



Title	マルチオミクス解析による好熱性水素酸化細菌からの可逆的TCA 回路の発見
Author(s)	布浦, 拓郎; Nunoura, Takuro; 力石, 嘉人 他
Citation	低温科学, 79, 31-36
Issue Date	2021-03-20
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.79.31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81349
Type	departmental bulletin paper
File Information	07_p031-036_LT79.pdf



マルチオミクス解析による好熱性水素酸化細菌からの可逆的 TCA 回路の発見

布浦 拓郎¹⁾, 力石 嘉人²⁾, 跡見 晴幸³⁾

2020年12月9日受付, 2021年1月22日受理

生物による炭素固定は地球上の生命そして生態系の維持において必須の機能であり, 還元的 TCA 回路 (reductive tricarboxylic acid cycle) は, ウッドリュンガル (Wood-Ljungdahl) 経路 (アセチル CoA 経路) と並び, 最も始原的な炭酸固定経路ではないかと考えられてきた. 我々は始原的系統群に属す好熱性水素酸化細菌 *Thermosulfidibacter takaii* に対するマルチオミクス解析を実施し, 二酸化炭素や有機酸等, 入手可能な炭素源により機能方向が変化する可逆的 TCA 回路を発見した. 更に, この TCA 回路の性質を基に, 初期生命が還元的 TCA 回路でなく, 可逆的 TCA 回路を保持した可能性を提唱した.

A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile revealed by multi-omics

Takuro Nunoura, Yoshito Chikaraishi, Haruyuki Atomi

Inorganic carbon fixation is essential to sustain life and ecosystem on Earth. The reductive tricarboxylic acid (rTCA) cycle, also known as the citric acid cycle, and the Wood-Ljungdahl pathway, also known as the acetyl-CoA pathway, are the most ancient carbon fixation metabolisms. A combination of multi-omics analyses revealed a previously unknown reversible TCA cycle whose direction was regulated by available carbon sources such as inorganic carbon and organic acids. Moreover, we hypothesized that primordial life harbored the reversible TCA cycle but not rTCA cycle.

キーワード: 好熱菌, TCA 回路, 代謝解析, 安定同位体
Thermophile, TCA cycle, Metabolomics, Stable isotope

連絡先

布浦 拓郎

海洋研究開発機構 生命理工学センター

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15

Tel. 046-867-9707

e-mail: takuron@jamstec.go.jp

1) 国立研究開発法人海洋研究開発機構

Japan Agency for Marine-Earth Science & Technology (JAMSTEC), Yokosuka, Japan

2) 北海道大学 低温科学研究所

Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

3) 京都大学大学院工学研究科

Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan

1. はじめに

教科書にはミトコンドリアにおけるエネルギー生産の主要経路として, クエン酸回路, つまり酸化的 TCA 回路 (oxidative tricarboxylic acid cycle) が記述されている. 勿論, 酸化的 TCA 回路はミトコンドリアだけでなく, 好気性細菌にも広く分布する. その一方で, 微生物における TCA 回路を見渡せば, 回転方向の異なるもの, 部分的に欠失した経路やバイパス経路も知られており, 更に, 回路を担う個々の化学反応を担う酵素にも多様性が存在する. このように TCA 回路は全生物に共通する基本的な代謝系であるため, 回路を構成する化合物のネットワークとしての保存性は非常に高いが, 生命現象としては柔軟であり, 教科書に書かれている「好気性生物に

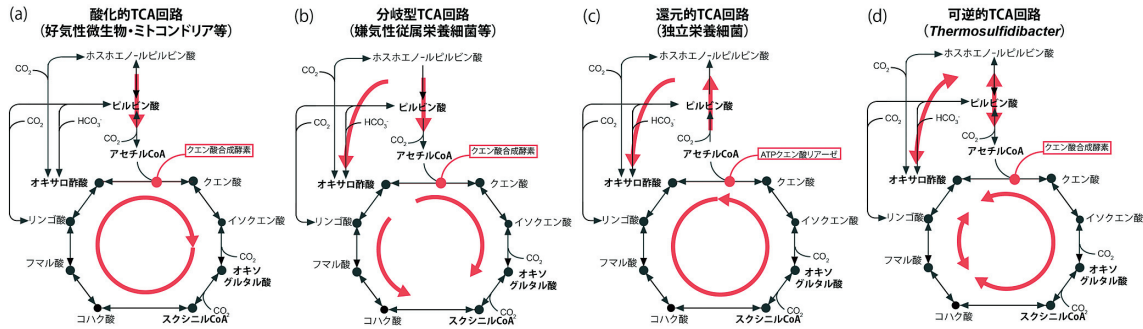


図1：完全型 TCA 回路の多様性

におけるエネルギー獲得経路」とは、その1つの型、そして1つの役割に過ぎない。多様な TCA 回路が有する機能の本質は、「アミノ酸や核酸等の前駆体となる中間代謝物の生産」である (Smith and Morowitz 2004; Wächtershäuser 1990)。そして、その起源は生命の誕生以前の「化学進化の時代」にまで遡る可能性が指摘されており、TCA 回路の非生物学的な再現は、現在、化学進化の再現・実証研究における最も競争的な研究対象の一つとなっている。

2. TCA 回路の多様性

完全型の TCA 回路として、酸化型 TCA 回路、酸化型回路とは真逆に回転することで炭酸固定に機能する還元型 TCA 回路の他、分岐型経路が知られている (図1)。酸化型 TCA 回路は好気性生物だけでなく嫌気性微生物にも広く分布し、還元型 TCA 回路も後述の通り嫌気性微生物だけでなく好気性微生物にも分布する。そして完全型の分岐型 TCA 回路は嫌気性従属栄養微生物から見出されている。一方、回路を担う酵素群の分布から TCA 回路の多様性を見ると、教科書にクエン酸回路として記述される主に好気条件下で機能する酵素群がむしろ例外的であり、嫌気性微生物に分布する酸化型 TCA 回路を担う酵素群は、還元型 TCA 回路や分岐型 TCA 回路を担う酵素群と共通性が高い。還元型 TCA 回路と他の TCA 回路を分けるのは、還元型 TCA 回路におけるクエン酸開裂反応を担う ATP クエン酸リアーゼ (ATP citrate lyase) (クエン酸 + CoA + ATP → アセチル CoA + オキサロ酢酸 + ADP) やその機能を2段階で担うシトルリル CoA 合成酵素 (citryl-CoA synthetase) (クエン酸 + CoA + ATP → シトルリル CoA + ADP) 及びシトルリル CoA リアーゼ (citryl-CoA lyase) (シトルリル CoA → アセチル CoA + オキサロ酢酸) の存在のみである (Aoshima et al. 2004ab)。

また、熱力学的に TCA 回路の多様性を比較すると、最も安定な完全型 TCA 回路は分岐型経路である。酸化型、還元型回路のいずれも、他の酵素反応との共役等を必要とする非自発的な反応 (吸エルゴン反応) を含む。特に、酸化型回路におけるリンゴ酸脱水素酵素 (malate dehydrogenase) が触媒する反応は、極めて非自発的な吸エルゴン反応である ($\Delta G^0 + 30 \text{ kJ}$)。なお、還元型回路においては、ピルビン酸：フェレドキシンオキシドレダクターゼ (ピルビン酸合成酵素) (pyruvate ferredoxin oxidoreductase) 及び 2-オキソグルタル酸：フェレドキシンオキシドレダクターゼ (2-オキソグルタル酸合成酵素) oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase (いずれも $G^0 + 19 \text{ kJ}$) が吸エルゴン反応で機能する (Fuchs 2011) (図1)。

更に近年、生命進化、生態学的観点から、還元型 TCA 回路に注目が集まっている。生命進化において、還元型 TCA 回路はメタン菌等の炭酸固定経路として知られるウッドリエンガル (Wood-Ljungdahl) 経路 (アセチル CoA 経路) と並び、最も始原的な炭酸固定経路であると考えられている (Smith and Morowitz 2004; Braakman and Smith 2012)。そして、現在の地球環境においても、還元型 TCA 回路は水圏・陸圏に広範に生息する亜硝酸酸化菌等にも分布することが近年の研究で明らかにされ、酵素が豊富に存在するグローバルな生態系においても改めてその重要性が再評価された (Lücker et al. 2010; Pachiadaki et al. 2017)。従来、還元型 TCA 回路は限られた嫌気環境や貧酸素環境における主要炭酸固定経路の一つと考えられてきたが、もはや、特殊な炭酸固定経路という認識は誤りとなった。

3. *Thermosulfidibacter* における可逆的 TCA 回路

上述のように、TCA 回路は古典的でありながら、な

おかつ新しい研究対象であり続けている。筆者らは好熱性水素酸化菌の生理生態を研究する中で、始原的細菌系 Aquificae 門に属す嫌気性好熱菌 *Thermosulfidibacter takaii* より、新たな形の TCA 回路を見出し報告した (Nunoura et al. 2018)。*T. takaii* は高温環境 (至適増殖温度 70°C) において、水素を酸化して硫黄を還元することでエネルギーを獲得し、炭酸固定に依存する独立栄養条件の他、水素をエネルギー源、酢酸やコハク酸等の有機酸等を炭素源とする混合栄養条件でも増殖することが出来る (注: 混合栄養増殖には複数の意味が存在するが、本報における“混合栄養生物”は、無機化合物を電子供与体、有機化合物を少なくとも一部の炭素源として利用し、増殖する生物を意味する)。研究開始当初、筆者らは他の Aquificae 門細菌と同様、*T. takaii* は独立栄養条件では還元的 TCA 回路により炭素固定を行うと予想した。しかし、本菌のゲノムには、TCA 回路に関する完全な遺伝子が揃う一方、還元的 TCA 回路に不可欠なクエン酸開裂反応を担う ATP クエン酸リアーゼやその機能を 2 段階で担うシトリル CoA 合成酵素及びシトリル CoA リアーゼをコードする遺伝子が存在せず、また、既知の他の炭素固定経路 (ウッドリエンガル経路やカルビンベンソン回路等) を担う遺伝子セットも見出されなかった。そこで、筆者等は「ATP クエン酸リアーゼを代替する何らかの仕組みで還元的 TCA 回路が機能する」と仮説し、独立栄養条件及び混合栄養条件で培養した細胞を用い、細胞粗抽出液の酵素活性測定、トランスクリプトーム及びプロテオーム解析を実施した。その結果、TCA 回路が試験した全ての培養条件で恒常的に発現し機能していること、そして、非常に高いクエン酸合成酵素 (citrate synthase) 活性 (アセチル CoA + オキサロ酢酸 → クエン酸 + CoA) が常に存在することが明らかとなった。また、独立栄養細胞においても、ATP クエン酸リアーゼ活性が認められない一方、独立栄養、混合栄養いずれの細胞においても、クエン酸合成酵素の逆反応によるクエン酸開裂反応は検出された。そして、このクエン酸合成酵素の逆反応活性は還元的 TCA 回路を有す Aquificae 門細菌の ATP クエン酸リアーゼ活性とほぼ同等であった。つまり、吸エルゴン反応 ($\Delta G^0 = +37.6 \text{ kJ}$) であり (Guynn et al. 1973) 生体内では生じ得ないとされてきたクエン酸合成酵素の逆反応により、*T. takaii* 細胞内では還元的 TCA 回路が機能していることが強く示唆されたのである。

ところが、ここで問題が生じた。一連の解析結果は、*T. takaii* が独立栄養増殖において、クエン酸合成酵素の逆反応により、還元的 TCA 回路を機能させている可能

性は示している。しかし、TCA 回路の機能方向を直接証明するものではないからである。*T. takaii* において TCA 回路を構成する酵素反応は、全て可逆的であり、また、同様に TCA 回路が機能するであろう混合栄養条件でも回路が還元方向に機能するのかが等、疑問は尽きない。従来、このような場合、安定同位体標識した基質を投与し、鍵となる中間代謝産物の標識を評価する解析が NMR や LC-MS 等を用いて行われてきた。しかし、力石ら (本誌 3 章) がまとめるように、NMR は多量の試料を必要とし、*T. takaii* のように細胞収量が低い菌株への適用は極めて困難である。また、LC-MS を用いて細胞内の遊離有機酸を測定する手法も大腸菌等よく増殖する微生物を対象に利用されているが、この手法も細胞収量の低い菌株への適用は現実的ではなかった。そこで現れたのが、筆者 (力石) らが有機地球化学の新しい研究手段として検討してきた、GC-MS と解析ソフトウェア MassWorks を組み合わせた新たな手法である。一見異なる研究分野の融合により、低い細胞収量が故に代謝解析が困難であった環境微生物を対象とし得る新しいオミクス研究の手段が誕生したのである。

新手法では、力石ら及び澄田らに詳述されている通り (本誌 3 章及び 6 章)、既存の手法と同様、培養基質に含まれる特定の炭素原子を「炭素 13」で標識し、*T. takaii* がピルビン酸、オキサロ酢酸、2-オキソグルタル酸を前駆体として生産したアミノ酸、即ち、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸の「どの炭素原子」に「炭素 13」が取り込まれているのかを、以下のように定量し、代謝経路の流れを判断する。

- (1) 安定同位体標識した基質を用いた培養
- (2) 全菌体蛋白質の加水分解とアミノ酸の誘導体化
- (3) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) による分析
- (4) ソフトウェア (MassWorks) による炭素 13 の標識率を算出
- (5) TCA 回路の反応方向の確定

この結果、*T. takaii* において、以下のように、TCA 回路は増殖条件により、極めて柔軟な振り舞いをする事が明らかになった (図 2)。

- (1) 独立栄養条件においては還元的 TCA 回路と同様に機能する。
- (2) コハク酸あるいは酢酸を添加した混合栄養条件では、それぞれの基質で、酸化方向、還元方向に機能する部位が異なる分岐型の経路が機能する (注: いずれ分岐パターンも、従来知られている分岐型 TCA 回路とは異なる)。その結果、炭酸固定と脱炭

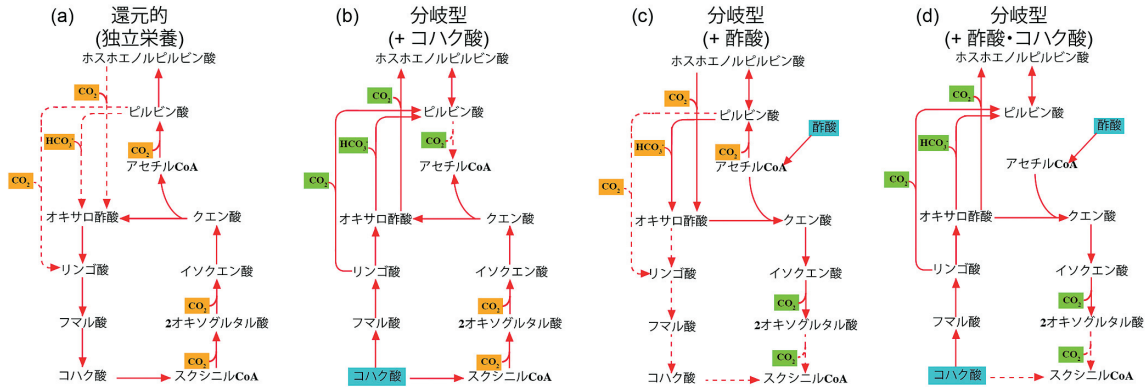


図2: 代謝解析によって示された各種培養条件下での *T. takaii* TCA 回路の振る舞い. 点線は, 本研究における代謝解析からの解釈では明示されなかった経路.

酸が生じる経路がそれぞれの分岐型経路で入れ替わる.

- (3) コハク酸と酢酸の双方を添加した混合栄養条件下では, アナプロレティック経路 (典型的 TCA 回路においては, ピルビン酸あるいはホスホエノルピルビン酸をカルボキシル化してオキサロ酢酸を生成する還元方向の反応経路) を含め, 酸化的に TCA 回路が機能する. つまり, TCA 回路での炭酸固定能が消失する.

さらに, *T. takaii* のクエン酸合成酵素がクエン酸開裂反応に適した酵素学的性状を有すか否か検証するため, 大腸菌で発現した酵素を用いて検討した. その結果, *T. takaii* のクエン酸合成酵素は, 単独でも, あるいはクエン酸開裂反応で生じたオキサロ酢酸を消費するリンゴ酸脱水素酵素の存在下でも, 還元的反応を触媒することを確認した. また, クエン酸開裂反応においては, クエン酸に対する K_m 値 (速度 $v=1/2 V_{max}$ (最大速度) とするときの基質濃度, K_m 値が低い程基質との親和性が高いことを意味する) が既報の ATP クエン酸リアーゼと比較すると明らかに低いこと, 更に, k_{cat}/K_m 値 (分子活性 k_{cat} が K_m に対して高いほど触媒効率が高いことを示す) もクエン酸に対し, 比較的高いことが明らかになった. これらはこの酵素が, *T. takaii* の TCA 回路を還元的な方向に回転させるために十分に高い触媒効率を有すこと, 更に言えば TCA 回路が柔軟に回転方向を変化させることに適した性状を有すことを示す.

4. 生命誕生と可逆的 TCA 回路

T. takaii より見出された可逆的 TCA 回路は, TCA 回路が本質的に持つ柔軟性を明らかにした. 一方,

TCA 回路は, アミノ酸や核酸合成の起点となる中間代謝産物の生成に不可欠であり, 少なくともその原型のような経路が化学進化の時代より存在したであろうと考えられている. この二つの視点は, 従来, 従属栄養が独立栄養の何れかで誕生したと議論されてきた生命誕生論争に新たな視点を与える. 即ち, 独立栄養と混合栄養を使い分ける通性混合栄養として生命が誕生した可能性である. 生命の起源論争において, 従属栄養で誕生した生命は, 自らによる有機物消費により絶滅してしまう可能性が指摘され, 一方で, 生命誕生には有機物の濃集した環境が必要であるにも関わらず, そのような条件下で独立栄養生物が生じる不可思議さも指摘されてきた (Lazcano 2010). この永遠に続くかに思える議論に対し, 通性混合栄養として生命が誕生したと仮説すると, 所与の環境条件において, 無機物からエネルギーを獲得する一方, 炭素源については, 有機物同化 (脱炭酸) と炭酸同化を柔軟に使い分ける, 即ち混合栄養と独立栄養を使い分ける通性混合栄養の形で生命が誕生し, 継続したと説明することが可能となる. この通性混合栄養生物としての生命誕生仮説は, 両説の利点を統合し, それぞれへの批判を克服し得るものであると考える.

5. その後

T. takaii の可逆的 TCA 回路は, Deltaproteobacteria に属す *Desulfurella acetivorans* から見出された同様の可逆的 TCA 回路と並べて発表された (Mall et al. 2018). *D. acetivorans* は *T. takaii* と同様に, 水素を電子供与体として硫黄を還元する独立栄養条件下で増殖する他, 酢酸を電子供与体及び炭素源として用い増殖する. この両増殖条件下にて, それぞれ還元的 TCA 回路と酸化的 TCA 回路を使い分けることが示されたのである. ま

た、*D. acetivorans* のゲノム情報からは、ATP クエン酸リアーゼ遺伝子が偽遺伝子化し、クエン酸合成酵素がその機能を代替したことが示されている。その後、ゲノム解析により、水素を電子供与体とする化学合成独立栄養細菌 *Deferribacter autotrophicus* が同様にクエン酸合成酵素を用いた炭素固定を行う可能性が示唆された (Slobodkin et al. 2019) 他、鉄還元菌 *Geobacter sulfurreducens* に人為的なゲノム変異を誘起することで、新たにクエン酸合成酵素の逆反応を用いる炭素固定能を獲得したことが報告されている (Zhang et al. 2020)。これらの報告は、クエン酸合成酵素を用いた可逆的 TCA 回路が自然環境に広く分布している可能性を示している。

一方、クエン酸合成酵素と ATP クエン酸リアーゼの関係について、重要な知見が ATP クエン酸リアーゼの構造解析によりもたらされた (Verschuieren et al. 2019)。筆者らは、クエン酸合成酵素と ATP クエン酸リアーゼ、シトリン CoA リアーゼの系統関係をクエン酸合成酵素ドメインの系統解析により議論し、クエン酸合成酵素より citryl-CoA リアーゼや ATP クエン酸リアーゼが生じた可能性を指摘していた (Nunoura et al. 2018)。これに対し、Verschuieren らは ATP クエン酸リアーゼの結晶構造解析を行うと共に、その構造に基づくアライメント解析を行い、シトリン CoA リアーゼのドメイン重複とその部分欠失により、クエン酸合成酵素が誕生したことを示したのである (図 3)。さらに、このクエン酸合成酵素の起源を根拠に、還元型 TCA 回路が酸化型 TCA 回路より先に誕生したと考察した。これに加え、ATP クエン酸リアーゼのドメイン構造の進化及びその熱力学的性質を考慮することで、TCA 回路の起源については新たな側面が見えてくる。

(1) ATP クエン酸リアーゼのドメイン構造

Verschuieren らは、シトリン CoA 合成酵素+シトリン CoA リアーゼが機能する還元型 TCA 回路を最も始原的な TCA 回路として定義した。一方、ATP クエン酸リアーゼとシトリン CoA 合成酵素が共有する 2 つのドメイン構造は、スクシニル CoA 合成酵素と起源を共にし (Aoshima et al. 2004a)、ATP クエン酸リアーゼ、シトリン CoA リアーゼ、シトリン CoA 合成酵素、スクシニル CoA 合成酵素、クエン酸合成酵素のドメイン構造を比較すると図 3 のようになる。つまり、シトリン CoA 合成酵素+シトリン CoA リアーゼが機能する還元型 TCA 回路が誕生する前に、より始原的な TCA 回路の存在が仮説できる。そして、そのもっとも始原的な回路においては、スクシニル CoA 合成酵素とシトリン CoA 合成酵素の機能を一つの酵素が担い、シトリン CoA リ

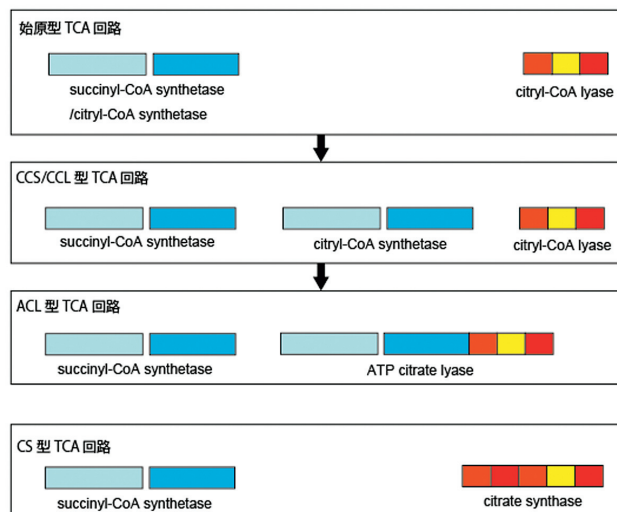


図 3：スクシニル CoA 合成酵素、シトリン CoA 合成酵素 (CCS)、シトリン CoA リアーゼ (CCL) と、クエン酸合成酵素 (CS) におけるドメイン構造の分布と、TCA 回路の進化モデル。始原型 TCA 回路からの還元型 TCA 回路 (CCS/CCL 型 TCA 回路及び ACL 型 TCA 回路) の進化過程と、クエン酸合成酵素 (CS) を含む TCA 回路を比較した。CS 型 TCA 回路の誕生段階や、始原型回路の機能方向を現時点において決定することは困難である。

アーゼと共に機能していたと推測されるのである。

(2) ATP クエン酸リアーゼの熱力学

ATP クエン酸リアーゼ (あるいはシトリン CoA 合成酵素+シトリン CoA リアーゼ) の熱力学的性質 ($\Delta G^0 + 4 \text{ kJ}$) (Fuchs 2011) を考慮すると、還元型 TCA 回路の回転方向を決定するのは、ATP クエン酸リアーゼではなく、回路全体の物質フラックスであり、また、フェレドキシンを補酵素とする酸化還元酵素の機能方向を担保する還元力供給のフローであることが分かる。実際、ATP クエン酸リアーゼが酸化方向に機能し、酸化型リン酸化による ATP 供給に貢献する報告もある (Möller et al. 1987)。更に、シトリン CoA リアーゼ自体もクエン酸合成酵素活性を有することが知られる (Aoshima et al. 2004b)。つまり、ATP 依存的なクエン酸開裂反応の熱力学を考慮すると、少なくとも、*T. takaii* や *D. acetivorans* において TCA 回路の可逆性が担保された条件が存在すれば、始原的な還元型 TCA 回路も可逆的に機能した可能性は十分にあり得る。

蛋白質立体構造解析に基づき、クエン酸合成酵素の進化過程が明らかにされたことにより、我々が提唱したクエン酸合成酵素を含む可逆的 TCA 回路が最も始原的な TCA 回路であるという仮説は否定された。一方、ATP クエン酸リアーゼ (ATP 依存のクエン酸開裂は反応) の熱力学的性質を考慮すると、シトリン CoA リアーゼを含む始原型“還元型” TCA 回路が、初期生命において還

元方向に回転し、炭酸固定のみに機能していたと結論するに十分ではない。筆者らは、生命の起源における TCA 回路の可逆性、そして、その生命が通性混合栄養であった可能性は十分にあり得ると考えている。

この他、一般的なクエン酸合成酵素の他、立体特異性が異なり、また進化的にも全く異なるクエン酸合成酵素 [(re)-citrate synthase] も一部の嫌気性細菌から見出されている (Gottschalk 1968) [一般的なクエン酸合成酵素は、(re)-citrate synthase に対し、(si)-citrate synthase と記述される]。生命誕生時の TCA 回路において、(re)-citrate synthase が機能していた可能性も現時点では排除することが出来ない。今後も多角的な研究の進展が期待される。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコックホ機能生態学」(課題番号: 19H05684)、日本学術振興会化学研究費補助金・基盤研究 (A)「TCA 回路の多様性とその起源の解明」(課題番号: 19H00988) で行われた。また、本稿の完成には亀谷将史氏、千葉洋子氏より、示唆に富む指摘をいただいた。感謝申し上げる。

参考文献

Aoshima, M., Ishiii, M. and Igarashi, Y. (2004a) A novel enzyme, citryl-CoA synthetase, catalysing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol. Microbiol.*, **52**, 751-761.

Aoshima, M., Ishiii, M. and Igarashi, Y. (2004b) A novel enzyme, citryl-CoA lyase, catalysing the second step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol. Microbiol.*, **52**, 763-770.

Braakman, R. and Smith, E. (2012) The Emergence and Early Evolution of Biological Carbon-Fixation. *PLOS Comput. Biol.*, **8**, e1002455.

Fuchs, G. (2011) Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 631-658.

Gottschalk, G. (1969) Partial purification and some properties of the (R)-citrate synthase from *Clostridium acidu-urici*. *Eur. J. Biochem.*, **7**, 301-306.

Guynn, R. W., Gelberg, H. J. and Veech, R. L. (1973) Equilibrium Constants of the Malate Dehydrogenase, Citrate synthase, citrate lyase, and acetyl coenzyme A hydrolysis reactions under physiological conditions. *J. Biol. Chem.*, **248**, 6957-6965.

Lazcano A. (2010) Historical development of origins research. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a002089.

Lücker, S. et al. Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Sinnighe Damsté, J. S., Spieck, E., Le Paslier, D. and Daims, H. (2010) A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 13479-13484.

Mall, A., Sobotta, J., Huber, C., Tschirner, C., Kowarschik, S., Bačnik, K., Mergelsberg, M., Boll, M., Hügler, M., Eisenreich, W. and Berg, I. A. (2018) Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science*, **359**, 563-567.

Möller, D., Schauder, R., Fuchs, G. and Thauer, R. K. (1987) Acetate oxidation to CO₂ via a citric acid cycle involving an ATP-citrate lyase: a mechanism for the synthesis of ATP via substrate level phosphorylation in *Desulfobacter postgatei* growing on acetate and sulfate. *Arch. Microbiol.*, **148**, 202-207.

Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T., Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yahagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi, N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H. and Takai, K. (2018) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science*, **359**, 559-563.

Pachiadaki, M. G., Sintès, E., Bergauer, K., Brown, J. M., Record, N. R., Swan, B. K., Mathyer, M. E., Hallam, S. J., Lopez-Garcia, P., V Takaki, Y., Nunoura, T., Woyke, T., Herndl, G. J. and Stepanauskas, R. (2017) Major role of nitrite-oxidizing bacteria in dark ocean carbon fixation. *Science*, **358**, 1046-1051.

Smith, E. and Morowitz, H. J. (2004) Universality in intermediary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 13168-13173.

Slobodkin, A., Slobodkina, Allieux, M., Alain, K., Jebbar, M., Shadrin, V., Kublanov, I., Toshchakov, S. and Bonch-Osmolovskaya, E. (2019) Genomic insights into the carbon and energy metabolism of a thermophilic deep-sea bacterium *Deferribacter autotrophicus* revealed new metabolic traits in the phylum *Deferribacteres*. *Genes*, **10**, 849.

Verschueren, K. H. G., Blanchet, C., Felix, J., Dansercoer, A., De Vos, D., Bloch, Y., Van Beeumen, J., Svergun, D., Gutsche, I., Savvides, S. N. and Verstraete, K. (2019) Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature*, **568**, 571-575.

Wächtershäuser, G. (1990) Evolution of the first metabolic cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 200-204.

Zhang, T., Shi, X.-C., Ding, R., Xu, K. and Tremblay, P.-L. (2020) The hidden chemolithoautotrophic metabolism of *Geobacter sulfurreducens* uncovered by adaptation to formate. *ISME J.*, **14**, 2078-2089.