

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	硫酸還元菌のエネルギー変換系蛋白質の研究
Title(English)	
著者(和文)	小澤潔
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第3512号, 授与年月日:2001年3月31日, 学位の種別:論文博士, 審査員:吉田 賢右
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第3512号, Conferred date:2001/3/31, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

硫酸還元菌のエネルギー変換系蛋白質の研究

2001年3月
東京工業大学

小澤 潔

目次	．．． 1
第 1 章 序論	．．． 6
1-1 硫酸還元菌	．．． 7
1-2 <i>Shewanella oneidensis</i>	．．． 9
1-3 硫酸還元菌の異化作用とエネルギー生産	．．． 9
1-4 本研究の目的	．．． 12
参考文献	．．． 21
第 2 章 ATP 合成酵素	．．． 23
要旨	．．． 24
2-1 緒言	．．． 25
(1) FoF ₁ -ATP 合成酵素 (あるいは ATPase) の世界	．．． 25
(2) 古細菌の ATPase	．．． 26
(3) 液胞膜の H ⁺ -ATPase	．．． 27
(4) 植物液胞と古細菌の ATPase	．．． 27
(5) H ⁺ -ATPase の進化	．．． 28
2-2 実験方法	．．． 29
(1) <i>D. vulgaris</i> Miyazaki F のゲノムライブラリーの構築	．．． 29
(2) クローニングと塩基配列決定	．．． 31
(3) <i>D. vulgaris</i> Miyazaki F からの F ₁ -ATPase の精製	．．． 32
(4) 他の方法	．．． 32
(5) 塩基配列の accession number	．．． 33
2-3 結果	．．． 33
(1) クローニングおよび ORFs 1 から 5 の遺伝子の塩基配列決定	．． 33
(2) <i>D. vulgaris</i> Miyazaki F 細胞膜からの ATPase 活性のある構成成分の精製	．．． 35
2-4 考察	．．． 36
参考文献	．．． 59

第 3 章 末端酸化酵素	・・・ 63
要旨	・・・ 64
3-1 緒言	・・・ 65
(1) 酸素呼吸生物における末端酸化酵素	・・・ 65
(2) ヘム・銅末端酸化酵素における金属中心の起源と機能進化	・・・ 66
(3) 硫酸還元菌に末端酸化酵素は存在するか？	・・・ 68
3-2 実験方法	・・・ 69
(1) 細胞膜小胞の調製	・・・ 69
(2) シトクロム分析	・・・ 70
(3) 膜結合性シトクロムの部分精製	・・・ 70
(4) 酵素測定	・・・ 71
(5) ノーザンブロッティング	・・・ 72
3-3 結果	・・・ 73
(1) 膜結合性シトクロム類のキャラクタリゼーション	・・・ 73
(2) 細胞膜の酵素活性	・・・ 74
(3) 膜結合性シトクロムの部分精製	・・・ 74
(4) ノーザンブロット分析	・・・ 76
3-4 考察	・・・ 76
参考文献	・・・ 91
第 4 章 電子伝達蛋白質 (1)-シトクロム c_3 -	・・・ 95
はじめに	・・・ 96
参考文献	・・・ 103
4-1 <i>S. oneidensis</i> を宿主とする <i>c</i> 型多ヘムシトクロムの大量発現系の確立	・・・ 104
要旨	・・・ 105
4-1-1 緒言	・・・ 106
4-1-2 材料および実験法	・・・ 107
(1) 細菌培養および試薬	・・・ 107
(2) 発現ベクターの構築	・・・ 108

(3) <i>S. oneidensis</i> の形質転換	・・・	109
(4) 形質転換した <i>S. oneidensis</i> の大量培養	・・・	111
(5) 組換え体シトクロム c_3 と高分子量シトクロム c (Hmc) の精製	・	111
(6) その他の方法	・・・	113
4-1-3 結果	・・・	113
(1) pRKM3F (広宿主域ベクター) による組換え体シトクロム c_3 の発現	・	113
(2) pUC 型ベクターによる <i>S. oneidensis</i> の形質転換	・・・	115
(3) pMC3 (pUC 型ベクター) による組換え体シトクロム c_3 の大量発現	・	117
(4) <i>S. oneidensis</i> における、16 ヘム高分子量シトクロム c の発現	・・・	118
4-1-4 考察	・・・	119
<u>参考文献</u>	・・・	135
4-2 シトクロム c_3 変異体を用いた電子伝達経路制御機構の解析	・・・	140
<u>要旨</u>	・・・	141
4-2-1 研究目的	・・・	142
4-2-2 変異体の作製と発現	・・・	143
(1) アミノ酸置換体の発現ベクターの作成	・・・	143
(2) 変異型シトクロム c_3 の発現	・・・	145
(3) 形質転換菌体の大量培養と発現シトクロム c_3 の精製	・・・	146
4-2-3 結果	・・・	146
(1) Y44L 変異体のマススペクトルの測定と N 末端アミノ酸配列分析	・・・	146
(2) 紫外可視吸収および一次元 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル	・・・	147
(3) 巨視的酸化還元電位	・・・	147
(4) Laser Flash Photolysis	・・・	148
4-2-4 考察	・・・	149
<u>参考文献</u>	・・・	171

第 5 章 電子伝達蛋白質 (2)-フラボドキシン-・・・ 172

要旨	・・・	173
5-1 緒言	・・・	174
5-2 実験方法	・・・	175
(1) クローニングと塩基配列決定	・・・	175
(2) フラボドキシンの大量発現	・・・	176
(3) 部位特異的変異	・・・	177
(4) 発現タンパク質の精製	・・・	177
(5) スペクトル分析および N-末端アミノ酸配列分析	・・・	178
(6) 酸化還元電位の決定と <i>in vitro</i> 活性	・・・	178
(7) 非修飾、および、リン脂質修飾されたグラファイト電極における酸化還元挙動	・・・	180
(8) 補欠分子族の同定	・・・	181
(9) イムノプロット分析	・・・	181
5-3 結果	・・・	182
(1) フラボドキシン遺伝子のクローニングと塩基配列決定	・・・	182
(2) 組換え型フラボドキシンの精製	・・・	182
(3) 補欠分子族の同定	・・・	182
(4) フラボドキシンとその変異型 (A16E) の電気化学的性質と FMN 結合特性	・・・	183
(5) 組換え型フラボドキシンのグラファイト電極との酸化還元挙動	・・・	184
(6) リン脂質修飾 BPG 電極における野生型フラボドキシンの電気化学	・・・	184
(7) イムノプロット分析	・・・	185
5-4 考察	・・・	185
参考文献	・・・	200

第 6 章 硫酸還元菌のエネルギー変換系のメカニズムについての総括	・・・	205
-----------------------------------	-----	-----

Appendix	・・・	210
----------	-----	-----

A-1	巨視的および微視的酸化還元電位の測定	・・・	211
	(I) シトクロム c_3 の酸化還元電位	・・・	211
	(1) 巨視的および微視的酸化還元電位決定の理論	・・・	211
	(II) 微分パルスポーラログラフ測定	・・・	212
	(1) 微分パルスポーラログラフイーについて	・・・	212
	(2) 装置	・・・	214
	(3) 試料調製と巨視的酸化還元電位の決定	・・・	214
A-2	シトクロム c_3 の $^1\text{H-NMR}$	・・・	215
A-3	Laser Flash Photolysis 法による電子移動速度定数の測定	・・・	216
	(1) Laser Flash Photolysis 法の原理	・・・	216
	(2) 反応溶液の調製法と phototitration の準備	・・・	216
	(3) Y44L シトクロム c_3 の電子移動速度定数の測定	・・・	217
A-4	Y44L シトクロム c_3 の結晶化と X-線結晶構造解析	・・・	218
A-5	[NiFe] ヒドロゲナーゼによる E42K シトクロム c_3 還元反応の測定	・・・	219
A-6	変異体研究の今後	・・・	219
	<u>参考文献</u>	・・・	234
	業績リスト	・・・	235
	研究後記	・・・	237
	謝辞	・・・	239

第 1 章

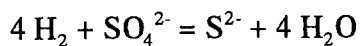
序論

1-1 硫酸還元菌¹⁾

現在、生命あふれるこの地球も、誕生してまもなくはまだ生命体は存在せず、大気の成分も現在とは大きく異なっていたであろうと考えられている。その原始大気中は、放電により現存する生命体の細胞中に含まれる主な低分子有機物を作り得ることがミラーの実験によって確認されている。これらの有機物は、数億年といった非常に長い時間をかけて徐々に海中などに蓄積され、さらにそれらが複雑に合成され、最初の生命体が生まれた。この生命体は、当初は、その周囲の分子を使っただけの生存・成長しかできなかった。その頃、大気中に酸素はほとんど存在しなかったため、最初のエネルギー代謝は解糖や発酵に類するものであった。その後、進化の過程で嫌氣的呼吸(硫酸・硝酸還元)や光合成が誕生した。光合成によって大気中に酸素が蓄積されるに伴い、エネルギー代謝は酸素呼吸へと進化していった。

硫酸還元菌は、この嫌氣的呼吸をおこなう代表的な生物であり、硫酸呼吸により、エネルギーを獲得している。この細菌は嫌気条件下で電子供与体として水素や有機物を利用し、硫酸塩を電子受容体としてエネルギーを獲得する偏性嫌気性細菌である。硫酸が還元される過程については *Desulfovibrio* で詳しく研究された。硫酸塩が還元されるためには、まず最初に ATP スルフィラーゼ (ATP-sulfurylase) によりアデノシンホスホ硫酸 (APS) に活性化され、次いで重亜硫酸、チオ硫酸を経て硫化水素まで還元される。この硫酸呼吸に基づくエネルギー変換系を酸素呼吸と対比させると Fig. 1-1 のような3つの代謝系からなることができる。すなわち、有機化合物が分解されていく異化の過程、ここで引き抜かれた電子 (あるいは水素) が流れていく電子伝達系、最後にその電子を硫酸イオンに渡して、硫化水素と水を生成する酸化の仕上げの過程である。多くの場合、有機化合物の分解による最終産物は酢酸であるが例外もある。有機化合物の分解と電子伝達は、酸素呼吸の場合と同じく、硫酸イオンの関与なしに行われる。生成する最終産物も、 H_2O とともに、その酸素を硫黄に置き換えただけの H_2S である。 H_2O と H_2S は化学的性質は全く異なるが、分子の構成としては非常に類似している。ところで、Fig. 1-1 が示すように、このエネル

ギ一産出系の構成が酸素呼吸系と大きく違うところは、分子状水素の関与である。硫酸還元菌は、有機物から引き抜いた水素を分子状水素に変えることもできるし、分子状水素を酸化してエネルギー源に使うこともできる²⁾。中でも、*D. vulgaris* (Marburg) は水素分子と硫酸イオンのみをエネルギー源としてもよく生育することが知られている²⁾。硫酸イオンによる水素の酸化反応は次のようなものである³⁾。



$$\Delta G^{\circ} = -172.0 \text{ kJ}, E^{\circ} = -188 \text{ mV}$$

ここで、 ΔG° は反応の自由エネルギー、 E° はその標準酸化還元電位を示す。これより、 -188 mV よりも還元的環境にあれば、この反応はエネルギー源として使えることがわかる。実際の酸化還元電位は反応物の濃度にも依存するし、反応が起こるためには他の因子も絡んでくるので、この条件はあくまでも一つの目安である。嫌氣的培養でよく行われるように、 N_2S で還元的環境にすると、その酸化還元電位は約 -250 mV であり、水素をエネルギー源として使う必要条件是満たされている。

1960年代半ばに、Campbell と Postgate はそれまで報告されていた硫酸還元菌の細菌学的特徴の整理を行ない、孢子形成硫酸還元菌を *Desulfotomaculum* 属とし、孢子非形成硫酸還元菌を *Desulfovibrio* 属とした¹⁾。現在、硫酸還元菌の種類は真正細菌で13属、古細菌で1属の計14属にのぼる。これらの属名、特徴を Table 1-1 に示した。真正細菌の中で *Desulfotomaculum* だけがグラム染色陽性の菌種で、*Desulfovibrio* や *Desulfomicrobium* 等他の菌種はグラム染色陰性の菌種である。この中で我々が注目している *Desulfovibrio* は、*Proteobacteria* の δ 属に属し、*vulgaris* Hildenborough、*vulgaris* Miyazaki、*gigas*、*desulfuricans* Norway、*africanus*、*themophilus*、*salexigens*、*baculatus*、*baarsii*、*sapovorans* に分類される。われわれは特に、*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株 (*DvMF*) に焦点を当てて研究を行っている。この *DvMF* は、1947年宮崎県の都城の老朽化水田より岩崎修一が採取し、石本真、八木達彦らにより精力的に研究されたものである。

1-2 *Shewanella oneidensis*

Shewanella oneidensis は 16S rRNA 分析に基づき *E. coli* と同じ *Proteobacteria* の γ 属に属している (Fig. 1-2)。通性嫌気性細菌で嫌気条件でも好気条件でも生育が可能である。海水、湖水、炭坑の廃棄物などに住み、実に様々な物質 (酸素、硝酸塩、硫黄、チオ硫酸塩、亜硫酸塩、フマル酸、トリエチルアミン N オキシド(TMAO)、金属イオン) を最終電子受容体として生育する能力があるという特徴を持つ⁴⁾。特に重金属を還元することから、バイオレメディエーションに役立つと考えられ、近年、米国を中心として世界的にさかんに研究されている。

興味深いことに、*S. oneidensis* はこれまで偏性嫌気性細菌である硫酸還元菌に特有のタンパク質と思われていたシトクロム c_3 を持つ⁵⁾。電子受容体として硫黄原子を利用できることを考えあわせると、この通性嫌気性細菌は多くの嫌気性細菌の特徴をもっているといえる。分子量は 12,120 で、今まで知られているシトクロム c_3 の中では際だって小さい。*S. oneidensis* のシトクロム c_3 と *DvMF* のシトクロム c_3 の物性値の比較^{5,11)}を Table 1-2 に示した。また、アミノ酸配列の比較を Fig. 1-3 に示した。

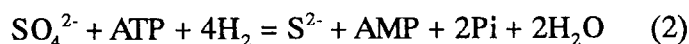
また、*S. oneidensis* はシトクロム c_3 以外にもバラエティーに富んだ c 型シトクロムをもつ。好気条件でも嫌気条件でも豊富な c 型シトクロムをもつ^{4,6)} (Table 1-3) が、嫌気条件の方が全細胞中の c 型シトクロム量は数倍多い。しかし、その多くは外膜に結合している点が興味深い^{7,8)}。グラム陰性菌では、シトクロム類や他の電子輸送を構成するタンパク質は細胞膜に存在すると考えられてきた。しかし、外膜にその多くが存在するかもしれないという事実はこの常識を覆すものである。一方で、シトクロム c_3 など可溶性の c 型シトクロムは、好気条件の方が全細胞中の c 型シトクロム量の割合が高い。すなわち、全細胞中の c 型シトクロム量は嫌気条件の方が多いが、可溶性の c 型シトクロムは好気条件の方が割合が多いのである。シトクロム類の構成及び生産量は酸素分圧に大きく影響され、また培地中の鉄濃度とも関連がある⁵⁾。

1-3 硫酸還元菌の異化作用とエネルギー生産 (Fig. 1-4)

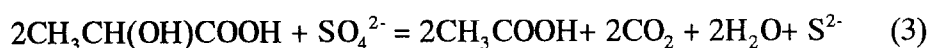
硫酸還元菌の進化的位置は解糖系あるいは発酵によって生じた有機物の利用と結びついている。周知のように、最も多い発酵生産物の一つは乳酸である³⁾。したがって、硫酸還元菌はエネルギー源として乳酸を最もよく利用する。乳酸は乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase) により脱水素されてピルビン酸に変わり、次ぎにピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase) によって脱水素と脱炭酸を受けて、アセチル補酵素 A へ変わる³⁾。アセチル補酵素 A は、アセチルリン酸を経て、酢酸となる。この間に 1 mol の ATP が合成される。多くの硫酸還元菌ではこの酢酸が最終生成物となる。したがって、還元力を H₂ として表せば、異化反応は次のようにまとめることができる³⁾。



一方、硫酸イオンの還元において、1 mol の硫酸を亜硫酸に還元するためには 1 mol の ATP が必要で、中間体として、アデノシン-5'-ホスホ硫酸 (adenosine-5'-phosphosulfate, APS と略す) ができる。これを触媒するのは ATP スルフリラーゼ (ATP sulfurylase) である。この反応は $\Delta G^0 = 11 \text{ kcal}$ という極端な吸エルゴン反応である³⁾。しかし、生じたピロリン酸がピロフォスファターゼによって直ちに分解されることにより、これを含めた反応の標準自由エネルギー変化は 4 kcal にまで下がる。したがって、ピロリン酸の分解は、APS 生成の重要な推進力となっている。次ぎに、APS が、APS 還元酵素 (APS reductase) により還元されて、亜硫酸イオンとなる。この際、1 mol の水素 (2 電子) が消費される。亜硫酸イオンはさらに 3 mol の水素 (6 電子) により還元されて硫化水素になる³⁾。したがって、硫酸イオンによる酸化反応は、



となる³⁾。反応式 (1) と (2) を比較して考えるのには、(1) 式を 2 倍するとよい。すなわち、2 mol の乳酸が分解すると 2 mol の高エネルギー結合 ((ADP + Pi = ATP) x 2) と 4 mol の水素 (8 電子) が生成する。一方、1 mol の硫酸イオンの還元には 2 mol の高エネルギー結合 (ATP = AMP + 2Pi) と 4 mol の水素 (8 電子) が必要な訳で、ATP を高エネルギー結合の数で置き換えれば両者は完全に一致する。すなわち、



となる。しかしこのことは、基質レベルでの ATP 合成からは自分が生きて行くために必要なエネルギーを供給できないことを意味する。現実には乳酸と硫酸イオンをエネルギー源にして、菌は増殖していくのであるから、他のエネルギー生産システムがなければならない。その最も有力な候補と考えられているのは、酸素呼吸と同様に電子伝達に伴うエネルギー変換系である。

ここにおけるエネルギー変換の機構として、Odom と Peck は「化学浸透水素サイクル」という考えを提案している⁹⁾。Fig. 1-5 にその概念図を示す。すでに述べたように、硫酸還元菌の細胞質内で、2 mol の乳酸が分解されると 4 mol の水素分子が発生する。これは無極性であるので、細胞質膜を通り抜けることができる。外側のペリプラズムにはヒドロゲナーゼ (hydrogenase)¹⁰⁾ とシトクロム c_3 (cytochrome c_3)¹¹⁾ が存在し、水素を酸化してプロトンに変える。ここで得られた電子が再び細胞質に運ばれて、硫酸イオンの還元に使われる。結果として、細胞質では 8 mol のプロトンが消費され、ペリプラズムでは 8 mol のプロトンが増える。こうして、乳酸の分解が進むとともに、細胞質膜の内外にプロトン濃度勾配ができていく。このようにして作られた電気化学ポテンシャルを、 H^+ -ATP 合成酵素¹²⁾ が ATP へ変換するというものである。これは大変魅力的なモデルであるが、実験的な検証はまだ十分ではない。細胞質ヒドロゲナーゼとシトクロム c_3 については疑問がある。このエネルギー変換モデルを支持する実験としては次のようなものがある。*D. gigas* でペリプラズムのヒドロゲナーゼとシトクロム c_3 を完全に失ったスフェロプラストをつくと、乳酸は酸化されなくなる。ところが、これにヒドロゲナーゼとシトクロム c_3 を加えると再び乳酸を酸化するようになる。したがって、ペリプラズムに存在するこの 2 つの蛋白質は、乳酸の酸化と硫酸イオンの還元を結ぶ鎖の不可欠な一部を形成しているものと考えられる。化学浸透サイクル説と直接結びつく訳ではないが、水素消費にともなうプロトン濃度勾配の形成も観察されている¹³⁾。*D. vulgaris* (Miyazaki K) の懸濁液に水素を通気しながら亜硫酸イオンを加えると、媒質中の pH が下がる。脱共役剤の存在下ではこのような pH 変化が起こらない。また、水素の代

わりに窒素を用いても、pH 変化は見られなかった。

1-4 本研究の目的

本論文においては、細菌の細胞膜に共通に存在し、電子伝達系と共役してエネルギー生産をしているであろうと考えられている H^+ -ATP 合成酵素¹⁰⁾ およびその電子伝達系を構成していると思われる末端酸化酵素をとりあげ、これまで硫酸還元菌においては全く明らかにされていなかったエネルギー変換の根幹の部分明らかにしようと考えた。また、ペリプラズムに存在し、ヒドロゲナーゼから電子を受け取り細胞質内に流す働きをされると考えられているシトクロム c_3 および、細胞質に存在し、ピルビン酸脱水素酵素から電子を受け取ると考えられているフラボドキシンについても、硫酸呼吸を構成する電子伝達蛋白質として取り上げ、それらの電子移動機構を詳細に検討するために、まず、遺伝子クローニングを行い、大量発現系の構築に取り組んだ。そして、電子移動に重要であると考えられるアミノ酸残基を別の残基に置き換えることで、その性質の変化を調べ、考察をおこなった。

したがって、本論文の構成は、第1章 序論、第2章 硫酸還元菌のATP 合成酵素、第3章 硫酸還元菌の末端酸化酵素、第4章 硫酸還元菌のシトクロム c_3 、第5章 硫酸還元菌のフラボドキシン、そして、第6章で、硫酸還元菌のエネルギー変換システムについての総括。という形とした。すなわち、 H^+ -ATP 合成酵素と末端酸化酵素の存在と機能について細胞膜を調べ、次に、電子伝達タンパク質であるシトクロム c_3 とフラボドキシンの大量発現系を構築することで、それらの電子移動機構を理解し、硫酸還元菌特有のエネルギー変換系の制御について考察していった。

本論文において、硫酸還元菌のエネルギー変換系がどのように構成され、制御されているのかということの最も重要な部分を明らかにすることができた。また、このことにより、硫酸還元菌の基本的な生命のしくみを体系化し、生物進化における位置づけをより鮮明にすることができたと考えている。

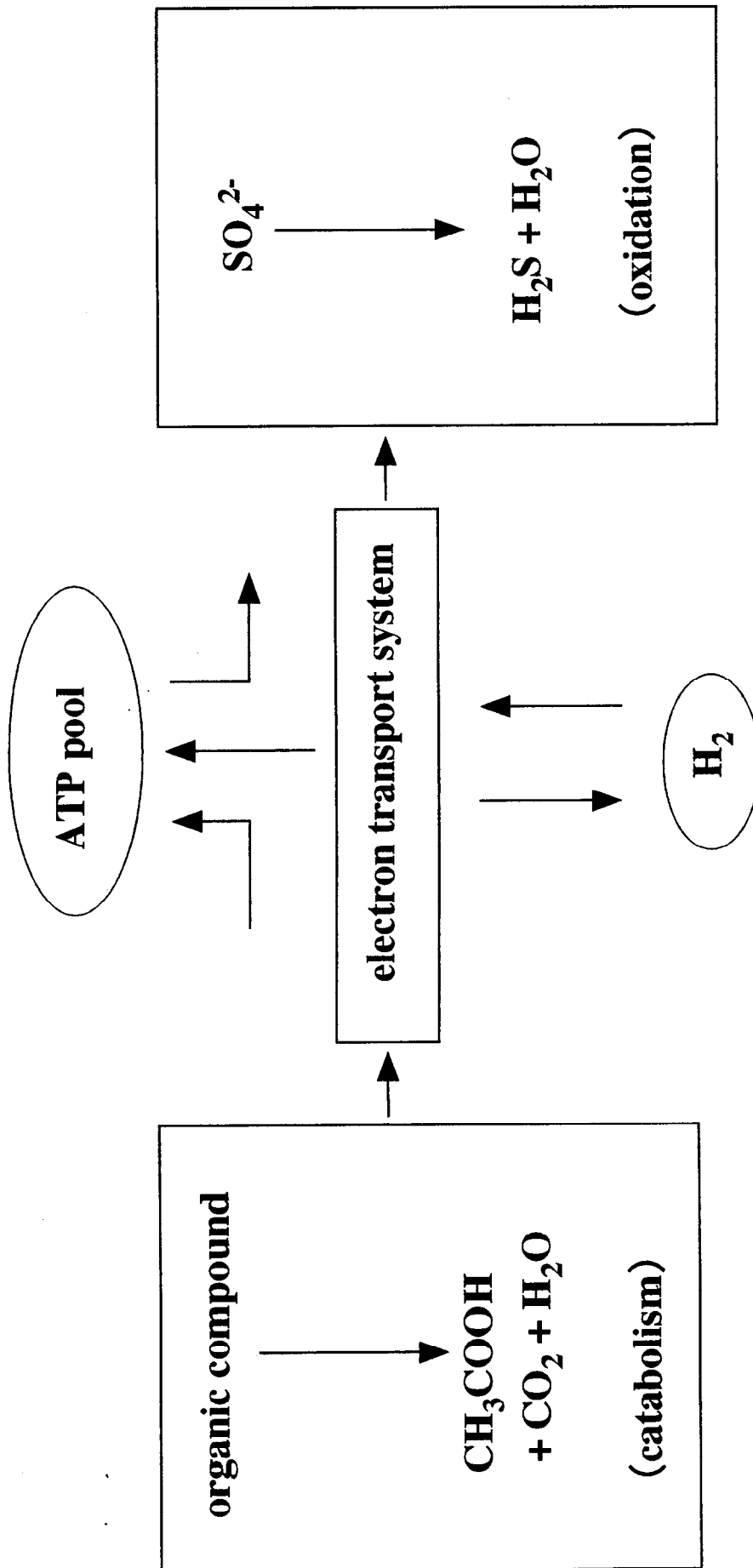


Fig. 1-1 The energy metabolism in a sulfate reducing bacterium

Table 1-1 The classification and characteristics of the sulfate-reducing bacteria¹⁾

Genus	Morphology	cell wall/membrane ^a	Organic compound oxidation ^b	Desulfoviridin	Spore formation	Cytochrome
<i>Desulfovibrio</i>						
<i>desulfuricans</i>	Vibrio	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	+	No	c ₃
<i>vulgaris</i>	Vibrio	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	+	No	c ₃
<i>gigas</i>	Spirilloid	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	+	No	c ₃
<i>africanus</i>	Sigmoid	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	+	No	c ₃
<i>saalexigens</i>	Fat vibrio	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	+	No	c ₃
<i>thermophilus</i>	Rod	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	+	No	c ₃
<i>baculatus</i>	Rod	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	-	No	b, c
<i>baarsii</i>	Vibrio	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	-	No	NR
<i>sapovorans</i>	Vibrio	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	-	No	b, c
<i>Desulfotomaculum</i>	Rod	Gram ⁺ , Euba	Both	-	Yes	b, c
<i>Desulfomicrobium</i>	Oval/rod	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	-	No	
<i>Desulfobulbus</i>	Oval	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	-	No	b, c
<i>Desulfobacter</i>	Oval/Vibrio	Gram ⁻ , Euba	Complete	-	No	b, c
<i>Desulfobacterium</i>	Oval	Gram ⁻ , Euba	Complete	-	No	b, c
<i>Desulfococcus</i>	Sphere	Gram ⁻ , Euba	Complete	+	No	b, c
<i>Desulfosarcina</i>	Oval(agggregates)	Gram ⁻ , Euba	Complete	-	No	b, c
<i>Desulfomonile</i>	Rod	Gram ⁻ , Euba	Complete	+	No	
<i>Desulfonema</i>	Multicellular filaments	Gram ⁻ , Euba	Complete	±	No	NR
<i>Desulfobotulus</i>	Vibrio	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	-	No	
<i>Desulfocarcullus</i>	Vibrio	Gram ⁻ , Euba	Complete	-	No	
<i>Termodesulfobacterium</i>	Rod	Gram ⁻ , Euba	Incomplete	-		
<i>Archaeoglobus</i>	Sphere	Archaeobacteria	Complete	-		

^aGram⁻/+, Euba = typical eubacterial Gram-negative or -positive cell wall and membrane

^bIncomplete = organic compounds oxidized to acetate; Complete = organic compounds oxidized to CO₂

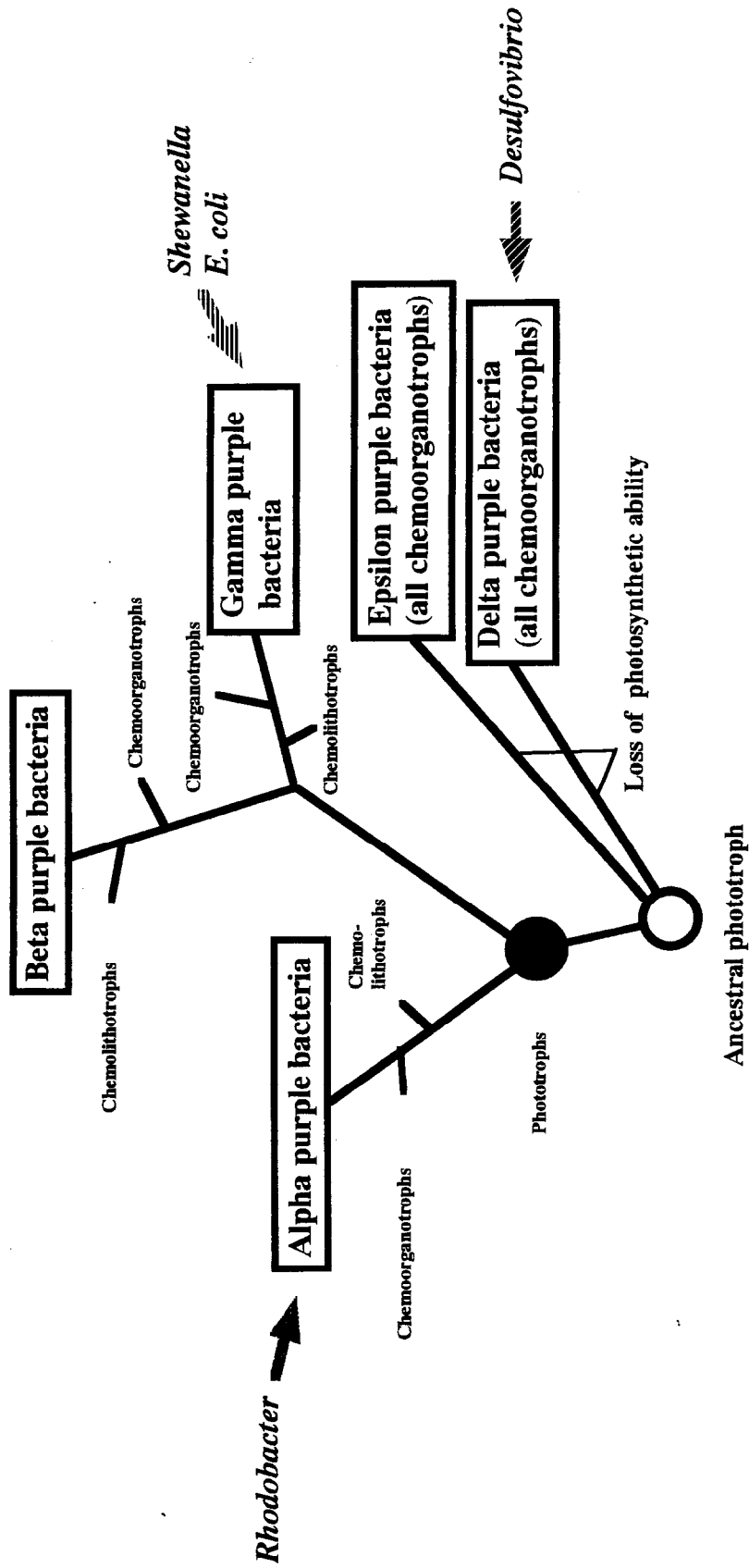


Fig. 1-2 Phylogenetic tree of Proteobacteria

Table 1-2 The comparison of cytochromes c_3
between *S. oneidensis* and *D. vulgaris* Miyazaki F

Cyt. c_3	<i>S. oneidensis</i>	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F
Heme	4	4
Amino acid residue	92	107
M.W	12120	13995
pI	5.8	10.6
Absorbance (Ferri)	529nm,410nm(γ)	530nm,410nm(γ)
Absorbance (Ferro)	552nm(α),521nm(β), 419nm(γ)	552nm(α),524nm(β), 419nm(γ)
Redox potential	-233mV	-300mV

S -----ADQKLSDFHAESGGCESCHK
D APKAPADGLKMDKTKQPVVFNHSTHKA-VKCGDCHH
S DGTPSADGAFEFAQC--OSCHGKLSEMDA-----
D PVNGKEDYQ----KCATAGCHDNMDK--KDKSAKGY
S VHKPHDGNL---VCADCHAVHDMNVGQ----KPT
D YHAMHDKGTKFKSCVGCHLETAGADAACKKELTG
S C--ESCHDDGRTSASVLKK
D CKGSKCHS

<p> S: <i>Shewanella cyt. c₃</i> D: <i>DvMF cyt. c₃</i> </p>

Fig. 1-3 Amino acid sequences of cyt. *c₃* from
D. vulgaris Miyazaki F and *S. oneidensis*

Table 1-3 Information on the cytochromes in *Shewanella oneidensis*

CYT TYPE	PURIFIED	AA SEQUENCE	CLONED	GENE SEQUENCE	MOL WT (kD)	REDOX POTENTIAL (mEV)	MULTI-HEME
C			+	+	?	?	12
C ₃	+	+	+	+	12	-233	4
C ₄	+	N-TERM			20	343	2
C			+	+	21		4
C ₅	+	N-TERM			9	315	1
CCP	+	N-TERM			46		2
C'	+	+	+	+	32		1
FLAVOCYT	+	+	+	+	62	-230	4
FERREDOX	+	+			7.6		
C-MEMBR.	+	N-TERM					

CCP; cytochrome *c* peroxidase, FLAVOCYT; flavocytochrome *c*, FERREDOX; ferredoxin, C-MEMBR; membrane-bound cytochrome *c*, N-TERM; N-terminal sequence

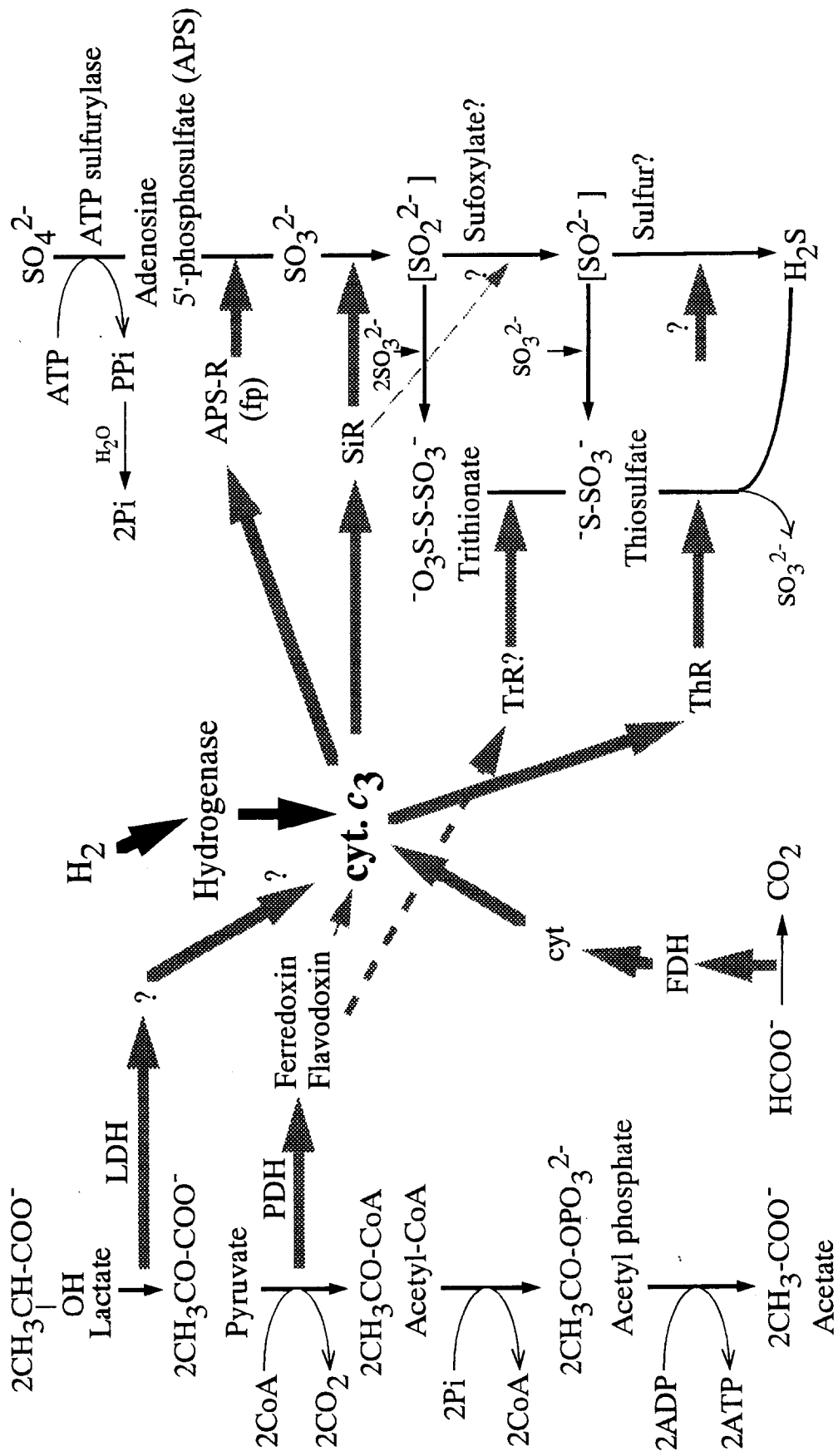


Fig. 1-4 The energy metabolism mediated by cytochrome *c*₃ in a sulfate reducing bacterium

参考文献

1. **Postgate, J. R.**, The Sulfate-reducing Bacteria, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge (1984)
2. **Badiziong, W., R. K. Thauer, and J. G. Zeikus**, Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source, *Arch. Microbiol.*, **116**: 41-49 (1978)
3. 上木勝司、永井史郎 編著 嫌気微生物学 (1993) 養賢堂
4. **Meyers, C. R., and K. H. Nealson**, Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor, *Science*, **240**: 1319-1321 (1988)
5. **Tsapin, A. I., K. H. Nealson, T. Meyers, M. A. Cusanovich, J. Van Beuumen, L. D. Crosby, B. A. Feinberg, and C. Zhang**, Purification and properties of a low-redox-potential tetraheme cytochrome c_3 from *Shewanella putrefaciens*, *J. Bacteriol.*, **178**: 6386-6388 (1996)
6. **Morris, C. J., A. C. Black, S. L. Pealing, F. D. C. Manson, S. K. Chapman, G. A. Reid, D. M. Gibson, and F. B. Ward**, Purification and properties of a novel cytochrome: flavocytochrome c from *Shewanella putrefaciens*, *Biochem. J.*, **302**: 587-593 (1994)
7. **Meyers, C. R., and J. M. Meyers**, Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1, *J. Bacteriol.*, **174**: 3429-3438 (1992)
8. **Meyers, C. R., and J. M. Meyers**, Outer membrane cytochrome of *Shewanella putrefaciens* MR-1: spectral analysis, and purification of the 83-kDa c -type cytochrome, *Biochim. Biophys. Acta*, **1326**: 307-318 (1997)
9. **Odom, J. M. and H. D. Peck, Jr.** 1981. Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **12**: 47-50.
10. **Yagi, T., K. Kimura, H. Daidoji, F. Sakai, and S. Tamura**, Properties of purified hydrogenase from the particulate fraction of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki, *J Biochem*, **79**: 661-671 (1976)
11. **Yagi, T., and K. Maruyama**, Purification and properties of cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki, *Biochim. Biophys. Acta.*, **243**: 214-224 (1971)

12. **Ozawa, K., Meikari, T., Motohashi, K., Yoshida, M., and H. Akutsu,** Evidence for the presence of an F-type ATP synthase involved in sulfate respiration in *Desulfovibrio vulgaris*, *J. Bacteriol.*, **182**: 2200-2206 (2000)
13. **Kobayashi, K., H. Hasegawa, M. Takagi, M. Ishimoto,** Proton Translocation Associated with Sulfate Reduction in a Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfovibrio vulgaris*, *FEBS lett.*, **142**: 235-237 (1982)

第 2 章

ATP 合成酵素

要 旨

偏性嫌気性細菌である硫酸還元菌宮崎株のエネルギー変換系中で酸化的リン酸化が働いているのかどうかを調べるために、プロトン ATP 合成酵素の存在を調べた。まず、既知の ATPase の保存配列を参考にしてプライマーを合成し、PCR 法により、硫酸還元菌の染色体 DNA から増幅した遺伝子断片を得た。この遺伝子断片の配列をもとに、新しいプライマーを合成した。このプライマーを用いて、硫酸還元菌のゲノムライブラリーより、F₁-ATPase 遺伝子のすべてのサブユニット遺伝子を含む断片をクローニングし、その塩基配列を決定した。決定した塩基配列中には合計 5 つの読み枠が存在し、それぞれについてその相同性を検討した結果、順に、F₁-ATPase の δ 、 α 、 γ 、 β 、 ε サブユニットであると同定できた。さらに、硫酸還元菌の細胞膜小胞をクロロホルム処理し、得られた水層より、ATPase 活性のある画分の部分精製を行い、SDS-PAGE 分析を行った。分離した 60.5, 51.5, 34.7 kDa の主要な 3 本のバンドをそれぞれ、PVDF 膜へ転写後、アミノ末端配列分析を行ったところ、一番大きなバンドから順に α 、 β 、 γ サブユニットに相当するポリペプチドであることが同定できた。すなわち、クローニングされた遺伝子から推定されたアミノ酸配列と、N-末端の 10 残基がそれぞれが一致したからである。ただし、 α サブユニット以外は、開始メチオニン残基が削られていた。以上の結果より、硫酸還元菌の細胞膜にはプロトン ATPase が存在しており、実際に機能していることが明らかになった。さらに、その存在量、および、水素消費に伴うプロトングラジエントの形成等の証拠から、好気性細菌と同様に、偏性嫌気性細菌である硫酸還元菌は、エネルギー生産のためにこの ATP 合成酵素を使って硫酸呼吸と共役して酸化的リン酸化を行っている結論した。

2-1 緒言

(1) FoF₁-ATP 合成酵素 (あるいは ATPase) の世界¹⁾

光や栄養物のエネルギーは、いったん膜をへだてて H⁺ の濃度差 (電気化学的ポテンシャル差) の形に変換され、次ぎにこれが ATP 合成に使われる。これが生体エネルギー論のセントラルドグマである。実際に、H⁺ が流れ込むときに放出されるエネルギーで ATP を合成しているのは、FoF₁ と呼ばれる H⁺-ATP 合成酵素である。上記のドグマの一般性に対応するかのよう、ミトコンドリア、葉緑体、細菌の FoF₁ は互いに驚くほどよく似ている。FoF₁-ATP 合成酵素 (FoF₁-ATPase と呼ばれる) は、分子量 50 数万の巨大な膜酵素 (構造モデルを Fig. 2-1 に示した。) であるが、簡単な処理により、ATP 加水分解活性 (この ATP 水解活性は、N₃⁻ で阻害される。) の触媒部位を持つ膜表在性の F₁ 部分と、H⁺ チャンネルを形成する膜内在性の Fo 部分に分離できる。

F₁ は分子量約 38 万で、5 種の異なるサブユニットからなり、共通の組成は、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ である。このうち、 α (53-55 K) と β (49-51 K) は、機能上もとくに大切で、生物種間でそのアミノ酸配列が保存されており、大腸菌とヒトの間で 60-70% の相同性がある。

Fo は、H⁺ のチャンネルであり、多くの場合、a, b, c の 3 種のサブユニットを含む。このうち、c サブユニットは、非常に疎水的なタンパク質であり、H⁺ の膜透過に中心的な役割を果たしていると考えられる。嫌気性菌も FoF₁-ATPase を持ち、ATP 合成の逆反応で H⁺ 輸送を行っていると考えられている。

本論文では、若干、主題とずれるので、多くを触れないが、この酵素の分子機構の解明には長年、多大の努力が払われており、近年、華々しい成果が続々と発表されている。Walker 等によるウシミトコンドリア由来の F₁ $\alpha_3\beta_3\gamma$ ドメインの X-線結晶構造²⁾、吉田等によるこの酵素の回転触媒機能の証明³⁾など、新しい事実が次々と明らかにされている。

*Propionigenium modestum*⁴⁾ と *Acetobacterium woodii*⁵⁾、両者とも偏性嫌気性細菌であるが、ATP を合成するというナトリウムイオン輸送性 ATP 合成酵素

を持っている。*P. modestum* におけるナトリウムイオン濃度勾配の形成は、ナトリウムイオン輸送性膜結合メチルマロニル-補酵素 A (CoA) デカルボキシラーゼによる脱炭酸反応と共役している⁴⁾。*Moorella thermoacetica* (以前の名前は、*Clostridium thermoaceticum*⁶⁾) も偏性嫌気性細菌であるが、プロトン輸送性 ATP 合成酵素を持っていると指摘された⁷⁾。これは、シトクロム b_{554} 、 b_{559} 、メナキノン、ルブレドキシン、そしてフラボプロテインのような電子キャリアーを含む嫌氣的な電子伝達によって生み出されたプロトン濃度勾配を使って ATP を合成すると考えられているが、電子伝達系の最終電子受容体は、未だ、明らかにされていない。

(2) 古細菌の ATPase¹⁾

古細菌 (archaebacteria) と呼ばれる特異な細菌の一群がある。諸種の生化学的な特徴は、この細菌群が“通常の”細菌 (真性細菌, eubacteria) とは進化的に非常に遠縁であることを示している。好塩菌、メタン菌、好熱好酸菌などがこれに含まれる。古細菌も H^+ の勾配を用いて ATP を合成することは確かめられている。それで当然、 $F_0 F_1$ の存在が予想された。しかし、1983 年、向畑らが好塩菌 (*Halobacterium halobium*) から F_1 と似た方法で得た水溶性 ATPase は、81 K と 63 K の 2 種のサブユニットから成っていた。1986 年、稲富は、メタン菌 (*Methanosarcina barkeri*) の膜から水溶性の分子量約 42 万の ATPase の精製を報告した。これも α (62 K) と β (49 K) の 2 種のサブユニットから成る酵素で、 N_3^- で阻害されない。1987 年、吉田らは、好熱好酸菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*) より ATPase (*Sul* ATPase) を精製した。すると、分子量 36 万、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の組成で F_1 によく似た六角の形の酵素がとれた。しかし、メタン菌と同じく N_3^- で阻害されず、 NO_3^- で阻害された。大きな K_m の値や、 α サブユニットの分子量 (69 K) など、ほかにも F_1 にはおかしな点があった。 F_1 との免疫交差反応も弱かった。そこで、遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が調べられた結果、*Sul* ATPase のサブユニットの構造遺伝子は、1 つのオペロン上にあり、その中の遺伝子の順序は大腸菌などの $F_0 F_1$ オペロンとは全く異なっていた。まず、*Sul*

ATPase の α , β サブユニットのアミノ酸配列を F_1 のそれと比べたところ、この4種類のポリペプチドは、どんな組み合わせで比べても、20-25% の相同性を示していた。このことからいくつかの重要なことが示唆される。まず、4種のポリペプチドは、1つの共通の祖先ポリペプチドから進化してきたことがわかる。しかし、*Sul*ATPase は、 F_1 ではないこともはっきりした。 F_1 であれば、種が違って、60-70% のアミノ酸が相同のはずである。また、別の実験から *Sul*ATPase の触媒部位は、 α にあると思われ、この点も F_1 (触媒部位は、 β) と異なる。

(3) 液胞膜の H^+ -ATPase¹⁾

真核生物の細胞中にはリソソームやゴルジ体、分泌小胞、液胞 (植物) などの一重膜で囲まれた膜小胞器官 (vacuolar system, ここでは空胞系と呼ぶ) が存在し、さまざまな機能を果たしている。小胞の内側は、酸性に保たれている。そのため、小胞の膜には H^+ -ATPase が存在していると考えられた。1985年、大隅と安楽らは、酵母の液胞膜から H^+ -ATPase を精製することに成功した。これは、空胞系の H^+ -ATPase で最初の精製例である。酵母の液胞膜の H^+ -ATPase が F_0F_1 でないことは、一見して明らかであった。分子量は約54万、サブユニットは、67 K、57 K、20 K の3種であり、触媒サブユニットは 67 K、膜中において、 H^+ の透過に関与しているのは、20 K のサブユニットであった。 NO_3^- が活性を阻害したが、 N_3^- ではまったく阻害されなかった。また、 Na, K -ATPase など、E-P 中間体をつくる E_1E_2 型 ATPase の阻害剤であるバナジン酸でも阻害を受けなかった。彼らは、この H^+ -ATPase を新しいタイプの H^+ -ATPase と考えた。これを V (vacuolar) タイプと呼ぶ。各タイプの H^+ -ATPase の比較を (Table 2-1) にまとめた。

(4) 植物液胞と古細菌の ATPase¹⁾

V タイプと古細菌の ATPase は、サブユニット組成や阻害剤感受性に似たところがあるため、1989年、*Sul* ATPase のアミノ酸配列が空胞系の V タイプの H^+ -ATPase と比べられた。その結果、驚くほど高い相同性 (50-55%) が α と

70 K、 β と 60 K の間に見い出された。*Sul* ATPase が FoF₁ ではなく、V タイプの H⁺-ATPase によく似たタイプの ATPase に属することがはっきりした。古細菌以外にもこのタイプの ATPase を持つ細菌がいる可能性があるが、これを A (archaeobacteria) タイプと呼ぶ。向畑らは、好塩菌でこのタイプの ATPase が実際に ATP 合成をしていると思われる証拠を示している。古細菌では、真核細胞の空胞系のものに近縁の H⁺-ATPase が ATP 合成を行っていたのである。ただし、*Methanosarcina barkeri* という古細菌より、FoF₁ 型の ATPase 遺伝子クラスターが、1997 年に発見された⁸⁾。実際に細胞内で発現しているかは不明であるが、古細菌の中にも変わり者がいる可能性もあり、進化を考える上で大変興味深い。

(5) H⁺-ATPase の進化¹⁾

今まで述べたどの H⁺-ATPase も $\alpha_3\beta_3$ 型の中心的な構造を持ち、前述のように、両サブユニットとも、アミノ酸配列が進化の過程で多かれ少なかれ保存されている。その相同性を評価すれば H⁺-ATPase の進化を考えることができる (Fig. 2-2)。その結果、古細菌の A タイプは H⁺-ATPase (AV) から生じ、それはまた、FoF₁ と共通の原始 H⁺-ATPase (AVF) から生じたと推論された。ここでは詳しく述べないが、Fo の c サブユニットに相同な疎水的なサブユニットが、空胞系や古細菌にもあることがわかった。また、このサブユニットだけでの H⁺ の膜透過が可能であることを示している。 α 、 β 、c 以外のサブユニットで、どの ATPase にも保存されているものはないようなので、原始 H⁺-ATPase の構造は $\alpha_3\beta_3c_6$ の形ではなかったかと思われる。現に酵母液胞膜の H⁺-ATPase のサブユニット組成は、上記のように見える。さらに α と β は、共通のポリペプチドから生じたのであるから、それを改めて β と呼べば、 β_6c_6 型の H⁺-ATPase (プロト AVF) がその前に存在したと考えることができる。

グラム陰性真性細菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F は、最終電子受容体として硫酸塩を使う偏性嫌気性細菌である。硫酸還元菌におけるエネルギー伝達に関わる電子伝達タンパク質は広く研究されてきたが⁹⁾、ATPase についてはほとんど何も知られていない^{10, 11)}。*D. vulgaris* は 2 mol の乳酸を酸化し、酢酸に

する間に 2 mol の ATP を生産するにもかかわらず、それらは硫酸イオンの還元の際に、アデノシン 5'-フォスフォ硫酸を形成してしまうため使い果たされる¹²⁾。したがって、生きる活性を得るために、この細菌は、他の ATP 産生システムを持っていなくてはならない。ひとつの可能な源は、電子伝達系と共役したエネルギー変換システムである。Odom と Peck は、*Desulfovibrio* 種におけるエネルギー共役のための一般的なメカニズムとして、化学浸透水素サイクルモデルを提出した¹³⁾。硫酸塩還元と共役した水素分子の酸化を通じたプロトン濃度勾配の生成を予言している。現実には、(*D. vulgaris* の) 懸濁液において、水素消費にともなうプロトン濃度の増加が観測されている^{10, 14)}。しかしながら、*Desulfovibrio* において、プロトン輸送性 ATP 合成酵素の同定に関する報告はない。この酵素は *Desulfovibrio* において、エネルギー変換システムの鍵を握る酵素として、また、生物学的なエネルギー変換システムの進化においての画期的な素材としての 2 倍の重要性を持っている。

本研究において、*D. vulgaris* Miyazaki F で初めて、F 型 ATPase の存在を確証する酵素の部分精製と、F₁-ATPase の α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ サブユニット遺伝子のクローニングとシーケンシングの結果について報告する。

2-2 実験方法

(1) *D. vulgaris* Miyazaki F のゲノムライブラリーの構築

D. vulgaris Miyazaki F の菌体を、Postgate の C 培地により、37°C で嫌氣的に培養した¹⁵⁾。その菌体を 0.5% (w/v) の SDS で溶菌し、100 μ g/ml の proteinase K で処理した。細胞壁残査、ポリ多糖、そして、残存しているタンパク質を、CTAB (cethyl trimethyl ammonium bromide) 沈殿法¹⁶⁾により選択的に取り除いた後、染色体 DNA をイソプロパノール沈殿により、その上清から回収した。まず、PCR 用の 2 つのデオキシリボヌクレオチドプライマーを、F₁-ATPase の β -サブユニット (F₁ β) の既知のアミノ酸配列に従ってデザインした。Primer-1 は、(いわゆる P-loop と呼ばれている G-G-A-G-V-G-K-T-V というアミノ酸配列に対応している) 塩基配列 5'-GGCGGCGCGGGCGTGGGCAAGAC-3'

(23-mer) であり、Primer-2 は、5'-GTCGGTAAGGTCGTCCTCCGCGGGCAGTA-3' (27-mer) という塩基配列とした。これは、中央部の Y-V-P-A-D-D-L-T-D というアミノ酸配列に対応する塩基配列を相補するものである。*D. vulgaris* DNA の高い GC 含量 (65%)¹⁵⁾ による既知のコドン嗜好性を、これらの primer のデザインの際に考慮にいった。約 500-bp DNA 断片を、PCR によって、*D. vulgaris* Miyazaki F のゲノム DNA を鋳型として増幅した。その 500-bp DNA 断片を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより 5' 末端リン酸化した後、pUC19 ベクターの *Sma*I 部位に組み込んだ。得られたプラスミドの塩基配列を、2 つのユニバーサルプライマー、5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' と 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' を用いて完全に決定した。決定したインサートの DNA 配列を基にして、 $F_1\beta$ 遺伝子 (*atpD*) 用に 4 つの新しいプライマー (Primer-3, 4, 5, 6) を合成した。それらの配列はそれぞれ、5'-CCTTGGTGGCCTGCAGGAACGCATC-3' (25-mer)、5'-GATGCGTTCCTGCAGGCCACCAAGG-3' (25-mer)、5'-GGTGTTGGCGAGCGTACCCG-3' (20-mer)、5'-CGGGTACGCTCGCCAACACC-3' (20-mer) である。これらのオリゴヌクレオチドを、以下のように、ハイブリダイゼーション実験のためにも使った。

一方、ゲノムライブラリーの調製のために、*D. vulgaris* Miyazaki F のゲノム DNA を、*Sau*3AI で部分消化した。その消化した断片を、サイズ分画のために、40%(wt/vol) ショ糖を含む 5 mM EDTA-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液中で、140,000 x g で 24 時間超遠心した。15 から 20 kbp の DNA 断片を含む分画を、1 mM EDTA-10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で 3 倍に希釈し、エタノール沈殿によって回収した。これらの 15 から 20 kbp の DNA 断片を、あらかじめ、*Bam*HI で消化しておいた λ EMBL3 ベクターに組み込んだ。連結した DNA を、Gigapack II gold packaging extracts を使って λ ファージに再構成し、大腸菌 XL1-Blue MRA (P2) に感染させた。この大腸菌株は、Spi/P2 選択¹⁷⁾ により、組換えファージのみ、感染できるようになっている。こうして得られた λ ファージを、*D. vulgaris* Miyazaki F のゲノムライブラリー保存液として約 10^8 PFU まで増幅した。

(2) クローニングと塩基配列決定

D. vulgaris Miyazaki F のゲノムライブラリーの、15- から 20-kbp DNA 断片を含んでいるプラークを Hybond-N⁺ 膜に転写した。1,000 のプラーク中 34 個が primer-3 と primer-5 でハイブリダイズするということが、オートラジオグラフィによってわかった。あるひとつの陽性プラークから一種類のファージ溶液を調製し、上記 primer によって再ハイブリダイズ実験を行い、真性の陽性ファージであることを確認した。それからそのファージ溶液を、約 10⁸ PFU まで増幅し、保存液とした。

その増幅したラムダファージのファージライセートから、Qiagen のラムダスターターキットを用いてファージゲノム DNA を単離した。精製されたラムダ DNA は、(これ以降は、λMK27 と呼ぶ) ひとつの 17-kbp インサートを含んでいた。インサートを、*Sal*I、*Pst*I のどちらか、あるいは *Pst*I と *Sph*I の両方で消化した後、0.7%アガロースゲルで電気的に分離し、pUC118 ベクターの同じ制限酵素部位にサブクローンした。これらの組換えプラスミドを、pMK1、-2、-3、-4 とそれぞれ名付けた。pMK1 と pMK2 は、それぞれ 4,700 と 750 bp の *Sal*I インサートを含んでおり、pMK3 と pMK4 は、3,000 bp の *Pst*I インサートと 1,200 bp の *Pst*I-*Sph*I インサートをそれぞれ含んでいた。pMK1 ベクターをさらに *Sph*I と *Sal*I で消化し、その結果として得られた 900 bp の *Sph*I-*Sal*I 断片は pUC118 ベクターに再サブクローンした。この pMK1 より新たに派生したベクターを、pMK11 と名付けた。さらに pMK1 の中の 4,700 bp の *Sal*I インサートを、*Sau*3AI で消化し、得られた 660-bp 断片を、pUC118 の *Bam*HI 部位にサブクローンした。この pMK1 より新たに派生したベクターを、pMK12 と名付けた。pMK1 インサートの異なる長さのデリションミュータントも、*exonuclease* III と *Mungbean nuclease* によって得ることができた。pMK2 ベクターについては、*Pst*I あるいは、*Pst*I と *Sal*I の両方で消化し、得られた 3 つの断片は独立に pUC118 にサブクローンし、pMK21 (100-bp インサート)、pMK22 (250-bp インサート)、pMK23 (400-bp インサート)を得た。上で述べたすべての

プラスミドを制限酵素マッピングに供し、これらプラスミドインサートの両鎖の塩基配列はダイデオキシシーケンス法¹⁸⁾によって完全に決定した。この仕事で使われたプラスミドを、Table 2-2 にまとめた。

(3) *D. vulgaris* Miyazaki F から F_1 -ATPase の精製

細胞膜の調製については、第3章で述べられている¹⁹⁾のでここでは触れない。得られた細胞膜 (15 mg タンパク質/ml) の 3-ml 懸濁液を等量のクロロホルムと混合し、この混合液を2分間、激しく振とうした後、6つのエッペンドルフチューブへ分注して、(Tomy MRX-150 遠心機を用いて) 15,000 rpm で、15分間冷却 (4℃) 遠心した。その透明な上清を、milliQ-水で10倍に希釈し、あらかじめ、1 mM EDTA-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液 (buffer A) で平衡化しておいた、MonoQ カラム (5-mm 内径、5 cm 長さ) にかけた。ATPase 活性のある分画を、buffer A 中で 0 から 0.5 M の NaCl 直線濃度勾配をかけることによって得た。固形の硫酸アンモニウムを最終濃度を 30% 飽和になるように加え、15,000 rpm、30 分間冷却 (4℃) 遠心後、その上清を Phenyl Sepharose カラム (5-mm 内径、5 cm 長さ) にかけた。そのカラムは 1M 硫酸アンモニウムを含む 3 mM EDTA-10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液 (buffer B) であらかじめ平衡化しておいた。buffer B をベースにして、硫酸アンモニウムの 1M から 0M までの直線逆濃度勾配をかけることで吸着タンパク質を溶出し ATPase 活性分画を得た。

(4) 他の方法

N-末端アミノ酸配列は、試料を 12% SDS-PAGE ゲルから PVDF 膜へ転写した後、島津社製、PPSQ-10 protein sequencer によって分析した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準とした BCA 法によって決定した²⁰⁾。ATPase 活性は、25℃で、ATP-regenerating system によって測定した²¹⁾。推定される遺伝子は、ソフトウェア Genetyx-Mac ver. 9.0 によって、読み枠を (ORFs) 同定した後、その機能は DNA から推測されるタンパク質の相同性検索から推測した。相同性は、National Center for Biotechnology Information からの BLAST network

service²²⁾ を用いて決定した。

(5) 塩基配列の .accession number

ここで報告された塩基配列データは、DDBJ、EMBL、GenBank の塩基配列データベースに、accession number AB022018 で公開されている。

2-3 結果

(1) クローニングおよび ORFs 1 から 5 の遺伝子の塩基配列決定

λ MK27 染色体 DNA の 17-kbp インサートの一部の領域を、pUC118 ベクターにサブクローンし、塩基配列を決定した。リボソーム結合部位である Shine-Dalgarno (SD) 配列と思われる領域を含む 5つの読み枠 (ORF) がその中に見つかった。しかしながら、プロモーターやターミネーター様領域は発見できなかった。それゆえ、これらの 5つの読み枠は、この DNA 断片の上流に存在する同じプロモーターより転写されるように思われる。

ORF-4 は、1,416 塩基対からなり、Fig. 2-3 に示されている領域の 5' 末端から 3,078 番目の塩基の ATG 開始コドンから始まっている。最初に PCR 用にデザインしたプライマーと近い配列もその中に見つかった。その DNA 配列より翻訳されたアミノ酸配列 (Fig.2-3 に同様に含まれている) は、471 アミノ酸残基からなり、 F_1 -ATPase の β -サブユニット (Table 2-3) のそれらと高い相同性がある (Fig. 2-4)。その大きさも、他の細菌の β -サブユニットとだいたい同じである。ウシミトコンドリアの F_1 -ATPase の結晶構造が報告されているが、 β と α -サブユニット両者とも、N-末端、中央、C-末端の 3つのドメインからなっている²⁾。 *D. vulgaris* Miyazaki F からの ORF-4 産物の対応する領域は、アミノ酸配列で言うと、1 から 82 (N-末端)、83 から 357 (中央)、358 から 471 (C-末端) の領域である。中央部には、結合ヌクレオチドのリン酸領域と相互作用する P-loop に対応する配列がある。さらに、Glu-188 の周辺領域は、他の β -サブユニットのその部分と高い相同性がある。Glu-188 は、ATP の加水分解を触媒すると予想されているグルタミン酸残基に相当する²⁾ (Fig. 2-5)。以上の結果より、ORF-4

産物は、 F_1 -ATPase の β -サブユニットであると結論づけられる。

ORF-2 は、1,467 塩基対からなり、Fig. 2-3 に示されている領域の 5' 末端から 654 番目の塩基の ATG 開始コドンから始まっている。その DNA 配列より翻訳されたアミノ酸配列 (Fig. 2-3 に同様に含まれている) は、488 アミノ酸残基からなり、 F_1 -ATPase の α -サブユニット (Table 2-3) のそれらと高い相同性があり、その大きさも、他の細菌のそれらにほぼ近い。P-loop に対応する配列 (1,158 番目の塩基より始まる G-D-R-Q-T-G-K-T) も、存在している。したがって、ORF-2 は F_1 -ATPase の α -サブユニットであると考えられる。

ORF-3 は、885 塩基対からなり、Fig. 4-3 に示されている領域の 5' 末端から 2,176 番目の塩基の ATG 開始コドンから始まっている。その DNA 配列より翻訳されたアミノ酸配列 (Fig. 2-3 に同様に含まれている) は、294 アミノ酸残基からなり、 F_1 -ATPase の γ -サブユニット (Table 2-3) のそれらとある程度の相同性がある。比較的低い相同性というのは、他のいろいろな細菌種からの F_1 -ATPase γ -サブユニットの一般的な特徴である。ORF-3 は他の細菌種の F_1 -ATPase の他のサブユニットとほとんど似ていない。さらに、その大きさは、他の細菌の γ -サブユニットとたいたい同じものである。それゆえ、ORF-3 は F_1 -ATPase の γ -サブユニットであると考えられる。

ORF-1 と ORF-5 は、それぞれ、519 と 405 塩基対からなっている。ORF-1 は、Fig. 2-3 に示されている領域の 5' 末端から 131 番目の塩基の GTG 開始コドンから始まっている。その DNA 配列より翻訳されたアミノ酸配列 (Fig. 2-3 に同様に含まれている) は、172 アミノ酸残基からなり、 F_1 -ATPase の δ -サブユニット (Table 2-3) のそれらと多少の相同性がある。ORF-5 は、Fig. 2-3 に示されている領域の 5' 末端から 4,504 番目の塩基の ATG 開始コドンから始まっている。その DNA 配列より翻訳されたアミノ酸配列 (Fig. 2-3 に同様に含まれている) は、134 アミノ酸残基からなり、 F_1 -ATPase の ϵ -サブユニット (Table 2-3) のそれらと一定の相同性を示す。ORF-1 と ORF-5 は、他の細菌の他のサブユニットとの相同性があまり高くないが、大きさから見ても、ORF-1 と ORF-5 産物は、それぞれ、 F_1 -ATPase の δ - と ϵ -サブユニットであると結論づけられる。

上で述べた遺伝子の構成を、Fig. 2-6 に表にしてある。FoF₁-ATPase 遺伝子は、一般にクラスターを形成していることが知られている²³⁾。*D. vulgaris* Miyazaki F 中の δ 、 α 、 γ 、 β 、 ϵ サブユニット遺伝子という順番での遺伝子配列は、他の種に見られるものと一致している²⁴⁾。このことも、*D. vulgaris* Miyazaki F が、F-型 ATPase (あるいは、ATP synthase) を持っているという結論を支持するものである。F-型 ATPase 遺伝子のオペロンは、通常、Fo 遺伝子を、F₁ 遺伝子の前に持っているので、この解析した領域に、プロモーター領域がないというのは自然なことである。*atpH*、*atpA*、*atpG*、*atpD*、*atpC* 遺伝子のコドン使用頻度における GC 含量の割合は、それぞれ、62.2、63.7、63.1、62.6、64.0% であった。この研究で塩基配列を決定した 4,950 bp 全体の GC 含量の割合は、62.8% であったが、これに対して、同じ *D. vulgaris* Miyazaki F のシトクロム *c*₃²⁵⁾ は 61.7%、フラビンモノヌクレオチド結合タンパク質²⁶⁾ は 74.4%、[NiFe] ヒドロゲナーゼ²⁷⁾ は 66.2%、シトクロム *c*₅₅₃²⁸⁾ は 62.1% であった。したがって、コドンの好みは、*D. vulgaris* Miyazaki F の他の遺伝子のそれと似ていると言える。

(2) *D. vulgaris* Miyazaki F 細胞膜からの ATPase 活性のある構成成分の精製

D. vulgaris Miyazaki F の細胞膜から精製した ATPase 活性のある構成成分のことは、実験方法のところに記述している。Table 2-4 に示したように、その比活性は、3段階の精製により約 100 倍に増加した。ATPase 活性のある画分の SDS-PAGE は、60.5、51.5、34.7 kDa の大きさに対応する 3つの主要なバンドが存在していることを示している (Fig. 2-7)。これらのタンパク質を同定するために、それぞれの3つのバンドを 12% SDS-PAGE から、PVDF 膜に電氣的に転写し、別々に切り取って Protein sequencer によって解析した。3つのバンドのうち、最も大きなものの N-末端配列は、MQIKAEISK... であり、*atpA* 遺伝子の予想された産物の配列と同一であった。2番目に大きなバンドの N-末端配列は、SANIGKIVQVIGAVVDVEFP... であり、*atpD* 遺伝子の予想された産物の配列と開始メチオニンが削られている以外は同一であった。3番目ののは、

PSLKDVKVKIAGVKKTKQITKAMNMVA...であり、*atpG* 遺伝子の予想された産物の配列と開始メチオニンが削られている以外は同一であった。それゆえ、 F_1 -ATPase 遺伝子は、生理的な条件の下、*D. vulgaris* Miyazaki F の細胞膜中で現実に発現しているということが結論づけられる。

2-4 考察

硫酸還元菌の F_1 -ATPase の α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ サブユニット遺伝子すべてをクローニングし、塩基配列決定を行ったのは本研究が初めてである。さらに、*D. vulgaris* Miyazaki F の細胞膜に、現実にその遺伝子産物が存在していることも確認した。それゆえ、その実際の構成成分とそれらの間の化学量論比は、まだはっきりしていないものの、この酵素がこの細菌において、 F_1F_o -ATPase として実際に存在しているはずである。*D. vulgaris* Miyazaki F の中での ATPase 遺伝子産物の生物学的な役割を理解するために、その比活性を、37°C で好氣的に一晩培養された大腸菌株 JM109 の細胞膜のそれと比較した。大腸菌の細胞膜分画を、*D. vulgaris* Miyazaki F のそれと同様に調製したところ、その ATP 分解の比活性は、0.078 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ タンパク質であった。これは、Table 2-4 に示された *D. vulgaris* Miyazaki F の細胞膜分画の比活性と類似している。それゆえ、*D. vulgaris* Miyazaki F は、好氣的な条件下で働く大腸菌の細胞膜にあるのとあまり変わらない量の F_1F_o -ATPase を持っているはずである。大腸菌における F_1F_o -ATPase は、エネルギー生産のために、つまり、好氣的な条件のもとでの ATP 合成のために働いている。*D. vulgaris* Miyazaki F の中での大量の ATPase の存在は、その遺伝子産物が、実際には、F 型 ATP 合成酵素であって、*D. vulgaris* Miyazaki F の中で、嫌氣的な条件の下でさえ、ATP を合成するために働いているということを強く支持するものである。この量は、 F_1F_o -ATPase が中性の pH 領域で、ATP の消費によりプロトン濃度調節として働くためには多すぎると思われる。

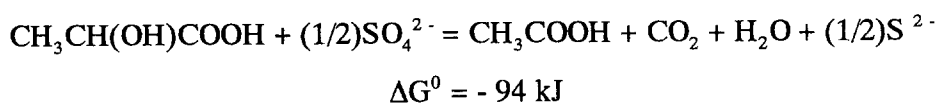
硫酸還元菌は、偏性嫌氣性細菌であるにもかかわらず、豊富なシトクロムを含んでいる¹²⁾。これらのシトクロムは、硫酸呼吸において、電子伝達系にか

かわっているはずである。いくつかの硫酸還元菌は、分子状水素を単一のエネルギー源としてよく生育する²⁹⁾。さらに、*D. vulgaris* Miyazaki において、水素消費と亜硫酸還元に伴い、細胞膜の外側で、プロトン濃度の増加が報告されている¹⁴⁾。これは、水素から亜硫酸への電子伝達に伴って、細胞膜をはさんでのプロトン濃度勾配が形成されることを示している。それゆえ、 F_1 -ATPase 遺伝子の産物は、硫酸呼吸における電子伝達系によって生じたプロトン濃度勾配を利用して、ATP 合成に関わっていると結論づけられる。これは、硫酸呼吸と共役した F 型 ATP 合成酵素の存在を示した最初の例である。1981 年に Odom と Peck は、*Desulfovibrio* 種におけるエネルギー共役のための、化学浸透水素サイクルモデルを提唱した。このモデルは、*Desulfovibrio* が、酸化的リン酸化により ATP を生産する事ができ、プロトン輸送性 ATP 合成酵素を持っているはずであるということを予測している。つまり、本研究において発見された F 型 ATPase が、プロトン濃度勾配と共役して ATP 合成酵素として硫酸還元菌内で働いているというわれわれの結論は、彼らのモデルを支持するものである。*Desulfovibrio gigas* の膜小胞においては、亜硝酸還元に伴う ATP 合成が、プロトン濃度勾配の形成と関連していると報告されている¹⁰⁾。したがって、硫酸還元菌内に ATP 合成酵素が存在するとすれば、この現象も同様に説明する事ができる。

偏性嫌気性生物における F 型プロトン輸送性 ATP 合成酵素の役割は、まだよく理解されていない。いくつかの偏性嫌気性細菌においては、プロトンをくみ出す際に、ATP 分解酵素として働くと示唆されている。他方、ATP 合成酵素として機能しているといういくつかの例もある。*P. modestum* におけるナトリウムイオン輸送性 F_1F_0 -ATPase は、細胞膜をはさんだナトリウムイオン濃度勾配を利用して、ATP を合成することが知られている⁴⁾。脱炭酸反応が、直接的にメチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼにおけるナトリウムイオンくみ出しと共役している。コハク酸のプロピオン酸と二酸化炭素への発酵において、全体の自由エネルギー変化は、-20 kJ/mol だけである³⁰⁾。このエネルギー量は、ADP と無機リン酸から 1 mol の ATP を合成するためには充分ではない。また、

生体内の条件で、ATP の合成に使われる自由エネルギーは、約 70 から 80 kJ/mol である³¹⁾。従って、3つか4つの脱炭酸反応が、1つの ATP 分子合成と共役しなければならない。これが、*P. modestum* における ATP 合成酵素の存在の主要な理由として示されている⁴⁾。*M. thermoacetica* におけるプロトン輸送性 F₁F₀-ATPase は、メナキノンや、2つの b 型シトクロムを含む電子伝達鎖によって生み出されたプロトン濃度勾配を利用して ATP を合成するとも報告されている⁷⁾が、その詳細なメカニズムやこのエネルギー変換の役割はまだはっきりしていない。*M. thermoacetica* の ATPase の F₀ 部分の構造は、普通の F 型 ATP 合成酵素のそれとは異なっているとも報告されている^{32, 33)}。

硫酸還元菌の場合には、乳酸の酢酸への酸化により、1 mol の ATP と 4 mol の電子 (あるいは、2 mol の水素分子) が基質レベルで生成する。基質レベルで合成された ATP は、硫酸イオンの還元のための活性化に使われる¹²⁾。さらに上述の電子も硫酸イオンを還元するために使われる。全体の反応は、以下のよう記述される¹⁵⁾。



この酸化還元反応から解放された自由エネルギーは、*P. modestum* のそれよりずっと大きいので、*D. vulgaris* Miyazaki F におけるエネルギー変換システムは、*P. modestum* のものとは異なっているはずである。-94 kJ/mol の自由エネルギー変化は、プロトン濃度勾配と共役しての電子伝達をとおして ATP に変換される。*P. modestum* とは対称的に、このプロトン濃度勾配は、有機化合物の酸化と直接的には共役していない。つまりこの過程は、酸素呼吸の原型であると言える。

ところで、F₁ 領域に続いて F₀ 領域の塩基配列を解読していったところ、δ サブユニット遺伝子の前に、通常とは大きさの違う b サブユニット遺伝子が存在していることがわかった。この大きさは、アミノ酸にして 335 残基で、大腸菌や通常の生物の b サブユニットの約 2 倍である。335 残基全体で、BLAST 検索してみても、b サブユニットとして相同性があったが、前と後ろの長さにしてちょうど半分ぐらいで 2 つのドメインが存在しており、これらのアミノ酸

配列を別々に BLAST 検索してみても、両者とも、b か b' サブユニットという結果に落ち着いた。大腸菌や、Thermophilic bacteria PS3 の F_1F_0 -ATPase オペロンの場合、サブユニット構成の順番は、前から、a, c, b, δ , α , γ , β , ϵ という並びであり、遺伝子はそれぞれ1つずつ存在している。そこで、*D. vulgaris* Miyazaki F で発見された F 型 ATPase の場合も同様な並びが予想された (Fig. 2-8) が、読み進んで行っても、先に述べた 大きな b サブユニットより前には、c サブユニット遺伝子も、a サブユニット遺伝子も見つからなかった。それがなくかわりにプロモーター様構造が発見された [(Fig. 2-9) の 2409-2414 (-35 領域), 2432-2437 (-10 領域)]。さらにその前には、588 塩基離れて Cell Division Protein という ATPase とはおおよそ関係のないタンパク質と極めて相同性の高い ORF が存在しているだけであった。この領域については、今回の λ MK27 クローンだけでなく、別のクローンについても調べてみたが、同じ結果であった。今回発見された Cell Division Protein と大きな b サブユニットの ORF の間には、588 塩基しかスペースがないので、一般的な a サブユニット遺伝子と c サブユニット遺伝子では、そのスペースには入りきらないと思われる。そこで現在、*D. vulgaris* Miyazaki F の細胞膜より、膜結合の ATP 合成酵素サブユニットが精製できるかどうかを、大腸菌よりの、c サブユニット精製法を参考にして試みているが、まだ、結果はでていない。もし、実際に c サブユニットが精製されれば、そのアミノ酸配列を一部決定することにより、今回と同様なハイブリダイゼーション実験を行えば、c サブユニットを捕まえることができるだろう。しかしながら現在までのところ、私がクローンした遺伝子断片中 (λ MK27 の 17 kbp 挿入断片) には c サブユニット遺伝子も、a サブユニット遺伝子も発見されなかったので、硫酸還元菌においては、これらの遺伝子は、スプリット遺伝子として染色体の別の位置に存在して、今回、発見された large b + F_1 部位のサブユニット遺伝子とは、別々に発現している可能性が示唆された。もっとも、残りの遺伝子は、硫酸還元菌には存在しないという可能性もないとは言えないが、特に c サブユニットは、プロトン輸送に必須であると考えられるので、きっとどこかに存在していると私は考えている。現在進行中の、タンパク質精製ができれば、それ

もはっきりするだろう。予備的な実験では、大腸菌の細胞膜より、自身の c サブユニットを精製する方法と全く同様な方法を用いることで、硫酸還元菌の細胞膜より、通常の F_0F_1 -ATP 合成酵素の c サブユニットと同程度の大きさのタンパク質が精製されており、現在、その N-末端アミノ酸配列を調べているところである。したがって、まだ、はっきりしたわけではないが、硫酸還元菌においては、 F_0 の構造が、多少異なっている可能性もありそうである。硫酸還元菌の他の種において、ATPase が同定された報告はないので、新たな事実が発見される可能性も大いに期待できる。進化的に見ても非常に興味深い。

偏性嫌気性細菌の F_1F_0 -ATPase の生理的な役割に関して、もっかのところ、3つのタイプがあると思われる。もっとも原始的なタイプでは、電子伝達系とは関係なく、ATP 合成酵素として働いている。プロトンやナトリウムイオンの濃度勾配は、小さなエネルギーの効率的な集積のために使われる。2番目のタイプは、エネルギー生産を F_1F_0 -ATP 合成酵素にほとんど頼らない。発酵における基質レベルでの ATP 合成が、これらの嫌気性生物のエネルギーの主要な源である。この場合、 F_1F_0 -ATPase は主に、細胞質の pH の制御のために使われている。3番目のタイプでは、電子伝達系と共役した F_1F_0 -ATP 合成酵素がエネルギー生産で重要な役割を果たしている。3番目の偏性嫌気性生物におけるエネルギー変換システムは、進化的な観点から言うと、丁度、発酵と酸素呼吸の間に位置していると言える。硫酸還元菌は、3番目のタイプの主要なグループの1つである。

本研究により、偏性嫌気性細菌である硫酸還元菌は、好気性細菌と同様に、エネルギー生産のために、ATP 合成酵素を利用して酸化的リン酸化を行っていると結論できた。

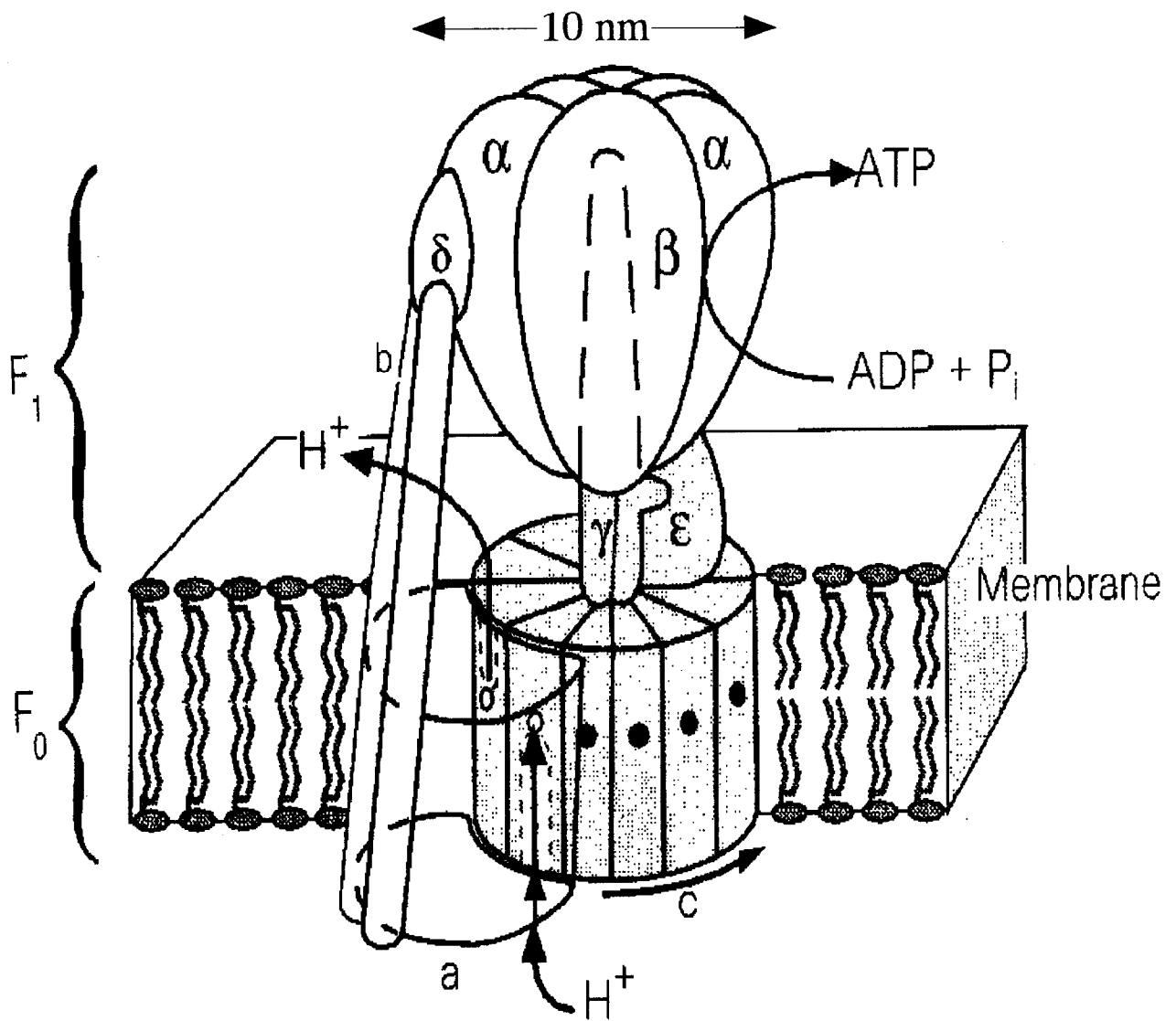


Fig. 2-1 A structural model of F₁F₀-ATP synthase³⁷⁾

Table 2-1 Comparison of three types of H⁺-ATPases¹⁾

Type	Location	Composition	Catalytic site	Inhibitor
F ₀ F ₁	Mitochondria Chloroplast Eubacteria	$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ab_2c_6-12 others	β	N_3^-
V	Vacuole Secretory vesicle Lysosome, etc. Vacuolar system	$\alpha_3\beta_3$ $\alpha_3\beta_3$ $(c \times 2)_6^a$ others	α	NO_3^-
A	Archaeobacteria	$\alpha_3\beta_3\gamma$ c_n others	α	NO_3^-

^a The molecular weight becomes twice after dimerization

P-type H⁺-ATPases which form E-P intermediates are removed from this table.

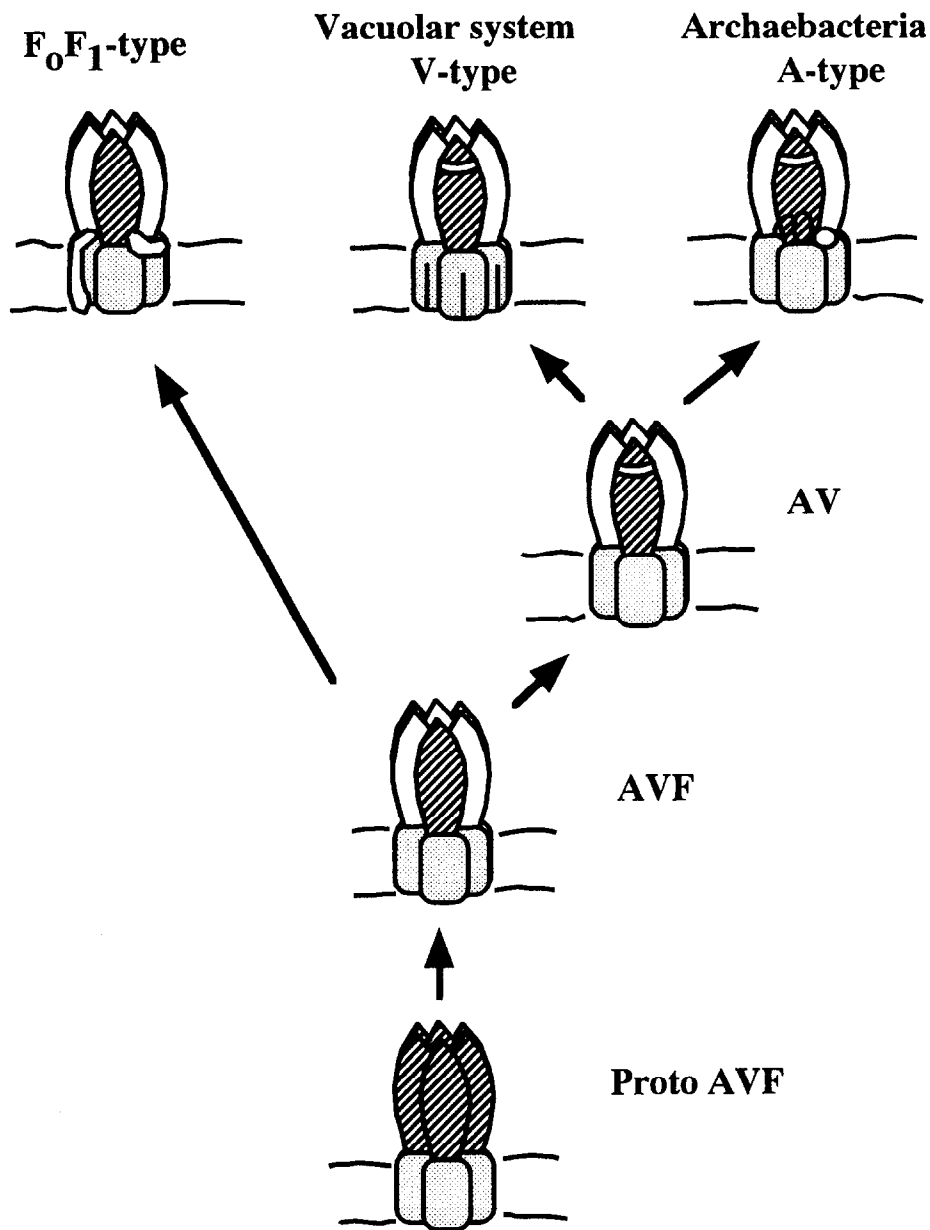


Fig. 2-2 An evolutionary model for H⁺-ATPase¹⁾

Dark domain represents the subunit with catalytic site. Dotted domain is subunit c. In AVF, the catalytic subunit (β) is the second size. On the way of the evolution to AV, an insertion into the β subunit by about 90 amino acids took place, resulting in the α subunit. The subunit c becomes dimer in the size of 16-19K during the evolution from AV to V.

Table 2-2 Phage DNAs and plasmids used in this work.

Vectors	Comments	References
λ-phage DNA		
λ EMBL3		(17)
λ MK27	17-kbp insert containing <i>atp</i> genes	This work
plasmids		
pUC118	Amp ^r	(34)
pMK1	4,700-bp <i>SalI</i> insert in pUC118	This work
pMK11	900-bp <i>SalI-SphI</i> insert in pUC118	This work
pMK12	660-bp <i>Sau3AI</i> insert in pUC118	This work
pMK2	750-bp insert <i>SalI</i> insert in pUC118	This work
pMK21	100-bp <i>PstI</i> insert in pUC118	This work
pMK22	250-bp <i>SalI-PstI</i> insert in pUC118	This work
pMK23	400-bp insert <i>PstI</i> insert in pUC118	This work
pMK3	3,000-bp <i>PstI</i> insert in pUC118	This work
pMK4	1,200-bp <i>PstI-SphI</i> insert in pUC118	This work

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 GATCATTTCCGCCCGCCGAAAAGATGCTTCAGGAAAAGCTCACTGGTAAGGAGCAGGAAAGCTCATCGACAAATACTTAACGAAGGTGGTGTCAATTGACCGGCAACATCGTAGCTCGC

130 ORF1 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
AGATACGCCCGTGGCGCTTTTTCGGCTGGGCGGAAATCGGGCGGTGGTGGAGCTGATGAAGCTCGCCAGCGACCTTTCGCCGCTTGGCGGGGCTCTCGACGGCGGCCCGAACTTGGCGG
 H R F L R W A R N R A V G E L D K L G S D L A A L A G A L D A A P E L G R

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 CATCTTCCGAAATCCCATCAACCGCGGTGAGAAGCGGAACGTCATCTCAAACTGGTTCGAGAAGTACGGCGTCAAGCGCCACCGTCCGCAATTTCTGTCGTCTGGCGGACAAAGG
 I F R N P I I T A G E K R N V I L K L V E K Y G V S A T V R N F C L L L A D K G

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 GGGTCTCGACTGCTTTCGACATACAGGCTTCTACGGCGTCTCTCGAGCGCGAAAAGGGCGTCAATCGGGCGGAGCTGATGACGGCGCTTGAACCTGGCGAAAGCAAGCGCGCAC
 R L D C L S D I Q A F Y G V L L D A E K G V I R G E L H T A V E L A E A K R A Q

490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 GGTCAAGCGCGCTTGAACAGCAGGCGGACCGCAAGCTGGAACCTCACCTTCAGCGTGAACAGGACATCTTGGCGCGTCTGCTGAAGGTCGGCGACCGGGTCTGGATGCCAGTCT
 V K A A L E Q A G R K L E L T F S V N K D I L G G V V L K V G D R V L D A S L

610 620 630 640 650 ORF2 660 670 680 690 700 710 720
 GCGCGCGCTTAGGTATCTCAAGACAAATCAAGCGGCTGAGTAGGGCTATAGGGCTAAAGCCGAAGAAATCAGCAAGATCATCGAAGAGCAGATCCAAAGCTATGAGCAGCGGG
 R A Q L G I L K D N I K R G E * H Q I K A E E I S X I I E E Q I Q S Y E Q R V

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
 TCGAGATGAGCGAAAACCGGACCGTCTTTCGGTGGTGGAGCGCAITGGCGCGGTCTACGGCGTCTGTAATGCCATGGCCATGGAACCTGCTGAGTTCGCCGCGGCTCATGGCGGCT
 E H S E T G T V L S V G D G I A R V Y G V R N A H A H E L L E F P G G L H G H V

850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
 TGCTGAACCTTGAAGAGGACAACTGGGTCTTCTTCGGCGAAGACACCGCCATCAAGGAAGCGGACCGCGTCAAGCGTACCGCGCAAGATCTTCTCGGTTCGGCGGGTGGACGAGG
 L N L E E D N V G V A L L G E D T G I K E G D P V K R T G K I F S V P V G D E V

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TCATGGCGCGGTCTCAACCCCTCGGCGAGCCCATCGAGCGGCTGGCGCGGTGGAAGCGCAAGAGTTCGCGCGGTGGAACGAAAGCCCGCGGATCATCGCCGTAAGTCCGGTGC
 H G R V L N P L G Q P I D G L G P L E A K E F R P V E L K A P G I I A R K S V H

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ACCAGCCCATGCCACCGCATCAAGCCATCGACCCATGAGCGCCATCGGCTGGTGGCCAGCGGCAAGCGTATCATGGCGCGGTCAGCCGCGGCGGCTGCAATCGAGCCCA
 Q P H P T G I K A I D A H T P I G R G Q R E L I I G D R Q T G K T A V C I D A I

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TCTGCGCCAGCGGATACCGGCATCCGCTGCTTCTACGTGGCCATCGGCGCAGAAGAAGGCAACGGTTCGCGCTGGCGGACACCCCTGGCGCAAGCAGCGTCCATCGAATACACCACCA
 L A Q R D T G I R C F Y A I G Q K K A T V A L V A D T L R K H G A H E Y T T I

1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TCATCTCGCCACCGGCTCGGAACCGCGCGCTCGAGTTCATCTCGCGTACTCGGCGTCCAGCATGGCGGAGTTCACCGTGAAGGGCGACCGCCCTGATCATCTACGATGACC
 I S A T A S E P A P L Q F I S A Y S G C T H A E F Y R D K G D H A L I I Y D D L

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 TGTCCAAAGCAGCGGTGGCTACCGCCAGATGTGCTGCTCGCGTCTCGCGGCGTGAAGCTACCGCGCGGACGCTTTCACCTGCTGCTGCGGCTCGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGG
 S K Q A V G Y R Q H S L L L R R P P G R E A Y P G D V F Y L H S R L L E R A A K

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GTGAAGCTACCGCGGACGCTTCTACCTGCACTCGCGGCTCGGAAACCGCGCGGCAAGGTCAGAGTTCGCTGGCGCGCGGCTCGGCTGACCGGCTCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGG
 E A Y P G D Y F Y L H S R L L E R A A K V N D S L G A G S L T A L P I I E T Q A

1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 CTGGGACGCTGTCCGGTACATCCCGACCAAGCTTATCTCCATCAACGACGGTCAAGGTGACCTGGAACCCCAAGCTGTTCACCGCGGACATCCGCGCGCCATCAAGCTCGGTCTGTCCG
 G D V S A Y I P T N V I S I T D G Q V Y L E P N L F N A G I R P A I N V G L S V

1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 TGTCCGAGTGGCGCGCGCGCGCAGATCAAGCGGATGAAGCAGGTTGCGCGCACCATGCGCTTGGACCTTGGCCAGTACCGCGGAACTGCGCTTCCGCGAGTTCGGGTTCCGACCTCG
 S R Y G G A A Q I K A H K Q Y A G T H R L D L A Q Y R E L A A F A Q F G S D L D

1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 ACAAGCCACCAAGCAGAGCTCGACCGCGCGCGCGCTGGTGGAACTGCTGAAGCAGCCCGCAGTACCGCCCATGCGCTGCGAAGCAGGCTCGGCTCCATGACCGCGCCACCGCGG
 K A T X Q K L D R G A R L V E L L K Q P Q Y Q P H P Y E Q V A S H Y A A T R G

1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GCCTGATGAGCGATGTGCCCTGCTGGCCATTCGCAAGTTCGAAGCCGAAATGCTGCACTTCTCAAGAACTGGAAGCGGACATCTGAAAGCAGATCAAGACCAAGAGGCTCTCGAGC
 L H D D V P V L A I R K F E A E H L D F L K N S K A D I L N D I K T K K A L D A

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 ORF3 2180 2190 2200 2210 2220
 CGGACATCGAAGACCGCTGAAGGACGCTGTTGCGGAGTTCAAAAAGGGCTTCCAAGCCCTAGCGGGAGGTAACCGATGCGCTCTTTTGAAGACGTCAGGTCAAGATCGCGCGGCTCAAG
 D I E D R * H P S L K D V K V K I A G V K

2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 AAGCAAGCAGATCAACAGCCATGAACATGCTGGCTCGCGGAACTGCGCGGTCGCCAGCAGCCATAGAACGGTTCGCGCCCATGCGCGGCAAGTTCATTGACATGCTGGGAGAC
 K T X Q I T K A M N H V A S A N V R G A Q Q R I E R F R P I A A K F I D H L G D

2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 CTGGCGAGCAAGCGGACGCTCCGCTCCACCTGCTCTCGAAGTTCGCGGAGGAAATCAAGCAGTGTGGATGCTCTCGCCACCTCGGACCGCGGCTGTGGCGGAGCTTCACTCCAAC
 L A S K A D S S V H P A S G S A R G N Q D V W D R P R H L G P R A V R Q L H S N

Fig. 2-3 Nucleotide sequence of the *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpD*, and *atpC* genes from *DvMF* and deduced amino acid sequences of the five *atp* gene products.

The putative ribosome binding sites from the five *atp* genes are doubly underlined. The P-loop amino acid sequence in the β -subunit was indicated by a dark box.

2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 CTCATCACCCCGCCCTGAAGCTGGGCGCCCAAGAAGCGCCGGAAGGCAAGAAAGGTTCAAGTTCTACTGCGTGGGCAAGAAAGCGCGGATGCGGCGCCGCAAGACCGACCCAGGAGTGC
 L I T T A L K L G R Q E G R G R Q E R S S S T A W A R K A A M R P A R P T T R S

2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 CCATGGCGGTGGCGACAGATGGCGAGCTTCGACTTCCAGCTCGCCAAACAGGATTCGGGCTCGATGTCATCAATGCTACCTGGCGCGTGAATCGACGAAGTATCATGCTTACGGC
 P W R L P T R W A A S T S S S P T G F G L D V I N A Y L A R E L D E V I H Y Y G

2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 CTCGATGTCATCAATGCTTACCTGGCGCGTGAAGTGGACGAAGTATGATGCTTACGGGAGTTCGTTGAGCATGGCCAAAGCAGCTGCCCATCGCGCTGGCCATCCTGCCCATCGCTGCC
 L D V I N A Y L A R E L D E V I H V Y G E F V S H A K Q L P I A L P I L P I A P

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 GAGTTCGTGAGCATGGCCAAAGCAGCTGCCATCGCGCTGCCATCCGTCGCCATCGCTCCCAAGGAAGAGGAGCGCCCGCGCTGCCCGCCCTCCAAACAGGAGTATCTACGAAACCC
 E F V S H A K Q L P I A L P I L P I A P K E E E A A P A A P A S N K E Y I Y E P

2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 GCGGTGGAGGGCGCTTGCAGCAACTGCTGCCCGCTTCATCAAGGTGCACTGTATCGGGCGCTGCTTGACAGCTCCGCCAGCGAGCATGGCGGCGCATGGCGCGCATGGCATAGCCG
 A Y E G L L A E L L P R F I K Y Q L Y R G L L D T S A S E H A A R H A A H D N A

2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 ACCGCGACGTGGCAGCAGATGATCGGTTCCTGACGCTGCTTCAACAAGAAGCGGCGCTTCGATCACCGCGGACCTCATGGACATCGTGGTGGCGCGGAGGCGCTGAAAGGCTAA
 T R T C D D M I G S L T L L F N K T R Q A S I T R D L M D I V G G A E A L K G *

3070 **ORF4** 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180
 TAAAGGCGGTACACACATGATGCTTAACATTTGGCAAGATCGTTCAAGTTCATCGGCGCGCTCGTGGAGCGTCCGAGCGGCAACCTCCGCAACATCTTTGAGCGCTTGGACATCA
 H S A N I G K I Y Q V I G A V D Y E F P S G N L P N I L S A L D I K

3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 AGAACCCCAACAGCAGCAGCGCGCCCGCTTGGTTCGCGAAGTTGCGCAGCACTTCGGCGACAAAGCTGTCGCGACCATCGCCATGGACCGGACCGGAAGGCTCTGTCGCGCGCATGGAG
 N P N N S D A P Q L V C E V A Q H L G D N V V R T I A H D A T E G L V R G H E A

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 CGGTGGACACCGCGCAAGCCATCATGTTGCTGTCGCGAAGCGCTTGGCGGTATCATGAAAGTGGGCGCTCCGTTGACGAAATGGGCCCCATCAAGACCGACAAATACCTGC
 Y D T G K P I H V P V G K A S L G R I H N V V G R P V D E H G P I K T D K Y L P

3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 CCATTCACCGTCCGCGCGCGGAGTTCACCGAGCAGAACCAAGGTGCAACTGCTCGAAACCGGCAACAGGTGCTTGACCTGCTCATCCCGTTGGGGAAGGCGCGCAAGATGGCGCTGT
 I H R P A P E F T E L T K V E L L E T G I K V Y D L L I P L G K G G K H G L F

3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 TCGCGCGCGCGCGGTGGCGAAGCGGTATCTCCTCATGGAAATGATCAACAACTTCGCGAAGCAGCAGCGCGCTATCTCCGTTGTCGAGGTGTTGGCGAGCGTACCCGTTAAGGGAAGC
 I L H E H I N N I A K Q H G A I S V F A G V G E R T R E G N D

3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 ACTTTCAGCAAGAAATGAAGGACCGCGCTTTCGGAAGCGCGCTTATCTACGGCCAGATGAACGAAACCGCGAGGCGCGTTCGCGCGCTGACCGCTTCCGCTGCGCGG
 L Y H E H K D A G V L E K A A L I Y G Q M N E P P G A R A R Y A L T A L A C A E

3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 AAATACTCCGTTGACATCGAGAACCGGACGCTGCTACTGTTCTGTCGACAACTTCCGCTTCCAGCGCGGTTTCGGAAGTGTGCGCACTGCTCGCGCGCATGCTTCCGCGCGGCGGT
 Y F R D I E N Q D V L L F Y D N I F R E T Q A G S E V S A L L G R H P S A V G Y

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020
 ACCAGCCACCGTGGTACCGACCTTGGTGGCCGTCAGGAAACGATCACCTTCCAGGTTCAAGGGCTCGATCACCTCGGTCAGGCGCGTGTACGTGCGCGCGGACGACCTTACCGACCCCG
 Q P T L G T D L G L Q E R I T S T V Y K G S I T S V Q A V Y V P A D D L T D P A

4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 GCGTCCACCCAGCTTCTGCGCACTTGGCGTACCGTGGTCTTTCCGCTCAGATCGCTGAACTGGCATCTACCTGCGGTTGACCCGCTCGACTCCAGCTCGCGCATCTCGACCCCA
 P A T T F S H L D G T L V L S R Q I A E L G I Y P A Y D P L D S T S R I L D P N

4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 ACGTGGTCCCGGACTACTCGGTGGCCCGCGCGTGCAGCAGGTTCTGCAAGTACAAGGATCTGCAAGCATCATCGCCATCTCGGCATGGACGAAGTCTCGACGAAGACA
 V V G P E H Y S V A R A V Q Q V L Q K Y K D L Q D I I A I L G M D E L S D E D K

4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380
 AGCTGACCGTCCCGCGCGCGCATCCAGCGCTTCTGTCGACGCGCTTCCAGCTGGCCGAAACCTTACCGCGCACGCGCGCGGTGTACGTGAAAGTGGAAAGACACCATCAAGCGGT
 L T V A R A R I Q R F L S Q P F H Y A E T F T G T P G V Y Y K L E D T I K A F

4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 TCCGGGATCTGTAACCGTACTTCCGACACCTTCCGGAAGCGGACTTCTACATGGTGGCGGCAATCGAGACCGCCCTTGAAGTACAAAGCGCCAGGAGCAGCAATAAGAGTGA
 R G I L N G D F D H L A E G D F Y M Y G G I E T A L E K Y K K R Q E Q Q *

ORF5 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620
 CCCATGGAAGTCCATCTCGAAATCGTACGCTGACAGGCTGCTCAGCGAGAAGGTCGACTATGTTGGCGCGCCCGGCTACGAGGGCGAATTCGGCATCTCGCGCAAGCCAC
 M E K S L H L E I V T P D R L V L S E K V D Y V G A P G Y E G E F G I L P N H

4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720 4730 4740
 ATTCCCTTCTCCCGGTTGAACATCGCGAGCGCTGACTACAGGCTGGCGGCAAGACGACTGGATCTTCTGTTCCGCGGTTTTCGCGAGGTTTTCGGACAACAGGTTGACCGTCTG
 I P F L S A L N I G S L Y Y K A G G K T H W I F V S G C F A E V S D N X V T V L

4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860
 GCGGAATCGGCGGACCGCAGAGGACATCGACCTGGAACCGCGCGCAAGGCAAGGAAAGCTGCGGAGCAACCGCTGGCCAGGCAAGGAAAGCTGACAGCGCACGCGCCCGGCG
 A E S A E R A E D I D L E R A R K A K E R A E Q R L A Q A K E K L D S A R A Q A

4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950
 GCCCTGCAACCGCATGCGCGCGCATGAGGCTAGCGCGCGCGCATAGCGCACCGCGTCAAGAGGACATGCGGAGCGCGCGCA
 A L Q R A H A R H R V R G A A *

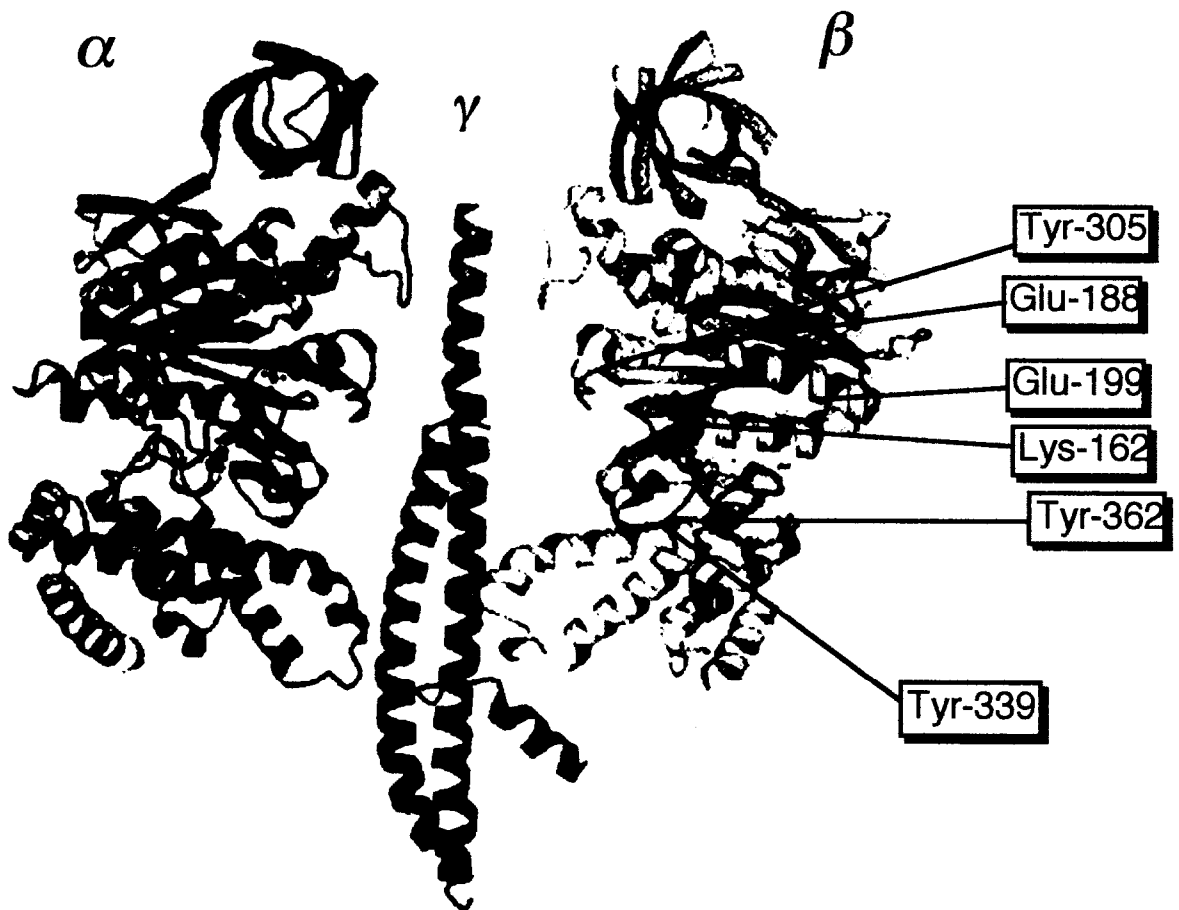
Fig. 2-3 continued

Table 2-3 The amino acid sequence homologies between the *DvMF atp* genes and those of other bacteria.

Gene	Sub-unit	Size (aa)	% identity (% similarity)					
			Aquif	Moor	E.coli	PS3	B.stear	Prop
<i>atpA</i>	α	488	65 (81)	64 (80)	54 (70)	64 (82)	64 (82)	63 (82)
<i>atpD</i>	β	471 ^a	64 (77)	72 (83)	68 (79)	70 (83)	68 (80)	68 (78)
<i>atpG</i>	γ	294 ^a	38 (63)	42 (61)	40 (65)	44 (65)	45 (66)	41 (65)
<i>atpH</i>	δ	172	24 (44)	28 (54)	31 (61)	22 (48)	24 (50)	28 (54)
<i>atpC</i>	ϵ	134	34 (51)	46 (68)	38 (61)	46 (63)	46 (63)	37 (59)

References: *Aquifex aeolicus* (Aquif), (35); *Moorella thermoacetica* (Moor), (33); *Escherichia coli* (E.coli), (36); thermophilic bacterium PS3 (PS3), (23); *Bacillus stearothermophilus* (B.stear), (Accession No. D38060 in the GenBank database); *Propionigenium modestum* (Prop), (Accession No. X58461 in the EMBL database).

a) The initial methionine is removed in the gene products.



Molecular weight of the β subunit : 52,000

Fig. 2-5 Crystallographic structure of Bovine F₁-ATPase α , β , γ subunits²⁾

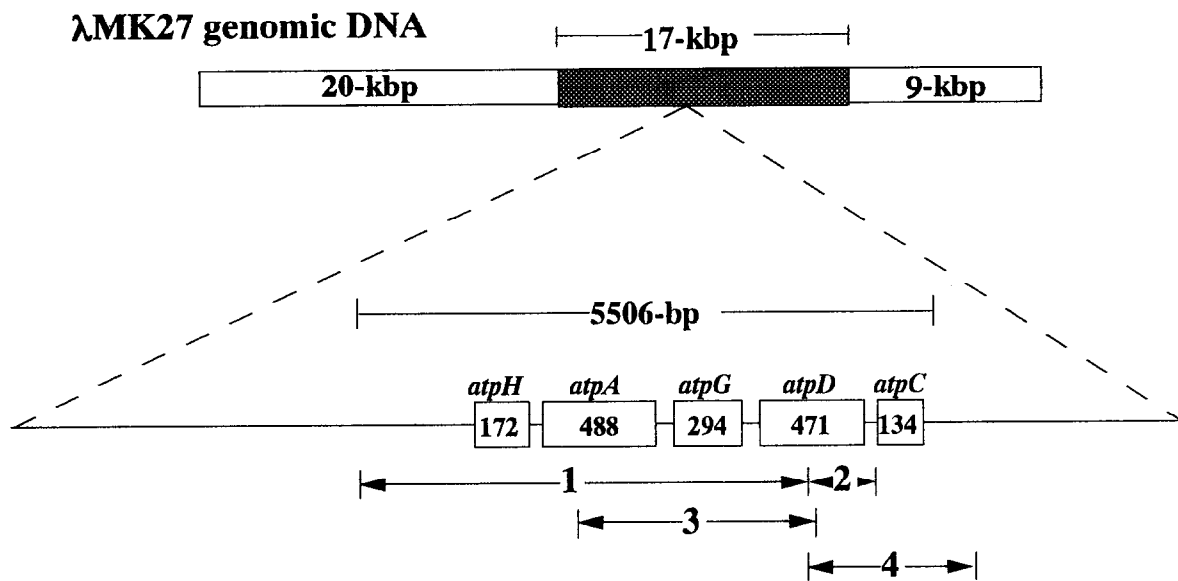


Fig. 2-6 The organization of *atp* genes of *DvMF*

ORFs are represented by boxes. The numbers in *atpH* -*atpC* boxes indicate those of the amino acid residues. The horizontal arrows with numbers indicate the fragments used in various subclones designated as pMK1, pMK2, pMK3, and pMK4, respectively (see Table 2-2). The shaded box of λ MK27 genomic DNA indicates the cloned 17-kbp fragment.

Table 2-4 Purification of *Dv*MF F₁-ATPase

Purification steps	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Total activity* ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Cytoplasmic membranes	0.067	48.6
Chloroform treatment	1.04	17.1
MonoQ	2.66	11.7
Phenyl sepharose	6.56	5.37

* ; per 100g of *Dv*MF wet cells

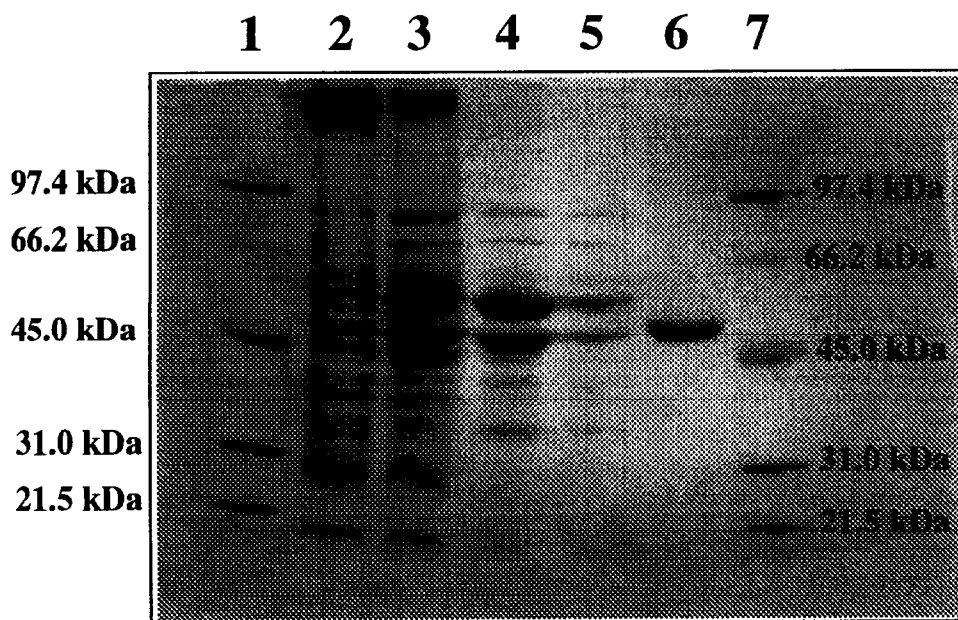


Fig. 2-7 12% SDS-PAGE analysis of the relevant fraction at each purification step

The fractions with ATPase activity were analyzed by 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. The molecular weight marker in the lanes 1 and 7 is composed of phosphorylase *b* (97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), and soybean trypsin inhibitor (21,500). Lane 2, the cytoplasmic membrane fraction; lane 3, the supernatant after chloroform treatment; lane 4, after MonoQ elution; lane 5, after phenyl sepharose elution; lane 6, β subunit purified from a thermophilic bacterium PS 3.

Sequence Position: 1 - 4068

Translation Position: 782 - 1897; 2485 - 3492; 3543 - 4061;
4066 - 4068;

Genetic Code : Universal Code

```

      10      20      30      40      50      60
CGGCATGCGCCTGACCGTCAACGACGACCGGGGCACCGCCAAGGTGCTGCGCCGTTTCGGA
      70      80      90     100     110     120
TGCCGTCATGGGCGGCAAGACCGGCACCGCGCAGGTCACCAAGCTGAAGATGGTGGGCGA
     130     140     150     160     170     180
AGAGCGCGTGCGCACGGAAAATCTGGCCTACGAGCACCGCGACCACGCCTGGATCGCCAC
     190     200     210     220     230     240
ATGGGGCGAAAAGGCGGGCAAGCGGCTGGTGGTGGTGGTTCATGGTGGAGCACGGCGGGCA
     250     260     270     280     290     300
CGGCGGTTCCGACGCAGGCCCCGTGGCGCGTCGGGTGTTTCGACAAGTTTTTCGGCGCTCC
     310     320     330     340     350     360
GCCCGGTACGGCAACTGCCCGCCCCGCAGGGCAGGTCGAGCCGGCCAGCCCAGTCAGCCC
     370     380     390     400     410     420
GACTGCCCCGGCGCAGCCGTCGCAATCAGCCCCAGCCATGCCAGTCTCGCCAGTCACGCC
     430     440     450     460     470     480
CGGCACCCGCCCCGGCTGCCCCGGCCACGCCGCCCGTCCGACCCGGCCAGGCGGCAGGCCG
     490     500     510     520     530     540
GCCCGAACGGCATGAACAGCGTGACCAGCAGGATTCGCAGGACCGGCAGGATCAACTGGA
     550     560     570     580     590     600
CCGGCAGGACGAAGGGCTGCGCACCGTGCCCACGGGCCGTTTCGGCGCGTCCCGCAGGGCG
     610     620     630     640     650     660
TGACCGCGCGACGGGCAGGGGGGCGGAGCACCCCGAAGTCGAGGACGCGCGCGGAGGGCC
     670     680     690     700     710     720
AGCACCGCTACGACCCCGACACCTTCGATCCCGACGCCGACACGCCTGACGGGCGGGGGG
     730     740     750     760     770     780
GCGACGACGGCGTGGTGGCCCCGCTGCGGGCGCTTCCAGAACGTGGCCCCGAGGACGGAC
Cell division protein
     790     800     810     820     830     840
AATGAGCCCCATCGACCGACGCCTGATCACCCACATGAACTGGGGCCTGGTGGGCTTCAC
  M S P I D R R L I T H M N W G L V G F T
     850     860     870     880     890     900
CGCGCTGCTGTTTCCTTTTCGGGGTGACCAACCTGTATTTCGGCCAGCGGCGTGCGCATGGA
  A L L F L F G V T N L Y S A S G V R M E

```

Fig. 2-9 The DNA sequence and the putative ORFs in front of δ subunit gene of *DvMF F₁-ATPase*

910 920 930 940 950 960
 AGACGGCATCGTGGTCTCCACGTTCTACCAGAAGCAGCTTCTGTGGGGGCTGATGGGGCT
 D G I V V S T F Y Q K Q L L W G L M G L

970 980 990 1000 1010 1020
 TGGCGGCATGGTCTTCTTCATGTTGTTCTCGACTACCGGCACATGAAAAGCCTGGCCCTGCC
 G G M V F F M L F D Y R H M K S L A L P

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GCTGTTTCATCGTCACCATGATCCTGCTGGCGGCCATTCCGGTGTTCGGCAAGGTGGTGTA
 L F I V T M I L L A A I P V F G K V V Y

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CGGCGCGCGGCGCTGGCGGCCGCTGGGCTTCATGAACCTGCAACCCAGCGAGGTGGCCAA
 G A R R W R P L G F M N L Q P S E V A K

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GATCGCCATCCTGATCATGGGTGCGCGCTTCTGTTCGCGCAGCCGCGAACCGCTGGGCTG
 I A I L I M G A R F L S R S R E P L G W

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GAAGGGGCTGTTTCGAGGTGCTGGCGCTGGGCGGCCTGCCCGCCGGGTTTCATCGTGATGCA
 K G L F E V L A L G G L P A G F I V M Q

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GCCGGACCTTGGCACCACGCTGCTGCTGCTGATGCTGCTGGGCGGCATAACCCTGTTCCA
 P D L G T T L L L L M L L G G I T L F H

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CGGGGTGAAGCCGGGCGTGCTGAAGACCTGCCTGGTGGTGGTGCCCTCCATGCTGCCGCT
 G V K P G V L K T C L V V V P S M L P L

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GCGTGGTTCGCTGCATGACTACCAGAAGCAGCGCATCATGACCTTCTCGACCCCGG
 A W F R L H D Y Q K Q R I M T F L D P G

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CAACGACCCGCTGGGGGCGGGGTACCACATCATCCAGTCGCAGATCGCCATCGGCTCGGG
 N D P L G A G Y H I I Q S Q I A I G S G

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 CCAGCTGTGGGGCAAGGGCTTCTGGGGGGCACGCAAAGCCAGTTGCGTTTTCTGCCGGA
 Q L W G K G F L G G T Q S Q L R F L P E

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 AAAGCACACCGACTTCGCCCTGGCCGTGTTTCGGCGAGGAATGGGGCTTCATCGGGTGCGI
 K H T D F A L A V F G E E W G F I G C V

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GTTGCTGGTGGTGTGTTCTGTCTGTTCTGCTGAGCATCTTCAACACCGCGCGGACGC
 L L V V L F C L F L L S I F N T A R D A

Fig. 2-9 continued

1690 1700 1710 1720 1730 1740
CAAGGACCGCTTCGGCAGTTACCTGACGGTGGGGGTGTTCTTCTATTTCTTCTGGCAGAT
K D R F G S Y L T V G V F F Y F F W Q I

1750 1760 1770 1780 1790 1800
ACTGATCAACATGGGCATGGTCATGGGGCTCATGCCGGTGGTGGGGGTGCCATTGCCCTT
L I N M G M V M G L M P V V G V P L P F

1810 1820 1830 1840 1850 1860
CATCAGCTACGGCGGCAGCGCAACCCTGGTCAATTTTCAGCCTGATTGGGATCGTGCTCAA
I S Y G G S A T L V N F S L I G I V L N

1870 1880 1890 1900 1910 1920
TGCTCCATGCGGCGATTTCATGTTCAAGACCTCGTGATTGCTGAAACTACCAAGCACGAC
V S M R R F M F K T S *

1930 1940 1950 1960 1970 1980
AGCGTTGCACTTTCGCTCACAAAGGAGGCGACACACACGGCAAGGGACGAGATAAACGCC

1990 2000 2010 2020 2030 2040
TTCTCGGCGGGCACCGTATAACCAGGGCCAGCTGAGCTTTCAGGGCGCGGTGCGCATA

2050 2060 2070 2080 2090 2100
GACGGCAACTTCGTGGGCGAGGTGCATTCCGAGGGCACGCTCATCGTGGGCAAGGACGCC

2110 2120 2130 2140 2150 2160
AACGTGGAGGGGCTGGTGC GCGTGGGCCAGCTGATCCTGTGCGGGCCGGGTACCCGGAGAG

2170 2180 2190 2200 2210 2220
GTGGCCGCCAGCGCAAGGTGATCCTGCACCGCACCGGCAACCTGAATGGCAATCTTTCC

2230 2240 2250 2260 2270 2280
ACCCCGGTGCTGGTGTGGAAGAGGGCGCCGTCATCGAGGGGCGCATCACCATGCAGCCC

2290 2300 2310 2320 2330 2340
GCGGAAAAGACGGAATAAACCCCTGCCGTTACATGCCTTTTTTTGGCCGCCTTCGGGCGG

2350 2360 2370 2380 2390 2400
CTTTTTTCATTTGTGCCGGAATGACGGCGGGTGGCTTCCAGAAGACTGTTTGAAAGGAA

2410 **-35** 2420 2430 **-10** 2440 2450 2460
AAAAGACT**TTGACA**CCCCCGTGGTAATCAGCT**TAAATC**TACCCGACTTTGAGCTTAAATT

b subunit

2470 2480 2490 2500 2510 2520
CACAACCTACCAAGGGAGCAGGCATGATCGATCTGAACATCACCTTCTTCTTCCAGTTG
M I D L N I T F F F Q L

2530 2540 2550 2560 2570 2580
GTGAACTTCTTGTGACGCTGGTTGTCCTGAATGCCATCCTCATCCGGCCGGTGC GGGAT
V N F L V T L V V L N A I L I R P V R D

2590 2600 2610 2620 2630 2640
ATCATCAGACAGCGGCGTGACAAGATGTCCGGTCTTCTCGGCGAATCGGAGCAGTTCGCC
I I R Q R R D K M S G L L G E S E Q F A

Fig. 2-9 continued

The doubly lines show a putative promoter region.

2650 2660 2670 2680 2690 2700
 GGCCAGGCCGACACCAAGCTGAAGAATTACGAGGCCACCCTTGTCAAGGCCCGCGCCGAA
 G Q A D T K L K N Y E A T L V K A R A E

2710 2720 2730 2740 2750 2760
 GCCACGGCCGAGCGCGACAAGGCCCGTGCCGAGGGCGTGGCCCGGGAGCAGGTGATCCTG
 A T A E R D K A R A E G V A R E Q V I L

2770 2780 2790 2800 2810 2820
 GCCGACGCCGGCAGGCAGGCCAGGACTACCTCGAAAAGTCTCGCCAGGAGGTGGCCGCG
 A D A G R Q A Q D Y L E K S R Q E V A A

2830 2840 2850 2860 2870 2880
 CAGGTGAAGACCGCCATGGATAACCCTGAAGGGCAGGTCGACGCTTGCCCGCCAAGGCTA
 Q V K T A M D T L K G Q V D A C P P R L

2890 2900 2910 2920 2930 2940
 CCGCCAAGGTGCTGGGCTAAGACTCCACGTCAAGTGCGCACCAGCAAGGAGGGATCGGCG
 P P R C W A K T P R Q V R T S K E G S A

2950 2960 2970 2980 2990 3000
 TTGAAAGGGCTGAAACACAGTGCAGCGGCGCTCGGACTGGTGCTTGTACCGCCGGCGTG
 L K G L K H S A A A L G L V L V T A G V

3010 3020 3030 3040 3050 3060
 GCGTGGCTCCGAAGGCGGGGGCGAGCATCATGCCGACTGGGGCAACTTCGCCTTCCGT
 A L A S E G G G E H H A D W G N F A F R

3070 3080 3090 3100 3110 3120
 GTCGCAACTTCGTTCATCTTCATCGGCATCATCTACTGGGCCGCGGGCAAGAAGATTGTG
 V A N F V I F I G I I Y W A A G K K I V

3130 3140 3150 3160 3170 3180
 GGCTTCTTCTCCGGGCGCAGGAAGGGCATCGAGCAGGAGCTGAACGACCTTGAAAGCCGC
 G F F S G R R K G I E Q E L N D L E S R

3190 3200 3210 3220 3230 3240
 AAGCCGAGGCCGCAAGAACCTGGCCGATGTGGAGCGCCGCATAGCCAACCTTGAGCAG
 K A E A A K N L A D V E R R I A N L E Q

3250 3260 3270 3280 3290 3300
 GAACGGCAGTCCATTCTCGCCGAATACCGTGCCAGGGCGAAGCCATGGCAGGCCGCCAI
 E R Q S I L A E Y R A Q G E A M A G R H

3310 3320 3330 3340 3350 3360
 CATCGAGAAGGCGGAAAAGACCGCCTCCAGATCACCGAGCAGGCCGCGCGCACGGCCGA
 H R E G G K D R L P D H R A G R A H G R

3370 3380 3390 3400 3410 3420
 GGAACGAGATCAAGCAGGCCATGGAGACCATGCGCGCCGAGATGGCCGACAAGATCATTG
 G T R S S R P W R P C A P R W P T R S L

3430 3440 3450 3460 3470 3480
 CCGCCCGGAAAAGATGCTTCAGGAAAAGCTCACTGGTAAGGAGCACGAGAAGCTCATCG
 P P P K R C F R K S S L V R S T R S S S

Fig. 2-9 continued

3490 3500 3510 3520 3530 3540
 ACAAATACTTAACGAAGGTGGTGCTCAATTGACCGGCAACATCGTAGCTCGCAGATACGC
 T N T *

δ subunit 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 CCGTGCGCTTTTTGCGCTGGGCGCGAAATCGGGCCGTCGGTGAGCTCGATAAGCTCGGCA
 M R F L R W A R N R A V G E L D K L G S

3610 3620 3630 3640 3650 3660
 GCGACCTTGCCGCGCTTGCCGGGGCTCTCGACGCGGCGCCCGAACTTGGCCGCATCTTCC
 D L A A L A G A L D A A P E L G R I F R

3670 3680 3690 3700 3710 3720
 GCAATCCCATCATCACCGCCGGTGAGAAGCGGAACGTCATCCTCAAACCTGGTTCGAGAAGT
 N P I I T A G E K R N V I L K L V E K Y

3730 3740 3750 3760 3770 3780
 ACGGCGTCAGCGCCACCGTCCGCAATTTCTGTCTGCTGCTGGCGGACAAGGGGCGTCTCG
 G V S A T V R N F C L L L A D K G R L D

3790 3800 3810 3820 3830 3840
 ACTGCCTTTCGACATACAGGCCTTCTACGGCGTTCTCCTCGACGCCGAAAAGGGCGTCA
 C L S D I Q A F Y G V L L D A E K G V I

3850 3860 3870 3880 3890 3900
 TCCGCGGCGAGCTGATGACGGCCGTTGAACTTGCGGAAGCAAAGCGCGCACAGGTCAAGG
 R G E L M T A V E L A E A K R A Q V K A

3910 3920 3930 3940 3950 3960
 CGGCTCTTGAACAGCAGGCCGGACGCAAGCTGGAACCTCACCTTCAGCGTGAACAAGGACA
 A L E Q Q A G R K L E L T F S V N K D I

3970 3980 3990 4000 4010 4020
 TCCTTGGCGGCGTCGTGCTGAAGGTCGGCGACCGGGTGCTGGATGCCAGTCTGCGCGCGC
 L G G V V L K V G D R V L D A S L R A Q

4030 4040 4050 4060 4070 **α subunit**
 AGTTAGGTATCCTCAAAGACAACATCAAGAGGGGTGAGTAGGGCTATG
 L G I L K D N I K R G E * M

Fig. 2-9 continued

参考文献

1. 吉田賢右, 生化学, 第 61 卷, 第 7 号: 588-591 (1989)
2. **Abrahams, J. P., A. G. W. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker.** (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*, **370**: 621-628.
3. **Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinoshita.** (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **389**: 299-302
4. **Dimroth, P.** (1997) Primary sodium ion translocating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**: 11-51.
5. **Rahlfs, S., S. Aufferth, and V. Müller.** (1999) The Na⁺-F₁F₀-ATPase operon from *Acetobacterium woodii*. *J. Biol. Chem.* **274**: 33999-34004.
6. **Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. Farrow.** (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 812-826
7. **Hugenholtz, J. and L. G. Ljungdahl.** (1990) Metabolism and energy generation in homoacetogenic clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 383-390.
8. **Sumi, M., M. Yohda, Y. Koga, M. Yoshida.** (1997) FoF₁-ATPase genes from an archaeobacterium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 427-433.
9. **Peck, Jr, H. D. and J. LeGall.** (1994) *Methods in Enzymology.* **243**: Academic Press, Inc., San Diego.
10. **Barton, L. L., J. LeGall, J. M. Odom, and H. D. Peck, Jr.** (1983) Energy coupling to nitrite respiration in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* **153**: 867-871.
11. **Kobayashi, K., Y. Morisawa, T. Ishitsuka, M. Ishimoto.** (1975) Biochemical studies on Sulfate-Reducing Bacteria. *J. Biochem.* **78**: 1079-1085.

12. **Odom, J. M. and R. Singleton, Jr.** (1993) The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives. Springer-Verlag, New York
13. **Odom, J. M. and H. D. Peck, Jr.** (1981) Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **12**: 47-50.
14. **Kobayashi, K., H. Hasegawa, M. Takagi, M. Ishimoto.** (1982) Proton Translocation Associated with Sulfate Reduction in a Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfovibrio vulgaris*. *FEBS lett.* **142**: 235-237.
15. **Postgate, J. R.** (1984) The Sulfate-reducing Bacteria, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge
16. **Murray, M. G. and W. F. Thompson.** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* **8**: 4321-4325.
17. **Frishauf, A.-M., H. Lehrach, A. Poustka, and N. Murray.** (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842.
18. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5363-5367.
19. **Ozawa, K., T. Mogi, M. Suzuki, M. Kitamura, T. Nakaya, Y. Anraku, and H. Akutsu.** (1997) Membrane-bound cytochromes in a sulfate-reducing strict anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Anaerobe* **3**: 339-346.
20. **Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
21. **Tozawa, K., M. Odaka, T. Date, M. Yoshida.** (1992) Molecular Dissection of the β Subunit of F₁-ATPase into Peptide Fragments. *J. Biol. Chem.* **267**: 16484-16490.
22. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

23. **Ohta, S., M. Yoshida, M. Ishizuka, H. Hirata, T. Hamamoto, Y. Otawara-Hamamoto, K. Matsuda, and Y. Kagawa.** (1988) Sequence and over-expression of subunit of adenosine triphosphate synthase in thermophilic bacterium PS3. *Biochem. Biophys. Acta* **933**: 141-155.
24. **Walker, J. E., I. M. Fearnley, R. Lutter, R. J. Todd, and M. J. Runswick.** (1990) Structural aspects of proton-pumping ATPases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **326**: 367-378.
25. **Kitamura, M., K. Ozawa, S. Kojima, I. Kumagai, H. Akutsu, and K. Miura.** (1993) The primary structure of pre-cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) as determined by nucleotide sequencing of its gene and partial amino acid sequencing. *Protein Seq. Data Anal.* **5**: 193-196.
26. **Kitamura, M., S. Kojima, K. Ogasawara, T. Nakaya, T. Sagara, K. Niki, H. Akutsu, and I. Kumagai.** (1994) Novel FMN-binding protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F). Cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 5566-5573.
27. **Deckers, H. M., F. R. Wilson, and G. Voordouw.** (1990) Cloning and sequencing of a [NiFe]hydrogenase operon from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J. General Microbiol.* **136**: 2021-2028.
28. **Kitamura, M., K. Mizugai, M. Taniguchi, H. Akutsu, I. Kumagai, and T. Nakaya.** (1995) A gene encoding a cytochrome *c* oxidase-like protein is located closely to the cytochrome *c*-553 gene in the anaerobic bacterium, *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F). *Microbiol. Immunol.* **39**: 75-80.
29. **Badiziong, W., R. K. Thauer, and J. G. Zeikus.** (1978) Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. *Arch. Microbiol.* **116**: 41-49.
30. **Dimroth, P.** (1994) Bacterial sodium ion-coupled energetics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 381-395.

31. **Thauer, R. K., K. Jungermann, and K. Decker.** (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**: 100-180.
32. **Das, A., D. M. Ivey, and L. G. Ljungdahl.** (1997) Purification and reconstitution into proteoliposomes of the F_1F_0 -ATP synthase from the obligately anaerobic Gram-positive bacterium *Clostridium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **179**: 1714-1720.
33. **Das, A. and L. G. Ljungdahl.** (1997) Composition and primary structure of the F_1F_0 -ATP synthase from the obligately anaerobic bacterium *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **179**: 3746-3755.
34. **Vieira, J. and J. Messing.** (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**: 3-11.
35. **Deckert, G., P. V. Warren, T. Gaasterland, W. G. Young, A. L. Lenox, D. E. Graham, R. Overbeek, M. A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R. A. Feldman, J. M. Short, G. J. Olsen, and R. V. Swanson.** (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature.* **392**: 353-358.
36. **Walker, J. E., N. J. Gay, M. Saraste, and A. N. Eberle.** (1984) DNA sequence around the *Escherichia coli* unc operon. *Biochem. J.* **224**: 799-815.
37. **Elston, T., H. Wang, and G. Oster.** (1998) Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, **391**: 510-513.

第 3 章

末端酸化酵素

要 旨

偏性嫌気性細菌である硫酸還元菌宮崎株の遺伝子の中に、酸素呼吸生物のミトコンドリア内膜に存在するシトクロム *c* 酸化酵素のサブユニット I と極めて相同性の高い読み枠が発見された。そこでわれわれは、実際に硫酸還元菌の中に末端酸化酵素が発現して機能しているのかどうかを調べるため、硫酸還元菌の細胞膜小胞を調製し、その中のシトクロム分析を行った。末端酸化酵素類は、その活性中心として aa_3 , bo , bd , cbb_3 型などのヘムを持っていることが知られている。77K の極低温酸化還元スペクトル測定や、CO 結合差スペクトル、CN 結合スペクトル測定等の分光学的方法を用い、シトクロム類の同定を試みた。硫酸還元菌の細胞膜小胞には、主に *b* 型と *c* 型のシトクロムの存在が同定されたが、その中に CO や CN を結合する 5 配位のシトクロム (シトクロム *o*) が存在していることが明らかになった。しかしながら、塩酸アセトンにより抽出したヘム (ヘム *c* はこの方法では抽出されない) を HPLC により分析した結果、ヘム *o* およびヘム *a* は存在していないことが分かった。次に細胞膜小胞についてさまざまな好氣的、嫌氣的呼吸鎖を構成すると考えられる酵素活性を調べたところ、好氣的呼吸鎖に存在すると考えられているユビキノール酸化酵素活性を持つことを発見した。この酵素活性を指標にして部分精製を行ったところ、その比活性が上昇したことから、硫酸還元菌の細胞膜にはキノール酸化酵素が存在していると結論した。キノール酸化酵素が存在していることがわかったので、この酵素のサブユニット I が、硫酸還元菌宮崎株の遺伝子中に見つかった読み枠からの遺伝子産物 (COLP) ではないかと考え、この遺伝子の mRNA の検出を試みた。放射性同位元素標識した DNA プローブを作り、ノーザンブロットィング法により mRNA の存在を調べたところ、全く存在しなかった。我々の通常の培養条件のもとでは COLP の遺伝子は発現していないと結論できる。したがって、硫酸還元菌の膜に存在するキノール酸化酵素とこの読み枠の遺伝子産物 (COLP) とは全く別のものであると結論した。以上の結果より、偏性嫌気性細菌である硫酸還元菌には、キノール酸化酵素が存在し、末端酸化酵素として働いている可能性が強いと結論した。

3-1 緒言

(1) 酸素呼吸生物における末端酸化酵素

生体における酸素を利用したエネルギー獲得系の中でも最も重要な位置を占めるのが、シトクロム *c* 酸化酵素¹⁾ である。これは、ミトコンドリアの電子伝達系の末端酸化酵素で、2分子のヘム *a* と2原子の銅 (Cu_A , Cu_B と呼ばれている) を持ち、ミトコンドリアの内膜に存在する膜タンパク質である。この酵素は、1分子の酸素を還元して2分子の水を生成する機能と、そして酸素の還元に伴い、プロトンを内膜の内から外に輸送するプロトンポンプの機能を併せ持つ。このプロトン輸送の結果生じた膜内外でのプロトン濃度勾配を利用して生体エネルギーの源である ATP が合成される。われわれの体に取り込まれた酸素のほぼ 90% がこのシトクロム *c* 酸化酵素によって水に還元されることからこの酵素の重要性がうかがえる。

近年、種々の好気性細菌から酸素を水に還元する機能と酸素還元に共役したプロトンポンプの機能を併せ持つ酸化酵素が単離され、その性質が明らかにされた。その結果、それらは、ほ乳類や酵母などの真核生物のシトクロム *c* 酸化酵素をも含んだヘム-銅・酸化酵素スーパーファミリーを形成することがわかった²⁾。このファミリー内には、基質の違い (シトクロム *c*, ユビキノール)、あるいは活性中心のヘムの違い (ヘム *a*, ヘム *o* 等) など多様性が認められる。しかし、このファミリーの特徴は、それぞれの酵素の中で、一番大きなサブユニット (サブユニット I) の相同性が高いことであり、例えばウシと大腸菌とを比較すると、ほぼ 40% のアミノ酸残基が同一である。そして、ヘム-銅 (Cu_B) の2核の金属中心を持ち、このヘム部分に酸素が結合して4電子還元される。この2核の金属中心を構成するヘムとして、ヘム *a* とヘム *o* が知られ、両者は共に、ファルネシル基を持つヘムである。細菌の酵素の研究からサブユニット I がこの酵素の持つ二つの機能を担うことが明らかになっている。そしてこのサブユニットには、ヘム-銅の金属中心と、それと約 15Å 離れた部位にもう1分子のヘムが結合している。このヘムとして、ヘム *a* あるいはプロトヘム IX を持つ

ものが単離されており、それぞれヘム-銅金属中心に電子を伝達する役割を持つ。

ウシシトクロム *c* 酸化酵素は、13 個のサブユニットからなり、その中で、サブユニット I, II, III はミトコンドリアの DNA に、残りは核の DNA にそれぞれコードされる。サブユニット II には銅原子 (Cu_A) が結合しており、そしてまた基質 (シトクロム *c*) の結合部位であると示唆されている。したがって、銅、そしてヘムを通じて電子が酸素還元部位のヘム-銅金属中心に伝達されるという電子の流れが推定される。

近年、そのシトクロム *c* 酸化酵素の X-線結晶構造が明らかになり^{3,4)}、より詳細な反応メカニズムの解析が可能となった。

(2)ヘム・銅末端酸化酵素における金属中心の起源と機能進化⁵⁾

大腸菌シトクロム *bo* 複合体は、*cyoABCDE* オペロンによってコードされ、各読み枠は、サブユニット II, I, III, IV, ヘム *o* 合成酵素の構造遺伝子として働いている。ヘム・銅末端酸化酵素に属する大腸菌 *bo* 型キノール酸化酵素は、オペロン構造などの点で、酢酸菌 *ba* 型や枯草菌 *aa₃* 型のキノール酸化酵素、*Bacillus* や *Thermus thermophilus* の *caa₃* 型シトクロム *c* 酸化酵素とともに、クラス 1 酵素に細分類することができる (Fig. 3-1)。クラス 1 酵素では、サブユニット遺伝子が II-I-III (-IV) の順に配置され、また、大腸菌 *cyo* オペロンや *Bacillus* の *caa₃* 型酵素オペロンでは、サブユニット遺伝子群の前後にヘム *o* 合成酵素遺伝子 (ie., *cyoE*, *ctaB*) を備えている。一方、ミトコンドリア型のクラス 2 酵素に属する *P. denitrificans* や *Rhodobacter sphaeroides* の *aa₃* 型シトクロム *c* 酸化酵素は、サブユニット I 遺伝子とサブユニット II (CtaC)/III (CtaE) オペロン (*ctaCB-ORF2-ctaGE*) の 2 つの独立した遺伝子座によってコードされている (Fig. 3-1)。

1994 年、Saraste と Castresana によって、*aa₃* 型シトクロム *c* 酸化酵素の金属中心は、嫌気条件下で機能する脱窒作用の酵素系に由来するという興味深い仮説が提唱された⁶⁾ (Fig. 3-2)。サブユニット II の Cu_A ドメインは、脱窒菌の N_2O (亜酸化窒素) 還元酵素 (*nosZ* 遺伝子産物) のパープル銅部位と、一次構造

および分光学的性質が類似している。一方、低スピンヘムとヘム・銅複核中心を結合するサブユニット I は、シトクロム *cb* 型 NO (酸化窒素) 還元酵素 (*norAB* 遺伝子産物) のシトクロム *b* と約 20% の相同性を持つ。NorA タンパク質は、疎水性領域を一つ持つ膜結合性シトクロム *c* で、一方、12 個の膜貫通領域を持つ NorB タンパク質 (シトクロム *b*) にはヘム・銅末端酸化酵素で金属中心配位子として働くヒスチジン残基が完全に保存されている。NorB タンパク質と Cu_A (パープル銅) ドメインを親水性領域に持つ膜結合性サブユニットから、シトクロム *c* 酸化酵素の触媒活性に必要なシトクロム *c* 酸化酵素複合体の骨格を作り上げることができる。

さて、根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* は、自由生活時には、*aa*₃ 型シトクロム *c* 酸化酵素を末端酸化酵素として用いて酸素呼吸を行っている。Hennecke 等は根粒菌がマメ科植物の根粒中で、バクテロイドとして極低酸素分圧下 (10-30 nM) で呼吸する際には、*cbb*₃ 型シトクロム *c* 酸化酵素 (*fixNOQP* 遺伝子産物) が共生に特異的な末端酸化酵素として用いられることを明らかにした。一方、Gennis と Daldal 等は、紅色非硫黄細菌 (*Rb. Sphaeroides*, *Rb. capsulatus*) から根粒菌の Fix 酸化酵素と類似した *cbb*₃ 型シトクロム *c* 酸化酵素を精製した。そして、これらの酵素はヘム *bb* 型でヘム・銅複核中心を持つ、サブユニット I、シトクロム *c* ドメインを持つ 2 種類の膜結合性サブユニットから構成され、*aa*₃ 型シトクロム *c* 酸化酵素と同程度の分子活性を持つことを明らかにした。シトクロム *c* 酸化酵素が NO 還元活性を持つことを考慮すると、脱窒菌のシトクロム *cb* 型 NO 還元酵素から派生した極低酸素分圧下で機能する *cbb*₃ 型シトクロム *c* 酸化酵素 (クラス 3 酵素) を祖先型として *aa*₃ 型シトクロム *c* 酸化酵素は進化・発展してきたと考えられる。膜結合性シトクロム *c* に依存する電子取り込み系を Cu_A (パープル銅) ドメインを持つサブユニット II によって代替することにより、ペリプラズム空間でシトクロム *c* によって媒介される複合体間電子移動系が獲得され、また、ヘム *bb* 型酵素からファルネシル基を持つヘム *a* が導入されたヘム *aa* 型酵素への変換によって、好氣的増殖条件下での分子状酸素の還元に適応していったのではないだろうか。

染色体からシトクロム c や bc_1 複合体遺伝子を欠失した細菌では、サブユニット II から Cu_A ドメインの機能的役割が失われる一方で、他の領域にキノール酸化活性ドメインが獲得され、新たな分子機能を発揮する末端酸化酵素 (キノール酸化酵素) を持つ呼吸鎖が発達し (例、酢酸菌のシトクロム a_1 (ba 型キノール酸化酵素))、さらに、染色体からヘム a 合成酵素遺伝子を失うことなどにより bo 型キノール酸化酵素 (シトクロム o : 大腸菌、*Gluconobacter suboxydans*、*Vibrio arginolyticus*、*Rhodospirillum rubrum*) が生まれ、末端酸化酵素の多様化が進行したと考えられる。酢酸菌 ba 型キノール酸化酵素はヘム o も酸素還元部位に結合できるので、ヘム・銅末端酸化酵素は、一般的に高スピンヘム結合部位にヘム a を結合する能力・活性を持っている可能性がある。

(3) 硫酸還元菌に末端酸化酵素は存在するか？

1995 年、北村らは、硫酸還元菌 *D. vulgaris* Miyazaki F 株のシトクロム c_{553} 遺伝子をクローニングした際に、その 3' 末端 (正確には、その間に 2 つの未同定の読み枠も存在していた) に種々の好気性生物に見られるシトクロム c 酸化酵素のサブユニット I と非常に相同性の高い 541 アミノ酸残基の読み枠が存在することを発見した⁷⁾。北村らは、その *col* 遺伝子より推定されるタンパク質をシトクロム c 酸化酵素様タンパク質 (cytochrome c oxidase-like protein) ということで、COLP と命名した。そのアミノ酸配列による相同性を他の生物由来のものと比較すると、一般的なシトクロム c 酸化酵素に含まれる構造的な特徴が保存されていた。すなわちヘム a および、銅イオンに配位するヒスチジン残基が 6 個完全に保存され、また、12 個の膜貫通領域も持っていた。これまでに単離された 12 個のシトクロム c 酸化酵素 (Fig. 3-3) のうち、そのアミノ酸配列と COLP のそれが共通であったのは、541 アミノ酸残基中、先ほどの 6 個のヒスチジン残基を含む 130 アミノ酸残基にのぼる。さらに、12 個のシトクロム c 酸化酵素のうち 9 個以上のシトクロム c 酸化酵素のアミノ酸配列と COLP のそれが一致していたものを加えると 202 アミノ酸残基となり、全体の 37% にまでのぼる。しかし、一方で、12 個のシトクロム c 酸化酵素のアミノ酸に共通に

存在するにもかかわらず、COLP において異なったアミノ酸であったものは、59 残基と 11% にまでのぼった。一般に酵素群の多様性は、膜から外に出ている領域にあると言われているが、COLP の場合、膜中の領域にも一致しないアミノ酸残基が存在している。

D. vulgaris 内における *col* 遺伝子の存在は、大変興味深い疑問を投げかけている。硫酸還元をする編性嫌気性細菌において、末端酸化酵素様タンパク質が、本当に存在しているのか？もし存在するとすればその役割は何なのか？そのようなタンパク質の同定をすることは、エネルギー伝達のメカニズムにおいてだけでなく、末端酸化酵素の分子進化においても新しい光をあてることになるだろう。これらの疑問に答えるために、本研究では、*D. vulgaris* Miyazaki F の細胞膜結合性シトクロムを解析することにした。

3-2 実験方法

(1) 細胞膜小胞の調製

培地の調製、および使用においては、Postgate によって報告されたものを基本とし、厳格に嫌気的な条件下で遂行した⁸⁾ (Table 3-1)。まず、180 L のファーマンター (Marubishi Co., Ltd., Tokyo) を用いて、*D. vulgaris* Miyazaki F の 150 L 培養を嫌気的に行った。この際、その培地には、新鮮な前培養液 30 L を接種し、培養中は、培地に絶えず窒素ガスの通気を行いながら、37℃で pH7.3 に保った。その後、20 時間培養を行ったところで定常期に達したので、その培養菌体を、7,000 x g で遠心することによって集菌した。50 mM Tris-HCl (pH7.4) で一度菌体を洗浄した後、10 µg/ml デオキシリボヌクレアーゼ I と 1 mM PMSF を含む 2 倍量の同じ緩衝液に再懸濁した。その菌体液を、Branson Model 250 sonifier を使って、30 分間 (43 ワット, 1 秒おき, 5 分 x 6 回) 4℃で、完全に超音波破碎し、その破碎溶液を、23,000 x g で 20 分間遠心した。得られた沈殿に、等量の 50 mM Tris-HCl (pH7.4)-3 mM EDTA 緩衝液を加え、テフロン製のホモジナイザーを使って再懸濁した(Fig. 3-4)。その懸濁液を、7,000 x g で 15 分間遠心し、未破壊菌や、硫化鉄沈殿を取り除いた。沈殿を、等量の 50 mM Tris-HCl

(pH7.4)-3 mM EDTA 緩衝液で、2度洗浄した後、140,000 x g で1時間遠心することで粗膜画分を回収した。10 mM Tris-HCl (pH7.4)-3 mM EDTA 緩衝液 (buffer A) に懸濁した後、44% (w/w) ショ糖を含む buffer A 中で、16時間 140,000 x g で遠心した [44% (w/w) ショ糖密度勾配遠心法]⁹⁾。3倍量の buffer A で希釈した後、細胞膜小胞画分を、超遠心によって、ペレット状にした。そのペレットは、10% (w/v) ショ糖を含む buffer A で約 15 mg/ml のタンパク質濃度に再懸濁した。これらの操作はすべて、4℃で実行し、タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準として、BCA タンパク質測定試薬 (Pierce) によって決定した。

(2) シトクロム分析

0.5 mm の光路長に調整した島津 UV-3000 二波長分光計を用いて、ジチオナイト還元スペクトルから空気酸化スペクトルを差し引いた差スペクトルの測定を 77 K で行った¹⁰⁾。また、10 mm の光路長に調整した UV-3000 を用いて CO-結合差スペクトルを室温で記録した。ヘム含量は、ヘム b とヘム c に対する差ミリモル吸光係数 $20.7 (\Delta \epsilon_{556.5-539.5})$ と $24.3 (\Delta \epsilon_{550-535})$ ¹¹⁾ を用いてピリジンフェロヘモクロモゲン法によって決定した。酸-アセトン可溶性ヘムは、Puresil ODS カラム (4.6 mm I.D. x 25 cm, Waters) を用いた逆相高分解能液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にかけた。ヘムは、70% エタノールと17% 酢酸と13% milliQ-水の混合溶液によって、0.5 ml/min の流速で溶出した。細胞膜タンパク質は、10% トリシン-ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Tricine SDS-PAGE)¹²⁾ によって分析し、ヘム c は、クマシーブリリアントブルー R250 染色の前に、*o*-dianisidine¹³⁾ によって可視化した。

(3) 膜結合性シトクロムの部分精製

まず細胞膜小胞を、50 mM Tris-HCl (pH7.4)-0.5% sucrose monolaurate (SM, 三菱化学食品), 1 mM PMSF (buffer B) で完全に溶解した。この溶液を、4℃で140,000 x g、1時間遠心した後、その上清を、buffer B で平衡化した DEAE-Toyopearl 650S カラム (15 mm I. D. x 5 cm, 東ソー) にかけた。吸着されたシト

クロムは、buffer B 中の NaCl 濃度を 0 から 0.5 M へと直線的に上げていくことで溶出した。また、DEAE-Toyopearl 650S カラムの素通り画分は、buffer B で平衡化した SP-Sepharose HP カラム (16 mm I. D. x 10 cm, ファルマシア) にか、buffer B 中の NaCl 濃度を 0 から 0.8 M まで直線的に上げていくことで分画した。

(4) 酵素測定

まず、シトクロム *c* 酸化酵素活性を、還元型シトクロム *c* の α -ピークである 550 nm の吸光度の減少を追うことで、分光学的に調べた。標準反応混合液には、0.5 mg/mL の膜タンパク質、10 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.1% SM を入れておき、生物種の種特異性をみるために、馬心筋、酵母、*Pseudomonas aeruginosa* (Sigma) からのシトクロム *c* についてそれぞれ活性測定を行った。還元型のシトクロム *c* を終濃度 50 μ M となるように添加することによってその反応を開始した。ユビキノール-1 (Q_1H_2) 酸化酵素活性は、ユビキノンの 275 nm の吸光度の増加を追うことで、分光学的に決定した¹⁴⁾。その反応混合液には、24 μ g/mL の膜タンパク質、10 mM リン酸ナトリウム (pH6.0)、0.1% SM を入れておき、 Q_1H_2 を終濃度 0.21 mM となるように添加することによって反応を開始した。コハク酸脱水素酵素活性は、電子受容体として phenazine methosulfate を用い、その還元型の 570 nm の吸光度の増加を追うことで、分光学的に決定した¹⁵⁾。その反応混合液には、15 μ g/mL の膜タンパク質、10 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.1% SM、0.1 mM PMSF、0.12 mg/ml phenazine methosulfate、そして 0.06 mg/ml 3-(4,5-dimethyl-thiazolyl-2) 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide を入れておき、コハク酸ナトリウムを終濃度 20 mM となるように添加することによって反応を開始した。亜硫酸還元酵素活性は、シリコン栓で密栓した 15 mL の試験管内において、針金によって下の反応液と接触しないように吊され、吸収液 [0.27 M Zn (AcO)₂, 0.12 M NaAcO, 0.86 mM NaCl] 0.05 mL で湿らせた紙片 (3 cm x 1 cm の短冊状) に吸収された硫化水素の量として定量した¹⁶⁾。試験管内の反応混合液には、0.22 mg/mL の膜タンパク質、40 mM リン酸ナトリウム (pH6.5)、1 mM メチルビオ

ロゲン、10 mM 亜硫酸ナトリウム、0.1% SM を入れておき、水素ガス通気を行うことによって、内在性のヒドロゲナーゼを使って反応を開始した。反応液中のメチルピオロゲンが青くなり、試験管を振ってもその色が消えなくなったら、水素通気をやめ、2 時間 25°C でインキュベートした。そして、試験管から濾紙を取り出し、1 mL の吸収液の入った試験管に投入し、200 μ L の発色液 A [0.25 M $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.35 M H_2SO_4]、続いて 1 mL の発色液 B [2.1 mM N, N-Dimethyl-p-phenylene diamine sulfate, 3.6 M H_2SO_4] を素早く加えて十分に混合した。室温で 1 時間放置後、675 nm の吸光度を測定した。この際、1 $\text{OD}_{675} = 0.234 \mu\text{mol H}_2\text{S}$ として評価した。NO 還元酵素活性については、ガスクロマトグラフィーによって、嫌氣的に決定した¹⁷⁾。反応混合液には、0.5 mg/ml の膜タンパク質、50 μ M 酵母シトクロム c (あるいは、0.1 mM N, N, N', N'-tetramethyl p-phenylene diamine)、20 mM アスコルビン酸ナトリウム (pH7.4)、0.1 M Tris-HCl (pH7.4)、0.1% SM、10 mM 亜硫酸ナトリウム、0.1% SM を入れておき、NO を終濃度 55 μ M となるように添加することによって反応を開始した。硝酸還元活性は、硝酸の還元産物としての亜硝酸イオンの定量によって評価した¹⁸⁾。反応混合液には、0.22 mg/ml の膜タンパク質、40 mM リン酸ナトリウム (pH7.0)、1 mM メチルピオロゲン、10 mM 硝酸カリウム、0.1% SM を入れておき、ジチオナイトの添加により反応を開始した。亜硝酸還元活性は、亜硝酸イオンの減少を亜硝酸の定量法 (亜硝酸イオンを Sulfanylamide と反応させた後、N-(Naphthyl)-ethylene diamine とカップリングさせるとピンク色の発色が見られる。この色を 530 nm の吸光度で定量する。ここでは、31.7 $\text{OD}_{530} \text{ unit} = 1 \text{ nmol}$ の NO_2^- イオンとした。) を用いることによって評価した¹⁸⁾。反応混合液には、2.78 mg/ml の膜タンパク質、10 mM リン酸カリウム (pH7.0)、1 mM メチルピオロゲン、8 μ M 亜硝酸ナトリウム、0.1% SM を入れておき、ジチオナイトの添加により反応を開始した。すべての測定は、25°Cで行った。

(5) ノーザンプロットイング

まず、総 RNA を、ISOGEN キット (ニッポンジーン) を使用して D.

vulgaris Miyazaki F から単離した¹⁹⁾。この方法は、フェノールとチオシアン酸グアニジンを含む均一な溶液による液相分離法を用いており、硫酸還元菌の湿菌体をそのままこの溶液で溶解し遠心分離することで、水相からイソプロパノール沈殿により RNA のみを回収することができる。ノーザンブロット分析のために、RNA(20 µg/slot) をホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲル電気泳動によって分離し、Hybond-N⁺ (アマシャム) 膜に 10 x SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M クエン酸ナトリウム (pH7.4)) 中で一晩かけ転写した。転写した RNA を、302 nm の紫外線で 5 分間露光し、膜に固定した。*col* 遺伝子の mRNA を検出するために、膜に固定した総 RNA に対して、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ でラベルした *col* 遺伝子をプローブとして用いたハイブリダイゼーション実験を行った。また、*D. vulgaris* Miyazaki F の *cyc* と *cyf* 遺伝子^{7,20)} も *col* 遺伝子と同様に、ハイブリダイゼーション実験のポジティブコントロールとして使用した。RNA サイズマーカー (0.3 から 7.4 kb) は、ベーリンガーマンハイムより購入したものをを用いた。

3-3 結果

(1) 膜結合性シトクロム類のキャラクタリゼーション

細胞膜 (全体で 30 mg タンパク質) を、*D. vulgaris* Miyazaki F の湿菌体 100g から単離した。77 K における膜の酸化還元差スペクトルには、440 nm にソーレーピーク (420 nm に肩)、552 nm に α -ピーク (556 nm に肩) があった (Fig. 3-5A)。その 2 次微分差スペクトルは、552 と 556 nm に α -ピーク、419 と 426 nm にソーレーピークを持つ 2 つの主要なシトクロム成分が細胞膜中に存在することをはっきりと示している [(Fig. 3-5A) 挿入図]。しかしながら、シトクロム *aa₃* および *bd* に特徴的なピークは全く観測されなかった²¹⁾。塩酸-アセトン可溶性画分と不溶性画分のピリジンフェロヘモクロームスペクトルは、それぞれ、555、524、418 nm および、550、520、414 nm を示した。後者は典型的なヘム *c* のピークであるが、前者はヘム *b* のそれら (556、525、418 nm: ヘミンでの実験値) から少しだけ低波長側にシフトしている (blue-shift)。この前者の画分について、逆相 HPLC 分析を行ったところ、大腸菌シトクロム *bo* より抽

出されたヘム *b* より少しだけ疎水性の位置に単一ピークを得た。また、膜にヘム *o* とヘム *a* の存在するという証拠はなかった (Fig. 3-6) が、スペクトルの α -ピークの高さより、ヘム *b* とヘム *c* の全量を、それぞれ、0.09 と 0.51 nmol/mg タンパク質であると評価できた (Table 3-2)。

CO 結合差スペクトル (Fig. 3-5B) は、431、523、552 nm に谷、414、537、567 nm に山を持つ典型的な *o* 型シトクロム (5 配位のヘムを持っているシトクロムをすべてこのように呼ぶので注意が必要である。すなわち、ヘム *o* を補欠分子族として持っているシトクロムという意味ではない。) の特徴を示している²²⁾。さらに、空気酸化された膜へのシアン結合により、ソーレーピークが、409 nm から 423 nm へと長波長シフト (red-shift) した。この (423 nm という) 値は、大腸菌のシトクロム *o* のそれより 4 nm 長かった。

(2) 細胞膜の酵素活性

細胞膜タンパク質をキャラクタライズするために、われわれは、好気的な呼吸鎖 (すなわち、キノール酸化酵素、シトクロム *c* 酸化酵素、コハク酸脱水素酵素) と嫌気的な呼吸鎖 (亜硫酸、NO、硝酸そして亜硝酸還元酵素) の酵素活性を調べた。その結果、キノール (Q_1H_2) 酸化酵素、亜硫酸還元酵素、および亜硝酸還元酵素のみ、膜中に検出できた (Table 3-2)。ただし、酸化酵素活性は、5 mM のシアン化カリウムにも非感受性であった。亜硝酸還元酵素活性は、非常に低いものであったので、膜内に亜硝酸還元酵素が存在しているとまで結論することはできない。実際に、シトクロム *c*₃ のようなヘムタンパク質のあるものは、亜硝酸還元酵素活性も示すことができるらしい (石本真、私信)。

(3) 膜結合性シトクロムの部分精製

膜タンパク質を、sucrose monolaurate により完全に溶解し、DEAE-Toyopearl クロマトグラフィーによって、4 つの分画 (I-IV) に分離した (Fig. 3-7A)。この素通り画分を、SP-Sepharose クロマトグラフィーによって、2 つの分画 (V、VI) に分離した (Fig. 3-7B)。それぞれの分画を、10% トリシン SDS-PAGE によっ

て分析し (Fig. 3-7C)、ヘム *c* 染色も行った。分画 V (レーン 7) と VI (レーン 8) はそれぞれ、みかけの分子量 65,000 と 15,000 の *c* 型シトクロムを含んでいた。それは、異なるタイプの SDS-PAGE によって確認した。分画 VI の中の 15 kDa の *c* 型シトクロムは、77 K における酸化還元差スペクトルにおいて、552、524、419 nm のピークを示し、抗シトクロム *c*₃ 血清に反応した。また、アミノ末端より 15 アミノ酸残基の配列は、ペリプラズムに存在するシトクロム *c*₃ のそれと同一であった。分画 V の中の 65 kDa の *c* 型シトクロムは、77 K における酸化還元差スペクトルにおいて、552、522、420 nm のピークを示した。したがって、15 kDa の *c* 型シトクロムはシトクロム *c*₃ であると結論づけた。また、分子量、吸収スペクトル、そしてヘム分析の結果、65 kDa の *c* 型シトクロムは高分子量シトクロム *c* (Hmc) であると思われる^{23,24}。しかしながら、Hmc は細胞を破碎した際の可溶性分画にも回収されたので、膜表在性タンパク質であると考えられる。

77 K における分画 I の酸化還元スペクトルは、551 と 625 nm に α -ピークを示し、またその 2 次微分差スペクトルにおいて、(分画 I の) γ -ピークは 418、426、440 nm の 3 つのピークに分裂した (Fig. 3-8A)。このことは、分画 I の中に、2 種類の *c* 型シトクロムとシトクロム *d* か *d*₁ の存在を示唆している。(仮に) シトクロム *bd* (が存在した場合) のシトクロム *b*₅₅₈ と *b*₅₉₅ のスペクトル上の (存在の) 根拠が全くないので、この分画は、シトクロム *d*₁ を含んでいると言える。細胞膜の CO 結合差スペクトル (Fig. 3-5B) は、分画 I のそれと類似している (Fig. 3-9A)。それゆえ、このシトクロムは、細胞膜中の主要な CO 結合ヘムと帰属することができる。膜の可溶化において、Q₁H₂ 酸化酵素活性は、もとの 4 分の 1 となった。その活性は、分画 I にのみ回収され、その比活性は、可溶化された膜のその 1.3 倍だった (Table 3-2)。ピリジンフェロヘモクロム分析により、分画 I と II はヘム *c* のみを含んでいることがわかった。分画 II の場合、77 K における酸化還元差スペクトルは、556 と 550 nm に α -ピークを示し (Fig. 3-8B)、また、CO 結合差スペクトルは 425 nm に谷、414 nm に山を示した (Fig. 3-9B)。これらの特徴は、分画 I のそれらとは異なっている

[(Fig. 3-8A) と (Fig. 3-9A)]. 分画 III と IV においては、410 nm の吸収がないので、これらの分画にはシトクロムはないはずである。

結果として、分画 I には、シトクロム c_{551} と可能性として d_1 、およびキノール酸化酵素を含み、他方、分画 II には、シトクロム c_{550} と c_{556} を含んでいると言える。さらに、両方の分画には、CO 結合性の c 型シトクロムを含んでいることもわかった。

(4) ノーザンプロット分析

ブチルゴム栓とアルミキャップでシールできる 200 ml のガラスボトルに、窒素ガス通気下で、嫌氣的に調製された 180 ml の培地を入れ、この中で、 OD_{600} が約 0.4 となるまで細菌を静置培養した。得られた菌体より全 RNA を単離し、このうち、20 μ g をすべての (電気泳動の) レーンに投入した。ハイブリダイゼーションは、60°Cで一晩行ったが、その結果は Fig. 3-10 に示してある。放射性同位体で標識された *cyc* (シトクロム c_3 遺伝子をコード) および *cyf* (シトクロム c_{553} 遺伝子をコード) 遺伝子でそれぞれハイブリダイゼーションを行ったところ、全 RNA 抽出物の中に、約 0.6-kb と 0.8-kb の RNA 種が検出された。しかしながら、この条件下では、*col* 遺伝子プローブに対しては全くハイブリダイズしなかった。これらの結果は、*col* 遺伝子の転写物は、報告されている推測²¹⁾に反してシトクロム c_{553} の mRNA にオペロンの一部としては含まれていないということを示している。

3-4 考察

これまで、*D. vulgaris* においては、モノヘムシトクロム c_{553} 、4ヘムシトクロム c_3 、16ヘム高分子量シトクロム c (Hmc) を含んだ可溶性の c 型シトクロムの存在が、報告されてきた²³⁻²⁷⁾。*D. vulgaris* Miyazaki F の Hmc は、同様に膜にも存在していると報告されている²⁷⁾。本研究は、この硫酸還元菌の細胞膜に、Hmc (分画 V) とシトクロム c_3 (分画 VI) の他に、シトクロム c_{551} とおそらくシト

クロム d_1 (分画 I)、そしてシトクロム c_{550} とシトクロム c_{556} (分画 II) が存在することを示した。ヘム b は、膜に存在していたにもかかわらず、部分精製の間に失われた。

分画 I と分画 II の c 型シトクロムは、シトクロム c_3 で報告されているのと同じように²⁸⁾、CO と結合することがわかった。シトクロム c_3 と Hmc の CO 結合差スペクトルはお互い類似している。それらはソーレー帯において、420 nm にひとつの谷と 411 か 412 に山を持っていることで特徴づけられる。これらの値は、膜および、分画 I (それぞれ、谷 431 nm、山 414 nm) のそれとは異なっている。それゆえ、膜試料における CO 結合活性の主要な寄与は、分画 I の c 型シトクロムから来ているものである。この CO 結合シトクロムの α , β , γ ピークの波長は、 bc 型のシトクロムのそれと類似している²¹⁾。Q₁H₂ 酸化酵素活性は、シアンに非感受性なので、 o 型シトクロムが、この活性と直接的につながっているとは考えにくい。ただし、他の硫酸還元菌において、見つかった微酸素呼吸は、シアンに非感受性であると報告されている²⁹⁾。

分光学的な解析では、シトクロム aa_3 , bo , bd を *D. vulgaris* Miyazaki F の細胞膜に検出することはできなかった。ノーザンハイブリダイゼーション分析によっても、*col* 遺伝子は、通常の生育条件のもとでは発現していないことが示された。それゆえ、*col* 遺伝子は、特殊な生育条件のもとで発現する遺伝子であるように思える。他方、われわれは、酸素を還元する Q₁H₂ 酸化酵素活性を細胞膜と分画 I から検出した。*Desulfovibrio* 属を含む硫酸還元菌は、メナキノンしか持っていないので³⁰⁾、Q₁H₂ 酸化酵素活性がそれほど大きくないのは、酵素の基質特異性のためであると思われる。*D. gigas* からのルブレドキシン酸化酵素 (rubredoxin-oxygen oxidoreductase) は、Fe ウロポルフィリン I とヘム c の誘導体を含み、分子状酸素を水に還元する³¹⁾。それに対して、*D. vulgaris* と *D. gigas* からの NADH 酸化酵素 (rubredoxin-NAD oxidoreductase)^{32, 33)} は、分子状酸素還元最終生成物として、過酸化水素を生成する。ルブレドキシン酸化酵素と NADH 酸化酵素は、可溶性タンパク質であるにもかかわらず、Q₁H₂ 酸化酵素は、膜酵素である。それゆえ、後者は、膜上で電子伝達系に関係しているのかもしれない。

れない。電子伝達系が、細胞代謝の維持、あるいは、微酸素条件のもとでの分子状酸素の解毒に関わっている可能性がある。別の可能性としては、この酵素の電子受容体が、酸素分子とは異なっており、硫酸還元に関わる基本的な物質が基質であるかもしれない。この膜に新たに発見された CO 結合シトクロムは、*D. vulgaris* における末端酸化酵素様タンパク質の候補であるので、これらのタンパク質を精製し、遺伝子のクローニングをすることで、硫酸還元菌の末端酸化酵素の実体をさらに明らかにすることができるはずである。

本研究により、偏性嫌気性細菌である硫酸還元菌には、キノール酸化酵素が存在し、末端酸化酵素として働いている可能性が強いと結論した。

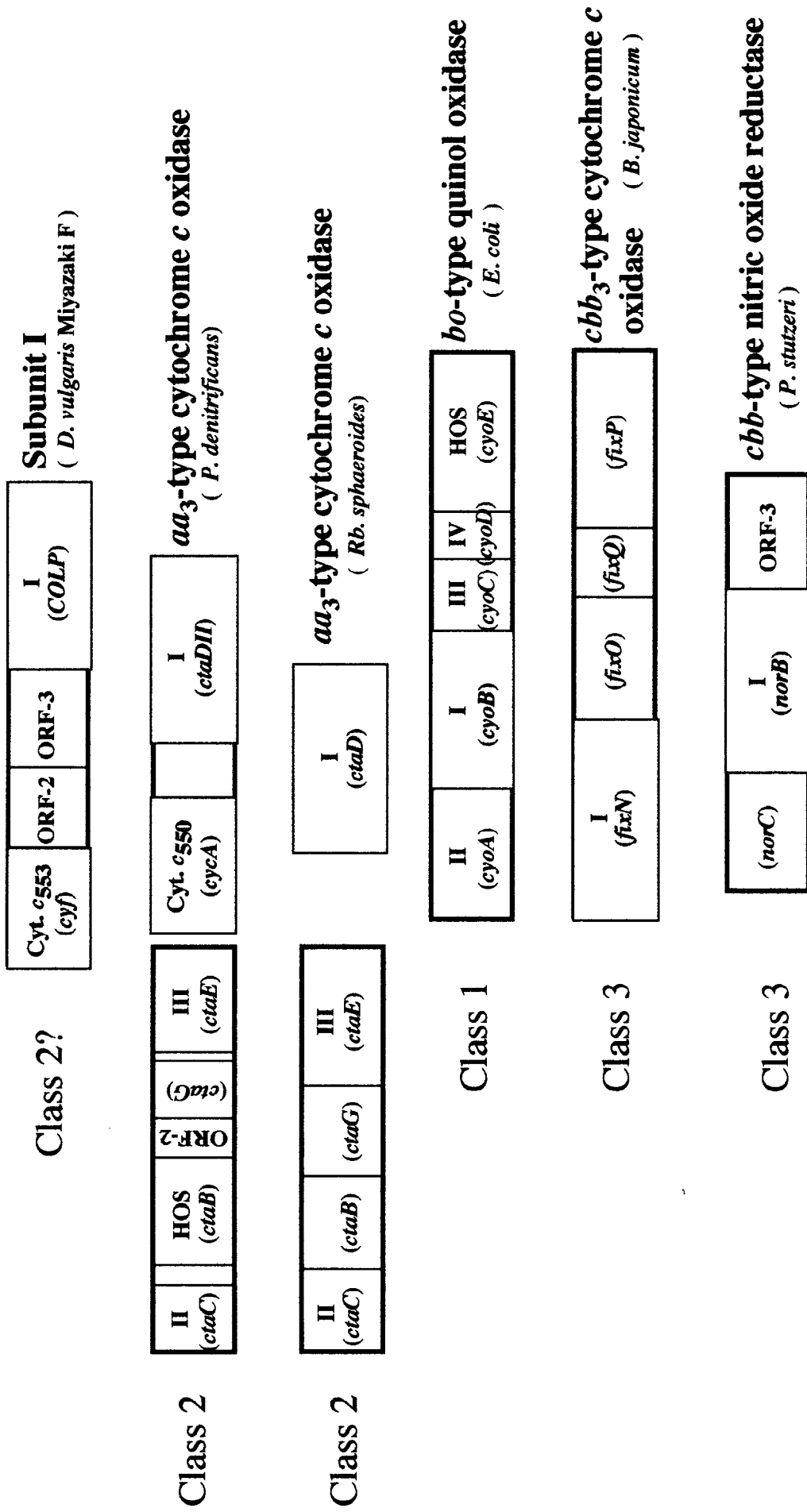


Fig. 3-1 Organization of genes for the heam-copper terminal oxidases

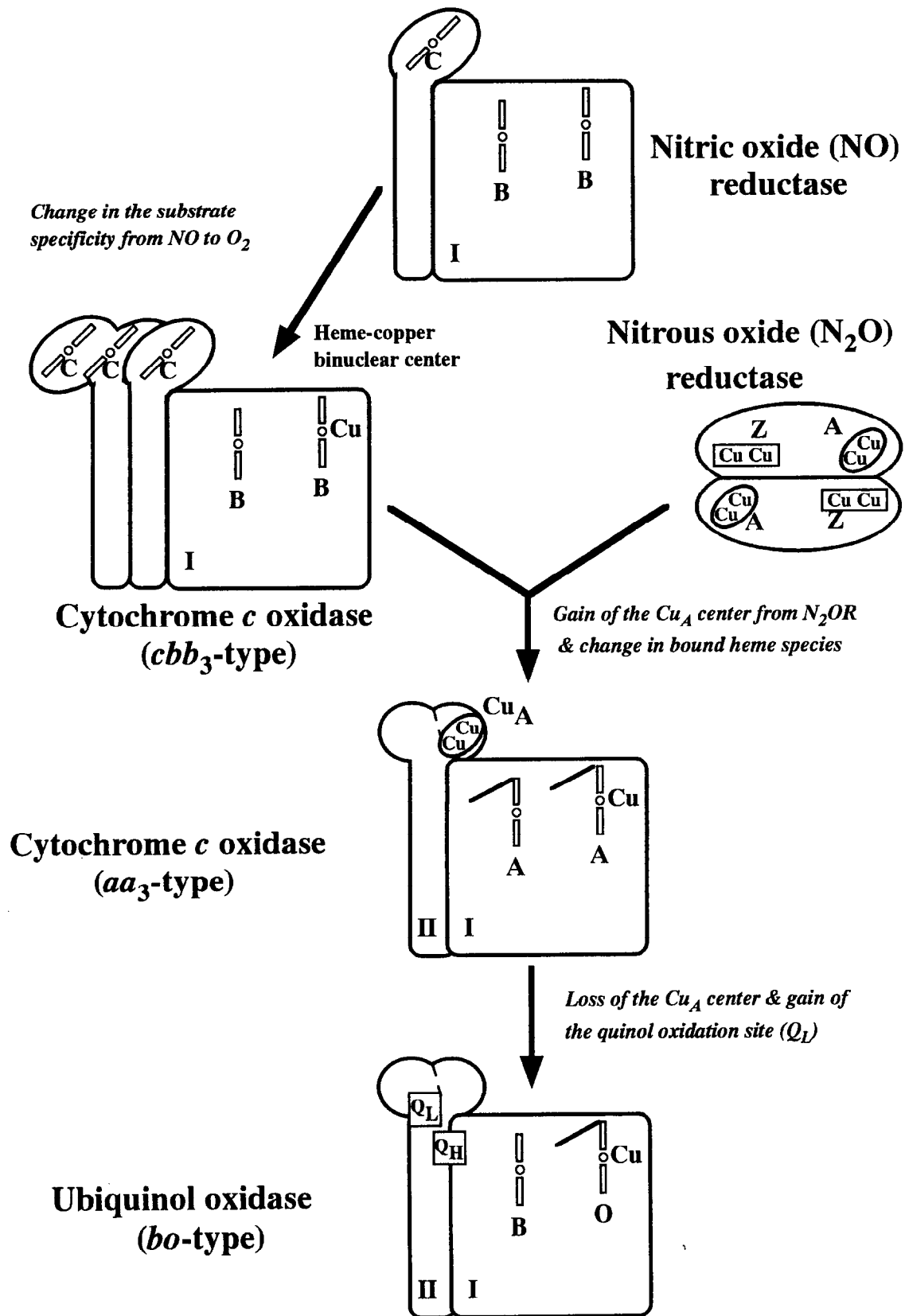


Fig. 3-2 Evolution of the heme-copper terminal oxidase superfamily⁵⁾

Table 3-1 Postgate C medium for *DvMF*⁸⁾

Reagent	Grade	Weight
KH_2PO_4	GR	0.5 g
NH_4Cl	GR	1.0 g
Na_2SO_4	GR	4.5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	GR	0.06 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	GR	0.06 g
Sodium Lactate	70%	6.0 g
Yeast extract		1.0 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.004 g
Sodium citrate $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.3 g
adjusted to pH7.5 by NaOH		
GR: Guaranteed Reagent		(per 1 liter)

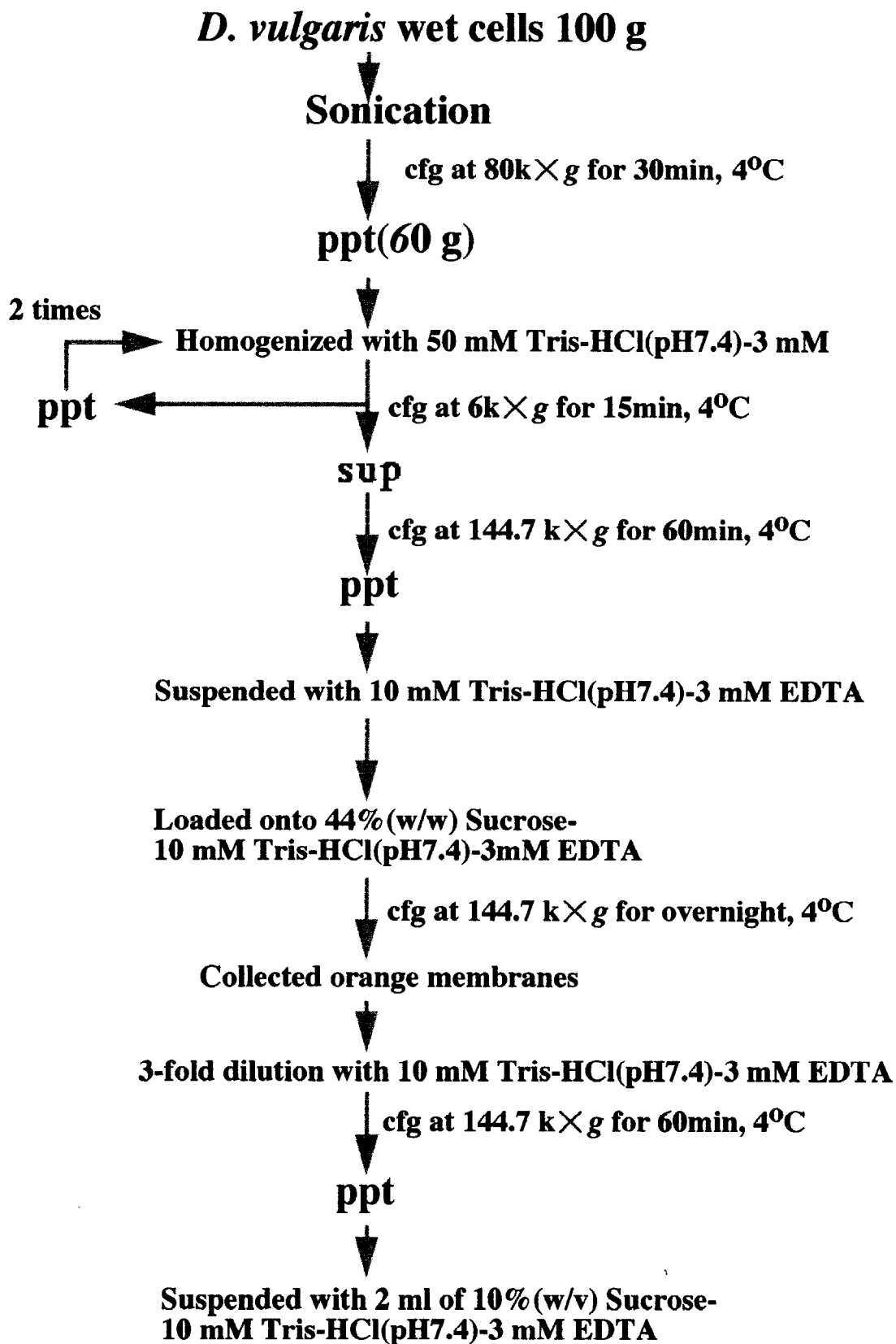


Fig. 3-4 Preparation of plasma-membranes from *D. vulgaris* Miyazaki F

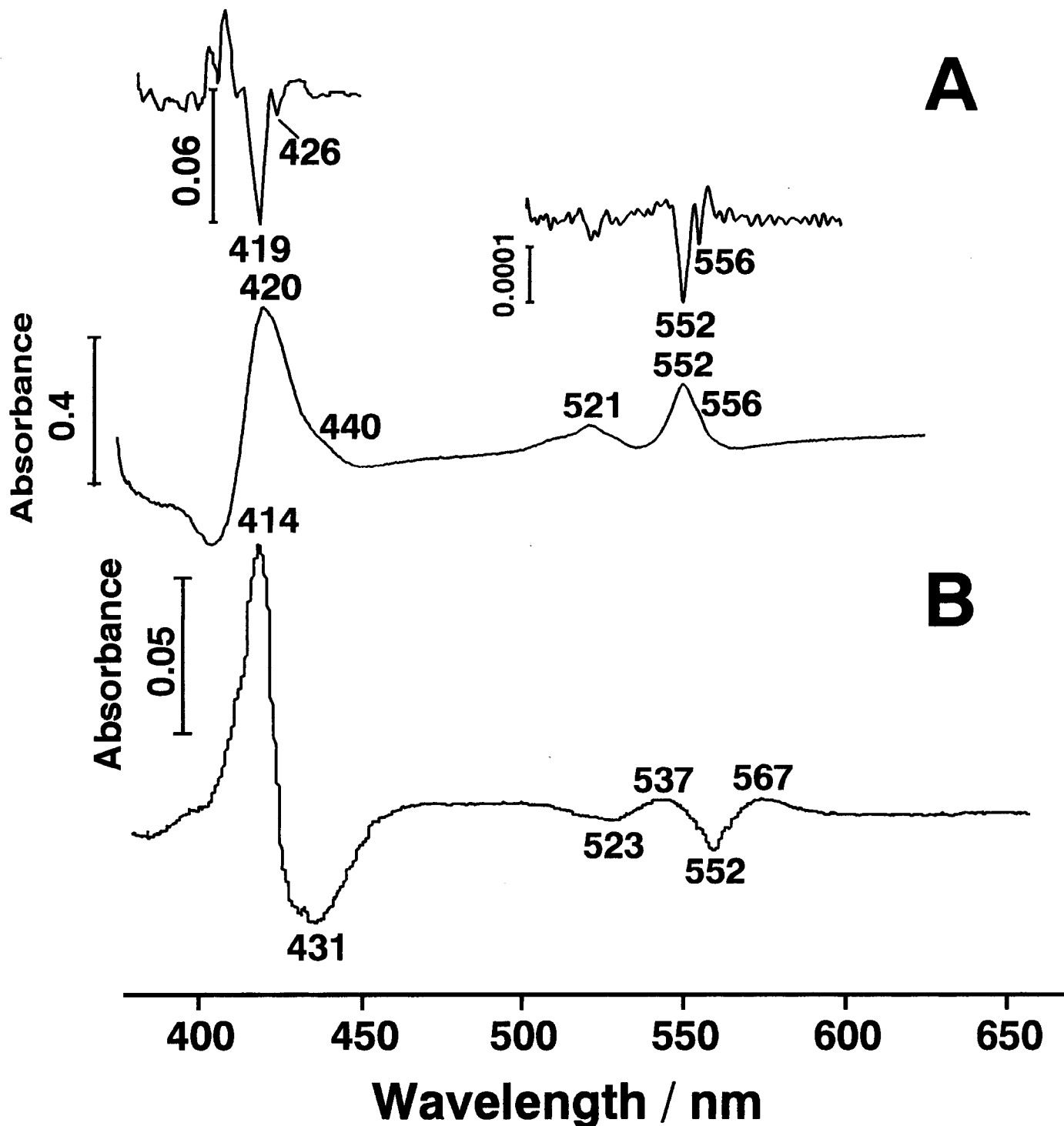


Fig. 3-5 Dithionite-reduced *minus* air-oxidized difference spectrum at 77K (A) and CO-binding difference spectrum at room temperature (B) of the cytoplasmic membranes.

Inset of A; the second-order finite difference spectra of the α and β peaks ($\Delta\lambda = 2.1$ nm) and the γ peak ($\Delta\lambda = 3.5$ nm). The membranes were diluted with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.1% SM to protein concentrations of 5.2 (A) and 0.65 (B) mg/ml, respectively.

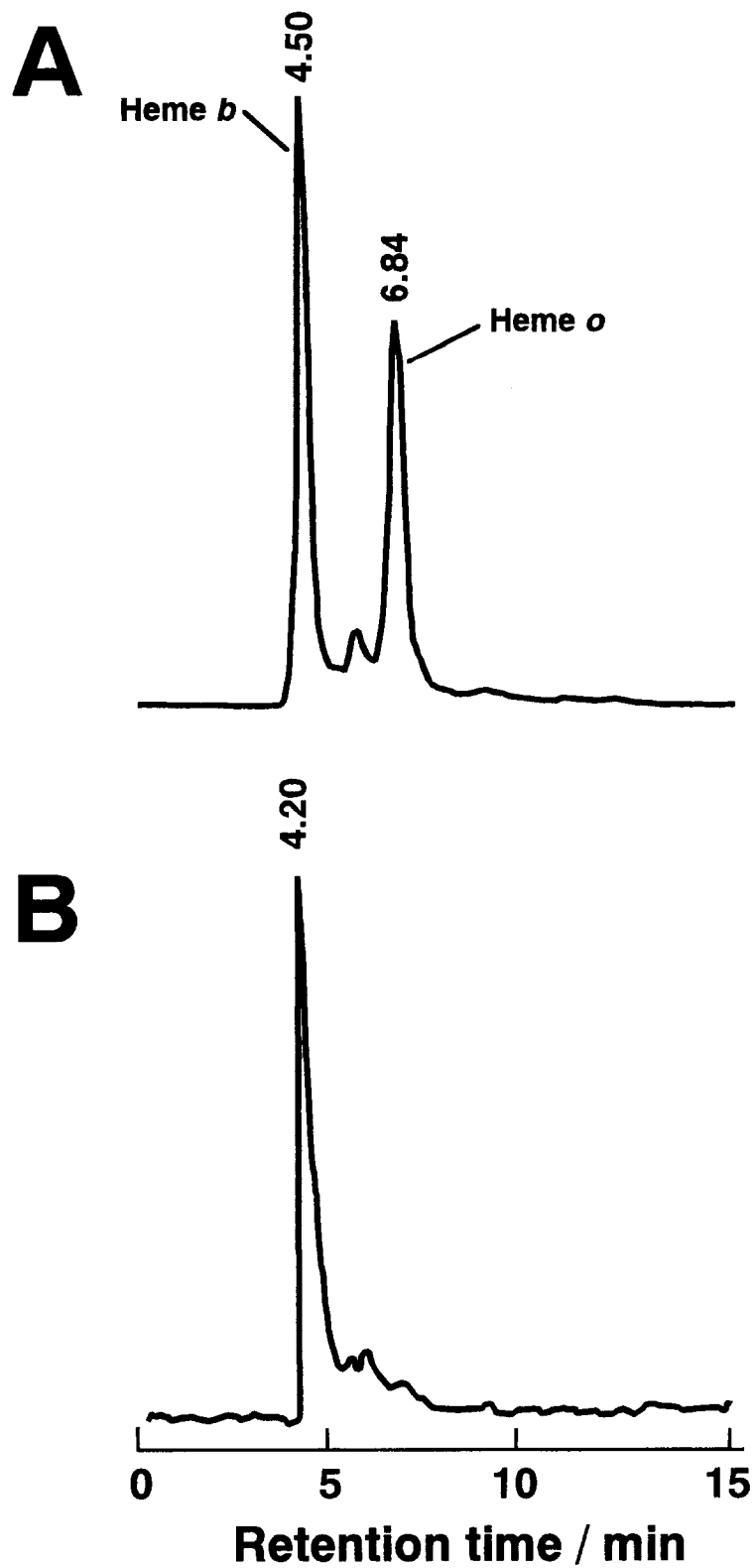


Fig. 3-6 HPLC chromatograms of the HCl-acetone soluble fraction of the *E. coli* cytochrome *bo* (A) and the *D. vulgaris* membranes (B).

Hemes were monitored by the absorbance at 400 nm.

Table 3-2 Properties of the cytoplasmic membranes
from *D. vulgaris* Miyazaki F

Hemes or enzymes	Contents or activities
Heme <i>b</i>	0.09 nmol/mg protein
Heme <i>c</i>	0.51 nmol/mg protein
Cytochrome <i>c</i> oxidase	not detected
Ubiquinol-1 oxidase	100 nmol/min/mg protein (25 nmol/min/mg protein)* (32 nmol/min/mg protein)**
Succinate dehydrogenase	not detected
Sulfite reductase	7.2 nmol/min/mg protein
Nitric oxide reductase	not detected
Nitrate reductase	not detected
Nitrite reductase	0.03 nmol/min/mg protein

* The solubilized cytoplasmic membrane proteins.

** The fraction I partially purified by DEAE-Toyopearl 650S chromatography (Fig. 3-7A).

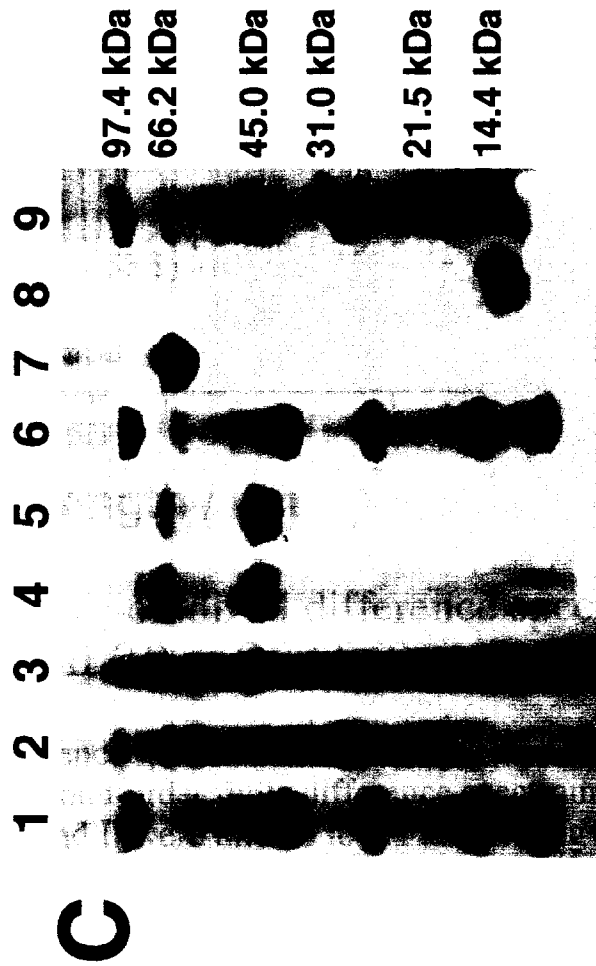
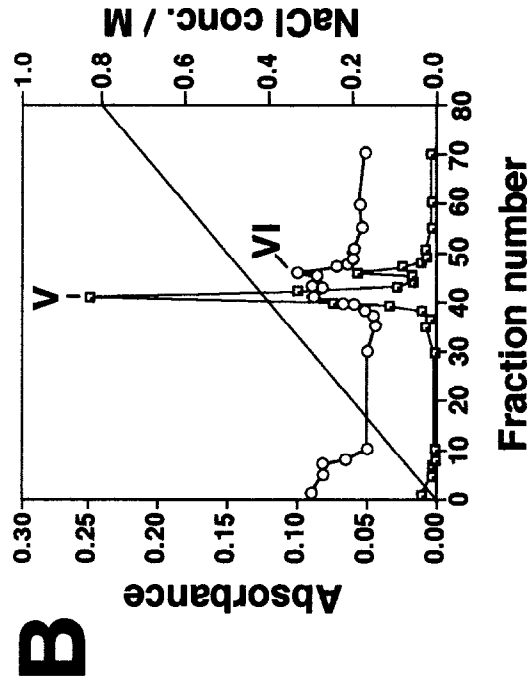
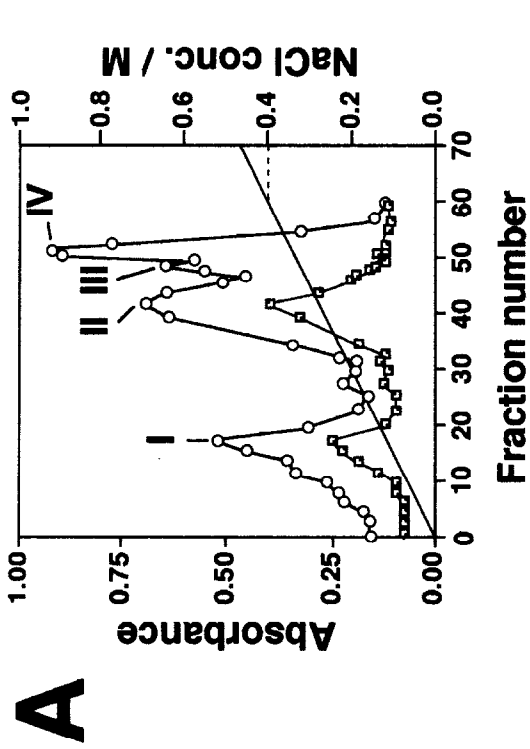


Fig. 3-7 Elution profiles of the solubilized membrane proteins in DEAE-Toyopearl 650S (A) and SP-Sepharose (B) chromatographies, and 10% Tricine SDS-PAGE pattern (C).

A and B; the open circles and squares represent the absorbances at 280 and 410 nm, respectively. C; the gel was stained by Coomassie brilliant blue R250. Lanes 1, 6 and 9 are molecular mass marker mixtures. Lanes 2 - 5 correspond to fractions I - IV, respectively, and lanes 7 and 8 are fractions V and VI, respectively. The molecular mass marker mixture is composed of phosphorylase b (97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), and lysozyme (14,000).

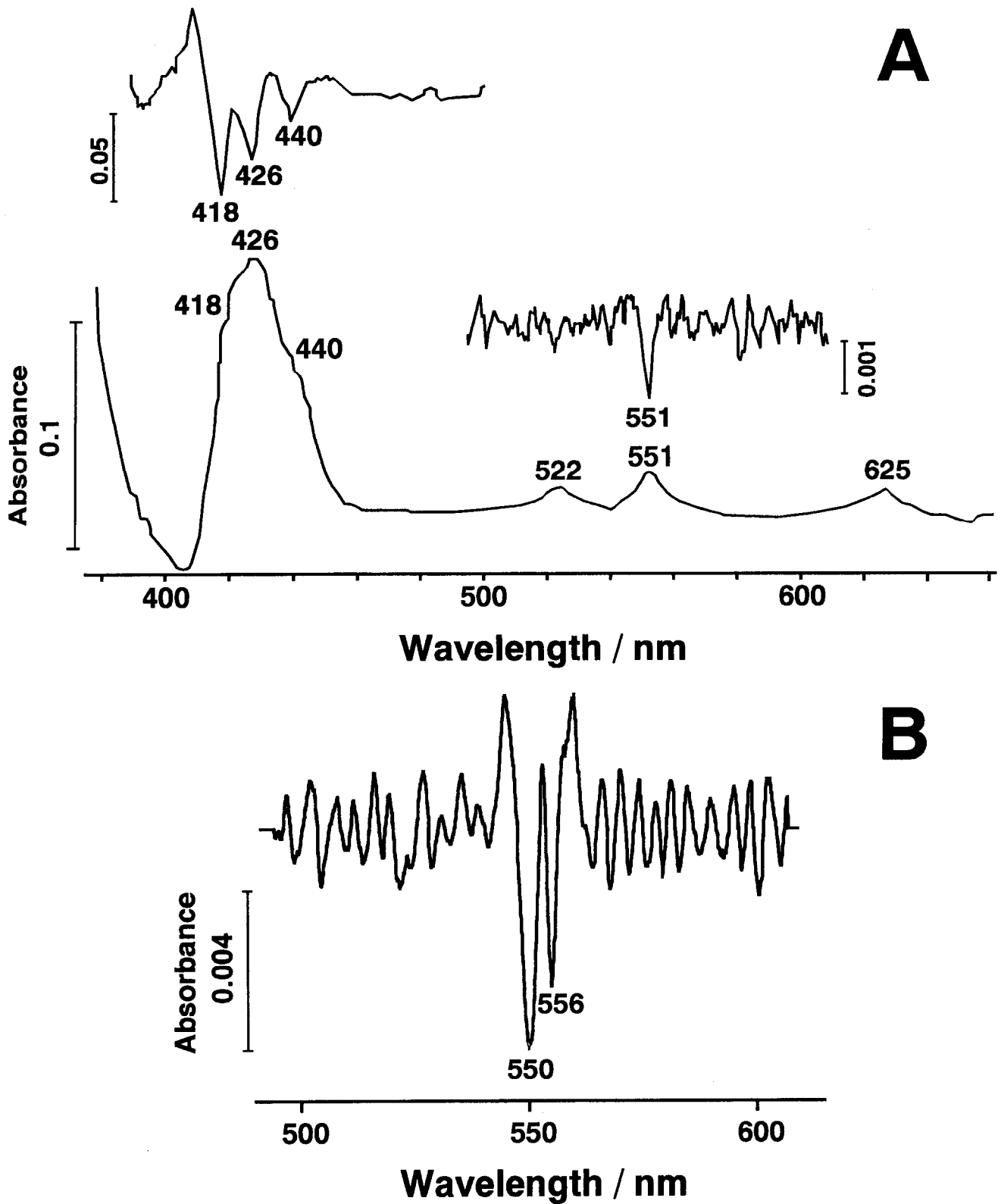


Fig. 3-8 Dithionite-reduced *minus* air-oxidized difference spectra at 77K of the fractions I (A) and II (B) in DEAE-Toyopearl 650S chromatography (Fig. 3-7A).

A; insets, the second-order finite difference spectra of the α and β peaks ($\Delta\lambda = 2.8$ nm) and the γ peak ($\Delta\lambda = 5.6$ nm). B; the second-order finite difference spectrum of the α and β peaks ($\Delta\lambda = 2.1$ nm). The fractions I and II were diluted to 1.1 and 1.6 mg protein / ml, respectively, with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.1% sucrose monolaurate.

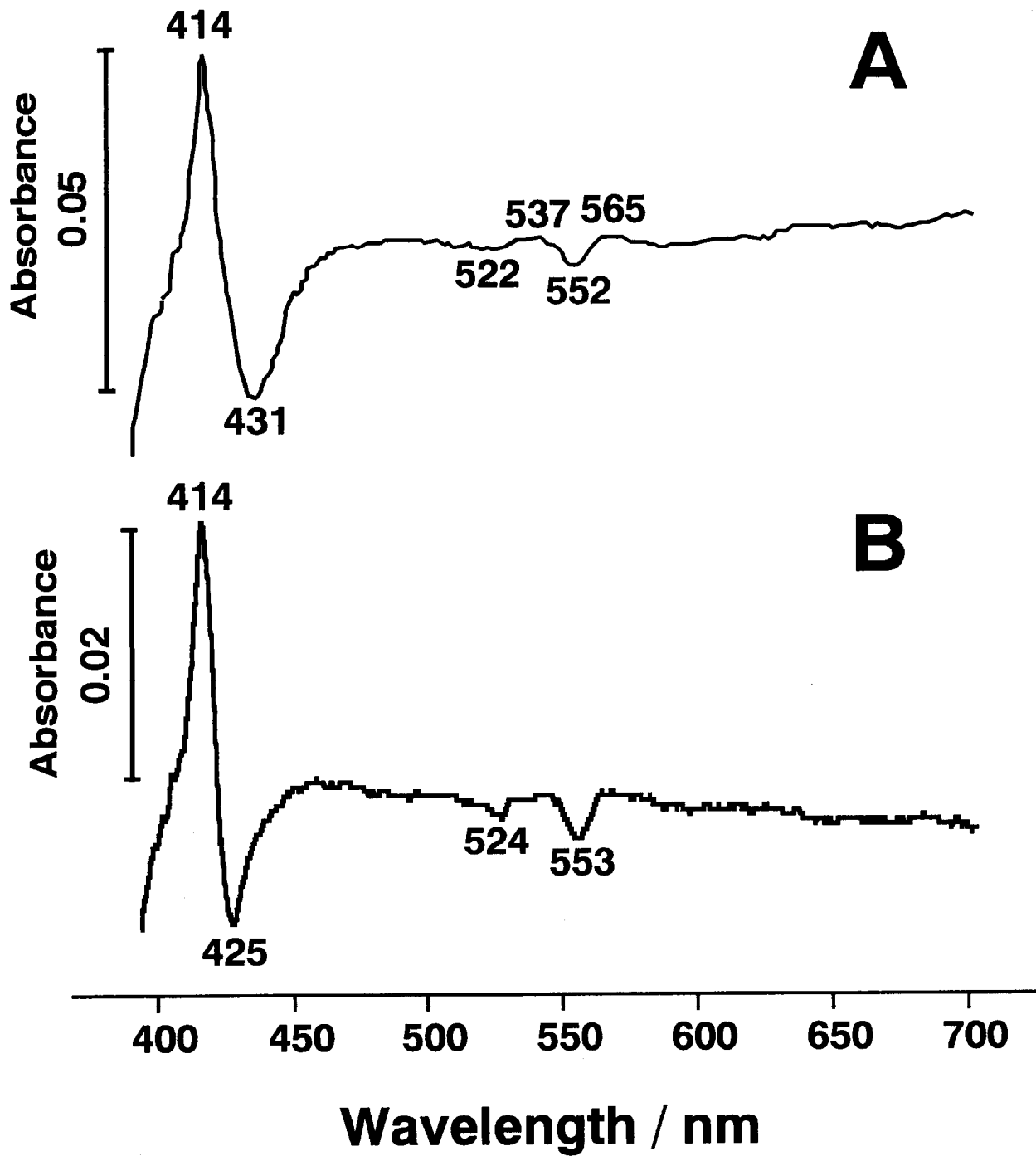


Fig. 3-9 CO-binding difference spectra of the fractions I (A) and II (B) at room temperature.

The protein concentrations of the fractions I and II (see Fig. 3-7A) are 0.6 and 0.3 mg/ml, respectively.

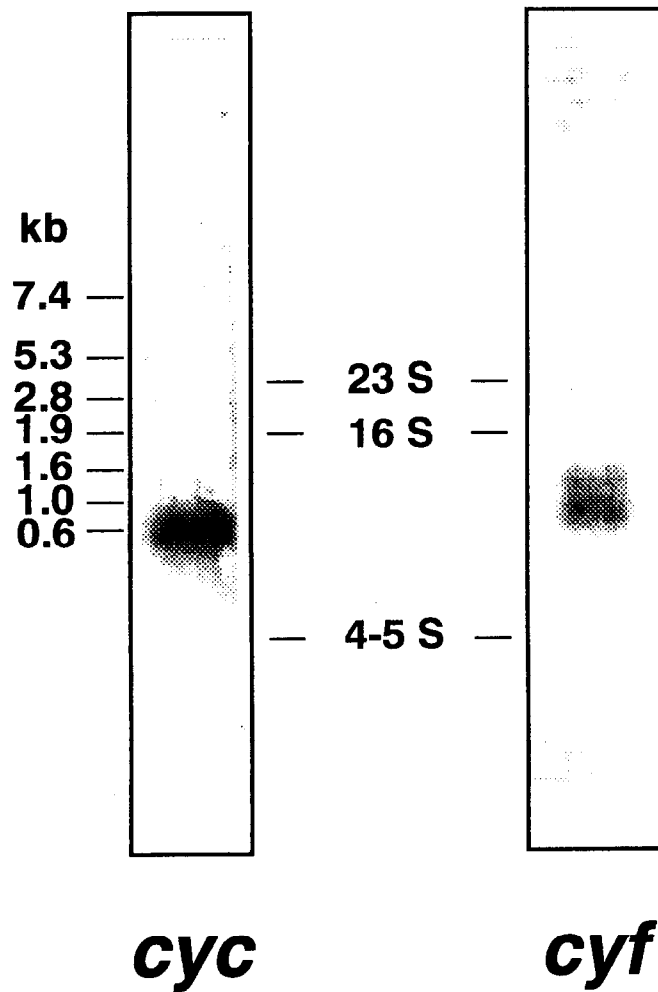


Fig. 3-10 Northern blot patterns of mRNA extracted from *D. vulgaris* Miyazaki F cells.

RNA size markers are indicated on the left side. The size of ribosomal RNAs is given in the middle. All lanes contained 20 μ g of RNA isolated from the fresh cultures. The blot was performed on a nylon membrane, which was cut it into three pieces. They were hybridized separately with equal amounts of labeled *cyc* (encoding cytochrome c_3), *cyf* (cytochrome c_{553}) and *col* (homologous to subunit I of aa_3 -type cytochrome *c* oxidase)DNAs, respectively, and exposed to an X-ray film overnight. No hybridization was observed for the *col* gene. The bands hybridized with the probes of the *cyc* and *cyf* genes are shown in the lanes on the left and right, respectively.

参考文献

1. **Calhoun, M. W., J. W. Thomas, R. B. Gennis**, The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps, *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 325-330 (1994)
2. **Gennis, R. B.**, Some recent advances relating to prokaryotic cytochrome *c* reductases and cytochrome *c* oxidases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1058**: 21-24 (1991)
3. **Iwata, S., C. Ostermeier, B. Ludwig, and H. Michel**, Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature*, **376**: 660-669 (1995)
4. **Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa**, The whole structure of 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science*, **272**: 1136-1144 (1996)
5. 茂木立志, 生化学, 第 67 卷, 第 2 号: 93-107 (1995)
6. **Saraste, M. and Castresana, J.** (1994) Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes, *FEBS Lett.* **341**: 1-4
7. **Kitamura, M., Mizugai, K., Taniguchi, M., Akutsu, H., Kumagai, I. and Nakaya, T.** (1995) A gene encoding a cytochrome *c* oxidase-like protein is located closely to the cytochrome *c*₋₅₅₃ gene in the anaerobic bacterium, *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F), *Microbiol. Immunol.* **39**: 75-80
8. **Postgate, J. R.** (1984) *The Sulfate-reducing Bacteria*. 2nd Edn Cambridge University Press, Cambridge
9. **Mogi, T., Yamamoto, H., Nakao, T., Yamato, I. and Anraku, Y.** (1986) Genetic and physical characterization of *putP*, the proline carrier gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 35-41
10. **Minagawa, J., Mogi, T., Gennis, R. B. and Anraku, Y.** (1992)

Identification of heme and copper ligands in subunit I of the cytochrome *bo* complex in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 2096-2104

11. **Williams, J. N., Jr.** (1964) A method for the simultaneous quantitative estimation of cytochromes *a*, *b*, *c*₁, and *c* in mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **107**: 537-543
12. **Schägger, H. and von Jagow, G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379
13. **Connelly, J. L., Morrison, M. and Stotz, E.** (1958) Hemins of beef heart muscle. *J. Biol. Chem.* **233**: 743-747
14. **Sato-Watanabe, M., Mogi, T., Miyoshi, H., Iwamura, H., Matsushita, K., Adachi, O. and Anraku, Y.** (1994) Structure-function studies on the ubiquinol oxidation site of the cytochrome *bo* complex from *Escherichia coli* using *p*-benzoquinones and substituted phenols. *J. Biol. Chem.* **269**: 28899-28907
15. **Futai, M.** (1973) Membrane D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *Biochemistry* **12**: 2468-2474
16. **St. Lorant, L.** (1929) Über neu colorimetrische Micromethode zur Bestimmung des Schwefels in Sulfiden, Sulfaten usw. *Z. Physiol. Chem.* **185**: 245
17. **Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K. and Shoun, H.** (1993) Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J. Biol. Chem.* **268**: 8350-8355
18. **Nicholas, D. D. J. and Nason, A.** (1957) In Colowick, S. P. and Kaplan N. O. (eds) *Methods in Enzymology* vol. III, pp 983-984. Academic Press, New York
18. **Chomaczynski, P. and Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
20. **Kitamura, M., Ozawa, K., Kojima, S., Kumagai, I., Akutsu, H. and Miura, K.** (1993) The primary structure of pre-cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio*

- vulgaris* (Miyazaki F) as determined by nucleotide sequencing of its gene and partial amino acid sequencing. *Protein Seq. Data Anal.* **5**: 193-196
21. **Yamanaka, T.** (1992) *The Biochemistry of Bacterial Cytochromes*. Japan Scientific Press, Tokyo
 22. **Kita, K., Konishi, K. and Anraku, Y.** (1984) Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiration chain. I. Purification and properties of cytochrome *b562-o* complex from cells in the early exponential phase of aerobic growth. *J. Biol. Chem.* **259**: 3368-3374
 23. **Peck Jr, H. D. and LeGall, J.** (1994) *Methods in Enzymology*, vol **243**, pp 43-240. Academic Press, San Diego
 24. **Le Gall, J., Payne, W. J., Cvhen, L., Liu, M.-Y. and Xavier, A. V.** (1994) Localization and specificity of cytochromes and other electron transfer proteins from sulfate-reducing bacteria. *Biochimie (Paris)* **76**: 655-665
 25. **Pollock, W. B. R. and Voordouw, G.** (1994) Molecular biology of *c*-type cytochromes from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Biochimie (Paris)* **76**: 554-560
 26. **Florens, L. and Bruschi, M.** (1994) Recent advances in the characterization of the hexadecahemic cytochrome *c* from *Desulfovibrio*. *Biochimie (Paris)* **76**: 562-568
 27. **Ogata, M., Kiuchi, N. and Yagi, T.** (1993) Characterization and redox properties of high molecular mass cytochrome *c*₃ (Hmc) isolated from *Desulfovibrio vulgaris*. *Biochimie (Paris)* **75**: 977-983
 28. **Yagi, T. and Maruyama, K.** (1971) Purification and properties of cytochrome *c*₃ of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki. *Biochim. Biophys. Acta* **243**: 214-224
 29. **Dilling, W. and Cypionka, H.** (1990) Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**: 123-128
 30. **Collins, M. D. and Widdel, F.** (1986) Respiratory quinones of sulphate-reducing and sulphur-reducing bacteria: A systematic investigation. *System. Appl.*

Microbiol. **8**: 8-18

31. **Timkovich, R., Burkhalter, R. S., Xavier, A. V., Chen, L. and Le Gall, J.** (1994) Iron uroporphyrin I and a heme *c*-derivative are prosthetic groups in *Desulfovibrio gigas* rubredoxin oxidase. *Bioorg. Chem.* **22**: 284-293
32. **Chen, L., Le Gall, J. and Xavier, A. V.** (1994) Purification, characterization and properties of an NADH oxidase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) and its coupling to adenylyl phosphosulfate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 839-844
33. **Chen, L., Liu, M. Y., Le Gall, J., Fareleira, P., Santos, H. and Xavier, A. V.** (1993) Purification and characterization of NADH-rubredoxin oxidoreductase involved in the utilization of oxygen by *Desulfovibrio gigas*. *Eur. J. Biochem.* **216**: 443-448

第4章

電子伝達タンパク質 (1)

-シトクロム c_3 -

はじめに

DvMF のシトクロム c_3 は、107 のアミノ酸残基 (本章で 108 残基 と訂正することになるが)、分子量 13,995 (アミノ酸残基数を 108 と訂正後は分子量 14,066) からなる 1 本のポリペプチド鎖に 4 つの c 型ヘム (Fig. 4-1) を持つ塩基性タンパク質である。X 線結晶構造解析による 3 次元構造のリボンモデル¹⁾ を Fig. 4-2 に、アミノ酸配列²⁾ 及び塩基配列³⁾ を Fig. 4-3 に示す。このタンパク質は、生体内では親水性の膜表在性タンパク質で、細胞膜に付着した形で存在していると考えられる。また c 型シトクロムタンパク質としては、-300 mV (標準水素電極基準) と著しく低い酸化還元電位を持っている (Table 4-1)。さらには、還元型固体膜における電気伝導度が酸化型固体膜のそれに比べ 10^9 程度高く、そのイオン化ポテンシャルがポルフィリン誘導体の中で最も低い等の、非常に特異的な物理化学的性質を示し、その機能や物性の解明のため多くの研究者により精力的な研究が進められている。

シトクロム c_3 は生体エネルギー変換系の進化の上からも注目すべきタンパク質である。還元的環境下でエネルギー代謝を行うために、非常に低い酸化還元電位を持つ。今までに明らかにされた巨視的および微視的酸化還元電位から、4 つのヘムは、環境が変わるとともにその役割を変えている可能性がある。すなわち、電子授受のパートナーを変えることにより、環境に適応した電子伝達系を選択する役割を果たしている可能性があることが明らかになっている⁴⁾。

本研究でとり上げるシトクロム c_3 の結晶構造はすでに決定されている⁵⁾。そのヘム鉄間の距離は、最も近いものは (ヘム 1-3 間) 11.0 Å、最も離れているもの (ヘム 1-4 間) でも 17.8 Å と近い (ヘム 1-2 間は 12.2 Å、ヘム 2-4 間は 16.4 Å、ヘム 3-4 間は 12.0 Å)、ヘム間にはなんらかの相互作用があり、またシトクロム c_3 の電子授受の際にこの 4 つのヘムがそれぞれの役割を分担しているとも考えられている。またヘムにはヒスチジンのイミダゾール環が配位しており、その側面にはフェニルアラニンあるいはチロシンといった芳香族アミノ酸残基が存在していることから、この芳香環がヘムの電子伝達に重要な役割を果たしていると推測される。NMR と電気化学的手法による解析より、シトクロム c_3

の巨視的 (分子を単位としての) 酸化還元電位および微視的 (ヘム毎の) 酸化還元電位が決定されている⁴⁾。その結果、各ヘムの酸化還元電位はまわりの酸化状態が変化するとともに変化していくことが明らかになった。例えば、DvMF シトクロム c_3 のヘム 1 は、最も酸化的環境下では下から二番目の酸化還元電位を持ち、電子供与体としての性質を示すが、最も還元的環境下では、最も高い酸化還元電位を示し、電子受容体としての性質を示すようになる。したがって、4 つある各ヘムの役割は、硫酸還元菌をとりまく環境に大きく依存すると言える。このことはまた、シトクロム c_3 が還元状態での硫酸呼吸を効率よく働かせるために、環境に適応した電子伝達経路を選ぶスイッチの役割を果たしている可能性を示すものである。

他の硫酸還元菌由来のシトクロム c_3 についてもいくつかの菌種において、そのアミノ酸一次配列および、塩基配列が発表されている。いずれもそのアミノ酸配列中に、2 カ所の -Cys-X-X-Cys-His- と、同じく 2 カ所の -Cys-X-X-X-X-Cys-His- の構造を持っている。特に、*D. vulgaris* Hildenborough 株は、われわれが興味を持っている *D. vulgaris* Miyazaki F 株とは親類ぐらゐの関係で、アミノ酸の長さも同じで例外的に相同性が高く、全体の 90% にまで上る。しかしながら、他の株のシトクロム c_3 の場合は、アミノ酸配列の相同性も高くなく (30-50%)、等電点も酸性側にあったり、塩基性側にあったり、中性付近にあたりとまちまちである。にもかかわらず、いずれも低い酸化還元電位を示しているのは、おそらくその三次元構造において、4 つのヘム周辺の構造やアミノ酸の保存性が極めて高いためであると思われる。いくつかの株からのシトクロム c_3 の三次構造の解析により、そのヘム周辺構造が原子レベルで明らかになり、このシトクロム c_3 の間の共通点として、ヘムの第 5、第 6 配位子は、両方とも His のイミダゾール環であることも分かった。これは、同じヘムタンパク質であるシトクロム c が His および Met である点と異なっている。また、分子中に存在する 4 個のいずれのヘムも分子表面に浅く埋もれており、それぞれの面がお互いにほぼ直行するように位置している。4 個のヘムのプロピオン酸基はそのほとんどが分子表面に露出しているが、チオエーテル結合部位を含むヘム端も露

出している。いずれにせよ、他のヘムを補酵素とするタンパク質の酸化還元電位は、ウマ心筋シトクロム c が +200 mV、シトクロム c_2 (*R. rubrum*) が +320 mV、ウシ肝臓シトクロム b_5 が +20 mV (いずれも標準水素電極基準) であるので、これらと比較しても、シトクロム c_3 の -300 mV という酸化還元電位は著しく低いと言え、またそれがこのタンパク質における大きな特徴の一つである。

このように、硫酸還元菌の電子伝達系を特徴づける電子伝達タンパク質であるシトクロム c_3 は4つのヘムを持ち、 c -型シトクロムとしては非常に低い酸化還元電位を持つ。このタンパク質はペリプラズムに存在し、ヒドロゲナーゼから電子を受け取り、まわりの環境に応じてさまざまな電子伝達タンパク質に電子を渡すと考えられており、その際、4つのヘムが重要な役割を果たすと推定される。したがって、このタンパク質における各ヘムの酸化還元電位の制御、電子移動のメカニズムは硫酸還元菌における電子伝達系の制御と密接にかかわっている。これらの問題を、タンパク質の高次構造と物理化学的性質を基礎に解明するためにはこのタンパク質の大量発現系および遺伝子操作のシステムを作りあげることが必須である。しかしそれは並大抵のことではない。 c 型シトクロムはヘムがポリペプチドと共有結合を作る必要があるため、同種の宿主を用いる以外では大量発現に成功していない。したがって、一般的に使える c 型シトクロムの大量発現系を確立することができれば、シトクロム c_3 にとどまらず、 c -型シトクロムに関する研究は大きく発展することが期待される。

本章では、4-1節でシトクロム c_3 の大量発現系を確立することで、シトクロム c_3 のタンパク質工学的研究への道を拓き、4-2節において、その大量発現系を利用したシトクロム c_3 のアミノ酸置き換えを行い、4つのヘムの間、また、他の分子との間の電子移動のメカニズムを解明し、硫酸還元菌のエネルギー変換系における、テトラヘムの役割を理解することを目標に研究に取り組んだ。

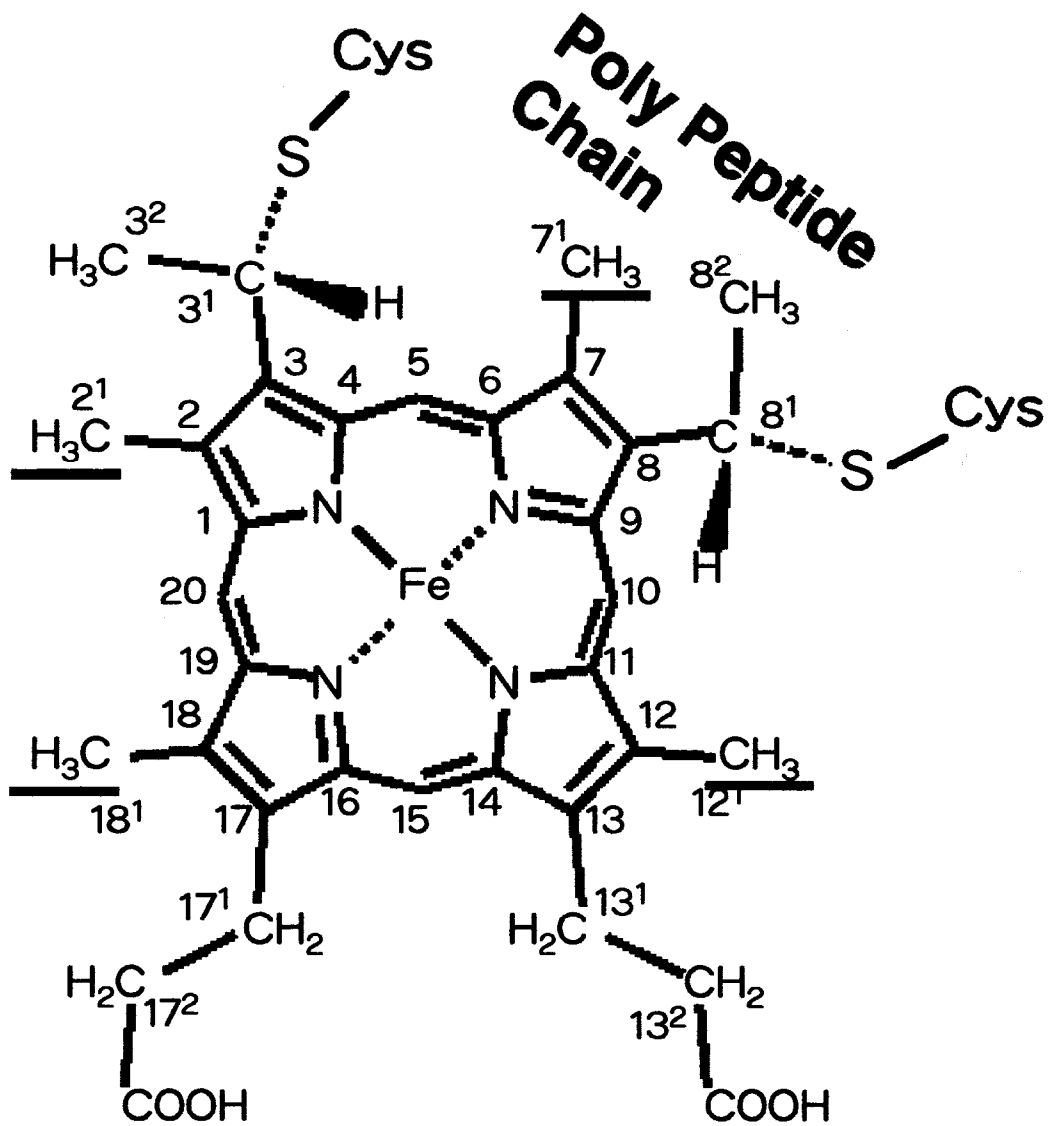


Fig. 4-1 The chemical Structure of *c*-type Heme

The nomenclature of the heme protons and carbons is given in the figure.

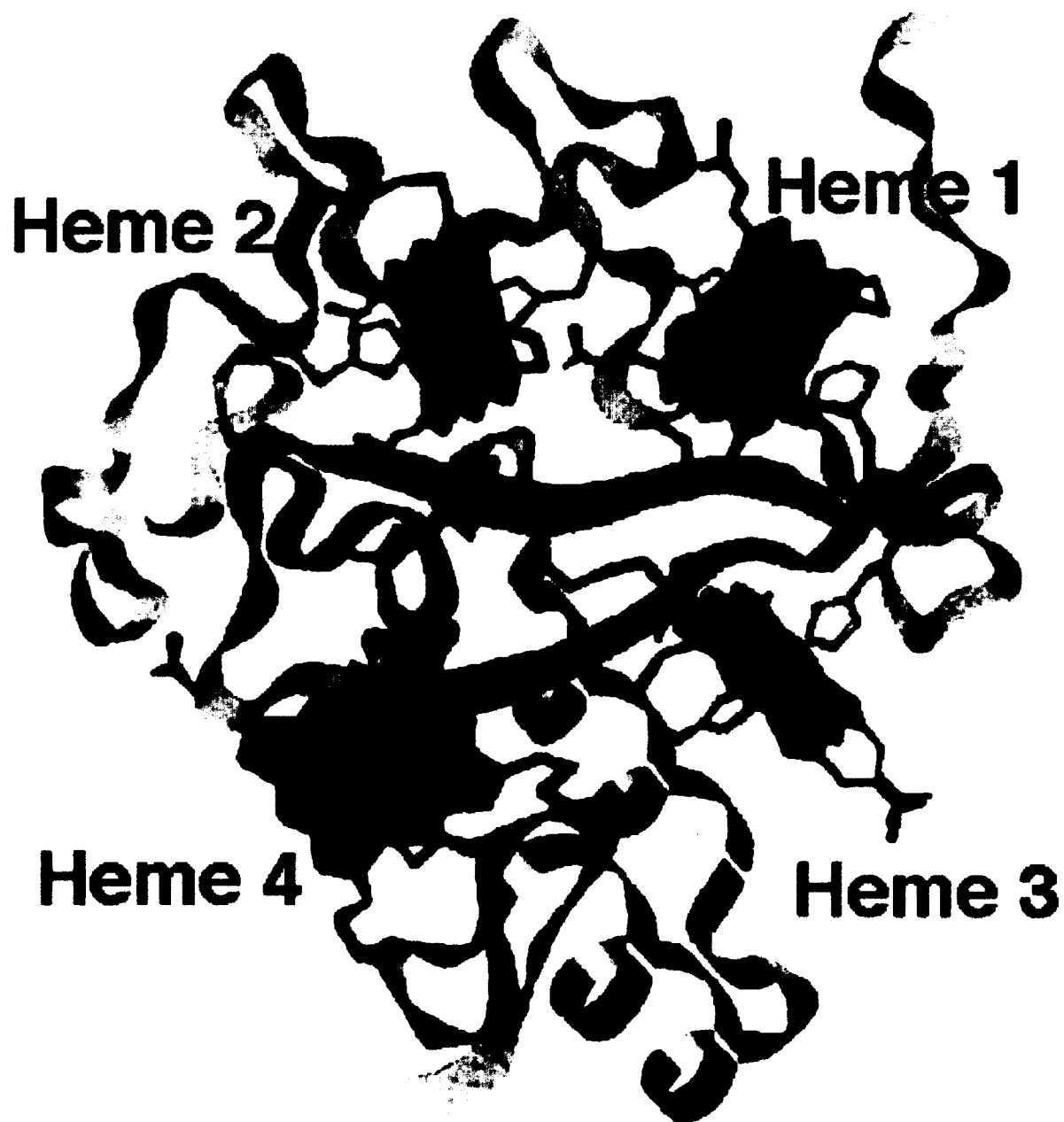


Fig. 4-2 The crystal structure of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F strain⁵⁾.

ATGAAAAGATGTTCTCACCGGTGTGCTCGCGCTGGCCGTT
M K K M F L T G V L A L A V
GCCATCGCCATGCCCGCCCTTGCCGCCGCCCGAAGGCCCT
A I A M P A L A A A P K A P
GCCGACGGTCTGAAGATGGACAAGACCAAGCAGCCCGTGGTC
A D G L K M D K T K Q P V V
TTCAACCACTCGACCCACAAGGCCGTGAAGTGTGGCGACTGT
F N H S T H K A V K ~~C G D C~~
CACCACCGGTCAACGGCAAGGAAGACTACCAGAAGTGCGCC
H H P V N G K E D Y Q K ~~C A~~
ACCGCCGGTTGCCACGACAACATGGACAAGAAGGACAAGTCC
~~T A Y I N S S C~~ H D N M D K K D K S
GCCAAGGGCTACTACCAGCCATGCATGACAAGGGCACAAAG
A K G Y Y H A M H D K G T K
TTCAAGAGCTGCGTGGGCTGCCACCTTGAAACCGCGGGCGCC
F K S ~~C V C C~~ H L E T A G A
GACGCCGCCAAGAAAAGGAAGTACTGACGGGCTGCAAGGGCTCC
D A A K K K E L T G ~~O K G S~~
AAGTGCCATAGCTAG
~~K C~~ H S

Fig. 4-3 The base sequence of cytochrome c_3 gene from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F and its amino acid sequence

The underline shows the region of signal peptide sequence.

Table 4-1 The characteristics of cytochrome c_3
from *D. vulgaris* Miyazaki F

Absorption maximum of ferricytochrome c_3	530nm, 410nm(γ)
Absorption maximum of ferrocyclochrome c_3	552nm(α), 524nm(β), 419nm(γ)
Isosbestic point	560nm, 542nm, 532nm, 508nm, 432nm, 412nm, 343nm, 254nm
Absorption coefficient	120mM ⁻¹ cm ⁻¹ (at 552nm, the fully reduced state) 32mM ⁻¹ cm ⁻¹ (at 552nm, the fully oxidized state)
Macroscopic redox potential	-240mV, -297mV, -315mV, -357mV
Isoelectric point	10.6
Molecular weight	13995

参考文献

1. **Higuchi, Y., Kusunoki, M., Matsuura, T., Yasuoka, N., and Kakudo, M.**, Refined structure of cytochrome c_3 at 1.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **172**: 109-139 (1984)
2. **Shinkai, W., T. Hase, T. Yagi, and H. Matsubara**, Amino acid sequence of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris*, *J. Biochem. (Tokyo)*, **87**: 1747-1756(1980)
3. **Kitamura, M., K. Ozawa, S. Kojima, I. Kumagai, H. Akutsu, and K. Miura**, The primary structure of pre-cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) as determined by nucleotide sequencing of its gene and partial amino acid sequencing, *Protein Seq. Data Anal.*, **5**: 193-196 (1993)
4. **Fan, K., H. Akutsu, Y. Kyogoku, and K. Niki**, Estimation of microscopic redox potentials of a tetraheme protein, cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki F, and partial assignments of heme groups, *Biochemistry* (1990) **29**: 2257-2263.
5. **Yoshiki Higuchi**, Structure and function of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki, (1984) The Doctoral Thesis, p56.

4-1

S. oneidensis を宿主とする *c* 型多ヘム
シトクロムの大量発現系の確立

要 旨

4 ヘムタンパク質シトクロム c_3 は、硫酸還元菌のペリプラズムに豊富に存在し、エネルギー変換系の中で、さまざまな電子伝達タンパク質に電子を渡すことで、硫酸還元菌のエネルギー変換系を制御するという重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、われわれはこのタンパク質の遺伝子をクローニングし、大量発現系を構築しようとしてきたが、これまで、大腸菌、酵母、枯草菌と宿主を変えてもホロタンパク質はできなかった。理由は、4 つのヘムが、アポタンパク質に共有結合しなかったからである。光合成細菌を宿主に用いると、ホロタンパク質が生産されたが、その量は、硫酸還元菌から得られる収量よりもさらに少なかった。ところが、*Shewanella oneidensis* という湖沼に棲む通性好気性細菌を宿主とすると、ホロシトクロム c_3 が、大量に生産されることが分かった。発現ベクターに広宿主域ベクターを用いた場合、硫酸還元菌から得られる収量と比較すると、グラム菌体あたり 3 倍強、リッター培地あたり 6 倍強も多くとれた。また、この際、培養条件によって、シトクロム c_3 の収量に違いがでることも判明した。この発現系をさらに簡便で効率的にするために、広宿主域ベクターのかわりに大腸菌で汎用されている pUC 型ベクターを用い、さらに形質転換法を接合法からエレクトロポレーション法へ改良したところ、シトクロム c_3 の収量は、硫酸還元菌より得られる収量と比較して、グラム菌体あたり約 10 倍、リッター培地あたり 27 倍強にまで大きく跳ね上がり、同時に実験のスピードアップ化もできるようになった。

この発現系の普遍性を調べるために、同じく硫酸還元菌由来の高分子量シトクロム c 遺伝子 (*hmc*) についてもその発現を調べたところ、一分子中に 16 個の c 型ヘムを持ったホロ体も、正しくできることが確認された。またその際、現在知られているホモの硫酸還元菌を使った発現系よりもグラム菌体あたりで約 5 倍、リッター培地あたり約 9 倍、という圧倒的に大量のシトクロム収量が得られることがわかった。

本研究は、簡単で、速く、高効率な c 型多ヘムシトクロムの大量発現系の構築に成功した世界で初めての例である。

4-1-1 緒言

c 型シトクロム類の簡単で高効率な遺伝子発現システムを構築することは、物理化学的解析、生物電気化学、環境化学、そしてバイオテクノロジーのような広範で、さまざまな研究分野において重要なことである。特に、多ヘムシトクロム *c* とそのアミノ酸置換体の大量調製はとても難しい。それはタンパク質の成熟化のために、シグナル配列消化酵素やヘムライエースのようなさまざまな特殊な酵素を必要とするためである。この理由のために、*c* 型シトクロム類をヘテロな宿主において発現させることは、1つの挑戦であるといえる。*Saccharomyces cerevisiae* のイソ-1-シトクロム *c* は、シトクロム (CYC1) とシトクロム *c* ヘムライエース (CYC3) をコードしている酵母遺伝子の共発現によって、大腸菌の中で発現した¹⁾。しかしながら、大腸菌の発現系の中には酵母のメチルトランスフェラーゼがないために、72番目のリジン残基にトリメチル化がされなかった。いろいろなモノヘムシトクロム *c* が、大腸菌のなかでホロタンパク質としてうまく発現している²⁻⁷⁾が、4ヘムシトクロム *c*₃ の場合には、大腸菌中ではアポタンパク質しか作られなかった⁸⁾。そこで硫酸還元菌由来の4ヘムシトクロム *c*₃ の発現実験は、いろいろな異種細胞において調べられた。ホロシトクロム *c*₃ は、紅色非硫黄細菌でのみ、うまく発現してきた⁹⁾が、不幸なことに、その発現量は、物理化学的な解析のために使用するには十分に多くなかった。他方、ホモな宿主における発現は、成功している。例えば、紅色非硫黄細菌よりのシトクロム *c*₂^{10,11)} やシトクロム *c*'¹²⁾ は、酸素呼吸あるいは光合成によるどちらの生育条件でも大量発現した。硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH) からのシトクロム *c*₃ の大量発現も、ホモな宿主である *D. desulfuricans* G200 の中では成功している¹³⁾。

しかしながら、一般的に偏性嫌気性生物の培養は、好気性生物のそれと比べてずっと難しい。これは、シトクロム *c*₃ の発現系における深刻な問題である。硫酸還元菌はよく知られた偏性嫌気性細菌であり、生育する際、硫化水素を生み出す。硫化水素は臭くて有毒で腐食性であるため、硫酸還元菌からのシ

トクロム c_3 の大量調製を行う場合、さまざまなトラブルが引き起こされる。それゆえ、シトクロム c_3 の効率的でヘテロな宿主による発現系ができれば、ホモの系よりもずっと有用である。本章でとりあげる *S. oneidensis* MR-1 は、自身がシトクロム c_3 ¹⁴⁾ を作ることで知られ、多くの多ヘムシトクロム c を含んでいる^{14,15)}。また、通性好気性細菌であるので、大腸菌と同様に、たやすく速く、高密度の細胞を得ることができ、発現宿主として使える可能性がある。

本研究ではこの可能性について検討し、*D. vulgaris* Miyazaki F (*DvMF*) のシトクロム c_3 遺伝子が、実際に、*S. oneidensis* MR-1 の中で、好氣的にも嫌氣的にも発現することを示す。さらに、*S. oneidensis* の形質転換法の改良と、大腸菌で汎用されている pUC 型高コピーベクターを採用することにより、*S. oneidensis* の潜在的な可能性をさらに発掘し、大腸菌における遺伝子操作並に、簡単で速く、効率的な遺伝子発現システムを確立することができたので報告する。

4-1-2 材料および実験法

(1) 細菌培養および試薬

S. oneidensis MR-1 (*S. putrefaciens* MR-1 の改名¹⁶⁾) は、30 °C で好氣的に一晩、LB 培地を用いて培養した。*S. oneidensis* MR-1 のリファンピシン耐性変異株 *S. oneidensis* TSP-C の培養の際には、LB に加えて、10-50 $\mu\text{g/ml}$ となるようにリファンピシンを加えた。*Shewanella* の嫌気培養のためには、最終電子受容体として 30 mM フマル酸ナトリウムが入った LB 培地を脱ガスして用い、培養容器には、ブチルゴム栓で密封されたガラス瓶を使用した。低融点、高融点アガロースおよび、すべての制限酵素、修飾酵素は宝酒造より購入した。PCR 用プライマー (合成オリゴヌクレオチド DNA) は、ファルマシア (Sweden) より購入した。電気泳動用の分子量マーカーは、バイオラッド (USA) とファルマシアから得た。ウエスタンブロッティング分析のための PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (0.2 μm) と HRP-color 検出試薬 (西洋ワサビペルオキシダーゼと共役したヤギ抗ウサギイムノグロブリン G 二次抗体、4-クロロ-1-ナフトール、そして過酸化

水素) はバイオラッドから購入した。高純度卵白アルブミン (EWA) は、生化学工業から得た。抗 *DvMF* シトクロム c_3 血清は、北海道大学名誉教授の石本真先生よりいただいた。Hiload SP-Sepharose HP (2.6 x 10 cm)、Hiload Q-Sepharose HP (2.6 x 10 cm)、Hiload Superdex 75 (2.6 x 60 cm) カラムは、ファルマシアより購入した。他のすべての試薬および抗生物質は、和光純薬より得た。

(2) 発現ベクターの構築

pRKM3F (広宿主域ベクター)

DvMF からのシトクロム c_3 遺伝子 (*cyc* 遺伝子) を含んだプラスミド pKM300 (pUC18 の *AatII-SphI* 部位に、900-bp の *AatII-SphI* 断片が入っている。) ¹⁷⁾ を、*AatII* と *SphI* で二重消化した。得られた 900-bp の *AatII-SphI* 断片を、T4 DNA ポリメラーゼで末端平滑化し、プラスミド pUC118 の *SmaI* 部位に連結した。*lac* プロモーターと反対の向きのシトクロム c_3 遺伝子を持つプラスミドを選択し、そのプラスミドを、pUKM300 と名付けた。プラスミド pUKM300 を、それから *XbaI* と *EcoRI* で消化し、その 900-bp 断片をゲルより単離した後、広宿主域ベクター pRK415¹⁸⁾ の *XbaI-EcoRI* 部位に組みこんだ。そのプラスミド溶液で、大腸菌 JM109 を形質転換し、15 $\mu\text{g/ml}$ テトラサイクリン (Tc)、40 $\mu\text{g/ml}$ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactoside)、0.1 mM IPTG (isopropyl- α -D(-)-thiogalactopyranoside) の入った LB プレートにまいた。組換えプラスミドは、プレート上に生えてきた白コロニーから単離し、*XbaI* と *EcoRI* での消化により、900-bp の *cyc* 遺伝子を切り出すことで、目的とするものかどうかを確認した。完成した組換えプラスミド、pRKM3F (Fig. 4-1-1) は、後に *S. oneidensis* の形質転換のために使用した。

pMC3 および pHHMC (pUC 系ベクター)

テトラサイクリン耐性タンパク質 (Tet)、*DvMF* シトクロム c_3 (MC3)、そして *DvH* 高分子量シトクロム c (HHMC) をそれぞれコードする遺伝子 DNA

断片を増幅するために PCR を用いた。プライマー、5'-CTTCAAGACGTCTCATGTTTGACAGC-3' (26-mer)、および 5'-CCGCCGACGTCCATTCAGGTCGAGGTGGCC-3' (30-mer) を使ってプラスミド pBR322¹⁹⁾ を鋳型にした PCR 増幅を行うことで、Tet^r 遺伝子の 5' および 3' 末端に、制限酵素 *Aat* II の認識配列を導入した。また、プライマー 5'-AAACTGCAGGTTTACCCCTAACCCACCAGAG-3' (31-mer)、および 5'-GCGAATTCTTAGCTATGGCACTTGGAGCCCTTGC-3' (34-mer) を使い、プラスミド pKM300¹⁷⁾ を鋳型にした PCR を行うことで、MC3 遺伝子の 5' および 3' 末端に、それぞれ制限酵素 *Pst*I および *Eco*RI の認識配列を導入した。同様な方法で、プライマー 5'-GCCTGCAGCGCTGCAATTGCATCTGCGCG-3' (29-mer)、および 5'-GCGAATTCTATTCGCGCGTTCCTTGTGGCAATCGAC-3' (37-mer) を使い、*Dv*H の染色体 DNA を鋳型にした PCR を行うことで、HHMC 遺伝子の 5' および 3' 末端に、それぞれ制限酵素 *Pst*I および *Eco*RI の認識配列を導入した。

次にあらかじめ、*Pst*I-*Eco*RI 消化した pUC119²⁰⁾ ベクターに、上で増幅した MC3 と HHMC 遺伝子断片の *Pst*I-*Eco*RI 消化物をそれぞれクローニングし、できたプラスミドをそれぞれ、pUCMC3 と pUCHHMC と名付けた。次に、同様に上で増幅した Tet^r 遺伝子断片の *Aat*II 消化物を pUCMC3 と pUCHHMC の *Aat*II 部位にそれぞれクローニングし、生じたベクターをそれぞれ、pMC3 (Fig. 4-1-2) および pHHMC と名付け (そのヌクレオチドの配列より、これらのプラスミドは、それぞれ、14- および 65.5-kDa の多ヘムシトクロムをコードしているはずである)、後に *S. oneidensis* の形質転換のために使用した。また、DNA の塩基配列決定の際には、サーモシークエネースサイクルシークエンシング法 [7-deaza-dGTP および 2 種類の赤外線色素ラベルプライマー (M13 Forward/IRD800 と M13 Reverse/IRD700) と PCR を利用する方法] により反応を行い、ライカの DNA シークンサー LIC-4200 システムを用いて電気泳動および塩基配列の確認を行った。

(3) *S. oneidensis* の形質転換

接合法

S. oneidensis の形質転換の方法としてまず、接合法を試みた。この方法は、いったん、大腸菌 S17-1²¹⁾ 株を pRKM3F, pMC3, or pHHMC プラスミドにより形質転換した後、この形質転換された大腸菌から、プラスミドだけを *S. oneidensis* へ移すという間接的なプラスミド導入法である。

S. oneidensis と大腸菌 S17-1 / pRKM3F, pMC3 or pHHMC の 1:1 (v/v) 混合液を LB のみの液体培地の中で、30℃、4 時間 (か一晚) 培養した後、リファンピシン (30 mg/L) とテトラサイクリン (5 mg/L) を含む LB-agar プレート上に広げ、30℃で一晩静置培養した (ただし、以下 pRKM3F での形質転換の場合は、テトラサイクリン濃度のみを 15 mg/L とした)。

エレクトロポレーション法

次に検討したのはエレクトロポレーション法である。この方法は、接合法とは異なり、プラスミドを直接的に *S. oneidensis* に導入する方法である。

30℃で一晩振とう培養された、新鮮な *S. oneidensis* の 3 mL 培養液のうち、1 mL を、100 mL の LB 培地に植菌した。600 nm の光学密度が、約 0.5 となるまで 30℃で振とう培養を続け、その後、すばやく 4,000 x g で 15 分、4℃で遠心することにより、集菌を行った。過剰な上清を出来る限り除いた後、菌体を溶菌させないように注意して 10% の冷グリセロール溶液 100 mL に懸濁した。その懸濁液を上と同様に遠心分離し、上清をもう一度取り除いた。沈殿を、50 mL の冷 10% グリセロールに再懸濁した後、遠心して上清を取り除き、さらに 10 mL の冷 10% グリセロールに再懸濁した。そして最後に遠心して得られた沈殿を 0.4 mL の冷 10% グリセロールに懸濁し、懸濁液を、40 μ L ずつ、小分けにして、液体窒素で急凍した後、-70℃で保存した。

形質転換を行う際には、まず、この凍結菌体 (40 μ L each) を素早く氷に

つけて溶かし、Minipreps によって得られたプラスミド溶液 2 μ L と完全に混合し、1分間、氷につけた。Bio-Lad 社製の *E. coli* Pulser を用いて、0.2 cm のギャップ付き電極用キュベットに素早く混合液を入れた後、2.50 kV の電圧を瞬間的にかけた。その後、素早く 0.8 mL の LB 培地をキュベットに投入し、菌体とよく混合後、全量回収し、2 mL のポリプロピレン製チューブに入れ、30°C で 2-12 h 保温した。そして、このうち 0.1 mL の菌体懸濁液を、30 mg/L のリファンピシンと 5 mg/L のテトラサイクリンの入った LB-agar プレート上にまき、プレートは、30°C で一晩 (あるいは二晩) 静置培養した。

(4) 形質転換した *S. oneidensis* の大量培養

プレート上にコロニーができた直ちに、形質転換された *S. oneidensis* の単一コロニーを拾い、10 mg/L のリファンピシンと 5 mg/L のテトラサイクリンの入った 3 mL の LB 培地に植菌した。振とう培養器 (Taitec 社製の double shaker NR-30) により、30°C で激しく振りながら (130 min^{-1})、一晩培養後、そのうち、1 mL を 300 mL の三角フラスコに入った 100 mL の LB 液体培地 (10 mg/L のリファンピシンと 5 mg/L のテトラサイクリンを含む) に植え継いだ。4-5 時間、あるいは、一晩の振とう培養 (130 min^{-1}) 後、3L の三角フラスコに入った 1L の LB 培地 (10 mg/L のリファンピシンと 10 mg/L のテトラサイクリンを含む) に前培養液 50 mL を植え継いだ。この 1L の培養液は、30°C で 24-26 時間 (対数増殖期後期まで) 振とう培養した (Taitec 社製の water bath shaker MM-10 で、90 min^{-1})。その後、培養菌体を、4°C、7,000 g で 15 分遠心し、回収した (Tomy GRX-220 遠心機、No. 17N rotor)。

(5) 組換え体シトクロム c_3 と高分子量シトクロム c (Hmc) の精製

形質転換された *S. oneidensis* の湿菌体 約 12 g を、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のデオキシリボヌクレアーゼ I (Sigma) と 1 mM の PMSF を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) の 約 36 mL に充分懸濁し、Branson 社製の Model 250 sonifier を用いて、氷冷しながら細胞を超音波破碎した。以降、すべての精製作業は、4°C

で行い、特に断りがなければ、緩衝液の pH は、7.0 としている。細胞の膜やデブリは、23,000 g で 20 min の遠心によって取り除いた。この遠心で得られた可溶性の上清に、1 g の湿菌体につき約 0.16 g のストレプトマイシン硫酸塩を加えた後、30 分間ゆっくりかき混ぜた。その後、23,000 g で 30 min 遠心して、核酸成分を沈殿させた。上清は、以下のさらなる精製のために使用した。

組換え体 DvMF シトクロム c_3 は 2 段階で精製した (Fig. 4-1-3)。最初に、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に対して透析後、上清を、前もって同じ緩衝液で平衡化しておいた SP-Sepharose HP カラム (2.6 x 10 cm) にかけた。この条件下では、DvMF シトクロム c_3 (pI = 10.6) は、イオン交換樹脂に結合するが、内在の *S. oneidensis* のシトクロム c_3 (pI = 5.8) は、他のタンパク質とともに溶出する。10 mM リン酸ナトリウム緩衝液中で 0 から 500 mM の NaCl 濃度勾配をかけて、DvMF シトクロム c_3 をカラムから溶出した (DvMF シトクロム c_3 は、約 150 mM の NaCl 濃度で溶出)。溶出したシトクロム c_3 分画をさらに、FPLC システム (アマシャムファルマシア) を用いて、あらかじめ、50 mM NaCl-10 mM リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化しておいた Hiload Superdex 75 ゲルろ過カラム (2.6 x 60 cm) を通して精製した。純度は、15% SDS-PAGE の CBB 染色により、他のバンドが見えないことによって確認した (Fig. 4-1-4 レーン 5)。また、精製度 Index [$A_{552\text{red}}/A_{280\text{ox}}$] \cong 3.0 も指標とした。ただし、 $A_{552\text{red}}$, $A_{280\text{ox}}$ はそれぞれ還元型での 552 nm の吸収、酸化型での 280 nm における吸収である¹⁶⁾。

組換え体 DvH Hmc は、ほとんど 1 段階で精製できた (Fig. 4-1-5)。まず、Q-Sepharose HP (2.6 x 10 cm) と SP-Sepharose HP (2.6 x 10 cm) をこの順で連結させたカラムを 10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液で平衡化したものを用意した。そして、核酸沈殿処理済みの上清を、10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液で充分透析した後、この連結カラムに通した。この条件下では、*S. oneidensis* に本来内在しているシトクロム類は、陰イオン交換樹脂である、Q-Sepharose HP にすべて吸着し、一方、DvH Hmc は、pI=9.2²²⁾ なので、陽イオン交換樹脂である SP-Sepharose HP に吸着する。その後、Q-Sepharose HP との連結を取り外し、

SP-Sepharose HP カラムのみにし、0 から 500 mM までの、NaCl 濃度勾配をかけた。組換え体 *DvH Hmc* は、約 165 mM の塩濃度で溶出した。純度は、15% SDS-PAGE 後の CBB 染色により確認した。単一にまで精製されたものの純度 index ($[A_{552\text{red}} - A_{570\text{red}}] / A_{280\text{ox}}$) は、3.0 である²³⁾。

(6) その他の方法

試料を、15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、タンパク質全体を染色する際には CBB (Coomassie Brilliant Blue R-250)、ヘム *c* を染色する際には *o*-tolidine dihydrochloride²⁴⁾ を用いて可視化した。*N*-末端アミノ酸配列は、15% SDS-PAGE ゲルから、いったん、PVDF 膜へ電氣的に移されたタンパク質のバンドを島津社製、PPSQ-10 プロテインシークエンサーにかけて分析した。紫外-可視吸収スペクトルは、島津社製 UV-2200 分光器を用いて測定した。MALDI-TOF マススペクトルは、PerSeptive Biosystems 社製 Voyager TMDE を使って決定した。この際、使用したマトリックスは、sinapinic acid である。¹H-NMR スペクトルは、Bruker 社の DRX-400 NMR spectrometer で測定した。ヘム含量は、ヘム *c* のための差ミリモル吸光係数、24.3 ($\Delta\epsilon_{550-553}$)²⁵⁾ を使って、ピリジンフェロヘモクロモゲン法により決定した (この方法では、1 mol の分子量既知のシトクロム中に、何 mol のヘムが含まれているのかを知ることができる。)。タンパク質濃度は、BCA 法²⁶⁾ によって、ウシ血清アルブミンを標準として決定した。精製されたシトクロムの収量の評価のために、還元型 *DvMF* シトクロム c_3 では、552 nm の吸光係数 $116,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ²⁷⁾、還元型 *DvH Hmc* では、553 nm の吸光係数 $374,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ²²⁾ を用いた。

4-1-3 結果

(1) pRKM3F (広宿主域ベクター) による組換え体シトクロム c_3 の発現

DvMF の *cyc* 遺伝子の発現を確認するために、*S. oneidensis* とその組換え体 *S. oneidensis* (pRKM3F) の可溶性タンパク質画分を、SDS-PAGE にかけて分離した。

Fig. 4-1-6A と 6B におけるレーン4(野生株由来) と6(組換え体由来) を比較すると、レーン 6 には、14 kDa の *c* 型シトクロムが現れていることがわかる。このことから *S. oneidensis* (pRKM3F) は *Dv*MF シトクロム c_3 の遺伝子産物を発現していることがわかる。また、そのバンドの位置は、*Dv*MF シトクロム c_3 マーカー (レーン3と7) と同一であり、*S. oneidensis* (レーン5) からのシトクロム c_3 のそれとははっきりと異なっていた。さらに、レーン 6 に見られる 14 kDa のバンドは、*S. oneidensis* (pRKM3F) の培養液中のテトラサイクリンの濃度を 15 μ g/ml から 30 μ g/ml まで上げた時に、約 2 倍の濃さに増加するという事も判明した。一方、ゲルのヘム染色 (Fig. 4-1-6B) によって、*S. oneidensis* の中に、さまざまな *c* 型シトクロムが存在しているのが可視化されたが、このことは、既に報告されている結果 (*Shewanella* には、多くの *c*-型シトクロムが存在しているという報告)¹⁵⁾ と矛盾しなかった。さらにこれらのバンドのウェスタンブロット分析を、抗 *Dv*MF シトクロム c_3 血清を用いて行った (Fig. 4-1-6C)。その結果、レーン3、6、7 のバンドにクロス反応が現れた。レーン6 の 14 kDa バンドは、*S. oneidensis* 内に *Dv*MF のシトクロム c_3 が存在していることを示しており、他方、ネガティブコントロールであるレーン 4 と 5 にクロス反応がないことは、この血清が、*S. oneidensis* 内で生産されるシトクロム類とは全くクロス反応しないということを示している。

次に、菌体を 3 つの異なる条件下で培養し、得られたシトクロム c_3 の収量を検討した。1) 好氣的条件下：5-liter ファーマンターでの激しい通気。2) 微好氣的 (中間的通気) 条件下：3-liter の三角フラスコでの 2-liter 培養。3) 嫌氣的条件下：硫酸塩による *D. vulgaris* の嫌氣培養のように、フマル酸塩による嫌氣培養 (Table 4-1-1)。グラム湿菌体あたり (per-weight basis) のシトクロムの収量は、*D. vulgaris* の 0.15 mg に対して、*S. oneidensis* (pRKM3F) の場合、好氣的には 0.29 mg、微好氣的、あるいは嫌氣的には 0.5 mg であった。

1-liter 培地あたりの収量は、*D. vulgaris* の 0.3 mg に対して、*S. oneidensis* (pRKM3F) の場合、好氣的には 1.9 mg、微好氣的、あるいは嫌氣的には 1 mg であった。これらの相違は、3 つの異なる培養条件下で得られる菌体収量の違いを

反映している。好氣的培養は簡単で、高い菌体収量が得られるため、高い収量となる。したがって、この発現系は、簡単で、効率的なシトクロム c_3 生産系と言える。

また、*S. oneidensis* における *lac* プロモーターの効果を調べた。これは、将来、別の遺伝子の発現実験に *S. oneidensis* を利用する場合、どのプロモーターが、*S. oneidensis* には有効なのかという疑問にヒントを与えることができるからである。今回のプラスミド pRK3F は *lac* 遺伝子と *DvMF cyc* 遺伝子のプロモーターが、この順番でタンデムに含まれている。われわれは、*cyc* 遺伝子プロモーターがないプラスミドを構築することによって、*S. oneidensis* の中で *lac* プロモーター単独で機能するのかどうかを調べた。組換え体シトクロム c_3 の収量は、このプロモーターを持つ場合、湿菌体あたりの収量は約 10 分の 3 (0.15 mg / g wet cells) で、培地あたりの収量は約 10 分の 1 (0.21 mg / L culture) であった。しかしこの結果は *DvMF cyc* 遺伝子が、単独の *lac* プロモーターによってでも発現させることができることを示す。また、*lac* プロモーターの誘導物質である IPTG を加えても、その発現量は、変化しなかった。その後実験的に、*S. oneidensis* 自身は、 β -ガラクトシダーゼ活性を持っているが、IPTG を入れないとほとんど誘導されないということが分かった。したがって、*S. oneidensis* 自身の染色体に存在している *lac* プロモーター様構造は、大腸菌のものとは多少違うのかもしれない。そのために、*S. oneidensis* のリプレッサーはプラスミド上に存在する大腸菌のプロモーター領域に結合できない可能性がある。

(2) pUC 型ベクターによる *S. oneidensis* の形質転換

S. oneidensis と広宿主域ベクター pRK415 を用いた *DvMF* シトクロム c_3 の発現については上で述べた¹⁶⁾。その結果は、*S. oneidensis* が多ヘム型を含むさまざまな外来 *c* 型シトクロム類を大量発現する潜在的な可能性を示していた。そこでさらにこのシトクロム c_3 の発現レベルを向上させるため、われわれはこれまで用いていた pRK415 ベクターを、大腸菌内で高コピー数の複製が可能なプラスミド pUC119 に置き換えることを検討した。接合法による大腸菌

S17-1 (pMC3) から *S. oneidensis* への pUC 型ベクターの転送は、広宿主域ベクター (pRKM3F) の時と同様に幸いにもうまくいった。しかしながら、*S. oneidensis* の pUC 型ベクターによる形質転換効率は、広宿主域ベクターによるそれよりも悪かった。他方、*S. oneidensis* (pMC3) を 3 mL 一晚培養 (LB- 10 mg/L リファンピシン、10 mg/L テトラサイクリン) したものと通常の Minipreps によって抽出された pMC3 プラスミドの収量は約 8 μg (350 μg / g 湿菌体) であったが、この値は、通常同様に培養された大腸菌 JM109 より得られる収量 (約 10 μg / 3 mL 培地, 500 μg / g 湿菌体) と近い値であることもわかった。このプラスミドの収量は、大量培養した後でも大差ないことから、*S. oneidensis* は、一度中に入ってしまったら、pUC 型ベクターでも安定に維持でき、また、高い効率でそのコピーを複製することができる都合の良い宿主と言える。

そこでこの発現系をさらに使いやすくするために、pUC 型ベクターによる *S. oneidensis* の直接的な形質転換の可能性について検討した。まず、よく知られたカルシウム法による *S. oneidensis* のコンピテントセルを調製し、ヒートショック (30°C で 45 秒間) による形質転換を試みた。しかし、抗生物質入り LB プレート上には、1 つも形質転換体が現れなかった。そこで、電気的な形質転換 (エレクトロポレーション) を試みた。幸いなことに、pUC 型ベクターによるエレクトロポレーションは成功だった。pMC3 ベクターによる *S. oneidensis* の形質転換効率は、およそ、平均 6×10^3 コロニー/ μg プラスミドだった。ちなみに pRK415 の場合には、エレクトロポレーションの効率は、およそ 10^4 から 10^5 コロニー/ μg プラスミド DNA だった。接合による形質転換の場合と同様に、pUC 型ベクターによる *S. oneidensis* の形質転換効率は、広宿主域ベクターのそれよりも悪かったと言える。しかしながらこの pRK415 の結果は Saffarini 等の報告にある他の広宿主域ベクターによる *S. putrefaciens* のエレクトロポレーション効率と矛盾しない値である²⁸⁾。pMC3 ベクターによる *S. oneidensis* の形質転換効率は、大腸菌のエレクトロポレーションによる同ベクターの形質転換効率 (約 10^9 コロニー/ μg プラスミド DNA) よりはずっと悪いが、大量発現の実験を実行するには充分であると思われる。

(3) pMC3 (pUC 型ベクター) による組換え体シトクロム c_3 の大量発現

S. oneidensis (pMC3) から単離したプラスミド pMC3 の収量は、*S. oneidensis* (pRKM3F) から単離したプラスミド pRKM3F の収量よりずっと多かった。このことは、pUC 型ベクターの方が、広宿主域ベクターよりタンパク質の高レベル生産に適していることを示唆している。実際、*S. oneidensis* (pMC3) からの組換え DvMF シトクロム c_3 の収量は、Table 4-1-2 に示すように、1.4 mg/g 湿菌体、8.3 mg/L 培地であったが、他の宿主由来のものよりずっと多かった。1 L 培地あたりの収量は、DvMF における野生型のシトクロム c_3 の収量の約 27 倍であり、*S. oneidensis* (pRKM3F) からの組換え DvMF シトクロム c_3 の収量¹⁶⁾ の約 4 倍である。

この大量発現系で得られた組換えタンパク質を、野生型の DvMF シトクロム c_3 と比較した。酸化型、還元型の紫外-可視吸光スペクトル、および、SDS-PAGE 分析によるみかけの分子量はともに、野生型の DvMF シトクロム c_3 より得られたものと同じであった。低磁場における野生型、および組換え体酸化型シトクロム c_3 の NMR スペクトルは、Fig. 4-1-7 に示してある。図は、常磁性シフトしたヘム由来のシグナルが現れる領域で、シトクロム類の化学的、あるいは物理的変化を検出するのに最も適している。Fig. 4-1-7 より明らかなように、この領域においては、野生型 DvMF シトクロム c_3 と組換え体シトクロム c_3 は、本質的に同一であった。今回精製された組換え体シトクロム c_3 のアミノ末端配列 (AAPKAPADGLKMDK...) は、*S. oneidensis* (pRKM3F) よりの組換え体シトクロム c_3 と同じく¹⁶⁾、報告されていた配列 (APKAPADGLKMDK...) ²⁹⁾ に、もう一つの余分なアラニン残基が付いていた。そこでわれわれは、野生型の DvMF シトクロム c_3 のアミノ末端配列を徹底的に調べ直した。すると、PMSF を入れないで精製した場合、その報告されていた配列は正しいことが確認されたが、PMSF を入れて精製した際には、野生型のタンパク質にも余分なアラニンが存在していることがわかった。それゆえ、野生型と組換え体シトクロム c_3 の間に見られた N-末端配列の差異は、精製の際の最初のアラニン残基

のアミノペプチダーゼへの感受性に起因するものであると考えられる。また、N-末端にアラニンが1つと2つの場合、DvMF シトクロム c_3 の質量数の計算値は、それぞれ、13,995.0 と 14,066.1 であると予想される。野生型と組換え体シトクロム c_3 のマスペクトルを測定することにより実験的に決定した質量数は、それぞれ、14,067.8 ± 14.1 と 14,061.7 ± 14.1 であった (Fig. 4-1-8)。それゆえ、0.1% の誤差を考慮に入れても両者の質量数は、N-末端における2つのアラニンの存在を支持している。以上の結果より、われわれは、組換え体 DvMF シトクロム c_3 と野生型のは、N-末端配列を含めて同一であると結論した。

(4) *S. oneidensis* における、16 ヘム高分子量シトクロム c の発現

c 型の多ヘムシトクロム類の遺伝子発現系の普遍性を調べるために、*D. vulgaris* Hildenborough の 16 ヘムシトクロム c の発現実験を行った。このタンパク質は、高分子量シトクロム c (Hmc) とも呼ばれている。

まず Hmc 遺伝子を含むプラスミド pHHMC (pUC 型ベクター) を、エレクトロポレーションにより *S. oneidensis* に導入し、形質転換した *S. oneidensis* (pHHMC) を、*S. oneidensis* (pMC3) の場合と同様に培養した。

次に実験方法で述べた 1 段階精製法により組換え体 DvH Hmc を精製した。それぞれの精製段階における試料を、SDS-PAGE にかけて、CBB 染色 (Fig. 4-1-9A) あるいは、*o*-tolidine dihydrochloride によりヘム染色を行った (Fig. 4-1-9B)。Fig. 4-1-9A と Fig. 4-1-9B の比較により、65.5 kDa の c 型シトクロムが可溶性画分に発現しており、完全に単一バンドにまで精製されたことがわかった。レーン5 の精製タンパク質のバンドの位置は、DvH Hmc マーカー (レーン6) と同一であった。

組換え体 DvH Hmc の紫外-可視吸収スペクトルは、10 mM リン酸緩衝液中、室温、酸化型で 410 nm のピーク、ジチオナイト還元型で 552、523、419 nm のピークを示した (Fig. 4-1-10)。これらのピークは、DvH から単離した野生型 Hmc のそれと同一であり、その純度 Index [$A_{552\text{red}}/A_{280\text{ox}}$] は 3.0 であった。

組換え体 Hmc のみかけのヘム含量は、ピリジンフェロヘモクロモーゲン法とタンパク質定量によって、14.8 と決定した。この値は、野生型の *DvH* Hmc の報告されている数と同じである²³⁾。次に組換え体 Hmc の N-末端 10 アミノ酸残基の配列を、エドマン分解法により決定した。その配列は、KALPEGPGEK であり、野生型のそれ³⁰⁾と同一であった。したがって、組換え体 Hmc は、野生型の Hmc と同一であると結論付けられる。

このシトクロムの収量は、Table 4-1-2 に示したように、最高で、湿菌体あたり 0.25 mg、1L 培地 (1 L あたり 10 mg リファンピシンと 10 mg テトラサイクリンを含む 2 xYT 培地) あたり 0.50 mg だった。この値は、湿菌体 1g あたりで野生型 *DvH* より単離された Hmc (0.017 mg/g 湿菌体)³¹⁾ の約 15 倍である。これは、野生株より Hmc の収量が 3 倍多い大量発現系 (0.053 mg/g 湿菌体) であるという *Desulfovibrio desulfuricans* G200 を用いたホモの発現系³¹⁾での収量よりもずっと多い。この g 湿菌体あたりの収量は、結果の (1) で述べたように、好気的な条件よりむしろ、微好気的な条件のもとの方が、より多かった。ヘム数の増加にともなって、収量は落ちたが、この発現系は、報告されているいずれのものと比較しても、c 型多ヘムシトクロムの遺伝子発現において、高効率であることが判明した。

4-1-4 考察

大腸菌は、嫌気的条件下でのみ、自らの c 型シトクロム類を作る^{32, 33)}にも関わらず、他の生物種由来の c 型モノヘムシトクロム類は好气的に生産する場合もある。*Bacillus subtilis* シトクロム c-550³⁾、*Hydrogenobacter thermophilus* シトクロム c-552⁶⁾、*Thiobacillus versutus* シトクロム c-550⁴⁾ は、好气的に育てられた大腸菌であっても、ホロタンパク質の合成が観測されている。*T. versutus* のシトクロム c-550 は、微好気条件のもとで、最も効率的に発現した。この際の収量は、1L 培地あたり、1-2 mg のホロシトクロム c であったのに対して好気あるいは嫌気条件下では 1L 培地あたり、0.1 mg だけであった⁴⁾。好気条件下

での *D. vulgaris* Hildenborough (DvH) のシトクロム *c*-553 の大腸菌内での発現量は、1L 培地あたり、2 mg のレベルであった⁵⁾。さらに、最近、大腸菌 JCB7120 株が、*c* 型シトクロム遺伝子を異常に高いレベルで発現するという事実が報告された。この株は、*Pseudomonas aeruginosa* のホロシトクロム *c*-551 を嫌氣的条件下で 1L 培地あたり 8 mg の収量で生産している⁷⁾。

対照的に、これまで *c* 型の多ヘムホロシトクロム類をヘテロな宿主の中で大量発現させることは極めて難しかった。大腸菌は、好氣的、あるいは嫌氣的のどちらでも、DvH の 4 ヘムシトクロム *c*₃ のホロ体を合成することができないと報告されている⁸⁾。*Rhodobacter sphaeroides* は、DvH シトクロム *c*₃ を合成することができたが、そのホロ体の量はとても少なかった⁹⁾。つい最近、大腸菌は、大腸菌の *ccm* 遺伝子クラスターと一緒に持ち込むことにより (シトクロム *c*₃ 遺伝子と) 共発現をさせると、4 ヘムシトクロム *c*₃ を作ることもできるということが判明した³⁴⁾。それにもかかわらず、そのシトクロム *c*₃ の収量は、約 0.8 mg/L 培地であり、本研究で確立した方法における収量よりずっと低いものである (Table 4-1-2)。このような状況を鑑みると、今回の研究により確立した新しい宿主-ベクター系は、*c* 型の多ヘムシトクロム類遺伝子の発現のための新しい強力な方法と言える。

この発現系における重要なポイントは、大きく分けて 2 つある。一つ目は、*S. oneidensis* が、pUC 型のベクターによって、初めて形質転換されたことである。このことは、われわれに大きな利点を与えた。pUC 型ベクターの DNA 配列は完全に知られており、また、大腸菌の中で、非常に高コピー数で安定に存在できるのに対して、広宿主域ベクターの DNA 配列は一般的に知られていない。また、後者は、大きく不安定で、大腸菌の中でさえ、低いコピー数でしか存在できない。そのようなベクターを取り扱っている場合、たまに、そのベクターのどこかの領域の欠損等のようなよくわからないトラブルに出くわすことがある。広宿主域ベクター上には制限酵素部位が多すぎて、単一に消化できる部位が少ないことも、遺伝子操作のためには不便である。形質転換された *S. oneidensis* からの培地あたりの pUC 型プラスミドの収量は、同様に、pUC 型

プラスミドによって形質転換された大腸菌のそれと近い値であった。それゆえ、pUC 型ベクターは、*S. oneidensis* の中で、大腸菌の中でと同じぐらいの高コピー数で維持されているといえる。2 番目に重要なポイントは、*S. oneidensis* が、pUC 型ベクターによって、エレクトロポレーション法で直接的に形質転換されたことである。エレクトロポレーションによる形質転換は、大腸菌からの接合による方法よりも遙かに簡単で速い。このことは、目的のタンパク質のさまざまな遺伝子組換え変異体を作るための時間の節約となる。つまり、広宿主域ベクターを使つての接合による形質転換法の場合、目的の遺伝子への部位特異的変異を導入してから、組換え遺伝子の発現確認まで、ほとんど 1 ヶ月かかっていたのが、pUC 型ベクターでのエレクトロポレーション法では、同じことを 1 週間で成し遂げることができる。

S. oneidensis から単離された組換え DvMF シトクロム c_3 の 1L 培地あたりの収量は、野生型の DvMF からの収量より、27 倍以上多くなった。言い換えると、pUC ベクターでの収量は、広宿主域ベクター (pRKM3F) での収量より 4 倍以上多く、この 8.3 mg/L 培地という値は、大腸菌 JCB7120 株において大量発現したという *Pseudomonas aeruginosa* のモノヘムホロシトクロム c -551 の収量に匹敵するものである (Table 4-1-2)。発現条件および精製方法を最適化すれば、ホロシトクロム c_3 の収量をさらに改善できるであろう。

16 ヘムの Hmc の収量は、4 ヘムシトクロム c_3 の収量のだいたい 10 分の 1 であった。これは、ヘムの数や分子量の違いに起因しているかもしれない。正しいシステイン残基へのヘムの結合、配位子がヘム鉄へ正しく配位すること、そして、主鎖ポリペプチドが正しくフォールディングすることが、ヘムの数や、分子量の増加により、困難は幾何級数的に増大するものと思われる。さらに Hmc は、プロテアーゼに大変感受性であるので、Hmc の収量が抑えられている可能性がある。

本研究の結果、シトクロム c_3 の収量は、硫酸還元菌より得られる収量と比較して、グラム菌体あたり約 10 倍、リッター培地あたり 27 倍強にまで大き

く跳ね上がった。そして結果として、速く、簡単で、そして高効率な c 型多ヘムシトクロム類のヘテロな宿主による遺伝子発現系が確立した。このシステムは、電子移動機構や、生物電子素子、および環境化学のような c 型多ヘムシトクロムに関わるさまざまな研究において、新しい可能性を広げるものとなると思われる。

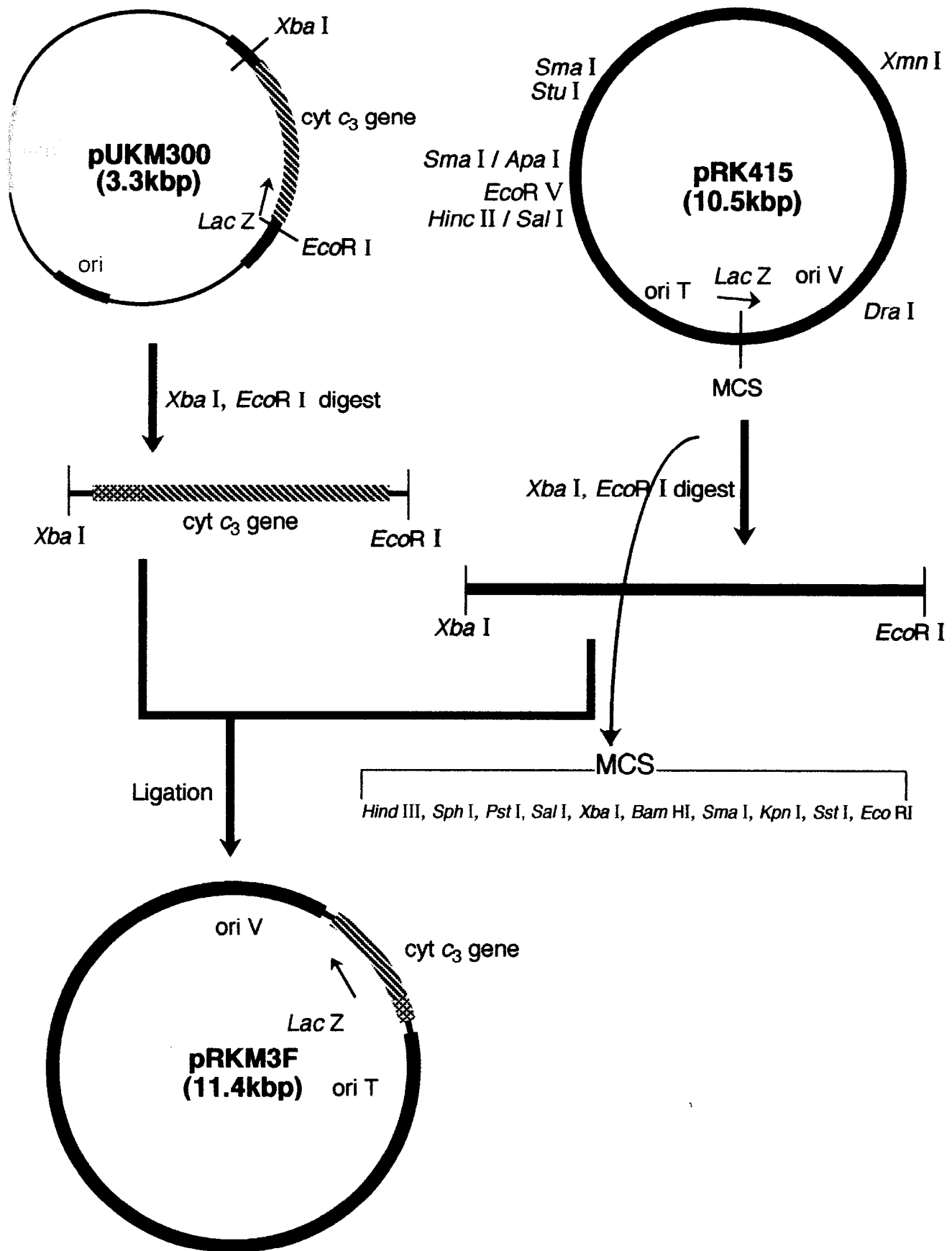


Fig. 4-1-1 Construction of pRKM3F

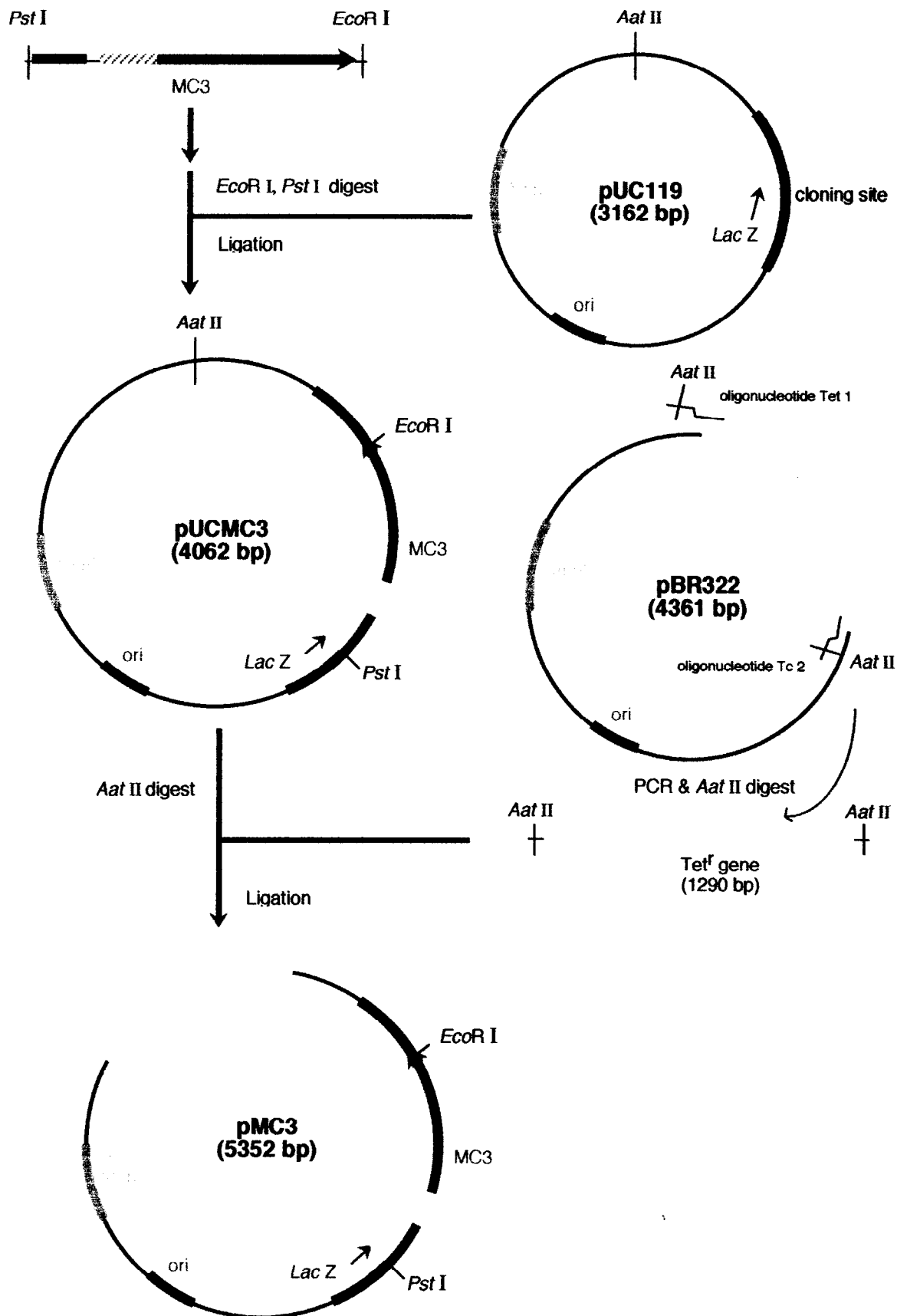


Fig. 4-1-2 Construction of pMC3

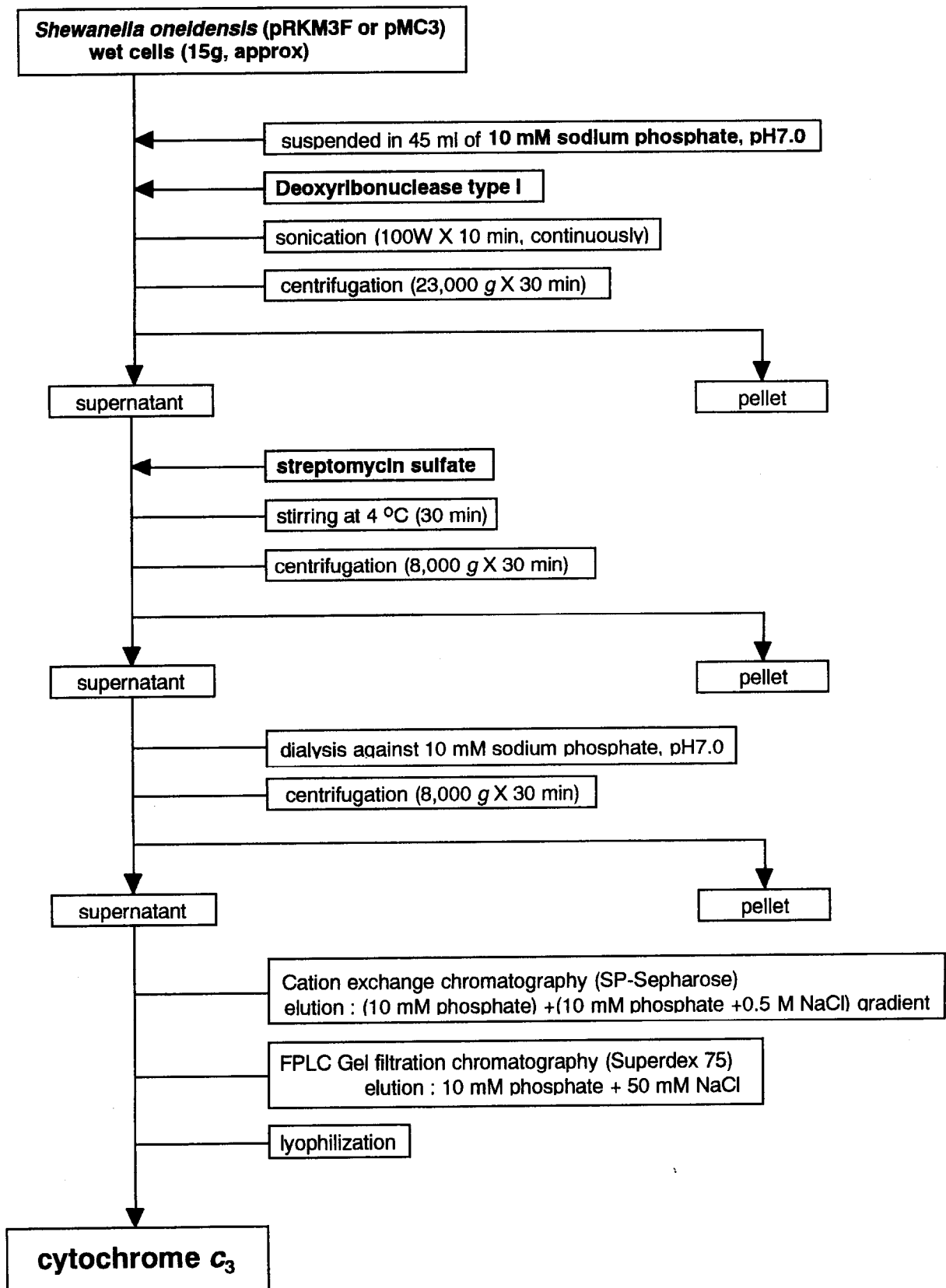


Fig. 4-1-3 The purification procedure of recombinant cytochrome c_3

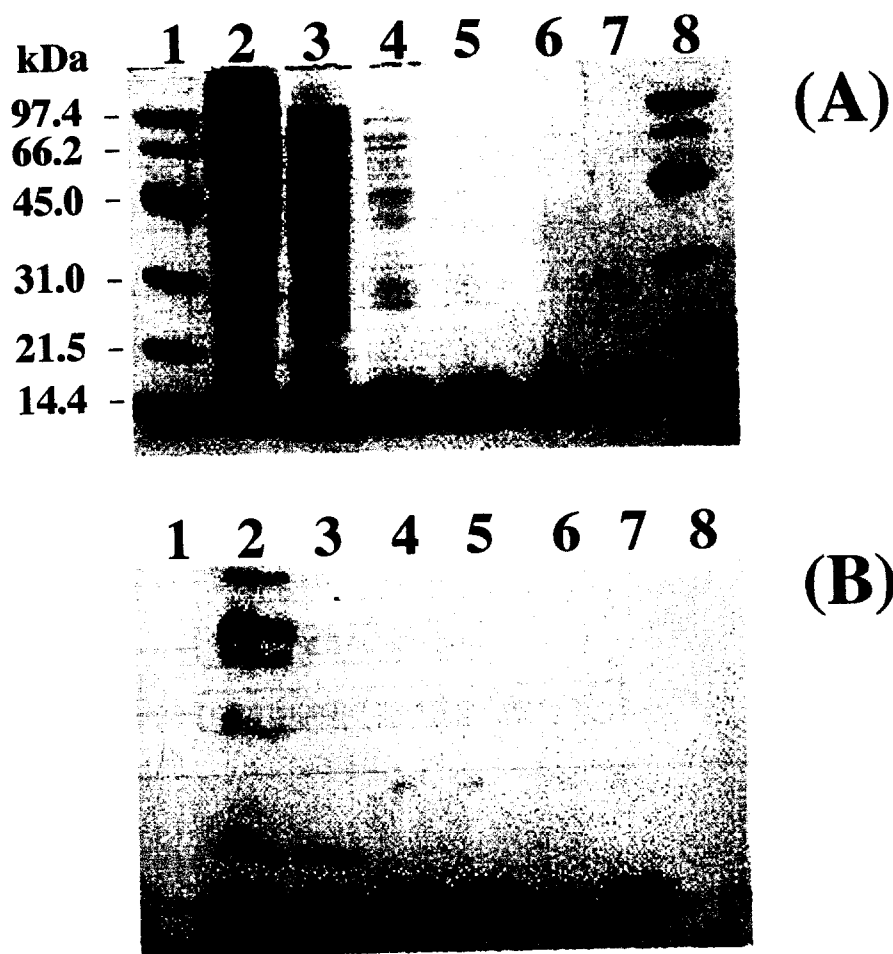


Fig. 4-1-4 15% SDS-PAGE analyses of recombinant cytochrome c_3 in the purification process.

Enzyme preparations were analyzed by 15% SDS-PAGE. Two different stainings are shown: (A) CBB staining; and (B) heme staining. Lane 2 was loaded with ca. 1 mg protein, lane 3 – 0.3 mg protein, lanes 4, 5, and 7 – ca. 0.01 mg proteins, lane 6 – 0.005 mg protein.

Lanes 1 and 8: high molecular weight markers.

Lane 2: supernatant of *S. oneidensis* (pRKM3F) extract.

Lane 3: supernatant after dialysis.

Lane 4: cytochrome c_3 fraction after SP-Sepharose column chromatography.

Lane 5: cytochrome c_3 fraction after Superdex 75 column chromatography.

Lane 6: *S. oneidensis* cytochrome c_3 marker.

Lane 7: authentic DvMF cytochrome c_3 marker.

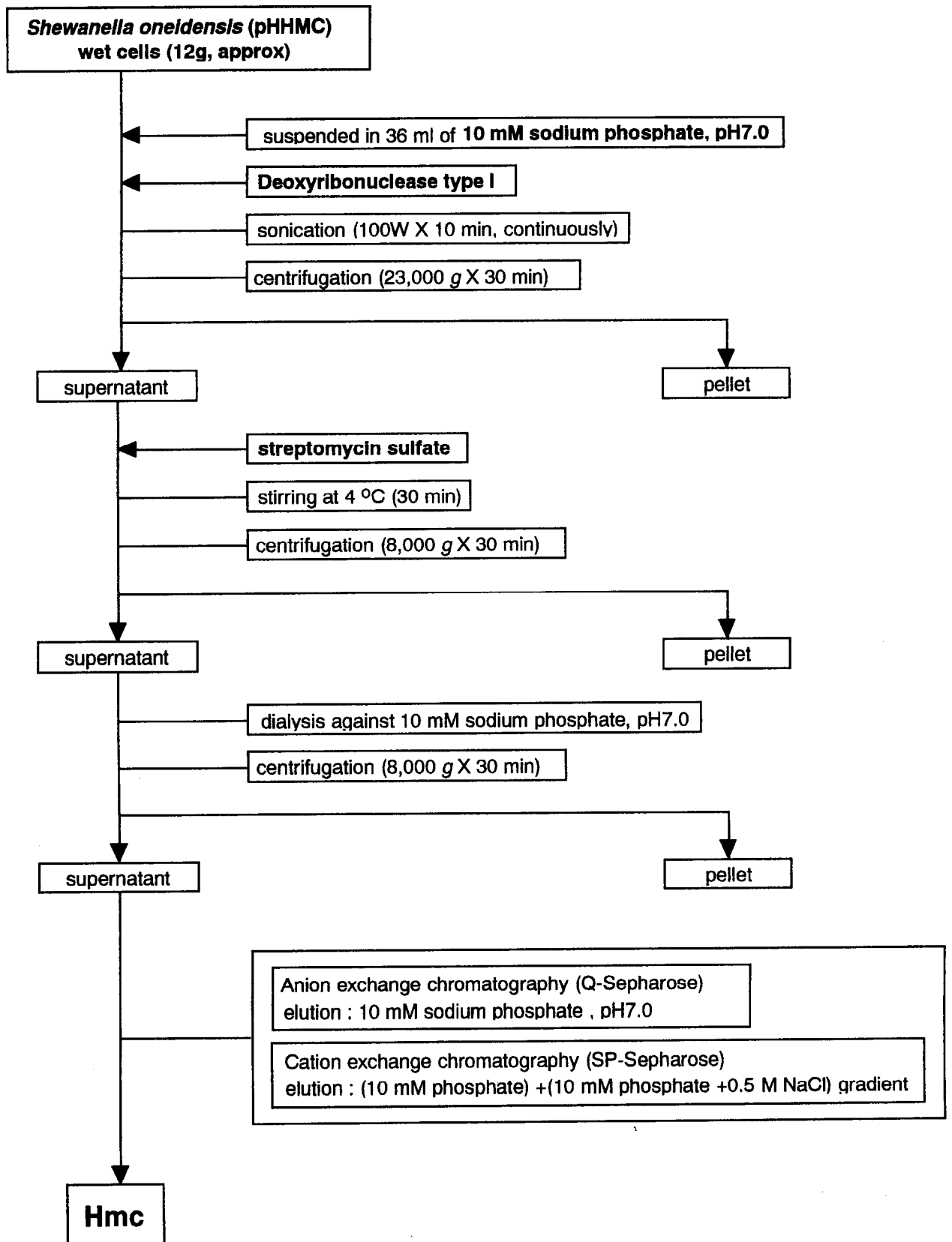


Fig. 4-1-5 The purification procedure of recombinant Hmc



Fig. 4-1-6 15% SDS-PAGE analyses of cytochrome c_3 in *S. oneidensis*

Cell preparations were analyzed by 15% SDS-PAGE. (A) protein staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB); (B) heme staining with *o*-tolidine dihydrochloride heme; and (C) Western blotting with antibody to cytochrome c_3 from *DvMF*.

Lanes 3, 5, and 7 were loaded with ca. 0.005 mg proteins, and lanes 4 and 6 with ca. 1 mg protein.

Lane 1: High molecular weight markers [phosphorylase *b* (97.4 kDa); bovine serum albumin (66.2 kDa); ovalbumin (45 kDa); carbonic anhydrase (31 kDa); soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa); lysozyme (14 kDa)]

Lanes 2 and 8: low molecular weight markers [globin (16.95 kDa); globin I+II (14.4 kDa); globin I+III (10.7 kDa); globin I (8.16 kDa)].

Lanes 3 and 7: authentic cytochrome c_3 from *DvMF*.

Lane 4: cell lysate from *S. oneidensis*.

Lane 5: authentic cytochrome c_3 from *S. oneidensis*.

Lane 6: cell lysate from *S. oneidensis* (pRKM3F).

Table 4-1-1 Cytochrome c_3 produced under different conditions

Host strain (condition)	mg/ g cells	mg/ liter culture
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F (anaerobic)	0.15	0.30
<i>D. desulfuricans</i> G200 (anaerobic)	(0.2) ^a	-
<i>S. oneidensis</i> TSP-C (aerobic)	0.29	1.9
<i>S. oneidensis</i> TSP-C (microaerobic)	0.50	1.0
<i>S. oneidensis</i> TSP-C (anaerobic)	(0.5) ^b	(1.0) ^b

^a Expression of the *D. vulgaris* Hildenborough *cyc* gene (13).

^b Similar to the amounts obtained under microaerobic conditions, judged from the intensity of the bands on SDS-PAGE.

Table 4-1-2 Yields of cyt c_3 and Hmc produced in various systems.

Host strain /vector	mg/ g cells	mg/ liter culture	ref.
Cytochrome c_3			
<i>D. vulgaris</i> Hildenborough	0.04	0.04	13
<i>D. desulfuricans</i> G200 /pJRDC800-1*	0.20	0.20	13
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	0.15	0.30	16
<i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3)/pT7Ddc ₃ **/pEC86	-	0.8	34
<i>S. oneidensis</i> TSP-C /pRKM3F***	0.5 ^{a)}	1.9 ^{b)}	16
<i>S. oneidensis</i> TSP-C /pMC3***	1.4 ^{a)}	8.3 ^{b)}	this work
High molecular weight cytochrome c			
<i>D. vulgaris</i> Hildenborough	0.017	0.018 ^{c)}	31
<i>D. desulfuricans</i> G200 /pBPHMC-1****	0.053	0.057 ^{c)}	31
<i>S. oneidensis</i> TSP-C /pHHMC****	0.25 ^{a)}	0.50 ^{a)}	this work

*; The pJRDC800-1 vector contains the *cyc* gene from *DvH*.

**; The pT7Ddc₃ vector contains the *cyc* gene from *Dd*.

***; The pRKM3F and pMC3 vectors contain the *cyc* gene from *DvMF*.

****; The pBPHMC-1 and pHHMC vectors contain the *hmc* gene from *DvH*.

a, b); The best values were obtained under different cell yields.

a) Approximately 2g wet cells /L culture, and b) approximately 6g wet cells /L culture.

c); The values are calculated on the basis of the data in ref. 31, namely, 320 g wet cells /300 L culture.

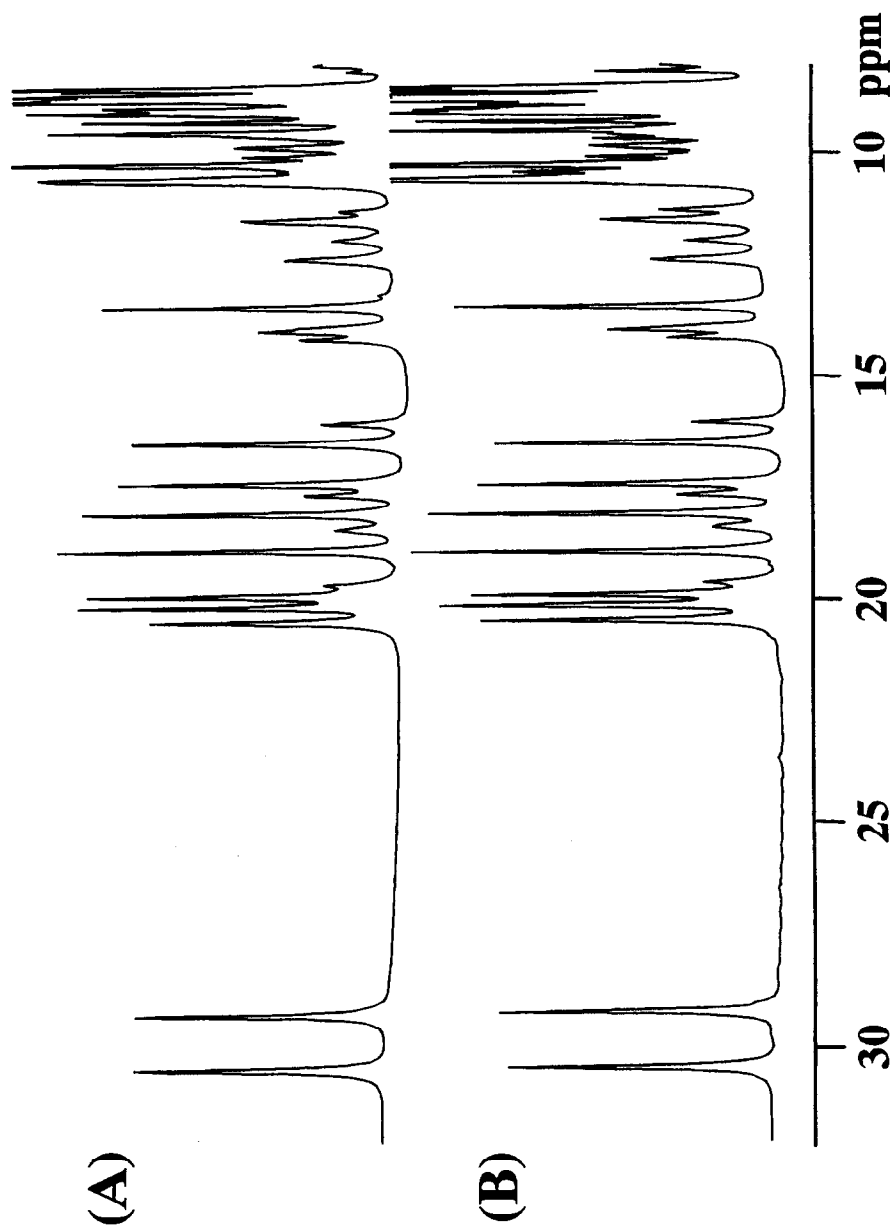
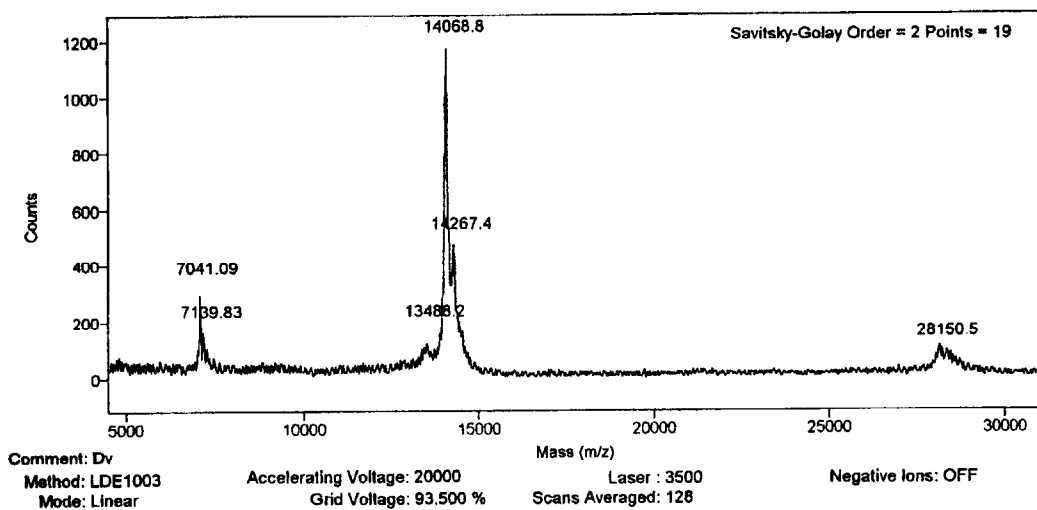


Fig. 4-1-7 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra of authentic (A) and recombinant (B) *DvMF* ferricytochromes c_3 at 303 K.

Only the fingerprint regions are presented. The protein was dissolved at 0.6 mM in a deuterated solution of 10 mM sodium phosphate buffer, p^2H 7.0.

(A)



(B)

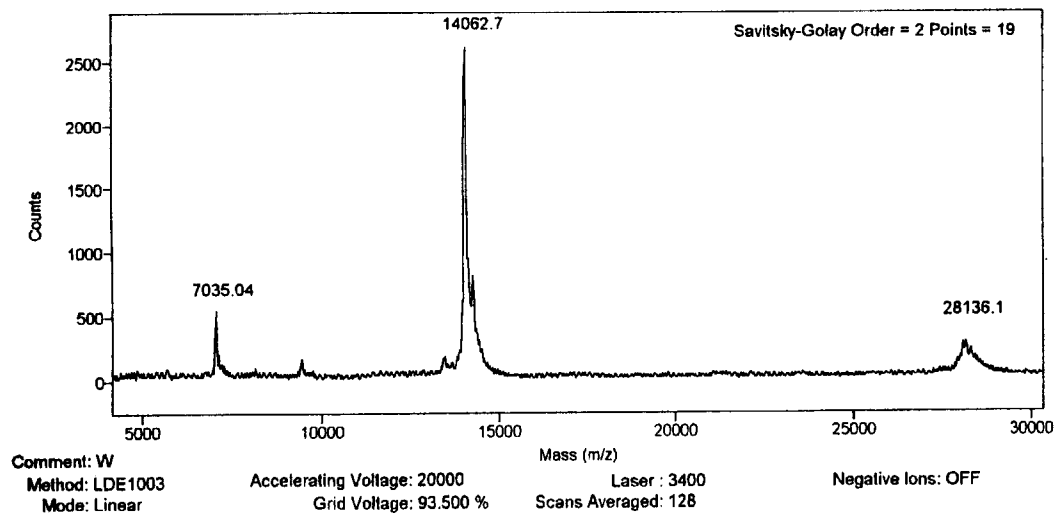


Fig. 4-1-8 MALDI-TOF mass spectra of cytochrome c_3

(A) authentic cytochrome c_3 isolated from *D. vulgaris* Miyazaki F

(B) recombinant *Dv*MF cytochrome c_3 isolated from *S. oneidensis*

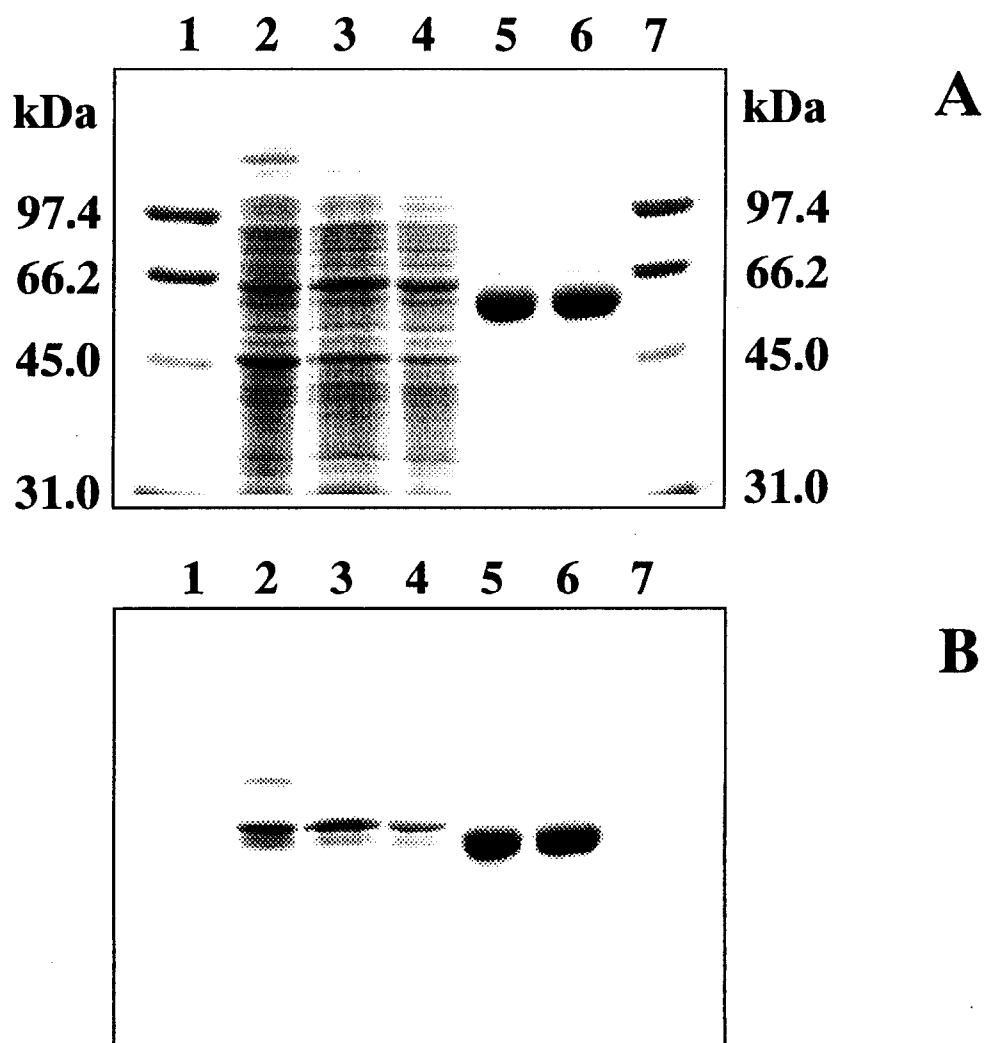


Fig. 4-1-9 15% SDS-PAGE analysis of the relevant fractions at each purification step of recombinant Hmc.

The samples were analyzed by 15% SDS-PAGE and stained with coomassie brilliant blue (A) or *o*-tolidine dihydrochloride (B). The molecular weight markers in the lanes 1 and 7 are composed of phosphorylase *b* (97400), bovine serum albumin (66200), ovalbumin (45000), carbonic anhydrase (31000). Lane 2, the crude extract; lane 3, the supernatant after streptomycin precipitation; lane 4, after dialysis against 10 mM phosphate buffer (pH7); lane 5, purified recombinant Hmc; lane 6, authentic *DvH* Hmc.

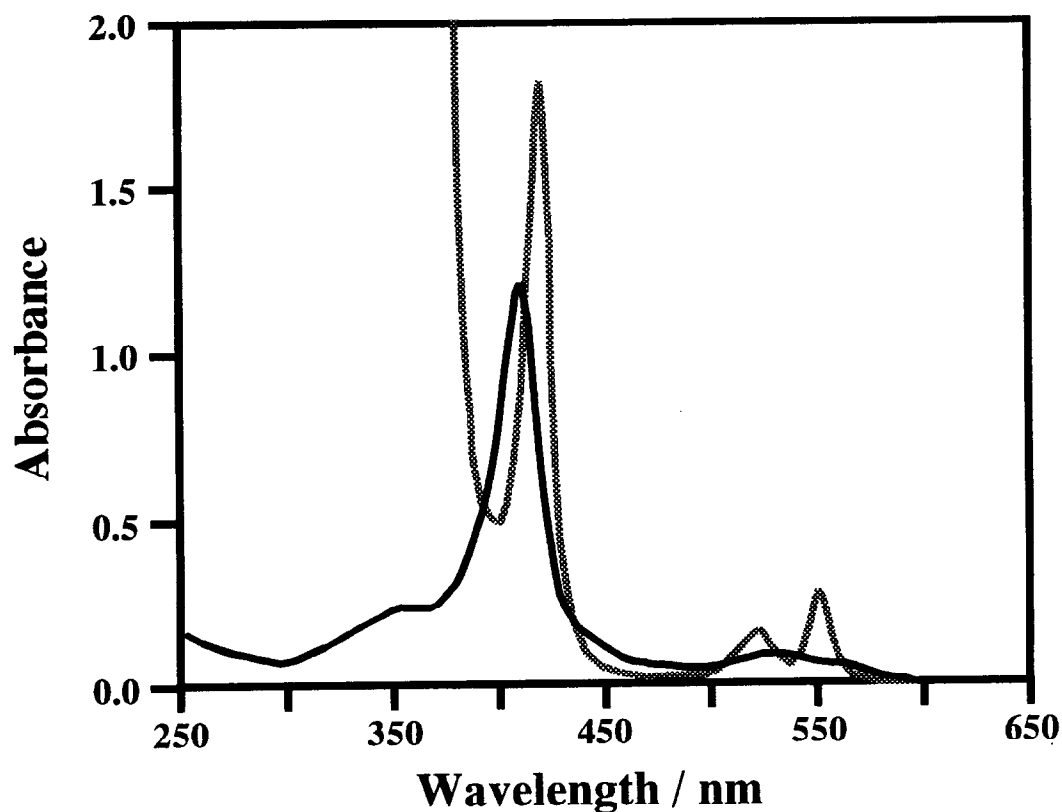


Fig. 4-1-10 Absorption spectra of the oxidized (dark line) and dithionite-reduced (pale line) recombinant Hmc.

The recombinant *DvH* Hmc showed the peak at 410 nm in the oxidized state and the peaks at 552, 523, 419 nm in the dithionite-reduced state in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 at room temperature. The spectrum of the reduced Hmc is masked by the absorption of dithionite in the region lower than 380 nm.

参考文献

1. Pollock, W. B., Rosell, F. I., Twitchett, M. B., Dumont, M. E., and Mauk, A. G., Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome *c*. Trimethylation of lys72 in yeast iso-1-cytochrome *c* and the alkaline conformational transition. *Biochemistry*, **37**, 6124-6131 (1998).
2. MacEwan, A. G., Kaplan, S., and Donohue, T. J., Synthesis of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c*₂ in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**, 253-258 (1989).
3. Von Wachenfeldt, C. and Hederstedt, L., *Bacillus subtilis* holocytochrome *c*₅₅₀ can be synthesized in aerobic *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **270**, 147-151 (1990).
4. Ubbink, M., van Beeumen, J., and Canters, G. W., Cytochrome *c*₅₅₀ from *Thiobacillus versutus*: cloning, expression in *Escherichia coli*, and purification of the heterologous holoprotein. *J. Bacteriol.*, **174**, 3707-3714 (1992).
5. Pollock, W. B. and Voordouw, G., Aerobic expression of the *cyf* gene encoding cytochrome *c*₅₅₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **140**, 879-887 (1994).
6. Sambongi, Y., Yang, J. H., Igarashi, Y., and Kodama, T., Cloning, nucleotide sequence and expression of the cytochrome *c*-552 gene from *Hydrogenobacter thermophilus*. *Eur. J. Biochem.* **198**, 7-12 (1991).
7. Hasegawa, J., Shimahara, H., Mizutani, M., Uchiyama, S., Arai, H., Ishii, M., Kobayashi, Y., Ferguson, S. J., Sambongi, Y., and Igarashi, Y., Stabilization of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*₅₅₁ by systematic amino acid substitutions based on the structure of thermophilic *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*₅₅₂. *J. Biol. Chem.* **274**, 37533-37537 (1999).
8. Pollock, W. B., Chemerika, P. J., Forrest, M. E., Beatty, J. T., and

- Voordouw, G.**, Expression of the gene encoding cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough in *Escherichia coli*: export and processing of the apoprotein. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2319-2328 (1989).
9. **Cannac, V., Caffrey, M. S., Voordouw, G., and Cusanovich, M. A.**, Expression of the gene encoding cytochrome c_3 from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* in the purple photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **286**, 629-632 (1991).
10. **Caffrey, M., Brutscher, B., Simorre, J. P., Fitch, J., Cusanovich, M., and Marion, D.**, Assignment of the ^{13}C and ^{13}CO resonances for *Rhodobacter capsulatus* ferrocyclochrome c_2 using double-resonance and triple-resonance NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 63-75 (1994).
11. **Blanchard, L., Neil Hunter, C., and Williamson, M. P.**, The effect of ring currents on carbon chemical shifts in cytochromes. *J. Biomol. NMR*, **9**, 389-395 (1997).
12. **Caffrey, M., Simorre, J. P., Brutscher, B., Cusanovich, M., and Marion, D.**, NMR assignment of *Rhodobacter capsulatus* ferricytochrome c' , a 28 kDa paramagnetic heme protein. *Biochemistry*, **34**, 5904-5912 (1995).
13. **Voordouw, G., Pollock, B., Bruschi, M., Guerlesquin, F., Rapp-Giles, B., and Wall, J. D.**, Functional expression of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough cytochrome c_3 in *Desulfovibrio desulfuricans* G200 after conjugational gene transfer from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **172**, 6122-6126 (1990).
14. **Tsapin, A. I., Nealson, K. H., Meyers, T., Cusanovich, M. A., Van Beuumen, J., Crosby, L. D., Feinberg, B. A., and Zhang, C.**, Purification and properties of a low-redox-potential tetraheme cytochrome c_3 from *Shewanella putrefaciens*. *J. Bacteriol.*, **178**, 6386-6388 (1996).
15. **Morris, C. J., Black, A. C., Pealing, S. L., Manson, F. D. C.**,

- Chapman, S. K., Reid, G. A., Gibson, D. M., and Ward, F. B.,** Purification and properties of a novel cytochrome: flavocytochrome *c* from *Shewanella putrefaciens*. *Biochem. J.*, **302**, 587-593 (1994).
16. **Ozawa, K., Tsapin, A. I., Neilson, K. H., Cusanovich, M. A., and Akutsu, H.,** Expression of a tetraheme protein, *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F cytochrome *c*₃, in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4168-4171 (2000).
17. **Kitamura, M., Ozawa, K., Kojima, S., Kumagai, I., Akutsu, H., and Miura, K.,** The primary structure of pre-cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) as determined by nucleotide sequencing of its gene and partial amino acid sequencing. *Protein Seq. Data Anal.* **5**, 193-196 (1993).
18. **Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger.** Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**, 191-197 (1988).
19. **Sutcliffe, J. G.,** Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 77 (1979).
20. **Viera, J. and Messing, J.,** Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **153**, 3 (1987).
21. **Simon, R., U. Prierer, and A. Pühler.** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**, 784-791 (1983).
22. **Higuchi, Y., Inaka, K., Yasuoka, N., and Yagi, T.,** Isolation and crystallization of high molecular weight cytochrome from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Biochim. Biophys. Acta*, **911**, 341-348 (1987).
23. **Peck, Jr, H. D. and LeGall, J.,** *Methods Enzymol.*, **243**, 159 (1994).
Academic Press, Inc., San Diego.
24. **Connelly, J. L., M. Morrison, and E. Stolz.** Hemins of beef heart muscle. *J. Biol. Chem.* **233**, 743-747 (1958).

25. **Ozawa, K., Mogi, T., Suzuki, M., Kitamura, M., Nakaya, T., Anraku, Y., and Akutsu, H.**, Membrane-bound cytochromes in a sulfate-reducing strict anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Anaerobe* **3**, 339-346 (1997).
26. **Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C.**, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985).
27. **Yagi, T. and K. Maruyama.** Purification and properties of cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki F. *Biochem. Biophys. Acta* **243**, 214-224 (1971).
28. **Saffarini, D. A., DiChristina, T. J., Bermudes, D., and Nealson, K. H.**, Anaerobic respiration of *Shewanella putrefaciens* requires both chromosomal and plasmid-borne genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **119**, 271-278 (1994).
29. **Shinkai, W., T. Hase, T. Yagi, and H. Matsubara.** Amino acid sequence of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Biochem. (Tokyo)* **87**, 1747-1756 (1980).
30. **Pollock, W. B. R., Loutfi, M., Bruschi, M., Rapp-Giles, B. J., Wall, J. D., and Voordouw, G.**, Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding the high-molecular-weight cytochrome c from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.*, **173**, 220-228 (1991).
31. **Bruschi, M., Bertrand, P., More, C., Leroy, G., Bonicel, J., Haladjian, J., Chottard, G., Pollock, W. B. R., Voordouw, G.**, Biochemical and spectroscopic characterization of high molecular weight cytochrome c from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough expressed in *Desulfovibrio desulfuricans* G200. *Biochemistry*, **31**, 3281-3288 (1992).
32. **Bragg, P. D. and Hackett, N. E.**, Cytochromes of the trimethylamine- N -oxide anaerobic respiratory pathway of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **725**, 168-177 (1983).
33. **Kajie, S. and Anraku, Y.**, Purification of a hexaheme cytochrome c_{552} from

Escherichia coli K12 and its properties as a nitrite reductase. *Eur. J. Biochem.*, **154**, 457-463 (1986).

34. **da Costa, P. N., Conte, C., and Saraiva, L. M.**, Expression of *Desulfovibrio* tetraheme cytochrome *c* in *Escherichia coli*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 688-691 (2000).

4-2

シトクロム c_3 変異体を用いた
電子伝達経路制御機構の解析

要 旨

4-1 節で構築したシトクロム c_3 の大量発現系を用いて、シトクロム c_3 のアミノ酸置換体を系統的に作成することができるようになった。そこで、本節では、ヘム 1 とヘム 2 の間に存在する芳香族アミノ酸残基である Tyr 44 の芳香環が、シトクロム c_3 の酸化還元電位や電子移動速度にどのような影響を与えているかを調べるために、Tyr 44 を Leu に置き換えた変異体を作成し、そのキャラクターゼーションを行った。まず、得られた **Y44L** シトクロム c_3 の巨視的酸化還元電位を調べてみると、4 つすべての電位が野生型のものより +7 mV ~ +31 mV 高くなっていた。つまりこの結果は、シトクロム c_3 の酸化還元電位には 4 つのヘムの複雑な相互作用が反映していることを強く示唆している。次に、フラッシュフォトリシス法によるシトクロム c_3 と 5-デアザリボフラビンセミキノンラジカルとの間の電子移動速度を測定し、解析したところ、野生型では一番速かったヘム 4 への電子移動速度が遅くなり、逆にヘム 3 からの電子移動速度が大きく上昇するという予想外の結果が得られた。**Y44L** シトクロム c_3 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを見ると、ヘム 1、2、3 周辺の構造は比較的大きく変化しているが、変異位置から距離的に一番遠いヘム 4 周辺の構造にはその影響が小さいことが判明した。そのため、このヘム 4 からの電子移動速度が減少したという事実は非常に興味深い。また、Tyr 44 を Phe に置き換えた変異体 (**Y44F** シトクロム c_3) を解析してみると、その巨視的酸化還元電位が、野生型のものよりさらに低くなっていることがわかった。以上の結果より、Tyr 44 の芳香環がシトクロム c_3 の酸化還元電位を低く保つこと、および電子移動制御において、重要な役割を持つ残基であることが証明された。シトクロム c_3 の最も重要な生理的電子授受パートナーはヒドロゲナーゼである。そこで、Glu 42 を Lys に置き換えた変異体 (**E42K** シトクロム c_3) のヒドロゲナーゼによる還元速度を測定したところ、野生型の約 5 倍にもその還元速度が上昇することが明らかになった。すなわち、この領域 (アミノ酸残基 38-45) の構造が、シトクロム c_3 が電子授受相手を選ぶ上で、非常に重要であることが判明した。

4-2-1 研究目的

シトクロム c_3 は硫酸還元菌の電子伝達系に含まれ、1分子中に4つの c 型ヘムを持つ分子量約 14,000 のタンパク質であり、酸化還元電位が非常に低いという特徴を持つ。酸化型シトクロム c_3 の結晶構造は既に報告されているが、酸化還元電位とタンパク質構造およびヘム周辺構造の関係を明かにするためには、NMR による微視的酸化還元電位の測定が必要である。そのため、現在われわれは基礎となる NMR シグナルのアミノ酸配列帰属に取り組んでいる。しかしながら、これらの物理化学的な測定に供する試料の調製には、偏性嫌気性細菌である硫酸還元菌の大量培養および、高価なラベルアミノ酸等が必要であり、技術的にも経済的にも大変な労力と困難をとまなう。そこで、われわれは、このシトクロム c_3 の大量発現系の確立が急務であると考え、長年にわたり、大腸菌、枯草菌、酵母、光合成細菌と、宿主を変え、また、システムを変え、シトクロム c_3 の発現系を検討してきた。その結果、湖水に住み、バイオレメディエーションに役立つと考えられ、近年、米国でさかんに研究されている *Shewanella oneidensis* を宿主に用いた際に、通常の硫酸還元菌からのシトクロム c_3 の収量と比較して、菌体あたり、約 10 倍、また培地あたり、約 27 倍、多くとれる条件を発見した (第 4-1 節)。

S. oneidensis は、自身でも、シトクロム c_3 のようなマルチヘムを持ち、他にも豊富に c -type のシトクロムを含んでいる。また、この宿主系は、好気的な条件での培養ができるという点と、大腸菌と同じ属に属していることから、培地も、形質転換法も、ベクターも、大腸菌での方法がそのまま利用できるという点に特徴がある。したがって、偏性嫌気性細菌に由来する大量培養および菌の単離法等における技術的困難が解消された。このような発現系は、世界に例がなく、したがって、 c -type シトクロムの発現系のあり方を根本的に変えるものと思われる。海外におけるシトクロム c_3 の発現は、硫酸還元菌を用いたホモの宿主系が主流となっているが、この系では、野生株の 2~5 倍程度の収量で、かつ、依然、偏性嫌気的な培養を強いられる。また、現在一般的なミトコンド

リア型シトクロム c およびシトクロム c_2 のようなモノヘムタイプの c -type シトクロムについて、比較的大量に発現する宿主系としては、酵母と光合成細菌の系および大腸菌の変異株に限られている。昨年 (2000 年)、大腸菌で c 型ヘム生合成系の 8 つの膜タンパク質遺伝子を共発現させることにより、ホロ型のシトクロム c_3 が出来ることが報告された。しかし、その生産量はまだ十分とは言えない。したがって、この *S. oneidensis* の系を用いたマルチヘムを持つ c -type シトクロムの発現系は、大量に発現しうるヘテロな宿主系としては、世界初の系である。そこで、本研究では、まず、

- 1) アミノ酸置換体シトクロム c_3 を作製し、この系で、充分量の試料がえられるかどうかを検討する。
- 2) 軸配位子の近傍にある Tyr 44 を Leu や Phe に置き換えたアミノ酸置換シトクロム c_3 を用意し、NMR により、巨視的および微視的酸化還元電位を決定する。また、Glu 42 を Lys に変換して表面電荷を変えたシトクロム c_3 変異体を用意し、タンパク質間における電子移動速度の変化を調べる。

4-2-2 変異体の作製と発現

(1) アミノ酸置換体の発現ベクターの作成

まず、カナマイシン耐性遺伝子 (Km^r) を薬剤マーカーとして含む pUC 型プラスミドが *S. oneidensis* の中でテトラサイクリン耐性のもの (第 4-1 節参照) と同様に維持され複製できるかどうかということを確認した。その結果、カナマイシン (Km) 耐性ベクター上の組換え $DvMF$ シトクロム c_3 遺伝子の発現レベルは、培地中のカナマイシン濃度が 100-200 mg / L の時に、最高になることが分かった。その収量は、テトラサイクリン耐性の pUC ベクターを用いての最高収量と同程度であった。

そこで、Oligonucleotide-directed Dual Amber (ODA) 法と LAPCR (Long and Accurate PCR) テクノロジーによって、わずか 1 日で部位特異的変異導入を行う

ことができる Takara の Mutan-Super Express Km キット¹⁾を用いて、アミノ酸改変遺伝子をもつ発現ベクターを作成した (Fig. 4-2-1)。まず、pUC 型プラスミド由来で、かつ、そのカナマイシン (Km) 耐性遺伝子上に二重のアンバー変異をもつベクター pKF19k (Gene bank への Accession No. D63847) を制限酵素 *EcoRI* および *PstI* で完全消化した。この pKF19k/*EcoRI*/*PstI* 消化ベクターとシトクロム *c₃* 遺伝子 (第 4-1 節 pUCMC3 /*EcoRI*/*PstI* 消化 900-bp 断片) を 16 °C で一晩ライゲーションした。これを用いて *supE* 株である *E. coli* JM109 を形質転換し、LB (Km 50 μg/ml, X-gal, IPTG) プレート上でコロニーの青白選択を行った。シトクロム *c₃* 遺伝子が組み込まれていると思われる白コロニーを 3 ml の液体 LB (Km 50 μg/ml) 培地へ植菌し、37 °C で一晩振とう培養を行った後、Wizard *plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) によりプラスミドを抽出・精製した。このベクターを pKF-3FPB と名付けた。

次に上で構築した pKF-3FPB ベクターとそれぞれの 5' 末端をリン酸化したアミノ酸置換変異導入用合成ヌクレオチド (100 pmol) (Y44L については、5'-CGGCAAGGAAGATCTCCAGAAGTGCGCC-3' 28-mer) および、カナマイシン耐性遺伝子内のアンバーコドンをもとのセンスコドンに回復させるための) セレクションプライマー (5 pmol) を用いて 50 μl の反応系で LA-PCR (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 3 min を 1 サイクルとし、それを 30 回) を行った。反応液の一部 1 μl を 1% アガロースゲル電気泳動で確認後、残りの反応液をエタノール沈殿処理し、ペレットを 5 μl の滅菌蒸留水に懸濁した。5 μl 中 2 μl の DNA 溶液で *sup⁰* の大腸菌 *E. coli* MV1184 を形質転換し、LB (Km 100 μg/ml) プレート上で 37 °C、一晩培養した。出来たコロニーのいくつかを 3 ml の LB (Km 100 μg/ml) 液体培地へ植菌し、37 °C で一晩振とう培養を行った後、Wizard *plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) によりプラスミドを抽出・精製した。

このようにしてほとんど 95% 以上の確率で、野生型、F21A、F21H、F21Y、T25V、H23M、H26M、C31S、H35M、H36M、K41E、E42K、Y44L、Y44F、H53M、K58M、K61M、Y66L、Y67L、Y67E、H71M、H84M、K94Q、

K94R、**K102M**、**H107M** シトクロム c_3 遺伝子をもつカナマイシン耐性の発現ベクターを作成することができた。

以上すべてのベクターについて、その塩基配列を確認し、変異の導入を確認めた。また、上で太字で示した変異体は、その変異体タンパク質の精製まで終了し、解析が進んでいるものであり、下線をつけたものは、精製をしたが、しっかりした構造をとっていないため、部分精製までしかできなかったものである。本論文においては、最も解析の進んでいる **Y44L** シトクロム c_3 に的を絞って考察する。また、**E42K** シトクロム c_3 についても、ヒドロゲナーゼとの相互作用に絞って紹介する (細かなキャラクターゼーションについては省略)。これらは、ともにヘム 1 近傍に存在し、前者は、側鎖の芳香環の影響を、また後者は電荷の影響を調べることを目的とした変異体である。また、ヘムの第 5、第 6 軸配位子であるヒスチジン残基をメチオニンに置き換えた変異体 {**H23M** (6th)、**H26M** (6th)、**H35M** (5th)、**H36M** (6th)、**H53M** (5th)、**H71M** (6th)、**H84M** (5th)、**H107M** (5th) シトクロム c_3 } については、その構造の安定性を保つために、非常に重要な役割を果たしていることが、最近判明したが、性質が一様でないため、紙面の都合上割愛した。参考のため、酸化型シトクロム c_3 の結晶構造上における Tyr 44 の位置を Fig. 4-2-2 に示した。

(2) 変異型シトクロム c_3 の発現

4-1 節で確立したエレクトロポレーション法により、シトクロム c_3 の発現ベクターで *Shewanella oneidensis* TSP-C を形質転換した。LB (Km 100 μ g/ml, Rf 10 μ g/ml) プレート上にはえた菌のコロニーをいくつか拾い、発現チェック用に 3 ml LB (Km 100 μ g/ml, Rf 10 μ g/ml) 液体培地にそれぞれ植菌し、30 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養 (130 min^{-1}) した。ちなみにここで、リファンピシン (Rf) を培地に投入しているのは、*Shewanella oneidensis* TSP-C がそれ自身でリファンピシンに耐性を示す変異株であるからである。

3 ml の飽和培養液をあらかじめ風袋を測っておいた 1.5 ml エッペンドルフチューブで遠心分離 (6,000 rpm, 5 min) を 2 回行い集菌した。回収した菌

体と同容量の等張液で懸濁し、超音波破碎を行った。この際、Deoxyribonuclease I を少々と 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) を加えた。破碎物を遠心分離 (15,000 rpm, 20 min) し、上清 (細胞抽出液) に SDS-PAGE 用の Sample Buffer を同容量加えて、電気泳動 (17% SDS-PAGE)を行った後、ヘム染色によってシトクロム c_3 の発現をチェックした。

(3) 形質転換菌体の大量培養と発現シトクロム c_3 の精製 (Fig. 4-2-3)

S. oneidensis (pKF19-wild) と上でシトクロム c_3 の発現を確認した *S. oneidensis* (pKF19-mutant) の大量培養を行った。まずプレートに生えた菌のコロニーを拾い、3 ml LB (Km 100 μ g/ml, Rf 10 μ g/ml) 液体培地に植菌し、30 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養 (130 min^{-1}) した。次にその培養液 1 ml を 300 ml 三角フラスコに調製した 100 ml LB 培地 (Km 50 μ g/ml, Rf 10 μ g/ml) に植菌し、30 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養 (130 min^{-1}) した。そして 100 ml の培養液から 50 ml ずつを 3 L 三角フラスコに調製した 1 L 2 \times YT 培地 (Km 100 μ g/ml, Rf 10 μ g/ml) 2 本にそれぞれ植菌した後、Taitec 社製 Incubator M-100^D を使用して 26 時間程度振とう培養した。振とう速度は 90 min^{-1} (microaerobic condition の設定) で固定した。これにより、培地中への酸素の導入をある程度制限することができた (第 4-1 節で述べたように、*S. oneidensis* 中でのシトクロム c_3 の発現量は、微好氣的 (microaerobic) な条件が最も湿菌体あたりのシトクロム c_3 発現量が多いため)。そして培養液を遠心分離 (Tomy CX210 Rotor: No.17N, 6,000 rpm, 15 min) し、菌体を約 6.4 g 得た。

シトクロム c_3 の抽出と精製は、野生型、変異型とも硫酸還元菌と同様の方法を用いた (第 4-1 節参照)。

4-2-3 結果

(1) Y44L 変異体のマススペクトルの測定と N 末端アミノ酸配列分析

Y44L シトクロム c_3 の *S. oneidensis* 内での発現量は、第 4-1 節で述べた野生型の発現量と変わらなかった。すなわち、この変異体のタンパク質としての安定性は野生型と変わらなかったと言える。

変異体の確認のために、野生型のものと同様に、**Y44L** シトクロム c_3 のマススペクトルと、N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ、N 末端 10 アミノ酸残基についても野生型と同一であった。第 4-1 節で述べたように、ここでも N 末端には Ala が二つ存在していた。N 末端に Ala が二つついている場合の理論マスナンバーは、14,016 であり、測定値は、誤差が 0.1% であることを考えると $14,004 \pm 14$ であった (Fig. 4-2-4) ため、両者は誤差範囲で一致していると言える。また、電気泳動によるヘム分析と合わせてもこの **Y44L** シトクロム c_3 は *S. oneidensis* 内で正しく発現し、シグナルペプチドの切断も正確に起こったと言える。

(2) 紫外可視吸収および一次元 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

Y44L シトクロム c_3 の紫外可視吸収スペクトルは、野生型のものと全く変わりがなかった。

一方、完全酸化型の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (便宜上、野生型シトクロム c_3 の低磁場側から順に A-J までヘムメチルシグナルを命名してある。) では、Fig. 4-2-5 に見るように、ヘム 4 (図の A, H, I のヘムメチルシグナル) 以外のヘムメチルシグナルはすべてどちらかに移動している。したがって、ヘム 4 の周りの構造変化は特にないが、他のヘムまわりの構造は、ヘム 1 とヘム 2 の間に存在している Tyr 44 を Leu に変えることで、多少なりとも変化をしていることが分かった。面白いのは、Tyr 44 からは遠く離れているヘム 3 の周りにも影響を与えていることである。

(3) 巨視的酸化還元電位 (Appendix 参照)

30 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH=7.0) での微分パルスポーラログラフの測定を行った (Fig. 4-2-6)。得られた微分パルスポーラログラフに松田ら

の理論式を非線型最小二乗法によりフィッティングさせ、巨視的酸化還元電位を得た。Table 4-2-1 にその結果を示す。全体としては、野生型のシトクロム c_3 と比べてすべて酸化還元電位が上昇している。

(4) Laser Flash Photolysis (Appendix 参照)

シトクロム c_3 の Laser Flash Photolysis の実験では、Appendix Fig. A-8 のような時間に対する吸収変化が得られる。そこで Appendix に述べた解析ソフト Origin ver.6 により、そのグラフを 2つの指数関数の和として $y = \exp(-k_{\text{fast}}t) + \exp(-k_{\text{slow}}t)$ の式で最適化したところよくフィットした (1次の指数減少としてはうまくフィットしなかった。)。したがって、速いほうの過程 (Fast Phase)、遅いほうの過程 (Slow Phase) の2つの過程が存在することが分かった。野生型シトクロム c_3 による電子移動解析により、速い方の過程の k_{fast} がシトクロム c_3 による電子移動の擬一次速度定数 (Pseudo-first-order Rate Constant, k_{obs}) であることが分かっているのでこちらの値を用いて解析を進めた (遅いほうの過程は EDTA 由来と考えられる。)

完全酸化型の Y44L シトクロム c_3 の還元過程には、野生型同様に、シトクロム c_3 濃度依存性が認められた。実際に、Y44L シトクロム c_3 の濃度を横軸に、縦軸に電子移動速度定数を取りプロットしたグラフは、その濃度に対して比例関係となっていた ($k_{\text{obsd}} = [6.4 \pm 0.6] \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$)。

そこで、4つのヘムの微妙な電子移動速度への寄与を区別するために、シトクロム c_3 の濃度を固定して (8.25 μM)、あらかじめ、(白色光照射により) それぞれ還元率の違うシトクロム c_3 試料をつくっておいた上で、その擬 1 次速度定数を (上で述べた2つの指数関数の和として最適化することで) あらためて求めた。このようにして求めたそれぞれの実測値を flash 前のヘムの還元率 に対してプロットし、グラフにしたもの (phototitration) が、Fig. 4-2-7 である。

一方、今回求めた Y44L シトクロム c_3 の4つの巨視的酸化還元電位より、Appendix に述べた (A-1) 式を使って、各電位 (後で実測値の還元率と合

わせる作業を容易にするため、0.1 mV ずつ細かく設定しておいた。) における各還元状態 (完全酸化、1 電子還元、2 電子還元、3 電子還元、完全還元) のヘムのモル分率を計算することで、同時に全体の還元率および、初期濃度より求められるそれぞれの電位における各還元状態にあるヘム濃度も求めることができた (理論値)。これらのデータと Fig. 4-2-8 に示す理論式を用いて、Sigma Plot (解析ソフト) により、このプロットの最小二乗フィッティングを行ったところ、2つのパラメーター k_i , k_{ii} を持つ、 $k_{obs} = k_i*[c_1+c_2+c_3]+k_{ii}*[c_4]$ という式で最適化した際に、最も合理的な $k_1, k_2, k_3 = 1.1 \times 10^8$ (誤差 6.0×10^7), $k_4 = 1.5 \times 10^9$ (誤差 1.1×10^8) 値を得ることができた。 k_1, k_2, k_3, k_4 がすなわち、Y44L シトクロム c_3 の4つのヘムそれぞれにおける2次速度定数 (Second-order Rate Constant) である (Table 4-2-2)。ただし、この k_1, k_2, k_3, k_4 の下付の1-4の番号は、実際の構造上のヘムの番号ではなく、酸化還元電位の高いものからの順番で、1-4 となっているので注意が必要である。

グラフを一見しても明らかなように、野生型と Y44L では、グラフの形がまるで違っている。野生型では、阿久津等の報告²⁾にあるように、還元率20-50% 付近まで比較的急な勾配で、その後、ややなだらかな勾配となっているが、Y44L の場合では、逆に最初は、ややなだらかな勾配で、その後60% を越えたあたりより急な傾きで落ちている。また、野生型の phototitration に対しては、 $k_{obs} = k_i*[c_1]+k_{ii}*[c_2+c_3+c_4]$ という式が最も最適化した。その結果、二次速度定数も $k_1 = 4.0 \times 10^8$ (誤差 1.2×10^8), $k_2, k_3, k_4 = 1.4 \times 10^8$ (誤差 2.0×10^7) となった。野生型と比較すると、Y44L シトクロム c_3 では k_1 が小さくなり、 k_4 が著しく大きくなっている。

4-2-4 考察

シトクロム c_3 の4つのヘムの側面には芳香族アミノ酸残基がいくつかみられ、その多くが他の硫酸還元菌のシトクロム c_3 においても保存されている。電子移動経路における芳香環の役割についてはいろいろ議論されている。Tyr 44

は、Fig. 4-2-2 に見るように、ヘム 1 の近くにあるので、この芳香環がヘム間の電子移動においてどのような役割をしているのか興味深い。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果より、ヘム 1、ヘム 2、ヘム 3 のメチルシグナルは、野生型シトクロム c_3 のそれと比較して、ケミカルシフトの位置が、大きく変化していた。これに対して、ヘム 4 のそれは、ほとんど変わりがなかった。このことから、**Y44L** の置換により、ヘム 1、ヘム 2、ヘム 3 付近の構造が変化していることが示唆された。

Y44L シトクロム c_3 の巨視的酸化還元電位は高いものから順に、 $E^0_1 = -223 \text{ mV}$ (野生型 = -242 mV)、 $E^0_2 = -265 \text{ mV}$ (野生型 = -296 mV)、 $E^0_3 = -299 \text{ mV}$ (野生型 = -313 mV)、 $E^0_4 = -351 \text{ mV}$ (野生型 = -358 mV) であった。野生型のシトクロム c_3 については、この酸化還元電位の高いものから順に、ヘム 4、ヘム 1、ヘム 2、ヘム 3 が主に還元されるステップに対応することが分かっている。この変異体についても、NMR によりヘムメチルの還元率を見積もったところ (Table 4-2-3)、野生型のそれと対応関係 (酸化還元電位の高いものから順に、ヘム 4、ヘム 1、ヘム 2、ヘム 3 と帰属) が同じであった。したがって、野生型との差は、 $+19 \text{ mV}$ 、 $+31 \text{ mV}$ 、 $+14 \text{ mV}$ 、 $+7 \text{ mV}$ となり、すべてのヘムの酸化還元電位が上昇している。ちなみにそれぞれの電位間の差は、**Y44L** は、 42 mV 、 34 mV 、 52 mV 、野生型は、 54 mV 、 17 mV 、 45 mV である。野生型では、2 番目と 3 番目の電位間の差が小さいのに対して、**Y44L** では、だいたい均等であるのが特徴である。

Laser Flash Photolysis による電子移動速度解析における大きな特徴は、**Y44L** の場合、 k_1 、 k_2 、 $k_3 = 1.1 \times 10^8$ (誤差 6.0×10^7) であるのに対して、 $k_4 = 1.5 \times 10^9$ (誤差 1.1×10^8) となっており、 k_4 が、 k_1 、 k_2 、 k_3 に対して 10 倍以上速くなっていることと、野生型のものよりも 10 倍程度速くなっていることである。つまり、**Y44L** の場合、シトクロム c_3 が 4 段階で還元されて行く過程で、4 段階目の還元段階になると、急に、電子が入りやすくなるということになる。 4 電子還元過程でのヘム 3 の微視的酸化還元電位³⁾ (Table 4-2-4) はそれほど上がっていないことと、還元率³⁾ (Table 4-2-3) が、この段階では野生型も **Y44L** も、ほぼ同じであることから、みかけの電子移動速度が 10 倍にも上昇した一番の

原因は、**Y44L** シトクロム c_3 の構造変化がその段階で起こったためと考えられる。また、1 電子還元過程においては、微視的酸化還元電位は上がっている (Table 4-2-4)、ヘム 4 周辺の構造変化もほとんどないにもかかわらず、 k_1 が落ちている。この原因は、1 電子還元過程における各ヘムの還元率の変化が影響していると思われる。すなわちこの段階において、ヘム 4 が寄与している割合は、野生型では約 69% であったのが、**Y44L** では約 43% ほどに落ちているのに対して、ヘム 1 の寄与している割合は、野生型では約 8% 不足だったのが、**Y44L** では約 28% へと上昇している (Table 4-2-3)。この点がみかけの電子移動速度の減少に影響していると考えられる。実際、1 電子還元過程におけるヘム 1 の微視的酸化還元電位は、ヘム 3 の電位を追い抜いて、大きく上昇している (Table 4-2-4)。つまりこの還元率の変化を反映していると言える。このことは、空間的に、ヘム 1 とヘム 2 の間に位置している Tyr 44 の芳香環が、完全酸化型シトクロム c_3 の 1 電子還元過程において、4 つのヘム間の電子の非局在化に深く関与している可能性を示唆している。つまり 4 つのヘム間だけでなく、芳香環との間にも協同性が存在しており、電子が非局在化していることを示すのかもしれない。

ただ、 k_1 が減少するということは、依然、おかしな現象である。つまり、シトクロム c_3 の 4 つのヘムの 5-dRf' による還元は、いくつかの箇所からすべてのヘムがほぼ同時 (3 倍-5 倍の範囲で) に還元されるのではないかとする阿久津等の報告³⁾ における "メカニズム 1" 説と矛盾しているように思えるからである。すなわち、"メカニズム 1" 説の根拠は、野生型シトクロム c_3 では、それぞれのヘムの露出度が、すべて、ミトコンドリア型のものより大きい (Table 4-2-5) ので、5-dRf' のような電氣的に中性な小分子が、どれか特定のヘムだけに接近しやすいということは考えにくいからというものであった。一方、その際、どちらかというかと否定されていた "メカニズム 2" 説であるが、それは、最初に還元されるヘムへの電子の入口は、1 つか 2 つに限られており、一番酸化還元電位の低いヘム (ここの議論ではヘム 3) がまず、還元され、その後、他のより高い酸化還元電位のものが、還元されていくのが、熱力学的に一番合理的な流れ

だとするものである。しかし、**Y44L** の場合、どちらかというところの "メカニズム 2" に近いような印象を受ける。

Y44L の場合、ヘム 1 とヘム 2 の間に位置している Tyr を変えたことにより、その影響がヘム 1 とヘム 2 だけでなく、すべてのヘムへ影響を与えている。とりわけ、¹H-NMR の結果、ヘム 4 のまわりの構造は、ほとんど変わっていないにもかかわらず、ヘム 4 が主に寄与している電位への 5-dRf' による還元速度は、約 1/4 にまで減少しているという大きな影響があった。このことは、"メカニズム 1" 説にあるような、すべてのヘムがほぼ同時 (3 倍-5 倍の範囲で) に還元されるとする説では説明がつかない。とするとこの結果は、ヘム 3 より入った電子が、ヘム 1、ヘム 2、ヘム 4 と流れていく分子内電子移動の道筋の存在を示唆しているのかもしれない。Fig. 4-2-7 のグラフを見ると、仮に、4 つのヘムからほぼ同じ速度で電子が入ってくるとすると、そのグラフは簡単な右下がりの直線図になるはずなので、野生型の場合はそれに近い感じであると考えられる。しかし、**Y44L** ではその全体の還元率が上がってもみかけの電子移動速度がなかなか下がらないというグラフで、解析の結果としてほぼヘム 3 だけに電子が入りやすくなっていることが分かった。

ヘム 3 と他のヘムとの違いを考えた時、ヘム 4 とヘム 1 は、ヘムとポリペプチドとのチオエーテル結合が外側を向いており、ヘム 3 とヘム 2 は、プロピオン酸基が外を向いているということが挙げられる。しかしこの違いが電子移動に影響を与えているのかは不明である。今後、ペリプラズムに存在し、シトクロム c_3 の最も重要な生理的電子授受パートナーであると考えられている [NiFe]ヒドロゲナーゼ (*DvMF* 株では一部細胞膜と結合しているが、*DvH* 株では完全にペリプラズムタンパク質である) と **Y44L** シトクロム c_3 との間の電子移動速度解析を行うことで、野生型シトクロム c_3 との違いを浮き彫りにしていきたいと考えている。

[NiFe] ヒドロゲナーゼは、野生型シトクロム c_3 のヘム 4 の周りに多く存在する Lys 残基と相互作用して複合体を作り、ヘム 4 から電子移動を行うと考えられている。仮にその電子移動速度にほとんど変異の影響がないならば、

それぞれのヘムに、もともと役割があったと考える説が有力になると思われる。しかしながら、Tyr 44 と同様にヘム 1 近傍に存在する Glu 42 を Lys に置き換えた **E42K** シトクロム c_3 と [NiFe] ヒドロゲナーゼの間の電子移動速度の変化を野生型シトクロム c_3 と比較したところ、驚いたことに、その電子移動速度が約 5 倍も上昇することが明らかになった (**Appendix Fig. A-11, A-12** 参照)。これらのことは、ヘム 1 と 2 の近傍の構造 (-N-G-K-E⁴²-D-Y⁴⁴-Q-K-)、あるいは、芳香環や、電荷の影響が、分子全体の機能、特に空間的に最も遠いヘム 4 にまで大きく影響するという事実を示している。このように、分子表面の荷電側鎖は、電子授受パートナーを選択する上で重要な役割を果たしていると考えられる。

電子移動の効率を考える場合、何を基準にすれば良いのであろうか。Marcus 理論によると、シトクロム類の電子移動を表すための半経験的な式として、以下の式が提出されている。

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G^0 + (\Delta G^\ddagger(0) / \ln 2) \ln \{1 + \exp(\Delta G^0 \ln 2 / \Delta G^\ddagger(0))\}$$

$$k_{et} = A \sigma^2 \exp(-\Delta G^\ddagger / RT)$$

ここで、 ΔG^\ddagger は活性化自由エネルギー、 ΔG^0 はシトクロム c_3 と使用された還元剤 (5-dRf) の酸化還元電位差 (ΔE_m) から起因する反応の駆動力である ($= -nF\Delta E_m$; n 反応電子数, F ファラデー定数)。 $\Delta G^\ddagger(0)$ は潜在的な障壁、 $A \sigma^2$ は、分子の衝突頻度、 R は気体定数、 T は絶対温度である。また、 $\Delta G^\ddagger(0)$ は、 $\lambda/4$ と等しく、 λ は、再配向エネルギー (reorganizational energy) である。律速段階の電子移動速度定数である k_{et} は今回報告した実験では直接測定できない。むしろ、電子移動の前の、シトクロム c_3 と還元剤 (5-dRf) の複合体の形成のための平衡定数と、 k_{et} の積であるみかけの 2 次速度定数 (apparent second-order rate constant) が求まることになる。

上の式からも、少なくともその電子伝達体の酸化還元電位が 1 つの因子であると考えられる。すなわち、一般には酸化還元電位の差が大きいほど、そ

これらの間の電子移動速度も速いはずである。しかしながら、今回の **Y44L** 変異体の場合のように、野生型のもの比べてすべての巨視的酸化還元電位が上昇している (すなわち、5-dRf との電位差も上昇している) にもかかわらず、主にヘム 4 が寄与する電位へのみかけの 2 次速度定数は下がるような複雑な現象も存在する。上述したように、このような複雑な対象には、個々のヘムの役割を明確化しなければわからない。そういう意味でも今回、アミノ酸置換体を用いて NMR により個々のヘムの還元率や、微視的酸化還元電位を決定できたことは、シトクロム c_3 全体の機能、ひいては硫酸呼吸全体の電子移動の制御機構におけるシトクロム c_3 の役割を調べていく上での礎を築いたと言える。

ところで、Tyr 44 は、近縁種である *D. vulgaris* Hildenbrough (*DvH*) 株や *D. gigas* (*Dg*)でも保存されているが、*D. salexigenes* (*Ds*) や *D. desulfuricans* Norway (*DdN*) では Val、*D. desulfuricans* (*Dd*) では、Ile となっている (Table 4-2-6)。したがって、必ずしも芳香環を持っていなくても良いように思われるが、実際には、今回のように、その側鎖の違いで非常に大きな変化が現れたので、重要な残基であることは間違いない。そこで、われわれは、44 番目の Tyr 残基を Phe へと置換した **Y44F** シトクロム c_3 を調製し解析したところ、面白いことに、その巨視的酸化還元電位は、野生株のものよりすべて減少していた (Table 4-2-7)。このことはすなわち、Tyr 44 の芳香環の役割が、シトクロム c_3 の 4 つのヘムの酸化還元電位を下げる要因を作っていることを意味する。本研究で明らかになった 44 番目以外の他の芳香族アミノ酸、例えば、Tyr 67 は、*DvH*, *Dg*, *Ds*, *Dd* の 4 種で保存されており、Tyr 66 は、*DvH* で保存されている他、*Dg* では Trp, *Ds*, *Dd* では Phe となっており、いずれも芳香族環を保存している。これらの芳香環の役割も興味深い。

現在、当研究室において、野生型シトクロム c_3 の NMR による完全還元状態における構造解析が行われているが、Tyr 44 付近の構造が、酸化型と還元型では違っているという結果が出ている (原田英里砂 未発表データ)。また、*DvH* 株においても、Arg 45 から Gly 48 までの溶液構造が、酸化型と還元型では異なっているということが指摘されている⁴⁾。したがって、この Tyr 残基は、

シトクロム c_3 の還元過程で、大きな役割を担っているというのは、妥当な考えであろう。

以上の結果は、アミノ酸置き換えが、シトクロム c_3 の酸化還元電位を著しく低くしている機構、および、電子移動メカニズムを解析する上で、他の方法では得られない重要な情報を提供することを示している。今後、ヒドロゲナーゼや、(シトクロム c_3 と同様に 4-1 節で発現に成功した) 16 ヘム Hmc などとのアミノ酸置換体の相互作用解析を進めることで、硫酸呼吸におけるシトクロム c_3 との環境に応じたパートナーシップも明らかになるであろう。

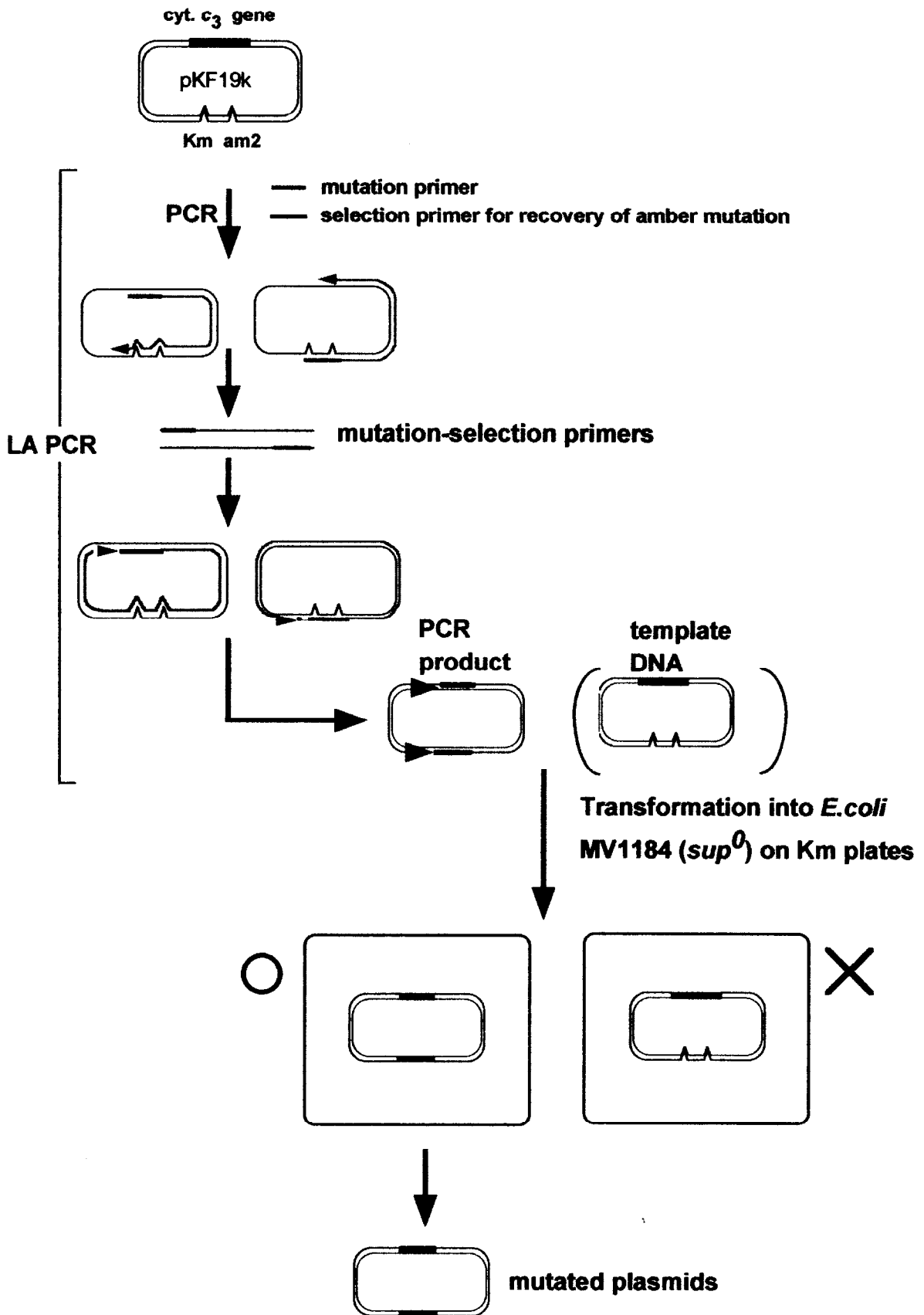


Fig. 4-2-1 The principle of the ODA-LA PCR mutational method¹⁾

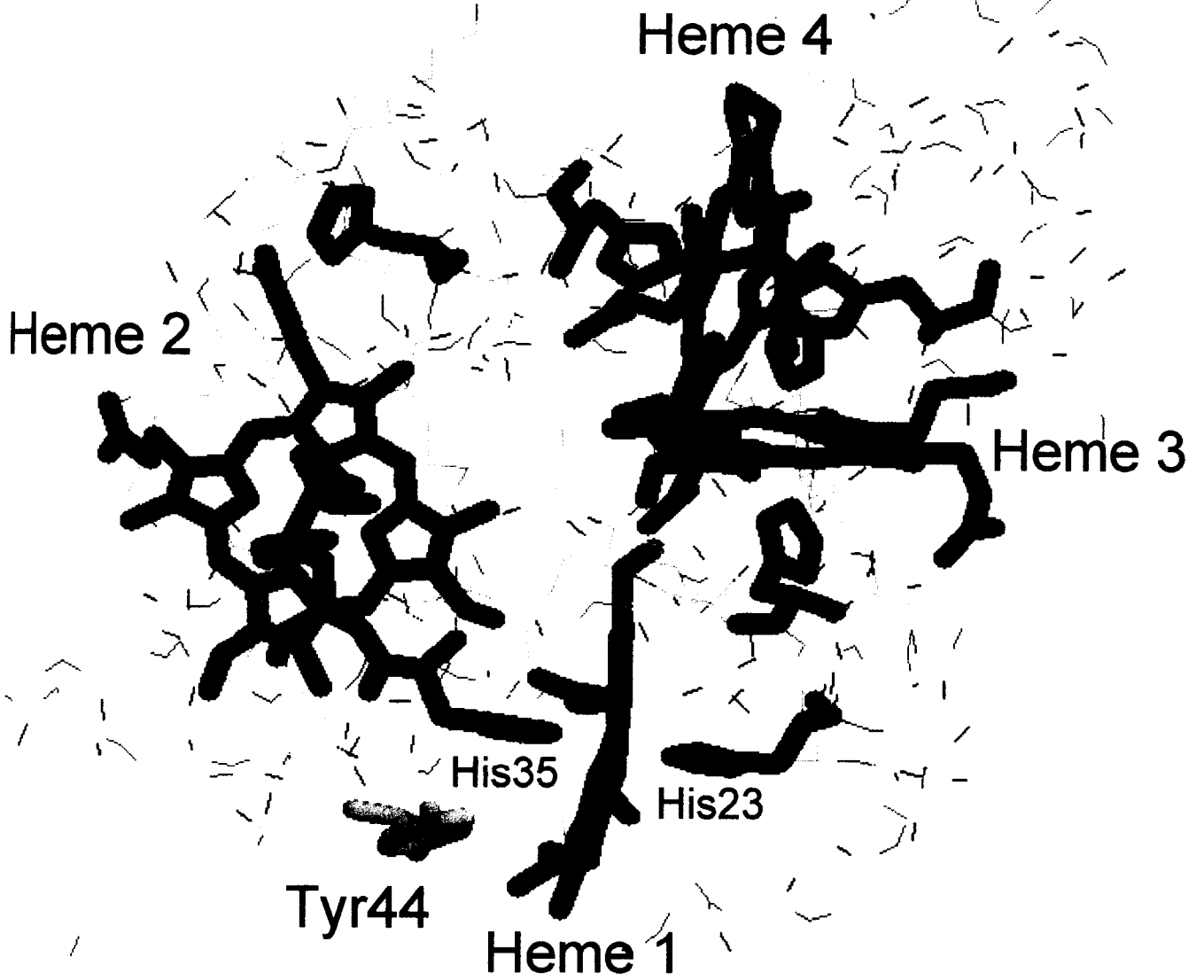


Fig. 4-2-2 The position of Tyr44 in the crystal structure of ferri-cytochrome c_3

Tyrosine44 (TAC) → Leucine (CTG)

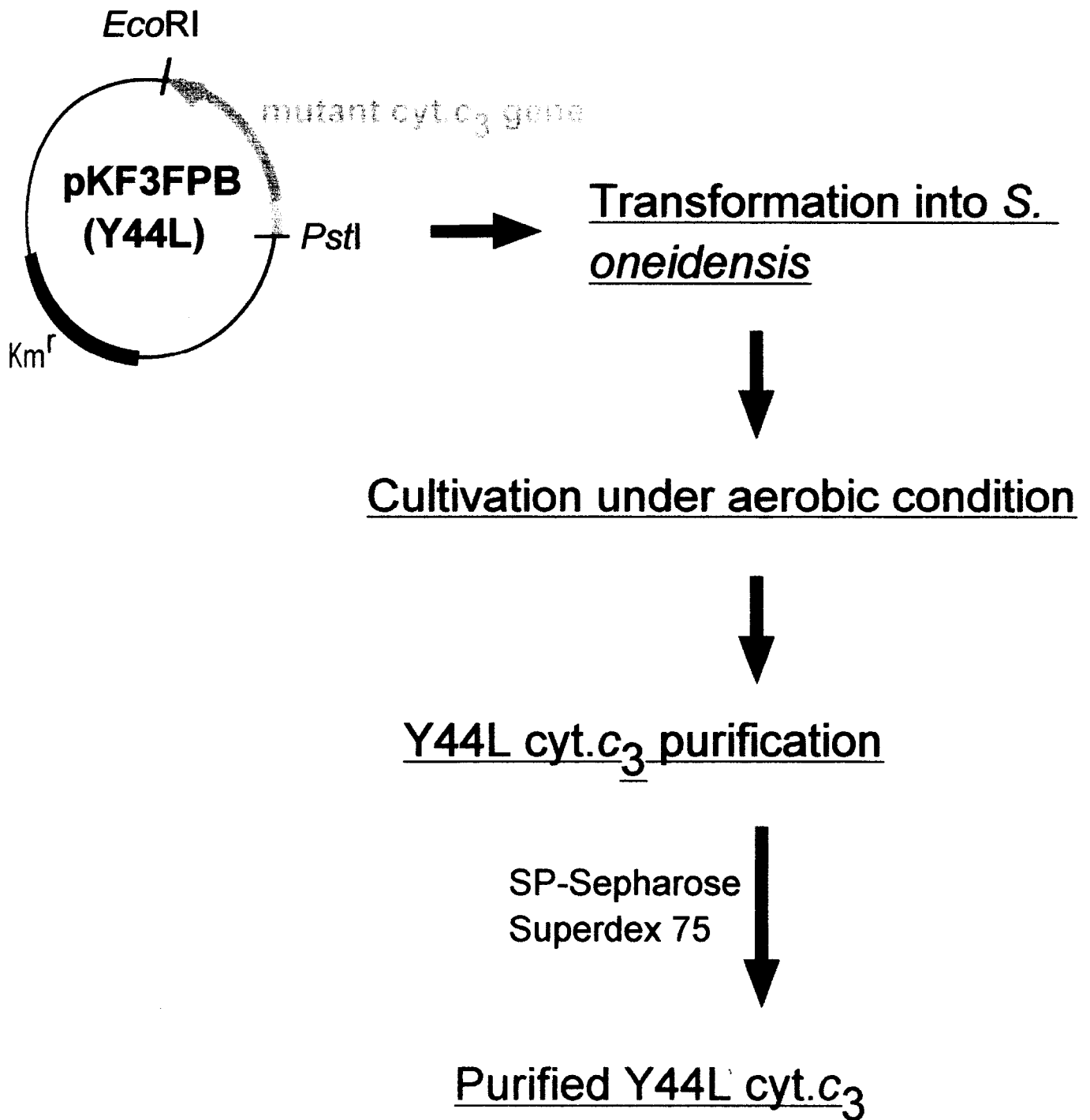


Fig. 4-2-3 Preparation of Y44L cytochrome c_3
The codon change is presented on the top.

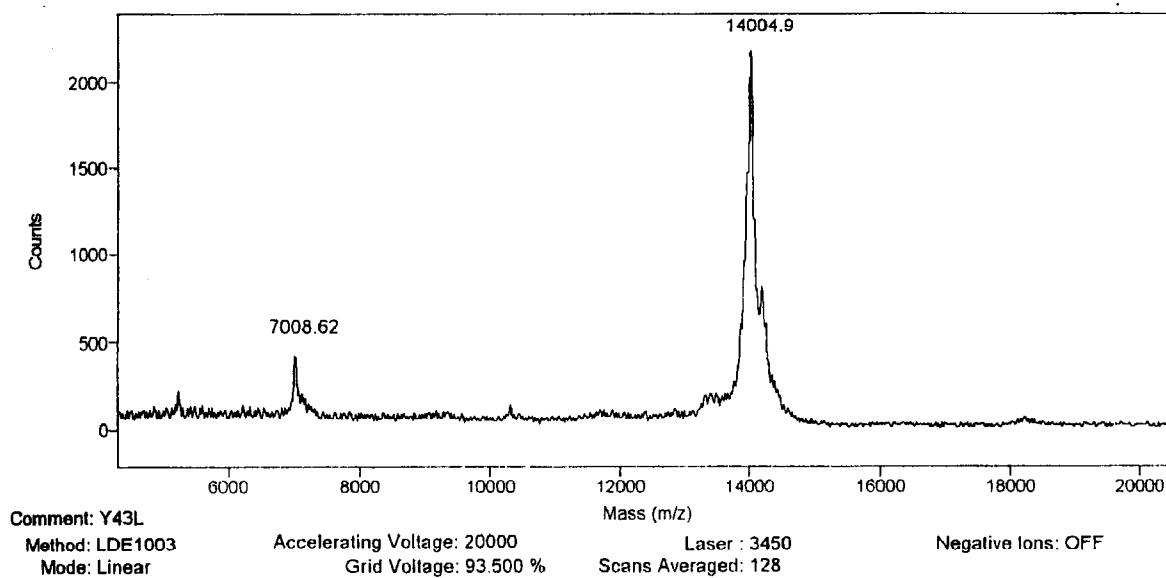


Fig. 4-2-4 MALDI-TOF mass spectrum of Y44L cytochrome c_3

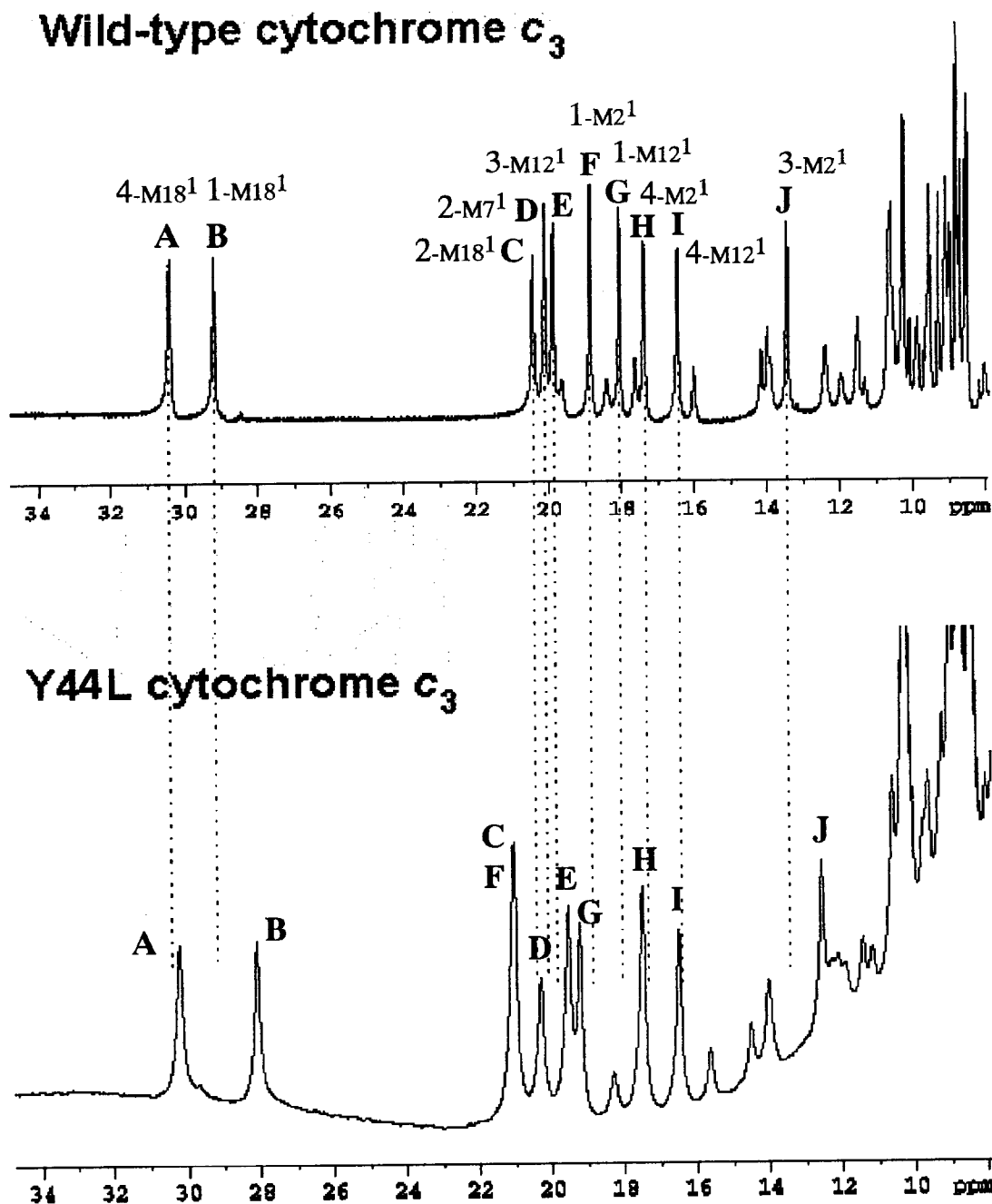
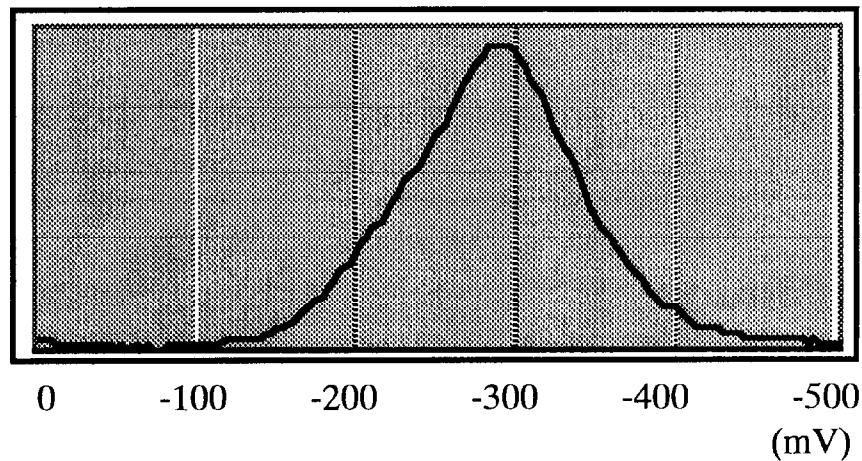


Fig. 4-2-5 400 MHz ^1H -NMR spectra of wild-type and Y44L *Dv*MF ferricytochromes c_3 at 303 K

Only the finger print regions are presented. The protein was dissolved at 0.6 mM in a deuterated solution of 30 mM sodium phosphate buffer, $p^2\text{H}$ 7.0. The nomenclature of heme protons is given in the Fig. 4-1.

Wild-type cytochrome c_3 30mM Phosphate buffer



Y44L cytochrome c_3 30mM Phosphate buffer

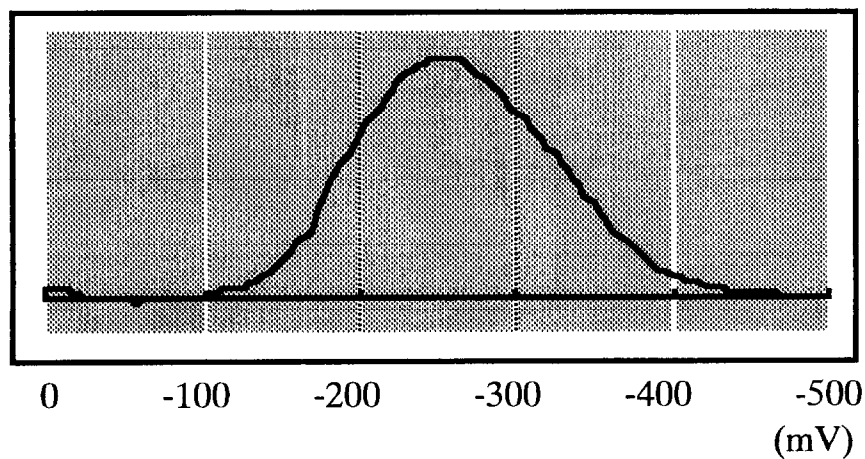


Fig. 4-2-6 Differential pulse polarograms of wild-type and Y44L cytochrome c_3

Table 4-2-1 The macroscopic redox potentials

Potential	wild-type cyt .c ₃	Y44L cyt. c ₃	Difference
$E^{0'}_1$	-242 mV	-223 mV	+19 mV
$E^{0'}_2$	-296 mV	-265 mV	+31 mV
$E^{0'}_3$	-313 mV	-299 mV	+14 mV
$E^{0'}_4$	-358 mV	-351 mV	+7 mV

Relative to the standard hydrogen electrode (SHE)
Phosphate buffer, pH7

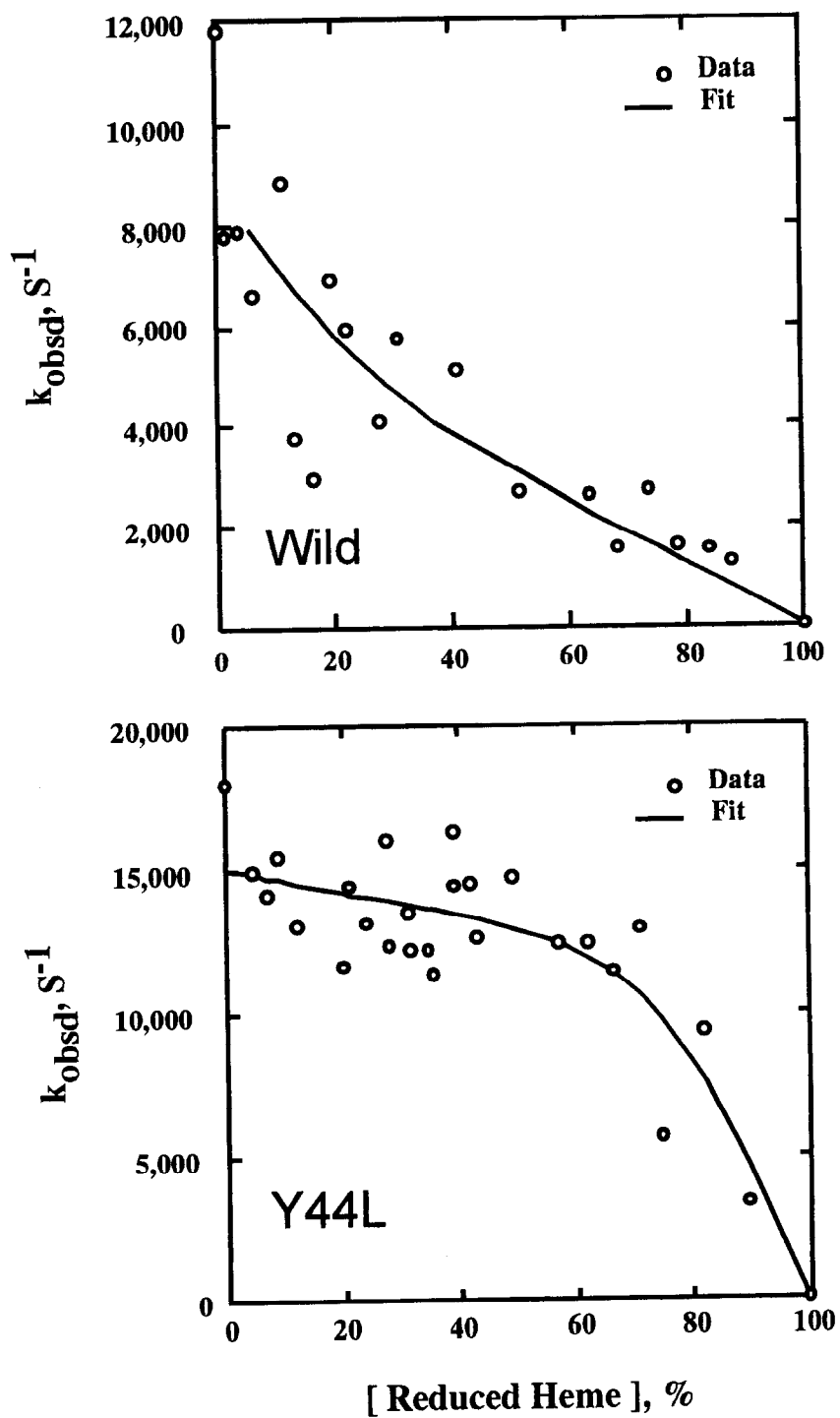


Fig. 4-2-7 Pseudo-first-order rate constants plotted as a function of the percent heme beduced by steady-state photoreduction prior to laser flash photolysis

$$\begin{aligned}
k_{\text{obs}} &= k_i ([c_1] + [c_2]) + k_{ii} ([c_3] + [c_4]) \\
&= k_i ([c_1] + [c_3]) + k_{ii} ([c_2] + [c_4]) \\
&= k_i ([c_1] + [c_4]) + k_{ii} ([c_2] + [c_3]) \\
&= k_i ([c_1] + [c_2] + [c_3]) + k_{ii} [c_4] \\
&= k_i [c_1] + k_{ii} ([c_2] + [c_3] + [c_4]) \\
&= k_i [c_2] + k_{ii} ([c_1] + [c_3] + [c_4]) \\
&= k_i [c_3] + k_{ii} ([c_1] + [c_2] + [c_4])
\end{aligned}$$

Fig. 4-2-8 The equation for k_{obs} can be written as one of several combinations of the four oxidized heme concentrations and two kinetic parameters

k_i and k_{ii} denote the apparent second-order rate constants and c_n denotes the concentration of oxidized heme n . The numbering of the hemes is based on their order of reduction potentials.

Table 4-2-2 Apparent second-order rate constants for reduction of *D. vulgaris* Miyazaki F cytochrome c_3 by 5-dRf.

	Wild-Type ^{a)}	Y44L ^{b)}
	$\times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_1	4.0 ± 1.2	1.1 ± 0.6
k_2	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.6
k_3	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.6
k_4	1.4 ± 0.2	15 ± 1.1

^a Rate constants derived from fitting using Eqn (1) with $k_i = k_1$ and $k_{ii} = k_2 = k_3 = k_4$.

$$k_{\text{obs}} = k_i * [c_1] + k_{ii} * ([c_2] + [c_3] + [c_4]) \quad (1)$$

^b Rate constants derived from fitting using Eqn (2) with $k_i = k_1 = k_2 = k_3$ and $k_{ii} = k_4$.

$$k_{\text{obs}} = k_i * ([c_1] + [c_2] + [c_3]) + k_{ii} * [c_4] \quad (2)$$

Table 4-2-3 The reduction fractions of four hemes at the four reduction steps of Wild and Y44L cytochromes c_3 at p²H 7.1 and 30 °C.

Wild	Reduction fraction			
	R^I	R^{II}	R^{III}	R^{IV}
Heme 4	0.686	0.050	0.106	0.159
Heme 1	0.077	0.533	0.334	0.056
Heme 2	0.049	0.225	0.535	0.192
Heme 3	0.187	0.193	0.026	0.594

Y44L	Reduction fraction			
	R^I	R^{II}	R^{III}	R^{IV}
Heme 4	0.425	0.224	0.188	0.163
Heme 1	0.283	0.468	0.195	0.054
Heme 2	0.068	0.210	0.517	0.205
Heme 3	0.209	0.086	0.128	0.577

Table 4-2-4 Determination of the microscopic redox potentials of Y44L cytochrome c_3

Potential / mV			
	Wild	Y44L	Difference
e^I_1	-306	-256	+50
e^I_2	-318	-293	+25
e^I_3	-283	-264	+19
e^I_4	-249	-245	+4
e^{IV}_1	-283	-275	+8
e^{IV}_2	-315	-310	+5
e^{IV}_3	-344	-337	+7
e^{IV}_4	-310	-304	+6
I_{12}	+41	+6	-35
I_{13}	-20	-17	+4
I_{14}	+1	-8	-9
I_{23}	-9	-14	-5
I_{24}	-29	-8	+21
I_{34}	-33	-42	-9

e^j_i ; microscopic redox potential of heme i at j th reduction step

I_{ij} ; interacting potential

E^{0j} ; macroscopic redox potential (303 K, p^2H 7.0)

Table 4-2-5 Exposure of the Heme

mitochondrial cytochrome <i>c</i>	32 to 49 Å ²
<i>DvMF</i> cytochrome <i>c</i> ₃	127 to 168 Å ²

Table 4-2-6 The amino acid sequences of six purified cytochrome c_3 from *Desulfovibrio*

		1		1		2	2	3	3	4	
	5	0		5		0	5	0	5	0	
<i>DvM</i>	AAPKAPADGLKMD		KTK		QPVV FNHSTHKAVKCGDCHHPVNGKEDY						
<i>DvH</i>	APKAPADGLKME		ATK		QPVV FNHSTHKSVKCGDCHHPVNGKEDY						
<i>Dg</i>	V DVPADGAKIDFIAG		GEK		NLVV FNHSTHKDVKCDDCHHQP GDKQY						
<i>Ds</i>	V DVPAD MVLKAPAGAK		MTK		AP VDFSHKGHAAALDCTKCHHKWDGKAEV						
<i>Dd</i>	V DVPAD MVIKAPAGAK		VTK		AP VAFSHKGHASMDCKTCHHKWDGAGAI						
<i>DdN</i>	A DVPGDDYVISAPEGMKAKPRGDKPGALQKTVPFPHTKHATVECVQCHHKADG		GAV								
	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9
	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
<i>DvM</i>	QKCATAGCHDNMD		KKDK SARGYY		HAMHD KGTKFKSCVGCH LETAGADAARK						
<i>DvH</i>	RKC GTAGCHDSMD		KKDK SARGYY		HVMHD KNTKFKSCVGCH VEVAGADAARK						
<i>Dg</i>	AGCTTDGCHNILD		KADK SVNSWY		KVVHDAKGGAKPTCISCHK DRAGDDKELK						
<i>Ds</i>	KKCSAEGCHVBT		SKKGGKSTPKFY		SAFHS KSDI		SCVGCHKALKK		A		
<i>Dd</i>	QPCGASGCHANTESKKGDDS		FY		MAFHERKSEK		SCVGCHKSMKK				
<i>DdN</i>	KKCTTSGCHDSLE		FRDKANAKDIKLVESAFHT				QCIDCH ALRKKD		KKP		
	1	1									
	0	0									
	0	5									
<i>DvM</i>	KELTGCKGSKCHS										
<i>DvH</i>	KDLTGCKKSKCHE										
<i>Dg</i>	KKLTDCKGSACHPS										
<i>Ds</i>	TGPTKC G		DCHPKKK								
<i>Dd</i>	GPTKC T		ECHPKN								
<i>DdN</i>	TGPTAC G		KCHTTN								

DvM : *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F
DvH : *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough
Dg : *Desulfovibrio gigas*
Ds : *Desulfovibrio salexigenes*
Dd : *Desulfovibrio desulfuricans*
DdN : *Desulfovibrio desulfuricans* Norway

Table 4-2-7 The macroscopic redox potentials and the reduction fractions of four hemes at the four reduction steps of the Y44F cytochrome c_3 .

Potential	wild-type cyt. c_3	Y44F cyt. c_3	Difference
$E^{\circ'}_1$	-242 mV	-254 mV	- 12 mV
$E^{\circ'}_2$	-296 mV	-301 mV	- 5 mV
$E^{\circ'}_3$	-313 mV	-317 mV	- 4 mV
$E^{\circ'}_4$	-358 mV	-363 mV	- 5 mV

Relative to the standard hydrogen electrode (SHE)
Phosphate buffer, pH7

Y44F	Reduction fraction			
	R^I	R^{II}	R^{III}	R^{IV}
Heme 4	0.702	0.090	0.088	0.120
Heme 1	0.098	0.517	0.313	0.073
Heme 2	0.046	0.203	0.554	0.197
Heme 3	0.182	0.179	0.052	0.588

at p²H 7.1 and 30 °C

参考文献

- 1) Biotechnology Catalog (2000) Takara (Kusatsu)
- 2) **Akutsu, H., J. H. Hazzard, R. G. Bartsch, and M. A. Cusanovich**, Reduction kinetics of the four hemes of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* by flash photolysis, *Biochim. Biophys. Acta* (1992) **1140**: 144-156.
- 3) **Fan, K., H. Akutsu, Y. Kyogoku, and K. Niki**, Estimation of microscopic redox potentials of a tetraheme protein, cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki F, and partial assignments of heme groups, *Biochemistry* (1990) **29**: 2257-2263.
- 4) **Messias, A. C., D. H. W. Kastrau, H. S. Costa, J. LeGall, D. L. Turner, H. Santos, and A. V. Xavier**, Solution structure of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) ferrocycytochrome c_3 : Structural basis for functional cooperativity, *J. Mol. Biol.* (1998) **281**: 719-739.

第5章

電子伝達タンパク質 (2)

-フラボドキシン-

要 旨

硫酸還元菌宮崎 F 株のフラボドキシンは、1972 年に石本らによって単離されているが、その一次構造や化学的性質は決定されていない。一方、1994 年に北村らにより、この菌種から、一般のフラボドキシンとは全く異なる性質を持つ分子量約 13,000 の FMN 結合タンパク質が発見された。例えば、一般的なフラボドキシンの分子量は 15,000 ~ 23,000 でその酸化還元電位は、標準水素電極に対して $E_1 = -400$ mV 程度、 $E_2 = -100 \sim 200$ mV である。これに対し、この菌種のみで新規に見つかった FMN 結合タンパク質の場合は、一つの酸化還元電位 -202 mV を持つだけである。よって、硫酸還元菌において、この新規な FMN 結合タンパク質が石本らが発見したフラボドキシンと同じものなのか、それとも別のものかは進化的に興味深い。そこで、フラボドキシンの遺伝子をクローニングして塩基配列を決定するとともに、大腸菌内で大量発現させた。得られた組換えフラボドキシンは、分子量 15,900 で、標準酸化還元電位は、 $E_1 = -434$ mV、 $E_2 = -151$ mV であった。イムノプロット分析の結果では、新規 FMN 結合タンパク質に対するポリクローナル抗体と組換えフラボドキシンとは 1/100 程度しか反応しなかった。したがって、分子量、アミノ酸配列、標準酸化還元電位、イムノプロット分析のすべての結果から、新規な FMN 結合タンパク質とフラボドキシンは全く異なるタンパク質であることが分かった。それぞれの機能的な役割の違いが注目される。

一方、これまで他の硫酸還元菌から単離されたすべてのフラボドキシンにおいて、FMN 結合領域付近で且つ分子表面に存在する 16 番目のアミノ酸残基は Glu として保存されていたが、本研究でクローニングされたフラボドキシンの遺伝子産物においては、Ala であることが判明した。分子表面の負電荷が、フラボドキシンの酸化還元電位に影響を与えると報告されているので、これを Glu に置き換えてその影響を調べた。しかし、野生型と変異型ではその酸化還元電位には大きな変化がなかった。また蛍光滴定法により、FMN とアポタンパク質の間の解離定数等を測定した結果、野生型と Glu 置換体の間ではほとんど差がないことも分かった。

5-1 緒言

フラボドキシソ類は、分子量約 15,000–23,000 程度の比較的小さなフラボタンパク質のグループである。さまざまな微生物より単離されてきたが、いろいろな代謝経路において、電子伝達タンパク質として機能していると考えられている¹⁾。それらは、補欠分子族として 1 分子の FMN を非共有結合的に含んでおり、結合している FMN は 3 つの酸化還元状態をとりうる (Fig. 5-1)。そのうち、セミキノソ (半還元) / ハイドロキノソ (完全還元) 型の対は非常に低い酸化還元電位を示す。この低い酸化還元電位は、ほぼフェレドキシソの酸化還元電位範囲に入るので、フラボドキシソ類は、*in vitro* ないしは *in vivo* において、フェレドキシソと置き換わることができると考えられている^{2,3)}。フラボドキシソに結合している FMN の酸化還元特性は、タンパク質と結合していないフリーの FMN の酸化還元特性と異なっており、セミキノソ状態が非常に安定であることが特徴的である。

X-線結晶構造解析により、*Clostridium beijerinckii* MP⁴⁾ と *Chondrus crispus*⁵⁾ 由来のフラボドキシソの 3 次元構造が決定されており、また、2 次元 NMR 解析により、*Megasphaera elsdenii* のフラボドキシソの 3 次元構造が決定されている⁶⁾。*Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) のフラボドキシソの 3 つの酸化状態における構造は、X-線結晶構造解析あるいは、NMR 解析により、よく研究されてきた⁷⁻¹⁰⁾。その結果、フラビンとそのアポタンパク質の間には、多数の相互作用が存在することが明らかになり、ペプチド部分が、フラビンの酸化還元特性を制御していることが示唆された。

硫酸還元菌は、多くの酸化還元タンパク質を含んでおり、フラボドキシソについては、これまで 6 つの種から単離され、それらのアミノ酸配列が決定されてきた¹¹⁻¹⁵⁾。*D. vulgaris* (Miyazaki F) においては、いろいろな酸化還元タンパク質について多くのことが知られているが^{16,17)}、この菌株由来のフラボドキシソに関する報告はほとんどなく、その 1 次構造さえ、まだ決定されていなかった¹⁸⁾。他方、この菌株からは、別のフラボタンパク質である FMN 結合タンパク

質が単離されており、それはフラボドキシンと同様、比較的小さな（122 アミノ酸残基よりなる）タンパク質であることが示された¹⁹⁾。しかし、FMN 結合タンパク質のセミキノン状態は、不安定であり、完全酸化状態と完全還元状態の間の酸化還元電位は、-325 mV であると報告されている。この酸化還元特性は明らかにフラボドキシンのものとは異なっているが、この FMN 結合タンパク質が、*D. vulgaris* (Miyazaki F) のフラボドキシンである可能性は否定されていなかった。

そこでこの章では、*D. vulgaris* (Miyazaki F) のフラボドキシンをコードしている遺伝子のクローニングと塩基配列の決定、そして大腸菌での大量発現と、ホロタンパク質としてのいくつかの特性について報告する。本研究により、FMN 結合タンパク質は、フラボドキシンとは異なるものであることが明らかになった。

5-2 実験方法

(1) クローニングと塩基配列決定

D. vulgaris Miyazaki F は Postgate の C 培地²⁰⁾により、嫌氣的に培養した。この培養菌体より、Saito-Miura の方法²¹⁾を用いてゲノム DNA を単離した。まずわれわれは、このゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。*D. vulgaris* Miyazaki F のフラボドキシンのアミノ酸配列は、報告されていなかったもので、PCR 反応のために、他の硫酸還元菌株で報告されているアミノ酸配列の保存領域を参考にし、2本のプライマーを合成した。Primer-1 は、23 mer で、その塩基配列は 5'-GGCTCCACCACCGGCAACACGGA-3' であるが、これは⁹G-S-T-T-G-N-T-E というアミノ酸配列に対応する。Primer-2 は、20 mer で、その塩基配列は 5'-GTCCACCGCGCCGCGCAGAAGT-3' であるが、こちらの対応するアミノ酸配列は、¹⁰⁰Y-F-C-G-A-V-D である。ここでアミノ酸配列の上付の番号は、Fig. 5-5 における残基番号を示す。これらの配列のデザインにあたっては、Miyazaki 種における既知遺伝子のコドン使用頻度を考慮した。PCR を行ったのち、増幅 DNA 断片は、T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、pUC18 の

Sma I 部位に結合させた。この反応混合液を使って形質転換した大腸菌 JM109 株のいくつかからプラスミドを抽出し、その挿入 DNA 断片の塩基配列を決定した。そのうちの1つの塩基配列から予想されるアミノ酸配列が、別の硫酸還元菌のフラボドキシンのアミノ酸配列と類似していた。そこで、⁸⁹A-C-F-G-C-G-D-S-S-Y-T のアミノ酸配列に対応する 5'-GTGTAGCTGCTGTCGCCGAGCCGAAGCAG-3' という塩基配列をもつ 30 mer の DNA プローブを合成した。この合成 DNA の 5' 末端を放射性同位元素 ([γ -³²P] ATP) でラベルしたものをプローブとして、65℃で、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、ハイブリダイズしたバンドを *Sal*I-*Eco*RI 二重消化物中、約 1.6 kbp の位置に検出した。そこで、ゲノム DNA を *Sal*I と *Eco*RI で消化し、その消化物をアガロースゲル電気泳動により、いくつかのサイズの異なる分画に分離した。分離した断片を、pUC18 の *Sal*I-*Eco*RI 部位に結合させ、大腸菌 JM109 を、その反応液を使って形質転換した。コロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングしたところ、形質転換体のうち1つに陽性の信号を検出した。この形質転換体は、*D. vulgaris* Miyazaki F の約 1.6 kbp *Sal*I-*Eco*RI 断片を含んでいるプラスミドを持っていたので、そのプラスミドを pSE1600 と命名した。挿入されていた DNA 断片は、さらに pUC18 のマルチクローニングサイトへサブクローニングしたり、*exonuclease* III と *Mung Bean nuclease* を用いて欠失変異体をつくることで、適当な長さにして解析し易くした。その塩基配列の決定には、ダイデオキシシーケンシング法²²⁾ と、DNA シーケンサー (A. L. F. II; Pharmacia LKB) を併用して行った。

(2) フラボドキシンの大量発現

われわれは、pUT7 を用いた大腸菌での大量発現系を構築しようと試みた。pUT7 は、T7 プロモーターを持ち、コピー数が多い発現ベクターである²³⁾。まず、プラスミド pUT7 を、*Bam*HI で消化して平滑末端化し、さらに *Nco*I で消化した。次にプラスミド pSE1600 を、*Eco*RI で消化して平滑末端化し、さらに *Nco*I で消化した。*Nco*I 部位が、フラボドキシン遺伝子の開始コドン領域

を含んでおり、また、フラボドキシンの遺伝子の下流に、*EcoRI* 部位があるからである (Fig. 5-1 参照)。得られた DNA 断片を上記の処理をした pUT7 に結合させた。結果として得られたフラボドキシンの発現ベクターを、pUTFLV と名付けた。

(3) 部位特異的変異

このフラボドキシンの 16 番目のアミノ酸残基はアラニンであるが、他の硫酸還元菌から得られたフラボドキシンの 16 番目のアミノ酸残基はすべてグルタミン酸で保存されている。それは、FMN 結合領域の近傍に位置しているため、FMN の結合ないし酸化還元電位の決定に重要であると考えられている。そこでわれわれは、18 mer のデオキシオリゴヌクレオチド 5'-CAACACCGAATGGGTCGC-3' を用いて、Inouye 法²⁴⁾ の変法により部位特異的変異を 16 番目のアミノ酸残基に対応する部位に導入した。そのようにして得られた変異体プラスミドを pSE1700 と名付けた。そしてその挿入断片を、pUTFLV を作った時と同様な方法で、プラスミド pUT7 に組み込み、フラボドキシンの A16E 変異をコードしている変異体プラスミド pUTFLV2 を得た。

(4) 発現タンパク質の精製

pUTFLV で形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) を、50 µg/ml アンピシリンを含んだ 1.7 ml の LB 培地で 37°C、9 時間培養した。250 ml の LB 培地を含んだ 8 つのフラスコに、それぞれ、1.7 ml の前培養を接種し、37°C で一晩振とう培養した。菌体を、6,000 rpm で 15 min の遠心で回収し、菌体ペレットを、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で懸濁した後、Model 201M ソニケーター (KUBOTA) で、9,000 Hz、200 W、10 min 間、超音波破碎した。その懸濁液を、35,000 rpm で 2 時間、4°C、遠心した後、その上清を、蒸留水に対して 4°C、一晩透析した。結果的に得られた黄色い溶液を、あらかじめ、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した DEAE-cellulose (DE52) カラム (2.0 x 9.0 cm) により精製した。すなわち、カラムを前述の緩衝液 100 ml で洗った後、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中、0 か

ら 300 mM まで、NaCl による直線濃度勾配をかけた。フラボドキシンを含んでいる分画は、その光学スペクトルから同定した。色のついた分画を集め、2 倍に希釈した後、DE52 カラムに同じ条件でもう一度精製した。溶出した色のついた溶液 ($A_{268} : A_{448} < 4.5$) を、蒸留水に対して透析後、凍結乾燥した。この試料を Superose HR-12 カラム (1.0 x 30.0 cm) によるゲルろ過により精製した。展開溶媒としては、200 mM NaCl / 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用い、流速は 0.4 ml/min とした。精製した組換え型フラボドキシンは、35 min に溶出した。SDS-PAGE は、Laemmli の方法²⁵⁾に従って、15% の濃度で行った。

(5) スペクトル分析および N-末端アミノ酸配列分析

日立 320 spectrophotometer を用いて室温における吸収スペクトルを測定した。また、アミノ酸配列分析のためには、逆相系クロマトグラフィーによる精製を行った。ゲルろ過で精製したタンパク質を蒸留水に溶解し、島津 HPLC システムを用いて、流速 2 ml/min とし、1% TFA 中のアセトニトリルの濃度を直線的に上げ、ポリペプチドを溶出させた。カラムは、RESOURCE-RPC (ファルマシア, 3 ml) を用いた。精製したポリペプチドを、Applied Biosystems の model 476A プロテインシーケンサーを用いて解析した。

(6) 酸化還元電位の決定と *in vitro* 活性

セミキノン型フラボドキシシ / 完全還元型フラボドキシシ (以下 SQ / HQ と略す) の酸化還元電位 (E_1) および、酸化型フラボドキシシ / セミキノン型フラボドキシシ (以下 OX / SQ と略す) の酸化還元電位 (E_2) の二組を、それぞれ、フラボドキシシとメチルピオロゲン、および、2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノンの混合液をもって、平衡反応と分光学的な測定方法²⁶⁾で決定した。平衡状態におけるこの系の酸化還元電位、 E_h は、ネルンストの式より計算した。

$$\begin{aligned} E_h &= E_{m,7}(\text{dye}) + (RT / nF) \ln ([\text{oxidized dye}] / [\text{reduced dye}]) \\ &= E_1(\text{fld}) + (RT / F) \ln ([\text{SQ}] / [\text{HQ}]) \end{aligned}$$

ここで、 R は気体定数、 T は絶対温度であり本研究では 298 K、 F はファラデー定数、そして n は電気化学当量数であり、メチルビオロゲンの場合は 1、2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノンの場合は 2 である。また、 E_2 決定の場合は、上記式中の E_1 (fld) が E_2 (fld) となり、自然対数の中が $([OX]/[SQ])$ となる。

実際の測定にはまず、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7)–3 mM EDTA の中に、フラボドキシシと色素が入った溶液をガラスキューベットに封入し、繰り返し窒素ガスで置換することで、中を嫌氣的にした。

E_1 決定のためには、SQ 型になっているフラボドキシシが必要である。そこでわれわれは、150W のスライドプロジェクター²⁷⁾ を使ってあらかじめフラボドキシシを光還元しておいた。そうすることで、すべて SQ 型になっているフラボドキシシが得られた。この SQ 型になっているフラボドキシシと色素 (メチルビオロゲン) の入った系に、ある量のジチオナイト溶液を滴下していき、600 nm と 730 nm の吸光度をモニターした。この値からフラボドキシシの SQ 型と HQ 型の比率およびメチルビオロゲンの酸化型と還元型の比率を求めプロットした。この 2 波長の選択の理由は、酸化状態のメチルビオロゲンが、600 nm と 730 nm のどちらにも吸収がないことと、フラボドキシシの場合は、730 nm には HQ 型、SQ 型のどちらも吸収がないが、600 nm にはそれぞれ適当な吸収があることからである (Fig. 5-2)。そこで、730 nm の吸収からメチルビオロゲンの酸化状態を算出し、600 nm で、フラボドキシシの酸化状態を算出した。フラボドキシシの SQ 型と HQ 型の比率が 1:1 である時のメチルビオロゲンの酸化型と還元型の比率をグラフから導き、ネルンストの式に代入して酸化還元電位を決定した。ここで、SQ 型と HQ 型におけるフラボドキシシの ϵ_{600} には、それぞれ、 $4,870 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と $900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用した。

E_2 の決定のために、まず予備的な実験を行い、OX 型と SQ 型の間の等吸収点は、506 nm であることがわかった ($\epsilon_{506} = 3,160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Fig. 5-2)。等吸収点では、状態が変わっても吸収が変わらないが、色素 (2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン) は酸化状態によって変化するので、その波長の吸収から、色素

が何% 酸化状態にいるか測定できる。そこで、506 nm をモニターした。また、620 nm には、OX 型のフラボドキシンも酸化型の色素 (2-ヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン) も吸収がないので、この波長でフラボドキシンの還元をモニターした ($\epsilon_{620} = 4,020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。等吸収点のモニターにより、色素が何% 酸化状態で存在しているかを定量できるので、その量をフラボドキシンの測定吸収波長 (620 nm) のところから引くことで、フラボドキシンが何% 酸化状態で存在するかわかる。そこで上記のネルンスト式に当てはめることにより E_2 を求めた。また、 E_2 の決定にあたって、色素 (2-ヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン) と OX 型フラボドキシンの混合液の還元状態を変えていくのには、ジチオナイトを使わず、スライドプロジェクターによる光還元を使った。

また、 H_2 による還元測定を、嫌気的な条件の下で行った。その反応溶液は、全量 1 ml、30 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に、ヒドロゲナーゼ、シトクロム c_3 、そして、20 μM のフラボドキシンを入れた。

(7) 非修飾、および、リン脂質修飾されたグラファイト電極における酸化還元挙動

非修飾 basal-plane パイロリティックグラファイト (BPG) あるいは、edge-plane パイロリティックグラファイト (EPG) 電極における酸化還元挙動を測定した。30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) 中で、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ において、窒素雰囲気下、3 電極で構成された電解セルを用いてボルタメトリー測定を行った。現在の文献に引用されているすべての電位は、標準水素電極を参照としているが、ここでは Ag/AgCl 電極を、参照電極として使用した¹⁹⁾。北村等の論文²⁸⁾に示されているように、ルブレドキシンは、リン脂質修飾されたグラファイト電極において、かなりの酸化還元反応を示した。これはおそらく、リン脂質膜がタンパク質の構造変化を防ぐという能力を持っており、電子伝達タンパク質の電極反応にとって、適切な反応環境を提供しているからだと予想される。よって今回も、リン脂質で修飾された BPG 電極を用いてフラボドキシンの電気化学測定を行った。BPG 電極表面をリン脂質で修飾するために、L- α -ジミリスト

イルフォスファチジルコリン(DMPC)を使用した。

(8) 補欠分子族の同定

氷冷された 5% トリクロロ酢酸と 0.3 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に精製したタンパク質を溶解し、4℃で、12,000 rpm、10 min 遠心することによってポリペプチド部分を取り除いた。それからジエチルエーテルと重炭酸ナトリウムを使って補欠分子族を含む溶液を中和した。補欠分子族を同定するために、この中和溶液を、HPLC C-8 カラム (Hiber LiChrosorb RP-8, Cica-MERCK) を用い、0.1% トリクロロ酢酸 - 10% アセトニトリル溶媒により流速 2 ml/min で展開した。

(9) イムノプロット分析

組換えフラボドキシンの構造を、同じ細菌の FMN 結合タンパク質の構造と比較するために、イムノプロット分析を行った。試料を、15% ポリアクリルアミド SDS ミニスラブゲルにより電気泳動後、ニトロセルロースフィルターへ電氣的にプロットした。つづいて、10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20 を含む緩衝液 A の中に、3% (w/v) ウシ血清アルブミンを入れた溶液中で上記のフィルターを振とうすることによりブロッキング操作を行った。緩衝液 A で一度洗った後、そのフィルターを、緩衝液 A で 1:1,000 希釈されたポリクローナル抗体 (大腸菌から精製されたホロ FMN 結合タンパク質に対してのウサギ抗血清) と共に 30 分間インキュベートした¹⁹⁾。さらにそのフィルターを、緩衝液 A で徹底的に洗った後、1 µl のヤギ抗ウサギ IgG を共役してあるアルカリフォスファターゼと共に緩衝液 A 中でインキュベートした。その後まず、緩衝液 A で一度洗い、緩衝液 B [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂] によってさらに洗った後、そのニトロセルロースフィルターを、nitroblue tetrazolium と 5-bromo-4-chloro-3-indoyl リン酸を含む 5 ml の緩衝液 B と共にインキュベートして発色させた。そのフィルターを、最終的に水で洗って乾かした。

5-3 結果

(1) フラボドキシン遺伝子のクローニングと塩基配列決定

SalI-EcoRI の塩基配列決定のために使用した制限酵素地図 (一部) とその戦略を、Fig. 5-3 に示した。また、フラボドキシン遺伝子全体を含む決定ヌクレオチド配列を、Fig. 5-4 に示した。フラボドキシンをコードしていると予想される読み枠 (ORF) は、アミノ末端のメチオニンを入れて、148 アミノ酸残基より成り、*SalI-EcoRI* 断片の 404-407 番目の塩基に、リボソーム結合部位配列 (AGGA) が見つかった。*D. vulgaris* (Miyazaki F) のフラボドキシンのアミノ酸配列は、他の硫酸還元菌由来のそれと相同性があり (Fig. 5-5)、特に、*D. vulgaris* (Hildenborough) のものとは、67% の一致が見られた。しかしながら、FMN 結合領域近傍で、かつ、分子表面に位置している 16 番目の残基は、他の硫酸還元菌のフラボドキシンではすべて、グルタミン酸であるのに対して Miyazaki では、アラニンであった。他のタンパク質の遺伝子は、このクローン断片の中には見つからなかった。

(2) 組換え型フラボドキシンの精製

われわれは、pUTFLV を持つ大腸菌 BL21 (DE3) から、組換えフラボドキシンを精製した。DE52 と Superose HR12 の 2 段階のクロマトグラフィーを行うだけで、大量のフラボドキシン (25 mg/g 湿菌体) を、SDS-PAGE において単一になるまで精製できた。また、SDS-PAGE により、変性状態での分子量は、約 19,000 であると決定した (Fig. 5-6) が、塩基配列より予想されるアミノ酸配列を基にした計算値 (15,600) とはむしろ異なっていた。アミノ末端の配列分析の結果は、Ala-Asn-Val-Leu-Ile-Val-Tyr-Gly-Ser-Thr であり、メチオニンは検出できなかった。それゆえ、組換え型フラボドキシンの分子量は、FMN の 1 分子を含めて 15,900 であると思われる。

(3) 補欠分子族の同定

組換え型フラボドキシンに結合している補欠分子族を同定するために、精製したホロタンパク質の紫外-可視スペクトルを測定した (Fig. 5-7)。可視領域では、吸収極大が、377 と 448 nm に観測されたが、これは、フラビン類が結合しているタンパク質に特徴的なものである。トリクロロ酢酸で抽出した補欠分子族を用いて、C-8 カラムによる逆相系 HPLC の溶出時間を、フラビン類のものと比較した。Fig. 5-8 に示すように、組換えフラボドキシンより抽出された補欠分子族の溶出時間は FMN のそれと正確に同じであった。ホロタンパク質の $A_{448} : A_{268}$ の比率は、0.234 であったことから、大腸菌でホロタンパク質として発現したフラボドキシンは、補欠分子族 FMN と 1:1 の比で結合していると思われる。

(4) フラボドキシンとその変異型 (A16E) の電気化学的性質と FMN 結合特性

われわれは、組換え型フラボドキシンが、*in vitro* で、ヒドロゲナーゼとシトクロム c_3 存在下において、 H_2 により還元されるということを確認した。発現させた野生型および変異型フラボドキシンの酸化還元電位を Table 5-1 にまとめた。

HPLC で精製した FMN 溶液を、解離定数の決定のために使った。また、FMN とリボフラビンのアポフラボドキシンへの結合の解離定数 (K_d) を、蛍光滴定²⁹⁾によって決定した。25°Cにおいて、0.1 μ M FMN 溶液 (50 mM リン酸カリウム (pH 7.0) - 5 mM EDTA 緩衝液) 3 ml へ、マイクロリッター量のアポフラボドキシンを加えると、FMN の蛍光の減少が数分で起こった。結合した FMN の割合は、蛍光の減少の程度を測定することによって、以下に示す平衡論に従って、グラフより決定した (Fig. 5-9)。すなわち、FMN 結合タンパク質は次式のように FMN と 1:1 で結合しているので



よって解離定数の定義より

$$K_d = [\text{Apoprotein}] [\text{FMN}] / [\text{Holoprotein}] = ([\text{Apoprotein}] / [\text{Holoprotein}]) \times [\text{FMN}]$$

ここで K_d は解離定数である。ゆえに、 I_{obs} を蛍光の滴定値、 I_0 を蛍光の初期値、 I_{ideal} を蛍光の理想値、 V を溶液の体積、 M_0 を FMN のモル数であるとする
るとこの式は、

$$K_d = \{(I_{\text{obs}} - I_{\text{ideal}}) / (I_0 - I_{\text{obs}})\} \times \{(I_{\text{obs}} - I_{\text{ideal}}) / (I_0 - I_{\text{ideal}})\} \times M_0 / V$$

と書き換えられる。よってグラフ (Fig. 5-9) より求まるこれらの値を代入することで、解離定数を求めることができた。

FMN、リボフラビンとの解離定数のデータは、フラボドキシン類が、補欠分子族との結合および酸化還元電位において、基本的に同じ特性を持ち、*D. vulgaris* (Hildenborough) のもの²⁶⁾ とはほとんど同じであることを示している。

(5) 組換え型フラボドキシンのグラファイト電極との酸化還元挙動

サイクリックボルタメトリー (CV) では、すべての pH において、BPG と EPG 電極のどちらを使っても、陰極ピークと陽極ピークが現れた。pH 7.3 におけるフラボドキシンの式量電位 (formal potential, $E^{0'}$) は、微分パルスボルタモグラム (DPV) と ac ボルタモグラムのピーク電位および、陽極と陰極のピーク間の midpoint の電位から、 $-477 \pm 3 \text{ mV}$ と決定した。また、pH の関数としての $E^{0'}$ のプロットを、3つの直線にフィットさせることができた (Fig. 5-10)³⁰⁾。傾きは、 $\text{pH} < 8.5$ と $\text{pH} > 10$ では -58 mV/pH 、 $8.5 < \text{pH} < 10$ では -29 mV/pH であった。それゆえ、EPG 電極に吸着したフラボドキシンの酸化還元反応は、 $\text{pH} < 8.5$ と $\text{pH} > 10$ においては 2 電子、2 プロトン移動過程であり、他方、 $8.5 < \text{pH} < 10$ においては 2 電子、1 プロトン移動過程である。pH 7.0 へ外挿すると、 $E_{m,7}(\text{EPG}) = -435 \text{ mV}$ を与えるが、それは、液相でのフラボドキシンの E_1 とほぼ同じであった。

(6) リン脂質修飾 BPG 電極における野生型フラボドキシンの電気化学

CV は、2 組みの、陰極ピークと陽極ピークを示した。pc1-pa1 組みの CV

波のピーク変化は、pc2-pa2 組みの CV 波のピーク変化の約 1/5 だった。ピーク電位の電位掃引速度依存性から、CV 反応での 2 組みに対して得られた $E^{0'}$ は、 $E^{0'}_{p1} = -318 \text{ mV}$ と $E^{0'}_{p2} = -136 \text{ mV}$ であった。 $E^{0'}_{p1}$ と $E^{0'}_{p2}$ の両者とも、 $E_{m,7}$ (EPG) より高かった。5.2 < pH < 9.2 の範囲における pH に対するピーク電位のプロットは、 -59 mV/pH の傾きの直線上にあった。このことは、酸化還元反応が、2 電子、2 プロトン反応であることを示している。

(7) イムノプロット分析

組換えフラボドキシンは、FMN 結合タンパク質に対するポリクローナル抗体とは、組換え FMN 結合タンパク質の 1/100 しか反応しなかった (Fig. 5-11 参照)。これは、フラボドキシンと FMN 結合タンパク質の構造が、FMN 結合タンパク質の抗体に対して反応するほどは似ていないということを示唆している。

5-4 考察

本研究においてわれわれは、PCR によって、*D. vulgaris* (Miyazaki F) のフラボドキシン遺伝子を単離した。これは、*D. vulgaris* (Miyazaki F) のフラボドキシンのアミノ酸配列を決定した最初の報告である。われわれの結果は、硫酸還元菌が、高いアミノ酸配列相同性を示すフラボドキシンを一般に含んでいるということを示し、さらに、FMN 結合領域付近には、いくつかの保存配列を持っていることを示した。しかしながら、A16E 変異体の酸化還元および FMN 結合特性の性質から、保存されている Glu-16 残基は、FMN 結合領域近くに存在し、分子表面に存在するにもかかわらず、特に重要ではない、ということがわかった。ただし、A16E 変異体は、野生型とは異なる方法でヒドロゲナーゼと相互作用するという可能性も残っている。最近、*D. vulgaris* (Hildenborough) 由来のフラボドキシンの酸化還元電位において、表面の Glu 残基あるいは、Asp 残基の静電的な影響が報告され、セミキノンとヒドロキノンの間の酸化還元電位は、酸からアミドへの置換の数と関係があるということが示された²⁹⁾。し

かしながら、A16E 変異体の酸化還元電位 (E_1 と E_2 の両方) は、野生型のものと同様である。したがって、酸性残基の数と酸化還元特性の関係は、それほど簡単ではないように思われる。

非修飾の EPG 電極に吸着したフリーな FMN は、同じ条件下で 2 組の陰極、陽極ピークを示している (Sagara, T. and Takaki, S., 未発表データ)。それゆえ、非修飾の EPG 電極上で観測された 1 組のピークは、フラボドキシンの結合した FMN の反応に起因するものと言える。ボルタモグラムに単一のピークが現れたことから判断すると、液体状態でのフラボドキシンの半キノン型は、不安定であると考えられる。また、フリーな FMN の場合、リン脂質で修飾された BPG 電極における CV 応答は、低い電位掃引速度であっても、シグモイド型波形を示している (Sagara, T., Takaki, S., Honda, M., Ezoe, K., and Nakashima, N., 未発表データ)。一方、リン脂質で修飾された BPG 電極におけるフラボドキシンの CV の場合、低い電位掃引速度ではピーク型波形を示すので、得られた CV 波形はフラボドキシンの遊離したフリーな FMN によるものではないと結論できる。ここでは 2 組の CV 反応が観測されたが、 E_{p1}° と E_{p2}° が E_1 と E_2 にそれぞれが等しいと考えるのは危険である。2 組の CV 応答が現れることは、むしろ、リン脂質膜の中に存在するフラボドキシンの 2 つの状態を示していると考えるのが最も自然だと思われる。しかし、時間あたりのピーク電流が、わずかに減少したとはいえ、EPG 電極に吸着したフラボドキシンの酸化還元活性は 1 週間安定であったのは重要なことである。すなわちこのような性質は、バイオチップのような電子工学のために役立つ可能性があるからである。

すべてのフラボドキシンは、共通の特徴的な構造を持っている。すなわち、1 対のアルファヘリックスが 5 本の平行ベータシート面を挟んだ構造である。FMN は、ほとんど分子表面付近にあり、FMN のイソアロキサジン環は、Trp-60 と Tyr-98 の 2 つの環状側鎖の間に埋もれている⁷⁾。Tyr-98 は、部位特異的変異法³¹⁾による実験から、酸化還元電位を決めるのに特に重要であることがわかっている。これらの 2 つのアミノ酸残基は、*D. vulgaris* (Miyazaki F) のフラ

ポドキシンにも保存されており、他のフラボドキシン類と類似した構造を持っているように考えられる。しかしながら、イムノブロット分析によると、フラボドキシンは、FMN 結合タンパク質と似たアミノ酸領域 (Thr-Trp-Asn or Gly) を持っているにもかかわらず、はっきりと FMN 結合タンパク質とは異なった構造を持つことが示された。また、フラボドキシンの Gly-61 は、セミキノン状態を安定化するために重要であると報告されてきた³²⁾が、他方、FMN 結合タンパク質の場合には、この領域における Trp 残基が FMN 結合のために重要であることもわかっている (野生型 FMN 結合タンパク質の FMN との K_d は、0.43 nM である。、未発表データ)。われわれは今、FMN 結合タンパク質とフラボドキシンの構造を NMR により詳細に研究しており、それらが、FMN とペプチド鎖の間の相互作用においては、お互いに類似していないということもわかっている³³⁾。FMN 結合タンパク質とフラボドキシンの両者はほとんど同じ分子量を持ち、同種の *D. vulgaris* からほとんど同じ解離定数で、FMN へ結合する。しかしながら、FMN 結合タンパク質は、アミノ酸配列、高次構造、酸化還元特性から明らかなように、フラボドキシンとは異なる分子であると結論した。

本研究により、硫酸還元菌宮崎 F 株のフラボドキシン遺伝子の配列を決定した。そして大腸菌における大量発現系を構築することに成功し、さらにその酸化還元電位、および、FMN との解離定数を見積もることに成功した。その結果、硫酸還元菌宮崎 F 株には、2種類の異なるフラボドキシン様 FMN 結合タンパク質が存在していることを明らかにすることができた。今後、これら 2種類のフラボドキシン様 FMN 結合タンパク質がどのような機能と役割を硫酸還元菌内で果たしているのかを明らかにする上で、この大量発現系の構築ができたことは意義深いことと思われる。

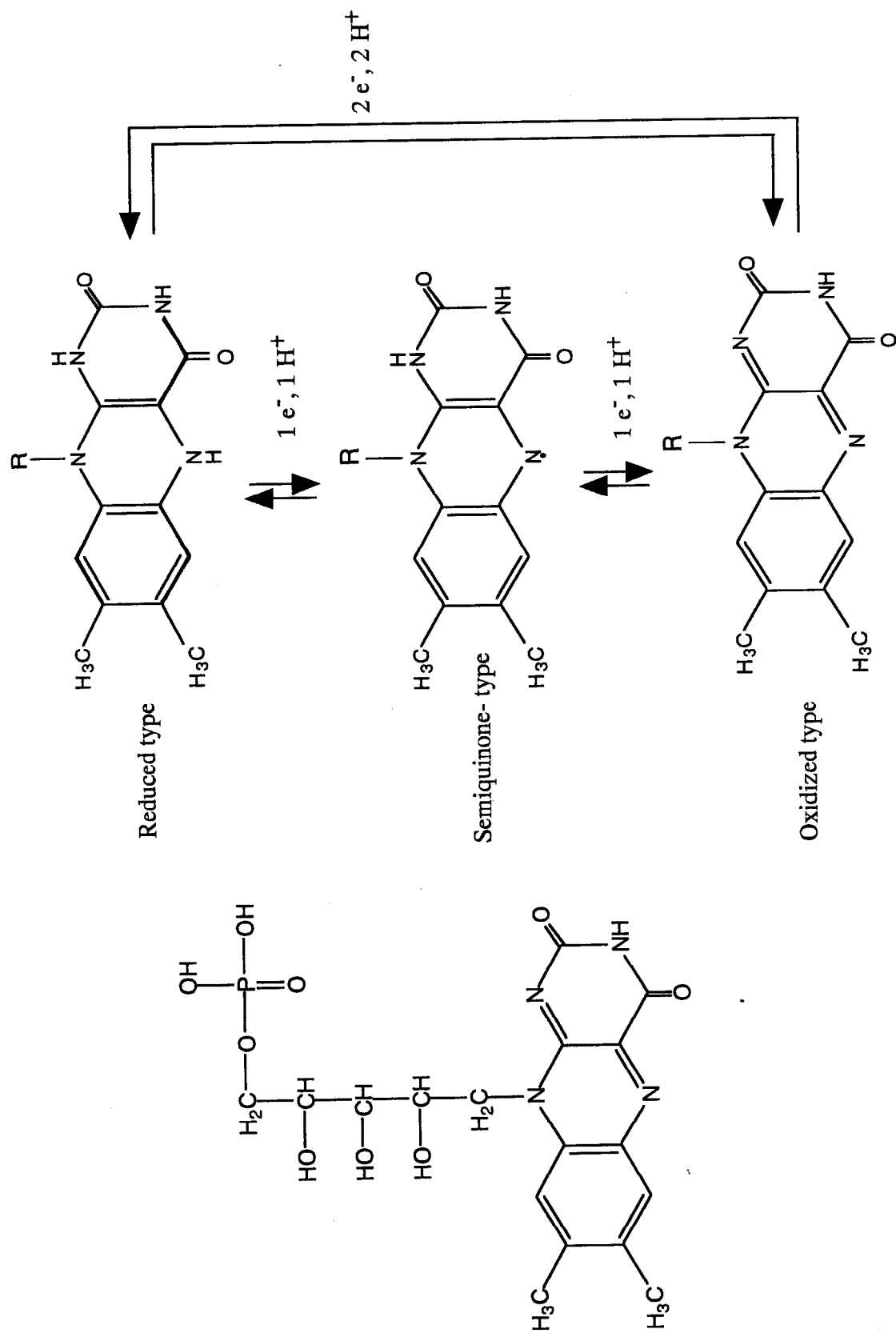


Fig. 5-1 Chemical structure of FMN and its reduction process

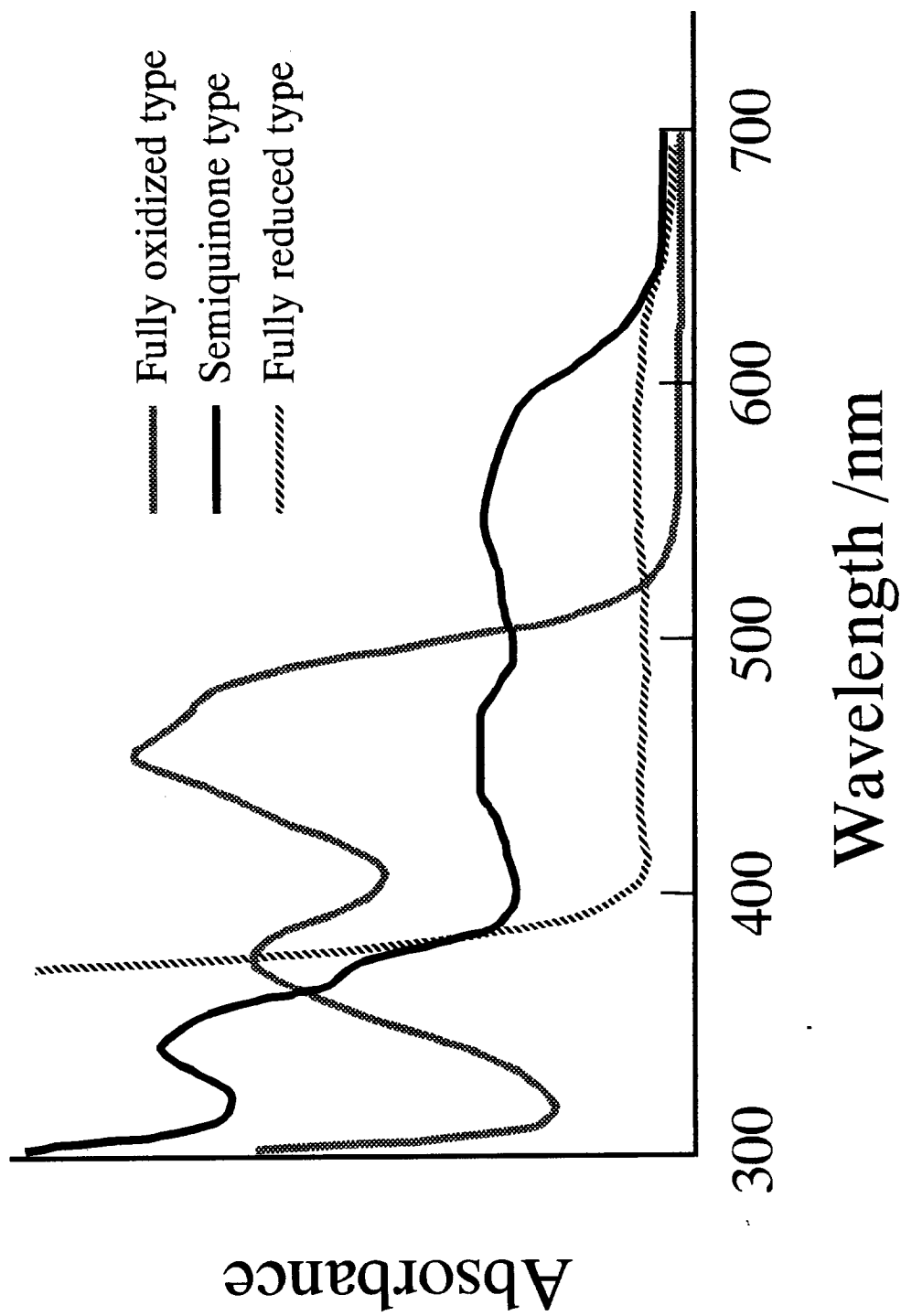


Fig. 5-2 The absorption spectra for three oxidized states of flavodoxin

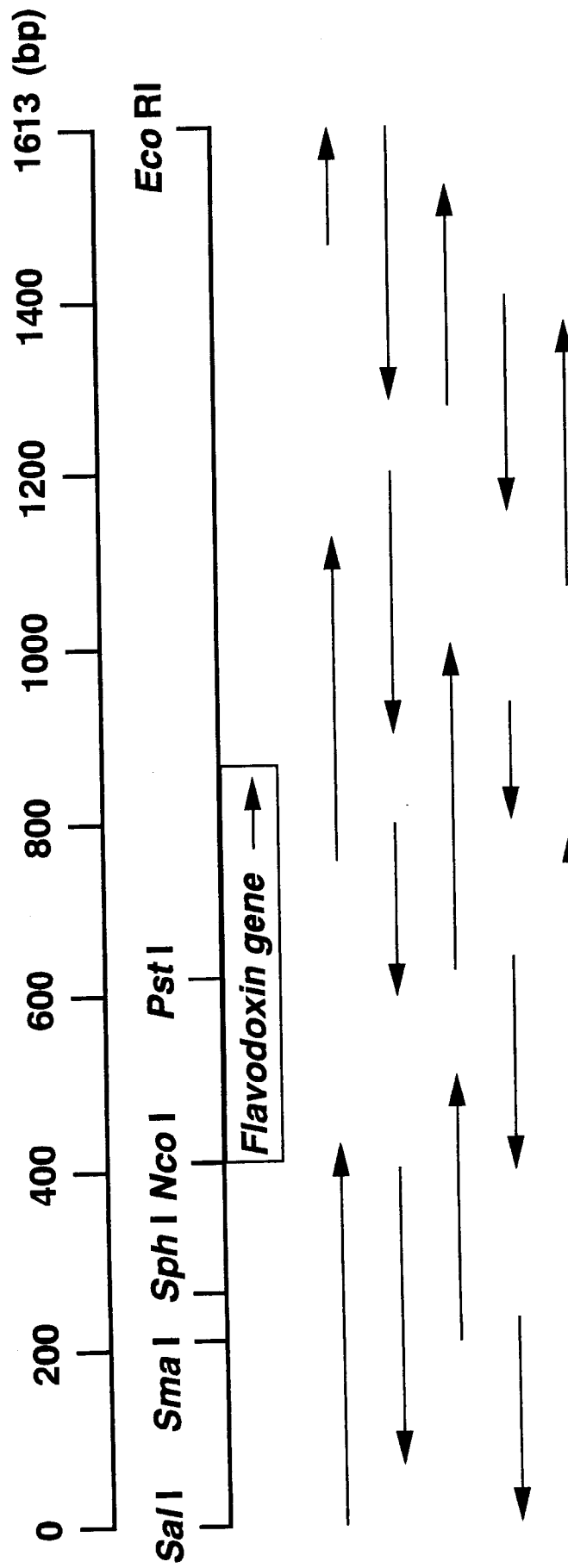


Fig. 5-3 Partial restriction map and sequencing strategy for the cloned 1.6-kbp *SmaI-SalI* fragment. The open reading frame is shown within the box. The arrows indicate the region sequenced on each DNA strand for the restriction fragment cloned into the multicloning site of pUC18, and the deletion mutants obtained on treatment with exonuclease III and mung bean nuclease. Some restriction enzyme sites are also indicated.


```

90      100      110      120      130      140      150      160
CTTTTTCTTGAAAAGGATTTTCAATTTTCAATTAAGGTTCCCTCAACGATCAACCTCAACGACGCCCCCCCATGCCCCACA
-35 region
-10 region
170      180      190      200      210      220      230      240
TCACTCCACAGTATTCAGCCTCCGGCCTTTCCCGTCCGTCCCGGCCTTGCAACCCGGGGGACGGGGAACGCCACCCC

250      260      270      280      290      300      310
CTGCACGCATGGGCACGTTCCGCGAGGTTGCGGCATCCCCCCTGCTCACCCCTGCCTATTGGGCCCATTTGGGTCCACCC

330      340      350      360      370      380      390      400
ACCAGCGGAACGGTGTAGTCGGGCCCTGACGGGTGGCCCCACTCGAACAACCGACACGCTTTCACAGACACCATCCACC

410      420      430      440      450      460      470      480
CGGAGGATTTCCCAATGGCCAAACGTGCTCATCGTCTACGGTTCCACCACCGGCAACACCCGCTGGGTCCGCCGAAACCGTCCGG
SD sequence M A N V L I V Y G S T T G N T A W V A E T V G

490      500      510      520      530      540      550      560
TCGGACATCGGGGAAAGCGGCCACAGCGTTGAAATCCGGACGCGGGCCAGGTAGAGCCCGAAGGACTGTGCGAAGGCC
R D I A E A G H S V E I R D A G Q V E A E G L C E G R

570      580      590      600      610      620      630      640
GGGACCTCGTGTGTCGGCTGCTCCACCTGGGGCGACGACGAAATCGAACTGCAGGACGACTTCATCCACCCTGTACGAA
D L V L F G C S T W G D D E I E L Q D D F I H L Y E

650      660      670      680      690      700      710      720
TCGCTGGAAGCCACGGGCGGGCAAGGCGCGCTGCTGGCTGGCTGGCGGACAGCAGCAGCTACACCTACTTCTGCGG
S L E A T G A G K G R A A C F G C G D S S Y T Y F C G

730      740      750      760      770      780      790      800
CGCGGTGGATGCCATCGAAGAGCGCCTGTCCGGCCTTGGCGGGACATCGTGGCAGATTGCGTGAATAATCGACGGGATC
A V D A I E E R L S G L G A D I V A D S L K I D G D P

810      820      830      840      850      860      870      880
CCCGCACCATGGCGACGATGTTCCCGCCTGGGCGGGCGGTGGTGACCGCCCTGTAGGGCTGCCCGCATTCGCACACC
R T M R D D V S A W A G R V V T A L *

```

Fig. 5-4 Partial nucleotide sequence of the cloned 1.6-kbp fragment

The amino acid sequence deduced from the possible open reading frame is shown with one-letter abbreviations. The putative ribosome-binding site and the -35 and -10 regions are indicated.

1.	MANVLIIVYGS	TTGNTAWVAE	TVGRDIAEAG	HSVEIRDAGQ	VEAEGICEGR	DLVLFGCSTW
2.	MPKALIVYGS	TTGNTTEYTAE	TIARELADAG	YEVDSRDAAS	VEAGGLFEGF	DLVLLGCSTW
3.	MSKSLIVYGS	TTGNTETAEE	YVAEAFENKE	IDVELKNVTD	VSVADLNGY	DIVLFGCSTW
4.	MSKVLIVPGS	STGNTESIAQ	KLEELIAAGG	HEVTLLNAAD	ASAENLADGY	DAVLFGCSSAW
5.	MPKALIVYGS	TTGNTTEGVAE	AIAKTLNSEG	METTUVNVAD	VTAPGLAEGY	DVLLGCSTW
6.	MGKALVVFGS	TTGNTETVAE	VVAKVLEESG	MAVDLKNATK	VKAAAGLAEGY	DLVVFGCSTW
7.	MSKVLILFGS	STGNTESIAQ	KLEELVAAGG	HEVTLLNAEE	ASADNLADGY	DAVLMGCCSAW
61	* * * * *	* * * * *	# !	* * *	#####	###
1.	GDDEIELQDD	FIHLYESLEA	TGAGKGRAAC	FGCGDSSYTY	FCGAVDAIEE	RLSGLGADIV
2.	GDDSIELQDD	FIFLFDLSLE	TGAQGRKVAC	FGCGDSSYTY	FCGAVDAIEE	KLKNLGAEIV
3.	GEEIEELQDD	FIFLYDSLEN	ADLKGKKVSV	FGCGDSDYTY	FCGAVDAIEE	KLEKMGAVVI
4.	GMEDLEMQDD	FLSLFEEFNR	IGLAGRKYAA	FASGDQYEH	FCGAVPAIEE	RAKELGATII
5.	GDDEIELQED	FVPLYEDLDR	AGLKDKKVGV	FGCGDSSYTY	FCGAVDVIEK	KAEELGATLV
6.	GDDEIELQED	FIFLYDDLGA	AGLGRKVAV	FGCGDSSYTH	FCGAVDAIAE	KAASLGAKVI
7.	GMEDLELQDD	FAPLFDEMEN	MGLKGKLLAA	FASGDMEYEH	YCGAVPAIEE	KAYGLGAEVI
121	* ## * * * *	# #	# #	# #	# #	# #
1.	ADSLKIDGDP	RTMRDDVSAW	AGRVVTAL			
2.	QDGLRIDGDP	RAARDDIVGW	AHDVRGAI			
3.	GDSLKIDGDP	--ERDEIVGW	GSGIADKI			
4.	AEGLKMEGDA	SNDPEAVASF	AEDVLKNL			
5.	ASSLKIDGEP	--DSAEVLDW	AREVLARV			
6.	DLPLKIDGAP	--DTAEARDW	AKEVLRSA			
7.	PEGLKIEGDA	SSDPDAVSFAF	AEDVLK			

Fig. 5-5 Comparison of the amino acid sequences of flavodoxins from *Desulfovibrio*

Lane 1, *D. vulgaris* (Miyazaki F) (this work) ; Lane 2, *D. vulgaris* (Hildenborough) (34, 35) ; Lane 3, *D. salexigens* (12) ; Lane 4, *D. desulfuricans* [Essex 6] (13) ; Lane 5, *D. gigas* (ATCC19364) (14) ; Lane 6, *D. gigas* (ATCC29494) (14) ; Lane 7, *D. desulfuricans* (ATCC27774) (15). *, conserved; #, conserved except for one strain; !, conserved except for *D. vulgaris* (Miyazaki F); -, a gap. The identity in the amino acid sequences of the flavodoxins from *D. vulgaris* (Miyazaki F) and *D. vulgaris* (Hildenborough) is 66.9%.

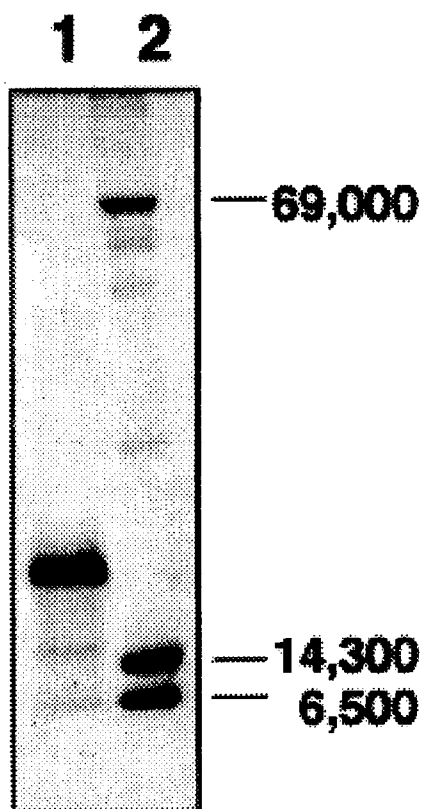


Fig. 5-6 SDS-PAGE of the purified recombinant flavodoxin
Lane 1, recombinant flavodoxin; Lane 2, molecular mass marker mixture

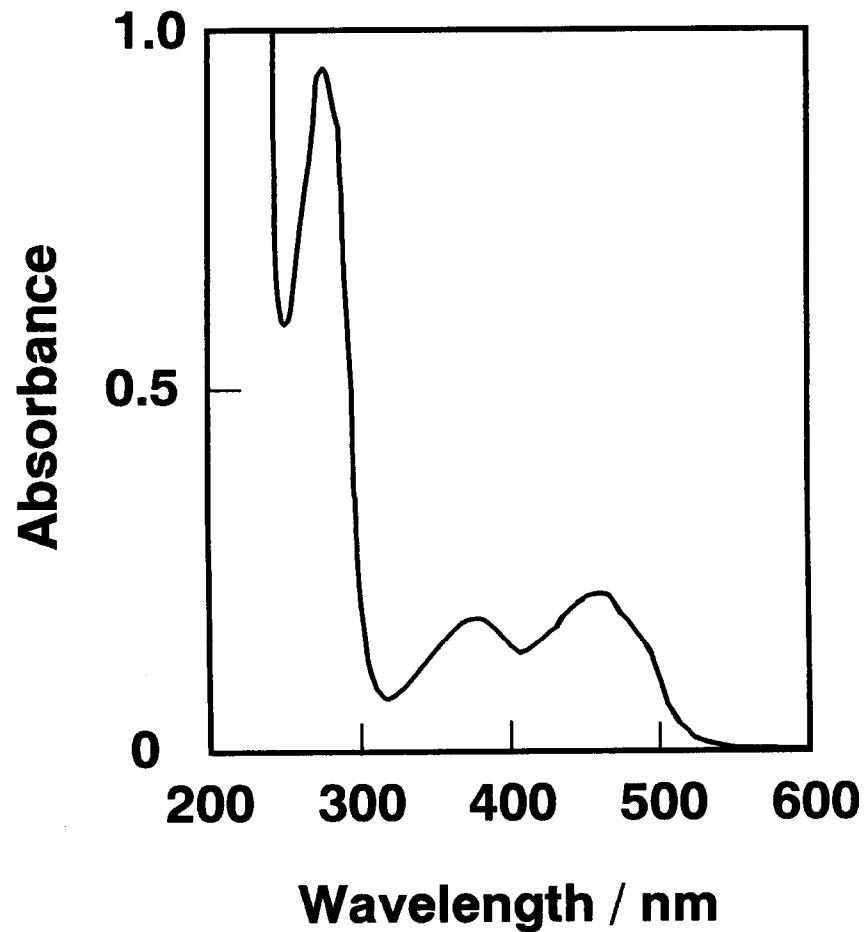


Fig. 5-7 An ultraviolet and visible spectrum of the purified flavodoxin expressed in *E. coli* (pUTFLV).

The absorption spectrum was recorded at room temperature using a Hitachi 321 spectrophotometer.

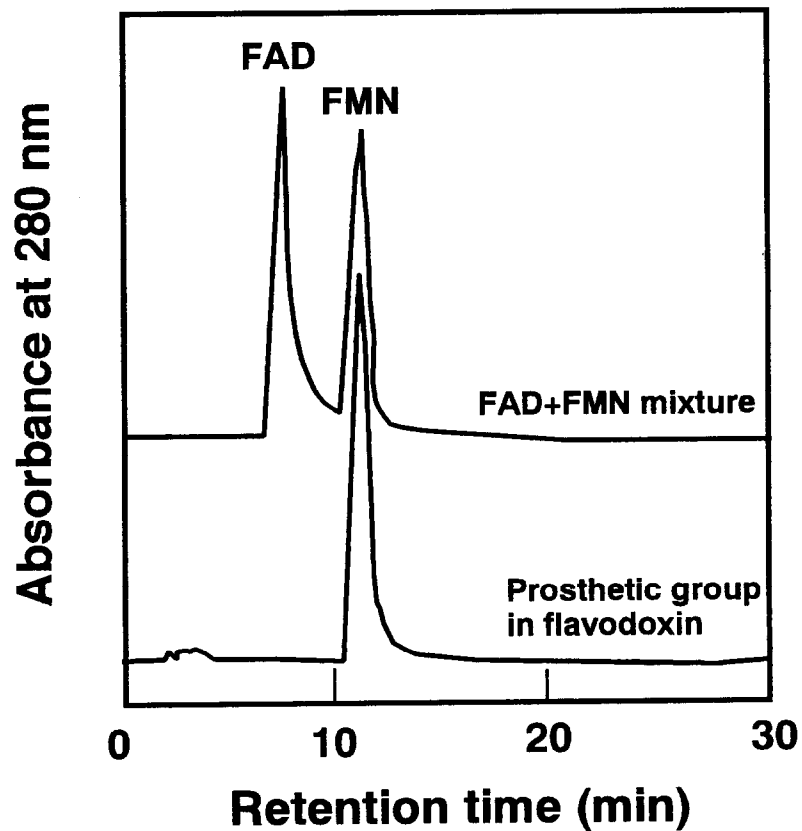


Fig. 5-8 Identification of the prosthetic group by HPLC

The extracted prosthetic group was subjected to reverse-phase HPLC on a C8 column (Hiber LiChrosorb RP-8) with 10% acetonitrile and 0.1% trichloroacetic acid at the flow rate of 2 ml/min.

Table 5-1 The dissociation constants of apoprotein with FMN and riboflavin, and the redox potentials of the flavodoxins of Hildenborough, Miyazaki, and mutant (A16E).

		Hildenborough	Miyazaki	A16E
K_d with FMN	(nM)	0.24	0.38	0.36
K_d with riboflavin	(mM)	0.72	2.13	2.16
E_1	(mV)	-440	-434	-425
E_2	(mV)	-143	-151	-136

K_d stands for the dissociation constant, and E_1 and E_2 stand for the redox potentials between hydroquinone and semiquinone, and semiquinone and the fully oxidized state, respectively.

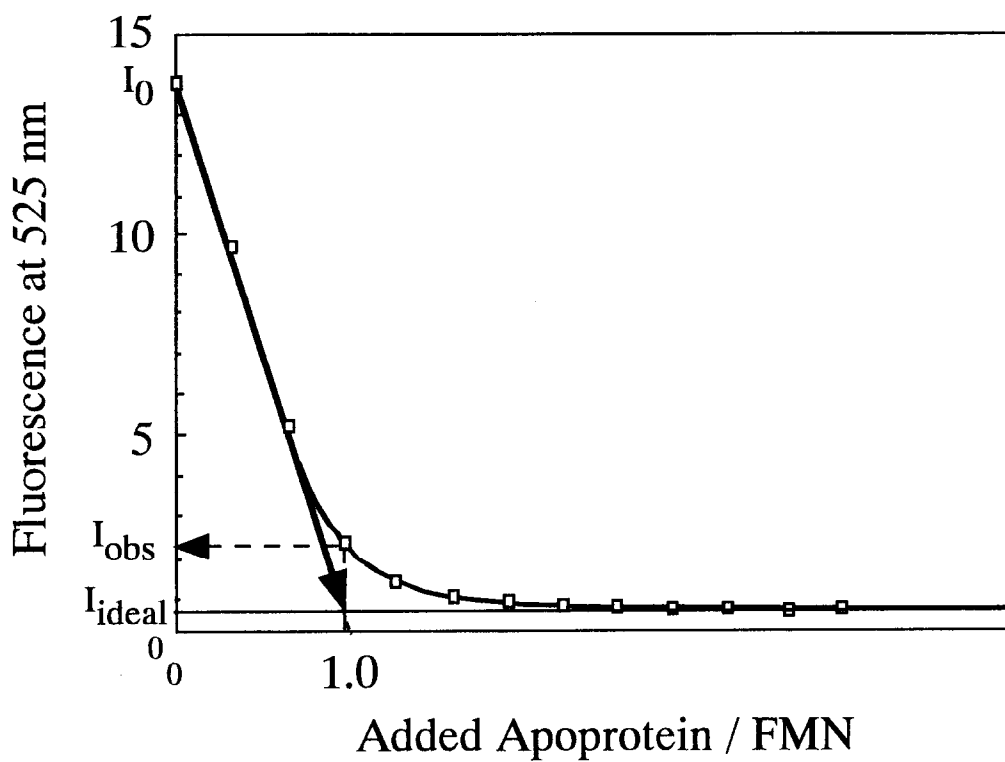


Fig. 5-9 Determination of the dissociation constant of apoprotein with FMN by fluorescence titration

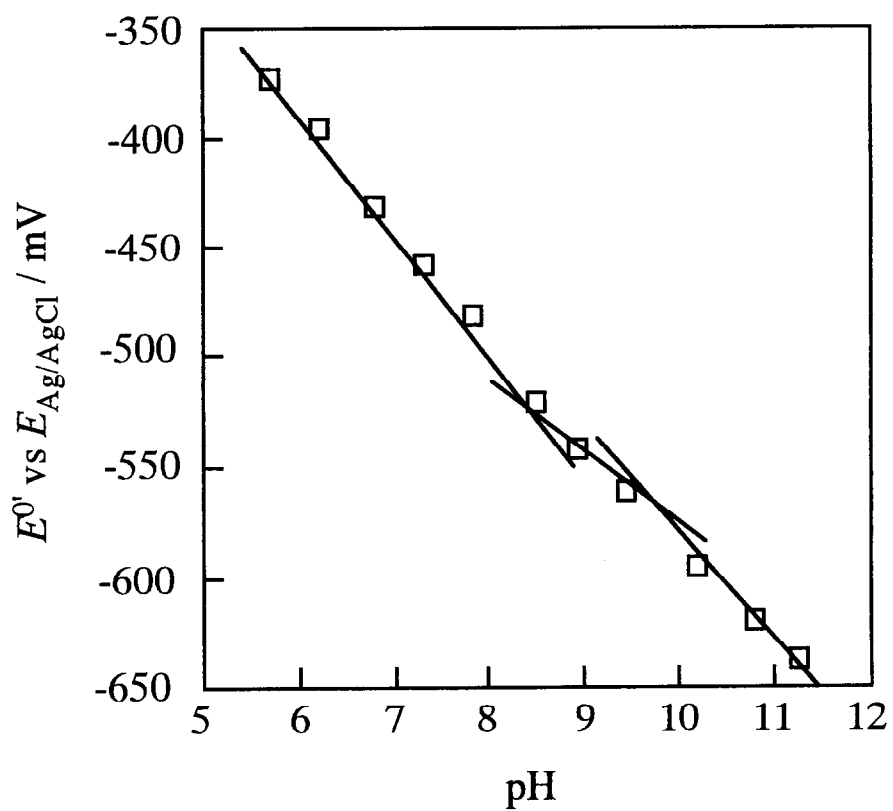


Fig. 5-10 The formal potential as a function of pH for the flavodoxin adsorbed on the EPG electrode

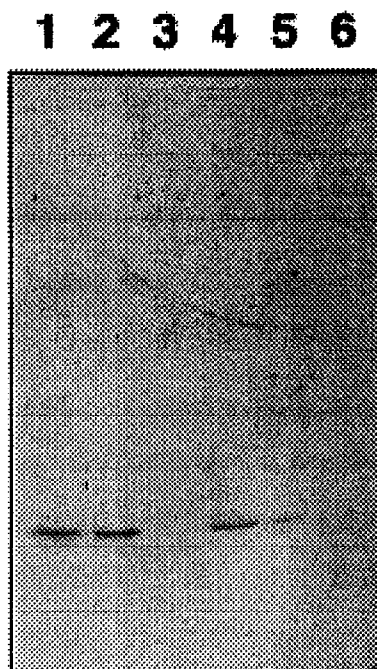


Fig. 5-7 Immunoblot analysis of the recombinant flavodoxin and FMN-binding protein

Lane 1, purified FMN-binding protein, 8 pmol; Lane 2, purified FMN-binding protein, 4 pmol; Lane 3, purified FMN-binding protein, 0.8 pmol; Lane 4, purified flavodoxin, 800 pmol; Lane 5, purified flavodoxin, 400 pmol; Lane 6, purified flavodoxin, 80 pmol.

参考文献

1. **Vervoort, J., Heering, D., Peelen, S., and van Berkel, W.** (1994) Flavodoxins in *Method Enzymology* (Peck, Jr., H. D., and LeGall, J., eds) Vol. 243, pp. 188-203, Academic Press, New York
2. **LeGall, J. and Fauque, G.** (1988) Dissimilatory reduction of sulfur compounds in *Biology of Anaerobic Microorganisms* (Zehnder, A. J. B., ed.), pp. 587-639, John Wiley & Sons, New York
3. **Simonsen, R. P. and Tollin, G.** (1980) Structure-function relations in flavodoxins. *Mol. Cell. Biochem.* **33**, 13-24
4. **Anderson, R. D., Apgar, P. A., Burnett, R. M., Darling, G. D., LeQuesne, M. E., Mayhew, S. G., and Ludwig, M. L.** (1972) Structure of the oxidized form of a flavodoxin at 2.5-Å resolution: Resolution of the phase ambiguity by anomalous scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 3185-3188
5. **Fukuyama, K., Wakabayashi, S., Matsubara, H., and Rogers, L. J.** (1990) Tertiary structure of oxidized flavodoxin from an eukaryotic red alga *Chondrus crispus* at 2.35-Å resolution: Localization of charged residues and implication for interaction with electron transfer partners. *J. Biol. Chem.* **265**, 15804-15812
6. **Mierlo van, C. P. M., Sanden van der, B. P. J., Woensel van, P., Müller, F., and Vervoort, J.** (1990) A two-dimensional ^1H -NMR study on *Megasphaera elsdenii* flavodoxin in the oxidized state and some comparisons with the two-electron-reduced state. *Eur. J. Biochem.* **194**, 199-216
7. **Watt, W., Tulinsky, A., Swenson, R. P., and Watenpaugh, K. D.** (1991) Comparison of the crystal structure of a flavodoxin in its three oxidation state at cryogenic temperatures. *J. Mol. Biol.* **218**, 195-208
8. **Romero, A., Caldeira, J., LeGall, J., Moura, I., Moura, J. J. G., and**

- Romao, M. J.** (1996) Crystal structure of flavodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 in two oxidation state. *Eur. J. Biochem.* **239**, 190-196
9. **Knauf, M. A., Löhr, F., Curley, G. P., O'Farrell, P., Mayhew, S. G., Müller, F., and Rüterjans, H.** (1993) Homonuclear and heteronuclear NMR studies of oxidized *Desulfovibrio vulgaris* flavodoxin: Sequential assignments and identification of secondary structure elements. *Eur. J. Biochem.* **213**, 167-184
10. **Peelen, S., and Vervoort, J.** (1994) Two-dimensional NMR studies of the flavin binding site of *Desulfovibrio vulgaris* flavodoxin in its three redox states. *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 291-300
11. **Dubourdieu, M., and Fox, J. L.** (1977) Amino acid sequence of *Desulfovibrio vulgaris* flavodoxin. *J. Biol. Chem.* **252**, 1453-1463
12. **Helms, L. R., Krey, G. D., and Swenson, R. P.** (1990) Identification, sequence determination, and expression of the flavodoxin gene from *Desulfovibrio salexigens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 809-817
13. **Helms, L. R., and Swenson, R. P.** (1991) Cloning and characterization of the flavodoxin gene from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**, 417-419
14. **Helms, L. R., and Swenson, R. P.** (1992) The primary structures of the flavodoxins from two strains of *Desulfovibrio gigas*: Cloning and nucleotide sequence of the structural genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 325-328
15. **Caldeira, J., Palma, P. N., Regalla, M., Lampreia, J., Calvete, J., Schäfer, W., LeGall, J., Moura, I., and Moura, J. J. G.** (1994) Primary sequence, oxidation-reduction potentials and tertiary-structure prediction of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 flavodoxin. *Eur. J. Biochem.* **220**, 987-995
16. **Higuchi, Y., Kusunoki, M., Matsuura, Y., Yasuoka, N., and Kakudo, M.** (1984) Refined structure of cytochrome c_3 at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **172**, 109-139

17. **Okawara, N., Ogata, M., Yagi, T., Wakabayashi, S., and Matsubara, H.** (1988) Characterization and complete amino acid sequence of ferredoxin II from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki. *Biochimie* **70**, 1815-1820
18. **Irie, K., Kobayashi, K., Kobayashi, M., and Ishimoto, M.** (1973) Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria: XII. Some properties of flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Biochem.* **73**, 353-366
19. **Kitamura, M., Kojima, S., Ogasawara, K., Nakaya, T., Sagara, T., Niki, K., Miura, K., Akutsu, H., and Kumagai, I.** (1994) Novel FMN-binding protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F): Cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 5566-5573
20. **Postgate, J. R.** (1984) *The Sulphate-reducing Bacteria*, 2nd Ed., pp. 30-50, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
21. **Saito, H., and Miura, K.** (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid (DNA) by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 619-629
22. **Sanger, F., Nicklen, S., and Coulsen, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5363-5367
23. **Tsumoto, K., Nakaoki, Y., Ueda, Y., Ogasawara, K., Yutani, K., Watanabe, K., and Kumagai, I.** (1994) Effect of the order of antibody variable regions on the expression of the single-chain HyHEL 10 Fv fragment in *E. coli* and the thermodynamic analysis of its antigen-binding properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 546-551
24. **Kojima, S., Nishiyama, Y., Kumagai, I., and Miura, K.** (1991) Inhibition of subtilisin BPN^I by reaction site P1 mutants of *Streptomyces subtilisin* inhibitor. *J. Biochem.* **109**, 377-82
25. **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
26. **Curley, G. P., Carr, M. C., Mayhew, S. G., and Voordouw, G.** (1991)

- Redox and flavin-binding properties of recombinant flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur. J. Biochem.* **202**, 1091-1100
27. **Massey, V. and Hemmerich, P.** (1978) Photoreduction of flavoproteins and other biological compounds catalyzed by deazaflavins. *Biochemistry* **17**, 9-16
28. **Kitamura, M., Koshino, Y., Kamikawa, Y., Kohno, K., Kojima, S., Miura, K., Sagara, T., Akutsu, H., Kumagai, I., and Nakaya, T.** (1997) Cloning and expression of the rubredoxin gene from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F): Comparison of the primary structure of desulfoferrodoxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1351**, 239-247
29. **Zhou, Z. and Swenson, R. P.** (1995) Electrostatic effects of surface acidic amino acid residues on the oxidation-reduction potentials of the flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Biochemistry* **34**, 3183-3192
30. **Kitamura, M., Taniguchi, M., Nakaya, T., Sagara, T., and Akutsu, H.** (1997) Cloning and expression of the flavodoxin gene from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) in *Flavins and Flavoproteins 1996* (Stevenson, K. J., Massey, V., and Williams, C. H., Jr., ed.), pp. 441-444, University of Calgary Press, Calgary, Canada
31. **Stockman, B. J., Richardson, T. E., and Swenson, R. P.** (1994) Structural changes caused by site-directed mutagenesis of tyrosine-98 in *Desulfovibrio vulgaris* flavodoxin delineated by ^1H and ^{15}N NMR spectroscopy: Implications for redox potential modulation. *Biochemistry* **33**, 15298-15308
32. **Carr, M. C., Curley, G. P., Mayhew, S. G., and Voordouw, G.** (1990) Effects of substituting asparagine for glycine-61 in flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Biochem. Int.* **20**, 1025-1032
33. **Liepinsh, E., Kitamura, M., Murakami, T., Nakaya, T., and Otting, G.** (1997) Pathway of chymotrypsin evolution suggested by the structure of the FMN-binding protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F). *Nature Struct. Biol.* **4**, 975-979

34. **Curley, G. P., and Voordouw, G.** (1988) Cloning and sequencing of the gene encoding flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**, 295-299
35. **Krey, G. D., Vanin, E. F., and Swenson, R. P.** (1988) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the flavodoxin gene from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *J. Biol. Chem.* **263**, 15436-15443

第 6 章

硫酸還元菌のエネルギー変換系
のメカニズムについての総括

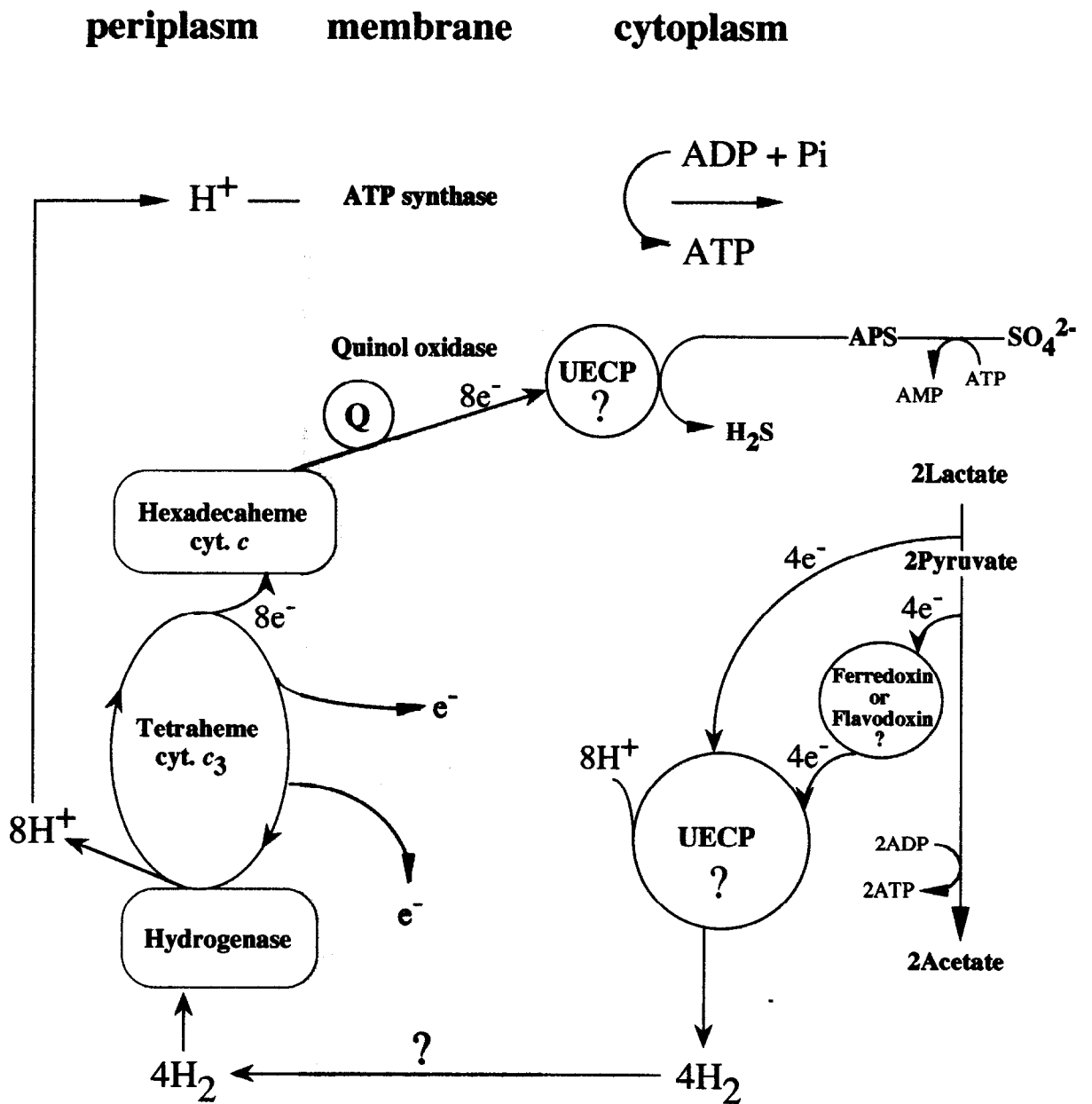
硫酸還元菌はイネの秋落ち現象の原因菌として日本でも大変古くから知られており、最近では、建物倒壊の原因の一つである盤膨れ現象にも深く関わっていることが分かってきた。また、偏性嫌気性細菌でありながら硫酸イオンを電子受容体とする呼吸を行い、エネルギー代謝の進化においても重要な位置を占めている。しかし、その生育の際に腐食性で有毒な硫化水素を発生するため、大量培養や単離が困難で研究は遅れている。本論文では、この細菌の進化上での位置を明らかにする上で最も重要なエネルギー変換系のタンパク質に絞って、呼吸鎖に関与するいくつかのタンパク質の存在を調べ、それらの機能を明らかにするとともに大量発現させる系の開発を行った。

エネルギー変換系にとって、膜タンパク質は大変重要な機能を持っている。しかし、硫酸還元菌の場合、エネルギー変換にかかわる膜タンパク質の存在がこれまで全く明らかにされていなかった。そこで、本論文では、硫酸還元菌がどのようにしてエネルギーを獲得しているのかを調べるために、細菌の細胞膜に共通に存在している ATP 合成酵素および末端酸化酵素について、遺伝子レベルおよび酵素レベルでの探索を行った。その結果、硫酸還元菌の細胞膜には、大腸菌とほぼ同じ存在量で ATP 合成酵素が存在していることが明らかになった。サブユニットの遺伝子がクラスターを形成している部分について、塩基配列を決定したところ、F-型と相同性の高い α 、 β 、 γ 、 δ 、 ε の遺伝子が確認された。したがって、硫酸還元菌には、F-型の H^+ -ATP 合成酵素が存在していると結論できた。本研究により、絶対嫌気性菌である硫酸還元菌が、好気性生物と同様に、細胞膜を横切るプロトン濃度勾配を利用して ATP 合成酵素により ATP を合成して生育している可能性が示唆された (Fig. 6-1)。また、硫酸還元菌が偏性嫌気性細菌であるため、酸素呼吸生物の電子伝達系に存在する末端酸化酵素が存在しているかどうかは、その呼吸を理解する上で非常に重要な問題である。本研究において、細胞膜に存在するシトクロム類の分析と、好氣的、嫌氣的呼吸鎖における酵素活性の測定により、キノール酸化酵素が存在することが示唆された (Fig. 6-1)。キノール酸化酵素は、酸素呼吸系における末端酸化酵素の一つであり、硫酸呼吸におけるその役割が注目される。

一方、この細菌の電子伝達系を特徴づける電子伝達タンパク質にシトクロム c_3 がある。シトクロム c_3 は4つのヘムを持ち、c-型シトクロムとしては非常に低い酸化還元電位を持つ。このタンパク質はペリプラズムに存在し、ヒドロゲナーゼから電子を受け取り、まわりの環境に応じてさまざまな電子伝達タンパク質に電子を渡すと考えられている (Fig. 6-1)。その際、4つのヘムが重要な役割を果たすと推定される。したがって、このタンパク質における各ヘムの酸化還元電位の制御、電子移動のメカニズムは硫酸還元菌における電子伝達系の制御と密接にかかわっている。そこで、シトクロム c_3 のアミノ酸置き換えをすることで、4つのヘムの間、また、他の分子との間の電子移動のメカニズムを解明し、硫酸還元菌のエネルギー変換系におけるテトラヘムの役割を調べた。まず、この遺伝子のクローニングと塩基配列の決定を行い、次に、その大量発現系の開発を行った。シトクロム c_3 は、c-型ヘムを持つため、その大量発現系の開発は非常に困難であったが、*Shewanella oneidensis* という通性好気性細菌を宿主に用い、pUC型のベクターと組み合わせることで、その収量を野生型の硫酸還元菌から得られる収量の10倍程度にまで高めることに成功した。次にこの発現系を利用して、シトクロム c_3 のヘム1近傍に存在して、電子移動に関与していると考えられるチロシン44をロイシンに置き換えた変異体を作製し、野生型との比較を行った。一つのアミノ酸残基の変異により、立体構造、巨視的酸化還元電位、電子移動速度において、タンパク質全体に及ぶ変化が観測された。これらはシトクロム c_3 が電子の流れを制御するにあたり、4つのヘムが協同的に働いていることを示唆するものである。

硫酸還元菌の硫酸呼吸は、末端酸化酵素が存在することから、電子伝達系が働いており、その過程で生じたプロトンの濃度勾配を利用してATP合成酵素がATPを生み出すという酸素呼吸生物とほぼ同じシステムを備えていることが強く示唆された (Fig. 6-1)。このことは、一般の嫌気性細菌に見られる解糖系による基質レベルでのエネルギー生産から、硫酸イオンを最終電子受容体とすることにより、硫酸還元菌が酸素呼吸の原型とも言うべきエネルギー生産系を獲得する方向へと進化していったことを示唆している。また硫酸還元菌

の電子伝達系には、好気性生物のシトクロム c よりも遙かに複雑な構造と機能を持つシトクロム c_3 が存在する。このことは、硫酸還元菌との共通の祖先から酸素呼吸生物への進化において、電子伝達系が酸素を最も効率よく使えるものへと単純化していったことを示唆する。硫酸呼吸の電子伝達系におけるシトクロム c_3 やフラボドキシンの役割を理解することで、硫酸呼吸と酸素呼吸の進化の道筋をより鮮明にさせることが可能である。本研究は、呼吸系の進化を理解する基礎を築いたものと言える。



UECP : unknown electron carrier proteins

Fig. 6-1 A model for the energy transduction of *D. vulgaris* Miyazaki F

Appendix

A-1 巨視的および微視的酸化還元電位の測定

(I) シトクロム c_3 の酸化還元電位

(1) 巨視的および微視的酸化還元電位決定の理論¹⁾

シトクロム c_3 は、酸化還元中心に 4 つのヘムを含んでいる。その酸化還元反応は、見かけの反応電子数が 0.77 であることがわかっている。このため、分子全体で見た電極反応は、可逆な 4 電子反応ではなく、4 段階の 1 電子反応であると考えられる。これを電位で考えると、Fig. A-1 に示すように、完全酸化状態から完全還元状態まで 5 つの巨視的酸化状態があり、この間に 4 つの巨視的酸化還元電位が定義できる。5 つの巨視的酸化状態はそれぞれ、完全酸化状態、1 電子、2 電子、3 電子還元状態、完全還元状態があり、 $S_0 \sim S_4$ で表される。また、巨視的酸化還元電位は、1~4 電子還元標準電位を E°_{1-4} とする。それぞれの酸化状態の分子の濃度をそれぞれ $C_0 \sim C_4$ とし、 $f_i = C_i / (C_1 + \dots + C_4)$ とすると、巨視的標準酸化還元電位 E°_i は、

$$E = E^{\circ}_i + (RT/F) \ln (f_{i-1} / f_i) \quad (i = 1, 2, 3, 4) \quad (\text{A-1})$$

と定義される。ここで E は系の酸化還元電位、 R は気体定数、 T は絶対温度、 F はファラデー定数である。

次ぎに電子の入るヘム 1つ1つについて見てみる。4 つのヘムは、非等価なので、Fig. A-1 のように、電子の入るヘムによって完全酸化状態から完全還元状態まで全部で 16 個の微視的酸化状態 (酸化還元分子種) が定義できる。

微視的酸化還元電位はこの酸化状態間で

$$E = e_i^I + (RT/F) \ln (P_{\text{ox}} / P_j)$$

$$E = e_i^{IIj} + (RT/F) \ln (P_j / P_{jk})$$

$$E = e_i^{IIIjk} + (RT/F) \ln (P_{jk} / P_{jkl})$$

$$E = e_i^{IVjkl} + (RT/F) \ln (P_{jkl} / P_{red})$$

(i, j, k, l = 1 ~ 4)

と定義される。 E_i^{IVjkl} は、ヘム j, k, l に電子が入っている状態で、ヘム m に電子の入る場合を表す。 P_{jkl} は、j, k, l に電子が入っている酸化還元分子種の割合を表す。 P_{ox} は完全酸化、 P_{red} は完全還元状態の割合である。この定義によって、16個の微視的酸化状態の間に 32 の微視的酸化還元電位が定義される。

巨視的酸化還元電位は電気化学的測定により、微視的酸化還元電位は NMR と電気化学的測定を組み合わせることで算出できる。また、4つのヘムは酸化型では常磁性、還元型では反磁性となるため、ヘムプロトンやヘム近傍のアミノ酸プロトンの NMR シグナルは酸化状態に敏感である。そのため、NMR は酸化還元挙動を検討する手法として、非常に有用である。分子内電子交換速度が NMR の時間尺度より速いと、ヘムメチルの中間還元状態のシグナルは完全酸化型と完全還元型との間に現れる。このことから NMR の時間尺度では伝達された電子が 4つのヘムのなかで非局在化していることを示す。それゆえ、ヘムメチルシグナルの化学シフトから電子が 4つのヘムにどのような時間的割合で分布しているかを知ることができる。ヘム I に存在する割合をヘム I の還元率(R_i)と呼ぶ。この還元率と巨視的酸化還元電位を用いて個々のヘムの微視的酸化還元電位を決定する。Fig. A-2 に、野生型 DvMF シトクロム c_3 において決定された 32 の微視的酸化還元電位を図にして示す。

(II) 微分パルスポーラログラフ測定

(1) 微分パルスポーラログラフについて

シトクロム c_3 は、固体電極と直接に、また可逆に電子授受反応を起こす特異な性質を持つ生体物質である。試料と電極との電子授受反応速度が 10^2

cm/s 以上で可逆な反応を示し、高い精度が求められる場合、微分パルスポーラログラフィー (DPP) 法が酸化還元電位を求めるのに適している。これまでの研究で、シトクロム c_3 の 4 段階の巨視的な酸化還元電位 $E_1 \sim E_4$ の測定には、微分パルスポーラログラフが最も優れていることが知られている。

ポーラログラフィーを用いると、溶液中に含まれている化学種を電気分解して得られる電流と電位との関係 (ボルタモグラムまたはポーラログラム) から、溶液の組成や電極反応機構を知ることができる。普通、水銀を電極とし、細いガラス管から水銀滴を滴下させながら行う電気化学測定である。

電流と電位の関係曲線は、ステップのような限界電流を示す。この限界電流を拡散電流 i_d と呼び、限界電流の波高の半分になる電位を半波電位 $E_{1/2}$ と呼ぶ。溶液中に溶存しているイオンや分子などの化学種の濃度と i_d は比例関係にあり、また $E_{1/2}$ の値は化学種の還元に対して固有な電位である。

微分パルスポーラログラフィーは、直流印加電圧に一定の電圧幅 (10~100mV) のパルス電圧を重畳する方法である。ポーラログラムは一次微分形式のシグナルが得られる。

シトクロム c_3 は、Hg 電極上で可逆なポーラログラフ波を与え、その酸化還元電位は、他の c 型ヘムを持つタンパク質に比べ、著しく低い値を示す。また、4 つのヘムを持っているが、その酸化還元反応は、可逆な 4 電子反応ではなく、4 段階の 1 電子反応である。このことより松田らは可逆な n 段階の 1 電子移動過程での測定値 i_{DPP} と巨視的酸化還元電位 E_p^0 ($p = 1 \sim n$) の以下のような関係式を導いた。

$$i_{DPP} = (i_d)_{Cott} \left\{ \frac{\sum_{p=1}^n p \exp\left[\frac{pF}{RT}(E_p^0 + \Delta E - E)\right]}{\sum_{p=1}^n \exp\left[\frac{pF}{RT}(E_p^0 + \Delta E - E)\right] + 1} - \frac{\sum_{p=1}^n p \exp\left[\frac{pF}{RT}(E_p^0 - E)\right]}{\sum_{p=1}^n \exp\left[\frac{pF}{RT}(E_p^0 - E)\right] + 1} \right\}$$

ここで、 E : 電極電位、 $(i_d)_{Cott}$: 一電子伝達プロセスに対する Cottrell 式による拡散限界電流、 ΔE : パルス振幅、 p : p 電子移動過程 (シトクロム c_3 の場合は $p = 1 \sim 4$)、 R : 気体定数、 T : 絶対温度、 F : ファラデー定数である。この理論

を用いて観測された電流-電圧曲線に最小二乗法により最適化して 4 つの巨視的酸化還元電位を求める。

(2) 装置

微分パルスポーラログラム及びパルスポーラログラムを得る為に、扶桑製作所（株）製 Polarograph Model 312 を用いた。記録用 X-Y レコーダーとしては、横河電機製作所（株）製 X-Y レコーダー Type 3036 を用いた。

Fig. A-3 に微分パルスポーラログラム及びパルスポーラログラムの測定に用いた電解セル及び塩橋、参照電極を示した。

参照電極としては、飽和銀・塩化銀電極 (Ag/AgCl) を用いた。これは次の要領で作製したものである。酸化銀 Ag_2O を乳鉢で純水を少し加えた後、すり潰してペースト状にしたものを銀 (Ag) 線の表面に塗りつけ、これをバーナーの還元炎中にかざした後、1M 塩酸溶液中でカソード電解 (45mA、45min) した。これを飽和塩化カリウム溶液 (KCl) に浸けたものである。

緩衝溶液の pH 測定用には、堀場製作所（株）製 pH METER F-12 を用いた。シトクロム c_3 の濃度決定には、可視紫外吸収スペクトルを測定したが、これは島津製作所（株）製 UV-2200 を用いた。データ解析には、Personal computer である EPSON PC-486GR と NEC PC9801FA を用いた。

(3) 試料調製と巨視的酸化還元電位の決定

2 ml の緩衝溶液で溶かした時に $100\mu\text{M}$ となるようにシトクロム c_3 濃度を調整した溶液を (上記のように、可視紫外吸収スペクトル測定後、 α ピークのモル吸光係数より濃度決定された) ナスフラスコに入れ、凍結乾燥を行った。その後、30 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 2 ml を加えて溶かし、微分パルスポーラログラフィー測定用のシトクロム c_3 サンプル ($100\mu\text{M}$) を調製した。

緩衝溶液中の $100\mu\text{M}$ シトクロム c_3 の微分パルスポーラログラムを測定後、得られたデータをプログラムにより解析し、それぞれの巨視的酸化還元電位を求め、標準水素電極 (SHE) に換算するため +199mV を加えた。

A-2 シトクロム c_3 の $^1\text{H-NMR}$

Fig. A-4 に各酸化状態における DvMF シトクロム c_3 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。一番上が完全酸化状態で、この状態で得られたスペクトルより、低磁場から 16 本のヘムメチルシグナルに、A~P まで番号を付けた (O, P は、示していない。)。その下は、完全酸化状態から僅かに還元に進んだ中間状態で、 S_0 のピークが弱まり、 S_1 のピークが現れている。真ん中のスペクトルは更に還元を進めたもので S_0 ピークはほとんどなくなり、 S_2 ピークが高磁場側に現れている。さらに還元させると下から二番目のスペクトルのようになる。還元が進んで、電子密度が低いヘムに属するヘムメチル基の S_3 のピークが現れている。このように還元が進むにつれて、ヘムメチルシグナルは高磁場側にシフトしていく (一番下のスペクトルは完全還元状態)。DvMF シトクロム c_3 は、1 つの分子中に 4 つの c 型ヘムを持つ。1 つのヘムにつき 4 つのヘムメチル基を持つので、1 分子中に 16 個のヘムメチル基がある。ヘムメチルのピークは、酸化状態において大きく低磁場側にシフトする。これは、ヘムの中心金属 Fe^{3+} の常磁性によるものである。低スピン酸化状態では Fe^{3+} に不対電子が生じる。量子力学的計算によると、この Fe の電子軌道のエネルギー準位がポルフィリンの π 電子系のエネルギー準位と近くなるため、この間に相互作用が起き、電子の非局在化が生じる。非局在化した不対電子のスピンの直接ポルフィリン環のメチル基に作用する。ヘムの鉄原子が、電子を受け取って酸化状態から還元状態に変化すると常磁性から反磁性に変わる。この変化に対応して、鉄原子に近接するヘムメチル基が影響を受け、そのシグナルが低磁場から高磁場に変化する。常磁性の影響を受けると 30 ppm から -6 ppm にかけての広い範囲でシグナルが現れる。反磁性ではシグナルは 3 ppm 付近に集まり、他のアミノ酸のシグナルと重なり観測しにくくなる。このように電子の授受においてヘムメチルシグナルが変化するので、完全酸化状態から徐々に還元に進むにつれて違ったスペクトルが現れる。このヘムメチル基のケミカルシフトを観測すれば、中心金属

の電子状態に関する情報を得ることができる。

A-3 Laser Flash Photolysis 法による電子移動速度定数の測定

(1) Laser Flash Photolysis 法の原理

Laser Flash Photolysis 法は、高時間分解能で電子移動過程等を調べるのに適した方法である。Laser Flash Photolysis System の概略図は Fig. A-5 に示した。サンプル中には EDTA と電子供与体 (flavin etc. : ここでは flavin として話を進める) が混在する。光源は、pulsed N₂ Laser (PRA LN100) によりポンピングされた Dye Laser (1.2mM solution of 1,4-bis(2-methylstyryl)benzen (Bis-MSB) in p-dioxane) で、まずこれらの光学系よりピコ秒 order で発せられたパルスレーザー光がサンプルに照射される。それにより、サンプルセル中では EDTA による triplet flavin の還元を経由して flavin semiquinone が生じる。この flavin semiquinone は、非常に不安定で強い還元性をもつ free radical であるので、すばやく不均化反応を起こすか、あるいは還元され得る分子種が存在する場合はすばやく電子移動を起こし、それを還元する。サンプルには、これとは別に常にモニター光 (quartz-iodine projector lamp through a monochrometer) が励起光と 15 度の角度で照射されている。この波長をあらかじめモニターしたい波長に合わせておき、その吸光度変化を取り込み、Transient Digitizer, Signal Averager, Personal Computer でデジタル処理する。得られた酸化還元曲線に対して、最小二乗 Exponential Fitting をし電子移動速度定数を求める。

(2) 反応溶液の調製法と phototitration の準備²⁾

シトクロム c₃ に Laser Flash Photolysis 法を用いる場合は、シトクロム c₃ の酸化還元電位が -300mV と大変低いため、電子供与体として 5-deazariboflavin (5-dRf) を用いた。この 5-deazariboflavin の酸化還元電位は -650mV とさらに低いため、シトクロム c₃ に対しても電子供与体となることができる。構造と反応は Fig. A-6 に示した。

本実験のサンプルは、緩衝溶液中に 0.5 mM EDTA と 65.5 μ M 5-deazariboflavin を含んでいる。5-deazariboflavin は光に対して不安定なので、サンプルは暗所で調製した。この溶液は、光路差 1 cm の rubber septum-sealed cuvette に入れ、脱気、(水蒸気を飽和させた) アルゴンガス注入を数回繰り返すことにより溶存酸素を除去し嫌気状態を作った。すべての実験は、擬一次式 (Pseudo-First-Order) に従うものとして解析した (Fig. A-7)。1 flash で生じる 5-deazariboflavin semiquinone radical (5-dRf \cdot) の量に対して、electron acceptor である シトクロム c_3 の量は常に大過剰量存在するからである。

また、シトクロム c_3 が、完全酸化型で存在していると、1 電子還元される際にはほとんどが一番酸化還元電位の高いヘムのみを還元してしまい、4 つのヘムそれぞれの微妙な電子移動速度差が区別できず、求められなくなってしまふ。そこで、あらかじめ、レーザーフラッシュをあてる前のシトクロム c_3 試料を白色光により部分的に還元しておき、酸化還元電位の高いヘムを一定の割合で還元状態にしておく。この時のシトクロム c_3 の還元率は、白色光に当てる時間に依存することになる。このようにすることで、4 つのヘムの微妙な電子移動速度差を区別して測定することが可能となる。このような測定法を phototitration と言う。すべての測定は室温で行なった。

(3) Y44L シトクロム c_3 の電子移動速度定数の測定

552 nm (シトクロム c_3 の α -ピーク) の吸光度の時間変化を観察し、シトクロム c_3 の還元過程をモニターすることにした。

電子の流れは Fig. A-6 のような反応式で示される。EDTA と 5-dRf の存在下でレーザーをフラッシュすると、酸化型 5-dRf は EDTA による triplet flavin の還元を経由して励起され、5-deazariboflavin semiquinone radical (5-dRf semiquinone radical) になる。この 5-dRf semiquinone radical は非常に不安定な free radical であるので、すばやく不均化反応を起こし、酸化型 5-dRf と還元型 5-dRf を生じる。しかし、近くに酸化還元タンパク質が存在する場合はすばやく電子移動を行なう。今回の場合は、この酸化還元タンパク質が Y44L シトクロム c_3 で、5-dRf

semiquinone radical の不均化反応と競争的に Y44L シトクロム c_3 が還元される。この過程における 552 nm の吸光度の時間変化を、ある Y44L シトクロム c_3 濃度 (今回は、8.25 μM) で実際に測定した Laser Flash Photolysis のスペクトルを例として示す (Fig. A-8)。この試料は、実際には白色光 (35W のタングステンランプで、約 12 cm の距離から 1~30 sec. 照射) により、あらかじめ 57% 還元されている。

上で述べたスペクトルの値をアスキーファイルに落とし、さらにエクセルファイルとした後、Origin ver.6 (解析ソフト) 上で、そのスペクトルを再現した。Fig. A-8 において、Laser Flash 直後の下に孤を描いた曲線はシトクロム c_3 の 0 ~2 msec の還元過程を表している。本来、552 nm の吸収は、還元型の増加とともに上昇するが、それを反転させて示している。

Laser Flash Photolysis の実験では 1 flash で生じる 5-dRf semiquinone radical (5-dRf \cdot) の量は大変少なく、シトクロム c_3 の方が常に大過剰に存在するという擬一次 (Pseudo-First-Order) 条件が成り立っている。その際求まる一次の反応速度は Fig. A-7 の最後に示した式に見るようにシトクロム c_3 の濃度に依存する。

以上のように、この Laser Flash Photolysis の実験は、シトクロム c_3 による電子移動の素過程を観察することになる。

A-4 Y44L シトクロム c_3 の結晶化と X-線結晶構造解析

Y44L 変異がどのように立体構造に影響を与え、電気化学的な性質を変化させてきたのかを明らかにするために、この変異型シトクロム c_3 の結晶構造解析を行った。

20 mg/ml に濃縮した Y44L シトクロム c_3 をエタノールを沈殿剤とした蒸気拡散法により結晶化した (Fig. A-9)。結晶 (1.0 x 0.1 x 0.1 mm) をキャピラリーにマウントし、つくばの高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所の放射光 X-線 (波長 1.0000 Å) を用いて 1.6 Å 分解能を越える回折デー

データの収集に成功した (Fig. A-10; 測定温度 100 K、振動範囲 1.5 度、露光時間 20 秒)。得られたデータについてプログラム・MOSFLM にて指数付けを行い ($R_{\text{merge}} = 0.11$)、*D. vulgaris* Miyazaki F 株シトクロム c_3 の座標データ (2CDV) を用いて X-PLOR による精密化を行っている (現在 $R = 0.250$)。

A-5 [NiFe] ヒドロゲナーゼによる E42K シトクロム c_3 還元反応の測定

気密にできるキュベットに酸素消費システム³⁾ (250 units/ml catalase, 0.5 units/ml glucose oxidase, 2.5 mM glucose, 50 mM HEPES pH7) とさまざまな濃度の野生型、または E42K シトクロム c_3 溶液を入れて密閉し、それぞれ 45 分間水素を通気させ、嫌気状態にした。その後 4 nM となるようにヒドロゲナーゼをシリンジで加え、室温で 552nm (シトクロム c_3 の α -peak) の吸収強度の経時変化を観察した。

野生型と E42K シトクロム c_3 についてさまざまな濃度で測定し、その初速度を求め、グラフ化した。シトクロム c_3 の濃度が 2 μ M の時の結果を Fig. A-11 に示した。この図から一見してわかるように、明らかな変化が見られた。図に三角形の斜辺で示してあるような部分を傾きとしてとると、吸光度は、濃度に対応しているため、この傾きは、反応の初速度として考えることができる。そうしてみると明らかに、野生型よりも E42K シトクロム c_3 の方が反応の初速度がはるかに上昇しているのがわかる。また、縦軸に初速度、横軸にシトクロム c_3 の濃度をプロットしたものを Fig. A-12 に示した。このグラフから、2 μ M の時だけでなく、全濃度において、野生型の時よりも、E42K の時の方が反応の初速度が大幅に上昇しているのがわかった。この初速度の上昇率は、最大で 7.6 倍 (1 μ M)、最小で 3.3 倍 (0.5 μ M)、平均すると 5.4 倍であった。

A-6 変異体研究の今後

シトクロム c_3 の電子移動機構を研究する上でタンパク質工学的手法におけるアミノ酸置き換えが有効である。本文第 4-1、4-2 節で述べたように、通性好気性細菌である *Shewanella oneidensis* を宿主とした硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来シトクロム c_3 の大量発現系が確立された。そこで、この発現系を用いてアミノ酸置換体を作成し、野生型のシトクロム c_3 と比較検討することで各アミノ酸残基の構造に対する重要性の検討を行うことができるようになった。

今回はさまざまなアミノ酸残基の中で Tyr 44 と Glu 42 に注目したが、たった 2 つのアミノ酸置換体の解析をしただけでも興味深い結果が多く得られた。今後、さらにいろいろな変異体の解析を行えば、シトクロム c_3 の電子移動機構のみならず、多くの電子伝達タンパク質に共通な原理のようなものが見つかるのではと期待できる。

今後の方針として、まず現在、詳細に解析中である 8 個の軸配位子 His / Met 置換体解析の遂行、および残りの保存芳香族アミノ酸残基の解析が挙げられる。

また、*D. vulgaris* Miyazaki F 株と非常に近い種である Hildenborough 株由来のシトクロム c_3 とのアミノ酸残基を限りなく近づけていくということも面白いかもしれない。それにより、両者間で異なる物性を示す理由が明らかになる可能性が高い。

静電的な相互作用を見るために、Gly 103 あるいは、Ser 108 を正電荷 (Lys or Arg) や負電荷 (Asp or Glu) に変えることによるヘム 3 への影響。また、これらを同時に正電荷を増やしたり (+2)、負電荷を増やしたり (-2) する。

柔軟性を見るために、特に表面に位置する残基である Ala 28, Ala 48, Asn 55, Gly 74 を置換する。

また、野生型シトクロム c_3 の各ヘムに与える静電ポテンシャルが計算されており⁴⁾、それを参考にすると、表面電荷のうち、どの残基の寄与が大きいかわかる。そこで、ヘム 4 への正電荷の影響を調べるために、Lys 58, Lys 61, Lys 73, Lys 102 がその候補として挙げられる。ヘム 4 へ与える影響は、この順で弱

くなるので、Lys 58 だけを負電荷に変えることで相当なイオン強度依存性の変化が起きる可能性がありそうである。また、ヘム 1 については、Lys 4, Lys 27, Lys 46 が候補として挙げられる。Lys 27 は、ヘム 3、Lys 46 はヘム 2 にも影響を与えているので、Lys 4 のみ負電荷へ変えれば良いだろう。

イオン強度からは、電荷の反発しかわからないが、静電ポテンシャルと酸化還元電位との関係は一致している。このことから、ヘム 2 の負電荷を正電荷に置換するか、ヘム 1 とヘム 2 を負電荷にすることで、相当電位が変化すると考えられる。参考までに、ヘム 2 の負電荷を正電荷に変えるには、Asp 54 や Asp 60 を置換すれば良いだろう。いずれにしても、置換により静電ポテンシャルがどのように変化するかを見積もる必要があるだろう。

以上のように、電荷を変えることが主であるが、柔軟性についてはこのタンパク質の場合、非常に重要なポイントになると思われる。したがって、柔軟性に影響を与えると思われる残基を置換していく方針が良いのではないだろうか。最終的には、すべての電位と構造、電子移動速度を測定して静電ポテンシャルも含めて議論する必要があるだろう。

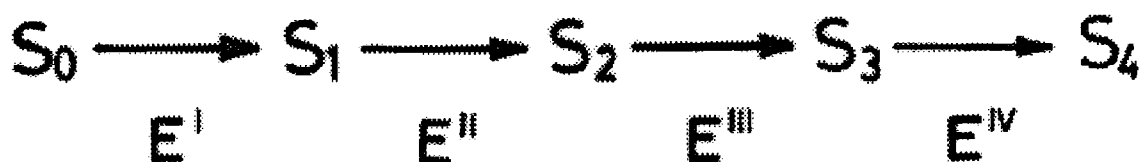
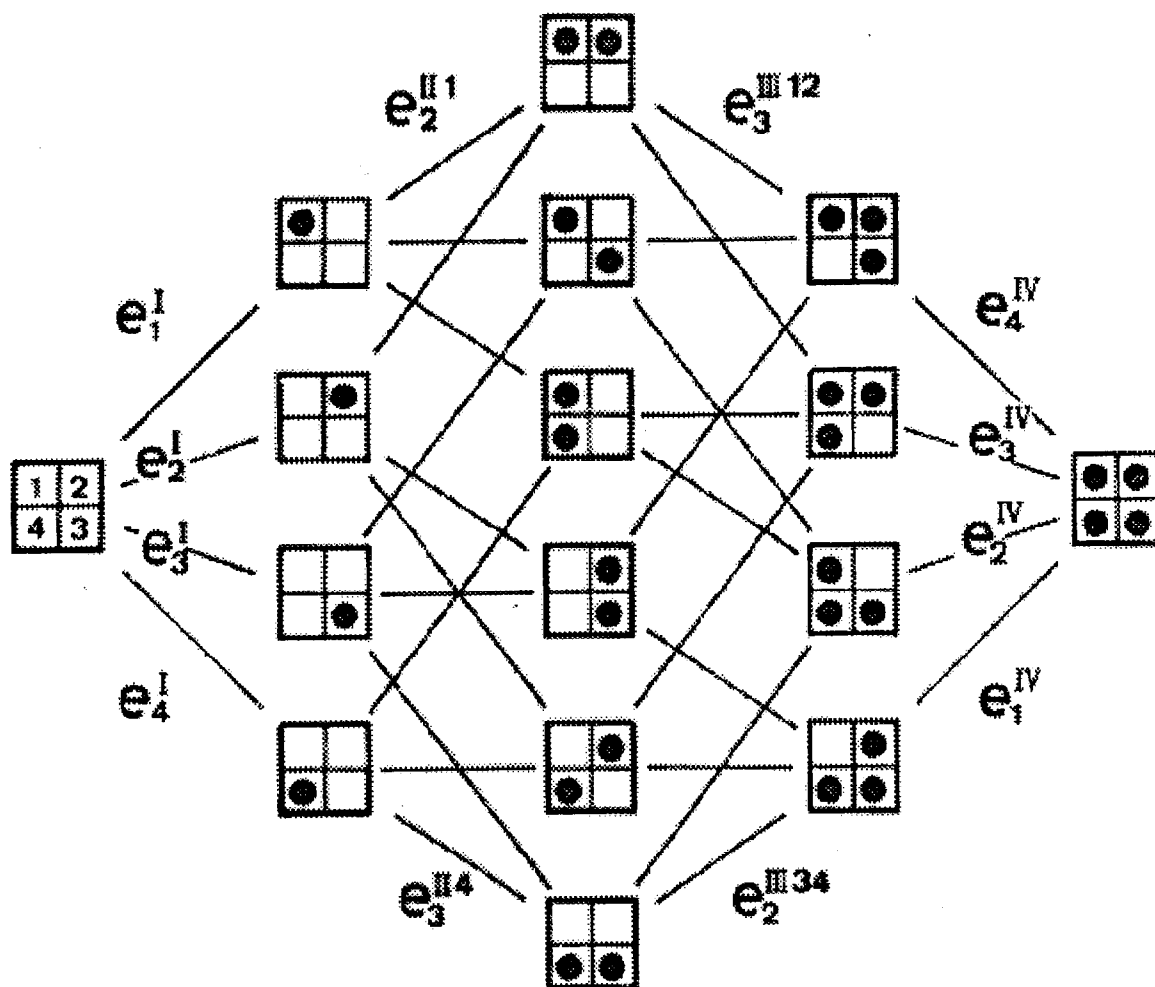


Fig. A-1 Schematic presentation of reduction-oxidation process of 4-heme protein, cytochrome c_3 ¹⁾

The numbers in the square denote the heme numbers. S_i ($i = 1-4$) is the five macroscopic oxidation states, and E^i ($i = I-IV$) is the macroscopic formal redox potential in the i th reduction step. e_i denotes the microscopic formal redox potential of heme i . The superscript indicates the reduction step as in the case of the macroscopic redox potentials. I and IV show the first and fourth reduction steps, respectively. A combination of step numbers (II, III) and heme numbers (1-4) was used in the superscript to describe the microscopic redox potentials in the second and third reduction steps because of the multiple pathway.

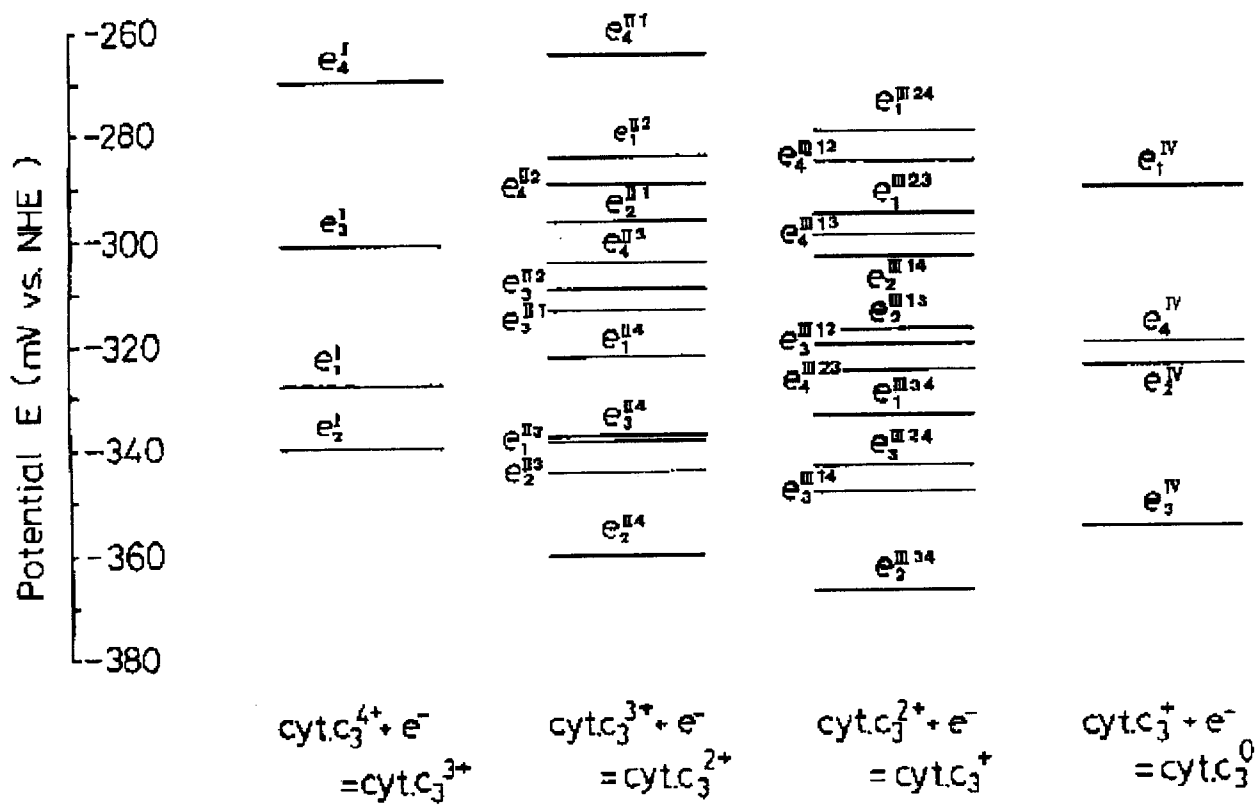


Fig. A-2 A diagram of thirty-two microscopic redox potentials of cytochrome c_3 estimated by NMR at 30 °C¹⁾

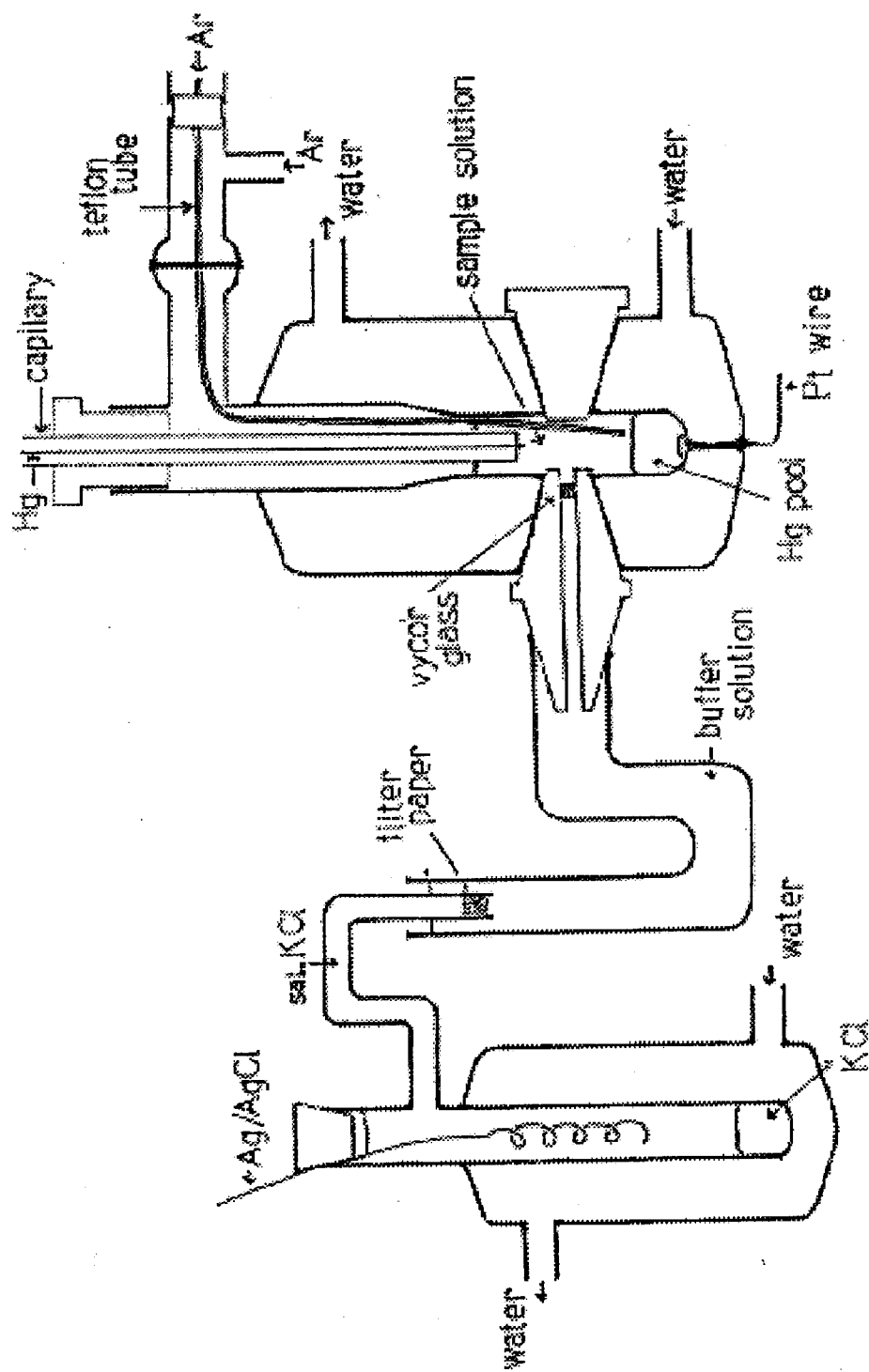


Fig. A-3 Diagram of a equipment for measuring differential pulse polarogram

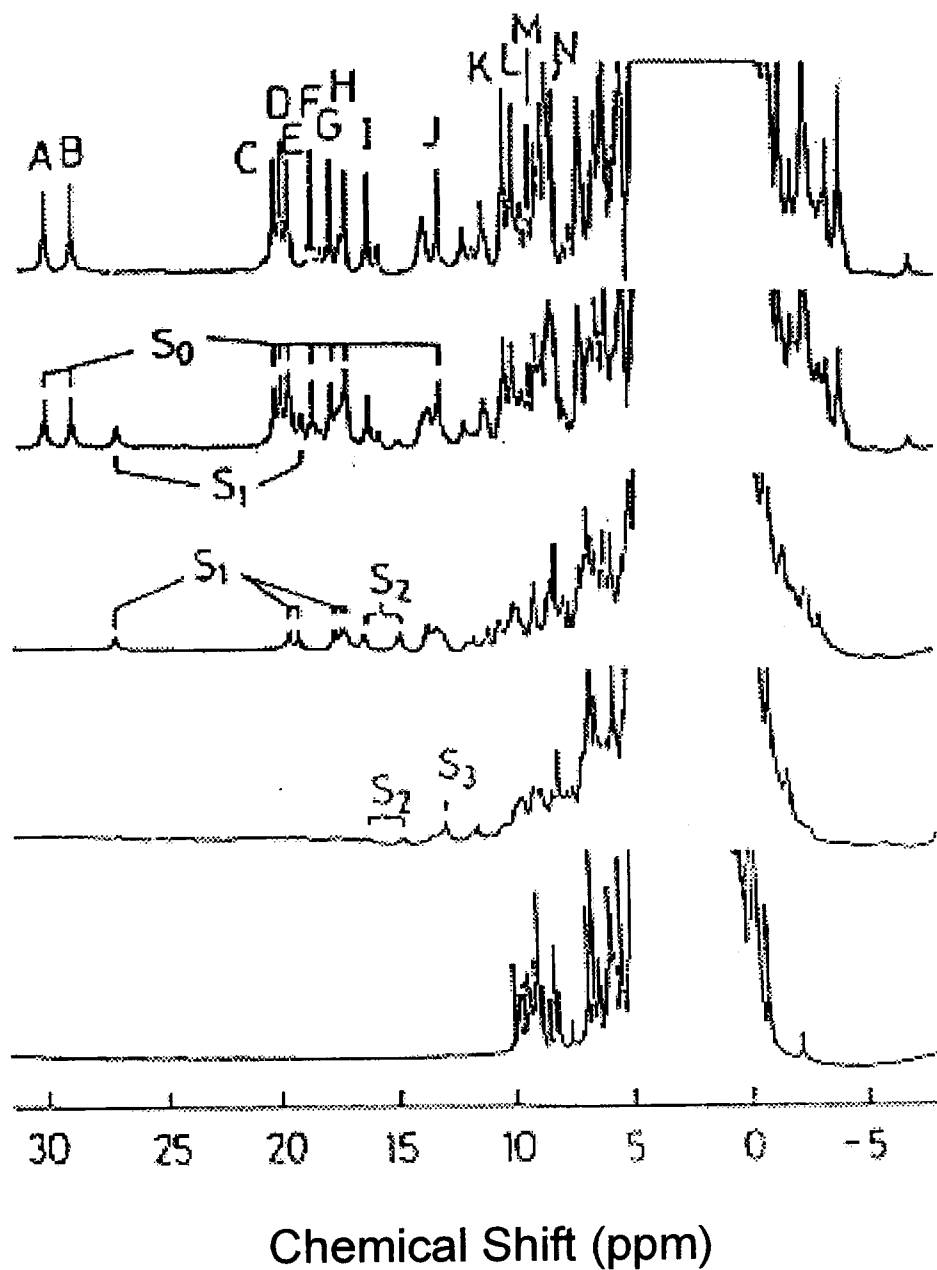


Fig. A-4 400 MHz ^1H -NMR spectra of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F in a variety of redox stages at 30 $^\circ\text{C}$, p^2H 7.0.

The stage of oxidation was changed from the fully oxidized (top) to the fully reduced one (bottom) by changing the hydrogen partial pressure in the presence of hydrogenase. The heme methyl signals are labeled on top.

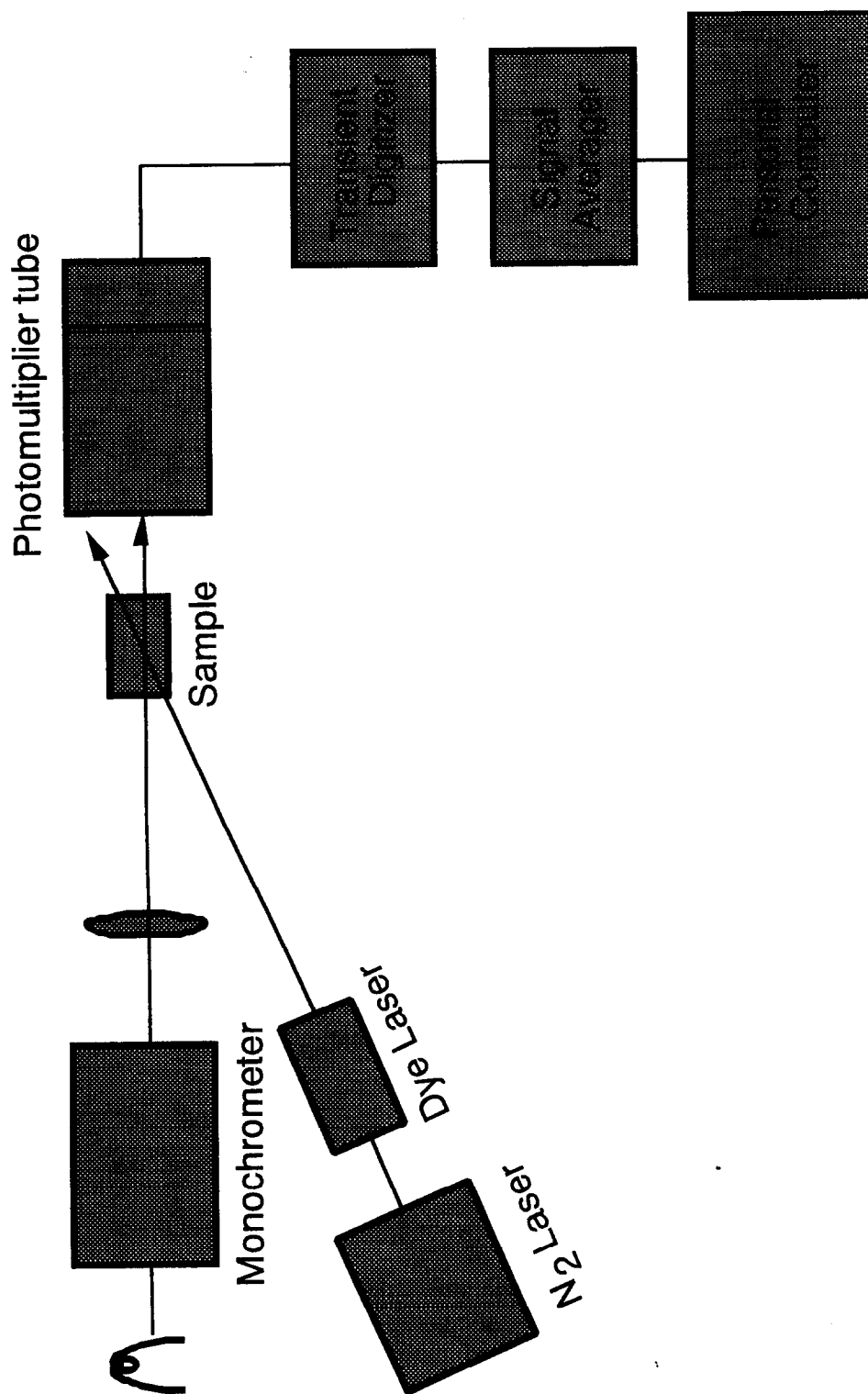


Fig. A-5 *Laser Flash Photolysis system*

5-deazariboflavin ($E^{0'} = -650 \text{ mV}$)

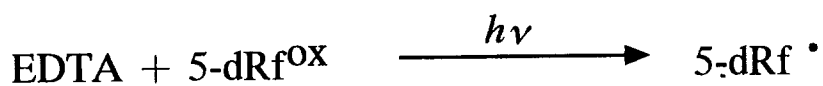
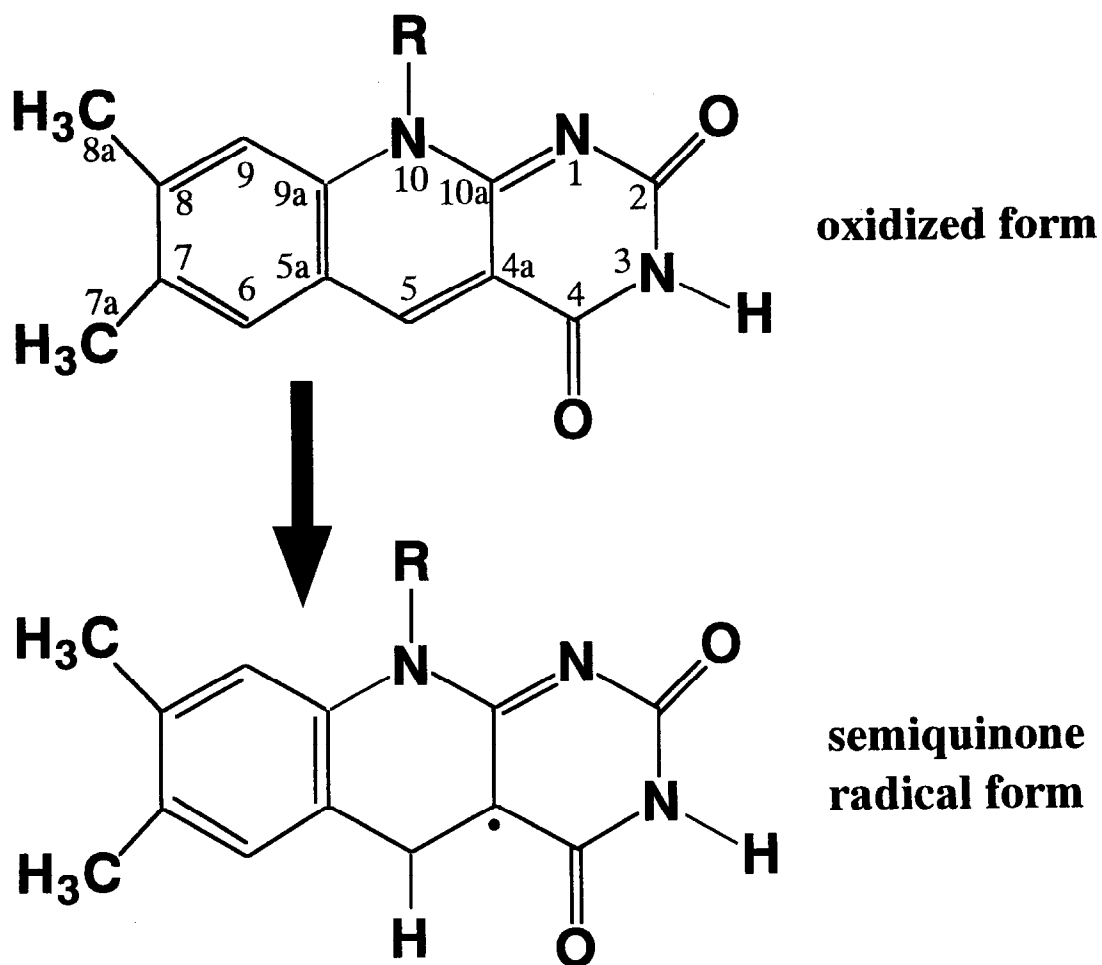
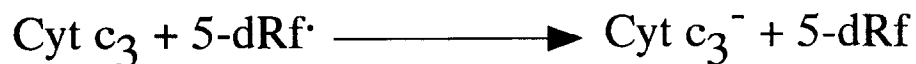


Fig. A-6 The structure of 5-deazariboflavin and its reaction with cytochrome c_3



$$d[\text{Cyt } c_3^-]/dt = k [\text{Cyt } c_3] [5\text{-dRf}\cdot]$$

$$d[\text{Cyt } c_3^-]/dt = k_{\text{obs}} [5\text{-dRf}\cdot]$$

$$k_{\text{obs}} = k [\text{Cyt } c_3]$$

$$d[\text{Cyt } c_3^-] = - d[5\text{-dRf}\cdot]$$

$$d[5\text{-dRf}\cdot]/dt = - k_{\text{obs}} [5\text{-dRf}\cdot]$$

$$[5\text{-dRf}\cdot] = ([5\text{-dRf}\cdot]_0 - [\text{Cyt } c_3^-])$$

$$d([5\text{-dRf}\cdot]_0 - [\text{Cyt } c_3^-])/dt = - k_{\text{obs}} ([5\text{-dRf}\cdot]_0 - [\text{Cyt } c_3^-])$$

$$\ln ([5\text{-dRf}\cdot]_0 - [\text{Cyt } c_3^-]) = - k_{\text{obs}} t + C$$

$$[5\text{-dRf}\cdot]_0 - [\text{Cyt } c_3^-] = \exp (- k_{\text{obs}} t + C)$$

$$\begin{aligned} [\text{Cyt } c_3^-] &= [5\text{-dRf}\cdot]_0 - \exp (- k_{\text{obs}} t + C) \\ &= [5\text{-dRf}\cdot]_0 - \exp (- k_{\text{obs}} t) \exp C \end{aligned}$$

$$t = 0, [\text{Cyt } c_3^-] = 0$$

$$\exp C = [5\text{-dRf}\cdot]_0$$

$$[\text{Cyt } c_3^-] = [5\text{-dRf}\cdot]_0 - ([5\text{-dRf}\cdot]_0) \exp (- k_{\text{obs}} t)$$

$$[\text{Cyt } c_3^-] = [5\text{-dRf}\cdot]_0 \{1 - \exp (- k_{\text{obs}} t)\}$$

$$[5\text{-dRf}\cdot]_0 = [\text{Cyt } c_3^-]_{\infty}$$

$$1 - [\text{Cyt } c_3^-]/[\text{Cyt } c_3^-]_{\infty} = \exp (- k_{\text{obs}} t)$$

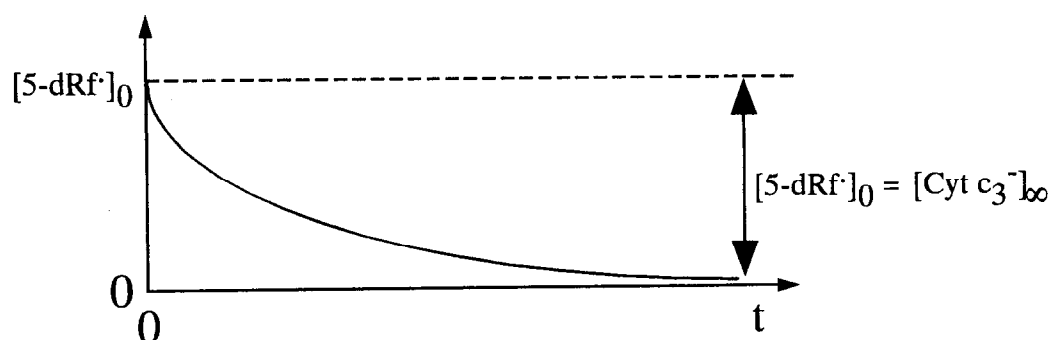


Fig. A-7 Determination of the macroscopic pseudo first-order rate constant

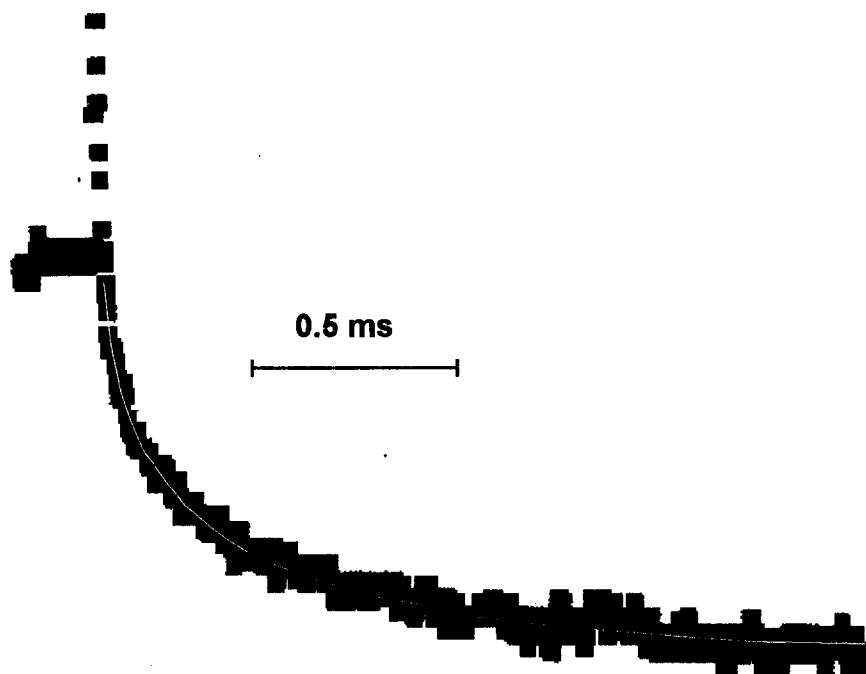


Fig. A-8 Cytochrome c_3 reduction process, monitored at 552 nm.

5-dRf was excited at 395 nm. Sweep time is 2 ms. White line is a double exponential fit to the obtained data. [cyt. c_3] = 8.25 μ M.

This reduction process of *Dv*MF cyt. c_3 by 5-dRf is an example of the measurement for the cyt. c_3 57% initially reduced.

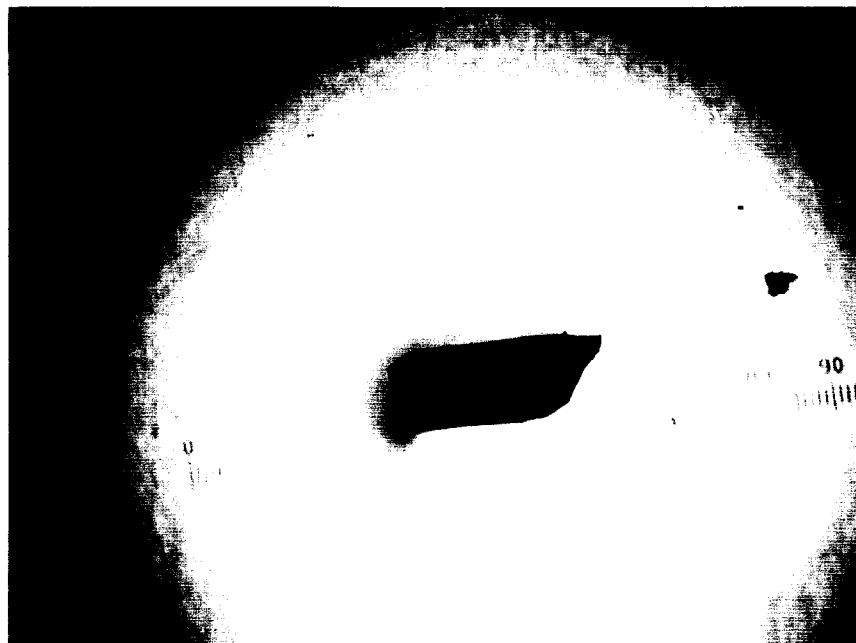


Fig. A-9 Crystallization of Y44L cytochrome c_3

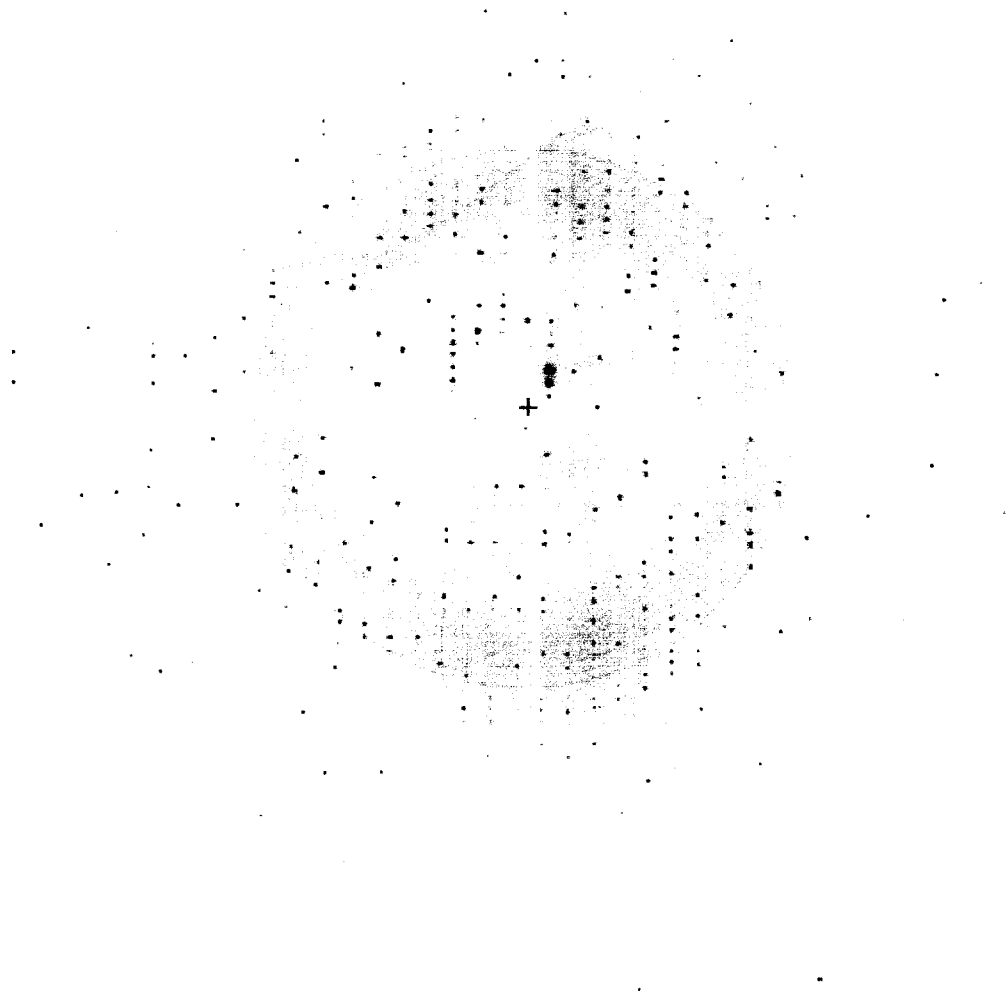


Fig. A-10 Reflections of the Y44L cytochrome c_3 crystal

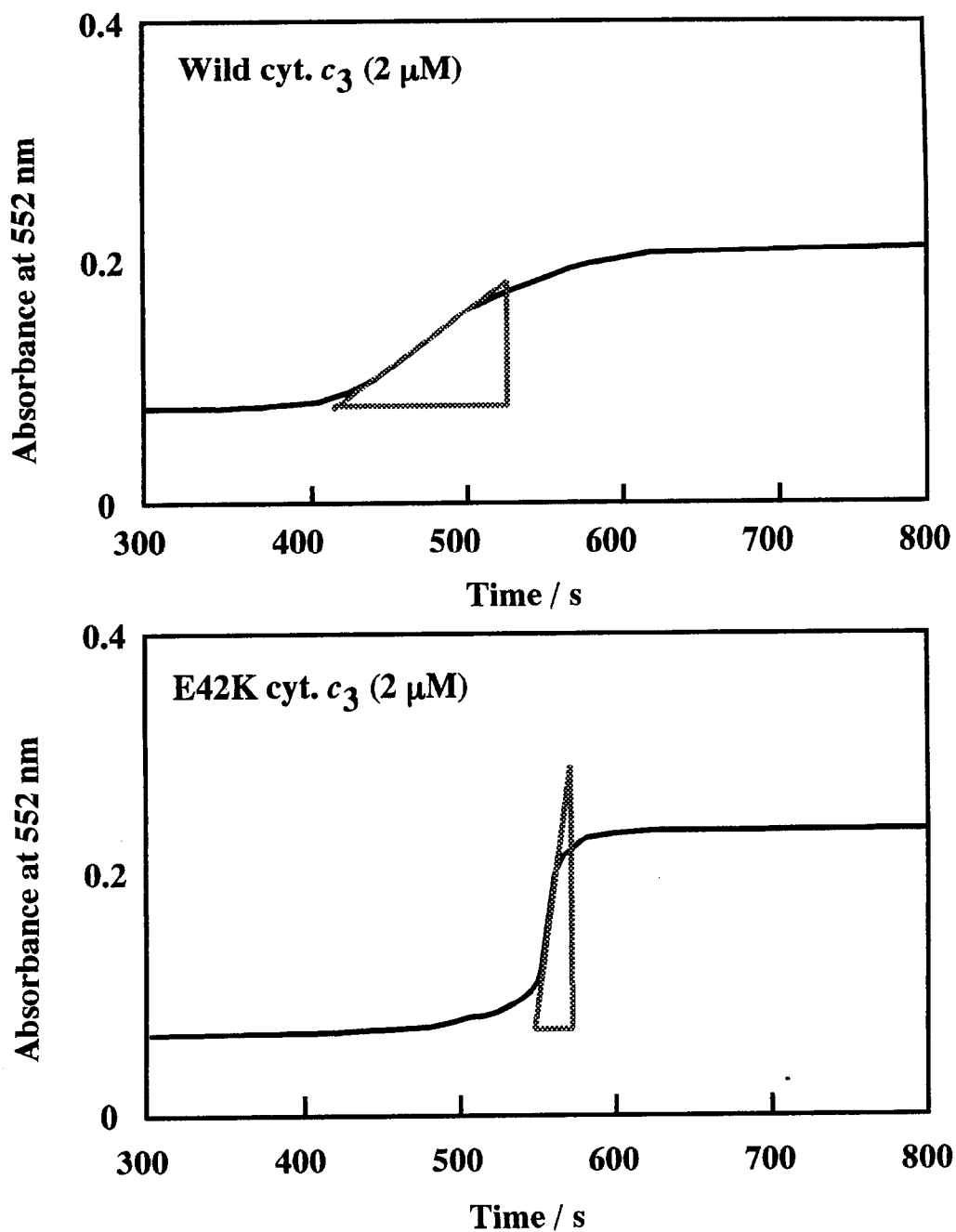


Fig A-11 Examples of the measurement for the reduction rates of Wild and E42K cytochromes c_3 in the presence of 4 nM [NiFe] hydrogenase

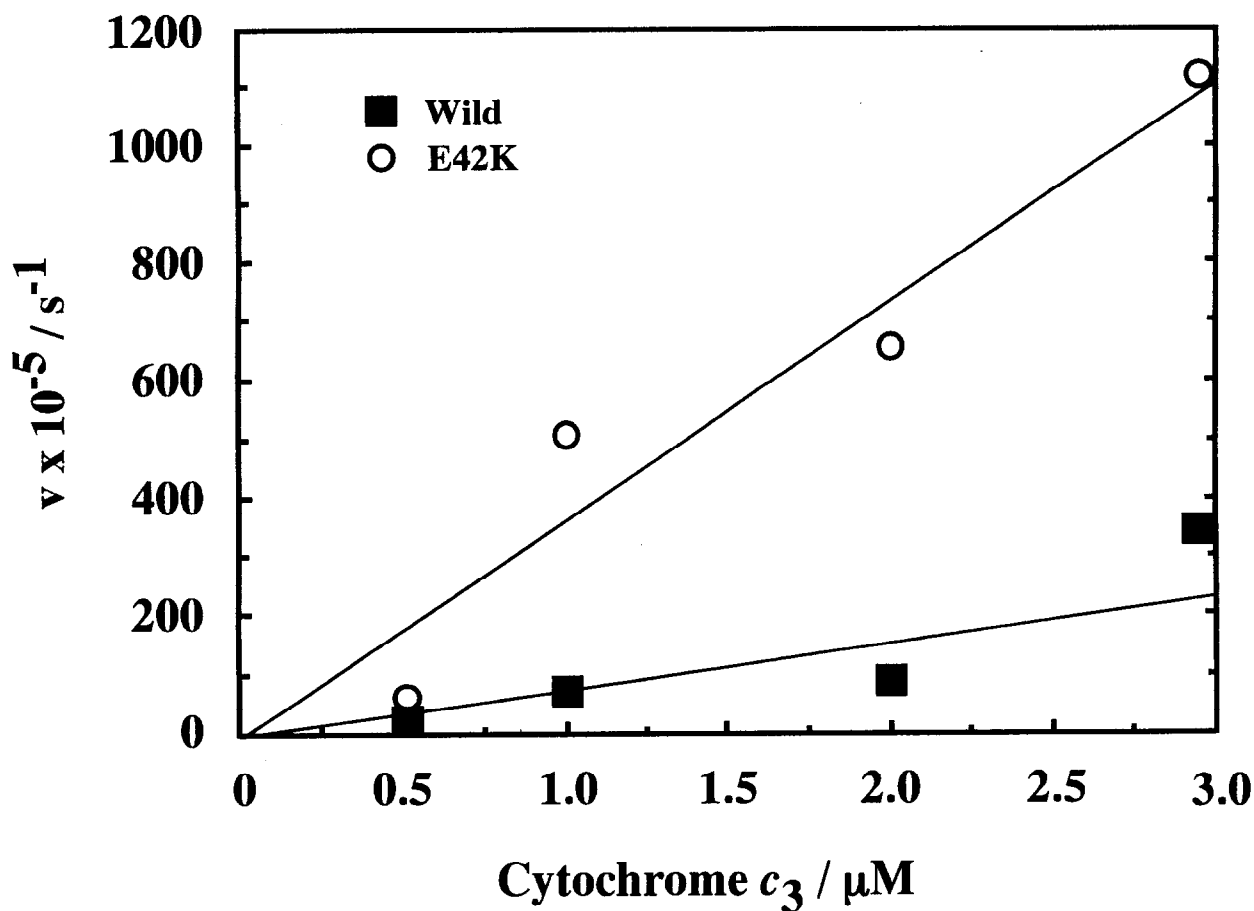


Fig. A-12 The reduction rates as a function of the concentration of Wild and E42K cytochromes c_3 in the presence of 4 nM [NiFe] hydrogenase.

参考文献

- 1) **Fan, K., H. Akutsu, Y. Kyogoku, and K. Niki**, Estimation of microscopic redox potentials of a tetraheme protein, cytochrome c_3 of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki F, and partial assignments of heme groups, *Biochemistry* (1990) **29**: 2257-2263.
- 2) **Akutsu, H., J. H. Hazzard, R. G. Bartsch, and M. A. Cusanovich**, Reduction kinetics of the four hemes of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* by flash photolysis, *Biochim. Biophys. Acta* (1992) **1140**: 144-156.
- 3) **Dolla, A., P. Arnoux, I. Protasevich, V. Labachov, M. Brugna, M. T. Giudici-Orticoni, R. Haser, M. Czjzek, A. Makarov, and M. Bruschi**, Key role of phenylalanine 20 in cytochrome c_3 : Structure, stability, and function studies, *Biochemistry* (1999) **38**: 33-41.
- 4) **Ohmura, T., H. Nakamura, K. Niki, M. A. Cusanovich, and H. Akutsu**, Ionic strength-dependent physicochemical factors in cytochrome c_3 regulating the electron transfer rate, *Biophys. J.* (1998) **75**: 1483-1490.

業績リスト

本論文の内容を構成するのは以下の発表論文である。

第 2 章

K. Ozawa, T. Meikari, K. Motohashi, M. Yoshida, H. Akutsu, Evidence for the presence of an F-type ATP synthase involved in sulfate respiration in *Desulfovibrio vulgaris*., *J. Bacteriol.*, **182**, 2200-2206 (2000).

第 3 章

K. Ozawa, T. Mogi, M. Suzuki, M. Kitamura, T. Nakaya, Y. Anraku, and H. Akutsu, Membrane-bound cytochromes in a sulfate-reducing strict anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F., *Anaerobe*, **3**, 339-346 (1997).

第 4 章

K. Ozawa, A. I. Tsapin, K. H. Nealson, M. A. Cusanovich, and H. Akutsu Expression of tetraheme protein, *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F cytochrome c_3 , in *Shewanella oneidensis* MR-1., *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4168-4171 (2000).

K. Ozawa, F. Yasukawa, Y. Fujiwara, and H. Akutsu, A simple, rapid, and highly efficient gene expression system for multiheme cytochromes c , *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(1), 185-189 (2001).

第 5 章

M. Kitamura, T. Sagara, M. Taniguchi, M. Ashida, K. Ezoe, K. Kohno, S. Kojima, **K. Ozawa**, H. Akutsu, I. Kumagai, and T. Nakaya, Cloning and expression of gene encoding flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F)., *J. Biochem.*, **123**, 891-898 (1998).

その他の論文

- 1) M. Kitamura, **K. Ozawa**, S. Kojima, I. Kumagai, H. Akutsu, and K. Miura, The primary structure of pre-cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) as determined by nucleotide sequencing of its gene and partial amino acid sequencing, *Protein Seq. Data Anal.*, **5**, 193-196 (1993).
- 2) N. Yamazaki, H. Hori, **K. Ozawa**, S. Nakanishi, T. Ueda, I. Kumagai, K. Watanabe, and K. Nishikawa, Substrate specificity of tRNA(Adenine-1-)-methyltransferase from *Thermus thermophilus* HB27, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1128-1133 (1994).
- 3) 阿久津秀雄, 小澤潔, 佐野晴洋
嫌気条件下におけるポルフィリンの生合成
有機化学協会誌 第54巻第3号 (1996) 176-187
- 4) T. Ishida, L. Yu, H. Akutsu, **K. Ozawa**, S. Kawanishi, A. Seto, T. Inubushi, S. Sano, A primitive pathway of porphyrin biosynthesis and enzymology in *Desulfovibrio vulgaris*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4853-4858 (1998).
- 5) L. Yu, T. Ishida, **K. Ozawa**, H. Akutsu, and K. Horiike, Purification and characterization of homo- and hetero-dimeric acetate kinases from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris*, *J. Biochem.*, (2001) in press

研究後記

硫酸還元菌は、非常に古くから知られている細菌であるが、その生理学的な研究は、ほとんどと言って良いぐらい何も明らかにされていない。その一番の理由は、やはり、偏性嫌気性細菌であり、かつ悪臭で有毒かつ腐食性な H_2S ガスを放出しながら生育するという質の悪さから、人々に嫌がられたためであろう。この菌の培養をファーメンターで大量のタンク培養させてくれというお願いをすると、必ず、嫌な顔をされる。われわれも、今から 3-4 年前までは、自前のファーメンターを持っていなかったため、横浜からはるばる姫路工業大学の理学部までこの菌の大量培養のための遠征合宿を夏休み期間に行っていた。ここの培養装置は、50 L と 200 L のファーメンターが連結しており、研究室での培養スケール (10 L のショットビンを直列に 2-3 個連結して窒素通気する) とはくらべものにならなかった。この時得られた菌のおかげで、私は第 2, 3 章の膜タンパク質の研究が進められたと考えている。第 4 章で述べたシトクロム c_3 は、異化型亜硫酸還元酵素 (Desulfovibrin) とともに、硫酸還元菌 *Desulfovibrio* 属のマーカータンパク質として非常に有名なタンパク質である。一分子中に 4 つの c -型ヘムを持ち、著しく低い酸化還元電位を持つ特異なキャラクターが、主に電気化学の分野の研究者を惹きつけ、詳細な物理化学的な測定や解析が行われてきた。しかしながら、もともと、培養が難しい菌より、大量のタンパク質を得ることは、大変な労力を必要とするため、その遺伝子のクローニングと大腸菌等での大量発現系の確立が急務とされていた。そこで、学部 4 年生であった私は当時、東京大学におられた三浦謹一郎博士の研究室へこの遺伝子のクローニング技術を勉強させてもらいに行くことで、シトクロム c_3 遺伝子の塩基配列を決定することに成功した。ところがその後、大腸菌、枯草菌、酵母と宿主を変えてもその大量発現どころか、まったく発現しないという事態に陥ってしまい、研究はそこでまったく進まなくなってしまった。その間、約 5 年。その間に、海外 (アリゾナ大学) において、光合成細菌を使った他の種のシトクロム c_3 遺伝子の発現系が発表された。そこで私はアリゾナ大学へ行き、そのノウ

ハウを教わった。帰国後、その系をわれわれのシトクロム c_3 遺伝子に試したところ、微量ではあるが、ホロシトクロム c_3 遺伝子の発現が確認された。しかしながら、この量は、とても大量発現と言える量ではなく、もともとの硫酸還元菌より取れるシトクロム c_3 の収量よりも悪かった。そこでまた 2-3 年の不毛な年月を過ごしてしまった。発現しない理由はある程度ははっきりしており、それは、宿主である生物の中に、硫酸還元菌中に存在するであろうヘムライエースというヘムをポリペプチドに共有結合させる酵素が欠損、あるいは、特異性が低いために、アポシトクロム c_3 はできてもホロシトクロム c_3 はできないで分解してしまうという結果であることは明らかであった。そうこうしているうちに、アメリカで湖の微生物を研究しているロシア人の Tsapin 博士が来日し、同時に、*Shewanella oneidensis* という菌をわれわれに紹介してくれた。博士の話で、この菌の中には、硫酸還元菌のシトクロム c_3 と同様、4 ヘムシトクロム c_3 が存在しており、さらに、通常の細菌にはない非常に多くのバラエティーに富んだ多ヘム c -型シトクロムが存在しているということであったので、この宿主を、硫酸還元菌のシトクロム c_3 の発現実験に使用してみた。ほとんどいちかばちかの心境であった。光合成細菌用に、すでに広宿主域ベクターのシトクロム c_3 発現システムが構築されていたので、全く同じように大腸菌との接合でその遺伝子導入を試み、培養後、電気泳動で発現チェックを行った。すると、今までの発現量では信じられないことであったが、泳動中にすでに、赤いバンドがガラス越しに透けて見えていたのである。Tsapin 博士は小躍りして喜んでいたが、私は今まで数々の失敗があったため、精製して解析するまではと努めて冷静にしていた。それが今から 3 年前の 4 月の出来事であった。その後の結果が第 4 章に華々しく載せてある。この Tsapin 博士の来日の 1 ヶ月がなければ今の私はなかっただろう。この 1 ヶ月、昼御飯も食べずにがんばった甲斐があった。神様は存在している。ありがとう神様。

謝辞

思えば、大学 4 年の卒業研究で、シトクロム c_3 と出会ってから私の研究生活が始まりました。それまで、学部の学生実習が大嫌いであった私が、その一年で、研究が大好きになりました。さらに、その後、やってもやっても発現がうまくいかず、結果がでない日々でいい加減腐りかけていた私を長い目で見ていただいて、初志貫徹させてくださったことと、そのような普通の神経の人ならとてもできないような難しい研究を私に提示してくださった大阪大学蛋白質研究所（横浜国立大学工学部と併任）の阿久津秀雄 教授に感謝いたします。

上記大学 4 年時の卒業研究において、御指導いただいた、当時東京大学工学部の三浦謹一郎教授（現学習院生命分子研究所所長）および、熊谷泉助教授（現東北大学大学院工学研究科教授）、北村昌也 博士（現大阪市大工学部講師）、小島修一 博士（現学習院生命分子研究所助教授）他、同期や先輩の方々は、現在でも非常に親しくしていただいております。いろいろなアドバイスや、御意見を賜っており、感謝しております。なにより、この時期に、私が研究を続けたいと感じさせていただいたことが、今の自分の始まりでありました。また、北村昌也 博士には、公私ともにお世話になっていると同時に、私の研究のよき理解者として温かく見守ってくださっており、大変感謝しております。

大学院時代に研究室でお世話になった当時東京工業大学総合理工学研究科の渡辺公綱教授（現東京大学工学部教授）、西川一八助教授（現岐阜大学工学部教授）、上田卓也助手（現東京大学工学部教授）、横川隆志助手（現岐阜大学工学部講師）他、研究室の皆さんには、現在の研究とは直接関係ありませんが、私がこれ以上ないぐらい楽しい雰囲気のもと、研究生活を送らせていただけたことを、今でも感謝しています。あんな楽しい研究室は後にも先にもありませんでした。

姫路工業大学理学部の安岡則武教授および、樋口芳樹助教授（現京都大学理学部助教授）、そして、研究室の皆さんには、硫酸還元菌の大量培養合宿の際に、200 L のファーメンターを貸して頂き、さらには、培養の指導等を懇切丁

寧にさせていただきました。普通の培養と違い、硫酸還元菌の培養であるため、毎回、トラブルが起こるので、大変、勉強になりました。トラブルにも強くなり、その後、自前のファーメンターを立ち上げる際にも、忍耐強く対処することができるようになりました。今でも、姫路工業大学での培養は、とても懐かしく思い起こされます。大変、楽しく貴重な一時でした。ありがとうございました。

東京大学理学部の茂木立志先生と、京都大学理学部の井口八郎先生には、研究室にお邪魔して、研究させていただいた上、高度な知識と研究姿勢を私にたたき込んで頂き、大変感謝しております。個人的に、尊敬してやみません。

アリゾナ大学の Cusanovich 教授、Meyer 助教授、Fitch 技官には、光合成細菌の扱い方や、シトクロム c_3 のフラッシュフォトリシス実験などでお世話になった他、私に大変、親切にしてくださり、第二の故郷のような感じがしています。いつもありがとうございます。

カリフォルニア工科大学の Nealson 教授、および、Tsapin 博士には、*Shewanella* 菌の扱い方を伝授していただき、私の積年のうっぶんを晴らしてくれるきっかけを与えてくださり、感謝の言葉もありません。そして、Venkat 博士、Carlos 君、Tony 君 (現バルセロナ大)、Mariu さん、James 君は、仲の良い友達として親切に接してくださり、大変ありがたかったです。今後ともよろしくお願いします。

横浜国大の藤原敏道助教授には、研究的には全く異なっていましたが、研究室や学生実習のことで、間接的にいろいろお世話になりました。北海道大学名誉教授の石本真先生には、シトクロム c_3 の抗体をいただいたり、一緒に硫酸還元菌の研究をさせていただいたり、大変勉強になることが多かったです。ありがとうございました。また、これまでの卒業生の方々は、直接私と実験をともにしていなくても、大変優秀な方々ばかりだったと思います。特に、宗友栄二君 (現大正製薬) には、大変、笑わせていただきました。不世出の偉人だと思います。一緒に実験ができて大変楽しかったです。また、2000年11月3日のマリーンルージュ船上における結婚式に招待してくれてありがとう。冬なの

で、外で 1 時間待っていた時、とっても寒かったです。その後、やはり風邪をひきました。それから、橘英樹君には、いろいろな面で助けていただきました。一緒に昼夜問わず、食事に行ったり、遅くなったときは、車で家まで送ってもらったりしました。言葉には出さないけど大変感謝しています。その他、あまり驚かない私が安川文美子さんの仕事ぶりには驚きました。彼女の助けがあったおかげで、急激に、シトクロム c_3 の仕事が進むようになりました。ありがとうございます。

東工大資源研の吉田賢右先生には、主査になっていただき感謝しております。先生の鋭い研究内容と、研究室でのよりよい研究環境づくりの手腕に、いつも感服しております。研究者の鏡だと思いました。また、東工大資源研の久堀徹先生には、論文執筆の際に、いろいろアドバイスをいただきました。感謝いたします。

最後になりましたが、私の両親には、大変長い間、学位がとれず、心配をかけ、また、大変な苦勞をかけさせてしまいました。私が精神破綻をおこさず元気でいられるのも両親と弟の理解と励ましがあったからこそです。いつもありがとうございます。これからも一生心配をかけようとしてほしいのですが、よろしくお願いします。そのうち孝行します。

2001 年 1 月 小澤 潔