

学位論文題名

Biochemical properties and physiological function
of cytochrome *c*-552
from alkaliphilic *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T

(好アルカリ性細菌 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T の
シトクロム *c*-552の生化学的特徴および生理学的機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

好気性生物における ATP 合成機構は P. Mitchell の化学浸透圧説により説明されている。すなわち、細胞質膜に存在する呼吸鎖の電子伝達に共役して細胞質膜の内側から外側へプロトンが汲み出され、細胞質膜を隔てたプロトン濃度勾配が形成される。その結果、細胞質膜を隔てた pH 濃度勾配 (ΔpH ; 内側がアルカリ性, 外側が酸性) と膜電位 ($\Delta\psi$; 内側が負, 外側が正) の和であるプロトンの電気化学ポテンシャル差 (Δp) が ATP 合成酵素の唯一の駆動力となり ATP が合成される。

これまでに、多くの好アルカリ性細菌が多様な環境から単離され、それらの生理学的諸性質の研究および産業利用に用いられてきた。さらに、アルカリ環境で生育している好アルカリ性細菌の細胞内 pH は細胞外 pH と比較してより酸性であることが知られている。このため、好アルカリ性細菌は細胞質膜を隔てたプロトン濃度勾配が逆転することから、ATP 合成が困難であると考えられている。しかし、複数株の好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌を用いた実験結果において、中性細菌 *Bacillus subtilis* 以上の生育を示すことが報告されている。また、通性好アルカリ性細菌 *Bacillus cohnii* YN-2000 および *Bacillus pseudofirmus* OF4 は中性の培養時よりも pH 10 での培養時に多量のシトクロム *c* を産生することが報告されている。このため、好アルカリ性細菌のシトクロム *c* が ATP 合成に不利なアルカリ性環境を克服するための重要な役割を持つことが示唆されている。

これまでの好アルカリ性細菌のエネルギー代謝の研究は、主にグラム陽性細菌の膜結合性シトクロム *c* について行われてきた。そこで、細菌の細胞構造の違いからグラム陰性細菌の可溶性シトクロム *c* を研究することにより新規な知見の獲得が期待できる。このため我々は、アルカリ性環境への適応における可溶性シトクロム *c* の生理学的機能を研究するためにグラム陰性好アルカリ性細菌 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T 株を単離した。

P. alcaliphila AL15-21^T 株のペリプラズム空間に存在する可溶性シトクロム *c* 含有量は pH 7.0・高通気条件下よりも pH 10.0・低通気条件下での培養時に 3.6 倍に増加することを見出した。このことから、本菌株の可溶性シトクロム *c* が高 pH・低通気条件下での生育の効率を維持するための生理機能を持つことが示唆された。そこで、*P. alcaliphila* AL15-21^T 株の可

溶性シトクロム *c* の主要な成分である可溶性シトクロム *c*-552 を精製し、タンパク質化学的諸性質を調べ、遺伝子配列を決定した。決定した遺伝子配列により、シトクロム *c*-552 はクラス I のグループ 4 のシトクロム *c*₅ に分類された。これは好アルカリ性細菌のクラス I の可溶性シトクロム *c* についての最初の知見である。これまでに多くの *Pseudomonas* 属細菌のシトクロム *c* が精製されたが、シトクロム *c*-552 と相同なシトクロム *c* は精製されておらず、それらの遺伝子配列のみがデータベースに登録されている。

シトクロム *c*-552 の吸収スペクトルは Resting 状態でほぼ完全還元型を示した。既報の多くのシトクロム *c* は Resting 状態が酸化型であることから、シトクロム *c*-552 の高い電子親和性が示唆された。そこで、シトクロム *c*-552 の酸化還元特性を詳細に解析するために、大腸菌での組換えシトクロム *c*-552 の発現系を構築し、多量の組換えシトクロム *c*-552 を取得した。得られた組換えシトクロム *c*-552 も吸収スペクトルが Resting 状態で完全還元型を示した。さらに、既報の *Pseudomonas* 属細菌のシトクロム *c* と異なり、組換えシトクロム *c*-552 の E° は pH 5.0 から 10.0 の範囲で一定の値 (+215 ~ +225 mV) であった。また、組換えシトクロム *c*-552 の酸化速度は pH 8.0 ($6.1 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$)、pH 9.0 ($1.4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) および pH 10.0 ($1.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) では非常に遅く、pH 6.0 ($3.9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) および pH 7.0 ($2.5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) では早いことが明らかになった。一方、ウマ心筋由来シトクロム *c* の酸化速度は pH 6.0 から 10.0 ($3.4 \times 10^{-3} \sim 4.5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) の範囲で、組換えシトクロム *c*-552 よりも早い値であった。これらの結果から、シトクロム *c*-552 が pH 8.0 から 10.0 において還元状態を維持する特有の機能を持つことが示唆された。このようなシトクロム *c* の pH 8.0 から 10.0 での電子保持能力はこれまでに報告されておらず、新規な機能である。また、シトクロム *c* においてプロトン共役型の電子伝達を示す報告がある。シトクロム *c*-552 においてプロトン共役型の電子伝達が起こると仮定すると、シトクロム *c*-552 の高い電子保持能力は高い pH および低通気条件下での本菌株の ATP 合成に寄与する可能性が考えられた。

アルカリ性環境に生育する好アルカリ性細菌が効率的に ATP を合成するためには、細胞質から汲み出されたプロトンがプロトン濃度の希薄な外部環境に漏出することなく、ATP 合成酵素に伝達される必要がある。このプロトンの汲み出しは呼吸鎖複合体の電子伝達に共役している。そこで、シトクロム *c*-552 の生理的機能を解明するために、*P. alcaliphila* AL15-21^T 株のシトクロム *c*-552 欠損株を構築した。野生株およびシトクロム *c*-552 欠損株はそれぞれ PYA 培地で生育を示し、シトクロム *c*-552 は本菌株の生育に不可欠ではないことが明らかになった。また、野生株および欠損株の酸素消費速度はそれぞれの培養条件下で同等であり、シトクロム *c*-552 欠損は本菌株の呼吸活性に影響しないことが明らかになった。また、野生株および欠損株の最大比増殖速度および最大増殖濁度は、pH 7.0 の培養条件下では両株において同等であったが、pH 10.0・高通気条件下では野生株と比較して欠損株の対数増殖期中期における生育の低下がわずかに見られた。さらに、pH 10.0・低通気条件下では欠損株の最大比増殖速度 (40%低下) および最大増殖濁度 (25%低下) の顕著な低下が見られた。これらの結果から、シトクロム *c*-552 欠損株は pH 10.0・低通気条件下において電子伝達系の機能が効率良く ATP 合成に利用されていないことが示唆された。このことから、*P. alcaliphila* AL15-21^T 株のペリプラズム空間に存在するシトクロム *c*-552 は ATP 合成のためのプロトン輸送および電子伝達の効率を促進することによって pH 10.0・低通気条件下における本菌株の生育の効率を維持していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 湯 本 勳

副 査 教 授 田 村 具 博

副 査 教 授 鎌 形 洋 一

副 査 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

Biochemical properties and physiological function of cytochrome *c*-552 from alkaliphilic *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T

(好アルカリ性細菌 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T の
シトクロム *c*-552の生化学的特徴および生理学的機能に関する研究)

好気性生物の ATP 合成機構は化学浸透圧説により説明されている。すなわち、呼吸鎖の電子伝達に共役して細胞質膜の内側から外側へプロトンが汲み出される。この細胞質膜を隔てたプロトン濃度勾配に基づくプロトンの電気化学ポテンシャル差により ATP が合成される。

好アルカリ性細菌は細胞質内 pH が細胞質外 pH よりも酸性であるため、細胞質膜を隔てたプロトン濃度勾配が逆転するために、ATP 合成が困難であると考えられる。しかし、複数株の好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌は中性細菌 *Bacillus subtilis* と同等以上の生育を示し、さらに、通性好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌では中性条件よりもアルカリ性条件で多量のシトクロム *c* を産生する。従って、好アルカリ性細菌のシトクロム *c* がアルカリ性環境を克服する役割をもつことが示唆される。また、これまでは主にグラム陽性細菌の膜結合性シトクロム *c* が研究されており、グラム陰性細菌の可溶性シトクロム *c* の研究により新規知見の獲得が期待できる。

1) *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21 株のシトクロム *c*-552 の生化学的諸性質の解析

P. alcaliphila AL15-21^T 株のペリプラズム空間に存在する可溶性シトクロム *c* 含有量は pH 7.0・高通気条件下よりも pH 10.0・低通気条件下で 3.6 倍に増加した。そこで、本菌株の可溶性シトクロム *c* の主要な構成成分であるシトクロム *c*-552 を精製し、生化学的諸性質および遺伝子配列を決定した。このシトクロム *c*-552 はグループ 4 の低分子のシトクロム *c*₅ に分類された。これまでに多数の

Pseudomonas 属細菌のシトクロム *c* が精製されたが、シトクロム *c*-552 と相同なシトクロム *c* は精製されておらず、本研究により初めてタンパク質化学的性質を明らかにした。シトクロム *c*-552 の吸収スペクトルは Resting 状態でほぼ完全還元型を示した。一方、既報の多くのシトクロム *c* は Resting 状態が酸化型である。このことから、シトクロム *c*-552 の高い電子親和性が示された。

2) 組換えシトクロム *c*-552 の構築および酸化還元特性の解析

シトクロム *c*-552 の酸化還元特性を詳細に解析するために、大腸菌での組換えシトクロム *c*-552 の発現系を構築した。組換え体の吸収スペクトルも Resting 状態で完全還元型を示した。さらに、組換えシトクロム *c*-552 の酸化速度は pH 8.0 ($6.1 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$)、pH 9.0 ($1.4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) および pH 10.0 ($1.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) では非常に遅く、pH 6.0 ($3.9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) および pH 7.0 ($2.5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) では早いことを明らかにした。さらに、組換え体の 24 時間後の酸化率は、pH 8.0 では約 5% の非常に低い値を示し、pH 6.0 では約 30% であった。これらの結果から、シトクロム *c*-552 は pH 8.0 から 10.0 で高い電子保持能力を有することを明らかにした。このようなシトクロム *c* の電子保持能力はこれまでに報告されておらず、新規な機能である。

3) アルカリ性環境への適応におけるシトクロム *c*-552 の生理学的機能を解明

シトクロム *c*-552 の生理学的機能を解明するために、*P. alcaliphila* AL15-21^T 株のシトクロム *c*-552 欠損株を構築した。野生株および欠損株の酸素消費速度はそれぞれの培養条件下で同等であり、シトクロム *c*-552 欠損は本菌株の呼吸活性に影響しないことを明らかにした。野生株および欠損株の最大比増殖速度および最大増殖濁度は、pH 7.0 の培養条件下では同等であった。一方、pH 10.0・高通気条件下では欠損株の対数増殖期中期の生育低下が見られた。さらに、pH 10.0・低通気条件下では欠損株の最大比増殖速度（40%低下）および最大増殖濁度（25%低下）の顕著な低下が見られた。これらの結果から、シトクロム *c*-552 欠損株は pH 10.0・低通気条件下において電子伝達系の機能が効率良く ATP 合成に利用されていないことが示された。このことから、シトクロム *c*-552 は ATP 合成のためのプロトン輸送および電子伝達の効率を促進することで pH 10.0・低通気条件下での本菌株の高い生育を維持することが示された。

以上、申請者は好アルカリ性細菌 *P. alcaliphila* AL15-21^T 株のシトクロム *c*-552 の産生条件および精製条件の確立、生化学的諸性質の解析、遺伝子配列の決定、同シトクロム *c* の発現系の構築、さらに、遺伝子破壊による生理学的機能の解明を行った。本研究はグラム陰性好アルカリ性細菌のシトクロム *c* に関する最初の報告である。本研究によって、① *Pseudomonas* 属細菌がもつ低分子量のシトクロム *c*₅ のタンパク質化学的性質を初めて明らかにした。また、② シトクロム *c* が

高アルカリ性・低通気条件下で生理的機能を担うことを初めて明らかにした。本知見は好アルカリ性細菌の生理およびシトクロム *c* の生理学的機能の理解に大きく貢献するものである。

よって審査員一同は、松野敏英が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。