

Mini Review

微生物呼吸鎖電子伝達系の多様性と種分化

Diversity of Respiratory Chain and Speciation in Bacteria

福 森 義 宏

YOSHIHIRO FUKUMORI

金沢大学理学部

〒 920-1192 金沢市角間町

Department of Biology, Faculty of Science, Kanaza University,
Kakuma-machi, Kanazawa-city, Ishikawa 920-1192, Japan

(受付 1998 年 7 月 22 日—受理 1998 年 8 月 7 日)

(1) 硝化細菌 *Nitrobacter winogradskyi* の呼吸鎖電子伝達系^{9,14)}

N. winogradskyi は亜硝酸イオンを硝酸イオンに酸化することにより生育に必要なエネルギーを得ている化学合成独立栄養細菌であり、地球窒素循環において重要な役割を担っている。本細菌の呼吸鎖電子伝達系について、筆者等は 3 種類の膜結合性蛋白質（亜硝酸-チトクロム *c* 酸化還元酵素、膜結合性チトクロム *c* 及びチトクロム *c* 酸化酵素）で構成されるモデル（図 1）を提案している。これらの呼吸酵素は何れも重要な機能を担っているが、特に亜硝酸-チトクロム *c* 酸化還元酵素は本細菌の生理的特徴、すなわち高濃度の亜硝酸塩が存在する無機的環境下で生育するという特質に直接的に関わる重要な酵素である。本酵素は 4 種類のサブユニット (145 kDa, 59 kDa, 30 kDa, 20 kDa) で構成され、補欠分子族としてヘム *a*、ヘム *c*、鉄硫黄クラスター、モリブデンコファクターを持つ複雑な膜結合性蛋白質である。私達は、本酵素の構造機能相関の解明を目的に 145 kDa サブユニットの遺伝子をクローニングし、全塩基配列の決定を試みた。その結果、本酵素の 145 kDa サブユニットのアミノ酸配列は *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* の硝酸塩呼吸鎖電子伝達系の末端酵素である膜結合性硝酸塩還元酵素のモリブデンコファクター結合サブユニットのアミ

ノ酸配列と類似していることが明らかとなった（図 2）。さらに、*N. winogradskyi* 亜硝酸酸化酵素の抗 59 kDa サブユニット抗体と *E. coli* 硝酸塩還元酵素との反応性を調べたところ、*E. coli* 硝酸塩還元酵素の鉄硫黄クラスター結合サブユニットと強い免疫交差反応を示した。これらの結果は、硝化細菌 *N. winogradskyi* の生理的特質を規定している酵素が、*E. coli* 等の従属栄養細菌の嫌気呼吸鎖電子伝達系で機能している硝酸塩還元酵素と同じ起源であることを強く示唆する。

一方、硝化細菌 *N. winogradskyi* は炭酸固定を行う独立栄養細菌であるが、そのためには還元力 NADPH を必要とする⁸⁾。しかしながら、本細菌は光エネルギーを利用できない。さらに、呼吸基質の亜硝酸イオン/硝酸イオンの標準酸化還元電位は約 +420 mV であることから、NADP (標準酸化還元電位が約 -340 mV) は呼吸鎖電子伝達系により生成されたエネルギー (ATP? 膜電位?) をもちいた電子の逆流により還元されると考えられている⁴⁾。最近、私達は本細菌から精製した NADPH-チトクロム *c* 酸化還元酵素が補欠分子族として FAD を持ち、その N 末端アミノ酸配列が光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* の NADPH-チトクロム *c* 酸化還元酵素やシアノバクテリア *Spirulina platensis* の光合成電子伝達系成分であるフェレドキシン-NADP 酸化還元酵素 (FNR) の N 末端アミノ酸配列と類似していることを見いだした⁶⁾。ま

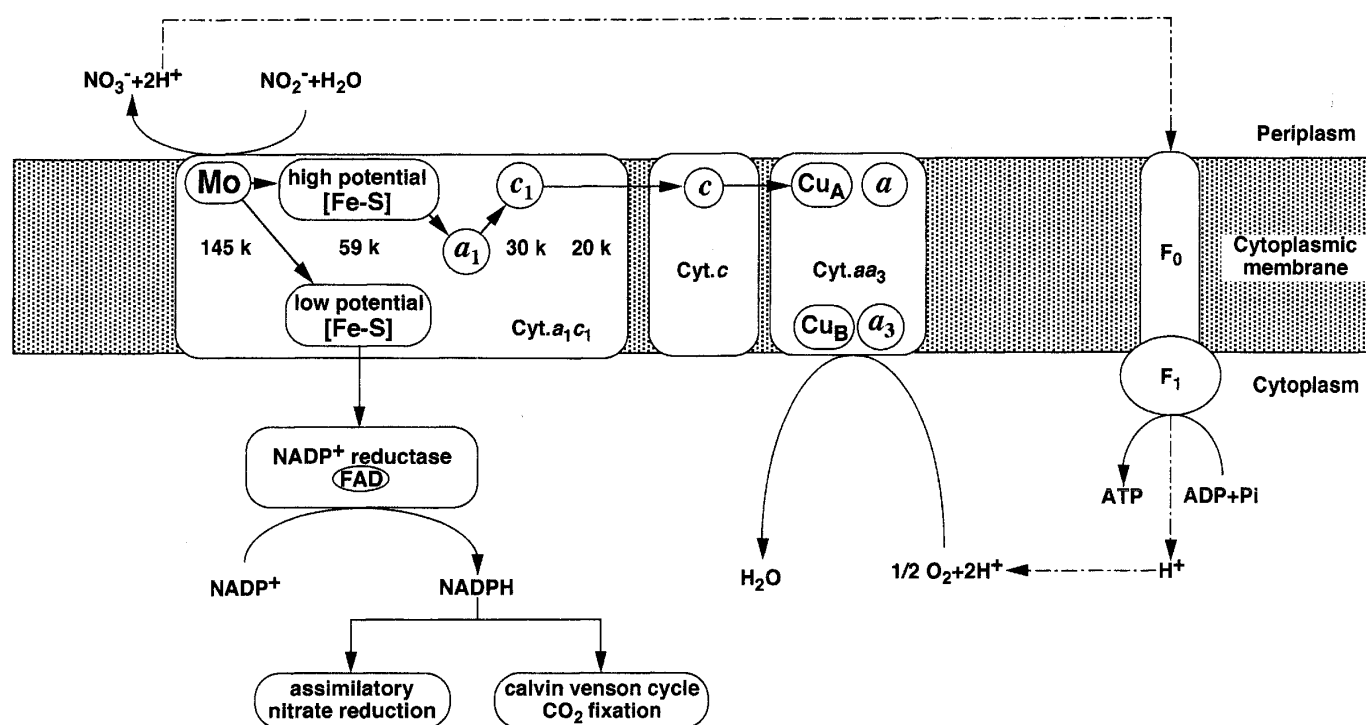


図1. 硝化細菌 *Nitrobacter winogradskyi* の呼吸鎖電子伝達系のモデル。本細菌の呼吸鎖電子伝達系は亜硝酸—チトクロム *c* 酸化還元酵素、膜結合性チトクロム *c* 及びチトクロム *c* 酸化酵素の3種類の膜結合性蛋白質で構成される。炭酸固定に必要な還元力 NADPH は、光合成生物の Fd-NADP reductase と類似した NADP reductase により供給される。

た、本酵素は BVH (還元型ベンジルビオローゲン)-NADP 酸化還元酵素活性も示し、さらに 16S r-RNA から *N. winogradskyi* が *R. palustris* と近縁であることも明らかになっており¹³⁾、硝化細菌 *N. winogradskyi* の NADPH-チトクロム *c* 酸化還元酵素が NADP 還元酵素として機能し、その起源は光合成細菌の Ferredoxin-NADP reductase にあると考えられる。

このような研究成果から、私達は硝化細菌 *N. winogradskyi* 呼吸鎖電子伝達系の進化起源について図3の仮説を提案している。この仮説では①硝酸塩呼吸を行う光合成細菌の出現、②脱窒酵素である NO 還元酵素と N₂O 還元酵素の融合によるチトクロム *c* 酸化酵素の創出 (文献11参照)、③硝酸塩還元酵素の亜硝酸—チトクロム *c* 酸化還元酵素への機能変換と亜硝酸から酸素までの呼吸鎖電子伝達系の成立、④呼吸鎖電子伝達系による NADPH の生成、⑤光合成能の喪失といった過程を経て現存の化学合成独立栄養細菌 *N. winogradskyi* の呼吸鎖電子伝達系が生じたと推論している。もちろん、新規な呼吸鎖電子伝達系の獲得だけで、新たな種が誕生するとは考えにくいし、その逆の可能性も十分考えられ

る。しかしながら、呼吸鎖電子伝達系酵素の変異・融合が新規な呼吸鎖電子伝達系を誕生させ、従来とは異なる環境へ適応できる新たな細菌種の出現へとつながったことは想像に難くない。

(2) 磁性細菌 *Magnetospirillum magnetotacticum* の呼吸鎖電子伝達系⁹⁾

磁性細菌 *M. magnetotacticum* は沼の泥から単離されたグラム陰性の微好気性細菌である²⁾(図4)。本細菌は両端にべん毛を持ち、細胞内にはマグネトソームと呼ばれる磁気微粒子を持つ。1個のマグネトソームはマグネタイト (Fe₃O₄) 単結晶がリン脂質膜で被われた構造を持ち、細胞内では10~20個長軸方向に並び、磁気センサーとして機能していると考えられている。本論文では、*M. magnetotacticum* の重要な表現形質であるマグネトソームの発現、特にマグネタイト合成と呼吸鎖電子伝達系との関連について考察する。

Blakemore 等は磁性細菌 *M. magnetotacticum* によるマグネタイト合成は、本細菌を1%酸素-99%窒素の硝酸塩存在下で培養したときに最も活発であ

N.win: 1KWEEFYRNWSDHNVFRSTHGVNCTGGCSWAIYVKDGLITWEMOQTDYPLRLSLPPYEPSCORGISAS
E.col: 31DWEDGYRQWQHDKIVRSTHGVNCTGSCSWKIYVKNGLVTWETQOTDYPRTRPDLPNNEPRGCPRGASYS
B.sub: 35DWENVYRNWQYTKVVRSTHGVNCTGSCSWNIYVKNGLVTWECQNLNYPSTGPDMPDFEPGCGPRGASFS

N.win: 71WYVYSPIRVKYFYVRCPLYDLWKEAKASHPDVQAWASLVGDEQKRSRIQKARGKGGFRRAKWDELVELI
E.col: 101WYVYSANRLKYPMRKRMLMKMREAKALHSDVEAWASIIEDADKAKSFQARGCGGFVRSSWOEVNELI
B.sub: 105WYVYSPLRVKYFYVRCGLINLWREALQTHQNPLEAWKSIVENPERAKSYKQARGKGGFVRAEPEVILKLI

N.win: 141AAAALYTARKYGPDRVMGFSPIPAMSMLSYAGSRFLQLFGGVNMSFYDWYADLETSPPEETNGDOTDVCE
E.col: 171AASNVTIKNYGPDRVAGFSPIPAMSMVSYAGSARYLSLIGGTCLSFYDWYODLEPASQPTWGBOTDVPE
B.sub: 175SASLLYTVMKYGPDRNVGFSPIPAMSMISHASGSRFMSLIGGPMLSFYDWYADLEPASQPTWGBOTDVPE

N.win: 211SADWYNSKFIVSMAANMMNTRTPDVHFTISKARTEGTRFVVLSPDFSQIAKYCDEPIQAGQDIALWMAA
E.col: 241SADWYNSSYLIAWGSNNPQTRTPDAHFFTEVRYKGTKTVAVTPDYAEIAKLCDLWLPKQCTDAAMALAM
B.sub: 245SSDWYNSGYIITWGSNNVPLTRTPDAHFLAEARYKGAQVISISDPFAESSKFADDWLSIROQCTDALAMAM

N.win: 281NHVILKEYYIDRQVPYFIDYVKRYTDLFFLVELEPNNGNTYKTRILLR--SNRVARYKDVENGEMKMLVLDT
E.col: 241GHVILREFHLDNPSQYFTDYVRRYTDMPMLVMLEERDGYAAGRMLEADLVLDALGQENNPFWKTVAFNT
B.sub: 315GHVILQEFYVNQETERFIEKAKQYTDFFFLVTLKENGVTAGRFLH-AKDIGR---KTKHDQWPAVWDE

N.win: 350ATGEPRAFRCQVQDRWGSTHCKWNLSAEDTLDNSPIDFVLSFIDQSDGVVQVG---F-----DDF--VN-
E.col: 311-NCMVAPNGSICFRWG-EKCKWNLEQRDGTGEETELQSLLSQDEIAEVGFFPYFGDGTETHFKNVEL
B.sub: 382QTSSFAIPQCTMGSRWDG-QQKWNLMIDEETGEPIEPRLSVLEDEIGTVRIP---Y-----FSN---DG--

N.win: 409GSVSVRGVEVKRIA-TDKGEVLVATGFDIMMSQFCHSRGL-EASFATSYDDEDAPYTPAWQERHTCIGRE
E.col: 379ENVLLHKLKLVKRLQADGSTALVTIVYDLTLANYGLERGLNDVNCATSYDDVKA-YTPAWAEQITGVRSRS
B.sub: 440NKVLERDLKIKMMN-LNGEETYITIVFDLILANYGVNRCI-GERSAVSYDDPE-PFTPAWQEQMTGKKE

N.win: 477TAIRFAREFATNAELTNKSMVIVGAEANHWYNNLCYRSATVALILCCCGVNGGGINHYVGOEKIAPV
E.col: 448QIIRIAREFADNADKTHGRSMIIVGAGLNHWYHLDMMYRGLINMLIFCCGCVGSGGGWAHYVGOEKIUREQ
B.sub: 505AVVKIAREFAQNAIDTDGRSMIIVGAGINHWFNSDTIYRAVLNLVLLVSAQGVNGGGWAHYVGOELURPA

N.win: 547APNNTIAMLDMWTKPPRVVQSSTWHYAHSCQWRYEQEFTEYCLRLRTRDGPRTVRLTSRRSRFVAAGCRL
E.col: 518TCWQPLAPALDWORPARHMNSTSYFYNHSSQWRYETVTAEELLSPMADKSRYTGHLDIFNVRAERMG-WL
B.sub: 575EGWQTIATALDWEGVPKLQNGTSSFFYFATDOWRYEDQISDLASPIRYKHHADYNVLAARLGWLPSTPTFN

N.win: 617RHTLIVTRLNWLRLRSAGAKSSADIVTHVVDQVTSKKVNFATIDDPDAEESWPFMMWFIWRGNAIQSSAKGH
E.col: 587PSAPQLGT-NPLTIAGEAEKAGMNPVDYTVKSLKEGSIIFAAEQPENGKNEPRNLFIWRNLLGSSCKGH
B.sub: 645QSGIDILYKEA----EKGAATPEDVGAYVASQLQEKKLKATEDPDNEVNFERNLFIWRANLLSSCKGH

N.win: 687EFFLRHYLGAHDNSIAD---RAKGKTQVRKYRDTAPRGKYDLVVDLNFMRMTTSLYSDIVLPTARWYER
E.col: 656EFMLKYLKTEHGIQKDLGQGGVKPEEVDWQDNGLEKGLDLVVTDLFRLSSTCLYSDIILPTATWYER
B.sub: 711EYFLKHLGTTNGLMND---SDSIRPEEIKWREQAPECKLDLLINLDFRMAGTALYSDIVLPAATWYER

N.win: 754NDLNTDHLSTLHVLGQAVPPVWESKTDWEIIFKLSKKVSELSPLAFSKPVRDVVVOPLMHDTPDELAQP
E.col: 726DMMNTSDMHPHIEHPLSAAVDPABAKSDWEIYKAIKKFSEVCVGHGKET-DIVTLPICHDSSAAELAQP
B.sub: 778HDLSTDMHPHIEHPPAPISAPWESKSDWDIFKALSKAVSDLAEEVDMEPVKEVVATPLLHDTMQELAQP

N.win: 824-EILDWABGECKPVPGKSPFHVVRVERDYANLYNKFISFGPKAREDGVSAGVNIPIKKQYDQMLDNPIIM
E.col: 795LDVKDWKKGECDLIPGKTAPHIMVVERDYPATYERFTSICP--LMEKIGNCGKGIWNTQSEMDL-LRKL
B.sub: 848-KINDWSKGECEAIPGKTMENIQVVERDYKHIFHKMTALGPNVALKPSGTCMSWSIADEYES-LQQRILG

N.win: 893PMPGARHMRCEVWGGKRRYPSLEDVLDACNTLMLCAPEANGFVVCYQGFHNEHHVGLPLVDIAEPTRGVSS
E.col: 863NYT-----KAEGPAKGQPMNLTAIDAAEMILTLAPETNGQVAVKAWAALSEFTGRDHTHALNKEDEKI
B.sub: 917EITSDS-----VAKGCPNISEAKQAAEAILTLSSTSNCKVAVKAWESLENITNLKLDLAEEERECECF

N.win: 963TYDYDLTROPRRILTSPECWTGLVNDGRAYSAWCMNVERLVPWRTLGRQSLYLDHQQWYLDGGEHIPTYKER
E.col: 927RFRDIQAOPRKIISSPTWSGLEDEHVSYNAGYTNVHELIPWRTLSGROQLYQDQWMMRDFGESLLVYRPR
B.sub: 981TEQITAQPKTVITSPAFTESEKGGRRYSFFTINVEKLIPWRTLGRQSYVVDHELMMEFGETMATFKETI

N.win: 1033LNPRKTDGDIVKSRVD-DRSLVLNLYITPHCKWNIHSTYKDNHRMLMLSRGMDPVWINDRDAEKVGIEDNDW
E.col: 997IDTRSVKEVIGQKSNNGQEKALNFLTPHCKWGIHSTYSNLLMLTLGRGGPVVWLSEADAKDLGIADNDW
B.sub: 1051LQHRFFLS-KRPDQE-CKEIVLNLTPHNKWSVHSMYFSLFMLELFRGGPTVMMNKDDAEDTDINDNDW

N.win: 1102EVYNDNGVVVTRANVSRRIQPCTCMYYHABERTVYIPKSQERKWRGGCHNSLTRINELFLAGGYAQF
E.col: 1067IEVFNNSGALTARAVVSQRPACMTMMYHAQRTIVNLPGSEITQQRGGIHNSTRTITPKETHMIGGYAHL
B.sub: 1119IECFNRNGVVVARAVLSHRIPKCMAFMHHAQDRHINVEGTKLTNNRGGTINSPTRIHVKEBTOMIGGYAQL

N.win: 1172YGFNYGPTGIFTRDTHVVVRKMEKLEW
E.col: 1137YGFNYGPTVGS-NRDEFVVVRKMNIDMLDGEENDQVQESV
B.sub: 1189SYGFNYGPTGN-QRDLNVVVRRLKEVDMLD

図 2. 硝化細菌 *Nitrobacter winogradskyi* の亜硝酸—チトクロム *c* 酸化還元酵素の 145 kDa サブユニットと *Eschericia coli* 及び *B. subtilis* の硝酸塩酸化還元酵素のモリブデンコファクター結合サブユニットとのアミノ酸配列の比較。3 種類のサブユニットで保存されているアミノ酸を白抜きで表示。

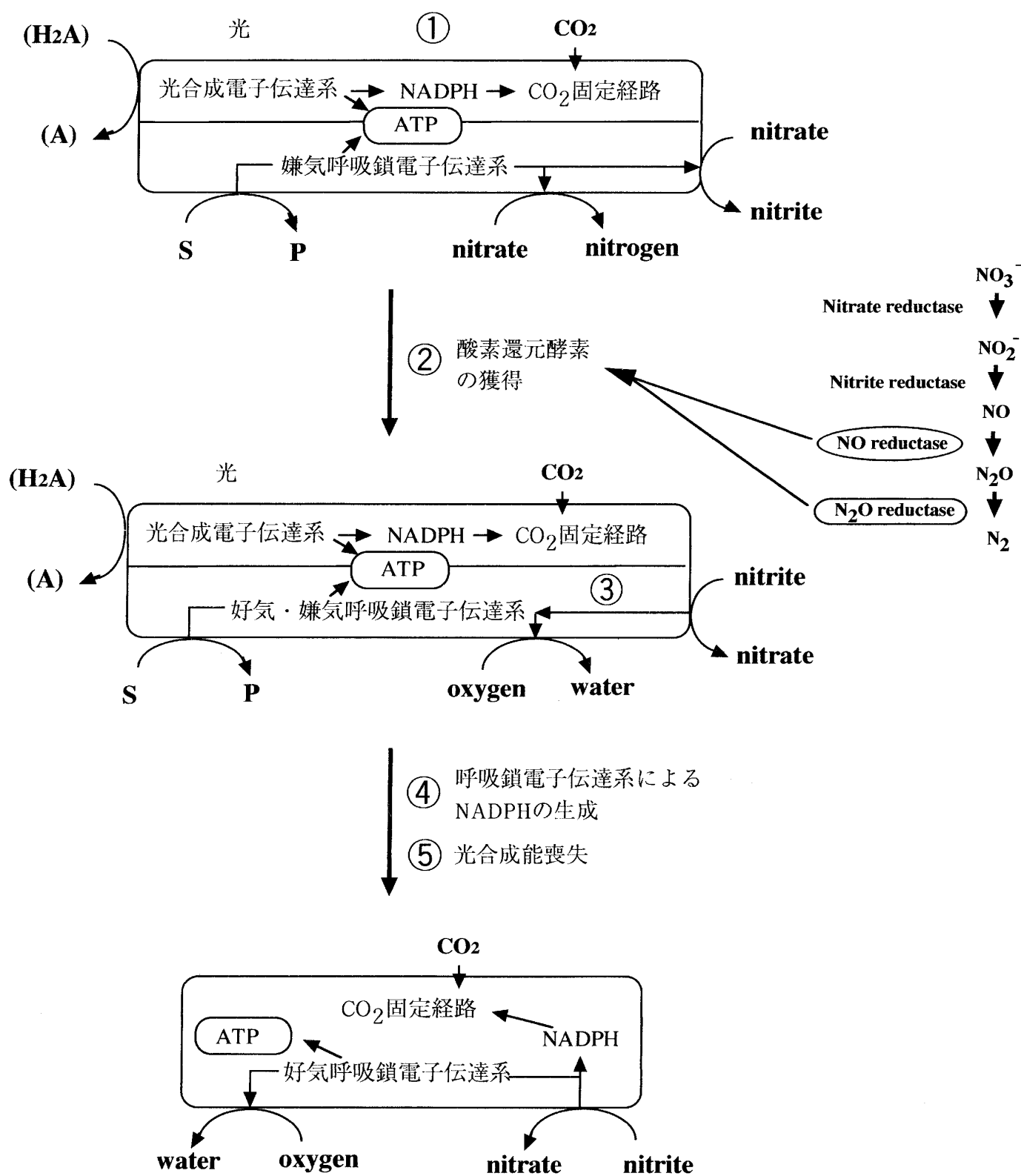


図 3. 硝化細菌 *Nitrobacter winogradskyi* の呼吸鎖電子伝達系の進化仮説。

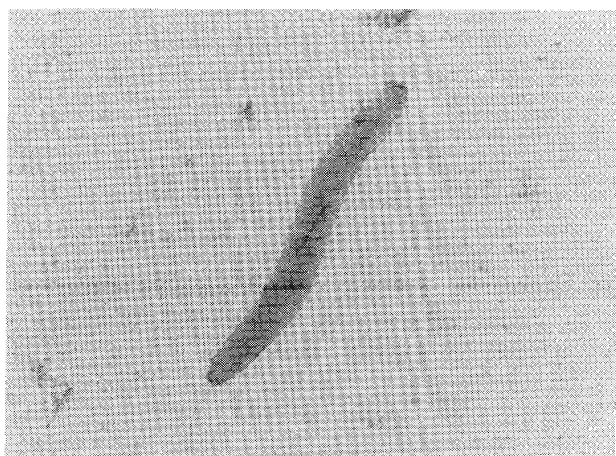


図4. 磁性細菌 *Magnetospirillum magnetotacticum* の電子顕微鏡写真。細胞内に観察される黒い顆粒が磁気微粒子(マグネトソーム)である。

り、その際に硝酸イオンは窒素にまで還元されると報告している³⁾。最近、Abe 等は亜硝酸塩を Fe (II) の酸化剤として有効に利用することにより、マグネタイトを嫌気条件下(反応温度は約 75°C)で化学的に合成することに成功している¹⁾。一方、筆者等

は磁性細菌 *M. magnetotacticum* の硝酸塩呼吸に關与する亜硝酸塩還元酵素(チトクロム *cd*₁)に關する生化学的研究から、本酵素は *Pseudomonas aeruginosa* の様な脱窒細菌の亜硝酸塩還元酵素(チトクロム *cd*₁)と異なり、*c* タイプチトクロムを電子供与体として利用できないが、Fe (II) イオンを電子供与体とする Fe (II)-NO₂ 酸化還元酵素活性を持つことを見いだした¹⁵⁾。さらに、磁性細菌 *M. magnetotacticum* から調製した無細胞抽出液を呼吸基質であるコハク酸で嫌氣的に還元しても、亜硝酸塩還元酵素は還元されない。このことは、亜硝酸塩還元酵素の電子供与体がチトクロム *c* の様な呼吸鎖成分ではないことを示し、細胞内での亜硝酸塩還元酵素の機能がマグネタイト合成のための Fe(II) 酸化反応にあることを示唆する。

一方、磁性細菌 *M. magnetotacticum* は生育に酸素を絶對的に必要とすることから、酸素呼吸によりエネルギーを生産していると思われる。最近、私達はその酸素呼吸鎖末端酸化酵素を精製したところ、その酵素は *cbb*₃ 型チトクロム *c* 酸化酵素であり¹²⁾、微好氣的環境で培養された根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum*¹⁰⁾ や光合成細菌 *Rhodobacter*

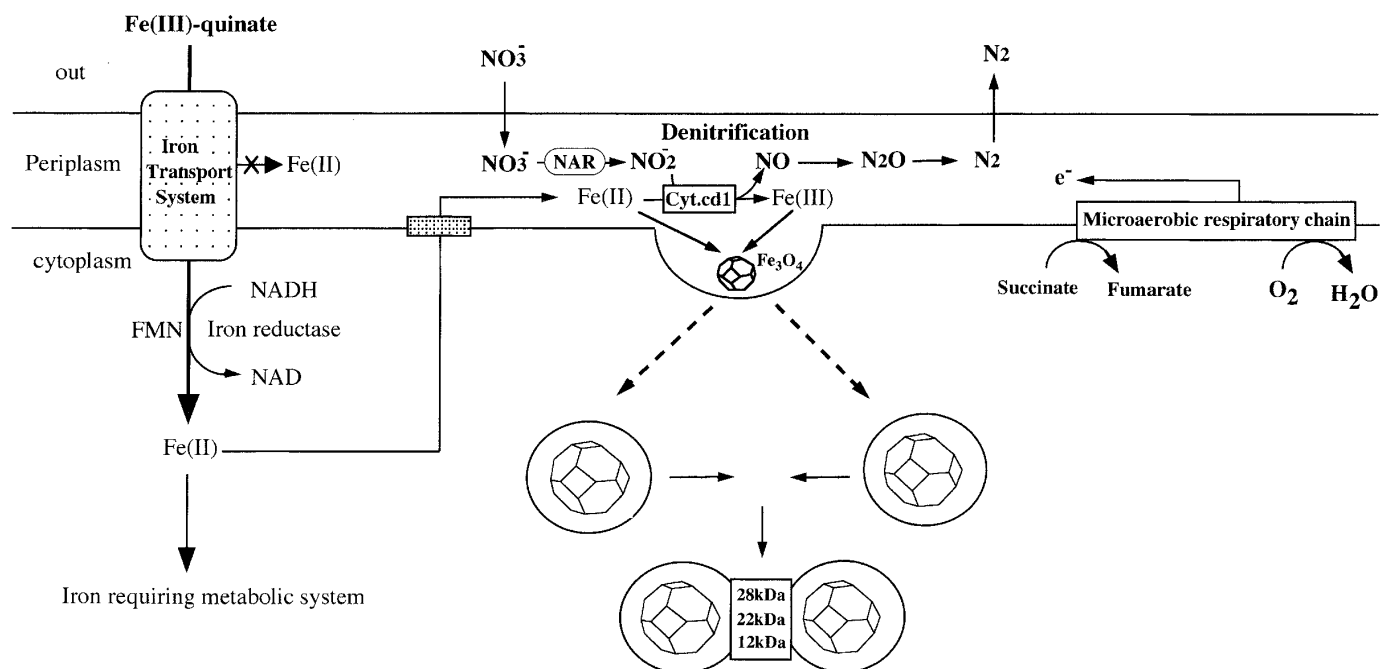


図5. 磁性細菌 *Magnetospirillum magnetotacticum* の酸素呼吸鎖電子伝達系と硝酸呼吸鎖電子伝達系。酸素呼吸鎖電子伝達系は、コハク酸脱水素酵素、ユビキノロン、チトクロム *bc*₁ 複合体、チトクロム *c* 及び *cbb*₃ 型チトクロム *c* 酸化酵素で構成され、ATP 合成の為のプロトン駆動力をつくる。一方、脱窒に關与する酵素は、電子を酸素呼吸鎖電子伝達系から受け取ると予想されるが、亜硝酸塩還元酵素は Fe (II) イオンを電子供与体とする Fe (II)-亜硝酸塩酸化還元酵素として機能し、マグネタイト合成に必要な Fe (III) を供給する。

*capsulatus*⁷⁾ の微好気型チトクロム *c* 酸化酵素と同じファミリーに属することを見いだした。従って、磁性細菌 *M. magnetotacticum* は酸素と硝酸塩を呼吸鎖電子伝達系の最終電子受容体とする微好気性の脱窒細菌であり、シアノバクテリア等の生物による酸素発生以前から絶対嫌気性細菌と共に地球上に生息していたとも考えられる¹¹⁾。また、多くの脱窒細菌はエネルギー生産のために酸素呼吸鎖電子伝達系と硝酸塩呼吸鎖電子伝達系を同時に利用することは少なく、環境の変動に応じて発現制御されることが知られている。しかしながら、磁性細菌 *M. magnetotacticum* では両呼吸鎖電子伝達系が同時に発現し、酸素呼吸鎖電子伝達系は ATP 生成を担い、硝酸塩呼吸鎖電子伝達系はマグネタイト合成の為に Fe (II) 酸化反応を担っていることがこれまでの研究により示唆され (図 5), エネルギー代謝とは関連が少ない表現形質の発現にも呼吸鎖電子伝達系が直接関わっていることが示された。

文 献

- 1) Abe, T., T. Itoh and Y. Tamaura. 1992. Magnetic and biomagnetic films obtained by ferrite plating in aqueous solution. *Thin Solid Films* **216**: 155-161.
- 2) Blakemore, R.P., D. Maratea, R.S. Wolfe. 1979. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bact.* **140**: 720-729.
- 3) Blakemore, R.P., K.A. Short, D.A. Bazylinski. 1985. Microaerobic conditions are required for magnetite formation within *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Geomicrobiol. J.* **4**: 53-71.
- 4) Bock, E., H. Koops, H. Harms and B. Ahlers, in "Variations in Autotrophic life", ed. by J.M. Shively and L.L. Barton. Academic Press, San Diego, 1991, pp.171-200.
- 5) 福森義宏. 1995. 磁性細菌の生化学, **40**: 919-925.
- 6) Fukumori, Y., S. Hikichi and T. Yamanaka, in "Flavins and Flavoproteins" ed. By K. Yagi. Walter de Gruyter and Co., Berlin, Germany, 1994, pp.455-458.
- 7) Gray, K.A., M. Grooms, H. Myllykallio, C. Moomaw, C. slaughter and F. Daldal. 1994. *Rhodobacter capsulatus* contains a novel *cb*-type cytochrome *c* oxidase without a CuA center. *Biochemistry* **33**: 3120-3127.
- 8) McFadden, B.A. and J.M. Shively, in "Variations in Autotrophic life", ed. by J.M. Shively and L.L. Barton. Academic Press, San Diego, 1991, pp.25-49.
- 9) Nomoto, T., Y. Fukumori and T. Yamanaka. 1993. Membrane-bound cytochrome *c* is a physiological electron donor for cytochrome *aa₃* in *Nitrobacter winogradskyi*. *J. Bacteriol.* **175**: 4400-4404.
- 10) Preisig, O., R. Zufferey, L. Thony-Meyer, C.A. Appleby and H. Hennecke. 1996. A high-affinity *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bact.* **178**: 1532-1538.
- 11) Saraste, M. and J. Castresana. 1994. Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Lett.* **341**: 1-4.
- 12) Tamegai, H. and Y. Fukumori. 1994. Purification and some molecular and enzymatic features of a novel *ccb*-type cytochrome *c* oxidase from a microaerobic denitrifier, *Magnetospirillum magnetotacticum*. *FEBS Lett.* **347**: 22-26.
- 13) Teske, A., E. Alm, J.M. Regan, S. Toze, B.E. Rittmann and D.A. Stahl. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bact.* **176**: 6623-6630.
- 14) Yamanaka, T. and Y. Fukumori. 1988. The nitrite oxidizing system of *Nitrobacter winogradskyi*. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**: 259-270.
- 15) Yamazaki, T., H. Ohyanagi, T. Fujiwara and Y. Fukumori. 1995. Nitrite reductase from magnetotactic bacterium, *Magnetospirillum magnetotacticum*, a novel cytochrome *cd₁* with Fe(II)-nitrite oxidoreductase activity. *Eur. J. Biochem.* **233**: 665-671.