

## 2Da-8

光合成細菌 *Rhodospseudomonas sphaeroides*  $b-c_1$  複合体から単離されたチトクローム  $b-562$  の一次構造

射場 厚, 諸橋憲一郎, 大村恒雄, 宮田敏行, 岩永貞昭, 高宮建一郎 (九大・理・生物)

光合成細菌 *Rhodospseudomonas sphaeroides* の  $b-c_1$  複合体には, 酸化還元電位の異なる2種の  $b$  型チトクロームが存在している。これらのチトクロームは, Mitchell の唱えた  $Q$  サイクルモデルにおいて, キノール酸化部位 ( $Q_2$ ) からキノン還元部位 ( $Q_c$ ) への膜を横切る電位差形成的 (electrogenic) な電子伝達経路に位置していると考えられている。近年, 我々は, 高いキノール・チトクローム  $c_1$  酸化還元活性を持つ  $b-c_1$  複合体標品から, SDS-PAGE でも, また, 分光的にも純度の高い  $b$  型チトクローム,  $b-562$  を単離した(1)。液体ヘリウム温度での EPR の測定から, このチトクロームは  $b-c_1$  複合体の場合と同様, 酸化還元電位の異なる2つの  $\pi$  ムを持ち, また, それらの  $\pi$  ム間に直接的なスピン・スピン相互作用があることが明らかにされた(2)。今回, 我々はこのチトクロームの一次構造を遺伝子工学的手法を用いて決定したので, その結果といくつかの知見について報告する。

〈材料と方法〉文献(1)で得られたチトクローム  $b-562$  の  $N$  末端領域のアミノ酸配列を気相シーケンサー (Applied Biosystems 470A) を用いて分析し, それに対応するコドンのオリゴヌクレオチド (14 mer) を合成し, プローブに用いた。あらかじめ, *R. sphaeroides* の全 DNA サガンプロッティングを行ない, EcoRI で完全に切断した場合, 上記のプローブが唯一 74 kb の DNA 断片にハイブリットすることを確認した。この長さの DNA 断片をアガロースゲルから抽出し, pUC18 をベクターに用いて DNA ライブラリーを作製した。1000 個のコロニーからそれぞれプラスミド DNA を単離し, サガンプロッティングを行なった結果, 2 個のクローンが上記プローブとハイブリットし, 制限酵素地図から同一のクローンであることが確かめられた。得られた 74 kb の DNA 断片の塩基配列は M13 ファージを用い dideoxy 法により決定した。

〈結果〉見出された open reading frame から予想されたアミノ酸配列は, 157 残基, 分子量 17,237 から成り, チトクローム  $b-562$  の精製標品の SDS-PAGE による推定分子量 16,000 とほぼ等しかった。また, 両者のアミノ酸組成はよく一致し, 予想された  $N$  末端アミノ酸配列は気相シーケンサーにより決定された  $N$  末端配列 (30 残基) と完全に一致した。一方, アミノ酸配列の hydropathy profile から, このチトクロームが4つの膜貫通領域を持つ典型的膜タンパクであることが示唆された。アミノ酸一次構造, および, hydropathy profile から, チトクローム  $b-562$  に存在する2つのプロト  $\pi$  ムに対するリガンドは,  $N$  末端から 120 番目と 134 番目のヒスチジン残基であることが推定された。その場合, このチトクロームは  $2\pi$  ム/ $2\pi$  ムのダイマーとして存在することが考えられ, 精製標品のタンパクとプロト  $\pi$  ムのモル比がほぼ 1 である結果と一致する。

(1) Iba et al. (1985) FEBS Lett. 183, 151.

(2) Iba et al. (1986) J. Biochem. 100, 1477.