

解説

Agrochemistry and Biology Series

細菌呼吸鎖の特徴

—チトクロムオキシダーゼの多様性と可変性—

松 下 一 信

山口大学農学部生物資源科学科

(平成7年11月20日受理)

Bacterial Respiratory Chains: Diversity and Exchangeability of the Cytochrome Oxidase

Kazunobu MATSUSHITA

*Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University,
Yoshida, Yamaguchi 753, Japan*

はじめに

すべての生物は栄養基質の化学エネルギーや太陽の光エネルギーを生物が利用できる型の生体エネルギーに転換し、それを利用して生命活動を営んでいる。この化学エネルギーの生体エネルギーへの転換反応は、さまざまな栄養基質の酸化反応に基づいており、ヒトなどの真核生物では、このほとんどの反応はミトコンドリアで行なわれている。この酸化反応とカップルしたエネルギー生成反応は、細菌ではその細胞質膜に、ミトコンドリアではその内膜に存在する呼吸鎖電子伝達系で行なわれている。最近、この分野では、その呼吸鎖を構成する呼吸鎖酵素複合体を、とくに遺伝子解析、X線構造解析、阻害剤を用いた構造活性相関解析などのさまざまな手法を用いて、その構造を理解しようとする研究が集中的に進められている。

従来、呼吸鎖成分の構造や機能の研究は、ウシ心筋や酵母のミトコンドリアを用いた研究に片寄っていた。それは、細菌の呼吸鎖がそれぞれの種や株によってその呼吸鎖成分の組成が大きく異なることや、さらにはそれらの培養条件によっても大きく変動することから、呼吸鎖成分の構造や機能の研究には向かないとみなされ、それらの研究はあまり注目を集めてこなかった。しかし、いくつかの細菌の呼吸鎖成分、とくにその末端で機能するオキシダーゼ（チトクロムオキシダーゼもしくは末端オキシダーゼと呼ばれる）がさまざまな細菌から単離されるようになって、その事情は一変した。後でも述べるように、一般に呼吸鎖酵素複合体は細胞膜に埋め込まれた非常に疎水性の高いタンパク

質であるだけでなく、その組成が非常に複雑であることが研究の進展を大きく妨げていた。たとえば、ウシ心筋のミトコンドリアから分離されたチトクロムオキシダーゼは13個のサブユニットからなる複雑な構造をもっているのに対し、細菌から分離されたチトクロムオキシダーゼは非常に単純な組成（2～3個のサブユニット）であることが示されたからである。そのサブユニット組成の単純さはその構造の解析を早めると単純に考えることができる。このことが明らかとなって以来、細菌の呼吸鎖の研究はその多様性にもかかわらず、その呼吸鎖成分の構造解析へと進展していった。とくに、古くから生化学に用いられてきた大腸菌、ミトコンドリアに類似した呼吸鎖をもつ *Paracoccus* 属菌で精力的に研究されてきた。最近になって、細菌由来の呼吸鎖成分、とくにチトクロムオキシダーゼの遺伝子レベルでの研究が進み、それらの構造がミトコンドリア由来のものとは非常に高い相同性を有することが明らかとなってなおさら、そうした細菌由来の呼吸鎖成分の構造研究は拍車をかけられた。このようにして、細菌呼吸鎖の研究は、その呼吸鎖酵素のミトコンドリア呼吸鎖成分と比較してその組成がより単純であること、さらにはその構造がミトコンドリア成分と高いホモロジーを有することを基にして、呼吸鎖酵素の普遍的な構造と機能を理解しようとする方向で精力的に進められている。これらの研究とその成果はいくつかの総説^{1,2)}にまとめられているので、興味をおもちの方はそれらをみていただきたい。

ここでは、これらの流れとは逆の視点に立って、細菌呼吸鎖を眺めてみたいと思う。つまり、はじめに述べたよう

に、本来細菌の呼吸鎖は非常に多様であるとともに、さまざまな生育の環境条件で大きく変化することである。細菌の進化や生理学に注目すれば、その多様性とその可変性は必ず重要な意味をもつはずである。そこで、細菌の呼吸鎖はどのようにミトコンドリアのそれらと異なるのか、またどのような多様性が存在するのか、さらにどのような環境の変化、とくに酸素濃度の変化に対応してその組成を変化させるのか、その生理学的な意味は何なのかといった点に焦点をあてて解説してみたい。

ミトコンドリア呼吸鎖

ミトコンドリア呼吸鎖は、TCA 回路の反応によって生成する NADH とコハク酸を呼吸酵素複合体、NADH 脱水素酵素（複合体 I）およびコハク酸脱水素酵素（複合体 II）、によって対応する NAD とフマル酸に酸化し、その酸化反応によって供給された電子を電子伝達系を介して酸素へと最終的に渡す過程で、生体エネルギーをも形成するよう機能している。また、同時に、この NADH とコハク酸の酸化反応は TCA 回路を円滑に回転させ、そのことによって生体成分合成の代謝中間体を供給することにも貢献している。この呼吸鎖のエネルギー生成反応は、呼吸酵素複合体を横切る電子移動反応と、それにカップルしたマトリックス側からの内膜を横切ったプロトンの排出に基づいている。つまり、不伝導体である膜内を横切るこのプロトン移

動と電子移動反応に伴ってプロトン勾配 (pH 勾配) と膜電位が形成され、この両者の総和がプロトン駆動力として働き、生体エネルギーの源となる。このプロトン駆動力は、ATP の合成をはじめミトコンドリアマトリックス内へのさまざまな代謝化合物の取込みや、外への排出さらには種々のイオンの流入や排出のエネルギー源である。とくに、それ自身さまざまな生体反応のエネルギー源としてみられる ATP も、実は複合体 V と呼ばれる ATP 合成酵素によって、このプロトン駆動力を利用して ADP と Pi から 2 次的に合成されていることに注意する必要がある。それゆえ、「生体エネルギー」というときは、大まかに呼吸鎖を通る電子伝達反応によって形成されるプロトン駆動力とそれを利用して作られる ATP の両者を指すと考えてよい。

このような機能をもつミトコンドリア呼吸鎖は、図 1 に示すように、四つの呼吸酵素複合体から形成されており、ATP 合成酵素とともにミトコンドリア内膜に埋め込まれている。NADH 脱水素酵素は 40 数種類のサブユニットからなる非常に複雑な膜酵素であり、そのグローバルな構造やプロトン輸送能を含め、その構造と機能について多くの不明な点が残されている³⁾が、その他の複合体のタンパク組成や関与する補欠分子族はほぼ完全に明らかにされている^{1,2,4)}。現在では、それらの個々の複合体の電子伝達ルートや、プロトン輸送ルート等の反応に関与する構造や、そのアミノ酸残基の解析の段階に入っている。また、NADH 脱

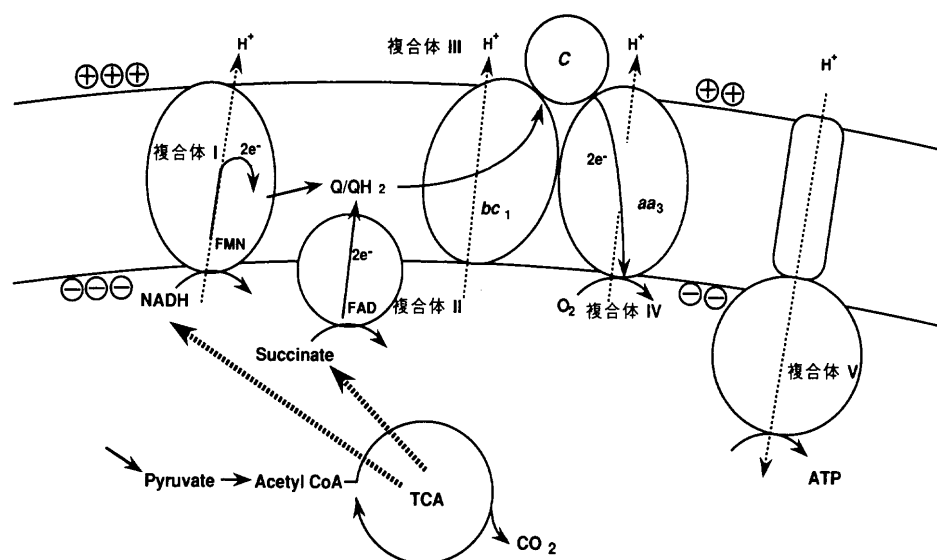


図1 ミトコンドリア呼吸鎖の模式図

ミトコンドリア・マトリックス内で TCA 回路によって生じる NADH とコハク酸は、ミトコンドリア内膜の内側で、複合体 I (NADH 脱水素酵素) および複合体 II (コハク酸脱水素酵素) によってそれぞれ NAD とフマル酸に酸化される。その際、複合体 I の FMN や複合体 II の FAD によって抽出された電子はユビキノ (Q) に渡される。結果として生じる還元されたユビキノール (QH₂) から、電子は複合体 III (チトクロム bc₁)、チトクロム c そして複合体 IV (チトクロムオキシダーゼ: チトクロム aa₃) を経て酸素へと最終的に渡される。このとき、呼吸酵素複合体を横切る電子移動反応 (実線矢印) にカップルしたマトリックス側からの内膜を横切ったプロトンの排出 (破線矢印) が生じる。このプロトン移動と電子移動反応に伴って、pH 勾配に加えて膜電位 (---/++) が形成される。形成されたプロトン駆動力は複合体 V (ATP 合成酵素) を駆動して、ADP と Pi から ATP を合成する。

水素酵素とチトクロム bc_1 (複合体 III) はユビキノンの反応部位を有するため、ユビキノンの構造的に類似した阻害剤を用いたユビキノン反応部位の構造解析も進んでいる⁵⁾。最近、相次いで、ATP 合成酵素とチトクロムオキシダーゼ (複合体 IV) の X 線構造解析が発表され、ますますこのあたりの研究に拍車がかかってきている⁶⁻⁸⁾。

細菌呼吸鎖の多様性

ミトコンドリアの呼吸鎖はミトコンドリア顆粒の内膜に局在するのに対し、細胞内膜系をもたない細菌は、その呼吸鎖を細胞質膜に保有しており、プロトン勾配は細胞質と細胞外 (グラム陰性細菌では外膜との間のペリプラズム) に形成することになる。最初にも述べたように、この細菌の呼吸鎖はミトコンドリアと違い、その組成や電子伝達ルートにおいてさまざまな多様性を示すとともに、それらが環境要因によって大きく変動することが特徴となっている。

細菌呼吸鎖の電子伝達成分の組成は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I, II, III, および IV に対応するもの (たとえば *Paracoccus* 属菌呼吸鎖, 図 2) から、複合体 I と IV だけに対応する成分から成る短絡した呼吸鎖 (たとえば大腸菌や酢酸菌の呼吸鎖, 図 3), さらに複合体 I と違いエネルギー生成能をもたない NADH 脱水素酵素も存在し (たとえば大腸菌や酢酸菌の呼吸鎖, 図 3), それらの組成の違いに応じて、エネルギー生成部位もミトコンドリアのように一定でなくさまざまである。また、細菌呼吸鎖はほとんどの場合、初発の脱水素酵素領域と末端のオキシダーゼ領域

とが種々に分枝している。これまでは、その呼吸鎖がミトコンドリアとほとんど同様と考えられていた *Paracoccus* 属菌や枯草菌などの場合でも、現在では非常に多様に分枝した呼吸鎖をもつことが示されている (図 2)。

呼吸鎖の初発脱水素酵素は個々の細菌によって特徴的で、ミトコンドリアの複合体 I と II に対応する NADH 脱水素酵素とコハク酸脱水素酵素以外に、さまざまな脱水素酵素が見いだされている。糖 (グルコース, ソルビトールなど), 有機酸 (乳酸, リンゴ酸など), アルコール (メタノール, エタノールなど), アミノ酸 (D-アラニン, L-プロリンなど), さらに無機物 (水素, 鉄やアンモニアなど) をも酸化できる酵素を呼吸鎖にもつ細菌が存在している。これらは、このように多様な栄養基質に対応して生育できるよう進化したそれぞれの細菌の特徴と関係している。

一方、チトクロムオキシダーゼ (末端オキシダーゼ) の構造や機能は、さらに多様で細菌呼吸鎖のもっとも大きな特徴となっている。表 1 に示すように、細菌の呼吸鎖の末端オキシダーゼは、ミトコンドリアと同じチトクロム c オキシダーゼであるものと、還元型ユビキノンを直接酸化するユビキノールオキシダーゼを末端オキシダーゼとするものとにまず大別される。さらに、これらのオキシダーゼはそのヘム成分、エネルギー生成能や酸素に対する親和性などでさらに細かく細分される。さらに、嫌気条件下で生育できる細菌のなかには、酸素以外のさまざまな化合物を電子受容体として機能する呼吸鎖を有しているものがあり、これらの末端オキシダーゼは、それらの

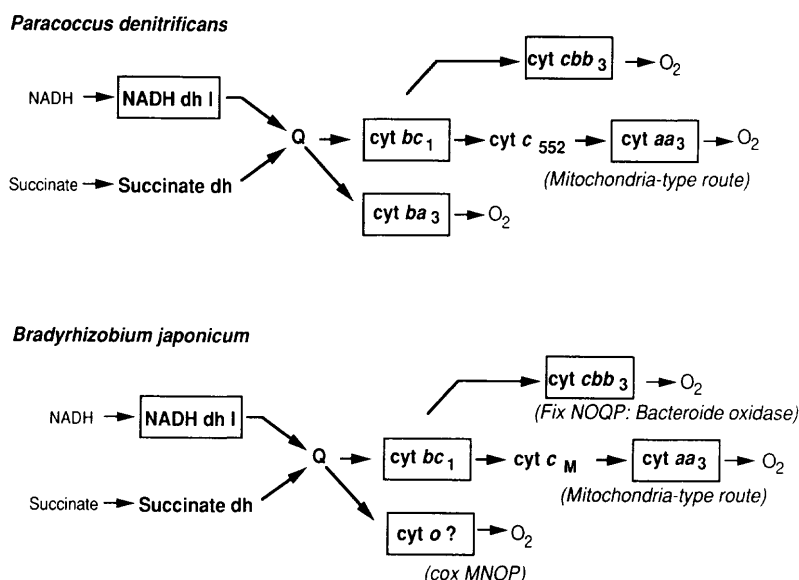


図 2 ミトコンドリアに類似した呼吸鎖を部分的にもつ *Paracoccus* 属菌とダイズ菌の呼吸鎖

ミトコンドリア呼吸鎖に類似した電子伝達ルートをもつ *Paracoccus* 属菌 (*Paracoccus denitrificans*) とダイズ菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) の呼吸鎖の模式図を示す。両菌とも複合体 I と II に対応する NADH 脱水素酵素 (NADH dh I) のコハク酸脱水素酵素 (Succinate dh) を初発脱水素酵素としてもち、複合体 III および IV に対応するチトクロム bc_1 (cyt bc_1) とチトクロム aa_3 (cyt aa_3) のルートをもつ。しかし、同時に別のチトクロム c オキシダーゼ (cyt cbb_3) とユビキノールオキシダーゼ (cyt ba_3 あるいは cyt o) を分枝呼吸鎖としてもっている。ボックスで囲まれたものはエネルギー生成能を有する成分を示している。

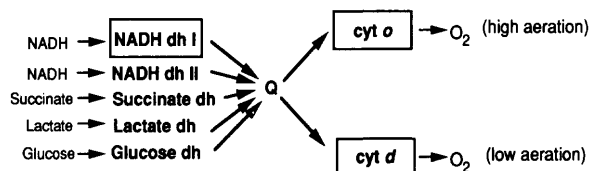
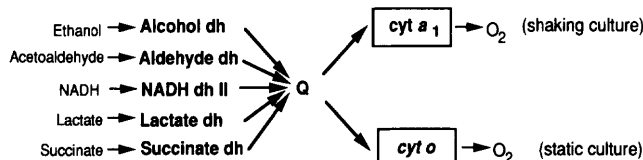
Escherichia coli**Acetobacter aceti**

図3 ミトコンドリアと本質的に異なる大腸菌と酢酸菌の呼吸鎖

大腸菌 (*Escherichia coli*) と酢酸菌 (*Acetobacter aceti*) の呼吸鎖はミトコンドリアと異なり、2種類のユビキノールオキシダーゼを末端オキシダーゼとしている。これらの呼吸鎖の初発脱水素酵素は非常に多様で、大腸菌の場合、ミトコンドリアの複合体IとIIに対応する NADH dh I と Succinate dh 以外に、エネルギー生成能をもたない NADH 脱水素酵素 II (NADH dh II) や乳酸脱水素酵素 (Lactate dh)、さらにグルコース脱水素酵素 (Glucose dh) を有している (この他に誘導的に生じるいくつかの脱水素酵素が知られている)。酢酸菌の場合、上述の酵素の他に、酢酸発酵に関与するアルコールやアルデヒド脱水素酵素 (Alcohol dh と Aldehyde dh) が含まれているが、そのほかにさまざまな糖 (グルコースやフルクトース) や糖アルコール (グリセロールやソルビトールなど) に対する脱水素酵素を構成的に保有している。

化合物を還元するとする視点から多くは還元酵素と呼ばれている。最近、これらの嫌気性細菌の特殊な還元酵素反応を利用して、ウランや金の還元的濃縮を試みる報告まである^{9, 10)}。

大腸菌、酢酸菌、*Azotobacter* 属菌などは、上述したユビキノールオキシダーゼを末端オキシダーゼとする典型であるが、枯草菌、*Paracoccus* 属菌、*Pseudomonas* 属菌などはチトクロム *c* オキシダーゼをもつ典型であり、これらはその呼吸鎖の性質に依存して、どちらかのタイプの末端オキシダーゼをもつものと考えられていた。しかし、少なくとも枯草菌や *Paracoccus* 属菌ではチトクロム *c* オキシダーゼとユビキノールオキシダーゼがそれらの呼吸鎖に共存することもわかってきており、その組成の複雑さは研究の進展とともに深まるばかりである。

このような複雑さに加えて、細菌の呼吸鎖は、生育環境の急激な変化に対応してそれらの呼吸鎖成分の発現を調節し、さまざまにその成分を変化させている。こうした細菌呼吸鎖の多様性と可変性は、それらが代謝反応の律速要因であり同時に生体エネルギーの生成因子として機能してい

る重要性を考えるならば、そこに何らかの重要な意味があるはずである。以下に、これらの細菌呼吸鎖の多様性と可変性を示すもっとも特徴的な現象、酸素濃度によるチトクロムオキシダーゼの変換を取り上げ追跡してみたい。

酸素濃度によるチトクロムオキシダーゼの変換

上述したように、細菌は環境要因の急速な変化に対応して生育しなければならない。実験室の培養フラスコのなかでさえ、その環境要因は刻々と変化している。栄養基質の濃度、代謝産物の蓄積、pH の変化、酸素濃度の変化等である。まして、その自然の生育環境では、その要因は天文学的数字に増大するはずである。こうした環境要因によって細菌呼吸鎖が受けるもっとも大きな変化として知られているのは、培養時の通気量、つまり酸素濃度によってそのチトクロムオキシダーゼ (末端オキシダーゼ) が変換することである。完全な嫌気条件ではもちろん酸素と反応することで機能するチトクロムオキシダーゼは発現しなくなり、酸素呼吸は止まる。代わって、発酵、あるいは大腸菌のような細菌では、硝酸還元酵素を末端にもつような嫌気呼吸鎖を発現することでエネルギー生成を行なうようになる。このような完全な嫌気条件下ではなく好気条件下での微妙な酸素濃度の変化でも、細菌の呼吸鎖成分、とくにその末端オキシダーゼは大きく変化することが知られている。

1. 大腸菌の呼吸鎖末端オキシダーゼの変換

このような例として古くから知られている典型は、大腸菌のチトクロムオキシダーゼであろう。大腸菌呼吸鎖の末端オキシダーゼはともにユビキノールオキシダーゼとして機能するチトクロム *o* とチトクロム *d* であり (表1)、これらは機能こそ違え、ともにエネルギー生成能を有している (図3)。大腸菌をフラスコで培養するとその生育の初期にはチトクロム *o* を発現するが、培養が進むにつれフラスコ内の溶存酸素濃度が減少し、それにつれてチトクロム *d* が発現するようになる¹¹⁾。このチトクロム *o* とチトクロム *d* は、O₂ に対する *Km* 値がそれぞれ 2.9 μM と 0.38 μM で親和性が7倍異なっており、さらにチトクロム *o* の発現には少なくとも 80 μM 以上の酸素が必要であることも明らかになっている。詳細は他著^{12, 13)}にゆずるが、この両末端オキシダーゼは FNR (これは Fumarate and Nitrate Reduction の略で、もともと嫌気条件下でのフマル酸や硝酸呼吸の誘導に関与する因子という意味でつけられた) と ArcA (Aerobic Respiration Control の略で、嫌気条件下で好気呼吸の抑制に関与する因子という意味でつけられた) と呼ばれる二つの O₂ センサータンパク質によって、巧妙にその発現が調節されていることが明らかになってきた。つまり、酸素が欠乏してくると FNR タンパク質から O₂ が離れて活性化され、それが DNA に直接作用してチトクロム *d* とチトクロム *o* の両者の発現を抑制する。一方、ArcA タンパク

表1 細菌呼吸鎖で機能するチトクロムオキシダーゼ

チトクロムオキシダーゼ	種類	含まれる補欠分子族	細菌菌株
チトクロム <i>c</i> オキシダーゼ	<i>aa₃</i>	2 heme <i>a</i> , 2 Cu	<i>Paracoccus</i> 属菌, <i>Bradyrhizobium</i> 属菌
	<i>caa₃</i>	2 heme <i>a</i> , 1 heme <i>c</i> , 2 Cu	枯草菌
	<i>cbb₃</i>	3 heme <i>c</i> , 2 heme <i>b</i> , 1 Cu	<i>Bradyrhizobium</i> 属菌, <i>Pseudomonas</i> 属菌
ユビキノールオキシダーゼ	<i>o</i> (<i>bo₃</i>)	1 heme <i>b</i> , 1 heme <i>o</i> , 1 Cu	大腸菌, 酢酸菌
	<i>a₁</i> (<i>ba₃</i>)	1 heme <i>a</i> , 1 heme <i>b</i> , 1 Cu	酢酸菌, <i>Paracoccus</i> 属菌
	<i>aa₃</i>	2 heme <i>a</i> , 1 Cu	枯草菌
	<i>d</i> (<i>bd</i>)	2 heme <i>b</i> , 1 heme <i>d</i>	大腸菌, <i>Azotobacter</i> 属菌

質も、メカニズムがまだはっきりしないが、まず膜に存在する ArcB タンパク質が何らかの酸素欠乏シグナルを感知し、そのことで活性化された ArcB タンパク質によって次に活性化される。この場合、FNR と違って、チトクロム *o* の発現は抑制されるが、チトクロム *d* の発現は誘起される。このように二つのセンサータンパク質が協同的に働くことで、チトクロム *o* の発現は酸素濃度の低下に伴って完全に停止する。一方、チトクロム *d* は酸素濃度の減少に伴って二つのセンサーが競合することになり、酸素濃度が中間的なところだけで発現できるように厳密にコントロールされている。このような酸素濃度の変化に対応した厳密なチトクロムオキシダーゼの変換反応が、さまざまな細菌で見いだされてきている。

この大腸菌の末端オキシダーゼの変換に類似した現象が、いくつかの細菌や真核微生物でも知られるようになってきた。そのなかから、植物細胞内で共生できる窒素固定細菌と静置培養で培地表面に浮遊して生育できる絶対好気性の酢酸菌の例を以下に示そう。

2. 根粒菌の共生に伴うチトクロムオキシダーゼの変換

窒素固定を行なう生物は原核生物に限られているが、それらのなかには *Azotobacter* 属菌のような直接窒素固定を行なうものと、根粒菌のように特定のマメ科植物の根のなかに共生してそのなかで窒素固定を行なうものがある。どちらの場合もこの窒素固定反応を行なう酵素はニトロゲナーゼであり、酸素に非常に不安定であることはよく知られている。そのため、これらの窒素固定細菌は窒素固定を行なうような生育条件では特別な酸素条件を必要とすると考えられる。*Azotobacter* 属菌は自由生活型の土壌細菌で、窒素源の欠乏した生育条件では窒素固定を行なうことができ、そのとき大腸菌でみられたのと同様のチトクロム *d* が呼吸鎖の末端オキシダーゼとして大量に生成される。このチトクロム *d* は酸素に対する親和性が非常に高く (*K_m* 値が 20 nM) かつ反応が非常に強いので、細胞質内の酸素濃度を非常に低く保つことができ、そのことでニトロゲナーゼを酸素による阻害から守っていると考えられている。最近、根粒菌 (*Rhizobium* および *Bradyrhizobium*) の呼吸鎖の末端オキシダーゼでもその窒素固定反応と関連して興味ある

ことがわかってきた。ダイズ菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) はその他の根粒菌と同様に土壌中で自由に生活する好気性の細菌であるが、同時にダイズの根のなかに侵入し根粒を形成して、その組織のなかでバクテロイドとして共生することもできる¹⁴⁾。これらの根粒菌は *Azotobacter* 属菌と違って、根粒のなかで共生しているときだけ窒素固定能を示すようになる。土壌表面での酸素濃度は 250 μM 程度であるが根粒組織のなかでの濃度は 3~30 nM であるので、この菌にとっては 10⁴ から 10⁵ も違う酸素濃度に適応することになる。それゆえ、バクテロイドでは酸素に高い親和性をもつ共生に特異的な末端オキシダーゼをもつようになるだろうと信じられてきた。自由生活をする条件下では、このダイズ菌は、チトクロム *bc₁*、チトクロム *c_M*、チトクロム *aa₃* 型のチトクロム *c* オキシダーゼから成るミトコンドリアと類似した呼吸鎖と、大腸菌に類似したチトクロム *o* (ユビキノールオキシダーゼかどうかは確認されていないが) をもっており、他の細菌呼吸鎖と同様に末端で分枝していることが示されている (図 2)。しかし、これらの呼吸鎖成分のうち、チトクロム *c*、チトクロム *aa₃* やチトクロム *o* は根粒中に共生するバクテロイドの呼吸鎖には必要ではなく、チトクロム *bc₁* のみが関与していることが変異実験から示されていて、バクテロイドで機能する末端オキシダーゼはわかっていなかった。最近、このダイズ菌で、窒素固定条件下でのみ発現する窒素固定遺伝子群のなかに四つのサブユニットから成る末端オキシダーゼ遺伝子 (*fixNOQP* 遺伝子と呼ばれる) がみつかり、しかもそれが微好気条件下で発現しているらしいこともわかった¹⁵⁾。その遺伝子構造の解析と他の末端オキシダーゼとのホモロジー検索から、この末端オキシダーゼは光合成細菌の *Rhodobacter* 属菌、さらには *Paracoccus* 属菌や *Pseudomonas* 属菌で、最近相次いで発見されたチトクロム *cbb₃* 型のチトクロム *c* オキシダーゼ (表 1) と類似のものであることがわかった。しかし、このオキシダーゼが実際にバクテロイドで発現しているか否か、さらに予想されるような酸素に対する異常に高い親和性を示すか否かについてはまだわかっていない。ところが、これらの根粒菌には、さきに述べた大腸菌の ArcA/ArcB に類似した FixL/FixJ と呼ばれる O₂ センサータンパク質が存在し、これらが根

粒内の低酸素濃度を感知して *fixNOQP* 遺伝子を含む一連の窒素固定遺伝子を発現するようになることが明らかとなっており^{16, 17)}, この *FixNOQP* オキシダーゼは窒素固定条件下で発現し, バクテロイドで機能している可能性が非常に高い。

3. 培養液の表面で浮遊して生育できる酢酸菌の呼吸鎖

Acetobacter 属酢酸菌はお酢を造る菌として古くから, とくに日本で私たちに親しまれてきた細菌である。古来から今に至るまで, 酢酸菌を使ってお酢を造るには, もちろん, 今日ではタンクを用いた通気攪拌培養も用いられているが, 多くの場合樽やカメのなかで静置培養を行ってきた。このとき, これらの細菌はその培地の表面に薄い菌膜 (ペリクル) を作って生育し, エタノールを酢酸にまで酸化する。この酢酸菌の菌膜形成能は実験室で保存されている間に容易に失なわれる。最近, この酢酸菌 *Acetobacter aceti* のなかには菌膜形成能をもつものと持たないものが共存しており, 振盪培養を繰り返すとその菌膜形成能をもたない菌が優勢となることがわかった。これら二つの菌株はコロニー形態の違いから容易に分離することで, 菌膜形成能をもつ株はコロニー表面が粗面 (rough) であるため R 株と, その能力がなく静置培養では生育できない株はコロニー表面が滑面 (smooth) であるので S 株と呼ばれる¹⁸⁾。また, 菌膜形成能をもつ R 株は振盪培養を繰り返して行なうとそのなかから菌膜形成能を失った S 株が現われ, やがてはそれらが優勢になることもわかってきた。これらの変化のメカニズムはまだ完全には理解されていないが, 酢酸菌のこれら二つの菌株の間で, 呼吸鎖に特徴的な変化が起こることがわかった。

Acetobacter 属酢酸菌の呼吸鎖は, 大腸菌に類似したユビキノールオキシダーゼを末端オキシダーゼとする典型的な細菌である。この呼吸鎖はエタノールから酢酸への酸化に関与するアルコールおよびアルデヒド脱水素酵素をはじめ多くの糖質酸化系酵素をその初発脱水素酵素として, 細胞質膜のペリプラズム側に有する特徴をもっている¹⁹⁾。この酢酸菌の呼吸鎖末端オキシダーゼは, 静置培養で R 株が優勢となり培地表面に浮いて生育するとチトクロム *o* に, 振盪培養で培地中に懸濁されて生育すると S 株が優勢になりチトクロム *a*₁ に変わる (図 3)。この場合, 上述した大腸菌や根粒菌の場合と異なり, 酸素濃度に対するレスポンスが少々複雑である。分離された S 株は培地表面に浮くことができないので, 振盪培養でしか生育できず, もちろんそのときはチトクロム *a*₁ をもっている。一方, 分離された R 株は静置培養と同様に振盪培養でも生育でき, その場合でも R 株の末端オキシダーゼはチトクロム *o* のままである。しかし, この R 株は振盪培養では劣勢で, 分離された S 株と R 株とで混合振盪培養を繰り返すと, 最終的には S 株だけが残ってくる。培地表面で生育する場合と培地中で懸濁

される場合で, これらの細菌にとっての酸素濃度はどうなるのであろうか。この問題は簡単には分析できないが, かたや空中酸素を利用するのに対し, もう一方は水中の溶解酸素を利用していると考えることができ, 培地表面のほうが酸素濃度が高いのではなかろうか。事実, 精製された両酵素の O₂ に対する *K_m* 値は, チトクロム *o* が 16.9 μM であるのに対し, 沈んだ菌体で機能するチトクロム *a*₁ は 4.4 μM と O₂ に対する親和性が 4 倍高くなっている²⁰⁾。酢酸菌は, 本来腸内細菌である大腸菌とは違い, 花の密とか果物の表面, そしてそれらが腐敗して発酵した溶液の表面で酢を造りながら生息している非常に好気的な環境で生育する細菌である。その点から考えても, 大腸菌にとって好気条件で機能するチトクロム *o* (*K_m* 値 2.9 μM) と比べても, 大腸菌と同じく培地表面で生育できない酢酸菌で働くチトクロム *a*₁ でさえ, その酸素に対する親和性は 1.5 倍, 表面で生育するときのチトクロム *o* のそれは 6 倍も低くなることになる。まして, 微好気性で機能する大腸菌のチトクロム *d* と比べると 45 倍も違うことになる。

また, 酢酸菌におけるこれら酵素間の変換は, 上述した大腸菌や根粒菌の場合と違って, 異なる遺伝子からの発現ではない可能性が高い。つまり, 両オキシダーゼは大腸菌のチトクロム *o* と非常に高い相同性を有しているが¹⁾, 相互には構造的に識別できず, 同一の遺伝子から発現された同じタンパク質である可能性が高い。それゆえ, チトクロム *o* とチトクロム *a*₁ とは, 酸素との反応部位で機能するヘム分子がヘム *o* からヘム *a* に代わっただけであると考えられる (表 1)。ヘム *a* はヘム *o* から単一の酵素反応 (ヘム *a* 合成酵素) で合成されることが示唆されているので²¹⁾, 酢酸菌におけるチトクロム *o* とチトクロム *a*₁ との変換は, このヘム *a* 合成酵素遺伝子に挿入変異が出たり入ったりする形の新規な機構でコントロールされているのではないかと考えられる。

お わ り に

これまで述べてきたように, 細菌の呼吸鎖は異常なまでの多様性と可変性を示す。それは細菌が非常に多様な環境に生息していることと関係しているであろう。それらの環境要因としては, 供給される炭素源, 生育温度, pH, あるいは浸透圧などさまざまな多くの要因が考えられる。なかでも, 上述した酸素濃度の変化が細菌の呼吸鎖に与える影響はもっとも大きいと思われる。しかも, これらの細菌を取り巻く環境要因は刻々と, また急激に変化している。それゆえ, 多様な環境条件のなかで生きて行かなければならない細菌は上述した多様な呼吸鎖を準備していると考えられる。また, 細菌は, 急激でかつ広範な環境変化に対応してそれらの呼吸鎖組成を速やかに変化させることで, 幅広い適応範囲を確保しているのかもしれない。今回は紙面の

都合で触れられなかったが、ここで述べた細菌呼吸鎖の末端で働くチトクロムオキシダーゼの多様性や可変性に加えて、それらの呼吸鎖成分のなかには、エネルギー生成能をもたず呼吸鎖の途中から電子を酸素に渡すいわゆるバイパス・オキシダーゼも多く、多くの細菌で見いだされており、これらは多くの場合オキシダーゼとしては特異なシアンに耐性な性質を示す²¹⁾。さらに、細菌呼吸鎖の初発で働く脱水素酵素も非常に多様であり、それらのなかにはミトコンドリアの複合体Iと違い、エネルギー生成能をもたない特異なNADH脱水素酵素（複合体Iと区別してNADH脱水素酵素IIと呼ばれる）も多くの細菌の呼吸鎖で機能していることも知られてきている^{22, 23)}。

生化学的な視点からすれば、安定で恒常的なシステムこそが生理学的に重要であり、細菌呼吸鎖のように多様で変動しやすいものは、あまり重要な機能をもたないと考えられがちであった。それゆえ、これまでは、エネルギー生成能を示す呼吸鎖電子伝達系成分に興味が集申し、エネルギー生成能をもたないシステムは機能的な重要性をもたないと考えられ、ほとんど研究らしい研究がされてこなかった。しかし、環境の変動とそれに対応した呼吸鎖の変化は細菌の生育をコントロールする重要な意味をもっていると考えられるので、今後はエネルギー生成能をもたない成分も含めた細菌呼吸鎖の多様性とその可変性について多くの研究が進展することが期待される。

引用文献

- 1) 茂木立志：生化学 **67**, 93 (1995)
- 2) T. Mogi, K. Saiki & Y. Anraku: *Mol. Microbiol.* **14**, 391 (1994)

- 3) H. Weiss, T. Friedrich, G. Hofhaus & D. Preis: *Eur. J. Biochem.* **197**, 563 (1991)
- 4) U. Brandt & B. Trumpower: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 165 (1994)
- 5) 三芳秀人：化学と生物 **33**, 151 (1995)
- 6) J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, R. Lutter & J. E. Walker: *Nature* **370**, 621 (1994)
- 7) S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig & H. Michel: *Nature* **376**, 660 (1995)
- 8) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono & S. Yoshikawa: *Science* **269**, 1069 (1995)
- 9) D. R. Lovely, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby & E. R. Landa: *Nature* **350**, 413 (1991)
- 10) J. Rennie: *Sci. Am.* **267**, 14 (1992)
- 11) 北 潔：生化学 **62**, 417 (1990)
- 12) S. S. Spiro & J. R. Guest: *TIBS* **16**, 319 (1991)
- 13) J. R. Guest: *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2253 (1992)
- 14) 東 四郎, 小林不二夫：農化誌 **67**, 1065 (1993)
- 15) O. Preissig, D. Anthamatten & H. Hennecke: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3309 (1993)
- 16) M. A. Gilles-Gonzalez, G. S. Ditta & D. R. Helinski: *Nature* **350**, 170 (1991)
- 17) A. F. Lois, M. Weinstein, G. S. Ditta & D. R. Helinski: *J. Biol. Chem.* **268**, 4370 (1993)
- 18) K. Matsushita, H. Ebisuya, M. Ameyama & O. Adachi: *J. Bacteriol.* **174**, 122 (1992)
- 19) K. Matsushita, H. Toyama & O. Adachi: "Advances in Microbial Physiology," ed. by A. H. Rose & D. W. Tempest, Vol. 36, Academic Press, London, pp. 247-301, 1994
- 20) K. Matsushita, H. Ebisuya & O. Adachi: *J. Biol. Chem.* **267**, 24748 (1992)
- 21) 皆川信子, 吉本昭夫：化学と生物 **31**, 83 (1993)
- 22) K. Matsushita, T. Ohnishi & H. R. Kaback: *Biochemistry* **26**, 7732 (1987)
- 23) O. M. Neijssel & M. J. Teixeira de Mattos: *Mol. Microbiol.* **13**, 179 (1994)