海洋細菌および大腸菌に存在する
呼吸鎖の比較生化学的研究

1992年

三好　徹

目次

	頁
略語一覧	1
第１章　序論	2
第２章 材料と方法	6
１．菌株、培養および集菌	6
２．膜小胞分画の調製	6
３．酵素の分離・精製	7
４．酵素活性測定法	12
５．補欠分子族の分析	14
６．膜電位(△ψ)測定法	16
７．電気泳動による解析	17
８．免疫学的比較	17
９．タンパク質定量法	18
１０．試薬等	18
第３章　大腸菌呼吸鎖の NADH-quinone reductase 領域の解析	20
１．NADH-ferricyanide dehydrogenase(NFD) と NADH-quinone reductase(NQR) の分離と精製	21
２．精製酵素の蛋白質組成とフラビン分析	26
３．精製酵素の性質	29
４．NFD、NQR と細胞膜上の NQR-1、NQR-2 の性質の比較	34
５．考察	46
第４章　海洋細菌と大腸菌の NADH-quinone reductase の比較	50
１．NADH-quinone reductase 領域の膜電位形成能の解析	52

2．海洋細菌の酵素に対する電子供与体前処理の効果 54
3．各酵素のキノン還元様式 57
4．免疫学的比較 59
5．考察 59
第5章　*V.alginolyticus* 呼吸鎖の quinol oxidase 領域の解析 64
1．quinol oxidase の精製 65
2．精製 quinol oxidase の電気泳動 69
3．精製酵素のスペクトル分析 73
4．補欠分子族の分析 79
5．基質特異性及び、阻害剤の効果
6．精製酵素の酵素活性に対する界面活性剤、リン脂質の効果 86
7．考察 87
第6章　考察・結論 91
1．NQR-2 について 91
2．quinol oxidase について 92
3．NQR-1 について 93
4．ナトリウム駆動型呼吸鎖とプロトン駆動型呼吸鎖 95
5．結論 97
謝辞 98
参考文献 99

略語一覧

5'-AMP	アデノシン 5'- モノリン酸
ATP	アデノシン 5'- 三リン酸
$C_{12}E_8$	n-ドデシルオクタエチレングリコールモノエーテル
CCCP	カルボニルシアニド m- クロロフェニルヒドラゾン
CHAPS	3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸
DCIP	2,6-ジクロロフェノールインドフェノール
d-NADH	還元型ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド
ESR	電子スピン共鳴スペクトル
FAD	フラビンアデニンジヌクレオチド
FMN	フラビンモノヌクレオチド
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
Liponox DCH	アルキルポリオキシエチレンエーテル（アルキル鎖平均長 10、オキシエチレン鎖平均長 8）
NADH	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NQR-1	エネルギー共役型 NADH-quinone reductase
NQR-2	エネルギー非共役型 NADH-quinone reductase
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
SDS	ラウリル硫酸ナトリウム
TMPD	N,N,N',N'- テトラメチルフェニレンジアミン
$\triangle P$	プロトン駆動力
$\triangle pH$	生体膜を隔てた pH 差
$\triangle \psi$	生体膜を隔てた膜電位差
$\triangle \bar{\mu} H^+$	プロトンの電気化学的ポテンシャル差
$\triangle \bar{\mu} Na^+$	ナトリウムイオンの電気化学的ポテンシャル差
オキソノールVI	ビス[3- ビニル -5- オキソイソキサゾール -4- イル]ペンタメチネオキソノール
デュロキノール	還元型 2,3,5,6- テトラメチルベンゾキノン
ヘペス	N-2- ヒドロキシエチルピペラジン -N'-2- エタンスルホン酸
メナジオン	2- メチル -1,4- ナフトキノン
ユビキノール-1	還元型ユビキノン-1
ユビキノン-1	2,3- ジメトキシ -5- メチルベンゾキノン -6-(2- メチル -1,3- ブタジオン)
ε	分子吸光係数

第１章　序論

生体が、生命活動を維持して行くためにはエネルギーの獲得が必須である。生体の持ついくつかのエネルギー獲得機構のうち、生体膜上に存在する呼吸鎖は特に重要な役割を果たしている(1,2)。P.Michell により提唱された化学浸透説では、呼吸鎖はその電子伝達過程で、NADH、コハク酸などの基質の酸化により放出されるエネルギーを利用してプロトンを排出し、生体膜を隔てたプロトンの電気化学ポテンシャル差 ($\Delta\overline{\mu}H^+$) を形成する(3,4)。この $\Delta\overline{\mu}H^+$ は ATP 合成酵素の直接の駆動力になるとされており、この理論は現在広く受け入れられている。$\Delta\overline{\mu}H^+$ は、膜を隔てたプロトンの濃度勾配である ΔpH 及び、プロトン等の移動に付随して形成される生体膜を隔てた電位差 (膜電位、$\Delta\psi$) の二成分から構成されており、$\Delta\overline{\mu}H^+/F$(F: ファラデー定数)は ΔP と表され、プロトン駆動力とも呼ばれる。このプロトン駆動力は、ATP 合成の他、様々な輸送系の駆動力、大腸菌を始めとする細菌における鞭毛運動、アンチポーターなどによる細胞内 pH の恒常性維持などの種々の生命活動のエネルギー源として利用される（図１）(1)。

この様にプロトンは生体エネルギー論上からも重要なイオンである。しかしながら最近の研究で、*Vibrio alginolyticus* を始めとする多数の細菌、特に海洋細菌で、呼吸鎖においてプロトンの他にナトリウムイオンを排出し、ナトリウムイオンの電気化学的ポテンシャル差（$\Delta\overline{\mu}Na^+$）、ナトリウム駆動力を形成することが明らかにされてきた(1,5-8)。これらの細菌においてナトリウム駆動力は、栄養素輸送系(9,10)、鞭毛運動(11,12)等の駆動力として利用されており、さらにはATP合成の駆動力としても

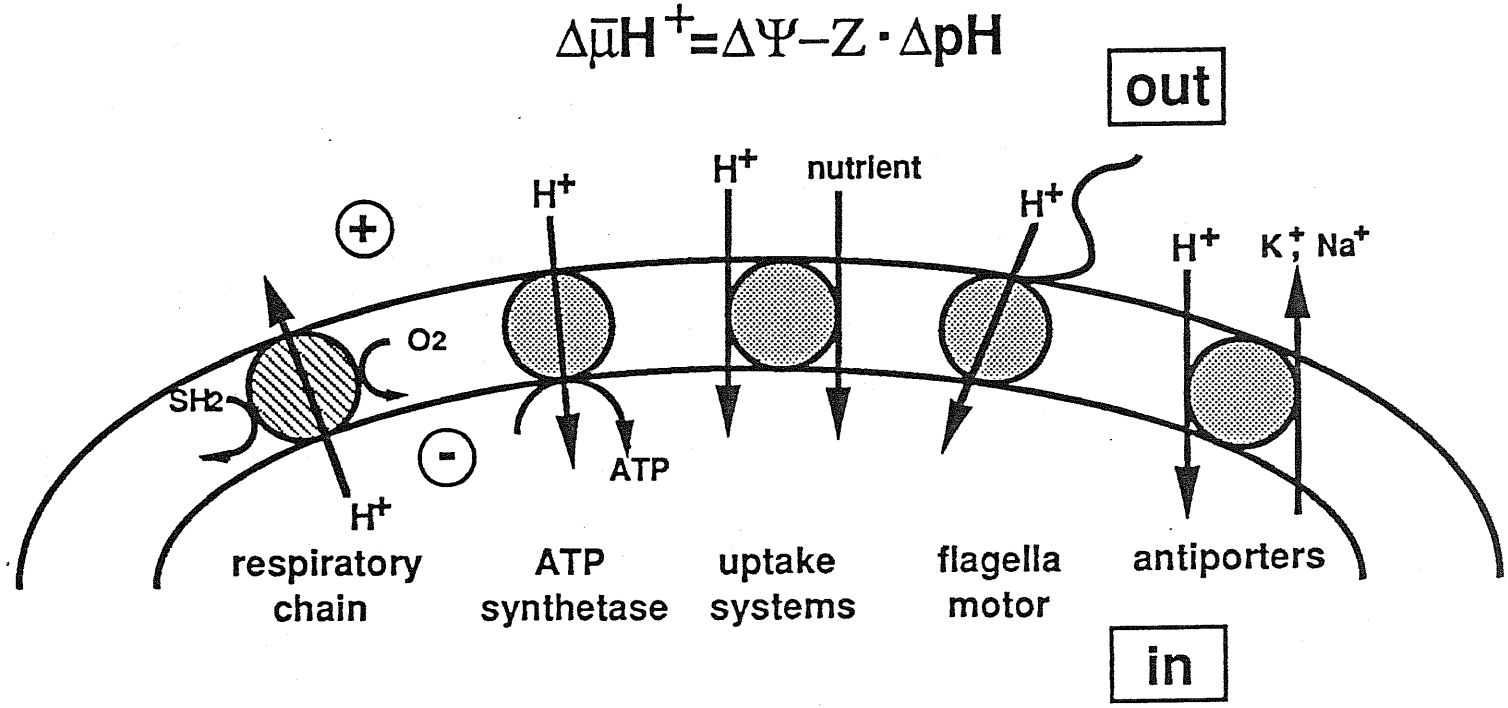


図 1-1 呼吸鎖によるプロトン駆動力の形成とその利用
in、out は細胞の内外を、+、- は呼吸鎖により形成された膜電位差の配向を示す。

利用されるという報告がある(13)。これらの例から明らかなように、エネルギー共役反応にはプロトンばかりでなくナトリウムイオンも重要な役割を果たす(1,14)。しかしながら、化学浸透説そのものは純粋にエネルギー論的であり、実際の呼吸鎖におけるイオン排出のタンパク質化学的メカニズムについてはまだ明らかにされていない。そのため、呼吸鎖構成成分の分離、精製、再構成及び、遺伝学的解析が、真核細胞、原核細胞で精力的に行われている(1,2)。

プロトンの他にナトリウムイオンを排出する呼吸鎖(以下、ナトリウム駆動型呼吸鎖)を持つ細菌に関する知見が増加すると共に、呼吸鎖でプロトンを排出する呼吸鎖(以下、プロトン駆動型呼吸鎖)を持つ細菌との間で、異なるイオンを排出する酵素が類似した電子伝達反応を触媒する例が知られるようになった(1,14)。このことはイオン排出メカニズムの解析の重要な手がかりとなると考えられる。即ち、それらの触媒反応過程を詳細に比較し、両者の共通点、相違点を見いだすことで、”イオン”排出に重要な反応段階及び、イオン特異性に重要な反応段階を特定できる。この様な方法によるエネルギー共役の解析は、部位特異的アミノ酸置換などの遺伝学的手法とは全く異なるアプローチであり、酵素反応とイオン排出を直接結び付けることが可能となる。また、生化学的な比較によりナトリウム駆動型呼吸鎖とプロトン駆動型呼吸鎖の関係についても新たな知見を得られる。しかしながら、この様な観点に立脚した研究はほとんど行われていない。

この様な検討のためには、細胞膜を用いた呼吸鎖全体の解析に加え、個々の酵素タンパク質について解析を行わなければならない。その為には膜タンパク質である各酵素を活性を保持した状態で安定に分離・精製

することが必要である。そこで筆者はナトリウム駆動型呼吸鎖を持つ細菌として、海洋細菌 *V.alginolyticus*、プロトン駆動型呼吸鎖を持つ細菌として大腸菌を用い、両者の呼吸鎖の酵素複合体を分離・精製し、それらの性質を解析した。

第２章 材料と方法

１．菌株、培養および集菌

大腸菌 K12 C600 株(15)は組成 1、*V.alginolyticus* 138-2 株及び 138-2 株由来のナトリウムポンプ欠損変異株 Nap1(16)は組成 2、の栄養培地を用い pH 7.3～7.4 で大腸菌は 30°C または 37°C、*V.alginolyticus*は 37°C で好気的に増殖させた。波長 600nm の濁度測定により生育を追跡し、対数増殖後期に 10,000×g、6分間、0°C で遠心し集菌した。大腸菌は、10 % グリセロール、5mM 硫酸マグネシウムを含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) (緩衝液 1) で 2 回洗浄し -75°C で保存した。quinol oxidase の精製に用いる *V.alginolyticus* は 5mM 硫酸マグネシウム、20% グリセロールを含む 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)(緩衝液 2) で 2 回洗浄し、-75°C で保存した。なお、*V.alginolyticus* の NQR-2 精製に使用する菌体の洗浄法は膜分画調製法に併せて示した。

	組成 1	組成 2
ポリペプトン	１．０％	０．５％
乾燥酵母抽出物	０．５％	０．５％
塩化ナトリウム	０．５％	３．０％
リン酸１水素２カリウム	０．４％	０．４％

２．膜小胞分画の調製

以下の操作はすべて、4°C 以下、もしくは氷中で行った。10μg/ml デオキシリボヌクレアーゼ I、1mM ジチオスレイトール、10

%グリセロールを含む緩衝液1(大腸菌の場合)またはグリセロール濃度10%の緩衝液2(*V.alginolyticus*の場合)に菌体を0.25g湿重量/mlに懸濁した。この懸濁液をフレンチプレス(14,000psi)に通し、菌体を破壊し、30,000×g、15分間遠心した。上清分画を200,000×g、2時間遠心し細胞膜分画を得た。細胞膜分画は緩衝液1または2で1回洗浄し、反転膜小胞(膜分画)を得、-75°Cで保存した。なお*V.alginolyticus*のquinol oxidaseの精製に使用する膜分画は洗浄及び凍結保存せず、そのまま酵素の可溶化段階に移った。

*V.alginolyticus*のNQR-2精製に使用する膜分画は以下の浸透圧ショック法でナトリウムポンプ欠損変異株Nap1細胞から調製した。

菌体を1.0M塩化ナトリウム、5mM EDTAを含む20mMトリス－塩酸緩衝液(pH 7.5)で2回洗浄後、10mM塩化ナトリウム、5mM EDTAを含む20mMトリス－塩酸緩衝液(pH 7.5)に菌体湿重量濃度40mg/mlとなるよう懸濁し、25°Cで5分間インキュベーション後、20,000×g、20分間遠心した。沈澱は10mM塩化ナトリウム、0.5mM EDTAを含む20mMトリス－塩酸緩衝液(pH 7.5)に懸濁後、5μg/mlデオキシリボヌクレアーゼI、2mM塩化マグネシウムを添加し5分間インキュベーション後、再度遠心し膜分画を得た。得られた膜分画は10mM塩化ナトリウム、10%グリセロールを含む10mMトリス－塩酸緩衝液(pH 7.5)に懸濁し、-75°Cで保存した。

3．酵素の分離・精製

以下の操作は特に断わらない限り、4°C以下もしくは氷中で行った。

3－1　大腸菌の NADH-quinone reductase の精製

3－1－1　膜分画の EDTA 処理及び、酵素の可溶化

膜分画を、5mM EDTA、20% グリセロールを含む 20mM トリス－塩酸緩衝液 (pH7.5) に 4mg/ml の濃度で懸濁し、20 分間緩やかに撹拌した後、240,000×g で 2 時間遠心した。沈澱分画を 20% グリセロール、1mM EDTA を含む 20mM トリス－塩酸緩衝液 (pH7.5) に懸濁した。この懸濁液に、$C_{12}E_8$ を、緩やかに撹はんしながら終濃度 2mM となるように滴下し、20 分間撹拌後、300,000×g、1 時間の条件で遠心し、上清分画を $C_{12}E_8$ 可溶化分画とした。

3－1－2　DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィー

予め、50mM 塩化ナトリウム、0.5mM $C_{12}E_8$、0.1mM EDTA、10% グリセロールを含む 10mM トリス－塩酸緩衝液 (pH7.8) で平衡化した DEAE-Sephacel カラムに、$C_{12}E_8$ 可溶化分画を、線流速 20cm/hr で負荷した。100mM 塩化ナトリウムを含む先の緩衝液によりカラムを充分洗浄し、250 mM 塩化ナトリウムを含む先の緩衝液で溶出した。活性のピーク分画を、アミコン社製 PM10 限外濾過膜を用いた限外濾過により脱塩濃縮し、DEAE-Sephacel 分画とした。

3－1－3　TSK gel DEAE-5PW 高速液体クロマトグラフィー

以下のカラム操作は室温で行った。予め、0.1% Liponox DCH、0.1mM EDTA、5% グリセロールを含む 10mM トリス－塩酸緩衝液 (pH7.8) で

平衡化した TSK gel DEAE-5PW カラム (21.5×150mm) に流速 3ml/min で DEAE-Sephacel 分画を負荷した。150mM 塩化ナトリウムを含む先の緩衝液で洗浄後、本文図中に示した塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出した。得られた各分画の活性のピーク部分を氷中で脱塩濃縮したものを 5PW 分画とした。NQR 分画は脱塩濃縮の過程で、Liponox DCH 濃度を 0.02% とした。

3－1－4 Bio-gel HTP カラムクロマトグラフィー

予め 10μM FMN、0.02% Liponox DCH、0.1mM EDTA、5% グリセロールを含む 10mM トリス－塩酸 (pH7.5) に、10mM 塩化ナトリウムを加えた緩衝液で平衡化した Bio-gel HTP カラムに 5PW の NFD 分画を線流速 25cm/hr で負荷した後、平衡化緩衝液によりカラム容積の約 4 倍洗浄した。その後、平衡化緩衝液と、塩化ナトリウムに代えてリン酸ナトリウム (pH 7.5) を含む緩衝液を図中に示した直線濃度勾配となるようにし溶出を行った。NFD のピーク部分を脱塩濃縮したものを HTP 分画とした。

3－2 *V.alginolyticus* からの NQR-2 の精製

3－2－1 酵素の可溶化

Nap1 の膜分画を 5mM EDTA、5% グリセロールを含む 20mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5) にタンパク質濃度 5mg/ml となるように懸濁し、25°C で 20 分間インキュベーション後、20,000×g、20 分間遠心した。沈澱は 0.1mM EDTA、5% グリセロールを含む 20mM トリス－塩酸緩衝液

(pH 8.0) にタンパク質濃度 10mg/ml となるように懸濁し、6mM $C_{12}E_8$ を含む上述の緩衝液を等量加え、25°C で 20 分間放置した。これを遠心し、得られた上清を -75°C で保存した。

3－2－2 DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィー

予め 0.1% Liponox DCH、10% グリセロール、0.1mM EDTA、20mM 塩化ナトリウムを含む 20mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 8.0)(緩衝液 3) で平衡化した DEAE-Sephacel カラム に、先の可溶化分画をカラム容積 1ml に対してタンパク質 5mg の割合で負荷した。0.1M 塩化ナトリウムを含む平衡化緩衝液で洗浄後、0.2M 塩化ナトリウムを含む平衡化緩衝液で溶出し PM-10 限外濾過膜により脱塩濃縮した。

3－2－3 5'-AMP アフィニティークロマトグラフィー

予め 0.1% Liponox DCH、10% グリセロール、5mM EDTA を含む 20mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した 5'-AMP アフィニティーカラムにカラム容積 1ml あたりタンパク質 5mg の DEAE-Sephacel 分画を負荷した。カラムを平衡化緩衝液で洗浄後、1mM NADH を含む平衡化緩衝液で酵素を溶出した。限外濾過により NADH の除去・濃縮を行った。

3－3 *V.alginolyticus* の NQR-1 及び、β サブユニットの精製

文献 17 の方法により精製された標品を用いた。

3－4　*V.alginolyticus* の quinol oxidase の精製

3－4－1　酵素の可溶化、DEAE-Sepahcel カラムクロマトグラフィー

10% グリセロール、5mM 硫酸マグネシウムを含む 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)(緩衝液 3) に 0.5% Liponox DCH を加えた緩衝液に、方法 2 で得た膜分画をタンパク質濃度約 10mg/ml となるように懸濁後、室温で 10 分間撹拌し、200,000×g、40 分間、4° C の条件で遠心し膜分画を洗浄した。洗浄膜分画は 5% Liponox DCH を含む緩衝液 3 に洗浄時と同容量に懸濁し、200,000×g、30 分間、4° C の条件で遠心し酵素を可溶化した。可溶化酵素は 0.1mM EDTA、10% グリセロール、0.5% Liponox DCH を含む 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)(緩衝液 4) で予め平衡化した DEAE-Sephacel カラム (5.8×5cm) に流速 240ml/hr で負荷し、50mM 塩化ナトリウムを含む緩衝液 4 で 充分洗浄後 300mM 塩化ナトリウムを含む緩衝液 4 で酵素を溶出した。ピーク画分は 50% 飽和硫安により濃縮し、凍結せず次の精製段階に移行した。

3－4－2　TSK gel DEAE-5PW HPLC

先の濃縮 DEAE-Sephacel 分画を 0.1mM EDTA、5% グリセロール、0.5% Liponox DCH を含む 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-5PW HPLC (21.5×150mm) に流速 3ml/min で負荷した。続いて、本文図中に示した塩化ナトリウムの直線濃度勾配により酵素を溶出した。ピーク分画は PM10 限外濾過膜により脱塩・濃縮し、必要に応じ -75° C で保存した。

3－4－3　Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィー

先の濃縮 5PW 分画を 0.1mM EDTA、10% グリセロール、0.1% Lipono x DCH を含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したSeph acryl S-300(Superfine)(1.9×95cm) に負荷し、同緩衝液で展開した。流速は 14ml/hr、負荷量は 3ml 以下とした。ピーク画分は PM10 限外濾過膜により濃縮し、-75° C で保存した。

4．酵素活性測定法

全ての酵素活性は 30° C で行い。1 分間あたり 1 μmolの基質を変化させる酵素量を 1 unit とした。非酵素的反応はブランクとして差し引いた。測定は日立200形、100形ダブルビーム分光光度計または日立557形二波長分光光度計を用いた分光光度法により行った。特に断わらない限り、反応は酵素の添加により開始した。

4－1　NADH-ferricyanide dehydrogenase(NFD) 活性測定

フェリシアン化カリウム(フェリシアナイド)の還元を、420nmの吸光度の減少(ε =1.0mM^{-1}·cm^{-1})で測定した。通常は、20mM 硫酸マグネシウム、0.2mM d-NADH もしくは 0.2mM NADH、1.0mM フェリシアン化カリウムを含む 25mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) 中で反応を行い、必要に応じさらに 10mM シアン化カリウムを加えた。

4－2 NADH-quinone reductase(NQR) 活性測定

d-NADH、NADHからユビキノン-1への電子伝達を、1) d-NADH、NADHの減少で測定する場合には340nmの吸光度の減少 (ε =6.81mM^{-1}·cm^{-1}) (18) を、ユビキノン-1の還元により生ずるユビキノール-1の形成を測定する場合には二波長法で270.5nm-242nm (19) の吸光度変化を、それぞれ追跡した。

5mM硫酸マグネシウム、0.1mM d-NADHもしくはNADH、8μMユビキノン-1を含む25mMトリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5)中で行い、反転膜小胞の場合には10mMシアン化カリウムを、可溶化以降の分画の場合には0.02% Liponox DCHをそれぞれ加えた。

4－3 quinol oxidase 活性測定

0.02% Liponox DCHを含む25mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 中、1mMデュロキノールの条件で行った。カラム溶出分画での測定では簡便のため265nm(ε =15.0mM^{-1}·cm^{-1}) で測定を行い、また反応液からLiponox DCHを除いた。その他の測定では265-289nm(ε =18.8mM^{-1}·cm^{-1})の二波長法で行った。 酸素吸収はYellow splings Instrument 社製YSI 5331 Clark型酸素電極を用いて測定した。酵素活性算出の為の30°Cでの酸素分子濃度は281μMを使用した。

4－4 精製酵素の基質特異性

NFDの場合、0.2mM d-NADHもしくはNADH、20mM硫酸マグネシウムを含む25mMトリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5)、NQRの場合、0.1mM NAD

H、0.02% Liponox DCH、 5mM 硫酸マグネシウムを含む 25mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5) 緩衝液中で測定した。DCIP(ε_{600nm}=20.6mM^{-1}·cm^{-1})は40μM、メナジオン(ε_{340nm}=6.22mM^{-1}·cm^{-1})は0.1mM、フェリシアン化カリウムは1.0mM、ユビキノン-1は8μMの濃度でそれぞれ用いた。

quinol oxidase の基質特異性は 0.02% Liponox DCH を含む 25mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 中で測定した。TMPD の酸化は ε_{520nm}=6.1mM^{-1}·cm^{-1} (20)、TMPD 濃度 2.5mM の条件で測定した。ユビキノール-1 のキノンへの酸化は方法４－２の波長を用い、50μM ユビキノール-1 の条件で行った。

５．補欠分子族の分析

５－１　フラビン分別定量

FaederとSiegelの方法(21)に従った。NFD の精製過程で添加された FMN はTSK-gel SW3000G カラムでゲル濾過し除去した。ゲル濾過は 40mM 塩化ナトリウム、5% グリセロール、0.1mM EDTA、0.02% Liponox DCH を含む 10mM トリス－塩酸緩衝液 (pH7.5) 中、流速 3ml/min の条件で行い、活性ピーク分画を濃縮しフラビン含量の測定を行った。

FADは ε_{445nm}=11.3mM^{-1}·cm^{-1}、FMNは ε_{450nm}=12.5mM^{-1}·cm^{-1} でそれぞれ濃度補正し標準溶液とした。蛍光測定は日立650型蛍光分光光度計により、励起波長 450nm、蛍光波長 530nm、励起側スリット幅 5nm、蛍光側スリット幅 5nm で測定した。

5－2　フラビンの同定

FAD、FMN の確認は、Merck 社製 Kieselgel を用いた薄層クロマトグラフィーにより行った。展開溶媒は、n-ブタノール:氷酢酸:蒸留水=4:4:2 (V/V)と 5% リン酸二ナトリウム 12 水和物の 2 種類を用いた。

5－3　ピリジン－ヘモクロームの分析

シトクローム溶液に終濃度 20% となるようにピリジンを添加し、続いて終濃度 0.2M となるように水酸化ナトリウムを添加した。撹拌後、微量のハイドロサルファイトナトリウムにより還元し、日立 557 型または U-3200 型分光光度計によりスペクトルを測定した。

5－4　逆相カラムによるヘムの同定

文献 22 の方法に従い抽出したヘムを μBondapak C18(Waters社) により分析した。溶媒はメタノール：酢酸：水 =65:17:12 とし、流速は 1ml/min で行い、405nm の吸収をモニターした。

5－5　銅含量の測定

日立 Z-8000 型ゼーマン偏光原子吸光光度計により行った。原子化はグラフィアトアトマイザーを用いた。硫酸銅・5 水和物を正確に 0.1N 塩酸に溶解し、用時に酵素溶液と同じ緩衝液に 0～10μM の濃度となるよう希釈し検量線を作製した。試料添加量は 10 μl とした。酵素タンパク質約 2～4μg を使用し、測定を行った。

6．膜電位(△ψ)測定法

6－1　反転膜小胞の調製

方法1で培養した菌体を、大腸菌の場合には方法1と同様の緩衝液中、5,000 psi、*V.alginolyticus*の場合は5mM硫酸マグネシウム、0.1Mショ糖を含む10mMヘペストリス緩衝液(pH 7.5)中で、8,000 psiの条件で、10μg/mlデオキシリボヌクレアーゼⅠ、1mMジチオスレイトール存在下フレンチプレスにかけ、その後方法2と同様に反転膜小胞を得た。

6－2　膜電位測定

オキソノールVIをプローブとし小胞内部が正の膜電位を測定した。20°Cで、反転膜小胞を反応液中でプローブと1分間インキュベーションした後、625nm-587nm (23,24)の吸光度変化を追跡した。

大腸菌の場合、タンパク質濃度50 μg/mlで、2μMオキソノールVI、0.1mM NADHまたはd-NADH、5mM硫酸マグネシウムを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)中で測定を行った。10μMユビキノン-1、または1.0mMフェリシアン化カリウムを電子受容体とする場合には10 mMシアン化カリウムを添加した。

*V.alginolyticus*の場合、タンパク質濃度0.5mg/mlの条件で5μMオキソノールVI、0.2mM NADH、30mM硫酸マグネシウム、0.05M硫酸ナトリウム、0.1Mショ糖を含む10mMヘペストリス緩衝液(pH 7.5)中で測定し、NADH-quinone reductase領域の測定ではさらに、50μMユビキノン-1、10mMシアン化カリウムを添加した。

7．電気泳動による解析

SDS-PAGE は Laemmli らの方法(25)、非変性性ゲル電気泳動は Davies らの方法(26)に従った。非変性性ゲル電気泳動の場合、ゲル及び、電極液に0.1% Liponox DCHを加えた。タンパク質染色はクマシーブリリアントブルー R-250を用いた。非変性性ゲル電気泳動における Ferguson プロットでは標準タンパク質として牛血清アルブミン(1 量体分子量 67KDa)の 1～5 量体を用いた。SDS-PAGE における Ferguson プロットでは標準タンパク質として、ホスホリラーゼ b (94KDa)、牛血清アルブミン(67KDa)、オボアルブミン(45KDa)、カルボニックアンヒドラーゼ(30KDa)、β-ラクトグロブリン(18KDa)、リゾチーム(14.5KDa)を用いた。

8．免疫学的比較

8－1　抗体調製

ウサギ(日本白色、メス、約 2kg) 2 羽を免疫した。大腸菌 NFD は調製用 SDS-PAGE で 48KDa. のタンパク質を調製し抗原とした。大腸菌 NFD 約 10 μg、大腸菌 NQR-2 約 100 μg、*V.alginolyticus* NQR-1 約 100 μg と Freund の完全アジュバントを混合し後足フットパッド部等に投与した。2 週間後同様の投与、さらに 2 週間毎に 1/2 のタンパク質量を Freund の不完全アジュバントと共に投与した。抗体産生はイムノブロッティングにより確認した。抗体産生が確認された個体を追加免疫し、1 週間後採血し抗血清を得た。

V.alginolyticus NQR-1 の抗血清は、以下の方法で非特異的抗体を除去した。抗血清 15ml と浸透圧ショック法で調製した Nap1 の膜分画 100mg

を混合し、0°Cで1時間放置後、30,000×gで20分間、4°Cで遠心した。得られた上清に同じ処理を再度行った後、硫酸アンモニウムで1/3飽和として抗体を分画した。遠心分離により得られた抗体はリン酸緩衝生理食塩水15mlに溶解した。

8－2　イムノブロッティング

文献25の方法でSDS-PAGE後、アトー社製AE-6675型セミドライブロッティング装置を用いて、0.1Mトリス、192mMグリシン、5%メタノールを含む緩衝液中で2mA/cm_2の定電流で60分間 通電し、BIO-RAD社製ニトロセルロース膜にタンパク質をブロッティングした。　この膜をBIO-RAD社製キット、Immun-blotを用いて染色した。ブロッキング処理は1時間、一次抗体処理は抗血清の希釈率を200倍として1時間、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体処理は30分間、それぞれ行った。

9．タンパク質定量法

Lowryら(27)もしくはBradford (28)の方法に従った。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。

１０．試薬等

d-NADH、デオキシリボヌクレアーゼＩはSigma社、オキソノールVIはMolecular probe社、Bio-gel HTPはBio-rad社、$C_{12}E_8$は日光ケミカル社からそれぞれ購入した。ユビキノン-1はエーザイ(株)から、Liponox DC

H はライオン(株)から分与された。その他の試薬は、特級のあるものはすべて特級を使用した。

デュロキノールは Sigma 社製デュロキノンを 20mg/ml となるようエタノールに溶解し、少量の水素化ホウ素化カリウムで還元し、1M 塩酸添加後再結晶した。これをジメチルスルホキシドに溶解し、少量の 0.1N 塩酸を添加して -75° Cで保存した。濃度補正は、エタノール中、ε_{287nm}= 2.6mM^{-1}·cm^{-1}(29)を用いた。ユビキノール-1 は約 5mM のユビキノン-1 のエタノール溶液に小量の水素化ホウ素化カリウムを添加し、黄色が消えた後、少量の 0.1N 塩酸を添加し、過剰の水素化ホウ素化カリウムを分解して使用した。

結果の部

第 3 章　大腸菌呼吸鎖の NADH-quinone reductase 領域の解析

一般的に細菌呼吸鎖の NADH-quinone reductase は 2 種類に区別できる。即ち、第一のタイプの酵素はイオンを駆動しエネルギー共役するものであり、第二のタイプの酵素はエネルギー共役しないものである(30)。便宜上、以下ではエネルギー共役する酵素を NQR-1、エネルギー共役しない酵素を NQR-2 と呼ぶ。

大腸菌の場合、好気的呼吸鎖の NADH-quinone reductase 領域の酵素については以下の点が明らかにされている。即ち、1) 免疫電気泳動法から少なくとも 2 種類の NADH-quinone reductase の存在が指摘されており(31-33)、反転膜小胞を用いた解析から、 2) 細胞膜上には 2 種類の NADH-quinone reductase 活性が存在し、一方はプロトン駆動力を形成するので NQR-1 であるのに対し、他方はエネルギー共役しないので NQR-2 であり、3)NQR-1 は、NADH のアナログである d-NADH ともよく反応するのに対し、 NQR-2 は d-NADH と全く反応せず、4)NQR-1 は、NQR-2 に較べ、 NADH、d-NADH に対し高親和性であること、が報告され(34)、さらに 5)ESR による解析から NQR-1 の電子伝達反応には鉄ーイオウクラスターが関与することが報告されている(35,36)。しかしながら、NQR-1、NQR-2 のタンパク質として実体については不明である。

一方、Shapiro らは大腸菌細胞膜から NADH-quinone reductase を分画・精製し(37)、Young らは構造遺伝子のクローニング等を行っている(38-41)。これらの報告にある NADH-quinone reductase は共に、非共有結合型

FAD を含む分子量 47kDa の単一タンパク質である。しかし、この酵素と先の NQR-1、NQR-2 との関係については不明である。

従って、本菌 NADH-quinone reductase 領域の詳細な解析には NQR-1、NQR-2 を精製しその実体を明らかにすることが必要であった。

これらの酵素の精製に際し筆者が特に着目したのは細胞膜上の NADH-ferricyanide dehydrogenase 活性である。大腸菌細胞膜上には、キノンの他に、フェリシアナイド、メナジオン、DCIP 等を電子受容体とする活性が認められる。予試験の結果、これらの酵素活性のうちフェリシアナイドを電子受容体とする活性は最も比活性が高く、また大腸菌 NQR-1 の特異的な基質である d-NADH を電子供与体とした時も高い反応性を示した。ミトコンドリアの NADH-quinone reductase は、 NADH-ferricyanide dehydrogenase 活性を示すフラグメントを含んでいることはよく知られていたので(42,43)、大腸菌細胞膜の NADH-ferricyanide dehydrogenase 活性も、NQR-1 と何等かの関係を持つ可能性が考えられた。

そこで、NADH-quinone reductase 活性及び、NADH-ferricyanide dehydrogenase 活性の分離・精製法を検討した。続いて精製された酵素と、細胞膜分画の NQR-1、NQR-2 の性質を比較し、これらの関係を検討した。

1．NADH-ferricyanide dehydrogenase(NFD)と NADH-quinone reductase(NQR) の分離と精製

表 3-1 には以下に述べる精製の結果をまとめた。

1－1　膜分画の EDTA 処理及び、酵素活性の可溶化

一般に、呼吸鎖の酵素類は脂質二重層に組み込まれた形で存在してい

表 3-1 大腸菌細胞膜からの NFD、NQR の精製

d-NADH と反応する NADH-quinone reductase 活性は EDTA 処理により失われ、以降検出されないので表記していない。その活性は膜分画では NADH-quinone reductase 活性の 65～75% である。2nd DEAE-5PW の NQR 分画の回収率は最も比活性の高い分画だけを示した。実際の収率は 45% であった。

fraction	protein	NQR for NADH		NFD for NADH		NFD for d-NADH	
	(mg)	(units)	(u/mg)	(units)	(u/mg)	(units)	(u/mg)
membrane	1000	2380	2.38	3230	3.23	2780	2.78
EDTA treatment	487	1256	2.58	1802	3.70	1271	2.61
$C_{12}E_8$ treatment	255	696	2.73	1346	5.28	852	3.34
DEAE-Sephacel	105	306	2.91	834	7.99	763	7.27
1st DEAE-5PW							
NFD fraction	5.5	0	0	311	56.2	222	40.2
NQR fraction	1.7	57	37.7	3.9	2.30	8.6	5.08
2nd DEAE-5PW							
NQR fraction	0.11	11	82.4	0.7	6.66	0	0
Bio-Gel HTP							
NFD fraction	0.86	0	0	288	335	251	292

るものと考えられている(2)。この様なタンパク質を機能的に安定な状態で取り出し分画・精製を行うには、界面活性剤等による可溶化操作が必要とされる。　筆者が用いた方法では、膜分画を 5mM EDTA を含む緩衝液で洗浄することにより、マグネシウムイオンなどを膜との結合因子とするタンパク質類を除去した後、可溶化操作を行う。この EDTA 処理により、膜分画からは NQR-1 の特異的基質である d-NADH によるユビキノン-1 の還元酵素活性がほぼ完全に失われてしまい、NQR-2 の活性のみが保持される。しかしながら、EDTA 処理は今回筆者が精製した酵素の可溶化に重要である。即ち、NADH-quinone reductase 活性を指標とした場合、EDTA で処理しない膜分画からの可溶化率は、EDTA 処理した場合の 25% 程度に過ぎなかった。

また、EDTA 処理の過程で上清に NADH-ferricyanide dehydrogenase 活性が 40% 分離されたが、その性質から、この分離された酵素活性の 60～70% は膜分画調製時に混入する細胞質に由来するものであると考えられた。

以上により得られた EDTA 処理後の膜分画から、酵素活性を可溶化するためいくつかの界面活性剤を検討した結果、 非イオン性界面活性剤 $C_{12}E_8$ により、NFD 活性は 75%、NQR 活性は 55%、それぞれ可溶化することが出来た。

１－２　DEAE-Sephcacel カラムクロマトグラフィー

$C_{12}E_8$ 可溶化分画を部分精製及び核酸除去目的のため、$C_{12}E_8$ 共存下に D EAE-Sephacel カラムにかけた。本過程の前後で A_{260}/A_{280} の比を 1.1 から 0.

8 に減少させることが出来た。

1－3　TSK gel DEAE-5PW HPLC

1－2 で得た DEAE-Sephcacel 分画までは界面活性剤として $C_{12}E_8$ を添加していたが、以降の精製にはより可溶化力が強く良好な分離結果が得られる非イオン性界面活性剤 Liponox DCH を用いた。なお、高濃度の Liponox DCH 中では、酵素類はより不安定になるため、DEAE-5PW 時の Liponox DCH 濃度は 0.1% に設定し、カラムから酵素を溶出後、迅速に Liponox DCH 濃度を 0.02% まで下げることで失活を抑制した。

図 3-1 中に示した塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出を行ったところ、　保持時間約 50 分（270mM 塩化ナトリウム）で NADH-ferricyanide dehydrogenase 活性が、　約 75 分（320mM 塩化ナトリウム）で NADH-quinone reductase 活性がそれぞれ溶出され、両者を分離することが出来た。そこで NADH- ferricyanide dehydrogenase を NFD、NADH-quinone reductase を NQR と名付けた。そのほか 60 分付近に NFD、NQR の小さなピークが認められたが、以降の精製では主たるピークでより比活性の高い、50 分付近の NFD 及び、75 分付近の NQRを用いた。

1－4　NQR の DEAE-5PW による再クロマトグラフィー

1－3 で分離した NQR は、再び TSK gel DEAE-5PW HPLC にかけることによりさらに精製を進めた。第一回と同条件下、緩衝液総容量 330ml で、150mM から 400mM までの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出を行った。表 3-1 に示した様に、この過程で最も比活性の高い画分は、リクロマト以前の約 2 倍に精製できた。

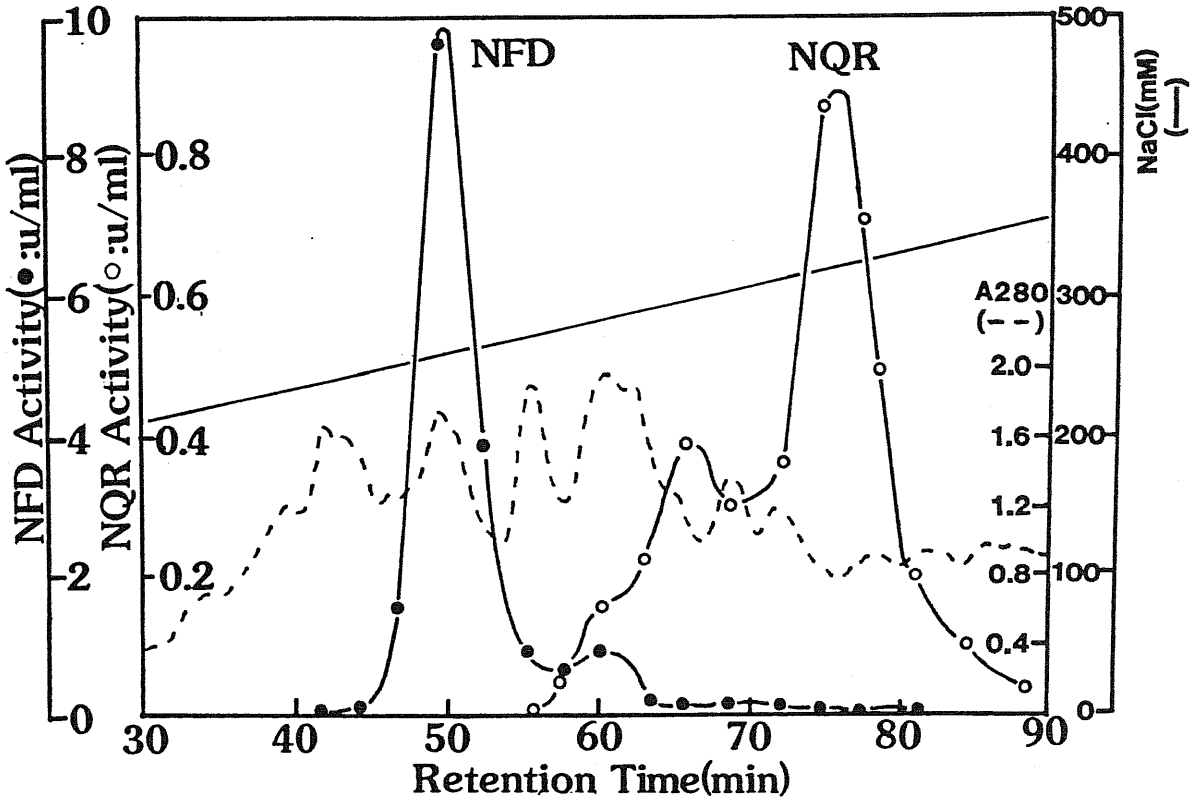


図 3-1 1st TSK gel DEAE-5PW HPLC の溶出パターン

DEAE-Sephacel 分画約 75mg を負荷し、150mM 塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄後、図中に示した塩化ナトリウムの濃度勾配で溶出した。●は NFD の活性を、○は NQR の活性を表す。

1－5　NFD の Bio-gel HTP クロマトグラフィー

一方、1－4で分画したNFDの精製にはBio-gel HTPを用いた。カラム条件を検討した結果、図3-2のb、cに示すようにFMNを共存させることにより酵素の失活を防げることが明らかとなった。即ち、NFD溶出位置はFMNの有無に関係なく同一であったが、回収率及び、ピーク部分の比活性ともFMN存在下の場合がより高かった。なおこの保護効果はFADでは置き換えられなかった。このFMNの効果は後述する様にNFDがFMN含有タンパク質であるためと思われる。

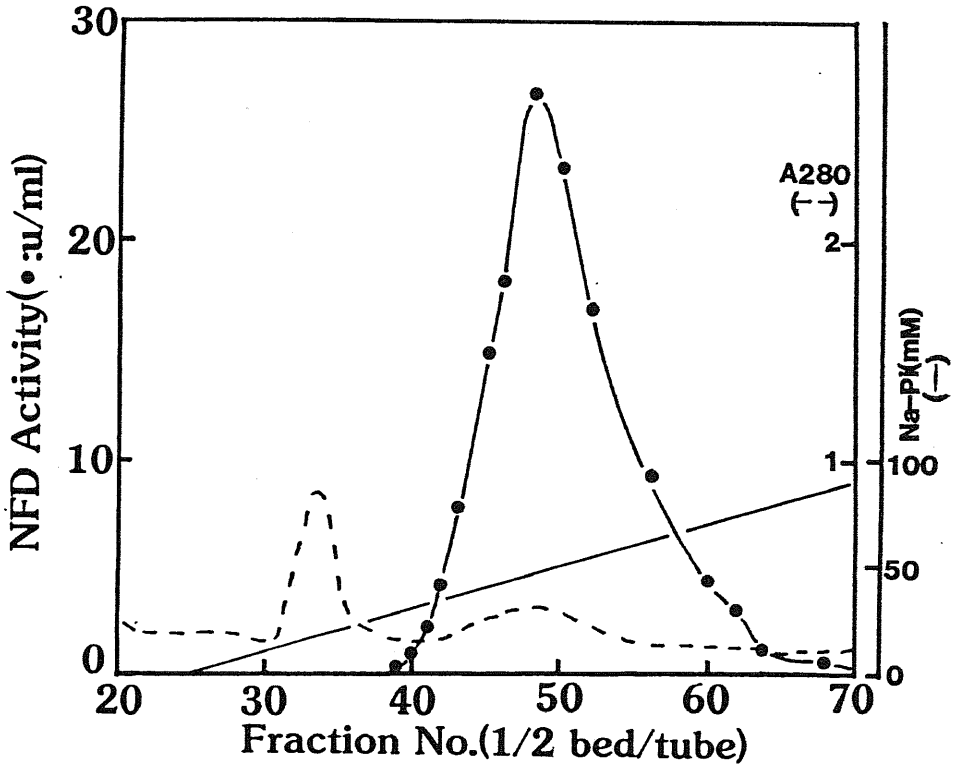
そこで、10μM FMN共存下で精製を行った結果、図3-2aに示したようにNFDはリン酸濃度約70mMで溶出された。

以上の精製の結果、膜分画から、基質特異性の異なる2種類の酵素、即ち、NFD、NQRを分画・精製することが出来た。EDTA処理後の膜小胞分画と比較した場合、表3-1に示したように、NFDは比活性で約90倍に精製され、収率は約15%、NQRは比活性で約35倍に精製され、収率は2%であった。

2．精製酵素の蛋白質組成とフラビン分析

2－1　NFD、NQRのタンパク質組成

以上精製されたNFD、NQRをSDS-PAGEにかけた。図3-3aに示したようにNFDには分子量約48kDa、96kDaのものが主たるバンドとして認められたが、種々の分画を検討した結果、48KDaのものが活性の本体と考えられた。一方、NQRは図3-3bに示したように分子量約47kDaのバ



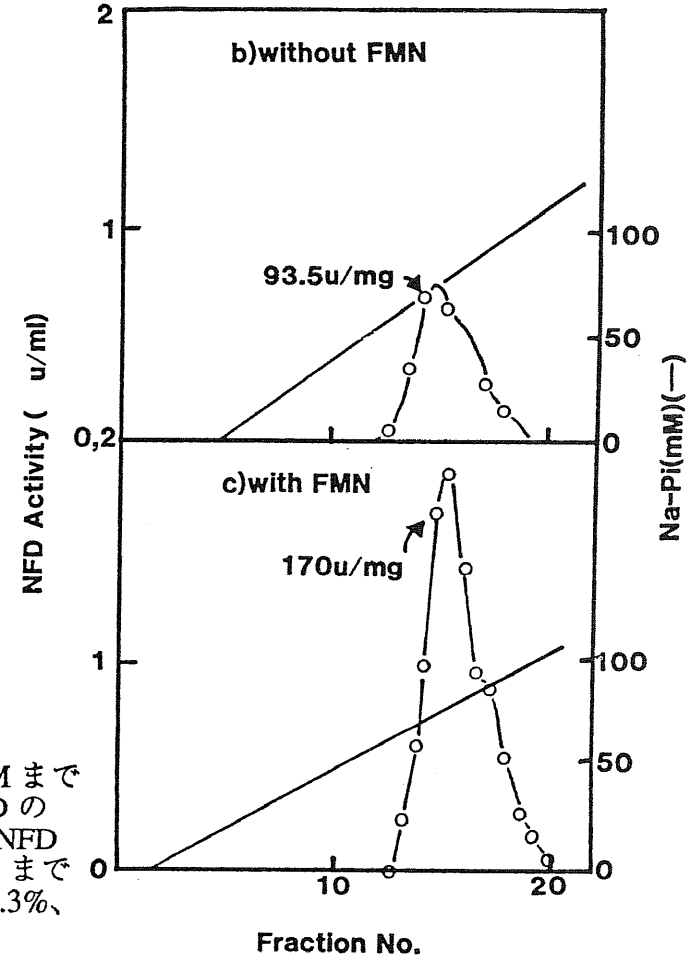


図 3-2 Bio-gel HTP における NFD の溶出パターン

a) 1st TSK gel DEAE-5PW HPLC の NFD 分画約 19 mg を負荷し、0～100mM までのリン酸ナトリウム (pH 7.5) を含む緩衝液の濃度勾配で溶出した。●は NFD の活性を示す。b,c) カラムにおける FMN 共存の効果を示した。○はそれぞれ NFD の活性を表す。b) FMN 非存在下、または c) 10 μM FMN 存在下、0～200mM までのリン酸ナトリウム (pH 7.5) の濃度勾配で溶出した。活性の回収率は、b)52.3%、c)100.8%、比活性は、b)2.8 倍、c)5.0 倍上昇した。

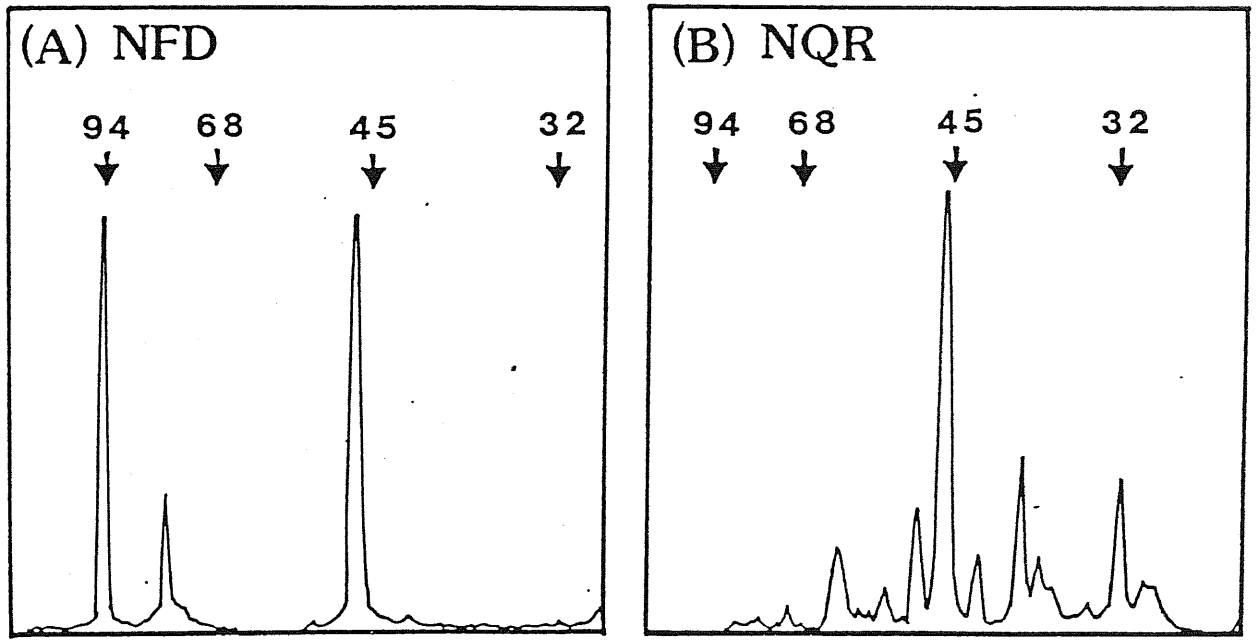


図 3-3 NFD、NQR の SDS-PAGE

比活性 498 units/mg の NFD と比活性 87 units/mg の NQR を 8% 濃度のゲルで泳動し、デンシトメトリーでスキャンした結果を示した。図中の数字は KDa 単位で表した各標準タンパク質の泳動位置である。

ンドが濃縮されていた。なお、結果は示さないが、SDS の代わりに 0.1 % Liponox DCH を添加し、タンパク質を活性を保持したまま泳動後、活性染色法により特定された活性バンドを切り出し、SDS-PAGEで分析しても、これらのバンドが確認された。

2－2　フラビンの分析

精製した NFD と NQR のフラビン含量を定量した。表 3-2a に示した通り、NFDは 1mg タンパク質あたり 12.7nmol の FMN を含んでおり FAD は検出されなかった。精製の最終段階である Bio-gel HTP カラムは FMN 共存下で展開されている。そこでその前段階である DEAE-5PW 分画の NFD を分析をしたところ、同様に FMN が主たるフラビンであった。従って、最終標品で検出された FMN は精製過程から混入したものではないと考えられる。一方、NQR は 1mg タンパク質当り 3.0nmol の FAD を含んでおり、また FMN は総フラビンの 4% に過ぎなかった。なお、FMN、FAD の確認は薄層クロマトグラフィーにより行った。

以上より NFD は FMN を、NQR は FAD を補酵素とすることが分かった。

3．精製酵素の性質

3－1　マグネシウムイオン及び、界面活性剤要求性

NFD、NQR とも、活性測定の際、マグネシウムイオンが存在すると顕著な活性の増強が認められた。NFD の場合、図 3-4 の左図に示したように、マグネシウムイオン濃度約 20mM でほぼ最大活性が得られ、マグ

表 3-2 NFD、NQR のフラビン含量

Bio-gel HTP カラムの段階で NFD 分画に添加された FMN はゲル濾過により除いた。FMN、FAD の確認は薄層クロマトグラフィーにより行った。

Enzyme	Flavin(nmol/mg)		Activity
	FAD	FMN	U/mg(NQR or NFD)
NFD	n.d.	12.7 (100%)	498(as NFD)
NQR	2.97 (95.8%)	0.13 (4.2%)	82.4(as NQR)

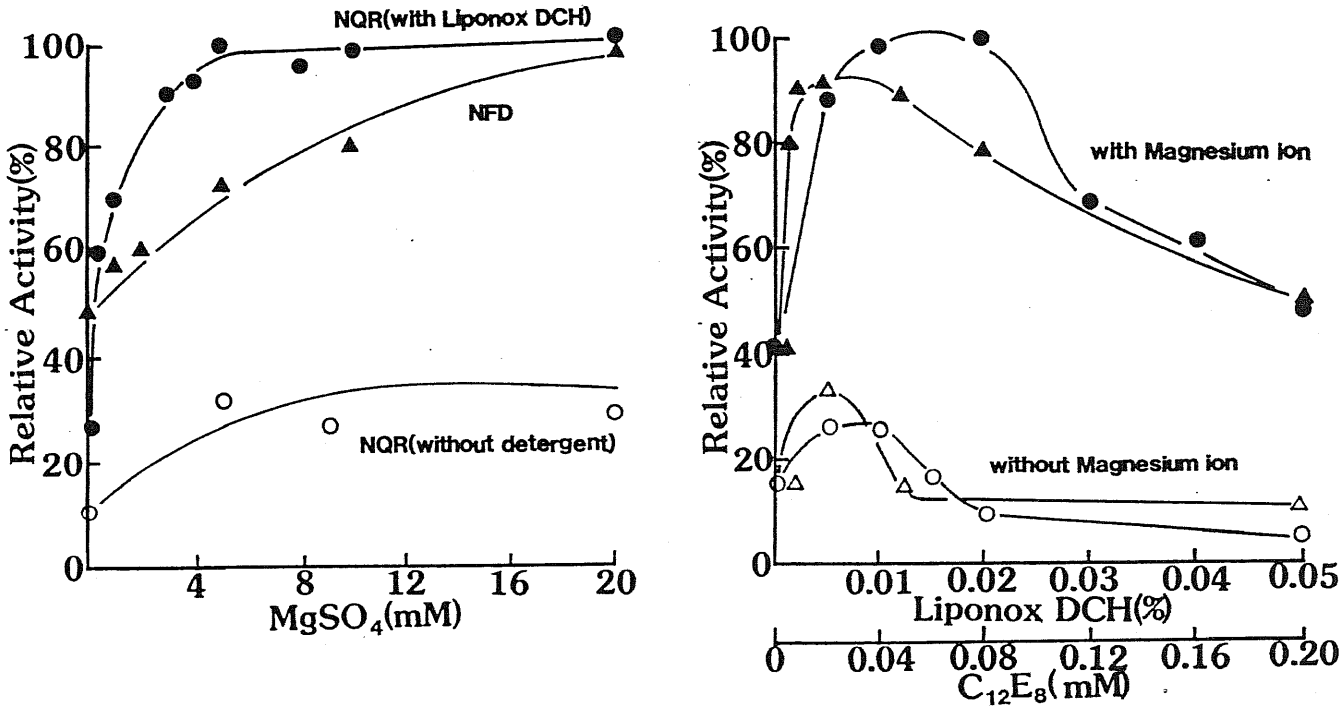


図 3-4 NFD、NQR の酵素活性に対するマグネシウム、界面活性剤の効果
左図）：NFD、NQR に対するマグネシウムイオンの影響、○：界面活性剤非存在下のNQR の活性；●：Liponox DCH 0.02% 存在下の NQR の活性、▲：NFD の活性。右図）：NQR に対する非イオン性界面活性剤の効果、○：硫酸マグネシウム無添加、Liponox DCH；●：硫酸マグネシウム 5mM 存在下、Liponox DCH；△：硫酸マグネシウム無添加、$C_{12}E_8$；▲：硫酸マグネシウム 5mM 存在下、$C_{12}E_8$。

ネシウム非存在下に比べ、その活性は約2.5倍に増加した。この様な効果は膜分画及び、精製初期段階の分画でも認められた。一方、NQR の場合、最大活性は約 5mM で得られ、特に 0.02% Liponox DCH の共存下では活性は約 4 倍に増加した。

図 3-4 の右図には NQR に対する界面活性剤の効果を示した。Liponox DCH、$C_{12}E_8$ どちらによっても活性は増加した。図中にはマグネシウムイオンが存在しない場合の界面活性剤の効果を併せて示した。同様の界面活性剤の効果は Shapiro らが精製した NADH-quinone reductase でも報告されている(37)。なお、NQR に対する界面活性剤の効果は $C_{12}E_8$ による可溶化操作以前の分画では認められなかった。一方、NFD は、用いた濃度では Liponox DCH 等の非イオン性界面活性剤によってはその活性に顕著な影響は受けなかったが、0.05% SDS が反応液中に存在すると活性は完全に失なわれた。

3－2　基質特異性

表 3-3 には、NFD、NQR の各基質に対する特異性を示した。

NFD の場合、NADH、d-NADH どちらとも高い反応性を示した。また、用いた電子受容体のうち、フェリシアナイドの場合に最も高い活性が得られた。一方、ユビキノン-1 をキノールに還元する活性は全く認められなかった。

NQR の場合、どの電子受容体を用いた場合でも d-NADH とは全く反応しなかった。一方、NADH を電子供与体とした場合、用いた電子受容体のうち、ユビキノン-1 の場合に最も高い活性を示した。また、フェリシアナイドとも僅かに反応し、その比活性はユビキノン-1 を電子受

表 3-3 NFD、NQR の基質特異性

NQR と d-NADH とは全く反応しなかった。各電子受容体濃度は方法の部に示した。NFD、NQR の各電子受容体に対する酵素活性を u/mg 単位で示した。

enzyme	donor	Q-1	ferricyanide	menadione	DCIP
NQR	NADH	82.4	6.66	9.25	1.93
NFD	NADH	0	335	7.68	24.9
	d-NADH	0	292	8.23	18.6

容体とした場合の約 10 分の 1 であった。

これらの酵素はメナジオン、DCIP とも弱いながら反応性を示した。

3－3　阻害剤の効果

図 3-5 には、NQR に対する NADH dehydrogenase の阻害剤の効果を示した。

NQR は、ミクソチアゾール、HQNO では阻害されなかったが、ジクマロール、5'-AMP では強く阻害された。既に報告された NADH-quinone reductase は 5'-AMP に高感受性(37)であり、ここで精製した NQR はこれと同様の性質を示した。

一方、NFD はここで用いたどの阻害剤によっても阻害されなかった。

4．NFD、NQR と細胞膜上の NQR-1、NQR-2 の性質の比較

4－1　電子供与体前処理による効果

大腸菌細胞膜上に存在する NADH dehydrogenase 活性を電子受容体の存在しない条件で、電子供与体と前処理するとその活性が減少するという現象は、Gutman ら(44)、Matsushita ら(34) らにより報告されてるが詳細には検討されていなかった。今回精製された NFD は、予試験の段階で電子供与体前処理により容易に失活することが分かったので、この性質を詳細に検討し以下の解析に利用した。

図 3-6a,b には、NFD、NQR を電子受容体でフェリシアナイドまたはユビキノン-1 の存在しない条件で、電子供与体により前処理した時の活性に対する影響の経時変化を示した。実験は、反応液中で酵素を電子供

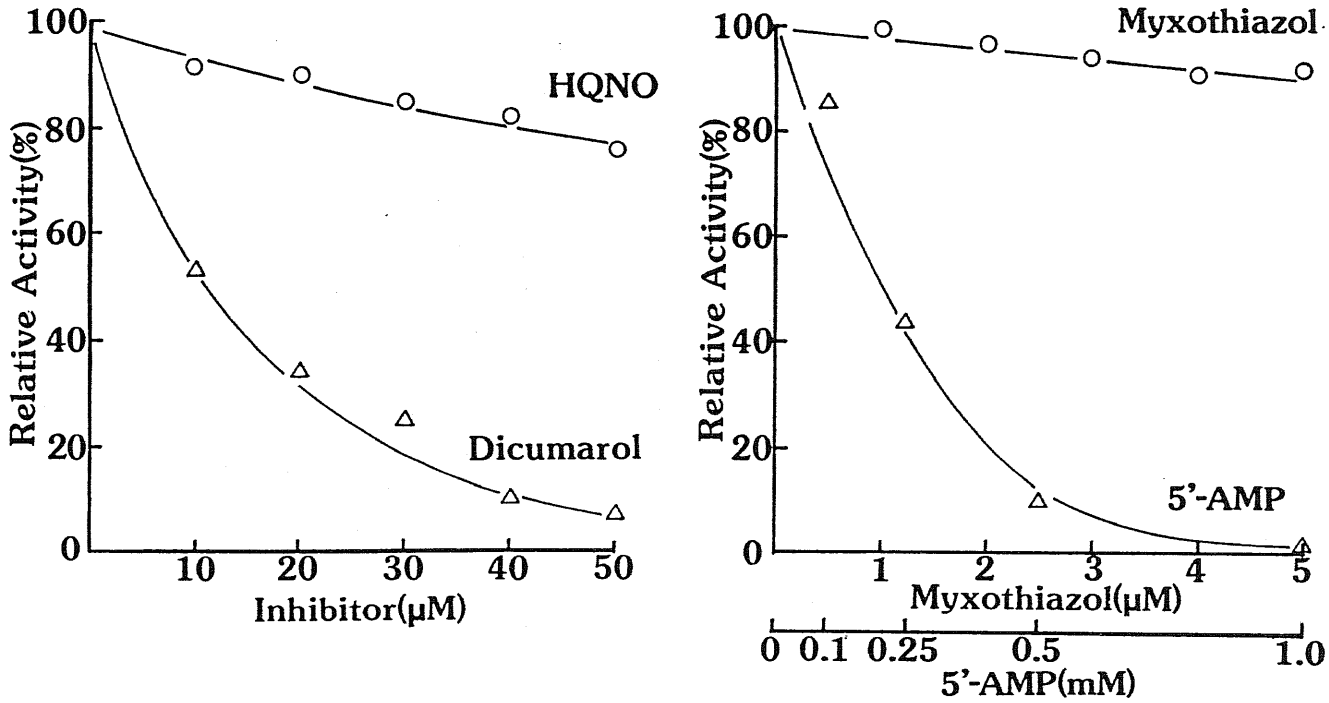


図 3-5 NQR に対する阻害剤の効果

左図：HQNO、ジクマロールを 0 から 50μM の範囲で使用した。右図：ミクソチアゾールを 0 から 50μM、5'-AMP を 0 から 1.0mM の濃度範囲で用いた。全ての測定は酵素を阻害剤と 30 秒間、30°C で前処理した後行った。

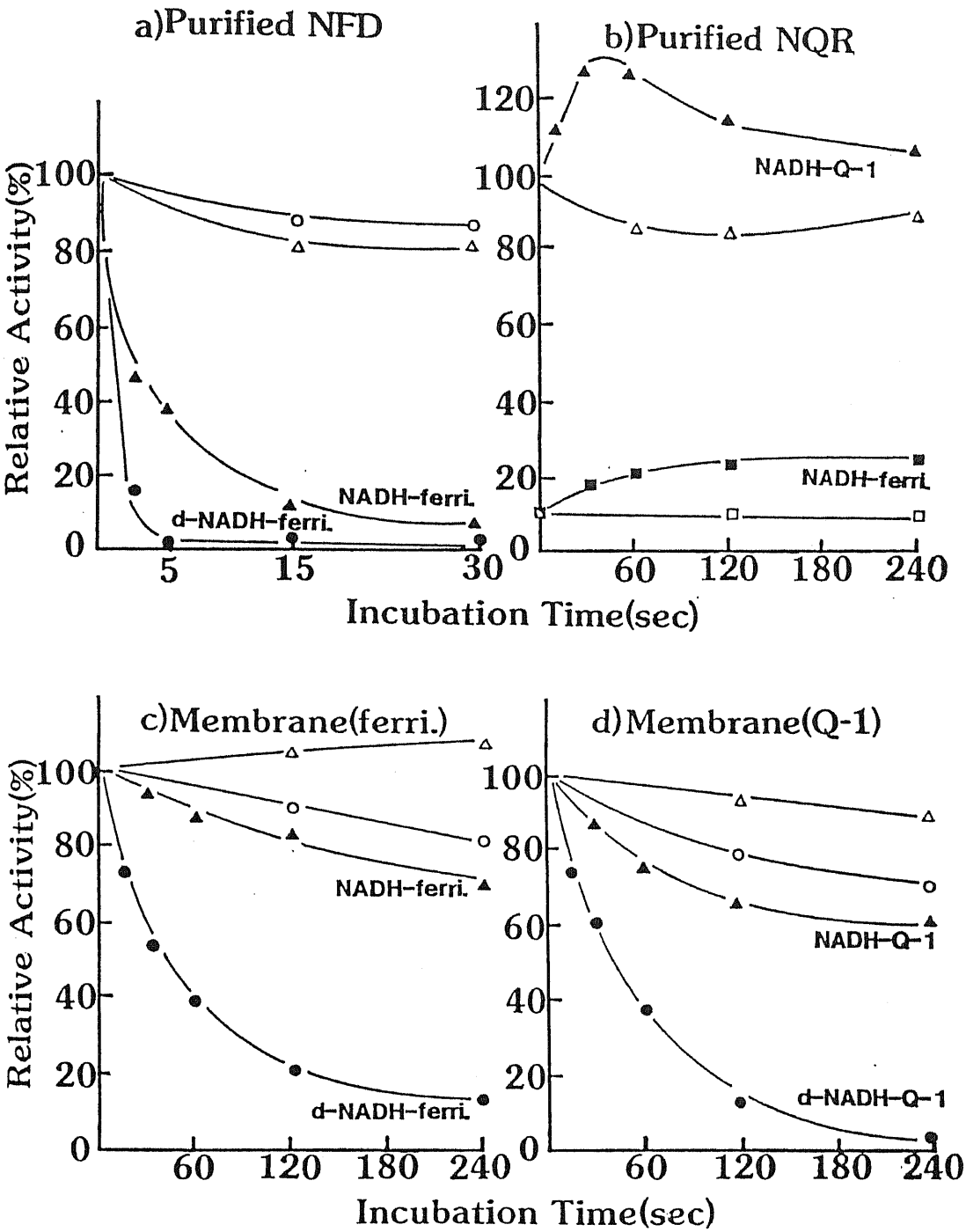

a)Purified NFD
b)Purified NQR
c)Membrane(ferri.)
d)Membrane(Q-1)
Relative Activity(%)
Incubation Time(sec)
NADH-ferri.
d-NADH-ferri.
NADH-Q-1
d-NADH-Q-1
0
20
40
60
80
100
120
5
15
30
60
120
180
240

図 3-6 精製NFD、NQR 及び膜分画の酵素に対する電子供与体前処理の効果

実験は、反応を電子受容体の添加で開始した他は、方法と材料の部に示した条件で行った。上段は精製した NFD、NQR の場合、下段は膜小胞分画の場合である。図中の”NADH-ferri.”などの記号は、黒塗のシンボルの場合、NADH とインキュベーションしフェリシアナイドを添加して活性を測定したことを表し、白抜きのシンボルの場合、酵素のみをインキュベーションして、NADH からフェリシアナイドへの電子伝達反応の活性を測定したことを表す。電子受容体と前処理した場合の酵素活性は、酵素のみの場合と変わらなかった。

なお、精製した NFD の失活は FMN により保護される。Bio-Gel HTP 時に NFD 分画には FMN が添加されているので、この実験では、1st TSK DEAE-5PW 段階の標品を用いた。測定時のタンパク質濃度はフェリシアナイドを電子受容体とした場合、50μg/ml、Q-1 の場合 6.3μg/ml で行った。各反応の 100% の実際の値は以下の通りである。精製した NFD :d-NADH-ferri. 27u/mg NADH-ferri. 38u/mg 精製した NQR :NADH-Q-1. 50u/mg NADH-ferri. 5.0u/mg 膜小胞上の酵素活性: d-NADH-ferri. 2.3u/mg NADH-ferri. 2.9u/mg d-NADH-Q-1 1.7u/mg NADH-Q-1 2.6 u/mg

与体添加、電子受容体添加または非添加の条件で30°Cで図中に示した時間インキュベーションした後、残りの基質を添加し反応を開始することにより行った。

NFDの場合、図3-6aに示したように、電子供与体、特にd-NADHによる前処理で非常に容易に活性を失った。しかし、酵素のみの場合、または電子受容体と前処理した場合、では活性はほとんど変動しなかった。

NQRの場合、NFDとは逆に、図3-6bに示したようにNADHでの前処理によりユビキノン-1、フェリシアナイド、どちらを電子受容体とした場合でも、活性の増強が認められた。ユビキノン-1を電子受容体とした場合、その活性化の程度は最大で1.3倍前後だったが、フェリシアナイドを電子受容体とすると、比活性で3倍程度の活性化が認められた。なおNQRをd-NADHで前処理した後、NADHを添加し活性を測定した場合には、この様な活性化は認められなかった。

以上から、NFDは、電子供与体前処理により特異的に失活することが分かった。一方、NQRは同様の処理により、NADHによってむしろ活性化されることが分かった。このNQRとNFDの違いは、NFDの特異的失活反応として利用できる。

そこでこの方法を用い、膜分画の酵素類の解析を行った。図3-6cに示したように、d-NADH前処理の場合、膜分画のd-NADH-ferricyanide dehydrogenase活性は、精製したNFDと同じく、容易に失活する性質を示した。同様の性質は図3-6dに示したように、d-NADHと反応するNADH-quinone reductase活性、つまりNQR-1にも認められた。しかも、この時の両者の失活パターンはよく相関していた。

一方、NADH前処理の場合、図3-6c,dに見られるようにNADH-ferri-

cyanide dehydrogenase 活性、NADH-quinone reductase 活性は部分的な失活しか起こさなかった。この残存活性は、先に述べた精製した NQR で認められた NADH との前処理による活性化の性質が寄与すると考えられた。

以上の結果から、d-NADH と反応する酵素群、即ち、精製した NFD、膜小胞分画の d-NADH-ferricyanide dehydrogease 活性及び NQR-1 は、d-NADH での前処理により容易に失活するという性質を持つことが明らかとなった。この失活のメカニズムは、膜分画を用いた解析の際、電子伝達をユビキノン-1 やフェリシアナイドへバイパスさせる方法としてシアン化カリウムの代わりに、窒素置換により嫌気条件とした場合でも同様の失活が起こることから、これらの酵素が還元型になるためと考えられた。

なお、図 3-7 に示したように精製した NFD の失活は FMN が共存することにより部分的に抑制された。実験は電子供与体前処理の際、横軸に示した濃度の FMN または FAD を共存させ、非添加の場合と比較することにより行った。FMN の代りに FAD を用いた場合にはこの失活抑制は認められず、この効果は FMN に特異的であった。

4－2　反応速度論的解析

次に精製酵素及び、膜分画の酵素活性の、NADH、d-NADHに対する反応速度論的解析を行った。

NFD の場合、表 3-4a に示したように、d-NADH、NADH に対する見かけのミカエリス定数 (Km) はそれぞれ、8.8 μM、7.3 μM であった。一方、NQR の場合、ユビキノン-1 への電子伝達反応を測定すると、NA

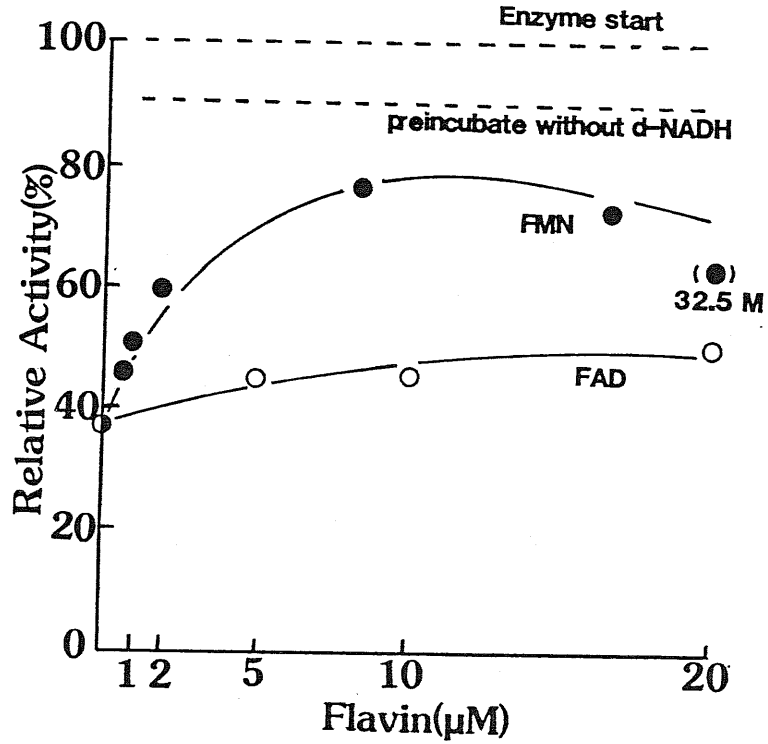


図 3-7 NFD の電子供与体前処理による失活の FMN による保護

Bio-Gel HTP カラム後の NFD 分画は標品中に10μM FMN を含む為、0.2mM d-NADH で30 秒間、前処理すると 36% 程度までのみ失活する。この前処理の時、同時にフラビンを添加し、その効果を調べた。（）内は 32.5μM FMN を添加した場合である。

表 3-4 NFD、NQR 及び、膜分画酵素の反応速度論的解析

反応は、材料と方法の部に述べた条件で行い、Q-1 を電子受容体とする反応は、NADH、もしくは d-NADH の減少で酵素活性を測定した。a)は、図 3-8 の両逆数プロットの実験結果から求めた値である。a)精製された酵素の NADH、d-NADH に対する見かけのミカエリス定数。b)膜小胞上酵素の NADH、d-NADH に対する見かけのミカエリス定数。

a)

Reaction measured	Km(μM)	
NADH-Q-1	19.1±4.2	43.0±2.0
d-NADH-Q-1	21.7±0.7	——
NADH-ferri.	19.1±2.7	
d-NADH-ferri.	19.9±1.6	

b)

enzyme	status	reaction measured	Km(μM)
NQR	non-activated	NADH-Q-1	96.5±12.7
	activated		48.3± 3.2
	non-activated	NADH-ferri.	45.2± 9.2
	activated		43.8± 8.9
NFD	——	NADH-ferri.	7.3± 0.9
		d-NADH-ferri.	8.8± 1.0

DHに対する見かけのKmは97μMであった。4－1で示した、電子供与体前処理による活性化操作後では、Kmは48μMとなり、この活性化がNADHへの親和性の変化によるものであることが示唆された。一方、NQRのフェリシアナイドへの電子伝達反応の活性を測定した場合のNADHに対する見かけのKmは約44μMであり、電子供与体処理前後で変化はなかった。

以上より精製酵素ではNFDはNQRに比べ電子供与体に親和性が高いことが分かった。

図3-8には膜分画の解析結果を両逆数プロットで表した。このNADHからユビキノン-1への反応では両逆数プロットは明かな二相性を示し、各々のNADHに対する見かけのKmを求めると、高親和性のものは19μM、低親和性のものは43μMであった。一方、d-NADHを用いた場合には、この様な二相性は示さず、Kmは22μMであり、NADHを用いた場合の高親和性のものに相当した。NQR-1はd-NADHとも反応し、NQR-2はNADHのみと反応することから、これら2つのKmは高親和性のものがNQR-1の性質を、低親和性のものがNQR-2の性質を、それぞれ反映していると考えられた。この結果はすでに報告(34)されたものとも一致した。

一方、フェリシアナイドを電子受容体とした場合は、NADH、d-NADHどちらを用いた場合にも、Kmは高親和性のものしか定まらなかった。表3-4bには、膜小胞分画を用いた場合の解析の結果をまとめた。

以上から、d-NADHとも反応する酵素群、即ち、精製したNFD、膜小胞分画のNADH-ferricyanide dehydrogease活性及びNQR-1は、NADH、d-NADHどちらに対しても高親和性であるという共通した性質を持つこ

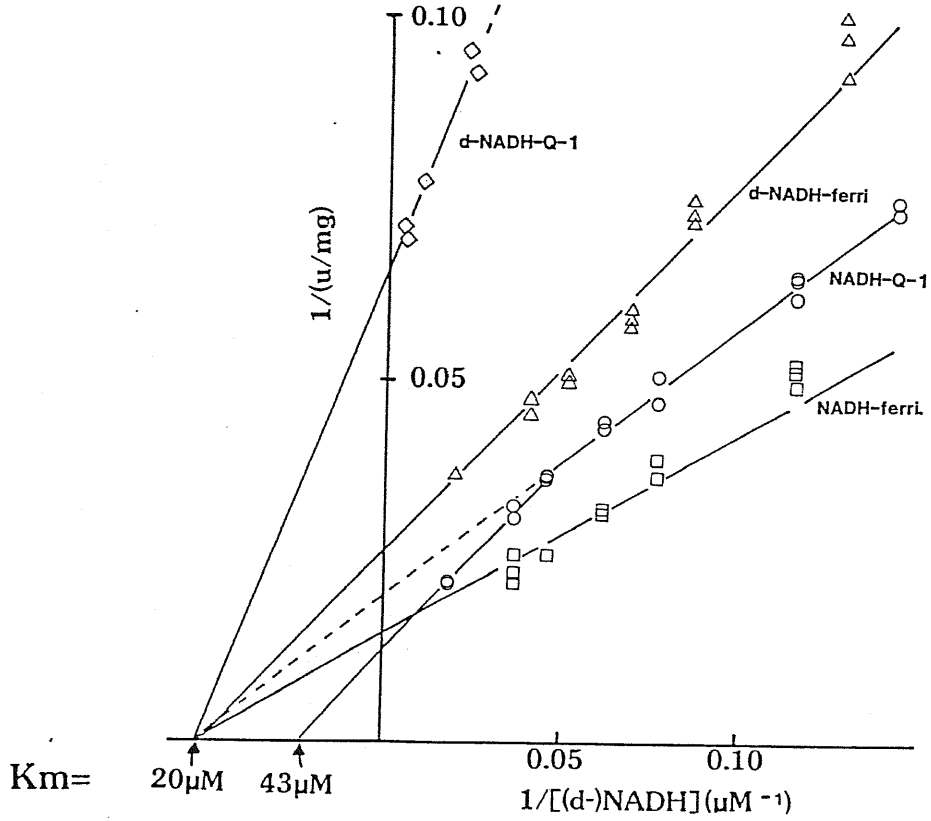


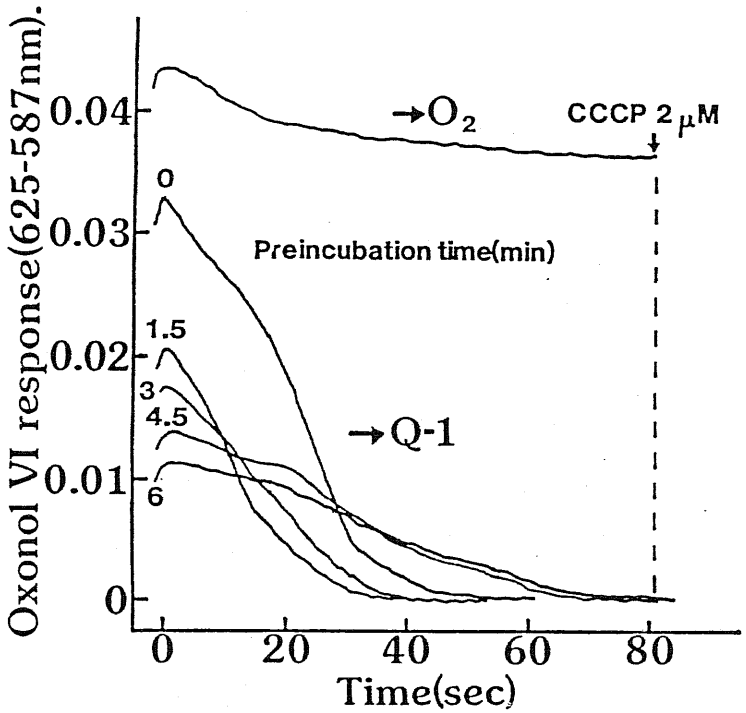
図 3-8 膜分画酵素に対する反応速度論的解析の両逆数プロット
解析結果を両逆数プロットで表した。直線回帰は文献 45 の方法に従った。図中の" d-NADH-Q-1" などの記号は、d-NADHからQ-1への電子伝達反応を触媒する酵素活性を測定したことを表す。Q-1 を電子受容体とする反応では、NADH、もしくは d-NADH の減少で酵素活性を測定した。

とが分かった。精製したNFDの値が変化しているのはリン脂質等の影響であると推定される。　これに対し、NADHのみと反応する酵素群、即ち精製したNQR、膜分画のNQR-2は、NADHに対して親和性が低いという逆の性質を持つことが分かった。また、NQRに存在するNADHからフェリシアナイドへの電子伝達を触媒する酵素活性もNADHに対し低親和性の性質を持ち、この活性がNFDの混在によるものではないことがここでも示された。

4－3　反転膜小胞の膜電位形成能と酵素活性の関係

図3-9には、反転膜小胞の膜電位形成の様子及び、酵素活性との関係を示した。左図のトレースa,bに示した通り、ユビキノン-1を電子受容体とした場合、NADH、d-NADHどちらによっても膜電位が形成された。この時、膜電位がほとんど維持されないのは、非常に多量の膜小胞を用いているため、基質であるユビキノン-1が即座に消費されるからである。一方、図中には示さないが、フェリシアナイドを電子受容体とした場合には、NADH、d-NADHどちらによっても膜電位は形成されなかった。この膜電位形成能に対しても4－1で述べた電子供与体前処理を行ったところ、図3-9、左図のトレースc,dに示した様に、NADH、d-NADHどちらと前処理しても膜電位形成能は減少し、前処理をしない場合の約30%となった。しかも、NADHで前処理した場合は、d-NADHで前処理した場合に較べ、膜電位がほとんど維持されないことから、NADHとの前処理で失活しない酵素は膜電位の形成を伴わずユビキノン-1を消費した。

次に、この膜電位形成能と各酵素活性の関係を詳細に検討するため、



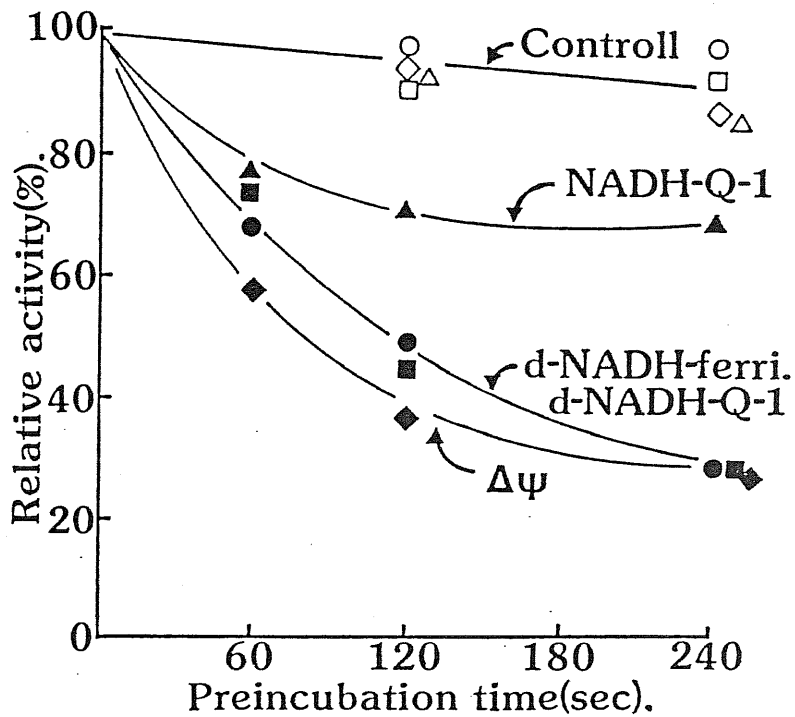


図 3-9 反転膜小胞の膜電位形成及び、酵素活性に対する電子供与体前処理の効果

酵素活性の測定、膜電位測定とも同じタンパク質濃度、オキソノール存在下で行った。左図：トレース a,b は電子供与体前処理を行わない場合である。トレース c,d は反転膜小胞を 0.1mM NADH(トレース c)もしくは 0.1mM d-NADH(トレース d)で 6 分間前処理した後、Q-1 を加えて反応を開始した。右図：全ての酵素活性測定は膜電位測定と同条件で行った。黒塗りのシンボルは d-NADH と、白抜きのシンボルは酵素のみを示した時間インキュベーション後、それぞれ基質を加えて反応を開始した。

電子供与体前処理を行った時の酵素活性の経時変化を調べた所、図 3-9、右図に示したように、d-NADH と前処理することにより、膜電位形成能の減少と、 d-NADH-ferricyanide dehydrogenase 活性及び、 d-NADH-quinone reductase 活性の失活は平行して起こった。一方、d-NADH との前処理後、0.1mM NADH を添加し、NADH-quinone reductase 活性を測定すると、この活性は充分に保持されており、膜電位形成能の失活とは相関しなかった。

以上の結果から反転膜小胞における膜電位形成能も電子供与体前処理に感受性であり、その失活は NADH-ferricyanide dehydrogenase 活性の失活と相関することが分かった。 また、 d-NADH と反応するNADH-quinone reductase のみが膜電位形成を行うことが分かり、これは以前の報告(34)とも一致した。

5．考察

5－1　分画・精製及び精製酵素の性質

大腸菌細胞膜から NFD、NQR を異なる画分として精製することに成功した。NFD の本体は分子量約 48kDa のものであり、NQR は 47KDa のものである。

NFD は、FMN を補酵素とし、マグネシウムイオンにより顕著に活性化される。本酵素は、電子供与体前処理により非常に容易に失活するという特徴を持つ。この失活が FMN で特異的に抑制されること、精製の際に FMN が必要であることから、NFD に含まれる FMN は補酵素として確かに機能していると考えられる。

このNFDに類似した性質を持つ大腸菌細胞膜由来のNADH-ferricyanide dehydrogenase活性を持つ分画はGutmanらにより報告(44)されているが、彼らの用いた分画は、凍結・融解した膜小胞分画の洗液であること及び、その性質から、筆者の精製したNFD、NQRが混在するものであると考えられる。　この報告を除いては、大腸菌細胞膜のNADH-ferricyanide dehydrogenase活性に着目した解析はほとんど行われておらず、筆者の得たNFDは、本菌細胞膜からの、フェリシアナイドに特異性の高いNADH-dehydrogenaseの精製例のはじめてのものである。また、NFDの性質は、NQRとは大きく異なるので、NFDがNQRに由来するものでないことは明らかである。

一方NQRは、FADを補酵素とし、その酵素的性質から、既に分画・精製され、また遺伝学的解析から明らかにされている大腸菌呼吸鎖のNADH-quinone reductase(37-41)と同一のものと考えられる。また、このNQRの新たな特徴として、マグネシウムにより活性化されることが分かった。

5－2　精製酵素と膜小胞分画の酵素活性の関係

精製されたNFDと膜分画のNADH-ferricyanide dehydrogenase、特に、d-NADH-ferricyanide dehydrogenaseの活性は、電子供与体前処理で容易に失活すること及び、電子供与体に対し高親和性であることから、NFDが、膜分画のd-NADH-ferricyanide dehydrogenaseであることは明らかである。

次に、NFDの性質と、エネルギー共役型酵素であるNQR-1の反応を比較検討すると、a)NFDとNQR-1は電子供与体に対する特異性が同じであり、b)電子供与体前処理により両者とも容易に失活し、膜分画では両

者の失活が平行して起き、c)これらの酵素は電子供与体に高親和性を持つ。従って両者は、電子供与体との反応という面からは、全く同一のものであると考えることが出来る。しかしながら、d)NFD はユビキノン-1 をキノールに還元せず、e) 膜分画の NFD は膜電位形成能を持たない。それ故 NQR-1 の反応のいわば後半段階では両者は異なる性質を持つ。

一方、NQR は、基質特異性、NADH に対する親和性、さらに電子供与体前処理に対する感受性とも、膜分画の NQR-2 のそれと一致した。従って、NQR は膜分画のエネルギー非共役型酵素である NQR-2 そのものであると考えられる。

以上から大腸菌呼吸鎖の NADH-quinone reductase 領域は図 3-10 に示すような構成を取ると考えられる。即ち、今回精製された NFD は NQR-1 のNADH との反応サブユニットである。NQR-1 の電子伝達反応には鉄ーイオウクラスターが関与する(35,36)ので、NFD 中の FMN を経由した電子は、この鉄ーイオウタンパク質を介してキノンへ伝達される。また、鉄ーイオウタンパク質部分でプロトン駆動力形成が行われると考えられる。なお、エネルギー共役型酵素である NQR-1 のフラビンタンパク質部分のフラビンが FMN であることは今回初めて明らかにされた事実であり、ミトコンドリアの対応酵素(42,43)と同様であったことは興味深い。一方、今回精製された NQR は NQR-2 の本体と考えられる。

以上により、大腸菌呼吸鎖の NADH-quinone reductase 領域の構成を明確にすることが出来た。

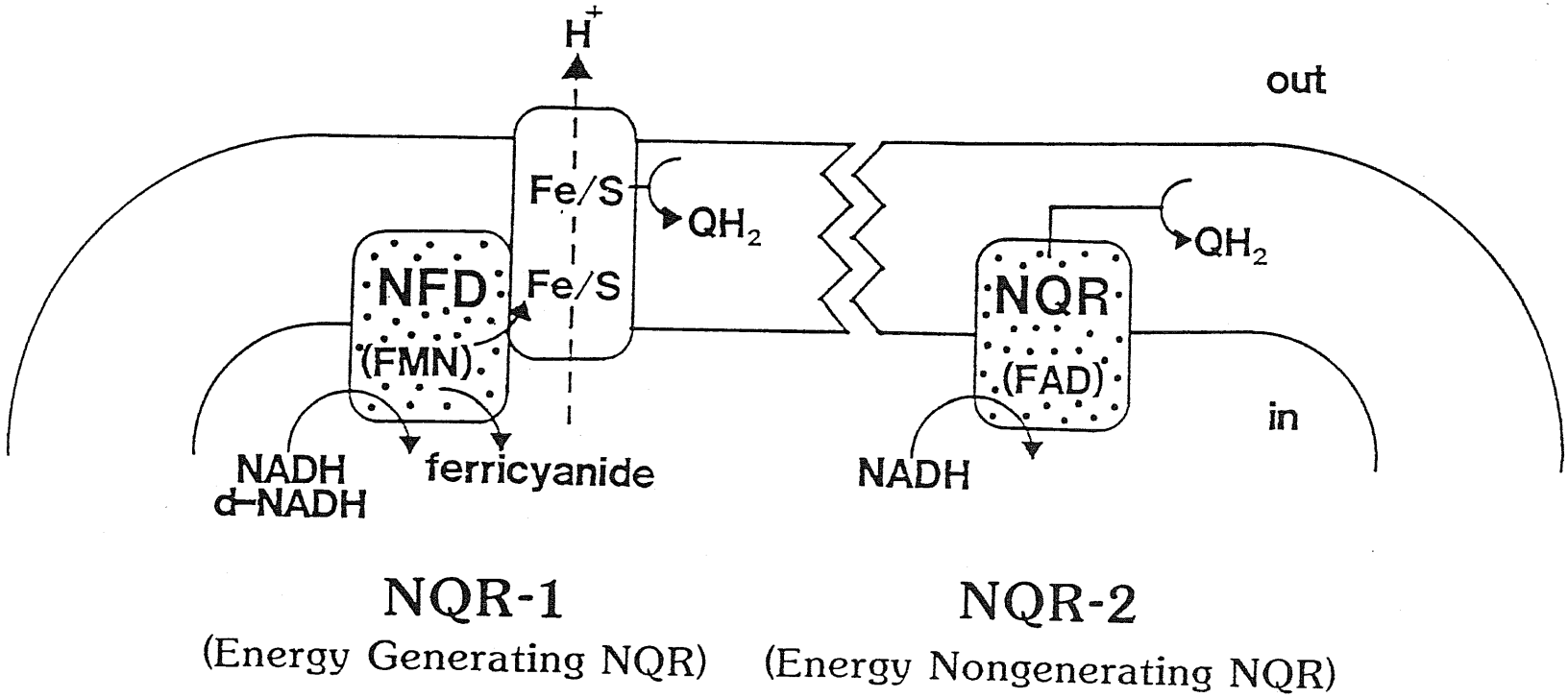


図 3-10 大腸菌呼吸鎖の NADH-quinone reductase 領域

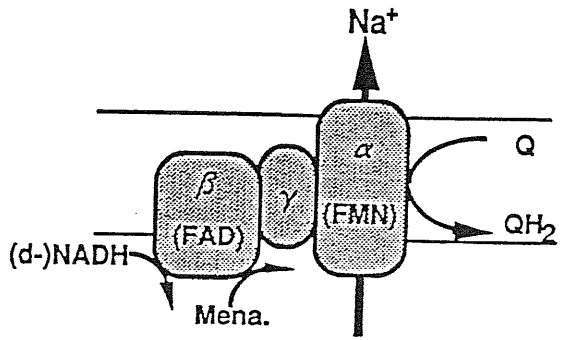
第４章　海洋細菌と大腸菌の NADH-quinone reductase の比較

呼吸鎖に共役したナトリウムポンプの存在は海洋細菌である *V.alginolyticus* において最初に報告された(5-7)。以降、海洋を主たる生育環境とする海洋細菌を始めとして多数の細菌にナトリウム駆動型呼吸鎖が存在する例が報告されており(1,8,46,47)、その存在は現在広く認識されている。　*V.alginolyticus* は大腸菌と同じグラム陰性桿菌であること、NADH-quinone reductase 領域について検討が進んでいること、さまざまな生化学的性状 について知見が得られていること(48-50)、から研究対照として適している。

本菌呼吸鎖の NADH-quinone reductase 領域にはナトリウム依存性とナトリウム非依存性の２種類の酵素活性が存在している(51)（図 4-1）。これは阻害剤や変異株を用いた実験より確認されている。　ナトリウム依存性 NADH-quinone reductase は単一に精製されており、α、β、γの３サブユットからなる複合体である。βサブユニットは FAD を補酵素とし、それのみで NADH を酸化しメナジオンを１電子還元する。一方、αサブユニットは FMN を補酵素としγサブユニットの存在下、βサブユニットと共同することでナトリウム依存にユビキノンをユビキノールに２電子還元する。プロテオリポソームへの再構成からこの酵素複合体が実際にナトリウムポンプとして機能することが確認されている(48-50)。

従って、先に述べた NADH-quinone reductase の区別に従えば、この *V. alginolyticus* のナトリウム依存性 NADH-quinone reductase は NQR-1 に分類される。

Sodium-dependent
NADH-quinone reductase



= NQR-1

Sodium-independent
NADH-quinone reductase

unkown

図 4-1 海洋細菌 *V.alginolyticus* 呼吸鎖の NADH-quinone reductase 領域

一方、ナトリウム非依存性酵素についてはそのタンパク質としての実体及びエネルギー共役能を持つか否かについて全く不明であった。従って、このナトリウム非依存性 NADH-quinone reductase の実体を明らかにすることが以降の解析に欠かせない。

そこでまず、このナトリウム非依存性酵素のエネルギー共役能について検討し、この酵素が NQR-1 であるか NQR-2 であるかを解明することとした。

1．NADH-quinone reductase 領域の膜電位形成能の解析

V.alginolyticus の細胞をフレンチプレスで破砕することにより調製した反転膜小胞の膜電位形成能を、オキソノールVIをプローブとして測定した。序論で述べた様に膜電位形成はエネルギー共役能の指標の一つである。

図 4-2 左側には *V.alginolyticus* 野生株から調製した反転膜小胞の膜電位形成の性質を示した。左上部に示したように NADH から酸素までの電子伝達反応で膜電位が形成され、この膜電位はプロトノフォアである CCCP の添加のみでは消失せず、ナトリウムとプロトンの逆輸送を触媒するモネンシンの添加により初めて完全に解消された。同様の現象は左下に示した NADH から ユビキノン-1 への電子伝達反応、即ち NADH-quinone reductase 領域を測定した場合にも認められた。これらのことは *V.alginolyticus* 呼吸鎖のナトリウムポンプが NADH-quinone reductase 領域に局在するという知見と一致し、また測定条件が妥当であることが分かる。

一方、左側には NQR-1 欠損変異株である Nap1 の実験結果を示した。

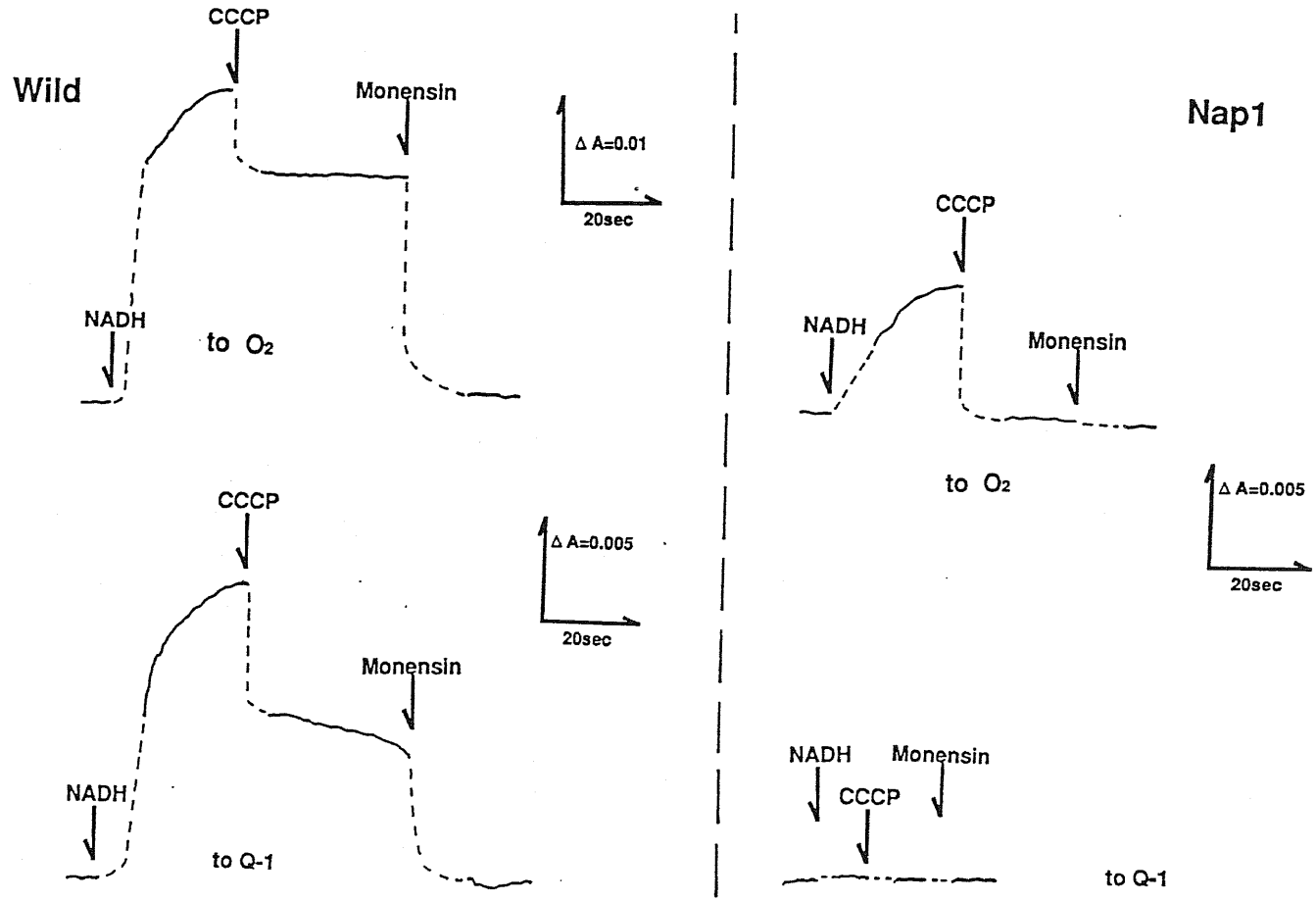


図 4-2 *V.alginlyticus* 野生株と Nap 1 の反転膜小胞の膜電位形成能
CCCP は 3 μM、モネンシンは 30 μM で使用した。トレースの上方向への変化は小胞内正の膜電位の形成を示す。

右上部に示した様にNADHから酸素までの電子伝達反応で膜電位が形成され、野生株の場合と異なりCCCPの添加により完全に膜電位は解消した。従って、この反転膜小胞が膜電位測定を行うに適した状態であり、またNQR-1が欠損していることが分かる。これに対し、NADH-quinone reductase領域を測定した場合、膜電位は全く形成されず、 このNap1のNADH-quinone reductase領域はエネルギー共役能を持たないことが明らかとなった。

以上より*V.alginolyticus* 呼吸鎖のナトリウム非依存型NADH-quinone reductaseはNQR-2に分類されることが分かった。

続いて、本酵素を精製した。この酵素は精製後もナトリウム依存性は認められず、HQNO、亜鉛、5'-AMPなどの阻害剤に感受性であり、SDS-PAGE上で44と75KDaの2つのタンパク質が認められ、至適pHは6.8〜7.8で、ユビキノン-1とピンポン機構で反応する性質を持っていた。次に、海洋細菌と大腸菌のNADH-quinone reductase領域の酵素の性質を比較を行った。

2．海洋細菌の酵素に対する電子供与体前処理の効果

先に第3章で行った電子供与体前処理の効果を海洋細菌の酵素でも検討した。図4-3に示したようにNQR-1はNADHと前処理すると容易に失活したがユビキノン-1と前処理しても失活はほとんど認められず、これは何も加えず酵素をインキュベーションした場合も同様だった。一方、メナジオンを用いてNQR-1のβサブユニット部分のみを測定してもNADHで前処理した場合には失活が認められた。

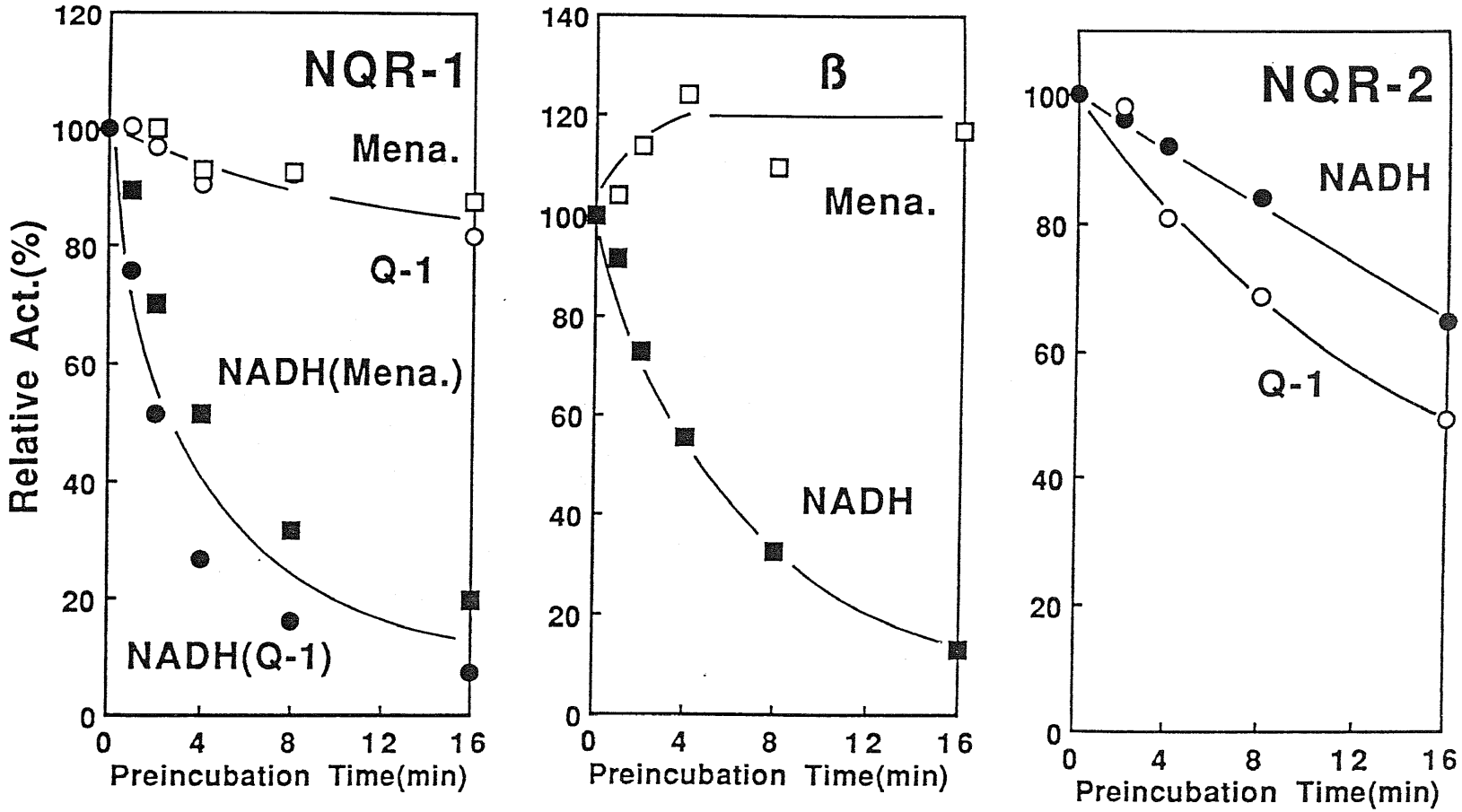

NQR-1
Mena.
Q-1
NADH(Mena.)
NADH(Q-1)
Relative Act.(%)
Preincubation Time(min)
ß
Mena.
NADH
Preincubation Time(min)
NQR-2
NADH
Q-1
Preincubation Time(min)

図 4-3 海洋細菌の酵素に対する電子供与体前処理の効果

左図：NQR-1 の場合、0.2M 塩化ナトリウム、0.02% Liponox DCH、0.1mM NADH、15μM Q-1 を含む 25mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中、タンパク質濃度 0.2μg/ml で行い、NQR-1 のβサブユニット部分の測定の場合には、0.2M 塩化ナトリウム、0.1% Liponox DCH、0.2mM NADH、0.1mM メナジオンを含む 25mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中で行った。中央図：βサブユニットのみを測定する場合、タンパク質濃度 0.4μg/ml で左図と同じ条件で行った。右図：NQR-2 の場合、0.015% Liponox DCH、5mM 硫酸マグネシウム、0.1mM NADH、15μM Q-1 を含む 25mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中、タンパク質濃度 0.2μg/ml で行った。黒いシンボルは NADH と、白いシンボルは電子受容体とそれぞれ横軸の時間インキュベーションした場合を示す。酵素のみをインキュベーションした場合は白いシンボルと同様であった。

単離したβサブユニットの場合、NQR-1の場合と同様、NADHで前処理を行うと酵素は容易に失活した。この時、対照実験では失活は認められなかった。

一方、NQR-2の場合、NADHで前処理すると酵素は2分間で約40%失活したが、対照実験であるユビキノン-1前処理ではより顕著な失活が認められた。従って、NQR-2のNADH前処理による失活は特異的なものではないことが分かった。

以上より、海洋細菌の酵素のうちNQR-1は電子供与体前処理に感受性であり、その失活はNQR-1のβサブユニット部分に起因すること及び、NQR-2は非感受性であることが分かった。

3．各酵素のキノン還元様式

フラビンを補欠分子とする酵素が、ユビキノンなどのキノン化合物を還元する際には、1電子還元する場合と2電子還元する場合がある(52)。1電子還元された場合、キノンはセミキノンラジカルとなり、このセミキノンラジカルは酸素により自動酸化を受けキノンに再酸化されるので、酸化還元サイクルが形成される。一方、2電子還元された場合にはキノンは比較的安定なキノールとなる。NADHと反応する酸化還元酵素がキノン化合物を1電子還元するか、2電子還元するかはその酵素の性質によっている。1電子還元型酵素の場合には先に述べた酸化還元サイクルの形成のため、反応液中に添加されたキノン量以上のNADHの消費が起き、しかもキノールが形成されないのに対し、2電子還元型酵素の場合、NADHの消費とキノール形成が化学量論的に進行する（図4-4下部）。従って、NADH消費とキノール形成の量的関係を調べれば、その酵素の

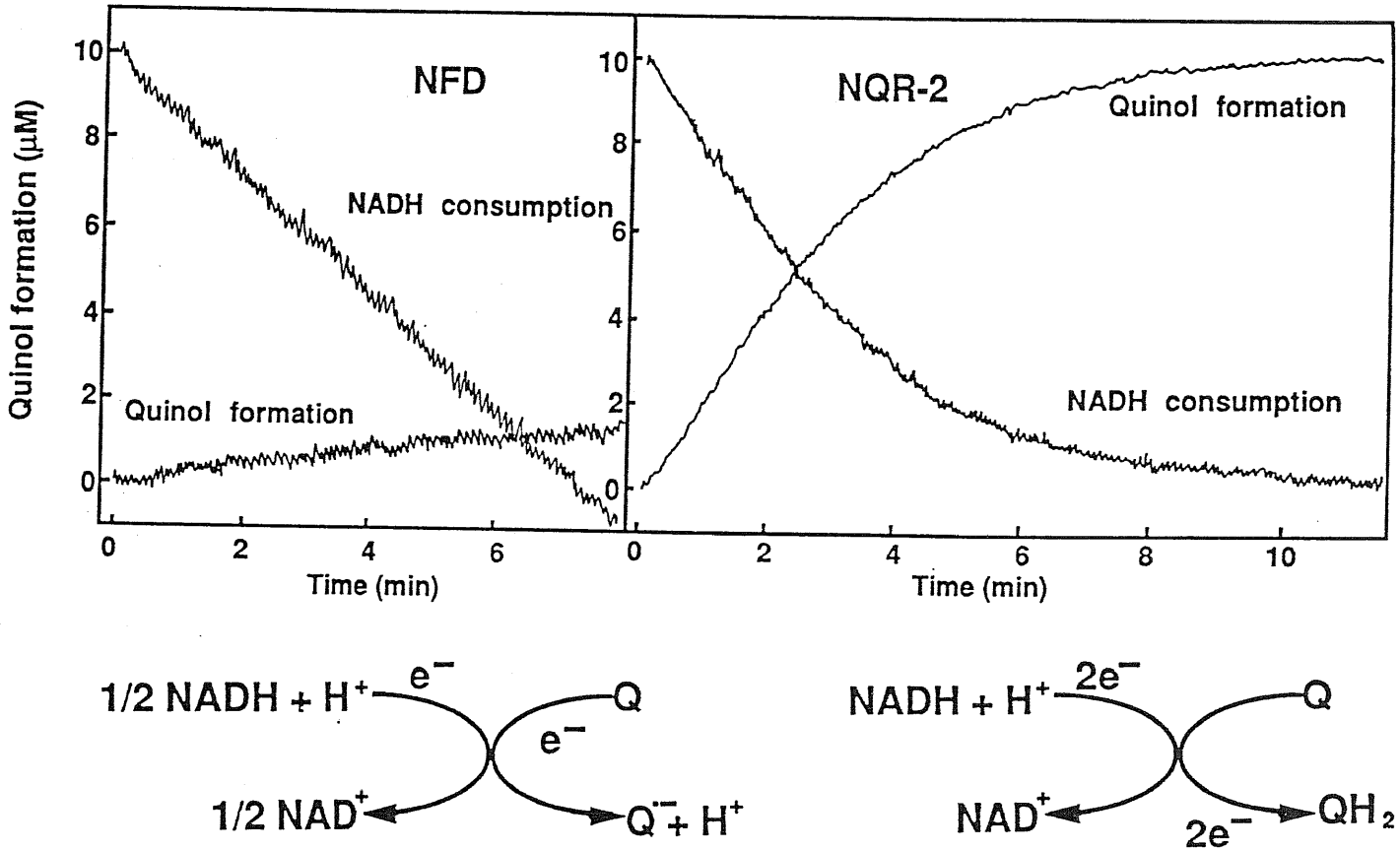


図 4-4 大腸菌 NFD、NQR-2 のキノン還元様式

反応液は方法の部に示した NFD、NQR の各反応液で行った。但し電子受容体として Q-1 10μM を用いた。NFD は NFD 活性で 0.7 units/ml、NQR-2 は 0.014μ units/ml でそれぞれ使用した。

キノン還元様式を知ることが出きる。

大腸菌 NFD の場合、NADH が消費され反応が進行しているにも係わらずキノール形成は認められなかったので（図 4-4 左）、本酵素は 1 電子還元型であった。一方、図 4-4 右に示したように大腸菌 NQR-2 では NADH の消費とキノールの形成はよく相関しており、この酵素は 2 電子還元型であることが分かった。

一方、*V.alginolyticus* の NQR-2 は図 4-5 右に示したように 2 電子還元型の性質を示した。これに対し単離した β サブユニットは図 4-5 左に示したように 1 電子還元型の性質を示し、これまでの知見と一致した。

4．免疫学的比較

図 4-6 にはイムノブロッティングによる各酵素間の免疫学的相同性の検討結果を示した。抗大腸菌 NFD 抗体及び抗海洋細菌 NQR-1 抗体はどちらもそれぞれ大腸菌 NFD、海洋細菌 NQR-1 のみと反応した。これに対し、抗大腸菌 NQR-2 抗体は大腸菌 NQR-2 の他に、海洋細菌 NQR-2 と交差反応することが分かった。

5．考察

表 4-1 には以上より明らかとなった海洋細菌と大腸菌の NADH-quinone reductase 領域の性質をまとめた。

両細菌の NQR-1 とも NADH との反応を司るフラボタンパク質、即ち、β サブユニットまたは NFD を含む。これらのフラボタンパク質はどちらも電子供与体前処理により容易に失活する性質を持ち、キノンの還元様式は 1 電子還元型である。一方、どちらの NQR-2 とも電子供与体前

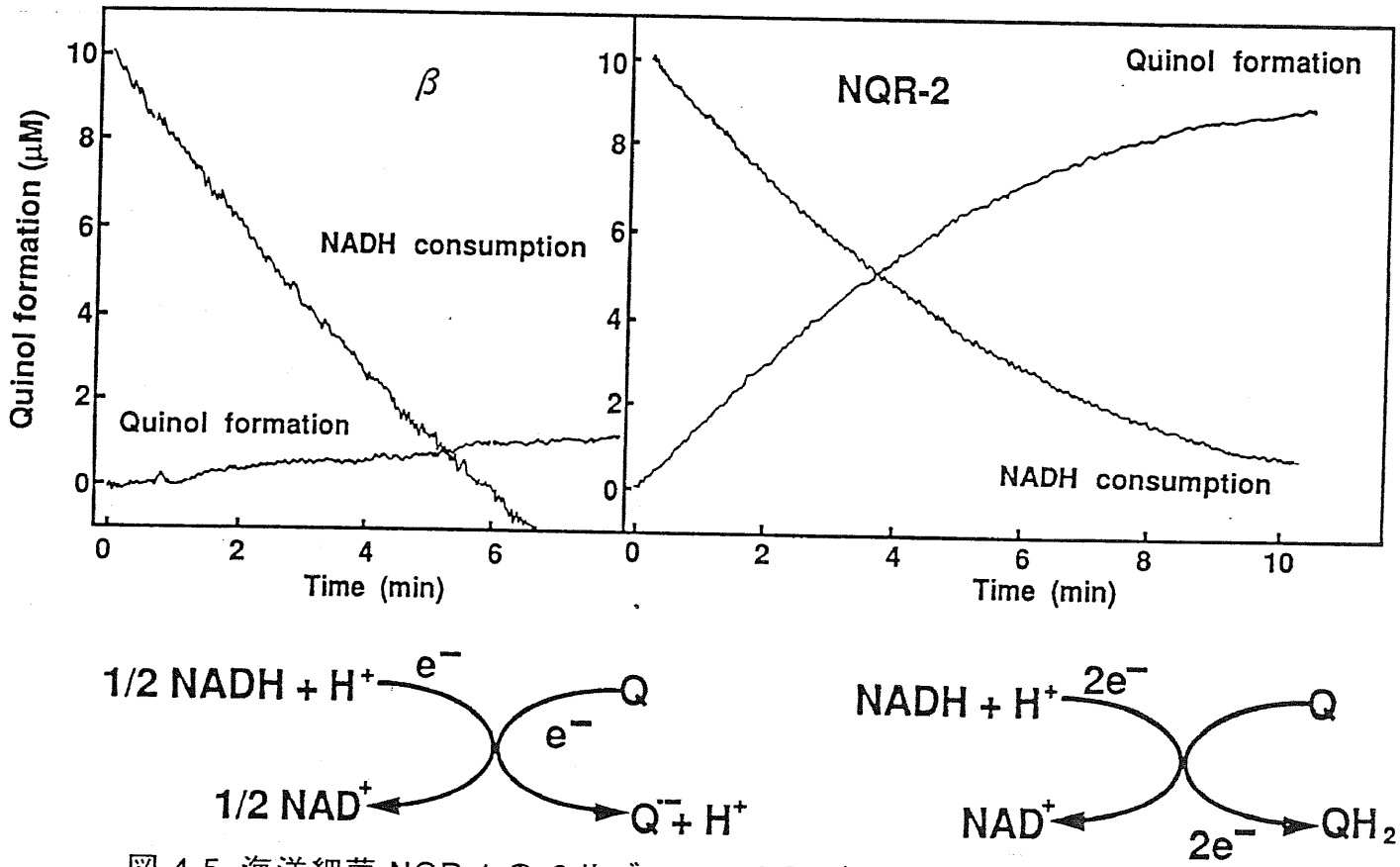


図 4-5 海洋細菌 NQR-1 の β サブユニット及び、NQR-2 のキノン還元様式

β サブユニットは メナジオンを電子受容体とした場合の活性で 0.04units/ml、NQR-2 は 0.02units/ml の濃度でそれぞれ用いた。反応液は図 4-3 と同様の反応液を用いた。

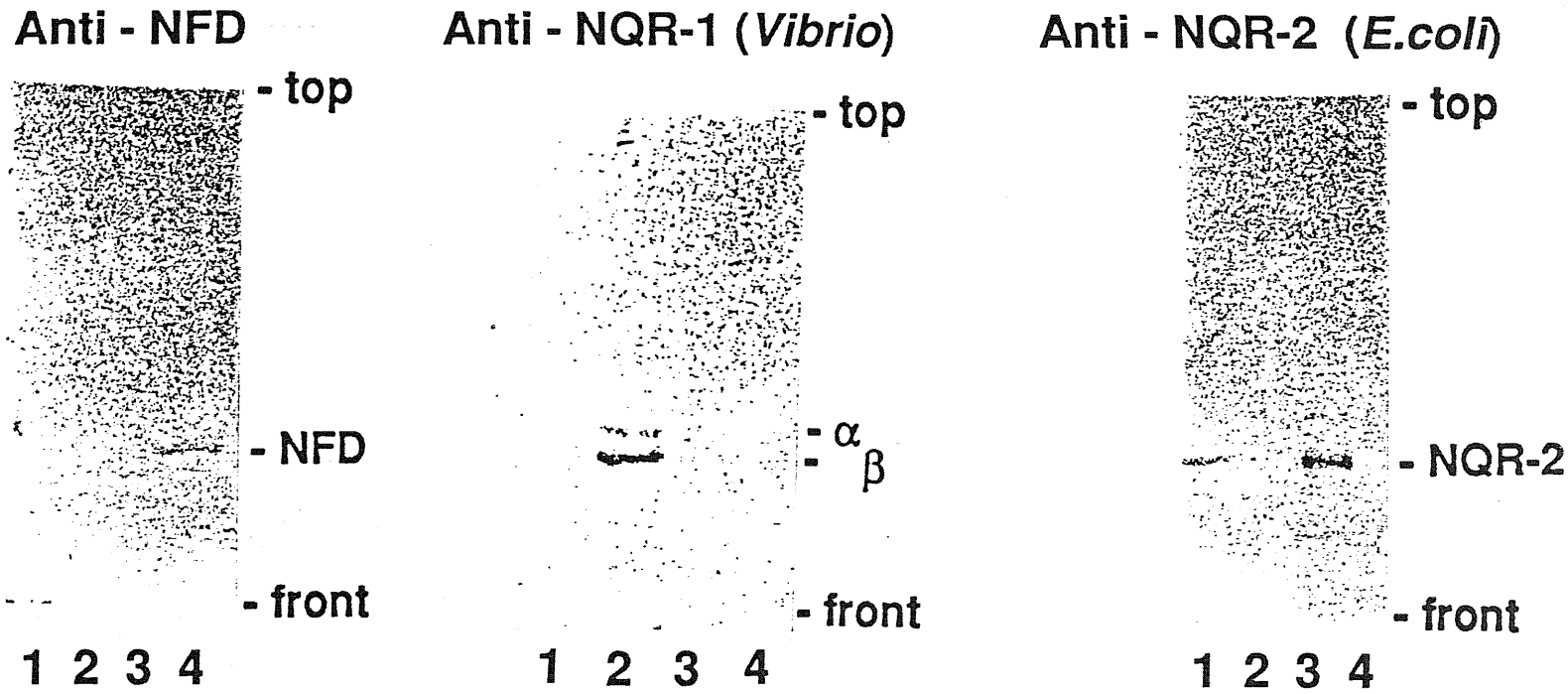


図 4-6 海洋細菌と大腸菌の NADH-quinone reductase の
イムノブロッティング

抗血清または抗体を希釈率 200 倍で使用し、30' C で 1 時間反応させた。レーン 1 には海洋細菌 NQR-2、2 には海洋細菌 NQR-1、3 には大腸菌 NQR-2、4 には大腸菌 NFD をそれぞれ約 0.05units ブロッティングしてある。用いた抗血清は上部に示した。大腸菌 NFD(左)、NQR-2(右)、海洋細菌 NQR-1 (中央)の α、β サブユニットの位置を図中に示した。

表 4-1 海洋細菌と大腸菌の NADH-quinone reductase 領域の比較

			cofactor	NADH-preincubation	quinone -reduction
NQR-1	*Vibrio*	β	FAD	sensitive	1-electron
	E.coli	NFD	FMN	sensitive	1-electron
NQR-2	*Vibrio*		—	insensitive	2-electron
	E.coli		FAD	insensitive	2-electron

処理に非感受性でありキノンの還元様式は2電子還元型である。また、免疫学的にも相同性が高い。

以上から、両細菌のNQR-2はそれぞれ酵素レベル、分子レベルで類似することが明らかとなった。一方、NQR-1のNADHと反応するフラボタンパク質部分も共通した反応機構を持つことが分かった。

第５章　*V.alginolyticus* 呼吸鎖の quinol oxidase 領域の解析

一般に末端酸化酵素は補欠分子としてヘムを含む。ヘムの種類は、ヘム *a*、プロトヘム（ヘム *b*）、ヘム *c*、ヘム *d* などであり、それぞれのヘム含有タンパク質はシトクローム *a*、シトクローム *b* などと呼ばれる。また、末端酸化酵素のシトクロームのなかで、ヘム *b* を含み酸素と結合する機能を持つシトクロームを特にシトクローム *o* と呼ぶ(53,54)。大腸菌の quinol oxidase 領域にはシトクローム *o* 型 quinol oxidase 及び、シトクローム *d* 型　quinol oxidase の２種類の酵素が存在し、プロトン駆動力形成を行う。この大腸菌の酵素は末端酸化酵素のなかで、最も解析が進んでいる例である(54-56)。

一方、海洋細菌 *V.alginolyticus* 呼吸鎖の quinol oxidase 領域については、膜分画を用いた分光学的解析からシトクロームとして、*b*、*c*、*d*、*o* 型が存在し、*a* 型が認められないこと(57)、細胞、反転膜小胞を用いた解析からこの領域がプロトン駆動力形成のみを行うこと(6,58)、が報告されている。しかしながら、タンパク質としての実体や酵素的性質についてはほとんど明らかではない。従って、大腸菌の quinol oxidase との比較の為には、quinol oxidase 領域の酵素を精製することが必要であった。

quinol oxidase の反応は、ミトコンドリアの場合のように、実際には quinol:cytochrome *c* 酸化還元酵素 (複合体III) と cytochrome *c* oxidase (複合体IV) という二つの酵素により触媒される場合と、大腸菌のように単一の quinol oxidase 酵素複合体が触媒する場合がある(53,54,56)。予試験の結果、*V.alginolyticus* では quinol oxidase 活性は充分認められ、また弱いながら cytochrome *c* oxidase 活性も認められた。しかし quinol:cytochrome

c 酸化還元酵素活性はほとんど認められず、quinol:cytochrome *c* 酸化還元酵素の阻害剤であるミクソチアゾールにより quinol oxidase 活性はほとんど影響を受けなかった。それ故、quinol:cytochrome *c* 酸化還元酵素は quinol oxidase 領域に関与しないと思われた。そこで、以降では quinol oxidase に着目し、これを精製する方法を確立し、次にその性質を検討し、これまでに明らかにされている大腸菌の quinol oxidase の性質と比較した。

1．quinol oxidase の精製

表 5-1 には以降に述べる *V.alginolyticus* からの quinol oxidase の精製の典型的な結果をまとめた。

1－1　酵素の可溶化と DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィー

末端酸化酵素の可溶化には比較的高濃度の界面活性剤が必要とされることが多い。そのため不要なタンパク質を可溶化以前に除去しておくことがより重要となる。膜分画から不要なタンパク質を除去する方法として、第 3 章で用いた EDTA による洗浄は、quinol oxidase の収率が低いので適当ではなかった。そこで界面活性剤による洗浄法を用いることにした。洗浄を行わない場合の可溶化率は約 60% であり洗浄を行った場合に比べ高収率であったが、以降の精製における分離が悪いので洗浄を行った後、可溶化をすることとした。界面活性剤濃度を検討した結果、0.5% 濃度の非イオン性界面活性剤 Liponox DCH による洗浄を行った後、5% 濃度の Liponox DCH により可溶化を行うのが最も適当であった。こ

表 5-1 海洋細菌 *V.alginolyticus* 呼吸鎖からの quinol oxidase の精製
Sephacryl S-300 段階の収率は比活性の最も高い分画のみを示してある。

fraction	protein (mg)	quinol oxidase (units)	quinol oxidase (u/mg)
membrane	2592	3135	1.21
washed membrane	1252	1892	1.51
Liponox extract	1161	1061	0.914
DEAE-Sephacel	536	496	0.925
DEAE-5PW	9.54	214	22.4
Sephacryl S-300	0.42	51.8	123

の方法により、洗浄操作で約 50% のタンパク質を除去でき、可溶化操作で約 30% の酵素活性を可溶化できた（表 5-1）。

この可溶化酵素の活性は、凍結や 4°C での一夜程度の放置に不安定であったので、可溶化後、迅速に DEAE-Sephacel に負荷した。この時、負荷する容量、カラムの直径と長さの比、線流速は重要であった。即ち、カラムを同じ容量で長いものに変えたり、線流速を減じたりするとカラム収率は 30% 以下となった。これらの現象は酵素が高濃度の界面活性剤に不安定な為と思われる。用いた条件でのカラム収率は 50% 程度であった。得られた活性分画は 50% 飽和硫酸アンモニウムにより濃縮した。この濃縮過程での収率は 95% 以上であった。得られた濃縮分画は凍結せず次の精製段階に移った。

1－2　TSK gel DEAE-5PW HPLC

1－1 で得られた DEAE-Sephacel 分画を DEAE-5PW HPLC にかけた。図 5-1 中に示した塩化ナトリウムの濃度勾配で溶出したところ保持時間約 65 分のところに quinol oxidase が溶出された。出発材料である膜分画を浸透圧ショック法で調製した場合、また展開緩衝液に 0.1mM EDTA を添加しない場合には、酵素活性は 45 分付近に溶出され主たるタンパク質のピークと重なるので、良好な分離を得ることは出来なかった。この様な膜分画調製法の違いやEDTA の効果は、大腸菌の末端酸化酵素で報告されている(59)細胞外膜由来タンパク質との相互作用によるものと推定される。

以上の HPLC によりカラムの前後で比活性で 24 倍精製することが出来、収率は約 40% であった。

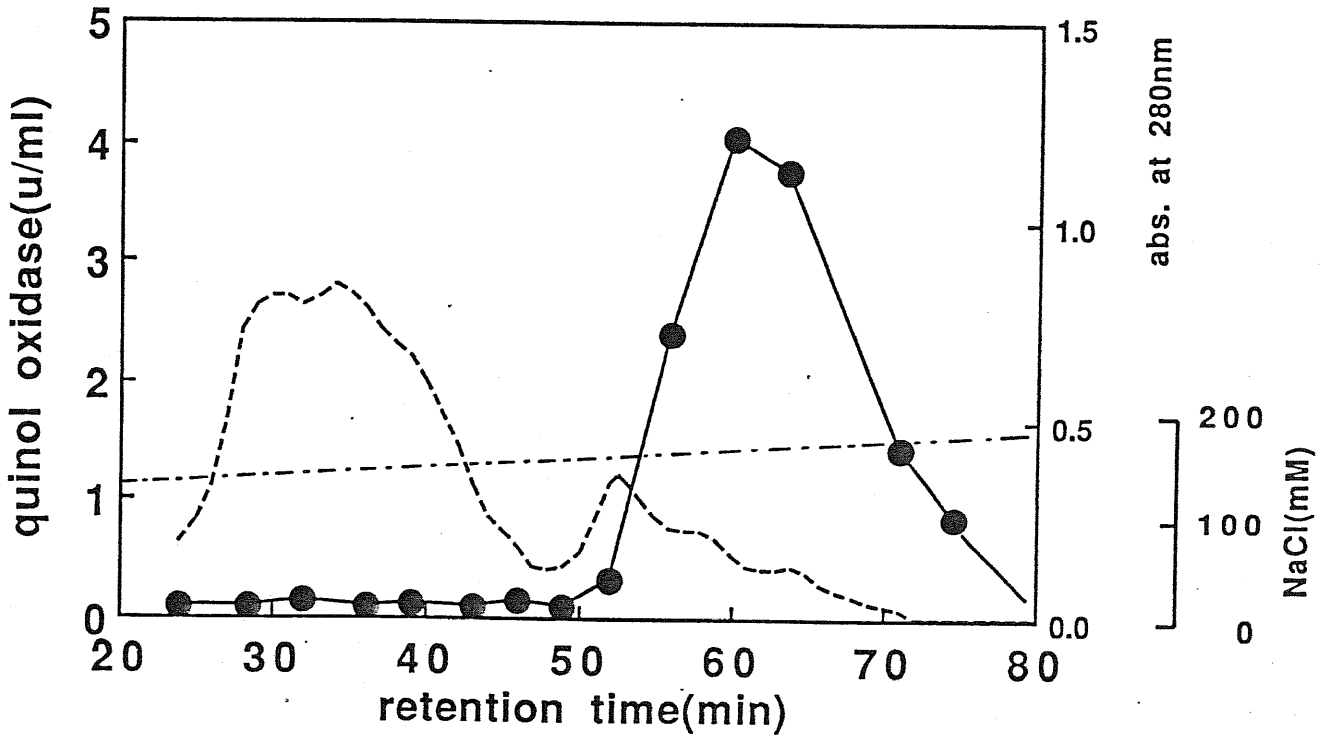


図 5-1 TSK gel DEAE-5PW における quinol oxidase の溶出パターン
DEAE-Sephacel 分画約 500mg を負荷し、150mM 塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄後図中の塩化ナトリウムの濃度勾配で酵素を溶出した。●は quinol oxidase 活性を、破線は 280nm における吸収を、一点鎖線は塩化ナトリウムの濃度勾配を示す。280nm の吸収は層長 5mm のフローセルにより測定した。

1－3　Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィー

DEAE-5PW 分画を Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィーにかけさらに精製した（図 5-2）。溶出パターンでは 3 つのタンパク質ピークが認められ、quinol oxidase は最も高分子側に溶出された。なお、シトクロームは 3 つのピークのうち最も高分子側と最も低分子側の 2 ヶ所に溶出された。界面活性剤をより可溶化力が強いとされる N-ラウロイルザルコシン 0.01% 濃度に変えても酵素の溶出位置は変わらなかった。

以上のカラムにより比活性で約 6 倍精製できた。この標品を最終標品とし以降の実験に用いた。

2．精製 quinol oxidase の電気泳動

図 5-3 左には精製酵素の非変性性ゲル電気泳動パターンを示した。タンパク質バンドは 1 本のみであり、またこのバンドはヘム染色によっても染色された。従って、標品はほぼ単一に精製されていることが分かった。　この非変性性ゲルにおける Ferguson プロットの結果から quinol oxidase はこの泳動条件で 288KDa の分子量を示した（図 5-4）。

一方、精製酵素を SDS-PAGE にかけたところ、3 つのタンパク質バンドが認められた（図 5-3右）。7 種類の標品について、それぞれのクマシーブリリアントブルー R-250 染色における量比をデンシトメトリーにより調べたところ、高分子側からサブユニットI、II、IIIとした場合、II を基準とすると、I：II：III＝ 1.04±0.08：1：0.34±0.04 でありほぼ一定していた。また、先の非変性性ゲルで標品がほぼ単一であることから、quinol oxidase は少なくともこれら 3 つサブユニットから構成されると考えられた。

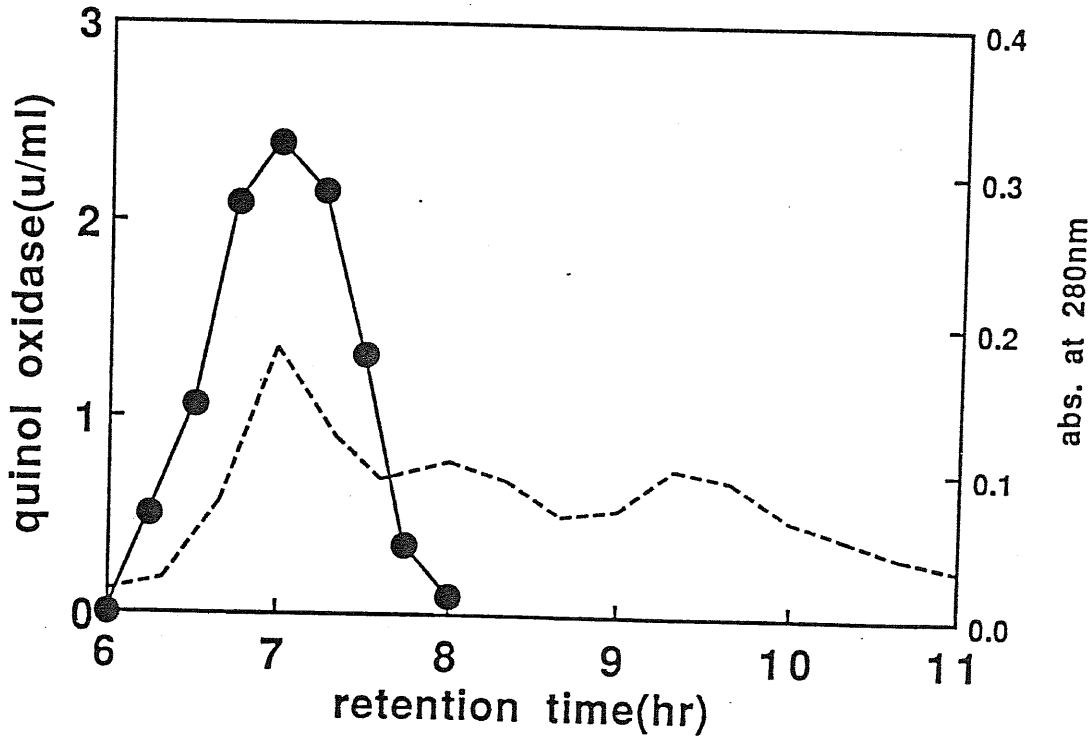


図 5-2 Sephacryl S-300 カラムの溶出パターン
DEAE-5PW 分画約 10mg を負荷した。●は quinol oxidase 活性を、破線は 280nm（層長 5mm）における吸収を示す。

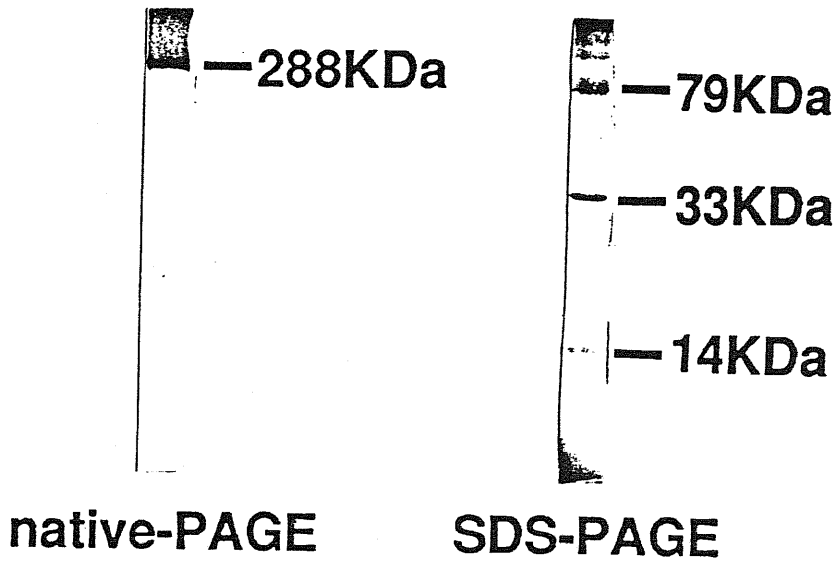


図 5-3 精製 quinol oxidase の電気泳動
左図：ゲル濃度 8% の非変性性ゲル、右図：ゲル濃度 14% の SDS-ポリアクリルアミドゲル。SDS-PAGE 中での 79KDa のタンパク質の分子量は、12～20% の各濃度のゲルを用い、Ferguson 法により算出した。

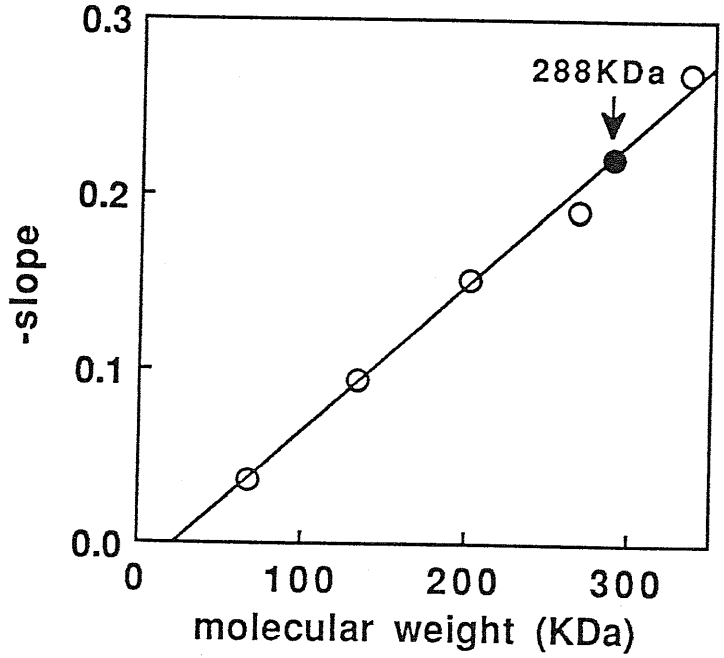


図 5-4 非変性性ゲル電気泳動における quinol oxidase の Ferguson プロット

各標準タンパク質及び、quinol oxidase の電気泳動度を 4～8% 濃度の非変性性ゲルで測定した。

なお、これらのうちサブユニットIの SDS-PAGE での移動度はゲル濃度に強く依存していた。これは大腸菌(60)や *Gluconobacter suboxydans*(20)のシトクローム *o* 型 quinol oxidase でも報告されている現象であり、この場合、分子量算出には Ferguson プロットが用いられている。またサブユニットIはゲル濃度が低下すると拡散し、特に 12% 以下では確認が困難となる性質も持っていた。

以上から、このサブユニット I については Ferguson プロットにより、サブユニット II、III は常法により分子量を求めた。サブユニット I は 79KDa、II は 33KDa、III は 14KDa と算出された。なおサブユニット II、III については常法でも、Ferguson 法でも得られる分子量の差は ± 2KDa 程度であった。この分子量は、さきに求めた酵素複合体がサブユニット I から III の 2 量体から形成されるとしても若干少ない。これは、より低分子の第 4、第 5 のサブユットの存在によるのかもしれない。

3．精製酵素のスペクトル分析

3－1　吸収スペクトル

図 5-5 には精製酵素の吸収スペクトルを示した。酸化型は 407nm に、還元型は 427、531、561nm に吸収極大を示した。

3－2　差スペクトル

図 5-6 には還元－酸化差スペクトル及び、一酸化炭素・還元－還元差スペクトルを示した。還元－酸化差スペクトルでは 428、531、561nm に吸収極大が認められ、シトクローム *a* の存在を示す 600nm 付近及び、

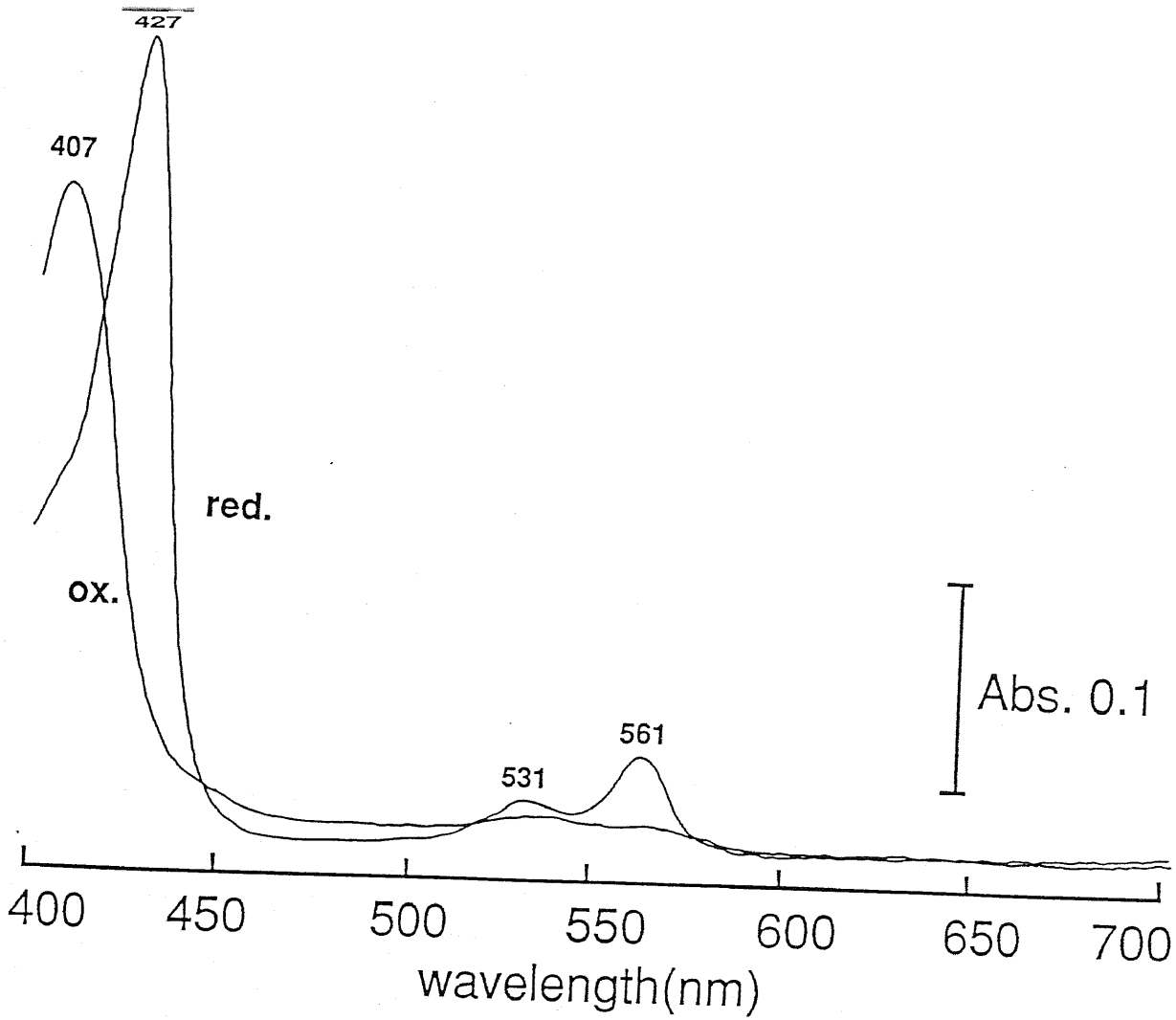


図 5-5 精製 quinol oxidase の吸収スペクトル

室温における吸収スペクトルを 0.01% Liponox DCH を含む 0.5M トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5) で測定した。還元はジチオナイトを少量添加することにより行い、測定後さらにジチオナイトを添加して還元が完全であることを確認した。タンパク質濃度は 89.3 μg/ml で行った。

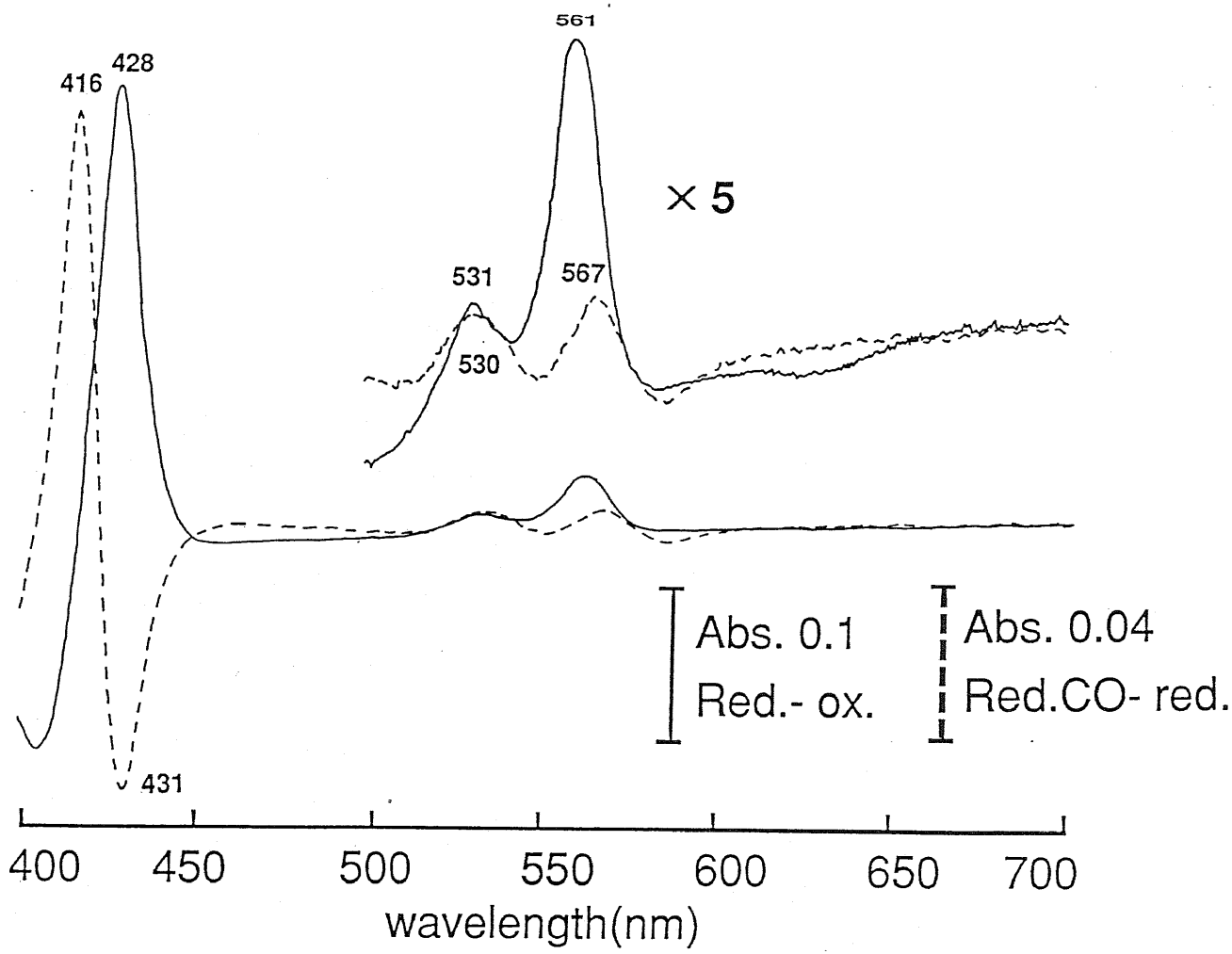


図 5-6 精製 quinol oxidase の差スペクトル

室温におけるジチオナイト還元－空気酸化差スペクトル（実線）及び、一酸化炭素・ジチオナイト還元－ジチオナイト還元差スペクトル（破線）を、図 5-5 と同条件下で測定した。一酸化炭素処理は遮光下、反応液中に一酸化炭素を 2 分間吹き込むことにより行った。図中の×5 の表示はスケールを 5 倍に拡大したことを表す。

シトクローム d の存在を示す 615-630nm 付近に吸収は認められなかった。また、この条件下で α ピークに分裂や肩などは認められなかった。

一方、一酸化炭素・還元－還元差スペクトルでは 416nm に極大、431nm に極小が認められ、本酵素は典型的なシトクローム o 型であることが分かった。

表 5-2 には酵素複合体が 2 で述べた 3 つのサブユニット 1 分子ずつから構成されるとした場合の各吸収帯の分子吸光係数をまとめた。なお、大腸菌のシトクローム o 型 quinol oxidase の場合、還元－酸化差スペクトルにおいて 560-580nm で 18.7(55)、24.2(61)、一酸化炭素・還元－還元差スペクトルにおいて、416-430nm で 145(55)、287(61)の研究者により異なる分子吸光係数が報告されている。これらの差異の原因については不明である。

3－3　酸化還元差スペクトルに対するシアン処理の効果

シアン、一酸化炭素などのリガンドは末端酸化酵素として機能するシトクロームの酸素と反応するヘムと結合する。この様なヘムをリガンド結合ヘムと呼び、この結合性は複数のヘムから構成される末端酸化酵素の機能解析などに利用される。

図 5-7 には精製酵素をシアン化カリウム存在下でデュロキノールにより還元した場合の還元－酸化差スペクトルを示した。左側に示したように、γ 吸収帯の山と谷の差は、シアン処理をしない場合に比べ、シアン処理をした場合、1/2 以下に減少した。これに対し α 吸収帯はシアン処理した場合でもピークの高さは約 70% 保持されていた。即ち、シアン処理前の γ ／ α 比は 10 であるのに対し、シアン処理後では 5.9 となっ

表 5-2 精製酵素の各吸収ピークの分子吸光係数

図 5-5、5-6 と同様の実験を 3 種類の標品について行った結果から、それぞれの条件における吸光度と使用したタンパク質濃度から分子吸光係数を求めた。

spectrum type		wavelength(nm)	ε (mM^{-1} cm^{-1})
absorption	ox.	407	225
	red.	427	290
	red.	561	33
red.-ox.		428-458	226
		561-583	27
CO red. - red.		416-431	142

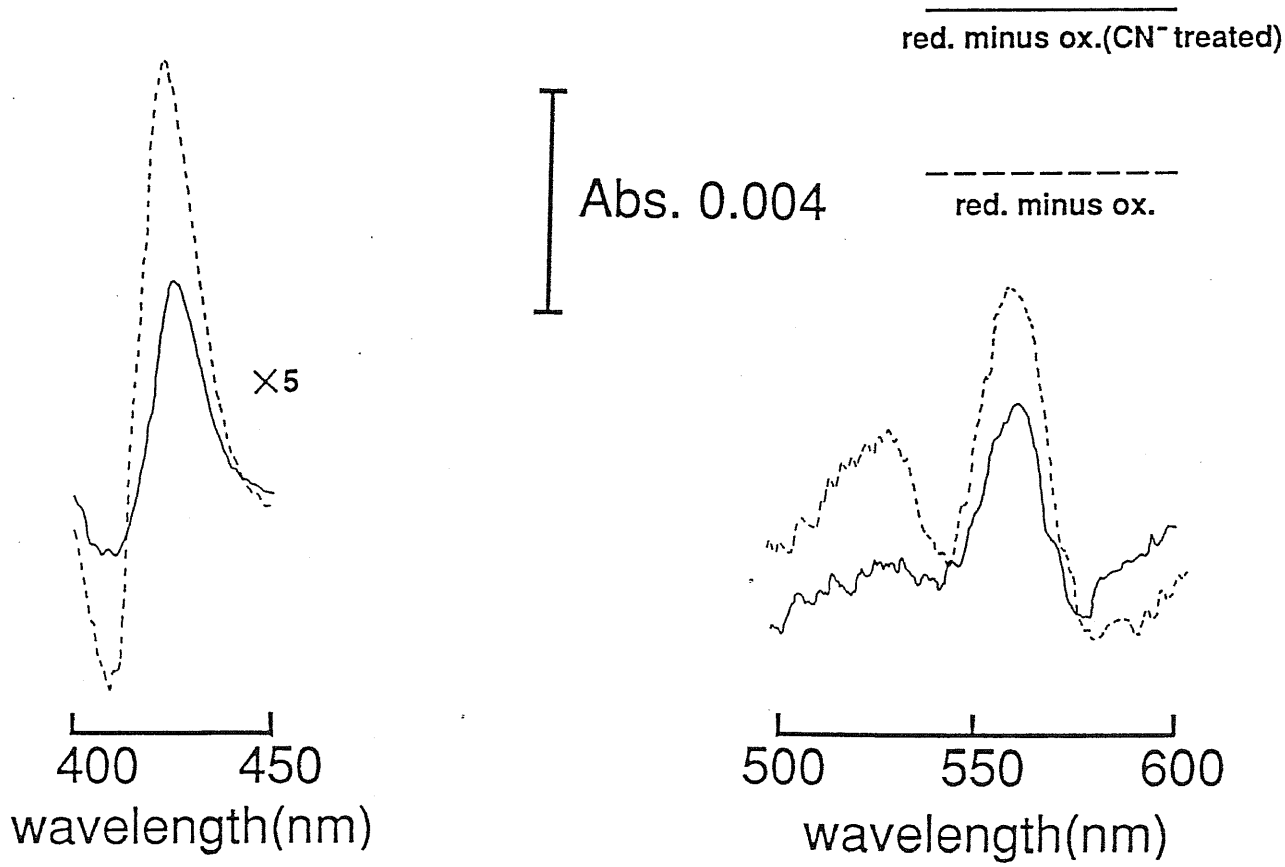


図 5-7 精製酵素の差スペクトルに対するシアンの影響
シアン処理は 1mM シアン化カリウムを用い室温で行った。還元は 1mM デュロキノールにより行った。図中の×5の表示はフルスケールを5倍にしたことを意味する。

た。従って、本酵素には複数のヘムが存在し、それらのうちリガンド結合ヘムのα吸収体への寄与は30%程度＊と少ないことが分かった。同様のリガンド結合ヘムの性質は大腸菌のシトクローム*o*型quinol oxidaseでも報告されている(62)。

＊：寄与率の算出には、シアン結合ヘムがシアンと結合した場合α、γ吸収帯両方で完全に吸収を失い、シアン非結合ヘムはシアン共存下でα、γ吸収帯に影響を受けず、また両ヘムのγ吸収帯への寄与が1:1であることを仮定した。

4．補欠分子族の分析

4－1　精製酵素のピリジン－ヘモクロームスペクトル

一般にシトクローム中に含まれるヘムの種類を特定する手段として、ピリジン－ヘモクローム法がある。これはアルカリ条件でヘムとピリジンを反応させ、その後還元することによりピリジン－ヘモクロームを形成させ、そのα吸収ピークの波長を測定する方法である。各ヘムのピリジン－ヘモクロームは特有の吸収波長を持つのでこれによりヘムを同定出来る(63)。

図5-8には精製quinol oxidase及び、ヘム*b*含有タンパク質としてヘモグロビン、ヘム*c*含有タンパク質としてウマシトクローム*c*のピリジン－ヘモクロームの吸収スペクトルを示した。精製quinol oxidaseは554nmに吸収極大を持っていた。この吸収極大の位置は酸性アセトンによりタンパク質からヘムを抽出した場合も同様でありタンパク質との結合に

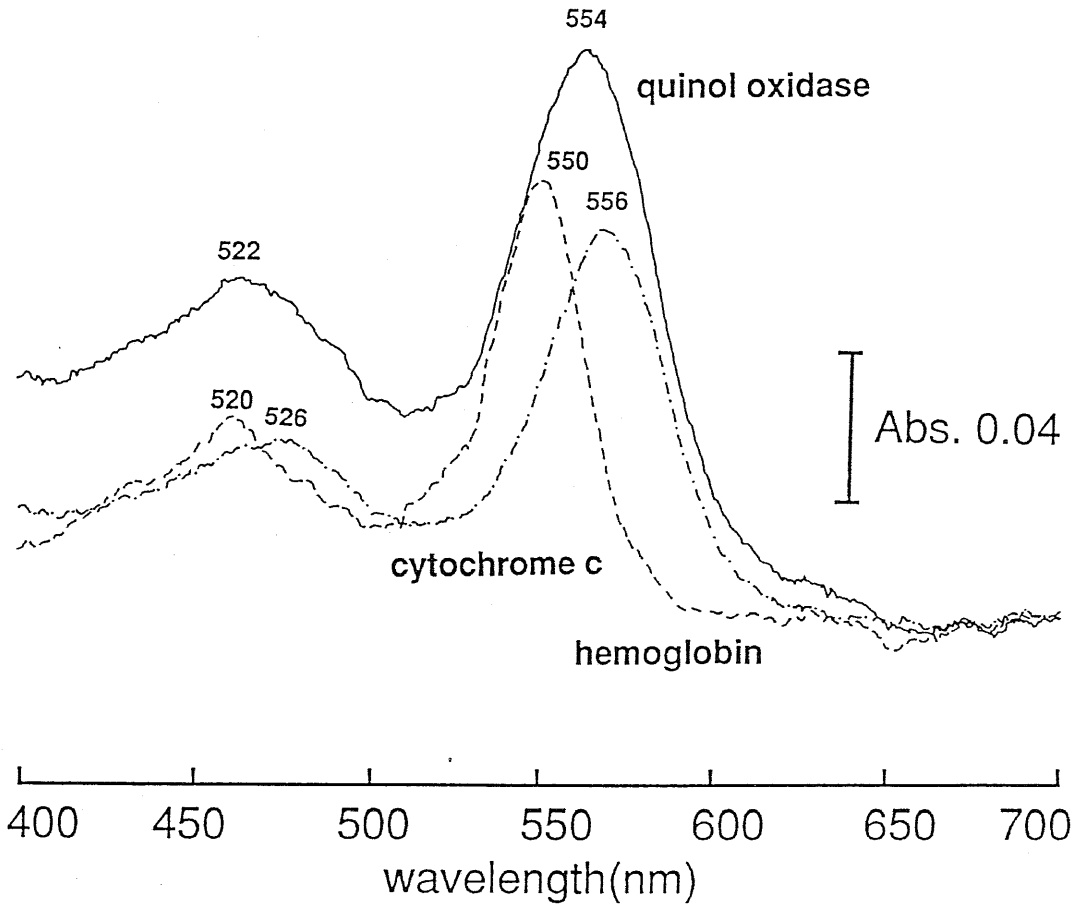


図 5-8 精製酵素のピリジンーヘモクロームスペクトル
方法の部に示した通りピリジンーヘモクロームを形成させた。ピリジン濃度を10% から 30% まで、またアルカリ濃度を 0.1N から 0.3N まで変化させても吸収位置に違いは認められなかった。

は影響されていなかった。なお、この時の抽出効率は約 90% であった。一方、ヘモグロビンは 556nm 、シトクローム *c* は 550nm に吸収極大を持ち、一般的なヘム *b*、ヘム *c* のそれと一致した。なお、ヘム *a*、ヘム *d* のピリジン－ヘモクロームはこの領域に α 吸収帯を持たない。従って、今回精製した酵素中に、ヘム *b*、ヘム *c* などではない新規のヘムの存在が推定された。

4－2　逆相 HPLC によるヘムの分析

そこで、ヘムをタンパク質から抽出後逆相 HPLC により分析した。展開溶媒に酢酸を添加するいわゆるイオン抑制法を用い、エタノールを基本とした溶媒とメタノールを基本とした溶媒で分離結果を比較した。その結果、メタノール系が良好な分離を得られたので、メタノール：酢酸：水系で展開した。

図 5-9a には精製酵素から抽出したヘムの溶出パターンを示した。保持時間 5.0 分と 10.7 分の 2 ヶ所にヘムが溶出された。ヘモグロビンから抽出したヘム *b* の溶出位置は 5.0 分であったので第一のピークはヘム *b* であることが分かった。

一方、10.7 分に溶出されたヘムは、大腸菌細胞膜から抽出したヘムでの溶出パターンでも認められるヘムであった（図 5-9b）。この大腸菌由来の第二のヘムのピリジン－ヘモクロームは 553nm に吸収極大を持ち、ごく最近大腸菌のシトクローム *o* 型 quinol oxidase で存在が報告された新規のヘム(61)、ヘム *o* であった。従って精製 quinol oxidase の 10.7 分に溶出したヘムもヘム *o* であると考えられた。

また、図 5-9a の 2 つのヘムのピーク面積比は 5 種類の標品の分析の

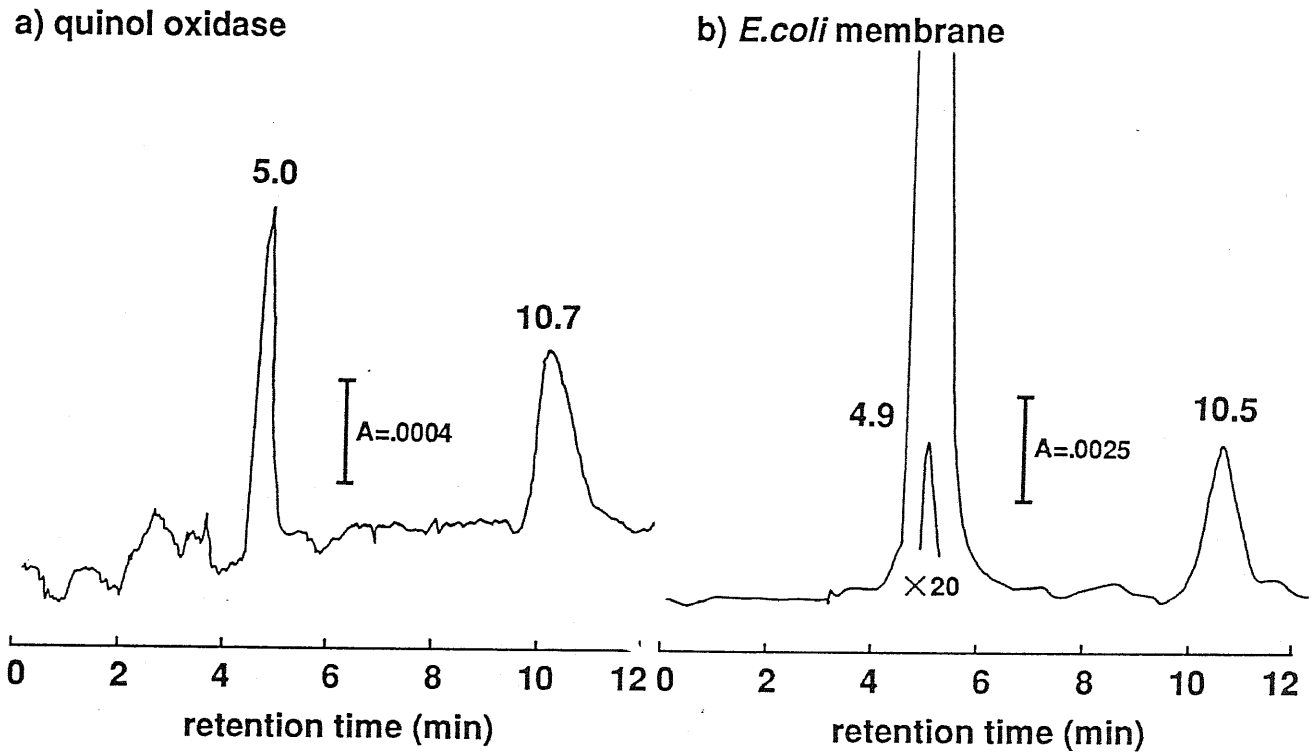


図 5-9 精製酵素から抽出したヘムの逆相 HPLC による分析
抽出ヘム溶液を 10～20 μl 負荷し 405nm の吸収をモニターした。図中の×20 はフルスケールを 20 倍にしたことを示す。

結果 1.01±0.03 であった。ヘモグロビン由来のヘム *b* 及び、大腸菌由来のヘム *o* は展開溶媒中で共に 397nm に吸収極大を持っていたので、両者の分子吸光係数が同じであると仮定すると、精製 quinol oxidase にはヘム *b* とヘム *o* が当量づつ含まれると考えられた。

4－3　ヘム、銅の含量

表 5-3 には精製酵素のヘム・銅含量の分析結果を示した。ヘム含量は還元－酸化差スペクトルから、銅含量は原子吸光法からそれぞれ測定した。3 種類の標品で測定を行った結果、ヘム含量は酵素タンパク質 1mg あたり 12.3～13.9nmol、平均 12.9±0.4nmol であり、銅含量は酵素タンパク質 1mg あたり 9.05～13.4nmol、平均 11.6±1.1nmol であった。従って、両者の比率はほぼ 1:1 であった。表 5-3 では標品を直接測定したが、他の分画について、5mM EDTA を含む緩衝液に透析し、透析前後でヘムと銅の含量比を比較しても変化は無かった。以上求められた含量は、酵素複合体が先に SDS-PAGE で認められた 3 つのサブユニット 1 分子づつから構成されるとすると、複合体あたりヘム約 1.6 個に相当すると計算された。従って、先の逆相 HPLC によるヘム分析の結果と合わせると、ヘム、銅とも酵素複合体あたり 2 個含まれると考えられた。

5　基質特異性及び、阻害剤の効果

表 5-4 左には精製酵素の基質特異性を示した。酵素は、デュロキノール、ユビキノール-1 どちらともよい反応性を示した。また人工的電子供与体である TMPD とも反応性を示した。一方、還元型ウマシトクローム *c* とは全く反応しなかった。なお、デュロキノールを基質として酵素活

表 5-3 精製酵素のヘム及び、銅の含量

ヘム含量はジチオナイト還元ー酸化差スペクトルから求めた。ヘム *o* を含むシトクロームの分子吸光係数は確定していないので、シトクローム *b* の分子吸光係数(561-583nm、 ε =19.0mM^{-1}·cm^{-1}) を用いた。

Preparation	heme (nmol/mg)	Cu (nmol/mg)	heme/ Cu
1	12.5	12.3	1.01
2	13.9	13.4	1.04
3	12.3	9.05	1.36

表 5-4 精製酵素の基質特異性及び、阻害剤の効果

左には各電子供与体との反応性を示した。用いた基質濃度は方法の部に示した。右には各阻害剤の酵素活性を 1/2 にする濃度を I_{50} として表示した。阻害剤の効果はデュロキノールを基質として測定した。

electron donor	U/mg	inhibitor	I_{50}(μM)
duroquinol			
(by opticaly)	83.7	HQNO	3.2
(by O_2 uptake)	90.1	$ZnSO_4$	3.4
ubiquinol-1	100	KCN	6.4
TMPD	11.7		

性を酸素電極で測定した場合にも酸素消費が認められ、この酸素消費は分光学的に測定したデュロキノールの酸化と化学量論的であった。なお、この酸素消費は、反応液にカタラーゼを酵素単位で quinol oxidase の 10 倍濃度添加しても影響されなかった。従って、この酵素は確かに quinol oxidase として機能していた。

表 5-4 右には精製酵素に対する阻害剤の効果を各阻害剤の 1/2 阻害濃度で示した。酵素はシアン化カリウム、HQNO、硫酸亜鉛に高い感受性を示した。 なお、本酵素は海洋細菌の酵素であるが、ナトリウムイオンにより特異的に活性化される性質は示さなかった。

6　精製酵素の酵素活性に対する界面活性剤、リン脂質の効果

精製酵素の酵素活性に対する Liponox DCH の効果を検討した。反応液中の Liponox DCH 濃度を 0.002% から 0.4% まで変化させ酵素活性を測定したところ、quinol oxidase は 0.01～0.02% の Liponox DCH により約 5 倍に活性化される性質を示した。活性化率は酵素の精製段階によって異なっており、膜分画、洗浄膜分画では 1.4 倍、可溶化分画、DEAE-5PW 分画は 1.0 倍、DEAE-Sepahcel 分画は 2.0 倍程度であった。0.02% Liponox DCH の存在下、非存在下でデュロキノールに対する速度論的解析を行った結果、見かけのミカエリス定数は約 1/2 となっていたので、この活性化の機構はキノールへの親和性の増加であることが分かった。同様の活性化機構は大腸菌のシトクローム *o* 型 quinol oxidase でも報告されている(55)。

この様な酵素の活性化は、それぞれ活性化の至適濃度は異なるが、非イオン性界面活性剤である $C_{12}E_8$、両イオン性界面活性剤である Zwitterg

ent 3-14、陰イオン性界面活性剤であるSDS、N-ラウロイルザルコシンによっても認められた。これに対し、デオキシコール酸やCHAPSなどでは最大で約2倍の部分的な活性化しか認められなかった。

一方、精製quinol oxidaseはカルジオリピンによってもLiponox DCHの場合と同様に活性化され、至適濃度は40μg/mlであった。しかし、ホスファチジルグリセロール、大豆リン脂質（主にホスファチジルコリンを含む）、大腸菌のリン脂質（主にホスファチジルエタノールアミンを含む）では全く活性化されなかった。

5．考察

5－1　精製酵素の特徴

精製酵素は少なくとも79、33、14KDaの少なくとも3つのサブユニットから構成される。この酵素複合体は補欠分子族としてプロトヘム(ヘム*b*)と最近発見されたヘム、ヘム*o*を1分子づつ及び、銅を2分子含む。

スペクトル的には典型的なシトクローム*o*型でありシトクローム*a*、*c*、*d*、などは見いだされない。また、リガンド結合ヘムのα吸収帯への寄与が少ない。酵素的にはquinol oxidaseとして機能し、一般的なシトクローム*o*型末端酸化酵素の阻害剤に高い感受性を示す。その活性はLiponox DCHなどの両親媒性分子により活性化される。

なお、ヘム*o*は大腸菌で報告された新規ヘムである(61)。当初、大腸菌のシトクローム*o*型quinol oxidaseには2分子のヘム*b*が存在し、それらの一方がシトクローム*o*として機能すると報告されていた。しかし、

この酵素のピリジンーヘモクロームは553nmに吸収極大を持っており、ヘム*b*のそれとは異なっていたので、この差異が詳細に解析された結果、これまで知られていないヘムの存在が確認されたものである。この発見後いくつかの細菌でヘム*o*の存在が報告されており(64,65)その中にはシトクローム*c* oxidaseとして機能する酵素の例もある(65)。従って、ヘム*o*は末端酸化酵素において普遍的に存在する可能性が高い。

5－2　大腸菌シトクローム*o*型quinol oxidaseとの比較

表5-5では、以上から明らかに出来た海洋細菌*V.alginolyticus*のquinol oxidaseと大腸菌のシトクローム*o*型quinol oxidaseの特徴を比較した。その結果、両者は、含有ヘムの種類、スペクトル的特徴、酵素の基質特異性、阻害剤感受性、両親媒性分子による活性化、といった酵素的性質において基本的に類似していることが分かった。

銅の含量については、大腸菌でも当初複合体あたり2個と報告されていた(54)。しかし、EDTA処理した複合体ではその含量は1個となり、ESRの結果もこれを支持したことから(62)、現在では複合体あたり銅原子1個という値が受け入れられている(66)。一方、海洋細菌の酵素の場合、EDTA処理によっては銅は除去されなかった。ミトコンドリアのaa_3型シトクローム*c* oxidaseには銅が複合体あたり2個存在し、そのうち一方はシトクローム*c*との反応に重要な役割を果たすと考えられている(66)。従って、今回精製したquinol oxidaseが銅2分子を含むことと*V.alginolyticus*呼吸鎖に存在する*c*型シトクロームは無関係ではないかも知れない。この点を明らかにするにはこの*c*型シトクロームを単離することが必要であり、現在検討中である。

表 5-5 海洋細菌 quinol oxidase と大腸菌シトクローム *o* 型 quinol oxidase の比較
大腸菌の酵素については文献 55、56、61を参照した。

	V.alginolyticus	*E.coli*
subunit number	≥3	5
heme in complex	1 *b* and 1*o*	1 *b* and 1*o*
CN^-- binding heme contribution to α-peak	weak	weak
Cu in complex	2 Cu	1 Cu
electron donor	quinol	quinol
inhibitor	CN^-, HQNO, $ZnSO_4$	CN^-, HQNO, $ZnSO_4$

大腸菌の酵素のヘム *o* については、当初は複合体あたり 2 分子のヘム *o* を含み、　分析過程で検出されたヘム *b* は夾雑物であると報告された(61)。しかし、他の研究者グループはヘム *o* とヘム *b* をそれぞれ 1 分子づつ含むと報告している(67)。また、他の細菌でもヘム *o* とヘム *b* を 1 分子づつ含む例が報告されている(64)。そこで、表 5-5 では後者の報告を採用した。

第６章　考察・結論

１．NQR-2 について

今回の比較生化学的解析から、ナトリウム駆動型呼吸鎖とプロトン駆動型呼吸鎖という異なる呼吸鎖を持つ海洋細菌 *V.alginolyticus* と大腸菌の NQR-2 が、分子レベルを含めて類似性が高いことが明らかとなった。

NQR-2 は動物のミトコンドリアでは認められないが、植物ミトコンドリアではその存在はよく知られている。

一方、細菌の場合、NQR-2 に分類される酵素の知見は多い。しかしながら、この NQR-2 の存在意義についての研究は、NQR-2 がエネルギー共役能を持たない酵素であるが故、盛んとは言えなかった。Yagi は、NQR-2 が真性細菌、古細菌を問わず広く存在し、特に古細菌においては NQR-2 のみの存在が報告されていることから、NQR-2 は NQR-1 より起源が古く、また、NQR-1 が機能しなくなる環境でも NQR-2 が機能し得ることに着目し、NQR-2 は細胞内の酸化還元当量の調節に関わっているのではないかと推測している。(30)。

今回明らかにされた海洋細菌と大腸菌の NQR-2 の類似性及び、大腸菌の NQR-2 が NQR-1 に較べ、NADH に親和性が低いことは、先の考え方を支持する。また、これまでに報告された NQR-2 に分類される NADH-quinone reductase の多くが FAD を含み単一のサブユニットから構成されることも興味深い。

さらに、今回得られた結果では NQR-2 は 2 電子還元型であり、キノンをセミキノンラジカルの形成を伴わず還元できる。セミキノンラジカルの発生はキノンの生体への毒性発現の重要な段階であるので、この発

生を伴わないNQR-2はキノン代謝にも重要な役割を果たすかも知れない。従って、他の細菌で知られているNQR-2のキノン還元様式にも興味が持たれる。

この様なNQR-2の起源・機能については、さらに多数のNQR-2を、今回用いた手法や遺伝学的手法で比較することで明確に出来るものと期待される。

2．quinol oxidaseについて

今回精製された海洋細菌 *V.alginolyticus* のquinol oxidaseはシトクローム *o* 型であり、その酵素的性質は大腸菌のシトクローム *o* 型quinol oxidaseと高い類似性を持つことが明らかとなった。

近年、遺伝子レベルでの解析から、*Paracoccus denitrificuns* などの aa_3 型cytochrome *c* oxidaseと大腸菌のシトクローム *o* 型quinol oxidaseなど、ヘムと銅を含む末端酸化酵素がスーパーファミリーを形成していることが提唱されている(66,68)。今回精製した酵素も、その性質から、このスーパーファミリーに属する可能性が高い。

一方、末端酸化酵素の中には、先のスーパーファミリーに属さないユニークな酵素も多種多様存在する(54)。例えば、海洋細菌 *Pseudomonas nautica* はシトクローム *o* 型でキノールを酸化する酵素を持つ。しかしこの酵素はESRで検出可能な銅を持たず、酸素を水ではなく過酸化水素に還元する(69)。ナトリウム駆動型呼吸鎖を持つ *V.alginolyticus* が、この様なユニークな酵素ではなく、スーパーファミリーに属するであろう酵素を呼吸鎖に持つことは興味深い。

なお、最近滑走細菌として知られ海洋由来でない *Vitreoscilla* 属の細菌

がナトリウムポンプとして機能するquinol oxidaseを持つことが明らかにされた(70)。この酵素を、プロトンポンプとして機能するquinol oxidaseを今回の手法を用いて酵素的に比較することでquinol oxidaseのイオン排出についても重要な知見が得られ、ナトリウム駆動型呼吸鎖とプロトン駆動型呼吸鎖の関係もより明らかにできるであろう。また、この*Vitreoscilla*の酵素と末端酸化酵素のスーパーファミリーとの関係についても興味が持たれる。

3．NQR-1について

海洋細菌と大腸菌のNQR-1は異なるイオンと共役するにも係わらず、思いの他、類似点が多いことが分かった。即ち、両者ともNADHと反応するフラボタンパク質を含む構成を取っており、そのフラボタンパク質は酵素的に高い類似性を持っている。このことはこれらのフラボタンパク質が同じ電子伝達機構をもつことを意味する。この様なフラボタンパク質サブユニットの存在及び、反応機構の類似性が細菌のNQR-1に普遍的であるか否かは興味の持たれる点である。

これらのフラボタンパク質が電子供与体前処理により失活する機構は酵素が還元型になるためと考えられる。このことはフラビンが2還元当量を受け取り、完全還元されることが失活の重要な要因であることを示唆する。それ故、通常細胞内では、このフラビンは2電子還元される事はなくフラボセミキノンと酸化型フラビンのサイクルを形成しながら、イオンポンプサブユニットへ1電子づつ電子を伝達するのであろう。事実、今回明らかにされた様にこれらのフラビン酵素は1電子還元型である。また、大腸菌で呼吸鎖に由来すると思われるユビキノンのラジカル

が検出されていること(71)は、この事を、1個づつ電子を受け取るであろうイオンポンプサブユニットの側から支持する。

では、これらのNQR-1イオンポンプ部分によるイオン排出機構についてはどうであろうか。海洋細菌NQR-1では、FMNを補酵素とするαサブユニット部分でナトリウム排出が行われ、このナトリウム排出にはキノール形成が密接に関連することが明らかにされている(50)。呼吸鎖におけるプロトン駆動力形成機構の仮説は、キノン、フラビン、シトクロームなど可動性の還元当量キャリアーにより、プロトンや還元当量が細胞膜を隔てて転移されるループ機構と、酵素複合体の電子伝達による立体構造変化に伴いプロトンや還元当量の転移される立体構造変化機構の2種に大別される(72)。海洋細菌NQR-1がループ機構でナトリウムイオンを排出するためにはフラビンまたはキノンがナトリウム型となり、これが膜内を自由に移動できることが必要となる。しかし、この様な物質が膜内で自由に移動できるとは考えにくい。それ故、海洋細菌NQR-1のイオン排出には立体構造変化が重要な役割を果たすと思われる。従って、もし海洋細菌と大腸菌が基本的に同じ反応機構でイオン排出を行うなら、大腸菌のNQR-1のイオン排出にも立体構造変化が重要な役割を果たすであろう。しかしながら、これらのNQR-1がフラボタンパク質以降の部分で違う反応機構を持つ場合は、この考えが適用できず、大腸菌NQR-1が基本的にループ機構でイオン排出する可能性があることは自明である。

その一方で、大腸菌NQR-1が海洋細菌NQR-1と異なる立体構造変化機構によりプロトンを排出する可能性もある。*Propionegenium modestum*のATP合成酵素は条件により、駆動イオンをナトリウムまたはプロト

ンと変化させる(73)。この事は、イオン輸送体のイオン特異性が、アミノ酸配列のわずかな違いに起因することを示唆する。従って。両細菌のNQR-1のイオン特異性が変異導入により容易に変化し、しかも両者の反応機構が異なる場合もあるかも知れない。

この様な解析の為にも、イオンポンプとして機能するサブユニットの分離・精製と機能解析が重要となる。大腸菌NQR-1複合体全体の分離・精製については、本酵素を細胞膜から可溶化できたものの、本複合体が非常に不安定であるため以降の精製が行えず、現在のところ成功していない。従って、今後の検討課題である。

4．ナトリウム駆動型呼吸鎖とプロトン駆動型呼吸鎖

以上の解析から明らかにされたように、海洋細菌と大腸菌は異なるタイプの呼吸鎖を持つにも係わらず、全体的な構成には非常に類似していた。図6-1には海洋細菌と大腸菌の呼吸鎖を模式的に示した。

先に述べたように、イオン輸送タンパク質のイオン特異性はアミノ酸の僅かな違いで起こる可能性がある。この可能性に従えば、ナトリウム駆動型呼吸鎖の獲得にあたり呼吸鎖が大きく変貌していないことは理解しやすい。しかし逆に、ナトリウムポンプ部分以外の他の部分の変貌が少ないことは、それらの保存の為の選択圧が強いことを示すのかも知れない。どちらの場合であっても、今回の結果からは、海洋細菌と大腸菌の、ナトリウム駆動型呼吸鎖とプロトン駆動型呼吸鎖の起源が異なるものとは考えにくい。

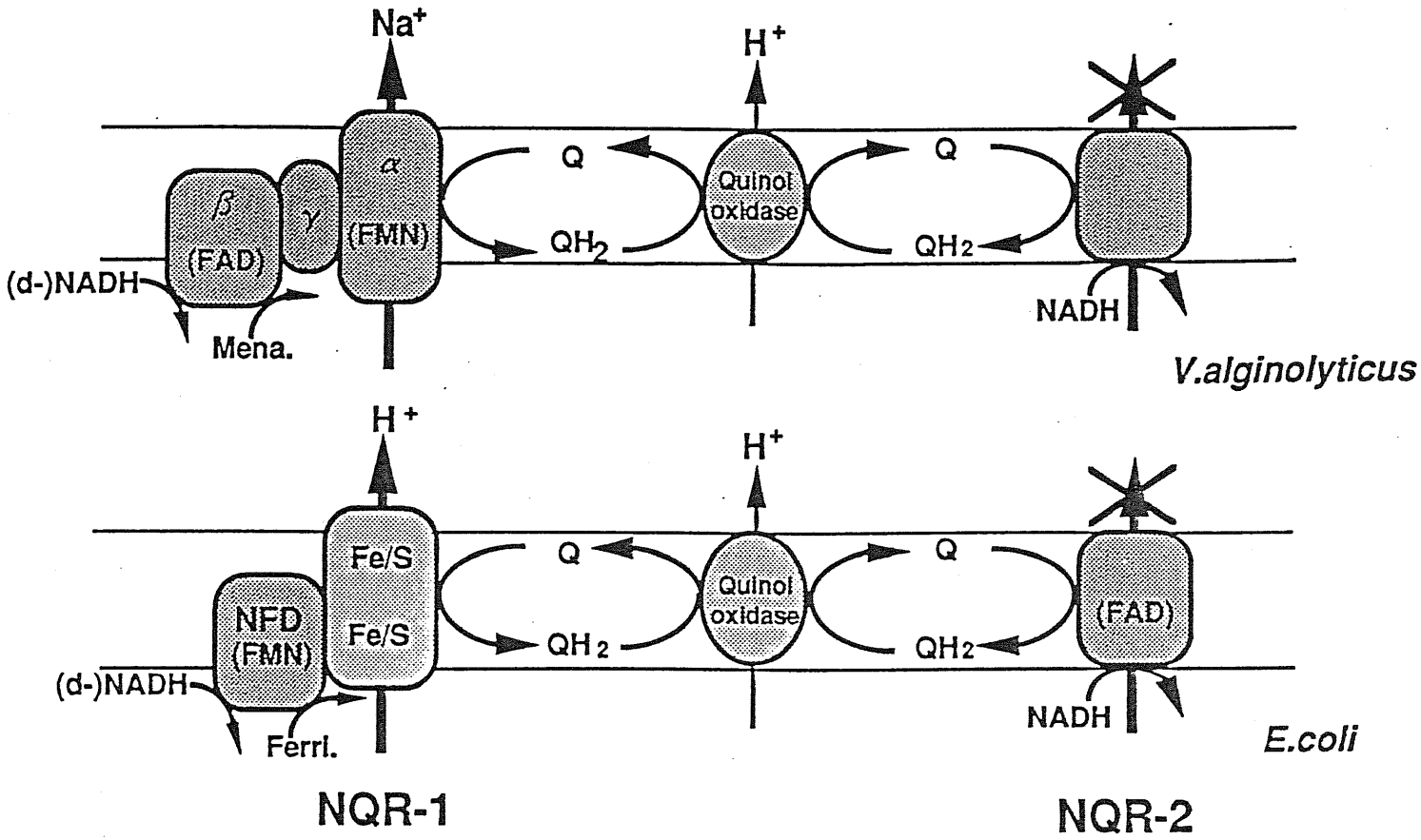


図 6-1 海洋細菌と大腸菌の呼吸鎖

左側に示した NQR-1 及び、右側に示した NQR-2 により還元されたキノールは、中央に示した quinol oxidase の基質となっている。各細胞膜の上側が細胞外、下側が細胞内である。

5．結論

海洋細菌のもつナトリウム駆動型呼吸鎖と大腸菌の持つプロトン駆動型呼吸鎖は基本的に類似しており、またイオン特異性の異なるNQR-1部分についても、そのフラボタンパク質部分の電子伝達機構は類似性が高い。また、今回明らかに出来たNQR-1、NQR-2それぞれの酵素的特徴は以降の解析の重要な手がかりとなる。

より詳細な、NQR-1のイオン特異性やイオン排出機構については、イオンポンプとして機能するサブユニットの解析が重要である。一方、ナトリウム駆動型呼吸鎖とプロトン駆動型呼吸鎖の関係については多数の事例の検討が重要である。これらの解析に、今回用いた比較生化学的手法は、遺伝学的手法とは異なる観点に立った非常に有効な手段である。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始暖かく丁寧にご指導下さった、畝本　力教授、林　万喜助教授に心より感謝の意を表します。また、研究に際し、貴重な御助言を下さった中村辰之介助手に深く感謝致します。さらに、サンプル調製にご協力くださった臨床化学研究室の皆様、抗体調製をご指導くださった薬物学研究室の皆様に深くお礼申し上げます。最後に、私を、励まし、また私のため御尽力下さった大学院生、卒業研究生の皆様に心よりお礼を申し上げます。

参考文献

1)V. P. Skulachev (1988). Membrane bioenergetics, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

2)R. B. Gennis (1989). Biomembrane, Springer-Verlag New York.

3)P. Mitchell (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature(London), *191*:144-148.

4)P. Mitchell (1968). Chemiosmotic coupling and energy transduction, Glynn. Research, Bodm in, Cornwall, England.

5)H. Tokuda, T. Unemoto (1981). A respiration-dependent primary sodium extrusion system functioning at alkaline pH in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., *102*:265-271.

6)H. Tokuda, T. Unemoto (1982). Characterization of the respiration-dependent Na^+ pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. J. Biol. Chem., *257*: 10007-10014.

7)H. Tokuda, T. Unemoto (1984). Na^+ is translocated at NADH:quinone oxido-reductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. J. Biol. Chem., *259*:7785-7790.

8)P. Dimroth (1987). Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. Microbiol. Rev., *51*(3): 320-340.

9)G. R.Draoeay, R. A. Macleod (1963). Na^+ dependent active transport of α-aminoisobutylic acid into cells of a marine pseudomnad. Biochem. Biophys. Res. Commun., *12*: 111-115.

10)P. T. S. Wong, J. Thompson, R. A. Macleod (1969). Nutrition and Metabolism of marine bacteria. XVII. Ion-dependent retention of α-aminoisobutyric acid and its relation to Na^+-dependent transport in a marine pseudomonad. J. Biol. Chem.,*244*:1016-1025.

11)H. Tokuda, M. Asano, Y. Shimamura, T. Unemoto, S. Sugiyama, Y. Imae (1988). Roles of the respiratory Na^+pump in bioenergetics of *Vibrio alginolyticus*. J. Biochem., *103:* 650-655

12)Y. Imae and T. Atsumi (1989). Na^+-driven bacterial flagellar motors. J. Bioenerg. Biomembr., *21*(6):705-716.

13)R. A. Dibrov, R. L. Lazarova, V. P. Skulachev, M. L. Versovskaya (1986). The sodium cycle. II. Na^+-coupled oxidative phosphorylation in *Vibrio alginolyticus* cells. Biochim. Biophys. Acta, *850*:458-465.

14)V. P. Skulachev (1989). Bacterial Na^+ energetics.FEBS lett., *250*: 106-114.

15)日本生化学会編　生化学データブック、5. 遺伝、大腸菌 K12 株の系図. pp.708-726. 東京化学同人

16)H. Tokuda (1983). Isolation of *Vibrio alginolyticus* mutants defective in the respiration-coupled Na pump. Biochem. Biophys. Res. Commun., *114*:113-118.

17)M. Hayashi, T. Unemoto (1986). FAD and FMN flavoproteins participate in the sodium-transport respiratory chain NADH:quinone reductase of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. FEBS lett., *202*:327-330.

18)T. E. King (1982). in Function of Quinones in Energy Conserving Systems (B. L. Trumpower, ed.), pp. 3-25, Academic Press, New York.

19)M. Hayashi, T. Unemoto (1987). A direct spectrophotometric assay of quinol produced by NADH:quinone reductase and its application. Biochem. (Life Sci. Adv.), *6*:157-161.

20)K.Matsushita, E. Shinagawa, O. Adachi, M. Ameyama (1987). Purfication, characterization and reconstitution of cytochrome *o*-type oxidase from *Gluconobacter suboxydans*. Biochim. Biophys. Acta, *894*:304-312.

21)E. J. Faeder, L. M. Siegel (1973). A rapid micromethod for determination of FMN and FAD in mixture. Anal. Biochemi., *53*:332-336.

22)J. D. Weinstein, S. I. Beale (1983). Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*, J. Biol. Chem., 258:6799-6807.

23)C. L. Bashford, W. S. Thayer (1977). Thermodynamics of the electrochemical proton gradient in bovine heartsubmitochondrial particls. J. Biol. Chem., *252*: 8459-8463.

24)J. T. Russell (1984). △pH, H^+ diffusion potentials and Mg^{2+} ATPase in neurosecretory vesicles isolated from bovine neurohypophyses. J. Biol. Chem., *259*: 9496-9507.

25)U. K. Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterophagi T4. Nature, *227*:680-685.

26)B. J. Davis (1964). Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., *121*:404-427.

27)O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. L. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., *193*:265-275.

28)M. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochemi., *72*:248

29)Carla A. M. Marres, Simon de Vries (1991). Reduction of the Q-pool by duroquinol via the two quinone-binding sites of the QH_2:cytochrome *c* oxido-reductase. A model for the equilibrium between cytochrome b_{562} and the Q-pool. Biochim. Biophys. Acta, *1057*:51-63.

30)矢木隆雄 (1989). 呼吸鎖 NADH-キノン酸化還元酵素の構造と機能. 蛋白質・核酸・酵素, *34*(4):351-363.

31)P. Owen and H. R. Kaback (1978). Molecular structure of membrane vesicles from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., *75*:3148-3152.

32)P. Owen and H. R. Kaback (1979). Immunochemical analysis of membrane vesicles from *Escherichia coli*. Biochemistry, *18*:1413-1422.

33)P. Owen and H. R. kaback (1979). Antigenic architecture of membrane vesicles from *Escherichia coli*. Biochemistry, *18*:1422-1426.

34)K. Matsushita, T. Ohnishi and H. R. Kaback (1987). NADH-ubiquinone oxidoreductase of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. Biochemistry, *26*: 7732-7737.

35)T. Ohnishi, K. Matsushita, H. R. Kaback, K. Hon-nami and T. Oshima (1986). Comparative studies of the NADH-Q oxidoreductase system of bacterial respiratory chain system. in Iron-sulfer protein research, H. Mastubara et al. ed., pp. 232-239. Japan sci. soc. press, Tokyo/Sprringer-Verlag, Berlin.

36)S. W. Meinhardt, K. Matsushita, H. R. Kaback and T. Ohnishi (1989). EPR characterization of the iron-sulfer-containing NADH-ubiquinone oxido-reductase of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. Biochemistry, *28*: 2153-2160.

37)J. W. Thomson and B. M. Shapiro (1981). The respiratory chain NADH dehydrogenase of *Escherichia coli.* J. Biol. Chem., *256*:3077-3084.

38)I. G. Young and B. J. Wallace (1976). Mutations affecting the reduced nicothinamide adenine dinucleotide dehydrogenase complex of *Escherichia coli.* Biochim. Biophys. Acta, *449*:376-385.

39)I. G. Young, A. Jaworowski and M. I. Pulis (1978). Amplification of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* by gene cloning. Gene, *4*: 25-36.

40)A. Jaworowski, G. Mayo, D. C. Shaw, H. D. Campbell and I. G.Young (1981). Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* and reconstitution of NADH oxidase in ndh mutant membrane vesicles. Biochemistry, *20*:3621-3628.

41)I. G. Young, B. L. Rogers, H. D. Campbell, A. Jaworowski and D. D. C. Shaw (1981). Nucleotide sequence coding for the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli.* UUG initiation codon. Eur. J. Biochem., *116*:165-170.

42)Y. Hatefi (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Ann. Rev. Biochewm., *54*:1015-1069.

43)H. Weiss, T. Friedrich, G. Hofhaus and D. Preis (1991). The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. Eur. J. Biochem., *197*:563- 576.

44)M. Gutaman, A.Schejter and Y. Avi-Dor (1968). The preparation and properties of the membranal DPNH dehydrogenase from *Escherichia coli.* Biochim. Biophys. Acta, *162*:506-517.

45)W. W. Cleland (1979). Statistical analysis of enzyme kinetic data. Meth. Enzymol.(D. L. Purich), *63*:Part A,103-138. Academic Press, New York.

46)V. P. Skulachev (1989). The sodium cycle: a novel type of bacterial energetics. J. Bioenerg. Biomembr., *21*(6):635-647.

47)H. Tokuda and K. Kogure (1989). Generalized distribution and common properties of Na^+-dependent NADH:quinone oxidoreductase in gram-negative marine bacteria. J. Gen. Microbiol., *135*:703-709.

48)T. Unemoto and M. Hayashi (1989). Sodium-transport NADH-quinone reductase of a marine *Vibrio alginolyticus*. J. Bioenerg. Biomembr., *21*(6): 649-662

49)T. Unemoto, H. Tokuda and M. Hayashi (1990). Primary sodium pumps and their significance in bacterial energetics. The Bacteria, Vol. 12, pp.33-54.

50)畝本　力・中村辰之助・林　万喜 (1991). 微生物の環境適応と膜機能 Membrane, *16*(1):3-14.

51)H. Tokuda and T. Unemoto (1985). The Na^+-motive respiratory chain of marine bacteria. Microbiol. Sci., *2*(3):65-71.

52)T. Iyanagi and I. Yamazaki (1970). One-electron-transfer reactions in biochemical systems V. difference in mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase). Biochim. Biophys. Acta, *216*:282-294.

53)R. K. Poole (1988). Bacterial cytochrome oxidases. in Bacterial energy transduction . C. Anthony ed. Academic Press, London . pp. 231-291.

54)Y. Anrakku (1988). Bacterial electron transport chains. Ann. Rev. Biochem., *57*: 101-132.

55)北　潔 (1990). 大腸菌呼吸鎖のユビキノール酸化酵素. 生化学, *62*(6): 417-433.

56)曽根雪史 (1991). 細菌の呼吸鎖複合体におけるシトクロムの役割とプロトン輸送. 蛋白質・核酸・酵素, *36*(5):798-813.

57)T.Unemoto and M. Hayashi (1979). NADH:quinone oxidoreductase as a site of Na^+-dependent activation in the respiratory chain of marine *Vibrio alginolyticus*. J. Biochem., *85*:1461-1467.

58)I. A. Smirnova, M. L. Vaghina and V. A. Kostyrko (1990). $\Delta\Psi$ and ΔpH generation by the H^+ pumps of respiratory chain and ATP ase in subcellular vesicles from marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. Biochim. Biophys. Acta, *1016*:385-391.

59)K. Kita, K. Konishi and Y. Anraku (1984). Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. J. Biol. Chem., *259*:3368-3374.

60)K. Matsushita, L Patel and R. Kaback (1984). Cytochrome *o* type oxidase from *Escherichia coli*. Characterization of the enzyme and mechanism of electrochemical proton gradient generation. Biochemistry, *23*:4703-4714.

61)A. Puustinen and M. Wikström (1991). The heme groups of cytochrome from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. sci., *88*:6122-6126.

62)A. Puustinen, M. Finel, T. Haltia, R. B. Gennis and M Wikström. (1991). Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. Biochemistry, *30*: 3936-3942.

63)J. W. Falk (1964). Porphyrins and Metalloporphyrins. Elsevier, Amsterdam.

64)松下一信, 恵美須屋廣昭, 足立収生 (1991). 酢酸菌 *Acetobacter aceti* の 2 つの末端酸化酵素チトクロム a_1 とチトクロム *o* の相同性. 第 17 回生体エネルギー討論会要旨, pp. 24-25.

65)N. Sone and Y. Fujiwara (1991). Haem O can replace haem A in the active site of cytochrome *c* oxidase from thermophilic bacterium PS3. FEBS letts., *288*:154-158.

66)M.Saraste, L. Holm, L. Lemieux, M. Lubben and John van der Oost (1991). The happy family of cytochrome oxidases. Biochem. Soc. Transact., *19*:608 -612.

67)川崎政人, 茂木立志, 安楽泰宏 (1991). 大腸菌シトクロム *bo* 複合体のプロトンポンプ機構. 第 17 回生体エネルギー討論会要旨, pp. 34-35.

68)R. B. Gennis (1991). Some recent advances relating to prokaryotic cytochrome *c* reductase and cytochrome c oxidases. Biochim. Biophys. Acta, *1058*:21-24.

69)S. Arnaud, F. Malatesta, B. Guigliarelli, J. P. Gayda, P. Bertrand, R. Miraglio and M. Denis (1991). Purification and characterization of the oxidase from the marine bacterium *Pseudomonase nautica* 617. Eur. J. Biochem.,, *198*:349-356.

70)B. J. S. Efiok and D. A. Webster (1990). A cytochrome that can pump sodium ion. Biochem. Biophys. Res. Commun., *173*(1):370-375.

71)J. A. Hamilton, G. B. Cox, F. D. Looney and F. Gibson (1970). Ubisemiquinone in membranes from *Escherichia coli*. Biochem. J., *116*:319-320.
72)D. G. ニコルズ著, 西崎友一郎訳 (1984). 生体膜と生体エネルギー. 培風館.
73)W. Laubinger and P. Dimroth (1989). The sodium ion translocating adenosine- triphosphatase of *Propionegenium modestum* pumps protons at low sodium ion concentrations. Biochemistry *28*:7194-7198.