

解説

紅色光合成細菌における反応中心への電子供与体の多様性

首都大学東京 大学院理工学研究科 生命科学専攻

永島賢治

はじめに

紅色細菌 (purple bacteria) という名称は光合成を行う種の菌体の色に由来するが、遺伝子の塩基配列情報を利用した系統分類においては光合成をしない種も非常に多数含まれており、現在ではプロテオバクテリアという呼び方が一般的である (図1)。このグループのエネルギー代謝は酸素呼吸、発酵、脱窒 (硝酸呼吸)、硫黄酸化、硫酸還元など多様であり、光合成はそうした数あるエネルギー代謝のうちの1つである。光合成能を持つ種は紅色光合成細菌と呼んで区別してはいる

ものの、それ以外のエネルギー代謝経路を複数併せ持っているのが普通である。したがって、光合成の機能が全く独立に働いているとは考えにくく、電子伝達を通じて他の経路と互いにリンクし合っていると考えるのが自然であろう。こうしたリンクを形成する様式の1つとして光化学反応中心への電子供与体を共有するという方法がある。本稿では紅色光合成細菌において反応中心と相互作用するこれら電子伝達タンパクにどのようなものがあるか、現時点で解っている範囲でまとめたいと思う。

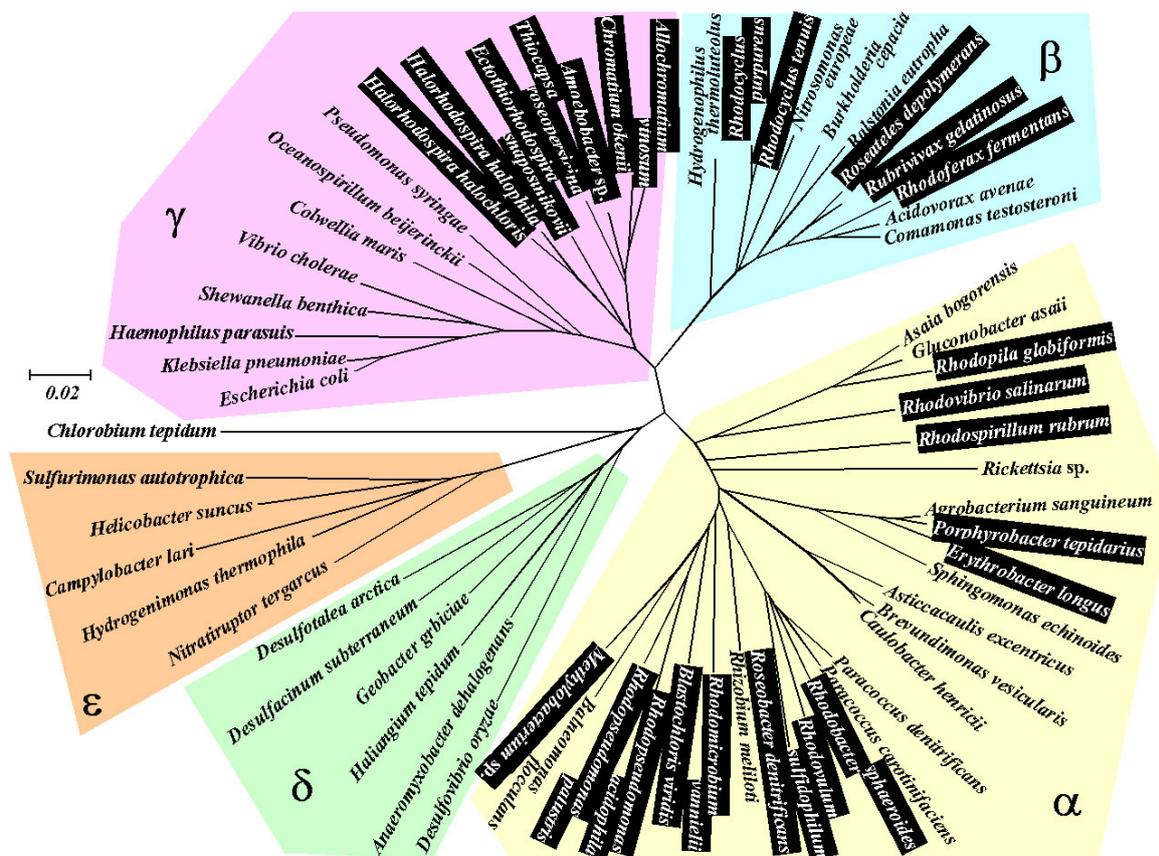


図1 紅色光合成細菌の16S rRNAの塩基配列比較に基づく系統樹
反転表示は光合成能を有する種を示す。

紅色光合成細菌の系統分布

現在までに知られている光合成細菌は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の比較に基づき、紅色細菌（プロテオバクテリア）、綠色イオウ細菌、綠色繊維状細菌（繊維状非酸素発生細菌）、ヘリオバクテリア、シアノバクテリアの 5 つの系統に分類されている¹⁾。紅色細菌は α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の 5 つのサブクラスにさらに細分されており、光合成をする種は α 、 β 、 γ のグループに見られる（図 1）。古典的な分類学に従えば、 γ サブグループに属するのはいわゆる紅色イオウ細菌で、これらは H_2S のような還元型イオウ化合物を光合成の末端電子供与体として利用する光独立栄養生物である。 α および β サブグループに属する光合成細菌は紅色非イオウ細菌とも呼ばれ、有機物を利用して増殖する光従属栄養生物である。多くの場合、紅色非イオウ細菌は光合成のみならず、酸素呼吸等他の生育様式でも盛んに増殖する。

光合成細菌のうち、葉緑体の起源とされるシアノバクテリアは二つの光化学系を持っている。光化学系 1 反応中心複合体では鉄-硫黄クラスターが、光化学系 2 反応中心複合体ではキノンが、それぞれ複体内での末端電子受容体として働く。その他の光合成細菌はいずれか一方の反応中心複合体を持っており、全ての紅色光合成細菌は光化学系 2 反応中心複合体とよく似た反応中心複合体を持っている。しかし複合体への電子供与体は異なっており、光化学系 2 反応中心では水

を分解して電子を得るのに対し、紅色光合成細菌では電子伝達タンパクから電子を得る。

紅色光合成細菌の電子伝達系

紅色細菌における主要な光合成電子伝達経路は循環的であることが知られている。この経路は反応中心、チトクロム bc_1 複合体、キノンプール、水溶性電子伝達タンパクの 4 つの要素から成り立っている。光励起されたスペシャルペアから放出された電子は反応中心複合体中のキノンへ運ばれ、還元されたキノン（キノール）は反応中心を離れて膜中にプールされる。電子はチトクロム bc_1 へ伝達され、次いで水溶性電子伝達タンパクに渡される。さらにこの水溶性電子伝達タンパクからの電子が、光酸化されたスペシャルペアに渡されることで循環的経路が成立する（図 2）。

しかし、光合成電子伝達はこの循環的経路のみで閉じているのではなく、途中で様々な電子の出入りがあり、それは水溶性電子伝達タンパクまたはキノンを介して起こる。よく知られた例としては、還元型のイオウ化合物がフラボチトクロム等によって酸化されて電子の供給源となり、水溶性電子伝達タンパクを経て反応中心へ伝達される経路がある²⁾。この反応経路は紅色イオウ細菌において特に重要である。一方、 bc_1 複合体から電子を受け取る水溶性電子伝達タンパクは、反応中心以外にもチトクロム酸化酵素や、種によっては脱窒（硝酸呼吸）に働く酵素への電子供与体としても

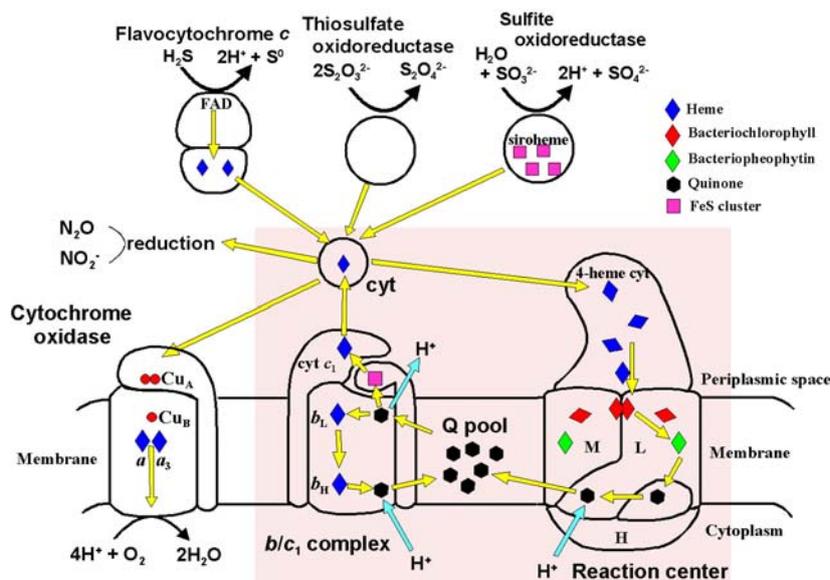


図 2 紅色光合成細菌における電子伝達経路
 反応中心へ電子を供与する水溶性電子伝達タンパクを中心に置いている。循環的電子伝達経路は四角で囲まれている。

働く³⁾。前者の場合、キノールの供給源を反応中心複合体からNADH脱水素酵素に置き換えれば一般的な呼吸の電子伝達鎖となる。

水溶性電子伝達タンパク

以上のように、光合成だけでなく様々な電子伝達経路を仲介する水溶性電子伝達タンパクとして、紅色光合成細菌において最も良く研究されてきたのはチトクロム c_2 であろう。このチトクロムは c 型ヘムを1つ結合した分子量1万前後の小さなタンパクであり、*Rhodobacter sphaeroides*や*Blastochloris viridis*など、 α グループに分類される細菌にのみ見られる。非光合成細菌においても、チトクロム bc_1 からチトクロム酸化酵素への電子伝達に使われる。 β および γ グループの細菌にはチトクロム c_2 に対応する水溶性の c 型チトクロムとしてチトクロム c_8 が知られている。このチトクロムはチトクロム c_2 と同様、ヘムを1つ結合する分子量1万以下の小さなタンパクであり立体構造もよく似るが(図3)、アミノ酸配列がチトクロム c_2 とは明確に異なっているためチトクロム c_8 と呼ばれている⁴⁾。チトクロム c_8 の機能はチトクロム c_2 と同様であると考えられているが、種によっては検出されていない。

β および γ グループの光合成細菌の多くの種では水溶性の電子伝達タンパクとして高電位鉄-イオウタンパク(HiPIP: High-Potential Iron Sulfur Protein)が合成されている。通常HiPIPと呼ばれるこのタンパクは4Fe-4S型の鉄-イオウクラスターを1つ含み、大きさはチトクロム c_2 や c_8 とほぼ同じである(図3)。HiPIPの生理学

的な機能は1990年代半ばまで必ずしも明確ではなかったが、 β グループの*Rhodospirillum rubrum*⁵⁾と*Rubrivivax gelatinosus*⁶⁾において反応中心を還元するという報告が相次いだことで注目を浴びるようになった。ただし、これらの種ではHiPIPだけでなくチトクロム c_8 も合成されるため、どちらが反応中心への主要な電子供与体なのか、また、両者に生理機能の違いがあるのかという疑問は残った。そこで筆者らは*Rubrivivax gelatinosus*を用いてこれら電子伝達タンパクを欠く一連の変異株の作製を試みてきた。

チトクロム c_8 とHiPIP

*Rubrivivax gelatinosus*においては多量のHiPIPに加え2種類のチトクロム c_8 が合成される⁷⁾。1つは65 mVという比較的低い中間電位を持ち、もう一つは約300 mVというHiPIPとほぼ同等の高い電位を示す。これら3つの水溶性電子伝達タンパクそれぞれの単欠損株および全ての組み合わせの2重欠損株、さらに3つ全てを欠く3重欠損株を作製したところ、呼吸(暗所・好気)条件下では全て野生型と変わらない生育速度を示した。光合成(明所・嫌気)条件下では3つの単欠損株の中ではHiPIP欠損株のみが野生株の約半分の生育速度となる一方、2つのチトクロム c_8 のいずれかを欠く変異株は野生株と生育速度が全く変わらなかった(図4)。このことは*Rubrivivax gelatinosus*における光合成電子伝達ではHiPIPが生理的に主要な電子伝達タンパクであることを示している⁸⁾。2重欠損株シリーズの中ではHiPIPと高電位チトクロム c_8 を欠く株が光合成条件

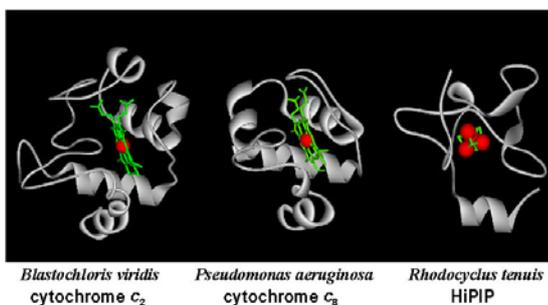


図3 反応中心へ電子伝達することが知られている水溶性電子伝達タンパクの立体構造

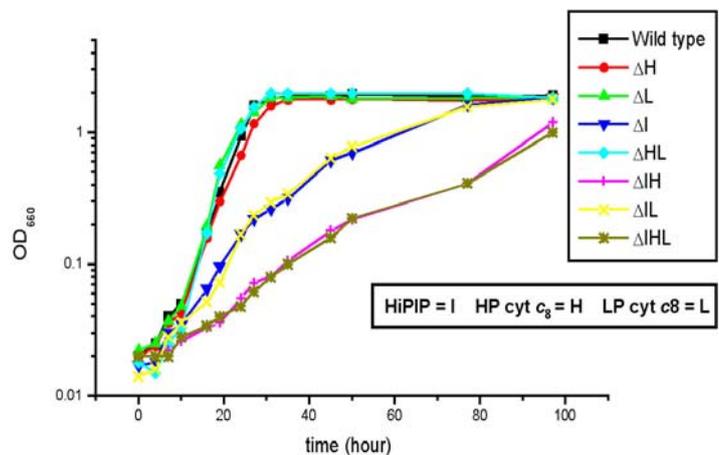


図4 *Rubrivivax gelatinosus* 電子伝達タンパク変異株の光合成条件下での生育曲線

培地はポリペプトンおよび酵母エキスを含む天然培地を使用した。

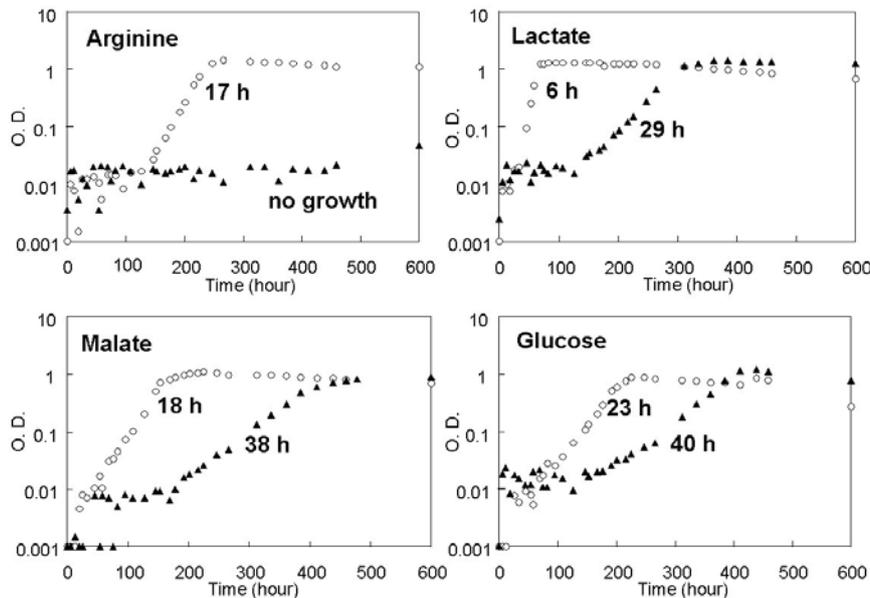


図5 *Rubrivivax gelatinosus* 野生株と反応中心結合チトクロム欠損株の培地組成の違いに応じた生育の変化
 各パネルに示された有機物を唯一の炭素元とする培地で光合成培養した結果を示す。白丸 (○) が野生株、黒三角 (▲) が欠損株の生育を示している。

下で野生株の約4分の1の生育速度となったことから高電位チトクロム c_8 もHiPIP程ではないにせよ光合成電子伝達を維持し得ると考えられる。一方で、低電位チトクロム c_8 の欠損は生育速度に何ら影響を与えなかった。*Rubrivivax gelatinosus*に見られるようなHiPIPを主としチトクロム c_8 を補とする関係は、*Rhodocycclus tenuis*⁹⁾や*Allochroamtium vinosum*¹⁰⁾でも示唆されており、両タンパクを合成する β および γ グループの光合成細菌全般に共通する性質かもしれない。

HiPIPとチトクロム c_8 の使い分けについて、*Rubrivivax gelatinosus*の反応中心結合チトクロムサブユニットの欠損株で興味深いデータが得られている。この変異株は光合成条件下での生育が野生株より遅く、これは主要な電子供与体であるHiPIPが変異株では反応中心を認識せず、もっぱらチトクロム c_8 が電子供与体となるためと考えられる。この変異株を炭素元を限定した様々な培地で光合成培養すると野生株の生育速度との比が変化する。例えば炭素元がグルコースやリンゴ酸の場合変異株の生育速度は野生株の約半分であるが、乳酸の場合は5分の1の速度となる(図5)。アルギニン炭素元とした場合には野生株が生育可能であるのに対し変異株は不可となる。このことは炭素元それぞれの代謝経路が異なる電子供与体を通じて光合

成電子伝達経路とリンクしていることを示唆している。

チトクロム c_4

上述の変異株の研究でひとつ注目しておきたいのは、HiPIPと2つのチトクロム c_8 を欠いた*Rubrivivax gelatinosus*変異株が光合成条件下で生育可能なことである。これは別の電子伝達タンパクが働いていることを意味している。この3重欠損株の生細胞を用いて閃光照射実験を行うと、光酸化された反応中心結合チトクロムを還元するc型チトクロムの存在が、 α 吸収帯ピークの555 nmから553 nmへの明確なシフトとして観察された。水溶性タンパクを対象とした通常の精製法では該当するチトクロムを得ることはできなかったが、低濃度のオクチルグルコシド存在下で精製を試みたところ、分子量約25 kDaで553 nmに α ピークを持つc型チトクロムが得られた。酸化還元中点電位は325 mVであり、精製した光合成膜標品との再構成実験では反応中心結合型チトクロムへの電子供与体として機能することが確認された。このチトクロムをコードする遺伝子をクローン化し塩基配列を調べたところ、一次構造中にc型ヘムの結合モチーフを二つ含んでおり、相同検索の結果からはチトクロム c_4 と同定された。チトクロム c_4 は光合成の有無に関係なく紅色細菌に広く

分布する2ヘム型チトクロム c で、末端酸化酵素を還元することが示唆されているものの¹¹⁾、その生理的役割はあまりよく解っていない。実際、このチトクロム c_4 を単欠損した株を作製したところ野生型との違いは見られなかった。しかし先の3重欠損株を親株として4重欠損株を作製したところ、光合成条件下での生育速度は顕著に遅くなり、3重欠損株のほぼ半分、野生型の10分の1程度となった。このことから*Rubrivivax gelatinosus*においてチトクロム c_4 が反応中心への生理的な電子供与体として働き得ることが明らかになった。恐らくは他の種でも同様な電子伝達経路が存在するものと予想される。

膜結合型電子伝達タンパク

反応中心への電子供与体が複数存在する別の例として α グループの*Rhodobacter capsulatus*がある。この細菌はチトクロム c_2 を豊富に合成して反応中心への電子供与体としているが、チトクロム c_y と呼ばれる膜結合型のモノヘムチトクロムも合成する¹²⁾。チトクロム c_2 欠損株ではこのチトクロム c_y がその機能を相補し光合成電子伝達を維持することが報告されている¹²⁾。興味深いのは同属の*Rhodobacter sphaeroides*ではチトクロム c_2 欠損株は光合成不可となることで、この細菌でもチトクロム c_y が合成されるにもかかわらず反応中心への電子供与体として働かないことである¹³⁾。チトクロム c_y のC-末端領域のアミノ酸配列はチトクロム c_2 と30-40%の相同性がある。また、チトクロム c_y のホモログは*Rhodobacter*属だけでなく、近縁な非光合成細菌でも報告されている¹⁴⁾。

筆者らは最近、*Rhodobacter*属に近縁な*Rhodovulum sulfidophilum*においても膜結合型のチトクロム c が反応中心への電子供与体として働いていることを見いだした¹⁵⁾。*Rhodovulum sulfidophilum*は海洋性の光合成細菌で、他の α グループの細菌と同様にチトクロム c_2 を合成する。しかしチトクロム c_2 欠損株を作製しても野生型との生育の違いは見られず、同等の働きを持つ電子伝達タンパクの存在が予想された。初めにその候補として水溶性画分から精製されてきたのは分子量約25 kDaの c 型チトクロムであった¹⁶⁾。チトクロム c -549と名付けたこのチトクロムは再構成実験において反応中心への良い電子供与体として働くことが分かったが、対数増殖期の細胞中にほとんど検出されなかった。さらに探索を進めた結果、膜画分に約50 kDaの分子量を示すチトクロム c が多量に合成されていることを見だし、精製して膜標品と混ぜ閃光照射実験をしたところ、反応中心結合チトクロムへの速い電子伝達が観察された。 α 吸収帯のピークは550 nm、酸化還元中点電位は369 mVであった。クローニングした遺伝子の塩基配列情報に基づいて、このチトクロムはN末端に膜を1回貫通する疎水性領域を持ち、長いリンカー領域を経てC末端領域にヘム結合モチーフを1つ持つことが推測された。さらにはリンカー領域内に先に述べたチトクロム c -549のN末端配列が見つかったことからチトクロム c -549はこの50 kDaの膜結合チトクロム c が特異的に切断されて生じたものと考えられた。そのC末端ヘム結合領域はチトクロム c_2 と高い配列相同性があり、アミノ酸配列の比較に基づく分子系統樹ではチトクロム c_2 のクラスター内に位置付けられる(図6)。こ

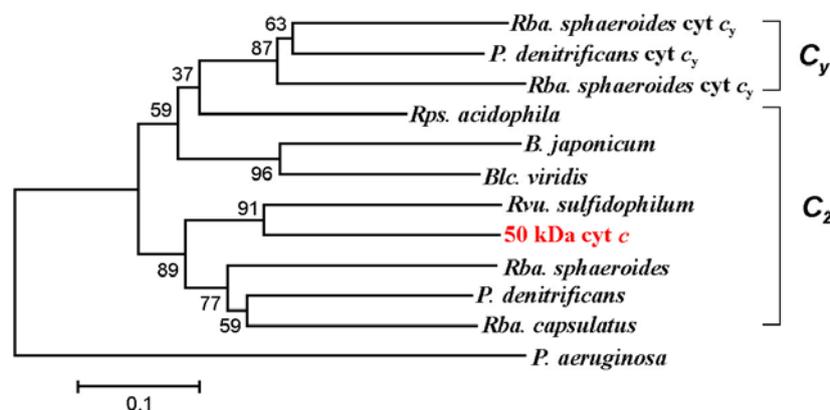


図6 *Rhodovulum sulfidophilum*の新規(50 kDa)膜結合チトクロムを含むチトクロム c_2 とチトクロム c_y の分子系統樹
膜結合領域やシグナルペプチド部分を除いたC末端ヘム結合領域のアミノ酸配列(約100残基)の比較に基づいて描かれている。

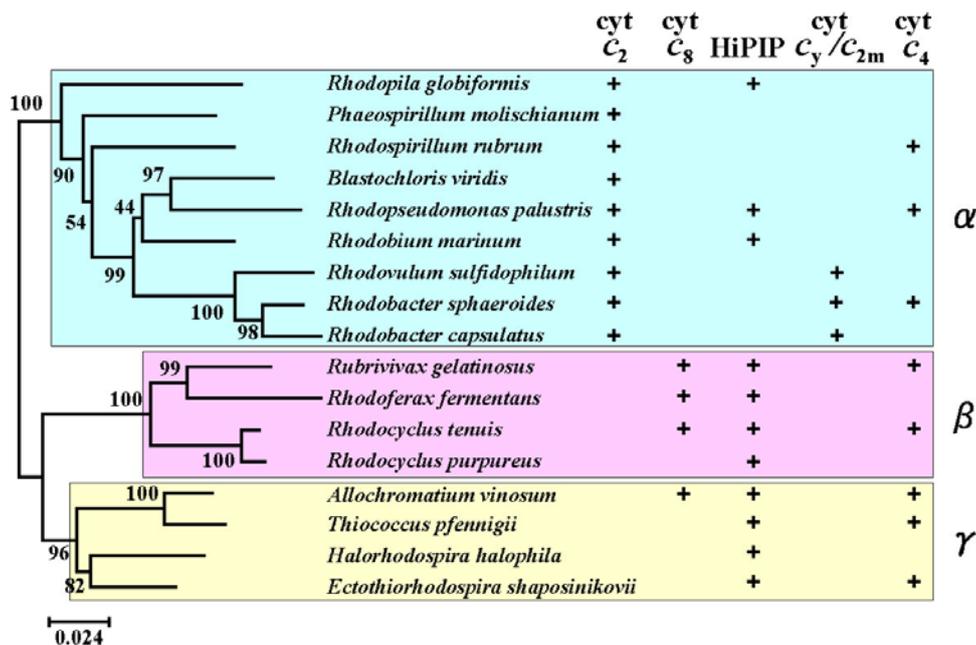


図7 各種電子伝達タンパクの紅色光合成細菌における分布
Van Driessche et al. (2003)¹⁷⁾ に筆者らのデータを加えて作製した。

の新規チトクロムは膜結合型であるという点ではチトクロム c_y に似ているが、分子進化の観点からはチトクロム c_2 に直接的な起源を持つと考えられ、筆者らはチトクロム c_{2m} という名称を提案している¹⁵⁾。

*Rhodovulum sulfidophilum*に見い出されたチトクロム c_{2m} の生理機能を明らかにするためにこの遺伝子の欠損株を作製したところ、チトクロム c_2 の欠損株と同様、その生育は野生型と変わらなかった。しかし、両者をともに欠く2重欠損株では光合成による生育が不可となった。このことから*Rhodovulum sulfidophilum*においては水溶性のチトクロム c_2 と膜結合型のチトクロム c_{2m} が bc_1 複合体から反応中心への電子伝達タンパクとして全く等価に働くものと考えられた。これら2つのタンパクの役割にどのような差異があるのか、現時点ではまだ明らかになっていない。

おわりに

本稿で紹介したように紅色細菌の反応中心に対する電子供与体は多様である。全ての種について検証されているわけではないが、図7に主要な紅色光合成細菌において検出されている電子伝達タンパクの分布を示した。複数の電子伝達タンパクを持つ種が多数あることは歴然であり、そのような種では反応中心への電子供与体を複数持つであろうことは想像に難くない。本

稿で例示した*Rubrivivax gelatinosus*では少なくとも3種類の供与体があり、その中にはこれまで生理機能が明確でなかった2ヘム型のチトクロム c_4 も含まれる。さらに、これら全てを欠損した変異株でも非常に遅いながらも光合成能が見られたことから、まだ未知の供与体があるものと推測される。

紅色細菌における反応中心への電子供与体の多様性がどのような進化的背景を持ち、また菌体にどのような利点を与えているのかはまだ明らかにはなっていないが、それぞれの電子供与体が関与する電子伝達経路を逐一同定していくことは細菌の光合成が持つ生理学的・生態学的重要性を明らかにするうえで有益であろう。また、光エネルギーによって駆動される人工的な代謝経路の構築といった応用にも結びつくのではあるまいか。筆者らは現在、光合成を取り巻く電子伝達網の全容を解明すべく様々な変異株を使用した生理実験を試みおり、モデル生物として *Rubrivivax gelatinosus* の全ゲノム解読を進めている。

参考文献

1. Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
2. Meyer, T. E., and Cusanovich, M. A. (2003) Discovery and characterization of electron transfer proteins in the

- photosynthetic bacteria, *Photosynth. Res.* 76, 111-26.
3. Pettigrew, G. W., and Moore, G. R. (1987) Chapter 3: The function of bacterial and photosynthetic cytochromes *c*, in *Cytochromes c: Biological Aspects* pp 113-142, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
 4. Ambler, R. P. (1991) Sequence variability in bacterial cytochrome *c*, *Biochim. Biophys. Acta* 1058, 42-47.
 5. Hochkoeppler, A., Zannoni, D., Ciurli, S., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., and Tollin, G. (1996) Kinetics of photo-induced electron transfer from high-potential iron-sulfur protein to the photosynthetic reaction center of the purple phototroph *Rhodospirillum rubrum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6998-7002.
 6. Schoepp, B., Parot, P., Menin, L., Gaillard, J., Richaud, P., and Verméglio, A. (1995) In vivo participation of a high potential iron-sulfur protein as electron donor to the photochemical reaction center of *Rubrivivax gelatinosus*, *Biochemistry* 34, 11736-11742.
 7. Menin, L., Yoshida, M., Jaquinod, M., Nagashima, K. V. P., Matsuura, K., Parot, P., and Verméglio, A. (1999) Dark aerobic growth conditions induce the synthesis of a high midpoint potential cytochrome *c₈* in the photosynthetic bacterium *Rubrivivax gelatinosus*, *Biochemistry* 38, 15238-15244.
 8. Nagashima, K. V. P., Matsuura, K., Shimada, K., and Verméglio, A. (2002) High-potential iron-sulfur protein (HiPIP) is the major electron donor to the reaction center complex in photosynthetically growing cells of the purple bacterium *Rubrivivax gelatinosus*, *Biochemistry* 41, 14028-14032.
 9. Menin, L., Schoepp, B., Parot, P., and Verméglio, A. (1997) Photoinduced cyclic electron transfer in *Rhodocyclus tenuis* cells: participation of HiPIP or cyt *c₈* depending on the ambient redox potential, *Biochemistry* 36, 12183-12188.
 10. Verméglio, A., Li, J., Schoepp-Cothenet, B., Pratt, N., and Knaff, D. B. (2002) The role of high-potential iron protein and cytochrome *c₈* as alternative electron donors to the reaction center of *Chromatium vinosum*, *Biochemistry* 41, 8868-8875.
 11. Ng, T. C. N., Laheri, A. N., and Maier, R. J. (1995) Cloning, sequencing, and mutagenesis of the cytochrome *c₄* gene from *Azotobacter vinelandii*: characterization of the mutant strain and a proposed new branch in the respiratory chain, *Biochim. Biophys. Acta* 1230, 119-129.
 12. Jenney, F. E., and Daldal, F. (1993) A novel membrane-associated *c*-type cytochrome, cyt *c_y*, can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*, *EMBO J.* 12, 1283-1292.
 13. Myllykallio, H., Zannoni, D., and Daldal, F. (1999) The membrane-attached electron carrier cytochrome *c_y* from *Rhodobacter sphaeroides* is functional in respiratory but not in photosynthetic electron transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4348-4353.
 14. Turba, A., Jetzek, M., and Ludwig, B. (1995) Purification of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c₅₅₂* and sequence analysis of the gene, *Eur. J. Biochem.* 231, 259-265.
 15. Kimura, Y., Alric, J., Verméglio, A., Masuda, S., Hagiwara, Y., Matsuura, K., Shimada, K., and Nagashima, K. V. P. (2007) A new membrane-bound cytochrome *c* works as an electron donor to the photosynthetic reaction center complex in the purple bacterium, *Rhodovulum sulfidophilum*, *J. Biol. Chem.* 282, 6463-6472.
 16. Masuda, S., Tsukatani, Y., Kimura, Y., Nagashima, K. V. P., Shimada, K., and Matsuura, K. (2002) Mutational analyses of the photosynthetic reaction center-bound triheme cytochrome subunit and cytochrome *c₂* in the purple bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*, *Biochemistry* 41, 11211-11217.
 17. Van Driessche, G., Vandenberghe, I., Devreese, B., Samyn, B., Meyer, T. E., Leigh, R., Cusanovich, M. A., Bartsch, R. G., Fischer, U., and Van Beeumen, J. J. (2003) Amino acid sequences and distribution of high-potential iron-sulfur proteins that donate electrons to the photosynthetic reaction center in phototropic proteobacteria, *J. Mol. Evol.* 57, 181-199.