

N-14

超好熱性古細菌 *Pyrobaculum oguniense* のシトクロムを含む電子伝達系The electron transport system containing cytochrome in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum oguniense*○吉澤 大司<sup>1)</sup>, 佐藤 克哉<sup>1)</sup>, 天女目 勇太<sup>1)</sup>, 谷川 実<sup>2)</sup>, 西村 克史<sup>2,3)</sup>\*Daiji Yoshizawa<sup>1</sup>, Katsuya Satoh<sup>1</sup>, Yuta Nabatame<sup>1</sup>, Minoru Tanigawa<sup>2</sup>, Katsushi Nishimura<sup>2,3</sup>

Abstract: *Pyrobaculum oguniense* is a facultative anaerobic archaeon that grows optimally at 90-94°C. It expresses cytochrome *a*, *b* and *c* under an aerobic condition. By contrast, *Pyrobaculum islandicum* that is an obligatory anaerobic archaeon and grows optimally at 100°C expresses cytochrome *b*<sub>557</sub> and *b*<sub>559</sub>. In this study, we purified cytochromes from *P. oguniense* and *P. islandicum*. From *P. oguniense*, cytochrome *c*, *a*, *b*<sub>557</sub> and *b*<sub>559</sub> were yielded. From *P. islandicum*, cytochrome *b*<sub>557</sub> and *b*<sub>559</sub> were obtained. Reconstitution experiments showed that the electron was transported into cytochrome *b*<sub>559</sub> in both cases.

## 緒言

超好熱性古細菌 *Pyrobaculum oguniense* (*P. oguniense*) は、好気あるいは嫌気条件のどちらでも生育可能な通性嫌気性の超好熱性古細菌である。この呼吸様式から、*P. oguniense* は嫌気呼吸から好気呼吸へ進化する過程の情報を与えてくれる生物であると考えられる。一方、同じ *Pyrobaculum* 属の *Pyrobaculum islandicum* (*P. islandicum*) は嫌気条件でのみ生育可能な絶対嫌気性の超好熱性古細菌である。これらの呼吸様式に、深く関わっているのがシトクロムである。好気条件で培養した *P. oguniense* では、シトクロム *a*, *b*, *c* が発現し、嫌気条件で培養した *P. islandicum* においては、シトクロム *b* のみが発現する。このことから、シトクロム *a*, *c* は、好気呼吸への進化と深く関わるタンパク質であると予想される。

本研究では、この 2 つの生物の電子伝達系を比較することにより、嫌気呼吸から好気呼吸への進化の過程を解き明かすことを目的とし、*P. oguniense* と *P. islandicum* よりシトクロムの精製を行った。

## 方法

1. *P. oguniense* のシトクロムの精製

*P. oguniense* 菌体に、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む 10 倍量 (v/w) の蒸留水を加えフレンチプレスで破碎し、遠心分離 (20,000 g × 30 min, 4°C) と超遠心分離 (140,000 g × 60 min, 4°C) により膜画分と可溶性画分に分けた。得られた膜画分を、1% Tween 20 を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて可溶化 (2 h, 4°C) し、超遠心分離により可溶化膜画分を得た。残った不溶性の膜画分を 5% Triton X-100 を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて可溶化 (14 h, 4°C) した。超遠心分離後の可溶化膜画分に硫酸アンモニウムを加え、得られた 20-40% 飽和沈殿画分を CM-Toyopearl カラムクロマトグラフィー (0-750mM NaCl の濃度勾配) を用いて二つの画分に分離した。非吸着画分にシトクロム *c*, 吸着画分にシトクロム *a* を含むシトクロム *b*<sub>557</sub>, シトクロム *b*<sub>559</sub> を得た。

2. *P. islandicum* のシトクロムの精製

*P. islandicum* 菌体に、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む 10 倍量 (v/w) の蒸留水を加えフレンチプレスで破碎し、遠心分離 (20,000 g × 30 min, 4°C) と超遠心分離 (140,000 g × 60 min, 4°C) により膜画分と可溶性画分に分けた。得られた膜画分を、1% Tween 20 を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて可溶化 (16 h, 4°C) し、超遠心分離により可溶化膜画分を得た。残った不溶性の膜

1: 日大理工・院・応化 2: 日大理工・教員・応化 3: 日大短大・教員・化学

画分を 5% Triton X-100 を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて可溶化 (16 h, 4°C) した。超遠心分離後の可溶化膜画分に硫酸アンモニウムを加え、得られた 20-40% 飽和沈殿画分を CM-Toyopearl カラムクロマトグラフィーに供し、非吸着画分にシトクロム  $b_{559}$  を、吸着画分にシトクロム  $b_{557}$  を得た。

*P. oguniense* と *P. islandicum* それぞれ再構成実験では、精製した電子伝達系の構成成分である NADH 脱水素酵素 (50  $\mu\text{g}$ ) の他に、コエンザイム  $\text{Q}_0$  (10  $\mu\text{M}$ )、精製したシトクロム  $b$  (200  $\mu\text{g}$ )、電子供与体として NADH 脱水素酵素の基質である NADH (500  $\mu\text{M}$ ) を加え、室温で 10 min 放置後、吸収曲線を測定した。

### 結果及び考察

*P. oguniense* と *P. islandicum* からそれぞれのシトクロムを精製した。*P. oguniense* から得たシトクロム  $b$  は、 $\alpha$ ピークを 557 nm と 559 nm に持つことから、*P. islandicum* が持つシトクロム  $b$  と同じ種類であると考えられた (Fig. 1, 2)。これら 2 種類のシトクロム  $b$  の構造や機能の違いは不明である。再構成実験では、シトクロム  $b$  を示す吸収極大が得られた。*P. oguniense*, *P. islandicum* の電子伝達系では、電子供与体から脱水素酵素、コエンザイム  $\text{Q}_0$  を介してシトクロム  $b$  へと電子が渡っていることが示された (Fig. 3, 4)。また、得られたピークから、電子の授受が異なっていることが分かる。再構成実験では、コエンザイム  $\text{Q}_0$  を用いたが、*P. oguniense*, *P. islandicum* がコエンザイム  $\text{Q}_0$  を持っているか分かっていない。そのため、各タンパク質とコエンザイム  $\text{Q}_0$  との親和性によるものだと考えられる。

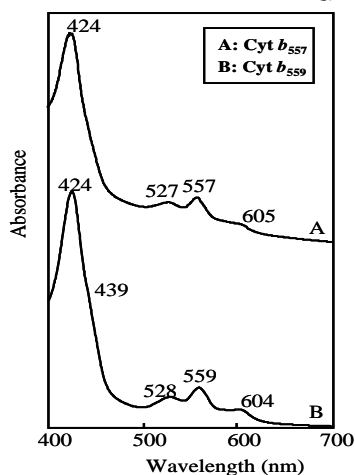


Fig. 1. Cytochrome  $b$  (Sample: *P. oguniense*)

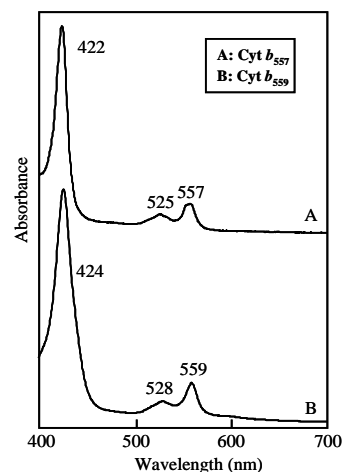


Fig. 2. Cytochrome  $b$  (Sample: *P. islandicum*)

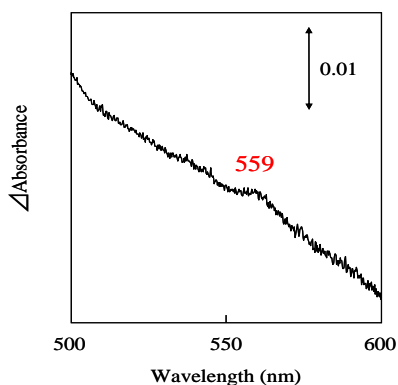


Fig. 3. Reconstitution of electron transport system (Sample: *P. oguniense*)

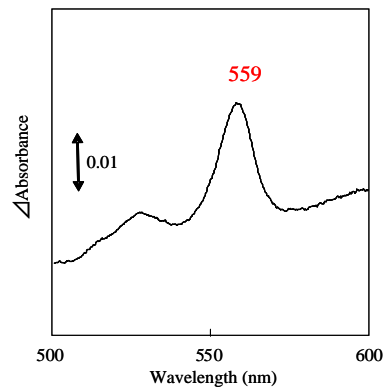


Fig. 4. Reconstitution of electron transport system (Sample: *P. islandicum*)