

## 緑色硫黄細菌の非循環型の光合成電子伝達系<sup>‡</sup>

<sup>1</sup>ペンシルバニア州立大学 生化学分子生物学科

<sup>2</sup>大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

塚谷 祐介<sup>1\*</sup>、浅井 智広<sup>2</sup>、大岡 宏造<sup>2</sup>

### 1. はじめに

植物が2つの光化学反応中心（光化学系Iと光化学系II）を利用する一方で、「光合成細菌」と総称される微生物群は、どちらか1つだけの反応中心しか持たない。よりシンプルな光合成様式を持つことから、光合成細菌を研究材料として用いる意義・利点は、エネルギー変換機構の基本原則、光合成の最小ユニット、光合成器官の進化等を解明するための基礎研究に適している事が挙げられる。これらは将来の人工光合成系開発の土台となる重要な項目でもあり、基礎研究だけではなく応用研究においても光合成細菌は有用である。

本稿では、光化学系I型反応中心のみを持つ緑色硫黄細菌にスポットをあてて、反応中心を取り巻く光合成電子伝達系について紹介する。緑色硫黄細菌の電子伝達系は、未解明な副次的経路の存在が示唆されるものの、基本的には直線的な「非循環型」で、電子源である硫化物等の還元硫黄化合物を出発点として生体還元力NADPHを生成するためのものである。植物やシアノバクテリアを研究している方々には、Zスキームの非循環型電子伝達経路から光化学系IIを除いて、さらに水と水酸化系を硫黄化合物と硫黄酸化酵素群に置き換えて考えていただくと大枠が捉えられるのではないかと思います。つまり、電子源の酸化で得られた電子がどのように反応中心まで渡されるのかというのが大きな謎であり興味深いところである。まずは緑色硫黄細菌が持つ光化学系I型の反応中心複合体について触れた後に、それを取り巻く光合成電子伝達系について紹介する。

### 2. 光化学系I型反応中心

#### 2.1. 緑色硫黄細菌反応中心のサブユニット構成

緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum (Cba.) tepidum* の反応中心のサブユニット数は4つで、それぞれ $pscA\sim pscD$ 遺伝子にコードされる<sup>1)</sup>。PscAがホモダイマーを形成するコアサブユニット、PscBが $F_A/F_B$ 蛋白質であり、それぞれ光化学系IのPsaA/PsaBヘテロダイマーおよびPsaCと相同の機能を持ち、光合成初期過程の電荷分離反応に必要なコファクター（スペシャルペアP840,  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $F_x$ ,  $F_A/F_B$ )を結合している（図1）<sup>1-3)</sup>。PscCは緑色硫黄細菌に特有のサブユニットであり、我々はこのシトクロムc蛋白質の電子伝達メカニズムに興味を持って研究を進めてきた。

PscCはヘムを1分子持つモノヘム型シトクロムcであり、反応中心1個あたり2分子結合している（図1）<sup>4,5)</sup>。反応中心あたり2分子存在する生理的意義は未だ

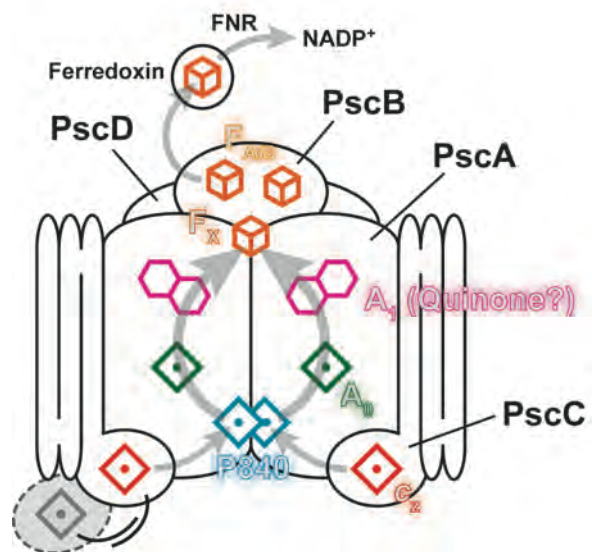


図1 緑色硫黄細菌の光化学系I型反応中心の模式図

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成細菌 —研究材料としての魅力—」

\* 連絡先 E-mail: yut3@psu.edu

解明されていない。PscCには膜結合ドメインと可溶性ドメインがある。N末端側の膜結合ドメインに存在する3つの膜貫通 $\alpha$ -ヘリックスがPscAコアサブユニットと強固に結合しており、ペリプラズムに突出したC末端側の可溶性ドメイン（ヘムcを結合）が電子伝達反応を担う（図1, 2）<sup>9)</sup>。この構造と反応様式が紅色細菌のシトクロム $c_y$ と似ており、我々はPscCのことをシトクロム $c_z$ と呼んでいる。PscCの機能は、電荷分離反応によって酸化したスペシャルペアP840（P840<sup>+</sup>）を速やかに還元することである。反応中心標品を用いたP840<sup>+</sup>の還元反応の時定数（ $t_{1/e}$ ）は室温では約 150  $\mu$ s であるが（速度定数  $6.7 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ）<sup>9)</sup>、標品にグリセロールを加えて溶液の粘性を上げると、その還元速度は著しく遅くなる（60% (V/V) グリセロール存在下では $t_{1/e} = 77 \text{ ms}$ 、速度定数 $1.0 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ となる）。このことは、PscCはN末端ドメインで細胞膜にアンカーし、C末端ドメインはペリプラズム中に露出して大きく揺らいでいることを示唆している。ごく最近、PscCの可溶性ドメインの結晶構造が決定された<sup>7)</sup>。可溶性ドメインは立体構造上クラスI型シトクロムに分類され、*Starkeya novella* のSorB蛋白質や緑藻 *Monoraphidium braunii* のシトクロム  $c_6$  と構造的に似ていることが分かった。

PscDは、植物・シアノバクテリアの光化学系IのPsaDと低い相同性があり、PsaDと同様に“F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>蛋白質からフェレドキシンへの電子伝達反応の促進<sup>8)</sup>”という機能を持つのではないかと推測されてきた<sup>9)</sup>。我々は*Cba. tepidum* を用いてPscDの欠損変異株（ $\Delta$ PscD株）を作製し、PscDの機能について興味深い知見を得ることに成功しているので<sup>10)</sup>、ここで簡単に触れておきたい。 $\Delta$ PscD株と野生株において、F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>蛋白質からフェレドキシンへの電子伝達反応の効率をNADP<sup>+</sup>の光還元速度として見積もったところ、 $\Delta$ PscD株ではわずかに遅くなっていた。一方、蛍光寿命の測定結果は、 $\Delta$ PscD株において集光性アンテナ・クロロソームから反応中心へのエネルギー移動効率が大きく低下していることを示していた。反応中心に対する光捕集蛋白質FMOの含量が減少しており、PscDは光捕集系と光化学系を機能的・構造的にリンクさせながら、光エネルギー移動効率を最大に維持するために働いていると考えられる（\*光捕集系の構造・配置については、本号、原田博士らの解説記事中の「図1. 緑色硫黄細菌の光合成器官の模式図」を参照していただきたい）。緑

色硫黄細菌PscDが持っている“集光性アンテナからのエネルギー移動効率化”という主要な機能は、植物PsaDへの進化の過程で消失し、“フェレドキシンへの電子伝達反応の促進”という性質がより顕在化したのではないかと考えている。

## 2.2. 反応中心P840からNADP<sup>+</sup>までの電子伝達

スペシャルペアP840は光エネルギーによって励起されると電子を放出し、次のような経路で電子は細胞質側のPscB（鉄硫黄センター F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>）まで到達すると考えられている [P840→A<sub>0</sub>→A<sub>1</sub>→F<sub>x</sub>→F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>]（図1）<sup>1-3)</sup>。P840からF<sub>x</sub>までのコファクターはPscAホモダイマー内において対称的に配置されており、電子も両方向に移動すると推測されているが直接的な証拠はない。緑色硫黄細菌の反応中心の立体構造を解明することが、次のブレイクスルーをもたらす最も重要なステップであろう。反応中心あたりクロロフィル $a_{PD}$ （C17位に長鎖炭化水素基として $\Delta$ 2,6-phytyadienolがエステル結合したクロロフィル $a$ ）が4~8分子存在し<sup>11)</sup>、そのうちの2分子がA<sub>0</sub>（一次電子受容体）として機能している。A<sub>1</sub>（二次電子受容体）は、おそらくメナキノンである（図1）。しかし分光学的解析では、キノンの酸化還元反応に由来する過渡的なシグナルが未だに検出されていない<sup>12)</sup>。メナキノンは比較的緩く反応中心に結合し、光化学系IIのQ<sub>B</sub>部位のように還元型キノンが遊離するという仮説もある<sup>1,13)</sup>。PscBに到達した電子は水溶性フェレドキシンに渡される（図1）<sup>14)</sup>。還元型フェレドキシンは、ferredoxin:NADPH oxidoreductase (FNR)<sup>15)</sup>を介してNADP<sup>+</sup>をNADPHに還元する他、生体内の様々な還元反応系に利用される。緑色硫黄細菌にはカルビン回路は存在せず、二酸化炭素の固定には還元的TCA回路が働いている。

## 3. 反応中心への2つの電子供与経路—シトクロムc-554とシトクロムbc複合体—

前項目（2.1.）では、光酸化したスペシャルペアP840<sup>+</sup>を還元する事がPscCの機能だと述べた。その還元反応によって生じた酸化型PscC<sup>+</sup>に電子を渡すのは、シトクロムc-554とシトクロムbc複合体である（図2）。

シトクロムc-554は、分子量10,000程度の水溶性電子伝達蛋白質である<sup>16-19)</sup>。緑色硫黄細菌*Cba. tepidum*では、この蛋白質の $\alpha$ -吸収極大が554 nmにあることが

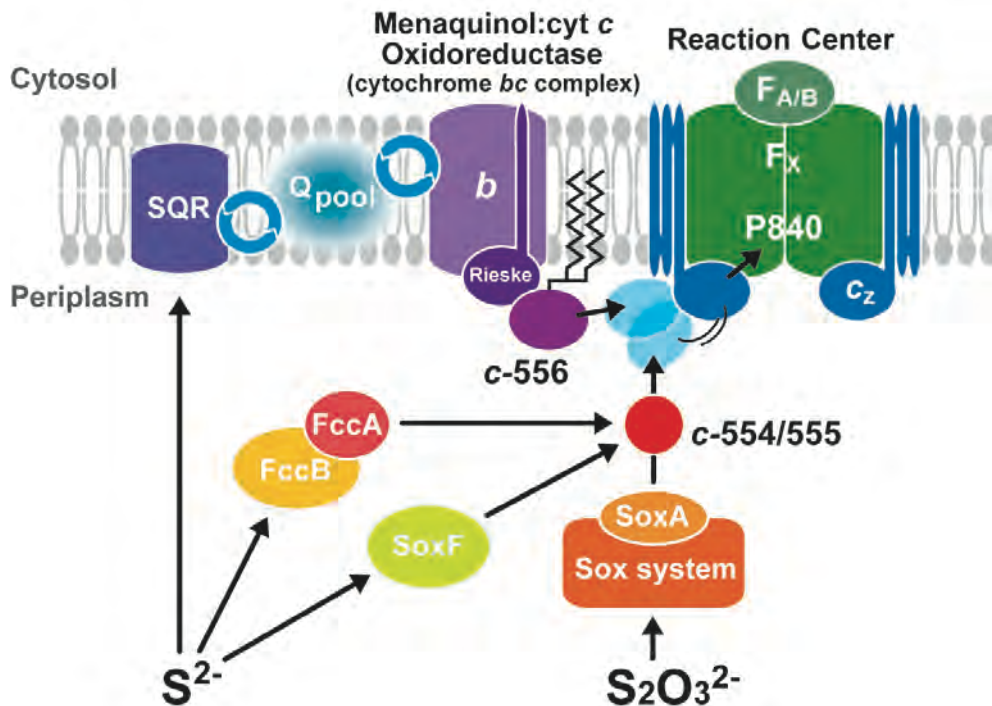


図2 緑色硫黄細菌の非循環型の光合成電子伝達経路の模式図  
黒い矢印は電子伝達の方向を示す。

らシトクロム *c*-554 と呼ばれている (近縁種の *Cba. parvum* では吸収極大が 555 nm にあることからシトクロム *c*-555 と表記される)。このシトクロム *c*-554/555 の  $\alpha$ -吸収帯は非対称で、藻類等において光化学系 I 反応中心への電子供与体として機能するシトクロム *c*<sub>6</sub> の  $\alpha$ -吸収帯と似ている。そのためシトクロム *c*-554/555 は、発見当初 (1968年) から反応中心への電子供与体ではないかと推測されてきた<sup>20)</sup>。2002年になって *Cba. tepidum* から精製したシトクロム *c*-554 および反応中心標品を試験管内で再構成した閃光照射実験が行われ、シトクロム *c*-554 は反応中心への電子供与体であることが明らかとなった (図2)<sup>19)</sup>。またシトクロム *c*-554 は P840 を直接還元するのではなく、電子は必ず PscC を経由してから P840 へ渡ることが示された<sup>19)</sup>。これは P700 を直接還元するシトクロム *c*<sub>6</sub> とは異なる点である。反応中心のペリプラズム側に PscC が存在するためにシトクロム *c*-554 が物理的に P840 までアクセスできないのか、それとも単純にシトクロム *c*-554 が P840 を還元できないのかは不明である。シトクロム *c*-554 の酸化還元電位は +130~150 mV と報告されており<sup>18,19)</sup>、P840 は 240 mV であるので電位だけを見れば電子伝達は不可能ではない。

PscC に電子を渡すもう一つの成分はシトクロム *bc* 複合体である。過去 (1998年) に我々のグループは、

*Cba. tepidum* から細胞膜を調製して閃光照射実験を行うと、P840<sup>+</sup> に電子を与えることにより酸化型になった PscC が再還元される様子を観測した<sup>21)</sup>。これは、PscC の可溶性ドメインがペリプラズム中を大きく揺らぎながら、直接シトクロム *bc* 複合体から電子を受け取るためと結論した。しかしながら細胞膜標品中に混在するシトクロム *c*-554 を介して、PscC が還元されたという可能性は否定できなかった。そこで最近になって、シトクロム *c*-554 の欠損変異株 ( $\Delta c$ -554 株) を作製して閃光照射実験を行ったところ、やはり PscC の再還元が観測された<sup>22,23)</sup>。つまり水溶性シトクロム *c*-554 の他にも、PscC を還元する電子伝達成分が細胞膜中に存在するという結論には間違いなかった。この電子伝達成分がシトクロム *bc* 複合体であることは、2種類の阻害剤を用いて証明したので以下に説明しておきたい。

一般的にシトクロム *bc* 複合体には2つのキノン結合部位 ( $Q_o$ ,  $Q_i$ ) があり、ペリプラズム側の  $Q_o$  部位ではキノール (還元型キノン) が2電子酸化を受けてキノンになり、細胞質側の  $Q_i$  部位ではキノンが還元されてキノールとなる。 $Q_o$  部位で放出される2電子のうち1個は Rieske 鉄硫黄センターを経てシトクロム *c* へ、もう1個は低電位ヘム *b<sub>L</sub>* から高電位ヘム *b<sub>H</sub>* を経て  $Q_i$  部位へと流れる。 $Q_o$  部位でのキノール酸化が2回繰り返される

と、細胞質側の $Q_i$ 部位ではキノンが2電子還元を受けてキノールとなる。このキノールは再度、キノンプールを介して $Q_o$ 部位で酸化されることになる。この一連の反応で、1電子あたり2個のプロトン ( $H^+$ ) が細胞質側からペリプラズム側に流れ込む計算になり、膜を介した $H^+$ の電気化学ポテンシャルが形成される。これがMitchellの提唱したQサイクルメカニズムである<sup>24)</sup>。

我々の行った実験は、それぞれのキノン結合部位に特異的に結合する阻害剤を使っている<sup>2, 1, 2, 3)</sup>。stigmatellinはシトクロム $bc$ 複合体の $Q_o$ 部位に作用する。この阻害剤の存在下では、キノールの酸化が阻害されるためにシトクロム $c$ へ電子が流れなくなり、PscCの再還元が観察されなくなった。また $Q_i$ 部位に対する阻害剤 antimycin A を用いると、 $Q_i$ 部位での電子授受が起これないため、酸化型 PscC の再還元とともにへム $b_H$ の持続的な還元が見られた。このとき PscC の再還元当量とへム $b_H$ の還元当量がほぼ一致し、PscC とシトクロム $bc$ 複合体は化学量論的に1対1で反応することも示した。つまり緑色硫黄細菌ではシトクロム $c$ -554を介さずとも、PscCは直接シトクロム $bc$ 複合体から電子を受け取ることが明らかとなった (図2)。

#### 4. シトクロム $c$ -554とシトクロム $bc$ 複合体の関係

シトクロム $c$ -554とシトクロム $bc$ 複合体は、どちらもPscCへの電子供与体として機能することを述べた。当然*in vivo*ではシトクロム $c$ -554とシトクロム $bc$ 複合体は共存している。紅色細菌の水溶性シトクロム $c_2$ は、シトクロム $bc$ 複合体と反応中心複合体との間の電子伝達反応を担っていることはよく知られている。緑色硫黄細菌のシトクロム $c$ -554も*in vivo*ではシトクロム $bc$ 複合体から電子を受け取り、反応中心複合体のPscCに電子を渡しているのであろうか? 微生物学の教科書にはシトクロム $c$ -554が複合体間の電子伝達反応を担っていると記載されているが、この反応経路を実験的に確認したという報告例はこれまで無かった。

そこで我々は、 $\Delta c$ -554株の細胞膜と、野生株*Cba. tepidum*のシトクロム $c$ -554 (もしくは*Cba. parvum*由来のシトクロム $c$ -555) を用いて再構成実験を行った<sup>23)</sup>。もしもシトクロム $bc$ 複合体からシトクロム $c$ -554への電子伝達反応が進行するならば、antimycin A存在下で閃光照射実験を行ったとき、シトクロム $c$ -554の再還元反応にともなってへム $b_H$ の持続的な還元が観察され

るはずである。ところが酸化されたシトクロム $c$ -554の再還元反応が起これないにも関わらず、へム $b_H$ の還元が観察された。しかもへム $b_H$ の還元当量は、1電子当量からシトクロム $c$ -554の酸化当量 ([シトクロム $c$ -554 $\rightarrow$ PscC $^+$ ] の反応による) を引いた量にほぼ等しかった。このことは、(1)シトクロム $bc$ 複合体からシトクロム $c$ -554への電子伝達は起これないこと、(2)PscC $^+$ の再還元反応はシトクロム $c$ -554からとシトクロム $bc$ 複合体からの互いに独立した電子伝達により進行すること、を意味している。つまり植物・シアノバクテリアや紅色細菌で知られているような [シトクロム $bc_1/b_6f$  複合体  $\rightarrow$  水溶性シトクロム/プラストシアニン  $\rightarrow$  反応中心] という電子伝達は緑色硫黄細菌では存在しない。

シトクロム $c$ -554からPscC $^+$ への電子伝達反応は二次反応 (反応速度定数 $k_2 = 1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) であるため<sup>19)</sup>、加えるシトクロム $c$ -554の濃度によってPscC $^+$ の再還元反応への寄与度は異なる。シトクロム $c$ -554の細胞内 (ペリプラズム空間内) 濃度を数mMと仮定するとシトクロム $c$ -554からPscC $^+$ への反応は擬一次反応となり、電子伝達反応の時定数 ( $t_{1/e}$ ) は約 10  $\mu\text{s}$  と見積ることができる。シトクロム $bc$ 複合体からPscC $^+$ への電子伝達反応は約  $t_{1/e} = 150 \mu\text{s}$  である<sup>21)</sup>ことを考えると、細胞内ではシトクロム $c$ -554はシトクロム $bc$ 複合体よりも極めて効率的な電子供与体であることが分かる。後述するが、シトクロム $c$ -554とシトクロム $bc$ 複合体は、それぞれチオ硫酸酸化系と硫化物酸化系からの電子を受け取る経路上に存在する。したがって環境中の各硫黄源の濃度によって主要な反応経路が決定さ

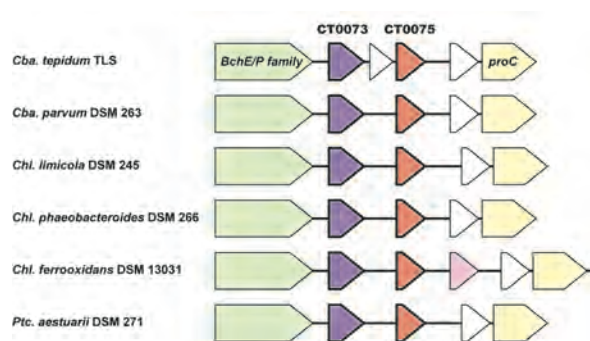


図3 緑色硫黄細菌の代表種におけるシトクロム $c$ -554/555遺伝子 (CT0075オルソログ) とシトクロム $c$ -556遺伝子 (CT0073オルソログ) 近傍の遺伝子座

*Chl. ferrooxidans*におけるピンク色で示した遺伝子もシトクロム $c$ 遺伝子である。*Ptc.*は*Prosthecochloris*の省略形。

れると考えられる。

### 5. 緑色硫黄細菌の quinol:cytochrome c oxidoreductase は bc タイプである

緑色硫黄細菌の quinol:cytochrome c oxidoreductase が、シトクロム**b**/Rieskeタイプであるのか、あるいはシトクロム**bc**タイプであるのか、という議論について補足しておきたい。ここで言う**bc**タイプとは3つのサブユニットから成る *b/c*/Rieske の事であり (Rieskeの表記は通常は省略)、*b*/Rieske タイプとはシトクロム**c** サブユニットを欠くタイプの事である。一般にプロテオバクテリア (紅色細菌) の quinol:cytochrome c oxidoreductase の構成成分は Rieske 鉄硫黄サブユニット、シトクロム**b**、シトクロム**c**<sub>1</sub>からなる**bc**タイプであり、通常シトクロム**bc**<sub>1</sub>複合体と呼ばれている。それぞれのサブユニットは*fbcF*、*fbcB*、*fbcC*という遺伝子にコードされ、オペロンを形成している<sup>25)</sup>。一方で緑色硫黄細菌では同一オペロン中に*fbcF*と*fbcB*は存在するが、塩基配列の類似性からは*fbcC*の存在を示唆するゲノム情報は得られていない<sup>26,27)</sup>。そのため緑色硫黄細菌の quinol:cytochrome c oxidoreductase については *b*/Rieske タイプであると主張するグループがある。しか

し、ここでは詳しくは述べないが、我々は*Cba. tepidum*の野生株およびΔ*c*-554株を用いてquinol:cytochrome c oxidoreductaseと反応中心複合体との電子伝達反応を解析する実験で、新たにシトクロム**c**-556をスペクトル成分として見出した<sup>21,23)</sup>。反応キネティクスからは、このシトクロム**c**-556がプロテオバクテリアのシトクロム**c**<sub>1</sub>に相当すると思われ、我々は緑色硫黄細菌の quinol:cytochrome c oxidoreductase は**bc**タイプだと考えている (それゆえ、本稿ではシトクロム**bc**複合体と呼ぶことにしている)。

*Cba. tepidum*のゲノム上には7つのシトクロム遺伝子が存在するが、そのうちCT0073がシトクロム**c**-556をコードする遺伝子であると我々は推定している<sup>28)</sup>。CT0073のすぐ下流には、シトクロム**c**-554遺伝子 (CT0075) があり、互いに近接している (図3)。現在までに12種の緑色硫黄細菌のゲノムが解読されているが、*Chloroherpeton (Chp.) thalassium*以外の全ての種でCT0073オルソログ遺伝子とCT0075オルソログ遺伝子が隣り合っている (図3)。PscCを還元するという意味で同じ機能を持つシトクロム**c**-554とシトクロム**c**-556をコードする遺伝子が互いに隣接していることは十分に期待されるので、CT0073が*fbcC*遺伝子である

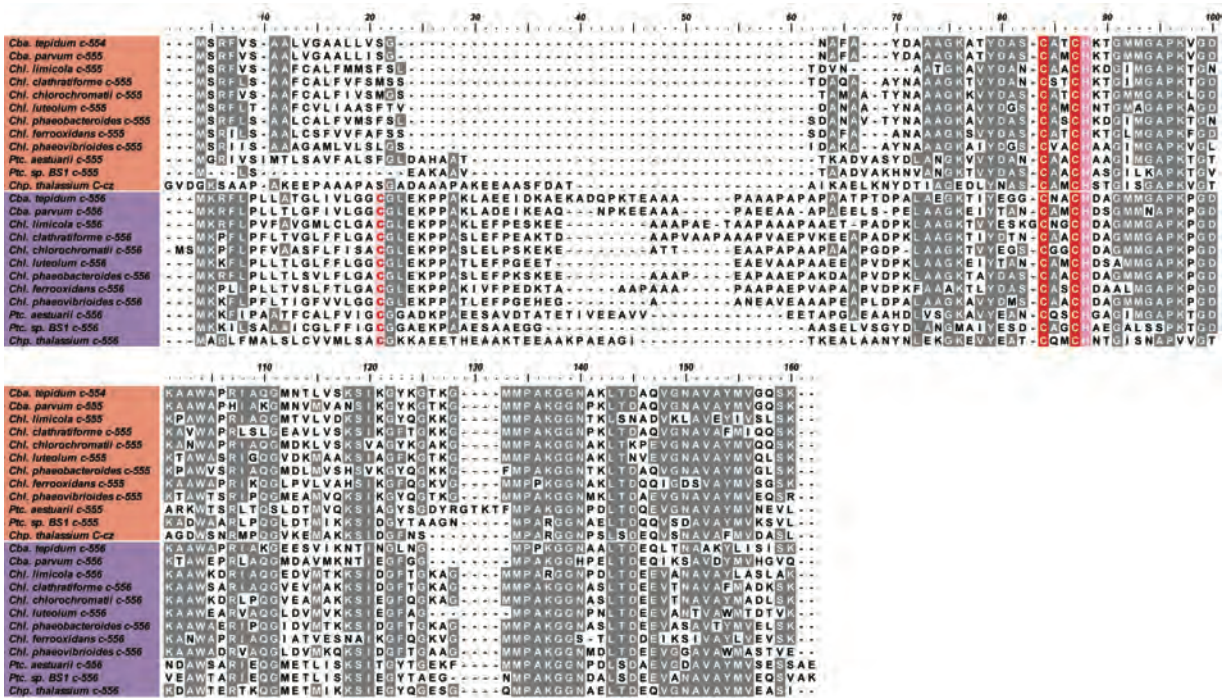


図4 シトクロム**c**-554/555とシトクロム**c**-556のアミノ酸配列のアライメント

Clustal Wを用いた。ヘム結合モチーフ (C-X-X-C-H) を赤色で示す。シトクロム**c**-556において、シグナル配列が切断された後に、脂肪酸が結合すると想定されるシステイン残基を赤字で示す (*Cba. tepidum*で18番目の残基)。 *Chp. thalassium*では、シトクロム**c**-554遺伝子は、PscC遺伝子とフュージョンしているため、C末端側のシトクロム**c**-554部分をアライメントに利用した (C-czと表記)。

可能性が高い。CT0073のN末端には、リポ蛋白質に特徴的なシグナル配列が存在する(図4)。シグナル配列が切断された後のN末端システイン残基(図4)に脂肪酸が結合し、これによってシトクロムc-556は膜にアンカーされると考えられる(図2)。これは、C末端部に膜貫通ヘリックスを持つシトクロムc<sub>1</sub>とは異なる点である。

### 6. 硫黄酸化系と電子伝達系のリンク

緑色硫黄細菌の生育に必要な電子源は、還元型の硫黄化合物(硫化物イオンS<sup>2-</sup>、チオ硫酸S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>など)である<sup>29)</sup>。S<sup>2-</sup>は *Chlorobium (Chl.) ferrooxidans* を除くすべての緑色硫黄細菌が利用できるが、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>を利用できるかどうかは種によって異なる<sup>29,30)</sup>。S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>の酸化にはSox系と呼ばれる酵素群が寄与し<sup>31)</sup>、緑色硫黄細菌ではオペロン(*soxFXYZAKBW*)を形成する<sup>27)</sup>。最近の研究からシトクロムc-554がSox系酵素群のうちSoxAXKから電子を受け取ることが分かっている[S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>→Sox系→シトクロムc-554]<sup>32)</sup>が、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>酸化の詳細な反応機構はまだ明らかとなっていない。一方、S<sup>2-</sup>は、sulfide:cytochrome c reductaseとして働くSoxFとFccAB、及び膜結合蛋白質であるsulfide:quinone reductase(SQR)によって酸化される(図2)<sup>30,33)</sup>。いずれも活性中心にFADを含むフラボ蛋白質で、S<sup>2-</sup>を硫黄単体(S<sup>0</sup>)まで酸化する活性をもつ。SoxFとFccABによるS<sup>2-</sup>酸化の際にシトクロムc-554が電子受容体として機能することが示されている[S<sup>2-</sup>→SoxF/FccAB→シトクロムc-554]<sup>34,35)</sup>。SQRはその名の通り、S<sup>2-</sup>を酸化して、細胞膜中のキノンを還元する<sup>36)</sup>。還元型キノン(キノール)は、シトクロムbc複合体によって酸化される[S<sup>2-</sup>→SQR→キノンプール→シトクロムbc複合体]。Sox系酵素群を持つ種に存在するシトクロムc-554は、アミノ酸配列に基づく系統解析では単独のクラスターを形成しない(図5)。そのためシトクロムc-554は、Sox系酵素群から電子を伝達する以外の機能も推測される。

上記の反応経路はいずれも*in vitro*の解析から推定されたものであり、細胞内で各硫黄酸化経路が生長にどの程度寄与しているかは分からない。そこで我々は、*Cba. tepidum*のΔc-554株を利用して硫黄酸化系から反応中心までの電子の流れを調べた<sup>37)</sup>。Δc-554株ではS<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>の完全酸化は起こるもの(S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>はSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>まで酸化される)、野生株と比較してS<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>の消費速度およ

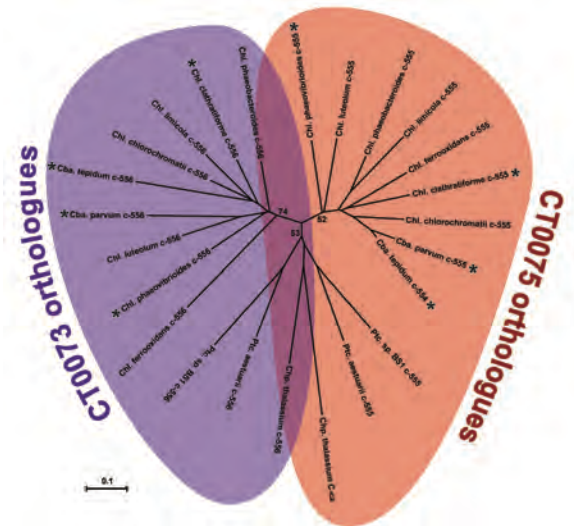


図5 シトクロムc-554/555とシトクロムc-556のアミノ酸配列に基づく系統樹  
図4のアライメントを元に、近隣接合法、MEGA4プログラムを用いて作製した。1000回繰り返しのブートストラップ値を枝に記す。アステリスクはチオ硫酸が利用できる(Sox系を持つ)種を示す。

び生長速度が顕著に低下していた。このことは細胞内においてもシトクロムc-554がSox系と反応中心の間の電子伝達体として働いていることを支持している。また、SoxFやFccABはS<sup>2-</sup>の酸化にほとんど寄与せず、もっぱらSQRを介してS<sup>2-</sup>が酸化されていた。SQRはゲノム配列が解読された12種全ての緑色硫黄細菌で保存されているが、SoxFとFccABの分布は種によって異なる<sup>30)</sup>。SQRによるS<sup>2-</sup>の酸化は、生育に必須なプロトン駆動力を優先的に得るための主要経路ではないかと考えている。

緑色硫黄細菌における硫黄酸化経路の全容解明には、今後さらなる解析が必要である。シトクロムc-554は、1960年代に初めて精製された当時、硫黄酸化に関わる酵素群と混合すると硫黄酸化活性が上昇することから、硫黄代謝反応の“エフェクター”と呼ばれていた<sup>17)</sup>。実に半世紀に亘り研究されている課題であり、このことは微生物における硫黄酸化機構解明の困難さを反映している。その困難さは、硫黄元素は-2から+6までの価数をもつ化合物を形成し、硫化物(S<sup>2-</sup>)から硫酸(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)にいたる酸化過程が非常に複雑な反応中間体を經由することに起因する。

### 7. モデル生物 *Chlorobaculum tepidum* の研究材料としての有用性

*Cba. tepidum*は、中度好熱性細菌であり、至適生育温度は46-48°Cである<sup>38)</sup>。最小培地中・47°Cで、倍加時間約2時間で生育する。絶対嫌気性の光独立栄養生物であり、その生長は光合成に依存している。しかし光照射下で酸素にさらされると生長できず、やがて死滅する。ほとんどの蛋白質は空気中で単離しても問題ないが、反応中心複合体などの酸化還元中心として鉄硫黄センターをもつ蛋白質は酸素にふれるとすぐに不活化(変性)してしまうケースが多い。反応中心複合体を精製するときには、嫌気チャンバー内で一連の作業を行う必要がある。反応中心は室温でも比較的安定であり、この性質は嫌気チャンバーで精製作業するには非常に重宝する。2001年に natural transformation による変異導入方法が確立され、簡便に変異株を作製できるようになった<sup>39)</sup>。2002年に全ゲノム配列が決定された<sup>27)</sup>。さらに現在までに米国エネルギー省(DOE/JGI)によって12種の緑色硫黄細菌のゲノム配列が解読されている。これによって、他の光合成生物のゲノム情報との比較を通して、緑色硫黄細菌に共通・特有の遺伝子を抽出することが可能となり、実際に緑色硫黄細菌のクロロフィル合成系・カロテノイド合成系・光捕集蛋白質複合体の研究は飛躍的に進展した。

## 8. おわりに

光照射によって酸化した反応中心内のスペシャルペアを速やかに還元状態に戻すことは、光合成反応の代謝回転を高めるうえで重要である。緑色硫黄細菌ではPscCがP840還元反応を担う事を本稿では述べた。さらに、酸化型PscC<sup>+</sup>は、シトクロム*c*-554とシトクロム*bc*複合体からの2つの経路により再還元される事を述べた。シトクロム*c*-554とシトクロム*bc*複合体による反応中心への電子伝達経路は、それぞれチオ硫酸と硫化物という異なる還元硫黄化合物の酸化経路と直接結びついている。チオ硫酸はSox系によって酸化され、得られた電子はシトクロム*c*-554に伝達される。一方、硫化物は主にSQRによって酸化され、得られた電子はキノンプールを介して、シトクロム*bc*複合体に伝達される。このように、緑色硫黄細菌において、電子源である還元硫黄化合物から反応中心までの一連の電子伝達経路はかなりの部分が明らかとなっている。反応中心内部の電子移動経路が未だ定かではないが、これには反応中心の結晶構造解析が不可欠であろう。これら

の直線的・非循環型の電子伝達系の他に、光化学系IIのQ<sub>B</sub>様に働くA<sub>1</sub>キノノンや膜結合型NADH dehydrogenaseを介した循環型の電子伝達経路の存在も示唆されている。これらもまた非常に興味深い研究テーマであり、今後取り組んでいきたい課題である。

## 謝辞

本稿で紹介した我々の研究内容は、伊藤繁教授(名古屋大学)との共同研究を含む。また、実験を遂行するにあたって、宮本良氏、村上広海氏(名古屋大学)からのご支援をいただいた。ここに御礼申し上げる。

Received June 21, 2010, Accepted July 22, 2010, Published August 31, 2010

## 参考文献

1. Hauska, G., Schoedl, T., Remigy, H., and Tsiotis, G. (2001) The reaction center of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1507, 260-277.
2. Büttner, M., Xie, D., Nelson, H., Pinther, W., Hauska, G. and Nelson, N. (1992) Photosynthetic reaction center genes in green sulfur bacteria and in photosystem I are related. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8135-8139.
3. Vassiliev, I. R., Antonkine, M. L., and Golbeck, J. H. (2001) Iron-sulfur clusters in type I reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* 1507, 139-160.
4. Okkels, J. S., Kjær, B., Handdon, O., Svendsen, I., Møller, B. L. and Schiller, H. V. (1992) A membrane-bound monoheme cytochrome *c*551 of a novel type is the immediate electron donor to P840 of the *Chlorobium vibrioforme* photosynthetic reaction center complex. *J. Biol. Chem.* 267, 21139-21145.
5. Oh-oka, H., Kamei, S., Matsubara, H., Iwaki, M., and Itoh, S. (1995) Two molecules of cytochrome *c* function as the electron donors to P840 in the reaction center complex isolated from a green sulfur bacterium, *Chlorobium tepidum*. *FEBS Lett.* 365, 30-34.
6. Oh-oka, H., Iwaki, M., and Itoh, S. (1997) Viscosity dependence of the electron transfer rate from bound cytochrome *c* to P840 in the photosynthetic reaction center of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biochemistry* 36, 9267-9272.
7. Hirano, Y., Higuchi, M., Azai, C., Oh-Oka, H., Miki, K., and Wang, Z. Y. (2010) Crystal structure of the electron carrier domain of the reaction center cytochrome *c*<sub>2</sub> subunit from green photosynthetic bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Mol. Biol.* 397, 1175-1187.
8. Xu, Q., Jung, Y. S., Chitnis, V. P., Guikema, J. A., Golbeck, J. H., and Chitnis, P. R. (1994) Mutational analysis of photosystem I polypeptides in *Synechocystis*

- sp. PCC 6803. Subunit requirements for reduction of NADP<sup>+</sup> mediated by ferredoxin and flavodoxin. *J. Biol. Chem.* 269, 21512-51518.
9. Rémy, H., Stahlberg, H., Fotiadis, D., Muller, S. A., Wolpensinger, B., Engel, A., Hauska, G. and Tsiotis, G. (1999) The reaction center complex from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*: a structural analysis by scanning transmission electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 290, 851-858.
  10. Tsukatani, Y., Miyamoto, R., Itoh, S., and Oh-Oka, H. (2004) Function of a PscD subunit in a homodimeric reaction center complex of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* studied by insertional gene inactivation. Regulation of energy transfer and ferredoxin-mediated NADP<sup>+</sup> reduction on the cytoplasmic side. *J. Biol. Chem.* 279, 51122-51130.
  11. Kobayashi, M., Oh-oka, H., Akutsu, S., Akiyama, M., Tomi-naga, K., Kise, H., Nishida, F., Watanabe, T., Ames, J., Koizumi, M., Ishida, N., and Kano, H. (2000) The primary electron acceptor of green sulfur bacteria, bacteriochlorophyll 663, is chlorophyll *a* esterified with  $\Delta 2,6$ -phytyadienol. *Photosynth. Res.* 63, 269-280.
  12. Kusumoto, N., Sétif, P., Brettel, K., Seo, D., and Sakurai, H. (1999) Electron transfer kinetics in purified reaction centers from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* studied by multiple-flash excitation. *Biochemistry.* 38, 12124-12137.
  13. Hager-Braun, C., Zimmermann, R., and Hauska, G. (1999) The homodimeric reaction center of *Chlorobium*, in *The Phototrophic Prokaryotes* (Peschek, G. A., Löffelhardt, W., Schmetterer, G., Eds.) pp. 169-183, Kluwer Academic Publishers, New York.
  14. Seo, D., Tomioka, A., Kusumoto, N., Kamo, M., Enami, I., and Sakurai, H. Purification of ferredoxins and their reaction with purified reaction center complex from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1503, 377-384.
  15. Seo, D., and Sakurai, H. (2002) Purification and characterization of ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup> reductase from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1597, 123-132.
  16. Meyer, T. E., Bartsch, R. G., Cusanovich, M. A., and Mathewson, J. H. (1968) The cytochromes of *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 153, 854-861.
  17. Kusai, K. and Yamanaka, T. (1973) A novel function of cytochrome *c* (555, *Chlorobium thiosulfatophilum*) in oxidation of thiosulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 107-112.
  18. Selvaraj, F., Devine, D., Zhou, W., Brune, D.C., Lince, M.T., and Blankenship, R.E. (1998) Purification and properties of cytochrome *c*-553 from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*, in *Photosynthesis: Mechanism and Effects* (Garab, G., Ed.) pp 1593-1596, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
  19. Itoh, M., Seo, D., Sakurai, H., and Sétif, P. (2002) Kinetics of electron transfer between soluble cytochrome *c*-554 and purified reaction center complex from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Photosynth Res.* 71, 125-135.
  20. Yamanaka, T., and Okunuki, K. (1968) Comparison of *Chlorobium thiosulfatophilum* cytochrome *c*-555 with *c*-type cytochromes derived from algae and nonsulphur purple bacteria. *J. Biochem.* 63, 341-346/
  21. Oh-oka, H., Iwaki, M., and Itoh, S. (1998) Membrane-bound cytochrome *c<sub>z</sub>* couples quinol oxidoreductase to the P840 reaction center complex in isolated membranes of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biochemistry* 37, 12293-12300.
  22. Tsukatani, Y., Miyamoto, R., Itoh, S., and Oh-oka, H. (2006) Soluble cytochrome *c*-554, CycA, is not essential for photosynthetic electron transfer in *Chlorobium tepidum*. *FEBS Lett* 580, 2191-2194.
  23. Tsukatani, Y., Azai, C., Kondo, T., Itoh, S., and Oh-Oka, H. (2008) Parallel electron donation pathways to cytochrome *c<sub>z</sub>* in the type I homodimeric photosynthetic reaction center complex of *Chlorobium tepidum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777, 1211-1217.
  24. Mitchell, P. (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* 62, 327-367.
  25. Schütz, M., Brugna, M., Lebrun, E., Baymann, F., Huber, R., Stetter, K. O., Hauska, G., Toci, R., Lemesle-Meunier, D., Tron, P., Schmidt, C., and Nitschke, W. (2000) Early Evolution of Cytochrome *bc* Complexes. *J. Mol. Biol.* 300, 663-675.
  26. Schütz, M., Zirngibl, S., Le Coutre, J., Buttner, M., Xie, D.-L., Nelson, N., Deutzmann, R., and Hauska, G. (1994) A transcription unit for the Rieske FeS-protein and cytochrome *b* in *Chlorobium limicola*. *Photosynth. Res.* 39, 163-174.
  27. Eisen, J. A., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Heidelberg, J. F., Wu, M., Dodson, R. J., Deboy, R., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Durkin, A. S., Kolonay, J. L., Yang, F., Holt, I., Umayam, L. A., Mason, T., Brenner, M., Shea, T. P., Parksey, D., Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Hansen, C. L., Craven, M. B., Radune, D., Vamathevan, J., Khouri, H., White, O., Gruber, T. M., Ketchum, K. A., Venter, J. C., Tettelin, H., Bryant, D. A. and Fraser, C. M. (2002) The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9509-9514.
  28. Azai, C., Tsukatani, Y., Itoh, S., and Oh-oka, H. (2010) *C*-type cytochromes in the photosynthetic electron transfer pathways in green sulfur bacteria and heliobacteria. *Photosynth. Res.* 104, 189-199.
  29. Imhoff, J. F. (1995) Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria, in *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E., Eds.) pp 1-15,



- Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
30. Frigaard, N.-U. and Bryant, D. A. (2008) Genomic and Evolutionary Perspectives on Sulfur Metabolism in Green Sulfur Bacteria, in *Microbial Sulfur Metabolism*. (Dahl, C. and Friedrich, C. G. Eds.) pp 60-76, Springer, Berlin.
  31. Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., and Fischer, J. (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 2873–2882.
  32. Ogawa, T., Furusawa, T., Nomura, R., Seo, D., Hosoya-Matsuda, N., Sakurai, H., and Inoue, K. (2008) SoxAX binding protein, a novel component of the thiosulfate-oxidizing multienzyme system in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Bacteriol.* *190*, 6097–6110.
  33. Sakurai, H., Ogawa, T., Shiga, M., Inoue, K. (2010) Inorganic sulfur oxidizing system in green sulfur bacteria. *Photosynth Res.* *104*, 163-176.
  34. Kusai, A., and Yamanaka, T. (1973) Cytochrome *c* (553, *Chlorobium thiosulfatophilum*) is a sulphide-cytochrome *c* reductase. *FEBS Lett.* *34*, 235-237.
  35. Ogawa T, Furusawa T, Shiga M, Seo D, Sakurai H, Inoue K. (2010) Biochemical studies of a soxF-encoded monomeric flavoprotein purified from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* that stimulates in vitro thiosulfate oxidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *74*, 771-80.
  36. Shahak, Y., Arieli, B., Padan, E. and Hauska, G. (1992) Sulfide quinone reductase (SQR) activity in *Chlorobium*. *FEBS lett.* *299*, 127–130.
  37. Azai, C., Tsukatani, Y., Harada, J., and Oh-oka, H. (2009) Sulfur oxidation in mutants of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* devoid of cytochrome *c*-554 and SoxB. *Photosynth. Res.* *100*, 57-65
  38. Wahlund, T. M., Woese, C. R., Castenholz, R. W., and Madigan, M. T. (1991) A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* *156*, 81-90.
  39. Frigaard, N.-U. and Bryant, D. A. (2001) Chromosomal gene inactivation in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* by natural transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 2538–2544.

## The Photosynthetic Linear Electron Transfer Pathway in Green Sulfur Bacteria

Yusuke Tsukatani<sup>\*1</sup>, Chihiro Azai<sup>2</sup>, Hirozo Oh-oka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University