

絶対好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のエネルギー代謝機構

吉 宗 一 晃, 湯 本 勳

好アルカリ性細菌は一般的な細菌がほとんど生育できないような pH 10 以上のアルカリ環境を好んで生育する。これまでの報告では好アルカリ性細菌の細胞質 pH は外界の pH より 2 程度低いいため、プロトン (H^+) が細胞質膜外へ向かう勾配ができる。しかし好アルカリ性細菌は中性細菌と同様に電気化学ポテンシャルによる H^+ の細胞質内への流入を利用して ATP を合成する。このようにエネルギー代謝上不利なアルカリ環境下において好アルカリ性細菌が効率良く ATP を合成する機構は未だ完全に理解されていない。好アルカリ性細菌のエネルギー代謝機構に関する研究はそれ自身が興味深いだけでなく、通常とは異なる視点から呼吸鎖機能を根本的に検討する手段とも考えられる。筆者らは好アルカリ性細菌の呼吸鎖を中性細菌のものと比較することでアルカリ環境下でのエネルギー代謝機構について検討してきたので、これまでに得られた結果を紹介する。

1. はじめに

Mitchell, P.D. (1920~1992) は化学浸透圧説を提唱し 1978 年にノーベル化学賞を受賞した。この説によると、呼吸により電子伝達系から得られるエネルギーは膜の内外に形成されるプロトン (H^+) 駆動力 (Δp) に変換され ATP 合成に用いられる¹⁾。この過程の模式図を図 1 に示した。呼吸鎖複合体は電子伝達の過程で H^+ を細胞質膜外に排出する。これによって膜外がより酸性の H^+ 勾配 (ΔpH) と膜内がより負電荷となる膜電位 ($\Delta \psi$) が形成される。 Δp は ΔpH と $\Delta \psi$ の和で、細胞質膜外の H^+ を膜内に流入させる力である。ところが好アルカリ性細菌の細胞質 pH を調べた報告によるとその細胞質 pH は全て外部環境よりも 2 程度低い²⁾。細胞質 pH が細胞質膜外より低い条件では、 ΔpH とは逆の H^+ 勾配、つまり H^+ には膜内から膜外へ向けた力が働く。この状態で膜外からの H^+ の流入を ATP 合成のエネルギーとすることは非常に困難であると予想され

る。しかし好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌は Δp を利用して ATP を合成している³⁻⁵⁾。このようにエネルギー代謝上不利なアルカリ環境下で生育するため好アルカリ性細菌は $\Delta \psi$ を上昇させたり^{6,7)}、シトクロム *c* 等の呼吸鎖関連タン

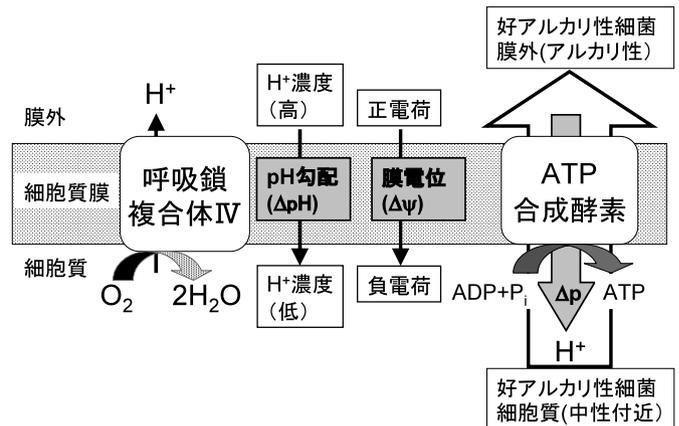


図 1 アルカリ環境における呼吸
呼吸鎖複合体によって細胞質側 (下側) から細胞質膜外 (上側) へと H^+ が排出される。これによって細胞質膜に pH 勾配 (ΔpH , 細胞質膜外がより酸性) と膜電位 ($\Delta \psi$, 細胞質膜外が正極) からなる H^+ 駆動力 (Δp) が形成する。この Δp によって H^+ が膜内へ流入することで ATP 合成酵素は ATP を合成する。ところが好アルカリ性細菌の場合、細胞質が細胞質膜外より酸性のため、膜外に向かった H^+ 勾配が存在する (白い上向き矢印)。この状態では ATP 合成に十分な Δp が得られないはずだが、好アルカリ性細菌は Δp を利用して効率良く ATP を合成している。

産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門 (〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 17 丁目 2-1)
Bioenergetics of obligate alkaliphilic *Bacillus*
Kazuaki Yoshimune and Isao Yumoto (Research Institute of Genome-based Biofactory, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo, 062-8517, Japan)

パク質の機能をアルカリ環境に適応させている⁶⁾。これに加えて呼吸によって汲み出された H^+ の細胞質外膜表面への蓄積によって十分な Δp を得ている可能性を後に述べる。

好アルカリ性細菌は中性環境でも生育できる通性好アルカリ性細菌と中性環境で生育できない絶対好アルカリ性細菌に分類される^{8,9)}。本総説では通性及び絶対好アルカリ性細菌を共に含む場合、単に好アルカリ性細菌と記述した。両者は中性環境での生育の可否だけでなく、16S rRNA 遺伝子の系統樹上でも区別されることが多いため⁸⁾、アルカリ環境への適応機構が異なる可能性もある。最近の好アルカリ性細菌の生理学的な研究は通性好アルカリ性細菌を用いた研究が主流となっている。通性好アルカリ性細菌には同一の菌体をアルカリ及び中性条件で培養して比較検討できる利点がある。しかし細菌のアルカリ適応をより極限環境の視点から検討するためには、より極端にアルカリ環境に適応した絶対好アルカリ性細菌の方が都合な場合もある。筆者らは絶対好アルカリ性グラム陽性細菌 *Bacillus clarkii* K24-1U 株を北海道夕張市の土壌から分離した¹⁰⁾。本分離菌株を用いて、呼吸鎖機能や呼吸鎖成分タンパク質について検討した結果、これまで見出されてこなかった新たな好アルカリ性細菌の生理学的機能を見出すことができた。本総説では好アルカリ性細菌のエネルギー代謝機構の特徴とともに筆者らの研究を紹介する。

2. 好アルカリ性細菌のアルカリ環境適応機構

好アルカリ性細菌はタンパク質の機能を保護するため細胞質を外界より2程度低いpHに保っている。このためそのままでは生育に必要な Δp が十分に得られないものと考えられる。ここではまず細胞質を中性付近に保つ機構を述べた後、アルカリ環境で十分な Δp を確保するための仕組みに関する筆者らの研究を紹介する。

2-1. 細胞質内 pH の維持

中性細菌はアルカリ環境におかれると有機酸生成によってその細胞質を中性付近に保とうとする¹¹⁾。しかしpH 10程度のアルカリ環境になると細胞質膜内外のpHの差があまりにも大きいため、有機酸生成だけでは細胞内pHを維持できない。好アルカリ性細菌の場合、 Na^+/H^+ 対向輸送体^{11~14)}やプロトンポンプ¹⁵⁾による H^+ の取り込み及び、細胞壁の成分である teichuronopeptide^{16,17)}が細胞質内の酸性化に貢献している。 Na^+/H^+ 対向輸送体は H^+ を細胞質内に取り込むと同時に Na^+ を細胞質膜外に排出する。 Na^+/H^+ 対向輸送体による細胞質内pHの維持には排出された Na^+ の細胞質内への再取り込みが必要となる。このため好アルカリ性細菌はアルカリ環境で Na^+ を効率良く取り込むための機構を備えている¹²⁾。通性好アルカリ性細菌 *Bacillus*

halodurans C-125 株や *Bacillus pseudofirmus* OF4 株から膜電位駆動型ナトリウムチャンネルが見つかった^{18,19)}。*B. pseudofirmus* OF4 株のナトリウムチャンネル (Na_vBP) の変異株や欠損株は細胞質内pHを維持できない¹⁹⁾。これに加え、好アルカリ性微生物のべん毛モーターは Na^+ の細胞質内への流入をその駆動力として用いているため、 Na^+ の再取り込みに貢献している^{20,21)}。以上のように好アルカリ性細菌は細胞質膜内外における Na^+ の循環により、細胞内pHの恒常性を維持していると考えられている。しかし細胞質膜外の H^+ 濃度が非常に低いアルカリ環境下で Na^+/H^+ 対向輸送体が H^+ を細胞内に流入させている機構は不明である。

2-2. 細胞質膜近傍の pH

アルカリ環境で生育に必要な Δp を確保することは非常に難しいと予想される。それにもかかわらず、好アルカリ性細菌の中には中性環境で生育する中性菌の生育速度を超えるものが存在する^{6,22)}。好アルカリ性細菌はアルカリ環境に適したATP合成酵素を持つことや²³⁾、呼吸鎖複合体からATP合成酵素へ H^+ が直接受け渡されることが示唆されている²⁴⁾。また好アルカリ性細菌は Δp を得るために、その細胞膜外表面の微小な環境のpHを低くしていることも予想されてきた。しかし細胞膜表面の微小な環境のpHを直接測定することは非常に難しくその証明は成されていない。筆者らは好アルカリ性細菌が Δp を確保する機構に興味を持ち、*B. clarkii* K24-1U 株の H^+ 排出によるpH変化を中性細菌 *Bacillus subtilis* IAM1026 株のものと比較した。両 *Bacillus* 属細菌をアルゴンガス通気下に20分置いた後、空気を与えると両者共にそれらの細胞から H^+ が流出し、pHメーターでpHの減少を測定することができる。このpHの減少は呼吸によって排出された H^+ によるもので、アルゴン通気下ではほとんどpHが減少しない。図2に示すように両 *Bacillus* 属細菌に酸素を与えてから反応系のpHが下がり始めるまでpH依存的な遅延時間が観測された。図3にこれら遅延時間に対する初期pHの影響をまとめた。*B. clarkii* K24-1U 株の遅延時間はpH 10で長く、pH 7で短い。一方、*B. subtilis* IAM1026 株の遅延時間は中性付近で長くpH 10で短い。両 *Bacillus* 属細菌の酸素消費を調べたところ、両者共に酸素添加後直ちに酸素を消費していることから、 H^+ 排出も酸素添加後直ちに行われていると考えられる。さらに遅延時間が長いpHで酸素消費速度が高いことから、この遅延時間は単純に呼吸による H^+ 排出速度の低下によるものではない。これらのことから呼吸鎖によって排出された H^+ がしばらくの間細胞質膜表面に蓄積することが示唆された。

この遅延時間の原因を調べるために、イオン選択的に膜の透過性を向上させるイオノフォア及び膜タンパク質によ

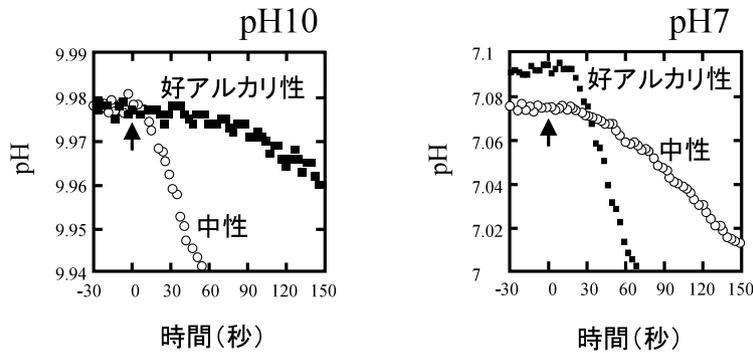


図2 pHメーターでH⁺が検出されるまでの遅延時間の測定
各pHで好アルカリ性細菌 *B. clarkii* K24-1U株 (黒四角) 及び中性細菌 *B. subtilis* IAM1026株 (白丸) をアルゴンガス通気下に37°Cで20分置いた後、矢印で示す(0秒)時間に反応系を大気に開放した。この間のpH変化をpHメーターで測定した。空気を通気してからpHが0.02下がるまでの時間を遅延時間とした。

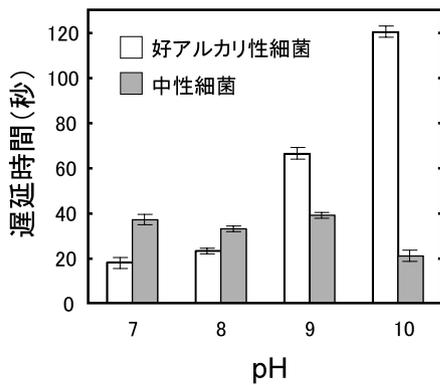


図3 pHメーターでH⁺が検出されるまでの遅延時間のpH依存性
各pHにおける好アルカリ性細菌 *B. clarkii* K24-1U株 (白色) 及び中性細菌 *B. subtilis* IAM1026株 (灰色) の遅延時間を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

るイオン透過の阻害剤を添加してそれらの遅延時間に対する影響を測定した。表1に遅延時間に対するイオノフォア及び膜タンパク質阻害剤の影響を示した。遅延時間は $\Delta\psi$ を消失させるバリノマイシンやETH-157²⁵⁾の添加によって大幅に短くなった。これは $\Delta\psi$ によってH⁺が細胞質膜表面に蓄積していることを示唆している。 $\Delta\psi$ によるH⁺の細胞質膜表面への蓄積はプロトンウェル仮説によって説明できる。この仮説では $\Delta\psi$ がもたらす誘電性によってH⁺が膜のくぼみ(ウェル)に引きつけられる^{26,27)}。*B. clarkii* K24-1U株の遅延時間は細胞質膜内外のNa⁺とH⁺を膜電位非依存的に交換するモネンシン²⁸⁾によって増加した。これは排出されたH⁺がモネンシンを通してしばらくの間細胞質膜内に再流入していることを示唆している。一般的にNa⁺濃度は細胞質より細胞膜外の方が高いため²⁹⁾、モネンシンを通じたH⁺の流入には外部から細胞質に向けたH⁺勾配が必要になる。この勾配は細胞質膜外が細胞質膜内より酸性、つまり細胞質膜表面におけるH⁺の蓄積を示唆して

表1 好アルカリ性細菌 *B. clarkii* K24-1U株の遅延時間に対するイオノフォア及び阻害剤の効果

	遅延時間 (秒)	主な効果	期待される効果
添加剤無し	120 ± 6.0		
イオノフォア			
バリノマイシン	9.6 ± 2.6	K ⁺ の膜透過	K ⁺ 流入による $\Delta\psi$ 消失
ETH-157	40 ± 2.8	Na ⁺ の膜透過	Na ⁺ 流入による $\Delta\psi$ 消失
モネンシン	230 ± 23	Na ⁺ 及びH ⁺ の膜透過	Na ⁺ 及びH ⁺ 勾配の消失
ナイジェリシン	110 ± 9.6	K ⁺ 及びH ⁺ の膜透過	K ⁺ 及びH ⁺ 勾配の消失
阻害剤			
DCCD	120 ± 7.5	ATP合成酵素の阻害	ATP合成酵素を介したH ⁺ 流入の阻害
EIPA	160 ± 17	Na ⁺ チャンネルの阻害	Na ⁺ 流入による $\Delta\psi$ 消失の抑制
ニフェジピン	170 ± 11	Na ⁺ チャンネルの阻害	Na ⁺ 流入による $\Delta\psi$ 消失の抑制
モネンシン+			
イオノフォア, 阻害剤			
モネンシン+バリノマイシン	23 ± 1.2		
モネンシン+EIPA	350 ± 26		
モネンシン+ニフェジピン	330 ± 22		

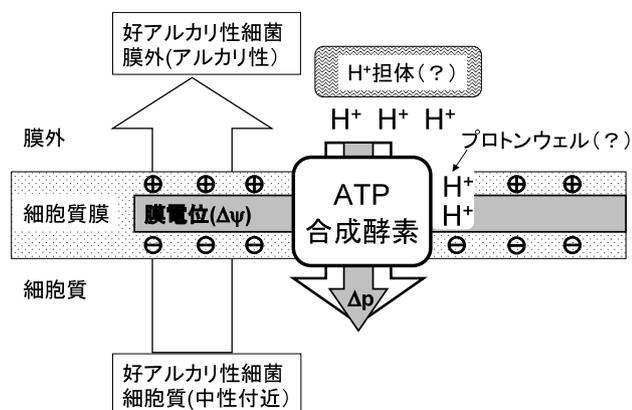


図4 細胞質膜外表面におけるプロトン蓄積のモデル
細胞質膜表面にH⁺が蓄積する時間が遅延時間と予想される。このH⁺蓄積によって細胞質膜外表面近傍は局部的に酸性となり、アルカリ環境でもATP合成等に必要なΔpが得られる。このH⁺蓄積はΔψの誘電性に依存するというプロトンウェル仮説、もしくは未同定のH⁺担体によるものとも説明できる。

いる。一方、H⁺とK⁺を交換するナイジェリシン³⁰⁾によってH⁺の遅延時間の増加は観察されなかった。ナイジェリシンによるH⁺の取り込みにはK⁺排出が必要なため、*B. clarkii* K24-1U株のK⁺の再取り込みが遅いことが原因と考えられる。

Na⁺の流入ポンプ能を阻害するニフェジピン^{31,32)}もしくは5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)-amiloride (EIPA)^{33,34)}をモネンシンと同時に添加すると*B. clarkii* K24-1U株の遅延時間はさらに長くなった。これはNa⁺の流入によるΔψの浪費を抑制したことによるものと説明できる。ATP合成酵素阻害剤の*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)³⁵⁾は遅延時間にほとんど影響を与えないことから、ATP合成酵素を介したH⁺流入の影響はほとんどない。

以上の結果から図4に示すように好アルカリ性細菌*B. clarkii* K24-1U株の細胞質膜表面にはそのΔψに依存してH⁺が細胞膜外表面に集まっていることが予想できた。今後H⁺保持に関与している物質の解明が期待される。

3. シトクロムc

シトクロムa, b及びcは呼吸鎖で電子の運搬を司るタンパク質である。遺伝子変異によりシトクロム含量を減少させた好アルカリ性細菌はアルカリ環境で生育できない³⁶⁾。さらにアルカリ環境でシトクロム含量を増大させる好アルカリ性細菌が知られている⁸⁾ことから、シトクロムは少なくとも一部の好アルカリ性細菌のアルカリ環境での生育に重要である。これらシトクロムcを大量に生産する好アルカリ性細菌の集菌体は肉眼でも赤く見える。シトクロムa, b及びcは、それぞれ特異的な吸収帯を持ち、酸化型と還元型が異なるスペクトルを示すことから生菌体および細胞膜中の定量が比較的容易である。表2は好アル

表2 好アルカリ性*Bacillus*属細菌のシトクロム含量

菌名	生育pH	シトクロム含量 (pmol/mg タンパク質)		
		a	b	c
<i>B. polygoni</i> YN-1 (絶対好アルカリ性細菌)	10	29	610	510
<i>B. cohnii</i> YN-2000 (通性好アルカリ性細菌)	9	7	350	380
<i>B. cohnii</i> YN-2000 (通性好アルカリ性細菌)	10	50	610	920
<i>B. cohnii</i> YN-2000 (通性好アルカリ性細菌)	9	53	350	420
<i>B. subtilis</i> IAM1026 (中性菌)	8	25	200	200
<i>B. subtilis</i> IAM1026 (中性菌)	7	122	148	120

(文献6より一部改変)

表3 シトクロムcの中間酸化還元電位

菌名	シトクロムc	中間酸化還元電位 (mV)
好アルカリ性細菌 (グラム陽性)		
<i>B. cohnii</i> YN-2000	c-553	+ 87
	c-552	+ 92
	シトクロム <i>aco</i> ₃ ^{a)}	+ 95
<i>B. pseudofirmus</i> RAB	c-552	+ 66
<i>B. pasteurii</i>	c-553	+ 47
<i>B. clarkii</i> K24-1U (グラム陰性)	c-550	+ 83
<i>Pseudomonas alcaliphila</i> AL15-21 (グラム陰性)	c-552	+228
中性細菌 (グラム陽性)		
<i>B. subtilis</i>	c-551	> +100
	c-550	+178
<i>Bacillus</i> sp. PS3 (グラム陰性)	c-551	+225
<i>Helicobacterium gestii</i>	c-553	+215

^{a)}ヘムcの値 (文献8より一部改変)

カリ性細菌と中性細菌のシトクロム含量を示している。通性好アルカリ性細菌*Bacillus cohnii* YN-2000株はpH10で培養するとpH8の時と比較してシトクロムc含量を4.6倍程度上昇させる。絶対好アルカリ性細菌*Bacillus polygoni* YN-1[†]もpH9で培養した時よりpH10で培養した際にこれらのシトクロムc濃度が上昇する。

シトクロムa及びbは膜タンパク質である呼吸鎖複合体の構成成分である。一方シトクロムcは単独で細胞質膜外の電子輸送を行うことから、シトクロムa及びbと比較してそのアルカリ環境適応が特に必要であると予想される。グラム陽性好アルカリ性細菌のシトクロムcの特徴として中性菌のものより酸化還元電位が低いことが挙げられる⁸⁾。表3に好アルカリ性及び中性細菌由来のシトクロムcの酸化還元電位を示す。酸化還元電位が低いと電子を受け取りにくく渡しやすいことになる。前述したようにアルカリ環境でのΔpHの形成は不利であり、不足した

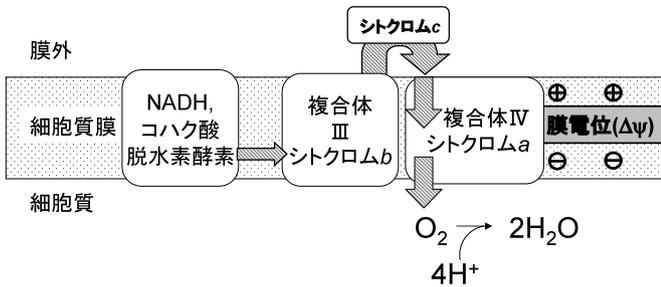


図5 呼吸鎖複合体における電子の流れ

矢印(斜線)は電子の流れを示す。シトクロム *a* 及び *b* はそれぞれ複合体 IV 及び III の構成成分である。NADH 及びコハク酸脱水素酵素から複合体 III へ渡された電子はシトクロム *c* を介して複合体 IV へ渡される。複合体 IV はこの電子を用いて酸素分子を水に還元する。好アルカリ性細菌の $\Delta\psi$ は中性菌のものより大きい。このため好アルカリ性細菌の場合、シトクロム *c* から酸素分子に向けた(図の下向き)電子移動に中性菌より多くのエネルギーが必要となる。このことが好アルカリ性細菌のシトクロム *c* の酸化還元電位が中性菌のものより低い(好アルカリ性細菌のシトクロム *c* がより電子を渡しやすい)理由かもしれない。

Δp を補うためにグラム陽性好アルカリ性細菌の $\Delta\psi$ は中性菌のものより大きい。このため好アルカリ性細菌の細胞質膜間にある大きな電位差に逆らうためにそのシトクロム *c* の酸化還元電位が中性菌のものより低くなったと考えられる。もう少し詳しく説明するために、図5に呼吸における電子の流れを示した。NADH もしくはコハク酸脱水素酵素からの電子は複合体 III へと渡される。シトクロム *c* は細胞質膜外で複合体 III から電子を受け取り、複合体 IV に電子を渡す。複合体 IV はこの電子を使って細胞質で酸素を還元する。シトクロム *c* の電子が酸素に渡る際に電子は細胞質膜外から内側へ移動するが、この移動は $\Delta\psi$ (膜外が正、膜内が負)に逆らうことになる。ここで $\Delta\psi$ が大きい好アルカリ性細菌の場合、電子が流れにくくなるのでそのシトクロム *c* は電子をより渡しやすくするために酸化還元電位が中性菌のものより低くなったという考えである。

好アルカリ性細菌でもグラム陰性菌 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T の可溶性シトクロム *c* は中性菌のものと同様の酸化還元電位を持つ³⁷⁾。これはグラム陰性菌が持つ外膜によって外部のアルカリ環境からシトクロム *c* が守られていることが理由の一つに挙げられる。

外膜を持つグラム陰性菌由来のシトクロム *c* には膜への結合力が無い可溶性のものが存在する。一方、外膜の無いグラム陽性菌のシトクロム *c* は細胞質膜外表面に結合して機能する。これらのシトクロム *c* は不溶性で膜に結合するための仕組みを持っている。*B. subtilis* には *c*-550 と *c*-551 の二つのシトクロム *c* が存在し、それぞれ膜への結合様式が異なる。*B. subtilis* 由来 *c*-550 は N 末端に疎水的な α ヘリックス構造を持つ 30 アミノ酸残基の膜結合領域を持っている³⁸⁾。もう一方の *B. subtilis* 由来 *c*-551 は

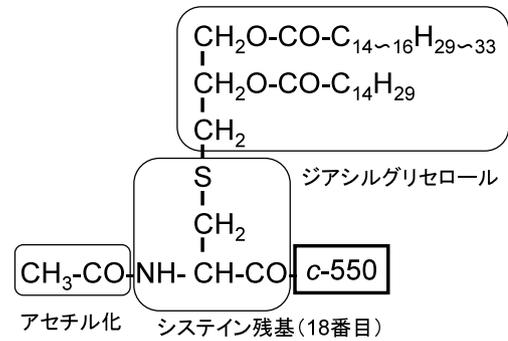


図6 シトクロム *c*-550 の修飾

B. clarkii K24-1U 株の *c*-550 は 118 アミノ酸残基からなる。N 末端 17 アミノ酸残基のシグナル配列が除かれた後、18 番目のシステイン残基の N 末端アミノ基がアセチル化、その側鎖がジアルシルグリセロールによる修飾を受けて成熟タンパク質となる。このジアルシルグリセロールが細胞質膜に結合する。文献 40 より一部改変。

N 末端近くのシステイン残基がジアルシルグリセロールの修飾を受けることで膜に結合している³⁹⁾。

好アルカリ性細菌由来のシトクロム *c* はこれまでにいくつかの研究例があるが、翻訳後修飾を含めた構造を示した例はこれまでに無かった。これは多くの好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌が持つ強いプロテアーゼ活性⁹⁾が一因だと考えられる。筆者らはスクリーニングにより低プロテアーゼ活性の *B. clarkii* K24-1U 株を得て、この菌から完全な翻訳後修飾を持つシトクロム *c* (*c*-550) を精製した。図6は *B. clarkii* K24-1U 株のシトクロム *c*-550 を示している。修飾を受けた *c*-550 は 17 残基からなる細胞質膜外への輸送シグナルペプチドが切断されている。さらに 18 番目のシステイン残基側鎖がジアルシルグリセロールによる修飾を受け、アミノ末端がアセチル化修飾を受けている。*c*-550 を *Escherichia coli* で大量生産しても組換え *c*-550 は図6で示した場合と同様の修飾を受ける。ただしこの場合、ジアルシルグリセロールの分子種は *E. coli* の細胞膜の脂肪酸組成を反映したものになる。ジアルシルグリセロール修飾を受ける Cys¹⁸ を Met に置換した変異型 *c*-550 は 17 残基からなるシグナルペプチドは切断されるが、修飾を受けない。このため野生型 *c*-550 は膜画分から得られるが、この変異型 *c*-550 は可溶性でペリプラズム空間から得ることができる⁴⁰⁾。

c-550 のアミノ酸配列を決定したところ、既知の中性および好アルカリ性細菌の膜結合性シトクロム *c* には存在しない Gly²²-Asn³⁴ の配列が含まれていた。図7に *c*-550 及びジアルシルグリセロールによる修飾を受けるシトクロム *c* のアミノ酸配列を示す。*c*-550 だけが持つ配列 (Gly²²-Asn³⁴) は *B. clarkii* K24-1U 株がアルカリ環境に高度に適応した絶対好アルカリ性細菌であることに起因するかもしれない。*c*-550 はこれまでに報告されている好アルカリ性細菌由来

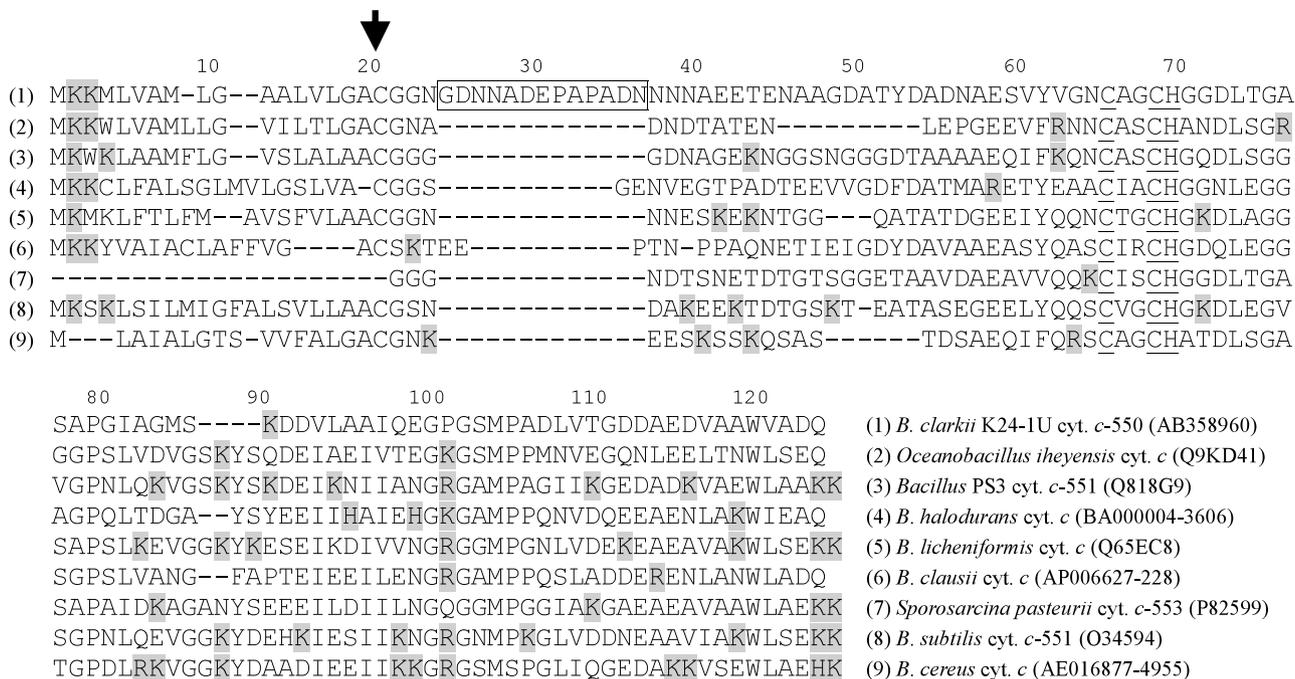


図7 ジアシルグリセロール修飾を持つシトクロム *c* のアミノ酸配列

絶対好アルカリ性細菌 *B. clarkii* K24-1U 株の *c*-550 だけ Gly²²-Asn³⁴ の挿入配列 (四角で囲む) が存在する。成熟 *c*-550 には塩基性アミノ酸残基 (灰色) が一つしかなく、他のシトクロム *c* のものと比べてかなり少ない。矢印はジアシルグリセロール修飾を受ける *c*-550 の Cys¹⁸ を示す。ヘム結合残基を下線で示す。文献 40 より一部改変。

のシトクロム *c* と比較しても極端に塩基性アミノ酸が少ない。一方、*c*-550 には酸性アミノ酸残基が多く、特に上記の Gly²²-Asn³⁴ の配列中には四つの酸性アミノ酸残基が含まれている。

c-550 は上記したようにグラム陽性好アルカリ性細菌のシトクロム *c* に特徴的な低い酸化還元電位を示す。酸化還元適定においては、これまで他の好アルカリ性細菌のシトクロム *c* の値と類似した +83 mV を示すのに対しサイクリックボルタメトリーで測定した場合においてさらに低い +7 mV を示す⁴⁰。このことは *c*-550 が実際の反応場や膜電位存在下において、これまで他の好アルカリ性細菌のシトクロム *c* で知られてきた酸化還元電位よりもさらに低い値で反応していることを示唆している。

4. おわりに

これまでの微生物のエネルギー代謝研究は *E. coli* や *Paracoccus denitrificans* といったこの分野での研究の王道ともいえる微生物種を中心に行われてきた。これら微生物種の研究をベースとして、未知のエネルギー代謝機構を持った微生物の研究が進むことを期待したい。好アルカリ性細菌がなぜアルカリ環境で効率良く生育できるのかという問題には未だ多くの疑問が残されている。好アルカリ性細菌でもシトクロムの含有量、脂質の組成、細胞壁の成分において菌株間にバリエーションが見られる⁶⁾。また好アルカ

リ性細菌は微生物分類学的視点においても以前においては考えられなかったほどの多様な微生物種から構成されることが明らかになってきた⁴¹⁻⁴⁷。このことからアルカリ環境適応機構においても多様なバリエーションが存在することが予想され、今後多くの発見が期待できる。好アルカリ性細菌のエネルギー代謝機構に関する新たな発見は、一般的な生体エネルギー関連の研究に対して、通常とは異なる角度から新規の知見をもたらす続けるものと考えられる。一方、好アルカリ性細菌は中性細菌よりも優れた生育特性を示すことから、好アルカリ性細菌のエネルギー獲得原理を部分的もしくは包括的に中性細菌に応用することによってその代謝機能を上昇させる等の応用展開も考えられる。

文 献

- Mitchell, P. (1961) *Nature*, 191, 144-148.
- Krulwich, T.A., Hicks, D.B., Swartz, T., & Ito, M. (2007) in *Physiology and Biochemistry of Extremophiles* (Gerday, C. & Glansdorff, N. eds.), ASM Press, Washington, D.C.
- Hicks, D.B. & Krulwich, T.A. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 20547-20554.
- Hoffmann, A. & Dimroth, P. (1991) *Eur. J. Biochem.*, 196, 493-497.
- Guffanti, A.A. & Krulwich, T.A. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 14748-14752.
- Goto, T., Matsuno, T., Hishinuma-Narisawa, M., Yamazaki, K.,

- Matsuyama, H., Inoue, N., & Yumoto, I. (2005) *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 365–379.
- 7) Guffanti, A.A., Mann, M., Sherman, T.L., & Krulwich, T.A. (1984) *J. Bacteriol.*, **159**, 448–452.
- 8) Yumoto, I. (2002) *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 342–353.
- 9) Horikoshi, K. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 735–750.
- 10) Yumoto, I., Nakajima, K., & Ikeda, K. (1997) *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 466–469.
- 11) Padan, E., Bibi, E., Ito, M., & Krulwich, T.A. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1717**, 67–88.
- 12) Krulwich, T.A., Ito, M., & Guffanti, A.A. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 158–168.
- 13) Kitada, M., Kosono, S., & Kudo, T. (2000) *Extremophiles*, **4**, 253–258.
- 14) Liu, J., Xue, Y., Wang, Q., Wei, Y., Swartz, T.H., Hicks, D.B., Ito, M., Ma, Y., & Krulwich, T.A. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 7589–7595.
- 15) Krulwich, T.A., Ito, M., Hicks, D.B., Gilmour, R., & Guffanti, A.A. (1998) *Extremophiles*, **2**, 217–222.
- 16) Ito, M. & Aono, R. (2002) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 218–220.
- 17) Aono, R., Ito, M., & Machida, T. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 6600–6606.
- 18) Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q., & Clapham, D. E. (2001) *Science*, **294**, 2372–2375.
- 19) Ito, M., Xu, H., Guffanti, A.A., Wei, Y., Zvi, L., Clapham, D. E., & Krulwich, T.A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10566–10571.
- 20) Sugiyama, S. (1995) *Mol. Microbiol.*, **5**, 592.
- 21) Sugiyama, S., Matsukura, H., Koyama, N., Nosoh, Y., & Imae, Y. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **852**, 38–45.
- 22) Guffanti, A.A. & Hicks, D.B. (1991) *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2375–2379.
- 23) Wang, Z., Hicks, D.B., Guffanti, A.A., Baldwin, K., & Krulwich, T.A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 26546–26554.
- 24) Liu, X., Gong, X., Hicks, D.B., Krulwich, T.A., Yu, L., & Yu, C.A. (2007) *Biochemistry*, **46**, 306–313.
- 25) Simon, W. & Carafoli, E. (1979) *Methods Enzymol.*, **56**, 439–448.
- 26) Mulikdjanian, A.Y. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 415–427.
- 27) Cherepanov, D.A., Feniouk, B.A., Junge, W., & Mulikdjanian, A.Y. (2003) *Biophys. J.*, **85**, 1307–1316.
- 28) Pressman, B.C. (1976) *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 501–530.
- 29) Mulikdjanian, A.Y., Dibrov, P., & Galperin, M.Y. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 985–992.
- 30) Graven, S.N., Estrada-O, S., & Lardy, H.A. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 654–658.
- 31) Cheng, J., Guffanti, A.A., Wang, W., Krulwich, T.A., & Bechhofer, D.H. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 2853–2860.
- 32) Fujinami, I., Sato, T., Trimmer, J.S., Spiller, B.W., Clapham, D.E., Krulwich, T.A., Kawagishi, I., & Ito, M. (2007) *Microbiology*, **153**, 4027–4038.
- 33) Terahara, N., Krulwich, T.A., & Ito, M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14359–14364.
- 34) Ito, M., Hicks, D.B., Henkin, T.M., Guffanti, A.A., Powers, B. D., Zvi, L., Uematsu, K., & Krulwich, T.A. (2004) *Mol. Microbiol.*, **53**, 1035–1049.
- 35) Michel, H. & Oesterhelt, D. (1980) *Biochemistry*, **19**, 4607–4614.
- 36) Lewis, R.J., Belkina, S., & Krulwich, T.A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 857–867.
- 37) Matsuno, T., Morishita, N., Yamazaki, K., Inoue, N., Sato, Y., Ichise, N., Hara, I., Hoshino, T., Matsuyama, H., Yoshimune, K., & Yumoto, I. (2007) *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 247–254.
- 38) Von Wachenfeldt, C. & Hederstedt, L. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 13939–13948.
- 39) Bengtsson, J., Rivolta, C., Hederstedt, L., & Karamata, D. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 26179–26184.
- 40) Ogami, S., Hijikata, S., Tsukahara, T., Mie, Y., Matsuno, T., Morita, N., Hara, I., Yamazaki, K., Inoue, N., Yokota, A., Hoshino, T., Yoshimune, K., & Yumoto, I. (2009) *Extremophiles*, **13**, 491–504.
- 41) Hirota, K., Nodasaka, Y., Orikasa, Y., Okuyama, H., & Yumoto, I. (2005) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 2355–2359.
- 42) Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y., & Nakajima, K. (2005) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1521–1524.
- 43) Yumoto, I., Hishinuma-Narisawa, M., Hirota, K., Shingyo, T., Takebe, F., Nodasaka, Y., Matsuyama, H., & Hara, I. (2004) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2013–2017.
- 44) Yumoto, I., Nakamura, A., Iwata, H., Kojima, K., Kusumoto, K., Nodasaka, Y., & Matsuyama, I. (2002) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 85–90.
- 45) Yumoto, I., Hirota, K., Goto, T., Nodasaka, Y., & Nakajima, K. (2005) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 907–911.
- 46) Yumoto, I., Yamaga, S., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Matsuyama, H., Nakajima, K., & Suemori, A. (2003) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1531–1536.
- 47) Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y., Yokota, Y., Hoshino, T., & Nakajima, K. (2004) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2379–2383.