

## 論文内容の要旨

論文題目: Studies on sulfur oxidizing multienzyme system in the green sulfur bacterium  
*Chlorobaculum tepidum*

(緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* における硫黄酸化多酵素系に関する研究)

氏名 小川 拓郎

葉緑体やシアノバクテリアは 2 種類の光化学系を持ち、 $H_2O$  を光合成の電子供与体として用いる。一方、緑色硫黄細菌は光化学系 I に近縁の 1 種類の光化学系のみを持ち、チオ硫酸や硫化水素などの還元的な無機硫黄化合物を光合成の電子供与体として用いる。緑色硫黄細菌 *C. tepidum* の光合成の電子供与体側の無機硫黄化合物酸化機構を明らかにするために、緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* 細胞破碎液よりチオ硫酸酸化に関連する蛋白質の精製を行った。精製の結果チオ硫酸を酸化し、光化学反応中心複合体への直接的な電子供与体であるシトクロム (cyt) *c*-554 を還元するのに必須な成分として SoxYZ、SoxB、SoxAX-CT1020 を、またチオ硫酸酸化促進に関与すると考えられる成分、SoxF2 を単離した。これらの成分を構成する蛋白質の遺伝子は全てゲノム DNA 上の *sox* (Sulfur OXidizing) クラスター内に内在していた。*sox* クラスターは、化学合成細菌や紅色硫黄細菌などチオ硫酸を利用する硫黄酸化細菌に広く見出され、緑色硫黄細菌がこれらの細菌と共通する反応機構によってチオ硫酸を酸化する可能性が示唆される。しかし、*sox* クラスターを構成する遺伝子群の構成には生物種による差がみられ、また Sox 蛋白質についても、SoxA 蛋白質のように細菌のグループ間で顕著な差がみられるものがある。Sox 蛋白質による無機硫黄化合物酸化機構の生化学的研究は主として化学合成細菌において研究が進められているが、未だ不明な点が多い。本論文では、*C. tepidum* のチオ硫酸酸化機構を明らかにするために Sox 多酵素系の生化学的解析を行い、そのなかでも特に緑色硫黄細菌の Sox 多酵素系に特

徴的な SoxK (CT1020)、SoxF2 (CT1015) に焦点を当て報告する。

## 1. 緑色硫黄細菌における新奇のチオ硫酸酸化因子、SoxK の機能解析

SoxAX-CT1020 は *C. tepidum* の細胞から複合体として単離されたが、他の生物で CT1020 のホモログが SoxAX と共精製されたという報告はこれまでになく、チオ硫酸酸化に必須の成分であるかどうか不明であった。CT1020 は *sox* クラスターを持つ緑色硫黄細菌で保存されており、機能的な関連が示唆されることから最近 *soxK* とも呼ばれるようになった。以後、CT1020 を SoxK と表記する。単離した SoxAXK 複合体はシトクロムを含むが、SDS-PAGE 後のヘム染色および MALDI-TOF MS による質量分析の結果から、SoxA、SoxX はそれぞれ 1 分子のヘムを結合しているが、SoxK は電子伝達成分を結合していないことが示された。SoxAXK は複合体として単離され、各サブユニットを分離することが困難であった。そこで SoxK の役割を明らかにするため、*soxA*、*soxX*、*soxK* をそれぞれ独立に大腸菌で発現させ、組み換え蛋白質 rSoxA、rSoxX、rSoxK を精製した。チオ硫酸酸化反応には SoxAXK、SoxB、SoxYZ の 3 つの成分が必要であるが、SoxAXK の代わりに rSoxA、rSoxX、rSoxK のいずれかを単独で SoxB と SoxYZ を含む反応液に加えてもチオ硫酸の酸化反応は起こらなかった。しかし、rSoxA、rSoxX、rSoxK の等モル混合液を上記の反応液に加えると、*C. tepidum* の細胞から単離した SoxAXK 複合体とほぼ同程度の反応速度が得られた。rSoxA と rSoxX の 2 成分を加えた場合は、同濃度の SoxAXK と比較して 1/30 程度の活性が見られた。これに rSoxK を加えて濃度を増加させていくと、およそ rSoxA、rSoxX と等モルになるまで反応速度は上昇し続けた。rSoxA または rSoxX の濃度をさまざまに変化させると、反応速度が一方の濃度に依存したレベルで飽和することから、rSoxA と rSoxX は溶液内でゆるく会合していることが示唆された。rSoxA、rSoxX、rSoxK が実際に複合体を形成できるかを調べるため、各成分を様々な組み合わせで混合し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。その結果、rSoxK と rSoxA を混合したときに保持時間が短くなり、これに rSoxX を加えた 3 成分混合の場合は、SoxAXK と同じ保持時間となり、いずれも複合体形成が証明された。なお、rSoxA と rSoxX のみを混合した場合はクロマトグラフィーからは複合体形成を証明できなかったことから、両者の結合は弱いものと結論された。様々な硫黄酸化細菌の SoxX の一次構造の比較から、*C. tepidum* を含む多くの種では他のグループの SoxX に含まれている配列の一部が欠けている領域が存在することが分かった。SoxK ホモログを持たない紅色硫黄細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* では SoxAX の結晶構造が明らかにされており、*C. tepidum* の SoxX に欠けている配列領域が SoxA、SoxX の複合体形成に重要な役割を果たすことが示されている。SoxK およびそのホモログは、上記の SoxX 内の欠損による複合体形成の不安定さに重要であると考えられる。以上の結果から、SoxK およびそのホモログは緑色硫黄細菌をはじめとする一部の細菌において SoxA と SoxX の複合体形成に関与する重要な成分であることが示された。

## 2. チオ硫酸酸化促進効果を持つ SoxF2 の機能解析

チオ硫酸酸化因子の精製過程で、活性を促進すると考えられる成分 SoxF2 を単離した。SoxF2 によるチオ硫酸酸化促進効果は、これまでにどの生物種においても生化学的に確認されていなかったため、促進機構について研究した。まず SoxAXK、SoxB、SoxYZ からなる Sox 酵素系が作用する基質を調べたところ、チオ硫酸のほか、亜硫酸、硫化水素を酸化できることを見出した。次に SoxF2 がそれぞれの基質に対してどのような効果を示すか調べた。チオ硫酸を基質とした場合、SoxF2 は単独ではこれを酸化できないが、SoxAXK、SoxYZ、SoxB からなる Sox 酵素系に加えるとチオ硫酸酸化を促進した。電子受容体として *C. tepidum* 由来の cyt c-554 を用いた場合、SoxF2 の添加は最大活性をおよそ 2 倍に上昇させるが、ウマ心臓 cyt c を用いると、最大活性の上昇は 1.3 倍程度にとどまった。このことから、SoxF2 の促進作用に対して、最終電子受容体としての cyt c の種類が大きく影響することが示された。Sox 酵素系成分である SoxB、SoxAXK、SoxYZ の濃度を成分ごとに様々に変化させて、SoxF2 の効果の変化を調べると SoxB と SoxYZ の濃度が低いほど、SoxF2 の促進効果は高くなった。一方、Sox 酵素系による亜硫酸の酸化は、逆に SoxF2 により阻害され、後者の阻害効果は非競合阻害の型を示すことが分かった。Sox 酵素系の各成分の濃度を変化させて阻害効果を調べると、SoxB と SoxYZ の濃度変化につれて、阻害定数も変化した。硫化水素に対しては、SoxF2 は単独で酸化することができ、電子受容体 cyt c を還元するが、cyt c-554 と馬心臓 cyt c では前者に対する活性がおよそ 50 倍高かった。Sox 酵素系は SoxF2 なしでも硫化水素を酸化できるが、SoxF2 単独の場合と比較して、最大活性は 1/6 程度であった。Sox 酵素系に、SoxF2 を添加しても、SoxF2 単独の場合と最大活性は変わらず、活性に相乗効果は見られなかった。Sox 酵素系は、単独でチオ硫酸 1 分子あたり 2 分子の cyt c を還元することができるが、SoxF2 の添加によって獲得電子数に変化は見られなかった。また、その獲得電子数から、酸化産物として硫酸 1 分子と元素硫黄を生じていることが示唆された ( $S_2O_3^{2-} + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + S + 2H^+$ )。

以上に述べたように SoxF2 は、硫化水素 ( $H_2S$ ) 酸化能を持つことに加えて、Sox 酵素系によるチオ硫酸 ( $SSO_3$ ) 酸化に対しては促進的、亜硫酸 ( $SO_3^{2-}$ ) 酸化に対しては阻害という異なる効果を示す。SoxF2 の効果の程度が電子受容体である cyt c の種類による差があることから、SoxF2 は Sox 酵素系の成分と結合することにより間接的に反応速度を高めることのほか、反応経路の途中から電子を受け取り、付加的経路で直接 cyt c-554 に電子を渡す可能性も考えられる。亜硫酸酸化時に阻害的に作用するのは、亜硫酸酸化時の反応中間体からは電子を受け取れないこと、SoxYZ または SoxB もしくはその両方と相互作用することによりそれらの立体構造変化を通じて、反応速度に影響していると考えられる。

本研究により、sox クラスター内にコードされる SoxK および、SoxF2 が、チオ硫酸酸化に関わることが明らかとなった。さらに、SoxK がチオ硫酸酸化に必須な成分、SoxA と SoxX の複合体形成安定化に関わること、SoxF2 が Sox 多酵素系のチオ硫酸酸化反応を促進することを生化学的に明らかにした。