海洋細菌に存在する Na^+ 駆動型 NADH oxidase†

(昭和61年度農芸化学奨励賞受賞)

徳田 元

(千葉大学生物活性研究所)

海洋には、生育に Na^+ を要求するいわゆる好塩細菌が数多く生息しており、その生育至適 Na^+ 濃度は一般に海水の Na^+ 濃度 (約 0.5 M) 付近にあることが知られている。これらのなかには、食中毒や食品腐敗の原因菌として、われわれの食生活や健康にかかわってくるものもあり、食品微生物学の分野では重要な細菌である。しかし、好塩細菌の生命現象に Na^+ がどのような役割を果たしているかについては、ほとんど明らかではない。細胞質に存在する反応で、特異的に Na^+ を要求するものはまだ見出されていない。好塩細菌においても、細胞内部の Na^+ 濃度は外部より常に低く維持されているので、内部の Na^+ は重要ではないとも考えられる。 Na^+ の役割は、外界との接点である細胞表面に見出されるのではないだろうか？ このような観点から、著者らは好塩細菌の膜系におけるエネルギー形成やその利用機構に対する Na^+ の関与を調べることにした。その結果、海洋性好塩細菌には、これまでに知られていない Na^+ を排出してエネルギーを形成する呼吸鎖が広く分布していること、すなわちエネルギー共役機構に顕著な特徴を持つことを明らかにした。

I. H^+ 循環によるエネルギー共役——化学浸透圧理論について

細菌から高等動物に至るまで、膜系におけるエネルギー共役は、化学エネルギーを膜を介したイオンの電気化学ポテンシャル差 (膜電位 $\Delta\phi$ とイオンの濃度勾配) に変換する primary active transport system (単にポンプ

とも呼ばれる) と、形成されたイオン電気化学ポテンシャル差を他の物質 (イオンや栄養物) の電気化学ポテンシャル差に変換する secondary active transport system で行われている。呼吸鎖やイオン駆動型 ATPase (F_1F_0 -ATPase, Na^+ , K^+ -ATPase) はポンプであり、 H^+ の流入によって Na^+ を排出する Na^+/H^+ antiporter や、イオンの流入とともに輸送される糖やアミノ酸輸送系は、secondary active transport system である。後者が恒常的に働くためには、ポンプによるエネルギー形成が必須となる。

ミッチェルの化学浸透圧理論^(1,2)に述べられているように、ミトコンドリアや好氣的に生育している細菌は、もっぱら呼吸鎖の H^+ 排出によってエネルギーを形成している。 H^+ 排出によって形成される $\Delta\phi$ (膜内が負) と H^+ の濃度勾配 ΔpH (膜内がよりアルカリ性) は、膜の H^+ に対する透過性の低さに支えられて、proton motive force (H^+ 駆動力) と呼ばれるエネルギーとして保たれることになる。secondary active transport system の多くは、 H^+ 流入のエネルギーによって駆動されるわけである。

細菌のエネルギー共役機構は、主として大腸菌などの非好塩細菌で解析されており、上述した膜を介する H^+ の循環が基本様式であることが明らかとなっている。 Na^+ とともにアミノ酸⁽³⁾や糖^(4,5)が輸送される系も存在してはいるが、この場合でもエネルギーとなる Na^+ 駆動力は、 Na^+/H^+ antiporter⁽⁶⁾ によって H^+ 駆動力が変換されて形成される⁽⁴⁾。したがって、非好塩細菌のエネルギー共役の源は、 H^+ ポンプによる H^+ 駆動力の形成にある (図1)。膜を H^+ 透過性にする作用のあるプロトンコンダクターが、ポンプ活性自体は阻害しないにもかかわらず、さまざまなエネルギー変換反応を強く阻害するもの、エネルギーの形成が破壊されるためである。

† The Na^+ -Motive NADH Oxidase of Marine Bacteria.

Hajime TOKUDA (Research Institute for Chemo-biodynamics, Chiba University, Inohana, Chiba 280)

図 1 H^+ 循環によるエネルギー共役とプロトンコンダクター

H^+ ポンプである呼吸鎖 (a) や、 F_1F_0 -ATPase (b) で化学エネルギーは H^+ 駆動力に変換される。secondary active transport system である Na^+/H^+ antiporter (c) や、輸送系 (d) は H^+ の流入によって駆動される。プロトンコンダクター (PC) は H^+ 駆動力を解消し (e), c や d を阻害する。 F_1F_0 -ATPase は、ATP を分解し H^+ 駆動力を形成するだけでなく、 H^+ 駆動力によって ATP 合成も行い。

ところで、これまで細菌には H^+ 駆動型のポンプのみが存在し、他のイオンを駆動するポンプはないとされてきた。輸送系の多くが H^+ との共輸送で駆動される細菌に対し、 Na^+ 、 K^+ -ATPase の存在する動物細胞では、 Na^+ との共輸送によって駆動されている。輸送系の共役イオンとポンプの駆動するイオンは関連しているかのようである。それでは、 Na^+ 濃度の高い環境を好んで生育する細菌ではどうであろうか？

II. 海洋細菌のアミノ酸輸送系

海洋の魚から分離された *Vibrio alginolyticus* において、著者らがアミノ酸輸送系のエネルギー共役の解析を開始した時点では、好塩細菌の輸送系に関する知見は *Halobacterium halobium* で得られていたのみであった。この細菌では、すべてのアミノ酸輸送が Na^+ 依存型であるが⁽⁷⁾、*H. halobium* は古細菌として分類される高度好塩細菌 (生育至適 Na^+ 濃度は 4 M 前後) であり、輸送系のこのような性質が広く他の好塩細菌にも観察されるかどうかは疑問であった。また、海洋細菌 *Alteromonas haloplanktis* では数種のアミノ酸輸送系の Na^+ 依存性⁽⁸⁾ が報告されていたが、エネルギー論的解析は十分ではなかった。

V. alginolyticus を 0.3 M Na^+ と 14 mM K^+ を含む合成培地に生育させると、細胞内部には約 80 mM の Na^+ と 0.4 M の K^+ が維持されている⁽⁹⁾。このような細胞では、すべてのアミノ酸の輸送が Na^+ のみを要求した⁽¹⁰⁾。細胞内の陽イオン濃度を人為的に調節する方法を

確立していたので^(9,11)、内部の K^+ を除き、その代わりに Na^+ を負荷した細胞で調べると、輸送には Na^+ だけでなく K^+ も必須となった。一方、 K^+ や Na^+ 以外のイオンを負荷した細胞では、細胞外に Na^+ が存在すれば輸送活性が現れた。また、 Na^+ 負荷細胞に K^+ を加えると、細胞内部の Na^+ は急速に排出されることが明らかとなった⁽¹⁰⁾。これは、 Na^+ 負荷細胞が浸透圧や電気的中性を保ちながら、約 0.4 M の Na^+ を 80 mM 程度に排出して下げるためには、 K^+ 取込み系で K^+ が流入することが必須となるためであった。これらの結果は、すべて Na^+ 濃度勾配 (外>内) 形成の重要性を示すものであった。また輸送活性は、 $\Delta\phi$ を解消すると強く阻害されることがわかった。こうして *V. alginolyticus* のアミノ酸輸送系には、 Na^+ 駆動力が必須の働きをしていることが明らかとなったのである。

III. Na^+ 駆動型呼吸鎖の発見

1. プロトンコンダクター抵抗性 Na^+ 駆動力

H^+ ポンプしか存在しない非好塩細菌の $\Delta\phi$ は、プロトンコンダクター carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) を加えると解消してしまう。*V. alginolyticus* の $\Delta\phi$ も、細胞外 pH が 7.0~7.5 以下のときは CCCP によって解消した。ところが pH 8.5 における $\Delta\phi$ は、CCCP によってまったく影響されないことを見出した⁽¹²⁾。また、CCCP 存在下に形成される $\Delta\phi$ は、細胞内への H^+ の二次的取込みを引き起こし、細胞内部の pH は 6 付近にまで低下した。このことは、CCCP によって膜自体は完全に H^+ 透過性になっていることを示している。このような条件下でも形成されてくる $\Delta\phi$ は、 H^+ ポンプでは説明できない。CCCP 抵抗性 $\Delta\phi$ の形成は、呼吸依存であり、 Na^+ で促進されるため、 Na^+ 駆動型の呼吸鎖の存在が考えられた⁽¹³⁾。そこで、 Na^+ 排出系の性質を Na^+ 負荷細胞で調べた (図 2)。pH 6.5 における Na^+ 排出は CCCP で強く阻害されており、secondary active transport system である Na^+/H^+ antiporter によるものであった。これに対し、pH 8.5 での Na^+ 排出は CCCP 抵抗性であり、ポンプによるものと考えられた。この Na^+ ポンプ活性は、呼吸阻害剤によって強く抑制された。これらの結果から、*V. alginolyticus* の呼吸鎖あるいはその一部は、アルカリ性に至適 pH を持つ Na^+ 駆動型のものであることが明らかとなったのである。

図2 Na⁺ 負荷細胞による pH 6.5 (A) と 8.5 (B) での Na⁺ 排出⁽¹²⁾

Na⁺ の排出は KCl を加えて開始させた。
-KCl (○), control (●), +CCCP (▲), +CCCP + NaCN (△)。

Na⁺ 駆動型呼吸鎖は、呼吸鎖は H⁺ を排出するものというこれまでの常識からは予想すらされていなかったものであり、その機構や生理的役割あるいはそれがどの程度広く好塩細菌に存在しているかといった点に興味を持たれた。

2. Na⁺ 駆動型呼吸鎖欠損変異株

Na⁺ 駆動型呼吸鎖は、CCCP 存在下でも Na⁺ 駆動力 ($\Delta\psi$ および Na⁺ 濃度勾配) を形成する。この結果、これを直接のエネルギーとするアミノ酸輸送も、酸性 pH では CCCP で阻害されるが、pH 8.5 においては CCCP 抵抗性を示すようになった⁽¹²⁾。 *V. alginolyticus* におけるエネルギーとしての Na⁺ 駆動力の重要性を考えると、生育そのものもアルカリ性 pH では CCCP 抵抗性になることが考えられた。そこで生育に対する CCCP の影響を調べたところ、pH 6.5 では 5 μ M CCCP が完全に生育を抑制したが、pH 8.5 では 60 μ M 以上の CCCP 存在下でも生育することが明らかとなった⁽¹⁴⁾。これは、Na⁺ 駆動型呼吸鎖が形成する Na⁺ 駆動力のみで *V. alginolyticus* は生育できることを示している。この知見から、Na⁺ 駆動型呼吸鎖を欠損する変異株は、pH 8.5 での生育が酸性 pH と同様 CCCP 感受性を示すものと考えた。そこで、ニトロソグアニジンを変異原として、CCCP 存在下に pH 8.5 で生育できない変異株 Nap 1, Nap 2 を分離した⁽¹⁵⁾。

図3 野生株 (A) と変異株 Nap 1 (B), Nap 2 (C) の pH 8.5 における Na⁺ 排出⁽¹⁵⁾

Na⁺ 負荷細胞に KCl を加えて Na⁺ 排出を開始させた。-KCl (○), control (●), +CCCP (▲)

野生株と Nap 1, Nap 2 の Na⁺ 排出活性を pH 8.5 で比べると、野生株では Na⁺ 駆動型呼吸鎖による CCCP 抵抗性の活性が認められるのに対し、両変異株の活性は CCCP で完全に阻害されている (図3)。CCCP が不在の場合、変異株は Na⁺ を排出するが、これは Na⁺/H⁺ antiporter がこの pH でも働いているためである。CCCP 非存在下の排出速度は、野生株のほうが変異株よりも大きい。野生株では、Na⁺ 駆動型呼吸鎖と、Na⁺/H⁺ antiporter 両方で Na⁺ を排出しているためと思われる。

変異株は呼吸鎖による Na⁺ 排出活性を欠損しているが、H⁺ の排出活性はどうであろうか？ 野生株、変異株の細胞懸濁液を pH 8.5 で嫌氣的に保っておき、酸素パルスによる反応液の pH 変化を調べた。呼吸によって H⁺ が排出されると、反応液は酸性化する。野生株も変異株も、酸素パルスによって反応液は酸性化し、この酸性化の速度や程度に大きな違いは認められなかった⁽¹⁵⁾。Nap 1, Nap 2 は、Na⁺ 駆動型呼吸鎖の活性を欠いているが、H⁺ 排出活性は正常であることを示している。また、野生株における H⁺ 排出活性は 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (HQNO) に抵抗性であるが、Na⁺ 排出は低濃度の HQNO ではほぼ完全に阻害されることも明らかとなった⁽¹⁶⁾。これらの結果から、呼吸鎖の特定の部位が Na⁺ を排出しており、その部位は HQNO 感受性であると考えられた。

3. Na⁺ 駆動型 NADH oxidase

変異株はどの呼吸鎖に欠陥を生じ、Na⁺ の排出ができなくなったかを明らかにするため、細胞質膜を分離した。他の海洋細菌と同様、*V. alginolyticus* は低張液中で

溶菌し、容易に膜分画を得ることができる^(17,18)。なお、*V. alginolyticus* では、こうして得た膜の大部分は閉じた小胞構造ではなく、高分子物質に対しても透過性となっている。エネルギー形成を調べるには適さないが、膜透過性の低い呼吸基質の酸化も調べることができる利点がある。Na⁺ 駆動型呼吸鎖の発見に先立ち、*V. alginolyticus* の NADH oxidase は Na⁺ を特異的に要求する性質を持っていることが知られていたが⁽¹⁹⁾、変異株ではこの Na⁺ 要求性を完全に失っていることが明らかとなった(図4)⁽¹⁶⁾。Nap 2 から Na⁺ 駆動型呼吸鎖を持つようになった自然復帰変異株 Nap 2 R を分離すると、この株では NADH oxidase は再び Na⁺ 要求性に復帰していた。Na⁺ 要求性は、野生株や Nap 2 R の NADH oxidase に特異的であり、NADH 以外を電子供与体にした場合はいずれの株においても、呼吸活性は Na⁺ 非要求性であった。

Na⁺ 要求性 NADH oxidase が Na⁺ 駆動型のポンプであることを再構成実験によって証明した⁽²⁰⁾。野生株の膜を2% オクタグルコンドで可溶化し、大豆リン脂質より調製したリボゾームと混合後、希釈によってオクタグルコンド濃度を下げた。この方法⁽²¹⁾によって、疎水

性の膜蛋白はリボゾームに再構成されることが明らかとなっている。NADH はリボゾーム膜を通過できないので、加えた NADH を酸化できるのは細胞とは逆の方向性で再構成された NADH oxidase のみである。したがって、NADH 酸化で形成されるエネルギーの方向も細胞とは逆になっており、リボゾーム内が正の $\Delta\psi$ 形成と、リボゾーム内への Na⁺ の取込みが見られた。Na⁺ の取込みは CCCP 抵抗性であり、Na⁺ 要求性 NADH oxidase の Na⁺ ポンプとしての性質が明らかとなった⁽²⁰⁾。ところが、リボゾーム内への H⁺ の取込みは認められず、NADH oxidase は H⁺ ポンプとしては機能しないのではないかと思われた。

Na⁺ 要求性 NADH oxidase が Na⁺ ポンプとしての働き、H⁺ ポンプ活性は持っていないことを反転膜小胞系で明らかにした⁽²²⁾。フレンチプレスで細胞を破壊すると、膜の方向性が反転した小胞が得られる。*V. alginolyticus* の反転膜小胞は、NADH 酸化によって Na⁺ を取り込むが H⁺ の小胞内への蓄積はなかった。また、*V. alginolyticus* よりも高濃度の Na⁺ を生育に要求する *V. costicola* にも、Na⁺ 駆動型 NADH oxidase が存在しているが⁽¹⁴⁾、この細菌の反転膜小胞も NADH 酸化の直接の結果は Na⁺ 輸送であり、H⁺ の動きは二次的であることを明らかにしている⁽²³⁾。

IV. Na⁺ 排出部位の解析

1. NADH : quinone oxidoreductase

NADH から電子が酸素に伝達される過程のどの反応が Na⁺ を排出するかを、さらに詳細に解析した⁽¹⁶⁾。NADH : quinone oxidoreductase (以下 NQR と略す) は、NADH を酸化しキノンをキノール(QH₂)に還元する反応を触媒している。この部位は、ミトコンドリア呼吸鎖の site I に相当するが、ミトコンドリアにおいても H⁺ 排出の詳細な機構は不明である。*V. alginolyticus* では、NADH 以外の電子供与体でもキノールが形成される。電子供与体が異なっても、キノール形成後は共通の経路で酸素に電子が伝達されると思われる。NADH oxidase のみが Na⁺ 要求性を示すことから、Na⁺ 要求性はこの site I に相当する NQR 部位に存在することが考えられた。そこで、NQR 活性の Na⁺ 要求性ならびに HQNO 感受性を調べた(表1)。野生株、Nap 2 R の活性は Na⁺ 要求性であるが、変異株の活性には Na⁺ は必須ではない。また、HQNO はこの Na⁺ 要求性の NQR

図4 野生株(A)、Nap 2 R(B)、Nap 1(C)およびNap 2(D)の膜分画におけるNADH oxidaseのNa⁺要求性⁽¹⁶⁾
KCl (○), NaCl (●)

表 1 膜画分の NQR 活性に対する陽イオンと HQNO の影響⁽¹⁶⁾

菌 株	NQR 活性 (ユニット/mg 蛋白)		
	KCl	NaCl	NaCl+HQNO
野 生 株	0.37	0.99	0.42
Nap 1	0.43	0.42	0.43
Nap 2	0.51	0.54	0.53
Nap 2 R	0.29	0.82	0.31

活性のみを強く阻害している。

Na⁺要求性 NQR は、界面活性剤で可溶化後もキノール形成活性を持っているのに対し、変異株の NQR は可溶化すると失活した⁽¹⁶⁾。また、Na⁺要求性 NQR と変異株 NQR には、性質の異なる NADH dehydrogenase (以下 NDH と略す) が含まれており、Na⁺要求性 NQR には Ag⁺感受性、変異株 NQR には Ag⁺抵抗性の NDH が存在することが明らかとなった⁽²⁴⁾。変異株 NDH は可溶化によって失活するが、フラビンを加えると部分的に活性が回復した。活性の回復には、FMN よりも FAD のほうが効果的であった。変異株 NQR に含まれている NDH は、Na⁺要求性 NQR 中の NDH とは異なり、可溶化によってフラビンが解離し活性を失うものと思われる。また野生株の場合でも、NQR の Na⁺要求性や NDH の Ag⁺感受性は可溶化によって常に増加した。これらの結果は、野生株には本来性質の異なる 2 種類の NQR が存在し、変異株は Na⁺要求性の NQR を特異的に欠いていることを示している。

2. Na⁺駆動型 NQR の精製と再構成

Na⁺要求性 NQR を精製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による見かけの分子量が 50,000, 47,000, 31,000 の 3 種類のサブユニットからなる複合体であることを明らかにした⁽²⁵⁾。いずれのサブユニットも、膜蛋白に占める割合は少量であり、全膜蛋白の SDS-PAGE では検出が困難である。しかし、コール酸処理と、Mg²⁺ 存在下で非イオン性界面活性剤リポソックス DCH⁽¹⁵⁾ 処理した膜をオクタシルグルコシドで可溶化すると、Na⁺要求性 NQR 複合体を選択的に濃縮できることを見出した。NQR 画分をイオン交換およびハイドロキシアパタイトカラムによって精製した。分子量 47,000 のサブユニットは、単独で Ag⁺感受性 NDH 活性を持っており、精製の過程でしばしば NQR 複合体から解離してきた。NDH が解離した複合体では、NADH 酸化もキノール形成も認められなかった。NDH の性質

図 5 再構成した Na⁺要求性 NQR 複合体による $\Delta\psi$ の形成

$\Delta\psi$ (内側正) は、オキソール-V の蛍光変化より調べた。A, B, C には矢印で NADH とユビキノ-1 (Q-1) を加えた。D には矢印で NADH とメナジオン (MD) を加えた。 $\Delta\psi$ はバリノマイシン (val) で解消させた。control (A), -Na⁺ (B), +HQNO (C), -Q-1+MD (D)

は林と畝本によって調べられており⁽²⁶⁾、Na⁺非要求性、HQNO 非感受性の NADH 酸化を触媒し、その際キノンはセミキノラジカル (Q⁻) にまで還元されるが、キノール形成はないとされている。したがって、分子量 50,000 と 31,000 のサブユニットが Na⁺要求性と HQNO 感受性の性質を持ち、セミキノラジカルからキノールを形成すると考えられる。

精製した Na⁺要求性 NQR 複合体を再構成し、 $\Delta\psi$ の形成を調べた (図 5)。Na⁺ 存在下で、電子受容体としてユビキノ-1 を用いると、NADH 添加によって $\Delta\psi$ (内側正) が形成された (a)。反応系から Na⁺ を除くと、 $\Delta\psi$ は形成されず (b)。また系に HQNO を加えると $\Delta\psi$ 形成は阻害された (c)。メナジオン (MD) を電子受容体にすると、NDH から電子を受取るため、 $\Delta\psi$ 形成は抑制された (d)。これらの結果から、Na⁺要求性 NQR 複合体は、セミキノラジカルからキノールを形成する過程で Na⁺ を駆動し、 $\Delta\psi$ の形成を行うことが明らかとなった。

3. 変異株の変異部位の解析

Nap1 および Nap2 は、Na⁺駆動型 NQR 複合体に含まれている Ag⁺感受性 NDH の活性を欠いている。野生株から精製した Ag⁺感受性 NDH を Nap2 の膜に加え、界面活性剤存在下に 37°C で反応させると、

表 2 Na^+ 駆動型 NQR を構成するサブユニットの種類, 性質および各株における存在^a

サブユニット ^b	性 質	野生株	Nap 1	Nap 2	Nap 2 R
47,000 (NDH)	Ag^+ 感受性	+	—	+	+
			(不活性)		
50,000	$\{\text{Na}^+$ 要求性	+	—	+	+
31,000	HQNO 感受性	+	—	+	+

^a Na^+ 非要求性 NQR がすべての株に存在するが, そのサブユニット組成は明らかではない.

^b SDS-PAGE での見かけの分子量.

Na^+ 要求性と HQNO 感受性の性質を持った NQR 活性が再構成されることを見出した⁽²⁴⁾. Nap 2 R の出現頻度から, Nap 2 の変異は single mutation と考えられる. また SDS-PAGE で調べると, Nap 2 の膜にはすべてのサブユニットが存在していた⁽²⁵⁾. これらの結果から, Nap 2 は Na^+ 駆動型 NQR 複合体中の NDH が変異で不活性型になっているが, 分子量 50,000 と 31,000 のサブユニットは正常であることがわかった. 一方, Nap 1 からは自然復帰変異株が出現せず, また Ag^+ 感受性 NDH と反応させても, 再構成は起こらなかった. そこで SDS-PAGE で調べると, Nap 1 はすべてのサブユニットを欠く変異株であることが明らかとなった. 表 2 にこれらの結果をまとめて示す.

V. Na^+ 駆動型呼吸鎖のプラスミド依存性

ナリジキン酸 (Nal) 耐性のマーカーをつけた野生株を供与菌とし, リファマイシン (Rif) 耐性のマーカーをつけた Nap 1 を受容菌として接合を行い, Rif と CCCP を含む pH 8.5 の選択培地 (Na^+ 駆動型呼吸鎖を持つ株は pH 8.5 での生育が CCCP 抵抗性) で生育させると, Nap 1 単独では観察されない生育の良いコロニーが数多く出現した. 97% のコロニーが Nal 感受性であり, これらのコロニーは Nap 1 が接合によって Na^+ 駆動型呼吸鎖を獲得したものであることを示している. 膜での NDH 活性は Ag^+ 感受性, また NQR 活性は Na^+ を要求し HQNO で阻害された. さらに, SDS-PAGE によってこれらのトランスコンジュガントには, 3 種のサブユニットが存在することが確認された (図 6). このトランスコンジュガント (Rif 耐性) を供与菌とし, Nap 1 Nal を受容菌として接合を行うと, Na^+ 駆動型呼吸鎖を獲得した Nap 1 Nal が出現した. これらの結果は, Na^+ 駆動型 NQR がプラスミド依存性であり, Nap 1 はこのプラスミドの欠失変異株である可能性を示唆し

図 6 野生株, Nap 1 およびトランスコンジュガントの Na^+ 要求性 NQR 画分の SDS-PAGE

Nap 1 (1), トランスコンジュガント (2), 野生株 (3), 精製 NQR 複合体 (4), 精製 NDH (5). レーン 4 の移動度の小さいバンドは不純物による. レーン 2 と 3 には, レーン 1 にはない数本のバンドが 47 k と 31 k の間にも存在しているが, これらもプラスミド支配かどうかは明らかではない.

ている. Nap 2 型の変異株が得られることから, 細胞当りのプラスミドのコピー数は 1 個程度と思われる. 一方, Na^+ 非要求性 NQR は, おそらく染色体支配であろう. いずれにしても, 呼吸鎖の中心をなす NADH oxidase の初発反応に, プラスミド依存の NQR が関与していることは興味深い.

VI. Na^+ 駆動型呼吸鎖の海洋細菌における分布

著者らが *V. alginolyticus* において Na^+ 駆動型呼吸鎖を見出して以後, 著者らや他のグループによって現在までに数種類の細菌で Na^+ 駆動型呼吸鎖の存在が報告されている. これらは, *V. costicola*^(14,23), *V. parahaemolyticus* をはじめとする 4 種のビブリオ属細菌とビブリオ科の 1 種⁽²⁷⁾, および死海から分離された絶対好気性菌 BA 1⁽²⁸⁾ である. 重要な共通点は, ①これらは好塩細菌であり, その生息環境 (海洋や死海) の pH が 8~8.5 であること, ② Na^+ の排出はすべてアルカリ性に至適 pH を持つ Na^+ 要求性 NADH oxidase によっている

(他の呼吸基質によって駆動される Na⁺ ポンプは見出されていない) こと, ③Na⁺ 排出部位が詳細に解析されている *V. costicola*⁽²³⁾ と BA 1⁽²⁸⁾ では, *V. alginolyticus*⁽¹⁵⁾ 同様, キノン還元部位 (NQR) で Na⁺ が排出され, この部位は HQNO で強く阻害されることである。大腸菌などでは, HQNO は NADH oxidase 以外の oxidase も阻害するが, *V. alginolyticus* や *V. costicola* では, NQR の部位で NADH oxidase を特異的に阻害し, 他の oxidase にはほとんど影響がない。これらの知見は, 好塩細菌 (とくに海洋性好塩細菌) には, アルカリ性に至適 pH を持つ Na⁺ 駆動型の NADH oxidase が一般的に存在している可能性を示唆している。そこで著者らは, さらに 10 種のグラム陰性海洋細菌 (*Alteromonas*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Flavobacterium* 等) について Na⁺ 駆動型 NADH oxidase の検索を試みた。生育に対する CCCP の影響を pH 6.5 と pH 8.5 で調べたところ, pH 8.5 での CCCP の最小阻止濃度は pH 6.5 に比べ, 少ないもので 3 倍, 多いものでは 50 倍以上にもなった。膜分画での NADH oxidase に対する陽イオンの影響を調べると, 10 種すべてについて Na⁺ 要求性であった⁽³⁰⁾。また, 海洋細菌 *Photobacterium phosphoreum* の NADH oxidase も Na⁺ 依存性であると報告されている⁽³¹⁾。一方, 大腸菌の NADH oxidase は Na⁺ 非要求性である⁽¹⁹⁾。したがって, グラム陰性の海洋性好塩細菌には, Na⁺ 要求性 (すなわち Na⁺ 駆動型) NADH oxidase が一般的に存在するといえるのではないだろうか。しかし, これらがすべてプラスミド依存とは考えにくい。Na⁺ 駆動型呼吸鎖の遺伝的解析は今後の課題である。

VII. Na⁺ 排出系の生理的役割

細胞にとって Na⁺ 排出系の存在意義は何であろうか? また, 海洋細菌にはなぜこのように広く Na⁺ 駆動型 NADH oxidase が分布しているのだろうか? 高等生物の細胞同様, 細菌細胞内の K⁺ 濃度は常に外部より高く, 一方 Na⁺ 濃度は低く保たれている。非好塩細菌の蛋白合成系は, K⁺ で促進され Na⁺ で阻害されるため, Na⁺ 排出の理由であるかもしれない。しかし, 好塩細菌の *in vitro* 蛋白合成系には, 高濃度 Na⁺ 存在下でも高い活性を現わすものがある⁽³²⁾。蛋白合成系に対する K⁺ や Na⁺ の効果は, むしろ細胞内のイオン環境に

蛋白合成系が適応した結果生じたと考えたほうがよいのではないだろうか。また, Na⁺ 排出の意義を原始細胞の浸透圧調節という面から進化的に考察したすぐれた総説⁽³³⁾があるが, Na⁺ 排出系がこの機能を果たしている証拠は得られていない。細胞内 pH の調節に Na⁺/H⁺ antiporter の関与を示唆する結果が動物細胞や細菌細胞で蓄積してきている。しかし *V. alginolyticus* に関する限り, pH 調節で中心的役割を果たしているのは K⁺ 取り込み系⁽⁹⁾と, K⁺/H⁺ antiporter^(34,35)と思われる。いずれにしても, 細菌の pH 調節機構については, まだ解明しなければならない点が多く残されている。

Na⁺ の排出が Na⁺/H⁺ antiporter で行われるにしろ, Na⁺ ポンプで行われるにしろ, H⁺ 駆動力とは別のエネルギーを形成することに, Na⁺ 排出系の本来の意義があるのではないだろうか。H⁺ ポンプしかない大腸菌においても, H⁺ 駆動力の一部を Na⁺ 駆動力に変換しておけば 2 種類のエネルギーが利用できることになる。pH が 8 付近にある海水中で生息している細菌にとって, Na⁺ 駆動力は一層その重要性を増すと思われる。H⁺ 濃度の低いこのような環境下では, H⁺ を共役イオンとするより, はるかに高濃度存在する Na⁺ を利用するほうが理にかなっているのではないだろうか。ところで, Na⁺/H⁺ antiporter で 1 mol の Na⁺ を排出するためには, 1 mol 以上の H⁺ の流入がアルカリ性 pH では必要になってくる⁽³⁶⁾。したがって, 化学エネルギーを H⁺ ポンプによって H⁺ 駆動力に変換し, それをさらに Na⁺/H⁺ antiporter で Na⁺ 駆動力に変換する系は, アルカリ性 pH ではより多くの化学エネルギーを消費することになる。これに対し, Na⁺ ポンプによれば化学エネルギーは直接 Na⁺ 駆動力に変換することができるわけである。海洋細菌に広く Na⁺ 駆動型呼吸鎖が存在する理由は, Na⁺ 濃度の高いアルカリ性の環境下で, 効率良く Na⁺ 駆動力を形成することにあると考えられる⁽³⁷⁾。

一方, 生育の至適 pH が 10 から 11 という極端なアルカリ性を好む細菌が知られている。これらの好アルカリ性細菌においても, 輸送系^(38,39)や鞭毛運動⁽⁴⁰⁾は, Na⁺ 駆動力をエネルギーとしている。好アルカリ性細菌の形成する H⁺ 駆動力は小さいにもかかわらず, Na⁺ ポンプはこれらの細菌には見出されていない⁽⁴¹⁾。エネルギー共役の詳細な分子機構の解明が待たれる細菌であろう。

細菌に存在する Na⁺ ポンプは, Na⁺ 駆動型呼吸鎖以外に, Na⁺ 駆動型 ATPase と Na⁺ 駆動型 decarboxyl-

ase が知られている。 *Streptococcus faecalis* の Na^+ 駆動型 ATPase は、 H^+ 駆動力の形成ができない条件下に、高濃度 Na^+ で誘導される系であり、アルカリ性に至適 pH を持っている^(12,13)。アルカリ性における、 H^+ 駆動力の代替エネルギーとして、 Na^+ 駆動力が重要であることを示しているかのようである。また、 Na^+ 駆動型の decarboxylase と ATPase 両方を持つ *Propionigenium modestum*⁽¹⁴⁾ は、海底の泥から分離された絶対嫌気性好塩細菌であり⁽¹⁵⁾、この菌では H^+ 駆動力は必要ないと思われる。

おわりに

温度、pH、塩濃度などが異常な環境下でも、そこに生息する細菌が見出されてくる。pH や塩濃度が特殊な環境に適応した細菌では、外界との接点である膜系に適応機構の実態が存在している。これらのなかには、secondary active transport system としてのイオン輸送系で特殊環境に適応しているだけでなく、*V. alginolyticus* などの海洋細菌のようにポンプそのものが通常の細菌には存在しないものもあり、生物学的に興味ある材料であろう。

興味のおもむくままに研究することをお許しいただいた、千葉大学教授畠本 力先生に感謝いたします。また、常に励まして下さった名古屋大学教授水島昭二先生に感謝いたします。研究にご協力いただいた浅野誠氏、宇田川俊昭氏に御礼申し上げます。

- (1) P. Mitchell : *Nature*, **191**, 144 (1961).
- (2) P. Mitchell : *J. Bioenerg.*, **4**, 63 (1973).
- (3) T. Tsuchiya, S. M. Hasan and J. Raven : *J. Bacteriol.*, **131**, 848 (1977).
- (4) H. Tokuda and H. R. Kaback : *Biochemistry*, **16**, 2130 (1977).
- (5) T. Tsuchiya, J. Raven and T. H. Wilson : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 26 (1977).
- (6) I. C. West and P. Mitchell : *Biochem. J.*, **144**, 87 (1974).
- (7) J. K. Lanyi : *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 377 (1979).
- (8) J. E. Fein and R. A. MacLeod : *J. Bacteriol.*, **124**, 1177 (1975).
- (9) H. Tokuda, T. Nakamura and T. Unemoto : *Biochemistry*, **20**, 4198 (1981).
- (10) H. Tokuda, M. Sugawara and T. Unemoto : *J. Biol. Chem.*, **257**, 788 (1982).

- (11) T. Nakamura, H. Tokuda and T. Unemoto : *Biochim. Biophys. Acta*, **692**, 389 (1982).
- (12) H. Tokuda and T. Unemoto : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 265 (1981).
- (13) H. Tokuda and T. Unemoto : *J. Biol. Chem.*, **257**, 10007 (1982).
- (14) H. Tokuda and T. Unemoto : *J. Bacteriol.*, **156**, 636 (1983).
- (15) H. Tokuda : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 113 (1983).
- (16) H. Tokuda and T. Unemoto : *J. Biol. Chem.*, **259**, 7785 (1984).
- (17) T. Unemoto, M. Hayashi and M. Hayashi : *J. Biochem.*, **82**, 1389 (1977).
- (18) H. Tokuda : *Methods Enzymol.*, **125**, 520 (1986).
- (19) T. Unemoto, M. Hayashi and M. Hayashi : *J. Biochem.*, **82**, 1389 (1977).
- (20) H. Tokuda : *FEBS Lett.*, **176**, 125 (1984).
- (21) E. Racker, B. Violand, S. O'Neal, M. Alfonzo and J. Telford : *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 470 (1979).
- (22) H. Tokuda, T. Udagawa and T. Unemoto : *FEBS Lett.*, **183**, 95 (1985).
- (23) T. Udagawa, T. Unemoto and H. Tokuda : *J. Biol. Chem.*, **261**, 2616 (1986).
- (24) M. Asano, M. Hayashi, T. Unemoto and H. Tokuda : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2813 (1985).
- (25) 宇田川俊昭, 浅野 誠, 畠本 力, 徳田 元 : 日本薬学会第 106 年会講演要旨集, 1986, p. 261.
- (26) M. Hayashi and T. Unemoto : *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 470 (1984).
- (27) T. Tsuchiya and S. Shinoda : *J. Bacteriol.*, **162**, 794 (1985).
- (28) S. Ken-Dror, R. Preger and Y. Avi-Dor : *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 122 (1986).
- (29) S. Ken-Dror, J. K. Lanyi, B. Schobert, B. Silver and Y. Avi-Dor : *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 766 (1986).
- (30) 木暮一啓, 清水 潮, 宇田川俊昭, 畠本 力, 徳田 元 : 1985年度日本海洋学会秋季大会講演要旨集, 1985, p. 163.
- (31) H. Watanabe, A. Takimoto and T. Nakamura : *J. Biochem.*, **82**, 1707 (1977).
- (32) M. Kamekura and D. J. Kushner : *J. Bacteriol.*, **160**, 385 (1984).
- (33) T. H. Wilson and E. C. C. Lin : *J. Supramol. Str.*, **13**, 421 (1980).
- (34) T. Nakamura, H. Tokuda and T. Unemoto : *Biochim. Biophys. Acta*, **776**, 330 (1984).
- (35) T. Nakamura, H. Tokuda and T. Unemoto : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 1030 (1986).

- (36) S. Schuldiner and H. Fishkes : *Biochemistry*, **17**, 706 (1978).
 - (37) H. Tokuda and T. Unemoto : *Microbiol. Sci.*, **2**, 65 (1985).
 - (38) N. Koyama, A. Kiyomiya and Y. Nosoh : *FEBS Lett.*, **72**, 77 (1976).
 - (39) M. Kitada and K. Horikoshi : *J. Bacteriol.*, **131**, 784 (1977).
 - (40) N. Hirota, M. Kitada and Y. Imae : *FEBS Lett.*, **132**, 278 (1981).
 - (41) T. A. Krulwich : *J. Membr. Biol.*, **89**, 113 (1986).
 - (42) N. Kinoshita, T. Unemoto and H. Kobayashi : *J. Bacteriol.*, **158**, 844 (1984).
 - (43) Y. Kakinuma and F. M. Harold : *J. Biol. Chem.*, **260**, 2086 (1985).
 - (44) W. Hilpert, B. Schink and P. Dimroth : *EMBO J.*, **31**, 1665 (1984).
 - (45) B. Schink and N. Pfennig : *Arch. Microbiol.*, **133**, 209 (1982).
-