

*Rhodopseudomonas gelatinosa*의 Chromatophore에서 시토크롬 bc₁ 복합체와 시토크롬 c 산화효소의 확인 및 특성연구

강대길 · 최명재 · 최원기
전남대학교 자연과학대학 화학과

Identification and Characterization of Cytochrome bc₁ Complex and Cytochrome c Oxidase in Chromatophore of *Rhodopseudomonas gelatinosa*

Kang, Dae-Gil, Myung-Jai Choi and Won-Ki Choi

Department of Chemistry, College of Natural Science, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

ABSTRACT: The chromatophore from the chemotrophically grown facultative anaerobic photosynthetic bacterium, *Rhodopseudomonas gelatinosa* ATCC 17013 was isolated through stepwise sucrose gradient centrifugation. The isolated chromatophore showed high activities of the cytochrome bc₁ complex and cytochrome c oxidase. The activity of cytochrome bc₁ complex was completely inhibited by 5 μ M antimycin A, 10 μ M myxothiazol, and that of cytochrome c oxidase was completely inhibited by 50 μ M KCM and 100 μ M NaN₃ but not inhibited by carbon monoxide. The activity of cytochrome c oxidase of the chromatophore was increased by addition of ionophores or protonophores. The reduced-oxidized difference spectrum of cytochrome bc₁ complex isolated by affinity chromatography showed the absorption maxima at 553 nm (shoulder at 547 nm), 520 nm, and 418.5 nm, on the other hand, that of cytochrome c oxidase showed α , β , and γ peaks at 554 nm, 523 nm, and 421 nm, respectively. The cytochrome c oxidase from chemotrophically grown *Rhodopseudomonas gelatinosa* seems to be a b-type cytochrome c oxidase.

KEY WORDS □ *Rhodopseudomonas gelatinosa*, Chromatophore, Cytochrome bc₁ complex, Cytochrome c oxidase

미토콘드리아, 엽록체, 세균의 형질막 등 생체막의 전자전달계에는 시토크롬 bc₁ 복합체 (ubiquinol; ferricytochrome c oxidoreductase, E.C. 1.10.2.2)와 시토크롬 c 산화효소 (E.C.1.9.3.1)가 막에 결합하여 전자전달과 양성자 기울기를 형성시켜주는 중요한 기능을 하는 것으로 널리 알려져 있다 (Nicholls, 1982). 시토크롬 bc₁ 복합체는 heme b, c와 Rieske Fe-S 중심 및 quinone을 가지고 있는 단백질로서 동물세포의 미토콘드리아에서 분자량이 각각 다른 8 개의 subunit로 구성되어 있으며 전자전달계에서 ubiquinol로부터 전자를 받아 산화된 시토크롬 c에 전자를 전달한다 (Bartsch, 1983) 식물의 엽록체에서는 특이하게 시토크롬 c₁ 대신 시토크롬 f를 포함

하여 5개의 polypeptide, Fe-S 중심 등으로 구성된 시토크롬 b/f 복합체를 형성한다 (Clark와 Hind, 1983; Rich, 1988) 광합성 세균에서의 시토크롬 bc₁ 복합체에 관한 연구는 Yu와 Yu (1982)에 의해 *Rhodopseudomonas sphaeroides*에서 시토크롬 bc₁ 복합체를 분리하여 그 특성에 대한 연구를 수행한 바 있다. 또한 *Rhodopseudomonas sphaeroides* GA (Gabellini 등, 1982)와 *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26 (Takamiya 등, 1982; Yu 등, 1984; Ljungdahl 등, 1987)과 *Rhodopseudomonas capsulata* (Ljungdahl 등, 1987) 등에서 시토크롬 c 복합체를 정제하여 그 특성을 연구하였으며 최근에는 *Rhodobacter capsulatus* (Myatt 등, 1989; Gabellini

등, 1989) *Rhodospseudomonas sphaeroides* [Crielaard 등, 1989; Lavorel 등, 1989]에서 정제한 시토크롬 bc_1 복합체를 리포솜에 재구성하여 막 전위와 양성자수송에 관한 연구를 수행하고 Drachev 등(1989)은 시토크롬 bc_1 의 생체내에서의 기능 및 전자전달 속도를 측정할 바 있다.

시토크롬 c 산화효소에 대한 연구는 오랜 역사를 가지고 있으며 최근에는 미토콘드리아의 시토크롬 c 산화효소 각 subunit에 대한 연구가 수행된 바 있다 (Baker, 1987; Beavis, 1987; Brezenzinski, 1987; Zhang, 1988; Davy 등, 1989; Bona, 1990; Cooper, 1990; Garver, 1990). 광합성 세균에서의 시토크롬 c 산화효소는 Sasaki 등 (1970)에 의해 전자전달계의 최종효소로서 기능을 하는 a형과 o형 시토크롬이 발견된 후 *Rhodospseudomonas palustris* (King과 Drews, 1976)에서 시토크롬 o에 대한 연구가 수행되었고 *Rhodospseudomonas capsulata* (Hudig 등, 1982) *Chromatium vinosum* (Doi 등, 1982) *Rhodospseudomonas sphaeroides* (Takamiya 등, 1983)에서 각각 b형 시토크롬 c 산화효소가 정제되어 그 특성이 밝혀진 바 있다. 하지만 *Rhodospseudomonas gelatinosa*에서의 시토크롬 bc_1 복합체 및 시토크롬 c 산화효소에 관해서는 그 특성이 보고되지 않고 있다. 그러므로 본 연구에서는 빛이 없는 조건에서 화학영양성으로 배양 (Chemotrophically grown)시킨 광합성 세균 *Rps. gelatinosa*의 chromatophore를 분리하여 시토크롬 bc_1 복합체와 시토크롬 c 산화효소를 확인하고 아울러 protonophore와 ionophore가 chromatophore막에서 시토크롬 c 산화효소의 활성에 미치는 영향을 연구하고자 한다.

재료 및 방법

균의 배양

광합성 세균 *Rps. gelatinosa* ATCC 17013을 1% Yeast extract (Difco), 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4$, pH 7.2 액체배지에 carotenoid 생성을 억제시키기 위하여 50 μM diphenylamine을 첨가하고 빛이 없는 조건하에서 호기성으로 30°C에서 배양하여 대수기의 말기에 수확하여 시료로 사용하였다.

재 료

실험에 이용된 cytochrome c-agarose, cytochrome c (type II-S), Tris, Tween-80 (polyethylen sorbitan mono-oleate), Triton X-100, carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazon (CCCP), carbonylcyanide-p-trifluoro-methylphenylhydrazon (FCCP), valinomycin, gramicidin, nigericin, 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), antimycin A, myxothiazol과 전기영동 관련시약들은 Sigma 제품을 사용하였고 그 밖의 완충용액을 비롯한 여러시약들은 특급 시약을 사용하였다.

Chromatophore의 분리

*Rps. gelatinosa*에서 chromatophore의 분리과정은 Clark 등 (1981)의 방법을 응용하여 4°C에서 수행하였다.

세포 20 g (wet wt.)을 100 ml의 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)에 현탁시킨 후 ultrasonic oscillator를 이용하여 파쇄시키고 10000×g에서 20분 원심분리 (Hitachi model SCR-20BA)하여 얻어진 조추출물을 다시 98000×g에서 120분간 원심분리 (Sorval OTD75B)하여 침전된 일차 chromatophore를 얻었다. 여기서 얻어진 일차 chromatophore를 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)에 $A_{660} = 50 \text{ cm}^{-1}$ 이 되게 현탁시키고 0.5-1.1 M 사이의 sucrose농도를 0.2 M 간격의 단계 기울기 (stepwise gradiet)로 90분간 65000×g에서 원심분리하여 chromatophore를 얻었다.

시토크롬 bc_1 복합체의 활성도 측정

Chromatophore에서 시토크롬 bc_1 복합체 활성도는 0.5% Tween-80, 약 10 μM 의 산화된 cytochrome c, 100 μM KCN이 포함된 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에 20 μl chromatophore 용액을 가하여 25°C에서 1분간 방치한 후 20 μM 의 hydroquinol을 첨가하여 cytochrome c의 환원량을 550 nm에서 흡광도를 읽어 밀리몰흡광계수 $\epsilon_{mM} = 19.1 \text{ cm}^{-1}$ (Gabbellini 등, 1982)로 부터 계산하였다.

Cytochrome c 산화효소의 활성도 측정

환원된 cytochrome c의 산화량을 0.5% Tween-80, 25 mM KCl, 그리고 75 mM choline chloride가 포함되어 있는 Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)에서 Bill 등 (1980)의 방법을 이용하여 측정하였다.

시토크롬 bc_1 복합체와 시토크롬 c 산화효소의 분리

일차 chromatophore를 1% Triton X-100이 포함된 Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)에서 120분간 부드럽게 저어주고 98000×g에서 150분간 원심분리하여 chromatophore 막에서 추출된 막결합단백질 용액을 얻었다. 여기서 얻어진 막 결합 단백질 용액을 0.1% Triton X-100이 포함된 Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)으로 미리 팽형된 cytochrome c-agarose 친화성 column (1.3×10 cm)에 주입하고 100 ml의 0-80 mM NaCl 직선농도 기울기로 단백질을 용출시키고 50 ml의 200 mM NaCl로 column에 남아있는 단백질을 분리하였다.

환원-산화 차이 스펙트럼

시토크롬 bc_1 복합체의 활성도가 나타난 분획과 시토크롬 c 산화효소 활성도가 나타난 분획을 potassium ferricyanide로 산화시키고, 과량의 potassium ferricyanide는 sephadex G-25 column으로 제거한 후, $Na_2S_2O_4$ 로 환원된 시료와 차이 스펙트럼의 UV-vis spectrophotometer (Hitachi model 557)를 이용하여 얻었다.

기타방법

단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로한 Lowry (1951)방법을 이용하였고 대략적

Table 1. Cytochrome c oxidase activity of the chromatophore preparation step.

Step	Total protein (mg)	Cyt. c oxidase activity (Units)	Specific activity (Units/mg)
Crude extract	1,460	2,038	1.39
Crude chromatophore	545	1,700	3.12
Chromatophore	245	1,430	5.84

*Cytochrome bc₁ complex specific activity in the chromatophore was 1.5 unit/mg. Cytochrome bc₁ complex activity at crude extract and crude chromatophore could not be determined.

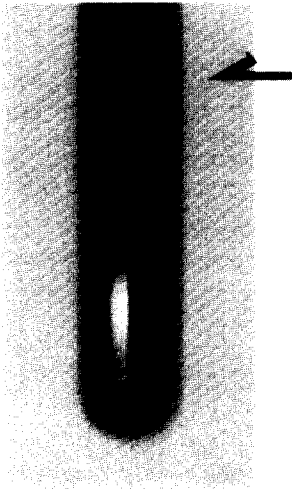


Fig. 1. Chromatophore band isolated by sucrose gradient centrifugation: (→) indicate the chromatophore.

인 Cytochrome의 정량은 Cytochrome의 solet 흡수대인 416 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 수행하였다.

결과 및 고찰

광합성 세균 *Rps. gelatinosa*에서 chromatophore를 분리하는 과정을 요약하면 Table 1과 같다.

광 순환 전자전달을 억제하고 호흡에 의한 전자전달을 하게함으로써 시토크롬 bc₁ 복합체와 시토크롬 c 산화효소의 생성을 유도하기 위하여 세균을 빛이 없는 조건에서 diphenylamine을 넣어 carotenoid의 생성을 억제하고 호기성으로 배양한 후 세포를 깨어 원심분리통해 cell debris를 제거하고 조추출물을 얻었다. 여기서 얻어진 조추출물을 다시 원심분리를통해

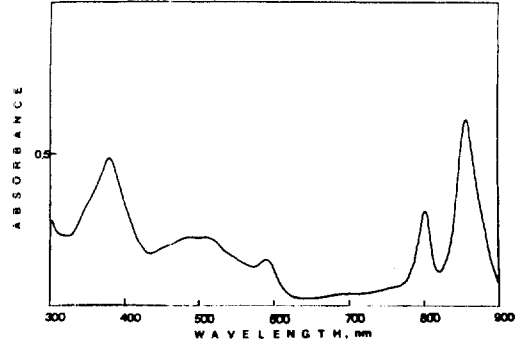


Fig. 2. UV-vis spectrum of isolated chromatophore. The chromatophore was suspended in 50 mM Tris-HCl buffer solution (pH 7.2).

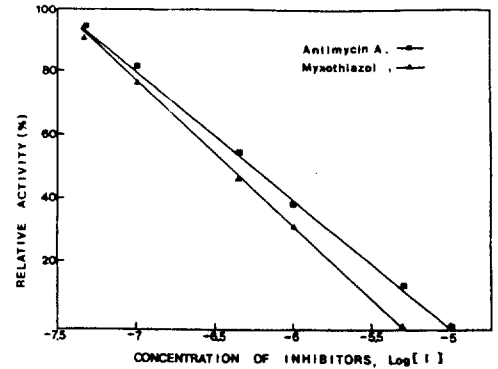


Fig. 3. The inhibition effect of antimycin A and myxothiazol on cytochrome bc₁ complex in the chromatophore. Antimycin A and myxothiazol were dissolved in 99.8% methanol.

가용성 단백질을 제거하고 막 성분만 모은후 sucrose 단계기울기 원심분리를 하여 0.7 M sucrose 근처에서 chromatophore band를 얻었다 (Fig. 1). 분리된 chromatophore의 흡수곡선은 Bacteriochlorophyll a를 포함하고 있으며 carotenoid 흡수대는 거의 없었다 (Fig. 2). 조추출물과 막결합 성분에서 시토크롬 bc₁ 복합체의 활성도는 200 μM 이상의 KCN에 의해 시토크롬 c 산화효소의 활성이 저해되지 않고, 비효소적 활성이 나타나 측정하지 못했으며 chromatophore 막에서도 시토크롬 c 산화효소에 비해 그 활성이 크게 낮았다.

Antimycin A와 Myxothiazol의 cytochrome bc₁ complex 저해

시토크롬 bc₁ 복합체의 저해제로 알려진 antimycin A와 myxothiazol은 *Rps. gelatinosa*의 chromatophore에서 각각 5 μM과 10 μM에서 시토크롬 bc₁ 복합체의 활성을 100% 저해하였다 (Fig. 3). Antimycin A에 의한 시토크롬 bc₁ 복합체의 활성도 저해는 이미 널리 알려진 바 있고, myxothiazol은

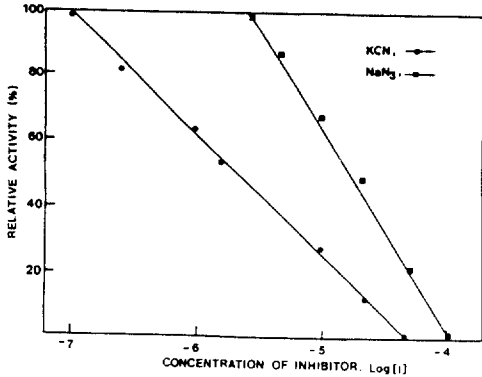


Fig. 4. The inhibition effect of KCN and NaN_3 on cytochrome c oxidase in the chromatophore.

myxobacterium인 *Myxococcus fulvus*에서 생성되는 항생물질로서 동물세포의 미토콘드리아의 전자전달계에서 시토크롬 bc_1 복합체를 저해하는것으로 보고된 바 있는데 (Thierbarch와 Reuchenbach, 1981) *Rps. gelatinosa*에서도 $10 \mu\text{M}$ 의 myxothiazol에 의해 시토크롬 bc_1 복합체의 활성도가 완전히 저해된다. 이는 myxothiazol이 시토크롬 bc_1 복합체내의 b형 시토크롬의 활성부위에 결합하여 전자전달을 저해할 것으로 여겨진다.

CN^- , N_3^- , CO의 cytochrome c 산화효소 저해

KCN은 $50 \mu\text{M}$ 에서, NaN_3 는 $100 \mu\text{M}$ 에서 각각 Cytochrome c oxidase의 활성을 완전히 저해했으나 CO는 시토크롬 c 산화효소의 활성을 저해하지 못했다 (Fig. 4). aa_3 형 시토크롬 c 산화효소나 시토크롬 o에서는 CO에 의해서는 그 활성이 저해되고 b형 시토크롬 c 산화효소는 CO에 의해서 활성이 저해받지 않는다고 보고된 바 있는데 (Hudig와 Drews, 1982) *Rps. gelatinosa*의 chromatophore에서 시토크롬 c 산화효소가 CO에 의해서 저해를 받지 않는 것으로 보아 b형 시토크롬 c 산화효소일 것으로 추측된다.

Protonophore 및 Ionophore의 시토크롬 c 산화효소의 활성에 미치는 영향

Chromatophore막에 ionophore로서 valinomycin, gramicidin, nigericin을 그리고 protonophore로서 carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP), carbonyl cyanide-p-trifluoromethylphenylhydrazine (FCCP), 2,4-dinitrophenol (2, 4-DNP)를 첨가해 주었을때 모두 시토크롬 c 산화효소의 활성도가 증가하였다 (Fig. 5). 이는 protonophore나 ionophore를 첨가해 줌에 따라 막 전위 (membrane potential)가 감소하여 (Clark와 Jackson, 1981) 시토크롬 c 산화효소에 의한 전자전달이 더 활발히 진행되었을 것으로 생각되어진다. 또한 시토크롬 c 산화효소가 protonophore와 ionophore의 영향을 받는것으로 보아 chromatophore에서

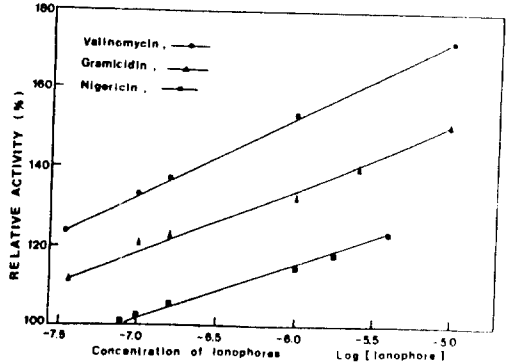


Fig. 5. The effect of protonophore and ionophore on cytochrome c oxidase in the chromatophore. Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP), carbonyl cyanide-p-trifluoromethylphenyl hydrazine (FCCP), and 2,4-dinitrophenol (2, 4-DNP) as the protonophores and valinomycin, gramicidin, and nigericin as the ionophores were dissolved in 99.8% methanol.

시토크롬 c 산화효소는 전자전달과 막을 통한 양성자 전달을 짝지어서 수행할 것으로 여겨진다.

시토크롬 bc_1 복합체와 시토크롬 c 산화효소의 분리

*Rps. gelatinosa*의 chromatophore에서 시토크롬 bc_1 복합체와 시토크롬 c 산화효소 시토크롬 c 친화성 크로마토그래피를 이용하여 부분 정제하였다. Triton X-100에 의하여 추출된 막 성분 단백질을 cytochrome c-agarose column에 주입하고 $100 \text{ ml } 0-80 \text{ mM}$ 의 NaCl 직선 농도 기울기를 걸어 4.2 ml 씩 분획을 받았다. 시토크롬 bc_1 복합체의 활성은 NaCl 기울기를 걸자마자 나타났으나 그 활성은 비교적 낮은 편이었는데 이는 Triton X-100에 의해 활성도가 저해되었을 것으로 생각되어진다. 시토크롬 c 산화효소는 50 mM NaCl 농도 근처에서 용출 되어지고 column에 남아있는 단백질을 50 ml 의 200 mM NaCl로 모두 용출시켰더니 약간의 활성도가 나타났다 (Fig. 6).

환원-산화 차이 스펙트럼

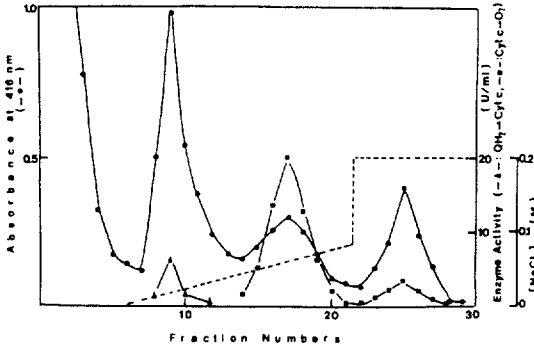


Fig. 6. Elution profile of cytochrome c-agarose affinity chromatography. The membrane-bound proteins suspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 1% Triton X-100 were eluted through the cytochrome c-agarose column (1.3×10 cm) which was preequilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 0.1% Triton X-100, and collected in 4.2 ml fraction volum. (cytochrome bc₁ complex activity: —●—, cytochrome c oxidase activity: —■—).

시토크롬 bc₁ 복합체의 활성도가 가장 높게 나타나는 9번 분획과 시토크롬 c 산화효소의 활성도가 가장 높게 나타나는 16번 분획을 각각 potassium ferricyanide로 산화시키고 과량의 potassium ferricyanide를 sephadex G-25로 제거한 후 Na₂S₂O₄에 의해 환원되어진 시료와의 환원-산화 차이 스펙트럼 (Na₂S₂O₄reduced-K₃[Fe(CN)₆]oxidized difference spectrum)을 얻었다. 시토크롬 bc₁ 복합체의 환원-산화 차이 스펙트럼에서 553 nm와 547 nm에서 2개의 α 흡수 peak가 나타났고 520 nm와 418.5 nm에서 β 및 solet 흡수대가 각각 나타났다. 이는 b형 시토크롬과 c형 시토크롬이 결합하여 하나의 복합체를 형성하여 ubiquinol로부터 전자를 받아 산화형의 시토크롬 c에게 전자를 작용을 하는 ubiquinol ferri-cytochrome c oxidoreductase로써 기능을 하는 시토크롬 bc₁ 복합체의 전형적인 스펙트럼이다 (Gabellini 등, 1982). 시토크롬 c 산화효소 활성도가 높은 분획의 환원-산화 차이 스펙트럼에서는 α, β, solet peak가 554 nm, 523 nm, 그리고 421 nm에서 각각 나타났다 (Fig. 7). Cytochrome c oxidase에 대한 환원-산화 차이 스펙트럼에서 α 흡수대가 554 nm인 것으로 보아 이 효소가 b형 시토크롬 c 산화효소 일 것으로 여겨진다.

이상의 결과로 볼 때 대부분의 광합성 세균은 에

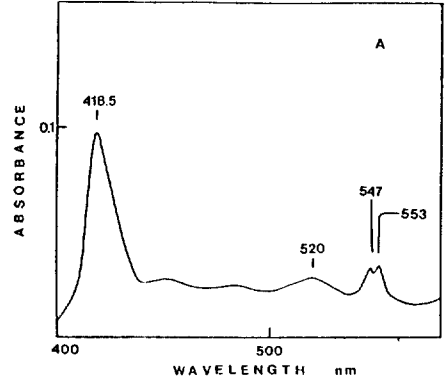


Fig. 7. Sodium dithionite reduced-potassium ferricyanide oxidized difference spectra of cytochrome bc₁ complex(A) and cytochrome c oxidase(B) partially purified with cytochrome c affinity chromatography.

너지원으로써 빛을 조사하면서 배양하면 광순환 전자전달을 하는 것으로 널리 알려져 있는데 빛이 없는 조건에서 호기성으로 성장시킨 *Rps. gelatinosa*의 chromatophore에는 시토크롬 bc₁ 복합체와 b-형 시토크롬 c 산화효소가 존재하여 호흡에 의한 전자전달을 수행할 것으로 생각하고 동물세포의 미토콘드리아에서와 마찬가지로 chromatophore막을 통한 양성자 기울기 형성에도 관여할 것으로 여겨진다.

적 요

통성 혐기성 광합성세균 *Rhodospseudomonas gelatinosa*를 화학 영양성으로 배양하여 chromatophore를 분리하였다. 분리된 chromatophore에 시토크롬 bc₁ 복합체와 시토크롬 c-산화효소의 활성도가 높게 나타났고 시토크롬 bc₁ 복합체는 5 μM의 antimycin A와 10 μM myxothiazole에 의해 그리고 시토크롬 c 산화효소는 50 μM의 KCN과 100 μM의 NaCN에

의해 각각 그 활성도가 완전히 저해되었으나 CO에 의해서는 저해를 받지않았다. 또한 chromatophore 내의 시토크롬 c 산화효소는 ionophore와 protonophore의 존재하에서 그 활성도가 증가했다. 시토크롬 c 친화성 크로마토그래피에 의해 분리된 시토크롬 bc₁ 복합체에 대한 환원-산화 차이 스펙트럼에서 553 nm와 547 nm에서 2개의 α 흡수대가 나타났고 520 nm와 418.5 nm에서 β 와 solet 흡수대가 나타났다. 시토크롬 c 산화효소의 환원-산화 스펙트럼에서는 α , β , 그리고 solet 흡수대가 각각 554 nm, 523 nm, 421 nm에서 각각 나타났다. 시토크롬 c 산화효소는 CO에 의해 저해를 받지 않고 환원-산화 스펙트럼의 α 흡수대가 554 nm인것으로 보아 b-형 시토크롬 c-산화효소일것으로 생각된다.

REFERENCES

1. **Azzi, A., K. Bill and C. Broger**, 1982. Affinity chromatography purification of cytochrome c binding enzymes. *Biochemistry* **79**, 2447-2450.
2. **Baker, G.M., M. Nogochi and G. Palmer**, 1987. The reaction of cytochrome c oxidase with cyanide. *J. Biol. Chem.*, **262**, 595-604.
3. **Bartsch, R.G.**, 1983. Cytochromes in "The photosynthetic bacteria" (Clyton and Siström ed.) pp. 249-299. Academic press, N.Y.
4. **Beavis, A.D.**, 1987. Upper and lower limits of the charge transduction stoichiometry of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6174-6181.
5. **Bill, K., R.P. Casey, C. Broger and A. Azzi**, 1980. Affinity purification of cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.*, **120**, 248-251.
6. **Bona, M., M. Fabian and Sedlak**, 1990. Spectral and catalytic properties of cytochrome c oxidase in organic solvent. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1020**, 94-100.
7. **Brzezinski, P. and B.G. Malmström**, 1987. The mechanism of electron gating in proton pumping cytochrome c oxidase: The effect of pH and temperature on internal electron transfer. *Biochim. Biophys. Acta.*, **894**, 29-38.
8. **Clark, A.J. and J.B. Jackson**, 1981. The measurement of membrane potential during photosynthesis and during respiration in intact cells of *Rhodospseudomonas capsulata* by both electrochromism and by permeant ion redistribution. *Biochem. J.*, **200**, 389-397.
9. **Clark, B.D. and G. Hind**, 1983. Isolation of a five polypeptide Cytochrome b-f complex from spinach chloroplasts. *J. Biochem.*, **258**, 10348-10354.
10. **Cooper, C.E.**, 1990. The steady-state Kinetic of Cytochrome c oxidation by Cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1017**, 187-203.
11. **Crielaard, W., N. Gabellini, K.J. Hellingwerf, and W.N. Konings**, 1989. Functional reconstitution of photosynthetic electron transfer in liposome. *Biochim. Biophys. Acta*, **974**, 211-218.
12. **Doi, M.K., Takamiga and M. Nishimura**, 1982. Isolation and purification of membrane-bound Cytochrome b-550 from photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. *Photosynthesis Res.*, **3**, 131-139.
13. **Drachev, S.A., B.S. Kaurow, M.D. Mamedow, A.Y. Mulkijanjan, A.Y. Semenov, V.P. Shinkarev, V.P. Skulachav, and M.I. Verkhoucky**, 1989. Flash-induced electrogenic events in the photosynthetic reaction center and bc₁ complex of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophore. *Biochim. Biophys. Acta.*, **973**, 189-197.
14. **Gabellini, N., J.R. Bowyer, E. Hurt, B.A. Melardri, and G. Hauska**, 1982. Cytochrome bc₁ complex with ubiquinol-cytochrome-c: oxido-reductase activity from *Rhodospseudomonas sphaeroides* G.A. *Eur. J. Biochem.*, **126**, 105-111.
15. **Garber, E.A.E. and E. Margoliash**, 1990. Interaction of Cytochrome c oxidase: An understanding of the high-to low-affinity transition. *Biochim. Biophys. Acta.*, **105**, 279-287.
16. **Huding, H. and G. Drews**, 1982. Characterization of a b-type cytochrome c oxidase of *Rhodospseudomonas capsulata*. *FEBS Lett.*, **146**, 389-392.
17. **King, M.T. and G. Drews**, 1976. Isolation and partial characterization of the cytochrome c oxidase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Eur. J. Biochem.*, **68**, 5-12.
18. **Lavorel, J., P. Richaud and A. Vermeglio**, 1989. Interaction of photosynthesis and respiration in Rhodospirillaceae: evidence for two functionally distinct bc₁ complex fractions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **974**, 290-295.
19. **Ljungdahl, P.O., J.D. Pennoyer, D.E. Robertson and B.L. Trumpower**, 1987. Purification of high active bc₁ complex from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. *Biochim. Biophys. Acta*, **891**, 227-241.
20. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall**, 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
21. **Myatt, J.F., N.P.G. Cotton and J.B. Jackson**, 1987. Protomotive activity of the cytochrome bc₁ complex in chromatophores of *Rhodobacter capsulata* in the presence of myxothiazol and antimycin A. *Biochim. Biophys. Acta.*, **890**, 251-259.
22. **Nicholls, D.G.**, 1982. Bioenergetics: An introduction to the chemiosmotic theory. pp. 99-130 Academic Press, N.Y.
23. **Rich, P.R.**, 1988. A critical examination of the supposed variable proton stoichiometry of the chloroplast cytochrome bf complex. *Biochim. Biophys. Acta.*, **932**, 33-42.
24. **Takamiya, K.**, 1983. Properties of the cytochrome c oxidase activity of cytochrome b-561 from photoaerobically grown *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Plant and cell physiol.*, **24**, 1457-1462.
25. **Takamiya, K., M. Doi and H. Okimatsu**, 1982.

- Isolation and purification of a ubiquinone cytochrome bc_1 complex from a photosynthetic bacterium, *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 987-997.
26. **Thierbach, G. and H. Reichenbach**, 1981. Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome bc_1 segment of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta.*, **638**, 282-289.
27. **Virville, J.D. and F. Moreau**, 1989. Effect of membrane structure on proton/electron stoichiometry of cytochrome c oxidase activity in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1015**, 464-470.
28. **Yu, L. and C.A. Yu**, 1982. Isolation and properties of the cytochrome bc_1 complex from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **108**, 1285-1291.
29. **Yu, L., Q.C. Mei and C.A. Yu**, 1984. Characterization of purified cytochrome bc_1 complex from *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26. *J. Biol. Chem.*, **259**, 5752-5760.
30. **Zhang, Y.Z., M.A. Lindorfer and R.A. Capaldi**, 1988. Orientation of the cytoplasmically made subunits of beef heart cytochrome c oxidase determined by protease digestion and antibody binding experiments. *Biochemistry*, **27**, 1389-1394.

(Received June 24, 1991)

(Accepted August 20, 1991)