

平成 23 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580079

研究課題名 (和文) 鉄酸化細菌由来新規有機水銀分解酵素の分子生物学的解析とその利用

研究課題名 (英文) Molecularbiological study on a novel organomercurial decomposing enzyme from iron-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* and use of the enzyme for bioremediation of mercury

研究代表者

杉尾 剛 (SUGIO TSUYOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20033269

研究成果の概要：鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は無機水銀を還元気化する水銀還元酵素 mercuric reductase (MerA) を持つが、有機水銀の炭素-水銀結合(C-Hg bond) を切断する水銀分解酵素 mercuric lyase (MerB) を持たない事が知られている。高度水銀耐性鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* MON-1 株が MerA 及び MerB の関与しない新規な水銀分解機構で無機及び有機水銀から金属水銀を還元気化する事を新たに明らかにした。即ち、MON-1 株は、水銀耐性の *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase (*aa3*) を持ち、*aa3* 中の α -及び β -subunits が C-Hg bond の切断と Hg^{2+} の Hg^0 への還元の両方を触媒することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

It has been known that iron-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* has a mercuric reductase (MerA) which reduces Hg^{2+} to a volatilizable metal mercury (Hg^0), but not has a mercuric lyase (MerB) which cleaves a C-Hg bond in organomercurials. Author newly found a novel Hg^0 volatilizing enzyme system in a highly mercury resistant *A. ferrooxidans* MON-1. Namely, strain MON-1 has a mercury resistant *aa3*-type cytochrome *c* oxidase (*aa3*) and α - and β -subunits in *aa3* has activities to cleave C-Hg bond in organomercurials and to reduce Hg^{2+} to Hg^0 .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：鉄酸化細菌、水銀還元酵素、有機水銀分解酵素、チトクローム *c* オキシダーゼ、

1. 研究開始当初の背景

地球の環境浄化・保全是、21世紀人類に果たせられた最も重要な課題の一つである。環境ホルモンや重金属などの化学物質は、生物の適正な機能の維持と生命の存続に重大な影響を及ぼす。水銀による水俣病やカドミウムによるイタイイタイ病の発症は世界に重金属公害の恐ろしさを強く印象付けた。重金属のなかでも特に水銀は人体を含め生物体に容易に蓄積されるため人々の健康に重大な影響を及ぼす。火力発電所や金の採掘現場、化学工場や廃棄物など、水銀の汚染源は多岐に渡っており、しかも水銀化合物は気化し易く大気などを通じて地球規模で移動するため、世界規模での水銀汚染問題の解決が急務とされている。2007年2月にはナイロビの国連環境計画本部で水銀規制を検討する国際会議が開かれている。

2. 研究の目的

水溶性の無機および有機水銀をガス状の金属水銀に変換できる高度水銀耐性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1株の特徴ある水銀還元酵素活性を分子生物学的に解析し、得られた知見を水銀汚染土壌から微生物的に水銀を気化・回収するバイオレメディエーション技術へ導いていこうとするものである。

3. 研究の方法

水銀分解酵素を精製するための鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* MON-1株の大量培養は、培養条件の検討後、2価鉄をエネルギー源とした電気培養法によって行った。無機水銀あるいは有機水銀から細胞外へ気化放出される金属水銀は、還元気化原子吸光法で定量した。

培養液中の有機水銀濃度はECDガスクロマトグラフィーを用いて定量した。細胞膜に存在する新規水銀還元酵素 (*aa₃*型チトクローム *c* オキシダーゼであることを今回明にした) は、界面活性剤オクチルグルコシド (1-*O*-*n*-octyl- β -D-glucopyranoside) で可溶化した後、硫酸分画、及び各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製の純度は、SDS-PAGEで決定した。*aa₃*型チトクローム *c* オキシダーゼに対する抗体はウサギを用いて調製した。チトクローム *c* オキシダーゼ活性は還元型mammalian cytochrome *c*、及びMON-1株から精製したcytochrome *c* を基質にして分光光学的に測定した。

4. 研究成果

(1) 電気培養法を用いた大量培養法の確立

水銀気化酵素の精製を行うため、*A. ferrooxidans* MON-1株を2価鉄と無機塩類を組成とする培養液(pH2.5)を用い電気培養法で培養した。電気培養条件の最適化を試み、14日間の培養で1リットル当たり400mgの菌体を得ることに成功した。なお、通常の回分培養法では1リットル当たり10mgの菌体収量である。

(2) 有機水銀分解酵素(MerB 様タンパク質)の精製

MON-1株の洗浄細胞を2%のオクチルグルコシドと1.0Mの硫酸アンモニウムを含むpH2.0のbuffer中で可溶化した後、45%硫酸分画、Phnylchromatography, Shephadex G-100 chromatography、Superdex chromatographyを用いて有機水銀、及び無機水銀還元酵素をSDS-PAGEで均一に精製

した。精製酵素は、無機水銀あるいは有機水銀と還元剤(還元型 mammalian cytochrome *c* あるいは MON-1 株から精製した cytochrome *c* の還元型)とインキュベートすると酵素濃度に比例して金属水銀を気化させた。

3) 精製した有機水銀分解酵素が *aa3* 型の cytochrome *c* oxidase であることの決定

精製酵素の SDS-PAGE は、*aa2* 型 cytochrome *c* oxidase に特徴的な 3 種類の subunits の存在を示した[α -subunit (59 kDa)、 β -subunit (26 kDa)、 γ -subunit (22 kDa)]。また精製酵素の可視還元スペクトルは *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase に特徴的な 2 種類のピークを 596 nm (α -band) と 440 nm (γ -band) を示した。精製酵素は、無機水銀及び有機水銀(methylmercurychloride, MMC) からの金属水銀の気化を触媒したが、この気化反応は *aa3* cytochrome *c* oxidase に対してあらかじめ調製しておいた抗体によって完全に阻害された。

(4) 有機水銀分解に関与する *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase 中の subunits の決定

aa3 には、3 種類の subunits (α -、 β -、及び γ -subunits) が存在している。3 種類のうち、どの subunit が水銀の気化に関与しているかを検討した。精製 *aa3* を 0.1% メルカプトエタノールを含む 5% SDS で処理し subunits に解離させた後、G-100 カラムグラフィーを用いて各 subunits の単離を試みた。G-100 カラムクロマトグラフィー分画により 2 つのタンパク質溶出ピーク(ピーク A 及びピーク B) が観察された。G-100 カラムクロマトグラフィー分画を 2 回繰り返すことによって A ピーク及び B ピークを別々に単離することができた。A ピークは cytochrome *c*

oxidase 活性を持ち、SDS-PAGE の結果 2 本のタンパク質バンド(59 KDa, 24 kDa)を示した。分子量より α -及び β -subunits が存在する画分であることが明らかになった。一方、B ピークは、SDS-PAGE の結果 1 本のタンパク質バンド(59 KDa)を示し、分子量より α -subunits のみを含んでいる画分であった。B ピークは cytochrome *c* oxidase 活性を示さなかった。 α -及び β -subunits を含む A ピークの cytochrome *c* oxidase 活性は解離前の未変成 *aa3* より約 10 倍高い活性を示した。この結果より *aa3* の水銀還元触媒部位は α -及び β -subunits にあり γ -subunit は cytochrome *c* oxidase 活性の制御を行っていることが推定された。

無機水銀及び有機水銀(MMC)を電子受容体にし、還元型 mammalian cytochrome *c* を電子供与体にして金属水銀の気化活性の有無を検討した。G-100 カラムクロマトグラフィー後の A ピーク及び B ピークのみではわずかな金属水銀気化活性しか示さなかった。しかし、A ピークに B ピークを加えると B ピークの添加濃度に比例して顕著な金属水銀の気化活性の増大が観察された。Cytochrome *c* oxidase 活性を持つ α -及び β -subunits 以外に α -subunit のみを含む B ピークも金属水銀気化反応に必要なと言える。A ピークによる無機水銀あるいは MMC からの金属水銀の気化活性は 0.1 mM の Cu^{2+} の添加によって約 2 倍活性化された。B ピーク添加による水銀気化活性の活性化はこの画分に存在する α -subunit 中の銅成分(Cu_B)に原因するかもしれない。

(5) MON-1 株の *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase の特徴

MON-1 株は他の *A. ferrooxidans* 株(ATCC 23270 や AP19-3 株)に比較して *aa3*

cytochrome *c* oxidase (*aa3*) が水銀に耐性である特徴を有していた。更に MON-1 株 *aa3* は SDS に耐性であるばかりでなく *aa3* はドデシル硫酸ナトリウム(SDS)に対しても耐性であった。*A. ferrooxidans* ACC 23270 株由来精製 *aa3* は 0.05 mM SDS 存在下で完全に阻害されたが、MON-1 株の *aa3* は 0.05 mM SDS 存在下でも約 80%の活性を保持していた。MON-1 株由来 *aa3* は 0.2 mM のカドミウム (Cd^{2+})、亜鉛(Zn^{2+})、ニッケル (Ni^{2+}) などによって阻害、あるいは活性化されないが、0.2 mM の Cu^{2+} 存在下で約 3 倍活性化される特徴を持っていた。

(6) 硫黄で増殖した *A. ferrooxidans* MON-1 株の水銀還元機構

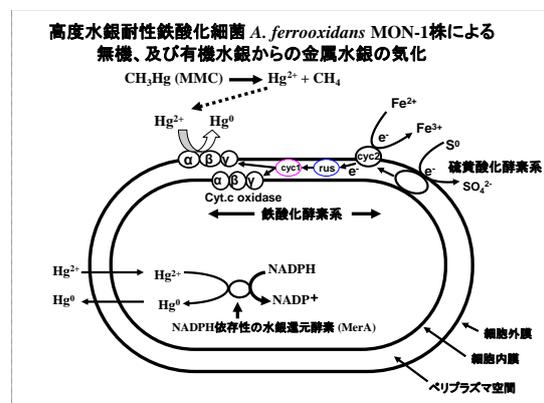
硫黄で増殖した *A. ferrooxidans* の水銀還元機構に関する報告例はこれまでなかった。元素硫黄で増殖した MON-1 株より水銀還元気化酵素の精製を試み、2 価鉄生育菌と同様に *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase が、無機水銀からの金属水銀の気化を触媒することを明らかにした。

また、硫黄生育鉄酸化細菌に鉄生育鉄酸化細菌と同じ鉄酸化酵素系が存在しているかどうか不明であったが、上記硫黄生育 MON-1 株から精製した *aa3* を、2 価鉄生育菌から精製した *aa3* 以外の鉄酸化酵素系の成分、即ち rusticyanin 及び 2 種類の *c* 型 cytochrome (Cyc1 及び Cyc2) と混合すると、鉄酸化酵素系を再構成できることを示すことができた。

以上、本研究から明らかになった知見を基礎にして高度水銀耐性鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* MON-1 株の水銀還元気化機構を下図のように表すことができる。*A. ferrooxidans* には、中性 pH で増殖する従属栄養

細菌で明らかにされていた水銀還元酵素 (MerA) が存在していることが報告されていた。一方、鉄酸化細菌の標準菌株である *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株ゲノム中には C-Hg 結合を切断する酵素 MerB は存在しないことが報告されている。このような歴史的背景のなかで有機水銀にも耐性である MON-1 株がどのような機構で有機水銀を分解するか興味深い重要な問題点であった。

水銀耐性鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* は、高濃度 (多分 5 μM 以上) の無機水銀が存在する特殊環境下では、鉄酸化酵素系の末端酸化酵素として通常機能している *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase を用い、2 価水銀を電子受容体にして水銀を還元しているものと推定している。MON-1 株 *aa3* は無機水銀ばかりでなく有機水銀の C-Hg 結合も分解できることが本研究で新たに明らかにされた。興味深い点は、MON-1 株の cytochrome *c* oxidase は水銀感受性鉄酸化細菌 (ATCC 23270 株や AP19-3 株) の *aa3* 型 cytochrome *c* oxidase とは異なり水銀耐性、SDS 耐性という特殊な性質を持っていることである。Cytochrome *c* oxidase 活性及び水銀気化及び C-Hg 結合分解活性発現の最小単位は *aa3* 中の α -、 β -subunits であり、活性発現には Cu^{2+} の存在が必須であった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ① Sugio, T., Komoda, T., Okazaki, Y., Takeda, Y., Nakamura, S., and Takeuchi, F., Volatilization of metal mercury from organomercurials by highly mercury-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、Vol. 74、2010、1007-1012
- ② Sugio, T., Ako, A. and Takeuchi, F., Sulfite oxidation catalyzed by *aa₃*-type cytochrome *c* oxidase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、Vol. 74、2010、2242-2247
- ③ Sugio, T., Taha, T. M., Negishi, A., Takeuchi, F., Existence of ferrous iron-dependent mercury reducing enzyme system in sulfur-grown *A. ferrooxidans* MON-1 cells. *Adv. Materials. Research.*, 査読有、Vol. 71-73, 2009、745-748
- ④ Sugio, T., Taha, T. M., and Takeuchi, F., Ferrous iron production mediated by tetrathionate hydrolase in tetrathionate-, sulfur-, and iron-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有、Vol. 71, 2009、2663-2669
- ⑤ Taha, T. M., Takeuchi, F., and Sugio, T., Reduction of cytochrome *c* by tetrathionate in the presence of tetrathionate hydrolase purified from sulfur-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 cells. *Adv. Materials Research.* 査読有、Vol. 71-73, 2009、243-246
- ⑥ Sugio, T., Wakabayashi, M., Kanao, T., and Takeuchi, F., Isolation and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain D3-2 active in copper bioleaching from a copper mine in Chile. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、Vol.

72、2008、998-1004

- ⑦ Sugio, T., Fujii, M., Ninomiya, Y., Kanao, T., Negishi, A., and Takeuchi, F., Reduction of Hg²⁺ with reduced mammalian cytochrome *c* by cytochrome *c* oxidase purified from a mercury-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain, MON-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、Vol. 72、2008、1756-1763
- ⑧ Taha, T. M., Kanao, T., Takeuchi, F. and Sugio, T., Reconstitution of iron oxidase from sulfur-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有、Vol. 74, 2008、6808-6810

〔学会発表〕(計 14 件)

- ① 杉尾 剛, 竹田有希、竹内文章、高度水銀耐性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 株由来 *aa₃* 型 cytochrome *c* oxidase subunits による 2 価水銀の金属水銀への還元、日本生物工学会 2010 年度大会、2010 年 10 月 29 日、シーガイア (宮崎市)
- ② 狩野典香, 竹内文章, 杉尾 剛、鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* の外膜における *aa₃* 型 cytochrome *c* oxidase の存在、日本農芸化学会 2010 年度中四国支部大会、2010 年 9 月 25 日、香川大学農学部 (高松市)
- ③ 小野田桂子、竹内文章、杉尾 剛、銅のバイオリーチング活性の高い鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* D3-2 株は亜硫酸耐性である、日本農芸化学会 2010 年度中四国支部大会、2010 年 9 月 25 日、香川大学農学部 (高松市)
- ④ SUGIO, T., KOMODA, T., OKAZAKI, Y., TAKEDA, Y., NAKAMUR, S., and TAKEUCHI, F., Mercury Volatilization from Organomercurials by Mercury-Resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1, アメリカ微生物学会 2010 年度大会、2010 年 5 月 26 日、コンベンションセンタ (サンジェゴ、USA)
- ⑤ 杉尾 剛, 薦田友恵、岡崎夕子、竹田有希、T. M. Taha, 竹内文章、高度水銀耐性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 株由来 *aa₃* 型 cytochrome *c* oxidase による有機水銀の分解、第 61 回日本生物工学会大会、2009 年 9 月 24 日、名古屋市 (名古屋大学工学部)
- ⑥ Sugio, T., T. M. Taha, A. Negishi, and

F. Takeuchi, Existence of ferrous iron-dependent mercury reducing enzyme system in sulfur-grown *A. ferrooxidans* MON-1 cells, 2009 年度国際ナショナルバイオハイドロメタルロジー ジンポジウム (IBS2009)、2009 年 9 月 17 日、ベルロッチ (アルゼンチン)

⑦Taha, T. M., F. Takeuchi, and T. Sugio, Reduction of cytochrome *c* by tetrathionate in the presence of tetrathionate hydrolase purified from sulfur-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, 2009 年度国際ナショナルバイオハイドロメタルロジー ジンポジウム (IBS2009)、2009 年 9 月 17 日、ベルロッチ (アルゼンチン)

⑧杉尾 剛、ターヘル タハ、竹内文章、鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 株における tetrathionate hydrolase が関与する 2 価鉄の生産、2009 年度日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、福岡市 (福岡国際会議場)

⑨Taha, T. M., F. Takeuchi, T. Sugio, Reduction of cytochrome *c* by tetrathionate in the presence of tetrathionate hydrolase purified from sulfur-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, 2009 年度日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、福岡市 (福岡国際会議場)

⑩Sugio, T., T. M. Taha, and F. Takeuchi, Ferric Iron Reduction by Tetrathionate is Catalyzed by Tetrathionate Hydrolase in Tetrathionate-, Sulfur-, and Iron-Grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 Cells 2nd International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism, 2009 年 3 月 17 日、トマール (ポルトガル)

⑪T. M. Taha, F. Takeuchi, T. Sugio, Reconstitution of Iron Oxidation System from Sulfur-Grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 Cells, 平成 20 年度日本農芸化学会中四国支部大会、平成 20 年 9 月 13 日、鳥取市 (鳥取大学)

⑫杉尾剛, T. Taha, 早崎琢也, 赤穂亜実, 竹内文章, *A. ferrooxidans* D3-2 株由来亜硫酸酸化酵素系の *c* 型 cytochrome 及び *aa₃* 型 cytochrome oxidase からの再構成、平成 20 年度日本農芸化学会中四国支部大会、平成 20 年 9 月 13 日、鳥取市 (鳥取大学)

⑬村上知佐、金尾忠芳、上村一雄、杉尾剛、鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* におけるテトラチオン酸ハイドロラーゼの転写解析、平成 20 年度日本生物工学会大会、2008 年 8 月 29 日、仙台市 (東北学院大学)

⑭金尾忠芳, 松本知恵, 白神久美子, 上村一雄, 杉尾剛、鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus*

ferrooxidans 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの大腸菌組換え発現と活性型酵素の取得、平成 20 年度日本生物工学会大会、2008 年 8 月 29 日、仙台市 (東北学院大学)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉尾 剛 (SUGIO TSUYOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 20033269

(2) 研究分担者

竹内 文章 (TAKEUCHI FUMIAKI)

岡山大学・環境管理センター・准教授

研究者番号: 90294446