

平成21年 6月 30日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19870039  
 研究課題名（和文） 深海熱水噴出孔環境の硫黄酸化細菌の元素状硫黄酸化に関わるタンパク質の解明  
 研究課題名（英文） Proteins for oxidation of elemental sulfur from a sulfur-oxidizing bacterium in deep-sea hydrothermal fields.  
 研究代表者  
 山本 正浩（YAMAMOTO MASAHIRO）  
 独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター・研究員  
 研究者番号：60435849

研究成果の概要：深海熱水環境の優占微生物であるイプシロンプロテオバクテリアの硫黄代謝経路について種々の解析を行い、この菌が複数の硫黄代謝経路を同時に利用していることを明らかにした。これらの代謝の鍵酵素の基質はポリスルフィドなどの水溶性化合物であるため不溶性の元素状硫黄に直接作用するタンパク質をさらに追跡したところスルフィドキノ還元酵素(SQR)様タンパク質が精製された。水に不溶性元素状硫黄を効率的に代謝経路に取り込み、そこからエネルギーを取り出すモデルを構築できた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,270,000	381,000	1,651,000
総計	2,630,000	381,000	3,011,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生態・環境

キーワード：硫黄代謝

## 1. 研究開始当初の背景

微生物による硫黄化合物の酸化は以下の点により人間社会にとって極めて重要である。すなわち、(i)地球規模の硫黄循環の主要な役割を担う、(ii)独立栄養的生育により生態系の起点となりバイオマス生産に寄与する（間接的にも硫酸還元菌にエサを与えることでもバイオマスに寄与している）、(iii)硫酸生産によりコンクリートや金属などの人工建材を風化・腐食させる、(iv)鉱物資源から含硫黄不純化合物を除去する（バクテリオリーチング）。また、硫黄酸化経路は原始生命の誕生や光合成の誕生に深く関わっていると考えられており、生物進化の観点からも興味深い。したがって、地球上の硫黄酸化経路

を明らかにし生態系への関与を調査することは非常に重要である。しかしながら、硫黄酸化経路の全貌については未だに解明されていない部分が多い。これには次のような理由が考えられる。(ア)生物の硫黄酸化能は複数の祖先から収斂的に進化しており（共通の祖先を持たない）、様々な経路・酵素が存在する。さらには水平伝播等も繰り返したと考えられ、普遍的なメカニズムが存在しない（このことは硫黄酸化が生物にとっていかに重要であることを示している。）。(イ)硫黄酸化細菌には培養困難なものが多く、これまで実験材料が限定されてきた。(ウ)硫黄化合物は種類が多く、それぞれが様々な化学反応を起こすので、生化学的解析が困難である。

硫黄酸化経路の中でも特に未知な部分が多いのは元素状硫黄の細胞内取り込みや酸化反応など元素状硫黄に直接作用するメカニズムについてである。微生物がいかにして水に不溶で安定な化合物である元素状硫黄を食べているのかはほとんど解っていない。元素状硫黄は硫黄酸化代謝の初発基質や中間体であり、環境中にも極めて豊富に存在する重要な物質である。その代謝メカニズムを明らかにすることこそ、硫黄酸化経路全貌を解くための最大の課題である。

深海底熱水噴出孔周辺には独特で高密度な生物相が発達している。すなわち、チューブワーム、貝類、甲殻類などが重なり合うように密生している。これらの高等生物は細胞の内外に硫黄酸化細菌を共生させている。共生菌は熱水に豊富に含まれる硫黄化合物をエネルギー源として増殖し、宿主に対し栄養分を供給している。共生菌に限らず、周辺の海水や土壌には硫黄酸化細菌が優占的に存在しており、プランクトンや高等動物のエサとして捕食される。地球上でもっとも高密度な生物空間のひとつである深海底熱水環境の生態系は硫黄酸化細菌によって支えられていると言っても過言ではない。これまで海洋研究開発機構では、深海底熱水環境から多数の硫黄酸化細菌を単離してきた。これらの細菌は元素状硫黄を唯一のエネルギー源として生育することが、実験室内で確かめられている。まぎれもなく硫黄を食べているのだ。

## 2. 研究の目的

本研究では、深海底熱水環境から単離された硫黄酸化細菌を材料として、元素状硫黄酸化に直接関わるタンパク質の精製、同定、特徴付けを行い、硫黄酸化経路全体における（ひいては生態系全体における）元素状硫黄の動態を解明することを目的とした。

環境から直接抽出した DNA をもとに生態系の微生物相や機能遺伝子の有無を調査することで環境の物質・エネルギー循環を評価しようとする試みが頻繁に行われている。しかしながら、この手法を使えるのは調査対象となる代謝経路・酵素特性が解明されている場合に限る。したがって、現時点で環境の硫黄酸化能力を評価することはできない。硫黄酸化能力は系統学的に広範囲に分布しているし、硫黄酸化経路は多様性に富んでいて普遍性に乏しいため適当な DNA プライマーを構築できない。特に元素状硫黄酸化酵素はほとんど正体が明らかになっていないため、遺伝子的解析は絶望的である。これらのタンパ

ク質情報を得ることは環境学・生態学的見地から言って急務である。中でも元素状硫黄酸化反応は硫黄酸化経路全容を知る上でボトルネックとなっているため、この部分を明らかにする意義は大きい。元素状硫黄酸化の解明は硫黄酸化経路全体の解明に繋がり、それは様々な方向に新しい知見を与えるに違いない。

硫黄酸化細菌の多くは培養困難であるとされ、これまで研究対象が限定されてきた。当機構は、熱水噴出孔周辺という極めて特殊でおそらく最も豊富に硫黄酸化が行われている環境から土壌や海水を採取し、難培養とされてきた硫黄酸化細菌を多量に純培養することに成功してきた。しかも、これらのうち2菌株についてはゲノム解読が終了している。これらが硫黄酸化経路研究に絶好の材料であることは疑いがない。さらに、このうち1株はシロウリガイ等の高等生物に共生している硫黄酸化細菌と非常に近縁であることから、高等生物との共生関係まで含めた広範囲の硫黄循環の解明に役立つことが期待される。

## 3. 研究の方法

深海底熱水環境から単離されたイプシロンプロテオバクテリア *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株を材料として用いた。まずは様々な栄養条件の培地を用意して、本菌株の硫黄化合物に対する栄養要求性を確認した。次に本菌株の生育時における基質や生産物の変遷を HPLC や GC でモニタリングした。これらの結果から予想される硫黄代謝に関わる酵素活性を測定した。次にこれらの酵素を精製するべくこの菌株を 10L ジャーファーメンターで硫黄酸化条件または硫黄還元条件で大量培養を行ない十分量の菌体を得た。この菌体から硫黄代謝に関わる酵素群を粗精製し、LC-MS でタンパク質同定を行なった。これらの結果から本菌株の硫黄代謝マップをモデル化した。元素状硫黄に対するより直接的な作用タンパク質のスクリーニングとして、培地に添加した元素状硫黄を培養後回収し界面活性剤で洗浄後、硫黄表面に付着したタンパク質を還元剤で剥離させ、電気泳動で分離後、LC-MS でタンパク質同定を行なった。得られたタンパク質を大腸菌で異種発現させ、現在機能を解析中である。

## 4. 研究成果

### (1) 生育生理学的特性

エネルギー代謝のための電子供与体/受容体の組み合わせの利用率を確かめるために、我々は *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株を様々な電子供与体

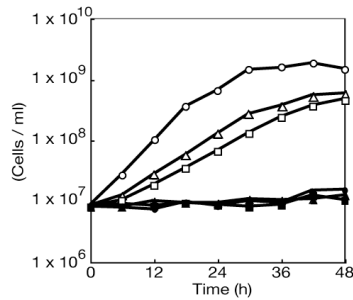


図1 様々な電子供与体と電子受容体の組み合わせでの *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株の生育曲線。白四角、白三角、白丸はそれぞれ、 $H_2/S^0$ 、 $S_2O_3^{2-}/NO_3^-$ 、 $H_2 + S_2O_3^{2-}/S^0 + NO_3^-$  の生育を表す。黒四角、黒三角、黒丸はそれぞれ、 $S^0/NO_3^-$ 、 $HS^-/NO_3^-$ 、 $H_2/NO_3^-$  の生育を表す。

／受容体の組み合わせで培養した。代表的な生育曲線を図1に示した。この株は  $H_2/S^0$ 、 $S_2O_3^{2-}/NO_3^-$ 、 $S_2O_3^{2-}/O_2$  の組み合わせの時に生育可能だった。これらの基質 ( $H_2$ 、 $S_0$ 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 $NO_3^-$ ) を全て与えた際に最も高い増殖速度が観察され、 $H_2/S^0$  と  $S_2O_3^{2-}/NO_3^-$  の組み合わせのときのおよそ2倍の増殖速度であった。対照的に、NBC37-1 株は  $H_2/NO_3^-$ 、 $HS^-/NO_3^-$ 、 $S^0/NO_3^-$ 、 $H_2/O_2$  の組み合わせのときにあまり生育できなかった。今回の研究の結果は明らかにNBC37-1 株が2種類の硫黄関連エネルギー代謝、水素酸化-硫黄呼吸とチオ硫酸酸化-酸素/硝酸呼吸を保持することを証明している。

NBC37-1 株が水素と硫黄の組み合わせで培養された時、培養ボトルの気層に硫化水素の蓄積が観察された(図2)。硫化水素の濃度は培養3日で約6 ppmで(図2A)、培養6日で約500 ppmに達した。NBC37-1 株をチオ硫酸と硝酸の組み合わせで培養した時は最終生産物である硫酸の蓄積は細胞の生育と同期的に起った(図2B)。加えて、硫酸の生産量はチオ硫酸の消費量と化学量論的に一致した。NBC37-1 株を混合基質培地 ( $H_2$ 、 $S^0$ 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 $NO_3^-$ ) で培養した時は、 $H_2S$  と  $SO_4^{2-}$  の両方が生育中に蓄積した(図2C)。混合基質培地中での生育は水素/硫黄、チオ硫酸/硝酸の組み合わせの生育よりも増殖速度が2倍高いことから、この株は水素とチオ硫酸を同時に消費していると考えられる。電子供与体利用の好み

Table 1 Enzyme activities of sulfur-related energy metabolisms in *Sulfurovum* sp. NBC37-1.

Putative enzyme	Enzyme activity of cell-free extract grown with:		
	$H_2$ and $S^0$ (mU mg protein <sup>-1</sup> )	$S_2O_3^{2-}$ and $NO_3^-$ (mU mg protein <sup>-1</sup> )	$H_2$ , $S_2O_3^{2-}$ , $S^0$ and $NO_3^-$ (mU mg protein <sup>-1</sup> )
Hydrogenase (Hyd)	114 ± 6.3	Not detected	33 ± 5.5 (24 h) 22 ± 5.4 (72h)
Polysulfide reductase (Psr)	53 ± 15	Not detected	56 ± 14 (24h) 38 ± 11 (72h)
Sox system	3.5 ± 0.7	7.5 ± 0.5	6.7 ± 1.7 (24h) 2.4 ± 2.2 (72h)

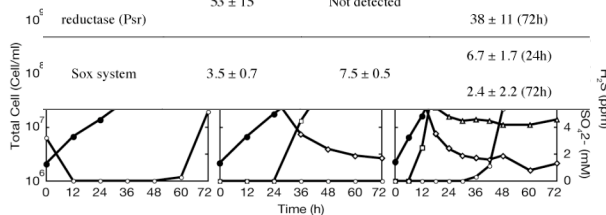


図2 *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株の生育中の基質利用特性。(A)  $H_2/S^0$  で生育下の生育曲線と  $H_2S$  の生産。(B)  $S_2O_3^{2-}/NO_3^-$  で生育下の生育曲線、 $NO_3^-$  と  $S_2O_3^{2-}$  の消費、 $SO_4^{2-}$  の生産。(C)  $H_2 + S_2O_3^{2-}/S^0 + NO_3^-$  で生育下の生育曲線、 $NO_3^-$  と  $S_2O_3^{2-}$  の消費、 $H_2S$  と  $SO_4^{2-}$  の生産。黒丸は細胞数を表す。白四角、白三角、白丸、白菱形はそれぞれ、 $SO_4^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 $H_2S$ 、 $NO_3^-$  の濃度を表す。

はこの研究で使われた NBC37-1 株と過去に報告された他の深海性イブシロンプロテオバクテリアとの間で相違がある。エネルギー代謝のための酸化還元対の利用性の相違は熱水孔環境において様々な深海性イブシロンプロテオバクテリアが異なるニッチを有していることと強い関連性があると思われる。

## (2) 酵素活性

ヒドロゲナーゼ、Psr、Sox システムの酵素活性が NBC37-1 株の無細胞抽出液を用いて測定された(表1)。

$H_2$  と  $S^0$  をそれぞれ電子供与体と電子受容体とした培養液から調整した無細胞抽出液は、ヒドロゲナーゼ活性を示した。興味深いことに、チオ硫酸酸化条件で培養した細胞の無細胞抽出液はヒドロゲナーゼ活性を示さなかった。混合基質培地を用いた培養液からの無細胞抽出液では、ヒドロゲナーゼ活性は対数増殖期と定常期の両方で活性があった。ヒドロゲナーゼ活性の発現はエネルギー源としての  $H_2$  の存在と直接的に関与しているようだ。このことは  $H_2$  の存在がヒドロゲナーゼの発現を制御していることを示唆している。どれだけの  $H_2$  濃度がヒドロゲナーゼ発現の誘導に必要なかはまだ不明だが、深海熱水環境の生息域において NBC37-1 株の水素依存的エネルギー代謝が水素の量にコントロールされていることは合理的と言える。

ポリスルフィド還元酵素 (Psr) 活性もまた  $H_2$  と  $S^0$  をそれぞれ電子供与体と電子受容体とした培養液から調整した無細胞抽出液において確認された。その上、この活性はチオ硫酸酸化条件下では確認されなかった。ポリスルフィド還元酵素活性の発現パターンと量は、今回試験した全てのケースでヒドロゲナーゼのそれと類似していた。この結果は、*M. succinogenes* においてヒドロゲナーゼとポリスルフィド還元酵素が直接リンクしていてヒドロゲナーゼから供給される電子がポリスルフィドの還元を利用されるという過去に示唆された考えと一致する。

硫黄化合物 (チオ硫酸塩、亜硫酸塩、硫化物塩、ポリスルフィド) の酸化の酵素活性は、チオ硫酸酸化条件で培養された NBC37-1 株の無細胞抽出液で確認された(表2)。一方、元素状硫黄を実際の基質としての酸化は確認できなかった。興味深いことに、これらのチオ硫酸酸化酵素活性は今回試験した全ての生育条件で (たとえチオ硫酸を含んでいない条件であっても)、確認できた(表1)。硫黄酸化酵素の発現パターンはヒドロゲナーゼとポリスルフィド還元酵素のそれとは異なっていて、NBC37-1 株の中では硫黄酸化酵素は構成的に発現しているようだ。

## (3) 酵素タンパク質の同定

Table 2 Enzyme activities of oxidation of specific sulfur substrate in *Sulfurovum* sp. NBC37-1\*.

Substrates	Activities* (mU mg protein <sup>-1</sup> )
Sodium thiosulfate	7.5 ± 0.5
Disodium sulfite	7.2 ± 1.5
Disodium sulfide	4.1 ± 0.9
Polysulfide	4.3 ± 1.1
Elemental sulfur	Not detected

\* Cell-free extract was prepared from the cells grown with S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### ①水素酸化酵素とポリスルフィド還元酵素

水素酸化活性と硫化水素酸化活性をそれぞれ触媒する酵素を同定するために、これらの酵素の精製を試みた。まず、水素と元素状硫黄をそれぞれ電子供与体と電子受容体にして生育させた NBC37-1 株の無細胞抽出液を可溶性画分液と膜画分液に分離した。水素酸化活性と硫化水素酸化活性は膜画分液において確認され、可溶性画分ではほとんど活性が見られなかった。DEAE カラムと Q イオンカラムによるクロマトグラフィーの結果、水素酸化活性と硫化水素酸化活性は同じ画分に溶出された。この画分のタンパク質溶液を SDS-PAGE に供し、主要なバンドを切り出し LC-MS/MS で分析した。同定されたタンパク質には HydA, HydB, PsrA, PsrB が含まれていた(図 3)。スルフィド:キノン還元酵素 (Sqr) も含まれていた。HydC と PsrC を見出すことは出来なかった。このクロマトグラフィー画分をさらにゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分離した。強い水素酸化活性が得られた画分からは HydA と HydB のバンドが検出できた。このヒドロゲナーゼ活性画分には Sqr も含まれていた。Sqr は主に隣の別のピークとして検出されたことから、このヒドロゲナーゼ活性画分中の Sqr はコンタミであり HydB と複合体を形成しているわけではないと考えられた。硫化水素酸化活性は二つのピークに分離し、それぞれ Sqr と PsrAB が分離された。Sqr はスルフィドとキノンの酸化還元反応を触媒する酵素であるから、今回の実験で精製の指標にした硫化水素酸化-メナジノン還元反応を示すのは妥当と言える。NBC37-1 株での Sqr の生理的機能は明らかではないが、硫黄代謝に何らかの関与をしている可能性は考えられる。今回の結果から、NBC37-1 株の水素酸化-硫黄呼吸時のヒドロゲナーゼ活性が HydAB に依存することが明らかとなった。

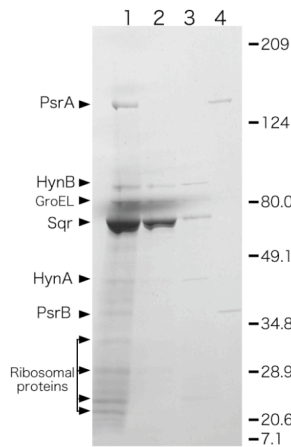


図 3 水素酸化酵素と硫化水素酸化酵素の部分精製とタンパク質同定。カラムクロマトグラフィー後の酵素活性を示す画分を SDS-PAGE に供した。レーン 1: サンプル No. Q1 (mono-Q カラムクロマトグラフィー後の画分); レーン 2-4: サンプル No. G1, G2, G3 (ゲルろ過カラムクロマトグラフィー後の画分)。主要なバンドは LC-MS/MS によってタンパク質が同定された。

### ②チオ硫酸酸化酵素

チオ硫酸酸化活性のタンパク質要素を同定するために、酵素の精製を試みた。まず、チオ硫酸をエネルギー源として生育させた NBC37-1 株の無細胞抽出液を可溶性画分液と膜画分液に分離した。興味深いことに、チオ硫酸酸化活性は可溶性画分液と膜画分液の両方から失われた (data not shown)。しかしながら、これら二つの画分液を混合したところ、チオ硫酸酸化活性が回復した (data not shown)。活性には可溶性画分と膜画分の両方を要求した。過去に報告されたアルファプロテオバクテリア *P. pantotrophus* における Sox システムでは、チオ硫酸酸化に要求される 7 種類のタンパク質 SoxXYZAABCD は全て可溶性タンパク質として存在し、膜タンパク質は要求しなかった。そこで、可溶性画分と膜画分の両方をカラムクロマトグラフィー (陰イオン交換、ゲル濾過) で更に精製した。膜画分をクロマトグラフィーで分画して、それぞれを可溶性画分液と混合してチオ硫酸酸化活性を測定した。活性の得られたタンパク質画分を SDS-PAGE に供した後に主要なタンパク質のバンドを切り出し LC-MS/MS でアミノ酸配列を決定し、NBC37-1 株のゲノム配列データと比較してタンパク質を同定した(図 4)。可溶性画分液も同様にクロマトグラフィーで分画して膜画分液と混合しチオ硫酸酸化活性を得られたものからタンパク質を同定した。

膜画分液からの部分精製したタンパク質のアミノ酸配列は、sox 遺伝子クラスターに含まれるチトクロム c (CytC)、Sqr 相同タンパク質、SoxC、機能不明タンパク質 SoxH (亜鉛依存的 hydrolase に一致した。Sqr 相同タンパク質は上述の硫化水素酸化活性酵素として精製された Sqr とは別のタンパク質である。DNA 配列から予想されるこれらのタンパク質のアミノ酸配列は、チトクロム c、Sqr-相同タンパク質、SoxH は膜結合タンパク質としてのモチーフを有していた。一方、SoxC は可溶性が予想される構造であった。可溶性画分液から回収したタンパク質溶液は SoxC と SoxD から成るタンパク質を含んでいた。SoxCD が供精製されたのは、これら二つのタンパク質が複合体を形成しているためと考えられる。なぜなら、*P.*

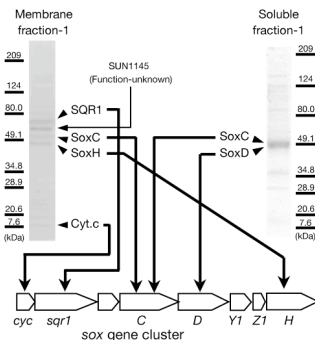


図 4 チオ硫酸酸化酵素の部分精製とタンパク質同定。カラムクロマトグラフィー後の酵素活性を示す画分を SDS-PAGE に供した。主要なバンドは LC-MS/MS によってタンパク質が同定された。

チオ硫酸酸化酵素として精製された Sqr とは別のタンパク質である。DNA 配列から予想されるこれらのタンパク質のアミノ酸配列は、チトクロム c、Sqr-相同タンパク質、SoxH は膜結合タンパク質としてのモチーフを有していた。一方、SoxC は可溶性が予想される構造であった。可溶性画分液から回収したタンパク質溶液は SoxC と SoxD から成るタンパク質を含んでいた。SoxCD が供精製されたのは、これら二つのタンパク質が複合体を形成しているためと考えられる。なぜなら、*P.*

*pantotrophus* では SoxCD は  $\alpha_2\beta_2$  のヘテロ 4 量体を形成することが知られているからである。今回の研究では、他の Sox タンパク質は精製できなかつた。これは精製過程でチオ硫酸酸化活性が劇的に失われるためである。しかしながら、今回の部分精製により、NBC37-1 株がチオ硫酸酸化酵素としてゲノム上の *sox* 遺伝子ファミリーにコードされた Sox タンパク質を発現していることが明確に示された。加えて、NBC37-1 株の Sox システムは可溶性成分のみならず膜成分 (チトクロム *c*、Sqr 相同タンパク質、SoxH) も要求する。*P. pantotrophus* の *vitro* での再構成 Sox システムは、膜成分を必要としない。これらの結果は、深海性イブシロプロテオバクテリア *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株がチオ硫酸依存のエネルギー代謝のために可溶性成分と膜成分から成る新規の Sox システムを保有していることを強く示唆している。

#### (4) 元素状硫黄結合タンパク質

培養後の培地から元素状硫黄を回収し、界面活性剤で洗浄後、硫黄表面に付着したタンパク質を還元剤で剥離させ、電気泳動で分離後、LC-MS でタンパク質同定を行なった (図 5)。その結果、スルフィド:キノン還元酵素 (Sqr) が同定された。この酵素が本菌の元素状硫黄の可溶性に深く関与していることが示唆された。この *sqr* 遺伝子を大腸菌で異種発現させたところ膜タンパク質として大量発現した。現在機能を解析中である。



図 5 元素状硫黄結合タンパク質

#### (5) NBC37-1 株の硫黄代謝の予想モデル

生育実験は、深海性イブシロプロテオバクテリア *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株において水素酸化-硫黄呼吸とチオ硫酸酸化-硝酸/酸素呼吸の二つの異なる硫黄関連エネルギー代謝が機能していることを明らかにした。酵素学的な実験はこれらの経路の生化学的な証拠を与えた。精製実験によって、水素酸化-硫黄呼吸経路において *hydABC* 遺伝子にコードされるタンパク質のうち少なくとも HydAB がヒドロゲナーゼ活性を触媒していることを明らかにした。硫黄呼吸の直接的な触媒酵素は確定できていないが、逆反応の硫化水素酸化反応から *psrAB* 遺伝子にコードされるタンパク質のうち PsrAB が関与していることが示唆された。Sqr も硫化水素酸化活性を持つことが明らかとなった。

NBC37-1 株によるチオ硫酸酸化は、チトクロム *c* や Sqr 相同タンパク質や SoxH のような膜成分を要求する新規性の Sox システムで

ある。イブシロプロテオバクテリアの Sox システム独特の特徴を表している。この Sox システムはチオ硫酸とリンクした得意的な電子伝達体を持つのかも知れない。イブシロプロテオバクテリアの Sox システムの完全な成分はまだ明らかにされておらず、解明のために更なる研究が必要である。

本研究で明らかにされた NBC37-1 株のもう一つの重要な特徴は、二つの主要なエネルギー代謝が特有の発現パターンを持つことであつた。すなわち、誘導的な水素酸化-硫黄呼吸経路と構成的なチオ硫酸酸化-酸素/硝酸呼吸経路である。これは、どのようにして深海性イブシロプロテオバクテリアの多様なエネルギー代謝が内在と外在のメカニズムによって制御され、熱水孔環境の混合領域中の流動的な環境条件に適応しているかを考える上で重要な洞察を与えるものである。*Sulfurovum* sp. NBC37-1 株における様々な還元条件に対応した硫黄代謝の概要モデルを図 6 に示した。硫黄酸化代謝の構成的な発現から考えて、*Sulfurovum* sp. NBC37-1 株や類似の表現型を持つ近縁種の生息域のほとんどは比較的に酸化的環境 (熱水の流入が少ない) であると推測され、その物理的・化学的条件から通常において水素酸化-硫黄還元経路よりも硫黄酸化-酸素/硝酸呼吸経路をより好むであろう。しかしながら、この混合領域における物理的・化学的条件は、熱水の流入の程度により常に還元的状態と酸化的状態の間を変動する。このような物理的・化学的多様性が深海熱水性のイブシロプロテオバクテリアに対しエネルギー的に有利な代謝のシフトを誘導するのであろう。*Sulfurovum* sp. NBC37-1 株の誘導性のヒドロゲナーゼとポリスルフィド還元酵素は生化学と分子適応の間で起こる。しかしながら、どれだけの水素濃度が実験室や実際の環境の生育において *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株の水素酸化-硫黄呼吸の作用を誘導するかは不明である。加えて、*Sulfurovum* sp. NBC37-1 株は SoxCD をコードする遺伝子を持っているが、他の二種の深海性イブシロプロテオバクテリアは *soxCD* 遺伝子を持たない。SoxCD は Sox システムの中で硫黄脱水素酵素として機能し、チオ硫酸の完全酸化に必須である。一方、SoxCD を含まない Sox システムでは、チオ硫酸の硫酸基を硫酸に酸化するのみで、もう一つの硫黄元素を酸化できず、元素状硫黄かポリスルフィドとして放出すると考えられる。一分子のチオ硫酸を酸化した場合、SoxCD を含む Sox システムでは 8 分子のシトクロム *c* を還元できるのに対し、SoxCD を含まない Sox システムでは 2 分子シトクロム *c* しか還元できない。硫黄酸化では SoxCD を含む Sox システムの方が SoxCD を含まない Sox システムよりもエネルギー的に有利である。

しかし環境がより還元的で酸素や硝酸のような酸化的な電子供与体が豊富ではない場合、チオ硫酸の硫黄元素を元素状硫黄かポリスルフィドの形で放出し、硫黄呼吸の電子受容体としてストックするのは有効な手段と言えるかも知れない。深海性イブシロンプロテオバクテリアの生理的・代謝的多様性の分子生物学的・生化学的特徴付けは、何故これらの微生物が深海熱水環境の混合領域で優占種として繁栄できているのかの問いに答えることにつながるであろう。

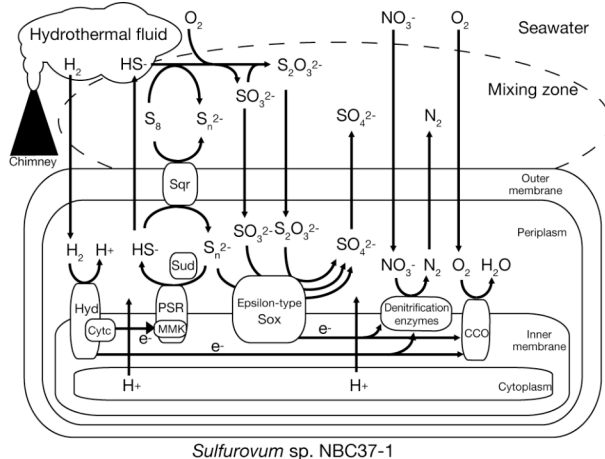


図 6 *Sulfurovum* sp. NBC37-1 株における硫黄代謝の概要図。図の左側から右側に行くにつれて、ミキシングゾーンの還元度は還元的な状態から酸化的な状態に移る。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①高井研、中村謙太郎、宮崎淳一、山本正浩、鈴木勝彦、熊谷英憲  
エネルギー代謝の進化から見た初期生命進化-UltraH3 リンケージ仮説  
『生物の科学 遺伝』Vol. 61 No. 6, 28-36 (2007) (査読無)

②Ueda, Y., Yamamoto, M., Urasaki, T., Arai, H., Ishii, M. and Igarashi, Y. Sequencing and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis of Four Hydrogenase Gene Clusters from an Obligately Autotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J. Biosci. Bioeng.* Vol. 104, 470-475. 2007 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

①山本正浩 深海熱水域におけるタンパク質の直接採集と酵素解析 Blue Earth' 09 2009 年 3 月 13 日 (立教大学、東京)

②Yamamoto, M. Enzymatic Analyses of Microbial Energy Metabolism Using Proteins Directly Extracted from Deep-Sea

Hydrothermal Environments.

7th International Symposium for Subsurface Microbiology  
17 Nov 2008 (Shizuoka, Japan)

③Yamamoto, M. Microbial Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds in Deep-Sea Hydrothermal Field. -Cases for *Epsilon-Proteobacteria*- International Symposium on Environmental Microbiology  
29 Feb 2008 (Tokyo Metropolitan University, Tokyo)

④山本正浩 硫黄酸化の熱水生態系における重要性 InterRidge-Japan 研究発表集会  
2007 年 10 月 30 日 (東京大学海洋研究所、東京)

⑤Yamamoto, M. Enzymatic Characterization of Thiosulfate Oxidation in *Epsilon-Proteobacteria* Isolated from Deep-Sea Hydrothermal Field. InterRidge Theoretical Institute 'Biogeochemical interaction at deep-sea vents' 11 Sep 2007 (Woods Hole, USA)

[その他]

ホームページ等

JAMSTEC 研究成果データベース

<http://www.jamstec.go.jp/seika/jdb/index.do?jsessionid=7BA699C00FD3A42D6349691A4E3EED98>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 正浩 (YAMAMOTO MASAHIRO)

独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター・研究員

研究者番号：60435849

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし