

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08112

研究課題名(和文) 海洋性硫黄酸化細菌の機能解析とバイオリーチングへの利用

研究課題名(英文) Analyses of functions in marine sulfur-oxidizing bacterium and their application to bioleaching

研究代表者

上村 一雄 (Kamimura, Kazuo)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：80294445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：硫化鉱石から金属を回収する技術であるバイオリーチングを塩を含む環境からの硫化鉱石に適用するための技術を開発するため、海洋性の硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus* SH株を取得した。バイオリーチングの効率を高めるために必要な硫黄化合物の代謝機構を検討した結果、チオ硫酸を代謝する新規なチオ硫酸キノン酸化還元酵素(TQO)を精製した。この遺伝子を決定するために、SH株の全ゲノムを解析したところ、SH株はこれまでの硫黄酸化細菌とはゲノムの特徴が異なり、新規な硫黄酸化細菌であることが分かった。また、ゲノム情報と遺伝子の転写解析から、TQO遺伝子および硫黄代謝経路を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋から単離した硫黄酸化細菌の硫黄代謝酵素やその遺伝子の解析によって、硫黄酸化細菌がこれまでに報告のないものであることが明らかとなるとともに、硫黄代謝に関与する酵素も新規であることが明らかとなった。この発見は、生物が硫黄代謝系をどのように進化させてきたかを理解する上で重要であるだけでなく、地球規模での硫黄の循環に果たす好酸性の海洋性硫黄酸化細菌の役割を理解する上でも学術的に重要である。また、好酸性・好塩性の硫黄酸化細菌は、バイオリーチングやバイオレメディエーションにも利用できるため、得られた成果は、金属資源の枯渇問題の解決や環境問題の解決に大きく貢献できると考えられ、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Halophilic acidophilic sulfur-oxidizing bacteria have gained increasing interest because of their importance in bioleaching operations in salt-containing environments. *Acidithiobacillus* sp. strain SH is a marine bacterium with sodium chloride-stimulated sulfur-, sulfite-, and thiosulfate-oxidizing activities. The clarification of RISCs oxidation mechanism is indispensable to develop the efficient bioleaching. A novel thiosulfate:quinone oxidoreductase (TQO) was purified and characterized from strain SH. The gene for TQO was determined in the draft genome sequence of strain SH. The draft genome of strain SH provided further insights into the genomic diversity of members of the genus *Acidithiobacillus*, enabled us to determine a gene encoding the novel TQO, and contributed to a better understanding of the mechanism for RISCs metabolism in sulfur-oxidizing prokaryotes.

研究分野：農芸化学 (応用微生物学)

キーワード：硫黄酸化 硫黄酸化細菌 バイオリーチング チオ硫酸酸化 好酸性細菌 海洋性細菌 資源回収

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオリーチングは、微生物を使って硫化鉱石から金属を回収する技術である。金属資源の枯渇が叫ばれるようになって、海底から採取した硫化鉱石等の NaCl 含有鉱石からの金属資源の回収に、この技術を適用する研究が重要な研究課題となっている。この技術は、陸生の好酸性鉄・硫黄酸化細菌を用いて開発されたが、これらの細菌は、1%の NaCl 存在下で生育が阻害されるため、NaCl を含む硫化鉱石からの金属イオンの可溶化には適用できなかった。この問題を克服するために海洋性の好酸性硫黄酸化細菌 (*Acidithiobacillus* SH 株) を分離した。バイオリーチングでは、硫化鉱石の硫黄成分はチオ硫酸 ($H_2S_2O_3$) に変換されて、硫黄酸化細菌で硫酸に酸化される。従って、リーチングの効率を高めるために、硫黄代謝の中でもチオ硫酸代謝に関与する酵素の性質やその遺伝子の発現制御機構の解明が重要である。これまでに、SH 株からチオ硫酸をテトラチオン酸 ($H_2S_4O_6$) に変換する新規な酵素として、チオ硫酸:キノン酸化還元酵素 (TQO) を精製し、その性質を明らかにした。しかし、TQO をコードする遺伝子は、決定できていなかった。

2. 研究の目的

SH 株のチオ硫酸代謝の一端は明らかにされているが、代謝経路の全容の解明にはほど遠い。そこで、本研究では、NaCl を含有する硫化鉱石からの金属の可溶化・回収技術を開発するため、SH 株の硫黄代謝に関与する酵素の性質や遺伝子発現を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゲノム解析による硫黄代謝系の推定; 次世代シーケンサーにより SH 株ゲノムの全塩基配列を決定し、元素硫黄、チオ硫酸、テトラチオン酸、硫化水素、亜硫酸の酸化酵素遺伝子および末端酸化酵素をコードすると考えられる遺伝子を相同性解析によって明らかにする。得られた情報をもとに硫黄化合物代謝経路を推定し、既報の硫黄代謝経路との比較を行う。

(2) チオ硫酸:キノン酸化還元酵素 (TQO) 遺伝子の決定; チオ硫酸生育細胞から精製した SH 株のチオ硫酸:キノン酸化還元酵素のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列を用いて、SH 株のゲノム情報から TQO をコードしている遺伝子を決定し、相同性解析や既知の硫黄酸化細菌 (*A. thiooxidans* の ATCC19377, A01, Licanantay 株) のゲノムとの比較によって、その起源等を推定する。

(3) チオ硫酸代謝経路の末端酸化酵素の決定; チオ硫酸生育 SH 株から精製した TQO は、キノン電子受容体を使用した。この結果から、チオ硫酸はキノンを電子の受容体および供与体を使用する酵素系で代謝されると推測された。陸上の硫黄酸化細菌 *A. thiooxidans* のゲノム解析では、末端酸化酵素として、ユビキノール酸化酵素と推定される遺伝子しか同定されていないが、その性質は明らかにされていない。そこで、ヘムを持つオキシダーゼの人工基質である TMPD を電子供与体を用いて、チオ硫酸生育細胞から末端酸化酵素を精製し、その性質を明らかにするとともに、その遺伝子の同定を行う。

(4) 硫黄代謝関連遺伝子の発現解析; 元素硫黄、チオ硫酸、テトラチオン酸で生育した細胞内の mRNA を抽出し、リアルタイム PCR により、チオ硫酸:キノン酸化還元酵素遺伝子 (*tqo*)、テトラチオン酸加水分解酵素遺伝子 (*tth*)、硫化水素:キノン酸化還元酵素遺伝子 (*sqr*)、末端酸化酵素遺伝子 (*cyd*, *cyo*) などの硫黄代謝関連遺伝子の発現を解析する。得られた結果とゲノム情報から推測した硫黄化合物代謝経路をから、SH 株の硫黄代謝経路を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *A. thiooxidans* SH 株の硫黄代謝系の遺伝子レベルでの解析; 次世代シーケンサーにより海洋性硫黄酸化細菌 *A. thiooxidans* SH 株ゲノムの全塩基配列を決定した。その塩基配列を用いて元素硫黄、チオ硫酸、テトラチオン酸、硫化水素、亜硫酸の酸化酵素遺伝子と、末端酸化酵素をコードすると考えられる遺伝子を相同性解析によって明らかにし、硫黄化合物代謝系を推定した。SH 株は、他の *A. thiooxidans* 株と類似した硫黄代謝関連遺伝子を保持していた。チオ硫酸代謝に関与する酵素系である SOX (*soxYZB-hyp-resB-soxXA*, *soxXYZA-hyp-soxB*) は他の *A. thiooxidans* と同様 2 つ存在し、テトラチオン酸を硫黄、チオ硫酸、硫酸に変換するテトラチオン酸加水分解酵素遺伝子 (*tth*)、チオ硫酸:キノン酸化還元酵素をコードしていると考えられる遺伝子 (*doxD* と *doxA*)、硫化水素:キノン還元酵素遺伝子 (*sqr*)、細胞内の元素硫黄 (S^0) の代謝に関与するヘテロサルファイド還元酵素 (*hdr*)、二つの bo_3 型のユビキノール酸化酵素遺伝子 (*cyo*) と 4 つの *bd* 型のユビキノール酸化酵素遺伝子 (*cyd*) が存在していた。ゲノム情報から、SH 株の硫黄代謝経路を図 1 のように推定した。

SH 株は 16S rRNA 遺伝子の解析に基づいて、*Acidithiobacillus thiooxidans* と同定された。しかしながら、全ゲノム配列に基づく相同性解析の結果、*Acidithiobacillus* には属するが、*thiooxidans* との相同性は 82% と非常に低いことが明らかとなった。通常は、同一種ならば、98~99% の相同性を示すので、SH 株は新種であることが明らかとなった。

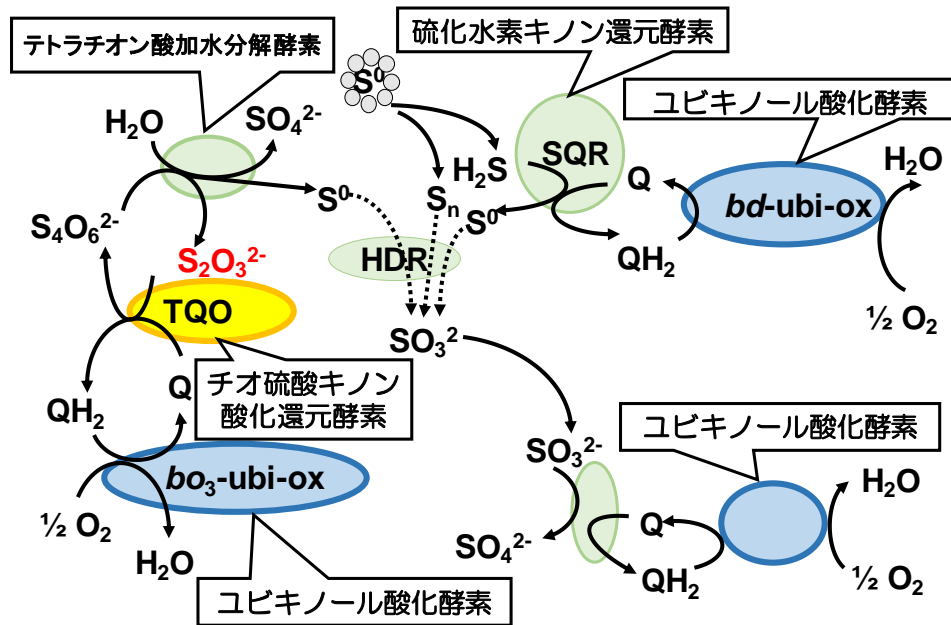
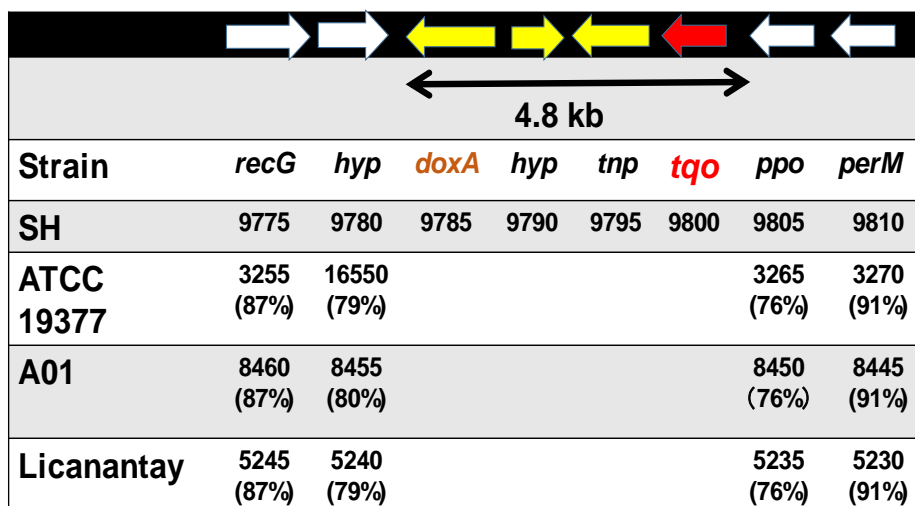


図1. SH株のゲノムから推定される無機硫黄化合物の代謝経路.

(2) チオ硫酸:キノン酸化還元酵素 (TQO) 遺伝子の決定と解析: チオ硫酸生育細胞から精製した TQO は、キノンを電子受容体に用いる膜酵素であった。精製酵素のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列を用いて、SH 株の全ゲノムから TQO 遺伝子を決定した。TQO は、29 残基のシグナルペプチドを持つ 444 アミノ酸をコードする 1283 bp の遺伝子にコードされていた。SDS-PAGE で推定された TQO の分子量は 44 kDa であったが、遺伝子から推定された分子量は 45.9 kDa であった。SH 株のゲノムには、2 個のチオ硫酸:キノン還元酵素 (DoxD と DoxA) 遺伝子が検出されたので、この遺伝子のいずれかが TQO ではないかと考えられたが、遺伝子は Dox ではなかった。アミノ酸配列の相同性を調べた結果、*A. caldus* や *A. thiooxidans* の外膜タンパク質ポーリンと、それぞれ 67% と 64% の相同性を示した。図 2 に示したように、この遺伝子は、他の *A. thiooxidans* 株 (ATCC19377, A01, Licanantay) には存在しておらず、その遺伝子構造から、SH 株は、この遺伝子を水平伝播によって獲得したものと推定された。遺伝子クラスターに含まれる *doxA* 遺伝子の相同性解析によってその起源を推定した結果、*Serratia* 属の細菌に相同性のある遺伝子が存在したが、*Serratia* 属細菌にはチオ硫酸代謝能は報告されていないので、遺伝子の起源を明確にすることはできなかった。

(3) チオ硫酸代謝の末端酸化酵素の解析; チオ硫酸代謝にはキノンを電子輸送体を使用する代謝系を用いるものと推測された。SH 株のゲノムには、4 種類の *bd* 型ユビキノール酸化酵素と 2 種類の *bo* 型ユビキノール酸化酵素の遺伝子が存在していた。チオ硫酸の酸化に使用される末端酸化酵素を決定するため、ヘムを持つオキシダーゼの人工基質である TMPD を電子供与体を用いて、チオ硫酸生育細胞から末端酸化酵素を精製し、その遺伝子の同定を試みた。精製過程でユビキノール酸化酵素活性を示す画分に TQO が含まれていることが明らかとなった。TQO は膜画分の可溶化によって精製されたが、膜内ではユビキノール酸化酵素と複合体を形成していることが示唆された。また、部分精製標品にはユビキノール酸化活性が検出された。トリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列情報からサブユニットの遺伝子を決定した結果、*bo* 型のユビキノール酸化酵素であった。興味深いことに、二つの *cyo* オペロンにコードされているタンパク質から成る複合体であることが明らかとなった。

(4) チオ硫酸キノン酸化還元酵素遺伝子 (*tqo*) の大腸菌での発現解析: 海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus* SH 株の全ゲノム配列を用いて決定した *tqo* 遺伝子を pET22、pET28 および pRham ベクターに導入して、非発現用大腸菌宿主 DH5 を形質転換した。しかし、形質転換体は得られなかった。おそらく、*tqo* 遺伝子産物が大腸菌細胞に毒性が強く、*tqo* 遺伝子の導入されたプラスミドベクターを保持した非発現用宿主内でわずかな遺伝子発現が起こったため、形質転換株が得られなかったと推定した。*tqo* の異種遺伝子発現の解析は、同定された *tqo* 遺伝子が該当する酵素をコードしているかどうかを確認するために重要であるばかりでなく、酵素の反応機構や立体構造を解析するために欠かすことができないため、*tqo* の異種遺伝子発現は引き続き検討する予定である。



recG, ATP依存性DNAヘリカーゼ; *hyp*, 機能未知タンパク質;
doxA, チオ硫酸:キノン酸化還元酵素のサブユニット; *tnp*, トランスポザゼ;
tpo, チオ硫酸:キノン酸化還元酵素;
ppo, プロトポーフィリノーゲン酸化酵素; *perM*, 輸送タンパク質

図2. チオ硫酸:キノン酸化還元酵素遺伝子 (*tqo*) を含む遺伝子クラスターの構造。

(5) 硫黄化合物酸化関連遺伝子の転写解析: ゲノム解析の結果、SH株は硫黄代謝系として、テトラチオン酸を介した経路(*tth*, *tqo*, *sqr*)、チオ硫酸代謝に関与するSox系、細胞内の元素硫黄(S⁰)の代謝に関与するヘテロサルファイド還元酵素(*hdr*)を持っていることが明らかとなった。そこで、硫黄、テトラチオン酸およびチオ硫酸で生育した細胞から、メッセンジャーRNAを調製し、RT-PCRの手法を用いて、それぞれの硫黄化合物で生育した細胞内で、どの硫黄代謝系が主要な経路として機能しているかを検討した。テトラチオン酸生育細胞では、*tth*(テトラチオン酸加水分解酵素)遺伝子の強い転写が観察された。Sox系は硫黄生育細胞で強く転写され、*tqo*遺伝子の転写は、チオ硫酸培養細胞で最も強かったため、SH株のチオ硫酸代謝は、Sox系よりもTQO系が関与する新規な代謝経路で進行することが明らかとなった。

また、ゲノムには、末端酸化酵素としてシトクロームc酸化酵素の遺伝子が検出されず、*bd*型と*bo*型のユビキノール酸化酵素が存在する。チオ硫酸代謝には*bo*型のユビキノール酸化酵素が関与していることが明らかとなったが、転写解析の結果チオ硫酸およびテトラチオン酸生育細胞で、*bo*型の遺伝子(*cyo*)の転写が活性化されており、酵素精製の結果を支持した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Kanao T, Onishi M, Kajitani Y, Hashimoto Y, Toge T, Kikukawa H, Kamimura K., Characterization of tetrathionate hydrolase from the marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 査読あり, 82巻, 2018, 152-160
DOI: 10.1080/09168451.2017.1415128
- ② Kamimura K., Sharmin S, Yoshino E, Tokuhisa M, Kanao T., Draft Genome Sequence of *Acidithiobacillus* sp. strain SH, a Marine Acidophilic Sulfur-Oxidizing Bacterium. *Genome Announcement*, 査読あり, DOI: 10.1128/genomeA.01603-17, 2018
- ③ 上村一雄、金尾忠芳、微生物を用いる湿式冶金—バイオリーチング—、*生物工程*, 査読あり、95巻、2017、662-666
- ④ 上村一雄、硫黄酸化微生物のエネルギー生成機構と環境・資源工学への利用、*硫酸と工業*, 査読なし、69巻、2016、133-145

[学会発表] (計9件)

- ① 上村一雄、化学合成独立栄養細菌の硫黄代謝の多様性、日本農芸化学会中四国支部農芸化学若手セミナー(招待講演)2018
- ② 池田くみ子、金尾忠芳、上村一雄、*Acidithiobacillus ferrooxidans*のチオ硫酸代謝に関する研究、日本農芸化学会2018年度中四国支部大会2018
- ③ Kanao T, Characterization of tetrathionate hydrolase from the marine acidophilic sulfur oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH

- 5th International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (国際学会) 2018
- ④ Kamimura K, Sharmin S, Yoshino E, Tokuhisa M, Kanao T, Characterization of the novel thiosulfate:quinone oxidoreductase from a marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus* sp. strain SH, 5th International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (国際学会) 2018
- ⑤ 上村一雄、徳久未来、金尾忠芳、海洋性硫黄酸化細菌のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの遺伝子解析、日本農芸化学会 2018 年度大会 2018
- ⑥ 金尾忠芳、上村一雄、海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株のテトラチオン酸ハイドロラーゼに関する研究～第 2 報～、日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会 2018
- ⑦ Kamimura K, Yoshino E, Tokuhisa M, Kanao T, A Novel Thiosulfate Dehydrogenase from a Marine Acidophilic Sulfur-Oxidizing Bacterium, *Acidithiobacillus thiooxidans*, 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (国際学会) 2017
- ⑧ 吉野永里子、金尾忠芳、上村一雄、チオ硫酸で生育した海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* の末端酸化酵素の性質、日本農芸化学会中四国支部第 47 回講演会 2017
- ⑨ 上村一雄、吉野永里子、金尾忠芳、海洋性 *A. thiooxidans* SH 株の末端酸化酵素の解析、第 68 回日本生物工学会大会 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当者なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：金尾 忠芳

ローマ字氏名：Kanao Tadayoshi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。