

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380194

研究課題名（和文） 海洋性硫黄酸化細菌の硫黄酸化関連酵素及びその遺伝子の解析

研究課題名（英文） Analysis of enzymes and genes involved in sulfur oxidation in a marine sulfur-oxidizing bacterium.

研究代表者

上村 一雄（KAMIMURA KAZUO）

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80294445

研究成果の概要：鉄や硫黄を酸化してエネルギーを得る細菌を使用して、硫化鉱石から銅やウランなどの金属を溶出させる技術にバクテリアリーチングがある。これまでの細菌は、NaCl存在下では増殖ができないため、海洋環境などのようにNaClを含む環境下でのバクテリアリーチングは不可能だった。本研究では、そのような環境でバクテリアリーチングを可能にするために分離した細菌の、硫黄酸化に関与する酵素や遺伝子の構造を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	9,100,000	2,730,000	11,830,000

研究分野：農学（境界農学）

科研費の分科・細目：6701

キーワード：環境修復、資源循環システム、微生物利用学、遺伝子資源、微生物代謝、微生物酵素、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

重金属汚染は、汚染の程度の違いはあるが世界的に深刻な問題となっている。また、生活排水等の処理過程で生じた汚泥は、肥料等に加工して再利用することが望まれているが、重金属が基準値を超えていることから再利用の妨げとなっている。近年これらの重金属によって汚染された土壌や汚泥から、金属イオンを可溶化して除去する技術としてバクテリ

アリーチングが注目されている。特に、発展途上国ではその必要性が高まっている。この金属の可溶化技術では、好酸性の鉄酸化細菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) や硫黄酸化細菌 (*A. thiooxidans*) などの化学合成独立栄養細菌の作用で生じた3価鉄やプロトン（硫酸）が重要な役割を演じる。ところが、従来の鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌は1%以上

の塩素イオンが存在する環境では、その生育が阻害される。塩素イオンは、重金属で汚染された沿岸の堆積物や活性汚泥中にも含まれており、バクテリアリーチングを適用する際の妨げとなっている。

2. 研究の目的

私どもは、塩が存在する環境下でバクテリアリーチングを可能にするため、海洋から塩素存在下でも増殖できる好酸性の鉄酸化細菌 (KU2-11株) や硫黄酸化細菌 (SH株) の分離を世界で初めて分離した。これらの細菌は、陸上の細菌が増殖できないNaCl存在下でも増殖可能であり、塩素存在下でのバクテリアリーチングの実現に大きく前進した。分離した細菌の鉄酸化機構や硫黄酸化機構の解明は、塩含有汚染物へのバクテリアリーチングの効率を向上させる上で欠かすことができない。好酸性のNaCl要求性の鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の鉄や硫黄の酸化機構はほとんど解明されておらず、その機構の解明は、応用面に反映できるのみならず、地球レベルでの鉄や硫黄のサイクルに関して重要な知見をもたらすことが期待される。そこで、本研究では、硫黄酸化経路に焦点をあてて、硫黄化合物の酸化に関与している酵素の性質及び遺伝子構造を解明する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞および細胞膜の調製

好酸性の*Acidithiobacillus*属の硫黄酸化細菌を材料に用いた。本菌の培養には、SilvermanとLundgrenによって提案された9K基本塩培地 [0.3% (NH₄)₂SO₄、0.05% K₂HPO₄、0.05% MgSO₄・H₂O、0.01% KCl、0.001% Ca(NO₃)₂、pH 3.0] に、終濃度1%の元素硫黄(S⁰)を添加した硫黄培地、もしくは前培養では5 mM、本培養では3 mMのテトラチオン酸 (K₂S₄O₆)を添

加したテトラチオン酸培地を用いた。硫黄およびテトラチオン酸生育細胞は、まず吸引ろ過により硫黄を除去した後、遠心分離

(12,000×g、10 min、4°C)で集菌を行った。

次に、0.1リン酸カリウム緩衝液 (KPB) (pH 6.3)で3回洗浄後、5 mM MgSO₄・7H₂O、10% グリセロール、1 mM ジチオスレイトール (DTT)を含む同緩衝液に再懸濁して洗浄菌体とした。

無細胞抽出画分の調製のために、洗浄菌体を30秒間、超音波破砕し、氷上に1 min静置した。これを360サイクル行って細胞を破砕した。遠心分離 (12,000×g、10 min、4°C)によって得られた上清を無細胞抽出画分とした。この無細胞抽出画分を、超遠心分離 (105,000×g、60 min、4°C)して得られた沈殿を5 mM MgSO₄・7H₂O、10% グリセロール、1 mM DTT含有の 0.1 M KPB (pH 6.3)に再懸濁し、膜画分とした。遠心上清は、可溶性画分 (細胞質とペリプラズム画分を含む) とした。

(2) 酵素活性の測定

ユビキノール酸化酵素活性は、合成ユビキノール (Q₂H₂) のキノンへの酸化を278 nmの吸光度の上昇によって測定した。硫化水素:キノン酸化還元酵素 (SQR) 活性は、Na₂Sの添加によるQ₂の還元を278 nmの吸光度の減少で測定した。テトラチオン酸加水分解酵素活性は、テトラチオン酸をシアノリシスによって定量し、その減少速度から求めた。チオ硫酸デヒドロゲナーゼ活性は、電子受容体としてフェリシアナイド (K₃Fe(CN)₆)を用いて420 nmにおける吸光度の減少により測定した。

(3) 酵素の精製

①SQRの精製

膜画分を0.3 M KClを含む30 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.3)に懸濁し、4°Cで一晩攪拌し、膜にゆるく結合している表在性蛋白質を可溶化した。この懸濁液を超遠心にかけて、得られた上清を粗酵素として用いた。酵素は、

硫安分画、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを行って精製した。

②テトラチオン酸ヒドラーゼの精製

膜画分を0.5 M 硫酸アンモニウムを含むリン酸カリ緩衝液(pH 7.3)に懸濁し、SQRの場合と同様に表在性蛋白質を可溶化した。酵素は、表在性蛋白質画分に含まれていたため、疎水性クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを行って精製した。

(4) 遺伝子の解析

精製した酵素のN-末端アミノ酸配列を決定し、*A. ferrooxidans*の全ゲノム情報から遺伝子を特定し解析に用いた。

4. 研究成果

①SQRの性質と遺伝子解析

*Acidithiobacillus ferrooxidans*では、硫黄の分解過程で硫化水素が中間代謝物として生じる。この硫化水素は、SQRによって酸化される。酵素は、膜に比較的緩く結合している表在性蛋白質として検出され、塩存在下で抽出できた。最終的に、膜画分から128倍に精製された。酵素は、47 kDaの分子量をもつポリペプチドの単量体であった。硫化水素およびユビキノンに対する K_m 値はそれぞれ42 μ Mおよび14 μ M、酵素活性の見かけの最適pHは7付近であった。SQRは、シアノバクテリアや中性域に生息する硫黄酸化細菌から精製されているが、好酸性の硫黄酸化細菌からは初めて精製された。N-末端アミノ酸配列の情報を用いて特定されたSQRの遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定された。推定されたアミノ酸配列は、434個のアミノ酸からなり、分子量は47.29 kDa、等電点は6.5であった。他の細菌の酵素とアミノ酸配列を比較したところ、シアノバクテリアや他の細菌からのSQRと相同性を示したが、その類似性は25-56%と

極めて低かった。これまでのSQRにはFADが補因子として含まれていることが報告されているが、精製した酵素がFADを含んでいるかどうかは確認できなかった。また、大腸菌内でチオレドキシン融合タンパク質として発現された*sqr*遺伝子は封入体を形成し、活性を保持したタンパク質の発現には成功しなかった。

海洋性の硫黄酸化細菌にもSQR活性が検出され、細胞質膜に緩く結合していることが明らかとなった。そこで、調製した細胞質膜を0.3 M KClを含むバッファーで処理することによって可溶化することができた。酵素の精製を、同様な精製手法を用いて行っている。

②テトラチオン酸ヒドラーゼの性質と遺伝子解析

本菌をテトラチオン酸をエネルギー源として30°C、12日間培養すると、10リットルの培養液から少なくとも1gの湿菌体重量を得ることができ、良好な生育を示すことが確認された。菌体の生育に伴い、培養液中のテトラチオン酸の消費が確認されたため、この生育菌体を用いた試験管内 (*in vitro*) でのテトラチオン酸分解活性を測定した。この結果、時間と共に一定量のテトラチオン酸が分解される活性を検出できたため、菌体を超音波で破砕して、本活性の本体である酵素の精製を試みた。硫安分画、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなど各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製を行い、最終的にSDS-PAGEによって単一のタンパク質バンドを確認できる標品を得た。本酵素は、SDS-PAGEおよびゲル濾過法を用いた分析結果より、分子質量約50kDaの同一サブユニットからなる二量体の酵素であることが分かった。また無細胞抽出液の超遠心分画によって、活性の大部分は膜画分に局在することから、膜結合性の酵素であることが推定された。反応

の最適pHは3.5, pH 1.0~7.5まで主に酸性域において高いpH安定性を持っていた。特にpH1.0、氷上で1時間曝した後も95%以上の残存活性を有し、強酸性条件下でも極めて安定であることが分かった。この様に、本酵素は酸に対して極めて安定であるという好酸性細菌の細胞質外タンパク質の典型的な特徴を示した。

この50kDaタンパク質のN-末端アミノ酸配列を決定した (AVAVPMDSTGPYR)。この決定されたN-末端アミノ酸配列を含む遺伝子の検索を行った結果、シグナル配列を含む分子量約55kDaのタンパク質をコードした1500bpの遺伝子を特定した。シグナル配列を除いた遺伝子より推定されたN-末端アミノ酸配列は、精製した酵素のそれと完全に一致し、分子量も約49,700と計算され、これもほぼ完全に一致した。データベースを用いた相同検索

(BLAST)の結果は、本遺伝子が硫黄生育時に発現が誘導される機能未知の外膜タンパク質として登録されていた (locus name AF005208, accession No. AAB93983)。この結果より、機能未知である本遺伝子はテトラチオン酸ハイドロラーゼをコードしていることを強く示唆した。

このことを確認するために、本遺伝子を大腸菌に導入し、組換えタンパク質として発現を試みたが、活性を持たない不溶性の封入体を形成した。封入体から調製したタンパク質をマウスに接種することによって作成した抗体を用いてWestern Blot解析を行った。その結果、組換え遺伝子産物に特異的に反応する抗体が、元株精製酵素を認識した。以上のことから、本遺伝子がテトラチオン酸ハイドロラーゼをコードしていることを、分子量とN-末端アミノ酸配列だけでなく、免疫学的にも証明することができた。テトラチオン酸ハイドロラーゼの遺伝子は、本研究によって初め

て明らかになった。類似の遺伝子は、硫黄酸化細菌*Acidithiobacillus caldus*でもその後報告されており、さらに*Sulfolobus*属や*Leptospirillum*属の硫黄酸化細菌のゲノムにも検出される。

③チオ硫酸デヒドロゲナーゼの精製

海洋性硫黄酸化細菌は、チオ硫酸の酸化にチトクロームcを用いる。従って、チオ硫酸デヒドロゲナーゼの活性をフェリシアナイドの還元によって測定した。酵素活性は、膜画分に検出され、その最適pHは3であることから、触媒部位はペリプラズマ側に露出しているものと考えられた。酵素は、オクチルグルコシドによって膜から可溶化できた。単一精製には至っていないが、分子量48kDaと52kDaの二つのサブユニットからなる酵素であることが示唆されている。

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 7件)

- ①Manchur, M. A., Kanao, T., Sugio, T., Kamimuta, K., Effects of increasing concentration of salts on the expression of omp40 gene encoding a major porin of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. J. Biol. Sci., 8, 125-130, 2008, 査読有
- ②Taha, T., Kanao, T., Takeuchi, F., Sugio, T., Reconstitution of iron oxidase from sulfur-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Appl. Environ. Microbiol., 74, 6808-6810, 2008, 査読有
- ③Sugio, T., Taha, T., Kanao, T., Takeuchi, F., Involvement of iron oxidation enzyme system in sulfur oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270, Advanced Materials Res., 20-21, 443-446,

2007, 査読有

④Taha, T., Kanao, T., Takeuchi, F.,
Increasing in Fe²⁺-producing activity
during growth of *Acidithiobacillus*

ferrooxidans on sulfur, Biosci. Biotechnol.
Biochem., 71, 2663-2669, 2007, 査読有

⑤Wakai, S., Tsujita, M., Kikumoto, M.,
Manchur, M. A., Kanao, T., Kamimura, K.,
Purification and Characterization of
sulfide:quinine oxidoreductase from an
acidophilic iron-oxidizing bacterium,
Acidithiobacillus ferrooxidans, Biosci.
Biotechnol. Biochem., 71, 2735-2742, 2007,
査読有

⑥Sugio, T., Hisazumi, T., Kanao,
T., Kamimura, K., Takeuchi, F., and
Negishi, A., Existence of aa₃-type
ubiquinol oxidase as a terminal oxidase in
sulfite oxidation of *Acidithiobacillus*
thiooxidans. Biosci. Biotechnol. Biochem.
70, 1584-1591, 2007, 査読有

⑦Kamimura, K., Wakai, S. and Kanao, T.
Purification and properties of
sulfide:quinone oxidoreductase from an
acidophilic, iron-oxidizing bacterium,
Acidithiobacillus ferrooxidans NASF-1,
grown on sulfur medium, Proceedings of
International Symposium on Extremophiles
and Their Applications Vol. 2005, 373,
2007, 査読無

[学会発表] (計 11件)

①金尾忠芳, 村上知佐, 上村一雄, 鉄酸化細
菌*Acidithiobacillus ferrooxidans*由来テ
トラチオン酸ヒドロラーゼの発現解析と活性
型酵素の取得, 2009年度日本農芸化学会大会,
2009年3月29日, 福岡

②長田 臨, 金尾忠芳, 上村一雄, 鉄酸化細

菌*A. ferrooxidans*の鉄及び硫黄代謝の制御
機構の解析, 2009年度日本農芸化学会大会,
2009年3月29日, 福岡

③Kazuo Kamimura, Nozomu Nagata, Tadayoshi
Kanao, Analysis of a protein involved in
the regulation of sulfur and iron oxidation
by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 微生物
硫黄代謝に関するEMBO-FEMSワークショ
ップ, 2009年3月17日, ポルトガル

④Tadayoshi Kanao, Chisa Murakami, Kazu
Kamimura, Tetrathionate hydrolase: a key
enzyme of the dissimilatory, 微生物硫黄代
謝に関するEMBO-FEMSワークショップ, 2009年
3月17日, ポルトガル

⑤上村一雄, 野口真一, 金尾忠芳, 鉄と硫黄
で増殖した*Acidithiobacillus ferrooxidans*
のペリプラズムタンパク質の解析, 第60回日
本生物工学会大会, 2008年8月29日, 仙台

⑥金尾忠芳, 上村一雄, 杉尾 剛, 鉄酸化細
菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans*におけ
るテトラチオン酸ヒドロラーゼの転写解析,
第60回日本生物工学会大会, 2008年8月28日,
仙台

⑦村上知佐, 上村一雄, 金尾忠芳, 鉄酸化細
菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans*由来テ
トラチオン, 第60回日本生物工学会大会,
2008年8月28日, 仙台

⑧辻田瑞穂, 長田 臨, モハメッド・マンシ
ュル, 金尾忠芳, 上村一雄,

*Acidithiobacillus ferrooxidans*の硫黄代謝
酵素遺伝子の発現制御機構の解析, 日本農芸
化学会 2007年度中四国・西日本支部合同大
会, 2007年9月15日, 山口

⑨モハメッド マンシュル, 金尾忠芳, 杉尾
剛, 上村一雄, *Acidithiobacillus*
*ferrooxidans*の主要なポーリンをコードす
る遺伝子omp40の発現に及ぼす環境因子の影
響, 日本農芸化学会中四国支部第18回講演

会，2007年5月12日，広島

⑩金尾忠芳，上村一雄，杉尾剛，鉄酸化細菌
Acidithiobacillus ferrooxidansのテトラチ
オン酸ハイドラーゼの性質と遺伝子解析，日
本農芸化学会2007年度大会，2007年3月27
日，東京

⑪Manchur Mohammed，金尾忠芳，杉尾 剛，
上村一雄，鉄酸化細菌の OmpAファミリー外
膜タンパク質の解析，日本農芸化学会2007
年度大会，2007年3月27日，東京

〔図書〕（計 1件）

上村一雄，地人書館，微生物増殖学の現在・
未来，2008，427-444

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 一雄 (KAMIMURA KAZUO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80294445

(2) 連携研究者

金尾 忠芳 (KANA O TADAYOSHI)

岡山大学・自然生命科学研究支援センタ

ー・助教

研究者番号：40379813