

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580458

研究課題名(和文) 低品位硫化鉱石からの金属資源回収技術の高効率化に関する研究

研究課題名(英文) Research on the development of highly improved method for bioleaching from low-grade sulfide ores

研究代表者

上村 一雄 (KAMIMURA, Kazuo)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：80294445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：鉄酸化細菌*Acidithiobacillus ferrooxidans*は、鉱石から金属を回収する技術であるバクテリアリーチングに使用される。鉱石からの金属硫黄の回収には、鉄酸化活性と硫黄酸化活性が同時に必要であるが、この細菌は鉄と硫黄が存在すると鉄酸化に関する遺伝子を優先的に発現させるため、硫黄酸化活性は極めて低い。リーチングの効率を高めるためには、硫黄酸化に関する遺伝子も同時に発現させることが望まれる。そこで、硫化水素代謝に関する硫化水素：キノン還元酵素の発現に関する遺伝子の役割について検討するとともに、チオ硫酸の代謝に関する新たな酵素を精製し、遺伝子を初めて決定した。

研究成果の概要(英文)：An iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, is one of the key organisms used in industrial bioleaching applications. Both iron- and sulfur-oxidizing activities are necessary for bioleaching. However, expressions of genes involved in sulfur oxidation are strongly repressed in the presence of ferrous iron. In this research, a protein (ScpB) thought to be involved in the transcriptional regulation of sulfide:quinone reductase gene was examined. The transcription of scpB gene was highly activated in sulfur-grown cells. ScpB could bind to putative promoter regions of genes involved in iron or RISC oxidation. Although thiosulfate metabolism in this bacterium has not been characterized, a new gene involved in thiosulfate metabolism has been identified. The properties of the enzyme (thiosulfate dehydrogenase) was characterized.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：鉄酸化細菌 硫黄酸化 チオ硫酸デヒドロゲナーゼ バクテリアリーチング 応用微生物学 遺伝子発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

人類は地球上に存在するさまざまな資源を利用してきた。しかし、その資源には限りがあることは明らかであり、我々は現在、さまざまな資源の不足に直面している。特に、金属資源の枯渇は深刻で、低品位の鉱石あるいは廃棄物からも金属を回収する必要に迫られている。また、重金属による環境汚染も、特に発展途上国において極めて深刻な問題として露呈している。近年、このような資源枯渇や環境汚染問題の解決に、微生物による硫化鉱石からの金属の溶出回収技術（バクテリアリーチング）が、注目を集めている。鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* は、二価鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) だけでなく還元型硫黄化合物 (RISC;  $\text{S}^0$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  など) の酸化によって代謝や増殖に必要なエネルギーを獲得する独立栄養細菌で、重金属耐性が非常に高いため、バクテリアリーチング技術の重要な微生物である。

鉄で増殖した細胞は、高い鉄酸化活性を持っているが、硫黄で増殖すると鉄酸化酵素系の活性は極めて低くなる。本菌は硫黄を酸化できるが、その酸化には鉄酸化に關与する呼吸鎖電子伝達経路とは異なる電子伝達系が使用される。硫黄の酸化過程で生じた硫化水素は、硫化水素：キノン酸化還元酵素 (SQR) が關与する。また、その酵素の性質と遺伝子発現の解析から、SQR は鉄増殖細胞内ではほとんど検出されないが、硫黄やテトラチオン酸で増殖した細胞内で発現する。また、テトラチオン酸加水分解酵素も鉄増殖細胞ではほとんど検出されず、硫黄やテトラチオン酸で増殖した際に発現する。このように、*A. ferrooxidans* の鉄酸化経路や硫黄酸化経路の酵素は、利用可能な鉄や硫黄の存在量によってその発現量が異なる。

## 2. 研究の目的

バクテリアリーチングでは、鉄と硫黄の両方

の酸化能が必要で、高い重金属耐性も要求される。鉄酸化細菌はこれらの条件を満たしているが、鉄の酸化系と硫黄の酸化系が常に発現している鉄酸化細菌を作成できれば、バイオリーチング効率を飛躍的に向上させることが可能となり、資源回収あるいは環境汚染問題の解決に大きく寄与できると考えられる。そこで本研究では、鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* の鉄と硫黄の代謝酵素の発現制御機構を分子生物学的に明らかにするため、以下の項目について解析を行う。

- (1) 硫化水素：キノン酸化還元酵素遺伝子 (*sqr*) の上流に存在する制御様タンパク質 (*ScpB*) が結合するプロモーターを明らかにする。
- (2) *sqr* 遺伝子のプロモーターに結合するタンパク質を検出する。
- (3) 硫黄酸化経路の全容を明らかにするため、新たな硫黄代謝関連タンパク質の検出と遺伝子の同定を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用菌株・培養組成・培養方法

鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株を用いた。培養は、UME 培地 (3.2%  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1%  $\text{KCl}$ , 0.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.014%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) に、二価鉄 ( $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) を 50 mM 添加した鉄培地、元素硫黄 ( $\text{S}^0$ ) を 1% 添加した硫黄培地、およびテトラチオン酸 ( $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ ) を 5 mM 添加したテトラチオン酸培地を用い、通気攪拌培養した。遺伝子のクローニングおよび発現には大腸菌株を用いた。培養には、LB (Luria-Bertani) 培地 (1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 1.0%  $\text{NaCl}$ , pH 7.2) を用い、37 °C で培養した。

### (2) 遺伝子発現調節タンパク質の調製

*A. ferrooxidans* ATCC23270 株の SQR の遺伝子領域上流に転写制御に關与すると考え

られたタンパク質 (ScpB) は、大腸菌内で発現させたものを使用した。

### (3) ゲルシフトアッセイ

ScpB とプロモーター領域との結合の解析には、ゲルシフトアッセイ法を用いた。プロモーター領域を含む配列を PCR 法により増幅し、0.1 pmol DNA と ScpB (0.1 ~ 100 pmol) を反応液に加えて全体量を 20  $\mu$ L とし、室温で 15 分間反応させた。7%ポリアクリルアミドゲルを使って 100V、約 1h 電気泳動した後、SYBR Green 染色によって DNA バンドを検出した。

### (4) チオ硫酸デヒドロゲナーゼの精製

電子受容体としてフェリシアナイド  $[K_3Fe(CN)_6]$  を用いた。50 mM  $\beta$ -アラニン緩衝液 (pH 2.5)、1 mM フェリシアナイド、10 mM チオ硫酸ナトリウム ( $Na_2S_2O_3$ )、200 mM 硫酸ナトリウムおよび酵素を含む反応液の 420 nm における吸光度の減少により酵素活性を測定した。テトラチオン酸培養細胞を超音波破碎し、得られた無細胞抽出液を超遠心 (100,000  $\times$  g, 1 h) に供して、可溶性画分を調製した。この画分から、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによって酵素を精製した。

## 4. 研究成果

### (1) 鉄および RISC 酸化に関与する遺伝子の発現制御機構の解析

元素硫黄やテトラチオン酸で生育した細胞でその遺伝子の発現が活性化されることが確認されている *sqr* の上流にある *scpB* (Segregation and condensation protein B) 遺伝子と、その遺伝子がコードするタンパク質について、制御因子としての可能性を検討した。*A. ferrooxidans* 23270 ゲノム配列中の *sqr* 遺伝子を取り囲む領域を分析したところ、遺伝子のオペレーター部位に結合すること

が示唆される *scpB* 遺伝子が存在した。*scpB* 遺伝子が実際に *A. ferrooxidans* 細胞内で転写されているかどうかを確認するために、生育基質の異なる条件で培養した対数増殖期の細胞から抽出した mRNA から cDNA を調製し、これを鋳型に用いて PCR を行った。その結果、硫黄やテトラチオン酸生育細胞では転写が確認されたが、二価鉄生育細胞ではその転写量は低かった。16S rRNA 遺伝子の増幅はすべての細胞で同レベル検出されたことから、ScpB タンパク質が硫黄酸化関連遺伝子の転写制御に関与している可能性が示唆された。ScpB タンパク質が鉄や硫黄の酸化に関与した遺伝子のプロモーター領域に結合するかどうかを、ゲルシフトアッセイ法を用いて検討した。分析に用いる ScpB タンパク質は、*scpB* 遺伝子を組み込んだ発現用ベクター pETcoco-*scpB* を *E. coli* BL21 (DE3) に形質転換して大量発現させ、精製したものを用いた。硫黄酸化に関与するテトラチオン酸加水分解酵素をコードする *tth* 遺伝子や、鉄の酸化に関与するチトクローム *c* をコードする *cyc2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 断片と、精製した ScpB をインキュベートした結果 ScpB はすべてのプロモーター領域の DNA と結合することが分かった。16S rDNA とは結合が認められなかったことから、ScpB はプロモーター領域と非特異的に結合する能力があることが示された。特異性が低いことから、制御因子として機能している可能性は低いと考えられたが、DNA 結合能を持つことから、遺伝子発現調節に何らかの形で関与していることが推測された。

### (2) チオ硫酸デヒドロゲナーゼの精製と機能解析

テトラチオン酸で生育した菌体を用いたスベクトル解析の結果から、チオ硫酸を基質と

して用いた場合、チオ硫酸から末端酸化酵素への電子伝達には、ヘム *c* と 613 nm 付近にピークを持つヘムが関与していることが明らかとなり、チオ硫酸からの電子は、チトクローム *c* に渡された後、新規の末端酸化酵素に渡されることが示唆された。そこで、チオ硫酸酸化において重要な酵素であるチオ硫酸デヒドロゲナーゼ (Tsd) 活性の検出と酵素遺伝子の探索を試みた。

テトラチオン酸を生育基質として培養した *A. ferrooxidans* の無細胞抽出液で Tsd 活性を測定したところ、硫酸カリウム非存在下では活性が検出できなかったが、硫酸カリウムを含む反応液で酵素活性が検出され、200 mM で最大活性を示した。塩化ナトリウムや塩化カリウムでは活性が検出されなかったことから、本酵素が、活性発現に硫酸イオンを必要とすることが示された。最適 pH は、2.5 と 4.0 に検出され、2 つの Tsd の存在が示唆された。これらの活性は、テトラチオン酸あるいは元素硫黄を生育基質として用いた場合の細胞で検出されたが、二価鉄を生育基質として用いた細胞には検出されなかった。このことから、*tsd* 遺伝子が RISC 存在下で特異的に発現することが示された。

Tsd は、可溶性画分から回収率 3% で 64 倍に精製された (図 1A)。SDS-PAGE 解析の結果、酵素の分子量は約 25kDa と推定された。酵素の最適 pH と最適温度はそれぞれ 2.5 と 70 であった。本酵素は低い基質濃度では活性を示さず、基質濃度と活性の関係を示したグラフはシグモイド型となったことから、この酵素はアロステリック酵素であると考えられた。本酵素は、2 分子のチオ硫酸から 1 分子のテトラチオン酸の生成反応を触媒した。無細胞抽出液では、Tsd 活性に必要とされた硫酸イオンが、部分精製酵素では阻害剤として働き、1 mM という低濃度の亜硫酸イオンが活

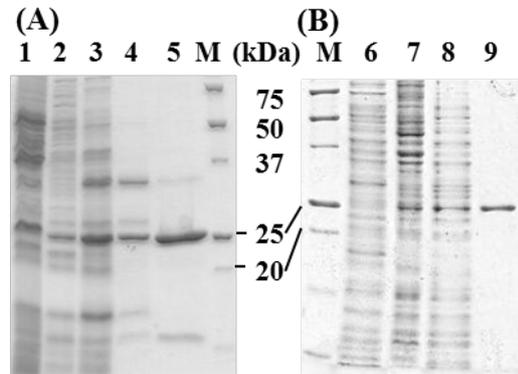


図 1. *A. ferrooxidans* (A) および大腸菌で発現させた (B) チオ硫酸デヒドロゲナーゼの精製。

性化剤として機能した。

### (3) *tsd* 遺伝子の解析

Tsd の N 末端アミノ酸配列を決定し、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 の全ゲノムデータを使って BLAST 検索を行った。N 末端アミノ酸配列から予測された *tsd* 遺伝子は、二価鉄よりも硫黄生育細胞で発現が高まることが報告されていたが、そのタンパク質の機能は未解明のものであった。この遺伝子の下流には、硫黄転移タンパク質 (ロダネース様タンパク質; p21) や硫酸/チオ硫酸結合タンパク質 (Sbp)、チオ硫酸: キノン還元酵素様タンパク質 (DoxD) をコードしていると推測される配列が並んでおり、*tsd* 遺伝子はこれらの遺伝子とクラスターを形成していた (図 2A)。*tsd* 遺伝子の相同性解析を行ったところ、いくつかの硫黄酸化細菌や好酸性細菌などに存在することが明らかとなった。また、Tsd のホモログを持つ細菌は、ほとんどがその近傍に *A. ferrooxidans* の硫酸/チオ硫酸結合タンパク質 (Sbp) のホモログ遺伝子を持つことが明らかとなった。無細胞抽出液では、Tsd 活性は硫酸イオン要求性だったが、精製した標品にはその要求性がなかった。また、硫酸イオン要求性を示す部分精製標品には、Sbp が含まれていたことから、Tsd は Sbp と

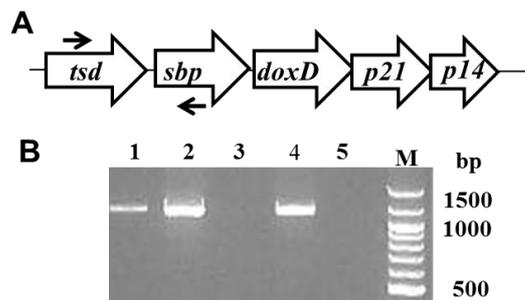


図 2. (A)チオ硫酸デヒドロゲナーゼ遺伝子近傍の遺伝子構造. *tsd*, チオ硫酸デヒドロゲナーゼ; *sbp*, 硫酸/チオ硫酸結合タンパク質; *doxD*, チオ硫酸:キノン還元酵素; *p21*, ロダネース様タンパク質; *p14*, ロダネース様タンパク質.(B)遺伝子発現の RT-PCR 解析. 硫黄 (lane 1), テトラチオン酸 (lane 2), 鉄 (lane 3) で生育した細胞から調製した cDNA, *A. ferrooxidans* の DNA (lane 4) を鋳型に PCR を行った. lane 5 は鋳型なし.

結合して存在し, Tsd 活性に硫酸イオン要求性を付与していることが推測された. *tsd* 遺伝子は, 硫黄培地, テトラチオン酸培地で生育した細胞内で発現していたが, 鉄培地では発現していなかった(図 2B)。

決定された遺伝子が, Tsd をコードしているかを確認するために, 大腸菌で発現させたところ, 分子量 25kDa の遺伝子産物が検出され, Tsd 活性を持つタンパク質は, *A. ferrooxidans* ATCC 23270 由来の Tsd の精製手順と同じ方法で精製することができた(図 1B)。精製した組換えタンパク質は, *A. ferrooxidans* の Tsd とほぼ同様な酵素特性を示したため, 決定された遺伝子が Tsd をコードしている遺伝子であると確定した。

#### (4)まとめ

本研究では, *A. ferrooxidans* のチオ硫酸デヒドロゲナーゼについて, はじめてその諸性質を明らかにし, その遺伝子を決定した。検出された遺伝子の解析によって, これまでに報告されたものとは異なるチオ硫酸代謝経路の存在を明らかにした。また, 詳細は省略

するが, *A. ferrooxidans* の鉄と硫黄の代謝制御に関与すると推測される新たな因子が検出され, この因子のさらなる解析によって本菌が鉄代謝から硫黄代謝に代謝系を変換する機構に関する知見が得られることが期待される。

#### 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 5 件)

Kanao T, Kosaka M, Yoshida K, Nakayama H, Tamada T, Kuroki R, Yamada H, Takada J, Kamimura K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Acta Crystallographica Section F. 査読有, 69, 692-694 (2013) DOI:10.1107/S1744309113013419

Kikumoto M, Nogami S, Kanao T, Takada J, Kamimura K. Tetrathionate-forming thiosulfate dehydrogenase from Acidophilic, chemolithotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol., 査読有, 79, 113-120 (2013), DOI: 10.1128/AEM.02251-12.

Manshur MA, Kikumoto M, Kanao T, Takada J, Kamimura K. Characterization of an OmpA-like outer membrane protein of the acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Extremophiles, 査読有, 15, 403-410 (2011), DOI: 10.1007/s00792-011-0371-6.

[学会発表] (計 15 件)

金尾忠芳, 上村一雄. 微生物の硫黄代謝酵素研究の新展開. 第 65 回日本生物工学会大会. 2013.9.20 広島

上村一雄, 濱崎良太, スルタナ シャーミン, 金尾忠芳. 鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* のロダネース様タンパク質の機能解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.26, 仙台.

中山久之, 小坂 恵, 上村一雄, 金尾忠芳. 鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶化. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.26, 仙台.

金尾忠芳, 伊藤 恵, 村上知佐, 上村一雄. 鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* におけるテトラチオン酸ハイドロラーゼ遺伝子の転写と制御に関する研究. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.26, 仙台.

上村一雄, 野上翔平, 菊本愛生, 高田潤, 金尾忠芳. *Acidithiobacillus ferrooxidans* の新規なチオ硫酸デヒドロゲナーゼの性質. 第 64 回日本生物工学会大会, 2012.10.23. 神戸.

菊本愛生, 野上翔平, 襟立佳那, 金尾忠芳, 高田潤, 上村一雄. *Acidithiobacillus ferrooxidans* のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの構造と機能. 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012.3.25. 京都.

田崎翔悟, 菊本愛生, 金尾忠芳, 上村一雄. Expression and characterization of a diheme cytochrome *c* encoded by gene *cycA2* from the acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a recombinant protein in *Escherichia coli*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress

2011.9.25, 札幌.

菊本愛生, 金尾忠芳, 高田潤, 上村一雄. Identification of a gene involved in thiosulfate oxidation in an acidophilic iron-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011.9.25, 札幌.

上村一雄, 菊本愛生, 高田潤, 金尾忠芳. Analysis of a protein involved in the regulation of sulfur and iron oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 19<sup>th</sup> International Biohydrometallurgy Symposium, 2011.9.19. China.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku01\\_7.html](http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku01_7.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村 一雄 (KAMIMURA Kazuo)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号: 80294445