

氏名	菊本 愛生		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農学		
学位授与番号	博乙第4396号		
学位授与の日付	平成25年 3月25日		
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第5条第2項該当)		
学位論文の題目	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> のチオ硫酸代謝経路の解析		
論文審査委員	教授 上村 一雄	教授 稲垣 賢二	教授 高田 潤

学位論文内容の要旨

全ての生物は、生育のために硫黄を必要とする。利用されている硫黄は、ほとんどが短期的なサイクルで循環している硫黄分であるが、堆積物中の金属硫化物が利用されなければ、硫黄の循環は滞る。したがって、硫化鉱石中の硫黄化合物の酸化に関与する微生物の生理、生態およびその酸化機構を知ることは、基礎生物化学的にも地球科学的にも重要である。

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二価鉄および還元型硫黄化合物を酸化して得られるエネルギーを利用して生育する、グラム陰性の独立栄養細菌である。この細菌は、硫黄化合物の変換に重要な役割を演じているだけでなく、低品位の硫化鉱石からの金属の回収技術であるバクテリアリーチングで利用されている微生物である。*A. ferrooxidans* の鉄酸化経路は、生理・生化学的および分子生物学的に解明されているが、硫黄の代謝については多くの研究報告があるにも関わらず、不明な点が多い。硫化鉱石のバクテリアリーチングでは、鉱石中の硫黄成分がチオ硫酸に変換されて代謝されると考えられているが、本菌のチオ硫酸代謝機構は明らかにされていない。本研究では、バクテリアリーチングの技術向上への新たな知見を得るため、チオ硫酸デヒドロゲナーゼ(Tsd)の解析を行うとともに、各種還元型硫黄化合物の代謝に関与する酵素遺伝子の発現制御機構の解析を行った。

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、本酵素は、活性発現に硫酸イオン要求性を示し、最適 pH は、2.5 と 4.0 であった。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ず、*tsd* 遺伝子が硫黄化合物存在下で特異的に発現することが示された。可溶性画分から精製された酵素の最適 pH と最適温度はそれぞれ、2.5 と 70°C であり、SDS-PAGE 解析の結果、分子量は 25 kDa であった。この分子量 25 kDa のタンパク質の 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 検索を行った結果、タンパク質をコードする遺伝子は、硫黄代謝に関連した遺伝子とクラスターを形成していた。相同性解析の結果、いくつかの硫黄酸化細菌や好酸性細菌などに Tsd のホモログ遺伝子が存在することが分かったが、そのほとんどが近傍に硫酸結合タンパク質(Spb)のホモログ遺伝子を持つことが明らかとなった。従って、Tsd は Spb と結合して存在し、Spb が酵素活性に硫酸イオン要求性を付与することが示唆された。

A. ferrooxidans は、鉄で生育すると硫黄代謝酵素遺伝子の発現が抑制される。この遺伝子発現の制御機構は全く解析されていない。ゲノム配列中の硫化水素：キノン酸化還元酵素 (*sqr*) 遺伝子近傍の領域を分析したところ、*sqr* 遺伝子上流に DNA 結合領域を持つタンパク質をコードする *scpB* 遺伝子が存在した。RT-PCR の結果、*scpB* 遺伝子は、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検出されなかったことから、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。そこで ScpB が制御因子として、硫黄代謝に関与する酵素遺伝子のプロモーター領域へ結合するかどうかを検討した。鉄や硫黄の酸化に関与する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確認したところ、*sqr* 遺伝子やテトラチオン酸加水分解酵素をコードする *thh* 遺伝子、鉄の酸化に関与する cytochrome *c* をコードする *cyc2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA と結合したため、プロモーター領域と結合する能力はあるが、非特異的であることが示唆された。

以上、本研究では、*A. ferrooxidans* のチオ硫酸デヒドロゲナーゼについてその性質を明らかにし、その遺伝子の解析によって、これまでとは異なるチオ硫酸代謝系の存在を明らかにした。

論文審査結果の要旨

本研究は、硫黄化合物の変換に重要な役割を演じているだけでなく、低品位の硫化鉱石からの金属の回収技術であるバクテリアリーチングで利用されている微生物である *A. ferrooxidans* のチオ硫酸代謝系に関する研究である。この菌は、鉄酸化細菌であるが硫黄も代謝できる。バクテリアリーチングでは、鉄の酸化と硫黄の酸化の両方が必要であり、その効率を向上させるためには、鉄の酸化機構に加えて、硫黄の代謝機構の解明が重要な課題である。硫化鉱石のバクテリアリーチングでは、鉱石中の硫黄成分がチオ硫酸に変換されて代謝されると考えられているが、本菌のチオ硫酸代謝機構は明らかにされていない。そこで、本研究では、チオ硫酸代謝の主要な酵素であるチオ硫酸デヒドロゲナーゼ(Tsd)の解析を行うとともに、各種還元型硫黄化合物の代謝に関与する酵素遺伝子の発現制御機構の解析を行っている。

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、本酵素は、活性発現に硫酸イオンを要求した。活性は、テトラチオン酸あるいは元素硫黄で生育した細胞で検出されたが、二価鉄で生育した細胞には検出されず、*tsd* 遺伝子が硫黄化合物存在下で特異的に発現することを明らかにした。可溶性画分から精製された酵素の生化学的性質を解析し、その特徴を明らかにし、また、N 末端アミノ酸配列から同定した遺伝子の解析によって、遺伝子が他の硫黄代謝に関連した遺伝子とクラスターを形成していることを明らかにした。相同性解析の結果、いくつかの硫黄酸化細菌や好酸性細菌などに Tsd のホモログ遺伝子が存在することを初めて明らかにし、それらの微生物が *A. ferrooxidans* と同様に溶質結合タンパク質(Spb)のホモログ遺伝子を持つことも明らかにしている。従って、Tsd は Spb と結合して存在し、Spb が酵素活性に硫酸イオン要求性を付与することを提案した。

A. ferrooxidans は、鉄で生育すると硫黄代謝酵素遺伝子の発現が抑制される。この遺伝子発現の制御機構は全く解析されていない。そこで、ゲノム配列中の硫化水素：キノン酸化還元酵素 (*sqr*) 遺伝子近傍の領域に存在する DNA 結合領域を持つタンパク質 (ScpB) の機能解を解析した。RT-PCR の結果、*scpB* 遺伝子は、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検出されなかったことから、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。そこで、鉄や硫黄の酸化に関与する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、プロモーター領域と結合することを確認している。

以上、本研究で得られた成果は、微生物によるチオ硫酸代謝の研究に大きく貢献するとともに、本菌のバクテリアリーチング効率の向上に関する研究にも寄与するものである。従って、学位審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位に値するものであると判定した。