

氏名	根岸 敦規
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4120号
学位授与の日付	平成18年 3月24日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文の題目	Studies on the Utilization and Growth Regulation of Iron- and Sulfur-Oxidizing Chemolithoautotroph <i>A. ferrooxidans</i> and <i>A. thiooxidans</i> (鉄酸化及び硫黄酸化化学合成独立栄養細菌 <i>A. ferrooxidans</i> 及び <i>A. thiooxidans</i> の利用と増殖制御に関する研究)
論文審査委員	教授 杉尾 剛 教授 笹川 英夫 教授 上村 一雄

学位論文内容の要旨

Acidithiobacillus 属細菌の主要メンバーとして、硫黄化合物のみを酸化できる硫黄細菌 *A. thiooxidans* と2価鉄と硫黄化合物の両方を酸化できる鉄細菌 *A. ferrooxidans* が知られている。両細菌はバイオリーチングや地球の無機物循環反応に重要な役割を果たしているとともに、硫黄の酸化に伴い大量の硫酸を生成することから河川の酸性化、コンクリートの腐食劣化など人間生活に害作用を及ぼすことも知られている。本研究は、*Acidithiobacillus* 属細菌の有効利用と増殖制御の両方を目指している。

A. ferrooxidans の有効利用に関する研究として、水銀耐性株 SUG-2株の新規水銀還元酵素、即ち「2価鉄依存性の水銀還元酵素」の水銀汚染土壌のバイオレメディエーションへの利用を検討した。回転ドラムからなる反応槽と気化した金属水銀をトラップできるシステムを合わせ持つ水銀回収装置を考案した。水銀汚染土壌(1000 mg Hg/10 kg)に2価鉄、無機塩、SUG-2株の洗浄細胞(104 mg)を添加し、30℃で4週間処理する事によって700 mgのHgを気化・回収する事ができた。SUG-2株より誘導した更に水銀耐性能の高いMON-1株から鉄酸化酵素の主要成分であるcytochrome *c* oxidaseを精製し、精製酵素がTMPDを電子供与体として水銀を気化できることを明らかにした。この結果は、末端酸化酵素のみと知られていた cyt. *c* oxidaseが分子状酸素以外にHg²⁺をも還元でき、呼吸以外の機能、即ち、水銀耐性に関与していることを示している。

硫酸を生成する *A. thiooxidans* 及び *A. ferrooxidans* の増殖制御に関する研究として、コンクリート腐食に対する防菌剤の開発、コンクリート腐食の分析法、並びに防菌剤の増殖阻害機構について検討した。両菌は、ともにpH4以下の酸性でタングステン(W)を強く結合し増殖が強く阻害された。一方、金属ニッケル(Ni)は中性で強い阻害効果があった。鉄細菌では、cyt. *c* oxidaseに多量のWが結合することによって増殖阻害が起こると推定された。一方、本菌細胞膜内に、Wを特異的に結合できるW結合タンパク質が存在することを初めて明らかにした。本結合タンパク質は12 kDaおよび20.7 kDaの2種類のsubunitから構成されていた。硫黄細菌の硫黄酸化に関与する初発酵素である sulfur dioxygenaseのsubunit構造に関する報告例はない。NB1-3株の本酵素は19.5 kDaのmonomer酵素であること、また、本精製酵素が1.0 μMのNiで完全阻害されることを初めて示した。硫黄細菌の末端酸化酵素はaa₃型のubiquinol oxidaseであること、また57, 34, 23 kDaの3種類のsubunitから構成されていることを特定した。本精製酵素はNi及びWにより強く阻害された。以上、防菌剤として利用されている両金属の増殖阻害機構を精製酵素を用い明確に示すことができた。コンクリートの腐食速度の正確な測定法を開発するとともに、28 ppmの硫化水素が存在する污水处理施設マンホール内で2年間の暴露試験を行うことによって、0.075%のCaWO₄と0.075%のNiを添加したコンクリートが0.075%のNiのみを添加したものより腐食速度が顕著に遅いことを明らかにした。なお、WとNiの両方を混入させた防菌剤入りコンクリートは、現在、年間1万トン生産・利用されている。

論文審査結果の要旨

硫黄細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* 及び鉄細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* はバクテリアリーチングの有用菌であるとともに、硫黄の酸化に伴い強酸である硫酸を生成することからコンクリートの腐食劣化、河川の酸性化など人間生活に害作用を及ぼす有害菌であることも知られている。本研究は、*Acidithiobacillus* 属細菌の有効利用と増殖制御の両方を目指して行われた。

有効利用に関する研究として、水銀耐性鉄細菌が保有する2価鉄依存性水銀還元酵素のバイオレメディエーションへの利用を試み、1 gの水銀を含む10 kgの水銀汚染土壌を洗浄菌体と30℃で4週間処理する事により70%の水銀を気化・回収する事に成功した。耐性菌より鉄酸化酵素系の主要成分であるcytochrome *c* oxidase (cyt. *c* oxidase) を精製し、本酵素の特異的基質であるTMPDにより Hg^{2+} が Hg^0 に還元・気化されることを示した。これは、末端酸化酵素として知られているcyt. *c* oxidaseが2種類の機能を持つ多機能性酵素であることを示す最初の知見である。増殖制御に関する研究として、これまで使用されていたニッケル (Ni) に加えてタングステン (W) がコンクリート腐食の防菌剤として優れていることを新たに見出し、その阻害機構を明らかにした。硫黄及び鉄細菌はpH4 以下の酸性でWを強く結合し増殖が強く阻害されるが中性では結合されず阻害されないこと、一方、Niは中性で強く結合し阻害効果が高いこと、鉄細菌ではcyt. *c* oxidase にWが結合することによって増殖阻害が起こること等を明らかにした。硫黄細菌の硫黄酸化に関与する初発酵素sulfur dioxygenaseを初めて精製し、モノマ酵素であること、1 μM のNiで活性が完全阻害されることを示した。硫黄細菌の末端酸化酵素を精製し a_{a3} 型のubiquinol oxidaseであること、Ni及びWにより強く阻害されることを明らかにした。コンクリートブロックを28 ppmの硫化水素が存在する汚水処理施設マンホール内で2年間暴露し、 CaWO_4 とNiを添加したブロックがNiのみを添加したものより腐食速度が顕著に遅いことを明らかにし、WとNiの両方を混入させることが高い防菌効果を生むために必須であることを示した。

本研究は、鉄細菌を水銀のバイオレメディエーションに利用する上での基礎を作るとともにcyt. *c* oxidase が関与する新規水銀還元機構の存在を明確なものとした。また、コンクリート腐食に対する防菌剤としてのタングステンの有効性を、2種類の硫黄酸化酵素を世界に先駆け精製単離し阻害部位を決定することにより、またタングステン入りコンクリートブロックを浄化処理槽内に2年間暴露することにより確証した。本論文は、鉄酸化細菌及び硫黄酸化細菌の基礎及び応用研究の発展に大きく寄与するものであり博士（農学）の学位に十分値すると判定した。