

氏名	NG KIM YONG		
授与した学位	博	士	
専攻分野の名称	学	術	
学位授与番号	博甲第 2066 号		
学位授与の日付	平成 12 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文の題目	Studies on the enzymes involved in the reduction of inorganic sulfur compounds in <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> の無機硫黄化合物還元酵素に関する研究)		
論文審査委員	教授 杉尾 剛	教授 白石友紀	教授 稲葉昭次

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* は、2 価鉄あるいは還元型無機硫黄化合物を唯一のエネルギー源、炭酸ガスを唯一の炭素源にして増殖する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。従来、鉄酸化細菌に関する研究は、2 価鉄あるいは還元型無機硫黄化合物に対する酸化酵素の解析に基づくエネルギー生成機構の解明に対して主として行われて来た。一方、酸化ではなく無機硫黄化合物の還元に関与する酵素に関しては極わずかな研究例があるのみであった。本研究は、*T. ferrooxidans* が元素硫黄(S^0)を還元して硫化水素(H_2S)を菌体外へ放出する現象を新たに見つけるとともに、これが新規酵素 sulfur reductase によって行われることを初めて示したものである。

T. ferrooxidans の洗浄細胞が、嫌気条件下、 S^0 を酵素的に還元して H_2S を生成する活性を 2 種類持つことを初めて明らかにし、一方を pH1.5-硫化水素生成系 (pH1.5- S^0 Rase)、他方を pH 7.5-硫化水素生成系 (pH7.5- S^0 Rase) と命名した。検討した鉄酸化細菌菌株のうち両活性がともに高かった NASF-1 株を用いて硫化水素生成の機構を検討した。電子受容体の特異性に関しては、pH7.5- S^0 Rase が S^0 のみを用いたのに対して、pH1.5- S^0 Rase は S^0 とテトラチオン酸($S_4O_6^{2-}$)の両方を用いることができた。各種阻害剤を用いた実験より、両硫化水素生成系は異なる酵素によって触媒されていることを明らかにした。アルゴンガス嫌気条件下 $S_4O_6^{2-}$ を電子受容体にする H_2S 生成反応のストイキオメトリーを検討し、1.0 mM の $S_4O_6^{2-}$ の減少に伴って 0.6 mM のトリチオン酸と 0.8 mM の H_2S が生成することを明らかにした。pH1.5- S^0 Rase は、 S^0 を電子受容体にできること、上記定量関係、及び阻害剤に対する実験結果を総合して、 $S_4O_6^{2-}$ の分解は、下記の 2 式に従って行われていると結論した。 $S_4O_6^{2-}$ は、テトラチオン酸分解酵素によってトリチオン酸と S^0 に分解される (1 式)。



次いで、中間体として生成した S^0 が、電子供与体 (AH_2) によって還元され、 H_2S を生成する (2 式) は、pH1.5- S^0 Rase によって触媒される。pH7.5- S^0 Rase の精製と性質の検討を行った。粗酵素液を硫酸分画後、Q-Sepharose FF、Phenyl-Toyopearl 650 ML、Blue Sepharose FF カラムクロマトグラフィーを行うことによって本酵素を 69 倍に精製した。精製酵素の比活性は 38 U/mg であった。Blue Sepharose FF カラムクロマトグラフィー後の標品をゲルカットして得られた標品は、硫化水素の生産活性を失っていたが、未変性電気泳動で 1 本のバンドを示し、SDS 電気泳動の結果より 54kDa、36kDa、35kDa からなるヘテロトリマー酵素であることを明らかにした。未変性酵素の分子量は 120kDa であった。

以上、応用微生物学的にも非常に重要な化学合成独立栄養細菌 *T. ferrooxidans* に、元素硫黄及びテトラチオン酸を還元して硫化水素を生成する硫黄還元酵素が 2 種類存在することを初めて明らかにした。テトラチオン酸からの硫化水素の生成メカニズムを明らかにするとともに、2 種類硫黄還元酵素のうちの 1 種類を単一に精製しその分子的な性質を明らかにした。

論文審査結果の要旨

鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* は、2 価鉄あるいは還元型無機硫黄化合物を唯一のエネルギー源、炭酸ガスを唯一の炭素源にして増殖する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。従来、鉄酸化細菌に関する研究は主として、2 価鉄あるいは還元型無機硫黄化合物に対する酸化酵素の解析に基づくエネルギー生成機構の解明に対して行われてきた。一方、酸化ではなく無機硫黄化合物の還元に関与する酵素に関しては極わずかな研究例があるのみであった。本研究は、*T. ferrooxidans* が元素硫黄(S^0)を還元して硫化水素(H_2S)を生成する現象を新たに見つけるとともに、これが新規酵素 sulfur reductase によって行われることを初めて示したものである。

T. ferrooxidans の洗浄細胞が、嫌気条件下、 S^0 を酵素的に還元して H_2S を生成する活性を 2 種類持っていることを初めて明らかにし、一方を pH1.5-硫化水素生成系 (pH1.5- S^0 Rase)、他方を pH 7.5-硫化水素生成系 (pH7.5- S^0 Rase) と命名した。検討した鉄酸化細菌菌株のうち両活性がともに高かった NASF-1 株を用いて硫化水素生成の機構を検討し、電子受容体の特異性に関しては、pH7.5- S^0 Rase が S^0 のみを用いたのに対して、pH1.5- S^0 Rase は S^0 とテトラチオン酸($S_4O_6^{2-}$)の両方を用いることを示した。各種阻害剤を用いた実験より、両硫化水素生成系は異なる酵素によって触媒されることを明らかにした。アルゴン及び水素ガス嫌気条件下 $S_4O_6^{2-}$ を電子受容体にする H_2S 生成反応の定量的関係を明らかにし、 $S_4O_6^{2-}$ の分解は、下記の 2 式に従って行われることを決定した。即ち、 $S_4O_6^{2-}$ は、テトラチオン酸分解酵素によってトリチオン酸と S^0 に分解される (1 式)。次いで、 $S_4O_6^{2-} \longrightarrow S_3O_6^{2-} + S^0 \cdots (1 \text{ 式})$ $S^0 + AH_2 \longrightarrow H_2S + A \cdots (2 \text{ 式})$

中間体として生成した S^0 が、電子供与体 (AH_2) によって還元され、 H_2S を生成する (2 式)。2 式は、pH1.5- S^0 Rase によって触媒される。pH7.5- S^0 Rase の精製と性質の検討を行った。本酵素は、NAD(P)H を電子供与体にし硫化水素の生成活性とともにヒドロゲナーゼ活性を持っていた。粗酵素液を硫酸分画後、各種カラムクロマトグラフィーを行うことによって本酵素を 69 倍に精製した。最終標品をゲルカットして得られた標品は、硫化水素の生産活性を失っていたが、未変性酵素の電気泳動は 1 本のバンドを示し、SDS 電気泳動の結果より 54kDa (α)、36kDa (β)、35kDa (γ) からなるヘテロトリマー酵素 (分子量は 120kDa) であることを明らかにした。本酵素の N 末端アミノ酸配列を決定し、データベースより、各サブユニットと既知酵素との相同性を明らかにした。

以上、応用微生物学的にも非常に重要な化学合成独立栄養細菌 *T. ferrooxidans* に、元素硫黄及びテトラチオン酸を還元して硫化水素を生成する硫黄還元酵素が 2 種類存在することを初めて明らかにした。従来全く報告のなかったテトラチオン酸からの硫化水素の生成反応のメカニズムを明らかにするとともに、2 種類の硫黄還元酵素のうちの 1 種類を単一に精製し、分子量、サブユニット構造、N 末端アミノ酸配列等、分子的な性質を明らかにした。本論文は、鉄酸化細菌の生理的、応用的研究に新しい展開をもたらすものであり、博士 (学術) の学位に十分値するものと判定した。