

〔醸酵工学 第59巻 第5号 415—420. 1981〕

Thiobacillus ferrooxidans のエネルギー源選択性と 元素硫黄代謝機構

木野 邦器*・杉本 信幸・宇佐美昭次

早稲田大学理工学部応用化学科

Preferential utilization of energy sources and the elemental sulfur metabolism in *Thiobacillus ferrooxidans*. KINO, K., N. SUGIMOTO, and S. USAMI (Department of Applied Chemistry, Waseda University, Okubo 3-4-1, Shinjuku, Tokyo 160) *Hakkokogaku* 59 : 415—420. 1981.

The growth and the activities of energy-acquiring enzymes of *Thiobacillus ferrooxidans*, one of the more common iron-oxidizing bacteria having the capacity to oxidize elemental sulfur as well as ferrous iron, were investigated with mixed-substrate medium. Highlights of this study are as follows :

1. Addition of elemental sulfur resulted in delays of the iron oxidation as well as the cell growth.
2. On the mixed-substrate medium ferrous iron was preferentially utilized.
3. Elemental sulfur was well oxidized after complete oxidation of the ferrous iron, but a gradual oxidation of sulfur had occurred during the iron oxidation.
4. Ferrous iron might induce the synthesis of iron oxidase and repress thiosulfate-oxidizing enzyme while it didn't inhibit rhodanese or AMP-independent sulfite oxidase.
5. Diauxic growth on the mixed-substrate medium might be caused by the conversion of energy metabolism.
6. A main pathway was proposed in the elemental sulfur metabolism of *T. ferrooxidans* : $S^0 \longrightarrow SO_3^{2-} \longrightarrow SO_4^{2-}$

鉄酸化細菌として知られている *Thiobacillus ferrooxidans* は、エネルギー源として第一鉄のほか元素硫黄や硫黄化合物をも利用し生育することができ、近年各国で工業化されているバクテリア・リーチングは、この微生物のエネルギー誘導機構を巧みに利用したものである。一般に、リーチングの対象となる金属の硫化鉱石には黄鉄鉱(FeS_2)が含まれており、これが *T. ferrooxidans* により酸化されて浸出能力を持つ硫酸第二鉄となることから、リーチングにとって大きな因子となっている。したがって、第一鉄および元素硫黄を含む混合エネルギー源培地での *T. ferrooxidans* の生育を、エネルギー要求の面から検討することは、本菌のエネルギー獲得形式を知る上に必要であり、バ

クテリア・リーチングを効果的に行うためにも重要な知見を与えると思われる。

そこで著者らは、混合エネルギー源培地での *T. ferrooxidans* の生育を調べ、更に酵素レベルにおける検討を加え考察を行った。その結果 diauxic growth を確認し、 Fe^{2+} によって iron oxidase 生成が促進され、thiosulfate-oxidizing enzyme 生成は抑えられるという知見を得た。さらに、*T. ferrooxidans* による元素硫黄代謝の主経路が推定されたので報告する。

実験方法

使用菌株 本研究に用いた鉄酸化細菌 WU-66B 株は秋田県同和小坂鉱山排水より著者らの研究室で分離したもので、*T. ferrooxidans* に属する。¹⁾

* 現在、協和醸酵工業株式会社技術研究所

培養方法 前報²⁾ 記載の 9 K および S° 培地をそれぞれ鉄および硫黄を含む基本培地として培養を行った。ただし、S° 培地における pH は、9 K 培地と同様に 2 N-H₂SO₄ により pH 2.5 に調整した。

分析法 第一鉄酸化割合は過マンガン酸カリウム滴定法により、培養液中の硫酸根量は Fritz ら³⁾ の方法を用いて定量した。粗酵素抽出液の調製および活性測定は前報²⁾ に従った。iron oxidase は Fe²⁺ を基質として α , α' -ジピリジル法により、また rhodanese はチオ硫酸およびシアンを基質とした時に生成するチオシアンを比色定量して活性を決定した。他の酵素活性は、それぞれの基質に対するフェリシアンの還元を 440 nm における吸光で測定して求めた。

実験結果および考察

元素硫黄による *T. ferrooxidans* WU-66B の生育 鉄および元素硫黄を酸化可能な鉄酸化細菌は、第一鉄をエネルギー源として生育した後では、馴養を行わないと有効に元素硫黄を資化し生育することができないと言われている。しかし *T. ferrooxidans* WU-66B は、S° 培地で 4.0 としていた pH²⁾ を、9 K 培地と同様 2 N-H₂SO₄ により pH 2.5 に調整すると、Fig. 1 に示すように良好な生育を示した。本菌では鉄よりも元素硫黄をエネルギー源とした方が菌体収量が良いことが確かめられた。²⁾

混合エネルギー源培地における *T. ferrooxidans*

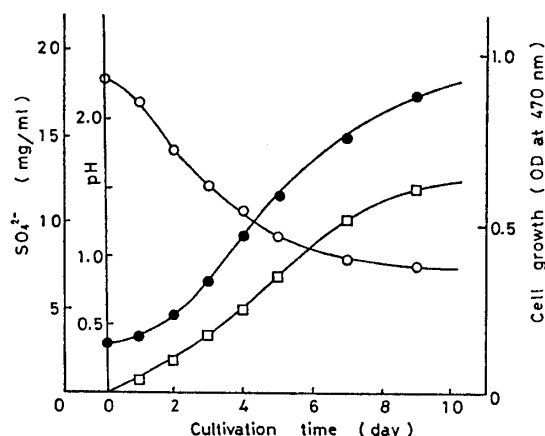


Fig. 1. Growth of *T. ferrooxidans* WU-66B on elemental sulfur medium (S° medium). The initial pH of the medium was adjusted to 2.5 with 2N-H₂SO₄. ○, pH changes; ●, amount of SO₄²⁻; □, cell growth.

WU-66B の生育 9 K 培地に元素硫黄を 5, 10, 15 g/l 添加した混合エネルギー源培地における WU-66B の生育の経時変化を追った (Fig. 2). 混合エネルギー源存在下では、元素硫黄の酸化が鉄酸化とともに徐々に起こるものの、WU-66B の生育は初期においては鉄酸化によって得られるエネルギーに大部分依存していると考えられる。

元素硫黄添加により、pH 変化、鉄酸化および菌生

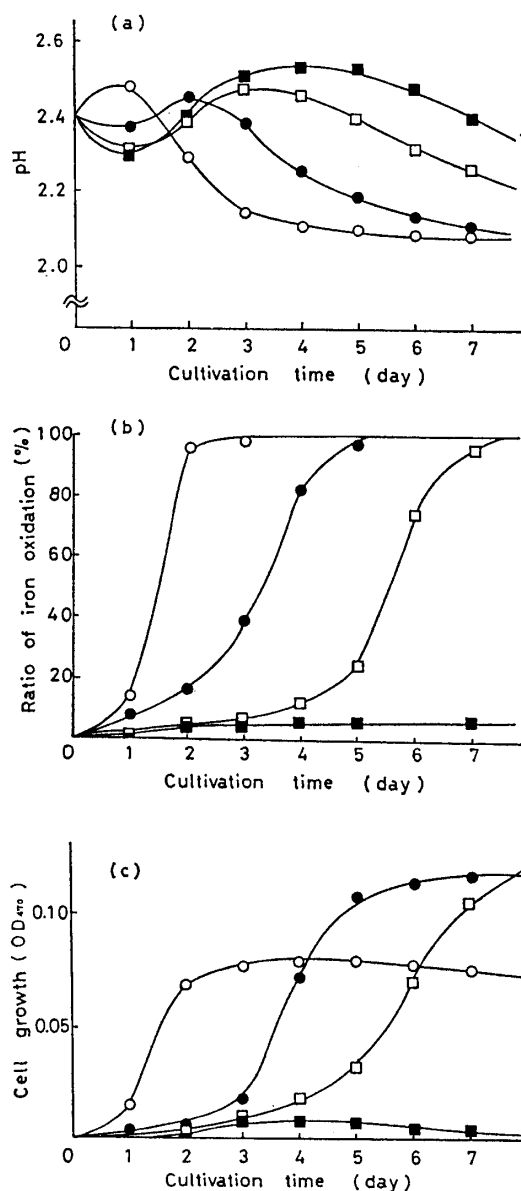


Fig. 2. Effect of elemental sulfur on the growth of *T. ferrooxidans* WU-66B growing on 9 K medium. (a) pH changes, (b) oxidation of ferrous iron, (c) cell growth. ○, 0 g; ●, 5 g; □, 10 g; ■, 15 g of elemental sulfur per 1 l-medium were added.

育はいずれも遅れ、その遅延の程度は元素硫黄の添加量に応じ大きくなった。培地 pH (Fig. 2a) はいずれの場合も一度上昇した後下降した。この pH 上昇は、ATP 産生に結びついた菌体内への H^+ 取り込みによるものであらうと考えられており、⁴⁾ この上昇時期は生育の誘導期に相当しているのがわかる。また pH 低下は生成した硫酸塩に由来するものと思われ、その時期は対数増殖期に相当し、特に培地 pH が初発 pH を下まわる頃より鉄酸化および菌体量の著しい増加が見られた。さらに、鉄酸化 (Fig. 2b) の遅れが大きくなるほど生育 (Fig. 2c) の遅れが大きくなっており、また鉄酸化の増大とともに菌体量も増大し鉄の完全酸化によって、生育は停滞しているの、WU-66B の生育は鉄酸化のエネルギーに依存していると考えられる。しかし、Fig. 2c で明らかなように、添加硫黄量が多いほど、定常期における菌体総量が多くなり、さらに硫黄無添加で鉄が完全酸化された時と同量の菌体量を示す時期の鉄酸化割合をみると、5 g/l 添加で約80%、10 g/l 添加では約70%の鉄酸化しか起きていない。これは明らかに、生育が鉄の酸化によるエネルギーだけに依存するのではなく、鉄の完全酸化以前に元素硫黄の酸化も徐々ながら起こり、生育に関与していることを示している。

次に、9 K 培地に元素硫黄を 5 g/l 添加した混合エネルギー源培地における WU-66B の生育を、鉄酸化が完全に行われたあとに注目して追跡した (Fig. 3)。WU-66B は鉄の完全酸化後元素硫黄を資化し、

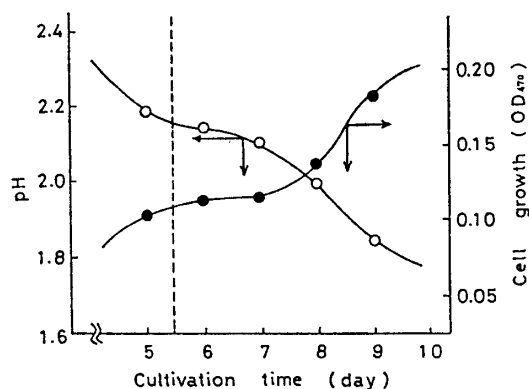


Fig. 3. Growth of *T. ferrooxidans* WU-66B on 9 K medium containing elemental sulfur (5 g per 1 l-medium). The dotted line indicates the time when ferrous iron was completely oxidized and only elemental sulfur remained as the energy source for growth. ○, pH changes; ●, cell growth.

diauxic growth を示した。

鉄の完全酸化後も増殖は2段目の誘導期の後、培養8日目あたりから再び認められた。pH 変化も、同時期に誘導期に対応する曲線が得られた。また2.0以下のpH低下は、9 K 培地生育では認められないもので (Fig. 2a)、明らかに硫黄酸化による硫酸生成が関与しているものと思われる。なお、元素硫黄を10 g/l 添加した培地においても diauxic growth が確認された。Unz ら⁵⁾ は混合エネルギー源培地での *T. ferrooxidans* の生育を調べて、生育曲線に誘導期が2つあることから、鉄がまず選択的に酸化されてから硫黄が酸化されると報告している。Beck⁶⁾ もワールブルグマノメーターを用いて同様の結果を得ており、著者らの結果と一致する。

エネルギー獲得系についての酵素レベルでの検討

混合エネルギー源培地における生育で認められたような diauxic growth は、異化物質抑制 (catabolite repression) でみられるように、硫黄酸化酵素生産の Fe^{2+} による抑制が起こっていることを示唆している。そこで、エネルギー獲得系についての酵素レベルでの検討を加えた。

9 K, S^0 および混合エネルギー源培地で生育した WU-66B 細胞のエネルギー獲得系酵素活性を測定した結果を Table 1 に示す。

iron oxidase 活性は、 S^0 培地に比べ9 K 培地生育細胞の方が高く、supernatant 画分での比較では約500倍も活性が高い。これは元素硫黄培地で iron oxidase 生産が抑えられているためと考えられ、事実 S^0 生育菌を9 K 培地へ接種しても鉄酸化速度が低く、数回の継代培養を行わないと、もとの鉄酸化能力は回復しないことを確認している。また混合エネルギー源培地生育細胞では、9 K 培地生育細胞よりも活性が低く、 Fe^{2+} が完全に酸化されたあとの培養6日目と12日目では、ほとんど変化は認められない。したがって、この培地では元素硫黄培地で抑えられていた iron oxidase の生成は添加 Fe^{2+} によって促進されるものと推定される。

また硫黄酸化酵素である rhodanese および AMP-independent sulfite oxidase の両活性は、鉄生育菌体においても確認され、その活性値も硫黄生育菌体との比較において大差がなかった。一方、thiosulfate-oxidizing enzyme 活性は9 K 培地生育細胞では検出されなかった。さらに混合エネルギー源培地生育細胞

Table 1. Comparison of enzyme activities in *T. ferrooxidans* WU-66B.

Growth medium	Culture time (day)	Fraction	Specific activities (nmol/min·mg-protein) of				
			Iron oxidase*	Rhodanese	Thiosulfate-oxidizing enzyme	AMP-independent sulfite oxidase	APS*** reductase
9 K	6	S	0.483	2.42	ND**	10.89	3.25
		P	4.773	25.72	ND**	247.72	ND**
S°	6	S	0.001	25.20	4.98	16.49	4.60
		P	0.502	30.40	21.30	219.30	ND**
9 K+S° (5 g/l)	6	S	0.324	3.32	ND**	12.49	3.28
		P	2.568	28.68	0.10	251.44	ND**
	12	S	0.350	12.48	2.58	15.45	3.53
		P	2.248	27.56	9.75	258.32	ND**

The cells were harvested by centrifugation ($11,000 \times g$, 10 min, -4°C). The resulting cell paste was washed twice with distilled water (pH 2.5 with $2\text{N-H}_2\text{SO}_4$), and WU-66B cells grown on 9 K medium were treated with ion exchanger IR-120 to remove Fe^{3+} and iron particles. The washed cells were resuspended in 5 mM phosphate buffer (pH 7.0), washed twice with the cold buffer, centrifuged ($11,000 \times g$, 10 min, -4°C), and resuspended to 10 ml with 5 mM phosphate buffer. The cells in the 10 ml suspension were disrupted with a 20 kHz sonic oscillator for 30 min in ice-water. After centrifugation at $24,000 \times g$ for 30 min, the supernatant fraction (fraction S) and the pellet fraction (fraction P) were used for the enzyme assay.

* Iron oxidase activity: ($\mu\text{mol oxidized Fe}^{2+}/\text{mg-protein} \cdot 15 \text{ min}$).

** ND: not detected.

*** APS: Adenosine-5'-phosphosulfate.

では、 Fe^{2+} の完全酸化後この酵素活性の上昇が認められた。これは、thiosulfate-oxidizing enzyme の生成が Fe^{2+} により抑えられていることを示すものである。

Table 2 は各酵素活性に及ぼす Fe^{2+} の影響を調べたもので、結果は Fe^{2+} 無添加の各酵素活性を100%とした時の相対活性で示した。Rhodanese では Fe^{2+} の影響はあまり認められなかったが、thiosulfate-oxidizing enzyme および AMP-independent sulfite oxidase ではむしろ活性化が認められた。

T. ferrooxidans WU-66B の元素硫黄代謝機構

元素硫黄の代謝機構に関する研究は多くの研究者によりなされており、⁷⁻⁹⁾ Fig. 4 に示すような代謝経路が考えられる。Silver ら¹⁰⁾ は *Ferrobacillus* (*Thiobacillus*) *ferrooxidans* を用いて、硫黄酸化酵素の1つである sulfur-oxidizing enzyme の活性に及ぼす Fe^{2+} の影響を調べており、 10^{-4}M で52.2%、 10^{-3}M で20.9%に活性が低下し、 Fe^{2+} がこの酵素を阻害したと報告している。この報告結果と、thiosulfate-oxidizing enzyme の生成が Fe^{2+} により抑えられ、

Table 2. Effect of Fe^{2+} on enzymes of *T. ferrooxidans* WU-66B grown on S° medium.

Enzyme	Relative activity (%) at Fe^{2+} concn. of			
	0M	10^{-5}M	10^{-4}M	10^{-3}M
Rhodanese	100	99.9	102.4	98.6
Thiosulfate-oxidizing enzyme	100	117.1	126.4	130.2
AMP-independent sulfite oxidase	100	164.0	177.3	186.5

Supernatant fraction was used for the enzyme assay. Assay mixtures were preincubated for 5 min with Fe^{2+} before the initiation of reaction, and enzyme activities were determined using a 10-min assay as described in *Materials and Methods*.

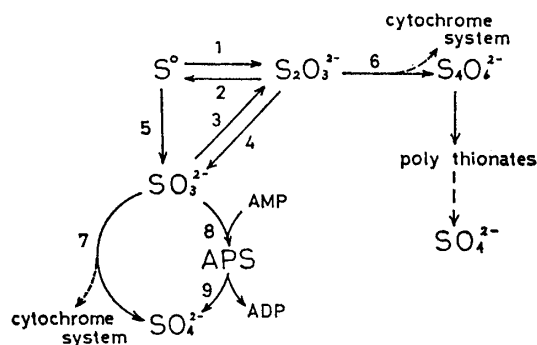
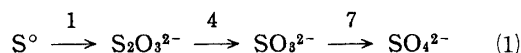


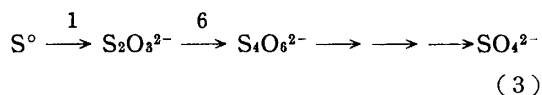
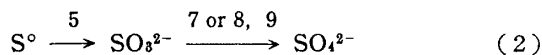
Fig. 4. Scheme for elemental sulfur metabolism.

1 and 3, nonenzymatic; 2 and 4, rhodanese; 5, sulfur-oxidizing enzyme; 6, thiosulfate-oxidizing enzyme; 7, AMP-independent sulfite oxidase; 8, adenosine-5'-phosphosulfate reductase; 9, ADP-sulfurylase.

その反面 rhodanese および AMP-independent sulfite oxidase は Fe^{2+} により阻害されないという実験結果から、混合エネルギー源培地での WU-66B の初期生育において、(1)の代謝経路だけが確実に維持されていることになる。



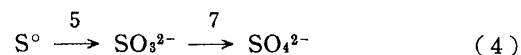
そのため鉄の完全酸化以前にも硫黄の酸化は行われており、鉄が完全酸化された時期の菌体量が硫黄無添加に比べ多かったのであろうと思われる。しかし thiosulfate への最初の反応が非酵素的に進行するため、この部分が律速段階となり、 Fe^{2+} が存在する初期の生育では、前述のように鉄酸化によって得られるエネルギーが生育に大きく関与するものと考えられる。鉄が完全に酸化されると、 Fe^{2+} による sulfur-oxidizing enzyme と thiosulfate-oxidizing enzyme への阻害および抑制が解除され、次の(2)、(3)の代謝経路により元素硫黄が本格的に酸化されたのであろうと思



われる。混合エネルギー源培地で認められた diauxic growth (Fig. 3) は、このような酵素系の阻害、抑制およびその解除に伴った代謝経路の転換によって起きた現象であろうと考えられる。

以上の事から、WU-66B の元素硫黄代謝経路において次のような考察が可能となる。まず adenosine-5'-phosphosulfate reductase 活性が AMP-independent sulfite oxidase の活性に比べ低いことか

ら (Table 1), 亜硫酸は主に AMP-independent sulfite oxidase によって酸化されて硫酸になるものと思われる。また元素硫黄から thiosulfate への反応が非酵素的に進行するため次の(4)の代謝経路が WU-66B における元素硫黄代謝の主経路であろうと思われる。



したがって thiosulfate から亜硫酸を経由して硫酸に酸化される(1)の経路 および thiosulfate から tetrathionate を経由する(3)の経路はいずれも第二の元素硫黄代謝経路であろうと思われる。

以上の実験結果は元素硫黄や第一鉄を含む単純な培地での生育を検討して得られたものであるが、自然界におけるこれら微生物の生活環境はもっと複雑なものである。したがって、著者らはバクテリア・リーチングへの直接的な応用を考えて、黄鉄鉱 (FeS_2) のような実際の鉱石に対する生育挙動を今後の課題としてさらに検討していくつもりである。

要 約

T. ferrooxidans WU-66B の混合エネルギー源培地での生育において、元素硫黄により鉄酸化および菌生育の遅れが認められた。またこの遅れがほぼ一致していることから、初期の生育は、鉄酸化によって獲得されたエネルギーに依存していると考えられた。さらに第一鉄が完全に酸化されてからも誘導期が存在し、硫黄酸化による2段階目の生育および pH 低下が起こる diauxic growth が認められた。鉄酸化が優先的に起こるものの、同時に硫黄の酸化も徐々ながら進行し菌生育に関与していた。この結果元素硫黄の酸化において、 Fe^{2+} に制御される経路と、されない経路の2種以上の代謝経路の存在が考えられた。

一方、エネルギー源を変えた培地での生育挙動とエネルギー獲得系酵素活性の比較により、 Fe^{2+} は iron oxidase の生成を促進し thiosulfate-oxidizing enzyme の生成を抑えると考えられた。硫黄代謝に関与する rhodanese および AMP-independent sulfite oxidase 活性は、鉄生育細胞においても確認され、元素硫黄培地生育細胞に比べ差は認められなかった。また両酵素とも Fe^{2+} により阻害されず、むしろ活性化の傾向が認められた。以上の実験結果と sulfur-oxidizing enzyme が Fe^{2+} により阻害されるという

報告とを合わせて、*T. ferrooxidans* の元素硫黄代謝において、亜硫酸から硫酸へ酸化される経路が主経路であり、thiosulfate から亜硫酸を経由する経路および thiosulfate から tetrathionate を経由して硫酸に酸化される経路は第2の経路であろうと推定された。

この報文の概要は昭和55年度日本醸酵工学会大会において発表した。

文 献

- 1) 宇佐美, 弓本: 水処理技術, **11**, 17 (1970).
- 2) 宇佐美, 木野, 黒田, 杉本: 醸酵工学, **58**, 123 (1980).
- 3) Fritz, J. S., Freeland, M. Q.: *Anal. Chem.*, **26**, 1593 (1954).
- 4) Apel, W. A., Dugan, P. R., Tuttle, J. H.: *J. Bacteriol.*, **142**, 295 (1980).
- 5) Unz, R. F., Lundgren, D. G.: *Soi. Sci.*, **92**, 302 (1961).
- 6) Beck, V. J.: *J. Bacteriol.*, **79**, 502 (1960).
- 7) Silver, M., Lundgren, D. G.: *Can. J. Biochem.*, **46**, 1215 (1968).
- 8) Lyric, R. M., Suzuki, I.: *Can. J. Biochem.*, **48**, 355 (1970).
- 9) Vestal, J. R., Lundgren, D. G.: *Can. J. Biochem.*, **49**, 1125 (1971).
- 10) Silver, M., Lundgren, D. G.: *Can. J. Biochem.*, **46**, 457 (1968).

(昭55. 11. 25 受付)