

総 合 論 文

鉄酸化細菌の利用に関する基礎的研究

(昭和63年度 日本醸酵工学会斎藤賞受賞)

杉 尾 剛

岡山大学農学部生物機能・遺伝資源開発学大講座

Fundamental studies on the use of the iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* —Monograph— TSUYOSHI SUGIO (*Division of Biological Function and Genetic Resources Science, Faculty of Agriculture, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700*) Hakkokogaku 67: 173-193. 1989.

The iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* inhabits drainages in acid mines and plays a crucial role in the bacterial leaching of sulfide ores. The value of *T. ferrooxidans* in bacterial leaching may be due to the ability of this bacterium to oxidize both ferrous ions and reduced sulfur compounds. To obtain more valuable strains for bacterial leaching, it is important to study the mechanism of iron- and sulfur-oxidation in *T. ferrooxidans*. The following findings are discussed in this paper.

- (1) A proteinous factor having a stimulating effect on iron-oxidizing activity was purified from *T. ferrooxidans* grown on iron-salts medium.
- (2) Novel sulfur- and sulfite-oxidizing enzymes, namely, sulfur : ferric ion oxidoreductase (SFORase) and sulfite : ferric ion oxidoreductase, were found in *T. ferrooxidans*, and the actual substrate during a solid sulfur oxidation by SFORase was identified.
- (3) A new route for sulfur oxidation other than that previously reported was proposed in *T. ferrooxidans*, in which elemental sulfur is oxidized by the cooperation of three enzymes, namely, SFORase, sulfite : ferric ion oxidoreductase, and iron oxidase, and Fe^{3+} and Fe^{2+} act as mediators of electrons among these enzymes.
- (4) Evidence that this new sulfur oxidation route is actually involved in aerobic sulfur oxidation by this bacterium is presented.
- (5) The mechanisms for the inhibition by Cu^{2+} and Co^{2+} of the sulfur metabolism of *T. ferrooxidans*, and the mechanisms for Mn^{4+} and Mo^{6+} reduction with elemental sulfur by *T. ferrooxidans* were clarified.

1. はじめに

Thiobacillus 属細菌は生理学的性質の異なった多様な微生物群を包含しているが、金属鉱石から有用金属イオンを溶出させる技術であるバクテリアリーチング¹⁻³⁾において重要な役割を担っているのは、好気性の絶対独立栄養細菌である硫黄酸化細菌 *T. thiooxidans* および鉄酸化細菌 *T. ferrooxidans* と考えられ

ている。後者は、還元型無機硫黄化合物ばかりでなく Fe^{2+} をも酸化でき、こうして生成される Fe^{3+} が各種金属イオンに対する強力な酸化剤である等の点から特に重要と考えられている。両細菌共に、空気中の炭酸ガスを固定して独立栄養的に生育でき、また金属イオンが可溶性で安定な酸性条件下に生息できるという特徴を持っている。

本研究は、工業的により有用な鉄酸化細菌を育種す

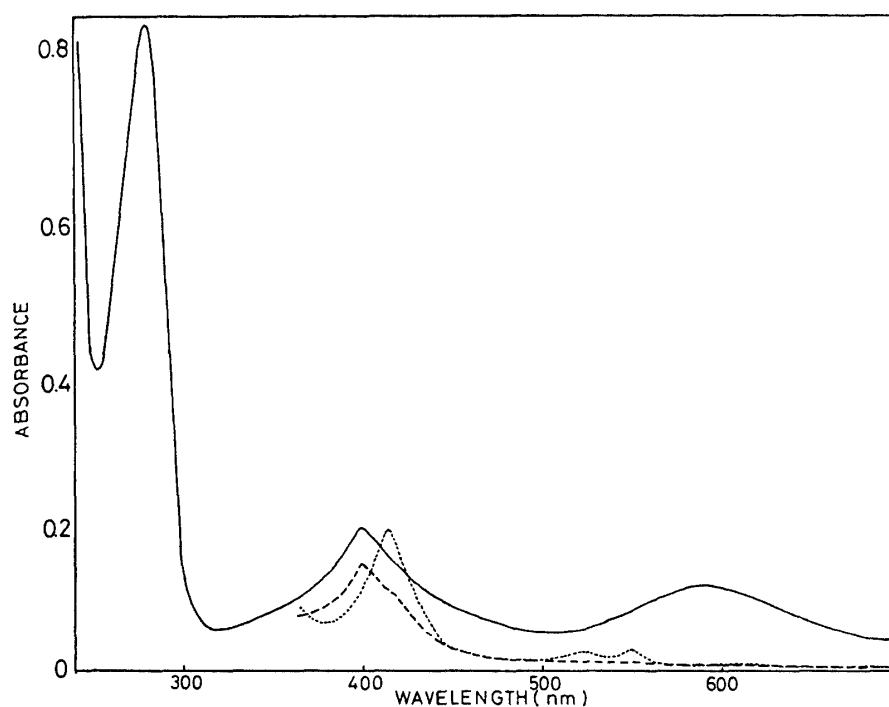


Fig. 1. Absorption spectra of stimulating factor from *T. ferrooxidans*.
—, oxidized form; ---, moderately reduced form; ···, reduced form

るための基礎研究として、*T. ferrooxidans* の鉄酸化酵素系、硫黄酸化酵素系、重金属イオンに対する阻害機構の解明を目的として行ったもので、*T. ferrooxidans* AP19-3 株中に Fe^{3+} を電子受容体にする新規な硫黄酸化酵素、亜硫酸酸化酵素の存在を明らかにし、従来報告されているものとは異なった新しい硫黄酸化経路の存在を提案したので、この点を中心に解説したい。

2. 鉄酸化酵素系⁴⁻⁷⁾

鉄酸化細菌において最も特徴的かつ重要な酵素は鉄酸化酵素および硫黄酸化酵素である。鉄酸化細菌のエネルギー源である Fe^{2+} は、pH 3 以下では分子状酸素で自動酸化されにくく安定に存在するため、本菌は一般に pH 3 以下の酸性環境下に生息している。 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ の標準酸化還元電位が +0.771V と $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ のそれに近いため、鉄酸化酵素は最も単純な電子伝達系から構成されていると考えられているが、完全な解明は現在に至ってもまだなされていない。本項では、鉄酸化酵素の重要な成分として、銅とc型チクロムを含むタンパク質 (stimulating factor と命名した) を電気泳動的に単一の標品として得、2~3の性質について検討したのでこれについて述べる。^{4,5)}

0.01 M 以下のリン酸カリウム緩衝液中で鉄酸化細菌洗浄細胞を超音波破碎して得られる膜画分は、大きく破碎された plasma membrane と考えられ強い鉄酸化活性を示した。⁴⁾ この膜画分をさらにイオン強度を上げた 0.1M リン酸カリウム緩衝液中で超音波破碎を

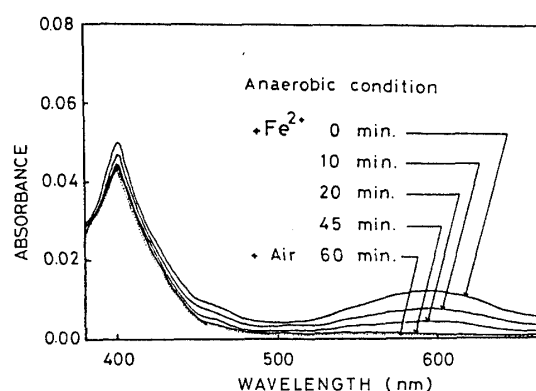


Fig. 2. Effects of ferrous ion on the spectrum of stimulating factor in 0.1 M β -alanine- SO_4^{2-} buffer, pH 3.5.

Absorption spectra of stimulating factor after addition of ferrous sulfate was traced under anaerobic conditions. Absorption spectrum of stimulating factor after 60 min aeration is shown with a broken line.

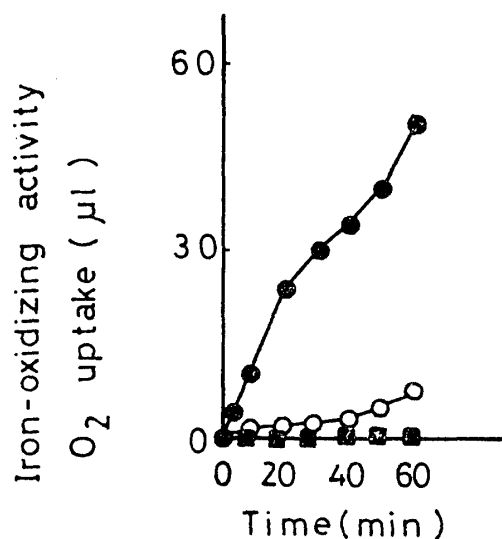


Fig. 3. Effects of stimulating factor on iron-oxidizing activity of plasma membrane.

Symbols: O, plasma membrane (4.2 mg of protein) which has a low level of iron-oxidizing activity; ●, purified stimulating factor (0.41 mg of protein) was added to plasma membrane (4.2 mg of protein); ■, purified stimulating factor (0.4 mg of protein).

行くと, plasma membrane はさらに細かく破碎され, 同時に鉄酸化活性がほとんど消失してしまった. この原因は膜面分より鉄酸化に必要な成分 (stimulating factor) が可溶化し除かれてしまったためである. stimulating factor を電気泳動的に均一な標品として精製し, 分子中に銅成分と *c* 型チトクロム (ハイドロサルファイトで強く還元することで存在が検出できる) を含んでいることを明らかにした (Fig. 1).⁵⁾ 分子中の銅成分は酸性条件下 Fe^{2+} によって還元されるが (597 nm のピークが消失することで確認できる), 一たん還元された銅は自動酸化されなかった (Fig. 2).

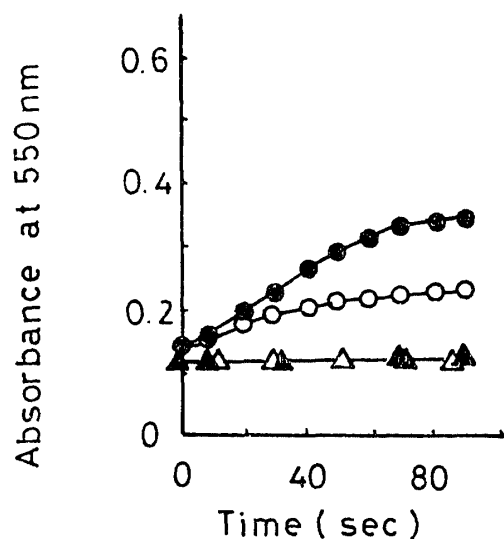


Fig. 4. Iron-cytochrome *c* reductase activity of purified stimulating factor.

The composition of the reaction mixture was as follows: acetate buffer, 150 μmol ; purified stimulating factor, 0.76 mg of protein; mammalian cytochrome *c* (Sigma type III), 10^{-5} M; ferrous sulfate, 10 μmol . The total volume was 3.0 ml. Symbols: O, chemical reaction at pH 5.5; ●, purified stimulating factor, at pH 5.5; Δ, chemical reaction at pH 5.0; ▲, stimulating factor at 5.0.

stimulating factor は鉄酸化活性を失った plasma membrane の鉄酸化活性を活性化する作用を持っていた (Fig. 3). また, pH 5.5 で Fe^{2+} による mammalian cytochrome *c* の還元を触媒する活性, すなわち iron-cytochrome *c* reductase 活性を示したが, pH 5.0 以下ではこの活性は認められなかった (Fig. 4).

Fe^{2+} -無機塩培地に 1 mM の Cu^{2+} を添加して培養すると, 洗浄細胞の鉄酸化活性は約1.56倍増大した.

Table 1. Summary of the purification procedure for stimulating factor from 9K medium grown cells.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	A_{597}/A_{280}	Yield (%)
El-P-S-P-S	442	1860	4.2	0.051	100
Heat treatment	273	2047	7.5	0.052	61.8
Precipitation at pH 4.5	50	1200	24.0	0.125	13.3
DEAE cellulose negative adsorption	36	1674	46.5	0.132	8.1

Table 2. Summary of the purification procedure for stimulating factor from 9K-CuSO₄ (10⁻³ M) medium grown cells.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	A_{597}/A_{280}	Yield (%)
El-P-S-P-S	371	3930	10.6	0.047	100
Heat treatment	259	3910	15.1	0.053	69.8
Precipitation at pH 4.5	89.5	2005	22.4	0.063	24.1
DEAE cellulose negative adsorption	74.2	2700	36.4	0.130	20.0

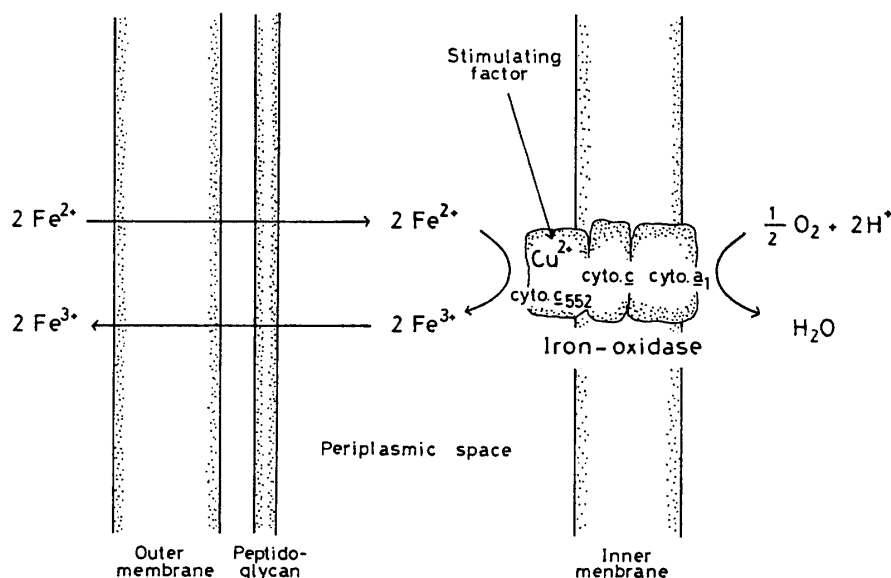
Cu²⁺ 添加または無添加の培地で培養した菌体から stimulating factor をそれぞれ精製し比活性および総活性を比較したところ、比活性はほぼ同じであったが、Cu²⁺ 添加培地で培養すると総活性が約1.61倍高くなることが観察され、鉄酸化活性の上昇と stimulating factor の含量とに相関があることが明らかになった (Table 1 および 2)。以上得られた結果および嫌気条件下、Fe²⁺ の添加によって plasma membrane に固く結合した c 型チトクロムが還元され、さらに好気条件下でチトクロムオキシダーゼによって再酸化されるという知見より,^{6,7)} 鉄酸化酵素系を現在 Fig. 5 に示すように考えている。

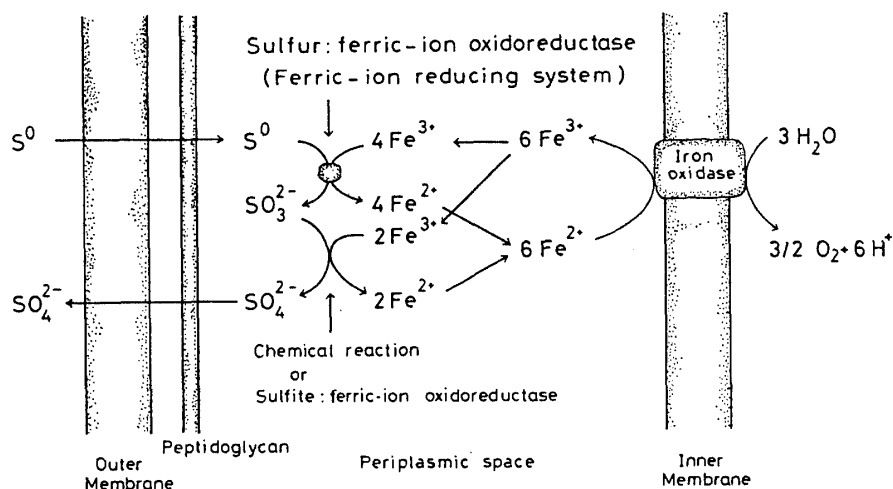
Cobely らも鉄酸化細菌から、ラスティシアニンと彼らが命名した銅タンパク質を単離し、Fe²⁺ の電子が、ラスティシアニン、c 型チトクロム、チトクロムオキシダーゼ、分子状酸素に順に伝達される鉄酸化酵

素系を提案している。^{8,9)} 最近山中らは、鉄酸化細菌から鉄酸化酵素を高度に精製し、これが Fe²⁺ の電子を酸性条件下でチトクロム c-552 へ直接伝達する活性を持っていることを報告した。¹⁰⁾ 近い将来、鉄酸化酵素系の解明が急速に進むことが期待される。

3. 硫黄酸化酵素系^{11,12)}

T. ferrooxidans は *T. thiooxidans* と共に低 pH という異常環境に生育する耐酸性微生物の代表の一つと考えられてきたが、その生育環境が高濃度の重金属イオン、特に鉄イオンに対しても異常環境である点に関しては余り注目されなかった。著者は、高濃度の鉄イオンの存在に対応するユニークな酸化還元酵素が *T. ferrooxidans* 中に存在するはずであるという観点から、*T. ferrooxidans* AP19-3 株の硫黄酸化酵素系の検討を行い、従来他の thiobacilli で報告されてきたものとは

Fig. 5. Proposed mechanism of iron oxidation of *T. ferrooxidans*.

Fig. 6. Proposed mechanism of sulfur oxidation of *T. ferrooxidans* AP19-3.

全く異なった、二種類の Fe^{3+} を電子受容体にする新規硫黄酸化酵素 (sulfur: ferric ion oxidoreductase および sulfite: ferric ion oxidoreductase) と iron oxidase とが鉄イオンで連結されサイクリックに回転する新しい硫黄酸化経路の存在を提案した (Fig. 6).^{11,12)}

T. ferrooxidans AP19-3 株からの sulfur: ferric ion oxidoreductase の精製と性質^{11,12)}

現在までに多くの研究者が、還元型無機硫黄化合物をエネルギー源にしての *T. ferrooxidans* の生育について¹³⁻¹⁵⁾、硫黄酸化機構について、¹⁶⁻²⁰⁾ そして硫黄酸化に関与する酵素²¹⁻²⁴⁾ について報告してきた。Suzuki は *T. thiooxidans* から sulfur dioxygenase を部分精製し、これが触媒量の還元型グルタチオン (GSH) の

存在下、元素硫黄を酸化して亜硫酸 (SO_3^{2-}) を生成することを示した。^{25,26)} sulfur dioxygenase が, *T. thioparus*,²⁷⁾ *T. novellus*,²⁸⁾ *T. ferrooxidans*²¹⁾ にも存在するとの報告から, *T. ferrooxidans* においても *T. thiooxidans* と同様の硫黄酸化経路 (Fig. 7) が存在し

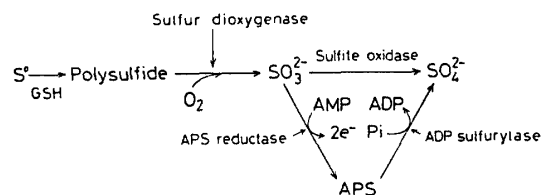
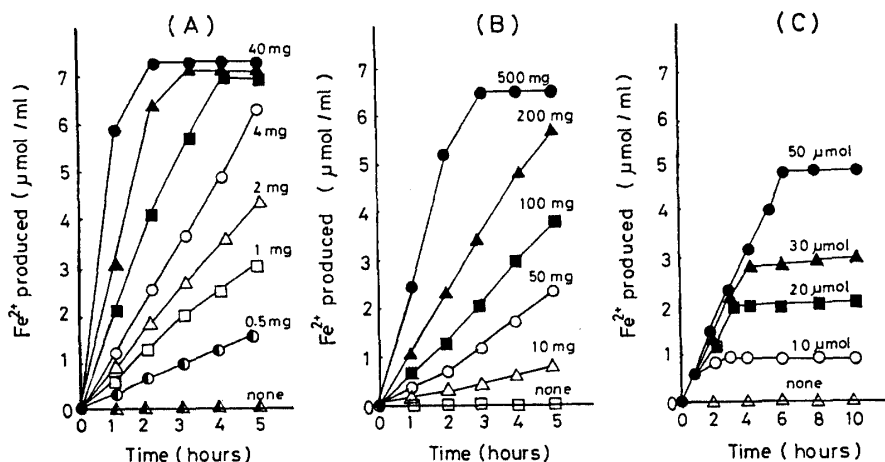
Fig. 7. Postulated scheme for sulfur oxidation of *Thiobacillus thiooxidans*.^{25,26,29,30)}

Fig. 8. Effects of the concentrations of cells, elemental sulfur, and ferric ion on the activity of the ferric ion-reducing system. The reaction was done under aerobic conditions in the presence of 5 mM cyanide. (A) Effects of cell concentration of the activity of Fe^{3+} reduction. (B) Effects of elemental sulfur concentration on the activity of Fe^{3+} reduction. (C) Effects of Fe^{3+} concentration on the activity of Fe^{3+} reduction.

ていると考えられてきた。^{16,21,22,24)} この硫黄酸化経路によれば、まず触媒量の GSH の存在下で元素硫黄の 8 員環が化学的に開裂しポリサルファイドが生成する。ポリサルファイドは sulfur dioxygenase の作用で分子状酸素によって酸化され SO_3^{2-} を生成する。 SO_3^{2-} は 2 種類の方法でさらに硫酸まで酸化されるが、その一つは、亜硫酸-チトクロム c 還元酵素が関与し、もう一方はアデノシン-5'-ホスホスルフェート還元酵素およびアデノシンジリン酸スルフィラーゼが関与する経路である。^{29,30)}

さて鉄酸化細菌はその名が示すとおり強力な Fe^{2+} 酸化活性を有しているために、この菌が元素硫黄 (S^0) を電子供与体にして Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元する酵素を持っていることは長い間気づかれなかった。硫黄無機塩培地に添加した Fe^{3+} が Fe^{2+} に還元される現象は、*Sulfolobus acidocaldarius*,³¹⁾ *T. thiooxidans*,^{31,32)} そして *T. ferrooxidans*^{31,32)} を用いた生育実験で報告されたが、この Fe^{3+} の還元が酵素的に行われるのか否かについての明確な知見は得られていなかった。

寒天平板で単一コロニーとして分離した絶対独立栄養細菌 *T. ferrooxidans* AP19-3 株³³⁻³⁶⁾ の洗浄細胞を嫌気条件下、pH 3 で S^0 および Fe^{3+} を含む反応液中で incubate すると Fe^{3+} を酵素的に還元し Fe^{2+} が生成すること、 Fe^{2+} の生成量は菌体濃度、電子供与体である S^0 濃度、電子受容体である Fe^{3+} 濃度にそれぞれ比例して増大すること等を明らかにした¹¹⁾ (Fig. 8)。好気条件下では全く Fe^{2+} の生成は観察されなかったが、好気条件下でも鉄酸化酵素を完全に阻害する 5 mM のシアンを存在させると、嫌気条件下で観察されたと同程度の Fe^{2+} の生成がみられた (Fig. 9)。

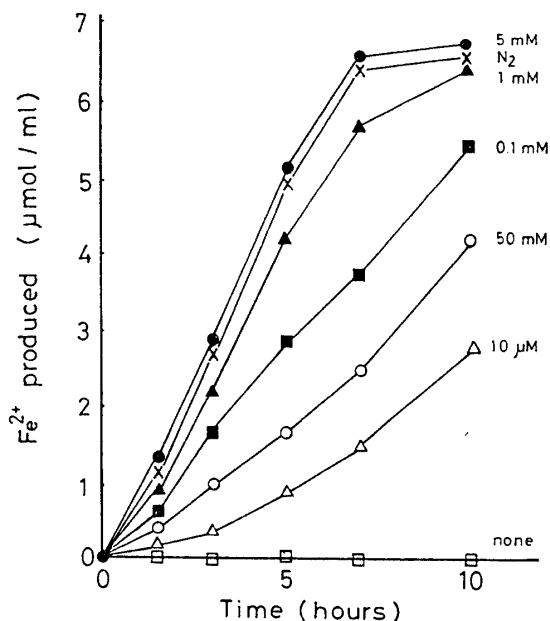


Fig. 9. Effects of cyanide on the activity of Fe^{3+} reduction by washed intact cells of *T. ferrooxidans* AP19-3 under aerobic conditions.

As a control, the reduction of Fe^{3+} under anaerobic conditions was done with a complete reaction mixture lacking cyanide (x).

これらの結果は、 S^0 の酸化に伴って生成した Fe^{2+} が鉄酸化酵素によって直ちに再酸化されることを示している。

洗浄細胞を用いて、嫌気条件下 S^0 による Fe^{3+} 還元のスโตイキオメトリーを検討し、下記の式に従って硫黄酸化反応が進むと推定した (Fig. 10).¹¹⁾ まず 4 mol の Fe^{3+} が 1 mol の S^0 によって還元され、4 mol の Fe^{2+} と 1 mol の SO_3^{2-} を生成する (1 式)。

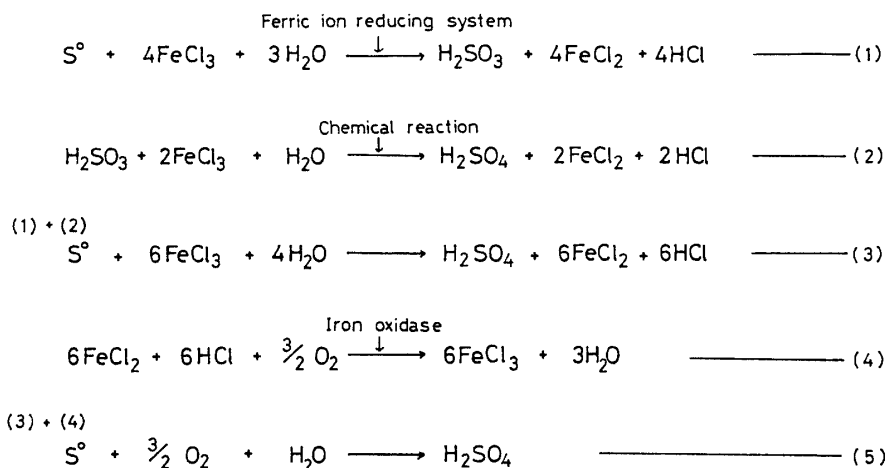


Fig. 10. Stoichiometry of anaerobic and aerobic sulfur oxidations by *T. ferrooxidans* AP19-3.

1 式を触媒する酵素を鉄還元酵素系 ferric-ion reducing system と仮に呼んだが、後に電気泳動的に単一な標品として単離し, sulfur: ferric ion oxidoreductase (SFORase) と命名した.¹²⁾ 次いで1式で生成してくる中間体の SO_3^{2-} が2molの Fe^{3+} によって非酵素的に酸化され, 2molの Fe^{2+} と1molの硫酸イオン(SO_4^{2-})を生成する. この反応が酵素的にも行われることを後で確かめ sulfite: ferric ion oxidoreductase と命名

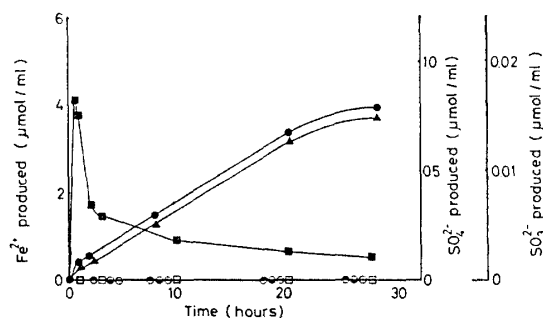


Fig. 11. Production of ferrous, sulfate, and sulfite ions in anaerobic oxidation of elemental sulfur with ferric ion by washed intact cells of *T. ferrooxidans* AP19-3.

Symbols: ●, Fe^{2+} production in a complete reaction mixture; ▲, SO_4^{2-} production in a complete reaction mixture; ○, SO_4^{2-} production in a complete reaction mixture lacking cells; ◐, SO_4^{2-} production in a complete reaction mixture lacking elemental sulfur; ◑, SO_4^{2-} production in a complete reaction mixture lacking Fe^{3+} ; ■, SO_3^{2-} production in a complete reaction mixture; □, SO_3^{2-} production in a complete reaction mixture except that active cells were replaced by cells boiled for 10 min.

した. 嫌気条件下における S^0 による Fe^{3+} 還元的全反応式は3式となる. すなわち, 1molの S^0 は6molの Fe^{3+} によって酸化され1molの SO_4^{2-} と6molの Fe^{2+} を生成する. 生成する SO_4^{2-} と Fe^{2+} のmol比は実測の結果0.95~1.15対6.0であった(Fig. 11). 嫌気条件下で生成する6molの Fe^{2+} が, 好気条件下鉄酸化酵素によって直ちに酸化されたとすれば4式のようなになる. 従って, 好気条件下における *T. ferrooxidans* AP19-3株の S^0 酸化の全式は5式となる. AP19-3株の硫酸酸化に際して5式が成り立つことが実際に確かめられたが(Fig. 12), 5式は *T.*

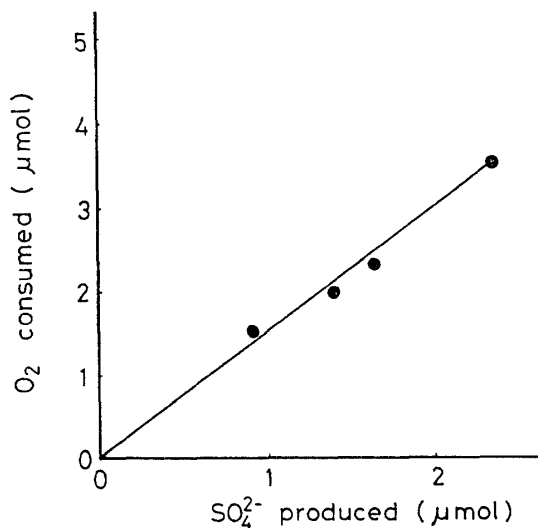


Fig. 12. Relation between oxygen consumption and sulfate production in an aerobic sulfur oxidation by *T. ferrooxidans* AP19-3.

Table 3. Summary of purification procedure for sulfur: ferric ion oxidoreductase from iron-grown *T. ferrooxidans* AP19-3.

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Sp act ^a (U/mg)	Yield (%)
Cell extract	744.3	7,443	10.0	100.0
105,000×g supernatant	364.5	7,946	21.8	106.8
(NH_4) ₂ SO ₄ (0 to 40%)	111.8	7,222	64.6	97.0
Sephadex G-100	15.5	5,595	361.0	75.2
FPLC (Mono Q) ^b	1.1	1,121	1,019.8	15.0
PAGE-gel cut ^c	0.1	154.3	1,543.2	2.0

^a The activity of sulfur: ferric ion oxidoreductase was determined by measuring sulfite produced in the reaction mixture under aerobic conditions at pH 6.5.

^b Purification with an anion-exchange resin or Mono Q column (0.5 by 5 cm) of a Pharmacia FPLC system.

^c After PAGE, the enzyme fraction on the gel was cut off and extracted with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5).

thiooxidans が S^0 を酸化する際の式と同じであり、両者は単に全反応式を比較するだけなら区別がつかない。

1 式を触媒する酵素，すなわち鉄還元酵素 (FIR system) の精製を試み，電気泳動的に単一な酵素標品を得た (Table 3).¹²⁾ この精製酵素標品は pH 6.5，嫌気条件下， Fe^{3+} のキレート剤である *o*-phenanthroline の存在下で，1 mol の S^0 を酸化する際に，1 mol の SO_3^{2-} の生成に対して約 4 mol の Fe^{2+} を生成した (Fig. 13)。この結果から，1 式を触媒する鉄還元酵素が単離できたと結論し，この Fe^{3+} を電子受容体にする新規酵素を sulfur: ferric ion oxidoreductase (SFORase) と命名した。

SFORase の分子量は46,000，等電点は4.6であった。SDS-PAGE で分子量23,000の位置に単一バンドを示すことから，SFORase は同一分子量の二つのサブユニットよりなると考えている。SFORase の最適 pH は6.5 にあり (Fig. 14)，pH 4.5 以下または pH 8.5 以上で活性は観察されなかった。SFORase 反応は cofactor として GSH の存在を絶対に必要とするが (Fig. 15)，この理由については後でふれる。

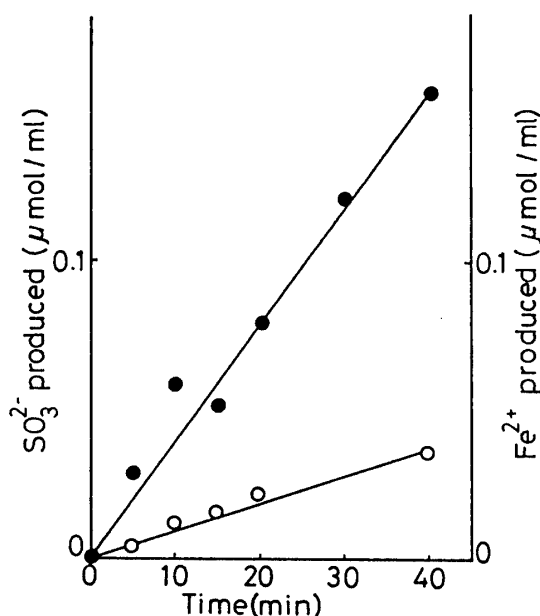


Fig. 13. Production of ferrous ion and sulfite by anaerobic oxidation of elemental sulfur by sulfur: ferric ion oxidoreductase. SFORase purified at the stage of Mono Q column chromatography (30 μg of protein) was used in the reaction. Symbols: ●, production of Fe^{2+} ; ○, production of sulfite.

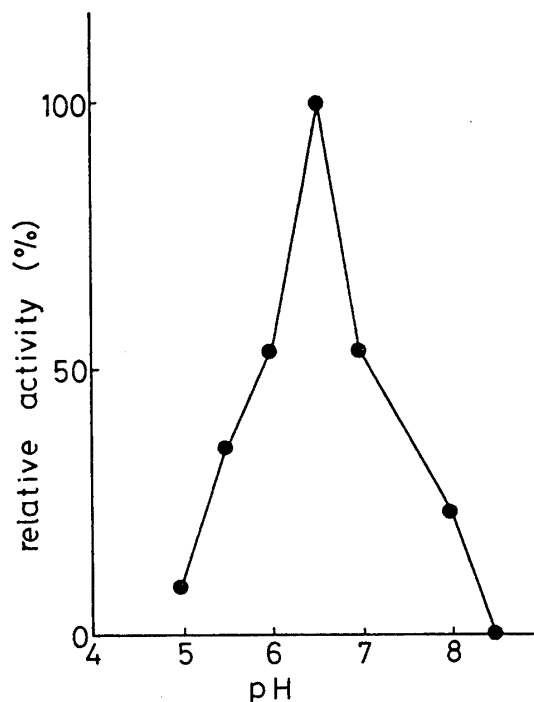


Fig. 14. Effects of pH on the activity of sulfur: ferric ion oxidoreductase.

The activity was measured by the sulfite produced under aerobic conditions. The buffer used in the pH curve was 0.1 M sodium phosphate buffer. Enzyme purified at the stage of Mono Q column chromatography (30 μg of protein) was used in the reactions.

pH 6.5 好気条件下において，精製 SFORase によって S^0 が酸化される際 SO_3^{2-} の生成が認められるが (Fig. 16)， Fe^{2+} はこの pH で直ちに自動酸化されるため生成は観察できなかった。しかし，反応液中に *o*-phenanthroline を存在させておけば Fe^{2+} の生成を確認できる (Fig. 17)。また，pH 6.5 好気条件下において，反応液中に Fe^{3+} を添加しなくても SO_3^{2-} の生成が見られるが，これは酵素中に cofactor として存在すると考えられる Fe^{3+} が Fe^{2+} に還元された後，分子状酸素で再酸化され SFORase 反応が進むためと考えている。反応の進行に伴って生成される SO_3^{2-} は反応液中に未反応で残っている S^0 と化学的に反応しチオ硫酸を生成する。²⁷⁾ SFORase はチオ硫酸を酸化できないので，反応15分経過後からチオ硫酸が反応液中に集積してくる。

洗浄細胞を osmotic shock 処理すると，SFORase は periplasmic space のマーカー酵素である酸性ホスファターゼと一緒に shock 溶液中に溶出してくるの

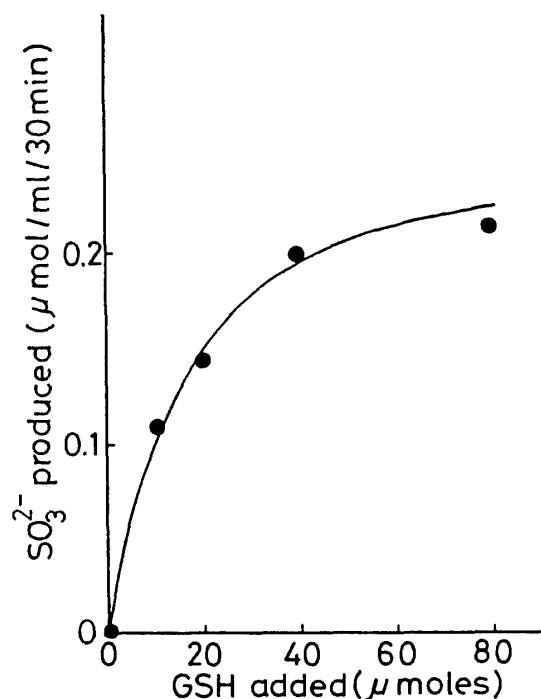


Fig. 15. Effects of GSH on the activity of sulfur: ferric ion oxidoreductase.

The activity was measured by sulfite aerobically. Enzyme purified at the stage of Mono Q column chromatography (30 μ g of protein) was used in the reactions.

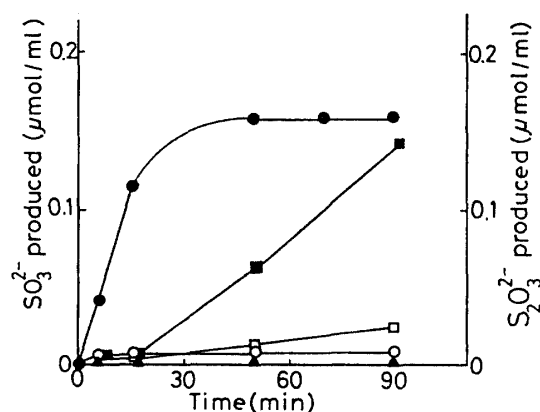


Fig. 16. Ferrous ion, sulfite, and thiosulfate formation by the aerobic oxidation of elemental sulfur by sulfur: ferric ion oxidoreductase.

Enzyme purified at the stage of Mono Q column chromatography (30 μ g of protein) was added to the reaction mixture. Symbols: ▲, production of Fe^{2+} by native enzyme; ●, production of sulfite by native enzyme; ○, production of sulfite by enzyme boiled for 15 min; ■, production of thiosulfate by native enzyme; □, production of thiosulfate by enzyme boiled for 15 min.

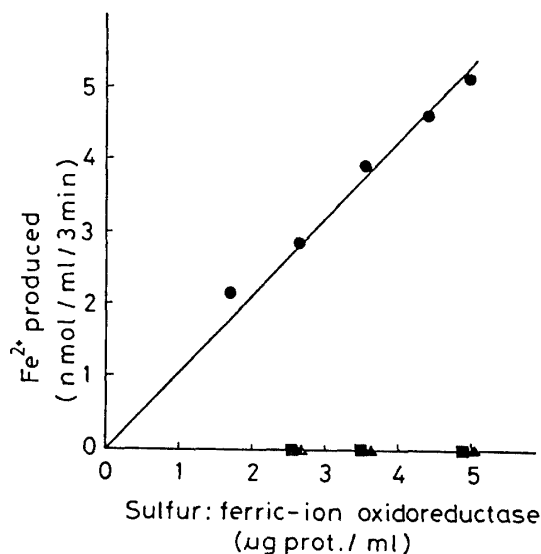


Fig. 17. Aerobic production of ferrous ion by sulfur: ferric ion oxidoreductase.

The reaction mixture contained 4.0 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5), 20 μ g of enzyme purified at the stage of Mono Q column chromatography, 20 μ g of GSH (adjusted to pH 6.5 with diluted NaOH), 100 mg of S^0 , 0.2 mg of bovine serum albumin, 0.5 μ mol of Fe^{3+} , and 1 μ mol of *o*-phenanthroline. Total volume was 5.0 ml. Symbols: ●, complete reaction mixture; ▲, without Fe^{3+} ; ■, without *o*-phenanthroline.

で periplasmic space に局在していると考えている (Fig. 18).¹²⁾ また、洗浄細胞をプロテアーゼ処理しても SFORase 活性は全く減少しなかった。さらに、洗浄細胞を 0.5% フェノールで短時間処理すると、SFORase 活性は完全に失活するけれど鉄酸化活性は影響を受けなかった。これらの結果は、SFORase が本菌の外膜表面に、また内膜より内側に存在しないことを示唆している。

以上得られた結果より、SFORase が *T. ferrooxidans* AP19-3 株の periplasmic space に局在し、鉄酸化酵素と共同して本菌の硫黄酸化に関与する新しい硫黄酸化経路の存在を提案した (Fig. 6).¹²⁾ *T. thiooxidans* の洗浄細胞を用い、AP19-3 株と同じ条件下で S^0 による Fe^{3+} 還元の有無を検討し、*T. thiooxidans* に Fe^{3+} 還元活性がほとんど存在しないこと (Fig. 19), AP19-3 株の硫黄無機塩培地での生育量が Fe^{3+} 添加量に比例して増大するのに対して *T. thiooxidans* にこの現象がみられないこと (Fig. 20), *T. thiooxidans* の sulfur dioxygenase と SFORase の性質が非常に

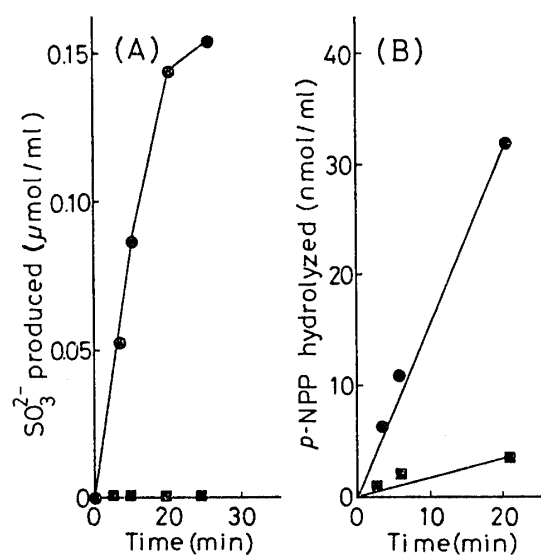


Fig. 18. Activities of sulfur: ferric ion oxidoreductase (A) and acid phosphatase (B) in osmotic shock fluid.

Osmotic shock fluid was prepared by treating intact cells with 50 mM Tris-10 mM sodium EDTA (pH 7.5) with (●) or without (■) 20% sucrose. The activities of sulfur: ferric ion oxidoreductase and acid phosphatase were measured. The protein concentration in the assay was 0.094 mg/ml.

異なっている等の点から、両菌の硫黄酸化機構は本質的に異なっていると現在考えている。

T. ferrooxidans AP19-3 株の硫黄酸化における

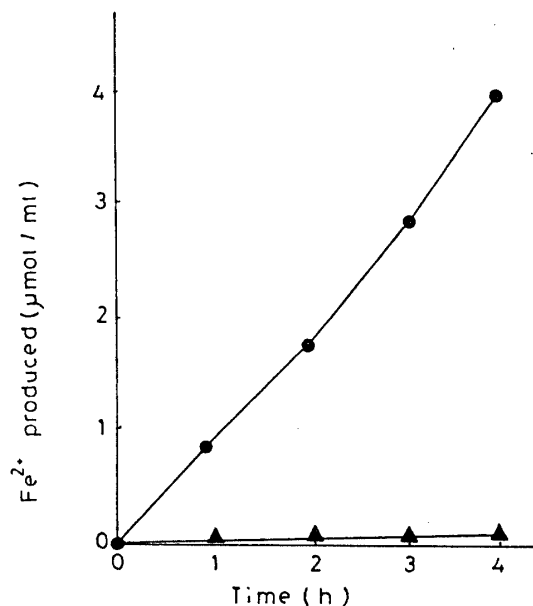


Fig. 19. Activities of ferric-ion reducing system of *T. ferrooxidans* AP19-3 and *T. thiooxidans* ON106.⁴⁷⁾

Symbols: ●, *T. ferrooxidans* AP19-3; ▲, *T. thiooxidans* ON106.

鉄酸化酵素の関与^{37,38)} 前項において、*T. ferrooxidans* AP19-3 株の硫黄酸化に鉄酸化酵素も関与することを推定した。以下、本菌の硫黄酸化に鉄酸化酵素も実際に関与することを示す結果を示す。

大量の AP19-3 株洗浄細胞を用いて、 S^0 と Fe^{3+} が存在する嫌気条件下、鉄還元反応をあらかじめ行わ

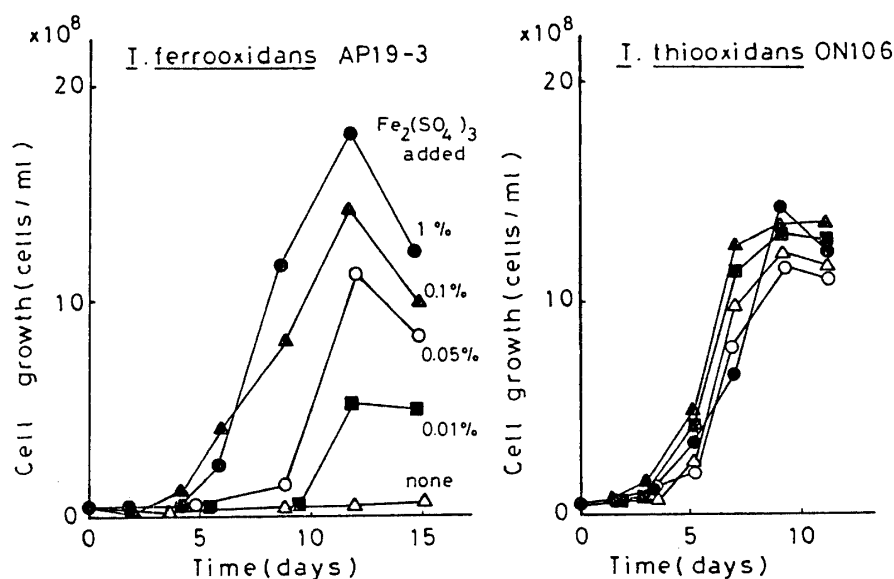


Fig. 20. Effects of ferric ion on the growth of *T. ferrooxidans* AP19-3 and *T. thiooxidans* ON106⁴⁷⁾ on sulfur-salts medium.

せた。Fe²⁺ の生成したことを *o*-phenanthroline 法で Fe²⁺ を定量することによって確認した後、遠心分離を行って硫黄と菌体を除いた。この様に、あらかじめ洗浄菌体に生産させた Fe²⁺ を含む培地に少量の AP19-3 株を種菌として加え好気条件下で培養した (Fig. 21)。AP19-3 株が自分で生産した Fe²⁺ を酸化して増殖できるのが確認できた。³⁷⁾ 一方、嫌気条件下 S⁰ を電子供与体、Fe³⁺ を電子受容体にしての増殖 (Fe³⁺ 呼吸による増殖) は観察されなかった (Fig. 22)。³⁸⁾ 精製 SFORase のスペクトルにチトクロム *b* および *c* のバンドが観察されないこと、SFORase 活性が HOQNO によって阻害されないことより、S⁰ による Fe³⁺ の還元チトクロム *b* は関与しないと結論した。この結果は、本菌が Fe³⁺ 呼吸によって増殖できなかった理由を良く説明する。

好気条件下、鉄酸化酵素の阻害剤であるシアンの非存在下においても S⁰ 依存性の Fe²⁺ の生成が確認されれば AP19-3 株の硫黄酸化に鉄酸化酵素も関与することが強く示唆される。*o*-phenanthroline とキレートを形成した Fe²⁺ は鉄酸化酵素の基質にならないこと

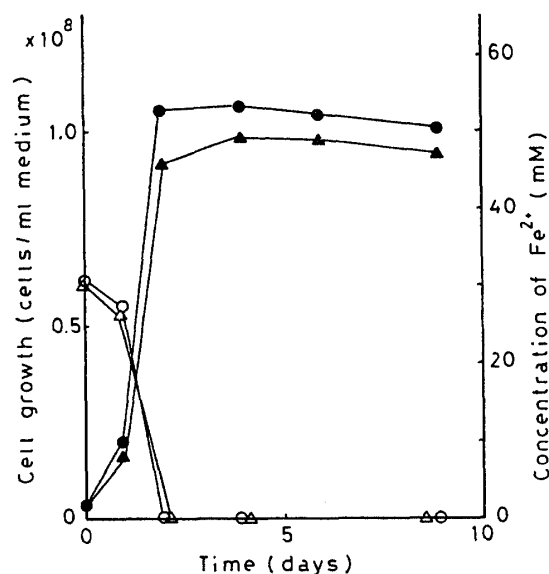


Fig. 21. Use of Fe²⁺ produced beforehand by a ferric-ion reducing system and elemental sulfur for growth of *T. ferrooxidans* AP19-3.

Symbols: cell growth (●) and Fe²⁺ consumption (○) in Fe²⁺-salt medium in which Fe²⁺ was produced beforehand by the FIR system and elemental sulfur; cell growth (▲) and Fe²⁺ consumption (△) in Fe²⁺-salt medium in which FeSO₄·7H₂O (guaranteed reagent) was added to 100 ml of fresh salt solution at 30.5 mM.

を利用して、好気条件、*o*-phenanthroline 存在下、AP19-3 株が S⁰ 依存性の Fe²⁺ の生成を行うことを示した (Fig. 23).³⁷⁾ AP19-3 株の硫黄無機塩培地での生育および洗浄細胞による硫黄酸化活性は、5 mM および 50 mM の *o*-phenanthroline でそれぞれ完全に阻害された。

AP19-3 株が硫黄無機塩培地で生育する際の SFORase (鉄還元酵素) および鉄酸化酵素の比活性の変動について検討した。AP19-3 株の増殖に伴って SFORase の比活性が約2.5倍増大するばかりでなく、鉄酸化酵素も約8倍増大した (Fig. 24).³⁸⁾ この結果は硫黄生育の際、SFORase ばかりでなく鉄酸化酵素も

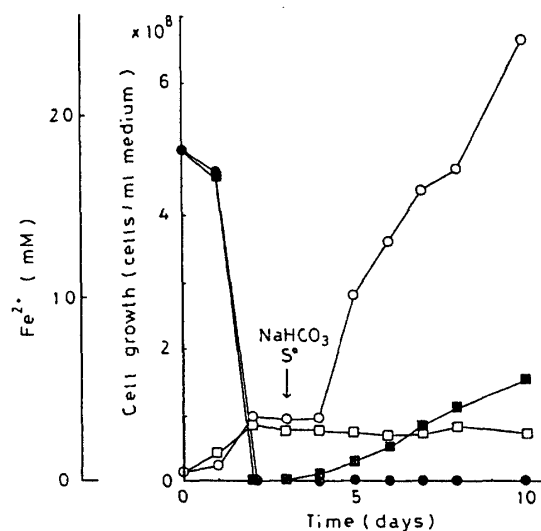


Fig. 22. Attempted anaerobic growth of *T. ferrooxidans* AP19-3 with a ferric ion as the terminal electron acceptor.

T. ferrooxidans AP19-3 was grown on Fe²⁺ (18 mM)-salts medium at 30°C. At the point indicated by the arrow, at which Fe²⁺ in the medium was completely oxidized to Fe³⁺, elemental sulfur (1 g) and NaHCO₃ (0.2 g) were added. The headspace of one of the cultures was purged with nitrogen gas and incubated anaerobically with Fe³⁺ as the terminal electron acceptor at 30°C; the other was incubated aerobically at 30°C. The amount of Fe²⁺ produced in the medium and the growth rate were determined. Symbols: ○, number of cells in the medium incubated under aerobic conditions; □, number of cells in the medium incubated under anaerobic conditions; ●, Fe²⁺ content in the medium incubated under aerobic conditions; ■, Fe²⁺ content in the medium incubated under anaerobic conditions.

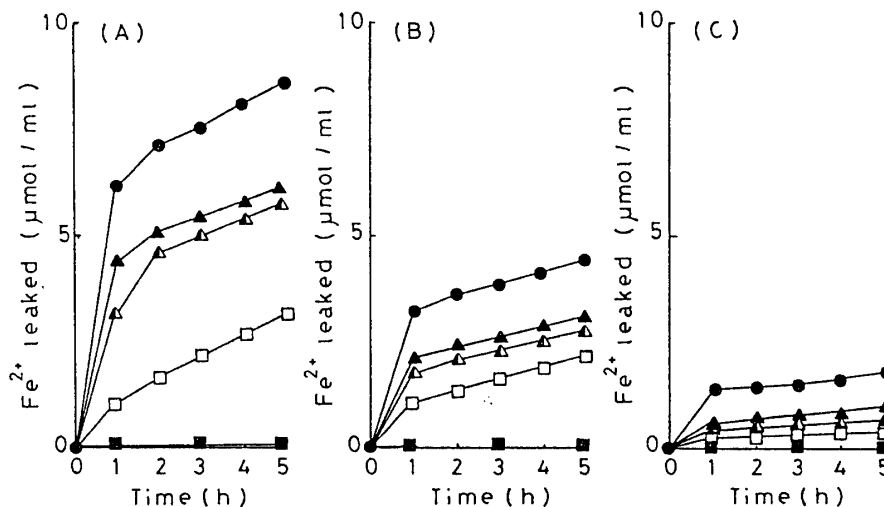


Fig. 23. Sulfur-dependent leakage of ferrous ions from intact cells of *T. ferrooxidans* AP19-3 under aerobic conditions.

(A): Leakage of Fe^{2+} from iron-grown cells washed three times with dilute sulfuric acid, pH 3.0. (B): Leakage of Fe^{2+} from iron-grown cells that were passed twice through cation-exchange resin. (C): Leakage of Fe^{2+} from sulfur-grown cells that were cultured 22 times in sulfur-salt medium. Elemental sulfur (200 mg), 2 ml of 0.1% *o*-phenanthroline, hydroxylamine (1.5 mmol), or sodium cyanide (0.05 mmol) was added to a reaction mixture of 7 ml of 0.1 M β -alanine- SO_4^{2-} buffer, pH 3.0 and intact cells (4 mg of protein) in a total volume of 10 ml. Reaction was under aerobic conditions at 30°C. A sample of the reaction mixture was withdrawn after some time and centrifuged at $10,000\times g$ for 5 min to obtain supernatant; the intensity of the orange arising from *o*-phenanthroline- Fe^{2+} complexes in supernatant was measured. Symbols: ■, no addition; □, *o*-phenanthroline; ▲, sulfur and *o*-phenanthroline; ●, sulfur, *o*-phenanthroline, and NaCN; ●, hydroxylamine and *o*-phenanthroline.

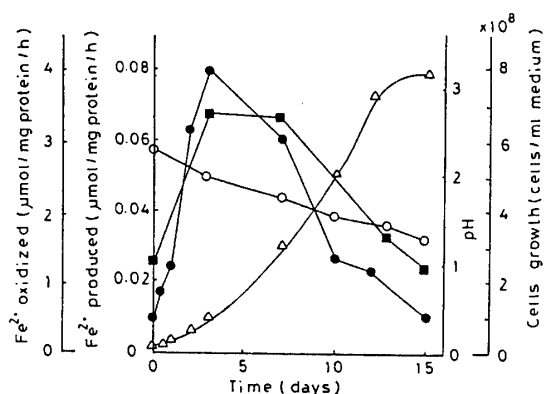


Fig. 24. Synthesis of iron-oxidizing and ferric-ion-reducing systems during growth of *T. ferrooxidans* AP19-3 on sulfur-salts medium.

Symbols: Δ , cell growth; $\circ$, pH of the medium; $\bullet$, specific activity of the iron-oxidizing system; $\blacksquare$, specific activity of the ferric ion-reducing system (sulfur: ferric ion oxidoreductase).

同時に *de novo* 合成されることを, すなわち鉄酸化酵素も硫黄培地での生育に重要な役割を持っていること

を強く示唆している。

硫黄無機塩培地に22回継代培養後の AP19-3 株洗浄細胞は, Fe^{2+} を唯一のエネルギー源として増殖した菌の約62%の鉄酸化活性を保有しており, Fe^{2+} 無機塩培地に植え換えてもほとんど lag phase なしに増殖がみられた。上記の結果も, AP19-3 株が硫黄無機塩培地で生育する時にも高い鉄酸化酵素活性を保持しなければならない機構になっていることを示唆している。

***T. ferrooxidans* AP19-3 株による固体硫黄の酸化機構⁴⁰⁾** 水に不溶性の固体硫黄がどのような機構で酸化されるのか多くの研究者が興味を持ってきた。*T. thiooxidans* が固体硫黄を酸化する際に, まず菌が固体硫黄に吸着する必要があり, この吸着がエネルギー依存性であることが高桑らによって報告されている³⁹⁾。Suzuki が提案した固体硫黄酸化の機構については先に述べたが, SFORase と sulfur dioxygenase とは GSH を必須とする点以外で共通性は少ない。そこで精製 SFORase を用いて固体硫黄酸化の機構を検討した。⁴⁰⁾

現在まで検討した限りで SFORase の基質になった硫黄化合物は, S^0 , FeS そして低濃度の硫化水素(H_2S)の3つのみで, 他の硫黄化合物は基質にならなかった. GSH 以外の SH 化合物, s-methylglutathione, s-hexylglutathione 等は GSH のかわりにならなかった. 固体硫黄酸化の機構を明らかにするために GSH の役割について検討し, SFORase 反応の最適条件下で緩衝液, GSH, S^0 を incubate すると, H_2S が化学反応で生成すること, また SFORase を反応液に最初から存在させると SO_3^{2-} の生成は見られるが H_2S は全く生成しないこと, 反応の進行に伴って GSH が酸化されて GSSG が生成すること等を明らかにした (Fig. 25).⁴⁰⁾ 以上の結果より, SFORase による固体硫黄酸化の真の基質は H_2S であると結論した.

SFORase 活性は高濃度の H_2S (0.5 mM) によって完全に阻害されるが, この阻害は Fe^{2+} を反応液に添加することで特異的に軽減された (Fig. 26). 一方, Fe^{3+} , Sn^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , M^{6+} 等の金属イオンに阻害軽減効果はなかった. これらの結果より, Fe^{2+} は H_2S

と反応することによって FeS となり SFORase が阻害を受けない濃度にまで H_2S 濃度を低下させる機構によって阻害の軽減を行うものと推定した. Fe^{2+} 以外の金属に阻害軽減効果がなかった理由および FeS 以外の硫化金属が SFORase の基質にならなかった理由は, Fe^{2+} に比較するとこれらの金属イオンが SFORase を強く阻害することにあると推定した.⁴⁰⁾ 以上の結果より, *T. ferrooxidans* AP19-3 株の固体硫黄酸化の初期ステップを Fig. 27 のように考えている.⁴⁰⁾ SFORase の真の基質が H_2S であることが明らかになったので, SFORase の名前はむしろ hydrogen sulfide: ferric ion oxidoreductase とした方が適當ではないかと考えている.

さて, H_2S が SFORase の真の基質であるならば, SFORase は固体硫黄と接触しなくても S^0 を酸化し SO_3^{2-} を生成するはずであるが, この点を検討するために透析チューブに固体硫黄と GSH の両方を緩衝液と共に入れて透析したものとの透析外液, もう一方は単に固体硫黄と緩衝液のみを透析チューブに入れて透析

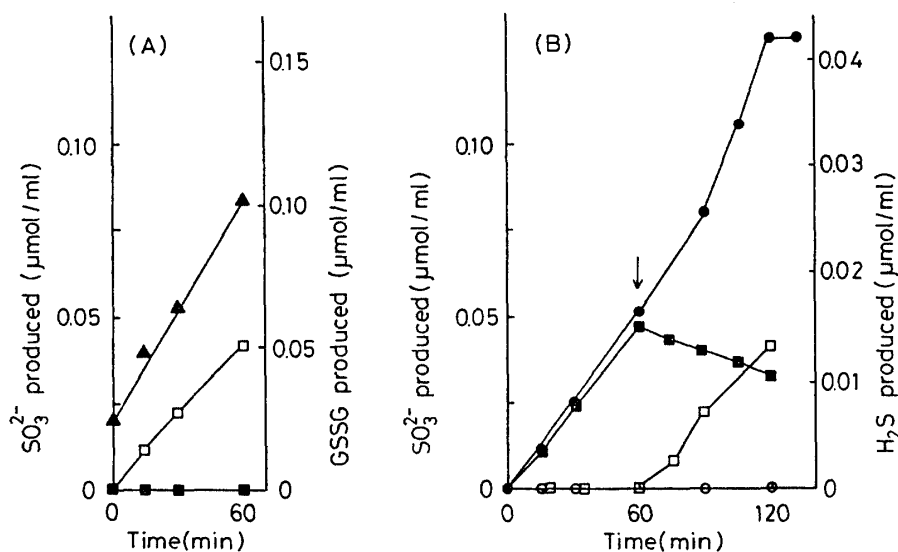


Fig. 25. Production of hydrogen sulfide, sulfite, and GSSG in elemental sulfur oxidation by sulfur : ferric ion oxidoreductase purified from *T. ferrooxidans* AP19-3.

Enzyme purified at the stage of Mono Q column chromatography (3.5 μg of protein) was added to the reaction mixture. Symbols: (A) A purified SFORase was added to the standard assay mixture for SFORase at the start of reaction, and the concentration of sulfide (■) and sulfite (□) were determined. (B) Two flasks containing both GSH and elemental sulfur were incubated for 1 h. One of the flasks was further incubated without the addition of SFORase and concentration of sulfide (●) and sulfite (○) in the reaction mixture were measured. SFORase (3.5 μg) was added to another flask at the point of arrow, and the concentration of sulfide (■) and sulfite (□) were measured. A chemical production of GSSG in the standard reaction mixture without SFORase was also plotted (▲).

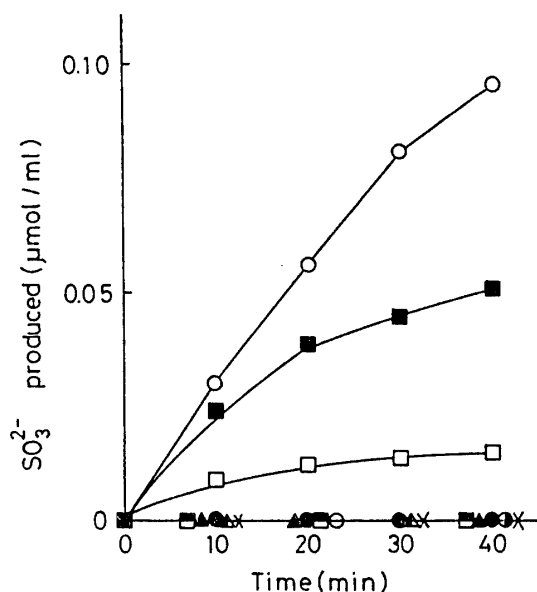


Fig. 26. Effects of metal ions on the oxidation of sodium sulfide by sulfur: ferric ion oxidoreductase purified from *T. ferrooxidans* AP19-3. Enzyme purified at the stage of Mono Q column chromatography (12.5 μ g of protein) was added to the reaction mixture. Sulfide instead of elemental sulfur was added to the standard assay mixture for SFORase as a substrate. Symbols: Metal ions described below were added at the following concentrations. $\square$, Fe^{2+} (1 mM); $\blacksquare$, Fe^{2+} (4 mM); $\bullet$, Fe^{3+} (1 mM); $\blacktriangle$, Sn^{2+} (1 mM); $\blacksquare$, Ni^{2+} (1 mM); $\triangle$, Cr^{3+} (4 mM); $\bigcirc$, MoO_4^{2-} (4 mM). No metal ion was added ($\times$). Sulfite production with the standard assay mixture, in which both metal ions and sulfide were absent ($\circ$).

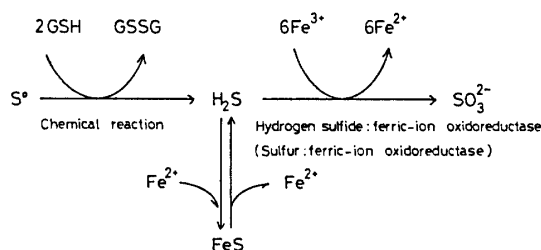


Fig. 27. Initial steps of elemental sulfur oxidation by hydrogen sulfide: ferric ion oxidoreductase (sulfur: ferric ion oxidoreductase) purified from *T. ferrooxidans* AP19-3.

したもの、の透析外液の2つを用意した。両透析外液にSFORaseを作用させると、固体硫黄のみを透析することによって得られた透析外液では SO_3^{2-} の生成が全く見られなかったが、 S^0 とGSHが共存したものを

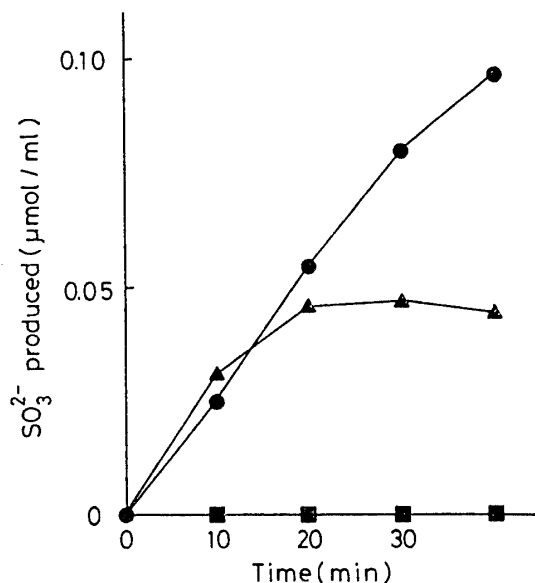


Fig. 28. Oxidation of elemental sulfur without contacting sulfur: ferric ion oxidoreductase with solid elemental sulfur. Elemental sulfur (200 mg) suspended with 2 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) supplemented with or without GSH (40 μ mol) was put into dialyzing bag, and incubated for 8 h at 30°C. The dialyzates obtained by 8 h of incubation were tested for the production of sulfite by incubating them with SFORase in the absence of elemental sulfur. Symbols: $\blacktriangle$, the dialyzate obtained by incubating both elemental sulfur and GSH in the dialyzing bag was used as a substrate for SFORase; $\blacksquare$, the dialyzate obtained by incubating elemental sulfur with buffer solution lacking GSH was used as a substrate for SFORase; $\bullet$, sulfite production with the standard assay mixture. Enzyme purified at the stage of Mono Q column chromatography (12.5 μ g of protein) was added to the reaction mixture.

透析した外液では SO_3^{2-} の生成が見られた (Fig. 28).⁴⁰⁾ 現在、バクテリアリーチングの機構として、直接接触機構と間接触機構の2つが考えられているが、⁴¹⁻⁴³⁾ 上記の結果は、GSHが存在していればSFORaseは固体硫黄と直接接触しなくてもこれを酸化できる可能性を示唆するもので、今後バクテリアリーチングの機構解明に役立つものと考えている。

4. 亜硫酸酸化酵素 (sulfite: ferric ion oxidoreductase)^{48,49)}

元素硫黄がSFORaseによって酸化される際 SO_3^{2-}

がどうしても生成される。^{11,12)} この SO_3^{2-} を酸化する酵素が存在しないかどうかを *T. ferrooxidans* AP19-3 で検討した。

AP19-3 株の洗浄細胞を用いて SO_3^{2-} 酸化に対する pH 曲線を描くと、pH 2 および pH 7 に2つの活性ピークを示した (Fig. 29)。これは本菌が2種類の異なった方法で SO_3^{2-} を酸化できることを示している。pH 2 における SO_3^{2-} の酸化はシアンで強く阻害され鉄酸化酵素に対する pH 曲線と一致したことから、鉄酸化酵素の関与する SO_3^{2-} の酸化と考えた。すなわち、 SO_3^{2-} は Fe^{3+} によって化学的に酸化され Fe^{2+} を生成し、この Fe^{2+} が鉄酸化酵素によって酸化され Fe^{3+} を再成する方法である。さて、洗浄細胞で pH 7 に最適 pH を示す SO_3^{2-} 酸化酵素に関してはこれまで *T. ferrooxidans* で報告がなかった。この SO_3^{2-} 酸化酵素は AP19-3 株の periplasmic space 側の内膜に比較的強く結合して存在していることが推定された。膜標品を用いての本酵素の最適 pH は 6.0, 57°C, 15分間の incubate 処理又はプロテアーゼ処理により完全に失活した。従来 *T. thiooxidans* 等で報告されているチトクロム関与の sulfite oxidase とは異なり、^{24,30,44-47)} 電子受容体として Fe^{3+} を特異的に用いる新規な SO_3^{2-} 酸化酵素であることが下記の実験から示唆され sulfite: ferric ion oxidoreductase と命名した。⁴⁸⁾ すなわち、(i)嫌気条件下、 Fe^{3+} の存在下で好気条件下とはほぼ同様の速度で SO_3^{2-} を酸化した (Fig. 30)、(ii) Fe^{3+} を電子受容体にしたが、チトクロム *c* およ

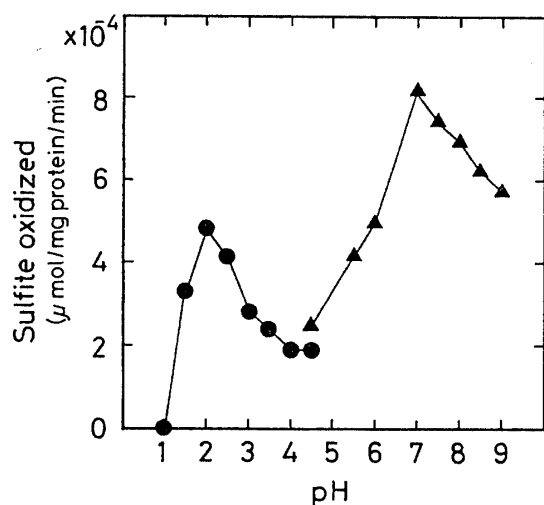


Fig. 29. Effects of pH on the oxidation of sulfite by washed intact cells of *T. ferrooxidans* AP19-3. Symbols: ●, 0.1 M β -alanine- SO_4^{2-} buffer; ▲, 0.1 M sodium phosphate buffer.

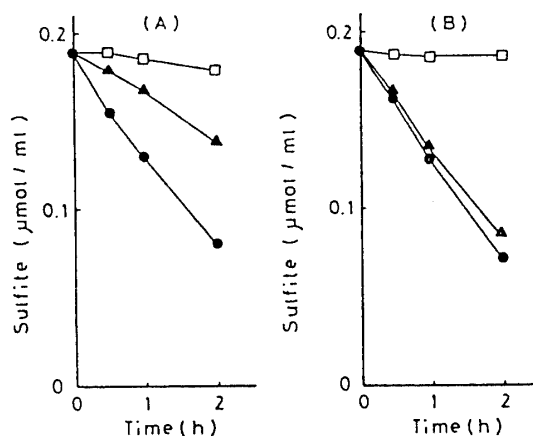


Fig. 30. Effects of ferric ions on the activity of sulfite oxidase.

Sulfite consumed in the reaction mixture was measured in the absence (A) or in the presence (B) of ferric ions (0.2 $\mu\text{mol/ml}$) under aerobic and anaerobic conditions. Symbols: ●, consumption of sulfite measured under aerobic conditions; ▲, consumption of sulfite measured under anaerobic conditions; □, consumption of sulfite due to chemical oxidation measured with the enzyme boiled for 10 min under aerobic conditions.

びフェリシアナイドを利用することができなかった (Fig. 31), ④ 4,5-dihydroxy-*m*-benzene-disulfonic acid disodium salts (Tiron), α, α' -dipyridyl のような Fe^{3+} に対するキレート剤で強く阻害された等である。

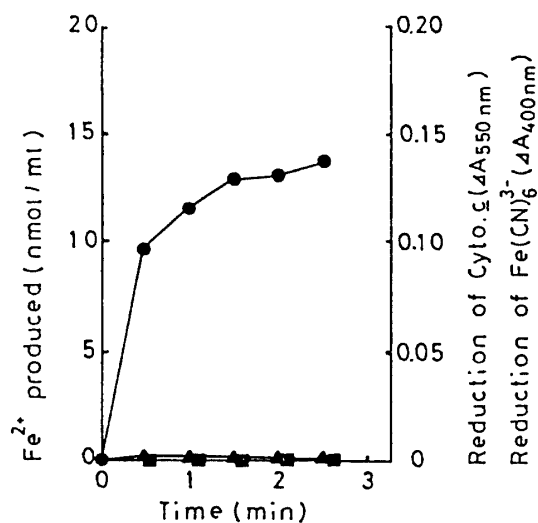


Fig. 31. Electron acceptor for sulfite oxidase. The reduction on ferric ions (●), horse heart cytochrome *c* (▲), or ferricyanide (■) by sulfite was measured.

現在本酵素の可溶化精製を進めている。

Sulfite: ferric ion oxidoreductase の生理的意義は、下記に示すように SFORase による S^0 酸化の際にどうしても生成してくる毒作用の強い SO_3^{2-} を分解するとともに、鉄酸化細菌のエネルギー源である Fe^{2+} をも生成することにあると現在考えている。^{48,49)} すなわち、AP19-3 株の洗浄細胞を鉄酸化酵素の働かない pH 6 で S^0 と incubate すると、 SO_3^{2-} が多量蓄積してくるが、鉄酸化酵素が活性な pH 3 で incubate した場合には SO_3^{2-} の生成はほとんど認められなかった (Fig. 32). こうして各 pH の緩衝液中で菌体と S^0 を 2 時間 incubate した後洗浄細胞の鉄酸化活性および鉄還元 (SFORase) 活性を測定すると、pH 3 で incubate したものは活性の低下は認められなかったが、 SO_3^{2-} が大量に生成する pH 6 で incubate したものは両酵素活性が無処理菌の 10% にまで低下していた (Fig. 33).⁴⁹⁾ この様に本菌は、もし鉄酸化酵素が阻害されると、自分で生成した SO_3^{2-} によって damage を受ける。pH 6 で洗浄細胞を S^0 と incubate した場合、2 時間を過ぎると反応液に集積し続けていた SO_3^{2-} は徐々に減少し始める。2 時間後に、sulfite: ferric ion oxidoreductase の阻害剤である Tiron を添加すると

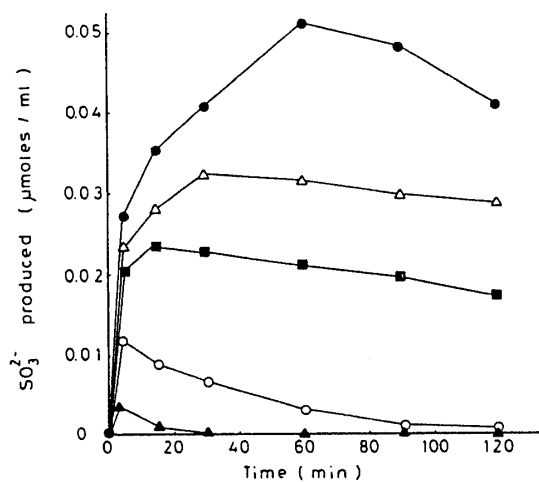


Fig. 32. Production of sulfite during aerobic sulfur oxidation by *T. ferrooxidans* AP19-3.

Washed iron-grown cells of *T. ferrooxidans* AP19-3 (5 mg of protein) were incubated under aerobic conditions with 2% elemental sulfur in 10 ml of 0.5 M β -alanine- SO_4^{2-} buffer, pH 3.0 ($\blacktriangle$), pH 4.0 ($\circ$), pH 5.0 ($\blacksquare$), pH 6.0 ($\triangle$) and pH 6.5 ($\bullet$). Sulfite in the incubation mixtures was measured spectrophotometrically by the pararosaniline method.

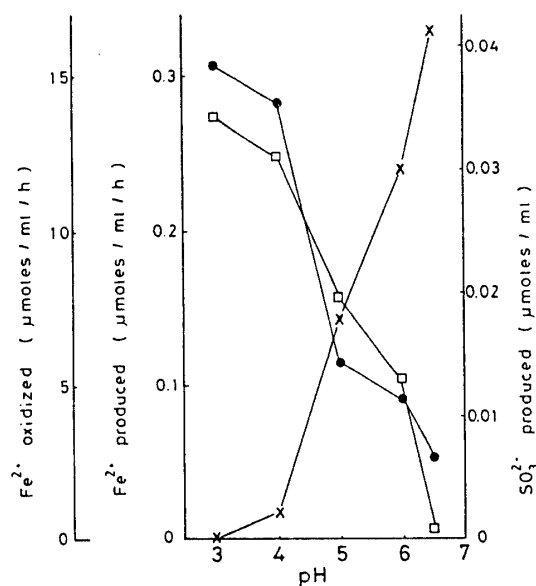


Fig. 33. Activities of the ferric-ion reducing and iron-oxidizing systems in *T. ferrooxidans* AP19-3 after incubation of the cells with elemental sulfur under aerobic conditions.

Washed iron-grown cells of *T. ferrooxidans* AP19-3 (5 mg protein) were incubated under aerobic conditions with 2% elemental sulfur in 10 ml of 0.5 M β -alanine- SO_4^{2-} buffer, pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 6.5, for 2 hr. The treated cells were harvested and then washed three times with 0.1 M β -alanine- SO_4^{2-} buffer, pH 3.0. Symbols: $\bullet$, the activity of the ferric-ion reducing system; $\square$, the activity of iron oxidase; $\times$, sulfite in the incubation mixture after 2 hr.

SO_3^{2-} は減少せず増加し続けた (Fig. 34).⁴⁸⁾ この結果は AP19-3 株が S^0 を酸化する際、SFORase による SO_3^{2-} の生成と、sulfite: ferric ion oxidoreductase による SO_3^{2-} の分解が同時に起っていることを示唆している。もし、sulfite: ferric ion oxidoreductase が本菌中に存在しないとすれば、なんらかの原因で鉄酸化酵素が阻害された場合に、毒作用の強い SO_3^{2-} が菌体内により蓄積し、さらに damage が大きくなることが予想される。現在 AP19-3 株の SO_3^{2-} 酸化を Fig. 35 のように考えている。

5. *T. ferrooxidans* AP19-3 株による金属イオンの還元^{53,54)}

従来鉄酸化細菌においては、鉄酸化酵素、硫黄酸化酵素といった酸化酵素の解明を中心に研究が進められてきたが、今回本菌が金属イオンを酸化するばかりでなく、還元する能力をも合わせ持っていることを明ら

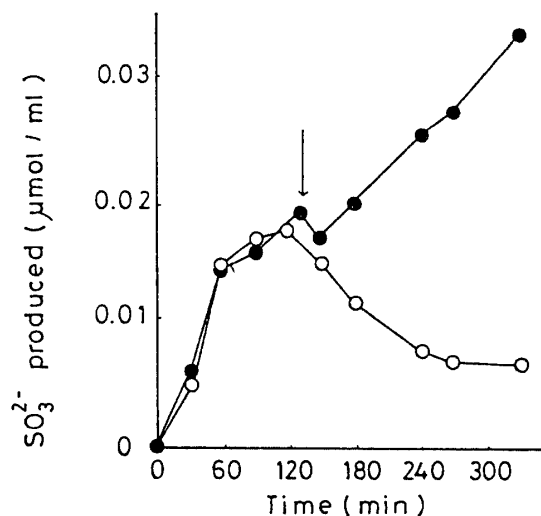


Fig. 34. Effects of 4, 5-dihydroxy-m-benzenedisulfonic acid disodium salts (Tiron) on the production and decomposition of sulfite during aerobic oxidation of elemental sulfur.

After 2 h of incubation of washed intact cells of *T. ferrooxidans* AP19-3 with elemental sulfur under aerobic conditions, 10 mM Tiron was added at the point indicated by the arrow (●); cells with no Tiron added were also tested (O).

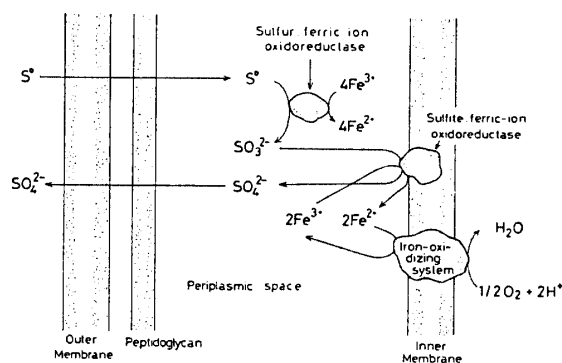


Fig. 35. Proposed mechanism of sulfite oxidation of *T. ferrooxidans* AP19-3.

かにしたのでこの点について述べる。

T. thiooxidans, *T. ferrooxidans* を用いての二酸化マンガン (MnO_2) のリーチングが生育実験で研究されている。⁵⁰⁻⁵²⁾ *T. thiooxidans* が S^0 を酸化する際に生成する SO_3^{2-} や S^{2-} によって非酵素的に Mn^{4+} が Mn^{2+} へ還元される機構が提案されているが、洗浄細胞を用いての Mn^{4+} 還元機構に関しては報告がなかった。AP19-3 株洗浄細胞を用い、 S^0 による MnO_2 還元機構を検討し、 S^0 が SFORase によって酵素的に酸化されて生成した SO_3^{2-} が非酵素的に MnO_2 を

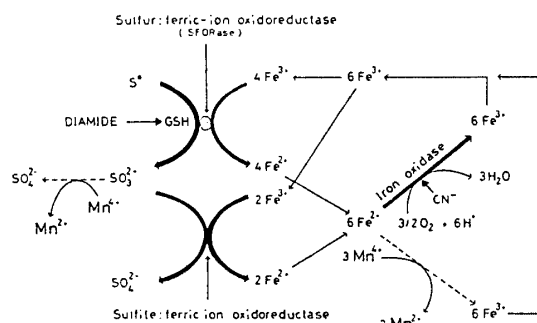


Fig. 36. Proposed mechanism of Mn^{4+} reduction with elemental sulfur of *T. ferrooxidans* AP19-3. Symbols: $\Rightarrow$, enzymatic reaction; $\rightarrow$, chemical reaction.

Mn^{2+} に還元するという機構を提案した (Fig. 36).⁵³⁾

上記 Mn^{4+} 還元機構を支持する実験結果として、(i)鉄還元酵素 (SFORase) の特異的阻害剤である diamide によって Mn^{4+} の還元が阻害される、(ii)鉄還元酵素による Fe^{2+} および SO_3^{2-} の生成が MnO_2 によって強く阻害される、(iii)鉄還元酵素の電子受容体である Fe^{3+} は Mn^{4+} の還元量を増大させる、(iv)鉄酸化酵素の阻害剤であるシアンは Mn^{4+} の還元量を増大させる、(v) SO_3^{2-} および Fe^{2+} によって Mn^{4+} は非酵素的にす早く還元される等をあげることができる。 S^0 の電子を直接 Mn^{4+} へ伝達する酵素活性の有無を本菌無細胞抽出液で検討したが検出できなかった。

AP19-3 株の洗浄細胞がリン酸イオンの存在下、 S^0 を電子供与体にして Mo^{6+} を酵素的に還元し molybdenum blue を生成することを明らかにした。⁵⁴⁾ Mo^{6+} 還元の最適 pH は 3.0、還元量は S^0 および菌体濃度に比例して増大した。洗浄細胞で観察された Mo^{6+} の還元が新規な Mo^{6+} 還元酵素によるのか否かを検討し、SFORase が S^0 を電子供与体にして Fe^{3+} ばかりでなく、 Mo^{6+} をも還元することを明らかにした。精製 SFORase を用いて、 $1\mu\text{mol}$ の SO_3^{2-} の生成に対して $4.6\sim 5.4\mu\text{mol}$ の molybdenum blue が生成されること、 Mo^{6+} に対する K_m は 7.6mM 、 $V_{\max}$ は $22.2\mu\text{mol/mg/min}$ であること、 Mo^{6+} の還元に対して Fe^{3+} と Cu^{2+} が競争的に阻害し K_i がそれぞれ 0.084mM および 0.015mM であること等を明らかにした (Fig. 37).⁵⁴⁾ Fe^{3+} が Mo^{6+} の還元を競争的に阻害するという結果は、SFORase が両金属イオンを電子受容体にするという考えを支持する。 Cu^{2+} も SFORase によって還元される可能性が示唆されたが、この点に関しては現在検討中である。

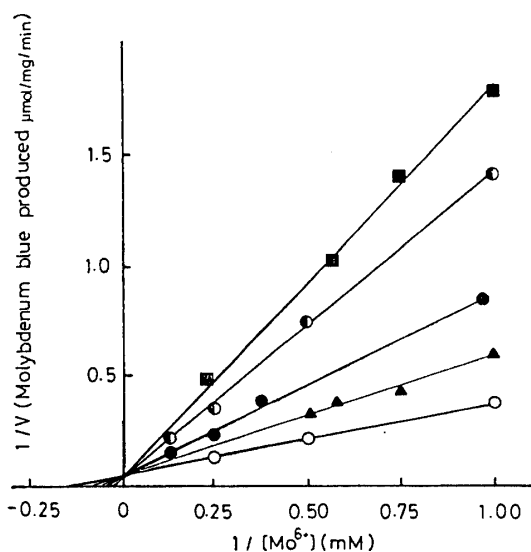


Fig. 37. Effects of Fe^{3+} , Cu^{2+} , and Co^{2+} on the velocity of molybdenum blue formation by SFORase purified from *T. ferrooxidans* AP19-3. Symbols: Fe^{3+} at 0.1 mM (●) or 0.2 mM (○), 0.05 mM Cu^{2+} (■), 0.1 mM Co^{2+} (▲), or no metal (○) was added to the reaction mixture.

この様に、SFORase は Fe^{3+} ばかりでなく Mo^{6+} , Mn^{4+} 等をも還元するが、生理的に重要な電子受容体は鉄酸化細菌の生息環境下に多量に存在する Fe^{3+} と考えられる。すなわち、AP19-3 株の洗浄細胞タンパク当たり、 S^0 による Fe^{3+} , Mo^{6+} , Mn^{4+} 還元の比活性はそれぞれ、 $3.3 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$, $0.13 \mu\text{mol molybdenum blue}/\text{mg}$, $0.10 \mu\text{mol Mn}^{2+}/\text{mg}$ で、 Fe^{2+} の生成量は molybdenum blue, Mn^{2+} 生成量の約25倍高かった。

6. 重金属イオンによる硫黄無機塩培地での生育阻害機構⁵⁵⁻⁵⁹⁾

硫化鉱石から溶出してくる種々の金属イオンに対してより耐性な鉄酸化細菌は、バクテリアリーチングに対してもより有用な菌株と考えられる。鉄酸化細菌は、 Fe^{2+} をエネルギー源にして増殖する際には、水銀イオン、銀イオンを除く各種重金属イオンに対して比較的耐性であるが、 S^0 を唯一のエネルギー源にして増殖する場合には、これらの重金属イオンに対してより感受性になることが知られている。従って、バクテリアリーチングに対する有用菌株を育種するためには、重金属耐性の硫黄酸化酵素を持つ株を取得することが重要と考えられるが、本菌の重金属耐性および重金属阻害

機構についての詳細な研究はなされていないのが現状である。

T. ferrooxidans AP19-3 株の硫黄無機塩培地での増殖は、100 mM の Cu^{2+} , または 1 mM の Co^{2+} によって完全に阻害されたので、これら重金属イオンによる阻害機構を検討した。その結果、 Cu^{2+} は本菌の硫黄酸化に関与する SFORase を、SFORase 本来の電子受容体である Fe^{3+} と活性中心を競争する様式で阻害することを明らかにした。⁵⁵⁾ 洗浄細胞を用いた場合、鉄還元酵素 (SFORase) の Fe^{3+} に対する K_m は 1.4 mM, Cu^{2+} に対する K_i は 1.2 mM であった。100 mM Cu^{2+} による生育阻害は、培地に Fe^{3+} を加えることで軽減され、18 mM の Fe^{2+} 添加で Cu^{2+} 無添加のコントロールと同様の生育量を示した (Fig. 38)。一方、1 mM の Co^{2+} による生育阻害に Fe^{3+} の添加効果が観察されないことから、両金属イオンによる阻害機構は異なるものと推定した。

硫黄培地での Co^{2+} による生育阻害は、以下に示す

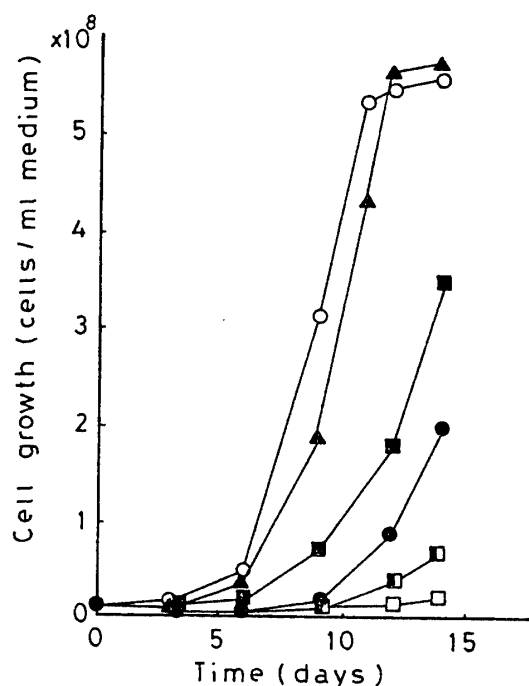


Fig. 38. Effects of ferric ions on the growth of *T. ferrooxidans* AP19-3 on sulfur-salts medium supplemented with 100 mM cupric sulfate. Symbols: Sulfur-salt medium without 100 mM cupric sulfate (○); sulfur-salt medium supplemented with 100 mM cupric sulfate (□); Ferric ions were added to sulfur-salt medium supplemented with 100 mM cupric sulfate at 7.2 (■), 11 (●), 14 (■), and 18 mM (▲).

ように Co^{2+} が SFORase 反応の cofactor である GSH を GSSG に化学的に酸化分解してしまう結果, SFORase が S^0 を酸化できなくなってしまうのが原因の一つになっていることを明らかにした.⁵⁶⁾ すなわち, AP19-3 株を 1 mM の Co^{2+} を含む硫黄無機塩培地で培養すると, 鉄還元酵素 (SFORase) 活性が見かけ上早く消失し, これに伴って菌の増殖が停止した (Fig. 39). 反応液に GSH を添加すると鉄還元活性が見られるようになることから, SFORase の失活というよりはむしろ, 細胞内 GSH 含量が減少したために見かけ上鉄還元活性が減少したものと考えた. 実際無細胞抽出液の SFORase 活性を測定すると, Co^{2+} 無添加のコントロールの 74% の SFORase 活性が Co^{2+} 添加した場合にも存在していた. 洗浄細胞の GSH 含量を定量すると, コントロール菌で $0.16 \mu\text{mol}$

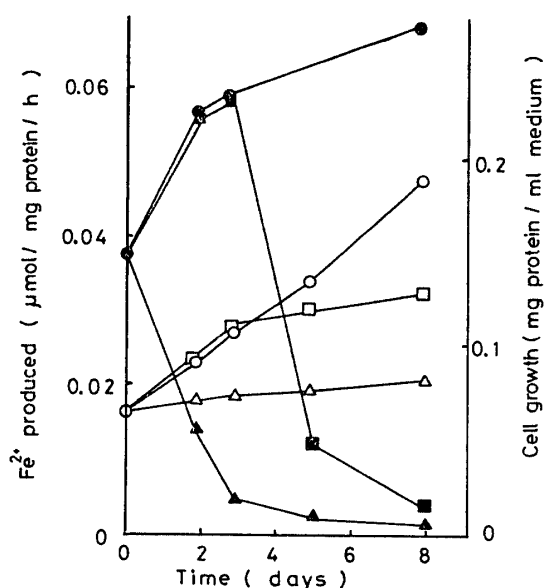


Fig. 39. Effects of Co^{2+} on the growth rate of *T. ferrooxidans* AP19-3 on sulfur-salts medium and on the ferric-ion reducing system activity of the cells.

Washed intact cells of iron-grown *T. ferrooxidans* AP19-3 were added to 200 ml sulfur-salts medium with or without 1 mM- Co^{2+} . ○, Growth without Co^{2+} ; △, growth with Co^{2+} (added at the start of incubation); □, growth with Co^{2+} (added after 3 d incubation); ●, FIR system activity after growth without Co^{2+} ; ▲, FIR system activity after growth with Co^{2+} (added at the start of incubation); ■, FIR system activity after growth with Co^{2+} (added after 3 d incubation).

/mg prot, Co^{2+} 添加菌で $0.10 \mu\text{mol/mg prot}$ となり, 培地に Co^{2+} が存在すると菌体内 GSH が低下するのが確かめられた.⁵⁶⁾ さらに, Co^{2+} が GSH を化学的に酸化して GSSG にする等,⁵⁷⁾ ^{35}S -GSH を一たん菌体内へ取り込ませておいた菌体懸濁液に Co^{2+} を添加して incubate すると, Mo^{6+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} といった他の金属イオンを添加して incubate した場合に比較して, より早く菌体内 ^{35}S -GSH が消失すること等を明らかにした (Fig. 40).⁵⁷⁾

GSH はエネルギー依存性で菌体内へ取り込まれる. S^0 よりも Fe^{2+} をエネルギー源にしての取り込み速度の方が約20倍速かった. 鉄酸化酵素の阻害剤あるいは活性化剤は, 硫黄をエネルギー源にしての GSH の取り込みをそれぞれ阻害または活性化した (Fig. 41).⁵⁷⁾ 一方, GSH を酸化分解するジアミドや Co^{2+} は, 硫黄をエネルギー源にしての GSH の取り込みを阻害したが, 鉄をエネルギー源にしての取り込みは阻害しなかった. これらの結果は, AP19-3 株で提案してい

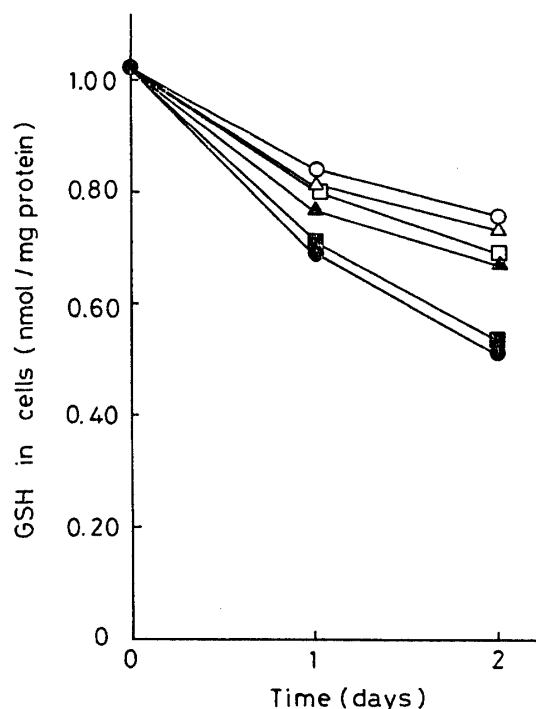


Fig. 40. Disappearance of GSH from ^{35}S -GSH-incorporated cells of *T. ferrooxidans* AP19-3 in the presence of heavy metal or diamide.

Symbols: GSH-incorporated cells were incubated with a 9K-basal salts solution supplemented with 10 mM Co^{2+} (●), Mo^{6+} (△), Cu^{2+} (□), or Pb^{2+} (▲), or 5 mM diamide (■), or without either a heavy metal or diamide (○).

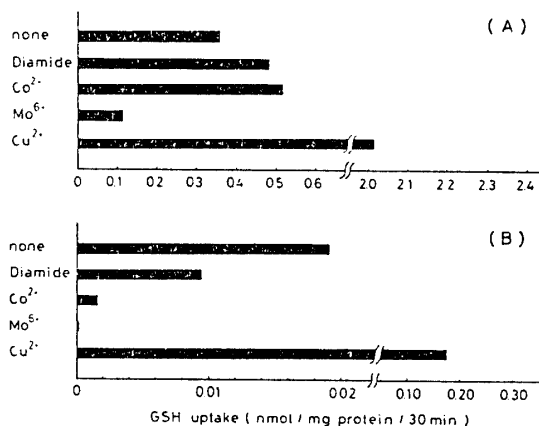


Fig. 41. GSH uptake into intact cells of *T. ferrooxidans* AP19-3 in the presence of heavy metals or diamide.

GSH uptake into intact cells of *T. ferrooxidans* AP19-3 was measured with ^{35}S -GSH in the presence or absence of heavy metals (10 mM). The composition of the reaction mixture was as follows: 3.5 ml of 0.1 M β -alanine- SO_4^{2-} buffer (pH 3.5); washed cells of iron-grown *T. ferrooxidans* AP19-3, 5 mg of cell protein; Fe^{2+} (50 μmol), or elemental sulfur (100 mg); carrier GSH, 9 nmol; and ^{35}S -GSH (new England Nuclear), 0.2 μCi . The total volume was 5.0 ml. The reaction was carried out for 30 min at 30°C. The reaction mixture (0.25 ml) was passed through a 0.2- μm membrane filter. The filter loaded with cells was washed and then the radioactivity was measured with an Aloka LSC-635 liquid scintillation system. GSH uptake activity was measured using Fe^{2+} (A) or elemental sulfur (B) as an energy source.

る鉄酸化酵素の関与する新しい硫黄酸化経路を用いて矛盾なく説明できる。

一たん細胞内に取り込まれた ^{35}S -GSH は、菌体を緩衝液で incubate すると菌体外へ溶出されてくることから,⁵⁸⁾ 細胞内で合成された GSH が内膜を横切って periplasmic space に至り、そこで S^0 酸化に利用される機構を現在考えている。GSH は鉄酸化細菌の銀イオン耐性にも関与している。すなわち、鉄酸化細菌の銀耐性機構として、銀耐性菌内で合成された GSH が細胞内膜を横切って periplasmic space に輸送され、そこで Ag^+ が細胞内膜に局在する鉄酸化酵素等の蛋白へ結合するのを抑制する様式で阻害を回避する機構を提案している。⁵⁹⁾

7. おわりに

T. ferrooxidans AP19-3 株に、 Fe^{3+} を電子受容体にする 2 種類のユニークな硫黄酸化に関与する酵素、すなわち硫黄酸化酵素 sulfur: ferric ion oxidoreductase および亜硫酸酸化酵素 sulfite: ferric ion oxidoreductase が存在することを明らかにし、これら二つの酵素と鉄酸化酵素とが鉄イオンで連結されサイクリックに回転する新しい硫黄酸化経路を提案した。特に前者 SFORase は *T. ferrooxidans* AP19-3 株の硫黄酸化の中心をなす酵素と考えられ、バクテリアリーチング能のすぐれた鉄酸化細菌を育種するために本酵素のクローニングを現在検討中である。

新しく提案している硫黄酸化経路を用いると、AP19-3 株が硫黄無機塩培地で生育する際なぜ Fe^{3+} を要求するかの理由、 Cu^{2+} および Co^{2+} による生育阻害の機構、 S^0 を電子供与体にしての Mo^{6+} および Mn^{4+} の還元機構、さらに本菌が Fe^{3+} の多量に存在する環境下で活発に硫化鉱石（一般に Fe と S を含む）を酸化し増殖できる生態学的特徴等をうまく説明できる。

T. ferrooxidans は S^0 を酸化するために SFORase の電子受容体としての Fe^{3+} を必須とする。すなわち、 Fe^{3+} の濃度が低いと S^0 を酸化できないし生育もできない。一方、SFORase によって S^0 を酸化する際、中間体としてどうしても毒作用の強い SO_3^{2-} が生成してくる。もし環境中に大量の Fe^{3+} が存在していなかったり、なんらかの原因で鉄酸化酵素が阻害され Fe^{3+} が再生できないと、菌体中に蓄積してくる SO_3^{2-} によって SFORase ばかりでなく鉄酸化酵素も damage を受けてしまう。その結果菌の増殖はストップする。環境中に Fe^{3+} が多量に存在していれば、この Fe^{3+} を用いて化学的に SO_3^{2-} を分解することもできるし、 Fe^{3+} を電子受容体にする sulfite: ferric ion oxidoreductase を作用させ酵素的に SO_3^{2-} を分解することもできる。

この様に、鉄酸化細菌が硫黄存在下で活発に増殖するためには、環境中に Fe^{3+} の存在することが必須で、鉄酸化細菌にとってエネルギー源として必要な Fe^{2+} のみが重要なのではなく、従来生理的意義が見落されがちであった Fe^{3+} に対しても重要性を認識していかなければならないと考えている。

終りに臨み、鉄酸化細菌研究のイロハから御指導下さいました岡山大学名誉教授今井和民先生、岡山大学農学部教授田野達男先生に心より感謝いたします。また、本研究遂行に当たり有益なご助言、ご協力をいただきました岡山大学農学部教授田中英彦先生、稲垣二

賢博士に深謝いたします。さらに、常にご助言、ご鞭撻をいただきました岡山大学農学部農芸化学グループの諸先生方に心より感謝の意を表します。内地留学の際、常に親切に御指導下さいました京都大学農学部山田秀明教授、谷吉樹教授、研究室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。最後に、協同研究者としてご協力いただきました岡山大学農学部発酵化学研究室内の、土松知歳、永無渉、片桐崇行、葉麗珍、谷尻真治、福田恭子、山領健司、和田公仁、野口昌子、森真奈美、宗像悠、浜本修、辻田良彦、平山耕一の諸氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 伊藤一郎：バクテリアリーチング，講談社サイエンスフィク，19-118 (1976).
- 2) 今井和民：独立栄養細菌，化学同人，127-136 (1984).
- 3) 杉尾 剛，田野達男：遺伝，42，28-31 (1988).
- 4) Sugio, T., Tano, T., Imai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 393-403 (1981).
- 5) Sugio, T., Tano, T., Imai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 405-412 (1981).
- 6) Imai, K., Sugio, T., Tsuchida, T., Tano, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1349-1354 (1975).
- 7) Sugio, T., Tano, T., Imai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1791-1799 (1981).
- 8) Cobley, J. G., Haddock, B. A.: *FEBS Lett.*, **60**, 29-33 (1975).
- 9) Ingledew, W. J., Cox, J. C., Halling, P. J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **2**, 193-197 (1977).
- 10) Fukumori, Y., Yano, T., Sato, A., Yamanaka, T.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**, (1988).
- 11) Sugio, T., Domatsu, C., Munakata, O., Tano, T., Imai, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1401-1406 (1985).
- 12) Sugio, T., Mizunashi, W., Inagaki, K., Tano, T.: *J. Bacteriol.*, **169**, 4916-4922 (1987).
- 13) Kinsel, N. A.: *J. Bacteriol.*, **80**, 628-632 (1960).
- 14) Sugio, T., Domatsu, C., Tano, T., Imai, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 461-467 (1984).
- 15) Unz, R. F., Lundgren, D. G.: *Soil Sci.*, **92**, 302-313 (1961).
- 16) Eccleston, M., Kelly, D. P.: *J. Bacteriol.*, **134**, 718-727 (1978).
- 17) Kelly, D. P.: *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* **298**, 499-528 (1982).
- 18) Landesman, J., Duncan, D. W., Walden, C. C.: *Can. J. Microbiol.*, **12**, 957-964 (1966).
- 19) Silver, M.: *Can. J. Microbiol.*, **16**, 845-849 (1970).
- 20) Silverman, M. P., Lundgren, D. G.: *J. Bacteriol.*, **78**, 326-331 (1959).
- 21) Silver, M., Lundgren, D. G.: *Can. J. Biochem.*, **46**, 457-461 (1968).
- 22) Silver, M., Lundgren, D. G.: *Can. J. Biochem.*, **46**, 1215-1219 (1968).
- 23) Tuovinen, O. H., Kelly, B. C., Nicholas, D. J. D.: *Can. J. Microbiol.*, **22**, 109-113 (1976).
- 24) Vestal, J. R., Lundgren, D. G.: *Can. J. Biochem.*, **49**, 1125-1130 (1971).
- 25) Suzuki, I.: *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 359-371 (1965).
- 26) Suzuki, I.: *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 97-101 (1965).
- 27) Suzuki, I., Silver, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 22-23 (1966).
- 28) Charles, A. M., Suzuki, I.: *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 522-534 (1966).
- 29) Peck, H. D., Jr.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **46**, 1053-1057 (1960).
- 30) Charles, A. M., Suzuki, I.: *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 522-538 (1966).
- 31) Brock, T. D., Gustafson, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 567-571 (1976).
- 32) Kino, K., Usami, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 803-805 (1982).
- 33) Sugio, T., Anzai, Y., Tano, T., Imai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1141-1151 (1981).
- 34) Sugio, T., Kudo, S., Tano, T., Imai, K.: *J. Bacteriol.*, **150**, 1109-1114 (1982).
- 35) Sugio, T., Domatsu, C., Tano, T., Imai, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 461-467 (1984).
- 36) Sugio, T., Tanijiri, S., Fukuda, K., Yamaryo, K., Inagaki, K., Tano, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2229-2236 (1987).
- 37) Sugio, T., Mizunashi, W., Tano, T., Imai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2755-2761 (1986).
- 38) Sugio, T., Wada, K., Mori, M., Inagaki, K., Tano, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 150-152 (1988).
- 39) Takakuwa, S., Fujimori, T., Iwasaki, H.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **25**, 21-29 (1979).
- 40) Sugio, T., Katagiri, T., Inagaki, K., Tano, T.: *Biochim. Biophys. Acta* **973**, 250-256 (1989).
- 41) Silverman, M. P.: *J. Bacteriol.*, **94**, 1046-1051 (1967).
- 42) Lundgren, D. G.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**, 263-283 (1980).
- 43) Imai, K., Sakaguchi, H., Sugio, T., Tano, T.: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 865-870 (1973).
- 44) Lyric, R. M., Suzuki, I.: *Can. J. Biochem.*, **48**, 334-343 (1970).
- 45) Toghrol, F., Southerland, W. M.: *J. Bacteriol.*, **258**, 6762-6766 (1983).
- 46) Yamanaka, T., Yoshioka, T., Kimura, K.: *Plant Cell Physiol.*, **22**, 613-622 (1981).
- 47) Tano, T., Ito, T., Takesue, H., Sugio, T., Imai, K.: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 181-187 (1982).
- 48) Sugio, Katagiri, T., Moriyama, M., Ye Li zhen, Inagaki, K., Tano, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 153-157 (1988).
- 49) Sugio, T., Noguchi, M., Tano, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1431-1433 (1987).

- 50) Tano, T., Imai, K.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 37, 576 (1963).
- 51) Tano, T., Imai, K.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 39, 477-479 (1965).
- 52) Ghosh, J., Imai, K.: *J. Ferment. Technol.*, 63, 259-262 (1985).
- 53) Sugio, T., Tsujita, Y., Hirayama, K., Inagaki, K., Tano, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 185-190 (1988).
- 54) Sugio, T., Tsujita, Y., Katagiri, T., Inagaki, K., Tano, T.: *J. Bacteriol.*, 170, 5956-5959 (1988).
- 55) Sugio, T., Wada, K., Mizunashi, W., Imai, K., Tano, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2917-2918 (1986).
- 56) Sugio, T., Hamamoto, O., Mori, M., Inagaki, K., Tano, T.: *J. Gen. Microbiol.*, 134, 887-892 (1988).
- 57) Sugio, T., Katagiri, T., Inagaki, K., Tano, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3177-3179 (1988).
- 58) Sugio, T., Kougami, T., Tano, T., Imai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2919-2924 (1982).
- 59) Sugio, T., Tano, T., Imai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2037-2051 (1981).