



平成 24 年度 博士論文

*Acidithiobacillus ferrooxidans* の  
チオ硫酸代謝経路の解析

平成 25 年 3 月

岡山大学大学院 自然科学研究科

バイオサイエンス専攻

51421454 菊本 愛生

## 目次

略語表	1
第一章 序論	
1.1 硫黄の循環	2
1.2 微生物による硫黄の代謝機構	3
1.3 バクテリアリーチングのメカニズム	7
1.4 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> で提案される硫黄代謝経路	10
第二章 チオ硫酸デヒドロゲナーゼの解析	
2.1 緒言	12
2.2 材料と方法	14
2.2.1 使用菌株、培地および生育条件	14
2.2.2 酵素活性測定	14
2.2.3 <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 株からの Tiosulfate dehydrogenase (TSD) の精製	15
2.2.4 大腸菌における <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 株由来 <i>tsd</i> 遺伝子のクローニングと発現タンパク質解析	17
2.2.5 タンパク質解析	21
2.2.6 硫黄化合物解析	22
2.2.7 PCR 解析	22
2.2.8 遺伝子解析	23
2.3 結果および考察	24
2.3.1 テトラチオン酸生育 <i>A. ferrooxidans</i> 細胞抽出液の TSD 活性	24
2.3.2 テトラチオン酸生育 <i>A. ferrooxidans</i> 細胞の可溶性画分からの TSD の精製	26
2.3.3 部分精製 TSD の性質	28
2.3.4 チオ硫酸酸化の化学量論	30
2.3.5 <i>A. ferrooxidans</i> の TSD をコードする <i>tsd</i> 遺伝子の同定と発現	31

2.3.6	大腸菌における <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 株由来 <i>tsd</i> 遺伝子の 発現と <i>A. ferrooxidans</i> の TSD との比較	38
2.4	結論	41
第三章 鉄および還元型硫黄化合物の酸化に関与する遺伝子の発現制御 機構の解析		
3.1	緒言	43
3.2	材料と方法	44
3.2.1	細菌、プラスミドおよび培養	44
3.2.2	RNA 抽出と RT-PCR 発現ベクター内での <i>scpB</i> 遺伝子の クローニング	45
3.2.3	組換え ScpB タンパク質の大腸菌内での合成と精製	47
3.2.4	ゲルシフトアッセイ (Electrophoretic mobility shift assays; EMSA)	48
3.2.5	データ解析	48
3.3	結果および考察	49
3.3.1	<i>sqr</i> 遺伝子近傍の ORF 解析	49
3.3.2	<i>A. ferrooxidans</i> における <i>scpB</i> 遺伝子の転写	53
3.3.3	鉄および硫黄酸化に関与する遺伝子のプロモーター領域への ScpB の結合	53
3.4	結論	56
第四章	総括	58
	謝辞	60
	参考文献	61

## 略語表

本文中で使用した略語は以下に示す。

APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
DDW	distilled deionized water
DMS	Dimethyl sulfid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside
KPB	Potassium phosphate buffer
mRNA	Messenger RNA
MtOH	methanol
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
RISCs	Reduced inorganic sulfur compounds
RNA	Ribonucleic acid
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SOR	Sufite: cytochrome <i>c</i> oxidoreductase
SQR	Sulfide: quinine oxidoreductase
TSD	Thiosulfate dehydrogenase
TTH	Tetrathionate hydrolase



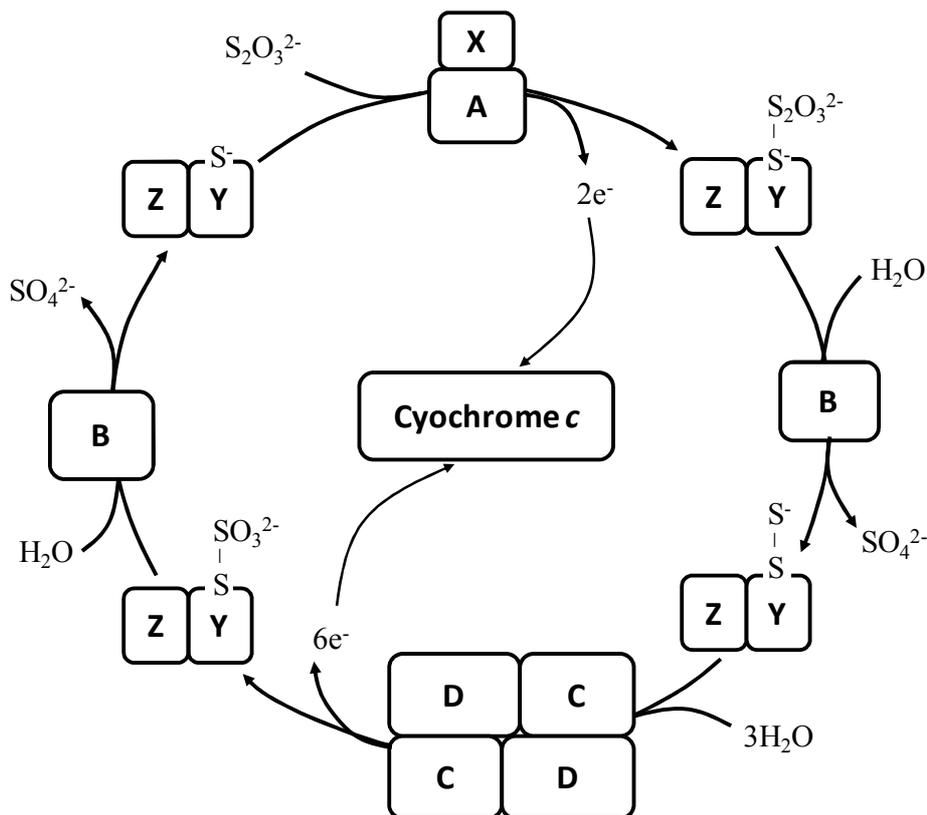
全ての生物は、生育のために硫黄を必要とする。細菌において、硫黄は細胞乾燥重量の0.5–1.0%に達し、主に含硫アミノ酸のシステインやメチオニンの成分になっている。同化に利用されている硫黄は、ほとんどが先に述べたような短期的なサイクルで循環している硫黄分である。しかしながら、異化的な硫酸還元、タンパク質中のチオール基の *desulfurylation*、および生物の死骸や排泄物の分解に由来する硫化水素は、容易に金属イオンと結合して堆積する。これらの堆積物中の金属硫化物が利用されなければ、硫黄の循環は滞る。したがって、硫化鉱石中の硫黄化合物の酸化に関与する微生物の生理、生態およびその酸化機構を知ることは、基礎生物化学的にも地球科学的にも重要である。

## 1.2 微生物による硫黄の代謝機構

化学合成無機栄養性菌による、元素硫黄や還元型硫黄化合物 (RISCs; 硫化物、チオ硫酸、ポリチオン酸、チオシアン酸、carbon disulfide、carbonyl sulfide、メチル化硫黄化合物など) の代謝経路については、少なくとも2つの主要な経路 (*Paracoccus sulfur oxidation pathway* (PSO 経路) および *S<sub>4</sub> intermediate pathway* (S4 経路)) が提案されている[1]。そのなかで、チオ硫酸の生化学的酸化については、下記に述べる4つの経路が化学無機栄養硫黄酸化細菌や光合成無機栄養硫黄酸化細菌から見つかっている。

### 1.2.1 Sox system

PSO 経路は Sox 経路として知られており、*Paracoccus versutus* や *Paracoccus denitrificans* に存在し、おそらく *Starkeya nobella* や *Xanthobacter* spp.にも存在する。この経路には、*sox* 遺伝子クラスターにコードされている酵素 (SoxXYZABCD) が主要な役割を担っている。SoxYZ とチオ硫酸や亜硫酸は、SoxXA の作用で、チオ硫酸-SoxYZ 複合体や亜硫酸-SoxYZ 複合体を生じる。それらは、SoxB によって加水分解され、硫酸と SoxZY-S-S<sup>-</sup>あるいは SoxZY-S<sup>-</sup>を生じる。SoxZY-S-S<sup>-</sup>は、SoxCD によって酸化され、生じた硫酸基が SoxB による加水分解で硫酸を遊離し SoxZY-S<sup>-</sup>に戻る。チオ硫酸からスタートするこの一連の反応において、生じた電子は、酸化型の cytochrome *c*<sub>552</sub> に伝達される (Fig. 1-2)。

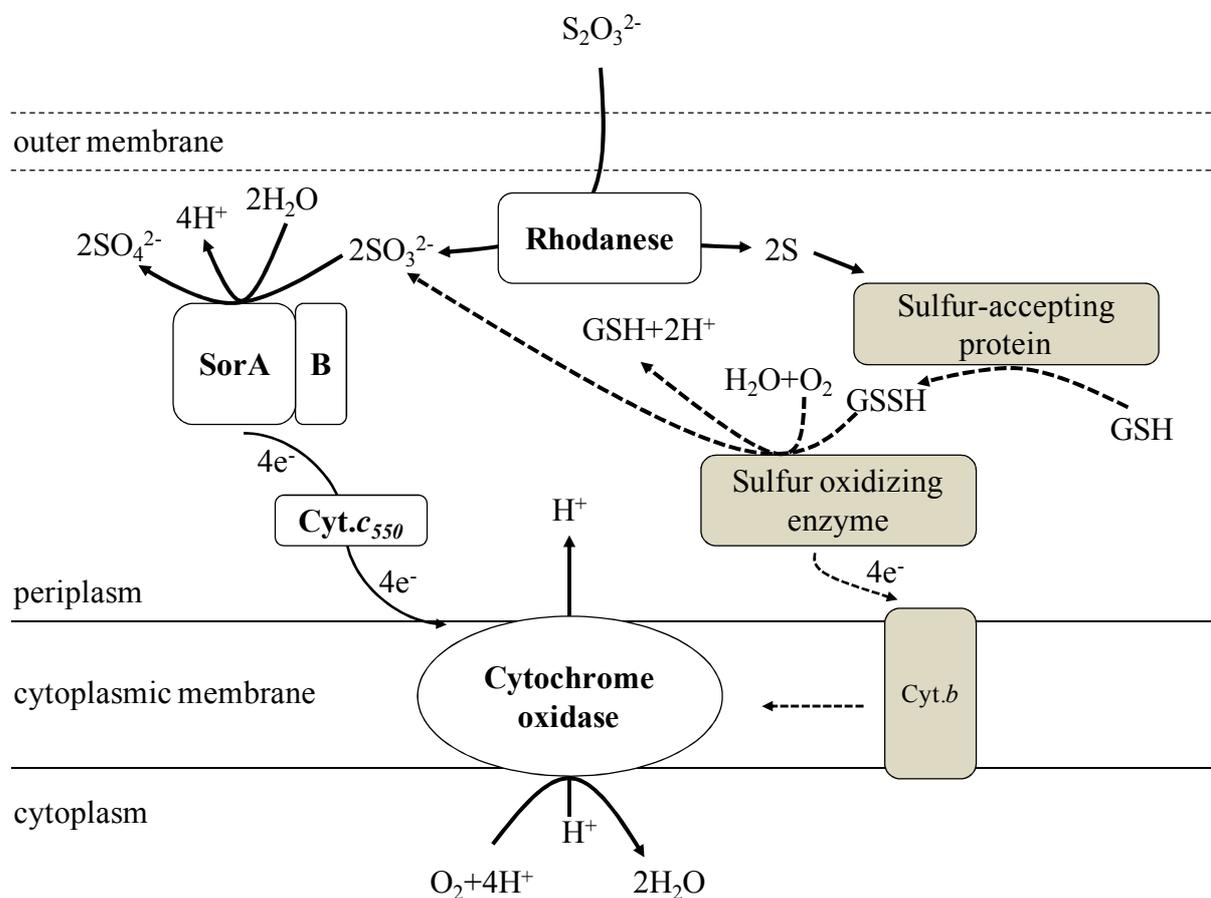


**Fig. 1-2.** Model of reaction cycle of thiosulfate oxidation by the Sox enzyme of *P. pantotrophus*. [2] XA, heterodimeric cytochrome *c* complex SoxXA; B, dimanganese sulfate-thioesterase SoxB; YZ, sulfur-binding complex SoxYZ; CD, 2 2-heterotetrameric SoxCD complex of the molybdoprotein SoxC and the cytochrome *c* SoxD.

### 1.2.2 *Starkeya nobella* の system

*Starkeya novella* は、チオ硫酸酸化のために2つの経路を持っており、一つは、不完全ながらも、Sox タンパク質の複合体である。もう一つは、ロダネース、硫黄酸化酵素、亜硫酸：シトクロム *c* 酸化還元酵素 (Sor, Sulfite:cytochrome *c* oxidoreductase) およびシトクロム *c* 酸化酵素を含む、膜結合型複合酵素である。最初に、チオ硫酸が、ロダネースによって亜硫酸と硫黄に分解される。生じた亜硫酸は、SorAB によって硫酸に酸化されると同時に電子をシトクロム *c* に渡し、末端酵素のシトクロム *c* 酸化酵素まで電子が運ばれる (Fig.1-3)。この電子伝達系は、*in vitro* での再構築がすでになされている [3]。しかしながら、最初のチオ硫酸の分解で生じた硫黄が、どのように亜硫酸に酸化されるかは、未解明である。Charles ら [4] は、*S. novella* の無細胞抽出液で、グルタチオン依存性硫黄酸化酵素活性を報告し、Kappler ら [5] は、硫黄を硫黄酸化酵素に輸送することができる硫黄受容タンパク質を発見し

た。これらのデータを基に、*S. novella* において推測されるチオ硫酸酸化経路を Fig. 1-3 に示す。

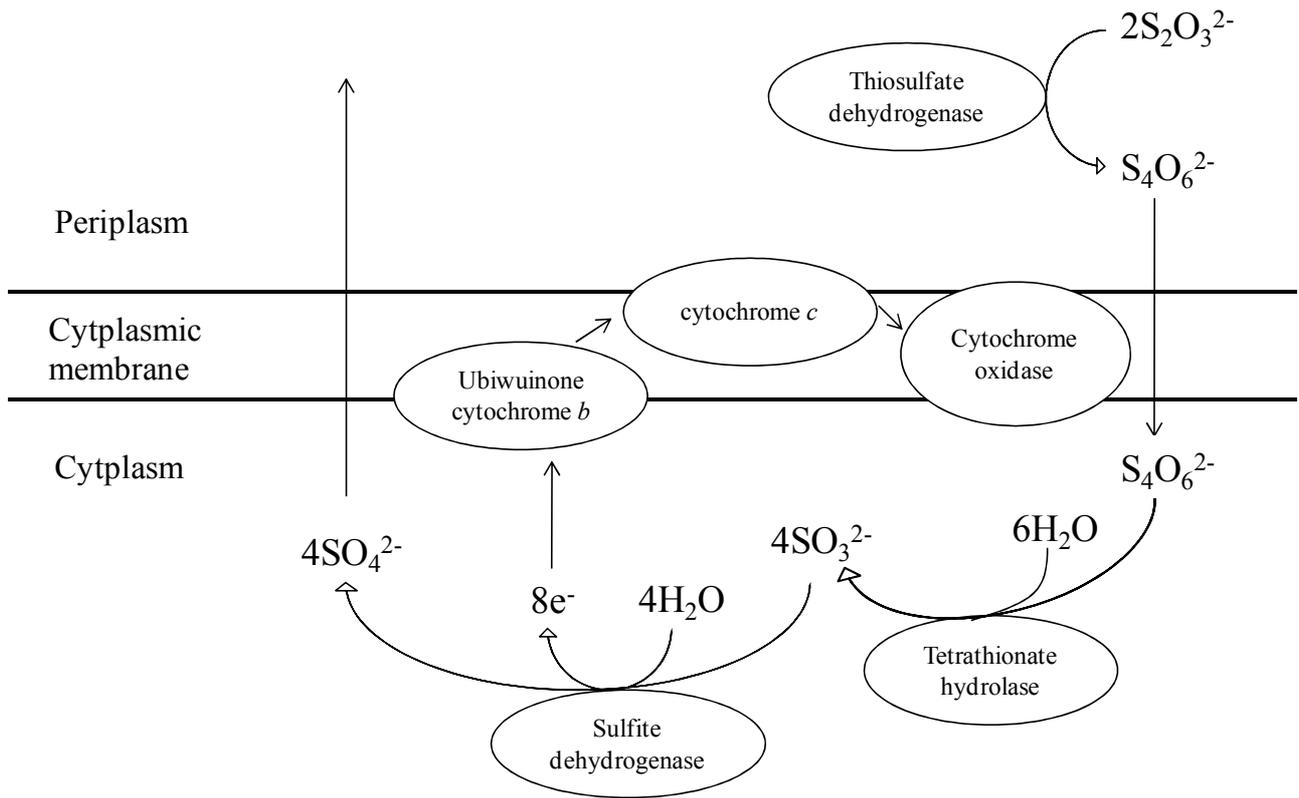


**Fig. 1-3.** Pathway of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella*. [5]

Shaded components, hypothetical proteins or enzymes; unshaded components, identified proteins or enzymes; dotted arrows, postulated reactions; GSH, glutathione; GSSH, Glutathione heterodisulfide.

### 1.2.3 S4 intermediate pathway

S4 経路は、*Thiobacillus* 属に特徴的な経路で、チオ硫酸での生育中にテトラチオン酸を中間体として生じるチオ硫酸の酸化経路である。*T. tepidarius* におけるチオ硫酸酸化のメカニズムは、ペリプラズム空間において、2 分子のチオ硫酸から 1 分子のテトラチオン酸が生成され、生じた電子が *c*-type cytochrome に伝達されると提案されている [1]。生じたテトラチオン酸は、ペリプラズムではなく、細胞質内に輸送されてから、硫酸へと酸化される。



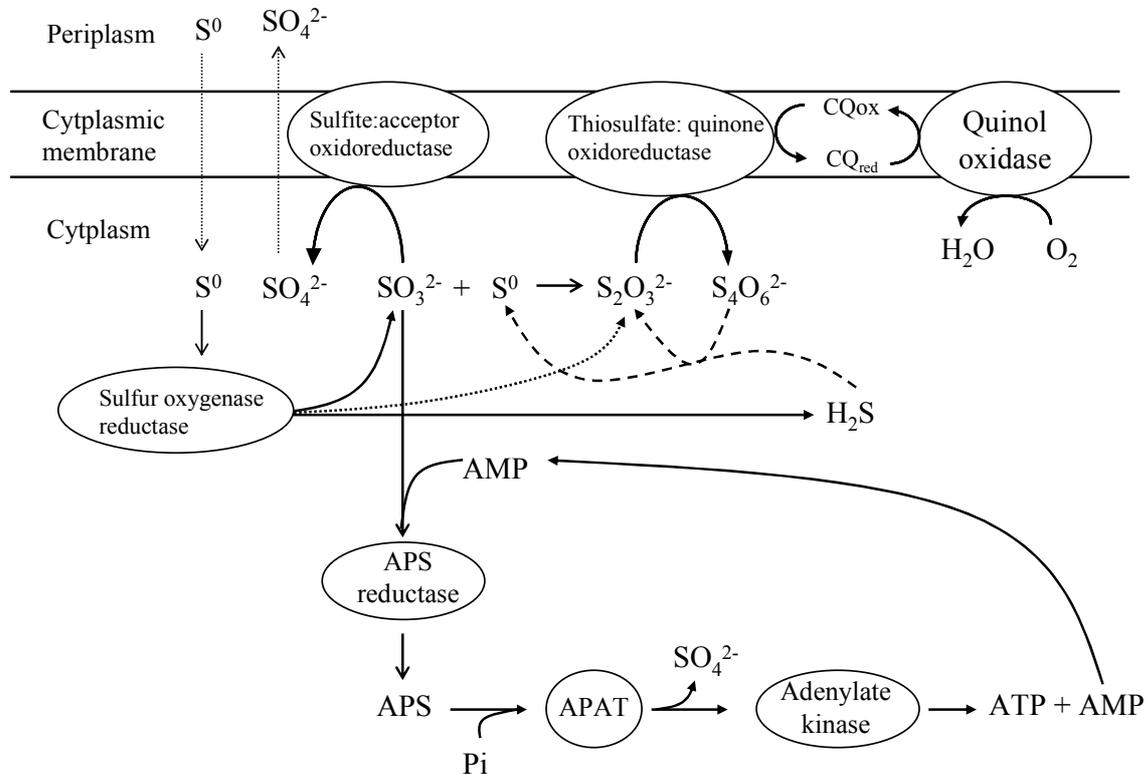
**Fig. 1-4.** Chemolithotrophic thiosulfate oxidation by the S4I pathway as proposed in *Thermithiobacillus tepidarius* [1, 6] and later supported by studies in *Acidithiobacillus caldus* [7] and *Therathio bacter kashmirensis* [8].

Thiosulfate is oxidized to tetrathionate in the periplasmic space while tetrathionate hydrolysis yielding sulfite as one of the intermediates takes place in the cytoplasm or in close vicinity of the inside of the cell membrane, followed by oxidation of sulfite to sulfate in same cellular compartment.

### 1.2.4 古細菌の経路

好熱塩性古細菌 *Acidianus ambivalens* は、膜結合型チオ硫酸：キノン酸化還元酵素 (TQO) によってチオ硫酸を代謝し、その反応生成物はテトラチオン酸である。TQO の 2 つのサブユニット (16 および 28 kDa) は、*doxDA* にコードされており、その相同体は、*Sulfolobus solfataricus* や *S. tokodaii* にも存在する。好気性古細菌である *Acidianus* や *Sulfolobus* は、電子供与体として元素硫黄を用い、可溶性、膜結合型両方の酵素を含む経路を使って、亜硫酸やチオ硫酸を経て硫黄を酸化する。Kletzin ら[9]によって提案された経路では、元素硫黄が細胞質の硫黄酸化還元酵素 (SOR) によって酸化され、チオ硫酸と亜硫酸、硫化水素を生じると想定されている (Fig. 1-5)。生じたチオ硫酸や亜硫酸が、TQO や SAOR の活性によってエネルギー生成に利用されると考えられる。

TQO に相同性のあるタンパク質をコードしている遺伝子が、*A. ferrooxidans* や *A. caldus*、*A. thiooxidans*、*A. ferrivorans* でも見つかっているが、その生化学的機能は明らかにされていない[10, 11, 12, 13, 14]。



**Fig. 1-5.** Model for sulfur oxidation in *Acidianus ambivalens*. [9]

AAPT, adenylylsulfate: phosphate adenylyltransferase; Pi, inorganic phosphate; dotted arrows, reactions postulated; broken arrows, non enzymatic reactions.

### 1.3 バクテリアリーチングのメカニズム

バクテリアリーチングとは、鉱石中の有用金属（銅、コバルト、ニッケル、亜鉛、ウランなど）を細菌の作用によって溶出させる技術である。バクテリアリーチングについては、これまで多くの研究がなされ、そのメカニズムはほぼ解明されており[15, 16]、三価鉄 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) やプロトン ( $\text{H}^+$ ) が関与する科学的なプロセスによる金属溶出が主要なメカニズムである。Rohwerder らは、チオ硫酸の関与するチオ硫酸経路とポリサルファイドと元素硫黄の関与するポリサルファイド経路について詳細に述べている[16]。チオ硫酸酸化経路は酸に不溶性な金属硫化物 ( $\text{FeS}_2$ 、 $\text{MoS}_2$  および  $\text{WS}_2$ ) の酸化に利用され (Fig. 1-6 A)、ポリサルファイド経路は、酸可溶性金属硫化物 ( $\text{ZnS}$ 、 $\text{PbS}$ 、 $\text{FeAsS}$ 、 $\text{CuFeS}_2$  および  $\text{MnS}_2$ ) の酸化に利用

される (Fig. 1-6 B)。

パイライト ( $\text{FeS}_2$ ) などの金属硫化物は、三価鉄によって酸化され、二価鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) とチオ硫酸として遊離する。金属硫化物のこの酸化機構は、最初に遊離してくる硫黄化合物がチオ硫酸であるため、チオ硫酸経路と呼ばれている。生じたチオ硫酸は、テトラチオン酸 ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) などのポリチオン酸 ( $\text{SnO}_6^{2-}$ ) を経て、最終的に硫酸にまで酸化される。

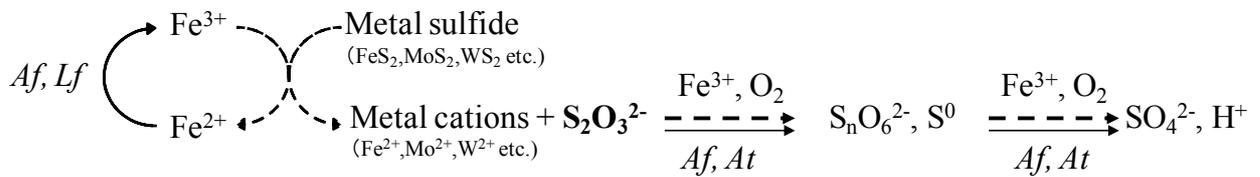
一方、カルコパイライト ( $\text{CuFeS}_2$ ) などの酸可溶性金属硫化物は、ポリサルファイド経路で溶出される。このグループの金属硫化物では、金属および硫黄部分の結合はプロトンアタックによって破壊される。2分子のプロトンが結合すると、硫黄部分は硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) として遊離し、この硫化物ラジカルは、高分子ポリサルファイドを経て、ポリサルファイドと元素硫黄を生産する。生じた元素硫黄は最終的に硫酸にまで酸化され、プロトンが再びプロトンアタックへと再利用される。この経路は、ポリサルファイドを経由して行われるので、ポリサルファイド経路と呼ばれる。硫黄酸化細菌非存在下で、この経路はその硫化物の 90%以上を元素硫黄へと酸化することができる[17]。チオ硫酸酸化経路では、金属硫化物からの金属溶出の最初のステップに、三価鉄の還元を必要としたが、ポリサルファイド経路では、金属の溶出がプロトンアタックのみでも進行するため、硫黄酸化細菌だけでも駆動可能である。しかしながら、硫化物ラジカルからポリサルファイドや元素硫黄への非生物的酸化には、三価鉄を必要とするので、効率的なリーチングを考えると、三価鉄の存在は大きい。

上記したいずれの経路においても、三価鉄の存在は全体の効率を大きく左右する。酸化鉄が金属の溶出やチオ硫酸およびポリサルファイドの酸化に共役して還元されると二価鉄が生じる。生じた二価鉄は、鉄酸化細菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans* や *Leptospirillum ferrooxidans*) によって生物的に酸化され、三価鉄として再利用される。また、三価鉄によって非生物的酸化によって進むチオ硫酸やポリサルファイドの酸化は、硫黄酸化細菌 (*Acidithiobacillus thiooxidans* や *Acidithiobacillus caldus*) や鉄酸化細菌 (*A. ferrooxidans*) によって生物的にも進む。

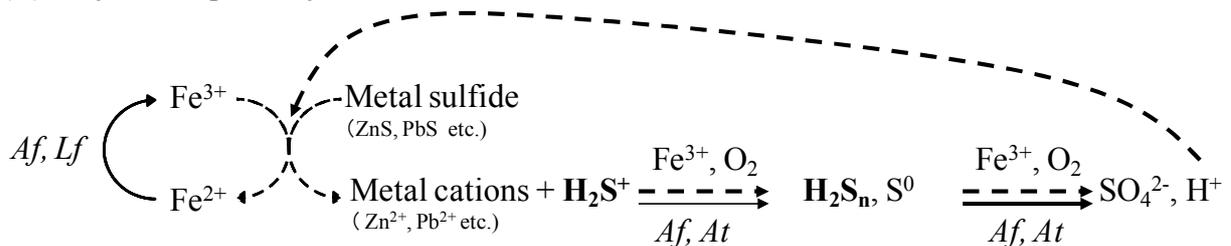
このように、バクテリアリーチングの反応において重要な因子は、三価鉄や硫酸の生成である。そこで、鉄や硫黄酸化能力のある化学合成独立栄養細菌が、本技術においては重要な生物となる。特に、(i) 大気中の二酸化炭素を固定して独立栄養的に生育できる、

(ii) 電子供与体として二価鉄あるいは還元型硫黄化合物を利用することができる、(iii) 低い pH 環境下でも生育可能な好酸性菌である、(iv) 様々な金属イオンに耐性をしめすような生物が求められている。そこで、様々な重金属に耐性を持ち[18]、好酸性で化学合成独立栄養性の鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* がモデル生物として最もよく研究されており[19]、ATCC 23270 株を用いたゲノム配列の解析や、分子遺伝学的な総説もなされている[20, 21]。

(A) Thiosulfate pathway



(B) Polysulfide pathway



**Fig. 1-6.** Bioleaching process by two different mechanisms via thiosulfate (A) and polysulfide (B) pathway. Dotted and solid arrows represent the chemical reaction and biooxidation, respectively. *Af*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Lf*, *Leptospurullum ferrooxidans*; and *At*, *Acidithiobacillus thiooxidans*. [17]

鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* の鉄酸化経路については、よく研究されており、二価鉄から酸素への電子伝達鎖として、少なくとも 2 つの *c*-type cytochrome (14 kDa の可溶性 cytochrome *c* [22] や *c*<sub>4</sub> cytochrome [23] ) および rusticyanin を経由し、末端酸化酵素として *aa3*-type cytochrome *c* oxidase を使用する経路が提案されている[22]。しかし、*A. ferrooxidans* は、種々の還元型硫黄化合物を酸化する能力を持っているが[24, 25, 26]、酸化される硫黄化合物が多様なこと、化学的反応性が高いこともあり、鉄酸化経路のように確立されていない。

#### 1.4 *Acidithobacillus ferrooxidans* で提案されている硫黄代謝経路

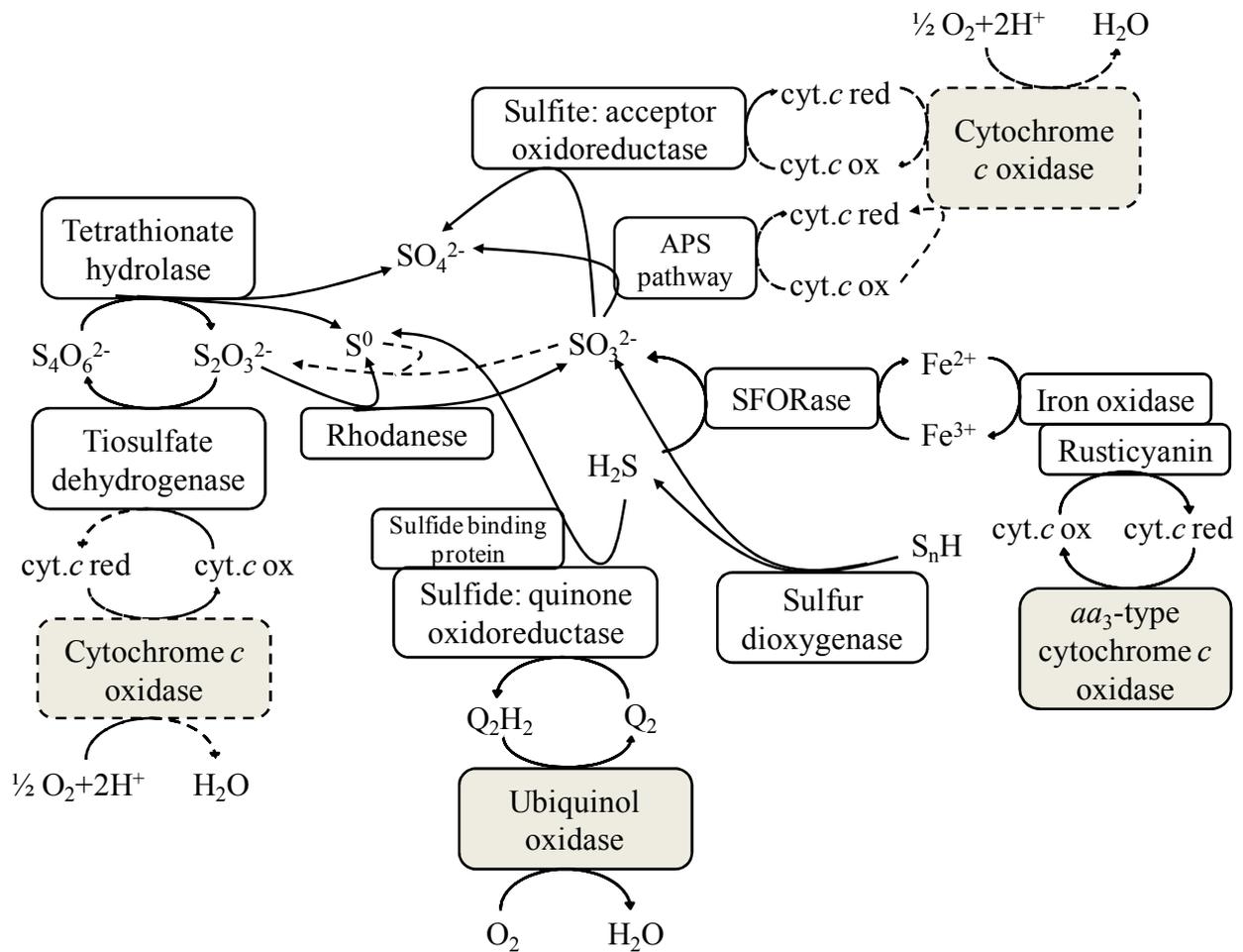
すでに述べたように、細菌の硫黄化合物酸化には非常に多くのメカニズムが存在し、*A. ferrooxidans* の RISCs 酸化にも、これらの酵素のうちいくつかが関与していることが報告されているが、未解明の部分が多い。これまでに、還元型グルタチオンを必要とする元素硫黄の酸化、硫化物酸化に関与する酵素として、チオ硫酸のテトラチオン酸への酸化を触媒するチオ硫酸酸化酵素[27]、チオ硫酸の亜硫酸および硫黄への不均化反応を触媒する Rhodanese[28]など多くの酵素が報告されている。また、酸化鉄の還元と共役した元素硫黄や亜硫酸酸化の機構も提案されている[29, 30] (Fig. 1-7)。

末端酸化酵素系の阻害剤を用いたこれまでの研究で、硫黄の酸化が、キノン関連酵素の阻害剤である HQNO によって顕著に阻害され、Cytochrome *c* oxidase 阻害剤の cyanide(KCN) や azide( $\text{NaN}_3$ )によってそれほど阻害されない[31]ことから、二価鉄と元素硫黄は、2 つの異なる経路で酸化されることが示唆されている[32, 33]。*A. ferrooxidans* NASF-1 株からは、Ubiquinol oxidase が精製されており、硫黄の酸化経路として sulfide: quinone oxidoreductase (SQR) を介して Ubiquinol oxidase に電子が渡される経路も提案されている。

*A. ferrooxidans* は、バイオリッチングの機構を解明するためのモデル微生物として使用され、研究が行われてきた。*A. ferrooxidans* のゲノム配列から、鉄の酸化に関与するタンパク質は、*rus* オペロンと *pet* オペロンにコードされていることが明らかとなった。二価鉄からの電子は、より高い酸化還元電位の電子伝達系に輸送される downhill、あるいは低い電子伝達成分に輸送される uphill 経路を経て、*aa<sub>3</sub>*-type cytochrome *c* oxidase や NADH デヒドロゲナーゼに渡されると考えられている[16, 34, 35, 36, 37]。

一方、すでに述べたように本菌の硫黄代謝機構は不明な点が多い。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。

その機構の解明は、本菌のバクテリアリーチング能の向上のための技術開発に新たな知見を提供するものと期待される。そこで、本論文では、第二章においてチオ硫酸デヒドロゲナーゼについて解析を行った。さらに第三章では各種還元型硫黄化合物の代謝酵素の発現調節に関する解析を行った。



**Fig. 1-7.** Mechanism proposed for the oxidation of reduced sulfur compounds in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Solid arrows represent enzymatic conversions, and dotted arrows show chemical reactions and undefined reaction.

## 第二章 チオ硫酸デヒドロゲナーゼの解析

### 2.1 緒言

*Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二価鉄や還元型無機硫黄化合物 (RISCs: reduced inorganic sulfur compounds) の酸化からエネルギーを得る、好酸性、化学合成独立栄養細菌である。この細菌は、工業的バイオリーチングの応用における重要な生物の一つであり[16, 20, 25, 38]、二価鉄の酸化については、かなり詳細に解明されている[12, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 43]。鉄酸化系には、Cyc2、Rusticyanin, CycI と *aa*<sub>3</sub>-タイプのシトクロム *c* 酸化酵素が含まれている。これらのタンパク質は、*rus* オペロンにコードされており、鉄が存在するとその発現が活性化され、RISCs のみの培養では、発現が抑制されることが報告されている。一方、好氣的な RISCs 酸化については、関与すると考えられる酵素活性が、これまでの研究でいくつか見つかっている[10, 27, 35, 44, 45, 46]。RISCs や金属硫化物で生育した細胞内には、ロダネース様タンパク質、硫化物：キノン酸化還元酵素 (SQR)、テトラチオン酸加水分解酵素 (TTH)、および機能未知のタンパク質が、高発現することが知られており、これらの酵素やタンパク質が、硫黄酸化に関与することが強く示唆されている[1, 15, 38, 42, 47, 48, 49]。RISCs は、化学的に反応し、いくつかの反応が非酵素的に生じるため、この細菌における生物的硫黄酸化のメカニズムは、未だ明らかにされていない。

第一章で述べたように、分類学的ならびに生理学的に多様な化学合成硫黄酸化細菌が、呼吸においてチオ硫酸を電子供与体として利用でき[50,51]、いくつかのチオ硫酸酸化酵素系が報告されている。*A. ferrooxidans* によるバクテリアリーチングでは、鉱石の硫黄成分がチオ硫酸を介して代謝されることが報告されている[52]。また、我々は、*A. ferrooxidans* が硫黄を酸化する際にテトラチオン酸や硫化水素が、中間体として形成され、これらの中間体は、テトラチオン酸加水分解酵素 (TTH) や硫化水素：キノン酸化還元酵素 (SQR) によってさらに代謝されることを提案してきた[1, 42, 53]。さらに、*bd*-タイプのユビキノール酸化酵素が、硫黄酸化に関与していることを明らかにした[54]。TTH は、テトラチオン酸をチオ硫酸と硫黄(S<sub>0</sub>)、亜硫酸へと加水分解する。この反応で生じたチオ硫酸は、チオ硫酸：シトクロム *c* 酸化還元酵素 (チオ硫酸デヒドロゲナーゼ ; TSD) やチオ硫酸：キノン

酸化還元酵素 (TQO) によって、酸化されると考えられている。*A. ferrooxidans* は、TQO に相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子を持っているので、TQO がチオ硫酸酸化に関与していると考えられているが、その生化学的特性は明らかにされていない[41, 55]。既に、分子量 45 kDa のタンパク質の 4 量体であるチオ硫酸デヒドロゲナーゼが、*A. ferrooxidans* CCM 4253 から精製されている[56]が、その遺伝子の特徴付けはされていない。そこで、本章では、*A. ferrooxidans* におけるチオ硫酸酸化に関与するチオ硫酸デヒドロゲナーゼの性質を明らかにするとともに、その遺伝子の同定を試みた。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 使用菌株、培地および生育条件

#### 2.2.1.1 鉄酸化細菌

鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株を用いた。本菌の培養は、UME Å 培地 [3.2%  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1%  $\text{KCl}$ , 0.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.014%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ] に、終濃度 3% (w/v) の二価鉄 ( $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) を添加した鉄培地、終濃度 1% (w/v) の元素硫黄 ( $\text{S}^0$ ) を添加した硫黄培地、もしくは終濃度 5 mM のテトラチオン酸 ( $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ ) を添加したテトラチオン酸培地を用いた[20]。鉄培養およびテトラチオン酸培養は、強制通気攪拌培養法を用いて、30°C、7 日間培養した。硫黄培養は、同じく、14 日間培養した。大量培養する際は、前培養として 5 mM テトラチオン酸培地 100 mL に 1 mL 植菌し、室温で 7 日間強制通気培養したものを、5 mM テトラチオン酸培地 4.5 L に接種した。7 日ほどで培養液が白く濁ってきたところで、3 mM テトラチオン酸水溶液を 500 mL 添加し、さらに 8 日間培養した。

#### 2.2.1.2 大腸菌

形質導入には、非発現用宿主として *E. coli* DH5 $\alpha$ 、発現用宿主として *E. coli* BL21 (DE3) を用いた。培養には、LB (Luria-Bertani) 培地 (1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, pH 7.2) を用い、培地の 1/100 量の種菌を植菌後、37°C で振とう培養した (16~18h)。必要に応じて、終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗生物質 (アンピシリン) を加えた。固体培地を作成する場合には、1.5% agarose を加えた。なお形質転換には SOC 培地を用いた。

### 2.2.2 酵素活性測定

#### 2.2.2.1 Thiosulfate dehydrogenase 活性

電子受容体として ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] を用いて、420 nm における吸光度の減少により測定した。50 mM  $\beta$ -alanine buffer (pH 2.5)、1 mM K-ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]、10 mM Na-thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )、200 mM Na-sulfate および酵素を含む反応液中で測定を行った。基質となる Na-thiosulfate を除いた反応液を、プレインキュベート (40°C, 10 min) し、基質の添加により反応を開始した。1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の ferricyanide を還元する酵素量を 1U と

定義する。

熱処理（100°C，10 min）した酵素を化学反応の測定に用い、酵素反応から化学反応を差し引いた。以下の酵素活性も同様に、酵素反応は化学反応を差し引いた値で示した。

#### 2.2.2.2 Thiosulfate:quinone oxidoreductase 活性

電子受容体として ubiquinone を用いて、275 nm における吸光度の減少により測定した。全量 1 mL 中に 50 mM  $\beta$ -alanine buffer (pH 2.5)、30  $\mu$ M ubiquinone-2 (Eizai Co., Tokyo, Japan)、10 mM Na-thiosulfate および酵素を含む反応液で活性測定を行った。基質となる Na-thiosulfate を除いた反応液を、プレインキュベート（37°C、10 min）し、基質の添加により反応を開始した。

#### 2.2.2.3 Thiosulfate:cytochrome c oxidoreductase 活性

電子受容体として、酸化型の馬心臓シトクロム *c* を用いて、550 nm の吸光度の上昇により測定した。全量 1 mL 中に、50 mM  $\beta$ -alanine buffer (pH 2.5)、0.1 mg 馬の心臓シトクロム *c*、10 mM Na-thiosulfate および酵素を含む反応液で活性測定を行った。基質となる Na-thiosulfate を除いた反応液を、プレインキュベート（40°C，10 min）し、基質の添加により反応を開始した。

#### 2.2.2.4 Sulfite:ferricyanide oxidoreductase 活性

電子受容体として ferricyanide [ $K_3Fe(CN)_6$ ] を用いて、420 nm における吸光度の減少により測定した。50 mM  $\beta$ -alanine buffer (pH 2.5)、1 mM K-ferricyanide [ $K_3Fe(CN)_6$ ]、200 mM  $K_2SO_4$ 、10 mM K-sulfite ( $K_2SO_3$ ) および酵素を含む反応液中（1 mL）で測定を行った。基質となる K-sulfite を除いた反応液を、プレインキュベート（37°C，10 min）し、基質の添加により反応を開始した。

### 2.2.3 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株からの Thiosulfate dehydrogenase の精製

#### 2.2.3.1 ペリプラズム画分調製法

テトラチオン酸培地で 15 日間培養した *A. ferrooxidans* ATCC 23270 培養液を No5B ろ紙

を用いてろ過することによって、硫黄を除去した後、遠心分離（6,000 × g, 10 min, 4°C）で集菌した。菌体を、0.1 M potassium phosphate buffer (KPB) (pH 6.3) で3回洗浄後、氷上で超音波破碎 [破碎 30 s, 静置(4°C) 1 min を 300 cycle] を行い、遠心（10,000 × g, 10 min）することによって、無細胞画分を調製した。この無細胞抽出画分を、超遠心分離（110,000 × g, 60 min, 4°C, TL-100 Ultracentrifuge, BECKMAN）して得られた沈殿を、5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、10 % glycerol、1 mM Dithiothreitol (DTT) を含む 0.1 mM KPB (pH 6.3) に懸濁し、膜画分とした。上清（可溶性画分）に、乳鉢ですり潰した硫酸 [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] を終濃度 3 M になるように、4°Cで攪拌しながら徐々に添加し、塩析を行った。氷上で1時間攪拌し、遠心分離（20,000 × g, 10 min, 4°C）で得られた沈殿を、5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1 mM DTT を含む 20 mM citrate buffer (pH 4.0) に懸濁し、30分氷上に静置、再度遠心分離（20,000 × g, 10 min, 4°C）して、得られた上清を pH 4.0 上清画分（ペリプラズム画分）、沈殿を、5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1 mM DTT を含む 0.1 mM KPB (pH 6.3) に懸濁し、pH 4.0 沈殿画分（細胞質画分）とした。

#### 2.2.3.2 透析

セロファン透析チューブを用いて pH 4.0 上清画分の硫酸を除くため、20 mM citrate buffer (pH 4.0) を用いて透析を行った。長めに切ったチューブを10分間程度煮沸し、片方の端を固く結んで、サンプルを7分目まで充填。交換用溶液中に浮かべ、静かに溶液を攪拌し、1時間後に外液を交換した後、一晩透析を行った。外液はサンプルの20~30倍量で行った。

#### 2.2.3.3 イオン交換クロマトグラフィー

AKTAprime plus (GL. science) に ToyoScreen CM-650M (φ6.4 mm × 3 cm, TOSOH) を装着し、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。平衡化には、5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1 mM Dithiothreitol (DTT) を含む 20 mM citrate buffer (pH 4.0) を用い、溶出には 0–0.5 M NaCl の直線的濃度勾配を用いた。流速は 1.0 mL/min、0.5 mL ずつ分画した。

#### 2.2.3.4 疎水性クロマトグラフィー

AKTAprime plus (GL. science) に ToyoScreen Butyl-650M (φ14.6 mm × 3 cm, TOSOH) を

装着し、疎水クロマトグラフィーを行った。平衡化には、5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1 mM Dithiothreitol (DTT)、1.33 M 硫酸アンモニウム (30% 硫安) を含む 20 mM citrate buffer (pH 4.0) を用い、溶出には 1.33–0 M 硫酸アンモニウムの直線的濃度勾配を用いた。流速は 1.0 mL/min、1.0 mL ずつ分画した。

#### 2.2.3.5 ゲルろ過クロマトグラフィー

AKTAprime plus (GL science) に TSKgel G3000SW (φ8.0 mm × 30 cm, TOSOH) を装着し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。平衡化には 5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1 mM Dithiothreitol (DTT)、0.2 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM citrate buffer (pH 4.0) を用いた。流速は 0.3 mL/min、1.0 mL ずつ分画した。タンパク質の分子量を決定するために、分子量スタンダードとして、Thyroglobulin (669kDa)、Ferrithin (440kDa)、Catalase (232kDa)、Aldolase (158kDa)、Albumin (67kDa)、Ovalbumin (43kDa)、Chymotrypsinogen (25kDa)、Ribonuclease (13.7kDa) (Gel Filtration Calibration Kits、Amersham Biosciences) を用いた。

### 2.2.4 大腸菌における *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株由来 *tsd* 遺伝子のクローニングと発現タンパク質の精製

#### 2.2.4.1 ゲノム DNA の精製

洗浄菌体を saline-EDTA solution [0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M EDTA, 50 mM NaCl] 中に懸濁し、氷上で 60 分間静置した。遠心分離 (12,000 × g, 10 min) して得られた沈殿を、10 mM EDTA、150 mM NaCl、0.2 % sodium dodecylsulfate を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し溶菌した。proteinase K/phenol/chloroform 法およびエタノール沈殿法により、ゲノム DNA を抽出した。

#### 2.2.4.2 *tsd* 遺伝子のクローニング

##### 2.2.4.2.1 *tsd* 遺伝子の PCR 増幅

*tsd* 遺伝子は、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 株から抽出したゲノム DNA を鋳型に用いて、後述の反応液および反応条件で増幅した。増幅した DNA は、1.5 %アガロースゲル電気泳動によって分離し、約 700 bp の PCR 産物のバンドを切り出し、GFX PCR DNA and Gel Band

Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製した。

制限酵素部位 NdeI (下線部) を持つ forward primer ThioD-F-NdeI (5'-AATGCCTCCCATATGGCCGCCGCGCATGAGC-3') は、*A. ferrooxidans* 23270 株から精製された TDS の N 末端アミノ酸配列を基に構築した。制限酵素部位 XhoI (下線部) を持つ reverse primer ThioD-R-XhoI (5'-CTCATTTCCTCGAGAGTTATTTGGCGTACTG-3') は、*A. ferrooxidans* 全ゲノムデータベースから得られたオープンリーディングフレームの C 末端領域の相補的な配列から設計された。

*tsd* 遺伝子は、シグナルペプチドをコードする塩基配列を持っており、ペリプラズムで発現すると考えられるが、使用したプライマーは TSD のシグナルペプチドを除いた部分を増幅するように設計した。したがって、遺伝子発現タンパク質は、細胞質で発現する。

PCR reaction component	
×10 reaction buffer (KOD Plus)	5.0 μl
2 mM dNTPs	5.0 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2.0 μl
10 μM F Primer (ThioD-F-NdeI)	1.5 μl
10 μM R Primer (ThioD-R-XhoI)	1.5 μl
KOD Plus polymerase	1.0 μl
Template DNA	x μl
D.D.W.	34-x μl
	50 μl

PCR reaction cycle	
94°C	2:00
94°C	0:15
58°C	0:30
68°C	1:30
} 30 cycle	
68°C	3:00
4°C	∞

#### 2.2.4.2.2 pUC-*tsd* の作成

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 株から増幅させた *tsd* 遺伝子を pUC119 に導入し、pUC-*tsd* を作成した。pUC を、制限酵素 *Sma*I を用いて 30°C で一晩処理し、反応物をアガロースゲル電気泳動に供した後、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製した。制限酵素処理を行った pUC119 と *A. ferrooxidans* ATCC23270 株由来 *tsd* 遺伝子が 1:10 になるように調整した溶液に、TOYOBO Ligation high ver.2 を加え、16°C で 60 分反応させた。

非発現宿主である *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell (40  $\mu$ L) を氷上で融解し、ライゲーション処理した溶液を 2  $\mu$ L 加えた。氷中に 5 分間静置後、42°C に保った温水に 30~40 秒浸け、Heat-shock 処理を行った。氷中に 2 分静置後、SOC 培地を 160  $\mu$ L 加え、37°C で 60 分インキュベートした。LB plate (+Amp) に、反応液を 50  $\mu$ L ずつプレーティングし、37°C で一晩培養した。青白選択により生じた白コロニーへの *tsd* 遺伝子の挿入を、インサートチェックにより確認した。選別した菌株を LB 培地 (+Amp) を用いて、37°C で一晩振とう培養した。菌体からプラスミドを抽出し、これを pUC-*tsd* とした。インサートチェックには、Insert Check -Ready- (TOYOBO) を使用した。

使用したプライマーと PCR の反応条件は下記のとおりである。

##### Insert Check -Ready- Primer

Name	Sequence (5'→3')
M13 Primer P7	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13 Primer P8	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGAAAC

##### PCR reaction cycle

94°C	4:00	
94°C	0:30	} 30 cycle
60°C	0:05	
72°C	0:30	
72°C	3:00	
4°C	$\infty$	

### 2.2.4.2.3 pET-*tsd* 作成

pUC-*tsd* の *tsd* 遺伝子を pET-21a にライゲーションするため、制限酵素 NdeI と XhoI を使用し、37°Cで一晩反応させた。反応物をアガロースゲル電気泳動に供して、目的のバンドを切り出し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製し、ライゲーションの試料とした。

NdeI と XhoI で制限酵素処理を行った pET21a と上記の *tsd* 遺伝子が 1:5 になるように調整した溶液に、TOYOBO Ligation high ver.2 を加え、16°Cで 60 分反応させた。

非発現宿主である *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell (40  $\mu$ L) を氷上で融解し、ライゲーション処理した溶液を 2  $\mu$ L 加えた。氷中に 5 分間静置後、42°Cに保った温水に 30~40 秒浸け、Heat-shock 処理を行った。氷中に 2 分静置し、SOC 培地を 160  $\mu$ L 加え、37°Cで 60 分インキュベートした。

LB plate (+Amp) に、反応液を 50  $\mu$ L ずつプレーティングし、37°Cで一晩培養後、*tsd* 遺伝子の挿入を、T7 Promoter と T7 Terminator プライマーを用いたコロニーPCR 法で確認した。確認できたコロニーを、LB 培地 (+Amp) を用い 37°Cで一晩振とう培養し、プラスミドを抽出した。*tsd* 遺伝子の挿入の有無は、制限酵素 NdeI と XhoI を用いて確認し、これを pET-*tsd* とした。大腸菌からのプラスミド抽出には、Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA)を用いた。

### 2.2.4.3 *tsd* 遺伝子の発現と組み換えタンパク質の精製

#### 2.2.4.3.1 *tsd* 遺伝子の発現

pET-*tsd* を *E. coli* DH5 $\alpha$  から、Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) を用いて精製した。このプラスミドを、発現用宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 中に Heat-Shock (42°C, 30 s) で導入した。形質転換の成否は、前述のコロニーPCR により行った。

*E. coli* BL21 (DE3) (pET-*tsd*) を培地に植菌して、37°Cで培養後、OD<sub>660</sub> の値 0.4~0.7 を目安に、終濃度 0.2 mM になるように isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) を添加して 37°Cで 1 晩培養して TSD の発現誘導を行った。

#### 2.2.4.3.2 組換え TSD の精製

発現誘導を行った大腸菌を遠心分離 (12,000 × g, 10 min, 4°C) に供して、集菌し、菌体を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に懸濁して全細胞画分を得た。超音波破碎 (破碎 30 s, 静置 (氷上) 30 s を 30 cycle) によって菌体を破碎した後、遠心分離 (12,000 × g, 10 min, 4°C) して、上清を無細胞抽出画分として回収した。この画分に乳鉢ですり潰した硫酸を最終濃度 3 M になるように、4°C で攪拌しながら徐々に添加した。氷上で 30 分静置し、遠心分離 (12,000 × g, 10 min, 4°C) して得られた沈殿を、1.33 M の硫酸を含む 20 mM citrate buffer (pH 4.0) に懸濁し、30 分氷上に静置、再度遠心分離 (12,000 × g, 10 min, 4°C) して、得られた上清を酸性可溶性画分とした。この画分を疎水性クロマトグラフィー (2.2.3.4 参照) に供して TSD を精製した。

#### 2.2.5 タンパク質解析

##### 2.2.5.1 タンパク質定量法 (Bradford 法)

タンパク質は、Bradford 法による呈色反応によって測定した。試薬には Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) を用いた。5 倍希釈した Bio-Rad Protein Assay を 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに分注し、それぞれ Sample を 20 μL 加えて、十分に攪拌してから室温で 5 分間静置した。その後、595 nm の波長で吸光度を測定した。検量線は、牛血清アルブミン (BSA) を用いて作成した。

##### 2.2.5.2 Sodium dodecyl sulfate-polyacryl amid gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli の方法に従って、15% 泳動ゲルを用いて行った。電気泳動後のゲルは、染色液 (0.25 % Coomassie brilliant blue R-250, 45 % methanol, 10 % acetic acid) に浸して、30 分室温で振とうして染色し、脱色液 (10 % methanol, 10 % acetic acid) に浸して、バックグラウンドが薄くなるまで脱色した。

##### 2.2.5.3 N-末端アミノ酸解析

Butyl 650M column クロマトグラフィー後の Sample を SDS-PAGE によって分離し、ゲルを Transfer buffer [100 mM Tris, 192 mM glycine, 5 % (v/v) MtOH, D.D.W] に 20 分間浸し

た。ゲルサイズに切った PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜とろ紙も同様に Transfer buffer に浸した。PVDF 膜は、buffer に浸す前に、MtOH で親水化した。セミドライブブロッキング装置 (ホライズブロット ; AE-6677 型 ; ATTO) に陽極側からろ紙 3 枚、膜、ゲル、ろ紙 3 枚の順に重ね、 $2 \text{ mA/cm}^2$  の定電流で 2 時間通電した。陰極側の buffer には、0.02 % の SDS を添加し、タンパク質がゲルから抜けやすいようにした。膜の染色は、アミドブラック染色液 [0.6%(w/v) Amido Black 10B, 40% MeOH, 10% acetic acid, MilliQ 水] および脱色液 [50% MtOH, 7% acetic acid, D.D.W] を用いて行った。目的のバンドをカッターナイフで切りだし、この PVDF 膜をプロテインシークエンサーに供して、N 末端アミノ酸配列を決定した。

## 2.2.6 硫黄化合物解析

### 2.2.6.1 テトラチオン酸の定量

反応溶液から  $100 \mu\text{L}$  サンプルングを行い、 $0.1 \text{ M KCN}$   $250 \mu\text{L}$  と D.D.W  $150 \mu\text{L}$  に 混合、室温で 5 分間静置させた。その後、 $25 \text{ mM Fe}(\text{NO}_3)_3\text{-HNO}_3$   $250 \mu\text{L}$  と D.D.W  $250 \mu\text{L}$  を添加し、2 分以内に  $460 \text{ nm}$  の吸光度を測定した。

### 2.2.6.2 チオ硫酸の定量

反応溶液から  $25 \mu\text{L}$  サンプルングを行い、 $50 \text{ mM } \beta\text{-alanine buffer}$   $75 \mu\text{L}$  (5 倍希釈するため)  $0.1 \text{ M KCN}$   $250 \mu\text{L}$  と D.D.W  $150 \mu\text{L}$  に混合、室温で 5 分間静置させた。その後、 $25 \text{ mM Fe}(\text{NO}_3)_3\text{-HNO}_3$   $250 \mu\text{L}$  と  $33 \text{ mM CuCO}_2$   $250 \mu\text{L}$  を添加し、2 分以内に  $460 \text{ nm}$  の吸光度を測定した。

## 2.2.7 PCR 解析

$1 \text{ L}$  の二価鉄培地で 10 日間、硫黄培地、テトラチオン酸培地では 14 日間、 $30^\circ\text{C}$  で浸透培養した細胞を遠心し、 $1 \text{ mM EDTA}$  を含む  $10 \text{ mM Tris-HCl buffer}$  で懸濁後、RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Bacteria (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いて RNA の抽出を行い、ゲノム DNA を除去するために、RNase-free DNase (Invitrogen) で処理した。RNA 濃度は、Quant-iT RNA Assay kit (Invitrogen) を用い、Qubit fluorometer (Invitrogen) により

測定した。

等量の total RNA (0.067 µg) を用い、cDNA を調製した。反応溶液には、0.5 mM dNTPs mixture、2 µL の 10 µM revers primer (P14-R2)、0.067 µg の total RNA、4 µL の 5 × buffer、および 1 µL ReverTra Ace (TOYOBO) を含み、20 µL になるように調製した。42°C で 60 分、酵素反応を行い、99°C で 5 分間変性させた。調製した cDNA を鋳型 DNA として、PCR を行った。反応溶液には、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgSO<sub>4</sub>、0.4 µL ずつの 10 µM forward primer (TSD-F1) と reverse primer (MOD-R2)、2 µL の 10 × buffer、および 0.4 µl KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を含み下記に示す反応条件で PCR を行った。実験に用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 株の DNA ゲノム配列 (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>) を基にデザインした (Table 2-1)。2%アガロースゲル電気泳動によって増幅を確認した。

**Table 2-1** Primer used in this study

name	Sequence	Tm (°C)
TSD-F1	GCTGCAGGAATTGAGTAACC	55,52
MOD-R2	TCCACGTCATGTTGCCGATG	57,55

PCR reaction cycle

94°C	3:00	
98°C	0:10	} 30 cycle
60°C	0:30	
68°C	0:35	
68°C	3:00	
4°C	∞	

### 2.2.8 遺伝子解析

*A. ferrooxidans* 23270 株の全ゲノム配列、アノテーションおよび AFE number は、Comprehensive Microbial Resource (CMR) を利用した。

(J. Craig Venter Institute, <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>).

TSD の相同性解析には、NCBI の BLAST を使用した。AFE 番号は、NCBI のナンバリングのものを使用した。 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

## 2.3 結果および考察

### 2.3.1 テトラチオン酸生育 *A. ferrooxidans* 細胞の TSD 活性検出

テトラチオン酸加水分解酵素 (TTH) は、テトラチオン酸で生育した *A. ferrooxidans* 細胞で不可欠な酵素であり、テトラチオン酸をチオ硫酸と硫黄、そして亜硫酸に加水分解する反応を触媒する[57]。それゆえに、チオ硫酸酸化に関与する酵素もまた、テトラチオン酸上での *A. ferrooxidans* の生育に不可欠である。無細胞抽出液とフェリシアン、チオ硫酸を含む反応液中で TSD の活性を pH 1.5 から 6.0 の範囲で測定したが、活性は検出できなかった。*A. ferrooxidans* ATCC 23270 由来のテトラチオン酸加水分解酵素 (TTH) は、その活性発現に硫酸イオンを必要とする[58]ことから、本酵素においても硫酸イオンの影響を検討した。TSD 活性は、硫酸カリウムや硫酸ナトリウムを、反応液に加えることによって検出され、200 mM の硫酸ナトリウムを添加した時に最大活性が、得られた (Fig. 2-1)。塩化カリウムや塩化ナトリウムではこの効果を示さなかったことから、酵素活性の発現には硫酸イオンが必要であることが明らかとなった (Fig. 2-2)。

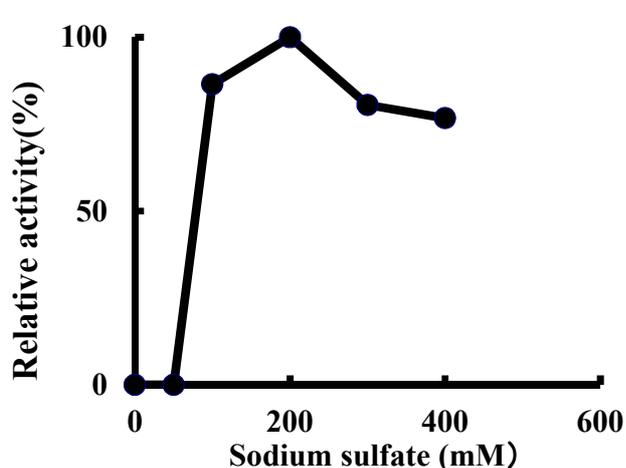


Fig. 2-1. Effect of sodium sulfate on the activity of thiosulfate:ferricyanide oxidoreductase.

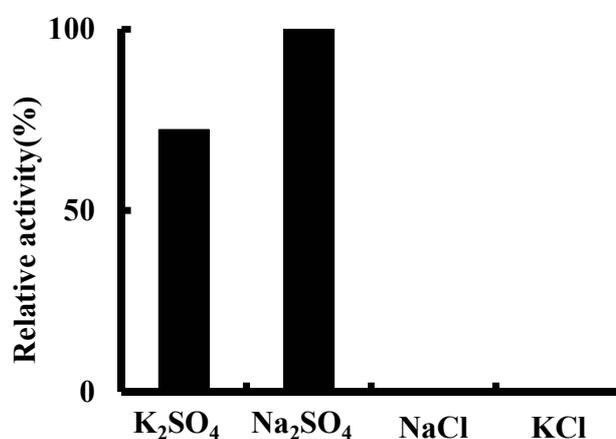
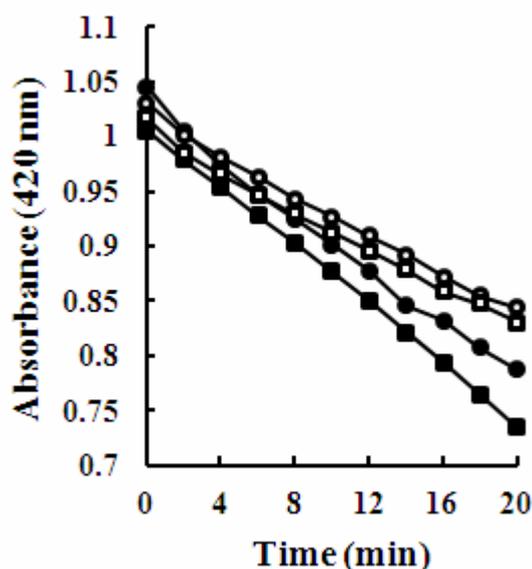


Fig. 2-2. Effects of sodium sulfate, potassium sulfate, sodium chloride, and potassium chloride on the activity of thiosulfate:ferricyanide oxidoreductase. Activities were measured in the presence of 200 mM of K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 100 mM of NaCl or KCl

チオ硫酸は、4.0 より低い pH では不安定であり[59]、3.5 より低い pH では、フェリシアンとだけでなく、二価鉄イオンとも化学的に反応してしまう。しかしながら、熱処理により失活させた酵素を用いた非酵素反応に比べ、優位な酵素活性が検出された (Fig. 2-3)。なお、Fig.2-3 で示す活性のタイムコースは、10 mM チオ硫酸ナトリウム、1 mM フェリシアン化カリウム、200 mM の硫酸ナトリウムおよび 60  $\mu\text{g/ml}$  のタンパク質を含む反応液を用い、pH 2.5、40°Cで測定したものである。

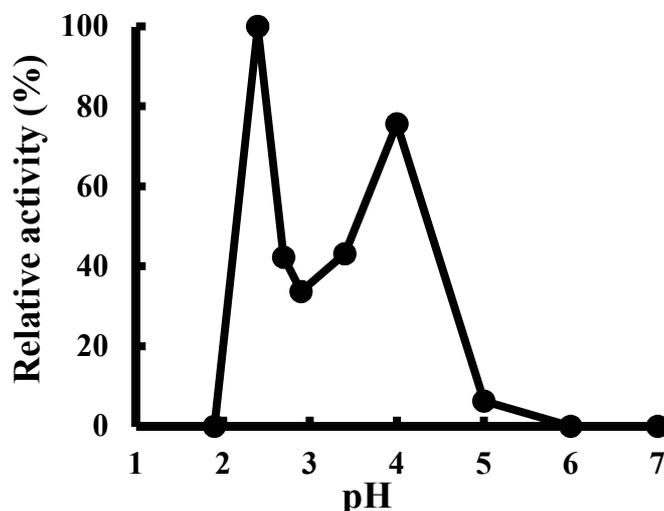


**Fig. 2-3.** Time course of the absorbance changes at 420 nm after mixing of thiosulfate and ferricyanide with soluble fraction (circle) or soluble fraction at pH 4 (square) from *A. ferrooxidans*. The enzymatic reactions and the non-enzymatic reactions by heat inactivated enzymes (10 min at 100 °C) were shown in black and white, respectively.

酵素活性に及ぼす pH の影響を調べた結果、2つのピーク (pH 2.5 と 4.0) が検出された。少なくとも2つの異なる酵素が、テトラチオン酸生育細胞によるチオ硫酸酸化に関与していることを示唆している (Fig. 2-4)。最適 pH 2.5 を持つ酵素活性は、可溶性画分から検出され、もう一つの pH 4.0 に最適 pH を持つ活性は、膜画分に検出された。

我々は、すでに、SQR や TTH が、硫黄やテトラチオン酸培地で生育した細胞内では合成されるが、二価鉄培地で生育した細胞では合成されないことを報告している[17,40]。同様に、TSD 活性は、硫黄生育細胞から調製された可溶性画分からも、テトラチオン酸生育細胞から調製された可溶性画分からも、それぞれ 0.063 U/mg と 0.085 U/mg 検出され

たが、鉄生育した細胞の可溶性画分からは検出されなかった。この結果は、*tsd* 遺伝子は、RISCs の存在下で、特異的に発現することを示唆している。



**Fig. 2-4.** Effect of pH on the activity of thiosulfate:ferricyanide oxidoreductase by cell-free-extract. Activities were measured in the presence of 200 mM sodium sulfate.

### 2.3.2 テトラチオン酸生育 *A. ferrooxidans* 細胞の可用性画分からの TSD の精製

TSD は、テトラチオン酸で生育した *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株から調製した可溶性画分から精製した。可溶性画分を 20 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で透析し、20,000 × g で 10 分間遠心した。TSD 活性は、上清に検出された。*A. ferrooxidans* は、好酸性細菌であり、ペリプラズムの pH は、2.5–3.0 の間であることから、pH 4.0 でも可溶性であるというこの結果は、TSD がペリプラズムに局在していることを示唆している。

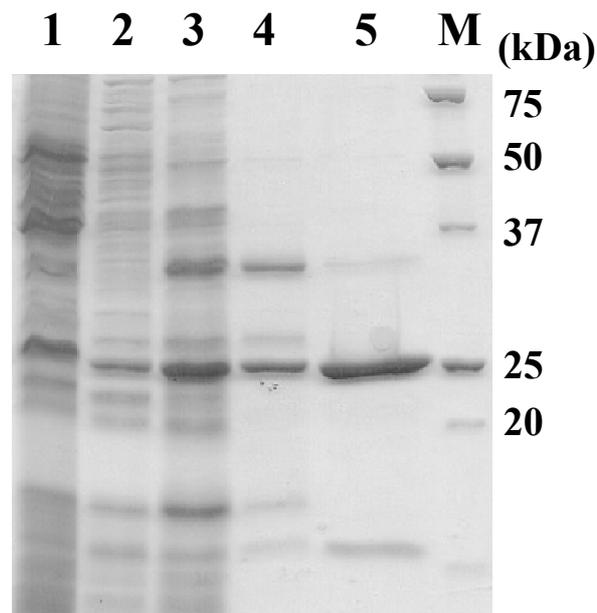
TSD の部分精製は、Table.2-2 で示した手順で行い、細胞抽出液から回収率 3% で 64 倍に精製された。Butyl-650M カラムクロマトグラフィーの活性サンプルを、TSK ゲル G3000 カラムクロマトグラフィーにかけると、比活性が大幅に減少したので、Butyl-650M カラムクロマトグラフィーのサンプルを、諸性質の検討に使用した。

Fig. 2-5 に示すように、SDS-PAGE 分析によって、CM-650M カラムクロマトグラフィー後のサンプル (lane 4) と比較して、Butyl-650M カラムクロマトグラフィー後のサンプル (lane 5) で分子量 25 kDa のバンドが濃くなっていることが示された。比活性もまた、増加した (Table 2-2)。従って、この 25 kDa に分子量を持つタンパク質が、TSD 活性を示すと結論

付けられた。データは示さないが、TSK ゲル G3000 を使用したゲルろ過分析の結果から、TSD がモノマー構造であることが明らかとなった。

**Table 2-2.** Purification of thiosulfate dehydrogenase with the pH optimum at 2.5 from soluble fractions of tetrathionate-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270

Purification step	Total protein	Specific activity	Total activity	Recovery	Purification
	(mg)	( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	(%)	(fold)
Cell-free extract	200.8	0.05	10.0	100	1.0
Soluble fraction	55.1	0.09	4.9	49	1.8
Soluble fraction at pH 4.0	11.1	0.20	2.2	22	4.0
CM650M fraction	1.3	2.28	3.0	30	45.6
Butyl650M fraction	0.1	3.16	0.3	3	63.2

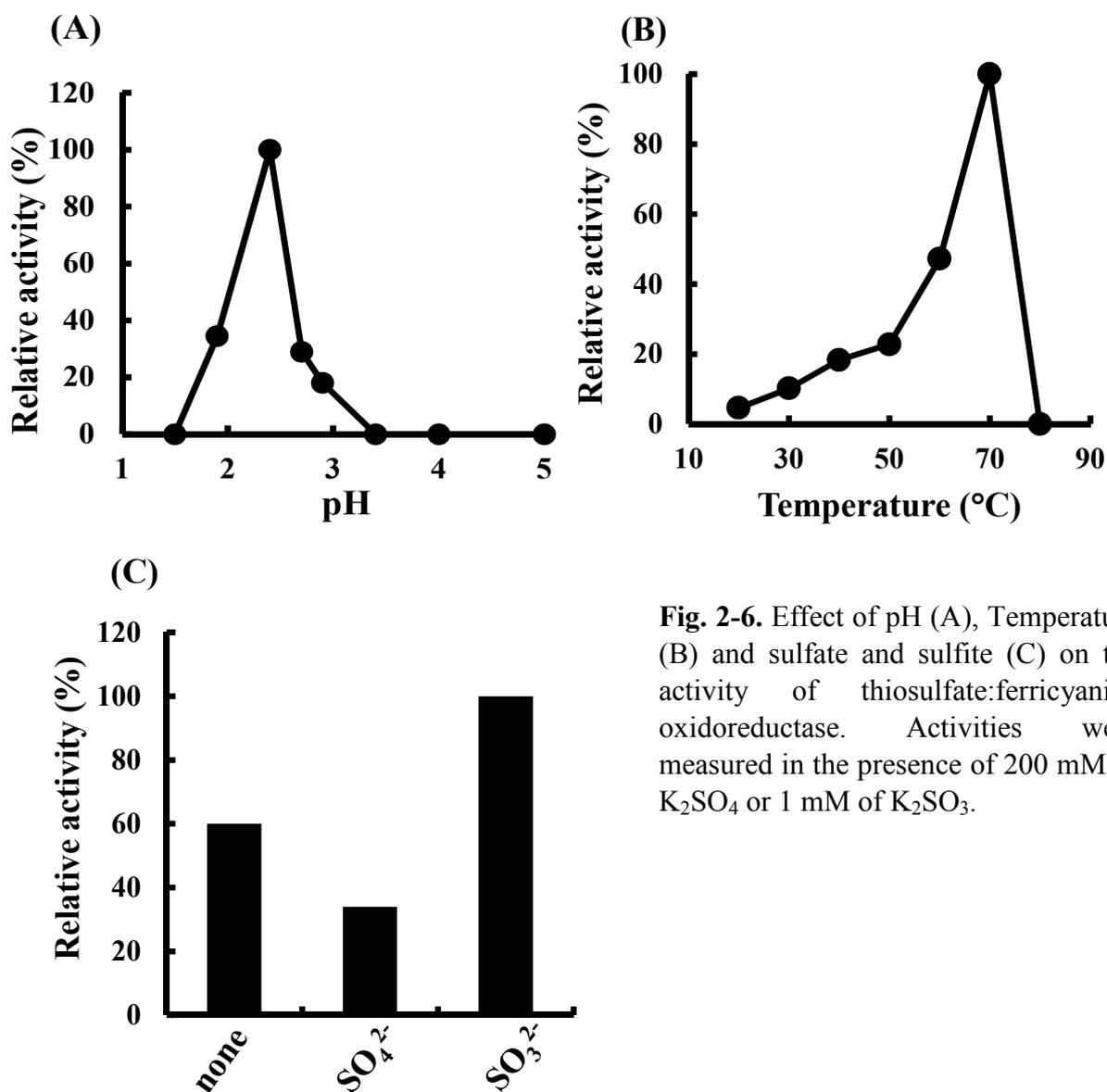


**Fig. 2-5.** SDS-PAGE of partially purified thiosulfate dehydrogenase. M, size marker; 1, Cell-free extract; 2, Soluble fraction; 3, Soluble fraction at pH 4.0; 4, CM650M; 5, Butyl650M.

### 2.3.3 部分精製 TSD の性質

#### 2.3.3.1 最適 pH、最適温度および硫酸イオン等の影響

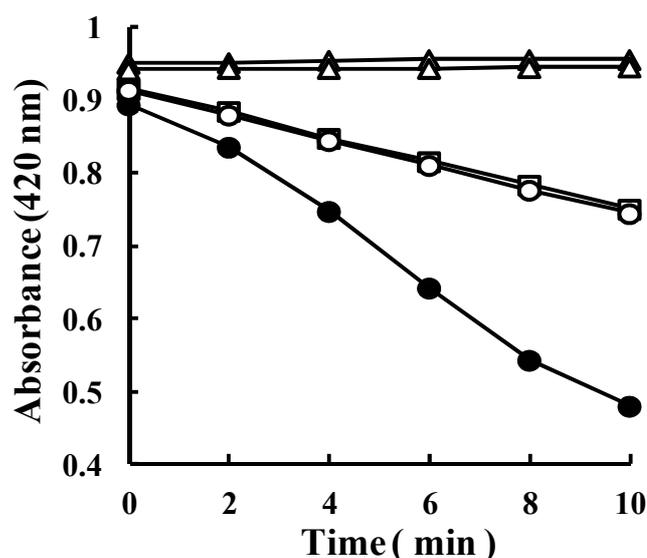
酵素活性の最適 pH と温度は、それぞれ、pH 2.5 と 70°C であった (Fig. 2-6 A,B)。可溶性画分の酵素は、活性のために硫酸を必要としたが、Butyl-650M カラムクロマトグラフィーで精製した後の TSD 活性は、硫酸イオン非存在下でも活性を示し、高濃度の硫酸イオンでは阻害された。硫酸ナトリウム非存在下での酵素活性の約 45% が、200 mM 硫酸ナトリウムによって阻害された (Fig. 2-6 C)。1 mM の亜硫酸は、酵素活性を活性化した (Fig. 2-6 C)。しかしながら、1 mM より高濃度の亜硫酸は、酵素活性を阻害し、10 mM の亜硫酸で、完全に阻害された。



**Fig. 2-6.** Effect of pH (A), Temperature (B) and sulfate and sulfite (C) on the activity of thiosulfate:ferricyanide oxidoreductase. Activities were measured in the presence of 200 mM of K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or 1 mM of K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.

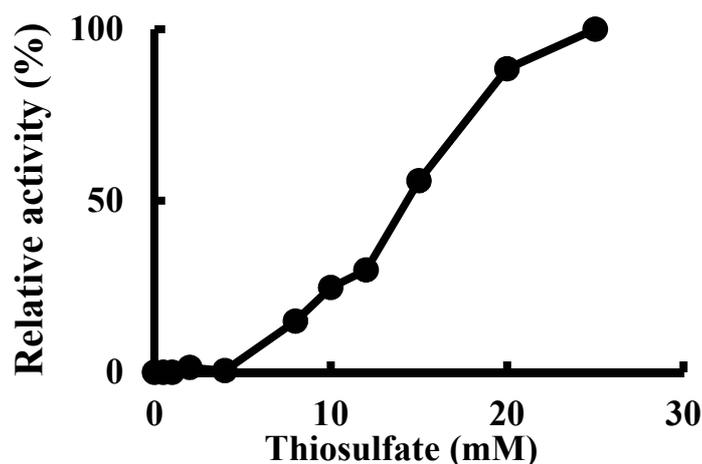
### 2.3.3.2 電子受容体の検討および基質特異性と最適基質濃度

部分精製された本酵素は、ユビキノンや馬心臓シトクロム *c* を電子受容体として利用しなかった。また、チオ硫酸を基質として加えた場合、Fig.2-7 に示したように、フェリシアンの還元が観察されたが、亜硫酸やテトラチオン酸では観察されなかった。さらに、熱処理して失活させた酵素を用いて化学反応を測定したところ、チオ硫酸はケミカルにフェリシアンを還元するのに対して、亜硫酸では、ケミカルな還元は起こらなかった (Fig. 2-7)。



**Fig. 2-7.** Time course of the absorbance changes at 420 nm after mixing of thiosulfate or sulfite and ferricyanide in the presence or absence of enzyme. Black circle, thiosulfate and enzyme; open circle, thiosulfate and heat-denatured enzyme; white square, thiosulfate and water; black triangle, sulfite and enzyme; white triangle, only enzyme without substrates.

1 mM のフェリシアンを含む反応液中、亜硫酸ナトリウム非存在下で得られた  $K_m$  値は、15 mM と推定された (Fig. 2-8)。また、チオ硫酸の濃度が 4 mM よりも低いときには、酵素活性が検出されなかった。pH が 4.0 より低い条件では、チオ硫酸が不安定であるため、TSD のみかけ上の  $K_m$  値は、もう少し低いと考えられる。これまでの報告には *A. ferrooxidans* 由来の TSD は、 $K_m$  値が 0.9 mM であるという報告もある[25]。基質濃度と反応速度の関係は、シグモイド曲線を示した (Fig. 2-8)。これは、本酵素がアロステリック酵素であり、酵素反応にアロステリックエフェクターを必要としていることを示唆している。



**Fig. 2-8.** Effect of thiosulfate concentration on the activity of thiosulfate:ferricyanide oxidoreductase. Activities were measured in the presence of 1 mM ferricyanide at pH 2.5.

*A. ferrooxidans* からは、2つのチオ硫酸酸化酵素の精製が報告されている。Silver と Lundgren は、ヘムを持たず、最適 pH を 5.0 に持つ酵素を報告しているが、その酵素の分子量は、述べられていない[27]。Janiczek らは、最適 pH を 3.0 に持ち、分子量 45 kDa のサブユニットから成る酵素を報告しているが、酵素活性への硫酸イオンの影響や、タンパク質をコードしている遺伝子についての報告はない[57]。報告されている酵素の分子量は、この研究で部分精製された TSD のものと、明らかに異なる。また、チオ硫酸やジチオン酸で還元した酵素の可視吸収スペクトルの結果、本研究で報告されたタンパク質内にヘムの存在を示す典型的なピークは示されなかった（データは示さない）。

### 2.3.4 チオ硫酸酸化の化学量論

温度に伴って、化学的な分解反応が増加するため、TSD によるチオ硫酸酸化の化学量論は、20°C で、5 mM のチオ硫酸と 1 mM のフェリシアンを含む反応液中で測定した (Fig. 2-9)。チオ硫酸酸化の最終産物は、テトラチオン酸であった。30 分間の反応で、0.33 mM チオ硫酸が 0.18 mM テトラチオン酸へ、また、60 分間の反応で 0.78 mM チオ硫酸が 0.33 mM テトラチオン酸へ、化学量論的に転換されることが、シアノリシスによる定量で明らかとなった。この結果は、TSD が、2 分子のチオ硫酸から、1 分子のテトラチオン酸の形成を触媒することを示した。

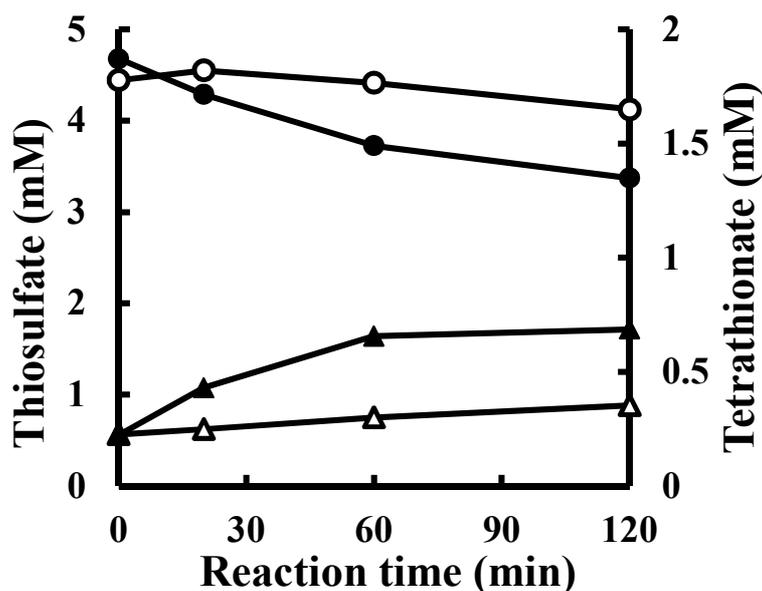


Fig. 2-9. Stoichiometry on thiosulfate consumption and the tetrathionate formation by the enzymatic traction of the thiosulfate dehydrogenase.

Thiosulfate in the presence (●) and absence (○) of the enzyme. Tetrathionate in the presence (▲) and absence (△) of the enzyme.

### 2.3.5 *A. ferrooxidans* の TSD をコードしている遺伝子の同定と発現

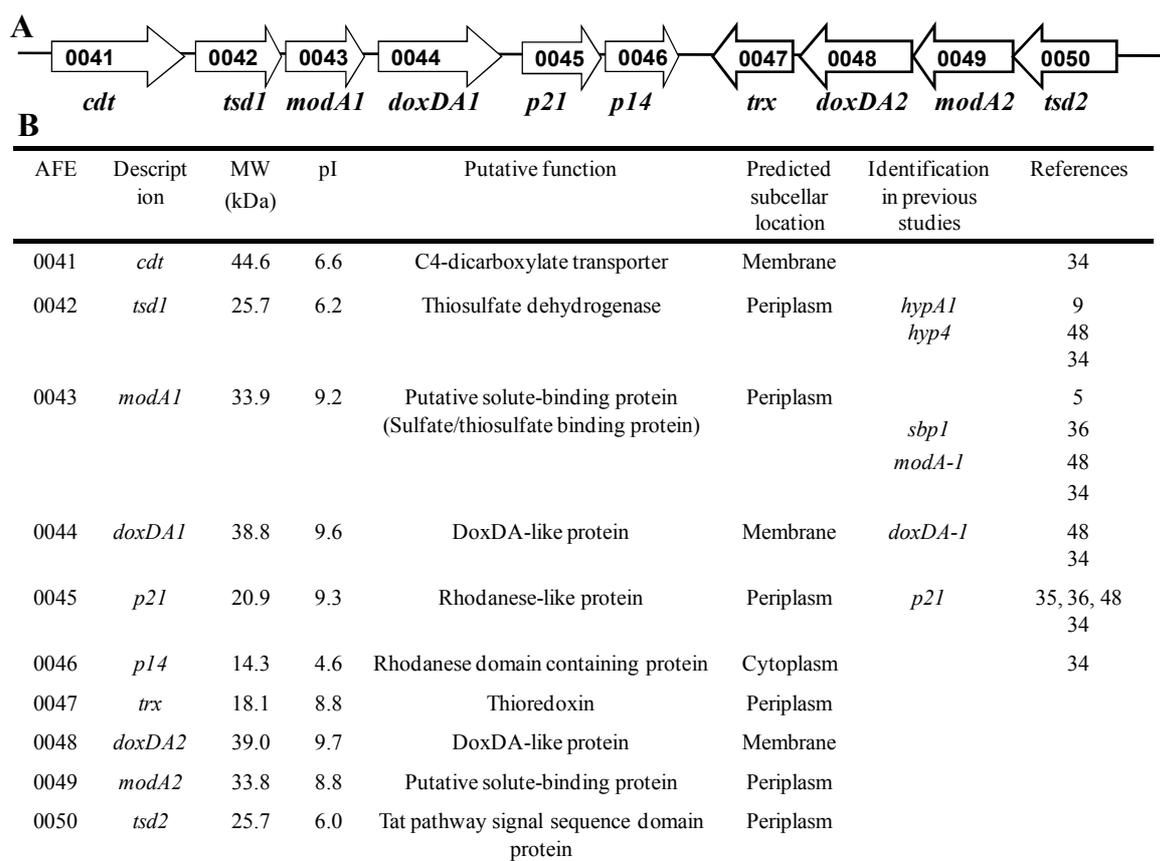
#### 2.3.5.1 遺伝子の同定

分子量 25 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列は、AGMSGNPANLLPTGA であると決定された。National Center for Biotechnology Information nonredundant database を利用した BLASTP 検索の結果、*A. ferrooxidans* ATCC 53993 におけるタンパク質をコードしていると推測される Lferr\_0043 が、この 15 アミノ酸配列を含むことが示された。*A. ferrooxidans* ATCC23270 株の中で、これに対応する遺伝子は、GenBank database によると、AFE\_0042 であった。この 15 アミノ酸配列を含む遺伝子 (810 bp) は、推定されるシグナルペプチド (N末端から 37 アミノ酸) を含む 270 アミノ酸のタンパク質をコードしている (Fig. 2-11)。シグナルペプチドの存在は、このタンパク質がペリプラズムに局在することを示唆した。シグナルペプチドを持たない (233 アミノ酸) 成熟したタンパク質の分子量は、25,796 Da、等電点は、6.2 と推測された。先に述べたとおり、スペクトル分析とヘム染色によって、このタンパク質がヘムを持っていないことが明らかとされている。AFE\_0042 のアミノ酸配列

の中に、ヘム結合領域や、鉄-硫黄クラスター、モリブデンの様な金属共有因子結合領域は保存されていなかった。AFE\_0042 は、硫黄の存在でその発現が制御される遺伝子（参考文献の中では *hyp4*）としてすでに報告されており、二価鉄よりも硫黄培地でその発現が活性化されることが分かっている[40, 38]。硫黄代謝に AFE\_0042 が関与していることが示唆されているが、その機能は明らかにされていなかった。AFE\_0042（参考文献の中では HypA1）のペリプラズム局在性も、既に報告されている[48]。

AFE\_0042 遺伝子を囲む領域は、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 のゲノム配列上ですでに分析されている[12, 40, 49, 60]（Fig. 2-10）。この領域は、Fig. 2-10 に示すように、硫黄代謝に関与する遺伝子がクラスターを形成していることから、注目を集めている[15, 49]。2つの TSD 相同体と、2つの溶質結合タンパク質相同体、2つの DoxDA 相同体、ロダネース領域を含む2つのタンパク質とチオレドキシソキシソ相同体が、この領域には含まれている。ロダネース様タンパク質をコードしている *p21* は、二価鉄で生育した細胞と比較して、硫黄で生育した細胞で高く発現することが報告されている[12, 40, 47, 49, 60]。*p21* タンパク質の機能はまだ明らかにされていないが、硫黄代謝に関与していることは強く示唆されている。類似した遺伝子構造(*tsdI-modAI-docDAI* だけで、他の部分は違う)が、*Gluconobacter oxydans* の遺伝子で、すでに見つかっている[41]。

AFE\_0042 相同体をコードしている遺伝子は、*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Acidiphilium multivorum*、*Thiomonas intermedis*、*Hydrogenobaculum* sp、*Burkholderia cencepacia*、*Gluconobacter oxydans* あるいは *Leptospirillum ferrodiazotrophum* から見つかった (Fig.2-11)。RISCs の利用に関しては、*Acidiphilium*、*Thiomonas*、*Hydrogenobaculum* そして *Burkholderia* 属は、チオ硫酸を酸化することができる[10, 19, 44, 61, 62]。*L. ferrodiazotrophum* は、好酸性鉄酸化細菌であるが、エネルギー生成を伴う硫黄酸化を行う可能性が、遺伝子解析によって示されている[63]。*G. oxydans* がチオ硫酸を利用できるという情報はない[64]。また、*A. ferrooxidans* の AFE\_0042 の相同体遺伝子を持つ細菌が、TSD 活性を示すかどうかは今後の課題として残されている。



**Fig 2-10.** (A) Schematic map of the contig region containing the putative gene cluster context around gene *tsd* from *A. ferrooxidans*. (B) Putative functions of AFEs present in this region (see reference 41). AFE, derived from the NCBI numbering. Molecular weight (MW), pI, and export signal prediction was done with sequences from a local database. MW was estimated using the putative amino acid sequence without the signal peptide.

↓

YP002424556	1	<b>MSN</b> ----- <b>ESNL</b> - <b>LSRREAMKRTVL</b> -GAGAVAVGALGANASAMAAGMSGNPANLLPTGAGT <b>LQELS</b> NR <b>LAKAPRRRDFK</b>	72
YP004785011	1	<b>MIN</b> ----- <b>ESNL</b> - <b>LNRRREAMKRAVL</b> -GAGVVAVGAMGASASAMAAGMSGNPGNLLPPGAST <b>LQELS</b> NR <b>LAKAPRRRDFK</b>	72
YP002424564	1	<b>MSN</b> ----- <b>EQNL</b> - <b>LSRRDAMKHALW</b> -GAGALAVGAVGTQTSAVAAGLSGNPGNLLPTGARS <b>LKELGERLAKT</b> PRRRDFK	72
YP003641775	1	<b>MST</b> -----HSPVQPS <b>SRRLALQSTL</b> VAGLGLTALGA---KTAQAASAQERF----MPQ <b>GASTLAE</b> LK <b>GLAAAPRRRDFK</b>	67
YP004284142	1	<b>MSDTGQTERDSSLQLSRR</b> TALSLPAV-GVGTAVI <b>GAM</b> --IMPAAEAANSAPP <b>PNLIT</b> PE <b>SKKLR</b> LAAAL <b>LAKAPRRRNYK</b>	77
YP004675973	1	<b>MT</b> -----MTG----- <b>RRQALQAFGL</b> -ALAAASVGGFT <b>READAAAAHD</b> -----IPAGASALAD <b>LTDRLAKT</b> PRRRDFK	61
YP002120754	1	<b>MDQ</b> ----- <b>SRRNV</b> LKG <b>AAIL</b> -GLGAGMVASALNPTAA <b>KAEEVGA</b> ----L <b>IPK</b> GART <b>LKELAE</b> R <b>LAKAPRRR</b> NFK	63
YP002235043	1	<b>MSD</b> -----RHA----- <b>RRDAL</b> KL <b>LGL</b> -AAGTVLLAA-TRPAHAA <b>APDTG</b> ----T <b>LLP</b> GGAAR <b>LADL</b> TRR <b>LAAT</b> PRRRDFK	64
ZP08900025	1	<b>MND</b> -----MT <b>SNLRADRR</b> HALLGLMA-ATAGATIAT-T <b>STALA</b> ARSSSS----H--ADGT <b>GNLAV</b> L <b>TSQ</b> LARS <b>PRRRDFR</b>	67
ZP08903590	1	<b>MND</b> -----MT <b>SNLRADRR</b> HALLGLMA-ATAGATIAT-T <b>STALA</b> ARSSSS----H--ADGT <b>GNLAV</b> L <b>TSQ</b> LARS <b>PRRRDFR</b>	67
YP190376	1	<b>MND</b> -----MT <b>SNLRADRR</b> HALLGLMA-ATAGATIAT-T <b>STALA</b> ARSSSS----H--ADGT <b>GNLAV</b> L <b>TSQ</b> LARS <b>PRRRDFR</b>	67
EES53836	1	<b>M</b> -----SRSM <b>SRE</b> MLGMLAM <b>GTAGVAL</b> GLGGK <b>VPLAS</b> AEHL---D <b>LQPRGDH</b> HL <b>HALLSAL</b> ARAK <b>RRR</b> YR	67
YP005469801	1	<b>M</b> -----SES <b>VSRE</b> MLGMVATI <b>GAGAAL</b> GLGVG <b>KLPEAAA</b> SEKL---D <b>LEPKGDH</b> HL <b>KALLRAL</b> ERAK <b>RRR</b> YK	67
YP002424556	73	<b>TVPMMLTSPDQW</b> SEALDEILHYAGGPKQVWDNTAL <b>TSPWLN</b> LMRNSM <b>NVQIWS</b> FKHP--DFL <b>L</b> SATHGS <b>SAHFALYD</b> NY	150
YP004785011	73	<b>TVPMILTSPDQW</b> SEALNEVLHYAGGPKQVWDNT <b>VLKSPWLN</b> LMR <b>NAMNCQIWS</b> FKHA--DFFC <b>A</b> SATHGS <b>SAHLALYD</b> NY	150
YP002424564	73	<b>TVPMILTKPDEWD</b> DALREI <b>IHYAGGPKQVWD</b> NTD <b>VSSPWL</b> NLMRNSM <b>NVQVWS</b> FRHP--DFLC <b>V</b> SATHGS <b>SAHFALYD</b> DF	150
YP003641775	68	<b>TTQMVL</b> ENRDEWD <b>AEALD</b> LV <b>LAYAGQPQV</b> WNN <b>NTNLEGPWLN</b> LMR <b>NAMNAQIWS</b> FKHP--DFL <b>V</b> SATHGS <b>SAHLALYD</b> DA	145
YP004284142	78	<b>SVPMIL</b> NSDQW <b>SEALHILF</b> YAAGPKQ <b>IWDNTDLTGPWLN</b> LMR <b>NAMNAQIWS</b> WKHP--NF <b>LAV</b> SATHGS <b>SAHLALYD</b> NY	155
YP004675973	62	<b>TVPMIL</b> DHSDQW <b>DEALKE</b> VLAYK <b>PVTKQAWD</b> VT <b>DIAGPWL</b> NV <b>MRSINAQIWS</b> FKHP--DFL <b>VV</b> SATHGS <b>SAHYALYD</b> QA	139
YP002120754	64	<b>SLEPMV</b> LD <b>PLNWD</b> WEALDE <b>VFHYKGER</b> QVWD <b>NTDHS</b> PWLNLMRNSM <b>NVQVWS</b> YK <b>NP</b> --DFL <b>V</b> SATHGS <b>SAHFALYD</b> Y	141
YP002235043	65	<b>TVPMIL</b> ERPDQW <b>HAALTE</b> VIGY <b>RGGPKQV</b> WDN <b>TELGGPWL</b> NLMRNS <b>LNAQIWS</b> YGHP--DFL <b>VV</b> SATHGS <b>SAHLALF</b> DR <b>I</b>	142
ZP08900025	68	<b>TVPMV</b> LD <b>PLMWD</b> AQALD <b>LVIAYRGER</b> QVWD <b>NTAIDSPWLN</b> LMRNS <b>VNAQVF</b> SFRHP--DFL <b>V</b> SATHGS <b>SAHLALYD</b> Q <b>T</b>	145
ZP08903590	68	<b>TVPMV</b> LD <b>PHMWD</b> AQALD <b>LVIAYRGER</b> QVWD <b>NTAIDSPWLN</b> LMRNS <b>VNAQVF</b> SFRHP--DFL <b>V</b> SATHGS <b>SAHLALYD</b> Q <b>T</b>	145
YP190376	68	<b>TVPMV</b> LD <b>PLMWD</b> AQALD <b>LVIAYRGER</b> QVWD <b>NTAIDSPWLN</b> LMRNS <b>VNAQVF</b> SFRHP--DFL <b>V</b> SATHGS <b>SAHLALYD</b> Q <b>T</b>	145
EES53836	68	<b>SLTMI</b> SLHQ <b>DEWDEAL</b> ALL <b>LHYHAKPQV</b> WD <b>NTIFGSPWLN</b> LMRNS <b>LNAQVY</b> SFGK <b>K</b> --DAL <b>V</b> L <b>SATHGTA</b> HL <b>LGLF</b> DD <b>T</b>	145
YP005469801	68	<b>SVTMI</b> SLHK <b>DEWDEAL</b> SLL <b>FHYRAKPQV</b> WD <b>NTVIGSPWLN</b> LMRNS <b>LNAQVY</b> SFGK <b>K</b> --DAL <b>V</b> L <b>SATHGTA</b> HL <b>LGLF</b> DD <b>H</b>	145
YP002424556	151	<b>IWNKY</b> -LATAT----- <b>KGKWKAN</b> AWL <b>KQPPASAT</b> NPAD <b>FEDPEGV</b> SPHDNS <b>IIVLQRRGAV</b> L <b>LACHNEV</b> WEL <b>TMGLH</b>	222
YP004785011	151	<b>IWNKY</b> -LATLT----- <b>KGKWKAN</b> AWL <b>KQPPASAT</b> NPAD <b>FEDAEGV</b> SPHDNS <b>IIVLQRRGAV</b> L <b>LACHNEV</b> WEL <b>TMGLH</b>	222
YP002424564	151	<b>IWNKY</b> -LAQMT----- <b>GGKWKD</b> NE <b>WIK</b> EP <b>PAAAD</b> PAN <b>FENPEGV</b> SPGDNS <b>SVTLVQRRGAV</b> L <b>LGCHNGI</b> WEL <b>TEGLV</b>	222
YP003641775	146	<b>LWAKY</b> QLGSLT----- <b>KGKAKT</b> NT <b>WIK</b> TS <b>LADAD</b> PK <b>SVEDPKGVY</b> SPADNS <b>ITVLQRRGAV</b> L <b>LACHNAI</b> WEL <b>TGHLH</b>	218
YP004284142	156	<b>IWKY</b> -LSSFT----- <b>GGKFSN</b> NI <b>WIEE</b> PSA <b>SSPASS</b> FND <b>PKGVF</b> SPHDNS <b>IIVLQRRGAV</b> L <b>LACHNEV</b> WEL <b>TMAVL</b>	227
YP004675973	140	<b>MWDKY</b> QFAKIV----- <b>GKGFEK</b> NT <b>LIVDK</b> PA <b>ASAN</b> PAD <b>YESPTGV</b> FSP <b>LNN</b> SI <b>PALQRRGAV</b> L <b>FMSCHNAI</b> WEL <b>QATKLH</b>	212
YP002120754	142	<b>VWETY</b> -ITPLT----- <b>KGK</b> L <b>KNV</b> W <b>LKMP</b> -GM <b>LKDS</b> PT <b>DES</b> G <b>AFSP</b> ADNS <b>VEALIERGAV</b> L <b>LACHNQ</b> T <b>WEMAG</b> ALL	212
YP002235043	143	<b>AWDKY</b> GLAKFA----- <b>GAAFP</b> T <b>NTLL</b> DA <b>KPAQ</b> KA <b>QDHEL</b> PD <b>GAFSS</b> HD <b>NGIAALQRRG</b> IV <b>L</b> S <b>CHNAI</b> WEL <b>LAER</b> LD	215
ZP08900025	146	<b>IWDKY</b> QLAKLA----- <b>GPAFAE</b> NT <b>L</b> IK <b>T</b> -PD <b>GAL</b> DA <b>SAHED</b> PK <b>GLFGAAG</b> NT <b>I</b> P <b>LQKRGV</b> V <b>F</b> MACHNAI <b>WEL</b> Q <b>TGKLI</b>	217
ZP08903590	146	<b>IWDKY</b> QLAKLA----- <b>GPAFAE</b> NT <b>L</b> IK <b>T</b> -PD <b>GAL</b> DA <b>SAHED</b> PK <b>GLFGAAG</b> NT <b>I</b> P <b>LQKRGV</b> V <b>F</b> MACHNAI <b>WEL</b> Q <b>TGKLI</b>	217
YP190376	146	<b>IWDKY</b> QLAKLA----- <b>GPAFAE</b> NT <b>L</b> IK <b>T</b> -PD <b>GAL</b> DA <b>SAHED</b> PK <b>GLFGAAG</b> NT <b>I</b> P <b>LQKRGV</b> V <b>F</b> MACHNAI <b>WEL</b> Q <b>TGKLI</b>	217
EES53836	146	<b>MWEKY</b> RLYKKA----- <b>GVKSK</b> T <b>NPL</b> IR <b>LS</b> P <b>ASTK</b> PL <b>SALND</b> PH <b>GVLS</b> PE <b>DNNI</b> P <b>V</b> LQ <b>ARGV</b> V <b>L</b> LACH <b>MIWEL</b> S <b>GALK</b>	218
YP005469801	146	<b>MWEKY</b> KLHEKA----- <b>GMKSA</b> Q <b>NPL</b> L <b>KRS</b> P <b>ASEK</b> PL <b>SDL</b> NN <b>PH</b> GV <b>LS</b> PE <b>DNNI</b> P <b>V</b> LQ <b>ARGV</b> V <b>L</b> LACH <b>MIWEL</b> S <b>GALK</b>	218
YP002424556	223	<b>SKGINP</b> DHLS <b>SHEEMAAEF</b> T <b>NH</b> LI <b>PGV</b> V <b>LTPGIV</b> GT <b>LPELQ</b> LAG-YQYAK----- 270	270
YP004785011	223	<b>NKGINP</b> SKLS <b>HVEMAAEF</b> T <b>NH</b> LI <b>PGA</b> IL <b>TPGIV</b> GT <b>LPEL</b> LAG-FQYAK----- 270	270
YP002424564	223	<b>KKGINP</b> DGLS <b>HEQMAAEF</b> T <b>NH</b> LI <b>PGV</b> IL <b>TPGV</b> GT <b>LPELQ</b> LAG-FQYAK----- 270	270
YP003641775	219	<b>AIGHNP</b> DKV <b>SHAQMAAEF</b> T <b>NH</b> LI <b>PGAV</b> L <b>TPGIV</b> GT <b>LVE</b> LENAG-YRYAG----- 266	266
YP004284142	228	<b>KRGINP</b> DKLS <b>HEQLAAEF</b> T <b>NH</b> LI <b>PGA</b> IL <b>TPGIV</b> GT <b>IPQ</b> FELAG-FQYAK----- 275	275
YP004675973	213	<b>EKGVP</b> ND <b>KLE</b> VDAL <b>AAEL</b> T <b>NH</b> LI <b>PGV</b> V <b>LTPGAV</b> AT <b>LPELQ</b> QAG-FHYAR----- 260	260
YP002120754	213	<b>KAGINP</b> HK <b>LTHDE</b> LSAD <b>L</b> T <b>NH</b> I <b>IPQAI</b> V <b>TPGV</b> VAT <b>IPELQ</b> MRG-FHYINTAD <b>FPK</b> -- 266	266
YP002235043	216	<b>GANANP</b> DK <b>LPL</b> DAL <b>AADL</b> T <b>NH</b> VI <b>PSA</b> IV <b>TPGAV</b> GT <b>LPELQ</b> QAG-FTYAK----- 263	263
ZP08900025	218	<b>EKGINP</b> DHLS <b>HEQMAAE</b> L <b>TNH</b> LI <b>DGV</b> V <b>LTPGIV</b> AT <b>IPELQ</b> HAG-FGYVK----- 265	265
ZP08903590	218	<b>EKGINP</b> DR <b>LSHEQMAAE</b> L <b>TNH</b> LI <b>DGV</b> V <b>LTPGIV</b> AT <b>IPELQ</b> HAG-FGYVK----- 265	265
YP190376	218	<b>EKGINP</b> DHLS <b>HEQMAAE</b> L <b>TNH</b> LI <b>IPG</b> V <b>V</b> L <b>TPG</b> -----HRG-NRSL <b>NCNMP</b> VSAT 264	264
EES53836	219	<b>KEGTNP</b> D <b>HKT</b> H <b>GEIAAE</b> L <b>TNH</b> LI <b>PGV</b> V <b>LTPGIV</b> GT <b>LPL</b> LVEAG-YQYAH----- 267	267
YP005469801	219	<b>KGGVNP</b> D <b>HKT</b> H <b>GEIAAE</b> L <b>TNH</b> LI <b>PGV</b> V <b>LTPGIV</b> GT <b>IPL</b> LSEAG-FHYARS----- 267	267

**Fig. 2-11 Multiple alignment of thiosulfate dehydrogenase homologues.**

Homologues of thiosulfate dehydrogenase were obtained by BLASTP analysis and indicated in accession numbers. The alignment was made using the ClustalW program. Completely conserved residues across all the aligned sequences are indicated by red letters. Highly conserved residues are indicated by blue letters. The same residues as TDS of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 were indicated by green letters. ↓ indicated the cleavage site for the signal peptide.

- YP\_002424556: hypothetical protein [*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270]
- YP\_004785011: Tat pathway signal sequence domain-containing protein [*Acidithiobacillus ferrivorans* SS3]
- YP\_002424564: hypothetical protein [*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270]
- YP\_003641775: Tat pathway signal sequence domain-containing protein [*Thiomonas intermedia* K12]
- YP\_004284142: hypothetical protein [*Acidiphilium multivorum* AIU301]
- YP\_004675973: unnamed protein product [*Hyphomicrobium* sp. MC1]
- YP\_002120754: hypothetical protein [*Hydrogenobaculum* sp. Y04AAS1]
- YP\_002235043: hypothetical protein [*Burkholderia cenocepacia* J2315]
- ZP\_08900025: hypothetical protein [*Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2]
- ZP\_08903590: hypothetical protein [*Gluconacetobacter europaeus* LMG 18494]
- YP\_190376: hypothetical protein [*Gluconobacter oxydans* 621H]
- EES53836: protein of unknown function [*Leptospirillum ferrodiastrophum*]
- YP\_005469801: unnamed protein product [*Leptospirillum ferrooxidans* C2-3]

YP002424557	1	MKSKTLQVATVAASLLFCGVAAQA-----ADMGWNGKAEAPRYQEQVFPWQHGENNPAIHQGLEFTVPEVDDLAD	75
YP004783859	1	MKTTIARMTLLAACTSMLVGMTAHA-----ADMGWHGKAEVPRYQEQVFPWQHGANNTVKKGLNFTVPEVDDLAD	75
YP002424563	1	MTKSSTLRLAPLLAAASLMVFGTCAVA-----ADNGWGAPGEFHGTSQVFPWQGANNPATSKGLDFTIPEVDNLPD	75
YP002218519	1	MRRIP-LATGTPLLAALLLALPVLAKAQVQVQADTGWQGVHAPQYKETIFPPWQHGANNPALNKGLEFTVPEVDNLPD	79
YP190377	1	MTPSRIRKTLTAAATFVLSTAAALADPVQ-----WNGKAQTPHYAEDVFPWQHGMNDATRGGFEFTVPEVDVLAD	75
ZP08900026	1	-----MATAAATFVLSTAAALADPVQ-----WNGKAQTPHYAEDVFPWQHGMNDATRGGFEFTVPEVDVLAD	75
YP004284143	1	MNRNH----IKAVATGLFVLLAGAGLAHATSPHDTGWRGKVQPPQYRGAIFFPWQGGANNDTVNKGFFVTIPEVDDVAD	76
YP004675974	1	MRANSIVKA-VFGAAIAGTVTLGAI SAQSAE-----QN-----APNIFPPWQHGFNNDATRGGFEFTVQVDNLD	66
YP004675974	1	MKKS-----LASAFLASLTLFLHGGPLSP-----AE SLAASSEIFPPWSHGRNNSPDKGIDVTVPDVDNLPDL	65
YP005469800	1	MNQR-----LMTILAVSLLL-----GGVSSG-----KTWVADETSTYPPWSHGHNNSPVGKGVNVTVPDVDNLPDL	62
YP003066433	1	MARLS-----LPAVLSGLALLAASPAG-----ADPQRDTNRAFFPWQGGANAPARDKGLEFTVHEADNLD	62
YP002755444	1	MSMYR-----RLTTLTLLMTAGALAAVQ-----QASAQQGPPWSRGANPDAA-QGYVQVFPVDNVPDL	59
YP002424557	76	HGSDIDNPQLTIFVGGNYFAMAPLVKA FEKEY PALRGKIYYETLPPGILIKQMKGGTITIGNMTWTVKPDVYAAGLKKV	155
YP004783859	76	HGSDIDNPQLVIFVGGNYFAMAPLVAA FEKEY PEIKGKIYYETLPPGILIRQMGGNTITVGNMTWTIQPDVYAAGLKKV	155
YP002424563	76	HGSDIDNPKLSIFVGGNYFAMAPLVAA FEKEHP EIKGRIYYETLPPGLLIRQMEHNTITVGNMTWTVKPDVYAAGLQKV	155
YP003641776	80	HGDLDPKLVIFVAGNYFAMAPLVQAF EKEHPDFKGRVFEYETLPPGILLKQMKAGGTITVGNMTWTVKPDVYAAGLKKI	159
YP190377	76	HGDITNPSLVLYVGGNYFAMAPLVSA FEHEHP EFSGKIYWE TIPPGLLIRQIEAGGTITSGNMTWTAKPDAYFAGLKKI	155
ZP08900026	66	HGDITNPSLVLYVGGNYFAMAPLVSA FEHEHP EFSGKIYWE TIPPGLLIRQIEAGGTITSGNMTWTAKPDAYFAGLKKI	145
YP004284143	77	HGDVDHPRLVLYIGGNYFAVAPLVKMF EKENPQYLGKVFVVTIPPGLLIKAMNADGRFMIIGNMSFTAKPDAYLAGLKKV	156
YP004675974	67	HGSVTDPKLVLYVGGNYFAMAPLVDE FEKAHP EFKGRVFEYETLPPGLLVHQIKAHGVVTSGNMTWTAKPDAYFAGLVAV	146
EES53835	66	HGNLSHPRLVLYVGGNYFAMAPLVKA FEKKY PQRIGGLFYETLPPGLLAKQIGKGRRLTIGNATMTVPGDVYAAGLKKV	145
YP005469800	63	HGNMSPPELLVMYVGGNYFAMAPLVAA FEKKY PKIRGKLFYE TIPPGLLAKQIAEKGRITVGNMTMTVPGDLYAAGLGQV	142
YP003066433	63	HGDLTNARLILYVGGNYFAMAPLVAA FEARHP ELAGRVYYETIPPGLLVQRAGGRVTVGNMTWTAKPDAYLAGLGAD	142
YP002755444	60	HGNPCDARLVLFIGNQFVFLPRLIAA FEQQHP ELKGHIFYETLPPGILRRQIAHDDTLTLGNLTLRVH PDVYEAAGLRAV	139
YP002424557	156	NAFIKEGLLQGPVAVYVNTDLTIMIPKGNPAHITGLQDLGKPGVRLSMPNPAWEGVARQIKMSLTKAGGPALEKMYD	235
YP004783859	156	NYLIHQGLLQGPVAVYVNTDLTIMIAKGNPAHITLRLDLGKPGIRLSMPDPRWEGVARQIQISLHKAGGPALEKMYD	235
YP002424563	156	DYYVQHGLLQGPVAVYVNTDLTIMVPGKNPAHISGLQDLGKPGMRLVMPNPAWEGVARQIKMSLTKAGGPALEKMYD	235
YP003641776	160	EAGIHDGVLTKAISYVSNDLTIMVPGKNPAHITGLADLQDLGKPGVRLSMPNPAWEGVARQIEASLKKAGGDALEQAVYD	239
YP190377	156	DQYIKSGLLAAAPVAVYVNTDLTIMIPKDNPGHVESLKDGLGRPGIRLAMPNPEFEGVARQIEASLDKAGGKALANAVYK	235
ZP08900026	146	DQYIKSGLLAAAPVAVYVNTDLTIMIPKDNPGHVESLKDGLGRPGIRLAMPNPEFEGVARQIEASLDKAGGKALANAVYK	225
YP004284143	157	KSLIAAGRLTAPAVAYATNDLTIMVPGKNPDHIRD LADLARKGVKVA MPNPAFEGVARQIEASLKKAGGKLEHEIYNTG	236
YP004675974	147	KRLVDDTLAGPPVAVYVNTDLTIMVPGKNPGHVESGLADLGRAGLRAMPNPEFEGVARQIKASLKKAGGEALEKEVYET	226
EES53835	146	RLLIAKLLVVGKPVVYATNDLTIMVPGKNPAGIKGLADLGRPGVRLVMPNPAWEGVSRQIKGSLVKAGGEKLSKTVYED	225
YP005469800	143	RKLIAKLLVGGPVAVYATNDLTIMVPGKNPAGIKGLSDLQDLGKPGVRLVMPNPAWEGVSRQIKGSLVKAGGEKLSKTVYED	222
YP003066433	143	ERLVREGDLIGPAAPVYVNTQLATIMVPGKNPAKV TGLADLARPGLRLAMPNPEFEGVARQIKSALR KAGGEDLVRTVYET	222
YP002755444	140	RQMQTAGQLHG-VVAYATNDLAIMVAKGNPRGHS LADLARPGLRLSMPNPAWEGVANQIAASLKKAGGESLYHAVYQAK	218
YP002424557	236	VKNGETILTHIHHRQTPFLMQGLADAGVTWSEAI FQEQAGHP IANVPIPAKDNTTAIYASAVVKGAAHPKWKADWVNF	315
YP004783859	236	VKNGETILTHVHHRQTPFLMQGLADAGVTWSEAI FQEQSGHP ISNIP IPAKDNTTAIYASAVAKGALHPKWKADWVNF	315
YP002424563	236	VKNGETILTEIHHRQSPMFLMQGRAVAGVTWSEAI FQEQKIGNPIGNVAIPAQFNTKAIYAAA VKDAPHPKWA EAWVNF	315
YP003641776	240	VKNGETLTHIHHRQTPFLYLMQGVAGVTWSEAI FQEQAGHP ISNVPIPADQNTTAIYAAAVVKGAAHPKAGLWAEF	319
YP190377	236	IANGSTVLTTHIHHRQTPFLMQGLADAGVTWQSEAI FQEQTGHAISHVDIPADQNSTAIYAGAMVKGAAHPQA AKLWDF	315
ZP08900026	226	IANGSTVLTTHIHHRQTPFLMQGLADAGVTWQSEAI FQEQTGHAISHVDIPADQNSTAIYAGAMVKGAAHPQA AKLWDF	305
YP004284143	237	VKNGTTLTTHIHHRQTPFLMQGLADAGVTWSEAI FQEEIGHPI SHVDIPARYNTTAIYGGAMVKNAPHPHAAKAWLSF	316
YP004675974	227	VADGGTILTHIHHRQTPFLMQGHVDAGVTWSEAFQEQVGNPI TNVPIPADQNTTAIYAGAMVKGAAHP EAARKWLD	306
EES53835	226	VKNGETLTHIHHRQSPMALMRKKADAGVTWRSEAV FQEEEGHP IENVSI PDSQNVRAIYAA G IIRGSRHV LWAKRWLTF	305
YP005469800	223	VKNGETLTHIHHRQSPMFLMRKKADAGVTWRSEAI FQEQVGHAIENVAIPDSQNVKAIYAA S IIRGARHKLWAKRWLIF	302
YP003066433	223	VADGTTTLTRMHHRQTPVWLMQGRADAGVTWRSEAI FQEAENLPT ERVDIPADENETGAYAGGAVKDAHPAEALSWLNF	302
YP002755444	219	VQSGQTVLTEIHHRQTPMRIMSGQADAGVTWASEVRFQESIGNPTIQLAIPAAQNATAIYAGGALNHPAHPAVAAWLA	298
YP002424557	316	LKSPTALQIFEHYGFKPY-T-GK-----	336
YP004783859	316	LRSPVALHIFERYGFKAYHD-AK-----	337
YP002424563	316	LKSPTALHIFEEYGFQPY-TQGK-----	337
YP003641776	320	LRSPITALKIFERYDFKPVSA-HKPG-----	343
YP190377	316	IKSPTALAIIFERYGFKAY--HGGSMPPHDSE	344
ZP08900026	306	IKSPTALAIIFERYGFKAY--HGGSMPPHDSE	334
YP004284143	317	IQSPAALKIFEHYGFQY----KRV-----	337
YP004675974	307	IHSPSALKIFEKYGF-----TPA----	324
EES53835	306	LKSPEALHVFEHYGFKPV--TRKDL----K-	329
YP005469800	303	LKSPEAKVFRHGFKFSV--TKADL----KK	327
YP003066433	303	LRGAEAAREIFARYGFEPY--RANA IPE--RR	329
YP002755444	299	LKTPQAQAIYHQYGFERSLPAAASQK-----	323

## Fig.2-12 Multiple alignment of putative sulfate-binding protein.

Homologues of putative sulfate-binding protein were obtained by BLAST analysis and indicated in accession numbers. The alignment was made using the Clustal W program. Completely conserved residues across all the aligned sequences are indicated by red letters. Highly conserved residues are indicated by blue letters. The same residues as TDS of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 were indicated by green letters.

YP\_002424557: putative sulfate-binding protein [*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270]

YP\_004783859: periplasmic solute-binding protein [*Acidithiobacillus ferrivorans* SS3]

YP\_002424563: putative sulfate-binding protein [*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270]

YP\_003641776: periplasmic solute-binding protein [*Thiomonas intermedia* K12]  
YP\_190377: putative sulfate-binding protein [*Gluconobacter oxydans* 621H]  
ZP\_08900026: putative sulfate-binding protein [*Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2]  
YP\_004284143: hypothetical protein ACMV\_19140 [*Acidiphilium multivorum* AIU301]  
YP\_004675974: unnamed protein product [*Hyphomicrobium* sp. MC1].  
EES53835: ABC transporter, periplasmic component [*Leptospirillum ferrooxidans*]  
YP\_005469800: protein product [*Leptospirillum ferrooxidans* C2-3].  
YP\_003066433: sulfate-binding protein [*Methylobacterium extorquens* DM4].  
YP\_002755444.1| hypothetical protein ACP\_2404 [*Acidobacterium capsulatum* ATCC 511

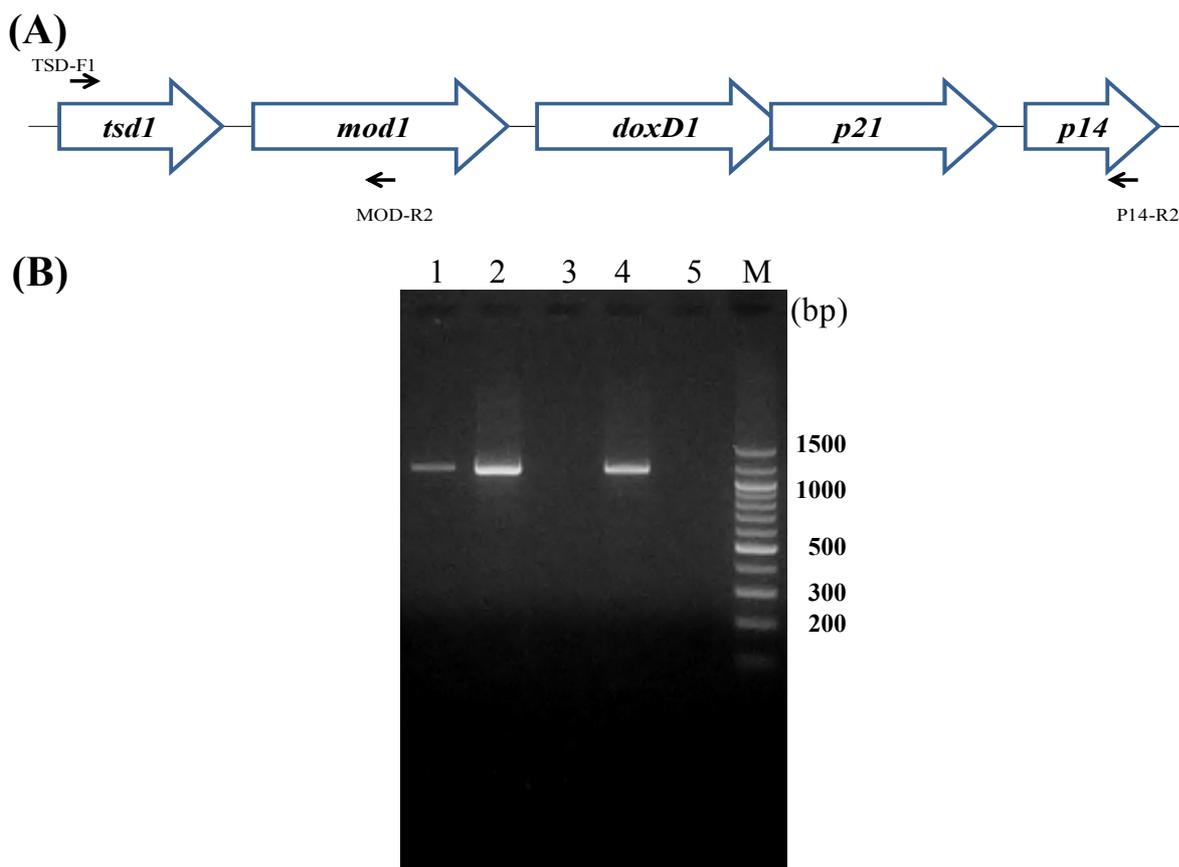
### 2.3.5.1 硫酸結合タンパク質の発見

BLASTP 検索の結果、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 の AFE\_0042 の相同体を持つ細菌は、AFE\_0043 (硫酸結合タンパク質と推測される ; SBP) の相同体も持つことが分かった (Fig. 2-10, 2-11, 2-12)。CM-650M 画分の TSD 活性は、硫酸イオンを必要としたが、要求性は、Butyl-650M 画分では、明らかでなかった (Fig. 2-14 A)。この結果は、硫酸要求性の酵素活性に関与する共同因子が、CM-650M 画分には含まれており、疎水性カラムクロマトグラフィーによって、それが除去されてしまうことが推測される。CM-650M 画分では、おおよそ 33 kDa の位置に、濃いタンパク質のバンドが確認されるが、Butyl-650M 画分では薄くなっている (Fig. 2-5 lanes 4 and 5)。その 33 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列は、ADMGWNGKAEAPRYQ と決定された。BLASTP 解析の結果、*A. ferrooxidans* ATCC 53993 株で硫酸結合タンパク質 (SBP) と推測される Lferr\_0044 が、この 15 アミノ酸配列を含んでおり、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 株で対応する遺伝子は、AFE\_0043 であることが明らかとなった (Fig. 2-10, 2-12)。33 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列から判断すると、N 末端から 27 アミノ酸がシグナルペプチドであった。したがって、成熟したタンパク質の分子量と、シグナルペプチドを除いたタンパク質の等電点は、それぞれ、33,983 Da と 9.2 であると算出された。

BlastP 解析の結果、AFE\_0042 の相同体遺伝子をもつ微生物ではそのすぐ上流かあるいは下流に AFE\_0043 と相同性のある SBP をコードしている遺伝子が存在していることが明らかとなり (Fig. 2-12)、TSD と SBP が複合体を形成していることが強く示唆された。また、TSD 活性に硫酸要求性を示す CM-650M 画分に AFE\_0043 タンパク質 (SBP) が検出されるが、SBP がなくなった Butyl-650M 画分では硫酸依存性が消失することから、AFE\_0043 タンパク質 (SBP) が AFE\_0042 タンパク質 (TSD) とヘテロオリゴマーを形成し、生体内でその複合体に、硫酸依存性の酵素活性を付与することを強く示唆する。

### 2.3.5.2 *A. ferrooxidans* における *tsd* 遺伝子の発現

鉄生育細胞と元素硫黄生育細胞では、鉄や元素硫黄、RISCs を基質とした酸化能力に違いがある。TSD 活性は、硫黄生育細胞で 0.063 U/mg、テトラチオン酸生育細胞で 0.085U/mg の値を示したのに対して、鉄生育細胞では活性を示さなかった。そこで、本研究で明らかとなった *tsd* 遺伝子の発現が、生育基質の違いによってどのように変化するのかを RT-PCR によって検討した。



**Fig. 2-13.** Analysis of cotranscription of the *tsd* gene of *A. ferrooxidans* by RT-PCR. (A) Schematic map of the genetic context around the *tsd* gene of *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Arrows indicate locations of primers used for the RT reaction and for PCR. (B) Agarose gel electrophoresis of partial *tsd* gene fragment amplified by PCR. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel. Lane M, 100 bp DNA Ladder Marker; lane 1, cDNA from sulfur-grown; lane 2, cDNA from tetrathionate-grown; lane 3, cDNA from ferrous-grown; lane 4, genome DNA; lane 5, D.D.W.

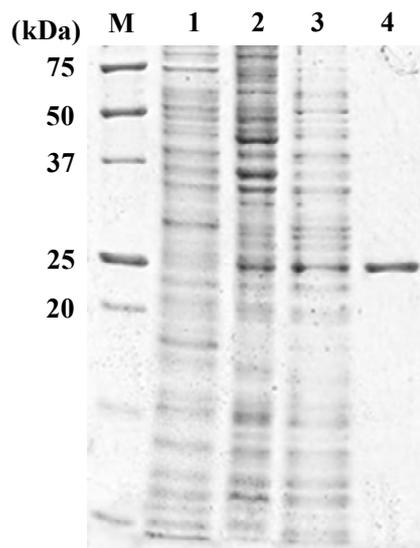
鉄生育細胞、硫黄生育細胞およびテトラチオン酸生育細胞から抽出した Total RNA の濃度をそろえ (0.067  $\mu$ g)、reverse primer (p14-R2) を用いて cDNA を作成した。ポジティブコントロールにはゲノム DNA を、ネガティブコントロールには逆転写を行っていない Total

RNA (データは示さない) および鋳型を含まない反応溶液を用いて PCR を行った。ネガティブコントロールにはいずれも PCR 産物の増幅は確認されず、ポジティブコントロールにおいて単一の PCR 産物が確認された (Fig. 2-13 B lane 4,5)。PCR 産物は、硫黄生育細胞よりも、テトラチオン酸生育細胞で、高い増幅を示したが、鉄生育細胞では、観察されなかった。この結果は、TSD 活性の結果と一致し、*tsd* 遺伝子は、硫黄代謝とテトラチオン酸代謝に関与しているが、鉄代謝には必要ないことが明らかとなった。

### 2.3.6 大腸菌における *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株由来 *tsd* 遺伝子の発現と *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株の TSD との比較

#### 2.3.6.1 大腸菌での *tsd* 遺伝子の発現と精製

AFE\_0042 が TSD をコードしていることを決定するために、大腸菌での発現を試みた。AFE\_0042 は、N 末端領域に、シグナルペプチドを持っているので、シグナルペプチドをコードしている領域を取り除いた遺伝子を構築した。pET-*tsd* を持った大腸菌 BL21 (DE3) 細胞を、30°C で 50 µg/ml のアンピシリンを含む培地で生育し、0.2 mM の IPTG によって 24 時間誘導後、無細胞抽出液を SDS-PAGE 分析に供した結果、25 kDa の分子量の遺伝子産物が検出された (Fig. 2-14)。大腸菌内で、遺伝子は、高い発現をしなかったが、無細胞抽出液は、TSD 活性を示した (Table 2-3)。組換え TSD は、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 の TSD の精製に用いた方法と同じ手順で精製された。したがって、AFE\_0042 が、TSD をコードしていると結論付けられた。組換え TSD は、26%の回収率で、無細胞抽出液から 61 倍まで精製された。比活性は、pH 2.5、40°C で 4.26 U/mg であり、これは、*A. ferrooxidans* ATCC 細胞からの TSD の 3.16 U/mg と似ていた。



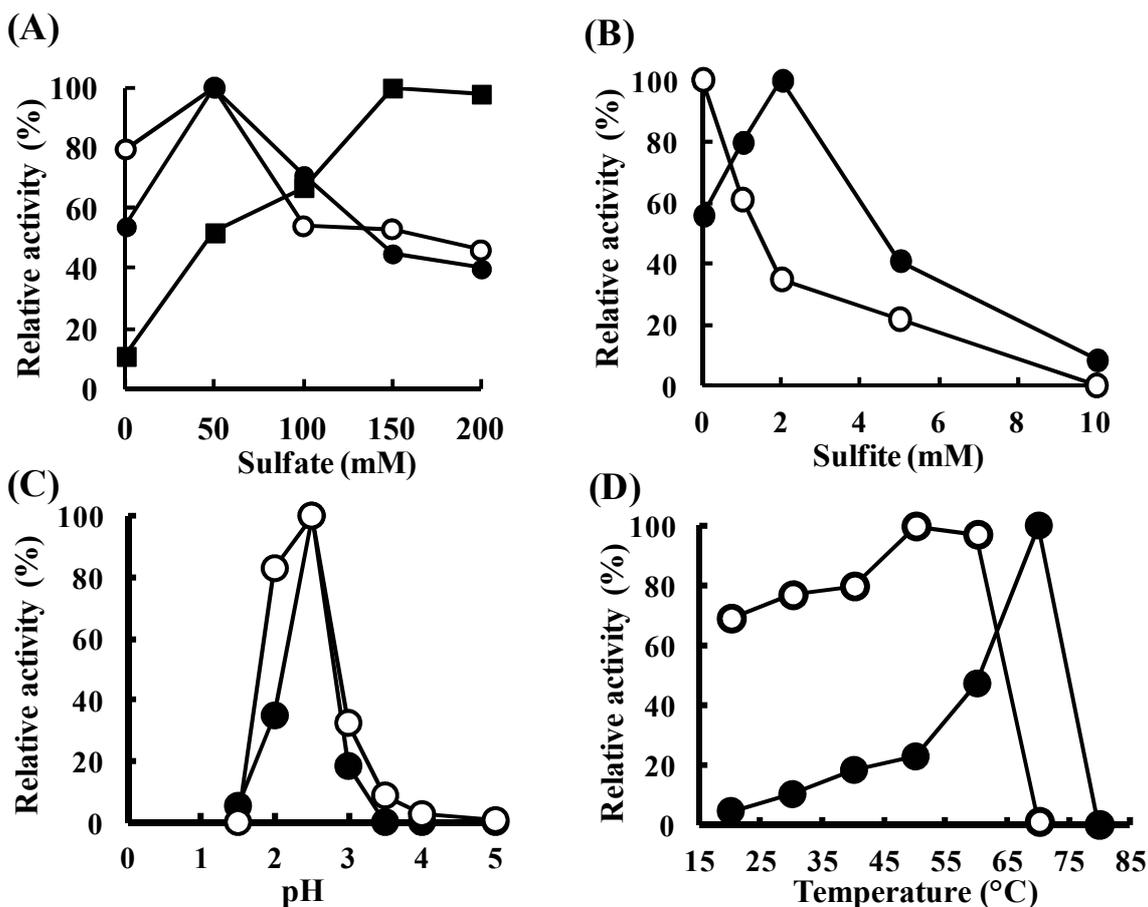
**Fig. 2-14.** SDS-PAGE analysis of the polypeptide expressed in *E. coli* BL21(DE3) harboring pET-*tsd*. Lane M, proteins for molecular marker; lane 1, cell-free extract from *E. coli* with pET21a; lane 2, cell-free extract; lane 3, soluble protein at pH 4.0; lane 4, Butyl-650M fraction.

**Table 2-3.** Purification of recombinant TSD from soluble fraction of *E. coli* harboring pET-*tsd*.

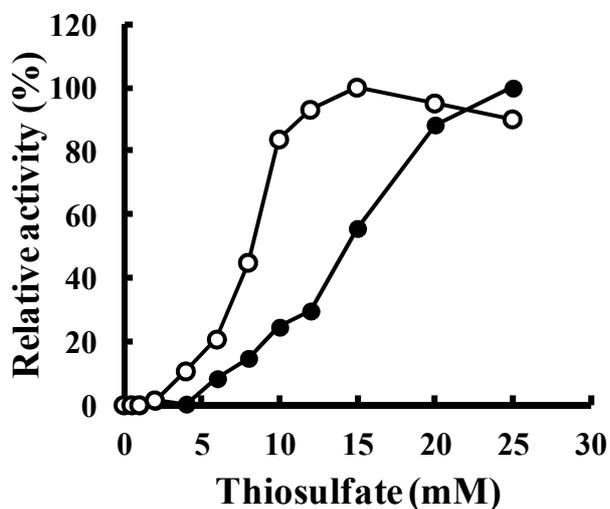
Purification step	Total protein (mg)	Specific activity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	Total activity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Recovery (%)	Purification (fold)
Cell-free extract	260.5	0.068	17.7	100	1
Soluble fraction at pH 4	32.6	0.26	8.47	48	3.8
Butyl-650M chromatography	1.1	4.16	4.57	26	61.2

### 2.3.6.1 諸性質の比較

組換え TSD の最適 pH は 2.5 (Fig. 2-15 C)、最適温度は 50°C であった (Fig. 2-15 D)。 *A. ferrooxidans* 細胞からの TSD 活性は、亜硫酸によって活性化がみられたが、組換え TSD では観察されなかった (Fig. 2-15 B)。 *Km* 値は、8 mM であり、*A. ferrooxidans* 細胞からの TSD の 15 mM よりも低かった (Fig. 2-16)。これらの違いは、TSD が成熟する場所、つまりペリプラズムや細胞質の pH の違いによるものと考えられる。すなわち、*A. ferrooxidans* では pH 2–3 の環境下で成熟するが、大腸菌では pH 6–7 である。*A. ferrooxidans* 由来の TSD と組換え TSD とには、多少の性質の違いがあるが、以上の結果は AFE\_0042 遺伝子にコードされる 25 kDa のタンパク質が、TSD 活性を触媒していることを示している。



**Fig. 2-15.** Effect of sulfate (A), sulfite (B), pH (C), or temperature (D) on TSD activity in Butyl-650M fraction from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (black circle) or *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-*tsd* (white circle). Effect of sulfate on TSD activity in CM-650M fraction was shown with black square (A). Specific activities in U•mg<sup>-1</sup> for the 100% value were given as follows; (A) 3.47 (black circle), 4.57 (white circle), and 2.34 (black square); (B) 5.47 (black circle) and 4.57 (white circle); (C) 3.47 (black circle) and 4.57 (white circle); (D) 13.79 (black circle) and 6.53 (white circle).



**Fig. 2-16.** Effect of thiosulfate concentration on TSD activity in Butyl-650M fraction from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (black circle) or *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-*tsd* (white circle). Experiments were carried out at pH 2.5 and 40°C in mixture containing 1 mM ferricyanide and 50 mM Na-sulfate.

## 2.4 結論

テトラチオン酸で生育した菌体を用いて、各種基質の酸化にどのような電子伝達系が関与しているのか検討したところ、コロイドイオウを基質として用いた場合、ヘム *d* (625 nm) とヘム *b* (580 nm) の還元が報告された。これは、鉄酸化細菌が持つ *bd*-type Ubiquinol oxidase の硫黄酸化への関与を明らかとした。また、チオ硫酸を基質として用いた場合の、ヘム *c* の顕著な還元、613 nm 付近のピーク出現により、チオ硫酸からの電子は、cytotirome *c* に渡された後、新規の末端酸化酵素に渡されることが示唆されている。

本研究では、チオ硫酸酸化に関与するチオ硫酸脱水素酵素 (TSD) について、解析することで、RISCs 酸化に関する知見を得ようと試みた。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、硫酸カリウム非存在下では活性が検出できず、200 mM の硫酸カリウムを含む反応液で最大活性を示した。塩化ナトリウムや塩化カリウム、硫酸ナトリウムの影響を検討したところ、塩化ナトリウムや塩化カリウムでは活性が検出されなかったことから、本酵素が、活性発現に硫酸イオンを必要とすることが示された。最適 pH は、2.5 と 4.0 に検出され、2 つの TSD 酵素の存在が示唆された。これらの活性は、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なかった。このことから、*tsd* 遺伝子が RISCs 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、透析法、陽イオン交換カラム (CM650M) と疎水性カラム (Butyl650M) を用いて TSD の精製を行い、回収率 3% で 64 倍の精製率を示した部分精製品の性質の検討を行った。最適 pH と最適温度はそれぞれ、2.5 と 70°C であった。SDS-PAGE 解析の結果、精製が進むにつれて、明らかに 25kDa 付近のバンドが濃く表れてくることから、この 25kDa の分子量をもつタンパク質が TSD であると考えられた。これまでに *A. ferrooxidans* から精製が報告されている TSD の分子量とは明らかに異なるものであった。本酵素は、チオ硫酸に基質特異性を示し、亜硫酸やテトラチオン酸を基質にはしなかった。他の菌で知られているチオ硫酸代謝酵素の *K<sub>m</sub>* 値は、一様に 1.0 mM 以下であるのに対し、本酵素は低い基質濃度では活性を示さず、基質濃度と活性の関係を示したグラフは、シグモイド型となったことから、この酵素がアロステリック酵素であり、反応液中に酵素活性を阻害するものがある

るか、あるいは酵素活性を活性化する何か他のモノが必要であると考えられた。無細胞抽出液では、TSD 活性に必要とされた硫酸イオンが、部分精製酵素では阻害剤として働き、1 mM という低濃度の亜硫酸イオンが活性剤として機能した。本酵素の触媒する反応の基質と生成物を調べるために、チオ硫酸とテトラチオン酸の定量を行ったところ、2 分子のチオ硫酸から 1 分子のテトラチオン酸が生成されることが分かった。

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、オープンリーディングフレームの存在が明らかとなった。N 末端アミノ酸配列から予測された遺伝子は、シグナルペプチドを持つ 270 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、成熟した（シグナルペプチドを除いた）タンパク質の分子量は 25,769 Da と推測された。この遺伝子は、すでに硫黄調整遺伝子として登録されており、二価鉄よりも硫黄生育細胞内で発現が高まることが報告されているが、機能は未解明のままである[65]。この遺伝子の下流には、硫黄転移タンパク質（ロダネース様タンパク質）や硫酸/チオ硫酸結合タンパク質、Dox 様タンパク質をコードしていると推測される配列が並んでおり、クラスターを形成していることが分かっている。

この遺伝子の相同性解析を行ったところ、いくつかの硫黄酸化細菌や好酸性細菌などに存在することが分かったが、それらすべてがチオ硫酸を酸化する能力を持つかどうかは確認されていない。また、それらホモログを持つ細菌は、ほとんどがその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。このことから、TSD は SPB と結合し、生体内で酵素活性のために、硫酸イオン要求性を示すのではないかと考えられた。

決定された遺伝子が、TSD をコードしているかを確認するために、大腸菌で発現させたところ、顕著に高い発現は示さなかったが、分子量 25kDa の遺伝子産物が検出され、無細胞抽出液は TSD 活性を示した。*A. ferrooxidans* ATCC 23270 由来の TSD 精製手順と同じ方法で精製することができたため、決定された遺伝子は TSD であると結論付けた。

### 第三章 鉄および RISCs 酸化に関与する遺伝子の発現制御機構の解析

#### 3.1 諸言

二価鉄が、化学的に鉱石から金属イオンの可溶化を触媒することから、鉄酸化細菌の二価鉄生成は、硫化物鉱石からのバイオリーチングに不可欠である。しかしながら、硫化物鉱石の表面に形成された硫黄層は、二価鉄イオンの硫化物金属への接触を妨げ、結果的にバイオリーチング効率を減少させる。それゆえに、鉄酸化活性とともに、鉱石表面に元素硫黄層を形成させないために、バイオリーチング操作において、硫黄酸化活性は重要な微生物的活性の一つである[44]。鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* は、工業的バイオリーチング応用のために研究されてきた化学合成無機独立栄養の好酸性細菌であり[14, 15, 44]、酸性条件下で、その生育や細胞維持のエネルギーを二価鉄や還元型無機硫黄化合物 (RISCs) から得る。すでに述べたように、鉄酸化において、二価鉄から酸素への電子伝達に関与する構成要素は、2つのシトクロム *c* (Cyc2 と Cyc1) と、ラステシアニン (Rus)、*aa<sub>3</sub>* タイプシトクロム *c* 酸化酵素であると考えられ、これらのタンパク質は、*rus* オペロンにコードされる[34, 66, 67]。このオペロンのより高い発現が、硫黄生育細胞よりも、鉄生育細胞において報告されている[67]。

*A. ferrooxidans* による RISCs の好氣的酸化に関与すると考えられるいくつかの酵素活性が検出され、酵素が生成されているが[20, 29, 35, 40, 45, 68]、RISCs 酸化経路は未だ明らかではない。本研究室では、硫黄生育した *A. ferrooxidans* 細胞の硫黄酸化が、中間体として硫化物を介して進み、その経路には、硫化物：キノン酸化還元酵素 (Sqr) や *bd* タイプユビキノール酸化酵素 (Cyd) [53, 56, 59] が関与していると考えている。また、*A. ferrooxidans* における、硫黄酸化とテトラチオン酸加水分解酵素 (Tth) の関係についてもすでに報告している[58]。

鉄の酸化や硫黄の酸化活性は、バイオリーチングにおいて両方とも必要不可欠であるが、鉄の酸化活性は、元素硫黄で生育した *A. ferrooxidans* 細胞で減少する[53, 67]。これまでに *sqr* や *tth* 遺伝子の発現が、元素硫黄やテトラチオン酸で生育した細胞で、その発現が活性化されることを報告してきた[53, 58]。プロテオーム解析によって、チオ硫酸硫黄転移タンパク質 (ロダネース様タンパク質) と予想される 21 kDa のタンパク質とチオ硫酸/硫酸結

合タンパク質 (ModA1) と予想される 33 kDa のタンパク質が、二価鉄で生育した細胞のよりも、硫黄やテトラチオン酸で生育した細胞内で、より多く合成されるということが明らかにされている[40, 49]。また、プロテオミク、バイオインフォミク解析によって、硫酸/モリブデン結合タンパク質 (おそらく ModA1) が、硫黄生育条件下で多量に合成されることも明らかにされている[47]。第二章で述べたように、チオ硫酸デヒドロゲナーゼ (TSD) と ModA1 が、硫黄およびテトラチオン酸生育細胞で検出されるが、鉄生育細胞では、TSD 活性が検出されず、また、それらの遺伝子の転写も著しく減少した。これらの結果は、*A. ferrooxidans* の中に、鉄や硫黄酸化に関与する遺伝子の転写制御に特定のメカニズムが存在することを示唆しているが、その制御メカニズムは十分に理解されていない。

リーチング効率を改善する新しい技術の開発のために、鉄や RISCs の酸化に関与する遺伝子の発現を制御するメカニズムの解明が期待されている。本章では、二価鉄生育と比較して硫黄生育での発現量の増加が確認され、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 ゲノム DNA 上で配列の決定されている Sulfide:quinine oxidoreductase (SQR) 遺伝子上流に存在する、発現制御因子であると予測される遺伝子 (*scpB*) の転写を調べ、鉄や硫黄酸化に関与する遺伝子のプロモーター領域への結合活性を調査した。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 細菌、プラスミドおよび培養

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 株を用い、第二章で述べた二価鉄培地、硫黄培地およびテトラチオン酸培地で生育した細胞を用いた。形質導入には、非発現用宿主として *E.coli* Nova F-、発現用宿主として *E.coli* BL21(DE3)を用いた (Table 3-1)。培養は前述のとおり。

**Table 3-1** Bacterial strain and plasmids used in this study.

Name	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
Nova F <sup>-</sup>	F <sup>-</sup> , <i>endA1 hasdR17</i> (r <sub>K12</sub> <sup>-</sup> m <sub>K12</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac</i>	Novagen
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
Plasmids		
pETcoco-2 System	Expression vector containing a T7 promoter, and two origins of replication control the single-copy ( <i>oriS</i> ) and medium-copy ( <i>oriV</i> ), AmpR	Novagen
pETcoco-scpB	pETcoco with <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 <i>scpB</i>	This work

### 3.2.2 RNA 抽出と RT-PCR 発現ベクター内での *scpB* 遺伝子のクローニング

#### 3.2.2.1 Total RNA 抽出

1 L の二価鉄培地で 4 日間、硫黄培地、テトラチオン酸培地では 7 日間、30°C で浸透培養した細胞を遠心し、1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で懸濁後、PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen Japan KK, Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出した。ゲノム DNA を除去するために、RNase-free DNase (Invitrogen) で処理した。RNA 濃度は、Quant-iT RNA Assay kit (Invitrogen) を用い、Qubit fluorometer (Invitrogen) により測定した。

#### 3.2.2.2 Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)

等量の total RNA (1 µg) を用い、PrimeScript 1<sup>st</sup> stand Synthesis kit (Takara-Bio, Shiga, Japan) を使って、メーカーのプロトコルに従い、cDNA を調製した。反応溶液 (20 µl) には、0.5 mM dNTPs mixture、1 µl の 10 µM reverse primer (P*scpB*-R)、1 µg の total RNA、4 µl の Primer Script buffer、0.5 µl の RNase inhibitor および 0.5 µl Prime Script TRase を含む。内部標準として、16S RNA 遺伝子を用いた。実験に用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、*A. ferrooxidans* ATCC 23270 株の DNA ゲノム配列(<http://cmr.jvci.org/cgi-bin/CMR/GenomePage>).

cgi?org=gtf)を基にデザインした (Table 3-2)。

*scpB* 遺伝子増幅のための PCR は、1  $\mu$ l ずつの 10  $\mu$ M forward primer (PscpB-F)と revers primer (PscpB-R)、5  $\mu$ l の cDNA、2  $\mu$ l の 10 mM dNTPs mixture、5  $\mu$ l の PCR buffer と TaKaRa Ex taq (Takara-Bio) を含む反応溶液を調製し、94°Cで1分間変性させ、94°Cで30秒、55°Cで30秒アニーリング、72°Cで1分間の伸長を30サイクル行った後、72°Cで7分間最終的な伸長反応を行った。

それぞれの PCR 産物は、15  $\mu$ l ずつ 3% agarose gel 電気泳動に供し、発現量を確認した。

ポジティブコントロールとして鋳型にゲノム DNA を用いたもの、ネガティブコントロールとして逆転写反応を行っていない total RNA を用いて PCR を行った。

**Table 3-2** Primers used to amplify *scpB* gene and promoter regions of genes involved in the sulfur or iron oxidation in *A. ferrooxidans*.

Primers	Sequence (5'>3')	Genes or DNA regions
ScpB-F-Nhe	TTTGGCGAGCTAGCCGTGAAGCGCTCCTGG	<i>scpB</i> gene
ScpB-R-Hind	GGAATATTATAGAAGCTTCCCAATT	<i>scpB</i> gene
PscpB-F	AAGCGCTCCTGGCATTGTTTTTGTCCAG	Partial <i>scpB</i> gene (RT-PCR)
PscpB-R	TGAAGCTGCTGCATGATCTGCACGCTGA	Partial <i>scpB</i> gene (RT-PCR)
Sqr-P-F	GGCAGGCATAACGGACTGAAACCTTA	<i>sqr</i> promoter
Sqr-P-R	GGGTTGGACGGAACGAACTGGAAATA	<i>sqr</i> promoter
ScpB-P-F	GTATCTCCATGAGCTTCTGCCGCTT	<i>scpB</i> promoter
ScpB-P-R	AAACAATGCCAGGAGCGCTTCACGCAT	<i>scpB</i> promoter
Tth-pro-R	GGCCAGCAATAATGCCGATA	<i>tth</i> promoter
Tth-pro-F	GGGATGCAGCCATAAATATA	<i>tth</i> promoter
Cyc2-pro-R	TTCCACCAACTGCTGCTAAT	<i>cyc2</i> promoter
Cyc2-pro-F	AAATAGAACGTGTGGGTGCT	<i>cyc2</i> promoter
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	16S rRNA gene
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	16S rRNA gene

### 3.2.2.3 発現ベクター内での *sqrB* 遺伝子のクローニング

*scpB* 遺伝子は、*A. ferrooxidans* ゲノム DNA を鋳型として、Amplitaq Gold PCR Mix (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)を用い、NheI サイトを含む ScpB-F-Nhe と Hind III サイトを含む ScpB-R-Hind (Table 3-2) で増幅した。3% agarose gel 電気泳動によって確認した約 600 bp の PCR 産物を切り出し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて精製した。*scpB* 遺伝子の全コード領域の N 末端に 6 つの His-tag を融合させた組換えタンパク質を生産するために、精製した PCR 産物を NheI と Hind III で制限酵素処理し、同様に処理したタンパク質発現用ベクター pETcoco plasmid と 4 : 1 のモル比で混合し、ライゲーションを行った。Heat Shock (60°C, 30 sec) により非発現用宿主 Nova F competent cell に導入、SOC 培地[2.0% peptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O(pH 7.2)] を加え、37°C で 1 時間振とう培養した。50 µg/ml の ampicillin と 0.2 % の D-glucose を含む寒天平板 BL 培地に培養液をプレーティングし、37°C で一晩静置培養した。得られた形質転換体に目的遺伝子が導入されていることをコロニー PCR および回収したプラスミドの制限酵素処理によって確認した。

コロニー PCR 法には、プレート上に形成されたコロニーを滅菌した爪楊枝でピックアップし、5 µl の滅菌水に懸濁、2 倍濃度の PCR 反応溶液を 5 µl 添加して用いた。PCR には、KOD-plus polymerase (TOYOBO) と特定のプライマー (T7 promoter and terminator) を用いた。

### 3.2.3 組換え ScpB タンパク質の大腸菌内での合成と精製

His-tag 付き ScpB タンパク質を生産するために、前項で作成した pETcoco-scpB を、発現型宿主 *E. coli* BL21 (DE3) に形質転換した。*E. coli* BL21 (DE3) (pETcoco-scpB) を、50 µg/ml のアンピシリンを含んだ 10 ml の LB 培地で 37°C 一晩培養した後、同じ濃度の抗生物質と、0.1 % のアラビノースを含む 1 L の LB 培地に移した。培地の O.D 600 nm が 0.6 に達した時、0.1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) の添加することによって組換え ScpB の発現を誘導した。さらに 22°C で 12 時間培養し、遠心 (15,000 × g, 10 min) によって集菌した。Ni-charged Chelating Sepharose Fast Flow resin (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用いて、メーカーの説明書に従い、組換え ScpB を精製した。100 mM イミダゾールを含むリン酸/塩化ナトリウム (PN) buffer [20 mM phosphate, 0.5 M NaCl, pH 7.4] で樹脂

を洗浄したのち、結合したタンパク質（組み換え ScpB）を、400 mM イミダゾールを含む PN buffer で溶出した。さらに 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)、80 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM dithiothreitol および 10% glycerol を含む溶出 buffer を用いて、溶出サンプルをゲルろ過カラム (G3000SW, Tosoh, Tokyo, Japan) に供し、組み換え ScpB を含むフラクションを採取した。試料は、濃縮後-70℃で保管した。

### 3.2.4 ゲルシフトアッセイ (Electrophoretic mobility shift assays; EMSA)

プロモーター領域を含む配列を PCR 法により増幅し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)を用いて DNA を精製した。DNA-Protein Binding Buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 80 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 10 % glycerol] に 0.1 pmol DNA と制御用タンパク質 (0.1~100 pmol) を加えて、Total volume 20  $\mu$ l とし、室温で 15 分反応させた。これに 6  $\times$  Loading buffer を加えて反応をとめ、7 %ポリアクリルアミドゲルを使って 100 V で約 1 時間電気泳動した。泳動後、D.W.でよく洗浄し、50 mM に調整した TBE buffer の中にゲルを入れ、5  $\mu$ l の SYBR Green I Acid Gel Stain (CAMBREX) を加え、30 分室温でインキュベートした。蛍光イメージアナライザー FMBIO II で染色を確認した。

### 3.2.5 データ解析

塩基配列の決定には、The Comprehensive Microbial Resource web site (<http://cmr.jevl.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>)を利用した。

決定された配列を基に、相同性のある DNA やタンパク質のデータベース検索に、National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を利用した。

### 3.3 結果および考察

#### 3.3.1 *sqr* 遺伝子近傍の ORF の解析

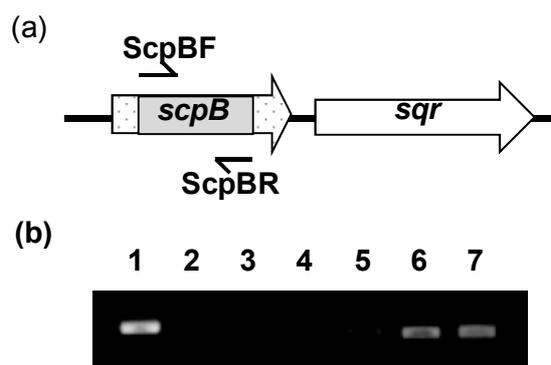
我々は、すでに *sqr* と *tth* 遺伝子の発現が、元素硫黄やテトラチオン酸で生育した *A. ferrooxidans* で上方制御され、鉄で生育した細胞では抑制されること報告している[10,25]。それは、硫黄酸化に関与する遺伝子の転写を制御するタンパク質が存在することを示唆している。

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 のゲノム配列中の Afe\_1792 上にある *sqr* 遺伝子を取り囲んだ領域を分析したところ、染色体分離凝縮タンパク質 (ScpB) であると注釈をつけられた Afe\_1791 が、*sqr* 遺伝子の上流領域で見つかった (Fig. 3-1 and Fig. 3-2)。その遺伝子は、分子量が 19,389 Da と予測される 177 アミノ酸のポリペプチドをコードしており (Fig. 3-3)、BLAST 解析の結果、ScpB には、細菌の制御に共通して存在するヘリックターンヘリック (HTH) モチーフが存在することが分かった (Fig. 3-3)。

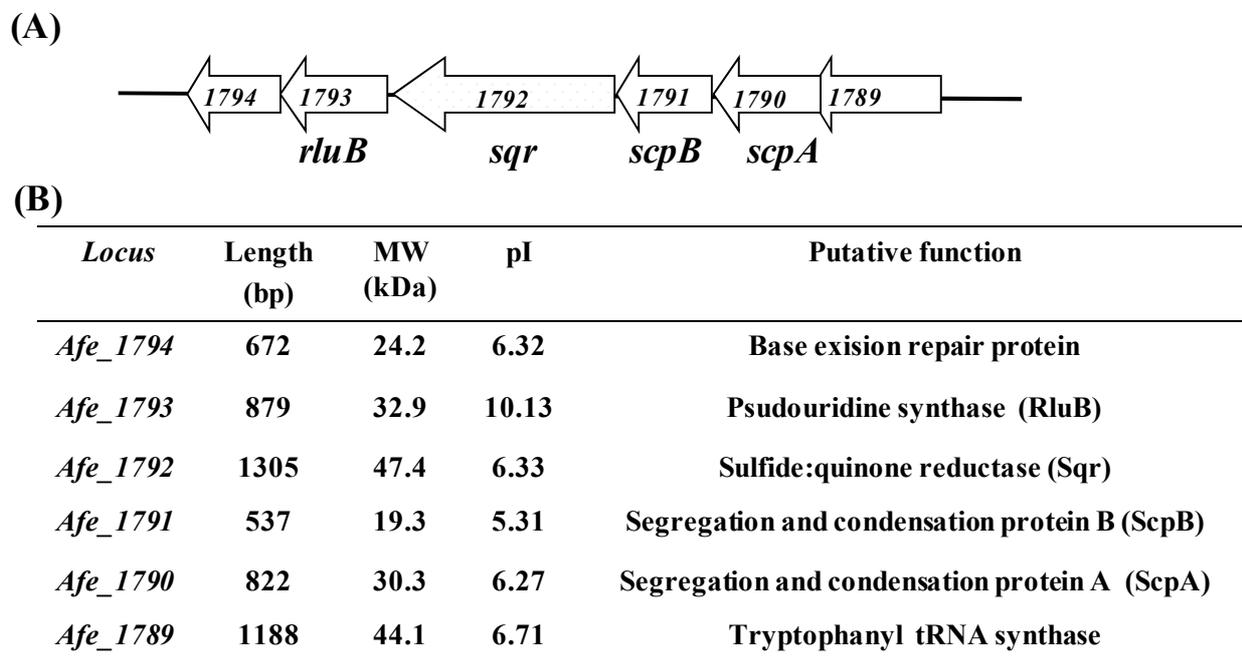
また、ScpB が、*Pseudomonas stutzeri* で予測される (Ypuh のような) 転写制御因子と 45%、*Acidithiobacillus ferrivorans* SS3 (74%)、*Acidithiobacillus thiooxidans* (68%)、*Acidithiobacillus caldus* (49%)、*Methylococcus capsulatus* (47%)、*Cellvibrio japonicas* (41%)、and *Legionella pneumophila* (39%) の ScpBs とカッコ内に示すような比較的高い相同性を持つということも明らかになった (Fig. 3-3)。*A. ferrivorans* は、最近新しい種として分類された、通性嫌気性、好冷性の鉄あるいは硫黄酸化細菌である[10]。*A. caldus* は、好酸性硫黄酸化細菌である[69]。これらの好酸性硫黄酸化細菌の ScpB は、RISCs 酸化に関与する遺伝子の発現において重要な役割を果たしているだろう。

ScpB は、*Bacillus subtilis* (枯草菌) で最初に発見され[70]、通常 *scpB* 遺伝子は、原核生物の *scpA* オペロンの中に局在している。ScpB は ScpA とともに、染色体構造維持タンパク質 (SMC) と相互作用するといわれており[70]、SMC と ScpA、ScpB で構成される複合体は、枯草菌において染色体の分離と凝縮のために必要であると考えられた。

しかしながら、枯草菌の ScpB は、*A. ferrooxidans* の ScpB と違って、ATP の有無に関係なく DNA に結合しなかった[71]。



**Fig. 3-1.** RT-PCR analysis of the *scpB* gene in *A. ferrooxidans* cells grown in ferrous iron, sulfur, or tetrathionate. (a) Schematic map of the genetic context of *scpB* and *sqr*. Arrows indicate locations of primers used for the RT-PCR analysis. (b) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products. The RT-PCR products amplified using cDNA from RNA prepared from cells grown in ferrous iron (lane 5), sulfur (lane 6), or tetrathionate (lane 7) were analyzed. PCR reactions with RNA prepared from cells grown in ferrous iron (lane 2), sulfur (lane 3), or tetrathionate (lane 4) were carried out in order to exclude amplification due to genomic DNA contamination. The PCR product amplified using genomic DNA was also analyzed (lane 1).



**Fig. 3-2.** (A) Schematic map of the contig region containing the putative gene cluster context around the *sqr* gene of *A. ferrooxidans* 23270. (B) Putative functions of proteins encoded in genes surrounding *sqr* (loci were numbered according to NCBI numbering).

細菌の中では3つの異なる SMC 複合体が、見つかっている[72]。一つは、腸内細菌や特定の  $\gamma$ -プロテオバクテリアで見つかった MukBEF、二つ目は、他の多くの細菌や古細菌で見つかった SMC-ScpAB、三つ目は、最近同定された MksBEF で、様々な細菌に広く存在することが分かった。*smc* 遺伝子は、*A. ferrooxidans* ゲノムの中でも見つかっているが[31]、この SMC と ScpB の間の相互作用に関する情報はない。BLAST 検索解析では、*A. ferrooxidans* の ScpB と、枯草菌の ScpB との相同性は 30%と低い値を示した(Fig. 3-3)。 *A. ferrooxidans* の ScpA のアミノ酸配列を使った BLAST 検索解析もまた、枯草菌の ScpA と低いレベルの相同性 (28%) を示した。このことから、枯草菌の ScpB は、染色体の分離凝縮に関与すると知られているが、*A. ferrooxidans* の ScpB は、制御タンパク質に共通の HTH モチーフを持っていることや枯草菌の ScpB と相同性が低いことなどから、染色体の分離凝縮タンパク質というよりも、転写制御タンパク質として機能していることが考えられた。

```

A. ferro -----MREALLALFLSSAEPLTRARLADIFDGDPGCA
A. ferri -----MREALLALLSSAEPLSREHLAAILDNDPDYA
A. caldus -----MTKVSQEGVLALLLASEGGLAHAQLAEVFAEN-AAD
P. stutze      HC AVEINRYLQESTVDLSDPKDLASLLEAFLLASCKPLSLERLGELEFEEHERPS
H. capsul -----MDLKAALLEAALFAAQRPPLSLAELEALFGEDERPA
L. pneumo -----MIDNELKNIVEALVLSSNEPVTLEKIQETFDEWQRP
C. japoni     MGLELVLESVVDGRNRGMPGSQTAVTPELLRQIVEGAILAAGQPNTIVRLRELFDEEFAPT
B. subtil -----MGLDIVHWKALVEALLYAAGDEGLTKKQLLTVLEIEEPE

A. ferro      GWEAALDMLLATGE---GPLQLVCVAGGYRLQIHPRFNALVARLHMEPPFRPLSRATLETL
A. ferri      GWEAELDELLAVGE---GVLQLVCVAGGYRLQIHQRFNALLARLHVEAFRPLSKATLETL
A. caldus     GLDEALVSLAREGF---GPLELVQTGGRYRLQIRSRYNPLLIRLRQTEARPLSRAANETL
P. stutze     SAQLKKALEVLKSKCKGRAFELKEVASGYRLQVRRQFSPWVGRLLWEERPQRYSRALLETL
H. capsul     TEEIRLALATLAD EYAARPLELRKVASGYRFQVRAAYAPWISRLFEERPGRYSRALLETL
L. pneumo     LEDLQAIIESLKADYSSRAFELVQVASGFKVQTKSKYAAWVARLQIEKPAKYSRALLETL
C. japoni     KEDIQAALLEQIQADSEGRGFELKEVASGWRFQVRENLA PWVNRLWEEKPQKYSRALLETL
B. subtil     LNTIMADVAD EYRG-DTRGIELIEYACTYHLSTKKDFAPYLKKELEIVPSKGLSQASLEVL

A. ferro      AVIAYQQEVTRFEIEHWRGVAVSVQIMQQLQERG#ITTSGHRDTPGRPALUVTTTPGFLEH
A. ferri      AVIAYQQFVTRFEIEHWRGVAVSTQIMQQLQDRSWIFVAGHRETTPGRPALUVTTTPQFLEH
A. caldus     AVIAYHQFITRFEMEQWRGVSIGAPILQQLQEVDWITVVGHRDSPGRPALWATTINRFLRH
P. stutze     ALIAYRQFITRGEIEDIRGVAVNSQIVKTLQEREWIEVVGHRDVPGR-PMFATTROFLDH
H. capsul     AIIAYRQFVTRGQIEEIRGVAVSSGIIRTLTEREWVTVVGHRDVPGRPALFATTPQFLDH
L. pneumo     AIIAYKQFVTRADIEDIRGVAVNSQIMKTLHEREWIEIAGYKDVVGPVYTTTKEFLNY
C. japoni     ALIAYRQFITRCDIEEIRGVAVSSHIMKTLLERDWVKVVGHRDVPGRPSLYATTRQFLDY
B. subtil     AIVSVKQFITRAETFEIRGVKS-FRTLHSLVAKAILCEUGRADGPGRAITLYGTTPTFLIQ

A. ferro      FSLPSLIALPEIVTMEEGQTDIQAGITD-----
A. ferri      F3LASLALGLPTVMGAAEV-----
A. caldus     F3LNTLDLPRVAPDFLPADNLSMS-----
P. stutze     FNLKNDLDELPLAVLREMEPELRLLEDAAVPVALQARADETLDEPQAPAREQTSFRSL
H. capsul     FNLESLLADLPALPEFAVSP-----ELEDVLAALAQTDPTHPSEPPDPADAEA-----
L. pneumo     FNLNLYSELPLPEINDTLTLH3ATQSIIEC7QNEQ-----
C. japoni     FNLKSLDELPSLSEIRDLDLNPMLNLGGEEGLGEKTDAPIPDSAQPELASLDERQEDM
B. subtil     FGLKTLDELPLPENAEEDVLQEEADLFFENFNQTFEDIK-----

A. ferro ----- 177 aa
A. ferri ----- 167 aa
A. caldus ----- 177 aa
P. stutze     LAELDGMEQGLKTDFFDLLLEAQAADIDSDDEEQSTP----- 268 aa
H. capsul ----- 201 aa
L. pneumo ----- 193 aa
C. japoni     QETEVI ALEDGFSDQQDAYEDTSTVTPDAEINDFVSAKTEDNLPANEDADKT 291 aa
B. subtil ----- 197 aa

```

**Fig. 3-3.** Sequence alignment of the ScpB of *A. ferrooxidans* with those of ScpBs or transcriptional regulators. *A. ferro*, ScpB of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270; *A. ferri*, ScpB of *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3(EGK91264); *A. caldus*, ScpB of *Acidithiobacillus caldus* ATCC51756(ZP\_05293617); *P. stutze*, transcriptional regulator of *Pseudomonas stutzeri* A1501(YP\_001172939); *M. capsul*, ScpB of *Methylococcus capsulatus* str. Bath(YP\_114626); *L. pneumo*, ScpB of *Legionella pneumophila* 1306(CBW99695); *C. japoni*, ScpB of *Cellvibrio japonicas* Ueda107(YP\_001982274); *B. subtil*, ScpB of *Bacillus subtilis* str.

168(SCPB\_BACSU). Accession numbers in parentheses are found in a report of a BLASTP search at NCBI website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). An underline indicates a predicted helix-turn-helix motif.

### 3.3.2 *A. ferrooxidans* における *scpB* 遺伝子の転写

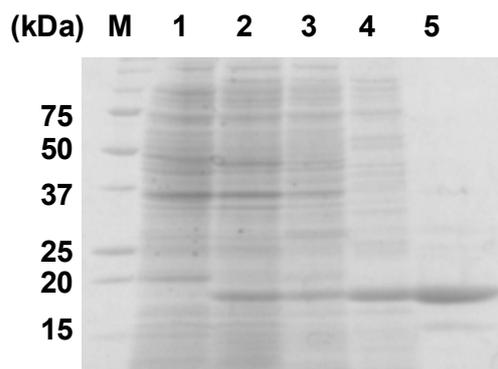
転写レベルで *scpB* 遺伝子の発現量を解析するために、二価鉄、硫黄、テトラチオン酸で生育した、対数増殖期の *A. ferrooxidans* 細胞から全 RNA を抽出し、RT-PCR を行った。予測された長さを持つ部分的な *scpB* 遺伝子が、硫黄やテトラチオン酸生育細胞から調製された cDNA を使って増幅された (Fig. 3-1 b)。これは、*scpB* 遺伝子が実際に *A. ferrooxidans* の中で転写されていることを示している。一方、二価鉄生育細胞からの cDNA を PCR 反応に用いた時に、バンドは検出されなかった。16S rRNA 遺伝子の転写産物は、二価鉄、硫黄、テトラチオン酸で生育した細胞全てで、同程度検出された (データは示さない)。以上の結果から、*scpB* 遺伝子の転写が、RISCs 存在下で活性化されることを示しており、硫黄酸化に関与する遺伝子の転写制御に ScpB タンパク質が関与していることが示唆された。

### 3.3.3 鉄および硫黄酸化に関与する遺伝子のプロモーター領域への ScpB の結合

*A. ferrooxidans* の ScpB は、染色体分離凝縮タンパク質として注釈がつけられていたが、HTH モチーフがを含んでおり、*scpB* 遺伝子の転写が、硫黄やテトラチオン酸で生育した細胞で活性化された。これらの結果は、*A. ferrooxidans* の ScpB は、転写制御因子としての役割を果たし、鉄や硫黄酸化に関与した遺伝子のプロモーター領域に結合することが予測された。

プロモーター領域と精製された制御タンパク質を用いたゲルシフトアッセイ

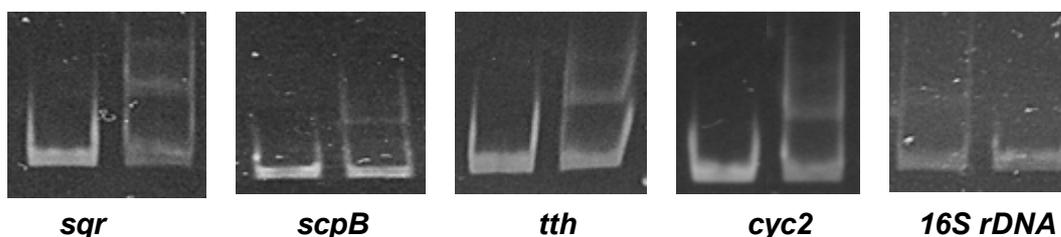
(Electrophoretic mobility shift assay; EMSA) は、転写制御タンパク質の DNA 結合能力を明らかにする方法として、よく用いられる手法である。そこで、大腸菌内で発現させた His タグ付き ScpB タンパク質 (Fig.3-4) を用いて EMSA 分析を試みた。



**Fig. 3-4.** SDS-PAGE analysis of the recombinant ScpB synthesized in *E. coli*.

Lane 1, cell-free extract from *E. coli* BL21 (DE3) with pETcoco; lane 2, cell-free extract from *E. coli* BL21 (DE3) with pETcoco-scpB; lane 3, supernatant obtained by centrifugation of cell-free extract from *E. coli* BL21 (DE3) with pETcoco-scpB at  $100,000 \times g$  for 1 h; lane 4, sample obtained by affinity chromatography using a Ni-charged Chelating Sepharose Fast Flow resin, lane 5, ScpB obtained by gel filtration. Proteins were stained with Coomassie Blue. Molecular masses in kDa are indicated on the left. Lane M, marker proteins.

精製した組換え ScpB タンパク質の性質を評価するために、最初に、ScpB タンパク質と *sqr* のプロモーター領域を使って EMSA 分析を行った。Fig.3-5 に示すように、ScpB は、*sqr* 遺伝子のプロモーターDNA の移動性をシフトさせることができた(Fig. 3-5, lane *sqr*)。



**Fig. 3-5.** Electrophoretic mobility shift assays using recombinant *A. ferrooxidans* ScpB protein and DNAs of promoter regions (*sqr*, *scpB*, *tth* and *cyc2* promoter regions). A 177-bp fragment located inside the 16S rRNA gene was used as control DNA (*16S rDNA*). Promoter DNA was incubated with (right lane) and without recombinant ScpB (left lane) in each EMSA analysis.

データは示さないが、 $100^{\circ}\text{C}$ で煮沸処理して変性させた ScpB タンパク質を、同じ条件下で分析した時には、変更された DNA バンドは検出されなかった。つまり組換え ScpB タンパク質は、タンパク質-DNA 複合体を形成する能力を持つことが証明された。

ScpB タンパク質が、鉄や硫黄酸化に関与する遺伝の、他のプロモーター領域に結合できるかどうかを調べるために、硫黄酸化に関与するテトラチオン酸加水分解酵素をコードする *tth* や、酸化に関与するシトクロム *c* をコードする *cyc2* のプロモーター領域の DNA 断片と一緒にインキュベートした。結果、プロモーターDNA の移動度は、ScpB タンパク質とインキュベートすることによって遅れることが示された。ScpB タンパク質とそれ自身のプロモーター領域との結合についても調べたところ、DNA バンドはの移動度が減少した (Fig. 3-5 lane *scpB*)。コントロール DNA (*16S rDNA*) とインキュベートした時は、DNA バンドの移動度の変化を示さなかったことから、ScpB タンパク質は、プロモーター領域と結合する能力があると結論付けられた。しかしながら、ScpB タンパク質は、この研究で調べた全てのプロモーター領域と結合したため、その結合の特異性は低いと考えられた。

### 3.4 結論

本章では、生育基質の異なる条件で培養した *A. ferrooxidans* ATCC 23270 細胞において、発現量の異なるタンパク質の発現制御機構の解明のため、すでに元素硫黄やテトラチオン酸で生育した細胞で上方制御が確認されている *sqr* 遺伝子上流にある *scpB* 遺伝子と、そのコードするタンパク質 (Segregation and condensation protein; ScpB) について、制御因子としての可能性を明らかにするため、硫黄や鉄の代謝に関与する遺伝子のプロモーター領域への結合活性について検証した。

*A. ferrooxidans* 23270 ゲノム配列中の *sqr* 遺伝子を取り囲む領域を分析したところ、上流に位置する配列は、染色体凝縮タンパク質と注釈づけられている *scpB* 遺伝子が存在した。*scpB* 遺伝子がコードする 177 アミノ酸からなるタンパク質は、細菌類の制御タンパク質に共通する HTH モチーフを持ち、遺伝子のオペレーター部位に結合することが示唆された。ScpB は、*Bacillus subtilis* において最初に発見され、染色体構造維持タンパク質 (structural maintenance of chromosomes protein; SMC protein) と相互作用する。*A. ferrooxidans* にも、*smc* 遺伝子は存在するが、SMC と ScpB の相互作用に関する情報は得られていない。また、*Bacillus subtilis* の ScpB は、ATP の有無に関係なく、DNA に結合しなかった。遺伝子配列の相同性も、これら二つの間では 30% と低く、以上の違いから、*A. ferrooxidans* の ScpB は、染色体の分離凝縮タンパク質というよりも、制御タンパク質として機能していると考えた。

*scpB* 遺伝子が、実際に *A. ferrooxidans* 細胞内で転写されているかどうかを確認するために、生育基質の異なる条件で培養した、対数増殖期の細胞から抽出した RNA から調製された cDNA を鋳型に、PCR を行った。結果、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。16SrRNA 遺伝子の増幅は、すべての細胞で同レベル検出されたことから、*scpB* 遺伝子が、RISCs 存在下で選択的に発現が誘導されることが示され、これは、ScpB タンパク質が硫黄酸化関連遺伝子の転写制御に関与している可能性を示唆した。

次に、ScpB タンパク質が鉄や硫黄の酸化に関与した遺伝子のプロモーター領域に結合するかどうかを、EMSA 分析法を用いて確認した。*sqr* 遺伝子、硫黄酸化に関与するテトラチオン酸加水分解酵素をコードする *tth* 遺伝子や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 断片と精製した ScpB をインキュベートした結果、すべてのプロモーター領域の DNA と結合することが分かった。16S rDNA とは結合が認められなかったことから、ScpB は、プロモーター領域と結合する能力があり、それは非特異的であることが示された。しかしながら、*Bacillus* 属の ScpB と異なり、DNA 結合能があり、その発現が鉄生育細胞では確認できないが、硫黄生育細胞で活性化されることから、硫黄代謝酵素遺伝子の発現に何らかの形で関与していることが予測された。

*A. ferrooxidans* の鉄や RISCs 代謝制御は、複雑化されている[18]ので、*A. ferrooxidans* の ScpB の機能を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。遺伝子ノックアウトは、機能的遺伝子解析のための一般的な手法である。遺伝子操作における巨大な困難のために、*A. ferrooxidans* の遺伝子ノックアウト変異構築の報告は一報しかないが、この細菌のためのマーカレス遺伝子置換システムが最近開発された[73]。このシステムを利用した、*A. ferrooxidans* の ScpB の機能解析が、今後の研究課題として早急に実施されることが望まれる。

## 第四章 総括

チオ硫酸は、テトラチオン酸で生育した細胞内で、テトラチオン酸加水分解酵素 (TTH) によって生産され、黄鉄鉱の硫黄部分の酸化 (チオ硫酸経路) の重要な中間化合物として生産されると主張されてきた。チオ硫酸形成の非生物機構は、既にいくつか報告されている。亜硫酸は硫化物と反応することができ、中間体として形成された元素硫黄は、すぐに、硫化物と反応してチオ硫酸と水を形成する ( $2\text{HS}^- + 4\text{HSO}_3^{2-} \rightarrow 3\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 3\text{H}_2\text{O}$ ;  $3\text{H}_2\text{S} + \text{SO}_3^{2-} \rightarrow 3\text{H}_2\text{O} + 4\text{S}$ ,  $\text{SO}_3^{2-} + \text{S} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ )。2 番目の可能な、非生物的チオ硫酸形成反応は、オリゴ硫化物鎖への亜硫酸分子の攻撃である ( $\text{S}_n^{2-} + \text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{S}_{n-1}^{2-} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ )。序論で述べたように、チオ硫酸の代謝経路は少なくとも 4 つ知られている。*A. ferrooxidans* ATCC 23270 の遺伝子配列分析によって、細菌に広く分布している SOX システムが、本菌には欠損していることが明らかになった。チオ硫酸デヒドロゲナーゼが、精製されているが、その遺伝子は明らかにされていなかった。*A. ferrooxidans* ATCC 23270 は、*A. ambivalens* のチオ硫酸: キノン還元酵素 (TQO) と同源性のあるタンパク質をコードする遺伝子 *doxDA* 遺伝子を持っていることから、チオ硫酸酸化には TQO が関与していると考えられていた。しかしながら、*A. ferrooxidans* におけるチオ硫酸酸化への TQO の関与は、生化学的には実証されていない。本研究で検出された膜結合型 TSD 活性は、おそらく TQO に起因している可能性が高いが、現時点で観察された膜結合性の TSD を TQO 活性に結びつけることができる証拠はない。チオ硫酸代謝に関与すると考えられる遺伝子が、*tsd* 遺伝子付近のゲノム領域に存在することから、TSD が、*A. ferrooxidans* のチオ硫酸酸化に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

しかしながら、チオ硫酸の濃度が 4 mM では活性を示さず、*K<sub>m</sub>* 値 15 mM という結果は、この酵素は、チオ硫酸との親和性がとても低く、TSD の活性化のためにはいくつかの共同因子やサブユニットを必要とすることを示す。同じ *K<sub>m</sub>* 値 (15 mM) の値は、TSD と SBP を両方含む CM-650 M 画分でも観察され、これは、SBP が硫酸依存性酵素活性には関与するが、低濃度のチオ硫酸存在下での活性化剤にはならないことを示した。これらの結果は、チオ硫酸からのテトラチオン酸形成が、TSD の主な反応ではないことを示唆した。したがって、この酵素が触媒する反応を特徴付けるためには、基質特異性や活性化因子に関する

さらなる検討が必要である。しかしながら、本研究によって、*A. ferrooxidans* 細胞内で、チオ硫酸からテトラチオン酸を生成する酵素とその遺伝子が初めて明らかとなった。酵素は cytochrome *c* を電子受容体に用いることが推測されるため、細胞内で機能している cytochrome *c* の検出と、その cytochrome *c* を酸化する末端酸化酵素の解明が今後の課題として残されている。

*A. ferrooxidans* の鉄や硫黄の代謝制御機構の解明は、バクテリアリーチングの効率を上げるために重要である。第三章では、その制御に関与すると考えられる ScpB について解析を行った。scpB 遺伝子の転写は、RISCs 内で生育した細胞で上方制御され、組換え ScpB タンパク質は、プロモーター領域と結合能力を示すことを明らかにした。ScpB タンパク質が *sqr* や *tth* 遺伝子の発現の制御に関与しているかどうかを明らかにすることが、本研究の目的であったが、ScpB タンパク質は、鉄あるいは硫黄酸化に関与すると考えられる遺伝子のプロモーター領域に非特異的に結合したため、ScpB タンパク質の機能を限定することができなかった。しかし BLAST 解析の結果、*A. ferrivorans* (74%)や *A. thiooxidans* (68%)、*A. caldus* (49%)の ScpB とカッコ内に示すような、比較的高い相同性を持つことが分かった。*A. ferrivorans* は、最近、新しい種として *Acidithiobacillus* 属の中で分類分けされた、鉄・硫黄酸化好酸性菌であり *A. thiooxidans* や *A. caldus* は、硫黄酸化好酸性菌である。これらの好酸性硫黄酸化細菌の ScpBs は、硫黄酸化に関与した遺伝子の転写制御において、重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられている。*A. ferrooxidans* における鉄や硫黄代謝の制御は、複雑なため、*A. ferrooxidans* の ScpB の本質的な機能を明らかにするために、さらなる研究が必要である。

遺伝子ノックアウトは、遺伝子機能を解析するために極めて有効な手法である。*A. ferrooxidans* では、これまでに利用しやすい遺伝子ノックアウト法がなかったが、最近、マーカーレス遺伝子組み換えシステムが開発された。このシステムを用いた *tsd* や *scpB* 遺伝子の解析によって、チオ硫酸代謝の詳細な経路の解明と、RISCs の代謝酵素遺伝子の発現制御機構の解明がなされることが期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心な御指導と貴重な御助言をいただきました岡山大学大学院環境生命科学研究科 上村一雄 教授、金尾忠芳 准教授に心から厚く御礼申し上げます。適切な御助言をいただきました岡山大学大学院環境生命科学研究科 稲垣賢二 教授、岡山大学自然科学研究科 高田潤 教授に深く感謝の意を表します。また、実験遂行に協力をいただき、有益な議論・意見交換を行った微生物機能学研究室の各位に感謝いたします。

最後に、研究生生活を支えていただいた家族、友人、貴重な機会を与えていただいた多治見市役所に心より感謝いたします。

## 参考文献

1. **Kelly DP, Shergill JK, Lu WP, Wood AP.** 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **71**:95-107.
2. **Elbehti A, Brasseur G, Lemesle-Meunier D.** 2000. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the bc1 and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **182**:3602-3606.
3. **Yamanaka T, Yoshioka Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y.** 1981. Purification of sulphite-cytochrome *c* reductase of *Thiobacillus novellus* and reconstitution of its sulphite oxidase system with the purified constituents. *Plant Cell Physiol* **22**: 613-622
4. **Charles AM, Suzuki I.** 1966. Mechanism of thiosulfate oxidation by *Thiobacillus novellus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **128**:510-521
5. **Kappler U, Friedrich CG, Trüper HG, Dahl C.** 2001. Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). *Arch. Microbiol.* **175**:102-111.
6. **Kelly DP.** 1989. Physiology and biochemistry of unicellular sulfur bacteria. Autotrophic Bacteria (Schlegel HG & Bowien B, eds), pp. 193-217. Springer-Verlag, Berlin Science Tech Publishers, Madison, WI.
7. **Hallberg KB, Dopson M, Lindström EB.** 1996. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J. Bacteriol.* **178**:6-11.
8. **Dam B, Mandal S, Ghosh W, Das Gupta SK, Roy P.** 2007. The S4-intermediate pathway for the oxidation of thiosulfate by the chemolithoautotroph *Tetrathiobacter kashmirensis* and inhibition of tetrathionate oxidation by sulfite. *Res. Microbiol.* **158**:330-338.
9. **Kletzin A, Urich T, Muller F, Bandejas TM & Gomes CM.** 2004. Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. *J Bioenerg Biomembr* **36**:77-91.
10. **Liljeqvist M, Valdes J, Holmes DS, and Dopson M.** 2011. Draft genome of the psychrotolerant acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3. *J. Bacteriol.* **193**:4304-4305.

11. **Mongold S, Valdes J, Holmes DS, Dopson M.** 2011. Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Front. Microbiol.* **2**:17 doi:10.3389/fmicb.2011.00017.
12. **Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, Jedlicki E, Holmes DS, Bonnefoy V.** 2009. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*. Doi:10.1186/1471-2164-10-394.
13. **Valdes J, Ossandon F, Quatrini R, Dopson M, Holmes DS.** 2011. Draft genome sequence of the extremely acidophilic biomining bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 provides insight into the evolution of the *Acidithiobacillus* genus. *J. Bacteriol.* **193**:7003-7004.
14. **Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, Blake R II, Eisen JA, Holmes DS.** 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*. **9**:597 doi:10.1186/1471-2164-9-597.
15. **Rawlings DE.** 2005. Characterization and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbiol. Cell Fact.* **4**:13 doi:10.1186/1475-2859-4-13.
16. **Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W.** 2003. Bioleaching review. Part A. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanism of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:239–248.
17. **Schippers A, Sand W.** 1999. Bacterial leaching of metalsulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**:319-321.
18. **Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi RP, Bond PL.** 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Micobiology*. **149**:1959-1970
19. **Panda SK, Jyoti V, Bharda B, Nayak KC, Shivaji S, Rainey FA, Das SK.** 2009. *Thiomonas bdubaneswarensis* sp. Nov., an obligately mixotrophic, moderately thermophilic, thiosulfate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:2171-2175.
20. **Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W.** 2003. Bioleaching review. Part A. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanism of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol.*

*Biotechnol.* **63**:239–248.

21. **Selkov E, Overbeek R, Kogan Y, Chu L., Vostein V, Holmes D, Silver S, Haselkorn R, Fostein M.** 2000. Functional analysis of gapped microbial genomes: Amino acid metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:3509-3514.
22. **Sato A, Fukumori Y, Yano T, Kai M, Yamanaka T.** 1989. *Thiobacillus ferrooxidans* cytochrome *c*-552: purification and some of its molecular features. *Biochim. Biophys. Acta.* **976**:129-134
23. **Cavazza C, Giudici-Orticoni MT, Nitschke W, Appia C, Bonnefoy V, Bruschi M.** 1996. Characterization of a soluble cytochrome *c*4 isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Eur. J. Biochem.* **242**:308-314
24. **Essleston M, Kelly DP.** 1978. Oxidation kinetics and chemostat growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* on tetrathionate and thiosulfate. *J. Bacteriol.* **134**:718-727
25. **Silver M, Lundgren DG.** 1968. Sulfur-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **46**:457-461.
26. **Tano T, Lundgren D.** 1978. Sulfide oxidation by spheroplasts of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:1198-1205.
27. **Silver M, Lundgren DG.** 1968. The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Biochem.* **46**:1141-1145.
28. **Tabita R, Silver M, Lundgren DG.** 1969. The Rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **47**:1141-1145.
29. **Sugio T, White KL, Shute E, Choate D, Blake RC.** 1992. Existence of a hydrogen sulfide:ferric ion oxidoreductase in iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:431-433.
30. **Sugio T, White KL, Shute E, Choate D, Blake RC.** 1992. Existence of a hydrogen sulfide:ferric ion oxidoreductase in iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:431-433.
31. **Corbett CM, Ingledew WJ.** 1987. Is Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> cycling intermediate in sulfur oxidation by Fe<sup>2+</sup>-grown *Thiobacillus ferrooxidans*? *FEMS Microbiol. Lett.* **41**:1-6

32. **Heunish GW.** 1977. Stoichiometry of the reaction of sulfites with hydrogen sulfide ion. *Inorg. Chem.* **16**:1411-1413.
33. **Pronk JT, Meulenberg R, Hazeu W, Bos, P, and Kuenen JG.** 1990. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by acidophilic Thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**:293-306.
34. **Appia-Ayme C, Guiliani N, Ratouchniak J, Bonnefoy, V.** 1999. Characterization of an operon encoding two *c*-type cytochromes, an *aa3*-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC33020. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4781-4787.
35. **Brasseur G, Levican G, Bonnefoy V, Holmes D, Jedlicki E, Lemesle-Meunier D.** 2004. Apparent redundancy of electron transfer pathways via *bc1* complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1656**:114-126.
36. **Elbehti A, Brasseur G, Lemesle-Meunier D.** 2000. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the *bc1* and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **182**:3602-3606.
37. **Malarte G, Leroy G, Lojou E, Abergel C, Bruschi M, Giudici-Ortoni MT.** 2005. Insight into molecular stability and physiological properties of the diheme cytochrome CYC41 from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry.* **44**:6471-6481.
38. **Visser JM, de Jong GAH, Robertson LA, Kuenen JG.** 1997. Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5. *Arch. Microbiol.* **166**:372-378.
39. **Bonnefoy V, Holmes DS.** 2011. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environ. Microbiol.* Doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02626.x.
40. **Ramírez, P, Toledo H, Guiliani N, Jerez CA.** 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1837-1845.
41. **Valdes J, Quatrini R, Hallberg K, Dopson M, Valenzuela PD, Holmes DS.** 2009. Draft

genome sequence of the extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus *Acidithiobacillus*. *J. Bacteriol.* **199**:5877-5878.

42. **Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V.** 2004. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus operon encoding two cytochromes *c*, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology* **150**:2113-2123.
43. **Yarzabal A, Brasseur G, Ratouchniak J, Lund K, Lemesle-Meunier D, DeMoss JA, Bonnefoy V.** 2002. The high-molecular-weight cytochrome *c* Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *J. Bacteriol.* **184**:313-317
44. **Rohwerder T, Sand W.** 2007. Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation. p.355-358. In Donati ER, Sand W (ed), *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Springer, *The Netherlands*, pp35-58
45. **Sugio T, Mizunashi M, Inagaki K, Tano T.** 1987. Purification and some properties of sulfur:ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **169**:4916-4922.
46. **Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, Blake R II, Eisen JA, Holmes DS.** 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics.* **9**:597 doi:10.1186/1471-2164-9-597.
47. **Bouchal P, Zdráhal Z, Helánová S, Janiczek O, Hallberg KB, Mandl M.** 2006. Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. *Proteomics.* **6**:4278-4285.
48. **Chi A, Valenzuela L, Beard S, Mackey AJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA.** 2007. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomics analysis. *Mol. Cell Proteomics.* **6**:2239-2251.
49. **Ramírez P, Guiliani N, Valenzuela L, Beard S, Jerez CA.** 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds or metal sulphides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4491-4498.
50. **Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fisher J.** 2005. Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:253-259.
51. **Ghosh W, Dam B.** 2009. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation

- by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:999-1043.
52. **Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliani N, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA.** 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* **24**:197-211.
  53. **Wakai S, Tsujita M, Kikumoto M, Manchur MA, Kanao T, Kamimura K.** 2007. Purification and characterization of sulfide:quinone oxidoreductase from an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**:273-282.
  54. **Kamimura K, Wakai S, Sugio T.** 2001. Identification of *Thiobacillus ferrooxidans* strains based on restriction fragment length polymorphism analysis of 16s rDNA. *Microbios.* **105**:141-152.
  55. **Bruscella P, Appia-Ayme C, Levicán G, Ratouchniak J, Jedlicki E, Holmes DS, Bonnefoy V.** 2007. Differential expression of two *bcl* complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. *Microbiology* **153**:102-110.
  56. **Kamimura K, Fujii S, Sugio T.** 2001. Purification and some properties of ubiquinol oxidase from obligately chemolithotrophic iron-oxidizing bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**:63-71.
  57. **Janiczek O, Zemanova J, Mandl M.** 2007. Purification and some properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **37**:101-111.
  58. **Kanao T, Kamimura K, Sugio T.** 2007. Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **132**:16-22.
  59. **Wakai S, Kikumoto M, Kanao T, Kamimura K.** 2004. Involvement of sulfide:quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:2519-2528.
  60. **Acosta M, Beard S, Ponce J, Vera M, Mobarec JC, Jerez CA.** 2005. Identification of putative sulfotransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC

23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS*. **9**:1329.

61. **Appia-Ayme C, Guiliani N, Ratouchniak J, Bonnefoy V.** 1999. Characterization of an operon encoding two *c*-type cytochromes, an *aa3*-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC33020. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4781-4787.
62. **Stöhr R, Waberski A, Völker H, Tindall BJ, Thomm M.** 2001. Hydrogenothermus marinus gen. nov., sp. Nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of Calderobacterium hydrogenophilum as a member of the genus Hydrogenobacter and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobaculum acidophilus* gen. nov., comb. Nov., in the phylum 'Hydrogenobacter/Aquifex'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1853-1862.
63. **Goltsman DSA, Deneff VJ, Singer SW, VerBerkmoes NC, Lefsrud M, Mueller RS, Dick GJ, Sun CL, Wheeler KE, Zemla A, Baker BJ, Hauser L, Land M, Shah MB, Thelen MP, Hettich RL, Banfield JF.** 2009. Community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic iron-oxidizing "*Leptospirillum rubrum*" (Group II) and "*Leptospirillum ferrodiazotrophum*" (Group III) bacteria in acid mine drainage biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:4599-4615.
64. **Deppenmeier U, Ehrenreich A.** 2009. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**:69-80.
65. **Silver MP, Lundgren DG.** 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.* **77**:642-647.
66. **Yarzabal A, Brasseur G, Bonnefoy V.** 2002. Cytochrome *c* of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 189-195
67. **Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V.** 2004. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus operon encoding two cytochromes *c*, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology* **150**: 2113-2123
68. **de Jong GA, Hazeu HW, Bos P, Kuenen JG.** 1997. Polythionate degradation by tetrathionate hydrolase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **143**: 499-504

69. **Mangold S, Valdés J, Holmes DS, Dopson M.** 2011. Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Front Microbiol* doi:10.3389/fmicb.2011.00017
70. **Soppa J, Kobayashi K, Noirot-Gros M-F, Oesterhelt D, Ehrlich SD, Dervyn E, Ogasawara N, Moriya S.** 2002. Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. *Mol Microbiol* **45**:59-71
71. **Hirano M, Hirano T.** 2004. Positive and negative regulation of SMC-DNA interaction by ATP and accessory proteins. *EMBO J* **23**:2664-2673
72. **Petrushenko ZM, She W, Rybenkov VV.** 2011. A new family of bacterial condensins. *Mol Microbiol* **81**:881-896
73. **Wang H, Liu X, Liu S, Yu Y, Lin J, Lin J, Pang X, Zhao J.** 2012 Development of a markerless gene replacement system for *Acidithiobacillus ferrooxidans* and construction of a pfkB mutant. *Appl Environ Microbiol* **78**:1826-1835