

氏 名	SULTANA Sharmin
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第5237号
学位授与の日付	平成27年 9月30日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Analysis of thiosulfate metabolism in a marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium, <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> strain SH (海洋性好酸性硫黄酸化細菌 <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> SH 株のチオ硫酸代謝の解析)
論文審査委員	教授 上村 一雄      教授 稲垣 賢二      准教授 金尾 忠芳

### 学位論文内容の要旨

Bacterial leaching is used to recover metals from low-grade of sulfide ores. The technique can also be applied for bioremediation of sediments and soils polluted with heavy metals. Acidophilic iron- and sulfur-oxidizing bacteria are used in the process. Since acidophilic sulfur-oxidizing bacteria that are tolerant to NaCl or require NaCl for growth are useful in developing remedial technologies for salt-containing environments, an acidophilic sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH was isolated, which requires NaCl for growth.

Thiosulfate metabolism is a key pathway in bacterial leaching, because a sulfur moiety of sulfide is thought to be metabolized via thiosulfate as the intermediate. To get a better understanding of sulfur metabolism in strain SH, the purification and characterization of thiosulfate dehydrogenase (TSD) from strain SH was carried out. A three-step procedure resulted in approximately 71-fold purification of the enzyme from membrane fraction. SDS-PAGE analysis of the final preparation revealed a major protein with an apparent molecular mass of 44 kDa. The maximum enzyme activity (45 U·mg<sup>-1</sup>) was observed at pH 4.0, 40°C, and 200 mM NaCl. Ubiquinone could be used as an electron acceptor, but horse heart cytochrome *c* could not be used. Comparison with thiosulfate metabolizing enzymes from the other microorganisms showed that TSD from strain SH was structurally different from previously reported thiosulfate oxidizing-enzymes. In addition, this is the first report of TSD whose activity is stimulated by NaCl.

The gene encoding TSD newly identified in strain SH was determined analyzing a draft genome sequence of strain SH. The draft genome of *At. thiooxidans* SH contains a total of 2.91 Mbp distributed in 73 contigs, with a G+C content of 54.3%. The annotation results revealed one 5S-16S-23S operon, 45 tRNAs, and 2,986 CDSs. Sulfur oxidizing complex (*sox*), tetrathionate hydrolase (*tet*), sulfide quinone reductase (*sqr*), and heterodisulfide reductase (*hdr*), found in strain SH were also found in the other *At. thiooxidans* genomes with the similar gene arrangement. Using sequence data obtained by HPLC-chip/QTOF analysis of peptide fragments produced from in-gel trypsin digestion of TSD, a Mascot Server search was carried out to determine a gene encoding TSD in strain SH genome. The *tsd* gene found in the genome encoded 444 amino acids with the signal peptide of 29 amino acids. A BLAST search revealed some homologous proteins from sulfur-oxidizing bacteria, such as *At. caldus*, *At. ferrooxidans* and *At. ferrivorans*, but the homologies are relatively low. Surprisingly, any homologous proteins with TSD from strain SH were not found in other *At. thiooxidans* strains. The *tsd* gene newly determined in strain SH was found in a genomic island with 4.8 kb containing transposases showing the similarity to IS4 or Lferr from *A. ferrooxidans*, suggesting that strain SH acquired this gene through a horizontal gene transfer. This is one of the reasons why homologous proteins were not found in other three *At. thiooxidans* strains than strain SH. TSD from strain SH was able to use quinone (Q<sub>2</sub>) as the electron acceptor, suggesting that the TSD from strain SH had TQO activity. The TQO from *Acidianus ambivalens* is the only one TQO characterized at the molecular genetic level. Although further detailed investigations are necessary to clarify the kinetic mechanism, the TSD from strain SH may be a novel thiosulfate:quinone oxidoreductase (TQO).

## 論文審査結果の要旨

微生物を用いて硫化鉱石から金属資源を回収する技術であるバクテリアリーチングは、海洋から回収した硫化鉱石にも適用可能であるが、これまで研究されてきた陸由来の微生物は、塩存在下ではその活性が著しく阻害されることが知られていた。そのため、塩環境でも生育可能な海洋性の硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH株の利用が検討された。バクテリアリーチングでは、硫化鉱石中の硫黄成分はチオ硫酸を中間体とする経路で硫酸に酸化されると考えられており、チオ硫酸代謝系の酵素の評価が重要である。申請者は、SH株からチオ硫酸デヒドロゲナーゼを精製し、その性質を明らかにした。酵素はNaClを活性発現に必要とし、補酵素にキノンを用いて、2分子のチオ硫酸をテトラチオン酸に変換する活性を触媒した。これまでに報告されたチオ硫酸酸化酵素との比較によって、精製した酵素はキノンを補酵素とする世界で2例目の新規な酵素であることを明らかにした。これまでに3株の *A. thiooxidans* の全ゲノムの情報が公開されており、遺伝子の同定は比較的容易であると考えられたが、N-末端アミノ酸配列解析およびトリプシン消化ペプチド断片の解析では、遺伝子の同定ができなかった。これは、新たに見出した酵素は、未知の遺伝子にコードされていることを示唆した。そこで、SH株の全ゲノム配列を解析することによって、遺伝子の同定が行われ、新規な遺伝子の同定に成功した。さらに、ゲノム解析によって、この遺伝子は既に公表されている *A. thiooxidans* のゲノム上には存在せず、約4.8 kbpの挿入断片中に存在し、その遺伝子断片中には、トランスポゾンが存在していた。これらの結果から、SH株はチオ硫酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を他の細菌から水平伝播によって獲得したものと推定した。なお、チオ硫酸代謝に関連する遺伝子を解析し、SH株のチオ硫酸代謝経路の推定も行っている。

本研究は、海洋性硫黄酸化細菌からチオ硫酸代謝に関連する新規な酵素とその遺伝子を発見したもので、微生物の硫黄代謝研究に新たな知見を提供すると同時に、塩環境でのバイオリーチングの実現に大きく貢献するもので、博士の学位（学術）に値するものであると判断した。