

氏名	TAHER MOHAMED TAHA MOHAMED
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4013号
学位授与の日付	平成21年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Involvement of Iron Oxidation- and Iron-Reduction-Enzyme Systems in Sulfur Oxidation of Iron-Oxidizing Bacterium <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (鉄酸化細菌 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> の硫黄酸化への鉄酸化酵素並びに鉄還元酵素の関与)
論文審査委員	教授 杉尾 剛 教授 白石 友紀 教授 一瀬 勇規

学位論文内容の要旨

Acidithiobacillus ferrooxidans is a chemolithotrophic gram negative bacterium that can oxidize not only iron but also reduced sulfur compounds including elemental sulfur, sulfite, tetrathionate, thiosulfate, and pyrite. This bacterium is involved in many economically important processes such as bioleaching of precious metals and bioremediation of acid mine drainage containing high concentration of ferrous iron. Among the metabolic aspects of this microorganism, sulfur oxidation is very important as it is the key reaction not only, in energy generation for cell growth and maintenance, but only in bioleaching and bioremediation processes. However, the precise mechanism of this reaction is not yet clear and there have been some problems still matters of argument. One of the biggest problems is on the terminal oxidase for sulfur oxidation by this microorganism. Some researchers proposed that the terminal oxidase of sulfur oxidation is *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase which is the same terminal oxidase of iron oxidation. Opposing to this proposal, some researchers proposed that *bd* and *bo*₃ quinol oxidases, but not *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase, are the terminal oxidases in sulfur oxidation.

In this thesis, author shows for the first time that sulfur-grown *A. ferrooxidans* cells have iron oxidase activity comparable to that of iron-grown *A. ferrooxidans* cells at the early log growth phase. The components of iron oxidation enzyme system, containing two cytochromes *c* (Cyc1 and Cyc2), rusticyanin, and *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase were purified from sulfur-grown cells and the complete iron oxidation enzyme system was reconstituted from these four components. These results indicate that *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase plays a crucial role in sulfur oxidation by *A. ferrooxidans* ATCC 23270 cells. The Fe³⁺-reduction activity of sulfur-grown cells was 10-20 fold higher than that of iron-grown cells. In addition to sulfide:ferric ion oxidoreductase (SFORase) and sulfite:ferric ion oxidoreductase, author shows for the first time, existence of the third Fe²⁺ producing enzyme in *A. ferrooxidans* cells by purifying Fe³⁺-reductase, which uses tetrathionate as an electron donor, from tetrathionate-, sulfur-, and iron-grown *A. ferrooxidans* cells and clarifies that, the enzyme is corresponds to tetrathionate hydrolase. Beside Fe³⁺-reduction, tetrathionate can also reduce cytochrome *c* in presence of tetrathionate hydrolase. Tetrathionate hydrolase decomposes tetrathionate to elemental sulfur, sulfate, and thiosulfate, among these products, only thiosulfate can reduce both Fe³⁺ and cytochrome *c*.

These new findings that the synthesis of iron oxidation- and iron reduction-enzyme systems are markedly activated during the growth of *A. ferrooxidans* in sulfur medium, strongly indicates that iron oxidation-enzyme system utilizing *aa*₃-type cytochrome oxidase as the terminal oxidase plays a crucial role in the energy generation of sulfur-grown *A. ferrooxidans* cells.

論文審査結果の要旨

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、好酸性の絶対化学合成独立栄養細菌で、金属鉱石中の 2 価鉄と還元型無機硫黄化合物の両方を酸化できる特性のためバイオリーチングの最有用菌として現在利用されている。*A. ferrooxidans* の鉄酸化機構に関しては、多数の生化学的及び分子生物学的研究結果からほぼ確立されたと言えるが、硫黄酸化機構に関してはまだ不明な部分が残されており確立されていない。即ち、鉄酸化細菌の硫黄酸化に「鉄酸化酵素系の成分 aa_3 型 cytochrome *c* oxidase (aa_3) が関与している」という説と、「*bd* quinol oxidase あるいは bo_3 quinol oxidase が関与しているが aa_3 は関与していない」という 2 説があり論争が続けられてきた。

申請者のターヘル・タハ氏はこの問題に取り組み、以下に示すように長年の論争点の一つである「硫黄酸化への aa_3 の関与という問題」に解決を与えた。申請者は、鉄酸化細菌の標準株 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 を用い、硫黄培養条件を改良して従来より増殖速度上昇させることに成功した。この培養条件を用い、硫黄生育の対数増殖期に鉄酸化酵素が生合成され鉄生育時とほぼ同程度の活性を示すこと、元素硫黄(S^0)あるいはテトラチオン酸(4-TH)を電子供与体にして 3 価鉄より 2 価鉄を生成する鉄還元酵素も同時に生合成され最大活性を示すこと、を明らかにした。硫黄で増殖した ATCC 23270 株より、鉄酸化酵素系の成分である 2 種類のチトクローム(Cyc1 と Cyc2)、rusticyanin、 aa_3 を精製し、これら 4 成分が存在した時のみ鉄酸化酵素活性が再構成されることを世界に先駆け報告した。また、 S^0 並びに 4-TH で増殖した ATCC 23270 株から鉄還元酵素をそれぞれ単一に精製し、これがすでに知られている 4-TH hydrolase であることを明らかにした。また、4-TH hydrolase の存在下でのみ Cyc1、Cyc2 及び aa_3 が 4-TH によって還元されることをエレガントに示したが、これは *A. ferrooxidans* において硫黄化合物酸化に対する完全な電子伝達系提示の最初の例となった。

本学位論文は aa_3 を含めた鉄酸化酵素系の成分が *A. ferrooxidans* の硫黄酸化に関与していることを明確に示したものでその内容は米国の専門誌に掲載された。更に、鉄細菌が硫黄で生育する際、鉄酸化酵素系が機能しなければならない理由を、硫黄あるいは 4-TH 依存性の鉄還元酵素活性の存在より明らかにした。これらの重要知見はバイオリーチングに直接関わっている鉄酸化細菌の生理学的並びに応用的研究に新しい展開をもたらすものであり博士(学術)に十分値すると判定した。