

鉄酸化細菌：その多様な鉄・硫黄代謝

上村 一雄*・金尾 忠芳

はじめに

鉄バクテリアは、19世紀の微生物学の先駆的研究者である Ehrenberg や Winogradsky らによって記載された最初の原核微生物の中の一つで、 Fe^{2+} を Fe^{3+} へ酸化して得られるエネルギーを用いて増殖する原核生物である。 Fe^{2+} は、pH 5 以上になると酸素によって自動的に酸化されて Fe^{3+} に変換され、褐色の沈澱を生じる (図 1A)。鉄の酸化エネルギーを増殖に使用するためには、 Fe^{2+} が安定に存在する環境、すなわち pH 5 以下の酸性環境、あるいはそれ以上の pH では酸素のきわめて少ない環境でないといけない。褐色の沈澱を生じている小川には、鉄の酸化物で鞘を作って生息する *Gallionella* や *Leptothrix* などの鉄バクテリアが観察される。これらのバクテリアは中性環境で生育しているが、実験室での培養が難しい難培養微生物に属する。一方、酸性の好気環境で生育している鉄酸化細菌は比較的培養が容易で、研究も進んでいる。コロニーは図 1B に示したように酸化鉄のために褐色を呈する。

1945年に酸性環境から鉄酸化細菌が初めて分離され、*Thiobacillus ferrooxidans* と名づけられた¹⁾。1954年にこの細菌とよく似た細菌が分離され、硫黄やチオ硫酸を酸化できないことから、*Ferrobacillus* という属が提案され、細菌は *F. ferrooxidans* と名づけられた²⁾。さらに、

1960年にこの細菌と類似した細菌が分離されたが、この菌は Fe^{2+} 以外にも硫黄やチオ硫酸もエネルギーに用いることができたため、*Ferrobacillus sulfooxidans* と命名された³⁾。しかし、その後の詳細な研究によって、鉄を酸化して独立栄養的に増殖する細菌として分離されたこれらの細菌は、鉄以外にも無機硫黄化合物を酸化できる同種の菌であることが明らかとなり、3種の菌は *Thiobacillus ferrooxidans* に統一された⁴⁾。

その後、*Thiobacillus* 属の細菌の再分類が行われて、好酸性の硫黄酸化細菌は *Acidithiobacillus* と呼ばれることとなった⁵⁾。我々が研究材料に使っている *A. ferrooxidans* は、名称の変遷からも推察できるように、発見当初から研究者を悩ませてきたたかな細菌である。今回は、そのユニークな生存戦略のために、我々も含めて多くの研究者を悩ませてきた *A. ferrooxidans* の素顔の一部を紹介させていただく。

バクテリアリーチング

鉄や硫黄は、黄鉄鉱 (FeS_2)、黄銅鉱 (CuFeS_2)、輝銅鉱 (Cu_2S)、閃亜鉛鉱 (ZnS)、方鉛鉱 (PbS) などの硫化鉱石として地殻に存在している。酸素と水分が存在する酸化環境中では、 Fe^{3+} によって触媒される化学的酸化反応によって、元素硫黄 (S^0) や Fe^{2+} がこれらの鉱石から溶出する。 S^0 や Fe^{2+} は、硫黄酸化細菌や鉄酸

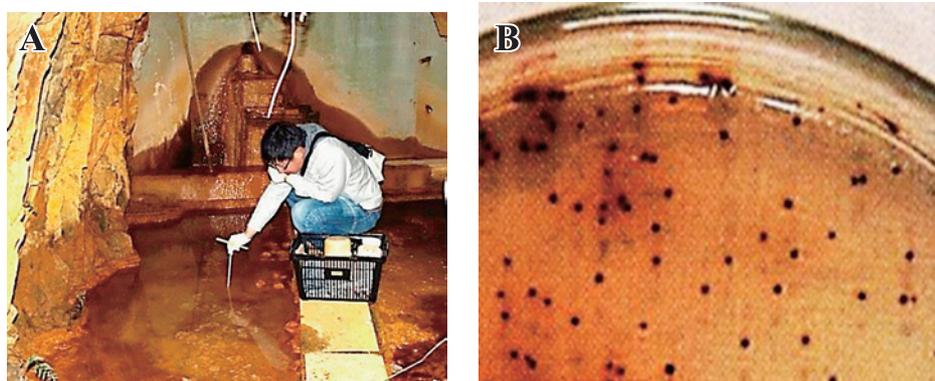


図 1. 鉄を含んだ酸性鉱山廃水が溜まっている岡山県柵原鉱山 (A) とその環境から分離された鉄酸化細菌のコロニー (B)

* 著者紹介 岡山大学大学院環境生命科学研究科農生命科学専攻 (教授) E-mail: kamimura@okayama-u.ac.jp

化細菌によって酸化され、硫酸や Fe^{3+} を生じるため、pH 2~3の酸性環境が形成される。黄銅鉱 (CuFeS_2) を例に金属イオンの溶出機構を簡単に説明しておく。黄銅鉱の銅は Fe^{3+} による強力な化学的酸化作用によって硫酸銅となって溶け出す。鉄酸化細菌は、この反応で生じた Fe^{2+} を Fe^{3+} に再酸化することによって、黄銅鉱から銅を酸化・溶出する触媒となる Fe^{3+} を再生する。これらの反応は、バクテリアリーチングという微生物を用いた鉱石からの銅、金、ウランなどの金属回収技術に応用されている⁶⁾。黄鉄鉱 (FeS_2) のような金属硫化物は、硫黄部分がチオ硫酸として遊離する。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 ($\text{S}_n\text{O}_6^{2-}$) を経て、硫黄酸化細菌によって硫酸にまで酸化される。このリーチング作用は、硫化鉱石が存在する環境では自然に生じており、特に閉山された鉱山などからは重金属を含んだ酸性鉱山廃水が流出し、河川や湖の酸性化・重金属汚染などの環境問題の原因となっている。*A. ferrooxidans* は、酸性鉱山廃水から分離できるもっとも代表的な鉄酸化細菌である。この細菌は、 Fe^{2+} 以外にも無機硫黄化合物や黄鉄鉱 (FeS_2) で生育できることから、バクテリアリーチングはこの細菌だけで可能であると考えられてきた。そのため、微生物による硫化鉱石からの金属溶出の機構を説明するためのモデル微生物として使用され、多くの生理的・生態学的な研究が行われてきた。

鉄の酸化機構

鉄の酸化機構は古くから研究されてきたが、その機構にも混乱が見られる。*A. ferrooxidans* には高ポテンシャルの鉄硫黄タンパク質 (high-potential iron-sulfur protein; HiPIP) が存在する。JCM 7811株から発見されたHiPIPはIroと名づけられ、 Fe^{2+} の Fe^{3+} への酸化を触媒する鉄酸化酵素として報告された⁷⁾。その後、Hipと名づけられた別のHiPIPが標準株ATCC 33020株で見つかり、Hipは硫黄代謝に関与していると提案された⁸⁾。また、*A. ferrooxidans* と同定された細菌はいずれも青色の銅タンパク質 (rusticyanin; Rus) を持っている。これまでに2種類のRusが報告されており⁹⁾、RusAはATCC 23270株やATCC 33020株に存在し、図2Aに示したように、鉄からの電子をシトクロムcに渡す反応を触媒する鉄酸化系の構成成分である。この鉄酸化系はrusオペロンにコードされており、RusAの他に2種類のシトクロムc (Cyc1とCyc2) と aa_3 型のシトクロムcオキシダーゼをコードする遺伝子から構成されている¹⁰⁾。この鉄代謝系では、外膜に存在するCyc2が鉄酸化酵素で、鉄からの電子はRusAを経てCyc1に渡され、シトクロムcオキ

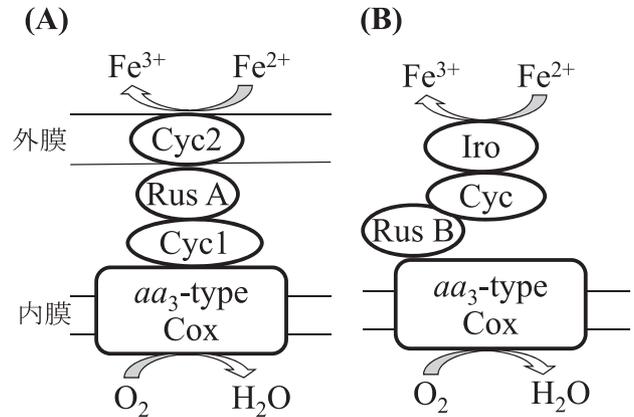


図2. *A. ferrooxidans*の鉄酸化機構。A, ATCC 23270株、ATCC 33020株やNASF-1株で提案されている機構。B, JCM 7811株で提案されている機構。Cyc, シトクロムc; Rus, Rusticyanin; Iro, 高ポテンシャル鉄硫黄タンパク質; aa_3 -type Cox, aa_3 型シトクロムcオキシダーゼ。

シダーゼを介して酸素に渡される。

一方、RusBはJCM 7811株にその存在が報告されており、図2Bの鉄酸化系の構成成分であると提案されている。この鉄酸化系では、上記のIroが鉄酸化酵素であり、鉄からの電子はCycを経て aa_3 型シトクロムcオキシダーゼに渡されると提案されているが、RusBのこの鉄酸化系への関与には不明な点が多い。このように、*A. ferrooxidans* と同定された鉄酸化細菌には2種類の鉄酸化系が報告されている。昔の論文を読み返してみると、使用している株が異なるにもかかわらず、当時の研究者は*A. ferrooxidans*なら同一の鉄酸化系を持っているものと思込んでいた節がある。性質の異なる鉄酸化酵素やRusは、鉄酸化系の多様性によるものであり、それが鉄酸化機構の解明を遅らせることとなった。今では、ATCC 23270株とATCC 33020株は、図2Aの鉄酸化系を持っているが、JCM 7811株は図2Bの鉄酸化系を持っているものと考えられている。

硫黄の酸化経路

A. ferrooxidans は鉄と硫黄を酸化できる。鉄酸化経路の研究と異なり、硫黄代謝経路の研究は混迷を極め、いまだにその全容は明らかにされていない。その理由としてまずあげられるのは、鉄酸化経路の研究と同様、研究者が用いた株が異なることによる硫黄代謝経路の多様性である。さらに、強い酸化剤である Fe^{3+} と酸に不安定な還元型無機硫黄化合物が引き起こすさまざまな化学反応が試験管内で生じるため、生体内での本来の硫黄代謝酵素活性の把握が難しい場合があることも、原因の一つとしてあげられる。*A. ferrooxidans*の硫黄代謝の多くの

反応はペリプラズムで行われるが、ペリプラズムのpHは3付近である。*A. ferrooxidans*からはテトラチオン酸加水分解酵素 ($S_4O_6^{2-} + H_2O \rightarrow S^0 + SO_4^{2-} + S_2O_3^{2-}$)、チオ硫酸デヒドロゲナーゼや硫化水素：キノン還元酵素 (Sqr) が精製されているが、これらの酵素は4付近に酵素反応の最適pHを持っている¹¹⁾。しかし、このpH環境では、亜硫酸 (SO_3^{2-})、チオ硫酸 ($S_2O_3^{2-}$) や硫化水素 (H_2S) は非常に不安定である。また、亜硫酸と硫化水素は速やかに反応してチオ硫酸を生じる。チオ硫酸は鉄を還元する。

元素硫黄 (S^0) の代謝酵素として、硫黄酸化酵素 (sulfur dioxygenase; $S^0 + O_2 + H_2O \rightarrow SO_3^{2-} + 2H^+$) が最初に報告された。その後、 S^0 が元素硫黄：Fe³⁺酸化還元酵素 (SFORase) によって SO_3^{2-} に酸化されるという説がAP19-3株の解析によって報告された¹²⁾。この酵素は、硫化水素を本来の基質に用いることがわかり、硫化水素：Fe³⁺酸化還元酵素 ($H_2S + 6Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow SO_3^{2-} + 6Fe^{2+} + 8H^+$) に名称が変更された。反応で生じたFe²⁺は鉄酸化系によってFe³⁺に酸化されるため、H₂Sの酸化が進行すると提案された(図3A)。

ゲノム解析の進展に伴って、多くの微生物が1種類以上の末端酸化酵素を持っていることはよく知られるようになったが、ゲノム情報がない時代には、存在する末端酸化酵素の種類を明らかにする手段は、酵素の精製によるしかなかった。*A. ferrooxidans*には、末端酸化酵素としてaa₃型のシトクロムcオキシダーゼしか検出されていなかったため、硫黄の酸化に鉄酸化系を使用する代謝

経路(図3A)が評価された。SFORase活性は、AP19-3株以外にもATCC 23270株、ATCC 33020株、ATCC 19859株などの*A. ferrooxidans*株で検出された。さらに、鉄をエネルギー源に利用して生育するが、硫黄化合物では生育しない*Leptospirillum ferrooxidans*のいくつかの株にもこの活性があることが報告され¹³⁾、SFORaseと鉄酸化系を使用する硫黄酸化系が、多くの鉄酸化細菌に存在するものとはしばらくの間考えられていた。その後、NASF-1株の解析で、別の末端酸化酵素であるbd型のユビキノールオキシダーゼが、鉄で増殖した細胞から精製された¹⁴⁾。種々の鉄培養細胞のユビキノール酸化酵素活性を測定したところ、標準株であるATCC 23270株とAP19-3株の活性は非常に低かった。後の研究で、ATCC 23270株のユビキノール酸化酵素の合成は、硫黄化合物で培養することによって誘導されることが明らかにされた。NASF-1株では鉄培養時にもこの酵素遺伝子が発現しており、ATCC 23270株とは発現制御系が異なることが予想される。しかし、制御系が異なったおかげで、ユビキノールオキシダーゼの存在が明らかとなった。今では、ゲノム解析によって*A. ferrooxidans*には、一種類のシトクロムcオキシダーゼと二種類のユビキノールオキシダーゼが存在することが明らかになっている。

ユビキノール酸化酵素の発見は、その役割についての研究に拍車をかけた。我々がその生理的役割について調べていた時に、海外のグループが久しぶりに*A. ferrooxidans*の硫黄代謝系の論文を報告した¹⁵⁾。彼らは、硫黄の酸化が硫黄酸化酵素 (sulfur dioxygenase) によって触媒されることを再び提案した。分析に用いられた*A. ferrooxidans*は広く解析に使用されていないR1株であったので、これまでの結果と直接比較ができないが、R1株には硫黄代謝酵素として提案されていたSFORase活性が検出されないことが強調された。さらに、SFORaseが存在するとされた*L. ferrooxidans*にもその活性がないため、この活性が*L. ferrooxidans*に検出されたのは、研究室の鉄酸化細菌の培養がいかげんで、硫黄酸化細菌の混入が原因ではないかとの考察付であった。この論文は、一緒に研究している我々にとってはショッキングなものだった。反論は研究するしかないので、筆者らはキノンが関与する硫黄代謝経路を探索し、硫化水素：キノン酸化還元酵素 (Sqr) がNASF-1株に存在することを見だし、ユビキノール酸化酵素が硫化水素の代謝に関与することを報告した(図3B)¹⁶⁾。しかし、*A. ferrooxidans*の硫化水素の代謝に、SFORaseと鉄酸化系を用いる経路とは別に、Sqrとユビキノール酸化酵素を用い

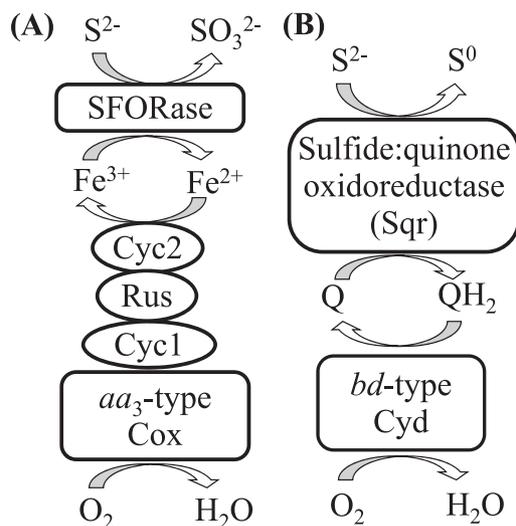


図3. *A. ferrooxidans*で提案されている硫化水素の酸化経路。A、鉄酸化酵素系を使用する経路。B、ユビキノールオキシダーゼを使用する経路。SFORase, sulfide: ferric ion oxidoreductase; bd-type Cyd, bd型ユビキノールオキシダーゼ。

る経路が存在するという発見は、海外の研究者にすぐには受け入れてもらえなかった。我々の論文の質の問題もあったが、研究室の培養がいろいろ加減だとした上記の論文が、この発見の容認に少しは影響したかもしれない。しかし、この論文の発表を境に、*A. ferrooxidans*の硫黄代謝系の研究がさらに活発化し、チオ硫酸の酸化にもキノン系が関与することが提案され、*bd*型のユビキノール酸化酵素以外にも*ba₃ bo₃*型の末端酸化酵素の存在が示唆された¹⁰⁾。この頃には、*A. ferrooxidans* ATCC 23270株の全ゲノム情報が取得可能になり、鉄や硫黄の代謝系の解析が加速的に進展した。その中でもっとも重要な報告は、鉄酸化系をコードしている*rus*オペロンの発現解析の結果である¹⁷⁾。*A. ferrooxidans* ATCC 23270株は、鉄と硫黄が同時に存在するときには鉄を優先的に酸化して増殖する。この時には*rus*オペロンが発現しているが、鉄が枯渇し、硫黄をエネルギーに用いて増殖するようになると*rus*オペロンの発現が抑制される。この報告は、硫黄代謝にSFORaseを用いるという説に疑問を投げかけるものとなった。SFORaseによる硫黄化合物の酸化はFe³⁺の還元を伴い、生じたFe²⁺は鉄酸化系で酸化されると提案されてきた。SFORaseはAP19-3株から精製されているが、その遺伝子はまだ決定されていない。最近、ATCC 23270株を用いてFe³⁺還元条件下で硫黄化合物の酸化に伴って発現する遺伝子を解析した結果が報告されたが、SFORaseに相当すると推測される遺伝子は見つからなかった¹⁸⁾。プロテオーム解析によってATCC 23270株の硫黄代謝に関与すると考えられる遺伝子が推定され、代謝経路が描かれているが¹⁰⁾、残念ながらまだ推定の域を出ない。

*A. ferrooxidans*の系統解析

以上述べてきたように、古くから研究材料として使用され、多くの研究者が鉄や硫黄の酸化機構の解明に取り組んできたにもかかわらず、*A. ferrooxidans*の鉄酸化や硫黄酸化の機構は、まだ十分に確立されてない。この原因は、最初に述べたような*A. ferrooxidans*の同定のあいまいさに原因があるように思える。*A. ferrooxidans*は、鉄だけでなく硫黄も酸化できるという性質と16S rRNA遺伝子の塩基配列によって同定されてきた。したがって、きわめて似ているが微妙に違う細菌が*A. ferrooxidans*として同定されていたと考えられる。最近、*A. ferrooxidans*株の詳細な系統解析が報告された¹⁹⁾。この系統解析には、16S rRNA遺伝子のほかに*iro/hip*、*rus*遺伝子の塩基配列も用いられた。その結果、図4に示したように、これまで*A. ferrooxidans*と同定されていた株は4つのグループ

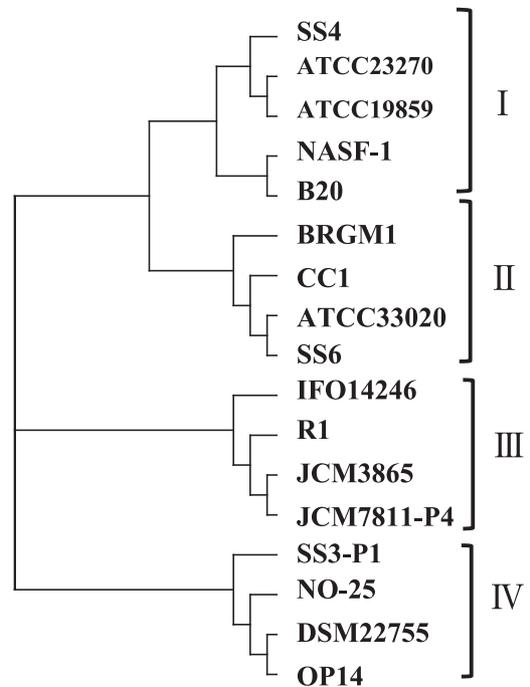


図4. *A. ferrooxidans*株の16S rRNA 遺伝子による系統解析

に分けられること、さらに16S rRNA 遺伝子の塩基配列が*A. ferrooxidans*ときわめて類似しているが性質が若干異なるため、新種として*A. ferrivorans*と命名された株(グループIV)が含まれていることが明らかとなった。この菌の鉄酸化系はまだ明らかになっていないが、RusBを含んでいることが報告されている。我々が解析に用いたNASF-1株はATCC 23270株と同じグループIに属しているが、このグループIと同じ鉄酸化系(図2A)を持っているATCC 33020株は、グループIIに分類された。また、図2Bの*Iro*が関与する鉄酸化系を持っているJCM 7811は、グループIIIに分類された。前述のR1株もこのグループIIIに属している。このように、これまで*A. ferrooxidans*と分類されてきた株がグループ分けされ、そのグループ分けは鉄酸化経路の違いにも反映されそうである。グループIVが*A. ferrivorans*と分類されたので、ATCC株(グループIとII)を*A. ferrooxidans*とするならば、図2Bの鉄代謝系を持つグループIIIには別の種名をつけるべきかもしれない。

おわりに

バクテリアリーチングでは、鉄の酸化と硫黄の酸化が必要である。リーチングの効率を高めるために、より高いリーチング能を持つ鉄酸化細菌が分離され、その鉄酸化機構や硫黄酸化機構が解析されてきた。昔は16S rRNA 遺伝子を決めるのは簡単ではなかった。また、特

許などの関係で菌株を登録することも一般的ではなかった。そのため、過去に報告された*A. ferrooxidans*の鉄酸化や硫黄酸化の機構がどのグループのものなのかを、もはや明らかにできない例もある。これまでの研究を見直してみると、鉄と硫黄を代謝する性質を持ち、16S rRNAの塩基配列が非常に似ているがために、代謝機構も同一であるとの前提で、多くの研究者が鉄の酸化や硫黄の酸化機構を議論してきたように思える。現在は多くの研究者が標準株であるATCC 23270株やATCC 33020株を用いているため、得られた成果の積み重ねによって、鉄や硫黄の酸化機構が統一的に理解できるようになってきた。特に硫黄酸化経路の解明に関しては、ここ10年間の研究で大きな進展が見られた。リーチング能の高い鉄酸化細菌の鉄や硫黄の酸化機構の解明は産業的に重要な課題であるが、研究者の間で混乱を招かないように、今後は、研究材料の株がこれまでの株とどのような系統関係にあるのかを把握しながら研究を行う必要があることを痛感する。

*A. ferrooxidans*は、大腸菌と同じ γ -プロテオバクテリアに属し、好気条件下では鉄と硫黄を酸化し、嫌気条件下では水素や硫黄を用いて鉄呼吸をする。もともとは鉄呼吸をしながら生息していたものが、酸素が利用できるようになってから、多様な酸性環境に適応するために微妙に異なる鉄・硫黄酸化機構を進化させたのではないかと考えられる。ある意味で非常に進化した細菌であるが、いい加減な生き方をする細菌と言えなくもない。こ

れからは、その生存戦略に振り回されないようにしたいものだ。

文 献

- 1) Colmer, A. R. *et al.*: *Science*, **106**, 253 (1947).
- 2) Leathen, W. W. *et al.*: *Bacteriol. Proc.*, p. 44 (1954).
- 3) Kinsel, N. A.: *J. Bacteriol.*, **80**, 628 (1960).
- 4) Unz, R. F. *et al.*: *Soil Sci.*, **92**, 302 (1961).
- 5) Kelly, D. P. *et al.*: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 511 (2000).
- 6) Rawlings, D. E. *et al.*: *Microbiology*, **153**, 315 (2007).
- 7) Fukumori, Y. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**, 169 (1988).
- 8) Bruscella, P. *et al.*: *Microbiology*, **151**, 1421 (2005).
- 9) Sasaki, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1039 (2003).
- 10) Quatrini, R. *et al.*: *BMC Genomics*, **10**, 394 (2009).
- 11) Kikumoto, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 113 (2013).
- 12) Sugio, T. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **169**, 4916 (1987).
- 13) Sugio, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 431 (1992).
- 14) Kamimura, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 63 (2001).
- 15) Rohwerder, T. *et al.*: *Microbiology*, **149**, 1699 (2003).
- 16) Wakai, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2519 (2004).
- 17) Yarzabal, A. *et al.*: *Microbiology*, **150**, 2113 (2004).
- 18) Osrio, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 2172 (2013).
- 19) Amouric, A. *et al.*: *Microbiology*, **157**, 111 (2011).