

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成14年度博士課程進学  
氏名 吉田直樹  
指導教員名 五十嵐泰夫

### 論文題目

好熱性好酸性アーキア *Acidianus manzaensis* の嫌気鉄呼吸に関する研究

#### 1、序

嫌気鉄呼吸は  $\text{Fe}^{3+}$  を電子受容体として用いる微生物の嫌気呼吸の1形態である。嫌気鉄呼吸能を有する微生物は進化系統的に広範囲に存在すること、また系統樹深くに位置する好熱性微生物 *Thermotoga maritima* および *Pyrobaculum islandicum* が本呼吸能を有することから、硫黄呼吸と並んで進化初期に獲得された呼吸代謝であることが提唱されている。また微生物による鉄還元は、菱鉄鉱や磁鉄鉱などの形成や不溶性金属の流出など環境中の土壌形成に大きく寄与していることが示唆されている。このように微生物の嫌気鉄呼吸は生物学的および地質学的に重要な代謝として注目されている。

これまで鉄還元細菌 *Geobacter sulfurreducens*、*Desulfulomonas acetoxidans* および *Hydrogenobacter thermophilus* において鉄還元活性を有する *c* 型チトクロムが精製されていることから、鉄還元酵素としての一般性が示唆されていた。しかしながら *Pelobacter carbinolicus* などにおいて *c* 型チトクロムの鉄呼吸への関与が認められなかったことから、鉄呼吸における鉄還元酵素は微生物によって異なることが考えられている。さらに鉄還元アーキアにおいては *P. islandicum* および *Ferroglobus fulgidus* において生育が確認されるものの鉄還元酵素は未だ単離されていない。また、硫酸還元アーキア *Archaeoglobus fulgidus* においてヘム鉄を有さない鉄還元酵素の存在が報告されているが、嫌気鉄呼吸による生育は確認されていない。

本研究では嫌気鉄呼吸に対する新たな知見を得ることを目的として、今まで報告例がない高温・酸性条件下から鉄還元微生物を単離し、その嫌気鉄呼吸における鉄還元酵素の解析をおこなった。

## 2. 高温・酸性条件下における鉄還元微生物の単離

群馬県万座温泉付近の H<sub>2</sub>S 噴出口における土壌をサンプルとして、高温・酸性条件下において H<sub>2</sub> を電子供与体、Fe<sup>3+</sup> を電子受容体として独立栄養的に嫌気生育する微生物をスクリーニングした。得られた微生物は 16S rDNA 配列解析(図 1)などの分類学的解析から新種であることが示唆され、*Acidianus manzaensis* NA-1 株(NBRC 100595<sup>T</sup>)と命名した。

本菌は pH1.2、80°C において H<sub>2</sub> を電子供与体、Fe<sup>3+</sup> を電子受容体として独立栄養的に嫌気生育し、鉄還元微生物として好熱性・好酸性を示す初めての例である。Fe<sup>3+</sup> の他に O<sub>2</sub> を電子受容体として好気生育もおこなう通性嫌気性を示す。また、グルコースや Yeast Extract を電子供与体とした従属栄養性を有している。

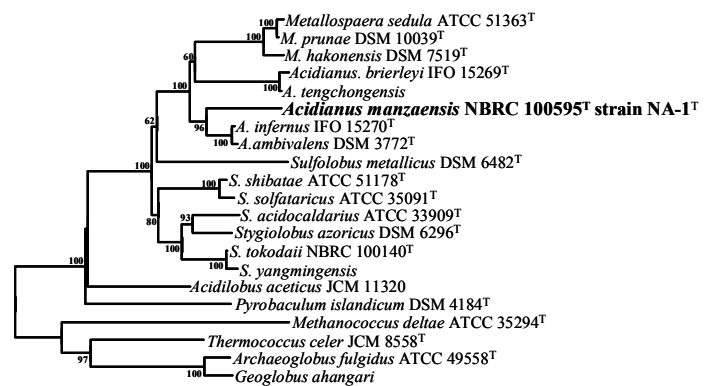


図 1、16S rDNA 解析に基づく系統樹。図中の数字は1000回抽出によるブートストラップ値を示す。

## 3. 鉄還元酵素の精製

嫌気鉄呼吸鎖における鍵酵素として呼吸鎖末端に位置する鉄還元酵素に着目した。pH1.5、70°C における Fe<sup>3+</sup>還元活性を指標に鉄還元酵素を精製した結果、分子量 64,200Da を示すモノマーとして精製された。本鉄還元酵素(Ferric-Iron Reductase; Fir)は還元型において 436、534、574 nm に吸収帯を有するスペクトルを示し、また酸化型において 418nm に吸収帯を有するスペクトルを示した。またヘム染色、EPR 解析から高スピン-Fe<sup>3+</sup>ヘム鉄を有するチトクロムであることが示唆された。さらに Fir の活性中心であるヘムのピリジンフェロヘモクロム体における吸収帯が既存のヘムに一致しなかったことから、Fir に含まれるヘムは新規構造を有していることが示唆された。サイクリックボルタンメトリー法により決定された酸化還元電位は  $E=+0.61V$  (vs NHE) であり、Fe<sup>3+</sup>( $E=+0.77V$ , vs NHE)を還元しうる酸化還元電位を有していた。さらに Fir は 50kDa のタンパクに 14kDa 相当の糖が付加した糖タンパクであり、イオンクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー解析からその成分として Rhm:Gls:Gal:Man:Glc:GlcNAc:GalNAc=1.5:1:3:1:8:6.5:3.5 が検出された。

以上から Fir は鉄呼吸鎖末端酵素として機能していることが示唆された。さらに新規ヘムを有することから、鉄呼吸に適応した電子伝達系を有している可能性が示された。

## 4. ヘム構造解析

精製 Fir から氷冷酸アセトン法によりヘムを抽出した。順相、C18 および C8 逆相カラムクロマトグラフィーによりヘムを精製した。LC-MS/MS により分子量および側鎖

構造を推定した結果、分子量 1008.5m/z を示す  $C_{59}H_4N_4O_7Fe$  であることが示された。本分子量に合致するヘムは報告されておらず、新規ヘムであることが裏付けられた。MS/MS 解析によりポルフィリン各側鎖がフラグメントとして検出され、図 2 に示す構造式が推定された。ポルフィリン 2 位炭素側鎖中の hydroxyethylgeranylgeranyl 基はアーキアにおける好気呼吸鎖末端酵素に含まれるヘム  $A_s$  および  $O_{p2}$  に同様に見られるものの、4 位 8 位炭素側鎖構造に大きく差異が認められた。現在  $^1H-NMR$  を用いてさらなる構造解析をおこなっている。

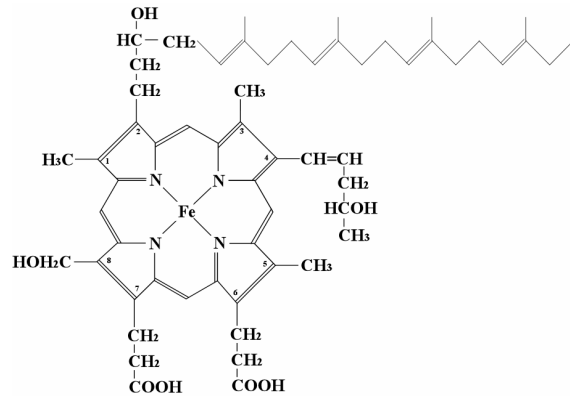


図 2、MS/MS解析から推測されるFIRに含まれるヘムの構造式

## 5、鉄還元酵素遺伝子の解析

鉄還元酵素遺伝子(Ferric Iron Reductase gene; *fir*)をクローニングするため、FIR の N 末端アミノ酸配列を解析した。脱ヘムおよび還元的カルボキシメチル化処理をした FIR の N 末端アミノ酸配列が解析できなかったことから、N 末端がブロッキングされている可能性が示唆された。そのため、FIR を V8 プロテアーゼおよびリシルエンドペプチダーゼにより断片化することにより得られた 3 つのペプチド(16kDa、18kDa、24kDa) の N 末端アミノ酸配列を決定した。16kDa の分子量を示すペプチドのアミノ酸配列からプライマーを設計し、制限酵素 *Bam*HI 処理をおこなったゲノム DNA を鋳型として PCR をおこなった結果、0.8kb の PCR 断片が取得された。この遺伝子配列中には 18kDa のペプチドの N 末端アミノ酸配列に一致する遺伝子配列が含まれていたため、本 PCR 断片の遺伝子配列からプライマーを設計し、同方法により *fir* を含む 4.0kb の遺伝子配列を決定した。得られた 1472b の遺伝子から推定されるアミノ酸配列は約 50kDa と計算された。FIR が 50kDa のタンパク質部分と 14kDa の糖から構成されていることが糖解析から示唆されており、この結果と一致した。アミノ酸配列中にはヘムのリガンドとして機能しうるヒスチジンが 3 残基存在していた。また、N および C 末端が高度の疎水的領域となっていた。*fir* は *Sulfolobus acidocaldarius* において低濃度酸素条件下で発現するチトクロム *b*<sub>558/566A</sub> サブユニット遺伝子(*CbsA*)と 66%の相同性を有していた。また、*fir* の下流には少なくとも 3 つの ORF(*orf-1,2,3*)が存在し、それぞれ *S. acidocaldarius* 由来チトクロム *b*<sub>558/566B</sub> サブユニット(*CbsB*)、*b* 型チトクロムおよび Rieske 鉄-硫黄中心を有するタンパクと相同性を有していた。後者 2 つは *S. acidocaldarius* において酸素呼吸鎖構成酵素として報告例があり、本遺伝子も同様の酵素を発現していることが考えられる。*fir* および *orf-1* の各上流にはリボソームバインディングサイトおよび BoxA 様プロモーター配列が存在していた。しかしながら、*CbsA*

および *CbsB* は共転写されること、*orf-1* と *CbsB* の相同性は 39%と低いこと、粗精製したチトクロム *b558/566* には鉄還元活性が見られないこと、および *S. acidocaldarius* は嫌気鉄呼吸生育をしないことから、Fir は嫌気鉄呼吸に特徴的な酵素であることが示唆された。

## 6、鉄還元メカニズム

*A. manzaensis* における鉄還元メカニズムを解明するために、Fir の局在性と配向性を解析した。嫌気鉄呼吸により生育した菌体をトリプシン及び V8 プロテアーゼにより処理した結果、Fir の内部アミノ酸配列に合致する 2 つの消化断片を得た。各ペプチダーゼ処理後の上清画分には精製 FIR と同様な吸収スペクトルが確認された。また、消化後の菌体の鉄還元活性は処理前と比較して約 1/3 であった。さらに精製した FIR は pH1.5 において 30-80°C で安定に存在するが、pH7.0 において 70°C では容易に失活する。以上から、本菌において Fir が菌体膜表面に鉄還元活性中心(ヘム)を位置する形で鉄還元をおこなっていることが示唆された。

## 7、総括

本研究により、高温・酸性条件下において嫌気鉄呼吸をおこなう新規アーキア *A. manzaensis* NA-1 株を単離した。また本菌の膜画分から鉄還元を有する 64.2kDa のチトクロムを精製した。Fir は高温・酸性下において安定に存在すること、高い酸化還元電位を有すること、およびヘム配位部位が膜上に存在することから、鉄呼吸鎖末端酵素として機能し、細胞外で  $Fe^{3+}$  を還元していることが考えられた。

また Fir が不飽和炭素鎖を側鎖に持つ新規ヘムを有することが示唆された。同様の不飽和炭素鎖を有するヘムとして好気性アーキアにおける好気呼吸鎖末端酵素がヘム  $A_S$  を有することが報告されている。しかしながら Fir に含まれる新規ヘムはヘム  $A_S$  と比較してポルフィリン側鎖が異なり、嫌気鉄呼吸鎖末端酵素の補因子として機能していることから、Fir が嫌気鉄呼吸に適応したチトクロムであることが示唆された。さらにプロトヘムを有する *S. acidocaldarius* 由来 *CbsA* と Fir がアミノ酸配列の相同性を示すものの鉄還元活性は Fir にしか見られないことから、Fir のヘム構造が鉄還元に必要な役割を担っていることが考えられた。

高温・酸性下において新規ヘムを有する Fir が鉄還元酵素として機能していることをはじめとして、環境条件が異なる鉄還元微生物から異なった鉄還元酵素が報告されていることから、鉄還元微生物はその環境に応じて異なった鉄還元メカニズムを有していることが示唆された。 $Fe^{3+}$  は pH-pI 曲線から示されるように、環境中において様々な形態をしている。他の呼吸基質には見られないこの物理化学的特徴が鉄呼吸の多様性を高めていることが考えられる。