

氏名(本籍)	中 ^{なか} 村 ^{むら} 和 ^{かず} 夫 ^お (山梨県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1,200号
学位授与年月日	平成8年5月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> JCM 7814の新規培養法の確立および亜硫酸酸化経路の解明とバイオセンサーへの応用
主査	筑波大学教授 工学博士 田中秀夫
副査	筑波大学教授 農学博士 祥雲弘文
副査	筑波大学教授 工学博士 松村正利
副査	筑波大学教授 農学博士 前川孝昭

論文の内容の要旨

自然界における無機硫黄化合物の代謝において化学独立栄養細菌 *Thiobacillus thiooxidans* が重要な役割を演じている。中でも無機硫黄化合物の代謝の鍵となる亜硫酸酸化反応は、*T. thiooxidans* のエネルギー生成に関与する最も重要でかつ基本的な反応である。また、本菌は強酸性下に生育できることから本菌の特殊な微生物機能を研究することは興味深く重要である。しかし、本菌の培養は困難で十分な細胞収量が得られていないため、亜硫酸酸化(代謝)経路の酵素レベルの研究は殆どなく、更に微生物機能の応用はバクテリアリーチング以外に行われていない。

本研究は *T. thiooxidans* JCM 7814 を供試菌株として、本菌を高密度に大量培養する方法の開発ならびに本菌の亜硫酸酸化経路の解明とその経路のキーエンザイムの精製およびその性質を明らかにしたものである。更にこれらの成果をもとに本菌の亜硫酸酸化機能を応用して、実用的な亜硫酸測定用微生物センサーを開発したものである。

新規培養法の確立：本菌のエネルギー基質にチオ硫酸ナトリウムを用い pH を 5 に制御して培養することにより、従来の硫黄での培養に比べて増殖速度が大幅に上昇することを見いだした。更に基質阻害が起らない濃度にチオ硫酸濃度を制御しかつ培養液中の生育阻害物質(硫酸塩)を連続的に除去する目的で、ホローファイバーモジュールを用いた濾過培養法を開発した。培養の結果、96時間で7,730mg/L という極めて高密度の菌体を得ることに成功した。

亜硫酸酸化経路の解明：微生物菌体を大量に得ることができたことから、本菌の亜硫酸酸化経路の解明を行った。本菌の亜硫酸酸化活性は細胞膜画分に局在しており、AMP によって活性化されなかった。また、亜硫酸と AMP からアデノシンホスホ硫酸が生成しないことを確認した。これらの結果から、本菌の亜硫酸酸化経路は亜硫酸脱水素酵素により亜硫酸から直接硫酸に酸化される AMP-independent 経路であることを証明した。更に亜硫酸が硫酸に酸化される際に発生する電子によってシトクロムが還元されることを明らかにした。

亜硫酸脱水素酵素の性質：本菌の亜硫酸酸化経路のキーエンザイムである膜結合型亜硫酸脱水素酵素の性質を明らかにする目的で酵素の精製を行った。膜画分から界面活性剤のヘプチルチオグルコシドによって酵素が効率よく可溶化されることを見いだした。可溶化酵素を Triton X-100 を含む緩衝液で平衡化したカラムで精製したところ、電気泳動的に均一な標品を得ることに成功した。本酵素は3つのサブユニットをもつ分子量400 kDa の

蛋白質であり、酵素の至適 pH は7.5、至適温度は20℃であった。また、本酵素は亜硫酸のみを基質とし、フェリシアニドとシトクロム c を電子受容体とすることがわかった。これらの結果から、本菌の亜硫酸酸化は亜硫酸脱水素酵素により亜硫酸が硫酸に酸化され、発生した電子がシトクロムを経由して最終的に酵素に伝達されて酸素吸収が起こる、機構であることを明らかにした。

亜硫酸測定用微生物センサーの開発：本菌の亜硫酸酸化機能を応用して、亜硫酸測定用微生物センサーを開発した。亜硫酸は食品産業において酸化防止などに広く使用されており、その濃度は常に適正に管理されなければならない。そのため、迅速かつ正確な亜硫酸の定量法が望まれている。本菌の菌体は亜硫酸酸化システム全体を含み長期間活性が安定であったため、バイオセンサーの分子認識素子として十分に満足するものであった。本菌を固定化した微生物膜、酸素電極およびガス透過性膜を組み合わせることで亜硫酸測定用微生物センサーを作製した。測定の結果、試料中の亜硫酸濃度と酸素電極の電流減少値の間に比例関係が認められ、遊離型亜硫酸を選択的に迅速かつ正確に定量することができた。更に試料中の結合型亜硫酸を酸性条件下で加熱分解する方法を開発し、本センサーが食品中の全亜硫酸量を分析できることを明らかにした。一方、本菌の亜硫酸酸化による硫酸の生成と同時に水素イオンの発生が認められたことから、pH 感受性ガラス電極 (pH 電極) をトランスデューサーとする亜硫酸測定用微生物センサーの開発を行った。その結果、本センサーは酸素濃度および測定温度に影響されずに、試料中の遊離型亜硫酸を定量できることを見いだした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は自然界の硫黄の循環に重要な役割を演じている *Thiobacillus thiooxidans* の高密度菌体の培養法を開発し、得られた菌体の亜硫酸酸化経路を解明するとともに、その利用として、亜硫酸測定用微生物センサーの開発とその実用化を目的として研究を行い、まとめたものである。

本論文は、エネルギー基質として硫黄にかえてチオ硫酸ナトリウムを用い、さらに培養液中に蓄積する硫酸塩を除去する濾過培養法を開発することにより、高密度菌体を得ることに成功し、その結果、得られた大量の菌体を用いることにより、これまで不明であった本菌の亜硫酸酸化経路の機構を初めて明らかにすることに成功している。また、本菌の性質を利用して遊離型亜硫酸の迅速で正確な定量用微生物センサーシステムを開発し、食品中の亜硫酸量測定の実用化にも成功している。

以上得られた研究成果は、いずれも初めての試みで得られたもので、本研究の独創性を示すものであり、また、本研究は、独立栄養微生物の培養工学的および生化学的研究の新しい道を開くものであり、さらに得られたセンサーの食品産業への応用性などから、高く評価できる研究である。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。