Note

# Inhibition of Sulfur Oxidizing Activity by Nickel Ion in *Thiobacillus thiooxidans* NB1–3 Isolated from the Corroded Concrete

Yasuo Nogami, Terunobu Maeda,\* Atsunori Negishi,\* and Tsuyoshi Sugio<sup>†</sup>

Department of Biological Function and Genetic Resources Science, Faculty of Agriculture, Okayama University, 1–1–1 Tsushima Naka, Okayama 700, Japan

\*Hazama Corporation, Technical Research Institute, 515-1 Nishimukai Karima Tsukuba, Japan Received December 16, 1996

It is of great importance to find ways to protect concrete from corrosion, to maintain the concrete structure for a long time. A sulfur-oxidizing bacterium, Thiobacillus thiooxidans, has been known to play a crucial role in concrete corrosion and the concrete supplemented with nickel was resistant to corrosion. To obtain biological bases of this Ni protection, the effects of Ni on sulfur dioxygenase and sulfite oxidase of T. thiooxidans NB1-3 isolated from corroded concrete were studied. Nickel sulfate strongly inhibited a sulfur dioxygenase that catalyzes the oxidation of elemental sulfur to shlfite and a sulfite oxidase that catalyzes oxidation of sulfite to sulfate. Nickel sulfate, antimycin A, 2n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide, and myxothiazol inhibited both sulfite oxidase and ubiquinol oxidase. Reduced mammalian cytochrome c was not oxidized by a cell extract of strain NB1-3. The b and a-type cytochromes in the plasma membrane was reduced by sulfite and ubiquinol-2 and these reductions were inhibited by NiSO4. The amounts of Ni in the plasma membrane with or without 0.1 mm nickel treatment were 32.6 and 2.8 nmol/mg protein, respectively. These results indicate that nickel binds to the plasma membrane and inhibits sulfur dioxygenase and sulfite oxidase, and as a result, inhibits cell growth.

Key words: sulfur-oxidizing bacterium;

Thiobacillus thiooxidans; concrete; corrosion; nickel

Concrete is considered to be one of the most durable construction materials. However, serious corrosion was noted in some concrete structures constructed for sewage treatment. In the process of concrete corrosion, hydrogen sulfide produced in the sewage pipe by the action of sulfate-reducing bacteria is oxidized by sulfur-oxidizing bacteria to give sulfuric acid. <sup>1-8</sup> The concrete structure just after construction contains calcium hydroxide and thus has a pH of 12–13. Carbon dioxide in the atmosphere has a role in neutralizing concrete structure and prompts concrete corrosion. The sulfuric acid produced by sulfur-oxidizing bacteria accelerates the neutralization of concrete, binds with calcium in the concrete, and give calcium sulfate, and as a result, decomposes the concrete.

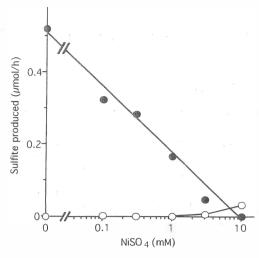
Sulfur-oxidizing bacteria, *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus neapolitanus*, *T. intermedius* and *T. novellus*, were isolated from the corroded concrete and sewer systems.  $^{1,2,5,9}$  To protect concrete from the corrosion, endurance tests have been done on the concrete supplemented with or without additives.  $^{10,111}$  Recently, we have prepared portland cement bars  $(4 \times 4 \times 16 \text{ cm})$  containing various kinds of inorganic and organic compounds and these bars were hung from the lid of the a sludge tank manhole and exposed to 5-10 ppm hydrogen sulfide atmosphere.  $^{12}$  After 2 years of exposure, it was found that the surface of the portland cement containing nickel was especially smooth, while that without

nickel was brittle and rough.<sup>12)</sup> We isolated *T. thiooxidans* NB1–3 from the corroded concrete to study the biological bases of this protection of portland cement corrosion by nickel, and showed that cell growth on elemental sulfur medium is completely inhibited by 0.1% metal nickel or 5 mm NiSO<sub>4</sub> and the nickel completely inhibits elemental sulfur oxidation of this bacterium at 10 mm.<sup>13)</sup> However, the precise inhibition site(s) of nickel in the sulfur oxidizing system of this bacterium remains unsolved. In *T. thiooxidans*, elemental sulfur is oxidized to sulfite by sulfur dioxygenase and sulfite thus formed is oxidized to sulfate by sulfite oxidase.<sup>14–17)</sup> Thus, we studied the effects of nickel on sulfur dioxygenase and sulfite oxidase activities. In this report, by using *T. thiooxidans* isolated from corroded concrete we first show that nickel binds to the plasma membrane and strongly inhibits sulfur dioxygenase and sulfite oxidase.

T. thiooxidans NB1-3 isolated from corroded concrete in Fukuyama City, Japan, was used throughout this study. 13) The bacterium was grown on a sulfur-salt medium under aerobic conditions at 30°C for 170 h. 13) The oxidative activity on sulfite was measured by the oxygen uptake caused by the oxidation of sulfite in a Warburg manometer. 13) Ubiquinone-2 (Q2) was kindly supplied by Eizai (Tokyo) and the reduced form (Q2H2) was prepared as described by Rieske. 18) Ubiquinol oxidase activity was measured spectrophotometrically at 25°C by following the increase in absorbance at 2/5 nm as described by Matsushita. 19, Oxidace activity for N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) was measured spectrophotometrically at 25°C by following the increase in absorbance at 608 nm. Nickel bound to the plasma membrane was measured as follows. The plasma membrane of strain NB1-3 cells (3 mg protein) was incubated in 5 ml of 0.1 m 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid buffer (MOPS buffer), pH 7.0 supplemented with 0.1 mm NiSO<sub>4</sub> for 1 h at 30°C. The membrane treated with NiSO4 was washed three times with MOPS buffer (pH 7.0), and ashed in a crucible at about 800°C for 2 h. The ashes were dissolved in 1 N HCl. The amount of nickel was measured by atomic absorption spectroscopy with a Shimadzu AA-625-01 spectrophotometer using an air-acetylene flame. The spectral line chosen was 2320 Å. The standard solution of nickel ion was prepared by dilution of the 1000 µg/ml standard nickel solution for atomic absorption spectroscopy (Ishizu Pharmaceutical Co., Ltd.) with 1 N HCl.

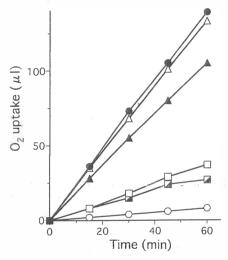
The effects of nickel sulfate (NiSO<sub>4</sub>) on sulfur dioxygenase and sulfite oxidase were studied. Suzuki showed that sulfur dioxygenase in *T. thiooxidans* cells stoichiometrically oxidizes elemental sulfur to sulfite with oxygen consumption in the presence of 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (HQNO) at pH 7.0.<sup>17)</sup> *T. thiooxidans* NB1–3 produced sulfite from elemental sulfur with oxygen consumption in the presence of  $2\,\mu\rm M$  HQNO (Fig. 1). The sulfur dioxygenase activity of strain NB1–3 was inhibited 91% and 100%

<sup>†</sup> Corresponding author,



**Fig. 1.** Effects of Nickel Sulfate on the Activity of Sulfur Dioxygenase Activity of Intact Cell of *T. thiooxidans*.

Sulfur dioxygenase activities of washed intact cells ( and boiled cells ( ) of strain NB1–3 were measured by the sulfite produced by the oxidation of elemental sulfur in the presence of 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (HQNO) at pH 7.5. The ion mixture with NiSO<sub>4</sub> (5 ml) contains cells of strain NB1–3 (0.2 mg of protein), 0.7 and Tris–HCl buffer (pH 7.5) (4.0 ml), elemental sulfur (0.2 g), HQNO (2  $\mu$ M) and NiSO<sub>4</sub>.



F., 2. Effects of Nickel Sulfate on Sulfite Oxidase Activity.

Sulfite oxidase activity was measured by the oxygen uptake caused by the oxidation of sodium bisulfite in a Warburg manometer. The reaction mixture with NiSO<sub>4</sub> (3.0 ml) contains the plasma membrane of strain NB1–3 (1 mg of protein), 0.1 m MOPS buffer (pH 7.0) (2.0 ml), sodium bisulfite (20  $\mu$ M), and NiSO<sub>4</sub>. Symbols: the following concentrations of NiSO<sub>4</sub> were added to the reaction mixture;  $\triangle$ , 0.01 mM;  $\triangle$ , 0.1 mM;  $\square$ , 1.0 mM;  $\square$ , 3.0 mM;  $\bigcirc$ , 10 mM. Sulfite oxidase activity was measured with the reaction mixture without NiSO<sub>4</sub> ( $\blacksquare$ ).

#### by 3.0 and 10 mm NiSO<sub>4</sub>, respectively.

Sulfite oxidizing activity was located on the plasma membrane of T. thiooxidans.  $^{20-22}$  Therefore, the effects of NiSO<sub>4</sub> on the activity of sulfite oxidase was studied with the plasma membrane of NB1-3. The enzyme activity was inhibited 74% and 94% by 1.0 and 10 mm NiSO<sub>4</sub>, respectively (Fig. 2). Sulfate ion that is a reaction product of sulfite oxidation did not affect the sulfite oxidase activity at 10 mm (data not shown). Sodium cyanide (1 mm), sodium azide (1 mm), antimycin A (10  $\mu$ m), HQNO (1  $\mu$ m), and myxothiazol (20  $\mu$ m) strongly inhibited sulfite oxidase activity (Table). The plasma membrane of NB1-3 did not have cytochrome c oxidase activity. However, it had ubiquinol oxidase activity (1.13  $\mu$ mol/mg/min) and TMPD oxidase activity (13.6 nmol/mg/min), suggesting that ubiquinol oxidase, but not cytochrome c oxidase functions as a terminal oxidase in T. thiooxidans NB1-3.

Table Effects of Inhibitors on Electron Transport Chain on Sulfite Oxidase Activity

Inhibitor	Concentration	Relative sulfite oxidase (%)
None		100
NaCN	0.1 mm	32
	1.0 mm	0
$NaN_3$	1.0 mm	0
Antimycin A	$10.0  \mu \text{M}$	9
2-Heptyl-4-hydroxyquinoline <i>N</i> -oxide	$20.0  \mu \text{M}$	6
Mixothiazol	$20.0 \ \mu \text{M}$	15

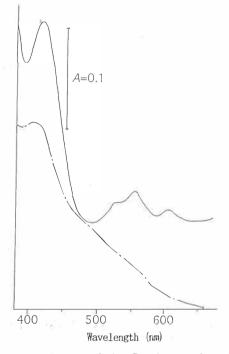


Fig. 3. Absorption Spectra of the Cytochromes from  $\it Thiobacillus thio oxidans NB1-3$ .

Lines: 1.0 ml of the plasma membrane of strain NB1-3 (10 mg of protein) reduced with sodium hydrosulfite (——) or oxidized with potassium permanganate (—-—).

Ubiquinol oxidase activity was inhibited 46.4%, 64.4%, and 41.3% by  $20\,\mu\text{M}$  Antimycin A,  $20\,\mu\text{M}$  HQNO, and  $10\,\mu\text{M}$  myxothiazol, respectively.

The spectra of cytochromes of strain NB1-3 are shown in Fig. 3. The absorption maximum at 557 nm is representative of the  $\alpha$ -peak of reduced cytochrome b and the absorption maximum at 608 nm is probably α-peak of a-type cytochrome. Effects of NiSO<sub>4</sub> on the reduction of these cytochromes by sulfite ion was monitored by the increment of absorbance at 557 nm. The reduction was completely inhibited by 10 mm NiSO<sub>4</sub> (Fig. 4). Ubiquinol-2 (Q<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) also reduced b and a-type cytochromes, supporting the idea that ubiquinol oxidase plays a role as a terminal oxidase in T. thiooxidans NB1-3. Ubiquinol oxidase activity of strain NB1-3 was completely inhibited by 500 μM NiSO<sub>4</sub> (Fig. 5). To investigate whether nickel binds to the plasma membrane of strain NB1-3 or not, the amount of nickel in the membrane after nickel treatment was measured by the methods shown in Materials and Methods. The plasma membrane without nickel treatment contained 2.8 nmol nickel per mg protein. In contrast, the cells treated with 0.1 mm NiSO<sub>4</sub> contained 32.6 nmol nickel per mg protein.

The sulfur oxidation system of T. thiooxidans is composed of

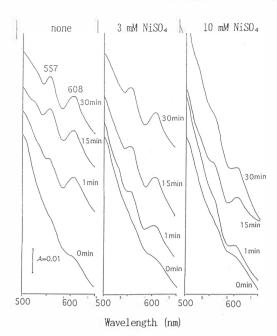


Fig. 4. Effects of Nickel Sulfate on the Reduction of Cytocrome b in the Plasma Membrane of Strain NB1-3 by Sulfite.

The reduction of cytochrome b in the plasma membrane of strain NB1–3 by sodium bisulfite was monitored by the increment of absorbance at 557 nm due to the  $\alpha$ -peak of cytochrome b. The reaction mixture with NiSO<sub>4</sub> (1.0 ml) contains the plasma membrane (10 mg of protein); 0.1 m MOPS buffler (pH 7.0) (500  $\mu$ I), and sodium bisulfite (1.0  $\mu$ mol)

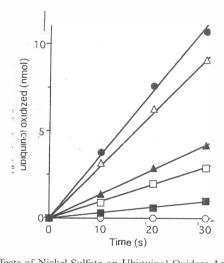


Fig. 5. Effects of Nickel Sulfate on Ubiquinol Oxidase Activity.

Ubiquinol oxidase activity was measured by the oxidation of ubiquinol-2  $(Q_2H_2)$  The reaction mixture with NiSO<sub>4</sub>  $(1.0\,\text{ml})$  contains the plasma membrane  $(20\,\mu\text{g})$  of protein),  $0.1\,\text{m}$  MOPS buffier(pH 7.0)  $(500\,\mu\text{h})$ ,  $Q_2H_2$   $(30\,\mu\text{m})$ , Tween 20 (0.02%), and NiSO<sub>4</sub>. Symbols: the following concentrations of NiSO<sub>4</sub> were added to the reaction mixture:  $\triangle$ ,  $1.0\,\mu\text{m}$ ;  $\triangle$ ,  $1.0\,\mu\text{m}$ 

sulfur dioxygenase and sulfite oxidase.<sup>15,17)</sup> Sulfur-oxidizing bacteria, such as *Thiobacillus denitrifican*<sup>23)</sup> and *Thiobacillus thioparus*,<sup>24)</sup> are known to oxidize sulfite to sulfate *via* adenosine 5'-phosphosulfate (APS-dependent pathway). However, *T. thiooxidans* probably does not use an APS-dependent pathway to oxidize sulfite because Nakamura recently showed that *T. thiooxidans* 

JCM 7814 has only an APS-independent pathway. 16,20,21) In this report, it was found that (i) nickel binds to the plasma membrane and inhibits both sulfur dioxygenase and sulfite oxidase activities of T. thiooxidans NB1-3 isolated from corroded concrete, (ii) a ubiquinol oxidase functions as a terminal oxidase in this bacterium and the activity is inhibited by nickel ion, and (iii) the reduction of cytochrome b by sulfite is inhibited by nickel. The informations on the membrane bound sulfite oxidase are still limited and there have been no reports on ubiquinol oxidase in the case of T. thiooxidans. The reasons why reduction of a-type cytochrome by sulfite was faster than that of cytochrome b and the levels of inhibition by NiSO4 and HQNO were different between sulfite oxidase and ubiquinol oxidase remain unsolved. However, the results obtained in this report suggest the possibility that the site of inhibition by NiSO<sub>4</sub> and HQNO is not identical, or that NiSO<sub>4</sub> inhibits more than one site on the sulfite oxidation system of this bacterium. To clarify the inhibition mechanism of sulfur oxidation by Ni more precisely, purifications of ubiquinol oxidase from the plasma membrane of strain NB1-3 are now under way.

Acknowledgment. We greatly thank Eizai Co., Ltd. (Tokyo) for kindly providing ubiquinol 2  $(Q_2)$ .

#### References

- 1) C. D. Parker, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 23, 81-90 (1945).
- 2) C. D. Parker, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 23, 91-98 (1945).
- 3) C. D. Parker, Nature, 159, 439-440 (1947).
- 4) C. D. Parker, Sewage and Industrial Wastes, 23, 1477-1485 (1951).
- K. Milde, W. Sand, W. Wolff, and E. Bock, J. Gen. Microbiol., 129, 1327–1333 (1983).
- 6) T. Mori, T. Nonaka, K. Tazaki, M. Koga, Y. Hikosaka, and S. Noda, *Water Res.*, **26**, 29–37 (1992).
- 7) W. Sand and E. Bock, Environ. Tech. Lett., 5, 517-528 (1984).
- 8) W. Sand, Appl. Environ. Microbiol., 53, 1645–1648 (1987)
- N. Yoshida, T. Morinaga, and Y. Murooka, J. Ferment. Bioeng., 76, 400–402 (1993).
- W. W. Duecker, J. W. Estep, M. G. Mayberry, and J. W. Schwab, J. Am. Waterworks Assoc., 7, 715–728 (1948).
- T. Emmel, H. Brill, W. Sand, and E. Bock, *Biodeterioration*, 7, 118–122 (1988).
- T. Maeda and A. Negishi, in "Fracture and Damage of Concrete and Rock-FDCR-2," ed. by H. P. Rossmanith, E&FN Spon, 1993.
- T. Maeda, A. Negishi, Y. Nogami, and T. Sugio, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 626–629 (1996).
- 1 4) I. Suzuki and M. Silver, Biochim. Biophys. Acta, 122, 22-33 (1966).
- 5) I. Suzuki, Ann. Rev. Microbiol., 28, 85-101 (1974).
- 6) K. Nakamura, S. Kuribayashi, H. Kurosawa, and Y. Amano, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 261–263 (1992).
- I. Suzuki, C. W. Chan, R. Vilar, and T. L. Takeuchi, in "Biohydrometallurgical Technologies," ed. by A. E. Torma, J. E. Wey and V. L. Lakshmanan, The Minerals, Metals & Materials Society, 1993, pp. 109-116.
- 8) J. S. Rieske, Methods Enzymol., 10, 239–245 (1967).
- K. Matsushita, E. Shinagawa, O. Adachi. and M. Ameyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 9863–9867 (1990)
- K. Nakamura, H. Yoshikawa, S. Okubo, H. Kurosawa, and Y. Amano, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 11–15 (1995).
- 21) K. Nakamura, S. Kuribayashi, H. Kurosawa, and Y. Amano, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 261–263 (1995).
- 22) S. Takakuwa, Plant & Cell Physiol., 17, 103-110 (1976).
- T. J. Bowen, F. C. Happold, and B. F. Taylor, *Biochim. Biophys Acta*, 118, 566–576 (1966).
- 24) H. D. Peck, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 46, 1053-1057 (1960)

腐食コンクリートより単離した硫黄酸化細菌 Thiobacillus thiooxidans NB1-3株のニッケルイオンによる硫黄酸化酵素活性の阻害 [ノート] (pp.1373~1375)

岡山大農、\*間組技術研

野上康雄、前田照信\*、根岸敦規\*、杉尾 剛

岡山大学 農学部総合農業科学科 〒 700 岡山市津島中 1-1-1 \*株式会社 間組 技術研究所 〒 305 茨城県つくば市苅間字西向 515-1

1996年12月16日 受理

長期間に渡ってコンクリート構造物を健全に保持 するためにコンクリート腐食の防止法を開発するこ とは重要である。硫黄酸化細菌 Thiobacillus thiooxid ansがコンクリート腐食に重要な役割を持っている こと、またコンクリートに添加されたニッケルがコ ンクリート腐食を遅らせることが報告されているの で、腐食コンクリートより単離した硫黄酸化細菌 N B1-3 株の sulfur dioxygenase および sulfite oxidase 活性に及ぼすニッケルの影響を検討した。元素硫黄 を亜硫酸に酸化する sulfur dioxygenase および亜硫 酸の硫酸への酸化を触媒する sulfite oxidase 活性は NiSO 4によって強く阻害された。NiSO 4, antimyci n A, 2-n-heptyl-4-hydroxyquinol one-N-oxidide, myxothiazolは、sulfite oxidaseと ubiquinol oxidase 活性を阻害した。 NB1-3株の無細胞抽出液は、還 元型の mammalian cytochrome cに対する酸化活性を 持っていなかった。細胞膜の cytochrome bと a型 c ytochrome は亜硫酸および ubiquinol-2によって還 元され、この還元はNiSO 4によって阻害された。 ニッケル無処理および処理細胞膜のニッケル含量は、 それぞれ 2.8 および 32.6nmol/mg タンパク質であっ た。これらの結果は、ニッケルが細胞膜に結合して sulfur dioxygenase および sulfite oxidase 活性を阻害 し、本菌の増殖を阻害することを示している。

キーワート\*: 硫黄酸化細菌; *T.thiooxidans*; 腐食; ニッケル

コンクリートは最も耐久性のある材料と考えられてきた。しかし、下水処理場のコンクリート建造物に激しい腐食が発生することが注目されてきた。コンクリートの腐食プロセスは硫酸塩を還元する。下水管中に細菌の作用で生じた硫化水素が硫黄を酸にする他の細菌により酸化され硫酸を生ずることにする。打設直後のコンクリートは水酸化カルシウムを含み pH は  $12\sim13$  である。大気中の炭酸ガスはコンクリートを中和する働きをし、腐食を早める。硫黄酸化細菌によって作られた硫酸は、コンクリームと結合し、硫酸カルシウムを生成し、やがてはコンクリートを崩壊する。

腐食したコンクリートや廃水処理施設から T.thio oxidans、 T.neapolitanus、 T.intermedius、 T.novell us等の硫黄酸化細菌が単離された $^{1,2,5,9}$ 。 コンクリートの腐食を防止するため、添加剤を加えた耐久テストが行われている $^{10.11}$ 。 最近では、我々は

各種の有機、無機の化合物を含んだポルトランドセメント片  $(4 \times 4 \times 16cm)$  を用いて汚泥タンクのマンホール の蓋に吊し、5~10ppmの硫化水素の空気中にさ らした12)。2年間の後にニッケルを含むがルトランドセ メントの表面は滑らかであったが、ニッケルを含まな いものは粗くガサガサしていることが見出された12)。 我々は腐食したコンクリートから T.thiooxidans NB1 -3株を単離し、ニッケルによるポルトランドセメントの腐 食の防止作用の生物学的基礎を研究し、0.1%の金 属ニッケル又は5mM NiSO 4により硫黄元素培地で 増殖が完全に防止され、ニッケルは 10mM でこの 細菌の元素硫黄の酸化を完全に防ぐことをつきとめ た13)。しかし、細菌の硫黄酸化機構の正確な防止 機構は未だ分かっていない。 T.thiooxidansでは元素 硫黄は sulfur dioxygenase により亜硫酸塩に酸化さ れ、これは sulfite oxidase によりさらに硫酸塩に酸 化される<sup>14~17)</sup>。これにより、sulfur dioxygenase と sulfite oxidaseの作用に及ぼすニッケルの効果が 分かった。本報告では、まず腐食したコンクリート から単離した T.thiooxidans を用いてニッケルが細胞 膜と結合し sulfur dioxygenaseと sulfite oxidaseを強 く阻害している状況を述べる。

本研究では、福山市の腐食したコンクリートから 単離した T.thiooxidans NB1-3 株を用いた13)。細菌 は好気性条件で30℃、170時間、硫黄塩培養地で 増殖させた13)。亜硫酸塩での酸化作用はワールブ ルグ検圧計中の亜硫酸塩の酸化によって生ずる酸素 の吸収度によって測定した13)。エーザイ社(東京) の好意により Ubiquinone-2 (Q₂)を入手し、リ ースケ<sup>18)</sup>の記述に従って還元体(Q<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)を準備 した。 Ubiquinol oxidase の作用は分光分析法により 松下<sup>19)</sup>の記述に従って、25°Cで275nmにおける 吸収の増加によって測定した。 N,N,N',N'- tetramet hyl-P-phenylenediamine(TMPD) に対する oxidase の活性度は分光分析で 25 ℃で 608nm での吸収の増 加により測定した。細胞膜に結合したニッケルは次 のように測定した。 NB1-3 株の細胞膜 (3mg 蛋白) を 5ml の 0.1M3-(N-morpholino)propane sulfonic 酸バ ッファー (MOPS バッファー) 中に入れ、 pH7.0 で 0.1mM Ni SO 4を添加し、30°Cで1時間培養した。NiSO4で 処理した膜を MOPS バッファー (pH7.0) で3回洗い、る つぼで 800 ℃ 2 時間で灰化する。灰分を 1N HClで 洗った。空気アセチレン炎を用い、島津 AA-625-01 分光光度計で原子吸着分光分析をおこなってニ ッケルの量を測定した。選んだスペクトル線は232 0Åであった。 1N HCIを用いて原子吸着分光分析

(石津製薬(株)) をするため、1000 μg/ml 標準 ニッケル溶液を薄めて標準ニッケル溶液を準備した。 Sulfur dioxygenaseと sulfite oxidase に及ぼす硫酸 ニッケル (NiSO 4) の効果を調べた。鈴木の報告で は T.thiooxidans 細胞中の sulfur dioxygenase は pH7.0 で 2-n-heptvl-4-hydroxyquinoline-N-酸化物 (H QNO) の存在下で酸素を消費して元素硫黄を化学量 論的に酸化する<sup>17)</sup>。 T.thiooxidans NB1-3株は2μ M HQNO の存在下で酸素を消費して元素硫黄から 亜硫酸塩を生成する(図1)。 3.0 および 10mM NiS O4により NB1-3株の sulfur dioxygenase の作用は 各々91%および100%阻害された。亜硫酸塩の酸 化作用は T.thiooxidans の細胞膜のところでおこなわ れる<sup>20-22)</sup>。それ故、sulfite oxidase の働きに対す る NiSO 4の効果は NB1-3 株の細胞膜で試してみた。 1.0 および 10mM の NiSO 4により酵素の活性は各々 74%および94%阻害された(図2)。硫酸塩イオ ンは亜硫酸塩の酸化により生成したもので 10mM において sulfite oxidase に影響を及ぼすことはない。 (データ表示なし) シアン化ナトリウム (1mM)、 sodium azi de(1mM), antimycin A(10  $\mu$  M), HQNO (1  $\mu$  M), myxothiazol(20 μ M) は亜硫酸塩 oxidase の活性を強 く阻害した(表)、NB1-3株の細胞膜は cytochrom e Coxidaseの働きをもっていなかった。しかし、u biquinol oxidase作用 (1.13 μ mol/mg/min)と TMPD o xidase 作用 (13.6nmol/mg/min) があり、 T. thiooxidan s NB1-3株で terminal oxidase として働くのは ubiqu inol oxidase であって cytochrome Coxidase ではない。 Ubiquinol oxidase の働きは20 μ M Antimycic A、 20 μ M HONO、および 10 μ M myxothiazol によ り各々46.4%、64.4%および41.3%阻害された。

NB1-3株の cytochromes のスペクトルは図3に示す。 557nm での吸収の最大値は還元された cytochrome b の $\alpha$ ピークであり、608nm での最大値は a 9イプ cytochrome の $\alpha$   $t^{\circ}$  -1 であると思われる。 亜硫酸塩に よるこれらの cytochromes の還元に対する NiSO 4の 効果は 557nm における吸収の増加によって観察し た。還元は 10mM NiSO 4により完全に阻害された (図4)。 Ubiquinol-2(Q2H2) もやはり b および a タイプの cytochromes を還元した。これは、 ubiqui nol oxidase が T.thiooxidans NB1-3 株で terminal oxid ase の役を果たしていることを裏付ける。 NB1-3 株の ubiquinol oxidase の作用は 500 μ M NiSO 4に より完全に阻害された(図-5)。ニッケルが NB 1-3株の細胞膜と結合するかどうかつきとめるた め、ニッケル処理後、膜中のニッケルの量を「材料 および方法」で示した方法で測定した。ニッケル処 理をしていない細胞膜は mg蛋白中2.8nmolのニッ ケルを含有していた。これに対し 0.1mM NiSO 4で 処理した細胞は32.6nmolのニッケルを含んでいた。

*T.thiooxidans* の硫黄酸化システムは sulfur dioxyge nase と亜硫酸塩 oxidase から出来ている<sup>15,17)</sup>。 *T. denitrifican* <sup>23)</sup> および *T.thioparus* <sup>24)</sup> のような硫黄酸化細菌は adenosine 5'-phosphosulfate (APS- 依存通路)を経て亜硫酸塩を硫酸塩に酸化することが知

られている。しかし、 T.thicoxidans は多分酸化に A PS- 依存通路を使っていないと思われる。なぜな ら中村が最近 T.thiooxidans JCM7814 のみが APS 依 存通路を持っていると報告している<sup>16,20,21)</sup>。こ の報告で次のようなことが見い出された。(I)ニ ッケルは細胞膜と結合し、腐食したコンクリートか ら単離された T.thiooxidans NB1-3株の sulfur diox ygenase と亜硫酸塩 oxidase の両方の活性を阻害す る。(II)Ubiquinol oxidaseのterminal oxidaseとし ての作用はニックルイオンにより阻害される。(Ⅲ)亜硫 酸塩による cytochrome b の還元はニッケルによっ て阻害される。膜と結合した亜硫酸塩 oxidase の知 識は未だ少なく T.thiooxidans の場合の ubiquinol oxid ase についての報告も無い。亜硫酸塩による a タイプ の cytochrome の還元が b タイプの場合より早いのは なぜか、また亜硫酸塩 oxidase と ubiquinol の間で NiSO 4と HQNO による阻害のレベルが違う のはなぜかについては未知である。しかし、本研究 で得られた結果から見て、多分 NiSO 4と HQNO の 阻害の場面が同じでないか、NiSO4はこの細菌の 亜硫酸酸化システムの複数の場面で作用しているの であろう。Niによる阻害メカニズムを更に明確に するため、目下 NB1-3 株からの細胞膜からの ubiq uinol oxidase の精製を行っている。

# <謝辞♪

エーザイ株式会社(東京)より ubiquinol $-2(Q_2)$  が入手できたことを感謝する。

## <対放>

- 1)C.D. パーカ- オーストラリア 実験生物学 (1945)
- 2)C.D. パーカ- オーストラリア 実験生物学 (1945)
- 3)C.D. パーカー ネイチャー (1947)
- 4)C.D. パーカ- 下水および工業廃水 (1951)
- 5)K. ミルド、W. サンド、W. ウォルフ、E. ボック 微生物学誌 (1983)
- 6)T. 森、T. 野中、K. 田崎、M. 古賀、Y. 彦坂、S. 曽田 水研究 (1992)
- 7)W. サンド、 E. ボック 環境工学 (1983)
- 8)W. サント 環境微生物 (1987)
- 9)N. 吉田、 T. 森永、 Y. 室岡 発酵工学会誌 (1993)
- 10)W.W. デッカー、 J.W. エステップ、 M.G. メイベリー、 J.W. シュワツブ 米国 水道工学会 (1948)
- 11)T. エミル、 H. ブリル、 W. サンド、 E. ボック バイオ劣化 (1988)
- 12)T. 前田、A. 根岸 コンクリートと岩石の破損 (1993)
- 13)T. 前田、A. 根岸、Y. 野上、T. 杉尾 バイオ科学、バイオ技術、バイオ化学 (1996)
- 14)I. 鈴木、 M. シルバ 生化学、生物理 (1966)
- 15)I. 鈴木 微生物化学年報 (1974)
- 16) K. 中村、S. 栗林、H. 黒沢、Y. 矢野 バイオ科学、バイオ技術、バイオ化学 (1992)
- 17) I. 鈴木、 C.W. チャン、 R. ビラー、 T.L. 竹内 バイオ流体治金工学
  - A.E. トルア、 J.E. ウェイ、 V.L. ラクシュマナン編 鉱物、金属、材料学会 (1993)
- 18)J.S. リースケ 発酵技術 (1967)
- 19)K. 松下、 E. 品川、 O. 安達、 M. 雨山 米国 科学協会 会報 (1990)
- 20)K. 中村、H. 吉川、S. 大久保、H. 黒沢、Y. 矢野 バイオ科学、バイオ技術、バイオ化学 (1995)
- 21) K. 中村、 S. 栗林、 H. 黒沢、 Y. 矢野 バイオ科学、バイオ技術、バイオ化学 (1995)
- 22)S. 高桑 植物細胞生理 (1976)
- 23)T.J. ボーエン、 F.C. ハポルド、 B.F. テイラ- 生化学、生物生理 (1966)
- 24)H.D. \^° y/ 米国科学協会会報 (1960)

## 図1 T.thiooxidans の不活性細胞の sulfur dioxygenase の作用に及ぼす硫酸ニッケルの効果

洗浄した不活性細胞(●)とボイルした細胞(○)の sulfur dioxygenase 作用を 2- n- heptyl-4-hydroxyquinolin e- N- 酸化物 (HQNO)と共に pH7.5 で元素硫黄の酸化した亜硫酸で測定した。 NiSO 4 (5ml) と合わせた混合体は NB1-3 株 (0.2mg の蛋白)の細胞、 0.1M Tris-HCl バッファ- (pH7.5)(4.0ml)、元素硫黄 (0.2g)、 HQND(2 μ M) と N iSO 4 を含む

## 図2 亜硫酸酸化 oxidase に及ぼす硫酸ニッケルの効果

### 図3 T.thiooxidans NB1-3 株の cytochromes の吸収スペクトル

(実線) ハイドロ亜硫酸ナトリウムで還元した 1.0ml の NB1-3 株、細胞膜 (10mg の蛋白)

(点線) 過マンガン酸カリで酸化した細胞膜

表 亜硫酸酸化作用での電子移動チェーンに及ぼす阻害剤の効果

阻害剤		濃度	亜硫酸酸化比率(%)
None			100
NaCN		0.1mM	32
		1.0mM	0
NaN3		1.0mM	0
Antimycin A		10.0 mM	9
2-Heptyl-4- N-oxide	hydroxyquinoline	20.0 μ M	6
Mixothiazol		$20.0~\mu$ M	15

#### 図4 NB1-3株の細胞膜中の亜硫酸による cytochrome bの還元に及ぼす硫酸ニッケル効果

NB1-3 株の細胞膜中の cytochrome b の 2 亜硫酸ソーダによる還元を cytochrome b の  $\alpha$  ピークによる 557nm における吸収の増量によって観測した。 NiSO  $_4$  (1.0ml) と合わせた反応混合物は細胞膜 (10mg の蛋白 )0.1M MOPD バッファー (pH7.0)(500  $\mu$  1)、 2 亜硫酸ナトリウム (1.0  $\mu$  mol) を含む。

## 図5 Ubiquinol oxidase の作用の及ぼす硫酸ニッケルの効果

Ubiquinol oxidase の作用を ubiquinol— $2(Q_2H_2)$  の酸化により測定した。 NiSO  $_4$  (1.0ml) と合わせた反応混合体は細胞膜 (20  $_{\mu}$  g 蛋白 )、 0.1M MOPS バッファ〜 (pH7.0)(500ml) 、  $Q_2H_2$  (30  $_{\mu}$  M) 、 トゥイーン 20(0.02 % ) 、 NiSO  $_4$  を含む。