

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12215

研究課題名（和文）淡水資源のヒ素汚染対策における嫌気性ヒ素酸化細菌の有用性の評価

研究課題名（英文）Effectiveness evaluation of anaerobic arsenic-oxidizing bacteria in addressing arsenic contamination of freshwater resources

研究代表者

小島 久弥 (Kojima, Hisaya)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：70400009

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒ素による淡水資源の汚染は、世界各地で深刻な健康被害を起こしている。この問題への対策として、無酸素条件下でヒ素を酸化する微生物を利用することが考えられる。こうした能力を持つ微生物（嫌気性ヒ素酸化細菌）の中でも、淡水環境で生育する微生物に関する研究は特に大きく遅れている。淡水性の嫌気性ヒ素酸化細菌を研究するうえで、現段階で最も有用な研究材料と思われる微生物を対象とした研究を行った。効率的で再現性の高い培養法を新たに開発し、公開した。この微生物が持つ様々な特性を明らかにし、学名を付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無酸素環境下での微生物によるヒ素酸化は、環境中での重要性が示唆されながらもその実態がほとんど明らかにされていない。特に、淡水環境に生息する嫌気性ヒ素酸化細菌については、圧倒的に知見が不足していることに加え、水資源のヒ素汚染対策に利用できる可能性からも研究の進展が望まれている。本研究の成果は、こうした研究を進めるための基盤を提供するものである。重要な研究対象となる微生物とその培養方法を公開し、多くの研究者が後続研究に参入するための道を開いた。学術的にも社会的にも少なからぬ意義のある嫌気性ヒ素酸化細菌に関する研究を、大きく進展させる契機になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Arsenic contamination of water for drinking and agriculture causes serious public health problems. Some microbes, referred to as anaerobic arsenic-oxidizing bacteria, are known to oxidize arsenic under anoxic conditions. They may be useful to reduce risk of arsenic contamination. Especially, anaerobic arsenic-oxidizing bacteria inhabiting freshwater habitats must be most important in water resources management, but very little is known about this group of bacteria. In this study, one of such bacteria were characterized in detail as a candidate for a model organism. For its cultivation, an effective and reproducible method was newly developed. The organism was described as a new species and publicized.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ヒ素 ヒ素酸化細菌 硫黄酸化細菌

1. 研究開始当初の背景

ヒ素による地下水の汚染は世界各地で深刻な健康被害をもたらしている。地圏・水圏におけるヒ素の存在形態は主に As (III) あるいは As (V) であり、毒性は前者でより高い。環境中に生息する微生物の中には As (III) や As (V) を生育のためのエネルギー獲得に利用するものが存在する。無酸素環境においては、ヒ素還元菌による As (V) から As (III) への還元が進行する。一方で酸素の存在下においては、ヒ素酸化細菌が As (III) を As (V) へと酸化する。このような微生物活動の結果、無酸素環境には As (III)、有酸素環境には As (V) が豊富に存在するという基本的な分布パターンが出来上がっている。こうした機能を持つ微生物は、水資源のヒ素汚染対策に利用できるものと期待される。As (III) は As (V) と比較して水への可溶性が高く、環境中で移動しやすい性質がある。微生物による As (III) と As (V) の間での変換をコントロールできれば、ヒ素の移動性を制御することを通じてその局在を管理下に置くことが可能になる。しかしながら前述の通り、ヒ素の酸化が望まれる状態、つまり As (III) が豊富に存在する条件においては、しばしば酸素が欠乏している。こうした条件下で有効になると考えられるのが、酸素に依存せずに As (III) を As (V) に変換する微生物である嫌気性ヒ素酸化細菌を利用することである。

嫌気性ヒ素酸化細菌が最初に発見されたのは、強アルカリ塩湖からである。それに続く嫌気性ヒ素酸化細菌に関する研究もまた、生育に高塩濃度・高 pH を要求する特定の系統の細菌についてのみ行われてきた。それらの研究を通じて、嫌気性ヒ素酸化細菌が特徴的なヒ素酸化酵素 *Arx* を持つことが明らかにされた。そうした中で研究代表者は、淡水環境から *Arx* をコードする遺伝子 (*arx* 遺伝子) を持つ細菌を複数発見した。これらの微生物は強アルカリ塩湖に由来する嫌気性ヒ素酸化細菌とは系統的に大きく隔たっており、またそれらが持つ *arx* 遺伝子も淡水性細菌に特有の系統を形成していることが確認されている (Cabrera-Ospino ら, 2019 年)。研究代表者によって温泉から分離された微生物である M52 株は、無酸素条件下でヒ素を酸化する能力を有していることが確認されている (Cabrera-Ospino ら, 2019 年)。淡水型の *Arx* によってヒ素酸化する微生物はこの他に確認されていないことから、淡水に生息する嫌気性ヒ素酸化細菌の研究では、M52 株を中心に知見を蓄積していくのが効率的なアプローチであると期待される。その一方で、この菌株をモデル生物とするためにはいくつかの課題が残されている。一例として、研究開始当初の段階で M52 株は分類が未確定であり、学名もついていなかった。その理由のひとつは、国外の菌株保存機関へ寄託する手続きが滞っていたことにある。その大きな原因となっていたと思われるのが、安定した形での培養が困難であるという点である。それまで M52 株を培養するために用いられてきた炭酸緩衝培地は、調整手順が煩雑であり、作成環境によっては品質を安定させにくいという欠点があった。2カ国以上の菌株保存機関への寄託は細菌の学名提唱に必須であることに加え、M52 株がモデル生物として広く利用されるためにも重要である。このため、国外の保存機関や多くの研究者にとっても簡便で再現性の高い培養法を確立する必要があった。また M52 株については、微生物としての基本的な情報が不足しており、これもまた学名の提唱に至っていない理由となっていた。

温泉由来の微生物である M52 株は、生育温度域がやや高いという特徴を有している。このことは、M52 株で得られた知見を地下水等の低温環境に適用する際に障害となる可能性がある。淡水型 *Arx* を保持するヒ素酸化細菌に関する基礎的な知見は依然として圧倒的に不足しており、M52 株以外にもモデル生物に適した微生物が存在しないか、幅広く探索を続ける余地がある。

2. 研究の目的

淡水資源のヒ素汚染対策への応用を想定し、淡水性モデル微生物を利用した嫌気性ヒ素酸化細菌研究を行うための基盤を構築することを目的とした。研究開始時点でのモデル微生物候補である M52 株について、基礎的な性状を明らかにして分類学上の位置を確定するとともに、菌株保存機関を通じた供給体制の安定化を図った。また、M52 株に代わりうる新たなモデル微生物候補を探索し、合わせて淡水環境における嫌気性ヒ素酸化細菌の多様性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究材料として、M52 株および近縁微生物である J5B 株を使用した。両株を安定して培養できる培地を探索し、できるだけ調整が容易で単純な組成になるように最適化した。目的に合致した基本培地の調整法を確立したうえで、この培地で培養した際の菌体脂肪酸組成を M52 株と J5B 株の双方について明らかにした。また、開発した新培地やこれを基に改変した培地を用いて、M52 株が利用可能な炭素源や増殖可能な温度・pH 範囲などの基本的な性状を調べた。両株のゲノム情報を基に系統解析を行ったうえで、文献に記載された各種の特性を比較して M52 株と J5B 株の分類学上の位置を確定した。

研究期間中に随時公共データベースを確認し、淡水性型 *Arx* の遺伝子を有する微生物株に関する知見を収集した。*Arx* の触媒サブユニットをコードする遺伝子である *arxA* 遺伝子を PCR 増幅するためのプライマーについて、先行研究で報告されたものを淡水性微生物の解析に特化した形に改変することを試みた。既存プライマー (Cabrera-Ospino ら, 2018 年) と同じ位置を対象とし、プライマーの配列長を短縮し、配列中の混合塩基の数を減らす変更を行った。設計し

たプライマーの有効性の検討は、淡水性型 *arxA* 遺伝子を持つことが確認されている細菌株を対象とした PCR によって行った。新たな淡水性の嫌気性ヒ素酸化細菌を探索するため、硫酸化細菌の集積培養系を多数確立した。培養系ごとにできるだけ異なる系統の細菌を優占させるため、培地組成、接種源、培養温度の組み合わせを多数用意した。確立された培養系については、16S rRNA 遺伝子解析によって優占種を特定するとともに、*arxA* 遺伝子用プライマーを適用することで嫌気性ヒ素酸化細菌の検出を試みた。

4. 研究成果

様々な培地での培養実験を経て、以下の手順で調整した培地で M52 株と J5B 株の安定した増殖が認められることを確認した。[カザミノ酸、酵母エキス、フマル酸二ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、硝酸ナトリウムを水に溶解、窒素ガスを通気したうえで窒素ガスとともに培養容器に密閉、オートクレーブ滅菌し室温まで冷却後に別途ろ過滅菌したシアノコバラミン溶液を加える]。この調製手順は、それ以前に使用していた培地の場合と比較して大幅に簡略化されている。従来使用していた培地の調整においては、個別に調製・滅菌した溶液を 6 種類、無菌的に混合する必要があった。開発した培地で培養した両株の菌体脂肪酸組成を分析したところ、パルミチン酸が主要な脂肪酸であることが明らかとなった。J5B 株については、従来の培地で培養したものについても分析を行ったが、同様にパルミチン酸が主要脂肪酸であった。先行研究では、M52 株は酢酸と乳酸を利用して増殖できることが示されていた。本研究では、これらに加えてピルビン酸、フマル酸、コハク酸、プロピオン酸、リンゴ酸、酪酸が生育に利用可能であることが確認された。糖やアルコールは用いての増殖はみられなかった。増殖可能な温度は 18°C から 55°C、増殖が最も速くなる温度は 50°C であった。増殖可能な pH の範囲は 5.5-8.6 であり、pH 6.6-6.9 で特に良好な生育が認められた。

先行研究にて行われた系統解析によって、M52 株と J5B 株は *Sterolibacteriaceae* 科に属し、同じ新属の別種として分類されるべきものであることが示唆されていた。本研究で明らかとなった諸特性と、文献で報告されている *Sterolibacteriaceae* 科細菌の特性を整理して、M52 株と J5B 株と比較した。より詳細な系統解析の結果と合わせて、新属 *Sulfuricystis* 属を提唱した。併せて、M52 株によって代表される新種を *Sulfuricystis thermophila*、J5B 株によって代表される新種を *Sulfuricystis multivorans* とすることを提唱した。さらに、*Sterolibacteriaceae* 科へ再分類するべきであると考えられた *Rugosibacter* 属について、属記載の修正を提案した。

研究開始時点において、淡水性型 Arx を持つ微生物はごく少数しか報告されておらず、純粋培養として利用可能なのは、M52 株と J5B 株、及び *Sulfuricella denitrificans* skB26 と *Sulfuritortus calidifontis* J1A の計 4 株しか存在しなかった。これら 4 株はいずれも独立栄養性の硫酸化細菌である。研究期間中に新たにゲノム配列が公開された菌株に対象を広げたところ、同じく独立栄養性の硫酸化細菌である *Sulfurimicrobium lacus* skT11 がこれに該当することが確認されたが、その他には *Sterolibacteriaceae* 科の従属栄養性細菌の 1 株が見つかったのみであった。このことは、淡水性型 Arx を持つ微生物を新たに発見するには、依然として硫酸化細菌の中から探索するのが有効であることを示唆している。新たに確認された細菌の配列も考慮に入れ、淡水性型 *arxA* 遺伝子の解析に特化したプライマーを設計した。新しいプライマーセットによって、硫酸化細菌 5 株 (M52・J5B・skB26・J1A および skT11 株) から期待される長さの PCR 産物が得られた。*arxA* 遺伝子を対象とした PCR は、嫌気性ヒ素酸化細菌の候補を環境中からの直接検出することに加え、集積培養系のスクリーニングにも有効であることが示されている (Cabrera-Ospino ら, 2018 年および 2019 年)。新しいプライマーセットを、それぞれ異なる属の細菌によって優占される集積培養系に適用した。集積培養系で優占する属 (*Halothiobacillus*, *Hydrogenophaga*, *Hydrogenophilus*, *Ideonella*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas Sulfurivermis*, *Thiobacillus*, *Thiomonas* 及び複数の未記載属) は多岐の系統にわたっていたが、いずれの培養系からも *arxA* 遺伝子の増幅は認められなかった。この結果は、先行研究で報告されたプライマーセットを用いた場合でも同様であった。研究期間中に他の研究者によって報告された知見を勘案して考慮しても、淡水型 Arx を持つ嫌気性ヒ素酸化細菌のモデル微生物候補としては依然として *Sulfuricystis thermophila* M52 株が最有力であり、既に発見されている他の硫酸化細菌がそれに準ずるものと考えられる。

<引用文献>

1. Melody Cabrera-Ospino, Hisaya Kojima and Manabu Fukui. Arsenite oxidation by a newly isolated betaproteobacterium possessing *arx* genes and diversity of the *arx* gene cluster in bacterial genomes. *Frontiers in Microbiology* 10:1210. 2019 年
2. Melody Cabrera-Ospino, Hisaya Kojima, Tomohiro Watanabe, Tomoya Iwata and Manabu Fukui. Diversity of anaerobic arsenite-oxidizing bacteria in low-salt environments analyzed with a newly developed PCR-based method. *Limnology* 19:177-183. 2018 年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kojima Hisaya, Watanabe Miho, Miyata Naoyuki, Fukui Manabu	4. 巻 204
2. 論文標題 Sulfuricystis multivorans gen. nov., sp. nov. and Sulfuricystis thermophila sp. nov., facultatively autotrophic sulfur-oxidizing bacteria isolated from a hot spring, and emended description of the genus Rugosibacter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00203-022-03186-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福井 学 (Fukui Manabu) (60305414)	北海道大学・低温科学研究所・教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------