

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20587

研究課題名(和文)水田土壤中のヒ素動態に関与する微生物群集構造と機能遺伝子の解析

研究課題名(英文) Diversity and transcriptional analysis of genes involved in respiratory As(V) reduction and As(III) methylation in Japanese paddy soils.

研究代表者

伊藤 虹児 (Ito, Koji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・研究員

研究者番号：70828863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では国内の水田土壌を湛水培養し、そこから抽出したRNAを用いてメタトランスクリプトームによるAs代謝遺伝子(arrA, ttrA, arsM)の発現解析を行なった。異化的ヒ酸還元酵素遺伝子としては、arrAよりもttrAの発現量が多かったことから、当該遺伝子がAsの還元溶解に関与していることが示唆された。主なttrAの発現宿主は土壌ごとに異なったものの、鉄、或いは硫黄還元細菌として知られるグループがAs還元溶解の鍵となる微生物であることが示唆された。さらに、多様な微生物がarsMを発現し、その発現量が3日目から9日目にかけて5～13.2倍に増加することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では日本の水田土壌中で土壌溶液中Asの供給源となり得る異化的As(V)還元酵素遺伝子として、これまで世界的に研究されてきたarrAではなく、ttrAが高度に転写されていることを見出した。ttrAを発現する微生物は鉄あるいは硫酸還元細菌として知られるグループであることが明らかとなった。また、As呼吸によってAs(III)が蓄積したタイミングで多様な微生物がAs(III)メチル化遺伝子arsMを発現することが明らかとなった。これらの結果は国内の水田においてAsの生物地球化学的循環を駆動する微生物の指標を与えるものであり、将来的にコメのヒ素汚染リスクを予測する上で有用な情報となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, total RNA was extracted from Japanese paddy soils with different levels of dissolved As under flooded conditions, and the transcription of As metabolic genes (arrA, ttrA and arsM) was analyzed via a metatranscriptomic approach. The results showed that ttrA was the predominant respiratory As(V) reductase gene transcribed in these soils rather than arrA, suggesting that ttrA contributes to the reductive dissolution of As. The predominant taxa expressing ttrA differed among soils but were mostly associated with genera known for their iron and/or sulfate reduction activity. In addition, a wide variety of microorganisms were found to express and upregulate arsM approximately 5.0- to 13.2-fold at 9 d compared to 3 d of incubation under flooded conditions in flasks. These results serve as a proxy for the microbial activity involved in the geochemical cycling of As in Japanese paddy soils and could provide useful information for predicting the risk of As contamination in rice.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：水田土壌 異化的ヒ酸還元酵素遺伝子 メタトランスクリプトーム 黒ボク土 土壌RNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コメを生産する水田は還元条件であるため、土壌中のヒ素 As がイネに吸収されやすい亜ヒ酸 As(III)へ変化する。しかし As(III)の生成と溶出が土壌により異なる要因は、土壌理化学性から十分説明できない。それは、As 動態への土壌微生物の寄与が大きいためである。しかし日本の水田土壌中で As 動態に関与する微生物群集構造や As 代謝遺伝子の機能レベルは分かっていない。

### 2. 研究の目的

将来的に土壌理化学的情報と菌叢・As 代謝遺伝子の情報を基盤にコメの As 汚染リスクを予測するモデルを構築するため、本申請研究では湛水状態で静置培養した水田土壌中で発現する As 代謝遺伝子(*arrA*, *ttrA*, *arsM*)とそれら遺伝子を発現する微生物を解析することで、土壌溶液中 As 濃度に影響を及ぼすキープレイヤーを特定する。

### 3. 研究の方法

#### (1)水田土壌の湛水培養

日本全国 10 箇所から収集した水田土壌の風乾土(40 g・dry soil 相当)と 10 mM 乳酸に調製した 120 mL PIPES buffer (pH = 7.2)を加え、25°C、暗所で静置培養した。継時的に土壌溶液を採取し、ICP-MS で溶存態 As 濃度を定量した。酸化還元電位(Eh)は白金電極と参照電極を用いて測定した。

#### (2)RNA 抽出

湛水培養 3 日目、9 日目、20 日目の水田土壌 no. 4, 6, 10 から 4 g・wet soil をサンプリングし、RNeasy PowerSoil Total RNA kit (Qiagen)のプロトコールに従って RNA 抽出を行った。尚、黒ボク水田土壌(no. 6)に於いては Qiagen のプロトコールの行程 2 にて、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコールのみ 400  $\mu$ L 10% カゼインナトリウム溶液(w/w, ミリ Q 水に溶解後、オートクレーブ滅菌)に変更し、15 分間のボルテックスによるビーズ破碎後、2,500  $\times$ g、3 分で遠心分離した。その後、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコールを加え、ボルテックスで混合し、2,500  $\times$ g、5 分で遠心分離した。上部の水層を新しい 15 mL チューブに移し、2 mL クロロホルム:イソアミルアルコールでボルテックスし、水層に残存したフェノールを除去した。これ以降はプロトコールの行程 7 より従った。得られた total RNA は DNase 処理し、カラム精製した。Total RNA の純度・濃度は吸光度で定量し、RNA のインテグリティは 5400 Fragment Analyzer (Agilent)で測定した。

#### (3)培養した水田土壌のメタトランスクリプトーム解析

湛水培養 3 日目、9 日目の水田土壌から抽出した total RNA の rRNA を除去した後、cDNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーで解読した。得られた生リードは fastp で前処理した。これらのリード中から As 代謝遺伝子の特異的に検出するため、gene targeted assembler である MegaGTA を使用した(Li et al. 2017)。このプログラムで必要となる reference gene file のうち、*arsM* と *arrA* に関しては Dunivin ら(2019)が公開しているものを使用した。*ttrA* に関しては As 還元活性が報告されている TtrA ホモログ(NCBI accession no. WP\_059435911.1、WP\_041969781.1)と、それらに 70%以上の相同性を示すアミノ酸配列からマルチプルアライメントを作成し、このマルチプルアライメントを基に TtrA の隠れマルコフモデル(HMM)を作成した。さらに、これらアライメントに使用したアミノ酸配列に対応する塩基配列を NCBI データベースから収集し、seed sequence とした。作成した HMM と seed sequence を reference gene file とし、*ttrA* のアセンブリに使用した。各遺伝子の発現量は検出されたコンティグのリードカウントを coverM v0.7.0 (<https://github.com/wwood/CoverM>)で算出し、各サンプルの総リード数で除したのち 100 万を乗じることで表現した。また、検出された各コンティグの系統分類は公共データベース: NCBI-nr を利用して解析した。

#### (4) *ttrA* ホモログ遺伝子の RT-PCR

メタトランスクリプトーム解析で検出された *ttrA* ホモログ遺伝子のうち、水田土壌 no. 10 で最もリードカウントが多かった *Anaeromyxobacter* 或いは *Chloroflexota* 由来の 2 種類の *ttrA*

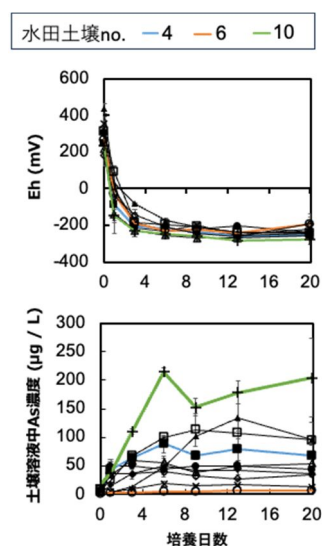


図 1: 酸化還元電位(Eh)と土壌溶液中溶存態 As 濃度の変化

ホモログを対象に特異的プライマーを設計し、3, 9, 20 日目の total RNA から合成した cDNA を鋳型に RT-PCR を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 水田土壌の湛水培養

酸化還元電位 (Eh) は培養開始後 3 日以内に全ての土壌で 0 mV 以下となり、この変化に対応して 10 箇所中 7 箇所の水田土壌で溶存態 As、Fe 濃度が増加した。このことから還元的環境が発達した可能性が示唆された。水田土壌 no. 10 で最大  $214 \pm 7 \mu\text{g/L}$  だった。一方、水田土壌 no. 6 は Eh の低下にも関わらず溶存態 As の増加が見られず、培養期間を通じて  $1.2 \pm 0.2 \sim 6.5 \pm 1.1 \mu\text{g/L}$  だった。また、水田土壌 no. 4 は中程度の As 溶出レベルを示し、培養 6 日目で最大で  $88.0 \pm 15.6 \mu\text{g/L}$  となった(図 1)。

##### (2) RNA 抽出

As 溶出レベルの異なる 3 つの水田土壌 no. 4, 6, 10 を選抜し、これら土壌の培養 3, 9, 20 日目から total RNA を抽出した。純度は全てのサンプルで  $260 \text{ nm} / 280 \text{ nm} = 1.91 \sim 2.15$ ,  $260 \text{ nm} / 230 \text{ nm} = 1.84 \sim 2.19$  であり、土壌ごとの total RNA はそれぞれ  $3.26 \sim 9.59 \mu\text{g}$  (no. 4)、 $0.929 \sim 9.14 \mu\text{g}$  (no. 6)、 $3.14 \sim 11.07 \mu\text{g}$  (no. 10) だった。また、メタトランスクリプトーム解析に供する 3, 9 日目の RNA Integrity Number (RIN) はそれぞれ  $5.9 \sim 7.7$  (no. 4)、 $2.3 \sim 2.8$  (no. 6)、 $6.4 \sim 7.3$  (no. 10) だった。黒ボク水田土壌 (no. 6) では全てのサンプルで  $\text{RIN} < 5$  となったため、抽出行程で RNA が分解された可能性があり、今後は RNase 活性を抑制するための更なる改善策を考える必要がある。

##### (3) 培養した水田土壌のメタトランスクリプトーム解析

培養 3, 9 日目の水田土壌 no. 4, 6, 10 から抽出した RNA をメタトランスクリプトーム解析で調べた所、異化的ヒ酸還元酵素遺伝子として世界的に研究されてきた *arrA* をコードするコンティグが水田土壌 no. 6 から検出され、培養 3 日目、9 日目のリードカウントはそれぞれ  $0.62 \pm 0.21$ ,  $1.17 \pm 0.58$  だった。しかしながら、水田土壌 no. 4, 10 からは *arrA* のコンティグが得られなかった。一方、Muramatsu ら (2020) によって新たに As(V) 還元活性が報告された *ttrA* ホモログをコードするコンティグが全ての土壌から合計 394 種類検出され、そのリードカウントは *arrA* より顕著に高かった。以上の結果から、本研究で用いた水田土壌中では *arrA* よりも *ttrA* ホモログが As の還元溶解に関与している可能性が高いと考えられる。*ttrA* を発現する優先種は土壌ごとに異なったものの、鉄、或いは硫黄還元細菌として知られるグループが As 還元溶解のキープレイヤーであることが示唆された。具体的には、水田土壌 no. 4 では *Desulfosporosinus* と *Desulfitobacterium* に由来する *ttrA* ホモログ配列が優先した。水田土壌 no. 6 では *Geomonas* に由来する *ttrA* ホモログ配列が最も多く検出され、水田土壌 no. 10 では *Anaeromyxobacter* と *Chloroflexota* に由来する *ttrA* ホモログ配列が多かった。さらに、多様な微生物が *arsM* を発現していることが明らかとなり、その発現量が 3 日目から 9 日目にかけて 5~13.2 倍に増加することが示された。

##### (4) *ttrA* ホモログ遺伝子の RT-PCR

メタトランスクリプトーム解析で検出された *ttrA* ホモログが実際に水田土壌中で転写されているかを明らかとする目的で、RT-PCR を行った。*Anaeromyxobacter* または *Chloroflexota* の *ttrA* ホモログをターゲットとするプライマーセットを用いて RT-PCR を行った結果、3, 9, 20 日目で両細菌の目的サイズの増幅産物が検出され、シーケンス解析の結果、これらの増幅産物の推定アミノ酸配列は *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株由来の *TtrA* ホモログとそれぞれ 82.50%, 44.29% の相同性を示した。以上の結果から、*ttrA* ホモログは水田土壌中で転写されていることが明らかとなった。

#### 引用文献:

- Duniviv et al. 2019. A global survey of arsenic-related genes in soil microbiomes. BMC Biol 17, 45
- Li et al. 2017. MegaGTA: a sensitive and accurate metagenomic gene-targeted assembler using iterative de Bruijn graphs. BMC Bioinformatics 18 (Suppl 12), 408
- Muramatsu et al. 2020. Possible Involvement of a Tetrathionate Reductase Homolog in Dissimilatory Arsenate Reduction by *Anaeromyxobacter* sp. Strain PSR-1. Appl Environ Microbiol 86:e00829-20.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koji ITO, Masato KURAMATA, Hachidai TANIKAWA, Aomi SUDA, Noriko YAMAGUCHI and Satoru ISHIKAWA
2. 発表標題 Development of RNA extraction method and transcriptional analysis of respiratory arsenate reductase gene in Japanese paddy soil.
3. 学会等名 2023 ASA-CSSA-SSSA International Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤虹児、倉俣正人、谷川八大、須田碧海、山口紀子、石川寛
2. 発表標題 日本の水田土壌中における異化的ヒ酸還元酵素遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第28回ヒ素シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------