

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07209

研究課題名(和文) 環境中における嫌気性ヒ素酸化細菌の多様性と分布

研究課題名(英文) Distribution and diversity of anaerobic arsenite-oxidizing bacteria

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素化合物は深刻な健康被害を起こす環境汚染物質であり、その環境中での挙動に大きな影響を及ぼすと考えられるのが、嫌気性ヒ素酸化細菌である。環境中での嫌気性ヒ素酸化細菌の多様性と分布を解析するための手法を開発し、実際に野外から得られた試料に適用した。その結果、効率的な手法が確立され、それを用いることによって環境中には従来知られていたよりも多様な嫌気性ヒ素酸化細菌が生息していることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Arsenic is a pollutant causing serious public health problem, and anaerobic arsenite-oxidizing bacteria are thought to have a great influence on dynamics of arsenic in environment. In this study, new methods to analyze distribution and diversity of anaerobic arsenite-oxidizing bacteria in environments were developed and applied. The obtained results suggested that arsenite-oxidizing bacteria in environments are more diverse than previously thought.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ヒ素 微生物 多様性

## 1. 研究開始当初の背景

ヒ素は毒性の高い環境汚染物質であり、飲料水等の汚染を通して世界各地で甚大な健康被害を及ぼしている。自然環境中でのヒ素の存在形態は主に As( ) と As( ) であり、毒性は前者でより高い。両者の間での変換には、エネルギー獲得にヒ素化合物を利用する微生物群の活動が大きく関与している。これらの微生物の中には、無酸素条件下(嫌気条件)において As( ) から As( ) への還元を行うヒ素還元菌と、逆向きの反応を担うヒ素酸化細菌が含まれ、それぞれについて様々な研究がなされている。このうち環境中のヒ素酸化細菌については、酸素を利用して As( ) を酸化する微生物についての研究が大多数である。無酸素条件下で As( ) を酸化する能力を持つ微生物(嫌気性ヒ素酸化細菌)の存在は知られているものの、これらの微生物の多様性や環境中での分布、存在量などについてはほとんど解明されていない。As( ) と同様に嫌気条件下で微生物が生成する化合物については、無酸素条件下で酸化する微生物がその消費に大きく寄与していることが示されている。これらのことは、環境中のヒ素動態を把握するうえで、またヒ素汚染に対処するうえでも、嫌気性ヒ素酸化細菌の生態を明らかにすることが重要な課題であること示している。

一般に、環境中の微生物は培養が困難である。したがって、特定の機能を持つ微生物の多様性や現存量を培養法によって明らかにすることはほぼ不可能であり、その推定には着目する機能に関わる遺伝子をマーカーとする培養非依存的手法がより広く用いられる。これはヒ素酸化細菌についても同様で、ヒ素酸化酵素の遺伝子を対象とした解析が行われている。しかし嫌気性ヒ素酸化細菌は、他のヒ素酸化細菌とは異なる特徴的な嫌氣的ヒ素酸化酵素 ArxA によってヒ素を酸化することが示されている。嫌氣的ヒ素酸化酵素

の遺伝子 (*arxA* 遺伝子) を持つことが示されている生物はわずかに数種しか知られておらず、その全てが硫黄酸化細菌あるいはその近縁種であるという共通点がある。また、それらの多くは特定の系統群に集中している。環境中から *arxA* 遺伝子を検出するためのプライマーについても報告例があるが、限られた生物の情報をもとに設計されたものであるため、その検出能力は限定的なものであると予想される。

## 2. 研究の目的

環境中における嫌気性ヒ素酸化細菌の多様性と分布を解析するためのツールの開発、基盤の整備を行い、実際の解析を数件程度行うことでその有用性を確認することを期間内における最終的な目的とした。具体的には *arxA* 遺伝子用の汎用プライマー設計、ならびに遺伝子配列と菌の性質を関連付けるためのデータベースの充実化を行う。この目的の達成に向け、可能な限り多様な嫌気性ヒ素酸化細菌の培養を試みる。得られた菌株については生理学的特性を明らかにするとともに、ゲノム配列の決定によって *arxA* 遺伝子の全長配列を得る。収集した遺伝子配列をもとに新規プライマーを設計、環境試料に適用してその有効性を検証しつつ、環境中での嫌気性ヒ素酸化細菌の多様性の一端を明らかにする。

## 3. 研究の方法

これまでに知られている *arxA* 遺伝子を持つ微生物の多くが硫黄酸化細菌であることに注目し、新たな硫黄酸化細菌の純粋培養化を試みた。得られた菌株についてはその基礎的な性質を明らかにするとともに、全ゲノム配列を決定して *arxA* 遺伝子を探索した。また、公共データベース上から *arxA* 遺伝子配列を収集し、これをもとに多様な *arxA* 遺伝子を検出可能な PCR プライマーを設計した。設計したプライマーを用いた PCR 増幅によ

って環境試料から *arxA* 遺伝子の断片を取得した。得られた断片についてはクローニングののちに配列を決定し、系統解析を行った。

#### 4. 研究成果

培養による探索の結果、それぞれが新種を代表すると考えられる硫黄酸化細菌 5 株を新たに得た。うち 3 株については新属新種として記載、報告した。既に得られていた菌株と合わせ、8 株のゲノム解析を行った。結果として、うち 3 株のゲノム上から *arxA* 遺伝子を見出した。これらの株が持つ *arxA* 遺伝子には、特徴的な挿入配列が認められた。また近縁種との比較ゲノム解析等により、系統関係その他の情報から事前に *arxA* 遺伝子の存在を予測することが不可能に近いことが改めて確認された。既知の細菌に占める *arxA* 遺伝子保有菌の割合から考えると、本研究における検出率は非常に高く、ここで用いられたアプローチが目的を達成するうえで極めて有用であったことが示された。

公共データベース上の配列を利用し、多様な *arxA* 遺伝子を増幅するための新たな PCR プライマーを設計した。大量の環境試料への適用を想定し、その後のクローニングを利用した解析が効率的に行われるような改変も行った。設計したプライマーの有効性は、菌株保存機関から取り寄せた *arxA* 遺伝子保有菌株のゲノム DNA を用いて事前に確認した。解析の対象としたのは、ダム湖湖水、温泉水、温泉バイオマットの試料であり、これらはいずれも比較的高いヒ素濃度の環境から得られた。PCR 増幅後にクローニング解析を実施し、合計 146 クローンの配列を決定した。系統解析の結果、これらの配列はそれまでに知られていた *arxA* 遺伝子の多くとは系統的に大きく隔たっていた。その一方で、本研究で新たに得られた菌株の *arxA* 遺伝子とより近縁であることが明らかとなった。これらの配列はまた、公共データベース上に登録されたメタゲノム配列中に含まれていたもののい

くつかともまた近縁であった。これらに共通するのは、中性に近い pH の環境に由来していることである。これは、本研究開始以前に知られていた *arxA* 遺伝子のほとんどが高い塩濃度と高い pH で特徴づけられる環境から得られたものであったことと対照的である。

研究期間中に、メタゲノム配列を中心に公共データベースで利用可能な微生物ゲノム情報が大幅に増大した。これらの中から改めて *arxA* 遺伝子が含まれるゲノム配列を収集、整理した。*arxA* 遺伝子を含むゲノムは研究計画立案時よりも大幅に増大していたが、その多くは以前から知られていた高 pH 環境を好む系統に属す細菌のものか、メタゲノムから再構成されたもののいずれかであった。それらはまた、いずれも *Proteobacteria* 門に属す細菌のものであった。収集した *arxA* 遺伝子を含むゲノムについては、各種の系統解析や、関連する遺伝子の存在の解析を実施した。各微生物の基礎的な性質、メタゲノムについては得られた環境条件などの情報を文献上から収集、集約した。これにより、環境から得られた部分的な *arxA* 遺伝子配列が持つ意味を解釈するための基盤が大幅に増強された。また、上記の特徴的な挿入配列については、*arxA* 遺伝子のなかでも特定の系統に属すもののみが例外的に持つことが示唆された。この配列について詳細な解析を行うため、挿入配列を挟む形でこの系統に特異的なプライマーを新たに設計し、湖水と温泉バイオマット試料に適用した。その結果、*arxA* 遺伝子全体を対象としたプライマーセットでは得られなかった配列が新たに検出されたほか、同系統内にも挿入配列を持つものと持たないものが存在することが確認された。

研究期間中に純粋培養化するに至らなかったものの、さらに別の *arxA* 遺伝子保有菌の集積培養にも成功した。目的とする微生物が培養系に含まれているかどうかの判定手

法として、本研究で設計したプライマーによる PCR が有効であることが確認された。今後、この手法を利用して培養条件の最適化を図り、この微生物についても純粋培養化してゲノム解析を実施する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Melody Cabrera Ospino, Hisaya Kojima, Tomohiro Watanabe, Tomoya Iwata, Manabu Fukui, Diversity of anaerobic arsenite-oxidizing bacteria in low-salt environments analyzed with a newly developed PCR-based method. *Limnology* 査読有 2018, Volume 19, Issue 2, 177-183. DOI: 10.1007/s10201-018-0539-1

Kojima Hisaya, Watanabe Miho, Fukui Manabu. *Sulfurivermis fontis* gen. nov., sp. nov., a sulfur-oxidizing autotroph, and proposal of *Thiopfundaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 査読有 2017, Volume 67, Issue 9, 3458-3461. DOI: 10.1099/ijsem.0.002137

Kojima Hisaya, Watanabe Miho, Fukui Manabu. *Sulfuritortus calidifontis* gen. nov., sp. nov., a sulfur oxidizer isolated from a hot spring microbial mat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 査読有 2017, Volume 67, Issue 5, 1355-1358. DOI: 10.1099/ijsem.0.001813

Kojima Hisaya, Fukui Manabu. *Sulfuriflexus mobilis* gen. nov., sp. nov., a sulfur-oxidizing bacterium isolated from a brackish lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 査読有 2016, Volume 66, Issue 9, 3515-3518. DOI: 10.1099/ijsem.0.001227

Kojima Hisaya, Kazuhiro Umezawa, Fukui Manabu. *Caldimicrobium thiodismutans* sp. nov., a sulfur-disproportionating bacterium isolated from a hot spring, and emended description of the genus *Caldimicrobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 査読有 2016, Volume 66, Issue 4, 1828-1831. DOI: 10.1099/ijsem.0.000947

Kazuhiro Umezawa, Tomohiro Watanabe, Aya Miura, Hisaya Kojima, Manabu Fukui. The complete genome sequences of sulfur-oxidizing gammaproteobacteria *Sulfurifustis variabilis* skN76<sup>T</sup> and *Sulfuricaulis limicola* HA5<sup>T</sup>. *Standards in Genomic Sciences* 査読有 2016, Volume 11, Issue 1, 71  
DOI: 10.1186/s40793-016-0196-0

〔学会発表〕(計 1 件)

Melody Cabrera Ospino, Detection of the *arx4* gene encoding arsenite oxidase in various ecosystems by using newly designed PCR primers. ヨーロッパ微生物学連合 2017 大会 (FEMS2017) 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 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