

平成21年 5月13日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770008
 研究課題名 (和文) 主要生体構成元素の循環に関与する培養不能な硫黄酸化細菌の機能解析
 研究課題名 (英文) Study on functions of unculturable sulfur-oxidizing bacteria involved in cycling of major bioelements
 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

研究成果の概要：細胞内に硝酸イオンを蓄積する能力を持つ硫黄酸化細菌は、生体を構成する主要な元素の循環において重要な役割を担っていると考えられている。純粋培養できないこれらの細菌について、遺伝子解析からの機能推定を行った。淡水性の種が持つことが判明していた遺伝子を特異的に定量する手法を新たに確立した。国内外の淡水・汽水湖沼で採取された試料に対し硫黄酸化に関わる遺伝子の解析を行い、配列を特定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	180,000	3,180,000

研究分野：微生物生態学

科研費の分科・細目：基礎生物学／生態・環境

キーワード：硫黄酸化細菌・微生物生態学

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する諸元素のうち、重要性の高いものとして窒素、リン、硫黄、および鉄が挙げられるこれらの元素の供給量は、生物生産を制限する要因の最も主要なもののひとつである。これらの元素の循環における重要な過程の多くは、原核生物特有の活性に依存している。原核生物は機能的に著しく多様であり、単一の生物が複数の元素循環に関与する例も多い。硝酸イオンを呼吸に用いる硫黄酸化細菌は、窒素・硫黄循環のリンクとしての役割を持つ。中でも特に注目されているのが、細胞内に硝酸イオンを蓄積する大型の硫黄酸化細菌である。硝酸イオン蓄積能を持つ

硫黄酸化細菌は海洋や湖沼の底泥堆積物を生息場所とし、現在知られているものは全て互いに近縁で、単系統群を形成している。際立って大きな細胞を持つこれらのバクテリアは、特定の条件下において極めて高い密度で生息し、莫大な現存量を示す。このことから、その活性が環境に与える影響は重大なものであると考えられている。しかし、これらのバクテリアの純粋培養は得られておらず、知見は限られたものに留まっている。特に、淡水環境に生息する種での研究例は非常に少ない。硝酸蓄積硫黄酸化細菌で唯一淡水に生息するのが、淡水 *Thioploca* である。硝酸蓄積硫黄酸化細菌は、多くの生物に対して毒

性をもつ硫化水素を酸化・無毒化するという重要な機能を果たしている。一方で、周辺環境への影響という点では、その窒素循環への関与が重大なものであると指摘されている。硝酸蓄積硫黄酸化細菌は細胞内に硝酸イオンを取り込んで貯蔵することにより、独占的にこれを利用することができる。一般的な硝酸呼吸の最終産物が水に不溶な分子状窒素であるのに対し、海洋に生息する硝酸蓄積硫黄酸化細菌は硝酸イオンを水溶性のアンモニアに還元する。このことは、水界からの窒素除去プロセスである脱窒が硝酸蓄積硫黄酸化細菌によって阻害されることを意味する。この効果が重大なものであることは、海洋の生息地における見積もりで既に示されている。これに対し、淡水種では硝酸還元最終産物自体が特定されておらず、窒素循環への寄与の大きさは不明である。近年、硝酸蓄積硫黄酸化細菌の一種である *Thiomargarita* が、酸素存在下で環境中からリン酸を取り込んで細胞内に蓄積し、嫌気条件でこれを放出することが示された。この活性は海水中からのリン酸の吸収と堆積物中でのリン酸塩の沈殿を引き起こし、結果として水中から利用可能なリンを除去していると考えられている。こうした機能が近縁なバクテリアに共通するものであるかは非常に興味深い点である。しかしながら、海洋に生息する他の硝酸蓄積硫黄酸化細菌の多くはその生息環境で酸素に触れることがなく、一部の種では酸素にさらされることで容易に活性を失うことが示されている。これに対し、淡水 *Thioploca* の生息環境では酸素に接触する機会が存在する。実際に、淡水 *Thioploca* が酸素の存在下でも運動性を失わないことは既に確認されている。こうしたことから、淡水 *Thioploca* がリン酸蓄積能を有している可能性は十分に考えられる。*Thiomargarita* は運動能をもたず、受動的に嫌気/好気条件に交互にさらされているが、淡水 *Thioploca* は能動的に嫌気環境と好気環境を行き来すると考えられる。したがって、仮にリン酸蓄積能が備わっている場合、その意義はより大きなものとなることが考えられる。こうした観点から、淡水性 *Thioploca* の元素循環に関わる機能を推定することには重大な意義があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、淡水 *Thioploca* が持つと予想される各元素循環に関わる機能について検証することを目的とした。各活性の存在に分子生物学的な裏付けを与えるため、各機能に関与する主要な遺伝子の配列決定を行った。得られた結果は、海洋に生息するものとの比較により、硝酸蓄積硫黄酸化細菌の機能に関

する理解を深めるうえで重要なものになると期待される。

3. 研究の方法

本研究では主たる試料採取地を北海道千歳市に位置するオコタンペ湖とした。純粋培養の得られていない *Thioploca* の遺伝子解析を行うためには、混入している他の微生物由来の遺伝子との識別が必須となる。底泥中から採取した *Thioploca* 試料は、濾過滅菌した湖水で繰り返し洗浄して底泥や付着物を可能な限り取り除いて実験に供した。洗浄した *Thioploca* から抽出した DNA を鋳型とし、全バクテリアの 16S リボソーム RNA 遺伝子を PCR によって増幅した。増幅産物に対してクローニング解析を行った。得られた全クローンに対し、既に設計されていた特異的プライマーで PCR を行い、*Thioploca* 由来のクローンであるか否かを判定した。全体に対する *Thioploca* 由来クローンの割合から抽出された DNA の純度を推定した。*Thioploca* 由来のものが大半であることが確認された DNA 試料から、異化的亜硝酸還元によるアンモニア生成に関わる遺伝子 *nrfA* を PCR 増幅し、クローニング解析に供した。26 クローンについて塩基配列を決定し、アミノ酸配を推定した上で系統解析をおこなった。また、同じ試料に対して硫黄酸化に関わる遺伝子のひとつである *soxB* 遺伝子についても同様の解析を行った。*soxB* 遺伝子については、琵琶湖、小川原湖、コンスタンツ湖で採取された *Thioploca* 試料についても同様の解析を行った。このような解析で得られた配列が実際に *Thioploca* 由来のものであることを確認するためのひとつの方法として、16S リボソーム RNA 遺伝子とのコピー数の比を測定することが考えられる。この目的のため、淡水性 *Thioploca* の 16S リボソーム RNA 遺伝子をリアルタイム PCR によって測定するためのプライマーセットの設計と反応条件の検討を行った。

4. 研究成果

オコタンペ湖由来の *Thioploca* 試料について、全バクテリアを対象としたクローニング解析をおこなった。得られた 96 クローンについて、*Thioploca* 特異的なプライマーで PCR をおこなったところ、80 クローンまで増幅が認められた。この結果は抽出された DNA に占める *Thioploca* 由来 DNA の割合の高さを示すものである。*Thioploca* 以外と判定されたクローンについては塩基配列の決定をおこなった。これらのクローンに相当するバクテリアは、*Thioploca* と何らかの相互作用を持っていることが考えられるが、その

ほとんどについては系統関係から機能を推定することができなかった。機能が推定できたものには硫酸還元菌が含まれており、これらのバクテリアが *Thioploca* に硫化水素を供給していることが予想された。*Thioploca* の割合が高いことの示された DNA 試料を基に、*nrfA* 遺伝子のクローニング解析をおこなった。26 クローンについて配列を決定し、系統解析をおこなった。これらのクローンは特定の系統には集中せず、また多くが既知の配列とは大きく異なっていた (図 1)。

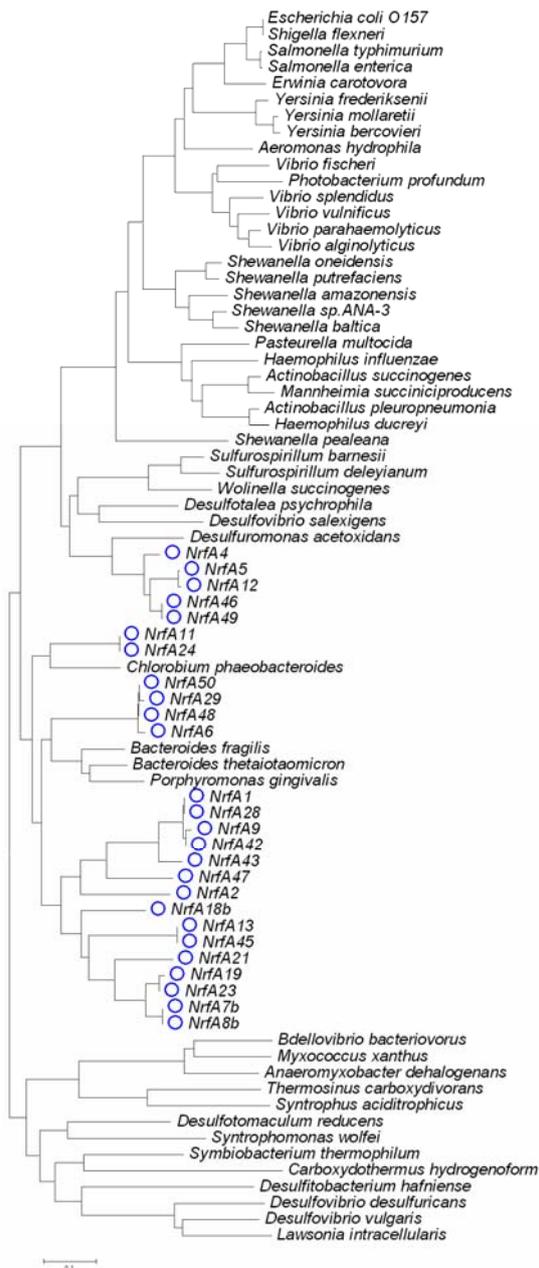


図 1 オコタンペ湖 *Thioploca* 試料から得られた *nrfA* 遺伝子クローンの系統関係。青色の○で示したものが本研究で得られたもの。

系統解析の結果からは、これらのクローンがどのような生物に由来しているかを推定することはできなかった。特定の系統のクローンが多く得られるということもなく、淡水性 *Thioploca* が *nrfA* 遺伝子を持つかどうかを判断することはできなかった。よって、淡水 *Thioploca* の呼吸による硝酸還元最終産物は依然として不明である。今後の展開として、硝酸呼吸の主要な経路である脱窒に関わる遺伝子で同様の解析を行うことが考えられる。また、洗浄した *Thioploca* という、比較的単純な微生物群集構造と予想される試料を解析したにも関わらず、非常に多様かつ新規性の高い *nrfA* 遺伝子が得られたことも興味深い。環境試料を対象とした *nrfA* 遺伝子のクローニング解析の例は極めて少なく、硝酸呼吸によるアンモニア生成を環境中で行っている微生物は従来知られていたものよりはるかに多様であることが考えられる。

ついで、同じ DNA 試料を基にチオ硫酸の酸化に関わる遺伝子である *soxB* 遺伝子についての解析を行った。7 クローンについて塩基配列を決定したところ、それらは全て互いに近縁であった。さらにこれらの配列は海洋堆積物中に生息する硝酸イオン蓄積硫黄酸化細菌 *Beggiatoa* sp. に由来する配列とも近縁であった。これらの配列に最も近縁な純粋培養されている種は *Beggiatoa alba* であり、この結果は 16S リボソーム RNA 遺伝子による系統解析の結果と一致していた (図 2)。

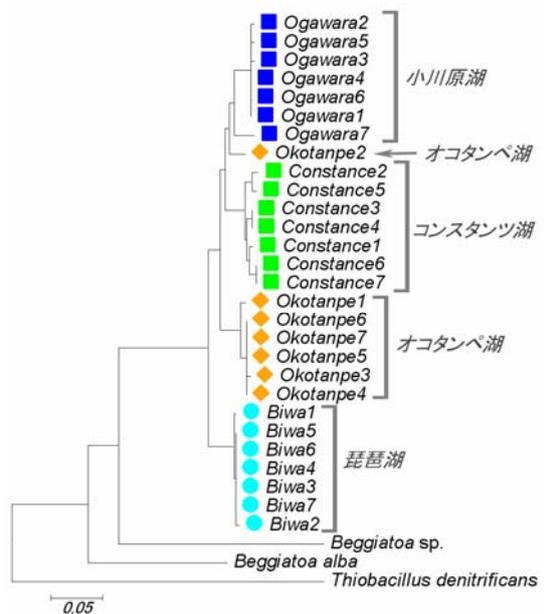


図 2 4つの湖に由来する *Thioploca* 試料から得られた *soxB* 遺伝子クローンの系統関係。

soxB 遺伝子を対象としたクローニング解析は、琵琶湖、小川原湖、コンスタンツ湖で採

取された試料に対しても行った。いずれの湖からも互いに極めて近縁な配列が得られた。また、4つの湖に由来するクローン群はそれぞれ独立したクラスターを形成したが、オコタンペ湖では1クローンだけ小川湖由来クローンに近いものが得られた(図2)。系統解析の結果から、得られた *soxB* 遺伝子の配列が *Thioploca* に由来するものであることが強く示唆された。これにより、淡水性 *Thioploca* が硫酸酸化能を持つことについて、初めての遺伝学的裏づけが得られた。また、バクテリアにおいて複数知られている硫酸酸化経路のうち、*Thioploca* においてどの経路が用いられているかも推定することができた。硫酸酸化に関わる遺伝子の塩基配列が得られたことにより、発現量の解析などへの道が開けた。今後、実際の生息環境における活性の評価に応用することが期待できる。また、16S リボソーム RNA 遺伝子配列では区別がつかないオコタンペ湖と小川湖の *Thioploca* は、*soxB* 遺伝子の配列では区別できることが示された。淡水・汽水環境から検出されている *Thioploca* はいずれも非常に近縁であり、16S リボソーム RNA 遺伝子配列の変異が極めて小さい。淡水 *Thioploca* は、海洋環境において硝酸イオン蓄積能を獲得した硫酸酸化細菌のなかから、唯一淡水環境に進出した系統であると考えられている。その進化と分布拡大の過程を検証する上で、機能遺伝子を用いた系統解析が有効である可能性が示された。

クローニング解析で得られた遺伝子の配列が実際に *Thioploca* に由来するものであることを証明する手段として、元になった DNA 試料中の 16S リボソーム RNA 遺伝子と対象遺伝子の存在量を比較することが考えられる。*Thioploca* が保持している遺伝子は、ゲノム上のコピー数の比に対応した一定の割合で DNA 試料中に含まれ、この比は混入している他の生物由来の DNA には影響されない。淡水性 *Thioploca* 由来の 16S リボソーム RNA 遺伝子については、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションなどによってその起源が確認されている。したがって、それ以外の遺伝子についてはこの遺伝子とのコピー数の比によって検証できる。インターカレーター法を用いたリアルタイム PCR によって *Thioploca* 由来の 16S リボソーム RNA 遺伝子を定量する方法を開発した。いくつかの特異的プライマーの組み合わせを用いて、特異性や検量線の直線性について検討した。スタンダードとしては、クローニング解析の過程で得られた、*Thioploca* 由来の配列が挿入されたプラスミドを用いた。プライマーの組み合わせと反応条件の最適化を行い、実用可能な条件を確定した。琵琶湖由来の試料を

用いて実際の解析を行い、定量が可能であることを確認した。今後、*Thioploca* 由来と推定された *soxB* 遺伝子を定量するための条件を整えば、これが実際に *Thioploca* 由来であるかを検証することが可能となる。このアプローチは今後解析する全ての遺伝子について適用が可能であると期待できる。また、この手法は現場での *Thioploca* 現存量の測定にも応用が可能である。遺伝子の存在から予想された機能については、培養実験で実際にその活性があるかを検証する必要がある。*Thioploca* は純粋培養できないため、培養実験の系には必ず他の微生物が混入してしまう。観察された活性が *Thioploca* によるものであることを示すためには実験に供した試料の純度を支持するデータが必要となる。培養に用いた試料中の、全生物に占める *Thioploca* の割合が十分に高いものであることを示す上でも、リアルタイム PCR による定量は有効な手法となると期待される。

近年、海洋性の硝酸イオン蓄積硫酸酸化細菌のゲノム解析が行われ、このグループのバクテリアが考えられていた以上に多様な機能を持っている可能性が示された。この解析によって、淡水性 *Thioploca* が持っているかどうかを検証すべき遺伝子の数は大幅に増加した。これらの遺伝子については、系統解析によって *Thioploca* 由来かどうかを判定することがある程度可能な状況になっている。本研究において確立された手法によってこれらの遺伝子に関する解析を進めることで、環境中の物質循環における硝酸イオン蓄積硫酸酸化細菌の働きが解明されてゆくものと期待される。

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0件)

[学会発表] (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