

令和元年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14594

研究課題名(和文) 毒性元素の生物利用機構から解き明かす微生物エネルギー代謝の多様性進化

研究課題名(英文) Diversity of microbial transformation pathways for toxic metalloids

研究代表者

濱村 奈津子 (Hamamura, Natsuko)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：50554466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、毒性元素を利用した微生物代謝の多様性進化を解き明かすことを目的に、新規アンチモン代謝細菌群の同定および多様性解析を実施した。酸素条件、炭素源やエネルギー源の異なる条件で集積培養を継続したところ、通性嫌気性アンチモン酸化細菌群、および嫌氣的アンチモン還元培養系の取得に成功した。また、通性嫌気性アンチモン酸化細菌は、同族元素であるヒ素は代謝せず、これまでに同定されている酵素とは異なる代謝経路を有する可能性が示された。本研究の結果から、アンチモン代謝細菌群は同族のヒ素代謝機構と同様に、系統的また生理生態的に多様な細菌群に分布していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチモンはヒ素と同様、生命体のエネルギー源となり得る元素であり、微生物進化において重要な役割を担っていた可能性が大きい。また、アンチモンはレアメタルとして半導体など広い用途に使われ、需要の高まりによる価格高騰や資源の枯渇から、リサイクル技術の開発が望まれている。本研究の成果は、微生物代謝の酸化還元反応によりアンチモンの溶解度や形態を変化させ、バイオメタル生成や固定化による汚染浄化など、バイオ技術の応用展開としても貢献が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Despite their toxicity, microorganisms have developed mechanisms to tolerate and catalyze redox transformation of toxic elements. In this study, soils from an old stibnite mine tailing were examined for the presence of antimony (Sb)-transforming microbial populations. After conducting anaerobic enrichment culturing, a couple of isolates capable of anaerobic and aerobic Sb oxidation were cultivated and their genome sequences were determined. These Sb-oxidizing isolates did not catalyze arsenic oxidation, suggesting the involvement of distinct mechanisms for Sb and As oxidation. In addition, an anaerobic Sb-reducing enrichment culture, consisted of Proteobacteria and Firmicutes-related populations, was also obtained. These results demonstrated that indigenous microorganisms associated with stibnite mine soils are capable of Sb transformations, indicating the potential importance of biological processes in regulating mobility and toxicity of toxic metalloids in polluted environment.

研究分野：微生物生態学

キーワード：毒性元素 微生物金属変換 アンチモン ヒ素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

周期表第15族元素であるヒ素(As)とアンチモン(Sb)は地殻の構成元素であり、原始地球から現在にいたるまで自然界に広く存在している元素群である。同族の窒素やリンは生体必須主要元素であるのに対し、これまでヒ素とアンチモンの生体機能は確認されておらず、逆に極めて有害な作用を示す毒性元素として認識されてきた。しかし、あらゆる生物種の中で唯一微生物は、これら有害元素の毒性から身を守る耐性のみならず、エネルギー源として利用するより積極的な代謝機構も発達させてきた。ヒ素の微生物代謝に関する過去20年間の報告から、ヒ素を利用したエネルギー代謝は好熱性菌やアーキアを含む多様な系統群に分布している起源が古い代謝系であると考えられており（図1）、原始地球に高濃度で存在していた有毒元素が生物に利用されていた事実を示している。

しかし、ヒ素以外の毒性元素の生物利用に関する知見は殆ど無く、例えばアンチモンもヒ素と同様に原始の地球環境に広く存在していた利用可能なエネルギー源であり、アンチモンの酸化還元反応による化学合成独立栄養も理論的に可能である。また、これまでアンチモンの生物利用に関してはほぼ未解明である。

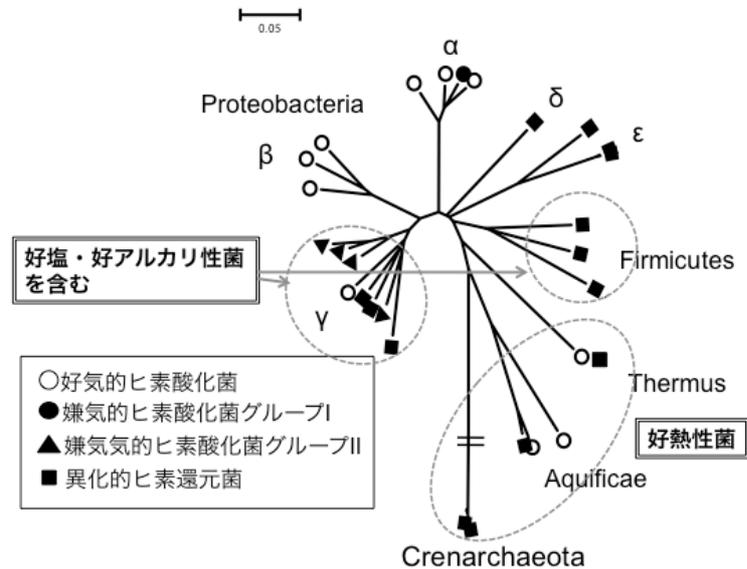


図1：ヒ素エネルギー代謝の系統分布

### 2. 研究の目的

本研究では、微生物エネルギー代謝の多様性進化において、これまで考慮されてこなかった毒性元素の役割を明らかにするために、ヒ素と同族元素であるアンチモンを利用した微生物エネルギー代謝機構の多様性を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では多様なアンチモン代謝菌群を探るため、高アンチモン環境試料からアンチモンの酸化還元によるエネルギー代謝を行う微生物群の分離培養を実施した。環境試料としては、すでに申請者がアンチモン酸化細菌を分離したアンチモン鉱山跡地土壌を用いた（Hamamura et al., 2013）。特に生理生態的に多様なアンチモン代謝菌群を探るため、酸素条件（好氣的・嫌氣的）、炭素源（CO<sub>2</sub>、乳酸、酢酸等）、エネルギー源の異なる条件で集積培養を実施した。培地組成等は、先行研究（Abin and Hollibaugh, 2014; Kulp et al., 2014）やこれまでに申請者が行ってきたヒ素代謝菌と同様に行った（Macur et al., 2004; Hamamura et al., 2013）。アンチモンの酸化還元反応の化学分析による活性モニタリングを継続し、活性を示した集積培養から、限界希釈法や直接プレート培養法により細菌を分離を試みた。

(2) 得られた新規アンチモン代謝細菌群については16S rRNA遺伝子配列を決定により分子系統学的に同定し、これまでに同定されているアンチモン及びヒ素代謝菌群（図1）と比較し分子系統学的な多様性を調べた。また、得られた分離菌群について、これまでに報告のあるアンチモンおよびヒ素代謝酵素遺伝子のスクリーニング、ゲノム配列の解読、および生理学的同定により、有害元素機構の解析を行った。

### 4. 研究成果

本研究では、高濃度アンチモンで汚染した環境試料を摂取源とし、好気・嫌氣的な酸化還元条件での集積培養を実施した。その結果、嫌氣的条件下で5個アンチモンを3個へと還元するアンチモン還元能を示す集積培養系の取得に成功した。本培養系では、アンチモン還元の際に5個アンチモンの減少にともなって生成する3個アンチモンが溶液中からは検出されず、還元されたアンチモンは三酸化アンチモンとして析出することが示された。本コンソーシアの構成細菌群を16S rDNA配列により同定したところ、ヒ素やその他金属の還元菌と系統的類似度の高いFirmicutes門とともに、アンチモン酸化および還元菌として知られているα-Proteobacteriaに近縁な配列が検出された。さらに、直接プレー

ト法やアガーシェイク法などを用いて分離培養を実施したところ、得られた複数の優占種株は単独ではアンチモン還元能を示さなかった。これらの結果より、アンチモン還元反応は複数の細菌群の存在が必須である可能性や、今回分離培養できなかった細菌が関与している可能性が考えられる。

さらに、その他のアンチモン変換活性を示した代謝機構として、嫌気および好気条件下でアンチモン酸化を司る細菌の分離培養に成功した。これまでの先行研究事例では、同族元素の化学特性や環境中での共存性などから、As 代謝細菌による Sb 代謝が報告されている (Lehr et al., 2007)。しかし、本課題で新規に得られた通性嫌気性アンチモン酸化細菌は、好気および嫌気条件下において同族元素であるヒ素は代謝しないことが確認された。また、ゲノム解読を実施したところ、これまでにアンチモン酸化能を示す酵素として同定されているアンチモン酸化酵素(AnoA)の類似配列(Li et al., 2015)は保有しておらず、すでに報告のあるアンチモン酸化経路やヒ素酸化細菌によるアンチモン酸化とは異なる代謝経路を有する可能性が示された。そこで、トランスポゾンを用いた突然変異体の作製を実施したところ、アンチモン代謝能および耐性能が欠損または減少した複数の変異株の取得に成功した。この結果から、アンチモン代謝や耐性には複数の機構が関与している可能性が考えられる。今後これら変異株のトランスポゾン導入遺伝子部位を同定するとともに、さらにアンチモン代謝機構の分子基盤の解明を進めていく予定である。

本課題での成果も含め、アンチモン代謝細菌群が主に鉱山汚染土壌や排水など、高アンチモン汚染環境に広く分布していることが明らかとなって来た。これまで嫌気的アンチモン酸化細菌およびアンチモン還元細菌については未だ報告事例も少なく、代謝経路の全貌も明らかにされていないため、本課題の成果はアンチモン代謝機構の多様性分布に関する新たな知見を提供するものである。本課題で同定されたアンチモン代謝細菌の近縁種には、アンチモン以外の重金属やヒ素を代謝する細菌も含まれており、同族元素のヒ素の微生物代謝と同様にアンチモンの代謝耐性機構も系統的、また生理生態的に多様な Proteobacteria や Firmicutes 門に広く分布していることが明らかとなった。今後さらに有害元素代謝機構の高熱性細菌への分布や、ヒ素やアンチモン代謝の特異性や代謝機構の多様性に関する分子基盤情報が望まれる。

#### <引用文献>

- Abin, C.A., and Hollibaugh, J.T. (2014): Dissimilatory antimonate reduction and production of antimony trioxide microcrystals by a novel microorganism. *Environmental Science & Technology*, 48, 681-688.
- Hamamura, N., Fukushima, K., and Itai, T. (2013): Identification of antimony- and arsenic-oxidizing bacteria associated with antimony mine tailing. *Microbes Environ*, 28, 257-263.
- Kulp, T.R., Miller, L.G., Braiotta, F., Webb, S.M., Kocar, B.D., Blum, J.S., and Oremland, R.S. (2014): Microbiological reduction of Sb(V) in anoxic freshwater sediments. *Environmental Science & Technology*, 48, 218-226.
- Lehr, C.R., Kashyap, D.R., and McDermott, T.R. (2007): New insights into microbial oxidation of antimony and arsenic. *Appl Environ Microbiol*, 73, 2386-2389.
- Li, J., Wang, Q., Li, M., Yang, B., Shi, M., Guo, W. et al. (2015): Proteomics and genetics for identification of a bacterial antimony oxidase in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Science & Technology*, 49, 5980-5989.
- Macur, R.E., Jackson, C.R., Botero, L.M., McDermott, T.R., and Inskeep, W.P. (2004): Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environ Sci Technol*, 38, 104-111.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Kataoka T, Mitsunobu S, Hamamura N. (2018) The influence of chemical form of antimony on soil microbial community structure and arsenite oxidation activity. *Microbes and Environment* 33:214-221.  
DOI:10.1264/jsme2.ME17182 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Yamashita, Y., Hamamura, N. (2018) Characterization and diversity of microbial antimony transformation pathways. The 32nd JSME and 10th ASME, Okinawa, Japan (国際学会)
2. Hamamura, N., Kataoka, T. (2017) Microbial community function and response associated with metalloid redox transformations in the contaminated environment. JpGU-AGU Joint Meeting 2017, Makuhari, Japan (招待講演)
3. Hamamura, N., Mitsunobu, S. (2017) Microbial biotransformation of toxic metalloids and its bioremediation implications. The 14th International Symposium on Persistent Toxic Substances, Nagoya, Japan (国際学会)

4. 濱村奈津子. (2017) 環境攪乱に対する微生物群集応答のダイナミクス:群集レベルの機能発現と遺伝子多様性をつなぐ観点からのアプローチ. 進化群集生態学シンポジウム 2017, Kyoto, Japan (招待講演)
5. Hamamura, N., Mitsunobu, S. (2016) Diversity of microbial metalloid transformation pathways and its geochemical implication Japan Geoscience Union Meeting 2016, Makuhari, Japan
6. Hamamura, N., Utsunomiya, S., Nakano, Y., Mitsunobu, S. (2016) Microbial antimony transformation associated with antimony mine tailing. Goldschmidt 2016, Yokohama, Japan (国際学会)
7. Hamamura, N., Huang, H., Damdinsuren, N. (2016) Diversity of microbial arsenic transformation pathways and community response to arsenic in a saline lake habitat. The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology, Taipei, Taiwan (国際学会)
8. Hamamura, N., Mori, K., Mitsunobu, S. (2015) Microbial transformation of antimony and its geochemical implications. Japan Geoscience Union Meeting 2015, Makuhari, Japan
9. Hamamura, N. (2015) Diversity of microbial arsenic transformation pathways associated with arsenic impacted environments. 4th International Congress on Natural Science, Changhua, Taiwan (国際学会)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~microecol/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

該当無し

### (2) 研究協力者

該当無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。