HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Genomics and proteomics of sulfur-oxidizing bacteria predominant in freshwater lake environments [an abstract of entire text]
Author(s)	渡邉, 友浩
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第11346号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55444
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Watanabe_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

氏 名　　渡 邉 友 浩

学 位 論 文 題 目

Genomics and proteomics of sulfur-oxidizing bacteria
predominant in freshwater lake environments
（淡水湖沼環境で優占する硫黄酸化細菌のゲノミクスおよびプロテオミクス）

Abstract in Japanese

硫黄、窒素、および炭素は、生体を構成・駆動する上で重要な元素であり、その自然環境中での挙動は微生物活動に強く依存する。系統的に極めて多様な化学合成硫黄酸化細菌（SOB）は、これら諸元素の循環をリンクする微生物として地球上に普遍的に生息する。このような特性に加え、その豊富な存在量から、海洋環境に生息する SOB は全球規模での元素循環に大きく貢献すると考えられている。このため、その生態を解明するために主要種の特定ならびにゲノム解析が成されてきた。蓄積してきた SOB のゲノム情報からは、系統ごとに異なる機能が解明されつつある一方で、多様な硫黄酸化経路の存在が見出されてきた。しかし、機能が類似する複数の経路や酵素の存在意義は十分に理解されておらず、重要な研究テーマの一つとなっている。一方で、陸域の元素循環に寄与する淡水湖沼の SOB は、海洋と比べて存在量が少ないことから研究が容易ではなく、現場に生息する系統すら不明瞭であった。一般的に、同じ機能群の細菌であっても、海水と淡水環境では主要種が異なる系統に属することが知られている。このことから類推すると、淡水湖沼には独自の系統の SOB が生息し、特有の性質を有することが推察される。このような SOB のゲノムが解明されることによって、他の環境由来の SOB との比較から、SOB 全体を俯瞰した進化過程を考察することが可能になると期待される。本研究では、淡水湖沼に生息する SOB の系統を特定し、主要種の硫黄酸化経路の特徴をゲノムから見出すことを目的とした。また、プロテオーム解析によりその発現ならびに淡水湖沼の SOB に特有の性質を検討した。

淡水湖沼の主要な SOB を特定するために、部分循環湖の塩川ダム湖（山梨県）の嫌気水層の水試料、地理的位置の異なる 5 つの淡水湖沼（琵琶湖、オコタンペ湖、スカーレン大池、親子池、丸湾大池）の堆積物試料を対象として 4 つの硫黄酸化関連遺伝子のクローニング解析を行った。この結果、いずれの淡水湖沼においても海洋環境とは異なり *Betaproteobacteria* 綱の SOB が優占することが示され、これらは不完全チオ硫酸酸化型の SOB であることが推定された。そして、嫌気水層と堆積物の主要種の 1 つを、それぞれ *Sulfiritalea hydrogenivorans* と *Sulfuricella denitrificans* であると同定した。これらは塩川ダム湖の嫌気水層から単離された SOB であり、本研究の調査地以外の淡水環境からもその存在が見出されている。以上より、これら 2 種を淡水湖沼のモデル SOB として、それぞれの基準株である sk43H と skB26 の完全ゲノム配列を対象にゲノム解析を行った。

sk43H のゲノムは約 3.8 Mb の染色体、skB26 のゲノムは約 3.1 Mb の染色体と約 87 kb のプラスミドから構成されていた。それぞれのゲノムから推定された 3587 と 3073 遺伝子の BLAST 解析を行った結果、それぞれの染色体上の 44 と 53 遺伝子が硫黄酸化に関与するものと推定された。その遺伝子構成から硫黄酸化経路を構築した結果、両株とも同じ硫黄酸化経路を有することが明らかとなった。これは、クローニングで解析した各硫黄酸化遺伝子の系統関係から推定された不完全チオ硫酸酸化型の経路であった。また、他の *Betaproteobacteria* 綱の硫黄酸化細菌のゲノムを含めた比較解析によって、この硫黄酸化経路が淡水性 SOB にのみ保存されていることが明らかになった。一方で、亜硫酸を酸化する 2 つの経路の存在が明らかとなった。

次いで、硫黄酸化関連遺伝子の発現を確認するために skB26 を用いてプロテオーム解析を行った。解析を行う際、skB26 が耐冷性 SOB であることに着目した。湖沼環境における SOB の基質の供給源は湖底で起こる硫酸還元が主であり、湖底付近はしばし低温になる。従って、低温への適応は湖沼環境において SOB が基質にアクセスする上で重要な性質であると考えられる。skB26 を至適温度（22℃）と分離源の温度（5℃）で培養し、タンパク質量を比較することで低温への応答を硫黄酸化経路の発現と共に検討した。この結果、5℃においてリボソームタンパク質、RNA シャペロン、RNA ヘリカーゼ、Sulfur relay タンパク質、そして脂肪酸生合成酵素の 1 つ FabZ の著しい増加が認められた。これらから推定される機能より、正確な翻訳の進行と膜流動性の維持が低温への主な応答で

あると結論した。その他、12 タンパク質の著しい増加が確認されたが、今回の解析だけでは低温耐性との関連付けはできなかった。一方で、硫黄酸化関連タンパク質はリボソームタンパク質に次いで 2 番目に存在量が多い機能群であることが明らかとなった。そして、チオ硫酸を硫酸まで酸化する一連の酵素群の発現が確認された。これは、Sox によるチオ硫酸の不完全酸化、Dsr による元素状硫黄酸化、そして ATP 生成を伴う APS 経路を介した亜硫酸酸化によって構成されていた。

本研究で明らかとなった硫黄酸化経路は、クローニング解析において種を特定することができなかった他のベータプロテオバクテリアでも共通すると考えられる。実際にこのような経路を有する SOB が優占していたことを鑑みると、この硫黄酸化経路は、淡水湖沼環境に適応した SOB が共有する性質であると考えられる。Dsr および ATP 生成を伴う APS 経路を介するチオ硫酸の酸化は、完全チオ硫酸酸化型の経路よりもエネルギー獲得効率が良いと考えられる。従って、この硫黄酸化経路は、無機硫黄化合物の供給が制限される淡水湖沼環境での生存に有利なものと考えられる。