



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Genomic and proteomic study of dissimilatory sulfur metabolism [an abstract of entire text]
Author(s)	梅澤, 和寛
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13109号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70353
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuhiro_Umezawa_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士（環境科学）

氏 名 梅澤 和寛

学 位 論 文 題 名

Genomic and proteomic study of dissimilatory sulfur metabolism
(ゲノミクスおよびプロテオミクスによる異化的硫黄代謝の研究)

硫黄酸化細菌、硫酸還元細菌および硫黄不均化細菌は、無機硫黄化合物を異化的に代謝することで生育に必要なエネルギーを獲得する。硫黄酸化細菌は硫黄化合物を硫酸イオンに酸化し、硫酸還元細菌は硫酸イオンを硫化水素に還元する。これらの機能群による硫黄化合物の酸化・還元の際には、他元素の化合物が電子受容体あるいは電子供与体として用いられる。これに対し、硫黄不均化細菌は単一の硫黄化合物のみからエネルギーを獲得して生育することができる。チオ硫酸や単体硫黄の不均化反応では、最終産物として硫化水素と硫酸イオンが生じる。硫黄不均化細菌の中には、硫黄酸化によっても生育できるもの、硫酸還元によっても生育できるもの、硫黄不均化のみによって生育するものが知られている。硫酸還元菌による硫酸イオンから硫化水素への還元に関与する酵素群はほぼ解明されており、その遺伝子セットはほとんどの硫黄不均化細菌にも保存されている。これらの酵素群は可逆的に作用することが知られており、一部の硫黄酸化細菌は硫黄酸化のためにこれを利用している。一方で、これらの酵素群の硫黄不均化における役割は未だ解明されていない。本研究では、知見の乏しい系統に属する微生物を中心としたゲノム解析とプロテオーム解析を通して、異化的硫黄代謝機構を解明することを目的とした。

*Acidiferrobacterales*目は、硫黄酸化細菌を含む新たな目として2015年に提唱された。この目に属する細菌は遺伝子解析により様々な環境から広く検出されており、その検出頻度の高さから生態学的な重要性も示唆されている。その一方で、純粋培養に基づいて記載されているのはわずか3属3種のみであり、異化的硫黄代謝機構は明らかとなっていない。本研究では、本目に属する硫黄酸化細菌である*Sulfuricaulis limicola* HA5^T株および*Sulfurifustis variabilis* skN76^T株のゲノム解析を行った。その結果、両株とも硫酸還元菌と共通する酵素群を介した硫黄酸化を行うことが明らかとなった。また、それら遺伝子の一部と炭酸固定に関与する遺伝子を重複して有しており、それぞれが系統的に明確に異なることが明らかとなった。

既知の硫黄不均化細菌のほとんどは硫酸還元細菌と近縁であるが、硫酸還元細菌に比べて限られた系統からしか見出されていない。*Nitrospira*門では、硫酸還元細菌の存在が知られている一方で、硫黄不均化細菌は報告されていない。この門には硫黄酸化細菌が含まれることも示唆されており、環境中における硫黄循環に大きな影響を与えていると考えられている。

本研究では、*Nitrospira*門に属する硫黄不均化細菌の集積培養系を確立した。集積培養は、温泉のバイオマットをチオ硫酸不均化細菌用の培地に接種して45°Cで培養することによって行った。数回の継代後に集積培養系からDNAを抽出し、細菌群集構造を解析した。PCRを介した16S rRNA遺伝子配列解析の結果、得られた集積培養系は*Nitrospira*門に属するほぼ1種のみから構成されることが明らかとなった。集積培養系から植え継ぐことによって生理学試験を行ったところ、硫酸還元による生育は認められなかった。これらの結果から、集積培養系の優占種は硫酸還元できない硫黄不均化細菌であると結論づけた。また、集積培養系から抽出したDNAについて直接塩基配列を決定することにより、優占種のドラフトゲノムを得ることに成功した。得られたゲノムは約2.4Mbpと約44kbpの2本のコンティグからなり、保存性の高い遺伝子を全て有していた。これらのことから、得られたゲノムは本細菌の代謝経路を推定するのに十分な完成度を持ったものであると考えられる。ゲノム上の16S rRNA遺伝子に基づく系統解析の結果、本細菌は既知の培養株から独立した系統に位置しており、最近縁種との配列相同性は88%に留まった。その一方で、本細菌と近縁な遺伝子配列は温泉、湖底堆積物や地下水などから検出されていることが明らかとなった。*Nitrospira*門に属する硫黄不均化細菌は環境中に広く分布し、硫黄循環において重要な役割を持っている可能性がある。

硫酸還元もしくは硫黄不均化に特異的に関与する遺伝子を探索するため、比較ゲノム解析を行った。約90種の比較ゲノム解析の結果、硫黄不均化細菌が有しておらず硫酸還元細菌が共通して有する遺伝子は見つからなかった。一方で、硫酸還元を行わない硫黄不均化細菌に特徴的な遺伝子群が見つかった。この遺伝子群には、硫黄の輸送と受渡しを行うタンパク質の遺伝子が含まれていた。以上のことから、硫黄不均化と硫酸還元は同じ酵素群に触媒されるもののその一部で反応が逆向きになっていること、その反応の方向性は硫黄の受け渡しと輸送に関わるタンパク質によって決定づけられている可能性が示された。また、3つの異なる門に属する硫黄不均化細菌は、炭素固定や硝酸還元に関わる遺伝子の多くが共通していた。

Caldimicrobium thiodismutans TF1^T株は、*Thermodesulfobacteria*門に属する好熱性細菌であり、硫黄不均化によってのみ生育する。この株を用いて、チオ硫酸不均化条件および単体硫黄不均化条件で発現するタンパク質を特定するためのプロテオーム解析を行った。その結果、不均化反応の基質によるタンパク質発現パターンの明確な違いは認められなかった。一方、上述の硫黄不均化細菌に特徴的な遺伝子群にコードされたタンパク質はどちらの条件においても高レベルに発現することが明らかとなった。また、硫酸還元に関わる酵素群も不均化反応の基質に依らず高発現しており、この結果は*Proteobacteria*門の細菌での先行研究と一致していた。