HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Phylogeny and diversity of genes for poorly characterized type of arsenite oxidase involved in anaerobic arsenic oxidation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Cabrera Ospino, Melody Christine
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第13309号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71945
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Cabrera Ospino_ Melody Christine_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏　名　Cabrera Ospino, Melody Christine

審査委員　主査　教 授　福井　学
副査　教 授　森川 正章
副査　教 授　山口 良文
副査　助 教　小島 久弥

学 位 論 文 題 名

Phylogeny and diversity of genes for poorly characterized type of arsenite oxidase involved in anaerobic arsenic oxidation
（嫌気的ヒ素酸化に関わる亜ヒ酸酸化酵素遺伝子の系統及び多様性）

ヒ素は地球上に広く分布する半金属元素であり，生物に対して高い毒性を示す。自然環境中でのヒ素の存在形態は主に＋３価【As(Ⅲ)】と＋５価【As(Ⅴ)】であり，無酸素環境においてはAs(Ⅲ)が卓越する。As(Ⅲ)とAs(Ⅴ)の間の変換には，エネルギー獲得にヒ素化合物を利用する微生物の活動が関与し，亜ヒ酸酸化酵素によってAs(Ⅲ)をAs(Ⅴ)に変換するのがヒ素酸化細菌である。また，無酸素条件でのヒ素酸化（嫌気的ヒ素酸化）は，環境中におけるヒ素循環における重要性が示唆されながらもその実態がほとんど不明なプロセスである。嫌気的ヒ素酸化において決定的な役割を果たすと考えられている亜ヒ酸酸化酵素は*arx*遺伝子群によってコードされるが，酸素存在下で機能する別の亜ヒ酸酸化酵素と比較すると基礎的な知見が圧倒的に乏しい。

*arx*遺伝子群の中でも，触媒サブユニットをコードする*arxA*遺伝子はヒ素酸化に不可欠であり，嫌気的ヒ素酸化を行う細菌を検出するためのマーカーとして有効であると期待される。*arxA*遺伝子を検出するための既存のプライマーは，系統的に偏った少数の微生物由来の配列のみによって設計されていたため，より多様な配列を検出することのできる新たなプライマーセットを設計した。さらに，設計したプライマーに改変を加えることによって，多量のサンプルを処理するのに適したより高効率な解析手法を確立した。確立された手法を用いることによって，湖水，鉱泉水，温泉バイオマットから多様な*arxA*遺伝子配列が得ることに成功した。これらの試料は，比較的低い塩濃度と中性付近のpHに特徴づけられ，検出された*arxA*遺伝子配列は，既知の配列の大半を占める好アルカリ・好塩細菌のゲノム上から見出された*arxA*遺伝子と系統的に明確に異なっていた。

これまでに数多くの原核生物のゲノム配列が決定されているなかにあっても，*arx*遺伝子群を持つことが指摘されている微生物種は依然として限られている。未培養微生物を含む公開済みゲノムを改めて精査し、*arx*遺伝子群の系統的分布と多様性について検証した。その結果，*arx*遺伝子およびそれに類似した遺伝子群は、数十の原核生物からのみ見出された。このうちアーキアから見出されたものは，遺伝子クラスターの構造や系統解析の結果から*arx*遺伝子群とは区別されるべきものであることが示された。これらを除外した結果，*arx*遺

伝子群は*Proteobacteria*門の細菌にのみ保持されていることが明らかとなった。また，発現の調整に関与する遺伝子群は一部の系統群では欠損していることも明らかとなった。見出された全ての*arxA*遺伝子について系統解析を行った結果，淡水性の細菌からなる系統が存在することが示された。また，この系統の*arxA*遺伝子は他には見られない特徴的な挿入配列を持つことが明らかとなった。挿入配列を含む領域を増幅するプライマーを設計，これを利用して環境試料を解析することにより，この系統に属すものが必ずしも挿入配列を持つわけではないことを改めて確認した。

*arx*遺伝子群を持つことが示されている細菌は限られているが、その中でもヒ素酸化能を持つことが確認されているのはさらに少数となる。本研究では，当該遺伝子群を有する新たな細菌，M52株を分離した。系統解析の結果，この細菌は*Sterolibacteriaceae*科の新種であることが示唆された。M52株のゲノム上には，亜ヒ酸酸化酵素をコードする遺伝子として*arx*遺伝子群のみが見いだされた。この菌の*arxA*遺伝子は淡水に特徴的な系統に属し，挿入配列を有していた。M52株による亜ヒ酸酸化能を培養実験によって検証した。その結果，本菌株によるヒ素酸化は，低濃度の酸素あるいは硝酸イオンの存在下においてのみ進行し，大気レベルの酸素濃度下では進行しないことが示された。この結果は，ゲノム上に存在する遺伝子から推定される機能と一致していた。

本研究では，様々な観点から大きな注目を集めながらも知見の乏しかった遺伝子群を対象としている。環境中での分布と多様性を解析するための有効な手法の開発に成功した他，多様性に関する知見を大幅に拡大し，低濃度酸素存在下でのヒ素酸化という新たな機能を提唱するに至った。

審査委員一同はこれらの成果を高く評価し，研究遂行の過程における研鑽や単位修得状況等も勘案し，申請者が博士(環境科学)の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。