HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Phylogeny and diversity of genes for poorly characterized type of arsenite oxidase involved in anaerobic arsenic oxidation [an abstract of entire text]
Author(s)	Cabrera Ospino, Melody Christine
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13309号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71946
Type	doctoral thesis
File Information	Cabrera Ospino_ Melody Christine_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 約

氏 名　Cabrera Ospino, Melody Christine

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おり，その検出能力に限界があると予想される。系統的により多様な配列を検出するため，新たなプライマーセットの設計を行った。公共データベース上から利用可能な*arxA*遺伝子配列の全てを収集し，これをもとに新たなプライマーを設計した。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の開発を目指した。設計されたプライマーの有効性は，まず純粋培養株を用いた実験によって確認された。その後，確立された高効率な解析手法を湖水，鉱泉水，温泉バイオマットの試料に適用した。これらに試料からは，多様な*arxA*遺伝子配列が得られ，開発したプライマーおよび解析手法が有効であることが示された。解析に供した試料は，比較的低い塩濃度と中性付近のpHに特徴づけられる。これらの試料から検出された*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。

*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。*arx*遺伝子群のうち，発現の調整に関与する遺伝子群*arxAXSR*は一部の系統群（*Oceanospirillales*目）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*遺伝子と*arxB*遺伝子について系統解析を行った結果，両者の間で非常によく一致する結果が得られ，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。この挿入配列を含む領域を増幅するプライマーを新たに設計し，環境試料（温泉バイオマットおよび湖水）中における多様性の解析を行った。その結果，淡水に特異的な系統に属す*arxA*遺伝子が必ずしも挿入配列を持つわけではないこと，挿入配列の長さにもバリエーションがあることが改めて確認された。

*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。当該遺伝子群を有する新たなヒ素酸化細菌を探索することを目的に，培養実験を行った。温泉バイオマットを接種源とし，ヒ素を加えた培地を用いて無酸素条件下で集積培養系を確立した。集積培養系内では亜ヒ酸酸化からヒ酸への酸化が行われ，また*arxA*遺伝子を有する菌が増殖していることが確認された。この集積培養系内の微生物群集構造を16S rRNA遺伝子配列によって解析したところ，*Sterolibacteriaceae*科の硫黄酸化細菌に近縁な微生物が集積されていることが明らかとなった。この硫黄酸化細菌は*arx*遺伝子を持つことが知られているため，その分離に用いられた手法を集積培養に適用した。その結果，目的とする新規微生物M52株の分離に成功した。詳細な系統解析の結果，この細菌は*Sterolibacteriaceae*科の新種であることが示唆された。M52株が有する遺伝子を特定するため，そのゲノム配列を解読した。得られたドラフトゲノム上には*arx*遺伝子群が見いだされた。またその*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，本菌株は実際に亜ヒ酸酸化を行うことが示された。また，その亜ヒ酸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が明らかとなった。この結果は，M52株のゲノム上に存在する酸素呼吸及び窒素呼吸に関わる遺伝子から推定される機能と一致していた。本菌株のゲノム中には，*arx*遺伝子群以外には亜ヒ酸酸化に関わる遺伝子は見出されなかった。これにより，観察されたM52株による亜ヒ酸酸化には*arx*遺伝子が関わっていることが示唆された。