

	たかはし ゆい
氏名	高橋 唯
授与学位	博士 (環境科学)
学位記番号	環博第25号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院環境科学研究科 (博士課程) 環境科学専攻
学位論文題目	硫酸還元能を有する 新規 <i>Clostridium</i> 属細菌の単離および特性評価
指導教員	東北大学教授 井上 千弘
論文審査委員	主査 東北大学教授 井上 千弘 東北大学教授 彼谷 邦光 東北大学教授 中山 亨 (工学研究科)

論文内容要旨

<緒論>

硫黄は生命体にとって必須元素であり、化学的および生物的に変換されながら環境中を循環している。環境中における硫化水素の発生は、大部分が硫酸還元細菌によるものとされてきたが、近年では新規細菌の単離報告とともに、硫黄循環の還元過程に関与する微生物が多岐にわたることが明らかになっている。

硫酸還元細菌は、グラム陰性およびグラム陽性孢子形成の真正細菌およびアーキアの1属に分布しており、グラム陽性孢子形成真正細菌の硫酸還元細菌はすべて、Firmicutes 門に分類される。

Firmicutes 門には嫌気性細菌である *Clostridium* 属も属している。*Clostridium* 属には様々な菌株が分類された最大の嫌気性細菌グループである。それらの細菌は類似の細胞形態など表現特性を持つが、遺伝子解析より異なる系統に属することが明らかにされている。Collins らは、*Clostridium* 属細菌を関連する細菌属とともに19のクラスターに分割したが、遺伝子解析による分類と表現特性による分類が混在し、その系統分類は混迷を極めていた。そのひとつに *Clostridium* 属細菌の硫黄化合物還元能特性が挙げられる。*Clostridium* 属は異化的硫酸還元を行わないと定義されている。しかし、硫酸還元細菌である *Desulfotomaculum* 属細菌の一部が系統分類上 *Clostridium* 属に入り込んでおり、これについての改変や検討はなされていない。一方で、*Clostridium* 属細菌による元素硫黄やチオ硫酸の還元が報告され、さらにチオ硫酸還元細菌の新属が Firmicutes 門内に分散していることが明らかとなった。本研究では、環境試料から *Clostridium* 属細菌に近縁な硫酸還元能を有する単離株を得た。この単離株の示す硫酸還元活性は、遺伝子解析から得られた *Clostridium* 属近縁という結果と矛盾する。よって、得られた単離株について16S rDNA 配列による系統解析および硫酸還元能の評価、硫酸還元に関する機能遺伝子の検討を行い、さらに近縁基準株との DNA 全体および生理的特徴の比較を行った結果、これらの単離株を *Clostridium* 属の新種細菌として提案した。同様に既存のグラム陽性孢子形成硫酸還元細菌である *Desulfotomaculum guttoideum* について、混乱した系統分類を改め *Clostridium* 属への再分類の提案を目的とした。

また、硫酸還元細菌の工業的利用として坑废水处理や難分解性有機物の分解などを目的とした研究が進められているが、その利用範囲は極めて限定されたものとなっている。そこで本研究では、硫酸還元細菌の新たな利用法のひとつとして、太陽光を利用した光触媒による硫化水素からの水素発生機

構への適用を提案した。水素発生後のポリ硫化物を硫酸還元細菌により硫化水素に変換し、再供給を目的として、環境試料より得た集積培養菌を用いたポリ硫化物の還元実験を行い、その還元能力の検討を行った。

<硫酸還元細菌によるポリ硫化物の還元>

国内 2 カ所の環境試料を用いて硫酸還元条件下において得られた集積培養に、ポリ硫化物溶液を添加し培養実験を行った結果、硫化水素生成が認められ硫酸還元細菌によるポリ硫化物還元が実験的に確認された。最も高いポリ硫化物還元能を示した集積培養 T2 を用いて、ポリ硫化物源および初期添加量、電子供与体の検討を行った。集積培養 T2 は異なるポリ硫化物を還元することができ、光触媒による水素生成後の溶液中に存在するポリ硫化物も還元した(Fig.1)。また、乳酸を始めとした様々な有機物を電子供与体として利用可能であった。初期ポリ硫化物添加量には最適値が存在し、10mM を超える濃度では微生物に対する阻害が認められた。さらに、1L リアクターを用いた長期硫化水素生成実験においても、pH、硫化水素濃度、ポリ硫化物濃度等の培養条件を調整することにより 1 ヶ月にわたる硫化水素生成を示した。これらの培養実験から得られた集積培養 T2 による硫化水素生成速度を基に、光触媒による水素生成システムの試算を行ったところ、水素生成装置と比較して、硫酸還元細菌の培養槽の大きさはバランスのとれるものであり、また下水汚泥から十分な有機物供給が可能であるが示唆された。すなわち、硫酸還元細菌と光触媒を組み合わせた水素生成システムは有効であることが示された。

集積培養 T2 から硫酸還元細菌の単離・同定を行った結果、得られた単離株は *Clostridium* 属細菌に分類された。*Clostridium* 属細菌は、元素硫黄を還元することができるため、既存の硫酸還元細菌である *D. desulfuricans* よりも高いポリ硫化物活性を示したものと考えられる。しかし、*Clostridium* 属細菌は異化的硫酸還元を行わないと定義されており、本研究において *Clostridium* 属近縁株が硫酸還元条件下の集積培養から単離されたことは、*Clostridium* 属の定義に矛盾し、より詳細な微生物学的検討を要するものであった。

<環境サンプルからの *Clostridium* 属近縁硫酸還元細菌の単離および特性評価>

国内 6 箇所の環境試料から計 25 株の硫酸還元細菌を単離し、16S rDNA を用いた遺伝子解析を行ったところ、既知の *Clostridium* 属細菌株と高い相同性を示す単離株が得られた。これらの菌株は *Clostridium* 属内において 3 つのグループに分割され、それらの 1 つは *Clostridia* クラスタ XIVa に属し、既存のグラム陽性孢子形成硫酸還元細菌である *D. guttoideum* と近縁であった(Fig.2)。また他の 2 つのグループは、多系統から成る *Clostridium* 属の中でコアグループ (*Clostridia* クラスタ I) に含まれる菌種と近縁であったが、*Clostridium* 属細菌は異化的硫酸還元を行わないと定義されており、単離株の性質とは矛盾するため、既知の硫酸還元細菌および近縁な *Clostridium* 属細菌を含めた培養実験を行った。その結果、獲得した単離株は既知の硫酸還元細菌には及ばないが硫酸還元活性を示し、それに伴う増殖が確認された(Fig.3)。それらの硫酸還元活性は系統分類上 *Clostridium* 属に分類される *D. guttoideum* と同等であった。一方、比較に用いた近縁種である *Clostridium* 属細菌の培養では、硫酸還元を示す硫化鉄沈殿は形成されず、単離株と近縁 *Clostridium* 属株との違いが明らかになった。

単離株の代表株として K311 および U42 株について、硫酸還元に関与する機能遺伝子の検出を試み

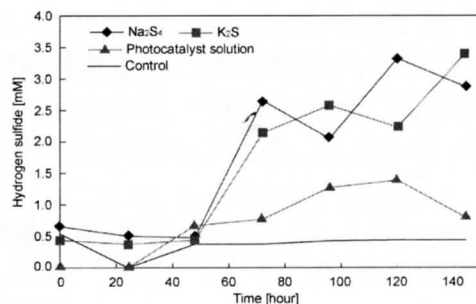


Fig.1: Hydrogen sulfide production from polysulfide solutions by enrichment culture T2.

たが、既存の硫酸還元細菌と類似の機能遺伝子配列は検出されなかった。また、同様に系統分類上、*Clostridium* 属に近縁なグラム陽性孢子形成硫酸還元細菌である *D. guttoideum* についても、機能遺伝子は検出されなかった。これらの菌株は、硫酸還元細菌に特異的な阻害剤であるモリブデン酸イオンを添加した培養において、既存の硫酸還元細菌のように阻害されず、また、その際の増殖量には大きな差異は見られなかった。以上のことは、*D. guttoideum* を含め、本研究で単離された *Clostridium* 属近縁硫酸還元細菌は、既存の硫酸還元細菌とは異なる硫酸還元メカニズムを有していることを示唆するものであった。一方、硫酸還元活性以外の単離株の特性は、桿菌でありグラム染色陽性、孢子形成し

発酵による増殖が可能であるという *Clostridium* 属細菌に準じた性質が観察された。したがって、これまで論じられてきたグラム陽性孢子形成硫酸還元細菌とは異なる硫酸還元細菌のグループが、*Clostridium* 属内に存在することが明らかになった。

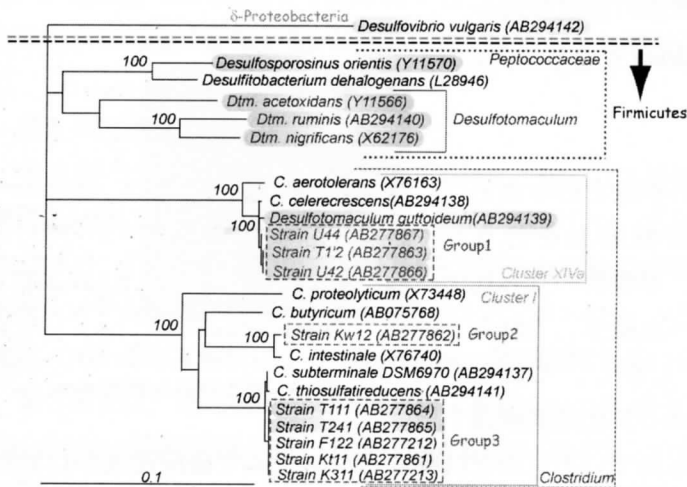


Fig.2: Phylogenetic tree isolates within genus *Clostridium* and relatives based on 16S rDNA sequence analysis. Clusters indicate the Clostridia groups within the genus *Clostridium* and related genera. (Collins et al., 1994, "Clostridia cluster" indicated in this thesis). Branch length is proportional to the number of bases. The number at the branch nodes indicates bootstrap confidence values (%) based on 1000 replicates. The scale bar denotes 0.1 base changes per nucleotide position.

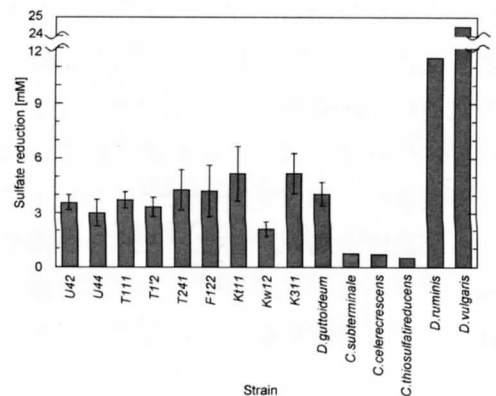


Fig.3: Amount of sulfate reduced by isolates and type strains. (Error bar indicates standard error from ten cultivations with the exception of type strains.)

<硫酸還元能を有する新種 *Clostridium* 属細菌の提案>

異なる分類グループに属する単離株 2 株(K311 および U42)について、より詳細な検討を行った。

単離株 K311 の近縁である *C. subterminale* および *C. thiosulfatireducens* と細胞の特徴および発酵基質利用性を比較すると、*C. thiosulfatireducens* が高いアミノ酸利用性を示すことを除いて顕著な差は見られなかった。しかし、これらの菌株間の DNA 相同性は、単離株 K311 と *C. subterminale* の相同性および K311 株と *C. thiosulfatireducens* の相同性は、それぞれ 55%, 63%と算出された。これは、種分化の基準 (相同性 70%以下) に対し十分に小さいものであり、単離株 K311 は新種であると判断することができる。そこで単離株 K311 を *Clostridium shinakium* と命名した。

単離株 U42 と近縁基準株である *C. celerecrescens* および *D. guttoideum* では、細胞形態および発酵基質利用性において菌株間で大きな違いが見られ、さらに単離株 U42 と *C. celerecrescens* の相同性および U42 株と *D. guttoideum* の相同性は、それぞれ 59%, 60%と算出された。以上のことから、単離株 U42 は、近縁基準株とは全く異なる新種であると判断でき、*Clostridium yuzawans* と命名した。

単離株 U42 の近縁基準株である *D. guttoideum* は、グラム陽性孢子形成硫酸還元菌 *Desulfotomaculum* 属の新種として単離されたが、16S rDNA による系統分類上では Clostridia クラスタ XIVa に属し、また、その硫酸還元能および発酵性が疑問視され、再分類が提案されているものの詳細な検討が行われていない細菌であった。しかし本論文において単離株 U42 の近縁基準株として検討した結果、*D.*

guttoideum は明確な硫酸還元能を示し、硫酸還元に伴い増殖した。また、利用できる基質の種類は少ないものの、高い糖類の発酵性を示し、近縁種である *C. celerecrescens* との DNA 相同性は 66% と算出された。したがって *D. guttoideum* は、単離株 U42 と同様に *Clostridium* 属に属する硫酸還元細菌であると判断される。しかしながら系統解析における分類を尊重し、本菌株は *Clostridium* 属に属するべきであり、さらに本研究において硫酸還元能を有する *Clostridium* 属細菌の存在が明らかになったことを踏まえ、*Clostridium guttoideum* と改名して、*Clostridium* 属に再分類することを提案した。

<結論>

環境試料から硫酸還元条件下にて微生物の単離を行ったところ、*Clostridium* 属の定義に反した、硫酸還元を行う *Clostridium* 属細菌の存在が明らかになった。単離株のうち代表 2 株について既存種との詳細な比較を行った結果、これらの 2 株は新種細菌であると判断された。しかし、これら *Clostridium* 属に属する硫酸還元細菌には既知の異化的硫酸還元酵素遺伝子群は見出されず、これまで知られているものとは異なるシステムで硫酸還元が行われている可能性が高い。また、これらの細菌は高いポリ硫化物還元を示し、光触媒を用いた太陽光による硫化水素からの水素生成システムの確立に有効であると考えられ、新たな硫酸還元細菌の利用性を確立できる可能性を秘めていることが明らかになった。

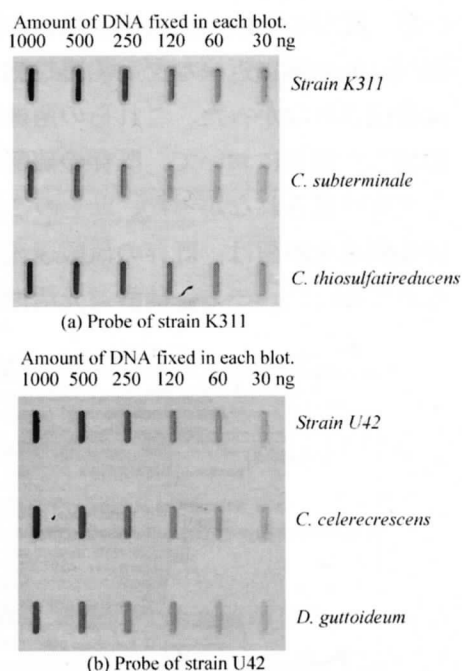


Fig.4 : DNA-DNA hybridization.

論文審査結果の要旨

硫酸還元細菌は嫌気的な環境に広く存在し、生物圏における硫黄化合物の循環に重要な役割を果たしているが、その工学的な利用は極めて限定されたものになっている。一方、硫酸還元細菌は細菌の系統分類上いくつかのグループに分けられるが、これまでグラム陽性孢子形成細菌として代表的な *Clostridium* 属に属するものは報告されていない。本論文は、環境試料より得られた硫酸還元能を示す細菌が *Clostridium* 属の新種細菌であることを明らかにするとともに、この細菌の保有するポリ硫化物還元能力を光触媒による硫化水素からの水素生成システムに適用することを検討した結果をまとめたものであり、全5章よりなる。

第1章は緒論である。

第2章では、環境試料より硫酸還元条件にて得られた集積培養を用いたポリ硫化物還元実験を行い、硫酸還元細菌によるポリ硫化物還元を実験的に確認した。また、培養条件を変化させたポリ硫化物還元実験および1Lリアクターを用いた長期硫化水素生成実験の結果、硫酸還元細菌と光触媒を組み合わせた水素生成システムが成立可能であることを示した。さらにこの集積培養系より得られた硫酸還元能を示す単離株が、16S rDNA 解析により *Clostridium* 属細菌株と高い相同性を有することを示した。

第3章では、国内数箇所の環境試料より得られた硫酸還元能を示す単離株について、これらが既知の *Clostridium* 属細菌株と高い16S rDNA 配列の相同性を示す一方で、既知硫酸還元細菌には及ばないものの硫酸還元活性を示し、それに伴う増殖を行うことを確認した。また、単離株のうち代表2株について、既存の硫酸還元酵素遺伝子群と類似の配列を有さないこと、硫酸還元細菌に特異的な阻害剤であるモリブデン酸イオンによる阻害挙動に違いのあることを示し、単離された *Clostridium* 属近縁硫酸還元細菌は、既存の硫酸還元細菌とは異なる硫酸還元メカニズムを有していることを推測した。

第4章では、第3章で検討した代表株2株の生理学的特徴について、既存種との詳細な比較を行った。また既存種とのDNAの相同性を検討し、これらの2株と既存種との相同性が種分化の基準である70%を下回ったことから、*Clostridium* 属の新種細菌であることを明らかにした。

第5章は結論である。

以上要するに本論文は、従来の *Clostridium* 属の定義に反した硫酸還元を行う *Clostridium* 属細菌の存在を明らかにし、*Clostridium* 属細菌ならびに硫酸還元細菌について新たな知見を提示するとともに、光触媒を用いた太陽光による硫化水素からの水素生成システムにこれらの細菌が保有するポリ硫化物還元能力を適用可能であることを示したものであり、環境科学並びに微生物学の発展に寄与することが少なくない。

よって、本論文は博士（環境科学）の学位論文として合格と認める。