

# 結晶性酸化鉄を還元する新規な微生物の分離培養と代謝メカニズムの解明

青柳 智 (石巻専修大学共創研究センター、現 産業技術総合研究所環境創生研究部門)

e-mail: aoyagi-to@aist.go.jp

## 背景と目的

鉄は地殻構成元素の第4位であり、地球の大部分を占める嫌気土壌圏には様々な結晶性酸化鉄が豊富に存在する。そのため、その生物学的還元反応は地球の炭素・エネルギー循環を理解する上で重要であるものの、結晶性酸化鉄を還元する微生物に関する知見は乏しい。我々はこれまでに様々な自然環境試料を接種源に結晶性酸化鉄 (Goethite, Hematite, Lepidocrocite, Magnetite) による集積培養系を構築し、そこから新規な鉄還元菌6種を分離培養してきた。これらの新規な細菌は、結晶性酸化鉄に電子を伝達する特別な代謝系を持つことにより、貧栄養環境下においても生き続けられると予想される。本研究は、結晶性酸化鉄での集積培養系から分離したDeltaproteobacteria綱の新規細菌6種の生理学的特徴付けとゲノム解読による還元メカニズムの解明、加えて、さらなる新規な当該微生物の高度集積・分離培養を試みた。ここでは分離菌の生理学的特徴付けとゲノム解読の結果について報告する。

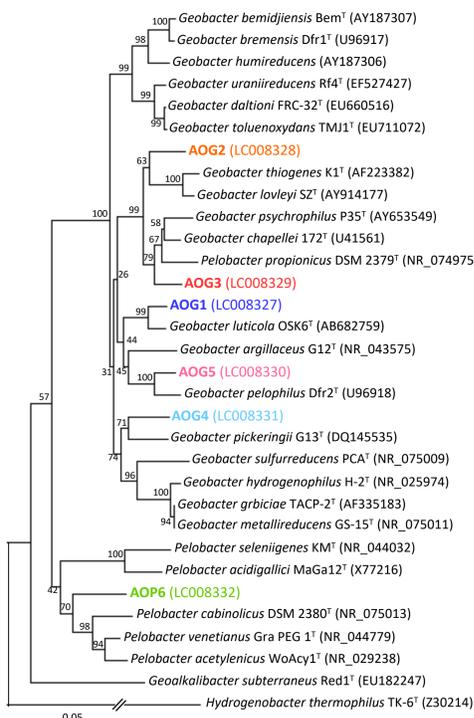
### ● 土壌圏に存在する様々な結晶性酸化鉄

Mineral	Oxyhydroxides Formula	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol)	Mineral	Oxides Formula	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol)
Goethite	$\alpha$ -FeOOH	-488.9	Hematite	$\alpha$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-742.8
Akageneite	$\beta$ -FeOOH	-752.7	Ferrihydrite	Fe <sub>3</sub> HO <sub>8</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-699.0
Lepidocrocite	$\gamma$ -FeOOH	-477.7	Magnetite	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-1016.1
Feroxyhyte	$\delta$ '-FeOOH	not known	Maghemite	$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-711.1

Schwertmann and Cornell, Iron oxides in the laboratory, (2000)

## 材料と方法

### 分離菌の系統学的位置



T. Hori, T. Aoyagi, et al., Front. in Microbiol. (2015)

### 実験1 結晶性酸化鉄での培養試験

#### 培養条件

- 電子受容体: Goethite (20 mM), Hematite (10 mM), Lepidocrocite (20 mM), Magnetite (10 mM)
- 電子供与体: 酢酸 (5 mM)
- 培養期間: 30日 (菌体量を一定にして培養開始)
- 培養温度: 25°C (静置)
- 気相: N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80%/20%)

#### 分析項目

- 鉄還元: 高濃度塩酸による鉄抽出、フェロジン法での二価鉄・全鉄の定量
- 酢酸酸化: HPLCによる酢酸の定量

#### 対照区

- 既知菌3種: *Geobacter sulfurreducens*, *G. bemidjiensis*, *G. pelophilus*
- 菌体無添加系および各菌をオートクレーブ処理し添加した滅菌系を用意

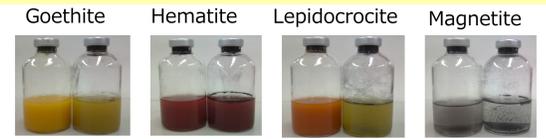


写真: 分離菌を結晶性酸化鉄で培養する前 (左) と6ヶ月以上培養した後 (右)

### 実験2 ゲノム解読

#### ライブラリ

- Paired-end library: insert size ~500 bp
- Mate-paired library: insert size ~3,100 bp

シーケンス: MiSeq (Illumina)、250 x 250 bp  
アセンブラー: allpathslg ver.46449



#### コンプリートゲノム解読 (AOP6のみ)

- プレアセンブラー: Unicycler ver.0.4.8
- アセンブラー: SPAdes ver.3.13.0
- ギャップクローズ: PCR/サンガーシーケンス 3730xl (ABI)
- アノテーション: DFAST ver.1.2.2

## 結果と考察

### (1-1) 高濃度塩酸による結晶性酸化鉄抽出の最適化

初めに結晶性酸化鉄の還元を評価するための鉄抽出方法を検討した。土壌等の環境試料では0.5N塩酸により鉄を抽出するが、この方法では結晶性酸化鉄はほとんど抽出されないためである。ここでは、4種の結晶性酸化鉄 (Goethite [20 mM], Hematite [10 mM], Lepidocrocite [20 mM], Magnetite [10 mM]) に対し、2N、2.5N、3N、6Nの塩酸で抽出を行い、それぞれの二価鉄および全鉄を定量した。

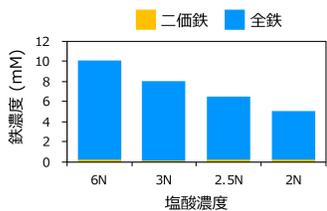


図: 異なる塩酸濃度で抽出した際の10mM Hematiteの二価鉄、全鉄濃度

- Hematite, Lepidocrocite, Magnetiteは高濃度の塩酸により鉄の抽出効率が向上し、6Nで投入した鉄濃度と同等の全鉄の抽出を達成
- Goethiteは上記の3種ほどではないが、高濃度塩酸により抽出効率が向上

### (1-2) 結晶性酸化鉄に対する分離菌の還元能

分離菌6種は4種の結晶性酸化鉄に対して還元活性を示し、既知鉄還元菌 *G. sulfurreducens* や *G. bemidjiensis*, *G. pelophilus* よりも高い濃度の二価鉄の生成が観察されたが、AOG3, AOG4はいずれもLepidocrociteに対する還元活性のみ既知鉄還元菌よりも低かった。一方で、AOG1はLepidocrociteに対して、AOG5はGoethite, Hematite, Lepidocrociteに対して、既知鉄還元菌と比べて2~4倍の二価鉄が生成した。このことは、分離菌がこれまで知られていない細胞外への電子伝達機構を有することを強く示唆している。

### (2-1) 分離菌のドラフトゲノムアセンブル

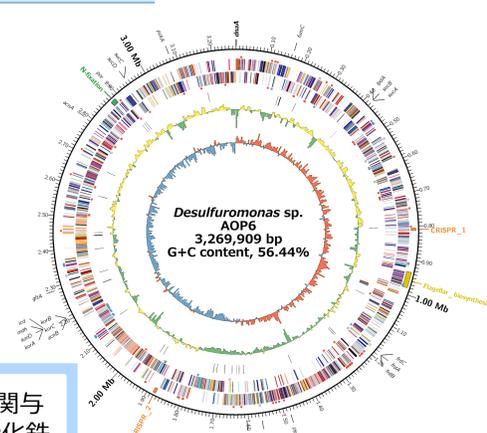
PE/MP	AOG1		AOG2		AOG3	
	PE	MP	PE	MP	PE	MP
Number of reads	1,950,584	800,232	2,122,640	725,682	1,981,504	836,208
Sequence coverage	111.2	49.5	106.6	42.3	84.2	35.4
Number of valid pairs assembled	925,639	367,461	993,962	325,895	848,690	312,067
Total length	3,755,042		4,073,310		4,483,750	
Number of contigs	9		8		9	
Largest contig	1,239,746		2,483,994		2,685,659	
GC (%)	57.37		57.2		56.97	
N50	1,125,079		2,483,994		2,685,659	

\* AOG4, AOG5は現在データ取得中

### (2-2) AOP6コンプリートゲノム解析

環状ゲノムサイズ: 3,269,909 bp

GC含量: 56.44%      CDS数: 3,000  
rRNA数: 2            type IV pili CDS数: 31  
tRNA数: 50            c-type cytochrome  
CRISPR 様座位数: 2      CDS数: 71



Y. Guo, T. Aoyagi, et al., Microbiol. Resour. Announc. (2020)

結晶性酸化鉄への電子伝達メカニズムは未知遺伝子が関与する可能性が高い。今後、取得したゲノム情報と結晶性酸化鉄での培養試験を融合させた比較ゲノムや網羅的遺伝子発現解析により、分離菌の代謝メカニズムの解明を進めてゆく。

## まとめと展望

- 分離菌AOG5は、結晶性酸化鉄に対して高い還元活性を有し、特に高結晶性のGoethiteとHematiteを唯一還元  
→ 結晶性酸化鉄への電子伝達のメカニズムをゲノム情報を基に解明してゆく