



Title	二種の高濃度セレン酸還元細菌のセレン酸還元関連遺伝子群の解析
Author(s)	黒田, 真史
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1682
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

二種の高濃度セレン酸還元細菌の
セレン酸還元関連遺伝子群の解析

2011

大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻

黒田 真史

博士論文

二種の高濃度セレン酸還元細菌の
セレン酸還元関連遺伝子群の解析

2011

大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻

黒田 真史

目次

緒論	1
第 1 章 セレン酸還元細菌とそのセレン酸還元機構に関する既往研究	8
第 1 節 緒言	
第 2 節 高濃度セレン酸を還元可能なセレン酸還元細菌についての既往研究	
第 3 節 セレン酸還元機構に関する分子生物学的研究	
第 4 節 要約	
第 2 章 分子生物学的手法による SF-1 株の系統学的分類・同定	17
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 5 節 要約	
第 3 章 <i>Bacillus selenatarsenatis</i> SF-1 のセレン酸還元酵素遺伝子群の単離及び解析	27
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 5 節 要約	

第 4 章	<i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-I の単離及び特徴付け	43
第 1 節	緒言	
第 2 節	実験材料及び方法	
第 3 節	結果	
第 4 節	考察	
第 5 節	要約	
第 5 章	<i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の単離及び解析	60
第 1 節	緒言	
第 2 節	実験材料及び方法	
第 3 節	結果	
第 4 節	考察	
第 5 節	要約	
	総括ならびに結論	78
	参考文献	84
	謝辞	96
	本論文に関する報文	97

緒論

日本は 2011 年現在、国内総生産世界第三位の経済大国であり、特に世界で高く評価される自動車や電子機器の製造業は、基幹産業として日本の経済を支えている。加えて、近年は化石燃料の枯渇と地球温暖化ガスによる気候変動への懸念を背景に、日本の得意とする低燃費自動車等の省エネルギー製品への需要が世界的に高まっている。さらには、2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災を発端とする東京電力福島第一原子力発電所の事故を契機として、太陽光発電等の再生可能エネルギー生産技術や、複雑化する電力需給をコンピュータにより高度に管理する技術の開発の加速化が期待されており、今後も日本は先端分野において、世界で中心的な役割を果たしていかなければならない。

このような高機能製品の製造に欠かせない原料がレアメタルである。レアメタルは、日本では「地球上の存在量が稀であるか、技術的・経済的な理由で抽出困難な金属のうち、現在工業用需要があり今後も需要があるものと、今後の技術革新に伴い新たな工業用需要が予測されるもの」と定義され、現在、Fig. 1 に示す 47 元素が指定されている（総合資源エネルギー調査会鉱業分科会レアメタル対策部会, 2007）。日本には良質なレアメタルの鉱山が存在しないために、レアメタル資源の確保の大部分を輸入に頼っているが、2010 年に尖閣諸島問題に関連して中国が日本に対する希土類の輸出を制限したことによって顕在化したように、レアメタル資源を過度に他国に依存することは安全保障上のリスクとなり得る。一方、レアメタルを含む製品の製造工程でのロスや、使用済みの製品としての廃棄により、利用過程で多くのレアメタルが希薄化し、経済的に再利用困難な状態で放置されている。レアメタルは枯渇性資源であるため、このような高エントロピー状態からの回収技術を確立し、資源の循環を促進することが極めて重要である。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	57-71 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	89-103 Ac	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt									

Lanthanoids	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu
Actinoids	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr

Common metals
 Rare metals

Fig. 1. Common metals and rare metals on the periodic table.

Table 1. Common selenium compounds in the environment

Name	Formula	Where found
Selenides (-II)	Se^{2-}	Reducing environments, e.g., soils. Forms metal complexes; highly immobile.
Dimethylselenide (DMSe)	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$	Gas formed by volatilization from soil bacteria and fungi.
Dimethyldiselenide (DMDSe)	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$	Gas formed by volatilization from plants.
Dimethylselenone	$(\text{CH}_3)_2\text{SeO}_2$	Volatile metabolite, possibly formed as a final intermediate prior to reduction to DMSe.
Hydrogen selenide	H_2Se	Gas, unstable in moist air; decomposes to Se^0 in water.
Selenocysteine	$\text{CH}_2(\text{SeH})\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$	Amino acid present in several enzymes.
Elemental Selenium (0)	Se^0	Stable in reducing environments; (a) red crystalline alpha and beta monoclinic; (b) red glossy or black amorphous forms, all insoluble in water and oxidation/reduction very slow.
Selenite (+IV)	SeO_3^{2-}	Soluble form, common in mildly oxidizing conditions, e.g., soils or air particles.
Trimethylselenonium (TMSe^+)	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$	TMSe^+ is an important urinary metabolite of dietary Se and is made rapidly unavailable to plants by fixation and volatilization.
Selenious acid	H_2SeO_3	Selenious acid is protonated in acid/neutral conditions. Se(IV) is easily reduced to Se^0 by ascorbic acid (vitamin C) or sulfur dioxide in acidic environments by microorganisms. Readily available by Fe oxides, amorphous Fe hydroxides, and aluminum sesquioxides in soils.
Selenium dioxide	HSeO^{3-}	Common in soils.
	SeO_2	Gas SeO_2 formed as a product of fossil fuel combustion (sublimation temperature, 300°C): dissolves in water to form selenious acid.
Selenate (+VI)	SeO_4^{2-}	Se(VI) is stable in well-oxidized environments, and very mobile in soils, hence easily available to plants. Slowly converted to more reduced forms: not as strongly absorbed as Se(IV)
Selenic acid	H_2SeO_4	
	HSeO^{4-}	Common in soils.

レアメタルの一つであるセレンは、半導体、乾式コピー機の感光ドラム、ガラスの着色剤などに用いられる重要な工業原料であり、特に太陽電池の主要な原料の一つとして今後も利用の増大が予想される。セレン自体を高濃度で含む鉱石は存在しないため、銅などの非鉄金属精錬の電解スライムから生産される。日本は銅鉱石のほぼ全量を他国からの輸入に頼っているが、銅の精錬に伴うセレンの生産量は世界第一位であり、その大部分を輸出している。しかし、このようなセレンの生産・利用の増大に伴って、人為的に高濃度化されたセレンの一部が環境中に流出する可能性も高まる。一般環境中に存在する主なセレン化合物を Table 1 に挙げる (Haygarth, 1994 より一部改変)。これらセレン化合物のうち、工業プロセスから発生するセレン含有廃水中において、セレンは主にセレン酸イオンまたは亜セレン酸イオンとして存在するが、これらは非常に毒性が高いため、水環境汚染の要因として特に重要である。また、セレンは沸点が 685°C と比較的低いため、セレンを含む燃料や廃棄物の焼却工程において揮発し、排ガスに移行する。そのため、排ガスの冷却に伴って発生する、石炭を燃料とするボイラーの飛灰 (Andren *et al.*, 1975) や、セメントキルン燃焼ガス抽気ダスト (太平洋セメント株式会社, 2008) には比較的高濃度にセレンが含まれており、これら固形廃棄物中のセレンは、セレン酸や亜セレン酸として容易に水に溶出し得るため、潜在的に水環境汚染をもたらす可能性があると考えられる。

日本では、工場・事業場からの排水に含まれるセレンの濃度は、水質汚濁防止法による排水基準によって規制されている。この排水基準は、平成 6 年 2 月 1 日に全国一律の排水基準としてセレン及びその化合物の許容濃度を 0.1 mg/l とする旨が施行されたが、安定的な排水処理技術はいまだ開発・実用化の途上にあるとして、特に高濃度のセレンを含む排水が発生するセレン化合物製造業に属する工場・事業所においては、近年まで暫定排水基準が適用されてきた。セレン化合物製造業に対するセレン及びその化合物の排水基準の変遷を Table 2 に示す。暫定排水基準は、平成 6 年 2 月 1 日に施工された 4 mg/l から段階的に引き下げられ、平成 21 年 2 月 1 日からは廃止されて一律排水基準が適用された。環境省水・大気環境局水環境課による平成 21 年度水質汚濁物質排出量総合調査 (2010) より、セレンに関する調査結果を抜粋したものを Table 3 に示す。これによると、セレン及びその化合物を含む排水は、「鉱業又は水洗炭業の用に供する施設」、「その他無機化学工業製品製造業の用に供する施設」「非鉄金属製造業の用に供する施設」「石炭を燃料とする火力発電施設の

Table 2. Transition of effluent standard for selenium and its compounds applied against selenium compound manufacturers, regulated by Water Pollution Control Law in Japan

Feb.1, 1994 – Jan.31, 1997	Feb.1, 1997 – Jan.31, 2000	Feb.1, 2000 – Jan.31, 2003	Feb.1, 2003 – Jan.31, 2009	Feb.1, 2009 – Current
Provisional effluent standard				Uniform effluent standard
4 mg/l	2 mg/l	0.5 mg/l	0.3 mg/l	0.1 mg/l

Table 3. Facilities discharging effluent containing selenium and its compounds, and their concentrations

	Number of institution	Concentration (mg/l)			
		Ave.	S. D.	Maximum	Minimum
Facilities for mining or coal washing	7	0.03	0.03	0.09	0.00
Facilities for production of other inorganic chemical compounds	4	0.02	0.03	0.06	0.00
Facilities for production of farmaceutials	1	0.00	—	0.00	0.00
Facilities for manufacturing of glass or glass products	4	0.00	0.01	0.01	0.00
Facilities for manufacturing of raw materials for ceramics	3	0.00	0.01	0.01	0.00
Facilities for iron and steel industry	2	0.00	0.00	0.00	0.00
Facilities for nonferrous metal refinery	5	0.02	0.02	0.05	0.00
Facilities for manufacturing of metal products or machines	3	0.00	0.01	0.01	0.00
Facilities for emission gas washing in coal fired power plant	3	0.01	0.01	0.02	0.00
Facilities for general or industrial water supply	3	0.00	0.00	0.00	0.00
Facilities for metal surface treatment using acid or alkaline	5	0.00	0.01	0.01	0.00
Facilities for electric metal plating	6	0.00	0.00	0.01	0.00
Facilities for investigation, analysis, examination, and education on science and technology	45	0.00	0.00	0.01	0.00
Facilities for incineration of general waste	2	0.00	0.00	0.00	0.00
Facilities for industrial waste disposal	6	0.01	0.01	0.03	0.00
Facilities for human waste treatment	2	0.00	0.00	0.00	0.00
Facilities for sewage treatment	16	0.00	0.00	0.01	0.00
Facilities for treatment of wastewater discharged from specified institution	2	0.00	0.00	0.00	0.00
Undefined facilities	1	0.05	—	0.05	0.05
Total	120	0.01	0.01	0.09	0.00

うち廃ガス洗浄施設」「産業廃棄物処理施設」を主とした 120 の事業場から排出されており、いずれの事業場も一律排水基準を満たしていることが報告されているが、最大の濃度に着目すると、「鉱業又は水洗炭業の用に供する施設」において、基準値に迫る 0.09 mg/l が記録されるなど、高濃度のセレンを含有する廃水に対する安定した処理技術は現在もなお十分に確立されていないことが伺える。

現在一般的に採用されているセレン含有廃水の処理方法は、下記のような物理化学的原理に基づくものである。まず、廃水中にセレン酸イオンが存在する場合は、電気還元等により、セレン酸イオンを亜セレン酸イオンに還元する。続いて、鉄系凝集剤を投入することにより、亜セレン酸を無機汚泥に吸着させ沈殿除去する。しかし、このプロセスによって上記の一律排水基準を達成するためには、電気還元工程でのエネルギーコスト、亜セレン酸に対する鉄凝沈効率の低さに起因する大量の凝集剤コスト、大量の凝集剤の使用により発生する大量の無機汚泥処分コストという 3 つの大きなコストがかかることから、事業者の大きな負担となっている。また、本法では枯渇性資源であるセレンを再利用の難しい無機汚泥の形で廃棄しなければならない、資源保全の観点からも問題を抱えている。

生物学的処理法は、以上のような問題点を持つ現行のセレン廃水処理法に替わる技術として期待される。自然環境中において、セレンは各種生物によって酸化還元反応を受けて形態を変えることにより、気相・水相・固相間を循環していることが知られている (Stolz et

al., 2006)。このような循環の一部を促進して利用することにより、水環境中のセレン酸や亜セレン酸を、水に不溶性の元素態セレン、あるいは揮発性の高いジメチルセレナイド、ジメチルジセレナイドにまで還元し、水中から除去することが生物学的処理法の基礎となっている。生物学的処理法によって得られる元素態セレンや揮発性セレンは、回収・再利用できる可能性があり (Lenz & Lens, 2009a)、回収したセレンの売却益によって廃水の処理コストが低減できるだけでなく、セレン資源の循環利用にも貢献できる有望な技術と考えられている。

これまでに報告されているセレン含有廃水の生物学的処理の試みを Table 4 に整理した。これらは全て、嫌気条件下における細菌のセレン酸還元作用を利用しており、セレン酸還元細菌によるセレン酸・亜セレン酸還元を利用したものや、脱窒細菌群や硫酸還元細菌群による非特異的還元作用を利用したものである。ほとんどの報告は、浄化対象として農業排水、または自然環境中のセレン汚染水を想定しており、1,000 $\mu\text{g-Se/l}$ 以下の濃度のセレン酸または亜セレン酸を含む廃水から、10 時間程度の短い水理学的滞留時間 (HRT) でほぼ全量のセレンを除去することに成功している。一方で、セレンを含む工業排水を浄化対象として想定した報告は、石油精製プラントから発生する廃水を想定したもの (Lawson & Macy, 1995)、セレン精錬プラント等から発生する廃水を想定した我々の研究グループによる報告 (Kashiwa *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2002; Soda *et al.*, 2011) に限られている。3,690 $\mu\text{g-Se/l}$ の亜セレン酸を 5.1 時間という短い HRT で処理した例 (Lawson & Macy, 1995)、3,500 $\mu\text{g-Se/l}$ のセレン酸を 22 - 29 時間という HRT で処理した例 (Soda *et al.*, 2011) はあるものの、より高濃度の 95,000 $\mu\text{g-Se/l}$ のセレン酸を処理した例 (Kashiwa *et al.*, 1999)、41,800 $\mu\text{g-Se/l}$ のセレン酸を処理した例 (Fujita *et al.*, 2002) ではそれぞれ 48 時間、95 時間という長い滞留時間を要しており、実用化に向けて改善が求められる。工業的に発生するセレン含有廃水は、高いもので 620 mg-Se/l のセレンを含むケースもあることから (下村ら, 1997)、その処理を行うリアクターにも高い能力が求められ、1 mM (= 78,960 $\mu\text{g-Se/l}$) を超えるような高濃度のセレンを含む廃水を、より短い滞留時間で処理できるリアクターの構築が必要である。水環境中のセレン酸または亜セレン酸の存在比は溶存酸素濃度や酸化還元電位によって変化することから (Kumar & Riyazuddin, 2011)、工業廃水中のセレン酸、亜セレン酸の存在比も廃水性状に依存して変化し得ると考えられるため、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスは両者に柔軟に対応できるものでなければならない。しかし、亜セレン酸還元細菌は水環境中に普遍に存在するのに対して、高濃度のセレン酸を還元できる細菌は一般水環境中には比較的少ない (Ike *et al.*, 2000) ことから、高濃度のセレン酸を含む廃水の処理は特に難しく、実績も乏しいのが現状である。この課題に対し、セレン酸還元細菌とそのセレン酸還元機構について、分子レベルにまで掘り下げて知見を集積し、その摂理に沿った合理的な改良を行うことで、セレン含有工業廃水に適した生物処理プロセスが確立できるものと考えられる。

本研究では、合理的なセレン含有廃水の生物学的処理プロセスの構築に向け、分子生物学的手法により高濃度セレン酸還元細菌のセレン酸還元機構を解明することを目的とした。

本論文は以下のような全 5 章で構成した。第 1 章では、高濃度のセレン酸を還元可能な細菌、及びそのセレン酸還元の分子機構に関する既往研究を概説し、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスの合理的運転制御に向けて不足している知見を整理した。第 2 章では、グラム陽性細菌の代表的セレン酸還元細菌である *Bacillus* sp. SF-1 について、分子生物学的手法を用いて分類同定を行った。第 3 章では、これまでに明らかにされていないグラム陽性細菌のセレン酸還元機構の解明を目指し、SF-1 株のセレン酸還元関連遺伝子の取得と解析を行った。第 4 章では、セレン酸、亜セレン酸の両方に対する還元能力の高い好気性セレン酸還元細菌の取得を試みた。また、第 5 章では、第 4 章で取得した細菌について、そのセレン酸還元機構の解明を目指し、セレン酸還元関連遺伝子の取得と解析を行った。これらの研究で得られた成果と今後の展望を、総括ならびに結論で取りまとめた。

Table 4. Summery of previous reports on biological treatment for selenium-containing wastewater

Reference	Reactor type	Inoculum, bacteria	Operateing condition	Se added as	Se conc. [μg/l]	Se removed [%]	RT or HRT [h]
<u>Batch reactor</u>							
Rege <i>et al.</i> , 1999	Batch (Pressurized with He gas)	Denitrifying consortium	Anaerobic, denitrifying	Selenite	2000	90	300
Kashiwa <i>et al.</i> , 2000	Sequencing batch	<i>Bacillus</i> sp. SF-1	Anaerobic	Selenate	95000	100	48
<u>Continuous reactor</u>							
Macy <i>et al.</i> , 1993b	Sludge blanket & fluidized-bed	<i>T. selenatis</i> + denitrifying bacteria	Anaerobic, denitrifying	Selenate	354-555	99	2.6-5.1
Lawson & Macy, 1995	Sludge blanket & fluidized-bed	<i>T. selenatis</i> + denitrifying bacteria	Anaerobic, denitrifying	Selenite	3690	95	5.1
Cantafio <i>et al.</i> , 1996	Medium-packed	<i>T. selenatis</i>	Anaerobic, denitrifying	Selenate	160-640	98	7-14
Bledsoe <i>et al.</i> , 1999	Medium-packed	<i>T. selenatis</i>	Anaerobic, denitrifying	Selenate	296-416	98	5.1
Fujita <i>et al.</i> , 2002	Bioreactor	<i>Bacillus</i> sp. SF-1	Anaerobic	Selenate	41800	99	95.2
Zhang & Frankenberger Jr., 2003	Rice straw bioreactor	Rice straw	Anaerobic	Selenate	1020	98	144
Hunter & Kuykendall, 2005	Sand column	Soil	Anaerobic	Selenite	10000	98	83
Zhang & Frankenberger Jr., 2005	Sand column	<i>E. taylorae</i>	Anaerobic	Selenate	469	95	16.8
Viamajala <i>et al.</i> , 2006	Packed bed	Anaerobic sludge	Anaerobic, denitrifying	Selenite	1400	95	13.7
Chung <i>et al.</i> , 2006	H ₂ -based membrane biofilm	Membrane biofilm	Anaerobic, pressurized with H ₂	Selenate	1000	83	0.41
Lenz <i>et al.</i> , 2008a	Upflow anaerobic sludge blunket	Granular sludge	Anaerobic, methanogenic	Selenate	790	99	6
Lenz <i>et al.</i> , 2008b	Upflow anaerobic sludge blunket	Granular sludge	Anaerobic	Selenate	790	90	6
Luo <i>et al.</i> , 2008	Bioreactor	Sulfate-reducing bacteria	Anaerobic, sulfate-reducing	Selenate	200	99	48
Lenz <i>et al.</i> , 2009b	Upflow anaerobic sludge blunket	<i>Su. barnesii</i> + Granular sludge	Anaerobic, denitrifying	Selenate	790	85	6
Soda <i>et al.</i> , 2011	Upflow anaerobic sludge blunket	Granular sludge	Anaerobic	Selenite	3500	97	22-29

第1章

セレン酸還元細菌とそのセレン酸還元機構に関する既往研究

第1節 緒言

緒論で指摘したように、合理的なセレン含有廃水の生物学的処理プロセスの実現には、セレン酸還元細菌によるセレン酸還元機構に対する理解が必要である。産業排水では1 mM以上の高濃度のセレン酸を含む廃水が発生する可能性もあることから、高濃度セレン酸を還元可能な菌株の特徴を明らかにすることが望まれる。そこで本章では、これまでに詳細が報告されているセレン酸還元細菌のうち、高濃度のセレン酸を還元可能なものについて個別に概説し、また、2菌株について報告されているセレン酸還元機構についても取りまとめ、合理的なセレン含有廃水の生物学的処理プロセスの構築に向けて不足している知見について考察した。

第2節 高濃度セレン酸を還元可能なセレン酸還元細菌についての既往研究

これまでに報告されているセレン酸還元細菌のうち、高濃度のセレン酸を還元可能なものについて、下記に個別に概説する。

1. *Bacillus* sp. SF-1 (Fujita *et al.*, 1997)

我々の研究グループがガラス工場排水溝堆積物より単離した *Bacillus* sp. SF-1 は、嫌気条件下で培養した場合、1 mM のセレン酸全量を12時間で還元した。また、それにより生成した亜セレン酸についても100時間で全量を還元し、元素態セレンを生成した。一方、初期に10 mM のセレン酸を添加した場合、セレン酸全量を24時間で還元するが、それにより生成した亜セレン酸については100時間の培養を継続しても8 mM程度残存した。さらに高濃度のセレン酸についても還元でき、初期20 mMの場合36時間で全量を、初期60 mMの場合は54時間で28 mMにまで還元した。セレン酸の還元は乳酸の酸化と共役した嫌気呼吸によるものであることが示されている。

2. *Sulfurospirillum barnesii* SES-3 (Oremland *et al.*, 1994; Stolz *et al.*, 1999)

Su. barnesii SES-3 は、アメリカ合衆国ネバダ州西部の Stillwater Wildlife Management Area にある湿地、Massie Slough の水より単離された。嫌気条件下において培養した場合、25 mM のセレン酸を180時間でほぼ全量還元し、亜セレン酸を生成した。元素態セレンの生成量は還元したセレン酸の5%程度だった。またセレン酸を電子受容体として培養した菌体を回

収し、無機塩類と乳酸、5 mM のセレン酸を含む水溶液に懸濁し嫌氣的に保った場合、セレン酸全量が 8 時間で還元され、それにより生成した亜セレン酸についても 33 時間で全量が元素態セレンにまで還元された。このセレン酸の還元は嫌気呼吸によるものであると考察されている。

3. *Thauera selenatis* AX (Macy *et al.*, 1989; Rech & Macy, 1992; Macy *et al.*, 1993a)

セレン含有廃水を処理するバイオリアクターより単離された *T. selenatis* AX は、嫌気条件下でセレン酸を還元することができる。Macy *et al.* (1989) によって、酢酸を炭素源として初期 11.5 mM のセレン酸を 132 時間で 6 mM にまで還元したことが報告されており、また、Rech & Macy (1992) によって、酢酸を炭素源として初期 26 mM のセレン酸を 90 時間で 8 mM にまで還元したことが報告されている。セレン酸の還元は嫌気呼吸によるものである。異化的亜セレン酸還元能は持っていないが、亜硝酸還元酵素によって亜セレン酸が還元されることから、脱窒条件下でセレン酸から元素態セレンまでの還元を達成できると報告されている。

4. *Bacillus* sp. ML-SRAO (Fisher & Hollibaugh, 2008)

Bacillus sp. ML-SRAO はアメリカ合衆国カリフォルニア州の塩湖である Mono Lake より単離された細菌で、嫌気条件下において培養した場合、乳酸を炭素源として 10 mM のセレン酸を 58 時間で約 2 mM にまで還元し、亜セレン酸を生成した。また、亜ヒ酸の酸化と共役して約 5 mM のセレン酸を約 116 時間で約 1 mM にまで還元し、亜セレン酸を生成した。ML-SRAO 株による亜セレン酸還元は確認されていない。

5. *Bacillus arsenicoselenatis* E1H (Blum *et al.*, 1998)

B. arsenicoselenatis E1H はアメリカ合衆国カリフォルニア州の塩湖である Mono Lake より単離された細菌で、嫌気条件下で乳酸の酸化と共役して約 10 mM のセレン酸全量を 66 時間で異化的に還元した。亜セレン酸の還元能は持たないが、亜セレン酸還元細菌 *B. selenitireducens* との共培養によって、約 9 mM のセレン酸全量を、亜セレン酸を経由して元素態セレンにまで、約 74 時間で還元除去できることが報告されている。増殖至適塩濃度が 60 g-NaCl/l、至適 pH が 8.5-10 の中度好塩性好アルカリ菌である。

6. *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 (Losi & Frankenberger Jr., 1997; Dungan & Frankenberger Jr., 2001; Leaver *et al.*, 2008)

アメリカ合衆国カリフォルニア州の San Joaquin Valley 周辺の水サンプルより単離された *E. cloacae* SLD1a-1 は、嫌気条件下でセレン酸を還元することができ、Tryptic Soy Broth (TSB) 培地で培養した場合、1,266 μ M (約 1.3 mM) のセレン酸を 48 時間で 99.8 μ M (約 0.1 mM) にまで還元した。また、低濃度であれば酸素が存在していてもセレン酸を還元することが

できる。セレン酸及び硝酸の還元は嫌気呼吸によるものと推測されている。洗浄菌体の懸濁液によるセレン酸還元試験においては、セレン酸の還元に伴って生成した亜セレン酸についても還元され、また、セレノアミノ酸またはメチル化セレン類といった-II 価のセレン化合物を生成することが示唆されている。

7. *Pseudomonas stutzeri* ATCC51152 (Lortie *et al.*, 1992)

Lortie らによって単離された *P. stutzeri* ATCC51152 は、TSB 培地で培養した場合、好気培養条件下において、約 6 mM のセレン酸を 14 時間でほぼ全量還元した。また約 6 mM の亜セレン酸を 20 時間でほぼ全量還元し、元素態セレンを生成したことが報告されている。また、最高 48.1 mM のセレン酸まで還元できることが示されており、セレン酸・亜セレン酸還元に及ぼす pH や温度、他のオキソアニオンの存在の影響についても調べられている。セレン酸・亜セレン酸還元には通気が必須であり、還元は解毒的反応によるものであると筆者らは推測している。

8. *Bacillus* sp. STG-83 (Saudi *et al.*, 2009)

Bacillus sp. STG-83 は、イラン・イスラム共和国の Gilan 州の Anzali lagoon、及び Mazandaran 州の Neidasht spring より単離された 148 の細菌のうちの 1 つであり、好気培養条件下において LB 培地で培養した場合に、1 mM のセレン酸を 24 時間で全量亜セレン酸に還元し、さらに、生成した亜セレン酸を培養 96 時間時点で全量還元し水中から除去できることが報告されている。亜セレン酸の還元に伴って、大部分は元素態セレンとして回収されるが、初期添加セレン量の約 0.1%は揮発性セレンに変換される。特筆すべきはセレンに対する高い耐性であり、セレン酸については 320 mM まで、亜セレン酸については 640 mM までの高濃度においても増殖し、一部のセレン酸・亜セレン酸の還元が可能であることが確認されている。筆者らはこの還元は解毒反応によるものであると考察している。その他に 10% NaCl という高い耐塩性を持つことも、セレン含有廃水処理プロセスへの適用において有利な点であることが指摘されている。

9. *Stenotrophomonas maltophilia* BAA-902 (Dungan *et al.*, 2003)

アメリカ合衆国カリフォルニア州の Tulare Lake Drainage District の蒸発池堆積物より単離された *St. maltophilia* BAA-902 は、微好氣的培養条件下において TSB 培地で培養した場合に、0.5 mM のセレン酸を 36 時間で 81.2%還元する。セレン酸の還元に伴う亜セレン酸の蓄積は少なく、速やかに元素態セレンを生成することが知られている。また十分に定量されていないものの、ジメチルセレナイド、ジメチルジセレナイドなどの揮発性セレンの生成も確認されている。*St. maltophilia* BAA-902 は嫌気条件下において、セレン酸、亜セレン酸を利用して嫌気呼吸できないことから、これらの還元は耐性機構によるものと推測されている。

10. セレン酸還元細菌に関する既往研究のまとめ

以上の各セレン酸還元細菌について、生物種の分類と特徴について Table 1-1 に整理した。これより、セレン酸還元細菌として、グラム陽性細菌である *Firmicutes* 門に属する *Bacilli* 綱細菌群と、グラム陰性細菌である *Proteobacteria* 門に属する *Beta*-、*Gamma*-、及び *Epsilon-proteobacteria* 綱細菌群が存在することがわかる。この中で、グラム陰性細菌である *T. selenatis* AX や *E. cloacae* SLD1a-1、*Su. barnesii* SES-3 については多くの研究報告があるのに対し、グラム陽性細菌は *Bacillus* sp. SF-1 を除いて研究報告は少ない。セレン酸還元細菌の多様性について評価したいいくつかの報告に目を向けると、セレン酸含有模擬廃水を UASB リアクターによって処理し、そこに含まれる細菌群を解析した例 (Lenz *et al.*, 2009b) や、セレン酸含有農業廃水に稲わらを添加して、そこに発生したセレン還元細菌群を解析した例 (Siddique *et al.*, 2005) があるが、いずれも *Proteobacteria* 門の細菌群と *Firmicutes* 門の細菌群が共に存在していたことや、蒸発池の堆積物から単離されたセレン酸、亜セレン酸還元細菌のほとんどが *Bacillus* 属細菌だったことが報告されており (Siddique *et al.*, 2006)、*Firmicutes* 門細菌群はセレン酸還元において重要な役割を果たしていると考えられる。そのため、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスの効率化のためには、セレン酸還元細菌群のうちの一つの大きなグループであるグラム陽性細菌についても、さらに理解を深めることが必要であると言える。

また、セレン酸還元を嫌気条件下で行う細菌と好気条件下で行う細菌が存在し、いずれのタイプについても高濃度のセレン酸を還元する能力を持つ場合があることがわかった。ここで、嫌気条件下でのセレン酸還元は全て嫌気呼吸によるもの、好気条件下でのセレン酸還元は全て解毒作用によるものと解釈されている。一方でセレン酸還元の結果として生じる亜セレン酸の還元能に着目した場合、嫌氣的セレン酸還元細菌については、還元には長い時間がかかるもの (*Bacillus* sp. SF-1)、洗浄菌体懸濁液でのみ亜セレン酸を還元できるもの (*Su. barnesii* SES-3、*E. cloacae* SLD1a-1)、亜セレン酸還元が確認されていないもの (*Bacillus* sp. ML-SRAO、*B. arsenicoselenatis* E1H) といったように、還元能は高くないものが多い。しかし、好気性セレン酸還元細菌である *P. stutzeri* ATCC51152、*Bacillus* sp. STG-83、*St. maltophilia* BAA-902 のいずれについても亜セレン酸還元能は比較的高く、好気性セレン酸還元細菌に共通した特徴である可能性が示唆されている。好気性セレン酸還元細菌のセレン酸を元素態セレンに変換する高い能力を利用すれば、より高速でセレン含有廃水を処理できる可能性があると考えられるが、好気性セレン酸還元細菌の報告例は少なく、十分な特徴付けがなされていないことから、今後もさらに検討を進めていくことが望まれる。

Table 1-1. Classifications and characteristics of selenate-reducing bacteria

Division	Class	Genus, species, strains	Selenate reduction				Selenite reduction
			A / AN*	Time (conc. [mM])	Mechanism	Max. conc. [mM]	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i> sp. SF-1	AN	12 h (1 → 0)	respiration	60	needs a long time
		<i>Bacillus</i> sp. ML-SRAO	AN	58 h (10 → 2)	respiration?	10	not detected
		<i>Bacillus</i> sp. STG-83	A	24 h (1 → 0)	detoxification	320	capable
		<i>B. arsenicoselenatis</i> E1H	AN	66 h (10 → 0)	respiration	10	not detected
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>T. selenatis</i> AX	AN	90 h (26 → 8)	respirtion	26	needs denitrifying condition
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>E. cloacae</i> SLD1a-1	AN	48 h (1.3 → 0.1)	respiration	1.3	only by washed cell
		<i>P. stutzeri</i> ATCC51152	A	14 h (6 → 0)	detoxification	48.1	capable
		<i>St. maltophilia</i> BAA-902	A	36 h (0.5 → 0.1)	detoxification	0.5	highly capable
	<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Su. barnesii</i> SES-3	AN	8 h (5 → 0)	respiration	25	only by washed cell

* A, under aerobic condition; AN, under anaerobic condition.

第3節 セレン酸還元機構に関する分子生物学的研究

効果的なセレン含有廃水の生物学的処理プロセスの構築のためには、能力の高い菌株の取得と特徴付けのみならず、そのセレン酸還元反応の分子機構や代謝経路、関与する遺伝子群とそれらの転写制御などの分子メカニズムに関する知見が必要不可欠である。これまでに、限定された菌株においてセレン酸還元反応の分子機構に関する報告が行われている。以下にそれらを概説し、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスの実現に向けて不足している知見を考察した。

1. *E. cloacae* SLD1a-1

E. cloacae SLD1a-1 のセレン酸還元酵素は 100 kDa の α サブユニット、55 kDa の β サブユニット、36 kDa の γ サブユニットから成る $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ の複合体であり、補因子としてモリブデン、ヘム、及び非ヘム鉄を含む膜結合型酵素である (Ridley *et al.*, 2006)。 *E. cloacae* SLD1a-1 のセレン酸還元酵素をコードする遺伝子は特定されていないものの、変異株の解析から特定された *fnr* (Yee *et al.*, 2007)、*tatC* (Ma *et al.*, 2007)、*menD* (Ma *et al.*, 2009) という3つの遺伝子の解析から、セレン酸還元機構の一端も明らかにされている。

fnr は転写因子 Fnr をコードする遺伝子である。Fnr は低酸素条件下において $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ クラスターを持つ2量体タンパク質として存在し、DNA と直接結合することにより様々な遺伝子の発現を調節する。好気条件下では $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ クラスターは2つの $[2\text{Fe-2S}]$ クラスターに分解されるとともに Fnr は単量体に変化し、DNA 結合能を失うために転写因子としての機能を失う (Kiley & Beinert, 1999)。このような働きにより、*E. cloacae* SLD1a-1 のセレン酸還元酵素遺伝子及びセレン酸還元関連遺伝子は、低酸素条件下においてセレン酸還元能を発現しているものと考えられる。

tatC は twin-arginine translocation pathway (TAT pathway) を担う中心的なタンパク質 TatC をコードしている。細菌細胞膜に存在する TAT pathway は、合成後に折りたたまれ、場合によっては既に補因子を組み込まれたタンパク質の構造を解くことなく細胞膜内から細胞膜外に輸送する経路である (Sargent, 2007)。TAT pathway を経由するタンパク質としては、大腸菌のジメチルスルフォキシド (DMSO) 還元酵素 DmsA や硝酸還元酵素 NapA といった鉄-硫黄クラスターやモリブデン補因子を含む酵素が知られており、同様の酵素と考えられる *E. cloacae* SLD1a-1 のセレン酸還元酵素も TAT pathway を経由して細胞膜外に輸送されているものと推測される。

menD はメナキノン合成経路を構成する酵素の一つ、MenD をコードする遺伝子である。メナキノンはグラム陽性細菌を中心とした多くの細菌が持つ脂溶性の物質で、細菌の呼吸鎖を構成する電子伝達体の一つであることが知られており、*E. cloacae* SLD1a-1 のセレン酸還元酵素もメナキノンを經由して電子を受け取っているものと推測される。

上記のように、*E. cloacae* SLD1a-1 のセレン酸還元は、3種のサブユニットから成る膜結

合型酵素によって触媒され、酸素濃度によって発現を制御されることが明らかにされており、還元酵素の輸送や、電子伝達系にメナキノンが関わることも示唆されている。しかし、セレン酸還元酵素をコードする遺伝子が特定されていないために、酵素の構造や輸送経路の手掛かりとなるアミノ酸配列や、遺伝子の転写制御機構についての詳細な知見は得られていない。

2. *T. selenatis* AX

T. selenatis AX のセレン酸還元酵素、SerABC は分子遺伝学や生化学的観点から最も詳細に検討されているセレン酸還元酵素である。SerABC はペリプラズムに存在する可溶性酵素であり、99.5 kDa の α サブユニット (SerA)、37 kDa の β サブユニット (SerB)、22.8 kDa の γ サブユニット (SerC) から成る (Schröder *et al.*, 1997)。SerABC をコードする遺伝子は、シャペロンタンパク質をコードすると考えられる *serD* とともにオペロンを形成しており、各遺伝子の塩基配列から各サブユニットのアミノ酸配列が特定されている (Krafft *et al.*, 2000)。さらに、そのアミノ酸配列から推測された補因子の存在が実験的にも確認されている (Dridge *et al.*, 2007)。

SerA は、原核生物のモリブデン酵素の catalytic subunit と相同性があり、セレン酸を亜セレン酸に還元する反応を直接に触媒していると考えられている。補因子として [4Fe-4S] クラスタとモリブデンを 1 つずつ含んでいる。また、N 末端に TAT pathway signal を持つことから、TAT pathway を経由してペリプラズムに輸送されることが考えられる。

SerB は、細菌や古細菌の持つモリブデン酵素の鉄-硫黄タンパク質サブユニットと相同性があり、電子伝達に関わっていると推測される。補因子として 4 つの鉄-硫黄クラスタを持ち、うち 3 つは [4Fe-4S] クラスタ、1 つは [3Fe-4S] クラスタである。N 末端に輸送シグナルを持たないことから、SerA と会合した状態で、TAT pathway を経由して 4 次構造を保ったままペリプラズムに輸送されることが推測される。

また、多くのモリブデン酵素の γ サブユニットが膜タンパク質であるのに対して、SerC は膜貫通領域を持たない可溶性タンパク質である。補因子として heme *b* を持っていることから電子伝達に関わるものと推測されるが、機能の詳細は不明である。N 末端には Sec pathway の輸送シグナルペプチドを持つ。Sec pathway は、高次構造を保ったまま細胞膜を通過する TAT pathway とは異なり、ポリペプチド鎖が解かれた状態で細胞膜外に輸送される経路であることから、SerC は SerAB とは別にペリプラズムに輸送された後に会合し、4 次構造を形成するものと考えられる。

その他に、生化学的検証により SerABC に電子を受け渡す機構として、電子伝達体シトクロム c_4 及びキノール-シトクロム c 酸化還元酵素の存在が示されている (Lowe *et al.*, 2010)。このように、*T. selenatis* AX のセレン酸還元酵素については非常に多くの分子生物学的知見が得られているが、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスの適切な制御のためには、このセレン酸還元の転写制御機構についての知見が不足していると考えられる。

3. セレン酸還元の分子機構に関する既往研究のまとめ

以上のように、*E. cloacae* SLD1a-1 と *T. selenatis* AX という 2 種の細菌についてのみ、セレン酸還元に関する分子生物学的知見が得られており、*E. cloacae* SLD1a-1 についてはセレン酸還元に関与する遺伝子群、*T. selenatis* AX についてはセレン酸還元酵素の構造の詳細が主に明らかにされている。一方で、*Bacillus* sp. SF-1 のようなグラム陽性細菌は、グラム陰性細菌とは細胞膜の構造が異なりペリプラズムを持たないことから、ペリプラズム酵素である *T. selenatis* AX のセレン酸還元酵素とは異なる特徴を持つ可能性がある。また、*E. cloacae* SLD1a-1 と *T. selenatis* AX はいずれも嫌気性セレン酸還元細菌であり、第 1 節でその有用性が示された好気性セレン酸還元細菌のセレン酸還元機構に関する知見も未だ得られていないため、その解明が望まれる。

第4節 要約

本章では、高濃度セレン酸の還元が報告されているセレン酸還元細菌、及びそのセレン酸還元機構について概観し、以下の知見を得た。

報告されているセレン酸還元細菌は、グラム陽性細菌である *Firmicutes* 門に属する *Bacilli* 綱細菌群と、グラム陰性細菌である *Proteobacteria* 門に属する *Beta*-、*Gamma*-、及び *Epsilon-proteobacteria* 綱細菌群の二者に大別される。グラム陰性細菌である *T. selenatis* AX や *E. cloacae* SLD1a-1、*Su. barneii* SES-3 について多くの研究報告があるのに対し、グラム陽性細菌については *Bacillus* sp. SF-1 を除いて研究報告は少ない。セレン酸の還元において重要な役割を果たしていると考えられるグラム陽性細菌についてさらに理解を深めることが、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスの効率化のために重要であると考えられる。

また、好気条件でセレン酸還元を行う細菌と嫌気条件でセレン酸還元を行う細菌が報告されているが、嫌気性セレン酸還元細菌はいずれも亜セレン酸還元能力が高くないのに対し、好気性セレン酸還元細菌は亜セレン酸についても比較的還元能が高いものと考えられた。このことから、好気性セレン酸還元細菌が持つセレン酸を元素態セレンにまで変換する高い能力を利用することで、より高速でセレン含有廃水进行处理できる可能性があると言えるが、これまでに報告されている好気性セレン酸還元細菌の例はわずかであり、さらなる菌株の単離と特徴付けが必要であると考えられた。

セレン酸還元の分子機構についてのこれまでの報告は、グラム陰性嫌気性セレン酸還元細菌である *E. cloacae* SLD1a-1 と *T. selenatis* AX に関する二例に限られている。特に、*T. selenatis* AX に関しては、可溶性ペリプラズム酵素であるセレン酸還元酵素 SerABC をコードする遺伝子とその機能についての報告がなされている。一方で、グラム陰性細菌とは異なる膜構造を持つ *Bacillus* sp. SF-1 をはじめとするグラム陽性セレン酸還元細菌は、グラム陰性細菌とは異なるセレン酸還元の分子機構を持つ可能性があるものの、これまでに報告はないことから、その解明が望まれる。また、*E. cloacae* SLD1a-1 と *T. selenatis* AX はいずれも嫌気性セレン酸還元細菌であることから、好気性セレン酸還元細菌のセレン酸還元の分子機構についても、現状では全く不明であり、今後の解明が待たれる。

第2章

分子生物学的手法による SF-1 株の系統学的分類・同定

第1節 緒言

第1章で指摘したように、グラム陽性細菌である *Firmicutes* 門に属する *Bacilli* 綱細菌群は、セレン酸還元において重要な役割を果たしていると考えられる。これまでに報告されている *Bacilli* 綱セレン酸還元細菌の中で最も研究が進んでいるのが SF-1 株である。SF-1 株はガラス工場排水溝底泥より単離された通性嫌気性のグラム陽性桿菌であり (Fujita *et al.*, 1997)、高いセレン酸還元能力を持つ。これまでに SF-1 株を利用して連続回分式リアクター (Kashiwa *et al.*, 2001)、及び連続式リアクター (Fujita *et al.*, 2002) を用いたモデル廃水からのセレンの効率的除去が達成されており、生物学的廃水処理に適用する菌株として最も有力な菌株の一つである。SF-1 株は、形態学的・生理学的特徴から *Bacillus* 属に分類されているが、未だ種の特定はされておらず、他の *Bacillus* 属細菌との類縁関係は不明である。グラム陽性セレン酸還元細菌を代表する SF-1 株の系統を明らかにすることは、*Bacilli* 綱セレン酸還元細菌の理解を深める上での 1 つの課題であることから、本研究では、近年、細菌分類の主流となっている 16S rDNA 配列を基にした系統解析、及びその他の生理学的、化学的分類手法等を行い、SF-1 株の種の特定と特徴付けを行った。

第2節 実験材料及び方法

1. 使用菌株と培養条件

セレン酸還元細菌として知られる *Bacillus* sp. SF-1、及び同定の対照菌株として *Bacillus jeotgali* JCM 10885^T を用いた。SF-1 株は無機塩培地 (0.30 g/l (NH₄)₂SO₄、0.14 g/l MgSO₄·7H₂O、0.2 g/l CaCl₂·2H₂O、0.1 g/l NaCl、0.05 g/l KH₂PO₄、0.05 g/l K₂HPO₄、0.6 mg/l H₃BO₃、0.17 mg/l CoCl₂·6H₂O、0.09 mg/l CuCl₂·2H₂O、0.1 mg/l MnCl₂·4H₂O、0.22 mg/l ZnCl₂、1.0 g/l yeast extract、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) に適当な炭素源を加えたもので培養した。好気培養には 10 g/l の glucose を、嫌気培養には 20 mM の乳酸ナトリウムを、それぞれ炭素源として加えた。また嫌気培養には 1 mM のセレン酸、ヒ酸、または硝酸を電子受容体として加えた。*B. jeotgali* JCM 10885^T は推奨される培地 (Yoon *et al.*, 2001) で培養した。

2. 各種生理学的試験方法

生理学的試験には API 20E 及び API 50CHB キット (bioMérieux) を用いた。抗生物質耐性試験では、SF-1 株を、kanamycin、tetracycline、chloramphenicol、ampicillin、erythromycin をそれぞれ 1–30 µg/ml の濃度で含む LB 寒天培地に植菌し、37°C で 4 日間培養して、菌体の生育を目視で確認した。

3. 各種化学的試験方法

脂肪酸組成の測定は Sherlock Microbial Identification System (MIDI) を用い、その標準法に従って行った。DNA の G+C 含量測定及び DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験のためのゲノム DNA の調製は以下の通り行った。SF-1 株、及び対照菌株である *B. jeotgali* JCM 10885^T を好氣的に培養し、対数増殖期中期において、菌体を遠心分離 (8000 × *g*, 10 min, 4°C) によって回収した。回収菌体より、DNeasy Tissue kit または DNeasy Plant kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA の G+C 含量は HPLC を用いて測定した (Katayama-Fujikawa *et al.*, 1984)。SF-1 株と *B. jeotgali* JCM 10885^T の DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験は Ezaki *et al.* (1989) の方法で行った。

4. 16S rDNA 配列を基にした系統解析

16S rDNA は 20F プライマー (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 及び 1500R プライマー (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) によって増幅した (Kawasaki *et al.*, 1993)。増幅した 16S rDNA は ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit 及び ABI PRISM model 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の決定に用いたプライマーは以下の通りである。20F、1500R、520F (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3')、520R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3')、920F (5'-AAACTCAAATGAATTGACGG-3')、920R (5'-CCGTCAATTCATTTGAGTTT-3')。

SF-1 株と 16S rDNA 配列の相同性の高い近縁種について、それぞれの 16S rDNA 配列を GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) より取得した。マルチプルアラインメント及びディスタンスマトリクスの生成は、ClustalX プログラム (Thompson *et al.*, 1997) 及び MEGA version 3.1 プログラム (Kumar *et al.*, 2004) を用いて行った。系統樹は neighbor-joining 法 (Saitou & Nei, 1987) 及び maximum-parsimony 法 (Kluge & Farris, 1969) を用いて計算した。ブートストラップ解析は 1000 回の試行を行い、それを基に系統樹の描画を行った。配列の相同性は GENETYX version 8 (Genetyx Corporation) を用いて計算した。

第3節 結果

1. SF-1 株の 16S rDNA 配列系統解析

これまでに、SF-1 株はグラム陽性、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陰性、運動性有り、孢子形成有り、通性嫌気性、桿菌であることが明らかとされ、その形態的、生理学的特徴から *Bacillus* 属であることが報告されている (Fujita *et al.*, 1997)。SF-1 株の 16S rDNA 配列 1413 bp を決定し、近縁種との系統解析を行った結果を Fig 2-1 に示す。低 G+C 含量、グラム陽性、好気、孢子形成有りの *Bacillus* 属との近縁性が認められたが、SF-1 株と 16S rDNA 配列の相同性が最も高いのは *B. jeotgali* YKJ-10^T (= JCM 10885^T) (99.6%) であることが明らかとなった。その他の SF-1 株と相同性の高い種はそれぞれ、*B. vireti* LMG 21834^T (96.7%)、*B. novalis* LMG 21837^T (96.6%)、*B. drentensis* LMG 21831^T (96.5%)、*B. niacini* NBRC 15566^T (96.1%)、*B. soli* LMG 21838^T (95.9%)、*B. bataviensis* LMG 21833^T (95.9%)、*B. fumarioli* LMG 17489^T (95.5%) であった。

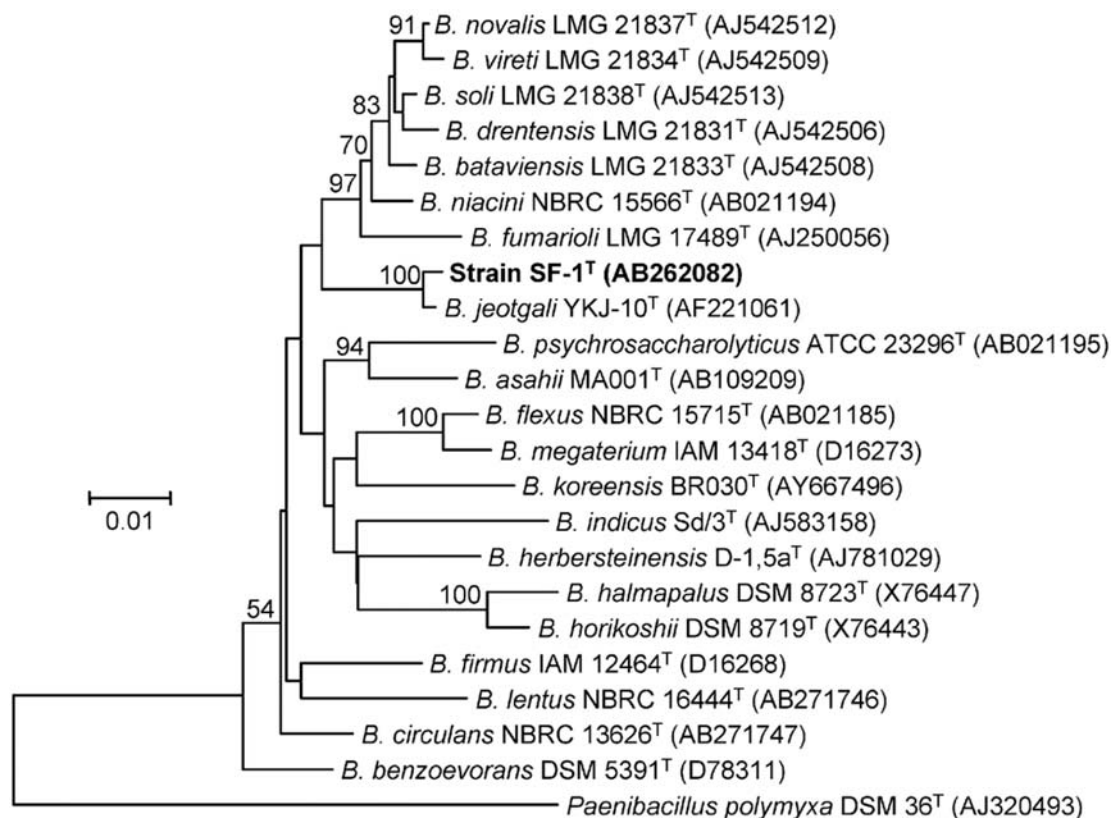


Fig. 2-1. Neighbor-joining tree derived from 16S rDNA sequences showing the relationships between strain SF-1^T and related *Bacillus* species. Bootstrap percentages (based on 1000 replications) greater than 50% are given at branching points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. *Paenibacillus polymyxa* DSM 36^T was used as the outgroup to root the tree. Accession numbers are given in parentheses.

2. SF-1 株の生理学的特性

SF-1 株の更なる特徴付けのため、その増殖特性についても調べた。SF-1 株の増殖至適 pH は 8.0、増殖至適温度は 40°C だった。また、抗生物質耐性について、SF-1 株は kanamycin (3 µg/ml)、tetracycline (3 µg/ml)、chloramphenicol (5 µg/ml) をそれぞれ含む LB 寒天培地上で生育可能だったが、ampicillin、erythromycin に対して感受性が高かった。

SF-1 株と 16S rDNA 配列の相同性が最も高かった *B. jeotgali* JCM 10885^T と比較する形で、SF-1 株の生理学的諸性質を Table 2-1 に示した。SF-1 株は通性嫌気性で、好気条件下のみならず、嫌気条件下でもセレン酸、ヒ酸、硝酸を電子受容体として利用可能であった (Fujita *et al.*, 1997; Kashiwa *et al.*, 2000; Yamamura *et al.*, 2003, 2004)。一方、*B. jeotgali* JCM 10885^T は、嫌気条件下ではセレン酸、ヒ酸を電子受容体として利用することはできず、硝酸を電子受容体とした時はわずかな増殖を示した。両菌株の耐塩性について、SF-1 株は 7%以上の NaCl 濃度で増殖できなかったが、*B. jeotgali* JCM 10885^T は 13%の NaCl 濃度においても増殖可能だった。また、両菌株の酸生成能について、SF-1 株は D-xylose、arbutin、salicin、amygdalin の各炭素源より酸生成可能であったが、*B. jeotgali* JCM 10885^T はこれらの炭素源より酸を生成しないという差異が認められた。また、SF-1 株は硫化水素を生産したが、*B. jeotgali* JCM 10885^T は生産しなかった。以上のような両菌株の多くの差異は、両菌株が異なる種であることを示唆するものであった。

Table 2-1. Comparison of phenotypic characteristics between strain SF-1^T and *B. jeotgali* JCM 10885^T

Unless otherwise specified, data for strain SF-1^T were obtained from Fujita *et al.* (1997) and Yamamura *et al.* (2003) and data for *B. jeotgali* JCM 10885^T were obtained from Yoon *et al.* (2001) and Imada *et al.* (2005). +, Positive; -, negative; W, weakly positive. Both strain SF-1^T and *B. jeotgali* JCM 10885^T are positive for growth in the presence of 2 and 5% NaCl, use of oxygen as an electron acceptor, catalase, β -galactosidase, nitrate reduction, decomposition of starch and acid production from glucose, fructose, aesculin, cellobiose, maltose, sucrose, trehalose, starch, glycogen, gentiobiose and 5-ketogluconate. Both strains are negative for oxidase, formation of indole and acid production from glycerol, erythritol, D-arabinose, L-arabinose, ribose, L-xylose, adonitol, methyl β -D-xyloside, galactose, mannose, sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, mannitol, sorbitol, methyl α -D-mannoside, methyl α -D-glucoside, N-acetylglucosamine, lactose, melibiose, inulin, melezitose, raffinose, xylitol, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconate and 2-ketogluconate.

Characteristic	Strain SF-1 ^T	<i>B. jeotgali</i> JCM 10885 ^T
Gram stain	Positive	Variable
Temperature range for growth (°C)	25–40	10–45
pH range for growth	7.5–9.0	7.0–8.0
H ₂ S production	+*	—*
Acid production from:		
D-Xylose	+*	—
Arbutin	+*	—
Salicin	+*	—
Amygdalin	+*	—
NaCl tolerance:		
7%	—	+
13%	—	+
Electron acceptors:		
Selenate	+	—*
Arsenate	+	—*
Nitrate	+	W*

* Results obtained in this study.

3. 化学的分類法による SF-1 株と *B. jeotgali* JCM 10885^T の比較

SF-1 株と *B. jeotgali* JCM 10885^T の差異を明確にするため、化学的分類法を用いて両菌株を比較した。両菌株の脂肪酸組成の分析結果を Table 2-2 に示す。両菌株ともに主要な脂肪酸は iso-C_{15:0} であり、共通していた。続いて、両菌株の DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験を行ったところ、両者の DNA 塩基配列の相同値は 14% であった。また、両菌株のゲノム DNA の G+C 含量を測定したところ、SF-1 株は 42.8 mol%、*B. jeotgali* JCM 10885^T は 41 mol% であった。

Table 2-2. Cellular fatty acid compositions (%) of strain SF-1^T and *B. jeotgali* JCM 10885^T

Data for strain SF-1^T were obtained in this study, whereas data for *B. jeotgali* JCM 10885^T were taken from Yoon *et al.* (2001).

Fatty acid	Strain SF-1 ^T	<i>B. jeotgali</i> JCM 10885 ^T
iso-C _{14:0}	4.5	1.9
C _{14:0}	0.6	1.3
Summed feature 1*	1	—
iso-C _{15:0}	47.3	49.3
anteiso-C _{15:0}	4.2	8.8
C _{16:1} ω7 <i>c</i> alcohol	8.6	4.5
iso-C _{16:1} H	2.7	—
iso-C _{16:0}	2.9	2.3
C _{16:1} ω11 <i>c</i>	2.6	5
C _{16:0}	0.8	3.2
iso-C _{17:1} ω10 <i>c</i>	10.1	7.5
Summed feature 4*	8.7	6.6
iso-C _{17:0}	2.6	4.1
anteiso-C _{17:0}	1.4	3.7

* Summed features represent groups of two or three fatty acids that could not be separated by GC with the MIDI system. Summed feature 1 contained iso-C_{15:1} H and/or C_{13:0} 3-OH; summed feature 4 contained anteiso-C_{17:1} B and/or iso-C_{17:1} I.

第4節 考察

1. SF-1 株と *B. jeotgali* JCM 10885^T の比較

本研究では従来の古典的な生理学・形態学的分類法において *Bacillus* 属に分類されていた SF-1 株について、分子生物学的・化学的手法を用いてさらに詳細に分類学的特徴を明らかにした。16S rDNA 配列を基にした系統解析の結果、SF-1 株は *B. jeotgali* JCM 10885^T と配列の相同性 (99.6%) が最も高いことが明らかになった。しかし、両菌株には嫌気条件下における電子受容体の利用性、高塩濃度下での増殖、各炭素源からの酸生成、硫化水素の生成等の生理学的差異が認められたため、化学的分類法を用いて両菌株をさらに比較した。両菌株の脂肪酸組成、DNA の G+C 含量に大きな違いはなかったが、DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験の結果、両者の DNA 塩基配列の相同値は 14%であることが示され、これは両菌株を異種として分類する基準となる 70%を大きく下回るものだった (Wayne *et al.*, 1987)。以上の結果より、SF-1 株を *Bacillus* 属の新種の細菌であると結論付け、*Bacillus selenatarsenatis* SF-1^T として提唱した。

2. *Bacillus selenatarsenatis* の分類学的特性

B. selenatarsenatis はグラム陽性、孢子形成有り、運動性有りの桿菌 (1×3–6 μm) であった。コロニーは円形白色だった。増殖は 25–40°C、pH 7.5–9.0、NaCl 濃度 2–5 %の範囲で可能だったが、NaCl 濃度 7 %以上では増殖できなかった。カタラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、硫化水素生成、硝酸還元各試験について陽性、オキシダーゼ、Voges-Proskauer 試験、インドール生成、フェニルアラニン脱アミノ化反応各試験において陰性だった。また、ゼラチン、及びデンプン加水分解性だった。D-Xylose、glucose、fructose、amygdalin、arbutin、aesculin、salicin、cellobiose、maltose、sucrose、trehalose、starch、glycogen、gentiobiose、5-ketogluconate の各炭素源より酸生成可能だったが、glycerol、erythritol、D-arabinose、L-arabinose、ribose、L-xylose、adonitol、methyl β-D-xyloside、galactose、mannose、sorbitol、rhamnose、dulcitol、inositol、mannitol、sorbitol、methyl α-D-mannoside、methyl α-D-glucoside、N-acetylglucosamine、lactose、melibiose、inulin、melezitose、raffinose、xylitol、D-turanose、D-lyxose、D-tagatose、D-fucose、L-fucose、D-arabitol、L-arabitol、gluconate、2-ketogluconate の各炭素源からは酸生成は認められなかった。Kanamycin (3 μg/ml)、tetracycline (3 μg/ml)、chloramphenicol (5 μg/ml) の各抗生物質を含む LB 寒天培地上で生育可能だったが、ampicillin、erythromycin に対して感受性が高かった。*B. selenatarsenatis* は通性嫌気性で、酸素、セレン酸、ヒ酸、または硝酸を電子受容体として呼吸を行い、セレン酸は亜セレン酸を経て元素態セレンに、ヒ酸は亜ヒ酸に、硝酸は亜硝酸を経てアンモニアにまで還元された。主要な脂肪酸は iso-C_{15:0} (47.3 mol%)、iso-C_{17:1} ω10c (10.1 mol%)、C_{16:1} ω7c alcohol (8.6 mol%) だった。DNA の G+C 含量は 42.8 mol% だった。以上のような特徴を持つ SF-1 (= JCM 14380 = DSM 18680) 株を *Bacillus selenatarsenatis* の基準株とした。

3. *Bacillus* 属セレン酸還元細菌の中での SF-1 株の位置付け

Fig. 2-1 に示した *Bacillus* 属細菌群に *Bacillus* sp. ML-SRAO、*Bacillus* sp. STG-83、*B. arsenicoselenatis* E1H の3種のセレン酸還元細菌を加えて再度マルチプルアラインメントを行い、得られた各株間の相同性を Table 2-3 に示した。その結果、SF-1 株は Fig. 2-1 で系統解析をした *Bacillus* 属細菌各基準株との相同性と比較して、*Bacillus* 属セレン酸還元細菌 *Bacillus* sp. ML-SRAO (90.4%)、*Bacillus* sp. STG-83 (92.6%)、*B. arsenicoselenatis* E1H (92.3%) との相同性が低いことが明らかとなった。従って、SF-1 株は他の *Bacillus* 属セレン酸還元細菌とは系統学的に遠い種に属すると考えられた。また、SF-1 株と上記3菌株の相互の相同性も 86.4-92.6%と高くなく、これまでに報告されている *Bacillus* 属セレン酸還元細菌は互いに近縁性の低い種であることが示唆された。*Bacillus* 属には幅広い特徴を持つ細菌群が含まれることが知られており、*Bacillus* 属を何らかの基準を用いてさらに複数の属に分ける必要があることが提案されている (Holt, 1984)。本研究で示された *Bacillus* 属セレン酸還元細菌群の相互の近縁性の低さもこのような *Bacillus* 属細菌の幅広さを反映しているものと考えられる。今後、セレン含有廃水の生物学的処理プロセス中でのセレン酸還元細菌の挙動を解析する際の基礎的知見として、幅広い種が含まれる *Bacillus* 属セレン酸還元細菌については、より網羅的な検討を行い、その差異と共通性質を解明することが望まれる。

第5節 要約

本章では、代表的なグラム陽性セレン酸還元細菌である SF-1 株について、細菌分類の主流となっている 16S rDNA 配列を基にした系統解析を行うとともに、その他の生理学的、化学的分類手法等を用いて種の特特定と特徴付けを行った。

近縁種間での 16S rDNA 配列の系統解析を行った結果、SF-1 株は *B. jeotgali* JCM 10885^T と最も高い相同性（99.6%）を示した。しかし、両菌株には嫌気条件下における電子受容体の利用性、高塩濃度下での増殖、各炭素源からの酸生成、硫化水素の生成等の生理学的差異が認められたことから、両菌株は異なる種であることが推測された。化学的分類手法によってさらなる特徴付けを行った結果、両菌株の脂肪酸組成、DNA の G+C 含量に大きな違いはなかったが、DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験から、両者の DNA 塩基配列の相同値は 14%と十分に低いことが示されたことから、両菌株が異なる種に分類されることが明らかとなった。本結果より、SF-1 株を新種の細菌 *Bacillus selenatarsenatis* の基準株として提唱した。

SF-1 株、及びこれまでに報告されている *Bacillus* 属セレン酸還元細菌について、他の 16S rDNA 塩基配列の系統解析を行ったところ、*Bacillus* 属セレン酸還元細菌は相互に相同性が低く、互いに近縁性が低いことが示唆された。従って、幅広い種が含まれる *Bacillus* 属セレン酸還元細菌については、より網羅的な検討を行い、その差異と共通性質を解明することが必要であると考えられた。

Table 2-3. Similarity matrix among aligned 16S rDNA sequences of *Bacillus* species including selenate reducers

	<i>B. indicus</i> Sd/3 ^T	<i>Bacillus</i> sp. STG-83	<i>B. herbersteinensis</i> D-1, 5a ^T	<i>B. flexus</i> NBRC 15715 ^T	<i>B. megaterium</i> IAM 13418 ^T	<i>B. koreensis</i> BR030 ^T	<i>B. selenatarsenatis</i> SF-1 ^T	<i>B. jeotgali</i> JCM 10885 ^T	<i>B. firmus</i> IAM 12464 ^T	<i>B. psychrosaccharolyticus</i> ATCC 23296 ^T	<i>B. novalis</i> LMG 21837 ^T	<i>B. vireti</i> LMG 21834 ^T	<i>B. soli</i> LMG 21838 ^T	<i>B. bataviensis</i> LMG 21833 ^T	<i>B. drenensis</i> LMG 21831 ^T	<i>B. niacini</i> NBRC 15566 ^T	<i>B. fumarioli</i> LMG 17489 ^T	<i>B. halmopalus</i> DSM 8719 ^T	<i>B. horikoshii</i> DSM 8719 ^T	<i>B. asahii</i> MA001 ^T	<i>B. lentus</i> NBRC 16444 ^T	<i>B. benzoovorans</i> DSM 5391 ^T	<i>B. circulans</i> NBRC 13626 ^T	<i>Bacillus</i> sp. ML-SRAO	<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 36 ^T	<i>B. arsenicoselenatis</i> EIH ^T
<i>B. indicus</i> Sd/3 ^T	100	92.4	93.3	91.8	92.3	94.9	94	92.1	92.9	92.3	92	92.1	92.4	92.4	94.8	92.1	91.8	92	91.9	91.7	92.5	91.6	92.6	87.1	85.7	89.3
<i>Bacillus</i> sp. STG-83	92.4	100	92.9	91.4	91.3	92.9	92.6	91.2	91.8	90.9	91.2	91.6	91.8	91.1	92.6	91.1	90.4	91.5	91.2	91.8	91.3	92.4	91.6	86.9	86.2	88.4
<i>B. herbersteinensis</i> D-1, 5a ^T	93.3	92.9	100	96	95.5	95.8	95.4	95.8	95.7	95.3	95.6	95.2	96	95.9	96.1	95.9	95.4	95.5	95.5	95.8	94.8	95.1	95.6	90.4	87.9	92.7
<i>B. flexus</i> NBRC 15715 ^T	91.8	91.4	96	100	98.7	96.5	95	95.3	96	95.5	95.3	95.2	95.6	95.9	96	95.6	94.6	95.6	94.9	95.9	95.1	95.3	96.4	89.8	88.6	92.2
<i>B. megaterium</i> IAM 13418 ^T	92.3	91.3	95.5	98.7	100	95.9	94.4	94.5	95.1	95.3	95	95	95.2	95.5	95.6	95.1	94.1	95.4	94.7	95.4	94.8	95.3	95.7	89.8	88.5	92
<i>B. koreensis</i> BR030 ^T	94.9	92.9	95.8	96.5	95.9	100	95.6	95.7	95.2	95.2	95.7	95.5	95.7	95.6	95.4	95.6	95.5	94.2	93.9	95.9	95.1	96	96	89.8	88.7	92
<i>B. selenatarsenatis</i> SF-1 ^T	94	92.6	95.4	95	94.4	95.6	100	99.6	96.2	95.4	96.7	96.8	96	95.9	96.5	96.1	95.9	94.8	95	95.5	95.1	95.8	96.2	90.4	87.7	92.3
<i>B. jeotgali</i> JCM 10885 ^T	92.1	91.2	95.8	95.3	94.5	95.7	99.6	100	96.5	95.6	96.9	96.8	96.3	96.5	96.8	96.5	96.4	95	95.2	95.7	95.4	95.8	96.4	90.3	88.3	92.8
<i>B. firmus</i> IAM 12464 ^T	92.9	91.8	95.7	96	95.1	95.2	96.2	96.5	100	95	95.9	95.9	96.3	96.1	96.5	95.8	95.4	94.5	94.3	95.6	96.3	96.2	96.9	90.6	88.5	92
<i>B. psychrosaccharolyticus</i> ATCC 23296 ^T	92.3	90.9	95.3	95.5	95.3	95.2	95.4	95.6	95	100	96	95.7	96.1	96	95.8	95.7	95	94.5	94.7	96.6	94.3	95.6	95.1	90.4	88.8	91.7
<i>B. novalis</i> LMG 21837 ^T	92	91.2	95.6	95.3	95	95.7	96.7	96.9	95.9	96	100	99.6	99.1	98.9	98.9	98.1	97.6	95	96.1	96.3	95.9	96.6	96.7	90.5	88.6	92.2
<i>B. vireti</i> LMG 21834 ^T	92.1	91.6	95.2	95.2	95	95.5	96.8	96.8	95.9	95.7	99.6	100	99.1	98.9	99	98.2	97.4	94.8	95.9	96.1	95.9	96.3	96.7	91.2	88.3	92.3
<i>B. soli</i> LMG 21838 ^T	92.4	91.8	96	95.6	95.2	95.7	96	96.3	96.3	96.1	99.1	99.1	100	99.2	99.3	98.5	97.5	94.6	95.6	96.4	95.8	96.4	96.9	90.9	88.4	92.2
<i>B. bataviensis</i> LMG 21833 ^T	92.4	91.1	95.9	95.9	95.5	95.6	95.9	96.5	96.1	96	98.9	98.9	99.2	100	99.2	98.5	97.5	94.9	95.9	96.5	95.9	96.2	96.9	90.5	88.7	92.6
<i>B. drenensis</i> LMG 21831 ^T	94.8	92.6	96.1	96	95.6	95.4	96.5	96.8	96.5	95.8	98.9	99	99.3	99.2	100	99	97.6	95.1	96	96	95.7	96.1	97	91.2	88.6	92.7
<i>B. niacini</i> NBRC 15566 ^T	92.1	91.1	95.9	95.6	95.1	95.6	96.1	96.5	95.8	95.7	98.1	98.2	98.5	98.5	99	100	97.7	94.6	95.7	96	95.5	96	96.8	90.6	88.6	92.6
<i>B. fumarioli</i> LMG 17489 ^T	91.8	90.4	95.4	94.6	94.1	95.5	95.9	96.4	95.4	95	97.6	97.4	97.5	97.5	97.6	97.7	100	94.2	95.2	95.6	95.1	95.8	96.2	90.5	88.5	91.8
<i>B. halmopalus</i> DSM 8719 ^T	92	91.5	95.5	95.6	95.4	94.2	94.8	95	94.5	94.5	95	94.8	94.6	94.9	95.1	94.6	94.2	100	98.4	94.9	93.9	94.7	95.3	90.5	88.3	93
<i>B. horikoshii</i> DSM 8719 ^T	91.9	91.2	95.5	94.9	94.7	93.9	95	95.2	94.3	94.7	96.1	95.9	95.6	95.9	96	95.7	95.2	98.4	100	95.5	93.7	94.8	95.9	90.6	87.8	92.8
<i>B. asahii</i> MA001 ^T	91.7	91.8	95.8	95.9	95.4	95.9	95.5	95.7	95.6	96.6	96.3	96.1	96.4	96.5	96	96	95.6	94.9	95.5	100	94.9	96.1	96.1	89.9	88.8	92.1
<i>B. lentus</i> NBRC 16444 ^T	92.5	91.3	94.8	95.1	94.8	95.1	95.1	95.4	96.3	94.3	95.9	95.9	95.8	95.9	95.7	95.5	95.1	93.9	93.7	94.9	100	96.2	95.5	90.3	88.1	91.2
<i>B. benzoovorans</i> DSM 5391 ^T	91.6	92.4	95.1	95.3	95.3	96	95.8	95.8	96.2	95.6	96.6	96.3	96.4	96.2	96.1	96	95.8	94.7	94.8	96.1	96.2	100	97.6	90	89.8	92
<i>B. circulans</i> NBRC 13626 ^T	92.6	91.6	95.6	96.4	95.7	96	96.2	96.4	96.9	95.1	96.7	96.7	96.9	96.9	97	96.8	96.2	95.3	95.9	96.1	95.5	97.6	100	90.6	89.2	92.8
<i>Bacillus</i> sp. ML-SRAO	87.1	86.9	90.4	89.8	89.8	89.8	90.4	90.3	90.6	90.4	90.5	91.2	90.9	90.5	91.2	90.6	90.5	90.5	90.6	89.9	90.3	90	90.6	100	86.4	92
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 36 ^T	85.7	86.2	87.9	88.6	88.5	88.7	87.7	88.3	88.5	88.8	88.6	88.3	88.4	88.7	88.6	88.6	88.5	88.3	87.8	88.8	88.1	89.8	89.2	86.4	100	87.8
<i>B. arsenicoselenatis</i> EIH ^T	89.3	88.4	92.7	92.2	92	92	92.3	92.8	92	91.7	92.2	92.3	92.2	92.6	92.7	92.6	91.8	93	92.8	92.1	91.2	92	92.8	87.8	100	

第3章

Bacillus selenatarsenatis SF-1 のセレン酸還元酵素遺伝子群の単離及び解析

第1節 緒言

セレン酸還元細菌を用いた廃水処理リアクターの性能を最大限に引き出すためには、そのセレン酸還元機構を明らかにすることが重要である。第1章で概説したように、これまでにセレン酸還元機構の一部が明らかにされている細菌は、グラム陰性細菌である *E. cloacae* SLD1a-1、*T. selenatis* AX の2菌株のみである。特に、*T. selenatis* AX のセレン酸還元酵素 SerABC は酵素学的解析に加えて、唯一、遺伝子の特定もなされており、より詳細な特徴が明らかとなっている (Krafft *et al.*, 2000)。一方で、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスにおけるセレン酸還元において重要な役割を果たしていると推測されるグラム陽性細菌のセレン酸還元機構については全く知られていない。

そこで本章では、高いセレン酸還元能を持つ細菌 *B. selenatarsenatis* SF-1 のセレン酸還元酵素遺伝子、及びその関連遺伝子群を単離・解析することを目的として研究を行った。

第2節 実験材料及び方法

1. 使用菌株とプラスミド

使用菌株とプラスミドを Table 3-1 に示す。SF-1SMR 株はストレプトマイシンを 1000 µg/ml 含む LB 寒天培地上に SF-1 株を塗布し、自然突然変異によるストレプトマイシン耐性 SF-1 株を選択することにより取得した。*Escherichia coli* DH5α は全てのプラスミドの宿主として用いた。

Table 3-1. Bacterial strains and plasmids used in this study

	Relevant properties	Reference
Organism and strain:		
<i>Bacillus selenatarsenatis</i>		
SF-1	Wild type	(Fujita <i>et al.</i> , 1997)
SF-1SMR	Spontaneous Sm ^r mutant	This work
<i>Enterococcus faecalis</i> CG110	Tn916 donor, Tc ^r , Sm ^s	(Gawron-Byrke & Clewell, 1982)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	(Sambrook & Russell, 2001)
Plasmid:		
pGEM-T Easy vector	TA cloning vector, Ap ^r	Promega
pGEMsrdBCA	<i>srdBCA</i> operon on pGEM T-easy vector	This work
pGEMsrdCA	Deleting <i>srdB</i> based on pGEMsrdBCA	This work
pGEMsrdBA	Deleting <i>srdC</i> based on pGEMsrdBCA	This work
pGEMsrdBC	Deleting <i>srdA</i> based on pGEMsrdBCA	This work
pGEMsrdB	Deleting <i>srdCA</i> based on pGEMsrdBCA	This work
pGEMsrdC	Deleting <i>srdBA</i> based on pGEMsrdBCA	This work
pGEMsrdA	Deleting <i>srdBC</i> based on pGEMsrdBCA	This work
pGEMsrdpt	Deleting <i>srdBCA</i> based on pGEMsrdBCA	This work

2. 培地及び培養条件

B. selenatarsenatis SF-1 とその派生変異株は、無機塩類 (24 g/l NaCl、7 g/l MgSO₄·7H₂O、5.3 g/l MgCl₂·6H₂O、0.7 g/l KCl、0.1 g/l CaCl₂) を加えた Bacto™ Trypticase Soy Broth (TSB; Becton–Dickinson) (pH 7.5 に調整) 培地 (Yoon *et al.*, 2001) 中、または 1.5% (w/v) の寒天を含む Difco™ LB broth Lennox (Becton–Dickinson) 寒天培地上で、37°C にて培養した。SF-1AM4 株の表現型解析に用いた無機塩培地は、下記の組成で調製した; 0.1 g/l NaCl、0.1 g/l KH₂PO₄、0.2 g/l CaCl₂·2H₂O、0.24 g/l NH₄Cl、0.12 g/l MgCl₂·6H₂O、0.6 mg/l H₃BO₃、0.17 mg/l CoCl₂·6H₂O、0.07 mg/l CuCl₂、0.22 mg/l ZnCl₂、1.0 g/l yeast extract、50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0)。無機塩培地での好気培養には 10 g/l の glucose を炭素源として加えた。また、無機塩培地での嫌気培養には、炭素源として 20 mM の乳酸ナトリウム、及び電子受容体として 1 mM のセレン酸ナトリウム、亜セレン酸ナトリウム、ヒ酸ナトリウム、または硝酸ナトリウムをそれぞれ加えた。*E. faecalis* CG110 及び *E. coli* の各株は LB 寒天培地上 37°C で培養した。全ての培養で、必要に応じて streptomycin (Sm; 500 µg/ml)、tetracycline (Tc; 10 µg/ml)、ampicillin (Ap; 30 µg/ml) の各抗生物質を培地に加えた。

3. DNA 操作

制限酵素 (TaKaRa Bio または Toyobo)、T4 DNA ligase (TaKaRa Bio) は説明書に基づき使用した。DNA の増幅はサーマルサイクラー GeneAmp PCR system 9700 (Life Technologies Japan) を用い、PCR によって行った (Sambrook & Russell, 2001)。PCR に用いたプライマーを Table3-2 に示す。DNA ポリメラーゼとして、inverse PCR とプラスミドベクターの作製

には KOD-plus DNA polymerase (Toyobo)、その他の用途、及び平滑末端 DNA 断片の A-tailing には *Ex Taq* DNA polymerase (TaKaRa Bio)を用いた。ゲノム DNA の調製には AquaPure Genomic DNA Kit (Bio-Rad Laboratories) を用い、プラスミド DNA の調製には Quantum Prep Plasmid MiniPrep Kit (Bio-Rad)を用いた。DNA 断片のアガロースゲルからの調製には Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いた。塩基配列の決定は BigDye Terminator Kit と ABI3100 system (Life Technologies Japan) を用いて行った。アガロースゲル電気泳動及び大腸菌の形質転換は Sambrook & Russell (2001) らの方法により行った。Fig. 3-1 に示す pGEMsrdBCA プラスミドの構築は、SF-1 野生株ゲノムから SRDBCAF と SRDBCAR のプライマーセットを用いた PCR によって *srdBCA* とその上流を含む領域を増幅し、pGEM-T Easy vector (Promega) に挿入することにより行った。*srdBCA* の 1 つ、2 つ、または全ての ORF を欠いた各プラスミドは、Table 3-3 に示す鋳型 DNA とプライマーセットを用い、PCR によって増幅した DNA 断片をセルフライゲーションすることにより作製した。各プライマーのアニーリングサイトを Fig. 3-1 に示す。

Table 3-2. Primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
TN916F	ATACCATTCACATCGAAGTGCCGCCA
TN916R	TGGCAAACAGGTTCAACCGGTACTAACA
SRDBCAF	CCAGAAACAGCAAAGTCCTTGTCG
SRDBCAR	GCAGCTTCCCTTTCGCACAAAGTT
SRDAF	ATGGAAAACCAACACCAGAAATTC
SRDBF	CTTATGGAGGTGAAATAAATGG
SRDCF	ATGTTAAAAAATTATATTTTACAGTG
SRDTF	TCTTTAAAAGATCTATTTAACAGCAAC
SRDPR	TTATTTACCTCCATAAGAATTAAC
SRDBR1	TATTCAGCACCTCCTCTTTATG
SRDBR2	TTATGTTAAGTAATATACATTGGTTCAG
SRDCR	TTACGCCTTGATATGAATTTCTG

Table 3-3. Primer sets and templates for plasmids construction in this study

Product	Template	Primer set
pGEMsrdCA	pGEMsrdBCA	SRDCF and SRDPR
pGEMsrdBA	pGEMsrdBCA	SRDAF and SRDBR2
pGEMsrdBC	pGEMsrdBCA	SRDTF and SRDCR
pGEMsrdB	pGEMsrdBCA	SRDTF and SRDBR1
pGEMsrdC	pGEMsrdCA	SRDTF and SRDCR
pGEMsrdA	pGEMsrdBCA	SRDAF and SRDPR
pGEMsrdpt	pGEMsrdBCA	SRDTF and SRDPR

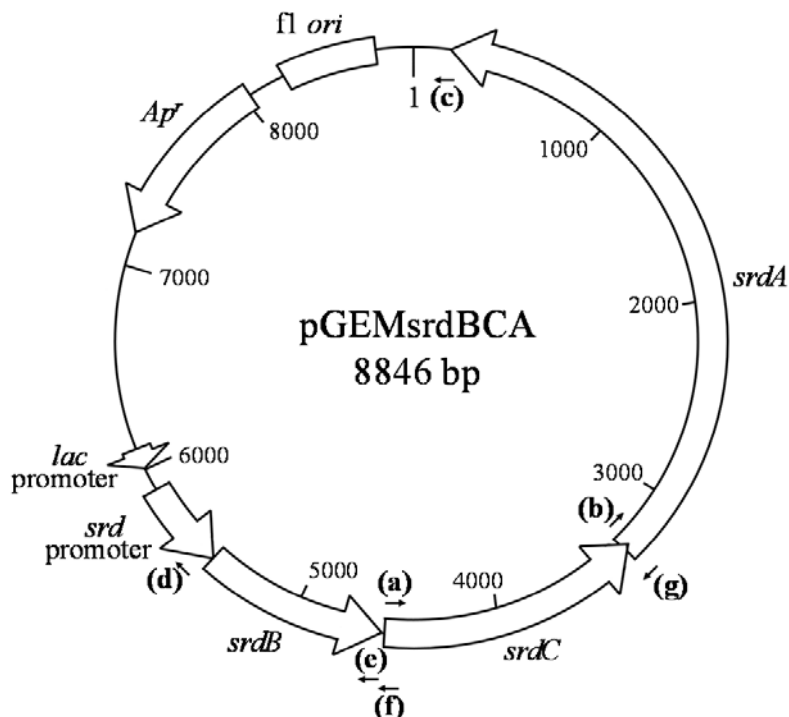


Fig. 3-1. Genetic map of pGEMsrdsBCA. The *srdsBCA* operon with its own promoter region was inserted into the pGEM-T Easy vector under the direction of the *lac* promoter. Annealing sites of primers used for the construction of derivative vectors are indicated: SRDCF (a), SRDAF (b), SRDTF (c), SRDPR (d), SRDBR1 (e), SRDBR2 (f), and SRDCR (g).

4. トランスポゾン Tn916 によるセレン酸還元能欠損変異株の作製

E. faecalis CG110 を Tn916 (Flannagan *et al.*, 1994) の供与菌として、*B. selenatarsenatis* SF-1SMR を受容菌として用いて、接合伝達により変異株ライブラリの作製を試みた。SF-1SMR 株は Sm を加えた 3 ml の TSB 培地で 20 時間、好氣的に培養した。CG110 株は LB 寒天培地上に 2.5 cm 程度の画線植菌をし、20 時間、好氣的に培養した。SF-1SMR 株培養液から菌体を遠心分離により回収し、3 ml の LB 培地で 2 回洗浄した後、3 ml の LB 培地に懸濁した。CG110 株が既に生育した LB 寒天培地上に、0.2 ml の SF-1SMR 株懸濁液を塗布し、37°C で一晚培養した。生育した SF-1SMR 株と CG110 株の混合物を 10 ml の TSB 液体培地により回収し、その菌体懸濁液を TSB 液体培地で 100 倍に希釈して、0.5 mM のセレン酸ナトリウム、Sm、Tc を含む LB 寒天培地（選択培地）に塗布した。その選択培地を 37°C で一晚培養した後、さらに 30°C で数時間の培養を続けることによりセレン酸の還元を進め、元素態セレンの生成を示す赤色の呈色を指標としてセレン酸還元能欠損株を選択した（1st screening）。白色を呈したコロニーを新たな選択培地に植菌し、37°C で一晚培養の後に嫌気条件下、30°C で 2 日間培養することにより、セレン酸の還元能の有無を再度確認した（2nd screening）。ここでの嫌気培養には AnaeroPouch-Anaero (Mitsubishi Gas Chemical Company) を用いた。2 回のスクリーニングの過程で安定して増殖し、白いコロニーを形成するものをセレン酸還元能欠損変異株として取得した。

5. サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションは Sambrook & Russell (2001) の方法に基づいて行った。SF-1SMR 株及び各セレン酸還元能変異株のゲノム DNA を制限酵素 *Hind*III によって断片化し、Hybond-N+(GE Healthcare)膜に転写した。検出のプロンプとして用いた Tn916 上の *tet*(M) 遺伝子の一部断片は、CG110 株のゲノム DNA を鋳型 DNA とし、プライマー TN916F と TN916R を用いて PCR によって増幅した。DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche Diagnostics) を用いて *tet*(M) 遺伝子の一部断片をラベリングし、Hybond-N+上の DNA とハイブリダイゼーションして検出した。

6. トランスポゾン挿入位置近傍のクローニング

トランスポゾン挿入位置近傍領域の DNA 断片を *Hind*III で消化した各変異株のゲノム DNA から inverse PCR によって増幅した (Sambrook & Russell, 2001)。増幅断片はゲル抽出の後に A-tailing を行い、pGEM-T Easy vector にサブクローニングし、塩基配列を決定した。*srdBCA* 全長のクローニングには LA PCR™ *in vitro* cloning kit (TaKaRa Bio) を用いた。

7. セレン酸還元能欠損変異株 SF-1AM4 の表現型解析

SF-1SMR 株と SF-1AM4 株を、50 ml 容バイアル瓶中のグルコースを含む 20 ml 無機塩培地で、好氣的に 30°C、12 時間培養した後、菌体を遠心分離 (6000 × *g*, 10 min, 4°C) によって回収して、少量の 50 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) に懸濁した。懸濁液を 50 ml 容バイアル瓶中の乳酸ナトリウムを含む 20 ml の無機塩培地に植菌し、それぞれの電子受容体(セレン酸、亜セレン酸、ヒ酸、硝酸)を添加した。バイアル瓶はブチルゴムセプタムとアルミキャップでシールし、気相部を窒素置換した。30°C の恒温回転振盪培養機中で、セレン酸、ヒ酸、硝酸の場合は 12 時間、亜セレン酸の場合は 48 時間の反応を行った。反応前後のセレン酸、亜セレン酸、ヒ酸、硝酸濃度をイオンクロマトグラフ (HIC-SP system; Shimadzu) を用いて測定し、それらの還元を調べた。ここで、分離カラムとしてセレン酸、亜セレン酸、硝酸の分析には IonPac AS4A-SC column (Dionex) を用い、ヒ酸の分析には HIC-SA3 column (Shimadzu) を用いた。移動相として DIRECT-Q system (Nihon Millipore) によって製造した超純水に 3 mM Na₂CO₃ を溶解し用いた。

8. 組換え大腸菌の表現型解析

各組換え大腸菌を Ap を含む 3 ml の LB 培地中で好氣的に 6 時間培養し、各培養液を Ap と 0.5 mM のセレン酸ナトリウムまたは亜セレン酸ナトリウムを含む LB 寒天培地上に 10 µl ずつスポットした。それを 37°C で 60 時間培養し、観察した。

9. DNA 塩基配列、タンパク質アミノ酸配列のソフトウェア解析

全ての DNA 塩基配列は GENETYX-WIN Program (version 3.2; Genetyx) を用いて解析し

た。DNA 塩基配列の相同性検索は BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) プログラムを用いて、nucleotide collection データベースを基に行った。遺伝子のアノテーションは BLASTX プログラム (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて、Swiss-Prot データベースを基に行った。推定アミノ酸配列のドメイン構造の推定は SMART プログラム (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Schulz *et al.*, 1998) を用いて行った。全てのデータベースを用いた解析は 2009 年 10 月 27 日に行った。各酵素のマルチプルアラインメントと系統解析は ClustalW プログラム (version 1.83) を用いて Rothery *et al.* (2008) を参考に行った。SrdBCA を除く全てのアミノ酸配列は SWISS-PROT データベース (<http://au.expasy.org/sprot/>) より、2009 年 10 月 27 日に取得した。系統樹は NJplot プログラム (Perrière *et al.*, 1996) を用いて描画した。

10. 塩基配列情報の登録

srdBCA オペロンの塩基配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (登録番号: AB534554)。

第3節 実験結果

1. セレン酸還元能欠損変異 SF-1 株の取得

E. faecalis CG110 の持つ接合伝達性トランスポゾン Tn916 のランダム挿入を利用して SF-1 セレン酸還元能変異株を作製した。SF-1 野生株は、セレン酸を含む寒天培地上で、セレン酸還元とセレン酸還元に伴って生成する亜セレン酸の還元を行うことにより赤色の元素態セレンを生成する。この色を指標にセレン酸還元能変異株のスクリーニングを行った。SF-1SMR 株と CG110 株の接合の結果、約 400,000 コロニーの変異株ライブラリより Sm、Tc、セレン酸を含む LB 寒天培地上で白いコロニーを形成した 110 株を取得した。これら 110 株のうち、上記同寒天培地上で安定して増殖し、表現型が再度確認された 17 株を SF-1AM1 ~SF-1AM17 株と名付け、セレン酸還元能欠損変異株として解析を進めた。

各セレン酸還元能欠損変異株のゲノム DNA から PCR によって Tn916 の断片の増幅を試みたところ、全ての株から予想サイズ通りの断片の増幅が確認された。また SF-1 野生株のゲノムを鋳型にした場合、増幅は見られなかったことから、全ての変異株に Tn916 が挿入されていることが確認された。さらに、サザンハイブリダイゼーションによって各セレン酸還元能欠損変異株中の Tn916 のコピー数を調べた結果を Table3-4 に示す。SF-1AM2、SF-1AM8、SF-1AM9、SF-1AM12 の 4 株はそれぞれ複数コピーの Tn916 をゲノム中に持っていた。また、SF-1AM17 からは Tn916 の存在を示すバンドが検出されなかった。残る 12 株からは単一コピーの Tn916 が検出された。

Table 3-4. Results of Southern blot and BLASTX analysis for mutant strains

Mutant strains	Band size [kbp]					Tn916 copy No. count	BLASTX results
SF-1AM1	7.7					1	diguanylate cyclase
SF-1AM2	6.1	6.8	14	18	26	5	
SF-1AM3	9.3					1	molybdate metabolism regulator
SF-1AM4	6.1					1	putative thiosulfate reductase
SF-1AM5	6.1					1	2-keto-4-pentenoate hydratase
SF-1AM6	5.4					1	unknown membrane protein
SF-1AM7	5.8					1	putative thiosulfate reductase
SF-1AM8	6.1	7.7	14	18		4	
SF-1AM9	5.8	6.8				2	
SF-1AM10	7.2					1	uncharacterized ATP binding cassette transpoter permase
SF-1AM11	6.1					1	putative thiosulfate reductase
SF-1AM12	6.1	13	17	26		4	
SF-1AM13	5.8					1	putative thiosulfate reductase
SF-1AM14	6.1					1	putative thiosulfate reductase
SF-1AM15	5.8					1	putative thiosulfate reductase
SF-1AM16	5.8					1	putative thiosulfate reductase
SF-1AM17						0	putative thiosulfate reductase

2. Tn916 挿入位置近傍の配列解析

単一コピーの Tn916 が検出された 12 株に、サザンハイブリダイゼーションでは Tn916 が検出されなかった SF-1AM17 を加えた計 13 株について、inverse PCR によってゲノム上の Tn916 近傍の配列をクローニングし、塩基配列を決定した。決定した塩基配列を BlastX によって解析した結果を Table 3-4 に示す。SF-1AM4、SF-1AM7、SF-1AM11、SF-1AM13、SF-1AM14、SF-1AM15、SF-1AM16、SF-1AM17 の 8 株はゲノム上の全く同じ位置に Tn916 が挿入されており、Tn916 によって破壊されていた遺伝子は thiosulfate reductase と相同性が高かった。その他、SF-1AM1 については diguanylate cyclase、SF-1AM3 については molybdate metabolism regulator、SF-1AM5 については 2-keto-4-pentenoate hydratase、SF-1AM6 については未知の膜タンパク質、SF-1AM10 については機能未知の ATP binding cassette transpoter permase と、それぞれ相同性の高い遺伝子が破壊されていることが示された。

3. *srdBCA* オペロンの特定

SF-1AM4 をはじめとする変異株 8 株において破壊されていた遺伝子がセレン酸還元酵素をコードしていることが推測されたため、8 株を代表して SF-1AM4 株による各電子受容体還元の実験型を調べた。結果を Fig. 3-2 に示す。トランスポゾンの受容菌として用いた SF-1SMR 株は、セレン酸、亜セレン酸、ヒ酸、硝酸をそれぞれ初期添加濃度約 1 mM に対して 90% (12 時間)、49% (48 時間)、80% (12 時間)、97% (12 時間) 相当を還元した。また、SF-1AM4 株はセレン酸、亜セレン酸、ヒ酸、硝酸をそれぞれ初期添加濃度約 1 mM に対して 0.7% (12 時間)、35% (48 時間)、80% (12 時間)、97% (12 時間) 相当を還元し

た。SF-1AM4 株は、ヒ酸、硝酸については、野生型形質を示す SF-1SMR 株とほぼ同じ還元率を示したため、Tn916 によって破壊された遺伝子は、ヒ酸、硝酸の還元に関わっていないものと考えられる。一方で、セレン酸については完全に還元能力が失われていたことから、SF-1AM4 株において Tn916 によって破壊された遺伝子は、セレン酸の還元に関わっているものと考えられた。亜セレン酸については、SF-1AM4 株において若干の還元率の低下がみられた。

SF-1AM4 株において Tn916 によって破壊されている遺伝子が、セレン酸還元酵素遺伝子であることが強く示唆されたため、open reading frame (ORF) 全体を取得すべく、Tn916 挿入位置の上流及び下流、約 6 kbp をクローニングし、その塩基配列を解析した。結果を Fig. 3-3 及び Table 3-5 として示す。この領域には 3 つの ORF が連続して存在しており、これらを上流からそれぞれ *srdB*、*srdC*、*srdA* と名付けた。Tn916 は *srdA* を挿入破壊していた。*srdB*、*srdC*、*srdA* のサイズはそれぞれ 876、1,278、3,144 bp であり、292、426、1,048 アミノ酸のタンパク質をコードしていると考えられた。また、*srdC* の開始コドンは *srdB* の終止コドンの 18 bp 下流に存在し、*srdA* の開始コドンは *srdC* の終止コドンの 35 bp 上流に存在していた。BLASTN 解析を行った結果、*srdBCA* それぞれの ORF は他の細菌の既知遺伝子との有意な塩基配列の相同性はなく、新規の遺伝子群であることが示唆された。また BLASTX 解析の結果、*srdBCA* は鉄-硫黄クラスターとモリブデン補因子を含む膜結合型酸化還元酵素をコードしていることが示唆された。明らかに機能の相関した 3 つの ORF が連続して並んでいることから、*srdBCA* はオペロンを形成していることが推測された (Fig. 3-3A)。

また *srdBCA* の各 ORF の上流には、SD 配列と推測される配列 (5'-GGAGGTG-3'、5'-GGAGGTG-3'、5'-GGAGGTA-3') がそれぞれ見出された。さらに *srdB* の上流には嫌気条件下において正の転写調節を行う転写因子 Fnr (Unden *et al.*, 1995) の結合部位とみられる配列 (5'-CTGATNNNNATCAG-3') が見出された (Fig. 3-3B)。

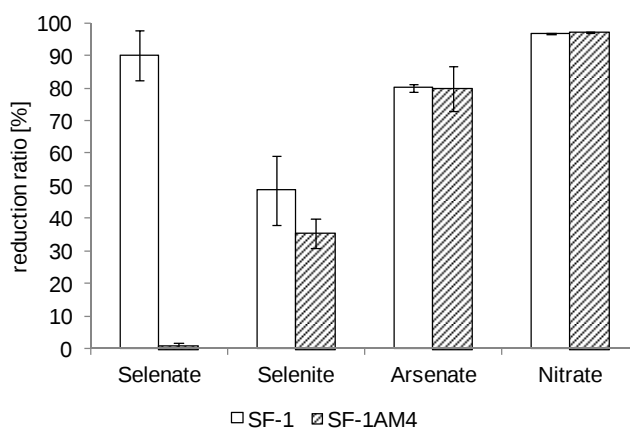


Fig. 3-2. Selenate, selenite, arsenate and nitrate reduction by strains SF-1SMR and SF-1AM4. The ratios of reduced electron acceptors against their initial concentrations (1 mM) are indicated as percentages. Values represent the mean electron acceptor reduction of three independent cultures, and error bars represent the SD.

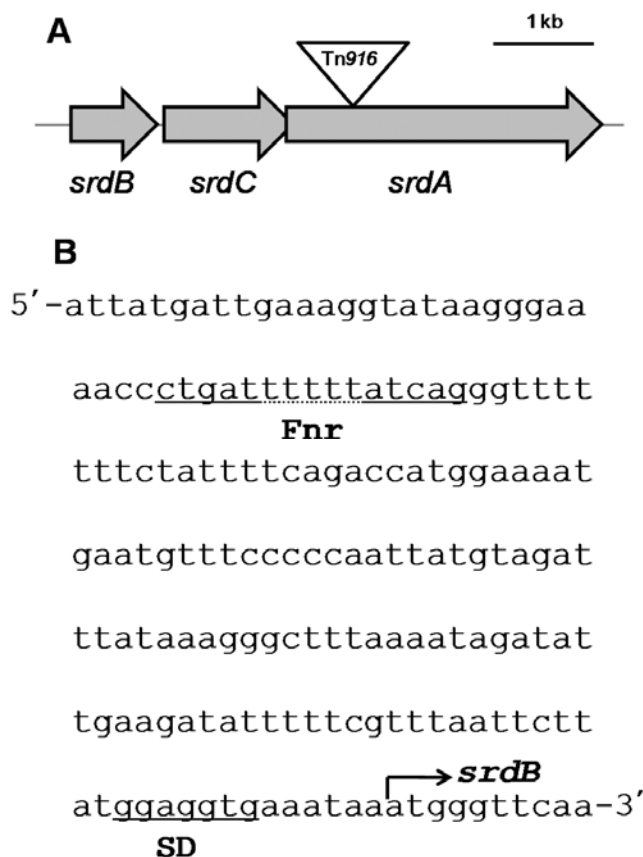


Fig. 3-3. (A) Schematic representation of the *srdBCA* operon. The inverted triangle indicates the Tn916 insertion site. (B) The nucleotide sequence of the promoter region is indicated in the *srdBCA* operon. A putative Shine–Dalgarno (SD) sequence and Fnr binding motif are located upstream of *srdB*.

Table 3-5. Summary of genes in the *srdBCA* operon, including their location, length and the BLASTX results

ORF	Start (base)	Stop (base)	Length (bp)	Organism	Putative function	Amino acids %identity
<i>srdB</i>	496	1371	876	<i>Wolinella succinogenes</i>	Polysulfide reductase chain B Heterodisulfide reductase-like	36
<i>srdC</i>	1392	2669	1278	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	menaquinol oxidoreductase integral membrane subunit	27
<i>srdA</i>	2635	5778	3144	<i>Haemophilus influenzae</i>	Formate dehydrogenase subunit alpha	25

4. SrdBCA のドメイン構造解析

SrdBCA の機能をその構造に基づいて推測するために、SMART プログラムを用いて SrdBCA のアミノ酸配列を解析し、ドメイン構造を推定した。その結果、SrdA には N 末端の TAT シグナル配列 (8-33 番アミノ酸) (Berks *et al.*, 2005)、モリブドプテリン酸化還元酵素の [4Fe-4S] 鉄-硫黄クラスタードメイン (56-127 番アミノ酸)、2 つのモリブドプテリン結合領域 (130-717 番及び 892-1041 番アミノ酸) という 4 つのドメインが見出された。SrdB には、N 末端 TAT シグナル配列 (1-43 番アミノ酸) と、4 つの [4Fe-4S] 鉄-硫黄クラスター結合ドメイン (86-109、138-151、163-186、及び 230-250 番アミノ酸) が見出された。また SrdC には、Sec シグナル配列 (1-28 番アミノ酸) (Martoglio & Dobberstein, 1998)、及び 9 つの膜貫通ドメイン (39-61、74-96、116-138、187-209、224-246、259-281、301-323、328-350、及び 383-405 番アミノ酸) の計 10 か所のドメインが見出された。

5. 組換え大腸菌での *srdBCA* オペロンの発現

srdBCA の全ての ORF がセレン酸還元に関わっているのかどうか調べるため、pGEMsrdBCA プラスミド、及びそれを基に各 ORF を脱落させたプラスミドによって大腸菌 *E. coli* DH5 α を形質転換し、表現型を寒天培地上で確認した。結果を Fig. 3-4 に示す。DH5 α /pGEMsrdBCA 株が、セレン酸を含む LB 寒天培地上で元素態セレンの生成を示す赤色コロニーを形成したのに対し、各 ORF を 1 つ、2 つ、または 3 つ全てを欠いた各プラスミドを保持する組換え大腸菌は白いコロニーを形成した。また、亜セレン酸を含む寒天培地上では全ての株が赤色コロニーを形成したことから、全ての株は亜セレン酸を還元できることが示された。従って、セレン酸を含む LB 寒天培地上で DH5 α /pGEMsrdBCA 株を除く他の株が白色コロニーを形成したことは、セレン酸還元能を持たないためであると考えられた。以上の結果より、*srdBCA* 全ての ORF がセレン酸還元に必要なことが示された。

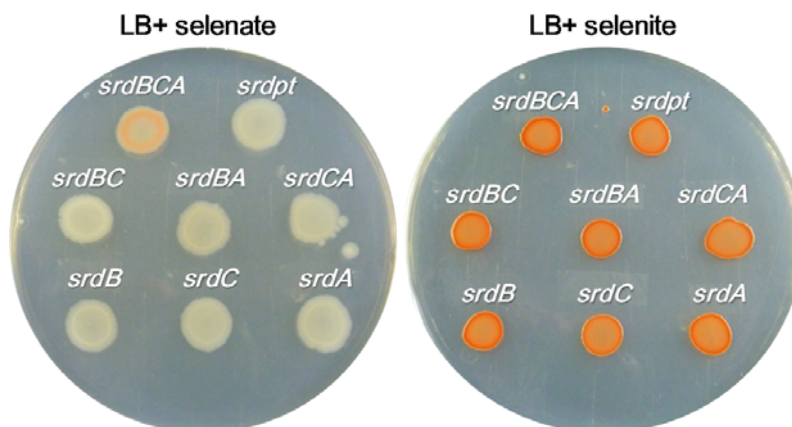


Fig. 4. Plate assay for selenate reduction. *E. coli* DH5 α strains harboring pGEMsrdBCA and its derivatives were spotted onto LB agar plates containing 0.5 mM selenate (left), and 0.5 mM selenite (right). All plates were incubated at 37°C for 60 h. The red color indicates the presence of elemental selenium.

第4節 考察

1. 既知の酸化還元酵素と SrdBCA のアミノ酸配列の比較

上述の解析により、SrdBCA はモリブデンを補因子とする酸化還元酵素としての構造上の特徴を持つことが示された。同様の構造は、セレン酸のみならず様々な基質の酸化還元反応を触媒する酵素に共通してみられるものであり、このような酵素群は総称してジメチルスルフォキシド (DMSO) 還元酵素ファミリーと呼ばれている。そこで、DMSO 還元酵素ファミリーに属する他の酵素との構造の比較や系統解析により、ファミリー内での SrdBCA の位置付けを調べた。

SrdA は、細菌の呼吸系酸化還元酵素に含まれる、モリブデンを補因子として含む触媒サブユニット (catalytic subunit) の典型的な特徴を有していた。これは、セレン酸還元能変異株 SF-1AM3 において、モリブデン酸代謝系の制御因子が Tn916 によって影響を受けていたこと、またタングステン酸の添加によって野生株のセレン酸還元反応が阻害を受けたこととも一貫している (Yamamura *et al.*, 2004)。SrdA、及び他の酸化還元酵素の触媒サブユニットのアミノ酸配列の分子系統解析を行った結果を Fig. 3-5 に示す。SrdA は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium のテトラチオン酸還元酵素 TtrA (Hensel *et al.*, 1999) と最も高い相同性を示した。両者のアミノ酸配列を比較したところ、[4Fe-4S]クラスター結合領域の 4 つのシステイン残基が保存されていた (Fig. 3-6A)。また、SrdA、TtrA、*S. enterica* serovar Typhimurium のチオ硫酸還元酵素 PhsA、及び *W. succinogenes* の polysulfide 還元酵素 PsrA という 4 つの酵素のアミノ酸配列を比較したところ、モリブデン補因子のリガンドであると推測されるシステイン残基が保存されていた (Fig. 3-6B) (Hensel *et al.*, 1999)。TtrA、PhsA、PsrA はシステイン残基がモリブデン補因子のリガンドであることを特徴とする I 型モリブデン酵素に属している (Jormakka *et al.*, 2004)。従って、SrdA も I 型モリブデン酵素であると考えられ、アスパラギン酸残基をモリブデン補因子のリガンドとする II 型モリブデン酵素である *T. selenatis* AX のセレン酸還元酵素触媒サブユニット SerA とは異なる酵素であることが示された。

SrdB は、細菌の呼吸系酸化還元酵素に含まれる、鉄-硫黄クラスターサブユニット (four cluster subunit: FCP) の典型的な特徴を有していた。このサブユニットはキノン類と触媒サブユニット間の電子の授受を担うことが知られ、今日では、構造上 2 種の FCP が知られている (Rothery *et al.*, 2008)。一方はサブユニット中に 4 つの[4Fe-4S]クラスターを持つタイプで、代表的なものとして *E. coli* のジメチルスルフォキシド還元酵素 DmsB が知られる (Bilous *et al.*, 1988)。他方は、3 つの[4Fe-4S]クラスターと 1 つの[3Fe-4S]クラスターを持つタイプで、代表的なものとして *E. coli* の硝酸還元酵素 NarH が知られる (Blasco *et al.*, 1989)。SrdB、DmsB、NarH と *T. selenatis* AX のセレン酸還元酵素の SerB のアミノ酸配列を比較したところ、SrdB は DmsB と同様に 4 つのシステイン残基を含む[4Fe-4S]クラスター結合モチーフ (コンセンサス配列: $C_A X_2 C_B X_{2-11} C_C X_3 C_D P$) を 4 つ持っていたが、SerB と NarH は 4

つのシステイン残基を含む[4Fe-4S]クラスター結合モチーフを3つと、3つのシステイン残基を含む[3Fe-4S]クラスター結合モチーフを1つ持っていた (Fig. 3-6C) (Rothery *et al.*, 2008)。即ち、SrdB は DmsB と同様に4つの[4Fe-4S]クラスターを持ち、3つの[4Fe-4S]クラスターと1つの[3Fe-4S]クラスターを持つ SerB とは異なる構造を有することが示された。

SrdC は9つの膜貫通領域を持つことから、細菌の呼吸系酸化還元酵素に含まれる、膜結合サブユニット (membrane anchor protein subunit: MAP) であると考えられた (Rothery *et al.*, 2008)。モリブデン酵素複合体の MAP はそれぞれ異なる数の膜貫通領域を持っている。これまでに9つの膜貫通領域を持つことが知られているのはテトラチオン酸還元酵素 TtrC のみであり、SrdC は TtrC と似た構造を有するものと推測された。TtrC は DmsC/NrfD/PsrC ファミリーに属していると考えられている。これらはペリプラズム側、細胞膜外側にメナキノール結合サイトを持っており、メナキノールの結合と酸化に関わることで、隣り合う FCP サブユニット、触媒サブユニットに電子を渡す働きがあると考えられる (Zhao *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2008)。

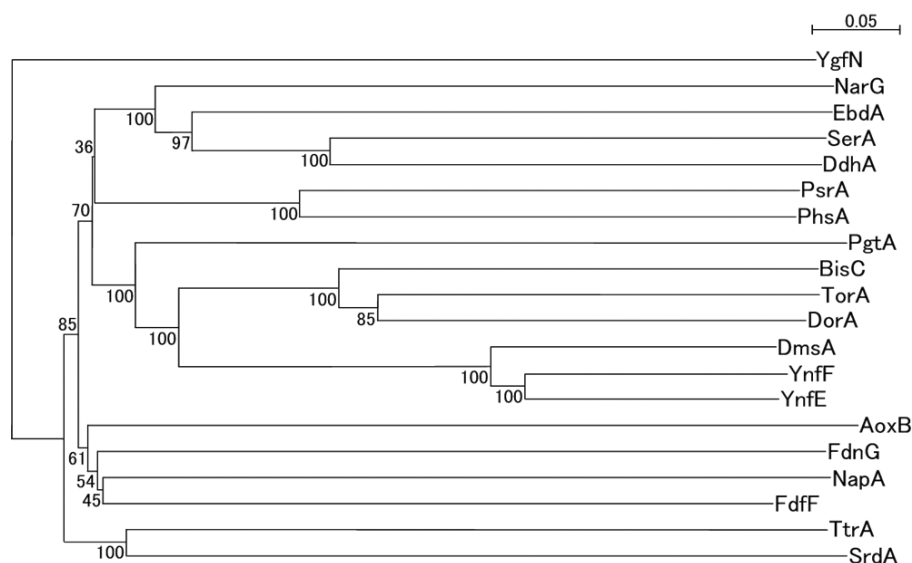


Fig. 3-5. Neighbor-joining phylogenetic tree of representative catalytic subunits including SrdA. Multiple alignment and phylogenetic analyses were performed using the ClustalW program. The tree was generated using NJplot. Five percent substitution of the sequence is indicated by a bar. Bootstrap values were calculated from 100 replicates. All protein sequences were obtained from the Swiss-Prot database: YgfN, putative hypoxanthine oxidase in *Escherichia coli* K-12; FdnG, formate dehydrogenase in *E. coli* K-12; AoxB, arsenate oxidase in *Alcaligenes faecalis*; NapA, periplasmic nitrate reductase in *E. coli* K-12; FdhF, formate dehydrogenase in *E. coli* K-12; PsrA, polysulfide reductase in *Wolinella succinogenes*; PhsA, thiosulfate reductase in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; NarG, nitrate reductase in *E. coli* K-12; EbdA, ethylbenzene dehydrogenase in *Azoarcus* sp. EB1; SerA, selenate reductase in *Thauera selenatis*; DdhA, dimethylsulfide dehydrogenase in *Rhodovulum sulfidophilum*; PgtL, pyrogallol hydroxytransferase in *Pelobacter acidigallici*; BisC, biotin sulfoxide reductase in *E. coli* K-12; TorA, trimethylamine-N-oxide reductase in *E. coli* K-12; DorA, DMSO/trimethylamine N-oxide reductase in *Rhodobacter capsulatus*; DmsA, DMSO reductase in *E. coli* K-12; YnfF, probable DMSO reductase in *E. coli* K-12; YnfE, putative DMSO reductase in *E. coli* K-12; TtrA, tetrathionate reductase in *S. enterica* serovar Typhimurium; SrdA, selenate reductase in *Bacillus selenatarsenatis* SF-1.

A		C		
SrdA	CLQCTVACSIVKIN-NGVCX ₃₃ CPK	DmsB	CTGCKTCELACK	CNHCEDPACTKVCP
TtrA	CFGCWTCQGIRARVNADGKVX ₄₂ CAR	SrdB	CVGCSSCTVACV	CMQCEHPPCTKVCP
		SerB	CIGCHTCTMACK	CNHCSNPACLAACP
		NarH	CIGCHTCSVTCK	CEHCLNPACSATCP
B				
SrdA	VNDSFGSVNWIEKTTLCGQTSNKA	DmsB	CIGCRYCHMACP	CDGCYDRVAEGKKPICVESCP
TtrA	ALNSFGSKNFGAHGAYCGLAYRAG	SrdB	CIGCRYCITACP	CHFCKHRLHKGMLSMCVTTCI
PhsA	LATAFGSPNTFTHASTCPAGKAIA	SerB	CKGYRYCVKACP	CIGCYPRVEKGEAPACVKQCS
PsrA	LAQAYGSPNIFGHESTCPLAYNMA	NarH	CRGWRMCITGCP	CFICYPRIEAGQPTVCSETCV

Fig. 3-6. Amino acid sequence alignments of SrdB or SrdA with related molybdoenzymes. (A) Alignment of the Fe-S cluster binding sites of SrdA and TtrA from *S. enterica* serovar Typhimurium. (B) Multiple alignments of the molybdenum co-factor binding regions of SrdA, TtrA, and PhsA from *S. enterica* serovar Typhimurium, and PsrA from *Wolinella succinogenes*. (C) Multiple alignments of DmsB from *E. coli*, SrdB from *Bacillus selenatarsenatis* SF-1, SerB from *Thauera selenatis*, and NarH from *E. coli*. All amino acid sequences were obtained from the Swiss-Prot database.

2. SrdBCA の局在

SMART プログラムによるドメイン構造解析の結果、SrdA、SrdB の N 末端には TAT シグナル配列、SrdC の N 末端には Sec シグナル配列が見出された。TAT pathway は補因子を含むタンパク質などを、その折りたたみ構造を保ったまま、細胞膜を通過して細胞膜外に輸送する経路である (Sargent, 2007)。また Sec pathway はタンパク質の折りたたみ構造を解き、一本のポリペプチド鎖の状態で細胞膜を通過させ、可溶性酵素であれば細胞膜外に輸送し、膜タンパク質であれば細胞膜内に埋め込むというタンパク質の輸送システムである (Martoglio and Dobberstein, 1998)。これを踏まえて考えると、モリブデン補因子や鉄-硫黄クラスターを補因子として抱える SrdA、SrdB は、細胞質において各補因子との結合の後に TAT 経路を経由して細胞膜外に輸送されているものと考えられる。他方、膜タンパク質である SrdC は Sec 経路を経由して細胞膜に埋め込まれているものと推測される。そして、輸送の後に 3 つのタンパク質は会合し、セレン酸還元酵素複合体を形成するものと推測される。これは、*B. selenatarsenatis* SF-1 のセレン酸還元酵素が不溶性画分に存在することが示唆されていること (寺師, 2004) と一致する。さらに、Rothery *et al.* (2008) は、細胞外膜を持たない細菌では、モリブデン酵素は膜結合型、または細胞質に存在しており、細胞膜外の可溶性モリブデン酵素は存在しないことを明らかにしているが、本研究の結果はこれを支持するものであり、SrdBCA はグラム陽性細菌である *B. selenatarsenatis* SF-1 に特有なセレン酸還元酵素であると言える。

3. セレン酸還元機構の推定

以上の解析を基に、SrdBCA によるセレン酸還元機構を推定した (Fig. 3-7)。SrdBCA の働きにより、セレン酸の還元はキノールの酸化と共役して行われる。キノールは細胞膜外側付近の SrdC の結合部位においてキノンに酸化され、2 分子のプロトンを細胞外に放出するとともに、2 つの電子を SrdB に渡す。2 つの電子は SrdB の鉄-硫黄クラスターと、SrdA の鉄-硫黄クラスターを経由して SrdA のモリブデン補因子に届けられる。このモリブデン補因子から 2 つの電子を受け取ることで、1 分子のセレン酸が 1 分子の亜セレン酸に還元され、それに伴って脱離する O^{2-} は 2 分子プロトンと結合することにより 1 分子の H_2O を生成する。この一連の反応においては、細胞膜外のプロトン濃度に影響を与えることはないが、キノンとキノールの酸化還元サイクルの促進に寄与することにより、細胞質から細胞膜外へのプロトンのくみ出しを行い、酸化リン酸化による ATP 合成を行っていると考えられる。

以上の解析より、*srdBCA* はこれまでに報告例のない膜結合型セレン酸還元酵素遺伝子であることが明らかとなった。また、本研究はグラム陽性細菌からの初めてのセレン酸還元酵素遺伝子の報告である。この結果は、セレン酸還元細菌の中で大きな位置を占めるグラム陽性細菌によるセレン酸還元機構を理解する上で、重要な知見の一つとなるものと期待される。

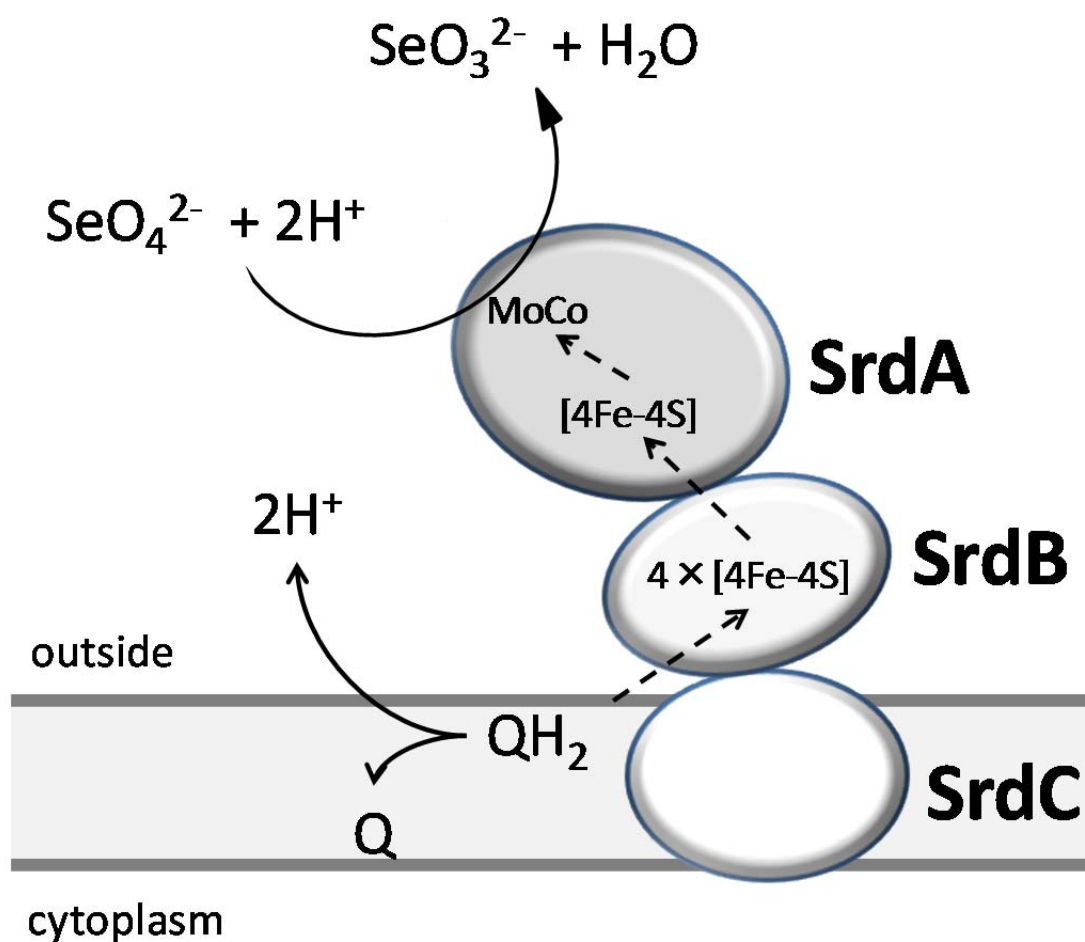


Fig. 3-7. Schematic representations of selenate reduction by SrdBCA from *Bacillus selenatarsenatis* SF-1. Selenate reduction is coupled with quinol oxidation. SrdC mediates quinol oxidation providing two electrons to SrdB. Electrons pass through the $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ clusters of SrdB and SrdA and selenate is reduced after receiving electrons via a molybdenum co-factor. The dashed arrows represent electron flow. Q, quinones; QH_2 , quinols; $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ iron-sulfur cluster; MoCo, molybdenum co-factor; SeO_4^{2-} , selenate; SeO_3^{2-} , selenite.

第5節 要約

本章では、グラム陽性細菌 *B. selenatarsenatis* SF-1 の持つセレン酸還元機構を明らかにすべく、分子生物学的手法を用いて SF-1 株のセレン酸還元に関わる遺伝子群を探索した。トランスポゾン Tn916 の挿入によって作製したセレン酸還元能欠損変異株 17 株のうち、SF-1AM4 株をはじめとする 8 株において破壊されていた遺伝子はセレン酸還元酵素遺伝子であることが推測された。SF-1AM4 株のセレン酸還元能は完全に失われていたが、野生株と比較してヒ酸、硝酸の各還元能に有意な低下は見られず、亜セレン酸還元能は若干の低下が見られた。SF-1AM4 株の Tn916 挿入位置近傍には 3 つの ORF からなるオペロンが存在しており、BLASTX 解析の結果、これらは酸化還元酵素をコードしていると推測されたことから、これら 3 つの遺伝子を上流よりそれぞれ *srdBCA* と名付け解析を進めた。*srdBCA* を挿入したプラスミド pGEMsrdBCA を構築し、さらに各 ORF を一つ、または二つ、または全て欠いたプラスミドをそれぞれ構築して、*E. coli* DH5α を形質転換したところ、*E. coli* DH5α/pGEMsrdBCA のみがセレン酸還元能を示したことから、*srdBCA* がセレン酸の還元形質を与えること、また全ての ORF がセレン酸還元に不可欠であることが示された。さらに、ドメイン構造解析の結果、*srdBCA* は膜結合型モリブデン含有酸化還元酵素の典型的な特徴を示したことから、セレン酸還元酵素遺伝子であることが証明された。本研究は、グラム陽性細菌における初めてのセレン酸還元酵素遺伝子の報告であり、グラム陽性細菌によるセレン酸還元機構を理解する上での極めて重要な知見となると考えられた。

第4章

Pseudomonas stutzeri NT-I の単離及び特徴付け

第1節 緒言

第1章において指摘した通り、嫌気性セレン酸還元細菌と比較した場合、好気性セレン酸還元細菌は、セレン酸還元に伴って生成する亜セレン酸についても比較的迅速に還元するという有用な特性を有しているものと推測される。これまでに好気的な培養条件下でセレン酸を還元する細菌として *P. stutzeri* ATCC51152、*Bacillus* sp. STG-83、*St. maltophilia* BAA-902 の3菌株が報告されているが、その生理特性及びセレン酸還元特性についての理解は未だ十分ではない。そこで本章では、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスへの適用が可能な新たな好気性セレン酸還元菌の単離を行い、その特徴付けを行った。

第2節 実験材料、方法

1. 使用培地

Bacto™ Trypticase Soy Broth (TSB; Becton–Dickinson) 培地、18 g/lの寒天を含むTSB培地 (TSB寒天培地)、及び1 g/lのグルコース、または2.2 g/lの乳酸ナトリウムを含む無機塩培地 (K_2HPO_4 1 g/l、 $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l、 $FeCl_3$ 0.01 g/l、 $NaCl$ 0.05 g/l、 $CaCl_2$ 0.01 g/l、pH 7.0) をNT-I株の培養に用いた。還元試験にはセレン酸または亜セレン酸をナトリウム塩として添加した。増殖試験では、培地に50 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 5.0–7.0)、またはTris–HCl緩衝液 (pH 8.0–9.0)、または炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0)を培地に添加してpHを調整した。塩濃度の調整は塩化ナトリウムを培地に加えることで行った。

2. NT-I株の単離

細菌の分離源として、セレン精錬工場の排水溝よりバイオフィーム状の懸濁質を含む水サンプルを採取した。このサンプルを適宜希釈し、セレン酸を含まないTSB寒天培地、及び1 mM、または5 mMのセレン酸を含むTSB寒天培地に塗布した。これら寒天培地を34°Cにおいて7時間保温した。続いて、セレン酸を含むTSB寒天培地上で、セレン酸からの元素態セレンの生成を示す赤色を呈色したコロニーを選択し、再度セレン酸を含む寒天培地上でセレン酸還元を確認した。濃い赤色を示し、高いセレン酸還元能が確認されたコロニーを選択し、純化した後、これをNT-I株とした。

3. NT-I 株の同定

NT-I 株のゲノム DNA 抽出は proteinase K と phenol-chloroform を用いて、既報の実験方法に従って行った (Sei *et al.*, 2000)。16S rDNA の PCR は、Mastercycler standard (Eppendorf) を用い、27F プライマー (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') (Weisburg *et al.*, 1991) と 1392R プライマー (5'-ACGGGCGGTGTGTACA-3') (Lane *et al.*, 1985)、及び *Ex Taq* DNA polymerase (TaKaRa Bio Inc.) を用いて、文献に基づいて行った (Sambrook & Russell, 2001)。塩基配列の決定はタカラバイオ株式会社に委託した。*Pseudomonas* 属細菌の 16S rDNA 配列マルチプルアラインメントは CLUSTALW プログラム (version 1.83) (Thompson *et al.*, 1994) を用いて行った。全ての塩基配列は、2011 年 2 月 3 日に NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のデータベースから取得した。本研究で得られた NT-I 株の 16S rDNA 部分断片の塩基配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (登録番号: AB612202)。NT-I 株の形態学的、生理学的特徴付け (形態観察、グラム染色、運動性、oxidative/fermentative (O/F) テスト、カタラーゼ活性、オキシダーゼ活性) は過去の文献に基づいて行った (Cowan & Steel, 1974)。

4. NT-I 株の比増殖速度の測定

NT-I 株を 50 ml 容バイアル瓶中の 20 ml グルコース無機塩培地に植菌し、28°C で 24 時間、好氣的に回転振盪培養した。この培養液の 1 ml を新たな同培地に植菌し、9 時間の培養を行った。続いて、この培養液の 1 ml を各 pH、塩濃度に調整したグルコース無機塩培地に植菌し、各温度条件下で培養を行った。培養基本条件を温度 30°C、pH7.0、NaCl 濃度 0.05 g/l とし、それぞれの試験系で温度、pH、NaCl 濃度のうち一つの条件のみを変更して試験を行った。波長 600 nm における吸光度 (OD₆₀₀) より菌体濃度を算出し、対数増殖期の増殖速度より比増殖速度を算出した。

5. セレン酸、亜セレン酸還元試験

NT-I 株を 300 ml 三角フラスコ中の 100 ml TSB 培地で好氣的に 24 時間培養した。続いて、1 ml の培養液を新たな同培地に植菌し、9 時間培養した。セレン酸または亜セレン酸還元試験は、この培養液 1 ml を所定濃度のセレン酸または亜セレン酸を含む TSB 培地 20 ml を分注した 50 ml バイアル瓶に植菌して行った。セレン酸、亜セレン酸還元試験は好気条件または嫌気条件で行った。嫌気条件の場合は、テフロンコートしたブチルゴムセプタムとアルミクランプでバイアル瓶を密栓し、気相部を窒素置換した。

6. 乳酸無機塩培地中でのセレン酸、亜セレン酸還元

50 mL 容バイアル瓶に分注した乳酸無機塩培地 20 mL に NT-I 株を 1 コロニー植菌し、28°C、120 rpm にて 24 時間回転振盪することにより好氣的に前々培養を行った。次に、同様の培地に OD₆₀₀ = 0.02 となるよう培養液を植え継ぎ、同条件で 12 時間の前培養を行った。その後、

セレン酸または亜セレン酸を終濃度 1 mM となるよう添加した本培養培地に、 $OD_{600} \approx 0.02$ となるよう培養液を植え継ぎ、28°C、120 rpm にて回転振盪し、好氣的または嫌氣的に本培養を行った。本培養の培地として、セレン酸還元の検討には乳酸無機塩培地を、亜セレン酸還元の検討には乳酸無機塩培地、またはカザミノ酸、ソイトンをそれぞれ所定濃度含む乳酸無機塩培地を用いた。好気培養の場合にはシリコ栓で蓋をし、嫌気培養の場合にはブチルゴム栓で蓋をして気相部を窒素置換した培地を用いた。培養液を経時的に採取し、セレン酸及び亜セレン酸濃度を測定した。

7. ホールセル還元試験

好氣的に 24 時間培養した NT-I 株の培養液 1 ml を、300 ml の三角フラスコに分注した 1 mM のセレン酸を含む 100 ml の TSB 培地に植菌し、セレン酸還元試験の場合 8 時間、亜セレン酸還元試験の場合 12 時間の培養を行った。この培養液 20 ml 分の菌体を遠心分離 ($10,000 \times g$, 10 min, 4°C) で回収し、5 mg/l トリポリリン酸ナトリウム水溶液で洗浄した後、各 pH、塩濃度に調整したセレン酸または亜セレン酸を含む乳酸無機塩培地に懸濁した。これを各温度条件で好氣的に培養した。培養基本条件を温度 30°C、pH7.0、NaCl 濃度 0.05 g/l (セレン酸還元試験)、または温度 28°C、pH7.0、NaCl 濃度 0.05 g/l (亜セレン酸還元試験) とし、それぞれの試験系で温度、pH、NaCl 濃度のうち一つの条件のみを変更して試験を行った。経時的にセレン酸、亜セレン酸の濃度を測定し、直線的減少を示した濃度の経時変化より比セレン酸還元速度、比亜セレン酸還元速度を算出した。

8. 走査型電子顕微鏡による解析

培養液を 0.1% の poly-L-lysine に事前に浸漬したガラスプレートにスポットし、2% グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液中で 1 時間、固定化処理を行った。固定化したサンプルはリン酸緩衝液中で 3 回洗浄し、*tert*-butanol によって脱水した後、凍結乾燥と炭素コーティングを行った。走査型電子顕微鏡 (SEM、JEOL JSM-6390LA) 及びエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX, Oxford Instruments) による解析は日本電子株式会社に委託した。

9. 機器分析

培養液の OD_{600} は分光光度計 (UV-1200; Shimadzu Corporation) によって行い、菌体濃度を下記の計算式により算出した；菌体濃度 (cells/ml) = $OD_{600} \times 9 \times 10^7$ 。全てのセレン類の分析サンプルは、分析に先立って遠心分離 ($15,000 \times g$, 10 min, 4°C) により液相と固相に分離した。液相中のセレン酸濃度及び亜セレン酸濃度はイオンクロマトグラフ (HIC-SP system; Shimadzu) を用いて測定した。ここで、分離カラムとして IonPac AS4A-SL column (Dionex) を用い、移動相として DIRECT-Q system (Nihon Millipore) によって製造した超純水に 3 mM Na_2CO_3 を溶解し用いた。また、遠心分離後の沈殿物として得られた固相は 0.8% NaCl で洗浄の後、混酸 (20 ml の 60% 硝酸と 1 ml の 95% 硫酸を混合して調整) 中で 10 分煮沸するこ

とにより、溶解した。溶解したサンプル中の全セレン濃度は誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (SPS7800; SII NanoTechnology Inc.) により測定した。気相部のメチル化セレン化合物の分析にはガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) を用いた。GC-MS の構成は以下の通りである。GC システム, GC-17A (Shimadzu) ; カラム, Rtx 624 (Restek) (長さ、30.0 m; 内径、0.25 mm; 膜厚、1.4 μ m) ; キャリアガス、ヘリウムガス; キャリアガス圧力、80 kPa; カラム流量、1.5 ml/min.; 全流量、9.0 ml/min.; カラム槽温度、33~180°C (10°C/min.昇温) ; 気化室温度、210°C; インターフェース温度、210°C; スプリット比、5; MS システム、QP-5000 (Shimadzu) ; 溶媒溶出時間、2 min.; 測定開始時間、3 min.; 検出器電圧、1.8 kV; ソフトウェアシステム CLASS-5000 (Shimadzu)。

第3節 結果

1. *P. stutzeri* NT-I の単離と形態学的、生理学的特徴付け、増殖特性

セレン精錬工場の排水溝より採取した排水サンプル中の生菌数について、セレン酸を 0、1 mM、または 5 mM 含む TSB 寒天培地上で調べたところ、それぞれ 1.2×10^6 、 9.9×10^5 、 7.5×10^5 CFU/ml であり、これらのコロニーのうち、1 mM セレン酸を含む TSB 寒天培地上で強力なセレン酸還元能を示すと考えられたものを分離して NT-I と命名した。16S rDNA 塩基配列を決定したところ、その配列は *Pseudomonas stutzeri* CCUG11256^T の 16S rDNA 塩基配列と完全に一致したことから、NT-I 株は *P. stutzeri* であると同定された。NT-I 株の形態学的、生理学的特徴を調べたところ、グラム陰性、桿菌、運動性有り、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、グルコースの oxidative-fermentative テストにおいて oxidative (酸化性) であった。また、API20NE を用いて NT-I 株の生理特性を調べた結果、Table 4-1 のようになった。これらの結果は *P. stutzeri* の基本的特性と一致するものだった (Holt, 1984)。さらに、BIOLOG GN2 を用いて炭素源資化性を調べた結果、Table 4-2 のようになった。

各培養温度、pH、塩濃度における NT-I 株の比増殖速度を Fig. 4-1 に示す。NT-I 株は好気条件下において 10–42°C、pH 6–9、0.1–50 g-NaCl/l の範囲で増殖可能であった。また、38°C、pH 7.0、10 g-NaCl/l の条件下で最大の比増殖速度 0.35 h^{-1} を示した。

Table 4-1. Physiological traits of strain NT-I determined using API20NE

Physiological traits	
Nitrate reduction	+
N ₂ production	-
Indole production	-
Glucose oxidation	-
Arginine dihydrolase	-
Urease	-
β -glucosidase	-
Gelatin hydrolysis	-
β -galactosidase	-
Glucose	+
L-arabinose	-
D-mannose	-
D-mannitol	+
N-acetyl-D-glucosamine	-
Maltose	+
Potassium gluconate	+
n-capric acid	+
Adipic acid	-
DL-malic acid	+
Sodium citrate	+
Phenyl acetate	-

+, positive; -, negative

Table 4-2. Growth on various carbon sources of strain NT-I determined using BIOLOG GN2

Sugars			
α -Cyclodextrin	-	α -D-Lactose	-
Dextrin	++	Lactulose	-
Glycogen	++	Maltose	-
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	D-Mannose	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	D-Melibiose	-
L-Arabinose	-	β -Methyl-D-Glucoside	-
D-Cellobiose	-	D-Psicose	-
D-Fructose	-	D-Raffinose	-
L-Fucose	-	L-Rhamnose	-
D-Galactose	-	Sucrose	-
Gentiobiose	-	D-Trehalose	-
α -D-Glucose	++	Turanose	-
Carboxylic acids			
Methyl pyruvate	++	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	-
Mono-Methyl succinate	+	Itaconic Acid	+
Acetic Acid	-	α -Keto Butyric Acid	-
Cis-Aconitic Acid	++	α -Keto Glutaric Acid	++
Citric Acid	++	α -Keto Valeric Acid	-
Formic Acid	++	D,L-Lactic Acid	++
D-Galactonic Acid Lactone	-	Malonic Acid	+
D-Galacturonic Acid	++	Propionic Acid	+
D-Gluconic Acid	++	Quinic Acid	-
D-Glucosaminic Acid	-	D-Saccharic Acid	++
D-Glucuronic Acid	++	Sebacic Acid	+
α -Hydroxybutyric Acid	-	Succinic Acid	++
β -Hydroxybutyric Acid	++	Bromosuccinic Acid	+
γ -Hydroxybutyric Acid	-	Succinamic Acid	-
Amino acids			
Glucuronamide	++	L-Ornithine	-
L-Alaninamide	-	L-Phenylalanine	-
D-Alanine	+	L-Proline	+
L-Alanine	+	L-Pyroglutamic Acid	++
L-Alanylglycine	-	D-Serine	-
L-Asparagine	++	L-Serine	-
L-Aspartic Acid	++	L-Threonine	-
L-Glutamic Acid	++	D,L-Carnitine	-
Glycyl-L-Aspartic Acid	-	γ -Amino Butyric Acid	-
Glycyl-L-Glutamic Acid	-	Urocanic acid	-
L-Histidine	-	Phenyethylamine	-
Hydroxy-L-Proline	-	Putrescine	-
L-Leucine	+		
Surfactants			
Tween 40	+	Tween 80	+
Phosphorylated sugars			
D,L- α -Glycerol Phosphate	-	D-Glucose-6-Phosphate	-
α -D-Glucose-1-Phosphate	-		
Sugar alcohols			
Adonitol	-	D-Sorbitol	-
D-Arabitol	-	Xylitol	-
i-Erythritol	-	2-Aminoethanol	-
m-Inositol	-	2,3-Butanediol	-
D-Mannitol	++	Glycerol	+
Nucleoside			
Inosine	-	Thymidine	-
Uridine	-		

++, OD₅₉₅>0.5; +, OD₅₉₅=0.1-0.5; -, OD₅₉₅<0.1

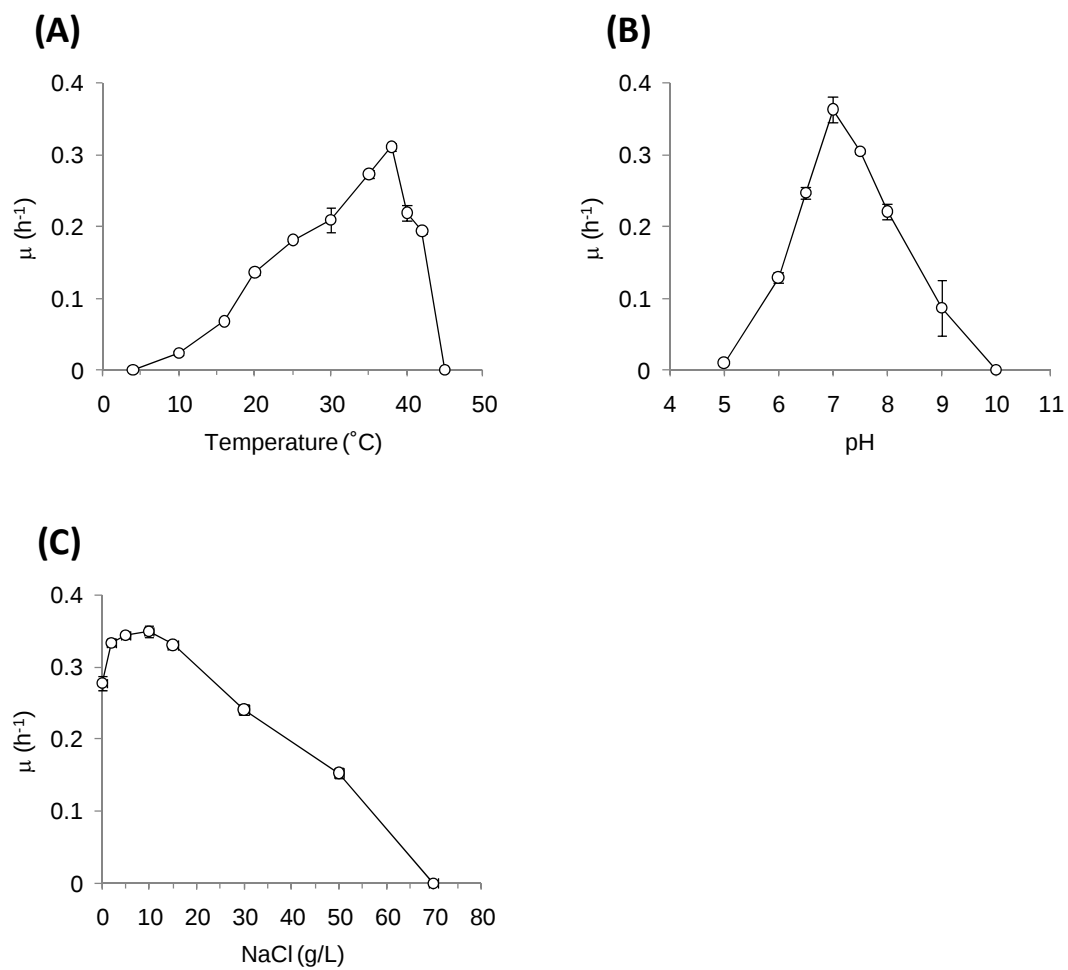


Fig. 4-1. Specific growth rate of strain NT-I under various temperatures, pH values, and salinities. **(A)** Effect of temperature, **(B)** effect of pH, and **(C)** effect of salinity. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

2. NT-I 株によるセレン酸及び亜セレン酸の還元

NT-I 株による好気条件下での還元試験におけるセレン酸、亜セレン酸濃度の経時変化を Fig. 4-2 に示す。NT-I 株は 1 mM のセレン酸全量を培養 6 時間で亜セレン酸にまで還元し、続いて、生成した亜セレン酸の全てを培養 18 時間で還元することで、水中から除去したものと考えられた。また、0.9 mM の亜セレン酸全てを培養 18 時間で還元し、固相中のセレンに変換した。これら還元試験において、培養液を SEM によって観察したところ、最大 200 nm 程度の直径の球形粒子が細胞外に遊離している様子が観察された (Fig. 4-3)。また、この粒子は EDX により、セレン粒子であることが明らかとなった。培養液が濃い赤を呈色していたことを考え合わせると、還元により生成した固相のセレンは元素態セレンであると推測された。

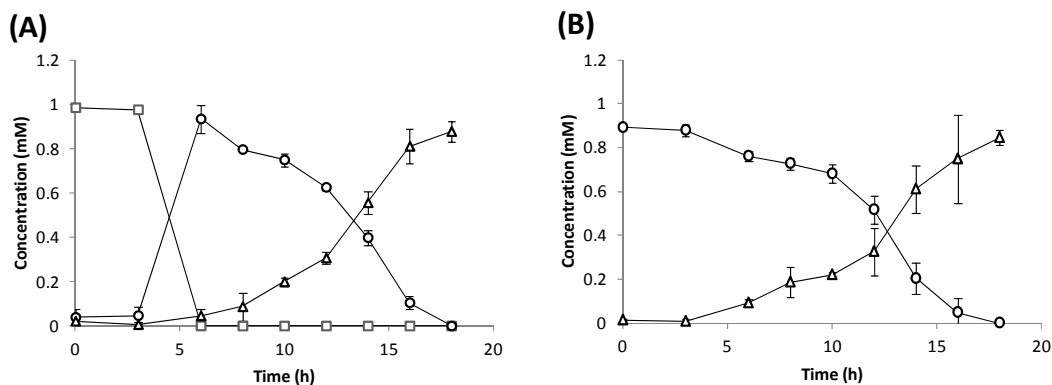


Fig. 4-2. Time course of aerobic selenate and selenite reduction to elemental selenium in TSB medium by strain NT-I. **(A)** Initial selenate concentration of 1.0 mM, and **(B)** initial selenite concentration of 0.9 mM. Symbols: open squares, selenate; open circles, selenite; open triangles, elemental selenium. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

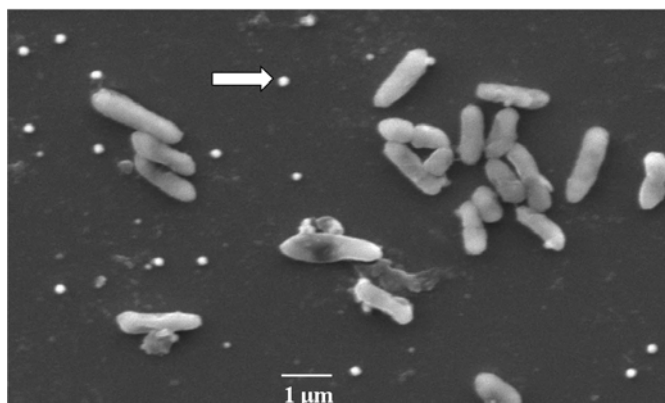


Fig. 4-3. Scanning electron microscopy image of strain NT-I. The arrow indicates a particle of elemental selenium.

3. セレン酸還元に伴う物質収支

TSB 培地中における NT-I 株のセレン酸還元に伴うセレンの物質収支を Table 4-3 に示す。培養開始 16 時間後に、セレン酸及びセレン酸の還元産物である亜セレン酸の濃度はともに 0 mM になり、初期に添加したセレン酸濃度に対する 97% が固相部の元素態セレンとして回収された。さらに開始から 120 時間まで培養を続けた場合、元素態セレンに由来する培養液の赤色が退色し、元素態セレンはセレン酸初期添加濃度に対して 17% にまで減少した。この時、セレン酸及び亜セレン酸の濃度も 0 であったことから、元素態セレンの減少分は固相部、液相部から気相部に移行したことが推測された。そこで、培養器中の気相部を GC-MS によって分析したところ、ジメチルセレナイド、ジメチルジセレナイド、及びジメチルセレニルサルファイドの存在が確認された。これまでに様々な生物において、セレン代謝産物としてメチル化セレン化合物が生成されることが報告されていることから (Chasteen & Bentley, 2009)、これらのメチル化セレン化合物は NT-I 株によって産生されたものであると推測された。この結果より、NT-I 株は TSB 培地での増殖に伴い、セレン酸及び亜セレン酸を元素態セレンに還元し、さらには長時間の培養の継続により元素態セレンの大部分を、酸化数 -II であるメチル化セレン化合物にまで還元することが示唆された。

Table 4-3. Transition of material balance of selenium during cultivation of strain NT-I

Time [h]	Selenium [mM]			Recovery as solid selenium [%]
	Selenate	Selenite	Elemental selenium	
0	0.96	0	0	0
16	0	0	0.93	97
120	0	0	0.165	17

4. 高濃度セレンの還元

NT-I による高濃度のセレン酸の還元試験の結果を Fig. 4-4A に示す。NT-I 株は 10 時間以内に 5 mM、16 時間以内に 11 mM のセレン酸を還元した。また、より高濃度のセレン酸の 48 時間での還元率は、25 mM の場合 49%、54 mM の場合 22%、122 mM の場合 16% だった。25 mM 以上のセレン酸については完全に還元することはできなかったが、ある程度の還元は可能であるという結果となった。

続いて、NT-I による高濃度の亜セレン酸の還元試験の結果を Fig. 4-4B に示す。NT-I 株は 4 mM の亜セレン酸を 20 時間で、9 mM の亜セレン酸を 48 時間で、それぞれほぼ全量還元した。また、より高濃度の亜セレン酸の培養開始 48 時間での還元率は、25 mM の場合 54%、50 mM の場合 17%、94 mM の場合 8% だった。この時、亜セレン酸濃度が高濃度になるにつれ、還元が始まるまでのラグタイムが長くなる傾向が認められた。

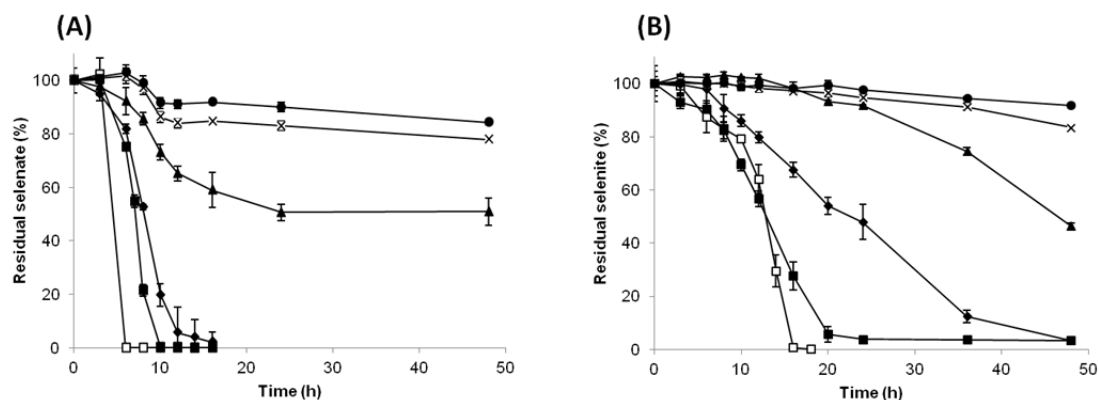


Fig. 4-4. Reduction of selenate and selenite at various initial concentrations. **(A)** Selenate reduction. Symbols: open squares, 1 mM; closed squares, 5 mM; closed diamonds, 11 mM; closed triangles, 25 mM; crosses, 54 mM; closed circles, 122 mM. **(B)** Selenite reduction. Symbols: open squares, 1 mM; closed squares, 4 mM; closed diamonds, 9 mM; closed triangles, 25 mM; crosses, 50 mM; closed circles, 94 mM. Concentrations of selenate and selenite were indicated as percentages against their initial concentrations. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

5. セレン酸還元、亜セレン酸還元速度に対する温度、pH、塩濃度、通気の影響

ホールセル還元試験により算出した各温度、pH、塩濃度条件下での比セレン酸還元速度、比亜セレン酸還元速度を Fig. 4-5 に示す。セレン酸還元については 40°C が至適温度であったが、比亜セレン酸還元速度は 20–50°C の間で温度の上昇とともに上昇した。pH についてはセレン酸還元の至適 pH が 8、亜セレン酸還元の至適 pH が 7 と若干の違いがあり、セレン酸については pH7–9 の範囲で、亜セレン酸については pH6–9 の範囲で還元が可能だった。塩濃度については、NaCl の濃度の上昇とともに比セレン酸還元速度、比亜セレン酸還元速度ともに低下した。また、温度 30°C、pH 7、NaCl 濃度 0.05 g/l の時の比セレン酸還元速度 (5.0×10^{-6} nmol/h/cell) を 100% とした場合、温度を 40°C にすれば、比セレン酸還元速度は 157% に、また pH 8 とした場合、比セレン酸還元速度は 122% になることがわかった。同様に、温度 28°C、pH 7、NaCl 濃度 0.05 g/l の時の比亜セレン酸還元速度 (4.1×10^{-7} nmol/h/cell) を 100% とした場合、温度を 50°C にすれば比セレン酸還元速度は 137% になることがわかった。このように、セレン酸、亜セレン酸還元条件の最適化によって、さらに還元速度を高められる可能性が示された。

好気条件下、嫌気条件下でのセレン酸、亜セレン酸還元を Fig. 4-6 に示す。セレン酸は好気、嫌気両条件下で還元が生じたが、好気条件下と比較して、嫌気条件下ではセレン酸還元はやや早く進行する傾向が認められた。一方で、亜セレン酸還元については、好気条件下は還元が進行したもの、嫌気条件下では完全に抑制された。

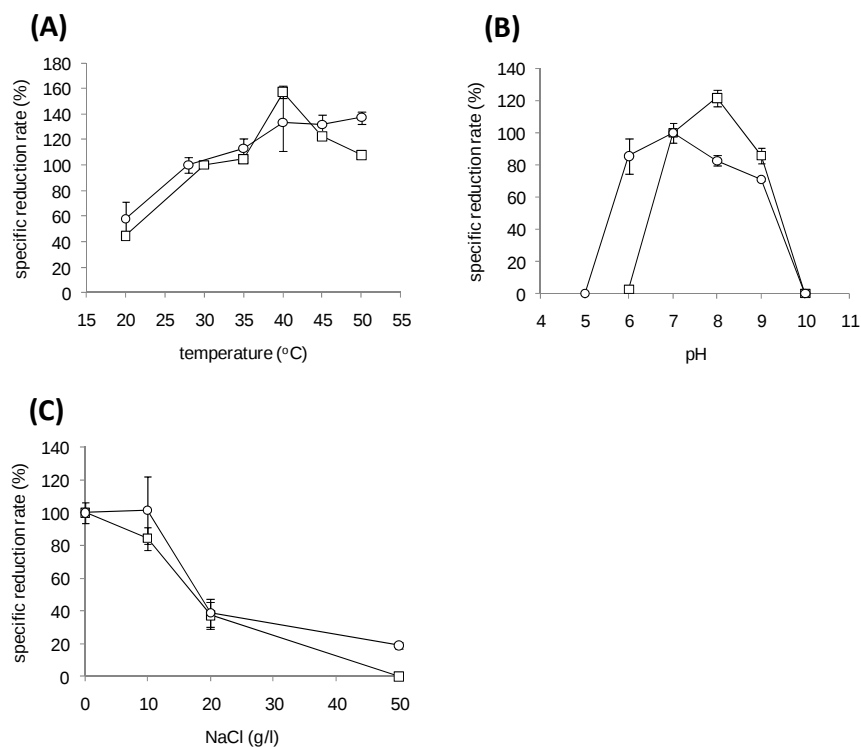


Fig. 4-5. Specific reduction rates of selenate and selenite based on whole cell reduction assays. **(A)** Effect of temperature, **(B)** effect of pH, and **(C)** effect of salinity. Specific reduction rates of selenate and selenite are indicated as percentages against the rates under basal conditions: 5.0×10^{-6} nmol/h/cell at 30°C, pH 7.0, and 0.05 g/L NaCl, and 4.1×10^{-7} nmol/h/cell at 28°C, pH 7.0, and 0.05 g/L NaCl. Symbols: open squares, specific selenate reduction rate; open circles, specific selenite reduction rate. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

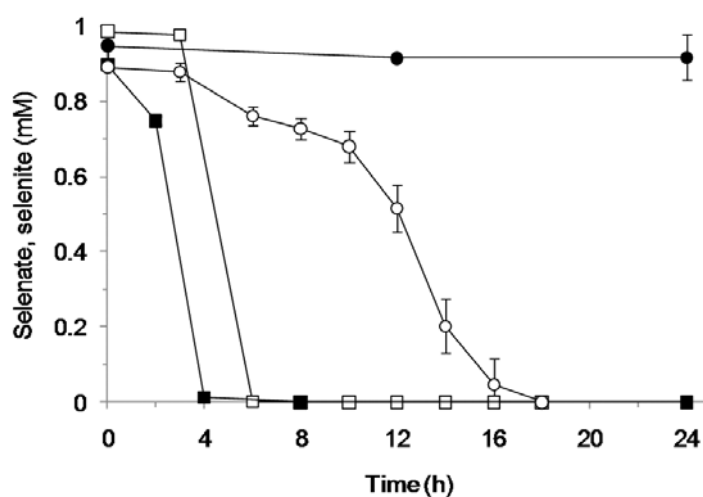


Fig. 4-6. Selenate and selenite reduction under aerobic and anaerobic conditions. Symbols: open squares, selenate under aerobic conditions; closed squares, selenate under anaerobic conditions; open circles, selenite under aerobic conditions; closed circles, selenite under anaerobic conditions. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

6. 無機塩培地中でのセレン酸、亜セレン酸還元

乳酸無機塩培地中での NT-I 株によるセレン酸の還元を試みた結果を Fig. 4-7 に示す。好気条件下において独立した 3 系のセレン酸還元試験を行ったところ、1 系において 24 時間でセレン酸は全く還元されず、残る 2 系においては 24 時間で 0.24 mM にまで還元された (Fig. 4-7 (A))。TSB 培地中でのセレン酸還元 (Fig. 4-2 (A)) と比較して、安定してセレン酸還元を再現できず、また還元に要する時間も長くなった。一方で、嫌気条件下において独立した 3 系のセレン酸還元試験を行ったところ、3 系とも同様の結果を示し、初期約 1 mM のセレン酸を 10 時間で全量還元した (Fig. 4-7 (B))。この時、セレン酸の還元によって生成した亜セレン酸は全く還元されなかった。以上の結果より、無機塩培地のような貧栄養環境下では、NT-I 株によるセレン酸還元には、厳密な嫌気条件が必要であることが示された。

同様に、乳酸無機塩培地中での NT-I 株による亜セレン酸還元を試みた結果を Fig. 4-8 に示す。乳酸無機塩培地中では亜セレン酸還元は生じるものの 48 時間でも 0.46 mM の亜セレン酸が残存し (Fig. 4-8 (A))、TSB 培地中での結果 (Fig. 4-2 (B)) と比較して還元速度が遅かったことから、何らかの栄養源が不足しているものと考えられた。そこで、TSB の成分の一つであるカザミノ酸を乳酸無機塩培地に種々の濃度で添加した。0.1 g/l のカザミノ酸を添加した場合、48 時間でほぼ全量の亜セレン酸を還元し (Fig. 4-8 (B))、1 g/l のカザミノ酸を添加した場合、24 時間でほぼ全量の亜セレン酸を還元した (Fig. 4-8 (C))。これらの実験において、カザミノ酸の添加による菌体濃度の大幅な増加はなかったことから、カザミノ酸が菌体あたりの亜セレン酸還元活性を高めたと推測された。しかし、6 g/l のカザミノ酸を添加した場合は、1 g/l のカザミノ酸を添加した場合と比較して、12 時間時点での亜セレン酸の残存濃度がやや高くなり、還元速度が低下したと考えられた (Fig. 4-8 (D))。また、1 g/l のカザミノ酸に加えて同じく TSB 培地の成分であるソイトンを 1 g/l 添加した系では 24 時間以降亜セレン酸が残存し (Fig. 4-8 (E))、1 g/l のカザミノ酸に加えてソイトンを 3 g/l 添加した系では還元速度が低下する傾向が認められた (Fig. 4-8 (F))。

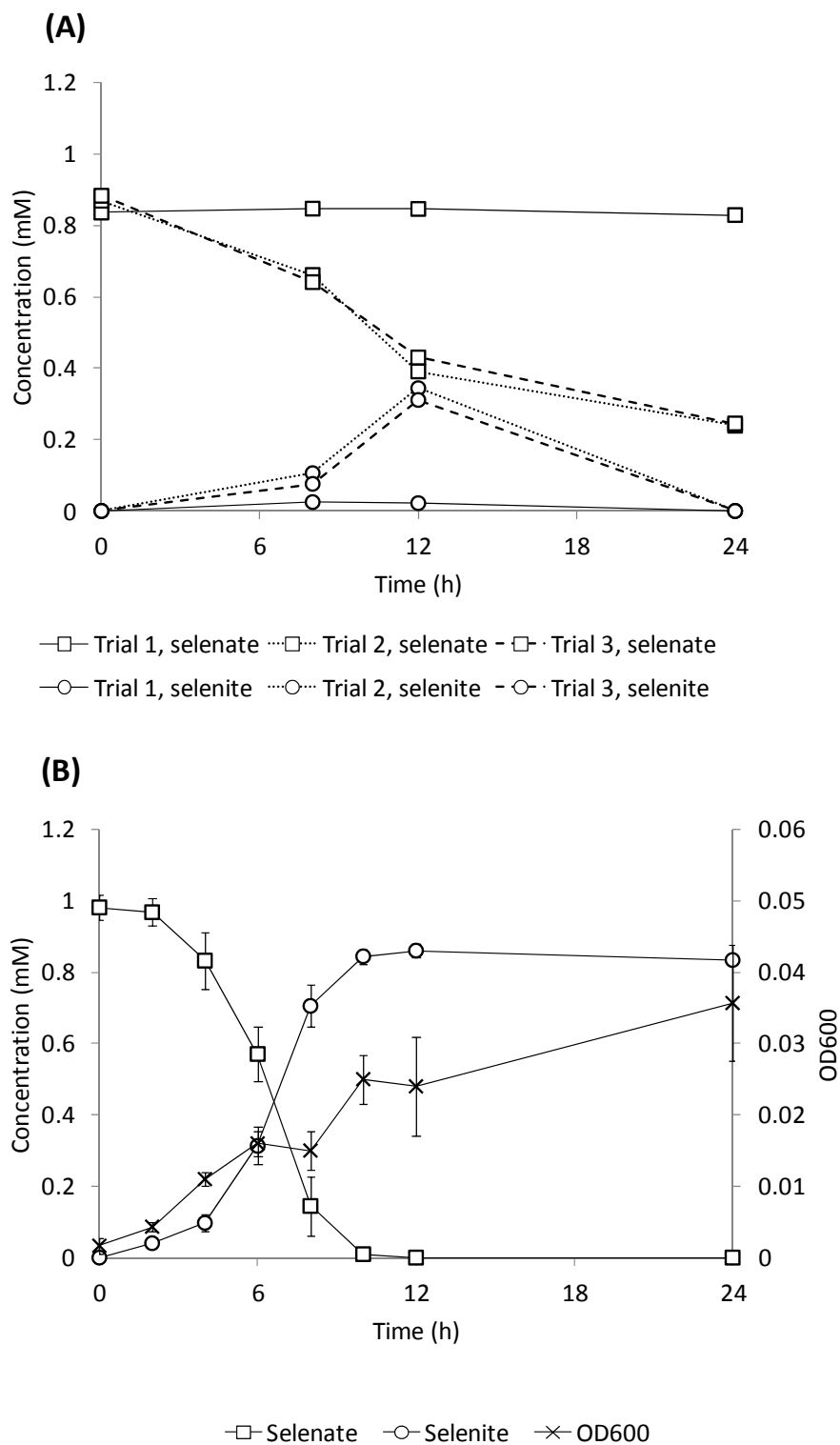


Fig. 4-7. Selenate reductions in lactate-basal salt medium by strain NT-I. (A) Selenate reduction in lactate-basal salt medium under aerobic condition. Results obtained in three trials are shown respectively. (B) Selenate reduction in lactate-basal salt medium under anaerobic condition. Mean values obtained from three independent trials were shown. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

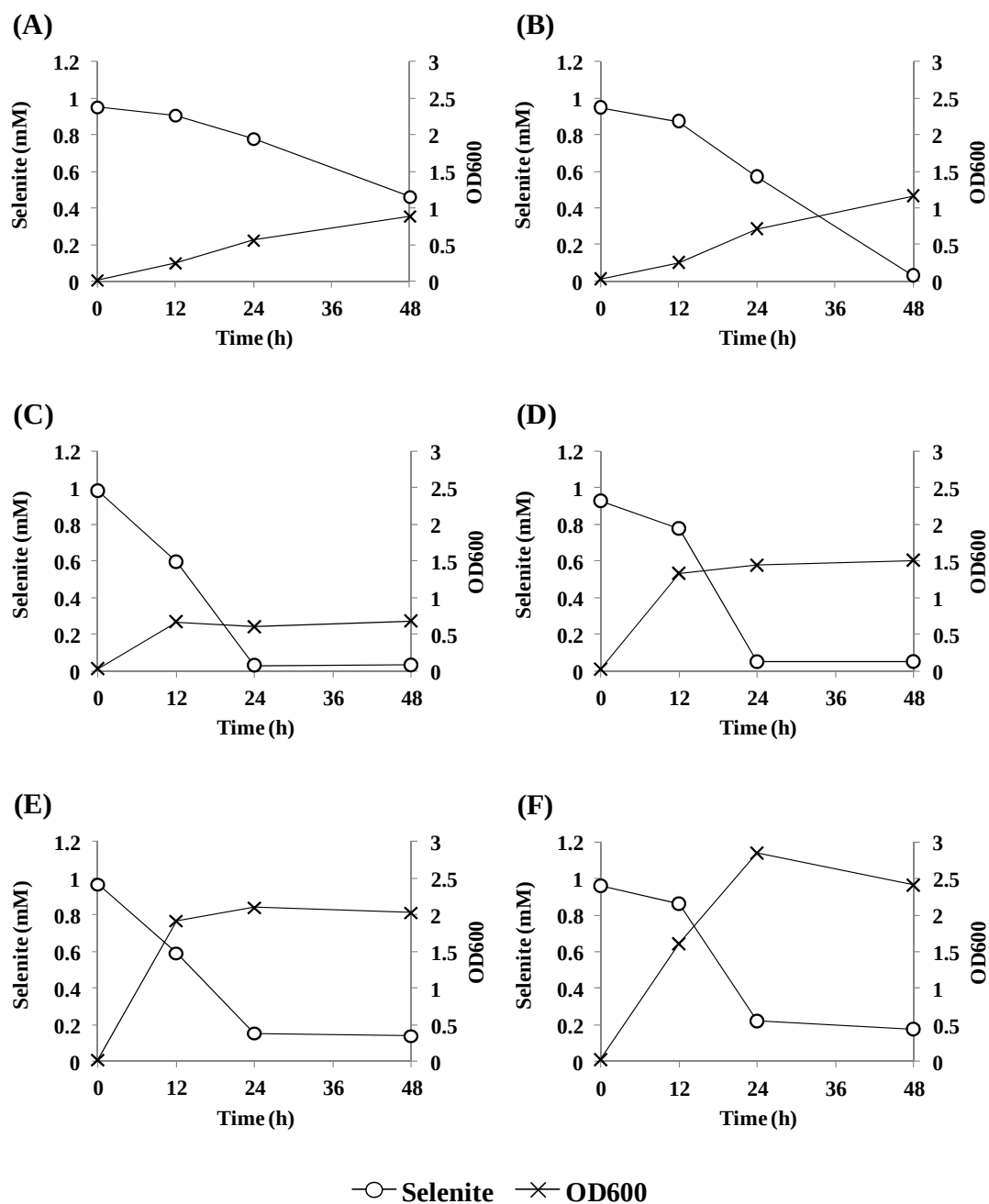


Fig. 4-8. Selenite reductions in lactate-basal salt medium plus nutrients by strain NT-I. Selenite reduction in lactate-basal salt medium plus (A) none, (B) 0.1 g/l casamino acids, (C) 1 g/l casamino acids, (D) 6 g/l casamino acids, (E) 1 g/l casamino acids and 1 g/l soytone, or (F) 1 g/l casamino acids and 3 g/l soytone. All cultures were incubated under aerobic condition.

第4節 考察

1. セレン含有廃水の生物学的処理プロセスへの NT-I 株の適応性

本研究で単離された NT-I 株は、好気条件下において約 1 mM という高濃度のセレン酸を亜セレン酸にまで還元でき、また、生成した亜セレン酸についても長時間の蓄積をすることなく、速やかに元素態セレンにまで還元することができた。同様に、約 1 mM の亜セレン酸についても速やかに元素態セレンに還元することができた。また、Fig. 4-4 に示すように、さらに高濃度の約 10 mM のセレン酸・亜セレン酸であっても、同様の条件で元素態セレンにまで還元できた。10 mM を超えるセレン酸・亜セレン酸については、全量を還元することはできなかったが、一部の還元は認められた。セレン酸については、いずれの濃度でも還元が始まるまでのラグタイムに大きな違いはなく、培養開始 6-16 時間の間に還元が進行し、10 mM 相当分のセレン酸が還元された。これより、セレン酸の毒性は NT-I 株に影響を与えておらず、セレン酸還元に必要な電子の供給源となる炭素源がセレン酸量に対して不足していたために還元が途中で停止したと推測され、培地成分の改善により、より高濃度のセレン酸も完全還元できる可能性があると推測された。亜セレン酸については、その濃度が高くなるにつれ還元が始まるまでのラグタイムが長くなる傾向が見られたことから、亜セレン酸の毒性が NT-I 株に影響を与えていることが考えられた。しかしながら、還元が開始してからの還元速度に大きな違いはなかったことから、NT-I 株は高濃度亜セレン酸の還元にも対応できるものと考えられた。以上より、NT-I 株は高濃度のセレン酸・亜セレン酸還元について高いポテンシャルを持つことが明らかとなった。

本研究ではさらに、NT-I 株のセレン酸・亜セレン酸還元に必要な温度、pH、塩濃度条件について調べた (Fig. 4-5)。セレン酸還元については、温度を 40°C にすること、または pH を 8.0 にすることで、30°C、pH7.0 の時と比較して比セレン酸還元速度がそれぞれ約 1.4 倍、約 1.2 倍になることが明らかとなった。また亜セレン酸についても温度を 50°C にすることで 28°C の時の約 1.4 倍の比亚セレン酸還元速度が得られることが明らかとなった。一方で、セレン酸還元、亜セレン酸還元ともに pH7 前後の中性域、NaCl 濃度 20 g/l までの低塩濃度環境下から逸脱した条件では還元ができないという結果が得られた。本試験は細胞全体を用いた試験であり、Fig. 4-1 に示す NT-I 株の各条件下での増殖特性と Fig. 4-5 に示すセレン酸・亜セレン酸還元特性が似通っていることから、セレン酸還元・亜セレン酸還元を担う酵素の特性のみならず、細胞自体の環境への適応性が反映されたものと考えられる。本菌株をセレン含有廃水生物学的処理プロセスへ適用する際には、還元反応に先立って廃水の pH や塩濃度をあらかじめ調整する必要があると言える。

2. NT-I 株と他のセレン酸還元細菌との比較

NT-I 株の特性を第 1 章に挙げたセレン酸還元細菌と比較し、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスへの適用性を検討した。第 1 章ですでに指摘したように、嫌気性セレン酸還

元細菌はいずれも亜セレン酸還元能力が高くないことから、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスにおいて利用するセレン酸還元細菌としては NT-I 株の方が優れていると考えられた。また、好気性セレン酸還元細菌である *Bacillus* sp. STG-83 は、亜セレン酸還元速度が NT-I 株ほど速くなく (Saudi *et al.*, 2009)、*St. maltophilia* BAA-902 は高濃度セレンの還元が確認されていないことから (Dungan *et al.*, 2003)、NT-I 株とそのセレン酸、亜セレン酸還元能力が比肩し得る唯一の菌株は *P. stutzeri* ATCC51152 であると考えられた (Lortie *et al.*, 1992)。ATCC51152 株は、報告されている試験条件は異なるものの、NT-I 株とほぼ同等のセレン酸及び亜セレン酸還元速度を有しており、高い能力を持つ菌株であると言える。NT-I 株と ATCC51152 株の相違点としては、ATCC51152 株がセレン酸、亜セレン酸について、それぞれ 48.1 mM、50 mM 以上の濃度における還元が報告されていないのに対し、NT-I 株はセレン酸については 122 mM まで、亜セレン酸については 94 mM までのより高い濃度における還元が可能であることが挙げられる。また、セレン酸還元最適温度が、NT-I 株は 40°C であるのに対し、ATCC51152 株は 25–35°C と若干低い。加えて、NT-I 株は好気、嫌気両条件下でセレン酸を還元できるのに対し、ATCC51152 株は好気条件下のみでセレン酸を還元し、嫌気条件下ではセレン酸を還元できないと報告されている。これらのセレン酸還元特性の差異は、両菌株が異なるセレン酸還元機構を持つことを示唆している。即ち、ATCC51152 株はセレン耐性のための還元機構を持つことが推測されると報告されているが、NT-I 株はセレン酸を嫌気呼吸における電子受容体として、嫌気条件下でのエネルギーを獲得に利用する機構を備えているのではないかと推測される。このように、NT-I 株と ATCC51152 株は、菌株としての特性に差異が認められるものの、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスへの適応性に大きな違いはなく、ともに有用性が高いと考えられる。しかし、ATCC51152 株に関する報告は Lortie *et al.* (1992) によるもの以降存在しないため、その詳細な特性は明らかでなく、実利用の可能性は現状では不明である。

3. セレンの揮発化について

本研究では、NT-I 株の長時間の培養によって、セレン酸から生成した元素態セレンが揮発性のメチル化セレン化合物として気相部に移行し得ることが示唆された (Table 4-3)。このようなメチル化セレン化合物の生成を行う細菌は珍しくなく、第 1 章に挙げたセレン酸還元細菌のうち、好気性セレン酸還元細菌である *Bacillus* sp. STG-83 (Saudi *et al.*, 2009)、*St. maltophilia* BAA-902 (Dungan *et al.*, 2003)、及び嫌気性セレン酸還元細菌である *E. cloacae* SLD1a-1 (Dungan & Frankenberger Jr., 2001) においても確認されている。しかし、元素態セレンの大部分が他のセレン化合物に変換された報告は、元素態セレンが Se^{2-} イオンに変換された 2 例 (Herbel *et al.*, 2003; Pearce *et al.*, 2009) を除いて他になく、NT-I 株は活発にセレンを揮発化する能力を持つことが示唆された。このような反応を利用すれば、廃水から除去したセレンを元素態セレンの形で固相部より回収するのみならず、メチル化物等揮発性セレン化合物の形で気相部より回収するプロセスの創造も可能であると考えられる。

4. 無機塩培地中でのセレン酸、亜セレン酸還元について

セレン含有廃水の生物学的処理プロセスへの適用を想定し、TSB 培地と比較して、より低コストであると考えられる乳酸無機塩培地での NT-I 株のセレン酸、亜セレン酸還元特性を検討した (Fig. 4-7、Fig. 4-8)。セレン酸還元については、乳酸無機塩培地中において好気条件下では還元速度が低下し、結果の再現性も低下したが、嫌気条件下では再現性が高まり、1 mM のセレン酸の全量を 10 時間で還元した (Fig. 4-7)。TSB 培地におけるセレン酸還元についても好気条件と比較して嫌気条件の場合にセレン酸がより早く還元されたこと (Fig. 4-6) と考え合わせると、NT-I 株はセレン酸還元において、ある程度の好気条件を許容するものの、嫌気条件がより好ましいのではないかと考えられた。

また、乳酸無機塩培地中において、亜セレン酸還元速度は低下し、48 時間の培養を行っても 1 mM 亜セレン酸の全量の還元は認められなかったが、ここにカザミノ酸を添加することにより、24 時間で全量の亜セレン酸を還元することができた (Fig. 4-8 (A)、(B)、(C))。この結果より、カザミノ酸に含まれる何らかのアミノ酸が亜セレン酸の還元に寄与していることが推測された。しかし、カザミノ酸の濃度を 6 g/l にした場合やカザミノ酸に加えてソイトンを添加した系では若干の還元速度の低下が見られた。カザミノ酸やソイトンは TSB 培地の成分であり、TSB 培地中での亜セレン酸還元速度 (Fig. 4-2 (B)) は、ここで試験した乳酸無機塩培地での還元速度よりも速かったことから、高濃度のカザミノ酸やソイトンが NT-I 株の亜セレン酸還元を阻害したとは考えられない。ここで、嫌気条件下では亜セレン酸の還元が生じない (Fig. 4-6) ことを考慮すると、6 g/l のカザミノ酸を添加した系、1 g/l のカザミノ酸と 1 g/l のソイトンを添加した系、1 g/l のカザミノ酸と 3 g/l のソイトンを添加した系では、これらを基質とした菌体の増殖に多量の酸素が消費されたために亜セレン酸還元が阻害されたものと考えられた。

以上より、NT-I 株のセレン酸、亜セレン酸還元の達成には、培地組成のみならず、通気が重要な因子であることが推測された。従って、NT-I 株のセレン酸、亜セレン酸還元に対する酸素供給の影響を定量的に評価することが、本菌株を用いたセレン含有廃水の生物学的処理プロセスの実用化に向けて重要な課題であると考えられる。

第5節 要約

本章では、セレン酸、亜セレン酸の両者に対して高い還元能力を持つ好気性セレン酸還元細菌の取得を目指し、セレン精錬工場の排水溝試料よりセレン酸還元細菌の分離を試みた。

単離された細菌 *P. stutzeri* NT-I は、好気条件下において 1 mM のセレン酸を、亜セレン酸を経て元素態セレンにまで還元した。また同様に、0.9 mM 亜セレン酸も元素態セレンにまで還元した。さらに高濃度のセレンについても、11 mM までのセレン酸を完全に亜セレン酸に還元し、9 mM までの亜セレン酸を完全に元素態セレンにまで還元することができた。加えて、より高い濃度のセレン酸、亜セレン酸についても一部のセレンの還元が観察された。セレン酸については 20–50°C、pH7–9、NaCl 濃度 0.05–20 g/l の範囲で還元することができ、亜セレン酸については 20–50°C、pH6–9、NaCl 濃度 0.05–50 g/l の範囲で還元することができた。また、好気、嫌気両条件下でセレン酸を還元できたが、亜セレン酸については好気条件下のみで還元が生じた。これらの結果より、NT-I 株はこれまでに報告されているセレン酸還元細菌と比較して最もセレン酸・亜セレン酸還元能力が高く、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスに活用するセレン酸還元細菌として有望であることが明らかとなった。さらに、培地としてより実用的な乳酸無機塩培地を用いた場合、TSB 培地を用いた場合と比較してセレン酸、亜セレン酸のいずれの還元能についても低下した。この問題に対し、嫌気条件下で培養することにより安定してセレン酸を還元でき、また乳酸無機塩培地に 1 g/l のカザミノ酸を添加することで安定して亜セレン酸を還元できることが明らかとなった。

第5章

Pseudomonas stutzeri NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の単離及び解析

第1節 緒言

第4章において、NT-I 株は好気・嫌気の両条件下においてセレン酸を還元する高い能力を持ち、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスに適用する菌株として有望であることが明らかとなった。これまでにセレン酸還元機構が明らかにされている細菌は、第1章で概説した *E. cloacae* SLD1a-1、*T. selenatis* AX の2菌株、及び第3章で明らかとなった *B. selenatarsenatis* SF-1 のみであるが、これらはいずれも嫌気性セレン酸還元細菌であり、好気性セレン酸還元細菌においてセレン酸還元機構が明らかになった例はない。そこで本章では、*P. stutzeri* NT-I のセレン酸還元酵素遺伝子、及びセレン酸還元関連遺伝子群を単離し、解析することを目的として研究を行った。

第2節 実験材料及び方法

1. 使用菌株とプラスミド

使用菌株とプラスミドを Table 5-1 に示す。NT-ISM^R 株は、Streptomycin を 1000 µg/ml 含む LB 寒天培地に NT-I 株を塗布し、自然突然変異による Streptomycin 耐性株を選択することにより取得した。*E. coli* DH5α λ pir は pUTmini-Tn5 Tc の宿主として用いた。*E. coli* DH5α はその他のプラスミドの宿主として用いた。

2. 培地及び培養条件

P. stutzeri NT-I とその派生変異株は、BactoTM Trypticase Soy Broth (TSB; Becton–Dickinson) 培地、及び 15 g/l の寒天を含む TSB 培地 (TSB 寒天培地) を用いて培養した。*E. coli* の各株は DifcoTM LB broth Lennox (LB; Becton–Dickinson) 培地、及び 15 g/l の寒天を含む LB 培地 (LB 寒天培地) を用いて培養した。NT-I セレン酸還元能欠損変異株の表現型試験には 2.2 g/l の乳酸ナトリウム、及び 3 g/l の TSB を含む無機塩培地 (K_2HPO_4 1 g/l、 $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l、 $FeCl_3$ 0.01 g/l、NaCl 0.05 g/l、 $CaCl_2$ 0.01 g/l、pH 7.0) を用い、また、セレン酸還元能の誘導条件の検討には、10 g/l のカザミノ酸を加えた乳酸無機塩培地を用いた。必要に応じて、電子受容体として 0.5 mM のセレン酸ナトリウムまたは亜セレン酸ナトリウムを加えた。全ての培養で必要に応じて streptomycin (Sm; 100 µg/ml)、tetracycline (Tc; 12.5 µg/ml)、ampicillin (Ap; 30 µg/ml)、kanamycin (Km; 30 µg/ml) の各抗生物質を培地に加えた。

Table 5-1. Bacterial strains and plasmids used in this study

	Relevant properties	Reference
Organism and strain:		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		
NT-I	Wild type	This work
NT-ISMR	Spontaneous Sm ^r mutant	This work
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	(Sambrook & Russell, 2001)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α λ pir	Containing <i>pir</i> gene necessary for the R6K origin replication of pUTmini-Tn5 Tc.	(Biomedal)
Plasmid:		
pGEM-T Easy vector	TA cloning vector, Ap ^r .	Promega
pUC18	Cloning vector, Ap ^r .	(Sambrook & Russell, 2001)
pUTmini-Tn5 Tc	Containing mini-Tn5, Tc ^r , Ap ^r .	(Biomedal)
pRK2013	Helper plasmid for the mobilization of plasmid, containing <i>tra</i> and <i>mob</i> . Km ^r .	(Biomedal)
pK18mobsacB	Mobilizable vector containing <i>mob, sacB</i> , Km ^r .	(Schäfer et al., 1994)
pK18mobsacBnarXLKO	pK18mobsacB containing shortened <i>narXL</i> operon.	This work

3. DNA 操作

制限酵素 (TaKaRa Bio または Toyobo)、T4 DNA ligase (TaKaRa Bio) は説明書に基づき使用した。DNA の増幅はサーマルサイクラーMastercycler standard (Eppendorf) を用い、PCR によって行った (Sambrook & Russell, 2001)。DNA ポリメラーゼとして、inverse PCR には KOD-plus DNA polymerase (Toyobo)、その他の用途、及び平滑末端 DNA 断片の A-tailing には *Ex Taq* DNA polymerase (TaKaRa Bio) を用いた。ゲノム DNA の調製には illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) を用い、プラスミド DNA の調製には High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science) を用いた。また、DNA 断片のアガロースゲルからの調製には Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いた。DNA 断片末端のリン酸化は T4 polynucleotide kinase (TaKaRa) を用いた。塩基配列の決定は BigDye Terminator Kit と ABI3100 system (Life Technologies Japan) を用いて行った。アガロースゲル電気泳動、及び大腸菌の形質転換は Sambrook & Russell (2001) らの方法により行った。

4. トランスポゾン Tn5 によるセレン酸還元能欠損変異株の作製

E. coli DH5 α λ pir/pUTmini-Tn5 Tc を Tn5 の供与菌として、*P. stutzeri* NT-ISMR を受容菌として、*E. coli* DH5 α /pRK2013 を Tn5 伝達のためのヘルパー菌としてそれぞれ用いて、三親接合により Tn5 を導入し、セレン酸還元能欠損変異株の取得を試みた。*E. coli* DH5 α λ pir/pUTmini-Tn5 Tc を Ap と Tc を加えた 3 ml の LB 培地中で、*P. stutzeri* NT-ISMR を Sm を加えた 3 ml の LB 培地中で、*E. coli* DH5 α /pRK2013 を Km を加えた 3 ml の LB 培地中で、それぞれ 37°C で一晩、好氣的に培養した。*P. stutzeri* NT-ISMR 培養液を 500 μ l、*E. coli* DH5 α λ pir/pUTmini-Tn5 及び *E. coli* DH5 α /pRK2013 各培養液をそれぞれ 50 μ l ずつ、別々のマイク

ロチューブに取り、菌体を遠心分離 ($8,000 \times g$, 1 min, 25°C) により回収して等量の LB 培地で2回洗浄した後、3株を混合して 100 μl の LB 培地に懸濁した。この懸濁液を LB 寒天培地に塗布し、 37°C で一晩培養した。続いて、5 ml の 10 mM MgSO_4 水溶液で寒天培地上の菌体を回収し、適宜希釈した後に Sm、Tc、及び 0.5 mM のセレン酸を含む TSB 寒天培地に塗布した。この寒天培地を 37°C で1日から2日培養し、白いコロニーを形成する株をセレン酸還元能欠損変異株として選択した。得られたセレン酸還元能欠損変異株を同様の TSB 寒天培地、及び Sm、Tc、0.5 mM の亜セレン酸を含む TSB 寒天培地に再度塗布し、 37°C で1日培養し、コロニーの呈色によりセレン酸または亜セレン酸還元能を確認した。

5. NT-I 株のドラフトゲノム解析

NT-I 株のドラフトゲノム解析は株式会社日立ソリューションズに委託して行った。ここでは、Genome Sequencer FLX System (Roche) を用い、ショットガンゲノム解析法によって配列情報が取得された。得られた配列情報をアセンブルし、複数のコンティグに分断された形のドラフトゲノム配列を得た。

6. トランスポゾン Tn5 挿入位置近傍のクローニング

トランスポゾン Tn5 挿入位置近傍領域の DNA 断片は、*Sph*I で消化した各変異株のゲノム DNA から inverse PCR によって増幅した (Sambrook & Russell, 2001)。Tn5 挿入位置の上流側の増幅には Tn5-001 (5'-taaagcatgctcaatcaatcaccgg-3') 及び Tn5-002 (5'-ttatgcgactcctgcattaggaag-3') のプライマーセットを、Tn5 挿入位置の下流側の増幅には Tn5-003 (5'-atgcgttgatgcaatt tctatgc gc-3') 及び Tn5-004 (5'-ataaagcatgctcaatcaatcaccgg-3') のプライマーセットをそれぞれ用いた。増幅断片を *Sph*I で制限酵素処理し、ゲル抽出により精製した後に、pUC18 の *Sph*I サイトにサブクローニングし、塩基配列を決定した。

7. セレン酸還元能欠損変異株の表現型解析

50 mL 容バイアル瓶に分注した上述の培地 20 mL に適宜抗生物質を加え、NT-ISMR 株、NT-IAM2 株、NT-IAM3 株、NT-IAM4 株をそれぞれ1コロニー植菌し、 28°C 、120 rpm にて24時間回転振盪することにより好氣的に前々培養を行った。次に、同様の培地に $\text{OD}_{600} \approx 0.02$ となるよう各培養液を植え継ぎ、同条件で12時間の前培養を行った。その後、同様の培地にセレン酸または亜セレン酸を終濃度 1 mM となるよう添加し、 $\text{OD}_{600} \approx 0.02$ となるよう各培養液を植え継ぎ、 28°C 、120 rpm にて24時間回転振盪し、好氣的または嫌氣的に本培養を行った。好気培養の場合にはシリコ栓で蓋をし、嫌気培養の場合にはブチルゴム栓で蓋をして気相部を窒素置換した培地を用いた。培養液を経時的に採取し、セレン酸及び亜セレン酸濃度を測定した。初期セレン酸または亜セレン酸濃度に対して培養24時間後に減少したセレン酸または亜セレン酸濃度をセレン酸または亜セレン酸還元率として示した。セレン酸、亜セレン酸濃度はイオンクロマトグラフ (HIC-SP system; Shimadzu) を用いて測定し

た。ここで、分離カラムとして IonPac AS4A-SL column (Dionex) を用い、移動相として DIRECT-Q system (Nihon Millipore) によって調製した超純水に溶解した 3 mM Na₂CO₃ を用いた。

8. DNA 塩基配列、タンパク質アミノ酸配列のソフトウェア解析

全ての配列は GENETYX-WIN Program (version 3.2; Genetyx) を用いて解析した。DNA 塩基配列の相同性検索は BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) プログラムを用いて、nucleotide collection データベースに基づいて行った。遺伝子のアノテーションは BLASTX プログラム (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて、Swiss-Prot データベースに基づいて行った。

9. NT-I 株の *narXL* 遺伝子の破壊

相同組換えを利用して ORF の大部分を脱落させることにより、NT-I 株の *narXL* 遺伝子を破壊した。まず、NT-I 株のゲノム DNA を鋳型とし、NT-I 株のゲノム情報より設計したプライマーセット narXLf (5'-cggcagtttccagctcat-3') 及び narXLr (5'- agatccagaggttgcgattg -3') を用いた PCR によって *narXL* の上流約 350 bp の位置から *narXL* の下流約 780 bp の位置までの範囲の DNA を増幅し、この DNA を pGEM-T easy vector (Promega) を用いてクローニングし、得られたプラスミドを pGEMnarXL とした。pGEMnarXL を鋳型とし、*narXL* の ORF の大部分を脱落させるよう設計したプライマーセット narXLKOf (5'-gcgacggtaatcgccag-3') 及び narXLKOr (5'-ctggagaacgaggcgaaag-3') を用いた PCR によって増幅した断片を、ゲル抽出によって精製した。精製した断片の末端をリン酸化し、1 ng/μl 以下の DNA 濃度で 15°C、16 時間のライゲーションを行った。このライゲーション産物によって *E. coli* DH5α を形質転換し、形質転換体より環状化 DNA、pGEMnarXLKO を精製した。この pGEMnarXLKO から *EcoRI* で切り出した DNA 断片を、pK18mobsacB (Schäfer *et al.*, 1994) の *EcoRI* サイトにサブクローニングして得られたプラスミドを pK18mobsacBnarXLKO とした。

E. coli DH5α/pK18mobsacBnarXLKO を供与菌として、*P. stutzeri* NT-ISMIR を受容菌として、*E. coli* DH5α/pRK2013 を pK18mobsacBnarXLKO 伝達のためのヘルパー菌としてそれぞれ用いて、接合伝達を行った。*E. coli* DH5α/pK18mobsacBnarXLKO を Km を加えた 3 ml の LB 培地中で、*P. stutzeri* NT-ISMIR を Sm を加えた 3 ml の LB 培地中で、*E. coli* DH5α /pRK2013 を Km を加えた 3 ml の LB 培地中で、それぞれ 37°C で 6–8 時間、好氣的に培養した。*P. stutzeri* NT-ISMIR 培養液を 1000 μl、*E. coli* DH5α/pK18mobsacBnarXLKO 及び *E. coli* DH5α/pRK2013 各培養液をそれぞれ 100 μl ずつ、別々のマイクロチューブに取り、菌体を遠心分離 (8,000 × *g*, 1 min, 25°C) により回収し、等量の LB 培地で 2 回洗浄した後、3 株を混合して 100 μl の LB 培地に懸濁した。この懸濁液を LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。続いて、8 ml の 0.8% NaCl 水溶液で寒天培地上の菌体を回収し、適宜希釈した後に、Sm 及び Km を含む LB 寒天培地に塗布した。この寒天培地を 37°C で 1 日培養し、そこから得られた NT-I

株由来のコロニー1つを Sm を加えた 3 ml の LB 培地に植菌し、37°C で一晩、好氣的に培養した。この培養液を適宜希釈し、200 g/l の sucrose を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で 1-2 日培養した。出現したコロニーの中から、ゲノム上の *narXL* の ORF が破壊されたものを選択し、この株を NT-IdeltanarXL 株とした。

10. セレン酸還元能の誘導条件の検討

50 mL 容バイアル瓶に分注した TSB 培地 20 mL に適宜抗生物質を加え、NT-ISMR 株または NT-IdeltanarXL 株を 1 コロニー植菌し、37°C、200 rpm にて 24 時間回転振盪することにより好氣的に前々培養を行った。次に、50 mL 容バイアル瓶に分注した、カザミノ酸を含む乳酸無機塩培地 20 mL に適宜抗生物質を加え、前々培養液の 200 μ l を植菌し、37°C、200 rpm にて 16 時間回転振盪することにより好氣的に前培養を行った。次に、500 mL 容バッフル付き三角フラスコまたは 500 mL 容三角フラスコに分注した、カザミノ酸を含む乳酸無機塩培地 200 mL に適宜抗生物質を加え、前々培養液の 1 ml を植菌し、37°C、160 rpm にて 6 時間回転振盪することにより本培養を行った。この本培養液を、バッフル付き三角フラスコで培養した場合は希釈なしに、三角フラスコで培養した場合は同組成の培地で OD = 1 となるよう希釈し、それぞれ 20 ml 容バイアル瓶に分注して終濃度 5 mM のセレン酸ナトリウム、または終濃度 5 mM の硝酸ナトリウムを加えて気相部を窒素置換し、ブチルゴム栓で密栓し、これらを 37°C、160 rpm にて回転振盪することにより誘導を行った。培養液を経時的に採取し、セレン酸、亜セレン酸、硝酸、亜硝酸濃度を測定した。セレン酸、亜セレン酸、硝酸、亜硝酸濃度はイオンクロマトグラフ (HIC-SP system; Shimadzu) を用いて測定した。

第3節 結果

1. NT-I セレン酸還元能欠損変異株の取得

Mini-Tn5 の導入によって作製した NT-I 変異株ライブラリより、0.5 mM セレン酸を含む TSB 寒天培地上で白いコロニーを形成する変異株 3 株を取得し、それぞれ NT-IAM2、NT-IAM3、NT-IAM4 株と名付けた。各変異株について、再度 0.5 mM のセレン酸または亜セレン酸を含む寒天培地上で還元試験を行った結果を Fig. 5-1 に示す。0.5 mM のセレン酸を含む TSB 寒天培地上では野生株は赤色を呈色したが、NT-IAM2 株、NT-IAM4 株は白色だった。また、NT-IAM3 株は一部赤色を呈色したものの、大部分が白色だった。一方、0.5 mM の亜セレン酸を含む TSB 寒天培地上では、全ての株が赤色を呈色した。従って、これらの変異株は mini-Tn5 の挿入によりセレン酸還元能を失っているものと推測された。

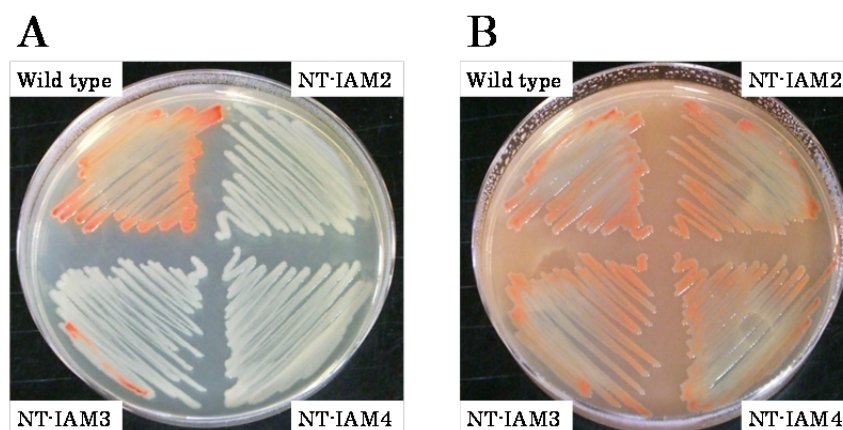


Fig. 5-1. Plate assay for selenate and selenite reduction. *P. stutzeri* mutant strains were streaked onto TSB agar plates containing 0.5 mM selenate (A), and 0.5 mM selenite (B). The red color indicates the occurrence of elemental selenium.

2. 各セレン酸還元能変異株の表現型の解析

続いて、各変異株について、3 g/l TSB を含む乳酸無機塩培地中での好気条件下または嫌気条件下におけるセレン酸及び亜セレン酸還元能を調べた (Fig. 5-2)。全ての条件において、野生株は 24 時間で 95%以上のセレン酸、亜セレン酸を還元した。一方、NT-AM2 株及び NT-IAM4 株は、好気、嫌気両条件下でセレン酸還元率が大きく低下し、特に好気条件下では両株ともセレン酸を全く還元しなかった。NT-IAM3 株は、好気、嫌気両条件下においてわずかなセレン酸還元 (11-13%) を示した。亜セレン酸については、いずれの変異株についても還元率が低下したが、還元能が完全に失われることはなかった。以上より、これらの変異株において mini-Tn5 によって破壊された遺伝子は、好気、嫌気両条件下でのセレン酸還元に関与していることが示唆された。

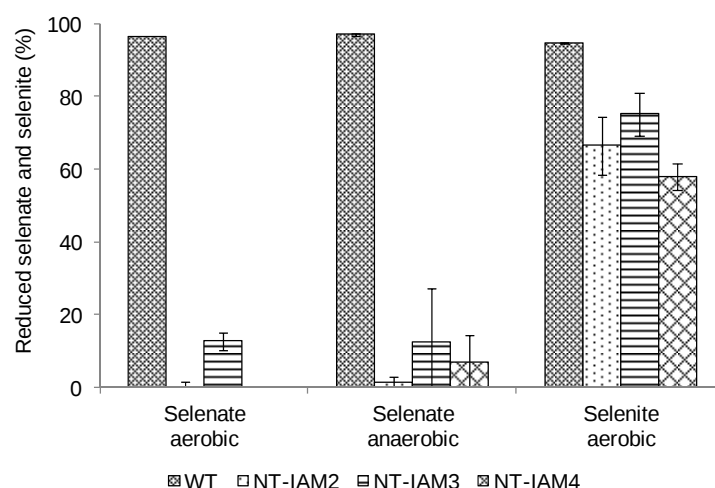


Fig. 5-2. Selenate and selenite reduction by wild type strain NT-ISM and mutant strains NT-IAM2, NT-IAM3, and NT-IAM4 in aerobic or anaerobic conditions. The ratios of reduced electron acceptors against their initial concentrations (1 mM) are indicated as percentages. Values represent the mean electron acceptor reduction of three independent cultures, and error bars represent the SD.

3. NT-I 株のドラフトゲノム解析

NT-I 株の遺伝子レベルの解析の基盤とすべく、NT-I 株ゲノム DNA 配列のドラフト解析を行った。結果を Table 5-1 に示す。解析総塩基数 63,558,482 bp に対してアセンブルを実行した結果、contig 数 115、総 contig 塩基数 4,833,352 bp となった。これらのうち、500 bp 以上の large contig 数は 97、large contig の総塩基数は 4,829,283 bp となった。総 contig 塩基数に対する large contig の総塩基数が 0.9992 となり、ほぼ 1 に近いこと、また予想ゲノムサイズに対する解析総塩基数で定義される冗長度がドラフトゲノム解読の目安となる 10 を超える約 13 と高い値を示したことから、ほぼゲノム全量に近いデータが得られたと考えられる。

Table 5-1. Overview of the obtained draft genome sequence of strain NT-I

Total read length [bp]	63,558,482
Number of all contigs	115
Total nucleotides of all contigs [bp]	4,833,352
Number of large contigs *	97
Total nucleotides of large contigs * [bp]	4,829,283
(Total nucleotides of large contigs) / (Total nucleotides of all contigs)	0.9992
Redundancy	13

* contigs not lower than 500 base pairs

4. NT-IAM2 株と NT-IAM4 株の mini-Tn5 挿入位置の特定及び周辺遺伝子群の解析

NT-IAM2 株と NT-IAM4 株の mini-Tn5 挿入位置近傍の配列を inverse PCR によってクローニングし、配列を決定した。両変異株において、mini-Tn5 によって全く同じ ORF が破壊されていることが明らかとなった。この mini-Tn5 挿入位置周辺の配列をドラフトゲノム解析結果より取得し、ORF 予測及び BLASTX 解析によるアノテーションを行った。NT-IAM2 株、NT-IAM4 株の mini-Tn5 挿入位置周辺領域の ORF 予測結果を Fig. 5-3 に示す。また、Fig. 5-3 に示した各 ORF の塩基長とアノテーション結果を Table 5-2 に示す。

両変異株において、mini-Tn5 は(e)に示す ORF に挿入されており、この ORF (e)は(d)、(c)、(b)と連続して並んでいた。ORF (e)、(d)、(c)、(b)の推定アミノ酸配列は、それぞれ *Ideonella dechloratans* の塩素酸還元酵素 ClrA、ClrB、*T. selenatis* AX のセレン酸還元酵素 SerD、SerC と最も高い相同性を示したが、NT-IAM2 株、NT-IAM4 株がセレン酸還元能変異株であることを踏まえると、ORF (e)、(d)、(c)、(b)は全てセレン酸還元酵素遺伝子であり、これらはオペロンを形成していると推測された。

そこで、プロモーター領域と考えられる ORF (e)の上流 485 塩基の塩基配列、及び ORF (e)、(d)、(c)、(b)の塩基配列と推定アミノ酸配列について、*T. selenatis* AX の *ser* プロモーター領域の塩基配列、及び *serABDC* オペロンの塩基配列と推定アミノ酸配列とそれぞれ比較した結果を Table 5-3 に示す。ORF (e)、(d)、(c)、(b)と *serABDC* は塩基配列、推定アミノ酸配列のいずれについても 83-95%の高い相同性を示した。Type II molybdoenzyme (Jormakka *et al.*, 2004) である SerA に特徴的な Asp 残基や[4Fe-4S]クラスター結合モチーフである HX₃CX₃CX₃₃C という配列、さらには Fig. 3-6 で示した SerB 中の 3 つの[4Fe-4S]クラスターと 1 つの[3Fe-4S]クラスター結合モチーフがいずれも保存されており、ORF (e)、(d)、(c)、(b)と *serABDC* は同様のセレン酸還元酵素をコードしていると考えられることから、*T. selenatis* AX に習い、ORF (e)、(d)、(c)、(b)をそれぞれ *serABDC* と命名した。一方、4 つの ORF の相同性が高かったのに反してプロモーター領域の塩基配列相同性は低かった。これより、*serABDC* は NT-I 株独自の遺伝子の転写制御機構の下で制御を受けていることが推測された。嫌気条件下において正の転写調節を行う転写因子 Fnr (Unden *et al.*, 1995) の結合部位のコンセンサス配列など、プロモーターの機能を示す明確な配列は見られず、今後のさらなる解析が必要であると考えられた。

また、NT-I 株のゲノムにおいて、*serABDC* オペロンの上流には 3 つの ORF (f)、(g)、(h) から成るオペロンが存在し、それらの推定アミノ酸配列は Phosphate-import protein である PhnD、Sensor protein である ZraS、Fimbriae expression regulatory protein である PilR とそれぞれ最も高い相同性を示した。また、*serABDC* オペロンの下流に存在する ORF (a)の推定アミノ酸配列は Molybdenum cofactor biosynthesis protein A 1 MoaA と最も高い相同性を示した。

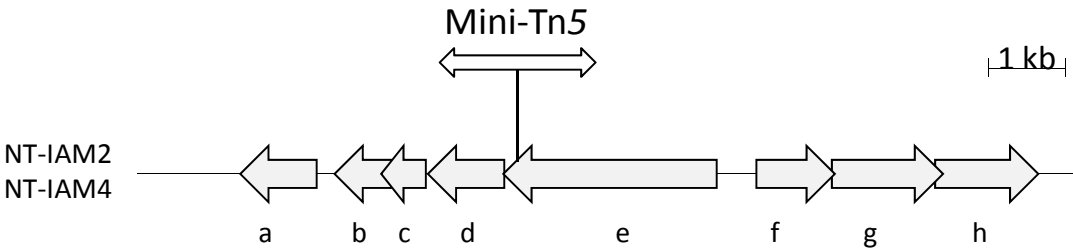


Fig. 5-3. ORF arrangement of the region flanking the Tn5 insertion site in the mutant strains NT-IAM2 and NT-IAM4. Left right double arrow indicates the Tn5 insertion site. ORF marks are associated with Table 5-2.

Table 5-2. Annotation results of ORF lying in the region flanking the Tn5 insertion site in the mutant strains NT-IAM2 and NT-IAM4. ORF marks are associated with Fig. 5-3.

orf	Length [bp]	Accession no.	Organism	putative function
a	1	Q9HXD6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Molybdenum cofactor biosynthesis protein A 1 <i>moaA</i>
b	0.7	Q9S1G7	<i>Thauera selenatis</i>	Selenate reductase subunit gamma <i>serC</i>
c	0.6	Q9S1G8	<i>Thauera selenatis</i>	Protein <i>serD</i>
d	1	P60069	<i>Ideonella dechloratans</i>	Chlorate reductase subunit beta <i>clrB</i>
e	2.8	P60068	<i>Ideonella dechloratans</i>	Chlorate reductase subunit alpha <i>clrA</i>
f	1	A0QQ71	<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 155	Phosphate-import protein <i>phnD</i>
g	1.4	P14377	<i>Escherichia coli</i> K-12	Sensor protein <i>zraS</i>
h	1.3	Q00934	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fimbriae expression regulatory protein <i>pilR</i>

Table 5-3. Comparison between *ser* operon of *P. stutzeri* NT-I and *T. selenatis* AX based on their nucleotide and deduced amino acid sequences

	%identity				
	promoter	ORF (e) (<i>serA</i>)	ORF (d) (<i>serB</i>)	ORF (c) (<i>serD</i>)	ORF (b) (<i>serC</i>)
Nucleotide	48	83	86	86	95
Deduced amino acid	-	83	88	87	93

5. NT-IAM3 株の mini-Tn5 挿入位置の特定及び周辺遺伝子群の解析

NT-IAM3 株の mini-Tn5 挿入位置近傍の配列を inverse PCR によってクローニングし、配列を決定した。この mini-Tn5 挿入位置周辺の配列をドラフトゲノム解析結果より取得し、ORF 予測と BLASTX 解析によるアノテーションを行った。NT-IAM3 株の mini-Tn5 挿入位置周辺領域の ORF 予測結果を Fig. 5-4 に示す。また、Fig. 5-4 に示した各 ORF の塩基長とアノテーション結果を Table 5-4 に示す。

NT-IAM3 株において、mini-Tn5 は(d)に示す ORF に挿入されていた。ORF (d)の上流には ORF (f)、(e)が連続して存在していた。ORF (f)、(e)、(d)の推定アミノ酸配列は、それぞれ由来となる生物種は異なるものの、モリブデン補因子生合成酵素 MoaC、MoaD、MoaE と最も高い相同性を示した。ORF の連続性と機能的関連より ORF (f)、(e)、(d)はオペロンであると推測された。セレン酸還元酵素 SerABC はモリブデンを補因子として持っていると推測されるため、MoaE の破壊によってセレン酸還元活性が低下したものと推測された。

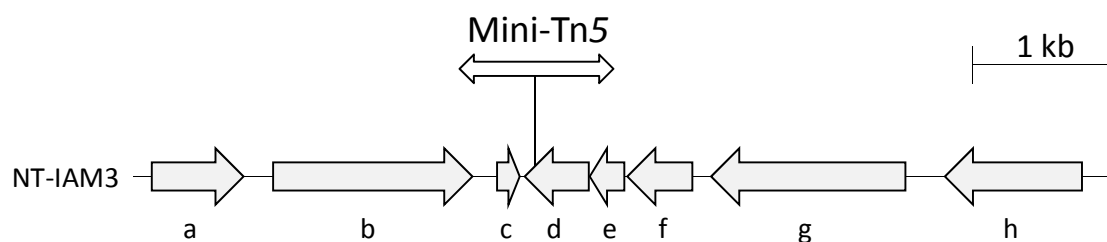


Fig. 5-4. ORF arrangement of the region flanking the Tn5 insertion site in the mutant strain NT-IAM3. Left right double arrow indicates the Tn5 insertion site. ORF marks are associated with Table 5-4.

Table 5-4. Annotation results of ORF lying in the region flanking the Tn5 insertion site in the mutant strain NT-IAM3. ORF marks are associated with Fig. 5-4

orf	Length [bp]	Accession no.	Organism	putative function
a	0.7	Q53547	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Carboxylesterase 2 <i>estB</i>
b	1.4	Q9HXE5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATP-dependent RNA helicase <i>rhIB</i>
c	0.2	Q89277	Yellow fever virus	Genome polypeptide
d	0.5	Q9HX97	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Molybdopterin synthase catalytic subunit <i>moaE</i>
e	0.2	P45309	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20	Molybdopterin synthase sulfur carrier subunit <i>moaD</i>
f	0.5	A4VIR7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	Molybdenum cofactor biosynthesis protein C <i>moaC</i>
g	1.4	O07635	<i>Bacillus subtilis</i>	Uncharacterized protein <i>ylaK</i>
h	1	Q8Z8B6	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	Zinc transporter <i>zitB</i>

6. セレン酸還元能の誘導条件の検討

serABDC による NT-I 株のセレン酸還元がどのような因子によって誘導されるのかを明らかにするため、バッフル付き三角フラスコまたは三角フラスコで好氣的に培養した菌体に、嫌気条件下でセレン酸、硝酸、またはその両方を加えてそれらの還元を測定した。結果を Fig. 5-5 に示す。バッフル付き三角フラスコに用いたより厳密な好気条件下で培養した菌体を、嫌気条件下に移して各電子受容体で誘導した場合、有意なセレン酸還元は生じなかったが (Fig. 5-5 (a), (c))、5 mM の硝酸は 2 時間で全量が還元された (Fig. 5-5 (b), (c))。ここで、硝酸還元によって生じた亜硝酸は還元されなかった (Fig. 5-5 (b), (c))。

セレン酸還元が誘導されなかった原因として、バッフル付き三角フラスコによる培養での酸素供給が過剰であることが原因ではないかと考え、三角フラスコを用いて、酸素供給を制限した好気培養によって得られた菌体を回収し、初期 OD₆₀₀ = 1 に調整し、嫌気条件下に移して各電子受容体で誘導した。5 mM のセレン酸のみを加えた場合、その全量が 3 時間で亜セレン酸に還元された (Fig. 5-5 (d))。また、5 mM の硝酸を加えた場合、1 時間以内に全量が還元され、生じた亜硝酸も 1 時間までに全て還元された (Fig. 5-5 (e))。また、5 mM のセレン酸と 5 mM の硝酸の両方を入れた場合、硝酸の還元はセレン酸を添加しなかった場合と変わらなかったが、セレン酸の還元速度は硝酸を添加しなかった場合と比較してやや低下した (Fig. 5-5 (f))。

さらに、硝酸還元に関わる転写因子によってセレン酸還元が抑制されているかどうかを確認するために、硝酸還元酵素遺伝子 *narG* の転写の正の調節に関わる転写因子をコードする遺伝子 *narXL* を特異的に破壊した変異株 NT-IdeltanarXL を構築し、この株におけるセレン酸還元能の誘導を Fig. 5-5 (d), (e), (f) と同様の方法で調べた。5 mM のセレン酸を添加した場合 (Fig. 5-5 (g))、野生型の NT-ISMR 株の場合 (Fig. 5-5 (d)) と比較して、若干のセレン酸還元速度の低下が見られた。また、5 mM の硝酸を添加した場合 (Fig. 5-5 (h))、野生型の NT-ISMR 株の場合 (Fig. 5-5 (e)) と比較して、大幅な硝酸還元速度の低下が見られた。また、5 mM のセレン酸と 5 mM の硝酸の両方を入れた場合 (Fig. 5-5 (i))、野生型の NT-ISMR 株の場合 (Fig. 5-5 (f)) と比較して、セレン酸還元速度が若干上昇していたが、一方、硝酸還元速度は大幅に低下していた。

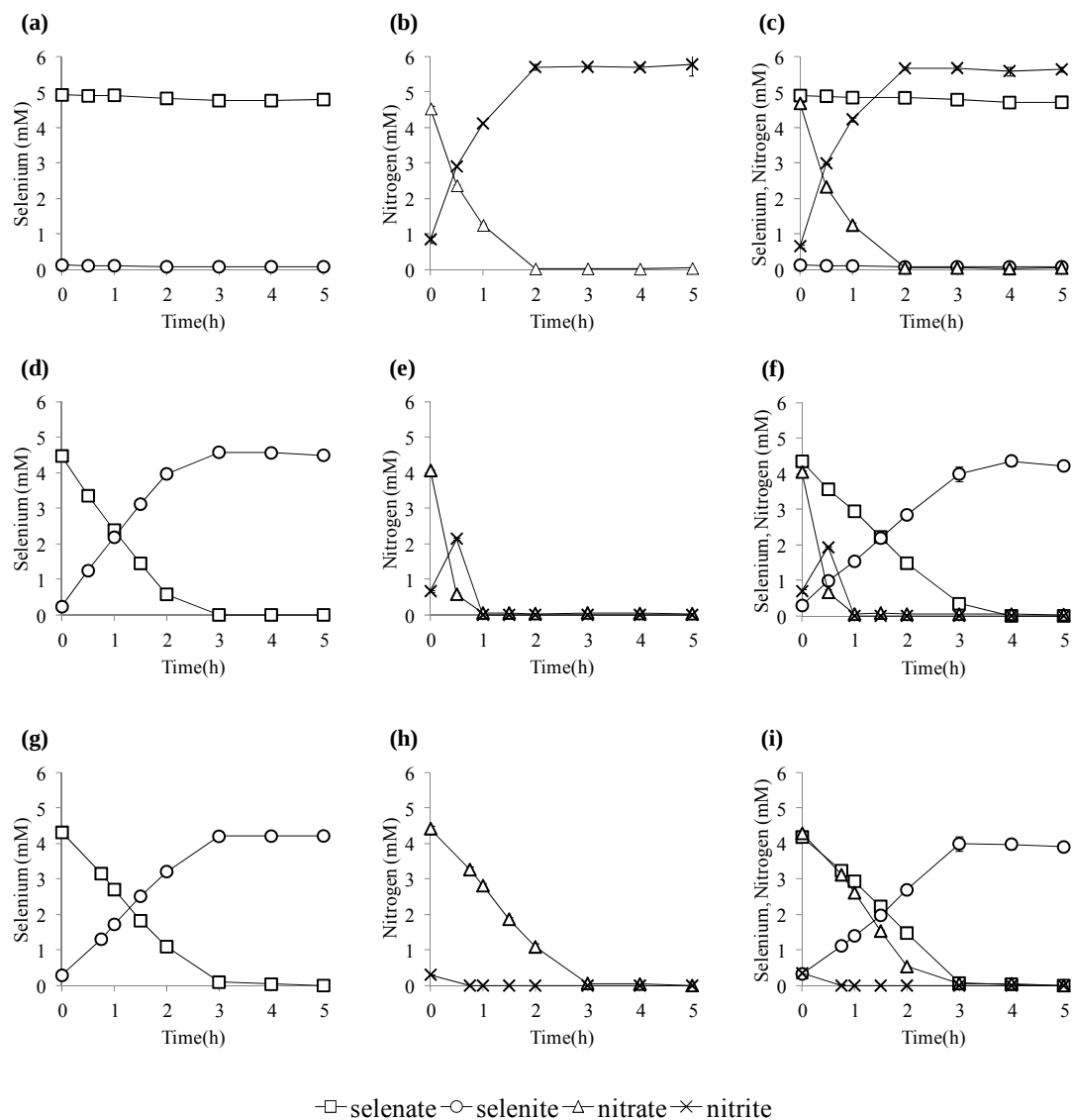


Fig. 5-5 Induction of selenate and nitrate reduction in strain NT-ISMR and mutant strain NT-IdeltanarXL. (a) selenate, (b) nitrate, and (c) selenate and nitrate reductions by strain NT-ISMR cells grown under strict aerobic conditions. (d) selenate, (e) nitrate, and (f) selenate and nitrate reductions by strain NT-ISMR cells grown under micro-aerobic conditions. (g) selenate, (h) nitrate, and (i) selenate and nitrate reductions by mutant strain NT-IdeltanarXL cells grown under micro-aerobic conditions. Mean values obtained from three independent cultures are shown. Error bars represent the SD.

第4節 考察

1. *P. stutzeri* NT-I と *T. selenatis* AX の *serABDC* の相同性について

本研究により好気性セレン酸還元細菌 *P. stutzeri* NT-I のセレン酸還元酵素遺伝子 *serABDC* が特定された。この NT-I 株の *serABDC* は、*T. selenatis* AX の同遺伝子と高い相同性 (83-95%) を持つことが示された。*T. selenatis* AX の *serABDC* の特徴となるアミノ酸残基、即ちモリブデン原子のリガンドとなる SerA の Asp 残基、SerA の [4Fe-4S] クラスター結合モチーフである $\text{HX}_3\text{CX}_3\text{CX}_{33}\text{C}$ 配列、SerB の 3 つの [4Fe-4S] クラスターと 1 つの [3Fe-4S] クラスター結合モチーフが、NT-I 株にも完全に保存されており、ほぼ同様の酵素であると考えられる。*T. selenatis* AX は NT-I 株とは違い典型的な嫌気性セレン酸還元細菌であり、無酸素条件下でのみセレン酸を還元する (Macy *et al.*, 1989)。さらには、SerABC の持つモリブデン補因子や [4Fe-4S] クラスターは酸素によって酸化されやすいことが知られている (Mendel & Bittner, 2006; Bandyopadhyay *et al.*, 2008) ことから、SerABC は嫌気性条件下でのセレン酸還元酵素であると考えられてきた。一方、Fig. 5-2 より NT-I 株のセレン酸還元酵素遺伝子 *serABDC* は嫌気条件下のみならず好気条件下でのセレン酸還元にも関わっていることが明らかであるため、NT-I 株の SerABC は酸素に対する耐性を持つことが示唆され、逆説的な解析結果となった。この問題の解明のためには、酵素分子の構造解析によって好気条件下での補因子の状態を調べることや、酸素濃度に対応する *serABDC* 遺伝子の転写調節機構について調べる必要があると考えられる。また、*T. selenatis* AX の SerABC は嫌気呼吸のための酵素であり、キノールの酸化と共役してセレン酸を還元していると報告されていることから (Lowe *et al.*, 2010)、NT-I 株の SerABC も同様の働きを持つと推測される。これまでに報告されている好気性セレン酸還元細菌は全て、セレン耐性機構によってセレン酸を還元していると推測されてきたが (Table1-1)、本研究はこれらの推論とは異なり、好気条件下で嫌気呼吸酵素が機能している可能性を具体的に示唆するものである。これをさらに裏付けるためには、今後、乳酸酸化とセレン酸還元の関係を化学量論的に評価することによって、NT-I 株によるセレン酸還元が異化的還元であることを証明することが必要であろう。

2. セレン酸還元能の誘導について

Table 5-3 より、NT-I 株のセレン酸還元酵素 SerABC は、嫌気性セレン酸還元細菌 *T. selenatis* AX の SerABC とアミノ酸配列の相同性が高い一方で、それらをコードする遺伝子 *serABDC* の上流のプロモーター領域の塩基配列は大きく異なっていたことから、NT-I 株特有の転写制御機構が存在すると考えられた。そこで、NT-I 株のセレン酸還元能の誘導に関わる因子を明らかにするために一連の実験を行った (Fig. 5-5)。その結果、好気性の高い条件で培養した菌体では、硝酸還元能は誘導される一方、セレン酸還元能及び亜硝酸還元能は誘導されなかったが、微好気条件下で培養した菌体では、セレン酸、硝酸、及び亜硝酸の全ての還元能が誘導された。*P. stutzeri* の脱窒酵素群の誘導に与える溶存酸素の影響を与えた報告

(Körner and Zumft, 1989) では、各酵素は低酸素濃度の場合に誘導されるが、その溶存酸素濃度の閾値は、硝酸還元酵素については 5 mg/l 以下、亜硝酸還元酵素については 2.5 mg/l であり、亜硝酸還元酵素の誘導には硝酸還元酵素と比較して、より低い酸素濃度を要求するとされている。これより、本試験での好気培養条件は硝酸還元酵素の誘導と亜硝酸還元酵素の誘導の両閾値の間間的な通気条件であり、微好気培養条件は亜硝酸還元酵素の誘導の閾値以下の通気条件であったと推測されるが、セレン酸還元酵素は亜硝酸還元酵素に準じる酸素濃度条件で誘導されたものと考えられる。亜セレン酸還元は嫌気条件下で生じないことが明らかとなっていることから、セレン酸還元と亜セレン酸還元が両立した Fig. 4-2A は微好気的条件下であったと考えられ、このような通気条件をセレン含有廃水の生物学的処理プロセスで再現することができれば、同一槽内でセレン酸から元素態セレンまで素早く還元できるプロセスが構築できると考えられる。

また、野生型形質を示す NT-ISMIR 株において、セレン酸と硝酸を同時に添加した系では、若干のセレン酸還元速度の低下が見られた (Fig. 5-5(f))。 *P. stutzeri* の硝酸還元関連遺伝子群の転写は 2 成分制御系酵素である NarXL によって正の制御を受けていることが報告されているが (Härtig *et al.*, 1999)、 *E. coli* において dimethyl sulfoxide/trimethylamine-*N*-oxide 還元酵素遺伝子 *dmsABC* が NarL によって負の転写制御を受けていることが示唆されていることから (Bearson *et al.*, 2002)、NT-I 株のセレン酸還元能の誘導が硝酸の存在によって抑制されている可能性を考え、*narXL* を特異的に破壊した変異株 NT-IdeltanrXL を作製して、その硝酸、セレン酸還元能の誘導を調べた。その結果、硝酸の還元速度は大幅に低下し (Fig. 5-5 (h))、セレン酸と硝酸を同時に添加した場合のセレン酸の還元速度は、野生型株と比較して若干上昇した (Fig. 5-5 (i))。NT-IdeltanrXL 株において、硝酸還元酵素遺伝子の転写の正の制御が行われなくなったために硝酸還元速度が明確に低下したが、セレン酸還元速度は明確に上昇したとは言えず、また、硝酸存在下でのセレン酸還元速度 (Fig. 5-5 (f)) と硝酸非存在下でのセレン酸還元速度 (Fig. 5-5 (d)) に大きな違いがないことを考えると、NarXL がセレン酸還元能の誘導抑制に関わっている可能性は低いと考えられる。従って、Fig. 5-5 (f) におけるセレン酸還元速度の若干の低下は、セレン酸還元酵素と硝酸還元酵素の NADH のような細胞内の電子伝達物質の競合によるものと解釈するのが合理的である。今後は、より詳細にセレン酸還元遺伝子の転写制御機構を解析することによって、これまで容易ではないと考えられてきた好気条件下でのセレン酸還元の効率を高めることにつながると期待される。

3. *serABDC* 上流の ORF (f)、(g)、(h)について

ドラフトゲノム解析の結果、*serABDC* の上流には 3 つの ORF (f)、(g)、(h) から成るオペロンが存在していたが、それぞれのアミノ酸配列は Phosphate-import protein *phnD*、Sensor protein *zraS*、Fimbriae expression regulatory protein *pilR* と最も高い相同性を示した。*PhnD* は *Mycobacterium smegmatis* 等の細菌のホスホン酸/亜リン酸輸送系における基質の結合タン

パク質である (Rizk *et al.*, 2006)。また、ZraS (Leonhartsberger *et al.*, 2001) と PilR (Jin *et al.*, 1994) は、細菌における一般的な環境応答様式である 2 成分制御系のセンサーヒスチジンキナーゼ及びレスポンスレギュレーターをそれぞれコードしており、ORF (g)、(h) も何らかの遺伝子の転写調節を行っていると考えられる。ORF (f)、(g)、(h) がオペロンを形成していること、また *serABDC* オペロンと隣接して存在することから考えると、ORF (f) についても、ORF (g)、ORF (h) と共にセレン酸還元に関連するシグナルの認識と転写調節に関わっている可能性が考えられる。また、Blastx 解析の結果、ORF (f) は *Achromobacter* sp. SY8 の亜硝酸酸化酵素遺伝子領域に存在する *aoxX* との相同性も持つことが示された。*aoxX* は 2 成分制御系をコードする *aoxSR* とともに *aoxXSR* オペロンを形成しており (Cai *et al.*, 2009)、ORF (f)、(g)、(h) と同様の遺伝子配置を持つが、*aoxXSR* についても詳細な機能は不明である。ORF (f)、(g)、(h) の解析により、セレン酸還元能の発現に関する情報が得られると推測されるため、さらなる研究の進展が望まれる。

4. セレン酸還元酵素 SerABC の組み立て及び局在化について

本研究によって、NT-I 株のセレン酸還元酵素 SerABC の合成と輸送、局在化の過程に関わる遺伝子群が明らかとなった。推定されるセレン酸還元酵素の組み立てと局在化の機構を Fig. 5-5 に示した。NT-IAM3 株において破壊されていた *moaCDE* オペロンのコードする MoaCDE は、NT-I 株ゲノム上で *serABDC* オペロンに隣接して存在した *moaA* のコードする MoaA などの酵素と共同し、2 分子の GTP、及びモリブデン酸より molybdenum bis-molybdopterin guanine dinucleotide (Mo-bis-MGD) という補因子の生合成に関わることが知られている (Schwarz *et al.*, 2009)。SerA はモリブデンを補因子として持つことから、MoaA 及び MoaCDE によって生合成された Mo-bis-MGD が SerA に挿入されていると考えられる。

また、最終的なセレン酸還元酵素複合体 SerABC には含まれないタンパク質 SerD も SerABC の組み立てに関与することが推測される。SerD はアミノ酸配列の相同性から redox enzyme maturation proteins (REMPs) であることが指摘されており (Turner *et al.*, 2004)、このファミリーのタンパク質の機能は、*E. coli* の硝酸還元酵素系のタンパク質 NarJ において下記のように詳しく調べられている (Lanciano *et al.*, 2007)。まず、リボソームで合成された NarG と NarH は細胞質において会合する。続いて NarJ が NarG の N 末端に存在する TAT シグナル配列と結合する。NarJ が TAT シグナル配列へ結合している間は、NarGH は TAT システムによって認識されなくなるために、細胞質にとどまる。さらに NarJ は NarG へのモリブデンや鉄-硫黄クラスターの正しい挿入を促す働きも持ち、補因子が NarGH に正しく挿入された後に NarJ は NarG から離れ、正しく組み立てられた NarGH は TAT システムによりペリプラズムへ輸送される。SerD 自体の機能は明らかになっていないが、SerD も NarJ と同様に SerABC の順序だった組み立てを助けていると推測される。

また、NT-I の SerABC のアミノ酸配列には、*T. selenatis* AX の SerABC と同様に、SerA の N 末端には TAT シグナル配列、SerC の N 末端には Sec シグナル配列が存在する。第 1 章で

概説した *T. selenatis* AX の SerABC と同様に、NT-I についても SerAB は TAT pathway によって、SerC は Sec pathway によって輸送され、ペリプラズムで SerABC として会合し、セレン酸還元酵素として働くものと推定される。

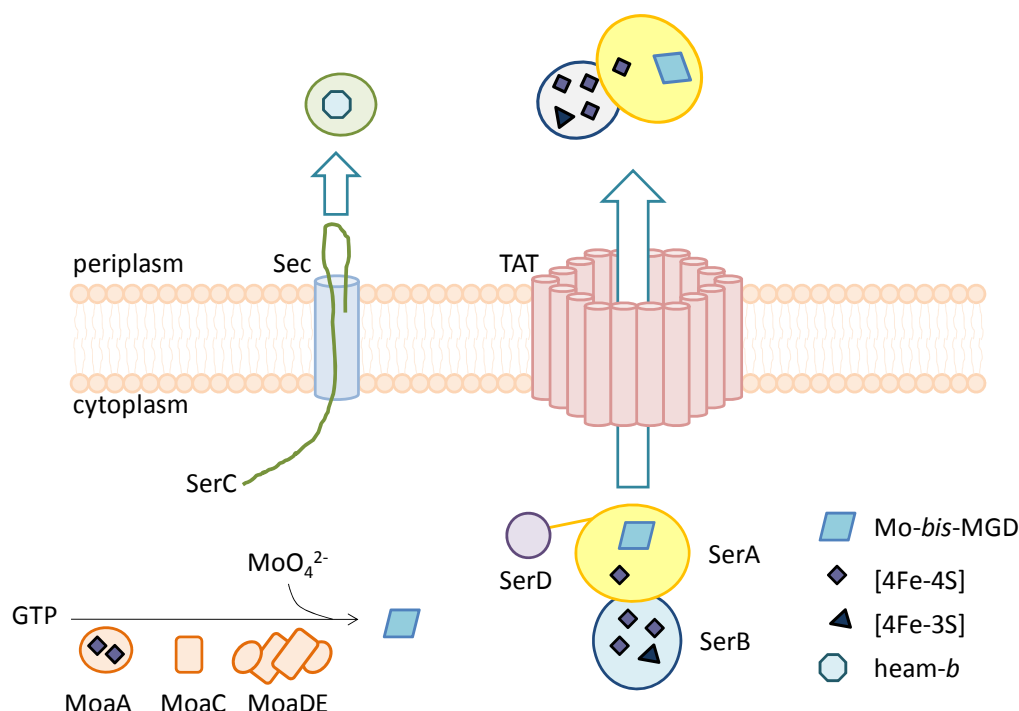


Fig. 5-5. Schematic representation of the assemble and translocation of SerABC of strain NT-I speculated from the results. Mo-bis -MGD is synthesized from molybdate and two GTPs through the pathway catalyzed by MoaA, MoaC, and MoaDE. SerAB acquires Mo-bis-MGD and iron-sulfur clusters appropriately, followed by translocation from cytoplasm to periplasm through TAT pathway. Accurate co-factor insertion and subsequent translocation are controlled by the system-specific chaperon protein, SerD. The other subunit, SerC, translocates through Sec pathway, followed by heme-*b* insertion. SerAB and SerC are assembled to catalyze selenate reduction in periplasmic space.

5. NT-I 株の SerABC のセレン酸還元機構の推定

NT-I 株のセレン酸還元酵素 SerABC は、SerA にモリブデン補因子と[4Fe-4S]クラスター、SerB に3つの[4Fe-4S]クラスターと1つの[3Fe-4S]クラスター、SerC に heme *b* を持つ可溶性ペリプラズム酵素であると考えられる。SerABC の推定されるセレン酸還元機構を Fig. 5-6 に示す。SerABC によるセレン酸の還元はキノールの酸化と共役して行われる。*T. selenatis* AX で報告されていると同様に、キノールの酸化によって得られた電子は、シトクロム *c*₄ のような水溶性電子伝達体を経由して SerABC に伝えられるものと考えられる。SerABC はシトクロム *c*₄ から受け取った電子を、酵素内部に持つ補因子を経由して、最終的にはモリブデン補因子よりセレン酸に渡すことにより還元する。この一連の反応においては、細胞膜外のプロトン濃度に影響を与えることはないが、キノンとキノールの酸化還元サイクルの促進に寄与することにより、細胞質から細胞膜外へのプロトンのくみ出しを行い、酸化的リン酸化による ATP 合成を行っていると考えられる。

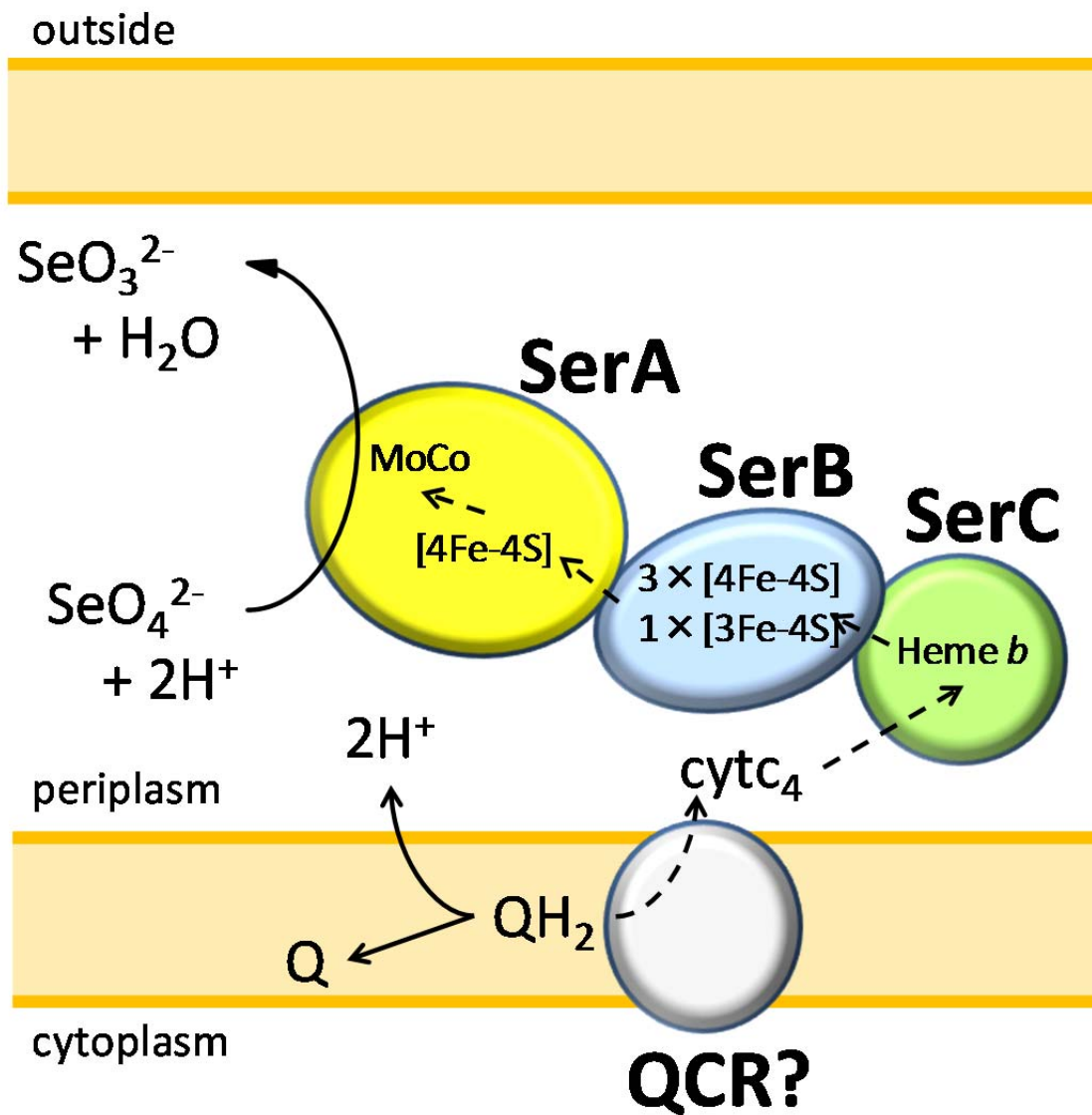


Fig. 5-6. Schematic representation of selenate reduction by SerABC from *Pseudomonas stutzeri* NT-I. SerABC receives electrons from cytochrome *c*₄, which is reduced by quinol-cytochrome *c* oxidoreductase coupled with quinol oxidation. Electrons pass through the heme *b* of SerC, and the iron-sulfur clusters of SerB and SerA and selenate is reduced after receiving electrons via a molybdenum co-factor. The dashed arrows represent electron flow. Q, quinones; QH₂, quinols; QCR, quinol-cytochrome *c* oxidoreductase; cytc₄, cytochrome *c*₄; [4Fe-4S], [4Fe-4S] iron-sulfur cluster; [3Fe-4S], [3Fe-4S] iron-sulfur cluster; MoCo, molybdenum co-factor; SeO₄²⁻, selenate; SeO₃²⁻, selenite.

第 5 節 要約

本章では、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスへの適用が有望であることが明らかとなった *P. stutzeri* NT-I のセレン酸還元に関わる遺伝子群を単離・解析することを目的とした研究を行った。

その結果、Tn5 挿入変異株ライブラリより NT-IAM2 株、NT-IAM3 株、NT-IAM4 株の 3 株のセレン酸還元能変異株が得られた。これら 3 株は好気、嫌気両条件下でのセレン酸還元能が大幅に低下していた。NT-I 株のドラフトゲノム解析結果より、Tn5 挿入位置近傍の配列情報を取得したところ、NT-IAM2 株と NT-IAM4 株において Tn5 によって破壊されていた遺伝子は *serABDC* オペロンであり、これは *T. selenatis* の同遺伝子と相同性が高いことから、セレン酸還元酵素遺伝子であることが推測された。また、NT-IAM3 株において破壊されていた遺伝子は、モリブデン補因子生合成酵素をコードする *moaCDE* オペロンであることが明らかとなった。*serABDC* はモリブデン補因子を持つ酵素であることから、*moaCDE* によって生合成されたモリブデン補因子が *serABDC* に挿入されていることが示唆された。*serABDC* は嫌気性セレン酸還元細菌 *T. selenatis* AX の同遺伝子と相同性が高い一方で、それらのプロモーター領域の塩基配列の相同性は低く、NT-I 株特有の制御を受けていることが示唆された。このため、NT-I 株のセレン酸還元能の誘導条件を調べたところ、セレン酸還元能は微好気条件で誘導されること、また硝酸の存在によって抑制されないことが示された。*SerABC* が持つモリブデン補因子や鉄-硫黄クラスターは酸素に対する耐性が低いと一般的に言われていることから、*P. stutzeri* NT-I の *SerABC* が微好気条件下でもセレン酸を還元することは大変興味深く、酵素の分子構造や転写制御機構に関する今後の研究が重要であると考えられた。

総括並びに結論

レアメタルの一つであるセレンは、半導体材料などとして重要な工業原料である一方、環境中での主な存在形態であるセレン酸化物（セレン酸、亜セレン酸）は水溶性が高く、高い毒性を持つことから、セレンの工業的利用に伴う環境中への流出、焼却操作等により濃縮された廃棄物による環境汚染を防止するために、十分な対策を取らねばならないことが指摘されている。現在、日本では水質汚濁防止法によって全セレン 0.1 mg/l の排水基準が設けられており、この基準を満たすためにセレン含有廃水の発生する事業所では物理化学的原理に基づく排水処理を行っている。しかし、現行の処理法は高コストであるために事業者の大きな負担となっている。また、除去されたセレンは再利用不可能な無機汚泥の形で廃棄する他なく、枯渇性資源であるセレンを浪費することが大きな問題となっている。

生物学的処理法は、このような問題を解決し得るセレン含有廃水の処理法として期待されている。これは、セレン酸、亜セレン酸を細菌によって還元し、不溶性の元素態セレン、または揮発性のメチル化セレン化合物にまで転換して水相から除去するものである。本法では、廃水からのセレンの除去が達成されるのみならず、固体または気体としてセレンを回収できる可能性があることから、セレン資源の循環利用に貢献し得る有望な技術となると期待されている。これまでに報告されているセレン含有廃水の生物学的処理プロセス構築の試みにおいては、主に低濃度のセレンを含む廃水の処理には一定の成績を挙げているものの、高濃度のセレン酸を含む廃水の処理は難しいとされ、実績も乏しいのが現状である。そこで、本研究ではセレン含有廃水の生物学的処理プロセスのさらなる性能向上を目指し、高濃度セレン酸還元細菌の単離・特徴付けと、セレン酸還元機構の解明を目的として一連の研究を行った。

第 1 章では、高濃度セレン酸の還元が報告されているセレン酸還元細菌、及びそのセレン酸還元機構について概観し、以下の知見を得た。

報告されているセレン酸還元細菌は、グラム陽性細菌である *Firmicutes* 門に属する *Bacilli* 綱細菌群と、グラム陰性細菌である *Proteobacteria* 門に属する *Beta-*、*Gamma-*、及び *Epsilon-proteobacteria* 綱細菌群の二者に大別される。グラム陰性細菌である *T. selenatis* AX や *E. cloacae* SLD1a-1、*Su. barneii* SES-3 について多くの研究報告があるのに対し、グラム陽性細菌については *Bacillus* sp. SF-1 を除いて研究報告は少ない。セレン酸の還元において重要な役割を果たしていると考えられるグラム陽性細菌についてさらに理解を深めることが、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスの効率化のために重要であると考えられる。

また、好気条件でセレン酸還元を行う細菌と嫌気条件でセレン酸還元を行う細菌が報告されているが、嫌気性セレン酸還元細菌はいずれも亜セレン酸還元能力が高くないのに対し、好気性セレン酸還元細菌は亜セレン酸についても比較的還元能が高いものと考えられた。このことから、好気性セレン酸還元細菌が持つセレン酸を元素態セレンにまで変換する高い能力を利用することで、より高速でセレン含有廃水を処理できる可能性があると言

えるが、これまでに報告されている好気性セレン酸還元細菌の例はわずかであり、さらなる菌株の単離と特徴付けが必要であると考えられた。

セレン酸還元の分子機構についてのこれまでの報告は、グラム陰性の嫌気性セレン酸還元細菌である *E. cloacae* SLD1a-1 と *T. selenatis* AX に関する二例に限られている。特に、*T. selenatis* AX に関しては、可溶性ペリプラズム酵素であるセレン酸還元酵素 SerABC をコードする遺伝子とその機能についての報告がなされている。一方で、グラム陰性細菌とは異なる膜構造を持つ *Bacillus* sp. SF-1 をはじめとするグラム陽性セレン酸還元細菌は、グラム陰性細菌とは異なるセレン酸還元の分子機構を持つ可能性があるものの、これまでに報告はないことから、その解明が望まれる。また、*E. cloacae* SLD1a-1 と *T. selenatis* AX はいずれも嫌気性セレン酸還元細菌であることから、好気性セレン酸還元細菌のセレン酸還元の分子機構についても、現状では全く不明であり、今後の解明が待たれる。

第2章では、代表的なグラム陽性セレン酸還元細菌である SF-1 株について、細菌分類の主流となっている 16S rDNA 配列を基にした系統解析を行うとともに、その他の生理学的、化学的分類手法等を用いて種の特定と特徴付けを行った。

近縁種間での 16S rDNA 配列の系統解析を行った結果、SF-1 株は *B. jeotgali* JCM 10885^T と最も高い相同性 (99.6%) を示した。しかし、両菌株には嫌気条件下における電子受容体の利用性、高塩濃度下での増殖、各炭素源からの酸生成、硫化水素の生成等の生理学的差異が認められたことから、両菌株は異なる種であることが推測された。化学的分類手法によってさらなる特徴付けを行った結果、両菌株の脂肪酸組成、DNA の G+C 含量に大きな違いはなかったが、DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験から、両者の DNA 塩基配列の相同値は 14% と十分に低いことが示されたことから、両菌株が異なる種に分類されることが明らかとなった。本結果より、SF-1 株を新種の細菌 *Bacillus selenatarsenatis* の基準株として提唱した。

SF-1 株、及びこれまでに報告されている *Bacillus* 属セレン酸還元細菌について、他の 16S rDNA 塩基配列の系統解析を行ったところ、*Bacillus* 属セレン酸還元細菌は相互に相同性が低く、互いに近縁性が低いことが示唆された。従って、幅広い種が含まれる *Bacillus* 属セレン酸還元細菌については、より網羅的な検討を行い、その差異と共通性質を解明することが必要であると考えられた。

第3章では、グラム陽性細菌 *B. selenatarsenatis* SF-1 の持つセレン酸還元機構を明らかにすべく、分子生物学的手法を用いて SF-1 株のセレン酸還元に関わる遺伝子群を探索した。トランスポゾン Tn916 の挿入によって作製したセレン酸還元能欠損変異株 17 株のうち、SF-1AM4 株をはじめとする 8 株において破壊されていた遺伝子はセレン酸還元酵素遺伝子であることが推測された。SF-1AM4 株のセレン酸還元能は完全に失われていたが、野生株と比較してヒ酸、硝酸の各還元能に有意な低下は見られず、亜セレン酸還元能は若干の低下が見られた。SF-1AM4 株の Tn916 挿入位置近傍には 3 つの ORF からなるオペロンが存

在しており、BLASTX 解析の結果、これらは酸化還元酵素をコードしていると推測されたことから、これら 3 つの遺伝子を上流よりそれぞれ *srdBCA* と名付け解析を進めた。*srdBCA* を挿入したプラスミド pGEMsrdBCA を構築し、さらに各 ORF を一つ、または二つ、または全て欠いたプラスミドをそれぞれ構築して、*E. coli* DH5 α を形質転換したところ、*E. coli* DH5 α /pGEMsrdBCA のみがセレン酸還元能を示したことから、*srdBCA* がセレン酸の還元形質を与えること、また全ての ORF がセレン酸還元に不可欠であることが示された。さらに、ドメイン構造解析の結果、*srdBCA* は膜結合型モリブデン含有酸化還元酵素の典型的な特徴を示したことから、セレン酸還元酵素遺伝子であることが証明された。本研究は、グラム陽性細菌における初めてのセレン酸還元酵素遺伝子の報告であり、グラム陽性細菌によるセレン酸還元機構を理解する上での極めて重要な知見となると考えられた。

第 4 章では、セレン酸、亜セレン酸の両者に対して高い還元能力を持つ新規の好気性セレン酸還元細菌を取得するとともに、その特徴付けを行った。

セレン精錬工場の排水溝試料より単離された細菌 *P. stutzeri* NT-I は、好気条件下において 1 mM のセレン酸を、亜セレン酸を経て元素態セレンにまで還元し、また同様に、0.9 mM 亜セレン酸も元素態セレンにまで還元した。さらに高濃度のセレンについても、11 mM までのセレン酸を完全に亜セレン酸に還元し、9 mM までの亜セレン酸を完全に元素態セレンにまで還元することができた。加えて、より高い濃度のセレン酸、亜セレン酸についても一部の還元が観察された。セレン酸については 20–50°C、pH7–9、NaCl 濃度 0.05–20 g/l の範囲で還元することができ、亜セレン酸については 20–50°C、pH6–9、NaCl 濃度 0.05–50 g/l の範囲で還元することができた。また、NT-I 株は好気、嫌気両条件下でセレン酸を還元できたが、亜セレン酸については好気条件下のみで還元が生じた。NT-I 株はこれまでに報告されているセレン酸還元細菌と比較して最もセレン酸・亜セレン酸還元能力が高く、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスに活用する添加するセレン酸還元細菌として有望であることが明らかとなった。さらに、培地としてより実用的な乳酸無機塩培地を用いた場合、TSB 培地を用いた場合と比較してセレン酸、亜セレン酸のいずれの還元能についても低下した。この問題に対し、嫌気条件下で培養することにより安定してセレン酸を還元でき、また乳酸無機塩培地に 1 g/l のカザミノ酸を添加することで安定して亜セレン酸を還元することが明らかとなった。

第 5 章では、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスへの適用が有望であることが明らかとなった *P. stutzeri* NT-I のセレン酸還元に関わる遺伝子群を単離・解析することを目的とした研究を行った。

その結果、Tn5 挿入変異株ライブラリより NT-IAM2 株、NT-IAM3 株、NT-IAM4 株の 3 株のセレン酸還元能変異株が得られた。これら 3 株は好気、嫌気両条件下でのセレン酸還元能が大幅に低下していた。NT-I 株のドラフトゲノム解析結果より、Tn5 挿入位置近傍の配列情報を取得したところ、NT-IAM2 株と NT-IAM4 株において Tn5 によって破壊されてい

た遺伝子は *serABDC* オペロンであり、これは *T. selenatis* の同遺伝子と相同性が高いことから、セレン酸還元酵素遺伝子であることが推測された。また、NT-IAM3 株において破壊されていた遺伝子は、モリブデン補因子生合成酵素をコードする *moaCDE* オペロンであることが明らかとなった。*serABDC* はモリブデン補因子を持つ酵素であることから、*moaCDE* によって生合成されたモリブデン補因子が *serABDC* に挿入されていることが示唆された。*serABDC* は嫌気性セレン酸還元細菌 *T. selenatis* AX の同遺伝子と相同性が高い一方で、それらのプロモーター領域の塩基配列の相同性は低く、NT-I 株特有の制御を受けていることが示唆された。このため、NT-I 株のセレン酸還元能の誘導条件を調べたところ、セレン酸還元能は微好気条件で誘導されること、また硝酸の存在によって抑制されないことが示された。*SerABC* が持つモリブデン補因子や鉄-硫黄クラスターは、酸素に対する耐性が低いと一般的に言われていることから、*P. stutzeri* NT-I の *SerABC* が微好気条件下でもセレン酸を還元することは大変興味深く、酵素の分子構造や転写制御機構に関する今後の研究が重要であると考えられた。

以上、本研究により、グラム陽性嫌気性セレン酸還元細菌 *B. selenatarsenatis* SF-1、及びグラム陰性好気性セレン酸還元細菌 *P. stutzeri* NT-I について、セレン酸還元機構の一部を解明することができた。これら異なる特徴を持つ 2 種の高濃度セレン酸還元細菌のセレン酸還元酵素を比較すると、相違点と共通点が存在している。

まず、両酵素の大きな相違点として、局在性の違いが挙げられる。本研究において明らかとなった SF-1 株のセレン酸還元酵素 *SrdBCA* は γ サブユニットである *SrdC* をアンカーとした膜結合型酵素であったが、NT-I 株のセレン酸還元酵素 *SerABC* は γ サブユニットである *SerC* が水溶性タンパク質であるペリプラズム局在性酵素であった。このような局在性の違いは、水溶性の細胞外酵素を持たないグラム陽性細菌と、ペリプラズムに水溶性の酵素を保持するグラム陰性細菌の違いをよく反映したものであり、細胞膜構造の違いにより保持し得るセレン酸還元酵素の性質が異なることを示す非常に貴重な知見である。

セレン酸還元酵素遺伝子を異種細菌へ導入し、セレン酸還元能を付与しようとする場合、両酵素の局在性の違いは異種宿主における酵素の発現の可否に影響する可能性が高い。実際、永野（2009）は、工学的応用を目指して *B. selenatarsenatis* SF-1 の *SrdBCA* を *E. coli* において高発現させることを試みたものの、高発現系を構築することはできなかったが、岩田（2005）は、可溶性タンパク質と比較して膜タンパク質の異種宿主発現はいつそう難しく、高い発現量を得られないことを指摘しており、*srdBCA* を組換え導入することにより異種細菌に高いセレン酸還元能を付与することが困難であることを裏付けている。一方、*SerABC* が水溶性タンパク質であることは、異種宿主での酵素の組換え発現、生産において *SrdBCA* よりも有利に働く可能性を示唆している。

他方、両酵素の共通点として、ともに嫌気呼吸鎖の末端酵素であることが明らかとなった。つまり、炭素源の酸化分解に伴って発生する電子が NADH やキノールといった電子伝達物質を経由してセレン酸にまで受け渡されることによりセレン酸還元は生じていると考

えられ、これらの酵素を持つセレン酸還元細菌の利用においては、還元力の源となる炭素源の供給が不可欠であることが明らかとなった。また、両酵素ともに、呼吸系酸化還元酵素として一般的なモリブデンや鉄-硫黄クラスターを補因子として含んでいることが示されたが、これらの補因子は一般に酸素に対して感受性が高いことが知られていることから (Mendel & Bittner, 2006; Bandyopadhyay *et al.*, 2008)、セレン酸還元細菌の利用においては、基本的に反応槽内の溶存酸素濃度の適切な管理が必要であることが示唆される。

以上のように、本研究で得られたセレン酸還元に関わる遺伝情報を、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスの機能向上へ活用するアプローチとして、以下の 2 つの方向性が考えられる。

まず挙げられるのが、バイオリアクター内でのセレン酸還元活性の動的挙動の解析である。セレン酸還元酵素遺伝子の配列情報を基にして、様々な環境変化に伴い変動する細胞中の mRNA 転写量の定量を行うことで、細胞レベルにおいてセレン酸還元に適した環境を明らかにし、リアクターの最適制御条件を見つけ出すことが可能となる。また、微生物群集中でのセレン酸還元細菌の挙動を、セレン酸還元酵素遺伝子配列をマーカーとして定量することで、リアクター内でセレン酸還元細菌がいかに定着しているかを明らかにできるなど、正確なモニタリングデータに基づいた処理系の管理が可能となる。遺伝情報そのものは静的な情報であるが、遺伝情報を基にこれらの動的な情報を得ることにより、セレン含有廃水の生物学的処理プロセスをより高度に運転することができるものと考えられる。

遺伝情報の活用方法としてもう一点挙げられるのは、遺伝子組換え技術によるセレン酸還元細菌の改良である。本研究で解析を行った SF-1 株及び NT-I 株は、両者とも中温域、中性 pH 域、低塩濃度下という条件下で高いセレン酸還元能力を発揮するものであったが、処理の対象となる工業廃水は必ずしもこのような性状を持つとは限らないことから、その機能を有効に活用できないことも考えられる。これに対し、本研究で得られたセレン酸還元酵素遺伝子を、高塩濃度下や高/低 pH 下などの特殊な処理環境下で優先種として生育できる細菌に導入し、セレン酸還元能を付与することにより、様々な性状を持つ廃水に対応し、高い性能を安定して保持できるプロセスを創造できる可能性がある。

セレン含有廃水の生物学的処理プロセスの実用化に向けては、今後さらにいくつかの課題解決に向けての研究・開発に取り組む必要がある。まず 1 つ目の課題は、亜セレン酸還元機構の解明である。本研究によって、セレン酸還元については、生理学的側面と分子生物学的側面の両面からの理解が進み、細菌によるセレン酸還元の大部分を説明することで、その合理的な利用に向けた基礎を構築することができた。しかし、亜セレン酸還元については、特に分子生物学的側面からの知見が全く得られていない。第 3 章および第 5 章で実施したトランスポゾンによるセレン酸還元能欠損変異株の作製では、同条件において亜セレン酸還元能欠損変異株を取得できる可能性があったにもかかわらず、セレン酸還元能欠損変異株のみが取得された。この理由として、亜セレン酸還元に関わる遺伝子が生存に必須

である、または単一の遺伝子の破壊による機能欠損が別の代謝経路によって補完されるといったことが推測され、この方法による亜セレン酸還元機構の解析の限界を示唆している。NT-I 株の亜セレン酸還元反応は好気条件下のみで生じることから、好気呼吸によって生み出される、より豊富なエネルギーを利用した同化的代謝経路によるものであるとも推測されるが、さらにセレンの揮発化産物として硫黄を含むジメチルセレンニルサルファイドが検出されていることに着目すれば、硫黄の代謝経路と関わりのある反応によって行われているとも推測される。今後、cDNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析、または、特にセレン高蓄積植物において実績のある HPLC-ICP-MS による定量と HPLC-MS/MS による定性を併用したセレン含有代謝物質の解析 (Ogra, 2008) などの手法の適用により、NT-I 株の持つセレン代謝機構を包括的に解析することが、亜セレン酸還元機構の解明に有効であると考えられる。これにより、セレン酸還元反応に加え、亜セレン酸還元機構も解明することができれば、セレン酸から元素態セレン、あるいは揮発性セレンを生成する細菌の代謝全体を合理的に制御することも可能である。2 つ目の課題は、貧栄養源環境下でもセレン酸化物還元を良好に行うための方策の検討である。本研究では、主に栄養源に富む TSB 培地を用いた場合に、NT-I 株の高いセレン酸化物還元能力が発揮されることを明らかにした。一方で、無機塩培地のような貧栄養培地中では、セレン酸、亜セレン酸還元速度が大幅に低下することも示唆された。実利用においては、コスト低減の観点から、できるだけ少ない栄養源の添加でセレンの還元反応を行うことが望ましいことから、セレン酸化物還元についての分子生物学的解析を基に、その還元を促進する要因を特定し、低コストで利用可能な廃棄物などから栄養源としての有用なものを選定することが望まれる。3 つ目の課題は、分子生物学的研究より想起される合理的プロセスを実際に構築し、パイロット試験機により実証試験することである。これまでに、いくつかのセレン含有廃水の処理を目的としたバイオリアクターの提案がなされてきたが、基本的には、いずれも硝酸還元や硫酸還元のような、古くからよく研究されている反応による還元を模倣した、経験的知見に基づいてデザインされたプロセスであった。本研究、及び今後明らかにしていく亜セレン酸還元反応の機構解明の成果に基づいて、還元能発現の制御機構や代謝経路の最適化を行うなどの工夫によって合理的なプロセスを構築すれば、これまでとは全く異なったコンセプトで高濃度のセレン酸を含む廃水の処理が可能になるものと期待される。このような新規のプロセスについては、副作用的なハザードが生じ得ないかを含めた、様々な条件での実証試験を通じた総合的評価が必要である。これらの課題を解決することができれば、本プロセスの普及が進み、産業におけるセレン含有廃水処理の問題に大きく寄与するとともに、社会におけるセレン資源の循環利用の促進につながるものと期待される。

参考文献

- Andren, A. W., D. H. Klein, and Y. Talmi.** 1975. Selenium in coal-fired steam plant emissions. *Environ. Sci. Technol.* **9**:856–858.
- Bandyopadhyay, S., K. Chandramouli, and M. K. Johnson.** 2008. Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **36**:1112–1119.
- Bearson, S. M., J. A. Albrecht, and R. P. Gunsalus.** 2002. Oxygen and nitrate-dependent regulation of *dmsABC* operon expression in *Escherichia coli*: sites for Fnr and NarL protein interactions. *BMC Microbiol.* **2**:13.
- Berks, B. C., R. Palmer, and F. Sargent.** 2005. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:174–181.
- Bilous, P. T., S. T. Cole, W. F. Anderson, and J. H. Weiner.** 1988. Nucleotide sequence of the *dmsABC* operon encoding the anaerobic dimethylsulphoxide reductase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2**:785–795.
- Bledsoe, T. L., A. W. Cantafio, and J. M. Macy.** 1999. Fermented whey-an inexpensive feed source for a laboratory-scale selenium-bioremediation reactor system inoculated with *Thauera selenatis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:682–685.
- Blasco, F., C. Iobbi, G. Giordano, M. Chippaux, and V. Bonnefoy.** 1989. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the *nar* operon and reassessment of the role of the alpha and beta subunits in iron binding and electron transfer. *Mol. Gen. Genet.* **218**:249–256.
- Blum, J. S., A. B. Bindi, J. Buzzelli, J. F. Stolz, and R. S. Oremland.** 1998. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.* **171**:19–30.

- Cai, L., C. Rensing, X. Li, and G. Wang.** 2009. Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *Achromobacter* sp. SY8 and *Pseudomonas* sp. TS44. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**:715–725.
- Cantafio, A. W., K. D. Hagen, G. E. Lewis, T. L. Bledsoe, K. M. Nuran, and J. M. Macy.** 1996. Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera selenatis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3298–3303.
- Chasteen, T. G., and R. Bentley.** 2003. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem. Rev.* **103**:1–25.
- Chung, J., R. Nerenberg, and B.E. Rittmann.** 2006. Bioreduction of selenate using a hydrogen-based membrane biofilm reactor. *Environ. Sci. Technol.* **40**:1664–1671.
- Cowan, S. T. and K. J. Steel.** 1974. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 2nd edition, Cambridge University Press.
- DeMoll-Decker, H. and J. M. Macy.** 1993. The periplasmic nitrite reductase of *Thauera selenatis* may catalyze the reduction of selenite to elemental selenium. *Arch. Microbiol.* **160**:241–247.
- Dridge, E. J., C. A. Watts, B. J. N. Jepson, K. Line, J. M. Santini, D. J. Richardson, and C. S. Butler.** 2007. Investigation of the redox centres of periplasmic selenate reductase from *Thauera selenatis* by EPR spectroscopy. *Biochem. J.* **408**:19–28.
- Dungan, R.S. and W. T. Frankenberger Jr.** 2001. Biotransformations of selenium by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Formation of dimethylselenide. *Biogeochemistry.* **55**:73–86.
- Dungan, R. S., S. R. Yates, and W. T. Frankenberger Jr.** 2003. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment, *Environ. Microbiol.* **5**:287–295.
- Ezaki, T., Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi.** 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:224–229.

- Fischer, J. C. and J. T. Hollibaugh.** 2008. Selenate-dependent anaerobic arsenite oxidation by a bacterium from Mono Lake, California. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**:2588–2594.
- Flannagan, S., L. A. Zitzow, Y. A. Su, and D. B. Clewell.** 1994. Nucleotide sequence of the 18-kb conjugative transposon Tn916 from *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **32**:350–354.
- Fujita, M., M. Ike, S. Nishimoto, K. Takahashi, and M. Kashiwa.** 1997. Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J. Ferment. Bioeng.* **83**:517–522.
- Fujita, M., M. Ike, M. Kashiwa, R. Hashimoto, and S. Soda.** 2002. Laboratory-scale continuous reactor for soluble selenium removal using selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *Biotechnol. Bioeng.* **80**:755–761.
- Gawron-Byrke, C., and D. B. Clewell.** 1982. A transposon in *Streptococcus faecalis* with fertility properties. *Nature* **300**:281–284.
- Härtig E., U. Schiek, K. U. Vollack, and W. G. Zumft.** 1999. Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:3658–3665.
- Haygarth, P. M.** 1994. Global importance and global cycling of selenium, p. 1-27. *In* Frankenberger W. T. Jr. and Benson S. (ed.), *Selenium in the environment*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Hensel, M., A. P. Hinsley, T. Nikolaus, G. Sawers, and B. C. Berks.** 1999. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **32**:275–287.
- Herbel, M. J., J. S. Blum, R. S. Oremland, and S. B. Borglin.** 2003. Reduction of elemental selenium to selenide: experiments with anoxic sediments and bacteria that respire Se-oxyanions. *Geomicrobiol. J.* **20**:587–602.
- Holt, J. G.** 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins.
- Hunter, W.J., and L. D. Kuykendall.** 2005. Removing selenite from groundwater with an *in situ* biobarrier: laboratory studies. *Curr. Microbiol.* **50**:145–150.

- Ike, M., K. Takahashi, T. Fujita, M. Kashiwa, and M. Fujita.** 2000. Selenate reduction by bacteria isolated from aquatic environment free from selenium contamination. *Water Res.* **34**:3019–3025.
- Imada, C., Y. Harada, T. Kobayashi, N. Hamada-Sato, and E. Watanabe.** 2005. Degradation of ferric chelate of ethylenediaminetetraacetic acid by bacterium isolated from deep-sea stalked barnacle. *Mar. Biotechnol.* **7**:21–25.
- Jin, S., K. S. Ishimoto, and S. Lory.** 1994. PilR, a transcriptional regulator of piliation in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to a *cis*-acting sequence upstream of the pilin gene promoter. *Mol. Microbiol.* **14**:1049–1057.
- Jormakka, M., D. Richardson, B. Byrne, and S. Iwata.** 2004. Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-*bis*MGD enzymes. *Structure* **12**:95–104.
- Kashiwa, M., S. Nishimoto, K. Takahashi, M. Ike, and M. Fujita.** 2000. Factors affecting soluble selenium removal by a selenate-reducing bacterium *Bacillus* sp. SF-1. *J. Biosci. Bioeng.* **89**:528–533.
- Kashiwa, M., M. Ike, H. Mihara, N. Esaki, and M. Fujita.** 2001. Removal of soluble selenium by a selenate-reducing bacterium *Bacillus* sp. SF-1. *Biofactors.* **14**:261–265.
- Katayama-Fujimura, Y., Y. Komatsu, H. Kuraishi, and T. Kaneko.** 1984. Estimation of DNA base composition by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* **48**:3169–3172.
- Kawasaki, H., Y. Hoshino, A. Hirata, and K. Yamasato.** 1993. Is intracytoplasmic membrane structure a generic criterion? It does not coincide with phylogenetic interrelationships among phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **160**:358–362.
- Kiley, P. J., and H. Beinert.** 1999. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:341–352.
- Kluge, A. G. and F. S. Farris.** 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**:1–32.

- Körner H., and W. G. Zumft.** 1989. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. Appl. Environ. Microbiol. **55**:1670–1676.
- Krafft, T., A. Bowen, F. Theis, and J. M. Macy.** 2000. Cloning and sequencing of the genes encoding the periplasmic-cytochrome *B*-containing selenate reductase of *Thauera selenatis*. DNA Seq. **10**:365–377.
- Kumar, A. R., and P. Riyazuddin.** 2011. Speciation of selenium in groundwater: Seasonal variations and redox transformations. J. Hazard. Mater. **192**:263–269.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. **5**:150–163.
- Lanciano, P., A. Vergnes, S. Grimaldi, B. Guigliarelli, and A. Magalon.** 2007. Biogenesis of a respiratory complex is orchestrated by a single accessory protein. J. Biol. Chem. **282**:17468–17474.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace.** 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **82**:6955–6959.
- Lawson, S., and J. M. Macy.** 1995. Bioremediation of selenite in oil refinery wastewater. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**:762–765.
- Leaver, J. T., D. J. Richardson, and C. S. Butler.** 2008. *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 gains a selective advantage from selenate reduction when growing in nitrate-depleted anaerobic environments. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **35**:867–873.
- Lenz, M., E. D. Hullebusch, G. Hommes, P. F. Corvini, and P. N. Lens.** 2008a. Selenate removal in methanogenic and sulfate-reducing upflow anaerobic sludge bed reactors. Water Res. **42**:2184–2194.

- Lenz, M., M. Smit, P. Binder, A. C. van Aelst, and P. N. Lens.** 2008b. Biological alkylolation and colloid formation of selenium in methanogenic UASB reactors. *J. Environ. Qual.* **37**:1691–1700.
- Lenz, M., and P. N. Lens.** 2009a. The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences. *Sci. Total Environ.* **407**:3620–3633.
- Lenz, M., A. M. Enright, V. O'Flaherty, A. C. van Aelst, and P. N. Lens.** 2009b. Bioaugmentation of UASB reactors with immobilized *Sulfurospirillum barnesii* for simultaneous selenate and nitrate removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**:377–388.
- Leonhartsberger, S., A. Huber, F. Lottspeich, and A. Böck.** 2001. The *hydH/G* Genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J. Mol. Biol.* **307**:93–105.
- Lortie, L., W. D. Gould, S. Rajan, R. G. L. McCready, and K.-J. Cheng.** 1992. Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:4042–4044.
- Losi, M. E. and W. T. Frankenberger Jr.** 1997. Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Isolation and growth of the bacterium and its expulsion of selenium particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3079–3084.
- Lowe, E. C., S. Bydder, R. S. Hartshorne, H. L. U. Tape, E. J. Dridge, C. M. Debieux, K. Paszkiewicz, I. Singleton, R. J. Lewis, J. M. Santini, D. J. Richardson, and C. S. Butler.** 2010. Quinol-cytochrome *c* oxidoreductase and cytochrome *c*₄ mediate electron transfer during selenate respiration in *Thauera selenatis*. *J. Biol. Chem.* **285**:18433–18442.
- Luo, Q., T. K. Tsukamoto, K. L. Zamzow and G. C. Miller.** 2008. Arsenic, selenium, and sulfate removal using an ethanol-enhanced sulfate-reducing bioreactor. *Mine Water Environ.* **27**:100–108.

- Ma, J., D. Y. Kobayashi, and N. Yee.** 2007. Chemical kinetic and molecular genetic study of selenium oxyanion reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. *Environ. Sci. Technol.* **41**:7795–7801.
- Ma, J., D. Y. Kobayashi, and N. Yee.** 2009. Role of menaquinone biosynthesis genes in selenate reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 and *Escherichia coli* K12. *Environ. Microbiol.* **11**:149–158.
- Macy, J. M., T. A. Michel, and D. G. Kirsch.** 1989. Selenate reduction by a *Pseudomonas* species: a new mode of anaerobic respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**:195–198.
- Macy, J. M., S. Rech, G. Auling, M. Dorsch, E. Stackebrandt, and L. I. Sly.** 1993a. *Thauera selenatis* gen. nov., sp. Nov., a member of the beta subclass of *Proteobacteria* with a novel type of anaerobic respiration, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:135–142.
- Macy, J. M., S. Lawson, and H. DeMoll-Decker.** 1993b. Bioremediation of selenium oxyanions in San Joaquin drainage water using *Thauera selenatis* in a biological reactor system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:588–594.
- Martoglio, B., and B. Dobberstein.** 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* **8**:410–415.
- Mendel, R. R., and F. Bittner.** 2006. Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**:621–635.
- Oremland, R. S., J. S. Blum, C. W. Culbertson, P. T. Visscher, L. G. Miller, P. Dowdle, and F. E. Strohmaier.** 1994. Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3011–3019.
- Ogra, Y.** 2008. Integrated strategies for identification of selenometabolites in animal and plant samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**: 1685–1689.

- Pearce, C. I., R. A. D. Patrick, N. Law, J. M. Charnock, V. S. Coker, J. W. Fellowes, R. S. Oremland, and J. R. Lloyd.** 2009. Investigating different mechanisms for biogenic selenite transformations: *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* and *Veillonella atypica*. Environ. Technol. **30**:1313–1326.
- Perrière, G., and M. Gouy.** 1996. WWW-query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. Biochimie **78**:364–369.
- Rech, S. A., and J. M. Macy.** 1992. The terminal reductases for selenate and nitrate respiration in *Thauera selenatis* are two distinct enzymes. J. Bacteriol. **174**:7316–7320.
- Rege, M. A., D. R. Yonge, D. P. Mendoza, J. N. Petersen, Y. Bereded-Samuel, D. L. Johnstone, W. A. Apel, and J. M. Barnes.** 1999. Selenium reduction by a denitrifying consortium. Biotechnol. Bioeng. **62**:479–484.
- Ridley, H., C. A. Watts, D. J. Richardson, and C. S. Butler.** 2006. Resolution of distinct membrane-bound enzymes from *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 that are responsible for selective reduction of nitrate and selenate oxyanions. Appl. Environ. Microbiol. **72**:5173–5180.
- Rizk, S. S., M. J. Cuneo, and H. W. Hellenga.** 2006. Identification of cognate ligands for the *Escherichia coli* *phnD* protein product and engineering of a reagentless fluorescent biosensor for phosphonates. Protein Sci. **15**:1745–1751.
- Rothery, R. A., G. J. Workun, and J. H. Weiner.** 2008. The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family. Biochim. Biophys. Acta **1778**:1897–1929.
- Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**:406–425.
- Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sargent, F.** 2007. The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. Biochem. Soc. Trans. **35**:835–847.

- Saudi, M. R., P. T. M. Ghazvini, K. Khajeh, and S. Gharavi.** 2009. Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. *J. Hazard. Mater.* **165**:71–77.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69–73.
- Schröder, I., S. Rech, T. Krafft, and J. M. Macy.** 1997. Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. *J. Biol. Chem.* **272**:23765–23768.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, and C. P. Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:5857–5864.
- Schwarz, G., R. R. Mendel, M. W. Ribbe.** 2009. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**:839–847.
- Sei, K., K. Asano, N. Tateishi, K. Mori, M. Ike, T. Kohno, and M. Fujita.** 2000. Development of simple methods of DNA extraction from environmental samples for monitoring microbial community based on PCR. *Jpn. J. Water Treat. Biol.* **36**:193–204.
- Simon, J., and M. Kern.** 2008. Quinone-reactive proteins devoid of haem *b* form widespread membrane-bound electron transport modules in bacterial respiration. *Biochem. Soc. Trans.* **36**:1011–1016.
- Soda, S., M. Kashiwa, T. Kagami, M. Kuroda, M. Yamashita, and M. Ike.** 2011. Laboratory-scale bioreactors for soluble selenium removal from selenium refinery wastewater using anaerobic sludge. *Desalination.* **279**:433–438.
- Siddique, T., B. C. Okeke, Y. Zhang, M. Arshad, S. K. Han, and W. T. Frankenberger Jr.** 2005. Bacterial diversity in selenium reduction of agricultural drainage water amended with rice straw. *J. Environ. Qual.* **34**:217–226.

- Siddique, T., J. M. Arocena, R. W. Thring, and Y. Zhang.** 2007. Bacterial reduction of selenium in coal mine tailings pond sediment. *J. Environ. Qual.* **36**:621–627.
- Stolz, J. F., D. J. Ellis, J. S. Blum, D. Ahmann, D. R. Lovley, and R. S. Oremland.** 1999. *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the *epsilon-Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1177–1180.
- Stolz, J. F., P. Basu, J. M. Santini, and R. S. Oremland.** 2006. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:107–130.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876–4882.
- Turner, R. J., A. L. Papish, and F. Sargent.** 2004. Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can. J. Microbiol.* **50**:225–238.
- Unden, G., S. Becker, J. Bongaerts, G. Holighaus, J. Schirawski, and S. Six.** 1995. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **164**:81–90.
- Viamajala, S., Y. Bereded-Samuel, W. A. Apel, and J. N. Petersen.** 2006. Selenite reduction by a denitrifying culture: batch- and packed-bed reactor studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**:953–962.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, and other authors.** 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:463–464.

- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697–703.
- Yamamura, S., M. Ike, and M. Fujita. 2003. Dissimilatory arsenate reduction by a facultative anaerobe, *Bacillus* sp. strain SF-1. *J. Biosci. Bioeng.* **96**:454–460.
- Yamamura, S., S. Terashi, M. Ike, M. Yamashita, and M. Fujita. 2004. Characterization of arsenate-, selenate-, and nitrate-reducing activities in *Bacillus* sp. SF-1. *Jpn. J. Water Treat. Biol.* **40**:161–168.
- Yee, N., J. Ma, A. Dalia, T. Boonfueng, and D. Y. Kobayashi. 2007. Se(VI) reduction and the precipitation of Se(0) by the facultative bacterium *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 are regulated by FNR. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1914–1920.
- Yoon, J., S. Kang, K. Lee, Y. Kho, S. Choi, K. Kang, and Y. Park. 2001. *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1087–1092.
- Zhang, Y., and W. T. Frankenberger Jr. 2003. Removal of selenate in simulated agricultural drainage water by a rice straw bioreactor channel system. *J. Environ. Qual.* **32**:1650–1657.
- Zhang, Y., and W. T. Frankenberger Jr. 2005. Removal of selenium from river water by a microbial community enhanced with *Enterobacter taylorae* in organic carbon coated sand columns. *Sci. Total. Environ.* **346**:280–285.
- Zhao, Z., and J. H. Weiner. 1998. Interaction of 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide with dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**:20758–20763.
- 岩田想. 2005. 膜蛋白質の結晶構造解析に将来はあるのか. 蛋白質 核酸 酵素. **50**:197–206.
- 環境省水・大気環境局水環境課. 2010. 平成 21 年度 水質汚濁物質排出量総合調査 (調査結果概要). 環境省.
- 下村光一郎, 初貝留美, 飯塚貞男, 江口憲治. 1997. 横浜市内事業所のセレン排水処理実態調査. 横浜市環境科学研究所報. **21**:119–122.

総合資源エネルギー調査会鉱業分科会レアメタル対策部会. 2007. 報告書「今後のレアメタルの安定供給対策について」. 経済産業省.

太平洋セメント株式会社. 2008. セメントキルン燃焼ガス抽気ダストの処理方法. 公開特許公報. 特開 2008-23420.

寺師佐知子. 2004. *Bacillus* sp. SF-1 株によるセレン酸、ヒ酸、及び硝酸の還元機構に関する研究. 大阪大学大学院 工学研究科 環境工学専攻 修士論文.

永野公太. 2009. *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 のセレン酸還元に関与する遺伝子の解析. 大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 修士論文.

謝辞

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、終始御懇篤なる御指導と御助言を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 教授 池道彦先生に、心より感謝致します。

本論文の査読ならびに御校閲を頂き、貴重な御助言を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 教授 栗津邦男先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜り、また、本論文の査読ならびに御校閲を賜りました、芝浦工業大学 工学部 応用化学科 教授 山下光雄先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜り、また、本論文の査読ならびに御校閲を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 准教授 惣田訓先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜りました、北里大学 医療衛生学部 健康科学科 教授 清和成先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、貴重な御指導と御助言を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 助教 小野比佐好先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、終始御指導、御援助を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 特任助教 井上大介先生、同 技術部 技術専門職員 山岡ゆり子氏に、心より感謝致します。

本研究第3章において使用した *Enterococcus faecalis* CG110 を快く分譲頂きました、北海道大学大学院 地球環境科学研究院 教授 森川正章先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、共同研究者として、御助言、御尽力賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 特任研究員 柏雅美先生、国立環境研究所 地域環境研究センター 主任研究員 山村茂樹先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、共同研究者として、御尽力賜りました、芝浦工業大学 SIT 総合研究所 レアメタルバイオリサーチセンター 研究員 成田 尚宣氏、大阪大学大学院 工学研究科 応用生物工学専攻 藤本典之氏、今尾加奈子氏、同 環境・エネルギー工学専攻 神崎雅也氏、永野公太氏、野田口恵美氏、鏡つばさ氏、佐藤彰子氏、三輪恵美子氏、長谷川愛氏、吉岡雅也氏に、心より感謝致します。

研究活動において、直接、間接の御協力、御支援を頂きました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 生物圏環境工学領域の諸兄姉に、心より感謝致します。

最後に、前職を辞して博士課程で研究を行うことに理解を示し、温かい応援を頂きました両親に、心より感謝致します。

本論文に関する報文

投稿論文

- 1) **Yamamura, S., M. Yamashita, N. Fujimoto, M. Kuroda, M. Kashiwa, K. Sei, M. Fujita, and M. Ike.** 2007. *Bacillus selenatarsenatis* sp. nov., a selenate- and arsenate-reducing bacterium isolated from the effluent drain of a glass-manufacturing plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**:1060–1064.
- 2) **Kuroda, M., M. Yamashita, E. Miwa, K. Imao, N. Fujimoto, H. Ono, K. Nagano, K. Sei, and M. Ike.** 2011. Molecular cloning and characterization of the *srdBCA* operon, encoding the respiratory selenate reductase complex, from the selenate-reducing bacterium *Bacillus selenatarsenatis* SF-1. *Journal of Bacteriology*, **193**:2141–8.
- 3) **Kuroda, M., E. Notaguchi, A. Sato, M. Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, T. Narita, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, and M. Ike.** 2011. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112**:259–64.
- 4) **Kuroda, M. M. Yamashita, E. Miwa, K. Sei, S. Soda, and M. Ike.** Identification of genes related to selenate reduction in *Pseudomonas stutzeri* NT-I. (投稿準備中)

国際会議録

- 1) **Kuroda, M.** 2004. Dissimilatory Arsenate and Selenate Reduction by *Bacillus* sp. SF-1. KAIST-Osaka university Joint Symposium 2004, S20, Korea Advanced Institute of Science and Technology, South Korea.
- 2) **Kuroda, M., M. Yamashita, E. Miwa, K. Sei, and M. Ike.** 2011. Molecular cloning and characterization of the *srdBCA* operon encoding the respiratory selenate reductase complex from the selenate-reducing bacterium, *Bacillus selenatarsenatis* SF-1. Asian Congress on Biotechnology 2011, H0443, Shanghai, China.
- 3) **Miwa, E., M. Kuroda, E. Notaguchi, A. Sato, M. Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, K. Sei, S. Soda, M. Yamashita, and M. Ike.** 2011. *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of reducing selenate/selenite into elemental selenium and volatilizing them as methylated selenium; a versatile microbial agent for biotreatment/bioremediation of selenium contamination. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, CD-ROM IUMS2011 Abstracts, P-AM03-5, Sapporo, Japan.