

## 論文の内容の要旨

専攻	応用生命化学
氏名	サイラ アバス
指導教員名	藤原 徹

### 論文題目

## **Isolation and Identification of Novel Species of Heavy-metals Tolerant Bacteria from Pakistan for Their Potential Usage in Bioremediation and in Agriculture**

(パキスタン由来の重金属耐性を示す新種細菌の  
単離・同定及びそのバイオレメディエーションや  
農業への応用の可能性についての研究)

環境劣化は地球全体で進行しているが、発展途上国における環境問題は先進国に比べて深刻である。発展途上国には人口密集地域が点在しており、そのような地域では農業に対する要求も高く、経済発展や工業化への期待も大きい。農業を含めた経済活動は環境を犠牲にして進められることが多い。これまでにも、世界の各地で急速な産業の発展に伴って産業廃液などの放出により重金属汚染が発生している。重金属は分解されることは無く環境中で安定であり、パキスタンにおいても重金属汚染問題が顕在化している。

重金属は遷移元素が多く、一般には環境中にほとんど存在しないので微量元素とも呼ばれる。金属元素は生物の代謝の様々な過程に関与しており、成長や分化にも影響を与える。重金属耐性微生物を単離することができれば、そのような微生物は環境中の重金属毒性を緩和する可能性がある。また、重金属耐性微生物の耐性機構の解明や遺伝子の水平伝播の理解にもつながる可能性がある。

本論文では重金属に高い耐性を示す細菌を同定しさらにその性質を調査した。本研究で同定された細菌にはこれまでに報告されている細菌に比べて、カドミウム(Cd)やヒ素(As)に対する耐性が高いものであった。また、同定した数種の新種細菌が異なる重金属に対する耐性を示すことが明らかになった。また、重金属蓄積能や重金属存在下での植物の生育を促進する系統も見いだされた。

シアルコット、イスラマバード、カスールの工業地帯の廃液の排出口近くから68種類の重金属耐性細菌を同定した。これらの細菌はクロム (Cr)、銅 (Cu)、Cd、鉛 (Pb) や As に耐性であった (図 1)。単離された菌株の中には、3600 ppm の Cr, 3300 ppm の Cu, 3000 ppm の Cd, 1500 ppm の Pb and 1200 ppm の As に耐性のものが含まれていた。特に、Cd と As に対する耐性については、今回同定されたものは既報のものよりも強い耐性を示した。

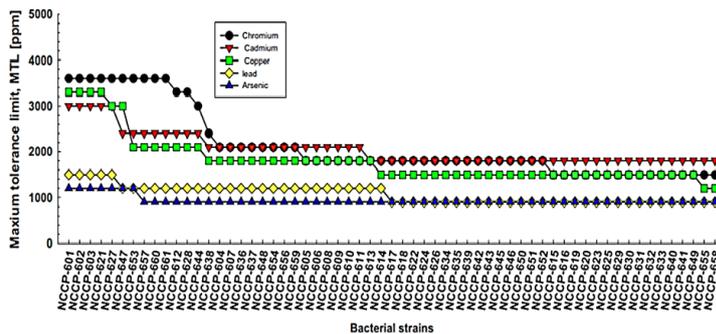


図 1 単離した細菌系統の異なる重金属(Cr, Cu, Pb, Cd および As)に対する耐性限界 (Maximum tolerance limit ;MTL)

これらの系統の一部については、重金属の蓄積能の検討を行った。この研究においては、Cr、Cu、Pb、Cd または As を 25 ppm 含む培地を準備し、系統上異なる 23 の系統を定常状態まで 48 から 72 時間培養し、それぞれの細菌株が培地から重金属を取り除く能力を検定した。23 の系統全体の傾向としては、Pb を取り除く能力が高く、続いて Cd、Cu が一定程度取り除かれたが、As や Cr の除去効率は低かった。系統によって Pb、Cd および Cu の除去効率に差が見られたが、As や Cr については有意な差は認められなかった。鉛については、NCCP-614 (99%)、NCCP-605 (96%)、NCCP-655 (91%) が高い除去効率を示した。NCCP-614 と NCCP-655 については Cd の除去効率も高く、89% および 59% であった。一方で、Cu の除去効率の高い系統は異なっており、NCCP-625 (42%)、NCCP-619 (38%) および NCCP-647 (36%) が高かった。この結果はこれらの同定された系統が汚染水中の重金属除去に利用できる可能性を示した。

同定された系統について 16S rRNA 配列を解析し、配列に基づいて細菌の属性を調べたところ、これらの重金属耐性系統は 19 の異なる属に属していることが示唆された (図 2)。同定された菌の多くは *Bacillus*, *Pseudomonas* 及び *Staphylococcus* 属に属していた。また、*Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Bravibacterium* 属に属するものも見られ、

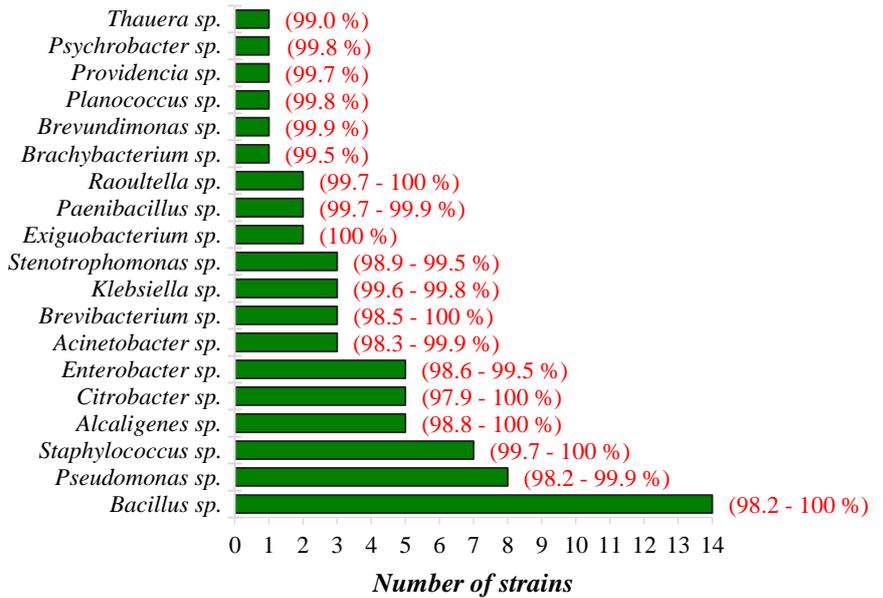


図 2 同定された重金属耐性系統の多様性  
棒グラフに示された数字は示された属の類似種の配列との相同性を示している。

16S rRNA gene sequence の相同性は 97.9 から 100 % の範囲であった。相同性の低い系統については、分類上新種として記述された。高い相同性(> 99%)を示した系統については、分類上位置づけを決める実験は行わなかった。

新種として同定された細菌は、3 系統あり、それらは、*Acinetobacter*, *Alcaligenes* および *Bacillus* 属に属するものであった。*Acinetobacter pakistanensis* sp. nov. (Abbas et al. 2014), *Alcaligenes pakistanensis* sp. nov. (Abbas et al. 2015a)、および *Bacillus malikii* sp. nov. (Abbas et al. 2015b) と命名された。これら新種細菌の分類学上の実験結果の詳細は第 5 章から第 7 章に記述している。これらの重金属耐性系統を新種の細菌として同定し、その過程で様々な生化学実験をしたことにより、生きた細胞の中での重金属の特性についての知見を得ることができた。また、これらの系統を将来研究することで、微生物における重金属輸送についての新しい知見が得られる可能性がある。

単離された重金属耐性系統の農業利用の可能性を調査するために、同定された菌株が *nifH* 及び *acdS* 遺伝子を持っているかどうか調査した。これらの遺伝子を持つ系統は植物の成長促進効果をもつ生物肥料として利用されることが知られており、今回単離した系統にこれらの遺伝子を持つものがあれば、重金属汚染土壌での植物生育促進効果が見られる可能性がある。この解析の結果は図 3 に示しており単離した系統の少なくとも 15 系統が *nifH* を、少なくとも 8 系統が *acdS* を持っていた。NCCP-650, NCCP-611, NCCP-660,

NCCP-635, NCCP-622, NCCP-614 および NCCP-605 は両者を持っていた。これらの系統のうち、NCCP-650 は同定の結果新種であることがわかり、*Alcaligenes pakistanensis* sp. Nov と命名した。この系統は亜硝酸還元酵素 *nirK* も持っていた。

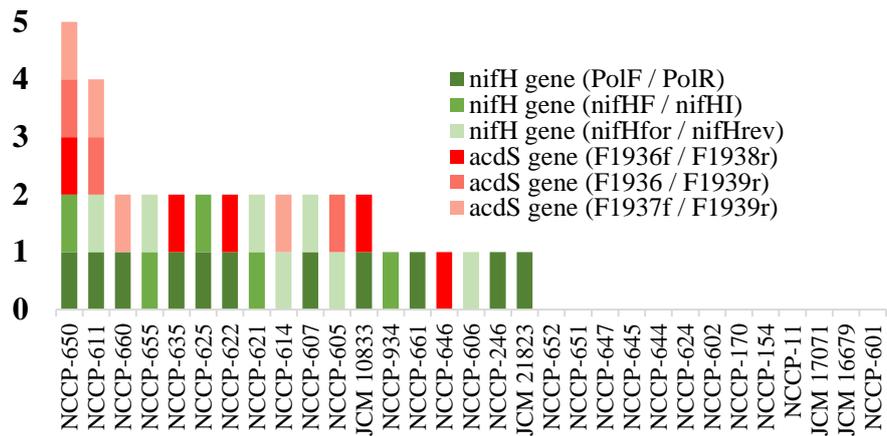


図3 同定された系統における *nifH* および *acdS* 遺伝子の存在

*nifH* および *acdS* の両者を持っていた菌株については、ナタネ *Brassica napus* の成長促進効果を検討した。試験に用いた重金属を 50ppm の濃度で含む水を与えて栽培したところ、Pb と Cd を用いた試験にといては、いずれの系統でも成長促進する傾向が認められた (図4)。試験に用いた菌株の中では、NCCP-650 の効果が最も高かった。この系統は *Alcaligenes pakistanensis*

に属しており、この種の菌株には植物の生育促進効果が報告されているものがある。

以上、本論文では、重金属に耐性な新種を含む微生物系等を同定し、それらの中に優れた重金属除去効果や植物の生育促進効果を持つものを見いだした。これらの系統の環境浄化や農業利用への可能性が示された。

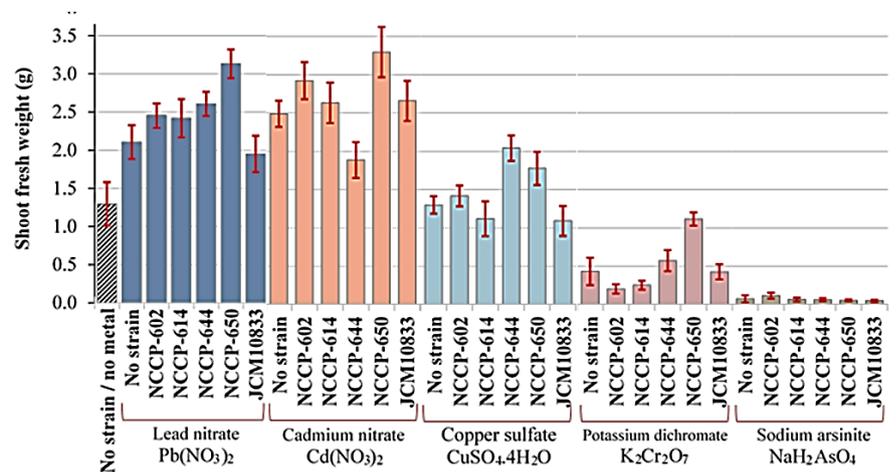


図4 同定された菌株のナタネ (*Brassica napus*) の促進効果。供試した重金属は 50ppm の濃度で与えた。