

国際共同研究事業 令和 5(2023)年度実施報告書

令和 6 年 4 月 26 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]

国立大学法人名古屋工業大学・大学院工学研究科

[職・氏名]

准教授・吉田 奈央子

[課題番号]

JPJSJRP 20191803

1. プログラム名 中国との国際共同研究プログラム(JRP with NSFC)

2. 研究課題名

(和文) 微生物による還元的脱ハロゲン化代謝による地下水浄化の電気化学的制御

(英文) The enhanced microbial dehalorespiration efficiency and metabolic regulation mechanism in the weak electrical energy involved bioremediation system in groundwater

3. 共同研究実施期間

令和 2 年 2 月 1 日 ～ 令和 6 年 12 月 31 日 (4 年 11 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Harbin Institute of Technology ・ Associate Professor ・ Zhiling Li

5. 当該年度実施状況

- ・当該年度実施計画書の「当該年度実施計画の概要」の内容と対応させつつ、当該年度の実施状況を簡潔に記載してください。再委託又は共同実施を行った場合は、それぞれの実施状況がわかるように記載してください。
- ・当該年度又は前年度(複数年契約を締結し繰越を行った場合)の各費目における増減が研究経費総額の 50% (この額が 300 万円を超えない場合は 300 万円)に相当する額を超えた場合は、その理由と費目の内訳を変更しても計画の遂行に支障がないと考えた理由を記載してください。

① C1～C2 化合物を炭素源とした塩素化エチレン脱塩素化コンソーシアの確立・機能微生物の分離

これまでに確立した電極を電子供与体として TCE をエチレンまで脱塩素化できる培養物より、電流利用微生物として *Desulfosporosinus* 属細菌を分離培養した。本年度は、この分離株について全ゲノム解析を行い、全長に対し 9 割程度のゲノムシーケンスを決定したが、全長決定には至らず、また転写・発現解析には至らなかった。本テーマに取り組んできた研究者が中国の国立研究機関に栄転したことより、今後は共同研究体として取り組んでいく。昨年度まで実施した C1 化合物を用いた脱塩素化培養物のうち、ギ酸から水素および酢酸を生産し *Dehalococcoides* 属細菌へ供する微生物として分離した *Desulfitobacterium* 属細菌について、*Dehalococcoides* 属細菌との共培養試験を繰り返し行った結果、水素存在下でのみ *Desulfitobacterium* 属細菌がギ酸または CO₂ を酢酸に異化し *Dehalococcoides* 属細菌に炭素源として供することが示された。

また、一昨年度に行った土壌の有機物含量ならびに水分含量が土壌の遺伝ポテンシャルまたは代謝ポテンシャルに比べて *Dehalococcoides* のオーグメンテーションに影響することを示した論文を出版した。本年度はさらに汚染サイト 25 か所より土壌性質が異なる深度の複数土壌における培養試験を実施した。現在、結果について解析中である。

② 固体腐植ヒューミンの生物電気化学特性の評価（再委託：名古屋大学）

あらゆる pH で不溶であり、物理化学的に安定な有機無機複合体である固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達能を担う化学構造の解明とともに、固体の細胞外電子伝達物質の人工合成への手がかりを得ることを目的として研究を進めた。ペンタクロロフェノール (PCP) の嫌気性脱塩素反応を行う嫌気性微生物群を細胞外電子伝達能の指標として用いて試験したところカイコ (*Bombyx mori*) の生産するシルクに細胞外電子伝達能力があることが見出されたことから、広く新鮮な天然物の細胞外電子伝達能力を調べるとともに、その化学構造の特徴との関係から、腐植ヒューミンの細胞外電子伝達能を担う化学構造への手がかりを得ることを目指した。

試験対象天然物として、卵白アルブミン、牛肉、牛乳、豚肉、大豆、卵黄、緑茶、コンブ、マイタケ、米（無洗米）、サツマイモ、グルコース、ラクトース、セルロース、デンプン、リグニン（東京化成）、キチン（富士フィルム和光純薬）、β グルカン（Jarrow Formulas, LA, USA）、血清アルブミン（富士フィルム和光純薬）、コラーゲン（タイプ I&III, Doctor's Best Inc, CA, USA）、セラチン（KeraGLO 水和セラチン, Doctor's Best Inc, CA, USA）、カザミノ酸（ライフテクノロジー・ジャパン、東京）、オリーブ油（富士フィルム和光純薬）、パーム油（ヤナムケイ工業、大阪）を用い、PCP 脱塩素活性による細胞外電子伝達能試験を行った。油試料以外は、凍結乾燥粉末を用いた。固体腐植ヒューミンをポジティブコントロールとした。構造解析として、元素分析、pH、電気伝導度、フーリエトランスフォーム赤外吸収スペクトル (FT-IR)、電子スピン共鳴スペクトル (ESR)、固相 ¹³C CP/MAS 核磁気共鳴スペクトル (NMR)、ラマンスペクトル (Raman)、X 線イオウ K 吸収端構造 (XANES)、サイクリックボルタンメトリ (CV)、電子受容・供与容量 (EDC/EAC) を測定し、細胞外電子伝達能と化学構造・電気化学特性の関係を調べた。

PCP 脱塩素活性を指標とした試験により、タンパク性天然物に広く細胞外電子伝達能力が分布することを見出した。供試凍結乾燥試料の水溶解度に関わらず、卵白アルブミン、牛肉、牛乳、豚肉、大豆、卵黄、血清アルブミンに活性がみられた。炭水化物や脂質には活性がみられなかった。構造解析の結果、

タンパク性天然物にみられるベータシート二次構造が細胞外電子伝達能に不可欠であることが示唆された。また、活性のあるタンパク性天然物には還元型イオウの含量が高かった。これまでタンパク質は微生物に対する栄養分として考えられてきたが、本研究によって細胞外電子伝達能があることが明らかにされた。また、この構造的特徴は、人工的に細胞外電子伝達物質を合成する際の重要な基礎的知見となる事が期待される。

③ 地下水環境における脱ハロゲン化呼吸細菌の生残機構の解明(名工大・吉田)

本年度は、新たに海水環境で用いることができる塩素化エチレンをエチレンまで脱塩素化細菌として *Dehalogenimonas* 属細菌 NIT-SMZ 株を分離した。また、シルク依存的に脱塩素化を生じる PCP 脱塩素化細菌ならびに嫌気性ベンゼン分解微生物の集積・分離に取り組んでいるが、集積培養物は維持されているものの、いまだ分離には至っていない。

・ 中国との協働体制

本年度は、12 月にハルビン工科大学においてプロジェクト報告会議を開催し、これまでにデータを取得してきた地下水や土壌および C1~C2 化合物を添加したマイクロビュウムの微生物群集データや中国・日本側で取得したデータを用いてネットワーク解析に関する意見交換を行った。このプロジェクト会議では、2024 年に中国で開催される脱ハロゲン化呼吸細菌の国際会議 (Dehalocon III-2024) のオーガナイザーを外部評価委員として迎え、この国際会議で本課題に関する成果報告を行うことが決定された。また、現在、低炭素なバイオオーグメンテーションに関する論文または総説を共同で執筆することに取り組んでいる。

7. 研究発表(当該年度において本共同研究の一環として本事業による支援を受けたことを明示して発表したものについて記載してください)

[雑誌論文] 計(3)件 うち査読付論文 計(3)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、論文標題等 ^{*2}
1	無	Lingyu Meng, Ryuya Tomita, Tomoki Yoshida, Naoko Yoshida (2023) Soil organic matter and nutrient availability affect the applicability of low-carbon energy source in Dehalococcoides-augmented soil, Journal of Hazardous Materials, 459, 132251 https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132251
2	無	Masaki Asai, Yuki Morita, Lingyu Meng, Hidetoshi Miyazaki, Naoko Yoshida (2023) Dehalococcoides mccartyi strain NIT01 grows more stably in vessels made of pure titanium rather than the stainless alloy SUS304, Environmental Microbiology Reports , 15, 557-567 https://doi.org/10.1111/1758-2229.13192
3	有	Tingting Hu, Mirai Yamaura, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama (2023) Wide distribution of extracellular electron transfer functionality in natural proteinaceous organic materials for microbial reductive dehalogenation, Journal of Bioscience and Bioengineering, 135, 238-249 https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.12.003

[学会発表]計(8)件 うち招待講演 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	発表者名、発表標題等 ^{*2}
1	無	Yohei Tsuji, Daisuke Komatsu, Naoko Yoshida (2023. 11. 28) Enrichment of dehalorespiring bacteria that can dechlorinated trichloroethene to ethene in groundwater mixed with seawater, 日本微生物生態学会（第36回浜松大会）アクトシティ浜松（ポスター）
2	無	YANO Atsuhiko, FUJII Yuta, YOSHIDA Naoko (2023.11.28) Characterization of Dehalococcoides mccartyi strain NIT-OBY that dechlorinate 1,3-Dichloropropene to completely non-toxic Propene. 2023年11月28日, 日本微生物生態学会（第36回浜松大会）アクトシティ浜松
3	無	Atsuhiko Yano ¹ , Yuta Fujii ² , Naoko Yoshida ¹ , (2024. 3. 1) Dehalococcoides mccartyi NIT-OBY株による1,3-ジクロロプロペンの無毒なプロペンへの脱塩素化, 令和5年度土木学会中部支部研究発表会
4	無	Yohei Tsuji ¹ , Naoko Yoshida ¹ , Daisuke Komatsu ² , 2024年3月1日[VII-04] 海水が混ざる環境下で塩素化エチレンを脱塩素化する微生物の分離, 令和5年度土木学会中部支部研究発表会
5	無	矢野敦大, 藤井雄太, 吉田奈央子(2024.3.7)デハロコイデス NIT-OBY 株による 1,3-ジクロロプロペンの脱塩素化、第58回日本水環境学会年会
6	無	片山新太 (2023.11.11) 土壌微生物活性に及ぼすヒューミンの役割、日本部食物質学会、2023年度第39回講演会（ISMOM共催記念特別講演）、創価大学、八王子（招待講演）
7	有	片山新太、Hu Tingting、原茂樹、山田良子、笠井拓哉、浅沼 章宗、渡辺雅尚、亀田恒徳 (2023.11.27-30) 各種タンパク質にみられる細胞外電子伝達能とその共通構造、日本微生物生態学会（第36回浜松大会）アクトシティ浜松
8	無	片山新太 (2024.1.15) 固相腐植ヒューミンの酸化還元シャトル機能に関与する元素に関する研究、2023年度名古屋大学シンクロトン光研究センターシンポジウム(2023), 名古屋大学、名古屋大学主催（ポスター）

[図 書] 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、著書名等 ^{*2}
1		

*1 相手国側参加者との共著(共同発表)がある場合は○と記入。

*2 当該発表等を同定するに十分な情報を記載すること。例えば学術論文の場合は、著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年(西暦)、最初と最後の頁、掲載論文の DOI、学会発表の場合は発表者名、発表標題、学会等名、発表年(西暦)、発表地(国名、国外開催の場合のみ)、図書の場合は著者名、著書名、出版社名、発行年(西暦)、総ページ数、ISBN、など(順番は入れ替わってもよい)。相手国側参加者との共著となる場合は、著者名が複数であっても省略せず、その氏名を記入し下線を付すこと。

*3 足りない場合は適宜行を追加すること。

8. 本事業による産業財産権の出願・取得状況(当該年度に出願又は取得したもの)

〔出 願〕 計(0)件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、出願年、国内・外国の別
1	

〔取 得〕 計(0)件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、取得年、国内・外国の別
2	

* 必要に応じて、欄を追加してください。