

国際共同研究事業 令和 2 (2020) 年度実施報告書

令和 3 年 4 月 2 8 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[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

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 (全採用期間)

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

4. 研究参加者 (代表者を含む)

(1) 日本側参加者 3 名

(2) 相手国側参加者 2 名

5. 主要な物品明細書 (一品又は一組若しくは一式の価格が 50 万円以上のものを購入した場合は記載)

物品名	仕様 型・性能等	数量	単価(円)	金額(円)	設置研究機関名	備考
なし						

※本事業の委託費と他の経費とを合算使用する際は、合算使用した旨を備考欄に記載した上で、金額は本事業の委託費で負担した額のみ記載してください。

※再委託先/共同実施先における支出である場合は、備考欄にその旨を記載してください。

7. 渡航実施状況

(1) 当該年度に相手国又は相手国以外の国を訪問した日本側参加者（委託費から支出した出張のみ記載。相手国以外の国における用務先には下線を付すこと。）

氏名	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)
なし	なし	なし
計 名 (延べ人数)		

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日」（旅行開始日～旅行終了日）

(2) 当該年度に受入れた相手国側参加者

氏名	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)
なし	なし	なし
計 名 (延べ人数)		

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日」（旅行開始日～旅行終了日）

8. 研究実施状況

※当該年度実施計画書の「5. 本年度実施計画の概要」の内容と対応させつつ、当該年度の研究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、それぞれの研究の実施状況がわかるように記載してください。

※年度途中で当初計画を変更した場合にはその内容及び理由も記載してください。特に、各費目の増減が研究経費の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、変更理由と費目の内訳を変更しても研究の遂行に支障がなかった理由を記載してください。

(1) 研究概要・目的

本研究は、塩素化エチレン等の有機塩素化合物に汚染された地下水を微生物反応による浄化するバイオレメディエーション技術の安全性を向上するための技術躍進を目指すとともに、この技術の学術的裏付けとなる微生物-土壌-化学物質間の代謝ネットワークを解明するものである。本年度は、下記①～⑤に示したサブテーマに取り組んだ。

(2) 本年度の実施内容

① *Dehalococcoides* 属細菌の塩素化エチレン脱塩素化の電気化学的制御および電子伝達機構の解明

脱塩素化呼吸細菌は共通して水素を還元的脱ハロゲン化反応の電子供与体として用いる。本研究では、この水素を地下水の循環貯留槽に設置した電極を-0.5V vs Ag/AgCl 程度に保ち、H⁺の還元により微量の水素または電流を発生させ、地下水中に供給し脱塩素化呼吸細菌による脱ハロゲン化反応を促すことを試みた。

【方法】実験装置の製作は、ハルビン工科大の研究指導を受け、アノード電解質は100mM フェロシアン化ナトリウム溶液とし、セパレータにはナフィオン膜を用いた。カソード槽は、無機塩培地を電解質とし、電極として黒鉛フェルト、脱塩素化細菌として *Dhc.* NIT01 株 (10⁷ cells/mL)、*Dhc.* に電子または水素を供する微生物源として水田土壌、炭素源として 5mM 酢酸ナトリウム、塩素化合物として 1mM トリクロロエチレン(TCE)を添加した。

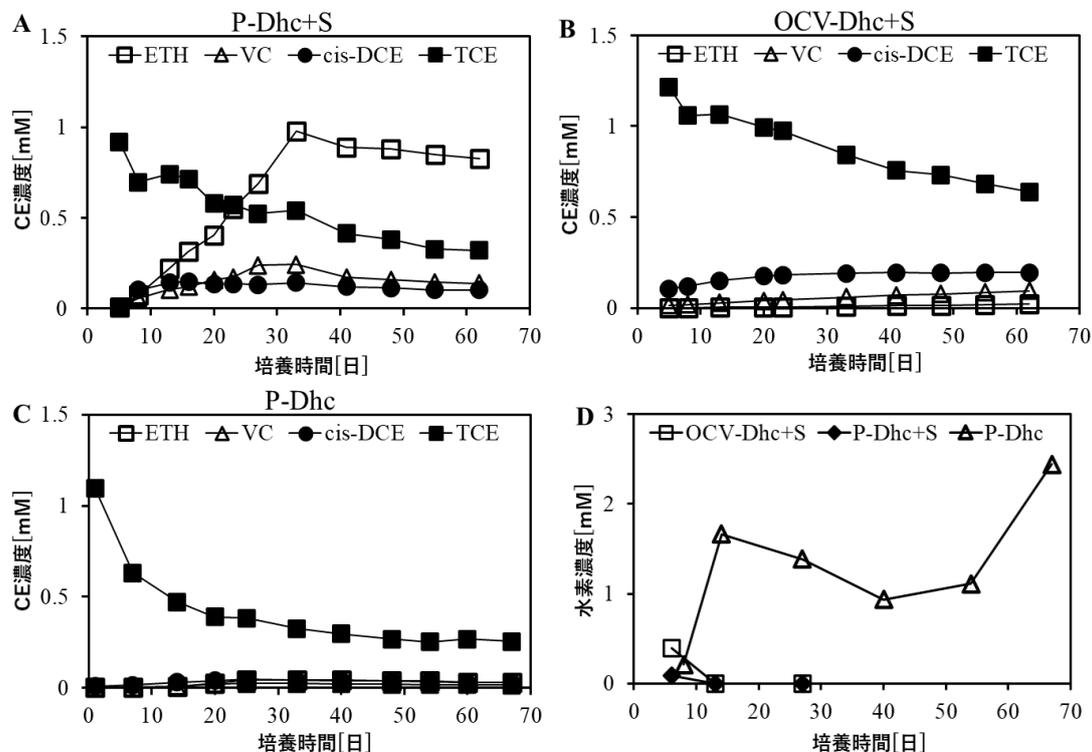


図1 各条件における TCE 及び脱塩生成物濃度(A、B、C)、水素濃度(D)経時変化

【結果】図1に示すように、約70日間の培養の結果、開回路(OCV-Dhc+S)ではほとんど脱塩素化が進まず、また *Dhc* のみ(P-Dhc)に-0.5V 与えた条件では脱塩素化がほとんど進行しないのに対し、*Dhc.*

NIT01 に水田土壌を加え-0.5V を与えた条件 (P-Dhc+S)でのみ TCE がエチレン(ETH)まで脱塩素化された。これより、水田土壌に棲息する微生物が *Dhc.*の電気化学的な脱塩に寄与することが確認できた。一方、分極による生成した低濃度の水素だけの利用による効率的な脱塩が起こらなかったことがわかった(図 4D)。つまり、*Dhc.*は電極からの電子をエネルギー源とした脱塩素化反応が起こるため、他の微生物との共生関係を築く必要があると考えられる。これ共生関係は、主に微生物間の細胞外電子伝達 (EET) を通じて、他の微生物を経由し電極からの電子を *Dhc.*に渡されると考えた。なお、本研究では、微生物菌叢解析による *Desulfosporosinus meridiei* の類縁種が *Dhc.*の電気化学的な脱塩に伴い、優占することが明らかにした。以上の結果により、自然界に棲息する微生物の有効活用による *Dhc.*の電気化学的な脱塩に促進できることが示唆され、本来電極からの電子をエネルギー源として利用できない *Dhc.*の利用による電気化学的な脱塩の可能性を明確した。

②C1～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

塩素化呼吸細菌に必要な水素は、注入される栄養剤によって活性化した地下水の従属栄養生物から供されるが、使用される栄養剤は C3 以上の高炭素のものが多く病原菌増加などのリスクが懸念される。本研究では、C1～C2 化合物を炭素源として塩素化エチレン汚染地下水に添加した際の脱塩素化活性ならびに、菌叢解析を用いた病原リスクの評価を試みた。

【方法】無機塩培地成分、ビタミンなどを加えた汚染地下水に 10mM 炭素源(メタノール, ギ酸塩, 酢酸塩, シュウ酸塩, エタノール, 乳酸塩, クエン酸塩, 安息香酸塩)をそれぞれ添加し、脱塩素化細菌に *Dhc.* NIT01 株 (10⁶ cells/mL), 塩素化合物として 1mM の TCE を添加した。これを 28℃で静置培養した。

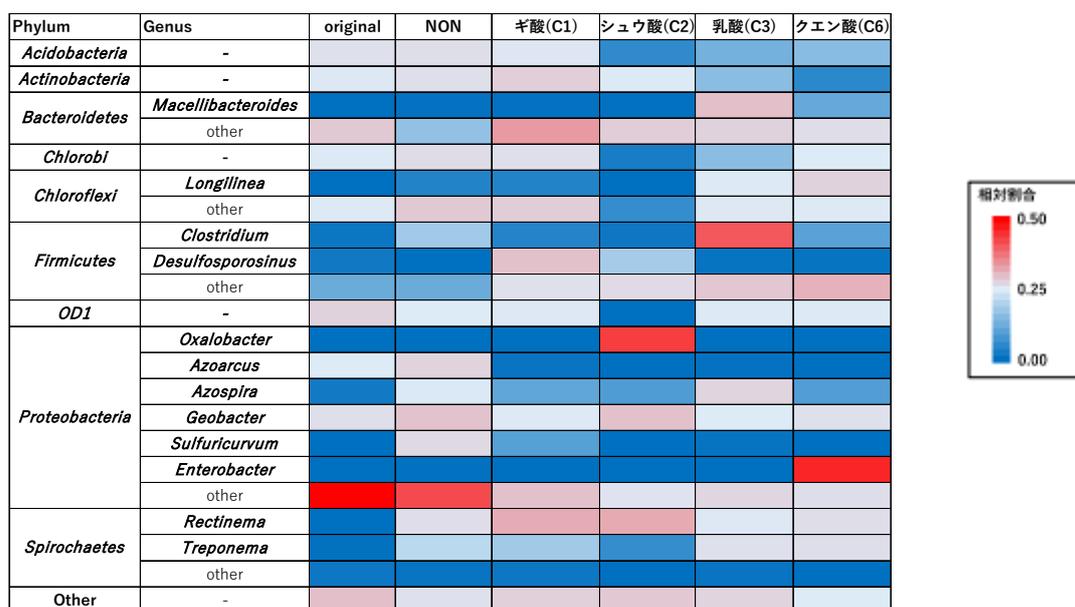


図 2 各条件における 16SrRNA アンプリコン解析結果

【結果】ギ酸塩, シュウ酸, 乳酸, クエン酸を添加した培養物において有効な脱塩素化が確認された。中でもギ酸, シュウ酸では、それぞれ 78 日, 40 日で TCE が全て無害なエチレンまで分解され、高い脱塩素化活性を確認した。有効な脱塩素化が見られた以上の 4 培養物と炭素源非添加系(NON), 元々の地下水に対して 16SrRNA アンプリコン解析を行ったところ、図 2 に示すように、炭素源を添加した培養物で微生物菌叢が大きく変化し、ギ酸では *Bacteroidetes* 門, シュウ酸では *Oxalobacter* 属, 乳酸では *Clostridium* 属, クエン酸では *Enterobacter* 属がそれぞれ顕著に増加した。中でも、乳酸培養物で確認された *C. butyricum*(相対割合 21%), クエン酸培養物で確認された *E. kobei*, *E. ludwigii*(計 47%)

が病原リスク指標(TRBA466-Classification of Prokaryotes (Bacteria and Archaea) into Risk Groups) の Risk group2 に該当し他の培養物よりも病原リスクが増加した。以上の結果より、C1, C2 化合物のギ酸, シュウ酸は病原リスクを抑えて高い脱塩素化活性を示す炭素源であることが示唆された。

③ *Dehalococcoides mccartyi* NIT01 株の増殖・死滅シミュレーション

【方法】増殖収率 Y は、塩素化エチレン (CE) 脱塩素化により生じた塩化物イオン濃度あたりの細胞密度変化を線形近似し決定した。CE 脱塩素化速度にかかわるミカエリス・メンテン式は自己阻害を式中で考慮し、パラメータは培養した NIT01 株の休止菌体を用いて異なる CE 濃度における脱塩素化速度を測定し、最小二乗法によって同式に近似し決定した。決定した定数を用いて、培養開始時の細胞密度および添加 TCE 濃度を初期条件として与えた際の CE 分解ならびに細胞増殖の予測計算を行い、計算値と実験値を比較検証した。

【結果】Dhc の培養時における細胞増加および脱塩素化で産生した塩化物イオン増加から増殖収率を 3.6×10^7 cells/ μmol と決定した (図 3 A)。この値は Dhc の既報の増殖収率: 10^7 - 10^8 cells/ μmol の範囲内であった。続いて、決定したミカエリス・メンテン式のパラメータを用いて計算した CE 濃度の経時予測結果から、各 CE 濃度の実験値と計算値の動態には大幅なズレが確認された (図 3 B)。その原因としては、本実験に用いたミカエリス・メンテン式が各 CE による自己阻害を考慮していたことに対して、実際の培養系においては競合的な阻害が発生していたことが考えられる。同様の理由から、塩化物イオン濃度の計算予測も実験値と比べて遅れた動態を示したことが考えられる (図 3 C)。細胞密度は、経過時間: 200 時間未満の培養初期においては計算値と実験値がおおむね一致した。一方で、経過時間: 200 h 以降において、計算値は実験値に比べ低い値を示していた。これは、上述した競合的阻害の影響に加えて、細胞密度の計算値を算出する際に用いた式中の死滅係数が、実測値に比べて大きく見積もられていたことによると考えられる。

以上の結果から、自己阻害のみを考慮したミカエリス・メンテン式を用いて NIT01 株の増殖並びに死滅を正確に表現することは困難であると示唆された。

さらに、今後、電極を用いた脱塩素化の動力的解析を行う目的から、下水微生物燃料電池においてミカエリスメンテン式を用いた電流生産が行えるか試み、バイオフィームにおいては基質供給が律速となるため、流れ等により基質拡散律速を解消することが重要であることが示され、本成果は国際投稿論文

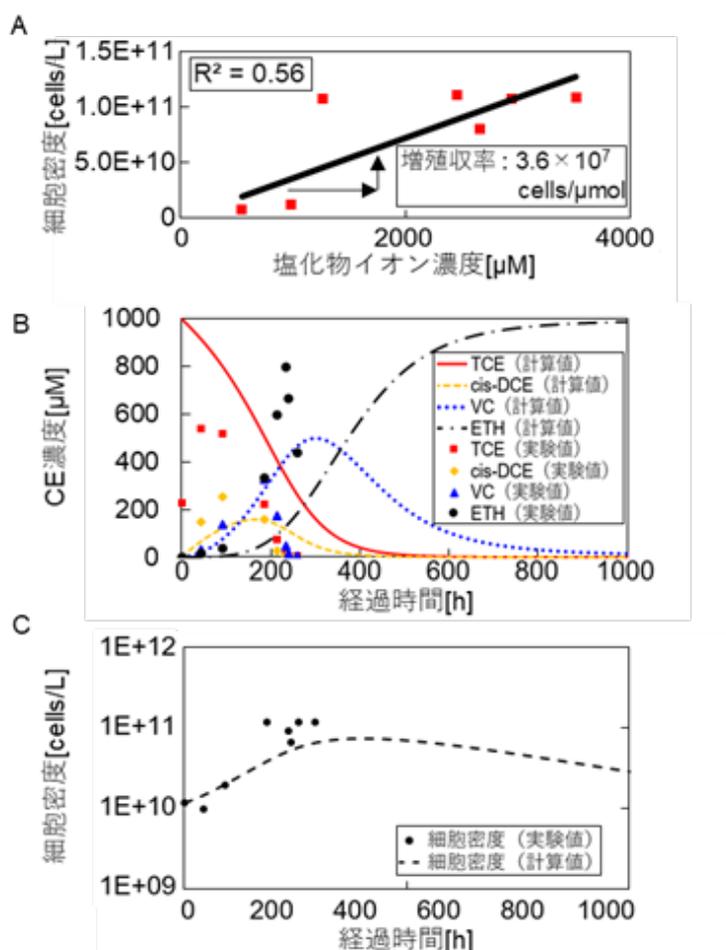


図 3 増殖収率 (A) の算出、CE 濃度 (B)・塩化物イオン濃度および細胞増殖 (C) の計算予測結果

として発表した。

④ *Dehalococcoides mccartyi* NIT01 株において塩素化エチレンの脱塩素化を担う RDH の特定

【方法】 塩素化エチレンの 1 種である TCE で培養した NIT01 株の細胞を破壊し細胞膜を分離後、細胞膜から界面活性剤 DDM を用いて膜画分タンパク質を抽出した。その後、抽出した膜画分タンパク質を 1.0MNaCl 濃度勾配で HPLC 分離することで複数の RdhA を分離した。分離後、SDS-PAGE で更に分子量分離し、検出されたバンドのいくつかを LC-MS/MS 分析することでバンドに含まれている膜画分タンパク質を特定した。また、RdhA の存在は電子供与体としてメチルビオロゲン、電子受容体として *cis*-DCE を用いての脱塩素化活測定により確認した。

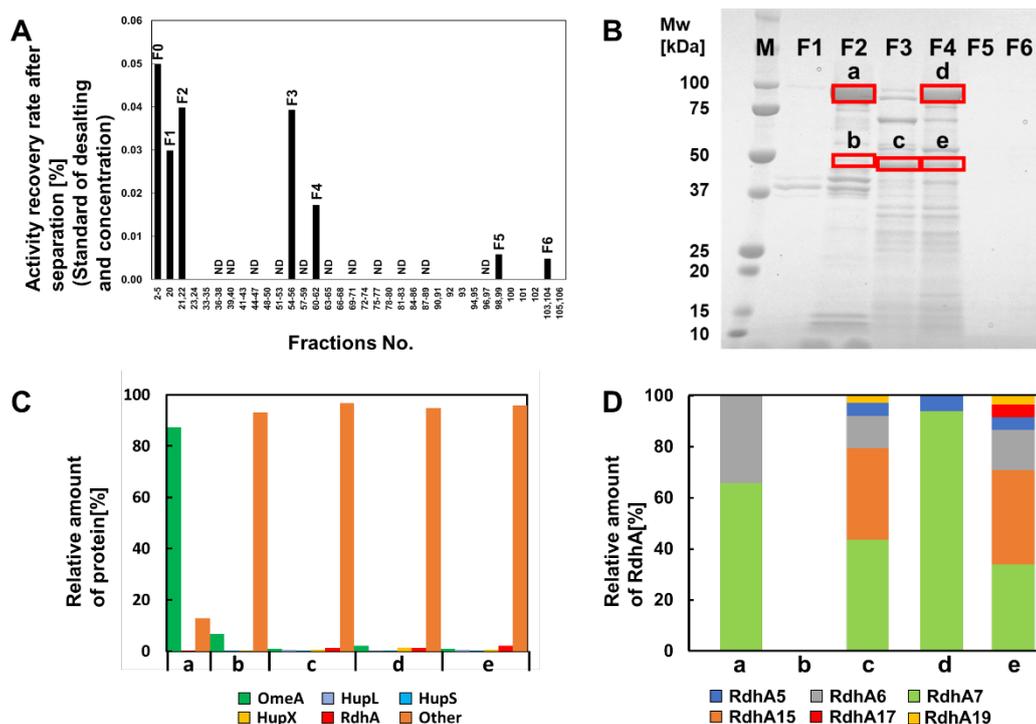
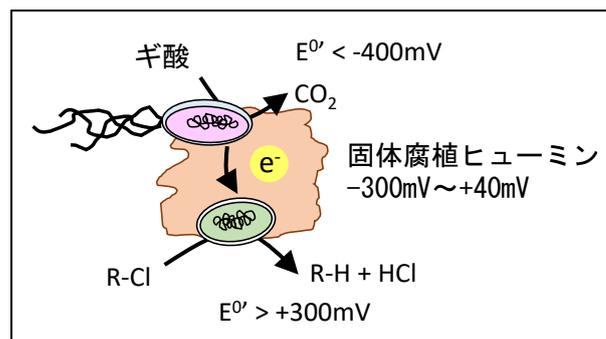


図 4 分離結果(A: HPLC 分離結果, B: SDS-PAGE 結果, C: バンド中のタンパク質相対量, D: バンド中の RdhA 相対量)

TCE 脱塩素化条件で培養した NIT01 株の膜画分タンパク質抽出液を HPLC 分離したところ、塩化物イオン濃度 120, 140, 440, 500, 800, 840 mM で溶出されたフラクション F1~F6 で脱塩素化活性のあるピークが存在した(図 4A)。脱塩素化活性のある分離液を SDS-PAGE で分子量分離し (図 4B), 検出された a~e の 5 つのバンドを LC-MS/MS 分析した結果、脱塩素化酵素複合体を形成する 7 種の膜画分タンパク質のうち 5 種が検出された(図 4C)。また、検出された膜画分タンパク質のうち、RdhA に着目すると RdhA5, 6, 7, 15, 17, 19 の 6 種類が検出され(図 4D), 機能が特定されている VcrA と高い類似性を示す RdhA7 が全体的に多く検出された。NIT01 株による塩素化エチレンの脱塩素化には複数の RdhA が発現しており、NIT01 株が得に高濃度の脱塩素化酵素複合体を形成すると示唆された。

⑤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)

サイクリックボルタンメトリ測定を用いて固体腐植ヒューミンの酸化還元電位の評価を試みた。硫酸ナトリウムを電解質として含むジメチルスルホキシド溶液および同水溶液を用いて測定したところ、いずれの条件でも明瞭な酸化還元ペアを示す明瞭なピークは得られなかった。しかし、固体腐植ヒューミン添加の無いブランクコントロールと比べると、サイクリックボルタモグラムの描く面積が広がる傾向が多く、固体腐植ヒューミンが有意な電気容量を持つことが示された。



これは、多様な酸化還元官能基が存在することによって、電気容量は有するが特異的なピークが現れないためではないかと考えられる。このことは、調製方法の異なる固体腐植ヒューミンの比較によって、その細胞外電子伝達能が酸化還元官能基と考えられるキノン骨格によるものだけでなく、窒素を含む官能基（おそらくはペプチドグリカン）と関連する構造の関与が示唆されることと一致していた。また、サイクリックボルタモグラムにおけるわずかな増加を手がかりとした酸化還元ペアを固体腐植ヒューミンの等電点として過去の研究結果を整理すると、平均値は約-100mV（標準水素電極基準、以下同様）で、標準誤差範囲は-300mV~+40mVであった。このことから、脱塩素反応の電子供与体として用いられる水素やギ酸の標準酸化還元電位 $E^0 < -400\text{mV}$ と各種脱塩素反応の標準酸化還元電位 $E^0 > +300\text{mV}$ の間で、固体腐植ヒューミンが細胞外電子伝達として機能することは熱力学的に妥当であることが明らかになった。

また、固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達を担う官能基とその機構の解明を目的として、固体腐植ヒューミンの人工合成を試みた。腐植物質の生成過程の一つであるリグニン-タンパク重縮合反応を、牛乳または卵白とコニフェニルアルコールを出発物質として過酸化水素とパーオキシダーゼを作用させて起こし、その生成物の細胞外電子伝達能をヒューミン依存性ペンタクロロフェノール脱塩素化コンソーシアの脱塩素化活性を指標として測定したが、細胞外電子伝達能は得られなかった。過酸化重縮合では、細胞外電子伝達官能基が失われるものと思われる。そこで、リグニン-タンパク重縮合反応とは異なる固体腐植ヒューミンの生成過程として、水溶性腐植酸と土壌・底質に存在する還元型鉄イオンの反応および各種有機物の分解反応をとりあげ、細胞外電子伝達物質を持つ固体腐植様物質の人工合成方法の検討を進めている。

(3) 中国との協働体制

本年度は COVID-19 の感染拡大状況下において対面での打ち合わせが叶わず、オンラインで互いの研究状況を報告する VooV ミーティングを実施した。日本側からコンソーシア集積、機能微生物または酵素の分離・精製、フミンの添加高価について報告し、中国からは電気化学的培養システムでの培養状況ならびに現場適用について報告された。COVID-19 感染状況が落ち着き次第、互いの持つ技術を互いに習得すべく、学生や研究員を滞在させて技術交流を図る方針が決定された。

9. 研究発表（当該年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（ 2 ）件 うち査読付論文 計（ 2 ）件

通番	共著の有無*1	論文名、著者名等*2
1	無	Michaelis–Menten equation considering flow velocity reveals how microbial fuel cell fluid design affects electricity recovery from sewage wastewater, Ken Fujii, Naoko Yoshida, and Kohei Miyazaki, 2021, Bioelectrochemistry, In press.
2	無	Humin: No longer inactive natural organic matter, Pham Minh Duyen, Kasai Takuya, Yamamura Mirai, Katayama Arata (2021) Chemosphere, 269, 128697.
3		

〔学会発表〕 計（ 6 ）件 うち招待講演 計（ 1 ）件

通番	共著の有無*1	標題、発表者名等*2
1	無	The Electrode Gives Electron for The Dechlorination of Trichloroethene-to-Ethene by Dehalococcoides mccartyi NIT01, Lingyu Meng, Naoko Yoshida, The Water and Environment Technology Conference online 2020 (JWET), November 2020.
2	無	Effect of Organic Acids on The Dechlorination of Trichloroethene in Microcosms Augmented with Dehalococcoides mccartyi NIT01, Ryuya Tomita, Lingyu MENG, Naoko Yoshida, The Water and Environment Technology Conference online 2020 (JWET), November 2020.
3	無	低炭素数炭素源を用いたDehalococcoides mccartyi NIT01株の脱塩素化及び病原リスクへの影響評価, 富田竜矢, 孟令宇, 吉田奈央子, 令和2年度土木学会中部支部研究発表会, 2020年3月
4	無	低炭素数炭素源を用いた Dehalococcoides mccartyi NIT01 株の脱塩素化及び病原リスクへの影響評価, 富田竜矢, 孟令宇, 吉田奈央子, 第55回日本水環境学会年会 The 55th Annual Conference of JSWE, 2020年3月
5	無	Dehalococcoides属細菌の塩素化エチレン脱塩素化および細胞増殖の予測計算, 森田悠揮, 吉田奈央子, 令和2年度土木学会全国大会, 2020年9月
6	無	Pham Minh Duyen, Kasai Takuya, Katayama Arata (2021.3.18-21) How do solid-phase humic substances (humin) serve as extracellular electron mediator in multiple anaerobic microbial reactions? 日本農芸化学会2021年度（令和3年度）[仙台] 大会（仙台+オンラインのハイブリッド開催）、2C05-062021年3月18日～21日（音声付きパワーポイントによる発表）

〔図書〕 計（ 0 ）件

通番	共著の有無*1	題名、著者名等*2
1		なし

*1 相手国研究代表者との共著（共同発表）がある場合は○、相手国研究代表者との共著であり謝辞等に事業名を明記している場合は◎と記入。

*2 当該発表等を同定するのに十分な情報を記載すること。例えば学術論文の場合は、論文名、著者名、掲載誌名、巻号や頁等、発表年（西暦）、学会発表の場合は標題、発表者名、学会等名、発表年（西暦）、著書の場合はその書誌情報、など（順番は入れ替わってもよい）。

*3 足りない場合は適宜行を追加すること。