

国際共同研究事業 令和3(2021)年度実施報告書

令和 4 年 4 月 20 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) 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－土壤－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①～④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

昨年度の研究で、*Dehalococcoides mccartyi* NIT01 (以下 NIT01)を用いた電気化学的な脱塩素化反応で、電極と NIT01 間の電子伝達を *Desulfosporosinus meridiei* の類縁種が担う可能性を示した。本年度は、電極と NIT01 の細胞外電子伝達機構の解明に向けて、ターゲット微生物の単離及び電気化学解析を試みた。

昨年度と同様の電気化学セルを用い、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 (10^7 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。反応終了後に 16S rRNA アンプリコン解析による菌叢解析を行い、再現性を確認した上アガーシェイク培養法によるターゲット微生物の単離を試みた。また、電気化学解析(サイクリックボルタンメトリー、以下 CV)による電極と NIT01 間の電子伝達に寄与する可能性がある電子伝達メディエーターを推測し、その分離を行った。

菌叢解析の結果によると、昨年度の *Desulfosporosinus meridiei* の類縁種以外に、*Desulfitobacterium*

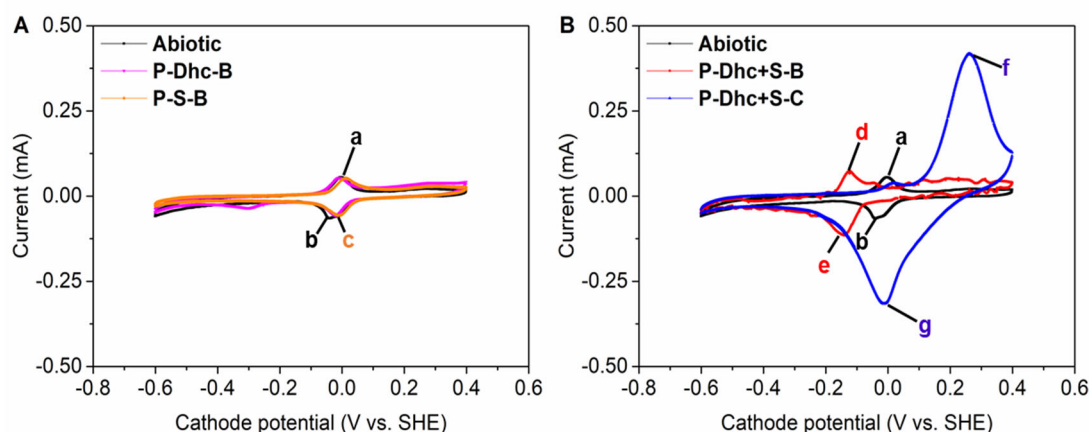


図 1 各条件における電位－電流曲線

(P : 分極 ; Dhc : *Dehalococcoides mccartyi* NIT01 ; S : 土壌 ; B : バイオフィーム ; C : カソード培養

hafniense の類縁種も電極と NIT01 間の電子伝達を担う可能性を示した。*Desulfosporosinus meridiei* の類縁種の単離がうまくできず、カルチャーコレクションの DSMZ から取り寄せ復元培養を行っている。一方で *Desulfitobacterium hafniense* Y51 との類似度が 99%以上を示す菌種を分離できた。一方で、電気化学解析においてカソードバイオフィームを用いた CV 実験では、P-Dhc と P-S において対照系である非生物のカソード (Abiotic) と同様な酸化還元ピークが観察された (図 1A) ことに対し、P-Dhc+S において中間電位が -130 mV vs SHE の酸化還元ピークが観察された (図 1B) 。また、P-Dhc+S においてカソ

ード培養液の色が黄色くなり、電気化学的な脱塩素化反応に伴い何か分泌された可能性が示唆されたため、CV 測定を行った。その結果、カソード培養液中の酸化還元特性を示す物質の酸化還元電位は、+138 mV vs SHE であり、すでに知られている酸化還元ペア中のユビキノンの酸化還元電位 (+110 mV vs SHE) に近いことがわかった。何れの酸化還元物質の酸化還元電位が塩素化エチレンの脱塩素化反応が起こる電位より低いことから (図 3)、脱塩素化反応に寄与する可能性が示唆された。さらに、カソード培養液に含まれる酸化還元物質はエタノールによる抽出ができないことがわかり、ターゲットの酸化還元物質はタンパク質の可能性があると考えた。今後、本研究室が所有するタンパク質精製分離装置 (AKTA) を用い、酸化還元特性を示すタンパク質の分離・同定を行うと予定している。

② 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

昨年度の研究で、C1 化合物であるギ酸塩を炭素源に用いた NIT01 のバイオオーグメンテーションで、高い脱塩素化活性と同時に微生物の増殖抑制することが示唆された。本年度は、ギ酸培養物の機能微生物の特定、分離を試みた。

電子供与体として 10 mM ギ酸塩、塩素化合物として 1mM TCE を添加した無機塩培地に昨年度のギ酸培養物 1 mL を接種した (継代 2 代目)。反応終了後、同様の培地に培養物を 1 mL 接種することを繰り返し (継代 3～5 代目)、継代 4 代目に 16S rRNA アンプリコン解析による菌叢解析を行った。また、ギ酸を代謝し NIT01 に水素を供与する微生物を単離する目的から、アガーシェイク培養を行った。アガーシェイク培養には電子供与体として 10 mM ギ酸塩、電子受容体として 1 mM TCE、5 mM チオ硫酸ナトリウムを用いた。

菌叢解析の結果によると、*Dehalococcoides (Dhc.)* が最も多くの割合 (33%) を占め、Dhc. の他に *Methanospaerula* (23%)、*Rectinema* (13%)、*Desulfitobacterium* (5.6%) が優占した。また、アガーシェイク培養の結果、*Rectinema cohabitans* HM 株との類似度が 99% 以上を示す菌種が分離できた。同定された *Desulfitobacterium* sp. と分離した菌種は、ギ酸から水素を生成する可能性がある。今後、分離した *Rectinema* 属細菌および培養機関から取り寄せた *Desulfitobacterium* 属細菌と NIT01 との共培養を行い、脱塩素化における相互作用の解明を予定している。

③ 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、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、ペンタクロロフェノールの嫌気性脱塩素反応を行う嫌気性微生物群で細胞外電子伝達物質として働く固体腐植ヒューミンの化学的・電気化学的特性の評価を行った。

これまでに、固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達能に関与する化学構造として、キノン構造とペプチドグリカン構造が示されている。ペプチドグリカン構造の関与は、キノン構造の無い固体腐植ヒューミンも細胞外電子伝達能を持つことから、その能力の大小と相関の高い官能基として示唆されたものである。しかし、ペプチドグリカン構造自体は酸化還元の可能な構造を含まないことから、更なる構造解析が必要となっていた。そこで、固体腐植ヒューミンの非破壊検査が可能で、各種元素の酸化還元状態の変化を解析できる X 線吸収分光法 (XAS) および X 線光電子分光法 (XPS) を用いて、固体腐植ヒューミンを分析した。X 線吸収分光法、X 線光電子分光法ともに、あいちシンクロトロン光センターを利用して測定した。

ワイドスキャン XPS スペクトルから、固体腐植ヒューミンの含有元素としてケイ素、イオウ、炭素、窒素、酸素、フッ素が検出された。過去の化学分析から、無機成分として鉄が含まれることがわかっている。そこで電気化学的に異なる酸化還元状態の固体腐植ヒューミンを調製し、これらの元素の酸化還元状態の変化を XAS (特に、X 線吸収端近傍構造に注目して) 調べたところ、イオウが固体腐植ヒューミンの酸化還元に伴って大きな酸化還元状態の変化を示したことから、詳細に解析を行った。畑水分土壌、水田土壌、底質から得られた固体腐植ヒューミンに含まれるイオウは、-2～+6 の広い範囲の酸化還元状態にあり、その由来の酸化還元状態を反映していた。この内、酸化還元により変化するイオウは固体腐植ヒューミンの有機画分に含まれ、酸化数が -2～+5 の範囲で酸化還元し、且つ含有全イオウの 9～19% を占めていた。このイオウの持つ酸化還元容量を求めたところ、 $1.2 \sim 17.1 \times 10^{-5}$ 当量/g-ヒューミンとなった。一方、

還元型の固体腐植ヒューミンを唯一の電子供与体とする条件で、ペンタクロロフェノール脱塩素微生物群による脱塩素化反応を調べたところ、 $1.0 \sim 1.4 \times 10^{-5}$ 当量/g-ヒューミンの細胞外電子の供給が起きたことがわかった。このことから、固体腐植ヒューミンの有機イオウは、脱塩素微生物群に十分な細胞外電子供与を行える電気容量を有すること、即ち、イオウが細胞外電子伝達に関与する酸化還元活性を持つことが明らかとなった。なお、ケイ素と鉄には酸化還元変化がみられなかった。炭素と酸素はカルボニルの生成消失を示唆する変化がみられ、キノン骨格の酸化還元と考えられた。窒素は変化が不明瞭であった。

今後、更に固体腐植ヒューミンの構造解析を進めるとともに、固体の細胞外電子伝達物質の人工合成の検討を進める予定である。

(3) 中国との協働体制

昨年に引き続き COVID-19 感染拡大下であったため、互いに学生や研究員が行き来することはできず、オンライン会議や共同セミナーによる意見交換を通じ互いの研究に貢献した。また、本年度は名工大-ハルビン工科大間で本プロジェクトの成果を社会実装に展開できるよう日中の民間企業に声掛けを行い成果の紹介や中国における浄化事業につなげられないか意見交換を行った。今後、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し技術交流を図るとともに、社会実装につなげられるような体制の拡大を図る。

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(6)件 うち査読付論文 計(6)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、論文標題等 ^{*2}
1	○	Lingyu Meng, <u>Naoko Yoshida</u> , and <u>Zhiling Li</u> , Soil microorganisms facilitated the electrode-driven trichloroethene dechlorination to ethene by <i>Dehalococcoides</i> species in a bioelectrochemical system, Environment Research, 209 (2022),112801.
2	無	Masaki Asai, Naoko Yoshida, Toshiya Kusakabe, Mohamed Ismaeil, Takumi Nishiuchi, and Arata Katayama, <i>Dehalococcoides mccartyi</i> NIT01, a novel isolate, dechlorinates high concentrations of chloroethenes by expressing at least six different reductive dehalogenases, Environmental Research, 207 (2022), 112150.
3	無	Li Xie, Naoko Yoshida, Shun'ichi Ishii, Lingyu Meng, Isolation and Polyphasic Characterization of <i>Desulfuromonas versatilis</i> sp. Nov., an Electrogenic Bacteria Capable of Versatile Metabolism Isolated from a Graphene Oxide-Reducing Enrichment Culture, Microorganisms (2022), 9 (9) 1953.
4	無	Mari Sugioka, Naoko Yoshida, Taiki Yamane, Yuriko Kakihana, Mitsuru Higa, Takahiro Matsumura, Mitsuhiro Sakoda, Kazuki Iida Long-term evaluation of an air-cathode microbial fuel cell with an anion exchange membrane in a 226L wastewater treatment reactorEnvironmental Research (2022) 205: 112416
5	無	R Itoshiro, N Yoshida, T Yagi, Y Kakihana, M Higa Effect of Ion Selectivity on Current Production in Sewage Microbial Fuel Cell Separators. Membranes (2021) 12 (2), 183
6	無	Duyen Minh Pham, Hiroshi Oji, Shinya Yagi, Satoshi Ogawa, Arata Katayama (2022) Sulfur in humin as a redox-active element for extracellular electron transfer, Geoderma, 408, 115580.

[学会発表]計(10)件 うち招待講演 計(3)件

通番	共著の有無 ^{*1}	発表者名、発表標題等 ^{*2}
1	無	Meng, L.,Yoshida, N., Co-metabolism of Desulfosporosinus with <i>Dehalococcoides</i> achieved full dechlorination in a bioelectrochemical system. JSME2021, Japan, November 2021.
2	無	Meng, L.,Yoshida, N., Exploring the microorganisms for achieving the bioelectrochemical dechlorination of <i>Dehalococcoides</i> via extracellular electron transfer. DehaloconIII 2021 online, Italy, September 2021.
3	無	Meng, L.,Yoshida, N., Electro-active soil microorganisms mediated the electron transfer for the dechlorination of trichloroethene by pure <i>Dehalococcoides</i> culture. 5th Asia-Pacific International Society of Microbial Electrochemistry and Technology Conference (5th AP-ISMET), online, China, July 2021.
4	無	Meng L., Xie, L., Yoshida, N., “Carbon physiochemistry differentiates electrogenic metabolism of <i>Geobacterbremensis</i> either chemotaxis or biofilm formation”, Poster presentation. Materials Research Meeting 2021, The Materials Research Society of Japan (MRS-Japan), December, Yokohama.
5	無	Xie, L., Yoshida, N., Meng, L., “Isolation and polyphasic characterization of ‘ <i>Desulfuromonas versatilis</i> ’ sp. nov., an electrogenic bacteria capable of versatile metabolism isolated from a graphene oxide reducing enrichment culture”, Poster presentation. Materials Research Meeting 2021, The Materials Research Society of Japan (MRS-Japan), December, Yokohama.
6	無	Tomita R, Meng, L.,Yoshida, N., Effect of e ⁻ donors on the Chloroethene Dechlorination and Pathogenic Risk in Groundwater Augmented with <i>Dehalococcoides</i> . DehaloconIII 2021 online, Italy, September 2021.

7	無	Naoko Yoshida, Up-scaling of microbial fuel cell toward the practical application in wastewater treatment, invited, International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021, Organizing committee of ICMaSS2021, November, Nagoya University
8	無	Naoko Yoshida Up-scaling of microbial fuel cell toward the practical application in wastewater treatment, invited, Materials Research Meeting 2021, The Materials Research Society of Japan (MRS-Japan), December, Yokohama.
9	無	Duyen Minh Pham, Hiroshi Oji, Shinya Yagi, Satoshi Ogawa, Arata Katayama (2021.11.4-6) Unveiling redox-active structure in humin by synchrotron radiation-based X-ray absorption near edge structure, International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021 (ICMaSS2021), Online meeting, (Nagoya University, Nagoya), 4-6, November 2021 (Oral)
10	無	Arata Katayama, Takuya Kasai, Naoko Yoshida (2021.11.08-11) Strategy of anaerobic bioremediation: design of artificial microbial community and bioelectrochemical system, the 41 st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin 2021), Tianjin, Hybrid (on site + on line). 08-11 November 2021 (Invited (keynote speaker) Oral, Online).

〔図 書〕 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、著書名等 ^{*2}
1		なし

*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	なし

〔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
1	なし

* 必要に応じて、欄を追加してください。