

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15431

研究課題名(和文)環境微生物の未知細胞外電子伝達系を介した固体腐植物質還元メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of reducing mechanisms of solid-phase humic substances by unknown extracellular electron transfer pathways of bacteria.

研究代表者

笠井 拓哉 (Kasai, Takuya)

名古屋大学・未来材料・システム研究所・助教

研究者番号：00833831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、固体腐植ヒューミン(ヒューミン)の電子伝達機構の解析を行うとともに、ヒューミン還元に関連する可能性がある細菌を明らかにした。具体的には、(i)モデル電気活性微生物である *Shewanella oneidensis* MR-1株と微生物電気化学システムを用いたヒューミン還元機構の解析、(ii)ヒューミン還元微生物の集積および次世代シーケンサーを用いたヒューミン還元微生物の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒューミンは、土壌や底泥に普遍的に存在する有機無機複合物であり、電子伝達物質として様々な微生物反応を促進することが報告されている。環境中では、ヒューミンを介した微生物間共生が予想されるが、ヒューミン還元菌に関する知見は全くない。また、ヒューミンの利用には既知の細胞外電子伝達系を持たない多様な微生物が関与することが示唆されているため、微生物電気化学システム(BES)への応用が期待されるが、その電子伝達機構も不明である。これらの課題を明らかにするためヒューミン還元機構に着目して研究を実施した。本成果は、環境微生物生態の一角の解明および、多様な微生物を利用できるBESの構築が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated mechanisms of reduction of solid phase humic substances by microorganisms and revealed microorganisms related in humin reduction. Specifically, we have carried out (i) examination of mechanism of humin reduction using *Shewanella oneidensis* MR-1 as a model electrochemically active bacterium and (ii) identification of humin reducing bacteria using a next generation sequencer.

研究分野：応用微生物学

キーワード：固体腐植物質 微生物電気化学 細胞外電子伝達

## 1. 研究開始当初の背景

腐植物質とは、動植物の死骸やフンなどが生物学的かつ化学的に分解された残渣である。腐植物質は、異なる pH への溶解性により 3 種類に分類される。これまでの研究から、腐植物質の中で、酸もしくはアルカリに可溶な画分(フミン酸とフルボ酸)は水溶性の電子伝達物質として機能することが知られている一方で、酸とアルカリの両方に不溶な画分の固体腐植ヒューミン(以下ヒューミン)は電子伝達物質として機能しないと考えられてきた。しかし、2012 年に Zhang and Katayama は、ヒューミンが固体電子伝達物質として機能し、ヒューミンから伝達された電子を利用する微生物(ヒューミン酸化微生物)の異化代謝系を活性化することを報告した。この報告以降、これまでに、ヒューミンが脱窒反応やペンタクロロフェノールの脱塩素反応、鉄還元反応などの様々な生物学的還元反応を促進することが示されてきた(Zhang and Katayama, *Environ Sci Technol.*, 46(12), 6575-6583, 2012)。さらに、ヒューミン酸化微生物には、*Dehalobacter* 属細菌や *Pseudomonas* 属細菌、*Shewanella* 属細菌、*Geobacter* 属細菌、*Sporomusa* 属細菌などが関与することがすでに明らかになっている(Pham et al., *Chemosphere*, 269: 128697, 2021)。近年では、ヒューミンの物質的特性および電気化学的特性の解析も進められており、ヒューミンの電子伝達物質としての機能について明らかにされつつある(Pham et al., *Surf Interface Anal.*, 1-8, 2018)。このように、ヒューミンおよびヒューミン酸化微生物について詳細な解析が精力的に進められてきた。一方で、ヒューミンを電子受容体として利用して生育するヒューミン還元微生物は、先行研究からその存在が示唆されているにも関わらず、これまで全く研究が行われてきていない。ヒューミンは土壌や底泥など幅広い環境中に存在する天然物である。ヒューミンが存在する環境中に生息している一部の環境微生物が、ヒューミンを介した電気共生により生存を図っていること、そしてヒューミンの存在が環境微生物生態系に何らかの影響を及ぼしていることは容易に予想されるが、その詳細については全く不明である。

微生物が細胞外に存在する固体電子伝達物質(活性炭やマグネタイトなど)を利用する時、導電性タンパク質を含む細胞外電子伝達系を介して電子伝達が行われることが知られている(Kouzuma et al., *Frontiers in microbiology*, 6:609, 2015)。細胞外電子伝達系を持ち、細胞外の固体電子伝達物質を利用できる微生物は電気活性微生物と呼ばれ、微生物電気化学システム(Bioelectrochemical systems: BES)への利用に期待されている。BES は、電気化学的に微生物代謝を制御し、有害物質の分解・除去や有用物質の生産などを行える新たなバイオテクノロジーとして注目されている技術であるが、本技術は微生物と電極間で電子授受を行う必要があるため、電気活性微生物の利用が必須である。一方で、これまでのヒューミンと微生物を用いた電子伝達に関わる研究では、既知の細胞外電子伝達系を持たない微生物(非電気活性微生物)もヒューミンから電子供与を受けていることが示唆されている。このことから、ヒューミンと電子授受する微生物には、未知の細胞外電子伝達機構が存在している可能性が考えられるが、その詳細は不明である。また、ヒューミンを BES へ取り入れることで、電気活性微生物に依存しない多様な微生物種を利用したシステムの構築が期待される。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究は環境微生物におけるヒューミン還元機構の解明を目的とした。本研究では、環境微生物のモデルとして異化的金属還元細菌の *Shewanella oneidensis* MR-1 株を使用し、ヒューミン還元機構の解析に取り組んだ。本細菌を使用した理由として、電気活性微生物のモデルとしてもよく研究が行われており、すでに細胞外電子伝達系を構成するタンパク質およびコードする遺伝子が同定されていること、全ゲノム配列が公開されていること、遺伝子組み換え操作が容易なこと、通性嫌気性細菌であり培養が容易であることが挙げられる。また、本細菌はヒューミンが存在する淡水湖(アメリカ合衆国、ニューヨーク州、オネイダ湖)の底泥より単離された環境微生物であることも理由の一つである。本研究では、微生物によるヒューミン還元機構を調べるうえで、ヒューミンの酸化還元状態を常時測定できるシステムがないことから、初めに本システムの構築を行った後にヒューミン還元機構の解明に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞外電子伝達能欠損変異株の作製

*S. oneidensis* MR-1 株の細胞外電子伝達系を構成するタンパク質の中で、最終電子受容体還元酵素 OmcA と MtrC をコードする遺伝子を二段階相同組換え法を用いて細胞電子伝達能を欠損させた細胞外電子伝達能欠損変異株を作製した。

## (2) ヒューミンを使用した微生物電気化学システムの構築

電気化学培養は、334 mL 容の 1 槽式リアクターを使用し、3 電極法により作用極電位の制御を行った。作用極には炭素棒 ( $\phi$  5 mm, 15 cm)、対極は白金線 ( $\phi$  0.8 mm, 1 m)、参照電極には Ag/AgCl 電極を使用した。ヒューミンは懸濁もしくは作用極表面にエポキシ接着剤で固定した電極を使用した。培地には乳酸を唯一の電子・炭素源とした乳酸最少培地を使用した。なお、培地には電解質として  $10 \text{ g L}^{-1}$  の塩化ナトリウムを加えた。

## (3) ヒューミン還元微生物の集積培養

ギ酸を唯一の有機炭素源としたギ酸最少培地に細胞外電子伝達物質として電気化学的に酸化または還元したヒューミンを加え、ヒューミン還元微生物の集積培養を行った。微生物源は、水田土壌からヒューミン混合培地で集積・維持していたペンタクロロフェノール脱塩素細菌群を使用した。なお、酸化型または還元型ヒューミンは、ヒューミンに  $-600 \text{ mV}$  または  $+300 \text{ mV}$  (vs. Ag/AgCl) の電位を 2 日間印加し続けることで作製した。

## (4) 16S rRNA 微生物群集構造解析

集積培養物から total DNA を FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いて抽出した。抽出した DNA を鋳型として 16S rRNA 微生物群集構造解析を行った。本解析は株式会社生物技研のアンプリコンシーケンス解析に依頼し、V3-V4 領域の塩基配列のデータを取得した。データ解析は qiime2 (ver. 2021.2) を使用し、silva (ver. 138) により系統推定を行った。さらに、系統解析で得られたデータを基に Galaxy アルゴリズム (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) を用いて Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) 解析による各微生物群集の類似性を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) *S. oneidensis* を用いたヒューミン還元機構の解析

これまでの研究から、ヒューミンを電子伝達物質として利用できる細菌には、*Shewanella* 属細菌や *Geobacter* 属細菌でよく研究されている細胞外電子伝達系と呼ばれる導電性タンパク質を含むタンパク質複合体を必要としない可能性が示唆されているが、その真偽は不明である。初めに、*S. oneidensis* を用いて、ヒューミン還元における既知の細胞外電子伝達系の関与について解析を行った。本解析では、*S. oneidensis* の細胞外電子伝達能を欠失させた変異株を使用した。変異株は、*S. oneidensis* の細胞外電子伝達系構成タンパク質の内、最終還元酵素である OmcA と MtrC をコードする遺伝子を欠損させて作製した (Kondo et al., Langmuir, 31(26): 7427-7434, 2015)。初めに、本変異株の細胞外電子伝達能を電気化学培養を用いて確認した。野生株では電流生成が確認された一方で、本変異株では電流生成が見られなかったことから、本変異株は細胞外電子伝達物質である電極へ電子を伝達できないことが示された。

次に、変異株を用いてヒューミンと微生物間の電子伝達について解析するため、ヒューミンを懸濁した乳酸最少培地を用いて電気化学培養を実施した。その結果、ヒューミン無し条件では、電流生成を示さなかったが、ヒューミン混合条件では電流生成を示し、さらにヒューミンの添加量の増加に伴い電流生成量の増加が観察された。本試験は、リアクターの台数などの関係により、統計解析に必要な反復実験が十分実施できていないが、実施したいずれの実験で、上記と同様の結果が得られている。このことから、本変異株は異化代謝で獲得した電子をヒューミンを介して電極へ伝達したことが示唆された。また、本変異株は既知の細胞外電子伝達系を欠損させているにも関わらず、電流生成したことから未知の細胞外電子伝達系によりヒューミンへ電子伝達したことが示された。

当初の計画では、本変異株へ紫外線暴露やトランスポゾン挿入などによりランダム遺伝子変異を行うことにより、ヒューミンへの電子伝達に重要な遺伝子を同定することを予定しており、そのスクリーニングに電気化学培養を利用することを考えていた。電気化学培養では、多数の電気化学リアクターを並行して運転することで、複数のランダム変異株のスクリーニングを計画していた。そのため、本研究では、ヒューミンの攪拌が不要となるヒューミン固定電極を用いた簡易リアクターを構築することも計画していたが、ヒューミン自体の導電性が低いこともあり、ヒューミン固定電極の開発が非常に難航した。そこで、ランダム遺伝子変異によるヒューミン還元関連遺伝子の同定と並行して、次のアプローチによるヒューミン還元機構の解析を進めた。

### (2) ヒューミン還元微生物群の集積培養と群集構造解析

ヒューミン還元微生物に共通する特徴から、ヒューミン還元機構を特定するため、継代培養によるヒューミン還元微生物の集積を行った。培養系では、微生物源に研究代表者が所属する研究グループで維持しているヒューミン依存的ペンタクロロフェノール脱塩素細菌群を用

い、最終電子受容体に酸化型ヒューミン、電子源および炭素源にはギ酸を使用した。継代培養では、バッチ培養系を2週間の培養期間ごとに新しい培地へ植え継いだ。なお、比較対象のため、酸化型ヒューミンの代わりに還元型ヒューミンを使用した集積培養を行った。

集積培養期間中の集積具合は変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により確認を行ったが、酸化型ヒューミンまたは還元型ヒューミンを加えた培養系間において、微生物群集に違いが見られなかった。そこで、各培養系で酸化・還元型ヒューミンを添加または無添加の培養系を作製し、集積培養を継続した。その結果、ヒューミン添加の有無の培養系を加えてから2世代後のヒューミン無添加培養系において、ギ酸の消費量がヒューミン添加系と比較して大きく減少した。この結果から、ヒューミンの有無により微生物群集に大きな変化が生じたと推察されたため、16S rRNA アンプリコンシーケンスによる微生物群集構造解析を実施した。

群集構造解析データをもとに多様性指数である Shannon 指数および Chao1 指数を算出したところ、酸化または還元型ヒューミン添加系がほぼ同一の値を示し、ヒューミン無添加系よりも多様性が高いことが示された。この結果は、ヒューミン添加培養系からヒューミン無添加培養系へ植え継いだことにより、ヒューミン依存的な細菌の生育が著しく低下したことに起因したためと考えられる。一方で、酸化型ヒューミンと還元型ヒューミンを添加した培養系では、微生物群集構造に大きな違いは見られなかった。LEfSe による統計解析により、ヒューミン添加系に特徴的な微生物として Acidobacteriota 門、Armatimonadota 門、Bacteroidota 門、Desulfobacterota 門、Firmicutes 門および Planctomycetota 門に属する13属が抽出された。また、酸化型ヒューミンと還元型ヒューミン添加系を比較した時に、酸化型ヒューミン添加系で存在比が増加した微生物が2属抽出され、Desulfobacterota 門 (Smithella) および Firmicutes 門 (DTU014) に属していた。一方で、ヒューミン添加系で優位に存在比が減少した微生物として Bacteroidota 門、Chloroflexi 門、および Proteobacteria 門に属する4属が抽出された。

ヒューミン依存的な微生物として抽出された6門に属する13株の細菌には、グラム陰性および陽性菌の両方が含まれていた。このことから、ヒューミンへの電子伝達には外膜やペプチドグリカン層などを含む細胞膜構造に依存しないことが示唆された。ヒューミン添加系で優位に抽出された細菌は分子系統学的に多様であることから、これまでの研究で報告されてきた細菌よりも、はるかに多くの細菌がヒューミン利用に関与していることが予想される。ヒューミン添加系で優位に増加した細菌には、分子系統学的に偏りなく幅広い細菌が見出されたことから、分子系統学的に多様な微生物がヒューミン還元に関与できる可能性が示された。

電気活性微生物としてよく知られている *Shewanella* 属細菌や *Geobacter* 属細菌は Proteobacteria 門に属する細菌であり、これまでにヒューミン酸化細菌として機能することが明らかになっている。しかし、本解析では、ヒューミン存在下でこれらの細菌の存在量が低下する結果が得られ、Firmicutes 門などヒューミン添加系で増加した微生物と比較してヒューミンとの親和性は低いことが示唆される。上記の *S. oneidensis* MR-1 株を用いた解析において、ヒューミン還元に関する解析がうまく進まなかった要因の一つとして、本株のヒューミン利用性が低かった可能性が考えられる。Firmicutes 門に属する細菌など、ヒューミンとの親和性が高いと考えられる細菌を用いることで詳細なヒューミン還元機構の同定が可能になると考えられるため、今後は本解析で得られた結果を元にヒューミン還元菌を選定し、詳細な解析を進める必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Dey Sujan, Awata Takanori, Mitsushita Jumpei, Zhang Dongdong, Kasai Takuya, Matsuura Norihisa, Katayama Arata	4. 巻 11
2. 論文標題 Promotion of biological nitrogen fixation activity of an anaerobic consortium using humin as an extracellular electron mediator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6567-6567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85955-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Pham Duyen Minh, Kasai Takuya, Yamaura Mirai, Katayama Arata	4. 巻 269
2. 論文標題 Humin: No longer inactive natural organic matter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 128697 ~ 128697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2020.128697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ha Biec Nhu, Pham Duyen Minh, Kasai Takuya, Awata Takanori, Katayama Arata	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of Humin and Chemical Factors on CO <sub>2</sub> -Fixing Acetogenesis and Methanogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 2546 ~ 2546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph19052546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Sujan Dey, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Promotion of Biological Nitrogen Fixation Using Extracellular Electron Mediator-Humin
3. 学会等名 The Water and Environment Technology Conference Online2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笠井 拓哉、ラスカー マハシュウエタ、片山 新太
2. 発表標題 固体腐植物質による生物学的二酸化炭素資源化反応の促進
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sujan Dey, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Promotion of nitrogen-fixation activity of diverse heterotrophic diazotrophs by supplying extracellular electrons from humin, a solid-phase humic substance
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arata Katayama, Mahasweta Laskar, Biec Nhu Ha, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai
2. 発表標題 Alternate functionality of humin, a solid-phase humic substance, as extracellular electron mediator in carbon dioxide-reducing acetogenesis
3. 学会等名 American Chemical Society, Spring 2021 meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Kasai, Mahasweta Laskar, Arata Katayama
2. 発表標題 Activation of carbon dioxide reduction by autotrophic acetogen by solid-phase humic substances
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sujan Dey, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Acceleration of Biological N-fixation by a Solid-phase electron mediator, humin
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Biec Nhu HA, Duyen Minh PHAM, Takuya KASAI, Arata KATAYAMA
2. 発表標題 Activity of CO <sub>2</sub> -Fixing Acetogenesis and Methanogenesis in Mixed Cultures with Humin under Different Conditions
3. 学会等名 The Water and Environment Technology Conference Online2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tingting HU, Mirai YAMAURA, Duyen minh PHAM, Takuya KASAI, Arata KATAYAMA
2. 発表標題 Extracellular Electron Mediating Functions Discovered in Fresh Organic Materials and Changes the Functionality in Artificial Soil
3. 学会等名 The Water and Environment Technology Conference Online2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sujan Dey, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Humin Promotes the Biological-H <sub>2</sub> (Bio-H <sub>2</sub> ) Production of an Anaerobic Consortium Enriched Under Nitrogen-deficient Condition
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Kasai, Sujan Dey, Takehito Noto, Ryouta Ujibayashi and Arata Katayama
2. 発表標題 Study on extracellular electron transfer mechanism in humin promoting redox reactions of nitrogen
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Biec Nhu Ha, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Takanori Awata, Arata Katayama
2. 発表標題 Effects of chemical factors and microbial community on the activity of CO <sub>2</sub> -fixing acetogenesis and methanogenesis with the presence of humin as extracellular electron mediator
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arata Katayama, Takuya Kasai, Naoko Yoshida
2. 発表標題 Strategy of anaerobic bioremediation: design of artificial microbial community and bioelectrochemical system
3. 学会等名 the 41st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tingting Hu, Mirai Yamaura, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama
2. 発表標題 Increase in Extracellular Electron Mediating Function of Rice Straw-artificial Soil Mixture During the Humification
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 能登 健仁, 笠井 拓哉, 片山 新太
2. 発表標題 微生物によるヒューミン還元機構の解析とそれに関わる微生物の同定
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田大起, Pham Duyen Minh, 笠井拓哉, 片山新太
2. 発表標題 固体フミン質を適用した微生物電気化学システムの構築と最適化
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠井 拓哉, 伊藤 啓人, Pham Minh Duyen, 菰田 峰生, 片山 新太
2. 発表標題 固体腐植ヒューミンを用いた生物電気化学システムにおける酢酸生成菌による二酸化炭素変換の促進
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------