

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580103

研究課題名(和文)ヒ酸還元能を持つジオバクター属細菌による水田土壌からのヒ素溶出

研究課題名(英文) Arsenic release from paddy soil by a dissimilatory arsenate-reducing bacterium *Geobacter* sp. OR-1

研究代表者

天知 誠吾 (Amachi, Seigo)

千葉大学・園芸学研究科・准教授

研究者番号：80323393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：国内のヒ素汚染土壌より、新規なヒ酸還元細菌 *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株を分離した。この菌株と、すでに分離に成功しているヒ酸還元細菌 *Geobacter* sp. OR-1 を滅菌水田土壌やヒ素を吸着したフェリハイドライトに接種することにより、ヒ素の溶出を再現できた。XANES 解析により、これら細菌は土壌固相のヒ酸を還元できることが示唆された。さらに、これら細菌のドラフトゲノム解析を行った。OR-1 株のゲノムにはヒ素代謝遺伝子群をコードする領域 (Arsenic island) が独立して 2 つ存在し、異化的ヒ酸還元反応を触媒すると考えられる *arrAB* 遺伝子も見出された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have succeeded to isolate a novel arsenate-reducing bacterium *Geobacter* sp. OR-1 from Japanese paddy soil. In this study, we isolated a new arsenate-reducing bacterium *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 from arsenic-polluted soil. When these bacterial strains were inoculated into sterile paddy soil, arsenic release was reproduced. XANES analysis revealed that these strains were able to reduce arsenate adsorbed on soil solid phase. In addition, the strains could release arsenic adsorbed on ferrihydrite. We also determined draft genome sequences of these strains. Preliminary draft genome analysis of strain OR-1 identified two arsenic islands containing multiple *arsA* and *arsD* genes, and possible dissimilatory arsenate-reductase genes (*arrAB*) were also found.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：環境微生物 ヒ素 水田土壌 溶出 *Geobacter* ヒ酸還元 *ArrA* XANES

## 1. 研究開始当初の背景

環境中でヒ素は、主にヒ酸 ( $H_3AsO_4$ ) と亜ヒ酸 ( $H_3AsO_3$ ) として存在する。酸化的環境ではヒ酸が優占種だが、土壌や堆積物中の鉄鉱物 (フェリハイドライトなど鉄酸化物) へ吸着するため、生物への可給性は低い。これに対して、還元条件ではヒ酸が還元されて亜ヒ酸が優占種となり、一部が液相に溶出する。これは、亜ヒ酸の鉄鉱物への吸着力がヒ酸よりも相対的に弱いこと、またヒ素のホストである鉄鉱物が還元溶解により失われるためと考えられる。現在、バングラディッシュやインドの西ベンガル地方、カンボジアなどでは地下水のヒ素汚染が深刻で、数百万もの人々が慢性ヒ素中毒による健康被害 (皮膚がん、肺がん、黒皮症) に晒されている。

近年、東南アジアの地下水ヒ素汚染には、嫌気性微生物が関与することがわかってきた。具体的には、易分解性有機物の存在下で異化的鉄還元細菌や異化的ヒ酸還元細菌が活性化し、鉄鉱物の還元溶解、ひいてはヒ素の溶出を引き起こすと考えられる。Islam ら (*Nature*, 430, 68-71, 2004) は、西ベンガルのヒ素汚染堆積物中では *Geobacter* 属細菌に近縁なクローンが優占することを明らかにした。またカンボジア (*Lear et al., Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 1041-1048, 2007) や西ベンガル (*Héry et al., Geobiology*, 8, 155-168, 2010) の堆積物中のヒ酸還元酵素遺伝子 (*arrA*) の解析を行ったところ、*Geobacter* の ArrA 様タンパクと近縁なクローンのみが検出されている。一般に *Geobacter* は鉄還元細菌として知られているが、これらの結果は *Geobacter* が異化的ヒ酸還元反応も触媒し、ヒ素の溶出に關与する可能性を強く示唆している。ところが不思議なことに、これまでにヒ酸還元能を有する *Geobacter* が分離培養された例はない。

我々は最近、国内のヒ素汚染水田土壌より、異化的ヒ酸還元能を持つ *Geobacter* 属細菌 OR-1 株を初めて単離した。OR-1 株はアジアの汚染地域で検出されたクローンとも近縁で、鉄還元能も有していた。また、水田土壌中の *arrA* 遺伝子を解析した結果、*Geobacter* の ArrA と近縁なクローン (クラスター1と2) が優占しており、このうちクラスター2 は OR-1 株と極めて近縁であった。以上の結果は、東南アジアのヒ素汚染地域のみならず、国内の水田土壌においても *Geobacter* がヒ素の溶出に重要な役割を演じていることを強く示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

日本では、東南アジアとは違って地下水のヒ素汚染はほとんど問題になっていない。しかしながら、土壌には平均 11 mg/kg のヒ素が含まれるため、水田のように還元状態の発達しやすい環境ではヒ素の溶出が起こりうる。実際、農作物からのヒ素摂取量において、我が国では米の寄与が大きいことがわかって

いる。このため、水田土壌におけるヒ素の溶出・吸着メカニズムの解明は重要である。

本研究は、水田環境におけるヒ素溶出に及ぼす微生物の影響を明らかにし、その溶出メカニズムを解明することを目的に、主に以下の4点について検討を加えた。国内土壌から新たにヒ酸還元細菌の分離を行う。モデル堆積物としてヒ素を吸着した鉄鉱物を調製し、鉄還元細菌やヒ酸還元細菌がヒ素を溶出できるか試験する。滅菌土壌への接種実験を行い、ヒ素溶出を再現できるか試験し、その中で *Geobacter* が果たす役割について考察する。分離したヒ酸還元細菌のドラフトゲノム解析を行い、中枢代謝系のみならず、ヒ素代謝、電子伝達系などに關与する遺伝子を推定する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒ酸還元細菌の分離

国内のヒ素汚染土壌を接種源とし、培養には嫌気的な無機塩培地 20 mL を用いた。酢酸ナトリウムを電子供与体、ヒ酸カリウムを電子受容体、システイン塩酸塩を還元剤として、それぞれの終濃度が 2 mM、5 mM、1 mM になるように添加した。純粋菌株の分離は加圧培養試験管を用いたアガーシェイク法にて行った。単一コロニーが形成された寒天培地から SCI を行った。コロニー化と SCI を複数回繰り返して、顕微鏡観察によって純粋菌株であることが確認された時点で分離に成功したと判断した。ヒ酸、亜ヒ酸、酢酸は HPLC にて定量し、カラムは Aminex HPX-87H (Bio-Rad) を使用した。

### (2) ヒ酸を吸着したフェリハイドライト (As-Fhy) からのヒ素溶出試験

$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  水溶液をアンモニアで中和し、洗浄後に透析することでフェリハイドライトを調製した。フェリハイドライトの構造は X 線回折で確認した。凍結乾燥したフェリハイドライトとヒ酸水溶液を混合し、洗浄後凍結乾燥することで As-Fhy を調製した。無機塩培地に 50 mg の As-Fhy を添加し、ここに種々の菌株を接種後 30 日間培養を行った。培養上清のヒ酸、亜ヒ酸を HPLC で、 $Fe(II)$  をフェロジン法で定量した。

### (3) 滅菌水田土壌からのヒ素溶出試験

ヒ素汚染水田土壌より採取した灰色低地土と水をバイアル瓶に入れ、 $H_2$  ガスで脱気・密栓した。その後ガンマ線 (50 kGy) を照射したものを滅菌水田土壌とした。あらかじめ嫌気培養した種々の菌株を洗浄後、滅菌水田土壌に接種した。電子供与体として 3 mM 酢酸を添加し、30 °C で 1 か月静置培養を行った。培養後遠心し、液相中のヒ酸と亜ヒ酸を HPLC/ICP-MS を用いて解析した。固相のヒ素の化学形態は、高エネルギー加速器研究機構の放射光科学研究施設 (フォトンファクトリー-BL12C) において X 線吸収端近傍構造

(XANES)によって分析した。

#### (4)ドラフトゲノム解析

*Geobacter* sp. OR-1 株と *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株のドラフトゲノム解析を東京大学オーミクス情報センターに依頼して行った。シーケンサーは 454 GS Junior または 454FLX Titanium を用いた。アセンブルは Newbler v2.8 にて、ORF 予測には MetaGeneAnnotator を用いた。ドラフトゲノムの解析には The SEED Viewer を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1)新規ヒ酸還元細菌の分離

国内ヒ素汚染土壌由来の集積培養系から分離した菌株を PSR-1 株と命名した。PSR-1 株はグラム陰性、細胞長 3~5  $\mu\text{m}$ 、細胞幅 0.3  $\mu\text{m}$  の短く湾曲した形態を持つ桿菌で、孢子またはシストの形成が確認された。PSR-1 株は 5 日間の培養で 5 mM のヒ酸を同量の亜ヒ酸に還元した。また、ヒ酸の還元とともに 2 mM の酢酸を消費した。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析の結果、PSR-1 株は  $\beta$ -プロテオバクテリア亜門の *Anaeromyxobacter dehalogenans* に 99%の相同性を示した。

電子受容体として利用可能な物質の検討を行ったところ、PSR-1 株はヒ酸の他にキレート鉄(Fe(III)-NTA)、フェリハイドライト、 $\text{O}_2$  (ただし微好気条件に限る)、フマル酸、セレン酸、マンガン(IV)、硝酸、亜硝酸の利用が可能であった。PSR-1 株のヒ酸還元が呼吸反応であることを示すため、呼吸阻害剤の影響を調べた。ジクマロール、HQNO、KCN の添加によって 10 日間でそれぞれ 83.0%、84.3%、97.5%のヒ酸還元反応が抑制された。以上の結果より、PSR-1 株は *A. dehalogenans* に近縁で新規な異化的ヒ酸還元細菌であることが明らかになった。

#### (2)As-Fhy からのヒ素溶出試験

微生物を接種しない対照区では、As-Fhy からのヒ素と Fe(II)の溶出は確認されなかった。これに対し、*Geobacter* sp. OR-1 を接種した場合、培養 30 日の間に亜ヒ酸(最大 700  $\mu\text{M}$ )と Fe(II)(最大 4 mM)の溶出が確認された。同様に、*Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株を接種しても亜ヒ酸と Fe(II)がそれぞれ最大で 600  $\mu\text{M}$  と 4 mM 溶出した。ヒ酸還元能を持たない鉄還元細菌(*Geobacter metallireducens* GS-15 および *Shewanella oneidensis* MR-1)を接種した場合は、Fe(II)の溶出は認められたものの、亜ヒ酸の溶出は観察されなかった。以上の結果から、As-Fhy からのヒ素溶出には鉄還元能とヒ酸還元能を併せ持つ微生物の存在が必要であることが示唆された。

#### (3)滅菌水田土壌からのヒ素溶出試験

微生物を接種しない対照区では、培養 1 週間で液相に 78 nM の亜ヒ酸と 29  $\mu\text{M}$  の Fe(II)しか溶出しなかった。これに対し、*Geobacter*

sp. OR-1 の洗浄菌体を接種した場合、904 nM の亜ヒ酸と 229  $\mu\text{M}$  の Fe(II)が溶出した。同様に、*Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株を接種すると 1,798 nM の亜ヒ酸と 560  $\mu\text{M}$  の Fe(II)が溶出した。

固相のヒ素の化学形態を XANES 解析により明らかにしたところ、微生物を接種しない対照区では培養後の亜ヒ酸の割合は 20%で、ほとんどがヒ酸として存在することがわかった。これに対し、OR-1 株や PSR-1 株を接種した場合、亜ヒ酸の割合が 42-52%まで上昇していた。このことから、OR-1 株や PSR-1 株は液相のみならず、固相(鉄酸化物など)に吸着したヒ酸を直接還元できる可能性が示唆された。また、液相の鉄濃度と亜ヒ酸濃度、さらに固相の亜ヒ酸の割合と液相の亜ヒ酸濃度には共に強い正の相関があることがわかり、鉄還元反応や固相のヒ酸還元反応が液相へのヒ素の溶出を決定する重要なファクターであると考えられた。

ヒ酸・鉄還元細菌の接種によって、滅菌土壌からのヒ素の溶出を再現できたことから、これら微生物がヒ素の溶出に必須の役割を演じていることを証明できた。

#### (4)ドラフトゲノム解析

*Geobacter* sp. OR-1 株の推定ゲノムサイズは 4.6 Mb、コンティグ数は 183、推定 CDS 数は 4,309 であった。rRNA は 6 個、tRNA は 50 個見いだされた。The SEED Viewer による解析の結果、OR-1 株のドラフトゲノム中にはヒ素代謝遺伝子群をコードする領域(arsenic island)が独立して 2 つ存在することが明らかになった。1 つ目はコンティグ 005 にコードされており、ヒ素の耐性およびヒ素呼吸に関わると予想される *arsD*, *arsA*, *acr3*, *arsR*, *arrA*, *arrB*, *arrD*, *arrE* などの遺伝子が見いだされた。一方、別の領域はコンティグ 002 に存在し、主にヒ素耐性に関与すると予想される *arsR*, *arsC*, *acr3*, *uspA*, *arsA*, *arsD* などが見いだされた。

OR-1 株の異化的ヒ酸還元酵素(Arr)のラージサブユニットをコードすると予想される *arrA* を解析したところ、鉄硫黄クラスターの結合に必要なシステインリッチモチーフやモリブデン結合ドメインなどが保存されていた。また、N 末端領域に TAT シグナルが見いだされ、Arr が細胞質からおそらくペリプラズムへ分泌されることが示唆された。さらに OR-1 株のドラフトゲノム中には電子伝達に関与すると推定される c 型シトクロームが 84 個見いだされ、このうち OR-1 株に特異的なシトクロームは 4 個存在した。すでに *G. sulfurreducens* などで鉄還元反応に重要な機能を有することが報告されている外膜局在性シトクローム(Omc)やペリプラズム局在性シトクローム(Ppc)、ピリ(Pil)のホモログも多数見つかった。

*Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株のドラフトゲノムは現在解析中である。少なくとも 1 つの

arsenic island が見いだされているが、典型的な Arr をコードする遺伝子 (*arrAB*) は見つかっていない。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

D. T. Dong, N. Yamaguchi, T. Makino and S. Amachi, Effect of soil microorganisms on arsenite oxidation in paddy soils under oxic conditions, *Soil Sci. Plant Nutr.* 査読有、(in press).

S. Yamamura and S. Amachi, Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation, *J. Biosci. Bioeng.* 査読有、(in press).  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.011>)

K. Kudo, N. Yamaguchi, T. Makino, T. Ohtsuka, K. Kimura, D. T. Dong and S. Amachi, Arsenic release from soil by a novel arsenate-reducing bacterium *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有、79, 4635-4642 (2013).

T. Ohtsuka, N. Yamaguchi, T. Makino, K. Sakurai, K. Kimura, K. Kudo, E. Homma, D.T. Dong and S. Amachi, Arsenic dissolution from Japanese paddy soil by a dissimilatory arsenate-reducing bacterium *Geobacter* sp. OR-1, *Environ. Sci. Technol.* 査読有、47, 6263-6271 (2013).

N. Yamaguchi, T. Nakamura, D. Dong, Y. Takahashi, S. Amachi and T. Makino, Arsenic release from flooded paddy soils is influenced by speciation, Eh, pH, and iron dissolution, *Chemosphere*, 査読有、83, 925-932 (2011).

[学会発表](計9件)

江原彩香、天知誠吾, 異化的ヒ酸還元細菌 *Geobacter* sp. OR-1 株のドラフトゲノム解析, 第29回日本微生物生態学会大会(2013.11.23. 鹿児島大学)。

S. Amachi, D. T. Dong, and N. Yamaguchi, Arsenic dissolution from Japanese paddy soil by a dissimilatory arsenate-reducing bacterium *Geobacter* sp. OR-1, Goldschmidt 2013 (2013.8.25. Florence, Italy).

天知誠吾, 新規ヒ酸還元細菌の分離: ヒ素の還元溶出へ与えるインパクト, 第1回 Metal(loid) Biogeochemistry 勉強会 (2013.6.14.千葉大学)。

工藤桂太郎、天知誠吾, 異化的ヒ酸還元能

を有する *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株の性質, 第18回ヒ素シンポジウム(2012.11.24. 宮日ホール)。

本間瑛理、天知誠吾, ヒ酸還元能を有する鉄還元細菌 *Geobacter* sp. OR-1 株の生理的特質, 第18回ヒ素シンポジウム(2012.11.24. 宮日ホール)。

天知誠吾, ヒ素呼吸能を持つ新規 *Geobacter* 属細菌による水田土壌からのヒ素の溶出, 第28回日本微生物生態学会大会(2012.9.19.豊橋技術科学大学)。

天知誠吾, 中村崇志、大塚俊彦、櫻井和宏、木村建太、工藤桂太郎、牧野知之、山口紀子, 国内水田土壌からのヒ素の溶出に及ぼす微生物の影響, 第17回ヒ素シンポジウム(2011.11.19.つくば国際会議場)。

工藤桂太郎、天知誠吾、本間瑛理, 国内水田土壌からの異化的ヒ酸還元細菌の分離, 第27回日本微生物生態学会大会(2011.10.8. 京都大学)。

S. Amachi, S. Nakamura, T. Ohtsuka, K. Kimura, K. Sakurai, K. Kudo, T. Makino and N. Yamaguchi, Microbial influences on arsenic release from Japanese paddy soils, IUMS2011 Sapporo (2011.9.6. Sapporo).

[図書](計1件)

山村茂樹、天知誠吾、成山堂書店、地球を救うメタルバイオロジー 微生物と金属資源のはなし、105-113 (2014).

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

天知 誠吾 (AMACHI, Seigo)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号: 80323393

(3)連携研究者

山口 紀子 (YAMAGUCHI, Noriko)

(独)農業環境技術研究所・土壌環境研究領域・主任研究員

研究者番号: 80345090