

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02842

研究課題名(和文) 土壌環境のヒ素汚染に関与する微生物要因の解明と汚染リスク評価への応用

研究課題名(英文) Microbial arsenic transformation pathways associated with polluted environments

研究代表者

濱村 奈津子 (Hamamura, Natsuko)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：50554466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒ素汚染土壌のカラム実験系を用いて、酸素濃度などの環境要因が引き起こすヒ素挙動変動および微生物プロセスを明らかにした。好氣的また冠水時を想定した嫌氣的条件下において継続的な三価から五価へのヒ素酸化活性が見られ、活性速度の上昇にともなってヒ素酸化遺伝子の発現量およびヒ素酸化酵素の遺伝子型の多様性の増加が確認された。酸素供給量や共存汚染金属などの環境要因変動への応答として、異なるヒ素代謝遺伝子型に反映される生理生態特性の異なるニッチに適応した細菌群が優占化していることを示唆しており、汚染土壌環境における潜在的な環境適応能力を評価する上で重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒ素汚染の原因究明は世界的にも注視されているが、ヒ素と微生物の相互作用は未解明な部分が多いため、実際の汚染土壌に有効な管理・浄化技術が確立されておらず、安全性を評価し二次汚染被害拡大を阻止する対策が求められている。本研究の成果は、環境中ヒ素挙動における生物学的な関与を明らかにするとともに、汚染土壌中でヒ素形態変化に関与する新規微生物群の取得により、ヒ素汚染リスク低減技術や評価技術への応用が期待できる。また、本研究で実施した環境中での微生物群の活性全体を定量的に検出・測定する手法はヒ素以外の化学物質代謝へ応用も期待されることから、学術的な意義も高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, the influence of environmental factors on biotransformation of arsenic by soil microbial community was investigated. Microbial arsenite oxidation was detected in the soil columns under oxic and anoxic conditions concomitant with the emergence of arsenite-oxidizing bacterial population and increase in arsenite oxidase gene diversity. Our results also indicated that the co-contamination of toxic metals along with arsenic imposed a selective pressure on the soil bacterial community and thus affecting the redox transformation of arsenic in natural environments.

研究分野：微生物生態学

キーワード：ヒ素 微生物ヒ素酸化 土壌微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

猛毒のヒ素は、鉱山開発など人為的な汚染源の他に、鉱物や掘削ずりからの溶出など自然汚染源からも環境中に放出され、現在、世界でもっとも深刻な被害を引き起こしている化学汚染物質の一つである。我が国でも、ヒ素は土壌汚染対策法の基準超過値の検出頻度が高い汚染物質であり、不溶化や吸着による固定化を用いた浄化処理が一般的に行われている。しかし、ヒ素は一旦固定化した土壌から再溶出する二次汚染を引き起こす事例が多く、より長期的な安全性の強化が求められているが、ヒ素溶出の原因は不明な点が多く有効な解決策が得られていない(Welch and Stollenwerk 2002)。

重金属の毒性や移動性はその化学形態に大きく依存し、特に反応速度の高い微生物代謝によるヒ素の形態変化はヒ素溶出を引き起こし、汚染リスクを悪化させる要因と考えられている(Oremland et al. 2003)。しかし、ヒ素と微生物の相互作用については不明な点が多く、固定化したヒ素の再溶出に影響する微生物代謝を予測・検出する手法が確立されていないことから、ヒ素汚染リスクを適切に把握する際の障害となっている。近年、ヒ素代謝微生物が数多く分離され、酸化還元反応によってヒ素溶出を駆動する微生物が環境中に広く分布していることが明らかになってきた(Inskeep et al. 2007, Hamamura et al. 2009)。しかし、微生物群集全体の機能・活性を考慮した現場環境におけるヒ素動態を予測する総合的な研究は極めて稀少であり、ヒ素溶出予測モデル構築の際の微生物要因の特定が急務となっている。また、ヒ素汚染の誘因については、現場のモニタリング調査とともに、天然を模擬した複雑系の実験研究が実施されており、その結果、季節変化にともなう酸素供給量(嫌気度)の変動、そして現場に共存する重金属や汚染物質の性質によって、固定化されているヒ素の溶出促進が示されている(Itai 2011)。そこで、これら環境要因の変動が微生物のヒ素代謝活性に影響する機構についても明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、汚染土壌のヒ素汚染リスクを適切に予測し安全性の評価につなげるため、ヒ素溶出に関与する微生物要因の定量的な検出手法を開発し、環境要因(酸素供給量・共存汚染重金属)の変化が引き起こす微生物ヒ素代謝プロセスを明らかにする。

3. 研究の方法

本実験では、ヒ素溶出に関与する微生物要因を定量的に検出する手法を確立するため、ヒ素汚染土壌のカラム実験系を用いて、特に微生物のヒ素酸化・還元反応を左右する土壌水分含量の変動等による酸素供給量(嫌気度)の増減、また共存汚染重金属の有無が微生物ヒ素代謝に及ぼす影響を調べた。土壌カラムの作成には、すでに申請者らにより土壌微生物のヒ素代謝が確認されている鉱山跡地のヒ素汚染土壌(Hamamura et al. 2013)を接種源に固相カラムを作成し(Macur et al. 2004)、それぞれ好氣的条件下と冠水時の嫌氣的条件下においてヒ素代謝活性と微生物群集の推移をモニタリングするとともに、ヒ素代謝酵素遺伝子の定量発現解析を実施した。また、共存汚染物質として、ヒ素と同族の毒性元素であるアンチモンの有無についても同様にカラム実験によりその影響を明らかにした。さらに、土壌カラム実験で検出された主要なヒ素代謝細菌群を分離培養し、16S rRNA 及びヒ素代謝遺伝子配列の同定による系統解析を行うとともに、液体培養後の細胞懸濁液を用いて特異的ヒ素代謝活性速度を測定した。

4. 研究成果

土壌カラム実験系において、酸化的条件下では三価から五価への継続的なヒ素酸化活性が測定され、活性速度の増加にともなう細菌群集構造の推移が確認された。また、冠水時を想定した嫌氣的条件下の土壌カラム実験では、好氣的条件下と比べてヒ素の酸化還元反応や細菌群集構造に顕著な推移は検出されず、継続したヒ素酸化が通性嫌気性菌または嫌氣的ヒ素酸化細菌群によって行われていた可能性が示唆された。

近年 Aio 型のヒ素酸化酵素も嫌氣的環境で活性を示すことが報告されている(Zhang et al. 2015)。さらに、嫌氣的ヒ素酸化酵素として新たに同定された Arx は、主にアルカリ塩湖や温泉などの極限環境に分布する細菌群から同定されており、汚染土壌環境における分布は不明であった。そこでヒ素代謝遺伝子の定量検出手法として、ヒ素酸化酵素(Aio)とヒ素還元酵素(Arr)に加えて、新規の嫌氣的ヒ素酸化酵素 Arx (図1参照)についても検出できるプライマーを作成した。本プライマーを用いることで、Arx 酵素遺伝子は極限環境のみならず、ヒ素汚染土壌中にも分布していることが確認された。これら嫌氣的ヒ素代謝経路も含め、土壌カラム実験におけるヒ素代謝酵素遺伝子群の継時的な検出を行ったところ、ヒ素酸化活性速度の増加にともなって Aio 型ヒ素酸化遺伝子の発現量およびヒ素酸化酵素の遺伝子型の多様性の増加が確認された。

さらに、土壌カラム実験系からヒ素代謝細菌の分離培養を実施した。その結果、実験に用いた土壌カラムにおいてヒ素代謝活性とともに増加が見られたヒ素代謝細菌を含む、プロテオバクテリア門に分布する多様なヒ素酸化細菌群が分離培養された。これら分離株のうち、主要な3系統群に分布する10株について、液体培養後の細胞懸濁液を用いてヒ素代謝活性速度を測定したところ、0.15-0.85 mM / day / cell の特異的活性速度が検出され、ヒ素酸化酵素遺伝子配列の相同性も高い系統近縁株においてもヒ素代謝に関与する生理活性の異なることが示された。

実際の汚染現場では、季節変化にともなう温度や降水量の変化による酸素供給量（嫌気度）の変動の他に、複数の重金属等と混在することによる複合暴露なども、微生物代謝活性へと影響しヒ素挙動変化を引き起こす誘因となると考えられる。そこで本研究では、ヒ素との複合汚染が報告されている同族毒性元素アンチモンがヒ素形態変化に及ぼす影響を明らかにするとともに、ヒ素挙動に関与する土壌微生物群集の推移と遺伝子発現応答の定量的検出を実施した。その結果、アンチモンの毒性は化学形態に依存し、毒性の高い三価態の共存下ではヒ素酸化活性が阻害されるが、ヒ素酸化酵素 Aio を保有する細菌群の割合は増加する傾向が見られた。三価態に比べ毒性の低い五価アンチモンの共存下ではヒ素酸化活性は変化しないが、アンチモンの複合暴露条件下ではいずれも細菌群集構造が推移し、異なるヒ素酸化細菌群が優占化することが示された。複合汚染の際の共存元素が鉄など比較的毒性の低い重金属の場合は、環境中ヒ素酸化活性やヒ素形態と、ヒ素酸化酵素遺伝子の定量解析は相関することが示されている(Mitsunobu et al. 2013)。qRT-PCR によるヒ素酸化酵素遺伝子 *aioA* の定量発現解析の結果、毒性の高い三価アンチモンとヒ素の複合曝露下において、ヒ素酸化酵素遺伝子の発現量は低下しておらず、ヒ素単独曝露の系と同程度の発現量であった。また、分離培養された複数のヒ素酸化土壌細菌群は、系統近縁種においてもアンチモン共存条件で異なるヒ素代謝速度を示し、アンチモン耐性レベルも異なることが明らかとなった。これらの結果を総合して、毒性元素の共存下では、複合汚染物質に耐性の高い微生物群が選択され、アンチモンに耐性を示すがヒ素代謝活性速度の異なるヒ素酸化細菌が出現したためヒ素酸化効率が減少し、毒性元素代謝活性に影響を及ぼしたと考えられる。

本結果は、酸素供給量や共存汚染金属などの環境要因変動への応答として、異なるヒ素代謝遺伝子型に反映される生理生態特性の異なるニッチに適応した細菌群が優占化していることを示唆しており、汚染土壌環境における潜在的な環境適応能力を評価する上で重要な知見である。

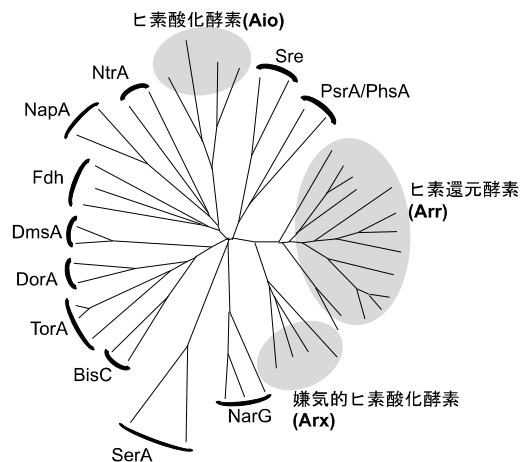


図1. ヒ素代謝に関与するヒ素酸化酵素 (Aio)、嫌気的ヒ素酸化酵素 (Arx)、ヒ素還元酵素 (Arr) クラスターを示している、DMSOリダクターゼファミリー酵素のモリプトブテリンサブユニットの系統樹。(From: Hamamura N. 2011. 日本微生物生態学会誌 26(2): 57-63.)

< 引用文献 >

- Hamamura N. et al. 2009, Linking microbial oxidation of arsenic with detection and phylogenetic analysis of arsenite-oxidase genes in diverse geothermal environments. *Environ Microbiol*, 11:421-431.
- Hamamura N. et al. 2011, Biogeochemistry of arsenic: microbial resistance, metabolism, and evolution. *Nihon biseibutsuseitai gakkaiishi*, 26(2):57-63.
- Hamamura N. et al. 2013, Identification of antimony- and arsenic-oxidizing bacteria associated with antimony mine tailing. *Microbes Environ*, 28:257-263.
- Inskeep W.P. et al. 2007, Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental Microbiology* 9:934-943.
- Itai T. 2011, A review of the field experimental studies aimed to clarify the formation mechanism of naturally occurring As contaminated groundwater in Bengal Basin. *Chikyukagaku*, 45:61-97.
- Macur R.E. et al. 2004, Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environ Sci Technol*, 38: 104-111.
- Mitsunobu S. et al. 2013, Arsenic attenuation in geothermal streamwater coupled with biogenic arsenic(III) oxidation. *Applied Geochemistry*, 35: 154-160.
- Oremland R.S. et al. 2003, The ecology of arsenic, *Science* 300:939-944.
- Welch and Stollenwerk 2002, Arsenic in Ground Water: Geochemistry and Occurrence. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Zhang J. et al. 2015, Anaerobic arsenite oxidation by an autotrophic arsenite-oxidizing bacterium from an arsenic-contaminated paddy soil. *Environ Sci Technol*, 49:5956-5964.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Fukushima Koh, Huang He, Hamamura Natsuko	4. 巻 30
2. 論文標題 Cellular Response of Sinorhizobium sp. strain A2 during Arsenite Oxidation	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 330 ~ 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME15096	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 Kataoka Takafumi, Mitsunobu Satoshi, Hamamura Natsuko	4. 巻 33
2. 論文標題 Influence of the Chemical Form of Antimony on Soil Microbial Community Structure and Arsenite Oxidation Activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 214 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME17182	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 Tsuchiya Tatsuya, Ehara Ayaka, Kasahara Yasuhiro, Hamamura Natsuko, Amachi Seigo	4. 巻 85
2. 論文標題 Expression of Genes and Proteins Involved in Arsenic Respiration and Resistance in Dissimilatory Arsenate-Reducing Geobacter sp. Strain OR-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00763-00719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.00763-19	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 Mitsunobu Satoshi, Hiruta Takuya, Fukudo Jinsuke, Narahashi Yuna, Hamamura Natsuko, Matsue Naoto, Takahashi Yoshio	4. 巻 373
2. 論文標題 A new method for direct observation of microscale multi-elemental behavior in waterlogged soil: μ XRF- μ XAFS combined live soil imaging chamber (LOACH)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geoderma	6. 最初と最後の頁 114415 ~ 114415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114415	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Hamamura, N., Kataoka, T.
2. 発表標題 Functional analysis of microbial communities associated with arsenic transformation in contaminated soil.
3. 学会等名 The 11th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hamamura, N., Yamashita, Y., Kataoka, T., Mitsunobu, S.
2. 発表標題 Diversity of microbial arsenic and antimony transformation pathways associated with antimony mine tailing
3. 学会等名 Goldschmidt2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱村奈津子
2. 発表標題 ヒ素の環境挙動に影響を及ぼす微生物代謝機構の多様性
3. 学会等名 資源・素材学会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hamamura, N., Okubo, T., Mitsunobu, S.
2. 発表標題 Microbial Biotransformation of Toxic Metalloids and Its Bioremediation Potentials
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hamamura, N., Kataoka, T.
2. 発表標題 Microbial community function and response associated with metalloid redox transformations in the contaminated environment
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hamamura, N., Mitsunobu, S.
2. 発表標題 Microbial biotransformation of toxic metalloids and its bioremediation implications
3. 学会等名 The 14th International Symposium on Persistent Toxic Substances (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱村奈津子
2. 発表標題 環境攪乱に対する微生物群集応答のダイナミクス：群集レベルの機能発現と遺伝子多様性をつなぐ観点からのアプローチ
3. 学会等名 進化群集生態学シンポジウム2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hamaura, N., Mitsunobu, S.
2. 発表標題 Diversity of microbial metalloid transformation pathways and its geochemical implications
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hamamura, N., Huang, H., Damdinsuren, N.
2. 発表標題 Diversity of microbial arsenic transformation pathways and community response to arsenic in a saline lake habitat
3. 学会等名 The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 片岡 剛文、濱村奈津子
2. 発表標題 土壌環境のヒ素挙動に関する微生物群集機能の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会第31会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hamaura, N., Utsunomiya, S., Nakano, Y., Mitsunobu, S.
2. 発表標題 Microbial antimony transformation associated with antimony mine tailing
3. 学会等名 Goldschmidt2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hamamura, N., Mori, K., Mitsunobu, S.
2. 発表標題 Microbial transformation of antimony and its geochemical implications
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2015
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Hamamura, N.
2. 発表標題 Diversity of microbial arsenic transformation pathways associated with arsenic impacted environments
3. 学会等名 4th Internationa Congress on Natural Science (国際学会)
4. 発表年 2015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
研究分担者	光延 聖 (Mitsunobu Satoshi) (70537951)	愛媛大学・農学研究科・准教授 (16301)	
連携研究者	板井 啓明 (Takaaki Itai) (60554467)	東京大学・理学研究院・准教授 (12601)	