

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310055

研究課題名(和文)嫌気微生物の脱塩素活性を高める固体電子メディエータの化学構造と活性化機構の解明

研究課題名(英文) Study on chemical structure and mechanism of soil-phase electron mediator enhancing dechlorination activity of anaerobic microorganisms

研究代表者

片山 新太(katayama, arata)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授

研究者番号：60185808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：土壌・底質に分布する腐植物質の中で酸でもアルカリでも不溶の固体腐植ヒューミンが、ペンタクロロフェノール(PCP)を還元的に脱塩素する嫌気性微生物群の細胞外電子伝達物質として機能することを明らかにした。同じ土壌由来の腐植酸では機能しなかった。FT-IR、NMR、ESR、成分分析、サイクリックボルタンメトリ解析から、ヒューミンの酸化還元中心がキノン骨格および鉄錯体であることが推定された。還元型ヒューミンを電子供与体として、PCPを電子受容体として脱ハロゲン呼吸を行う新規なDehalobacter属細菌の存在が推定された。電子伝達はヒューミンと微生物細胞の間で直接行われていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Solid-phase humin, a fraction of humic substances in soil and sediment which is not soluble in any pH condition, was found to function as external electron mediator for the anaerobic consortium reductively-dechlorinating pentachlorophenol. The humic acids extracted from the same source did not support the pentachlorophenol dechlorination. The redox-reacting centers of humin were suggested to be quinone structure or iron-organic acid chelating complex, based on the analyses using FT-IR, NMR, ESR, cyclic voltammetry. It was suggested that a novel Dehalobacter sp., requiring reduced-form humin as electron donor and pentachlorophenol as electron acceptor for the organohalide respiration, was present in the enriched consortium. It was considered that the electrons transfer from humin to microbial cells directly.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：固体電子メディエータ 脱ハロゲン反応 芳香族ハロゲン化合物 酸化還元中心 細胞外電子伝達系

### 1. 研究開始当初の背景

有機ハロゲン化合物による土壌地下水汚染は、日本のみならず世界中で大きな環境問題となっている。各種溶剤として使われた脂肪族塩素化合物、絶縁体として使われたポリ塩化ビフェニル、非意図的に発生するポリ塩素化ダイオキシン類、近年環境中濃度が上昇しつつある難燃剤等の有機臭素化合物など様々な汚染が報告されている。これらの汚染は、しばしば広範囲の低濃度の土壌地下水汚染であり、安価で省エネルギーである微生物技術による浄化が有力視されている。

有機ハロゲン化合物の微生物浄化では、環境残留性と有害性を高める原因となっているハロゲンを取り除く「脱ハロゲン反応」が重要である。近年、嫌気微生物が還元的脱ハロゲン反応を行って増殖する(ATP生成とリンクしている)こと、そこでは有機ハロゲン化合物が嫌気微生物の電子伝達系(呼吸系)の最終電子受容体として使われて還元的脱ハロゲン反応が起こること(いわゆる「脱ハロゲン呼吸」)が解明され(Haeggbloom & Bossert 監修「Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications」Kluwer Academic Publishers, Boston 501pp. 2003)、脱ハロゲン呼吸を行う *Dehalococcoides* 属菌を利用した浄化技術が開発されている。しかし、その還元的脱ハロゲン反応の活性は、共存する細胞外電子メディエータに大きく影響を受けることが見いだされ(Van der Zee & Cervantes, *Biotechnology Advances*, 27: 256-277, 2009)、その実態と微生物との共役機構の解明が重要課題となっている。

これまでの水溶性物質(画分)に注目した研究によれば、キノン構造、アジン構造、コバルト等の有機金属構造を持つ物質が細胞外電子メディエータとして働くことが見いだされている。キノン構造を持つ水溶性物質アントラキノ-2,6-ジスルホン酸(AQDS)は研究例が多く、微生物がAQDSを還元して生成するアントラヒドロキノ-2,6-ジスルホン酸が、四塩化炭素やヘキサクロエタンの脱塩素反応を促進することが報告されている。また、腐植物質(フミン質)のキノン構造を有する水溶性画分が還元的脱塩素反応を促進する例も観察されている(例えば Kappler & Haderlein, *ES&T*, 37: 1714-2719, 2003 や、Wang ら *J. Hazard. Materials*, 164: 941-947, 2009)。このことは、嫌気微生物の電子伝達系と細胞外電子メディエータ間で電子を授受(共役)できれば、還元的脱ハロゲン反応を促進できることを示唆している。しかし一方で、AQDS や腐植物質によって四塩化ビフェニルの還元的脱塩素反応が完全に阻害された例(Cutter ら *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2966-2969, 1998)もある。このような違いが生じる理由は、まだ明らかにされていない。これは、還元的脱塩素反応における嫌気微生物と細胞外電子メディエータ間の電子授受機構が解明されていないためであり、細胞外電子メディエータの化学構造と機能に関し、更に詳細な研究が必要と指摘されている(Watanabe ら *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20:633-641, 2009)。

また、これらの研究の殆どは、水溶性物質に限られてきた。自然の地圏環境の細胞外電子メディエータとして期待される腐植物質は、その大半が水に不溶の固体である。従って、嫌気微生物と細胞外電子メディエータとの電子授受機構を解明し、地圏環境における脱ハロゲン化反応を促進するためには、腐植物質の固体電子メディエータ機能に関する研究が必要不可欠と考えられる。しかし、固体電子メディエータに関する研究は、殆ど手つかずのまま、残された課題となっている。

### 2. 研究の目的

これに対し、本研究代表者らは、ペンタクロロフェノール(PCP)を脱塩素化する嫌気集積培養物の脱塩素活性に関し、水田土壌が無いと失われること(Yoshida ら *Sci. Total Environ.*, 381:233-242, 2007)、多様な水田土壌に維持能力がみられること(Kim ら *Korean J. Environ. Agric.*, 23, 138-141, 2004)、更に、AQDS や水溶性腐植酸(Aldrich<sup>TM</sup> Humic acid)では維持できないが、水田土壌から抽出した非水溶性腐植物質(ヒューミン画分)では維持できること(未発表)を見いだした。これは、PCP 還元的脱塩素反応において、(1)水田の非水溶性画分中に固体電子メディエータとして働く特異的の化学構造があること、(2)その特異的の化学構造を持つ非水溶性有機物が広く水田環境中に分布していることを示唆している。そこで、本研究では、水田土壌中の固体電子メディエータの化学的実態と、その脱ハロゲン活性化機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (A) PCP 還元的脱塩素反応を高める水田土壌中に分布する固体電子メディエータの特異的の化学構造の解明

土壌に広く分布する固体電子メディエータは、キノン構造を持つ腐植成分と予想される一方で、水田土壌由来のペンタクロロフェノールを脱塩素する嫌気集積培養物では、モデル腐植物質としてしばしば用いられ、またキノン構造を持つAQDS や Aldrich<sup>TM</sup> Humic Acid では脱塩素活性が失われた(予備試験結果)。これまでに知られている電子メディエータには、キノン構造の他に、アジン構造およびシアノコバラミンの様な金属を活性中心とする有機金属が報告されている。固体電子メディエータの特異的構造を明らかにするために、以下の研究を行う。

- 各種土壌およびモデル化合物の PCP 脱塩素活性の維持能力の評価
- 脱塩素活性を高める土壌画分の化学的解析
- 脱塩素活性を高める土壌抽出画分の共通構造を持つモデル化合物の合成と脱塩素活性維持能力の評価

#### (B) 固体電子メディエータの還元的脱塩素反応における役割の解明

嫌気微生物と固体電子メディエータが電子授受を行う際に、電子受容体および電子供与体の

二つの機能が予想される。ペンタクロロフェノール還元的脱塩素反応において、酸化型および還元型の固体電子メディエータを用いて、PCP脱塩素嫌気微生物にとっての電子受容体なのか、電子供与体なのかを明らかにする。

#### (C) 固体電子メディエータと微生物間の電子授受メカニズムの解明

固体電子メディエータが働くためには、単なる電子の授受だけでなく、細胞表面の電子伝達系との電子輸送メカニズムが必要である。そこで、以下の2点を解析する。

- 走査型電子顕微鏡観察による微生物の付着状態の解明
- 固体電子メディエータの電子輸送メカニズムの解析

#### 4. 研究成果

##### (A) PCP 還元的脱塩素反応を高める水田土壌中に分布する固体電子メディエータの特異的分子構造の解明

- 各種土壌およびモデル化合物の PCP 脱塩素活性の維持能力の評価  
腐植酸、ヘマチン、ヘミン、リボフラビン、ナフトキノン、ハイドロキノン、ビタミン B12 は、いずれも嫌気性微生物の PCP 還元的脱塩素反応を維持できなかった。一方、固体腐植ヒューミンは異なる土壌由来および底質由来のものも PCP 還元的脱塩素反応を維持した。
- 脱塩素活性を高める土壌画分の化学的解析

腐植酸（殆ど灰分を含まない）とヒューミン（灰分 50%以上）の FT-IR による分析（有機物部分の官能基解析）では明快な違いは見られなかった。固体腐植ヒューミンの PCP 脱塩素反応を指示する電子伝達能力は、30%過酸化水素水 30 分、0.1N 塩酸 48 時間、0.1N 塩酸ヒドロキシルアミン 48 時間、0.1M の 4 水素化ホウ素ナトリウム 15 時間、121 加熱 30 分でも、電子伝達能力は失われなかった。

固体腐植ヒューミンの特徴的な構造にはアリルカルボニル基があることが FT-IR および NMR スペクトルから推定された。アルカリ条件で ESR シグナルが増加することから、おそらくキノン構造が酸化還元中心の一つと考えられた。元素分析では、コバルトと鉄の含量が高かった。有機無機複合体が電子伝達に関与している可能性もあるが、ここでは有機無機複合体による電子伝達能の有無に関する結論は得られなかった。

- 脱塩素活性を高める土壌抽出画分の共通構造を持つモデル化合物の合成と脱塩素活性維持能力の評価

ハイドロキノン重合物を合成したが、PCP 脱塩素反応を指示しなかった。固体腐植ヒューミンの電子伝達能を示す官能基は不明のまま課題として残った。

一方で腐植酸を硫酸鉄(II)とゆっくり反応させて得られる黒色粉末が PCP 脱塩素活性を高めることを見出した。鉄画分を分かくして PCP 脱塩素活性の有無を調べた。すると、

ピロリン酸処理によって電子伝達能力が失われた。従って、ピロリン酸で抽出される鉄錯体が電子伝達に関与していることが推察された。

##### (B) 固体電子メディエータの還元的脱塩素反応における役割の解明

4 水素化ホウ素ナトリウムを用いて、固体腐植ヒューミンを化学的に還元し、炭素源を抜いた培養系における PCP 脱塩素反応に及ぼす影響を調べたところ、反応速度はやや低下するが PCP 脱塩素反応が進んだ。このことは、PCP 脱塩素微生物が直接的に電子を固体腐植ヒューミンから受け取った（ヒューミンは酸化される）ことを示唆している。また、固体腐植ヒューミンが電子供与体として酸化されることから、固体腐植ヒューミンを還元する微生物も存在すると思われる。このような電子を媒介とした嫌気性微生物は固体腐植ヒューミンが支える細胞外電子伝達系によって生物-非生物ネットワークが土壌中に形成されていることを示している。

##### (C) 固体電子メディエータと微生物間の電子授受メカニズムの解明

- 走査型電子顕微鏡観察による微生物の付着状態の解明

走査型電子顕微鏡で観察すると、固体腐植ヒューミンがサンプル調整時の乾燥過程で縮んでしまい、無機結晶鉱物（おそらくは 1:1 型粘土鉱物）のみが観察され微生物細胞は殆ど観られなかった。そこで、エチジウムブロミド染色を行って蛍光顕微鏡で観察したところヒューミンの膨潤性の有機物の上に微生物細胞が点在して付着していることが観察された。このことは、固体腐植ヒューミンは微生物の棲み場所として機能するとともに、微生物が付着することによって固体腐植ヒューミンとの電子授受を可能としているらしいことが、明らかとなった。

- 固体電子メディエータの電子輸送メカニズムの解析

輸送メカニズムについて考察した。固体腐植ヒューミン無しでは PCP 脱塩素反応が起きないことから、脱塩素微生物群から電子伝達物質が分泌されて電子伝達を行っている可能性は低い。これまでに知られているメカニズムは電気伝導性繊維毛によるものか C 型チトクロームの直接接触によるものが報告されているが、ヒューミンの場合はどのような電子伝達メカニズムを採るのかは不明であった。ヒューミン上に増殖が観察される微生物は、新規な *Dehalobacter* 属細菌であることが推察された。

#### 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 8 件)

- 1) Chunfang Zhang, Arata Katayama (2012) Humin as an electron mediator for microbial reductive dehalogenation, Environmental

- Science and Technology, 46, 6575-6583, DOI: 10.1021/es3002025
- 2) Chunfang Zhang, Daisuke Suzuki, Zhiling Li, Lizhen Ye, Arata Katayama (2012) Polyphasic characterization of two microbial consortia with wide dechlorination spectra for chlorophenols, Journal of Bioscience and Bioengineering, 114(5), 512-517, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.05.025
  - 3) Zhiling Li, Yasushi Inoue, Daisuke Suzuki, Lizhen Ye and Arata Katayama (2012) Long-term anaerobic mineralization of pentachlorophenol in a continuous-flow system using only lactate as an external nutrient, Environmental Science and Technology, 47, 1534-1541, DOI: 10.1021/es303784f
  - 4) Daisuke Suzuki, Daisuke Baba, Velayudhan Satheja Santhi, Robinson David Jebakumar Solomon, and Arata Katayama, (2013) Use of a glass bead-containing liquid medium for efficient production of a soil-free culture with polychlorinated biphenyl-dechlorination activity, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29, 1461-1471 DOI: 10.1007/s11274-013-1310-8
  - 5) Zhiling Li, Daisuke Suzuki, Chunfang Zhang, Naoko Yoshida, Suyin Yang, and Arata Katayama (2013) Involvement of *Dehalobacter* spp. in the anaerobic dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol, Journal of Bioscience and Bioengineering, 116(5), 602-609, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.009
  - 6) Chunfang Zhang, Zhiling Li, Daisuke Suzuki, Lizhen Ye, Naoko Yoshida, and Arata Katayama (2013) A humin-dependent *Dehalobacter* species is involved in reductive debromination of tetrabromobisphenol A, Chemosphere, 92, 1343-1348. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.051
  - 7) Suyin Yang, Yasushi Inoue, Arata Katayama (2013) Effects of lactate and sulfate concentration ratios on the anaerobic mineralization of pentachlorophenol (PCP) in a combined PCP-dechlorinating and phenol-degrading culture, Research Journal of Biotechnology 8(9): 4-9.
  - 8) Zhiling Li, Daisuke Suzuki, Chunfang Zhang, Suyin Yang, Naoko Yoshida, and Arata Katayama, (2014) Anaerobic 4-chlorophenol mineralization in an enriched culture under iron-reducing conditions, Journal of Bioscience and Bioengineering, in press, 10.1016/j.jbiosc.2014.04.007
- 〔学会発表〕(計 19 件)
- 1) Arata Katayama, Naoko Yoshida, Atsuchi Shibata, Daisuke Baba, Suyin Yang, Zhiling Li, Hyou-Ken Kim, Chunfang Zhang, and Daisuke Suzuki (2011) Anaerobic degradation of aromatic compounds by microorganisms in paddy field, KSEA's 30th Anniversary International Symposium on Environment and Food Safety for the Future Generation, the international Convention Center Jeju, Korea, July 7 to 9, 2011 (Invited)
  - 2) Chunfang Zhang, Lizhen Ye, Zhiling Li, Daisuke Suzuki, Toyoko Demachi, and Arata Katayama, (2011) Characterization of microbial community dechlorinating PCP to phenol with the presence of soil. The 4th IWA-ASPIRE Tokyo, Japan. Oct 2-6, 2011. (Oral)
  - 3) Zhiling Li, Yasushi Inoue, Takuya Mizoguchi, Yohei Simizu, Naoko Yoshida and Arata Katayama (2011) Simulation of the reductive dechlorination processes in a lab-scale anaerobic biobarrier with the enriched TCP dechlorination consortium. The 7<sup>th</sup> International Conference on Environmental Anaerobic Technologies and Bioenergy, Tianjin University, Tianjin, China, November 12-13, 2011. (Oral)
  - 4) Zhiling Li, Suyin Yang, Daisuke Suzuki, and Arata Katayama (2011) Enrichment of 4-chlorophenol-degrading culture under both iron-reducing and sulfate-reducing conditions. International Symposium on EcoTopia Science 2011, Nagoya University, Nagoya, Japan, Dec. 9-11 2011. (Oral)
  - 5) Chunfang Zhang, Zhiling Li, Daisuke Suzuki, and Arata Katayama. (2011) Microbial reductive debromination of Tetrabromobisphenol A. 第 14 回水環境学会シンポジウム. 2011 年 9 月 10-11 日、仙台 (Oral)
  - 6) Zhiling Li, Yasushi Inoue, Daisuke Suzuki, Arata Katayama. (2011) The microbial spatial distribution in a long-term maintained biobarrier for pentachlorophenol (PCP) anaerobic mineralization. 第 14 回水環境学会シンポジウム. 2011 年 9 月 10-11 日、仙台 (Oral)
  - 7) Chunfang Zhang, Daisuke Suzuki, Zhiling Li, Lizhen Ye, and Arata Katayama (2012) Polyphasic characterization of two anaerobic microbial consortia dechlorinating wide spectra of phenols with lower levels of chlorination, WET2012 Water and Environment Technology Conference, June 28-30, 2012. The University of Tokyo, Tokyo, Japan.
  - 8) Chunfang Zhang, Zhiling Li, Daisuke Suzuki, Lizhen Ye, Naoko Yoshida and

- Arata Katayama (2012) Characterization of a *Dehalobacter*-dominating consortium that debrominates Tetrabromobisphenol A” The power of the small-the 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology –ISME-14, The Bella Center , Copenhagen Denmark, 19-24 August 2012 (poster)
- 9) Daisuke Suzuki, Arata Katayama (2012) Characteristics of a 4-chlorophenol degrading, sulfate-reducing bacterium isolated from a river sediment contaminated with chlorinated solvents, The power of the small-the 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology –ISME-14, The Bella Center , Copenhagen Denmark, 19-24 August 2012 (poster)
- 10) Zhiling Li, Daisuke Suzuki, Chunfang Zhang, Arata Katayama. (2012) A novel *Dehalobacter* sp. is involved in anaerobic dechlorination of Trichlorophenol (TCP). The 15th International biotechnology Symposium and Exhibition (IBS). Sep 16-21, 2012, Daegu, Korea (Oral)
- 11) Zhiling Li, Yasushi Inoue, Daisuke Suzuki, Lizhen Ye and Arata Katayama. (2012) Long-term Anaerobic Mineralization of PCP in a Continuous-Flow System Using Only Lactate as an External Nutrient, the 4<sup>th</sup> International Conference on Soil Pollution and Remediation (SOILREM 2012), 23-26 September, 2012, Yantai, China (Oral)
- 12) Arata Katayama, Zhiling Li., Chunfang Zhang, Dongdong Zhang, Suyin Yang, and Daisuke Suzuki (2012) Microbial cofinment technology of groundwater contaminated with halogenated organic pollutants, First International Symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-1), November 11-13, 2012, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan (Invited)
- 13) Chunfang Zhang, Zhiling Li., Daisuke Suzuki, and Arata Katayama. (2012) Microbial reductive dechlorination of pentachlorophenol mediated by humin, First International Symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-1), November 11-13, 2012, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan (poster)
- 14) Zhiling Li., Daisuke Suzuki, Chunfang Zhang, Yasushi Inoue, and Arata Katayama. (2012) Spatial distribution of functional populatioins in a long-term maintained column for pentachlorophenol (PCP) anaerobic mineralization, First International Symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-1), November 11-13, 2012, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan (poster)
- 15) Daisuke Suzuki, Zhiling Li., Chunfang Zhang, and Arata Katayama. (2012) Influence of electron donors and electron acceptors on the 3-chlorophenol dechlorination activity of anaerobic enrichment culture, First International Symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-1), November 11-13, 2012, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan (poster)
- 16) Arata Katayama (2013) Anaerobic organohalide degradation by multiple microbial species for bioremediation, Launching Ceremony of IWA China Anaerobic Digestion Committee & Sino-Dutch AD Technology Workshop, 6<sup>th</sup> May 2013, Harbin Institute of Technology, Harbin, China (Invited)
- 17) Chunfang Zhang, Lizhen Ye, Toyoko Demachi, Daisuke Suzuki, and Arata Katayama (2013) Towards an Understanding of the Role of Humin as a Solid-phase Electron Mediator for Anaerobic Respiration, the 21<sup>st</sup> International Symposium on Environmental Biogeochemistry, October 13-18<sup>th</sup>, 2013, Wuhan, China (ISEM2013)
- 18) Dongdong Zhang, Chunfang Zhang, Zhiling Li, Daisuke Suzuki, and Arata Katayama (2013) Electron Transfer from a Graphite Electrode Assisted by Solid-Phase Electron Mediator (humin) Immobilization Enhances Microbial Reductive Dechlorination of Pentachlorophenol, International Symposium on EcoTopia Science 2013, December 13-15, 2013, Nagoya University, Nagoya, Japan
- 19) Chunfang Zhang, Dongdong Zhang, Zhiling Li, Tetsuji Akatsuka, Suying Yang, Daisuke Suzuki, and Arata Katayama (2013) Insoluble iron-humate complex as an electron mediator for microbial reductive dechlorination, 第29回日本微生物生態学会、2013年11月23日～24日、鹿児島大学、日本

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:電子伝達システムおよびその用途  
 発明者:片山新太、章春芳、張冬冬、李智灵、鈴木大典  
 権利者:名古屋大学  
 種類:特願  
 番号:2013-158394  
 出願年月日:2013年7月31日  
 国内外の別:国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山新太(名古屋大学エコトピア科学研究  
所・教授)

研究者番号：60185808

(2)研究分担者

鈴木大典(名古屋大学エコトピア科学研究  
所・助教)

研究者番号：10591076