

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340084

研究課題名(和文)チオ化フェニルヒ素化合物の環境動態の解明

研究課題名(英文)Environmental fate of thionated phenylarsenical compounds

研究代表者

原田 直樹 (HARADA, NAOKI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：50452066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ジフェニルアルシン酸(DPAA)のチオ化に関与する嫌気微生物としてDesulfotomaculum acetoxidans DEA14株を単離した。既知の硫酸還元菌であるDesulfovibrio aerotolerans JCM 12613TもDPAAをチオ化したことから、フェニルヒ素化合物のチオ化は硫酸還元菌によるH<sub>2</sub>S生成に伴う反応と推定された。DPAA以外の様々なフェニルヒ素化合物もH<sub>2</sub>Sと反応し、チオ化物が生成することを明らかにした。イネをDPAA模擬汚染土壌で栽培した結果、ジフェニルチオアルシン酸は土壌や根でのみ認められ、イネ地上部では部位毎に異なるフェニルヒ素化合物が検出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we isolated Desulfotomaculum acetoxidans strain DEA14, which could anaerobically transform diphenylarsinic acid (DPAA) to diphenylthioarsinic acid (DPTA). A known sulfate-reducing bacterial strain, Desulfovibrio aerotolerans JCM 12613T could also transform DPAA to DPTA. The findings suggest that H<sub>2</sub>S produced by sulfate-reducing bacteria has a role in thionation of DPAA under anaerobic soil conditions. In addition, we confirmed that other phenylarsenicals, such as diphenylmethylarsine oxide and phenylarsonic acid, could be thionated by reaction with H<sub>2</sub>S. Uptake of phenylarsenicals in rice was also investigated under flooded conditions. At the harvest, DPTA was found in the soil and root samples. In the leaf, stem and brown rice samples, As(V), DPMAO, PMAA and/or DPAA were detected. The results indicate that arsenical species found in rice vary at different parts and the aerial parts of rice contain no DPTA.

研究分野：土壌学、土壌微生物学

キーワード：ジフェニルアルシン酸 チオ化 硫酸還元菌 嫌氣的微生物変換 水稻

### 1. 研究開始当初の背景

ジフェニルアルシン酸(DPAA)は、遺棄化学兵器に含まれるジフェニルクロロアルシン(CLARK I)やジフェニルシアノアルシン(CLARK II)の合成原料であるとともに、これらのフェニルヒ素化合物から環境中で容易に生成される代謝産物でもある。そのため、これら化学兵器の遺棄現場周辺の地下水や土壌、堆積物中では、加水分解や酸化を経て生成した DPAA がよく検出される[1]。これは DPAA が中程度の難分解性物質であり、DPAA の形態で環境中に留まりやすいことを示している。日本においても、2003 年に茨城県神栖市の飲用井戸水から高濃度の DPAA が検出され、近隣住民に健康被害を与えた[2]他、地下水を灌漑水とした周辺水田で栽培されたイネのヒ素汚染も判明した。

フェニルヒ素化合物の土壌中での代謝経路については、上記の神栖市での中毒事件の後、主に DPAA を中心に調べられた[3-6]。現地土壌調査では DPAA の他、phenylarsonic acid (PAA)や bis(diphenylarsine)oxide (BDPAO)が検出され、さらに methylphenylarsinic acid (MPAA)、dimethylphenylarsine oxide (DMPAO)、diphenylmethylarsine oxide (DPMAO)及び無機ヒ素も検出された。神栖市の汚染水田土壌を用いたポット実験や室内モデル実験の結果から、DPAA が土壌中で脱フェニル及びメチル化し、上記の代謝物が生成すること、嫌気条件では好気条件より DPAA が速く変換されることが示された。

我々の最近の研究において、嫌気条件における DPAA の代謝は土壌に易分解性有機物を添加することで促進されるが、その効果は土壌によって大きく異なること、 $\text{SO}_4^{2-}$  を有機物と共に添加して硫酸還元を誘導すると DPAA 濃度が著しく減少し、主たる代謝物として未知ヒ素化合物が生成することを明らかにした[7]。その後、この未知ヒ素化合物を diphenylthioarsinic acid (DPTA)と同定し、土壌環境中でフェニルヒ素化合物がチオ化される現象を初めて見出した[8]。

フェニルヒ素化合物の変換を担う微生物としては、DPAA を好氣的に脱フェニルし無機化する *Kytococcus sedentarius* NK0508 株[9]や *Shinorhizobium* sp. L2406 株[10]が DPAA 汚染土壌から単離されている。一方、嫌気条件では好気条件より容易に DPAA の微生物変換が起きるが、チオ化を担う微生物についての報告はまだない。また、チオ化したヒ素は元化合物より毒性が高いとされることから、様々なフェニルヒ素化合物からのチオ化物生成の有無とその植物への影響について検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1)嫌気条件における DPAA 変換微生物の単離、及び(2)フェニルヒ素化合物のチオ化物生成の可能性の検証、及び(3)フェニルヒ素化合物の水稲への吸収について明

らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) DPAA のチオ化に關与する嫌気性微生物の単離と同定

土壌及び稲わら

新潟大学五十嵐キャンパス内の圃場(休耕地)から表層 10 cm の土壌(砂丘未熟土)を採取して風乾し、2 mm メッシュの篩を通した後に実験に供した。稲わらは新潟大学農学部附属フィールド科学教育研究センター新通ステーション(新通 ST)で採取したものを粉末化して用いた。

土壌培養

100 mL 容三角フラスコに風乾土 20 g、脱イオン水 30 mL、 $\text{K}_2\text{SO}_4$  425  $\mu\text{g-S g-乾土}^{-1}$ 、の他、炭素源として 3.5 mg-C g-乾土<sup>-1</sup>相当の稲わら粉末を加えた。これに 10  $\mu\text{g-As g-乾土}^{-1}$ 相当の DPAA を添加して封をした。

DPAA の定量とヒ素種同定

培養土壌中の DPAA 濃度は Guan et al. [7]の方法に従って求めた。

有機ヒ素の化学形態分析には LC-ICP-MS (Prominence series, Shimadzu + X series 2, Thermo Fisher Scientific)を用い、その詳細は Hisatomi et al. [8]と同様とした。

DPAA 変換微生物の獲得

五十嵐土壌から、DPAA の嫌気的変換に關与する微生物の単離を限界希釈法と嫌気平板培養法を用いて試みた。まずは DPAA を DPTA に変換可能な微生物コンソーシアを複数獲得し、これらから DPAA のチオ化に關与する単離株のコロニー分離を行った。コンソーシアや単離株の DPAA 変換能の検定は DPAA を加えた MM 培地 (pH7.0) で嫌気培養して行った。なお、MM 培地の組成は次の通りであった：1 l あたり、1.2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 ml 微量元素溶液及び 10 ml ビタミン溶液。

単離した DPAA 変換株については、遺伝子分類学的同定に供した。

(2) フェニルヒ素化合物のチオ化物生成の可能性の検証

DPMAO、DMPAO、PMAA および PAA の 100 ppm 溶液を作製した。バイアル瓶に 2-2.5 ml の各ヒ素化合物溶液と 1 mL の 50 mM 硫化ナトリウム溶液、及び 6.5~7.0 mL の超純水を加えた後、少量の硝酸を添加して pH7 とし、 $\text{H}_2\text{S}$  を発生させた。これを密封して 4 日間放置し、フェニルヒ素化合物と  $\text{H}_2\text{S}$  の反応液を得た。それぞれの反応液をメンブレンフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) で濾過後、LC/TOF-MS を用いて得られたピークの精密質量分析を行い、反応生成物の構造推定を行った。分離に用いた溶離液の条件を表 1 に示す。

(3) フェニルヒ素化合物の水稲への吸収模擬汚染土壌の調製

新通 ST の水田圃場より採取したグライ土に適当な濃度の DPAA 溶液を添加して模

表 1 LC-ICPMS の溶離液条件

対象物質	溶離液割合
DPMAO	0.1%ギ酸:0.1%ギ酸メタノール=50:50
DMPAO	0.1%ギ酸:0.1%ギ酸メタノール=50:50
PMAA	10 mMアンモニア水:メタノール=95:5
PAA	10 mMアンモニア水:メタノール=95:5

擬汚染土壌を作製した (0.5-0.6 mg-As /kg-土壌)。

#### 水稻栽培

2.5 kg の模擬汚染土壌 (DPAA 添加区) あるいは健全土壌 (対照区) を 1/5000 a ワグネルポットに入れ、基肥として硫酸アンモニウム (0.08 g-N) とリン酸一水素カリウム (0.15 g-K, 0.06 g-P) を添加した。これに水道水を加えて湛水し、よく混合後、イネ幼苗 (品種: コシヒカリ) を 2 本移植した。ポットは各条件について n=3 で用意し、温室で栽培した。なおポットの内にメッシュで底に蓋をした塩ビ管に土壌を充填したものを三本用意し、これらを垂直に埋め込んで非根圏区とした。サンプリングまでの期間は常に湛水状態を維持した。

#### 試料採取

栽培期間終了後、イネは水面から約 5 cm 上部から切断し収穫した。その後、玄米、モミ穀、葉、茎の部位に分け、4 暗所にて保存した。非根圏土壌は塩ビ管内から採取し、根圏土壌は根と混合した状態で採取した。土壌試料は直ちに空気が入らないようビニール袋に詰め、さらにアネロパックに入れて窒素パージした状態で 4 の暗所において保存した。また、イネ根は収穫後に移植ごてを用いて株ごと掘り出し、水道水で洗浄した後ビニール袋に詰め、4 の暗所にて保存した。

#### 総ヒ素濃度の定量

土壌は 180  $\mu\text{m}$  のふるいに通した後、根および茎、葉は 5 mm 程度に切断後、また玄米および籾殻はそのまま分析に供試した。土壌、根、玄米、籾殻は 0.3 g、茎及び葉は 0.1 g 用いてマイクロウェーブ法によって硝酸分解した後、ICP-MS を用いて分解液中のヒ素濃度を求め、各試料の総ヒ素濃度を算出した。

#### 有機ヒ素の抽出と定量

分析サンプルの調製作業は、空気中の酸素による酸化を防ぐため、窒素ガスでパージした嫌気グローブバック内で行った。根圏土壌と非根圏土壌は 180  $\mu\text{m}$  のふるいを通して土壌中の根や大きめの土壌粒子などを取り除いた。玄米は乳鉢と乳棒を用いて粉碎し、粉末状とした。葉及び茎ははさみで 3 mm 角程度に切断し、液体窒素をかけながら乳棒ですりつぶした後に 300  $\mu\text{m}$  のふるいに通した。

これらの試料から 70%メタノールを用いて試料中のヒ素化合物を抽出した。作業はすべて窒素パージしたグローブバック内で嫌气的に行った。土壌試料は 1~2 g、根は約 1 g、葉、茎、玄米は約 0.5 g を 30 mL 容マイクロ

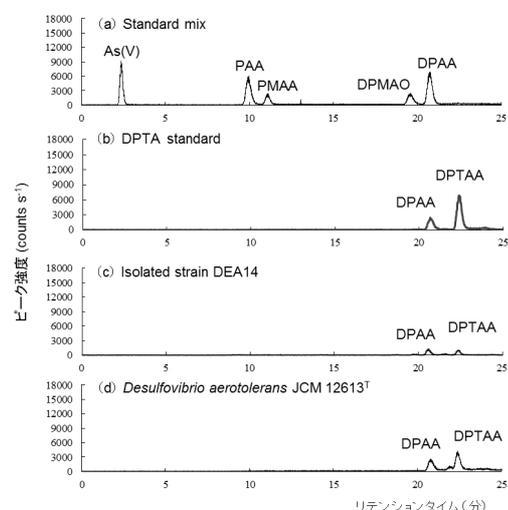


図 1 LC-ICPMS を用いて得られたクロマトグラム。(a) 標準試料 (5  $\mu\text{g-As/L}$  AsV, 2  $\mu\text{g-As/L}$  PMAA, 5  $\mu\text{g-As/L}$  PAA, 4  $\mu\text{g-As/L}$  DPMAO, 5  $\mu\text{g-As/L}$  DPAA)、(b) DPTA 標準試料、(c) *Desulfotomaculum acetoxidans* DEA14 株培養液、(d) *Desulfovibrio aerotolerans* JCM12613<sup>T</sup> 株培養液

波・試料分解用の PFA 容器に取り、70% (v/v) メタノール 5 mL を加えて軽く攪拌した。PFA 容器を超音波洗浄器にて 3 時間、ヒ素化合物を抽出した。抽出開始時の超音波洗浄器の湯浴温度は 50 程度とした。抽出後、グローブバッグ内で PFA 容器内の抽出液をメンブレンフィルター (ADVANTEC, Tokyo, Japan) にてろ過 (植物体試料は 0.45  $\mu\text{m}$ 、土壌試料は 0.2  $\mu\text{m}$ ) し、ろ液をヒ素形態分析用試料とした。

## 4. 研究成果

### (1) DPAA のチオ化に關与する嫌気性微生物の単離と同定

嫌気培養装置を用いた単コロニー分離の結果、DPAA をチオ化してジフェニルチオールシン酸 (DPTA) を生成する DEA14 株を得た (図 1c)。DEA14 株は遺伝子分類学的な検討の結果、*Desulfotomaculum acetoxidans* と同定された。硫酸還元菌の既知株である *Desulfovibrio aerotolerans* JCM 12613<sup>T</sup> についてその DPAA の嫌气的変換能を調べた結果、DEA14 株同様に DPAA を DPTA に変換した (図 1d)。

以上のことからフェニルヒ素化合物のチオ化は硫酸還元菌による硫化水素の生成に伴って生じる反応であることが明らかとなった。

### (2) フェニルヒ素化合物のチオ化物生成の可能性の検証

#### DPMAO の場合

DPMAO-H<sub>2</sub>S 反応液を LC/TOF-MS で分析した結果、DPMAO 及び DPMAO のチオ化物

の H<sup>+</sup>付加物と推定されるピークがそれぞれ保持時間(t<sub>R</sub>)=3.7分及び9.2分に認められ、後者は質量電荷比(m/z)=277に主イオンを有するスペクトルを有した。精密質量分析の結果、このピークの精密質量はm/z=277.00386と、推定組成式<sup>12</sup>C<sub>13</sub><sup>1</sup>H<sub>14</sub><sup>75</sup>As<sub>1</sub><sup>32</sup>S<sub>1</sub>との差は0.64 mmuとわずかであった。よって、DPMAOはH<sub>2</sub>Sと反応してチオ化し、ジフェニルメチルチオアルシンオキシドを生成すると結論付けられた。

#### DMPAOの場合

DMPAO-H<sub>2</sub>S反応液をLC/TOF-MSで分析した結果、DMPAO及びDMPAOのチオ化物のH<sup>+</sup>付加物と推定されるピークがそれぞれt<sub>R</sub>=6.9分及び3.4分に認められ、後者はm/z=215に主イオンを有するスペクトルを有した。このピークの精密質量はm/z=214.98728と、推定組成式<sup>12</sup>C<sub>8</sub><sup>1</sup>H<sub>12</sub><sup>75</sup>As<sub>1</sub><sup>32</sup>S<sub>1</sub>との差は0.29 mmuとわずかであった。よって、DPMAOはH<sub>2</sub>Sと反応してチオ化し、ジメチルフェニルチオアルシンを生成すると結論付けられた。

#### PMAAの場合

PMAA-H<sub>2</sub>S反応液をLC/TOF-MSで分析した結果、PMAA及びPMAAのチオ化物、ジチオ化物のH<sup>+</sup>付加物と推定されるピークがそれぞれt<sub>R</sub>=1.8、1.9及び2.2分に認められた。t<sub>R</sub>=1.9及び2.2分のピークはそれぞれm/z=217及び233に主イオンを有するスペクトルを有した。精密質量分析の結果、これらのピークの精密質量はm/z=216.96501及び232.94320となり、前者と推定組成式<sup>12</sup>C<sub>7</sub><sup>1</sup>H<sub>10</sub><sup>75</sup>As<sub>1</sub><sup>16</sup>O<sub>1</sub><sup>32</sup>S<sub>1</sub>との差は1.82 mmu、後者と<sup>12</sup>C<sub>7</sub><sup>1</sup>H<sub>10</sub><sup>75</sup>As<sub>1</sub><sup>32</sup>S<sub>2</sub>との差は0.79 mmuとわず

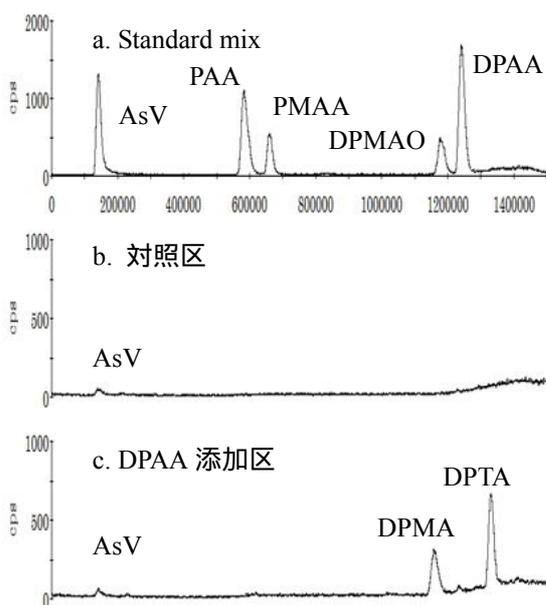


図2 栽培後の土壌試料に含まれるヒ素種の化学形態分析(LC-ICPMS)。(a)標準試料(図1と同じ)、(b)対照区、(c)DPAA添加区

かであった。よって、PMAAはH<sub>2</sub>Sと反応してチオ化してフェニルメチルチオアルシン酸を生成し、さらにその一部はジチオ化してフェニルメチルジチオアルシンが生成されると結論付けられた。

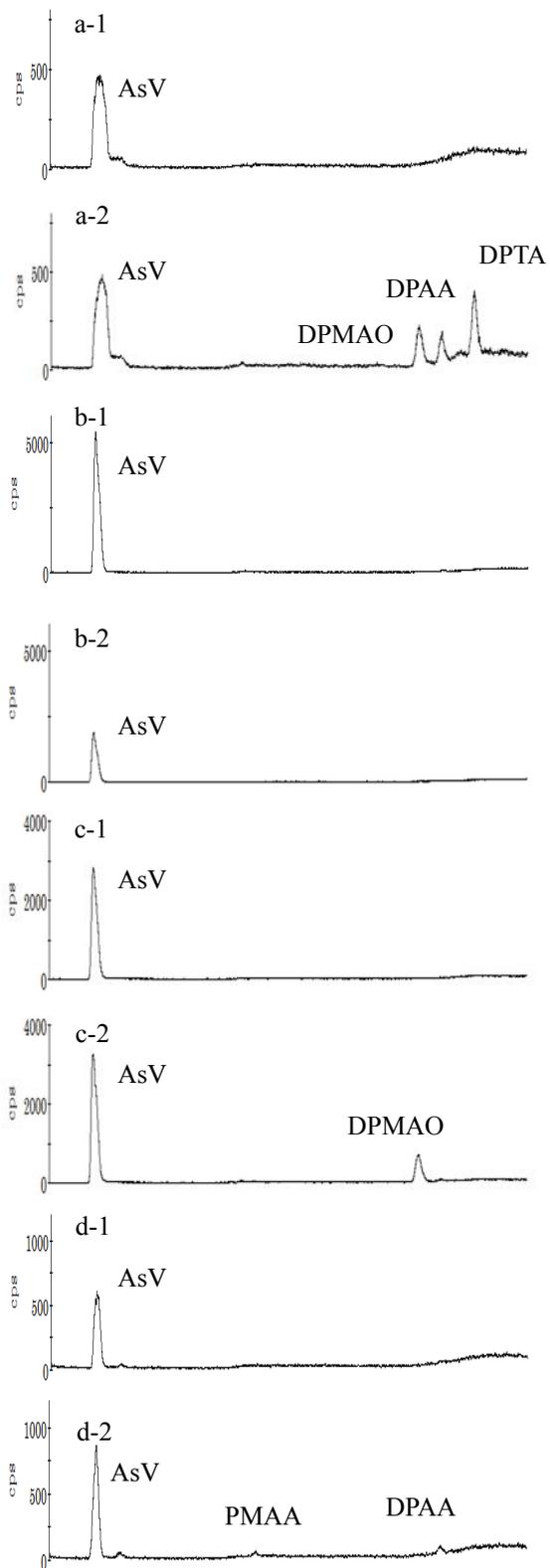


図3 栽培後の水稻試料に含まれるヒ素種の化学形態分析(LC-ICPMS)。(a)根試料、(b)茎試料、(c)葉試料及び(d)玄米試料。いずれも、1)対照区、2)DPAA添加区

## PAA

PAA-H<sub>2</sub>S 反応液を LC/TOF-MS で分析した結果、PAA 及び PAA のチオ化物の H<sup>+</sup>付加物と推定されるピークは t<sub>R</sub>=1.4 及び 1.8 分に認められ、後者は m/z=219 に主イオンを有するスペクトルを有した。精密質量分析の結果、このピークの精密質量は m/z=218.94610 となり、推定組成式 <sup>12</sup>C<sub>6</sub><sup>1</sup>H<sub>8</sub><sup>75</sup>As<sub>1</sub><sup>16</sup>O<sub>2</sub><sup>32</sup>S<sub>1</sub> との差は 1.04 mmu とわずかであった。よって、PAA は H<sub>2</sub>S と反応してチオ化し、フェニルチオアルシン酸を生成すると結論付けられた。

### (3) フェニルヒ素化合物の水稲への吸収

#### 土壤中の総ヒ素濃度と形態分析

イネ収穫後の土壤中の総ヒ素濃度を表 2 に示す。根圏土壌では非根圏土壌と比較して総ヒ素濃度が小さい傾向が見られた。また、イネ栽培後の DPAA 汚染土壌の主たるフェニルヒ素化合物は DPMAO であったことが報告されている[5]が、本研究の結果、DPMAO に加えて DPTA も生成することが明らかとなった(図 2)。

#### イネ植物体中の総ヒ素濃度と形態分析

イネ植物体中の総ヒ素濃度は表 2 に示すとおり、根 > 葉 > 茎 > 玄米の順となった。

図 3 に示す通り、根では主に As(V)、DPMAO、DPTA 及び DPAA が検出された。茎では As(V)が、葉では As(V)に加えて DPMAO が、玄米では As(V)に加えて低濃度の DPAA と PMAA が検出された。このようにイネ植物体で検出されるフェニルヒ素化合物の種類は部位によって異なった。また、土壌中で生成する DPTA は根のみで検出され、地上部では認められなかった。

表 2 ポット試験:土壌及びイネ植物体の総ヒ素濃度(mg-As · kg<sup>-1</sup>)

	汚染区	対照区
根圏土壌	11.0±0.3	10.4±0.3
非根圏土壌	13.1±0.5	13.3±0.7
根	282±3	213±29
葉	29.1±1.3	34.5±7.8
茎	9.7±0.2	12.0±2.8
玄米	1.3±0.6	1.4±0.1

### < 引用文献 >

- [1] Haas R, Schmidt TC, Steinbach K, von Low E (1998) Chromatographic determination of phenylarsenic compounds. *Fresenius J Anal Chem* 361:313-318
- [2] Ishii K, Tamaoka A, Otsuka F, Iwasaki N, Shin K, Matsui A, Endo G, Kumagai Y, Ishii T, Shoji S, Ogata T, Ishizaki M, Doi M, Shimojo N (2004) Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan. *Ann Neurol* 56:741-745

[3] Ishizaki M, Yanaoka T, Nakamura M, Hakuta T, Ueno S, Komuro M, Shibata M, Kitamura T, Honda A, Doy M, Ishii K, Tamaoka A, Shimojo N, Ogata T, Nagasawa E, Hanaoka S (2005) Detection of bis(diphenylarsine)oxide, diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid, compounds probably derived from chemical warfare agents, in drinking well water. *J Health Sci* 51:130-137

[4] Baba K, Arai T, Maejima Y, Watanabe E, Eun H, Ishizaki M (2008) Arsenic speciation in rice and soil containing related compounds of chemical warfare agents. *Anal Chem* 80:5768-5775

[5] Arai T, Maejima Y, Baba K (2009) Uptake of aromatic arsenicals from soil contaminated with diphenylarsinic acid by rice. *Environ Sci Technol* 43:1097-1101

[6] Maejima Y, Arai T, Baba K (2011) Transformation of diphenylarsinic acid in agricultural soils. *J Environ Qual* 40:76-82

[7] Guan L, Hisatomi S, Fujii K, Nonaka M, Harada N (2012) Enhanced transformation of diphenylarsinic acid in soil under sulfate-reducing conditions. *J Hazard Mater* 241-242:355-362

[8] Hisatomi S, Guan L, Fujii K, Nonaka M, Harada N (2013) Formation of diphenylthioarsinic acid from diphenylarsinic acid under anaerobic sulfate-reducing soil conditions. *J Hazard Mater* 262:25-30

[9] Kuroda K, Yoshida K, Yoshimura M, Endo Y, Wanibuchi H, Fukushima S, Endo G (2005) Microbial metabolite of dimethylarsinic acid is highly toxic and genotoxic. *Toxicol Appl Pharmacol* 198:345-353

[10] Nakamiya K, Nakayama T, Ito H, Edmonds JS, Shibata Y, Morita M (2007) Degradation of arylarsenic compounds by microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 274:184-188

[11] Harada N, Takagi K, Baba K, Fujii K, Iwasaki A (2010) Biodegradation of diphenylarsinic acid to arsenic acid by novel soil bacteria isolated from contaminated soil. *Biodegradation* 21:491-499

### 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 2 件)

Guan L, Shiiya A, Hisatomi S, Fujii K, Nonaka M, Harada N, Sulfate-reducing bacteria mediate thionation of diphenylarsinic acid under anaerobic

conditions. Biodegradation, 26, pp. 29-38, 2015, doi: 10.1007/s10532-014-9713-2

Hisatomi S, Guan L, Nakajima M, Fujii K, Nonaka M, Harada N, Formation of diphenylthioarsinic acid from diphenylarsinic acid under anaerobic sulfate-reducing soil conditions. Journal of Hazardous Materials, 査読有, 262, pp. 25-30, 2013, doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.09.054

〔学会発表〕(計5件)

Abe M, Shiiya A, Hisatomi S, Guan L, Fujii K, Nonaka M, Harada N, The role of H<sub>2</sub>S on environmental transformation of phenylarsenicals. 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Jul. 14, 2015, Fukuoka International Congress Center (Fukuoka, Japan)

椎谷郁花, Guan L, 久富志穂子, 中島真美, 藤井邦彦, 野中昌法, 原田直樹, 嫌気土壌における硫酸還元菌によるフェニルヒ素化合物のチオ化. 環境微生物系学会合同大会 2014, 2014年10月19日, アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県・浜松市)

久富志穂子, Guan L, 中島真美, 藤井邦彦, 野中昌法, 原田直樹, 硫酸還元条件におけるフェニルヒ素化合物の変換生成物の同定. 第19回ヒ素シンポジウム, 2013年11月17日, 九州大学(福岡県・福岡市)

Guan L, 椎谷郁花, 久富志穂子, 中島真美, 藤井邦彦, 野中昌法, 原田直樹, ジフェニルアルシン酸の嫌気的変換への硫酸還元菌の関与. 第19回ヒ素シンポジウム, 2013年11月17日, 九州大学(福岡県・福岡市)

Guan L, Hisatomi S, Nakajima M, Fujii K, Nonaka M, Harada N, Thionation of diphenylarsinic acid (DPAA) by sulfate-reducing bacteria under anoxic soil conditions. V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld, Oct. 2, 2013, Madrid (Spain)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 直樹 (HARADA NAOKI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号: 50452066