

博士論文

土壤環境における亜ヒ酸の挙動に及ぼす
細菌群集の影響

千葉大学大学院

園芸学研究科 環境園芸学専攻

生物資源科学コース 応用生命化学領域

董 典 涛

緒論.....	3
第一章 水田土壌におけるヒ素の酸化に及ぼす微生物の 影響.....	11
第一節 緒言.....	11
第二節 実験材料および方法.....	14
2-1 供試土壌	14
2-2 培養実験	14
2-3 HPLC/ICP-MS による液相中のヒ素の測定.....	17
2-4 XANES による固相の分析.....	20
2-5 土壌からの亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 (<i>aioA</i>) の増幅.....	22
第三節 結果.....	31
3-1 灰色低地土.....	31
3-2 グライ低地土.....	34
3-3 液相中の鉄濃度.....	37
3-4 亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 <i>aioA</i> のクローニング解析	38
第四節 考察.....	40
4-1 液相における亜ヒ酸の挙動.....	40
4-2 固相における亜ヒ酸の酸化.....	41
4-3 水田土壌における亜ヒ酸の酸化モデル.....	43
第五節 要約.....	46
第二章 亜ヒ酸が土壌中の亜ヒ酸酸化細菌群集構造に及ぼす影響.....	47
第一節 緒言.....	47
第二節 実験材料および方法.....	49
2-1 供試土壌	49
2-2 亜ヒ酸の酸化実験	49
2-3 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 分析.....	51
2-4 <i>aioA</i> を標的とした TA クローニング.....	57
2-5 亜ヒ酸耐性菌の計数及び単離.....	60
2-6 亜ヒ酸酸化細菌の接種実験.....	63

第三節 結果.....	64
3-1 灰色低地土.....	64
3-2 グライ低地土.....	80
第四節 考察.....	89
4-1 液相における亜ヒ酸の挙動.....	89
4-2 亜ヒ酸が土壤細菌群集構造に与える影響.....	91
第五節 要約.....	95
総合考察と今後の展望.....	96
引用文献.....	99
謝辞.....	109

緒論

ヒ素（原子番号 33, 原子量 74.92）は、周期表 5B 族、第 4 周期に属し、金属と非金属の性質を兼ね備える半金属元素（メタロイド）の 1 つであり、微量元素の 1 つとして位置付けられている。自然界のヒ素は主に、無機態であるヒ酸（ H_3AsO_4 ; As(V)）と亜ヒ酸（ H_3AsO_3 ; As(III)）として存在し、一部はジメチルアルシン酸（DMA）、モノメチルアルシン酸（MAA）などの有機態としても存在する（Bhumbla and Keefer, 1994）。ヒ素は古くから毒物として有名であり、その化学形態によって生物への可給性・毒性が異なる。一般的に有機態ヒ素より無機態ヒ素の方が毒性が強く、その中でも亜ヒ酸がより強い毒性を示す（Ferguson and Gavis, 1972）。亜ヒ酸は生体の細胞やタンパク質に存在するチオール（SH）基と親和性が高いため、種々の酵素に活性阻害を生じ、その結果強い生体毒性を示す（湊, 1998）。一方、ヒ酸はリン酸との類似性のため、ADP のリン酸化作用の共役を阻害し、結果的に ATP の生成を阻害する（山根, 1989）。また、マウスに対する LD_{50} （50% 致死量）で比較すると、亜ヒ酸（ 35 mg kg^{-1} ） < ヒ酸（ $1,050 \text{ mg kg}^{-1}$ ） < DMA（ $1,800 \text{ mg kg}^{-1}$ ） = MAA（ $1,800 \text{ mg kg}^{-1}$ ）となる（Kaise *et al.*, 1989）。ヒトの場合、約 $0.5 \sim 1 \text{ mg day}^{-1}$ の無機ヒ素化合物を長期間連続して摂取すると慢性中毒症状が発症するが、さらに症状が進行すると染色体異常やガン等にも発展すると考えられている（Morton and Dunnette, 1994. 安藤と眞柄, 1997）。

ヒ素は地圏、水圏、大気圏の各自然環境中に微量ながら至るところに存在している。自然界におけるヒ素の起源は地殻に由来する。ヒ素は地殻に平均 $2 \sim 5 \text{ mg kg}^{-1}$ 程度存在しており、主に石黄（ As_2S_3 ）や鶏冠石（AsS）、硫砒鉄鉱（FeAsS）といった硫黄や鉄と結合した鉱物に存在している（Tamaki and Frankenberger, 1992）。これらが起源となり侵食や風化、火山性のガスや温泉水などの自然作用によって環境中に放出されるが、近代ではこれに鉱山採掘や金属精錬などの人為的作用による排出が加わる。特に産業活動はヒ素の移行原因の 54% を占めており（Nriagu, 1990）、環境汚染の大きな要因となっている。また、

地殻中のヒ素は地下水に溶出することで井戸水を通じた飲料水や農業用水の汚染の原因となることもある。ヒ素を高濃度に含む地下水はアルゼンチン、チリ、中国、インド・西ベンガルやバングラディッシュなどの世界各地に存在している。特にベンガル盆地だけで 4,000 万人もの人々が高濃度のヒ素を含む飲用水を常飲し、大きな健康リスクとなっている (Smedley and Kinniburgh, 2002)。

日本においても、鉱山付近の土壌はヒ素濃度が比較的高い。現在日本全体で 14 地域 391 ha で土壌汚染対策法の基準 (150 mg kg^{-1}) を上回るヒ素が検出されている。特に、宮崎県の岩戸川流域土呂久では慢性ヒ素中毒の公害患者が 162 人認定されたことがある (浅見, 2001)。これは、1962 年までの約 30 年間、旧土呂久鉱山で亜ヒ酸の製造が行われた結果、重金属の粉塵や坑内水による河川の汚染により発生した公害である。日本国内では、水質汚濁に関わるヒ素の環境基準は 1993 年に $10 \mu\text{g L}^{-1}$ に改訂され、湖、河川、地下水におけるヒ素の汚染実態が毎年調査されている。環境省の平成 24 年度全国調査では、調査対象の湖 268 地点中 2 地点、河川 3,095 地点中 24 地点、地下水 3,017 地点中 68 地点で環境基準の超過が報告された (環境省, 2014)。

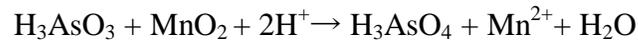
土壌環境中で優占している無機ヒ素のうち、酸化的环境下ではヒ酸が優勢な化学種となる。ヒ酸は鉄やアルミニウム(水)酸化物、アルミノケイ酸塩、マンガン酸化物 (Mn(IV)) など幅広い土壌粒子と強く吸着するため、溶解性が低い (Bhumbla and Keefer, 1994; Smith *et al.*, 1998; Dixit and Hering, 2003)。これに対して、還元的环境下では亜ヒ酸が優勢な化学種となる。亜ヒ酸は鉄(水)酸化物、 Mn(IV) 及びアルミニウム(水)酸化物に選択的に吸着するが (Dixit and Hering, 2003)、ヒ酸より鉱物から溶出しやすい性質を持つ。そのため、嫌気条件下のヒ素は移動しやすく、周辺地域に拡散しやすい性質がある (Mok and Wai, 1994)。

ヒ素は炭素や窒素、硫黄などと同様に、土壌環境中で酸化還元反応を介して循環している。特に還元条件下では、鉄鉱物の還元溶解に伴いヒ素の溶出が生じることがよく知られている (Bose and Sharma, 2002. Yamaguchi *et al.*, 2011)。実際、土壌の湛水培養によって溶出した2価鉄とヒ素濃度の間には高い相関があり、溶出したヒ素の86~91%が亜ヒ酸であると報告されている (山根, 1989. Yamaguchi

et al., 2011)。現在、ヒ素の還元・溶出にはヒ酸還元細菌や鉄還元細菌のような土壌微生物が関与するという研究データが蓄積しつつある (Ahmann *et al.*, 1997; Zobrist *et al.*, 2000; Oremland and Stolz, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2011; Ohtsuka *et al.*, 2013)。ヒ酸を還元する微生物には、ヒ酸を解毒的に還元するヒ酸耐性細菌 (arsenic-resistant microbes : ARM) と、ヒ酸を還元することで代謝エネルギーを獲得する異化的ヒ酸還元細菌 (dissimilatory arsenate-reducing bacteria : DARB) が存在する。ARMは、細胞質内に局在する解毒的ヒ酸還元酵素 (detoxifying arsenate reductase : ArsC) によりヒ酸を還元する細菌の総称で、リン酸トランスポーターを介して細胞内に侵入したヒ酸を細胞内のヒ酸還元酵素ArsCによって還元した後、生成した亜ヒ酸を膜結合型亜ヒ酸輸送体ArsABを介してエネルギー依存的に排出する (Oremland and Stolz, 2005) (Fig. 1A)。 *Escherichia coli*、 *Staphylococcus aureus*や*Clostridium*属など系統的に多様な微生物がARMとして知られている (Oremland and Stolz, 2003)。一方、DARBはヒ酸を最終電子受容体として利用する嫌気呼吸細菌の総称であり (Oremland and Stolz, 2005)、細胞膜またはペリプラズムに存在する異化的ヒ酸還元酵素 (respiratory arsenate reductase : Arr) を用いてヒ酸を還元する (Krafft and Macy, 1998; Afkar *et al.*, 2003) (Fig. 1B)。これまでに*Sulfurospirillum barnesii*, *Shewanella* sp. ANA-3, *Desulfomicrobium* sp. Ben-RB, *Bacillus selenitireducens*等の系統的に幅広い細菌がDARBとして分離されてきた (Niggemyer *et al.*, 2001; Oremland and Stolz, 2003; Santini *et al.*, 2004; Espino *et al.*, 2009)。

一方、酸化条件下での亜ヒ酸の酸化、およびそれに伴うヒ素の各種鉱物への吸着は、環境中のヒ素の固定化に重要な反応である。特に、バングラディッシュのようなヒ素汚染地下水の浄化には、地下水で優占する亜ヒ酸の酸化処理が重要である。現在、地下水からのヒ素の除去には、入手が容易で安価、それ自体が無害で扱いやすい、塩化第二鉄による共沈が期待されている。しかしながら、嫌氣的な地下水では吸着性の低い亜ヒ酸が優占するため、効率的にヒ素を除去するには、吸着性の高いヒ酸へ酸化する前処理が必要となる。マンガン酸化物 (Mn(IV)) は亜ヒ酸の重要な酸化剤として知られており (Oscarson *et al.*, 1983; Scott and

Morgan, 1995)、下式に従って亜ヒ酸を酸化しヒ酸を生成する (Scott and Morgan, 1995)。



Mn(IV)による亜ヒ酸酸化は湖の堆積物や土壌などの自然環境でも進行することが報告されている (Oscarson *et al.*, 1980, 1981, 1983)。しかしながら、酸化過程で生成したヒ酸、亜ヒ酸酸化によって生じたMn(II)やMn(III)の吸着によりMn(IV)が飽和・不活性となり、亜ヒ酸酸化能が低下することが知られている (Scott and Morgan, 1995; Lafferty *et al.*, 2010a; Lafferty *et al.*, 2010b)。一方、一部の鉄酸化物も亜ヒ酸を酸化できるが、その酸化能はMn(IV)より弱い (Tallman and Shaikh, 1980; Oscarson *et al.*, 1981)。

亜ヒ酸は上記のような鉱物による非生物的な酸化以外に、微生物による酸化も受ける。好気性亜ヒ酸酸化細菌についての研究の歴史は古く、1918年に従属栄養性亜ヒ酸酸化細菌 (heterotrophic arsenite oxidizers : HAOs) の存在が初めて確認された (Green, 1918)。HAOsは、有機炭素源を増殖に利用し、亜ヒ酸をヒ酸に酸化する従属栄養性細菌である。これら細菌は毒性の強い亜ヒ酸をヒ酸に変換することで解毒していると考えられている。このような細菌としては、*Alcaligenes faecalis* BEN-4 (Santini *et al.*, 2002), *Agrobacterium albertimagni* AOL15 (Salkassi *et al.*, 2002)などが知られている。一方、二酸化炭素を炭素源とする独立栄養性亜ヒ酸酸化細菌 (chemolithoautotrophic arsenite oxidizers : CAOs) は、亜ヒ酸を電子供与体として独立栄養的に生育する細菌であり、*Agrobacterium* sp. BEN-5, *Rhizobium* sp. NT-26, *Sinorhizobium* sp. DAO10などが知られている (Santini *et al.*, 2002; Rhine *et al.*, 2006)。これまで数多くの亜ヒ酸酸化細菌がヒ素汚染環境から分離されている一方、ヒ素汚染のない環境からの分離例も多い (Bachate *et al.*, 2012)。そのため、亜ヒ酸酸化細菌はヒ素汚染の有無に関わらず、環境に広く分布している可能性がある。さらに近年では、嫌気環境でも亜ヒ酸酸化が起こることが明らかになっている。カリフォルニアのモノ湖 (pH9.8、NaCl 90 g L⁻¹、As 200~300 μM) の底泥から分離された*Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1株は、嫌気条件下で亜ヒ酸酸化と硝酸還元を共役できることが確認されている (Oremland *et al.*, 2002)。

HAOsとCAOsはいずれもペリプラズムに局在する亜硫酸酸化酵素 (Aio) により、亜硫酸酸化を行うことが明らかになっている (Fig. 1C)。Aioは、DMSO還元酵素ファミリーの1種で、2つのサブユニットからなるモリブドプテリン酵素である。ラージサブユニット (AioA, ~90 kDa) はモリブデン原子を含み、スモールサブユニット (AioB, ~14 kDa) は2つの鉄-硫黄クラスターを持つ。Figure 2で示したように、AioAをコードする遺伝子のホモログは*Alpha-, Beta-, Gamma-Proteobacteria*綱を中心に見つかっているが、*Bacteroidetes*門、*Actinobacteria*門、*Firmicutes*門、*Aquificae*門、*Deinococcus-Thermus*門、*Chlorobi*門、*Chloroflexi*門、*Nitrospira*門、*Crenarchaeota*門などその他の門の微生物でも見つかっている。*Proteobacteria*門に属する多くの亜硫酸酸化細菌は中温菌であり、その系統から主に2つのグループに分けられている。グループIは*α-Proteobacteria*に属し、グループIIは主に*β-, γ-Proteobacteria*から構成される (Fig. 2)。現在、亜硫酸酸化酵素のラージサブユニット遺伝子 (*aioA*) は、自然環境における亜硫酸の酸化能を評価・予測するのによく用いられている (Oremland and Stolz, 2003; Inskeep *et al.*, 2007; Quéneur *et al.*, 2008; Hamamura *et al.*, 2009; Heinrich-Salmeron *et al.*, 2011)。一方、*A. ehrlichii* MLHE-1や、同じくモノ湖から単離された光依存性の亜硫酸酸化細菌*Ectothiorhodospira* sp. PHS-1株 (Kulp *et al.*, 2008) は、AioAとは系統的に少し異なる酵素 (ArxA) を用いて亜硫酸を酸化することが知られている。

近年、土壌のヒ素汚染の処理には、汚染された土壌の封じ込めや掘削除去が適用されているが、一般的に極めて高コストであるうえ、処理後の土壌利用が大きく制限されるという問題がある。そこで、ヒ素の循環・挙動に大きく関わっている微生物を利用した修復技術が注目されている。すでに述べたように、土壌におけるヒ素の還元・溶出には土壌微生物が重要な役割を演じている (Ahmann *et al.*, 1997; Zobrist *et al.*, 2000; Oremland and Stolz, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2011; Ohtsuka *et al.*, 2013)。しかしながら、土壌中の亜硫酸酸化反応に及ぼす微生物の影響については未だ不明な点が多い。また、亜硫酸の酸化に関与する因子として、Mn(IV)など物理化学的因子と、微生物的因子があることが分かっているが、種々の濃度のヒ素を含む土壌において、いずれの因子がより貢献しているかは明

らかではない。さらに、強い毒性を有する亜ヒ酸が土壤微生物群集構造に及ぼす影響もよく分かっていない。そこで本研究では、国内の2種類の水田土壤を用い、種々の濃度の亜ヒ酸と共に培養し、亜ヒ酸の挙動や土壤微生物群集構造に与える影響を解析した。第一章では、土壤由来の内在性ヒ素のみを用いた実験を行い、亜ヒ酸の挙動に及ぼす微生物及び鉍物など非生物的な因子の影響を調べた。第二章では、土壤に人為的に50～5,000 μM の亜ヒ酸を添加後培養し、亜ヒ酸の挙動を調べると共に、亜ヒ酸が土壤微生物群集構造、とりわけ亜ヒ酸酸化細菌群集構造に与える影響について検討した。

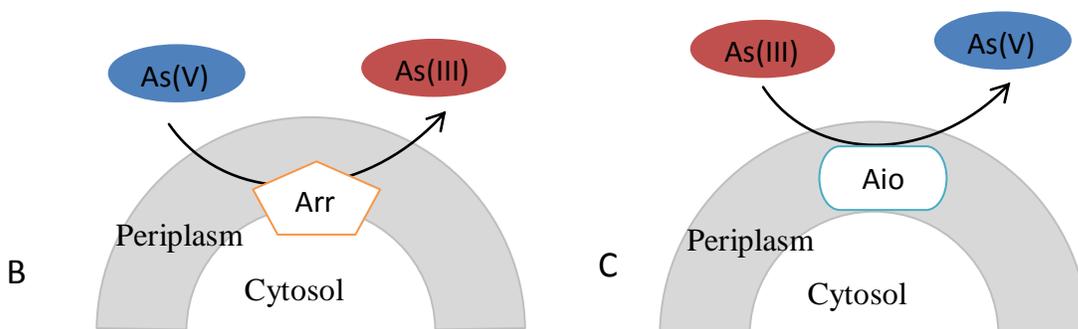
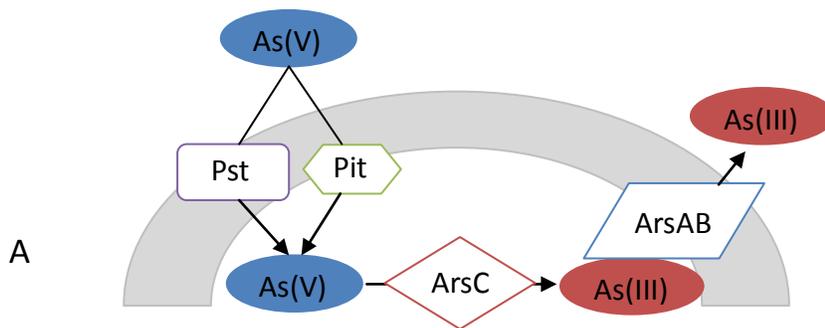


Figure 1. 微生物によるヒ素の化学形態変化

(A) リン酸輸送体 (Pst または Pit) により細胞内に侵入したヒ酸を ArsC により還元し、亜ヒ酸排出ポンプ ArsAB により排出する。(B) ペリプラズムに局在する Arr により呼吸の最終的電子受容体としてヒ酸が利用され、亜ヒ酸に還元される。(C) ペリプラズムに局在する Aio により亜ヒ酸がヒ酸に酸化される。

Pst, Pit: リン酸トランスポーター、ArsC: 解毒的ヒ酸還元酵素、ArsAB: 亜ヒ酸排出ポンプ、Arr: 異化的ヒ酸還元酵素、Aio: 亜ヒ酸酸化酵素

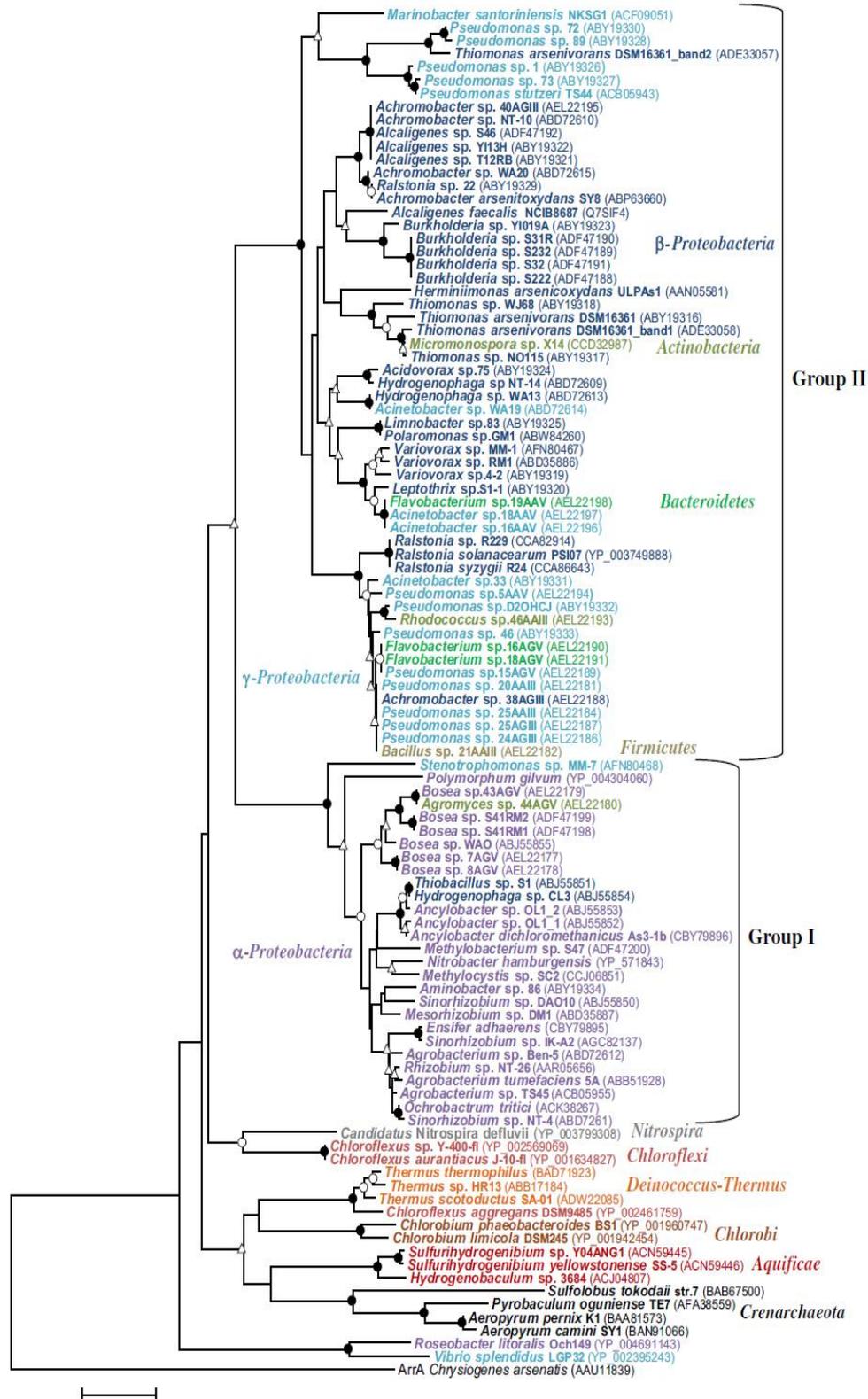


Figure 2. 亜硫酸酸化酵素(AioA)のアミノ酸配列に基づく亜硫酸酸化細菌の系統樹 (Yamamura and Amachi, 2014 より転載)。

第一章 水田土壌におけるヒ素の酸化に及ぼす微生物の影響

第一節 緒言

現在、ヒ素中毒に至る最も重要な要因は、ヒ素に汚染された地下水や井戸水の飲用である。一方、このような地域では汚染された井戸水を農業・灌漑用水として利用する場合も多いことから、米などの農作物を通じてヒ素中毒となる経路も指摘されている (Rahman and Hasegawa, 2011)。特に米は、食物を介した無機ヒ素摂取源として最も寄与している (Mondal and Polya, 2008)。ヒ素汚染された米ぬかなど米由来製品の摂取による発がんリスクも高いと指摘されている (Sun *et al.*, 2008)。世界では約 30 億人が米を主食としているが、日本人が 1 日に食品から摂取する総ヒ素量のうち、魚介類起源が 57.6%、海藻や野菜が 30.4% であるのに対し、米は 7.8% とやや劣る (Schoof *et al.*, 1999)。しかしながら、海産物中のヒ素の化学形態は毒性のほとんどない有機ヒ素であるのに対し、米中のヒ素は主として無機ヒ素として存在する (Schoof *et al.*, 1999)。

イネはヒ素の化学形態の中で亜ヒ酸を最も吸収しやすく (吸収速度: $147 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}$)、続いてヒ酸 ($126 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}$)、MMA ($12.7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}$)、DMA ($5.7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}$) の順となっている (Abedin *et al.* 2002)。イネは小麦などと違って湛水状態で栽培される。湛水時には土壌が嫌氣的になるため、ヒ酸が亜ヒ酸に還元されて水へと溶出し、イネの根から吸収される。このため、農業穀物の中で、米のヒ素含有量は他の穀物類に比べて高い (Yamane *et al.*, 1976)。最近、玄米中のヒ素含有量を低減させるため、新たなイネ栽培方法の検討が進んでいる。例えば、酸化的環境でイネを栽培することで玄米中のヒ素含有量を低減できる (Yamane *et al.*, 1976; Maejima *et al.*, 2008)。これは、イネのヒ酸吸収力は高いものの、酸化的環境では鉱物に吸着し吸収しにくいためと考えられる (Yamane *et al.*, 1976; Maejima *et al.*, 2008)。しかしながら、酸化的環境での栽培はイネによるカドミウムの吸収を増加させるという問題点もある (Arao *et al.*, 2009)。また、水耕栽培は雑草のコントロールや連作のダメージを減らすなど大きなメリット

がある (Kyuma, 2004)。このように、水田環境の酸化還元状態は、ヒ素の化学形態変化のみならず、イネに吸収されるヒ素の化学形態や、ひいては玄米中のヒ素の含有量にも大きな影響を及ぼしている。このため、水田環境におけるヒ素の化学形態変化、とりわけイネにより吸収されやすい亜ヒ酸の挙動を理解することには大きな意義がある。

すでに述べたように、水田を湛水すると酸化還元電位 (Eh) が低下し、それと共に水酸化鉄などに吸着したヒ酸が微生物により還元され、亜ヒ酸が溶出する (Yamaguchi *et al.* 2011)。溶出した亜ヒ酸の一部はイネに吸収され、玄米中に蓄積する (Fig. 3A)。一方、落水時には酸素の侵入により水田土壌は再び酸化状態になるため、溶出していた亜ヒ酸はヒ酸に酸化され、再び水酸化鉄などに吸着すると予想される (Fig. 3B)。緒論で述べたように、亜ヒ酸の酸化に関与する因子として、Mn(IV)など物理化学的因子と、微生物的因子があることが分かっている。Jones ら (2012) は、2種類の亜ヒ酸酸化細菌と、Mn(IV)による亜ヒ酸 (75 μM) 酸化速度を比較し、細菌よりも Mn(IV)の酸化速度がより速いこと、また両者が共存するとき最も酸化速度が速くなることを報告している。一方 Yamamura ら(2009)は、5種類の土壌に 1,000 μM の亜ヒ酸を添加し、液相中のヒ素の化学形態と濃度を測定した結果、すべての亜ヒ酸が微生物により酸化されることを報告している。以上の結果より、75 μM 程度の亜ヒ酸の酸化には物理化学的な因子が無視できないが、1,000 μM という高濃度では微生物的因子が優先することが推察される。しかしながらこれまで、湛水された非汚染水田において観察されるような低濃度の亜ヒ酸の酸化に、物理化学的因子と微生物的因子のいずれがより貢献しているかは明らかではなかった。また、亜ヒ酸が土壌の固相 (鉱物表面) で酸化されるのか、液相で酸化されるのかも不明であった。そこで本研究では上記2点を明らかにすることを目的に、まず水田土壌を還元培養に供して亜ヒ酸を液相に溶出させ、これを酸化条件にシフトした後、土壌固相および液相におけるヒ素の挙動を観察した。土壌固相のヒ素の化学形態は、X線吸収端近傍構造 (X-ray Absorption Near Edge Structure, XANES) 解析にて測定した。

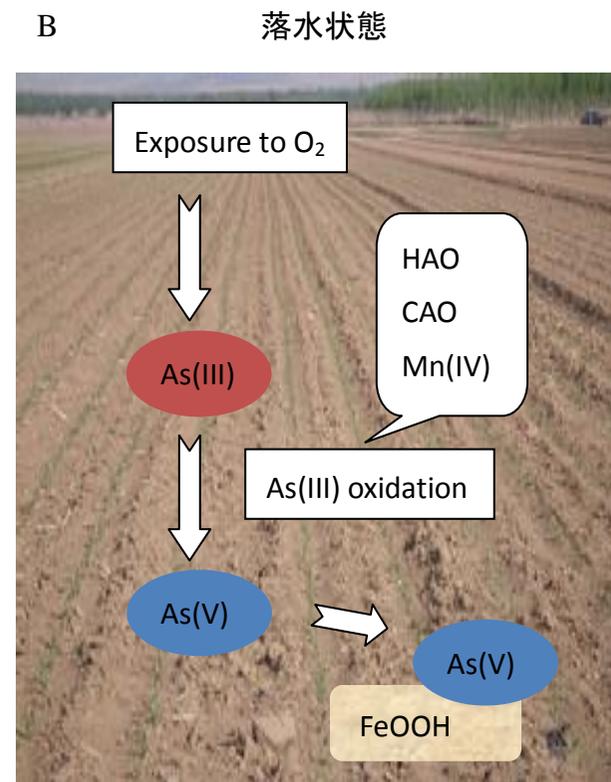
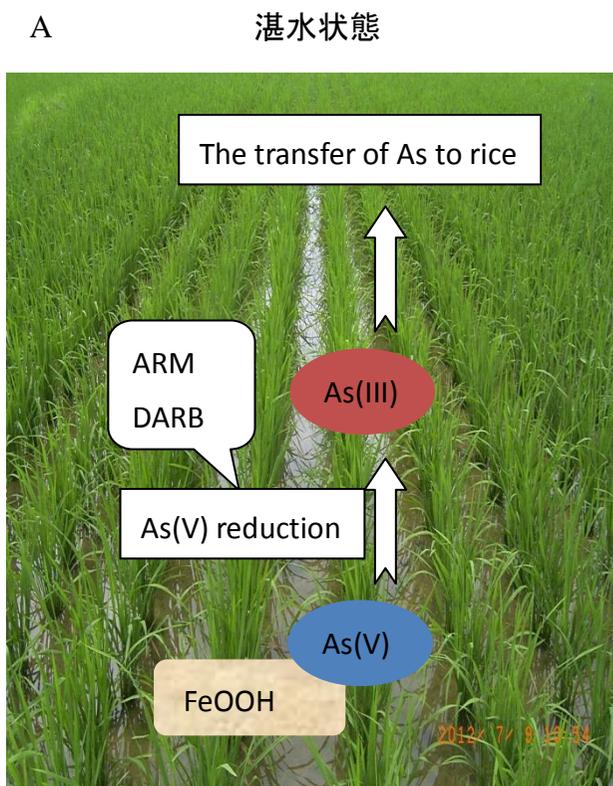


Figure 3. 水田土壤におけるヒ素の挙動と化学形態変化

ARM: Arsenic-resistant microbes、DARB: Dissimilatory arsenate-reducing bacteria、HAO: Heterotrophic arsenite oxidizers、CAO: Chemolithoautotrophic arsenite oxidizers

第二節 実験材料および方法

2-1 供試土壌

土壌汚染防止法により、ヒ素濃度 15 mg kg^{-1} 以上の汚染水田が対策地域に指定されている。本研究では、供試土壌として島根県の対策地域周辺の灰色低地土とグライ低地土の 2 種類を用いた。両土壌は土壌の US 分類学に基づき Aeric Epiaquents と分類された (Soil Survey Staff, 1994)。灰色低地土は埴壤土 (clay loam) であり、グライ低土は砂質埴壤土 (sandy clay loam) である。これら土壌の理化学的特徴を Table 1 に示した。

2-2 培養実験

人為的にヒ素を添加しない条件で土壌中の亜ヒ酸の酸化・吸着に及ぼす微生物の影響を明らかにするため、まず土壌を還元条件で培養して亜ヒ酸を液相に溶出させ、その後酸化培養にシフトして亜ヒ酸を酸化・吸着させた。

2-2-1 還元培養

土壌 20 g (乾土重量)、蒸留水 60 mL を 100 mL 容ガラスバイアル瓶に入れ、 N_2 ガスで 3 分置換し、ブチルゴム栓、アルミキャップで密栓した。その後、灰色低地土とグライ低地土をそれぞれ 60 日と 100 日間、嫌氣的に 30°C で静置培養した。また、微生物の影響を確認するため、密栓した後に γ 線滅菌 (照射量は 30 kGy) をした土壌も同条件で培養した。なお、 γ 線滅菌は (財) 放射線利用振興協会高崎事業所に委託した。

2-2-2 酸化培養

嫌気培養した土壌スラリーをクリーンベンチ内で無菌的に500 mL三角フラスコに移し、シリコ栓をした後、30°C、200 rpmで1週間振盪培養した。

Table 1. 供試土壌の理化学性

	Depth (cm)	pH	CEC (Cmolc/k)	As ^T (mg kg ⁻¹)	Fe ^T (g kg ⁻¹)	Al (g kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (g kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (g kg ⁻¹)	Available PO ₄ ³⁻ (mg kg ⁻¹)	Carbon ^T (mg kg ⁻¹)	Sand (%)	Clay (%)	Silt (%)
灰色低地土	0~15	5.4	28.2	39.5	23.5	0.9	8.6	56	4.8	23.3	42.5	32.1	25.4
グライ低地土	0~15	5.1	25.6	37.1	26.6	1.1	5.1	111	9.9	16.5	46.6	28.2	25.2

CEC: cation exchange capacity, ^T: total

2-3 HPLC/ICP-MS による液相中のヒ素の測定

2-3-1 分析用サンプルの調製

三角フラスコをよく振って土壌と水を懸濁し、2本の50 mL容遠沈管に全ての懸濁液を均等に入れ、遠心分離(4°C, 5,000×g, 15 min)した。上清は30 mL容シリンジ(テルモ)と0.2 μm PVDF膜フィルター(Whatman)を用いてろ過し、沈殿させた固相は石や木くずを取らないようにポリエチレンバッグに封入して解析まで冷凍(-30°C)保存した。一部の実験ではこの操作は0.22 μm ビバスピン 20 (Sartorius Stedim)を用いた遠心(4°C, 1,500×g, 7 min)ろ過により行った。鉄水酸化物の沈殿を防ぐために10%硝酸または500 ppb テルル入り10%硝酸をあらかじめ1 mL入れておいた15 mL容遠沈管に、ろ過した上清を9 mLずつ添加した。1%硝酸溶液をヒ素形態別分析用サンプル、50 ppb テルル入り1%硝酸溶液をヒ素及び鉄の全量分析用サンプルとした。

2-3-2 HPLC/ICP-MS および ICP-MS による測定

HPLC分析はPU712i GL Sciencesを使用し、ICP-MS分析は四重極型ICP-質量分析装置のELAN DRC-e (Perkin Elmer)を使用した。分析条件はTable 2の通りである。形態別分析用サンプルはHPLC/ICP-MSで分析し、各サンプル中のAs(III)およびAs(V)のピーク面積を算出した。全量分析用サンプルはICP-MSで分析後、各サンプル中のヒ素とテルルの強度を測定した。

Table 2. HPLC および ICP-MS の分析条件

項目	条件
オートサンプラー	MIDAS (Spark Holland BV)
カラム	Inertsil ODS-3 GL Science 4.6 mm(内径)×150 mm(長さ)
溶離液酸(pH 5.6)	5%(v/v)メタノール+5 mM TBAH+3 mM マロン酸
流量	1 mL min ⁻¹
注入量	10 μL
分析時間	11 min

2-3-3 ヒ素濃度の算出方法

各サンプルのヒ素全量濃度 (ppb) は以下の計算式で求めた。

$$\text{各サンプルのヒ素全量濃度 (ppb)} = G = C \times D \times (E/F - b) / a$$

A : 50 ppb テルル入り 10%硝酸の重量 (g)

B : サンプルの重量 (g)

C : テルル濃度 (ppb) = 50 (ppb) × (A/A+B)

D : サンプルの希釈倍率 = (A+B)/B

E : サンプル中ヒ素強度

F : サンプル中テルル強度

y=ax+b:スタンダードのヒ素濃度/テルル濃度比及び強度比を基に作った検量線

各サンプルの As(V)および As(III)濃度 (ppb) は以下の計算式で求めた。

$$G \times H / I = \text{各サンプルの As(V)および As(III)濃度 (ppb)}$$

G : ヒ素全量濃度 (ppb)

H : 各ヒ素形態のピーク面積

I : ピーク面積の合計

2-3-4 ICP-OES による鉄濃度の測定

ヒ素濃度の測定で用いた全量分析用サンプルを鉄濃度の測定にも用い、Varian の VISTA-PRO CCD Simultaneous ICP 発光分光分析装置 (ICP-OES) によって定量した。鉄濃度は 259.940 nm と 238.204 nm の波長で測定したスタンダード及びサンプルの強度から算出し、2-3-3 で記したサンプルの希釈倍率を掛けたのち 2 つの値の平均値を算出した。

2-4 XANES による固相の分析

近年、シンクロトロン放射光源X線を利用したX線吸収分光分析により、土壌固相に存在する元素の酸化状態や結合状態を直接分析することが可能になった。Figure 4にX線吸収端スペクトルを示す。急激な立ち上がり部分を吸収端と呼び、吸収端前後 50 eV 程度までの領域をX線吸収端近傍構造 (XANES) と呼ぶ。XANES 領域よりも高エネルギー側で、吸収端から 1,000 eV 程度までの領域に見られる構造を広域X線吸収微細構造 (Extended X-ray Absorption Fine Structure) と呼び、通常EXAFSと称される。吸収端のエネルギーはそれぞれの元素で固有の範囲にあるため、入射X線の波長を選ぶことによって、測定対象の情報を得ることができる。

本研究では、酸化培養中の固相中のヒ素の化学形態変化を明らかにするため、ヒ素原子だけを励起させるエネルギー (11,867 eV) のX線を土壌試料に照射し、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーBL12CにてXANESスペクトルを得た。土壌サンプルのXANESスペクトルは19素子Ge半導体検出器を使用した蛍光モードで集め、参照物質のXANESスペクトルは透過モードで集めた。エネルギー校正はヒ素の11,865 eVに割り当てられた亜ヒ酸ナトリウムで行った。土壌サンプルは室温で解凍してから解析した。固相のヒ素の化学形態は、モデル化合物とともにXANESスペクトルの線形重ね合わせ(LCF)で評価した。LCFのモデル化合物として亜ヒ酸ナトリウム、ヒ酸ナトリウムを用いた。適合範囲は11,850~11,880 eVとした。

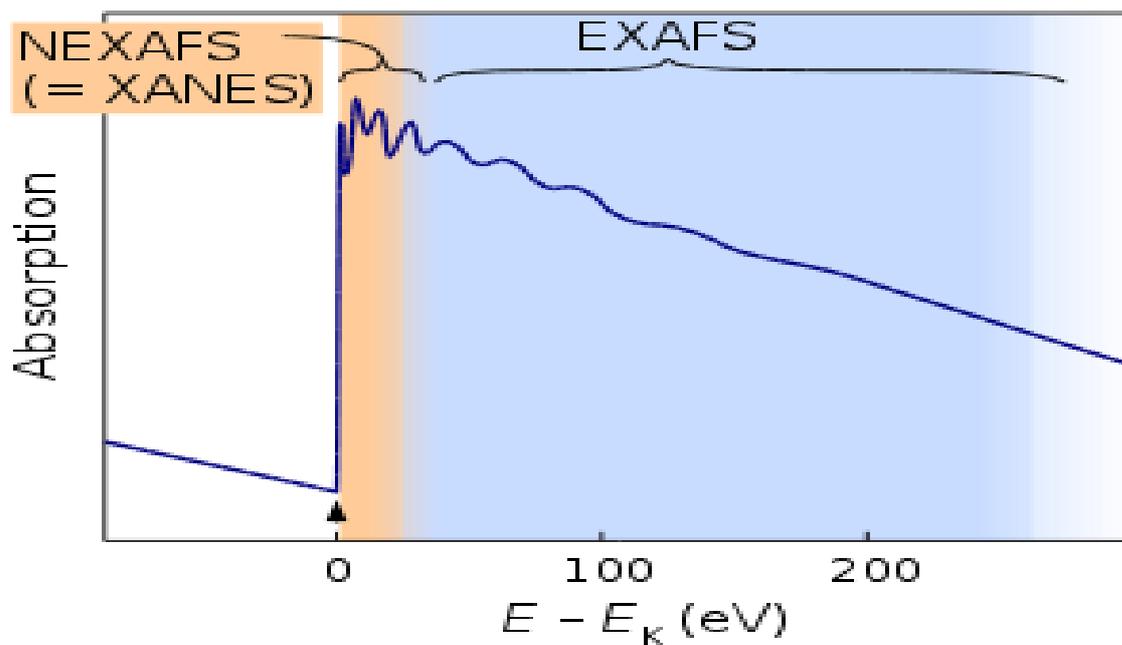


Figure 4. X線吸収スペクトルの例。横軸はX線のエネルギー（吸収端をゼロとする）、縦軸はX線の吸収量である。（Wikipedia, <http://www.ja.wikipedia.org/wiki/エックス線吸収微細構造>より転載）

2-5 土壌からの亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 (*aioA*) の増幅

2-5-1 DNA 抽出

1 週間酸化培養後の各土壌サンプルの沈殿から DNA 抽出を行い、実験に供した。DNA 抽出には FastDNASpin Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いた。抽出方法については付属のプロトコルに従った。抽出したゲノム DNA 溶液 2 μ L を蒸留水 98 μ L に懸濁し、紫外可視分光解析システム (Beckman Coulter DU 700) を用いて定量した。抽出した DNA は-30°Cで保存した。

2-5-2 *aioA* の PCR 増幅

50 ng の鋳型 DNA を用いて *aioA* 遺伝子断片を増幅した。用いたプライマー (Hamamura *et al.*, 2009)は Table 3 に示した。Taq polymerase および PCR buffer、dNTP (Takara Bio)の反応液組成、終濃度および各反応条件は Table 4 に示した。反応終了後、PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、目的断片が特異的に増幅されていることを確認した。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて精製した。操作はキット付属の添付マニュアルに従った。

Table 3. *aioA* 増幅用 PCR プライマー

Primers	Orientation	Sequences (5'-3')
<i>aroA95f</i>	Forward	TGYCABTWCTGCAIYGYIGG
<i>aroA599r</i>	Reverse	TCDGARTTGTASGCIGGICKRTT

Table 4. *aroA95f* / *aroA599r* プライマーを用いた PCR 条件

(a) PCR 反応液組成および終濃度

	Volume (μL)	Final conc.
Template DNA	2	$1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$
10×Ex Taq Buffer (20 mM Mg^{2+} plus)	5	20 mM Tris-HCl (pH8.0)
dNTP	4	2.5 mM each of dNTP
Ex Taq	0.25	$5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$
Forward primer	2.5	$0.5 \text{ } \mu\text{M}$
Reverse primer	2.5	$0.5 \text{ } \mu\text{M}$
Sterilized water	up to 50	

(b) PCR 反応条件

94°C	5 min	
94°C	45 sec	} 9 cycles
54°C (decreased by 0.5 °C after each cycle)	45 sec	
72°C	1.5 min	
94°C	45 sec	} 25 cycles
50°C	45 sec	
72°C	1.5 min	
72°C	7 min	

2-5-3 TA クローニング

i) ライゲーション

精製した PCR 産物を Mighty TA-Cloning kit (Takara Bio)を用いて pMD20-T ベクターにライゲーションした。ライゲーションの反応液組成を Table 5 に示した。

Table 5. ライゲーション反応液組成

Reagent	Volume (μL)
Template DNA	1
Ligation Mighty Mix	5
pMD20-T vector	1
Final volume	7

ii) 形質転換

ライゲーション反応液全量を DH5 α chemically competent *Escherichia coli* (Takara Bio)に添加し、ボルテックスで攪拌した。氷上で 10 min 静置した後、42°Cで 30 sec ヒートショックを行った。素早くチューブを氷上に戻し、SOC 培地 250 μ L を加えて 37°C、160 rpm で 1 h 振盪し、回復培養を行った。回復培養の後、Ampicillin、Isopropylthiogalactoside (IPTG)、5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactoside (X-gal)を含んだ LB 培地に塗抹植菌し、37°Cでコロニーが 1 mm 前後の大きさになるまで(約 16~20 h)培養を行った。培養後、Blue/White selection により 2-5-4 に供するコロニーを選別した。

SOC 培地組成を Table 6 に示した。LB 培地は Table 7 の組成で調製したのち、121°C、20 min でオートクレーブ滅菌を行った。滅菌後培地が約 70°C以下まで下がった後にアンピシリン、IPTG、X-gal を加えて培地を作成した。

Table 6. SOC 培地組成

Composition	Final conc.
Tryptone	2%
Yeast Extract	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Table 7. LB 培地組成

Composition	Final conc.
Polypeptone	1%
Yeast Extract	0.5%
NaCl	1%
Ampicillin	50 mg L ⁻¹
IPTG	100 μ M
X-gal	80 mg L ⁻¹

2-5-4 コロニーPCR

Blue/White selection により、DNA 断片が挿入されたプラスミドを獲得した大腸菌は白色を呈し、組み換えが起こらなかったプラスミドを獲得した大腸菌は青色を呈するため、組み換えプラスミドを持ったコロニーを容易に判別できる。しかしながら、白色コロニー中には様々な鎖長の DNA 断片が含まれているため、どの白色コロニーに目的長の DNA 断片が含まれているのかを明らかにする必要がある。そのため、白コロニーをダイレクトコロニーPCR に供した。

試薬は Quick Taq HS DyeMix (東洋紡)を用いた。プライマーは pMD20-T vector のインサート配列の外側にあるベクター配列を標的とした、M13-M4、M13-RV (Table 8)プライマーを用いた。Taq polymerase および PCR buffer、dNTP、MgCl₂ Solution (Applied Biosystems) の反応液組成、終濃度および各反応条件は Table 9 に示した。PCR 終了後、産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、目的断片(500 bp)の特異的増幅が適切になされているかを確認した。

Table 8. PCR プライマー

Primers	Orientation	Sequences (5'-3')
M13-M4	Forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13-RV	Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

Table 9. M13 プライマーを用いた PCR 条件

(a) PCR 反応液組成および終濃度

	Volume (μL)	Final conc.
Quick Taq HS DyeMix (2*Premix)	5	1 \times
Forward primer (10 pmol μL^{-1})	0.2	0.2 pmol μL^{-1}
Reverse primer (10 pmol μL^{-1})	0.2	0.2 pmol μL^{-1}
Sterilized water	to 10	

(b) PCR 反応条件

94°C	2 min	} 25 cycles
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
68°C	50 sec	

2-5-5 シークエンス反応

PCR 産物 2 μL を蒸留水 98 μL に懸濁し、紫外可視分光解析システム DU 700 を用いて濃度測定することで、使用する PCR 産物の鋳型量を算定した。DNA を鋳型として、M13 Forward / M13 Reverse プライマーセットを用い、シークエンス反応を行った。シークエンス反応には BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いた。反応液組成および終濃度と反応条件は Table 10 に示した。

Table 10. シークエンス条件

(a) シークエンス反応液組成および終濃度

Component	Volume (μL)	Final conc.
Template DNA		5 ng reaction ⁻¹
5×Sequencing Buffer	1.75	0.2 μM
Big Dye terminator	0.5	0.2 μM
Forward (Reverse) primer	0.33	1×
D. W.	to 10	

(b) シークエンス反応条件

95°C	1 min	} 25 cycles
95°C	30 sec	
50°C	30 sec	
60°C	4 min	

2-5-6 エタノール沈殿による DNA の精製

1.5 mL容エッペンドルフチューブに10 μL のPCR産物、2 μL の125 mM EDTA、2 μL の3M 酢酸ナトリウム、50 μL の100%エタノールを加え軽くボルテックスした。-30 $^{\circ}\text{C}$ で15 min静置した後、20,950 $\times\text{g}$ ・15 min遠心した。上清を捨て、200 μL の70%エタノールを加え、再び20,950 $\times\text{g}$ ・10 min遠心した。上清を捨て、減圧乾燥器で3 h以上乾燥させた。

2-5-7 シークエンス解析

精製・乾燥させたシークエンス反応産物に12 μL のホルムアミドを加え、30 secボルテックスした。8連チューブに移し、95 $^{\circ}\text{C}$ で3 min加熱後、氷上で5 min放置した。その後、3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により配列解析に供した。

2-5-8 AioA のアミノ酸配列に基づく近縁種の特定

得られた *aioA* 遺伝子配列は、配列解析ソフト (Bio Edit) を用いてリバース配列を逆相補鎖に変換し、アライメント解析ソフト (Clustal X2) によりフォワード配列とアライメントを行った (Larkin *et al.*, 2007)。アライメント終了後、Expsyにより塩基配列をアミノ酸配列に変換し、NCBIの Blast Pにより相同性検索し、近縁菌との相同性を算出した。得られた *aioA* 遺伝子配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースへ登録番号 AB897741-AB897755 及び AB905499-AB905513 として登録した。

2-5-9 系統樹の作成

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>)より、系統樹を構成する細菌の亜ヒ酸酸化酵素のアミノ酸配列を入手した。Clustal X2でアライメントを行い、配列編集ソフト (SeaView) で修正した (Galtier *et al.* 1996)。修正した配列を再び Clustal X2で開き、ブートストラップ法に基づいて系統樹を作成した (Felsenstein, 1985)。ブートストラップ値を1,000反復によって算出させた。系統樹は系統樹編集ソフト (NJplot、近隣接合法) により表示し、アウトグループの調整を行った (Saitou and Nei, 1987; Perrière and Gouy 1996)。

第三節 結果

3-1 灰色低地土

3-1-1 液相中のヒ素の化学形態と濃度

灰色低地土と水をバイアル瓶に入れ 60 日間還元培養に供したところ、液相に 3.6~4.0 μM の亜ヒ酸が溶出した。これを酸化培養にシフトさせたところ、培養後 1 日で亜ヒ酸が 0.13 μM 以下にまで減少した (Fig. 5A)。この間、液相にヒ酸の新たな生成は認められなかった。酸化培養にシフトする直前に γ 線滅菌した土壌で同様の解析を行ったところ、液相ヒ素の挙動は無処理土壌と大きな差は認められなかったが、最終的に 0.27 μM の亜ヒ酸が液相に残存した (Fig. 5B and inset)。

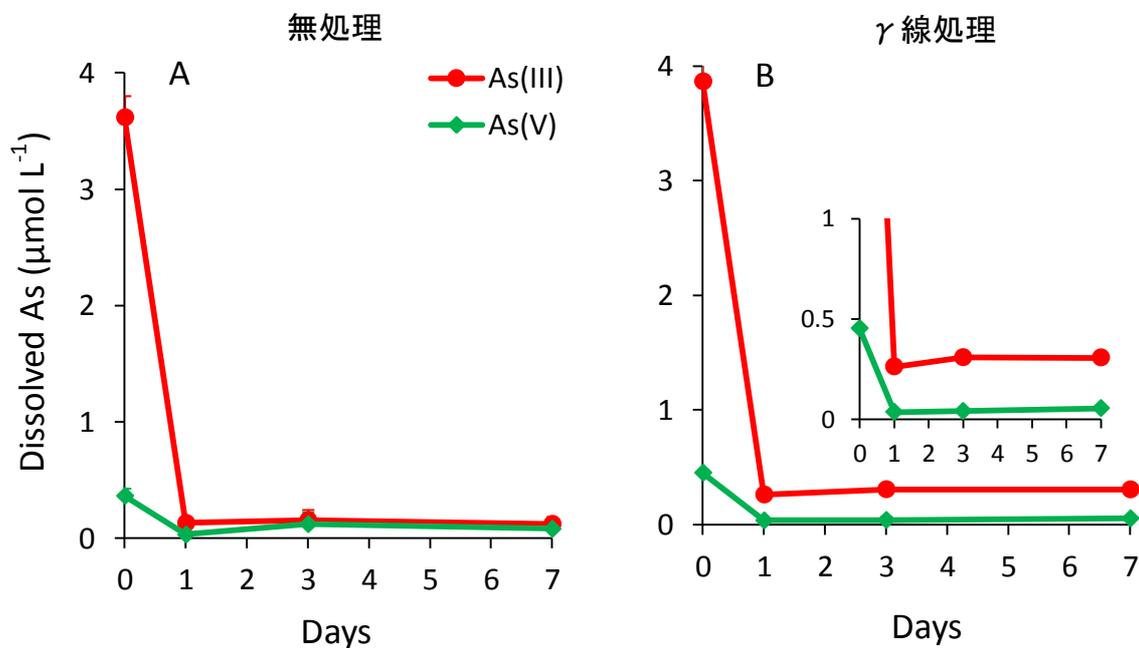


Figure 5. 灰色低地土の酸化培養における液相中のヒ素の濃度変化。グラフは2連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。エラーバーの欠如は、エラーがシンボルより小さいことを示す。

3-1-2 固相におけるヒ素の化学形態変化

固相ヒ素の形態別存在割合を XANES で解析したところ、無処理土壌では酸化培養 1 日後に亜ヒ酸の割合は 74% から 46% まで低下した。その後、亜ヒ酸の酸化は $2.5\% \text{ day}^{-1}$ の速度で緩やかに進行した。一方、 γ 線処理土壌では、酸化培養 1 日で亜ヒ酸は無処理土壌と同様に速やかに酸化されたが、速度の遅い 2 段階目の酸化がほとんど進行しなかった (Fig. 6)。

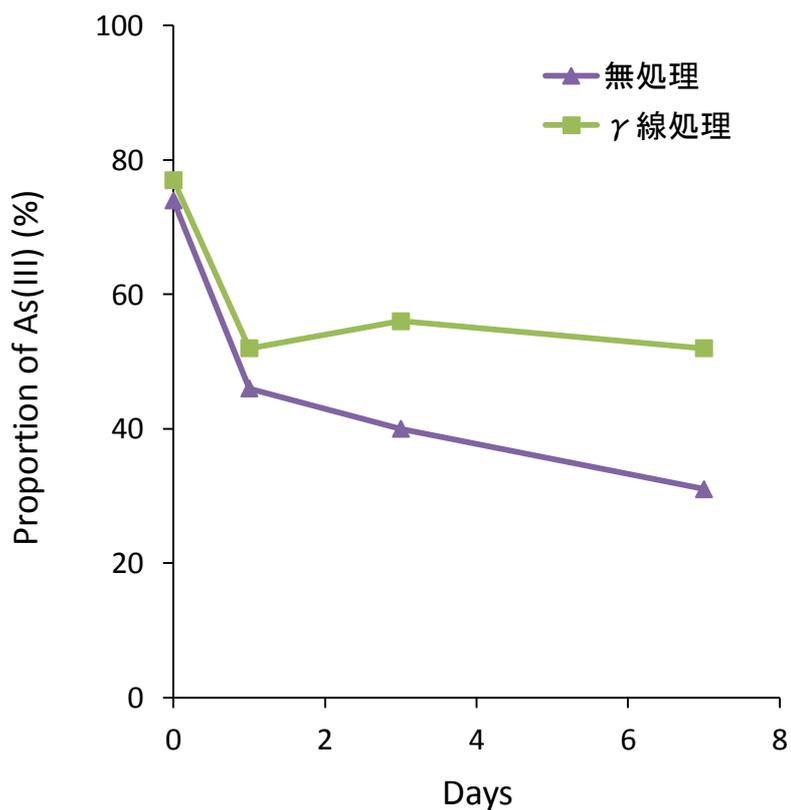


Figure 6. 灰色低地土の酸化培養における固相中のヒ素の化学形態変化。

フォトンファクトリーで得られた実際の XANES スペクトルを Figure 7 に示した。参照物質として、亜ヒ酸ナトリウム、ヒ酸ナトリウムのプレッジピークを示した。無処理土壌では酸化培養にシフトさせた直後に土壌懸濁液のピークセントロイドのエネルギーレベルは As(III)に類似しており、亜ヒ酸が優占的であることが示された。酸化培養に伴い、ピークセントロイドのエネルギーレベルは As(V)に近づき、ヒ酸が増加することが分かった。γ線処理土壌では、酸化培養 1 日以降はピークセントロイドの変化が見られなかった。

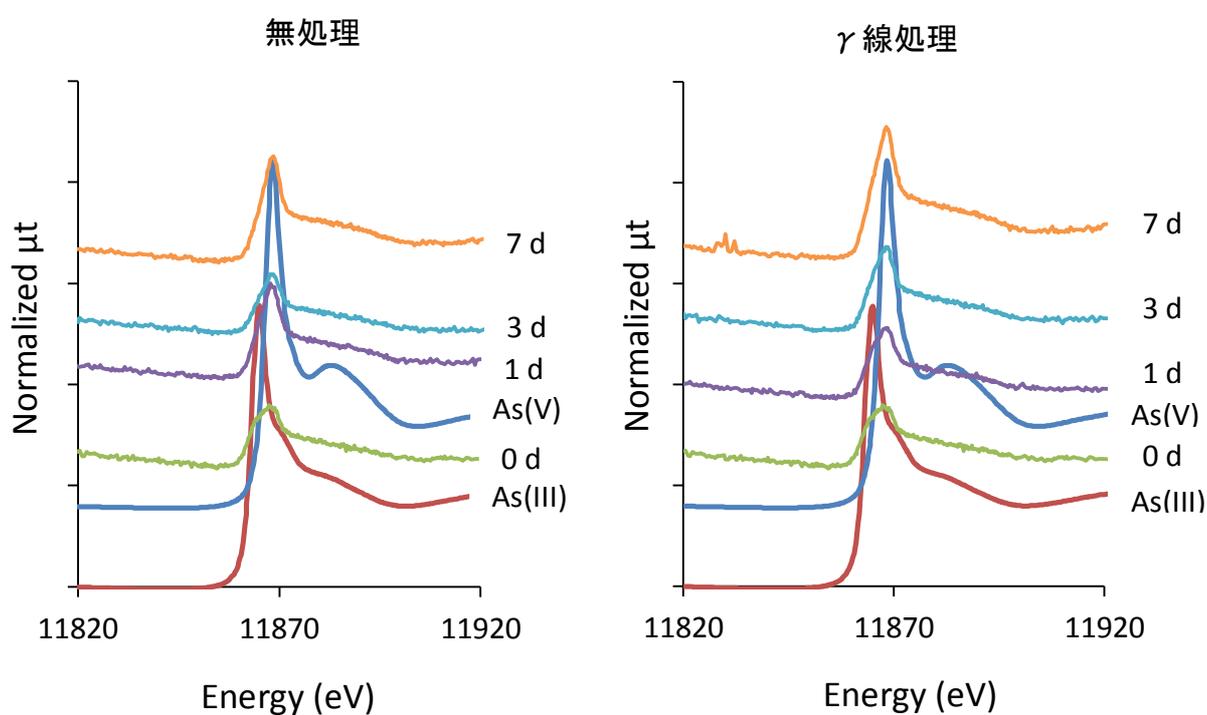


Figure 7. フォトンファクトリーの BL12C で得られたヒ素 K-edge XANES スペクトル。

3-2 グライ低地土

3-2-1 液相中のヒ素の化学形態と濃度

グライ低地土においても灰色低地土と同様の実験を行った。還元培養を100日まで行ったところ、液相に3~3.6 μM の亜ヒ酸が溶出した。これを酸化培養にシフトさせたところ、無処理土壌と γ 線処理土壌のヒ素の濃度変化パターンは灰色低地土と類似したものとなった。すなわち、培養1日後にはほとんどすべての亜ヒ酸が液相から消失したが、液相にヒ酸の新たな生成は認められなかった (Fig. 8A)。 γ 線滅菌土壌においては、最終的に0.27 μM の亜ヒ酸が液相に残存した (Fig. 8B inset)。

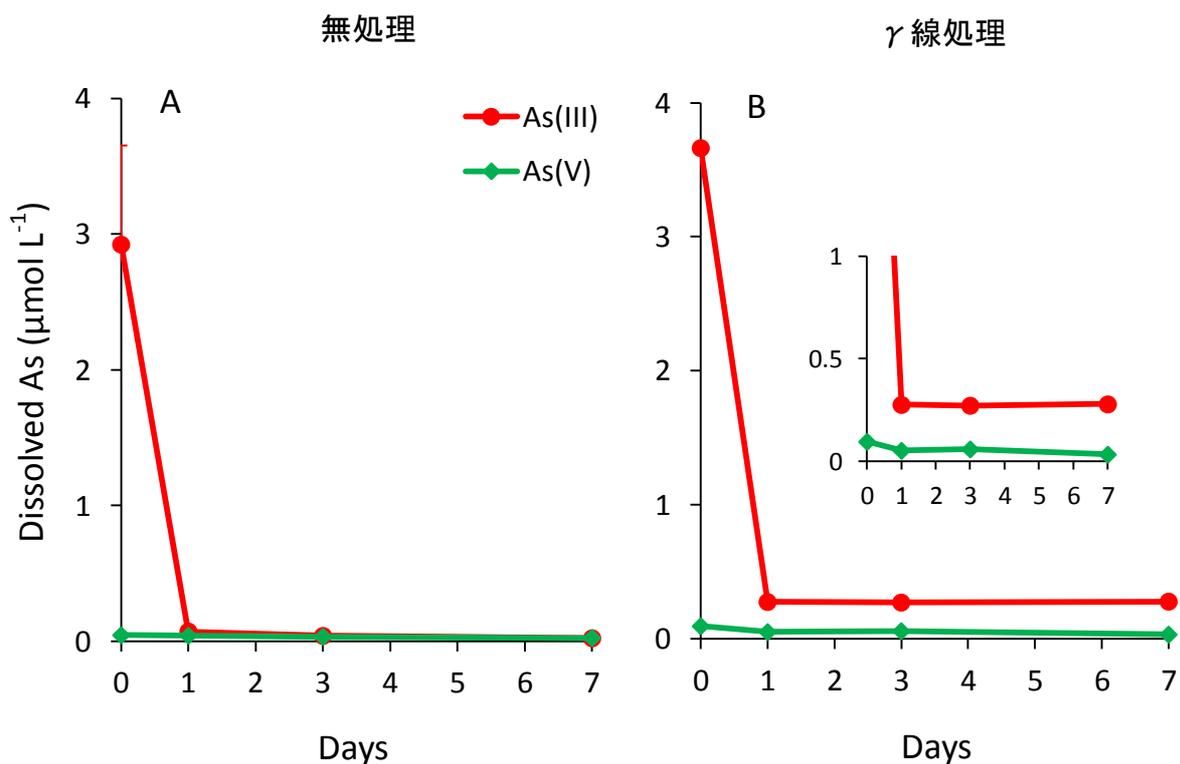


Figure 8. グライ低地土の酸化培養における、液相中のヒ素の化学形態変化。グラフは2連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。エラーバーの欠如は、エラーがシンボルより小さいことを示します。

3-2-2 固相中におけるヒ素の化学形態変化

グライ低地土においても固相中のヒ素の形態別解析を行った。XANES の結果、無処理土壌では酸化培養 1 日後に亜ヒ酸の割合は 85% から 47% まで減少した。その後、亜ヒ酸は $2.8\% \text{ day}^{-1}$ の速度で緩やかに低下した。一方、 γ 線処理土壌では、酸化培養 1 日で亜ヒ酸は無処理土壌と同様に急激に減少したが、速度の遅い 2 段階目の酸化はほとんど進行しなかった (Fig. 9)。

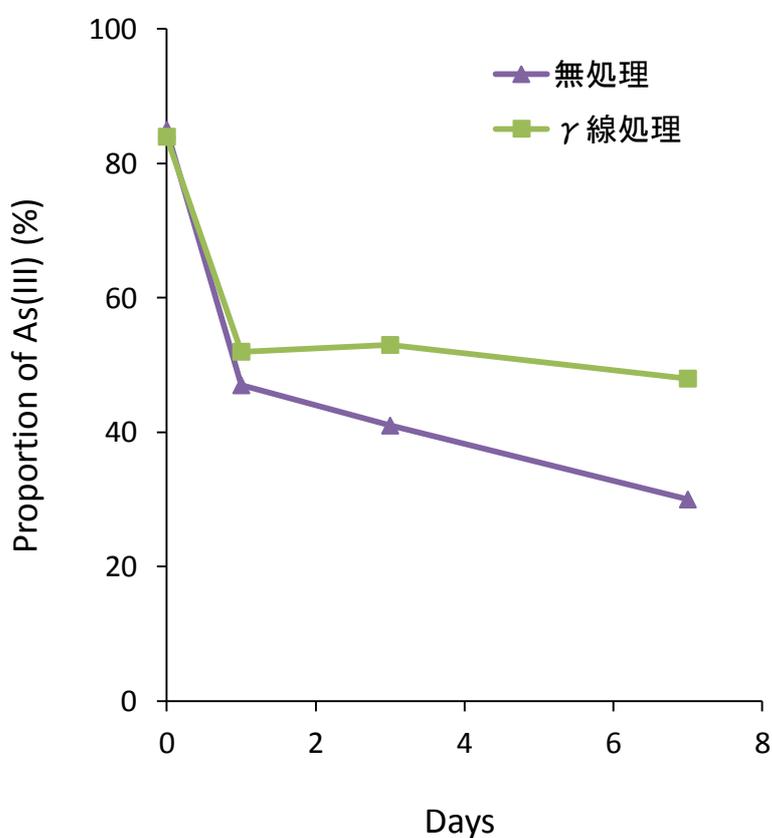


Figure 9. グライ低地土の酸化培養における固相中のヒ素の化学形態変化。

フォトンファクトリーで得られた XANES スペクトルを Figure 10 に示した。グライ低地土の XANES スペクトルのパターンは灰色低地土と極めて類似していた。

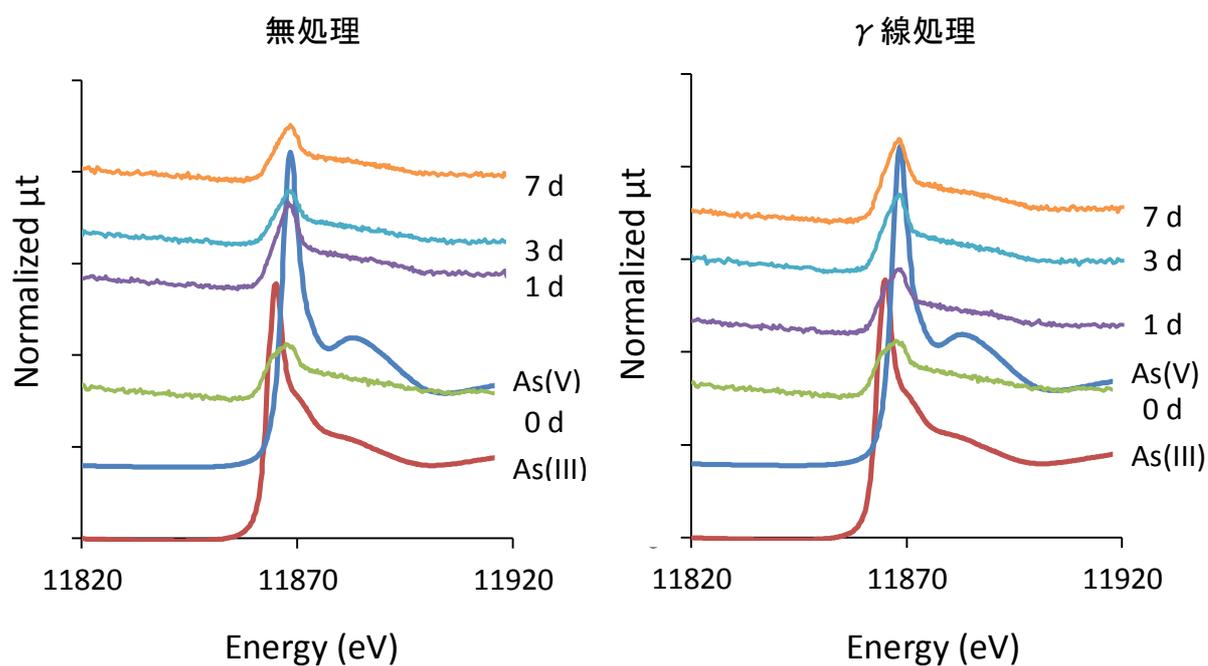


Figure 10. フォトンファクトリーの BL12C で得たヒ素 K-edge XANES スペクトル。

3-3 液相中の鉄濃度

灰色低地土とグライ低地土をそれぞれ 60 日と 100 日間還元培養したところ、液相に 1.6~2.0 mM 程度の鉄が検出された。これらを酸化培養にシフトさせたところ、いずれの土壌試料でも培養 1 日後にはすべての鉄が液層から消失した。酸化培養にシフトする直前に γ 線滅菌した土壌で同様の解析を行ったが、液相における鉄の消失は無処理土壌と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 11)。

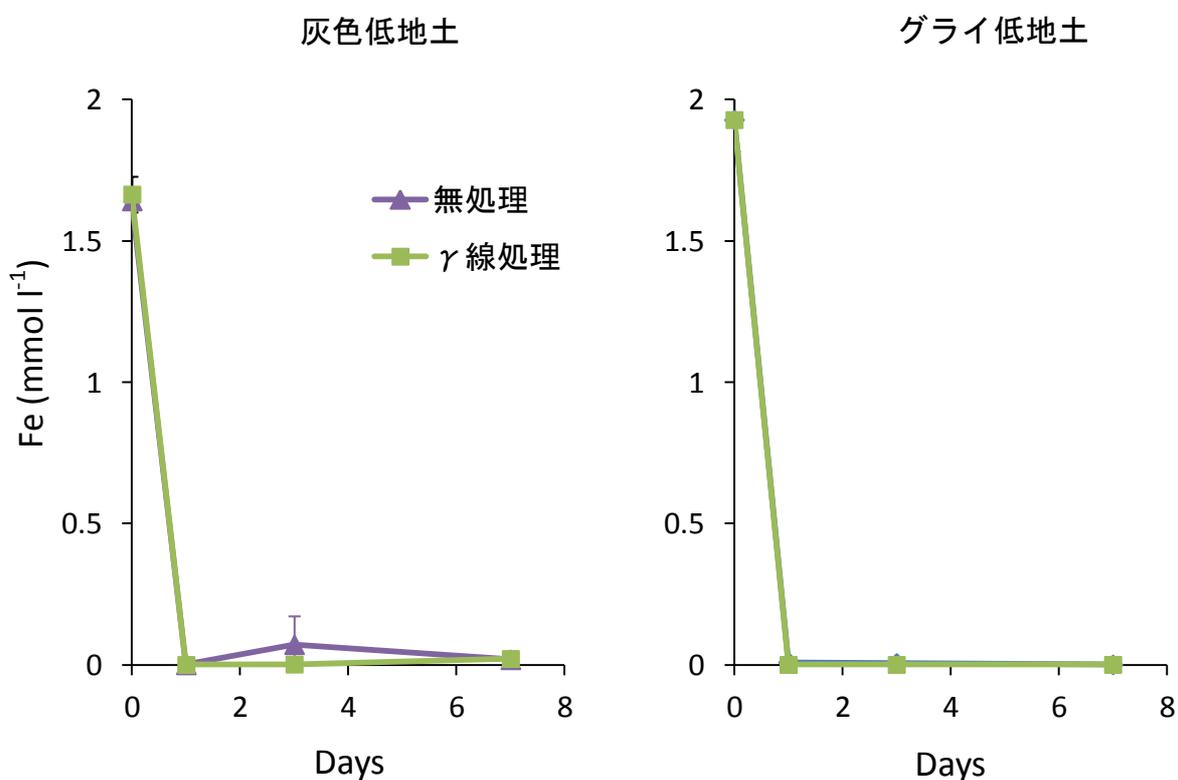


Figure 11. 灰色低地土とグライ低地土の酸化培養における、液相中の鉄の濃度変化。グラフは2連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。

3-4 亜硝酸酸化酵素遺伝子 *aioA* のクローニング解析

酸化培養を 1 週間行った 2 種類の水田土壌より DNA を抽出後、プライマー *aroA95f* / *aroA599r* を用いて *aioA* の PCR 増幅を行った。この産物をクローニング後、AioA のアミノ酸配列に基づき系統解析を行った。

いずれの試料からも 15 クローンをランダムに選抜し、合計 30 クローンを系統解析した (Fig. 12)。灰色低地土においては、得られたクローンは *Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱及び *Gammaproteobacteria* 綱の AioA と近縁であった。このうち、8 クローンは *Alphaproteobacteria* 綱に属した。一方、グライ低地土において得られたクローンは主に *Betaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱に属した。以上の結果より、2 種類の水田土壌中では *Proteobacteria* 門に由来する AioA が優占することが明らかになった。

soilA: 灰色低地土

soilB: グライ低地土

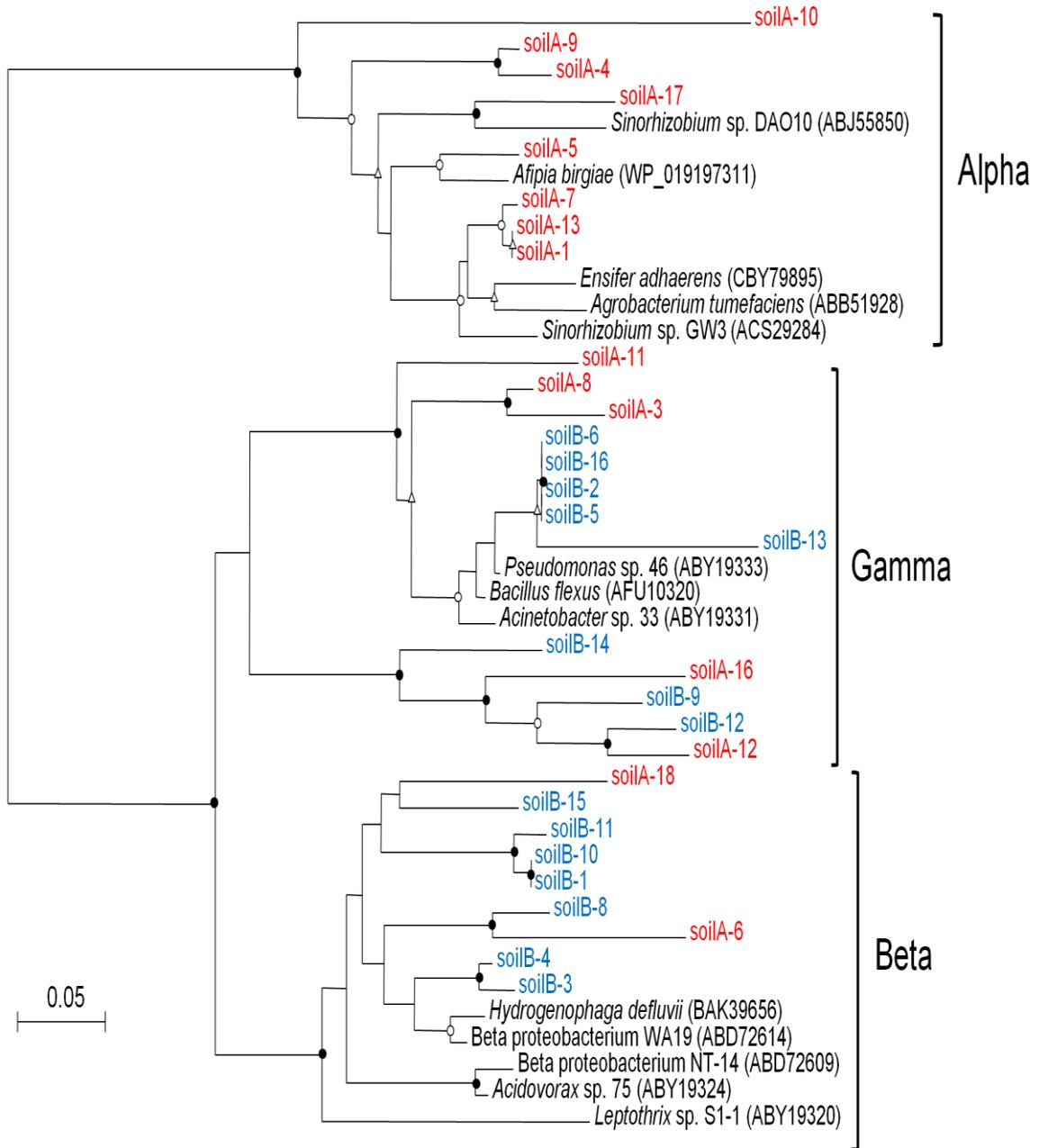


Figure 12. 亜硝酸酸化酵素遺伝子(*aioA*)アミノ酸配列に基づく系統樹。NJ法での解析における50%以上のBootstrap値を枝の分岐部分に表示している。● 90~100% ; ○ 70~89% ; △ 50~69%

第四節 考察

本研究では、人為的にヒ素を添加しない水田土壌において、亜ヒ酸の酸化反応に物理化学的因子及び微生物的因子がそれぞれどの程度寄与しているかを検討した。我々の過去の研究において、総ヒ素濃度 40 mg kg^{-1} の灰色低地土とグライ低地土を 60~100 日の還元培養に供することで、亜ヒ酸の溶出が起こることを明らかにしている (Yamaguchi *et al.*, 2011)。そこで本研究においても同様の土壌を用いて還元培養を行うことで、3~4 μM の亜ヒ酸を液相に溶出させることができた。還元培養後、土壌スラリーを酸化培養にシフトし、液相と固相におけるヒ素の形態変化を HPLC/ICP-MS と XANES によりそれぞれ測定した。また、微生物の影響を確認するため、同様の操作を還元培養後に γ 線滅菌した土壌でも行った。

4-1 液相における亜ヒ酸の挙動

2 種類の土壌スラリーを酸化培養にシフトしたところ、いずれの土壌においても無処理条件と γ 線滅菌条件での亜ヒ酸の挙動は類似しており、1 日後にほとんどすべての亜ヒ酸が液相から消失した (Fig. 5, Fig. 8)。この間、ヒ酸の新たな生成は認められなかった。また、いずれの土壌スラリーにおいても還元培養により 1.6~2.0 mM の鉄が液相に溶出したが、酸化培養により速やかに液相から消失した (Fig. 11)。無処理条件と γ 線滅菌条件で差がないことから、1 日目の亜ヒ酸の消失は物理化学的プロセスと考えるのが合理的である。この原因として、酸化培養にシフトした直後に亜ヒ酸は可溶性の Fe(II) と共沈し固相に固定化する可能性 (Roberts *et al.* 2004; Ona-Nguema *et al.* 2009)、また別な可能性として、酸化条件で可溶性の Fe(II) が酸化され、結晶性の低い鉄酸化物となり、この表層に亜ヒ酸が吸着し固定化する可能性の 2 つが考えられた (Hering *et al.* 1997; Dixit and Hering 2003)。一方、酸素による亜ヒ酸の非生物学的な酸化速度は非常に遅いことが知られているため (Tallma and Shaikh 1980)、亜ヒ酸がまず液相で酸化され、その結果生じたヒ酸が固相に吸着した、というシ

ナリオは考えにくい。以上をまとめると、液相におけるヒ素の化学形態解析より、液相に溶出した亜ヒ酸は Fe(II)との共沈、または鉄酸化物表層への吸着といった物理化学的プロセスにより固相に固定化することが示唆された。

4-2 固相における亜ヒ酸の酸化

固相に吸着した亜ヒ酸のその後の挙動を考察するため、固相中のヒ素の形態別存在割合を XANES で解析した。いずれの土壌スラリーにおいても、XANES スペクトルの変化が見られ、固相で亜ヒ酸が酸化されることが明らかになった (Fig. 7, Fig. 10)。無処理条件では、培養 1 日目に 28%~38%の亜ヒ酸が速やかに酸化された (Fig. 6A, Fig. 9A)。同様の亜ヒ酸酸化は γ 線処理条件でも見られたため (Fig. 6B, Fig. 9B)、この速やかな亜ヒ酸酸化反応は物理化学的なプロセスと考えられた。先に述べたように、バーネサイト (δ -MnO₂) のような Mn(IV)は、亜ヒ酸を含むメタロイドや重金属を効率的に酸化できる土壌鉱物として知られている (Oscarson *et al.*, 1981; Oscarson *et al.*, 1983)。しかしながら、亜ヒ酸の酸化過程で生成したヒ酸や Mn(II)、そしておそらく Mn(III)などが Mn(IV)鉱物表層の活性サイトを速やかにブロックして不活性化 (passivation) してしまうため、一定の段階で酸化反応は終了することが報告されている (Lafferty *et al.* 2010a, 2010b)。本研究の酸化培養実験においても、培養 1 日目までに観察された固相における速やかな亜ヒ酸酸化反応は、2 日目以降は観察されなかった。また後でも考察するように、Mn(IV)による亜ヒ酸酸化速度は細菌単独の酸化速度よりも速いことが報告されている (Jones *et al.*, 2012)。以上のことから、我々の用いた土壌スラリーにおいても、Mn(IV)は固相での亜ヒ酸酸化反応に関与しており、培養 1 日目までの酸化反応は主にこのような鉱物に起因するものであると考えられた。

無処理条件では、培養 2 日目以降も亜ヒ酸酸化反応が進行し続けたが、その速度は培養 1 日目までに観察された速度に比べて 10 倍以上遅いものであった (2.5~2.8% per day⁻¹)。この 2 段階目の酸化プロセスは γ 線処理条件では観察されなかったため、微生物の関与する反応であることが強く示唆された。培養 7

日間に固相で酸化された亜ヒ酸を 100%とすると、このうち微生物による酸化の貢献度は下式から 30%と算出された。

$$\text{貢献度} = \frac{P_{\text{mic}}}{P_7 - P_0} \times 100\%$$

P_{mic} : 微生物による酸化された亜ヒ酸の割合

P_7 : 7 日目における固相中の亜ヒ酸の割合

P_0 : 0 日目における固相中の亜ヒ酸の割合

速度の違い 2 段階目の酸化反応は、培養 7 日目以降も継続することが予想されるので、実際には微生物の貢献度はさらに高い可能性がある。さらに、培養 7 日目の土壌試料から抽出した DNA を用い、亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 (*aioA*) を標的とした細菌群集構造解析を行ったところ、*Proteobacteria* 門に属する系統的に幅広い亜ヒ酸酸化細菌が、我々の用いた土壌スラリーに確かに存在することが確認された (Fig. 12)。

過去の研究より、マンガン酸化細菌は土壌 (He *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008)、淡水 (Nelson *et al.*, 1999; Villalobos *et al.*, 2003)、海洋 (Rosson and Nealson, 1982) など自然環境中に普遍的に存在することが分かっている。これらの細菌は可溶性の Mn(II)を酸化し、吸着性や酸化能が高い Mn(IV)を生成する。また、インド洋の深海堆積物から分離された *Marinobacter* sp. MnI7-9 株は、Mn(II)を酸化することにより亜ヒ酸を間接的に酸化・除去することが報告されている (Liao *et al.*, 2013)。本研究では、亜ヒ酸の酸化に及ぼすマンガン酸化細菌の影響については検討を行わなかったが、土壌中のマンガン酸化細菌が亜ヒ酸酸化過程で生成した Mn(II)を再酸化することで、間接的に亜ヒ酸酸化に貢献する可能性も否定できない。

Jones ら (2012) は、バッチ実験によって δ -MnO₂ 及び亜ヒ酸酸化細菌 (*Pseudomonas fluorescens* と *Agrobacterium tumefaciens*) による亜ヒ酸酸化速度を比較している。その結果、細菌単独の場合に最も酸化速度が遅く、次いで δ -

MnO₂、また両者が共存すると最も酸化速度が速くなることを見出した。この原因として、細菌細胞の存在により亜ヒ酸の δ -MnO₂ 表層への吸着が抑制され、かつ脱離が促進されることが挙げられている。本研究においても、鉍物単独の条件 (γ 線滅菌条件) よりも、鉍物と細菌が共存する条件 (無処理条件) の方が、より高い割合の亜ヒ酸を酸化した。従って、本実験の結果は Jones らの結果を支持すると言える。一方、本研究の実験系では細菌を単独で用いることはできなかつたため、細菌単独と鉍物単独での比較を行うことはできなかつた。

無処理試料では、液相においてほとんどすべての亜ヒ酸が消失したのに対し、 γ 線処理試料では微量 (0.27 μ M) の亜ヒ酸が液相に残存した (Fig. 5B inset、8B inset)。このことは、微生物による速度の遅い 2 段階目の亜ヒ酸酸化反応は、液相で進行した可能性を示唆している。すなわち、土壌鉍物による速度の速い 1 段階目の酸化は固相で進行するが、微生物による 2 段階目の酸化は液相で進行すると考えられた。

4-3 水田土壌における亜ヒ酸の酸化モデル

以上の結果と考察をふまえて、Figure 13 に酸化的な水田土壌における亜ヒ酸酸化モデルを示す。湛水時に液相に溶出した亜ヒ酸は、酸化条件下でまず鉄との共沈または鉄酸化物への吸着により、種々の内圏錯体(単座配位錯体、二座配位単核錯体、二座配位二核錯体)及び外圏錯体を形成し、土壌中の鉍物に固定化する (山根, 1989)。固相中の亜ヒ酸は Mn(IV) のような土壌鉍物により速やかに酸化され、ヒ酸となる (Fig. 13A 黒矢印)。しかしながら、おそらく酸化剤となる鉍物の不活性化等により、この物理化学的な亜ヒ酸酸化反応は反応途上で停止する (Fig. 13A 赤矢印)。静電氣的相互作用と水素結合により生じる外圏錯体は比較的不安定であるため、固相中に残存した亜ヒ酸は一定の分配係数に従って一部液相に溶出し、ここで亜ヒ酸酸化細菌の作用によりヒ酸に酸化されると考えられる (Fig. 13A 緑矢印)。最終的にヒ酸はその高い吸着性のため、再び固相に固定化される。一方、滅菌処理した土壌では、微生物による酸化反応が進行しないため、溶出した亜ヒ酸が酸化されず、固相と液相間の吸着-脱離反応

が平衡に達する。このため、わずかながら液相に亜ヒ酸が残存するものと考えられる (Fig. 13B)。亜ヒ酸酸化細菌の有する亜ヒ酸酸化酵素 (Aio) はペリプラズムに局在し、土壌鉱物に吸着した亜ヒ酸に直接作用するのは困難と考えられる。最近、鉄鉱物や電池電極といった固相に電子を受け渡す、いわゆる細胞外電子伝達を行う微生物に注目が集まっている。このような微生物は、ナノワイヤーと呼ばれる電気伝導性の繊毛タンパクや、キノンといった電子授受を行うメディエーター物質を介して固相への電子の授受を可能にしている。本研究室においても、鉄鉱物に吸着したヒ酸に電子を受け渡すことのできる *Geobacter* sp. OR-1 や *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 を水田土壌より単離している。しかしながらこれまで、土壌鉱物に吸着した亜ヒ酸から直接電子を引き抜く能力を有する亜ヒ酸酸化細菌については報告がない。このため、主に亜ヒ酸が土壌液相で酸化される上記モデルは合理的と考えられた。また本モデルは、液相から固相へのヒ素の完全除去には、微生物の存在が不可欠であることを示しており、将来的な土壌ヒ素汚染修復技術の開発における微生物の重要性を示唆するものである。

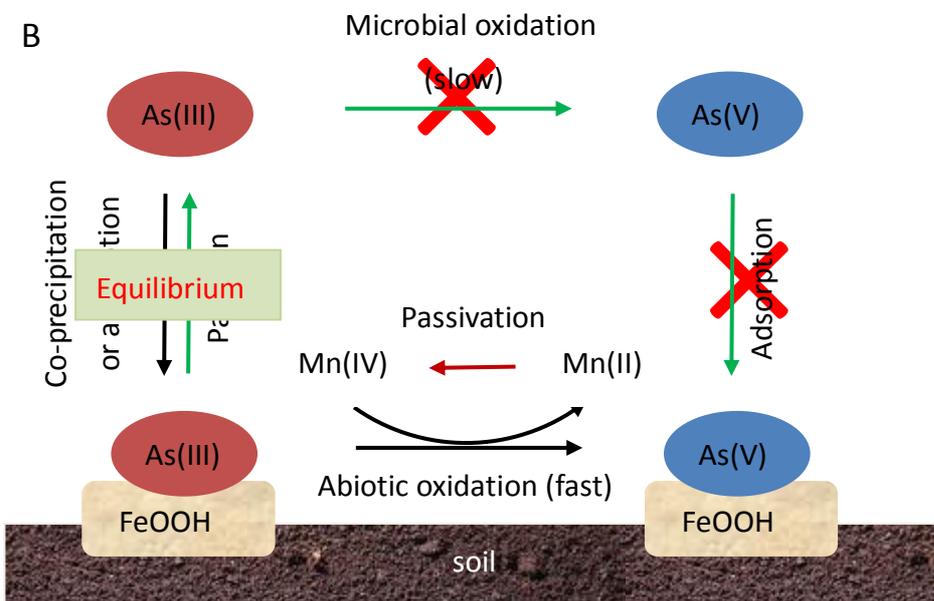
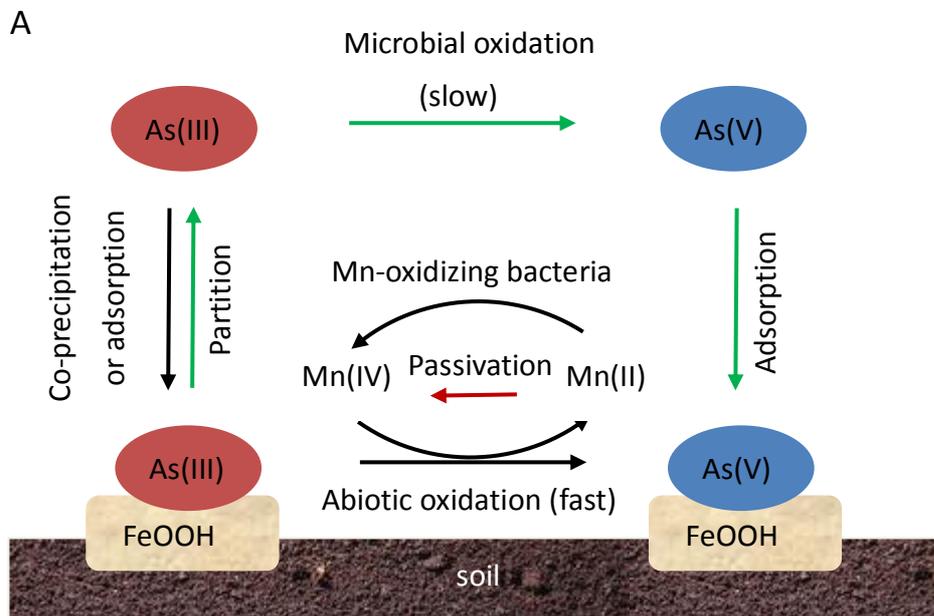


Figure 13. 土壌における砒と酸酸化のモデル
 A:無処理土壌試料、B: γ 線滅菌土壌試料

第五節 要約

土壌中のヒ素は主に、無機態であるヒ酸と亜ヒ酸として存在する。嫌気状態におけるヒ素の還元・溶出にはヒ酸還元細菌や鉄還元細菌のような土壌微生物が関与するという研究データが蓄積しつつある。一方、亜ヒ酸の酸化に関与する因子として、Mn(IV)など物理化学的因子と、微生物的因子があることが分かっている。先行研究より、高濃度の亜ヒ酸存在下では物理化学的な因子の影響は小さく、微生物的因子が優先することが推察される。しかしながらこれまで、水田環境で湛水中に観察されるような低濃度の亜ヒ酸の酸化に、物理化学的因子と微生物的因子のいずれがより貢献しているかは明らかではなかった。また、亜ヒ酸が土壌の固相（鉱物表面）で酸化されるのか、液相で酸化されるのかも不明であった。そこで本研究では上記 2 点を明らかにすることを目的に、まず水田土壌を還元培養に供して亜ヒ酸を液相に溶出させ、これを酸化条件にシフトした後、土壌固相および液相のヒ素の挙動を観察した。

還元培養により 3~4 μM の亜ヒ酸を液相に溶出させた。その後、スラリーを振盪条件での酸化培養にシフトしたところ、液相に溶出した亜ヒ酸は Fe(II) との共沈、または鉄酸化物表層への吸着により速やかに固相に固定化することが分かった。固相における亜ヒ酸の挙動を追跡したところ、培養 1 日目におそらく Mn(IV) のような鉱物による速やかな酸化プロセスが見られた。固相中に残存した亜ヒ酸は一部液相に溶出し、ここで亜ヒ酸酸化細菌の作用によりヒ酸に酸化されると考えられたが、その速度は物理化学的酸化反応の 1/10 以下であった。培養 7 日間に固相で酸化された亜ヒ酸を 100% とすると、このうち微生物による酸化の貢献度は 30% と算出された。さらに、培養 7 日目の土壌試料から抽出した DNA を用い、*aioA* を標的とした細菌群集構造解析を行ったところ、*Proteobacteria* 門に属する系統的に幅広い亜ヒ酸酸化細菌が検出された。

第二章 亜ヒ酸が土壌中の亜ヒ酸酸化細菌群集構造に及ぼす影響

第一節 緒言

自然界でのヒ素循環において、ヒ素の酸化還元反応が重要な影響を及ぼすことが知られている。特に、ヒ素還元反応とそれに伴うヒ素の溶出に微生物が深く関与することはよく知られている (Yamaguchi *et al.*, 2011; Ohtsuka *et al.*, 2013)。一方、ヒ素還元反応の逆反応である亜ヒ酸酸化反応は、物理化学的因子と微生物的因子からなることが知られている。「第一章 水田土壌におけるヒ素の酸化に及ぼす微生物の影響」では、土壌試料の還元培養により 3~4 μM の亜ヒ酸を液相に溶出させた後、酸化培養にシフトさせた。その結果、亜ヒ酸の酸化は主として固相に固定化した後で進行すること、また速度の速い物理化学的な酸化と、速度の遅い微生物的な酸化の 2 段階からなることがわかった。また微生物的な亜ヒ酸酸化反応の貢献度は全体の 30% 以上を占めることも明らかになった。一方 Yamamura ら (2009) は、5 種類の土壌試料に 1,000 μM の亜ヒ酸を添加して酸化培養したところ、亜ヒ酸の酸化は全て土壌微生物により触媒されることを報告している。以上のことから、土壌微生物は亜ヒ酸酸化反応に相当の影響を及ぼすものの、亜ヒ酸の濃度によりその貢献度は大きく異なることが予想される。

ヒ素は毒性物質として有名であり、特に無機態の亜ヒ酸は生体細胞に対してより強い毒性を示す (Ferguson and Gavis, 1972; 湊, 1998)。近年、亜ヒ酸が環境微生物及び亜ヒ酸酸化細菌の群集構造に及ぼす影響が注目されている (Quéménéur *et al.*, 2008, 2010; Halter *et al.*, 2011; Sultana *et al.*, 2012; Lami *et al.*, 2013)。Lami ら (2013) は、200 μM の亜ヒ酸が土壌微生物群集に及ぼす影響をカラム実験により検討したところ、亜ヒ酸の添加により 16S rRNA 遺伝子のコピー数は増加したが、土壌微生物群集の多様性が低下し、特に *Acidovorax* 属に近縁な細菌が優占することを報告している。また、*aioA* を標的として亜ヒ酸酸化細菌の群集構造を解析した結果、亜ヒ酸の添加により *aioA* のコピー数が増加することもわかった。フランスのヒ素汚染河川水においても、

汚染度により亜ヒ酸酸化細菌群集構造に変化が見られ、汚染が著しいサイトでは *aioA* のコピー数が高いことが報告されている (Quéméneur *et al.* 2010)。以上のことから、亜ヒ酸が土壌細菌群集構造や、特に亜ヒ酸酸化細菌群集構造に影響を与えることが示唆される。しかしながら、既往の研究において同じサイトの土壌を異なる複数の濃度の亜ヒ酸に曝露し、その細菌群集構造へ与える影響を検討した例はない。人為的なヒ素漏洩事故などにより環境中に高濃度のヒ素が放出されたとき、環境微生物にどのような影響を及ぼすか理解することは重要である。特に、亜ヒ酸酸化細菌群集に与える影響を理解することは、毒性の高い亜ヒ酸のその後の環境挙動や環境移行を予測する上で重要な情報を与える。そこで第二章では、国内の水田土壌を種々の濃度の亜ヒ酸と共に培養し、第一章と同様に微生物が亜ヒ酸酸化に及ぼす影響について検討すると共に、種々の濃度の亜ヒ酸が土壌細菌群集構造、とりわけ亜ヒ酸酸化細菌群集構造へ与える影響を調査した。具体的には、土壌試料に亜ヒ酸を終濃度 50、500、または 5,000 μM となるように添加し、好気条件で振盪培養を行った。HPLC/ICP-MSにて液相中のヒ素濃度を測定し、亜ヒ酸酸化反応に占める微生物の貢献度とその酸化速度を算出した。細菌群集構造と亜ヒ酸酸化細菌群集構造は、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 及び *aioA* 遺伝子を標的としたクローニングによりそれぞれ解析を行った。

第二節 実験材料および方法

2-1 供試土壌

第一章で用いた灰色低地土とグライ低地土を用いた。

2-2 亜ヒ酸の酸化実験

種々の濃度の亜ヒ酸存在下で、土壌微生物が亜ヒ酸の挙動に及ぼす影響を検討するため、人為的に亜ヒ酸を水田土壌に添加し酸化培養を行った。

2-2-1 亜ヒ酸を添加した酸化培養

土壌 0.3 g (乾土重量) と蒸留水 30 mL を 100 mL 容三角フラスコ瓶に入れ、終濃度が 50、500、5,000 μM となるように亜ヒ酸 (NaAsO_2 , Sigma-Aldrich) を添加し、シリコ栓をした。これ以降、これら試料をそれぞれ試料 50、試料 500、試料 5,000 と表記する。また、亜ヒ酸を添加しない試料を試料 0 と表記する。その後、各試料を 30°C、200 rpm で 7~28 日振盪培養した。また、亜ヒ酸酸化に及ぼす微生物の貢献度を確認するため、オートクレーブ滅菌 (121°C、1 h を連続 2 回) をした土壌試料も調製し同様に培養した。

2-2-2 土壌へのヒ酸吸着量の測定

オートクレーブ処理した土壌試料に、終濃度が 50 μM となるようにヒ酸 (KH_2AsO_4 , 和光純薬) を添加し、30°C、200 rpm で振盪培養した。液相中のヒ酸の減少量 (吸着量) を HPLC/ICP-MS にて測定した。

2-2-3 HPLC/ICP-MS 及び HPLC によるヒ素定量

終濃度50 μM で亜ヒ酸（試料50）またはヒ酸を添加した試料、及び試料500における液相中のヒ素の化学形態と濃度を「第一章 2-3 HPLC/ICP-MSによる液相中のヒ素の測定」に従って測定した。一方、試料5,000における亜ヒ酸とヒ酸の濃度はより簡便な高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定した。培養液1 mLを1.5 mL容エッペンドルフチューブに移し、21,000 $\times g$ 、5分で遠心分離した。その後、上清を採取し、Puradisc 13 mmシリンジフィルター（孔径0.2 μm 、直径13 mm、Whatman）およびシリンジを用い濾過した。HPLC分析にはHitachiのL-7000シリーズを用い、カラムはAminex HPX-87H Ion Exclusion Column (7.8 mm \times 300 mm, Bio-Rad Laboratories)を、溶離液は0.01 N硫酸を使用し、流速0.6 mL min^{-1} 、サンプル流入量25 μL 、分析時間16分という条件で分析した。

2-3 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 分析

土壌試料の細菌群集構造を解析するため、酸化培養後の土壌試料より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 分析を行った。対照実験として亜硫酸を添加しない土壌試料も酸化培養に供し、同様の解析を行った。

2-3-1 DNA 抽出

22 日間酸化培養後の各土壌試料から DNA 抽出を行い、実験に供した。DNA 抽出には FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いた。

2-3-2 PCR

抽出したゲノム DNA 2 μ L を蒸留水 98 μ L に懸濁し、紫外可視分光解析システム DU 700 を用いて定量した。50 ng の鋳型 DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。用いたプライマーは Table 11 に示した。実際には Forward 338f プライマーの 5' 末端に 40 bp の GC-clamp (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) を付加したものをを用いた。Amplitaq gold DNA polymerase (Applied Biosystems) および PCR buffer、dNTP、MgCl₂ Solution (Applied Biosystems) の反応液組成および終濃度と反応条件は Table 12 に示した。PCR 終了後、産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、目的断片の特異的増幅が適切になされているかを確認した。

Table 11. PCR-DGGE プライマー

	Name	Sequence (5' to 3')
Forward	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Reverse	518R	ATTACCGCGGCTGCTGG

Table 12. 338F-518R プライマーを用いた PCR 条件

(a) PCR 反応液組成および終濃度

	Volume (μL)	Final conc.
Template DNA	2	$1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$
10 \times Buffer	5	10 mM Tris-HCl (pH8.3)
dNTP	5	0.2 mM
MgCl ₂	5	2.5 mM
Taq Polymerase	0.5	$0.05 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$
Forward primer	1	$25 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$
Reverse primer	1	$25 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$
Sterilized water	to 50	

(b) PCR 反応条件

94°C	10 min	
94°C	15 sec	} 30 cycles
55°C	45 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	

2-3-3 DGGE

D Code ユニバーサルミューテーション検出システム (Bio-Rad Laboratories) を用いて DGGE を行った。ゲルの組成は変性剤濃度勾配が 30~60% になるように調製した (Table 13)。調製液は熱湯中で均一に溶かし、10 min 脱気後、氷上で 15 min 冷却した。それぞれに 0.1 mg mL^{-1} の過硫酸アンモニウムを 200 μL 、TEMED を 20 μL 添加し、変性剤濃度 60% の調製液には D code dye solution を 200 μL を添加した。よく混合し、直ちに濃度勾配装置 NKS-30 (AS ONE) とペリスタポンプ (ATTO) により濃度勾配ゲルを作成した。ゲル版作成の詳細は付属のプロトコルに従った。PCR 産物全量に 1/6 量の 10 \times Gel loading dye (Bio labs) を加えパラフィルム上で混合し、ウェルコームヘアプライした。泳動条件は 60 $^{\circ}\text{C}$ 、170 V、6 h で行った。終了後、ゲルを取り出し $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ エチジウムブロマイド溶液に 15 min 浸し染色し、1 \times TAE buffer 中で 20 min 脱色した。ゲルはプリントグラフ AE-6911FXFD (ATTO) により紫外線照射し撮影した。

Table 13 ゲル組成

	Denaturant concentration	
	30%	60%
Bis-Acrylamide	4 mL	4 mL
Formamide	2.4 mL	4.8 mL
50 \times TAE buffer	0.4 mL	0.4 mL
Urea	2.52 g	5.04 g
D.W.	to 20 mL	to 20 mL

2-3-4 銀染色

DGGE ゲルに Fixing solution を加え 15 分間振盪し取り除いた。そこに蒸留水を加え 10 分間振盪した。この作業を 3 回繰り返した。その後、Development accelerator solution を加え 1 分間振盪し取り除いた。ゲルに蒸留水を加え 1 分間振盪した。この作業を 2 回繰り返した後、Silver solution を加え 30 分間振盪し取り除いた。ゲルに蒸留水を加え 1 分間振盪した。この作業を 2 回繰り返し、Development solution を加えた。バンドが確認できるまで振盪し溶液を取り除いた。そこに Development stop solution を加え 30 分間振盪した。銀染色により染色されたバンドを切り出し、切り出したバンドを 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに入れて TE を 50 μ L 加え、DNA を溶出させた。銀染色に使用した溶液の組成を Table 14 に示した。

Table 14. 銀染色に使用した溶液の組成

(a) Fixing solution の組成

蒸留水	200 mL
Methanol	200 mL
Acetic acid	20 mL
Glycerol	5 mL

(b) Silver solution の組成

Silver nitrite	400 mg
蒸留水	to 400 mL

(c) Development accelerator solution の組成

Sodium thiosulfate pentahydrate	126 mg
蒸留水	to 400 mL

(d) Development solution の組成

37% Formalin	244.4 μ L
Sodium carbonate anhydrous	8 g
蒸留水	to 400 mL

(e) Development stop solution の組成

Acetic acid	10 μ L
蒸留水	to 400 mL

2-3-5 シークエンス

切り出したバンドから溶出させた16S rRNA遺伝子断片を鋳型とし、再び338 Fと518 RのプライマーペアによりPCRを行った。反応液組成および反応条件はTable 12に従った。PCRは2連で行い、QIAquick PCR Purification Kitによる精製で一つに濃縮した。操作はキット付属の添付マニュアルに従った。精製PCR産物を鋳型とし、シークエンスリアクションを行った。反応液はBigDye terminator v3.1 cycle sequencing kitを用いた。シークエンス反応は「第一章 2-5-6から2-5-8」に従って行った。得られたバンドの配列をDDBJ/EMBL/GenBankデータベースへ登録番号LC027609- LC027621として登録した。

電気泳動用の画像解析ソフトQuantity-one software (version 4.6.3, Bio-Rad Laboratories)を用い、バンドの濃度の計算を行った。下式のようにShannon-Wiener指数を計算し多様性指数を求めた。

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

S : 総バンド数

P_i : i 番目のバンドの濃度が総バンドの濃度に占める割合

2-4 *aioA* を標的とした TA クローニング

亜硝酸酸化酵素遺伝子 (*aioA*) を標的とした TA クローニング解析により、酸化培養後の土壌試料における亜硝酸酸化細菌群集構造を解析した。

2-4-1 DNA 抽出

2-3-1 で得た DNA を TA クローニングに供した。

2-4-2 *aioA* の PCR 増幅

50 ng の鋳型 DNA を用いて *aioA* 断片を増幅した。2 種類のプライマー *aoxBM1-2F/aoxBM3-2* (Quéménéur *et al.* 2008) 及び *aroA95F/aroA599R* を用いた。用いた *aroA95F/aroA599R* プライマー及び Taq polymerase、PCR buffer、dNTP (Takara Bio) の反応液組成、終濃度および各反応条件は「第一章 2-5-2 *aioA* 遺伝子の PCR」に示した。用いた *aoxBM1-2F/aoxBM3-2R* プライマーは Table 15 に示した。Taq polymerase および PCR buffer、dNTP (Takara Bio) の反応液組成、終濃度および各反応条件は Table 16 に示した。

Table 15. *aoxBM1-2F/aoxBM3-2R* プライマー

Primers	Orientation	Sequences (5'-3')
<i>aoxBM1-2F</i>	Forward	CCACTTCTGCATCGTGGGNTGYGGNTA
<i>aoxBM3-2R</i>	Reverse	TGTCGTTGCCCCAGATGADNCCYTTYTC

Table 16. *aoxBM1-2F/aoxBM3-2R* を用いた PCR 条件

(a) PCR 反応液組成および終濃度

	Volume (μL)	Final conc.
Template DNA	2	1 ng μL^{-1}
10 \times Ex Taq Buffer (20 mM Mg^{2+} plus)	5	20 mM Tris-HCl (pH8.0)
dNTP	4	2.5 mM each of dNTP
Ex Taq	0.25	5 U μL^{-1}
Forward primer	2	0.4 μM
Reverse primer	2	0.4 μM
Sterilized water	up to 50	

(b) PCR 反応条件

95°C	5 min	} 35 cycles
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	1.5 min	
72°C	7 min	

2-4-3 TA クローニング及びシーケンス

2-4-2で得たPCR産物を用い、「第一章 2-5-3から2-5-7」に従ってTAクローニング及びシーケンスを行った。得られた *aioA* 配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースへ登録番号 LC012044-LC012307 として登録した。

2-4-4 OTU の分類と系統樹の作成

各土壌試料ごとに配列データを OTU (Operational Taxonomic Unit) に分類してから系統樹を作成した。OTU の分類には解析ソフト MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013)、GreenGenes、Mothur (<http://www.mothur.org/>) を使用した。MEGA6 の ClustalW Multiple alignment 機能を使用して配列のアライメントを行い .fas ファイルとして保存した後、拡張子を .fasta に書き換えた。 .fasta ファイルを GreenGenes の Create distance matrix ツールに供して distance_matrix ファイルを取得後、拡張子を .dist に変更した。Mothur を起動し、97% 以上の相同性を示したものを 1 つの OTU として .dist ファイルから OTU を分類した。自動生成された .an.rabund ファイルにて OTU 数と含まれるクローン数を、.an.list ファイルにて各 OTU に該当するアミノ酸配列を確認した。OTU 内に複数の配列が含まれる場合はアミノ酸配列同士の相同性を計算し、より多くの配列と高い相同性を示した配列を OTU の代表配列とした。

NCBI より入手した各種細菌の *aioA* のアミノ酸配列データと、作成した OTU のデータを用いて系統樹を作成した。Clustal X2 でアライメントを行い、配列編集ソフト (SeaView) で修正した (Galtier *et al.* 1996)。修正した配列を再び Clustal X2 で開き、ブートストラップ法に基づいて系統樹を作成した (Felsenstein, 1985)。ブートストラップ値を 1,000 反復によって算出させた。系統樹は系統樹編集ソフト (NJplot) により表示し、アウトグループの調整を行った (Saitou and Nei, 1987; Perrière and Gouy 1996)。

2-4-5 Rarefaction curve の作成及び多様性の解析

Rarefaction curve の作成には、OTU の分類が必要となる。まずは 2-4-4 で Mothur を起動し、.dist ファイルを基に DNA 配列を OTU に分類した。自動生成された .an.rabund ファイルを .csv ファイルに加工した後、統計解析ソフト R (<http://cran.r-project.org/>) を用いて Rarefaction curve を作成した。Shannon-Wiener 指数を 2-3-5 で示した式に基づき計算し多様性を求めた。 S が総 OTU の数であり、 P_i は i 番目の OTU に入っている配列の数が総配列の数に占める割合である。

2-5 亜ヒ酸耐性菌の計数及び単離

土壌試料中の亜ヒ酸耐性細菌の計数を行うため、一般的な細菌培養用培地 (PTYG 培地) に終濃度 5,000 μM の亜ヒ酸を添加した培地を調製した。PTYG 培地の組成は Table 17 に示した。酸化培養後の土壌試料を適当に希釈し、各希釈倍率に 3 枚ずつ寒天培地にプレーティングを行った。培養温度は 30°C とし、培養 3 日後にコロニー数を計測し、土壌 1 g あたりの亜ヒ酸耐性菌数 (CFU) を求めた。培養後のプレートから 18 個のコロニーをランダムに選択し、single colony isolation 後、純粋菌株を得た。これら菌株は、16S rRNA 遺伝子に基づき簡易同定した。なお、土壌試料中の培養可能な総菌数を計数するため、亜ヒ酸を添加しない PTYG 培地も調製し、同様の操作を行った。単離した亜ヒ酸耐性菌の 16S rRNA 遺伝子を DDBJ/EMBL/GenBank データベースへ登録番号 LC051121-LC051138 として登録した。

得られた亜ヒ酸耐性菌株が亜ヒ酸酸化能を有するか確認するため、PTYG 液体培地、無機塩培地 (Table 18)、及び 0.01~0.1% の酵母エキスを含む無機塩培地をそれぞれ調製し、5,000 μM 亜ヒ酸の存在下で単離した亜ヒ酸耐性菌を接種・培養した。経時的に HPLC にて液相中のヒ素の化学形態と濃度を測定し、各菌株の亜ヒ酸酸化能の有無を確認した。

Table 17. PTYG 培地組成

Composition	Final conc. (g L ⁻¹)
Bacto Peptone	2.5
Bacto Tryptone	2.5
Yeast extract	5.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.035
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3
Glucose	5
Agar	15

Table 18. 無機鹽培地組成

Composition	Final conc.
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.5 g L ⁻¹
KCl	0.05 g L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂	0.1 g L ⁻¹
NaHCO ₃	0.5 g L ⁻¹
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	0.07 g L ⁻¹
Trace mineral element solution (Table 19)	1.0 mL L ⁻¹
Vitamin solution (Table 20)	1.0 mL L ⁻¹
17 mg L ⁻¹ Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	1.0 mL L ⁻¹
3 mg L ⁻¹ Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	1.0 mL L ⁻¹
NaAsO ₂	5.0 mM
pH	7.5-8.0

Table 19. Trace mineral element solution の組成

$C_6H_9NO_6$ (NTA)	64 mg L ⁻¹
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	6.750 mg L ⁻¹
$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	0.500 mg L ⁻¹
$CoCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.120 mg L ⁻¹
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.500 mg L ⁻¹
$ZnCl_2$	0.500 mg L ⁻¹
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.125 mg L ⁻¹
H_3BO_3	0.050 mg L ⁻¹
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0.120 mg L ⁻¹
NaCl	5.000 mg L ⁻¹
$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	0.600 mg L ⁻¹
$Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$	0.130 mg L ⁻¹

Table 20. Vitamin solution の組成

D-Biotin	0.020 mg L ⁻¹
Folic acid	0.045 mg L ⁻¹
Pyridoxine-HCl	0.100 mg L ⁻¹
Thiamine-HCl	0.050 mg L ⁻¹
Nicotinic acid	0.050 mg L ⁻¹
DL-Calcium pantothenate	0.050 mg L ⁻¹
Vitamin B ₁₂	0.001 mg L ⁻¹
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.050 mg L ⁻¹
DL-Lipoic acid	0.050 mg L ⁻¹

2-6 亜ヒ酸酸化細菌の接種実験

Alphaproteobacteria 綱の亜ヒ酸酸化細菌が、土壌に添加した高濃度の亜ヒ酸を酸化できるか確認するため、滅菌土壌への亜ヒ酸酸化細菌の接種実験を行った。

2-6-1 供試菌株

供試菌株として *Alphaproteobacteria* 綱に属する亜ヒ酸酸化細菌 *Shinorhizobium* sp. KGO-5 (Dong *et al.*, 2014) を用いた。KGO-5 株は本研究室において高度ヒ素汚染土壌から単離された通性独立栄養性の亜ヒ酸酸化細菌である。

2-6-2 KGO-5 株の培養及び菌体懸濁液の調製

KGO-5 株を無機塩培地 (Table 18) に接種し、5 日間 30°C、200 rpm で振盪培養を行った。培養液を 1 mL 採取し、1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移した後に遠心 (21,000×g、10 min) し、その上澄みを捨てた。1 mL の滅菌生理食塩水を添加後ボルテックスで攪拌し、同様に遠心し、その上澄みを捨てた。この作業を 2 回行い、再度 1 mL 生理食塩水に懸濁したものを菌体懸濁液とした。

2-6-3 菌体の接種および培養

2-2-1 と同様に調製した土壌試料に、終濃度 5,000 μM の亜ヒ酸を添加した後、オートクレーブ処理 (121°C、1 h を連続 2 回) した。ここに菌体懸濁液を 1 mL 添加し、4 日間 30°C、200 rpm で振盪培養を行った。また、オートクレーブ処理 (121°C、20 min) した菌体懸濁液を 1 mL 添加した対照実験も行った。HPLC によりヒ素の化学形態および濃度を経時的に測定した。

第三節 結果

3-1 灰色低地土

3-1-1 試料 50

無処理土壌試料においては、酸化培養 4 日間で 50 μM の亜ヒ酸はすべて液相から消失したが、ヒ酸は 15 μM しか生成しなかった (Fig. 14A)。オートクレーブ処理した土壌試料においても、酸化培養 3 日間で亜ヒ酸は 15 μM 減少したが、その後の減少は見られなかった (Fig. 14B)。オートクレーブ処理した土壌試料ではヒ酸の生成は全く認められなかった。

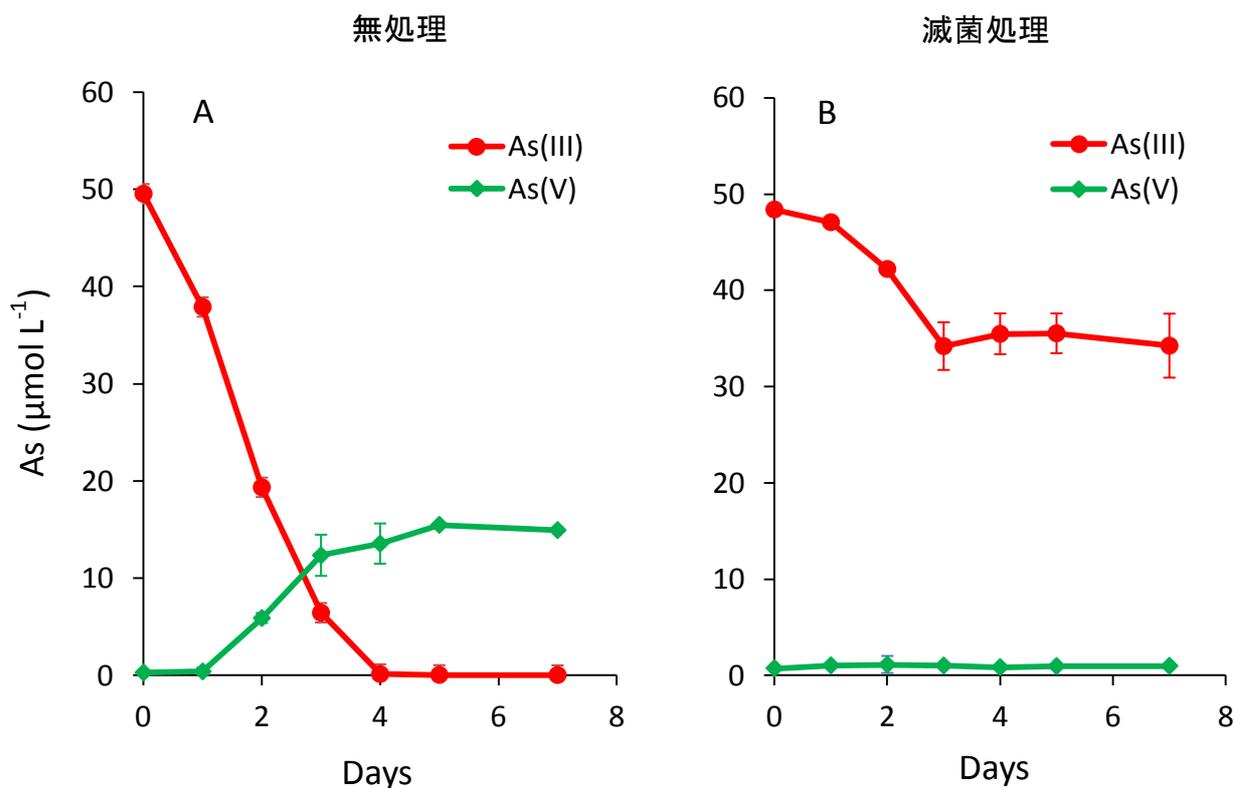


Figure 14. 試料 50 におけるヒ素の化学形態と濃度の経時変化。グラフは 2 連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。

3-1-2 ヒ酸の吸着実験

滅菌した灰色低地土へのヒ酸の吸着量を測定したところ、培養 2 日間でヒ酸は 20 μM 程度減少したが、その後の減少は見られなかった (Fig. 15)。

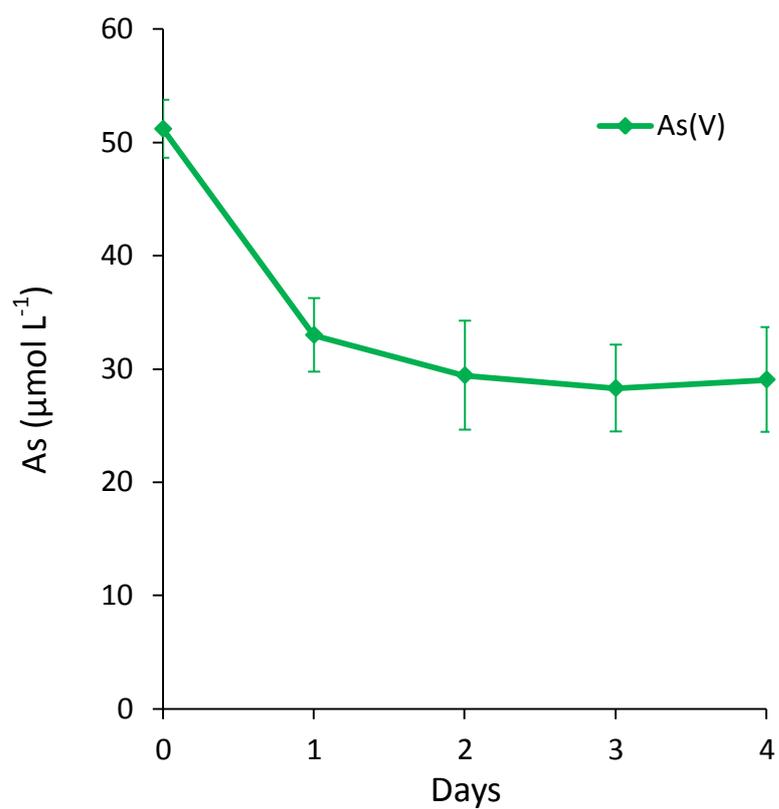


Figure 15. 滅菌灰色低地土へのヒ酸の吸着。グラフは 2 連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。

3-1-3 試料 500

無処理土壌試料においては、酸化培養 11 日間で添加した亜ヒ酸はすべて液相から消失し、400 μM のヒ酸が検出された (Fig. 16A)。オートクレーブ処理した土壌試料では、培養過程で 30 μM 程度の亜ヒ酸が減少したが、ヒ酸の生成は認められなかった (Fig. 16B)。

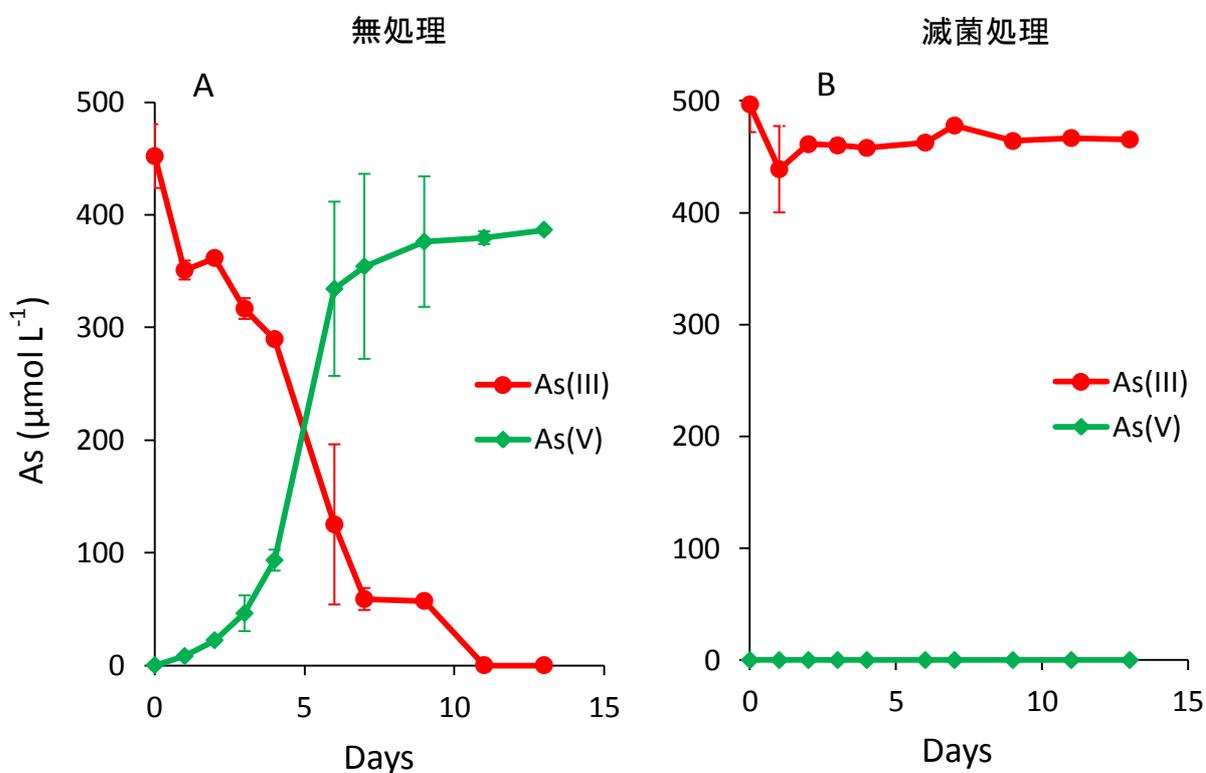


Figure 16. 試料 500 におけるヒ素の化学形態と濃度の経時変化。グラフは 2 連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。

3-1-4 試料 5,000

無処理土壌試料では、22 日間培養後に全ての亜ヒ酸が液相から消失し、約 5,000 μM のヒ酸が検出された (Fig. 17A)。一方、オートクレーブ処理した土壌試料では、亜ヒ酸の減少、ヒ酸の生成のいずれも観察されなかった (Fig. 17B)。

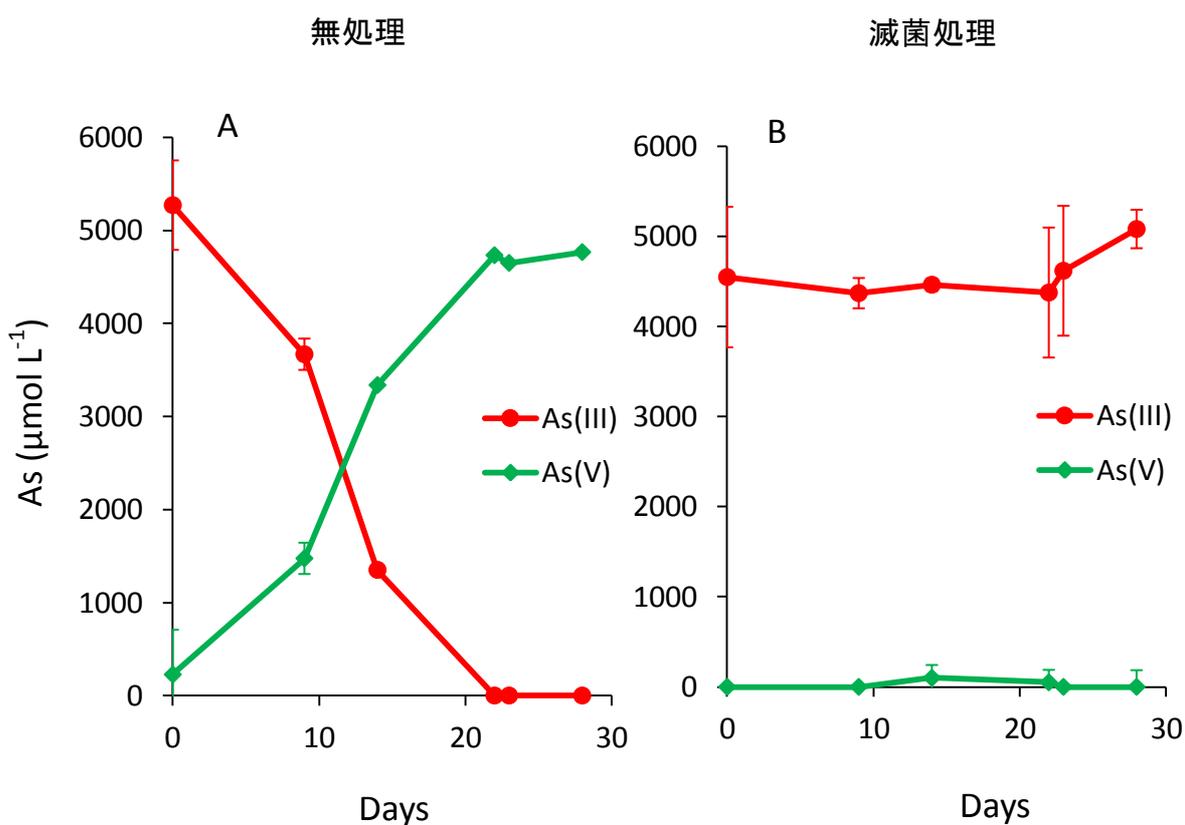


Figure 17. 試料 5,000 におけるヒ素の化学形態と濃度の経時変化。測定値は平均値 \pm 標準偏差 (n=3)。

3-1-5 PCR-DGGEによる微生物群集構造解析

種々の濃度の亜硝酸添加条件下における土壌細菌群集構造の変化を解析するため、亜硝酸を添加した試料（試料 50、試料 500、試料 5,000）及び添加しない試料（試料 0）を対象として PCR-DGGE を行った（Fig. 18）。その後、主要なバンドを切り出し、シーケンス解析を行った（Table 21）。

試料 50 と試料 500 における細菌群集構造は、試料 0 と比較して大きく変動しなかったが、*Chitinophaga filiformis* (band b), *Bdellovibrio bacteriovorus* (band c), *Bacillus thermocopriae* (band d), and *Chitinophaga arvensicola* (band e) と近縁なバンドが新たに検出された（Fig. 18）。一方、試料 5,000 ではこれらのバンドが消失し、細菌群集構造が大きく変動していることが明らかになった（Fig. 18）。試料 5,000 では特に *Bacillaceae* 科に近縁な細菌（bands f, g, h, i, j, k, l, and m）が優占していることが分かった（Table 21）。試料 0 及び試料 50、試料 500、試料 5,000 の Shannon-Wiener 指数 (H') はそれぞれ 2.022, 1.711, 1.511 と 1.496 であった。以上のことから、高濃度の亜硝酸の添加により土壌細菌群集構造が変化すると共に、その多様性が低下することがわかった。

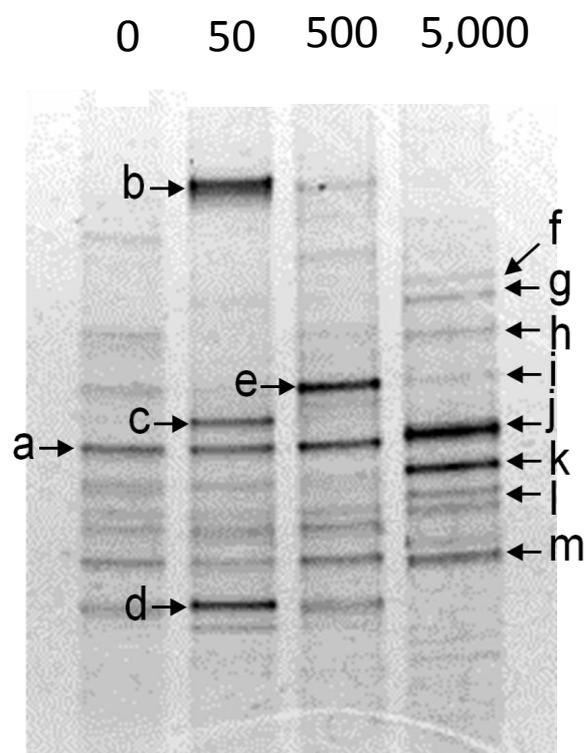


Figure 18. 種々濃度の酢ヒ酸の添加による土壤細菌群集構造の変動
 図の上の数字はそれぞれ試料 0、試料 50、試料 500、試料 5,000 を示す。
 a~m は切り出してシーケンスしたバンドを示す (Table 21 参照)

Table 21. DGGE バンドのシーケンス解析結果

Band	Length (bases)	Most closely related organisms in GenBank database	Accession no.	Similarity (%)
a	143	<i>Bacillus acidiceler</i>	KF475796	98
b	154	<i>Chitinophaga filiformis</i>	NR_113724	91
c	113	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	AF148941	94
d	135	<i>Bacillus thermocopriae</i>	KP010245	99
e	153	<i>Chitinophaga arvensicola</i>	AB681052	92
f	137	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	KF958479	94
g	132	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	KF958479	94
h	124	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	KF535154	98
i	122	<i>Bacillus licheniformis</i>	KM287418	96
j	162	<i>Bacillus licheniformis</i>	KM287420	95
k	142	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	KF958479	97
l	128	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	KF958479	95
m	135	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	96

3-1-6 亜硫酸耐性細菌の計数及び単離

各試料を亜硫酸を添加しない PTYG 培地にプレーティングし、培養可能な総菌数を計数した (Table 22)。試料 0 及び試料 50、試料 500 では、それぞれ 7.88、7.90、7.77 \log_{10} CFU g soil⁻¹ となり、有意差は観察されなかった (Student's *t*-test, $p > 0.23$)。これに対し試料 5,000 では、これら 3 つの試料に比べて有意に低い総菌数が確認された (7.34 \log_{10} CFU g soil⁻¹、Student's *t*-test, $p < 0.01$)。

一方、終濃度 5,000 μM の亜硫酸を添加した PTYG 培地を用い、各土壌試料中の亜硫酸耐性細菌の数を計数した (Table 22)。試料 0 では、亜硫酸耐性細菌の数は 6.25 \log_{10} CFU g soil⁻¹ となり、総菌数のわずか 2.3%であった。試料 50 と試料 500 においても、耐性菌の数は総菌数の 10%以下であった (Student's *t*-test, $p < 0.01$)。これに対し、試料 5,000 では総菌数とほぼ同程度の耐性菌が検出された (7.82 \log_{10} CFU g soil⁻¹)。前者 3 つの試料と、試料 5,000 中の亜硫酸酸化細菌の数には有意差が認められた。

試料 5,000 から得られた亜硫酸耐性細菌に亜硫酸酸化能が存在するか確認するため、18 コロニーをランダムに選抜し、純化した後 16S rRNA 遺伝子に基づき簡易同定した (Table 23)。その結果、18 株のうち 16 株が *Bacillus* 属と高い相同性を示した。さらに、PTYG 液体培地、無機塩培地、0.01~0.1%の酵母エキスを添加した無機塩培地など種々の培地を用いて、これらの菌株の亜硫酸酸化能の有無を検討した。しかしながら、すべての菌株で亜硫酸酸化能を確認することができなかった。詳細は記述しないが、試料 5,000 からは無機塩培地を用いて独立栄養性亜硫酸酸化細菌の集積と単離も試みたが、成功しなかった。

Table 22. 各種土壌試料中の培養可能な総菌数と亜ヒ酸耐性細菌数

Spiked As(III) (μM)	Log10 CFU g soil ⁻¹ on PTYG medium containing:	
	0 μM As(III) ^a	5,000 μM As(III) ^b
0 (unspiked slurry)	7.88 \pm 0.71 ^c	6.25 \pm 0.24
50	7.90 \pm 0.07	6.58 \pm 0.27
500	7.77 \pm 0.11	6.74 \pm 0.08
5,000	7.34 \pm 0.06	7.82 \pm 0.02

^a 総菌数を測定するため、亜ヒ酸を添加しない PTYG 培地を使用

^b 亜ヒ酸耐性細菌数を測定するため、5,000 μM の亜ヒ酸を添加した PTYG 培地を使用

^c 値は平均値 \pm 標準偏差 (n=3)。

Table 23. 試料 5,000 より単離された亜ヒ酸耐性細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づく簡易同定

Isolates	Length (bases)	Most closely related organisms in GenBank database	Accession no.	Similarity (%)
1	136	<i>Bacillus thioparans</i>	KM374719	100
2	140	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99
3	134	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99
4	138	<i>Bacillus thioparans</i>	KM374719	93
5	134	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	100
6	134	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99
7	134	<i>Bacillus licheniformis</i>	KM505054	99
8	128	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	GU944896	98
9	140	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99
10	141	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	98
11	138	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99
12	138	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99
13	148	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	97
14	126	<i>Rhodococcus equi</i>	AB999844	98
15	135	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99
16	132	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	98
17	133	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99
18	138	<i>Bacillus niacini</i>	AY167817	99

3-1-7 亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 (*aioA*) の解析

亜ヒ酸酸化酵素遺伝子 (*aioA*) を対象として *aroA95F/aroA599R* プライマーを用いたクローニングを行い、各土壌試料からそれぞれ 29~32 クローンの配列を得た。各土壌試料ごとに配列データを 11~20 OTUs に分類した。Rarefaction curve を作成し、coverage 指数と Shannon-Wiener 指数を算出し、亜ヒ酸酸化細菌群集の多様性の推定を行った (Fig. 19A)。

coverage 指数より、試料 0 及び試料 50、試料 500 から得られた配列は *aioA* 全体の 56~75% をカバーすることが分かった。それぞれの Shannon-Wiener 指数は 2.25、2.29 と 2.78 となり、これら試料間で多様性に大きな差は見出されなかった。これに対し、試料 5,000 では coverage 指数が 79% と高く、Shannon-Wiener 指数は 1.84 と他の試料に比べて最も低くなった。

4 種類の土壌試料から得られた *aioA* の塩基配列をアミノ酸配列に変換し、AioA の系統解析を行った (Fig. 20)。試料 0、試料 50、及び試料 500 において、系統的に多様なクローンが観察され、これらは *Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱の AioA と 80% 以上の相同性を示した (Fig. 20)。特に *Beta/Gammaproteobacteria* グループの AioA と近縁なクローンが優占することが分かった (Fig. 22A)。一方、試料 5,000 から得られた 29 クローンのうち、27 クローンは *Alphaproteobacteria* 綱の AioA と近縁であった。この中でも特に、*Bosea* sp. WAO に近縁な配列が優占することが明らかになった (Fig. 22A)。

次に *aoxBM1-2F/aoxBM3-2R* プライマーを用いて同様の実験を行った。4 種類の土壌試料からそれぞれ 33~40 個のクローンが得られ、これらは 4~24 OTUs に分類された。coverage 指数と Shannon-Wiener 指数を算出したところ、試料 0 では高い多様性が見られたが ($H' = 3.04$)、亜ヒ酸を添加した試料 (試料 50、試料 500、試料 5,000) では多様性が低下し、特に試料 5,000 で多様性が最も低下することが明らかになった ($H' = 1.97, 2.63, 0.55$)。AioA の系統解析の結果、いずれの土壌試料においても *Alphaproteobacteria* 綱の AioA と近縁なク

ローンが優占することが明らかになった (Fig. 21、Fig 22B)。興味深いことに、試料 5,000 では *aroA95F/aroA599R* プライマーを用いて解析した場合と同様に、*Bosea* sp. WAO に近縁なクローンが優占していた (Fig. 21、Fig 22B)。

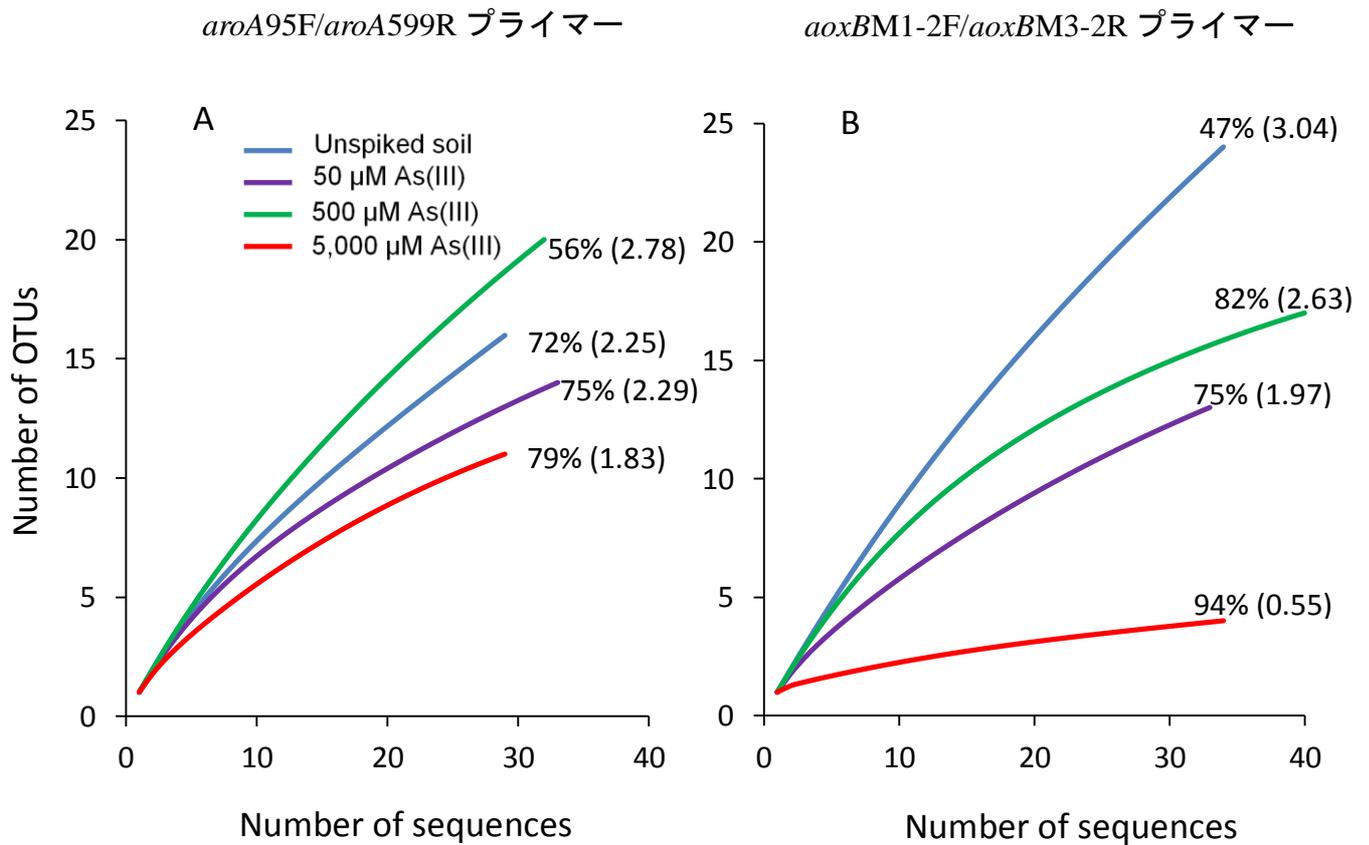


Figure 19. 2 種類のプライマーを用いて *aioA* のクローン解析を行った際の、各土壌試料の Rarefaction curve。パーセンテージは coverage 指数を示し、括弧内の値は Shannon-Wiener 指数を示す。

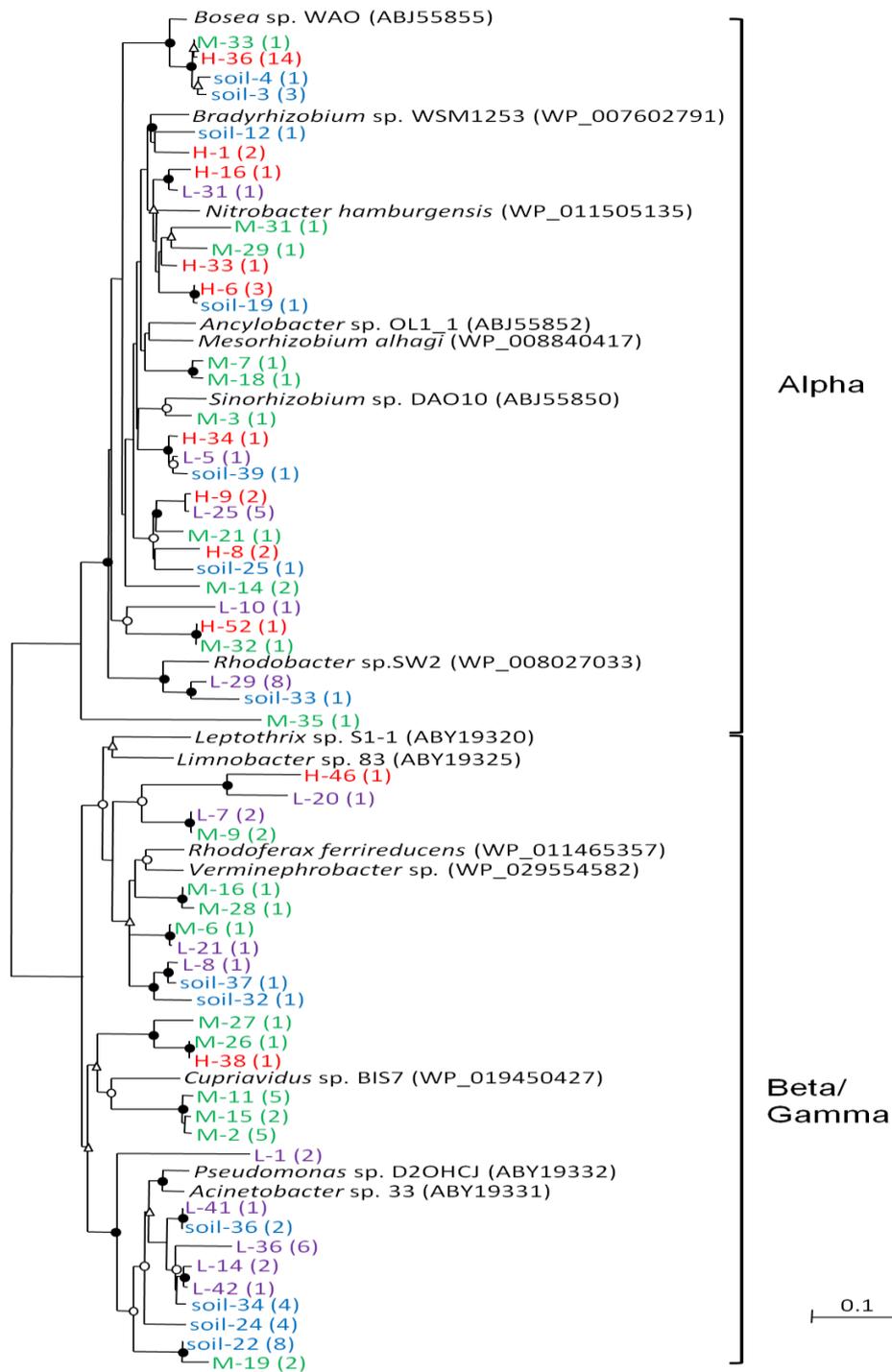


Figure 20. *aroA95F/aroA599R* プライマーを用いて解析した *AioA* の系統樹。試料 0 を青、試料 50 を紫、試料 500 を緑、試料 5,000 から得られたクローンを赤で示した。また、各 OTU に含まれるクローン数を括弧内に示した。NJ 法での解析における 50%以上の Bootstrap 値を枝の上に表示している。● 90~100% ; ○ 70~89% ; △ 50~69%

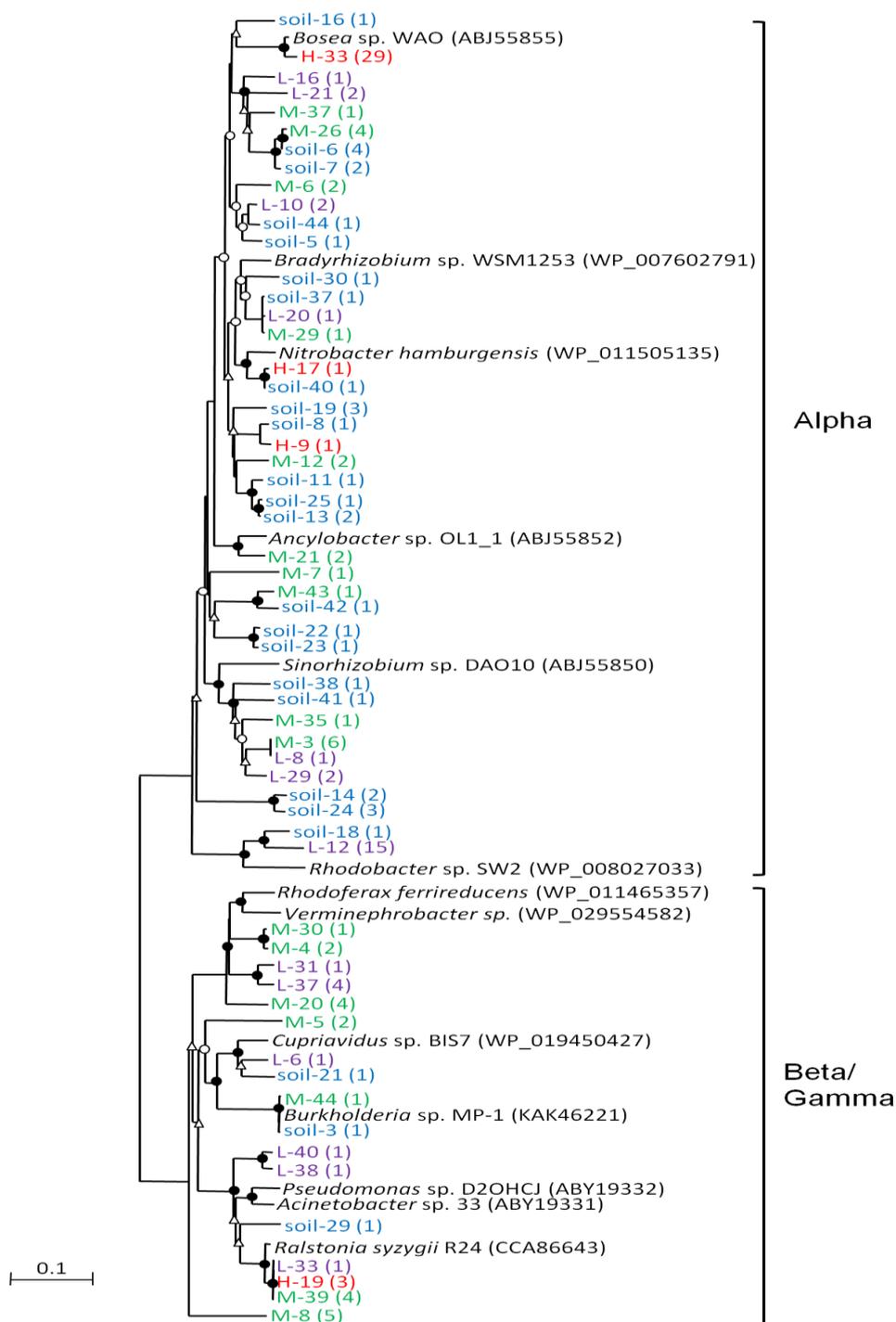


Figure 21. *aoxBM1-2F/aoxBM3-2R* プライマーを用いて解析した AioA の系統樹。試料 0 を青、試料 50 を紫、試料 500 を緑、試料 5,000 から得られたクローンを赤で示した。また、各 OTU に含まれるクローン数を括弧内に示した。NJ 法での解析における 50% 以上の Bootstrap 値を枝の上に表示している。● 90~100% ; ○ 70~89% ; △ 50~69%

aroA95F/aroA599R プライマー

aoxBM1-2F/aoxBM3-2R プライマー

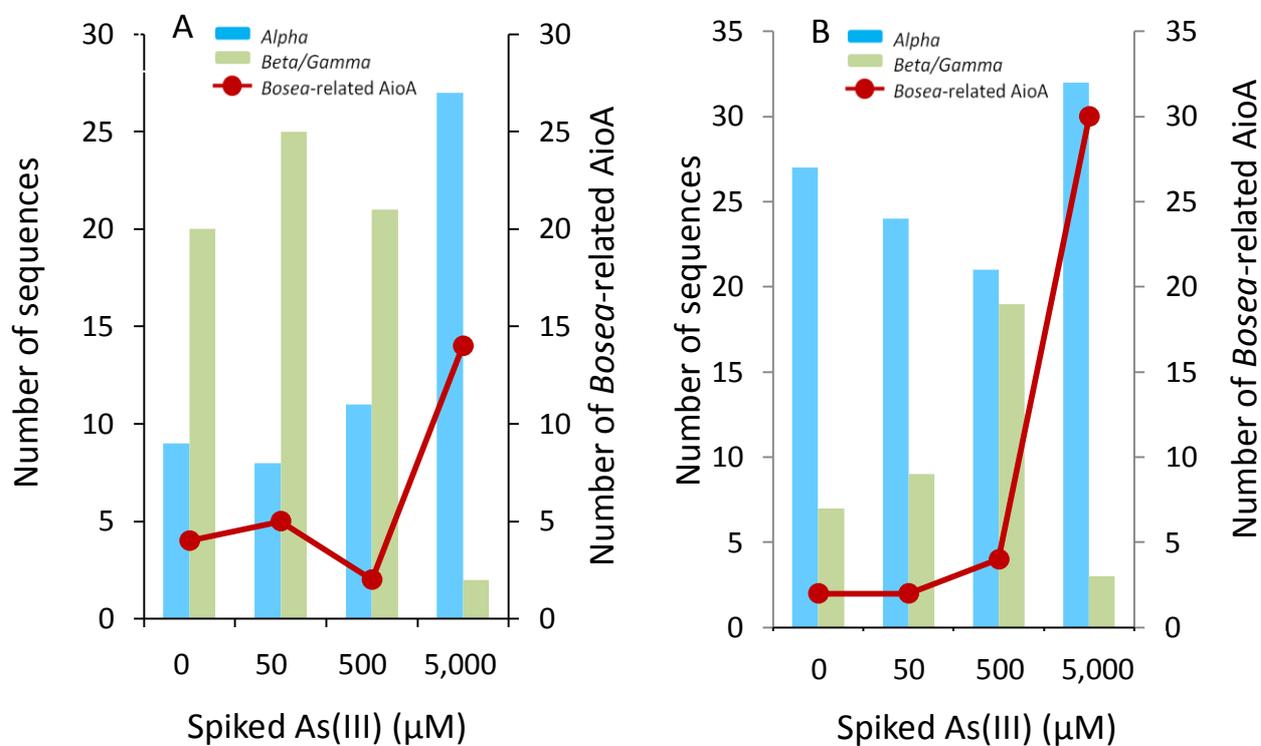


Figure 22. 各土壌試料から得られた AioA クロンのうち *Alphaproteobacteria* グループと *Beta/Gammaproteobacteria* グループに属するクローンの数。赤線はこのうち *Bosea* 属の AioA に近縁なクローン数を示す。

3-1-8 亜ヒ酸酸化細菌 KGO-5 株の接種実験

AioA の系統解析において優占が確認された *Alphaproteobacteria* 綱に属する亜ヒ酸酸化細菌が、実際に 5,000 μM の亜ヒ酸を土壌中で酸化できるか確認するため、滅菌処理した灰色低地土壌に終濃度 5,000 μM の亜ヒ酸を添加し、ここに亜ヒ酸酸化細菌 KGO-5 株の純粋培養菌液を接種した。対照として、オートクレーブ処理した菌液の接種実験も実施した。その結果、KGO-5 株を接種した試料では、培養 2 日間で 5,000 μM の亜ヒ酸がすべて酸化され、5,000 μM のヒ酸が生成した (Fig. 23A)。一方、滅菌した菌液を接種した対照実験では、亜ヒ酸の減少とヒ酸の増加は全く確認されなかった (Fig. 23B)。

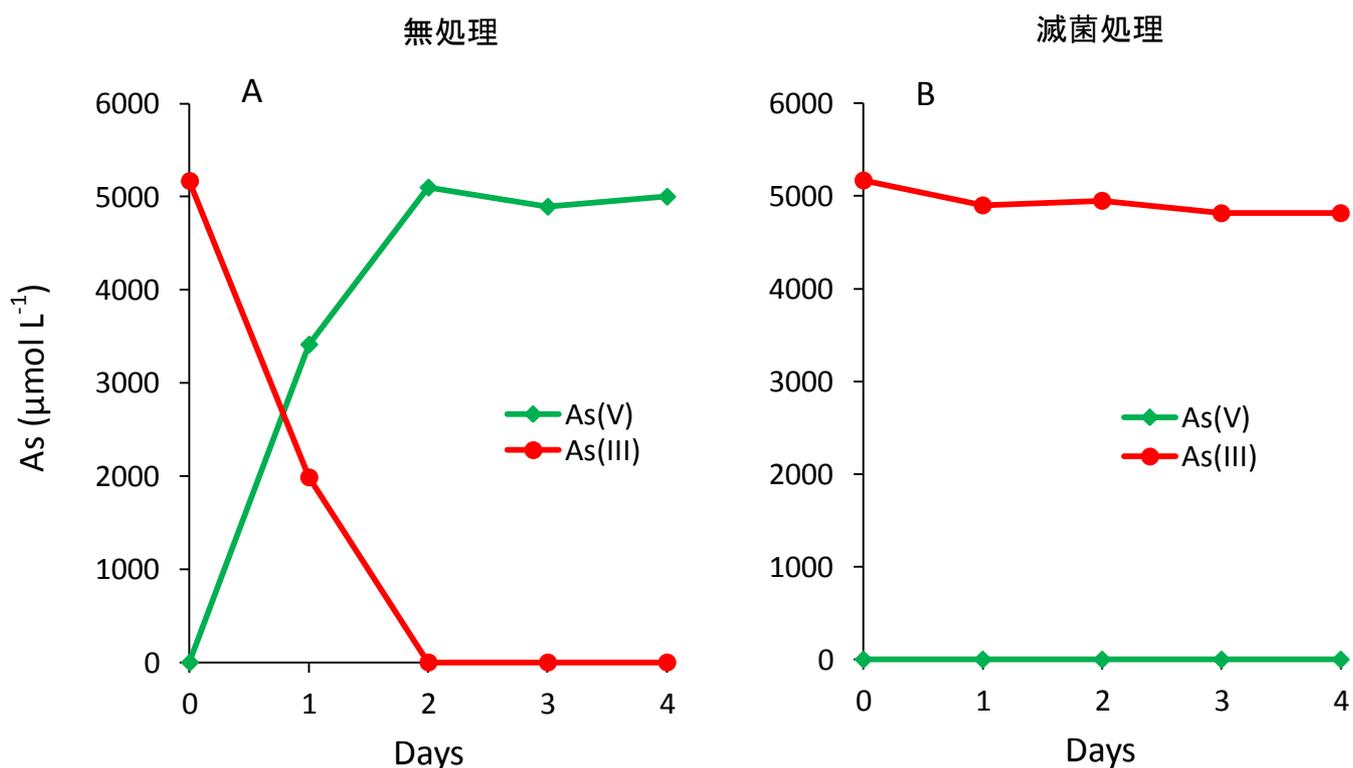


Figure 23. 滅菌土壌への亜ヒ酸酸化細菌 KGO-5 株の接種実験。滅菌した灰色低地土壌に終濃度 5,000 μM の亜ヒ酸を添加後、KGO-5 株の洗浄菌液を接種した (A)。B ではオートクレーブ滅菌した菌液を接種した。

3-2 グライ低地土

3-2-1 試料 50

グライ低地土においても、灰色低地土と同様に亜ヒ酸を添加後、酸化実験を行った。無処理土壌試料では、培養 5 日間で 50 μM の亜ヒ酸はすべて液相から消失したが、ヒ酸は 28 μM しか生成しなかった (Fig. 24A)。一方、オートクレーブ処理した試料において亜ヒ酸は 10 μM 減少したが、ヒ酸の生成はほとんど認められなかった (Fig. 24B)。

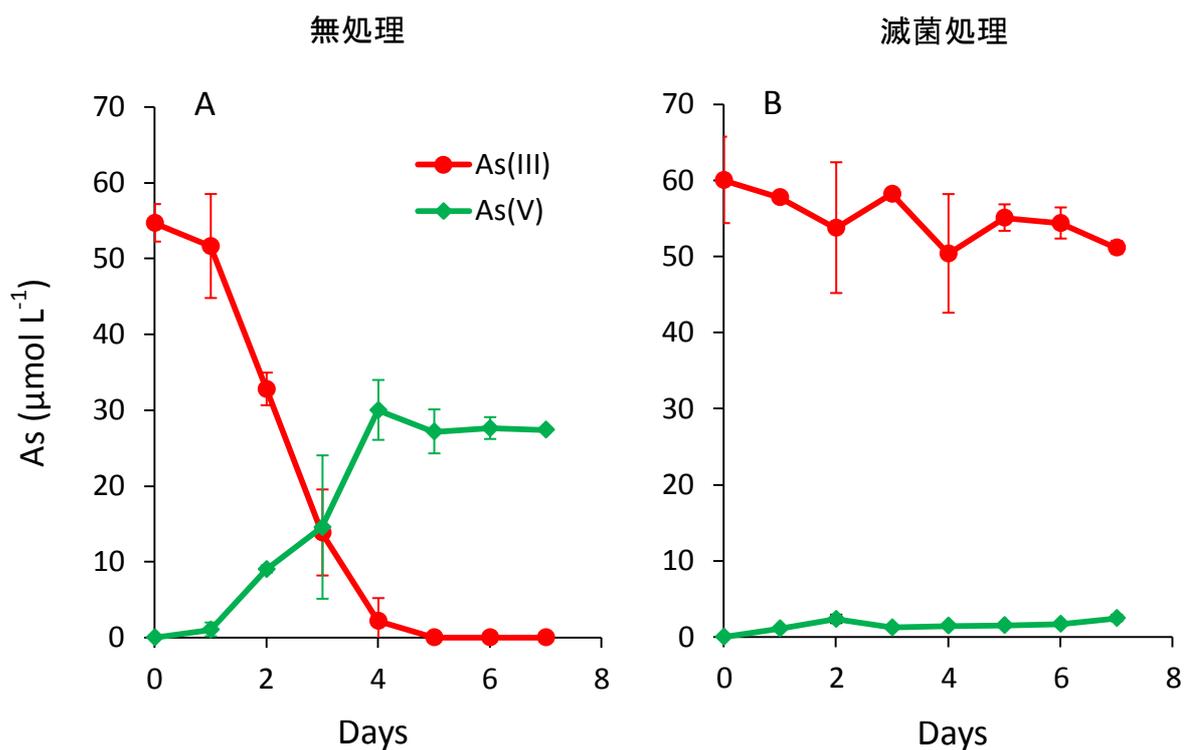


Figure 24. 試料 50 におけるヒ素の化学形態と濃度の経時変化。グラフは 2 連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。

3-2-2 ヒ酸の吸着実験

滅菌したグライ低地土へのヒ酸の吸着量を測定したところ、培養 2 日間でヒ酸は 20 μM 程度減少したが、その後の減少は見られなかった (Fig. 25)。

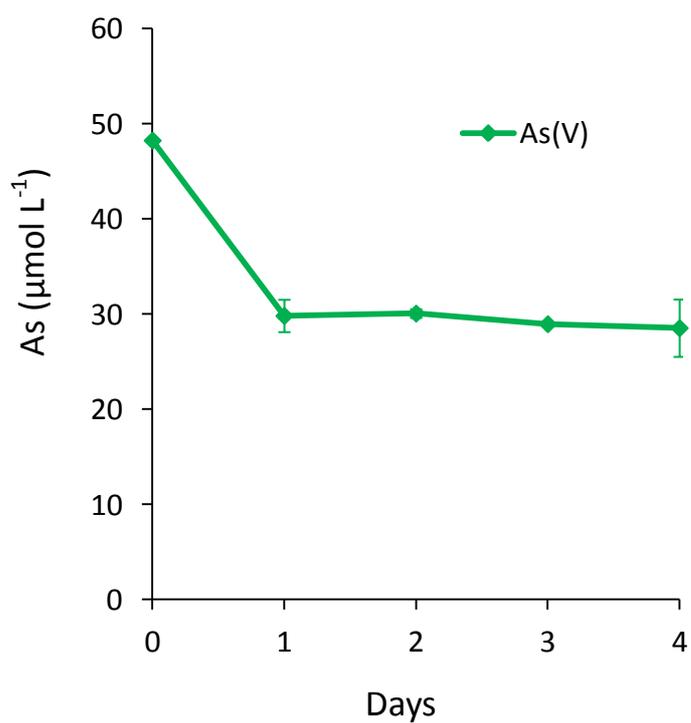


Figure 25. 滅菌グライ低地土へのヒ酸の吸着。グラフは 2 連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。

3-2-3 試料 500

無処理土壌試料では、培養 14 日間で添加した亜ヒ酸はすべて液相から消失し、これよりやや少ない量のヒ酸が検出された (Fig. 26A)。オートクレーブ処理した試料では、培養期間中に約 20 μM の亜ヒ酸の減少が見られたが、ヒ酸の生成は認められなかった (Fig. 26B)。

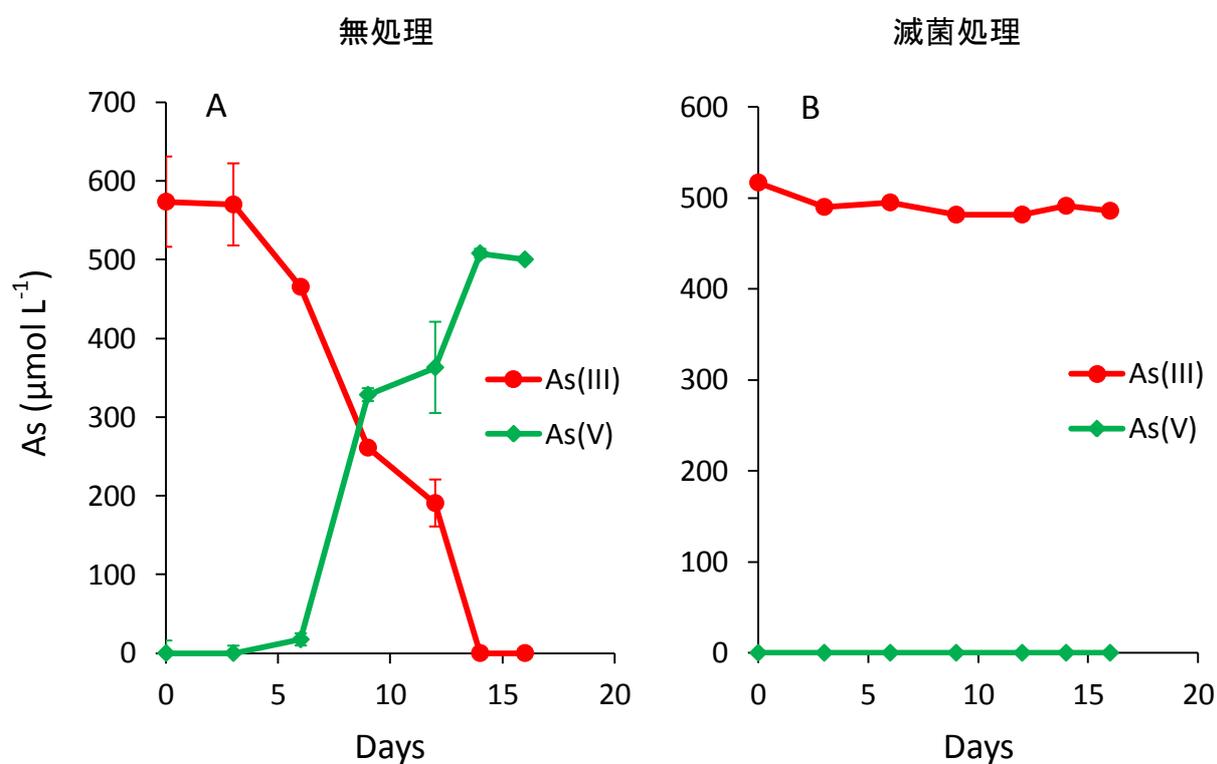


Figure 26. 試料 500 におけるヒ素の化学形態と濃度の経時変化。グラフは 2 連で行った平均値をプロットし、エラーバーは平均値からの差を示す。

3-2-4 試料 5,000

無処理試料では 22 日間の培養中に 5,000 μM の亜ヒ酸が全て酸化され、液相でこれとほぼ同量のヒ酸が検出された (Fig. 27A)。一方、オートクレーブ処理した試料では、亜ヒ酸の減少、ヒ酸の生成のいずれも観察されなかった (Fig. 27B)。

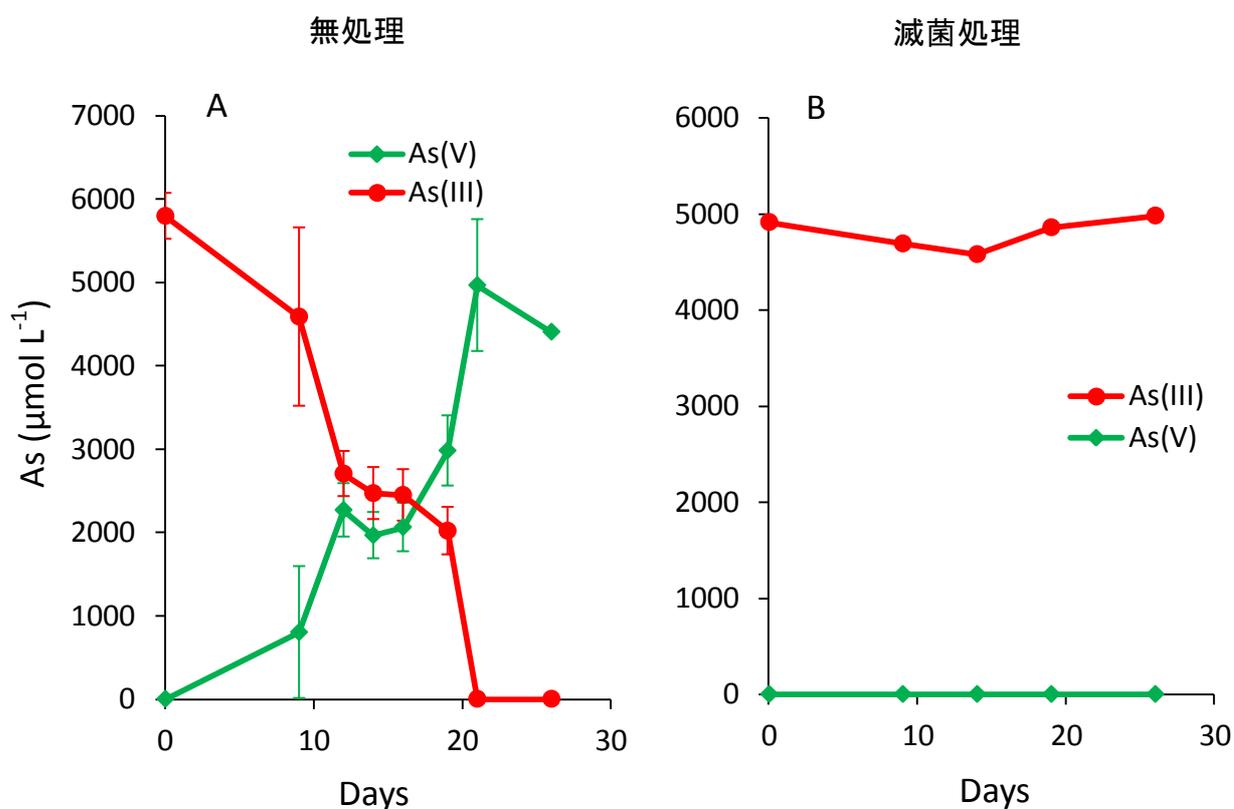


Figure 27. 試料 5,000 におけるヒ素の化学形態と濃度の経時変化。測定値は平均値 \pm 標準偏差 (n=3)。

3-2-5 *aioA* の解析

aioA を増幅対象として *aroA95F/aroA599R* プライマーを用いたクローニングを行い、グライ低地土の亜硫酸酸化細菌群集構造を解析した。4 種類の土壤試料からそれぞれ 17~24 クローンをランダムに選抜し解析した。各土壤試料ごとに配列データを 7~12 OTUs に分類した。Rarefaction curve を作成し、coverage 指数と Shannon-Wiener 指数から群集の多様性の推定を行った (Fig. 28)。試料 0 及び試料 50、試料 500、試料 5,000 における coverage 指数はそれぞれ 41%、71%、82%、75%であった。Shannon-Wiener 指数を算出したところ、試料 0 で最も高い *aioA* の多様性が見られ ($H'=2.31$)、亜硫酸添加条件下では多様性が低下した ($H'=1.68\sim 1.96$)。この中でも試料 5,000 で最も多様性が低いという結果が得られた ($H'=1.68$)。

4 種類の土壤試料から得られた *aioA* のアミノ酸配列に基づき系統解析を行った (Fig. 29)。試料 0 においては、*Alphaproteobacteria* グループの AioA と近縁なクローンが優占していた。これに対し、亜硫酸添加条件下では *Beta/Gammaproteobacteria* グループの AioA に近縁な配列が多く検出された (Fig. 30)。試料 50 と試料 500 から得られた配列の 70% 以上が *Beta/Gammaproteobacteria* グループの AioA と近縁であった。一方、試料 5,000 から得られた 24 クローンのうち、15 クローンは *Alphaproteobacteria* 綱の AioA と近縁であった。この中でも特に、*Aminobacter* sp. 86 に近縁な配列が優占することが明らかになった (Fig. 30)。

aroA95F/aroA599R プライマー

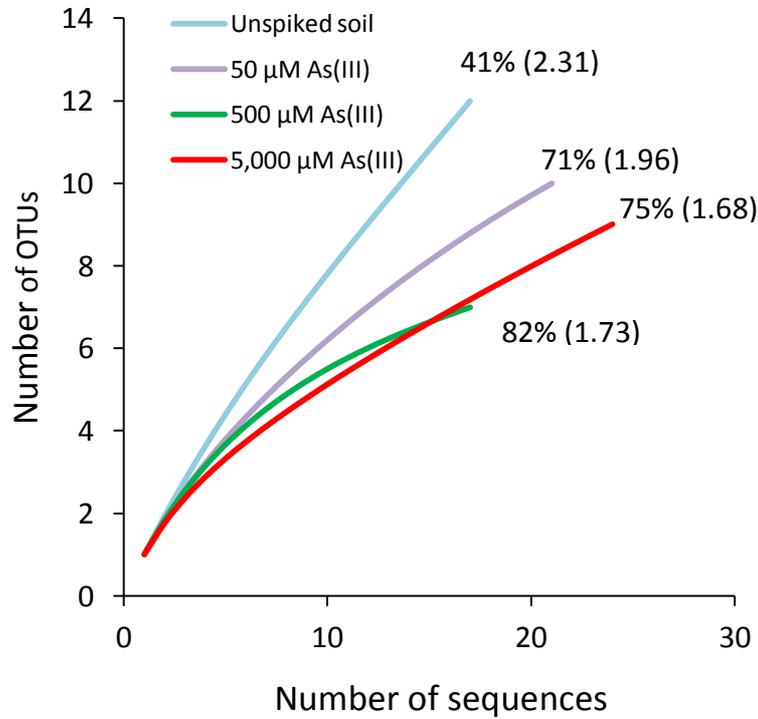


Figure 28. *aroA95F/aroA599R* プライマーを用いて *aioA* のクローン解析を行った際の、各土壌試料の Rarefaction curve。パーセンテージは coverage 指数を示し、括弧内の値は Shannon-Wiener 指数を示す。

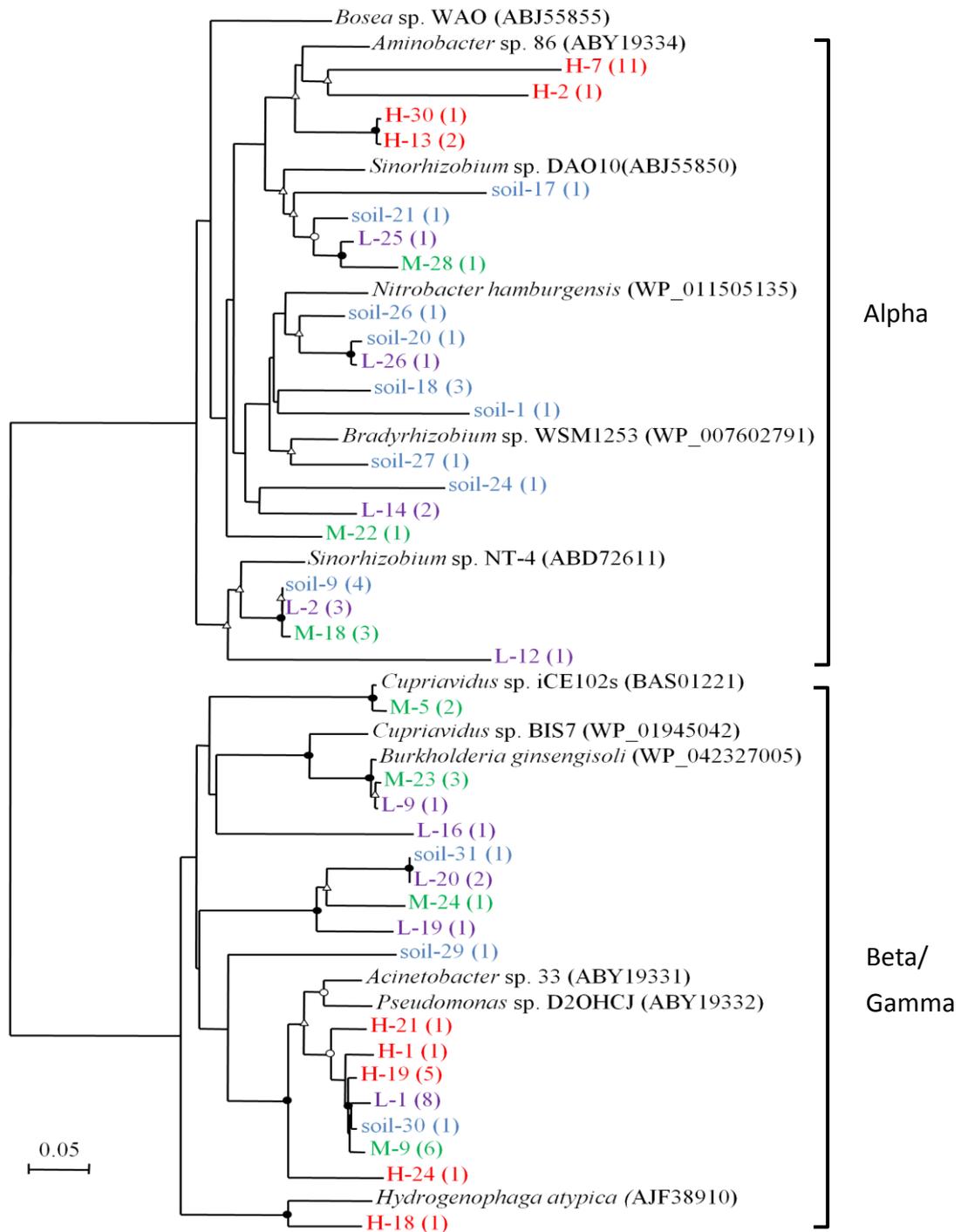


Figure 29. *aroA95F/aroA599R* プライマーを用いて解析した *AioA* の系統樹。試料 0 から得られたクローンを青、試料 50 を紫、試料 500 を緑、試料 5,000 を赤で示した。また、各 OTU に含まれるクローン数を括弧内に示した。NJ 法での解析における 50%以上の Bootstrap 値を枝の上に表示している。● 90~100% ; ○ 70~89% ; △ 50~69%

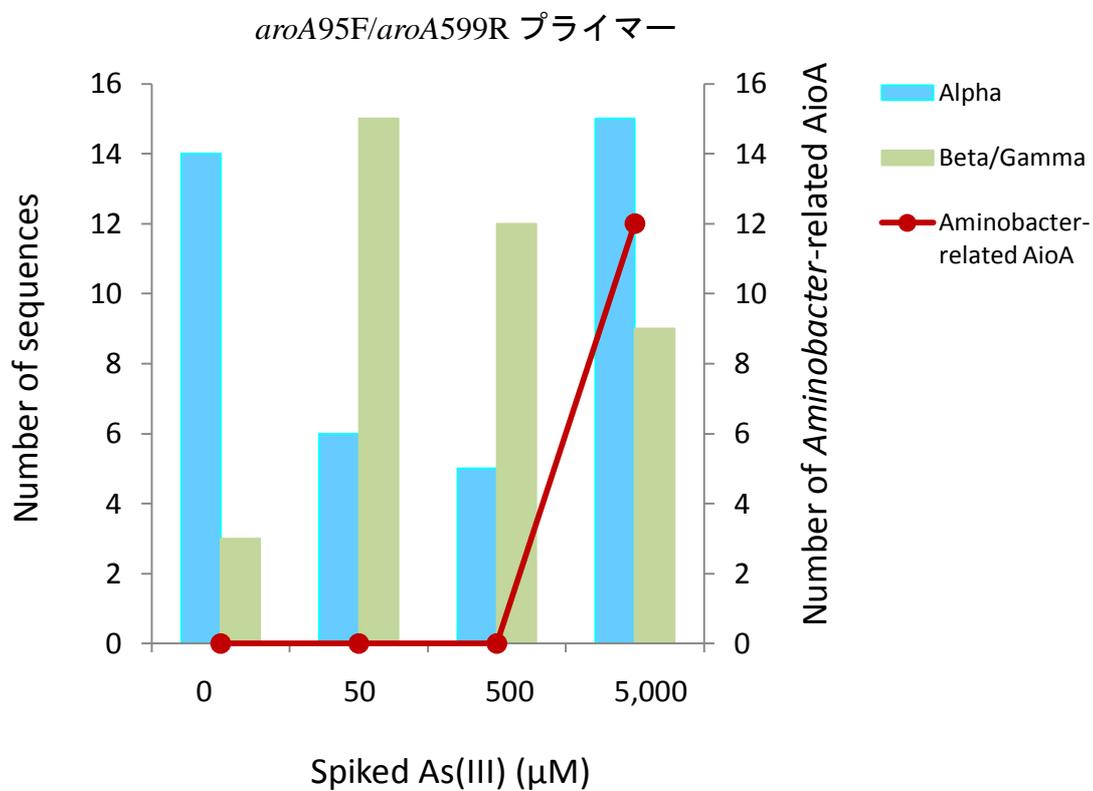


Figure 30. 各土壌試料から得られた AioA クロンのうち *Alphaproteobacteria* グループと *Beta/Gammaproteobacteria* グループに属するクロンの数。赤線はこのうち *Aminobacter* 属の AioA に近縁なクローン数を示す。

3-2-7 接種実験

滅菌処理したグライ低地土壤に終濃度 5,000 μM の亜ヒ酸を添加し、ここに亜ヒ酸酸化細菌 KGO-5 株の純粋培養菌液を接種した。対照として、オートクレーブ処理した菌液の接種実験も実施した。KGO-5 株を接種した試料では、培養 2 日間で 5,000 μM の亜ヒ酸がすべて酸化され、5,000 μM のヒ酸が生成した (Fig. 31A)。一方、滅菌した菌液を接種した対照実験では、亜ヒ酸の減少とヒ酸の増加は全く確認されなかった (Fig. 31B)。

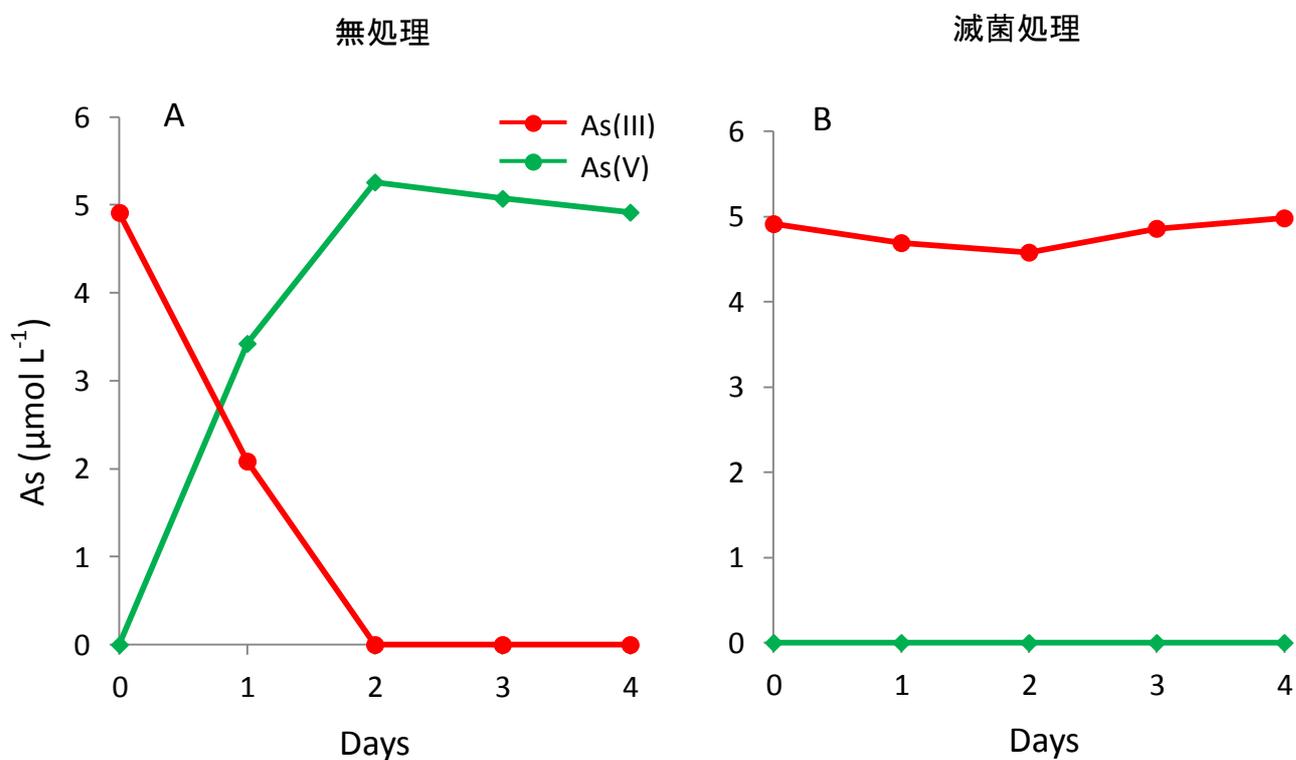


Figure 31. 滅菌土壤への亜ヒ酸酸化細菌 KGO-5 の接種実験。滅菌したグライ低地土壤に終濃度 5,000 μM の亜ヒ酸を添加後、KGO-5 の洗浄菌液を接種した (A)。B ではオートクレーブ滅菌した菌液を接種した。

第四節 考察

4-1 液相における亜ヒ酸の挙動

本章ではまず、灰色低地土に終濃度 50 μM の亜ヒ酸を添加し、好気条件で培養した (試料 50)。オートクレーブ処理した試料では 15 μM 程度の亜ヒ酸が液相から消失した (Fig. 14B)。微生物の影響は無視できるため、この亜ヒ酸の減少は物理化学的反応と考えられた。本実験で用いた灰色低地土には、亜ヒ酸に対する強い吸着性を有する鉄酸化物が 23.5 g kg^{-1} 含まれていた (Yamaguchi *et al.*, 2011)。従って、亜ヒ酸が鉄酸化物に吸着し、液相から消失した可能性が高いと考えられた。無処理試料でも同様のことが起こるはずであるため、添加した 50 μM の亜ヒ酸のうち、15 μM 程度の亜ヒ酸が土壌固相に吸着すると予想された。また、残りの 35 μM の亜ヒ酸が土壌微生物により酸化され、ヒ酸になることが期待された。しかしながら実際には、培養 4 日後に液相では 15 μM のヒ酸しか検出されなかった (Fig. 14A)。ヒ酸は鉄やアルミニウムの(水)酸化物、アルミノケイ酸塩、Mn(IV)など幅広い土壌鉱物と強く吸着するため (Bhumbla and Keefer, 1994; Smith *et al.*, 1998)、生成したヒ酸の一部が固相に吸着したものと考えられた。そこでヒ酸の土壌への吸着を調べたところ、最大吸着濃度は 20 μM であることが分かった (Fig. 15)。この最大吸着濃度 (20 μM) と液相で検出されたヒ酸濃度 (15 μM) を和すると、微生物的な酸化により生成すると予想されたヒ酸濃度 (35 μM) とよく一致した。以上のことから、50 μM の亜ヒ酸添加条件下では、物理化学的なヒ素の吸着と微生物学的な亜ヒ酸酸化反応が同時進行すること、また液相からの亜ヒ酸の除去に及ぼす微生物の貢献度は 70%であることがわかった。また試料 50 における微生物による酸化速度を算出したところ、0.875 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{g soil}^{-1}$ となった。

試料 500 では、少量の亜ヒ酸の吸着が認められたが、ほとんどの亜ヒ酸は土壌微生物により 3.82 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{g soil}^{-1}$ の速度で酸化された (Fig. 16)。また、試料 5,000 では、全ての亜ヒ酸が土壌微生物により酸化され、その酸化速度は

22.7 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ g soil}^{-1}$ と算出された (Fig. 17)。これら各試料における酸化速度から、Lineweaver-Burk の両逆数プロットにより灰色低地土の亜ヒ酸に対する親和定数 (K_m) と最大酸化速度 (V_{max}) を算出したところ、それぞれ 580 μM 、11 $\mu\text{mol As(III) day}^{-1} \text{ g soil}^{-1}$ となった (Fig. 32)。

グライ低地土においても、灰色低地土と同様な実験を行った。試料 50、試料 500 と試料 5,000 において、液相中のヒ素の挙動は灰色低地土とよく類似しており、液相からの亜ヒ酸の除去に及ぼす微生物の寄与は、亜ヒ酸濃度の増加に伴い濃度依存的に高くなった。各濃度における微生物的な亜ヒ酸酸化速度はそれぞれ 0.800、3.42、23.8 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ g}^{-1}$ であった。これらの値からグライ低地土の亜ヒ酸に対する K_m と V_{max} を算出したところ、それぞれ 490 μM 、9.4 $\mu\text{mol As(III) day}^{-1} \text{ g soil}^{-1}$ となった (Fig. 33)。

以上のように、本実験で用いた 2 種類の土壌の K_m 、 V_{max} は比較的類似していた。このような数値がバルク土壌で算出された例は過去になく、今後様々な土壌で同様の検討を行うことで、土壌の亜ヒ酸に対する親和性や酸化能を評価できるようになると考えられる。特に、今回算出された土壌の亜ヒ酸に対する K_m 値は、すでに多くの報告がある亜ヒ酸酸化細菌の純粋菌株の示す K_m 値 (42 ~ 3,800 μM) (Garcia-Dominguez *et al.*, 2008; Lugtu *et al.*, 2009; Bachate *et al.*, 2012) の範囲内にあり、我々の算出した値が合理的であることを支持している。興味深いことに、実際の水田土壌間隙水中の溶存ヒ素濃度は 10 ~ 30 nM 程度 (Takahashi *et al.*, 2004) と非常に低く、上記土壌の K_m 値はこの 1,000 倍以上高い。また、環境中にはヒ素汚染の有無に関わらず亜ヒ酸酸化細菌が普遍的に生息している (Bachate *et al.*, 2012)。さらに、非常に多用な原核生物・真核生物のゲノム中に、ヒ素耐性に関与する遺伝子 (*arsC*) が保存されている (Messens and Silver, 2006)。Oremland らは、還元的であった古環境においては、現在よりも高濃度のヒ素が表層環境に存在した可能性を示唆している (Oremland *et al.*, 2009)。現生の土壌細菌の示すヒ素への高い親和性は、原始生命が有していた優れたヒ素解毒能や、豊富な亜ヒ酸を用いた特異なエネルギー代謝系の名残をとどめているのかもしれない。

4-2 亜ヒ酸が土壤細菌群集構造に与える影響

亜ヒ酸が土壤細菌の群集構造に及ぼす影響を解析するため、各種濃度の亜ヒ酸存在下で培養した灰色低地土より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE を行った。その結果、亜ヒ酸を添加しない土壤で最も高い多様性が見られたが ($H'=2.022$)、50、500、5,000 μM と亜ヒ酸濃度が増加するに従って多様性が低下することが分かった (それぞれ $H'=1.711$ 、1.511、1.496)。Lami ら (2013) は、200 μM の亜ヒ酸を連続的に投入した土壤カラム実験で 16S rRNA 遺伝子を 454 pyrosequencing 解析したところ、亜ヒ酸の添加により Shannon-Wiener 指数が 7.1 から 5.4 まで減少することを報告している。従って、強い毒性を有する亜ヒ酸への曝露は、土壤細菌の多様性に負の影響を及ぼすことが示唆された。

一方、PCR-DGGE 解析の結果、亜ヒ酸の存在下では *Bacillaceae* 科の細菌に近縁なバンドが多数検出された。特に、最も高濃度の亜ヒ酸に曝露した試料 5,000 では、*Bacillaceae* 科の細菌以外のバンドは検出されなかった (Table 21)。さらに、試料 5,000 から単離したほとんどの亜ヒ酸耐性菌株は実際に *Bacillus* 属に近縁であった (Table 23)。一方、種々の培養条件でこれら菌株を亜ヒ酸と共に培養したが、亜ヒ酸酸化能を確認することはできなかった。以上のことから、これら *Bacillaceae* 科細菌は亜ヒ酸耐性細菌として各試料中で優占していると考えられた。これまで *Bacillus* 属細菌は、ヒ素に汚染された鉱石 (Shivaji *et al.*, 2005)、堆積物 (Pepi *et al.*, 2007)、植物根部 (Cavalca *et al.*, 2010)、地下水 (Liao *et al.*, 2011)、土壤 (Achour *et al.*, 2007; Majumder *et al.*, 2013) といった様々な環境からヒ素耐性菌として分離されている。これら細菌の多くは亜ヒ酸の解毒・排出に関わる酵素 (ArsB、ArsC、Acr3) を有しており、非常に高濃度 (>50 mM) の亜ヒ酸存在下でも生育可能である (Achour *et al.*, 2007; Cavalca *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2011)。また、*Bacillaceae* 科の細菌の多くが環境ストレスに強い芽胞 (孢子) を形成できることも、高濃度の亜ヒ酸存在下で優占できる理由の 1 つかもしれない (Majumder *et al.*, 2013)。

亜ヒ酸が灰色低地土中の亜ヒ酸酸化細菌群集構造に与える影響を理解するため、2種類のプライマーセット（*aoxBM1-2F/aoxBM3-2R* 及び *aroA95F/aroA599R*）を用いて *aioA* のクローニング解析を行った。*aoxBM1-2F/aoxBM3-2R* プライマーを用いた場合、亜ヒ酸を添加しない試料（ $H'=3.04$ ）より、亜ヒ酸を 50~500 μM 添加した試料において *aioA* の多様性がより低下する（ $H'=1.93\sim 2.67$ ）ことが分かった（Fig. 19B）。一方、*aroA95F/aroA599R* プライマーを用いた場合には、50~500 μM の亜ヒ酸では *aioA* の多様性は低下しなかった（Fig. 19A）。これらの試料では比較的低い coverage 指数を示しており、得られた *aioA* 配列情報が系内の多様性を完全に把握するには不十分なため、より多くの配列を解析する必要があると考えられた。しかしながら、5,000 μM の亜ヒ酸を添加した試料では、いずれのプライマーを用いた場合でも、79%~94%という高い coverage 指数を示し、かつ最も低い *aioA* の多様性を示した（ $H'=0.55\sim 1.83$ ）。同様の傾向は、1種類のプライマーを用いた解析しか行わなかったものの、グライ低地土においても観察された（Fig. 28）。前述した Lamiら（2013）は、亜ヒ酸の添加により 16S rRNA 遺伝子の多様性は低下するものの、*aioA* の多様性は変化しないと報告している。一方、Quemeneurら（2010）はヒ素に汚染された河川水中の *aioA* を解析し、亜ヒ酸濃度の高い水域では *aioA* の多様性が低いことを報告している。このように、亜ヒ酸が環境中 *aioA* の多様性に与える影響については、研究者によって異なる結果が得られており、今後 *aioA* の存在量（コピー数）に与える影響も含めてさらなる検討が必要と考えられる。

AioA のアミノ酸配列に基づく系統解析より、灰色低地土において最も多様性の低下した 5,000 μM の亜ヒ酸添加条件では、*Alphaproteobacteria* 綱の *AioA* と近縁なクローンが全体の 91~93%を占めることがわかった（Fig 22）。また、その中でも *Bosea* sp. WAO に近縁なクローンが特に優占していた。同様の傾向は、1種類のみで解析したグライ低地土においても観察された。具体的には、5,000 μM の亜ヒ酸添加条件下で *Alphaproteobacteria* 綱に属する *Aminobacter* sp. 86 に近縁なクローンが全体の 63%を占めた（Fig. 30）。*Bosea* や

*Aminobacter*をはじめとする *Alphaproteobacteria* 綱の亜硝酸酸化細菌は、これまでに様々な環境から単離されている (Santini *et al.*, 2000; Santini *et al.*, 2002; Garcia-Dominguez *et al.*, 2008; Rhine *et al.*, 2008; Lugtu *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2014)。これら細菌の多くは通性化学合成独立栄養性の亜硝酸酸化細菌であり、5,000 μM 以上の亜硝酸存在下でも生育でき、高い亜硝酸耐性を持つ。加えて、これら細菌は高濃度亜硝酸存在下でも非常に速く生育できることが知られている。従って、5,000 μM の亜硝酸存在下で、これら亜硝酸耐性が高くかつ生育速度の速い亜硝酸酸化細菌が、他の亜硝酸酸化細菌を圧倒して優占したものと考えられた。実際に *Alphaproteobacteria* 綱に属する *Sinorhizobium* sp. KGO-5 株を滅菌土壌に接種したところ、いずれの土壌においても非常に速い速度で 5,000 μM の亜硝酸を酸化できることが確認された (Fig. 23, Fig. 31)。

以上のことから、強い毒性を有する亜硝酸は、土壌細菌及び亜硝酸酸化細菌の群集構造と多様性に重要な影響を及ぼすことが明らかになった。具体的には、高濃度の亜硝酸に曝露されることで、土壌細菌群集の多様性は低下する一方、亜硝酸耐性菌の存在割合が増加することがわかった。また、高濃度の亜硝酸存在下では、亜硝酸酸化細菌群集の多様性も低下するが、亜硝酸耐性が高くかつ生育速度の速いある種の亜硝酸酸化細菌が優占することが示唆された。これらの細菌は高濃度の亜硝酸を効率的に酸化し、吸着性が高くかつ移動性の低い亜硝酸に変換するため、環境中のヒ素の動態に重要な影響を及ぼすものと考えられた。

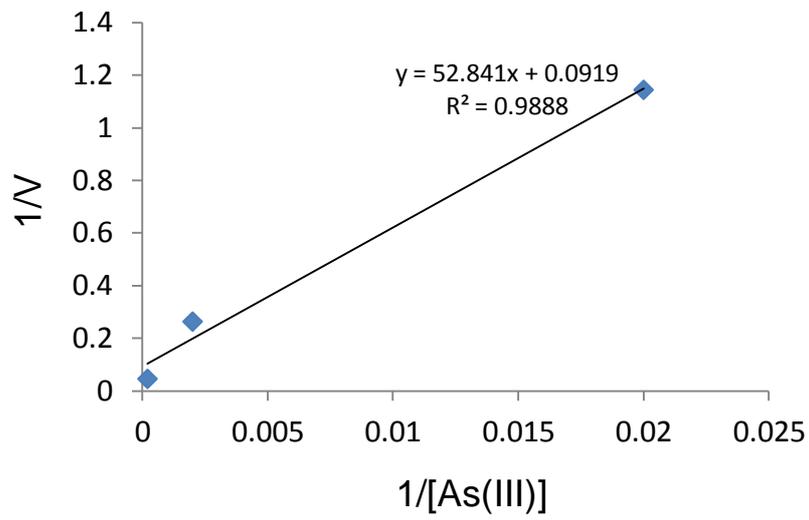


Figure 32. 灰色低地土における Lineweaver-Burk プロット。

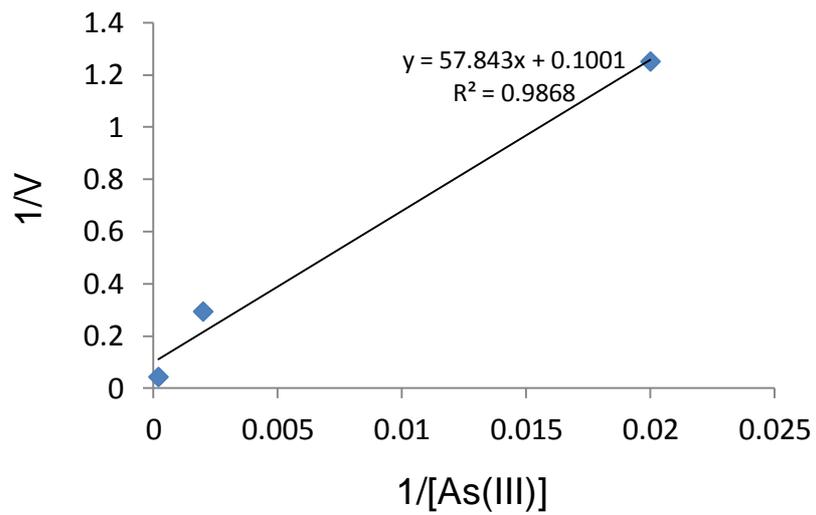


Figure 33. グライ低地土における Lineweaver-Burk プロット。

第五節 要約

これまで亜ヒ酸が土壌細菌群集構造や亜ヒ酸酸化細菌群集構造に影響を与えることがいくつか報告されている。しかしながら、同種類の土壌を異なる濃度の亜ヒ酸に曝露し、その細菌群集構造へ与える影響を検討した例はない。人為的なヒ素漏洩事故などにより環境中に高濃度のヒ素が放出されたとき、環境微生物群集にどのような影響を及ぼすか理解することは重要である。そこで本章では、国内の水田土壌を種々の濃度の亜ヒ酸と共に培養し、微生物が亜ヒ酸酸化に及ぼす影響を検討すると共に、亜ヒ酸が土壌細菌群集構造、とりわけ亜ヒ酸酸化細菌群集構造へ与える影響を調査した。

土壌試料に亜ヒ酸を終濃度 50、500、または 5,000 μM となるように添加し、好気条件で振盪培養を行った。液相からの亜ヒ酸の除去に及ぼす微生物の寄与は、亜ヒ酸濃度の増加に伴い濃度依存的に高くなった。各濃度における微生物による亜ヒ酸酸化速度から、土壌の亜ヒ酸に対する K_m と V_{max} を算出したところ、それぞれ 490~580 μM 、9.4~11 $\mu\text{mol As(III) day}^{-1} \text{ g soil}^{-1}$ となり、土壌細菌が環境濃度よりもはるかに高い K_m を有することが分かった。PCR-DGGE 解析より、強い毒性を有する亜ヒ酸への曝露は、土壌細菌の多様性に負の影響を及ぼすことが示唆された。また、*Bacillaceae* 科細菌が亜ヒ酸耐性細菌として優占することが明らかになった。また、*aioA* 遺伝子を標的としたクローニングにより、5,000 μM の亜ヒ酸を添加した試料では、他の試料に比べて低い *aioA* の多様性を示し、亜ヒ酸耐性が高くかつ生育の速いことで知られる *Alphaproteobacteria* に近縁な亜ヒ酸酸化細菌が優占することが明らかになった。これらの細菌は亜ヒ酸を酸化し吸着性の高いヒ酸にするため、環境中のヒ素の動態に重要な影響を及ぼすと考えられた。

総合考察と今後の展望

ヒ素は極めて毒性の強い元素であり、急性毒性のみならず、微量でも継続的に摂取し続けることにより慢性毒性を生じる。イネは他の穀物に比べヒ素を蓄積しやすい性質があり、また日本を始めアジア各国における主食でもあることから、米からの摂取がヒ素の総摂取量の多くを占める (Mondal and Polya, 2008)。また、バングラディッシュやインド・西ベンガル地方など世界の一部地域では地下水中に比較的高濃度のヒ素が含まれており、その地下水を灌漑に用いる結果生じる米のヒ素汚染が大きな問題となっている (Rahman and Hasegawa, 2011)。さらに 2014 年 7 月、国連の食品規格機関であるコーデックス委員会は、精米中のヒ素の最大許容量 0.2 mg/kg を採択した。これに基づき、米に含まれるヒ素の一層の低減策が求められている。これまで、米へのヒ素蓄積を低減する方法として、灌漑方法の改善やイネ品種の改良などが検討されてきた (吉川ら、1986)。しかしながら、貧困や技術力不足といったなど社会問題により、これらの方法が必ずしも容易でない場合があり、イネ栽培現場で広く実践されるには至っていない。そこで本総合考察では、水田環境におけるヒ素の化学形態変化、とりわけイネにより吸収されやすい亜ヒ酸の挙動を解析した結果から、イネによるヒ素の簡易な吸収抑制方法を展望する。

ヒ素は微量ながら自然環境中の至るところに存在するため、ヒ素非汚染地域でも一般的な稲作によりある程度のヒ素の吸収が起こると考えられる。特に、湛水により酸化還元電位 (Eh) が低下し、それに伴い水酸化鉄などに吸着したヒ素が微生物により還元され、亜ヒ酸が溶出する (Yamaguchi *et al.* 2011)。溶出した亜ヒ酸の一部はイネに吸収され、玄米中に蓄積する。イネのヒ素汚染が深刻となる地域では、畑のような好気環境でイネを栽培することが奨励されている (Yamane *et al.*, 1976; Maejima *et al.*, 2008)。しかしながら、伝統的な稲作は雑草の防除や連作ダメージを減らすなど大きなメリットがあるため (Kyuma, 2004)、この方法を広く実践するには至っていない。本論文の第一章では、水田における湛水・落水プロセスをバッチ実験で再現し、液相及び土壌固相にお

けるヒ素の挙動を観察した。水田土壌を還元培養に供して亜ヒ酸を液相に溶出させたが、酸素の侵入によりほとんどすべての亜ヒ酸は速やかに固相に固定化した。一方、固相で Mn(IV) のような土壌鉱物と微生物により亜ヒ酸はヒ酸に酸化されることが明らかになった。吸着性の高いヒ酸は水酸化鉄などの鉱物に吸着し、植物に吸収されにくい形態を取るため、イネへの吸収量を低減できると考えられる。よって、イネの栽培時における水田への簡易な曝気・通気処理が、米のヒ素低減化に貢献できる可能性が示唆された。

一方、ヒ素を高濃度に含む地下水はインド・西ベンガルやバングラディッシュなど世界各地に存在する。このような地域では地下水を農業用水として利用する場合も多いため、米などの農作物を通じてヒ素中毒となる経路が指摘されている (Rahman and Hasegawa, 2011)。地下水中のヒ素の最高濃度はしばしば $50 \mu\text{M}$ を超え、化学形態としては亜ヒ酸が優占することが知られている (Smedley and Kinniburgh, 2002)。本論文の第二章では、水田土壌スラリーに終濃度 $50 \mu\text{M}$ の亜ヒ酸を添加し好気培養すると、 $22\sim 35 \mu\text{M}$ のヒ素が土壌固相に固定化することが分かった (Fig. 14, Fig. 24)。この結果より、ヒ素で汚染された地下水を灌漑用水として利用することは、水田土壌のヒ素蓄積にも大きな影響を及ぼし、地下水の利用回数が増加するのに伴って土壌中ヒ素汚染が益々深刻化することが予想される。このため、米のヒ素蓄積量の低減や土壌汚染防止のために、灌漑用水中のヒ素の前処理が必要と考えられる。

上記のような深刻なヒ素汚染地域では、ヒ素は一般的な凝集沈殿や吸着処理によって容易に除去できない亜ヒ酸の形態で存在しており、効率的なヒ素除去のためには亜ヒ酸をまず吸着性の高いヒ酸に酸化する必要がある (Lin and Wu, 2001)。現在は主に次亜塩素酸や過マンガン酸、過酸化水素などを用いた化学的酸化処理と凝集沈殿法を組み合わせた物理化学的処理が行われているが、高コストでかつ環境負荷が高いという問題がある。一方、環境中には亜ヒ酸をヒ酸に酸化する亜ヒ酸酸化細菌が普遍的に存在しており (Oremland and Stolz, 2003)、これを用いることで低コストかつ低環境負荷型のヒ素除去プロセスを構築できる可能性がある。本論文の第二章で、 $5,000 \mu\text{M}$ の亜ヒ酸存在下で水田

土壌中の亜ヒ酸酸化細菌群集の多様性が低下し、*Alphaproteobacteria* 綱の亜ヒ酸酸化細菌が他の亜ヒ酸酸化細菌を圧倒して優占することが明らかになった。これら細菌の多くは通性化学合成独立栄養性亜ヒ酸酸化細菌のため、外部炭素源を添加せずとも地下水中の亜ヒ酸を効率的に酸化し、吸着性が高くかつ移動性の低いヒ酸に変換することができると考えられる。実際に *Alphaproteobacteria* 綱に属する亜ヒ酸酸化細菌 *Sinorhizobium* sp. KGO-5 株を滅菌土壌スラリーに接種したところ、5,000 μM の亜ヒ酸を速やかに酸化できることが確認された。

以上のことから、環境中の亜ヒ酸酸化細菌を積極的に利用することで、ヒ素汚染水の前処理が十分可能と期待される。具体的には、井戸より採取した汚染水を一定期間貯水し大気に接しておくだけで、ある種の亜ヒ酸酸化細菌が自然に増殖し、亜ヒ酸酸化反応が進行すると予想される。より反応速度を速めたい場合には、貯水の曝気や、安全性の確認された亜ヒ酸酸化細菌を外部から添加する方法も考えられる。もしヒ素汚染水が多量の二価鉄を含む場合には、大気中酸素による酸化で生成された Fe(III) 酸化物にヒ酸が吸着し、容易に回収が可能になると期待される。また別の方法として、亜ヒ酸酸化細菌菌体をゲルビーズなどに固定化した後カラムに充填し、連続的な汚染水処理を行うことも考えられる。上記のような生物学的な汚染水処理法は、すでに一部研究が進行しており、近い将来実用化される可能性もある。その際に最も必要なことは、ヒ素耐性が強く、かつ効率的な亜ヒ酸酸化反応が可能な優れた細菌の選抜と考えられる。本研究ではヒ素汚染の有無に関わらず亜ヒ酸酸化細菌が土壌環境に普遍的に分布すること、また高濃度の亜ヒ酸存在下では、ヒ素耐性の高い亜ヒ酸酸化細菌が優占することが明らかとなった。今後このような細菌の分離や生化学的特質を詳細に解明することで、生物学的ヒ素汚染処理に応用可能な、優れた亜ヒ酸酸化細菌の実用化に繋がることが期待される。

引用文献

- Abedin, M.J., Feldmann, J., Meharg, A.A., 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiol.* 128, 1120-1128.
- Achour, A.R., Bauda, P., Billard, P., 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* 158, 128–137.
- Afkar, E., Lisak, J., Saltikov, C., Basu, P., Oremland, R.S., Stolz, J.F., 2003. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 107-112.
- Ahmann, D., Krumholz, L.R., Hemond, H.F., Lovley, D.R., 1997. Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona watershed. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2923–2930.
- Arao, T., Kawasaki, A., Baba, K., Mori, S., Matsumoto, S., 2009. Effects of water management on cadmium and arsenic accumulation and dimethylarsinic acid concentrations in Japanese rice. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9361-9367.
- Bachate, S.P., Khapare, R.M., Kodam, K.M., 2012. Oxidation of arsenite by two β -proteobacteria isolated from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2135–2145.
- Bhumbla, D.K., Keefer, R.F., 1994. Arsenic mobilization and bioavailability in soils. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environment Part I: Cycling and Characterization*. Wiley-Interscience, New York, pp. 51–82.
- Bose, P., Sharma, A., 2002. Role of iron in controlling speciation and mobilization of arsenic in subsurface environment. *Water Res.* 36, 4916–4926
- Cavalca, L., Zanchi, R., Corsini, A., Colombo, M., Romagnoli, C., Canzi, E., Andreoni, V., 2010. Arsenic-resistant bacteria associated with roots of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 154–164.
- Dixit, S., Hering, J.G., 2003. Comparison of arsenic(V) and arsenic(III) sorption onto iron oxide minerals: Implications for arsenic mobility. *Environ. Sci. Technol.* 37,

4182–4189.

- Dong, D., Ohtsuka, T., Dong, D.T., Amachi, S., 2014. Arsenite oxidation by a facultative chemolithoautotrophic *Sinorhizobium* sp. KGO–5 isolated from arsenic–contaminated soil. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1963–1970.
- Espino, D.P., Tamames, J., Lorenzo, V., Ca’novas, D., 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals.* 22, 117–130.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Ferguson, J. F., Gavis, J., 1972. A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water Res.*, 6, 1259–1274.
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C., 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 543–548.
- Garcia-Dominguez, E., Mumford, A., Rhine, E.D., Paschal, A., Young, L.Y., 2008. Novel autotrophic arsenite-oxidizing bacteria isolated from soil and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 401–410.
- Green, H.H., 1918. Isolation and description of a bacterium causing oxidation of arsenite to arsenate in cattle-dipping baths. *Rep. Dir. Vet. Res. S. Afr.* 6:593–599
- Halter, D., Cordi, A., Gribaldo, S., *et al.*, 2011. Taxonomic and functional prokaryote diversity in mildly arsenic–contaminated sediments. *Res. Microbiol.* 162, 877–887.
- Hamamura, N., Macur, R.E., Korf, S., Ackerman, G., Taylor, W.P., Kozubal, M., Reysenbach, A.L., Inskeep, W.P., 2009. Linking microbial oxidation of arsenic with detection and phylogenetic analysis of arsenite oxidase genes in diverse geothermal environments. *Environ. Microbiol.* 11, 421–431.
- He, J.Z., Zhang, L.M., Jin, S.S., Zhu, Y.G., Liu, F., 2008. Bacterial communities inside and surrounding soil iron–manganese nodules. *Geomicrobiol. J.* 25,14–24.
- Heinrich-Salmeron, A., Cordi, A., Brochier-Armanet, C., *et al.*, 2011. Unsuspected

- diversity of arsenite-oxidizing bacteria revealed by a widespread distribution of the *aoxB* gene in prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4685–4892.
- Hering, J.G., Chen, P., Wilkie, J.A., Elimelech, M., 1997. Arsenic removal from drinking water during coagulation. *J. Environ. Engineer.* 123, 800–807.
- Inskeep, W.P., Macur, R.E., Hamamura, N., Warelow, T.P., Ward, S.A., Santini, J.M., 2007. Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environ. Microbiol.* 9, 934–943.
- Jones, L.C., Lafferty, B.J., Sparks, D.L., 2012. Additive and competitive effects of bacteria and Mn oxides on arsenite oxidation kinetics. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6548–6555.
- Kaise, T., Yamauchi, H., Horiguchi, Y., Tani, T., Watanabe, S., Hirayama, T., Fukui, S., 1989. A comparative study on acute toxicity of methylarsonic acid, dimethylarsinic acid and trimethylarsine oxide in mice, *Appl. Organometal. Chem.*, 3, 273–277 .
- Kulp, T.R., Hoefft, S.E., Asao, M., *et al.*, 2008. Arsenic(III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California, *Science*, 321, 967–970.
- Krafft, T., Macy, J.M., 1998. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.* 255, 647–653.
- Kyuma, K., 2004. The paddy soil/rice system in the environment. In: *Paddy soil science*. Kyoto University Press and Transpacific Press, Kyoto and Melbourne, 255–277.
- Lafferty, B.J., Ginder-Vogel, M., Sparks, D., 2010a. Arsenite oxidation by a poorly crystalline manganese-oxide 1. Stirred-flow experiments. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8460–8466.
- Lafferty, B.J., Ginder-Vogel, M., Zhu, M., Livi, J.T., Sparks, D., 2010b. Arsenite oxidation by a poorly crystalline manganese-oxide. 2. Results from X-ray absorption spectroscopy and X-ray diffraction. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8467–8472.

- Lami, R., Jones, L.C., Cottrell, M.T., Lafferty, B.J., Ginder-Vogel, M., Sparks, D.L., Kirchman, D.L., 2013. Arsenite modifies structure of soil microbial communities and arsenite oxidization potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 270-279.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., *et al.* 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Liao, V.H., Chu, Y.J., Su, Y.C., Hsiao, S.Y., Wei, C.C., Liu, C.W., Liao, C.M., Shen, W.C., Chang, F.J., 2011. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *J. Contam. Hydrol.* 123, 20–29.
- Liao, S.J., Zhou, J.X., Wang, H., Chen, X., Wang, H.F., 2013. Arsenite oxidation using biogenic manganese oxides produced by a deep-sea manganese-oxidizing bacterium, *Marinobacter* sp. MnI7-9. *Geomicrobiol. J.* 30, 150–159.
- Lin, T.F., Wu, J.K., 2001. Adsorption of arsenite and arsenate within activated alumina grains: equilibrium and kinetics. *Water Res.* 35, 2049–2957.
- Lugtu, R.T., Choi, S., Oh, Y., 2009. Arsenite oxidation by a facultative chemolithotrophic bacterium SDB1 isolated from mine tailing. *J. Microbiol.* 47, 686–692.
- Maejima, Y., Arao, T., Baba, K., 2008. Arsenic contamination in soils and crops in Japan. In: Hseu, Z.Y., Chen, T.C., Chao, H.R., (ed.) 2008. International symposium of soil heavy metal pollution and remediation. National Pingtung University of Science and Technology Press, Pingtung, Taiwan, 76–86.
- Majumder, A., Bhattacharyya, K., Bhattacharyya, S., Kole, S.C., 2013. Arsenic-tolerant, arsenite-oxidising bacterial strains in the contaminated soils of West Bengal, India. *Sci. Total Environ.* 463–464, 1006–1014.
- Messens, J., Silver, S., 2006. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J. Mol. Biol.* 362, 1–17.
- Mok, M.W., Wai, C.M., 1994. Mobilization of arsenic in contaminated river waters, p. 99-117. In: Nriagu, J.O. (ed.), *Arsenic in the environment Part I: cycling and*

- characterization. Willy-Interscience, New York.
- Mondal, D., Polya, D.A., 2008. Rice is a major exposure route for arsenic in Chakdaha block, Nadia district, West Bengal, India: a probabilistic risk assessment. *Appl. Geochem.* 23, 2987–2998.
- Morton, W.E., Dunnette, D.A., 1994. Health effects of environmental arsenic, p. 17-34. In: Nriagu, J.O. (ed.), *Arsenic in the environment PartII: human health and ecosystem effects*. Willy-Interscience, New York.
- Nelson, Y.M., Lion, L.W., Ghiorse, W.C., Shuler, M.L. 1999. Production of biogenic Mn oxides by *Leptothrix discophora* SS-1 in a chemically defined growth medium and evaluation of their Pb adsorption characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 175–180.
- Niggemyer, A., Spring, S., Stackebrandt, E., Rosenzweig, R.F., 2001. Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5568–5580.
- Nriagu, J.O., 1990. Global metal pollution. *Environment* 32, 7–33.
- Ohtsuka, T., Yamaguchi, N., Makino, T., Sakurai, K., Kimura, K., Kudo, K., Homma, E., Dong, D.T., Amachi, S., 2013. Arsenic dissolution from Japanese paddy soil by a dissimilatory arsenate-reducing bacterium *Geobacter* sp. OR-1. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6263–6271.
- Ona-Nguema, G., Morin, G., Wang, Y., *et al.*, 2009. Arsenite sequestration at the surface of nano-Fe(OH)₂, ferrous-carbonate hydroxide, and green-rust after bioreduction of arsenic-sorbed lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens*. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 73, 1359–1381.
- Oremland, R.S., Hoef, S.E., Santini, J.M., Bano, N., Hollibaugh, R.A., Hollibaugh, J.T., 2002. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4795–4802.

- Oremland, R.S., Stolz, J.F., 2003. The ecology of arsenic. *Science*, 300, 939.
- Oremland, R.S., Stolz, J.F., 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol.* 13, 45–49.
- Oremland, R.S., Saltikov, C.W., Wolfe-Simon, F., Stolz, J.F., 2009. Arsenic in the evolution of earth and extraterrestrial ecosystems. *Geomicrobiol. J.* 26, 522–536.
- Oscarson, D.W., Huang, P.M., Liaw, W.K., 1980. The oxidation of arsenic by aquatic sediments. *J. Environ. Qual.* 9, 700–703.
- Oscarson, D.W., Huang, P.M., Liaw, W.K., 1981. Role of manganese in the oxidation of arsenite by freshwater lake sediments. *Clays Clay Miner.* 29, 219–225.
- Oscarson, D.W., Huang, P.M., Liaw, W.K., Hammer, U.T., 1983. Kinetics of oxidation of arsenite by various manganese oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 644–648.
- Pepi, M., Volterrani, M., Renzi, M., Marvasi, M., Gasperini, S., Franchi, E., Focardi, S.E., 2007. Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. *J. App. Microbiol.* 103, 2299–2308.
- Perrière, G., Gouy, M., 1996. An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78, 364–369.
- Quénéneur, M., Heinrich-Salmeron, A., Muller, D., Lievreumont, D., Jauzein, M., Bertin, P.N., Garrido, F., Joulain, C., 2008. Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidising bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4567–4573.
- Quénéneur, M., Cêron, A., Billard, P., Battaglia-Brunet, F., Garrido, F., Leyval, C., Joulain, C., 2010. Population structure and abundance of arsenite-oxidizing bacteria along an arsenic pollution gradient in waters of the upper Isle River Basin, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4566–4570.
- Rahman, M.A., Hasegawa, H., 2011. High levels of inorganic arsenic in rice in areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation and cooking. *Sci. Total Environ.*, 409, 4645–4655.

- Rhine, E.D., Phelps, C.D., Young, L.Y., 2006. Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environ. Microbiol.* 8, 899–908.
- Rhine, E.D., Onesios, K.M., Serfes, M.E., Reinfelder, J.R., Young, L.Y., 2008. Arsenic transformation and mobilization from minerals by the arsenite oxidizing strain WAO. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1423–1429.
- Roberts, L.C., Hug, S.J., Ruettimann, T., Billah, M.M., Khan, A.W., Rahman, M.T., 2004. Arsenic removal with iron(II) and iron(III) in waters with high silicate and phosphate concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 38, 307–315.
- Rosson, R.A., Nealson, K.H., 1982. Manganese binding and oxidation by spores of a marine *Bacillus*. *J. Bacteriol.* 151, 1027–1034.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Salkassi, T.M., Venkateswaren, K., Satomi, M., Nealson, K.H., Newman, D.K., Hering, J.G., 2002. Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni* AOL15, sp. nov., isolated from hot creek, California. *Geomicrobiol. J.* 19, 53–66.
- Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D., Macy, J.M., 2000. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidising bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 92–97.
- Santini, J.M., Sly, L.I., Wen, A., Corie, D., Durand, P.W., Macy, J.M., 2002. New arsenite-oxidizing bacteria isolated from Australian gold mining environments--phylogenetic relationships. *Geomicrobiol. J.* 19, 67–76.
- Santini, J.M., Streimann, L.C.A., Hoven, R.N.V., 2004. *Bacillus macyae* sp. nov., an arsenate-respiring bacterium isolated from an Australian gold mine. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 54, 2241–2244.
- Schoof, R.A., Yost, L.J., Eickhoff, J., Crecelius, E.A., Cragin, D.W., Meacher, D.M., Menzel, D.B., 1999. A market basket survey of inorganic arsenic in food. *Food Chem. Toxicol.* 37, 839–846.

- Scott, M.J., Morgan, J.J., 1995. Reactions at oxide surfaces. 1. Oxidation of As(III) by synthetic birnessite. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1898–1905.
- Shivaji, S., Suresh, K., Chaturvedi, P., Dube, S., Sengupta, S., 2005. *Bacillus arsenicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from a siderite concretion in West Bengal, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1123–1127.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17, 517–568.
- Smith, E., Naidu, R., Alston, A.M., 1998. Arsenic in the soil environment: A review. *Adv. Agron.* 64, 149–195.
- Soil Survey Staff. 1994. Keys to soil taxonomy, 6th ed. Pocahontas Press, Blacksburg, VA, USA.
- Sultana, M., Vogler, S., Zargar, K., Schmidt, A.C., Saltikov, C., Seifert, J., Schlömann, M., 2012. New clusters of arsenite oxidase and unusual bacterial groups in enrichments from arsenic-contaminated soil. *Arch. Microbiol.* 194, 623–635.
- Sun, G.X., Williams, P.N., Carey, A.M., Zhu, Y.G., Deacon, C., Raab, A., Fieldmann, J., Islam, R.M. Meharg, A.A., 2008. Inorganic arsenic in rice bran and its products are an order of magnitude higher than in bulk grain. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7542–7546.
- Takahashi, Y., Minamikawa, R., Hattori, K.H., Kurishima, K., Kihou, N., Yuita, K., 2004. Arsenic behavior in paddy fields during the cycle of flooded and non-flooded periods. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1038-1044.
- Tallman, D.E., Shaikh, A.U., 1980. Redox stability of inorganic arsenic(III) and arsenic(V) in aqueous solution. *Anal. Chem.* 52, 196–199.
- Tamaki, S., Frankenberger, W.T., 1993. Environmental biochemistry of arsenic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 124, 79–110.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Villalobos, M., Toner, B., Bargar, J., Sposito, G., 2003. Characterization of the

- manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 67, 2649–2662.
- Yamaguchi, N., Nakamura, T., Dong, D., Takahashi, Y., Amachi, S., Makino, T., 2011. Arsenic release from flooded paddy soils is influenced by speciation, Eh, pH, and iron dissolution. *Chemosphere* 83, 925–932.
- Yamamura, S., Watanabe, M., Yamamoto, N., Sei, K., Ike, M., 2009. Potential for microbially mediated redox transformations and mobilization of arsenic in uncontaminated soils. *Chemosphere* 77, 169–174.
- Yamamura, S., Amachi, S., 2014. Microbial of inorganic arsenic: from metabolism to bioremediation. *J. Biosci. Bioeng.* 118, 1–9.
- Yamane, T., Yamaji, T., Takami, Y., 1976. Mechanism of rice plant injury in arsenic contaminated paddy soils and its preventive measures. I. Influence of arsenite and arsenate in growth media on the nutrient uptake, growth and yield of rice plant. *Bull. Shimane. Agri. Exp.* 14, 1–17.
- Zhang, L.M., Liu, F., Tan, W.F., Feng, X.H., Zhu, Y.G., He, J.Z., 2008. Microbial DNA extraction and analyses of soil iron-manganese nodules. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1364–1369.
- Zobrist, J., Dowdle, P.R., Davis, J.A., Oremland, R.S., 2000. Mobilization of arsenite by dissimilatory reduction of adsorbed arsenate. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4747–4753.
- 浅見輝男 2001、データで示す日本土壌の有害金属汚染 アグネ技術センター 東京 213–226.
- 安藤正典、眞柄泰基 1997、インド・西ベンガル州に起きた世界最悪のヒ素汚染—ヒ素の健康影響と西ベンガル州における地下水汚染—、資源環境対策、33、113-122.
- 環境省 2014、平成 26 年度環境白書
- 湊秀雄 1998、地質環境と地球環境シリーズ 4 砒素をめぐる環境問題—人工地質の有害と無害性、東海大学出版会

山根忠昭 1989、水稻におけるヒ素被害の発生機構と対策、島根農試研報、24、
1-54.

吉川年彦、直原毅、田中平議 1986、水稻の無機栄養と微量重金属元素の特異吸
収に関する研究（第3報）、近畿中国農業研究、71、8-11.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、日々アドバイスを惜しまなく、物心両面にご配慮下さった千葉大学園芸学研究科の天知誠吾准教授に心深く感謝いたします。また、本研究について暖かい関心を持って大事なアドバイスと励ましを下さった千葉大学園芸学研究科の安藤昭一教授、宍戸雅宏教授、渡辺正巳准教授、国立環境研究所の山村茂樹博士に感謝の気持ちを伝えたいと思います。さらに、研究の遂行にあたり、XANES 解析に関する研究に数々のご指導を賜りました独立行政法人農業環境技術研究所の牧野知之博士、山口紀子博士、東京大学理学部の高橋嘉夫教授に厚く御礼申し上げます。