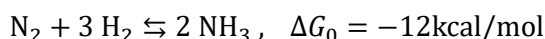


## 生物窒素固定を促進する細胞外電子伝達を担う固体腐植様物質の構造解明

研究代表者：名古屋大学未来材料・システム研究所 教授 片山 新太  
助教 笠井 拓哉

### 1. 緒言

現在、全世界で一年間に1億8000万トンのアンモニアが生産され（小島ら 2011）、その約8割が窒素肥料の製造に使用されている（田島 2011）。アンモニアは、高温高压を用いるハーバー・ボッシュ法によって大気中の窒素ガスを固定して工業的に製造されている。ハーバー・ボッシュ法の化学反応は、以下の化学反応式で表され、窒素 1kg あたり 26MJ のエネルギーが必要とされる（Boys 2011）。これは窒素ガスの反応性が乏しく、高温高压下（20MPa、500℃）で反応させる必要があるためである。



ハーバー・ボッシュ法によって1年間に消費されるエネルギーは、世界エネルギー消費量の約1%（原油換算で1億2000万トンに相当）を占めている。省エネルギー技術が世界的に必要とされる現在、この工業的空中窒素固定法の省エネルギー化は、将来必要不可欠の技術開発とされている。生物による空中窒素固定は常温常圧で省エネルギーであるため期待されているが、活性が低いため高活性化が必要である。近年、細胞外からの直接電子供与によって微生物の高活性化が可能であることが判ってきた。窒素固定微生物は細胞外電子を利用できないが、細胞外電子伝達物質を介すことによって電子供与・高活性化が可能である。しかし、これまで細胞外電子伝達物質としては、メチルビオローゲン等の水溶性有害化学物質が用いられており、実用化には無害且つ固体の細胞外電子伝達物質が必要とされる。これに対し本研究代表者は、あらゆる pH で不溶の固体腐植ヒューミン（以下、ヒューミン）とその類似物質が細胞外電子伝達能力を有し、脱ハロゲン菌(Zhang & Katayama 2012)、硝酸還元菌(Xiao et al 2016)等の還元反応の活性化に加え、嫌気性非共生的窒素固定菌の高活性化も可能であることを明らかにしつつある。ヒューミンは、土壌の一面分で無害である上、アルカリ処理、酸処理、100℃煮沸処理でも機能が失われないう非常に安定な物質である。しかし自然物であるため、その細胞外電子伝達効果はヒューミンによって異なる。窒素固定活性に必要なヒューミンの化学構造を明らかにできれば、将来それを出発点に生物窒素固定を促進する安定で高活性な新規環境材料としての利用が期待される。

そこで本研究では、ヒューミンが嫌気性窒素固定菌の窒素固定活性を細胞外電子供与によって高めることを明らかにするとともに、ヒューミンの化学構造を解析し、細胞外電子伝達に必要な化学的構造を明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 ヒューミンの調製

各種土壌および河川底質からヒューミンを抽出・調製した。風乾した試料を乳鉢・乳棒ですり潰し、ふるい（目開き 2mm）に通した。ふるった試料 100g を 250 ml 容遠心ボトルに入れ、150 ml の 2%HF 水溶液を加えて室温で 24 時間振とう（110 rpm）した。遠心分離（6000 g、10 分、24°C）し、傾斜法で HF 水溶液を除いた。同様の HF 処理を 10 回繰り返した。次に HF 処理と同様に 150 ml 0.1M NaOH を加え 24 時間振とう後、遠心分離して水溶液を傾斜法で取り除く処理を 10 回繰り返した。処理後、試料を超純水で 20 回洗浄（懸濁と遠心分離による）した。洗浄試料を 0.1 M NaOH 溶液を使用して pH 7.5 に調整し、凍結乾燥後、乳鉢と乳棒で粉末にした。表 1 にヒューミン抽出に用いた各種試料を示す。

表1 各ヒューミンの由来

ヒューミンの由来	場所	土壌分類	特徴
鎌島水田土壌	愛知県弥富市	Endoaquept	シルト質壤土
名古屋大学農場	愛知県東郷町	Palehumult	シルト質壤土
荒子川底質	愛知県名古屋市	—	シルト質壤土
茨城畑土壌	茨城県つくば市	Melanudand	軽埴土
弥富水田土壌	愛知県弥富市	Endoaquept	シルト質壤土

また、鎌島水田土壌から異なる方法を用いてヒューミンを調製した（表 2）。

表2 各種ヒューミンの抽出方法

抽出法	抽出操作							参考文献
	操作1	操作2	操作3	操作4	操作5	操作6	操作7	
方法1	0.1 N NaOH	2% HF	0.1 N NaOH	2% HF	0.1 N NaOH	蒸留水	凍結乾燥	Zhang & Katayama 2012
方法2	Benzene/methanol (1:1 v/v)	0.1 N NaOH	HCl/HF (1:9 v/v)	0.1 N NaOH	蒸留水	凍結乾燥		Hatcher et al 1985
方法3	0.1 N NaOH	Methyl isobutyl ketone	0.1 N NaOH	0.1 N NaOH	蒸留水	凍結乾燥		Rice & Maccarthy 1989
方法4	0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 M Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0.1N NaOH	CHBr <sub>3</sub> / ethanol (1.8 g/cm <sup>3</sup> )	0.1 N NaOH	蒸留水	凍結乾燥	Almendros et al 1996
方法5	0.1 N NaOH	0.1 N NaOH と 30 g/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 混合物	30 g/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 N NaOH	蒸留水	凍結乾燥		Tsutsuki & Kuwatsuka 1992
方法6	0.1 N NaOH	6M尿素含有 0.1 N NaOH	DMSO + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6% (v/v)→固相	0.1 N NaOH	蒸留水	凍結乾燥		Hayes et al 2010
方法7	0.1 N NaOH	6M尿素含有 0.1 N NaOH	DMSO + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6% (v/v)→液相	Adjust pH 9 by NaOH	0.1 N NaOH	蒸留水	凍結乾燥	Hayes et al 2010

\* それぞれの抽出操作で24時間振とう後、遠心分離して沈殿物を回収して次の操作を行った

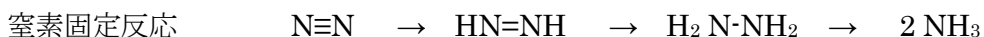
## 2.2 窒素固定微生物集積培養

Ashby 培地 (マンニトール 20g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g/L、NaCl 0.2g/L、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1g/L、CaCO<sub>3</sub> 5.0g/L、pH=7.4±0.2) を作製後、1 時間窒素ガスでスパーキングし、培地を各培養用バイアルへ移した。バイアルごとに数分間窒素バブリングを行い、ブチルゴム栓とアルミキャップで密閉し、オートクレーブ (121°C、20 分) で滅菌した。培地は使用するまで常温で保存した。ヒューミン添加培地を作製する際には、Ashby 培地を、あらかじめ最終濃度 15g/l となるようにヒューミンを添加したバイアルに移した。250 ml Ashby 培地を入れた 600 ml バイアルへ湿潤土 (ほぼ水飽和した土壌) 150 ml を微生物源として添加し、ブチルゴム栓とアルミキャップで密閉したのち、ヘッドスペースを窒素ガス置換したものを 2 本作製し、30°C で 7 週間培養し、これを第 0 世代とした。その後、第 6 世代までは各 4 週間、第 7 世代以降は各 2 週間の培養後に植え継ぎを行った。第 1 世代以降は、50 ml バイアルに 20 ml の Ashby 培地を入れ、ヘッドスペースを窒素ガスで置換したものを用意し、前世代の培養物をそれぞれ 2 ml 接種して植え継ぎを行った。全て 30°C 暗条件で静置培養した。

## 2.3 窒素固定促進効果試験

### 2.3.1 アセチレン還元活性試験

窒素固定酵素ニトロゲナーゼは、以下に示す反応式のように、窒素ガスと同様に三重結合を持つアセチレンガスを還元する能力を持っている (Schöllhorn et al., 1967)。そこで、窒素固定活性は、アセチレン還元活性試験により評価した (Burriss et al., 1991)。



アセチレンは、Molecular Sieve 5A (60/80) 3m のカラムを付けた水素炎検出器付きガスクロマトグラフィー (GC-14B、島津製作所、京都) で測定した。

### 2.3.2 窒素含有量評価試験

また、窒素固定量を元素分析により評価した。元素分析には、ヤナコ MT-5 CHN 分析計 (ヤナコ、京都) を用いた。

## 2.4 ヒューミンの酸化還元処理

ヒューミンを懸濁した嫌気性 Ashby 培地を入れた容器に、作用電極 (白金ワイヤー、直径 0.8mm、長さ 1m)、カウンター電極 (白金ワイヤー、同じサイズ)、参照電極 (Ag/AgCl、+250mV vs. 標準水素電極 (SHE)) をセットし、ポテンシオスタット (HSV-110、北斗電工、大阪) につないだ。還元する場合には -350mV (vs. SHE)、酸化する場合は +450mV (vs. SHE) に電位を 24 時間維持した。処理の間、ヒューミン懸濁液は、嫌気チャンバー内で室温条件下、スターラーで連続攪拌した。還元型・酸化型ヒューミンの効果は、マンニト

ールを抜いた Ashby 培地にヒューミンを加え、そこに飢餓培養した集積窒素固定菌群を接種してアセチレン還元活性を調べた。

## 2.5 ヒューミンの特性評価

### 2.5.1 元素分析

ヤナコ MT-5 CHN 分析計 (ヤナコ、京都) を用いて、ヒューミンおよび培養物の炭素、水素、窒素の分析を行った。ヒューミンの場合は、灰分測定も行い、全量から炭素、水素、窒素および灰分の量を差し引くことで、酸素量を推定した。

### 2.5.2 フーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR)

FT-IR スペクトルは、JASCO FT-IR 6100 スペクトロメーター (JASCO、東京) を用いて KBr 法で測定した。4500 から 500 $\text{cm}^{-1}$  の範囲で 4 $\text{cm}^{-1}$  の解像度で 8 回の測定の積分を行った。

### 2.5.3 電子スピン共鳴分析 (ESR)

ESR スペクトルは、JES-FA200 ESR スペクトロメーター (JEOL、東京) を用いて、分析した。ヒューミンは、固体粉末のまま石英硝子チューブ (JEOL、部品番号 422000281、内径 4mm) に、底から 40mm 詰めて測定した。ヒューミンは、あらかじめ 0.1N HCl または 0.1N NaOH を用いて、pH3 または pH11 に調製して測定した。

### 2.5.4 $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル分析 ( $^{13}\text{C}$ NMR)

固体試料分析が可能な ECA-700 スペクトルメータ (JEOL、東京) を用い、 $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR 測定を行った。ヒューミンは、ジルコニア試料管に詰め、緩和時間 1 秒、接触時間 2ms、共鳴振動数 176MHz、スウィーピング速度 70.4KHz とし、80,000 回ないし 160,000 回のスキャンを積分した。

### 2.5.5 X 線光電子分光分析 (XPS)

シンクロトロン光を用いた XPS 分析を行った。ヒューミン試料は、銅粉末 (サイズ 75 $\mu\text{m}$ 、99.95% 純度、ニラコ、東京) と 1:1 の容量比で混和した後、175MPa の圧力でペレット化して SUS 製試料台に両面炭素テープで貼り付けボルトナットで固定した。これらの作業は嫌気チャンバー内で行った。測定は、あいちシンクロトロン光センターのビームライン 7U (超軟 X 線, 32–1000 eV) で、ワイドスキャン分析とナローズスキャン分析を行った。金 (Au) 4f をキャリブレーションに用いた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ヒューミンによる窒素固定の活性化効果

鎌島水田土壌より Ashby 培地で集積培養した微生物群の窒素固定活性に対するヒューミンの効果を調べた。表 3 に示すように、集積微生物のアセチレン還元活性を 5 割以上高めた。ヒューミンのみで微生物の無い条件では、アセチレン還元活性はみられなかった。このことは、ヒューミンによる化学的アセチレン還元は起きていないこと、および集積微生物にヒューミンが共存することで微生物の窒素固定活性が高まる事を示している。また培養物全体に含まれる窒素含量を培地のみを 100%とすると、集積微生物のみやヒューミンのみの条件では 120~125%の窒素含量であったのに対し、集積微生物とヒューミンが共存した場合は 340%と窒素含量が 3 倍以上に増加した。

表3 アセチレン還元活性と窒素固定活性への鎌島ヒューミンの効果

条件	アセチレン還元活性 (エチレンmL/L)	相対的窒素含量 (%)
集積微生物+ヒューミン	16 ± 2	340 ± 30
集積微生物	10 ± 1	120 ± 30
ヒューミン	検出限界以下	125 ± 20
培地のみ	検出限界以下	100とする

各種ヒューミンの効果を同様に調べたところ、各種土壌および河川底質の異なる由来のヒューミンに程度の差はあれ促進効果がみられた (表 4)。このことは、窒素固定活性に対する促進効果はヒューミン一般にみられることを示している。

表4 アセチレン還元活性に対する各種ヒューミンの効果

ヒューミン	アセチレン還元活性 (エチレンmL/L)
なし (コントロール)	0.35 ± 0.1
鎌島	2.6 ± 0.3
名大農場	2.2 ± 0.2
荒子川	1.1 ± 0.3
茨城	1.3 ± 0.3
弥富	1.6 ± 0.5

次に、ヒューミンの効果を、還元剤の効果と比較した。用いた還元剤は、15 mM 硫化ナトリウム (Na<sub>2</sub>S) (Remberger et al., 1993), 1.7 mM L-システイン塩酸塩 (Hatamoto et al., 2014), 0.025 mM 塩化チタン (III) - ニトリロ三酢酸 (Ti-NTA) (Li et al., 2014) の 3 種である。どの還元剤も、ヒューミンに比べアセチレン還元活性が低かった (表 5)。このことより、ヒューミンの効果は培地を還元する効果とは異なることが明らかとなった。

表5 アセチレン還元活性に対する各種還元剤の効果

ヒューミン	アセチレン還元活性 (エチレンmL/L)
なし (コントロール)	0.6 ± 0.2
鎌島ヒューミン	3.4 ± 0.2
Na <sub>2</sub> S	検出されず
システイン塩酸塩	0.5 ± 0.1
Ti-NTA	0.5 ± 0.2

更に、還元型・酸化型のヒューミンを懸濁した培地を用意し、飢餓培養した集積窒素固定菌群のアセチレン還元活性を比較したところ、還元型ヒューミンでは窒素固定反応の促進がみられたが、酸化型ヒューミンではみられなかった(表 6)。このことから、ヒューミンが窒素固定微生物に対して電子供与していることによって反応促進していることが示唆された。

表6 アセチレン還元活性に対する還元型・酸化型ヒューミンの効果

ヒューミン	アセチレン還元活性 (エチレンμL/L)
なし (コントロール)	検出されず
処理無しヒューミン	検出されず
還元型ヒューミン	21 ± 2
酸化型ヒューミン	検出されず

そこで、各種ヒューミンの元素組成 (表 7) とアセチレン還元活性の促進効果 (表 4) を比較した。図 1 に示すように、各種ヒューミンの元素組成と促進効果には相関が見られなかった。このことは、ヒューミン中の有機物が、培地中に含まれるマンニトール以外の炭素源として窒素固定活性に対する効果を示す可能性は低いことを示している。換言すれば、細胞外電子伝達によって窒素固定活性を高めていることが示唆される。

表7 各種ヒューミンの元素組成

ヒューミン	炭素 (%)	水素 (%)	窒素 (%)	灰分 (%)	C/N 元素比	H/C 元素比
鎌島	8.27	1.61	0.67	75.6	14.4	2.34
名大農場	13.98	2.23	2.31	49.3	7.1	1.91
荒子川	9.48	1.42	0.6	71.6	18.4	1.80
茨城	4.26	0.97	0.39	78.2	12.7	2.73
弥富	2.56	1.02	0.15	88.0	19.9	4.78

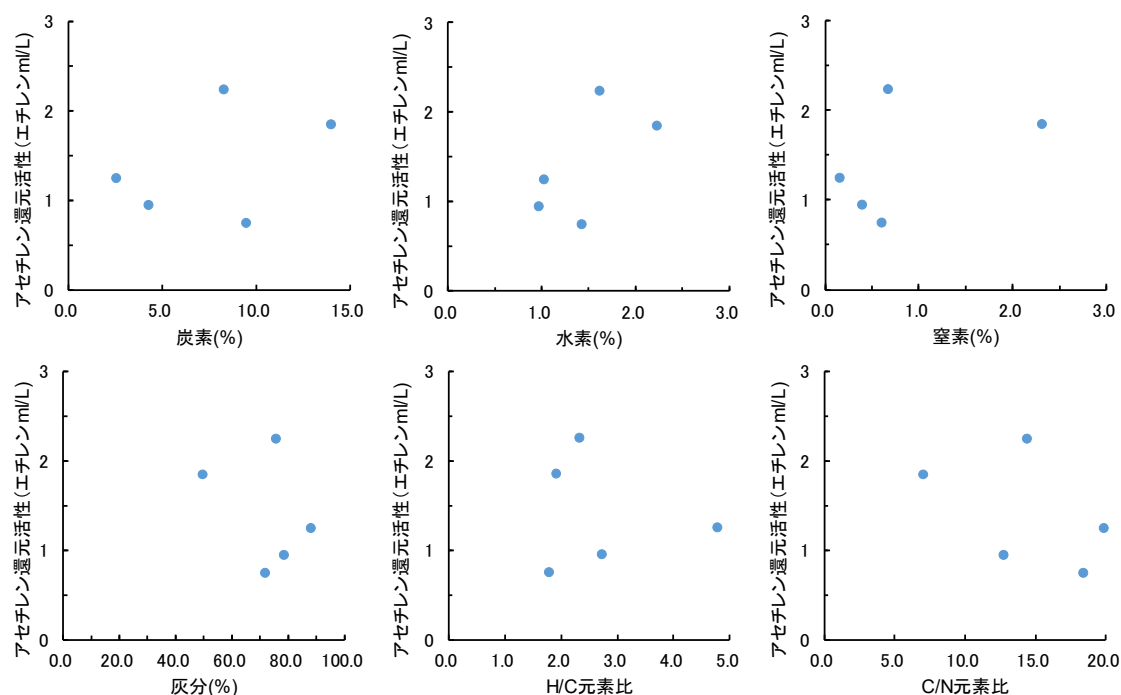


図1 各種ヒューミンの元素組成とアセチレン還元活性の関係

これまでに、ヒューミンの有機画分が活性化—即ち細胞外電子伝達機能—に有効であることが別の研究から明らかにされている (Zhang & Katayama 2012)。従って、ヒューミンの有機画分の化学構造上の特徴が重要であると考えられる。そこで、次にヒューミンの化学的特徴を調べることにした。

### 3.2 ヒューミンの化学的特徴

#### 3.2.1 異なる抽出法で得た鎌島ヒューミンの元素組成

同じ由来で異なる抽出法で得たヒューミンの持つ細胞外電子伝達機能が異なることを利用して、細胞外電子伝達機能に關与する化学的特徴を調べた。表 8 に元素組成と電子伝達能の強弱をまとめた。電子伝達能の強弱と炭素濃度をはじめとした元素組成の間の關係に一定の傾向がみられないことが確認された。

表8 各種抽出法で得たヒューミンの元素組成と電子伝達能

ヒューミン	収量 (mg/g soil)	元素組成 (%)			灰分 (%)	C/N 元素比	H/C 元素比	電子 伝達能
		炭素	水素	窒素				
方法1	14.5	6.86	1.94	0.50	76.95	15.89	3.40	強
方法2	1.2	38.65	5.24	2.99	27.60	15.08	1.63	弱
方法3	10.6	3.44	1.30	0.30	86.46	13.38	4.52	強
方法4	9.4	6.01	1.75	0.50	81.20	14.11	3.49	弱
方法5	14.0	2.48	1.32	0.17	85.14	16.71	6.38	中
方法6	9.9	3.63	1.20	0.26	85.25	16.50	3.96	中
方法7	1.5	13.05	2.49	0.79	64.19	19.27	2.29	無

### 3.2.2 FT-IR スペクトル

そこで、異なる方法で抽出したヒューミンのFT-IR スペクトルを比較した(図2)。しかし、いずれのスペクトルも似通っており、FT-IR スペクトルでは大きな構造上の違いは見られなかった。

### 3.2.3 ESR スペクトル

次に、有機ラジカルの有無を調べるために、ESR スペクトルを測定した(図3)。その結果、電子伝達機能の高いヒューミン(方法3, 4, 5, 6)は、方法1と同様にpH11に試料を調製した場合とpH4に試料を調製した場合での有機ラジカルを示すピーク強度が大きく変化した。このようなpH依存性はフェノール性ラジカルに特有の特徴で有り、細胞外電子伝達にフェノール性ラジカルが関与していることが示唆された。

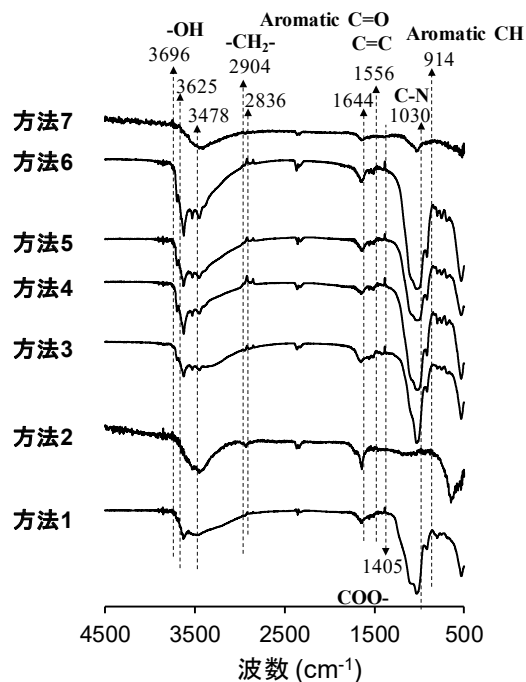


図2 各種ヒューミンのFT-IRスペクトル

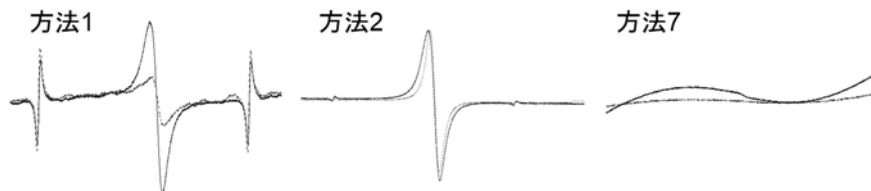


図3 電子スピン共鳴スペクトル  
両端はマンガンマーカを示す。実線はpH11に、点線はpH4に調製したヒューミンの測定結果を示す。方法3、4、5、6で抽出したヒューミンは、ほぼ方法1と同じスペクトルであった。

フェノール性有機ラジカルを発生し腐植物質にみられる構造は、キノーン-ハイドロキノンの骨格であることから、キノン骨格の関与が考えられる。しかし、方法2で抽出したヒューミンの有機ラジカルにはpH依存性がみられなかったことから、フェノール性ラジカル以外の化学構造が関与しているものと考えられる。一方、電子伝達機能が無い方法7で抽出したヒューミンには有機ラジカルのピークがみられなかった。



### 3.2.4 $^{13}\text{C}$ CP/MAS NMR スペクトル

ヒューミン中の有機画分の炭素骨格を調べるために、 $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR スペクトルを調べた。一例を図4に示す。化学シフトによって、炭素骨格を、脂肪族炭素、水酸化炭素（炭水化物）、芳香族炭素、カルボキシル炭素にグルーピングした（表9）ところ、細胞外電子伝達能が高いヒューミンは、芳香族炭素が少なかった。このNMR スペクトルの解析結果は、ESR スペクトルのフェノール性ラジカル（芳香族炭化水素を示唆する）の関与を示唆する結果とは、異なるものとなった。

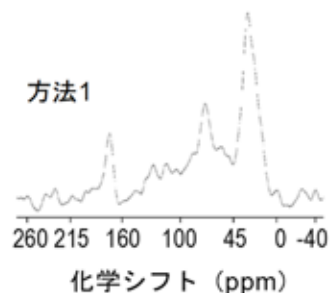


図4 方法1で抽出したヒューミンの $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMRスペクトル

表9  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMRに基づく各ヒューミンの炭素組成

ヒューミン	炭素の相対割合 (%)			
	脂肪族炭素 (0-45 ppm)	水酸化炭素 (45-100 ppm)	芳香族炭素 (100-160 ppm)	カルボキシル炭素 (160-215 ppm)
方法1	52.0	23.7	8.6	15.7
方法2	68.6	9.4	15.0	7.0
方法3	39.1	21.0	13.0	26.9
方法4	49.1	10.6	36.4	3.9
方法5	39.3	27.9	19.0	13.7
方法6	74.2	0.4	0.1	25.3
方法7	42.6	15.1	35.5	6.8

### 3.2.5 XPS スペクトル

ESR スペクトルと $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR スペクトルの間で結果が異なった。そこで、もう一つ別の炭素組成解析法としてXPS スペクトルを測定して、元素組成と比較した。図5に測定例を示す。結合エネルギーに基づくデコンボリューションを行って各炭素組成に同定した（表10）。ここでも、細胞外電子伝達活性が無い「方法7」、および活性が弱い「方法2と4」の3つのヒューミンは、 $\text{C}=\text{C}$ の割合が大きかった。従って、芳香族炭化水素の構造は、細胞外電子伝達機能にはあまり関与していないことが示唆された。一方、細胞外電子伝達能の高いヒューミンには、 $\text{O}=\text{C}-\text{N}$  や  $\text{O}=\text{C}-\text{O}$  の構造の割合が比較的大きなものが多かった。これらの化学構造が細胞外電子伝達機能に関与している可能性が考えられる。

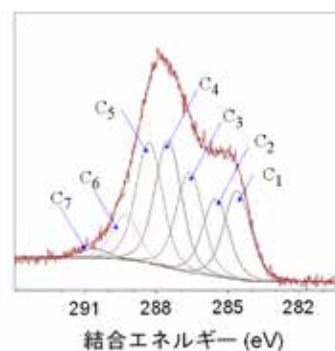


図5 C1sナローキャン分析

表10 XPSスペクトルに基づく各ヒューミンの炭素組成割合

ヒューミン	ピーク同定と面積割合(%)							
	C=C (C <sub>1</sub> )	C-C/C-H (C <sub>2</sub> )	C-O (C <sub>3</sub> )	C=O (C <sub>4</sub> )	O=C-N (C <sub>5</sub> )	O=C-O (C <sub>6</sub> )	CF <sub>1</sub> (C <sub>7</sub> )	CF <sub>2</sub> (C <sub>8</sub> )
	(284.3 ± 0.4 eV)	(285.5 ± 0.4 eV)	(286.5 ± 0.4 eV)	(287.5 ± 0.4 eV)	(288.5 ± 0.4 eV)	(289.5 ± 0.4 eV)	(290.5 ± 0.4 eV)	(291.5 ± 0.4 eV)
方法1	15.6	13.6	17.6	24.4	21.2	7.8	1.7	-
方法2	25.2	7.8	9.9	19.2	24.9	8.9	2.6	1.5
方法3	9.1	9.1	14.9	29.7	26.6	10.2	-	-
方法4	46.2	15.2	13.3	14.8	8.2	2.4	-	-
方法5	8.8	8.8	12.0	27.7	32.7	10.1	-	-
方法6	18.4	14.5	15.3	16.6	25.5	9.6	-	-
方法7	55.8	13.9	10.8	14.2	5.2	-	-	-

\* 記号“-”は検出されなかったことを示す。

このような部分構造は、ペプチドグリカンに多くみられるが、ペプチドグリカン自体には一般に酸化還元官能基が含まれないことから、ペプチドグリカンに関連する他の生体成分の関与が推察された。

#### 4. まとめ

本研究は、ヒューミンが嫌気性窒素固定菌の窒素固定活性を細胞外電子供与によって高めることを明らかにするとともに、ヒューミンの化学構造を解析し、細胞外電子伝達に必要な化学的構造を明らかにすることを目的とした。

アセチレン還元活性および窒素含量の両方から、ヒューミン存在下で窒素固定活性が高まる事が観察された。ヒューミンの効果は、培地に用いたマンニトールに次ぐ第二の炭素源としての働きによるものではなく、還元型・酸化型ヒューミンの効果の違いから、細胞外電子の供与によるものであることが示唆された。

細胞外電子伝達の機能は、有機画分にみられるが、その効果は有機物含量に相関関係は無かった。ESR スペクトル解析からは、フェノール性有機ラジカルが関与している可能性が示唆された。フェノール性有機ラジカルを発生し腐植物質にみられる構造は、キノーン・キノンの骨格である。また、一方 NMR スペクトルおよび XPS スペクトルからは、細胞外電子伝達能の高いヒューミンは、芳香族炭素含量が少なかった。XPS スペクトルでは、細胞外電子伝達能の高いヒューミンに、O=C-N や O=C-O の部分構造を持つ化学構造の割合が高かった。このような部分構造は、ペプチドグリカンに多くみられるが、ペプチドグリカンには酸化還元官能基が無いことから、ペプチドグリカンに関連する他の化学構造の細胞外電子伝達への関与が推察された。

今後は、多様なヒューミンの化学構造の解析を進めるとともに、更に電気化学解析も併せて行って、細胞外電子伝達機能—即ち窒素固定反応の促進活性化—を担うヒューミンの反応中心を解明することによって、高効率の生物窒素固定システムの開発につなげたい。

## 謝辞

本研究は、公益財団法人JFE21世紀財団の技術研究助成を受けて実施されたものである。関係各位に深く感謝の意を表します。

## 参考文献

- Almendros, G., Guadalix, M.E., González-Vila, F.J., Martin, F. (1996) Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. *Org. Geochem.* 24, 651–659.
- Bone, D. H. (1971) Nitrogenase activity & nitrogen assimilation in *Anabaena flos-aquae* growing in continuous culture, *Archiv für Mikrobiologie*, 80 (3) , 234-241.
- Boys, A. F. F. (2010) 石油ピーク後の食料事情、もったいない学会 WEB 学会誌、3、26-30.
- Burris R. H. (1991) Nitrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, No. 15, pp. 9339-9342.
- Capone, D. G., Taylor, D. L., & Taylor, B. F. (1977) Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with macroalgae in a coral-reef community in the Bahamas, *Marine Biology*, 40 (1) 29-32.
- Hatamoto, M., Kaneshige, M., Nakamura, A., & Yamaguchi, T. (2014) *Bacteroides luti* sp. nov., an anaerobic, cellulolytic & xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge, *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 64, 1770-1774.
- Hatcher, P.; Breger, I.; Maciel, G.; Szeverenyi, N. (1985) Geochemistry of humin. *In Humic Substances in Soil, Sediment, and Water: Geochemistry, Isolation and characterization*; Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P., Eds.; John Wiley and Sons: New York, NY, USA, 1985; Volume 21, pp. 275–302.
- Hayes, M.H.B., Swift, R.S., Byrne, C.M., Simpson, A.J. (2010) The isolation and characterization of humic substances and humin from grey brown podzolic and gley grassland soils. *In Proceedings of the 19<sup>th</sup> World Congress of Soil Science: Soil Solutions for a Changing World*, Brisbane, Australia, 1–6 August 2010; Gilkes, R.J., Prakongkep, N., Eds.; International Union of Soil Sciences: Crawley, UK, 2010; pp. 198–201.
- Li, Z., Suzuki, D., Zhang, C., Yang, S., Nan, J., Yoshida, N., Aijie, W., & Katayama, A. (2014) Anaerobic 4-chlorophenol mineralization in an enriched culture under iron-reducing conditions, *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 118, 529-532.
- Remberger, M., Hynning, P. A., & Neilson, A. H. (1993) Release of chlorocatechols from contaminated sediments, *Environmental Science & Technology*, 27, 158-164.
- Rice, J.A. & MacCarthy, P. (1989) Isolation of humin by liquid-liquid partitioning. *Sci.*

- Total Environ., 81–82, 61–69.
- Schöllhorn, R., & Burris, R. H. (1967) Acetylene as a competitive inhibitor of N<sub>2</sub> fixation, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 58, 213-216.
- Tsutsuki, K. & Kuwatsuka, S. (1992) Characterization of humin-metal complexes in a buried volcanic ash soil profile and a peat soil. Soil Sci Plant Nutr., 38, 297–306.
- Xiao, Z., Awata, T., Zhang, D., Zhang, C., Li, Z. & Katayama, A. (2016) Enhanced denitrification of *Pseudomonas stutzeri* by a bioelectrochemical system assisted with solid-phase humin, Journal of Bioscience and Bioengineering, 122, 85-91.
- Zhang, C., & Katayama, A. (2012) Humin as an electron mediator for microbial reductive dehalogenation. Environ. Sci. Technol. 46, 6575–6583.
- 小島由継・市川貴之 (2011) アンモニアを利用したグリーン水素キャリア、水素エネルギーシステム、36 (4)、34-41.
- 田島慶三 (2011) 図解入門 業界研究 最新化学工業の動向とカラクリがよ〜くわかる本、秀和システム、28p.