

令和元年6月10日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06876

研究課題名(和文)レアメタル代謝細菌における生物気化メカニズムの解明と気化回収開発

研究課題名(英文) Investigation of biovolatilization mechanism in rare metal metabolizing bacterium and development of biovolatile compounds recovery

研究代表者

山下 光雄 (Yamashita, Mitsuo)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：40220347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：セレン気化能を有する *Pseudomonas stutzeri* NT-1 はセレン酸から揮発性ジメチルジセレンド(DMDSe)を合成する。NT-1株を用いてセレン含有廃液からDMDSeを約39%硝酸に回収した。硝酸中のセレン化合物を中和、酸化、還元反応によって純度99.7%の元素態セレンに資源化できた。NT-1由来のDMDSe合成遺伝子をラクトースプロモーターの下流に連結した大腸菌DH5a (lac-ME-His)を作製した。この組換え体はNT-1と同様に元素態セレンを還元し、揮発化DMDSeを合成した。以上のように、組換え体でのセレン還元を含み廃水からセレン回収技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

太陽電池に使用されているレアメタルの1種類であるセレンに注目し、セレン還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* strain NT-1の気化能(セレンバイオボラタリゼーション)を活用してセレンを含む廃水から高純度の元素態セレンを精錬し、浄化回収資源化技術開発に成功した。生物由来の特異なバイオボラタリゼーションを利用したレアメタル浄化回収技術は廃水や廃棄物から有価資源を回収するという特色のある手法であり、「循環型社会」形成の一助となると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Selenate reducing bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain NT-1 reduce selenate, selenite, and biogenic elemental selenium into volatile selenium (Se), dimethyldiselenide (DMDSe). DMDSe was recovered at about 39% in nitric acid from waste water containing Se using strain NT-1. The biogenic elemental selenium was recycled at 99.7% purity from Se compounds in nitric acid by a sequence of reaction of neutralization, oxidation and reduction. The recombinant *E. coli* DH5a (lac-ME-His) was constructed harbouring DMDSe synthesis gene under lactose promoter. The recombinant *E. coli* DH5a (lac-ME-His) reduced biogenic elemental selenium and synthesized volatile DMDSe as same level as strain NT-1. Taken together, we succeeded in development of selenium recovery technology including recombinant DMDSe synthesis gene from waste water.

研究分野：工学

キーワード：レアメタル セレン 生物気化 メカニズム 回収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レアメタル(希少金属)は小型デジタル家電や、電気自動車のモーターや電池の材料として不可欠な元素であり、ハイテク産業での需要が急速に伸びている。レアメタルの中でも採年数が短く、近い将来に枯渇が予想される鉱種は、急激な価格の乱高下が起こりやすい。さらにレアメタルは特定国に偏在し、囲い込みが起きている。このために資源が乏しく、世界でも有数のレアメタル消費大国である日本では安定供給に向けた対策が望まれている。

レアメタルの一鉱種であるセレン(Se)は主にガラス染色や太陽電池の半導体材料として需要が伸びている工業的に重要な資源である。Seの精錬工程や火力発電所では有毒な可溶性のSe酸化物イオンを含む廃水が発生している。そのため、廃水中のSeは物理化学処理(電気還元や凝集沈殿法)により浄化されている。この処理は大量の薬剤を投入し大量の汚泥が発生するという欠点がある。さらに汚泥中のSe含量が低いため、汚泥からSeを回収、資源として再利用する事は難しい。毎年日本では廃水に含まれる約40t(生産量の5%)のSeが再資源化されず、廃棄・排出されている。

申請者は廃水や廃棄物からのレアメタル回収を可能とするアプローチとして、微生物による金属代謝(メタルバイオテクノロジー)の活用を提案している。生物のもつ高選択性を活かすことで、メタルバイオテクノロジーは廃水や廃棄物から金属を浄化・回収する技術になる。これまでに本技術を活用して廃水中からSeを回収する技術の開発を行っている。微生物によるメタルバイオテクノロジーの中でも生物気化(バイオボラタリゼーション)は、レアメタル回収技術への活用が期待されている機能の一つである。バイオボラタリゼーション能を保有する微生物の分離やその応用に成功すれば、レアメタルを温和な反応条件で容易に回収するプロセスの開発が可能となる。バイオボラタリゼーションを利用したレアメタル浄化回収技術は廃水や廃棄物から有価資源を回収するという特色のある手法であり、「循環型社会」形成の一助となると期待される。

2. 研究の目的

本研究期間では生物気化(バイオボラタリゼーション)を利用したレアメタルの1種であるセレン(Se)の気化メカニズムを明らかにし、それを応用した回収技術を開発する。具体的には以前単離したセレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株が水溶性セレン酸や亜セレン酸を不溶性元素態セレンに還元し(1)、その元素態セレンを揮発性ジメチルジセレンドに還元する(2)。NT-I 株の保有するSeをメチル化や気化能に関するメカニズムを解明し、実廃水からのSe気化回収試験と再資源化技術の構築を行う。NT-I 株が保有するSe気化能は固体から気体への相変化を伴う特色のある反応(バイオボラタリゼーション)で、これを利用すればSeを含む廃水や廃棄物から簡便に高純度のSeを回収できる可能性がある。これら一連の研究を通じて、既存技術では困難、または不可能とされている廃水や廃棄物からのレアメタルのリサイクルを可能とし、本技術を広く他のメタルに汎用できる技術にすることを旨とする。

3. 研究の方法

本研究計画はセレン酸還元細菌 NT-I 株の保有するバイオボラタリゼーションを利用したセレン(Se)の気化メカニズムを明らかにし、それを応用した回収技術を開発するための基盤研究を培養工学的試験と遺伝子工学試験の2つのアプローチにより達成していく計画である。具体的には培養工学的試験を通じて、本技術の処理時間短縮や実廃水を用いた検証を行う。遺伝子工学的な試験を通じて、ジメチルジセレンド(DMDSe)合成の基質や反応に關与する物質の特定など反応メカニズムの解明を行う。DMDSe 合成メカニズムから推測される合成反応に關与する情報をバイオボラタリゼーションを利用したSeの気化回収・再資源化技術開発を確立する。

(1) 培養工学的試験

処理時間の短縮を目指して実廃水を使った検証の達成に向けて培養工学的な試験とSe気化回収液からのSe再資源化技術の構築を行った。具体的には実廃水を使った検証のために *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を用いて実際のSe含有廃水を用いてSe気化回収試験を行い処理時間や回収率を計算し、模擬廃水と実廃水で得た値を比較した。実験材料や方法、Se気化回収バイオリアクターは既報を参考に行った(3)。次に、NT-I 株由来のDMDSe合成酵素遺伝子を導入した大腸菌を使用して、DMDSe合成に最適な培地、最適な培養条件の検討を行った。最後に回収したSeを再び資源とするために気化Se回収液からのSe精錬技術の検討を行った。

(2) 遺伝子工学的試験

DMDSe合成メカニズム解明と組換え酵素製剤による処理技術の確立の達成に向けて遺伝子工学的な試験を行った。セレン酸添加培養(3)や分子生物実験は既報に従って行った(4)。以前の科研(課題番号25420838)の成果物として得られた *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株由来の

DMDSe 合成酵素遺伝子 (*menG*) を導入した大腸菌株を用いて DMDSe 合成量を向上させ、メカニズムの解析を行い、DMDSe 合成の基質、反応条件を明らかにした。ファージディスプレイ法による Se と特異的に結合するペプチドを選別した (5)、さらに DMDSe 合成酵素の精製を His タグカラムを用いて試みた (6)。

4. 研究成果

(1) 培養工学的試験結果

Pseudomonas stutzeri NT-I 株とセレン酸含有模擬廃水を用いて、培養条件の最適化試験を行った。その結果培養温度 38、pH9.0、通気量 $1 \text{ L}^{-1}\text{min}^{-1}$ 、攪拌速度 250 rpm であった。実際の Se 含有廃水を用いて最適化条件で Se 気化回収試験を行った結果、処理時間 120 時間で初期セレン濃度の約 39% に当たる DMDSe を回収することに成功した。模擬廃水での回収率約 71% と比較すると、実廃水での回収率は約半分まで減少した。実廃水中の処理後のセレン分析値から推定すると、気体回収率の低下は DMDSe が可溶性セレンとして培養液に残存していたからであると考えられる。この最終培養液中の可溶性画分に含まれる DMDSe がすべて気体セレンとして回収できたとすると、回収率は初期セレン濃度の約 65% になる。これは模擬廃水を用いた時の約 71% と同等の回収率である。本研究に用いた模擬廃水には存在しない実廃水に存在する揮発化阻害物質の特定には至らなかったが、今後、この要因を除去することで、セレン気化回収率が高くなると思われる。

NT-I 株由来の DMDSe 合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌 DH5 α (lac-ME-His) を使用して、DMDSe 合成に最適な培地や培養条件の検討を行った。その結果、最適培地は完全培地の TSB 培地が LB 培地より還元能が優れていた。培養条件は pH9.0、温度 38 であった。TSB 培地は LB 培地と比較して大豆分解物が多く含まれているので、有機分やメチル基供与体も多く含まれていると示唆される。実際の Se 含有廃水を使用して組換え大腸菌の培養はできなかった。用いた廃水中に大腸菌の増殖を阻害する物質が入っていたと思われるが、その物質の特定には至らなかった。そのために NT-I 株と Se 気化回収による処理時間や回収率をリアクターを用いては計算することができなかった。

回収した Se を再資源化するために気化 Se を捕集した硝酸溶液からの回収の検討を行った。以前の結果から NT-I 株の合成した DMDSe は硝酸中で溶解し不揮発性のメチルセレン酸となる。しかしメチルセレン酸は工業利用されにくい化合物であるので、メチルセレン酸から元素態 Se や二酸化セレンに変換することを試行した。その結果、脱硝酸化 (80 で 60 分保温)、アルカリ化 (水酸化ナトリウム溶液)、酸化 (過酸化水素)、還元 (亜硫酸ナトリウム)、再還元 (アスコルビン酸) によって、回収率 25%、純度 99.7% の元素態セレンの精錬に成功した。

(2) 遺伝子工学的試験結果

科研費 (課題番号 25420838) 成果物とし得られた *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株由来の DMDSe 合成酵素遺伝子 (*menG*) を導入した大腸菌 DH5 α (pGEM-MemG) は NT-I 株と比較して DMDSe 合成量 (元素態セレンの還元能) が乏しかった。そこで発現量を向上させ、組換えタンパク質を容易に精製するために、DMDSe 合成酵素遺伝子だけを保有する大腸菌 DH5 α (ME)、DMDSe 合成酵素のカルボキシ末端に His-タグ (His-Tag) を化学修飾した遺伝子を持つ大腸菌 DH5 α (ME-His)、ラクトースプロモーターの下流に ME-His を組換えた大腸菌 DH5 α (lac-ME-His) を作製した。NT-I 株と種々の組換え大腸菌 DH5 α 株を TSB 培地に亜セレン酸を含む培養液を三角フラスコ培養し、その上清と沈殿中のセレン濃度を測定し、以下の図 1、2 に示した。DH5 α (lac-ME-His) 株は NT-I 株とほぼ同様のセレン濃度変化が見られた。可溶性亜セレン酸が不溶性の元素態セレンに還元され、生合成された元素態セレンは揮発性 DMDSe に還元された。

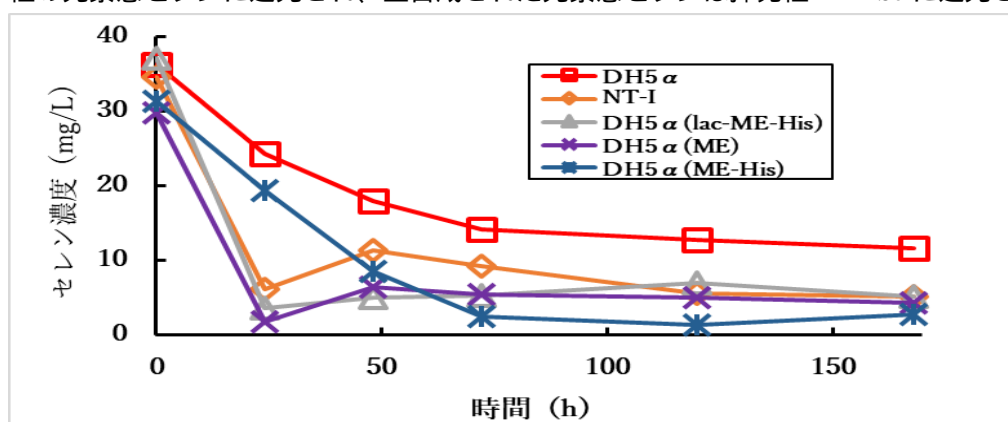


図 1 NT-I、大腸菌における培養上清中のセレン濃度変化

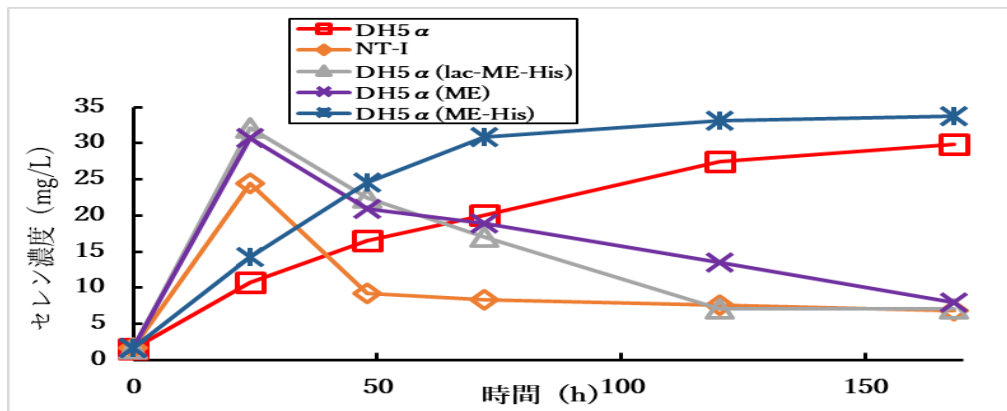


図2 NT-I、大腸菌における培養沈殿中のセレン濃度変化

TSB 培地における培養液上清と沈殿のセレン濃度を加算して本実験のセレン濃度の総量を下図3に示した。

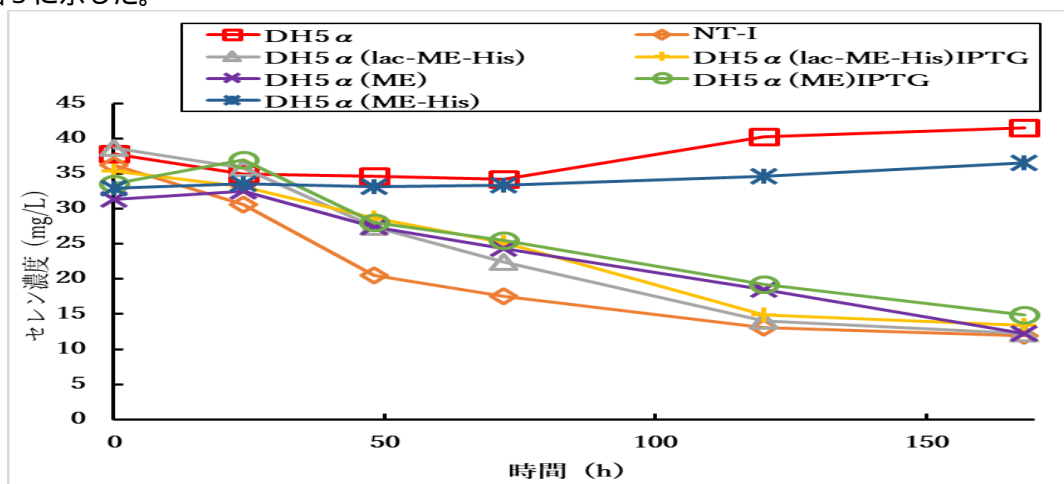


図3 NT-I、大腸菌における培養液（上清、沈殿）中のセレン濃度変化

NT-Iは初発セレン濃度が37.8 mg/Lであり、時間経過に伴いセレン濃度が減少し、168 hにおいては11.9 mg/Lまで減少した。組換え遺伝子発現を誘導する化合物IPTGの添加に関係なく、DH5α(lac-ME-His)のセレン濃度は減少し、168hにおいてNT-Iと同程度の12.0 mg/Lまで減少した。コントロール株である大腸菌DH5αのセレン濃度は初発37.8 mg/Lで、72 hにおいて34.3 mg/L、168 hにおいては41.6 mg/Lであった。このことからDH5α(lac-ME-His)は、NT-Iと同様に、亜セレン酸を不溶性元素態セレンに還元した後、不溶性元素態セレンを揮発性DMDSeに還元したと示唆される。計算上初発セレンの約70%のセレンがTSB培地中から気化したことがわかった。

次に組換え大腸菌DH5α(lac-ME-His)から組換えDMDSe合成酵素を精製することを試みた。大量培養した組換え大腸菌体を遠心分離にて回収し、ガラスビーズ破碎後の上清をHis-Tagアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いて精製したところ、該当する分子量23kのタンパク質バンドをSDS-PAGEで見つけることができたが、その他複数のタンパク質バンドも現れた。大腸菌由来の夾雑タンパク質がHis-Tagアフィニティカラムに非特異的に吸着したと思われる。イオン交換カラムクロマトグラフィーや分子量分画カラムクロマトグラフィーを併用して酵素を単一に精製する必要がある。単一にまで酵素精製できなかったため、DMDSeの基質やメチル基供与体の特定には至らなかった。

DMDSe合成酵素遺伝子中のSe結合部位を推測するためにファージディスプレイ法によってSeに特異的に結合するファージペプチドのパンニングを定法通り行った。最終的にファージ由来のDNA塩基配列を解析した結果、2種類の別々のファージペプチドを得た。得られたペプチドはDMDSe合成酵素のアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列はなかった。

以上の結果から、lac-ME-His遺伝子を構築しTSB培地にすることでセレン還元能の向上がみられた。TSB培地に含まれている何からの化合物成分がメチル化セレンの合成量促進をしたと考えられる。

<引用文献>

1. Kuroda, M. et al.: J. Biosci. Bioeng., 112(3), 259-264 (2011).

2. Kagami, T. et al.: Water Research, 47, 1361-1368, (2013).
3. 山下光雄ら：水環境学会誌, 37(2), 66-70 (2014).
4. Sambrook, J. et al.: Molecular Cloning 3rd ed. (2001).
5. Devlin, J.J. et al.: Science, 249, 404-406 (1990).
6. Mugita, N. et al.: Arch.Oral. Biol., 82, 233-240 (2017).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Takumi Horiike, Osamu Otsuka, Yasuhiro Tanaka, Takeshi Terahara, Chiaki Imada and Mitsuo Yamashita.: Diversity of salt-tolerant tellurate-reducing bacteria in marine environment. J. Gen. Appl. Microbiol. Doi: 10.2323/jgam.2018.11.003.

Takumi Horiike, Yuma Dotsuta, Yuriko Nakano, Asumi Ochiai, Satoshi Utsunomiya, Toshihiko Ohnuki and Mitsuo Yamashita: Removal of soluble strontium via incorporation into biogenic carbonate minerals by halophilic bacterium, *Bacillus* sp. strain TK2d in a highly saline solution. Appl. Environ. Microbiol., 83(20), e00855-17, 2017. DOI: 10.1128/AEM.00855-17(e00855-17).

Takumi Horiike, Hajime Kiyono and Mitsuo Yamashita.: *Penidiella* sp. strain T9 is an effective dysprosium accumulator, incorporating dysprosium as dysprosium phosphate compounds. Hydrometallurgy, 166, 260-265, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.07.014>.

Osamu Otsuka, Yutaka Yanaba, Takeshi Yoshikawa, and Mitsuo Yamashita.: Fundamental studies on oxidizing roasting of the “Bioselenium”. Materials Transactions, 57(7), 1183-1191, 2016. doi:10.2320/matertrans.M2016060.

〔学会発表〕(計 27 件) 12 件抜粋

Osamu Otsuka, Ryo Nishizato, Minoru Okuno, Hiroyuki Mutou, Naoto Watanabe, Tsutomu Matsuo, Fumiya Kotake, Mitsuo Yamashita. Bioremediation of selenate-contaminated soils using *Pseudomonas stutzeri* NT-I. The 7th International Selenium Conference (Se2018) Selenium in Biology, Chemistry and Medicine (Otsu, Shiga, Japan, October 1 - October 5, 2018).

平谷朋之、小竹史哉、永直文、大塚治、山下光雄、セレン酸還元細菌内包ポリマーカプセルによる新たなセレン廃水の浄化と資源化。(日本生物工学会 2018 年度大会(平成 30 年度)、大阪、9 月 5-7 日)。

山下光雄、小竹史哉、大塚治、西里亮、奥野稔、武藤宏行、バイオレメディエーションによるセレン汚染土壌浄化。(日本生物工学会 2018 年度大会(平成 30 年度) 大阪、9 月 5-7 日)。

山下光雄、大塚治、黒田雅史、池道彦、好気性セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株の Dimethyl Diselenide 合成特徴(その 2)。(第 4 回日本セレン研究会、草津市、7 月 21-22 日)。

小竹史哉、大塚治、山下光雄、西里亮、奥野稔、武藤宏行、佐々木雄一、セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理(その 3)。(日本農芸化学会 2018 年度大会(平成 30 年度) 名古屋、3 月 16-18 日)。

大塚治、福澤文人、堀池巧、山下光雄、西里亮、奥野稔、武藤宏行、セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株によるセレン酸汚染土壌のバイオレメディエーション。(土木学会平成 29 年度全国大会、福岡、9 月 11-13 日)。

黒田真史、櫻井柴乃、山下光雄、池道彦、*Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の同定と解析。(第 69 回日本生物工学会大会(2017) 東京、9 月 11-14 日)。

大塚治、黒田雅史、池道彦、山下光雄、好気性セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株の Dimethyl Diselenide 合成特徴。(第 3 回日本セレン研究会、東京、5 月 27-28 日)。

福澤文人、大塚治、山下光雄、西里亮、奥野稔、武藤宏行、セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理(その 1)。(日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、3 月 18-20 日)。

大塚治、福澤文人、山下光雄、西里亮、奥野稔、武藤宏行、セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理(その 2)。(日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、3 月 18-20 日)。

黒田真史、櫻井柴乃、池道彦、山下光雄、*Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の同定と解析。(日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、3 月 18-20 日)。

Osamu Otsuka, Masashi Kuroda, Michihiko Ike, and Mitsuo Yamashita, Optimization of Dimethyl diselenide synthesis by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. (13th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium. May 23-27, 2016. Gifu, Japan.

〔図書〕(計 2 件)

Takumi Horiike, Hajime Kiyono, and Mitsuo Yamashita.: Dysprosium Biomineralization by

Penidiella sp. Strain T9. Biomineralization (ISBN 978-981-13-1001-0) Chapter 26, p.251-257 (total page 413). Kazuyoshi Endo et al. (Eds). Springer. October/12 /2018.
<https://doi.org/10.1007/978-981-13-1002-7>.

Michihiko Ike, Mitsuo Yamashita, and Masashi Kuroda.: Microbial Removal and Recovery of Metals from Wastewater. Applied Bioengineering (Advanced Biotechnology Vol. 5) 573-595. Yoshida Toshiomi and et al (Eds). Wiley Biotechnology Series 2017. 03, (ISBN: 978-3-527-34075-0) Weinheim, Deutschland.

〔産業財産権〕

出願状況(計 6 件)

名称：新規ペプチド及びその利用方法, 発明者：山下光雄、三浦彰, 権利者：学校法人芝浦工業大学、J X 金属株式会社, 種類：特許, 番号：特願 2018-200143, 出願年：2018.10.24, 国内外の別：国内

名称：新規ペプチド及びその利用方法, 発明者：山下光雄、三浦彰, 権利者：学校法人芝浦工業大学、J X 金属株式会社, 種類：特許, 番号：特願 2017-039619, 出願年：2017.3.2, 国内外の別：国内

名称：新規ペプチド及びその応用, 発明者：山下光雄, 権利者：学校法人芝浦工業大学, 種類：特許, 番号：特願 2017-029308, 出願年：2017.2.20, 国内外の別：国内

名称：新規ペプチド及びその利用方法, 発明者：山下光雄、三浦彰, 権利者：学校法人芝浦工業大学、J X 金属株式会社, 種類：特許, 番号：特願 2016-180624, 出願年：2016.9.15, 国内外の別：国内

名称：新規ペプチド及びその利用方法, 発明者：山下光雄、三浦彰, 権利者：学校法人芝浦工業大学、J X 金属株式会社, 種類：特許, 番号：特願 2016-112986, 出願年：2016.6.6, 国内外の別：国内

名称：ウイルス組成物及びそれを用いた分離方法, 発明者：山下光雄、三浦彰, 権利者：学校法人芝浦工業大学、J X 金属株式会社, 種類：特許, 番号：特願 2016-112987, 出願年：2016.6.6, 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ <http://www.sic.shibaura-it.ac.jp/~yamashi/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：堀池巧、大塚治、福澤文人、小竹史哉、宇田川賢登

ローマ字氏名：Takumi Horiike, Osamu Otsuka, Fumito Fukazawa, Fumiya Kotake, Kento Udagawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。