

平成 31 年 4 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14522

研究課題名(和文) 遺伝子工学による高効率ヒ素酸化バイオマイニング細菌株の創製とその資源工学的評価

研究課題名(英文) Genetic engineering of biomining microorganisms for effective arsenic oxidation

研究代表者

沖部 奈緒子 (Okibe, Naoko)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：30604821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：持続的銅資源確保の為に、鉱石中の毒性ヒ素(As)に由来する環境問題を克服する必要がある。微生物のAs(III)酸化能の増強は1つの手法であるが、未開の研究領域であるバイオマイニング微生物の遺伝子工学手法の開発に挑戦した。Thiomonas属由来の亜ヒ素酸化酵素遺伝子群の広宿主域ベクターへの遺伝子導入は完了。同時にバイオマイニング微生物複数株に対して電気導入法・接合法・形質転換前後各ステップについて逐一検討を行った。抗生物質耐性や固体培地培養法など基礎的知見は集積したが、安定した形質転換手法確立には未だ複数の課題を克服する必要があり、研究期間の延長を必要とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類にとって最も重要な金属は銅であるが、銅鉱床の低品位化が進む中、その持続的な供給の可否は、鉱石に含まれる不純物であるヒ素(As)問題をどう克服できるかに依存しているとも言える。ヒ素含有廃液処理にはAs(III)のAs(V)への酸化が必要であるが、ここで微生物学的反応を利用できると、コスト・環境面で優位なバイオマイニングの開発が可能となる。そこで、本研究では微生物のAs(III)酸化能を遺伝子工学的に強化することを最終的な目的とし、バイオマイニング微生物の遺伝子工学的手法を開発することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：To secure stable Cu supply, it is necessary to overcome environmental problems deriving from toxic arsenic (As) existing in primary copper sulfide ores. One of the approaches to address this problem is the development of genetic engineering methods for biomining microorganisms. By so doing, it would be possible to enhance the As(III)-oxidizing ability of biomining microorganisms. A variety of transformation methods including electroporation and conjugation were tested and all the steps before and after the transformation were examined in detail. Fundamental knowledge such as antibiotics tolerance and growth conditions on solid media were obtained. However, further studies are needed to propose the solid methodology for the transformation method for biomining microorganisms.

研究分野：Biohydrometallurgy

キーワード：銅鉱石 製錬廃液 ヒ素 遺伝子工学

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

1. 研究開始当初の背景

近年の高品位金属資源の枯渇に伴う鉱石の低品位化、さらに資源ナショナリズムや世界経済の不安定化による金属需給バランスの懸念に伴い、日本においても特に低品位・難処理鉱に対して有効な低コスト・低環境負荷型の「微生物学的製錬技術(バイオミニング)」の開発強化がより一層求められている。銅鉱石では硫砒銅鉱(Cu_3AsS_4)や砒四面銅鉱($\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$)などに望まない不純物としてヒ素(As)が存在しているが、ヒ素含有割合も同じく今後増加を辿ると考えられる。ヒ素含有鉱物の製錬プロセスにて多量に生成するAs(III)含有廃液処理の課題もこれと連動して世界的に拡大している。申請者らはこれに対して、好熱好酸性・鉄酸化古細菌を利用した高温(70℃)でのAs(III)酸化不動態処理に成功している。この手法を更に低温環境にも適応し経済性を向上させるためには、超好酸性かつ中温~中等度好熱性の高効率ヒ素酸化微生物の存在が必須であるものの、本条件を満たす微生物株は未だ自然界から見出されていない。そこで、将来的にヒ素含有低品位・難処理鉱からの経済的な金属資源開発を可能とするためには、上記課題をクリア出来るヒ素耐性および高効率のヒ素酸化能を兼ね備えた超好酸性かつ中温~中等度好熱性バイオミニング微生物を遺伝子工学的に創製することが有効であると考えた。

2. 研究の目的

上記の理由により、本申請では未開の研究領域であるバイオミニング微生物の遺伝子工学的手法の開発に着手することとした。具体的には「(i) まず形質転換(宿主・ベクター)系の開発を行い、(ii) ヒ素酸化能を付与・増幅することにより、(iii) 最終的に超好酸性・中等度好熱性の高効率型ヒ素酸化細菌株を創製する」ことを目的とする。これにより、今後必要性の増す低品位・難分解性鉱物の効率的な資源開発を可能にしていく。

3. 研究の方法

平成 28-30 年度にかけて、各項目について順次下記の方法により実施した。

(I) 培養準備

1. 宿主となるバイオミニング細菌株として、増殖が良好かつ各種重金属やヒ素への耐性が高い株より複数種を選択(ゲノム解析済みの株を優先)し、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) または英国 Bangor University のカルチャーコレクションへ分譲を依頼する。
2. 各細菌株について、液体培養を立ち上げる。
3. 各細菌株について、遺伝子導入後のコロニー形成に必須となる固体培地条件の最適化を行う。

(II) 宿主各株において有効な形質転換(宿主・ベクター系の開発と最適化)

1. 広宿主域ベクターについて、(I) で選択した細菌株への有効性を検証する。
2. 各細菌株についての抗生物質耐性試験(遺伝子導入に成功したコロニーのみが抗生物質耐性を獲得するため、元々の細菌株自身が耐性を持たないことを確認する必要がある)を行う。
3. 遺伝子導入法(コンピテントセルによるエレクトロポレーション法/接合法)の適応可能性評価を行う。
4. 遺伝子導入操作前後の各ステップ直後の宿主蘇生培地および蘇生時間を最適化する。
5. 形質転換効率の算出・評価

4. 研究成果

本研究では、*Thiomonas arsenitoxydans* 3As (DSM 18570)由来の酵素タンパク arseniteoxidase をコードする遺伝子群(aioB、aioA など)を広宿主域ベクターpJRD215 cosmid に挿入し、条件に適した中度好熱好酸性菌に導入することを目指した。

まず、目的遺伝子を pMD20 T-vector にサブクローニングした上で、発現ベクターpJRD215 cosmid に挿入することを目指した。まず、目的遺伝子としてAs(III)酸化酵素遺伝子群(aioA、aioB、cyc1、orf1、cyc2)を選択し、PCR によって増幅、サブクローニングを試みたが、約 5000 bp から成る目的遺伝子を約半分のサイズの pMD20 T-vector に挿入することはできなかった。そこで cytochrome 発現遺伝子などを省いたAs(III)酸化酵素遺伝子群(aioA、aioB)3418 bp を目的遺伝子としたところ、PCR で増幅、pMD20 T-vector に挿入することに成功し pMD20_aioAB の構築が認められた。その後、増幅した pMD20_aioAB を制限酵素処理(EcoRI、NdeI)により切り出し、同様に制限酵素処理した pJRD215 cosmid と混合、ligation を行なったところAs(III)酸化酵素遺伝子(aioA、aioB)発現ベクターpJRD215_aioAB の構築に成功した。

同時に、廃液中のAs(III)からのスコロダイトを生成しやすい条件下での生育に適した種々の中度好熱好酸性菌のなかでも、遺伝子組換え操作の行ないやすい微生物株を見つけるために、

それぞれの微生物株に対し固体培地上での生育の可否や自然抗生物質耐性の有無の検証をした。

まず、当研究室の微生物株コレクションのなかから生育条件を満たしている微生物株を選定し、overlay 固体培地または Y.E.固体培地(微生物株によっては両方)の上で生育させた。その結果、*Am. ferrooxidans* ICP、*At. caldus* KU、*Sb sibiricus* N1、*Sb. acidiphilus* YTF1、*Ali. acidoterrestris* GD3B について、遺伝子操作を行なうために十分な程度のコロニー形成が認められた。次に、pJRD215 cosmid 内に Km 耐性遺伝子と Sm 耐性遺伝子がコードされていることから、それら抗生物質に対する自然耐性の有無を確かめた結果、*Sb sibiricus* N1 は両方の抗生物質に対して強い耐性を示したことから、*Ali. acidoterrestris* GD3B は本来の至適生育 pH が比較的高めの耐酸性菌であることから、宿主として適当ではないと考えられた。*Am. ferrooxidans* ICP、*At. caldus* KU、*Sb. acidiphilus* YTF1 はどちらかの抗生物質によって生育が阻害されたことから、宿主として適当であると結論付けられた。

そこで次に、*At. caldus* KU と *Sb. acidiphilus* YTF1 に対して、electroporation により pJRD215_ aioAB を導入することに先駆けて、まずは pJRD215 cosmid を用いて形質転換至適条件を検討した。はじめに、*At. caldus* KU への electroporation について、Field strength: 2.0 kV、Pulse time: 2.5 msec の条件でパルスを与えた細胞が、Km 含有 overlay 固体培地上にコロニーを形成したことから、pJRD215 cosmid の導入が期待されたが、colony PCR では確かめることができなかった。pJRD215 cosmid はコピー数が少ないため colony PCR ではなく、形質転換が期待される *At. caldus* KU のコロニーを液体培地に戻し、増殖させ、そこから精製した DNA をテンプレートとして PCR を行なおうとしたが、液体培地にてコロニーから *At. caldus* KU を増殖させることはできなかった。リカバリーの難しさなどを考慮すると *At. caldus* KU に対して遺伝子組換えを行なうことは困難であることが示唆された。また、*Sb. acidiphilus* YTF1 に対して、heat treatment などを手順に組み込んで様々な条件で electroporation を試みたが、得られた結果は総じて再現性に乏しく、少なくとも本研究で設けた条件下で electroporation により *Sb. acidiphilus* YTF1 に形質転換を行なうことは難しいと思われた。

次に、electroporation による形質転換に代わって conjugation による *At. caldus* KU への pJRD215_ aioAB 導入を目指した。まず供与菌として選んだ *E. coli* S17-1 λ pir に electroporation により pJRD215_ aioAB を導入することに成功した。次に *At. caldus* KU との conjugation 過程へと進み、一通り conjugation の工程を行なったが、至適生育条件が 45°C、pH 2.5 の *At. caldus* KU を conjugation の条件に慣れさせるため 37°C、pH 4.5 で前培養したところ、十分に細胞が生育しなかったため、効率が落ち、pJRD215_ aioAB が導入されることはなかった。よって至適条件において十分に生育させた *At. caldus* KU を用いて conjugation を行なう必要があると考えられた。また、他の中度好熱好酸性菌(*Am. ferrooxidans* ICP、*Sb. acidiphilus* YTF1)に対しても同様に conjugation を試すことが有効であると考察された。

以上より、As(III)酸化酵素遺伝子(aioA、aioB)発現ベクターである pJRD215_ aioAB の構築は完了した。その後、electroporation や conjugation により *At. caldus* KU と *Sb. acidiphilus* YTF1 への形質転換を試みたが、まだ分子生物学的に遺伝子が組換えられたことは確かめられておらず、今後は特に conjugation について特に焦点を当て検討を行なっていく必要があると考えられた。そもそもこれらの *バクテリア* 微生物自身が高い抗生物質耐性を有すること、固体培地でのコロニー形成が安定しないこと、Fe 等による細胞表面の性状により外来遺伝子の導入が難しいことなどの課題が多々見出された。これまで *バクテリア* 微生物の遺伝子組み換え研究領域がほぼ未開拓である理由はこれらの課題によるものかもしれない。今回の 3 年間の研究期間において抽出した諸々の課題について、引き続き基礎研究を続けていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://process.mine.kyushu-u.ac.jp/>

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：Prof Barrie Johnson 他

ローマ字氏名：バリー ジョンソン 他

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。