

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00625

研究課題名(和文) 枯草菌遺伝子操作株を滅菌・凍結乾燥させた粉体によるレアメタルの抽出法の開発

研究課題名(英文) Application of freeze-dried powders of genetically engineered microbial strains as adsorbents for rare earth metal ions

研究代表者

森脇 洋 (Moriwaki, Hiroshi)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：30321938

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)：希土類金属・金イオンの回収・分離に枯草菌遺伝子操作株をフリーズドライさせて得られた粉末を利用することを本研究の目的とした。希土類金属イオンの抽出には細胞壁加水分解酵素欠損株が、分離には壁テイコ酸欠損株がそれぞれ野生株より有用だった。次にD-アラニン修飾欠損株およびグルコース修飾欠損株を遺伝子操作により新たに構築し、得られた粉末による希土類金属イオン吸着挙動を検討した結果、いずれも野生株よりも高い吸着能を示した。また、塩化金酸イオンの吸着では、WTA株が最も高い吸着能を示した。遺伝子操作株のフリーズドライ粉末を吸着剤に適用した事例はほとんどなく、生物資源の新たな活用手法を提示できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は微生物をフリーズドライすることにより得られる粉体を環境科学に適用した研究である。とくに遺伝子操作を利用した点で新規性がある。本研究で用いた微生物粉体は効率よく希土類金属あるいは塩化金酸塩を吸着することが分かった。また、遺伝子操作によりその吸着性をコントロールできることが分かった。これらの結果は有用資源の回収の観点から、環境負荷の低い新たな手法として有用である。さらに微生物表面に金ナノ粒子を析出させる技術を確立した。また紙の上に書かれた鉛筆グラフアイト上の金ナノ粒子が金色を呈することを本研究で発見した。この発見は金ナノ粒子の新規な利活用の展開につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The adsorption behaviors of rare earth metal or chlorauric ions onto freeze-dried powders of genetically-engineered microbial strains were studied. The cell wall hydrolases-defective strain was suitable for the extraction of rare earth metal ions. The wall teichoic acid-defective strain was useful for the separation of rare earth metal ions and the extraction of chlorauric ion. The rare earth ion adsorption ability for the powders of glucose modification-defective, D-alanine modification-defective, and glucose plus D-alanine modification-defective strains were higher than that of wild type. These results of this study indicate that there is a possibility that modifications of the teichoic acids control the adsorption of the metal ions onto the cell walls and will be of help when microbial cells are applied as an adsorbent for metal ions.

研究分野：環境科学

キーワード：枯草菌 遺伝子操作株 吸着 希土類金属 金 ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

希土類金属は液晶、磁石などの材料として需要が高く、資源として重要である。しかしながら、その抽出および分離には酸や有害なリン化合物が一般に用いられており、環境負荷の低い抽出・分離手法の開発および確立が望まれている。

近年、増殖させたバクテリアを滅菌後、凍結乾燥することにより得られる粉体を吸着剤として利用する研究が注目されている。微生物粉体は安全で環境負荷が低いという利点がある。中でもグラム陽性菌である枯草菌は培養法が確立されていることもあり、さかんに検討されている。グラム陽性菌の細胞壁はペプチドグリカンとテイコ酸からなる構造をしている。テイコ酸は多数のリン酸基を有するポリマーであり、細胞膜と結合しているリポテイコ酸(LTA)、ペプチドグリカンと結合している壁テイコ酸(WTA)に分類できる。我々のグループは枯草菌 168 株からリポテイコ酸を欠損させた遺伝子操作株(Δ LTA)、壁テイコ酸を欠損させた遺伝子操作株(Δ WTA)および細胞壁溶解酵素を欠損させた遺伝子操作株を作成し、増殖、滅菌、凍結乾燥することにより、粉体を得た。これらの微生物粉体を希土類金属イオンの吸着剤として用い、その吸着挙動を比較した。希土類金属のイオンはリン酸基と強く相互作用することから、枯草菌粉体表面の細胞壁に存在するテイコ酸が吸着サイトとなることが予想された。結果、これらの微生物粉体が希土類金属イオンに対して高い吸着能を示すこと、希土類金属イオンが LTA より WTA によく吸着すること、野生株と遺伝子操作株で異なる吸着挙動を示すこと、遺伝子操作株により吸着挙動が異なることが分かった。さらにテイコ酸修飾の異なる遺伝子操作株についてどのような吸着挙動が見られるか、検討が必要な状況である。

2. 研究の目的

本研究は枯草菌ならびに遺伝子操作した枯草菌をフリーズドライすることにより得られた粉体を環境に資する材料として活用することを目的としている。とくに遺伝子操作を行うことにより、ユニークな特性を有する材料を開発できないかという点が本研究の新規な点である。

枯草菌は 168 株を野生株 (WT) として用い、遺伝子操作株はリポテイコ酸欠損株(Δ LTA)、壁テイコ酸欠損株(Δ WTA)、細胞壁溶解酵素欠損株(EFKYOJLp)、テイコ酸グルコース修飾欠損株(Δ tagE)、テイコ酸 D-アラニン修飾欠損株(Δ dltd)、テイコ酸グルコース+D-アラニン修飾欠損株(Δ tagE+dltd)を構築し、それぞれフリーズドライした粉体を作成することに成功した。(以降はフリーズドライした粉体の名前を株の名前で呼称することとする。)

こうして得られた微生物材料がどのような性能を示すか比較検討を行った。

3. 研究の方法

以下の三点について粉体ごとの性能評価の比較を行った。

希土類金属イオンの吸着剤

希土類は様々な先端技術に活用されている元素であり、分離・精製が困難なため、その再利用技術の開発が重要視されている。本研究で用いる微生物粉体は表面積が大きく、また希土類金属と相互作用をするリン酸基を多く含むことから希土類金属に対し、高い吸着能を示すことが予想される。また、生物材料であることから、使用に際して環境負荷が低い。さらに、遺伝子操作を行うことにより、吸着性をコントロールすることが出来る可能性がある。これらの点について上記の 7 種の微生物粉体について吸着能の比較を行った。

塩化金酸イオンの吸着剤

金は現在、様々な電子材料として活用されており、その枯渇が危惧されている。そのため、材料から抽出し、再利用する必要がある。金を抽出する際に、王水により溶解する手法が広く用いられている。王水により金は塩化金酸イオンとなり、水に溶解する。それゆえ、塩化金酸イオンを効率よく吸着する材料の開発が重要である。そこで、本研究で開発した 7 種類の微生物粉体について塩化金酸イオンの吸着性を測定した。

表面に析出させた金ナノ粒子による環境汚染物質の分解

金ナノ粒子はユニークな触媒活性を有しており、とくに水素化ホウ素ナトリウム共存下でニトロ基をアミノ基に変換する反応は選択性も高く、有用である。塩化金酸イオンを表面に吸着させた微生物株について還元剤により、金ナノ粒子を析出させ、それをニトロ基の有する環境汚染物質の分解に活用することを検討した。

以上、三点についてそれぞれ、結果と考察を以下に報告する。

4. 研究成果

4-1 微生物粉体の作成

共同研究者の山本博規氏(信州大学繊維学部)のグループにて枯草菌 168 株を野生株 (WT) としたりポテイコ酸欠損株(Δ LTA)、壁テイコ酸欠損株(Δ WTA)、細胞壁溶解酵素欠損株(EFKYOJLp)、テイコ酸グルコース修飾欠損株(Δ tagE)、テイコ酸 D-アラニン修飾欠損株

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

(Δ dltD)、テイコ酸グルコース+D-アラニン修飾欠損株(Δ tagE+dltD)の遺伝子操作株の構築に成功した。遺伝子操作により、微生物の形状に変化が見られるものもあった。WTは桿菌であるが、 Δ LTAおよびEFKYOJLpは細長い糸状の形状となり、一方、 Δ WTAは球状になった。これらを培養し、滅菌後、フリーズドライした粉体を作成した。なお、これら粉体は完全に滅菌をしているので、粉体から遺伝子操作株が増殖することはない。すなわち、これらを環境実験に用いても遺伝子操作株が環境中へ拡散することはない。

4-2 作成した微生物粉体による希土類金属イオンの吸着性

4-1 で得られた粉末を pH 3 に調整した 20 ppm の希土類金属イオンの水溶液 20 mL にそれぞれ 20 mg ずつ加え 100 rpm で 30 分間振とうさせ、ろ過・遠心分離した。その後、上清を 10 mL 取りそこに超純水と硝酸を 5 mL ずつ加え ICP 発光分光分析装置で金属の残留濃度を測定し、得られた値からそれぞれの粉末による金属の除去率を求めた。

WT と LTA および WTA の 3 種類で比較したところ、WT が最も除去率が高く、次いで LTA、WTA の順になった。このことは、枯草菌による希土類金属の吸着にはテイコ酸とくに壁テイコ酸が大きく関与していることを示唆している。また、テイコ酸欠損がなく長い菌体を有する EFKYOJLp では除去率が WT より高くなった。テイコ酸はポリリン酸を含んでおり、EFKYOJLp は WT よりもリン酸含有量が高い。リン酸基が希土類金属イオンと相互作用することにより、これら粉末が希土類金属イオンを吸着すると考えられる。そのため、遺伝子操作による吸着性の違いが生じたと考えられる。

また、WT 株と同様のリン酸含有量を示す Δ tagE、 Δ dltD、 Δ tagE+dltD についても WT よりも希土類金属の除去率が高かった。これはテイコ酸を修飾するグルコース、D-アラニンが希土類金属イオンの吸着を立体的に阻害しているためだと考えられる。しかし、WT に対する吸着性能の増加率は EFKYOJLp よりも低く、希土類金属イオンの吸着性において立体因子よりもリン酸含有量のほうがより大きな影響を与えたと考えられる。

また、LTA については希土類金属イオンと混合することにより凝集沈殿することが確認された。WT では凝集沈殿は全く観察されなかった。凝集沈殿をすることにより、溶媒と吸着材料との分離が容易となる。このことは吸着剤の使用の効率を大きく上げる。また、菌体が長く伸びている LTA と EFKYOJLp で凝集沈殿が観察されたことから、菌体の形が凝集沈殿のしやすさに影響があると考えられる。

4-3 作成した微生物粉体による塩化金酸イオンの吸着性

4-1 で得られた各種枯草菌粉末 10 mg を pH 3 に調整した 50 ppm の塩化金酸イオン溶液 20 mL 中に加え、100 rpm で 120 分間振とうした。その後、溶液をメンブレンフィルターでろ過し、そのろ液中の残存 Au 濃度を ICP-MS によって分析した。初期条件を変化させることによって、枯草菌粉体の塩化金酸イオン吸着に最適な条件を調べた結果、pH3~4 の範囲でよく吸着することが分かった。また、120 分の振とうで吸着平衡に達した。各株における塩化金酸イオン吸着能を比較した結果、WTA の吸着能が WT より大きく、最大吸着容量は、WT (213 mg g⁻¹)より WTA (250 mg g⁻¹)の方が 37 mg g⁻¹高かった。他の株は WT と同程度あるいは低い吸着能を示した。これまでの研究で、WTA は野生株より表面の負電荷の絶対量が小さいことが知られている。塩化金酸イオンはアニオン性のイオンであるため、負電荷が大きいと反発する力が働いて吸着能力が弱くなることが考えられる。このことが吸着性の違いとなって現れたと考えられる。

4-4 微生物粉体上に析出させた金ナノ粒子の触媒活性

4-3 項で WT と WTA について塩化金酸イオンを吸着後、アスコルビン酸により還元を行った。結果、これら粉体の表面に 100 nm 以下の金ナノ粒子が析出していることが透過型電子顕微鏡による観察で明らかになった。なお、粒径は WTA のほうが WT よりも小さい値で分布しており、表面に析出させたナノ粒子の粒径を遺伝子操作によりコントロールできる可能性が示唆された。金ナノ粒子を析出させたこれら微生物粉体をニトロフェノールの水素化ホウ素ナトリウム存在下における還元反応の触媒として用いたところ、いずれも効率よく反応が進行することが確認された。遺伝子操作による触媒能の変化については今後、検討する予定である。

枯草菌を金ナノ粒子の担体としたものとの比較を行うため、天然ポリマーの一種である紙 (Cellulose filter : CF) を担体として用い、金ナノ粒子を析出させた材料 (Au/CF) について触媒能を調査した。その際、鉛筆でマーキングした部分 (Pencil Graphite 吸着部 : PG) に析出した金ナノ粒子 (Au/PG/CF) が金ナノ粒子が元来、表面プラズモン共鳴により示す赤色ではなく、金色を呈することを発見した。これは金ナノ粒子の自由電子と CF 上の PG が相互作用をすることにより起こった現象であると結論づけた。

Au/CF と Au/PG/CF の触媒活性については NaBH₄ を用いたパラニトロフェノール (p-NP)、メチルオレンジ、ペンジメタリンの還元反応について検討した。Au/PG/CF の NaBH₄ を還元剤として用いた p-NP の還元反応速度は Au/CF よりも約 2 倍高かった。また金 1 mol が単位時間あたりに触媒した基質 mol 数は約 3 倍に向上した。メチルオレンジの分解実験では Au/PG/CF は反応速度が Au/CF よりも約 4 倍高く、金 1mol が単位時間あたりに触媒

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

した基質 mol 数は約 2 倍に向上した。農薬の一種であり発がん性がある可能性が指摘されているペンジメタリンの分解率は Au/CF では 49%であったのに対し、Au/PG/CF では 86%に向上した。このように鉛筆で紙を塗りつぶし、その上に金ナノ粒子を析出させることで、触媒能が増加することを明らかにした。

さらに金ナノ粒子の担体としてシリカおよびペリレンを吸着させたシリカについても検討を行った。シリカを担体とした場合は微生物やセルロースフィルターと比較して、金ナノ粒子の触媒能が低かった。しかし、ペリレンを吸着させたシリカについては光を照射することにより、金ナノ粒子の触媒活性を増加させることに成功した。このように光触媒と組み合わせることにより金ナノ粒子の触媒活性を増加させる例はほとんどなく、新しい知見が得られた。

4-5 本研究の社会への貢献および今後の検討について

本研究は微生物をフリーズドライすることにより得られる粉体を環境科学に適用した研究である。とくに遺伝子操作を利用した点で新規性がある。本研究で用いた微生物粉体は効率よく希土類金属あるいは塩化金酸塩を吸着することが分かった。また、遺伝子操作によりその吸着性をコントロールできることが分かった。これらの結果は有用資源の回収の観点から、環境負荷の低い新たな手法として有用である。一方で微生物を増殖するためにコストなどを考えると実用面からはさらなる検討が必要である。とくに微生物粉体の再利用、吸着した有用資源の脱離などについての技術を開発する必要がある。

さらに微生物表面に金ナノ粒子を析出させる技術を確立した。遺伝子操作により金ナノ粒子の粒径および触媒活性をコントロールできる可能性が示唆された。これらの検討は今後の課題となっているが、ナノサイエンスにおいて新しい技術の提案となるだろう。

また、微生物との比較のために行った検討である紙および紙の上に書かれた鉛筆グラフアイト上の金ナノ粒子の研究について、鉛筆で塗りつぶした上に析出した金ナノ粒子が金色を呈し、その金ナノ粒子(Au/PG/CF)が高い触媒活性を示すという結果は、これまでに無い新しい知見であり、イギリス王立学会の Chemistry world にも紹介された。金ナノ粒子のこれまでにない特性を発見したものであり、金ナノ粒子の新規な利活用の展開につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawabe Yukari, Ito Takashi, Yoshida Hiroaki, Moriwaki Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Glowing gold nanoparticle coating: restoring the lost property from bulk gold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 3786 ~ 3793
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8nr10016k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚 匠, 山本 博規, 森脇 洋
2. 発表標題 枯草菌あるいはその遺伝子操作株をフリーズドライした粉末による金イオンの吸着
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河邊侑香里, 伊藤 隆, 吉田裕安材, 森脇 洋
2. 発表標題 金色に輝く金ナノ粒子による環境汚染物質の分解
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者総覧 (SOAR)
<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.jCyFjFkV.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山本 博規 (Yamamoto Hiroki) (20262701)	信州大学・学術研究院繊維学系・准教授 (13601)	