

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19042

研究課題名（和文）レアメタルの持続可能な利用を目的としたモリブデンの生物学的濃縮・回収技術の開発

研究課題名（英文）Development of a biological recovery and concentration technology aimed at sustainable use of rare metals

研究代表者

簡 梅芳（Chien, Mei-Fang）

東北大学・環境科学研究科・助教

研究者番号：20533186

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：持続可能なレアメタル資源利用の実現に向け、レアメタルの生物学的濃縮技術の開発を行った。成果として、1、金属応答遺伝子を探索し、水銀耐性細菌MB1株の有機水銀分解酵素MerB3は生物学的な水銀解毒剤になる可能性を見出した。2、水銀耐性細菌MB24株は水銀とヒ素の解毒遺伝子群を特殊な構造で併せ持つことを明らかにした。上記の成果をそれぞれ英文論文として投稿・掲載した。3、モリブデン吸着タンパクを酵母の細胞表面に発現させ、モリブデンに優れた吸着性を示す酵母を作製した。また、酵母を固定化することで吸着量がさらに上昇することを確認した。上記の成果を日本農芸化学会、細菌学会、国際生物冶金会議にて発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、金属に応答を示す微生物の機能を探索・利用することで、その金属を特異的に回収・濃縮する生物学的な金属回収技術の基盤が確立できた。モリブデンを最初のターゲットとして試みたが、本研究により構築した技術に基づき、金属吸着効率の向上、他の金属吸着への応用、微生物利用システムのデザインなど、さらなる発展のシーズになり、これらの研究成果の蓄積による生物学的金属濃縮・回収の実現が期待できる。

研究成果の概要（英文）： The study aimed to develop biological recovery techniques to rare metal toward a sustainable using of rare metals. The achievements of this study are as follows: 1, Organic mercury degrading enzyme MerB3 in a mercury resistant bacterium MB1 showed the potential to be a biological antidote. 2, mercury resistant bacterium MB24 contains both mercury and arsenic resistance operons as a special structure. The above results were published in English journals Journal of Environmental Biotechnology and Microorganisms, respectively. 3, the molybdenum adsorbing yeast was constructed by expressing molybdenum binding protein on the cell surface of yeast cells. Besides, the efficiency of adsorption got increasing through immobilizing the yeast cells. The above results have been presented at Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry and International Biometallurgy Symposium 2019.

研究分野：環境生物学

キーワード：レアメタル 生物濃縮 モリブデン 微生物工学 酵母

## 1. 研究開始当初の背景

代表者は水銀などの重金属耐性細菌の単離・同定および生物の汚染浄化メカニズムの解明の基礎研究を行ってきており、微生物由来の水銀耐性遺伝子発現と制御を明らかにしてきた。また、水銀解毒能力を持つ微生物を用いて、溶液から水銀を除去・回収するバイオリアクターを作り上げた経験があった。これまでの研究により、金属に対する微生物の応答システムの多くは、「オペロン」という一連の遺伝子群が支配することを知り、対象金属イオンの存在下で、金属の結合・輸送・酸化還元などの機能が制御されることを熟知している。これまで有害金属に対する研究経験や知識を本研究の対象である有価金属に駆使・発展させると着想し、本研究の立案に至った。

本研究のターゲットであるモリブデンは、全ての生物にとって必須な微量元素であり、微生物は環境中のモリブデンを感知し、結合や輸送、取り込むシステム(オペロン)が備えられている。そのため、環境遺伝子からモリブデン応答遺伝子の探索は成功する確率が高いと予想した。また、探索してきた金属応答遺伝子をこれまでの研究経験を生かし、レアメタルの生物学的濃縮・回収技術の基盤を確立できると確信し、本研究の開始に踏み切った。

## 2. 研究の目的

ハイテク産業の発展に必須とされる希少金属(レアメタル)の需要が急増し、資源の枯渇が危惧されている。一方、地球での賦存量もしくは存在濃度が稀であるレアメタルに対する効率的かつ経済的な抽出・濃縮の技術や、レアメタルを含む廃棄物や排水から効率よく回収できる技術が確立されていない。本研究は、持続可能な資源利用を実現するために、レアメタルを選択的に濃縮・回収できる生物学技術の開発を目的として行った。モリブデンを最初のターゲットとし、まずはモリブデンに吸着・結合するタンパク質を探索・入手し、担体とする酵母の細胞表面に発現させることにより、「モリブデン濃縮システム」を構築した。また、モリブデンの存在下により細胞の凝集を引き起こす形質を付加し、モリブデンの濃縮・回収を同時に行うシステムの確立を試みた。

## 3. 研究の方法

本研究ではレアメタルのモリブデンを最初のターゲットとして、モリブデンを効率的かつ選択的に濃縮・回収するシステムを確立するため、以下研究項目 に分けて実施した。

モリブデン吸着遺伝子の探索:モリブデンは生物の必須な微量元素であり、生物はモリブデンを感知・応答する機能が備えられている。モリブデン含量の高い環境試料を採取し、試料中の環境DNAに対して次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行い、モリブデン吸着遺伝子を選定して研究項目 に供し、モリブデンにより誘導されるプロモーターを選定して研究項目 に供した。

レアメタルの濃縮システムの構築:酵母をモリブデンの吸着・回収担体とし、反応速度の速い細胞表面吸着法の検討を進めた。研究項目 で取得したモリブデン吸着遺伝子と、足場となる細胞表面に局在・固定する配列を酵母に組み込み、モリブデンを細胞表面に吸着する酵母を作製した。作製したモリブデン吸着酵母を用いて、吸着性能試験を重ね、最大吸着速度および吸着能や、そのための細胞培養・処理の諸条件を決定した。また、融合遺伝子の構成を編集することや、酵母を固定して密度を上げることなど、濃縮効率を向上させる方法も検討した。

## 4. 研究成果

(1)レアメタルの生物学的濃縮・回収技術の確立のため、まず金属応答遺伝子の探索を始めた。水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB 1 株は有機水銀を効率よく分解できることを確認し、さらに MB1 株の有機水銀分解酵素 MerB3 は猛毒のフェニル水銀(phenylmercury acetate, PMA)に強い親和性をもつことがわかり、MerB3 は生物学的水銀解毒剤とするポテンシャルがあることを示唆し、また基質親和性を金属応答性の指標とすることは有効であることを証明した(図1)。これらの成果を英文論文にして *Journal of Environmental Biotechnology* に掲載された。

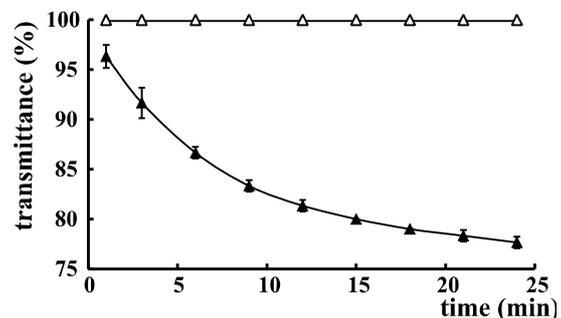


図1. PMA に対する MerB3 の解毒活性試験。  
△: PMA のみ、▲: PMA+ MerB3

(2) 金属応答遺伝子を探索した結果、水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB24 株を発見し、そのゲノムに水銀解毒遺伝子群とヒ素解毒遺伝子群を併せ持ち、しかも両者ともトランスポゾンという水平伝播可能な遺伝子カセットにあること、さらにヒ素解毒トランスポゾンは水銀解毒トランスポゾンに挿入されているというかなり特殊な構造を有することを明らかにした(図2)。これらの成果を英文論文として *Microorganisms* に掲載された。

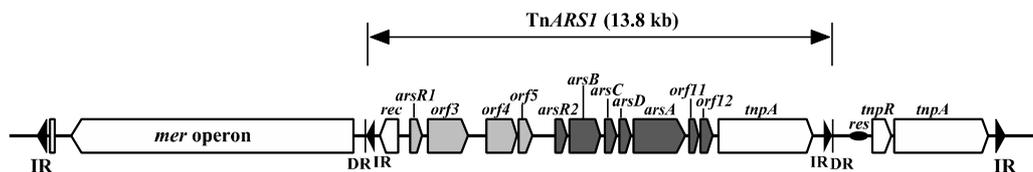


図2. *B. megaterium* MB24 株の持つ新規水銀-ヒ素耐性トランスポゾン。ヒ素耐性トランスポゾン (TnARS1) は水銀耐性トランスポゾンに存在し、この巨大なトランスポゾン (26 kb) を TnMARS1 と名付けた。

(3) モリブデンを最初の対象として、モリブデン結合タンパク質 (ModE) を酵母の細胞表面に発現させ、モリブデンの回収・濃縮に取り組んだ。酵母は *Saccharomyces cerevisiae* strain BY4741 を用いた。作製した組換え酵母の ScBp5 株を用いて、細胞表面における ModE タンパク質の発現を蛍光顕微鏡により確認できた(図3)。また、1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 1000  $\mu\text{g/ml}$  のモリブデン溶液に吸着性を示したものの、吸着率が 30% に止めており、吸着の最適化を行う必要が示唆された。

(4) モリブデン結合タンパク質 ModE の発現向上を図り、遺伝子の転写にかかわるプロモーターを酵母由来の TEF1 から ModE を構成するモリブデン輸送オペロンのプロモーターである modAp に置換し、ScBp6 株を作製した。作製した ScBp6 を用いて、1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 1000  $\mu\text{g/ml}$  のモリブデン溶液に対して吸着性を確認した結果、1000  $\mu\text{g/ml}$  では ScBp5 株と同等な吸着率を示したが、低濃度の 1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  においては、従来の ScBp5 株の約 2 倍の吸着率・量を示したことがわかった(現在論文投稿中により、データ未開示)。この結果から、プロモーターの検討や遺伝子の発現制御を行うことにより、さらなる発現・吸着能の向上やコントロールが可能になるのではないかと考えられた。

また、ScBp6 株による吸着特性を Langmuir 吸着等温式に適用することによって、モリブデン飽和吸着量/回収量、飽和モリブデン濃度、吸着定数といったシステムを評価する指数を算出することができた。したがって今後の遺伝子組み換えや条件検討の結果を Langmuir 吸着等温式により評価することで、作製した吸着システムの飽和濃度や反応定数などを数値化し、評価しやすくなると考えた。

(5) 吸着酵母の操作利便性および効率の向上を図り、ゲルによる菌体の固定を検討した。アルギン酸カルシウムを固定化担体とし、ScBp5 株と ScBp6 株の固定菌体による吸着特性を評価した結果、固定化細胞は遊離細胞より、モリブデン溶液からの濃縮・回収量が 3 倍以上も上昇したことがわかった(現在論文投稿中につき、データ未開示)。さらに、固定担体の濃度、菌体の濃度、固定時間など、固定条件の変動により、固定化菌体の吸着特性が異なることを明らかにした。現在は固定条件の最適化および他の固定材の選定も検討している。

上記(3) ~ (5) の成果を日本農芸化学会、細菌学会若手の会、国際会議「International Biometallurgy Symposium」にて発表を行った。また、「Molybdate recovery using immobilized bioengineered *Saccharomyces cerevisiae*」をタイトルとする英文論文を国際学術誌「Hydrometallurgy」に投稿し、現在査読中である。

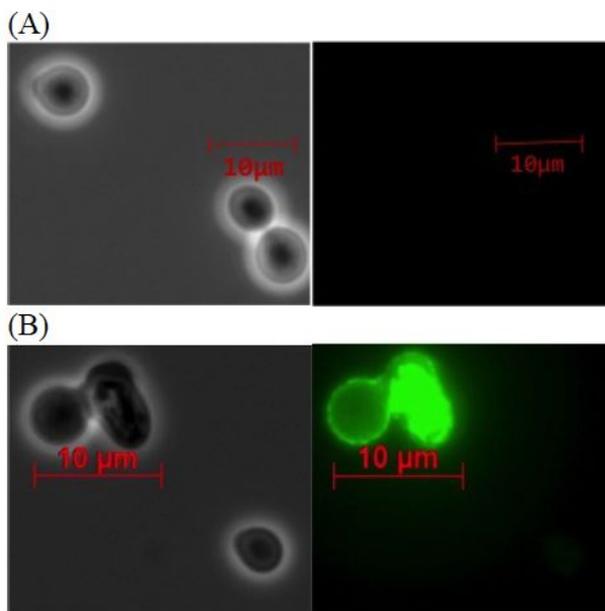


図3. 酵母 *S. cerevisiae* の(A)野生株と(B) ScBp5 株による(左)相対差顕微鏡および(右)蛍光顕微鏡の画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mei-Fang Chien, Ying-Ning Ho, Hui-Tzu Lin, Kuo-Hsing Lin, Ginro Endo, Chieh-Chen Huang	4. 巻 19
2. 論文標題 MerB3, an organomercurial lyase of Bacillus as an antidote against organomercurial poisoning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Biotechnology	6. 最初と最後の頁 73-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 Mei-Fang Chien, Ying-Ning Ho, Hui-Erh Yang, Masaru Narita, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo, Chieh-Chen Huang	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification of A Novel Arsenic Resistance Transposon Nested in A Mercury Resistance Transposon of Bacillus sp. MB24	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 566-576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7110566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Audrey Stephanie, Mei-Fang Chien, Naoya Ikeda, Kengo Kubota, Chihiro Inoue
2. 発表標題 Bioengineering of a stable molybdate binding system using Saccharomyces cerevisiae
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mei-Fang Chien, Audrey Stephanie, Naoya Ikeda, Chihiro Inoue
2. 発表標題 Potential of molybdenum recovery by genetically engineered yeast
3. 学会等名 第13回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Audrey Stephanie, Mei-Fang Chien, Naoya Ikeda, Chihiro Inoue
2. 発表標題 Molybdate recovery using immobilized bioengineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 International Biometallurgy Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	井上 千弘  (Inoue Chihiro)  (30271878)	東北大学・環境科学研究科・教授    (11301)	
連携研究者	久保田 健吾  (Kubota Kengo)  (80455807)	東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授    (11301)	