

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02654

研究課題名(和文) 金属応答性生物資源の開発によるレアメタル回収技術の基盤構築

研究課題名(英文) Development of fundamental technologies for rare metal recovery by exploring metal responsible bioresource

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、金属応答生物資源の探索、新規金属資源回収微生物の構築およびその金属回収微生物の利用展開を目的として行った。生物資源の探索について、微生物からレアメタルのモリブデン、ニッケルの吸着遺伝子の取得、有毒金属のヒ素と水銀の解毒遺伝子群を特殊な構造で併せ持つ微生物の発見、また、超蓄積植物からヒ素、カドミウム、亜鉛の取込に寄与する遺伝子の発現解析に成功した。金属回収微生物の構築について、モリブデン吸着酵母とニッケル・コバルト吸着大腸菌の作製に成功したうえ、これらの微生物の固定担体についても検討できた。これらの成果は学術論文として7報掲載し、学会発表を7件行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、(1)金属に対する生物応答遺伝子を探索し、レアメタルのモリブデン、ニッケル、コバルトに対して吸着能を持つ遺伝子、また有害金属のヒ素、カドミウムの除去・輸送に関する遺伝子の特定または取得ができた。(2)得られた金属応答遺伝子の機能解析および遺伝子組み換え微生物を構築し、生物学的金属回収・除去システムの技術基盤を確立できた。本研究により、高感度・高選択性を特徴とするこれらの生物学的金属応答機能をレアメタルの回収や有害金属の除去に適用する可能性を見出した。本研究は生物学分野の学術研究のみならず、産業分野・環境保全分野にも知見を提供できる社会的意義を有する研究であった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to discover the metal-responsible bioresources, to construct novel metal-recovery microorganisms, and to develop a biosystem by applying metal-recovery microorganisms. Regarding the search for bioresources, we succeeded in obtaining binding protein genes of two rare metals, molybdenum and nickel, in finding microorganisms that have detoxification genes for the toxic metals arsenic and mercury in a special structure, and in analyzing the expression of genes that contribute to the uptake of arsenic, cadmium, and zinc from hyperaccumulator plants. Regarding the construction of metal-recovery microorganisms, we succeeded in producing molybdenum-adsorbing yeast and nickel- and cobalt-adsorbing Escherichia coli cells, and were also able to study the fixation carriers for these microorganisms. These results have published six papers in academic journals and given seven presentations in academic conferences.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：レアメタル 生物学的金属回収 モリブデン 微生物固定

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) レアメタルはハイテク産業の発展に伴って需要が急増するが、その資源は特定の国・地域に偏在しており、日本はほとんど輸入に頼っている。一方、レアメタルを含む製品は大量に生産・利用されているが、廃棄物や排水から効率よくレアメタルを回収する技術は一部しか確立されておらず、低濃度排水からの回収技術は未確立である。例えばモリブデンを含む排水の日本国内のリサイクル率はわずか2%に止まっている。そのため、排水からレアメタルを回収できれば、レアメタルの自給率向上に貢献すると言える。レアメタルを含む排水の処理は、現在国内外ともに溶媒抽出法や、イオン交換、晶析などの手法がとられている。しかし、これらの処理法は低濃度のレアメタルに対する回収効率は極めて悪く、かつ大量の試薬投入による高いコストと化学物質による環境汚染が発生する問題があり、レアメタルを産業排水から効率よく回収可能な技術の確立が急がれる。一方、生物は環境中に存在する様々な金属類を利用し、あるいはその毒性を回避するために、金属を特異的に検知して敏感に応答する仕組みを持つことが知られている。

(2) 研究代表者の簡はこれまで、微生物や植物は環境中の金属を高感度(数十 ppb レベル)かつ高特異性で感知・結合や輸送・取り込むシステムが備えられている事を明らかにした。これまで蓄積した有害金属に関する知見を、視点を変えて有価金属に置き換えることで、微生物・植物のゲノムにコードされる金属応答遺伝子の探索は成功する確率が高いと予想し、本研究の先行研究として、レアメタルの生物学的濃縮に関する研究を開始し、最初のターゲットとしてモリブデンを吸着する酵母の作製に成功し、レアメタルの生物学的濃縮・回収は技術的に可能であることを確信した。この様な生物応答機能を解明し、応用につなげれば、特定のレアメタル類を選択的に分離・濃縮・回収することが可能となることを確信し、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 環境生物資源の発掘-金属応答性生物遺伝情報を獲得すること、(2) 新規金属資源回収技術の開発-生物工学的手法により、高集積度・高特異性の金属吸着酵母を創出すること、(3) 資源工学分野への展開-この金属吸着酵母を用いて金属濃縮・回収システムを開発することとする。

### 3. 研究の方法

本研究は以下3つの研究項目に分け、それぞれの研究方法を示す。

#### (1) 微生物・植物由来の金属応答遺伝子の探索

生物資源の発掘について、微生物および植物由来の金属応答遺伝子の探索を開始した。まずは環境試料から、金属に耐性を示す微生物を集積培養し、得られたコンソーシアムから金属応答性を持つ微生物やその生物機能の特定を行なった。

植物について、ヒ素とカドミウム・亜鉛に高い蓄積能を示すシダ植物に対して、ヒ素やカドミウム・亜鉛添加の有無による遺伝子発現のトランスクリプトム解析を行い、ヒ素の結合や輸送に寄与する遺伝子の特定を行った。

#### (2) 生物工学的手法による金属濃縮酵母の構築

金属を吸着・回収する担体は酵母とし、反応速度が速い細胞表面吸着法の適用を行う。研究項目(1)により大腸菌から取得したモリブデンの結合遺伝子を、融合遺伝子として酵母に導入・細胞表面に発現させた、モリブデンを細胞表面に吸着する組み換え酵母を作製した。作製したレアメタル金属吸着酵母を用いて、培養条件や金属吸着条件の特徴づけおよび最適化を行った。固定化によるモリブデン吸着効率の向上を検討した。モリブデンの他、ニッケルやコバルトの吸着遺伝子の吸着微生物の作成も検討した。

#### (3) 実用可能な金属回収生物材料の設計

項目(2)で構築した金属濃縮酵母を実用可能な生物材料として利用するため、微生物の固定方法について、包埋法であるアルギン酸ゲルによる固定および表面付着法であるセラミックスによる固定をそれぞれ検討した。固定材料と金属濃縮酵母の初期付着および材料の形状や表面処理による固定特徴を解明したとともに、固定した金属濃縮酵母を用いたモリブデン吸着挙動を評価した。

### 4. 研究成果

本研究で得られた成果のうち、主なものを以下に列挙する。

(1) 金属応答遺伝子の探索について、水銀とヒ素の両方に耐性を持つ微生物の *Bacillus* sp. MB24 株は、ゲノムにおいて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カセットにあり、さらに、ヒ素解毒遺伝子群は水銀解毒遺伝子群の間に挿入されていると、かなり特殊な構造を有していることを明らかにした (図1)。これらの成果の一部は *Microorganisms* 誌に掲載されている。

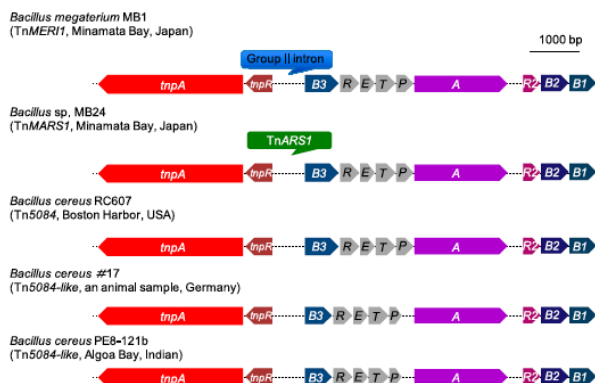


図1. 水銀解毒遺伝子群とヒ素解毒遺伝子群を特殊な入れ子構造で併せ持つ *Bacillus* sp. MB24 株 (Chien, et al., 2019 より)

(2) 金属応答遺伝子の探索について、ヒ素の超蓄積植物である *Pteris vittata* の根から、ヒ酸の取り込み、ヒ酸還元、亜ヒ酸輸送を担うそれぞれの遺伝子の挙動を Real-time PCR により明らかにし、これらの遺伝子はヒ酸・亜ヒ酸の除去に利用できると考えられる (図2)。また、*P. vittata* に対して RNAseq を行い、ヒ素の吸収・輸送に寄与する遺伝子群として、硝酸とホウ酸の輸送遺伝子が大きく寄与することが示唆された。また、ヒ素の吸収に寄与する機能性根圏微生物との組み合わせにより、環境からヒ素を効率的に除去・回収することは技術的に可能であることを証明した。これらの成果の一部は *Environmental and Experimental Botany* 誌に掲載されている。

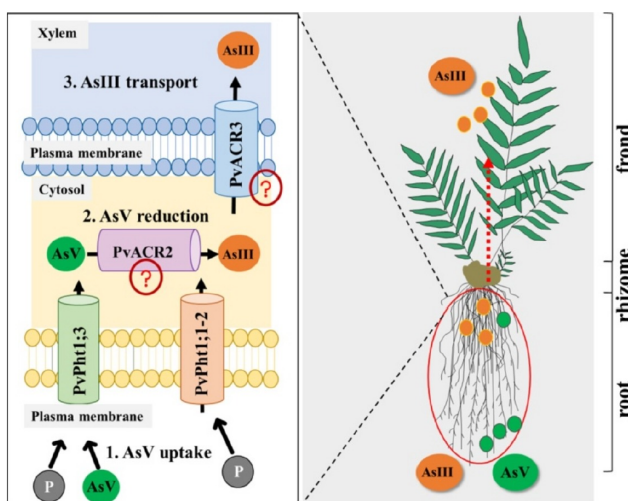


図2. ヒ素超蓄積植物 *Pteris vittata* の根におけるヒ酸輸送遺伝子 *PvPht1:3*、ヒ酸還元遺伝子 *PvACR2*、亜ヒ酸輸送遺伝子 *PvACR3* の協調作用のイメージ (Wei, et al., 2021 より)

(3) 金属応答遺伝子の探索の過程で、獲得した有機汚染物の 1,4-dioxane を有効分解できるコンソーシアムを用いて、その分解を担っている微生物の *Variovorax* sp. TS13 は新規の 1,4-dioxane 分解菌であったことを明らかにした。また、その後の解析により、他の汚染物と共存状態であっても 1,4-dioxane を効率よく分解できる安定したコンソーシアムの構築に成功した。これらの成果は *Microorganisms* 誌に二報掲載されている。

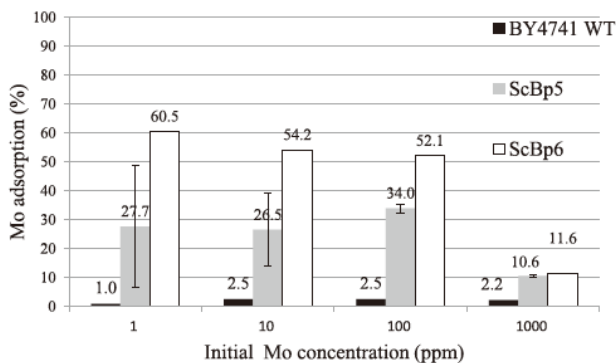


図3. プロモーターを変えた酵母 *ScBp6* 株によるモリブデン吸着の向上 (Audrey, et al., 2020 より)

(4) 金属濃縮酵母の構築について、レアメタルのモリブデンを吸着するタンパク質 ModE を酵母表面に発現させ、さらにその発現プロモーターを工夫することにより、モリブデン吸着能を向上した吸着酵母の作製に成功した (図3)。このデザインを中核として、金属対象遺伝子をニッケルやコバルトにデザインを変えて、それらの金属濃縮微生物の構築を行っている。大腸菌段階での構築に成功し、ニッケルとコバルトの吸着も確認できた。これらの成果の一部は *Hydrometallurgy* 誌に掲載されている。

(5) 金属回収生物材料の設計について、モリブデン濃縮酵母をアルギン酸ゲルに固定し、そのモリブデン吸着挙動を検討した。その他、固定担体とするセラミックスの特徴付け、また酵母を固定した際のモリブデン吸着挙動について評価した。多孔質は酵母の固定または固定後の増殖に有利な形状で、気孔径の大きさや深さを最適化することにより、酵母の固定量を向上させられることがわかった。モリブデン回収実験の結果と合わせ、セラミックスが効果的に酵母を固定す

るには、担体の形状、表面処理、酵母との親和性を向上、酵母固定量について、最適化する価値があると見出した。

(6) 金属回収生物材料の設計について、ヒ素の超蓄積植物モエジマシダを炭化させたバイオチャーは、市販の活性炭に並ぶ有害元素の吸着能を確認し、金属を吸着・除去する安価で実用性のある生物材料になりうることを証明した。これらの成果の一部は International Journal of Environmental Research and Public Health 誌に掲載されている。

その他、日本語論文1報と、学会にて計7件発表を行った。

また、上記の実績などにより、研究代表者の簡梅芳は2021年度東北大学女性研究者賞「紫千代萩賞」に選出された(課題名:植物・微生物による環境浄化機構の解明および有効利用の研究)。

さらに、本研究による成果の発展として、2022年度資生堂女性研究者サイエンスグラント第15回に採択された(課題名:循環型社会の実現に向けた生物学的金属応答機能の活用)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Stephanie Audrey, Chien Mei-Fang, Ikeda Naoya, Inoue Chihiro	4. 巻 198
2. 論文標題 Molybdate recovery using immobilized bioengineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hydrometallurgy	6. 最初と最後の頁 105491 ~ 105491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hydromet.2020.105491	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 -
1. 著者名 Wei Shujun, Kohda Yi Huang-Takeshi, Inoue Chihiro, Chien Mei-Fang	4. 巻 182
2. 論文標題 Expression of PvPht1;3, PvACR2 and PvACR3 during arsenic processing in root of <i>Pteris vittata</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental and Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 104312 ~ 104312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envexpbot.2020.104312	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 -
1. 著者名 Mei-Fang Chien, Ying-Ning Ho, Hui-Erh Yang, Masaru Narita, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo and 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 <i>Bacillus</i> 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
1. 著者名 Tanmoy Roy Tusher, Takuya Shimizu, Chihiro Inoue and Mei-Fang Chien	4. 巻 8
2. 論文標題 Enrichment and Analysis of Stable 1,4-dioxane- Degrading Microbial Consortia Consisting of Novel Dioxane-Degraders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 50-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8010050	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

1. 著者名 Sugawara Kazuki, Ichio Kouhei, Ichikawa Yumiko, Ogawa Hitoshi, Suzuki Seiichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Effects of Pyrolysis Temperature and Chemical Modification on the Adsorption of Cd and As(V) by Biochar Derived from Pteris vittata	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 5226 ~ 5226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph19095226	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 -

1. 著者名 Tusher Tanmoy Roy, Shimizu Takuya, Inoue Chihiro, Chien Mei-Fang	4. 巻 9
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Novel Bacteria Capable of Degrading 1,4-Dioxane in the Presence of Diverse Co-Occurring Compounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 887 ~ 887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9050887	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 -

1. 著者名 Mei-Fang Chien, Chongyang Yang, Shujun Wei, John Jewish A. Dominguez, Ying-Ning Ho, Chihiro Inoue	4. 巻 21
2. 論文標題 Elucidation and Application of Environmental Pollution Purifying Mechanisms by Plants and Microorganisms -Examples of Microbe-assistant Phytoextraction against Arsenic Pollution and Rhizodegradation against Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Pollution-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.50963/jenvbio.21.1_1	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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yang Chongyang, Han Ning, Ho Ying-Ning, Yang Yu-Liang, Nojiri Hideaki, Chien Mei-Fang, Inoue Chihiro
2. 発表標題 The interactions between Pteris vittata and its rhizosphere contribute to As phytoextraction
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 韓 凝, 楊 重陽, ホ インニン, 楊 玉良, 簡 梅芳, 井上 千弘
2. 発表標題 根圏メタボロミクス解析を起用したヒ素のファイトエキ ストラクション過程における代謝産物および代謝経路の調査
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tusher Tanmoy Roy, Shimizu Takuya, Chien Mei-Fang, Inoue Chihiro
2. 発表標題 Characterization of novel 1,4-dioxane-degrading bacteria isolated from a stable 1,4-dioxane-degrading microbial consortium
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 韓 凝, 楊 重陽, ホインニン, 簡 梅芳, 井上千弘
2. 発表標題 ポットを用いたモエジマシダのヒ素吸収における土壌との相互作用の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 簡梅芳, Tusher Tanmoy Roy, 井上千弘
2. 発表標題 複合環境下での1,4-ジオキサン生分解における 非分解菌の役割を示す経験的証拠
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 簡梅芳、魏書君、森内良太、井上千弘
2. 発表標題 RNAseqによるモエジマシダのヒ素輸送に寄与する遺伝子の抽出
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 簡梅芳
2. 発表標題 微生物・植物によるヒ素汚染浄化機構の解明とその応用
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2021年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究分担者	井上 千弘 (Inoue Chihiro) (30271878)	東北大学・環境科学研究科・教授  (11301)	
研究分担者	菅原 一輝 (Sugawara Kazuki) (60792405)	東京理科大学・工学部・研究員  (32629)	
研究分担者	飯塚 淳 (Iizuka Atsushi) (70451862)	東北大学・多元物質科学研究所・准教授  (11301)	



6. 研究組織（つづき）

	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	久保田 健吾  (Kubota Kengo)  (80455807)	東北大学・環境科学研究科・准教授     (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関