

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：53203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04678

研究課題名(和文)細菌由来新規キレート物質の大量生産および、めっき廃液からのニッケル回収への利用

研究課題名(英文) Production of bacterial metallophores and their application to nickel recovery from plating industry wastewater

研究代表者

篠崎 由紀子 (Shinozaki, Yukiko)

富山高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：60727113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室では、これまでに取得した細菌由来のキレート物質(メタロフォア)が、めっき廃液中のニッケルイオンの回収に利用できることを見出している。この物質の特徴は既知のものとは一致せず、新規化合物である可能性が高い。本研究ではこのメタロフォアについて、(1)高生産条件の検討、(2)精製と構造解析、(3)固相抽出と組み合わせたニッケル回収の条件検討を行った。(1)の結果、メタロフォアの生産量を当初の3倍に増やすことができた。(2)の結果、構造中に環状化オルニチン、アルギニン等を含むペプチドであることが示唆された。(3)では、実際のめっき廃液から、ニッケルイオンを回収できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内におけるニッケル等のレアメタルの安定供給を確保するため、そのリサイクル法の開発は重要である。本研究では、細菌由来のキレート物質(メタロフォア)を用いて、めっき廃液中のニッケルイオンの回収を検討した。現状ではメタロフォア生産のコストがニッケルの価格に見合わないという問題はあるが、原理的には可能であると示すことができた。また、このメタロフォアの特徴は既知の化合物とは一致せず、新規化合物の可能性があり学術的にも興味深い。その構造について調べることは、メタロフォアの金属選択性と構造との関係を知るための一助となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In our laboratory, we have found that the bacterial chelating substances (metallophores) can be used for the recovery of nickel ions in the plating waste liquid. The characteristics of this substance do not match those known and are likely to be novel compounds. In this study, we investigated (1) high production conditions, (2) purification and structural analysis, and (3) nickel recovery conditions combined with solid-phase extraction. As a result of (1), we were able to triple the production of metallophores. (2), it was suggested that the peptide contains cyclized ornithine, arginine, etc. in its structure. In (3), it was confirmed that nickel ions can be recovered from the actual plating waste liquid.

研究分野：応用微生物学

キーワード：メタロフォア シデロフォア めっき液 ニッケル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、効率的な分離回収が難しい無電解ニッケルめっきの排水・廃液に着目している。めっきの水洗工程において発生する比較的低濃度のニッケルを含む排水は、めっき工場内の排水処理施設において、苛性ソーダや消石灰に加えて高分子凝集剤などの薬剤を投入する中和沈殿により処理されている。その際に大量に生成する汚泥（スラッジ）は、専門の処理業者によって回収され、ニッケル含有スラッジとして海外に輸出されるか、あるいはニッケルが回収されないまま埋め立て処分されており、日本国内ではスラッジからのニッケルの回収は殆ど行われていない。

一方、高濃度のニッケルを含むめっき液の廃液については、一部の企業ではニッケルのリサイクルシステムが構築されているが、施設規模および初期投資費用が大きい。そのため、中小規模のめっき工場において現状では、自社でめっき廃液を処理せず専門の処理業者に処分を依頼している。このように、現段階では中小企業のめっき排水・廃液の大部分は、ニッケルが回収されないまま有償で処分されている。

2. 研究の目的

本研究では、細菌が生産するキレート物質に着目し、これを利用しためっき排水・廃液からのニッケル回収法の開発を最終目的とする。多くの細菌は、鉄欠乏下において、シデロフォアと総称される鉄キレート物質を種特異的に生産し、生育に必要な鉄イオンを効率よく取り込むことが知られている（ギリシャ語でシデロは鉄を、フォアは運搬体を意味する）（Schalk IJ et al., *Environ. Microbiol.*, 13, 2844–2854, 2011）。これまでシデロフォアは、3 価の鉄イオンに対しては高いキレート作用を示すが、鉄以外の 2 価の金属イオンに対するキレート作用は低いと考えられてきた。しかし近年、鉄以外の金属もキレートするシデロフォアが見出され、細菌の重金属耐性など鉄運搬以外の機能が着目されている。このような鉄以外の金属をキレートする細菌生産物は、メタロフォアとも呼ばれる（Johnstone and Nolan, *Dalton Trans.*, 44, 6320–6339, 2015）。

当研究室ではこれまでに、水溶液中のニッケルイオンと結合するメタロフォアの生産菌を取得している。本研究ではこのメタロフォアについて、(1)高生産条件の検討、(2)精製と構造解析、(3)固相抽出と組み合わせたニッケル回収の条件検討を行った。

3. 研究の方法

(1)メタロフォア高生産条件の検討

ニッケル結合メタロフォアの生産菌として、当研究室で過去に単離した *Delftia* sp. No.10 株を用いた。また、当初はコバルト結合メタロフォアの生産菌として過去に単離した *Pandoraea* sp. HCo-4B 株のメタロフォアが、ニッケルイオンとも結合することが分かり、この菌株も用いることとした。

培地成分として数種類の炭素源を検討し、窒素源およびリン源の濃度を変えて培養を行い、培養液中のメタロフォアの濃度を Fe-CAS アッセイ（Schwyn and Neilands, *Anal. Biochem.*, 160: 47–56, 1987）により推定した。培養液と Fe-CAS 溶液を 1 : 1 で混合し、30 分後の 630nm の吸光度の低下より、Fe-CAS からメタロフォアが鉄イオンを奪い取った量として算出した。

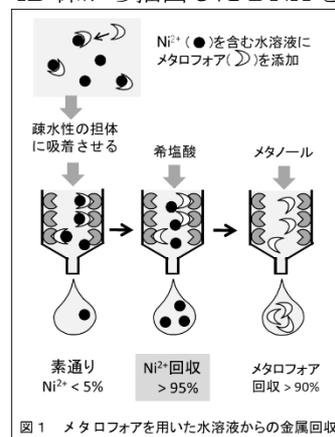
また、遺伝子組換えによるメタロフォアの大量生産を目指すため、メタロフォアの生合成遺伝子の取得と解析を試みた。*Delftia acidovorans* のメタロフォア生合成遺伝子として既に報告のある *del G*（C W Johnston et al., *Nature Chem Biol*, 9, 241–243, 2013）の塩基配列を基にプライマーを作製し、*Delftia* sp. No.10 株または *Pandoraea* sp. HCo-4B 株から抽出した DNA を鋳型として PCR による増幅を行った。

(2)精製と構造解析

No.10 株を培養し、遠心分離、ろ過滅菌にて菌体を除去し、エバポレーターで培養液を濃縮したのち、6 種類の担体（ルアーデバイス型 C₁₈、シリンジバレル型 C₁₈, C₈, Silica, HLB, MCX）を用いて固相抽出の担体検討を行った。抽出したメタロフォアを濃縮した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて分画・精製を行った。精製したメタロフォアを用いて核磁気共鳴（NMR）装置で測定を行い、構造を推定した。また、エドマン分解法によるペプチドシーケンス解析（依頼分析）を行った。

(3)固相抽出と組み合わせたニッケル回収の条件検討

精製したメタロフォアを用い、図 1 に示す方法で、希釈した無電解ニッケルめっき廃液からニッケルイオンを回収できるか再度確認を行った。Ni²⁺ 濃度は、ジメチルグリオキシムを用いた比色定量法にて測定した。



また、ニッケル以外の金属イオンの影響を調べるため、 FeCl_3 または PbCl_2 を添加して、同様の実験を行った。さらに、安定剤として鉛が含まれている実際のめっき廃液を用いて、同様の検討を行った。各溶液中の金属イオン濃度は、高周波誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-OES) で測定した。

4. 研究成果

(1)メタロフォア高生産条件の検討

培地成分として数種類の炭素源を用い、経時的に培養液中のメタロフォアの濃度を調べた結果、*Delftia* sp. No.10 株と *Pandoraea* sp. HCo-4B 株ともに、炭素源としてコハク酸またはアスパラギン酸が適しており、グルコースやフルクトースは生育に適さないことが分かった。炭素源をコハク酸として濃度を検討し、窒素源およびリン源の濃度も変えて培養を行い、どちらの菌株も、当初 (約 $30 \mu\text{mol/L}$) の約 3 倍までメタロフォアの生産量を増やすことができた。

また、*del G* プライマーを用いた PCR の結果、*Delftia* sp. No.10 株では多数の DNA 断片が増幅したが、*Pandoraea* sp. HCo-4B 株では約 1500 塩基と約 500 塩基の DNA 断片の増幅が見られた。今後はこれらの DNA 断片の塩基配列の解析を行いたいと考えている。

(2)精製と構造解析

Delftia sp. No.10 株について、固相抽出の担体検討より、ルアーデバイス型の C_{18} カラム (Sep-Pak Plus C_{18}) が回収率が最も高く約 90% となった。HPLC で分画・精製した結果、培養上清 1.8L から 36 mg の精製メタロフォアを得た。各種 NMR を測定した結果、溶媒 D_2O による ^{13}C -NMR では、文献値 (C W Johnston *et al.*, *Nature Chem Biol*, 9, 241-243, 2013) と近似している 165.2, 51.4, 19.4, 25.4, 172.4 ppm にシグナルを示したことから、環状化オルニチンが含まれていることが示唆された。ペプチドシーケンス解析の結果、アラニン、アスパラギン酸、バリンの側鎖を含むペプチドであることが示唆された。全体の構造決定のために、引き続き解析を行っている。

(3)固相抽出と組み合わせたニッケル回収の条件検討

精製した *Delftia* sp. No.10 株のメタロフォアを用いて最終濃度が $120 \mu\text{M}$ となるように添加し、ニッケル回収を行った。HCl 溶出液の Ni^{2+} 濃度の平均値は $121 \mu\text{M}$ であり、添加したメタロフォアの濃度と同程度のニッケルが回収できた。試薬の NiCl_2 と FeCl_3 または PbCl_2 を各 $200 \mu\text{M}$ となるよう添加して、同様の方法で検討したところ、HCl 溶出液の Ni^{2+} 濃度は殆ど変わらず、 Fe^{3+} または Pb^{2+} 添加による影響を受けないことが分かった。しかしこの HCl 溶出液には、 Fe^{3+} または Pb^{2+} も含まれていた。メタロフォア非添加の対照実験には Ni は含まれていなかったが、Fe と Pb は含まれていたため、Fe と Pb は担体へ非特異的に吸着している可能性が考えられる。

また、安定剤として鉛が含まれている実際のめっき廃液を用いて同様の実験を行った結果、HCl 溶出液中の鉛は検出限界 (20 ppb) 以下であった。一方、*Pandoraea* sp. HCo-4B 株のメタロフォアを用いた場合、同様の方法で、コバルトイオンとニッケルイオンの両方が回収されたため、金属選択性は高くないと考えられる。今後は、それぞれのメタロフォアの構造解析を進め、金属選択性と構造との関係を検討したいと考えている。また、メタロフォアを固定化した担体の作製を試みる。

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 1件）

1. 著者名 Shinozaki Yukiko, Kitamoto Hiroko, Sameshima-Yamashita Yuka, Kinoshita Aya, Nakajima-Kambe Toshiaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Isolation of a novel Co ²⁺ -resistant bacterium and the application of its siderophore in Co ²⁺ recovery from an aqueous solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 273 ~ 276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2018.12.001	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------