

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）海外学術調査

研究期間：2009～2011

課題番号：21405038

研究課題名（和文）レアメタル汚染の浄化と資源回収システムの開発を目指した新規金属代謝微生物の探索

研究課題名（英文）Exploration of novel metal-metabolizing bacterium to develop the purification of rare metal pollution and recovery system of rare metal

研究代表者

川本 純 (KAWAMOTO JUN)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：90511238

研究成果の概要（和文）：金属代謝微生物の金属呼吸機構を解明することで、微生物を用いたレアメタル汚染の浄化や汚染土壌からのレアメタル資源回収への応用を目指した。中国内モンゴル自治区の草原地域やオーストリア氷河域より採取した土壌から、低温での生育能に秀でた菌株を単離した。これらは、低温地域での汚染浄化への応用が期待される。金属還元能を有する特殊環境微生物 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸機構の解明に取り組み、特定のチャンネルタンパク質が本菌の鉄呼吸における三価鉄の取込に関与していることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：To develop the microbial purification and recovery system for rare metal, we explored novel metal metabolizing bacteria from cold environments, such as grass area in Inner Mongolia, China, and glacier area in Austria, and analyzed metal respiration mechanism of a metal-reducing bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. We successfully obtained various cold-adapted stains, and application of these strains is expected to develop the soil purification and rare metal-recovery system at cold environments. We also identified that *S. livingstonensis* Ac10, a cold-adapted metal-reducing bacterium, inducibly synthesized a specific channel proteins in the presence of trivalent iron, which is involved in iron transport during its iron respiration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：農学 A

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：バイオテクノロジー、応用微生物、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景
ニッケル、クロム、タングステン、モリブデン、コバルト、マンガン、バナジウム、セレンなどの希少金属（レアメタル）は自動車産業、半導体産業をはじめとするほとんどの製

造業で不可欠である。レアメタルはアジアを中心に世界規模で急激な需要拡大が進み、この 10 年ほどで価格が 2～8 倍にまで高騰したのもあり、産出国の輸出規制により「レアメタルパニック」とも呼ばれている状況に

ある。特に日本は全世界のレアメタルの 30% を消費し、そのほとんどを輸入に頼っているため、レアメタルの確保と安定供給が国策の急務となっている。しかし、日本には莫大な量のレアメタルが電子機器等の廃棄物中に存在することから、このような廃棄物は「都市鉱山」と呼ばれている。そこで、都市鉱山から安価かつ低環境負荷にレアメタルを回収する技術の開発に多くの期待が寄せられている。また一方で、レアメタル資源開発が一層盛んになるにつれ、鉱山抗や工場の排水に含まれるレアメタルによる環境汚染が懸念されている。資源開発と環境負荷は表裏一体であり、技術と環境の調和を進める必要がある。このような中、細菌、カビ、コケ、ホヤなどを使ってレアメタルを体内に取り込ませたり代謝物に吸着させたりする研究がなされている。

2. 研究の目的

生物の生態機能を利用するレアメタルの回収や環境浄化の研究の歴史はまだ浅く、既知生物のレアメタルの吸収、吸着、代謝などの分子機序の多くは不明である。また、微生物の驚くべき多様性・適応性を考えると、新たな観点からの探索・調査により未知の有用金属代微生物が見つかる可能性は非常に高い。本研究では、レアメタル汚染の浄化およびレアメタル資源の回収に関わる問題を克服し、優れたレアメタル代謝機能を持つ微生物の開発を飛躍的に促進するために、中国やチベット自治区、米国などの銅鉱山から微生物を採集し、レアメタルの吸着、吸収、蓄積、代謝能に秀でた金属代謝微生物を選抜する。特に、レアメタル同士、レアメタルと他の元素との相互作用を基軸とする金属代謝経路といった観点で新たな微生物の系統探索を行うことによる、優れた環境浄化および資源回収システムの開発を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 特殊環境からの新規低温適応性微生物群の探索と MALDI-TOF 質量分析による系統分類

汚染土壌の浄化、および汚染土壌からのレアメタル回収システム開発の基盤技術となる異化的金属代謝能を有する新規微生物群の獲得を目的とし、中国内蒙古自治区ハイラル区草原地域、およびオーストリアチロル地方の高山地域、氷河域の土壌調査を行った。採取した土壌から、低温 (4°C-18°C) での生育能を指標に、耐冷性微生物群を選抜した。4°C もしくは 18°C で増殖性の高い菌株を単離し、MALDI-TOF/MS によるリボソームタンパク質群の質量パターンから系統解析を行った。

(2) 金属還元微生物 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸機構の解明

(2-1) *S. livingstonensis* Ac10 の金属還元能の評価

S. livingstonensis Ac10 の金属還元能を評価するために電子受容体として三価鉄 (15 mM クエン酸鉄)、三価コバルト (5 mM コバルト (III)アセチルアセトナート)、もしくはフマル酸 (15mM) を含む合成培地を調製した。18°C で前培養した *S. livingstonensis* Ac10 を、金属含有培地に植菌し、18°C と、4°C で嫌氣的に静置培養した。

(2-2) 三価鉄誘導タンパク質の探索と転写レベルの解析

本菌の金属還元に関与するタンパク質を同定するために、三価鉄存在下で生産量が増加する膜タンパク質を網羅的に解析した。クエン酸鉄、もしくはフマル酸含有培地で培養した本菌の内膜タンパク質と外膜タンパク質をショ糖密度勾配遠心法で分離し、2次元電気泳動に供し、MALDI-TOF MS により同定した。三価鉄誘導的に生産されるタンパク質をコードする遺伝子群について、リアルタイム RT-PCR による転写量解析を行った。

(2-3) *S. livingstonensis* Ac10 の金属還元における PhoE の生理機能

外膜ポーリンタンパク質 PhoE は、大腸菌においてリン酸欠乏時に発現誘導されるリン酸選択的ポーリンタンパク質として知られている。本菌において、PhoE は三価鉄存在下で誘導生産されたことから、本菌の三価鉄の還元に関与していることが示唆された。本菌の金属還元における PhoE の生理的役割を解析するために、phoE 遺伝子破壊株を作製することとした。本菌の phoE 遺伝子の相同領域を有する遺伝子破壊用ベクターを構築し、ゲノム上の phoE 遺伝子との相同組換えによって遺伝子破壊株 (Δ phoE) を獲得した。 Δ phoE を三価鉄、三価コバルト、もしくはフマル酸を最終電子受容体として含む合成培地に植菌し、嫌気下での金属還元能を解析した。

4. 研究成果

(4-1) 中国内モンゴル自治区の草原地域を調査し、沙漠化が進行した退化地域、および草原域より採取した土壌試料を希釈度の異なる LB 寒天培地に塗布し、4°C と 18°C で形成されたコロニーを単離した。採取された菌株のうち、4°C での生育速度を指標に、2次選抜した。得られた低温での生育能に秀でた菌株について、MALDI-TOF 質量分析をもちい、分子量 1 万以下のリボソームタンパク質を含む可溶性低分子タンパク質群の生産パターンに基づいて系統解析を行った。その結果、上述の低温環境から 4°C で良好に生育する *Pseudomonas* 属細菌 (130 株) と、

Geobater 属、*Enterobacter* 属細菌を単離することができた。以上の菌株は、低温での増殖能に秀でたことから、寒冷地での金属汚染土壌の浄化、および金属回収に応用できる有用微生物群であると期待された。

(4-2) 南極海水から単離された *S. livingstonensis* Ac10 は4℃から25℃で良好に生育できる低温適応性のグラム陰性桿菌である。本菌のゲノム解析の結果、他の *Shewanella* 属細菌同様、約40種のcytochrome 関連遺伝子が存在したことから、多様な金属元素の還元的代謝能を有する低温適応細菌であることが示唆された。本菌について、嫌気環境下での異化的金属還元能を評価するために、種々の金属イオンを含む合成培地を用いて培養した結果、三価鉄、六価クロム、三価コバルト、四価マンガンを最終電子受容体として生育可能であることが示された。

(4-3) クエン酸鉄(III)存在下で生産量が増加するタンパク質を見出し、MALDI-TOF MSを用いたペプチドマスフィンガープリンティング法で8種のタンパク質を同定することができた(Table 1)。遺伝子の転写や翻訳に関与する RpsA, Tsf, PheT, 翻訳後の修飾や輸送に関与する Tig, TufB, PpsA, 外膜を介した可溶性分子の輸送に関与する Omp, PhoE が三価鉄存在下で誘導生産されることが示された。これらのタンパク質群が、本菌の異化的金属還元機構に重要であることが示唆された。

Table 1 三価鉄誘導タンパク質

Protein	Putative function
RpsA	Translation, ribosomal structure and biogenesis
Tig	Posttranslational modification, protein turnover
TufB	Translation, ribosomal structure and biogenesis, Amino acid transport and metabolism
Tsf	Translation, ribosomal structure and biogenesis
PpsA	Carbohydrate transport and metabolism
PhoE	Phosphate-selective porin
Omp	Outer membrane protein
PheT	Translation, ribosomal structure and biogenesis

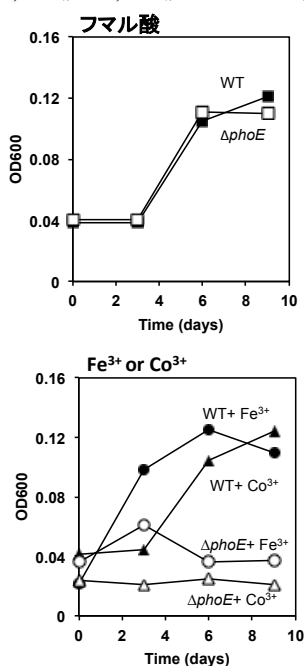
三価鉄、もしくはフマル酸含有培地で培養した本菌から、全 RNA を抽出し、三価鉄誘導性タンパク質をコードする遺伝子について、それぞれの転写量をリアルタイム

RT-PCR で解析した。その結果、三価鉄存在下で RpsA と TufB の発現は転写レベルで誘導されていることがわかった。

(4-4) 三価鉄誘導タンパク質の網羅的解析の結果、グラム陰性細菌の外膜に存在するチャンネルタンパク質である PhoE の生産量が三価鉄存在下で増加していることがわかった。PhoE は、大腸菌や *Pseudomonas* 属細菌においてリン酸欠乏時に発現が誘導される膜タンパク質として知られている。PhoE は正電荷を有するアミノ酸が局在する親水的な筒型構造を生体膜上で形成することで、リン酸イオン ($H_2PO_4^{2-}$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) を特異的に取り込む輸送体と考えられているが、嫌気環境下での金属代謝との関連は報告されていない。本菌の異化的金属還元機構における PhoE の生理的役割を明らかにするために、*phoE* 遺伝子破壊株 ($\Delta phoE$) を作製した。 $\Delta phoE$ は、フマル酸存在下では野生株と同様に生育したことから、フマル酸を電子受容体とした嫌気呼吸には PhoE は関与していないことが示された (Fig. 1 上段)。一方、三価鉄を最終電子受容体としたとき、 $\Delta phoE$ は野生株に比べて顕著に生育速度が低下したことから (Fig. 1 下段)、PhoE は三価鉄を用いた異化的金属還元において重要な機能を担うことが示された。

PhoE は、その1次配列から本菌の外膜において筒型構造を形成し、可溶性分子、特に陰イオン性の分子を基質とする輸送体として機能することが予想されることから、本菌の三価鉄の異化的金属還元において、三価鉄は陰イオン性の媒介物質と結合することで PhoE の親水的ドメインを介して積極時に細胞内に取り込まれていることが示唆された。また、三価鉄と同様に、三価コバルト含有培地においても、 $\Delta phoE$ の生育速度が低下していたことから、PhoE は三価鉄以外の異化的金属還元にも関与しており、三価コバルトは三価鉄と同様に PhoE を介して細胞内に取り込まれ、最終電子受容体として利用されていることが示唆された。

Fig. 1 PhoE 欠損株の異化的金属還元能
 フマル酸, 三価鉄, 三価コバルト含有培地に



おける野生株と $\Delta phoE$ の生育曲線。

以上の結果から、本菌の異化的金属還元機構における外膜を介した金属イオンの輸送を担うことが予想されるタンパク質の同定に成功した。本タンパク質について、タンパク質工学的な機能強化を図ることで、本菌を用いた金属回収システムの効率化が可能となり、微生物を用いた環境負荷の小さいレアメタル回収系の開発が期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 28 件)

- Function of FADH₂-dependent 2-haloacrylate hydratase from a 2-chloroacrylate-utilizing bacterium, *Burkholderia* sp. WS., Vasudevan, A., Fujita, M., Kurata, A., Kawamoto, J., Esaki, N., and Kurihara, T., Trace Nutrients Research 28: 58-64. (2011) 査読有り
<http://www.jtnrs.com/sym28/P-08.pdf>
- Eicosapentaenoic acid plays a role in stabilizing dynamic membrane structure in the deep-sea piezophile *Shewanella violacea*: a study employing high-pressure time-resolved fluorescence anisotropy measurement., Usui, K., Hiraki, T., Kawamoto, J., Kurihara, T., Nogi, Y., Kato, C., and Abe, F., Biochimica et Biophysica Acta 1818: 574-583. (2011) 査読有り
 doi: 10.1016/j.bbamem.2011.10.010.
- Piezotolerance of the Respiratory Terminal Oxidase Activity of the Piezophilic *Shewanella violacea* DSS12 as Compared with Non-Piezophilic *Shewanella* Species., Tamegai, H., Ota, Y., Haga, M., Fujimori, H., Kato, C., Nogi, Y., Kawamoto, J., Kurihara, T., and Sambongi, Y., Bioscience Biotechnology and Biochemistry 75: 919-924. (2011) 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100882>
- Differential roles of internal and terminal double bonds in docosahexaenoic acid: Comparative study of cytotoxicity of polyunsaturated fatty acids to HT-29 human colorectal tumor cell line. Sato, S.B., Sato, S., Kawamoto, J., and Kurihara, T., Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 84: 31-37. (2011) 査読有り
 doi: 10.1016/j.plefa.2010.09.006
- Identification of novel mammalian phospholipids containing threonine, aspartate, and glutamate as the base moiety. Omori, T., Honda, A., Mihara, H., Kurihara, T., and Esaki, N., Journal of Chromatography B 879: 3296-3302. (2011) 査読有り
 DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.04.033
- Thermal Stability of Cytochrome c5 of Pressure-Sensitive *Shewanella livingstonensis*. Masanari, M., Wakai, S., Tamegai, H., Kurihara, T., Kato, C., and Sambongi, Y., Bioscience Biotechnology and Biochemistry 75: 1859-1861. (2011) 査読有り
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/75/9/75_110370/_pdf
- Mammalian Selenocysteine Lyase Is Involved In Selenoprotein Biosynthesis., Kurokawa, S., Takehashi, M., Tanaka, H., Mihara, H., Kurihara, T., Tanaka, S., Hill, K., Burk, R., and Esaki, N., Journal of Nutritional Science and Vitaminology 57: 298-305. (2011) 査読有り
<http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.57.298>
- A mechanistic analysis of enzymatic degradation of organohalogen compounds., Kurihara, T., Biosci Biotechnol Biochem 75: 189-198. (2011) 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100746>
- Favourable effects of eicosapentaenoic acid on the late step of the cell division in a piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* DSS12, at high-hydrostatic pressures., Kawamoto, J., Sato, T., Nakasone, K., Kato, C., Mihara, H., Esaki, N., and Kurihara, T., Environmental Microbiology 13: 2293-2298. (2011) 査読有り
 doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02487.x.
- Escherichia coli* dihydropyrimidine dehydrogenase is a novel NAD-dependent

- heterotetramer essential for the production of 5,6-dihydrouracil. Hidese, R., Mihara, H., Kurihara, T., and Esaki, N., *J Bacteriol* **193**: 989-993. (2011) 査読有り
doi: 10.1128/JB.01178-10
11. *In vitro* Refolding of an OmpA Homolog, a Major Cold-Inducible Outer Membrane Protein, from a Psychrotrophic Bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10., Dai, X.-z., Kawamoto, J., Esaki, N., and Kurihara, T., *Journal of Japanese Society for Extremophiles* **10**: 90-96. (2011) 査読有り
<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/20120222875433695>
 12. 好冷性細菌が生産する高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生理機能., 川本 純, 栗原達夫, *バイオサイエンスとインダストリー* **69**: 305-307.(2011) 依頼原稿
 13. The distribution of phosphatidyl-D-serine in the rat. T. Omori, H. Mihara, T. Kurihara, and N. Esaki. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1953-1955 (2010) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100271>
 14. IscS functions as a primary sulfur-donating enzyme by interacting specifically with MoeB and MoaD in the biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. W. Zhang, A. Urban, H. Mihara, S. Leimkuhler, T. Kurihara, and N. Esaki. *J Biol Chem* **285**, 2302-2308 (2010) 査読有
doi: 10.1074/jbc.M109.082172
 15. Reaction mechanism and molecular basis for selenium/sulfur discrimination of selenocysteine lyase. R. Omi, S. Kurokawa, H. Mihara, H. Hayashi, M. Goto, I. Miyahara, T. Kurihara, K. Hirotsu and N. Esaki. *J Biol Chem* **285**, 12133-12139 (2010) 査読有
doi: 10.1074/jbc.M109.084475
 16. 2-Haloacrylate hydratase, a new class of flavoenzyme that catalyzes the addition of water to the substrate for dehalogenation. A. M. Mowafy, T. Kurihara, A. Kurata, T. Uemura and N. Esaki. *Appl Environ Microbiol* **76**, 6032-6037 (2010) 査読有
doi: 10.1128/AEM.00334-10
 17. 低温細菌における長鎖高度不飽和脂肪酸の生合成と機能. 栗原達夫, 川本純, 江崎信芳. *蛋白質核酸酵素* **55**, 94-99 (2010) 依頼原稿
www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/81-08-08.pdf
 18. 好冷酵素の特性と利用法. 栗原達夫. *酵素利用技術大系*, 239-243 (2010) 依頼原稿
 19. Eicosapentaenoic acid plays a beneficial role in membrane organization and cell division of a cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. J. Kawamoto, T. Kurihara, K. Yamamoto, M. Nagayasu, Y. Tani, H. Mihara, M. Hosokawa, T. Baba, S. B. Sato and N. Esaki. *J Bacteriol* **191**, 632-40 (2009) 査読有
doi: 10.1128/JB.00881-08
 20. X-Ray crystallographic and mutational studies of fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. strain FA1. K. Jitsumori, R. Omi, T. Kurihara, A. Kurata, H. Mihara, I. Miyahara, K. Hirotsu and N. Esaki. *J Bacteriol* **191**, 2630-7 (2009) 査読有
doi: **10.1128/JB.01654-08**
 21. Crystal structure of a homolog of mammalian serine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*. M. Goto, T. Yamauchi, N. Kamiya, I. Miyahara, T. Yoshimura, H. Mihara, T. Kurihara, K. Hirotsu and N. Esaki. *J Biol Chem* **284**, 25944-52 (2009) 査読有
doi: 10.1074/jbc.M109.010470
 22. Occurrence of phosphatidyl-D-serine in the rat cerebrum. T. Omori, H. Mihara, T. Kurihara, and N. Esaki. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 415-8 (2009) 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.035.
 23. Serine racemase with catalytically active lysinoalanyl residue. T. Yamauchi, M. Goto, H. Y. Wu, T. Uo, T. Yoshimura, H. Mihara, T. Kurihara, I. Miyahara, K. Hirotsu and N. Esaki. *J Biochem* **145**, 421-4 (2009) 査読有
doi: 10.1093/jb/mvp010
 24. Possible role of red blood cells in selenocysteine metabolism. T. Imai, H. Mihara, T. Kurihara, and N. Esaki. *Trace Nutrients Research* **26**, 22-25 (2009) 査読有
www.jtnrs.com/sym26/26_022.pdf
 25. Selenocysteine is selectively taken up by red blood cells. T. Imai, H. Mihara, T. Kurihara, and N. Esaki. *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 2746-2748 (2009) 査読有
doi: 10.1271/bbb.90306
 26. 低温下で機能する酵素. 栗原達夫, 江崎信芳. *化学工学* **73**, 324-327 (2009) 依頼原稿
 27. 低温細菌における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能. 栗原達夫. *生化学* **81**, 716-719 (2009) 依頼原稿
www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/81-08-08.pdf
 28. 好冷性細菌の低温適応に関わるタンパク質とリン脂質. 栗原達夫, 川本純, 江崎信芳. *生化学* **81**, 1072-1079 (2009) 依頼原稿
www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/81-12-07.pdf
- [学会発表] (計 3 件)
1. Jun Kawamoto, Cold-adaptation mechanism of an Antarctic psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis*

Ac10, 4th international conference on Polar and Alpine Microbiology, 2011年9月5日, Ljubljana, Slovenia

2. Jun Kawamoto, Cold-adaptation mechanism of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, MicroPerm workshop, 2010年11月8日, Potsdam, Germany
3. Jun Kawamoto, Eicosapentaenoic acid plays an important role in assembly of cell division machinery of an Antarctic sea bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Xth SCAR International Biology Symposium, 2009年7月26日, 札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本 純 (KAWAMOTO JUN)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：90511238

(2) 研究分担者

栗原 達夫 (KURIHARA TATSUO)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号：70243084

(3) 連携研究者

()

研究者番号：