

## 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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510086

研究課題名（和文） 高度水銀耐性鉄酸化細菌の無機・有機水銀分解気化酵素解析と環境浄化への応用

研究課題名（英文） Volatilization of Metal Mercury from Inorganic and Organic Mercury by Highly Mercury-Resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its Application to Bioremediation

研究代表者

竹内 文章 (TAKEUCHI FUMIAKI)

岡山大学・環境管理センター・准教授

研究者番号：90294446

研究成果の概要（和文）：*Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 は、無機水銀だけでなく有機水銀化合物に対しても非常に高い水銀耐性であり、NADPH 依存性の水銀気化活性及び二価鉄依存性の水銀気化活性を有する。MON-1 から精製した cytochrome *c* oxidase が、無機水銀及び有機水銀について  $Hg^0$  としての気化に関与しており、その活性は MON-1 株由来の cyt. *c* oxidase に対して調製した抗体あるいは NaCN を添加することによって完全に阻害した。 $CH_3HgCl$  の分解及び  $Hg^0$  気化活性は、MON-1 の細胞質基質でなく細胞膜画分の中に存在していることを確かめた。一方、実際の環境浄化として応用するための技術検討を行った。

研究成果の概要（英文）：*Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 is highly resistant not only to mercuric chloride but also to organomercurials. It has a novel ferrous iron-dependent mercury volatilization activity as well as an NADPH-dependent mercury reductase activity. We have found that cytochrome *c* oxidase, purified from strain MON-1, reduces  $HgCl_2$  to volatilizable metal mercury ( $Hg^0$ ) with reduced mammalian cyt. *c* or  $Fe^{2+}$  as an electron donor. In this study we found that cyt. *c* oxidase can volatilize  $Hg^0$  from  $CH_3HgCl$  (MMC) as well as from  $HgCl_2$  with reduced mammalian cyt. *c* or c-type cyt. *c* oxidase purified from strain MON-1 as an electron donor. We also found that MMC volatilization activity is present in the MON-1 plasma membrane but not in the cytosol. These activities were strongly inhibited by NaCN and the antibody produced against purified MON-1 cyt. *c* oxidase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境技術・環境材料

キーワード：(1)鉄酸化細菌 (2)*Acidithiobacillus ferrooxidans* (3)高度水銀耐性株 (4)水銀気化活性  
(5)酵素解析 (6)Cytochrome *c* oxidase (7)電気培養 (8)Bioremediation

## 1. 研究開始当初の背景

鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* は、二価鉄あるいは還元型無機硫黄化合物を唯一のエネルギー源とし、空気中の二酸化炭酸を唯一の炭素源として酸性環境下で増殖する絶対化学合成独立栄養細菌である。本菌は銅などのバクテリアリーチングや酸性鉱山排水処理などのバイオレメディエーションに利用されており、応用微生物学的にも非常に重要な細菌である。しかし、鉄酸化細菌を活用した水銀についてのバイオレメディエーションに関する研究例は国内外では例がなく、応用微生物学的にも注目されている。本菌は増殖速度が著しく遅いという問題点があり生化学的な解析が困難な状況であった。

一方我々は自然界より単離した 150 株の鉄酸化細菌に対してスクリーニングを行い、6  $\mu\text{M}$  の無機水銀に対して強い耐性を示す *A. ferrooxidans* SUG 2-2 株を選択した。さらに SUG 2-2 株を調整し 20  $\mu\text{M}$  の  $\text{Hg}^{2+}$  含む二価鉄無機塩培地でも生育する高度水銀耐性を示す *A. ferrooxidans* MON-1 株を得ている。本株の生化学的解析と実際の水銀含有排水、水銀汚染土壌から  $\text{Hg}^0$  として気化させて、回収することが可能であるが、高濃度な菌液を得ることが必要であった。これまでの洗浄細胞、細胞膜画分による研究に続き、関連酵素の解明が学問的にも重要な課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下のとおりである。

- (1) 本菌の生化学的解析と応用技術開発を進めるためには、高濃度培養液を得ることが重要であるために電気培養装置を開発する。
- (2) 高濃度培養液から本株の細胞膜に存在する cyt. c oxidase を精製し、この酵素及びそのサブユニットが、水銀気化にどの様に関与しているかを確かめる。

- (3) 電気培養で得られた高濃度培養液を継続的に活用するために微生物の固定化法について検討する。

## 3. 研究の方法

研究方法の概要は、次のとおりである。

- (1) 電気培養法は、微弱な電位で酸化した三価鉄を二価鉄への還元を繰り返しながら培養する方法である。多量の培養液、二価鉄の添加が不要で沈殿物の発生量が少なくなる。装置形状、液量、電位等制御値、酸素供給量、攪拌条件、電極位置、イオン交換膜、電子供与体以外の培地成分の濃度の影響、その他に初期菌体濃度、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、pH について経時的変化を調べる。
- (2) 本株の水銀気化活性の cyt. c oxidase による関与について学術的な提案をしており、電気培養で得た菌体、膜画分、精製酵素及びそのサブユニット、さらに、この酵素の抗体を用いて解析を進め明確化する。Cyt. c oxidase 活性の測定は、還元型 mammalian cyt. c の酸化速度を A550 nm の減少で、一方、水銀気化活性は、還元型 cyt. c の存在下、0.1 mM 塩化水銀 ( $\text{HgCl}_2$ ) または 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{CH}_3\text{HgCl}$  (MMC) から、気化してくる金属水銀を硫酸酸性  $\text{KMnO}_4$  にトラップし、還元気化原子吸光法により定量する。
- (3) 本株の二価鉄添加培地による生育菌と硫黄添加培地による生育菌について水銀気化活性及び有機水銀分解活性などについて比較する。また、標準株 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 との相異について検討にする。
- (4) 水銀に汚染された汚染土壌、廃液から水銀を選択的に気化させて回収する工学的技術が確立する。実際の環境修復における微生物固定化等の技術的資料を得る。

#### 4. 研究成果

本研究成果の概要は、次のとおりである。

- (1) 本研究では、増殖が遅い *A. ferrooxidans* MON-1 株を試作した電気培養装置で培養することで通常の培養（振とう培養あるいは通気培養）による方法と比べ、少容量の培地で、300 倍以上の菌体収量を得ることができる運転条件を得た。
- (2) 電気培養によって得られた高濃度菌液から  $aa_3$  型 *cyt. c oxidase* の酵素を精製した。無機水銀及び有機水銀分解・気化活性には、本酵素が大きく係わっていることを確認した。さらにMON-1 株由来の *cyt. c oxidase* に対して調製した抗体あるいは NaCN を添加することによって、無機及び有機水銀から金属水銀としての気化を完全に阻害した。
- (3) *Cyt. c oxidase* 精製酵素からサブユニットの解離させた場合、 $\alpha$ ,  $\beta$ バンドが存在するサブユニットは、 $\beta$ バンド単独のサブユニットに比べると *cyt. c oxidase* 活性及び水銀気化活性が高いことがわかった。
- (4) MON-1 株の  $aa_3$  から単離した  $\alpha$ ,  $\beta$ -サブユニットは、解離前の  $aa_3$  より約 20 倍高い *cyt. c oxidase* 活性を示し、0.2 mM  $Hg^{2+}$ , 0.2 mM  $Cu^{2+}$  によって特異的に活性化された。また、1 mM SDS 存在下においても活性を示し、他の鉄酸化細菌株に比較して SDS に対しても高度耐性であった。
- (5)  $\alpha$ ,  $\beta$ -サブユニットによる無機水 ( $HgCl_2$ ) 及び有機水銀 (MMC) からの  $Hg^0$  の気化は、0.1~0.2 mM の  $Cu^{2+}$  によって約 2 倍に活性化された。
- (6) 本研究では、さらに、本菌の高濃度電気培養液を活用することによって実際の水銀を含有した廃液（地下水）、土壌から水銀を気化回収するための知見を得た。

#### 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 8件)

- ① 杉尾 剛, 竹内 文章: 鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の基礎と応用 -水銀耐性鉄酸化細菌の分離と水銀耐性機構-, *Journal of Japanese Society for Extremophiles* (極限環境生物学会誌), Vol.10, No.2, (2011年12月), pp.43-53.
- ② 杉尾 剛, 竹内 文章: 鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の硫黄酸化機構, *発酵工学研究会誌*, 第66号, (2011年11月), pp.15-21.
- ③ Tsuyoshi SUGIO, Ami AKO and Fumiaki TAKEUCHI: Sulfite Oxidation Catalyzed by  $aa_3$ -Type Cytochrome *c* Oxidase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, Vol.74, No.11, (2010), pp.2242-2247.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/74/11/74\\_100446/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/74/11/74_100446/pdf)
- ④ Tsuyoshi SUGIO, Tomoe KOMODA, Yuko OKAZAKI, Yuki TAKEDA, Sousaku NAKAMURA and Fumiaki TAKEUCHI: Volatilization of Metal Mercury from Organomercurials by Highly Mercury-Resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, Vol.74, No.5, (2010), pp.1007-1012.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/74/5/74\\_90888/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/74/5/74_90888/pdf)
- ⑤ Tong Thi My Thi, Fumiaki TAKEUCHI and Tsuyoshi SUGIO: Volatilization and Recovery of Mercury from Mercury Wastewater Using *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 Strain Immobilized on Porous Ceramic, *PROCEEDINGS THE 5TH VIETNAMESE JAPANESE SCIENTIFIC EXCHANGE CONFERENCE, OCTOBER*, 査読有, (2009), pp.94-95.

⑥ Taher M. Taha, Fumiaki TAKEUCHI and Tsuyoshi SUGIO: Reduction of Cytochrome *c* by Tetrathionate in the Presence of Tetrathionate Hydrolase Purified from Sulfur-Grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, *Advanced Materials Research*, 査読有, 71-73, (2009), pp.243-246.

<http://www.scientific.net/requestpaper/70034>

⑦ Tsuyoshi SUGIO, Taher M. Taha, Atsunori NEGSHI, Fumiaki TAKEUCHI : Existence of Ferrous Iron-Dependent Mercury Reducing Enzyme System in Sulfur-Grown *A. ferrooxidans* MON-1 Cells, *Advanced Materials Research*, 査読有, 71-73, (2009), pp.745-748.

<http://www.scientific.net/requestpaper/70104>

⑧ Tsuyoshi SUGIO, Taher M. TAHA, and Fumiaki TAKEUCHI : Ferrous Iron Production Mediated by Tetrathionate Hydrolase in Tetrathionate-, Sulfur-, and Iron-Grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 Cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, Vol.73, No.6, (2009), pp.1381-1386.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/6/73\\_90036/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/6/73_90036/pdf)

〔学会発表〕(計 12 件)

① 杉尾 剛, 竹内 文章 : *A. ferrooxidans* 由来 ubiquinol oxidase 活性における  $aa_3$  型 cytochrome *c* oxidase の関与, 日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集, 2C24a12, [京都] (2012.3.23).

② 竹内 文章 : 高度重金属耐性鉄酸化細菌による重金属浄化及び回収, 平成 23 年度財団法人ウエスコ学術振興財団講演会, [岡山] (2012.1.19)

③ 杉尾 剛, 竹内 文章 : 鉄生育及び硫黄生育酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 株の ubiquinol oxidase 活性, 日本

生物工学会, 2Ha07, [東京] (2011.9.27).

④ 竹内 文章, 狩野典香, 杉尾 剛 : *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 株由来  $aa_3$  型 cytochrome *c* oxidase subunits の cytochrome *c* oxidase 活性に及ぼす重金属の影響, 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集, 2B22p13, [京都] (2011.3.26).

⑤ 杉尾 剛, 小野田 桂子, 竹内 文章 : 鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* におけるグルタチオン非依存性, 元素硫黄依存性の亜硫酸生成活性の存在, 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集, 2B22p11, [京都] (2011.3.26).

⑥ 杉尾 剛, 竹内 文章 : 高度水銀耐性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 株由来 cytochrome *c* oxidase による二価水銀の還元, 第 62 回日本生物工学 2009 年度大会講演要旨集, 3p-1105, [宮崎] (2010.10.29).

⑦ 杉尾 剛, 原田 有梨, 竹内 文章 : 鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の硫黄酸化活性に及ぼす  $aa_3$  type cytochrome *c* oxidase 抗体の影響, 日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集, 3AQp09, [東京] (2010.3.29).

⑧ Tong Thi My Thi, Fumiaki TAKEUCHI and Tsuyoshi SUGIO : Volatilization and Recovery of Mercury from Mercury Wastewater Using *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 Strain Immobilized on Porous Ceramic, THE 5TH VIETNAMESE JAPANESE SCIENTIFIC EXCHANGE CONFERENCE, Track 5-1 [東京] (2009.10.10).

⑨ Tsuyoshi SUGIO and Fumiaki TAKEUCHI : Metal Mercury Volatilization from Organomercurials by Mercury-Resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1, The American Society for Microbiology [San Diego] (2010.5.23).

⑩ 狩野 典香, 杉尾 剛, 竹内 文章：鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* の外膜における  $aa_3$  型 cytochrome *c* oxidase の存在, 2010 年度日本農芸化学会中国四国支部大会 (第 28 回講演会), B21, [香川] (2009.9.25).

⑪ 小野田 桂子, 竹内 文章, 杉尾 剛：銅のバクテリアリーチング活性の高い鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* D3-2 株は亜硫酸耐性である, 2010 年度日本農芸化学会中国四国支部大会 (第 28 回講演会), B20, [香川] (2009.9.25).

⑫ 杉尾 剛, 薦田 友恵, 岡崎 夕子, 竹田 有希, ターヘル タハ, 竹内 文章：高度水銀耐性鉄酸化細菌 *Acidithobacillus ferrooxidans* MON-1 株由来  $aa_3$  型 cytochrome *c* oxidase による有機水銀の分解, 第 61 回日本生物工学 2009 年度大会講演要旨集, 2Fp25, [名古屋] (2009.9.24).

[産業財産権]

○取得状況

名称：水銀の気化方法, 及び汚染土壌又は汚染水の浄化方法, 並びに水銀の気化方法

発明者：竹内 文章 他

権利者：同上

種類：特許

番号：P4578897

取得年月日：

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/emc/takeuchi/paper1.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 文章 (TAKEUCHI FUMIAKI)

岡山大学・環境管理センター・准教授

研究者番号：90294446

### (2) 研究分担者 (平成 21～22 年度)

杉尾 剛 (TSUYOSHI SUGIO)