

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360362

研究課題名(和文) 光駆動性の生物学的レアメタル濃縮系の開発とメタロミクスによる金属動態の理解

研究課題名(英文) Development of a biological rare-metal-concentrating system driven by light and understanding of its metal kinetics using metallomics

研究代表者

前田 勇 (Maeda, Isamu)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：10252701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,800,000円、(間接経費) 2,640,000円

研究成果の概要(和文)：産業上重要なレアメタルを希薄水溶液から光合成細菌により濃縮し細胞の形で回収する技術開発に取り組んだ。レアメタルの中でも、特にモリブデンは植物の硝酸還元酵素の働きにも必要不可欠な元素である。本研究において、光合成細菌の培養時に無機態窒素の有無で細胞における金属含量組成比が大きく変化し、窒素制限により選択的にモリブデンを濃縮可能であることが示された。モリブデンを高含量で集積した光合成細菌の細胞は、農地へのモリブデン供給のための生物資材としての利用が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The technological development to concentrate industrially important rare metals from solution with low concentrations by photosynthesis bacteria and to collect such metals in the form of bacterial cells has been conducted. Among such rare metals, molybdenum is an element especially indispensable for the function of vegetable nitrate reductases. This study revealed that during cultivation of photosynthesis bacteria, the metal compositional ratio in cells changed markedly by the presence or absence of an inorganic form of nitrogen, and molybdenum could be specifically concentrated by removal of the nitrogen source. The photosynthetic bacterial cells that accumulated molybdenum with high contents could be valuable as a bio-material to provide molybdenum to agricultural land.

研究分野：微生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：資源循環 レアメタル 生物濃縮 光合成細菌 モリブデン 細胞凝集 ニトロゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) レアメタルの供給源確保は、代替物質の開発と共に日本が科学技術により解決しなくてはならない最重要課題の一つである。このような社会情勢を鑑み、メタロプロテインのような金属配位分子の生合成を制御できれば光合成細菌の生細胞を光で駆動されるレアメタル濃縮装置として利用することができるのではないかとこの発想に至った。採算が合わないレアメタル資源が天然や事業所廃水に多量に存在している。太陽光を駆動力とする生物濃縮と、凝集による固液分離すなわち水相からの細胞分離を組み合わせることで、これら未利用資源の省エネルギー型濃縮系を確立する(図1)。これをメタロミクス解析により推し進め、外来の金属配位分子が細胞内の総金属動態にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

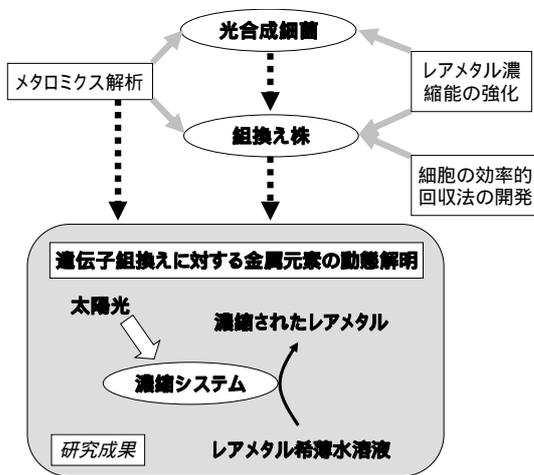


図1 研究の流れと予想される成果

2. 研究の目的

(1) 本研究の一つ目の課題として、モリブデンのキレート作用を有するタンパク質をコードする遺伝子を発現させることができるように組換え光合成細菌の育種を行う。その上で、外来のキレート分子の遺伝子が光合成細菌細胞内で機能しているか否か、さらにはキレート分子の生合成により、光合成細菌の増殖が阻害されるか否かについても明らかにする。

(2) 二つ目の課題として、組換え細菌のレアメタル濃縮能の増強を評価するために、培地中に含まれる全ての金属元素のフローの中で目的金属元素のフローを把握する必要がある。培養環境から細胞内への金属フローを野生株で把握した上で、遺伝子組換えにより合成されたレアメタル・キレート分子が物質フローにどのように影響するのかを明らかにする。キレート分子と他のタンパク質間での目的金属の競合や細胞内外への輸送に際しての律速の出現、レアメタル以外の金属の増減等の細胞内ネットワークが存在することが予測される。本研究では、従前に報告の

ないこれらの知見を得た上で、組換え菌株の育種方法や培養方法を最適化する手順で研究を推進させる。

(3) 三つ目の課題は、光合成細菌細胞の固液分離を光エネルギー駆動で行う系を構築することである。このために、光合成細菌のレアメタル濃縮能を強化すると共に、レアメタルを高濃度で含有する細胞の凝集塊として回収することを試みる。具体的には、光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* が細胞外マトリックス間の相互作用を介して凝集体を形成する性質を利用すべく検討を行う。これにより、レアメタルを濃縮した細胞塊をプランクトンネットによりエネルギー的に負荷をかけずに回収する。これにより、レアメタルを希薄溶液から濃縮することが可能になる。さらに、*Rvu. sulfidophilum* の細胞凝集に関与する分子を明らかにすることで、他の光合成細菌種でも同様の分子が生合成されるか否か、そして同様の固液分離の手法が適用可能か否かを知る手掛かりとする。

(4) 研究計画の優位性は、光合成細菌を用いることで太陽光を駆動力として、レアメタル濃縮が増殖と連動して自律的に行われる系を開発する点である。したがって、光量あるいは光合成活性に連動したレアメタル・キレート分子の生合成が期待される。数ある生物種の中でも光合成細菌は大量培養に必要な技術が確立されているため、太陽光をエネルギー源としたレアメタル濃縮と、細胞凝集を介したレアメタル高含有細胞の固液分離を実現することで、レアメタル再資源化へと結びつけることが最終目標である。

3. 研究の方法

(1) レアメタル濃縮能を強化した組換え光合成細菌育種のために、大腸菌由来のモリブデン応答性の転写調節因子 ModE の遺伝子全長、あるいはモリブデン結合ドメインである C 末端側ペプチドをコードする遺伝子領域を淡水性光合成細菌である *Rhodospseudomonas palustris* に導入し、モリブデンの濃縮能が強化された光合成細菌組換え株を育種した。また、遺伝子を導入した組換え株との比較対照のために、上記のいずれの遺伝子も含有しない空ベクターのみを導入した組換え株も同時に育種した、

(2) メタロミクスによる金属動態の解明として、野生株と組換え株の各細胞について培地中に含まれるナトリウム以外の金属(カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、マンガン)の細胞含量を誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析法により測定した。また、低含量のコバルトと銅に関しては黒鉛炉原子吸光分析法により、モリブデンに関しては両方の手法により定量を行った。野生株と組換え株について、酵素活性中心にモリブデンと鉄を配

位する、ニトロゲナーゼの合成が抑制された条件 N(+)と脱抑制された条件 N(-)にて培養を行い、細胞の各金属含量の比較を行った。野性株に関しては、淡水性の *Rps. palustris* の他に海水性の *Rvu. sulfidophilum* についても試験を行った。組換え株に関しては、転写調節因子 ModE の遺伝子全長、あるいはモリブデン結合ドメインである C 末端側ペプチドをコードする遺伝子領域、空ベクターをそれぞれ導入した淡水性の *Rps. palustris* 組換え株細胞の各金属含量の比較を行った。

(3) 導入した遺伝子が働いているか否かの確認と、培養条件として設定したニトロゲナーゼ抑制条件と脱抑制条件の検証のために、菌株から RNA を抽出し、逆転写 定量 PCR を行った。ModE のモリブデン結合ドメインである C 末端側ペプチドをコードする領域の一部と、ニトロゲナーゼの構造遺伝子の一つである *nifH* の一部を増幅し発現量の指標とした。また、16S rRNA の遺伝子領域の一部を増幅し、*modE* あるいは *nifH* の 16s rRNA に対する量比を求めることで発現量とした。

(4) 水相からの効率的なレアメタル回収法として、*Rvu. sulfidophilum* 細胞を凝集塊としてプランクトンネットで回収する省エネ型回収を試みた。また、その凝集性に関する細胞外高分子を明らかにするために、界面活性剤 0.1% (w/v) Tween 20 と 3% (w/v) NaCl を含む水溶液にて凝集塊を処理することで、細胞を懸濁状態とし凝集に関する細胞外高分子を溶解させた。溶解液について、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイドによる核酸染色、ドデシル硫酸ナトリウム ポリアクリリアミドゲル電気泳動と銀染色によるタンパク質染色、ならびに 3% (w/v) HCl 存在下、110、30 分間で得られた酸加水分解産物の薄相クロマトグラフィーによる分離とフェノール硫酸法による全糖の染色を行った。

4. 研究成果

(1) モリブデンは産業上重要なレアメタルであるだけでなく、生物学的に重要なニトロゲナーゼ等の働きを維持するためにも欠くことのできない元素である。ニトロゲナーゼは、大気中の窒素分子からアンモニアへの変換過程である窒素固定反応を触媒する酵素であり、根粒細菌やシアノバクテリアといった細菌においていくつかのサブタイプが報告されている。それらの中で最も普遍的に存在するタイプが、活性中心にモリブデンと鉄を配位するものである。光合成細菌はこのタイプのニトロゲナーゼを有しており、また光エネルギーを利用した増殖も可能である。

ニトロゲナーゼの遺伝子はアンモニア等の無機態窒素の存在しない条件下(N(-))で発現する。このため、N(-)条件と、5 mM の塩化アンモニウムを添加した N(+)条件でそれ

ぞれ培養して得られた細胞の乾燥重量当りの各金属含量を測定した(図2)。

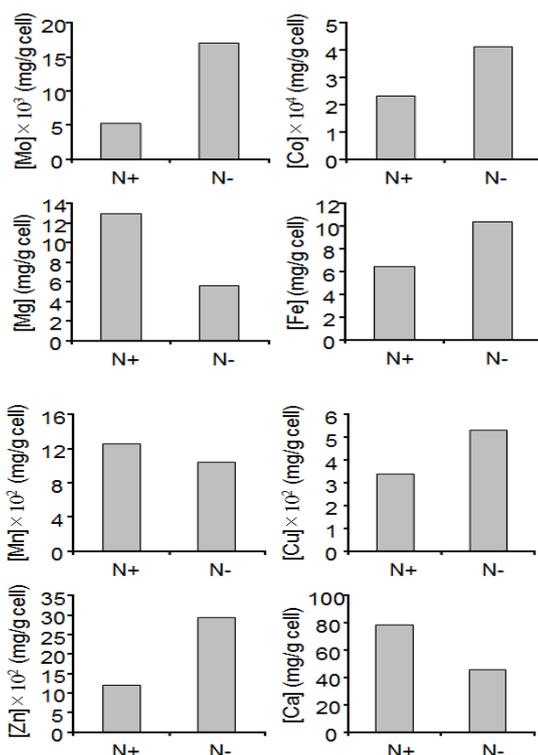


図2 アンモニア存在下(N+)と非存在下(N-)における光合成細菌野生株の金属含量

N(-)条件ではニトロゲナーゼの遺伝子発現が確認され、N(+)条件では遺伝子発現が認められなかったことから、N(-)条件でのみニトロゲナーゼタンパク質が生合成されていることが推察された。これらの条件で培養後に回収された細胞の金属含量を比較したところ、図2に示すように含量の比較的高いカルシウム、マグネシウムにおいては、活発な増殖が行われる N(+)条件下で高い値を示した。一方、含量が比較的低い元素においては、マンガン以外で N(-)条件での値が高くなった。特にモリブデンの増加が顕著であったことから、N(-)条件で培養を行うことで培地中のモリブデンの細胞内への取り込み量が増大することが示された。モリブデンと同様、ニトロゲナーゼの活性中心に配位する鉄でも N(-)条件で含量の増加が認められたが、鉄の含量がモリブデンの含量よりも桁違いに高いため、ニトロゲナーゼの生合成が鉄の含量増加に寄与する割合は少ないことが推察される。図2では、淡水性の光合成細菌を用いて金属濃縮を調べた結果を示したが、海水性の光合成細菌を用いて同様の試験を行った。その結果、含量が比較的高いカルシウムとマグネシウム、鉄においては N(+)条件下でより高い値を示した。一方、モリブデンと銅、亜鉛では N(-)条件での値が高くなった。これらの傾向は2つの異なる種で同様に認められており、培養における窒素源の有無で細胞にお

ける金属含量組成比が大きく変化することが明らかとなった。特に、無機態窒素を含まない、ニトロゲナーゼの脱抑制条件において、モリブデンを配位するタンパク質が生合成されたことにより、選択的にモリブデンの細胞含量が高くなることが示された。

(2) モリブデン応答性の転写調節因子 ModE の遺伝子全長、あるいはモリブデン結合ドメインであるC末端側ペプチドをコードする遺伝子領域をそれぞれ導入した光合成細菌組換え株において、モリブデン濃縮に及ぼす遺伝子導入の影響が、ニトロゲナーゼ脱抑制、抑制の状態変化でどのように変化するかを調べた。設定した実験条件の通りに遺伝子が働いているか否かを確認するために、各組換え株における遺伝子発現量を調べた(図3)。その結果、ニトロゲナーゼ脱抑制条件において全ての組換え株で *nifH* の発現量の増加が認められた。また、*modE* 遺伝子の発現は、遺伝子を導入した組換え株においてのみ認められ空ベクターを導入した組換え株においては認められなかった。これらの結果から、導入した遺伝子は機能しており、またニトロゲナーゼの遺伝子は脱抑制条件においてのみ働いていることが確認された。また、遺伝子導入により細胞の増殖はほとんど影響を受けなかったことから、遺伝子導入により細胞の収量が減少することはないと考えられる。

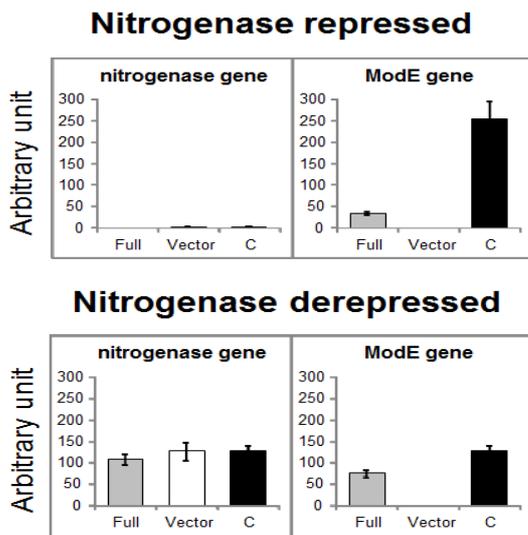


図3 遺伝子組換え株における遺伝子発現量

(3) 培地中に含まれる金属元素について遺伝子組換え株細胞の含有量を調べたところ、野生株で得られた結果と同様に、N(-)条件で培養を行うことでN(+)条件での培養と比較し顕著なモリブデン含量の増加が認められた(図4)。一方、導入する遺伝子の種類に関わらず遺伝子導入によりモリブデン含量の増加が認められたが、その効果はニトロゲナーゼ脱抑制条件下で培養したときに得られた効果と比較し限定的であった。遺伝子導入のモリブデン濃縮に対する効果がより顕著に

現れたのは、ニトロゲナーゼ脱抑制条件下においてであった。カルシウムや鉄、マグネシウムといった金属は、増殖が活発に行われるN(+)条件下において高含量化しており、N(-)条件下では比較的低い値であった。これらの元素に関しても、野生株を用いた試験と同様の傾向が認められたが、遺伝子導入がこれらの元素の濃縮に関しては促進的に働くことはなかった。

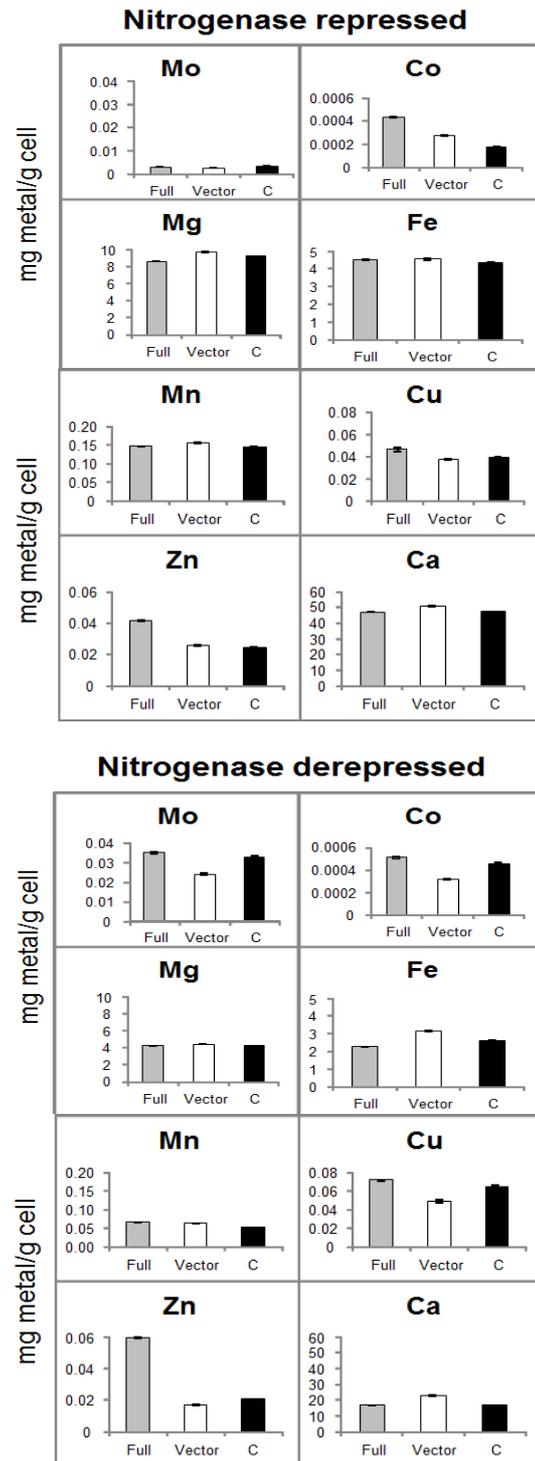


図4 アンモニア存在下(N+)と非存在下(N-)における光合成細菌組換え株の金属含量

コバルトと銅に関しても、*modE* の全長の遺伝子を導入することで濃縮が亢進したが、亜鉛において全長遺伝子の導入により最も著しい含量の増加が認められた。ModE は転写調節因子であるため、組換えタンパク質が生合成されることにより、亜鉛やコバルト、銅との親和性がある分子の生合成が増加したといった間接的な影響、あるいは生合成された ModE 自体の副次的な影響が考えられる。

これらの結果から、モリブデン結合タンパク質をコードする遺伝子の導入がモリブデン濃縮に及ぼす効果は、細胞内の状態によりその大きさが異なること、亜鉛等の他の金属濃縮も間接的に促進させること、モリブデンの選択的濃縮においてはニトロゲナーゼの脱抑制条件での培養が最も効果的であることが明らかとなった。

(4) 光合成細菌においてニトロゲナーゼの脱抑制条件である N(-)条件にて培養を行うことで、モリブデンの選択的濃縮能が高くなることが示された。光合成細菌は単細胞生物であるため、細胞と培地の固液分離を容易にするためにはモリブデンを濃縮した細胞の凝集塊を形成させる必要がある。

Rvu. sulfidophilum を、通常の 1/10 濃度である 0.05 mM の塩化アンモニウムを添加した N 制限培地で培養すると、効果的に凝集塊を形成させることが可能であった。懸濁状態の細胞のほとんどがプランクトンネットを通過してしまっただけに対して、凝集塊は容易に培地との分離が可能であった(図5)



図5 凝集細胞(左)と懸濁細胞のプランクトンネットによる濾過

形成された凝集塊は界面活性剤 0.1% (w/v) Tween 20 により懸濁状態へと分散させることが可能であった。この際に、遠心分離により得られた上清について、核酸とタンパク質の各々の電気泳動と染色を行ったところ、タンパク質のいくつかのバンドが確認されたが、核酸は検出されなかった。また、酸加水分解の結果、グルコースをモノマーとする多糖が上清に含まれていることも明らかとなった。懸濁細胞について同様の処理を行った際には、これらの物質は検出されなかったことから、細胞外に分泌されるタンパク質と多糖が凝集塊の形成に関与することが示唆された。

これらの結果から、*Rvu. sulfidophilum* の培養においては N 制限をかけることにより細胞

のモリブデン含量が高まると同時に、凝集塊の形成が促され培地からの細胞の分離が容易に行われることが示唆された。また、*Rvu. sulfidophilum* の細胞凝集を支える物質として細胞外に分泌されたタンパク質と多糖の関与が明らかにされた。

(5) 回収された光合成細菌細胞からの金属元素の精製法としては、液体としての水分がほとんど除かれていることから、細胞の灰化等の手法が考えられる。他方、モリブデンは植物体内の硝酸還元酵素の働きにも必要不可欠な元素であるため、モリブデンを高含量で集積した光合成細菌の細胞は、そのままの形で農地へのモリブデン供給のための生物資材としての利用が考えられる。今後は、光合成細菌細胞の効果的な凝集沈殿法を開発し、生物資材としての有効性を検証するといった課題が考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Maeda I, Sakurai H, Yoshida K, Siddiki MSR, Shimizu T, Fukami M, Ueda S, Monitoring of environmental arsenic by cultures of the photosynthetic bacterial sensor illuminated with a near-infrared light emitting diode array. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 査読有, Vol. 21, 2011, 1306-1311

DOI: 10.4014/jmb.1105.05017

Siddiki M S R, Ueda S, Maeda I, Fluorescent bioassays for toxic metals in milk and yoghurt. *BMC Biotechnol.*, 査読有, Vol. 12, 2012, 76 (10 pages)

DOI: 10.1186/1472-6750-12-76

Siddiki M S R, Shimoaoki S, Ueda S, Maeda I, Thermoresponsive magnetic nano-biosensors for rapid measurements of inorganic arsenic and cadmium. *Sensors*, 査読有, Vol. 12, 2012, 14041-14052

DOI: 10.3390/s121014041

Maeda I, Inaba A, Koike H, Yoneyama K, Ueda S, Yoshida K, Acyclic carotenoid and cyclic apocarotenoid cleavage by an orthologue of lignostilbene- α,β -dioxygenase in *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Biochem.*, 査読有, Vol. 154, 2013, 449-454

DOI: 10.1093/jb/mvt075.

[学会発表](計5件)

前田 勇 他, 紅色非硫黄細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* の凝集に関与する細胞外マトリックスの解明, 第64回日本生物工学会大会, 2012年10月23日~2012年10月26日, 兵庫県神戸市

前田 勇 他, 無機ヒ素とカドミウムの迅速検出のための熱応答性磁性ナノバイオセンサー, 第64回日本生物工学会大会, 2012年10月23日~2012年10月26日

日, 兵庫県神戸市
渡辺昌規 他, 茹で麵排水成分への各種
酵素添加による凝集・沈降性付与と静電
的特性との関連, 第 64 回日本生物工学会
大会, 2012 年 10 月 23 日 ~ 2012 年 10 月 26
日, 兵庫県神戸市

Maeda I, Naito T, Sachuronggui,
Bioconcentration of molybdenum and
hydrogen production by photosynthetic
bacteria. AsiaSense 2013, 2013 年 8 月 27 日
~ 2013 年 8 月 29 日, Melaka, Malaysia

薩初栄貴, 内藤多希, 前田 勇, 光合成細
菌の生細胞を利用したモリブデンの濃縮
に関する研究, 日本農芸化学会関東支部
2013 年度大会, 2013 年 11 月 22 日, 神奈川
県横浜市

〔図書〕(計 2 件)

前田 勇, 宮坂 均 他, 成山堂書店, 地
球を救うメタルバイオテクノロジー 微
生物と金属資源のはなし, 2014, 230

前田 勇 他, 技術情報協会, バイオセ
ンサの先端科学技術と新製品への応用開
発, 2014, 534

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 勇 (MAEDA, Isamu)
宇都宮大学・農学部・准教授
研究者番号: 1 0 2 5 2 7 0 1

(2) 研究分担者

渡辺 昌規 (WATANABE, Masanori)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号: 2 0 3 2 0 0 2 0

高橋 美智子 (TAKAHASHI, Michiko)
宇都宮大学・農学部・准教授
研究者番号: 9 0 3 4 5 1 8 2