

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420838

研究課題名(和文)レアメタル代謝細菌における生物気化能の解析

研究課題名(英文) Investigation of bio-volatilization in rare metal metabolizing bacterium

研究代表者

山下 光雄 (Yamashita, Mitsuo)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：40220347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：セレン気化能を有する *Pseudomonas stutzeri* NT-1株を用い、セレン気化物を特定したところジメチルジセレニド(DMDSe)であった。NT-1株のDMDSe合成最適培養条件を38度、pH9.0、攪拌速度250rpm、通気量3L/minと決定した。最大合成速度は37.8 $\mu\text{mol/h}\cdot\text{L}$ だった。NT-1株は生物気化を利用したSe気化回収に適していると思われる。

NT-1株のゲノムDNAを解析し、DMDSe合成酵素の遺伝子(*disA*)をクローニングした。DMDSe合成遺伝子組換え大腸菌は亜セレン酸やバイオセレンからDMDSeを合成した。*disA*は新規なDMDS合成遺伝子である。

研究成果の概要(英文)： *Pseudomonas stutzeri* strain NT-1 reduce selenate, selenite, and biogenic elemental selenium into volatilized selenium (Se), which was determined as dimethyldiselenide (DMDSe) by Gas Chromatograph Mass Spectrometer. The maximal culture conditions were 38 °C, pH 9.0, agitation speed 250rpm, aeration rate 3L/min for DMDSe synthesis, the speed of which was 37.8 $\mu\text{mol/h}\cdot\text{L}$. The DMDSe synthesis rate is fastest among previous reports, demonstrating that strain NT-1 is a promising biocatalyst for Se recovery.

From the genome analysis in strain NT-1, the *disA* gene coding for DMDSe synthesis enzyme was cloned into a TA cloning vector. The recombinant *Escherichia coli* carrying *disA* gene produced DMDSe from selenite, and biogenic elemental selenium. Therefore, we discovered the *disA* as DMDSe synthesis gene.

研究分野：工学

キーワード：レアメタル セレン 生物気化 メカニズム

1. 研究開始当初の背景

近年の先端科学産業では多様なレアメタルが利用されており、産業のビタミン剤と呼ばれるほど、製品製造において、必須の金属材料となっている¹⁾。一方、レアメタルはその名の示す通り、地殻中の存在量が比較的少なく、ほとんどの元素がベースメタルの鉱石に微量に含まれた状態で存在していることから、採掘や精錬、分離精製が技術的に困難であり、資源としての枯渇が懸念されている。さらに、ほとんどのレアメタルは中国、アフリカ、ロシア、南北アメリカなどの特定の国に偏在しており、世界各国で資源の自国内への囲い込みの動きも出てきていることから、世界でも有数の各種レアメタル消費大国である我が国において、その安定供給に向けた対策が必要とされている。持続的な資源利用を行うためには、排水や廃棄物からもレアメタルを回収することのできる、実用的な効率と経済性の高い技術開発が望まれている。

以前より申請者は、比較的低濃度で多様な物質と混在して存在している排水や廃棄物からのレアメタル回収を可能とする技術として、特殊微生物の金属代謝作用を活用するメタルバイオテクノロジーを提案している。それは、生物のもつ選択性の高いレアメタル代謝機能を利用することで、排水や廃棄物からの経済性の高い新たな回収技術になり得るものと思われる。さらに、この技術は、他には未だ検討されていない微生物で資源を「回収する」という独創的な手法となりえる。

排水や廃棄物中のレアメタルは毒性物質としても注目されており、レアメタル汚染という新たな環境汚染が懸念されている。本技術は、微生物を活用して排水・廃棄物からの浄化処理技術を兼ねるものであり、資源回収と環境浄化という二重に利益が得られる技術として、低コストで循環型社会形成の構築に大いに寄与するものである。

2. 研究の目的

本研究は、生物気化能(バイオボラリゼーション)を利用して、現状では回収されていない排水や廃棄物中のセレン(Se)を回収する技術開発を最終的に目指すものである。本研究内ではメチル化セレン合成の最適化培養条件を求め、合成に関わる因子や酵素遺伝子の特定を目標にして研究を推進する。培養工学と遺伝子工学的試験により具体的な目標を以下に示す。

(1) 培養工学的試験

すでに液相・固相のSeをメチル化し気化できることを明らかにしている *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株のDMDSe合成メカニズムや培養特性の検討を行う。DMDSeを合成するのに最適な培養条件の検討や、気化反応に影

響を及ぼす培地条件、促進因子や阻害因子の特定を行う。

(2) 遺伝子工学的試験

期間内に気化関与遺伝子の機能解析を行うために、*P. stutzeri* NT-I 株の宿主ベクター系の開発、形質転換系の構築を行う。さらにSe気化に関与する遺伝子を特定し、機能解析を行う。その結果に基づき気化Seの回収効率の向上に応用するためのデータの蓄積を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養工学的試験

DMDSe合成の培養方法

実験に使用するバイオセレンは既報¹⁾に基づいて調製した。

Se気化回収バイオリアクターの概要を図1に示す。5L容量のジャーファーマンターに3LのTSB培地を分注し、オートクレーブを行った。そこにOD600=1.0に調製したNT-I株の懸濁液を30mL添加し、38℃、pH9.0、攪拌速度250rpm、通気量1L/minの条件で12時間培養を行った。基質特異性を試験する場合は、培養開始から12時間後にセレン終濃度0.5mMとなるように赤色バイオセレンもしくは黒色バイオセレン、市販の結晶元素態セレンを添加し同条件で培養を続けた。促進因子や阻害因子を試験する場合は、0.5mM赤色バイオセレンと各因子を添加した。DMDSe合成最適培養条件を試験する場合は、0.5mM赤色バイオセレンを添加したと同時に、培養条件を変更した。

生成されたメチル化セレン(DMDSe)はリアクターの排気口に接続した気化回収槽中の硝酸によって捕集した。経時的にサンプリングを行い、DMDSe合成速度($\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$)を算出した。各培養条件での合成最大速度の値からDMDSe合成最適条件を決定した。

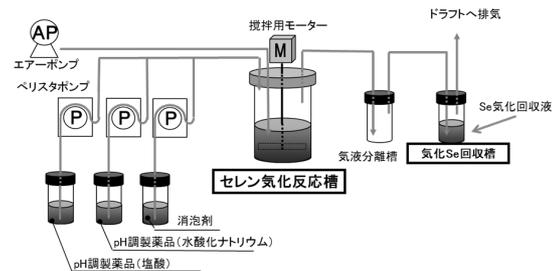


図1 セレン気化回収バイオリアクター

(2) 遺伝子工学的試験

NT-I株のゲノムDNAに存在するセレンメチル化候補遺伝子の探索

NT-I株のゲノム情報から、データベース検索や論文検索によって金属メチル化に関する遺伝子DNA配列を調べた。

セレンメチル化候補遺伝子のクローニングと組換え大腸菌の構築

NT-I株のゲノム中に存在するセレンメチル化候補遺伝子DNAを増幅するPCRプライマ

ーを設計し、増幅を行った。増幅 DNA を TA ベクターに組み込み、大腸菌を形質転換した。50mL の TSB 培地に組換え大腸菌を植菌し、0.5mM 亜セレン酸または赤色バイオセレンを添加し 37、120rpm で培養した。

(3) セレン定量定性分析²⁾

経時的にサンプリングした培養液をサンプル原液とし、ICP-AES により定量した。フラスコの気相は GC-MS により定量した。

4. 研究成果

(1) 培養工学的試験

DMDSe 合成基質の特異性

NT-I 株のセレンメチル化の基質特性を調べるために赤色バイオセレン、黒色バイオセレン、市販元素態セレンを用いて DMDSe 合成最大速度を算出した。DMDSe 合成最大速度は非晶質の元素態セレンである赤色バイオセレンは $28\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$ 、結晶の元素態セレンである黒色バイオセレンは $9.6\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$ と算出された。一方、市販の元素態セレンを NT-I 株培養液に添加してもメチル化セレンは合成されなかった。

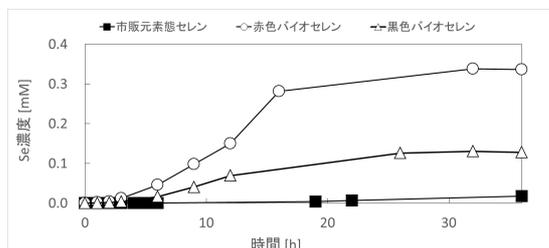


図2 各基質のセレン酸化回収槽中 (DMDSe) のセレン濃度 (○: 赤色バイオセレン、△: 黒色バイオセレン、■: 市販元素態セレン)

DMDSe 合成促進・阻害因子の探索

セレン酸化促進・阻害因子を調べるために赤色バイオセレンとアミノ酸やビタミン類を添加して DMDSe 合成速度を算出した。この実験では培養液中の物質の影響を除くために Tris-HCl 緩衝液 (pH9.0) を用いて実験を行い、さらに算出した DMDSe 合成速度を濁度 (OD600) 値で除して比較した。

TSB 培地を用いた場合、DMDSe 合成速度は $9.9\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}\cdot\text{OD600}$ であった。次に Tris-HCl 緩衝液 (pH9.0) を用いた場合、 $0.13\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}\cdot\text{OD600}$ であった。TSB 培地に含まれるアミノ酸やビタミン類が DMDSe 合成を促進していると示唆されたので、アミノ酸やビタミン類を添加して DMDSe 合成促進因子を探索した。メチオニンを追加すると約 10 倍、メチルコバラミンを追加すると 1.7 倍向上した。NT-I 株のセレン酸化反応は元素態セレンから DMDSe を合成する反応である。そのため添加したメチオニンやメチルコバラミンは元素態セレンにメチル基供与する反応を促進し、DMDSe 合成速度を増大したと思われる。シアノコバラミンを追加すると DMDSe 合成速度は減少した。シアノコバラ

ミンはメチルコバラミンのメチル基がシアノ基に置換した化合物である。DMDSe 合成に使用されるメチル基をシアノコバラミンと競合し DMDSe 合成速度が減少したと思われる。

DMDSe 合成最適条件の検討

NT-I 株の DMDSe 合成最適培養条件を調べるために種々の培養条件 (温度、pH、攪拌速度、通気量) を変更した。その結果、DMDSe 合成速度の最適培養条件は培養温度 38 度、pH9.0、攪拌速度 250rpm、通気量 3L/min と決定した。培養最適条件での DMDSe 合成速度は $37.8\mu\text{mol/h}\cdot\text{L}$ と算出できた。さらに通気量の変化した結果から、通気 (酸素) なしでは DMDSe の合成が阻害されているが、通気量を増大するにつれて DMDSe 合成最大速度が大きくなる傾向があった。これは通気が DMDSe 生合成反応に重要な因子であることを示唆している。

表1 微生物のセレン酸化速度

Bacteria	Substrate			Author・Year
	Selenate(VI)	Selenite(IV)	Elemental Selenium(0)	
<i>P.stutzeri</i> NT-I	14	22	38	Otsuka・2015
<i>Corynebacterium</i> sp.	—	—	2.0	Doran・1977
<i>Penicillium</i> sp.	—	0.8	—	Fleming・1972
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	0.05	—	—	Stalder・1997

既報の微生物の DMDSe 合成速度を示す (表1)。NT-I 株の合成速度 ($14\sim38\mu\text{mol/h}\cdot\text{L}$) は、これまでの微生物の合成速度 ($0.05\sim2\mu\text{mol/h}\cdot\text{L}$) の中で、基質に関係なく最速であることが明らかになった。NT-I 株は生物酸化を利用した Se 酸化回収に適している。

(2) 遺伝子工学的試験

NT-I 株における宿主ベクター系が確立できていないので、エレクトロポレーション法形質転換を試みたが、ルス電圧等を可変しても有効な形質転換体を得ることができなかった。次にトランスポゾンによるセレン酸化能変異株の取得を試みたが、目標とする酸化能変異株の取得には至らなかった。

NT-I 株のゲノム DNA 中にあるセレンメチル化候補遺伝子の特定

DMDSe 合成遺伝子を特定するために、*Pseudomonas stutzeri* の基準株でありゲノム情報が公開されている A1501 との比較ゲノム解析を行い、NT-I 株に特徴的な 43 箇所を見つけた。Thiopurine methyltransferase をコードする酵素遺伝子 *tpm* や Ubiquinone/enaquinone biosynthesis C-methyltransferase をコードする酵素遺伝子 *ubiE* と高い相同性のある遺伝子を見つけた。

さらに demethylmenaquinone に SAM 由来のメチル基を転移して menaquinone を合成する酵

素 Demethylmenaquinone methyltransferase 遺伝子 *menG* や 3-demethylubiquinone-9 に SAM 由来のメチル基を転移して ubiquinone-9 を合成する酵素 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase 遺伝子 *ubiG* と高い相同性のある遺伝子を発見した。以上の結果より、*tpm* と *ubiE* と *menG* と *ubiG* の 4 つの遺伝子を NT-I 株の DMDSe 合成遺伝子の候補とした。これら 4 つの遺伝子 DNA の PCR 増幅を行った。得られた PCR 増幅産物 DNA を TA vector に挿入し、*E. coli* DH5 α 株に形質転換し、組換え大腸菌を構築した。

組換え大腸菌の特性解析

組換え大腸菌がメチル化セレンを合成するか調べるためにバイオセレンを基質として培養実験をした。気相を GC-MS 分析した結果を示す (図 3)。

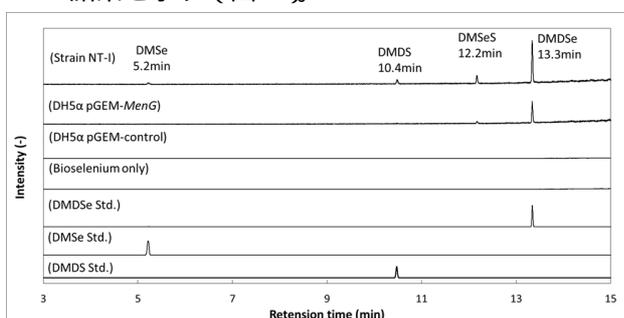


図 3 バイオセレンを基質とした組換え大腸菌の気相 GC-MS スペクトル

NT-I 株の場合はバイオセレンを添加すると主に DMDSe、少量の Dimethyl selenide (DMSe), Dimethyldisulfide (DMDS), Dimethyl selenylsulfide (DMSeS) が気相から検出された。*menG* を導入した大腸菌 DH5 α (pGEM-MemG) の気相から DMDSe を表すピークが検出された。他の候補遺伝子を導入した大腸菌や候補遺伝子を導入しない pGEM-T easy vector のみを持つ大腸菌 DH5 α (pGEM) の気相には何も検出されなかった。

さらに基質を亜セレン酸に変更して同様の実験を行った。気相を GC-MS 分析した結果を図 4 に示す。NT-I 株の場合は亜セレン酸からも主に DMDSe、少量の Dimethyl selenide (DMSe), Dimethyldisulfide (DMDS), Dimethyl selenylsulfide (DMSeS) が気相から検出された。バイオセレンを添加した際と同様に、*menG* を導入した大腸菌 DH5 α (pGEM-MemG) の気相から DMDSe を検出した。他の候補遺伝子を導入した大腸菌や大腸菌 DH5 α (pGEM) の気相には何も検出されなかった。

以上の結果から NT-I 株由来の Demethylmenaquinone methyltransferase 遺伝子 *menG* を導入した大腸菌 DH5 α (pGEM-MemG) は DMDSe 合成に関与している遺伝子だと示唆された。

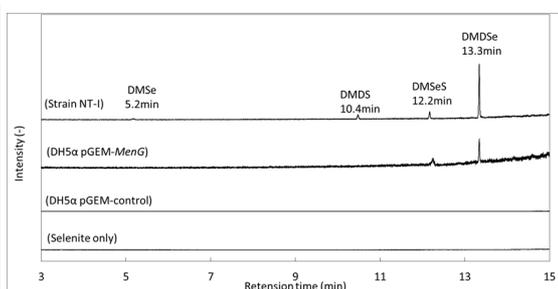


図 4 亜セレン酸を基質とした組換え大腸菌の気相 GC-MS スペクトル

セレンメチル化に関与する遺伝子として DMDSe 合成に関与する遺伝子は報告があるが、DMDSe 合成に関与する遺伝子の報告は調べた限り見当たらない。そこで本遺伝子を DMDSe 合成酵素をコードする新たな遺伝子 (*disA*) として命名した。DMDSe 合成経路はまだ未知な部分が多いため、NT-I 株由来の *disA* は、DMDSe 合成経路の解明に大きく寄与する発見だと思われる。大腸菌 DH5 α (pGEM-MemG) では NT-I 株とは異なり硫黄化合物である Dimethyl disulfide (DMDS) を気相に検出していない。この組換え大腸菌を Se 酸化回収試験に用いると、高純度な Se を酸化回収できることが期待される。

<引用文献>

- 1) 山下光雄、清和成編集、地球を救うメタルバイオテクノロジー、成山堂、2014 年。
- 2) 大塚治、築場豊、吉川健、山下光雄、酸化焙焼によるバイオセレンからのセレン分離の検討、日本金属学会誌、79 (6)、330-337、(2015)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

S. Soda, A. Hasegawa, M. Kuroda, A. Hanada, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike.: Selenium recovery from kiln powder of cement manufacturing by chemical leaching and bioreduction. *Water Science and Technology*, 査読有, 72(8), 1294-1300, (2015). doi: 10.2166/wst.2015.339

大塚治、築場豊、吉川健、山下光雄、酸化焙焼によるバイオセレンからのセレン分離の検討、日本金属学会誌、査読有, 79 (6)、330-337、(2015)。

<http://doi.org/10.2320/jinstmet.J2015008>

M. Kuroda, H. Ayano, K. Sei, M. Yamashita, and M. Ike.: Draft Genome Sequence of *Bacillus selenatarsenatis* SF-1^T, a promising agent for bioremediation of environments contaminated with selenium and arsenic. *Genome Announc.*, 査読有, 3(1), 1-2, 2015.

doi: 10.1128/genomeA.01466-14.

山下光雄、大塚治、セレン酸還元細菌 NT-I 株を用いた廃水からのセレン回収、水環境学会誌、査読無、37 巻、2 号、66-70、(2014)。
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40019974942>

T. Kagami, T. Narita, M. Kuroda, E. Notaguchi, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, and M. Ike.: Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Research*, 査読有, 47, 1361-1368, (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.001>

〔学会発表〕(計2件)

大塚治、黒田真史、池道彦、山下光雄、*Pseudomonas stutzeri* NT-I株のジメチルジセレニドDimethyl diselenide合成速度促進因子の探索、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

山下光雄、微生物培養による廃水や廃棄物からのレアメタル回収技術、2015年度日本生物工学会大会、2015年10月28日、城山観光ホテル(鹿児島・鹿児島市)

O. Otsuka, M. Kuroda, S. Soda, M. Ike, and M. Yamashita, Selenium recovery from simulated wastewater using selenium reducing bacteria *Pseudomonas stutzeri* NT-I, 7th International Seminar on Process Hydrometallurgy, July/22/2015, Antofagasta (Chile).

大塚治、築場豊、吉川健、山下光雄、セレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を用いた模擬廃水からのセレン再資源化、廃棄物資源循環学会 2014 年度春の研究発表会、2015 年 5 月 28 日、川崎市産業振興会館(神奈川県・川崎市)

S. Soda, A. Hasegawa, M. Kuroda, A. Hanada, M. Yamashita, M. Ike, Selenium recovery from kiln powder as by-product of cement manufacturing by using chemical leaching and bacterial reduction, The International water association World Water Congress & Exhibition, September /26/2014, Lisbon (Portugal)

M. Ike, T. Narita, M. Kuroda, S. Soda, M. Yamashita, Recovery of selenium in wastewater through biovolatilization by using *Pseudomonas stutzeri* NT-I. The International water association World Water Congress & Exhibition, September/26/2014, Lisbon (Portugal)

大塚治、山下光雄、循環型社会を目指した実廃水・実廃棄物からのレアメタル回収技術、エコデザインプロダクト&サービスシンポジウム、2014年7月30日、東京大学本郷キャンパス内山上会館(東京都・文京区)

大塚治、黒田真史、池道彦、山下光雄、微生物を用いた廃水からのセレン酸化回収技術の検討、廃棄物資源循環学会 2014 年度春の研究発表会、2014 年 5 月 29 日、川崎市産業振興会館(神奈川県・川崎市)

大塚治、成田尚宣、黒田真史、池道彦、山下光雄 *Pseudomonas stutzeri* NT-Iのジメチルジセレニド合成能の特徴、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月30日、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

樋口靖典、成田尚宣、黒田真史、惣田訓、山下光雄、池道彦、ジャーファーマンターを用いた *Pseudomonas stutzeri* NT-I によるセレンオキソアニオン還元特性の検討、第50回日本水処理生物学会、2013年11月15日、神戸市水道局たちばな職員研究センター(兵庫県・神戸市)

M. Kuroda, E. Miwa, K. Sei, S. Soda, M. Yamashita, and M. Ike, Analyses of selenate reduction mechanism in *Pseudomonas stutzeri* NT-I, the promising biocatalyst for selenium-removal and -recovery from contaminated water, IWA Metals 2013, November/9/2013, Shanghai (China)

〔図書〕(計3件)

山下光雄、大塚治、(株)シーエムシー出版、バイオベース資源確保戦略「セレン等の揮発化回収」小西康裕編集、2015年、p.281 (p.116-124)

山下光雄、清和成、成山堂書店、地球を救うメタルバイオテクノロジー「メタルバイオテクノロジー」、山下光雄、清和成編集、2014年、p.242 (p.5-12)

成田尚宣、山下光雄、成山堂書店、応用微生物学「微生物によるレアメタルの特異的回収技術」、小柳津広志、倉橋みどり編集、2013年、p.190 (p.121-132)

〔産業財産権〕

出願状況(計13件)

名称：タンパク質、核酸、組み換えベクター、形質転換体、及びジメチルジセレニドの製造方法、発明者：山下光雄、出願人：芝浦工業大学、種類：特許、出願番号：特願2015-243298、出願日：平成27年12月14日、国内外別：国内

名称：希土類元素を溶出させる能力を有する微生物、希土類元素の溶出方法、希土類元素を固化する能力を有する微生物及び希土類元素の固化方法、発明者：山下光雄、出願人：芝浦工業大学、種類：特許、出願番号：PCT/JP2014/061818 出願日：平成27年10月30日、国内外別：国外

名称：放射性核種を固化する能力を有する好塩菌、発明者：山下光雄、出願人：芝浦工業大学、種類：特許、出願番号：特願2015-133419号 出願日：平成27年7月2日、国内外別：国内

名称：新規セレン還元微生物及び該微生物を使用したセレン処理方法、発明者：山下光雄、三浦彰、出願人：J X 日鉱日石金属株式会社、種類：特許、出願番号：特願2014-131926、出願日：平成26年12月24日、国内外別：国内

名称：希土類元素を固化する能力を有する微生物及び希土類元素の固化する方法、発明者：山下光雄、出願人：芝浦工業大学、種類：特許、出願番号：特願2013-096423、出願日：平成25年5月1日、国内外別：国内

名称：希土類元素を溶出させる能力を有する微生物及び希土類元素の溶出方法、発明者：山下光雄、出願人：芝浦工業大学、種類：特許、出願番号：特願2013-096422、出願日：平成25年5月1日、国内外別：国内

〔その他〕

芝浦工業大学工学部応用化学科生命化学研究室ホームページアドレス

<http://www.ch.shibaura-it.ac.jp/yamashitalab/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

山下光雄 (YAMASHITA Mitsuo)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：40220347

(2)研究協力者

大塚治 (OTSUKA Osamu)