

令和元年6月11日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12619

研究課題名(和文) 真菌の高反応酵素による層状マンガン酸化物生産とレアメタル回収等環境資源技術の開拓

研究課題名(英文) Production of phyllo-manganates by a fungal highly-reactive enzyme and environmental biotechnological application including rare metals recovery

研究代表者

宮田 直幸 (MIYATA, Naoyuki)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20285191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：真菌 *Acremonium strictum* KR21-2株より、マンガン酸化酵素遺伝子をクローニングし、*Pichia pastoris*の組換えタンパク質発現系を利用して異種発現することに成功した。酵素のマンガン酸化反応過程を解析した結果、反応初期にナノ粒子の生成が観察され、その後2.5～3マイクロメートルまで粒子サイズが増大した。粒子成長の過程で、亜鉛等の金属イオンがマンガンに対するモル比で30%程度取込まれたことから、マンガン酸化酵素反応系を用いて微量金属回収が可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中でのマンガン循環を解明するため、微生物のマンガン酸化機構が国内外で研究されている。また、微生物が作るマンガン酸化物は優れた反応特性をもち、環境・資源技術への応用が期待されている。細菌のマンガン酸化酵素を同様に解析した事例はあるが、真菌ではなく、本研究により新規性が高く、学術的に意義ある成果が得られた。さらにマンガン酸化酵素を利用した金属除去回収技術の有効性が示され、社会的意義も大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：The manganese(II) oxidase gene was cloned from *Acremonium strictum* KR21-2 and expressed heterologously in a *Pichia pastoris* recombinant production system. The recombinant protein oxidized manganese(II) to manganese oxides, which initially appeared as nano-sized particles and then grew to larger particles with 2.5- to 3-micrometer sizes. During the manganese oxide formation, metal cations such as zinc was incorporated into the particles, whose molar ratio to manganese reached about 30%. The result suggests that the enzymatic manganese oxidation system serves as useful tool for removal and recovery of trace metal ions from water.

研究分野：環境生物学

キーワード：マンガン酸化菌 真菌 マンガン酸化酵素 金属回収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌及び真菌が生成する層状マンガ氧化物鉱物は表面積が大きく (~500 m²/g) 結晶中の格子欠陥により負電荷を高密度で保持する。このため反応性が高く、排水中の重金属やレアメタルの高性能吸着剤、ヒ素等無機化合物や難分解性有機物の酸化剤、酸化触媒やリチウム電池等、先進材料への適用が鋭意検討されている。しかし、微生物の酵素がマンガ氧化物の微結晶をどのように作り出すか、生成機構は未解明である。微生物菌体から酵素遺伝子をクローニングして酵素を大量生産できれば、氧化物生成過程の全容を解明でき、更には酵素反応によるマンガ氧化物の高効率生産系を確立できる(図1)。

(2) 細菌では、2013年に初めて *Bacillus* 属でマンガ酸化酵素遺伝子がクローニングされた。組換え大腸菌で調製した酵素を用いて、2ステップの酸化反応機構[Mn(II)→Mn(III)→Mn(IV)氧化物]が提唱されている。しかし細菌の酵素は「低反応性」と推察される。即ち、1 mM と高濃度の Mn(II)を加えると未反応の Mn(II)が多く残存して干渉するため、層状氧化物が生成しないとの報告がある。上記の研究目的を鑑みると、高濃度 Mn(II)を高速で層状マンガ氧化物に変換できる「高反応性」酵素を取得する必要がある。

(3) 研究代表者が河川床から分離した真菌 *Acremonium strictum* KR21-2 株は高速 (3.7 mM/日) で層状マンガ氧化物を生成する。また、真菌では世界に先駆けてマンガ酸化酵素 (マルチ銅オキシダーゼ) の精製に成功した。更に、生成したマンガ氧化物には活性を維持した酵素が保持され、マンガ氧化物の微結晶を高速かつ連続的に成長させながらレアメタル等金属イオンを取込むことが見出されている。このような結果は細菌では報告されておらず、真菌 KR21-2 株の酵素は細菌と比較して高い反応性を持つといえる。以上の成果から、KR21-2 株の酵素遺伝子をクローニングし大量調製できれば、酵素反応により層状マンガ氧化物を高効率生産できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、真菌 *Acremonium strictum* KR21-2 株のマンガ酸化酵素遺伝子をクローニングし、酵母を用いた大量発現系を構築すること、得られたマンガ酸化酵素を用いてマンガ酸化過程を明らかにすること、並びに酵素反応系により微量金属の除去回収が可能であるか明らかにすることを目的とする。

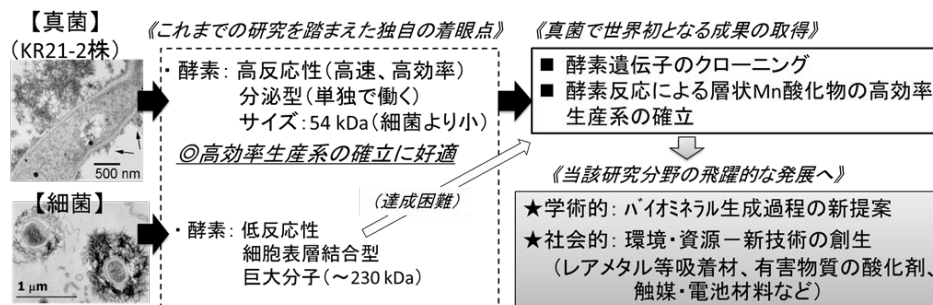


図1 研究の背景と目的

3. 研究の方法

(1) 供試菌株と培養方法: *Acremonium strictum* KR21-2 株を用いた。1 mM Mn(II)を含む有機栄養培地 (pH 7.0) に KR21-2 株を植種し、25 °C で振盪培養した。培養液上清のマンガ酸化酵素 (以下、MCO) 活性はロイコベルリンブルー試薬を用いて比色法で測定した。

(2) MCO 遺伝子の解析法 (図2)

次世代シーケンサーillumina MiSeq で KR21-2 株の全ゲノムを解析した。

MCO を発現している培養菌体から全 RNA を抽出後、RT-PCR により mRNA の cDNA を合成した。MCO 遺伝子領域を増幅するためのプライマーセットを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物から TA-クローニングによってクローニングライブラリーを作製した。

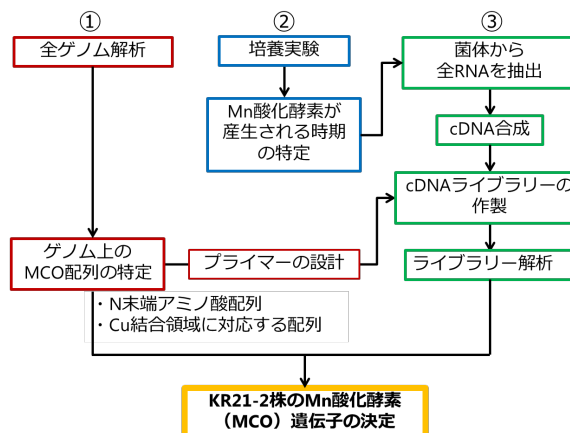


図2 MCO 遺伝子解析のアプローチ

(3) MCO 発現系の構築： 酵母 *Pichia pastoris* の組換えタンパク質発現系 (Invitrogen) を用いた。取得した cDNA 配列をプラスミドベクター-pPICZαA の分泌シグナル配列下流に挿入し線状化した後、*Pichia* X-33 株に導入して組換え体を作製した。MCO 発現株の選抜は、1 mM Mn(II) と 0.05 mM Cu(II) を添加した平板培地で行った。

(4) マンガン酸化反応の解析： 精製酵素 (組換え体) Mn(II) 及び HEPES 緩衝液 (pH 7.0) を含む混合液で 30 にて酵素反応を行った。反応途中におけるナノ粒子の生成は nanoSAQLA (大塚電子) を用いた動的光散乱法でモニタリングした。また、超高分解能走査型電子顕微鏡 SU8000 (日立ハイテクノロジーズ) 及びエネルギー分散型 X 線検出器を用いて観察した。反応液上清中の金属イオンは ICP 発光分光分析法により定量した。

4. 研究成果

(1) MCO 遺伝子配列の決定： ゲノム解析の結果、KR21-2 株 MCO の N 末端アミノ酸配列に対応する塩基配列を有する遺伝子配列を含むコンティグが得られた。一方で、MCO 活性を発現している培養菌体の mRNA から調製した cDNA クローンライブラリーを解析した結果、目的とする MCO 配列を保有するクローンが得られた。このクローン配列と先のゲノム配列の比較により、3 つのイントロン領域を特定するとともに、アミノ酸 614 残基から成るポリペプチド鎖をコードする遺伝子配列を決定することができた。この配列内には銅結合領域 (タイプ I~III) が見出され (図 3)、真菌のビリルビンオキシダーゼの一群と高い相同性を持つことが明らかになった (図 4)。

93	S	V	H	L	H	G	S	133	W	Y	H	D	H	A	M	398	H	P	I	H	V	L	V	452	M	F	H	C	H	N	L	I	H	E	D	Q	D	M	M	
Vd_BO	S	V	H	L	H	G	S	Vd_BO	W	Y	H	D	H	A	I	Vd_BO	H	P	I	H	I	H	L	V	Vd_BO	M	F	H	C	H	N	L	I	H	E	D	H	E	M	M
Nd_BO	S	V	H	L	H	G	S	Nd_BO	W	Y	H	D	H	A	M	Nd_BO	H	P	I	H	V	H	L	V	Nd_BO	M	F	H	C	H	N	L	I	H	E	D	S	D	M	M
Mo_BO	S	V	H	L	H	G	S	Mo_BO	W	Y	H	D	H	A	V	Mo_BO	H	P	I	H	I	H	L	I	Mo_BO	M	F	H	C	H	N	L	I	H	E	D	H	D	M	M
Bp_CotA	V	V	H	L	H	G	G	Bp_CotA	W	Y	H	D	H	A	M	Bp_CotA	H	P	I	H	L	H	L	V	Bp_CotA	V	W	H	C	H	I	L	E	H	E	D	Y	D	M	M
Cl_Lac	S	I	H	W	H	G	G	Cl_Lac	W	Y	H	S	H	F	S	Cl_Lac	H	P	I	H	L	H	G	H	Cl_Lac	L	M	H	C	H	I	A	W	H	V	S	M	G	L	S
Cs_AO	V	I	H	W	H	G	I	Cs_AO	F	Y	H	G	H	L	G	Cs_AO	H	P	W	H	L	H	G	H	Cs_AO	A	F	H	C	H	I	E	P	H	L	H	M	G	M	

図 3 KR21-2 株の MCO (最上段の配列) において推定される銅結合領域

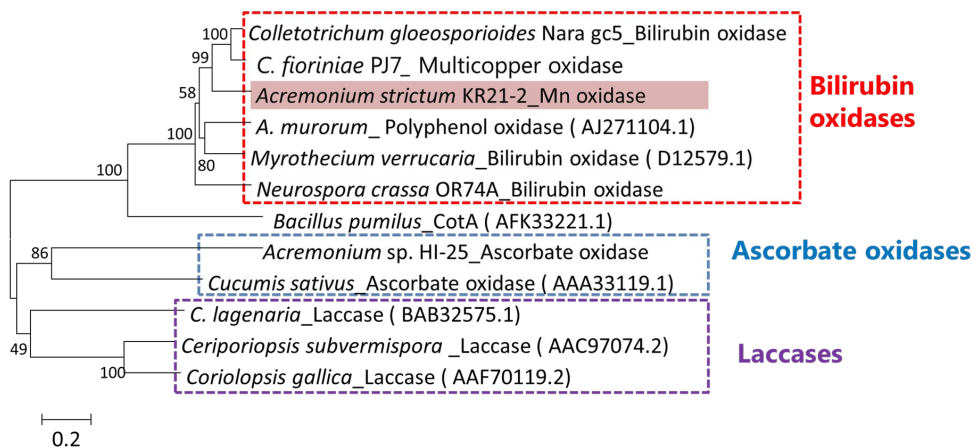


図 4 KR21-2 株の MCO とその類縁酵素の分子系統樹 (アミノ酸配列を近隣結合法で解析)

(2) MCO 発現系の構築： MCO 遺伝子を挿入したベクターで形質転換した *Pichia* 酵母を Mn(II) 含有培地で選抜した結果、マンガン酸化活性を賦与された株を得ることができた。この組換え体を液体培養し、培養液上清を SDS-PAGE で分析したところ、マンガン酸化活性を有する目的タンパク質の産生が確認された (図 5)。本株に挿入された遺伝子配列を決定した結果、KR21-2 株の MCO 遺伝子由来であることが確かめられた。

培養液上清を濃縮後、HPLC システム (Superdex 200 カラム及び Mono Q カラム) を用いて発現タンパク質を電気泳動的に均一になるまで精製した。これにより 4.5 mg の精製タンパク質が得られた。以上の結果から、KR21-2 株の MCO 遺伝子をクローニングして配列を決定するとともに、MCO 組換えタンパク質発現系を構築することができた。

(3) 抗 MCO 抗体の作製： 精製タンパク質を用いてウサギポリクロナール抗体の作製を試みた結果、10 万倍希釈した抗血清 (プロテイン A 精製標品) でも抗原に対して十分な反応性が検出され、力価の高い抗体を取得できた。今後、この抗体を利用した免疫化学的手法により、マンガン酸化反応時における酵素分子の挙動や局在性など、反応機構を詳細に解析できると期待された。

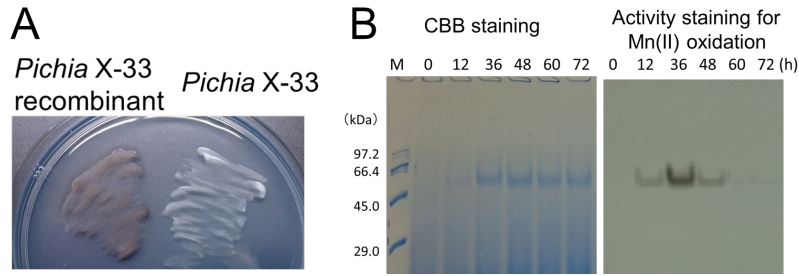


図5 *Pichia* 酵母発現系を用いた KR21-2 株 MCO の生産(A)と SDS-PAGE による活性検出(B)

(4) MCO による Mn(II)酸化反応： 精製酵素（組換え体）を用いて Mn(II)酸化反応の解析を検討した結果（Mn 濃度 0.5 mM）、反応開始後早い時間からナノ粒子の生成が観察され、30 分後で 400 nm、1 時間後に 700 nm 程度の粒径に成長することが明らかになった（図 5）。反応液に同濃度の Zn(II)、または Ni(II)を添加すると、粒子の生成速度が遅くなるものの、反応は進行していた（図 5）。また Zn(II)と Ni(II)を比較すると、Zn(II)の方が Mn(II)酸化に及ぼす影響が大きいことが示された。

0.6 mM Mn(II)を基質として 3 時間反応を行い、マンガン酸化物の構造特性を解析した。生成した酸化物は粒子径 2.5 ~ 3 μm の球状で、比較的均一であった（図 6A）。粒子は酸化物態 Mn が 96% を占め、吸着 Mn(II)は 4%と僅かであった（図 6A）。同濃度の Zn(II)共存下で反応を行った結果、Zn(II)は Mn に対するモル比で 30%が取り込まれ、その内の 53%は吸着ではなく酸化物構造に取り込まれて存在することが分かった（図 6B）。これらの結果から、Zn(II)のような金

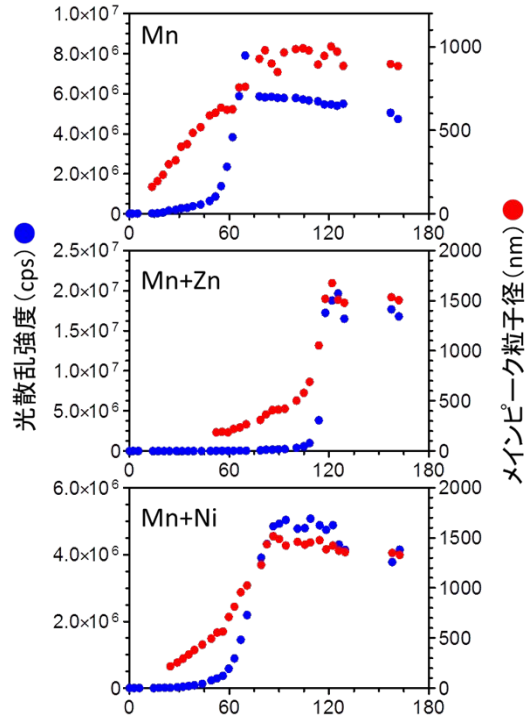


図5 KR21-2 株 MCO の Mn(II)酸化反応に及ぼす亜鉛及びニッケルイオンの影響（金属イオン濃度：各 0.5 mM）

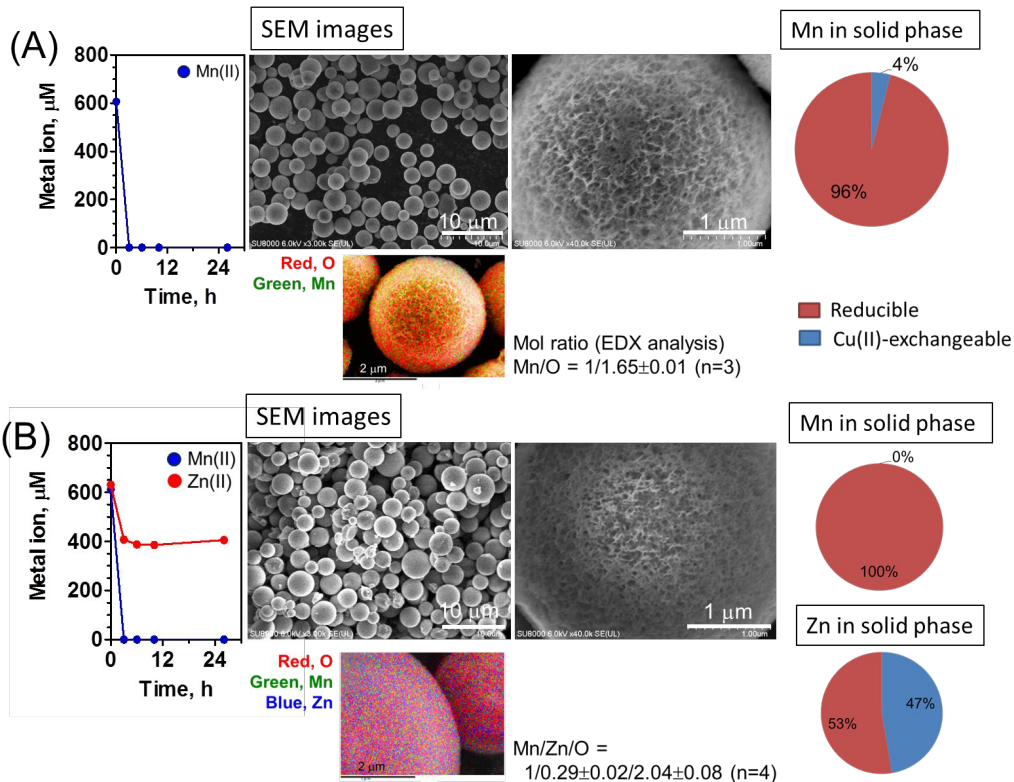


図6 KR21-2 株 MCO によるマンガン酸化物粒子の形成(A)と Zn(II)の取り込み(B)

属陽イオンは、酵素反応によるマンガ氧化物形成の過程で取り込まれやすく、Mn(II)とともに水相から除去回収できることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

東條ふゆみ、北山阿有美、福島淳、谷幸則、宮田直幸：*Acremonium strictum* KR21-2 株が生ずるマンガ氧化物酵素の大量発現を目的とした酵母への遺伝子導入、秋田応用生命科学研究会第28回講演会（秋田市）、2016.12.9.

N. Miyata, F. Tojo, A. Kitayama, J. Fukushima, Y. Tani: Identification of a fungal manganese(II) oxidase from *Acremonium strictum* strain KR21-2. The 23rd International Symposium on Environmental Biogeochemistry (ISEB 23), Cairns, Australia, 2017.9.25.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：東條 ふゆみ

ローマ字氏名： TOJO, Fuyumi

所属研究機関名：秋田県立大学

部局名：生物資源科学部

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：90758228

研究分担者氏名：福島 淳

ローマ字氏名： FUKUSHIMA, Jun

所属研究機関名：秋田県立大学

部局名：生物資源科学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00181256

(2)研究協力者

研究協力者氏名：谷 幸則

ローマ字氏名： TANI, Yukinori

研究協力者氏名：北山 阿有美

ローマ字氏名： KITAYAMA, Ayumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。