

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19879

研究課題名（和文）微量金属元素の微生物変換プロセスを利用したレアメタル結晶化回収技術の開発

研究課題名（英文）Application of microbial metalloids transformation pathways in metal recovery

研究代表者

濱村 奈津子（Hamamura, Natsuko）

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：50554466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、希少金属類を含む有用金属回収技術へ応用が期待できる微生物の金属代謝機構として、レアメタルとして利用されているアンチモンを生物還元しバイオミネラルを生成する微生物機構の解明に挑戦した。金属汚染鉱山土壌から集積培養したアンチモンを還元する微生物複合系の主要構成種3株の分離培養に成功し、ゲノム解析結果から優占種でありアンチモン代謝遺伝子を有する新規細菌を同定した。本新規細菌は、アンチモンの他にも毒性元素であるヒ素やセレンなど多様な金属還元能を示し、バイオミネラル生成による金属回収やバイオレメディエーションへの応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチモンはレアメタルとして半導体など広い用途に使われ、需要の高まりによる価格高騰や資源の枯渇から、排水などからの回収技術の開発が望まれている。本研究では、アンチモンバイオミネラル生成やその他の毒性金属代謝に関与する新規微生物の培養に成功し、また、複数種の相互作用が鉱物からの金属溶出に影響することを示した。本研究の成果は、微生物代謝によりアンチモンや毒性金属の溶解度や形態を変化させ、新規バイオメタル材料の生成や固定化による汚染浄化など、バイオ技術の応用展開としての貢献が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to understand the microbial antimony transformation processes. This process has potential applications in recovering valuable metals, including rare metals such as antimony. Antimony-reducing consortium was enriched from contaminated soils, and three major constituents of the consortium were successfully isolated. Among the three isolates, the novel gram positive bacterium was the most dominant species and its genome contained genes involved in antimony metabolism. This bacterium also demonstrated the ability to reduce toxic elements including arsenic and selenium, in addition to antimony. Consequently, it holds promise for metal recovery and bioremediation through the production of biominerals.

研究分野：微生物地球科学

キーワード：微生物金属代謝 バイオミネラル アンチモン還元 ヒ素還元 微生物複合系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

産業の発達や鉱山開発などにより環境に放出される重金属排水は、環境への汚染影響が懸念される一方で、特に資源の乏しい日本においては希少金属類を含む有用金属回収への利用が望まれている。しかし、排水中には多様な金属類が混在しているため、一般的に行われている物理化学的手法では、回収可能な有用金属や濃度が限定される場合も多く、技術開発における問題点の1つとなっている。特にレアメタルとして半導体など広い用途に使われ産業価値の高いアンチモン(Sb)は、比較的低濃度でしか環境中に含まれておらず、また化学的性質が類似しているヒ素等と共存するため、効率的な回収が困難である。

一部の微生物はエネルギー獲得や解毒のために金属類の形態変化を触媒する機能を有し、その一環として金属粒子の結晶体(バイオミネラル)を生成する現象が知られている (Hochella et al. 2008)。バイオミネラルは新規ナノ材料としても着目されており、これら生物作用を応用した有用金属類の回収技術は、これまでの工学的な処理方法に対し、触媒反応の基質特異性を利用した回収金属の選択性や低濃度での効率性、そしてコスト面でも利点があり期待できる技術である (Duran and Seabra 2012)。しかし、微生物によるバイオミネラル生成の過程は未解明な部分が多く、生成プロセスの制御や効率化が困難であり、回収技術としての開発を阻む要因となっている。

特にレアメタルとして半導体など広い用途に使われ産業価値の高いアンチモンは、ヒ素と同族の毒性元素であり、近年利用が拡大するにともなって環境汚染が懸念されるとともに、排水からの回収技術が望まれている。微生物による5価アンチモンの生物還元で生成する3価アンチモンは溶解度が低く結晶体として析出しやすいため回収技術の応用に適している。さらに、毒性の高いアンチモンを排水から除去するだけでなく、産業利用価値の高いバイオミネラル生成を同時に行うリサイクル技術が期待できることから、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

本課題では、鉱山汚染土壌から集積培養したアンチモンを生物還元しナノ粒子バイオミネラルを生成する微生物複合系について、ゲノム解析によりアンチモン代謝機構を明らかにし、バイオミネラル生成を駆動する微生物作用の特定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アンチモン還元微生物複合系の構築及び構成種分離培養

高濃度アンチモン・ヒ素を含む鉱山汚染土壌 (Hamamura et al. 2013) を接種源とし、アンチモン還元活性を指標に乳酸を添加した集積培養後、継続的な継代培養により安定したアンチモン還元活性を示す微生物複合系を構築した。本微生物複合系の群集組成を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)等により継続的にモニタリングし、主要構成種については、限界希釈法やロールチューブ法による分離培養を試みた。

(2) アンチモン還元微生物複合系および構成種ゲノム解析

鉱山汚染土壌より集積されたアンチモン還元微生物複合系について、次世代シーケンサーによりメタゲノム配列を解読した (Illumina HiSeqX, 150bp paired-end)。また、上記1で得られた分離培養株についてもゲノム配列を同定し、代謝ポテンシャルを明らかにするとともにアンチモンやヒ素等の金属代謝関連遺伝子について検索を行った。

(3) 微生物複合系および単離株の金属代謝活性

上記1で得られた分離培養株について、アンチモン、ヒ素、鉄等の金属還元活性を培養実験により調べた。鉱山排水などはアンチモンの他にも重金属を含み、特にアンチモンの多くは酸化鉄鉱物に吸着して存在するため、これら共存金属の存在下におけるアンチモン代謝活性を測定した。また、構成種を組み合わせることで混合微生物系を作成し、分離培養株の単独系や複合微生物系との金属代謝活性比較を行った。

4. 研究成果

本研究では、鉱山土壌から得られた嫌気的条件下で5価アンチモンを3価へと還元し、アンチモンバイオミネラルを生成する微生物複合系について、メタゲノム解析や分離培養法を用いて代謝ポテンシャルを明らかにした。本微生物複合系は、アンチモンやヒ素の他、腐植物質の構造類似物質である anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS)、フミン酸、クエン酸鉄やフェリハイドライトを乳酸を添加した条件で還元することが示された。また、共存金属存在下でのアンチモン還元活性への影響について調べたところ、フミン酸や AQDS の共存下でアンチモン還元活性は影響を受けず、クエン酸鉄とアンチモン共存下ではアンチモンを優先的に還元することから、アンチモンが電子受容基質としてエネルギー的にも優位に利用されることが示唆された。

本微生物複合系のドラフトメタゲノム解析では、90%以上の配列が *Bacillota* 門に属し、79%がグラム陽性細菌 *Desulfitobacterium* 属であることが示された(表1)。16S rRNA 遺伝子解析では、主要な構成種として *Desulfitobacterium* 属の他、*Lysinibacillus* sp. および *Rhizobium* sp. に近縁な

3種が検出された(図1)

表1: ドラフトゲノム組成

| Genus | Sequence abundance (%) |
|---------------------------|------------------------|
| <i>Desulfitobacterium</i> | 79.1 |
| <i>Clostridium</i> | 5.3 |
| <i>Bacillus</i> | 2.2 |
| <i>Desulfotomaculum</i> | 1.4 |
| <i>Mesorhizobium</i> | 1.0 |
| <i>Lysinibacillus</i> | 1.0 |

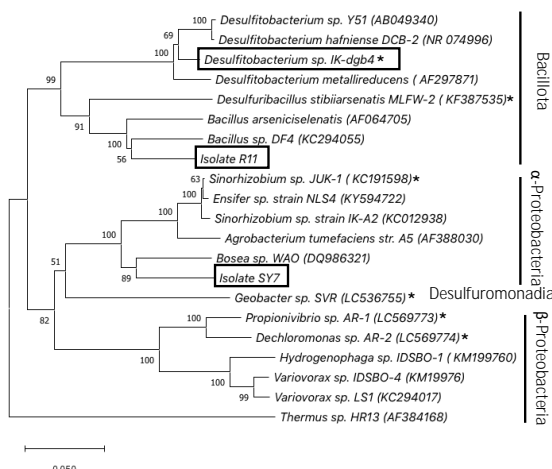


図1: アンチモン還元微生物複合系の主要構成種 (IK-dgb4, R11, SY7株)
* (星印): これまでに報告されている主なアンチモン還元細菌

限界希釈法やロールチューブ法による分離培養を試みたところ、R11株およびSY7株の純粋培養系が得られたが、これら2株の純粋培養系ではアンチモンやヒ素、鉄還元活性を示さなかった(図1)。優占種 *Desulfitobacterium* sp. の分離培養は困難であったが、本株の系統的近縁株が三価鉄やフミン酸、AQDS を還元することが報告されており、クエン酸鉄を電子受容基質とする嫌気培養を継続することにより、最終的には純粋培養に成功した。本 *Desulfitobacterium* sp. IK-dgb4 株単独でアンチモン還元しバイオミネラルを生成すること、そのほかヒ素や溶存三価鉄、六価と四価セレンの還元活性を示すことを確認した。さらに、微生物複合系のその他構成種2株も含めた主要3株のゲノム配列を解析し、優占種IK-dgb4株においてアンチモン還元酵素として報告のある Anr (Abin et al. 2019) と同源性を示す遺伝子を同定した。その他にIK-dgb4株ゲノムでは、ヒ素耐性、炭素固定、窒素固定、ポリスルフィドレダクターゼ、脱ハロゲン化酵素に関連する機能遺伝子が検出された。IK-dgb4株の系統的近縁種で鉄還元細菌として報告のある *D. metallireducens* はアンチモンやヒ素還元能は示さず (Finneran et al. 2002)、本IK-dgb4株はアンチモンの他にも毒性元素であるヒ素やセレンなど多様な金属還元能を有することからバイオレメディエーションへの応用も期待できる。

また、本優占種IK-dgb4株の純粋培養系では、複合系において確認された酸化鉄鉱物フェリハイドライトやAQDSの還元活性を示さないことが示された。そこで、IK-dgb4株単独系と、IK-dgb4株と複合系のその他構成種1種または2種との共培養系での金属代謝活性を調べたところ、複合系同様にフェリハイドライト及びAQDS還元活性を検出するに至った。これらの結果から、細胞外電子伝達による金属等の代謝機構においては複合系内の種間相互作用が影響している可能性が示唆される。環境中でアンチモンの多くは酸化鉄鉱物に吸着して存在しており、酸化鉄鉱物の還元により溶出したアンチモンの還元や、吸着態アンチモンの直接的な還元によるバイオミネラル生成の可能性についても今後検討が必要である。さらに、IK-dgb4株は嫌気性細菌であるが、微生物複合系やIK-dgb4株と複合系のその他構成種1種または2種との共培養系を微好気条件下で培養したところ、生育速度及びアンチモン代謝活性が高くなる結果が得られている。したがって、酸化鉄鉱物代謝による吸着金属の溶出やアンチモン還元活性と結晶化効率への種間相互作用の影響についても、今後明らかにしていくことで、回収技術の効率化や毒性金属の固定化による汚染浄化など、バイオ技術の応用展開としての貢献が期待できる。

<引用文献>

- Abin, C. A., and J. T. Hollibaugh. 2019. Transcriptional response of the obligate anaerobe *Desulfuribacillus stibiiarsenatis* MLFW-2T to growth on antimonate and other terminal electron acceptors. *Environmental Microbiology*. 21:618-630.
- Durán, N., and A. B. Seabra. 2012. Metallic oxide nanoparticles: state of the art in biogenic syntheses and their mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 95:275-288.
- Finneran, K. T., H. M. Forbush, C. V. G. VanPraagh, and D. R. Lovley. 2002. *Desulfitobacterium metallireducens* sp. nov., an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals and humic acids as well as chlorinated compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:1929-35.
- Hamamura, N., K. Fukushima, and T. Itai. 2013. Identification of antimony- and arsenic-oxidizing bacteria associated with antimony mine tailing. *Microbes Environ*. 28:257-263.
- Hochella, M. F., S. K. Lower, P. A. Maurice, R. L. Penn, N. Sahai, D. L. Sparks, and B. S. Twining. 2008. Nanominerals, Mineral Nanoparticles, and Earth Systems. *Science*. 319:1631-1635.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Okubo T., Nakajima N., Yamamura S., Hamamura N. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Draft genome analysis of Cupriavidus sp. strain IK-T018, isolated from an antimony-contaminated sediment | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e00724-21 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00724-21 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hamamura N, Yamashita D, Mitsunobu S. |
| 2. 発表標題 Microbe-mineral interaction and biotransformation of toxic metalloids |
| 3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamashita D, Mitsunobu S, Hamamura N. |
| 2. 発表標題 Biotransformation potential of antimony-reducing microbial consortium obtained from stibnite mine tailing soil |
| 3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2021（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamashita D, Mitsunobu S, Hamamura N. |
| 2. 発表標題 Biotransformation potential of antimony-reducing microbial consortium obtained from stibnite mine tailing soil |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉村雄弥, 鹿島裕之, 光延聖, 濱村奈津子 |
| 2. 発表標題 ヒ素・アンチモン複合汚染環境における微生物群集構造および金属代謝機能の解析 |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Okubo T., Yamashita D., Kashima H., Mitsunobu S., Hamamura N. |
| 2. 発表標題 Genomic and geochemical characterization of antimony-reducing microbial consortium obtained from mine tailing soil |
| 3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2020 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Okubo T., Yamashita D., Kashima H., Mitsunobu S., Hamamura N. |
| 2. 発表標題 Geochemical and microbial characterization of antimony metabolism by microbial consortium obtained from stibnite mine tailing soil |
| 3. 学会等名 日本地球化学会 第67回オンライン年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hamamura, N., Yamashita, Y., Kataoka, T., Mitsunobu, S. |
| 2. 発表標題 Diversity of microbial arsenic and antimony transformation pathways associated with antimony mine tailing |
| 3. 学会等名 Goldschmidt2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大久保公貴、山下葉里子、濱村奈津子 |
| 2. 発表標題 微生物有害元素代謝の多様性：嫌氣的アンチモン酸化細菌群の代謝機構と系統分布 |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 濱村奈津子 |
| 2. 発表標題 ヒ素の環境挙動に影響を及ぼす微生物代謝機構の多様性 |
| 3. 学会等名 資源・素材学会2019（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hamamura, N., Okubo, T., Mitsunobu, S. |
| 2. 発表標題 Microbial Biotransformation of Toxic Metalloids and Its Bioremediation Potentials |
| 3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamashita, Y., Hamamura, N. |
| 2. 発表標題 Characterization and diversity of microbial antimony transformation pathways |
| 3. 学会等名 The 32nd JSME and 10th ASME（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|---|-----------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 光延 聖 (Mitsunobu Satoshi) (70537951) | 愛媛大学・農学研究科・准教授 (16301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|