

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04302

研究課題名（和文）鉱山廃棄物の持続的な安定化に向けた有害金属の微生物-鉱物相互作用の解明

研究課題名（英文）Microbial-mineral interactions of toxic metals for stabilization of mine waste

研究代表者

濱村 奈津子（Hammaura, 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） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、有害金属動態プロセスのモデル化と安定化技術への応用を目指し、鉱山廃棄物の安定性及び有害金属挙動に影響する微生物-鉱物相互作用の解明を目的とした。有害金属の固体化に関与する微生物機構を調べるため、鉱山汚染試料を接種源とし好気的および嫌気的条件下でヒ素およびアンチモ代謝微生物の培養を実施した。その結果、生理生態的に多様な多系統群に分布する毒性元素代謝微生物の培養に成功し、ゲノム解析から代謝ポテンシャルを明らかにした。これら新規微生物の金属代謝機構を利用したレアメタル結晶体の生成による有用金属の回収や、酸化鉄鉱物の還元を介した有害元素安定化への寄与が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固体の有害金属と微生物の相互作用は、廃棄物からの長期的な拡散や二次汚染に関与しており、鉱山廃棄物の安定性評価や汚染対策を講じる上でも、そのプロセスの解明が必要とされている。本研究では、新規汚染物質であるアンチモンの環境動態に影響を及ぼす多様な微生物機構を明らかにした。この成果により、有害金属の固定化・安定化に寄与する微生物機構が明らかになり、微生物を利用した環境浄化技術の発展に寄与できる。また、本研究で得られた微生物金属代謝機構を活用し、有用金属の回収やバイオミネラルの新規ナノマテリアル応用など、資源の有効利用と環境浄化の両立を図る技術としての貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to elucidate the microbial-mineral interactions that affect the stability and geochemical cycling of toxic metal(loid)s in contaminated environments. To investigate the diversity of microorganisms involved in the transformation of toxic metal(loid)s, arsenic- and antimony-metabolizing microorganisms were enriched and isolated from contaminated environmental samples. Phylogenetically diverse metal(loid)-transforming bacteria were obtained and their biotransformation mechanisms were characterized by using genomic approach. The metal metabolism mechanism of these novel microorganisms is expected to contribute to the recovery of useful metals by producing rare metal crystals and to the stabilization of Sb through the reduction of iron oxide minerals.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物地球化学 微生物環境浄化 微生物金属代謝

1. 研究開始当初の背景

近年、世界各地の産業発達や鉱山開発にともない放出される有害重金属は、広域にわたる深刻な環境被害を引き起こしている。特に、猛毒のヒ素と同族(周期律表第15)の有害元素でありレアメタルとして産業利用が拡大しているアンチモンは、両者が共存して汚染することが多く、腎不全やがんなどの健康被害を引き起こすとして重要汚染物質に指定されている(US EPA)。有害元素の主要な汚染源として、鉱山で生じる大量の固体廃棄物(鉱くず)や風化産物の二次鉱物から、長期にわたって高濃度のヒ素やアンチモンの拡散が検出されており、地下水など水環境への二次汚染を防ぐためにも、早急な対策が必要とされている(Welch and Stollenwerk, 2002)。

ヒ素やアンチモンの毒性および移動性は、その化学形態に大きく依存し、特に反応速度の高い微生物代謝による形態変化は、汚染リスクに影響する主要な要因と考えられている(Oremland et al. 2003)。環境中でヒ素とアンチモンは、主に3価 [As(III), Sb(III)] と5価 [As(V), Sb(V)] の無機態で存在し、3価型はより高い生体毒性を示す。また As(III)は溶解度や環境移動性が高く、より広域な汚染を引き起こしやすいため、ヒ素の3価から吸着性の高い5価への変換は、固定化による浄化技術と成りえる。これら微生物の金属代謝は、固定化による有害金属の安定化や除去・回収への応用が期待できる。しかし、現時点では微生物代謝や制御機構に未解明な部分が多く、固定化プロセスの効率化や安定性評価を阻む要因となっている。

さらに、これまでに報告されている有害金属の微生物代謝では、一般的に溶解性の基質を利用する系が調べられてきており、鉱山廃棄物や二次鉱物の直接的な代謝は未解明である。その理由として、固体状の金属を基質とした微生物培養は増殖効率が低く、また自然界では天然の導電性物質を利用した電気共生系として存在している可能性も考えられる。固体の有害金属と微生物の相互作用は、固体廃棄物からの長期的な拡散や二次汚染にも関与すると考えられ、鉱山廃棄物の安定性評価や汚染対策を講じる上でも、そのプロセスの解明が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、有害金属動態プロセスのモデル化と安定化技術への応用を目指し、鉱山廃棄物の安定性及び有害金属挙動に影響する微生物-鉱物相互作用の解明を目的とする。そのために、高濃度のヒ素およびアンチモンで汚染している鉱山地域の調査を実施し、特に有害金属の固体化と固体有害金属の代謝に関与する微生物機構に着目して、汚染現場での有害金属鉱物の形態変化に及ぼす微生物作用の全体像を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、(i)有害金属の固体化、および(ii)固体・不溶性の有害金属を代謝利用する微生物機構の解明を目指し、汚染現場調査、培養法、ゲノム解析、ジオケミカル解析により調査を実施した。

(i)に関しては、鉱山汚染試料 (Hamamura et al. 2013)を接種源とし、好氣的または嫌氣的環境で特異的に As(III)や Sb(III)の酸化、及び嫌氣的環境で Sb(V)を Sb(III)へと還元する微生物の集積培養を行なった。得られた分離培養株及び微生物複合系のゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析により金属代謝機構を推定した。アンチモン代謝機構に関しては未同定遺伝子も多いため、ゲノム解析及び qRT-PCR による発現定量解析手法による代謝機構の同定を試みた。微生物代謝による鉱物形態変化や、バイオミネラル生成物質に関しては、XRD (X線回析法)・XAFS(X線吸収微細構造分析法)等により固相金属分析を実施した。

(ii)に関しては、鉱山廃棄物試料から固体金属代謝に関与する微生物、及び有害元素吸着酸化鉄鉱物の生物還元活性を有する微生物の同定を行なった。さらに、(i)で得られた金属代謝微生物を対象に、有害元素吸着酸化鉄鉱物の生物還元及び鉱物形態変化を測定した。

4. 研究成果

有害金属の固体化に関する微生物の多様性を調べるため、鉱山汚染試料 (Hamamura et al. 2013) を接種源とし、好気的および嫌気的条件下でヒ素およびアンチモ代謝微生物の培養を実施した。その結果、特異的に Sb(III)酸化による低毒化を促進する Sb 酸化細菌、及び嫌気的環境で Sb(V)を Sb(III)へと生物還元し三酸化二アンチモン結晶体を生成する Sb 還元細菌等の分離培養に成功した。これら有害元素代謝細菌群の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析から、ヒ素やアンチモン代謝機構は多系統に分布しており(図1) その生理生態学的特性も多岐にわたることが示唆された (Hamamura et al. 2021, 2020a, 2020b)。

微生物における Sb(III)酸化機構として、Sb(III)特異的酸化酵素である AnoAB (Li et al. 2015) のほか、As(III)酸化酵素 AioAB (Wang et al. 2015) や As(III)メチル化酵素 ArsV (Zhang et al. 2021) による代謝が報告されている。特に Aio は通性嫌気性細菌における As(III)および Sb(III)酸化に関与している

ことが示唆されている (Li et al. 2019)。本研究で分離した Sb(III)酸化細菌である *Mesorhizobium* sp. および *Hydrogenophaga* sp. のゲノム解析を実施したところ、Sb(III)酸化機構として *anoAB* や *arsV* 遺伝子は検出されず、*aioAB* と相同性を示す配列が確認された。この Aio は先行研究で同定されている As(III)酸化を触媒する Aio とはアミノ酸配列類似性が 45%と低く、またこれら 2 株は As(III)酸化活性を示さないことが確認された (Yamashita, 2020)。また、As および Sb 存在下での *aioA* 遺伝子発現を調べたところ、両株において Sb(III)存在条件でのみ顕著に発現が誘導されていたことから (Miyazaki, 2023; unpublished data) Aio が特異的に Sb(III)酸化を触媒している可能性が示唆される。これまでに報告されている Aio を保有している Sb(III)酸化細菌は、As(III)も酸化する事例がほとんどであり、本研究で同定した Sb(III)酸化機構は基質特異性が異なる点で新規性が認められる。

また、嫌気条件下で Sb(V)を Sb(III)へと生物還元しアンチモン結晶体を生成する集積培養系が得られている。本微生物複合系はアンチモンの他、ヒ素や鉄、セレンなど幅広い電子受容体を利用するとともに、酸化鉄鉱物であるフェリハイドライトも還元でき (20 日後に 0.15~0.50mM 程度の Fe(II)生成) 最終生成鉱物としてゲータイトを生成する事が確認された (Yamashita, 2022; unpublished data)。ゲータイトは溶存態 Sb(V)と反応し、安定した二次鉱物であるトリプヒアイトに形態変化する可能性が報告されており (Leverett et al., 2012) 微生物鉄還元反応を介して環境 Sb の固体化・安定化に寄与すると考えられる。さらに、本微生物複合系による、Sb(V)吸着フェリハイドライトの代謝を調べたところ、Sb 吸着濃度が 1.31 mM の系においてはフェリハイドライトのみの場合と同程度の Fe(II)の生成が確認されたが、吸着 Sb(V)の還元や溶出は確認されなかった (Hokimoto 2024)。したがって、本実験条件の範囲において、本微生物複合系は固体に吸着している Sb(V)は代謝できないが、Sb 吸着によるフェリハイドライト還元活性への影響はないと考えられる。先行研究において、Sb(V)とフェリハイドライト両方の還元能を有する *Shewanella* sp. CNZ-1 では、約 1 mM の Sb(V)存在下で Sb(V)還元による Sb(III)の溶出が検出されたが、フェリハイドライト還元は阻害される結果が報告されている (Zhang et al. 2023)。本研究においては、同程度の Sb(V)吸着フェリハイドライトの鉄還元は阻害されておらず、微生物複合系における酸化鉄鉱物の代謝やアンチモン還元機構が異なっている可能性も示唆される。

本結果は、重金属汚染環境における毒性元素微生物代謝機構の多様性に関して有用な新規知見を提供するものであり、特に、本研究で得られた新規微生物群は Sb(V)の生物還元によるアンチモン結晶体の生成を利用した有用金属の回収や、酸化鉄鉱物の還元を介した Sb 安定化への寄与が期待できる。

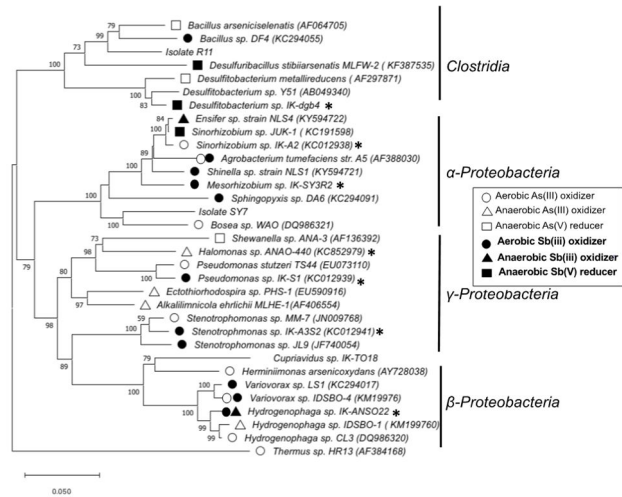


図1. ヒ素・アンチモン酸化還元細菌分離株の16S rRNA遺伝子系統樹 (*本研究で分離培養された株を示す)

<引用文献>

- 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.
- Hamamura, N., et al. 2020a. Draft genome sequence of *Stenotrophomonas* sp. strain SbOxS2, an antimony-oxidizing bacterium isolated from stibnite mine tailing soil. *Microbiol Resource Announcements*. 9:e01219-20.
- Hamamura, N., N. Nakajima, and S. Yamamura. 2020b. Draft genome sequence of the antimony-oxidizing *Pseudomonas* sp. strain SbOxS1, isolated from stibnite mine tailing soil. *Microbiol Resource Announcements*. 9:e01218-20.
- Hamamura, N., N. Damdinsuren, N. Nakajima, and S. Yamamura. 2021. Draft genome sequence of the anaerobic arsenite-oxidizing *Halomonas* sp. Strain anao-440, isolated from an alkaline saline lake in Khovsgol, Mongolia. *Microbiol Resource Announcements*. 10:e00899-21.
- Hokimoto, T. 2024. Investigation of the mechanism of antimony-iron mineral reduction by metal-reducing microbial consortium. M.S. Thesis, Kyushu University, Japan.
- Leverett, P., J. K. Reynolds, A. J. Roper, and P. A. Williams. 2012. Tripuhyite and schafarzikite: two of the ultimate sinks for antimony in the natural environment. *Mineralogical Magazine*. 76:891-902.
- Li, J., Q. Wang, M. Li, B. Yang, M. Shi, W. Guo, T. R. McDermott, C. Rensing, and G. Wang. 2015. Proteomics and genetics for identification of a bacterial antimonite oxidase in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environ Sci Technol*. 49:5980-5989.
- Miyazaki, D. 2023. Elucidating the mechanism of antimony metabolism in facultatively anaerobic antimony-oxidizing bacterium. M.S. Thesis, Kyushu University, Japan.
- Oremland, R.S. and Stolz, J.F. 2003. The ecology of arsenic. *Science*. 300:939-944.
- Yamashita, Y. 2020. Physiological and molecular characterization of a facultative anaerobic antimonite oxidizing bacterium *Mesorhizobium* sp. strain ANAO-SY3R2. M.S. Thesis, Kyushu University, Japan.
- Yamashita, D. 2022. Utilization of metallic minerals and electron mediators by Sb(V)-reducing consortia. M.S. Thesis, Kyushu University, Japan.
- Wang, Q., T. P. Warelow, Y.-S. Kang, et al. 2015. Arsenite oxidase also functions as an antimonite oxidase. *Appl Environ Microbiol*. 81:1959-1965.
- Welch and Stollenwerk. 2002, *Arsenic in Ground Water: Geochemistry and Occurrence*. Kluwer Academic Publishers.
- Zhang, J., J. Chen, Y.-F. Wu, et al. 2021. Oxidation of organoarsenicals and antimonite by a novel flavin monooxygenase widely present in soil bacteria. *Environ Microbiol*. 24:752-761.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5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 -
1. 著者名 Hamamura N., Damdinsuren, N., Nakajima N., Yamamura, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Draft genome sequence of an anaerobic arsenite-oxidizing Halomonas sp. strain ANAO-440 isolated from an alkaline saline lake in Khovsgol, Mongolia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00899-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00899-21	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 該当する
1. 著者名 Hamamura Natsuko, Nakajima Nobuyoshi, Yamamura Shigeki	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Stenotrophomonas sp. Strain SbOxS2, an Antimony-Oxidizing Bacterium Isolated from Stibnite Mine Tailing Soil	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01219-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01219-20	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 -
1. 著者名 Hamamura Natsuko, Nakajima Nobuyoshi, Yamamura Shigeki	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of the Antimony-Oxidizing Pseudomonas sp. Strain SbOxS1, Isolated from Stibnite Mine Tailing Soil	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01218-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01218-20	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 -

1. 著者名 Soreghan Gerilyn S., Beccalotto Laurent, Benison Kathleen C., Bourquin Sylvie, Feulner Georg, Hamamura Natsuko, Hamilton Michael, Heavens Nicholas G., Hinnov Linda, Huttenlocker Adam, Looy Cindy, Pfeifer Lily S., Pochat Stephane, Sardar Abadi Mehrdad, Zambito James, the Deep Dust workshop participants	4. 巻 28
2. 論文標題 Report on ICDP Deep Dust workshops: probing continental climate of the late Paleozoic icehouse?greenhouse transition and beyond	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Drilling	6. 最初と最後の頁 93 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5194/sd-28-93-2020	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 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 保木本剛、山下大祐、光延聖、濱村奈津子
2. 発表標題 アンチモン環境挙動に影響を及ぼす微生物-鉱物相互作用
3. 学会等名 2023九州微生物研究フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hokimoto, T., Yamashita, D., Mitsunobu, S., Hamamura, N.
2. 発表標題 Biotransformation of antimony and Fe(III) oxyhydroxide by microbial consortium associated with mine tailing soil
3. 学会等名 13th Asian Symposium for Microbial Ecology/36th Japanese Society of Microbial Ecology
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大政 勝喜、加藤 真悟、濱村 奈津子、光延 聖
2. 発表標題 独立栄養性ヒ素鉄酸化菌の分離
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植田 健太郎、大政 勝喜、加藤 真悟、濱村 奈津子、光延 聖
2. 発表標題 従属栄養性ヒ素鉄酸化菌の分離
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hamamura, N., Kashima, H., Mitsunobu, S.
2. 発表標題 Microbe-mineral interaction associated with stibnite mine tailings
3. 学会等名 2022九州微生物研究フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 保木本剛、山下大祐、光延聖、濱村奈津子
2. 発表標題 アンチモン環境挙動に影響を及ぼす微生物-鉱物相互作用
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

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 Yoshimura Y, Okubo T, Kashima H, Hamamura N.
2. 発表標題 Characterization of microbial communities associated with microbial fuel cells
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 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 高山清一郎、和穎朗太、荒井見和、濱村奈津子
2. 発表標題 土壌の複雑な微環境における土壌細菌群集構造のマイクロレベル解析
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

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 新規鉄酸化細菌、その鉄酸化細菌を含む資材、及びその鉄酸化細菌を用いたヒ素含有液体中におけるヒ素の除去方法	発明者 光延聖, 大政 勝喜, 植田健太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-195359	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 重金属イオンの回収方法、重金属イオンを回収するための構造体、および微生物の集積方法	発明者 濱村奈津子・鹿島裕之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-34423	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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)	
研究分担者	鹿島 裕之 (Kashima Hiroyuki) (70780914)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究開発プログラム)・研究員 (82706)	

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
---------	---------