

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05407

研究課題名(和文) 鉱物廃材の再資源化を指向した銅還元細菌の育種と銅還元機構の分子生物学的解明

研究課題名(英文) Cultivation and molecular biological analysis of copper reducing bacteria as for a copper recycling from low-grade metal ore

研究代表者

細田 晃文 (Hosoda, Akifumi)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：50434618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：河川底泥や海洋底泥を接種源として、嫌氣的培養条件下で銅イオンを還元できるマイクロコズムを構築し、NGS解析結果より、その中心的な細菌群はPseudomonas科、Alteromonas科、Rhodocyclas科およびShewanella科などいくつかの存在が明らかとなった。いくつかの細菌科においては金属還元能を有する細菌種が同定されていることから、これらの細菌種が嫌氣的条件下で銅イオンに対して耐性を有し還元能を発揮していることが明らかとなった。しかし、安定的な継代培養が難しい点と実用的な銅リサイクル濃度まで還元能を発揮するマイクロコズムを構築できなかった点で課題が残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したマイクロコズムにおける銅還元能は1.5 mM程度でAlteromonas科やPseudomonas科が優占化したことが分かった。これらの結果は、現在行われている銅リサイクルに適用可能な濃度(5000 ppm)ではないが、本研究で構築した銅還元-嫌氣性マイクロコズム中の細菌を環境から分離後、さらに銅還元遺伝子などを付与するといった遺伝子改変・育種によってエネルギー消費が少ない条件での生物的銅リサイクルについての可能性を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Anaerobic copper-ion reducing microcosms were constructed from river sediment or marine sludge. Next generation sequencing analyses revealed that dominant microbes were Pseudomonadaceae, Alteromonadaceae, Rhodocyclaseae and Shewanellaceae. Considering that some bacterial strains which could reduce metals were affiliated with these bacterial families, it was revealed that these bacteria had resistance to copper and reduction of copper-ion under anaerobic condition in the microcosms. However, this research project still has some problems in the difficulty of stable subculturing and constructing of microcosms that could reduce copper-ion up to a practical copper recycling concentration.

研究分野：微生物生態学

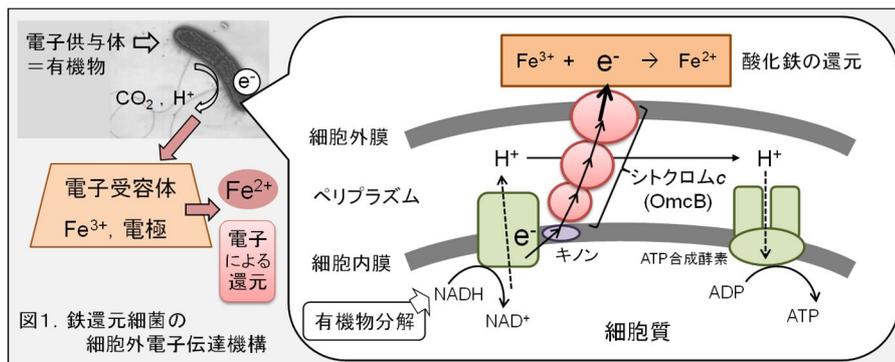
キーワード：銅イオン還元 嫌氣性細菌 Alteromonas科 Pseudomonas科 硫化銅 酸化銅

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物には嫌気的環境下で金属{金属イオン:クロム(Cr^{6+}),コバルト(Co^{3+}),ヒ素(As^{5+}),セレン(Se^{6+}),銀(Ag^+),金(Au^{3+}),ウラン(U^{6+})など}に電子を渡して増殖することができる種類(鉄還元細菌:Geobacter 属 Shewanella 属など)の細菌が存在することが知られてきた(1)(図1)。

これらの細菌は、電子受容体として金属のみならず電極に電子伝達ができるため発電,すなわち微生物燃料電池へ応用されてきた。国内



外の多くの研究者によって、これらの細菌は分子生物学,生化学,電気化学的アプローチにより細胞外電子伝達の詳細なメカニズムが解明されている。こうした背景から,研究代表者はこれまでに低環境負荷かつ廃棄物の有効利用を目的とした微生物による金属リサイクル技術の開発を目指し,製鉄過程で排出される含油鉄スケールから嫌気性の鉄還元細菌を単離し,スケール中の鉄を再利用する研究を行ってきた。一方,金属酸化/還元能を有する新たな細菌の探索や,その利用に関して様々な金属に対して研究が国内外で多数行われ,都市鉱山と呼ばれる小型電子機器の基盤に含まれるレアメタルなどにも応用されている(2)。しかし,多くの電子基板や電子機器に用いられる銅の実用的回収は,電気炉が主流であり,嫌気性細菌を利用する技術開発(生物製錬)は行われておらず,銅リサイクルに関しては,多くのエネルギー消費ならびに CO_2 排出となり持続的(低環境負荷)なりサイクルとは言えない。こうした背景から研究代表者は銅鉱物(硫化銅(I))を含む土壌から銅イオン還元に関わる嫌気性マイクロコズムを構築することに成功し,このマイクロコズムが酢酸を炭素源として銅を還元することを明らかにしてきた。しかし,このマイクロコズム中の細菌群集解析および銅還元に関わる細菌の単離・同定は,未着手である。これまで,銅はその高い生物毒性(IC_{50} : 1.9 mg/L)から殺菌技術への応用やそのメカニズム解析は行われてきたが(3),銅還元に関与する細菌に関する研究はほとんどない。従って,研究代表者が構築したマイクロコズムに生息する銅還元細菌を分離・培養できれば嫌気的な銅還元に関わる新しい細菌の特性を明らかにすることができる。また,この成果は従来よりも低環境負荷な銅リサイクル(バイオリッチングなど)への応用を可能とし,今後,高需要が予想される銅を宇宙空間で再生するなどの新技術開発にもつながると期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は,研究代表者が構築した嫌気性銅還元マイクロコズム中の細菌群集解析および銅還元反応に主要な細菌種の単離・同定とその生理的特性解析を行い,安定した嫌気的な銅還元反応に必要な因子を明らかにすることである。また,嫌気的な銅還元をする細菌(群)の報告は全くないことから,細菌の単離・同定およびその反応に関わる酵素群など生理的特性を明らかにすることは重要である。本研究目的を達成するために,嫌気性銅還元マイクロコズムのDNAから細菌群集解析を行う。その結果に基づいて銅還元反応に関わる細菌(群)の分離培養(単離)および種同定を行う。また,標的細菌を単離できた場合,高効率に銅還元が可能な培養条件の決

定,銅以外の金属類還元能の確認,銅還元に関わる酵素遺伝子の探索・同定といった細菌による廃棄物からの銅回収を目指した生理特性解析を行う。

3. 研究の方法

嫌気性銅還元マイクロコズムの細菌群集解析

研究代表者がすでに構築したマイクロコズム中の細菌群集を解明するために DNA を抽出し, 16S rRNA 遺伝子に基づいた次世代シーケンスにより定量的に細菌種の同定を行い, 嫌氣的に銅還元に関与する細菌または細菌群の特定を行った。また, 研究項目 においても集積培養などによる標的細菌の単離過程の確認や単一株に分離できたかを確認するため次世代シーケンス (NGS) や従来のシーケンス解析による細菌群集解析を行った。NGS および従来のシーケンス解析は外部機関へ委託した。また, 培養物に生成した沈殿物については X 線結晶回折によって物質同定を行った。

マイクロコズム内の銅還元細菌の単離・同定

研究項目 で構築したマイクロコズム中の嫌気性銅還元細菌 (群) を分離培養 (単離) するため, まず無機塩培地 (BSM, HEPES buffered pH7.5) に 5% (w/v) 塩化銅(II)と酢酸を加えた密閉型バイアル瓶で嫌氣的に継代培養 (25) を行った。さらに効率のよい標的細菌 (群) の単離を目的として, 培養物中に電子メディエーター {コトラルド* (以下, NR) 結晶体や金属 (亜鉛と銅の並列型) を蒸着したガラス板など} を加えた培養物も構築した。銅還元細菌 (群) の単離は還元される Cu^{2+} 濃度減少を比色定量法 (ネオキュプロイン法) で経時分析しながら, 蛍光顕微鏡 (SYBR Green 法) による細菌の確認により行った。

4. 研究成果

嫌気性銅還元マイクロコズムの細菌群集解析

河川汽水域底泥を接種源とし, 銅板を入れた培養物を調製しバイアル瓶 (2 連 × 2 × 4 処理区) のヘッドスペースを窒素ガスで置換した後, 25 にて静置培養した。ネオキュプロイン法による銅(II)イオンの定量およびサイバークリーン染色による菌数測定を各培養物に対してを行い, 銅イオンが減少した培養物の DNA 抽出, 16S rRNA 遺伝子 (V4 領域: 古細菌および細菌を標的) の PCR および NGS 解析を行った。滅菌処理を施していない 4 つの培養物 (培養 60 日) における菌数は, それぞれ $3.6 \sim 4.5 \times 10^6$ cells/ml まで増加し, 銅板の周辺に沈殿物を生じた。この時の銅イオン濃度は約 0.9 mM の減少であった。NGS 解析の結果, 約 65,000 リードの配列情報が得られ, Desulfobulbus 科 (5.06%), Desulfomonas 科 (8.24%), Pelobacter 科 (4.05%), Alteromonas 科 (24.1%), Clostridium 科 (7.08%) などが優占化している (存在比 3% 以上) ことが分かった。一方, 嫌気培養で優占化されやすいメタン生成アーキアなどは存在比 1% には満たなかった (Methanosarcina 科: 0.29%)。

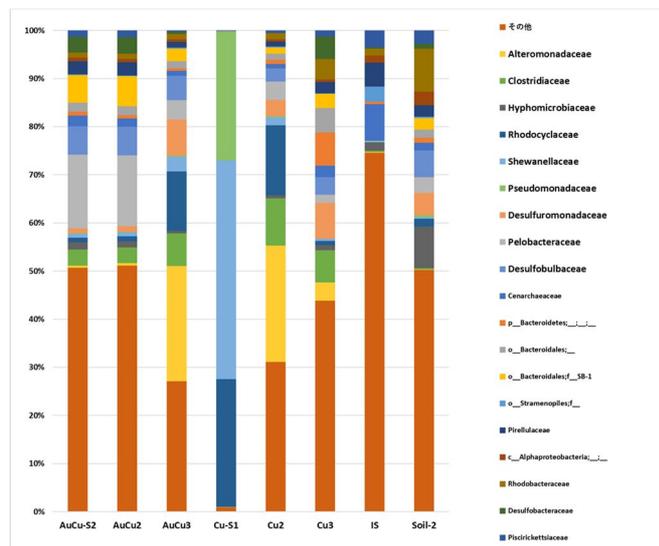


図2 嫌気性銅還元マイクロコズムの NGS 解析結果

また, ある培養物 (Cu-S1) では, 金属の還元能を有する Rhodocyclas 科 (26.5%) や電流生産

菌としてよく知られている *Shewanella* 科 (45.5%) のみが優占化していた (図 2)。

次にこれらのマイクロコズムの継代培養を続け、銅板または、銅板と金蒸着ガラス棒を密着して入れた培養物 (Cu 区, AuCu 区, 25, 70 日間静置培養) において嫌気性細菌の増殖を確認することができた。培養物のヘッドスペースガスを分析したが、水素などのガス生成は認められなかった。この培養中の銅 (II) イオン定量によって銅イオンの還元 (約 1.5 mM) が認められ、培養 48 日後に抽出した DNA を用いた次世代シーケンス解析 (16S rRNA 遺伝子) から *Alteromonas* 科 (Cu 区 41.9%, AuCu 区 68.9%) と優占化していた (図 3)。またこの培養中の Cu 区からは培養 10 日目以降に褐色沈殿物が生じたため、これらを回収して嫌気チャンパー内で乾燥後、X 線結晶回折 (XRD), および蛍光 X 線分析 (ED-XRF) 解析を行い、硫化銅 (Cu_2S) または酸化銅 (Cu_2O) であるという結果を得た。

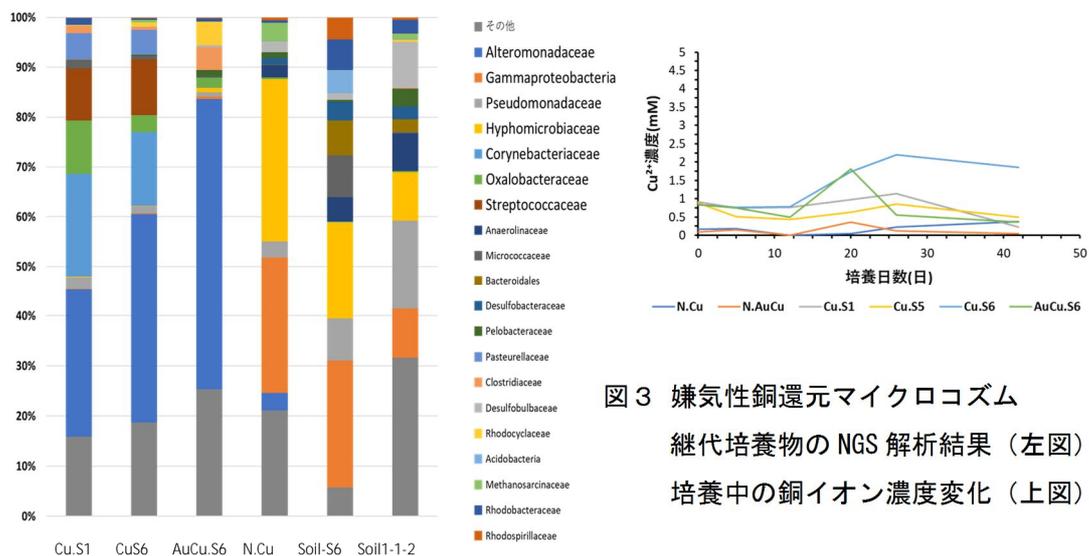


図 3 嫌気性銅還元マイクロコズム
継代培養物の NGS 解析結果 (左図)
培養中の銅イオン濃度変化 (上図)

しかし、2023 年度においてこれまで継代を続けていたマイクロコズムの銅還元活性が急激に低下し、銅還元細菌 (群) の死滅が推察された。そこで、これまで同時並行で培養していた海洋底泥由来の嫌気性銅還元マイクロコズムの継代および菌叢解析を続け、銅還元ができる嫌気性細菌の分離を目指した。この培養物では培養 8 日間で銅イオンを還元 (約 0.5 mM) し、再現性のある銅イオン還元能を示した (図 4)。

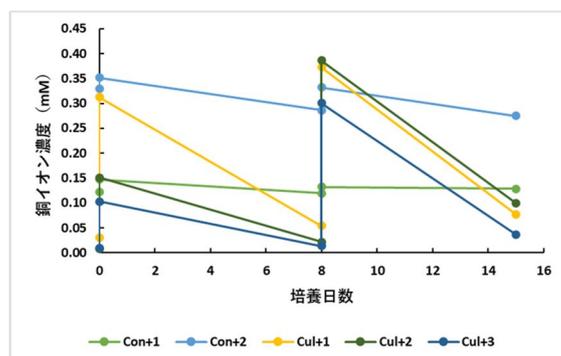


図 4 海洋底泥を接種源とした
嫌気性銅還元マイクロコズム
培養中の銅イオン濃度変化

この時の培養物から DNA を抽出、次世代シーケンス解析 (16S rRNA 遺伝子) を行った結果、*Pseudomonas* 科の細菌が優占化していることが分かった。またこの培養中の銅還元培養物について硫化銅 (Cu_2S) を含む培地にて継代したところ、培養に伴って生じる銅イオンが還元されるという結果を得た。NGS 解析から、優占した細菌種 (*P. pseudoalcaligenes*) においては、2 価銅吸着など銅還元に関する報告 (4) があることなどから、銅イオンを電子受容体として優占化してい

ることが示唆された。また、これまでと今年度の NGS 解析結果比較、銅イオンへの耐性や還元能において大きな違い（銅還元能；河川底泥：1.5 mM，海洋底泥：0.5 mM）があったことから優占化した細菌種が異なっていることを明らかにし、安定的に継代培養を行うためには、培養条件を早急に決定することが重要であることが分かった。さらに、培養物中の銅還元細菌種により銅リサイクルの実用化を目指した場合、銅イオンを含む低品位銅鉱物の濃度（5000 ppm）よりも低濃度の銅イオンでしかリサイクルできないことが課題となった。

引用文献

- (1) B.E. Logan, Microbial fuel cells, John Wiley & Sons, Inc., New York. 2008
- (2) H. Fathollahzadeh et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 103, pp.1043-1057, 2019; Y. Masaki et al. Extremophiles, 19, pp.495-503, 2015
- (3) T. Lotti, et al. Water Sci. Technol., 66, pp.1519-1526, 2012; E. Ladomersky and M.J. Petris, Metallomics, 7, pp.957-964, 2015
- (4) S. Singh et al. 3 Biotech, 7, 2017, doi:10.1016/j.envpol.2009.04.004

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Akifumi Hosoda	4. 巻 1
2. 論文標題 Bacteria improves copper recycling processes: Recycling electronic waste in efficient and novel ways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 48-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2022.1.48	査読の有無 無
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 Akifumi Hosoda, Mao Kurosaki, Kentaro Kazama, Hirotatsu Murano, Chitochi Mizota, Yasuyuki Niizuma	4. 巻 23
2. 論文標題 Correlation between molecular microbial community and nitrogen cycling on ornithogenic soil affected by tsunami in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecological Genetics and Genomics	6. 最初と最後の頁 100114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.egg.2022.100114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 奏希, 松尾 健太郎, 細田 晃文
2. 発表標題 海洋底泥中の銅還元嫌気性細菌の生態解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島 史大, 杉本 陸飛, 横井 裕伎, 松岡 七海, 細田 晃文
2. 発表標題 鉄還元能を有する糸状菌の生理的特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎本圭佑, 細田晃文
2. 発表標題 河川底泥からの嫌気性 銅酸化/還元微生物の集積培養と分子生態解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内穂孝, 林田真貴子, 細田晃文
2. 発表標題 汽水域底泥から集積した硝酸還元性鉄酸化細菌の分子生態解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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