

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：25406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658114

研究課題名（和文）微生物による重金属とセレン・テルルの同時回収、発光性半導体微粒子への変換

研究課題名（英文）Microbial formation of semiconductor materials contained selenium or tellurium for the simultaneous recovery of Se (Te) oxyanions and heavy metal ions

研究代表者

阪口 利文（SAKAGUCHI TOSHIFUMI）

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：10272999

研究成果の概要（和文）：ナノテクノロジーの発展とともにナノサイズの発光性微粒子が注目を集めている。中でも CdTe や CdSe は量子サイズ効果を有し、分子タグとして活用されている。また、元素回収の観点からもメタロイドや金属イオンを回収・再資源化できる技術が望まれている。本研究では、微生物による半導体微粒子の合成を目的にセレン（テルル）オキシアニオン還元性菌を Cd イオンなどの重金属イオンを含む培地で集積培養し、半導体や発光活性を期待できるナノ微粒子を合成可能な微生物の分離・培養を行った。その結果、バイオレメディエーションやバイオミネラリゼーションの研究・応用材料として活用可能な微生物株の獲得や解析を達成できた。これらの微生物株と生成微粒子の解析を遺伝子工学、電子顕微鏡、元素分析手法によって実施することで、重金属（例えばカドミウム）を含むバイオナノ微粒子の合成、及び分離株によるメタロイドと重金属イオンの同時回収と半導体など機能微粒子への変換可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Tellurium (Te) and selenium (Se) oxide ions are lethal toxicants to organisms and cause the serious toxicosis and carcinoma. However, recently, microorganisms capable of reducing Te or Se oxyanions in anaerobic conditions have been found from various environments. Some strains of microorganisms are able to produce intra- and extracellular elemental tellurium nano-particles by the anaerobic respiration. Bioremediation and biominealization due to these microorganisms have currently received increased attention as interesting subjects. In this study, we have achieved the isolation and enrichment of microorganisms capable of producing elemental Te and/or CdTe (or Se and/or CdSe) crystals, and the simultaneous recovery and conversion to useful nano-particles of heavy metals and anionic tellurium (or selenium)-metalloid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,500,000	0	1,500,000
平成 22 年度	1,300,000	0	1,300,000
平成 23 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境浄化

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

現在、ナノテクノロジーやマイクロファブリケーションの分野において微小で高性能な材料素材が要望されている。特に特異な電気・光学的挙動を有するナノ半導体微粒子は用途の広い結晶材料として利用価値が高い。中でもセレン化カドミウム(CdSe)やテルル化カドミウム(CdTe)などの発光性 Quantum Dot は蛍光微粒子タグとして注目され、物理・化学的性質が揃った微粒子を簡便に合成できる技術が望まれている。また、環境対策関連法案の施行以来、毒性金属（様）イオンの汚染環境からの回収技術が切望されている。申請者らは微生物によるセレン・テルルオキシアニオンの不溶性化回収に関する研究を進める中で、微生物の酸化還元代謝を用いて CdSe、CdTe のナノ微粒子ができることを確認した（阪口、松本：特願 2004-162187、特開 2005-341817）。本研究ではこの現象を新規の CdSe、CdTe ナノ微粒子の合成法の開発や排水・汚染環境中に含まれる重金属イオンと枯渇が懸念されるセレン、テルルなどのレアアース元素の同時回収に利用し、有害イオン種を微生物によって有用化合物半導体として再資源化・変換することを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、まず、微粒子合成に関わる基礎的事項について明らかにするために、これまで獲得した集積培養体から CdSe、CdTe 合成に関与する微生物の特定をはじめ、合成条件の把握、高分解能電子顕微鏡観察による合成場所の特定、培養液や菌体から効率的な微粒子抽出法の開発に関する研究を開始する。次に、分離株や組成の明らかな微生物コンソーシアによる CdSe、CdTe 合成を行い、変換効率の調査やカドミウム以外の重金属カチオンを用いた化合物半導体結晶の合成について検討する。また、タンパク質・遺伝子工学的手法を用いて CdSe、CdTe 合成に関与する酵素・遺伝子などの生体分子の特定や元素分析・結晶回折法を用いて生成した微粒子の結晶特性を評価する。更に、本研究内容の実用化を目的として、菌体固定化バイオリアクターをデザインし、実廃液レベルでのセレン・テルルアニオンと重金属イオンの同時回収、光半導体微粒子への変換を検証する。更に、合成されたナノ微粒子の材料デバイスとしての利用可能性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 重金属、及び金属様オキシアニオンのナノ微粒子への変換効率、培養条件の検討

単一株もしくは組成の明らかな微生物コ

ンソーシアによる目的ナノ微粒子の合成を行い、バッチ系における培養での各イオンから微粒子への変換効率を調査し、効率的な微粒子変換条件を明らかにした。本分析にはイオンクロマトグラフィー技術など用いて、添加した重金属や金属様オキシアニオンの除去・減少率、菌体内外から生成される微粒子を抽出、生成量などを調査し、微生物株によるこれら金属類の除去、回収効率の最適培養条件を検討した。更に、カドミウム以外の重金属カチオンを用いた他の化合物半導体結晶の合成についても調査した。特にカチオンについては環境中からの回収が望まれる鉛、戦略元素であるニッケル、コバルト、亜鉛、各イオンをカドミウムイオンに代わるイオンとして培養液中にセレン・テルルオキシアニオンとともに添加することで、PbSe (PbTe), NiSe (NiTe), CoSe (CoTe), ZnSe (ZnTe)などの化合物半導体結晶の合成・変換について検討した。これらの実験を行う際には、多種の専用カラムを購入して既存のイオンクロマトグラフィーシステムや機器分析装置を用いて行った。

(2) CdSe, CdTe ナノ微粒子合成に関与する生体分子の探索

遺伝子組換え取り扱い施設(P1-B1)などを利用し、CdSe, CdTe 微粒子の合成能が確認された分離菌株に対して接合伝達法を用いたトランスポゾン挿入変異や異種遺伝子導入系の開発（接合伝達及び変異系に要する微生物、遺伝子材料については申請者の研究室で既に保有している。）を行った。また、その表現型解析の結果からセレン・テルルオキシアニオンの還元や微粒子合成において変化・欠損があるノックアウト変異株を創製、見出すことで、関連遺伝子の探索、クローニング、解析に関する実験を遂行した。最終的には、微粒子合成に関与する遺伝子の特定を目指した。

(3) 元素回収・半導体微粒子合成バイオリアクターの構築と運転

菌体固定化循環型バイオリアクターをデザインし、モデル廃液や実廃液レベルでのセレン・テルルの有害アニオンと有毒重金属イオンの同時回収と蛍光性半導体ナノ微粒子への変換を検証した。実験では菌体の固定化素材や条件、リアクターの運転条件などについて調査し、フロー系固定化バイオリアクターでの金属類の除去、回収効率の最適運転条件を明らかにした。

(4) 微生物によって合成された化合物半導体

微粒子の材料評価・材料応用

微生物によって合成されたナノ結晶粒子を実際に様々な材料デバイスとしての応用を試みることで、結晶材料としての評価、利用価値について検討し、元素回収、変換技術としての有用性を確認した。

4. 研究成果

まず、CdSe, CdTe 合成に関与する微生物を特定するために、嫌気ジャー・プレート法などを用いて CdSe, CdTe 微粒子の合成が確認されている集積培養体から、微生物株の純化・分離を行った。得られた分離株 (SM-8, SM-9 株) については、16SrDNA の塩基配列に基づく系統分類を実施し、種属同定や分離株の呼吸代謝の類推に利用したところ、エンテロバクター属 (*Enterobacter cloacae*) の微生物によって微粒子合成が引き起こされていることが判明した。更に分離株のみを用いてスクリーニングの際使用した培地や新たに考案した増殖培地に接種し、集積培養体のもと同様の変化がみられることを指標に、結晶粒子の合成を行う微生物株の獲得に努め、幾つかの分離株の獲得に成功した。また、CdSe, CdTe 微粒子の合成が確認されている集積培養体についても変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)などを行うことで、CdSe, CdTe 微粒子の生成工程に関わる微生物群集の構成変化を調査し、合成に関与する微生物種についての知見を明らかにした。さらに微生物の培養に伴い菌体に生成したナノ結晶粒子の存在を透過型電子顕微鏡で詳細にわたり観察した。電子顕微鏡観察と同時に、菌体(培養液)から効率的に生成した CdSe, CdTe ナノ微粒子を回収するために超音波砕機やリゾチーム、プロテアーゼ酵素処理などによる微粒子の抽出を検討することで最適抽出条件やその工程の最適化について検討した。更に、抽出した微粒子についても元素分析、電子顕微鏡などを用いた解析、同定に関する研究を遂行し、蛍光性を有する半導体微粒子が合成されていることを明らかにした。

集積培養体から微生物株の純化・分離を行い、CdSe, CdTe 合成に関与する微生物を特定できた。また、微生物コンソーシアによる目的ナノ微粒子の合成を行い、バッチ系・バイオリアクターを用いた簡易フロー循環系における培養での各イオンから微粒子への変換を確認した。透過型電顕、並びに元素分析では、テルル微粒子からカドミウムが取り込まれ、CdTe が形成されるのではないかと考えられた結果が得られた。更に、カドミウム以外の重金属カチオンを用いた他の化合物半導体結晶の合成について検討したところ、環境中からの回収が望まれる鉛、戦略元素であるニッケル、コバルト、亜鉛、各イオンをカドミウムイオンに代わるイオンとして培養

液中にセレン・テルルオキサニオンとともに添加することで、セレン・テルルとの化合物半導体結晶の合成・変換が可能である結果が得られた。また、鉛とテルルを単独の微粒子で合成できる可能性や、亜鉛微粒子の形成を予測できる結果が確認された。またセレンオキサニオン還元への解明に向けた遺伝子解析では、有効なベクター系、遺伝子導入系の開発、変異株創製系の開発を達成でき、解明に向けたステップ研究を達成できた。カドミウム以外の重金属カチオンを用いた他の化合物半導体結晶の合成については、各イオンをカドミウムイオンに代わるイオンとして培養液中にセレン・テルルオキサニオンとともに添加することで、カドミウム以外の重金属を用いたなどの化合物半導体結晶の合成・変換できることが判明した。更に蛍光性が強いカチオン種イオンとも共存させながら培養することで、蛍光寿命の長い希土類化合物半導体結晶の微生物合成も原理的に可能であることが明らかになった。これらの研究を通じて、生成した微粒子の同定・特性評価が明らかになった。また、本研究内容の実用化を目的として、菌体固定化循環型バイオリアクターをデザインし、モデル廃液や実廃液レベルでのセレン・テルルの有害アニオンと有毒重金属イオンの同時回収と蛍光性半導体ナノ微粒子への変換を検証できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) 阪口利文、持田陽介、土井克也、仲宗根薫、加藤千明、三陸沖深海底から分離されたテルル酸還元性微生物の諸性質とテルル微粒子の形成、日本生物工学会、第 63 回日本生物工学会大会 トピックス集、pp.26-27 (2011) (査読なし)

(2) Toshifumi Sakaguchi, Taiki Nakano, Yuko Kimura, Shouhei Nogami, Ikue Kubo, and Yasutaka MORITA, Development of a genetic transfer system in selenate-respiring bacterium, *Citrobacter* sp. strain JSA which was isolated from a freshwater natural sediment (2011), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **111**, 443-447 (査読あり)

(3) 阪口利文、海洋微生物によるセレン回収の可能性 (総説) Biological recovery and conversion of selenium by marine microorganisms, (2010)、極限環境生物学会誌 (ISSN 1348-5474)、第 9 巻、第 2 号、116-128 項 (査読あり)

〔学会発表〕(計 19 件)

- (1) 阪口利文 他 4 名、琵琶湖深湖底からのセレンオキサニオン還元性微生物の探索、2012 年度(平成 24 年度)日本農芸化学会大会、平成 24 年度 3 月 23 日、京都女子大学、京都
- (2) 阪口利文、他 4 名、深海底から分離した微生物によって合成されたテルル微粒子の電子顕微鏡観察と解析、第 12 回極限環境生物学会年会、平成 23 年 11 月 27 日、28 日、長崎大学坂本キャンパス、長崎
- (3) 阪口利文、他 4 名、三陸沖深海底から分離されたテルル酸還元性微生物の諸性質とテルル微粒子の形成、生物工学会第 63 回大会、平成 23 年 9 月 27 日、東京農工大学工学部、東京
- (4) 阪口利文、他 2 名、海洋性セレン酸還元菌 *Vibrio* sp. NZ3-1 株に対するトランスポゾン変異株の創製、第 14 回マリンバイオテクノロジー学会大会、平成 23 年 5 月 28 日、29 日、グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター)、静岡
- (5) 阪口利文、他 2 名、微生物によるセレンを含む化合物半導体微粒子合成の可能性、日本農芸化学会 2011 年度京都大会(東日本大震災のため大会中止: 要旨提出をもって大会発表等は成立)、平成 23 年 3 月 27 日、京都女子大学、京都
- (6) Satoshi Soda, Masaki Miyake, Toshifumi Sakaguchi, and Michihiko Ike, Enrichment of and characterization of bacteria for cadmium selenide synthesis, International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIII International Congress of Mycology, Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011), Japan, 6-10 September 2011, Sapporo Convention Center and Sapporo Business Innovation Center, Sapporo, Japan
- (7) Toshifumi SAKAGUCHI, Yosuke MOCHIDA, Katsuya DOI, Kaoru NAKASONE, and Chiaki KATO, Aerobic reduction of selenite by microbes isolated from deep-sea sediments in Japan Trench, International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIII International

Congress of Mycology, Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011), Japan, 6-10 September, 2011, Sapporo Convention Center and Sapporo Business Innovation Center, Sapporo, Japan

- (8) 阪口利文 他 5 名、深海底から分離された分離された亜セレン酸還元菌の培養特性とセレン微粒子の形成、第 13 回マリンバイオテクノロジー学会、2010 年 5 月 29 日、広島大学、東広島キャンパス、広島
- (9) 阪口利文 他 1 名、好塩性セレン酸還元菌の培養特性とセレン酸還元酵素の探索、第 13 回マリンバイオテクノロジー学会、2010 年 5 月 29 日、広島大学、東広島キャンパス、広島
- (10) 阪口利文 他 1 名、海洋魚類の体表面から分離されたセレン酸還元菌からのセレン酸還元酵素の検出、第 62 回日本生物工学会、2010 年 10 月 28 日、ワールドコンベンションセンターサミット、フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎
- (11) 阪口利文、他 4 名、深海底から分離された亜セレン酸還元菌によって合成された元素体セレンナノ微粒子の観察、第 11 回極限環境生物学会年会、平成 22 年 11 月 15 日、16 日、京都大学化学研究所(宇治おうばくプラザ)
- (12) 阪口利文 (Toshifumi Sakaguchi)、他 1 名(招待講演) 原油湧出地から分離された微生物による蛍光性半導体微粒子の合成(Formation of semiconductor nano-particles by bacteria isolated from natural oil-producing environments)、RIKEN Symposium (SPring・8) 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 9 回連携研究会(The 9th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project of *Thermus thermophilus* HB8) 2010 年 8 月 21 日、播磨研究所 放射光科学総合研究センター、SPring-8 放射光普及棟講堂 (SPring・8 Public Relations Center), 佐用町、兵庫
- (13) 阪口利文、(招待講演)、海洋微生物によるセレン・テルル回収の可能性、極限環境生物学会第 11 回シンポジウム—極限環境適応の分子・ゲノム・システム基盤—、2010 年 6 月 4 日、産業技術総合研究所(つくば)、つくば、茨城
- (14) Toshifumi Sakaguchi、他 1 名、Microbial Formation of Semiconductor Nanoparticles Consisting of Selenium or Tellurium and Metals,

The 2010 International Conference Chemical Congress of Pacific basin Societies (PACIFICHEM 2010), 17 December 2010, Hawaii, USA

(15) Toshifumi Sakaguchi, 他 2 名, Isolation and characterization of marine selenium-oxyanion respiring bacteria for selenium recovery in saline environments, 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 14-18, September 2010, Palacongressi, Rimini, Italy,

(16) 阪口利文 他 2 名, 接合伝達法を用いたセレン酸還元菌への遺伝子導入系の開発、第 61 回日本生物工学会大会、平成 21 年 9 月 24 日、名古屋大学 東山キャンパス、名古屋、愛知

(17) 阪口利文 他 3 名, 接合伝達を利用したセレン酸還元菌への遺伝子導入と変異操作、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム、日本化学会、平成 21 年 9 月 14 日、九州大学 医系キャンパス・百年講堂、福岡

(18) 阪口利文 他 3 名, 魚の体表面から分離されたセレン酸還元菌の諸性質、第 12 回マリンバイオテクノロジー学会、平成 21 年 5 月 30 日、早稲田大学、西早稲田キャンパス、東京

(19) 阪口利文 他 4 名, ホタテのウロから分離された亜セレン酸還元菌の諸性質、第 12 回マリンバイオテクノロジー学会、平成 21 年 5 月 31 日、早稲田大学、西早稲田キャンパス、東京

〔図書〕(計 4 件)

(1) 阪口利文、セレンオキサニオン還元酵素とその遺伝子、(2012) 生物工学会誌、バイオメディア、第 90 巻、第 3 号、133 頁、ISSN 0919-3758

(2) Toshifumi Sakaguchi, Microbial formation of semiconductor nano-particles contained selenium or tellurium and metals (Cap.13) (2012) In Handbook of Metal Biotechnology- Application for Environmental Conservation and Sustainability (Edited by M. Ike, M. Yamashita and S. Soda), pp. Pan Stanford Publishing, pp.149-166, ISBN 978-981-4267-98-4 (ISBN 978-981-4267-99-1 eBook)

(3) 阪口利文、清水亮佑 (Toshifumi Sakaguchi

and Ryosuke Shimizu)、原油湧出地から分離された微生物による蛍光性半導体微粒子の合成 (Formation of semiconductor nano-particles by bacteria isolated from natural oil-producing environments), RIKEN Symposium (SPring・8)、理研シンポジウム 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 9 回連携研究会要旨集 (The 9th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project of *Thermus thermophilus* HB8), Abstract No. 51 (3 pages), (2010)

(4) 阪口利文、海洋微生物によるセレン・テルル回収の可能性、極限環境生物学会誌 (Journal of Japanese Society for Extremophiles)、第 9 巻、第 1 号、(July 2010)、極限環境生物学会第 11 回シンポジウム講演要旨、13-14 頁 (43-44 頁)、ISSN 1348-5474

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)
現在のところ出願を検討中

○取得状況 (計 0 件)
現在のところなし

〔その他〕ホームページ等

(1) 阪口利文、持田陽介、深海底から分離された微生物によるセレン・テルル微粒子合成 (Formation of Se and Te particles by microbes that were isolated from deep-sea environments in Japan trench) (2011)、文部科学省 先端研究施設共用イノベーション創出事業【ナノテクノロジー・ネットワーク】、京都・先端ナノテク総合支援ネットワーク研究補助事業、平成 23 年度装置利用支援成果報告書 H22-JA033

(2) 惣田 訓、三宅將貴、阪口利文、微生物によるセレン化カドミウム合成の可能性 (Microbial formation of crystalline CdSe particles)、(2011)、文部科学省 先端研究施設共用イノベーション創出事業【ナノテクノロジー・ネットワーク】、京都・先端ナノテク総合支援ネットワーク研究補助事業、平成 23 年度装置利用支援成果報告書 H22-JA034

(3) 阪口利文、清水亮佑、微生物を用いた含テルル重金属結晶微粒子の合成 (Microbial formation of crystalline particles contained cadmium and tellurium) (2009)、文部科学省 先端研究施設共用イノベーション創出事業【ナノテクノロジー・ネットワーク】、京都・先端ナノテク総合支援ネットワーク研究補助事業、平成 20 年度装置利用支援成果報告書 H20-JA013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 利文 (SAKAGUCHI TOSHIFUMI)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：10272999

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし