

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510099

研究課題名(和文) 微生物によるアルセノベタイン産生機構の解明とヒ素無毒化システムの構築

研究課題名(英文) Study on arsenic methylation characteristics of microorganisms and application to the detoxification process of arsenic

研究代表者

宮武 宗利 (MIYATAKE, Munetoshi)

宮崎大学・工学部・助教

研究者番号：40315354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では微生物の機能を利用して無機ヒ素をアルセノベタイン(AB)に変換するヒ素無毒化システムの構築を目的として、高活性のヒ素メチル化能を有する微生物の探索とこれらの細菌を使用したヒ素のメチル化反応について研究した。これまで保有していたヒ素メチル化細菌よりABへの変換効率が高い菌株を分離することができ、ヒ酸還元能を有する菌株と組み合わせることで、トリメチルヒ素化合物への変換効率の向上が図れた。これらの成果は、微生物を利用したヒ素の無毒化による自然還元技術の確立に繋がるものであった。

研究成果の概要(英文)：Biomethylation of arsenic is usually considered as a detoxification of arsenic because toxicity of most organic methylated arsenic is much less than that of inorganic arsenic. To develop an effective technology for conversion of inorganic arsenic to arsenobetaine (AB) by using microorganisms, we have searched for microorganisms that have the ability to methylate arsenic that are adequately applicable for the detoxification process. As a result, we have successfully isolated a strain, *Cellulomonas* sp. strain K63 that has arsenic methylation ability from the soil. In this study, the arsenic methylation characteristics of strain K63 were evaluated. The results suggest that strain K63 is a microorganism with arsenic methylation ability that is sufficient for use in detoxification processes, and further suggests that if the conversion efficiency to AB can be improved, a technology for restoration of arsenic to nature after detoxification using microorganisms can be established.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：環境技術 応用微生物 酵素工学 ヒ素の無毒化 アルセノベタイン

### 1. 研究開始当初の背景

有毒な無機ヒ素は人体に影響を与えないように、地下水や土壌、工場廃水など生活環境から各種処理法で除去回収されている。しかし、回収された高濃度の無機ヒ素は現在人と隔離するような方法(固化・埋設)で処理されており、特別な保管や保存施設を準備しなければならず、長期間にわたるモニタリングも必要である。そのため近い将来、保管場所の確保やランニングコストが問題になってくることは明白である。そこで、回収された無機ヒ素を無毒化することができれば、人と隔離する必要がなくそのまま自然に還元することが出来るようになるため、実用可能な無毒化処理技術の開発が望まれている。無機ヒ素の無毒化処理法としては、無機ヒ素のアルセノベタイン(AB)への変換が最も望ましいと考えられている。アルセノベタインの毒性は3価の無機ヒ素に比べ1/300と低いこと、体内蓄積性がなく半減期は3~5時間、体内で代謝されず尿中排泄されることなどから、アルセノベタインを自然に還元することは何の問題もない。現在、無機ヒ素のアルセノベタインへの変換については色々と研究がなされているが、現時点では変換効率が低い、処理にコストがかかるなど実用化には至っていない。そのため、低コストでアルセノベタインへの変換効率が高い無機ヒ素の無毒化処理技術の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

無機ヒ素のアルセノベタインへの変換において、大量に調製でき取扱いも容易である微生物を利用したメチル化反応がコスト面から最も現実的であると考え、これまで宮崎県内をはじめとして各地の土壌、地下水、河川水、汚泥などから高活性ヒ素メチル化能を持つ微生物の分離を行った。その結果、無機ヒ素を効果的にメチル化有機ヒ素に変換できるヒ素メチル化細菌を土壌から分離することができた。この細菌はこれまでに例を見ない高効率なヒ素メチル化活性を示し、さらにアルセノベタイン産生を確認することができ、無毒化処理へ十分に適用可能だと判断された。そこで、さらに高活性のヒ素メチル化能を有する微生物の探索とこれらの細菌を使用したヒ素の無毒化システムの構築を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒ素メチル化細菌のヒ素メチル化特性

供試菌株として、これまで保有していた *Bacillus cereus* R2 株に加え、新たに宮崎県内のヒ素に汚染されていない土壌より分離した *Cellulomonas* sp. K63 株のヒ素のメチル化特性について調べた。

培養時での実験では、培地として R2A 培地にグルコースを添加したものを使用した。ヒ素は3価のヒ素(As(III))として亜ヒ酸ナトリウムを、5価のヒ素(As(V))としてヒ酸二

ナトリウムを各種濃度で添加した。前培養は30、24時間、100 strokes/min の条件で実施した。本培養は前培養の培地を新たな培地に2.0 v/v%接種して行なった。好氣的培養は30、100 strokes/min で振とう培養した。嫌氣的培養は上部を窒素で置換した後、30で静置培養した。所定の時間ごとに培養液の濁度を測定した後、遠心分離(10,000rpm、15分間)により菌体と培養上清に分け、培養上清中のヒ素濃度を測定した。

菌体内抽出液を用いた実験では、R2A 培地にグルコース 1.0 g/L、亜ヒ酸ナトリウム 10.0 mg As/L 添加した培地で、好氣的に30、2日間培養した後、遠心分離(10,000rpm、15分間)により菌体を回収し、凍結乾燥した。得られた菌体を精製水に懸濁した後、菌体を破碎するために超音波処理を行い遠心分離(10,000rpm、15分間)により破碎菌体と上清に分け、その上清を菌体内抽出液とした。*Bacillus megaterium* UM-123 株および *Bacillus cereus* W2 株、R2 株の菌体内抽出液は、Nutrient Broth のみを用いて、好氣的に30、1日間培養して得られた凍結乾燥菌体を上記の方法で処理して調製した。ヒ素のメチル化反応は菌体内抽出液を0.10 mL、10.0 mg As/L As( )溶液を0.05 mL、20 mM S-アデノシルメチオニン溶液を0.05 mL に25 mM リン酸緩衝溶液を加え全量を0.50 mL として行った。ヒ素のメチル化反応に対する pH の影響では、pH6.0~8.0 のリン酸緩衝溶液を用いて35、2時間反応を行った後、反応溶液中のヒ素濃度を測定した。ヒ素のメチル化反応に対する温度の影響では、pH7.0 のリン酸緩衝溶液を用いて25~45で、2時間反応を行った後、反応溶液中のヒ素濃度を測定した。経時変化においては、pH7.0 のリン酸緩衝溶液を用いて35で、0.5~4時間反応を行い、各時間での反応溶液中のヒ素濃度を測定した。添加物の影響では、70 mM グルタチオン溶液(GSH)または *B. megaterium* UM-123 株、*B. cereus* W2 株の菌体内抽出液を0.05 mL 加え、pH7.0 のリン酸緩衝溶液を用いて35で、4時間反応を行った後、反応溶液中のヒ素濃度を測定した。

#### (2) ヒ素除去装置からの汚泥処理におけるヒ素メチル化細菌の利用

ヒ素除去装置の汚泥槽より採取した汚泥1.0 mL に滅菌水9.0 mL を加え懸濁した後の上澄み液に、培地を2.0 v/v%加え30で4日間培養を行なった。その際、ヒ素メチル化細菌の影響を調べるため、*B. cereus* R2 株をヒ素の添加していない培地で30、24時間振とう培養した後の培養液を、2.0 v/v%加え同様に培養を行なった。好氣的培養は培地100 mL を入れかぶせ式シリコ栓で蓋をした500 mL 容振とうフラスコを用いて、100 strokes/min で振とう培養した。嫌氣的培養は培地100 mL を入れシリコ栓で蓋をした100 mL 容メジューム瓶を用いて、上部を窒素

で置換した後、静置培養した。培養後、培養液を遠心分離(10,000×g,15分間)により、菌体と培養上清に分け培養上清中のヒ素濃度を測定した。

### (3)固定化菌体を用いたヒ素のメチル化

R2A 培地にグルコース 1.0 g/L、亜ヒ酸ナトリウム 10.0 mg As/L 添加した培地で、好氣的に 30℃、2 日間培養した後、遠心分離(10,000rpm,15分間)により菌体を回収し、凍結乾燥した。凍結乾燥菌体(5.0~10.0 w/v%)を分散させた水相と、5.0 w/v% ポリビニルアルコール(PVA)溶液を混合し、架橋剤として 25.0%グルタルアルデヒドを加え 1 分間攪拌した。その後、混合液をプラスチック容器に加え、-18℃で凍結し一晩保持した。生成した凍結ゲルを蒸留水に浸漬し PVA-固定化菌体とした。ヒ素のメチル化反応は 100 mg As/L As(III)溶液を 1.0 mL、20 mM S-アデノシルメチオニン溶液を 1.0 mL に pH7.0 のリン酸緩衝溶液を加え全量を 10.0 mL としたヒ素溶液中に、PVA-固定化菌体を加え 35℃で、24 時間反応を行った後、反応溶液中のヒ素濃度を測定した。

### (4)分析

培養液の濁度は紫外分光光度計(Shimadzu UV-210A)にて 600nm で測定し菌株の増殖度とした。ヒ素の定量分析は形態別に還元気化超低温捕集原子吸光装置(Shimadzu ASA-2sp - Shimadzu AA6650)を用いて測定した。トリメチルアルシンオキシド(TMAO)と AB は高速液体クロマトグラフィー質量分析装置(Waters QuattroMicro API)を用いて測定した。全ての実験は 3 回行ない、それぞれを 2 回測定した。

## 4. 研究成果

### (1)ヒ素メチル化細菌のヒ素メチル化特性

無機ヒ素をメチル化する機能を有した微生物として、*Cellulomonas* sp. K63 株を新たに宮崎県内の土壌から分離した。K63 株は、好氣的培養に比べて嫌氣的培養では対数増殖期に入るまでの誘導期が長く定常期に達するまでに時間を要した。K63 株は、200 mg As/L のヒ素を含む培地では増殖が見られず、好氣的、嫌氣的培養とも As(III)より As(V)の方が菌の増殖を抑制することが分かった。

K63 株は 50 mg As/L までの As(III)を培地に添加した場合に好氣、嫌氣の両方で効果的に無機ヒ素(iAs)をメチル化した。As(V)を培地に添加した場合ではあまりメチル化が進まず、As(III)のときとは逆に好氣的より嫌氣的の方がメチル化有機ヒ素化合物の割合が高くなった。このことから、K63 株は As(V)を As(III)に還元する機能が弱いと考えられる。メチル化有機ヒ素化合物の割合は 5.0 mg As/L の As(III)を添加した場合に、好氣的培養時に 90.1%で最大であった。このときのトリメチルヒ素化合物(TMAC)は TMAO と AB で

あり、AB の割合は 2.1%であった。また、どの条件においても培養液全体のヒ素量が培地に添加したヒ素量と変化しなかったことから、揮発性のメチル化有機ヒ素化合物は生成していないことが分かった。K63 株のヒ素メチル化能は、これまで保有していたヒ素メチル化細菌 *B. cereus* R2 株と同程度のヒ素メチル化能を有しており、K63 株の方が高濃度のヒ素に対して効果的にメチル化を行うことができた。さらに AB の産生においては、それぞれの最適条件下で比較すると産生した TMAC の割合はほぼ同じであったが、その中の AB の割合は K63 株の方が 2 倍程度高かった(表 1)。

表 1 菌株によるヒ素のメチル化反応の生成物の比較

Strain	Initial As(III) concentration (mg As/L)	Percent of total measured As compounds (%)				
		iAs	MMAA	DMAA	TMAO	AB <sup>a</sup>
<i>Cellulomonas</i> sp. K63	5.0	9.9	1.9	51.9	34.2	2.1
<i>Bacillus cereus</i> R2	0.1	11.0	0	53.7	34.4	0.9

菌体内抽出液を使ったヒ素のメチル化反応でも K63 株と R2 株ではほぼ同じ特性を示した。K63 株では pH 7.0、35℃、4 時間でメチル化有機ヒ素化合物の割合が 34.0%、TMAC の割合は 9.0%であった。培養時でのヒ素のメチル化に比べ、菌体内抽出液を用いた場合にはメチル化有機ヒ素化合物の割合は半分以下であったが、反応速度は約 18 倍になった。ヒ酸還元能を有する細菌 *B. megaterium* UM-123 株と *B. cereus* W2 株からの菌体内抽出液を反応溶液に加えると、メチル化有機ヒ素化合物の割合は無添加時と比べて変化はなかったが、TMAC の割合が 14.9%と 1.6 倍以上になった(図 1)。

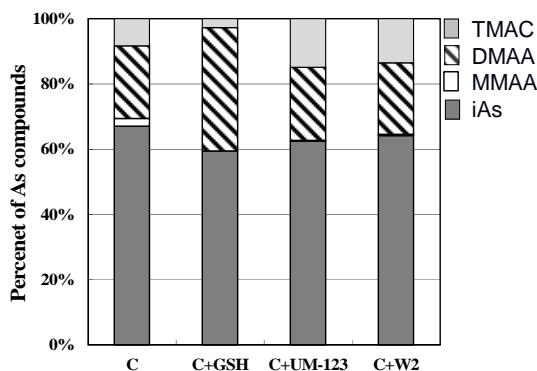


図 1 K63 株のヒ素のメチル化反応に及ぼす添加物の影響 .C; コントロール(K63 株菌体内抽出液のみ),C+GSH; コントロール+GSH, C+UM-123; コントロール+UM-123 株菌体内抽出液 ,C+W2; コントロール+W2 株菌体内抽出液.

これらの結果は、微生物を利用したヒ素の無毒化システムの構築に繋がるものであった。

### (2)ヒ素除去装置からの汚泥処理におけるヒ素メチル化細菌の利用

ヒ素メチル化細菌 *B. cereus* R2 株は、ジメチルアルシン酸(DMAA)や TMAO のような非揮発性のメチル化有機ヒ素化合物を産生することが分かっており、特に 0.100 mg As/L

の As( )を添加した場合に好氣的培養時に 89.0%の割合で無機ヒ素をメチル化有機ヒ素化合物に変換する。ヒ素除去装置から排出される汚泥中の無機ヒ素のメチル化を促進させるために、R2 株の培養液を培地に加え汚泥内の微生物と一緒に培養を行なった。その結果、好氣的または嫌氣的な培養条件においても R2 株を添加した場合、無機ヒ素 (iAs) の濃度が減少し、特に As( )を添加した好氣的培養では 0.005 mg As/L と、R2 株を添加していない場合に比べて 54.0%まで減少した。一方 DMAA は、R2 株を添加した場合でも添加しなかったときとほぼ同じ程度の濃度を示した。TMAO は As(V)を添加した好氣的培養以外で、R2 株を添加すると検出することができ、その濃度は As( )を添加した好氣、嫌氣的培養で 0.015 mg As/L 以上であった。培養液の全ヒ素濃度は TMAO を検出することができなかった As(V)を添加した好氣的培養以外で、R2 株を添加すると産生した TMAO 分だけ増加した (図 2)。

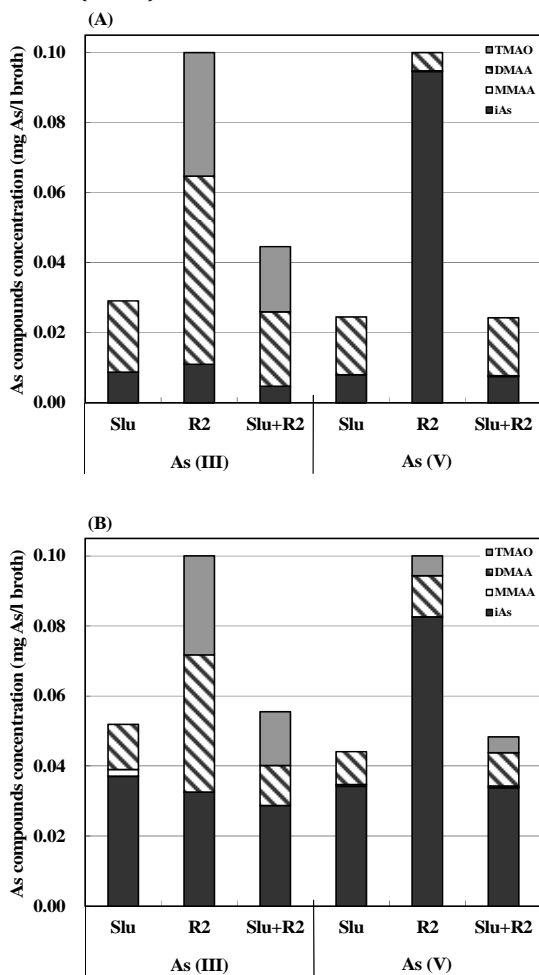


図 2 ヒ素メチル化細菌の影響。(A); 好氣的培養,(B); 嫌氣的培養, Slu; 汚泥の上澄み液のみ, R2; R2 株の培養液のみ, Slu+R2; 汚泥の上澄み液に R2 株の培養液を添加したもの

R2 株を添加することで、無機ヒ素をより多くメチル化有機ヒ素化合物に変化させることができ、ヒ素の毒性の低減化が図れた。しか

し、培養液中の全ヒ素濃度は R2 株を添加することで増加した。

### (3) 固定化菌体を用いたヒ素のメチル化

微生物を無毒化プロセスへ応用するために、固定化方法に PVA-冷凍法を用いて菌体を固定化し、アルセノベタインへの連続変換を検討した。この方法は、菌体を高密度に固定化でき、さらに担体が多孔体であるため無機ヒ素溶液との接触面積を稼ぐことができるため採用した。その結果、この方法では菌体の高い固定化率を維持することができたが、培養時や菌体内出液を用いた場合に比べ、メチル化有機ヒ素化合物の割合は半分程度であった。さらに、アルセノベタインへの産生は確認できなかった。これらの結果は、ヒ素メチル化反応が菌体内でヒ素の解毒作用として働いていることから無機ヒ素の細胞内への取り込みや排出、その他の代謝機構などがこの反応に深く影響を与えているためだと考えられる。今後実用化には、ヒ素メチル化反応に菌体自体を使うのではなく菌体内抽出液や酵素を用いた方が、反応を単純化し制御を容易にすることができ変換効率の向上が図れると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Munetoshi Miyatake, Sachio Hayashi, Arsenic Methylation by Microorganisms in Sludge Tank of Arsenic Removal Unit, Proceeding of the 3rd International Symposium on Health Hazards of Arsenic Contamination of Groundwater and its Countermeasures, 査読無、2012、pp.134 - 137

Munetoshi Miyatake, Sachio Hayashi, Characteristics of Arsenic Removal by *Bacillus cereus* Strain W2, Resources Processing, 査読有、Vol.58, No.3, 2011、pp.101 - 107

宮武 宗利、林 幸男、ヒ素除去装置の汚泥槽内の微生物によるヒ素のメチル化に関する研究、環境資源工学、査読有、58 巻、4 号、2011、141 - 145

[学会発表](計3件)

宮武 宗利、ヒ素メチル化能を有する *Cellulomonas* sp. K63 株の性質、第 19 回ヒ素シンポジウム、2013年11月17日、九州大学(福岡県)

宮武 宗利、微生物によるヒ素のメチル化とヒ素除去装置の汚泥処理に関する研究、第 18 回ヒ素シンポジウム、2012 年 11 月 25 日、宮日会館(宮崎県)

Munetoshi Miyatake, Arsenic Methylation by Microorganisms in Sludge Tank of Arsenic Removal Unit, The 3rd International Symposium on

Health Hazards of Arsenic  
Contamination of Groundwater and its  
Countermeasures、2012年11月23日、  
宮日会館(宮崎県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮武 宗利 (MIYATAKE, Munetoshi)

宮崎大学・工学部・助教

研究者番号：40315354