

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 16 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580482

研究課題名(和文) 深海底微生物によるセレン、テルルオキサニオンの単体元素化回収

研究課題名(英文) Removal and conversion of selenium and tellurium oxyanions into their elemental forms by deep-sea microbes

研究代表者

阪口 利文 (Toshifumi, Sakaguchi)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：10272999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：セレン・テルルはレアエレメントとしての希少性があり、廃液、廃棄物中からの有効な再資源化手法の確立が望まれている。毒性の高いセレン・テルル酸化物を常温・常圧下のマイルドな条件下での変換・回収が期待されている。本研究では、深海底由来の微生物による効率的なセレン・テルル回収法の開発を目的として、深海底からセレン・テルル還元能を有する微生物を探索した。また、得られた分離株の同定、培養特性の調査、ナノ微粒子の形成可能性、更には形成微粒子に対する観察、元素分析などを実施した。分離株は元素体セレン・テルル形成が可能であり、銀などのレアエレメントの微粒子の合成にも利用できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Selenium and tellurium have the rarity as rare element, and the effective method for recovery and recycling of selenium and tellurium under mild conditions, has been required. As selenium (Tellurium) -oxyanion which is one of the oxide form of Se (Te) is toxic to various organisms, the simple and practical technique for detoxification of Se (Te) -oxyanions is necessary. In this study, we searched for and isolated microbes capable of reducing Se (Te)-oxyanions into elemental Se (Te) nano-spheres from deep-sea sediments. Furthermore, the biochemical and culture properties, phylogenetic analysis, and the possibility of the nano-sphere formation were investigated. Formation of nano-sphere which consist of almost pure Se (Te) due to deep-sea isolates that were identified as *Shewanella* spp. was confirmed by the TEM observation and the EDS analysis. In addition, it was suggested that the isolates were also available for the synthesis of fine particles of rare elements such as silver.

研究分野：応用微生物学

キーワード：深海底生物資源 元素回収 レアエレメント 海洋微生物 カルコゲン元素

1. 研究開始当初の背景

カルコゲン元素を代表するセレン、テルルは、その特性から半導体をはじめとする無機結晶材料に多く用いられる有用元素である。そのため、これらの元素の活用分野は多岐に及ぶ。しかしながら、セレン・テルルの専用鉱なく、硫化銅を精錬する際の副産物として、かろうじて確保されている元素である。現在、銅需要の多さに伴う硫化銅の精錬頻度上昇によって国内需要に対して十分な量が確保されているが、需要を海外に依存する元素であるため廃棄物などからの同元素の有効な回収・再資源化法が望まれている。

同時に、セレンやテルルの酸化体アニオンであるセレン(テルル)オキシアニオンは環境中に放出された場合、発がんなどの問題を引き起こし、生物にとって有害な分子種となるため、日本をはじめ欧州・米国などでは厳しい排出規制値が設けられている。そのため、排水・廃棄物に含まれる総セレン・テルル量を有効かつ簡便に減容・回収する手法が模索されている現状である。

近年、深海泥質には多くのレアエレメントの含有が確認されており、深海泥質を生息域とする微生物種における希少元素に対する多様な代謝能が期待される場所である。そこで、本研究では、三陸沖日本海溝水深 6000メートル級の深海底海洋環境を中心に種々の海洋底試料から分離された新規の微生物を利用した簡便なセレン・テルル回収法の実用化を検討することで、精錬や都市鉱山品の処理排水からの有効なセレン、テルルの回収の可能性を着想した。更に、回収用のバイオリアクターシステムの作製を検討し、セレン・テルルの再資源化システムの構築が可能であると判断された。

2. 研究の目的

微生物によるカルコゲン元素回収の中でセレン・テルルについては物理・化学的手法などの既存法に比較して、常温・常圧のマイルドな条件での物質変換・回収・ナノ微粒子化が可能である。加えて、これら技法に比して安価に行える手法として注目されている。また、ある種の嫌気性微生物は毒性の高いセレン(テルル)オキシアニオンを生育のための最終電子受容体として、生体活動のエネルギーを獲得することが知られている。

そこで、申請者は微生物によるセレン・テルル回収・再資源化やこれらの毒性化合物の無害化に着想して、これまで、海洋探査船かいこう 7000II による調査潜航に参加し、三陸沖の日本海溝水深 6500~7000 m 級の深海底より採取した泥質、海水試料から、セレン・テルル回収に利用可能な微生物株の探索を実施してきた。

本研究ではこのシーズを活用しながら、深海由来微生物を利用した簡便なセレン・テルル回収法の実用化手法の開発を目的とする。この達成のために、セレン・テルル回収用生

物素材としての評価を行うことを目的とした分離微生物の培養特性、セレン・テルルオキシアニオンに対する挙動、分子系統解析を調査する。また、生成微粒子の電子顕微鏡解析・元素分析、循環型リアクターの構築、セレン・テルルの微粒子化に関連する分子種の同定に向けた研究課題を実施する。

3. 研究の方法

(1) 分離株については、代謝機構や種系統などの詳しい特性において不明な点があり、資源回収素材やバイオレメディエーションへの利用を達成するためには生物種の特長などの把握が必要となる。そこで、まず 16SrDNA の塩基配列に基づく分子系統解析によって既存分離株の生物種の確定を実施した。また、深海採泥試料(図1)を接種し

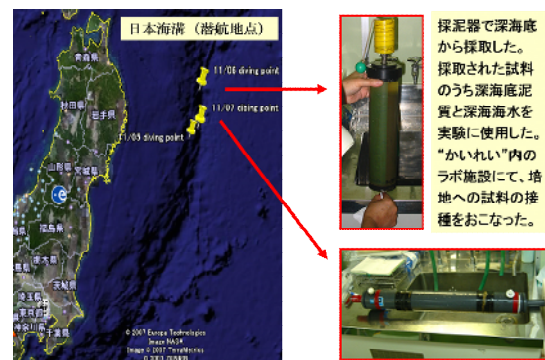


図1 深海底試料(底泥など)の採取

た集積培養体を作製し、醸成された集積培養体からプレート法などで微生物株の純化・分離を行った。これらの実験は、ルーティンな行程を繰り返すことで目的の分離株を獲得した。更に、数度にわたるプレートスクリーニングを繰り返すことでセレン・テルルオキシアニオンに対して還元能が高い株を選抜し、生化学試験、培養特性、系統分類などによる種属同定や分離株の代謝特性など基本的な特性の把握のための実験を行った。

(2) 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評価、応用を試みることで、結晶材料としての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する必要がある。そこで、分離株によって合成されたナノ微粒子に対する分析電子顕微鏡、元素分析、結晶回折などを用いた材料解析を実施した。また、リアクターによる回収システムの構築を目指し、バッチ、セミフロー系システムによるセレン・テルル回収について検討した。更に、異化的代謝に基づく嫌気的な条件での回収ではなく、硫黄代謝などの同化的なプロセスでの好氣的なセレン・テルル還元についても検討することで嫌気処理が不要な手法での回収・変換の可能性に明らかにした。更に、分離菌株に対して接合伝達法やエレクトロポレーションを用いたトランスポゾン挿入変異、異種遺伝子の導入について検討し、

セ微粒子合成に関与する遺伝子の特定を目指した。

4. 研究成果

(1) 三陸沖日本海溝の深海底からの目的分離株の純化をはじめ、研究に供する分離株のキャラクタリゼーション、培養特性の把握、カルコゲンオキシアニオンの変換可能性について明らかにすることができた。分離株の諸特性の結果については表1にまとめて掲載し

表1 純化株の簡易試験法による生化学試験結果

同定項目	NA-1	NA-2	NA-5	SA-1	SA-3
グラム染色	+	+	-	+	+
カタラーゼ活性	-	-	-	-	-
オキシダーゼ活性	-	-	-	-	-
硝酸塩の還元への還元	+	-	-	+	+
インドール産生	-	-	-	-	-
β-D-グルコースの糖化	-	-	-	-	-
アルギニンヒドロラーゼ	-	-	-	-	-
ウレアーゼ	-	-	-	-	-
加水分解(グルコシダーゼ)	+	+	+	+	+
加水分解(プロテアーゼ)	+	+	+	+	+
p-ガラクトシダーゼ	-	-	-	-	-
プロテアーゼの同化	+	+	+	+	+
L-アラビノースの同化	+	+	+	+	+
D-マンノースの同化	+	+	+	+	+
D-マンニトールの同化	+	+	+	+	+
N-アセチル-D-グルコサミンの同化	+	+	+	+	+
マルトースの同化	+	+	+	+	+
グルコシドカリウムの同化	+	+	+	+	+
α-ガラクトースの同化	+	+	+	+	+
アジピン酸の同化	+	+	+	+	+
dl-リンゴ酸の同化	+	+	+	+	+
クエン酸ナトリウムの同化	+	+	+	+	+
酢酸フェニルの同化	-	-	-	-	-

Key
+: 陽性
-: 陰性

た。これらに関する研究課題の遂行はほぼ達成されたと考えられた。また、分子系統解析についても 16SrDNA 配列に基づく分離株の分子系統分類が行われ、既に主要な分離株についても種属の同定を完了し、分離株は全て *Shewanella* 属に属する微生物種であることが明らかにされた (図2)。この結果から元素

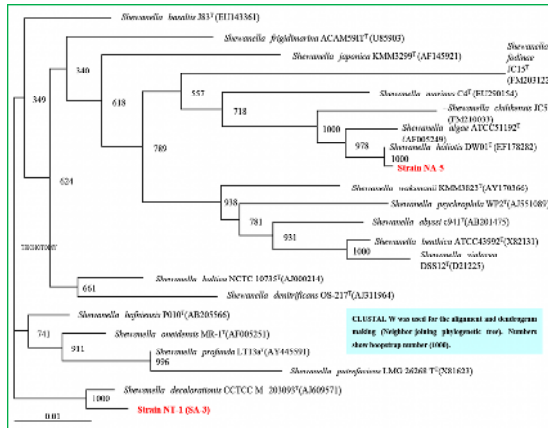


図2 Phylogenetic analysis based the 16SrDNA sequence of deep-sea isolates strains NT-1 and SA-3

回収のみならず微生物電池の生物素材としても利用できる可能性が示された。

また、深海底のみならず浅海の海洋泥や生物試料などから新たに目的微生物株の探索を実施した。昨年度、好氣的にセレン・テルルオキシアニオンが還元できる分離株の存在が判明した事実を受けて、同化的なプロセスによるカルコゲン元素の還元可能性について新たに着想した。その結果、好氣的な条件でセレン (テルル) オキシアニオンを還元できる多くの分離株が獲得でき、TEM/EDS 観察・分析によってセレン・テルルナノ微粒子の合成・変換が確認できた (図3)。この結果から、ほぼすべての微生物によるセレン・テル

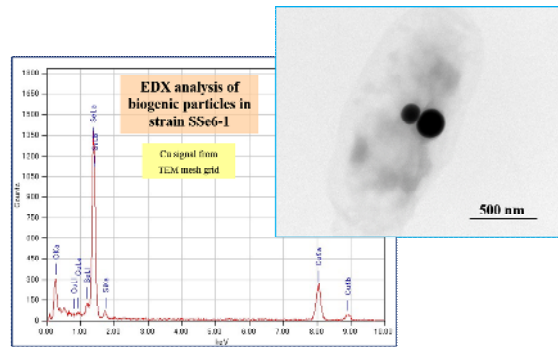


図3 海洋浅海から分離された好気性セレン酸還元菌 *Acidovorax* sp. SSe6-1 株の電子顕微鏡写真と同株に形成されたセレン微粒子の元素分析

ルナノ微粒子の合成・変換の可能性が示唆されるものであり、異化代謝によってセレンオキシアニオンを還元する (従来) の既存株とは異なり、硫黄やセレンの同化代謝によって高効率かつ簡便にセレンオキシアニオンを還元できる可能性が明らかになり、今後、当該研究の進展の必要性があると思われた。本結果は、本研究を通じて得られた有意義な派生効果であると考えられた。

セレン・テルルはその元素材料としての重要性からレアエレメントとしての希少性があり、廃液、廃棄物中からの有効な回収、再資源化手法の確立がのぞまれている。とりわけ、生物的手法は微生物の酸化還元による手法では、毒性の高いセレン・テルルの酸化物 (セレン・テルルオキシアニオン) を常温・常圧下のマイルドな条件で元素体のセレン・テルルにまで変換できる。そこで、次に、深海環境 (日本海溝) から分離された純化株に形成されたナノ微粒子の観察、元素分析を実施した。その結果、これまでの実験から得られた分離株は亜セレン、もしくはテルル酸を嫌気、好気の両条件で還元しながら増殖し、菌体内や菌体近傍に電子密度の高いナノ微粒子を形成することが透過型電子顕微鏡 (TEM) によって明らかにされた。形成されたナノ微粒子は亜セレン酸還元性の分離株では、球状で 50 から 200nm の大きさを有しており、エネルギー分散型元素分析装置 (EDX) による元素分析によってほぼセレンのみで構成されていた (図4)。これに対してテルル酸還

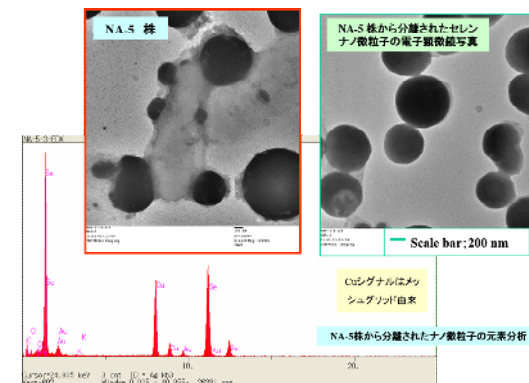


図4 深海底 (日本海溝) から分離された亜セレン酸還元菌 *Shewanella* sp. NA-5 株の電子顕微鏡写真と同株に形成されたセレン微粒子の元素分析

元性分離株の場合では、TEM 観察 EDX 解析によって、ほぼテルルで構成されている幅が

数ナノメートルで 10 から 200nm の長さを持つ針状微粒子の形成が判明した (図 5)。こ

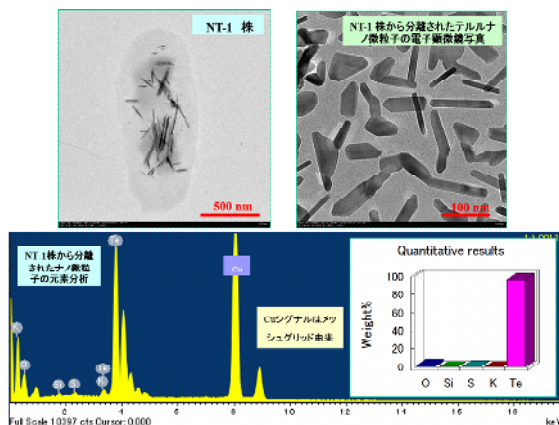


図5 深海底(日本海溝)から分離されたテル酸還元菌 *Shewanella* sp. NT-1 株の電子顕微鏡写真と同株に形成されたテル酸微粒子の元素分析

れらの結果から深海底からの分離株が毒性の高いセレン・テルルオキシアニオンをそれぞれ元素体のセレン・テルルに変換できることが明らかとなった。

バイオリクターの作製では連続・循環型の他に、(バフフルなどを用いた) バッチ方式についても検討し、セレンの回収が可能であることが明らかにされ、原理上、効率的な回収が可能であることを確認できた。しかしながら、同時に還元によって生じたセレン微粒子の保持担体外からの流出の問題を解決する必要があると判断され、今後も継続した研究課題の継続が必要であった。また、分離株におけるセレン・テルルオキシアニオン還元に関与する分子種の特異性、還元機構の解明に向けた研究については、これまでのところ予想された表現型での変異株が得られず、表現型の見直し、スクリーニング法の改善が必要であると判断され、これらについても今後の課題としなければならず、本研究結果における未達成課題と考えられた。しかしながら、同化的な代謝プロセスによるセレン・テルルオキシアニオンの還元・回収に着目し、本手法による変換・回収が可能であることを明らかにできたことは、本研究結果の他に多くの派生効果をもたらすことができ、コウジカビ、酵母、放線菌の培養菌体を用いた好気条件(嫌気処理を必要としない)で、簡便かつ効率的なセレン・テルル回収の達成につながるものとなった。

最後に、分離株による銀、パラジウムなど貴金属元素(レアメタル)の単体ナノ微粒子への変換についての研究を実施したところ、菌体活性による銀イオンの沈澱化が確認された。この結果から銀微粒子の形成が予想されたが、*Shewanella alga* の場合にみられるような、銀イオン添加後、数分以内での急激な沈澱物の形成はみられず、その形成は数日を要するものであることが確認されたが、分離株におけるレアエレメント金属イオンの生物還元については可能であることが明らかにされた。今後、パラジウムやロジウムなどの触媒用レアメタルの微粒子化にも転用で

きうる現象であると考えられ、セレン・テルルの他にも単体元素化回収が期待できると考えられた。

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 Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 576-581, 2014, Hiroyuki Ayano, Masaki Miyake, Kanako Terasawa, Masashi Kuroda, Satoshi Soda, Toshifumi Sakaguchi, and Michihiko Ike (査読有)

② Selenium recovery and conversion by a filamentous fungus, *Aspergillus oryzae* strain RIB40, *Asia Pacific Journal of Sustainable Agriculture Food and Energy*, 2(2), 5-8, 2014, Hiromi Kimura, Toshi-Hide Arima, Yoshiko Okamura, Takashi Oku and Toshifumi Sakaguchi (査読有)

③ Electron microscopy and X-ray analysis of Cr-containing precipitates synthesized by newly isolated actinobacterium, *Flexivirga alba* ST13^T, *Indian Journal of Microbiology*, 54, 358-360, 2014, Tomoyasu Sugiyama and Toshifumi Sakaguchi (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

① 六価クロムを還元する放線菌 *F. alba* ST13^T 株の TEM 解析、創立 90 周年記念第 64 回日本生物工学会大会、神戸国際会議場、(神戸、兵庫) 2012 年 10 月 24 日～2012 年 10 月 24 日、阪口利文、杉山友康

② Microbial formation of Se nano-particles by microbes newly isolated from deep sea sediment in Japan trench, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Central Public Hall of Kochi City, Culture Plaza, CUL-PORT, Kochi, Japan, 2012 年 07 月 14 日～2012 年 07 月 14 日、Toshifumi SAKAGUCHI, Tastuya HIRAOKA, Nobuyasu TANABE, Kaoru NAKASONE and Chiaki KATO

③ Cloning and sequence of selenium-oxoanion-responsive promoter region in a selenate-reducing microorganism, *Citrobacter* sp. strain JSA, The 12 Asian Conference on Transcription, Seogwipo KAL Hotel, Jeju Island, Korea, 2012 年 06 月 07 日～2012 年 06 月 07 日、Toshifumi SAKAGUCHI, Shougo HAMADA, Tastuya HIRAOKA, Nobuyasu TANABE and Kaoru NAKASONE

④三陸沖海溝の深海底から分離されたセレン・テルルオキシアニオン還元性微生物の系統分類、第15回マリンバイオテクノロジー学会大会、沖縄県市町村自治会館（沖縄県那覇市）、2013年06月01日～2013年06月02日、**阪口利文**、平岡達也、仲宗根薫、加藤千明

⑤琵琶湖深湖底から分離された新規亜セレン酸還元性バチルスに関する諸特性、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部および日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区合同大会、県立広島大学 広島キャンパス（広島県広島市）、2013年09月05日～2013年09月06日、**阪口利文**、平岡達也、石川可奈子、岡村好子、宮下英明

⑥カルコゲン元素をベースとした微生物による化合物半導体微粒子の合成、日本化学会（第28回生体機能関連化学シンポジウム、第16回バイオテクノロジー部会シンポジウム）第7回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学豊田講堂・野依学術交流館（愛知県名古屋市）、2013年09月27日～2013年09月29日、**阪口利文**、上野輝樹、溝口悠己、民谷栄一

⑦琵琶湖深湖底試料から分離された酵母、バチルス菌による亜セレン酸還元、生物工学会第65回大会、広島国際会議場（広島）、2013年09月18日～2013年09月20日、**阪口利文**、山下哲史、田邊信康、有馬英寿、石川可奈子、岡村好子、宮下英明

⑧ Elemental selenium and tellurium formation by *Shewanella* microbes newly isolated from deep sea sediments in Japan Trench, The 10th International Marine Biotechnology Conference (IMBC 2013), Brisbane, Australia Brisbane Convention and Exhibition Centre, 2013年11月11日～2013年11月15日、**Toshifumi Sakaguchi**, Yusuke Mochida, Nobuyasu Tanabe, Katsuya Doi, Kaoru Nakasone, Chiaki Kato

⑨遠州灘海洋域から分離された海洋微生物による好氣的セレンオキシアニオン還元とセレンナノ微粒子合成、第16回マリンバイオテクノロジー学会、三重大学・生物資源学部、三重県、2014年05月31日～2014年06月01日、**阪口利文**、木村博美、加藤侑香里、永富圭祐、石川輝、田口和典、岡村好子、宮下英明

⑩ Selenium reduction by a marine microbe, *Acidovorax* sp. strain SSE6-1 newly isolated from the intracellular water of planktonic tunicate (salpa) bodies that were collected in the offcoast of Enshu, Pacific Ocean, The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 2014年05月04日～

2014年05月08日、**Toshifumi Sakaguchi**, Tatsuya Hiraoka, Hiromi Kimura, Yukari Kato, Akira Ishikawa, Kazunori Taguchi, Hideaki Miyashita

⑪黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた亜セレン酸還元と元素体セレンの回収、第66回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター、北海道、2014年09月09日～2014年09月11日、木村博美、有馬寿英、岡村好子、**阪口利文**

⑫海洋から分離された微生物によるテルルオキシアニオンの還元とナノ微粒子合成、日本化学会第8回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学、津島キャンパス、岡山県、2014年09月11日～2014年09月13日、**阪口利文**、永富圭祐、永岡美優、渡邊真奈実、加藤侑香里、木村博美

⑬ Selenium Recovery and Conversion by a Filamentous Fungus, *Aspergillus oryzae* Strain RIB40, 2nd International Conference Sustainable Agriculture, Food, and Energy, 2nd International Conference Sustainable Agriculture, Food, and Energy, SAFE2014, Bari, Indonesia, 2014年09月17日～2014年09月19日、Hiromi Kimura, Toshi-Hide Arima, Yoshiko Okamura, Takashi Oku and **Toshifumi Sakaguchi**

⑭アヤマカサゴ (*Sebastes albofasciatus*) の体表面から分離された海洋由来 *Deinococcus* sp. AKG-1株の諸性質、第15回極限環境生物学会年会、今帰仁村コミュニティセンター、沖縄県、2014年11月01日～2014年11月03日、加藤侑香里、木村博美、石川輝、田口和典、宮下英明、**阪口利文**

⑮六価クロム還元性放線菌 *Flexivirga alba* ST13T株によるセレン・テルルオキシアニオン還元とナノ微粒子形成、第15回極限環境生物学会年会、今帰仁村コミュニティセンター、沖縄県、2014年11月01日～2014年11月03日、樋口隼平、木村博美、杉山友康、岡村好子、**阪口利文**

⑯セレン蓄積植物における亜テルル酸取り込みと代謝、2015年度（平成27年度）日本農芸化学会、岡山大学、津島キャンパス、岡山県、2015年03月26日～2015年03月29日、武田徹、宇賀司、田畑翔太郎、**阪口利文**

⑰麹菌による好氣的条件におけるセレンオキシアニオン変換とセレン回収、2015年度（平成27年度）日本農芸化学会、岡山大学、津島キャンパス、岡山県、2015年03月26日～2015年03月29日、**阪口利文**、木村博美、有馬寿英、岡村好子

〔図書〕(計2件)

① 海洋微生物によるセレン・テルル回収、
極限環境生物の産業展開 - Industrial
Application of Extremophiles- (監修:今中忠行)、
第6章:海洋生物圏、第3節、208-217頁、
ISBN978-4-7813-0624-7、シーエムシー
(CMC)出版、2012、阪口利文

② セレン・テルル半導体材料、地球を救う
メタルバイオテクノロジー (山下光雄、清
和成 編著)、3.3 新素材創出、3.3.1、
139-150頁、ISBN978-4-425-80001-8、(株)成
山堂書店、2014、阪口利文

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件予定)
現在準備中

○取得状況 (計 件)
該当なし

〔その他〕ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 利文 (TOSHIFUMI SAKAGUCHI)
県立広島大学・生命環境学部・生命科学科・
准教授
研究者番号: 10272999

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし