

微生物による金属代謝と環境技術への応用

Science and Applications of Microbial Metal Metabolism

黒田 真史¹

KURODA Masashi

1. はじめに

我々は、日常の会話の中で、生物のように柔軟かつ巧妙に連携することを「有機的な連携」と表現したり、木や革のような生物由来の素材が使われていない部屋を「無機質な部屋」と表現するなど、無意識のうちに「生物＝有機物、非生物＝無機物」と認識しているように感じる。しかし、実際には、ヒトの場合では酵素の活性中心（鉄、銅、コバルト、モリブデン、亜鉛など）、骨格（カルシウム）などとして、金属類を主とする無機物は重要な働きをしていることは広く知られており、この認識は学術的には正しくないことがわかる。微生物の場合はさらに、独立栄養代謝における電子供与体（鉄（II）、ヒ素（III）など）や嫌気呼吸における電子受容体（鉄（III）、クロム（VI）、ヒ素（V）、セレン（VI）など）として、エネルギー獲得の過程で無機元素の酸化還元反応を行うことが知られており、無機物は非生物的どころかむしろ、微生物代謝の根幹に関わっているとさえ言える。

さらに、微生物による金属類の代謝は、地球上の元素の動態にも深く関わっている。ヒ素を例にとれば、ヒ素（V）（ヒ酸； H_3AsO_4 ）は酸化鉄等の粒子表面への吸着性が高く、環境中では土壌圏に留まりやすい性質を持つが、ヒ酸還元細菌によってヒ素（III）（亜ヒ酸； H_3AsO_3 ）に還元されると、吸着性が低くなり水圏に流出し、地下水汚染の原因になる（Pal, 2015）。このように、微生物による酸化還元反応は、化学形態の変換を通じて地球上の元素の可動性を変化させることにより、元素の地球化学的循環に寄与している。重金属類やヒ素、セレン等の半金属類は、ヒト及び生態系に対する毒性が高いものが多いことから、微生物による金属類の酸化還元反応を理解することは、健康的な環境の維持のために極めて重要であり、さらには、これらを上手く制御し利用することで、金属汚染の除去やリサイクルも可能になると考えられる。このような観点から、筆者はこれまでに、金属代謝細菌の単離、特徴付け、代謝機構の解析、金属汚染除去・回収に向けた工学的応用等の「メタルバイオテクノロジー」に関する研究に取り組んできた。本稿では、メタルバイオテクノロジーの例として、水環境汚染物質として知られるセレンを代謝する細菌についての研究を紹介したい。

¹ 常葉大学社会環境学部

2. セレン代謝細菌の分離と水相からのセレン除去・回収への応用

原子番号 34、第 16 族元素のセレンは、周期表では硫黄の真下に位置する半金属元素であり、化学的性質も硫黄に類似している。環境中では硫黄と同様に酸化数 VI（セレン酸； SeO_4^{2-} ）、酸化数 IV（亜セレン酸； SeO_3^{2-} ）、酸化数 0（単体セレン； Se^0 ）、酸化数 -II（セレノール； R-SeH 、セレニド； R-Se-R 、ジセレニド； R-SeSe-R 等）などの形態で存在する。産業上では、合金の添加剤として用いられる他、近年は特に半導体原料としての利用が注目されており、セレンを含む CIGS 系太陽電池は、再生可能エネルギー需要の高まりを受けて、日本でも広く普及が進んでいる。

また、セレンは動物の必須微量元素でもあり、ギ酸デヒドロゲナーゼ等の酸化還元反応を触媒する酵素に含まれている。一方で、過剰な摂取により毒性を発揮する「諸刃の剣」であることも知られており、水環境および土壌環境の代表的な汚染物質の一つとして、環境基準項目にも挙げられている。セレンを含む排水・廃棄物は、化学工業、金属・非鉄金属製品製造業、火力発電所、セメント製造業、廃棄物処理業などで発生し得るため（環境省水・大気環境局水環境課，2020）、これら業種ではセレンの適切な処理・管理が求められているが、効果とコストの両面で有効な処理技術は未だ確立されていないため、基準値を満たすまで希釈して廃棄するなどの対応が取られている場合も多く、セレン含有排水・廃棄物の処理は事業者にとって大きな問題になっている。

一方、環境中には、排水や廃棄物中のセレンの主な形態であるセレン酸や亜セレン酸を代謝する細菌が存在している。セレン酸や亜セレン酸は高い水溶性を持ち、水相からの分離は容易ではないが、セレン代謝細菌はこれらを不溶性の粒子である単体セレンや揮発性を持つセレニド化合物に還元するため、水相からのセレン分離・回収操作が可能となる（図 1）。生物反応の特異性の高さに由来して、高い純度のセレンを回収できるため、資源として再利用可能であることも環境技術として優れた特徴として挙げられる。亜セレン酸は、亜硝酸還元酵素によって非特異的に還元される場合があることも報告されており（DeMoll-Decker and Macy, 1993）、経験的にも、多少のセレン還元活性を示す細菌は環境試料から比較的多く見つかるが、培養が容易で還元活性の高い工学的な利用に適した細菌に関する報告は多くない。そこで筆者らは、工学的に利用可能な新たなセレン代謝細菌を取得することを目的として研究に取り組み、セレン精錬工場の排水処理設備に付着していたバイオフィームから、*Pseudomonas stutzeri* NT-I を単離した（Kuroda et al., 2011）。NT-I 株は好気条件下で 1 mM のセレン酸を、亜セレン酸を経て単体セレンまで 18 時間で還元した（図 2）。培養後の菌体は非晶質セレンに特徴的な赤色を呈しており（図 3）、走査型電子顕微鏡による観察では、単体セレンは細胞外に直径数十 nm の粒子として生成

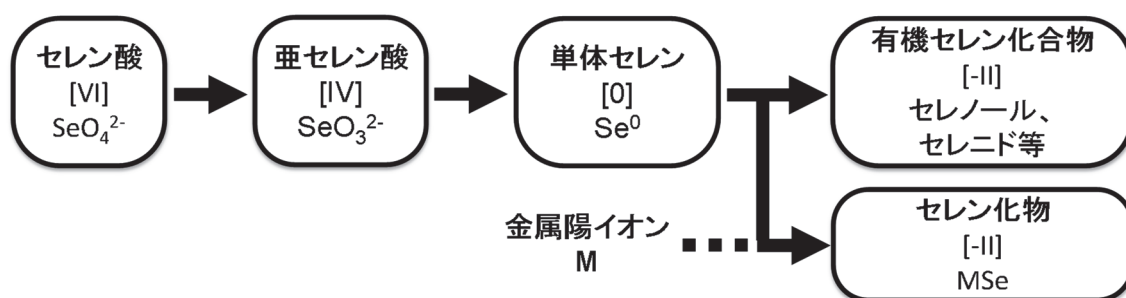


図 1 微生物によるセレンの還元経路

していた (図 4)。従来のセレン代謝細菌は、還元反応に厳密な嫌気条件を要求するものが多く、単体セレンの生成まで 100 時間程度を要するものもあるが (Fujita et al., 1997)、それと比較して本菌株は極めて高いセレン酸・亜セレン酸還元活性を持っているものと言える。また、当初は本菌株による最終生成物は単体セレンであると考えていたが、単体セレン生成後も培養液を回収せず、インキュベーター内で放置していたところ、培養液の赤色が退色していることを発見した。機器分析により詳細に確認したところ、80% 以上のセレンは揮発性のジメチルジセレニド ($\text{CH}_3\text{SeSeCH}_3$) 等の形態に変換され、培養系から気相部へと除去されていたことが明らかとなった (Kagami et al., 2013)。セレンの揮発化は糸状菌等においてごくわずかに生じることが知られていたが、このような活発な揮発化が生じることはほとんど報告されておらず、非常に稀有なセレン代謝細菌であることが明らかとなった。これらより、本菌株は排水・廃棄物に含まれるセレンの除去・回収への適用に有望な細菌であると考えられた。実際

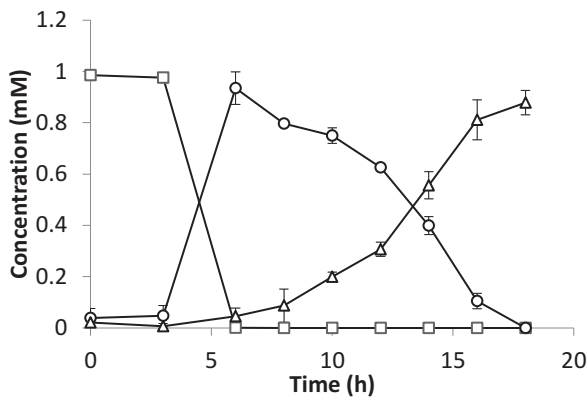


図 2 *P. stutzeri* NT-1 によるセレン代謝 (Kuroda et al., 2011).

□: セレン酸, ○: 亜セレン酸, △: 単体セレン.

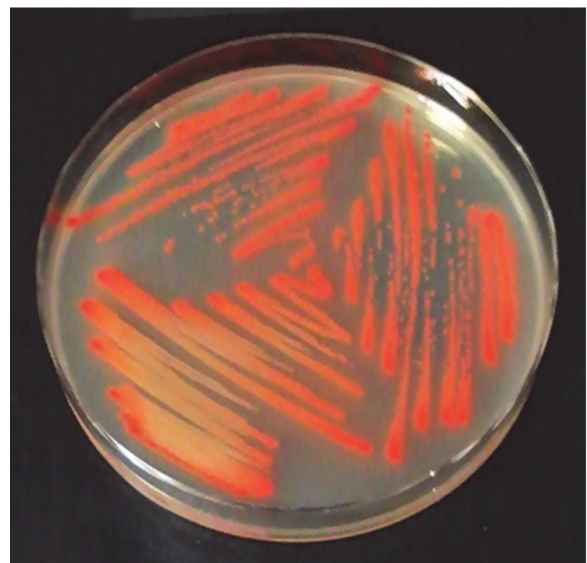


図 3 セレン酸を含む寒天培地上に生育した *P. stutzeri* NT-1 の菌体。非晶質セレンの生成により菌体全体が赤く呈色している。

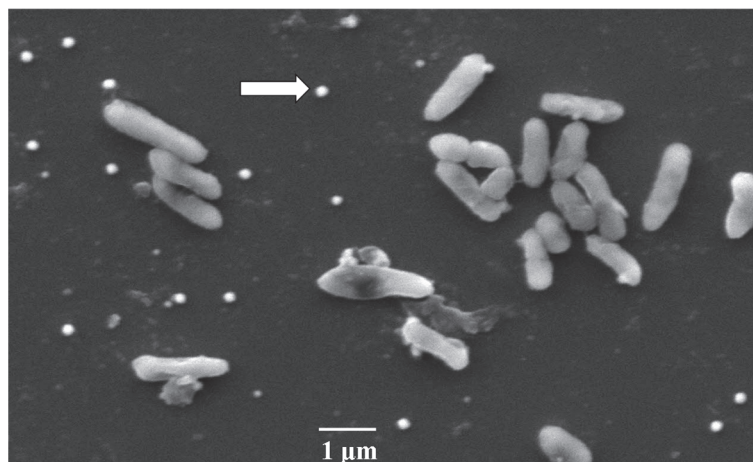


図 4 *P. stutzeri* NT-1 が生成した単体セレン粒子の走査型電子顕微鏡像 (Kuroda et al., 2011)。矢印が単体セレン粒子。

に、セレン精錬工場排水やセメント製造副産物に含まれるセレンの処理にも利用可能であることが実証されている (Soda et al., 2012; Soda et al., 2015)。一方で、これらの研究では、セレンを含む排水・廃棄物に含まれる塩分が NT-I 株の増殖とセレン代謝を阻害したため、排水の希釈が必要となった点が課題となった。塩分やその他の阻害物質への耐性が高いセレン代謝細菌を取得することが、実用化に向けた今後の課題であると考えられた。

3. 微生物による半導体ナノ粒子の合成

筆者らは、細菌による優れたセレン代謝を産業にも応用することを目指して、セレン代謝細菌を利用したセレン化物系半導体ナノ粒子の合成法の確立にも取り組んできた。上述のように、高い活性を持つセレン代謝細菌は、代謝の過程で酸化数 -II のセレノール化合物を生成する場合があります、ここに対応する金属陽イオンが共存することで、半導体である金属セレン化物が生成する可能性があると考えられる (図 1)。半導体ナノ粒子の合成法は、ホットソープ法や材料の粉碎・焼結などの化学的・物理的手法が主流であるが (Ma et al., 2008; Xie et al., 2009; Gao et al., 2013)、これらの多くは、有害な溶媒を用いることや、材料の合成と粉碎に多くのエネルギーを消費することなど、環境適合性が低い点が課題として挙げられる。一方で、生物反応の場合は、当然ながら生物に有害な物質は必要とせず、常温・常圧反応であることからエネルギー消費が少ないという特性を持つ。さらに、“マイクロファクトリー”である微細スケールの細胞を合成の場として利用することで、人の手で合成するよりも容易にナノ粒子を合成できる可能性もある。このような利点を生かすことで、生物学的合成法は環境適合性の高い手法になると期待される。

セレン化ビスマスは、熱エネルギーと電気エネルギーを相互に変換する性質を持つ熱電材料の一種であり、熱電変換素子として電子制御による加熱冷却や、排熱からのエネルギー回収に利用されている。筆者らは、NT-I 株に加えて、*P. aeruginosa* RB (Ayano et al., 2014)、テルルの代謝細菌でもある *Stenotrophomonas maltophilia* TI-1、*Ochrobactrum anthropi* TI-2、*O. anthropi* TI-3 (Kagami et al., 2012) の 5 種のセレン代謝細菌を用いて、セレン化ビスマス (Bi_2Se_3) の合成を試みた (Kuroda et al., 2019)。まず、これら 5 種の細菌のセレン代謝を同じ条件下で比較したところ、NT-I 株のみならず全ての細菌が速やかに水溶性の亜セレン酸を還元し、固相に単体セレンを生成した後、セレンを揮発化させる活発なセレン代謝を持つことが明らかとなった (図 5)。続いて、これら細菌を 1.5 mM の亜セレン酸と 1 mM のビスマス (III) イオン存在化で培養したところ、亜セレン酸とビスマス (III) が同調的に減少し、培養液は非晶質セレンの赤色とは異なる黒色を呈した。培養開始 48 時間後の固相を透過型電子顕微鏡で観察したところ、NT-I 株、RB 株、TI-2 株、及び TI-3 株は直径 50–100 nm の粒子を細胞外に形成していた (図 6 a, b, d, e)。また、TI-1 株は直径数 nm の微細な粒子を細胞表面または内部に多数形成していた (図 6 c)。エネルギー分散型 X 線分析により、それら粒子はいずれも主として硫黄、セレン、ビスマスの 3 種の元素から構成されており、(S+Se)/Bi 比は 1.51 ~ 1.67 であったことから、これらの粒子は $\text{Bi}_2\text{S}_x\text{Se}_{(3-x)}$ であると考えられた。半導体としての機能を最大限に発揮させるための粒子の組成とサイズを制御する培養法の確立が課題として残るが、温和な条件下でナノサイズの半導体粒子をワンステップで合成できる本手法は、セレン化物半導体ナノ粒子の新たな合成経路の可能性を提示するものと考えている。

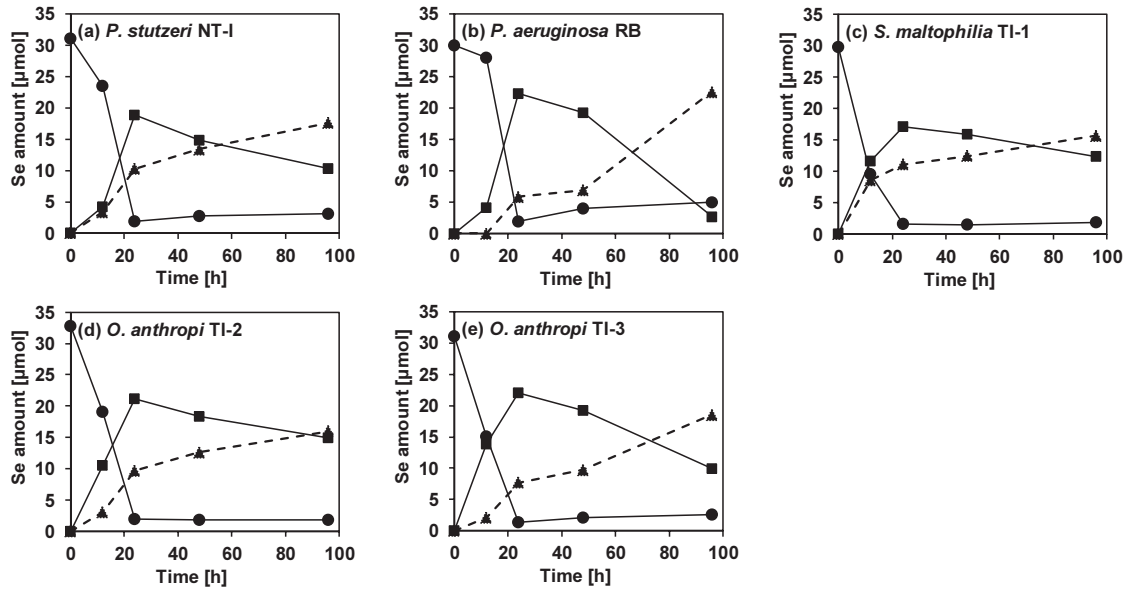


図5 5種の細菌のセレン代謝 (Kuroda et al., 2019).

●：水相セレン、■：固相セレン、▲：揮発により失われたセレン。

4. まとめと今後の展望

本稿では、微生物による金属類の代謝と環境技術への応用について、特にセレンを題材として紹介した。代謝に大きなエネルギーを要求しないことと反応特異性が高いことという全ての生物が共通して持つ特徴は、様々な物質を複合的に含む中で、できるだけ低コストで目的の汚染物質のみを除去・回収したいという、常に環境技術に求められる要件との親和性が非常に高いと考えられることから、メタルバイオテクノロジーは金属資源の適切な利用と管理に向けた有望な技術の一つであると言え、実用化に向けたさらなる技術開発を推進していくべきであると言える。一方、学術的には、生物による金属類の代謝の機構や金属代謝の生物学的意味などにおいて未知の部分は非常に多く残されており、分子機構から生態系のレベルに至るあらゆる段階で、さらなる詳細な研究が必要である。また、世界で汚染が問題になっているヒ素や、レアメタルとして非常に価値が高い希土類元素のような、社会的要請の高い元素に対する重点的な技術開発も必要である。筆者は、これらの課題に継続して取り組み、メタルバイオテクノロジーのさらなる深化と実用化に貢献していきたいと考えている。

参考文献

- Ayano, H., Miyake, M., Terasawa, K., Kuroda, M., Soda, S., Sakaguchi, T., Ike, M. (2014) "Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 117, No. 5, pp. 576–581
- DeMoll-Decker, H., Macy, J.M. (1993) "The periplasmic nitrite reductase of *Thauera selenatis* may catalyze the reduction of selenite to elemental selenium", *Archives of Microbiology*, Vol. 160, pp. 241–247

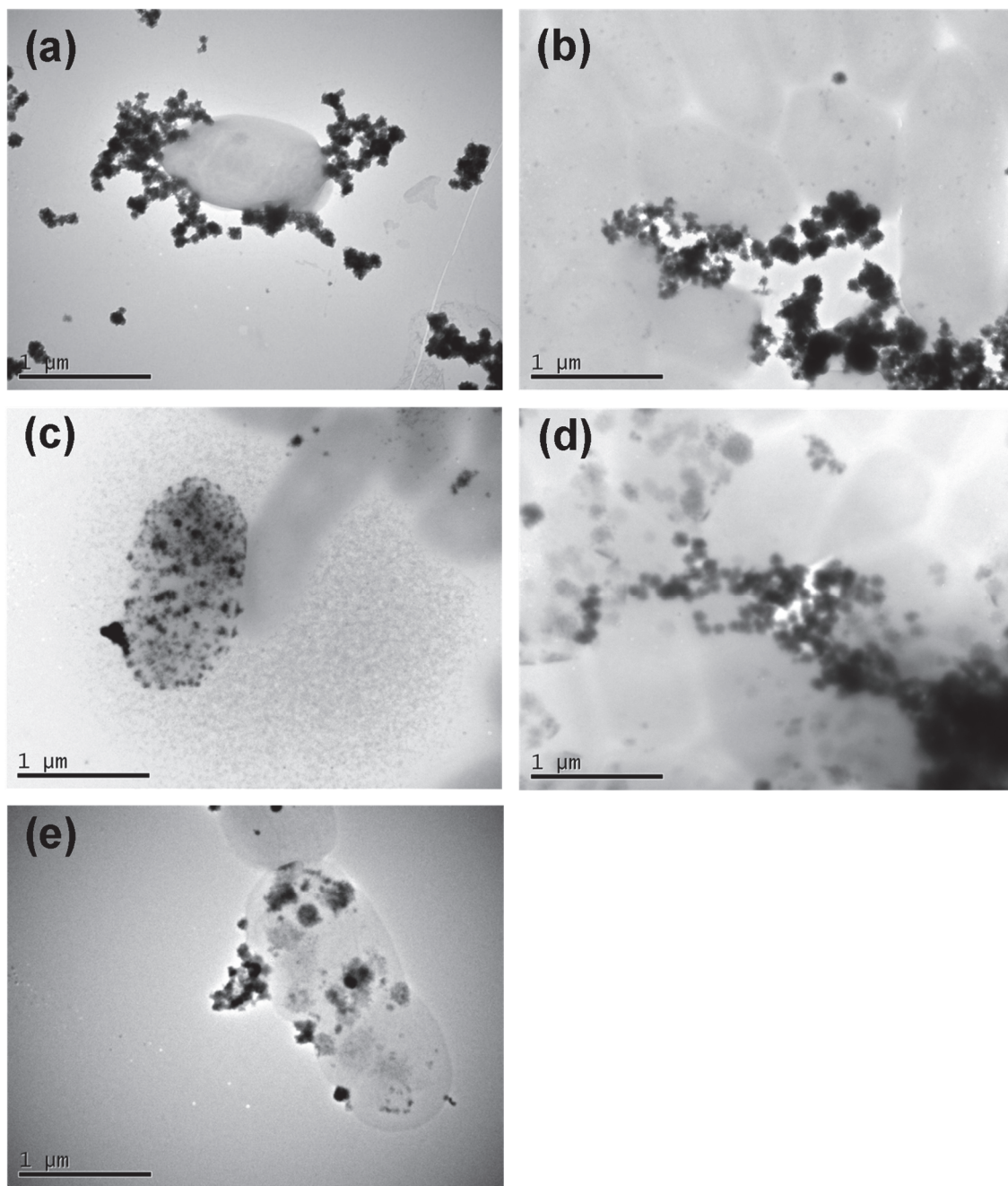


図6 5種の細菌の細胞と生成した Bi_2Se_3 粒子の透過型電子顕微鏡像 (Kuroda et al., 2019).
(a) *P.stutzeri* NT-I (b) *P.aeruginosa* RB (c) *S.maltophilia* TI-1 (d) *O.anthropi* TI-2 (e) *O.anthropi* TI-3

- Fujita, M., Ike, M., Nishimoto, S., Takahashi, K., and Kashiwa, M. (1997) "Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 83, No. 6, pp. 517–522
- Gao, M.R., Xu, Y.F., Jiang, J., Yu, S.H. (2013) "Nanostructured metal chalcogenides: synthesis, modification, and applications in energy conversion and storage devices", *Chemical Society Reviews*, Vol. 42, No. 7, pp. 2986–3017
- Kagami, T., Fudemoto, A., Fujimoto, N., Notaguchi, E., Kanzaki, M., Kuroda, M., Soda, S., Yamashita, M., Ike, M. (2012) "Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater", *Waste and Biomass Valorization*, Vol. 3, No. 4, pp. 409–418
- Kagami, T., Narita, T., Kuroda, M., Notaguchi, E., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S., and Ike, M. (2013) "Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I", *Water Research*, Vol. 47, No. 3, pp. 1361–1368
- Kuroda, M., Notaguchi, E., Sato, A., Yoshioka, M., Hasegawa, A., Kagami, T., Narita, T., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S., and Ike, M. (2011) "Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 112, No. 3, pp. 259–264
- Kuroda, M., Suda, S., Sato, M., Ayano, H., Ohishi, Y., Nishikawa, H., Soda, S., Ike, M. (2019) "Biosynthesis of bismuth selenide nanoparticles using chalcogen-metabolizing bacteria", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 103, pp. 8853–8861
- Ma, Y., Hao, Q., Poudel, B., Lan, Y., Yu, B., Wang, D., Chen, G., Ren, Z. (2008) "Enhanced thermoelectric figure-of-merit in *p*-type nanostructured bismuth antimony tellurium alloys made from elemental chunks", *Nano Letters*, Vol. 8, No. 8, pp. 2580–2584
- Pal, Parimal (2015) *Groundwater Arsenic Remediation - Treatment Technology and Scale Up* -. Elsevier. ISBN: 978-0-12-801281-9
- Soda, S., Takahashi, H., Kagami, T., Miyake M., Notaguchi, E., Sei, K., Iwasaki, N., Ike, M. (2012) "Biotreatment of selenium refinery wastewater using pilot-scale granular sludge and swim-bed bioreactors augmented with a selenium-reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I", *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, Vol. 48, No. 2, pp. 63–71
- Soda, S., Hasegawa, A., Kuroda, M., Hanada, A., Yamashita, M., Ike, M. (2015) "Selenium recovery from kiln powder of cement manufacturing by chemical leaching and bioreduction", *Water Science and Technology*, Vol. 72, No. 8, pp. 1294–1300
- Xie, W., Tang, X., Yan, Y., Zhang, Q., Tritt, T.M. (2009) "Unique nanostructures and enhanced thermoelectric performance of melt-spun BiSbTe alloys", *Applied Physics Letters*, Vol. 94, 102111
- 環境省水・大気環境局水環境課「令和元年度水質汚濁物質排出量総合調査調査結果報告書」2020 (<http://www.env.go.jp/water/report/r02-02/index.html>、2020年9月21日閲覧)

