

補助事業番号 2019M-162

補助事業名 2019年度 バイオプロセスによる選択的レアメタル回収技術の開発 補助事業

補助事業者名 法政大学 生命科学部生命機能学科 教授 山本兼由

1 研究の概要

ゲノム科学の発展は、バイオ技術を少数遺伝子改変するバイオテクノロジーからゲノム改変するバイオプロセスへと変化させている。本事業では、レアメタルを対象とした持続可能な社会に貢献するバイオプロセスを活用する新しい資源化技術の開発を行った。様々な反応を触媒する白金族金属は産業上有用であるが、その供給源は埋蔵地の偏りがある鉱石のみに依存し、鉱石以外を対象とする高い選択性をもつ回収・濃縮技術の必要性が明らかとなった。大腸菌バイオプロセスを用いた白金族金属の回収・濃縮技術を検討した結果、大腸菌細胞内にパラジウムを蓄積させるバイオアキュムレーションに成功した。さらに、遺伝子組み換えに代替する新しいゲノム編集技術HoSel(Homologous Sequence Integration)法を開発し、産業上より高い汎用性があるパラジウム蓄積ゲノム改変大腸菌の育種を可能とした。これらの成果は、都市鉱山からの回収のみではなく、海水など希薄に溶存する金属の濃縮など幅広い金属資源化への応用が期待できる。

2 研究の目的と背景

自動車排ガス浄化用触媒に使用されるパラジウムと白金の使用量は、両者で年間約400トンであり、白金族金属の90%を占めている。EVなど電気自動車への動きが進んでいるが、HV車とガソリン車の比率は今後も高く維持され、排ガス浄化の必要性はなくなる。排ガス浄化触媒で利用される白金族金属の現行リサイクル技術には、白金族金属の難溶解性に起因する濃縮工程の非効率性、白金族間の特異的分離が困難なこと、リサイクル率の向上が挙げられる。本補助事業では、パラジウムまたは白金を吸着もしくは蓄積するゲノム組み換え大腸菌を作製し、バイオプロセス型レアメタル回収技術を開発することを目的とした。

3 研究内容

(1)パラジウムまたは白金を高蓄積する組み換え大腸菌の作製(図1)

①バイオソープション

大腸菌のパラジウムバイオソープションについて技術検証を行った。大腸菌を用いたバイオソープションにおいて、パラジウム回収量は大腸菌1細胞あたり 19×10^{-15} gで、2 mMパラジウム溶液に 1.0×10^{10} 個の大腸菌を晒した場合、その回収率は90%となった(図2)。ただし、この技術では、パラジウムに対する選択性に課題を残した。

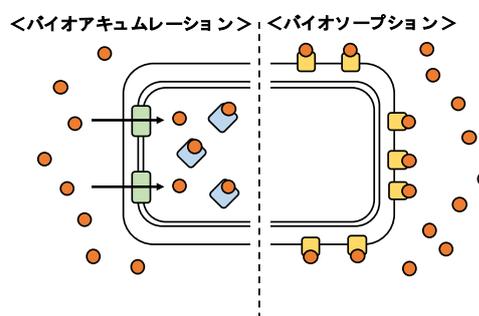


図1. 大腸菌を用いた金属回収方法

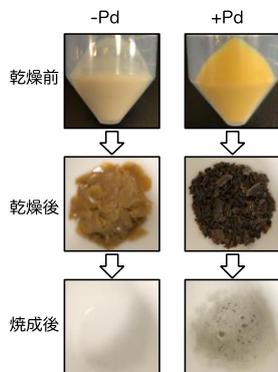


図2. 大腸菌バイオソープションで回収したパラジウム

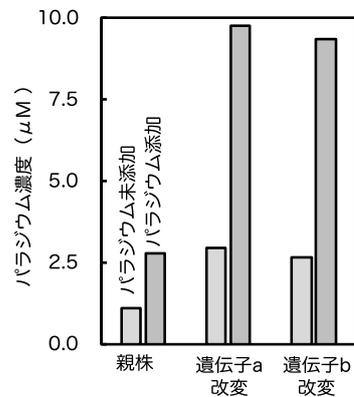


図3. 大腸菌バイオアキュムレーションで回収したパラジウム

② バイオアキュムレーション

大腸菌のパラジウムバイオアキュムレーションについて検証を行なった。パラジウム蓄積量は大腸菌1細胞あたり 0.12×10^{-18} gで、25 μMパラジウム添加培地での培養によって、その回収率は0.02%となった。さらに、パラジウム蓄積に関与する遺伝子を特定し、その遺伝子改変から、1細胞あたりのパラジウム蓄積量が 1.04×10^{-18} gで、同条件での回収率は0.07%まで向上させた。このようなパラジウム蓄積向上を可能とする遺伝子を少なくとも2つ特定した(図3)。

(2) 白金族金属分離回収技術開発に関する調査・開発

① 白金族金属の需給・市場動向

国内レアメタルのうち、28種類が年間10トンの供給量を超える。このうち、地金価格が高くかつ経済産業上重要な金属材料がパラジウムであった。パラジウムの国内供給の70%超がロシアと南アフリカからの輸入で、その国内需要の40%弱が燃料自動車用の排ガス触媒に利用されていた。一方、燃料自動車用の排ガス触媒のリサイクル率は数%でしかなかった。現在、世界の年間自動車生産台数は約9,700万台で、燃料自動車の排ガス触媒の需要は当面現状維持される。一方、ハイブリッド車、EV車、燃料自動車の普及は、大量な排ガス触媒廃棄物が地球規模で問題と推定された。

② ハード面の開発

微生物を利用した金属分離回収装置には、大量培養を行う発酵槽などを利用したバイオリクターが用いられる。一方、本事業で開発する担体は遺伝子組み換え生物であり、法令順守からハード開発にはその物理的封じ込めの措置が不可欠となる。半透膜などを利用するカプセルによる微生物の物理的封じ込めの活用を検討した。しかし、遺伝子組み換え大腸菌のカプセル内への包含およびカプセルから環境中への流出を完全に防げないなど問題が浮き彫りとなった。そのため、金属分離回収装置のソフトとなる担体の新規開発が必要という結論に至った。

③ソフト面の開発

遺伝子組み換え生物とは、ある生物(種)の遺伝子を取り出し、異なる生物(種)にそれを導入することで新しい性質をもつ生物を指す。ほとんどの遺伝子組み換え操作には、遺伝子を導入する際に遺伝子マーカースが必要であり、この遺伝子マーカース自体が他の生物に由来する遺伝子となるため、従来方法で作製したすべては遺伝子組み換え生物である。そこで、他の生物から由来する遺伝子マーカースを導入することなく、大腸菌ゲノム上の目的DNA配列に数塩基変異を導入する新しいゲノム編集技術HoSeI(Homologous Sequence Integration)法を開発しました。この技術は、遺伝子マーカースフリーな遺伝子改変ができるだけではなく、繰り返し行うことにより、ゲノム上の複数箇所にて遺伝子改変を容易にできる特徴がある(図4)。すなわち、本技術で作製する大腸菌は、自然界で常時生じている自然突然変異の範囲を超えず有用な変異を人工的に導入されたもので、いわゆる遺伝子組み換え生物に区別されない。したがって、新しいHoSeI法によって作製されるパラジウム高蓄積大腸菌は、ゲノム改変を行っているものの従来の微生物バイオリクターと同等な取り扱いを可能とし、適応範囲の拡張が見込めた(図5)。

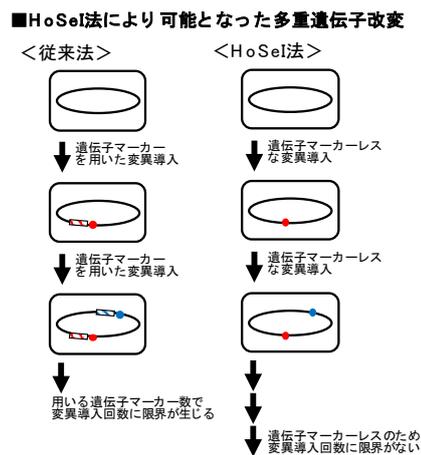


図4. 新規ゲノム編集技術 HoSeI 法の従来技術と比較した特徴

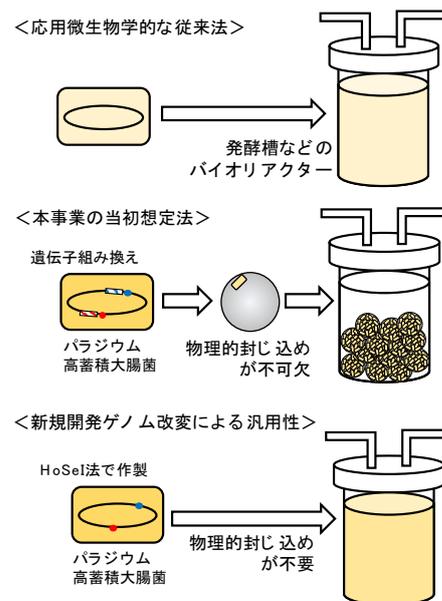


図5. HoSeI法を活用したパラジウム高蓄積大腸菌による汎用的回収装置設計

4 本研究が実社会にどう活かされるかー展望

持続可能な社会構築には、現在利用される様々な物質材料の安定供給が不可欠である。その解決法として、都市鉱山と称する使用済み製品から物質材料を回収するリサイクルが主に着眼されてきた。金属資源は、鉱物からの化学的な乾式・湿式による金属精錬・製錬技術をリサイクルに応用するが、鉱物で想定されていない多種物質が含有する都市鉱山資源からの目的金属の純化は困難な面が多い。一方、微生物を活用する金属回収技術も存在するが、やはり目的金属だけを純化できない場合が多い。本事業で開発した技術は、大腸菌の金属に対する包括的な生体

機能をバイオプロセスと捉え、目的金属を能動的で効率的に蓄積させる新しい特徴をもつ。また、従来の遺伝子組み換えが抱えるリスクを回避する新しいゲノム編集技術を活用し作製したゲノム改変大腸菌は、都市鉱山からの金属回収のみではなく、海水など希薄に溶存する金属濃縮など幅広い分野での金属資源化に応用が期待できる。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

本所事業者の山本は、基礎学術研究としてモデル細菌である大腸菌の細胞内金属恒常性の理解(70報以上の学術論文、2013年度日本農芸化学会奨励賞ほか)から、応用探索研究として、2遺伝子による金属蓄積大腸菌をデザインし、その金属蓄積能の向上をモリブデンにより実証した。その成果に関する特許(特許第6432818号)も取得済みである。さらに、この大腸菌バイオプロセス技術の実用化を目指した実用開発基礎研究も開始してきた(民間企業との共同研究)。これらの研究展開の中、本事業では、白金族金属に着目した大腸菌バイオプロセス技術の実用化を目指した実用開発基礎研究として、選択的レアメタル回収技術の開発を実施した。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

(1)学会発表

- ① 渡邊宏樹, 山本兼由, “大腸菌を用いたパラジウム回収技術の開発”, 日本農芸化学会2020年度大会(2020年3月25-28日, 九州大学, 福岡).
- ② 田島玖美子, 山本兼由, “大腸菌の増殖開始における核様体タンパク質の役割”, 第42回日本分子生物学会年会(2019年12月3-6日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡).
- ③ 三宅裕可里, 山本兼由, “大腸菌全二成分制御系遺伝子プロモーターの機能発現による分類”, 第42回日本分子生物学会年会(2019年12月3-6日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡).
- ④ 大野友嗣, 山本兼由, “腸内少数派細菌のビフィズス菌と大腸菌の分子相互作用 第41回日本分子生物学会年会”, 第42回日本分子生物学会年会(2019年12月3-6日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡). 口頭発表に選抜
- ⑤ 山本兼由, 山内えりか, 三宅裕可里, “細菌ジーンサイレンサーの溶原化による適応増殖での役割”, 第42回日本分子生物学会年会(2019年12月3-6日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡).
- ⑥ 岩崎倅千, 坂本明彦, 佐原潤平, 河合剛太, 山本兼由, 石浜明, 植村武史, 五十嵐一衛, 柏木敬子, 照井祐介, “細胞増殖因子スペルミジンの過剰蓄積が起こす細胞毒性の機序解析”, 第42回日本分子生物学会年会(2019年12月3-6日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡).
- ⑦ 渡邊宏樹, 小島文歌, 山本兼由, “大腸菌バイオプロセスによる金属資源化技術の開発”, 第18回微生物研究会(2019年11月9日, 立教大学, 東京).
- ⑧ 境晋史, 吉村美歩, 渡邊宏樹, 山本兼由, “大腸菌ニッケル恒常システムの包括的な金属

- 応答に関する研究”, 第18回微生物研究会 (2019年11月9日, 立教大学, 東京).
- ⑨ 菅原真悟, 三宅裕可里, 山本兼由, “高濃度EDTA存在下における大腸菌の増殖に必須な二成分制御系 第5回法政大学・立教大学微生物研究会”, 第5回法政大学・立教大学微生物研究会 (2019年8月30日, 立教大学, 東京).
 - ⑩ 飯野響歌, 三宅裕可里, 山本兼由, “大腸菌Mar/Sox/Robレギュロンによる適応増殖への寄与”, 第5回法政大学・立教大学微生物研究会 (2019年8月30日, 立教大学, 東京).
 - ⑪ 千野仁誉, 山本兼由, “Pseudomonas putidaの二成分制御系によるマンガン酸化の制御”, 第5回法政大学・立教大学微生物研究会 (2019年8月30日, 立教大学, 東京).
 - ⑫ 山本兼由, “大腸菌核様体タンパク質 H NS の増殖における役割”, 2019年度(令和元年度)国立遺伝学研究所研究会「環境中のDNA循環」(2019年8月19-20日、国立遺伝学研究所, 三島市). 招待講演
 - ⑬ M. Miyake, H. Watanabe, K. Yamamoto, A. Ishihama, “REGULATORY ROLES OF PYRUVATE-SENSING TWO-COMPONENT SYSTEM PyrSR (YpdAB) IN ESCHERICHIA COLI K-12”, 8th Congress of European Microbiologists (FEMS2019) (2019年7月7-11日, Glasgow, UK).
 - ⑭ 三宅裕可里, 菅原真悟, 山本兼由, “大腸菌二成分制御系遺伝子多重欠失株の構築”, 第16回 21世紀大腸菌研究会 (2019年5月29-30日, 琵琶湖ホテル, 大津市).
 - ⑮ 田島玖美子, 山本兼由, “大腸菌の増殖開始初期における核様体タンパク質Fisの役割”, 第16回 21世紀大腸菌研究会 (2019年5月29-30日, 琵琶湖ホテル, 大津市).

(2)論文発表

- ① A. Sakamoto, J. Sahara, G. Kawai, K. Yamamoto, A. Ishihama, T. Uemura, K. Igarashi, K. Kashiwagi, and Y. Terui, “Cytotoxic mechanism of excess polyamines functions through translational repression of specific proteins encoded by the polyamine modulon”, *Int. J. Mol. Sci.* in press.
- ② Y. Miyake and K. Yamamoto, “Epistatic effect of regulators to the adaptive growth of *Escherichia coli*”, *Sci. Rep.* 10(1):3661. doi: 10.1038/s41598-020-60353-3. (2020).
- ③ Y. Yamanaka, H. Watanabe, E. Yamauchi, Y. Miyake, K. Yamamoto, “Measurement of the promoter activity in *Escherichia coli* by using a luciferase reporter”, *Bio Protoc.* 10(2): e3500. doi: 10.21769/BioProtoc.3500. (2020).
- ④ T. Shimada, Y. Yokoyama, T. Anzai, K. Yamamoto, A. Ishihama, “Regulatory role of PlaR (YiaJ) for utilization of plant-derived nutrients in *Escherichia coli* K-12”, *Sci. Rep.* 9(1):20415. doi: 10.1038/s41598-019-56886-x. (2019).
- ⑤ Y. Miyake, T. Inaba, H. Watanabe, J. Teramoto, K. Yamamoto, A. Ishihama, “Regulatory roles of pyruvate-sensing two-component system PyrSR (YpdAB) in *Escherichia coli* K-12”, *FEMS Microbiol. Lett.* 366(2). doi: 10.1093/femsle/fnz009. (2019).

(3) プレスリリース

- ① 新しいゲノム編集技術HoSeI法を開発-HoSeI法により細菌適応増殖は複数遺伝子が相互作用するエピスタシス現象であることを実証(2020年02月27日 法政大学) (<https://www.hosei.ac.jp/press/info/article-20200306113314/>)

7 補助事業に係る成果物

(1) 補助事業により作成したもの

- ① 山本兼由, 渡邊宏樹, “微生物バイオプロセスを用いたレアメタル資源の確保 クリーンテクノロジー”, 30(1), 43-49. (2020).
- ② 大腸菌を用いたバイオプロセスによる金属資源化 「法政科学技術フォーラム 2019」(2019年09月15日 法政大学市ヶ谷キャンパス)

微生物バイオプロセスを用いたレアメタル資源の確保

大腸菌を用いた合成生物学アプローチによる金属資源化

法政大学 山本 兼由・渡邊 宏樹

はじめに:
バイオテクノロジーからバイオプロセスへ

バイオ技術は農学・薬学・医学に大きく貢献してきた。特に微生物を利用するバイオテクノロジーが果たしてきた役割は大きい。伝統的なアルコール飲料製造から、アルコールや有機物の生成に重要な酵母や細菌が単離され、それらを人為的に制御しそれらの生産を可能とした。アルコールからより応用的な微生物による生産として、グルタミン酸ナトリウムなどのアミノ酸生産菌が高い菌能も単離され、それらに応じた産業も実現した。これらは大量生産に耐えるバクテリカミカルへの適応に当たるが、その役割は化石燃料材料とした石油化学の発展に代わって代わるようになる。一方、多様な機能をもつ微生物が利用されるバイオテクノロジーは、ファインケミカルへ応用され、いくつものブレイクスルーを遂げてきた。極めて多様な代謝機能を示す放線菌から抽出された抗生物質ストレプトマイシン、抗寄生虫薬イベルメクチン、免疫抑制剤、コレステロール低下剤などは代表的な成果である。また、高温で生息する細菌から単離したDNAポリメラーゼによるDNA増幅技術開発や高アルカリで生息する菌から単離したDPPaseやアルカリラーゼによる酵素洗剤の開発なども代表的な成果である。このように微生物バイオテクノロジーの適応は、バクテリカミカルからファインケミカルに移

してきた。しかし、昨今の持続可能な社会の構築という課題から、微生物バイオテクノロジーを再度バクテリカミカルに適応する動向がある。例えば、植物由来の未利用バイオマスによって酵母を培養させ、得られるバイオアルコールなどはその例である(図1)。

遺伝子組換え技術は微生物バイオテクノロジーの発展に大きく貢献してきた。有用な遺伝子が様々な生物から単離され、それらを導入した遺伝子組み換え微生物を育種することで、バクテリカミカルやファインケミカル生産の様々な改良が行われている。例えば、血糖値異常性糖尿病ホルモンのインスリン遺伝子がヒトから単離され、それを導入した組換え大腸菌や組換え酵母が育種された。これらの組換え微生物から単離されたインスリンが実用化されている。さらに生物がもつすべての遺伝子に対

象としたゲノム科学の目覚ましい発展は、微生物バイオテクノロジーそのものを大きく変化させようとしている。その理由は大きく二つある。一つは莫大な遺伝子情報の蓄積であり、最近では微生物を単離することなく海水や土などに含まれる遺伝子情報を得ることができ、これらの大量な遺伝子情報は、様々な有用遺伝子を見つける機会を増やしている。もう一つは、複数遺伝子で作用する生物プロセスをシステムとして理解できることであり、これまでの単一の遺伝子で必要十分条件を満たす生物機能にしか着目できない限定的な応用と比べ、有用な生物プロセスを体系的に応用できる機会を得ている。また、生物プロセスの理解は、その生物の未利用な生体構造を効率的に活用する可能性も与える。このようにゲノ

図1 地下資源を代替する微生物バイオプロセス

① 放線菌から抽出されたDNAポリメラーゼは、植物由来の未利用バイオマス(糖上質)を微生物バイオプロセスをより有用材料とするバイオテクノロジーを開発している。② 放線菌を微生物プロセスで培養して有用な遺伝子情報を得ている。③ 放線菌を微生物プロセスで培養して有用な遺伝子情報を得ている。④ 放線菌を微生物プロセスで培養して有用な遺伝子情報を得ている。

大腸菌を用いたバイオプロセスによる金属資源化

持続可能な循環経済社会

<サイキュラーエコノミー>
・ 経理投資資源でありながら経済拡大が期待できるサイキュラーエコノミー

<金属資源化へのバイオプロセスを利用>
・ 日本は金属供給の多くを海外に依存
・ 微生物を構成する多様な金属元素
・ 金属リサイクルは不可欠
・ バイオプロセスの応用が期待
・ 微生物の金属蓄積性を利用したバイオプロセス技術開発

バイオプロセスに有効な大腸菌

<大腸菌K>
大腸菌K株は地球上で最も分子レベルで理解されている
長さ: 約 1 mm x 厚さ 0.5 μm
体積: 1 fL (10⁻¹⁵ L)

2時間培養 (4段階分)

ゲノム編集

ゲノム上の任意の位置で遺伝子配列の改変を行う技術

大腸菌での新しいゲノム編集技術を開発

バイオアキュムレーションとバイオソープション

<バイオアキュムレーション>
<バイオソープション>

HOSEI SCITECH FORUM
法政科学技術フォーラム 2019

- ③ 山本兼由, “微生物ゲノムを活用したバイオプロセスによる金属資源化”, *月刊 BIO INDUSTRY*, 6月号 72-80. (2019)
- ④ 山本兼由, “大腸菌ゲノム機能を用いたバイオプロセスによる金属資源の確保”, *分離技術*, 49(4), 232-237. (2019).

特稿 II レアメタル回収技術

大腸菌ゲノム機能を用いた バイオプロセスによる金属資源の確保

山本兼由*
Kaneyoshi Yamamoto

1. はじめに

金属は主に鉱物から乾式・湿式・電解により分離し、精製される。原料となる鉱物は目的金属の含有率が低ければ高いほど、精製される金属の純度が高くなる。しかし、このような貴金属資源は枯渇の一途を辿り、それに代わり不純物が含まれる鉱物による精製が行われているが、高い純度の金属を得ることは難しい。また、都市鉱山と呼ばれる廃棄物から金属を精製するリサイクルも試みられているが、金属種によっては廃棄物中の他の金属との分離が困難な場合も多く、新しい金属精製技術の開発が期待されている¹⁾。

省エネルギー、低環境負荷、低コストの利点をもつとして、さまざまな産業においてバイオプロセスが導入されてきた。特に、多種多様な機能を示す微生物は、化石燃料依存型のバクテリアカル生産や医薬品のファインケミカル生産で活用されている。金属分離精製の新しい技術開発としても、微生物バイオプロセスの応用が検討されてきた²⁾。応用微生物学では、環境中からの目的の機能をもつ微生物を単離し、さらにそれらをリード微生物として高い機能をもつ変異微生物を育種する。金属製錬を代替するバイオリーチングは高い金属還元をもつ微生物を利用し、金属製錬を代替するバイオソープションは金属を多く吸着する微生物を利用した技術である³⁾。

近年激増した微生物の全ゲノム情報はタンパク質などの生体分子と金属との多様な分子間相互作用⁴⁾ 法政大学生命科学部生命機能学専攻・マイクロテクノロジー研究センター 教授

40 (232) 分離技術

BIO R&D

微生物ゲノムを活用したバイオプロセスによる金属資源化

Recovery of Metal with Bioprocess Using the Designed *Escherichia Coli*

山本兼由*

微量分析の発達と微生物ゲノム機能の解明から、微生物における金属の役割を包括的に理解できるようになった。持続可能な社会の観点から、循環型流通の肝となる金属資源供給にバイオプロセスの応用が期待されている。本稿では、金属資源化を可能にするバイオソープションやバイオアキュムレーションに向けた大腸菌デザインについて紹介する。

1 サークュラー・エコノミーにおける金属資源化

人類は新しい社会システムを構築しつつある。17世紀ごろから急速に進んだ科学の深化は、18世紀のイギリスの産業革命で特徴付けられる大きな技術革新を結実した。特に化学と情報科学の貢献により発展してきた産業は、現在では地球を俯瞰するボーダーレスな社会システムを実現する。産業思想も人間本位の一方通行的なものから持続可能な循環型へと変遷してきた。最近、持続可能な社会を実現する「サーキュラー・エコノミー」が新しく提案される(図1)⁵⁾。

18世紀以降、大量生産・大量消費の産業は「作る・売る・使う・廃棄」の直線型流通を基本とした。しかし、20世紀中ごろに生じた公害や資源枯渇などの環境問題から、産業は低環境負荷型の生産・消費である「必要量作る・必要量売る・必要量使う(再利用)」を基礎とした循環型流通へ変化してきた。産業先進各国で取組まれた3R (Reduce・Reuse・Recycle) など低環境負荷政策がそれを後押しした。しかし、原料供給が資源から廃棄物へうまく移行できないことから、生産・消費サイクルは縮小方向に向かい、結果として新しい製品開発の抑制など産業成長の限界が懸念されてきた。その背景で、廃棄を前提とし製品を生産する Reduce の改修、製品の再利用や再販売、シェアリングなどの消費行動における新しい価値概念を提唱する Reuse の改修、再生可能な原料を利用する Recycle の改修によって、低環境負荷型でありながら経済拡大を

* Kaneyoshi Yamamoto 法政大学 生命科学部 生命機能学専攻
マイクロテクノロジー研究センター 教授

72 BIO INDUSTRY

(2)(1)以外で当事業において作成したもの
該当なし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 法政大学(ホウセイダイガク)
住 所: 〒184-8584
東京都小金井市梶野町3-7-2 小金井キャンパス
担 当 者: 教授 山本 兼由(キョウジュ ヤマモト カネヨシ)
担 当 部 署: 生命科学部(セイメイカガクブ)
E - m a i l: kanyamam@hosei.ac.jp
U R L: <https://www.hosei.ac.jp/seimei/>