

題目 マンガン酸化細菌の生理生態に基づく開放系での高濃度集積  
(Enrichment of high concentrated manganese oxidizing bacteria based on physiology and ecology in open system)

氏名 松下 修司

レアメタルは、現代の製品に欠かせない原料である。その需要は増加しているが、経済的な理由などからその採掘量は限られている。そのため、代替材料やリサイクル技術の開発が求められている。このような背景において、我々は、微生物を用いて排水から希少金属を回収する技術の開発を進めている。環境中には、Mn(II)から生物由来の Mn 酸化物 (Bio-MnO<sub>x</sub>) を生成する Mn(II)酸化細菌 (MnOB) が存在する。この Bio-MnO<sub>x</sub> は結晶欠損による高い負電荷密度を有し、化学合成された MnO<sub>2</sub> より高い金属イオンの吸着効率を有している。したがって、レアメタルを含有する排水を用いて MnOB を培養できれば、Bio-MnO<sub>x</sub> を連続生産してレアメタルを回収することが可能になる。しかしながら、MnOB の集積は困難であり、Bio-MnO<sub>x</sub> の生産速度も遅いため、未だ工業利用できる状況にはいたっていない。また、なぜ細菌が Bio-MnO<sub>x</sub> を形成するのか、どのように Bio-MnO<sub>x</sub> を形成するのか、といった本質的なことも明確になっていない。本論文は MnOB を分離してその生理生態を調査し、開放系で高濃度集積するための方法について行った研究をとりまとめたものである。

本論文は、第1章「序論」から第8章「総括」までの全8章からなる。

第1章「序論」では、本研究の背景となる希少金属をとりまく情勢や、金属イオンを含む排水の生物処理法の技術動向について整理した。さらに、これを基に Bio-MnO<sub>x</sub> を用いた希少金属回収技術の実用化までのロードマップを作成し、本論文で取り組んだ研究の位置づけを明確にした。

第2章「既往の研究」では、これまでに分離された MnOB について、分離された環境や 16S rRNA 遺伝子情報を紐づけ、その多様性について記載した。Mn(II)酸化のメカニズムについて、モデルとして取り組まれてきた細菌の研究結果を中心に、マンガン酸化の様式、遺伝子および酵素について、研究進展に沿って整理した。また、その形成メカニズムについて、提唱されている仮説を示した。また、Bio-MnO<sub>x</sub> の特徴について記載した。

第3章「メタン酸化細菌との共生による Mn(II)酸化細菌の集積培養」では、メタンを基質として供給して MnOB を集積培養した研究について記載した。多様な MnOB が存在するにも関わらず、他の従属栄養細菌との基質競合に負け、非純粋培養条件下での MnOB の集積培養は通常失敗する。多くの MnOB が薄い基質の環境から分離されていることに着目しメタンを供給して Bio-MnO<sub>x</sub> を製造する方法を検討した。DHS (down-flow hanging sponge) リアクター内で、MnOB の集積はメタン酸化との組み合わせによって成功し、Mn(II)除去速度は最大で 0.5kgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> に達した。MnOB は、メタン酸化細菌 (MOB) の代謝に由来する UAP (utilization-associated product) および、または BAP (biomass-associated product) を基質として増殖していた。微生物群集分析により、*Hyphomicrobiacea* 属のメタノール酸化細菌が Mn(II)酸化に重要な役割を果たしたことが明らかになった。また、Co (II) および Ni (II) を添加した結果、Co(II)/Mn(II) および Ni(II) / Mn(II) に対し、それぞれ 53% および 19% の割合で同時に除去されることが確かめられた。しかしながら、Bio-MnO<sub>x</sub> によって MOB の成長が阻害されていた。

第4章「 $\text{MnO}_2$ による微生物増殖阻害作用を用いた  $\text{Mn(II)}$ 酸化細菌の集積培養」では、第3章で明らかにした  $\text{MnO}_2$  の細菌の成長阻害効果に着目し、 $\text{MnO}_2$  を含浸したスポンジを用いて  $\text{MnOB}$  を集積培養した研究について記載した。  $\text{Bio-MnO}_x$  がどのような細菌の活性に影響を与えるのか不明であるが、 $\text{MnOB}$  は自己が生存するために  $\text{MnO}_2$  にも高い耐性を持っている可能性が高い。  $\text{MnO}_2$  の細菌成長の阻害効果を用いて、これまで上手く  $\text{MnOB}$  が集積できなかった有機合成基質を供給し、  $\text{Bio-MnO}_x$  の生産行われるかどうか検討した。化学合成  $\text{MnO}_2$  を含浸したスポンジを用いることで、解放系において分解しやすい基質を用いて  $\text{Mn(II)}$ 供給後すぐに  $\text{MnOB}$  を培養することに成功し、 $\text{Mn(II)}$ 除去速度は最大で  $0.35 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  に達した。84株の細菌を分離同定し、このうち *Comamonadaceae* 科を中心に新規の  $\text{MnOB}$  を含む48株を  $\text{MnOB}$  が占めていた。多数分離された *Comamonadaceae* 科の  $\text{Mn(II)}$ 酸化能力は非常に低く、この要因はゲノム比較によって、 $\text{Mn(II)}$ 酸化関連遺伝子を *moxA* の相同性遺伝子しかもたないことによると推定された。一方、比較的高い  $\text{Mn(II)}$ 酸化能力を有していたのは *P. putida* 属の近縁種だけであった。次世代シーケンスによる菌叢解析の結果、 $\text{MnO}_2$  により多くの細菌の成長は阻害され、 $\text{MnOB}$  とその近縁種を含む  $\text{MnO}_2$  耐性菌が優先化したことが明らかとなった。したがって、更にリアクターの効率を高めるためには、 $\text{MnOB}$  の近縁種の成長を阻害し、 $\text{MnOB}$  だけを集積する技術の開発が必要である。

第5章「環境中からの  $\text{Mn(II)}$ 酸化細菌の分離と難分解性物質の分解特性」では、 $\text{Bio-MnO}_x$  を生産する目的に着目し  $\text{MnOB}$  の生態について研究を行った。第3章のメタン供給による  $\text{SMP}$  供給や  $\text{MnO}_2$  による競合細菌の成長阻害によって  $\text{MnOB}$  の集積に成功した結果から、 $\text{MnOB}$  は  $\text{Bio-MnO}_x$  を生産しながら、他細菌の生育を阻害し難分解性物質を消費している可能性が示唆された。  $\text{MnOB}$  がどのように貧栄養条件下で生活しているか推定するため、 $\text{Mn}$  酸化物を豊富に含む池の泥から細菌を分離した。貧栄養条件で8株分離した結果、3株が  $\text{MnOB}$  であった。難分解性物質の分解特性を評価するために、色素 Bordeaux S を実験に用いた。  $\text{MnOB}$  は形成した  $\text{Bio-MnO}_x$  を用いて Bordeaux S を還元し、この酸化還元反応を繰り返しながら Bordeaux S を分解していた。一方、*Flectobacillus* 属と *Microbacterium* 属の2株は嫌気条件下で Bordeaux S を還元する能力を有していた。また、*Flectobacillus* 属は嫌気状態で  $\text{MnO}_2$  を還元し増殖する能力も有していた。これらの結果から、 $\text{MnOB}$  と非  $\text{MnOB}$  が環境中で  $\text{Mn(II)}$ の酸化還元の循環を行いながら生存競争している生活モデルを推定した。

第6章「*Pseudomonas resinovorans* MO-1株の特性評価および集積培養」では、高い効率で  $\text{Bio-MnO}_x$  を生産する  $\text{MnOB}$  に着目した。第4章で明らかにしたように  $\text{MnOB}$  は近縁種でも  $\text{Mn(II)}$ 酸化能力が大きく異なるため、この近縁種の増殖を阻害し、高い  $\text{Mn(II)}$ 酸化能力を持つ  $\text{MnOB}$  だけを集積させることが必要となる。そこで、高い能力を有する  $\text{MnOB}$  の生育特性や遺伝子構成を解析し、リアクターに直接植菌する方法を検討した。第5章で  $\text{Mn}$  酸化物を豊富に含む池の泥から分離した *P. resinovorans* MO-1株は、これまで分離した50以上の  $\text{MnOB}$  の中で最も高い  $\text{Mn}$  酸化能力を有していた。まず、この高い能力を示す遺伝的な背景を明らかにするため、全ゲノムシーケンスを行い122個のコンテイングから成る6,252,942 bpのドラフトゲノムを決定した。この配列から、 $\text{Mn(II)}$ 酸化に関連する遺伝子として知られる *MnxG*、*mcoA* および *mopA* と18の相同性遺伝子が検出され、この株の高い  $\text{Mn(II)}$ 酸化能力はこれらの遺伝子に支えられていることを明らかにした。さらにこの高い  $\text{Mn}$  酸化能力を有する MO-1株と比較として CA10株を用いて集積培養を試みた。早期の  $\text{Mn(II)}$ 酸化能力酸化を行い、最大で  $0.15 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  達成したが、長期間の運転の間に  $\text{MnO}_2$  の還元反応が生じ、 $\text{Mn}$  酸化を維持することができなかった。

第7章「*Pseudomonas resinovorans* の高濃度  $\text{Mn(II)}$ 耐性株の作出および集積培養」では、 $\text{MnOB}$  の  $\text{Mn(II)}$ 酸化能力に着目した。第6章で明らかになったように、基質濃度の向上は  $\text{Mn(II)}$ 酸化物還元細菌との競争に負け、長期にわたり  $\text{Mn(II)}$ 酸化を維持させることができない。そこで、基質濃度の向上とは異なる方法で効率を高める方法の検討を行った。これまでの研究で、 $\text{Mn(II)}$ 酸化のためにリアクターに供給する  $\text{Mn(II)}$ 濃度を高めると、 $\text{Mn(II)}$ 酸化効率が低下することが明らかとなっている。この阻害機構を解明し集積培養で利用するために、 $\text{Mn(II)}$ の耐性を有する  $\text{MnOB}$  の突然変異株を作製し、ゲノム解析を行った。突然変異源として EMS を用いて MO-1 および CA10 の突然変異体を作出した。その

中から  $300 \text{ mg Mn L}^{-1}$  で増殖した変異体5株を選抜した。これらの株は  $\text{Mn(II)}$  酸化能力も向上し、 $100 \text{ mg Mn L}^{-1}$  で  $\text{Mn(II)}$  酸化する能力を獲得した。また、野生株とのゲノム比較により、2 遺伝子領域に変異箇所を絞り込んだ。また、突然変異体 MO-1\_M3 株を用いてリアクターを運転し、 $0.33 \text{ kg Mn m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  を達成した。 $50 \text{ mg Mn L}^{-1}$  の高濃度  $\text{Mn(II)}$  条件下で  $\text{Mn(II)}$  除去は確かめられたが、短い HRT ではその除去が進まず効率を高めることはできなかった。

第8章「総括」では、本研究において明らかにした  $\text{MnOB}$  の生理生態と、これに基づき解放系で高濃度に集積するための技術についてとりまとめた。この結果をロードマップに位置づけ、今後の実用化に向けた展望や応用展開を示した。

なぜ  $\text{MnOB}$  は  $\text{Mn}$  酸化を行うのか。  $\text{BiO-MnO}_x$  は BAP といった難分解性物質を分解に役立ち、また多くのバクテリアの成長を阻害した。これらの結果から、 $\text{MnOB}$  が  $\text{Mn(II)}$  酸化を行う目的は、薄い基質環境下の中で有利に生存することがわかった。

どのように  $\text{MnOB}$  は  $\text{Mn(II)}$  酸化を行うのか。  $\text{Mn(II)}$  の酸化は、細菌の生育条件が良い時に起こり、自身の生存が脅かされるような極端な pH、温度、基質濃度、 $\text{Mn(II)}$  では生じなかった。特に高濃度の  $\text{Mn(II)}$  条件では、 $\text{Mn(II)}$  酸化を調節する遺伝子によって制御されていることが明らかとなった。

これらの基礎的な知見に基づき、様々な条件下で解放条件下の DHS リアクターで  $\text{MnOB}$  を集積することができた。しかし、いくつかの課題は残ったままである。 $\text{MnOB}$  の集積においてその近縁種だけをうまく阻害する方法は確立できなかった。また、高濃度の集積は高い基質濃度が有利であるが、高い基質濃度は  $\text{Mn(II)}$  酸化の発現に有利に働かず、 $\text{Mn}$  酸化物を還元する競合細菌の成長を促進した。したがって、今後は新たな基質や競合細菌を制御する試薬の検討を進める必要がある。

また、今回開発した技術は、希少金属の回収に加え、いくつかの応用展開が期待できる。 $\text{Bio-MnO}_x$  は難分解性物質の分解を促進することから、染色工場の排水処理に利用できる可能性がある。また、メタノール資化性の  $\text{MnOB}$  は、メタノールを含有する製紙工場などの排水に適用できるかもしれない。一方、 $\text{Bio-MnO}_x$  の高い金属吸着は上水中の有害金属の除去に利用できるだろう。本研究で得られた知見は、新たな排水処理システムの開発に役立つ。