

バイオミネラリゼーションを利用した地熱資源の有効利用基盤の創成

研究代表者 九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門 講師 土居克実

1. 緒言

近年、CO₂排出抑制に資する革新的技術の創出が喫緊の課題となっている。CO₂排出抑制のためには、“再生可能エネルギー”および“革新的なエネルギー高度利用技術”が不可欠な課題である。新エネルギー利用等の促進に関する特別措置法(RPS法)では、再生可能エネルギーとして太陽光、風力、地熱またはバイオマスなどが指定されている。地熱発電は再生可能エネルギーの中でもCO₂排出量が1KWhあたり15gであり(火力; 742g、太陽光; 53g、風力; 29g)、我が国の総地熱資源量は2,347万KWh(うち国立公園特別保護地区・特別地域以外での地熱資源量は425万KWh)である。また、地熱は他の自然エネルギーと比して、稼働率が高く(70%、太陽光; 12%、風力; 20%)、地熱源が国内に万遍なく存在するため、日照量や風量の少ない地域でも発電可能な点など純国産エネルギーとして有望である。しかしながら、これまでの国のエネルギー基本戦略では、地熱は新エネルギーに含まれず、RPS法で認定されるに至っても施行令上で、「熱水を著しく減少させないこと」、「バイナリー発電に限る」といった制限が課されている。この理由として、温泉水枯渇への懸念が挙げられるため、発電に使用した熱水は地下に還元され、再利用される。

ところが、地下貯留層中の熱水には高濃度のシリカ(SiO₂)が含まれており、これが地熱発電のボトルネックの一つとなっている。シリカは地殻中に最も多く存在する物質であり、水にはケイ酸として溶

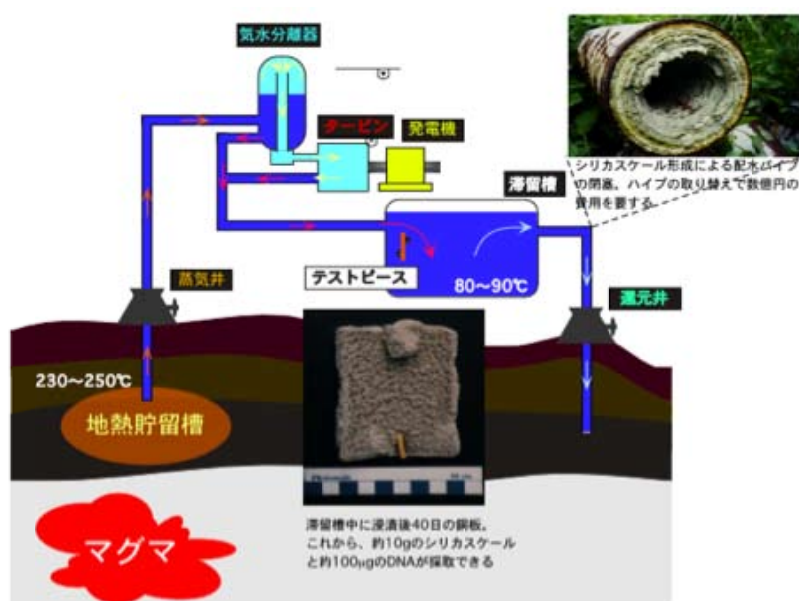


図1. 地熱発電の仕組みと開発のボトルネックとなるシリカスケール

解し、その飽和濃度は温度・圧力・pHに依存する。シリカは温度・圧力の低下により

過飽和になると脱水縮合し、ポリマーを形成することでコロイドとなり水溶液中に安定に存在する。よって過飽和シリカ溶液から固体状シリカは沈降しにくい。ところが地熱帯では、高温・高圧下でシリカが飽和した熱水が噴出し、地表付近のケイ酸濃度は過飽和に達する。このようなシリカの化学状態のため、地熱発電所のパイプライン中ではシリカ沈殿物であるシリカスケールが急速に形成され、熱効率の低下やパイプの閉塞を誘起し、発電効率の低下、メンテナンス費用の高騰、熱水の再利用の妨げとなっている(図1)。シリカスケール形成は圧力や温度、他の共存金属イオンとの相互作用を考慮した無機化学的な形成メカニズムでは説明不可能で、シリカスケール形成機構は未だ未解明である。また、シリカスケールは鉄鋼業などの送水設備でも熱交換器、酸洗ライン、熱延加熱炉などで発生し、化学薬品による除去が行われているが、薬品汚染による環境負荷が懸念され、より環境にやさしい対処法が求められている。

ところが、このように深刻な障害をもたらすシリカスケールであるが、その形成機構についての知見は殆どない。近年、生物が無機金属イオンを集積し鉱物化するバイオミネラリゼーション (biomineralization; 生物鉱化現象)が注目されており、シリカスケール形成にも微生物、特に耐熱性微生物の関与が推測された。また、微生物を用いた資源回収法としてバイオリッチングなどの手法が研究されてきており、微生物と金属元素との関連は急激に注目を浴びるようになったが、その相互作用、特に生育必須元素でない金属と生物との関連については、未だ未解明な点が多い。そこで本研究では、地熱発電所で生じるシリカスケールを対象とした高度好熱性細菌によるバイオミネラリゼーションの形成機序を明らかにすると共に、これらを用いた地熱資源の利活用法の開発を模索した。

2. 実験方法

2.1. 使用菌株および培養条件

本実験では、研究代表者のグループが地熱発電所より単離した高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* TMY (JCM 10668)¹⁾、および、ゲノム配列が解読されている *T. thermophilus* の基準株 HB8 を主に用いた。これら菌株を TM 液体培地および TM 固体培地を用い、70℃で培養を行った。液体培養は振とう (150 rpm) 培養を行い、増殖曲線は OD₆₆₀ の値を測定して作製した。また、細菌に対するシリカの影響を検する際は、TM 液体培地にメタ珪酸ナトリウムを適当な濃度となるよう添加したのを用いた。

2.2. 菌体からの生体高分子の分離・精製

菌体からの DNA の抽出・精製は、対数増殖期後期の菌体を遠心分離機にて集菌後、

常法に従い行った。得られたゲノム DNA は PCR 反応の鋳型として利用した。また、菌体からの全 RNA の抽出・精製は、培養時間毎に菌体を回収後、ホットフェノール法および RNeasy kit (キアゲン社製) を併用して行った。得菌体タンパク質は、回収した菌体を超音波破碎後、超遠心分離にて分離したものを、SDS-PAGE または 2D-PAGE 等により分画した。

2.4. PCR 増幅と増幅断片のクローニング

抽出・精製したゲノム DNA を基に目的の断片を増幅するために設計したプライマーセットを用い、LA *Taq* ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) により増幅した。増幅した断片を pTA2 ベクター (東洋紡製) に組み込み、大腸菌 JM109 に形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、挿入 DNA 断片の塩基配列を 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて解析した。

2.5. 転写解析

精製した RNA を用い、RT-PCR により cDNA ライブラリーを作製した。本ライブラリーを標識し、*Thermus thermophilus* 用 DNA Chip (Affymetrix 社製) を用いた DNA マイクロアレイにより、全遺伝子の転写量の変動を網羅的に解析した。また、プライマー伸長法及び 5'-RACE 法による *sip* 転写開始点の決定と、ノーザンハイブリダイゼーション及び LightCycler DX400 (ロシュ・アプライド・サイエンス社製) を用いた qRT-PCR による *sip* 転写の定量解析を行った。

2.6. 組換えタンパク質によるシリカ沈殿

組換え *sip* 遺伝子を PCR にて増幅し、pET21a 発現ベクターに挿入した。組換えプラスミドを大腸菌 Rosseta 株に形質転換し、組換え体を作製した。組換え大腸菌を LB 培地に接種し、前培養菌体を新鮮な LB 培地に移植し、IPTG による誘導を行って組換え Sip タンパク質を生産した。タンパク質生産大腸菌を超音波破碎し、熱処理 (70°C、30 min) 後、ニッケルキレートカラムを用い、精製した。精製タンパク質をシリカ溶液に添加し、経時的に回収し、上清に含まれるシリカ量を ICP 発光分光分析装置 (エスアイアイ・ナノテクノロジー社製) により定量分析した。

2.7. SEM および XRD 解析

シリカスケールおよび微生物の形態を観察するため、走査型電子顕微鏡 (JEOL JXA-733 ; 日本電子株式会社製) バイオミネラルの形態とシリコンの分布を検討するた

め、電子線マイクロアナライザ解析を行った。EPMAはJEOL JCXA-733（日本電子株式会社製）を用いて行った。

3. 結果及び考察

3. 1. シリカスケール形成に關与する微生物の単離および性状解析

シリカスケールの微生物叢を電子顕微鏡にて観察したところ、多数のシリカ球に包埋された桿状の微生物が多数観察された（図2）。次いで、地熱発電所滞留槽に浸漬した銅板に形成したシリカスケールを経時的に回収・摩砕し、DNAを抽出したところ、両者の間には有意な相関関係が認められた（図3）。このDNAの16S rDNA領域をPCR増幅し、塩基配列を解析したところ、高度好熱菌であるグラム陰性の *Thermus* 属細菌が主要菌群であることが分かった。

そこで、シリカスケール摩砕物をTM寒天培地に塗布して70℃で培養し、*Thermus* 属細菌の分離を試みた。その結果、黄橙色を呈するコロニーを分離し、TMY株と命名した（図4）。本株は生理・生化学試験や16S rRNA遺伝子塩基配列などから *Thermus thermophilus* TMY (JCM 10668) と同定した¹⁾。

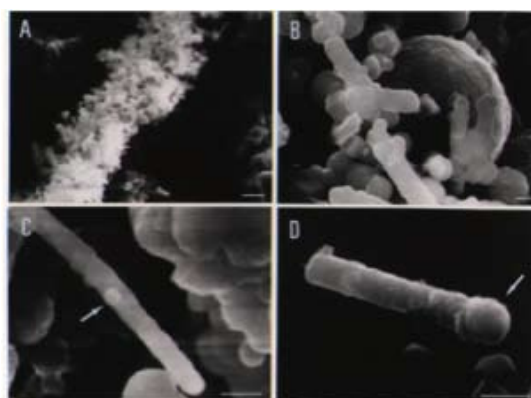


図2. シリカスケール中の微生物の電子顕微鏡写真

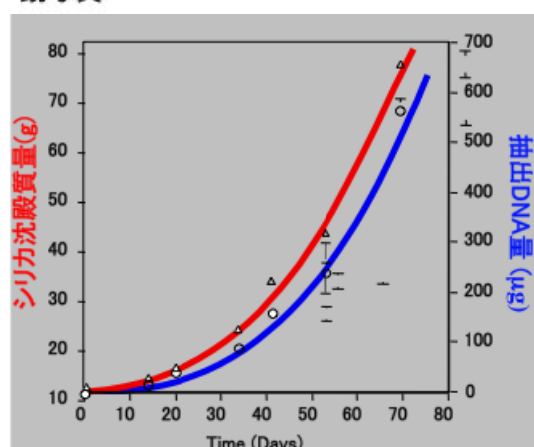


図3. シリカスケール形成量とそこから抽出されるDNA量の相関図



図4. シリカスケールより分離した *T. thermophilus* TMY 株のコロニー

3.2. *T. thermophilus* によるバイオシリカ沈殿

分離株 TMY を過飽和シリカ含有 TM 液体培地で振とう培養すると、対数増殖期中期以降、含有されているシリカ濃度が減少し、対数増殖期後期に減少量が最大に達した(図 5(A))。この際、シリカ含有の有無にかかわらず、菌の増殖は変化無かったため、シリカが菌の増殖に影響を及ぼさないことが示されたが、培地中のシリカ濃度の減少に伴い、

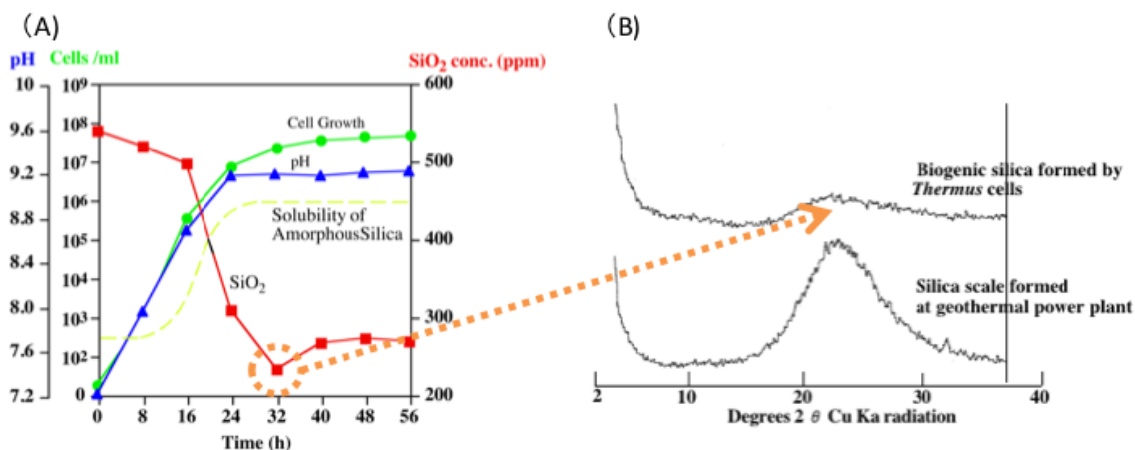


図5. (A) *T. thermophilus* の増殖曲線とTM培地中のシリカ濃度の変遷 (B) 試験管内で生じたバイオシリカ沈殿と地熱発電所のシリカスケールのX線回折

試験管底部にゲル状の沈殿が生じた。この沈殿物をバイオシリカと命名し、その性状を XRD により解析したところ、地熱発電所で形成されるシリカスケールと同様、非結晶質シリカであることが示された(図 5(B))。このことから、地熱発電所で形成されるシリカスケールには、高度好熱菌 *T. thermophilus* が関与することが示唆された²⁾。

3.3. *T. thermophilus* のシリカ誘導性タンパク質 (Silica-induced protein; Sip)

上記の結果から、*T. thermophilus* がシリカスケール形成に関与することが推察できたが、図 2 のように該菌はシリカを細胞内に吸収するのではなく、細胞表層でシリカと相互作用すると考えられた。そこで、細胞表層にその鍵があると推測し、含有シリカ濃度を変動させた TM 培地で培養した *T. thermophilus* TMY 株の細胞表層タンパク質を抽出し、SDS-PAGE に供した。その結果、図 6 に見られるように、過飽和シリカ含有培地で培養し

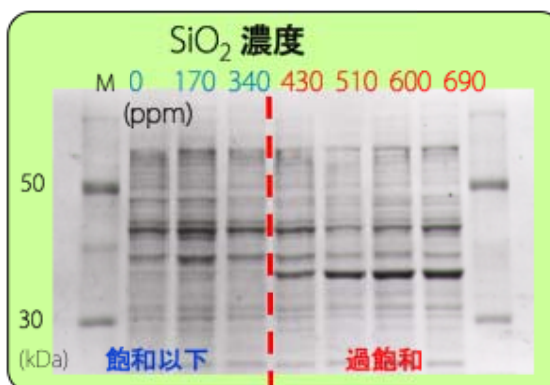


図6. 各シリカ濃度含有培地で培養した TMY 株の細胞表層タンパク質の SDS-PAGE 解析

た菌体表層タンパク質にのみ、新規のタンパク質が検出できた。

本タンパク質の性質を二次元電気泳動にて検したところ、本タンパク質は分子質量 35kDa、pI9.5 で、シリカ無添加時に比して 20 倍程度の生産量が認められた (図 7) ³⁾。

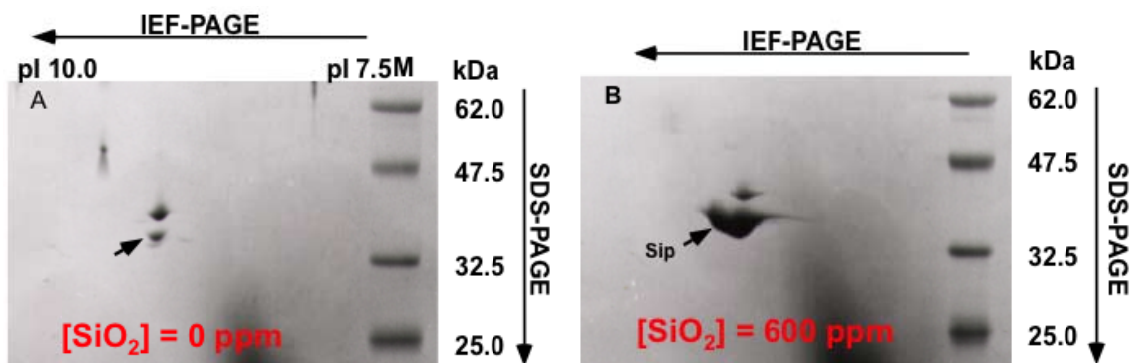


図7. (A)シリカ無添加、(B) 600 ppmシリカ含有TM培地で培養したTMY株の細胞表層タンパク質の2D-PAGE。Sip (silica-induced protein)は、分子質量= 35 kDa、pI = 9.5であることが判った。

本タンパク質と同様のタンパク質は、TMY 以外の *Thermus* 属細菌である *T. thermophilus* HB8、*T. thermophilus* AT-62、*T. aquaticus* YT-1 などでも検出され、過飽和シ

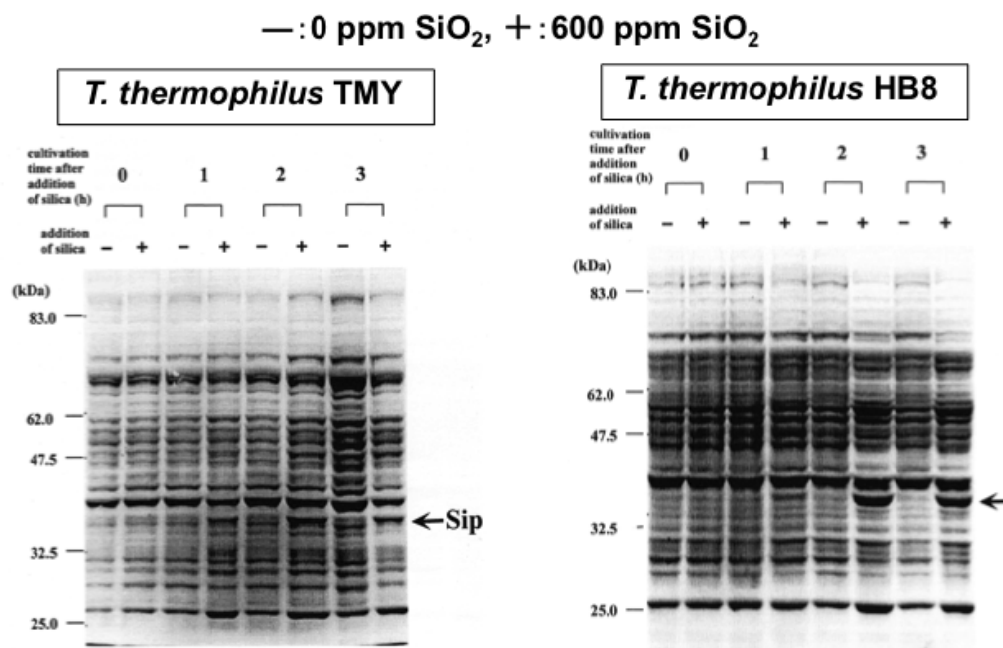


図8. (A) *T. thermophilus* TMYおよび (B) *T. thermophilus* HB8におけるシリカ誘導性タンパク質の生産誘導 (+) 600 ppm シリカ添加、(-) シリカ無添加を表す。

リカに応答する *Thermus* 属細菌に特有なタンパク質であると推測した。そこで、これらタンパク質が、シリカによって生産誘導されるか否かを検討した (図 8)。

その結果、タンパク質はシリカ添加後 1 時間以内に生産が開始され、無添加の場合は生産されなかった。従って、本タンパク質をシリカ誘導性タンパク質 (Silica-induced protein; Sip) と命名した。シリカによって生産が誘導されるタンパク質は、世界初の発見であった³⁾。

3.4. Sip をコードする遺伝子の同定と解析

Sip をコードする遺伝子を探索するため、TMY 株から本タンパク質を分離・精製した。ところが、精製タンパク質のアミノ末端はブロックされており、常法である N 末端解析は不可能であった。そこで、各種タンパク質分解酵素による分解で生じた断片を用いた内部アミノ酸配列を決定した。タンパク質分解酵素 Asp-N を用いて生じた断片のアミノ酸配列を決定し、既にゲノム配列の決定されている HB8 株との相同性検索の結果、本タンパク質は、Fe³⁺結合性 ABC トランスポーターと有意な相同性を示した (図 9)³⁾。

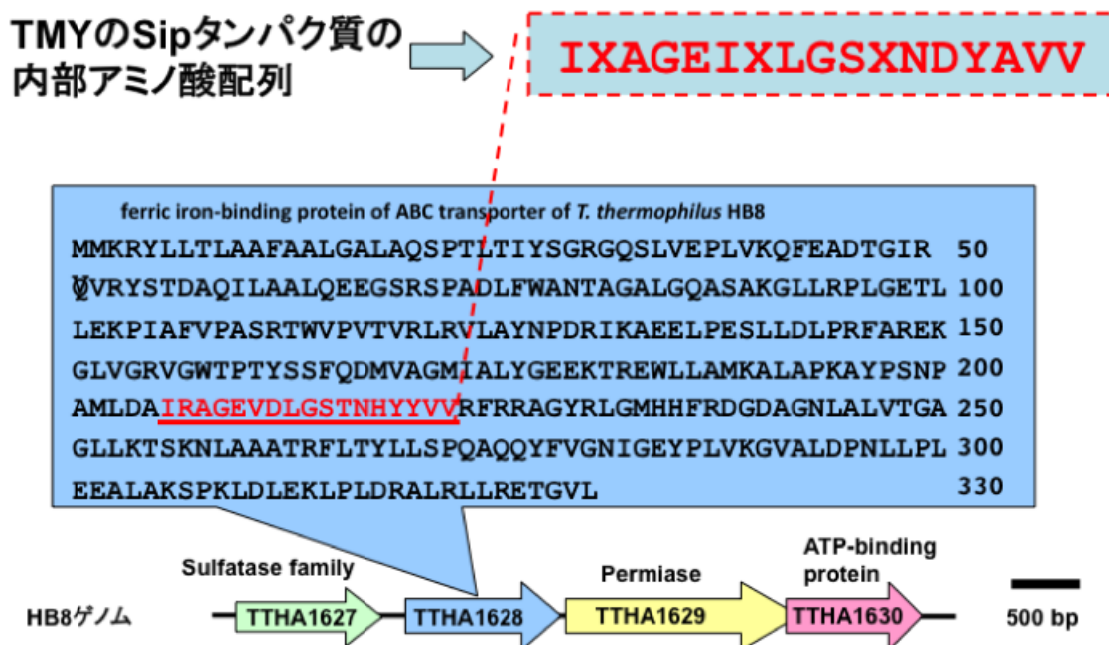


図9. *T. thermophilus* TMYのSip内部アミノ酸配列と *T. thermophilus* HB8の鉄結合性ABCトランスポーターのアミノ酸配列および本タンパク質をコードしている遺伝子(TTHA1628)とその周辺遺伝子の配列

本遺伝子は、鉄飢餓条件下での3価の鉄イオン取込みに機能することが推察され、いくつかの病原菌が感染または病原性を発露する際に必要な鉄イオンを細胞内に取り込むことが報告されている。ところが、本菌株は病原性菌ではなく、また、鉄イオンとシリカとでは、その電荷も機能を大きく異なる。したがって、本遺伝子がなぜ、過飽和シリカ添加時のみ発現するかは不明であった (図 10)。

3. 5. sip 遺伝子の転写解析

上記の疑問を解決し、シリカスケール形成の引き金を探索するため、シリカ濃度 (200ppm、400ppm、600ppm) を変化させた、またはキレート樹脂により鉄イオンを除

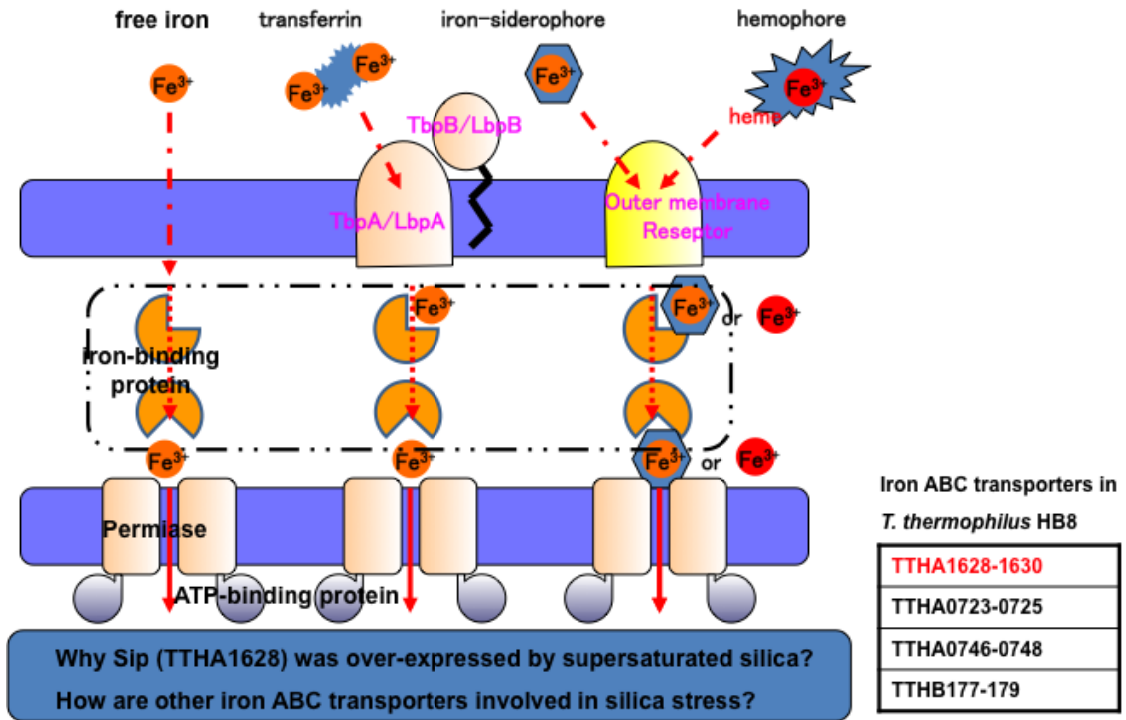


図10. 細菌の鉄取込み機構と*T. thermophilus* HB8ゲノム上に推定される遺伝子。

去した液体培地中で培養した *T. thermophilus* HB8 株から RNA を分離・精製し、これらを鋳型とした RT-PCR 法によって各遺伝子の転写量を定量解析した (図 11)。

その結果、TTHA1628 (*sip*) のみが、過飽和シリカに応答して転写量が増大した。また、本遺伝子は飽和以下の濃度では、転写量は 2 倍程度でしか無く、鉄飢餓状態では転写量は 10 倍以上に増加した⁴⁾。これらの結果は、DNA マイクロアレイの結果とも合致したことから、*sip* は鉄飢餓または過飽和シリカ刺激に応答して発現されるタンパク質であることが推察された。

3. 6. *Thermus* 属細菌におけるシリカスケール形成のメリット

Thermus 属細菌にとって Sip タンパク質を生産してシリカスケールを形成するメリットを考察した。まずは、自然の地熱環境中に見られるシリカ沈殿であるシンターを観察すると、熱水湧出孔近辺に形成されている。また、*Thermus* 属などの高度好熱菌の生育温度は 70 前後と幅広くないことから、該菌は自身の生育に適する温度域にとどまるため、シリカを足場として利用していることが考えられる。

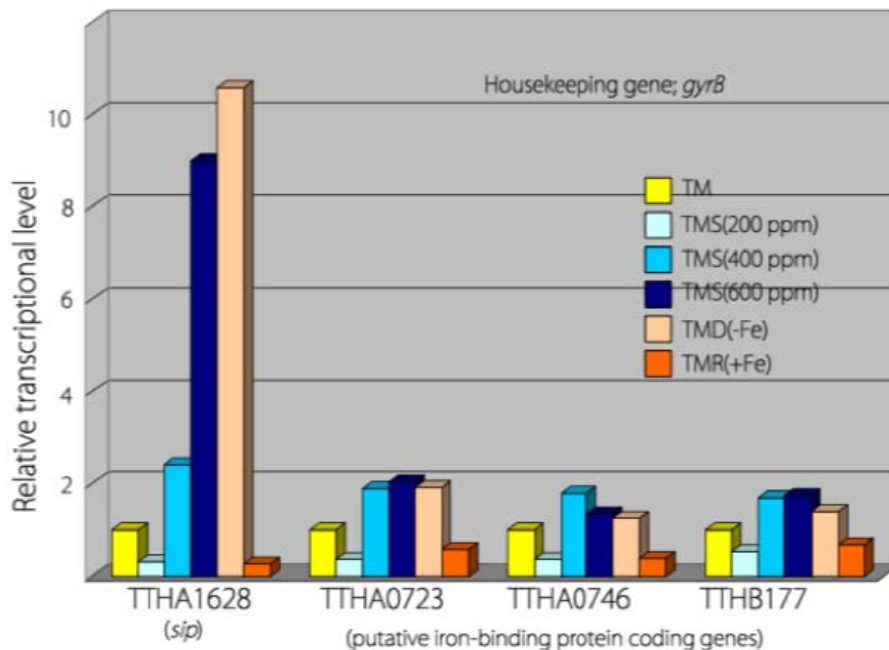


図11. RT-PCRを用いたシリカ存在下および鉄飢餓条件下における*T. thermophilus* HB8の鉄結合性ABCトランスポーター遺伝子の転写量解析

また、シリカが抗生物質に対する耐性を向上させていることも判った⁹⁾。アンピシリンなど、リボソームに作用してタンパク質合成を阻害する薬剤をシリカ添加した TM 液体培地に添加して、*T. thermophilus* HB8 を培養しても、シリカ無添加時と同様、増殖が阻害されるものの (図 12(A))、細胞膜形成阻害に関与するバシトラシンやコリスチンに対する耐性は、シリカ添加時に増加した (図 12(B))。さらに、*T. thermophilus* HB8 ゲノム上に推定される薬剤排出ポンプ遺伝子の発現を RT-PCR にて検討したが、全ての遺伝子が、シリカおよび薬剤の有無にかかわらず転写量の有意な増減は確認できなかった (図 13)。これらの結果から、シリカは本菌の生理、特にタンパク質合成を保護するのではなく、細胞表層にあたかも「鎧」のように重なり、細胞表層、特に膜の堅牢性を高めていると推察できる。

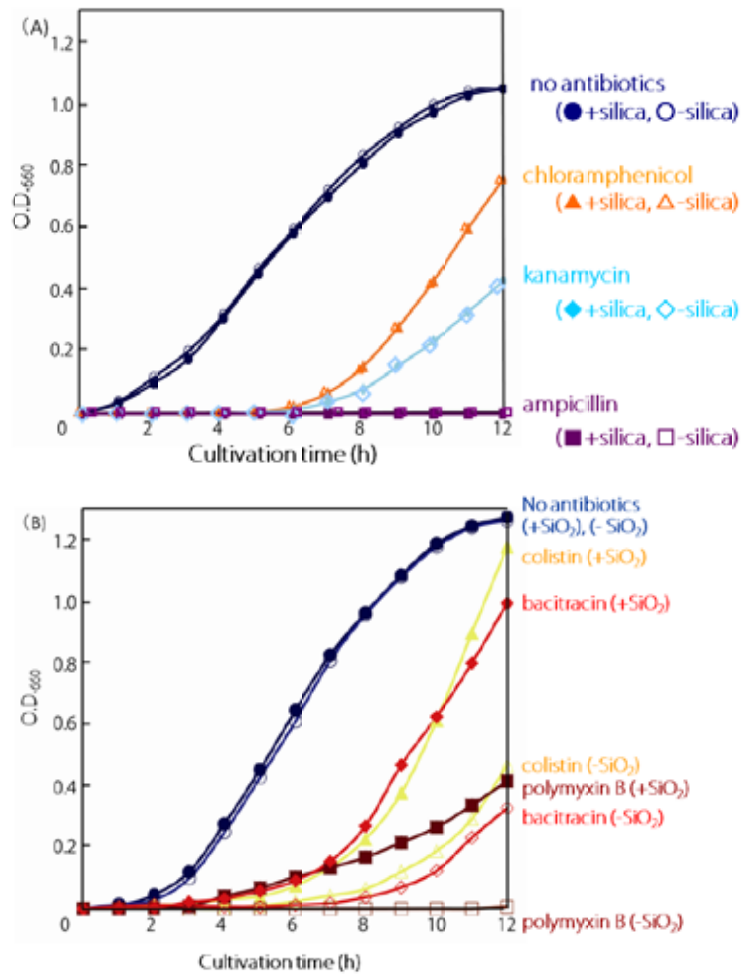


図12 *T. thermophilus* HB8の薬剤耐性。(A)タンパク質合成阻害剤 クロラムフェニコール、カナマイシン、アンピシリンに対する耐性 (B)細胞壁合成阻害剤 コリスチン、バシトラシンに対する耐性

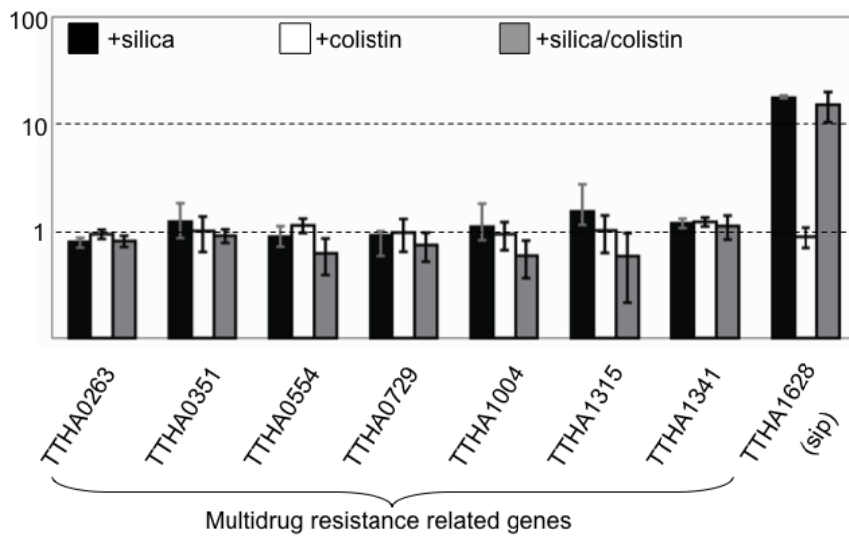


図13. シリカおよびコリスチン添加による*T. thermophilus* HB8ゲノム上の多剤耐性遺伝子発現量

3.7. Sip を用いたバイオリッチング

以上の結果を纏めると、Sip は過飽和シリカ刺激または、負に帯電した過飽和シリカと正電荷を帯びた鉄イオンが結合することにより、使用できる鉄イオンが枯渇すること

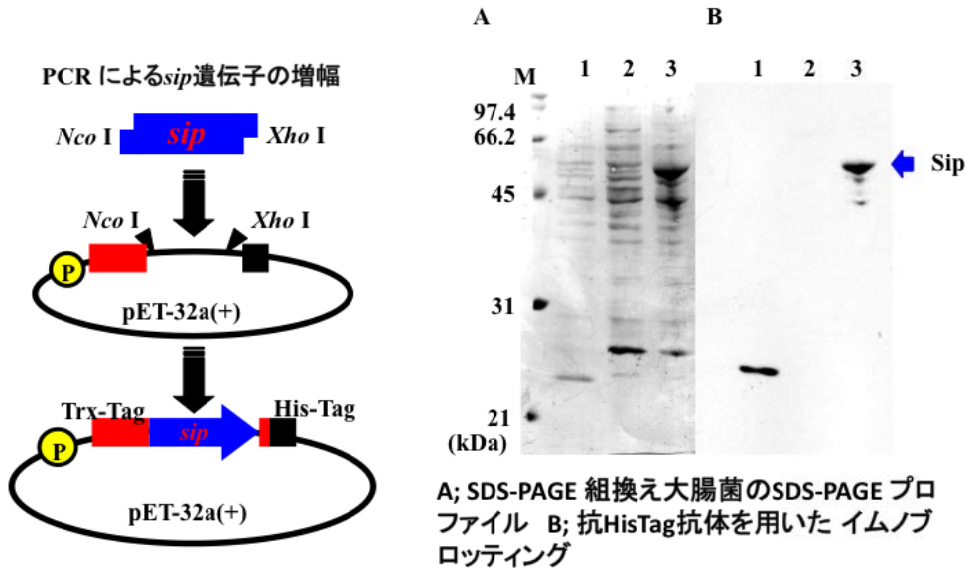


図14. 大腸菌による組換えSipの大量発現系の構築(左)と生産の確認(右)

で鉄飢餓状態に応答して誘導発現し、細胞表層に著量生産され、このような状態になった細胞がシリカと相互作用してシリカスケールを形成することが推察された。したがって、本タンパク質が細胞表層でシリカと結合するのではないかと推察した。

そこで、同定した *sip* 遺伝子産物を大腸菌内で大量発現させ、得られた組換え Sip を用いてバイオリッチングを試みた (図 14) ⁶⁾。

生産した組換え Sip を精製し過飽和シリカ溶液に混和したところ、70°Cにて加熱した場合のみ、シリカ沈殿が検出できた (図 15)。

この沈殿を詳細に分析すると、微細な球が多数形成されており、この球はシリカを高

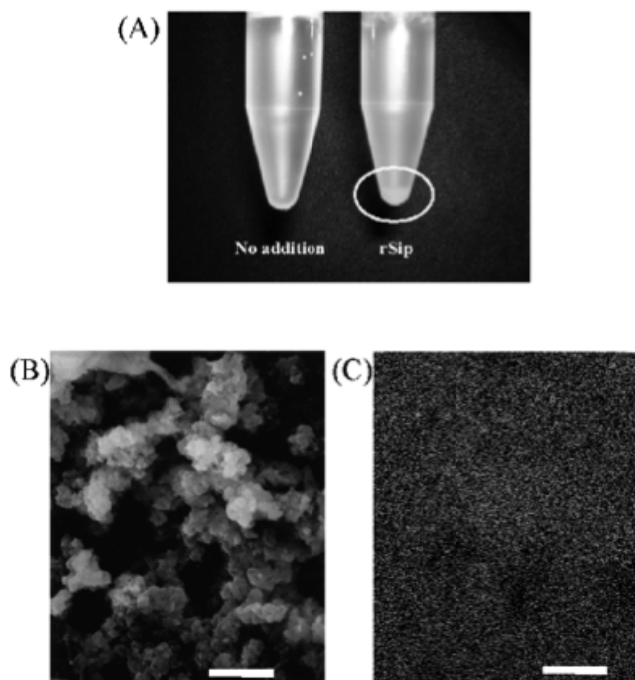


図15. 組換えSip (rSip)によるシリカ沈殿。(A) rSip無添加(左)および添加(右)条件での沈殿。(B) 沈殿のSEM像。(C) 沈殿のsilicon mapping。

濃度含有していることが判った。したがって、Sip がシリカに直接結合し、細胞表層にシリカを沈着していることが考えられた。

この結果から、本 Sip タンパク質を利用することで、任意にシリカを沈殿させることが可能となる。これは、シリカのバイオリーチングだけでなく、微細構造形成が必要となるナノテクノロジーへの応用展開も可能であることを示している⁷⁾。今後、さらに効率のかつ可塑性のあるシリカ沈殿を目指したい。特に Sip の立体構造解析から、タンパク質とシリカとの結合部位を同定し、本部位を単離または修飾して、さらに高機能な Sip の作製を試みたいと考えている。これらを利用することで地熱熱水からシリカのみを除去または単離し、高純度水ガラスなどの調製や、シリカ除去熱水からのリチウムの回収に繋げていきたいと考えている。

4. 謝辞

本研究は、JFE 21 世紀財団 2009 年度 技術研究助成により実施されたもので、JFE 21 世紀財団関係各位に深甚なる感謝を申し上げます。また、共同研究者である九州大学大学院理学研究院教授横山拓史先生のご尽力に謝意を申し上げます。本研究の一部は、九州大学大学院生物資源環境科学府博士後期課程 藤野泰寛氏（現 九州大学高等教育開発推進センター助教）の博士論文研究の内容を含んでおり、藤野博士にも心から感謝申し上げます。

5. 参考文献

- 1) Y. Fujino, R. Kawatsu, F. Inagaki, A. Umeda, T. Yokoyama, Y. Okaue, S. Iwai, S. Ogata, T. Ohshima and K. Doi, *Thermus thermophilus* TMY isolated from silica scale taken from a geothermal power plant, *J. Appl. Microbiol.*, 104, 70-78 (2008).
- 2) Doi, K., Fujino, Y., Ohshima, T. and Yokoyama, T.; Characterization of a Silica-Induced Protein in *Thermus Thermophilus* Related to Biosilicification, Goldschmidt Conference Abstracts, A238 (2010).
- 3) K. Doi, Y. Fujino, F. Inagaki, R. Kawatsu, M. Tahara, T. Ohshima, Y. Okaue, T. Yokoyama, S. Iwai and S. Ogata; Stimulation of Expression of a Silica-Induced Protein (Sip) in *Thermus thermophilus* by Supersaturated Silicic Acid, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 2406-2413 (2009).
- 4) Fujino, Y., Ohshima, T., Yokoyama, T and Doi, K.; Transcriptional Analysis of the Response to Supersaturated Silicic Acid in *Thermus Thermophilus*, Goldschmidt Conference Abstracts, A309 (2010).

- 5) S. Iwai, K. Doi Y. Fujino, T. Nakazono, K. Fukuda, Y. Motomura and S. Ogata, Silica deposition and phenotypic changes to *Thermus thermophilus* cultivated in the presence of supersaturated silica, *ISME J.*, **4**, 809–816 (2010).
- 6) M. Farahat, T. Hirajima, K. Sasaki, K. Doi; Adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum: Extended DLVO theory and flotation behavior, *Colloid. Surface B*, **74**, 140-149 (2009)
- 7) 土居克実：「高度好熱性細菌を用いたバイオリーチングの基礎と応用」、吉田和哉、池道彦、植田充美監修『メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収』、p. 115-120 (2009)、シーエムシー出版