

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6381263号
(P6381263)

(45) 発行日 平成30年8月29日(2018.8.29)

(24) 登録日 平成30年8月10日(2018.8.10)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 P 3/00 (2006.01) C 1 2 P 3/00 Z
 C 1 2 R 1/01 (2006.01) C 1 2 R 1:01

請求項の数 3 (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2014-82107 (P2014-82107) (22) 出願日 平成26年4月11日 (2014.4.11) (65) 公開番号 特開2015-202063 (P2015-202063A) (43) 公開日 平成27年11月16日 (2015.11.16) 審査請求日 平成29年3月3日 (2017.3.3)</p> <p>特許法第30条第2項適用 掲載アドレス：http://www.extremophiles.jp/nenkai/2013/abst13.php 掲載日：平成25年10月16日</p> <p>特許法第30条第2項適用 研究集会名：第14回極限環境生物学会年会 開催日：平成25年10月26日～27日</p>	<p>(73) 特許権者 504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1</p> <p>(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔</p> <p>(74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 節</p> <p>(74) 代理人 100169579 弁理士 村林 望</p> <p>(72) 発明者 桑原 朋彦 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内</p> <p>(72) 発明者 五十嵐 健輔 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】メタン菌を用いた酸化鉄からのGreigite生産

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

イオウ還元能を有するメタン菌を、元素状イオウと酸化鉄との存在下で培養する工程を含む、Greigiteの製造方法。

【請求項2】

イオウ還元能を有するメタン菌がMethanocaldococcus jannaschiiに属する微生物である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

酸化鉄がヘマタイト又はアモルファス酸化鉄である、請求項1又は2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えばイオウ還元能を有するメタン菌を利用して酸化鉄からGreigite(「グレイジャイト」又は「グライガイト」とも称される)を合成し、精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

Greigite(Fe(III)₂Fe(II)S₄)は混合原子価硫化鉄であり、フェリ磁性を有する。Greigiteは、その結晶の1/4セル構造が(FeS₂)₂(Fe₄S₄)で表わされるように、その内部に生命にとって必須な[4Fe4S]クラスター様の構造を有し、地球生命の化学進化(非特許文献1)に深くかかわった鉱物の1つと認識されている(非特許文献2)。
 [4Fe4S]クラスターは電子伝

達成分のみならず、酵素の活性中心として(非特許文献3)、あるいは翻訳制御因子(非特許文献4)、転写制御因子(非特許文献5)、あるいはラジカル利用タンパク質(非特許文献6及び7)の構成要素として重要な機能を担っている。

【0003】

Greigiteは、代替医療の1つであるアーユルヴェーダセラピーに用いられる、インド黒塩の構成物としても知られる(<http://encyclopedia.thefreedictionary.com/greigite>)。現在、使用されている鉄剤・鉄サプリメントは可溶性であり、これらを過剰に摂取すると活性酸素を発生させる危険性が指摘されている。これに対し、Greigiteは結晶構造をもつゆえに難溶性で活性酸素を発生させにくく、また、上記のように薬効が期待されることから、大量生産法が開発されれば、将来、鉄剤・鉄サプリメントとして有用になる可能性を有している。

10

【0004】

Greigiteは、多様な化学的方法により合成される(非特許文献8)。しかしながら、いずれの方法も、pHの異なる2液の混合(非特許文献9及び10)や硫化水素(猛毒ガス)の使用(非特許文献11)等、合成には極度の注意を要する。二価鉄溶液(酸性)とpolysulfide溶液(アルカリ性)を混合する方法(非特許文献9)においては、Greigiteは、Mackinawite(Fe(II)S)、Greigite、Pyrite(Fe(II)S₂)をこの順で生じる、polysulfide pathwayの中間体として合成される。polysulfide pathwayでは、Mackinawiteが全てGreigiteに変換しないうちにPyriteが生成する(非特許文献12)。この事実はGreigiteのみの合成が困難であることを示唆している。合成産物からアモルファス硫化鉄や他鉱物を除いてGreigiteを精製しようとする試みは未だにない。

20

【0005】

生物学的なGreigite合成に関しては、走磁性細菌による細胞内合成(非特許文献13)や硫酸還元菌による細胞外合成の報告がある(非特許文献14~17)。しかしながら、細胞内合成は大量生産には適さない。また、硫酸還元菌によってGreigiteは他鉱物の副産物として形成されるが、増殖が遅いため形成には2週間以上の時間を必要とする。

【0006】

このように、安全に且つ大量にGreigiteを生産することができるGreigiteの製造方法は、従来において知られていなかった。

【先行技術文献】

30

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Wachtershauser G (2006) From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. *Phil Trans R Soc B* 361:1787-1808

【非特許文献2】Russell MJ, Martin W (2004) The rocky roots of the acetyl-CoA pathway. *Trends Biochem Sci* 29:358-363

【非特許文献3】Lazizzera BA, Beinert H, Khoroshilova N, Kennedy MC, Kiley PJ (1996) DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol Chem* 271:2762-2768

【非特許文献4】Rouault T, Haile D, Downey W, Philpott C, Tang C, Samaniego F, Chin J, Paul I, Orloff D, Harford J, Klausner R (1992) An iron-sulfur cluster plays a novel regulatory role in the iron-responsive element binding protein. *Biometals* 5:131-140

40

【非特許文献5】Spiro S, Guest JR (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 75:399-428

【非特許文献6】Staples CR, Ameyibor E, Fu W, Gardet-Salvi L, Stritt-Etter A-L, Schurmann P, Knaff DB, Johnson MK (1996) The function and properties of the iron-sulfur center in spinach ferredoxin:thioredoxin reductase: a new biological role for iron-sulfur clusters. *Biochemistry* 35:11425-11434

【非特許文献7】Kamat SS, Williams HJ, Dangott LJ, Chakrabarti M, Rauschel FM (20

50

13) The catalytic mechanism for aerobic formation of methane by bacteria. Nature 497:132-136

【非特許文献 8】Rickard D, Luther GW (2007) Chemistry of iron sulfides. Chem Rev 107:514-562

【非特許文献 9】Wada H (1977) The synthesis of greigite from a polysulfide solution at about 100 . Bull Chem Soc Japan 50:2615-2617

【非特許文献 10】Dekkers MJ, Passier HF, Schoonen MAA (2000) Magnetic properties of hydrothermally synthesized greigite (Fe₃S₄)-II. High- and low-temperature characteristics. Geophys J Int 141:809-819

【非特許文献 11】Berner R (1964) Iron sulfides formed from aqueous solution at low temperatures and atmospheric pressure. J Geol 72:293-306 10

【非特許文献 12】Hunger S, Benning L (2007) Greigite: a true intermediate on the polysulfide pathway to pyrite. Geochem Trans 8:1

【非特許文献 13】Lefevre CT, Menguy N, Abreu F, Lins U, Posfai M, Prozorov T, Pignol D, Frankel RB, Bazylinski DA (2011) A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. Science 334:1720-1723

【非特許文献 14】Herbert RB, Benner SG, Pratt AR, Blowes DW (1998) Surface chemistry and morphology of poorly crystalline iron sulfides precipitated in media containing sulfate-reducing bacteria. Chem Geol 144:87-97 20

【非特許文献 15】Lin S, Krause F, Voordouw G (2009) Transformation of iron sulfide to greigite by nitrite produced by oil field bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 83:369-376

【非特許文献 16】Gramp JP, Bigham JM, Jones FS, Tuovinen OH (2010) Formation of Fe-sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. J Hazard Mater 175:1062-1067

【非特許文献 17】Bertel D, Peck J, Quick TJ, Senko JM (2012) Iron transformations induced by an acid-tolerant Desulfosporosinus species. Appl Environ Microbiol 78:81-88

【発明の概要】 30

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述した実情に鑑み、本発明は、安全に且つ大量にGreigiteを生産することができるGreigiteの製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、イオウ還元能を有するメタン菌を、元素状イオウと酸化鉄とを含む培地において培養すると、Greigiteが合成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】 40

すなわち、本発明は、以下を包含する。

(1) イオウ還元能を有するメタン菌を、元素状イオウと酸化鉄との存在下で培養する工程を含む、Greigiteの製造方法。

(2) イオウ還元能を有するメタン菌がMethanocaldococcus jannaschiiに属する微生物である、(1)記載の方法。

(3) 酸化鉄がヘマタイト又はアモルファス酸化鉄である、(1)又は(2)記載の方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、鉄サプリメント又は薬剤成分として有用なGreigiteを安全且つ大量に 50

短期間(例えば2日以内)で生産することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 $Mc+S^0+Hematite$ 培地を用いた *M. jannaschii* の培養の様子を示す写真である。16.5時間培養後、全ての鉄成分は黒色に変色しフェリ磁性を示した(セラム瓶間の銀色の物質はサマリウムコバルト磁石である：左のセラム瓶は菌の接種有であり、右のセラム瓶は接種無しのコントロールである)。

【図2】培養沈殿のX線回折スペクトルである。*M. jannaschii* を記載の培地を用いて記載の時間培養し、沈殿をXRD解析した。A： $Mc+S^0+FeO(OH)$ 培地、48時間、B： $Mc+S^0+Hematite$ 培地、48時間、C： $Mc+S^0+Hematite$ 培地、96時間。：Hematite、：Greigite、：Pyriteのピーク。

10

【図3】*M. jannaschii* を $Mc+S^0+Hematite$ 培地で32時間培養したときの沈殿のFE-SEM像である。板状物質に *M. jannaschii* が付着している。球状の物体及びそれらの間の橋渡しは、それぞれ、*M. jannaschii* 及びそのべん毛による細胞間ブリッジ(Igarashi K, Kuwabara T (2014) Fe(III) oxides protect fermenter-methanogen syntrophy against interruption by elemental sulfur via stiffening of Fe(II) sulfides produced by sulfur respiration. *Extremophiles* 18:351-361)である。バー：1 μ m。

【図4】*M. jannaschii* を $Mc+S^0+FeO(OH)$ 培地で48時間培養してできた沈殿を0.5 N塩酸で洗浄した標品のXRDスペクトルである。：Greigiteのピーク。

【発明を実施するための形態】

20

【0013】

本発明に係るGreigiteの製造方法(以下、「本方法」と称する)は、イオウ還元能を有するメタン菌を、元素状イオウと酸化鉄との存在下で培養する工程を含む。本方法では、当該メタン菌のイオウ還元作用により元素状イオウからsulfideが生成され、当該sulfideが酸化鉄を還元することでGreigiteが生成されることとなる。

【0014】

ここで、イオウ還元能を有するメタン菌は、元素状イオウを還元し、sulfideを生成するメタン菌を意味する。当該メタン菌としては、例えばMethanocaldococcus属やMethanopyrus属に属する超好熱性メタン菌が挙げられる。特にMethanocaldococcus *jannaschii* を使用することが好ましい。Methanocaldococcus *jannaschii* としては、特に限定されず、寄託機関に保存された公知の株を使用することができるし、また公知の株から派生した変異株を使用することもできる。Methanocaldococcus *jannaschii* の公知の株としては、例えば独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターから入手可能なMethanocaldococcus *jannaschii* JCM10045^T株を挙げることができる。

30

【0015】

一方、本方法において使用する酸化鉄としては、例えばヘマタイト($\alpha-Fe_2O_3$)及びアモルファス酸化鉄($FeO(OH)$)が挙げられる。

【0016】

また、本方法における培養に使用する培地としては、メタン菌が生育し、且つGreigiteが生成できる培地であれば特に限定されないが、下記の表1に示す組成を有するMc培地等が挙げられる。

40

【0017】

本方法では、イオウ還元能を有するメタン菌を、元素状イオウと酸化鉄とを含む培地において培養する。培地におけるイオウ還元能を有するメタン菌の菌密度としては、例えば $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cells ml⁻¹が挙げられる。また、培地における元素状イオウの濃度は、例えば60~350 mMが挙げられる。さらに、培地における酸化鉄の濃度は、例えば8~30 mMが挙げられる。培地のpH条件としては、例えばpH 5.4~6.0が挙げられる。また、培養は完全嫌気条件下で行われなければならない。培養時間としては、鉄成分が赤茶色から黒色に変色して磁石に引かれる(すなわち、Greigiteが生成される)のに十分な時間であればよく、例えば16~48時間が挙げられる。このような培養条件下でイオウ還元能を有するメタ

50

ン菌を培養することで、Greigiteを生成することができる。

【0018】

生成されたGreigiteはフェリ磁性を有することから、培養液より磁石を使用して精製することができる。また、培養液中の沈殿物(Greigite含有)を手回し遠心分離に供して遊離の元素状イオウを除き、例えば0.5 Nの塩酸で処理してアモルファス硫化鉄を除けば、得られた沈殿を乾燥させることで、乾燥品としてGreigiteを精製することができる。

【0019】

以上に説明する本方法によれば、気相に高濃度の硫化水素を放出させることなく、安全に且つ短期間でGreigiteを製造することができる。また、本方法により得られるGreigiteは、二価の鉄を含みながら胃液の塩酸濃度(最高で0.5% 0.16 N)以上の濃度の塩酸に難溶であり、鉄サプリメント又は薬剤成分として経口摂取しても、活性酸素発生の危険性が少ない。

10

【実施例】

【0020】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0021】

〔材料及び方法〕

1. 培地

Mc培地は、Japan Collection of Microorganisms(JCM)のJCM 232培地(http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_grmd?GRMD=232&MD_NAME=)からNaHCO₃を除いたものである。Mc培地は、JCM 232培地作成法に準拠して作製された。Mc培地の培地組成を下記の表1に示す。

20

【0022】

【表 1】

Mc 培地組成 (単位は g)

対象菌	<i>Methanocaldococcus</i>
JCM No.	232
pH	6.0
NaCl	30
KCl	0.33
NH ₄ Cl	0.25
MgCl ₂ 6H ₂ O	2.7
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.14
NiCl ₂ 6H ₂ O	0.00075
MgSO ₄ 7H ₂ O	3.4
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6H ₂ O	0.01
K ₂ HPO ₄	0.14
Na ₂ SeO ₃ 5H ₂ O	0.0005
Trace minerals	10 ml
Vitamin soln.	10 ml
L-Cysteine HCl H ₂ O	0.5
Na ₂ S 9H ₂ O	0.5
Resazurin	0.001
Distilled water	980 ml

151 Trace minerals (単位は g)

Nitritotriacetic acid	1.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	3
MnSO ₄ xH ₂ O	0.5
NaCl	1
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.1
CoSO ₄ 7H ₂ O	0.1
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.1
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.1
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.01
AlK(SO ₄) ₂	0.01
H ₃ BO ₃	0.01
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.01
Distilled water	1 L

10

後添加

197 Vitamin soln. (単位は mg)

Biotin	2
Folic acid	2
Pyridoxine HCl	10
Thiamine HCl	5
Riboflavin	5
Nicotinic acid	5
Calcium pantothenate	5
Vitamin B12	0.1
p-Aminobenzoic acid	5
Lipoic acid	5
Distilled water	1 L

20

【 0 0 2 3 】

元素状イオウを6.24 Mになるようにスターラーバーを用いて蒸留水に懸濁し、スターラーバーごと110 で30分オートクレーブした。翌日、再度、同様にオートクレーブした後、スターラーで攪拌してイオウ粒を細かくし、室温で保存した。このようにして、イオウに結合しているかもしれない雑菌の胞子を最初のオートクレーブで活性化させて発芽させ、二回目のオートクレーブで滅菌した。

30

【 0 0 2 4 】

Hematite(α -Fe₂O₃ ; 純度>99.9% , 和光純薬, 大阪)を蒸留水で洗った後、0.6 Mになるようにスターラーバーで攪拌しつつ蒸留水に懸濁した。アモルファス酸化鉄(FeO(OH))は(Lovley DR, Phillips EJP (1986) Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. Appl Environ Microbiol 51:683-689)の方法で調製し、蒸留水で6回洗浄した後、0.6 Mになるようにスターラーバーで攪拌しつつ蒸留水に懸濁した。いずれの酸化鉄もスターラーバーごと121 で20分間オートクレーブし、室温で保存した。

40

【 0 0 2 5 】

次いで、クリーンベンチにおいて68 ml容のセラム瓶内で培地要素を無菌的に混合して培地を作製した。即ち、12 mlのMc培地(Na₂Sを除く)に、0.6 mlの元素状イオウ懸濁液及び0.6 mlのHematite又はFeO(OH)懸濁液(いずれもスターラーバーで攪拌しつつ分取)を加え、それぞれ、Mc+S⁰+Hematite培地又はMc+S⁰+FeO(OH)培地(S⁰は元素状イオウを表す)とした。

【 0 0 2 6 】

50

2. 培養

水素栄養性超好熱性メタン菌 *Methanocaldococcus jannaschii* (*M. jannaschii*, JCMカタクログ番号: 10045^T; Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology* 136:254-261) を JCM から購入し、JCM 232 培地を用いて 80 °C で 24 時間の培養を繰り返して保持した。メタン菌は酸素を極度に嫌うため、培地への接種は嫌気ワークステーション内 (気相: N₂:H₂:CO₂ (80:10:10)) で行われた (Kuwabara T, Minaba M, Iwayama Y, Inouye I, Nakashima M, Marumo K, Maruyama A, Sugai A, Itoh T, Ishibashi J, Urabe T, Kamekura M (2005) *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:2507-2514)。培地に 60 μl の 10% Na₂S · 9H₂O (表1の Na₂S 成分) を加えて嫌気化し、1 × 10⁵ cells ml⁻¹ 以上の菌密度になるように *M. jannaschii* を接種して、プチルゴム栓とアルミシールで密栓した。培地中に含まれるレサズリンの色で培地の嫌気化をモニターした。完全嫌気化したら、セラム瓶を嫌気ワークステーションから取り出し、気相を H₂:CO₂ = 80:20 に置換した後、記載の時間 80 °C で培養した。

【0027】

3. フェリ磁性鉄の塩酸処理、乾燥、精製及び保存

培養後の沈殿をディスプレイ遠心チューブ (15 ml 容量) に移し、手回し遠心分離に供して未反応のイオウを除去した。上清を遠心分離 (3000 rpm, 5分) に供して Greigite を沈殿させた。次いで、予め窒素バブリングして酸素を除いた 0.5 N 塩酸で上清を置換した後、攪拌して遠心分離に供する、という洗浄操作を 3 回行った。

【0028】

得られた沈殿を窒素バブリングした蒸留水で 2 回、70% エタノールで 1 回洗浄した。沈殿を遠心濃縮機 (CC-105; TOMY, 東京; 設定温度 40 °C) にかけて残っている溶媒をとばした。得られた試料を、室温・窒素雰囲気下のデシケータ内で暗黒下 (アルミホイルで包む) においてさらに乾燥及び保存した。

【0029】

乾燥したフェリ磁性鉄の塊を乳鉢と乳棒でできるだけ細かくし、厚紙に乗せて下からフェライト磁石を操作して、磁石に引かれるフェリ磁性鉄を精製した。精製の前後で重量を測定し、フェリ磁性鉄の全体に対する割合を求めた。ただし、フェリ磁性をもたない物質がフェリ磁性鉄に結合した状態で一緒に磁石に引かれる可能性もあるので、この値はフェリ磁性鉄の最大値を表わす。

【0030】

4. X線結晶構造解析

培養終了後、1 日以内にセラム瓶中の沈殿を遠心操作で集め、その X 線回折 (XRD) を粉末 X 線回折装置 (Ultima IV; Rigaku, 東京) で分析した。乾燥標品はそのまま、濡れた試料はシリコン無反射ホルダーに乗せ、空気をトラップしないようにポリイミドフィルムと真空グリースで覆って分析した。得られたスペクトルを Powder Diffraction FileTM のデータベースと比較して鉱物を同定した。

【0031】

5. 放射型走査顕微鏡観察 (FE-SEM)

FE-SEM を行うため、セラム瓶にガラス SEM プレート (直径 8.5 mm) を入れて培養を行った。培養後にガラス SEM プレートを取り出し、2% (w/v) グルタルアルデヒド、0.2 M カコジル酸ナトリウム (pH 7.2) を用いて室温で 2 時間固定後、既報に従って観察した (Kuwabara T, Igarashi K (2012) Microscopic studies on *Thermosiphon globiformans* implicate a role of the large periplasm of *Thermotogales*. *Extremophiles* 16:863-870)。観察には放射型走査電子顕微鏡 JSM-6330F (JEOL, 昭島) を用いた。

【0032】

【結果】

1. メタン菌の元素状イオウ還元による酸化鉄からのフェリ磁性硫化鉄形成

10

20

30

40

50

メタン菌の中には元素状イオウを還元できるものがある(Stetter KO, Gaag G (1983) Reduction of molecular sulphur by methanogenic bacteria. Nature 305:309-311)。本発明者等は、水素栄養性超好熱性メタン菌 *M. jannaschii* もそのようなメタン菌の1種であることを発見した。*M. jannaschii* を $Mc+S^0+FeO(OH)$ 培地又は $Mc+S^0+Hematite$ 培地で培養すると、鉄成分はいずれも赤茶色から黒色に変色し、最初のうちは磁石に引かれなかったが、しばらくすると磁石に引かれるようになった。すなわち、フェリ磁性を示した。これらの結果は、*M. jannaschii* が元素状イオウを還元して sulfide を生成し、その sulfide が鉄成分を還元してフェリ磁性硫化鉄を形成したことを示唆する。

【0033】

どちらの培地を用いた場合にも、セラム瓶の外からあてがったサマリウムコバルト磁石に引かれない黒色沈殿がまず生成した。この黒色沈殿はXRDで特異的なピークを示さなかったことから、アモルファス硫化鉄と思われる。 $Mc+S^0+Hematite$ 培地では培養16.5時間後には、全ての沈殿が同磁石に引かれた(図1)。しかし、48時間培養でもXRD測定を行うと Greigite の他に Hematite のピークが観察された(図2B)。この事実は Hematite 粒子の表面が Greigite に変化したために全体が磁石に引かれたことを示唆する。一方、 $Mc+S^0+FeO(OH)$ 培地では、48時間培養後に沈殿のXRDを測定すると Greigite のピークが観察されたが、他の鉄鉱物のピークは観察されなかった(図2A)。しかし、Hematite の結果を考えると、 $FeO(OH)$ の表面が Greigite でコートされている可能性がある。得られた Greigite 標品の収率は、Hematite からは 89%、 $FeO(OH)$ からは 50% (g/g、いずれも3回の実験の平均) であった。

【0034】

$Mc+S^0+Hematite$ 培地で96時間培養行うと Greigite と Pyrite が検出されたが、Hematite は検出されなかった(図2C)。この結果は、粒子内部の Hematite は Greigite にまで還元されたが、粒子表面の Greigite はさらに還元されて Pyrite に変換したことを示唆する。本法では用いた培地、培養時間によらず Mackinawite、Pyrrhotite は検出されなかった。従来の還元(二価)鉄からの場合と異なり、酸化(三価)鉄から Greigite を合成する場合には Mackinawite を経ないことが示唆された。

【0035】

2. FE-SEM

M. jannaschii を、 $Mc+S^0+Hematite$ 培地を用いて32時間培養したときの沈殿をFE-SEMで解析した。*M. jannaschii* が多様な大きさの板状物質(縦、横、厚みが、それぞれ0.4 μm 、0.2 μm 、0.1 μm 以下)に付着していた(図3)。この板状物質は Hematite には見られないことから Greigite と考えられる。この結果は、メタン菌が Hematite に付着して直接還元することを示唆している。

【0036】

酸化還元電位的には、Hematite は sulfide によって還元されにくい(Kappler A, Straub KL (2005) Geomicrobiological cycling of iron. Rev Mineral Geochem 59:85-108; Igarashi K, Kuwabara T (2014) Fe(III) oxides protect fermenter-methanogen syntrophy against interruption by elemental sulfur via stiffening of Fe(II) sulfides produced by sulfur respiration. Extremophiles 18:351-361)にも拘らず、菌の付着により、そこから排出される高濃度の sulfide で還元が可能になったと推察される(Igarashi K, Kuwabara T (2014) Fe(III) oxides protect fermenter-methanogen syntrophy against interruption by elemental sulfur via stiffening of Fe(II) sulfides produced by sulfur respiration. Extremophiles 18:351-361)。微生物の利用には、高濃度の硫化水素を気相に放出させないで Hematite を還元できる利点がある。 $Mc+S^0+FeO(OH)$ 培地を用いた場合にも同様にメタン菌の板状物質への付着が確認された。

【0037】

3. 耐酸性

M. jannaschii を $Mc+S^0+FeO(OH)$ 培地で48時間培養することにより Greigite を合成した。沈殿に含まれるアモルファス硫化鉄を洗い出すために0.5 N塩酸で洗浄を行った後も沈殿

はフェリ磁性を保っていた。塩酸処理標品をXRD解析したところ、Greigiteのピークのみが検出された(図4)。この事実は、本合成法によるGreigiteが0.5 N塩酸(1.54% (w/v) ; 胃液の塩酸濃度の3倍以上)に難溶であることを示す。アモルファス硫化鉄(Brock TD, O'Dea K (1977) Amorphous ferrous sulfide as a reducing agent for culture of anaerobes. Appl Environ Microbiol 33:254-256)は0.5 N 塩酸による洗浄の操作で容易に可溶化したことから、Greigite合成産物にアモルファス硫化鉄が残っていても、塩酸洗浄で除かれることが示唆された。

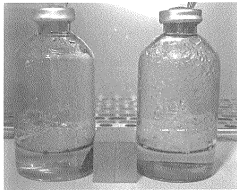
【0038】

4. 耐酸素性

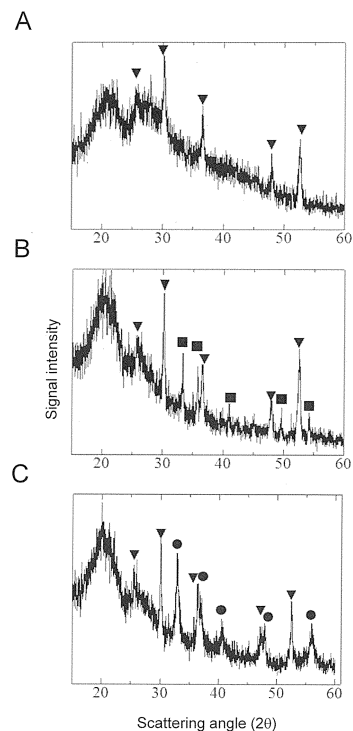
Greigiteは水分と酸素によって変質しやすい(Skinner BJ, Erd RC, Grimaldi FS (1964) Greigite, the thio-spinel of iron; a new mineral. Am Mineralogist 49:543-555)。*M. jannaschii*をMc+S⁰+Hematite培地を用いて48時間培養し、得られた沈殿物を、0.5 N塩酸洗浄及び乾燥後、磁石を用いてフェリ磁性硫化鉄を精製した。これを、室温・室内光・空気下で1週間放置して、酸化させた後、再度、磁石で精製すると90%がフェリ磁性を保っていた。この結果は、本法によって合成されたGreigite標品が、既報のものと同様に、乾燥状態では酸素により酸化されにくいことを示している。

10

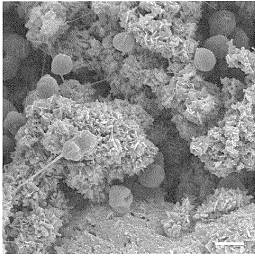
【図1】



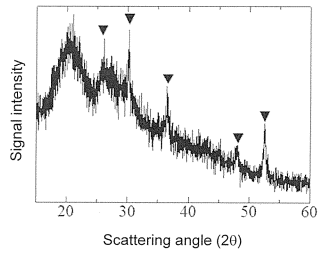
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

特許法第30条第2項適用 刊行物名 : The International Biogeoscience
Conference 2013 Nagoya, Japan, Program 発行日 : 平成25年11
月1日 発行者 : 日本地球化学会

特許法第30条第2項適用 研究集会名 : The International Biogeoscience
Conference 2013 Nagoya, Japan 開催日 : 平成25年11月1日~4日

(72)発明者 山村 泰久

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

(72)発明者 安達 卓也

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

審査官 植原 克典

(56)参考文献 Science, 2011年, vol.334, p.1720-1723

Journal of Hazardous Materials, 2010年, vol.175, p.1062-1067

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 3/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN)