

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成30年度博士課程進学
氏名 加藤 由悟
指導教員名 鈴木 道生

論文題目 金属ナノ粒子生成細菌による金属沈着機構の解明

序 | 背景と目的

現在、地球上には元素が118種存在するとされており、それらは大きく金属元素と非金属元素に分けられる。一部の金属元素は必須元素と呼ばれ、生物の代謝やその他の生命現象を維持するために必要不可欠である。一方で、必須元素も非必須元素も過剰に摂取すると毒性を発現することが知られている。微生物もまた代謝に必須な金属元素を体内にとりこんで金属と関わりながら生存している。例えば鉄還元細菌は鉄と電子をやり取りすることでエネルギーを獲得して生存している。さらに、体内で鉄を鉱物化し鉄ナノ粒子を合成することで磁場を検知する磁性細菌のような微生物が存在する。金属ナノ粒子は1~100 nmの金属の結晶であり、表面の影響が大きくなるだけではなく、全体を構成する原子核と電子の数が有限となることで量子サイズ効果と呼ばれる独特の物性を持ち、医療や工学の分野で数多く利用されている。磁性細菌のように生存戦略としてナノ粒子を合成する微生物が存在することから、微生物により有用な金属ナノ粒子を合成することができると考えられ、研究が進められてきた。微生物による金属ナノ粒子合成手法はエネルギーを必要としない新たな手法として注目を集めているが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない (Kato and Suzuki, 2020)。

本研究では菌体内に金属をナノ粒子として生成する微生物に着目し、その沈着機構の解明を目指して研究を行った。金属をナノ粒子化させる原因物質の特定は、溶液中の金属回収効率や金属ナノ粒子合成効率を向上させるために不可欠である。

1 | 乳酸菌による金ナノ粒子合成

乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC393 株 (以下、乳酸菌) の懸濁液にテトラクロリド金(III) 酸カリウム (以下、塩化金酸) を加えることにより金ナノ粒子が合成された。乳酸菌は培養が容易で、人体への害も少なく、処分も容易であることから、金ナノ粒子合成が可能な微生物として応用性が高いと考えられる。これまでの研究から乳酸菌の細胞膜に存在する糖脂質ジグリコシルジアシルグリセロール (DGDG) が金ナノ粒子の合成に関与していることが

分かっている (Kikuchi et al., 2016)。しかし、DGDG を用いて *in vitro* で合成した金ナノ粒子の粒径は乳酸菌を用いた時に *in vivo* で合成された金ナノ粒子よりも大きく、乳酸菌に含まれる成分には DGDG の他に金ナノ粒子の合成に寄与している物質が存在することが示唆された。金ナノ粒子を合成した乳酸菌の菌体をクライオ電子顕微鏡により観察したところ、金ナノ粒子は細胞膜の表面近傍で合成されていることから、菌体外に放出している成分 (菌体外成分) に粒子の凝集を抑え粒径を小さくする物質が存在していると考え、分析を行った。乳酸菌の菌体外成分に塩化金酸を加えたところ、粒子の大きさがそろっており、平均粒子径 15.5 nm の小さな金ナノ粒子が合成されたため、菌体外成分が優秀な分散剤として機能することが分かった。菌体外成分により合成された金ナノ粒子を SEM (走査型電子顕微鏡) によって観察したところ、金ナノ粒子の周りが繊維状の有機物質に覆われている様子が観察された。この繊維状の物質が金ナノ粒子合成において分散剤として寄与していると考え、成分の解析を行った。アミドカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより分離した菌体外成分のうち、金ナノ粒子合成活性画分を核磁気共鳴スペクトルおよび質量分析装置を用いて分析したところ、lacto-*N*-triose (LNtri) のようなアセチル化された三糖と乳酸が金ナノ粒子合成に活性を持つことを突き止めた。そこで、市販の lacto-*N*-triose II (LNtri II) と乳酸、もしくは両者の混合溶液に塩化金酸を添加することで *in vitro* での金ナノ粒子合成試験を行った。LNtri II と乳酸は単独では金ナノ粒子を合成できなかったが、混合液ではナノ粒子を合成することができた。LNtri II と乳酸に、さらに乳酸菌から抽出し精製した DGDG を加えた 3 物質の混合液を用いたところ、乳酸菌が作る金ナノ粒子と同程度のサイズの金ナノ粒子の合成に成功した。このことから、これらの成分が協調して乳酸菌の中で金ナノ粒子が生成されるというメカニズムを初めて明らかにした (Kato et al., 2019)。本研究成果による乳酸菌の金ナノ粒子生成メカニズムの解明は、微生物を用いたより効率的な金属ナノ粒子の合成や生体を模倣した新たな金属ナノ粒子合成手法の開発に繋がると期待される。

2 | 環境微生物による重金属沈着

本項目では金属濃度の高い水域から金属ナノ粒子合成能を持つ環境微生物を単離し、その金属濃集のメカニズムの解明を行うことを目的に研究を行った。金属耐性を持つ微生物により、高濃度の金属溶液中で増殖しながらナノ化を行うことで、高効率に金属回収を行うことができると考えられる。このような特殊な環境微生物の金属粒子生成のメカニズムを解明することにより、バイオレメディエーションへの応用や合成された金属ナノ粒子の応用を目指している。本項目では重金属の中でも鉛に着目した。鉛は人体にとっては急性・慢性ともに中毒性が認められている毒性元素である一方、鉛ナノ粒子は蓄電池など、電気化学的に応用可能である。

金属に汚染されている水域として北陸地方の廃鉱山周辺の流域からサンプリングを行った。はじめに、得られた環境水を鉛含有平板培地に塗布することで鉛に耐性を持つ約 100 株の微生物ライブラリーを作成した。単離した微生物を、酢酸鉛を含む液体培地にて 24 時間培養し、TEM (透過型電子顕微鏡) を用いた観察により鉛の沈着物を菌体周辺に合成する微生物 (KKY-29 株) を特定した。この微生物の種の同定を行うため、16S rRNA の塩基配列のシーケンシングを行った。The Ribosomal Database Project のデータベースにより相同性検索を行い、近接結合法を用いて系統樹解析を行った結果、この微生物は *Pseudomonas koreensis* と近縁で、タイプ株には登録されていない未同定の *Pseudomonas* 属の株であることが判明した。

初めに、KKY-29 株により合成されたナノ粒子について詳細な分析を行った。スクリーニングでは培養液に酢酸鉛を添加したため、培地成分による無機的な沈着の寄与を否定できない。そこで、KKY-29 株のみでナノ粒子を合成するため、培養した KKY-29 株を滅菌水で洗浄し、酢酸鉛水溶液中でインキュベートした。合成されたナノ粒子の局在性を調べるため、高圧凍結および凍結置換した菌体を樹脂包埋し、超薄切片を作成した。切片を TEM にて観察したところ、ナノ粒子が菌体内部に合成されていることが分かった。合成された鉛ナノ粒子の沈着物の組成を知るために TEM による観察および付属のエネルギー分散型 X 線分析装置による元素組成分析を行った結果、ナノ粒子は主に鉛とリンと酸素と炭素を含むことが示唆された。さらに、X 線回折装置を用いた鉱物同定を行ったところ、Pyromorphite ($Pb_5(PO_4)_3Cl$) および Hydrocerussite ($2PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$) からなることが分かった。これらの鉛ナノ粒子は 15~50 nm 程度の粒子径であった。また、鉛粒子沈着後の菌体について、生存性を示す蛍光試薬である LIVE/DEAD® Cell Viability Kit にて染色し蛍光顕微鏡にて観察したところ、KKY-29 株は鉛ナノ粒子の合成後も生存していることが分かった。以上のことから、KKY-29 株は生体反応として鉛イオンを菌体内に取り込み、菌体内にてリン酸イオンと鉛イオンとを結合し、さらに、鉛ナノ粒子の結晶成長を抑えてナノ化を助ける分散剤成分を生成していると考えられた。

次に KKY-29 株を超音波破碎することで、鉛ナノ粒子を菌体から分離し、分散剤として粒子に結合している物質の特定を目指した。まず、菌体内から鉛イオンに結合する物質を探索するため、検出試薬として TPPS-鉛錯体 (5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphinetetrasulfonic acid) を用いた分光分析手法を用いた。これは鉛イオン結合分子により TPPS-鉛錯体から鉛が奪われることにより、溶液の極大波長が変化することを利用して検出する方法である。これにより、溶液の吸収スペクトルを測定することで結合物質の存在を明らかにすることができる。分析の結果、鉛イオン結合物質は菌体外には存在せず、菌体の超音波破碎液に存在することが分かった。鉛ナノ粒子の沈着後の超音波破碎液を詳細に分析するため、超音波破

砕により得られた抽出液および残渣をろ過することで得られたろ液を分析した。それぞれのサンプル中の鉛濃度を測定したところ、双方に鉛ナノ粒子が存在していると考えられ、ゲルろ過カラムによる HPLC-ICP-MS（高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析）に供した。本手法では、HPLC により菌体成分を分離し、ICP-MS により鉛を高感度で分析することで、鉛と結合した画分を特定することができる。特定した画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離を行った。バンドパターンから得られた鉛結合物質と思われるバンドを LC-MS/MS（液体クロマトグラフ質量分析計）に供したところ、外膜タンパク質として金属イオン輸送に寄与する TonB-dependent receptor であると同定された。遺伝子の発現解析の結果、鉛イオン添加時に発現量が増加していることが分かり、鉛ナノ粒子の沈着に寄与していると考えられた。

最後に KKY-29 株の鉛以外の金属沈着能力を探索した。鉛と同様に、洗浄した KKY-29 株を金属イオン溶液中にてインキュベートし、TEM により菌体周囲の金属沈着の観察を行ったところ、KKY-29 株が金、銀、パラジウム、白金などの貴金属やカドミウム、ニッケルなどの重金属といった多様な金属に対してナノ粒子合成能力を持つことが観察された。さらに、溶液中の金属イオンの濃度の測定を行ったところ、銅や亜鉛などの重金属を菌体内に回収することが示された。

総括

本論文では希少性の高い貴金属として金、毒性のある重金属として鉛を選択し、それぞれの金属をナノ粒子化する機構の解明を行った。本研究で明らかとなった各成分の発現量を調整することや各成分を *in vitro* で用いることで、生体を模倣した新たな金属回収手法やナノ粒子合成手法の開発につながると期待される。

参考文献

- [Kato, Y., Suzuki, M., 2020. Synthesis of Metal Nanoparticles by Microorganisms. Crystals 10, 589.](#)
[Kikuchi, F., Kato, Y., Furihata, K., Kogure, T., Imura, Y., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2016. Formation of gold nanoparticles by glycolipids of *Lactobacillus casei*. Sci. Rep. 6, 34626.](#)
[Kato, Y., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2019. Synthesis of Gold Nanoparticles by Extracellular Components of *Lactobacillus casei*. ChemistrySelect 4, 7331–7337.](#)