

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14888

研究課題名(和文)酸耐性と選択的透過性を両立する生物由来シリカ膜の解析とin vitroでの再現

研究課題名(英文)Analysis and in vitro reconstitution of biosilica layers that show acid resistance and selective permeability

研究代表者

池田 丈(Ikeda, Takeshi)

広島大学・先端物質科学研究科・助教

研究者番号：10505754

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):一部のBacillus属細菌はケイ酸を細胞内に取り込み、その重合体であるシリカを孢子殻上に蓄積する。形成されたシリカ層は酸に対する防壁として機能する一方で、発芽誘起物質の少なくとも一部を透過すると考えられた。これらの機能を両立しているメカニズムを解明するために、孢子よりシリカ層を単離し、その内部に存在する有機物を抽出した。質量分析の結果、本物質は多数のアミノ基を有するポリマーであることが判明した。本ポリマーを合成できない遺伝子破壊株を作製したところ、シリカ層の微細構造がわずかながら野生株と異なる様子が観察された。このことから、本ポリマーがシリカ層の性質に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):Bacillus cereus and its close relatives take up soluble silicate from the environment and accumulate it as insoluble silica in and around the spore coat layer. The silica layer serves as a protective coating against acid while showing permeability towards germinant molecules. To elucidate the mechanism underlying these dual functions, we extracted organic molecules from the silica layer. MS analysis revealed the presence of organic polymers containing multiple amino groups. A gene disruptant lacking these polymers formed a silica layer whose nanostructures were slightly different from those of the wild-type one. These results suggest that the polymers embedded in the silica layer might play an important role in the functions of the silica layer.

研究分野：生物工学

キーワード：細菌 孢子 ケイ素

## 1. 研究開始当初の背景

生物による無機鉱物合成、いわゆるバイオミネラルゼーションは、化学合成とは異なり、常温常圧という温和な環境で反応が進行し、かつ、遺伝的なメカニズムによって合成が厳密に制御されている。このような生物由来の合成能力を利用して、従来の化学プロセスでは作りえない新たな構造体を創出しようという研究が盛んに行われている。特にケイ素(Si)は半導体・太陽電池の原料として産業的に重要な素材であり、ナノスケールでの微細加工技術が確立されている。人工的なナノ構造体作製法と、ナノサイズの生体分子による自己組織化的なバイオプロセスを組み合わせることで、革新的な機能性ナノ構造体の創出が可能になるものと期待されている。

珪藻や海綿といった一部の真核生物がケイ素の酸化物であるシリカ( $\text{SiO}_2$ )のバイオミネラルゼーションを行うことは古くから知られており、そのメカニズムについても研究が進んでいるのに対し、原核生物とケイ素の関わりについてはこれまでほとんど報告がなかった。我々は、多様な代謝系を有する原核生物の中には、環境中に豊富に存在するケイ素を積極的に利用するものもいるのではないかと予想し、ケイ素を利用する細菌の探索を行った。その結果、一部の *Bacillus* 属細菌が孢子形成期に可溶性のケイ酸( $\text{Si}[\text{OH}]_4$ )を細胞内に取り込み、細胞内でシリカへと重合して孢子殻上に蓄積することを発見した(文献1)。

シリカ層が形成された孢子は、酸に対する耐性が向上しており、孢子表面のシリカ層が酸に対する防壁として機能していることが強く示唆された。孢子がいわばシリカの殻を纏うことで種々のストレスに対する耐性を高め、生存率を向上していると考えられた。一方で、シリカ層の有無は孢子の発芽率に影響を与えないことから、発芽誘起物質(糖やアミノ酸など)の少なくとも一部を透過する性質を有しており、また、孢子発芽時にはシリカ層が脱落することが示唆されている。つまり、本菌が形成するシリカ層は単なるガラス質のコーティングではなく、化学的耐久性と選択的透過性を併せ持ち、なおかつ能動的な分離が可能な多機能性の膜状構造体と言えるが、そのような機能を実現しているメカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Bacillus* 属細菌が形成するシリカ層の微細構造ならびに形成機構の解析を行うことで、化学的耐久性と選択的透過性を両立しているメカニズムを解明することを目的とした。また、得られた知見を基に、本菌のシリカ層を模倣した機能性シリカ膜を形成することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 孢子からのシリカ層の単離と電子顕微鏡による観察

本研究では *B. cereus* をモデルとして用いた。ケイ酸を添加した培地中で *B. cereus* を培養し、ケイ酸が蓄積された孢子を調製した。得られた孢子を濃硝酸・濃硫酸混合液中で強熱することでシリカ外部の有機物を分解した後、超遠心により酸に不要な画分を回収した。得られた画分を超純水で繰り返し洗浄した後、走査型電子顕微鏡ならびに透過型電子顕微鏡で観察した。

(2) シリカ層の内部に存在する有機物の抽出と同定

孢子より単離したシリカ層をフッ化アンモニウム溶液に懸濁することでシリカを溶解し、シリカ層内部に存在する物質を溶出させた。透析によりフッ化アンモニウムを除いた後、凍結乾燥によって溶媒を除去することで、溶出した物質を濃縮した。得られた物質を少量の超純水に溶解し、SDS-PAGE に供した。また、本物質を同定するために質量分析に供した。

(3) シリカ層内部に存在する有機物を合成できない遺伝子破壊株の構築

シリカ層内部に存在する有機ポリマーの化学構造から、その生合成経路を予想した。既知の関連酵素との相同性解析により、本ポリマーの生合成に関与すると予想される遺伝子の候補を見出した。これらの候補遺伝子について、相同組換えによる薬剤耐性遺伝子との置換によって目的の遺伝子を破壊した株を構築した。得られた遺伝子破壊株についても(1)の実験と同様にシリカ層の単離と電子顕微鏡による観察を行い、野生株と比較した。

## 4. 研究成果

(1) 孢子からのシリカ層の単離と電子顕微鏡による観察

シリカ層の微細構造を詳細に観察するために、孢子からのシリカ層の単離を試みた。シリカは酸に不溶であることを利用して、孢子を強酸処理に供することで有機物を分解し、酸に不要な画分を回収した。得られた画分を電子顕微鏡で観察したところ、孢子と同サイズの殻状の構造体が多数観察された(図1)。エネルギー分散型X線分析による元素分析の結果、この構造体がシリカであることが確認されたことから、シリカ層の単離に成功したと判断した。観察された殻状の形態から、当初の予想通り、シリカ層が孢子を覆う形でコーティングすることで酸に対する耐性を高めていると考えられた。

シリカ層の微細構造を詳細に観察したところ、シリカ層の表面には数十 nm 程度の凹

凸が全面に存在する様子が見られた。このことから、基層となるタンパク質膜(孢子殻)上でナノスケールの微細シリカ粒子が形成され、それらを基にさらにシリカの重合が進行することで層状の構造体が形成されていることが強く示唆された。

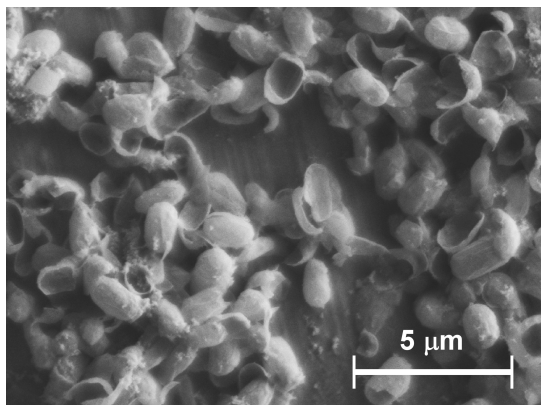


図1 単離したシリカ層の電子顕微鏡写真

## (2) シリカ層の内部に存在する有機物の抽出と同定

生物によるシリカ形成に関与する生体分子は、形成されたシリカの内部に埋め込まれる形で存在することが多い(文献 2-4)。本菌においてもシリカ内部に生体分子が存在し、シリカ層の性質に影響していることが予想されたため、本菌のシリカ層内部に存在する有機物の抽出と同定を試みた。単離したシリカ層をフッ化アンモニウム処理に供することでシリカを溶解し、内部に存在する物質を溶出させた。得られた物質を SDS-PAGE に供し、泳動後のゲルを CBB で染色したところ、低分子量の領域にバンドが観察された。CBB によって染色されたことから、本物質はタンパク質であると当初は予想していたが、質量分析による同定を試みたところ、予想に反してタンパク質ではないことが判明した。得られたマススペクトルを解析した結果、本物質はアミノ基を多数有するポリマーであると考えられた。

## (3) シリカ層内部に存在する有機物を合成できない遺伝子破壊株の構築

(2)の実験で発見されたポリマーがシリカ形成においてどのような役割を果たしているかを明らかにするために、本ポリマーを合成できない遺伝子破壊株の構築を試みた。本ポリマーの化学構造より、その生合成経路を予想し、合成に関与すると予想される複数の遺伝子を見出した。これらの遺伝子を破壊した株を構築したところ、本ポリマーを合成できない変異体を取得することに成功した。得られた変異体の孢子よりシリカ層を回収し、透過型電子顕微鏡を用いて微細構造の観察を行ったところ、シリカ層を構成する粒子状

構造体の形状がわずかながら変化している様子が見られた。

これらの結果から、本ポリマーがシリカの性質に影響を与えている重要な物質である可能性が強く示唆された。よく似た構造のポリマーは本菌以外のシリカ形成生物にも存在することが報告されており(文献 5,6)、生物によるシリカ形成において何らかの重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

## <引用文献>

- R. Hirota, Y. Hata, T. Ikeda, T. Ishida, A. Kuroda, The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores, J. Bacteriol., vol.192, 2010, pp.111-116.
- N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation, Science, vol.286, 1999, pp.1129-1132.
- K. Shimizu, J. Cha, G.D. Stucky, D.E. Morse, Silicatein : Cathepsin L-like protein in sponge biosilica, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.95, 1998, pp.6234-6238.
- K. Shimizu, T. Amano, M.R. Bari, J.C. Weaver, J. Arima, N. Mori, Glassin, a histidine-rich protein from the siliceous skeletal system of the marine sponge *Euplectella*, directs silica polycondensation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.112, 2015, pp.11449-11454.
- N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.97, 2000, pp.14133-14138.
- S. Matsunaga, R. Sakai, M. Jimbo, H. Kamiya, Long-chain polyamines (LCPAs) from marine sponge: possible implication in spicule formation, ChemBioChem, vol.8, 2007, pp.1729-1735.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

池田 文, 中川 美樹, 山本 光士郎, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 中温性グラム陽性細菌 *Bacillus cereus* は孢子表面に無機固体であるシリカを形成し、その内部には長鎖ポリアミンが存在する, 日本ポリアミン学会第9回年会, 2018

M. Nakagawa, T. Ikeda, T. Tanaka, K. Yamamoto, R. Hirota, A. Kuroda.

Discovery of long-chain polyamines (LCPAs) in a silica layer of the gram-positive, spore-forming bacterium *Bacillus cereus*.  
BiomimXIV/14th International Symposium on Biomineralization, 2017  
中川 美樹, 田中 達也, 池田 文, 廣田 隆一, 黒田 章夫, *Bacillus* 属細菌が形成するシリカ内部に含まれる長鎖ポリアミンの発見, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017  
池田 文, 田中 達也, 中川 美樹, 本村 圭, 廣田 隆一, 黒田 章夫, *Bacillus* 属細菌のシリカ蓄積メカニズムの解析, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 文 (IKEDA, Takeshi)  
広島大学・大学院先端物質科学研究科・  
助教  
研究者番号: 10505754