

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32670

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2021

課題番号：18H06071・19K21194

研究課題名(和文)鉄酸化細菌が作る酸化鉱物形成機構の解析

研究課題名(英文)Visualization and structural analysis of oxidized minerals produced by iron-oxidizing bacteria

研究代表者

鈴木 智子 (SUZUKI, Tomoko)

日本女子大学・理学部・研究員

研究者番号：30623772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Leptothrix ochracea やGallionella ferrugineaは、細胞外に管状やらせん状の非常に特異な形状の酸化鉱物を生成する。本研究では、当該細菌の培養法を考案・駆使して、酸化鉱物の形成過程を経時的に電顕観察し、ミクロレベルで可視化した。また、菌体から酸化鉄が生成される場面を空間的に解析するために、最新の電顕技法である連続切片SEM法によるアレイトモグラフィーによる3次元再構築を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当該細菌の生成する酸化鉱物を機能性材料と位置づけており、細菌の生成物を工業材料の創製に活用することを最終目標としている。本研究で得られた成果は、これまで培養ができなかった細菌を人為的に増やし、その酸化鉱物の生成過程の一端を明らかにできたことに意義がある。また、最新の電顕観察技法を用いて微生物と無機材料(酸化鉱物)を立体再構築している点においても学術的意義をもち、今後の技術的な課題についても浮き彫りにした。

研究成果の概要(英文)：Leptothrix ochracea and Gallionella ferruginea, so-called iron-oxidizing bacteria have been recognized for their potential to form iron oxide (hydroxide) structures in natural aquatic environments. Their products (iron hydroxides) have unique structures as micro tubes or twisted stalks. In this study, formation process of micro tubular structures produced by which L. ochracea has been cultured in ground water, was visualized using electron microscope. In addition I attempted to reconstruct three-dimensional images obtained from serial section scanning electron microscopy (array tomography) of the cell producing the iron hydroxides.

研究分野：細胞生物学

キーワード：鉄酸化細菌 酸化鉱物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鉄酸化細菌は、湖沼や河川、地下水の浸出場所、水道管内などの鉄分の多い水環境中で褐色の沈殿物を形成する常在細菌である。これらの細菌は水中の  $Fe^{2+}$  や  $Mn^{2+}$  を酸化してエネルギー源とし、菌体外に特異形状の酸化鉱物を形成するとされている。代表的な細菌として、管状酸化鉄を生成するレプトスリックス属菌、らせん状酸化鉄を生成するガリオネラ属菌が挙げられる。これら細菌は、鉱物生成に関わる細菌として国内外で認知され、地球科学分野の研究対象となることが多い。管状酸化鉄を生成するレプトスリックス属では、現在4種が確認されているが、当研究対象とする *Leptothrix ochracea* は、環境中で観察される管状酸化鉄のほとんどが本菌由来の酸化鉄であるにも拘らず、単離された例がなく、分類学的にも生理学的にも全く未知な細菌である。また、本菌は、鉄分を豊富に含む地下水が流れる場所では大量の管状酸化鉄を生成することから、浄水場で鉄分除去のために利用されている。しかしながら、それら浄水場では年間40t(乾燥重量)もの酸化鉄が産業廃棄物として処理されている。そこで、この酸化鉄の有効利用に向けて材料学的に研究がなされた結果、この未知の細菌が生成するユニークな形状の酸化鉄は、その特異な構造から機能性材料として多様な用途において優れた特性を示すことが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞外にユニークな構造の酸化鉄を生成する細菌がどのようにして酸化鉄を生成するのかを解明することを目標として、当該細菌の培養法を考案・駆使して、酸化鉱物の形成機構をイメージングにより可視化し、生成機構の一端を明らかにする。また、その生成を人為的に制御して細菌由来の新規素材生成法の確立を目指す。培養方法を確立し、培地の制御によりこれまででない管状酸化鉱物を創造することで、新しい機能性材料の創出方法を確立したいと考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) 地下水培養による酸化鉱物の形成過程の経時的観察

予備研究において、新しく形成された酸化鉱物沈殿物を採取すると、比較的高頻度で生きた当該細菌が存在する。これを、少量採取して地下水を満たした透析チューブに入れて両端を閉じ、地下水の流水条件下に浮かべて経時的に取り出し、内容物について光学顕微鏡観察し、LIVE/DEAD®BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて細菌の生死判定を行った。また、同沈殿物を激しく懸濁後、1.2  $\mu m$  のメンブレンフィルターに通すことで、菌体と酸化鉱物を分離させることが可能である。フィルターを通過させた菌体懸濁液を、フィルター滅菌した地下水に戻すことで、経時的に酸化鉱物の生成過程を追うことができる。時間経過毎に回収した試料を、切片 SEM 法を用いた微細構造の解析により、管状酸化鉄がどのように形成されていくのかを観察した。

#### (2) 酸化鉱物含有糖の解析

これまでの研究から、当該細菌が生成する酸化鉱物は炭素を骨格として持つことを明らかにしている。これら炭素は、おそらく酸化鉱物の形状を決定する重要な因子で、酸化鉱物の骨格を成すものであると考えられる。そこで、これら酸化鉱物に含まれる糖や官能基を明らかにするため、レクチン蛍光ラベルにより酸化鉱物に含まれる糖について解析した。採取した酸化鉱物を蒸留水で10回洗浄、遠心分離により回収し、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識レクチンを処理した。供試した標識レクチン(J-OIL MILLS Co.)は、Canavalin A (ConA)、Lens culinaris Agglutinin (LCA)、Arachis hypogaea Agglutinin (PNA)、Phaseolus vulgaris Agglutinin (PHA-E4) を用いた。対照として、各レクチンと反応する糖を200mMに調整し、再懸濁する際の緩衝液の代わりに糖水溶液を用いた。各レクチンに対する対照実験には、ConA および LCA にはグルコースとマンノースを、PNA にはガラクトースを、PHA-E4 には N-アセチルガラクトサミンを阻害糖として用いた。

また、フェノール硫酸法により含有糖の定量を行った。洗浄した酸化鉱物を凍結乾燥し、10mgの乾燥試料を0.5mlの1N塩酸に溶解した。対照として500で焼成した酸化鉱物を用いた。試料塩酸溶液をSpectra Pore MWC0.500の透析チューブに入れ、外液を500mlの1N塩酸とし、一晚攪拌し完全に酸化鉄を溶解・希釈させた。次に、外液を500mlの0.5N塩酸、0.25N塩酸に順次交換してそれぞれ一晚透析し、鉄および塩酸量を低下させた。さらに、外液を500mlの蒸留水に交換し、一晚透析した。一晚経過した外液はpH 4.0であった。外液がpH7.0になるまで蒸留水を交換し、チューブ内の液を回収した。回収した液を18,100 rpmで5分間遠心分離し、上清を回収し、糖定量試料とした。糖定量は、黄色比色定量のフェノール硫酸法に従った。グルコースを用いて検量線を作成し、測定値から  $x = \text{試料 OD490} - \text{対照 OD490}$  とし、検量線から得られた  $y = 103.65x + 0.9314$  の式に当てはめ、糖定量値をグルコース換算により導き出した。

### (3) 連続切片 SEM 法を用いた 3D 再構築による構造解析

*G. ferruginea* や *L. ochracea* の細胞と細胞外酸化鉱物の生成過程を空間的に把握するため、最近の手法である連続切片 SEM 法を用いた 3 次元再構築を試み、細菌細胞と生成された酸化鉱物との空間的配置について明らかにした。切片 SEM 法は、豊岡らの報告を参考に行い、樹脂包埋ブロックから連続超薄切片を作製し、それをシリコンウェハー上に張りつけ酢酸ウランおよび鉛染色液により電子染色し、FE-SEM (SU8220、日立ハイテック社製) に搭載の YAG-BSE 検出器により観察した。観察条件は、加速電圧 5.0kV、WD 8.0mm とし、取得した連続切片 SEM 像は 3D 再構築ソフト Image pro 3D (Media Cybernetics 社) により立体構築した。

## 4. 研究成果

### (1) 地下水培養による酸化鉱物生成過程の経時的観察

透析チューブで培養した培養物について、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡観察した結果を図 1 に示す。透析チューブの様子は、培養開始時には無色透明だった内容液がオレンジ色に変化していた。内部に形成された沈殿物を観察すると、管状酸化鉱物が観察され、細胞の生死判定試薬により染色したところ、管状酸化鉱物の中に連なった緑で染色された生細胞が多数観察できた。一方、培養 3 日目になると、管状酸化鉱物の数は増えていたが、生死判定染色では酸化鉱物内部の細菌は赤く染色されその多くが死細胞であり、さらに空の酸化鉱物も多数あることが判明した。この結果から、コロニー内の

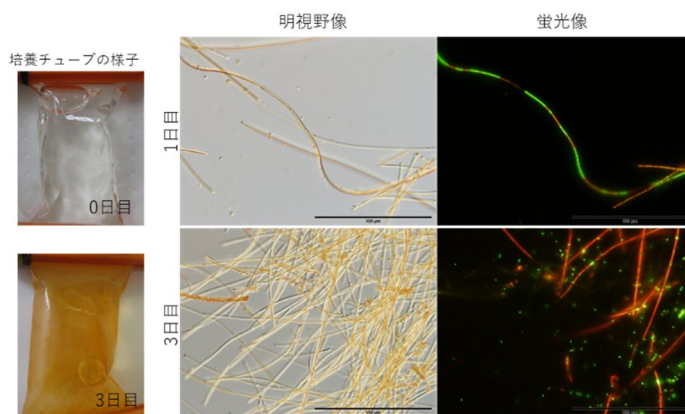


図1. 透析チューブ培養による管状酸化鉱物の生成 (明視野像) と細胞の生死判定。左端は培養開始前と培養3日目の透析チューブの様子を示す。蛍光像の緑の蛍光は生細胞を、赤の蛍光は死細胞を示す。

増殖が 24-48 時間程度でピークに達することが示唆された。次に、メンブレンフィルターを通して細菌と酸化鉱物を分離し、菌体とフィルターを通過した細かい酸化鉱物のみを培養源として地下水で培養を行った。透析チューブ培養の結果を踏まえて、培養時間は 48 時間までとし、6、12、18、24、48 時間と経時的に培養沈殿物を回収して電子顕微鏡解析を行った。その結果、培養 18 時間後には図 2. に示すように菌体 (図 2. c) の周囲に *L. ochracea* が作る管状酸化鉱物が形成されていた。図 2. では、*Leptothrix* 属細菌の単離菌株を人工合成培地で培養した際の酸化鉱物の生成過程を TEM 像 ( ~ ) で示している。の像では、管状酸化鉱物の外側が広がり毛羽立った様相を呈しており、再集生成物である酸化鉱物の形状が異なることを明確に示している。この違いは、培地成分の違いによるものか、分泌糖鎖の違いに起因するのではないかと考えた。今回、*L. ochracea* において、に相当する写真は得られなかったが、恐らく同様の過程を経て形成されるのではないかとと思われる。図 2. 下に経過時間に伴い形成される酸化鉱物の模式図を示している。まず菌体から分泌された糖鎖が細胞周囲をぐるりと取り囲み、そこに酸化鉱物が沈着するというものである。しかしながら、どこで電子のやり取り、エネルギーの授受が行われているのかはいまだ不明である。

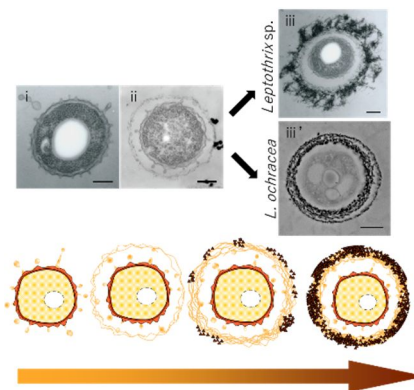


図2. *Leptothrix*属細菌の酸化鉱物の生成過程  
上段には細菌(c)と酸化鉱物生成過程の電顕写真を示す。  
Scale bars: 200nm(i - iii), 500nm(iii').  
下段には経過時間に伴う酸化鉱物生成過程の模式図を示す。

### (2) 酸化鉱物含有糖の解析

フェノール硫酸法による比色糖定量の結果、酸化鉱物乾燥試料から抽出した溶液中のグルコース換算濃度は 3.52  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となり、10 mg の酸化鉱物乾燥重量あたり約 3  $\mu\text{g}$  の糖 (グルコース換算) が含まれることになる。すなわち、酸化鉱物の 0.03% が糖であることを示している。一方、500  $^{\circ}\text{C}$  焼成した酸化鉱物からは、糖は検出されなかった。

レクチン反応による糖の検出を試みた。その結果、グルコース・マンノースと反応する ConA および LCA、およびガラクトースと反応する PNA においては、極稀に反応する酸化鉱物があったものの、ほぼすべての酸化鉱物が無反応であった。一方、N-アセチルガラクトサミンと反応する PHA-E4 では、すべての酸化鉱物が反応し、FITC の蛍光を示した。しかしながら、PHA-E4 に対する N-アセチルガラクトサミンの阻害糖実験においても、蛍光強度は弱まるものの FITC 標識されたことから、非特異的吸着による可能性を否定できなかった。

### (3) 連続切片 SEM 法を用いた 3D 再構築



*G. ferruginea* が生成するらせん状酸化鉄物(stalk)の生成機構解明の一助のため、菌体から stalk が出現する領域の 3 次元的観察は必須と考え、切片 SEM 法による連続切片像から簡易的に stalk と繋がる菌体の立体再構築を試みた。新鮮なコロニーを採取できれば、光学顕微鏡でソラマメ形の菌体を見つけることは難しくないが、*Gallionella* 細胞と stalk は非常に外れやすく、さらにコロニーである沈殿物は少しの水の動きで簡単に水中に拡散・懸濁されるため、試料作製中に stalk から菌体が離脱してしまう。そのため菌体とそこから出生する stalk を併せ持つ標的を樹脂包埋切片の中に捉えられる割合はかなり低い。菌体と stalk の離脱を防ぐため、コロニーを崩さず固定後速やかに寒天と混和させて不動化したものを樹脂ブロックに包埋し、作製した連続超薄切片(厚さ 70 - 80 nm)を観察した。切片上にある無数の stalk の中から細胞を持つ stalk を探しだし、連続切片から同標的を撮像した。1 μm 前後の大きさの粉体や浮遊細胞を標的として 70 ~ 100 nm 厚の連続切片を作製した場合、標的周囲には常に目印となる構造物が無い場合が多く各切片から標的を見つけ出すことは容易ではなかった。取得した標的細胞の連続写真 9 枚を図 3a-i に示した。これを Image-Pro 3D を用いて立体再構築した(図 3j)。今回取得した細胞では一部のみ細胞と stalk のつながる部位があり、3D 再構築することで細胞からの stalk 出現領域や細胞周囲に形成された酸化鉄の配置を空間的に捉えることができた。しかしながら、久住ら が本法の欠点とも指摘する切片厚が直接的な Z 軸分解能となる点において、微小な本標的に対しては Z 軸分解能の不足が如実に表れる結果であった。ナノスケールの stalk 繊維出現箇所までを明瞭に捉えるためには、収束イオンビーム SEM (FIB-SEM) による連続断面観察や連続切片に対する電子線トモグラフィー、クライオ FIB-SEM を応用した電子線トモグラフィーなど、より Z 軸分解能の高い別のアプローチも必要になるとと思われる。*L. ochracea* の 3 次元再構築は、連続切片像を取得しており、Image pro 3D による再構築を試みているところである。

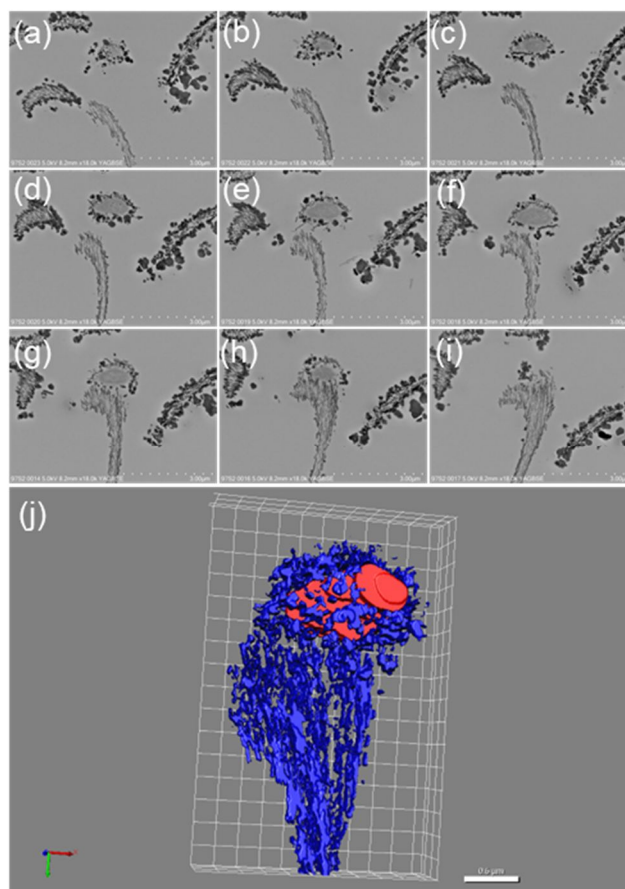


図 3. *Gallionella* 菌体と stalk の連続 SEM 像(a-i)と 3D 再構築像(j)。菌体を赤、stalk と菌体周縁の酸化鉄を青で示した。

#### < 引用文献 >

- Emerson. 2010. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:561-583.  
 Hashimoto et al. 2014. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6: 5374-5378.  
 Sakai et al. 2010. *Org. Biomol. Chem.* 8:336-338.  
 Ishihara et al. 2014 *Minerals* 4: 565-577.  
 Furutani et al. 2011 *J. Marine Sci. Res. Development*, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9910.S5-001>  
 豊岡公徳, 若崎真由美, 宮彩子, 佐藤繭子 2020. *顕微鏡*. 55(1):7-12.  
 久住聡, 甲賀大輔, 柴田昌宏, 渡部剛 2020. *顕微鏡*. 55(1):18-22.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鈴木智子, 後藤友美, 橋本英樹, 佐藤繭子, 豊岡公德	4. 巻 57 (2)
2. 論文標題 鉄酸化細菌がつくるらせん状酸化鉄の構造解析とアレイトモグラフィー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------