

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 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：2015～2016

課題番号：15H06654

研究課題名(和文)新規機能材料創出に向けた難培養性鉄酸化細菌の単離と酸化鉄生成機構に関する基盤研究

研究課題名(英文) Basic studies of isolation of uncultured iron-oxidizing bacteria, and mechanism of forming iron oxides produced by the bacteria for producing novel functional materials.

研究代表者

鈴木 智子 (Suzuki, Tomoko)

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号：30623772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、チューブ状やらせん状の人工合成不可能な鉄酸化物構造体を細胞外に生成する鉄酸化細菌の単離と培養方法の確立、生成される構造体の形成機構の解明を目的に研究を進めた。当該細菌の生息場所を探索し、高純度にチューブ状酸化鉄を採取できる井戸を発見したが、採取許可が得られなかった。一方、培養により得られた *Gallionella ferruginea* 由来のらせん状酸化鉄を解析し、その構成元素や結晶構造を調べ、自然界のものとは異なることを明らかにした。また、培地組成の改変によりその組成や結晶構造を制御できることを明らかにし、新規機能性材料の創出に貢献する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to isolate and look for a culture methods for iron oxidizing bacteria that produced tubular or corkscrew-shaped iron oxides outside the cell, and then, to clarify the mechanism of formation of uniquely-shaped iron oxides. I searched for the habitat of iron-oxidizing bacteria, and I found a well with floating brownish floccs consists of tubular iron oxides. However, I did not get permission for sampling. On the other hand, the corkscrew-shaped iron oxides obtained from enrichment culture of *Gallionella ferruginea* were analyzed by using LM, SEM, SEM-EDX, HRTEM-FFT. Shortly-pitched long fiber iron oxides formed in the synthetic medium with different shape, structure and elemental composition from naturally-formed the corkscrew-shaped iron oxides. FFT pattern with few spots indicates microcrystalline. Our results showed that novel functional materials could be produced through culturing in different media.

研究分野：環境微生物学

キーワード：鉄酸化細菌 *Leptothrix ochracea* *Gallionella ferruginea*

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、鞘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。これら細菌群は、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。鞘状酸化鉄を形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鞘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。一方、*Gallionella ferruginea* は単離された例はあるが、現存するのはらせん状酸化鉄の形成能を消失した菌株だけである。近年、自然界から採取されたガリオネラの酸化鉄と集積培養で得られた同酸化鉄の X 線顕微鏡 (STXM) 解析により、らせん状酸化鉄が酸性多糖を含むことが明らかにされている。しかし、その詳細な構成成分や構造特性および酸化鉄と多糖との複合体形成機構などは不明である。

(2) 研究代表者が前職で所属していた岡山大学大学院自然科学研究科では、これらの細菌由来の酸化鉱物が触媒 や Li イオン二次電池正極材、赤色顔料 として利用できることを発見し、細菌由来の酸化鉱物を新規機能性材料と位置づけ、工業的利用に向けて研究を進めている。また、合成培地で培養可能な *Leptothrix cholodnii* に近縁の細菌 (*Leptothrix* sp. strain OUMS1) を単離し、培養法の改変による組成制御に着手している。

ガリオネラ属菌とレプトスリックス属菌が形成する鉄酸化物構造の外見は全く異なるが、これらの異形構造のナノレベル基本構造およびその材料特性に高い相同性があることを見出した。すなわち、両者はほぼ $\text{Fe}:\text{Si}:\text{P}=75:16:4$ (at%) からなる複合酸化鉄非晶質ナノ粒子 (3 nm) によって構成され、表面積が大きな多孔質体となっている。さらにその構造内部には、細菌多糖由来の炭素骨格を有することを明らかにし、両酸化鉱物が精巧な有機無機複合体であることを見出した。これらの物理的・化学的特性は電池電極・触媒・顔料などへの活用基盤に結びついていると考えられる。

2. 研究の目的

上記の研究背景を鑑み、鉄酸化細菌由来の酸化鉱物の用途への更なる性能向上や、用途に応じた材料特性付加を自在にできれば、革新的な工業材料の創出に繋がると期待される。

これを実現するためには、素材の安定的な大量供給プロセスの開発が必須となる。その一手段として細菌の増殖を人為的に制御し、常時大量に純粋素材を供給できる細菌の単離・純粋培養が不可欠である。既に単離した OUMS1 株を培養して鞘状酸化鉄生成過程を詳細に観察したところ、菌体外に糖質繊維からなる薄膜状チューブが先ず形成され、そこに酸化鉱物が沈着して鞘状構造が成熟することが明らかになった。しかしながら、単離菌の培養により最終的に得られる鞘状酸化鉄は、自然界から得られるものとは異なり、凝集が激しく鞘同士が癒着し、独立した一本のチューブ状構造体を得ることは難しかった。また、地下水のみで爆発的に増殖し、炭素源の添加を必要としない *L. ochracea* や *G. ferruginea* の純粋菌株を得ることは、上記目的達成に避けては通れない命題であると思いついた。そのため、本研究では、細菌由来の機能性材料生産を量的・質的に人為制御することを最終目標として、当該細菌の細胞外多糖分泌と酸化鉱物形成過程を把握するとともに、微生物が混在する水環境中から目的細菌を単離・純粋培養し、酸化鉱物の大量取得への道を開く。単離菌の大量増殖と酸化鉱物の大量生成のための培養条件は必ずしも同一とは限らない。両立する最適条件の把握も一つの焦点である。本研究により得られる成果は、工業利用に向けた今後の大量培養と構成元素の人為的改変に直接結びつき、新たな機能性材料の創出に貢献するものと確信する。

3. 研究の方法

岡山大学が保有する鉄バクテリア浄水法パイロットプラントのタンクに極めて優先に生息する *L. ochracea* および *G. ferruginea* 菌体は(これらは別々のタンクに生息)、タンク洗浄後、1日以内に生成される新しい酸化鉱物沈殿物とともに採取できる。これを出発材料として用い、以下(1)および(2)の研究を並行して進めた。また、速やかに実験に供試できる環境を整備するため、当該大学関連施設および近隣における湧水箇所について、当該細菌の生息および酸化鉱物の生成の有無を調査した。

(1) 現在までに当該細菌が自然環境中で生成する酸化鉱物の形態やサイズ、微細構造、構成元素、化学組成等を明らかにしている。本研究では、これを最終形態と位置づけたときの、形成過程を明らかにしていく。まず、自然環境下での集積培養による酸化鉱物生成過程を微細構造レベルで時間的・空間的に明らかにする。ここでは、ノマルスキー微分干渉顕微鏡、蛍光顕微鏡、走査型電子顕微鏡 (SEM)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、走査透過型電子顕微鏡 (STEM) に加え、EDX および EELS 解析手法を駆使し、経時的に酸化鉱物の形成過程をナノレベルで可視化するとともに、免疫電顕技法および GC-MS, LC-MS, MALDI TOF-MS 解析, NMR 等により酸化鉱物形成の鍵分子と

考えられる糖複合体の局在と分子構造を明らかにする。

(2) 集積培養から単離・純粋培養を行い、人工合成培地での培養を可能にする。ここでは、常法に則り集積培養から希釈純化を試みるが、マイクロマニピレーターおよびガラスキャピラリー針を用いて、鞘内に生息する *Leptothrix* 菌体および酸化鉱物を柄として有する *Gallionella* 菌体の分離に併用する。培養により得られた酸化鉱物は、結晶構造や化学結合状態、元素組成、表面積といった材料学的解析により評価する。

4. 研究成果

(1) 当該大学関連施設（日本女子大学目白キャンパスならびに附属校園）および近隣における湧水箇所について、当該細菌の生息および酸化鉱物の生成の有無を調査した。その結果、学内の井戸3か所では、地下水に鉄イオンが含まれず、鉄酸化細菌の生息および酸化鉄沈殿物も検出されなかった。近隣では、神田川への排水口2か所から褐色の付着物を回収し、そこにチューブ状の酸化鉄を確認したが、夾雑物が多く当該細菌の単離源に用いるには不向きであると判断した。また、近隣の商業施設（東京都、文京区）内の庭園にある井戸では、非常に高純度でほぼ夾雑物のない状態のチューブ状酸化鉄および当該細菌の生息を顕微鏡観察により確認した（図1）。また、SEM および SEM-EDX による元素分析の結果、これまで得られたどの個所から採取した試料とは異なり、Fe:Si:P の元素割合が 64:30:6 と鉄の割合が低く、その分ケイ素の含有率が高いことが明らかになった。これ



図1. 文京区商業施設内の井戸から採取したチューブ状酸化鉄(A)および鎖状に並ぶ *L. ochracea* とされる菌体(B)

は、地下水に含まれる鉄イオンの濃度に依存しているのではないかと推測した。この商業施設内の井戸から研究試料を採取できるよう交渉したが、許可が下りず断念した。一方で、らせん状酸化鉄を含む酸化鉄沈殿物はどの湧水箇所からも検出されなかった。

(2) *Gallionella ferruginea* の集積培養による単離・純粋培養に向けて、まず、人工合成培地である Modified Wolf's Mineral Medium (MWMM: ATCC7226, ATCC MD-VS, ATCC MD-MS) を用いて培養し、得られた酸化鉱物について、光学顕微鏡(LM)観察、SEM, SEM-EDX, HRTEM 解析を行った。その結果、自然界で採取されるらせん状酸化鉄とは異なり、1本の繊維が太く、数は数本から構成されるものであった(図2)。また、HRTEM 解析の結果、HRTEM 像から得られたフーリエ変換パターンに微

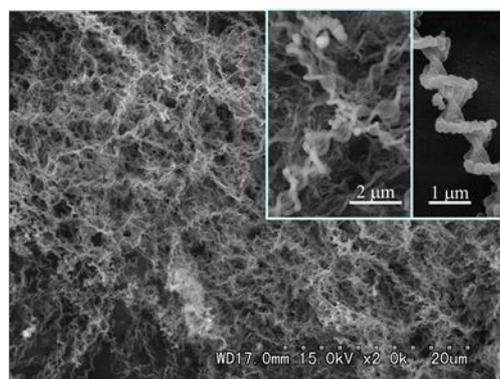


図2. 集積培養した *G. ferruginea* のSEM像

小なスポットがみられ、わずかに結晶性を有した微結晶構造をとることが明らかとなった(図3)。自然界から得られたらせん状酸化鉄は、完全にアモルファス構造(非晶質)であることから、培養により得られた酸化鉄は結晶構造も異なることが明らかとなった。また、SEM-EDX の結果は、Fe:Si:P = 97:1:2 となり、Si と P の割合が顕著に減少することが明らかとなった。これは、培地組成にケイ素が含まれない事が要因であると考え、MWMM に Si 濃度が 0、15、150、300ppm となるようケイ酸ナトリウムを添加した MWMM で再度培養を試みた。その結果、0、15、150ppm では

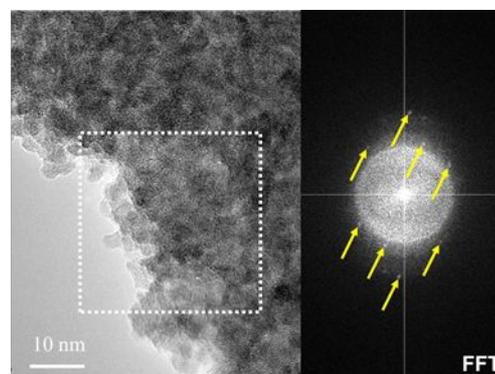


図3. 集積培養した *G. ferruginea* のHRTEM 像とそれに相当するFFTパターン

らせん状酸化鉄が生成されていたが 300ppm では生成されなかった。Si 濃度 0、15、150ppm を添加した MWM に生成されたらせん状酸化鉄の Fe:Si:P の元素数% (at%) は、それぞれ 97:1:2、82:9:9、70:24:6 となった。さらに、HRTEM 解析では Si の含有割合が増加すると微結晶から非晶質に変化した。すなわち、この結果は、培地組成を改変することにより、元素組成や結晶構造を改変することが可能であることを示唆した。

<引用文献>

- Emerson. 2010. Annu. Rev. Microbiol. 64:561-583.
Emerson and Moyer. 1997. Appl. Environ. Microbiol. 63:4784-4792.
Chan et al. 2009. Geochim. Cosmochim. Acta 73:3807-3818.
Sakai et al. 2010. Org. Biomol. Chem. 8:336-338.
Hashimoto et al. 2014. ACS Appl. Mater. Interfaces 6: 5374-5378.
Hashimoto et al. 2007. Dyes and Pigments 95 :639-643.
Sawayama et al. 2011. Curr. Microbiol. 63:173-180.
Suzuki et al. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77:2877-2881.
Suzuki et al. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77:7873-7875.
Suzuki et al. 2012. Appl. Environ. Microbiol. 78:236-241.
Hashimoto et al. 2007. J. Magn. Magn. Mater. 310:2405-2407.
Furutani et al. 2011 Minerals 1:157-166.

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)

[雑誌論文](計 4 件)

- Kunoh T, Hashimoto H, I. R. McFarlane, Hayashi N, Suzuki T, Taketa E, Tamura K, Takano M, El-Naggar M Y, Kunoh H, Takada J. Abiotic deposition of Fe complexes onto *Leptothrix* sheaths. Biology, 査読有、vol.5, No. 2, 26, 2016 DOI:10.3390/biology5020026
Kunoh T, Hashimoto H, Suzuki T, Hayashi N, Tamura K, Takano M, Kunoh H, Takada J. Direct adherence of Fe(III) particles onto sheaths of *Leptothrix* sp. strain OUMS1 in culture. Minerals, 査読有、vol. 6, No. 1, 4, 2016, DOI:10.3390/min6010004.
Takada J, Hashimoto H, Suzuki T, Kunoh H. Biological and

physicochemical characters and functions of amorphous iron oxides produced by iron-oxidizing bacteria at ambient temperature in hydrosphere. Journal of the Japan Society of Powder Metallurgy, 査読有、vol. 63, No. 10, 2016, pp. 869-875.

<http://doi.org/10.2497/jjspm.63.869>

Suzuki T, Kunoh T, Nakatsuka D, Hashimoto H, Tamura K, Kunoh H, Takada J. Use of iron powder to obtain high yields of *Leptothrix* Sheaths in culture. Minerals, 査読有、vol. 5, No. 2, 2015, pp. 335-345, DOI:10.3390/min5020335

[学会発表](計 3 件)

鈴木智子: 鉄酸化細菌 *Gallionella ferruginea* がつくる酸化鉄の材料特性と培養による酸化鉄材料生成. 日本女子大学バイオイメージングセンター公開シンポジウム 2016. バイオ周辺領域とイメージングとの関わり, 東京都, 2016年10月22日(招待講演)

鈴木智子, 橋本英樹, 久能均, 高田潤: 鉄酸化細菌がつくる酸化鉄の構造と物理化学的解析. 2015年度日本地球化学会年会, 特別セッション「S02 鉄の地球微生物学と地球化学」, 横浜市, 2015年9月17日(招待講演)

Tomoko Suzuki: Structural and physicochemical analyses of iron oxides produced by iron oxidizing bacteria *Gallionella ferruginea* and *Leptothrix ochracea*, Interuniversity Workshop on Biological Responses to External Stimuli, 東大阪市, 2015年12月15日(招待講演)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木智子 (SUZUKI, Tomoko)

日本女子大学・理学部物質生物科学科・助教

研究者番号: 30623772