

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：26402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12422

研究課題名(和文) 難分解性nanoプラスチック粒子が引き起こす微細藻の生理異常と種スペクトラム解析

研究課題名(英文) Analyses of abnormal physiological responses induced by stable resin nanoparticles and its species spectrum

研究代表者

大濱 武 (Ohama, Takeshi)

高知工科大学・環境理工学群・教授

研究者番号：00194267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イソブチルシアノアクリレートモノマーとするナノ粒子(iBCA-NP)、エチル粒子(ECA-NP)、メチル粒子(MCA-NP)、イソプロピル粒子(iPCA-NP)を、Tween 80を用いて作成した。これらの粒子が持つ増殖阻害能を細菌、酵母、緑藻を用いて検証した。iBCA-NPがもっとも弱い細胞増殖阻害能を示すことが多く、ECA-NPが最も多くの生物種に対して、細胞死誘導能を示した。iPCA-NPは、iBCA-NPやECA-NP曝露が全く生育に影響を及ぼさないような緑藻に対しても、強い細胞増殖阻害を示す場合もあった。ナノ粒子曝露の効果は、近縁種の間でも全く異なるという例があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シアノアクリレート系ポリマーから構成されたナノ粒子は、野外環境において迅速に分解される。しかも藻類、細菌、酵母などの幅広い種について活性酸素種(ROS)の発生を促すことで、細胞増殖阻害を引き起こす。また、その強さは原材料であるシアノアクリレート・モノマーによって異なる。しかも、動物等には毒性がない事が報告されている。そのため、適当なモノマーを選択することにより、意図する微細生物種の繁殖を一定期間抑制する事が可能である。その作用機構は、従来の抗生剤とは全く異なるため、薬剤耐性を示すような微細生物種にも有効である。このように新規な増殖阻害剤としての利用が見込める。

研究成果の概要(英文)：Isobutylcyanoacrylate nano particle (iBCA-NP), ethyl particles (ECA-NP), methyl particles (MCA-NP), and isopropyl particles (iPCA-NP) were prepared using Tween 80. The growth inhibitory potential of these particles was tested using bacteria, yeasts, and green algae. iBCA-NPs often showed the weakest cell growth inhibitory potential, and ECA-NPs showed the greatest cell death inducing potential against the greatest tested species. iPCA-NPs were effective in several green algae, where iBCA-NPs and ECA-NPs' exposure had no effect on growth at all.

In some cases, the effects of nanoparticle exposure were quite different even among closely related species.

研究分野：環境微生物学

キーワード：シアノアクリレート ナノ粒子 微細プラスチック 増殖阻害 生分解性 活性酸素種 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

工業的に製造されマイクロプラスチック、あるいは大きなプラスチック片から2次的に生じたマイクロプラスチックが、海洋中に低濃度で溶け込んでいる環境ホルモンやPCBなどの化学物質を表面で吸着濃縮する。これが生物に取り込まれる事で、有害な化学物質の生物濃縮が始まるという懸念が示されている。これは日本だけの問題ではなく、全世界的な問題である。個体は、微細化されると質量あたりの表面積が増える。そのため、大きな塊の場合には顕著ではなかった、表面での反応が顕在化する。マイクロプラスチックではほとんど起こらないが、nanoサイズのプラスチック粒子を含む培養液中では、微細藻の細胞死が顕著に起こる事である。ナノ粒子は、工業的に盛んに利用されている。例えば、顔料インクは、nanoサイズのマイクロプラスチックナノ粒子に色素を含ませた物である。難分解性のnano粒子が、海洋中に投棄され続けられれば、微細藻の細胞死により、大きな環境負荷の原因となる。プラスチック粒子が微細藻に対して、生理的な異常をもたらすという報告はない。TiO₂などの金属酸化物のナノ粒子については、藻と凝集体形成する事により光合成や細胞分裂に悪影響を及ぼす事が報告されている。しかし、そのような影響はdayやweekというような長い時間を通して現れる反応である。それに対して申請者は、iso-ButylCyanoAcrylate polymer NanoParticle (iBCA-NP)を、100 ppm (100 mg/L)程度の濃度で単細胞緑藻のクラミドモナスの培養液に投入すれば、3時間以内にほぼ100%の細胞を殺してしまう現象を昨年度に発見し、報告した。nanoサイズのプラスチック粒子による微細藻の細胞死誘導機構を明らかにしたい。それを基に、nanoサイズのプラスチック粒子の利用・廃棄について必要な規制を考える上での基礎データを提供したい。

2. 研究の目的

どのような特性のナノ粒子が、どれくらい広範囲の微細藻にどのようなメカニズムで細胞死を誘導するのかを解析する。細胞のどのような性質の違いにより、感受性の藻と耐性の藻が生じるのかは、細胞死誘導のメカニズムを知る上で重要な手掛かりとなる。国立環境研究所が配布している緑藻に関しては、18SrRNA 遺伝子による分子系統樹が作成されている。多くの株を購入して、ナノ粒子暴露を実施する。評価した藻の耐性・感受性を、分子系統樹上に投影することで、耐性種に共通な特性を分子系統樹から割り出す。また、ゲノム配列が高度に整理されている単細胞緑藻を用いて、ナノ粒子暴露による遺伝子発現の変化を網羅的に解析することにより、どのような代謝経路に変化が生じるのかを明らかにする。これまでの研究から活性酸素種(ROS)の発生が、ナノ粒子暴露では誘導されることが分かっているので、ROS発生に至る機構の解明に注力する。

3. 研究の方法

(1) iBCA-NP 暴露により活性化される代謝系を明らかにする：クラミドモナスでは、高温などの典型的なストレスにより、どのような遺伝子群の発現が協調的に変化するのかが解析されている。iBCA-NP を短時間暴露した細胞と、無処理の細胞における遺伝子発現の違いを、次世代シーケンサーを利用して抽出する。これにより、iBCA-NP がどのような代謝経路を活性化させるのか、これまで知られているどのようなストレスに似ているのかを明らかにする。

(2) iBCA-NP の暴露は細胞の微細構造にどのような変化をもたらすのか：iBCA-NP でクラミドモナスを1時間暴露した細胞では、細胞壁が層状に剥がれており、多くの粒子が細胞壁と細胞質膜の間の空間に、起源が不明な膜様の構造体に包まれて存在していることが、電顕観察の解析から分かっている。ナノ粒子暴露による微細構造(液胞、ER膜、ゴルジ体、葉緑体)の変化を経時的に追う。その変化から、どのような代謝異常がどのような細胞内小器官で生じているかを解析する。

(3) iBCA-NP 以外のナノ粒子による細胞死誘導を解析する

イソブチルシアノアクリレート他に側鎖基が異なるシアノアクリレートのモノマーを原材料として合成したシアノアクリレート系ナノ粒子について、細胞死誘導能の種特異性や細胞増殖阻害能の違いを検証して、化学構造との関連性からナノ粒子が誘導する細胞死等に関するメカニズムを解析する。

4. 研究成果

(1) iBCA-NP 暴露により活性化される代謝系：イソブチルシアノアクリレートナノ粒子(iBCA-NP)をクラミドモナスに100 ppmで暴露させ、細胞死誘導率が凡そ2%、15%、30%に達した細胞からmRNAを抽出して、RNA-seq解析を実施した。その結果、細胞死誘導率が凡そ2%の段階から30%に至るまでの間、一貫してHSP遺伝子やredoxに関与する酵素をコードする遺伝子がコントロール(ナノ粒子液に含まれる界面活性剤のみによる暴露)に比べて、50倍から1000倍程度

の発現上昇が観察された。これは、ナノ粒子暴露による活性酸素種 (ROS) の発生による生理的環境の異常に対応した遺伝子発現の変化であると考えられる。

また iBCA-NP 暴露により、栄養増殖をしている細胞の細胞壁の消化が起こり、細胞がプロトプラスト化することが観察されているので、細胞壁溶解酵素をコードする遺伝子に関しても、その発現変化に注目した。その結果、通常の Life cycle で顕著な発現が見られない細胞壁溶解酵素の一つ、Cre13.g605200 遺伝子の発現が 100 倍程度、上昇していることが明らかになった。また、この遺伝子の tag 挿入突然変異体入手して、ナノ粒子暴露に対する感受性を検証した結果、野生型の細胞よりも顕著に遅い細胞死誘導が観察された。これらの事から、ナノ粒子暴露におけるプロトプラスト出現に関与している細胞壁溶解酵素は、Cre13.g605200 遺伝子であることが明らかになった。また、この遺伝子の破壊株 (ClIP mutant) について、ナノ粒子感受性を検証したところ、野生型よりも優位に強い耐性を示し、細胞壁の溶解率も低いことが分かった。

細胞死誘導が起こった細胞からゲノム DNA を調整し、電気泳動によりその状態を調べた。その結果、スメア状に分解された DNA の中にクロモソーム単位で分解された DNA 断片が観察された。これはナノ粒子暴露による細胞死は、爆発的に生じた ROS によるネクローシスを主として細胞死であるが、ROS の発生が限定的である暴露初期には PCD が誘導された事を示唆している。

(2) iBCA-NP の暴露は細胞の微細構造にどのような変化

緑藻綱に属するクラミドモナスを iBCA-NP で暴露すると、液胞の肥大化が最も顕著な微細構造の変化であった。短時間のナノ粒子暴露において、ミトコンドリアや葉緑体には著しい構造の変化は観察されなかった。一方、クリプト藻綱に属する *Rhodomonas atrosea* では、液胞の肥大化の他に、ミトコンドリアの肥大化と内膜の損傷が顕著に観察された。

(3) iBCA-NP 以外のナノ粒子による細胞死誘導

iBCA-NP 暴露により、*Chlamydomonas reinhardtii* は短時間で細胞死が起こるが、分子系統解析において近縁種であること示されている *Chlamydomonas asymmetrica* では、遊泳パターンや細胞外型を含め、顕著な異常は誘導されなかった。また、*Chlorella vulgaris* についても ROS の発生を含めて顕著な異常は誘導されなかった。それに対して、エチルシアノアクリレート製のナノ粒子 (ECA-NP) を *Chlorella vulgaris* に暴露すると、明瞭な ROS の発生を伴う明瞭な細胞増殖阻害が観察された。しかし、その細胞壁の損傷は軽微であり、最外層の一層が捲れ上がる程度の損傷であり、ナノ粒子が貫通できるような損傷は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Al-Azab Ayat J.S., Widyaningrum Dwiyantari, Hirakawa Haruna, Hayashi Yashuko, Tanaka Satoshi, Ohama Takeshi	4. 巻 54
2. 論文標題 A resin cyanoacrylate nanoparticle as an acute cell death inducer to broad spectrum of microalgae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102191 ~ 102191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2021.102191	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 -

1. 著者名 Kong Fantao, Yamaoka Yasuyo, Ohama Takeshi, Lee Youngsook, Li-Beisson Yonghua	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular Genetic Tools and Emerging Synthetic Biology Strategies to Increase Cellular Oil Content in Chlamydomonas reinhardtii	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1184 ~ 1196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz022	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 該当する

1. 著者名 大濱 武, Dwiyantari Widyaningrum, 林 八寿子, 小松 千景, 飯田 大介, 近森 洋二,	4. 巻 29
2. 論文標題 アクリルナノ粒子が示す広範囲な殺藻	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 クリーンテクノロジー	6. 最初と最後の頁 1184-1196
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 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 A.Alazab, D. Wiewyaningrum, Y. Hayashi, T. Ohama
2. 発表標題 Acutely induced burst ROS generation and cell death on broad algal species by resin nanoparticle exposure
3. 学会等名 5th Int. National Volvox conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分担者	林 八寿子 (Hayashi Yasuko) (20228597)	新潟大学・自然科学系・准教授 (13101)	
研究 分担者	右手 浩一 (Ute Koichi) (30176713)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・教授 (16101)	
研究 分担者	青木 裕一 (Aoki Yuichi) (40747599)	東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教 (11301)	

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
---------	---------