

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658078

研究課題名(和文) 微生物金属代謝能を利用した機能性金属ナノ粒子合成系の開発

研究課題名(英文) Synthesis of functional metal nano particles based on bacterial metal metabolism

研究代表者

川本 純 (Kawamoto, Jun)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：90511238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細菌による機能性金属ナノ粒子合成系の開発を目指し、基盤技術となる金属ナノ粒子合成性細菌の獲得を試みた。その結果、中国内モンゴル自治区より採取された *Pseudomonas* 属細菌が、粒径約 20 nm の銀ナノ粒子を形成することを見いだした。また、南極海水由来の好冷性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の多様な異化的金属還元能を有することから、本菌株は微生物による金属ナノ粒子合成の宿主となりえると期待された。本研究では、本菌が三価鉄存在下でリン酸選択的チャンネルタンパク質を誘導生産し、可溶性三価鉄の輸送に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Metallic nanoparticles have huge potentials in nanotechnology. In this study, we attempted to develop the novel methods for metallic nanoparticles by using microorganisms. We have isolated a novel strain of *Pseudomonas* species, which produces nano-sized silver particles in the presence of silver nitrate at moderate temperatures, suggesting that this strain has a unique mechanism for metallic nanoparticle synthesis. In order to develop the efficient nano particle synthesis, we also analyzed the iron-respiratory mechanism of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, which has flexible metal respiratory system at anaerobic conditions. Only when grown with divalent iron (ferric citrate), this strain produces a homolog of a phosphate selective porin, PhoE. In the presence of ferric citrate, a gene-disrupted mutant of *phoE* showed growth retardation, indicating that PhoE has an important role in iron-respiration mechanism of this strain.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：応用微生物学 微生物機能 環境農学 金属ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

ナノサイズの金属、あるいはその酸化物は金属ナノ粒子と呼ばれ、大きな表面積を持つことによる原子の移動・拡散・溶解性の増大、量子サイズ効果の影響から、自然界に存在しない新奇な性質や触媒機能を有する材料として、燃料電池用材料、化粧品材料といったナノテクノロジー、さらにドラッグデリバリー、新規造影剤、蛍光標識などの生物学といった様々な科学技術への応用が期待されている。例えば、バルク状態では化学的に非常に安定な金は、直径 10 nm 以下のナノ粒子として鉄やアルミなど卑金属酸化物上に分散・固定化することで、高い触媒活性を発現する。さらに、金ナノ粒子と光との相互作用(表面プラズモン共鳴)で生じる光吸収は、ナノ粒子のサイズや形態、重合度に応じて異なる。この性質を利用した超高解像度の光ナノイメージングや表面増強ラマン散乱顕微鏡などの開発が進められている。同時に、金属ナノ粒子のサイズや形態などが制御可能な合成系が求められている。近年、カゴ状タンパク質や多孔性結晶を形成するタンパク質内に金属ナノ粒子を構築し、金属ナノ粒子-タンパク質複合体を化学反応場とした材料合成法が注目されている (S. Abe *et al.*, *Inorg Chem* **46**, 5137 (Jun 25, 2007).)。これらには主に、金属イオンを補因子とする金属酵素(リゾチーム、キナーゼ)の多孔性結晶や金属イオンを輸送・貯蔵する金属タンパク質(ミオグロビン、フェリチン)が用いられる。フェリチンは、細菌から哺乳類にわたるほとんどの生物種において保存されており、タンパク質内に鉄を貯蔵することで細胞内の鉄濃度を制御する生理的に重要なタンパク質である。

従来の化学合成法に比べて、金属ナノ粒子含有タンパク質を用いたナノ粒子合成は、常温・常圧の穏和な条件で粒子形成が進行することから、環境負荷の小さい合成法として注目されている。一方で、近年多様な金属イオンを嫌気呼吸の最終電子受容体として利用できる特殊環境微生物が多く報告されており、*Shewanella* 属細菌や、*Geobacter* 属細菌は一般的な大腸菌に比べて多数の *cytochrome* 遺伝子を有しており、セレンやテルル、クロムや銀などを還元することが知られている。近年、これら金属還元能を有する細菌群の中で、金属呼吸に伴って金属ナノ粒子を形成するものが存在することが明らかとなり、新たな金属ナノ粒子合成の基盤技術として注目を集めている。

## 2. 研究の目的

本研究では、微生物機能を活用した新規金属ナノ粒子合成系の確立を目指し、新たな金属ナノ粒子合成微生物の獲得、および効率的な金属ナノ粒子合成の宿主細胞となる金属還元能を有する特殊環境微生物の金属呼吸機構の解析に取り組んだ。様々な科学技術分野で材料の高機能化、軽量化、高精度化が求め

られる現在、金属ナノ粒子の持つ触媒活性や機能を利用した無機精密反応の需要は増す一方である。金属ナノ粒子の触媒活性に影響するその粒径や形態を制御しつつ合成する手法が求められている。

本研究で着目した微生物による金属ナノ粒子合成には、粒子合成能に秀でた微生物の獲得が必須となる。特に、環境負荷の小さい粒子合成には、低温での効率的に粒子を合成する低温適応細菌の獲得が求められた。本研究では、低温環境に由来する土壌試料から低温適応性の金属ナノ粒子合成微生物の獲得を目指した。同時に、効率的な粒子合成の宿主として多様な金属イオン存在下でも良好に生育する宿主細胞が必要である。本研究では、約 20 種以上の *cytochrome* 遺伝子を有する低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を宿主とした粒子合成系を構築することとした。異種タンパク質生産系や部位特異的変異導入が可能な本菌の金属呼吸機構の解明することで、粒子合成に関与する外来遺伝子群の導入、及び機能発現に適した宿主細胞の作製が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 低温適応性金属ナノ粒子合成微生物の獲得

中国内モンゴル自治区の草原保護地域より採取した土壌を、希釈度の異なる LB 寒天培地に播種し、4 °C で静置することで、低温で良好に生育する菌株を単離した。寒天培地上に形成されたコロニーを 2.5 % のトリフルオロ酢酸に懸濁し、得られた上清画分を MALDI-TOF MS 解析に供することで、リボゾームタンパク質群の質量分析を行った。得られた 130 株の低温菌群について、リボゾームタンパク質群の系統解析を行った。同時に、16S rDNA 配列解析を行うことで、系統分類した。

4 °C で培養した単離株を集菌し、得られた菌体に硝酸銀水溶液(終濃度 1 mM)を添加し、静置した。静置後の反応液について、吸光スペクトルを解析することで、銀ナノ粒子に由来する 400 nm の吸収を有する菌株を選抜した。銀ナノ粒子形成能を有した菌株について、培養後の菌体を破砕し、可溶性画分と膜画分を調製し、それぞれの画分における銀ナノ粒子形成能を解析した。単離株によって得られた銀ナノ粒子について、透過型電子顕微鏡解析に供し、粒径分布、および粒径について解析した。同様に、塩化金酸を添加することで、金ナノ粒子形成能を解析した。

### (2) 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸機構の解明

フマル酸、もしくはクエン酸鉄(三価鉄)を最終電子受容体とし、嫌気条件下で *S. livingstonensis* Ac10 を培養した。三価鉄存在下で誘導生産される膜タンパク質を解析するために、培養後の菌体から調製した膜画分

を2次元電気泳動に供した。三価鉄依存的に生産量が増加する膜タンパク質をMALDI-TOF MSを用いたペプチドマスフィンガープリンティング法で同定した。三価鉄誘導性タンパク質群のうち、リン酸選択的チャンネル PhoE の生理機能を明らかにするために、*phoE* 遺伝子破壊株 ( $\Delta phoE$ ) を作製した。 $\Delta phoE$  をクエン酸鉄や不溶性の酸化鉄、コバルトアセチルアセトネート存在下で培養した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 低温適応性金属ナノ粒子合成微生物の獲得

中国内モンゴル自治区の草原保護地域より採取した土壌から、4°C で良好に生育する低温菌群を130株単離した。単離株について、MALDI-TOF MSによるリボゾームタンパク質群の解析による系統解析を行った結果、*Pseudomonas* 属細菌に分類される低温菌であることがわかった。これらの単離株を4°C で培養し、得られた培養液に終濃度1mMとなるように硝酸銀を添加した。静置した培養液が銀ナノ粒子に由来する黄色から褐色に変化する株を選抜することで、銀ナノ粒子合成能を有する低温菌群を2株選抜した。菌体によって合成された銀ナノ粒子について吸光スペクトル解析を行った。銀ナノ粒子は400nm付近に特徴的な吸収スペクトルを有しており、粒径が大きくなると吸収スペクトルが長波長側にシフトすることが知られている。吸収スペクトル解析の結果、400nmにピークを有するシャープなスペクトルを示す粒子を形成する株を一株獲得した。本株に由来する粒子は、比較的粒径の小さい均一な粒子を形成している可能性が示された。また、同様に調製した銀ナノ粒子について、透過型電子顕微鏡で観察した結果、15 ± 5 nm (n=80) の銀ナノ粒子が合成されていることがわかった。4°C で培養した菌株を超音波破碎することで、無細胞抽出液を調製し、遠心により可溶性画分と不溶性の膜画分を獲得した。両画分にそれぞれ硝酸銀水溶液を添加し、静置した結果、不溶性画分の懸濁液で銀ナノ粒子合成が示されたことから、本菌において銀ナノ粒子合成は細胞膜画分で進行することが予想された。また、塩化金酸を同様に添加した結果、本菌は金ナノ粒子も合成可能であることが示された。本菌の細胞膜における金属ナノ粒子合成機構の詳細は未だ明らかでないが、本菌は環境負荷の小さい穏和な条件下で金属ナノ粒子合成に応用できることが示された。

##### (2) 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸機構の解明

*Shewanella* 属細菌は、近年汚染土壌の浄化への応用が期待される細菌種であり、多様な環境から単離された *Shewanella* 属細菌についてゲノム解析が進められている。その結果、

*Shewanella* 属細菌のゲノムには、一般的な大腸菌に比べて多数の *cytochrome* 遺伝子が存在することが明らかとなった。これら多様な *cytochrome* 遺伝子が機能することで、多様な金属イオンを最終電子受容体と金属呼吸系が存在すると予想されている。本研究では、南極海水より採取された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸能に着目した。本菌のゲノム解析はすでに終了しており、ゲノム情報に基づいたタンパク質の網羅的な発現解析が可能である。また、本菌は4°C で良好に生育し、大腸菌と同様の菌体収量が得られることから、低温でのタンパク質生産系の宿主細胞に適していると考えられ、本菌の宿主ベクターシステムがすでに構築されている。さらに、部位特異的変異導入法も確立していることから、実験1で見いだされた細菌による金属ナノ粒子合成機構を活用する上で、効率的な粒子合成系を構築するための宿主細胞として有望である。本研究では、嫌気環境下での *S. livingstonensis* Ac10 の金属呼吸に関与するタンパク質を明らかにすることで、金属還元機構の分子基盤を解明し、金属ナノ粒子生産系への応用を目指した。本菌の鉄呼吸に関連するタンパク質、特に金属イオンの認識、輸送、結合に関与する膜タンパク質に着目し、三価鉄存在下で生産量が増加するタンパク質についてプロテオーム解析を行うことで、金属呼吸関連タンパク質群を網羅的に解析した。その結果、三価鉄依存的に生産量が増加するタンパク質を8種同定することに成功し、グラム陰性細菌の外膜に存在するチャンネルタンパク質である PhoE の生産量が三価鉄存在下で増加していることがわかった。また、これら鉄誘導的に生産される膜タンパク質群について、リアルタイム RT-PCR 解析を行った結果、PhoE の誘導生産は転写レベルで制御されていることがわかった。

PhoE は、大腸菌や *Pseudomonas* 属細菌においてリン酸欠乏時に発現が誘導される膜タンパク質として知られている。PhoE は正電荷を有するアミノ酸が局在する親水的な筒型構造を生体膜上で形成することで、リン酸イオン ( $H_2PO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ) を特異的に取り込む輸送体と考えられているが、嫌気環境下での金属代謝との関連は現在報告されていない。この結果は、ウランやプルトニウム、セレンやクロムといった多様な金属化合物の還元能を有する *Shewanella* 属細菌が、従来報告されている微生物の金属呼吸とは異なるメカニズムを有していることを示唆している。

本菌の金属呼吸における PhoE の生理的役割を明らかにするために、*phoE* 遺伝子破壊株 ( $\Delta phoE$ ) を作製した。 $\Delta phoE$  はフマル酸を最終電子受容体とした嫌気培養では、野生株と同様に生育したが、クエン酸鉄(水溶性三価鉄)を最終電子受容体とした場合に、顕著に生育速度が低下することがわかった。

*phoE* 遺伝子上流に存在する予想プロモーター領域と *phoE* 遺伝子を含む相補用プラスミドを  $\Delta phoE$  に導入した結果、クエン酸鉄含有培地で野生株と同様に生育したことから、本菌の鉄呼吸において PhoE を介した物質輸送が重要な機能を担うことが示された。一方で、難溶性の三価鉄（酸化鉄(III)）を最終電子受容体とした培地では、 $\Delta phoE$  は野生株と同様に酸化鉄(III) を還元することがわかった。この結果は、PhoE は水溶性の鉄の還元系に寄与しており、本菌は呼吸基質の溶存状態に依存した呼吸系を有していることを示唆している。また、 $\Delta phoE$  はコバルトアセチルアセトネート（三価コバルト）を含む培地においても、野生株に比べて生育速度が低下したことから、PhoE を含む金属呼吸系は可溶性の呼吸基質、特に三価の水溶性金属の還元に関与していることが明らかとなった。

#### 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 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

##### ① 日本農芸化学学会 2014 年度大会

「*Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸における外膜タンパク質 PhoE の機能」

○丸山 沙織、川本 純、樽井 淳、王 玉、江崎 信芳、栗原 達夫、2014 年 3 月 29 日、東京

##### ② 第 14 回 極限環境生物学会

「低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 による金属還元機構の解析」

○丸山 沙織、川本 純、樽井 淳、王 玉、江崎 信芳、栗原 達夫、2013 年 10 月 26 日、東京

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本 純 (Kawamoto, Jun)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：90511238

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：