

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24405030

研究課題名(和文)特殊環境由来の機能性金属ナノ粒子生産微生物の探索

研究課題名(英文) Exploration of functional-metal nano particle-producing bacteria from extremophile environments

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナノサイズ加工された金属粒子は、バルクの金属材料とは顕著に異なる物理化学特性を有している。金属ナノ粒子の触媒特性は様々な分野での応用される一方で、金属ナノ粒子のサイズや形状を精密に制御した合成法の確立が求められている。本研究では、生理的条件下での金属ナノ粒子合成に資する微生物の探索、および微生物による金属ナノ粒子合成メカニズムの解明に取り組んだ。中国内モンゴル自治区より採取された *Pseudomonas* 属細菌、南極海水より採取された *Shewanella* 属細菌によって菌体外に生産される金属ナノ粒子は、菌体より分泌生産される膜小胞が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Metal nanoparticles have significantly different physicochemical characteristics from bulk metal materials, and their catalytic activities have great interests in various fields. In this study, to develop a synthesis method for metal nanoparticles at moderate environments, we attempted to explore metal nanoparticle-producing bacteria and their synthesis mechanism. *Pseudomonas* sp. H206 isolated from inner Mongolia and *Shewanella livingstonensis* Ac10 isolated from Antarctic seawater, which produce silver nanoparticles at the extracellular region, secret vesicles surrounded by lipid bilayer, and the size of membrane vesicles are about 100 nm. To elucidate the vesiculation mechanism of *S. livingstonensis* Ac10, we performed molecular characterization of the membrane vesicles of this strain. Moreover, the production of uniformly sized spherical vesicles might be involved in the synthesis of nano sized metal particle by these microorganisms.

研究分野：応用生物化学

キーワード：金属ナノ粒子 極限環境微生物 低温菌 菌体外膜小胞

1. 研究開始当初の背景

100 nm 以下にナノサイズ加工された金属ナノ粒子は、大きな表面積を持つことによる表面電子の移動、拡散、溶解性の増大、量子サイズ効果の影響から、バルクの金属材料とは顕著に異なる新奇の性質や触媒特性を有する有用機能性材料である。無機金属触媒として多様な合成反応に使用される他、造影剤や化粧品への添加など、金属ナノ粒子は多様な分野での応用が期待される機能性材料である。金属ナノ粒子の化学特性は、粒子のサイズや形状に依存することから、これらを精密に制御した合成法の確立が求められている。一方で、嫌気条件下で金属呼吸能を有する微生物を、硝酸銀存在下で培養したとき、約 20 nm 程度の均一なサイズの銀ナノ粒子を菌体外に合成する特殊環境微生物が存在した。本研究では、このような微生物による生理的条件下での金属ナノ粒子生産能は、微生物機能に基づく新たな機能性材料の創製法の確立につながると考えられた。

2. 研究の目的

微生物機能に基づいた穏和な生理的条件下における機能性金属ナノ粒子の合成法の確立を目指し、微生物による金属ナノ粒子合成の分子基盤の解明を目指し、中国内モンゴル自治区草原土壌から金属ナノ粒子を高生産する低温適応細菌の採取を試みた。また、菌体外で均一なサイズで合成される金属ナノ粒子は、微生物が生産する菌体外膜小胞による空間的制御が関与していることが予想された。本研究では、南極海水より採取された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 に着目し、本菌の金属呼吸能、および菌体外膜小胞生産能の分子基盤の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 中国内モンゴル自治区草原地区より採取された *Pseudomonas* sp. H206 による金属ナノ粒子の合成

中国内モンゴル自治区ハイラル市草原保護区より採取した土壌を懸濁し、LB 寒天培地に植菌し、4 °C にて形成されるコロニーを単離した。16S リボゾーム RNA の遺伝子領域を PCR にて増幅し、塩基配列を解析することで遺伝子系統解析を行った。獲得した菌株について、硝酸銀からの銀ナノ粒子生産能を解析するため、種々の温度で培養した培養液に硝酸銀を添加し、合成された銀ナノ粒子のサイズを UV-VIS 分光解析により解析した。培養条件が銀ナノ粒子合成能に及ぼす影響を解析するために、硝酸塩存在下で培養した菌体について、同様に銀ナノ粒子生産能を解析した。

(2) 南極海水由来の低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の鉄呼吸機構の解析：酸化鉄誘導的に生産される外膜タンパク質の生理機能解析

S. livingstonensis Ac10 の三価鉄誘導性タンパク質 PhoE をコードする遺伝子を相同組換えにより破壊した。得られた *phoE* 欠損株 ($\Delta phoE$) をフマル酸、もしくはクエン酸鉄 (三価鉄) を最終電子受容体とした培地で嫌気培養することで、鉄呼吸における PhoE の生理的役割を解析した。PhoE は大腸菌において、リン酸欠乏時に誘導生産されるチャンネルタンパク質として同定されていたことから、リン酸濃度が本菌、および $\Delta phoE$ の金属呼吸能におよぼす影響を解析した。本菌と近縁の *Shewanella oneidensis* MR-1 は、大腸菌に比べて多様な *cytchrom* 関連遺伝子を有しており、多様な金属を呼吸基質とする金属呼吸能に秀でた菌株である。MR-1 株の金属呼吸能における PhoE の生理機能を解析するために、MR-1 の *phoE* 遺伝子破壊株 ($\Delta mrPhoE$) を作製した。

(3) 南極海水由来の低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 による菌体外膜小胞の生産

4 °C で培養した *S. livingstonensis* Ac10 の培養液を遠心分離により菌体と上清画分を得た。上清画分を 0.22 μm のフィルターで濾過した後、超速遠心分離 (100,000 g) にて菌体外膜小胞を沈殿させた。菌体外膜小胞の形態、およびサイズ分布を透過型電子顕微鏡および動的光散乱法にて解析した。本菌由来の菌体外膜小胞の生化学的特性を解析するために、小胞関連タンパク質と小胞を形成するリン脂質組成を解析した。野生株由来の菌体外膜小胞を SDS-PAGE にて分離し、MALDI-TOF MS をもちいたペプチドマスフィンガープリンティング法により小胞関連タンパク質を同定した。小胞を構成するリン脂質は Bligh & Dyer 法により抽出した。リン脂質を構成するアシル鎖組成は、リン脂質抽出物をメチルエステル化処理し、GC-MS にて解析した。本菌の膜小胞分泌における、エイコサペンタエン酸 (EPA) の生理的役割を解析するために、EPA 生合成遺伝子を破壊した EPA 非生産株 (ΔEPA) の膜小胞生産能、および小胞関連タンパク質組成を解析した。 ΔEPA の小胞生産能は、脂溶性蛍光試薬 FM4-64 で定量した。

4. 研究成果

(1) 中国内モンゴル自治区草原地区より採取された *Pseudomonas* sp. H206 による金属ナノ粒子の合成

草原土壌由来の低温適応細菌 *Pseudomonas* sp. H206 (H206 株) は、低温で高い硝酸還元活性を有する低温菌として採取され、低温土壌環境下における窒素循環に関与することが予想される特殊環境微生物である。低温で培養した本菌の培養液に硝酸銀水溶液を添加すると、経時的に培養液の色調が変化することがわかった。硝酸銀添加後に吸収スペクトル解析を行った結果、400 nm

付近に銀ナノ粒子と予想される特徴的な吸収ピークが検出された。硝酸銀添加後の本菌を透過型電子顕微鏡解析に供した結果、H206株の表層に粒径が 14.8 ± 4.9 nm の粒子が形成されていることがわかった。以上の結果は、硝酸銀存在下において銀イオンが還元され元素状銀で構成されるナノ粒子が合成されている可能性を示唆していた。加えて、H206株によって合成される銀粒子は、ほぼ均一にサイズ制御されていたことから、本菌には銀ナノ粒子の粒子成長を制御する仕組みが存在することを示している。

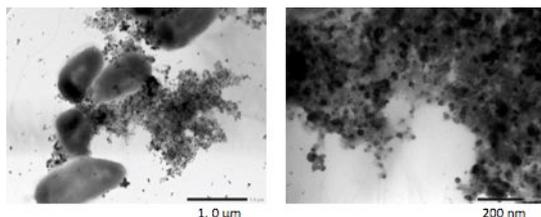


Fig. 1 *Pseudomonas* sp. H206 による銀ナノ粒子形成

(2) 南極海水由来の低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の鉄呼吸機構の解析：酸化鉄誘導的に生産される外膜タンパク質の生理機能解析

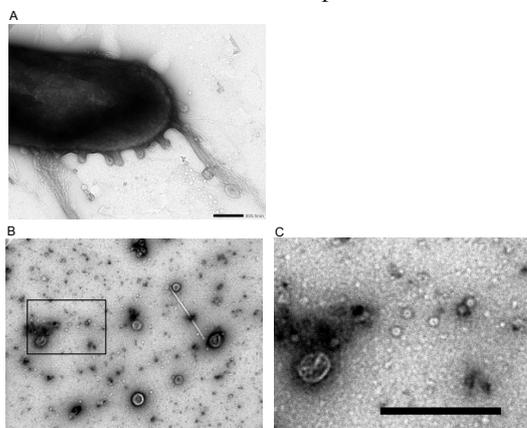
多様な環境から単離される *Shewanella* 属細菌は、40 種以上のチトクローム関連遺伝子を有することで、多様な金属を呼吸基質とすることで、広大な生育可能圏を獲得した微生物群と考えられている。本研究では、南極海水より採取された *S. livingstonensis* Ac10 の金属呼吸能に着目し、本菌の金属呼吸の分子基盤の解明を目指した。これまでに、本菌は三価鉄依存的にリン酸選択的チャンネル PhoE を誘導生産することを明らかにした。PhoE は大腸菌においてリン酸欠乏時に誘導生産される膜チャンネルタンパク質であり、正電荷を有するアミノ酸残基で構成される親水的な筒型構造を形成することで、リン酸イオンを積極的に細胞内に取り込むことが予想されている。一方で、細菌による嫌気環境下での異化的金属還元における PhoE の生理機能は明らかでない。*S. livingstonensis* Ac10 の *phoE* 遺伝子破壊株 ($\Delta phoE$) はフマル酸を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 (三価鉄) を電子受容体としたとき、 $\Delta phoE$ の生育は野生株に比べて顕著に低下した。以上の結果は、本菌の鉄呼吸において PhoE が関与する基質の膜輸送が重要であることが示された。一方で、微生物の金属呼吸のモデル微生物である *S. oneidensis* MR-1 について同様に *phoE* 遺伝子破壊株を作製し、金属呼吸能におよぼす影響を解析した結果、PhoE の欠損は MR-1 株の鉄呼吸に影響しないことが示された。MR-1 株の鉄呼吸では、外膜に局在するチトクローム関連タンパク質により細胞表層における電子の授受が重要であるこ

とが示されているのに対して、Ac10 では PhoE を介して三価鉄を取り込み、ペリプラズム空間における三価鉄の還元機構の存在が示唆された。一方で、培地中のリン酸濃度の変化が本菌、および $\Delta phoE$ の嫌気環境下での生育におよぼす影響を解析した結果、リン酸濃度の減少は、本菌の $\Delta phoE$ の生育には影響しなかったことから、本菌のリン酸の輸送に PhoE は関与していない可能性が示唆された。先述の通り、PhoE は正電荷アミノ酸残基で構成される親水性チャンネル構造を有する膜タンパク質であることから、本菌の鉄呼吸において基質となる金属イオンは負電荷を有する水溶性分子によってキレートされた状態で菌体内に取り込まれることが予想された。

(3) 南極海水由来の低温適応細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 による菌体外膜小胞の生産

近年、ほとんどのグラム陰性細菌が菌体外膜小胞 (MVs) を分泌生産することが報告されている。これらの MVs は細菌同士、もしくは細菌-宿主間のコミュニケーションツールとして機能し、病原性因子やバイオフィーム形成の制御因子など多様な生理活性物質を輸送していることが知られている。実験 1 でみいだした均一にサイズ加工された金属ナノ粒子の合成過程において、このような MVs によって空間的に制御されることで、粒子成長が制御されていると予想されている。本研究では、金属呼吸能に秀でた南極海水由来の低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 の MVs 生産能、および MVs 生産機構の解析を試みた。Ac10 を 4°C で培養し、培養上清を調製した。フィルター濾過後の培養上清を超速遠心により MVs 画分を回収し、電子顕微鏡解析に介した結果、膜に囲まれた小胞の存在を見いだした。極低温電子顕微鏡観察と動的散乱解析の結果、Ac10 の MV は約 100 nm の小胞が主に生産されており、一部は二重膜構造など多様な構造を有する MVs も生産されていた。MVs 由来の膜脂質を解析した結果、本菌の MV はホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルグリセロールで構成されていた。これらのリン脂質を構成するアシル鎖を解析した結果、Ac10 の MV は細胞に比べて相対的に多くのエイコサペンタエン酸 (EPA) を含有していることがわかった。本菌において、EPA は低温誘導的に生産され、生体膜を構成するリン脂質のアシル鎖として存在する。EPA 含有リン脂質は、本菌の細胞分裂部位に特異的に濃縮されることで、EPA 含有マイクロドメインを形成していることが示されている。EPA の欠損が MV の生産能や生化学的特性におよぼす影響を解析した結果、本菌の EPA 欠損株 (Δ EPA) は野生株に比べて顕著に MV 生産能が増加しており、その生産量は野生株の 5 倍であった。 Δ EPA の MV を動的散乱解

析に供した結果、MV のサイズ分布が大きくなることがわかった。加えて、MV 関連タンパク質を SDS-PAGE により解析した結果、MV に含まれる膜タンパク質 Omp176 の量が Δ EPA において、顕著に増加していた。Omp176 は、本菌の低温誘導性タンパク質として同定されている外膜ポーリンタンパク質であり、低温環境下での外膜を介した水溶性分子の取り込みを担うチャンネルタンパク質である。Omp176 は EPA の有無によって生産量が変化する膜タンパク質であり、 Δ EPA においては膜における安定性が低下することで、生産量が低下することが報告されていた。本研究において、Omp176 の MV への移行量を解析したとき、 Δ EPA 由来の MV では野生株の MV に比べて顕著に Omp176 量が増加していたことから、 Δ EPA においては、MV 輸送を介した Omp176 の菌体外へ



の輸送が促進されていることが示された。

Fig. 2 *S. livingstonensis* Ac10 による菌体外膜小胞の生産

(A) 菌体外膜小胞は Ac10 の外膜より分泌生産され、膜に囲まれた 20-100 nm の球状の形態を示す (B, C)。

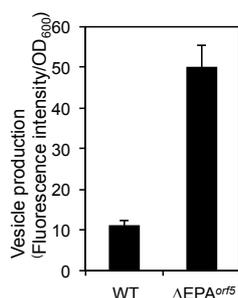


Fig. 3 EPA の欠損は菌体外膜小胞を生産を促進する。4 °C で培養した野生株 (WT) と EPA 欠損株 (Δ EPA^{orf5}) の小胞生産能を FM4-64 で定量解析した。

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 6 件)

(1) 川本 純、栗原達夫, 低温菌の低温環境への適応メカニズム, 生物工学会誌 93 (8) 477-80 2015, 査読なし

http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9308/9308_tokushu_6.pdf

(2) Goto S, Kawamoto J, Sato SB, Iki T, Watanabe I, Kudo K, Esaki N, Kurihara T., Alkyl hydroperoxide reductase enhances the growth of *Leuconostoc mesenteroides* lactic acid bacteria at low temperatures.

AMB Express. 2015 Feb 18;5:11. doi: 10.1186/s13568-015-0098-3. eCollection 2015. 査読あり

(3) 川本 純、栗原達夫, 低温菌のタンパク質と脂質, CSJ カレントレビュー 17 55-61 2014;134, 査読無し

(4) Kurihara T, Kawamoto J., Chemical approach to analyze the physiological function of phospholipids with polyunsaturated, Yakugaku Zasshi. 2014;134(4):507-13. 査読無し

(5) 栗原達夫、川本 純, 長鎖多価不飽和脂肪酸エイコサペンタエン酸の生理機能, 医学のあゆみ「生命を支える脂質」vol. 13 (248), 1221-1227, 2014 査読無し

(6) Yoshimune, K.; Kawamoto, J.; Kurihara, T. Proteins Involved in Cold Adaptation Cold-Adapted Microorganisms 97-110, 2013 査読無し

[学会発表] (計 3 件)

(1) 丸山沙織, 「*Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸における外膜タンパク質 PhoE の機能」, 2014/3/29, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 東京 第 1 5 回極限環境生物学会 2014/11/2

(2) KAWAMOTO Jun, “Eicosapentaenoic acid-containing membrane domain involved in cell division of a cold-adapted bacterium”, 2015/2/10, Biophysical Society 2015, Baltimore, USA

(3) 川本 純, 「細菌の生体膜に見いだされたエイコサペンタエン酸含有マイクロドメイン-南極に住む微生物の生存戦略」, 2015/5/28, 第 57 回脂質生化学会, 東京

[その他]

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~mmsicr/mmstojp/Top.html>

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

栗原 達夫 (KURIHARA, Tastuo)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号：70243087