

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05206

研究課題名(和文) 藻類細胞を利用した金属ナノ粒子の生成および放射光X線分析による粒子生成機構の解明

研究課題名(英文) Formation of metal nanoparticles using algal cells and investigation of the formation mechanism by synchrotron X-ray analysis

研究代表者

保倉 明子 (Hokura, Akiko)

東京電機大学・工学部・教授

研究者番号：20343569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞藻類を用いて、金、銀、ニッケル、パラジウム、セレン等の添加実験を行い、細胞内においていずれも高濃度に蓄積されることを実証した。これらの元素を蓄積した藻類細胞について、X線吸収分光分析を行った。得られたX線吸収スペクトルを解析し、その化学形態を明らかにした。また電子顕微鏡で観察し、藻類細胞内で生成されたナノ粒子の粒子サイズについて考察を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単細胞藻類に種々の金属・半金属元素のイオンを添加して、藻類においてナノ粒子が生成されるかどうかを調べた。放射光X線分析を用いて、藻類細胞内における化学形態を明らかにし、また電子顕微鏡により細胞内で生成されたナノ粒子の観察を行った。このように植物機能を利用した金属ナノ粒子の合成は、従来の化学的な合成法よりも、省エネルギーで環境にやさしい合成手法として期待される。

研究成果の概要(英文)：Some elements such as gold, silver, nickel, palladium, and selenium, etc. were added to unicellular algae for a certain time. It was found that they all were accumulated in the cells at high concentrations. X-ray absorption spectrometry was performed on the algal cells that had accumulated the element. The obtained X-ray absorption spectra were analyzed to clarify their chemical forms. In addition, the particle size of the nanoparticles produced in the algal cells was examined by using a scanning electron microscope.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノ粒子 植物細胞 先端計測 資源回収 ファイトマイニング

## 1. 研究開始当初の背景

鉄還元細菌が生成する白金、金、パラジウムの貴金属ナノ粒子[1]や酵母細菌の表面で生成される希土類リン酸塩鉱物モナザイト ( $\text{CePO}_4$ ) のナノ粒子[2]が報告されている。これらは細胞を用いるレアメタルの回収法および細胞がつくるナノ粒子生成現象として注目されている。これに対して、クロレラやアブラナなどの植物細胞では、細胞内において金ナノ粒子が生成されることが見出されている[3]。乳酸菌 *Lactobacillus casei* では、金(III)イオンが糖脂質により金(0)に還元されると報告されている[4]。しかしながら、多くの植物細胞における金ナノ粒子の生成メカニズムは十分には理解されていない。植物内の還元剤の候補としては、グルタチオンのようなシステインを含むポリペプチド、糖と脂質の複合体など、いくつか挙げられているものの、明確な解答は得られていないのが現状である。また多くの金属イオンに対して還元能を有するもの[1]もあれば、金しか還元できないものもある。このように、植物を用いて有用なメタルを回収する「ファイトマイニング」は環境にやさしいグリーンテクノロジーとして期待され、細胞によって生成されるナノ粒子を積極的に利用しようとする研究が盛んになってきている。一方で、有用メタルが植物内において、いかに高蓄積されるかが重要視され、蓄積される重金属の化学形態についての理解はあまり進んでいないという課題があった。

## 2. 研究の目的

本研究では、藻類細胞内で生成される金属ナノ粒子の生成に着目し、放射光 X 線分析を用いて、その生成機構の解明を目的とした。まずは、単細胞藻類を用いて、金、銀、ニッケル、パラジウム、セレン等の添加実験を行い、細胞内における蓄積濃度を明らかにする。その後、蓄積機構やナノ粒子の生成機構についての知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 単細胞藻類における金ナノ粒子の生成

単細胞藻類 *Pseudococcomyxa simplex* および *Chlamydomonas reinhardtii* (図 1) を国立環境研究所微生物系統保存施設から入手し、液体浮遊培養して 2 週間ごとに継代した。藻類を含む液体 30 mL をコニカルチューブに分取し、遠心分離後に上澄み(培養液)を除去した。そこへ金属イオンを含む水溶液 30 mL を添加し、インキュベータ内で一定時間振とうした。その後、遠心分離し、純水で数回洗浄した藻類細胞を取り出し凍結乾燥した。藻類に蓄積された金属濃度については蛍光 X 線分析で定量し、金属の化学形態については X 線吸収微細構造(XAFS)解析を行った。細胞の内部での様子を観察するため、試料調製方法について検討した。クライオミクロトームを用いて、急速凍結した細胞の切片(厚み 10  $\mu\text{m}$ )を作製し、走査電子顕微鏡(SEM)観察を実施した。

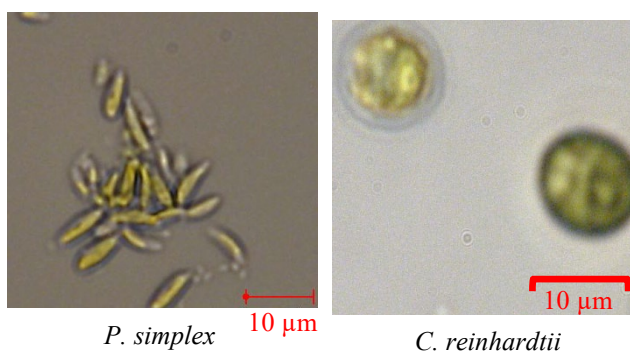


図 1 実験に用いた単細胞藻類 (NIES Collection)

### (2) 単細胞藻類におけるセレンナノ粒子の生成

藻類やバクテリアなど生物積能を利用して排水の浄化を行う手法は、環境にやさしい技術として注目を集めている。規制項目に定められているセレンについても、高蓄積能を有するバクテリア等が報告されており、排水処理技術への展開が期待されている。

本研究では、藻類細胞 *P. simplex* (藻類細胞質量 = 40~90 mg DW) に、調製したセレン酸水溶液あるいは亜セレン酸水溶液水溶液 (pH 5.80, [Se]=100 ppm, 6 ppm) を 30 mL 添加し、インキュベータ内で振とう培養した。一定時間経過後の藻類細胞試料を凍結乾燥し、メノウ乳鉢で粉碎・均質化し、蛍光 X 線分析法により藻類中 Se の定量を行った。Photon Factory BL-12Cにおいて、Se K 吸収端 (12.6546 keV) の XAFS 解析を行い、藻類に蓄積された Se の化学形態について検討した。測定は蛍光法で行った。化学形態が既知の Se 化合物を参照物質として用いた。また Se を蓄積した細胞の SEM 観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 単細胞藻類における金ナノ粒子の生成

*P. simplex* に塩化金(III)水溶液 ([Au]=100 ppm) を添加したところ、緑色の細胞が赤く呈色し、添加 3 時間後には、乾燥質量で 3.5% 程度の金が蓄積された。藻類の Au L3 吸収端 (11.9197 keV) の X 線吸収端近傍構造(XANES)スペクトルからは、添加 1 分後にはテトラクロリド金(III)酸イオン

ンの金は還元されて藻類内に取り込まれていることが示された。SEM で観察したところ、金ナノ粒子が多数生成されていた。これらの金ナノ粒子は、細胞の表面ではなく、細胞内部に存在していた。また添加時間が長いほど、粒子の数は増加し、粒子サイズは大きくなる傾向が見られた。

(2) 単細胞藻類におけるセレンナノ粒子の生成

藻類中 Se 濃度は時間の経過に伴い、次第に増加した。Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> よりも K<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を添加するほうが高濃度となり、100 ppm の Se を添加した場合、約 10,000 ppm の高蓄積となった。藻類に蓄積された Se の価数を調べたところ、Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> を添加した場合、取り込まれた Se の一部は還元されており、4 価の Se が約 20%、-2 価の Se が 10% 存在した。一方、K<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を添加した場合には、細胞に蓄積した Se の 90% が 0 価の Se に還元されていた。SEM により、細胞内において、セレン(0 価)のナノ粒子が生成しており、その粒径は数十 nm であることが見いだされた。

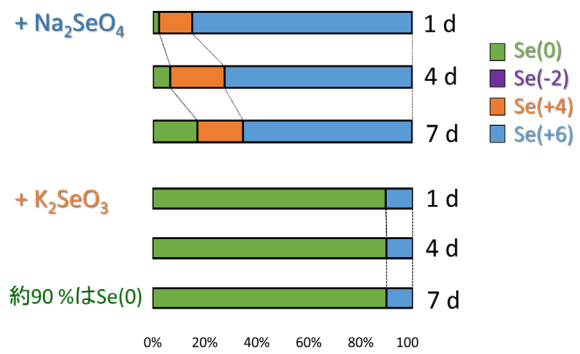


図2 藻類に蓄積されたセレンの化学形態分析結果

[1] 小西康裕, 斉藤範三, 「金属回収方法」特願 2006-259938. [2] M. Jiang, *et al.*, *Chemical Geology*, **277(1-2)**, 61-69 (2010). [3] T. Luangpipat, *et al.*, *J. Nanopart. Res.*, **13**, 6439-6445 (2011). [4] F. Kikuchi, *et al.*, *Scientific Reports*, **6**, 34626 (2016). [5] A. Hokura, *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**, 321-328 (2006).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kashiwabara, Teruhiko, Keitaro Tanoi, Nobuyuki Kitajima, Akiko Hokura, Tomoko Abe, Tomoko Nakanishi, Izumi Nakai	4. 巻 48(4)
2. 論文標題 Comparative in vivo Imaging of Arsenic and Phosphorus in Pteris vittata Gametophyte by Synchrotron micro-XRF and Radioactive Tracer Techniques	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 319-321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.180996	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 Naoki Fukuda, Nobuyuki Kitajima, Yasuko Terada, Tomoko Abe, Izumi Nakai, and Akiko Hokura	4. 巻 12
2. 論文標題 Visible cellular distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator Arabidopsis halleri ssp. gemmifera determined by 2-D X-ray fluorescence imaging using high-energy synchrotron radiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 193-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9MT00243J	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 IDO Koyo, OBAYASHI Hideyuki, ZHU Yanbei, HIRATA Takafumi, HOKURA Akiko, NONOSE Naoko, INAGAKI Kazumi	4. 巻 34
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Major and Minor Elements in Lead-free Solder Chip by LA-ICP-MS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 693 ~ 699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18SBP07	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 井上昂哉, 大根田祐人, 保倉明子	4. 巻 50
2. 論文標題 偏光光学系蛍光X線分析装置を用いたコマツナ中微量元素の定量および産地判別への試み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 X線分析の進歩	6. 最初と最後の頁 233-248
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 -

1. 著者名 Yu-ki Tanaka, Shohei Takada, Kazuhiro Kumagai, Keita Kobayashi, Akiko Hokura, Yasumitsu Ogra	4. 巻 62
2. 論文標題 Elucidation of tellurium biogenic nanoparticles in garlic, <i>Allium sativum</i> , by inductively coupled plasma-mass spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 126628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtemb.2020.126628	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 Teruhiko Kashiwabara, Nobuyuki Kitajima, Ryoko Onuma, Naoki Fukuda, Satoshi Endo, Yasuko Terada, Tomoko Abe, Akiko Hokura, Izumi Nakai	4. 巻 13(4)
2. 論文標題 Synchrotron micro X-ray fluorescence imaging of arsenic in frozen-hydrated sections of a root of <i>Pteris vittata</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 mfab09
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mtomcs/mfab009	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 Orapan Meesungnoen, Piyanete Chantiratikul, Kanjana Thumanu, Nitra Nuengchamngong, Akiko Hokura, Woranan Nakbanpote	4. 巻 .
2. 論文標題 Elucidation of crude siderophore extracts from supernatants of <i>Pseudomonas</i> sp. ZnCd2003 cultivated in nutrient broth supplemented with Zn, Cd, and Zn plus Cd	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	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) 10.1007/s00203-021-02274-x	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

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 井戸 航洋, 宮下 振一, 朱 彦北, 有賀 智子, 藤井 紳一郎, 保倉 明子, 稲垣 和三
2. 発表標題 spICP-MSにおけるマトリクスマッチングを実現する2液同時噴霧導入システムの開発とその応用
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保倉明子, 黒子涼太, 武内悠悟, 熊谷和博
2. 発表標題 単細胞藻類に蓄積されたセレンの化学形態分析
3. 学会等名 第5回 日本セレン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市之瀬 智生, 井戸 航洋, 保倉 明子, 熊谷 和博, 宮下 振一, 藤井 紳一郎, 稲垣 和三
2. 発表標題 scICP-MSによる単細胞藻類 <i>Pseudococcomyxa simplex</i> に蓄積されたニッケルの定量分析
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保倉明子
2. 発表標題 単細胞藻類を利用した有用メタルの回収
3. 学会等名 2019年度 日本地球化学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武内悠悟, 黒子涼太, 市之瀬智生, 保倉明子, 熊谷和博
2. 発表標題 単細胞藻類 <i>Pseudococcomyxa simplex</i> に蓄積されたセレンの化学形態分析
3. 学会等名 第 55 回 X 線分析討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Ichinose, Koyo Ido, Akiko Hokura, Kazuhiro Kumagai, Shin-ichi Miyashita, Shin-ichiro Fujii, Kazumi Inagaki
2. 発表標題 sciCP-MS analysis of gold nanoparticles bio-synthesized produced by unicellular algae
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiaki Fujii, Kazuki Takanashi, Etsuko Shato, Tomoki Ichinose, Kazuhiro Kumagai, Akiko Hokura
2. 発表標題 Biosynthesis of gold nanoparticles in unicellular alga and evaluation of their catalytic potency
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Hokura
2. 発表標題 Study on accumulation mechanism of gold in unicellular alga by X-ray analyses
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Hokura
2. 発表標題 Study on accumulation mechanism of precious metals in unicellular alga by X-ray analyses
3. 学会等名 1st International Workshop on Metallomics and Nanoparticles (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko HOKURA, Ryota KUROKO
2. 発表標題 Study on accumulation mechanism of selenium in unicellular alga by X-ray analyses
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保倉明子, 南部晃一
2. 発表標題 放射線 X 線分析によるモエジマシダ( <i>Pteris vittata</i> L.)におけるセレン蓄積機構の解明
3. 学会等名 第 6 回 メタロミクス研究フォーラム, プラズマ分光分析研究会 第 104 回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市之瀬 智生・井戸 航洋・保倉 明子・熊谷 和博・宮下 振一・藤井 紳一郎・稲垣 和三
2. 発表標題 単細胞藻類を用いた有用メタルの蓄積機構の解明
3. 学会等名 日本分析化学会 第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市之瀬 智生・保倉 明子・今村 悠・熊谷 和博
2. 発表標題 単細胞藻類 <i>Pseudococcomyxa simplex</i> におけるニッケル及び白金の蓄積機構の解明
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 稲葉 健介, 武内 悠悟, 黒子 涼太, 市之瀬 智生, 保倉 明子, 熊谷 和博
2. 発表標題 単細胞藻類に蓄積されたセレンとテルルの化学形態分析
3. 学会等名 生命金属に関する合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保倉明子
2. 発表標題 単細胞藻類におけるバイオジェニックナノ粒子の生成
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保倉 明子, 岸田 裕富, 熊谷 和博
2. 発表標題 単細胞藻類を利用して合成した金ナノ粒子のSEM観察
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第76回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保倉 明子, 武内 悠悟, 山本悠暉, 熊谷 和博
2. 発表標題 植物に蓄積されたセレンの化学形態分析
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 保倉明子： 日本加速器学会編、神谷幸秀編集委員長	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 596
3. 書名 加速器ハンドブック，第21章 暮らしに役立つ加速器技術，3節 環境保全	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京電機大学工学部応用化学科 分析化学研究室 <a href="http://www.s.dendai.ac.jp/labs/hokura/htmls/study.html">http://www.s.dendai.ac.jp/labs/hokura/htmls/study.html</a>
---

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