

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05391

研究課題名(和文) 微生物を利用した新規ナノ半導体合成法の開発とその光および電気制御

研究課題名(英文) Development of a novel method for synthesis of nano-semiconductors using microorganisms and its optical and electrical control

研究代表者

野尻 正樹 (Nojiri, Masaki)

大阪大学・理学研究科・講師

研究者番号：20333346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、低毒性半導体量子ドットを微生物が持つ導電性ナノワイヤー(繊毛)を介して付着させ、まだ報告例のない「低毒性のカルコパイライト系半導体ナノ粒子の微生物を用いた合成方法」の確立を目指した。本研究目的達成のために有用な微生物(Thiobacillus種)の培養からカルコパイライト系半導体の材料になる硫化物イオンを蓄積する条件を検討し、主に電子供給源としての黄鉄鉱(FeS)から酸化反応、ならびにアミノ酸システインにより得る条件で良好な手応えを得た。また、さらなる培地添加硫黄源と金属イオンの検討を行い、有意な半導体候補となり得るナノ粒子の予備的な合成方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の我が国は、半導体産業革命期である。その中で「低毒性のカルコパイライト系半導体」はまだ未知の可能性を秘めた非常に伸びしろのある材料である。ABC2型に限らず、他にも様々な元素の組合せや、半導体結晶内にさらに遷移金属をドーピングして新たな物性を発現させる試みなどもさかんに行われている。そういった背景のもと本研究課題遂行によりカルコパイライト系半導体の微生物合成に関わるノウハウが蓄積されることは社会的に非常に意義深く、その合成に関わる技術分野に大きなインパクトを与える。

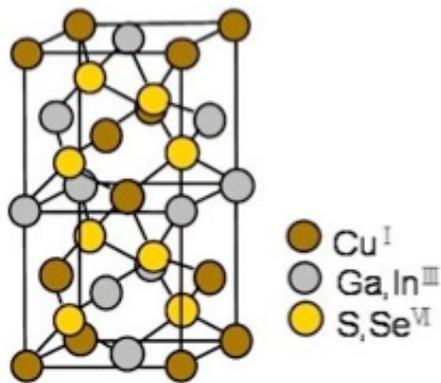
研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a microbe-based synthesis method of low-toxicity chalcopyrite-based semiconductor nanoparticles, which has not yet been reported, by attaching low-toxicity semiconductor quantum dots via the conductive nanowires (cilia) of microorganisms. In order to achieve the purpose of this study, we investigated the conditions for accumulating sulfide ions, which are the materials of chalcopyrite-based semiconductors, from the culture of useful microorganisms (Thiobacillus species), and obtained good results under the conditions of oxidation reaction from pyrite (FeS) as the main electron source and amino acid cysteine. In addition, we further investigated the sulfur source and metal ions added to the culture medium, and established a preliminary synthesis method of nanoparticles that could be significant semiconductor candidates.

研究分野：生物無機化学

キーワード：金属ナノ粒子 バイオテクノロジー 微生物合成

1. 研究開始当初の背景

昨今、COP21 (「パリ協定」) 等でも明言されるように国家レベルでの地球温暖化対策と『環境保全』に力を入れた“持続可能な社会”の実現が広く世界的に望まれている。近年、その目的達成に向けた『微生物および(微生物が持つ)酵素を利活用した有用物質の生産(変換)システムや環境浄化システムの開発』などのバイオテクノロジー分野の進展が目覚ましい(https://www.jst.go.jp/alca/kadai/bnk_02.html)。例えば、フォトレジスタ(光導電体:光励起を利用した半導体の一種)としての硫化カドミウム「CdS」に着目し、システインを硫黄源にCdSを微生物に生合成させた「人工的な光エネルギー駆動型の(非光合成生物による)二酸化炭素の固定と有用物質への変換システム」なども実現されている(Sakimoto, *et. al.*, Science, 351, 74 (2016))。このような進展著しいグリーン/ホワイトバイオテクノロジー技術からヒントを得、本研究課題では(当研究室でこれまで精力的に研究を続けている)生物学的脱窒過程を同様の半導体ナノ粒子による光エネルギーによって駆動させることを計画した。生物学的脱窒過程は地球全体の「窒素サイクル」維持のためにも大変重要なプロセスであり、特に温室効果がCO₂の300倍以上もある亜酸化窒素(N₂O)を無害なN₂ガスへと還元・無害化することができる反応も、本脱窒過程を行う微生物体内の酵素によってのみ自然界では触媒される。申請者はこれまで、それら脱窒プロセスに必要なとされる酵素群と電子伝達について詳細に分子・原子レベルで解析しており、その研究成果が本研究課題遂行を通じて社会に役立てる事ができるのではないかと考えた。現在、半導体研究分野においてCdSはそのカドミウムの猛毒性から徐々にその使用範囲も狭まってきているとの現状もあり、本研究課題ではCdSに比べ遥かに低毒性の「カルコパイライト系半導体」に着目した。カルコパイライト系半導体とは、ももとのSi系ダイヤモンド型半導体から発展してきた半導体の1つである。その結晶構造はZnS系結晶でみられる(各原子が正四面体の形で結合した)「閃亜鉛鉱型結晶構造」をとり(右図)、Znの代わりに周期表13族の「Al」、「Ga」や「In」、そして11族の「Ag」や「Cu」で置換されたものを指す。それら挿入される金属種の違いや量比によって半導体エネルギーバンドギャップの大きさが異なり、吸収波長や発光、導電性など様々な物性に変化が見られるのが特徴である。現在、新しい物性発現をねらったそれら金属種の組合せなどの検討もさかんに行われており、大きな期待がよせられる無機材料系の1つである。



2. 研究の目的

本研究の目的は、上述の低毒性半導体量子ドットを微生物が持つ導電性ナノワイヤー(繊毛)を介して付着させ、その微生物が持つ脱窒プロセスを量子ドットが吸収する光エネルギーとその後の電子伝達によって駆動させる系を立ち上げる事およびその実績を作ることである(これを光エネルギーを利用した次世代「環境浄化バイオエコシステム」と呼ぶ)。また、光エネルギーを用いて脱窒を駆動させるのみに注目するならば、すでに報告例のあるCdS系の量子ドットを使用しても構わない。しかしながら、本研究課題が成功した後の汎用性などを考慮すると、今のうちにまだ報告例のない「低毒性のカルコパイライト系半導体ナノ粒子の微生物

物を用いた合成方法」をこの機会に検討するべきであると意義（目標）づけることができる。

3. 研究の方法

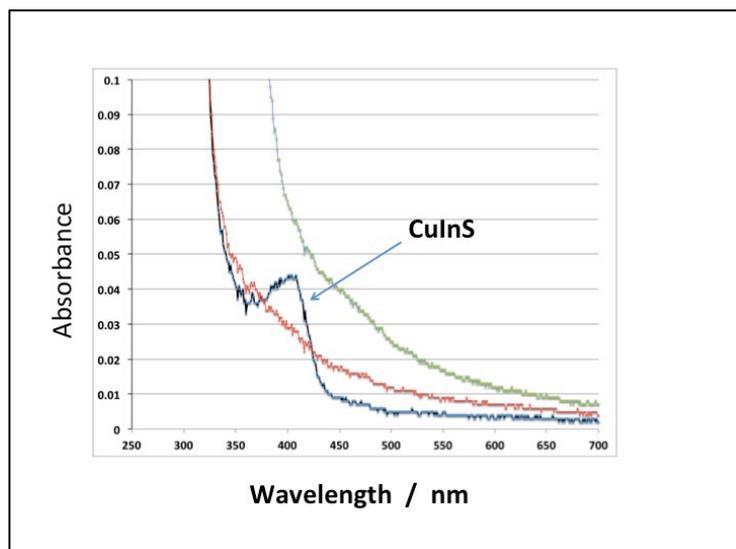
本研究課題では、量子ドットと脱窒微生物間の効率的な電子伝達を可能にする微生物として、*Thiobacillus denitrificans* を用いた。本菌株は独立化学合成細菌に分類され非常に興味深い性質を持つ。それは環境中の黄鉄鉱（FeS）などに**繊毛**を介して付着しそこから電子を奪い、嫌気条件下において硝酸イオンを段階的に還元する（脱窒）ことで生育することである（<http://genome.jgi.doe.gov/thide/thide.home.html>）。本研究課題では黄鉄鉱の代わりに今回、新たに微生物合成するカルコパイライト半導体ナノ粒子を量子ドットとして、本菌株が持つ繊毛を介した電子移動をさせ脱窒させることをねらった。まずは、カルコパイライト系半導体の必要成分の硫黄を供給する培養条件の検討を行った。続いて、硫化物イオン（HS⁻）を蓄積した培養液中に半導体原料となるインジウム（In）、銀、銅などといった無機イオンを段階的にかつ量比バランスおよび pH 等を調節して添加し、しばらく攪拌あるいは静置することにより「AgInS₂」や「CuInS₂」などカルコパイライト系半導体（量子ドット）ナノ粒子微結晶を合成する方法論を確立した。

4. 研究成果

本菌株培養時におけるカルコパイライト半導体ナノ粒子の硫黄源として、主に黄鉄鉱（FeS）あるいはアミノ酸システインを用い、培地組成ならびに嫌気あるいは好気下などの培養条件を詳細に検討した。その結果、システインを用い嫌気下の条件で最も多く硫化物イオンとして蓄積することがわかった。続いて、金属源の種類と添加順など様々な条件検討を行い、最終的に以下に示す方法を確立した。①まず先に硫黄源のシステインと同時に銅イオンを添加し、嫌気的かつ脱窒条件下で4～5日間培養することで本菌株を生育させる。続いて、②そこに13族金属イオン（ここでは、アルミニウムイオン、ガリウムイオン、そしてインジウムイオン）を銅イオンの半量加え、さらに嫌気下培養を3日間継続する。ここで、遠心分離により菌体を回収し、0.9% NaCl で菌体をよく洗浄し、菌体表面に付着した金属ナノ粒子前駆体ごと菌体を回収する。次に本菌株培地組成から金属源を抜いた培地を新たに用意し、そこへ金属ナノ粒子前駆体が付着した菌体を入れ、好

気下で3日間浸透し続けるとその培地上清に金属ナノ粒子が形成されることがわかった（右図）。今回、確立したこの方法は、微生物を介した金属ナノ粒子合成の分野においても全く報告例のないものであり、これまで報告されている CdS などの合成方法からのレベルアップにつながる重要な位置づけになると期待される。現在、

これら結果をまとめ学術論文として報告する準備をしている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Masaki Nojiri | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Analysis of Intramolecular Electron Transfer on the Redox Enzymes: Structural Basis for Origin of the Geometrical Constrains of the Metal Centers | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA Research Report | 6. 最初と最後の頁 172-176 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18957/rr.7.2.172 | 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 Saori Ikebuchi, Felicia Shirota, Masaki Nojiri | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Preliminary X-ray Diffraction Studies for the Mutants and Functional Insights for the N-terminal Cupredoxin Domain of Hexameric Copper Nitrite Reductase | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA Research Report | 6. 最初と最後の頁 84-87 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18957/rr.8.1.84 | 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 Ryohei Yoneda, Kazuya Horibe, Masaki Nojiri | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Structure and Functional Insights for the Thermus Copper Nitrite Reductase | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA Research Report | 6. 最初と最後の頁 197-200 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18957/rr.7.2.197 | 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 Takeo Sumi, Masaki Nojiri | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Crystallization and Preliminary X-ray diffraction Analysis of the Physiological Electron Acceptor, Cytochrome c553, for Lanthanide-containing Alcohol Dehydrogenase | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA Research Reports | 6. 最初と最後の頁 52-55 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18957/rr.9.52 | 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 野尻正樹 | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 シンバイオレメディエーションと新・生物無機化学 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 月刊アグリバイオ | 6. 最初と最後の頁 49-51 |
| 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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 米田涼平、堀部和也、越山達貴、山本祐輔、石原可奈子、永田智大、舩橋靖博、平大輔、野尻正樹 |
| 2. 発表標題 新規な銅含有亜硝酸還元酵素の立体構造と触媒反応におけるバリエーション |
| 3. 学会等名 第46回 生体分子科学討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 墨岳夫、市田尚久、舩橋靖博、平大輔、野尻正樹 |
| 2. 発表標題 希土類金属含有アルコール脱水素酵素における触媒反応機構 |
| 3. 学会等名 第13回バイオ関連科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本祐輔、越山達貴、舩橋靖博、野尻正樹 |
| 2. 発表標題 硫化鉄酸化細菌由来の新規なマルチ銅酸化酵素の構造と機能 |
| 3. 学会等名 第13回バイオ関連科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 墨岳夫、市田尚久、船橋靖博、平大輔、野尻正樹 |
| 2. 発表標題 新規な希土類金属アルコール脱水素酵素の構造と機能 |
| 3. 学会等名 第92回生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加登大河、墨岳夫、船橋靖博、野尻正樹 |
| 2. 発表標題 多核金属硫黄活性中心モデル酵素を用いた前生物学化学反応の探索 |
| 3. 学会等名 第92回生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Taiga KATO, Takeo SUMI, Yasuhiro FUNAHASHI, Masaki NOJIRI |
| 2. 発表標題 Nickel-Metallothionein as a Minimum Multinuclear Metalloenzyme Model |
| 3. 学会等名 The 29th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (SRM2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tatsuki KOSHIYAMA, Yusuke YAMAMOTO, Ryohei YONEDA, Kazuya HORIBE, Kanako ISHIHARA, Yasuhiro FUNAHASHI, Masaki NOJIRI |
| 2. 発表標題 Proton-coupled Electron Transfer for Copper Nitrite Reductase and its Metal-Substituted Proteins |
| 3. 学会等名 The 29th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (SRM2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuki MIYAGUCHI, Wan WEIGZONG, Yuki KIKUI, Yasuhiro FUNAHASHI, Masaki NOJIRI |
| 2. 発表標題 Structural and Mechanistic Insights into the Stabilization for High-valent Oxo-Iron species and Enzymatic Acitivity on the Hemoproteins |
| 3. 学会等名 The 29th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (SRM2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takeo SUMI, Naohisa ICHIDA, Yasuhiro FUNAHASHI, Masaki NOJIRI |
| 2. 発表標題 Characterization of the Lanthanide-containing Alcohol Dehydrogenase and its Physiological Redox Partner, Cytochrome c553 |
| 3. 学会等名 The 29th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (SRM2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yusuke YAMAMOTO, Tatsuki KOSHIYAMA, Yasuhiro FUNAHASHI, Masaki NOJIRI |
| 2. 発表標題 Characterization of the Multicopper Oxidase Complex from the bacterium, Thiobacillus denitrificans |
| 3. 学会等名 The 29th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (SRM2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 墨岳夫、市田尚久、砂川琢己、船橋靖博、平大輔、野尻正樹 |
| 2. 発表標題 希土類金属含有アルコール脱水素酵素のキャラクタリゼーション |
| 3. 学会等名 第45回生体分子科学討論会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 越山 達貴、米田 涼平、堀部 和也、山本 祐輔、亀井 美佐、船橋 靖博、野尻 正樹 |
| 2. 発表標題 銅亜硝酸還元酵素触媒反応におけるプロトン共役電子移動機構 |
| 3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|