

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：33801

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14373

研究課題名(和文)細菌のカルコゲン代謝の分子生物学的解明と半導体ナノ粒子合成への応用

研究課題名(英文)Molecular biology of bacterial chalcogen metabolism and the application to semiconductor nanoparticle production

研究代表者

黒田 真史(Kuroda, Masashi)

常葉大学・社会環境学部・講師

研究者番号：20511786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：環境適合性に優れるカルコゲナイド系半導体(ChSC)ナノ粒子の微生物合成の実現を目指し、ChSCナノ粒子合成細菌であるNT-1株のセレン・テルル代謝の詳細を明らかにすることを目的として研究を行った。1 g/L以上のメチオニンの添加によりNT-1株のセレン代謝が活性化されたこと、また亜セレン酸還元過程の代謝物としてセレノメチオニンが検出されたことから、セレンはアミノ酸合成経路を通じて代謝されることが推定された。また、テルル代謝の過程でセレン代謝時と同様のメチル化合物が検出されたことから、テルル代謝も同様にアミノ酸合成経路と深く関わっていることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な先端産業で利用されるセレンやテルルを含む半導体ナノ粒子を、微生物を利用して効率的に合成するための基礎として、半導体ナノ粒子合成細菌NT-1株のセレン・テルル代謝を調べた。その結果、NT-1株はセレンおよびテルルを、アミノ酸合成経路を通じて代謝していることが明らかになった。また、メチオニンの添加によりセレン代謝を促進できることを見出した。この成果は、これまでに非常に報告が少ないセレン・テルルを含む半導体ナノ粒子の微生物による合成の実現に大きく近づく発見である。

研究成果の概要(英文)：Biosynthesis of chalcogenide semiconductor (ChSC) nanoparticles is a promising technology due to its low environmental burden. This study investigated selenium and tellurium metabolism of ChSC nanoparticle-synthesizing bacterium, *Pseudomonas stutzeri* NT-1. Culture medium supplemented with over 1 g/L methionine significantly improved the selenium metabolism of strain NT-1. Selenomethionine was detected in a cell lysate of strain NT-1 under selenite-reducing condition. These results strongly suggested that selenium metabolism was closely related to selenoamino acid synthetic pathway. Methylated tellurium compounds, which are analogous to selenium metabolites, were detected in the gas phase of tellurium-reducing culture of strain NT-1, suggesting that tellurium metabolism is also related to amino acid synthetic pathway.

研究分野：生物環境工学

キーワード：セレン テルル カルコゲン 半導体ナノ粒子 代謝物分析

1. 研究開始当初の背景

化合物半導体は、構成元素の組合せにより様々な特性を示し、比較的安価であることから、近年利用が急拡大してきている。中でも、蛍光性を示す量子ドットとして利用される CdSe、太陽電池として利用される CdTe や Cu(In,Ga)Se₂、熱電材料として利用される Bi₂(Se,Te)₃ など、第 16 族元素 (カルコゲン) と金属の化合物であるカルコゲナイド系半導体材料 (Chalcogenide Semiconductors: ChSC) は、ナノ粒子化することで飛躍的に高い性能を示すことから、次世代の半導体として先端産業分野で注目されている。ChSC ナノ粒子の合成法として、現在は一般に物理・化学的合成法が用いられているが、合成に有害な薬品を使用すること、高温・高圧下で行う ChSC 合成工程や、ChSC のナノ粉碎工程において多大なエネルギーを消費することなど、高環境負荷であるという問題を抱えている。一方で、ChSC ナノ粒子の微生物合成法は、微生物が亜セレン酸 (SeO₃²⁻)、亜テルル酸 (TeO₃²⁻) 等を還元する際に生成するカルコゲナイド (Se²⁻、Te²⁻) を Cd²⁺、Bi³⁺ 等の対イオンと結合させるもので、温和な条件で反応が進行すること、微粉碎工程を経ずとも ChSC はナノサイズの粒子で生成することなど、物理・化学的合成法と比較して環境適合性に優れることから、実現が期待されている。

これまでに CdS を中心とした硫黄系 ChSC ナノ粒子の微生物合成について 20 報程度の研究があり¹⁾、一部の報告では蛍光を発することも確認されていることは、微生物が合成した ChSC ナノ粒子が十分な性能を発揮することを示している。一方、より産業上の価値の高い Se 系および Te 系の ChSC については、申請者らの研究²⁾³⁾を含めて 10 例に満たない。これは、微生物が普遍的に代謝し、代謝経路も明らかになっている硫黄と比較して、Se や Te を盛んに代謝する微生物は非常に限られており、特にその代謝経路が明らかになっていないことが大きな障壁になっているためであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ChSC ナノ粒子合成細菌の持つカルコゲン代謝の詳細を明らかにすることを目的とした。本研究では特に、極めて高いセレン代謝活性を持ち⁴⁾⁵⁾、テルルについても活発に代謝することが明らかになりつつある *Pseudomonas stutzeri* NT-1 を対象として、特に以下(1)、(2)の 2 項目について重点的に取り組んだ。

(1) Se 代謝を促進する培養条件の検討と Se 代謝物の分析

これまでに、NT-1 株は TSB 培地等の有機性栄養源を含む培地では活発な Se 代謝を示すが、無機塩培地中では Se 代謝活性が低下することが観察されている。これは、有機性栄養源に含まれる何らかの物質が Se 代謝の鍵になっているためであると考えられる。本項目では、有機性栄養源中の Se 代謝に影響を及ぼす成分を明らかにするとともに、Se 代謝における中間代謝物を同定することにより、NT-1 株の Se 代謝経路を推定することを目的とした。

(2) Te 代謝を促進する培養条件の検討と Te 代謝物の分析

以前の研究において、NT-1 株は極めて高い Te 揮発化活性を持つことが明らかになった (科研費 15K16145 研究成果報告書)。ChSC ナノ粒子合成に深く関わると考えられる Te 揮発化を促進する培養条件を明らかにすること、さらに Te 代謝物を同定することで、これまで特に困難であった Te 系 ChSC 合成の手がかりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Se 代謝を促進する培養条件の検討と Se 代謝物の分析

有機性栄養源の添加による Se 代謝への影響を評価するため、50 mL 容のバイアルを用い、0.1 mM の亜セレン酸を含む乳酸無機塩培地にカザミノ酸、ソイトン、またはカザミノ酸とソイトンの両方をそれぞれ 0.1 g/L、1 g/L、3 g/L、または 17 g/L となるように添加し、NT-1 株を植菌して 28 ℃ で好氣的に 24 時間培養した。メチオニンの添加による影響を評価する場合、上記と同様に調製した培地にメチオニンを 0.01 g/L、0.1 g/L、1 g/L、5 g/L、または 10 g/L となるように添加し、NT-1 株を植菌して 28 ℃ で好氣的に 24 時間培養した。液相 Se 濃度の分析は誘導結合プラズマ発光分光分析によって行った。

Se 代謝における中間代謝物の分析は、亜セレン酸を含む TSB 培地で培養した菌体を遠心分離 (6000 ×g、10 min) により回収し、生理食塩水により菌体を洗浄した後、超音波破砕機により菌体を破砕し、遠心分離 (6000 ×g、10 min) により得られた上清を高速液体クロマトグラフ-水素化物発生原子蛍光分析計に供することで行った。

(2) Te 代謝を促進する培養条件の検討と Te 代謝物の分析

1 L 容ジャーファーマンターを用い、0.1 mM の亜テルル酸を含む TSB 培地 600 mL に NT-1 株の前培養液を OD₆₀₀ が 0.02 となるように植菌した。培養温度 28 ℃、pH7.0、通気量 0.2 L/min を基本の運転条件として、pH、温度、通気量を変化させたそれぞれの条件で 24 時間の培養を行い、培養条件が Te 揮発化に及ぼす影響を評価した。液相 Te 濃度、固相 Te 量の分析は誘導結合プラズマ発光分光分析によって行い、培養開始時に添加した Te 量から培養終了時に液相および固相に含まれる Te 量を引くことにより、揮発化分を推定した。

Te 揮発化合物の定性的分析は、0.1 mM の亜テルル酸を含む 10 mL の TSB 培地に NT-1 株を植菌した後に密栓し、回転振盪培養 (28、120 rpm) した。培養 24 時間後に気相部 1 mL を採取し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) に供することで、気相に生成した Te 化合物の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) Se 代謝を促進する培養条件の検討と Se 代謝物の分析

様々な濃度のカザミノ酸またはソイトンを添加した培地における、NT-1 株による水相からの亜セレン酸の除去率を図 1 に示す。カザミノ酸を 1 g/L 以上添加した条件では、対照系として無機塩培地中で培養した場合と比較して、亜セレン酸除去率が大きく改善され、90%以上の除去率を記録した。一方、ソイトンを添加した場合、いずれの濃度においても対照系との有意な差は見られなかった。この結果より、カザミノ酸に含まれる何らかの成分が NT-1 株の Se 代謝を促進し、Se の除去率を高めたものと考えられた。カザミノ酸は、カゼインを加水分解して得られるアミノ酸の混合物であり、カザミノ酸を構成するアミノ酸のいずれかが Se 代謝の促進に関与していると推測された。

続いて、カザミノ酸を構成するアミノ酸群のうち、予備検討において効果が認められたメチオニンを様々な濃度で培地に添加し、亜セレン酸の除去試験を行った。結果を図 2 に示す。0.1 g/L 以上のメチオニンを添加した場合に亜セレン酸除去率は有意に改善され、90%以上の除去率を記録した。このことから、メチオニンは NT-1 株における Se の代謝に深く関わっていることが強く示唆された。

NT-1 株による Se の代謝についてさらに詳細な情報を得るために、亜セレン酸還元過程における Se を含む代謝物の動態を、Se を特異的に検出可能な高速液体クロマトグラフ - 水素化物発生原子蛍光分析計により調べた。結果を図 3 に示す。培養開始後 12 時間後の菌体からは様々な保持時間を持つ Se 含有化合物が検出されたことから、亜セレン酸は NT-1 株により様々な代謝物に変換されたと考えられた。その後、培養開始 24 時間後および 60 時間後には、亜セレン酸の他に、保持時間 5.3 分を示すセレノメチオニンと推定される化合物と、保持時間 8.7 分を示す未知化合物のみが検出された。この結果より、亜セレン酸として添加した Se の一部は、NT-1 株の代謝によりメチル化物として揮発する過程で、セレノメチオニンを經由するものと推測された。

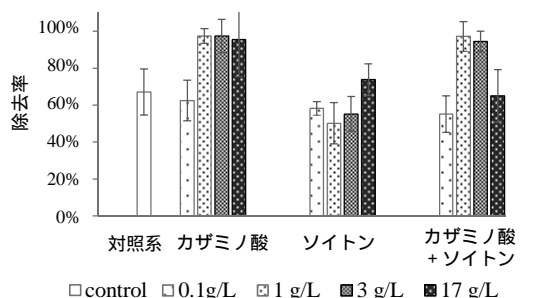


図 1 カザミノ酸およびソイトンが NT-1 株の Se 代謝に及ぼす影響。

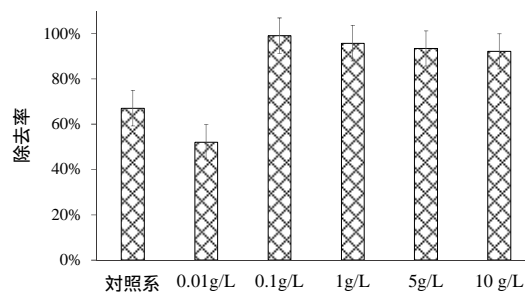


図 2 メチオニンが NT-1 株の Se 代謝に及ぼす影響。

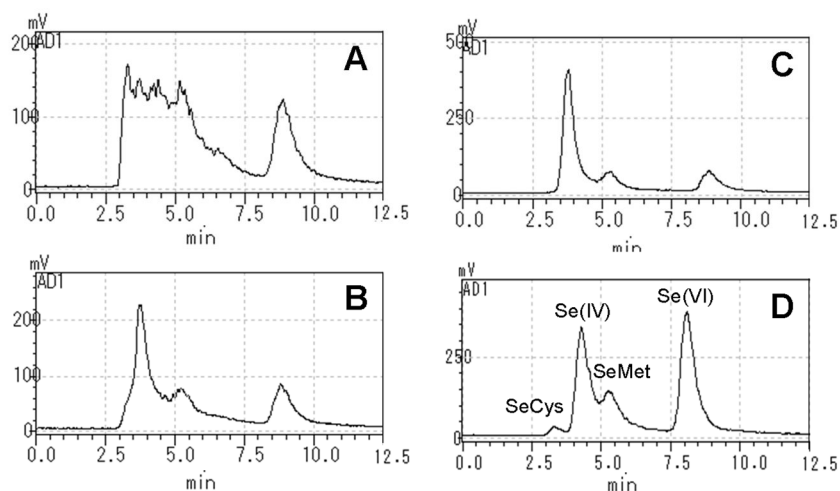


図 3 NT-1 株の亜セレン酸還元過程における Se 代謝物の分析。A: 培養 12 時間後、B: 培養 24 時間後、C: 培養 60 時間後、D: 標準試料

図4に含硫アミノ酸代謝経路を参考に推定した含Seアミノ酸代謝経路を示す。この代謝経路では、亜セレン酸還元により生成するセレン化水素はO-アセチル-L-セリンと化合してセレノホモシステインへと変換された後、セレノメチオニンまたはセレノシステインを經由し、メタンセレノールへと変換された上で、メチル化物として揮発する。メチオニンがSe代謝を促進したこと、およびSe代謝の過程でセレノメチオニンが検出されたことから、NT-1株におけるSe代謝はアミノ酸代謝経路と深く関わっていると推測され、この経路の活性化がSe代謝の活性化、さらにはそれによるChSCナノ粒子合成の活性化につながるものと考えられた。

(2) Te代謝を促進する培養条件の検討とTe代謝物の分析

NT-1株によるTe代謝の詳細の手がかりを得るために、様々なpH、温度、通気量における元素態テルル生成率（固化率）、メチル化テルル生成率（揮発化率）および固化と気化の両方の効果による水相からの除去率を比較した。特に影響の大きかった温度による影響について図5に示す。NT-1株の生育を強く制限する温度域である20℃では、80%近いTeは揮発により除去され、約20%のTeは固化により除去された。より高い培養温度に設定すると、揮発化率が低下する一方で固化率は上昇し、40℃では60%を超えるTeが固化により除去され、揮発化したTeは40%弱にとどまった。

また、ガスクロマトグラフ-質量分析計を用いてTe代謝の過程で生成する揮発性化合物の分析を行ったところ、Teを含む物質としてdimethyl telluride、dimethyl ditelluride、dimethyl tellurenyl sulfideが検出された。これらの物質はSeを添加した培地中でNT-1株を培養した際に揮発化物として生じるdimethyl selenide、dimethyl diselenide、およびdimethyl selenyl sulfideが化学構造の中に持つSe原子がTeに置き換わった構造であると言える。従って、NT-1株においてTeの代謝は図4に示した含Seアミノ酸代謝経路と類似した経路によって行われているものと推測される。この経路で生成するテルル化水素をはじめとするTe化合物の安定性が低いため、高い温度でNT-1株を培養した場合はTeの自然酸化が発生し元素態Teが生成すること、従ってTeを含むChSCナノ粒子を合成するためには、安定したTe代謝を発現させるために低温環境でNT-1株を培養しなければならないものと考えられた。

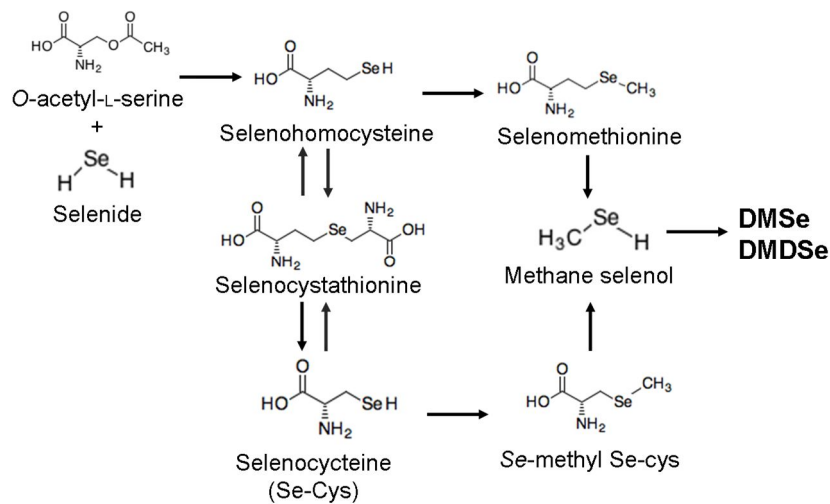


図4 推定されるNT-1株のセレン代謝経路。

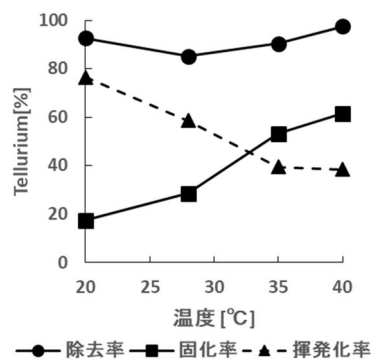


図5 NT-1株のTe代謝に及ぼす培養温度の影響。

<引用文献>

- 1) **Jacob JM, Lens PNL, Balakrishnan RM (2015)** Microbial synthesis of chalcogenide semiconductor nanoparticles: a review. *Microbial Biotechnol*, **9**, 11-21
- 2) **Ayano H, Miyake M, Terasawa K, Kuroda M, Soda S, Sakaguchi T, Ike M (2014)** Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles. *J Biosci Bioeng*, **117(5)**:576-81.
- 3) **Ayano H, Kuroda M, Soda S, Ike, M (2015)** Effects of culture conditions of *Pseudomonas aeruginosa* strain RB on the synthesis of CdSe nanoparticles. *J Biosci Bioeng*, **119(4)**:440-445.
- 4) **Kuroda M, Notaguchi E, Sato A, Yoshioka M, Hasegawa A, Kagami T, Narita T, Yamashita M, Sei K, Soda S, Ike M (2011)** Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J Biosci Bioeng*, **112**:259-264.
- 5) **Kagami T, Narita T, Kuroda M, Notaguchi E, Yamashita M, Sei K, Soda S, Ike M (2013)** Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Res*, **47**:1361-1368.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kuroda Masashi, Suda Soshi, Sato Mamoru, Ayano Hiroyuki, Ohishi Yuji, Nishikawa Hiroshi, Soda Satoshi, Ike Michihiko | 4. 巻 103 |
| 2. 論文標題 Biosynthesis of bismuth selenide nanoparticles using chalcogen-metabolizing bacteria | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 8853 ~ 8861 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-10160-2 | 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 黒田 真史、池 道彦 | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 微生物のカルコゲン代謝を利用した環境適合型半導体ナノ粒子合成 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 環境技術 | 6. 最初と最後の頁 318 ~ 321 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Zhang, Y., Kuroda, M., Nakatani, Y., Soda, S., Ike, M. | 4. 巻 127(5) |
| 2. 論文標題 Removal of selenite from artificial wastewater with high salinity by activated sludge in aerobic sequencing batch reactors | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering | 6. 最初と最後の頁 618-624 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.11.002 | 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 - |

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 黒田真史、畠中玄彦、末神悠人、池道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas stutzeri NT-1による水相からのテルルの揮発化と回収 |
| 3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤守, 黒田真史, 井上 大介, 池 道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas stutzeri NT-1 によるセレン化物半導体ナノ粒子の合成 |
| 3. 学会等名 第19回環境技術学会年次大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤 守, 黒田 真史, 井上 大介, 池 道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas stutzeri NT-1によるセレン化物半導体ナノ粒子の合成 |
| 3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 黒田 真史 小林 慎, 高山 一也, 池 道彦 |
| 2. 発表標題 好氣的硫黄代謝細菌を活用した重金属除去 |
| 3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 黒田真史, 池田美紗希, 池道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas stutzeri NT-1のセレン代謝に及ぼす培地成分の影響 |
| 3. 学会等名 日本水処理生物学会第56回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Misaki IKEDA, Masashi KURODA, Daisuke INOUE, Michihiko IKE |
| 2. 発表標題 Nutrients Accelerating Selenium Removal by Pseudomonas stutzeri NT-1 |
| 3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (WET) 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masashi Kuroda, Haruhiko Hatanaka, Yuto Suegami, Daisuke Inoue, Michihiko Ike |
| 2. 発表標題 Efficient Biovolatilization of Tellurium from Water Phase by Pseudomonas stutzeri NT-1 |
| 3. 学会等名 Federation of European Microbiological Societies (FEMS) 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masashi Kuroda, Michihiko Ike |
| 2. 発表標題 Removal and recovery of selenium from wastewater utilizing biovolatilization by selenium-metabolizing bacteria |
| 3. 学会等名 23rd International Biohydrometallurgy Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 黒田真史, 畠中玄彦, 井上大介, 池道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas stutzeri NT-1による水相からのテルルの揮発化除去と回収 |
| 3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 黒田真史, 惣田訓, 池道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas属細菌のセレン・テルル代謝の解析と半導体ナノ粒子合成への応用 |
| 3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 畠中玄彦, 黒田真史, 井上大介, 池道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas stutzeri NT-1によるテルル揮発化に影響を及ぼす因子の検討 |
| 3. 学会等名 日本水処理生物学会第55回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 末神悠人, 畠中玄彦, 黒田真史, 井上大介, 池道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas stutzeri NT-1 の揮発化作用による水相からのテルルの除去と回収 |
| 3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 黒田真史, 畠中玄彦, 末神悠人, 井上大介, 池道彦 |
| 2. 発表標題 Pseudomonas stutzeri NT-1による水相のテルルの効率的揮発化 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuanyuan Zhang, Masashi Kuroda, Daisuke Inoue, Michihiko Ike |
| 2. 発表標題 Biological treatment of selenate in saline wastewater by activated sludge under alternating anoxic/oxic condition |
| 3. 学会等名 11th Joint Workshop on Advanced Engineering Technology for Environment and Energy (国際学会) |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------|---------|
|---------|---------|