

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32657

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620150

研究課題名(和文)植物機能を利用した細胞内における金属ナノ粒子の生成

研究課題名(英文)Production of metallic nano particles in plant cells with the aid of plant function

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞藻類*Pseudococcomyxa simplex*および*Chlamydomonas reinhardtii*に、100 ppmの塩化金(III)水溶液を添加したところ、細胞内において数万ppmの金が蓄積された。またいずれの藻類を用いても、金ナノ粒子が細胞内で生成されることが示された。細胞内で生成された金ナノ粒子は比較的粒径が揃っており、およそ50 nmだった。この金ナノ粒子は凝集せず長期間にわたって安定に存在していた。一方、パラジウムは錯体として細胞内に蓄積されていた。白金および銀については、添加条件によってナノ粒子のできる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study confirmed that the unicellular alga, *Pseudococcomyxa simplex* and *Chlamydomonas reinhardtii*, accumulated high concentrations of Au, Pd, Ag, and Pt. The chemical forms of Au and Pd accumulated by these algae were clarified by X-ray absorption fine structure (XAFS) analysis. This study was also the first to successfully visualize the distribution of Au and Pd in a unicellular alga by X-ray fluorescence (micro-XRF) imaging.

研究分野：分析化学

キーワード：金属回収 金ナノ粒子 植物機能 X線分析 イメージング

1. 研究開始当初の背景

最近、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($CePO_4$)のナノ粒子が報告されている。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。このように細胞の内外におい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が、その生成メカニズムは十分に理解されていない。

研究代表者らの研究グループでは、単細胞藻類 *Pseudococcomyxa simplex* に 100 ppm の塩化金(III)水溶液を添加したところ、緑色の細胞が赤や青に呈色することを見出した。この細胞には乾燥質量で数%程度の金が蓄積されていた。一般的に細胞におけるナノ粒子を観察するためには、TEM が使われているが、観察前に多くの前処理を必要とするという短所がある。細胞内における生成メカニズムを明らかにするためには、リアルタイムで化学形態の変化をモニターする計測が不可欠であるという着想に至った。

2. 研究の目的

塩化金(III)酸イオンを細胞内に取り込み、金ナノ粒子を生成する単細胞藻類を見出した。乾燥質量で数%もの金を細胞内に蓄積するきわめてユニークな特性をもつ。そこで、植物細胞の中で形成される金属ナノ粒子の生成過程を、放射光を光源とする X 線分析により *in vivo* 計測し、細胞内でおこる金属ナノ粒子の生成メカニズムを明らかにすることを目的とする。

金以外にも、パラジウム、銀、白金など一連の貴金属元素を添加し、細胞内における還元反応を体系的に明らかにする。植物機能を利用して、種々の金属ナノ粒子の生成に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内への貴金属イオンの取り込み速度と蓄積量

単細胞藻 *Pseudococcomyxa simplex* を培養し(図1)、金、銀、パラジウム、白金など一連の貴金属元素を、クロロ錯イオン(銀をのぞく)として添加した。金属イオンの濃度は 100 ppm 程度とした。溶液の pH が 2 以下になると植物細胞が死に至るため、pH 3~程度に調整した。添加金属濃度は、100 ppm 程度とした。添加時間にもよって変化する細胞内の貴金属濃度を XRF 分析で定量した。

またモデル生物として用いられているコナミドリムシ(*Chlamydomonas reinhardtii*)を国立環境研究所微生物系統保存施設(NIESコレクション)から入手し、同様の実験を行った。



図1 液体培養および細胞の様子

(2) 細胞内に蓄積された貴金属イオンの化学形態分析

貴金属を取り込んだ細胞を集め、放射光施設 Photon Factory において、X 線吸収微細構造(XAFS)解析を行った。まずは一定時間経過した細胞を凍結乾燥した試料を測定に用いた。

(3) 一細胞ごとの *in vivo* 計測

研究対象とする単細胞藻類の細胞は 5 μm 程度である。SPring-8 のビームライン BL37XU を利用して、貴金属を蓄積した細胞を一細胞ごとに分析し、細胞内における元素分布を測定した。BL37XU の集光ビームは非常に高輝度であり、細胞内の局所分析へのメリットは大きい。一方で、高輝度ゆえに試料へのラディエーションダメージが心配される。そこで、クライオジェットにより低温窒素ガスを試料へ吹きつけ、試料を低温に保持できる測定システムを用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞内への貴金属イオンの取り込み速度と蓄積量

単細胞藻 *Pseudococcomyxa simplex* における金の蓄積量の変化を図2に示す。このように、この藻類細胞は、乾燥質量あたり約 3%もの金を蓄積することが示された。ほぼ半日で一定の蓄積量となることがわかった。

銀やパラジウムについても、ほぼ同様の結果となった。一方、白金については数千 ppm 程度の蓄積であり、他の金属よりも約 1 桁小さくなった。

Chlamydomonas reinhardtii でも似た傾向が

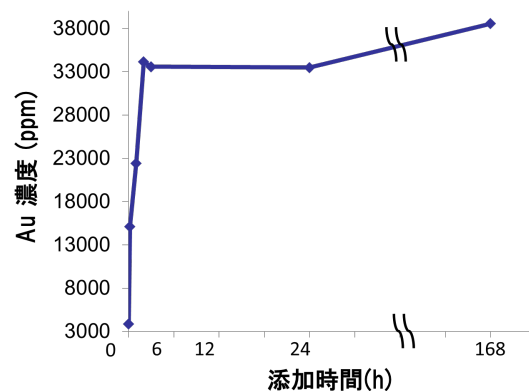


図2 *P. simplex* 中の金濃度の経時変化
添加溶液の金濃度 100 ppm

示された。

(2) 細胞内に蓄積された貴金属イオンの化学形態分析

P. simplex に蓄積された金の L_3 -XAFS 解析を行った。添加時間 24 時間および 1 週間の試料の結果を図 3 に示す。また比較のため、化学形態既知の金薄膜、 HAuCl_4 (粉末) および HAuCl_4 溶液のスペクトルも合わせて示した。図にみられるように、藻類に塩化金酸イオンとして添加した金は、還元されて藻類において金属状態で蓄積していた。

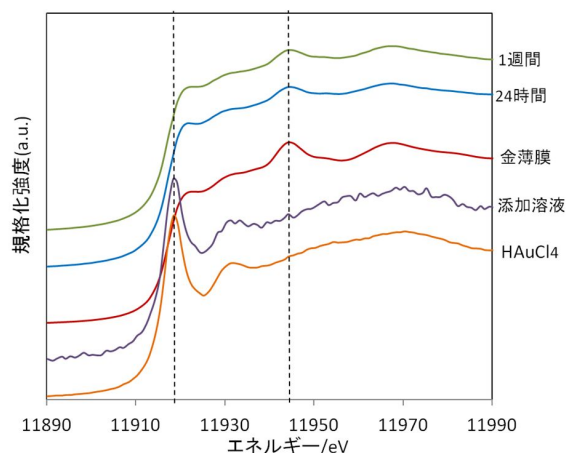


図 3 *P. simplex* に蓄積された金の L_3 -XANES スペクトル
参照物質: 金薄膜, HAuCl_4 (粉末), HAuCl_4 溶液

一方、パラジウムを添加した系では、パラジウムの還元は見られず、窒素が 4 配位したアンミン錯体のような化学形態で蓄積されていることがわかった。

白金および銀においては、添加条件により蓄積される化学形態が変化するため、現在、詳細な検討を続けている。

(3) 一細胞ごとの *in vivo* 計測

金を添加した藻類細胞を高分子膜上において急速凍結をし、放射光 μ -XRF イメージングに供した。結果の一例を図 4 に示す。添加 6 時間の試料である。KB ミラーで形成された

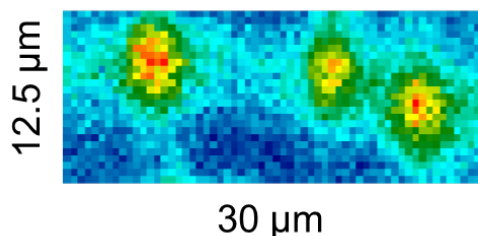


図 4 *P. simplex* に蓄積された金の μ -XRF イメージング
X線ビームサイズ: $0.6 \mu\text{m} \times 0.7 \mu\text{m}$
入射 X 線のエネルギー: 14 keV

$0.6 \mu\text{m}$ (垂直方向) $\times 0.7 \mu\text{m}$ (水平方向) の X 線集光ビームを用いることで、藻類一細胞 (約 $5 \mu\text{m}$) における金の分布の可視化に成功した。金は細胞表面に吸着しているのではなく、細胞内に取り込まれていることがわかった。

一方、SEM で観察したところ、細胞内において約 50nm の比較的粒径のそろった粒子状物質が多数認められた。

主な研究成果をまとめると以下の通りである。

(i) 単細胞藻類 *Pseudococcomyxa simplex* および *Chlamydomonas reinhardtii* に、 100ppm 程度の低濃度金溶液を添加すると、金は細胞内において数万 ppm という高濃度で蓄積される。またいずれの藻類を用いても、金ナノ粒子が細胞内で生成される。

(ii) 細胞内で生成された金ナノ粒子は比較的粒径が揃っており、およそ 50nm だった。

(iii) 金ナノ粒子は細胞内に取り込まれているため、凝集せず長期間にわたって安定に存在する。

(iv) Pd は細胞内で錯体を形成していた。Pt および Ag については、条件を検討することで、金属ナノ粒子が生成できる可能性はある。

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 3 件)

本田真央, 北島信行, 阿部知子, 梅村知也, 保倉明子, 放射光蛍光 X 線分析を用いるモエジマシダ (*Pteris vittata* L.) におけるクロム蓄積機構の解明, 分析化学, 査読有, 64, (2015), 801-810, <http://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.64.801>

Yukiko Ishihara, Mari Aida, Akito Nomura, Hidekazu Miyahara, Akiko Hokura, Akitoshi Okino, Development of Desolvation System for Single-cell Analysis Using Droplet Injection Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, Analytical Sciences, 査読有, 31, (2015), 781-785, <http://doi.org/10.2116/analsci.31.781>

保倉明子, 単細胞藻類を用いるレアメタルの回収, 東京電機大学総合研究所年報 2014, 査読無, 34, (2015), 19-22.

[学会発表](計 18 件)

高橋拓人, 保倉明子, 北島信行, 阿部知子, 放射光 X 線による重金属蓄積植物モエジマシダにおける水銀蓄積機構の解明, 第 29 回放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 2016 年 1 月 11 日, 東京大学柏の葉キャンパス (千葉県柏市).

廣瀬菜緒子, 山口直人, 保倉明子, 後藤文之, ヘビノネゴザ (*Athyrium yokoscense*)

のカルスにおける希土類元素の蓄積, 第5回 CSJ 化学フェスタ 2015, 2015年10月15日, タワーホール船堀(東京都江戸川区).

今村悠, 保倉明子, 単細胞藻類による Ag 及び Pt 蓄積機構の解明, 日本分析化学会第 64 年会, 2015年9月11日, 九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市).

保倉明子, XAFS を用いた環境分析, XAFS 夏の学校 2015, 2015年9月8日, 八王子セミナーハウス(東京都八王子市).

今村悠, 保倉明子, 単細胞藻類による Ag 及び Pt 蓄積機構の解明 XAFS 夏の学校 2015, 2015年9月7日, 八王子セミナーハウス(東京都八王子市).

Yu Imamura, Akiko Hokura, Elucidation of accumulation mechanism for Ag and Pt in unicellular algae, RSC Tokyo International Conference 2015, 2015年9月3日, 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市).

土門友, 本田真央, 廣瀬菜緒子, 高橋拓人, 保倉明子, シダ植物に高蓄積されたクロムの化学形態分析, 第18回 XAFS 討論会, 2015年7月30日, 高エネルギー加速器研究機構小林ホール(茨城県つくば市).

為澤文孝, 保倉明子, 寺田靖子, 熊谷和博, 放射光蛍光 X 線分析による重金属蓄積植物ヘビノネゴザ (*Athyrium yokoscense*) における金属蓄積機構の解明, 日本化学会第 95 回春季年会, 2015年3月26日, 日本大学船橋キャンパス(千葉県船橋市).

山岸郁貴, 保倉明子, 森田剛, 畠山義清, 単細胞藻類 (*Pseudococcomyxa simplex*) における金ナノ粒子の生成, 第50回 X 線分析討論会, 2014年10月31日, 東北大学片平キャンパス(宮城県仙台市).

保倉明子, 放射光 X 線分析による植物中のカドミウムやクロムの動態解明, 第58回日本薬学会関東支部大会 シンポジウム金属毒性学 Today 環境健康影響における元素・分子の反応と動態, 2014年10月4日, 昭和薬科大学(東京都町田市).

為澤文孝, 保倉明子, 阿部知子, 平野智也, Au を蓄積した重金属蓄積植物ヘビノネゴザ (*Athyrium yokoscense*) の XAFS 解析, 第17回 XAFS 討論会, 2014年9月22日, 徳島大学総合科学部常三島キャンパス(徳島県徳島市).

石原由紀子, 相田真里, 岩井貴弘, 宮原秀一, 保倉明子, 沖野晃俊, 時間分解 ICP 質量分析法による単細胞藻類の高感度微量元素分析, 日本分析化学会第 63 年会, 2014年9月18日, 広島大学(広島県東広島市).

石原由紀子, 相田真里, 岩井貴弘, 宮原秀一, 保倉明子, 沖野晃俊, ドロブレット ICP-TOFMS を用いた単細胞藻類の単一細胞多元素同時分析, 日本分析化学会第 63 年会, 2014年9月17日, 広島大学(広島県東広島市).

Yu Imamura, Akiko Hokura, Elucidation of

accumulation mechanism for Ag and Pt in unicellular algae by synchrotron radiation X-ray analysis, 英国王立化学会東京国際コンファレンス 2014「未来社会に向けた分析技術」, 2014年9月4日, 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市).

今村悠, 保倉明子, 放射光 X 線分析を用いた単細胞藻類による Ag 及び Pt 蓄積機構の解明, XAFS 夏の学校 2014, 2014年8月30日, 休暇村讃岐五色台(香川県坂出市).

保倉明子, 放射光で読み解く植物の重金属蓄積機構, PF 研究会 次世代放射光源で期待される XAFS を活用したサイエンス, 2014年7月11日, 高エネルギー加速器研究機構(茨城県つくば市).

石原由紀子, 野村亮仁, 鍋木結貴, 岩井貴弘, 宮原秀一, 保倉明子, 沖野晃俊, ICP 発光/質量分析装置による単細胞藻類の単一細胞微量元素分析, 日本分析化学会第 74 回分析化学討論会, 2014年5月24日, 日本大学工学部(福島県郡山市).

原田英美子, 保倉明子, 放射光 X 線で読み解く植物の重金属蓄積機構, 日本分析化学会第 74 回分析化学討論会, 2014年5月24日, 日本大学工学部(福島県郡山市).

〔図書〕(計 2 件)

保倉明子, シーエムシー出版, バイオベース資源確保戦略 - 都市鉱山・海底鉱山に眠る貴金属・レアメタル等の分離・回収技術 -, (2015), 総 281 頁 (176-183).

保倉明子, 講談社, 機器分析, (2015), 総 278 頁 (101-118).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.s.dendai.ac.jp/labs/hokura/>

6. 研究組織

(1) 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