

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660072

研究課題名(和文)細菌による金属ナノ粒子合成機構の解明と太陽電池層への応用

研究課題名(英文) Mechanism of metal nanoparticle synthesis in bacteria and its application to solar cells

研究代表者

三原 久明 (Mihara, Hisaaki)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：30324693

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)：細菌の金属ナノ粒子生成機構を解明し、太陽電池用半導体微粒子材料として利用可能なCdS、CdSe、CdTeなどの金属ナノ粒子の合成法に応用することを目指した。細菌におけるテルル酸還元機構について解析するとともに、システインを脱硫する酵素であるシステインデスルフラゼを常温常圧下での効率的な金属ナノ粒子合成反応へと応用した。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to clarify the mechanism of metal nanoparticle formation in bacteria and to apply it to the synthesis of CdS, CdSe, and CdTe nanoparticles, which can be used as materials for solar cells. We analyzed the tellurate reduction mechanism in bacteria and applied a cysteine desulfurase enzyme to the effective synthesis of metal nanoparticles under mild conditions.

研究分野：応用微生物学・酵素学

キーワード：金属ナノ粒子 酵素

1. 研究開始当初の背景

金属をナノ粒子化すると、融点、結晶構造、光学特性、磁気特性、触媒能などにおいて、バルク体にはない新たな特性や機能が発現する。このような現象はサイズ効果や表面効果と呼ばれ、金属ナノ粒子を利用することで従来製品の高機能化や全く新たな機能を付与することが可能となる。そこで、金属ナノ粒子は近年注目を集め、電池、センサー、光学材料、医療材料、生体分子標識タグ等、幅広い様々な分野で既に利用されており、今後その用途はさらに拡大するものと予想される。特に、次世代エネルギーとして期待が高まっている太陽光発電分野においては、太陽電池用半導体微粒子材料として、CdTe、CdS、CdSe、Ag 等のナノ粒子に対する需要が高まっている。

本研究代表者らは、有毒な亜セレン酸・亜テルル酸に対して優れた耐性を有する *Cellulomonas* 属、*Bacillus* 属、*Pseudomonas* 属等の種々の細菌株を自然界より単離し、それらのセレン・テルルナノ粒子生成の分子メカニズムについて研究を進めている。これら細菌を用いたセレンナノ粒子の合成は、常温常圧、嫌気条件下で行われ、合成されたナノ粒子の粒径は比較的均一である。

2. 研究の目的

金属をナノ粒子化すると、バルク体にはない新たな特性や機能が発現する。微生物を利用した金属ナノ粒子の合成は、常温常圧下で行われるためエネルギー消費が少なく環境考慮型の無機材料合成技術である。本研究開発課題では、細菌の金属ナノ粒子生成機構を解明し、太陽電池用半導体微粒子材料として利用可能な CdTe、CdS、CdSe、Ag などの金属ナノ粒子の合成法に応用することを目指した。これにより、従来の金属ナノ粒子合成方法で課題となっている、粒径制御、エネルギー消費、環境負荷物質に関する諸問題の解決に繋がると期待される。金属ナノ粒子の生成に関わる生体分子・遺伝子を明らかにし、ナノ粒子生成能を強化したりコンビナント株を構築し、常温常圧下での効率的な金属ナノ粒子合成反応へと応用する。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌におけるテルル酸還元機構の解明

微生物における亜テルル酸還元に関しては、膜結合型硝酸還元酵素、細胞内チオレドキシン・グルタチオン系やキノンプールの関与など、複数の例が報告されている。一方、テルル酸還元については大腸菌でモリブドプテリン含有酵素の関与が示唆されるのみであり、その詳細なメカニズムはわかっていない。そこで、大腸菌の一遺伝子欠失株コレクションである Keio コレクション株を用いて、テルル酸還元に関わるタンパク質の解析を行った。

(2) 酵素法による CdS/CdSe ナノ粒子の合

成

ハイテク産業用半導体微粒子材料として、CdS、CdSe、SnSe、ZnS、ZnSe、PbSe 等のカルコゲニド(第16族のS、Se、Te)金属ナノ粒子に対する期待が高まっている。金属ナノ粒子の従来の合成法は、膨大なエネルギー消費を伴う物理・化学的手法が主流であり、酵素利用による環境考慮型ホワイトバイオテクノロジーを適用した例は国内外を通じて皆無である。本研究代表者らはこれまでに、呼吸・光合成などに必須な金属クラスター補因子である鉄硫黄クラスターの生合成を担う酵素の研究を行い、顕著な成果を挙げてきた。この経験から、鉄硫黄クラスター生合成系酵素をカルコゲニド金属ナノ粒子の合成に応用する斬新な着想に至った。鉄硫黄クラスター生合成系酵素から供給される硫黄(および同族のセレン)はカルコゲニド金属ナノ粒子合成に適した化学形態であると考えられる。システインデスルフラゼ(IscS)はピリドキサル5'-リン酸(PLP)依存性酵素であり、L-システインの脱硫黄反応によりFe-Sクラスターの生合成において硫黄供給を担う。本酵素の反応機構において、基質である遊離L-システインに由来する硫黄がIscSの活性中心に位置するシステイン残基(Cys328)に結合し、ペルスルフィド中間体(IscS-Cys328-S-SH)を生じる。ペルスルフィド中間体は、IscUをはじめとする硫黄キャリアータンパク質に転移され、IscAをはじめとする酵素群の働きによりモリブドプテリンやチアミン、ピオチンなどの鉄硫黄コファクターの生合成に利用される。本研究では、IscSの触媒反応特性に着目し、L-システインとCd²⁺を基質として酵素反応を用いた新たなCdSナノ粒子合成法について検討した。IscSはL-セレノシステインを基質とたセレン元素の転移反応も触媒することから、CdSeを含む様々な金属を対象としたナノ粒子の合成も試みた。

4. 研究成果

(1) 大腸菌におけるテルル酸還元機構の解明

Keio コレクション全3812株を対象とし、テルル酸還元に伴い生じる黒色沈殿の生成を指標とし、テルル酸還元能を欠失した遺伝子欠損株の選抜を行った。その結果、8種の遺伝子(*ynbA*、*ydaS*、*yjeB*、*yidH*、*moeA*、*paaG*、*pdxY*、*yjbB*)がテルル酸還元に関与することが示唆された。野生株をテルル酸含有TSB培地で培養し、還元されたテルル酸の量を継時的に測定した。その結果、還元されたテルル酸の量は継時的に増加することが分かった。一方、上記8種の遺伝子の欠損株をテルル酸含有TSB培地で24h培養し、テルル酸の還元はほぼ認められなかった。本実験で用いたテルル酸濃度(0.5mM)では野生株、8種の欠損株ともに、生育の障害は見られなかった。野生株と8種の欠損株によるセレン酸、亜セレン酸の還元について調べた結果、いずれの

欠損株もセレン酸還元能を欠失していることがわかった。また、欠損株の亜セレン酸還元量が野生株に比べ31%~46%減少した。また、本実験で用いたセレン酸、亜セレン酸濃度(0.5 mM)においても、野生株、8種の欠損株ともに生育の阻害は見られなかった。テルル酸還元能欠失株として選出された8種の遺伝子欠損株は、テルル酸だけでなく、セレン酸の還元能も欠失していた。このことより、テルル酸還元はセレン酸還元と共通した還元機構に依存するのではないかと考えられる。セレン酸還元に関与するタンパク質として、モリブデンコファクター、Fe-Sクラスターを含むYnfEFが報告されている。本研究において、テルル酸還元機構との関与が示された遺伝子によりコードされるタンパク質の役割を調べたところ、8種の内4種がFe-Sクラスター合成に関与しており、テルル酸およびセレン酸の還元Fe-Sタンパク質が関与することが示唆された。以上より、YnfEFがセレン酸還元に加えて、テルル酸還元も担っている可能性が考えられる。本実験で選出された遺伝子欠損株においては、Fe-Sクラスター合成障害により、YnfEFが正常に機能せず、テルル酸、セレン酸還元能が欠失したのではないかと考えられる。

(2) 酵素法によるCdS/CdSe ナノ粒子の合成

大腸菌 JW2514 を宿主とし、His-tag 融合タンパクとして大腸菌由来 IscS を高発現させ、Ni-NTA カラムを用いて精製した。本酵素とL-システインをCdCl₂存在下で反応させ、励起波長350 nmにおける蛍光スペクトルを測定した。その結果450 nm付近に強い蛍光ピークが観測され、L-システイン濃度や反応時間に応じた蛍光ピーク波長の変化が認められた。動的散乱法(DLS)を使用して粒径を測定した結果、大きな粒子を形成しているサンプルほど高波長側に蛍光ピークを持つことがわかった。また反応産物について透過型電子顕微鏡観察(TEM)およびエネルギー分散型X線分析(EDS)を行った。これらの結果からIscSを用いた酵素反応によりCdSナノ粒子を合成されること示し、反応条件により異なる粒径の粒子を合成できることを明らかにした。鉄硫黄タンパク質合成経路の一つであるISC経路において、IscSペルスルフィド中間体が転移されるIscUが粒子合成に与える影響について調べた。IscUのみでは粒子を形成する活性を持たないが、IscSと共存させることによりIscS単独反応時に比べ、より短時間で強い蛍光を発する粒子が形成されようになった。この影響が、IscU添加によりSの放出量が増加したためか、IscUの何らか別の作用によるものかを調べるため、IscS単独条件とIscS、IscU共存条件の二つの反応のS放出量が等しくなるように酵素量を定め、その粒子合成について比較した。IscS、IscU共存条件ではIscS単独条件と比べ、S放出量が同じであっても生成粒子の蛍光

ピークは10 nm以上高波長側にシフトし、蛍光強度も強くなる。この結果とIscUを加えると短時間で粒子が形成されることから、IscSに比べIscUからCd²⁺へのペルスルフィド中間体の転移が起こりやすく、高い効率でCdSナノ粒子が合成されることが示唆された。さらに、基質をL-システインからL-セレノシステインに変えて実験を行った結果、波長542 nmに強い蛍光ピークが検出され、CdSeと推定される粒子が合成された。本反応では、反応時間が長くなるにつれ蛍光ピークは波長500 nmから540 nmに高波長側へのシフトが認められた。また、IscSの硫黄受容体であるIscUの添加による合成の影響を調べた結果、IscUを添加することにより蛍光ピークは添加しない溶液と比べ高くなるが、添加量が増えるにつれ蛍光ピーク値は低くなり、波長530 nmから500 nmに低波長側へシフトしていった。一方で、合成を行う際、条件により溶液に沈殿が生じて蛍光が見られなくなる現象や時間経過とともに蛍光が弱まる傾向が確認された。そのため、合成した粒子の蛍光を維持する条件の検討を行った。分散剤としてメルカプトエタノールを添加した場合、蛍光は弱まるが、時間経過による蛍光の減少は抑えられた。

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 8件)

1. Tani, Y., Kimura, K., and Mihara, H. (2016) Purification and properties of 4-methyl-5-hydroxyethylthiazole kinase from *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **80**, 514-517, 査読有, 10.1080/09168451.2015.1104239
2. Tani, Y., Omatsu, K., Saito, S., Miyake, R., Kawabata, H., Ueda, M., and Mihara, H. (2015) Heterologous expression of L-lysine α -oxidase from *Scomber japonicus* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the recombinant enzyme. *J Biochem* **157**, 201-210, 査読有, 10.1093/jb/mvu064
3. Tani, Y., Miyake, R., Yukami, R., Dekishima, Y., China, H., Saito, S., Kawabata, H., and Mihara, H. (2015) Functional expression of L-lysine α -oxidase from *Scomber japonicus* in *Escherichia coli* for one-pot synthesis of L-pipecolic acid from DL-lysine. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 5045-5054, 査読有, 10.1007/s00253-014-6308-0
4. Equar, M. Y., Tani, Y., and Mihara, H. (2015) Purification and Properties of Glycine Oxidase from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of nutritional science and vitaminology* **61**, 506-510, 査読有, 10.3177/jnsv.61.506
5. Tani, Y., Yamashita, Y., Saito, S., and Mihara, H. (2014) Effects of sugars and salt on the production of glycosphingolipids in *Mariannaea*

- elegans. *Trace Nutr. Res.* **31**, 37-44, 査読有,
6. Imai, T., Kurihara, T., Esaki, N., and Mihara, H. (2014) Glutathione contributes to the efflux of selenium from hepatoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1376-1380, 査読有, 10.1080/09168451.2014.918487
7. Hidese, R., Mihara, H., Kurihara, T., and Esaki, N. (2014) Global identification of genes affecting iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *J Bacteriol* **196**, 1238-1249, 査読有, 10.1128/JB.01160-13
8. Fukuyama, S., Mihara, H., Miyake, R., Ueda, M., Esaki, N., and Kurihara, T. (2014) Characterization of a thermostable 2,4-diaminopentanoate dehydrogenase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1. *J Biosci Bioeng* **117**, 551-556, 査読有, 10.1016/j.jbiosc.2013.11.002

〔学会発表〕(計 31 件)

1. 梅村晃弘, 戸部隆太, 田島寛隆, 三原久明. *Bacillus* sp. NTP-1 株由来マンガンカタラーゼ様タンパク質の機能解析. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター (北海道), 2016 年 3 月 30 日
2. 山内美咲, 青木志帆, 近藤和貴, 佐藤大起, 戸部隆太, 三原久明. *Pseudomonas putida* 由来 D-リジントランスポーターの基質結合タンパク質の解析. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター (北海道), 2016 年 3 月 29 日
3. Jahan, M. I., Tobe, R., and Mihara, H. Characterization of a novel putative porin of the metal-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. Institute for Chemical Research International Symposium 2016, ICR, Kyoto University (Japan), Mar. 7, 2016
4. Kido, A., Tobe, R., and Mihara, H. Properties of aspartate aminotransferase from the thermophilic alkaliphilic bacterium *Thermobacillus composti*. Institute for Chemical Research International Symposium 2016, ICR, Kyoto University (Japan), Mar. 7, 2016
5. 綾田真人, 戸部隆太, 田島寛隆, 三原久明. システインデスルフラゼを用いた CdS ナノ粒子の酵素的合成. 日本農芸化学会関西支部第 493 回講演会, 京都大学楽友会館 (京都府), 2016 年 2 月 6 日
6. 松崎佑樹, 杉山慧, 高本奈々, 戸部隆太, 谷泰史, 三原久明. *Geobacter sulfurreducens* におけるマルチヘムセレンタンパク質の機能解析. BMB2015, 神戸国際展示場(兵庫県), 2015 年 12 月 3 日
7. 清水敦貴, 波北悟, 戸部隆太, 田村隆, 三原久明. 細菌におけるセレノリン酸合成酵素へのセレン基質供給系の解析. BMB2015, 神戸国際展示場 (兵庫県), 2015 年 12 月 2 日
8. 佐藤大起, 戸部隆太, 近藤和貴, 谷泰史, 三宅良磨, 川端潤, 三原久明. *Pseudomonas putida* におけるアミノ酸異化および D-リジ

- ン異化オペロンの解析. BMB2015, 神戸国際展示場 (兵庫県), 2015 年 12 月 2 日
9. 紀戸彩加, 戸部隆太, 谷泰史, 三原久明. 好熱好アルカリ性細菌 *Thermobacillus composti* のアスパラギン酸アミノ基転移酵素の機能解析. BMB2015, 神戸国際展示場 (兵庫県), 2015 年 12 月 2 日
10. Mihara, H. Characterization of a novel putative porin of the metal-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. The 5th International Selenium Seminar (ISS2015), Moscow-Yaroslavl (Russia) Sep. 23, 2015
11. 波北悟, 戸部隆太, 清水敦貴, 田村隆, 三原久明. セレノリン酸合成酵素の基質供給系の解析. 2015 年度酵素補酵素研究会, 福井 AOSSA (福井県), 2015 年 7 月 10 日
12. 紀戸彩加, 戸部隆太, 谷泰史, 三原久明. 好熱菌アミノ酸アミノ基転移酵素の解析. 2015 年度酵素補酵素研究会, 福井 AOSSA (福井県), 2015 年 7 月 10 日
13. 田島寛隆, 山際恭平, 大内田竜大, 山本紘資, 名田イサナ, 谷泰史, 斎藤茂樹, 峯元高志, Prakash, N. T., 三原久明. インドセレン蓄積地帯の土壌より単離した *Cellulomonas* sp. D3a の亜セレン酸還元特性. 第 26 回日本微量元素学会学術集会, 北海道大学 (北海道), 2015 年 7 月 4 日
14. 三原久明. 細菌におけるセレン・テルルの代謝. 第 42 回日本毒性学会学術年会, ホテル日航金沢 (石川県), 2015 年 7 月 1 日
15. 片岡三和, 谷泰史, 三原久明. 糸状菌 *Neurospora crassa* におけるセラミド生合成関連遺伝子の機能解析. 第 32 回日本微量栄養素学会学術集会, 京都リサーチパーク (京都府), 2015 年 5 月 30 日
16. 片岡三和, 山下泰典, 谷泰史, 三原久明. *Neurospora crassa* におけるセラミド代謝酵素遺伝子ホモログの生理的役割. 第 62 回日本生化学会近畿支部例会, 立命館大学 BKC (滋賀県), 2015 年 5 月 16 日
17. 西田亮, 安間友香理, 田島寛隆, 斎藤茂樹, 谷泰史, 戸部隆太, 三原久明. 大腸菌一遺伝子欠失株 Keio コレクションを用いたテルル酸還元関連遺伝子の網羅的解析. 第 62 回日本生化学会近畿支部例会, 立命館大学 BKC (滋賀県), 2015 年 5 月 16 日
18. 谷泰史, 山下泰典, 三原久明. *Neurospora crassa* のフィトセラミド型中性スフィンゴ糖脂質合成に関わる新奇糖転移酵素 α -1,2-glucosyltransferase の同定. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学津島キャンパス (岡山県), 2015 年 3 月 27 日
19. 田島寛隆, 大場杏奈, 大内田竜大, 斎藤茂樹, 谷泰史, Prakash, N. T., 三原久明. 大腸菌変異株を用いたセレン微粒子生成関連遺伝子の探索. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学津島キャンパス (岡山県), 2015 年 3 月 27 日
20. 田島寛隆, 岡林拓弥, 山際恭平, 山本紘資, 名田イサナ, 斎藤茂樹, 谷泰史, 峯元高

志, Prakash, N. T., 三原久明. 高濃度セレン地帯土壌より単離した *Cellulomonas* sp. D3a の亜セレン酸還元特性. 第 4 回メタロミクス研究フォーラム, 武蔵野大学 (東京都), 2014 年 11 月 7 日

21. Mihara, H., Imai, T., Kurihara, T., and Esaki, N. Delivery of selenium to selenoprotein biosynthesis. The International Selenium Seminar 2014, Busan (Korea), October 17, 2014

22. 近藤和貴, 谷泰史, 三宅良磨, 川端潤, 三原久明. *Pseudomonas putida* KT2440 株における D-リジン異化代謝オペロンの解析. 第 87 回日本生化学会大会, 京都国際会館 (京都府), 2014 年 10 月 16 日

23. 田島寛隆, 安間友香理, 西田亮, 斎藤茂樹, 谷泰史, 三原久明. 大腸菌のテルル酸還元関連遺伝子の網羅的探索. 第 87 回日本生化学会大会, 京都国際会館 (京都府), 2014 年 10 月 16 日

24. 畠本奈々, 谷泰史, 杉山慧, 斎藤茂樹, 三原久明. 金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のマルチヘムセレンタンパク質が関与する電子伝達経路の解析. 特殊環境微生物セミナー2014, 名古屋大学 (愛知県), 2014 年 10 月 1 日

25. Esaki, N., Kurokawa, S., Omi, R., Hayashi, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Kurihara, T., and Mihara, H. Physiological role and reaction mechanism of selenocysteine lyase: unique vitamin B6 enzyme acting specifically on selenocysteine. The Fourth International Conference on Cofactor (ICC-04), Parma (Italy), August 27, 2014

26. Mihara, H., Tani, Y., Shinno, E., Sugiyama, S., Shimamoto, N., Zhang, W., Saito, S., Kurihara, T., and Esaki, N. The unique multiheme selenoprotein of the metal-reducing anaerobic bacterium *Geobacter sulfurreducens*. The Fourth International Conference on Cofactor (ICC-04), Parma (Italy), August 26, 2014

27. 三原久明, 今井岳志, 栗原達夫, 江崎信芳. 哺乳類細胞における亜セレン酸代謝. 第 25 回日本微量元素学会, 岡山大学 (岡山県), 2014 年 7 月 3 日

28. Equar, Y., Tani, Y., Saito, S., and Mihara, H. Characterization of glycine oxidase involved in thiamine biosynthesis of *Pseudomonas putida* KT2440. 日本ビタミン学会第 66 回大会, 姫路商工会議所 (兵庫県), 2014 年 6 月 14 日

29. 山下泰典, 谷泰史, 斎藤茂樹, 三原久明. 子囊菌類 *Mariannaea elegans* の中性スフィンゴ糖脂質に塩およびグルコースが与える影響. 第 31 回日本微量栄養学会学術集会, 関西大学 (大阪府), 2014 年 6 月 7 日

30. 名田イサナ, 山際恭平, 永野知哉, 田島寛隆, 斎藤茂樹, 谷泰史, Prakash, N. T., 三原久明. グラム陽性細菌のテルル酸還元に関わる遺伝子の同定. 日本農芸化学会関西支部例会第 484 回講演会, 京都府立大学 (京都府), 2014 年 5 月 24 日

31. 畠本奈々, 谷泰史, 杉山慧, 斎藤茂樹, 田島寛隆, 三原久明. 金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* のマルチヘムセレンタンパク質および関連タンパク質群の解析. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会, 京都産業大学 (京都府), 2014 年 5 月 17 日

〔図書〕(計 2 件)

1. Mihara, H., Kurihara, T., and Esaki, N. (2014) Selenocysteine lyase: Delivering selenium in biosynthetic pathway. in *Selenium in the Environment and Human Health*, CRC Press, 248, pp 181

2. 三原久明. (2014) 金属タンパク質. in 地球を救うメタルバイオテクノロジー (山下光雄, and 清和成 eds.), 成山堂, 242, pp 207-215

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/skbiot/mihara/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原 久明 (MIHARA, Hisaaki)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号: 30324693

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

峯元 高志 (MINEMOTO, Takashi)
立命館大学・理工学部・教授
研究者番号: 80373091

田島 寛隆 (TAJIMA, Hiroataka)
立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・専門研究員
研究者番号: 40642468

谷 泰史 (TANI, Yasushi)
立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・専門研究員
研究者番号: 90583295