The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	微生物によるセレン化カドミウムナノ粒子の合成に関する研究
Author(s)	綾野, 裕之
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52203
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士学位論文

微生物によるセレン化カドミウムナノ粒子の合成に関する研究

綾野　裕之

2015 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻

目次

緒論 1

第 1 章　微生物による量子ドット合成に関する既往研究 4

第 1 節　緒言 4

第 2 節　**CdTe**、および **ZnSe** ナノ粒子の微生物合成に関する既往研究 4

第 3 節　**CdSe** ナノ粒子の微生物合成に関する既往研究 6

第 4 節　要約 15

第 2 章　**CdSe** ナノ粒子合成細菌の集積および単離 16

第 1 節　緒言 16

第 2 節　実験材料および方法 16

第 3 節　実験結果 21

第 4 節　考察 28

第 5 節　要約 30

第 3 章　***Pseudomonas* sp. RB** 株の生理学的特徴づけおよびドラフトゲノム解析 31

第 1 節　緒言 31

第 2 節　実験材料および方法 31

第 3 節　実験結果 33

第 4 節　考察 38

第 5 節　要約 41

第 4 章　**RB** 株の培養条件が **CdSe** ナノ粒子合成に及ぼす影響 42

第 1 節　緒言 42

第 2 節　実験材料および方法 42

第 3 節　実験結果 44

第 4 節　考察 50

第 5 節　要約 55

総括ならびに結論 56
参考文献 59
謝辞 68
本研究に関する報文 70

緒論

ナノ粒子はナノサイズの超微細な粒子のことである。一般に、固体粒子はナノサイズ化されることで、形態・構造的物性 (EPR 効果 (Enhanced permeation and retention effect) や結晶構造の変化など)、熱的物性 (融点の低下)、電磁気的物性 (誘電率の増大や常磁性体化)、力学的物性 (機械強度の増大や超塑性現象) 、光学的物性 (プラズモン吸収や蛍光発色) などにおいて、バルク体 (目に見える大きさの塊) とは異なった性質を示すようになる (細川ら, 2004)。このような特性から、ナノ粒子は、ライフサイエンスや医療、環境、エネルギーなど様々な分野で応用されており (Kaur and Gupta, 2009; Lee and Alvarez, 2010; Li *et al*., 2011; Lohse *et al*., 2012)、我が国の産業競争力を強化する重要な先端的基盤技術である。

その代表例である量子ドットは、粒径 1–10 nm の範囲において粒径に応じた蛍光発色を示す半導体ナノ粒子である (Kumar *et al*., 2007)。量子ドットの一種であるセレン化カドミウム (CdSe) は、カドミウム (Cd: 原子番号 48、原子量 112.411) とセレン (Se: 原子番号 34、原子量 78.96) が 1:1 の元素比で結合した六方晶系ウルツ鉱構造をとる II-VI 族半導体であり、光学デバイスや発光、電気電子工学、触媒化学など幅広い分野で応用されている (Trindade, 2001)。また、粒径 4–10 nm において紫外光を照射した場合の発光が可視光領域を全てカバーできるため (Fig. 1)、近年では生体内の細胞や分子の挙動を視覚的に解析するバイオイメージングなどの生命科学分野での利用も期待されている。

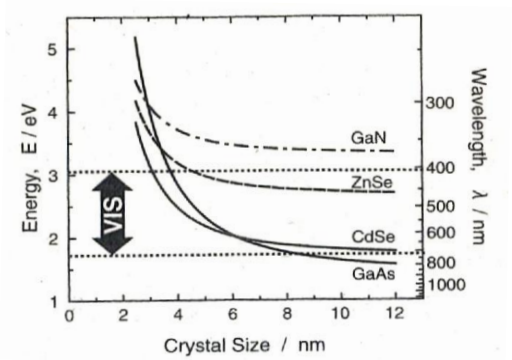

Fig. 1. Shifts of fluorescene wavelength according to the crystal size of compound semiconductors (野瀬ら, 2007).

ナノ粒子の合成法としては、比較的短時間に意図した粒径や形状が得られる物理化学的な量産技術が主流であるが (細川ら, 2003)、この方法は多大なエネルギーの投入や高価で有害な薬品の使用を必要とするという欠点を有している。例として挙げた CdSe を含む半導体ナノ粒子の合成方法の現在の主流はホットソープ法であり、トリオクチルホスフィンオキサイドやトリオクチルホスフィン、ジメチルカドミウムなどの有害な薬品や溶媒を必要と

し、また 300°C という高温の反応条件が必要である (Murray *et al*., 1993)。そのため、環境保護と持続的発展の観点から、より環境調和型のナノ粒子合成法の開発が求められている。

そのような可能性をもつナノ粒子合成法として近年注目されているのが、微生物の金属代謝作用を利用するメタルバイオテクノロジー (吉田ら, 2009) である。メタルバイオテクノロジーによるナノ粒子合成は、1) 高価で有害な薬品を使用しないため、低コストで環境調和型である (Narayanan and Sakthivel, 2010; Li *et al*., 2011)、2) 反応が室温で起こるため、省エネルギー型である (Mohanpuria *et al*., 2008)、3) 微生物という細胞レベルの合成系を用いるため、小さな粒径のナノ粒子の大量生産に適する (Klaus *et al*., 1999) といった利点を有しているうえ、合成されたナノ粒子は、4) 表層がタンパク質で覆われることで、生物への適合性が高くなる (Yan *et al*., 2014)、5) 比較的高い触媒活性と大きな比表面積を持ち、酵素や金属塩との密着性が向上する (Li *et al*., 2011)、といった応用上有用な特性をももつことが知られており、現在までに様々な微生物を用いた種々のナノ粒子の合成法が研究されている (Mohanpuria *et al*., 2008; Talebi *et al*., 2010; Narayanan and Sakthivel, 2010; Lloyd *et al*., 2011)。

微生物による CdSe ナノ粒子の合成に関する研究としては、本研究の成果を除くと、5 件の報告がある。これらについては次章で詳述するが、いずれも微生物により亜セレン酸 (Kumar ら (2008) は例外的に塩化セレン(IV)を用いているが、いずれも 4 価セレンである) を還元し、その還元産物をカドミウムと反応させることで CdSe ナノ粒子を合成するものである。しかし、これらで用いられている微生物はいずれも、純粋分離された既知の微生物を利用したものであり、特に CdSe ナノ粒子の合成のために検索されたものではない。よって、CdSe の合成触媒として必ずしも有効な微生物であるとはいえなかった。例えば、Kumar ら (2007) が用いた真菌 と Park ら (2012) が用いた遺伝子組換え大腸菌を除けば、これまでに用いられてきた微生物はカドミウム耐性を持たないため、CdSe ナノ粒子の合成工程は、亜セレン酸を微生物に還元させた後にカドミウムを添加する 2 段階の反応系 (two-vessels) で構成しなくてはならないという制約があった。また、Kumar ら (2007) が用いた真菌 (真核微生物) は、1 段階の反応系 (one-vessel) での CdSe 合成が可能であるものの、細菌に比べて反応速度が遅いのが欠点である。そこで、増殖や代謝反応が速い細菌の中から、カドミウム耐性と亜セレン酸還元能を有するものをスクリーニングすれば、one-vessel で CdSe を合成できる系を構築できるものと考えられる。加えて、細菌に対しては遺伝子操作技術が進んでいるため、合成に関わる酵素の高発現などの改良を行うことで、CdSe 合成をさらに効率化・合理化し得るというメリットも想定できる (Karbasian *et al*., 2008)。

本研究は、上記の要件を満足するような、one-vessel での CdSe ナノ粒子を合成可能な低コストで環境調和型の合成プロセスの開発を目指し、それに資する細菌株のスクリーニングとその CdSe ナノ粒子の合成特性の特徴づけを行うことを目的とした実験検討を行ったものであり、以下の全 4 章で構成されている。第 1 章では、CdSe 等の量子ドットの微生物合成に関する既往研究を概観し、現在までの知見と課題について整理した。第 2 章では、亜セレン酸還元能とカドミウム耐性の両方を有し、one-vessel で CdSe ナノ粒子を合成可能な

細菌の集積・単離を行った。第 3 章では、第 2 章で単離された細菌の生理学的特徴づけ、およびドラフトゲノム解析を行い、本菌の利用に必要な知見を得るとともに、CdSe ナノ粒子合成機構についても考察した。第 4 章では、本菌による CdSe ナノ粒子の合成に及ぼす培養条件の影響を明らかにし、好適な合成法を確立した。また、これらの研究で得られた成果と今後の展望を、総括ならびに結論で取りまとめた。

第 1 章　微生物による量子ドット合成に関する既往研究

第 1 節　緒言

緒論で述べたように、微生物を用いることで、低コストで環境調和型の CdSe ナノ粒子合成プロセスを実現できることが期待できる。しかしながら、CdSe を含めた半導体ナノ粒子の微生物合成に関する研究事例は少なく、合成プロセスや合成メカニズムについての検討は決して十分とは言えない。そこでまず本章では、CdSe ナノ粒子を主とした量子ドットの微生物合成に関する既往研究を整理し、低コストで環境調和型の CdSe ナノ粒子合成プロセスの構築に向けての課題を明らかにした。ここでは特に、CdSe とそれと同じく II-VI 族半導体であり、微生物合成を行う上で金属の還元と重金属耐性の両方の問題が関わるセレン化亜鉛 (ZnSe) およびテルル化カドミウム (CdTe) に着目して既往研究の概観を行った。これらはともに量子ドットとして使われるが、その結晶構造は CdSe が六方晶系ウルツ鉱構造、ZnSe と CdTe が立方晶系閃亜鉛鉱構造であるという点で異なっている。

第 2 節　CdTe、および ZnSe ナノ粒子の微生物合成に関する既往研究

Table. 1.1 に CdSe、ZnSe、CdTe の微生物合成に関する報告をまとめている。まず、ZnSe の微生物合成の事例については、現在まで Pearce ら (2008) の報告が見られるのみである。ここでは、嫌気性細菌 *Veillonella aypica* を用いて亜セレン酸を元素態セレン、さらにセレン化水素にまで還元し、菌体を除去した上清と塩化亜鉛 ($ZnCl_2$) を反応させる two-vessel で ZnSe ナノ粒子を合成している。一方、CdTe に関しては現在 4 報が報告されているが、テルル源として Syed と Ahmad (2013) の研究では塩化テルル(IV)が、その他の研究では亜テルル酸が使われ、カドミウム源にはすべて塩化カドミウム ($CdCl_2$) が使われている。合成メカニズムとしては、テルルの還元産物とカドミウムが、重金属耐性に関わる機構により結合するもの (Monrás ら (2012) は亜テルル酸の還元機構にしか触れていない) と考察されているが、Bao ら (2010a, b) の 2 つの報告では、亜テルル酸の還元のために高価な還元剤として知られる水素化ホウ素ナトリウム ($NaBH_4$) を加えており、微生物の役割はテルル還元産物とカドミウムを結合させることに限定されている。一方、Monrás ら (2012) は微生物にグルタチオン合成酵素を高発現させることで亜テルル酸を還元し、また、Syed と Ahmad (2013) は微生物由来のアントラキノンが亜テルル酸の還元に関わっていると考察しており、これらは微生物反応のみでの CdTe 合成といえる。また、Bao ら (2010a) の研究を除いて、これらの研究のすべては two-vessel での半導体ナノ粒子合成となっている。

Table 1.1. List of microorganisms that synthesize CdSe, ZnSe, and CdTe nanoparticles

Nanoparticle	Microorganism	Domain	Metal salts as material	Synthesis System	Location	Size [nm]	Method of particle extraction/purification	Remarks	Reference
CdSe	*Fusarium oxysporum*	Eukaryote	$SeCl_4$, $CdCl_2$	one-vessel	Extracellular	9–15 (11±2)	Distilled ethanol treatment	The first report of CdSe quantum dots biosynthesis	Kumar *et al*., 2007
CdSe	*Saccharomyces cerevisiae* BY4	Eukaryote	Na_2SeO_3, $CdCl_2$	two-vessel	Intracellular	2.69±0.07 3.04±0.20 4.37±0.17 6.34±0.79	Ultra sonication followed by filtering with centrifugal filter devices	Size control synthesis by culturing time	Cui *et al*., 2009
CdSe, ZnSe	*Veillonella atypica*	Bacteria	Na_2SeO_3, $Cd(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$, $ZnCl_2$	two-vessel	Extracellular (cell free)	2–4 (CdSe) 3–6 (ZnSe)	Size selective precipitation procedure using nonsolvent	Anaerobic synthesis	Pearce *et al*., 2008
CdSe	*Escherichia coli* K12 (recobinant)	Bacteria	SeO_2, $CdCl_2{\cdot}2.5H_2O$	one-vessel	Intracellular	4.99±0.69 5.01±0.89 3.51±0.24	Homogenization in original wash buffer followed by filitration	Extraneous heavy metal binding protein, size controled synthesis by conentration of Se and Cd	Park *et al*., 2012
CdSe	*Escherichia coli* GIM1.223	Bacteria	Na_2SeO_3, $CdCl_2$	two-vessel	Intracellular	8–11	Glass beading and ultra sonication followed by filitration	Optimization of synthesizing condition	Yan *et al*., 2014
CdTe	*Saccharomuces cerevisiae*	Eukaryote	Na_2TeO_3, $CdCl_2{\cdot}2.5H_2O$	one-vessel	Extracellular	2–3.6	Centrifugation (for cells removal cells) and dialysis (for rediual chemicals removal)	$NaBH_4$ was used to reduce tellurite	Bao *et al*., 2010a
CdTe	*Escherichia coli*	Bacteria	Na_2TeO_3, $CdCl_2$	two-vessel	Extracellular	2–3.2	Centrifugation (for cells removal cells) and washing with 50% ethanol (for rediual chemicals removal)	$NaBH_4$ was used to reduce tellurite	Bao *et al*., 2010b
CdTe	*Escherichia coli* (recombinant)	Bacteria	Na_2TeO_3, $CdCl_3$	two-vessel	Intracellular	5.98 4.8	Lysozyme teatment and sonication (for cells disruption) and SDS* treatment (for membrane solbilization)	Overexpressing the *gshA* gene involoving glutathione biosynthesis	Monrás *et al*., 2012
CdTe	*Fusarium oxysporum*	Eukaryote	$TeCl_4$, $CdCl_2$	two-vessel	Extracellular	15–20	Filtration	$NaBH_4$ was not used to reduce tellurite	Syed and Ahmad, 2013

*SDS = sodium dodecyl sulfate

第 3 節　CdSe ナノ粒子の微生物合成に関する既往研究

3.1 *Fusarium oxysporum* による合成 (Kumar *et al*., 2007)

Kumarらは、菌類の一種である*F. oxysporum*をPDA斜面培地 (potato 200 g/L, dextrose 20 g/L, agar 20 g/L) を用いて25°Cで7日間培養し、その菌糸を100 mLのMGYP液体培地 (malt extract 3 g/L, glucose 10 g/L, yeast extract 3 g/L, peptone 5 g/L) を用いてさらに26±1°C、200 rpmで96時間振盪培養した。この菌糸を遠心分離により回収し、蒸留水で洗浄した後、反応液 ($CdCl_2$ 1 mM、$NaNO_2$ 5 mM、$SeCl_4$ 1 mM) に接種し、室温、200 rpmの振盪条件のもとで96時間培養することで、CdSeナノ粒子をone-vesselで合成した。反応終了後、CdSeナノ粒子を含む固相を蒸留エタノール (2:1 v/v) で処理することで、菌体由来と思われる非結合性の夾雑タンパク質を除去・粗精製し、粒子の特徴づけを行った。

この合成系において、反応液が赤褐色 (reddish brown) を呈し (Fig. 1.1A)、また、紫外可視分光光度計によるスペクトル分析により、370 nmを中心波長とした明確な表面プラズモン共鳴がみられたことから、CdSeナノ粒子が合成されたとしている。また、培養液については270–280 nmで吸収スペクトルが確認されたが、これは細胞外培養液中のCdSe合成に関わる還元酵素に由来するのではないか、と筆者らは推測している。また、得られた粒子に対し励起波長370 nmにおける蛍光スペクトルを調べた結果、440 nmを中心とした発光帯がみられた。さらに、Si(111) 基板に粗精製ナノ粒子懸濁液を滴下被覆することでCdSeナノ粒子の薄膜を作成し、X線回折 (XRD) およびX線光電子分光法に供した結果、前者では、既報のCdSeのミラー指数と一致するピークが見られたが (ただし、参考文献として挙げているものはいずれもCdSに関するものであった)、後者では、反応液中にはCd, Se C, O, N, Na以外のピークは見られなかった。また、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察の結果、合成されたCdSe粒子の粒径は9–15 nm (平均11±2 nm) であった (Fig. 1.1B)。

この報告は微生物によるCdSe量子ドット合成に関する最初の報告である。ここでは既知の真菌である*F. oxysporum*を用いているが、この微生物を選んだ理由については触れられていない。

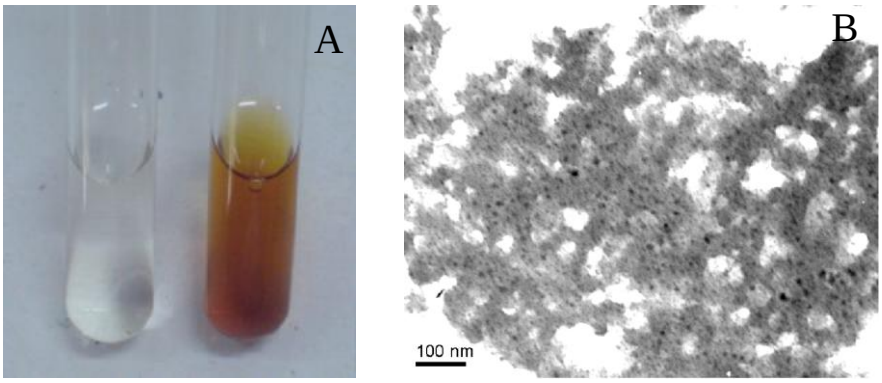

Fig. 1.1. (A) Test tubes containing $CdCl_2$ and $SeCl_4$ solution before (test tube on the left) and after reaction with the fungal biomass (test tube on the right), and (B) Bright field TEM micrograph image of CdSe nanoparticles formed by reaction of $CdCl_2$ and $SeCl_4$ with the fungal biomass after 96 h (Kumar *et al*., 2007).

3.2 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 による合成 (Cui *et al*., 2009)

Cui らは、塩化カドミウムは酵母の亜セレン酸還元を阻害するが、適切なタイミングで添加すれば、亜セレン酸還元産物と、カドミウムへの防御機構として生じるビス(グルタチオナト)カドミウム (bis(glutathionato)cadmium, $Cd(GS)_2$) を反応させ、CdSe ナノ粒子を生成させることができるのではないかと考えた。そこで、まず酵母 *S. cerevisiae* BY4742 を YPD 培地 (yeast extract 10 g/L, tryptone 20 g/L, glucose 20 g/L) にて定常期まで培養し、さらに 5 mM の亜セレン酸ナトリウム (Na_2SeO_3) を添加して 30°C で 24 時間培養した。この時、細胞内物質を抽出し、高速液体クロマトグラフィー/誘導結合プラズマ質量分析 (HPLC-ICP-MS) に供したところ、セレノシスチンやセレノメチオニンなどの亜セレン酸の還元によって生じる有機セレン化合物の生成が認められた。その後、遠心分離により菌体を回収し、1 mM の $CdCl_2$ を含む YPD 培地に植菌し、さらに 30°C で撹拌培養することで、two-vessel で CdSe 量子ドットを合成することに成功した。生産された CdSe 量子ドットは細胞内に蓄積されたため、遠心分離により菌体を回収し、0.02 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) に懸濁した後、ガラスビーズによるビーズビーティング処理 (425–600 μm, 20 min) および超音波破砕処理 (30 min) により細胞を破砕した。さらに遠心分離により細胞断片を分離し、上清を遠心沪過 (分画分子量: 100 kD) すること により CdSe 量子ドットを細胞から分離・回収した。

共焦点レーザー走査型顕微鏡観察の結果、培養開始後 6–8 時間で細胞内から蛍光が観察され始めた。このとき細胞内の粒子の粒径は 2.69±0.07 nm で、単位格子定数は Xie ら (2005) が CdSe のそれに非常に近いものとして報告している数値と一致していた。精製された粒子に対してエネルギー分散型 X 線分析 (EDS) を行った結果、粒子は Cd と Se から構成され、そのモル比は 1:1.28 であることが示された。一方、亜セレン酸またはカドミウムを含まな

いコントロール系で培養した細胞には粒子が見られなかった。また、この研究では Table 1.2 に示すように、培養時間の経過に沿って、CdSe 粒子の粒子径、蛍光波長、蛍光色が変化することが報告されている。

Table 1.2. The chronological changes of CdSe quantum dots' size, emission wavelength, and color of fluorescence synthesized by yeast (Cui *et al*., 2009)

Incubating time [h]	12	24	40
Size [nm]	3.04±0.20	4.37±0.17	6.34±0.79
Emission wavelength [nm]	520	560	670
Color of fluorescence	Green	yellow	Red

この研究を通じて、Cui らは酵母による CdSe 合成機構についても一定の考察を行っている。亜セレン酸存在下で培養した酵母の細胞内からセレノシスチンとセレノメチオニンが検出されたことから、これらとこれらの前駆体であるセレノシステインをそれぞれ塩化カドミウムおよびグルタチオン (GSH) と窒素雰囲気下で混合 (事前に $Cd(GS)_2$ が生成することを確認) したところ、セレノシステインを用いた系のみで CdSe 結晶の生成が確認された。この理由について、彼らはセレノシステインのみがセレノール (R-SeH) であり、生理的 pH 条件下ではアニオン ($R\text{-}Se^-$) の状態で存在するため、重金属類と強く結合し、CdSe 量子ドット合成に用いられたものと考察している (Fig. 1.2)。

この研究は、合成される CdSe 量子ドットの粒径および発する蛍光波長が反応時間によって制御可能である点と、CdSe の前駆体となる有機セレン化合物を *in vitro* 実験によって推定している点で非常に興味深い。一方で CdSe の合成法としては、酵母による亜セレン酸還元過程と、CdSe 合成過程が分離されている two-vessel 反応となっている点で制約がある。

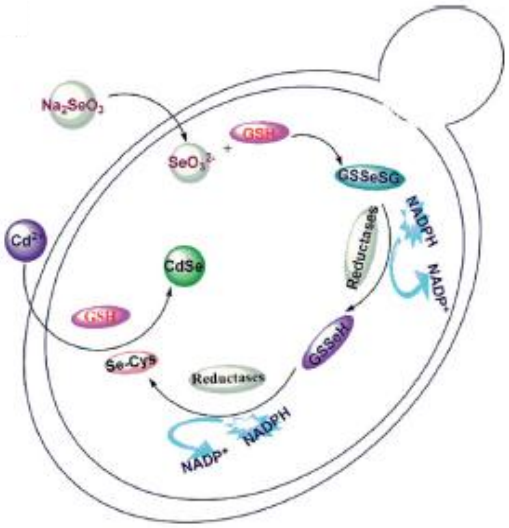

Fig. 1.2. Route for unnatural biosynthesis of fluorescent CdSe quantum dots by *S. cerevisiae* (Cui *et al*., 2009) .

3.3 *Veilonella atypica* による合成 (Pearce *et al*., 2008)

Pearce らは、嫌気性細菌である *V. atypica* により亜セレン酸を還元し、生じたセレン化物と $ZnCl_2$ または過塩素酸カドミウム ($Cd(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$) と反応させることで、ZnSe および CdSe のナノ粒子を合成した。

まず *V. atypica* を対数増殖後期まで培養し、次に菌体を Na_3SeO_3 (5 mM) を電子受容体、酢酸ナトリウム、ギ酸ナトリウム、または乳酸ナトリウム (いずれも 75 mM) を電子供与体、アントラキノン-2,6-ジスルホン酸二ナトリウム (Disodium anthraquinone-2,6-disulfonate, AQDS) を外因性の細胞外酸化還元メディエーターとして含む MOPS (3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid) バッファーに懸濁し、休止細胞系として 3 日間静置した。また、ヘッドスペースは窒素ガスまたは電子供与体としての水素ガスで満たした。その結果、水素ガスを電子供与体としたときに最も効率的な亜セレン酸還元がみられ、26 時間以内に全量が元素態セレンに還元され、培養液が元素態セレン特有の赤色を示した。その後、全水溶性セレン濃度が上昇し、培養液が赤色から黄色に変色したことから、元素態セレンが可溶性のセレン化物 (Se(-II)) に還元されたことが示唆された。反応液を広域 X 線吸収微細構造 (EXAFS) に供したところ、このセレン化物はセレン化水素であると考えられた。この培養液をフィルターろ過して菌体を除いたろ液に、無酸素状態の $ZnCl_2$ 水溶液 (pH 11.5) または $Cd(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 水溶液 (pH 11.2) 、および安定剤としてグルタチオンまたは 2-メルカプトエタノールを添加することで、ZnSe または CdSe の合成が行われた。

合成された ZnSe のコロイドは酸素および窒素雰囲気下で不安定であることが分かり、95°C で 1 時間熱処理しても、酸素雰囲気下では不安定 (粒子表面のチオール安定剤の分解により、蛍光を発さない沈殿物を生じる) なままであった。一方、CdSe は空気中の酸素に曝露しても安定であった。さらに 110°C で還流することでナノ粒子を成長させた結果、粒径 3–6 nm の ZnSe ナノ粒子と粒径 2–4 nm の CdSe ナノ粒子が得られ、CdSe ナノ粒子は EDS により平均 Cd:Se:S 比が 57:33:10 であることが明らかになった (Fig. 1.3)。また、合成された CdSe ナノ粒子と ZnSe ナノ粒子を蛍光分光分析に供したところ、それぞれ 512 nm と 368 nm にピークを持つ蛍光スペクトルが得られた。

この研究では上記 2 報と異なり、細菌を用いて CdSe 合成を行っているが、嫌気性であるためハンドリングが煩雑になり、培養過程と合成過程が異なる two-vessel 反応であるというのが制約である。

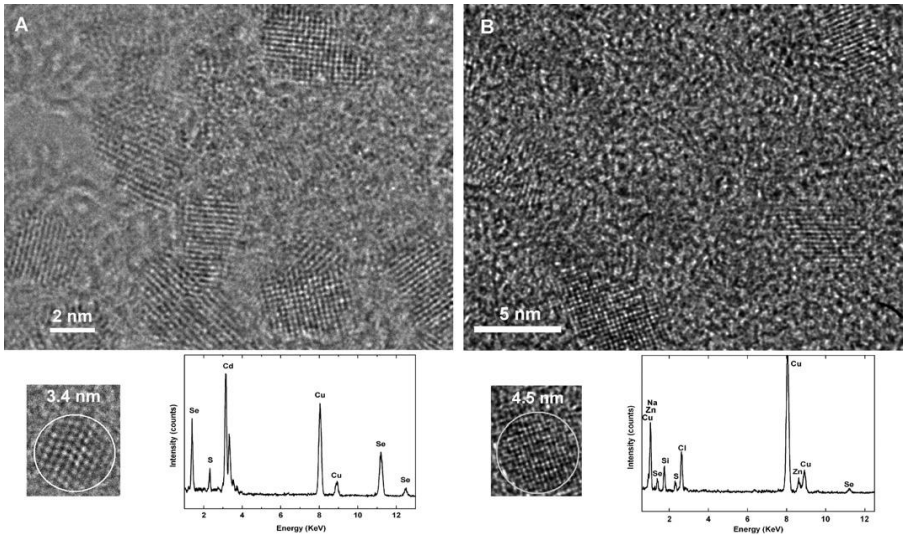

Fig. 1.3. HR-TEM micrographs and EDX spectra of (A) size-fractionated 2-mercaptoethanol-stabilized CdSe quantum dots with a Cd:Se:S ratio of 57:33:10 and (B) glutathione-stabilized ZnSe quantum dots. Insets show single quantum dots (Pearce *et al*., 2008).

3.4 遺伝子組換え大腸菌による合成 (Park *et al*., 2012)

Park らはメタロチオネイン (MT) やファイトケラチン (PC) のような重金属結合タンパク質が金属ナノ粒子の合成に利用できると考え、大腸菌 *Escherichia coli* DH5α に *Pseudomonas putida* KT2440 由来の MT (PpMT)、および *Alabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) 由来の PC 合成酵素 (AtPCS) の遺伝子を組み込むことで、CdSe をはじめとした種々のナノ粒子の合成を行った。

まず、彼らは大腸菌に PpMT 遺伝子または AtPCS 遺伝子を個別のベクターに組み込んだプラスミド DNA の片方または両方を導入した系と、これらの遺伝子を同一のベクターに組み込んだプラスミド DNA を導入した系 (MT&PC とする) を作製した。これらの株を、アンピシリンを含む Luria-Bertani (LB, tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L) 液体培地を用いて 37°C で振盪培養し、OD_{600} = 0.6 となったときに温度を 30°C に下げ、1 mL のイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えて導入遺伝子を発現させた。さらに 2 時間培養した後、塩化カドミウム 2.5 水和物 ($CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$) および二酸化セレン (SeO_2, 水溶液中では亜セレン酸の形態をとる) 水溶液をそれぞれ 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 mM となるように添加し、one-vessel で CdSe 合成を開始した。6–12 時間培養した後、遠心分離によって菌体を回収し、イオン交換水で 3 回洗浄した後、1 L の緩衝液 (urea 181.8 g/L, glycine 11.25 g/L, EDTA 0.37 g/L, and dithiothreitol 0.77 g/L) に再懸濁した。これを高圧ホモジナイザー (1000 bar) による処理に供し、8 μm 及び 0.1 μm 径のフィルターでろ過して、生成粒子を回収した。

各組換え大腸菌から回収された CdSe 量子ドットの蛍光強度を比較したところ、MT、PCS

両遺伝子を発現させると、各遺伝子を導入したベクターが個別であっても単一であっても、蛍光強度が約 4 倍になった。これは共発現により CdSe 合成効率が向上したためと、彼らは考察している。

TEM および高分解能透過型電子顕微鏡 (HRTEM) 観察の結果、組み込まれた重金属結合タンパク質遺伝子が MT か PC かによって合成された CdSe ナノ粒子のサイズや結晶構造に差が生じており、PpMT では 4.99±0.69 nm の斜方晶、AtPCS では 5.01±0.89 nm の立方晶、そして両遺伝子を単一のベクターで導入した系では 3.51±0.24 nm の立方晶が形成されたことが明らかになった (Fig. 1.4)。これは、重金属結合タンパク質の重金属との結合方式および粒子の組み立て機構の違いによるものであり、両タンパク質を発現させた場合は、より多様な粒子が相互作用的に合成されると考察している。また、合成された CdSe ナノ粒子の粒径が添加したカドミウム源およびセレン源の濃度によって変化しており (Fig. 1.5)、原料物質の濃度による粒径の制御が可能であると報告している。

この研究は、大腸菌に重金属結合タンパク質合成遺伝子を導入することでカドミウムの毒性による影響を軽減し、細菌による CdSe 量子ドットの one-vessel 合成を実現しているという点で新規性が高いものであり、また、セレン源およびカドミウム源の濃度による粒径制御が行えるという点も新たな知見として注目に値する。彼らの考える CdSe 合成機構は、カドミウムイオン (Cd^{2+}) とセレンイオン (Se^{2+}) が重金属結合タンパク質内で結合するというものである(Fig. 1.6)。ただし、本法による CdSe の合成速度や収率を高めるための培養条件の最適化といった視点からの検討は行われておらず、実用化のための評価が不十分なものといえる。

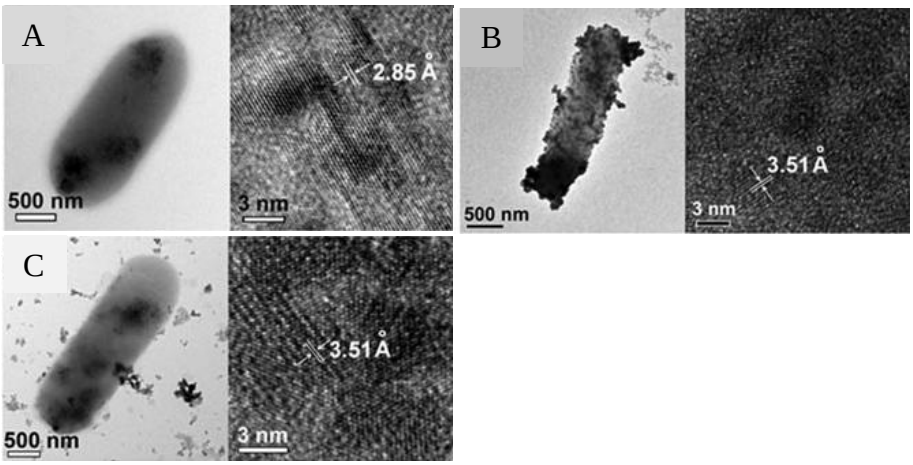

Fig. 1.4. TEM images of recombinant *E. coli* cells (expressing PpMT (A), AtPCS (B), and both AtPCS and PpMT with one plasmid (C)) synthesizing CdSe nanoparticles, and HRTEM images of the synthesized CdSe nanoparticles. All recombinant cells were incubated with 5.0 mM each of Cd and Se ions (Park *et al*., 2012).

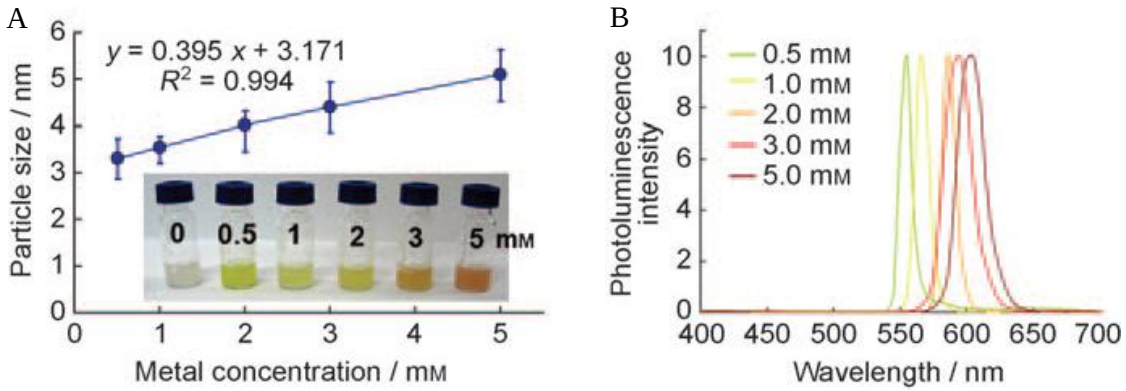

Fig. 1.5. A) Graph showing the correlation between the concentration of the Cd and Se ions solution (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, and 5.0 mm) and the size of the resulting CdSe nanoparticles with *E. coli* (MT&PC) cells. An image of the purified CdSe nanoparticless is shown in the inset. B) Fluorescence emission spectra of CdSe nanoparticles synthesized under the each concentration of the Cd and Se ions solution (Park *et al*., 2012).

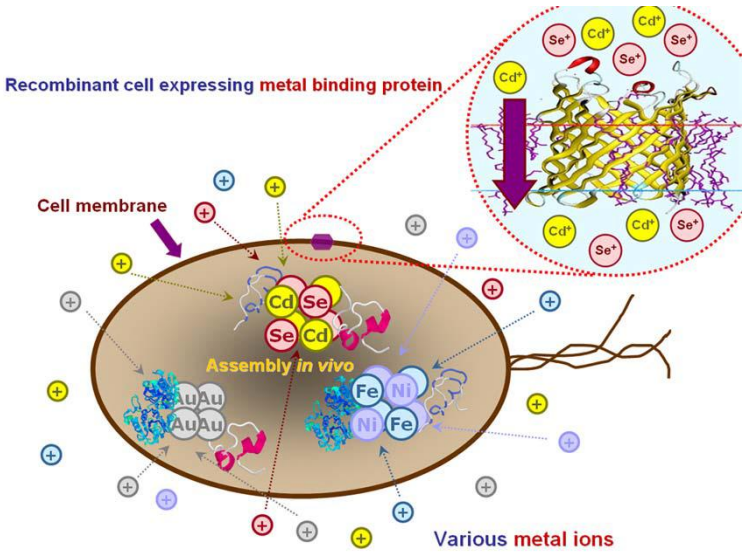

Fig. 1.6. Schematic diagram for in vivo synthesis of metal nanoparticles in recombinant *E. coli* cells. Protein and peptide shown represent MT and PC (Park *et al*., 2012).

3.5 大腸菌による合成 (Yan *et al*., 2014)

Yan らは大腸菌 *E. coli* (GIM1.223 = CMCC44102) を用いて two-vessel での CdSe 量子ドットの合成を行った。この研究では、セレン化物を生成する最初の工程での亜セレン酸の添加時期と濃度、添加後の培養時間、および CdSe を合成する 2 段目の反応系におけるカドミウム濃度と反応時間を検討している。

まず、LB 液体培地 (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L) にて大腸菌を好気的に培養し、各増殖フェーズ (対数増殖前期、対数増殖中期、対数増殖後期、定常期) で様々な濃度 (125, 250, 500, 1000, または 2000 μM) の亜セレン酸を添加し、0–12 時間培養した。その後、菌体を各濃度の塩化カドミウム (250, 500, 1000, または 1250 μM) を含む LB 培地に植菌し、暗条件で 4–32 時間培養することで、two-vessel での CdSe 合成を試みた。粒子の回収のため、菌体を遠心分離によって回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) を用いて 3 回洗浄した後、ガラスビーズによるビーズビーディング処理 (425–600 μm, 30 min) および超音波破砕 (10 min) によって菌体を破砕した。得られた懸濁液を遠心分離に供し、200 nm 径のフィルターを用いて菌体断片と不溶性の変性したタンパク質を除去後、さらに遠心ろ過によって 100 kD 以下の物質を除去することで CdSe 量子ドットを回収・精製した。

結果として、亜セレン酸添加時期は定常期、菌体をカドミウムを含む培地に移すまでの培養時間は 2 時間以上、亜セレン酸およびカドミウム濃度はそれぞれ 250 μM および 750 μM を添加して合成した CdSe 量子ドットから最も強い蛍光が得られた (Fig. 1.7A–D)。また、合成開始から 3 時間後から蛍光がみられるようになり、8 時間以降に強い蛍光が得られることが明らかとなった (Fig. 1.7E)。この条件で得られた CdSe の粒径は約 8–11 nm であり、オストワルド成長 (Gaponik *et al*., 2002) によって合成時間の経過とともに粒径の分布が広がった。この研究では、大腸菌による CdSe 合成機構を以下のように考察している。まず、亜セレン酸はグルタチオンによってセレノジグルタチオンに還元され、さらに NADPH 依存的にグルタチオセレノールに還元される。グルタチオセレノールはセレノシステインに変換され、これが塩化カドミウムとグルタチオンから生じる$(GS)_2Cd$ と反応して CdSe 量子ドットとなるというものである。

この研究は蛍光強度を指標に CdSe 合成条件を検討している点で新規である。ただし、CdSe 合成条件として、Cd や Se 濃度以外には、温度や pH といった基礎的な条件は検討されておらず、さらなる条件の最適化が望まれるうえ、蛍光強度以外では CdSe 合成効率に関わる定量的評価は行われていない。

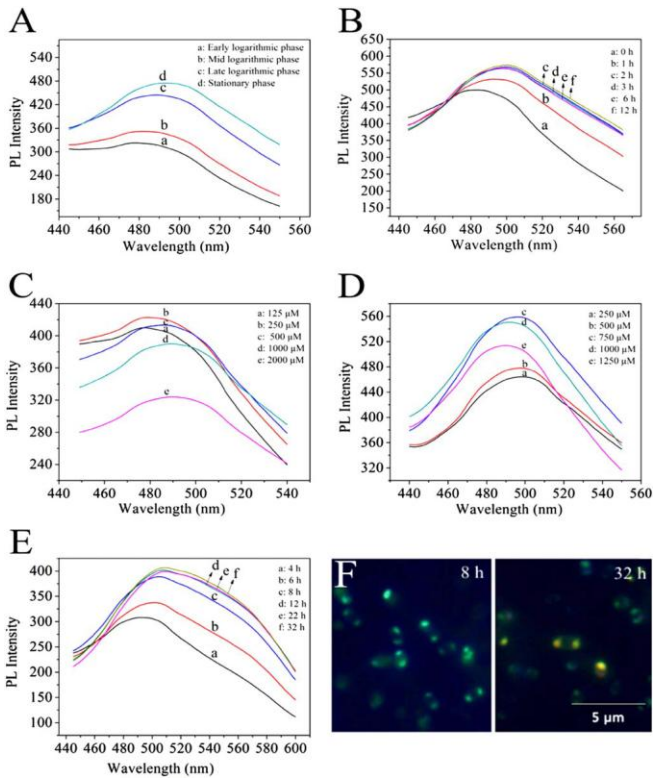

Fig. 1.7. (A) Fluorescence emission spectra of *E. coli* treated with different selenium feeding points. (B) Fluorescence emission spectra of *E. coli* cells incubated with selenium sources at stationary phase (SP) for different duration. (C) Fluorescence emission spectra of *E. coli* cells incubated with selenium sources at different concentrations for 2 h in SP. (D) Fluorescence emission spectra of *E. coli* cells treated with 250 μM 2h seleniumization in SP and cadmium source at different concentrations. (E) Fluorescence emission spectra of *E. coli* cells treated with 250 μM 2 h seleniumization in SP and different co-incubation durations with 750 μM $CdCl_2$. (F) Fluorescence microscopic images of *E. coli* cells treated with 250 μM 2 h seleniumization in SP and 750 μM cadmium source with different co-incubation durations (Yan *et al.*, 2014).

第 4 節　要約

本章では、量子ドットとして利用される化合物半導体である CdSe、ZnSe、および CdTe ナノ粒子の微生物合成に関する既往研究をまとめた。ここで取り上げた 9 報のうち、多くのものは真菌や酵母を用いており、代謝速度が速いとされる細菌として用いられたものは、*V. atypica* と大腸菌のみであるが、前者は嫌気性細菌であるためハンドリングが煩雑になり、また代謝速度は好気性微生物に比べて必ずしも早くないものと考えられる。また、Bao ら (2010a)、Kumar ら (2009)、および Park ら (2012) らの研究を除けば、半導体ナノ粒子合成プロセスは、微生物の培養過程と原料金属を加える合成過程が分かれた two-vessel 反応であり、より低コストな合成プロセスの構築のためには、one-vessel 反応での合成を検討することが望ましいものと考えられた。一方、 one-vessel 反応であっても、ナノ粒子が細胞内に合成される Intracellular 系の場合、細胞を破砕して粒子を回収する作業が必要となるという欠点がある。Yan ら (2014) の報告を除いては CdSe の合成条件の最適化という視点からの検討は行われていないことから、今後はプロセスの効率化に関する検討も重要といえる。また、合成のメカニズムについては、Cui ら (2009) が *in vivo* と *in vitro* の双方からの合成によりセレノシステインの関与という知見を提供し、Park ら (2012) は重金属結合タンパク質による合成が可能であることを示しているが、さらなる詳細は不明であり、今後の解明が待たれている。

第 2 章　　CdSe ナノ粒子合成細菌の集積および単離

第 1 節　緒言

緒論および第 1 章で述べたように、微生物の亜セレン酸還元能を利用した CdSe ナノ粒子の合成に関して行われたこれまでの研究は、すべて純粋分離された既知の微生物を利用したものであり、これらは特に CdSe ナノ粒子の合成のために検索されたものではないことから、必ずしも有効な CdSe 合成触媒であるとはいえない部分があった。例えば、Kumar ら (2007) と Park ら (2012) の報告を除けば、これまでに用いられてきた微生物はカドミウム耐性を持たないため、CdSe ナノ粒子の合成工程は、亜セレン酸を微生物に還元させた後にカドミウムを添加する 2 段階 (two-vessels)で構成しなくてはならないという制約があった。また、Kumar ら (2007) が用いたカドミウム耐性を有する微生物触媒は真核微生物 (真菌)であり、反応速度は細菌等の原核生物に劣るという欠点がある。そこで、真核生物に比べて増殖が速く、カドミウム耐性を有する細菌をターゲットとして、CdSe 合成能を示すものをスクリーニングすることができれば、より効果的な CdSe 合成系を構築できるものと考えられる。この戦略では、加えて、細菌は遺伝子操作技術が進んでいるため、CdSe ナノ粒子の合成のための新たな機能を付与することもより容易であるというメリットも想定できる。本章では CdSe ナノ粒子を 1 段階 (one-vessel) で合成することが可能であり、より発展的利用が有望な微生物をスクリーニングすることを目的として、亜セレン酸還元能とカドミウム耐性の両方を有する細菌を土壌中の微生物群から集積・単離することを試みた。

第 2 節　実験材料および方法

2.1 供試土壌

目的の細菌は亜セレン酸還元能およびカドミウム耐性を有している必要があるため、金属汚染が疑われる土壌を採取し、集積培養系の植種源とすることにした。本研究では、2009 年に兵庫県の海岸部の電化製品が不法投棄されていた場所の表層土壌、および金属精錬工場に隣接する公園の植え込みの表層土壌を採取した。

2.2 使用培地

無機塩培地 (K_2HPO_4 0.5 g/L、 NH_4Cl 1 g/L、 NaCl 0.05 g/L、 $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.01 g/L、 $CaCl_2$ 0.01 g、 Na_2SO_4 0.05 g/L、 H_3BO_3 0.06 mg/L、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1 mg/L、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.12 mg/L、 $ZnCl_2$ 0.07 mg/L、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025 mg/L、 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.015 mg/L、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.025 mg/L、 Bacto™ yeast extract (Becton, Dickinson and Co., NJ, USA) 0.02 g/L、pH 7.0) に、炭素源として乳酸ナトリウム (終濃度 20 mM)、真核生物のタンパク質合成阻害剤として cycroheximide (終濃度 100 mg/L)、カドミウムがリン酸塩として沈殿するこ

とを防ぐためにキレート剤としてニトリロ三酢酸 (終濃度 0.216 g/L) を添加したものを L-BSM1 (Lactate-containing Basal Salt Medium 1) 培地と称し、基礎培地とした。これに亜セレン酸ナトリウム (Na_2SO_3)、および塩化カドミウム 2.5 水和物 ($CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$) をそれぞれ終濃度 1 mM となるように添加したものを LCdSe-BSM1 とし、集積培養に用いた。同様に、L-BSM1 培地に塩化カドミウム 2.5 水和物 (終濃度 1 mM) 加えたものを LCd-BSM1 培地、亜セレン酸ナトリウム (終濃度 1 mM) を加えたものを LSe-BSM1 培地と表記し各種試験に用いた。なお、cycroheximide の溶媒はエタノールであり、L-BSM1 にはエタノールが 1%含まれていることになる。また、カドミウムが硫化物として沈殿することを抑制するため、培地成分中の硫黄源としての硫酸塩濃度を細胞合成に必要な最小限量に設定している。本研究で用いる寒天培地は Agar 濃度を 1.8%とした。また、cycroheximide およびエタノールを含まず、50 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) で pH を 7.0 に調整したこれらの培地をそれぞれ、L-BSM2、LCdSe-BSM2、LCd-BSM2、LSe-BSM2 と表記する。

単離後の菌株の平板培養には cycroheximide エタノール溶液を添加していない LCdSe-BSM1 寒天培地を用いた。単離株の前々培養には LB (tryptone 10 g/L、yeast extract 5 g/L、sodium chloride 10 g/L; Difco^{TM}LB broth、Miller) 培地に塩化カドミウム 2.5 水和物を 1 mM となるように添加したもの (以下、Cd-LB 培地) を、前培養には cycroheximide エタノール溶液を添加していない LCd-BSM1 培地を使用した。特に断らない限り、生理特性等を調べる本培養試験には L-BSM1 培地にエタノールを 1% (v/v)濃度になるように添加したものを使用した。

2.3 CdSe ナノ粒子合成細菌の集積培養

50 mL 容バイアル瓶に LCdSe-BSM1 培地を 20 mL 分注し、0.5 wet-g の土壌サンプルを植種してシリコ栓で蓋をし、30°C の暗所で静置し、集積培養 1 回目とした。培養液がセレンの還元産物による赤系統の呈色、および沈殿形成を示したことを確認した後、新しい LCdSe-BSM1 培地に 5%量の培養液を植え継いだ。同様の操作を繰り返すことで継代培養を行い、CdSe ナノ粒子合成細菌の集積培養系の構築を試みた。

2.4 分析方法

2.4.1 亜セレン酸、水溶性カドミウム、および水溶性セレンの分析

培養液の 850 μL を採取し、遠心分離 (21,900 × *g*, 4°C, 10 min) により固液分離を行い、上清の 750 μL を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター (DISMIC Disposable syringe filter unit: Cellulose acetate, ADVANTEC, Tokyo, Japan) にてろ過して得られたろ液を、亜セレン酸および水溶性カドミウム濃度の分析に供した。分析をするまでろ液は 4°C で保存した。

亜セレン酸はイオンクロマトグラフィー (HIC-20A SUPER システム, Shimadzu, Kyoto, Japan) を使用して測定した。分析条件は以下のとおりである。検出器: CDD-10Asp、カラム: Dionex Ionpac AS4A-SC、ガードカラム: Dionex Ionpac AG4A-SC、溶離液: Na_2CO_3 (3.0 mM)、

温度: 45°C、流量: 1.0 mL/min。

水溶性カドミウムは、HNO_3 を 10%になるようサンプルに加えたものを、さらに 10 倍に希釈し、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES; SPS7800, SII Nanotechnology) にて 214.438 nm の吸収波長強度を測定することで分析した。

水溶性カドミウムと同様に希釈したものを ICP-AES により 196.023 nm の吸収波長強度を測定することで、全水溶性セレンを分析した。

2.4.2 セレン固形画分の分析

固形セレンの分析には、採取した培養液 1 mL 中の固形分を遠心分離により回収し、トリポリリン酸ナトリウム (5 mg/L) にて 3 回洗浄したものを用いた。上清を 900 µl 除去し、濃硝酸と濃硫酸を 10:0.5 の割合で混合した溶液を 900 µl 添加した後、100°C のウォーターバスにて 10 分間煮沸することで酸消化を行った。得られた溶液を超純水にて希釈し、ICP-AES により分析を行った。

2.4.3 水溶性セレン化物の分析

Baesman ら (2009) の方法に準じて水溶性のセレン化物 (Se^{2-}) の分析を行った。採取した培養液を遠心分離し、上清を孔径 0.45 µm のメンブレンフィルターによりろ過したろ液に等量の 50 mM 塩化銅(II)・2 水和物溶液を混合することで水溶性のセレン化物をセレン化銅 (CuSe) として凝集させた。得られた固形分を超純水にて 3 回洗浄後、2.4.3 と同様に酸消化を行った後、ICP-AES により分析を行った。

2.4.4 集積培養系により合成された粒子の回収および元素分析

遠心分離 (21,900 × *g*, 4°C, 10 min) にて培養液から固形分を回収後、超純水で 3 回洗浄し、超音波細胞破砕機 (Vibra cell VCX-130, SONICS & MATERIALS, USA) を用いた超音波処理 (65W, 40 min) にて菌体を十分に破砕した。超音波処理後の全固形分を遠心分離によって回収後、0.5%のドデシル硫酸ナトリウム存在下で Proteinase K を 10 µg/mL となるように添加し、37°C の条件で 24 時間振盪し、酵素処理を行った。酵素処理後の反応液中の固形分を超純水で 3 回洗浄し、孔径 0.2 µm のメンブレンフィルター (DISMIC Disposable syringe filter unit: Cellulose acetate, ADVANTEC) にてろ過して得られたろ液中の粒子を遠心分離にて回収後、真空乾燥させたものを元素分析に供した。元素分析は走査型電子顕微鏡 (SEM; ERA-8800FE, ELIONEX) 付属のエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX; Phoenix, EDAX) を用いて加速電圧 10kV にて行った。試料は走査型電子顕微鏡中の試料台に直接カーボンテープにて固定、もしくは銅メッシュグリッド (エラスチックカーボン支持膜 STEM100Cu 仕様, 応研商事) 上に固着させたものをカーボンテープにて固定し、Au/Pd 蒸着を行うことにより導電性を付与し、固形分表面の元素分析に供した。

2.5 集積系内微生物叢の解析

集積系内の微生物叢の解析には真正細菌の 16S rDNA を対象とした T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いた。植え継ぎ終了後の集積培養液 2 mL を採取し、ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE) を用い、添付のプロトコルに従って DNA を抽出した。16S rDNA の増幅は、フォワードプライマーの 5’末端を 6-FAM (phosphoramidite fluorochrome 5-carboxyfluorescein) で蛍光標識したプライマーセット[27F-FAM (5’-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3’), 1392R (5’-ACG GGC GGT GTG TAC A-3’)]を用いて行った。PCR は反応系を 50 μL (*Taq* DNA polymerase (TaKaRa Ex *Taq*™) 1.5U, 10 × *Ex Taq* Buffer (TaKaRa) 5 μL, dNTP 200 μM each, forward primer 1 μL, reverse primer 1 μL, DNA template 5 μL) とし、サーマルサイクラー (Mastercycler standard, Eppendorf, Germany) を用いて行った。反応は熱変性 10 min. (95°C) 後、熱変性 1 min. (95°C)、アニーリング 1 min. (57°C)、伸長 3 min. (72°C)、を 1 サイクルとして 30 サイクル、最後に伸長 10 min. (72°C)を行う Hot Start PCR 法により行った。反応は各 DNA template につき 2 連で行い、計 100 μL の増幅産物を得た。増幅産物の 5 μL を 1.5% (w/v) アガロースゲル (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, U.S.A.) を用いて 20 分間電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド溶液 (0.5 μL/mL) で 20 分間染色し、紫外線照射により 16S rDNA の増幅を確認した。残りの 95 μL を SUPEREC™ PCR (TaKaRa) を用いて添付のプロトコルに従って精製し、制限酵素 *Hha* I (切断部位 : GCG/C) による消化 (20 μL 系 ; *Hha* I 20U (TaKaRa), 10 × M Buffer 2 μL, 精製 DNA 2 μL) を 37°C の条件で 5 時間以上行った。消化物の 1 μL を 12 μL の HiDi formamid (Appied Biosystems, U.S.A.) および 0.5 μL の GeneScan™2500 ROX™ Size Standard (Applied GeneScan, Applied Biosystems) と混合し、熱変性 (3 min, 95°C) の後 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によるレーザー蛍光検出キャピラリ電気泳動に供し、蛍光末端制限断片 (T-RFs) パターンを得るとともに、付属の断片長解析ソフトウェア (GeneScan, Applied Biosystems) により断片長解析を行った。電気泳動は 47 cm × 50 μm のキャピラリカラムを用いて POP-4 (Applied Biosystems) 中で行った。

2.6 細菌の単離および同定試験

継代 31 回目の培養液を LCdSe-BSM1 寒天培地に塗布し、28°C 暗所で 7 日間培養した。得られたコロニーを LCd-BSM1 寒天培地に塗抹培養し、これを繰り返すことで純化した。得られたコロニーに対して、単一菌であることの確認を行うため、2.5 の方法に準じて DNA を抽出し、真正細菌の 16S rDNA を対象とした T-RFLP 法に供した (制限酵素 : *Hha* I, *Hae* III (切断部位:GG/CC (20 μL 系; *Hae* III 20U (TaKaRa), 10 × M Buffer 2 μL, 精製 DNA 2 μL)), *Msp* I (切断部位:C/CGG (20 μL 系; *Msp* I 20U (TaKaRa), 10 × T Buffer 2 μL, 0.1% BSA 2 μL, 精製 DNA 2 μL))。

単離された菌株の生理特性は、Cowan and Steel の一次鑑別試験 (Cowan and Steel, 1973) に準じ、LB 寒天培地上に画線培養後 2 日目のコロニーを用いて光学顕微鏡観察、グラム染色性試験、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、グルコース酸化・発酵試験 (OF テスト) を

行って調べた。また、非腸内細菌用グラム陰性菌同定キット「API 20NE」(BIO MÉRIEUX) を用いた生理特性試験も併せて行った。

さらに、2.5 に記す方法に準じて DNA を抽出し、PCR を用いて 16S rDNA の増幅を行って塩基配列を決定し、分類学的同定を行った。なお、PCR 反応に用いる forward primer には 27F (5'-AGA GTT TGA TC TGG CTC AG-3') を使用した。電気泳動にて 16S rDNA の増幅を確認した後、得られた増幅産物をテンプレートとしてタカラバイオ株式会社に解析を委託し、16S rDNA の塩基配列を決定した。得られた配列を相同性検索ソフト FASTA によるホモロジーサーチに供し、相同性の高い菌種を明らかにした。

2.7 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察は、植継ぎ終了後の培養液を遠心分離と超純水によって 3 回洗浄し、回収した細胞に対して行った。洗浄・回収した細胞は超純水に再懸濁し、さらに適宜超純水で希釈したものを銅メッシュ上に滴下し、自然乾燥により固着させ TEM 観察に供した。

また合成粒子の透過型電子顕微鏡観察および元素分析のための試料として、1.5 mL 容マイクロチューブに培養液 1 mL を採取し、遠心分離と超純水で 3 回洗浄した菌体を超音波処理 (130 W, 5 min) 後、固形分を遠心分離 (21,900 × *g*, 4°C, 10 min) により沈降させ、超純水で洗浄した。この操作を 3 回行った後、固形分に 0.5%ドデシル硫酸ナトリウムと 10 μg/mL Proteinase K (GE healthcare UK, Buckinghamshire, UK) を加えて 1 mL の反応系とし、55°C の条件で 24 時間振盪して酵素処理を行った。酵素処理後の固形分を遠心分離と超純水で 3 回洗浄し、1 mL の超純水に懸濁させ、粒子が液中で十分に分散する程度にまで 130 W に設定した超音波細胞破砕機で超音波処理を行い、銅メッシュグリッド上に滴下し、自然乾燥により固着させたものを TEM 観察に供した。TEM 観察ならびに元素分析には EDX 付属の H-7650 (HITACHI, Tokyo, Japan) を用い、加速電圧 100kV にて行った。

2.8 分離菌株の CdSe 合成試験、亜セレン酸還元試験、およびカドミウム耐性試験

分離株の 1 コロニーを 50 mL 容バイアル瓶に 20 mL 分注した Cd-LB 培地に接種し、24 時間好気条件において培養した (前々培養)。その後、50 mL 容バイアル瓶に 20 mL 分注した LCd-BSM1 培地に前々培養液を 5%量植菌し、12 時間好気条件で培養した (前培養)。前培養液の菌体を遠心分離 (20,000 × *g*, 4°C, 5 min) にて回収し、滅菌生理食塩水 (0.85% NaCl) で洗浄後、CdSe 合成試験では LCdSe-BSM1 培地、亜セレン酸還元試験では LSe-BSM1 培地に初期 OD_{600} が 0.02 となるように懸濁し、静置条件 (30°C) で培養した。ここで、セレンを含まない対照系として、LCd-BSM1 培地に単離株を懸濁した系を用いた。また、既知のカドミウム耐性細菌を用いた対照系として、*Ralstonia metallidurans* CH34 (Mergesy *et al*., 1978) も用意し、同様に培養した。経時的に培養液を採取し、2.4 の方法に準じて CdSe 合成試験では亜セレン酸と水溶性カドミウムを、亜セレン酸還元試験では亜セレン酸に加えて全水溶性

セレン、固形画分中セレン、水溶性セレン化物を経時的に測定した。亜セレン酸還元試験では、複数の試験用バイアル瓶を用意し、各サンプリング時に 1 瓶の培養液全量を回収して各種分析に供した。

カドミウム耐性試験では、コロニーを 50 mL 容バイアル瓶に分注した L-BSM2 培地に接種し、24 時間好気条件で前々培養した。前々培養液を 300 mL 容三角フラスコに分注した L-BSM2 に 5%量植菌して 12 時間好気的に前培養した。前培養液を 0–5 mM の塩化カドミウム 2.5 水和物を含む LCd-BSM2 培地に初期 OD_{600} が 0.02 となるように懸濁し、ロータリーシェーカーで回転振盪培養 (120 rpm) した。ここで、LCd-BSM2 培地には、ニトリロ三酢酸をカドミウム 1 mM につき 0.216 g/L の割合で添加した。

本試験以降、特に断らない限り試験は全て 3 連で行った。

第 3 節　実験結果

3.1 CdSe ナノ粒子合成細菌の集積

Fig. 2.1 に電化製品不法投棄場所から採取した土壌を接種した集積培養系における亜セレン酸、および水溶性カドミウム濃度の経日変化を示す。継代は 408 日間の間に 46 回行われた。亜セレン酸の除去は初期から安定していたが、カドミウムの除去は不安定であった。継代 10 回目以前の各培養ではカドミウムの水相からの除去量は 0.5–0.6 mM 程度であったのに対し、継代 10 回目以降になると、0.65–0.7 mM のカドミウムが亜セレン酸と同調的に安定して除去されるようになった。

Fig. 2.2 に継代 7 回目 (集積 49–58 日目) 、33 回目 (278–288 日目) 、 および 39 回目 (338–348 日目) の集積培養液中の亜セレン酸と水溶性カドミウムの濃度の変化を詳細に示す。継代 7 回目では、亜セレン酸と水溶性カドミウムはほぼ同じ速度で水相から除去され、回分培養 6 日目 (集積 55 日目) には全量が除去された (Fig. 2.2A)。しかし、継代 33 回目では両者の除去速度は 7 回目に比べて低下し 4 日目 (集積 282 日目) の時点で亜セレン酸の除去量は 0.53 mM であったのに対し、水溶性カドミウムの除去量はわずか 0.11 mM に留まった。ただし、6 日目には亜セレン酸は全量除去され、水溶性カドミウムも速やかに除去されるようになった (Fig. 2.2B)。継代 39 回目では、亜セレン酸は 2 日のラグをおいて速やかに除去された。水溶性カドミウムの除去は 33 回目と同様に、緩速と急速の 2 相に分かれる傾向がみられるようになった (Fig. 2.2C)。

Fig. 2.3 に継代 22 回目の集積培養液の写真を示す。集積培養液は暗赤～赤褐色を示すようになった。

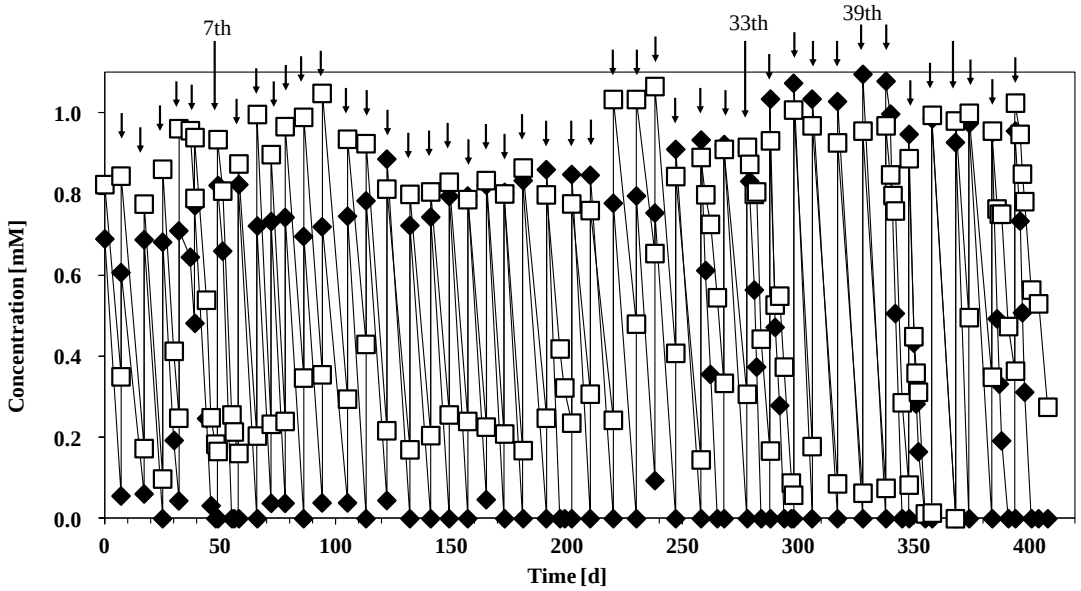

Fig. 2.1. Time courses of the selenite and cadmium ion concentrations in the water phase of the enrichment culture. Symbols: closed diamonds, selenite; open squares, cadmium ion. Arrows indicate the transfer of culture into new medium.

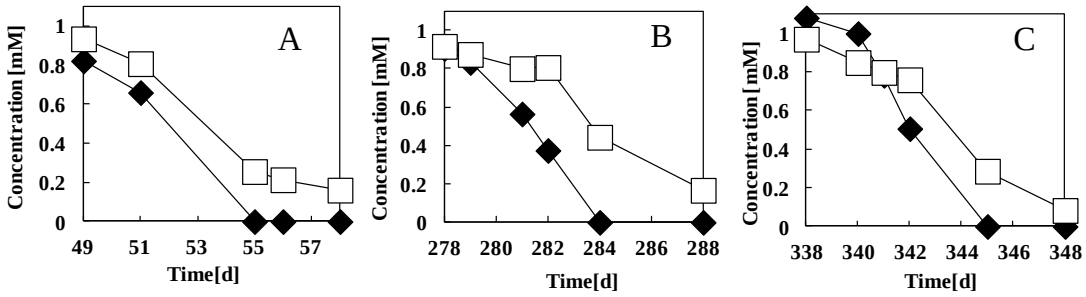

Fig. 2.2. Time courses of selenite and cadmium ion concentrations in the 7th, 33rd, and 39th batch cultures in the enrichment culture. Symbols: closed diamonds, selenite; open squares, cadmium ion.

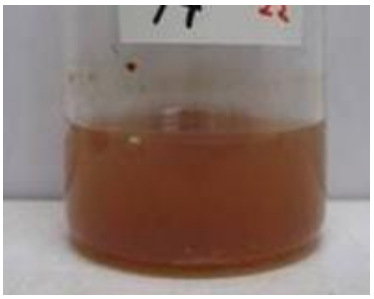

Fig. 2.3. The enrichment culture after 22th batch culture after 10-days cultivation.

3.2 集積系で合成されたナノ粒子の元素分析

Fig. 2.4 に継代 6 回目と 37 回目の集積培養液から回収した固相分の元素分析結果を示す。亜セレン酸、および水溶性カドミウムがともに 0.77 mM 除去された継代 6 回目の培養液中の固相分では、セレンとカドミウムの顕著なピークがみられる視野もあったが (Fig. 2.4A)、セレンのピークがみられる一方でカドミウムのピークがみられない視野も多く確認された (Fig. 2.4B)。一方、亜セレン酸とカドミウムの除去が安定した継代 37 回目の固相分では、視野によらずセレンとカドミウムのピークが普遍的にみられるようになった (Fig. 2.4C)。

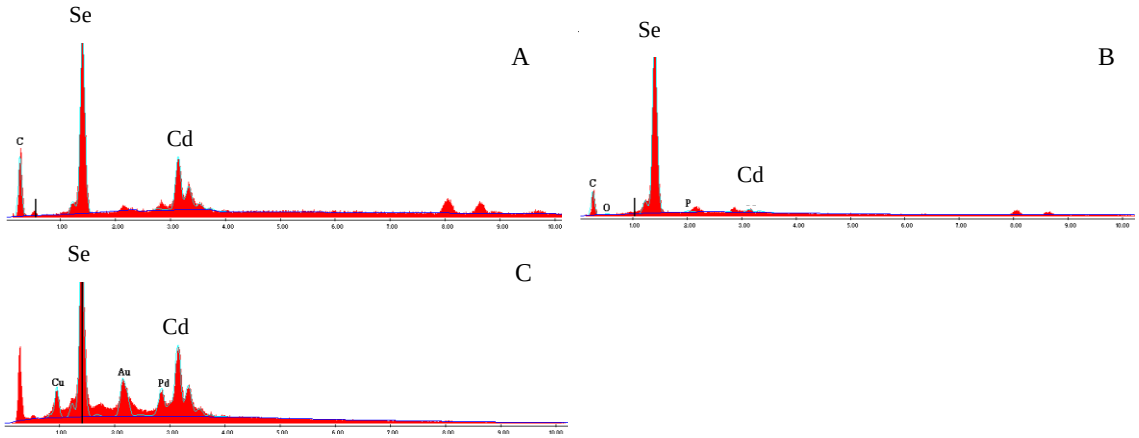

Fig. 2.4. EDS spectra of the particles recovered from the 6th (A, B) and the 37th (C) batch cultures in the enrichment culture. Spectra A and B show different image sites of the same sample.

3.3 集積系の菌叢解析および CdSe ナノ粒子合成細菌の単離

Fig. 2.5 に継代 31 回目の集積培養液に対し、真正細菌の 16S rDNA を対象とした制限酵素 *Hha*I 消化による T-RFLP 解析を行った結果を T-RF パターンとして示している。150–151bp の断片長に主要なピークがみられた他、566–567bp にも小さなピークが検出された。

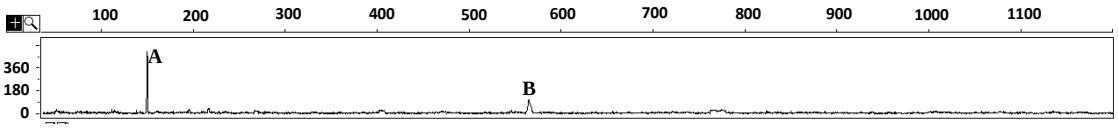

Fig. 2.5. *Hha* I–digested T-RF profiles of 16S rRNA gene in the 31st batch culture of the enrichment culture. Major peak A corresponds to strain RB. Minor peak B corresponds to strain M.

次に、継代 31 回目の培養液を LCdSe-BSM1 寒天培地に塗布し、28°C のもと暗所で 7 日間培養した後、形成されたコロニーを観察した。Fig. 2.6 に示すように、培養液と同様に赤

褐色に呈色する直径約 5 mm のコロニーと、赤黄色に呈色する直径 0.5 mm の程度コロニーが現れたので、この両者をそれぞれ単離し、RB 株および M 株と命名し、生理特性および同定試験に供した。

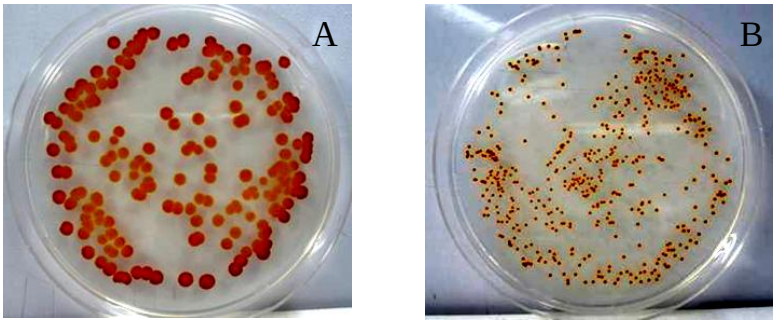

Fig. 2.6. Colonies of strain RB (**A**) and M (**B**) formed on LCdSe-BSM1 agar medium.

3.4 単離株の同定試験

Table 2.1 に分離株に対して行った Cowan and Steel の一次鑑別試験の結果を示す。RB 株、M 株ともにグラム陰性の桿菌であり、運動性を有し、オキジダーゼおよびカタラーゼ活性が陽性であった。一方で RB 株はグルコースを好気的に分解したが、M 株は好気的にも嫌気的にも分解せず、アルカリを生成するという差が認められた。Table 2.2 に API 20NE による同定試験の結果を示す。これより、RB 株は M 株が持たないプロテアーゼ活性、グルコース同化能、マンニトール同化能、*N*-アセチル D-グルコサミン同化能、カプリン酸同化能を有する一方で、M 株が有するフェニル酢酸同化能を持たないことが分かった。API データベース (V7.0) による同定試験の結果、RB 株はプロファイル番号 1024575 で *Pseudomonas aeruginosa* と 91.2%の相同性、M 株がプロファイル番号 1000467 で *Achromobacter denitrificans* と 82.2%の相同性を示した。

16S rDNA 塩基配列を FASTA による相同性検索に供した結果、RB 株は *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071T 株 (NR026078) と 98.8% の高い相同性を示した。M 株は *Achromobacter insolitus* LMG6003T 株 (AY170847) と 99.6%の高い相同性を示した。

Table 2.1. Physiological properties of strain RB and M by Cowan and Steel's manual

	RB	M
Shape	Rod	Rod
Gram strain	Nagative	Negative
Mobility	+	+
Catalase activity	+	+
Oxidase activity	+	+
O-F	O	-

Table 2.2. Physiological properties of strain RB and M by API 20NE

	RB	M
Nitrate reduction	+	+
Indole production	-	-
Glucose fermentation	-	-
Arugininedihydrolase	-	-
Urease	-	-
β-Glucosidase	-	-
Protease	+	-
β-Galactosidase	-	-
Glucose assimilation	+	-
Arabinose assimilation	-	-
Mannose assimilation	-	-
Mannitol assimilation	+	-
N-Acetyl-D-glucosamine assimilation	+	-
Maltose assimilation	-	-
Gluconate potassium assimilation	+	+
Capric acid assimilation	+	-
Adipic acid assimilation	+	+
Malate assimilation	+	+
Trisodium citrate assimilation	+	+
Phenyl acetate assimilation	-	+

3.5 単離株の CdSe 合成、亜セレン酸還元、およびカドミウム耐性試験

Fig. 2.7A に、RB 株を LCdSe-BSM1 培地、および LCd-BSM1 培地で培養した時の亜セレン酸と水溶性カドミウムの濃度変化を示す。LCdSe-BSM1 培地中の亜セレン酸と水溶性カドミウムは、3 日目までは同時的に除去されていたものの、その後、亜セレン酸がほぼすべて除去されたのに対し、水溶性カドミウムの除去は緩やかになり、10 日目の時点で約 0.22 mM の水溶性カドミウムが残留した。また、LCd-BSM1 培地では水溶性カドミウムの除去は確認されなかった。

Fig.2.7B に RB 株を LSe-BSM1 培地で培養した時の亜セレン酸、全水溶性セレン、水溶性セレン化物、固相セレンの濃度変化を示す。亜セレン酸は 3 日以内に完全に除去され、亜セレン酸の除去と同時に水溶性セレン化物と固相セレンの蓄積がみられた。水溶性セレン化物は 1.5 日目、固相セレンは 3 日目に減少に転じ、2 日目には水溶性セレン化物が完全になくなり、6 日目には固相セレンも約 0.1 mM が残留するのみとなった。また、全水溶セレンも約 0.15 mM のみが残留しており、ほとんどのセレンは固相および水相から除去された。

一方、LSe-BSM1 培地における M 株の培養 1 日後の亜セレン酸の除去量は約 0.89 mM (Fig. 2.7C) と、RB 株の約 0.42 mM よりも高かったが、LCdSe-BSM1 培地では培養液の色が reddish brown に変化するのに 3 日を要した (data not shown)。また、RB 株と M 株を混合して LCdSe-BSM1 培地で培養した場合、RB 株のみの場合と比較して亜セレン酸と水溶性カドミウムの除去に大きな影響はみられなかった (Fig. 2.7D)。

カドミウム耐性菌として知られる *R. metallidurans* CH34 を LCdSe-BSM 培地で培養すると、培養 6 日後でもほとんどの亜セレン酸と水溶性カドミウムが除去されずに残留した (Fig. 2.7E)。

Table 2.4 に水溶性カドミウム濃度が RB 株と M 株の増殖速度に与える影響を示す。各濃度において、RB 株の増殖速度は M 株のそれよりも高い値を示した。

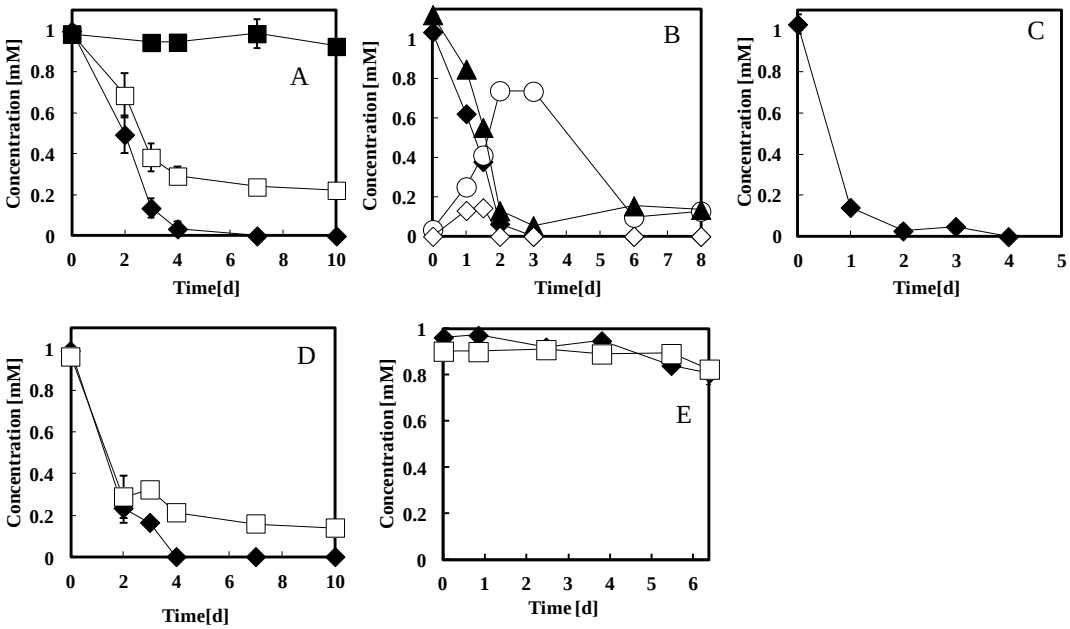

Fig.2.7. Time courses of chemical species concentrations of the bacterial culture. Strain RB was cultured in the LCdSe–BSM and LCd–BSM1 (A), and in LSe–BSM1 (B). Strain M was cultured in LSe-BSM1 (C). Strain RB and strain M were mixed and cultured in LCdSe-BSM1, each strain's initial OD_{600} were adjusted at 0.01 (D). *R. metallidurans* CH34 was cultured in LCdSe-BSM1 (E). Symbols: closed diamonds, selenite; open squares, cadmium in LCdSe–BSM1 culture; closed squares, cadmium in LCd–BSM1 culture; closed triangles, soluble selenium; open circles, solid phase selenium; open diamonds, soluble selenide in LSe-BSM1.

Table 2.4. Maximum specific growth rates μ [h^{-1}] of strains RB and M at various cadmium concentrations in LCd-BSM2 broth

	Cadmium concentration[mM]				
Strain	0	1	2	3	5
RB	0.46	0.43	0.44	0.41	0.33
M	0.098	0.051	0.059	0.052	0.063

3.6 細菌細胞と生成粒子の観察と分析

Fig. 2.8 に RB 株の細胞および回収された粒子の TEM 画像を示す。細胞の大きさは約 0.4 × 1 μm であり、その内部および表面に 10–20 nm ほどの粒子が分布している様子が観察された (Fig. 2.8A)。このような小さな粒子は細胞の外側にはみられなかったが、そのかわり 100 nm 以上の大きな粒子がみられた。Table 2.5 に回収された粒子 (Fig. 2.8B) の主な組成を示す。ここで、銅メッシュグリッド由来とみられる銅、および細胞断片由来とみられる炭素、酸素、リンは除いている。メジャーな成分として、セレンとカドミウムが検出され、粒子の Se/Cd 比は 1.18 であった (Table 2.5)。

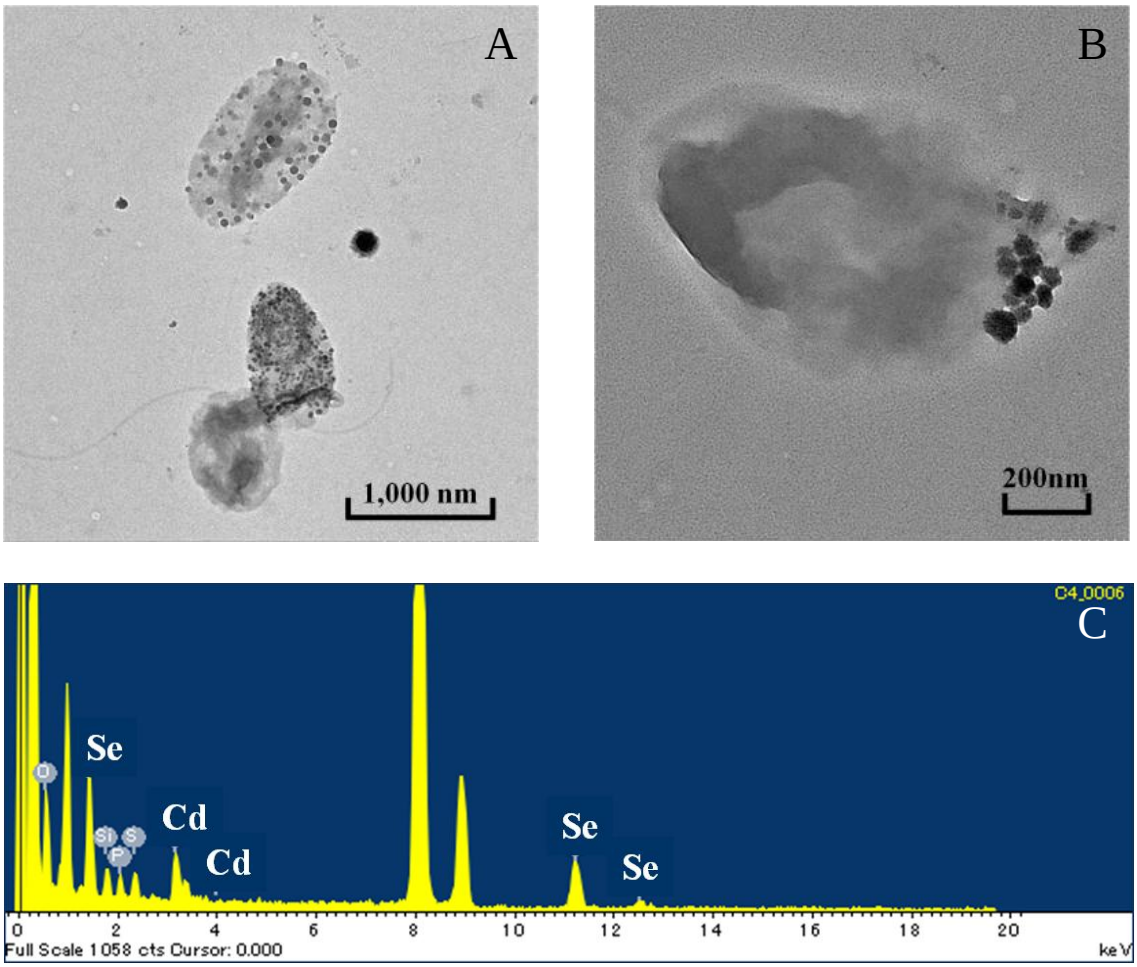

Fig. 2.8. Transmission electron micrographs of the strain RB cells (A), obtained biogenic CdSe particles (B), and EDS spectra of the extracted particles of TEM image (C).

Table 2.5. Elements of extracted biogenic particles and the ratio of Se/Cd

Element	Atomic%
S	20.7
Se	42.9
Cd	36.5
Se/Cd ratio	1.18

第 4 節　考察

本章では、重金属汚染の可能性がある土壌を植種源とし、亜セレン酸とカドミウム、および真核生物生育阻害剤としての cycloheximide を加えた培地で CdSe ナノ粒子合成細菌の集積を行った。集積の初期には、水相から亜セレン酸とカドミウムの両者が除去されたが、しばしば亜セレン酸に比べてカドミウムの除去率が低下し (Fig. 2.1)、生成粒子にカドミウムが存在しない部分があることが示された(Fig. 2.4B)。 このことから、初期の亜セレン酸と

カドミウムの水相からの除去は必ずしも CdSe の合成によるものではなく、前者は微生物の還元作用による元素態セレンとしての沈殿、後者は細胞やバイオポリマーなどへの吸着によって、少なからず除去されていたものと考えられた。しかし、集積が進むにつれてほぼ同量の亜セレン酸とカドミウムが水相から除去され (Fig. 2.1)、両者を含む粒子が生成されるようになった (Fig. 2.4C)。加えて、集積培養液の色がセレン化カドミウムに特徴的な reddish brown (Kumar *et al*., 2007, Fig. 1.1A) を示すようになった (Fig. 2.3) ため、目的通り CdSe 合成能をもつ細菌が優占したと考えられた。また、T-RF プロファイル (Fig. 2.5) と得られたコロニー (Fig. 2.6) から、集積系は 2 種類の優占細菌から構成されていることが明らかとなり、それぞれを単離して RB 株、M 株と名付けた。ここで、7 日間の培養で直径約 5 mm の大きなコロニーを形成する方を RB 株、直径約 0.5 mm の小さなコロニーを形成する方を M 株としている。なお、RB 株が寒天培地上で主要なコロニーとして出現したため、T-RFLP 解析における 150bp の断片長 (Fig. 2.5A) を有する細菌種が RB 株、567bp の断片長 (Fig. 2.5B) を有する細菌種が M 株であると考えられた。

本方法と同様にして、金属精錬工場に隣接する公園の植え込みの表層土壌を植種源とした集積培養も試みたが、その培養液の色は reddish brown ではなく、元素態セレンに特有の赤色を示したことから、目的の微生物は集積されなかったと考えられた (data not shown)。また、我々の研究室では、亜セレン酸をメチル化セレンに還元する能力を持つ *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を単離している (Kuroda *et al*., 2011; Kagami *et al*., 2013) が、この菌株はカドミウム存在下では生育できない (Soda *et al*., 2012)。さらに、*R. metallidurans* CH34 はカドミウム耐性をもち、亜セレン酸を元素態セレンに還元する能力を有する (Roux *et al*., 2001) が、CdSe の合成は少なくとも培養 6 日後まではみられなかった (Fig. 2.7E)。以上より、カドミウム耐性と亜セレン酸の還元能力の両方を有し、one-vessel で CdSe を合成可能な細菌は、普遍的に存在しているわけではないものといえ、ここで CdSe 合成能を有する集積系を構築できたことの価値は大きい。

集積系から単離された 2 種類の菌株において、M 株は亜セレン酸の還元速度という点では RB 株より優れていたものの (Fig. 2.7C)、カドミウム耐性が低く (Table2.4)、また LCdSe-BSM1 培地で培養したときに培養液が reddish brown を呈するまで 3 日を要した。このため、CdSe ナノ粒子合成細菌としては RB 株がより有望であると考えられた。M 株と RB 株を混合して培養した場合にも、RB 株のみの培養と比べて、亜セレン酸及び水溶性カドミウムの除去に大きな違いはみられなかった (Fig. 2.7D)。これらの知見から、M 株の集積系における役割を推測することはできないが、RB 株が CdSe 合成のためにカドミウムを水中から除去したことで M 株は集積系で生き残った可能性もある。API 20NE による同定試験および 16S rDNA の配列を用いた相同性検索の結果から、RB 株は *Pseudomonas aeruginosa* と高い相同性をもつことが示されたため、*Pseudomonas* sp. strain RB と命名した。ゲノム配列による種レベルの同定は次章で行うこととする。

RB 株を亜セレン酸のみを含む培地で培養した場合、亜セレン酸はカドミウムを含む系よ

りも速く除去され、それに伴って元素態セレン (固相セレン) と水溶性セレン化物の蓄積量が増加した。その後、水溶性セレン化物は培養 2 日目までに除去され (Fig. 2.7B)、元素態セレンも培養 6 日目でほぼ全量が除去された。この結果から、RB 株は亜セレン酸をすみやかに水溶性セレン化物に還元し、水溶性セレン化物は元素態セレンに酸化された後、ジメチルセレニド (Challenger *et al*., 1954) やジメチルジセレニド (Ranjard *et al*., 2002) のような揮発性セレンに還元された可能性が示唆される。微生物によるセレンの揮発化機構の詳細は現在のところ不明であるが、おそらく RB 株の揮発化経路は NT-I 株のもの (Kagami *et al*., 2013) に類似しているのではないかと考えられた (この点については次章で考察する)。また、水溶性セレン化物はカドミウムと結合する CdSe の前駆体である可能性があり、このような水溶性セレン化物の候補としては、セレン化水素 (Tarze *et al*., 2007) やセレノシステイン (Stadtman *et al*, 1983) などが挙げられるが、本研究の範囲では明確な同定は行えていない。

RB 株をカドミウムのみを含む培地で培養した場合、水相からのカドミウムの除去はみられず、カドミウムは亜セレン酸が存在している時のみ除去された (Fig. 2.7A)。この過程では亜セレン酸の除去にともなってカドミウムも同時に除去され、培養液の色が特徴的な reddish brown を呈することから、RB 株により CdSe が合成されていることが支持され、カドミウムはセレンと結合することでのみ水相から除去されたものと考えられた。ただし、同じ培養時間における亜セレン酸の除去量はカドミウムのそれより多くなっており、生成した粒子の組成もセレンがカドミウムを若干上回っていた。このことは、CdSe の前駆体となる水溶性セレン化物とカドミウムの反応速度が元素態セレンの生成速度よりは速いものの、一部のセレン化物が元素態セレンとして沈殿したことを示唆している。

RB 株は細胞の内部と表層に 10–20 nm の比較的小さな CdSe ナノ粒子を、細胞外に 100 nm を超える比較的大きな粒子を蓄積した (Fig. 2.8)。このことから、CdSe の粒子は細胞内または細胞表層である程度の大きさまで成長し、続いて細胞から離れるのではないかと考えられる。量子ドットとして使用するには、ここで得られた CdSe ナノ粒子は大き過ぎ、10 nm 以下の大きさに制御することが望ましい。本章における RB 株の培養条件が CdSe 合成に適切かどうかは不明であり、これらの問題については第 4 章で議論する。

第 5 節　要約

本章では、亜セレン酸およびカドミウムを含む培地を用いて、重金属汚染が疑われる土壌サンプルから CdSe ナノ粒子を合成する細菌の集積・単離を行った。その結果、有望な細菌株として *Pseudomonas* sp. strain RB が得られた。RB 株は亜セレン酸とカドミウムを含む培地中で両者を同時に除去し、培養液は CdSe に特徴的な reddish brown を呈した。さらに、RB 株は主にセレンとカドミウムから構成される 10–20 nm の粒子を細胞内および細胞表層に蓄積することが確認された。以上から、RB 株は CdSe ナノ粒子を one-vessel で合成できる細菌であるといえ、世界で初の報告となる。

第 3 章　*Pseudomonas* sp. RB 株の生理学的特徴づけおよびドラフトゲノム解析

第 1 節　緒言

第 2 章では、金属汚染が疑われる土壌から CdSe ナノ粒子合成細菌として *Pseudomonas* sp. RB 株を単離した。RB 株を CdSe ナノ粒子の生産に利用する上で、その生理学的特徴や遺伝学的特徴を明らかにすることは、極めて重要である。そこで本章では、RB 株の炭素源資化特性を調べ、様々な pH、温度、NaCl 濃度、亜セレン酸濃度、およびカドミウム濃度条件下で増殖試験を行うことで、RB 株の増殖に好適な条件を明らかにした。また、亜セレン酸存在下で RB 株を培養し、菌体増殖と亜セレン酸還元の関係を明らかにした。さらに、RB 株のドラフトゲノムを解析し、そのセレン代謝や重金属耐性に関わる遺伝子を調べ、CdSe ナノ粒子合成との関連を考察した。

第 2 節　実験材料および方法

2.1 使用菌株および使用培地

本章では用途に合わせて L-BSM2、LSe-BSM2、および LCd-BSM2 を用いた。増殖試験では、pH の異なるバッファーとして、終濃度 20 mM のフタル酸水素カリウム (pH 4.5–5)、リン酸バッファー (pH 6–6.5)、50 mM の HEPES バッファー (pH 7–8)、および CHES (N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid) バッファー (pH 9–10) を用いて培地を調製した。また、カドミウム耐性試験でカドミウム濃度を変化させる際には、ニトリロ三酢酸をカドミウム 1 mM に対して 0.216 g/L の割合で添加した。

2.2 RB 株の炭素源資化特性

RB 株のコロニーを 20 mL L-BSM2 培地を分注した 50 mL バイアル瓶に 1 白金耳量植種し、28°C、120 rpm で 24 時間培養後 (前々培養)、その培養液を同様の培地に 5%量植菌し、同条件で 12 時間培養した (前培養)。この前培養液から遠心分離 (1,200 × *g*, 15 min) によって RB 株を集菌し、生理食塩水で 2 回洗浄した後、OD_{600} = 0.01 となるように菌体懸濁液を調製した。この菌体懸濁液を 150 µL ずつ Biolog GN2 plates (Biolog Inc., USA) の各ウェルに植種し、暗所、30°C のもとで 48 時間静置培養した。その後、Multi-spectrophotometer (Viento XS;. Dainippon Sumitomo Pharma, Tokyo, Japan) を用いて 595 nm での吸光度 (A_{595}) を測定した。

2.3 RB 株の増殖試験、亜セレン酸耐性試験、およびカドミウム耐性試験

2.2 と同様にして得た RB 株の前培養液を、各種 NaCl 濃度、pH に調整した 100 mL の

L-BSM2 培地が入った 300 mL 容三角フラスコに初期 OD_{600} = 0.02 になるように植菌し、各温度条件のもと、120 rpm で好気培養した。温度 37°C、NaCl 濃度 0.05 g/L、pH 7.0 を基本条件とし、それぞれの試験系で温度、NaCl 濃度、pH、亜セレン酸濃度、カドミウム濃度のうち、一つの条件のみを変更して培養試験を行った。菌体濃度として OD_{600} を継時的に測定し、対数増殖期の比増殖速度を算出した。また、亜セレン酸を添加した系では、元素態セレンに由来する赤色沈殿による吸光度測定への影響を考慮し、以下のようにタンパク質濃度を測定して菌体濃度 (OD_{600}) への換算を行った。まず、基本条件で RB 株を定常期まで培養し、希釈系列を作成した。これらの OD_{600} を測定した後、超音波破砕 (130 W, 1 min, Vibra cell VCX-130, SONICS & MATERIALS, USA) に供し、それぞれ 20 µL ずつ 96 穴ウェルマイクロプレートの各ウェルに入れた。続いて各ウェルに Coomassie Brilliant Blue (CBB, DOJINDO, Kumamoto, Japan) を 280 µL ずつ泡立てないよう静かに加え、1 分間静置して発色させた後、Multi-spectrophotometer を用いて A_{595} を測定した。測定結果から A_{595} に対する OD_{600} の検量線 (式 3.1)を作成し、5 倍希釈した培養液に対して同様に測定した A_{595} を OD_{600} の値に換算した。

$$OD_{600} = 1.9993(A_{595} - A_{595,0}) - 0.0211 \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (3.1)$$

$A_{595,0}$: LSe-BSM2 培地 20 µL に CBB280 µL を加えたコントロール系の A_{595}

2.4 RB 株ゲノム DNA の次世代シーケンス解析およびアノテーション

RB 株のゲノム DNA のシーケンスライブラリーは TruSeq DNA sample preparation kit (Illumina, USA) のプロトコルに従って調製した。調製した DNA サンプルの塩基配列の決定は北海道システムサイエンス株式会社に委託して行った。ここで、実際の手順としては、101 bp のペアエンドリードを用いたペアエンド法と合わせて、次世代シーケンサーIllumina HiSeq 2000 によるマルチプレックスシーケンス法が行われた。そして、得られた 3.7 Gbp のリードから cutadapt program (https://code.google.com/p/cutadapt/) によりアダプター配列を取り除き、Velvet program ver. 1.2.08 (http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/) によりドラフトゲノム配列としてアセンブルされた。

得られたドラフトゲノム配列は、Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) パイプライン (Aziz *et al*. 2008) によってアノテーションを行った。また、ドラフトゲノム配列およびアノテーション情報は、規定の形式に変換し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のデータベース に登録した (Accession No.はそれぞれ、BAUN01000001–BAUN01000102、DF396803–DF396880)。さらに、このデータを RAST の比較ツールにより Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, Ogata *et al*., 1999) と連携させ、RB 株のセレン代謝経路を推測した。

2.5 分析方法

第 2 章 2.4.1 と同様にして亜セレン酸濃度を測定した。ただし、培養液および遠心分離後の上清の採集量は 1 mL とした。

第 3 節　実験結果

3.1 RB 株の炭素源資化特性

Table 3.1 に RB 株の炭素源資化特性を示す。RB 株は広範な種類の炭素源を利用でき、特にアミノ酸とカルボン酸の資化能が高いことが分かった。この傾向は *P. aeruginosa* の典型株と類似した結果であった (Grimont *et al*., 1996)。第 2 章で炭素源として用いた乳酸に対しても高い資化能力を示した。

Table 3.1. Carbon source utilization profile of strain RB

Carbon Sources	Availability	Carbon Sources	Availability	Carbon Sources	Availability
Sugars		L-Histidine	+++	Quinic Acid	+++
α -Cyclodextrin	−	Hydroxy-L-Proline	+++	D-Saccharic Acid	−
Dextrin	+	L-Leucine	+	Sebacic Acid	+
Glycogen	+	L-Ornithine	++	Succinic Acid	++
N-Acetyl-D-Galactosamine	−	L-Phenylalanine	+	Bromosuccinic Acid	++
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	L-Proline	++	Succinamic Acid	+
L-Arabinose	+	L-Pyroglutamic Acid	+++		
D-Cellobiose	−	D-Serine	−	**Amines**	
D-Fructose	+	L-Serine	+	Phenyethylamine	−
L-Fucose	−	L-Threonine	−	Putrescine	+++
D-Galactose	−	D,L-Carnitine	+		
Gentiobiose	−	γ -Amino Butyric Acid	+++	**Sugar alcohols**	
α -D-Glucose	+++	Urocanic Acid	+++	Adonitol	−
α -D-Lactose	−			D-Arabitol	+
Lactulose	−	**Carboxylic acids**		i-Erythritol	−
Maltose	−	Pyruvic Acid Methyl Ester	+++	m-Inositol	−
D-Mannose	−	Succinic Acid Mono-Methyl-Ester	+	D-Mannitol	+++
D-Melibiose	−	Acetic Acid	+	D-Sorbitol	−
β -Methyl-D-Glucoside	−	Cis-Aconitic Acid	+++	Xylitol	−
D-Psicose	+	Citric Acid	+++	2-Aminoethanol	++
D-Raffinose	−	Formic Acid	+	2,3-Butanediol	+
L-Rhamnose	−	D-Galactonic Acid Lactone	−	Glycerol	++
Sucrose	−	D-Galacturonic Acid	−		
D-Trehalose	−	D-Gluconic Acid	+++	**Nucleotides**	
Turanose	−	D-Glucosaminic Acid	−	Inosine	++
		D-Glucuronic Acid	−	Uridine	+
Amino Acids		α - Hydroxybutyric Acid	−	Thymidine	−
Glucuronamide	−	β -Hydroxybutyric Acid	+++		
L-Alaninamide	+	γ -Hydroxybutyric Acid	+	**Surfactants**	
D-Alanine	+	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	+++	Tween 40	+++
L-Alanine	+	Itaconic Acid	+++	Tween 80	++
L-Alanyl-glycine	−	α -Keto Butyric Acid	−		
L-Asparagine	+++	α -Keto Glutaric Acid	+++	**Phosphate compounds**	
L-Aspartic Acid	+++	α -Keto Valeric Acid	−	D,L-α -Glycerol Phosphate	+
L-Glutamic Acid	+++	D,L-Lactic Acid	+++	α -D-Glucose-1-Phosphate	−
Glycyl-L-Aspartic Acid	−	Malonic Acid	+	D-Glucose-6-Phosphate	−
Glycyl-L-Glutamic Acid	−	Propionic Acid	++		

- : $A_{595} < 0.1$,　+ : $0.1 \leqq A_{595} < 0.5$,　++ : $0.5 \leqq A_{595} < 1.0$,　+++ : $1.0 \leqq A_{595}$

3.2 RB 株の増殖特性、亜セレン酸耐性、およびカドミウム耐性

Fig. 3.1 に各種培養温度、NaCl 濃度、pH、亜セレン酸濃度、およびカドミウム濃度における比増殖速度を示す。RB 株は 10–45°C、pH 5–9.5、および NaCl 0.05–40 g/L という広範な条件下で増殖し、40°C、pH 7.0、NaCl 0.05 g/L において最も高い比増殖速度 (0.88 h^{-1}) を示した。比増殖速度は、亜セレン酸 1 mM を含む培地では、亜セレン酸を含まない培地と同程度であったが、2.5 mM 以上の亜セレン酸濃度下では急激に低下した (Fig. 3.1D)。一方、カド

ミウム耐性試験では、1–20 mM のカドミウム濃度条件下で比増殖速度が約 25%低下した。

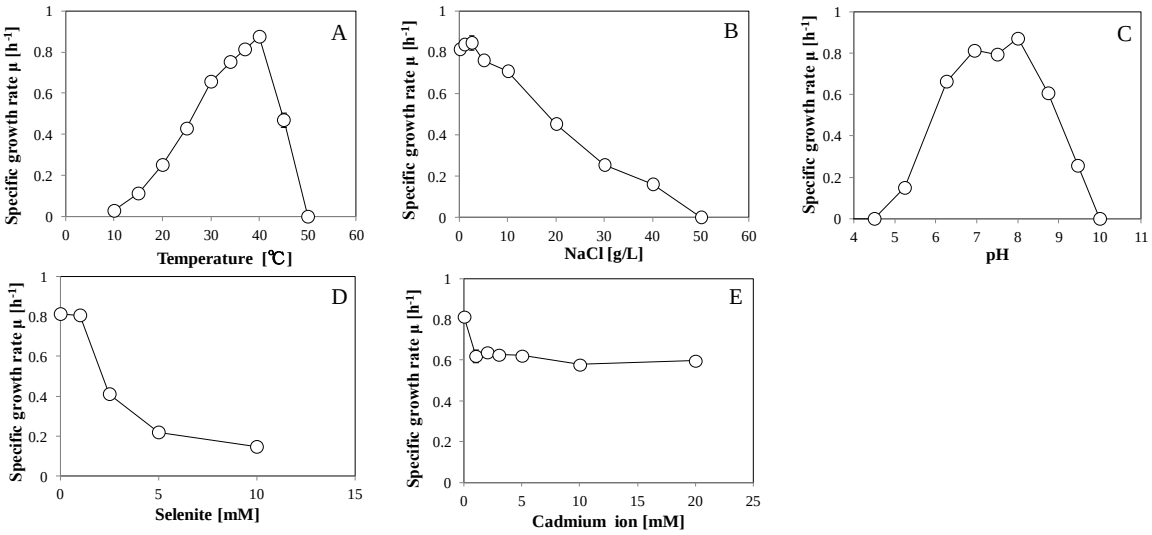

Fig. 3.1. Specific growth rates of strain RB under various temperatures, pH values, salinities, and selenite or cadmium ion concentrations: effects of (A) temperature, (B) salinity, (C) pH, (D) selenite concentration, and (E) cadmium ion concentration. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

Fig. 3.2 に亜セレン酸 1 mM を含む培地を用いた培養における菌体濃度 (OD_{600}) と亜セレン酸濃度の経時変化を示す。図示したように亜セレン酸の除去は増殖が定常期に到達してから進行した。

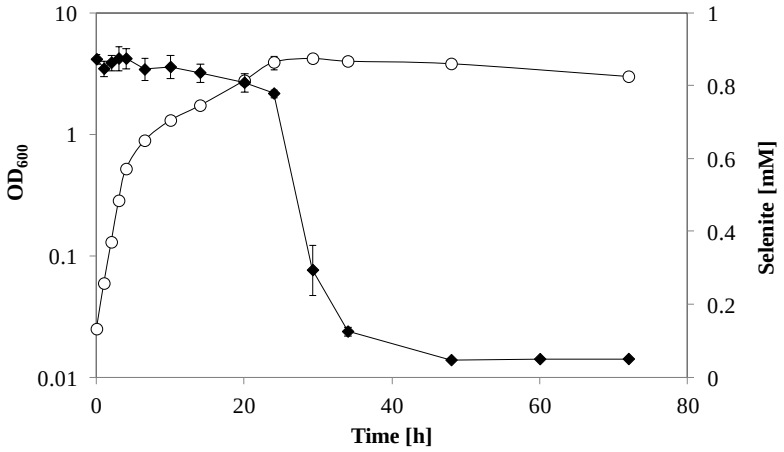

Fig. 3.2. Time courses of concentrations of cells (OD_{600}) and selenite in LSe-BSM2, containing 1 mM of selenite. Symbols: closed diamonds, selenite; open circles, OD_{600}. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

3.3 RB 株のドラフトゲノム解析

得られたドラフトゲノムは 78 個の contig からなり、全ゲノム長は 6,200,537 bp、GC 含量は 66.6%であった。RAST により、コードされているタンパク質の数 (CDS, coding sequence) は 5690 個、このうち名称・機能が不明のタンパク質 (hypothetical protein) は 1080 個含まれ、tRNA 遺伝子は 63 個、rRNA 遺伝子は 2 個確認された。また、現在フルゲノムが解読されている種の内では *Pseudomonas aeruginosa* 19BR (Schurek *et al*., 2009) が最も近い類縁種であることが分かった (score 501)。以上から、RB 株を *Pseudomonas aeruginosa* RB 株と改めて命名した。

Fig. 3.3 に、RAST および KEGG により推測された RB 株のセレン化合物の代謝経路を示す。ここに示した酵素は既知の *P. aeruginosa* に共通のものであった。この経路では、亜セレン酸はまず、グルタチオン (GSH)、もしくはチオレドキシンレダクターゼによってセレン化水素に還元される。セレン化水素の一部はセレノリン酸シンセターゼによってセレノリン酸に変換され、L-セリル-tRNA セレントランスフェラーゼによってホスホセリル tRNA のリン酸基とセレノール基が置換されて L-セレノシステニル-tRNA が生成し、セレノプロテインの合成に使われる。また、セレン化水素の一部はシステインシンターゼによってセレノシステインに変換される。セレノシステインは *O*-アセチルホモセリンスルフヒドラーゼ (または *O*-スクシニルホモセリンスルフヒドラダーゼ) 等によってセレノシスタチオニンに変換されるが、この経路については全容が明らかにはなっていない。また、セレノシスタチオニンからセレノホモシステインへの反応を触媒する酵素は確認されず、この逆反応を触媒するセレノシスタチオニン β-リアーゼが可逆性であるかも不明であるため、セレノシスタチオニン以降の代謝産物が生成されるかは不明である。

Table 3.2 には、Fig. 3.3 に示した酵素を含むセレン代謝とその周辺の代謝に関わる遺伝子、Table 3.3 にはカドミウム耐性に関わる遺伝子について、RB 株と他の 9 種類の *P. aeruginosa* 株 (19BR (Boylea *et al*., 2012), DK2 (Yang *et al*., 2011), MPAO1/P2 (Olivas *et al*., 2012), NCGM2.S1 (Miyoshi-Akiyama *et al*., 2011), 2192 (Mathee *et al*., 2008), PAO1 (Stover *et al*., 2000), UCBPP-PA14 (Lee, *et al*., 2009), LESB58 (Winstanley, *et al*., 2009), M18 (Wu *et al*., 2011)) が保有する遺伝子数を比較したものである。これらの *P. aeruginosa* 株は保有するシステイン生合成、メチオニン生合成、チオレドキシンレダクターゼ、セレノプロテイン、グルタチオン等、セレン代謝に関わりのある酵素、およびその周辺酵素の種類がほぼ共通しており、例外はギ酸デヒドロゲナーゼ N 遺伝子を 2192 株のみが保有する点のみであった。また、各酵素の遺伝子数についても、1～2 個の差はあるもののほぼ類似しており、RB 株に特に目立った特徴は認められなかった。また、カドミウム耐性遺伝子としては、いずれの株も排出システムである *czc* (Cadmium-zinc-cobalt) 遺伝子や重金属結合タンパク質の 1 種であるメタロチオネイン等を保有していた。ここでもセレン代謝遺伝子と同様に保有する遺伝子数に若干の差はあるものの、RB 株に特徴的な遺伝子は認められなかった。

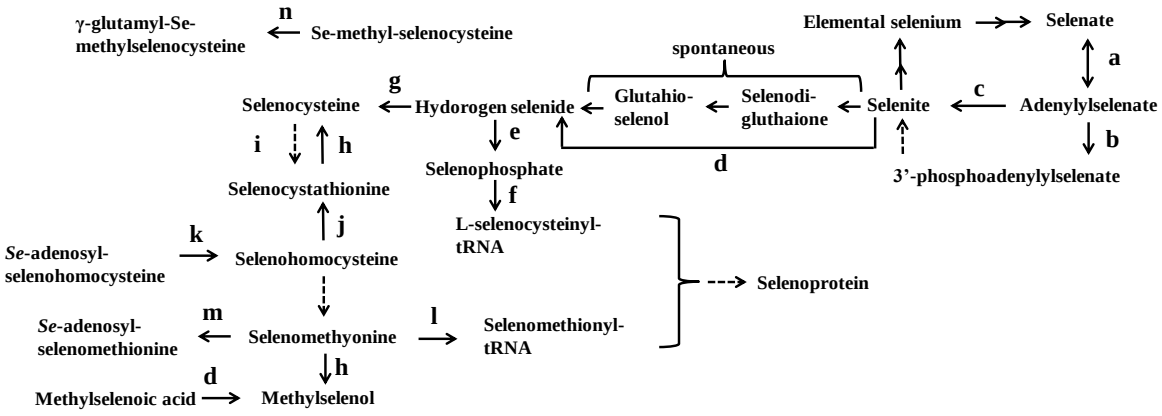

Fig. 3.3. The metabolic pathway of seleno-compounds of strain RB, which was expected by RAST and KEGG. Dashed arrows represent indirect relationships in the KEGG pathway. The each alphabet indicates sulfate adenylyltransferase (a), adenylylsulfate kinase (b), adenylylsulfate reducatase (c), thioredoxin reductase (d), selenide, water dikinase (selenophosphate synthetase) (e), L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase (f), cysteine synthase (g), cystathionine gamma-lyase (h), *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase (i), cystathionine beta-synthase (j), adenosylhomocysteinase (k), methionyl-tRNA synthetase (l), *S*-adenosylmethionine synthetase (m), and gamma-glutamyltranspeptidase (n), respectively.

Table 3.2. The genes and its numbers involving selenium metabolism and its peripheral pathways in *P. aeruginosa* strain RB, 19BR, DK2, MPAO1/P2, NCGM2.S1, 2192, PAO1, UCBPP-PA14, LESB58, and M18 genomes

System	Coded protein	RB	19BR	DK2	MPAO1/P2	NCGM2.S1	2192	PAO1	UCBPP-PA14	LESB58	M18	Correspondance to Fig. 3.3
Cystein biosynthesis	Serine acetyltransferase	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	
	Cysteine synthase	3	3	3	4	3	4	4	3	3	4	g
	Sulfate adenylyltransferase subunit 1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	a
	Adenylylsulfate kinase	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	b
	Phosphoadenylyl-sulfate reductase [thioredoxin]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	
	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Sulfate transport system permease protein CysT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Sulfate transport system permease protein CysW	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Sulfate and thiosulfate import ATP-binding protein CysA	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Sulfate and thiosulfate binding protein CysP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Sulfate permease, Trk-type	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	Sulfate permease	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	
	Cystathionine gamma-lyase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	h
	Cystathionine beta synthetase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Methionine Biosynthesis	Homoserine dehydrogenase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Homoserine O-acetyltransferase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	7	7	7	7	7	7	7	8	7	7	i
	Cystathionine beta-synthase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	j
	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Methionine ABC transporter ATP-binding protein	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
	S-adenosylmethionine synthetase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	m
	Adenosylhomocysteinase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	k
	Homoserine kinase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Serine acetyltransferase	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	
	Methionine repressor MetJ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Thioredoxin-disulfide reductase	Thioredoxin reductase	3	3	2	3	5	4	3	5	3	3	d
	Alkyl hydroperoxide reductase protein F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Alkyl hydroperoxide reductase protein C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Thiol peroxidase, Tpx-type	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Thiol peroxidase, Bcp-type	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C-like protein	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Adenylylsulfate reductase	Adenylylsulfate reducatase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	c
Selenocysteine metabolism	Formate dehydrogenase N alpha subunit (selenocysteine-	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
	L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	f
	Selenocysteine-specific translation elongation factor	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	
	Selenide,water dikinase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	e
	Selenophosphate-dependent tRNA 2-selenouridine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Selenoprotein O	Selenoprotein O and cysteine-containing homologs	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
tRNA aminoacylation, Met/Scaffold proteins for [4Fe-4S] cluster assembly (MRP family)	Methionyl-tRNA synthetase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	l
Glutathione: Biosynthesis and gamma-glutamyl cycle	Glutamate--cysteine ligase eukaryotic	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Glutathione synthetase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Gamma-glutamyltranspeptidase	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	n

Table 3.3. The genes and its numbers involving cadmium resistance in *P. aeruginosa* strain RB, 19BR, DK2, MPAO1/P2, NCGM2.S1, 2192, PAO1, UCBPP-PA14, LESB58, and M18 genomes

Group	Coded protein	RB	19BR	DK2	MPAO1/P2	NCGM2.S1	2192	PAO1	UCBPP-PA14	LESB58	M18
Cobalt-zinc-cadmium resistance	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	3	3	4	3	3	4	3	3	5	3
	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA	4	4	5	4	4	4	4	6	6	4
	Heavy metal RND efflux outer membrane protein, CzcC family	2	2	4	2	2	2	2	3	3	2
	Putative copper efflux system protein CusB	4	5	6	5	5	5	5	6	6	5
	Nickel-cobalt-cadmium resistance protein NccB	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Cation efflux system protein CusA	4	4	5	4	4	4	4	6	6	4
	DNA-binding heavy metal response regulator	5	5	4	5	4	5	4	3	4	5
	Heavy metal sensor histidine kinase	3	3	5	3	3	4	3	3	3	4
	Cd(II)/Pb(II)-responsive transcriptional regulator	6	6	7	6	6	7	6	6	7	6
Oxdative Stress	metallothionein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

第 4 節　考察

RB 株を工業的に利用するには、菌体量を確保するため、その至適培養条件を明らかにすることが重要である。本章 3.2 から、RB 株は良く知られた *P. aeruginosa* 株同様、多くの炭素源を資化でき、広範な条件下で増殖可能であることが明らかとなり、安定した培養が可能であることが示された。Fig. 3.1A において、比増殖速度は 40°C で最大となった。しかし、これ以上の温度では急激に増殖が阻害されたため、実際に菌体量を確保する際には 37°C で培養することが適切であると考えられる。また、RB 株は少なくとも 20 mM までのカドミウムに安定した耐性を示すことがわかった。カドミウム耐性は、CdSe の one-vessel 合成を行うには必須条件であることから、きわめて重要な特徴であるが、ここでの結果は、カドミウム濃度を大きく変動させても RB 株による安定した CdSe ナノ粒子の合成が可能であることを示唆するものといえる。一方で、RB 株は亜セレン酸に対しては 2.5 mM 以上の濃度で大きく増殖が阻害されることが分かり、CdSe ナノ粒子の合成では、亜セレン酸濃度は 1 mM 程度に留めることが肝要であることが明らかとなった。

RB 株による亜セレン酸の還元は増殖が定常期に移ると同時に進行することが明らかになった。このような傾向は、鉄など多くの金属を異化的に還元する細菌として知られる *Shewanella oneidensis* MR-1 を亜セレン酸存在下で好気的に培養した場合や (Klonowska *et al.*, 2005)、光合成細菌である *Rhodospirillum rubrum* でも報告されており(Kessi *et al.*, 1999)、RB 株に限らず広くみられる現象である。これらの微生物にとって亜セレン酸の還元は、増殖に必要なセレン源を供給するためではなく、酸化ストレス応答などホメオスタシスの維持のために行われるものと考えられる。

RB 株のドラフトゲノム解析の結果、本菌株のゲノムは *P. aeruginosa* としての特徴を持つことがわかった。CdSe ナノ粒子の合成に関与すると思われるセレン代謝やその周辺、およびカドミウム耐性に関わる遺伝子も他の *P. aeruginosa* 株と共通しており、RB 株に特異的な遺伝子はみられなかった。このことから、*P. aeruginosa* は適切な培養条件等の違いはあるとしても、基本的には共通して CdSe ナノ粒子を合成する機構を備えている可能性がある。この点については、実際に他の *P. aeruginosa* 株を用いて合成試験を行い、CdSe ナノ粒子合成

の有無を検証する必要がある。あるいは、RB 株に特有の未知の酵素または合成機構が存在する可能性もある。

第 2 章では、CdSe ナノ粒子の前駆体は何らかの水溶性セレン化物ではないかと考えられた。このことを考慮すると、ドラフトゲノム解析から推定された RB 株によるセレン代謝経路 (Fig. 3.3) 上に見られる代謝産物の中で CdSe 前駆体として考えられるのは、グルタチオセレノール、セレン化水素、セレノシステイン、セレノシスタチオニン、セレノホモシステイン、セレノメチオニン、*Se*-アデノシルセレノホモシステイン、*Se*-アデノシルセレノメチオニン、メチルセレノール、そしてセレノプロテインである。ただし、RB 株を含め今回比較に用いた *P. aeruginosa* は、セレノシスタチオニンをセレノホモシステインに変換 (j の逆反応) するシスタチオニン β-リアーゼ遺伝子を持たず、また、この反応の可逆性も現在のところ不明であるため、セレノホモシステインとその下流にある物質が実際に生産されているかどうかは定かではない。ここで、Cui ら (2009) は、セレノシステイン、セレノシスチン、およびセレノメチオニンをそれぞれ塩化カドミウムと反応させることで、酵母による CdSe 合成を *in vitro* で再現する実験を行ったが、その結果、セレノシステインの系のみにおいて CdSe の合成がみられたと報告している (第 1 章 3.2)。セレノシステイン以外はセレノール基を持たず、セレノール基は生理的 pH 条件下ではアニオン形態をとることから、この 3 つの有機セレン化合物の中ではセレノシステインのみが重金属と結合することができ、CdSe 合成に寄与したものと Cui らは考察している。Yan ら (2014) も、セレノシステインとカドミウム耐性機構の一部として生じるビス(グルタチオナト)カドミウム ($(GS)_2Cd$) が反応して CdSe を生じると考察している (第 1 章 3.5)。RB 株でもセレノシステインが関与しているかどうかは明らかでないが、これらからセレノール基 (-SeH) を含む化合物が CdSe の前駆体として有力であると考えられる。セレノール基の p*K*a は 5–6 であるため (Ogasawara *et al*., 2001)、Cui ら (2009) が考察したように、中性～塩基性条件下では脱プロトン化してセレノラートアニオン ($-Se^-$) が生じる方向に平衡が移動し、求核剤として働きやすいと考えられる。また、CdSe 合成におけるカドミウム側の前駆体として$(GS)_2Cd$ が挙げられたが、これはカドミウムがグルタチオン 2 分子によってキレート化されたものであり、カドミウム原子は 2 つの硫黄原子と挟まれるように結合している。ここでカドミウムの電気陰性度は硫黄のそれより低いため、$(GS)_2Cd$ におけるカドミウム原子は正に分極していると考えられる。よって、カドミウムが$(GS)_2Cd$ の形態であれ、カドミウムイオンの形態であれ、セレノラートアニオンによる求核攻撃を受けやすい状態であるといえる。これらより、RB 株を含めた微生物による CdSe 合成機構の候補の一つとして Fig. 3.4 のような仕組みが考えられる。ここで、Fig. 3.3 においてセレノール基を含む物質は、グルタチオセレノール、セレン化水素、セレノシステイン、ホモセレノシステイン、メチルセレノール、セレノプロテイン (セレノホモシステインとその下流にある物質を除くと、グルタチオセレノール、セレン化水素、セレノシステイン、セレノプロテイン) であり、このいずれかが CdSe の前駆体となっている可能性が高い。

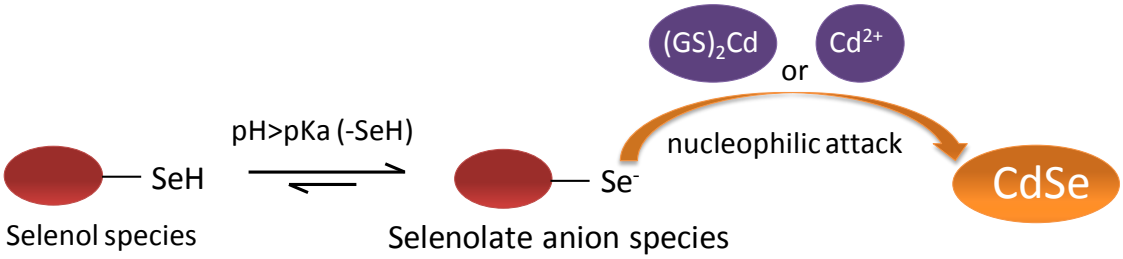

Fig. 3.4. Schematic representation of CdSe synethesis by *P. aeruginosa* RB. Some kind of selenol species is deprotonated to be selenolate anion species under physiological pH (>pKa of selenol residue (5–6)). CdSe would be synthesized by nucleophilic attack by the selenolate anion species to $(GS)_2Cd$ or Cd^{2+}.

一方で、第 1 章で述べたように、Park ら (2012) は大腸菌に *Pseudomonas putida* 由来のメタロチオネイン遺伝子を導入することで、CdSe をはじめとする多くの化合物半導体ナノ粒子を合成できたと報告している (第 1 章 3.4)。これはメタロチオネインに取り込まれた金属間に化学結合が生じたためと考えられ、RB 株のメタロチオネインでも同様の現象が起こるという可能性も考えられる (Fig. 1.6)。ただし、*P. putida* のメタロチオネインと *P. aeruginosa* のメタロチオネインでは、システインや正電荷アミノ酸の配置は類似しているものの、使われているアミノ酸の種類や数に違いがあり (相同性 56%)、この機構での化合物半導体ナノ粒子の合成は *P. putida* のメタロチオネインに特有の性質である可能性もある。この検証には、Park ら (2012) と同様にして RB 株のメタロチオネイン遺伝子を大腸菌に導入し、CdSe ナノ粒子を合成するかどうかを確認する必要がある。

また、第 2 章で RB 株がセレンを揮発することが示唆され、その機構は *P. stutzeri* NT-I 株 (Kuroda *et al*., 2011; Kagami *et al*., 2013) に類似のものではないかと予想した。しかし、NT-I 株によるセレンの揮発化には SAM-dependent methlytransferase の関与が示唆されている一方 (秋山, 2014)、RB 株ドラフトゲノムにはこの酵素の合成遺伝子がみられなかったことから、RB 株によるセレンの揮発化は NT-I 株と別経路である可能性がある。ただし、この点に関しては同じアミノ酸配列の酵素でもデータベースによって命名が異なっており、RAST で ribosomal RNA large subunit methyltransferase A としてアノテートされた配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) による相同性検索では SAM-dependent methlytransferase として検出されることに留意しなければならない。

RB 株は他の *P. aeruginosa* 株同様、重金属イオンの排出に関与する遺伝子と重金属結合タンパク質の両方を有していた。ここで、第 2 章で RB 株を LCd-BSM1 培地で培養した結果、カドミウム濃度が変化しなかったことから、RB 株のカドミウム耐性は主に排出によるものと考えられる。

第 5 節　要約

本章では、第 2 章で単離された *Pseudomonas* sp. RB 株に対し、炭素源資化特性と増殖特性を明らかにすることで生理学的特徴づけを行い、さらにドラフトゲノムを解析し、他の類縁種との比較を行った。その結果、RB 株はアミノ酸やカルボン酸を中心に多くの炭素源を資化可能であり、10–45°C、pH 5–9.5、および NaCl 0.05–40 g/L の広範な条件下で増殖したことから、多様な条件下で安定した培養が可能な細菌であることが示された。また、亜セレン酸濃度が 1 mM を超えると増殖が大きく阻害され、カドミウム濃度 1–20 mM において比増殖速度が約 25%低下することが明らかになった。さらに、ドラフトゲノム情報から RB 株は *P. aeruginosa* と同定された。RB 株が保有する亜セレン酸代謝およびカドミウム耐性に関わる遺伝子は、他の *P. aeruginosa* 株と比較して特異的なものがみられず、*P. aeruginosa* は種として基本的に CdSe の合成に必要な酵素を有しているか、RB 株が未知の酵素または合成機構を有している可能性が示唆された。

第 4 章　RB 株の培養条件が CdSe ナノ粒子合成に及ぼす影響

第 1 節　緒言

第 3 章では RB 株の生理学的特徴づけ、およびドラフトゲノム解析を行い、本菌株の微生物学的特性を明らかにしたが、RB 株を用いて CdSe ナノ粒子を効率的に合成するためには、さらに、その粒子の合成に適した培養条件を絞り込む必要がある。このとき、合成条件の最適化は、その効率だけでなく生成粒子の純度という視点を含めて行われる必要がある。また、RB 株による CdSe 合成を実用化するうえでは、合成された粒子不純物が少ない状態で簡易に回収できる方法についても十分に検討するとともに、回収された CdSe ナノ粒子を量子ドットとして機能させるために、サイズ選択的光エッチング (size-selective photoetching) 等により (Matsumoto *et al*., 1995, 1996) その粒径を制御することも必要である。本章では、以上のような RB 株による CdSe 粒子合成の実用化の課題をクリアすることを目的として、RB 株による CdSe ナノ粒子合成に培養条件が及ぼす影響を詳細に調べ粒子合成条件を最適化するとともに、生成した CdSe 粒子の回収法およびサイズ選択的光エッチングによる粒子径制御法についても検討した。

第 2 節　実験材料および方法

2.1 使用培地

本章では LCdSe-BSM2 培地を用いて RB 株の培養及び粒子合成試験を行った。pH を変化させる際には、第 3 章 2.1 と同様のバッファーを用いて培地を調整した。

2.2 様々な培養条件における CdSe 合成試験

300 mL 容バッフル付き三角フラスコに 100 mL の L-BSM2 培地を分注し、第 3 章 2.2 と同様に調製した RB 株の前々培養液 1 mL を植菌して、28°C、120 rpm で 12 時間培養した (前培養)。この前培養液を 300 mL 容の三角フラスコに入った 100 mL の LCdSe-BSM2 培地に OD_{600} = 0.02 となるように植菌し、温度 30°C 、NaCl 濃度 0.05 g/L、pH 7.0 を基本条件とし、120 rpm で回転培養した。また、この基本条件のうちの一つを変更し、様々な培養条件において合成試験を行った。様々な温度で行った合成試験では、OD_{600} を菌体濃度として継時的に測定した。CdSe ナノ粒子の合成が開始されてからは、第 3 章 2.3 と同様にしてタンパク質濃度を測定し、菌体濃度 (OD_{600} で表現) への換算を行った。検量線は試験ごとに作成したものを用いた。各実験は 3 連で行った。

2.3 分析方法

第 2 章 2.4.1 と同様にして亜セレン酸および水溶性カドミウム濃度を測定した。ただし、

培養液は 200 μL 採取し、800 μL の超純水を添加することで 5 倍希釈したのちに試料調整を行った。

2.4 合成粒子の回収、TEM 観察、および元素分析

細胞からの CdSe 粒子の回収法として、1) 糖とタンパク質を分解する方法、2) 脂質を除去する方法、3) 遠心ろ過を用いる方法、および 4) wash buffer と超音波破砕処理、およびろ過を用いる方法を検討した。このうち、1)～3)については、培養液 1 mL を遠心分離 (21,600 × *g*, 4°C, 10 min) し、さらに超純水で 3 回洗浄することで、RB 株の細胞と CdSe 粒子が混在するペレットを回収した後、以下の操作を施した。

1) 糖とタンパク質を分解する方法：ペレットに超純水 1 mL を加えて分散させた懸濁液と液量の約 1/3 量のガラスビーズ (1.5–2.5 nm, BZ-2, AS ONE, Osaka, Japan) を 1.5 mL 容マイクロチューブに採り、15 分間タッチミキサーで強撹拌した。液相を新しい 1.5 mL 容マイクロチューブに採り、遠心分離 (21,600 × *g*, 4°C, 10 min) により沈殿を回収した後、塩酸 (3, 4, または 6 N) 1 mL を加え、100°C で 1–2 時間熱処理した。本手法は CdSe 粒子に付着した菌体断片が分解されることで可溶化し、解離した CdSe 粒子が熱処理残渣内に回収されることを想定したものである。

2) 脂質を除去する方法：ペレット にクロロホルム・メタノール (体積比 1:1) 混液 1 mL を加えた懸濁液を採り、1)と同様にガラスビーズを加えて強撹拌した後、液相を新しい 1.5 mL 容マイクロチューブに採取した。これに液量の 1/3 量の超純水または 3 mM の $MgCl_2$ 水溶液を加えて混合し、遠心分離 (21,600 × *g*, 4°C, 10 min) した後、脂質が溶解している上層とタンパク質が含まれる中間層を除去した。本法では、細胞由来の脂質とタンパク質を除去することによって、残留物中に CdSe 粒子を回収することを想定している。

3) 遠心ろ過を用いる方法： Cui ら (2009) の遠心ろ過法を改変して行った。1)、2)と同様にしてガラスビーズを用いて強撹拌したペレットを 1 mL の超純水に懸濁し、分画分子量 10 kD または 100 kD の遠心ろ過フィルター (Amicon Ultra-0.5 / Ultra-4 Cenrifugal Filter Devices, Merk Millipore, Germany) に移し、遠心分離に供してろ液に含まれる CdSe 粒子を回収した。

4) wash beffer と超音波破砕処理、およびろ過を用いる方法： Park ら (2012) の方法を改変して行った。培養液 45 mL を 50 mL 容遠沈管に移して遠心分離 (15,000 × *g*, 4°C, 10 min) によりペレットを回収し、超純水で 3 回洗浄した。上清を捨て、ペレットを 5 mL の wash buffer (urea 181.8 g/L、glycine 11.25 g/L、EDTA 0.37 g/L、dithiothreitol 0.77 g/L; Park *et al*., 2012) に懸濁し、15 mL 容の遠沈管に移した。この懸濁液を氷上で超音波破砕処理 (130 W, 5 min) に供した後、まず孔径 0.45 μm、次に 0.2 μm のメンブレンフィルターにてろ過した。得られたろ液 1 mL を 1.5 mL 容マイクロチューブに採取し、遠心分離 (21,600 × *g*, 4°C, 10 min) により得られたペレットを超純水で 3 回洗浄することで CdSe 粒子を回収した。

適宜希釈したこの懸濁液 10 μL を銅メッシュグリッド (エラスチックカーボン支持膜 STEM100Cu 仕様, 応研商事) に滴下し、余分な水分をウエスに吸収させた後にデシケータ

ー内で一晩乾燥・固着させた。これを TEM (JEM-2100F, 日本電子) による観察、ならびに EDS (EX-24063JGT, 日本電子) による元素分析に供して、回収粒子の性状や純度を調べた (加速電圧 200 kV)。

2.5 サイズ選択的光エッチングによる粒径制御試験

RB 株により合成された CdSe 粒子の粒径を制御する方法として、ナノ粒子の水溶液に単色光を照射し、光腐食を起こすことで粒径を小さくするサイズ選択的光エッチング (size-selective photoetching) (Matsumoto *et al*., 1995, 1996)の有効性を試験した。本方法は、半導体の光腐食を利用した表面加工技術であり、松本ら (1995) による硫化カドミウム粒子への適用よって、サイズ選択性が確認されている。粒子のバンドギャップエネルギーは、粒径が小さくなると増大し、照射している単色光の光子エネルギーと一致した時点で光子エネルギーの吸収、すなわち光腐食が起こらなくなり、粒径の減少が停止する (Matsumoto *et al*., 1995, 1996)。光子エネルギーは、その光の波長によって決まるため、照射する単色光の波長によって到達する粒径を制御できる。CdSe ナノ粒子では、以下の反応 (Austin *et al*., 2004; Ying *et al*., 2004) によって粒子表面が分解され、粒径が減少する。

$$CdSe + 3/2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{hv} Cd^{2+} + SeO_2 + H_2O \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (4.1)$$

ここで、SeO_2 は二酸化セレン (無水亜セレン酸) であり、水と反応して亜セレン酸になる。よって、CdSe ナノ粒子にサイズ選択的光エッチングを行うと、副産物として亜セレン酸とカドミウムイオンが生じることになる。

本章 2.2 と同様に前々培養、前培養を行い、300 mL 容の三角フラスコに入った 100 mL の LCdSe-BSM2 培地に初期 OD_{600} = 0.02 になるように RB 株を植菌し、30°C、NaCl 1 g/L、pH 7.0 の条件のもとで 48 時間回転培養 (120 rpm) した。この培養液の半量から CdSe 粒子を本章 2.4 と同様の方法で回収した後、超純水を加えて全量を 3 mL にし、ガラス製の試験管に移した。これに暗所で青色 LED 光 (7 W, LB1526BD, beamtec, Saitama, Japan) を約 15 cm の距離から 24 時間照射した後、この懸濁液 1 mL を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し、紫外灯を照射して蛍光の有無を確かめた。さらに、この懸濁液を適宜希釈し、本章 2.4 と同様にして TEM 観察に供した。

第 3 節　実験結果

3.1 各培養条件における亜セレン酸および水溶性カドミウムの除去特性

様々な温度、NaCl 濃度、および pH における、RB 株による液相からの亜セレン酸および水溶性カドミウムの除去量の経時変化を Fig. 4.1 に示す。なお、NaCl 5 g/L および pH 8.5 の培養条件でのグラフは、それぞれ NaCl 1 g/L および pH 8.0 の場合とほぼ同様であったため割愛した。また、様々な温度における実験結果 (Fig. 4.1A–D) では、OD_{600} の経時変化も示

しているが、pH を 6.5 および 7.5 以上にした場合や、NaCl 濃度を高めた場合は、細菌細胞の強固なフロックが形成され、菌体濃度の測定が困難であり、これらの実験では菌体濃度の経時変化は示していない。

多くの培養条件において共通して、1) 培養 12 時間目までは亜セレン酸とカドミウムの顕著な除去は生じない、2) 培養 12 時間以降は、ほぼ等量 (モル数として) の亜セレン酸とカドミウムが同時に除去される、3) 培養後期 (おおむね 48 時間以降) には、水溶性カドミウムの除去速度が亜セレン酸のそれに比べて緩やかになり、亜セレン酸の除去量は水溶性カドミウムのそれを上回る (Fig. 4.1L を除く) 傾向がみられた。

亜セレン酸と水溶性カドミウムの除去に及ぼす温度の影響を Fig. 4.1A–D に示す。両者の除去速度は、25°C と 30°C において高かった。一方、両者の除去速度は 37°C において低下し、培養液からのそれらの除去率は 4 割程度に留まった。45°C では、さらに両者の除去が制限され、2 割程度の除去率に留まった。

亜セレン酸と水溶性カドミウムの除去に及ぼす NaCl 濃度の影響を Fig. 4.1E–H に示す。NaCl 濃度の影響は、10 g/L までは軽微であり、特に培養初期には基本条件と顕著な差のない亜セレン酸および水溶性カドミウムの除去が観察されたが、培養後半から水溶性カドミウムの除去が 6 割程度でほぼ完全に停止し、亜セレン酸の除去のみが進行する傾向がみられた。NaCl 20 g/L では、両者の除去は大きく阻害され、その除去率は 4 割程度に留まった。また、NaCl 1 g/L 以上では、培養 48 時間目までの亜セレン酸と水溶性カドミウムの除去量が他の条件に比べて特に近い値となった。

亜セレン酸と水溶性カドミウムの除去に及ぼす pH の影響を Fig. 4.1I–L に示す。両者の除去率は、pH 7.0 において最大を示した。また、pH 6.5 では培養 24 時間目以降の亜セレン酸とカドミウムの除去速度が低くなった。一方、pH 7.5 における両者の除去量は 120 時間にわたってほぼ等しかったものの、その速度は非常に緩やかであった。pH 8.0 以上では、さらに反応が阻害され、培養 72 時間目までは、水溶性カドミウムの除去量が亜セレン酸の除去量をわずかながら上回った。このような挙動は他の条件ではみられず、アルカリ条件に特異的な傾向といえる 。

Fig. 4.2 に様々な条件における培養 48 時間目の亜セレン酸および水溶性カドミウムの除去率をまとめた。25–30°C、NaCl 0.05–10 g/L、pH 7.0 の範囲において、亜セレン酸の除去率が 49–56%、水溶性カドミウムの除去率が 44–55%と高い値を示した。また、37°C、NaCl 1–20 g/L、pH 7.5 の条件では、亜セレン酸および水溶性カドミウムの除去量がモル量としてほぼ等しくなっていた。

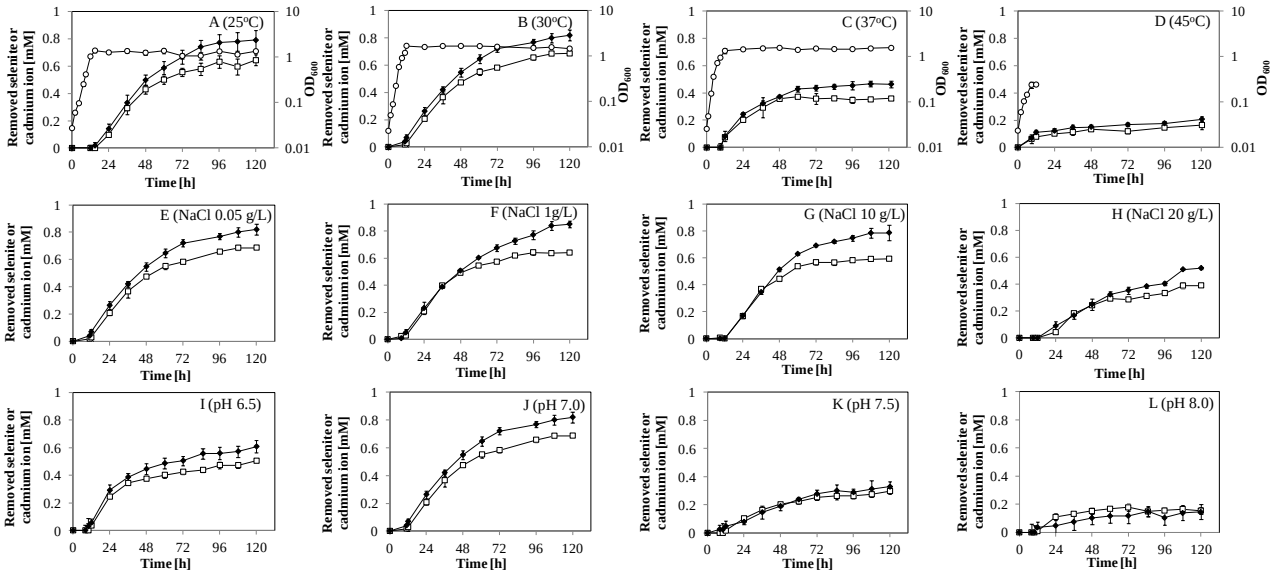

Fig. 4.1. Time courses of the cell concentrations (shown only in A–D) and removals of selenite and cadmium ion under the various conditions. Each experiment was conducted at (A) 25°C, (B) 30°C, (C) 37°C, (D) 45°C, (E) NaCl 0.05 g/L, (F) NaCl 1 g/L, (G) NaCl 10 g/L, (H) NaCl 20 g/L, (I) pH 6.5, (J) pH 7.0, (K) pH 7.5, and (L) pH 8.0. The common conditions were (A–D) NaCl 0.05 g/L and pH 7.0, (E–H) 30°C and pH 7.0, and (I–L) 30°C and NaCl 0.05 g/L. Symbols: closed diamonds, removed selenite; open squares, removed cadmium ion; open circles, OD_{600}. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

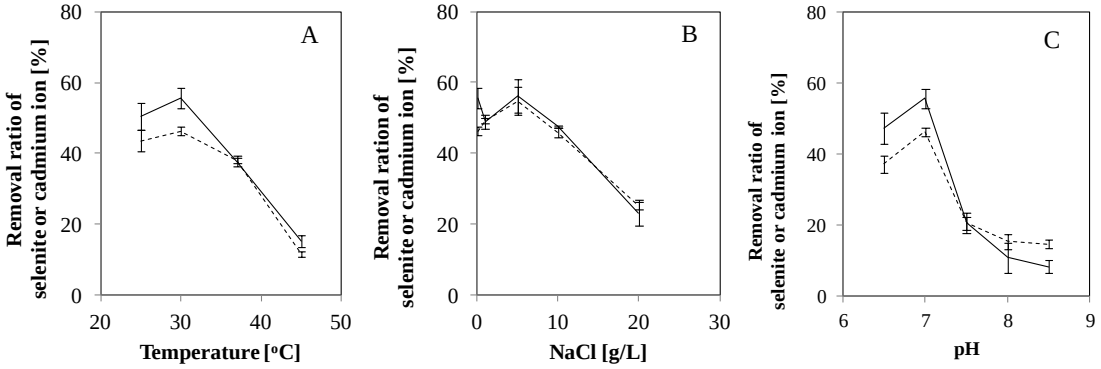

Fig. 4.2. The removal ratios of selenite and cadmium ion concentrations after 48-h cultivation of strain RB under various temperatures (A), salinities (B), and pH values (C). Symbols: solid lines, selenite; broken lines, cadmium ion. Vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments.

3.2 粒子回収方法の検討と各培養条件で合成されたナノ粒子の特徴

本章 3.1 で示した亜セレン酸と水溶性カドミウムの除去の傾向から、培養 48 時間以降は

生成粒子中のセレンの割合が増加すると考えられたため、粒子の回収は第 2 章のように反応終了後ではなく、培養 48 時間目に行い、以下のように各種の粒子回収法を検討した。

1) 糖とタンパク質を分解する方法では、ペレットが元素態セレンのような赤色に変色し、CdSe 粒子回収法として不適切なものと考えられた。一方、2) 脂質を除去する方法では、ペレットがこげ茶色に変色し、やはり純度の高い粒子回収法にはならないことが分かった。また、3) 遠心ろ過を用いる方法では、ろ液に粒子はみられず、やはり CdSe 回収法として不適であった。しかし、4) wash beffer と超音波破砕処理およびろ過を用いる方法では、CdSe に特徴的な色調を持つ粒子が回収され、粒子と細胞断片をより明確に分離できたものと考えられたことから、粒子回収方法としてこの方法を用いることにした。

基本条件 (30°C, NaCl 0.05 g/L, pH 7.0) において 48 時間培養した RB 株細胞と、その培養液から改変した Park ら (2012) の方法を用いて回収した粒子の TEM 画像を Fig. 4.3 に示す。また、様々な条件で 48 時間培養した RB 株の培養液から回収した粒子の TEM 画像および EDS スペクトルを Fig. 4.4 に示す。培養条件によって合成された粒子の形態およびサイズに大きな変化はみられず、10 nm 前後の小さな粒子と 70–100 nm 程の大きな粒子の混合物が回収されていた。

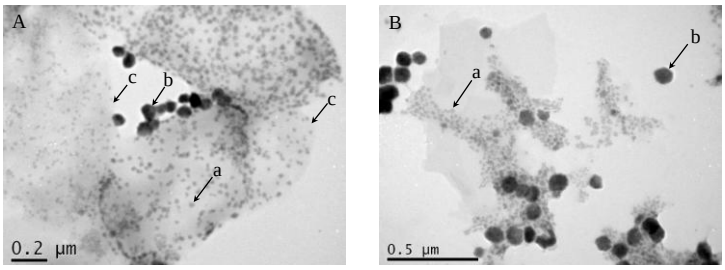

Fig. 4.3. Typical TEM images of (A) strain RB cells and (B) synthesized nanoparticles cultured for 48 h at 37°C, NaCl 0.05 g/L, and pH 7.0. The arrows indicate small particles (a), large particles (b), and the strain RB cells (c).

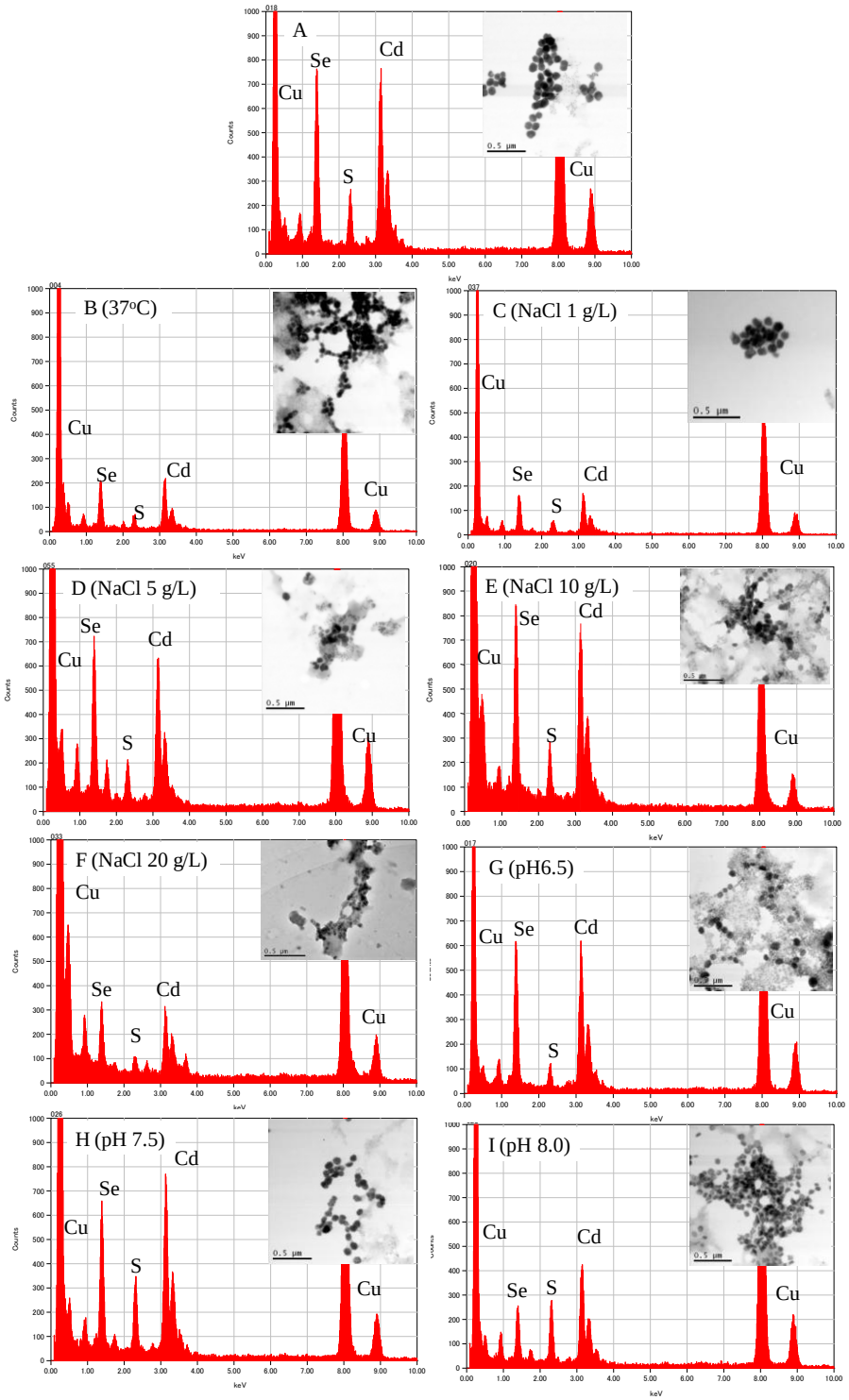

Fig. 4.4. EDS spectra of the particles and its microscopic sites synthesized under various conditions. The particles were synthesized under the basic condition of 30°C, 0.05 g/L NaCl, and pH 7.0(A), 37°C (B), NaCl 1 g/L (C), NaCl 5 g/L (D), NaCl 10 g/L (E), NaCl 20 g/L (F), pH 6.5 (G), pH 7.5 (H), pH 8.0 (I).

各条件で生成した粒子の組成 (細胞成分由来と考えられる炭素、リン、酸素および銅グリッドに由来する銅は除く) およびセレンとカドミウムの原子数比 (Se/Cd 比) を Fig. 4.5 に示す。温度や NaCl 濃度によって粒子の組成に大きな変化はなく、37°C および NaCl 1 g/L において、Se/Cd 比はそれぞれ 1.02、1.07 となり、各条件で最も CdSe の量論値 (1.0) に近くなった。一方、カドミウムの割合はあまり変化しなかったものの、pH がアルカリ性になるほど硫黄の割合が増え、セレンの割合が減り、Se/Cd 比は減少する傾向が見られた。逆に酸性側では、粒子に含まれる硫黄の割合が減少した。様々な pH における RB 株の培養液の画像を Fig. 4.6 に示す。pH が高くなるに従って、赤色から徐々に黄色を帯びていき、pH8.0、8.5 では明るい黄色を示した。

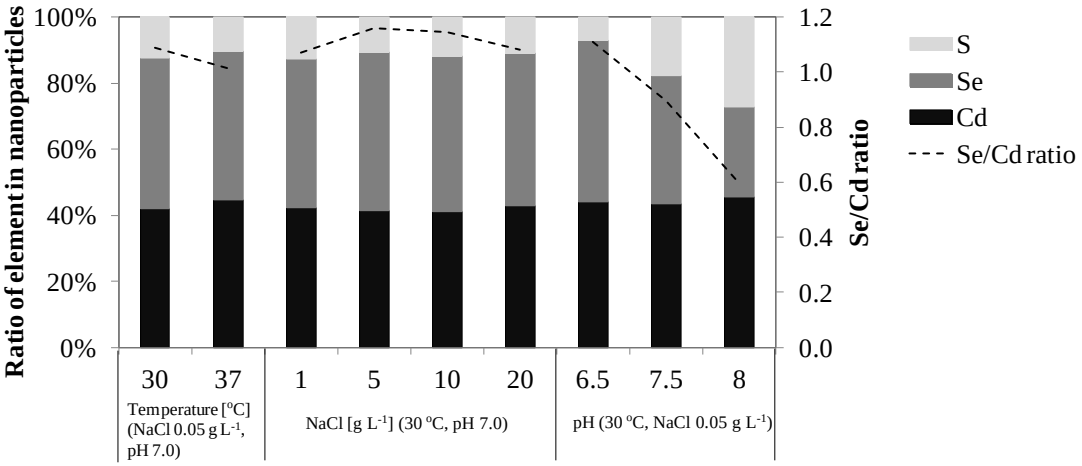

Fig. 4.5. Composition (bar graphs) and Se/Cd ratios (broken lines) of the biogenic nanoparticles synthesized under various conditions.

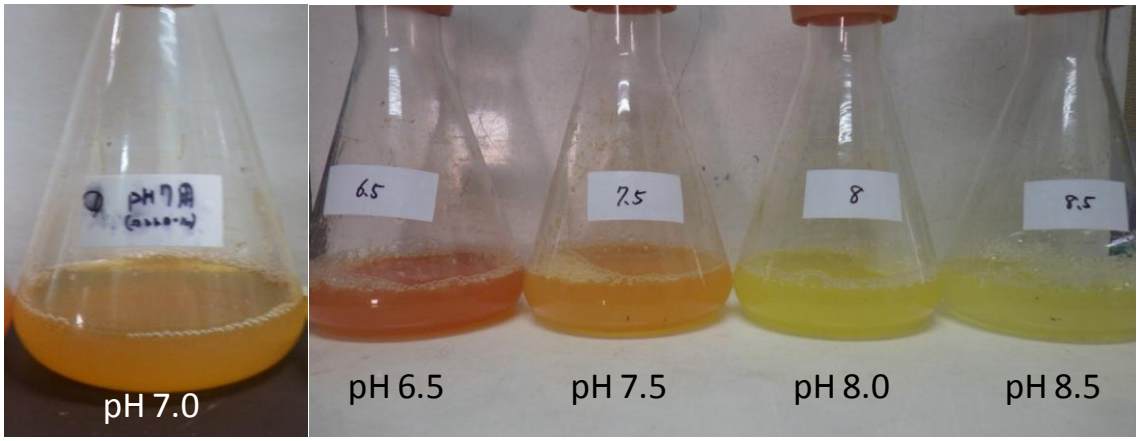

Fig. 4.6. Strain RB cultures with selenite and cadmium ion under various pH values.

3.3 青色光照射による光エッチングの適用による粒径制御

RB 株の培養液から回収した粒子に青色光を 24 時間照射することでサイズ選択的光エッチングを施した。その処理前後の紫外光による粒子の蛍光と TEM 画像を Fig. 4.7 に示す。培養液から回収した直後の CdSe 粒子を含む溶液は、ほとんど蛍光を発さなかったが、青色光を照射した後は、黄色の蛍光発色が確認された。また、このときの溶液中の粒子の大きさは、60 nm 前後のものも確認されたものの (data not shown)、その多くは 5 nm 前後であった。

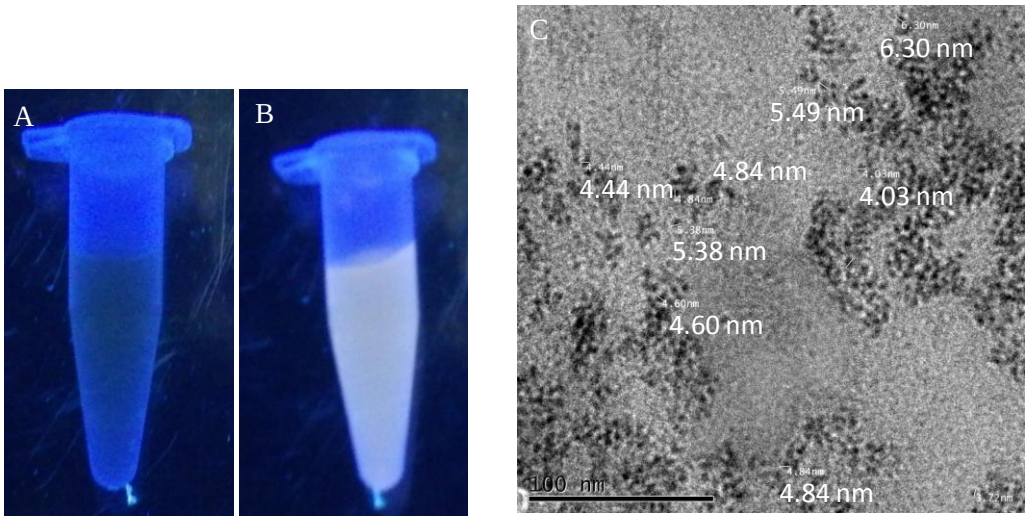

Fig. 4.7. The fluorescence emissions after 0 h (A) and 24 h (B) irradiation of blue light and the TEM image of the particles after 24 h irradiation (C).

第 4 節　考察

本章では、RB 株を様々な温度、NaCl 濃度、および pH のもとで培養し、これらの条件が CdSe ナノ粒子の合成に与える影響を明らかにすることで、CdSe ナノ粒子を効率的な生産条件を模索し、CdSe ナノ粒子合成の最適条件は 25–30°C、NaCl 0.05–10 g/L、pH 7.0 の範囲であることが明らかになった。

第 3 章に示したように RB 株の増殖の最適温度は 37°C であるが、亜セレン酸と水溶性カドミウムがその培養液から除去され、CdSe の合成が速やか進行する温度は、25–30°C であることが明らかになった。すなわち、CdSe 合成に関わる酵素の生産量や活性の安定性などの至適温度は、増殖の至適温度と異なると考えられる。CdSe 合成に関わる酵素の候補として、γ-Glutamyl transpeptidase (GGT) が考えられる。グルタチオンは微生物による CdSe 合成への関与が推測されており (Cui *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2014)、RB 株のドラフトゲノム解析でも、その関連遺伝子の存在が確認されている (Table 3.2)。GGT は細胞外のグルタチオンを加水分解し、細胞内で行われるグルタチオンの生合成に必要なシステインを供給する膜タ

ンパク質であり、大腸菌を用いた実験において、その活性、生産量、および *ggt* mRNA の安定性が 37°C では 20°C に比べて低下したという報告がある (Hashimoto *et al.*, 1997)。RB 株の持つ GGT が同様の温度特性を持っていれば、37°C 以上の条件では、システインの供給が阻害され、亜セレン酸の還元に必要なグルタチオンが不足する可能性がある。これらのことは、RB 株による CdSe 合成に GGT が関与しているという仮説を支持するものとも考えられる。

他方、CdSe 合成に影響を与える NaCl 濃度の範囲は、その増殖に影響を与える範囲とほぼ等しかった。すなわち、増殖に影響を及ぼさない NaCl 濃度では、CdSe 合成への影響も少ないと言える。ただし、高濃度の NaCl が CdSe の前駆体となるセレン化物とカドミウムを会合しやすくしている可能性がある。

pH は生成粒子の Se/Cd 比、および硫黄含有率に最も大きな影響を与える因子であった。塩基性域を除く条件では、第 2 章の結果 (Se/Cd 比 = 1.18, 硫黄含有率 20.7%) に比べ、生成した粒子の元素組成は CdSe 粒子の理想的な Se/Cd 比により近い値 (1.02–1.16) となり、硫黄含有率 (約 10%) も低くなったことから、pH を適正に制御することで純度が高い CdSe 合成を行えることが明らかになった。また、ここで培養後期にカドミウム除去速度の低下が生じることから、粒子の回収時期を最適化することは重要であるといえる。pH 7.5–8.0 における RB 株の増殖は良好であった一方 (Fig. 3.1)、CdSe 合成速度は大きく低下し、特に pH 8.0 においては CdSe 粒子の純度も低下した。CdSe が赤褐色である (Kumar *et al.*, 2007) のに対し、CdS は明るい黄色を示すことが知られているが (Ahmad *et al.*, 2002)、pH 7.5–8.5 での RB 株の培養液は黄色みがかっており、CdS が比較的多く生成したものと考えられた。酸性条件下では、合成された粒子のセレンの割合がやや高く、塩基性になるにつれて、セレンの割合が下がるとともに硫黄の割合が上昇した現象は、酸性条件下では元素態セレンが、塩基性条件下では CdS が、CdSe の合成と競合することによるものと推測される。ここで、カドミウムは塩基性条件下で水酸化カドミウムを形成するが、EDS 分析において、いずれの pH でも酸素や水素の存在比に変化は見られなかったため、水酸化カドミウムの合成量は無視できるものと考えられる。以上のような実験結果も踏まえ、酸性・中性条件と塩基性条件下において、RB 株が合成する粒子の合成経路の仮説を Fig. 4.8 に示す。まず、CdSe の合成機構は、第 3 章で考察したセレノラートアニオンによるカドミウムへの求核攻撃であると仮定する。また、Sanghi と Verma (2009) は、菌類 *Coriolus versicolor* による CdS 合成は、タンパク質のチオール基の硫黄とカドミウムの結合によるものと考察しているが、ここで、チオール基の酸解離定数 p*K*a は 8.9 (Harris and Turner, 2002) である。よって、本研究が行われた pH (6.5–8.5) の範囲では、チオール基は水素イオンを解離しにくい状態にあり、CdS の合成が起こりにくいと考えられる。しかし、塩基性域ではチオール基が水素イオンを解離してチオラートアニオンになりやすくなる。チオラートアニオンはチオールに比べて反応性 (求核性) が高く (Reddie *et al.*, 2008)、カドミウムイオンもしくは正に分極していると考えられる$(GS)_2Cd$ のカドミウム原子に求核攻撃しやすくなり、CdS の合成が促進された

と考えられる。このようにして、塩基性域では CdSe 合成と CdS 合成が競合したものと考えられる。

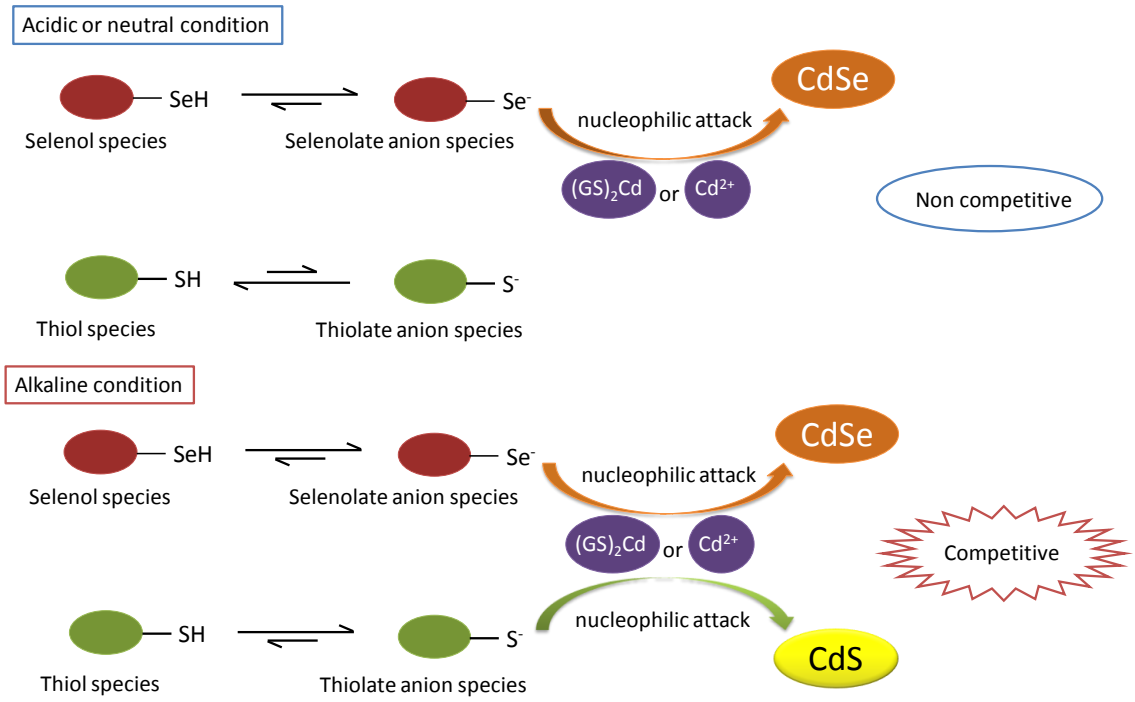

Fig. 4.8. Hypothetical mechanisms of CdSe and CdS synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* RB under different pH conditions. Under acidic and neutral conditions, the thiol group involved in the CdS synthesis does not easily release its proton, resulting in dominant synthesis of CdSe. Under alkaline conditions, the thiol group easily dissociates into thiolate anion and forms a Cd–S bond with the cadmium atom of $(GS)_2Cd$ or Cd^{2+}, resulting in competitive synthesis between CdSe and CdS.

また、培養液 (細胞) からの CdSe 粒子回収方法を種々検討したが、本章で試みた方法のうち改変した Park ら (2012) の方法以外では粒子の変性が起こる、もしくは十分な回収ができなかった。糖およびタンパク質の分解処理を行った場合、沈殿が赤色に変色したが、これは塩酸により CdSe が元素態セレンに酸化されたためと考えられる。脂質の分離操作を行った場合にこげ茶色に変色した理由については明らかにできなかったが、少なくとも回収物に CdSe 粒子以外の成分が比較的多く含まれているものと考えられることから、CdSe 粒子の回収法としては適していないものと判断した。また、遠心ろ過による回収ではろ液中に粒子が認められず、細胞断片と粒子が強く密着していたために、ガラスビーズを用いた撹拌では粒子の細胞からの乖離が十分に行われなかったものと考えられる。

Park ら (2012) の方法の改変法により、RB 株の培養液から回収された粒子の大きさの分布は、約 10 nm と 70–100 nm に二極化していたが、これらはそれぞれ培養液中の RB 株の細胞内/表層と細胞外で観察された粒子に由来すると考えられる。ここで、30–60 nm の中間の大きさの粒子がほとんど観察されなかったことから、厚みが約 10 nm であるペリプラズムのような細胞の微小空間において、粒径が制限されながら CdSe が合成され、細胞外に放出されると凝集して成長したために、先に述べた粒子径分布の二極化が見られたもの考えられる (Fig. 4.9)。この観察は、RB 株による CdSe 合成メカニズムを推定するうえで、ある種のヒントをあたえるものともいえる。例えば、3 章で挙げた CdSe 前駆体候補の物質が、ペリプラズムに集中的に存在するかどうかは不明であるが、亜セレン酸還元に関わると考えられるグルタチオンはペリプラズムに輸送されるという報告がある (Eser *et al*., 2009)。また、CdSe 合成の場がペリプラズムであれば、その付近にはイオンを排出するトランスポーターがあり、カドミウムを排出する際に CdSe 前駆体となるセレノラートアニオンとカドミウムが会合して CdSe を形成しているのかもしれない。NaCl 濃度が高い条件下では、陽イオンの排出が活発になり、トランスポーターは異なるとしても、カドミウムイオンの移動も活発になるのではないかと考えられるため、CdSe 前駆体との会合が起こりやすくなると考えれば、NaCl 濃度が高いときに亜セレン酸とカドミウムの除去量が、ほぼ等しくなったことと矛盾しない。

一方、既往研究 (He *et al*., 2008; Konishi *et al*., 2009; Gurunathan *et al*., 2009; Mohammed *et al*., 2009) では、温度または pH、もしくはその両方により、金または銀のナノ粒子の粒径および形状が変化したことが報告されている。これらの報告では、菌体を含まない培養液上清を用い、その還元作用によって銀もしくは金ナノ粒子を合成し、温度や pH の上昇とともに粒径が小さくなる傾向がみられた。生細胞を用いた本研究では、粒子の周囲にある多くの生体分子や細胞のホメオスタシスの影響により、粒子成長速度は温度や pH によって影響を受けにくかったと考えられる。one-vessel 反応である本研究では、RB 株の増殖への影響を考慮し、既往研究のような生物反応が生じにくい極端な条件 (10°C, 60°C , pH 2, pH 10 など) における検討はしていないが、今後検討の余地があるかもしれない。

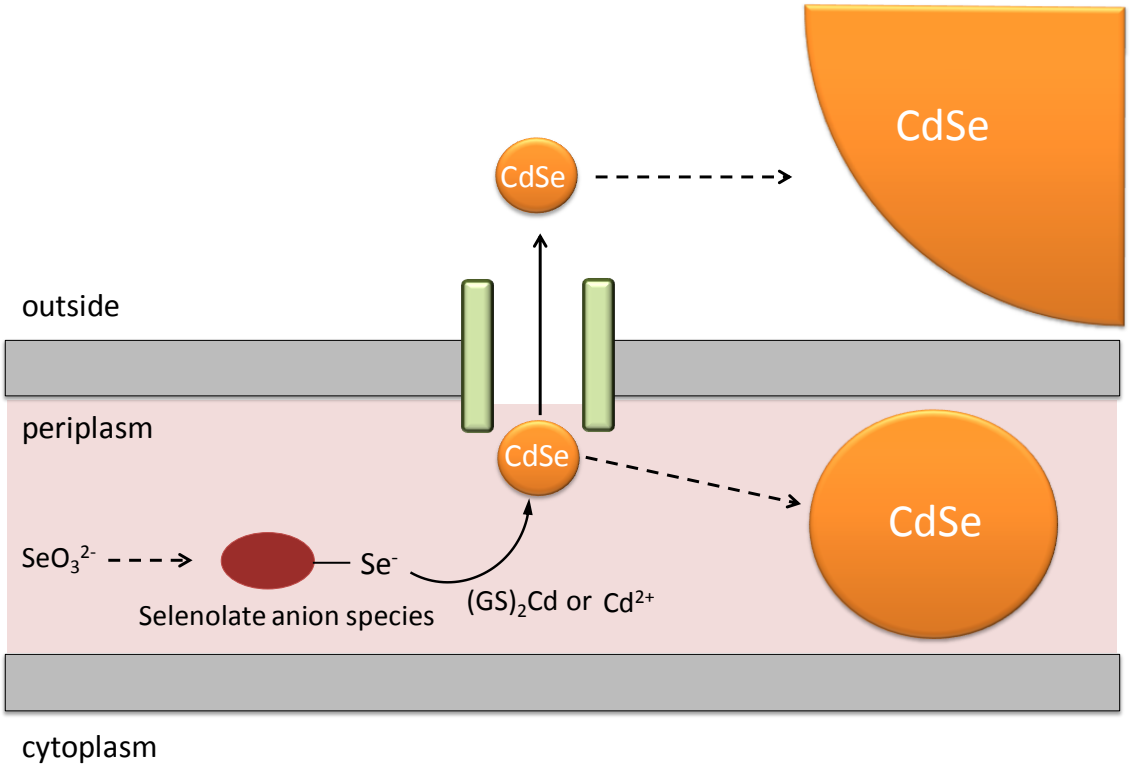

Fig. 4.9. Hypothetical mechanism of CdSe synthesis in periplasm of strain RB. CdSe particles grow up to 10 nm in the periplasm. CdSe nanoparticles are excreted from the cells through a transporter and grow outside up to 70–100 nm.

RB 株の培養液中から回収した粒子に青色光を照射することで、サイズ選択的光エッチングを行った結果、蛍光発色を確認することができ、これにより RB 株により合成された CdSe 粒子が実用化に耐えるものに加工し得ることが確認された。このとき得られた粒子の粒径は Table1.1 に示した黄色の蛍光を発するときの CdSe 量子ドットの粒径に近かった。サイズ選択的光エッチングでは、照射する単色光の波長によって粒径が制御できるので、RB 株によって合成された CdSe ナノ粒子に多様な量子ドットとしての性能を付与できると考えられる。ここではさらに、光を照射する前に 100 nm 前後の大粒子をフィルター沪過で取り除くことで、CdSe 粒子の粒径をより均一にできると考えられる。また、RB 株を人工気象器などで光を照射しながら培養すれば、CdSe ナノ粒子の合成と粒径制御を同時に行うことができ、目的の粒径を持つ CdSe ナノ粒子をより高収率で回収できる可能性がある。この場合は、光による酸化ストレスが細胞に悪影響を与えると予想されるため (Ziegelhoffer *et al.*, 2009)、抗酸化剤としてアスコルビン酸 (ビタミン C) と、アスコルビン酸の光分解を防ぐためにチオ尿素を添加する (稲垣ら, 1955) などといった措置が必要になると考えられる。

第 5 節　要約

本章では RB 株の培養条件が CdSe ナノ粒子の合成に与える影響を調べた。その結果、25–30°C、NaCl 0.05–10 g/L、pH 7.0 が CdSe ナノ粒子の合成のための適正条件であり、粒子の純度の低下を避けるため、粒子の回収は培養開始 48 時間後までに行うべきであることがわかった。また、塩基性域では CdSe と CdS の合成が競合するため、pH 制御が非常に重要であることが明らかになった。一方、培養条件による粒径の顕著な変化は生じず、その分布は約 10nm と 70–100 nm に二極化していた。そこで、培養液から粒子を回収後、青色光を用いたサイズ選択的光エッチングを施した結果、CdSe 粒子の大きさが 5 nm 前後になり、黄色の蛍光発色が観察された。以上から、RB 株による CdSe 量子ドットの合成が可能であることが示された。

総括ならびに結論

量子ドットの一種であるセレン化カドミウム (CdSe) は、学術的基礎研究も含め工業的に多くの分野で利用されている。しかし、現在主流となっている CdSe の化学的な合成法では有害な溶媒や高温高圧条件が用いられるため、より低コストかつ環境負荷の低い新たな合成法の開発が期待されて、微生物の金属代謝を利用したメタルバイオテクノロジーによる合成が注目されている。微生物による CdSe ナノ粒子の合成に関する研究としては、これまでに 5 件の報告があり、いずれも微生物により亜セレン酸を還元し、その還元産物をカドミウムと反応させることで CdSe ナノ粒子を合成するものである。しかし、これらで用いられている微生物はいずれも、純粋分離された既知の微生物を利用したものであり、特に CdSe ナノ粒子の合成のために特化してスクリーニングされたものではないことから、CdSe の合成触媒として必ずしも有効な微生物であるとはいえない側面が残されている。例えば、Kumar ら (2007) が用いた真菌 と Park ら (2012) が用いた遺伝子組換え大腸菌を除けば、これまでに用いられてきた微生物はカドミウム耐性を持たないため、CdSe ナノ粒子の合成工程は、亜セレン酸を微生物に還元させた後にカドミウムを添加する 2 段階の反応系 (two-vessels) で構成しなくてはならないという制約があった。また、Kumar ら (2007) が用いた真菌 (真核微生物) は、1 段階の反応系 (one-vessel) での CdSe 合成が可能であるものの、細菌に比べて反応速度が遅いのが欠点である。このような制約を取り払い one-vessel で速やかに CdSe を合成できる系を構築するためには、カドミウム耐性と亜セレン酸還元能を有する細菌を新たに検索し、利用することが考えられる。そこで、本研究では、one-vessel での CdSe ナノ粒子を合成可能な低コストで環境調和型の合成プロセスの開発を目指し、それに資する細菌株のスクリーニング、およびその CdSe ナノ粒子の合成特性の特徴づけを行うことを目的とした実験検討を行った。

第 1 章では、量子ドットとして利用される化合物半導体である CdSe、ZnSe、および CdTe ナノ粒子の微生物合成に関する既往研究をまとめた。ここで取り上げた 9 報の論文のうち、多くのものは真菌や酵母を用いており、細菌として用いられたものは、*V. atypica* (Pearce *et al.*, 2008) と大腸菌 (Park *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014) のみであったが、前者は嫌気性細菌であり、培養方法が煩雑であるという制約を持つものであった。また、多くのものは微生物の培養過程と原料金属を加える合成過程が分かれた two-vessel 反応で行われていた。一方、one-vessel 反応でのナノ粒子合成でも、細胞内に粒子が合成される intracellular 系の場合には、細胞を破砕して粒子を回収する作業が必要となるという欠点があることが示されていた。また、微生物の培養時間、亜セレン酸およびカドミウムの添加時期と濃度、反応時間等を検討し、CdSe の合成条件の最適化を試みているのは Yan ら (2014) の報告のみであり、今

後はプロセスの効率化に関する検討を行うことも重要であると考えられた。CdSe の合成のメカニズムについては、Cui ら (2009) が *in vivo* と *in vitro* の双方の実験により、セレノシステインが関与しているとの知見を提示し、また Park ら (2012) は重金属結合タンパク質が関与していることを示唆しているが、詳細は不明であり、今後の解明が待たれている。

第 2 章では、亜セレン酸およびカドミウムを含む培地を用いて、重金属汚染が疑われる土壌サンプルから CdSe ナノ粒子を合成する細菌の集積・単離を行った。その結果、有望な細菌株として *Pseudomonas* sp. strain RB が得られた。RB 株は亜セレン酸とカドミウムを含む培地中で両者を同時に水相から除去し、培養液は CdSe に特徴的な赤褐色 (reddish brown) を呈した。さらに、RB 株は主にセレンとカドミウムから構成される 10–20 nm の粒子を細胞内および細胞表層に蓄積することが確認された。以上から、RB 株は CdSe ナノ粒子を one-vessel で合成できる細菌であるといえ、世界で初の報告となる。

第 3 章では、単離された *Pseudomonas* sp. RB 株の炭素源資化特性と増殖特性を明らかにし、さらにドラフトゲノム解析を行うことで、その基礎的な生理学的・遺伝学的特徴を明らかにした。RB 株はアミノ酸やカルボン酸を中心に多くの炭素源を資化可能であり、10–45°C、pH 5–9.5、および NaCl 濃度 0.05–40 g/L の広範な条件下で安定した培養が可能な細菌であることが示された。また、亜セレン酸濃度が 1 mM を超えると増殖が大きく阻害され、カドミウム濃度 1–20 mM において比増殖速度が約 25%低下することが明らかになった。さらに、ドラフトゲノム情報から RB 株は *P. aeruginosa*、あるいはその類縁種であることが明らかとなった。RB 株が保有する亜セレン酸代謝およびカドミウム耐性に関わる遺伝子は、他の *P. aeruginosa* 株と比較して特異的なものではなく、*P. aeruginosa* は CdSe の合成に必要な酵素を共通して有している可能性が示唆された。また、RB 株が保有する遺伝子と他の研究例 (Cui *et al*., 2009; Park *et al*., 2012; Yan *et al*., 2014) から、CdSe 合成機構について以下のように考察した。すなわち、RB 株はその細胞内において亜セレン酸をセレノール基をもつ化合物に還元し、これが生理的 pH 条件下でセレノラートアニオンになり、カドミウムイオンもしくはビス(グルタチオナト)カドミウムと反応する、もしくはセレンおよびカドミウムがメタロチオネインに取り込まれることで CdSe が合成されると考えられた。

第 4 章では、RB 株の培養条件が CdSe ナノ粒子の合成に与える影響を調べ、その効率化を図る手がかりを得た。その結果、25–30°C、NaCl 0.05–10 g/L、pH 7.0 が CdSe ナノ粒子の合成のための適正条件であり、粒子の純度の低下を避けるため、粒子の回収は培養開始 48 時間後までに行うべきであることがわかった。また、塩基性の pH 域では CdSe と CdS の合成が競合するため、pH 制御が非常に重要であることが明らかになった。一方、培養条件に依存した CdSe 粒子の粒径の顕著な変化は生じず、その分布は約 10nm と 70–100 nm に二極化していた。そこで、培養液から粒子を回収後、青色光を用いたサイズ選択的光エッチン

グを施した結果、CdSe 粒子の大きさが 5 nm 前後になり、黄色の蛍光発色が観察された。以上から、RB 株による実用可能な CdSe 量子ドットの合成が可能であることが示されたものといえる。

以上、本研究では環境中から one-vessel、intracellular 系で CdSe ナノ粒子を合成できる新規な細菌として RB 株を単離し、その微生物学的特徴づけ、ドラフトゲノム解析による CdSe 合成経路の推定、高純度の CdSe ナノ粒子合成を効率的に得るための培養条件 (温度、NaCl 濃度、pH) および粒子の回収時期の最適化を行うことができた。さらに、合成された CdSe ナノ粒子に光エッチングを施すことで蛍光発色すること、すなわち量子ドットとしての機能発現を確認することができた。これらは前例のない研究であり、微生物による化合物半導体ナノ粒子合成に関する研究のさらなる発展に貢献する成果であると考える。

今後の展望として、CdSe のような従来の 2 元素からなる量子ドット (binary quantum dots) に留まらず、3 つ以上の元素からなる合金型量子ドット (alloyed quantum dots, Bailey *et al*., 2003) の合成へも微生物合成を適用していくことが期待される。合金型量子ドットは粒径、組成、内部構造といったパラメータを変化させることで、それを構成する個々の 2 元素系の量子ドットにはない特性 (遠/近赤外蛍光など) を付与することができる (Bailey *et al*., 2003)。例えば、セレン、カドミウム、および硫黄から構成される量子ドットとして、硫セレン化カドミウム (CdSeS, Jang *et al*., 2003; Al-Salim *et al*., 2007) が知られている。塩基性条件下で RB 株を培養した時に合成される粒子には、硫黄分が増加する傾向が認められており、あるいは CdSeS の合成が可能であるとも考えられる。特に、培養条件を変化させることで任意の組成をもつ $CdSe_xS_y$ や、その他の合金型量子ドットをも合成することができれば、その利用価値は極めて高いものとなる。

また、微生物よる合成が期待できる、量子ドット以外の半導体ナノ粒子として、テルル化ビスマス (Bi_2Te_3) やセレン化ビスマス (Bi_2Se_3) 等の熱電材料が挙げられる。熱電材料は温度差を与えると電圧を生じるというゼーベック効果を利用し、未利用熱エネルギーから電力を得る熱電発電に用いられる (太田と山本, 2013)。現状の熱電素子の化学合成でもやはり 130–400°C ほどの高温条件が必要であるため (Wang *et al*., 1999; Kadel *et al*., 2011; Saleemi *et al*., 2012; Fang *et al*., 2013)、微生物合成は省エネルギー型の合成法としての価値を有するものと考えられる。また、実用的な熱電変換効率を得るためにはナノ構造化が必要であり、そのために行われるボールミル処理等の工程にも多大なエネルギーを必要としているが (Lan *et al*., 2010)、微生物による微細粒子合成によって、このような工程での省エネルギー化を図ることも期待される。

参考文献

Ahmad, A., Mukherjee, P., Mandal, D., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R., and Sastry, M.: Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum*, J. Am. Chem. Soc., 124, 12108–12109 (2002).

Al-Salim, N., Young, A.G., Tilley, R.D., McQuillan, A.J., and Xia, J.: Synthesis of CdSeS nanocrystals in coordinating and noncoordinating solvents: solvent's role in evolution of the optical and structural properties, Chem. Mater., 19, 5185–5193 (2007).

Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., and Zagnitko, O.: The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology, BMC Genomics, 9:75. (2008).

Baesman S.M., Stolz J.F., Kulp T.R., and Oremland R.S.: Enrichment and isolation of *Bacillus beveridgei* sp. nov., a facultative anaerobic haloalkaliphile from Mono Lake, California, that respires oxyanions of tellurium, selenium, and arsenic, Extremophiles, 13, 695–705 (2009).

Bailey, R.E. and Nie, S.: Alloyed semiconductor quantum dots: tuning the optical properties without changing the particle size, J. Am. Chem. Soc., 125, 7100–7106 (2003).

Bao, H., Hao, N., Yang, Y., and Zhao, D.: Biosynthesis of Biocompatible Cadmium Telluride Quantum Dots Using Yeast Cells Nano Res, 3, 481–489 (2010a).

Bao, H., Lu, Z., Cui, X., Qiao, Y., Jun, G., Anderson, J.M., and Li, C.M.: Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots, Acta Biomaterialia, 6, 3534–3541 (2010b).

Boylea, B., Fernandezb, L., Larochea, J., Kukavica-Ibrulja I., Mendesc, C. M. F., Hancockb, R.W., and Levesquea R.C.: Complete Genome Sequences of Three *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Phenotypes of Polymyxin B Adaptation and Inducible Resistance, J. Bacteriol., 194, 529 (2012).

Challenger, F., Lisle, D. B., and Dransfield, P. B.: Studies on biological methylation. Part XIV. The

formation of trimethylarsine and dimethyl selenide in mould cultures from methyl sources containing 14C, J. Chem. Soc., 1760–1771 (1954).

Cowan, S.T. and Steel, K.J.: Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, second edition, Cambridge University Press, Cambridge (1974).

Cui, R., Liu, H.H., Xie, H.Y., Zhang, Z.L., Yang, Y.R., Pang, D.W., Xie, Z.X. Chen, B.B., Hu, B., and Shen, P.: Living yeast cells as a controllable biosynthesizer for fluorescent quantum dots, Adv. Funct. Mater, 19, 2539–2364 (2009).

Derfus, A.M., Chan, W.C.W., and Bhatia, S.N.: Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots, Nano Lett., 4, 11–18 (2004).

Eser, M., Masip, L., Kadokura, H., Georgiou, G., and Beckwith, J.: Disulfide bond formation by exported glutaredoxin indicates glutathione's presence in the *E. coli* periplasm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 1572–1577 (2009).

Fang, H., Feng, T., Yang, H., Ruan, X., and Wu, Y.: Synthesis and thermoelectric properties of compositional-modulated lead telluride−bismuth telluride nanowire heterostructures, Nano Lett., 13, 2058−2063 (2013).

Gaponik, N., Talapin, D.V., Rogach, A.L., Hoppe, K., Shevchenko, E.V., Kornowski, A., Eychmüller, A., and Weller, H.: Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes, J. Phys. Chem. B, 106, 7177–7185 (2002).

Grimont, P. A. D., Vancanneyt, M., Lefèvre, M., Vandemeulebroecke, K., Vauterin, L., Brosch, R., Kersters, K., and Grimont, F.: Ability of biolog and biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the Pseudomonads, Syst. Appl. Microbiol., 19, 510–527 (1996).

Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S.R., Muniyandi, J., Hariharan, N., and Eom, S.H.: Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*, Colloids Surf B Biointerfaces., 74, 328–335 (2009).

Harris, T.K. and Turner, G.J.: Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites, IUBMB Life., 53, 85–98 (2002).

Hashimoto, W., Suzuki, H., Yamamoto, K., and Kumagai, H.: Analysis of low temperature inducible mechanism of gamma-glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli* K-12, Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 34–39 (1997).

He, S., Zhang, Y., Guo, Z., and Gu, N.: Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulate*, Biotechnol. Prog., 24, 476–480 (2008).

Jang, E., Juna, S., and Pua, L.: High quality CdSeS nanocrystals synthesized by facile single injection process and their electroluminescence, Chem. Commun., 2964–2965 (2003).

Kadel, K., Kumari, L, Li, W.Z., Huang, J.Y., and Provencio, P.P.: Synthesis and thermoelectric properties of Bi_2Se_3 nanostructures, Nanoscale Res. Lett., 6, 1–7 (2011).

Kagami, K., Narita, T., Kuroda, M., Notaguchi, E., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S., and Ike, M.: Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I, Wat. Res., 47, 1361–1368 (2013).

Karbasian, M., Atyabi, S.M., Siadat, S.D., and Momen, S.B.: and Norouzian, D.: Optimizing nano-silver formation by *Fusarium oxysporum* PTCC 5115 employing response surface methodology, American Journal of Agricultural and Biological Science, 3, 433–437 (2008).

Kaur, A. and Gupta, U.: A review on applications of nanoparticles for the preconcentration of environmental pollutants, J. Mater. Chem., 19, 8279–8289 (2009).

Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M., and Bachofen, R.: Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, Appl. Environ. Microbiol., 65, 4734–4740 (1999).

Klaus, T., Joerger, R., and Olsson, E., and Granqvist, C.G.: Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 96, 13611–12614 (1999).

Klonowska, A., Heulin, T., and Vermeglio, A.: Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*, Appl. Environ. Microbiol., 71, 5607–5609 (2005).

Konishi, Y., Tsukiyama, T., Tachimi, T., Saitoh, N., Nomura, Y., and Nagamine S.: Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing bacterium *Shewanella algae*, Electrochim.

Acta, 53, 186–192 (2007).

Kumar, S. A., Ansary, A. A., Ahmad, A., and Khan, M. I.: Extracellular biosynthesis of CdSe quantum dots by the fungus, *Fusarium oxysporum*, J. Biomed. Nanotechnol., 3, 190–194 (2007).

Kuroda, M., Notaguchi, E., Sato, A., Yoshioka, M., Hasegawa, A., Kagami, T., Narita, T., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S., and Ike, M.: Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions, J. Biosci. Bioeng., 112, 259–264 (2011).

Lan, Y., Jerome, A., Chen, M.G., and Ren, Z.: Enhancement of thermoelectric figure-of-merit by a bulk nanostructuring approach, Adv. Funct. Mater., 20, 357–376 (2010).

Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M.: Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial, Genome Biol., 7, R90 (2009).

Lee, J., Mahendra, S., and Alvarez, P.J.J.: Nanomaterials in the Construction Industry: A Review of Their Applications and Environmental Health and Safety Considerations, ACS Nano, 4, 3580–3590 (2010).

Li, X., Xu, H., Chen, Z.S., and Chen, G.: Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications, J. Nanomater., 2011 (2011).

Lohse, S.E. and Murphy, C.J.: Applications of Colloidal Inorganic Nanoparticles: From Medicine to Energy, J. Am. Chem. Soc., 134, 15607–15620 (2012).

Lloyd, J.R., Byrne, J.M., and Coker, V.S.: Biotechnological synthesis of functional nanomaterials, Curr. Opin. Microbiol., 22, 509–515 (2011).

Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C.N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R.S., Montgomery, P., White, J.R., Godfrey, P.A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J.E., and Lory, S.: Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 26, 3100–31005 (2008).

Matsumoto, H., Sakata, T., Mori, H., and Yoneyama, H.: Narrowing size distribution of CdS nanocrystals by size selective photocorrosion, Chemistry Letters 7, 595–596 (1995).

Matsumoto, H., Sakata, T., Mori, H., and Yoneyama, H.: Preparation of Monodisperse CdS Nanocrystals by Size Selective Photocorrosion, J. Phys. Chem., 100, 13781–13785 (1996).

Mergesy, M., Houba, C., and Gwits, J.: Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a Pseudomonas, Arch. Int. Physiol. Biochim., 86, 440–442 (1978).

Miyoshi-Akiyama, T., Kuwahara, T., Tada, T., Kitao, T., and Kirikae, T.: Complete genome sequence of highly multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* NCGM2.S1, a representative strain of a cluster endemic to Japan, J. Bacteriol., 193, 7010 (2011).

Moghaddam, K.M.: An Introduction to microbial metal nanoparticle preparation method, JYI, January (2010).

Mohammed, F.A., Balaji, K., Kalaichelvan, P.T., and Venkatesan, R.: Fungal based synthesis of silver nanoparticles–an effect of temperature on the size of particles, Colloids Surf. B Biointerfaces., 74, 123–126 (2009).

Mohanpuria, P., Rana, N.K., Yadav, S.K.: Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications, J. Naqnopart. Res., 10, 507–517 (2008).

Monrás, J.P., Díaz, V., Bravo, D., Montes, R.A., Chasteen, T.G., Osorio-Román, I.O., Vásquez, C.C., and Pérez-Donoso, J.M.: Enhanced glutathione content allows the in vivo synthesis of fluorescent CdTe nanoparticles by *Escherichia coli*, PLoS One, 7, e48657 (2012).

Murray, C.B., Norris D.J., and Bawendi M.G.: Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites, J. Am. Chem. Soc., 115, 8706-8715 (1993).

Narayanan, K.B. and Sakthivel, N.: Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, Adv. Colloid Interface Sci., 156, 1–13 (2010).

Ogasawara, Y., Lacourciere, G., and Stadtman, T.C.: Formation of a selenium-substituted

rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 98, 9494–9498 (2001).

Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., and Kanehisa, M.: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Nucleic Acids Res., 27, 29–34 (1999).

Olivas, A.D., Shogan, B.D., Valuckaite, V., Zaborin, A., Belogortseva, N., Musch, M., Meyer, F., Trimble, W.L., An, G., Gilbert, J., Zaborina. O., and Alverdy, J.C.: Intestinal tissues induce an SNP mutation in *Pseudomonas aeruginosa* that enhances its virulence: possible role in anastomotic leak, PLoS One, 7, e44326 (2012).

Park, T.J., Lee, S.Y., Heo, N.S., and Seo, T.S.: In vivo synthesis of diverse metal nanoparticles by recombinant *Escherichia coli*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 49, 7019–7024 (2010).

Pearce, C.I., Coker, V.S., Charnock, J.M., Pattrick, R.A.D., Mosselmans, J.F.W., Law, N., Beveridge, T.J., and Lloyd, J.R.: Microbial manufacture of chalcogenide-based nanoparticles via the reduction of selenite using *Veillonella atypica*: an in situ EXAFS study, Nanotechnology, 19, 156603–156615 (2008).

Ranjard, L., Prigent-Combaret, C., Nazaret, S., and Cournoyer, B.: Methylation of inorganic and organic selenium by the bacterial thiopurine methyltransferase, J. Bacteriol., 184, 3146–3149 (2002).

Reddie, K.G. and Carroll, K.S.: Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation, Curr. Opin. Chem. Biol., 12, 746–754 (2008).

Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, V., and Coves, J.: Mobilization of selenite by Ralstonia metallidurans CH34, Appl. Environ. Microbiol., 67, 769–773 (2001).

Saleemi, M., Toprak, M.S., Li, S., Johnssonb, M., and Muhammeda, M: Synthesis, processing, and thermoelectric properties of bulk nanostructured bismuth telluride (Bi_2Te_3), J. Mater. Chem., 22, 725–730 (2012).

Sanghi, R. and Verma, P.: A facile green extracellular biosynthesis of CdS nanoparticles by immobilized fungus, Chem. Eng. J., 155, 886–891 (2009).

Schurek, K.N., Sampaio, J.L., Kiffer, C.R., Sinto, S., Mendes, C.M., and Hancock, R.E.: Involvement of *pmrAB* and *phoPQ* in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa, Antimicrob. Agents Chemother., 53, 4345–4351 (2009).

Soda, S., Takahashi, H., Kagami, T., Miyake, M., Notaguchi, E., Sei, K., Iwasaki, N., and Ike, M.: Biotreatment of selenium refinery wastewater using pilot-scale granular sludge and swim-bed bioreactors augmented with a selenium-reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I, Jpn. J. Water Treat. Biol., 48, 63–71 (2012).

Stadtman, T. C.: New biologic functions-selenium-dependent nucleic acids and proteins, Fundam. Appl. Toxicol., 3, 420–423 (1983).

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V.: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, Nature, 31, 959–964 (2000).

Syed, A. and Ahmad, A.: Extracellular biosynthesis of CdTe quantum dots by the fungus *Fusarium oxysporum* and their anti-bacterial activity, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 106, 41–47 (2013).

Talebi, S., Ramezani, F., and Ramezani, M.: Biosynthesis of metal nanoparticles by microorganisms, Nanocon Olomouc, Czech Republic, EU, 10, 12–18 (2010).

Tarze, A., Dauplais, M., Grigoras, I., Lazard, M., Ha-Duong, N. T., Barbier, F., Blanquet, S., and Plateau, P.: Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenite against Saccharomyces cerevisiae, J. Biol. Chem., 282, 8759–8767 (2007).

Trindade, T.: Nanocrystalline Semiconductors: Synthesis, Properties, and Perspectives, Chem. Mater., 13, 3843–3858 (2001).

Wang, W., Geng, Y., Qian, Y., Xie, Y., and Liu, X.: Synthesis and characterization of nanocrystalline Bi_2Se_3 by solvothermal method, Mater. Res. Bull., 34, 131–134 (1999).

Wang Y., Tang Z., Correa-Duarte M.A., Pastoriza-Santos I., Giersig M., Kotov N.A., and Liz-Marzán, L.M.: Mechanism of Strong Luminescence Photoactivation of Citrate-Stabilized Water-Soluble Nanoparticles with CdSe Cores, J. Phys. Chem. B, 108 , 15461–15469 (2004).

Winstanley, C., Langille, M.G., Fothergill, J.L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F., Thomson, N.R., Winsor, G.L., Quail, M.A., Lennard, N., Bignell, A., Clarke, L., Seeger, K., Saunders, D., Harris, D., Parkhill, J., Hancock, RE., Brinkman, F.S., and Levesque, R.C.: Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*, Genomes Res., 19, 12–23 (2009).

Wu, D.Q., Ye, J., Ou, H.Y., Wei, X., Huang, X., He, Y.W., and Xu, Y.: Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18, BMC Genomics, 12, 438 (2011).

Xie, H.Y., Zuo, C., Liu, Y., Zhang, Z.L., Pang, D.W., Li, X.L., Gong, J.P., Dickinson, C., and Zhou, W.: Cell-targeting multifunctional nanospheres with both fluorescence and magnetism, Small, 1, 506-509 (2005).

Yan, Z., Qian, J., Gu, Y., Su, Y., Ai, X., and Wu, S.: Green biosynthesis of biocompatible CdSe quantum dots in living *Escherichia coli* cells, Mater. Res. Express, 1, 015401 (2014).

Yang, L., Jelsbak, L., Marvig, R.L., Damkiær, S., Workman, C.T., Rau, M.H., Hansen, S.K., Folkesson, A., Johansen, H.K., Ciofu, O., Høiby, N., Sommer, M.O., and Molin, S.: Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108, 7481–7486 (2011).

Ziegelhoffer, E.C. and Donohue, T.J.: Bacterial responses to photo-oxidative stress, Nat. Rev. Microbiol., 7, 856–863 (2009).

秋山直之. 比較ゲノミクスを用いた *Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン代謝機構の解析, 大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 修士論文 (2014).

稲垣長典, 福場博保, 向井道子, 豊里節子. チオ尿素のアスコルビン酸酸化抑制機構に関する研究(第 1 報), 生命・食糧・環境, 29, 416–419 (1955).

参考文献

太田道広，山本敦. 熱電変換で進む未利用熱エネルギー，エネルギー・資源，34，332–336 (2013).

野瀬勝弘，小俣孝久. ホットソープ法. ナノ蛍光体の開発と応用，シーエムシー出版 (2007).

細川益男監修，野城清編著. ナノパーティクル・テクノロジー　―ナノテクの玉手箱―，日刊工業新聞社 (2003).

細川益男監修，ナノパーティクルテクノロジーハンドブック編集委員会編. ナノパーティクルテクノロジーハンドブック，日刊工業新聞社 (2004).

吉田和哉名誉監修、植田充美，池道彦監修. メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収―新元素戦略の新しいキーテクノロジー，シーエムシー出版 (2009).

謝辞

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、終始御懇篤なる御指導と御助言を賜りました、大阪大学大学院　工学研究科　環境・エネルギー工学専攻　教授　池道彦先生に、心より感謝致します。

本論文の査読ならびに御校閲を頂き、貴重な御助言を賜りました、大阪大学大学院　工学研究科　環境・エネルギー工学専攻　教授　山中伸介先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多くの貴重な御助言と御協力を賜りました県立広島大学生命環境学部環境科学科准教授　阪口利文先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜り、また、本論文の査読ならびに御校閲を賜りました、大阪大学大学院　工学研究科　環境・エネルギー工学専攻　准教授　惣田訓先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜りました、大阪大学大学院　工学研究科　環境・エネルギー工学専攻　助教　黒田真史先生に、心より感謝致します。

研究室での生活、研究の円滑な遂行に常に御配慮いただきました、大阪大学大学院　工学研究科　環境エネルギー工学専攻　技術部　技術専門職員　山岡ゆり子氏に、心より感謝致します。

本研究第 2 章における元素分析においては大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻准教授　西川宏先生ならびに同接合科学研究所技術部技術専門職員　塔本健次氏に御助言、御協力を賜りました。深く感謝の意を表します。

本研究第 2 章における透過型電子顕微鏡観察においては北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科産学官連携研究員　池田愛氏ならびに片山まどか氏の御尽力を賜りました。深く感謝の意を表します。

本研究第 3 章、および第 4 章における透過型電子顕微鏡観察、ならびに元素分析においては大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻准教授　西川宏先生ならびに同接合科学研究所技術部　元技術補佐員　中村依利氏、同技術補佐員　伊東万寿雄氏、村上猛氏に御助言、御協力を賜りました。深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、共同研究者として多くの御協力と御助言を賜りました、オルガノ株式会社　三宅將貴氏、株式会社日立製作所　寺澤加奈子氏に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多くの御協力と御助言を頂きました、成田 尚宣氏、鏡つばさ氏、武川将士氏、三輪恵美子氏、長谷川愛氏、秋山直之氏、樋口靖典氏、須田奏志氏に、心より感謝致します。

研究活動において、直接、間接の御協力、御支援を頂きました、大阪大学大学院　工学研究科　環境・エネルギー工学専攻　生物圏環境工学領域の諸兄姉に、心より感謝致します。

謝辞

最後になりましたが、私の進学の意思を尊重して博士課程で研究を行うことに理解を示し、長年の学生生活に応援と援助を頂きました両親に、心より感謝致します。

本研究第 2 章は文部科学省科学研究費補助金　挑戦的萌芽研究「微生物機能を利用した廃水からの金属回収とそれを用いた金属ナノ粒子の合成」(No. 2165140)の一環として実施されました。また、本研究の一部は大阪大学接合科学研究所「接合科学共同利用・共同研究拠点」共同研究員制度の下、行われました。ここに謝意を表します。

本研究に関する報文

投稿論文

1. **Ayano, H., Miyake, M., Terasawa, K., Kuroda, M., Soda, S., Sakaguchi, T., and Ike, M.:** Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles, Journal of Bioscience and Bioengineering, 117, 576–581 (2014).

Fig. 2.1 was adopted from Fig. 1 in this research paper.
Fig. 2.2 was cited from Fig. 2 in this research paper.
Fig. 2.4 was cited from Fig. 3 in this research paper.
Fig. 2.5 was cited from Fig. 4 in this research paper.
Fig. 2.7 was adopted from Fig. 5 in this research paper.
Fig. 2.8 was cited from Fig. 6 in this research paper.
Table 2.4 was adopted from Table 1 in this research paper.
Table 2.5 was adopted from Table 2 in this research paper.

2. **Ayano, H., Kuroda, M., Soda, S., and Ike, M.:** Draft Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain RB, a Bacterium Capable of Synthesizing Cadmium Selenide Nanoparticles, Genome Announcements, 2, e00368-14 (2014).

3. **Ayano, H., Kuroda, M., Soda, S., and Ike, M.:** Effects of culture conditions of *Pseudomonas aeruginosa* strain RB on the synthesis of CdSe nanoparticles, Journal of Bioscience and Bioengineering, 119, 440–445, (2015).

Fig. 3.1 was cited from Fig. 1 in this research paper.
Fig. 3.2 was cited from Fig. S1 in this research paper.
Fig. 4.1 was adapted from Fig. 2 in this research paper.
Fig. 4.4 was cited from Fig. 3 in this research paper.
Fig. 4.4 was adapted from Fig. 4 in this research paper.
Fig. 4.5 was cited from Fig. 5 in this research paper.
Fig. 4.6 was cited from Fig. S2 in this research paper.
Table 3.1 was cited from Table S1 in this research paper.

本研究に関する報文

国際会議録

1. **Ayano, H., Miyake, M., Soda, S., Sakaguchi, T., and Ike, M.:** Enrichment and isolation of a bacterium to recover soluble selenium and cadmium as CdSe nanoparticles from water phase, Metals in Water – Health Protection and Sustainability through Technical Innovation 2013, Tonji University, November, 2013

2. **Ayano, H., Miyake, M., Terasawa, K., Kuroda, M., Soda, S., Sakaguchi, T., and Ike, M.:** Enrichment and Isolation of a CdSe-synthesizing bacterium from a soil sample, The 6th Advanced Engineering Technology for Enrichment and Energy – Environment and Sustainable Development, Osaka University, August, 2013

3. **Ayano, H., Kuroda, M., Soda, S., and Ike, M.:** Effects of temperature, pH, and salinity on CdSe synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* strain RB, The 7th Advanced Engineering Technology for Enrichment and Energy – Environment and Sustainable Development, Busan National University, August, 2014