

ノート

■ 微生物への重元素の濃集機構を 生体分子レベルで解明する

- 重元素と微生物との相互作用の機構解明 -

刺激因子との相互作用解析による生命応答ダイナミックスの解明グループ
大 貫 敏 彦

Elucidation of Accumulation Mechanisms of Heavy Elements in Microorganisms at Molecular Levels

- Interaction of Heavy Elements with Microorganisms -

Toshihiko Ohnuki

Research group for dynamics of molecular and cellular responses to stimuli

The interaction of heavy elements with microorganisms has been extensively studied because of the potential for using these organisms to remediate contaminated waste streams and groundwater. However, the mechanisms of the interactions are poorly understood. We have been conducting basic on microbial heavy elements interactions in order to elucidate accumulation mechanisms of heavy elements in microorganisms at molecular levels. We show in this note the present status and future plans of our research activities.

1. はじめに

微生物、硫酸還元菌の電子伝達系において6価ウランに直接電子が授与され4価ウランに還元されること[1]が示されてから、微生物による重元素の化学状態変化機構の解明研究が世界的な規模で展開されている。その多くは、ウランを対象としており、細胞への吸着[2]、還元[3]、鉱物化[3]などである。これらの研究の成果はウラン鉱山の跡措置やウランの精錬跡地の保全などへの応用も可能であるため注目を集めている。しかしながら、微生物による濃集機構はこれまでの研究では解明されたとはいえない。

微生物は代謝のため必須元素を細胞内に取り込む機構を有している。また、呼吸を行うことから細胞外から電子を得て、電子伝達系を経て、細胞外の電子受容体に電子を渡す。このため、元素と微生物との相互作用反応として、(i)細胞表面への吸着、(ii)酸化・還元、(iii)鉱物化、及び(iv)分解が考えられる(図1A)。我々は、これらの反応について実験を行い様々な機構を明らかにしてきた[4-13]。一方、細胞表面はリボ多糖*、タンパク質、脂質、ペプチドグリカン*、テイコ酸などの生体分子で構成されている。生体分子レベルでの相互作用の機構の理解は細胞レベルでの現象を物理・化学的に解明するために不可欠である。さら

*リボ多糖：微生物の細胞表面に多く存在する糖と脂肪酸の化合物のこと。

*ペプチドグリカン：2種のアミノ糖が交互に繰り返した構造で、微生物の細胞表面を形成する主要物質である。ペニシリンがペプチドグリカンの架橋を阻害することを利用して菌を死滅させることは有名である。人間の細胞にはペプチドグリカン層がないことから生体に浸入した菌だけを選択的に取り除くことが可能となる。

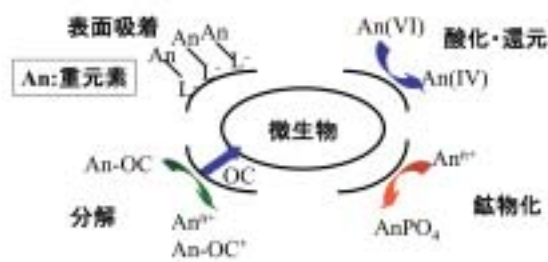


図 1 A 微生物細胞と重元素との相互作用を模式的に示した図。相互作用は主に細胞表面で起こる。

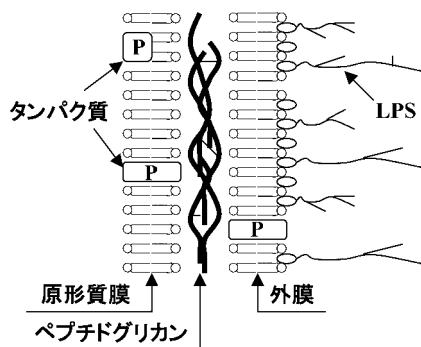


図 1B グラム陰性菌の細胞表面構造の模式図。

に、応用面においても、生体分子を直接利用することにより、細胞活性を維持するために生じる生物の生育条件による制限を超えた広範囲の条件における重元素の分離・回収が可能となる。ここでは、筆者らが実施している細胞レベル及び生体分子レベルの研究を将来の計画も含めて紹介する。

2. 微生物細胞と生体分子

細胞表面を拡大した模式図を図 1B に示す。外膜 (outer membrane) はグラム陰性菌* に存在しペプチドグリカン層の外側にあり、両者をリポタンパクが連結している。外膜はリン脂質を含むタンパク質が存在する層でありその外側にリボ多糖 (LPS) の側鎖が伸びている。LPS はリピド A と多糖からなり重元素の吸着に関与するカルボキシル基などの官能基を有している。ペプチドグリカンはグラム陽性菌* では最も外側に存在する。N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と N-アセチルムラミン酸 (MurAC) が交互に β -1,4 結合し、長い糖鎖であるグリカン鎖を形成し、アミノ酸

は MurAC の乳酸残基にアミド結合し、4 個のアミノ酸 [L-Ala-D-Glu-DAP(Lys)-D-Ala] からなるペプチドを構成する。この基本単位が数個～数十個繋がり長い鎖状構造をとる。細胞壁中のグリカン鎖は互いに平行に走り、ペプチド鎖同士の結合で架橋し、巨大分子を作っている。LPS と同じようにカルボキシル基などの官能基を有している。一方、酵母のような真核細胞では、外膜の外側に細胞壁が存在する。細胞壁は、マンナンタンパク質、グルカン、キチンが互いに結合しあうことにより強固な構造となっている。グラム陰性菌及びグラム陽性菌と同様にカルボキシル基などの官能基を有している。細胞質膜は全ての細胞に存在する脂質二重層の単位膜にタンパク質が挿入された袋状の膜である。膜タンパク質は、主として菌体内部と外部間の物質輸送、代謝の触媒、情報伝達などの機能をもつ。膜タンパク質は、タンパク分子表面のアミノ酸の種類 (疎水性 / 親水性) の違いにより細胞質膜の各部位に存在する。ここに存在するタンパク質の酵素反応により 6 価ウランが 4 価ウランに還元されると考えられているが、機構はまだ解明されていない。

3. 細胞を用いた研究

微生物を用いて細胞表面に存在する官能基の濃度と解離定数を見積もる実験を行った。実験ではグラム陽性菌として *Bacillus subtilis* (バチルス菌)、グラム陰性菌として *Pseudomonas fluorescens* (蛍光菌)、真核細胞として *Saccharomyces cerevisiae* (酵母) を用いた。結果を表 1 に示す。表では細胞表面の官能基の種類を解離定数の値からカルボキシル基、リン酸基及びアミノ基とした。表からグラム陰性菌 (図 1B) とグラム陽性菌では官能基の種類及び濃度はほぼ同じであることが分かる。両者は細胞の表面構造は異なるものの官能基に関してはほぼ同じものと考えて良いことを

表 1 滴定により得た微生物の細胞表面官能基。官能基の種類は解離定数からあてはめたもの。

| 微生物種 | | カルボキシル基 | リン酸基 | アミノ基 |
|-------------------|------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| バチルス菌 (グラム陽性菌) | 解離定数 | 3.9 | 6.5 | 9.65 |
| | 官能基数 (M/g) | 2.1×10^{-4} | 1.0×10^{-4} | 1.4×10^{-4} |
| 蛍光菌 (グラム陰性菌) | 解離定数 | 4.0 | 6.5 | 9.7 |
| | 官能基数 (M/g) | 2.4×10^{-4} | 1.6×10^{-4} | 1.6×10^{-4} |
| 酵母 (真核細胞) | 解離定数 | 4.7 | 8.4 | 10.1 |
| | 官能基数 (M/g) | 5.4×10^{-5} | 5.3×10^{-5} | 5.6×10^{-5} |

* グラム陰性菌、グラム陽性菌：デンマークの学者ハンス・グラムによって発明された染色法により紫色に染まるものをグラム陽性菌、赤く染まるものをグラム陰性と分類する。ペプチドグリカン層が細胞の最外側に存在するものが赤く染まるので、細胞表面構造を反映した分類である。

示している。一方、酵母についてはカルボキシル基及びリン酸基と考えられる官能基の解離定数が他の2種の菌よりも若干大きく、官能基の数は小さいことが分かる。これらの結果は、酵母の細胞表面構造であるマンナンタンパク質、グルカン、キチンなどの官能基の解離が他の2種の菌と異なることを示唆している。

官能基に関してはほぼ同じと考えられるグラム陽性菌及び陰性菌を用いて4価プルトニウム及び4価トリウムの吸着挙動について検討した。実験では3価鉄のキレート物質である desferrioxamine B (DFO) を加えた溶液に4価プルトニウムあるいは4価トリウムを添加し、微生物との相互作用を調べた。溶液のpHを変数としてプルトニウム及びトリウムの吸着割合をプロットした結果を図2に示す。4価プルトニウム及び4価トリウムの吸着割合は溶液のpHの減少に従い増加することが分かった。また、トリウムを用いた実験で溶液中のDFO濃度が変化しないことを確認した。これらの結果から、4価プルトニウム及び4価トリウムはDFO錯体から解離して微生物表面に吸着したものと考えられる。一方、グラム陽性菌及び陰性菌への吸着を比較すると、プルトニウム及びトリウムのグラム陰性菌への吸着割合がグラム陽性菌よりも大きい。既に述べたように両種の細胞は同じような官能基を有すると考えられる。したがって、官能基だけでは説明できない相互作用が影響している可能性がある。細胞表面にはタンパク質が存在する。我々は、この原因が細胞表面に存在するタンパク質の違いにあるのではないかと考えている。細胞表面に吸着したウランは細胞質膜までは到達することが示されている。細胞質膜に存在するタンパク質であるチトクロームC₃が、6価ウランの還元に関与していることが示されている。この

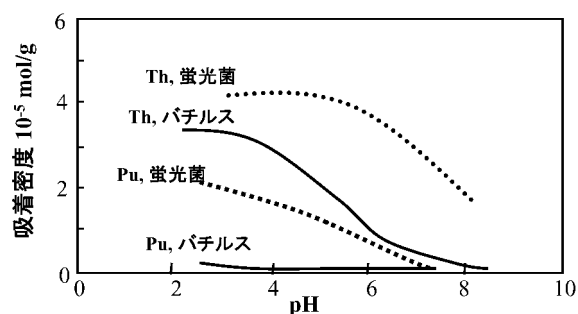


図2 Pu(IV)及びTh(IV)の蛍光菌及びバチルス菌への吸着割合と溶液のpHとの関係 [11]。ThがPuよりも吸着割合が高いこと、及び蛍光菌(グラム陰性菌)への吸着割合がバチルス菌(グラム陰性菌)への吸着よりも高いことが分かる。

ようなタンパク質はアクチノイドと特異的に結合する部位を有していると推察される。

蛍光菌と同じグラム陰性菌である、*Shewanella putrefaciens* をProteinase Kにより処理し、細胞表面のタンパク質を溶出させ、サイズ排除カラムによる分離を行った。溶出時間(分子量)と紫外吸光度の関係(図3)から、分子量100,000程度のタンパク質などが分離された。同様の分離実験を酵母について行った結果(図3)100,000程度のタンパク質や*S. putrefaciens*で分離されたタンパク質よりも分子量の小さなタンパク質が分離回収された。これらの結果は、微生物種により細胞表面のタンパク質が異なることを示している。今後は、ICP-MS*などによる元素分析を分離と同時にを行いウランなどを特異的に濃集するタンパク質を特定する予定である。

タンパク質の合成には遺伝子が関与している。酵母には約6000の遺伝子が存在し、多くの遺伝子の役割が解明されている。また、酵母では1遺伝子欠損株が入手可能である。そこで、5000種類の1遺伝子欠損株を用いて6価ウランの濃集試験を実施し、ウラン濃集に係わる遺伝子、すなわちタンパク質の特定を行っている。現在までに、ウラン濃集の度合い並びにウランへの耐性により100種類程度まで1遺伝子欠損株の絞り込みを完了した。欠損遺伝子には細胞表面に存在する蛋白質の合成に関与する遺伝子もあり、今後さらなる絞り込みを行い、ウランの濃集に関与する遺伝子を特定したい。

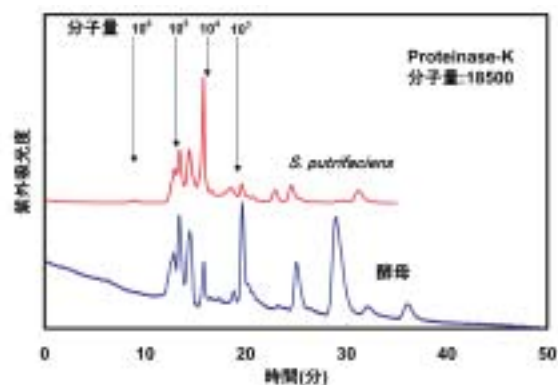


図3 *Shewanella putrefaciens*及び酵母からproteinase K溶液により溶出したタンパク質。

* ICP-MS: 誘導結合プラズマ質量分析装置のこと。プラズマで物質をイオン化させ質量分析を行う超高感度な分析機器。複数元素の同時測定ができ、測定範囲が広い(ppb ~ %)という特長をもつ。水中の微量元素の分析など環境分析などで重要な働きを担う。

4. 生体分子を用いた研究

生体分子としては、タンパク質などが対象となり、ウラン濃集に係わるタンパク質あるいは6価ウランの還元に係わるタンパク質を微生物細胞から直接抽出して用いる方法が考えられる。一方、電子伝達に関係するチトクロームCなどのタンパク質やキチン、キトサンなどは試薬として入手可能であり、実験手法の確立を目指す場合には試薬を大量に使うことが要求されるので、試薬を使用することは経済的にも有利である。

重元素の吸着に関する細胞表面の生体物質を特定するため、クロレラを用いてEuの吸着実験を行った。比較として用いた生体物質は、セルロース、キチン及びキトサンである。細胞あるいは生体物質に吸着したEuの配位環境を時間分解レーザー誘起蛍光分光法により分析した。得られた結果(図4)から、クロレラあるいは生体物質に配位したEuの配位環境は、水溶液中の状態(水和水分子が9個あり、周囲の分子との相互作用も小さい状態)と異なり、水和水分子の数が減少し、周囲分子との相互作用も大きいことが分かる。配位環境の比較から、クロレラに吸着したEuの配位環境はセルロースに吸着したEuに最も近いことが分かる。したがって、クロレラの細胞表面にはセルロースに似た吸着サイトが存在することが明らかとなった。生体分子同士を比較すると、セルロース、キチン及びキトサンの構造式から3者では構造的に大きな違いがないにもかかわらず、吸着したEuの配位環境が異なる。キトサンに吸着したEuは周囲分子との相互作用がキチンやセルロースよりも大きいこと、及びキチンに吸着したEuの水和水分子数が最も小さいことが明らかとなった。今後、生体分子に吸着した元素の配位環境と生体分子の構造との関係を明らかにし

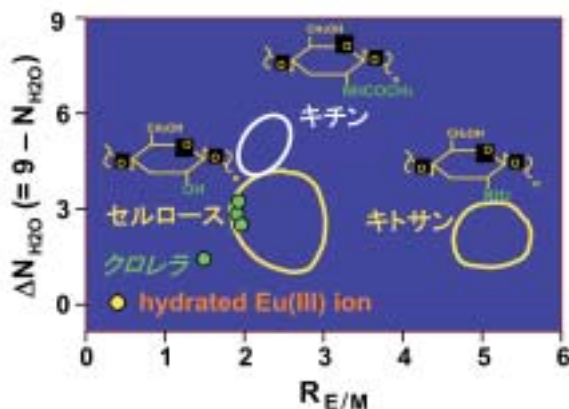


図4 クロレラ及びセルロース、キチン、キトサンに吸着したEuの配位環境プロット [5,13]。比較のため、水溶液中のEuの配位環境も示す。詳細は本文を参照。

ていきたいと考えている。また、配位環境の違いを応用して、生体物質あるいは微生物を用いた新規のアクチノイドの分離手法の開発なども視野に入れた研究を進めていきたい。

タンパク質へのアクチノイドの吸着機構を検討するため、タンパク質などを修飾した機能性ナノ粒子を用いた研究を開始した。機能性ナノ粒子は100nm-10mmのシリカ球あるいはポリスチレン球に様々な官能基を修飾したもので、タンパク質などの分離回収に用いられている。シリカ球にProtein Aを修飾した粒子(タンパク質粒子)に6価ウランを吸着させる実験を行い溶液のpHとウランの吸着割合(図5)の関係を求めた。図から、pHの上昇に伴い吸着割合が急激に増加するpH(吸着エッジpH)の序列は、Protein A粒子 <カルボキシル基を修飾した粒子 < シリカ粒子であった。この結果はProtein A粒子の吸着サイトがカルボキシル基以外にも存在する可能性を示している。今後は、吸着したウランの化学状態をX線吸収端微細構造解析などにより調べるとともに、滴定等によりProtein Aの官能基を明らかにし、吸着機構を解明する予定である。

実際の微生物細胞表面を構成する生体物質は種類が多く構造は複雑である。微生物細胞との相互作用をブレイクダウンして生体分子レベルでの反応を理解する方法は有効であるが、多くの仮定や複雑な分析・解析が必要となる。我々は、生体分子を用いて細胞表面を単純化したモデル細胞表面を構築することにより吸着や電子授受などの反応機構を明らかにできると考えた。手法としては、金薄膜上にアルカンチオール等の有機単分子層を自己組織化させる技術を応用している。金薄膜に自己組織化させた4-ピリジンチオール(以下、SAM)の還元脱離により流れる電流(サイクリックボルタモグラム*)から、印可電圧が約 - 1

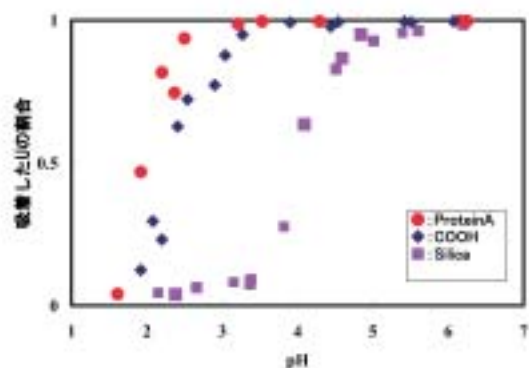


図5 Protein A、カルボキシル基を修飾したシリカ粒子(機能性粒子)に吸着したUの割合と溶液中pHとの関係。吸着のpHエッジはProtein Aが最も小さい。

Vにおいて4 - ピリジンチオールが金薄膜から脱離する解離電流が検知されたことが分かった。一方、SAM に Co を吸着させた場合には、約 0.18V に還元電流が、約 0.34V に酸化電流が検知された。この結果は、SAM 上で Co の II 価、III 価の酸化還元反応が生じていることを示している。さらに、ヘムタンパク質であるチトクローム C を修飾させ、酸化還元に伴う電子授受並びに化学状態変化を電気化学的手法及び分光学的手法により捉えることに成功した。今後は、SAM に 6 価ウランを吸着させ、チトクローム C 等のタンパク質との電子授受の機構を明らかにしたい。

参考文献

- 1) D. Loveley et al., Nature **350:413**(1991)
- 2) D. Gorman-Lewis, et al., Environ. Sci. Technol. **39**, 4906-4912(2005)
- 3) D.R. Lovley, et al., Appl. Envir. Microbiol., **59**, 3572-3576(1993)
- 4) T. Ohnuki, et al. Geochim. Cosmochim. Acta, **69**, 5307(2005)
- 5) T. Ozaki, et al., Environ. Tox. Chem., **22** 273(2003)
- 6) T. Ohnuki, et al., J. Environ. Radioact., **77**, 339(2004)
- 7) T. Yoshida, et al., Chem. Geol., **212**, 239 (2004)
- 8) T. Ohnuki, et al., Chem. Geol., **220**, 237-243(2005)
- 9) F. Sakamoto, et al., J. Nucl. Radiochem. Sci. **6**, 99(2005).
- 10) Y. Suzuki, et al., J. Radioanaly. Nucl. Chem., **266**, 199(2005)
- 11) T. Yoshida, J. Nucl. Radiochem. Sci. **6**, 77(2005)
- 12) T. Nankawa, et al., J. Alloy Compounds, **408-412**, 1329(2006)
- 13) T. Ozaki et al., J. Alloy Compounds,, **408-412**, 1334 (2006).



*サイクリックボルタモグラム：電気化学において電流動作電極の電位をある範囲で往復させて得られる電流-電位曲線のこと。サイクリックボルタモグラム測定により、その範囲に標準酸化還元電位をもつ物質の酸化電流、還元電流が測定でき、拡散係数やその物質の酸化状態の安定性、触媒反応の可能性などさまざまな情報を得ることができる。