

微生物による金属類還元作用を利用した光素子の合成

阪口 利文

本稿では、著者らが取り組んできたバイオミネラリゼーションの工学的応用の中で、カドミウムに代表される有害重金属カチオンと（セレン）テルルオキサニオンのような毒性アニオンを共存させ、微生物の代謝反応を用いて（セレン）テルル化カドミウム微粒子に変換する研究について紹介し、有害イオン種の同時回収、光素子などに利用可能な有用ナノ微粒子への変換、元素戦略における資源化への関与の可能性について述べてみたい。

微生物による磁性結晶の合成

歯、骨格、生体外殻などにみられるカルシウムバイオミネラルの微生物による合成は比較的早くからよく知られ、骨・歯形成などを対象とした医学分野を中心にその研究例も比較的多い^{1,2)}。ところが、酸化鉄や硫化鉄のような鉄を含有する磁性結晶の合成については、鉄還元微生物や硫酸還元微生物の異化的作用によって菌体外にマグネタイトやパイライトを合成できることが明らかになっているものの、材料合成や資源化といった観点から捕らえた研究例が少なく、詳細な生成機構については不明な点も多く残っている。一般に、これらの微生物による磁性物質の合成は、生育に必要な最終電子受容体物質の酸化還元反応に伴って生成した硫化物イオンが培養系内に存在した鉄（II）イオンと結合したり、フェリハイドライトのような水酸化鉄が存在した場合に、微生物の異化的代謝によって鉄（III）イオンの還元が起こった結果、フェリハイドライトがマグネタイトに変換されるものであり、主に菌体外において誘発したミネラリゼーションを主因としたものであった。これに対して、磁性細菌³⁾と総称される微生物は、菌体内に単磁区構造を有するナノマグネタイト結晶を合成でき、菌体内の磁性物質の存在によって菌体自体を磁化したり、地磁気を利用できるようになると考えられている⁴⁾。磁性細菌は2価、3価を区別せず鉄イオンを菌体内に濃縮し、異化的代謝とは直接関連しないプロセスによって磁気微粒子を合成する微生物であり、その磁気微粒子合成能と菌体の有する生育代謝が一定したものではない。つまり、光合成、独立栄養性と考えられるものから硝酸還元、硫酸還元菌などさまざまな微生物種の存在が明らかになっている³⁾。磁性細菌によって合成されるナノ磁性微粒子は主に磁性

酸化鉄（マグネタイト）で構成されており、大きさが約50 nmで結晶形態が微生物株によって一定であり、生物（遺伝）的に保持されている。近年の研究では結晶形態を制御、一定化させる因子の存在が確認されている⁵⁾。またこの他にも、多くの制御因子・バイオプロセスがあると考えられている。加えて、磁気微粒子の周囲には安定な有機膜が存在し、微生物ナノマグネットの合成・制御に関与する遺伝子の存在が次々に判明しており、日独米の関連研究者による成果競争の様相すら伺えるほどである⁶⁾。微生物によるナノバイオマグネットの利用、分子改変に関する研究では、東京農工大学の松永教授の研究グループが磁性細菌粒子の分子解析から得られた成果を利用して、微生物ナノマグネットを覆う生体膜分子の改変を行い、機能性磁気微粒子の創製、環境・医療分野におけるセンシング、濃縮デバイスとしての応用を展開している^{7,8)}。

微生物による半導体結晶の合成

微生物による半導体物質の合成が確認されたのは、ここ25年以内の出来事であり、高濃度のカドミウムイオンの存在下で培養した酵母（*Candida glabrata*, *Schizosaccharomyces pombe*）の菌体膜にquantum dotの硫化カドミウム（CdS）ナノ結晶の合成が観察されたのが最初である⁹⁾。この発表を契機にさまざまな微生物を高濃度のカドミウムイオンの存在下で培養することで同様のCdS結晶が形成されることが確認されている。たとえば、腸内細菌群として知られている *Klebsiella planticola* によっても合成できることが判明している¹⁰⁾。これらの微生物によるCdS微粒子の合成は、微生物の嫌気代謝とは直接関連したものではなく、カドミウムイオンに対する解毒・毒性の低減化において菌体内に合成されるメタロチオネイン様物質に由来するシステインの硫黄分子が重金属カチオン（カドミウムイオン）と結びついた結果、生成したものであると考えられている¹¹⁾。一方、硫酸還元菌の異化的代謝によって生じた硫化物イオンが重金属カチオンと結合して金属硫化物を形成することによっても化合物半導体結晶となりうる。これまでにCdSの他、CuS, ZnS, NiS, CoSなどの微粒子の形成が明らかになっており¹²⁾、毒性重金属カチオンの半導体材料への変換、回収技術として

注目されている。

微生物によるセレン化カドミウムの合成¹³⁾

近年、ナノテクノロジーやコンビバイオに関する分野の発展に伴い生体分子タグや特定分子の標識材料として量子蛍光結晶であるセレン化カドミウム (CdSe) やセレン化亜鉛 (ZnSe) が注目されている。これらの微粒子は quantum dot (量子ドット) 効果によって、結晶粒径が 10 nm 以下の場合、その粒径が揃っているとバンドギャップに応じて 1 nm の粒径単位で青から赤に至る発光制御が可能なナノ発光結晶となりうる¹⁴⁾。しかしながら、マイルドな条件で効率よくこれらの蛍光微粒子を合成できる技術が少ないのをはじめ、これらのナノ発光結晶を合成できる手法については、欧米の既往特許があるため、この特許技術をバイパスできるような手法が望まれていた。また、工場や発電施設の廃棄物に含まれるレアエレメント、とりわけセレン (テルル)、カドミウムに代表される有害金属 (様) イオンの回収が問題となっていた。そこで、我々は、このような有害元素種の回収について、微生物の酸化還元反応を利用したセレンオキシアニオンの還元と重金属カチオンの共存による化合物結晶への変換、回収の可能性を検討してきた。これまで、ラボに保存されている既存のセレンオキシアニオン還元菌株について、菌体を高濃度のカドミウムイオンの存在下で培養することで目的微粒子の形成を試みたが、いずれもカドミウムイオンの影響によって菌体の生育が阻害されてしまった。そのため、重金属 (カドミウム) に耐性がある微生物株のスクリーニングを実施した。セレンオキシアニオンと重金属イオンを含む培地を作製し、河川や海泥質を中心に約 90 箇所の試料を接種した。その結果、少なくとも 20 箇所の集積培養液に赤色、赤褐色、黒色などの溶液変化 (接種時は無色透明) が認められた。このうち安定した継体培養が可能な集積培養体から培養菌体を集菌して菌体から微粒子を抽出した¹⁵⁾。抽出した微粒子について元素分析、ならびに電子顕微鏡観察を実施したところ、兵庫県夙川の泥質を接種し、セレン酸とカドミウムイオンを共存させた試料から、粒径が 20 ~ 50 nm 以下の微粒子が多数観察され、小さなものでは 5 ~ 10 nm 程度の粒径であった (図1)。また、電子線回折像が撮られたことから、これらの微粒子は球・塊状の形態を持つ結晶性のナノ微粒子であると考えられた。さらに、この微粒子についてエネルギー分散型 X 線微量分析を行い、構成している元素を調べたところ、セレン (Se)、カドミウム (Cd) が主要ピークとして確認された (図2)。これらの結果から、微生物の代謝還元によってセレン酸のよ

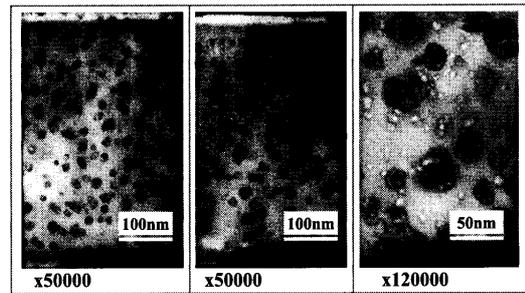


図1. セレン化カドミウムと考えられる微生物由来結晶の透過型電子顕微鏡写真。CdとSeで構成される50 nm以下の粒径の結晶性微粒子が兵庫県夙川の泥質試料を接種した集積培養体の菌体から多数観察された。

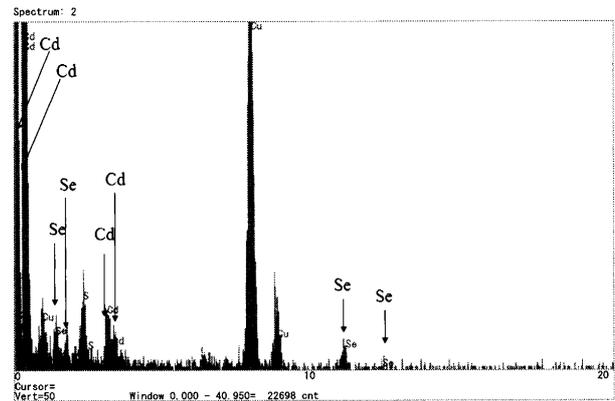


図2. CdSe結晶微粒子の合成を目的として兵庫県夙川の泥質試料を接種した集積培養体の菌体から抽出した微粒子 (図1) の元素分析 (EDX) の結果。セレン (Se)、カドミウム (Cd) が主要ピークとして確認された。なおCuシグナルはCuメッシュグリッドによるものである。

うな有毒アニオンを還元し、カドミウムイオンと結合してセレン化カドミウムと考えられるナノ微粒子に変換、同時回収できる可能性が明らかとなった。また、カドミウムの代わりに亜鉛イオンを添加した集積培養体からは、ZnSeと考えられる微粒子の合成が確認されており、添加する重金属種を変えることでさまざまな含セレン金属結晶を合成することも判明した。現在、蛍光半導体微粒子としての特性解析や合成に関与する微生物の分離、同定などの研究が進展中である。

微生物によるテルル化カドミウムの合成

セレン化カドミウム (CdSe) 微粒子の場合と同様な発想で、テルル化カドミウム (CdTe) ナノ結晶合成の可能性についてさらに検討した。CdTeはCdSe同様 quantum dot 効果によって、結晶粒径が 10 nm 以下の場合、その粒径が揃っているとバンドギャップに応じた蛍光性を有する蛍光性化合物半導体結晶である。また、テルルもレアエレメントとして回収が望まれる元素であり、亜テル

特 集

ル酸のような酸化物アニオンは生物毒性が強い化合物となるため、環境への影響が懸念されている。そこで、CdSe合成の場合と同様な手法を用いて、CdTe ナノ結晶が合成可能な微生物の集積培養体の形成について検討したところ、新潟県の原油湧出地の泥質を接種した試料など、いくつかの集積培養体の菌体からCdおよびTeで構成されるナノ微粒子の合成を確認した(図3)。このような微粒子は集積培養体から単菌分離した微生物株を培養した際にも形成されることが判明した。合成されたナノ微粒子は、大きさが5~20 nm程度の粒径を持つ微粒子が凝集したような構造を持っており、高分解能透過型電子顕微鏡による観察では、多数の結晶面が観察された。このことから、マルチドメインの結晶性微粒子であることが分かり、電子線回折像の解析を行ったところCdTe結晶に特徴的な閃亜鉛鉱構造が認められた。また、回折リングのパターンが閃亜鉛鉱構造を有する標準物質のCdTeとも合致したことから、これらのナノ結晶がテルル化カドミウムであることが明らかとなった。そこで更に、培養菌体をアルギン酸ゲルで固定化して、CdTe ナノ結晶の合成による亜テルル酸イオン、およびカドミウムイオンからのテルル・カドミウムの同時回収を目的とした循環型リアクターの作製を行った。その結果、循環液からカドミウム、亜テルル酸両イオンがリアクターの運転とともに減少し、最終的には初発濃度1 mMの両イオンが運転5日目にほぼ循環液からなくなり、リアクター内で黒色物質に変換された(図4)。この物質は、TEM, EDX, 電子線回折解析からCdTeのナノ微粒子結晶であることが確認され、菌体を固定化していない場合ではこれらの現象がみられなかった。これらの結果から、微生物の酸化還元反応によって両イオンを回収し、有用ナノ微粒子へ変換できることが明らかとなった。

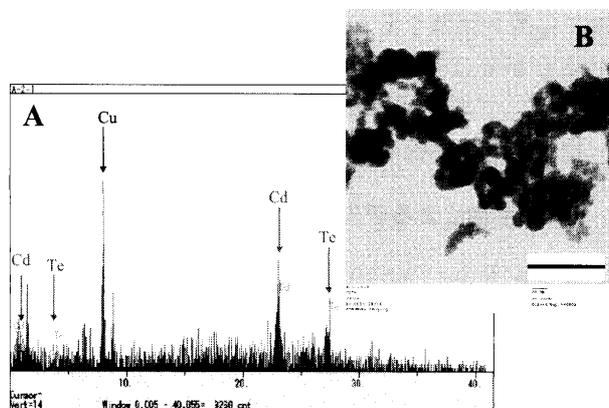


図3. CdTe結晶微粒子の合成を目的として新潟県シンクルトン記念公園建物裏沼試料を接種した集積培養体(SM-ER)の菌体に生成した微粒子のEDX結果(A)、およびTEM写真(B)。Scale bar, 100 nm. CuシグナルはCuメッシュグリッドによるものである。

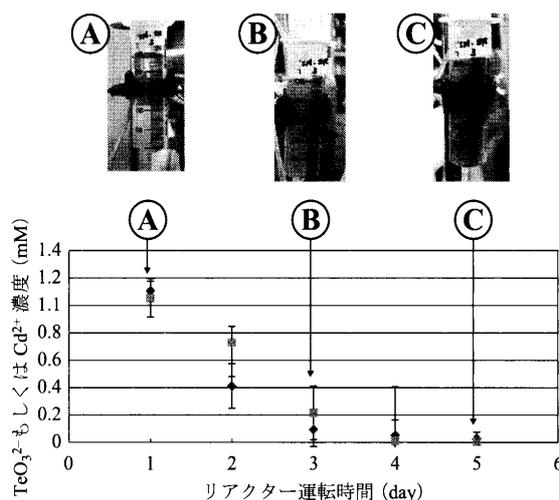


図4. 集積培養体(SM-ER)を固定化したアルギン酸ナトリウムビーズを用いたリアクターにおける亜テルル酸イオン、カドミウムイオン濃度の変化、及びSM-ER固定化ビーズの外観写真。◆: 亜テルル酸イオン, ■: カドミウムイオン。循環液の両イオンが黒色のCdTeに変換され、リアクターに回収されている。

簡単なまとめとして、今後、これらの研究をさらに進展させることで、微生物によるマイルドな条件での有害金属(様)カチオン、アニオン種の回収、資源化が期待できる他、生物機能を利用したこれまででない手法によって光素子結晶に代表されるナノ微粒子が合成できる日も近いと著者は考えている。

文 献

- 1) 和田浩爾, 小林巖雄: 海洋生物の石灰化と硬組織, p.115, 東海大学出版会(1996).
- 2) Mann, S.: *Biomaterialization-Principle and Concepts in Biomorganic Materials Chemistry*, p.6, Oxford University Press (2001).
- 3) Matunaga, T. and Sakaguchi, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 1 (2000).
- 4) 松永 是, 阪口利文: 生物と磁気, 微粒子工学大系 第I巻基本技術, p. 1119, フジテクノシステム(2001).
- 5) Arakaki, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **278**, 8745 (2003).
- 6) Bazykinski, D. A. and Frankel, R. B.: *Nature Rev. Microbiol.*, **2**, 217 (2003).
- 7) 松永 是, 阪口利文: 磁性細菌, バイオミネラルハンドブック 機能応用編, p.363, NTS(2001).
- 8) 松永 是, 阪口利文: 磁気微粒子をつくる細菌, 微粒子工学大系 第II巻応用技術, p. 686, フジテクノシステム(2002).
- 9) Dameron, C. T. et al.: *Nature*, **338**, 596 (1989).
- 10) Sharma, P. K. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3083 (2000).
- 11) Dameron, C. T. and Winge, D. R.: *TIBTECH*, **8**, 3 (1990).
- 12) Labrenz, M. et al.: *Science*, **290**, 1744 (2000).
- 13) 阪口利文, 松本光史: 特願2004-162187 (2004).
- 14) 村瀬至生: ナノマテリアル最前線, 化学フロンティア, p.721, 化学同人(2002).
- 15) 阪口利文, 松本光史: *Eco Industry*, p.34, シーエムシー出版(2006).