

微生物によるセレンナノ粒子発酵生産機構の解明

越智 杏奈

立命館大学 生命科学部

研究の目的

セレンは、毒性の強い元素である一方、ヒトを含む哺乳類や細菌など多くの生物にとって、欠くことのできない必須微量元素である。近年、セレンナノ粒子 (SeNPs) は他の形態のセレンよりも毒性が低く、その抗菌作用、抗酸化作用、抗癌作用などにより、医療、農業、産業の分野での利用が期待されている^{1,2)}。ある種の微生物は、有毒な亜セレン酸から比較的無毒な SeNPs を発酵生産する能力を持つ。微生物によって生産される SeNPs は表面が多糖類やタンパク質、脂質などの有機物によってコーティングされており、SeNPs 中に多くの有機物が含まれている。この有機物のために、生体適合性が高いなど、化学合成した SeNPs とは異なる性質を示すことがわかっている。しかしながら、微生物中でどのように SeNPs が生産され、どのように有機物を結合して行くのか、その機構はほとんど分かっていない。

我々は、*Escherichia coli* BW25113 および当研究室においてインドの亜セレン酸蓄積土壌より単離した *Cellulomonas* sp. D3a を用いて、全く性状の異なる SeNPs 生産に成功している。そこで、本研究ではこれら 2 菌株において SeNPs 形成機構を解明することを目的とする。

方法と結果

(1) *E. coli* における細胞外セレンナノベシクル形成機構の解明

これまでに我々は、*E. coli* によって形成される細胞外 SeNPs が、細胞膜に包まれたセレンナノベシクル (SeNVs) であることを明らかにしている。しかし、SeNVs の報告例はなく、その形成に関与するタンパク質や分機構は不明である。

そこで、細胞膜の完全性に関与する *E. coli* 遺伝子変異株 ($\Delta ompC$, $\Delta ompA$, $\Delta ompA$, $\Delta nlpI$ および $\Delta tolA$) を亜セレン酸存在下で培養し、SeNPs 形成能を調べた。その結果、野生株 (WT) および変異株はいずれも亜セレン酸を還元して SeNPs を形成しものの、その程度には差が認められた。

位相差顕微鏡観察および透過型電子顕微鏡観察 (TEM) の結果、 $\Delta ompC$ 株および $\Delta tolA$ 株では、SeNPs の細胞外排出が著しく低下し、多くの SeNPs が細胞質内に蓄積していることが明らかとなった (図 1)。さらに、これらの変異体で形成された細胞内 SeNPs は、WT に比べて粒子径が有意に大きかった。

また、WT、 $\Delta ompC$ 、 $\Delta tolA$ 株の亜セレン酸に対する耐性を比較したところ、 $\Delta ompC$ および $\Delta tolA$ では WT に比べて亜セレン酸への耐性が著しく低下していた。

これらの結果より、*E. coli* における SeNPs の細胞外への排出、すなわち細胞膜による SeNVs 形成には、OmpC および TolA を含む膜構造の完全性が必要であることが示唆された。

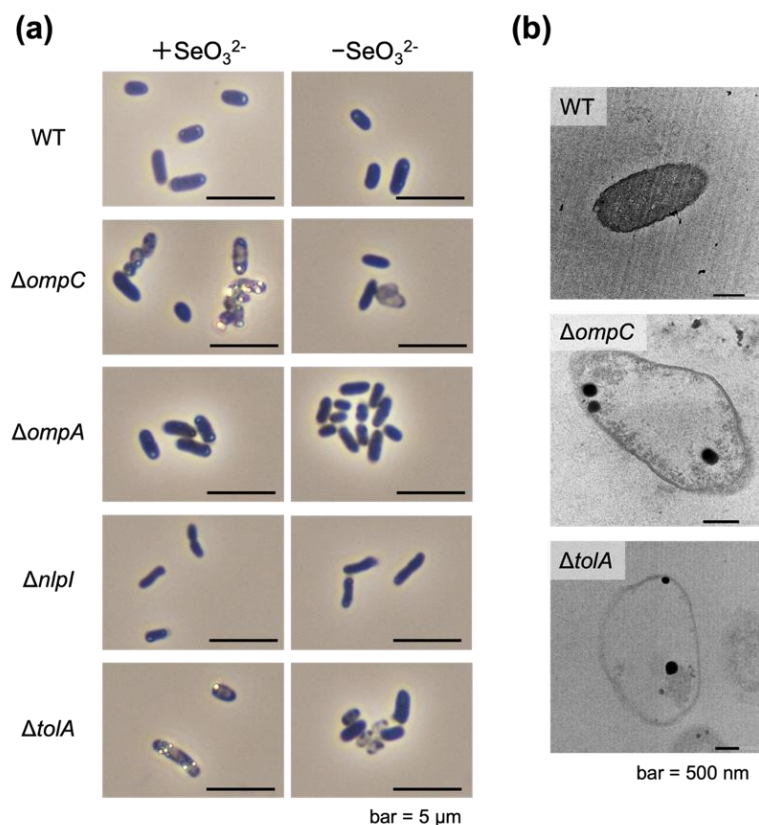


図 1. *E. coli* における SeNPs 形成の観察

- (a) 亜セレン酸存在下で培養した *E. coli* WT および欠損株の位相差顕微鏡像
 (b) 亜セレン酸存在下で培養した *E. coli* WT、 $\Delta ompC$ 、 $\Delta tolA$ 株の超薄切片の TEM 像

(2) *Cellulomonas* sp. D3a における細胞内 SeNPs 凝集機構の解明

本菌で生産される SeNPs は細胞内に蓄積され、その粒子径は 500 nm に達する。亜セレン酸存在下で培養すると、生育に伴って亜セレン酸を還元し、小さな SeNPs が集まった Se⁰ 集合体および球形の大きな SeNPs (sSe⁰) が観察される。これまで、微生物による SeNPs は、元素状 Se⁰ がオストワルド成熟によって凝集することで生じると考えられてきたが、SeNPs の凝集過程に関する詳細な研究は行われていない。

そこで、sSe⁰ 形成過程を明らかにするために、TEM を用いて経時的観察を行い、その割合定量的に評価した。その結果、培養 3-6 時間では小さな sSe⁰ および S⁰ 集合体が観察された。さらに培養 9-24 時間では Se⁰ 集合体の割合は減少し、約 400 nm の sSe⁰ の割合が増加した (図 2)。

また、共焦点顕微鏡観察の結果、本菌は細胞容量の半分を占める sSe⁰ を蓄積した状態でも、分裂・生育可能であることが明らかとなった。

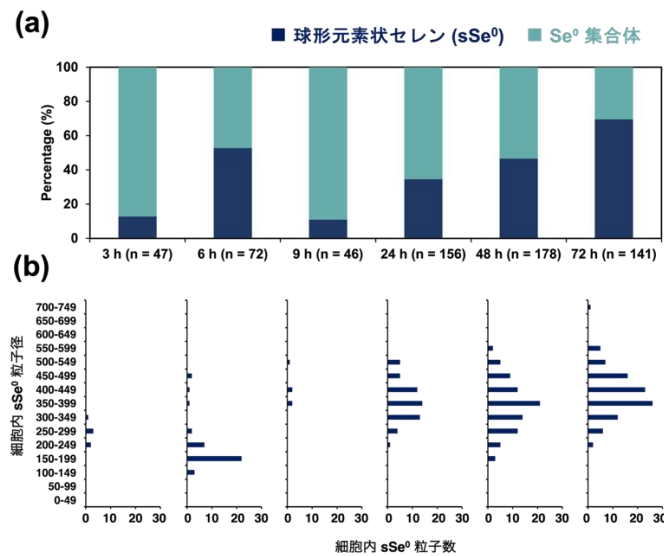


図 2. *Cellulomonas* sp. D3a における細胞内 SeNPs の凝集過程

- (a) 時間経過における細胞内 Se⁰ の形態変化
 (b) 時間経過における細胞内 sSe⁰ 粒子径

結論

E. coli では、細胞内で形成された SeNPs の細胞外排出には、OmpC および TolA を含む膜構造の完全性が必要であり、SeNPs は細胞膜に包まれた SeNVs として細胞外に分泌されることが明らかとなった。さらに、 $\Delta ompC$ および $\Delta tolA$ 株では亜セレン酸耐性が低下していたことから、SeNPs を細胞外に排出することで細胞毒性を低減していることが示唆された。一方、*Cellulomonas* sp. D3a では、SeNPs は主に細胞内に蓄積され、小さな SeNPs が集合して大きな sSe⁰ を形成する過程が TEM 観察により明らかとなった。さらに、sSe⁰ の蓄積は細胞の分裂や菌の生育に影響を与えないことも確認された。

これらの結果は、SeNPs 生産における微生物種特異的な形成・凝集メカニズムを示すとともに、微生物由来の SeNPs の生体適合性や機能性、さらには SeNPs を用いた毒性低減機構の理解に貢献する知見を提供する。

文献

- 1) Sans-Serramitjana, E. *et al.* Antimicrobial activity of selenium nanoparticles (SeNPs) against potentially pathogenic oral microorganisms: a scoping review. *Pharmaceutics* **2023**, 15 (9), 2253.
- 2) Cremonini, E. *et al.* Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. *Microb Biotechnol* **2016**, 9 (6), 758–771.