

課題番号	Q18S-01
課題名 (和文)	植物機能を利用した金属ナノ粒子合成およびその触媒能評価：藻類細胞がつくるナノ粒子を利用した環境浄化技術の開発
課題名 (英文)	Biosynthesis of metal nanoparticles in unicellular alga and evaluation of their catalytic potential
研究代表者	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 工学部 応用化学科 教授 氏名 保倉 明子
共同研究者	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 工学部 自然科学系列 講師 氏名 田中 里美
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 産業技術総合研究所物質計測標準研究部門 主任研究員 氏名 熊谷 和博
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 工学研究科 修士課程 氏名 市之瀬 智生
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 非常勤助手 氏名 社藤 悦子
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) Mahasarakham University, Lecture 氏名 Woranan Nakbanpote

研究成果の概要 (和文)

単細胞藻類に、金、銀、白金、パラジウム等の金属イオンを添加して栽培したところ、金、銀については、細胞内にナノ粒子を合成することができた。塩化パラジウム溶液を添加すると、アンミン錯体のような錯イオンが生成した。X線吸収分光法により、藻類に取り込まれた金の化学形態分析を行った。塩化金(III)酸を添加すると、藻類に取り込まれた金(III)イオンはすぐにAu(0)へ還元されるが、ナノ粒子が生成するまでは数時間かかることが示された。細胞を包埋剤と共に凍結し、クライオマイクロトームで切片を作製して電子顕微鏡で観察した結果、細胞内において金ナノ粒子の生成していることが可視化された。メチレンブルー(MB)は、触媒が存在すると水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)と反応して、無色のロイコメチレンブルー(LMB)に還元される。そこで、この還元反応を利用して、藻類の金ナノ粒子の触媒能を評価した。金ナノ粒子を合成した藻類細胞をMBとNaBH₄を含む溶液に添加すると、MBの退色が認められた。時間をかけて金ナノ粒子を合成した試料ほど、この退色反応において触媒として機能することが示された。

研究成果の概要（英文）

It has been reported that gold nanoparticles (NPs) were generated in plant cells when tetrachloroauric ion was added to the unicellular alga, *Chlorella vulgaris*. We have also found that *Pseudococcomyxa simplex* accumulated a lot of gold as NPs. Although these gold NPs would have a potential ability to catalyze chemical reaction as is the case with gold NPs produced by chemical synthesis, the catalytic ability of biogenic gold NPs has not yet been fully known. Therefore, in this study, we have evaluated the catalytic reaction of biogenic gold NPs using methylene blue (MB) and sodium tetrahydroborate. The blue MB is reduced to colorless leucomethylene blue (LMB) by NaBH_4 in the presence of gold NPs as the nanocatalysts. The results for the reduction of MB by NaBH_4 showed that the reaction was catalyzed in the presence of biogenic gold NPs. The blue color of MB solution immediately changed to colorless by the addition of alga containing gold NPs. It was also shown that the catalytic ability of alga with gold NPs for the reduction of MB had depended on the condition of biosynthesis for gold NPs. It was concluded that the biogenic gold NPs in alga, *P. simplex*, have the function of catalyst as with those synthesized chemical reaction.

1. 研究開始当初の背景

使用済み製品の中には様々な有用な金属元素が含まれており、この「都市鉱山」から金属資源を回収し、再利用する技術の開発が進められている。なかでも、植物を用いて有用なメタルを回収する「ファイトマイニング」は、省エネルギーで環境にやさしい技術として注目されている。また、ある種のバクテリアや植物は、酸化物や金属のナノ粒子を生成することが報告されており、細胞がつくるナノ粒子生成に関する研究は、この数年で急増している。しかしながら、蓄積される重金属の化学形態についての知見は少なく、生成メカニズムについての理解はあまり進んでいない。これは化学変化の過程を観察する手段が限られていたためである。

我々は、単細胞藻類 *Pseudococcomyxa simplex* に 100 ppm の塩化金(III)水溶液を添加すると、緑色の細胞が赤や青に呈色することを見出している。この細胞には乾燥質量で 10% 程度の金が蓄積され、走査電子顕微鏡(SEM)で観察したところ、50 nm 程度の比較的サイズの揃った金ナノ粒子が多数生成されていた。通常の化学的に合成した金

ナノ粒子は、時間の経過とともに凝集してしまうが、細胞が生成する金ナノ粒子は安定に存在できる特徴をもつ。そこで、細胞が生成した金や他の金属のナノ粒子を触媒として利用するという着想に至った。本研究は、放射光 X 線分析技術を植物細胞に応用し、細胞における金属ナノ粒子の生成メカニズムを理解した上で、その金属ナノ粒子を利用する、グリーンケミストリーとして位置づけられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の 3 つにまとめることができる。

- (1) 植物細胞における金属イオンの取り込みやナノ粒子化の機構を、先端分析法を用いて解明する
本研究で対象とする、単細胞藻類 (*P. simplex*) は乾燥質量で金を約 10% 蓄積する能力をもち、その存在自体が非常に斬新である。細胞内での化学反応を追跡するためには、細胞が活着している状態を保ちながら計測する必要がある。また経時変化を追跡するので、時間分解能の高い分析法が必要とされる。そこで、高輝度で非破壊分析が可能な

放射光 X 線を光源とする X 線吸収分光法により、藻類細胞に取り込まれた金属元素の化学形態の経時変化をモニターする。さらに放射光 X 線や電子顕微鏡で植物細胞の観察をするため、最適な試料調製法を合わせて開発し、新たな方法論を提案する。単細胞のどこでナノ粒子が生成しているのか、可視化する。

(2) 植物細胞を利用した、効率の良いナノ粒子生成反応を開発する

植物細胞に金属イオンを添加する際の条件を検討し、効率よくナノ粒子を生成する条件を明らかにする。単細胞藻類 (*P. simplex*) が金以外の元素を添加した場合、金属ナノ粒子を生成するかどうか、明らかにする。

(3) 植物細胞がつくるナノ粒子の触媒能を明らかにする

通常の化学的に合成した金ナノ粒子は、時間の経過とともに凝集してしまうが、細胞が生成する金ナノ粒子は安定に存在できる特徴をもつ。細胞内に形成された金属ナノ粒子は、いわば数 μm の細胞カプセルに入れられた状態といえる。そこで、細胞が生成した金や他の金属のナノ粒子が触媒として機能するかどうか、明らかにする。まずは、水溶液中の色素の分解反応における触媒能から評価していく。

3. 研究の方法

(1) 単細胞藻類内で合成された金ナノ粒子の観察

温度 24 ~ 26 °C、照度 6,000 lx の条件下、単細胞藻類 (NIES Collection) を培養液 1 L で継代培養した。藻類細胞懸濁液 30 mL から藻類細胞を採取し、調製した塩化金(III)酸水溶液 (pH 3.0, [Au] = 100 ppm) を 30 mL 添加した。その後、試料をインキュベータ内で 1 分 ~ 24 時間振とうした。振とう後、取り出した藻類細胞を包埋剤と共に急速凍結し、クライオマイクロトーム (Leica CM1860) を用いて、10 μm の切片を作製し、SEM

観察に供した。一方、藻類細胞に取り込まれた金の濃度については、藻類細胞を凍結乾燥した後、蛍光 X 線分析法を用いて検量線法で定量した。

(2) 単細胞藻類を利用して合成した金ナノ粒子の触媒能評価

メチレンブルー (MB) は、触媒が存在すると NaBH_4 と反応して、無色のロイコメチレンブルー (LMB) に還元される。そこで、この還元反応を利用して、藻類の金ナノ粒子の触媒能を評価することとした。藻類への金添加条件を変化させて、いろいろな条件で金ナノ粒子を合成した。この金ナノ粒子が生成している藻類細胞を 3.0 mg 量り取り、MB 溶液 (イオン交換水 5.78 mL + 0.5 M MB 20 μL + 0.1 M NaBH_4 200 μL) を加えて振とうした。その後、溶液の可視紫外吸収スペクトルを測定し、その吸光度の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 単細胞藻類内で合成された金ナノ粒子の観察

新規購入したクライオマイクロトームを利用して、藻類細胞の凍結切片の調製法を開発した。凍結乾燥後の切片を SEM 観察し、5 μm 程度の細胞内に生成された金ナノ粒子の様子を可視化することに成功した。従来、細胞内を高い空間分解能で観察するためには、さまざまな化学処理を伴う TEM しかなかったが、本研究で開発した手法を用いることで、化学処理によるアーティファクトなく、細胞内の金属ナノ粒子の観察ができたことは大きな成果である。

(2) 単細胞藻類を利用して合成した金ナノ粒子の触媒能評価

金ナノ粒子が生成している藻類細胞を入れることで、MB は LMB に変化し、溶液は青から無色へと変化した。この退色実験では、長時間かけて金ナノ粒子を合成した藻類細胞の方が、短時間で合成したものよりも吸光度の大幅な減少を示した。この単細胞藻類を利用して合成した金ナノ

粒子は、触媒能をもつことが示された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 市之瀬智生, 保倉明子, 今村 悠, 熊谷 和博, 単細胞藻類 *Pseudococcomyxa simplex* におけるニッケル及び白金の蓄積機構の解明, 第 78 回分析化学討論会, 2018 年 5 月 26 日, 山口大学常盤キャンパス.
 - ② 市之瀬智生, 井戸航洋, 保倉明子, 熊谷和博, 宮下振一, 藤井紳一郎, 稲垣 和三, 単細胞藻類を用いた有用メタルの蓄積機構の解明, 日本分析化学会第 67 年会, 9 月 12 日, 東北大学川内北キャンパス
 - ③ 保倉明子, 南部晃一, 放射線 X 線分析によるモエジマシダ(*Pteris vittata* L.)におけるセレン蓄積機構の解明, 第 6 回メタロミクス研究フォーラム・プラズマ分光分析研究会第 104 回講演会, 2018 年 11 月 2 日, 東京薬科大学.
 - ④ Akiko Hokura, Ryota Kuroko, Study on accumulation mechanism of selenium in unicellular alga by X-ray analyses, 日本化学会第 99 春季年会 2019, 2019 年 3 月 16 日, 甲南大学.
 - ⑤ 保倉明子, 黒子涼太, 武内悠悟, 熊谷和博, 単細胞藻類に蓄積されたセレンの化学形態分析, 第 5 回日本セレン研究会, 2019 年 7 月 21 日, 東海大学高輪キャンパス (東京都港区).
 - ⑥ 市之瀬智生, 井戸航洋, 保倉明子, 熊谷和博, 宮下振一, 藤井紳一郎, 稲垣和三, scICP-MS による単細胞藻類 *Pseudococcomyxa simplex* に蓄積されたニッケルの定量分析, 日本分析化学会第 68 年会, 2019 年 9 月 13 日, 千葉大学西千葉キャンパス (千葉市)
 - ⑦ 保倉明子, 単細胞藻類を利用した有用メタルの回収, 2019 年度日本地球化学会年会, 2019 年 9 月 18 日, 東京大学 (東京都文京区)
 - ⑧ 武内悠悟, 黒子涼太, 市之瀬智生, 保倉明子, 熊谷和博, 単細胞藻類 *Pseudococcomyxa simplex* に蓄積されたセレンの化学形態分析, 第 55 回 X 線分析討論会, 2019 年 10 月 30 日, コラッセふくしま (福島県福島市).
 - ⑨ Tomoki Ichinose, Koyo Ido, Akiko Hokura, Kazuhiro Kumagai, Shin-ichi Miyashita, Shin-ichiro Fujii, Kazumi Inagaki, scICP-MS analysis of gold nanoparticles biosynthesized produced by unicellular algae, OKINAWA COLLOIDS 2019, 2019 年 11 月 6 日, Nago, Okinawa.
 - ⑩ Chiaki Fujii, Kazuki Takanashi, Etsuko Shato, Tomoki Ichinose, Kazuhiro Kumagai, Akiko Hokura, Biosynthesis of gold nanoparticles in unicellular alga and evaluation of their catalytic potency, OKINAWA COLLOIDS 2019, 2019 年 11 月 6 日, Nago, Okinawa.
 - ⑪ Akiko Hokura, Study on accumulation mechanism of gold in unicellular alga by X-ray analyses, OKINAWA COLLOIDS 2019, 2019 年 11 月 7 日, Nago, Okinawa.
 - ⑫ Akiko Hokura, Study on accumulation mechanism of precious metals in unicellular alga by X-ray analyses, 1st International Workshop on Metallomics and Nanoparticles, 2019 年 12 月 23 日, 千葉大学亥鼻キャンパス.
- 〔図書〕(計 1 件)
- ① 保倉明子, 放射光 X 線による汚染物質の分析, 丸善, 加速器ハンドブック, 21 章 暮らしに役立つ加速器技術 3 節 環境保全, 分担執筆, 2018 年 4 月.