

シングルセル解析で金属を吸着する細胞集団の不均一性を解明

バイオソープション(生物吸着)は、微生物や生体物質が金属イオンなどを吸着・保持する現象です。生物学、農学、環境科学分野において古くから研究され、排水・下水処理のための活性汚泥など実社会で利用される技術にも広く応用されています。

これまで金属のバイオソープションに関する研究では、細胞が吸着する金属量はバルク解析と言われる、多くの細胞の平均値を求める方法で決定されてきました。これは、「全ての細胞で等しく生物吸着が起きている」ことを前提とした手法です。

本研究チームは今回、強酸性条件でも貴金属を吸着可能な単細胞性紅藻 *Galdieria sulphuraria* を実験対象とし、一つ一つの細胞が吸着した貴金属量(金、白金、パラジウム)を直接測定するシングルセル解析を行いました。その結果、反応条件によって1細胞あたりの貴金属吸着量は異なることを見出しました。さらに、細胞が貴金属を吸着する仕組みを調べたところ、吸着する金属種と *Galdieria* を入れた反応溶液の違いによって貴金属と細胞表層の相互作用が変化し、1細胞あたりの貴金属吸着量も変わることが明らかになりました。

これらの結果は、「均一に培養した細胞でも細胞表層の構造は不均一で、吸着する金属量には差があり、反応条件によって金属を吸着する細胞集団は変化する」ことを示します。

本研究では、溶液中の酸濃度の上昇に伴って、貴金属が細胞表層の官能基とより安定な結合を形成することで選択的に吸着される仕組みも明らかになりました。本研究成果は、バイオソープションについての理解を深めるとともに、生物由来の環境に優しい効率的な金属吸着剤の開発につながると期待されます。

研究代表者

筑波大学 生命環境系

蓑田 歩 助教

研究の背景

貴金属は、装飾品としてだけでなく先端産業でも需要が高い、豊かな社会に欠かせない資源です。しかし、その存在量は限られています。金属廃液に含まれる低濃度の貴金属回収には、イオン交換樹脂や活性炭などの方法が利用されていますが、コストの高さや回収効率の低さなどの課題があり、環境中への低濃度の流出や有用資源のロスといった問題が懸念されています。生物材料を利用した金属吸着剤は、吸着量は多くないものの、化学薬品やイオン交換樹脂を利用する方法に比べてコストが安く、環境に優しいため、低濃度の金属回収に適した技術として期待されています。本研究チームはこれまで、温泉のような強酸性・高温環境に生息する単細胞性紅藻のイデユコゴメ綱 *Galdieria sulphuraria* に着目し、生物由来の貴金属吸着剤の検証とその吸着メカニズムの解明を行ってきました^{文献1-3)}。

研究を進める中で、「一つ一つの細胞に吸着している貴金属量は異なる」という予備的なデータを得ました。これは、従来の金属のバイオソープション研究で、金属は均一に培養された全ての細胞に均一に吸着していると仮定してバルク解析を行い、細胞への金属吸着量を決定していることと相反します。

自然界において希な元素である貴金属は、バイオソープションの研究に適した金属種です。細胞内で代謝されず、細胞の生死や活性は関係しないからです。本研究では、貴金属のバイオソープションについて、従来とは異なるシングルセル解析を利用し、そのメカニズムを明らかにすることにしました。

研究内容と成果

従来の誘導結合型プラズマイオン質量分析法(ICP-MS)^{注1)}を用いたバルク解析では、試料を分析装置に直接導入できませんでした。このため、培養液中の細胞数を数えた後に細胞を回収し、有機物を分解して得られた溶液の金属濃度を分析装置で計測、それを細胞数で割ることで1細胞あたりの平均的な金属濃度を求めていました(図1)。

それに対して、本研究では、国立研究開発法人産業技術総合研究所で開発された、1細胞中に含まれる元素を高感度で検出することが可能な試料直接導入式のシングルセル ICP-MS 質量分析法(scICP-MS)^{文献4)}による細胞分析を行いました。この分析法では、細胞が含まれる試料を分析装置内に直接噴霧導入することができます。細胞内に含まれる元素がシグナルピークとして検出され、シグナルピークの数と強度が元素を含む細胞の数に、シグナルピークの強度がそれぞれの細胞が含む元素量に相当します。このため、シグナル情報をヒストグラムに変換すると、1細胞あたりの元素量と、特定の元素量を持つ細胞がどれだけの割合でいるのかが分かります(図1)。

貴金属の金 (Au)、パラジウム (Pd)、白金 (Pt) を含む2種類の濃度(5 mM と 500 mM)の塩酸溶液中で、細胞を30分間インキュベートし、scICP-MSによる細胞分析を行ったところ、リン (P) を含む細胞のヒストグラムの分布パターンは全ての培養条件で一致しました。このことから、実験に使用された細胞は均一に培養されたことが確認できました。それに対して、貴金属を吸着した細胞の分布パターンは、金属種や塩酸溶液の酸濃度により異なることが分かりました。このことは、均一に培養された細胞でも、細胞表層の構造は均一ではないこと、貴金属の吸着のメカニズムが金属種と反応溶液の酸濃度により異なることを示唆します(図2)。

そこで、X線吸収微細構造法^{注2)}により、各種金属の各溶液での吸着メカニズムを調べたところ、5 mM 塩酸溶液では、Auはチオール基の硫黄 (S) と、Ptはアミン基の窒素 (N) と、Pdは両官能基^{注3)}のSとNと内圏錯体^{注4)}を形成することが分かりました。500 mM 塩酸溶液では、Ptは細胞に回収されず、AuとPdはチオール基のSとのみ内圏錯体を形成することが分かりました(図2)。

scICP-MS解析結果と合わせると、両方の塩酸溶液中で主にチオール基のSと内圏錯体を形成していたAuは、どちらの溶液でも多くの細胞に少量のみ吸着していました。5 mM 塩酸溶液中では、PdとPtは、チオール基のSとアミン基のNと内圏錯体を形成し、さまざまな量で細胞に吸着していました。そ

れに対して、500 mM 溶液では、Pd はチオール基の S とのみ内圏錯体を形成し、多くの細胞に少量のみ吸着していました。Pt は細胞に吸着することができませんでした(図 2)。これらの結果から、溶液中の酸濃度の上昇に伴い、硬い/柔らかい酸と塩基の法則(HSAB 則)^{注5)}に従ってより安定な結合が残ることが分かりました。一方で、細胞あたりに吸着する金属量は、HSAB 則だけでなく、金属の還元状態や、細胞表層の官能基の数や配置が影響を与えていると考えられました。

今後の展開

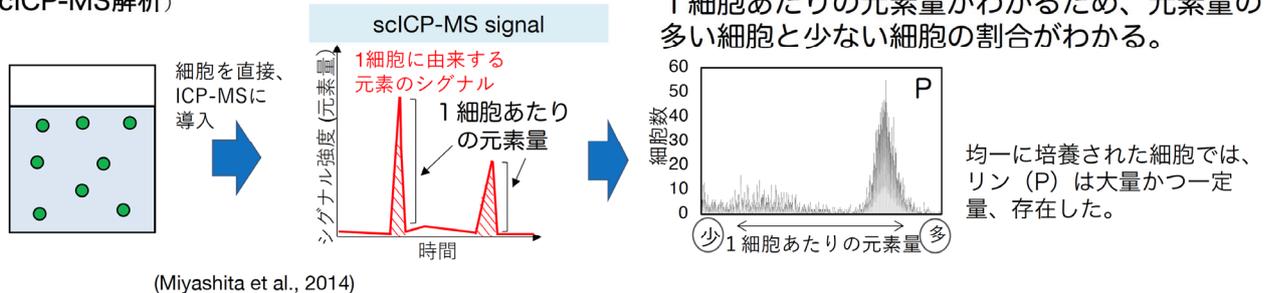
本研究では、シングルセル解析により、これまでのバルク解析では分からなかったバイオソープションにおける細胞集団の不均一性を示すとともに、貴金属の選択性の仕組みも明らかにしました。

金属選択性の仕組みが分かったことは、安価で環境に優しい生物由来の貴金属吸着材の開発に広く貢献するものです。また、細胞集団の不均一性に着目することで、均一に培養した細胞集団の中でも、多くの貴金属を吸着可能な残基の数や配置を持つ細胞が存在することも分かりました。将来的に、最も多くの金属を吸着している細胞を抽出して詳細に解析することができれば、より効率の高い生物由来の金属吸着剤の開発につながります。

本研究で着目した集団の中にひそむ不均一性は、自然界において、微生物集団だけでなく、環境中の粒子や土壌においても存在することが予想されます。そのため、本研究で用いたシングルセル解析と X 線吸収微細構造法を組み合わせた解析は、より広い分野において新たな知見をもたらすことが期待されます。

参考図

本研究で用いたシングルセル解析 (scICP-MS解析)



従来のバルク解析 (ICP-MS解析)

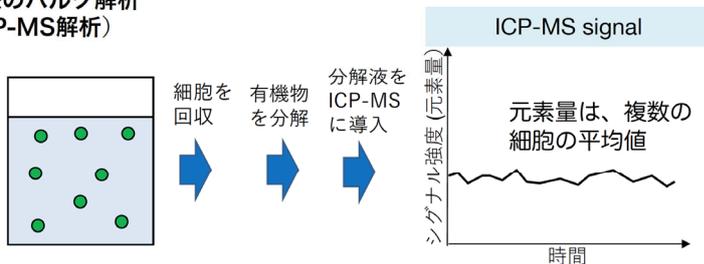


図 1 従来のバルク解析と本研究で用いたシングルセル解析の違い

従来のバルク解析(下図)では、全ての細胞は同じ量の元素をもっていると仮定し、1細胞あたりの元素量は平均値として決定された。それに対して、本研究で用いたシングルセル解析(上図)では、1細胞あたりの元素量を決定することで、1細胞あたりの元素量の違い、各元素を含む細胞の割合を知ることができる。

表層の残基と貴金属の相互作用の変化により、
細胞あたりに吸着する金属量や金属を吸着する細胞の数が増える

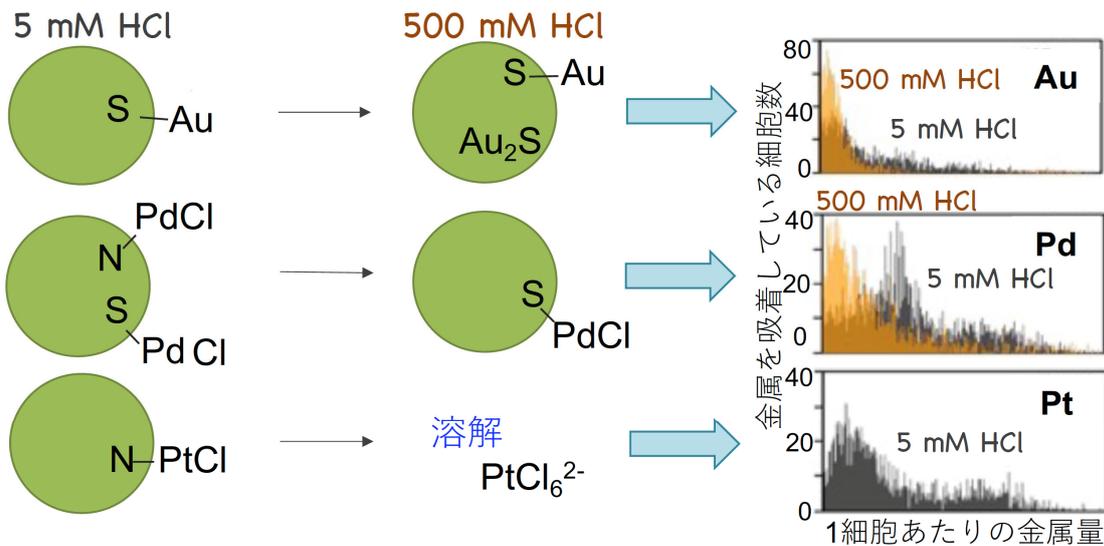


図2 貴金属錯体と細胞表層の残基の相互作用の変化により貴金属を吸着した細胞集団に変化が生じる

シングルセル解析を用いることで、従来のバルク解析では分からなかった、金属を吸着する細胞集団の挙動の変化を捉えることができました。溶液中の酸濃度の上昇に伴い、HSABの法則に従って、より安定な貴金属とSの相互作用が残りました。一方で、細胞あたりに吸着する金属量は、HSABの法則だけでなく、金属の還元状態、細胞表層の残基の数や配置も影響を与えていると考えられました。

参考文献

文献1) Ju X., Igarashi, K., Miyashita, S.-I., Mitsuhashi, H., Inagaki, K., Fujii, S.-I., Sawada, H., Kuwabara, T., Minoda, A., 2016. Effective and selective recovery of gold and palladium ions from metal wastewater using a sulfothermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.* 211, 759–764. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.061>

文献2) Miyashita, Si., Ogura, T, Fujii, Si., Inagaki, K, Takahashi, Y and Minoda, A 2021. Effect of lyophilization on the acid resistance of a unicellular red alga *Galdieria sulphuraria* during platinum recovery. *Journal of Hazardous Materials Advances* 3, 100015. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2021.100015>

文献3) Miyashita, Si, Ogura, T, Kondo, T, Fujii, Si., Inagaki, K, Takahashi, Y and Minoda, A, 2022. Recovery of Au from dilute aqua regia solutions via adsorption on the lyophilized cells of a unicellular red alga *Galdieria sulphuraria*: A mechanism study. *J. Hazard. Mater.* 425, 127982. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127982>

文献4) Miyashita Si, Groombridge AS, Fujii S, Minoda A, Takatsu A, Hioki A, Chiba K and Inagaki K 2014 Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 29.1598-1606 <https://doi.org/10.1039/C4JA00040D>

用語解説

注1) 誘導結合型プラズマイオン質量分析法 (ICP-MS) 金属の高感度分析法。通常は、有機物

の除去などの前処理をした液体試料を噴霧導入し、プラズマによってイオン化後、元素を質量分析計によって分離、検出する。

- 注2) X線吸収微細構造法 X線が試料に吸収される割合をエネルギーに対してプロットしたスペクトルはX線吸収微細構造と呼ばれ、その形状から試料中の対象元素の化学状態(価数や局所構造)を推定できる。高感度で、他の元素が存在する試料でも目的の対象元素の情報を選択的に得ることができる。
- 注3) 官能基 有機化合物の分子構造のうち特徴的な原子団。アミン基、チオール基、リン酸基などがある。これらの官能基は、化合物に特徴的な物理・化学的な特徴を与える。
- 注4) 内圏錯体：土壌や細胞の表面に金属イオンなどが吸着する際に、表面上の官能基と直接結合する金属イオン(内圏錯体)と、表面の官能基と結合は持たずに表面電荷に引き寄せられている金属イオン(外圏錯体)が存在する。表面上の官能基と直接結合をもつ内圏錯体の方が外圏錯体よりも安定で溶けにくい。
- 注5) 硬い/柔らかい酸と塩基の法則 (H S A B則, Hard and Soft Acids and Bases principle)：酸と塩基は、硬い酸と柔らかい酸、硬い塩基と硬い酸に分類され、硬い酸と硬い塩基、柔らかい酸と柔らかい塩基の組み合わせが強い結合をつくる。

研究資金

本研究は、科学研究補助金(18K05922)の一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Cell population behavior of the unicellular red alga *Galdieria sulphuraria* during precious metal biosorption.

(単細胞性紅藻 *Galdieria sulphuraria* の貴金属バイオソープションにおける細胞集団の挙動)

【著者名】 Ayumi Minoda, Shin-ichi Miyashita, Shin-ichiro Fujii, Kazumi Inagaki and Yoshio Takahashi

【掲載誌】 Journal of Hazardous Materials

【掲載日】 2022年2月25日(オンライン先行公開)

【DOI】 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128576>

問い合わせ先

【研究に関すること】

蓑田 歩 (みのだ あゆみ)

筑波大学生命環境系 助教

<https://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003189>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp