

バクテリアにおけるシリコンの役割

The Role of Silicon in Bacteria

廣田隆一*, 池田 丈, 黒田章夫
RYUICHI HIROTA, TAKESHI IKEDA, AKIO KURODA

広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻

TEL/FAX: 082-424-7047

* E-mail: hirota@hiroshima-u.ac.jp

Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

キーワード: シリコン, シリカ, バイオシリカ, 孢子, 耐酸性

Key words: silicon, silica, biosilica, spore, acid resistance

(原稿受付 2011年10月13日/原稿受理 2011年11月1日)

1. はじめに

シリコン (Si: ケイ素) は酸素に次いで地球上に2番目に多く存在する元素であり, 自然界では酸素と結合したシリカ (SiO_2), あるいはケイ酸 (H_4SiO_4) として存在する。生命の中のシリコンといえば, 美しい幾何学的構造をした珪藻のシリカの殻を思い浮かべる方が多いかもしれない。しかし, シリコンは珪藻などの微生物以外にも, 高等生物においても多く利用されている。ある種の海綿 (スポンジ) は, 体重の75%がシリカの骨からできていることが知られており, ケイ酸植物として知られるイネは, 籾殻にシリコンを重量の20%程度蓄積する。これらの生物は, いずれもシリコンをケイ酸の形態で取り込み, 細胞内で高濃度に濃縮して非晶質のシリカ (バイオシリカ) を形成する^{1,5,6)}。また, 哺乳類では, 骨, 歯, コラーゲンの組織形成をはじめ, 胚発生やアルツハイマー病の発症にシリコンが関わっていることが近年明らかにされている⁴⁾。このように, 生物とシリコンには予想以上に深い関係があることが認識されつつある。一方, バクテリアとシリコンの関わりについては, 1970年代に数種類のバクテリアによるシリコンの取り込みに関する論文が報告されていたが¹⁾, データの信頼性にも疑問が残る上, その後の研究は全くされていない。極めて多様な代謝系を有するバクテリアが, 地球上に多量に存在するシリコンを利用することは無いだろうか? 筆者らの研究はこの単純な疑問から始まった。

2. シリコン蓄積菌の単離

バクテリアによるシリコンの利用については, 1970年代に Heinen がグラム陰性の腸内細菌 *Proteus mirabilis* に微量のシリコンを蓄積する能力があることを報告して

いた¹⁾。この論文では, *P. mirabilis* がシリコンをケイ酸として取り込み, さらにこの現象がリン酸飢餓条件下でエネルギー依存的に起こることや, 細胞粗抽出液にケイ酸吸収活性があることが報告されていた。筆者らはこの古い論文に興味を持ち, 再現を試みたが, 残念ながらいずれの実験も再現することができなかった。実験に使用された株が異なることなども考えられたが, Heinen 以外に報告の無い実験を限られた情報だけで再現するのは難しいと考えた。そこで, 独自にシリコンを蓄積するバクテリアの単離を開始した。

水田をはじめとする土壌環境中から得られた240株のバクテリアを, ケイ酸を添加した改変 R2A 培地 (mR2A)⁷⁾ で培養し, 上清中のケイ酸濃度変化をケイ酸—モリブデンブルー法により測定した。その結果, このうち29株の培養液中のケイ酸濃度が有意に低下した。16S rRNA 遺伝子配列をもとに菌株の同定を行ったところ, 全て *Bacillus* 属細菌であり, さらにこの中の21株は *B. cereus* グループ (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*) に属するバクテリアであることが分かった (図1)。スクリーニングで得られた中で最も高い蓄積能力を示した株は *B. cereus* に最も近縁であり, 著者らはこの株を *B. cereus* YH64 と名付けた。YH64 株のケイ酸取り込みと増殖の関係を調べたところ, ケイ酸の取り込みは対数増殖期後期から始まり, 培養開始後約36時間の時点でおよそ100 µg/ml のケイ酸をほぼすべて取り込むことが明らかになった (図2A)。YH64 株は他の *Bacillus* 属細菌と同様に孢子形成を行うが, ミネラル成分 (Mn, Zn, Ca, Fe) を含まない通常の R2A 培地で生育させると孢子が形成されず, ケイ酸の取り込みも起こらないことなどから (図2A, B), ケイ酸の取り込みは孢子形成に関係があると考えられた。そこで, より詳細に

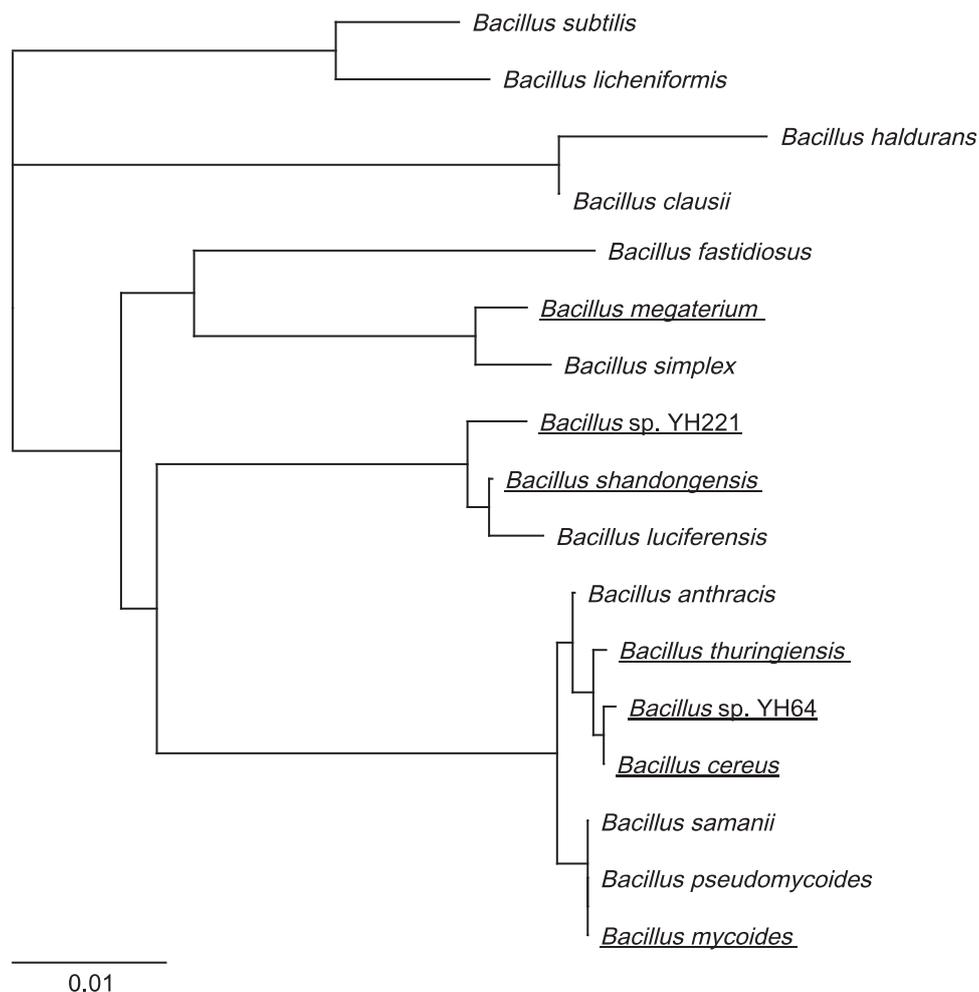


図 1. 16S rDNA 遺伝子配列をもとに作成した *Bacillus* 属細菌の系統樹
下線はシリコン蓄積が確認された株を示す。 *B. subtilis* には、有意なシリコン蓄積は見られなかった。

この関係を調べた。*Bacillus* 属細菌における孢子形成の過程は、(i) 母細胞の不均衡分裂の開始、(ii) 膜陥没、(iii) 内性孢子形成、(iv) 熱耐性孢子形成、(v) 孢子のスポアコート形成、(vi) 母細胞からの遊離、の 6 つのステージに大きく分けられており、形態観察や熱耐性孢子的計測を行うことで実験的に区別できる。YH64 株では熱耐性孢子が出現した直後にケイ酸濃度の低下が始まったことから、ケイ酸の取り込みはステージ iv 以降であることが明らかになった (図 2 C)。また、孢子形成におよぼすミネラル (Mn, Zn, Ca, Fe) の影響を調べるため、これらのうちいずれかを抜いた培地で培養を行ったところ、孢子形成は Mn, Ca を要求し、シリコンの蓄積も同様であることがわかった。以上のことからシリコンの蓄積は、*Bacillus* 属細菌の孢子形成に伴って起こることが明らかになった。

3. バクテリア孢子的シリコン

実はすでに 1980 年代の走査型透過電子顕微鏡 (STEM) を用いた解析から *B. cereus* や *B. megaterium* の孢子にシリコンが検出されることが報告されていた⁹⁾。しかしながら、X 線分析のシグナルが弱く解像度が低かったこ

とから、詳細な局在や分布までは分からず、検出されたシリコンのシグナルは、試薬等に含まれるシリコンのバックグラウンドや、何らかの異常あるいは例外と考えられていた^{3,12,15)}。そこで、YH64 に大量に取り込まれたシリコン (重量として約 6%) が、孢子的のどの部分に局在しているかを調べるため、YH64 株孢子的の透過型電子顕微鏡観察および元素マッピングによるシリコンの分布解析を行った。*Bacillus* 属細菌の孢子的は核酸とタンパク質を保護するように幾重ものバリアーのような層構造から形成される。*B. cereus* グループ細菌の孢子上においては、その層構造が外側から中心に向けて、exosporium (EX), coat (CT), undercoat (UC), cortex (CX), core (CR) に大別される。ケイ酸を含む培地で調製した孢子上 (Si (+) 孢子上) とケイ酸をほとんど含まない通常培地で調製した孢子上 (Si (-) 孢子上) の構造を比較したところ、EX と UC の構造についてはほとんど変化が見られなかったが、Si (+) 孢子上の CT は Si (-) 孢子上のそれよりも約 2.7 倍に肥厚していた (図 3 A, B)。さらに、Si (+) 孢子上では CT 層の外側にナノサイズの粒子状物質からなる層 (SX) が見出された。X 線分析により Si シグナルの分布を調べたところ、Si (+) 孢子上の CT と SX の両方に明確なシグナルが確認され、取り込まれた

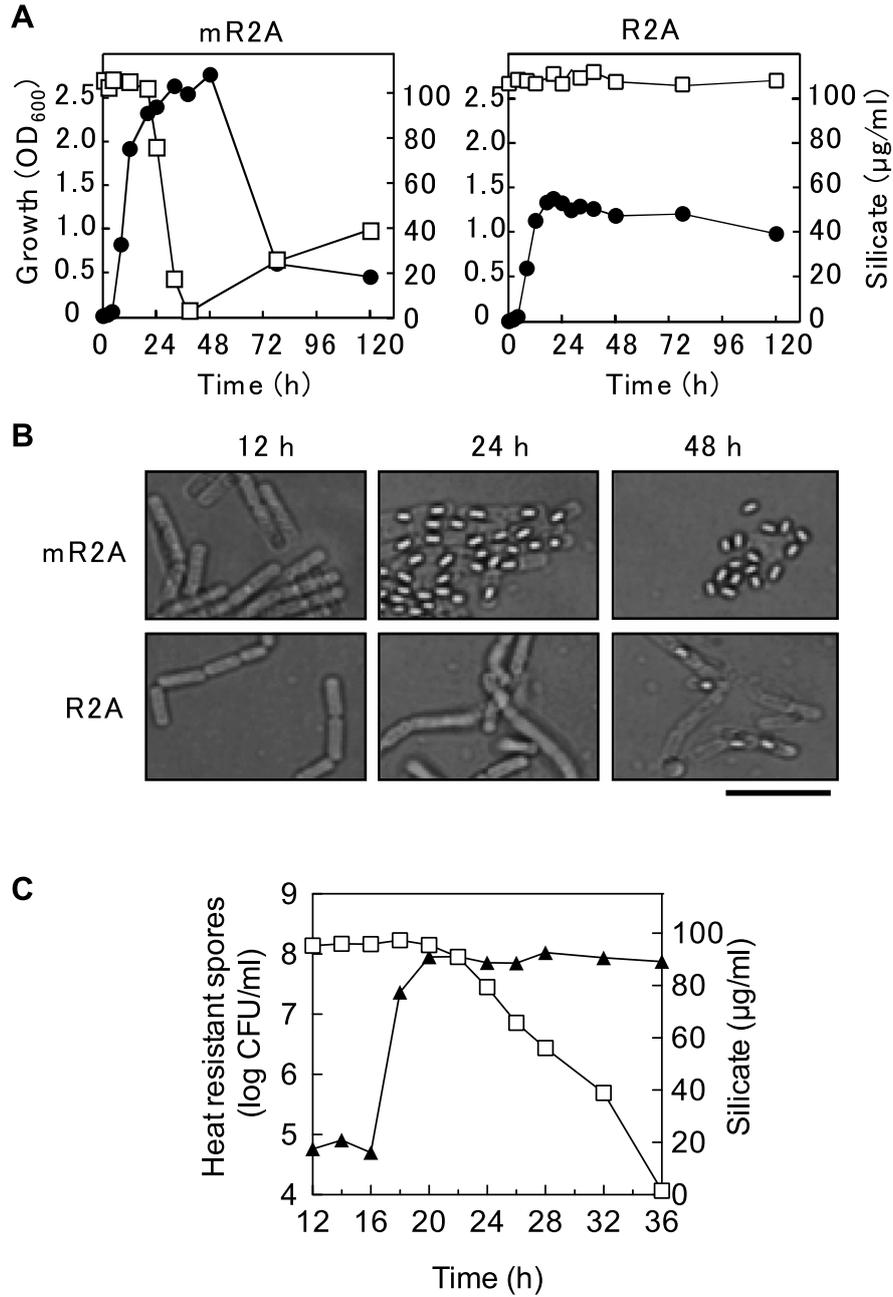


図2. *B. cereus* YH64 株胞子の増殖とシリコンの蓄積

(A) YH64 株の増殖 (●) と培養液のケイ酸濃度 (□) の経時変化。(B) R2A 培地および mR2A 培地で培養した YH64 株の位相差顕微鏡写真。写真右下のバーは 10 µm を示す。(C) YH64 株培養液のケイ酸濃度変化 (□) と熱耐性胞子出現数 (▲) の関係。

シリコンはこれらの領域に蓄積されていることが明らかとなった (図 3 C)。

4. ガラスの殻で身を守るバクテリア

胞子形成は栄養源の枯渇や乾燥状態など、生育に適さない環境状態やストレスを凌ぐための微生物の生存戦略のひとつである。よって胞子に特有の Spore coat は、これらのストレスから身を守るための防護服の様なものであるといえる。Spore coat には、薬剤の透過性を低下させる機能があることが知られている¹⁴⁾。このことから、肥厚した CT と SX 層を持つ Si (+) 胞子は、ストレスに対する抵抗性が変化していることが予想された。そこで、様々なストレスに対する YH64 株 Si (+), Si (-) 胞子の生存率を比較した。熱、紫外線、過酸化水素、アルカリに対しては生存率の変化はほとんど見られなかった。しかしながら、Si (+) 胞子は Si (-) 胞子に比べて、酸性溶液 (0.4 M HCl) での生存率が 10 倍以上高いことが分かった (図 4)。Si (+) 胞子は硝酸や硫酸などに対しても同様の耐性を示した。これらのことから、シリコンの蓄積は酸に対する抵抗性を高める効果があることがわかった。次に、この効果を YH64 株以外の

ら、肥厚した CT と SX 層を持つ Si (+) 胞子は、ストレスに対する抵抗性が変化していることが予想された。そこで、様々なストレスに対する YH64 株 Si (+), Si (-) 胞子の生存率を比較した。熱、紫外線、過酸化水素、アルカリに対しては生存率の変化はほとんど見られなかった。しかしながら、Si (+) 胞子は Si (-) 胞子に比べて、酸性溶液 (0.4 M HCl) での生存率が 10 倍以上高いことが分かった (図 4)。Si (+) 胞子は硝酸や硫酸などに対しても同様の耐性を示した。これらのことから、シリコンの蓄積は酸に対する抵抗性を高める効果があることがわかった。次に、この効果を YH64 株以外の

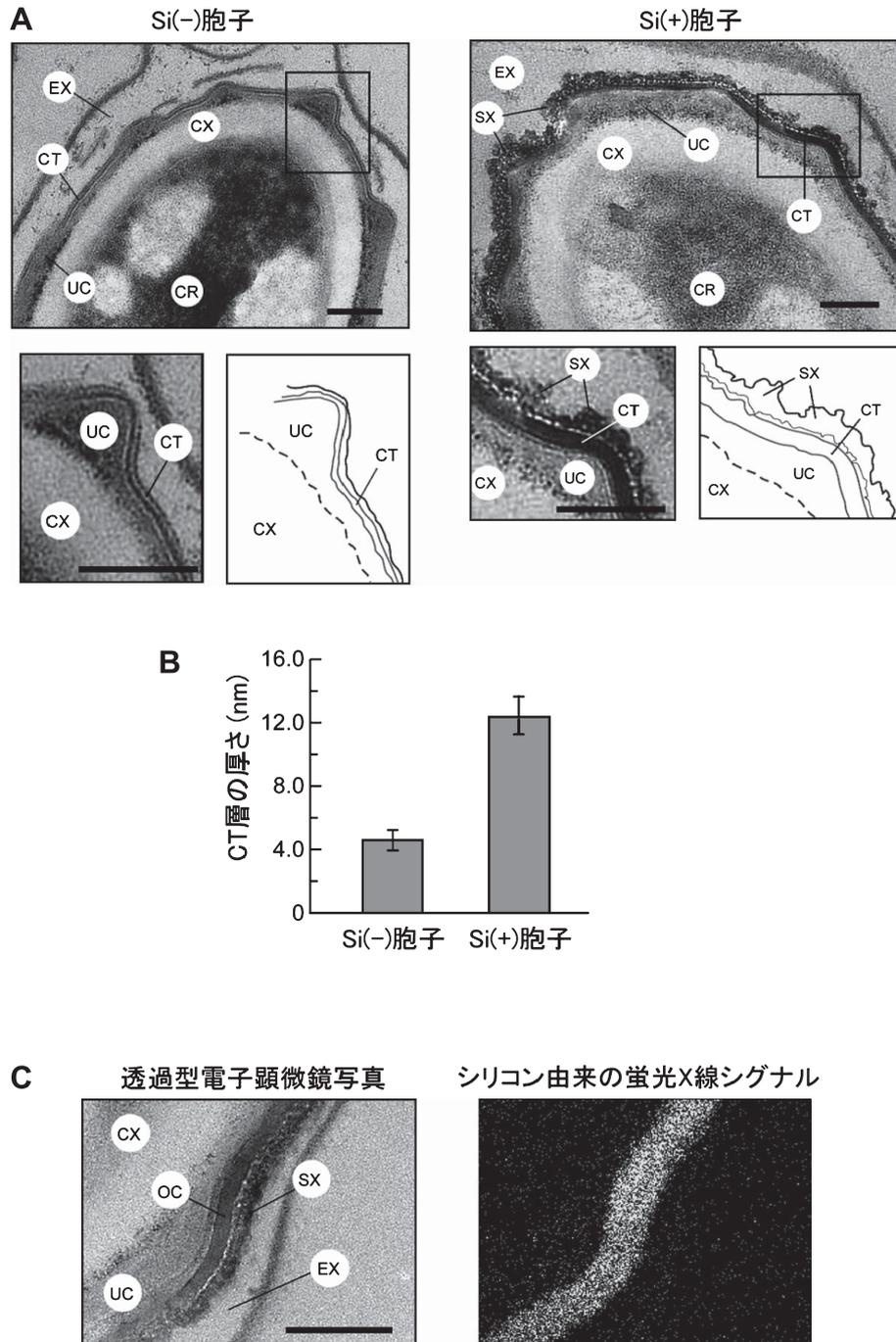


図3. *B. cereus* YH64株孢子の電子顕微鏡写真とシリコンの局在

(A) 通常の培地とシリコンを含む培地でそれぞれ培養した孢子 (Si (-) 孢子, Si (+) 孢子) の透過型電子顕微鏡 (TEM) 写真。上部写真内の四角で囲んだ部分を拡大したものとその領域を模式的に表した図を写真下部にそれぞれ示した。EX, exosporium; CT, coat; UC, undercoat; CX, cortex; CR, core; SX, シリカナノ粒子からなる層。(B) Si (+), Si (-) 孢子の CT 層の厚さ。(C) Si (+) 孢子の TEM 像 (左) と連続切片同部分を STEM-EDX で分析して得られたシリコン由来シグナル (右)。写真内のバーは 100 nm スケールを表す。

Bacillus 属細菌においても調べてみた。スクリーニングによって得られた *B. shandongiensis* に最も近縁の YH221 株, および NBRC より入手した *B. cereus* グループ細菌の基準株 *B. cereus* NBRC15305, *B. thuringiensis* NBRC101235, *B. megaterium* NBRC15308 はいずれもシリコンを蓄積した (図5)。その蓄積量は全て YH64 株の 1/5 以下であったが, このシリコン蓄積に

よって孢子の耐酸性が少なくとも 10 倍高められた。このことから, シリコン蓄積は *B. cereus* グループに属する細菌において特に顕著に見られる性質であり, さらに耐酸性の上昇はシリコン蓄積を示す *Bacillus* 属細菌の一般的な現象であることが分かった。CT, SX に蓄積されたシリコンはシリカ (ガラス) の形態で存在するが (後述), この状態はまさに “ガラスの殻で身を守る胞

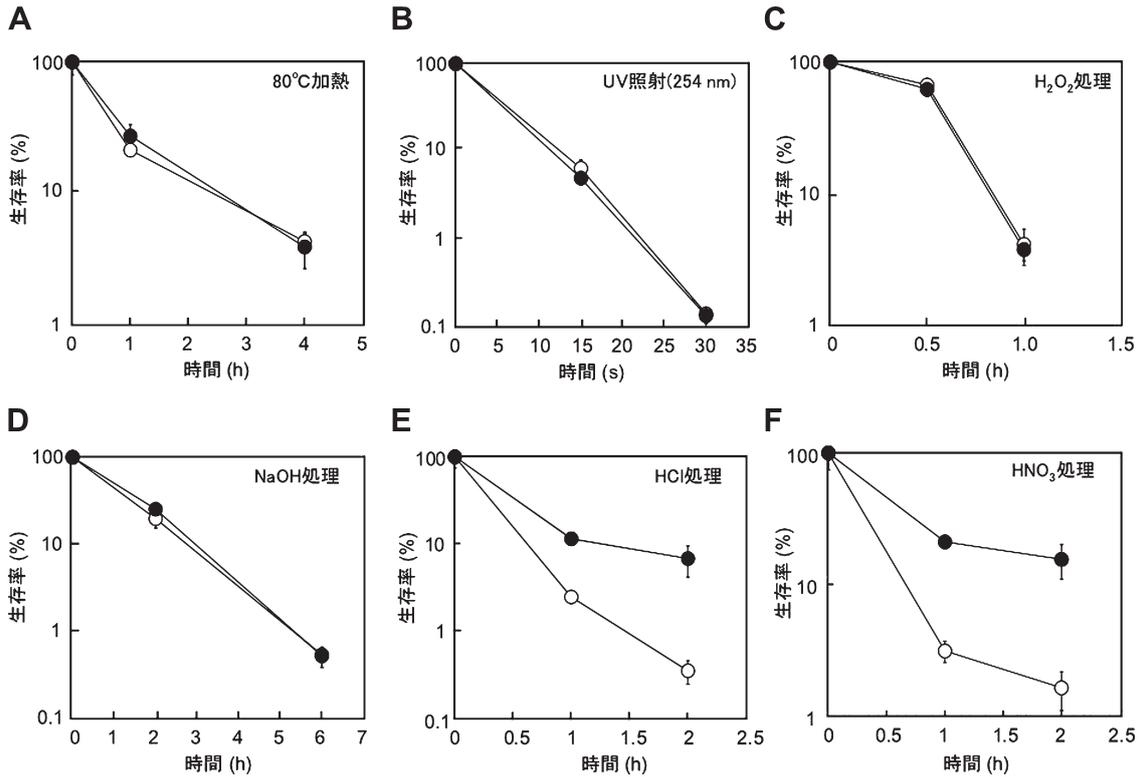


図4. 様々なストレスに対する *B. cereus* YH64 胞子の生存率変化
Si (+) 胞子を●, Si (-) 胞子を○で示す。胞子を様々なストレス条件にさらして生存率を調べた。

子” とでもいえよう。

塩酸や硫酸などのいわゆる鉱酸は、*Bacillus* 属細菌胞子の膜構造を破壊し、物質透過性を上昇させる。好酸性菌の耐酸性は、細胞内のプロトン積極的に排出するプロトンポンプによってもたらされる¹⁰⁾。しかし、休眠状態にあり代謝活動を行っていない胞子では、このようなエネルギー依存的な作用が起こっているとは考えにくく、異なる機構で耐酸性を発揮していると考えられる。そこで、蓄積されたシリコンの形態について考えた。珪藻、植物などのシリコンを蓄積する生物はすべてシリカの形態でシリコンを蓄積する。シリカはアルカリには弱い、酸には抵抗性があり溶解しない。ただ、例外的にフッ化水素 (HF) に溶解するので、フッ化水素で溶解すればシリコンはシリカの形態で存在するといえる。実際に Si (+) 胞子をフッ化水素で処理すると、蓄積されたシリコン量相当のケイ酸が遊離してくることが確認された。さらに、フッ化水素処理後の胞子はもはや耐酸性を示さなかった。このことから、耐酸性には CT, SX 層のシリカ層が必要であり、フッ化水素処理ではこれらが溶解されたため、耐酸性が失われたと考えられる。つまり、シリコンを蓄積した胞子は、酸にはめっぽう強いシリカガラスの殻によってプロトンの透過性を低下させ、酸性条件下での細胞の生存率を高めていると考えられる。シリコンは土壌中や淡水・海水中に存在し、地下水中のケイ酸濃度は 9.6–57.7 mg/L 程度といわれている⁵⁾。つまり、環境中の胞子も耐酸性を発揮するためのシリコン蓄積を行っている可能性が十分に考えられる。

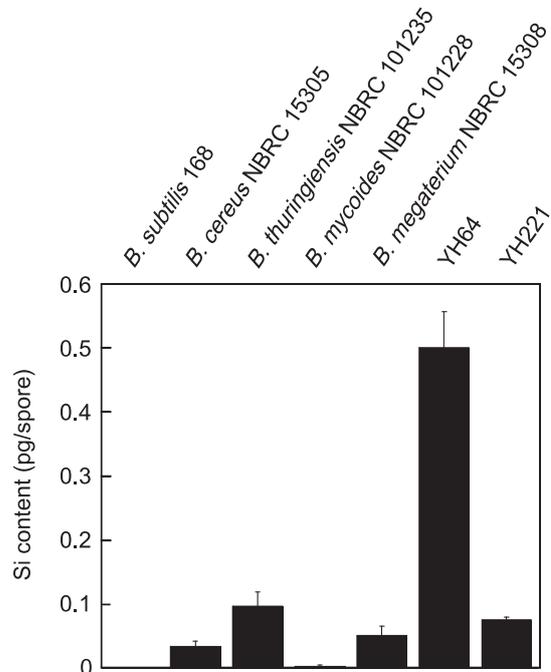


図5. 様々な *Bacillus* 属細菌のシリコン蓄積
一胞子あたりのシリコン含量を調べた。YH64, 221 株はスクリーニングで得られた株, その他は NBRC より入手した。

5. 炭疽菌のシリコン：バイオテロのミステリーとして注目されたシリコン

さて、先に述べたように1980年代に *B. subtilis* や *B. cereus* の孢子に微量のシリコンが見いだされていたが、これが生理的現象によるものかどうかその後調べられることはなかった。しかし、孢子中のシリコンに研究者の注目が集まる事件が2001年に起こった。米国炭疽菌テロ事件である。炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は、*B. cereus* グループに属する土壤中の常在菌であるが、時として家畜やヒトに感染して炭疽症を引き起こす。記憶に新しい方もおられるかもしれないが、このバイオテロは、テロリストが大量の炭疽菌孢子を封筒に入れて政府組織や市民に送りつけ、孢子を吸い込ませることで炭疽症を発症させ死に至らしめることを目論んだものであった。これにより、新聞記者、郵便局員など数人の一般市民が犠牲となり、米国全土を震撼させた。米国連邦捜査局 (FBI) の調査により、事件に使われた孢子は通常の孢子とは異なり、封筒を開けたときに飛散しやすいよう何らかの細工が施されており、さらに不思議な特徴として孢子周囲に高濃度のシリコンの存在が認められた¹²⁾。前述したように、当時は *Bacillus* 属細菌のシリコン蓄積についてほとんどわかっていなかったため、当局は孢子の飛散性を高めるためにテロリストがシリコンを意図的に付着した可能性があると考えていた¹²⁾。しかしながら、シリコンと飛散性を結びつける実験的確認は全く得られず、両者の関係は不明なままであった。筆者らはバイオテロとの関係は意図せず、*B. cereus* グループ細菌のシリコン蓄積を証明した。研究の過程でバイオテロの謎を知った著者らは、孢子が自らシリコンを蓄積した場合に飛散性が変化するかどうか調べてみることにした。粒子の飛散性に影響を及ぼす要因のひとつに荷電粒子間の反発力があげられる。そこで粒子の電荷を調べる E-SPART analyzer (ホソカワミクロン株式会社) を用いて、孢子の帯電状態を調べた。YH64 株の Si (+), Si (-) 孢子を凍結乾燥後、孢子の固まりを乳鉢により丹念に解砕し、封筒に入れられた状態を想定してプラスチックバッグ中で数回激しく振り混ぜ、孢子の帯電分布を調べた。その結果、シリコンの有無によって帯電状態の変化はほとんど見られず、自然に蓄積されたシリコンに飛散性を高める効果は無いことがわかった。つまり、孢子の飛散性を高めるには、シリコンを蓄積させるのではなく、それ以外の細工が必要であると考えられた。

それでは、なぜバイオテロに使われた孢子には多量のシリコンが検出されたのであろうか。シリコンの蓄積によって孢子の耐酸性化が起こることは、おそらく知られていなかったと思われる。仮に意味が分かっていたとしても、バイオテロにおいて孢子を耐酸性化させることはおそらくほとんど無意味である。従って、テロリストはおそらくシリコンを含んだ培地を意図せず使用し、結果としてシリコンを多量に含んだ孢子を生み出すことになったのではないだろうか。もしそうだとすると、培地中に含まれていたシリコンの由来が犯人を突き止める手がかりの一つとなる可能性がある。一般的な実験用培地に著量のシリコンが含まれることはまず無いが、米国で販売されているある種の消泡剤 (ファーメンターを使っ

た培養で使われる) に、*B. cereus* 属バクテリアのシリコン蓄積量を満たすレベルのケイ酸が含まれていることが指摘されている。従って、このような試薬の入手先を辿ることで、テロリストの特定につながるかもしれない。筆者らのこの考えは、「シリコンミステリー」としてバイオテロ事件の孢子の謎をテーマにしている *Science* 誌の News & View で紹介された²⁾。

6. シリコンと環境

最後にシリコンの環境における役割について考えた。シリコンは淡水、海水域において水質保全の観点からも重要な機能を持つことが分かってきている。珪藻の増殖は、河川・海域に流入するシリコン濃度に依存しているため、岩石や土壤中のシリカの溶出により供給される可溶性ケイ酸の供給状態が変化すると大きく影響を受ける。特にダム建設により河川の水がプールされると、シリコンはダムで増殖する淡水性の珪藻に収奪され、海洋へ流出するシリコン濃度は低下する。その結果、良性の珪藻の増殖が抑制され、赤潮の原因となる渦鞭毛藻などの有害な非ケイ藻類植物性プランクトンの増殖を招くことが示唆されている。これは「シリカ欠損仮説」と呼ばれ、アイアンゲートダム建設によって生じた黒海沿岸の様々な生態系変質を引き起こした原因のひとつとして、水質中のケイ酸量が取り上げられたことで広く認識され始めた⁹⁾。シリカ欠損による影響はさらに上位生物のクラゲの異常増殖にも影響を及ぼしている可能性が考えられており、現在、瀬戸内海沿岸や東アジア海域において長期的な検証調査が行われている¹⁰⁾。また、珪藻のバイオマスは地球規模で見ると膨大な量であるため、海洋シリコン濃度の変化は結果として炭素循環にも大きく影響を及ぼす。この様に、シリコンの循環は主に珪藻の働きをとおして重要な機能を果たしていることが知られている。バクテリア孢子によるバイオシリカ形成がどの程度行われているかは、現在のところ全く不明である。しかし、*Bacillus* 属細菌の様に環境中に広く存在するバクテリアのシリカ形成とその溶解は、主に地上部における環境中のシリコン動態に関わる新たな生物学的要因となる可能性があり、地球規模での物質循環に影響を及ぼしている可能性もあるかもしれない。

7. おわりに

以上、地球上に2番目に多く存在する元素であるシリコンとバクテリアの関わりの一つとして、*Bacillus* 属細菌孢子のシリコン蓄積を見いだした経緯について述べてきた。環境中において孢子がシリコンを蓄積することの生理的意義は、未だ不明であるが、動物や捕食者の消化から身を守るために役立っている可能性が考えられる。*Bacillus* 属細菌は動物腸内の常在細菌として存在することが知られており、腸内細菌相菌相のバランス維持、宿主の栄養吸収促進、免疫機能の強化など、いわゆるプロバイオティクスの効果をもたらすことが知られている¹³⁾。*Bacillus* 属細菌が食餌などにより動物に摂取され、腸内にたどり着くまでには酸性条件下である消化器官を通りぬける必要があり、“ガラスの殻”がそのバリアー

として機能しているのかもしれない。*Bacillus* 属細菌は環境中において非常に多くの種類が存在する。胞子が有する多層からなる膜構造のひとつに、今回見いだされたガラスの殻が加わることで、*Bacillus* 属細菌の環境中における新たな姿が見えてくるかもしれない。シリコンの取り込みや、ナノスケールでのシリカ粒子合成メカニズムも現在のところ不明であるが、植物で発見されているケイ酸輸送体のホモログ解析や、シリコン蓄積が起こるステージ iv 期の発現タンパク質の解析などを手がかりに解明が進むことが期待される。

文 献

- 1) Azam, F., B.B. Hemmingsen, and B.E. Volcani. 1974. Role of silicon in diatom metabolism. V. Silicic acid transport and metabolism in the heterotrophic diatom *Nitzschia alba*. *Arch. Microbiol.* 97: 103–114.
- 2) Bhattacharjee, Y. 2010. Silicon mystery endures in solved anthrax case. *Science* 327: 1435.
- 3) Carroll, A.M., M. Plomp, A.J. Malkin, and P. Setlow. 2008. Protozoal digestion of coat-defective *Bacillus subtilis* spores produces “rinds” composed of insoluble coat protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5875–5881.
- 4) Chumlea, W.C. 2007. Silica, a mineral of unknown but emerging health importance. *J. Nutr. Health. Aging.* 11: 93.
- 5) Epstein, E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91: 11–17.
- 6) Fauteux, F., W. Remus-Borel, J.G. Menzies, and R.R. Belanger. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 249: 1–6.
- 7) Hirota, R., Y. Hata, T. Ikeda, T. Ishida, and A. Kuroda. 2010. The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol.* 192: 111–116.
- 8) Humborg, C., D.J. Conley, A. Cociasu, and B. Bodungen. 1997. Effect of Danube River dam on Black Sea biogeochemistry and ecosystem structure. *Nature* 386: 385–388.
- 9) Johnstone, K., D.J. Eller, and T.C. Appleton. 1980. Location of metal ions in *Bacillus megaterium* spores by high-resolution electron probe X-ray microanalysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 7: 97–101.
- 10) Konings, W.N., S.V. Albers, S. Koning, and A.J. Driessen. 2002. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 61–72.
- 11) Krumbein, W.E. and D. Werner. 1983. The microbial silica cycle, pp. 125–158. In W. E. Krumbein (ed.), *Microbial Geochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- 12) Matsumoto, G. 2003. Bioterrorism. Anthrax powder: state of the art? *Science* 302: 1492–1497.
- 13) Nicholson, W.L. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59: 410–416.
- 14) Nicholson, W.L., N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh, and P. Setlow. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 548–572.
- 15) Stewart, M., A.P. Somlyo, A.V. Somlyo, H. Shuman, J.A. Lindsay, and W.G. Murrell. 1981. Scanning electron probe x-ray microanalysis of elemental distributions in freeze-dried cryosections of *Bacillus coagulans* spores. *J. Bacteriol.* 147: 670–674.
- 16) 原島 省. 2006 年環境省地球環境研究総合推進費研究課題 D-06–061.