微生物に取り込まれた銅(II)イオンの ESR による解析

中島暉*[1)]，横山秀克*[2)]，大矢博昭*[2)]，鎌田仁*[2)]

*[1)] 宮崎医科大学化学，　*[2)] 山形県生物ラジカル研究所

Electron Spin Resonance of Cu(II) Ion Taken up in Microbial Cells

Akira Nakajima[1)], *Hidekatsu Yokoyama*[2)], *Hiroaki Ohya-Nishiguchi*[2)], *Hitoshi Kamada*[2)]
[1)] Department of Chemistry, Miyazaki Medical College, Kiyotake, Miyazaki　889-1692;
[2)] Institute for Life Support Technology, Yamagata 990-2473

The copper accumulation by various microorganisms were examined.　Of microorganisms tested, *Arthrobacter nicotianae* IAM 12342 (603 ?mol/g cells), *Micrococcus luteus* IAM 1056 (529 ?mol/g cells), *Streptomyces flavoviridis* HUT 6147 (499 ?mol/g cells), *Streptomyces levoris* HUT 6156 (551 ?mol/g cells) have high abilities to accumulate copper.　Copper accumulation by bacterial cells was so rapid, and was affected by the pH of the solution.　The ESR spectra of Cu(II) ion taken up in microbial cells were axial type, having a major absorption to higher field at $g_{\perp}$ and lesser absorption to lower field at $g_{//}$ with four lines.　The ESR parameters, $g_{//}$ and $|A_{//}|$, of these spectra were in the ranges of 2.238～2.303 and 15.6～18.5 mcm^{-1}, respectively.　The ESR spectra of Cu(II) in *Arthrobacter nicotianae* and *Rhizopus oryzae* cells were the superposition of two types of signals (A: $g_{//}$ = 2.245～2.252, $|A_{//}|$ = 17.6～18.2 mcm^{-1} and B: $g_{//}$ = 2.285～2.289, $|A_{//}|$ = 15.6～15.9 mcm^{-1}).　A new signal, $g_{//}$ = 2.388, $|A_{//}|$ = 13.0 mcm^{-1}, was observed in *Arthrobacter nictianae* cells at pH 2～3.　The relationship between $g_{//}$ and $|A_{//}|$ of Cu(II) in microbial cells are almost linear, which is a similar manner as that of Cu(II)－glycyl-glycylglycylglycine in a series of pH values.　These results suggested that Cu(II) in microbial cells were in the similar axial type coordination circum-stances with nitrogen and oxygen donors as those of type II Cu-proteins, and that donor atoms of Cu(II) in microbial cells were altered from 4N (higher pH) to 4O (lower pH) according to the pH variation of their coordination abilities.

copper accumulation, bacteria, actinomycetes, fungi, yeasts, ESR of Cu(II)

緒言

微生物のなかには、重金属元素を多量に集積する能力を持つものが存在する。近年、この微生物の能力を利用する水圏中銅の除去に関する研究は活発に行われているが、微生物による銅集積機構はいまだ明確ではない[1)]。微生物菌体に取り込まれた銅の物理化学的性状を解析することは、銅集積機構を解明するうえで重要である。銅(II)イオンは、d 軌道 に一つの空孔を持ち、常磁性を示し、ESR 検出可能である。銅(II)錯体の ESR は、d 電子状態、配位環境に関するミクロな情報が得られることから有力な分析手法と考えられる。しかし、微生物に取り込まれた銅の ESR による性状解析については、殆ど行われていない[2)]。本研究では、ESR を用いて微生物に取り込まれた銅の性状について詳細に解析した。

実験方法

1. 微生物の培養：東京大学分子細胞生物学研究所 IAM カルチャーコレクション(IAM)及び広島大学大学院先端物質科学研究科生命分子機能化学講座(HUT)より分譲された微生物菌株を 3 日間培養後、遠心分離法またはろ過法で集菌し、後の実験に用いた。培地は、肉エキス 3 g/l、ペプトン 5 g/l、塩化ナトリウム 5 g/l (細菌)；酵母エキス 4 g/l、麦芽エキス 10 g/l、グルコース 4 g/l、pH 7.1 (放線菌)；酵母エキス 4 g/l、麦芽エキス 10 g/l、グルコース 4 g/l、pH 5.7 (糸状菌・酵母)を用いた。

2. 銅集積実験：前培養した微生物菌体 20 mg（乾重量として）を 40?M の銅を含む溶液(pH 5) 40 ml に懸濁し、銅を取り込ませた。銅塩として硝酸銅を用いた。遠心集菌後、残液中の銅濃度を ICP 法により測定し、銅集積量を求めた。また、菌体中の銅量は、中性子放射化分析法により求めた。凍結乾燥した微生物菌体粉末を日本原子力研究所 JRR－4 炉気送管(中性子束 5×10^{13} n・cm^{-2}・sec^{-1})で 1 分間照射し、3 分及び 12 時間冷却後、1039.0 KeV (^{66}Cu, 半減期 5.1 分) 及び 1345.5 KeV (^{64}Cu, 半減期 12.8 時間)のγ線を計測した。中性子照射した微生物菌体のγ線スペクトルを図 1 に示す。

3. ESR 測定：ESR スペクトルは、以下の条件で測定した。共鳴周波数 9.44 GHz、磁場 310 mT、磁場掃引幅 ±75 mT、磁場変調周波数 100 kHz、磁場変調幅 0.32 mT、マイクロ波出力 5 mW。

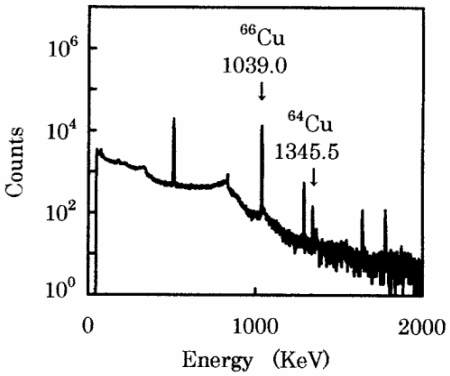

図１．中性子照射微生物粉末の
γ線スペクトル

結果・考察

1. 微生物による銅集積

細菌、放線菌、糸状菌、酵母の銅集積能を調べた。結果の一部を表 1 に示す。微生物の銅集積能はその種類によって異なり、*Arthrobacter nicotianae* (IAM 12342), *Micrococcus luteus* (IAM 1056) などの細菌、*Streptomyces fla-voviridis* (HUT 6147), *Streptomyces levoris* (HUT 6156)などの放線菌が高い値を示すことがわかった。

そこで、細菌類 *Arthrobacter nicotianae*, *Micrococcus luteus* について銅集積特性を調べた。両細菌による銅集積は極めて速く、銅溶液接触後数分で平衡に達した。両細菌による銅集積は、溶液の pH の影響を受け(図 2)、*Arthrobacter* 菌の銅集積量は pH 2～6 の範囲で pH とともに増加したが、一方、*Micrococcus* 菌は pH 4 に極大を持ち、pH 5 以上及び pH 3 以下で減少した。このように、微生物による銅集積に対する溶液の pH の影響は、微生物の種類によって異なることがわかった。

2. 微生物菌体中銅(II)の ESR

微生物菌体に取り込まれた銅(II)の ESR スペクトルは、いずれも典型的な多晶形銅(II)化合物のパターンを示した。図 3 に銅を集積した

Arthrobacter nicotianae のスペクトルを、表 1 に $g_{//}$と$|A_{//}|$の値の一部を示す。表 1 より、$g_{//}$ = 2.238〜2.303, $|A_{//}|$ = 15.6〜18.5 mcm^{-1}であり、微生物菌体中の銅(II)イオンは窒素原子と酸素原子がドナー原子として配位した歪んだ八面体構造を持つと考えられる[3)]。また、*Arthrobacter nicotianae, Rhizopus oryzae* などの ESR スペクトルは 2 種類のシグナル(表 1 の A と B)の重ね合わせであった。*Arthrobacter* 菌では、pH 2〜3 で、新たなシグナル($g_{//}$ = 2.388, $|A_{//}|$ = 13.0 mcm^{-1})が現れることもわかった。これらのスペクトルの $g_{//}$ー$|A_{//}|$プロットをとると、ほぼ直線になり、この変化は、Glycylglycylglycylglycine 銅(II)錯体の pH 変化と同じ傾向を示すことがわかった(図 4)[4)]。これらの結果から、微生物中の銅(II)は、細胞表面蛋白質のアミノ酸残基に結合しており、その配位状態は、微生物細胞表面付近のミクロな pH により影響を受け、微生物中の銅(II)は、pH 変化による窒素ドナーと酸素ドナーの配位能力変化に応じ 4N (higher pH), 3N1O, 2N2O, 1N3O, 4O (lower pH) と配位環境が変化するものと考えられた(図 5)。

表 1.　微生物の銅集積能及び菌体に取り込まれた銅(II)の ESR パラメーター

Species		Cu taken up (μmol/g) 4×10^{-5} M	Cu taken up (μmol/g) 8×10^{-4} M	$g_{//}$	$\|A_{//}\|$ (mcm^{-1})
Bacteria					
Arthrobacter nicotianae IAM 12342	(A)	70.0±1.2	603±5	2.245	18.2
	(B)			2.289	15.9
	(pH 2)			2.388	13.0
Bacillus subtilis IAM 1026		75.1±1.5	327±5	2.242	18.0
Citrobacter freundii IAM 12471		74.2±1.8	212±3	2.254	17.4
Escherichia coli IAM 1268		71.4±1.1	287±2	2.270	16.6
Micrococcus luteus IAM 1056		69.3±2.1	529±3	2.250	17.7
Pseudomonas stutzeri IAM 12097		96.0±2.3	340±4	2.276	17.3
Zooglea ramigera IAM 12136		64.0±1.3	377±3	2.245	17.7
Actinomycetes					
Actinomyces flavoviridis HUT 6147		64.2±0.6	499±9	2.249	17.6
Streptomyces fradiae HUT 6054		72.6±0.8	294±8	2.283	16.5
Streptomyces griseoflavus HUT 6153		68.0±0.8	292±3	2.303	15.6
Streptomyces hiroshimensis HUT 6033		65.3±0.4	309±9	2.266	17.3
Streptomyces levoris HUT 6156		72.2±1.1	551±3	2.249	17.6
Fungi					
Aspergillus niger IAM 2086		38.0±0.2	351±5	2.241	18.5
Penicillium chrysogenum IAM 7114		37.9±1.6	322±7	2.243	18.0
Rhizopus oryzae IAM 6006	(A)	38.0±3.3	382±9	2.253	17.6
	(B)			2.285	16.5
Yeasts					
Candida utilis IAM 4220		64.1±0.7	170±9	2.243	18.0
Cryptococcus laurentii IAM 12264		12.7±0.5	72±6	2.272	17.3
Saccharomyces cerevisiae IAM 4512		56.7±0.4	147±7	2.238	17.8

微生物菌体(乾重量として 20 mg)を 40 ml の Cu 溶液 (pH 5) に 1 時間懸濁した。

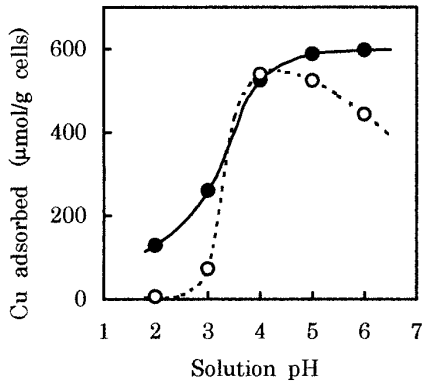

図２．微生物による銅吸着の pH 変化

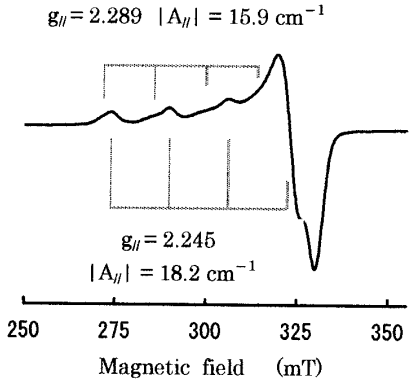

図３．Arthrobacter 菌体中 Cu(II)
の ESR スペクトル

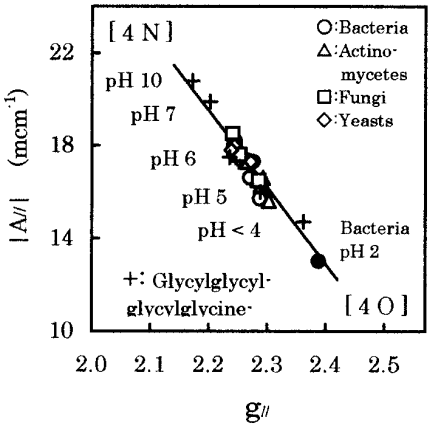

図４．微生物中 Cu(II)の ESR の
g// と |A//| の関係

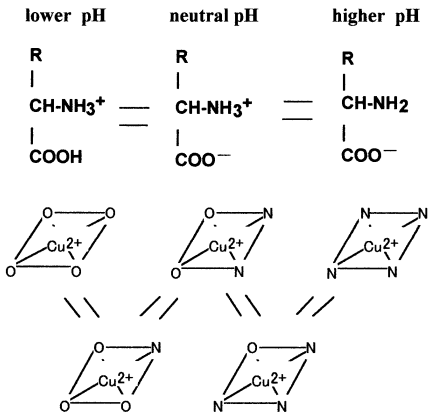

図５．微生物中銅(II)の配位環境

文献

1. Huang, C., Huang, C. P. (1996) Appica-tion of *Aspergillus oryzae* and *Rhyzopus oryzae* for Cu(II) removal. Wat. Res. 30: 1985; Macaskie, L. E. (1995) Copper tole-rance, phosphatase activity and copper up-take by a heavy metal-accumulating *Citro-bacter* species. Microbios 84:137; Philip, L., Iyengar, L., Venkobachar, C. (1995) Bio-sorption of copper(II) by *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Environ. Poll. 5:92.
2. Tsezos, M., Mattar, S. (1986) A further insight into the mechanism of biosorption of metals, by examining chitin EPR spectra. Talanta 33:225; Lebedev, V. S., Volodina, L. A., Fedorov, Yu. I. (1991) ESR analysis of copper binding sites in intact and N-ethyl-maleimide-modified bacteria *Escherichia coli*. Biophysica 36:91.
3. Peisach, J., Blumberg, W. E. (1974) Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance
spectra of natural and artifical copper pro-teins. Arch. Biophys. Biochem. 165:691.
4. Landolt-Boernstein : Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology, 1984, (Eds. K. H. Hellwege, O. Madelung), Vol.. 12, Magnetic Properties of Coordination and Organometallic Transition Metal Compounds, Subvolume b, Electron Paramagnetic Resonance, Springer-Verlag, Berlin.