

## 二国間交流事業 共同研究報告書

令和5年6月27日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]

立命館大学 生命科学部

[職・氏名]

教授 三原 久明

[課題番号]

JPJSBP 120217716

1. 事業名 相手国: インド (振興会対応機関: DST) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 微生物が分泌生産するセレンナノ粒子の細胞外高分子物質による安定化とその生理活性

(英文) Production of microbial exopolymeric substance (EPS) stabilized biogenic selenium nanoparticle (BioSeNPs) and their (EPS-SeNPs) application as bioactive matrices

3. 共同研究実施期間 2021 年 6 月 1 日 ~ 2023 年 5 月 31 日 (2 年 0 ヶ月)【延長前】    年    月    日 ~    年    月    日 (   年    ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Thapar Institute of Engineering and Technology, Professor, Prakash N.Tejo

5. 委託費総額(返還額を除く)

|                 |          |             |
|-----------------|----------|-------------|
| 本事業により執行した委託費総額 |          | 2,000,000 円 |
| 内訳              | 1年度目執行経費 | 930,000 円   |
|                 | 2年度目執行経費 | 800,000 円   |
|                 | 3年度目執行経費 | 270,000 円   |

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

|          |      |
|----------|------|
| 日本側参加者等  | 10 名 |
| 相手国側参加者等 | 4 名  |

\* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

|       | 派遣  |     | 受入   |
|-------|-----|-----|------|
|       | 相手国 | 第三国 |      |
| 1 年度目 |     |     | ( )  |
| 2 年度目 | 2   |     | ( )  |
| 3 年度目 |     |     | 1(1) |

\* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣: 委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入:相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

## 8. 研究交流の概要・成果等

### (1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

本研究は、微生物における外膜小胞(OMV)や細胞外高分子物質(EPS)とセレンナノ粒子(SeNPs)生成機構との関係を明らかにすることを目的として実施した。本研究代表者は、大腸菌ならびに *Geobacter* 属細菌による SeNPs 生成に OMV が関与することを見出した。OMV は、細菌細胞表面から放出される 20-250 nm の膜小胞であり、その生理的意義は明らかとなっていないが、生成機構の解明やワクチン製造などへの応用のため、近年多くの研究がなされている。一方、本共同研究者である Prakash 博士は糸状菌が細胞外に排出する EPS が SeNPs を安定化させることを見出した。EPS についても様々な生理活性が見つかり近年研究例が急激に増加している。OMV と EPS はいずれも微生物が分泌する物質であり、その成分、構造、機能は多様である。そこで、本研究代表者と Prakash 博士との共同研究により、微生物(細菌および糸状菌)における OMV・EPS と SeNPs 生成機構との関係を明らかにすることとした。

2021 年度は、SeNPs の微生物生成における OMV の役割を解明するための研究を実施した。しばらくの間、インド渡航の感染症危険情報はレベル 3(渡航中止勧告)であり、日本への入国条件も不安定であったため、メールと zoom を用いたディスカッションによる交流と連携を実施した。また、2021 年 8 月 10 日 14.30 - 16.30 (JST)には、「Joint Seminar 2021 (DST-JSPS program)」と題して、両国の本プログラム参加者全員で zoom にて研究進捗発表会および交流会を開催した。

2022 年度は、SeNPs の形成場所の特定と細胞外膜小胞への積み込みメカニズムの解明を目標として研究を実施した。三原と若手メンバー1名(植田)がインド・デリーを訪問(2023年2月26日～3月1日)し、Prakash 教授および Anmol 氏を交えて連携研究結果について詳細な検討を加えた。また、残りの計画の詳細についてディスカッションを実施し、2023年5月に Anmol 氏を日本(立命館大学びわこ・くさつキャンパス)に約20日に招いて共同研究する計画を立てた。

2023 年度は、本共同研究の総まとめ期として、得られた成果を学術雑誌および学会で公表するための準備を行った。Anmol 氏を立命館大学びわこ・くさつキャンパスの本研究代表者の研究室に招へい(2023年5月8日～5月28日)し、いくつかの追加実験を若手参加者らと共同で実施した。また、2023年5月20～21日には、本プログラムによる共同研究の成果を、Anmol 氏が代表となり、第2回生命金属科学シンポジウム(慶應義塾大学矢上キャンパス)にて発表し、関連の研究者と活発な討論を行った。このシンポジウムには、本プログラムの若手参加者である井上助教、芝本も出席し、Anmol 氏の道中のサポートもしながら互いに交流を深めた。

### (2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

2021 年度には、インドの高濃度セレン蓄積地帯から独自に単離した *Bacillus* sp. NTP-1、*Cellulomonas* sp. D3a および、*E. coli*、*Geobacter* 属細菌を対象に、SeNPs 生成・排出過程と OMV・EPS との関連について、遺伝子欠損株を用いた遺伝学的解析および精製タンパク質の生化学的解析、質量分析計による元素分析、構造解析と電子顕微鏡 (SEM、TEM)、走査型プローブ顕微鏡によるイメージ解析を実施した。その結果、*E. coli* が細胞外に放出する SeNPs が OMV に包まれていることが明らかとなった。また、SeNPs の原料となる亜セレン酸の還元にはチオレドキシンが関与する可能性が示唆された。インド側研究者においては、高濃度セレン蓄積地帯から SeNPs 生産性が顕著に高い糸状菌を複数単離し、それらのセレン耐性について評価するとともに、生産される SeNPs の特徴を、紫外可視分光光度計、粒子経分布解析装置、走査型電子顕微鏡、エネルギー分散型 X 線分析(EDX)装置により解析した。以上の研究の間、個々の実験結果について日本側研究者とのディスカッションを適宜実施した。

2022 年度には、日本側研究者において、SeNPs の形成場所の特定および生成(細胞外膜小胞への積み込み)機構について、生化学的、分子生物学的、応用微生物学的手法により解析を行った。超薄切片を用いた電子顕微鏡(TEM)解析の結果、SeNPs は *E. coli* がサイトゾル内で形成されることが示唆された。また、膜の完全性に重要なタンパク質をコードする遺伝子破壊株における SeNPs 生成について調べた結果、SeNPs の細胞外への放出には、外膜構造の完全性が保持された正常な膜小胞が形成される必要があることが示唆された。これらの実験の一部をインド側研究者との連携により実施した。インド側研究者においては、セレン耐性糸状菌が生産する SeNPs、EPS/OMV、EPS/OMV 結合性 SeNPs を単離精製し、生化学的、物理化学的性質について紫外可視分光光度計、粒子経分布解析装置、走査型電子顕微鏡、エネルギー分散型 X 線分析(EDX)装置などにより解析した。その結果、糸状菌抽出液により生成した SeNPs の物性を明らかにし、その抗菌活性、抗酸化活性についての知見を得た。本研究成果を共著論文 “Concomitant synthesis and stabilization of selenium nanoparticles using extract of endophytic fungus, *Nigrospora gullinensis*” にまとめ、Particuology 誌に投稿し、現在審査中である。

2023 年度には、上述したように、これまでの成果の一部を “Synthesis and stabilization of tellurium nanoparticles with soap nut extract as a capping agent” としてまとめ、第2回生命金属科学シンポジウム(慶應義塾大学矢上キャンパス、2023 年 5 月 20 日～21 日)にて共同発表した。

### (3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

本研究は、インドと日本の研究者が協力して、微生物における外膜小胞(OMV)や細胞外高分子物質(EPS)とセレンナノ粒子(SeNPs)生成機構との関係を明らかにすることを目的として行った。

本研究で両国の研究者の交流により得られた学術的な成果は以下のように要約することができる。

1. *E. coli* および *Geobacter* 属細菌における SeNPs 生成に OMV が関与することを明らかにした。
2. 糸状菌が細胞外に排出する EPS が SeNPs を安定化することを見出した。
3. OMV と EPS の成分、構造、機能に関する詳細な知見を得た。
4. SeNPs の形成場所の特定と細胞外膜小胞への積み込みメカニズムの一端を解明した。
5. セレン耐性糸状菌が生産する SeNPs や EPS/OMV の物性に関する知見を得た。

以上の成果は、微生物における OMV・EPS と SeNPs 生成機構との関係に関する新たな知見を提供し、研究分野の概念の展開に寄与する。また、異なる国や文化の研究者同士が協力して行った本研究は、本研究に参画した研究者同士の理解を深め、新しい発想の創出にも貢献した。さらに、Prakash 教授と三原との間の交流をさらに深め、絆を強固なものとすることができたのも大きな成果である。



写真 1

デリーにて、共同研究の結果について詳細な検討を加えている様子。

左より、植田氏、Anmol 氏、三原、Prakash 教授。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

本研究交流により得られた成果は、微生物における外膜小胞(OMV)や細胞外高分子物質(EPS)とセレンナノ粒子(SeNPs)生成機構との関係についての新たな知見を提供した。これにより、以下のような応用的価値や技術開発への貢献が期待される。

1. 環境科学への応用:

微生物による SeNPs 生成機構の解明は、環境科学の分野で重要な意義を持つ。特に、高濃度セレン蓄積地帯などの環境中でのセレンの挙動や生物地球化学的な役割に関する理解が深まることが期待される。また、SeNPs を利用した環境浄化技術やセレン回収技術の開発にも貢献する可能性がある。

2. 医療応用への展開:

SeNPs は、その特殊な物性から医療応用においても注目を集めている。本研究によって得られた知見は、SeNPs の生合成や安定化メカニズムの理解に役立ち、医薬品やバイオマテリアルの開発に応用する可能性がある。例えば、SeNPs は抗菌活性や抗酸化活性を持ち、抗癌剤や感染症治療薬の開発に役立つ可能性がある。

3. 産業応用への貢献:

OMV や EPS などの微生物由来の物質は、産業応用においても幅広い可能性を秘めている。OMV はワクチンの製造や薬物送達システムの開発に利用されることが期待される。一方、EPS は食品工業やバイオプラスチックの製造などに利用される可能性がある。本研究で明らかにされた OMV や EPS の生成機構や特性は、これらの産業応用の基盤となる知識を提供する可能性がある。

以上のように、日本とインドの研究者が協力して行った本学術研究は、産業や医療分野においても実用的な応用価値を持つ可能性がある。例えば、新たなセレンナノ粒子生成機構の解明に基づいて、セレンナノ粒子の製造方法や品質管理技術を開発することが可能である。これにより、セレンナノ粒子の大量生産や特定のサイズや形状の粒子の作製などが可能となり、医療診断や治療における利用範囲が広がることが期待される。さらに、インドと日本の研究者が共同して行った本研究は、両国の研究機関や企業との連携を促進し、産業界への技術移転や共同研究の機会を創出することにも繋がり得る。本研究交流は、科学技術の進歩や産業の発展に貢献するだけでなく、両国の研究者間の相互理解や文化交流を促進する役割も果たした。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

越智および博士後期課程の藤田の他、2 名の助教(青野、井上)に加え、4 名の博士前期課程学生を研究に参画させ、若手の活性化の効果についてもよい感触を得た。特に、博士前期課程の植田は、インドで単離された *Cellulomonas* D3a の解析も行い、積極的に本プログラムに関わった。2023 年 2 月 26 日～3 月 1 日には、インド・デリーを訪問し、Prakash 教授および Anmol 氏を交えて連携研究結果について詳細な検討を加えた(写真 1)。また、2023 年 5 月 8 日～5 月 28 日の Anmol 氏の当研究室への来訪の間、研究室のセミナーで Anmol 氏に研究紹介をしていただいた。また、研究の空き時間を利用して、周辺地域の観光案内を学生が行うなどの文化的交流も若手が率先して行い、これにより、若手研究者の国際感覚の醸成や英語でのコミュニケーションの重要性の理解を深めることができた。また、Anmol 氏は、紫外可視分光光度計、粒子経分布解析装置、走査型電子顕微鏡、エネルギー分散型 X 線分析装置に対する豊富な経験と知識を有することから、当研究室の若手研究者への確かな助言を与え、研究へのモチベーションを高めることにも貢献した。



写真2

Anmol 氏と研究室の学生との京都散策の様子。  
左から2人目が Anmol 氏。



写真3

研究室前での記念撮影。  
2列目の中央が Anmol 氏。その左が三原。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

微生物によるセレンナノ粒子生成のメカニズムや関連する物質の研究は、廃棄物やリサイクルに関する取り組みにも応用可能である。例えば、廃水や廃棄物中に含まれるセレンやその他の資源物質を微生物を利用して回収・再利用する手法の開発に発展させることが可能であり、これにより、資源の節約や環境負荷の低減が期待される。また、本事業の実施により、今後はインド側の研究者と日本側の研究者が密に連絡を取り合いながら、国際シンポジウム等を企画・運営することで、関連分野で研究を行っている異なる国や地域の研究者との連携を広げる機会を創出することが可能である。微生物を活用したナノ粒子合成やバイオテクノロジーの技術は、医薬品、化粧品、農業、食品などのさまざまな産業分野での応用が期待される。従って、国際的な学術交流および産学連携により、新たな学術的な成果やイノベーションの創出が可能になると期待される。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

例:大学間協定の締結、他事業への展開、受賞など