

令和元年6月5日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04245

研究課題名(和文) 微生物由来生体分子がもたらす核種移行モデルの新展開

研究課題名(英文) Influence of biomolecules on the migration of actinoids

研究代表者

田中 万也 (TANAKA, Kazuya)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 原子力科学研究所 先端基礎研究センター・研究副主幹

研究者番号：60377992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が細胞外に排出する有機物のうち錯体を形成しアクチノイドの可溶化促進する物質、及び電子授受により還元反応を促進する物質(電子メディエーター)の二つに着目し研究を行った。その結果、微生物細胞から排出される生体分子がTh(IV)やPu(IV)などの四価アクチノイドを可溶化することが明らかとなった。また、電子メディエーターである微生物に由来するフラビン類がウランの六価から四価への還元反応を促進することが新たに明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物活動が放射性核種の移行挙動に与える影響についてはこれまで研究例があるが、不明な点が多い。これまでの研究は微生物細胞表面で起こる現象を対象としていた。これに対して、本研究では細胞外に放出される生体分子によるアクチノイドの移行挙動への影響について明らかにした点において学術的意義が大きい。原子力発電の結果発生する放射性廃棄物の地層処分においては、放射性核種が環境中に漏えいした場合を想定した移行シナリオを評価する必要がある。本研究の成果は、こうした移行シナリオ評価に貢献するものであり社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)： We investigated the influence of biomolecules on the migration of actinoids. The tetravalent actinoids of Th(IV) and Pu(IV) were solubilized by complexation with organic compounds released from microbial cells. Flavin analogues as an electron mediator promoted U(VI) reduction to U(IV).

研究分野：地球化学

キーワード：アクチノイド 微生物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで移行遅延の観点から、アクチノイドの鉱物-水間の分配反応に関する研究が精力的に行われて多くのことが明らかとなってきた。それに加えて近年では、微生物活動の影響も注目されるようになってきた。これは微生物が単に放射性核種の吸着媒として作用するだけでなく、様々な溶存化学成分を鉱物化することによって放射性核種を固定し遅延効果をもたらすと考えられているためである。多くの研究者が、微生物細胞表面(細胞と水溶液の界面)で起こる化学状態の変化について研究を行ってきた。しかし一方で、微生物が細胞外に排出する有機分子がアクチノイドの移行挙動に影響を与えることが少しずつ分かって来た。具体的な影響としては、微生物が細胞外に放出する有機物が1) 四価アクチノイドと水溶液中で安定な錯体を形成し可溶化すること、及び2) 六価ウランの還元を促進することが挙げられる。こうした細胞外生体分子とアクチノイドの相互作用は国内外の研究者にはほとんど注目されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、上述のような微生物が細胞外に放出する有機物のうち錯体を形成しアクチノイドの可溶化促進する物質、及び電子授受により還元反応を促進する物質(電子メディエーター)の二つに着目した。本研究計画の目的はこれらの生体分子がどのような微生物種により放出されるのか、そしてアクチノイドの移行挙動にどの程度の影響を与えるのかを具体的に明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、Mn(II)酸化細菌である *Pseudomonas* sp. NGY-1 株及び Mn(II)酸化真菌 *Acremonium* sp. KR21-2 株を用いて研究を進めた(Tanaka et al., 2010, 2013)。これらの Mn(II)酸化菌の培養には Tani et al. (2004)による培養法を用いた。培養液に二価マンガンを添加し、層状マンガン(IV)酸化物を形成させた。マンガン酸化物と微生物細胞は分離せずにそのままアクチノイド(U(VI), Th(IV), Pu(IV))の吸着実験を行った。それぞれ用いたアクチノイドの核種は、²³⁸U, ²³²Th, ²³⁸Pu であった。10 mM NaCl 水溶液中に各アクチノイドのトレーサーを添加し pH を調整後、所定の時間ごとに溶液を採取した。溶液試料の回収時には、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターに通した後、濃度測定に供した。²³⁸U 及び ²³²Th は ICP-MS、²³⁸Pu は液体シンチレーションカウンタによりそれぞれ定量を行った。微生物の活性状態の有無によりアクチノイドの吸着挙動に影響がどうかを調べるために、滅菌処理した場合と滅菌処理をしない場合のそれぞれにおいて吸着実験を行った。また、比較実験のために、非生物的に合成したマンガン酸化物(δ -MnO₂)を用いて同様の吸着実験を行った。水溶液中における微生物由来の生体分子と Th(IV)の錯体の形成の有無を調べるために、サイズ排除型カラムを用いた HPLC-ICP-MS 分析を行った。

電子メディエーターの寄与を調べるために、電気化学的手法を用いてウラン還元反応への影響を調べた。生体由来の電子メディエーターとして補酵素フラビン類(リボフラビン、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド)及びアントラキノン誘導体を選択した。電気化学測定には、分光電気化学セル(BAS製、光路長 1.0 mm)、金メッシュ電極(作用電極)、白金線(対極)、銀-塩化銀電極(3M NaCl, +222 mV vs SHE)を用いた。電子メディエーターの濃度を 0.1 mM または 1 mM に固定し、硝酸ウラン濃度を 1-5 mM の範囲で変化させてサイクリックボルタンメトリーを行った。電気化学測定中、電極表面に四価ウランが析出して反応を妨害することを防ぐために、クエン酸を 50 mM、pH 変化を防ぐために HEPES を 50 mM、支持電解質として塩化カリウムを 50 mM となるように反応液を調製した。電子メディエーターの寄与を調べるために、定電位電解を行った。上記と同じ組成の溶液に -0.5 または -0.7 V の電極電位を印加して、ウランの還元量を分光光度法により追跡した。また、微生物の代謝物によるウランの還元を検討するために、真核生物として酵母(*S. Cerevisiae*)を用いて実験を行った。溶液の組成はウラン 10 mM、クエン酸と HEPES 緩衝液を 50 mM、YPD broth(栄養)を 50 g L⁻¹、となるように加え、酵母を加えて反応を開始した。24 時間酵母を培養し、任意の時間ごとに溶液を回収し、2000 rpm、5 分で遠心分離した後、上清を分光光度法で測定した。

4. 研究成果

KR21-2 株(真菌)を用いて形成させたマンガン酸化物への U(VI)及び Th(IV)吸着実験の結果を図 1 に示す。U(VI)の吸着挙動は滅菌した系と未滅菌の系では同様の吸着挙動を示した。一方、Th(IV)に関しては未滅菌のマンガン酸化物を用いた実験系では、時間とともに脱着していく(吸着率が低下する)様子が観察された。しかし、滅菌処理を行った系ではこのような Th(IV)の脱着は見られなかった。溶存炭素濃度の分析から滅菌及び未滅菌のいずれの系においても微生物細胞から有機物が分泌されていることを確認した。これらのことは微生物が活性状態(生きています)においてのみ、特異的な有機分子を分泌され、水溶液中において Th(IV)と安定な錯体を形成したことを示唆している。サイズ排除型カラムを用いた HPLC-ICP-MS 分析の結果、有機物と Th が同じ保持時間に検出された。このことから、水溶液中において微生物由来の有機分子と Th(IV)が結合し可溶化していることが直接的に示された。保持時間からかなり大きな有機分子(>670kDa)が Th(IV)と錯体を形成することも分かった。

このように、生物性マンガ氧化物では生体分子が水溶液中に排出されるに従い、マンガ氧化物表面に吸着していたトリウムが50%程度が水溶液中に脱離して可溶化していく(図1)。これに対して、 δ -MnO₂を用いた実験ではほぼすべてのトリウムが水溶液中から除去された。このことから、排出される微生物由来の生体分子とTh(IV)が形成する錯体はかなり安定であることが伺える。

同様に、生物性マンガ氧化物へのPu(IV)吸着実験を行った。また、マンガ氧化物なしの菌系のみへのPu(IV)吸着実験も行った。それらの結果を図2に示す。生物性マンガ氧化物へのPu(IV)吸着挙動は図1に示すU(VI)吸着挙動と似ており、マンガ氧化物によりPu(IV)がPu(VI)に酸化されることが示唆された。一方で、菌系のみを用いてPu(IV)吸着実験を行った場合には、未滅菌の実験系において時間とともにPuが水溶液中に脱離していく様子が観察された。このことから、Pu(IV)もTh(IV)と同様に水溶液中でPu(IV)と微生物由来の有機分子が錯体を形成することにより可溶化している可能性が示唆された。こうしたPuの脱離は菌系を滅菌した実験系では認められず、Th(IV)と同様に微生物が活性状態(生きている)においてのみ起こる特異的な吸着挙動であることが明らかとなった。

NGY-1株(バクテリア)に形成させたマンガ氧化物を用いて同様の実験を行った。その結果、真菌であるKR21-2株と同様にバクテリアであるNGY-1株が四価アクチノイドを可溶化させる有機物を細胞外に排出していることが分かった。さらに、低温での実験や滅菌処理を行った後の同様の実験においてはそれらの有機物との錯体形成による可溶化の効果が低下することも確かめた。

微生物が代謝の過程で利用するフラビン類を電子メディエーターとして、電気化学的手法を用いてウランへの電子供与速度を定量した。サイクリックボルタンメトリーに見られる酸化還元挙動の変化を解析した結果、フラビン類の標準酸化還元電位と六価ウランへの電子供与速度に負の相間が見られた。さらに、酸化還元電位の異なるキノン誘導体を用いて、上記と同様の手法でウランの酸化還元反応に与える影響を検討した。電気化学的手法を用いてアントラキノン誘導体を用いて比較したところ、キノン類の標準酸化還元電位とウランの還元反応の速度にも負の相間が見られた(図3)。これらの実験から、嫌気状態において微生物に由来するキノン類もウラン還元反応を促進することが新たに明らかとなり、その速度はメディエーターの酸化還元電位の影響を受けると考えられる。また、電子メディエーターが存在することで、見かけのウラン還元電位が0.2V上昇することが分かった。これは、より酸化的条件でもウランが還元されることを意味しており、電子メディエーター

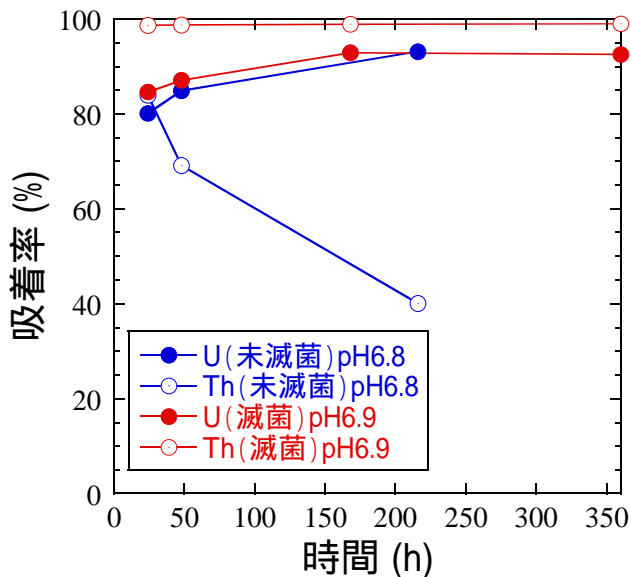


図1. 生物性マンガ氧化物へのU(VI),Th(IV)吸着.

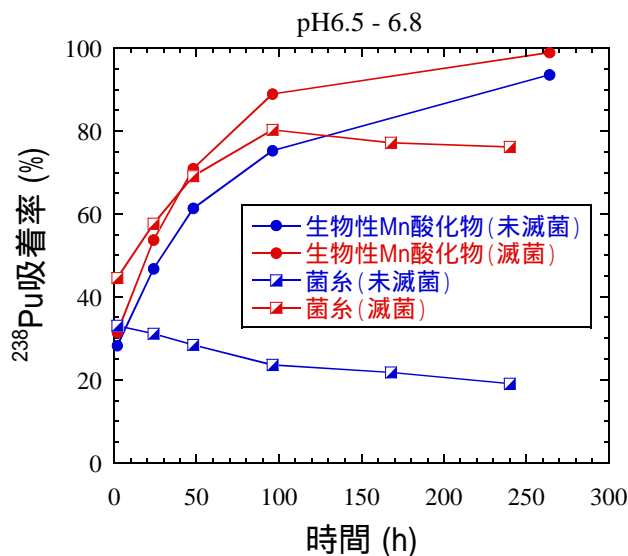


図2. 生物性マンガ氧化物及び菌系へのPu(IV)吸着.

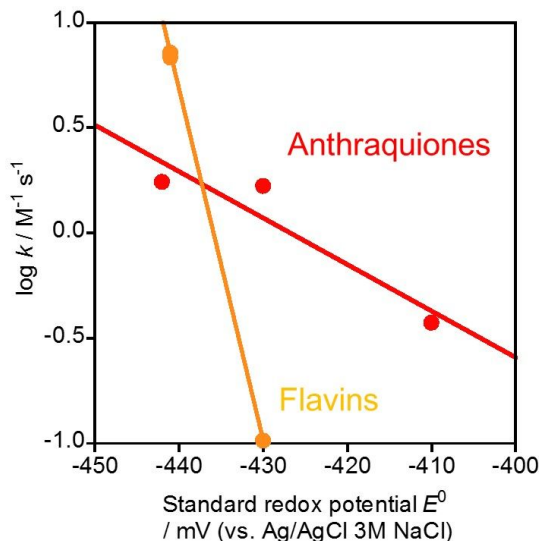


図3. 電子供与速度 vs 標準酸化還元電位.

エーターによりウラン還元反応が進み易くなることが明らかとなった。

さらに、真核生物である酵母を用いて代謝性生物が六価ウランの還元と与える影響を調べた。酵母を嫌気培養し、六価ウランを添加して還元反応を追跡した。その結果、微生物の増殖（代謝）とウラン還元反応量に相関が見られた。しかし、微生物の成長が定常状態に達した後はウランの還元は進まず、かつ全てのウランは還元されなかった。このため、環境水の条件よりも微生物の代謝の際に生じる電子がウランの反応に重要な寄与を果たす可能性が示唆された（図4）

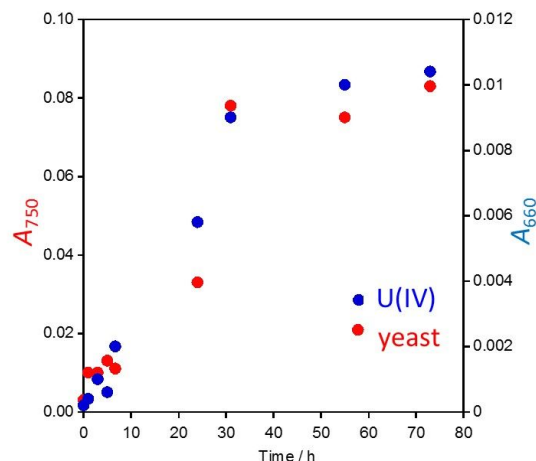


図4 . 波長 660 nm (四価ウラン) 及び 750 nm (酵母細胞数) の吸光度の嫌気培養時間に対する変化 .

< 引用文献 >

Tani Y., Ohashi M., Miyata N., Seyama H., Iwahori K. and Soma M. (2004) Sorption of Co(II), Ni(II), and Zn(II) on biogenic manganese oxides produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2. *J. Environ. Sci. Health A39*, 2641-2660.

Tanaka, K., Tani, Y., Takahashi, Y., Tanimizu, M., Suzuki, Y., Kozai, N. and Ohnuki, T. (2010) A specific Ce oxidation process during sorption of rare earth elements on biogenic Mn oxide produced by *Acremonium* sp. strain KR21-2. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 5463-5477.

Tanaka, K., Yu, Q., Sasaki, K. and Ohnuki, T. (2013) Cobalt(II) oxidation by biogenic Mn oxide produced by *Pseudomonas* sp. strain NGY-1. *Geomicrobiol. J.* 30, 874-885.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

Tanaka, K., Kozai, N., Ohnuki, T. and Grambow, B. (2019) Study on coordination structure of Re adsorbed on Mg-Al layered double hydroxide using X-ray absorption fine structure. *J. Porous Mater.* 26, 505-511. DOI:10.1007/s10934-018-0634-z (査読有)

Kuwahara, A., Aiba, Y., Yamasaki, S., Nankawa, T. and Matsui, M. (2018) High spectral resolution of diode laser absorption spectroscopy for isotope analysis using a supersonic plasma jet. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 33, 1150-1153. DOI:10.1039/C8JA00120K (査読有)

Ikehara, R., Suetake, M., Komiya, T., Furuki, G., Ochiai, A., Yamasaki, S., Bower, W.R., Law, G.T.W., Ohnuki, T., Grambow, B., Ewing, R.C. and Utsunomiya, S. (2018) Novel Method of Quantifying Radioactive Cesium-Rich Microparticles (CsMPs) in the Environment from the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *Environ. Sci. Technol.* 52, 6390-6398. DOI:10.1021/acs.est.7b06693 (査読有)

Yamasaki, S., Kurita, S., Ochiai, A., Hashimoto, M., Sueki, K. and Utsunomiya, S. (2018) Calcium molybdate nanoparticles formation in egg phosphatidyl choline based liposome caused by liposome fusion. *J. Colloid Interface Sci.* 530, 473-480. DOI:10.1016/j.jcis.2018.07.007 (査読有)

Ohta, A., Tanaka, K. and Tsuno, H. (2018) Preliminary Evaluation of Local Structure and Speciation of Lanthanoids in Aqueous Solution, Iron Hydroxide, Manganese Dioxide, and Calcite using the L3-Edge X-Ray Absorption Near Edge Structure Spectra. *J. Phys. Chem. A* 122, 8152-8161. DOI:10.1021/acs.jpca.8b06168 (査読有)

Yu, Q., Tanaka, K., Kozai, N., Sakamoto, F., Tani, Y. and Ohnuki, T. (2018) Adsorption of Cs onto biogenic birnessite: effects of layer structure, ionic strength, and competition cations. *ACS Earth and Space Chemistry* 2, 797-810. DOI:10.1021/acsearthspacechem.8b00042 (査読有)

Yamaguchi, A., Honda, T., Tanaka, M., Tanaka, K. and Takahashi, Y. (2018) Discovery of ion-adsorption type deposits of rare earth elements (REE) in Southwest Japan with speciation of REE by extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. *Geochem. J.* 52, 415-425.

DOI:10.2343/geochemj.2.0531 (査読有)

Tanaka, K., Kaplan, D.I. and Ohnuki, T. (2017) Preface of SI: RNs in the environments. Appl. Geochem. 85, 119-120. DOI:10.1016/j.apgeochem.2017.09.016 (査読無)

Kozai, N., Sakamoto, F., Tanaka, K., Ohnuki, T., Satoh, T., Kamiya, T. and Grambow, B. (2018) Complexation of Eu(III), Pb(II), and U(VI) with a Paramecium glycoprotein: Microbial transformation of heavy elements in the aquatic environment. Chemosphere 196, 135-144. DOI:10.1016/j.chemosphere.2017.12.154 (査読有)

Yu, Q., Ohnuki, T., Kozai, N., Sakamoto, F., Tanaka, K., Sasaki, K. (2017) Quantitative analysis of radiocesium retention onto birnessite and todorokite. Chem. Geol. 470, 141-151. DOI:10.1016/j.chemgeo.2017.09.008 (査読有)

Tanaka, K., Tanaka, M., Watanabe, N., Tokunaga, K. and Takahashi, Y. (2017) Ligand exchange adsorption and coordination structure of Pd on δ -MnO₂ in NaCl solution. Chem. Geol. 460, 130-137. DOI:10.1016/j.chemgeo.2017.04.022 (査読有)

Yamasaki, S., Tanaka, K., Kozai, N. and Ohnuki, T. (2017) Effect of flavin compounds on uranium(VI) reduction- kinetic study using electrochemical methods with UV-vis spectroscopy. Appl. Geochem. 78, 279-286. DOI:10.1016/j.apgeochem.2017.01.014 (査読有)

Fujimoto, J., Tanaka, K., Watanabe, N. and Takahashi, Y. Simultaneous recovery and separation of rare earth elements in ferromanganese nodules by using *Shewanella putrefaciens*. (2016) Hydrometallurgy 166, 80-86. DOI:10.1016/j.hydromet.2016.09.005 (査読有)

Yamasaki, S., Imoto, J., Furuki, G., Ochiai, A., Ohnuki, T., Sueki, K., Nanba, K., Ewing, R.C. and Utsunomiya, S. (2016) Radioactive Cs in the estuary sediments near Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. Sci. Total Environ. 551, 155-162. DOI:10.1016/j.scitotenv.2016.01.155 (査読有)

Yu, Q., Ohnuki, T., Tanaka, K., Kozai, N., Yamasaki, S., Sakamoto, F. and Tani, Y. (2016) Fungus-promoted transformation of lanthanides during the biooxidation of divalent manganese. Geochim. Cosmochim. Acta 174, 1-12. DOI:10.1016/j.gca.2015.11.004 (査読有)

Tanaka, K. and Watanabe, N. (2015) Study on the coordination structure of Pt sorbed on bacterial cells using X-ray absorption fine structure spectroscopy. PLoS ONE 10(5): e0127417. DOI:10.1371/journal.pone.0127417 (査読有)

Ohnuki, T., Jiang, M., Sakamoto, F., Kozai, N., Yamasaki, S., Yu, Q., Tanaka, K., Utsunomiya, S., Xia, X., Yang, K., He, J. (2015) Sorption of trivalent cerium by a mixture of microbial cells and manganese oxides: Effect of microbial cells on the oxidation of trivalent cerium. Geochim. Cosmochim. Acta 163, 1-13. DOI:10.1016/j.gca.2015.04.043 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

田中 万也、山崎 信哉、河床堆積物中の安定セシウムと放射性セシウムの関係、2016 年度地球化学会年会、2016/9/14 ~ 16、大阪市立大学 (大阪府大阪市)

山崎 信哉、田中 万也、本多 真紀、末木 啓介、天然水中のヨウ素の存在状態解明に向けた電気化学的手法の基礎的検討、2016/9/14 ~ 16、大阪市立大学 (大阪府大阪市)

Tanaka, K., Tani, Y. and Ohnuki, T. Specific sorption processes of REEs and actinides induced by biomolecules. Goldschmidt2016, June 26 – July 1, 2016, Yokohama, Japan.

Yamasaki, S., Kozai, N., Tanaka, K. and Ohnuki, T. Effect of redoxactive organic compounds on extracellular uranium(VI) reduction by using electrochemical methods. Goldschmidt2016, June 26 – July 1, 2016, Yokohama, Japan.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大貫 敏彦
ローマ字氏名：OHNUKI Toshihiko
所属研究機関名：東京工業大学
部局名：科学技術創成研究院
職名：教授
研究者番号（8桁）：20354904

研究分担者氏名：山崎 信哉
ローマ字氏名：YAMASAKI Shinya
所属研究機関名：筑波大学
部局名：数理物質系
職名：助教
研究者番号（8桁）：70610301

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。