

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18360459
 研究課題名（和文） 自己組織化単分子層を用いた細胞膜表面におけるアクチノイドの電子授受機構の解明
 研究課題名（英文） Study of electron transfer on cell surface by self assembly mono layer
 研究代表者
 大貫 敏彦（OHNUKI TOSHIHIKO）
 日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主席
 研究者番号 20354904

研究成果の概要：官能基を自発的に一分子層だけ配列させた金薄膜を電極として、細胞膜（SAM）-酵素-U間の電子授受機構を解明する研究を行った。その結果、U(VI)-有機酸錯体の還元挙動は錯形成定数の小さい場合にはU(IV)の沈殿を生じ、大きな場合には可溶性のU(IV)-有機酸を生じた。また、官能基として4-ピリジンに配位したU(VI)への電子授受を電気化学的に検出し、錯形成定数のおおよその値を得た。さらに、微生物レベルではU(VI)を還元できない酵母由来のチトクロームCを介したU(VI)への電子授受を捉えることに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力学

キーワード：自己組織化単分子層、アクチノイド、酸化還元、電子授受

1. 研究開始当初の背景

これまで主に無機物質で構成されていると考えられていた、地層処分を予定している地表1 kmまでの地下環境には嫌気性微生物などが生息することが知られてきた。微生物の活動によりアクチノイドの化学状態が変化することが指摘されている。例えば、細胞膜への吸着、呼吸に伴う電子授受、分泌物（有機酸）-アクチノイド錯体生成、などによるアクチノイドの化学状態の変化が考えられている。一方、硫酸還元菌、鉄還元菌はUを電子供与

体として用いることが可能なため、可溶性のU(VI)が不溶性のU(IV)に還元し、ナノスケールの粒子（コロイド）を形成し、地下水を移行する可能性があることが報告されている。したがって、細胞膜におけるU(VI)の還元機構を解明することは地層処分の安全評価において重要である。

これまでの研究から、還元菌とUとの電子授受には膜タンパク質が酵素として関わっていることが分かってきた。しかしながら、その機構は明らかにされていない。その理由と

して、細胞膜において、電子授受を制御する化学的な条件である pH や酸化還元電位を直接測定することが不可能であることが考えられる。

一方、抽出したタンパク質を基板上に薄膜化する技術として自己組織化単分子層 (SAM) が機能材料開発の観点から研究されている。これまでタンパク質を負荷した SAM による U 濃集機構の解明研究は世界的にもなされていなかった。

2. 研究の目的

自己組織化単分子層 (SAM) の形成研究の進歩に伴い可能になった、官能基を金表面に自発的に一分子層だけ配列させる技術と、微生物から酵素の抽出を可能にした分子生物学の技術を融合させることで、細胞膜 (SAM) - 酵素 - U 間の電子授受機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) U(VI) - 有機酸錯体の還元

1 mM $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$, 20 mM 有機酸 (マロン酸, リンゴ酸および酒石酸) および 0.1 M NaClO_4 を含む pH 4 の溶液を用いて、ウランの酸化還元特性をカラム電極電解法により調べた。作用電極にはグラッシカーボン繊維, 対極には白金線, 参照電極には銀-塩化銀電極を用いた。試料流量は $1.4\text{--}1.6 \text{ ml min}^{-1}$, 掃引速度は 0.3 mV s^{-1} で測定した。さらに、微生物による還元挙動を調べるため、様々な有機酸が存在する pH 7 の 1mM の U(VI) 溶液を用いて鉄還元菌 *Shewanella putrefaciens* による U(VI) の還元実験を行った。なお、乳酸を電子供給源として用いた。

(2) 自己組織化単分子層 (SAM) を介した電子授受機構の解明

模擬細胞膜を用いる研究として、有機配位子の有機物単分子として 4 - ピリジン (4-PyS) を用い金表面に自発的に一分子層だけ配列させて自己組織化単分子層 (4-PyS-SAM) を形成した。SAM を介した電子移動を調べるため、対極及び参照電極を用いて、電位 - 電流曲線 (CV) を測定した。さらに、4-PyS-SAM を介した U(VI) への電子授受を調べるため、1mM の U(VI)NO_3 水溶液中で CV を測定した。

(3) タンパク質を介した U(VI) への電子受容

金薄膜上にチオール基を介して形成した有機酸単分子層に酵母由来のチトクローム C を付加させ、酸化還元電流を調べる実験、及び ITO 導波路上にチトクロームを付加させて酸化還元電流並びに吸光スペクトルを測定する実験を行った。さらに、溶液中に U(VI) - シュウ酸を添加した溶液を用いて、CV の測定を行った。

4. 研究成果

(1) U(VI) - 有機酸錯体の還元

有機酸の存在しない系では、 UO_2^{2+} はそれぞれ半波電位 $E_{1/2} = -0.13 \text{ V}$ および -0.27 V の電流を検知した。検知された波は $n=1$ 付近で変曲していることから、 UO_2^{2+} から UO_2^+ への還元 (一段目), 及び UO_2^+ から U(IV) への還元 (二段目) 反応が生じたと考えられる。U(IV) の酸化波は測定できなかった。この結果は、pH 4 で U(IV) イオンの溶解度が極めて低いことと調和的である。一方、有機酸の存在下では、全ての系において UO_2^{2+} の一段階二電子還元波および U(IV) の一段階二電子酸化波が観測された。各有機酸存在下での還元波および酸化波の $E_{1/2}$ から、いずれの系でも還元波の $E_{1/2}$ は有機酸が存在しない系のそれより低い値であった。これは UO_2^{2+} と有機酸との錯形成により UO_2^{2+} が安定化され、還元されにくくなったためであると考えられる。

微生物による U(VI) の還元では、有機酸を含まない培地では、培養時間とともに溶存ウラン濃度は減少し、約 50 時間後までにほぼ 0 % になった。また、溶存ウラン濃度の減少にもなって沈殿物が生成し、XANES スペクトルから、沈殿物中のウランは 4 価であることがわかった。酢酸、マロン酸またはアジピン酸を含む培地でも、溶存ウラン濃度の減少および沈殿の生成がみられた。シュウ酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸または EDTA を含む培地では、培地中の溶存ウラン濃度はほぼ一定であった。これらのうち、リンゴ酸またはコハク酸を含む培地では、培養開始後約 150 時間まで培地の吸収スペクトルに変化は見られず、U(VI) の還元は見出されなかった。その他の培地では、時間経過とともに 400 nm から 700 nm の波長領域に U(IV) によると考えられる吸収が現れ、可溶性の U(IV)-有機酸錯体の生成が示された。一例として、EDTA を含む培地の吸収スペクトルを図 1 に示す。

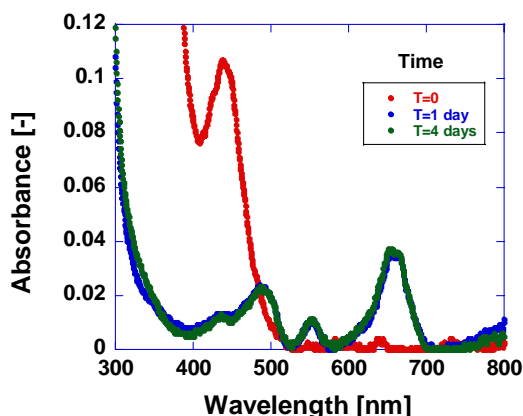


図 1 EDTA を含む培地の吸収スペクトルの経時変化

以上の結果から、有機酸存在下における *S. putrefaciens* による U(VI) の還元挙動は有機酸の種類により異なり、次の3通りに分類できると考えられる。(i)還元されて U(IV) の沈殿を生じる。(ii)還元されて可溶性の U(IV)-有機酸を生じる。(iii)還元されない。また、(1)に分類された有機酸は、U(VI) との錯形成定数が比較的小さく、(2)に分類された有機酸は、比較的大きい傾向がみられた。

(2) 自己組織化単分子層 (SAM) を介した電子授受機構の解明

4-ピリジン (4-PyS) を用い金表面に自発的に単分子層だけ配列させて SAM を作用電極として CV を測定した結果、 -0.4 V vs. Ag/AgCl) において 4-PyS の還元脱離に起因すると考えられる電流が観測された。さらに、U(VI) を加えた系で電位-電流曲線を測定した結果、U(VI) を加えることに起因して -0.05 V から負電位領域において還元電流が観測された。したがって、U(VI) が 4-PyS-SAM に吸着し金電極から 4-PyS-SAM を介して U(VI) に電子が移動することが分かった。さらに、U(VI) を吸着した 4-PyS-SAM をイオン交換水で洗浄した後、溶液中に 1mM の有機酸 (酢酸、シュウ酸) あるいは硝酸を加えて CV を測定した (図 2) ところ、酢酸中での電流は硝酸中のそれとほぼ同じであったが、シュウ酸では電流が減少した。この結果から、U(VI) と 4-PyS との錯形成定数は、U(VI)-酢酸よりも大きく、U(VI)-シュウ酸よりも小さいことが分かった。

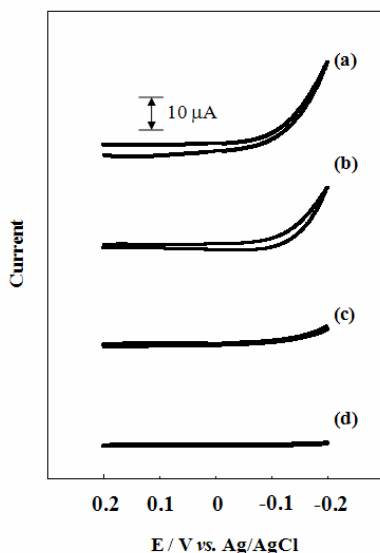


図 2 U(VI) を吸着した 4-PyS-SAM をイオン交換水で洗浄した後、溶液中に 1mM の有機酸 (酢酸、シュウ酸) あるいは硝酸を加えて測定した CV。

(3) タンパク質を介した U(VI) への電子受容

金薄膜上にチオール基を介して形成した有機酸単分子層に酵母由来のチトクローム C を付加させ酸化還元電流並びに吸光スペクトルを測定した結果、チトクローム C を付加した SAM 金薄膜電極では、チトクローム C の酸化還元に起因すると考えられる電流を検知できた。一方、チトクローム C を付加した ITO 電極では、チトクローム C の酸化還元に起因するピーク電流とともに吸光スペクトルで、チトクローム C のソーレー帯 (420nm) 付近に明確な吸収ピークが検知できた。さらに、酸化電位及び還元電位でピークの波長が変化し、チトクローム C の酸化還元変化を捉えることに成功した。これらの結果から、有機単分子層上に酸化還元酵素を付加させることに成功するとともに、電極とチトクロームの間の電子授受を捉えることに成功した。

酵母由来のチトクローム C を付加した ITO 電極を U(VI) 溶液中に浸けて、酸化還元電流の検知を試みた結果、U(VI)/U(IV) のレドックス反応に起因すると考えられる還元電流を検知することに成功した。さらに、チトクローム C を付加しない ITO を用いて測定した U(VI)/U(IV) の還元電流の電位と比較した結果、電位が性電位側にシフトしていることが分かった。この結果は、チトクローム C の触媒作用による U(VI) への電子の移動を示唆している。酵母は U(VI) を還元することができないことから、酵母由来のチトクローム C が U(VI) に電子を授与するとは考えられなかった。我々のデータは、従来の予測の範疇外のものである、新しい発見と考えられる。今後、チトクローム C を介した電子授受の機構を解明することにより、チトクロームの電子授受機構の新しい機構の発見に繋がる可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

T. Nankawa, Y. Suzuki, T. Ozaki, T. Ohnuki, A. J. Francis, Degradation of Eu(III)-Malic Acid Complexes by *Pseudomonas fluorescens*, J. Alloy Compounds, 408-412, 1329-1333(2006). 査読有

T. Ozaki, Y. Suzuki, T. Nankawa, T. Yoshida, T. Ohnuki, T. Kimura, A. J. Francis, Interactions of rare earth elements with bacteria and organic ligands, 408-412, 1334-1338 J. Alloy Compounds, (2006). 査読有

T. Ozaki, T. Kimura, T. Ohnuki, A.

Kirishima, T. Yoshida, H. Isobe, A. J. Francis, Association of europium(III), americium(III), and curium(III) with cellulose, chitin, and chitosan, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 2051-2058(2006). 査読有

Y. Suzuki, T. Nankawa, T. Yoshida, T. Ozaki, T. Ohnuki, A.J. Francis, S. Tsushima, Y. Enokida, I. Yamamoto: "Redox behavior of uranium in the presence of citric acid", *Radiochimica Acta*, 94, 579-583 (2006). 査読有

T. Ozaki, T. KIMURA, T. OHNUKI, A. J. FRANCIS, Effects of ionic strength on the coordination of Eu(III) and Cm(III) to a Gram-negative bacterium *Paracoccus denitrificans*, *Radiochimica Acta*, 94, 715-722 (2006). 査読有

T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Ozaki, N. Kozai, F. Sakamoto, T. Nankawa, Y. Suzuki, A.J. Francis, Chemical speciation and association of plutonium with bacteria, kaolinite clay, and their mixture, *Environmental Science & Technology*, 2007, 41, 3134-3139. 査読有

Y. Takenaka, T. Saito, S. Nagasaki, S. Tanaka, N. Kozai, T. Ohnuki, Metal sorption to *Pseudomonas fluorescens* of pH, ionic strength and metal concentrations, *Geomicrobiology J.*, 24, 205-210(2007). 査読有

Y. Suzuki, T. Nankawa, T. Ozaki, T. Ohnuki, A. J. Francis, Y. Enokida, I. Yamamoto, Electrochemical Studies on Uranium in the Presence of Organic Acids, *J. Nuclear Sci. Tech.*, 44, 1227-1232(2007). 査読有

N. Kozai, K. Inada, Y. Adachi, S. Kawamura, Y. Kashimoto, T. Kozaki, S. Sato, T. Ohnuki, T. Sakai, T. Sato, M. Oikawa, F. Egusa, H. Mitamura, Characterization of homoionic Fe²⁺-type montmorillonite: Potential chemical species of iron contaminant, *J. Solid State Chemistry* **180**, 2279-2289 (2007). 査読有

F. Sakamoto, T. Nankawa, N. Kozai, T. Fujii, H. Iefuji, A. J. Francis, T. Ohnuki, Protein Expression of *Saccharomyces cerevisiae* in Response

to Uranium Exposure, *J. Nucl. RadioChem. Sci.* 8, 133-136(2007). 査読有

A. J. Francis, T. Ohnuki, Microbial Transformations of Plutonium, *J. Nucl. RadioChem. Sci.*, 8, 121-126(2007). 査読有

T. Nankawa, Y. Suzuki, T. Ozaki, A. J. Francis, T. Ohnuki, Sorption of U(VI) on the 4-Mercaptopyridine Self-Assembled Monolayer, *J. Nucl. Sci. Tech.*, 45, 251-256(2008). 査読有

T. Ohnuki, T. Ozaki, T. Yoshida, N. Kozai, T. Nankawa, F. Sakamoto, T. Sakai, Y. Suzuki, A. J. Francis, Concurrent transformation of Ce(III) and formation of biogenic manganese oxides, *Chem. Geology*, 253, pp. 23-29, 2008. 査読有

T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Ozaki, K. Naofumi, F. Sakamoto, T. Nankawa, Y. Suzuki, A. J. Francis, Modeling of the Interaction of Pu(VI) with the Mixture of Microorganism and Clay, *J. Nucl. Sci. Technol.*, 46, 55-59, 2009. 査読有

N. Kozai, T. Ohnuki, Association of Uranyl Ions with Amino Functional Groups, *Chemistry Letters*, Vol. 38 p.152-153 (2009). 査読有

〔学会発表〕(計 20件)

T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Ozaki, F. Sakamoto, N. Kozai, T. Nankawa, Y. Suzuki, A. J. Francis, Interaction of Heavy Elements with Microorganisms, Plutonium future -The science 2006, Pacific Grove, CA, USA, July (2006).

T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Ozaki, F. Sakamoto, N. Kozai, T. Nankawa, Y. Suzuki, A. J. Francis, Microbial impacts on the environmental behavior of actinides, 19th Genral Meetings of International Mineralogical Association, Kobe Japan, July (2006).

T. OHNUKI, T. OZAKI, T. NANKAWA, N. KOZAI, F. SAKAMOTO, Y. SUZUKI, and A. J. FRANCIS, Microbial Impacts on the Migration of Actinides, International Symposium on Environmental Modeling and Radioecology, Rokkasho, Aomori, Japan, Oct. (2006).

T. OHNUKI, T. OZAKI, T. NANKAWA, N. KOZAI, F. SAKAMOTO, Y. SUZUKI, A. J. FRANCIS,

Interaction of uranium(VI) with cell surface of microorganisms, 233rd American Chemical Society National Meeting & Exposition, Chicago, March (2007)

T. OHNUKI, T. OZAKI, T. YOSHIDA, T. NANKAWA, N. KOZAI, F. SAKAMOTO, Y. SUZUKI, A. J. FRANCIS, MICROBIAL IMPACTS ON THE MIGRATION OF ACTINIDES - Effects of exudates on the migration, 233rd American Chemical Society National Meeting & Exposition, Chicago, March (2007).

T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Ozaki, F. Sakamoto, N. Kozai, T. Nankawa, Y. Suzuki, A. J. Francis, Interactions of Heavy Elements with Microorganisms, Goldschmidt2007, Cologne, Aug. 19-26(2007).

Y. Suzuki, T. Nankawa, T. Ozaki, T. Ohnuki, A.J. Francis, Reduction of U(VI) by *Shewanella putrefaciens* in the presence of organic acids, Goldschmidt2007, Cologne, Aug. 19-26(2007).

T. Ohnuki, T. Ozaki, N. Kozai, F. Sakamoto, T. Nankawa, Y. Suzuki, A. J. Francis, MODELING OF THE INTERACTION OF Pu(VI) WITH THE MIXTURE OF MICROORGANISM AND CLAY, Migration 07, Munchen, Aug. 26-31 (2007).

F. Sakamoto, T. Nankawa, T. Ohnuki, A. J. Francis, ANALYSIS OF PROTEINS EXPRESSED IN *Saccharomyces cerevisiae* EXPOSED BY URANIUM(VI), Migration 07, Munchen, Aug. 26-31 (2007).

N. Kozai, T. Nankawa, T. Ohnuki, A. J. Francis, ADSORPTION OF URANIUM(VI) ON SILICA PARTICLES MODIFIED WITH PROTEIN, Migration 07, Munchen, Aug. 26-31 (2007).

Y. Suzuki, T. Nankawa, T. Yoshida, T. Ozaki, T. Ohnuki, A. J. Francis, Y. Enokida, I. Yamamoto, REDOX BEHAVIOR OF Ce(IV)/Ce(III) IN THE PRESENCE OF ORGANIC ACIDS, Migration 07, Munchen, Aug. 26-31 (2007).

T. Ohnuki, T. Ozaki, F. Sakamoto, N. Kozai, T. Nankawa, Y. Suzuki, A. J. Francis, Interactions of Actinides with Microorganisms and Organic Ligands, Goldschmidt conference, July 13-18, Vancouver, Canada (2008)

N. Kozai, T. Ohnuki, Interaction between *Paramecium bursaria* and Europium(III), Goldschmidt conference, July 13-18, Vancouver, Canada (2008)

T. Ohnuki, T. Nankawa, Y. Suzuki, Study of uranium(VI) association with cell surface of microorganisms using functional groups attached electrodes, Pu Future The Science, July 6-11, Dijon, France(2008).

T. Ohnuki, Microbial Impacts on the Migration of Actinides, Workshop on Radionuclides Migration, Oct 12-14, Beijing, China (2008)

Y. Suzuki, N. Kozai, A.J. Francis, T. Ohnuki, Bioreduction of U(VI)-organic complexes by *Shewanella putrefaciens*, 7-th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM2008), Oct 16-21, Shizuoka, Japan (2008).

T. Ohnuki, N. Kozai, T. Nankawa, F. Sakamoto, Y. Suzuki, T. Tanaka, T. Sakai, A.J. Francis, Changes in chemical speciation of Ce(III) and its association with biogenic manganese oxides, 237th ACS National Meeting & Exposition, March 22-26, Salt Lake City, USA (2009)

大貫敏彦、他3名、Mn酸化微生物とCe(III)との相互作用、地球化学学会2008年年会、東京、駒場、9/17-19, 2008.

田中万也、大貫敏彦、マンガン酸化物への4価プルトニウムの吸着と酸化、地球化学学会2008年年会、東京、駒場、9/17-19, 2008.

鈴木義規、大貫敏彦、他2名、*Shewanella putrefaciens*によるU(VI)の還元 - 有機酸錯体の還元、地球化学学会2008年年会、東京、駒場、9/17-19, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大貫 敏彦 (OHNUKI TOSHIHIKO)
日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主席
研究者番号：

(2) 研究分担者

香西 直文 (KOZAI NAOFUMI)
日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究副主席
研究者番号：80354877
坂本 文徳 (SAKAMOTO FUMINORI)

日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究副主幹

研究者番号：60391273

鈴木 義規(SUZUKI YOSHINORI)

日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・博士研究員

研究者番号：20455281

田中 万也(TANAKA KAZUYA)

日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・博士研究員

研究者番号：60377992

(3)連携研究者

南川 卓也(NANKAWA TAKUYA)

日本原子力研究開発機構・バックエンド技術部・研究員

研究者番号：30370448

尾崎 卓郎(OZKAI TAKUO)

日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究員

研究者番号：50322673