

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05342

研究課題名(和文) 地下環境中のバイオマグネタイト生成機構の解明とそれらの重金属元素との相互作用研究

研究課題名(英文) Mechanism of bio-magnetite in subsurface environment and their interaction with heavy metal elements

研究代表者

天野 由記 (AMANO, YUKI)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・核燃料・バックエンド研究開発部門 核燃料サイクル工学研究所
環境技術開発センター・研究副主幹

研究者番号：60421674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、花崗岩および堆積岩の地下深部に分布する地下水において、ナノサイズの磁性粒子であるマグネタイトやグレイタイトを生成する微生物の分布や生成機構、それらの微粒子の核種との相互作用について、微生物のゲノム解析手法、培養法、電子顕微鏡観察、結晶構造解析手法等を組み合わせて明らかにするための研究を行った。その結果に基づき、放射性廃棄物地層処分の性能評価を行う上で未解決な課題である微生物代謝や微生物由来のナノ鉱物粒子が放射性物質の移行挙動に及ぼす影響について評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高レベル放射性廃棄物の地層処分システムにおいて、廃棄体から溶出した放射性核種は、地下水中の浮遊性粒子であるコロイドや微生物との相互作用により、移行の促進が懸念されている。特に微生物は細胞表面への元素の収着に加えて、細胞内外への濃集によって、代謝活動を通して核種移行に影響を及ぼす可能性がある。本研究で用いた評価手法や得られた成果は、今後の地層処分安全評価の信頼性向上に大きく貢献するものであり、わが国における処分サイトの候補の岩盤を対象としたデータ取得やその成果を安全評価に適切に反映していく手法として活用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the distribution and formation mechanism of microorganisms that produce nano-sized magnetite and greigite in the groundwater samples collected from deep subsurface in granite and sedimentary rocks, and the interaction of these particles with nuclides by combining metagenomic analysis, culture, electron microscopy, etc. Based on the results, we evaluated the effects of microbial metabolism on radionuclide migration behavior, which is an unresolved issue in the performance assessment of geological disposal of radioactive waste.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物群集 地下水 鉄代謝 バイオマグネタイト メタゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原子力発電所から発生した使用済燃料は、高レベルの放射性廃棄物として地下深くに地層処分することが日本を含め世界各国で計画されている。地層処分システムでは、多くの放射性核種について、廃棄物から地下水中への溶出と移行が物理・化学的に抑制され、天然の地下環境がもともと備えている閉じ込め機能が発揮されることが期待されている。しかしながら、一部の放射性核種は地下水中の浮遊性粒子であるコロイドや有機物、微生物との相互作用により、移行の促進が懸念されている。特に微生物は、細胞表面に放射性元素を収着するだけでなく、代謝反応によりナノサイズのコロイド状鉱物粒子を生成したり、放射性元素を細胞内外に濃集することで、物質移行への影響が懸念されているが、地下環境における放射性核種の微生物細胞内外の濃集やナノコロイドの細胞外生成の現象解明には至っていない。提案者らは、地下環境に優占する微生物の中には、磁性鉱物を細胞内に生成する「磁性細菌」に近縁な種が多く存在することを明らかにしてきた。磁性細菌は、ナノサイズのマグネタイトやグレイタイトの鉄鉱物を細胞内に生成するが、これらの鉄鉱物は、ネプツニウム、ウラン、セレンなどの放射性元素の化学形態を変化させたり、細胞内への取り込みを促進することが報告されている。生物由来のマグネタイト等のナノサイズの鉄鉱物が地下環境中に多く存在する場合、放射性元素の移行を促進させる可能性があることから、地下環境における微生物の鉄鉱物生成ポテンシャルとそれらの核種移行への影響について評価する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、地下環境における微生物による鉄代謝を行う微生物について調査し、その空間的分布及びナノサイズの鉄鉱物粒子の生成ポテンシャルを明らかにするとともに、微生物由来のナノ鉄鉱物粒子と放射性核種の相互作用を評価することを目的とした。具体的には、陸域深部地下環境の地下水中に存在する微生物について、次世代シーケンサーを活用した環境オミックス情報解析(16S rRNA アンプリコン解析及びメタゲノム解析)、代謝解析を行うとともに、鉄鉱物粒子の生成に関わる微生物の集積培養から生成される粒子の特性評価を行い、地層処分システムにおける核種移行影響評価に資するための情報を取得することとした。

3. 研究の方法

(1) 地下試料の採取

地下試料は、岐阜県の瑞浪超深地層研究所及び北海道の幌延深地層研究センターの地下研究施設を活用した。花崗岩及び堆積岩に分布する様々な水質条件における深部地下水試料を、地下研究施設内で掘削されたボーリング孔を用いて採取し、化学組成分析、微生物のメタゲノム解析、集積培養試験に供した。メタゲノム解析用試料は、大気に触れず被圧された状態で原位置にて数十から数百リットルを過し、0.2 マイクロメートルフィルター上に微生物細胞を捕集し、採取後直ちに冷凍保存した。集積培養用試料は、アルゴンガス置換した耐圧性の滅菌ステンレス容器、滅菌ガラスバイアル瓶等を用い、無酸素雰囲気下にて原位置条件を保持した状態で採取した。また、地下水中の磁性鉱物の存在量及び存在形態を調べるために、ネオジム磁石を用いて磁性鉱物を回収し、電子顕微鏡観察及び化学組成分析に供した。

(2) 環境微生物のメタゲノム解析

フィルター試料から DNA を抽出し、ゲノム DNA を断片化、シーケンス用ライブラリ調整を行った後、メタゲノム解析を実施した。配列解析は、Illumina HiSeq、NextSeq 等を用いた。取得したゲノム配列データセットについて、アセンブリ、ORF の推定、アノテーションを行い、各試料中の微生物群集において系統組成と遺伝子機能組成に関する情報を取得した。また、優占系統のドラフトゲノムについても構築した。

(3) 磁性粒子等の鉄鉱物生成に関わる微生物の集積培養

嫌氣的に採取した地下水をベースとして、地下環境をできるだけ再現した条件下にて、磁性粒子生成微生物の集積培養を行った。本研究で対象とする地下環境で検出されているマグネタイト生成菌に近縁な種は、いまだかつて培養に成功していない未知微生物群に属していることから、取得したゲノム情報を利用して培養条件を設定し、異なる化学形態の鉄を含む複数条件下で培養試験を行った。集積培養の過程で、微生物種組成を明らかにするために Illumina MiSeq を用いた 16S rRNA 遺伝子を解析するとともに、電子顕微鏡や X 線回折法を用いて培養液内の観察・分析を行った。

(4) 微生物由来の鉄鉱物粒子と核種との相互作用評価

微生物の集積培養液中に生成された磁性粒子を含む溶液を対象として、核種との相互作用挙動を明らかにするための反応試験を実施した。核種には、高レベル放射性廃棄物において長寿命放射性核種であり、安全評価上の重要核種の一つであるセレンを用いた。窒素ガス雰囲気下のグローブボックス内で、微生物由来の磁性粒子とセレンを一定時間反応させた後、溶液中の粒子について電子顕微鏡観察及び EDS 分析等を行った。

4. 研究成果

(1) 地下微生物の鉄代謝及び磁性鉱物生成に関わる微生物の空間的分布の把握

花崗岩及び堆積岩を対象とした様々な水質条件下から深部地下水試料を採取し、16S rRNA 遺伝子解析及びメタゲノム解析を実施して、地下水中の微生物の組成と多様性を解析した。地下施設内で掘削されたボーリング孔から被圧された地下水試料を採取できたため、掘削に伴う陸上由来物質の汚染は排除されており、微生物密度に応じた数十から数百リットルの地下水を対象とした解析を行うことで、コンタミネーションの少ない良質なゲノム情報を獲得することができた。また、メタゲノム解析データを基に、遺伝子機能組成に関する情報を取得し、優占系統のドラフトゲノムについても構築した。これらの情報を基に、鉄還元反応において細胞外電子伝達を担う主な因子であるシトクロム c やマグネタイト等の磁気微粒子であるマグネトソーム形成に必要な MamA、MamB などの遺伝子の有無について解析したところ、シトクロム c 遺伝子については花崗岩地下水及び堆積岩地下水中に存在する様々な種に分布しており、一部の種では 66 個ものシトクロム c 遺伝子を有することが確認された。また、マグネトソーム形成に必要な遺伝子については、MamA、MamB、MamP などの遺伝子が検出されたが、一部の種に限定されるとともに、マグネトソームたんぱく質遺伝子を有するドラフトゲノムにおいてもマグネトソーム形成に必要なオペロンを有していない可能性が示された。また、地下水中の磁性粒子の分布を明らかにするために、数百リットルの地下水を採取してネオジム磁石を用いた磁性粒子の回収を行い、走査型電子顕微鏡にて観察・分析を行ったが、マグネタイトやグレイタイトのような磁性を有する鉄鉱物は検出されなかった。このことから、地下環境に生息する微生物は、鉄鉱物を生成する能力を有しており、微生物による鉄微粒子も生成されているが、細胞内にマグネトソームを形成する種は極めて少なく、地下水中の微生物由来のナノサイズの磁性粒子の分布も非常に限られていることが示唆された。

(2) 鉄鉱物生成に関わる微生物群集の集積培養

メタゲノム解析を実施した地下水試料について、マグネタイト等の鉄鉱物粒子を生成する微生物の集積培養を実施した。採取された地下水の環境状態を可能な限り再現するため、地下水をベースとして、オキシ水酸化鉄、クエン酸鉄など形態の異なる鉄を添加し、基質として酢酸を利用する条件も作成した。その結果、1年以上経過した集積培養液中において、磁性鉱物が鉄の磁性鉱物の一種であるグレイタイトが検出されたが、マグネタイトは検出されなかった。集積培養液中の微生物細胞について、透過型電子顕微鏡を用いた観察を行ったところ、細胞内には鉄粒子様の物質は観察されたが(図1)、直鎖上の磁性微粒子を有するものは観察できなかったことから、これらの鉄鉱物は細胞外で生成されたか、細胞内で生成されたとしても速やかに排出された可能性が考えられた。集積培養液中では、*Spirochaetes* 門の *Rectinema cohabitans* や *Gamma Proteobacteria* 綱の *Pseudomonas knackmussii* に近縁な種その他、*Delta Proteobacteria* 綱に属する種が優占種として検出され、これらの種は、集積培養の実施期間において、経時的に増加する傾向が確認された。一方で、滅菌系においては、グレイタイトの生成は確認できなかったことから、これらの種が培養液中でグレイタイトの生成に関与している可能性が推定された。このうち、*Delta Proteobacteria* に属する種は既知の培養株との相同性が 89.7% であることから、新種の可能性が高いと考えられる。この種の存在比は、集積培養中で約 40% であり、分離培養に向けて限界希釈培養法などを用いて純化を進めている。グレイタイトの生成は、酢酸ナトリウムの添加の有無にかかわらず、オキシ水酸化鉄及びクエン酸鉄いずれの条件下でも確認されたが、酢酸ナトリウム及びクエン酸鉄を添加した条件下にて最も生成が促進されることが明らかになった。一方で、地下環境においては、酸化鉄は存在しているが、微生物にとって分解しやすい低分子の有機酸はほとんど存在していない。また、今回培養液中で検出された優占種は、地下水試料を対象としたメタゲノム解析において検出はされているが、同試料では優占種として存在していなかった。

さらに、本研究の集積培養試験では、原位置環境と比較すると高濃度の栄養塩が添加されている条件であるにもかかわらず、常温下での微生物由来のグレイタイトの生成には1年以上の期間を要したことから、天然の地下環境においては、これらの種がグレイタイトを生成する可能性は極めて低いと考えられる。

集積培養液中のグレイタイトは、培養過程で増加しておらず、パイライトの増加が確認されたことから、生成されたグレイガイ

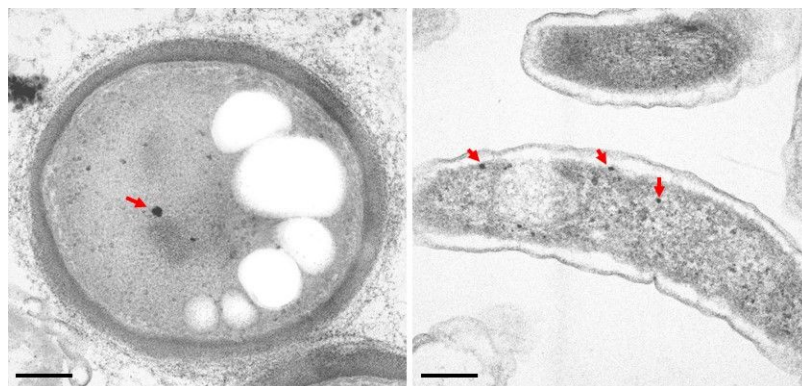


図1 集積培養液中の微生物細胞の透過型電子顕微鏡像
細胞内で観察された鉄粒子様の物質を矢印で示す。

スケールバーは 0.2 μm

トがパイライトに変化していることが推察された。

(3) 微生物由来の鉄鉱物と核種の相互作用評価

集積培養液中で生成された鉄鉱物粒子について、セレンを用いた収着試験を実施した。走査型電子顕微鏡観察及びエネルギー分散型X線分光分析の結果から、7日間の反応期間内に、添加した亜セレン酸溶液中のセレンは速やかに還元されて、亜セレン酸(+4)から赤色アモルファスの単斜晶セレン(0)が形成されることが示された。また、一部のセレンは、培養過程で形成されたパイライトに収着することが明らかになったが(図2)、グレイサイトへの収着は確認できなかった。さらに、培養液中の微生物細胞内に、セレンを濃集する様子が観察された。これらの結果から、鉄鉱物が共存する嫌気的環境下では、セレンは速やかに還元され、単体として存在するか、パイライトに分配される、あるいは微生物細胞内に取り込まれて蓄積されることが示された。本研究の成果より、地下環境においては、廃棄物からセレンが溶存態として溶出した場合でも、微生物活動により生成されたパイライトや微生物自体のセレン還元代謝反応により速やかに不溶化されると考えられる。一方で、微生物細胞内に濃集した場合、その細胞が走化性を有していた場合には、地下水中でセレンの移行が促進される可能性が考えられた。

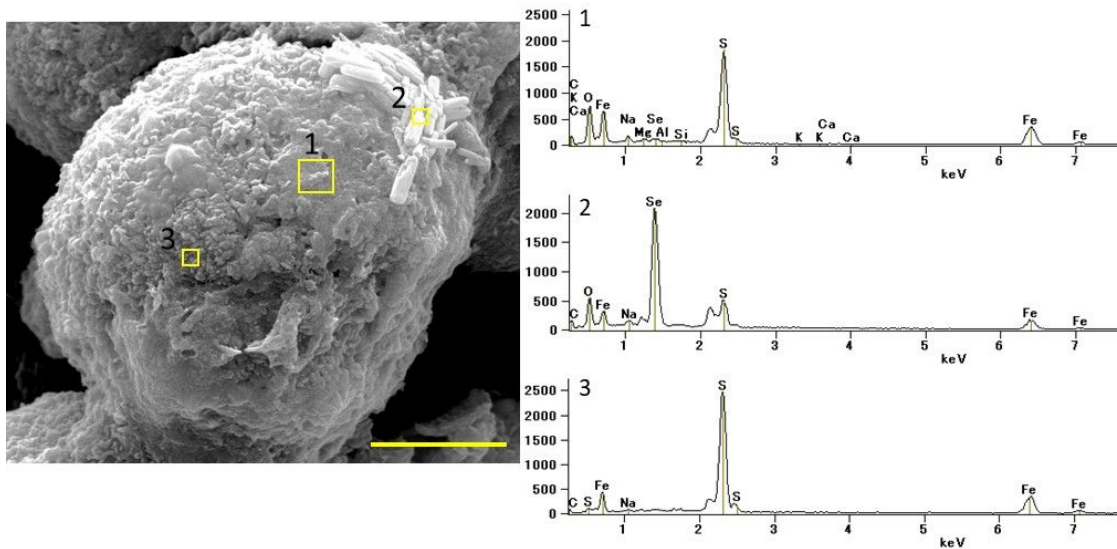


図2 走査型電子顕微鏡像とEDS分析

スケールバーは2 μm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Alexander L Jaffe, Alex D Thomas, Christine He, Ray Keren, Luis E Valentin-Alvarado, Patrick Munk, Keith Bouma-Gregson, Ibrahim F Farag, Yuki Amano, Rohan Sachdeva, Patrick T West, Jillian F Banfield	4. 巻 12
2. 論文標題 Patterns of gene content and co-B39occurrence constrain the evolutionary path toward animal association in CPR bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0052121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.00521-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nishimura, H., Kouduka, M., Fukuda, A., Ishimura, T., Amano, Y., Beppu, H., Miyakawa, L., Suzuki, Y.
2. 発表標題 The Fe(III)-dependent anaerobic methane-oxidizing activity in a deep underground borehole demonstrated by in-situ pressure groundwater incubation.
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2022年大会：JpGU2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 庸平 (Suzuki Yohey) (00359168)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	岩月 輝希 (Iwatsuki Teruki) (00421678)	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・核燃料・バックエンド研究開発部門 幌延深地層研究センター・部長 (82110)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	カリフォルニア大学バークレー校			