

機関番号：82110
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20560778
 研究課題名（和文） 原生動物のバクテリア摂食によるアクチノイドの化学状態遷移過程に関する基礎的研究
 研究課題名（英文） Fundamental research on biotransformation of actinides during intake of bacteria by Protozoa
 研究代表者
 香西 直文（KOZAI NAOFUMI）
 独立行政法人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：80354877

研究成果の概要（和文）：代表的な原生動物であるゾウリムシは、細胞膜への重元素の吸着を防ぐ機構を持つことを示唆する結果が得られた。予め重元素を固定させた酵母細胞を餌としてゾウリムシを培養すると、重元素は酵母からほとんど溶出せず、リン酸塩として酵母細胞の不消化残渣とともにゾウリムシ細胞外へ放出されることがわかった。これは、実際の生態系においても酵母等の重元素固定作用が期待できることを意味する。

研究成果の概要（英文）：It was found that the representative of protozoa, *Paramecium sp.*, may have a function to prevent adsorption of heavy elements on the cell membranes. When cells of *Paramecium sp.* were cultured with yeast cells as food source, the heavy elements pre-fixed on the yeast cells were hardly leached in the culture medium and excreted from paramecium cells as phosphates with indigestible residue of the yeast cells. This finding implies that functions of microorganism such as yeast and bacteria to immobilize heavy elements on the cells can be expected in the actual ecological system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：原子力学

キーワード：バックエンド

1. 研究開始当初の背景

環境中でのアクチノイド等の移行挙動に微生物、特にバクテリアや酵母等が影響を及ぼすことが知られており、近年精力的に研究されている。これまでの研究から、アクチノイド等は微生物との相互作用、すなわち細胞表面への吸着、分泌物との錯形成、細胞からの電子移動による酸化還元により、化学状態を変化させることが知られている。ウランなどの非常に重い元素の場合、それらが微生物細

胞内に取り込まれることはまれであり、細胞表面への吸着がアクチノイド等の移行における主たる作用である。

バクテリアや酵母等の微生物（以下、バクテリア等の微生物）は環境中での個体数が多く、かつ細胞表面にアクチノイドを吸着する能力が高いため、環境中でのアクチノイド等の挙動解明評価に重要な存在である。しかし、それらの微生物は固体としての存在期間が鉱物と比べて非常に短いため、環境中におけ

るアクチノイド等の挙動を明らかにするためには、細胞に吸着したアクチノイド等の長期的な挙動を明らかにする必要がある。ゾウリムシやアメーバなどの原生動物は、細菌等の微生物を捕食して増殖する。細菌等の微生物が原生動物体内に取り込まれたあと、細菌等の微生物に吸着していたアクチノイド等は化学状態を変化させる可能性が高い。しかし、このような原生動物による細菌等の微生物摂食によるアクチノイド等の化学状態遷移過程については、これまでの研究で明らかになっていない。さらに、アクチノイド等が存在する環境下での原生動物自体の挙動も未解明である。

本研究で対象とするゾウリムシは、湖沼・河川などに生育する代表的な原生動物であり、放射線耐性細菌と並あるいはそれ以上に耐放射線性が高いことが知られている。また、最近行われた地下水中の微生物調査で、地下数十メートルの嫌気性地下水中に原生動物が多数生息しており、細菌等の微生物の捕食者として活動していることが明らかになってきた。また、ゾウリムシなどのように湖沼・河川などに生育する原生動物も細菌等の微生物の捕食者である。したがって、原生動物は、地表面から中地層環境にいたるまで細菌等の微生物の生息に大きな影響を与える存在である。さらに、放射性廃棄物処分の安全評価の観点から、地下水→細菌等の微生物→原生動物に至る経路における化学状態遷移過程の解明は、放射性核種移行を評価する上で不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、代表的な原生動物であるゾウリムシを対象として、ウランなどの重元素放射性核種（以下、重元素と略記する）の環境中での移行における原生動物の寄与・役割を明らかにする。このため、本研究では、重元素を吸着させた細菌等の微生物を用いてゾウリムシを培養し、ゾウリムシ体内及び体表面における重元素の化学形態、さらに分泌物・代謝物等と重元素との錯形成状態を、放射化学的分析、分光学的分析（紫外可視分光分析、SEC-ICPMS、EXAFS）、走査・透過電子顕微鏡分析、微小領域陽子線励起 X 線分析 (μ -PIXE) などにより検討する。

3. 研究の方法

本研究では、3年間の研究期間内に、

- (1) 重元素が存在する条件でのゾウリムシ培養条件の検討
- (2) ゾウリムシ細胞による溶存形重元素の吸着・取り込みの検討
- (3) ゾウリムシ培養過程における、食餌微生物

物に固定させた重元素の化学状態変化に関する検討

を行い、これらの結果に基づき、ゾウリムシによる細菌等の微生物の摂食・消化によるアクチノイド等の化学状態変化を検討評価する。研究初年度には、3 価のアクチノイドと類似の化学的性質を持つ安定元素である Eu(III)を用いた検討を行い、培養条件・分析方法について幅広く検討する。研究 2 年度以降は、条件・方法を絞り、放射性核種であるウラン (VI) 等を用いた検討を行う。

4. 研究成果

(1) ゾウリムシの餌となるモデル微生物として酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を選び、予備実験として①酵母を用いたゾウリムシ（以下すべて *Paramecium bursaria* を用いた）の培養方法、②酵母を用いたゾウリムシ培養中のゾウリムシ細胞数密度の測定方法、③酵母細胞への重元素の吸着方法及び吸着した元素の化学状態分析方法、④ゾウリムシ細胞の元素分析法、⑤液相の元素の化学状態分析法について検討を行い、手法を確立し、下記の(2)及び(3)の本実験を行った。

(2) 溶存形重元素とゾウリムシの相互影響

ここでは、重元素 (Sr(II), Eu(III), Pb(II), U(VI)) の酢酸塩または塩化物の水溶液 (pH 約 7) にゾウリムシの生細胞を入れ、①24 時間後の生存率、②細胞による重元素の吸着・取り込み、③液相に残った重元素の化学状態を調べた。細胞による重元素の吸着・取り込みを調べるためには、機器分析の観点からは可能な限り液相の重元素濃度が高い方が良い。しかし、重元素濃度が高いと金属毒による細胞へのダメージが考えられる。そこで、24 時間生存率の観点から、細胞へのダメージが小さい重元素濃度の上限を求めた。細胞による重元素の吸着・取り込みについては、細胞を洗浄し、グルタルアルデヒドによる細胞固定後、高感度元素分析法である micro-PIXE によって調べた。液相の重元素の化学状態については、サイズ排除クロマトグラフィー紫外吸収-質量分析法 (SEC-UV-ICPMS) によって調べた。サイズ排除クロマトグラフィーでは、有機物あるいはイオンをサイズ及び電荷により分離した。分離された成分をオンラインで紫外吸収測定及び元素分析することにより、元素の化学状態を明らかにした。

①24 時間生存率

細胞培養の対数増殖後期から定常期にかけて採取したゾウリムシ細胞（以後、定常期の細胞と呼ぶ）の 24 時間生存比の結果を図 1 に示す。Sr(II) では、実験した濃度上限値である 0.5mM まで、生存比に全く変化が無かった（ほぼ全ての細胞が生き残った）が、Eu(III), Pb(II), U(VI) では、0.05mM を超え

ると生存率が著しく低下した。この結果から、以降の実験は元素濃度 0.05mM で行った。

Eu(III)についてのみ、培養の誘導期（細胞分裂を始める前の準備期間）に採取した細胞の 24 時間生存率を調べた。これは、微生物の細胞の刺激に対する感受性が、増殖のステージによって異なることが知られているからである。このため、培養開始から 2 日目に採取した細胞を直ちに洗浄し、Eu(III)の水溶液に加えた。図 1 に示すように、誘導期の細胞の 24 時間生存率は定常期の細胞より明らかに低く、重元素に対する耐性が低いことがわかった。

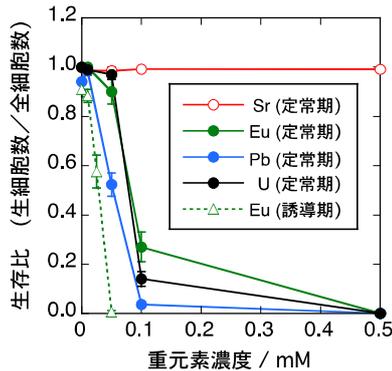


図 1 重元素水溶液中でのゾウリムシ細胞の生存比

②細胞による重元素の吸着・取り込み

重元素溶液中で生き残ったゾウリムシ細胞を micro-PIXE によって元素分析したところ、定常期の細胞では、重元素がまったく検出されなかった。比較のために、定常期の細胞を前述の方法で細胞固定した後に 0.05mM の重元素 (Eu(III), Pb(II), U(VI)) を含む水溶液に入れたところ、細胞全体に重元素が検出された (図 2)。この比較実験に用いた細胞は実験前に死んでいるので、重元素を細胞内に取り込むことは無い。したがって、この比較実験結果は、ゾウリムシ細胞膜には Eu(III), Pb(II), U(VI) に対する吸着サイトが豊富に存在することを示している。細胞膜への吸着であることを確認するために、Pb(II) 溶液に入れた後の細胞 (予め固定した細胞) の 3 次元元素分布を、開発中の 3 次元 micro-PIXE 分析法により分析した。図 2c に示すように、Pb(II) は細胞の外辺に濃集していることが判明した。したがって、ゾウリムシ細胞は、本来 Eu(III) などの重元素を細胞膜に吸着する性質を持つものの、生細胞では吸着を妨げる機構を有すると考えられる。

さらに比較のため、誘導期の生細胞を用いた同様の実験を、Eu(III) の水溶液を用いて行った。これは、前述したように、誘導期の

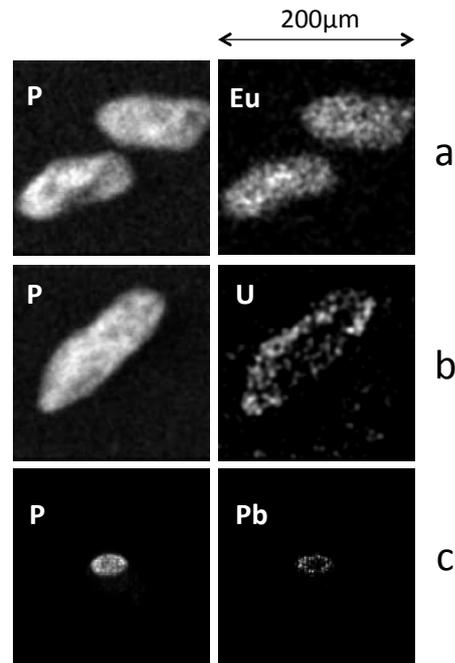


図 2 ゾウリムシ細胞の元素分布。予め薬品で固定した細胞を重元素の水溶液に 24 時間入れた後、micro-PIXE で分析した。a) と b) は Eu(III) と U(VI) の水溶液に入れた後の細胞の 2 次元元素分布、c) Pb(II) 水溶液に入れた後の細胞を 3 次元測定して得た細胞の約 1.5 μm 厚の断面の元素分布。P は細胞必須元素であり、細胞全体に分布する。

細胞は刺激に対する感受性が高いので、定常期の細胞とは重元素に対する反応が異なる可能性が考えられたからである。図 3 に示すように、ゾウリムシ細胞全体に Eu(III) が検出された。細胞の重元素濃度が高くなることにより、24 時間生存率 (図 1) が低下した可能性が考えられる。前述したように、ゾウリムシ生細胞では細胞膜への Eu の吸着を防ぐ機能があることが示唆されているので、誘導期の細胞に検出されたこれらの元素は、細胞内に取り込まれたものと考えられる。これらの元素の細胞内での位置を明らかにすることは、重元素に対するゾウリムシ細胞の応答機構を明らかにするために重要であるため、今後 3 次元 micro-PIXE 分析法により検討することを考えている。

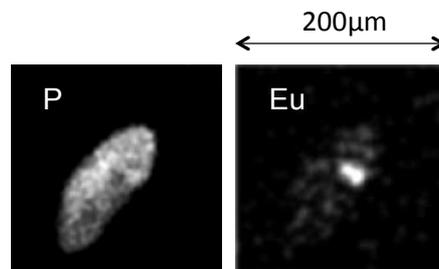


図 3 誘導期 (培養開始から 2 日め) のゾウリムシ細胞を重元素水溶液に 24 時間入れたあとの micro-PIXE による 2 次元元素分布。

③液相に残った重元素の化学状態

ゾウリムシ細胞が重元素の化学状態を変化させる可能性を調べるため、Sr(II)、Eu(III)、Pb(II)の水溶液にゾウリムシ生細胞を24時間入れた後の液相を、0.45 μ mのフィルターで濾過した後、SEC-UV-ICPMSにより分析した。SECに用いた分離カラムの充填材はわずかに負に帯電している。それ故、陽イオンはカラムに吸着するので、ICPMSのクロマトグラムには出現しない。したがってUV及びICPMSのクロマトグラムには出現するピークは、中性あるいは負の電荷を持つ成分に起因する。

分析結果を図4に示す。ゾウリムシを入れる前の水溶液に検出されたEuは、ゾウリムシの活動を維持させる必須元素であるリンとしてEu水溶液に入れた有機リンに錯体形成したものである(図4A)。ゾウリムシを水溶液に入れることによって、サイズ排除限界付近に微弱な紫外吸収ピークが出現した。このピークは元の水溶液には出現せず、重元素の有無に関係なくゾウリムシ生細胞を入れた後に出現したので、ゾウリムシ起源の巨大有機物分子(見かけの分子量は球状タンパク質換算で数10万)であるといえる。溶離時間23分頃に現れたピークもゾウリムシ起源であるが、見かけの分子量は小さい(数百以下)。重元素のクロマトグラムにおいて、元素による違いが現れた。クロマトグラムに現れたEu(III)の大部分はゾウリムシ起源の巨大有機物分子とともに検出された(図4B)。この結果は、ゾウリムシにより一部のEu(III)の化学状態が変化し、巨大有機物との擬似コロイドを形成することを意味している。一方、Sr(II)(図4C)はクロマトグラムに全く現れなかったことから、元々の化学形であるSr²⁺として存在し、カラムに吸着したと考えられる。Pb(II)は有機リンと錯体形成した成分以外に出現しなかった。したがって、ゾウリムシはPb(II)の化学状態を変化させない可能性が高い。

(3) ゾウリムシ培養過程における、食餌微生物に固定させた重元素の化学状態変化に関する検討

ここでは、Eu(III)及びU(VI)のどちらか1元素を吸着させた酵母をゾウリムシの餌として用い、ゾウリムシの培養過程におけるゾウリムシ及びそれら重元素の化学状態変化を検討した。①培養前の酵母細胞、②培養中のゾウリムシ細胞、③液相に溶出したEu(III)及びU(VI)の化学状態、④培養中の酵母細胞(沈殿物)の状態変化、について次のような結果が得られた。

①重元素を吸着させた酵母細胞

予め培養した酵母をEuの水溶液に入れると、液相のEu濃度は大きく低下した。Eu水

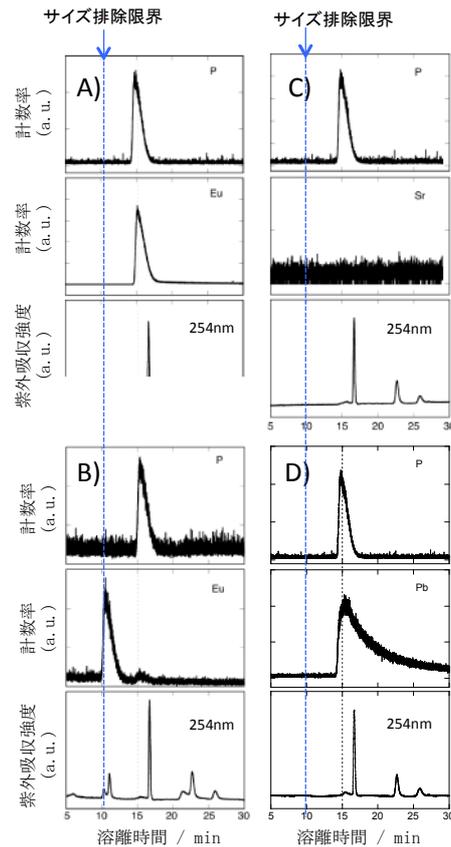


図4 定常期のゾウリムシ細胞を重元素水溶液に24時間入れたあとの水溶液のSEC-UV-ICPMSクロマトグラム。A)ゾウリムシを入れる前のEu水溶液、B)ゾウリムシを入れた後のEu水溶液、C)ゾウリムシを入れた後のSr水溶液、D)ゾウリムシを入れた後のPb水溶液

溶液から取り出した大部分の酵母の表面状態には変化がなかったが、一部の酵母の表面に数十ナノメートル程度の微小なEuリン酸塩鉱物が生成した。液相から減少したEuの多くは酵母細胞に吸着あるいは取り込まれ、一部が細胞から分泌されたリン酸イオンによりリン酸塩化したと考えられる。

U(VI)の場合も同様に、酵母細胞を投入することにより液相のU濃度は大きく低下した。U水溶液から取り出した大部分の酵母の表面状態には変化がなかったが、一部の酵母の表面に数ミクロンの円盤状のUリン酸塩鉱物が生成した。液相から減少したUの多くは酵母細胞に吸着あるいは取り込まれ、一部が細胞から分泌されたリン酸イオンによりリン酸塩化したと考えられる。

②培養中のゾウリムシ細胞

前述の酵母細胞を用いてゾウリムシを培養した。培養時間と細胞数の関係を図5に示す。ゾウリムシ培養の誘導期(0~4日)にゾウリムシ細胞全体にEuが分布することを見出した(図6)。指数増殖期及び定常期には細胞にEuが検出されることはなかった。但し、誘導期の細胞でなくても、接合中(遺伝子交換のため2つの細胞が合体している

状態)あるいは細胞分裂中とみられる細胞にはEuが検出された。

Uを吸着させた酵母細胞によるゾウリムシの培養では、Euと異なり、誘導期から定常期に至るまで、細胞全体に微量のUが検出された(図7)。前述したように、溶存形のUがゾウリムシ細胞に吸着あるいは取り込まれることはほとんど無いので、酵母を摂食し分解する過程でUが細胞内に取り込まれたものと考えられる。

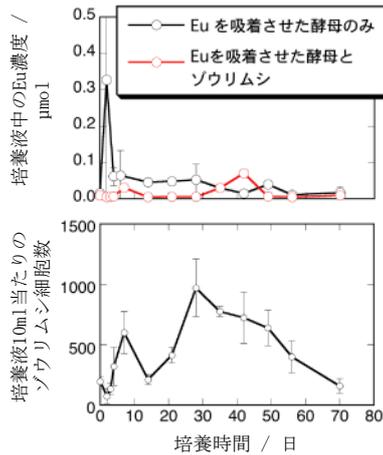


図5 Euを吸着させた酵母細胞を餌としてゾウリムシを培養したときの(下)ゾウリムシ細胞数密度、及び(上)液相に溶出したEu濃度の時間変化。

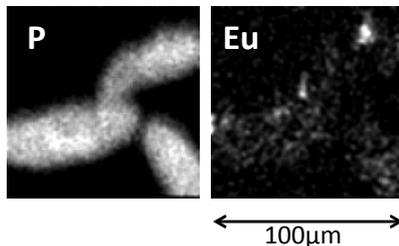


図6 Euを吸着させた酵母細胞を餌としてゾウリムシを培養し始めて24時間後のゾウリムシ細胞をmicro-PIXE分析して得た2次元元素分布。

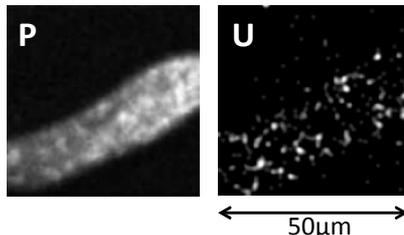


図7 Uを吸着させた酵母細胞を餌としてゾウリムシを培養し始めて28日後のゾウリムシ細胞をmicro-PIXE分析して得た2次元元素分布。

③液相に溶出したEu(III)及びU(VI)の化学状態

図5に示すように、Euを吸着させた酵母を食餌としてゾウリムシを培養すると、全培養期間にわたりEuは培養液中にほとんど溶出しなかった。酵母から溶出したEuの濃度は、酵母単独の場合よりもゾウリムシを培養し

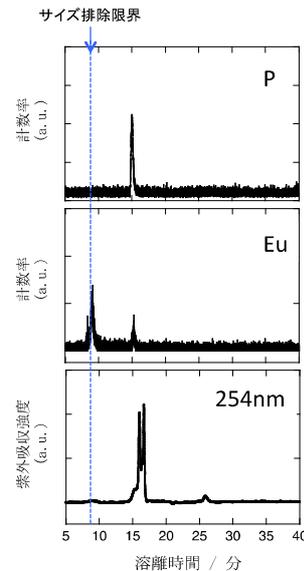


図8 Euを吸着させた酵母細胞を餌としてゾウリムシを培養した培養液のSEC-UV-ICPMSクロマトグラム。

た方が低かった。ゾウリムシを培養した場合、酵母から溶出したEuは、ゾウリムシ培養前に酵母に吸着させていたEuの最大0.1%程度であった。

Uを吸着させた酵母を食餌としてゾウリムシを培養すると、全培養期間にわたりUは培養液中にほとんど溶出しなかった。酵母から溶出したUは、ゾウリムシ培養前に酵母に吸着させていたUの最大3%程度であった。

次に培養液を0.45μmのフィルターで濾過した後、SEC-UV-ICPMSにより分析した。結果を図8に示す。Euを吸着させた酵母を培養液に投入すると、酵母起源の有機物と結合した有機形Eu(溶離時間約15分)と、おそらく正電荷を持つと推定される無機形Euが溶出する。溶出したEuの大部分は無機形Euであった。一方、酵母起源の有機物と結合した有機形Euは培養時間と共に減少し、サイズ排除限界付近に現れたゾウリムシ起源の巨大有機分子とともに検出されるようになった。この巨大有機分子に紫外吸収の強度は、ゾウリムシの増殖と関係なく概ね一定であった。この結果は、この巨大有機分子が重合し、一部が沈殿した可能性を示唆する。

Uを吸着させた酵母をゾウリムシ培養液に投入した場合、同様に、サイズ排除限界付近に現れたゾウリムシ起源の巨大有機分子とともにUが検出されるようになった。

④培養中の酵母細胞(沈殿物)の状態変化

ゾウリムシ培養前の培養液中には、餌となる酵母細胞の沈殿のみが存在し、培養容器を振とうすることで酵母細胞はすぐに分散する状態であった。ゾウリムシの培養が進むにつれて、分散しない膜状の沈殿へと変化した。この膜状沈殿物の電子顕微鏡写真を図9に示す。この膜状沈殿物は、多数の酵母細胞消化残渣及び残渣間の間隙を埋める有機物が

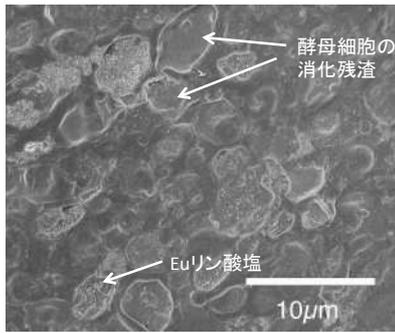


図9 Euを吸着させた酵母細胞を用いてゾウリムシを培養した培養液に生成した膜状沈殿物の電子顕微鏡写真。数µmの楕円形の物体は、ゾウリムシが排泄した酵母細胞の残渣。残渣の上にある明るい微粒子はEuリン酸塩

ら成っていた。Euを酵母に吸着させて用いた実験では、酵母細胞消化残渣の表面には、微小なEuリン酸塩が多量に存在していた。

Uを酵母に吸着させて用いた実験では、酵母細胞消化残渣の表面には、円盤状のUのリン酸塩が多量に存在していた。

(4)まとめ

本研究では、基礎科学的に下記の新奇な知見が得られた

①ゾウリムシの生細胞は、基本的に溶存形の重元素を吸着したり取り込んだりはしない。これは、生細胞に吸着を妨げる機能が備わっているからと考えられる。

②増殖の誘導期あるいは細胞分裂中などの一部特定の時期には、溶存形の重元素を細胞内に取り込む可能性がある。

③ゾウリムシは液相に巨大な有機物分子を放出する。溶存形Eu(III)やU(VI)はこの有機物分子と錯形成し、擬似コロイドを形成する可能性がある。

④酵母細胞に固定された重元素は、その酵母細胞を餌としてゾウリムシが消化分解しても、液相に再溶出されることはほとんどなかった。ゾウリムシが消化分解を経ても、重元素はリン酸塩の形態を維持したまま、ゾウリムシの活動によって形成する膜状沈殿物に移行した。

これらの現象は、これまで他の原生動物においても全く報告されていない新奇な知見である。

④の成果はまた、酵母等の微生物による重元素固定作用が実際の生態系においても維持されることを示しており、アクチノイド等重元素の環境安全の観点から非常に好ましい結果であるといえる。

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1件)

①N. Kozai, T. Ohnuki, M. Koka, T. Satoh, T.

Kamiya, Behavior of Paramecium sp. in solutions containing Sr and Pb: Do Paramecium sp. alter chemical forms of those metals?, 査読有、Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 印刷待ち, 2011.

[学会発表] (計7件)

①香西直文、大貫俊彦、佐藤隆博、江夏昌志、神谷富裕、ゾウリムシ培養過程における重元素の化学状態遷移に関する研究(II)-食餌微生物からの取り込み-, 第5回高崎量子応用研究シンポジウム、2010年10月14日、高崎

②N. Kozai, T. Ohnuki, M. Koka, T. Satoh, T. Kamiya, Behavior of paramecium sp. in solutions containing heavy elements: tolerance and sorption, 12th International Conference on Nuclear Microbe Technology and Applications, 2010年7月27日、ドイツ

③T. Satoh, M. Koka, A. Yokoyama, T. Kamiya, N. Kozai, Improvement of spatial resolution of PIXE-CT using ML-EM algorithm in TIARA, 12th International Conference on Nuclear Microbe Technology and Applications, 2010年7月27日、ドイツ

④N. Kozai, T. Ohnuki, T. Satoh, F. Esaka, Behavior of Eu during culture of Paramecium sp. with yeast cells sorbing Eu, Goldschmidt2010, 2010年6月15日、米国

⑤香西直文、大貫敏彦、佐藤隆博、ゾウリムシ培養過程における重元素の化学状態遷移に関する研究-細胞への吸着・取り込み-, 第4回高崎量子応用研究シンポジウム、2009年10月8日、高崎

⑥香西直文、大貫敏彦、酒井卓郎、佐藤隆博、鉱物・微生物への元素吸着挙動研究におけるマイクロPIXE分析法の適用、可視化情報学会全国講演会、2008年10月11日、釧路市北海道釧路市

⑦N. Kozai, T. Ohnuki, Interaction between Paramecium bursaria and Europium(III), Goldschmidt2008, 2008年7月18日、カナダ

6. 研究組織

(1)研究代表者

独立行政法人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
香西直文 (KOZAI NAOFUMI)
研究者番号: 80354877

(2)研究分担者

独立行政法人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
大貫敏彦 (OHNUKI TOSHIHIKO)
研究者番号: 20354904

(3)連携研究者

なし