

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340040

研究課題名(和文) 微生物による放射性セシウム除去を目指したセシウム濃集機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of cesium accumulation for decontamination of radiocesium by microbe

研究代表者

坂本 文徳 (SAKAMOTO, Fuminori)

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 先端基礎研究センター・研究員

研究者番号：60391273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：福島第一原発の周辺地域で放射性セシウムによる環境汚染が問題となっている。本研究では、微生物を利用した、福島第一原発より環境中に大量に放出された放射性セシウムの効率的な回収・除染への知見を提供することを目的とした。5416種類の微生物の一種である酵母を利用した研究の結果、放射性セシウムの耐性には液胞膜合成に関連する遺伝子が関係していることを明らかにした。また、酵母と、同じく微生物の一種であるきのこの菌糸を利用した野外実験の結果、800平方cmの範囲で、酵母で最大75Bq、きのこで最大86BqのCs-137を濃集した。今後もこの研究を進め、さらに効率的な放射性セシウム除去技術の確立に努めていく。

研究成果の概要(英文)：Environmental pollution with the radiocesium around Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant (FDNPP) is a big problem. The purpose of this study is to provide new knowledge for effective decontamination of radiocesium released from DFNPP in large quantities by using microbes. As a result of study using 5416 kinds of yeast which is one of microbe, we clarified that the genes in conjunction with tonoplast membrane composition are related to tolerance of radiocesium. In addition, as a result of field experiment using yeast and mycelia of mushroom which is also one of microbe, 75 Bq of Cs-137 was accumulated by the yeast and 86 Bq of Cs-137 was accumulated by the mycelia in maximum from the area of 800 square centimeters respectively. We continue the study to establish the more effective decontamination technique of radiocesium.

研究分野：環境放射線、微生物、

キーワード：放射性セシウム 酵母 一遺伝子欠損酵母 放射性セシウム回収

1. 研究開始当初の背景

福島第一原発の周辺地域で放射性セシウムによる環境汚染が問題となっている。鉱物や有機化合物、植物等を利用した除染活動が試みられているが、どれも決め手を欠く状況となっている中、微生物による放射性セシウム回収の可能性が探られている。

微生物が金属を濃集することは 1970 年代から報告されており、アクチノイド、レアメタル、有害金属などの回収に利用する目的で、金属を濃集する微生物の探索が国内外で広範に行われている。中でも、アクチノイドの効率的な回収は、核燃料サイクルの確立や、ウランで汚染されたウラン廃鉱地域の環境浄化のために重要視されてきた。OECD - NEA の原子力科学委員会は、1997 年に微生物を用いたアクチノイドの分離に関する研究を紹介し、坂口らは、生物が核燃料物質に対して強い親和性を示すことを報告している。また、5000 種類に及ぶ一遺伝子欠損酵母コレクションを使用した研究により、微生物による金属の濃集機構も徐々に明らかにされてきている。微生物の細胞表面には、生体分子であるタンパク質、糖鎖や脂質などが存在している。これらの生体分子は、カルボキシル基、リン酸基、水酸基などの官能基を有しているため、陽イオンとして存在するアクチノイドを吸着する。最近の研究成果によると、ウランを濃集するのは細胞表面タンパク質やリン酸基を有した生体分子であることが分かってきた。セシウムについても、同様の研究手法により、酵母への濃集機構を明らかに出来る可能性がある。

酵母や、酵母と同じ菌類であるキノコによるセシウムの濃集に関する研究では、セシウムが酵母やキノコに濃集することが確かめられている。また、菌体中のセシウムの分布がカリウムの分布と一致していること、カリウムと同じようにセシウムも水とエネルギーが小さいことから、セシウムがカリウムと同じ機構で菌類に取り込まれている可能性が示されている。

申請者らは、平成 12 年に旧日本原子力研究所の黎明研究で「菌類への重金属の濃集機構の解明」のタイトルで酵母とキノコによるセシウムの濃集に関する研究を実施した。その中で、酵母とキノコが高濃度でセシウムを濃集することを明らかにした。また、高速増殖炉を中心とした原子力システムにおける再処理技術開発に資するため、平成 17 年度から 3 年間「FBR 燃料再処理のためのタンパク質機能付加 SAM の創生」のタイトルで原子力システム研究開発事業を実施した。その中で、約 5000 種類に及ぶ一遺伝子欠損酵母コレクションを利用して、ウラン存在下で特異的に発現するタンパク質を酵母から抽出して同定した。現在は 6000 以上に株数が増えたこの一遺伝子欠損酵母コレクションを利用することで、セシウムを特異的に濃集する / しない株を特定出来ると考えた。また、

セシウム存在下で酵母が特異的に発現する / しないタンパク質を特定・同定し、その結果からセシウムに対する酵母の応答機構、セシウム濃集機構を解明することができると確信し、今回本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、6000 種類以上の一遺伝子欠損酵母コレクションから、放射性セシウムを特異的に濃集する / しない株を特定する。それらの株と一遺伝子欠損酵母の親株を利用して、放射性セシウム存在下で特異的に発現するもしくは発現しないタンパク質を特定する。さらに、時間飛行型質量分析装置 (TOF-MS) でアミノ酸配列を解読して当該タンパク質を同定する。放射性セシウム濃集に関連する欠損遺伝子、放射性セシウム存在下で特異的に発現する / しないタンパク質の放射性セシウムに対する酵母の応答機構を解明する。

発展内容として、福島県内で放射性セシウムにより汚染された土壌サンプルを採取し、本研究で特定した放射性セシウム濃集株を利用して、当該汚染土壌サンプルからの放射性セシウムを回収する試験にも取り組む。また、逆に、放射性セシウムの作物への取り込みを抑える手法につながる知見が得られる可能性もある。

平成 17 年度より 19 年度まで受託研究した原子力システム研究開発事業において、ウランを特異的に濃集する株を特定した。当該開発事業で確立した手法を利用することで、放射性セシウムを特異的に濃集するもしくは濃集しない株を確実に特定する。当該株と一遺伝子欠損株の親株を利用して、放射性セシウム存在下で特異的に発現するもしくは発現しないタンパク質を特定・同定する。放射性セシウム濃集に関わる遺伝子、放射性セシウム存在下で特異的に発現する / 発現しないタンパク質を調べることで、本研究期間内に放射性セシウムに対する遺伝子レベルでの酵母の応答機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、(1)寒天培地を利用した放射性セシウム濃集 / 非濃集酵母株の選定、(2)液体培地を利用した放射性セシウム濃集 / 非濃集酵母株の特定、(3)放射性セシウム特異的発現 / 非発現タンパク質の特定と同定、(4)過剰カリウム特異的発現 / 非発現タンパク質の特定と同定、(5)福島汚染土壌からの放射性セシウム濃集実験、(6)まとめの 6 つのステップからなる。(1)を大貫が、(2)と(5)を香西が、(3)と(4)を坂本が中心的に担う。そしてまとめの(6)を坂本と大貫が担当する。

研究初年度である平成 25 年度には、主に(1)と(2)の研究を実施する。平成 26 年度には(3)と(4)を主に研究する。そして、平成 27 年度には(5)を中心に研究するとともに、それまでの成果をまとめ、放射性セシウムに対

する酵母の応答反応の解明ならびに微生物または生体物質を利用した放射性セシウム
の効率的な回収・除洗法の可能性を探る。

研究課題：(1)寒天培地を利用したセシウム濃集酵母株の選定

6000種類以上の酵母株を、放射性セシウムを含む寒天培地上で培養し、全ての酵母株についてその成長の度合いとセシウム濃集割合を評価する。寒天培地上での培養は既存の植物培養装置を利用する。放射能測定は原子力システム研究開発事業の際に入手したバイオイメージングアナライザーを利用する。この実験は再現性を確認しながら複数回行い、成長度合いとセシウム濃集割合から、セシウム濃集酵母株として100株前後を選定する。培養には大量の試薬を必要とする。

研究課題：(2)液体培地を利用したセシウム濃集酵母株の特定(香西)

研究課題1で100株前後に絞った酵母株を、今度は放射性セシウムを含む液体培地で培養する。液体培地での培養は既存の振とう培養装置を利用する。液体培地から酵母の菌体を遠心分離機により分離し、分離した菌体に濃集した放射性セシウムの放射能を液体シンチレーションカウンターにより測定する。この実験も再現性を確認しながら複数回行い、最終的に数株のセシウム濃集酵母株を特定する。液体シンチレーションカウンター、遠心分離機ともに既存のものを利用する。

研究課題：(3)放射性セシウム特異的発現/非発現タンパク質の特定と同定

研究課題2で特定した特異株と親株を利用して、放射性セシウム存在下で特異的に発現するまたは発現しないタンパク質を特定・同定する。

研究課題：(4)過剰カリウム特異的発現/非発現タンパク質の特定と同定(坂本)

研究課題3と同様の方法により、過剰のカリウム存在下で特異的に発現するまたは発現しないタンパク質を特定・同定する。

研究課題：(5)福島汚染土壌からの放射性セシウム濃集実験

研究課題2で特定したセシウム濃集酵母を利用して、福島汚染土壌からの放射性セシウムの濃集を試みる。

4. 研究成果

福島第一原発の周辺地域で放射性セシウムによる環境汚染が問題となっている。本研究では、微生物を利用した、福島第一原発より環境中に大量に放出された放射性セシウムの効率的な回収・除染への知見を提供することを目的とした。まず、5416種類の酵母を利用して放射性セシウムを濃集しない株を

選別した。選別方法の一例を図1に、放射性セシウムを濃集しない株の一例を表1に示す。

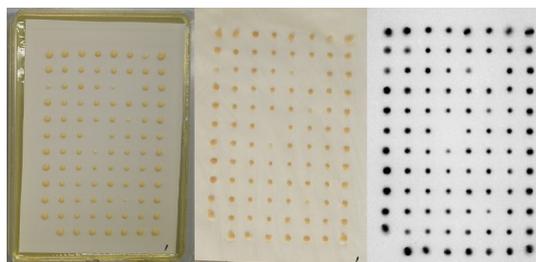


図1 ニトロセルロース膜上のコロニー (放射性セシウムを含む寒天培地にニトロセルロース膜を載せ、その上に1プレート当たり最大96株の一遺伝子欠損酵母を接種して培養した。左から順に、乾燥前のコロニー、乾燥後のコロニー、コロニーに濃集した放射性セシウムの放射線画像。60プレート存在し、1プレート当たり3回試験した。)

表1 一次選定した放射性セシウムを濃集しない酵母

plate No.	Index	平均 Bq	Bq 順	平均 Bq/mm ²	Bq/mm ² 順
No25	H-4	0.129	1	0.00851	1
No25	D-3	0.213	4	0.0169	2
No12	B-3	0.197	3	0.0186	3
No26	E-3	0.131	2	0.0208	4
No26	D-9	0.240	5	0.0306	5
No3	B-5	0.345	7	0.0348	6
No5	B-8	0.336	6	0.0357	7
No4	C-5	0.407	12	0.0408	8
No58	A-11	0.352	8	0.0432	9
No25	D-6	0.373	11	0.0442	10

最終的に放射性セシウムを濃集しない株を16種類選別した。当該酵母に欠損している遺伝子は表2の通りである。

表2 ウラン濃集割合が低い酵母に欠失している遺伝子の機能

標準名	機能区分	機能
VMA21	機能未知	機能未知 (液胞プロトン輸送 ATP 加水分解 酵素の構成要素?)
VMA16	輸送活性、触媒活性	プロトン輸送 ATP 加水分解酵素活性、循環機能
VMA13	輸送活性、触媒活性	プロトン輸送 ATP 加水分解酵素活性、循環機能
VMA6	輸送活性、触媒活性	プロトン輸送 ATP 加水分解酵素活性、循環機能
VMA2	輸送活性、触媒活性	プロトン輸送 ATP 加水分解酵素活性、循環機能

VPS29	輸送活性、触媒活性	タンパク質輸送活性に関与
VPS16	結合機能	ホスファチジルイノシトール結合に関与
PEX3	結合機能	タンパク質結合
APL2	結合機能	クラスリン結合
SWI3	結合機能	DNA 結合、ヒストン結合、転移酵素に関与
CTF4	結合機能	クロマチン結合、核酸結合
PRS2	酵素活性	リボースリン酸ジホスホキナーゼ活性に関与
CAX4	酵素活性	ドリチルニリン酸加水分解活性
KRE6	加水分解活性	グルコシド加水分解活性
YOR331C	機能未知	機能未知 違うプレートに同一の欠損遺伝子(YOR331C)があって同様に放射性セシウムを濃集しない。機能未知だが、明らかに何らかの関連性がある。
YLH47	機能未知	機能未知
VTC3	機能未知	機能未知

これらの結果から、放射性セシウムの耐性には液胞膜合成に関連する遺伝子が関係していることを明らかにした。また、酵母と、同じく微生物の一種であるきのこの菌系を利用した野外実験の結果、800 平方センチメートルの範囲で、酵母で最大 75 ベクレル、きのこで最大 86 ベクレルの Cs-137 を濃集した。今後もこの研究を進め、さらに効率的な放射性セシウム除去技術の確立に努めていく。

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 4 件)

Radioactive fallout cesium in sewage sludge ash produce after the Fukushima Daiichi nuclear accident. N. Kozai, S. Suzuki, N. Aoyagi, F. Sakamoto, T. Ohnuki, Water Research, 68, 616-626 (2015). 査読有り

Effects of CeO₂ nanoparticles on microbial metabolism. S. Masaki, H. Shiotsu, T. Ohnuki, F. Sakamoto, S. Utsunomiya, Chemical Geology, 391, 33-41 (2015). 査読有り

Effects of minerals on accumulation of Cs by fungus *Saccharomyces cerevisiae*, T.

Ohnuki, F. Sakamoto, S. Yamasaki, N. Kozai, H. Shiotsu, S. Utsunomiya, N. Watanabe, T. Kozaki, Journal of Environmental Radioactivity, 144, 127-133 (2015). 査読有り

Sorption of trivalent cerium by a mixture of microbial cells and manganese oxides: Effect of microbial cells on the oxidation of trivalent cerium, T. Ohnuki, M. Jiang, F. Sakamoto, N. Kozai, S. Yamasaki, Q. Yu, K. Tanaka, S. Utsunomiya, X. Xia, K. Yang, H. Jianhua, Geochimica et Cosmochimica Acta, 163, 1-13(2015). 査読有り

〔学会発表〕(計 11 件)

放射性セシウム存在下で発現酵母タンパク質の同定、坂本文徳、香西直文、大貫敏彦、他 1 名、第 88 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)、2015 年 12 月 1 日。

きのこの放射性セシウム濃集抑制剤の開発、大貫敏彦、坂本文徳、香西直文、原子力学会秋の大会、静岡大学(静岡県静岡市)、2015 年 9 月 10 日。

放射性セシウム濃集に関わる酵母遺伝子の探索、坂本文徳、香西直文、大貫敏彦、他 2 名、第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館(京都府京都市)、2014 年 10 月 17 日。

菌系培養期間と放射性セシウム濃集割合の関係、行川淳、坂本文徳、香西直文、大貫敏彦、他 2 名、第 18 回日本きのこ学会大会、京都大学(京都府京都市)、2014 年 9 月 12 日。

放射性セシウムを濃集する菌系を保持するゲル基材の選択、椎名和弘、坂本文徳、香西直文、大貫敏彦、他 2 名、第 18 回日本きのこ学会大会、京都大学(京都府京都市)、2014 年 9 月 12 日。

しいたけ廃菌床を利用した放射性セシウムの回収、田中健之、坂本文徳、香西直文、大貫敏彦、他 2 名、第 18 回日本きのこ学会大会、京都大学(京都府京都市)、2014 年 9 月 12 日。

きのこ菌系を利用した放射性セシウム濃集の野外実験、坂本文徳、香西直文、大貫敏彦、他 3 名、第 18 回日本きのこ学会大会、京都大学(京都府京都市)、2014 年 9 月 12 日。

きのこ廃菌床を用いた林床からの放射性セシウムの濃集、坂本文徳、大貫敏彦、熊田淳、長谷川孝則、第 51 回アイソトープ・放射線研究発表会、東京大学(東京都文京区)、2014 年 7 月 9 日。

きのこの子実体と菌糸体に濃集する放射性セシウムの比較、椎名和弘、坂本文徳、大貫敏彦、香西直文、他 3 名、第 17 回日本きのこ学会大会、広島大学(広島県広島市)、2013 年 9 月 13 日。

きのこへの放射背セシウム濃集を阻害する物質の探索、田中健之、坂本文徳、大貫敏彦、香西直文、他 3 名、第 17 回日本きのこ学会大会、広島大学(広島県広島市)、2013 年 9 月 13 日。

放射性セシウムを濃集する最適きのこ菌糸の選択、坂本文徳、大貫敏彦、香西直文、他 5 名、第 17 回日本きのこ学会大会、広島大学(広島県広島市)、2013 年 9 月 13 日。

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://asrc.jaea.go.jp/soshiki/gr/interfacial0/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 文徳 (SAKAMOTO, Fuminori)
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 先端基礎研究センター・研究員
研究者番号：60391273

(2) 研究分担者

大貫 敏彦 (OHNUKI, Toshihiko)
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 先端基礎研究

センター・研究員
研究者番号：20354904

(3) 研究分担者

香西 直文 (KOZAI, Naofumi)
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 先端基礎研究センター・研究員
研究者番号：80354877