

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 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：25420910

研究課題名(和文) 微生物の食物連鎖末端における持続的アクチノイドリン酸塩形成に関する研究

研究課題名(英文) Study on sustainable formation of actinide phosphates in microbial food chain

研究代表者

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・研究主幹

研究者番号：80354877

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)：ウラン等の重金属をリン酸塩化した酵母をゾウリムシが捕食すると、酵母細胞上の重金属リン酸塩はほとんど溶解することなく排泄され、酵母の消化残渣同士が緻密な有機物によって結合され形成される膜状沈殿物中にリン酸塩として移行した。ゾウリムシ細胞には、細胞表面の水溶性巨大糖タンパク質に重金属が結合し疑似コロイドとして細胞から溶出することで、細胞への重金属の吸着を低下させる機能があった。この糖タンパク質は水溶液中で容易に重合した。これらの結果は、ゾウリムシによって重金属イオンが疑似コロイド化することを示し、糖タンパク質の重合体が酵母消化残渣を結合して膜状沈殿物が形成された可能性も示唆する。

研究成果の概要(英文)：When Paramecium eats yeast cells on which heavy elements such as uranium were fixed as phosphate mineral, the heavy element phosphates were excreted from Paramecium, mostly undissolved, and migrated into membrane-like precipitates in which digestion residues of yeast cells were connected with each other by dense organic substances. We found that Paramecium has an ability to reduce adsorption of heavy elements on cells through the process where heavy elements are adsorbed to the soluble huge glycoproteins on Paramecium cell surfaces and subsequently the glycoproteins are dissolved into aqueous phase. These glycoproteins are easily polymerized in aqueous phase. These results show heavy elements are transformed to pseudocolloid by Paramecium and also suggest that the membrane-like precipitates may be formed with the glycoprotein binding digestion residues of yeast cells.

研究分野：放射性廃棄物地層処分

キーワード：ゾウリムシ 酵母 ウラン 食物連鎖 リン酸塩 疑似コロイド 表面タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

バクテリアや酵母などの環境微生物が、重金属イオンを細胞膜に吸着する、主に還元によって析出させる、あるいはリン酸塩として析出させる、という重金属元素固定機構は、アクチノイド等の放射性核種の環境中移行を抑制する機構として精力的に研究されている。中でも微生物が重金属をリン酸塩として細胞表面に析出させる作用は、微生物特有の反応であること、そして環境水中での溶解度が低いリン酸塩を環境水条件で析出させることから最も注目されている。しかし、その機構、つまりどのようなプロセスでリン酸塩が形成されるのかはほとんど解明されていなかった。

バクテリアや酵母等の環境微生物は生態系に生息する。つまり、それらの微生物は生態系が上位の生物により捕食される環境に生息する。重金属リン酸塩を細胞上に析出させた微生物が上位の微生物に捕食されたとき、重金属の化学状態が変化する可能性が考えられる。原生動物の食胞は弱酸性なので、食胞に入った重金属リン酸塩が溶解し細胞外に排泄されることが考えられる。しかし、そのような観点からはまったく検討されていなかった。そもそも、原生動物などの捕食微生物が環境水中の重金属元素に及ぼす作用もほとんど検討されていなかった。環境の生態系におけるそれぞれの微生物の寄与を明らかにすることが、元素移行における微生物影響の全体像を理解するために必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず微生物による重金属のリン酸塩形成機構を解明する。特に、微生物が分泌する有機物やリンの形態に着目した検討を行い検討する。

次に捕食生物として原生動物を用い、原生動物による水溶液中の重金属イオンの化学状態変化について明らかにする。さらに、微生物食物連鎖末端において、食物連鎖後の重金属の化学状態遷移機構を解明する。そのため、餌となる微生物細胞に重金属をリン酸塩として析出させ、それを原生動物が捕食・消化・排泄させることにより、重金属の化学状態がどのように変化するかを検討する。

### 3. 研究の方法

モデル微生物として酵母とゾウリムシを用いた。酵母は醸造用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。バクテリア(～1 $\mu$ m)よりも大きい(～5 $\mu$ m)ので観察しやすく、遺伝子情報が解析されている。ゾウリムシとして *Paramecium bursaria* (～200 $\mu$ m)を用いた。ゾウリムシは代表的な原生動物であり、湖沼などの淡水に生息し、バクテリアや酵母などの微生物を捕食する。培養法、遺伝的特性が最もよく研究されている原生動物である。

酵母での重金属 (Eu) のリン酸塩形成機構

については、あらかじめ培養して洗浄した酵母細胞に重金属を吸着させた後、液相を取り除き、重金属を含まない希薄な塩化ナトリウム水溶液を新たに加えた後、リン酸塩形成を観察した。細胞から分泌されるリンの化学状態を分析した。

重金属とゾウリムシの反応に関しては、重金属 (Eu, Pb, U) を含む水溶液にゾウリムシを入れ、ゾウリムシ細胞に吸着した重金属及び液相の重金属を分析した。細胞の元素分析には micro-PIXE による非破壊分析法を用いた。液相の重金属の化学状態については、サイズ排除クロマトグラフィ (SEC) によって重金属を形態別に分離したのち、クロマトグラフィからの溶出液を ICPMS に直接導入して元素分析を行った。

微生物食物連鎖における重金属の化学状態遷移機構に関しては、あらかじめ培養して洗浄した酵母細胞を重金属 (Eu, U) の水溶液に入れて重金属を細胞に吸着させた後、細胞を洗い、希薄な塩化ナトリウム水溶液に細胞を移し、数日静置することによりリン酸塩を形成させた。この酵母を餌としてゾウリムシに与えて培養した。細胞の元素分析には micro-PIXE による非破壊分析法を用いた。液相の重金属の化学状態については、SEC-ICPMS によって分析した。

### 4. 研究成果

食物連鎖の末端に位置するバクテリアや酵母等の微生物の中にはアクチノイド等の重金属をリン酸塩として析出し固定するものがある。希土類元素の場合、酵母細胞での希土類リン酸塩の析出は液相で形成したリン酸塩が細胞に付着するのではなく、一旦細胞膜に吸着した希土類元素がリン酸塩ナノ粒子として析出することがわかった。析出したリン酸塩は、微生物が無い無機条件で析出するリン酸塩とは大きさ形状ともに異なっていた。ある細胞に多数のナノ粒子が形成される一方で、まったくナノ粒子が形成されない細胞もあり、非常に不均一であった (図1)。酵母から細胞外に分泌されるリンは、タンパク質に含まれるものを除けば、有機リン、ポリリン酸イオンはなく、モノリン酸イオンであることが明らかとなった。細胞から分泌される有機物については、希土類元素の有無による差は認められなかったが、酵母に吸着あるいは析出した希土類の一部が有機物と結合して再溶解する可能性が示唆された。これらの結果を総合的に勘案すると、細胞上に不均一に分布する特定のタンパク質が重金属を吸着している可能性が考えられる。つまり、酵母細胞表面では、タンパク質が不均一に分布しており、特定のタンパク質が発現していない細胞も存在する。タンパク質に対する重金属の吸着特性はタンパク質ごとに異なると考えられる。重金属の吸着特性が高いタンパク質が細胞膜のある部分に密集して存在し、そこに重金属が選択的に吸着する。タンパク質の官能基と

重金属の結合よりも重金属とリン酸イオンの結合の方が強固であるため、リン酸塩が形成される。その結果、細胞上及び細胞間での重金属の不均一性が生じたのではないかと推察される。

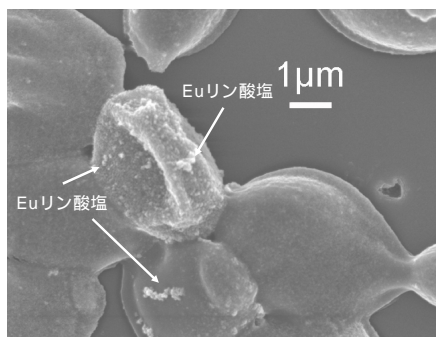


図1 酵母細胞に形成したEuリン酸塩

このようなリン酸塩析出の不均一性はウランの場合でも観察された。希土類元素の場合にはナノ粒子が細胞全体に形成し、かつその大きさはほぼ等しく、ある大きさ以上には成長しないが、ウランのリン酸塩が形成される場所が少なく、かつリン酸塩はμmサイズまで成長する(図2)。元素間のこのような違いがなぜ生じるのかは今後の課題である。

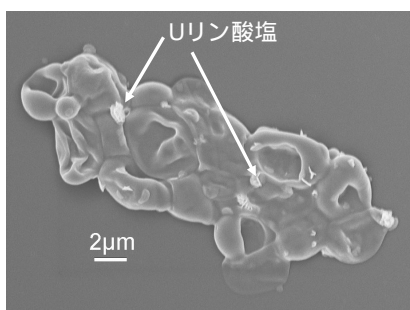


図2 酵母細胞に形成したUリン酸塩

ゾウリムシの細胞膜は、基本的にバクテリア等の細胞膜と類似の成分で構成され、細胞膜等にはウランなどの重金属を吸着するサイトが多数ある。バクテリアや酵母の細胞膜は重金属を吸着する。本研究では、ゾウリムシの生細胞には吸着を阻害する機能があることを見出した。ゾウリムシの細胞表面は、水溶性の巨大糖タンパク質(分子量約25万Da)で覆われている。この糖タンパク質は、希土類元素、鉛、ウランを結合することがわかった。この水溶性の巨大水溶性タンパク質が重金属と結合したあと溶出すると、重金属は疑似コロイドとして細胞から溶出することになる。その結果、ゾウリムシ生細胞への重金属の吸着が著しく減少し、吸着した重金属はMicro-PIXEやSEM-EDXでは検出できなかった。これに対して、細胞固定液であらかじめ固定したゾウリムシ細胞を重金属水溶液に入れると、細胞には重金属が明瞭に検出された。ゾウリムシは重金属に対する耐性が低いことが知られている。ゾウリムシ細胞表面の糖タ

ンパク質の機能はよくわかっていなかったが、生細胞の糖タンパク質に結合した重金属が糖タンパク質とともに溶出することは、この糖タンパク質が重金属から細胞を防御することを意味する(図3)。これはこの糖タンパク質が生来的に担う機能ではないかもしれないが、このような防御機能は、これまでどの微生物に関しても全く知られていない。

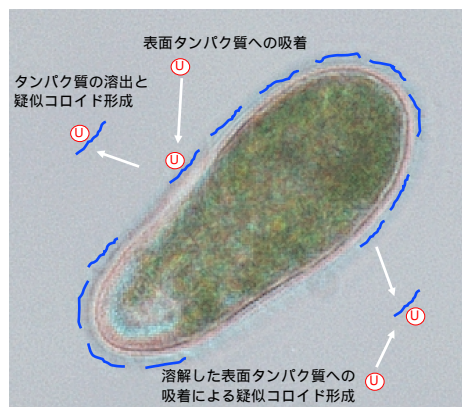


図3 ゾウリムシ細胞へのUの吸着と疑似コロイド形成

また、この糖タンパク質は、細胞密度が高い実験条件では水溶液中で容易に重合し、分子量100万以上の巨大なポリマーを形成した。この巨大なポリマーを重金属の水溶液に入れると、ポリマーに重金属が吸着した(図4)。

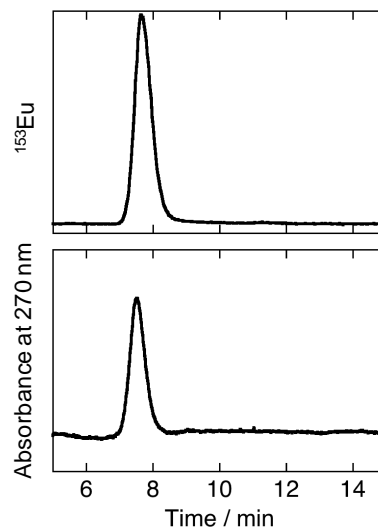


図4 溶出した糖タンパク質へのEuの吸着

ゾウリムシ細胞を水溶液に泳がせることで溶出した糖タンパク質を濃集したのち、Eu水溶液に入れた。その液相の一部をサイズ排除クロマトグラフィーで分離しながら質量分析装置(ICPMS)で元素分析した。

この結果は、溶出した糖タンパク質に重金属イオンが結合し、疑似コロイドになることを示す(図3)。原生動物によるこのような重

元素の化学状態変化機構はこれまで知られていない。

重金属リン酸塩を細胞膜上に析出させた酵母をゾウリムシが捕食したとき、酵母細胞上の重金属リン酸塩はほとんど溶解することなく排泄され、排泄物などによって形成される膜状沈殿物中に重金属リン酸塩のまま移行する（保存される）ことを見いだした。リン酸塩の形状は、酵母細胞表面にあるときとほぼ同じであった。ゾウリムシ細胞には重金属はほとんど検出されなかった。膜状沈殿物では、ゾウリムシに食べられた酵母細胞の消化残渣と重金属リン酸塩が、緻密な有機物によって結合されていた。食物連鎖中におけるこのような重金属リン酸塩の移行挙動はこれまで報告例が無く、かつ膜状沈殿物の形成とその特性について報告された論文は研究代表者らが調べた限り全くない。酵母を餌としてゾウリムシが増殖したとき、液相にはゾウリムシの細胞表面にある巨大糖タンパク質が検出された。しかし、糖タンパク質の濃度はゾウリムシの培養が進んでもほとんど変わらなかった。ゾウリムシの糖タンパク質が水溶性であることは知られているが、そのポリマーも水溶性であれば、増殖が進みゾウリムシの数が増えると、液相の糖タンパク質濃度は増加するはずである。糖タンパク質濃度が増加しなかったという事実は、糖タンパク質ポリマーが沈殿したことを示唆する。このことから、膜状沈殿物は溶解した糖タンパク質の重合体が排泄物を結合して形成された可能性が考えられる。これはもちろん一つの可能性であり、今後の詳細な検討が必要である。

本研究ではモデル微生物を用いた一つのモデル生態系での実験ではあるが、微生物由来の重金属リン酸塩が食物連鎖を経てもその形状を維持することを示唆する。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

N. Kozai, F. Sakamoto, K. Tanaka, T. Ohnuki, T. Satoh, T. Kamiya, Pseudocolloid formation of Uranium with soluble surface glycoprotein of Paramecium, Goldschmidt2016, 2016年6月29日, 横浜国際平和会議場(神奈川県横浜市).

香西直文, 坂本文徳, 大貫俊彦, 佐藤隆博, 江夏昌志, 神谷富裕, 江坂文孝, 単純な食物連鎖系における重元素の挙動, 地球化学会第62回年会, 2015年9月18日, 横浜国立大学(神奈川県横浜市)

N. Kozai, T. Ohnuki, M. Koka, T. Satoh, T. Kamiya, F. Esaka, Behavior of U(VI) in A Simple Prey (Yeast) -

Predator (Paramecium) Food Chain, Plutonium Future 2014, September 9, 2014, ラスベガス(アメリカ).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0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 0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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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・研究主幹  
研究者番号: 80354877

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: