

## 論文の内容の要旨

論文題目 微生物への金属の吸着に関する研究

氏 名 竹中 陽子

### 1. 研究の背景と目的

高レベル放射性廃棄物処分場の多くは地下 500~1000 メートルに建設が計画されている。このような地下深部にも地表付近と同様に膨大な数の微生物が存在する。そのため、地下深部での放射性核種の移行におよぼす微生物の影響は無視できないと考えられる。しかし、放射性廃棄物処分場近傍での微生物が放射性核種の地層中での挙動に与える影響はほとんど解明されていない。微生物と放射性核種との相互作用に関する基礎的知見を得ることは、環境中での放射性核種の挙動を正確に評価するために重要である。本研究では、放射性廃棄物に含まれる元素のうち Am(III), Cm(III) およびそれと類似した化学的性質を有する Eu(III) の微生物細胞への吸着におけるイオン強度, pH および金属濃度の影響を解析し、さらに基本的細胞表層特性と元素の吸着挙動との関連を解明することを目的とする。

まず、イオン強度が金属の吸着に及ぼす影響について検討した。各国の地層処分予定地の中には岩塩層が複数含まれている。例えば米国の廃棄物隔離パイロットプラント WIPP (The Waste Isolation Pilot Plant) の地下 650m の岩塩層からも好塩性微生物が見つかったという報告がある。また日本における地層処分に当たっても、海水などによるイオン強度の影響を考慮する必要がある。こうしたイオン強度が高い環境、あるいはイオン強度が変化しやすい環境において、微生物が放射性核種の移行に及ぼす影響を調べる必要がある。本研究では地下環境中での重金属の地層中移行に関する基礎的知見を得るため、Curium-244 および Europium-152 の好塩菌 *Halomonas elongata* に対する吸着挙動について、幅広いイオン強度で実験を行った後、吸着メカニズムの解明に向けて主に分子生物学的手法による研究を行った。

次に、pH および金属濃度が金属の吸着に及ぼす影響を検討した。本研究ではグラム陰性の土壌細菌 *Pseudomonas fluorescens* Migula (ATCC 55241) への Am(III), Eu(III), Ca(II), および Cu(II) について、バッチ法により、異なるイオン強度, pH, および金属濃度での微生物への吸着測定、ならびに吸着メカニズムの解明に向けて主に化学的手法による研究を行った。

### 2. イオン強度の影響

高度好塩性微生物の一種である *Halomonas* 属は海洋中や地層中等、地球上で広くみられる極めて一般的な微生物である。また、アメリカの WIPP (Waste Isolation Pilot Plant) など高レベル放射性廃棄物処分場のある地層からも *Halomonas* 属が単離されている。本研究で用いた *Halomonas elongata* は 0.1~5.2 M NaCl という幅広いイオン強度範囲に適応でき、急激な浸透

圧変化にも強い耐性を示す。また嫌気的環境下でも生育できるため、無酸素状態が予想される深部地下環境でも生育が可能である。微生物への金属吸着におけるイオン強度の影響を調べるために、微生物細胞への<sup>244</sup>Cm(III)および<sup>152</sup>Eu(III)吸着実験による分配係数測定、溶媒抽出法による細胞表層の疎水性測定、酸塩基滴定法による細胞表層の官能基発現状況解析、電気泳動法による細胞表層高分子発現状況解析（リポ多糖、糖タンパク質、総タンパク質）、PCR 法等による細胞表層特性の変化をもたらす浸透圧ストレス応答遺伝子の存在確認、を行った。

細胞への Cm(III)および Eu(III)の吸着実験の結果、*Halomonas elongata* は吸着溶液中の NaCl 濃度（生育溶液と同じ）によらず、Cm(III)と Eu(III)への高い親和性を示し、また 2.6 M より高い NaCl 濃度で生育した細胞への Cm(III)と Eu(III)の分配には大きな差が見られるという結果が得られた。

疎水性測定の結果、高い NaCl 濃度溶液中で生育した細胞ほど高い親水性を示し、親水性の度合いの増大は水和金属イオンとの相互作用の増加につながると考えられ、このことが吸着溶液中のイオン強度の増大にもかかわらず Cm(III)および Eu(III)の分配係数が低下しない原因の一つであると推測された。*Halomonas elongata* は、水の活量の小さい高イオン強度下でも生存に必要な水およびイオン性分子を得るために、細胞表層の構造を変化させ環境に適応する機構を有すると示唆された。

酸塩基滴定法による細胞表層の官能基発現状況解析結果から、細胞上にはカルボキシル基、リン酸基、アミノ基が存在すると示唆された。またスルホヒドリル基が存在する可能性もある。高い NaCl 濃度下（5.1 M）で生育した細胞では、pKa 値 7 付近〔リン酸基（およびスルホヒドリル基）〕の官能基が多く発現することが示された。

電気泳動法による細胞表層高分子発現状況解析の結果から、細胞表層のリポ多糖は、細胞生育溶液中のイオン強度により発現量が変化することがわかった。とくに分子量 50 kDa 付近のリポ多糖の発現量に特に大きなイオン強度依存性がみられ、Cm(III) および Eu(III)の分配係数の差および生育溶液中の NaCl 濃度と正の相関がみられた。また細胞表層糖タンパク質の解析結果から、細胞生育溶液中のイオン強度により発現量に変化が見られ、Cm(III)と Eu(III)の分配率の差と 40 kDa の糖タンパク質の発現の間に正の相関が見られた。リポ多糖およびタンパク質電気泳動の結果より、Cm(III)および Eu(III)の主要な吸着部位は糖鎖であることが示唆された。

PCR 法他による細胞表層特性の変化をもたらす浸透圧ストレス応答遺伝子の存在確認の結果、浸透圧ストレス応答遺伝子として知られる RpoS 遺伝子が *Halomonas* にも存在することが確認され、さらに RpoS 遺伝子の部分配列を解読した。イオン強度の違いによる細胞表層の変化は、浸透圧ストレス応答タンパク質の発現量変化によるものと考えられ、RpoS 遺伝子が表層特性の変化において重要な役割を果たしている可能性が高い。

### 3. pH および金属濃度の影響

土壌細菌 *Pseudomonas* 属は広範な環境に見出され、高レベル放射性廃棄物処分場の地層からも単離されている。本研究ではグラム陰性の土壌細菌 *Pseudomonas fluorescens* Migula を用いて、微生物への金属吸着におけるイオン強度、pH、および金属濃度の影響を調べるために、バッチ法

による細胞への Eu(III), Ca(II), Cu(II), および Am(III)の吸着実験, 細胞漏出有機物の TOC (全有機体炭素) 測定, 酸塩基滴定, ATR (全反射測定) 法による細胞への金属の吸着状態の解析を行った。

細胞への Eu(III), Ca(II), Cu(II), および Am(III)の吸着実験では, Ca(II)をのぞいてイオン濃度が上昇するにつれて吸着量が増大した。また, Eu(III)の *P. fluorescens* への吸着量は平衡 Eu(III)濃度が増加するにしたがい増加すること, および Eu(III)濃度の低い領域ではすべての塩濃度で pH の減少に従って Eu(III)の吸着量が増加する pH 依存性があるという結果が得られた。また, 吸着等温線の傾向にイオン強度依存性はみられなかった。この結果は, pH 変化により Eu(III)への高い親和性を有する構造が生じたか, pH に依存した何らかの競合的なプロセスが存在することを示唆している。TOC による漏出有機物の測定結果から, 本研究で観察された低濃度の Eu(III)の吸着における pH 依存性は, 細胞からの漏出有機物の影響ではなく, 細胞表面そのものと Eu(III)との相互作用によってもたらされる可能性が高いことがわかった。また, この pH 依存性については細胞表面の官能基の中でもカルボキシル基が果たす役割が大きいことも示唆された。

#### 4. 結論

微生物細胞への金属の吸着に及ぼすイオン強度, pH および金属濃度の影響を解明するために本研究で実施した研究についての結論は次のようにまとめられる。イオン強度の変化により *Halomonas elongata* の細胞表層の特性 (疎水性, 官能基発現, 高分子発現) は大きく変化し, この変化がアクチニド・ランタニドの吸着挙動に影響すると考えられる。また, 特定の分子量の糖鎖の発現量と Cm(III)・Eu(III)の分配の差に正の相関がみられた。*Halomonas* の細胞表層の糖鎖上の吸着構造が Cm(III)と Eu(III)との親和性の差をもたらすと考えることができる。3 価の f-元素の環境中挙動で, *Halomonas elongata* はランタニドよりアクチニドに大きな影響を与える可能性がある。またイオン強度の変化に応じて膜構造を変化させる遺伝子およびタンパク質を特定すれば, *Halomonas* への Cm(III)および Eu(III)の吸着・分離能を遺伝子工学的手法を用いて制御しうると考える。

*Pseudomonas fluorescens* における Eu(III) の吸着等温線は pH 依存的傾向を示したが, Eu(III)の吸着等温線において, イオン強度依存性は無かった。環境中での金属濃度が一定値以下の場合, 微生物と金属との吸着挙動は変化する可能性がある。