

セシウムを取り込む膜小胞包埋ゲルを用いたセシウム回収技術の確立

東洋大学 生命科学部 教授

伊藤 政博

1. はじめに

福島第一原発事故から13年が経過し、現在も増え続ける大量の汚染水から放射性核種を取り除いた「処理水」の海洋放出が話題となっている。2023年には、国際原子力機関（IAEA）が処理水の安全性に関する評価を行い、一定の基準を満たしていると報告したが、それでもなお多くの議論を引き起こしている。しかし、貯蔵されている「処理水」の70%以上は、「処理途上水」と分類され、放射性ストロンチウム（Sr）などの放射性核種が海洋放出基準値以下まで除去されておらず、再度の放射性核種除去処理を行わなければならないという問題がある⁽¹⁾。このように現在でも放射性核種（特にSrやセシウム（Cs））のより効果的で安価な除去技術が求められている。

微生物を利用した環境浄化技術は、安価で環境負荷を低く抑えられる技術として知られている⁽²⁾。¹³⁷Csの半減期は30年と長く、長期間の環境汚染が問題視されています。また、Csはカリウム（K）と物理化学的性質が似通っており、人体においてKと同じように全身に拡散する⁽³⁾。さらに、細菌においてCs⁺は細胞内にK⁺の取り込み系を介して取り込まれますが、Cs⁺の排出系は存在せず、細胞内にCs⁺が蓄積していくため、Cs⁺は細菌に対して毒性を示す⁽⁴⁾。しかし、当研究室においてハエトリグモの磨砕物から1200 mM CsCl存在下でも生育可能な高濃度セシウム耐性菌である*Microbacterium* sp. TS-1株が分離された⁽⁵⁾。TS-1株はH⁺を細胞内へ取り込み、Cs⁺を排出することが可能なCs⁺/H⁺アンチポーター（CshA）を保有していた。

本研究では、このCshAを活用し、Csを汚染物質から回収するためのシステムを構築することを目的としている。具体的には、CshA遺伝子を大腸菌で発現させて、そこから反転膜小胞を調製し、このCs⁺を取り込む反転膜小胞をアルギン酸ゲル内に包接することにより回収技術の試験を行うことを目的とした。

2. 実験方法

本実験では、実用化を目指した簡便な膜小胞回収システムの開発を行った。このシステムは、CshA酵素を含む反転膜小胞が多量のCs⁺を環境から回収・濃縮する技術として重要である（図1）。実用化のためには、より効率的な膜小胞回収システムが必要である。しかし、反転膜状態での回収には超遠心分離機が必要であり、これは実用化には不向きと考えた。そこで、CshA酵素を発現させた大腸菌反転膜小胞をゲル化剤であるアルギン酸カルシウムを用いて直径2ミリメートル程度の球状ゲル内に閉じ込め、球状ゲル化合物としてCs⁺回収処理方法を検討した（図2）。実験には、TS-1株が保有するCshAを大腸菌Mach1株に形質転換する過程で得られた高濃度Cs耐性大腸菌ZX1株を使用した。

反転膜小胞について

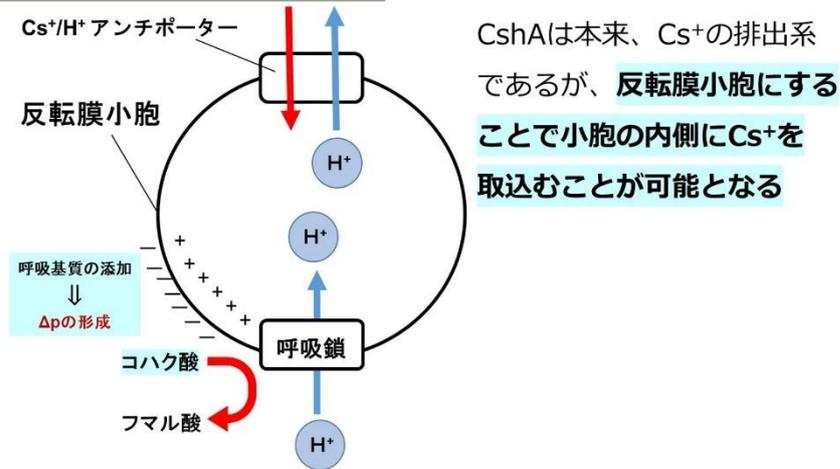


図1. CshA を発現した反転膜小胞の概要図

研究のコンセプト

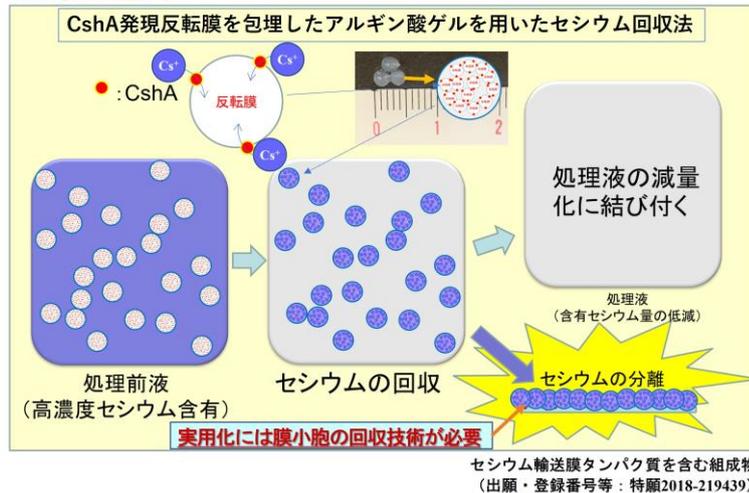


図2. 球状アルギン酸ゲルを用いたセシウム回収法の概要図

まず、CshA 酵素を発現させた膜小胞を埋包したアルギン酸カルシウムの球状ゲル化物の作成に関する条件検討を行い、条件検討の結果、混合比率の最適条件を決定した。

ZX1 株の反転膜小胞をアルギン酸球状ゲルに包埋するための条件について検討し、アルギン酸 Na と反転膜の混合比、アルギン酸 Na 溶液の濃度と滴下量を変えて、最適な作製条件を導き出した。アルギン酸 Na 混合液 (1.3%、1.95%) を超音波洗浄機で空気を除去し、それぞれ反転膜と混合した。混合液をハミルトンシリンジで塩化カルシウム混合液に滴下し、アルギン酸球状ゲルを作製した (図2)。条件検討の結果、アルギン酸 Na 混合液の濃度は 1.95%、反転膜との混合比は 5:1、滴下量は 20 μ l が最適であることが確認された。最終的に、これらの条件を基にして、CshA を発現させた反転膜を含有したアルギン酸球状ゲルを用いて Cs⁺ の回収能力を測定した。測定結果から、反転膜の量が少ないために Cs 回収能力が低下する可能性が示唆された。

次に、ZX-1 株をフレンチプレス機（Glen mills 社）による高圧細胞破碎によって反転膜小胞を調製した。作製した反転膜小胞は、二重管ノズルを用いて 1%アルギン酸ナトリウム水溶液で包み込む形で 100 mM 塩化カルシウム水溶液に滴下することにより球状ゲルにした（図 3）。



図 3. 二重管ノズルを用いた反転膜包埋アルギン酸ゲル作成装置とその概略図

球状ゲルは 15 ml 遠心チューブに各 20 個ずつ分取し、30 mM CsCl および 2.5 mM コハク酸を含む 30 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.5) 混合液に 3 ml ずつ分注しました。混合液を添加後、1 時間振盪し、混合液上清を回収しました。炎光光度計（BWB Technologies 社）を用いて混合液上清の Cs⁺濃度を測定した。さらに、CshA 酵素を発現させた膜小胞を埋包したアルギン酸カルシウムの球状ゲル化物の作成に関する条件検討を行い、試行錯誤の結果、混合比率の最適条件を決定した。

3. 結果・考察

3-1. 反転膜小胞による Cs⁺回収

ZX1 反転膜小胞による Cs⁺回収実験では、CshA を保有する大腸菌 ZX1 株の反転膜小胞において Cs⁺の取込みが確認された（図 4）。

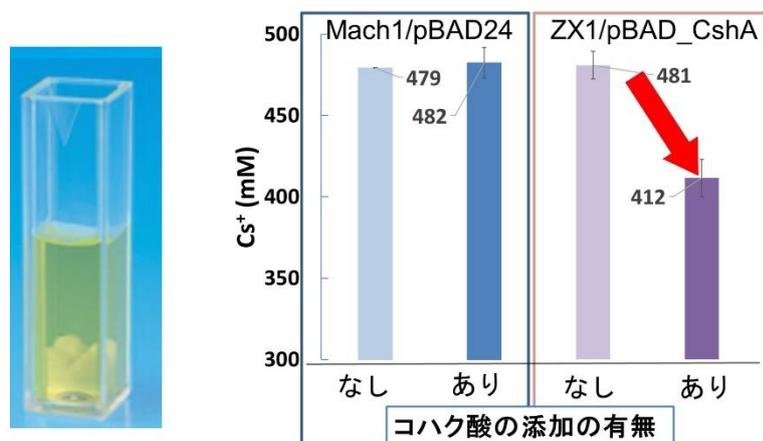


図 4. ZX1 反転膜小胞による Cs⁺回収後の上清中の Cs⁺濃度

しかし、膜小胞を回収するためには、超遠心分離を行う必要があり、大量の反転膜小胞の回収には不向きであった。

3-2. ZX-1 反転膜小胞混合型アルギン酸球状ゲルによる Cs⁺回収

そこで、アルギン酸ゲルに反転膜小胞を混合することで回収効率が上昇するかを検討した。その結果、反転膜小胞をアルギン酸に混合して作製したゲルによる Cs⁺回収後の上清中の Cs⁺濃度の測定を行った結果、反転膜小胞混合型アルギン酸ゲルでは選択的な Cs の取込みが確認されなかった (図 5)。この原因として、直接アルギン酸と混合したことで基質の反応の場がなくなるなどの悪影響が考えられた。

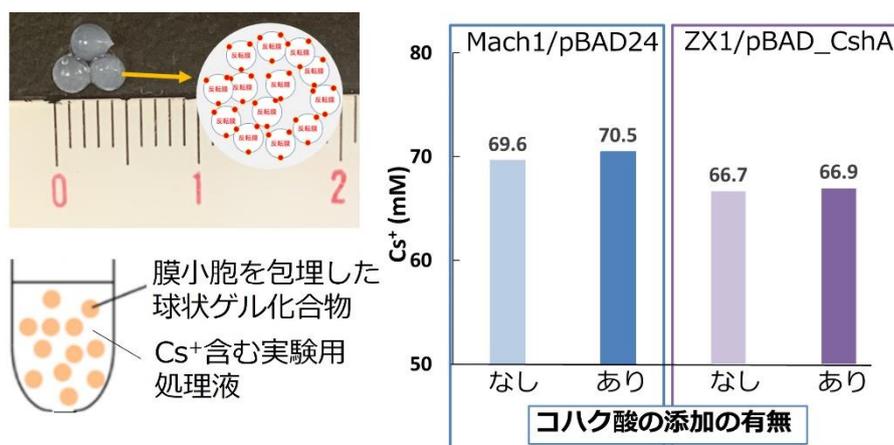


図 5. 反転膜小胞とアルギン酸を混合したゲルによる Cs⁺回収後の上清中の Cs⁺濃度

3-3. 反転膜小胞包埋型アルギン酸球状ゲルによる Cs⁺回収

そこで、二重管ノズルを用いてアルギン酸ゲルに反転膜小胞を包埋することで回収効率が上昇するかを検討した。その結果、包埋型でアルギン酸ゲルを作製することで Cs⁺の回収が確認された (図 6)。しかし、最も回収率が高かった 60 mM Cs⁺存在下での 40 mg/ml タンパク量濃度の反転膜包埋ゲルにおいても 5.35% の回収率であった。

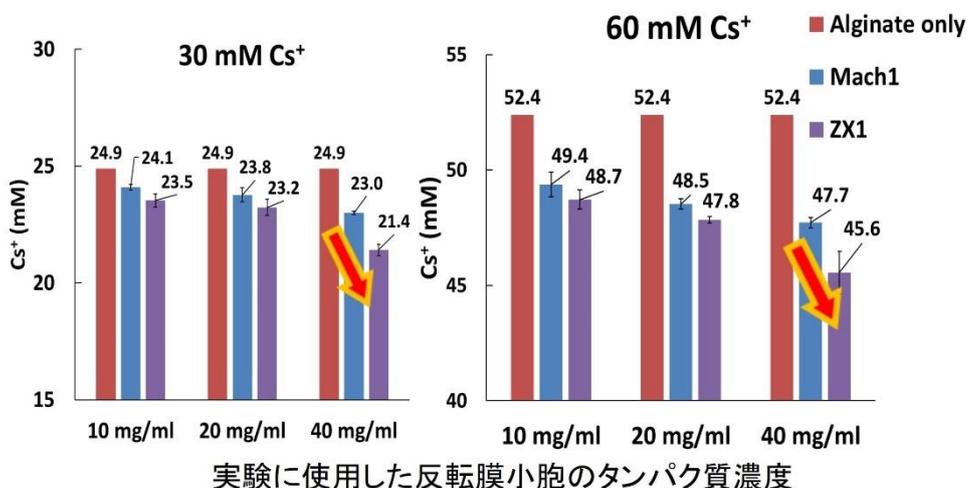


図 6. 反転膜小胞包埋アルギン酸ゲルによる Cs⁺回収後上清の Cs⁺濃度

この低回収率になってしまった原因として、大腸菌由来の Cs^+ 取り込みに関与する K^+ 取り込み系 Kup が反転膜になっている状態で Cs^+ 排出に関与している可能性が推察された。

大腸菌の Cs^+ に対する毒性は、次のように説明されている (図 7) ⁽⁶⁾。すなわち、① Cs^+ は、その化学的性質が K^+ と類似しているため、 Cs^+ の細胞内への流入に K^+ 取り込み系 Kup が関与している。② 大腸菌には、 K^+ 排出システム (K^+/H^+ アンチポーター) は存在するが、 Cs^+ 排出システムがないために細胞内 Cs^+ 濃度が上昇し、細胞内 K^+ 濃度が低下していく。③ 結果として、細胞内 K^+ 濃度の低下により、大腸菌の生育が阻害される。

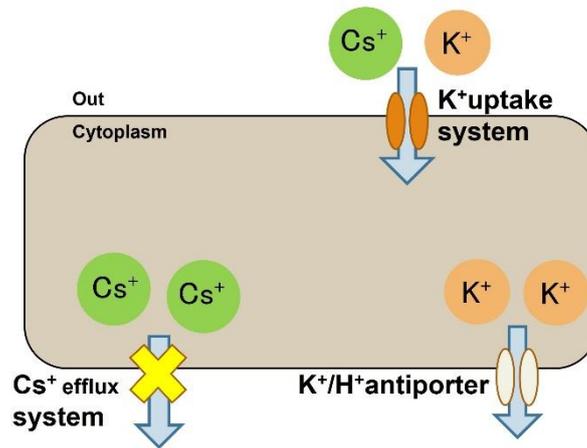


図 7. 大腸菌における Cs^+ の毒性に関係する輸送系の概要図

つまり、TS-1 株由来の CshA (Cs^+/H^+ アンチポーター) によって膜小胞内に蓄積した Cs^+ がある程度の濃度に達すると大腸菌由来の Kup タンパク質を介して Cs^+ が膜小胞外に排出されてしまっているため、 Cs^+ 回収率が上がらないのではないかと推察している。これを検証するため、現在、ZX-1 株の染色体上から kup 遺伝子を欠損させた株の構築を試みている。

4. まとめ

本研究では、以下の 3 つのことを明らかにした。すなわち、

- ① CshA を保有する大腸菌 ZX1 株の反転膜小胞により Cs^+ の取込みが確認された。
- ② より効率的な反転膜小胞の回収のため、反転膜小胞とアルギン酸を混合し、球状ゲルを作製したが、選択的な Cs^+ 取込みは確認されなかった。
- ③ 一方で、反転膜小胞の回収方法として、改良型である反転膜小胞包埋型アルギン酸球状ゲルが有用であることが示された。

5. 将来の展望

今後の研究では、 Cs^+ のより効率的な回収方法を確立するために以下の方向性を検討していく。まず、現行のアルギン酸球状ゲルを改良し、膜小胞の埋包技術をさらに高めることが重要である。また、ZX-1 株の染色体上から kup 遺伝子を欠損させた株の構築を進め、この欠損株

を用いてアルギン酸ゲル包埋反転膜小胞の Cs⁺回収能力を再評価する予定である。これにより、Cs⁺の取り込みと排出のメカニズムを解明し、回収効率の向上を目指す。

さらに、実用化に向けたスケールアップ実験や、他の放射性核種の同時回収能力の評価も進めていく。将来的には、本技術を用いた現場での実証実験を行い、福島第一原発事故後の環境浄化や、他の放射性物質が存在する環境における汚染除去技術としての実用化を目指す。このように、持続可能な環境保護に貢献する技術の開発を通じて、社会への貢献を果たしていくことを目指す。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所 2023 年度研究助成金から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) 東京電力処理水ポータルサイト
<https://www.tepco.co.jp/decommission/progress/watertreatment/alps01/>
- 2) Lopez-Fernandez, M., Jroundi, F., Ruiz-Fresneda, M., Merroun, M. (2021) Microbial interaction with and tolerance of radionuclides: underlying mechanisms and biotechnological applications. *Microbial Biotechnol.* **14**: 810-828
- 3) Melnikov P., Zanoni L.Z. (2009) Clinical effects of cesium intake. *Biol Trace Elem Res.* **135**:1-9.
- 4) Avery, S.V. (1995) Caesium accumulation by microorganisms: uptake mechanisms, cation competition, compartmentalization, and toxicity. *J. Ind. Microbiol.* **14**:76-84.
- 5) Koretsune, T. et al., (2022) Novel cesium resistance mechanism of alkaliphilic bacterium isolated from jumping spider ground extract. *Front Microbiol.* **13**: Article number 841821.
- 6) Bossemeyer, D., A. Schlosser, E.P. Bakker (1989) Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺ uptake system. *J. Bacteriol.* **171**:2219-2221.