

Biosorption of Heavy Metal Elements such as Uranium by Microorganisms and Its Effect on Hydroxy Radical Generation

journal or publication title	磁気共鳴と医学
volume	11
page range	25-28
year	2000
URL	http://hdl.handle.net/10458/996

微生物によるウランなどの重金属元素の生物吸着とそのヒドロキシラジカル発生に及ぼす影響

中島暉^{*1)}, 植田勇人^{*2)}, 横山秀克^{*3)}, 大矢博昭^{*3)}, 鎌田仁^{*3)}

^{*1)} 宮崎医科大学化学, ^{*2)} 宮崎医科大学精神医学,
^{*3)} 山形テクノポリス生物ラジカル研究所

Biosorption of Heavy Metal Elements such as Uranium
by Microorganisms and Its Effect on Hydroxy Radical Generation

Akira Nakajima¹⁾, Yuto Ueda²⁾, Hidekatsu Yokoyama³⁾,
Hiroaki Ohya-Nishiguchi³⁾, Hitoshi Kamada³⁾

¹⁾ Department of Chemistry, ²⁾ Department of Psychiatry, Miyazaki Medical College,
Kiyotake, Miyazaki 889-1692; ³⁾ Institute for Life Support
Technology, Yamagata Technopolis Foundation, Yamagata 990-2473

The effect of uranium biosorption on the hydroxy radical generation in UO_2^{2+} - H_2O_2 system were investigated. The amounts of uranium adsorbed by bacterial cells are differed with different species of bacteria, and *Arthrobacter nicotianae* has the highest ability to adsorb uranium among bacteria tested. ESR signal having four lines (intensity ratio, 1:2:2:1) is observed in UO_2^{2+} - H_2O_2 system. Its g-value and hyperfine constants were estimated to be $g = 2.0066$, $a_N = 1.49$ mT and $a_H = 1.49$ mT by the computer simulation, and the signal was identified to DMPO-OH. The ESR signal intensity of DMPO-OH in UO_2^{2+} - H_2O_2 system increases as the time passing, which is quite different from Fe^{2+} - H_2O_2 , VO^{2+} - H_2O_2 , and Cu^{2+} - H_2O_2 systems. Three steps of reactions were assumed for the hydroxy radical generation; (1) reduction of UO_2^{2+} to UO_2^+ by H_2O_2 , (2) disproportionation of resulting UO_2^+ to UO^{2+} and UO_2^{2+} , (3) oxidation of resulting UO^{2+} to UO_2^{2+} by H_2O_2 and generation of hydroxy radical. When bacterial cells are added to the reaction mixture, ESR signal intensity of DMPO-OH decreases. Egg albumin also indicates similar suppression effect. Two possible mechanisms were proposed to these results; (1) hydroxy radical was eliminated by the antioxidant action of microbial cells, and then DMPO-OH decreases. (2) microbial cells strongly couples with uranyl ion, which suppresses the uranyl ion reduction by H_2O_2 , and then DMPO-OH decreases.

uranium biosorption, hydroxy radical elimination, spin trapping

緒言

微生物のなかには、重金属元素を多量に集積する能力を持つものが存在する。著者らは、生物体の能力を活用する環境制御・資源リサイクル化の視点から、微生物による重金属集積機構の解析を行っている。これまでの研究で、微生物による重金属元素の集積は、代謝を通して行われるのではなく、細胞表面への物理化学的吸着（生物吸着 Biosorption）であることを認めている^{1,2)}。これは、生物体が重金属毒性を回避する方法の一つと考えられる³⁾。一方、Hamilton らは、ウラニルイオン (UO_2^{2+}) は、過酸化水素存在下で、ヒドロキシラジカルを発生することを報告している⁴⁾。これは、ウランが放射性であるという特性以外に、更に危険な側面をもっていることを示唆している。ヒドロキシラジカルが微生物に及ぼす効果についての報告はあるが、微生物がヒドロキシラジカル発生に及ぼす影響についての報告はない⁵⁾。本研究では、微生物と重金属元素との相互作用の解析、重金属吸着素材としての微生物のマイクロキャラクター化の確立の視点から、ウラン-過酸化水素系でのヒドロキシラジカル発生に及ぼす細菌菌体の影響、とりわけ、細菌によるウラン生物吸着との関係について検討した。

実験方法

1. 細菌の培養：東京大学分子細胞生物学研究所 IAM カルチャーコレクションより分譲された細菌菌株を 3 日間培養後、遠心分離法で集菌し、後の実験に用いた（使用培地：肉エキス 3 g/l、ペプトン 5 g/l、塩化ナトリウム 5 g/l）。
2. 試薬：硝酸ウラニルはメルク製、硫酸銅、硫酸鉄、塩化バナジウムは、半井テスク製、5, 5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) は同仁化学製を用いた。
3. ウラン吸着実験：前培養した細菌菌体 15mg（乾重量として）を 50mM のウランを含む溶液 (pH 3.5) 100 ml に懸濁し、ウランを吸着させた。遠心集菌後、残液中のウラン濃度を ICP 法により測定し、菌体中のウラン量を算出した。
4. ESR 計測：ウラン (1 mM) を含む生理食塩水に細菌菌体を懸濁し、過酸化水素 (25mM) を加えて、生成するヒドロキシラジカルを DMPO (25mM) でトラップし、生じたスピンアダクト (DMPO-OH) を日本電子製 JEOL JES-TE100 ESR スペクトロメーターで計測した（測定条件：共鳴周波数 9.43GHz, 磁場 334.5mT, 磁場掃引幅 \pm 5mT, 磁場変調周波数 100kHz, 磁場変調幅 0.1 mT, マイクロ波出力 8mW）。

表 1. 細菌によるウラン吸着

菌種	グラム性	ウラン吸着量 (?mol/g)	
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	IAM 12342	+	289
<i>Bacillus subtilis</i>	IAM 1026	+	220
<i>Citrobacter freundii</i>	IAM 12471	-	71
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	IAM 12435	+	25
<i>Escherichia coli</i>	IAM 1268	-	74
<i>Micrococcus luteus</i>	IAM 1056	+	163
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	IAM 12097	-	143
<i>Zooglea ramigera</i>	IAM 12136	-	209

Fifteen milligrams of microbial cells (dry weight basis) were suspended in a solution (pH 3.5) containing 50 ?M of uranium.

結果・考察

まず、種々の細菌について、ウラン吸着能を調べたところ、表 1 に示したように、菌種の違いによってウラン吸着能が異なっており、なかでも *Arthrobacter nicotianae*, *Bacillus subtilis*, *Zooglea ramigera* などの菌種が優れたウラン吸着能を持つことがわかった。すなわち、これらの細菌は、ウランと強く結合するものと考えられる。

次に、 UO_2^{2+} - H_2O_2 系でのヒドロキシラジカル発生特性を調べた。 UO_2^{2+} (1mM) を含む生理食塩水に過酸化水素 (25mM)、DMPO (25mM) を加えると、時間とともに、1:2:2:1 の強度を持つ 4 本線シグナルが増加してくる。このシグナルは、 $a_N = 1.49 \text{ mT}$, $a_H = 1.49 \text{ mT}$, $g = 2.0066$ の値を示し、DMPO-OH ラジカルと同定された。また、エタノールを共存させると、協奏反応が起こり、DMPO-OH と同時に、DMPO-OEt が生成することから、ヒドロキシラジカル

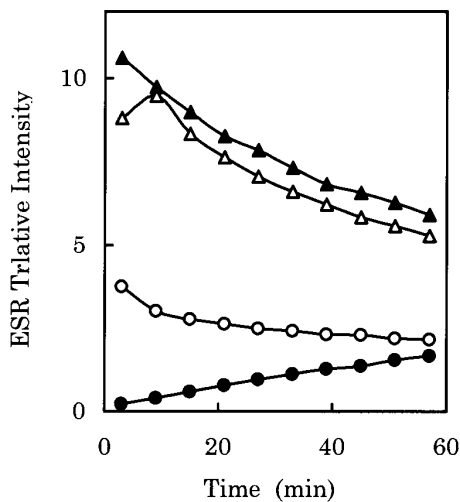
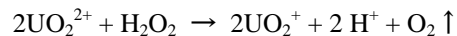


Fig. 1. ESR signal intensity of DMPO-OH in Metal- H_2O_2 systems.

Metal ion (1mM), DMPO (25mM) and H_2O_2 (25mM) were mixed. ●: U(VI), ○: Cu(II), ▲: Fe(II), △: V(IV)

のスピニアダクトであることが示された。過酸化水素が金属イオンより過剰に存在すると、 Cu^{2+} - H_2O_2 系、 Fe^{2+} - H_2O_2 系、 VO_2^+ - H_2O_2 系では、スピニアダクトの ESR 信号強度は時間とともに減少するが、 UO_2^{2+} - H_2O_2 系では増加することが認められた(図 1)。 UO_2^{2+} - H_2O_2 系では、次のような反応が起こっていると考えられる。

1. 還元反応



2. 不均化反応



3. Fenton 型反応



過酸化水素により UO_2^{2+} の還元反応が進行し、 UO^{2+} が生成して、 $\cdot\text{OH}$ の発生を促す。また、反応中に生成する UO_2^+ 、 UO^{2+} は、ともに最初の UO_2^{2+} に戻るため、過酸化水素が過剰に存在すると、絶えず $\cdot\text{OH}$ が発生することになる。また、 Fe^{2+} - H_2O_2 系では、生成した Fe^{3+} イオンが、スピニアダクト (DMPO-OH) と反応し、このラジカルを消去することが知られている⁶⁾。 Fe^{2+} - H_2O_2 、 VO_2^+ - H_2O_2 系では、このような反応により DMPO-OH のシグナルが急速に減衰するものと考えられる。一方、 UO_2^{2+} 系では、DMPO-OH のシグナルの減衰が見られないことから、上記のような作用が無いと考えられる。

次に、 UO_2^{2+} - H_2O_2 系にウラン吸着能を持つ細菌菌体を共存させ、ESR を測定したところ、DMPO-OH のシグナル強度が減少することがわかった(図 2)。また、この効果は、細菌の種類によって異なることも明らかになった。同様な減少効果は、EDTA、卵製アルブミンなど UO_2^{2+} と結合しやすい物質を共存させた場合にも見いだされた。これらの結果は、次の 2 つの可能性を示唆している。(1) 細菌菌体、EDTA、卵製アルブミンなどの物質が、抗酸化能を持ち、 UO_2^{2+} - H_2O_2 系において生成したヒドロキシラジカルを消滅させる。その結果として、DMPO-OH のシグナル強度が減衰する。(2) 細菌菌体、EDTA、卵製アルブミンなどの物質が、ウラニルイオンと強く結合することにより、U(VI) が安定となる。このため、

ヒドロキシラジカル発生の初期過程である過酸化水素によるウラニルイオンの還元が行われず、ヒドロキシラジカル発生が抑制される。その結果として、DMPO-OHのシグナル強度が減衰する。これらのいずれか、または、両方の効果がおこっているものと考えられる。

ちなみに、実験に用いた8種類の細菌について、ウラン吸着量とDMPO-OHのID₅₀ (mg/l) 概算値との関係をプロットしてみたが、明確な相関は得られなかった (図3)。今後、これらの効果について、より詳細な解析を行い、微生物と重金属元素との相互作用の解析、重金属吸着素材としての微生物のマイクロキャラクタリゼーション確立の一助としたいと考えている。

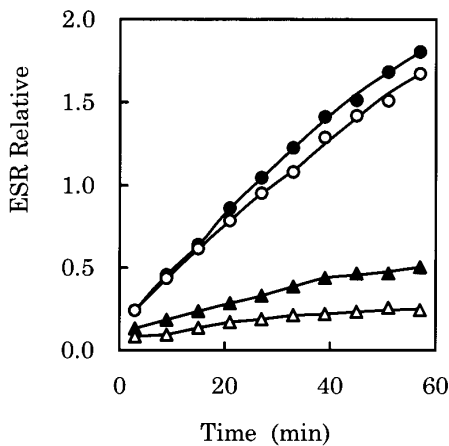


Figure 2. Effect of *Arthrobacter* cells on ESR signal intensity of DMPO-OH in UO_2^{2+} - H_2O_2 system.

Desired amounts of microbial cells were suspended in UO_2^{2+} -DMPO- H_2O_2 solution. ●: 0 mg/l, ○: 62.5 mg/l, ▲: 125 mg/l, △: 250 mg/l.

文献

1. Horikoshi, T., Nakajima, A., Sakaguchi, T. (1982) Eur. J. Appl. Microbiol. Bio-technol., 12 : 90-96.
2. Nakajima, A., Sakaguchi, T. (1990) Appl. Microbiol. Biotechnol., 24 : 59-64.
3. コーワン (小林宏、鈴木春男 監訳) 無機生化学、化学同人 第8章.
4. Hamilton, M. M., Ejniak, J. W., Carmichael, A. J. (1997) J. Chem. Soc., Perkin Transac., 2 : 2491-2494.
5. Pedahzur, R., Lev, O., Fattal, B., Shuval, H. I. (1995) Water Science Technology, 31 : 123-129.
6. Mizuta, Y., Masumizu, T., Kohno, M., Mori, A., Packer, L. (1997) Biochem. Molec. Biol. Int., 43 : 1107-1120.

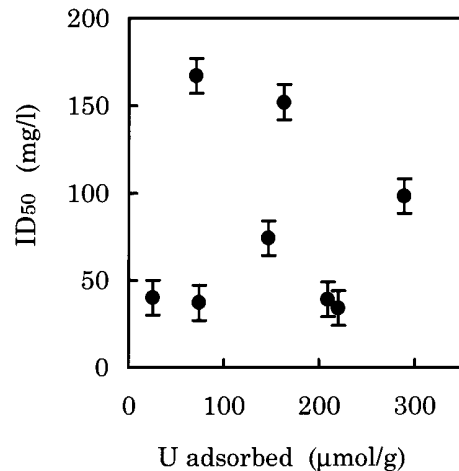


Figure 3. Relationship between U adsorbed by bacterial cells and ID₅₀ of DMPO-OH.