

原子力システム研究開発事業 ー基礎研究開発分野ー
若手対象型 事後評価総合所見公表用フォーマット

<p>研究開発課題名（研究機関名） FBR燃料再処理のためのタンパク質機能付加SAMの創生（日本原子力研究開発機構）</p> <p>研究開発担当者 機関名：独立行政法人日本原子力研究開発機構 総括代表者 坂本 文徳</p> <p>研究期間及び予算額 平成17年度～平成19年度（3年計画）81,203千円</p>	
項目	要 約
<p>1. 当初の目的・目標</p>	<p>エネルギー資源が非常に少ない日本におけるエネルギー需要に応えるため、原子力発電の稼働に伴い発生する使用済燃料を再処理して高速増殖炉の燃料として使用することは、将来にわたる原子力エネルギーの継続的な供給を可能にすることから必要不可欠である。核燃料サイクルの実用化研究開発における燃料再処理の工程では、先進湿式再処理法が有望なシステムの一つとして研究され、晶析、MA分離回収、U-Pu-Np共回収等の技術を組み合わせたプロセスが試験されている。また、公衆及び作業員の放射線防護及び環境保全の観点から、現在のPUREX法の代替法として、幾つかの基礎研究が提案、実施されている。例えば、配位子やキレート樹脂、抽出剤の開発が行われている。しかし、それらの技術にはなんらかの解決すべき問題点があり、実用化にはまだかなりの時間とブレイクスルーが必要であると考えられる。配位子やキレート樹脂の代わりに微生物を用いる代替法が研究されているが、生物そのものを利用することによる制限も大きい。これらの現状を踏まえ、先進湿式再処理システムに生物そのものではなく、生物から抽出した生体物質を利用した新たな技術を提案した。</p> <p>課題の到達目標は、FBR使用済燃料溶解液中からアクチノイドを効率的に吸着する生体物質の一つであるタンパク質を付加させた自己組織化単分子層（SAM）を創生することである。そして、当該SAMを利用することにより、アクチノイドの分離・回収を効率的に行える技術を開発することである。</p> <p>全体計画は以下の通りである。</p> <p>【1. 吸着タンパク質特定試験】</p> <p>①寒天培地を用いたウラン吸着試験 ウランを含む寒天培地で野生酵母及び1遺伝子欠損酵母を培養し、ウラン存在下でも成長が顕著な酵母を100以下まで絞り込む1次スクリーニングを行う。</p> <p>②野生酵母株へのネプツニウムの吸着試験 ウラン/ネプツニウム分離に関する予備試験として、野生酵母を液体培地で培養し、その培養液にウラン及びネプツニウムを加える試験を行い、野生酵母のウラン/ネプツニウム分離係数を求める。</p> <p>③ウラン吸着試験 ウランを含む液体培地で1. ①で選別した酵母を培養し、ウラン存在下でも成長が顕著な酵母（ウラン耐性酵母）を少数選別する。</p> <p>④ネプツニウム吸着試験 野生酵母及びウラン耐性酵母にネプツニウムを培養液中で接触させ、ネプツニウムの吸着係数、ウランとの分離係数を明らかにする。</p> <p>⑤タンパク質抽出特定試験 ③で選別したウラン耐性株を用いて、ウラン耐性株に特異的に発現</p>

	<p>するタンパク質を特定する。</p> <p>【2. タンパク質機能付加 SAM 創生試験】</p> <p>①結合性官能基保持化合物を修飾した SAM 作製 金薄膜上へのタンパク質を付加させた SAM 作製の予備試験として、数種類の結合性官能基保持化合物を修飾した SAM を作製する。</p> <p>②SAM 作製法の最適化 結合性官能基保持化合物、モデルタンパク質を利用してタンパク質を付加させた SAM 作製法の最適化を図る。</p> <p>③タンパク質機能付加 SAM 作製 1. ⑤で特定したタンパク質を付加した SAM を作製する。この作製した SAM の電気化学測定装置による電位-電流曲線を測定して、タンパク質の酸化還元電位を得る。また、SAM に吸着したウランについては、UV/VIS 表面・界面測定装置による UV/VIS 吸光スペクトル及び電位-電流曲線から、タンパク質に対する吸着状況を観測する。</p> <p>④アクチノイド濃集試験 2. ③で作製したタンパク質機能付加 SAM によるウラン濃集割合を求める。その中でウラン濃集割合の一番高い SAM を特定する。同様に、ネプツニウムの濃集割合を測定するため、模擬的なアクチノイド溶液を用いて、ウラン/ネプツニウムの分離係数を求める。 また、γ線を照射し、未照射サンプルと比較することで、SAM の耐放射線性を評価する。ヘリウムイオンを照射し、α線に対する耐放射線性も評価する。</p>
<p>2. 研究成果</p> <ul style="list-style-type: none"> ・当初予定の成果 ・特筆すべき成果 ・副次的な成果 ・論文、特許等 	<p>【1. 吸着タンパク質特定試験】</p> <p>①寒天培地を用いたウラン吸着試験 ウラン存在下でも成長が顕著な酵母を 100 以下まで絞り込む 1 次スクリーニングを行い、ウラン耐性酵母 98 株を選別した。選別したウラン耐性酵母は、ウラン濃集度の高い酵母 (83 株) とウラン濃集度の低い酵母 (15 株) に分別した。それぞれの酵母は欠損している一つの遺伝子が異なるだけで、酵母自体の構造的差異はない。欠損しているタンパク質の種類を調べてみると、生体反応に関連しているタンパク質が 44 種類、酵母を構成成分となっているタンパク質が 17 種類、様々な成分の輸送に関連したタンパク質が 7 種類、残りが機能不明タンパク質であった。特定の機能に限定されたタンパク質を特定することは出来ず、ウラン耐性に直接関連のあるタンパク質を同定するまでには至らなかった。</p> <p>②野生酵母へのネプツニウム吸着試験 液体培地での野生酵母のウラン/ネプツニウムの分離係数を求める試験を実施した。菌体重量と培地溶液中のウラン及びネプツニウムの濃度から分離係数を求めた結果、約 1200 となった。ウラン及びネプツニウムの濃集には細胞表面タンパク質が寄与していると考えられることから、本試験で目指すタンパク質によるアクチノイドの分離回収の可能性を示唆するものである。</p> <p>③ウラン吸着試験 1. ①で選別した 98 株から、酵母の成長割合、酵母へのウランの濃集割合、ウラン分布の比較によりウラン耐性酵母 6 株を選別した。</p> <p>④ネプツニウム吸着試験 ネプツニウムを添加した液体培地中でウラン耐性株を培養しつつ、培地中のネプツニウム濃度、pH 及び吸光度による菌体重量を測定した。また、菌体重量と液体培地中のネプツニウムの濃度から吸着係数を求めた。ネプツニウムの吸着係数とウランの吸着係数を比較した結</p>

果、分離係数は約 1400 であった。この値は 1. ②で得た野生株の分離係数 (約 1200) に較べて若干大きいことから、耐性株に特異的に発現するタンパク質がウランとネプツニウムを分離する可能性があることが明らかとなった。

⑤タンパク質抽出特定試験

ウラン耐性株に特異的に発現するタンパク質を 10 種類特定し、そのうち 6 種類を同定した。同定したタンパク質は、YCR012W、YGR192C、YHR008C、YJL052W、YLR109W 及び YMR116C であった。さらに、これら 6 種類のタンパク質を液体クロマトグラフィーにより大量に抽出・精製した。

本事業項目の⑤タンパク質抽出特定試験において、遺伝子工学の技術である二次元電気泳動法を利用した。この技術と、同じく遺伝子工学の技術であるウェスタンブロットティング、放射線化学の技術であるオートラジオグラフィーそして放射性重金属を利用することで、ある環境において特異的に発現するタンパク質の重金属吸着能をこれまでより格段に短い時間で特定出来る方法を考案した。時間的制限により、現時点でその技術が実際に利用可能か確認出来ていないが、もし確立出来れば確実に新たな研究の展開に結びつくと考える。

【2. タンパク質機能付加 SAM 創生試験】

①結合性官能基保持化合物を修飾した SAM 作製

金薄膜上に 4 種類の結合性官能基 (4-ピリジンチオール、10-カルボキシル-1-デカンチオール、11-アミノ-1-ウンデカンチオール及び 11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオール) を、浸漬時間を変えて (4-ピリジンチオール : 2、5、10 min、1 h ; 10-カルボキシル-1-デカンチオール及び 11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオール : 10 min、1、10、15、20、25 h) 修飾した SAM を作製した。作製した SAM-金薄膜を電極としたサイクリックボルタモグラムには官能基が金薄膜から解離する電流が検知された。したがって、金薄膜上に SAM の形成を確認できた。さらに、コバルトを吸着させた SAM のサイクリックボルタモグラムから、コバルトが SAM に吸着することを確認した。吸着したコバルトの 4-ピリジンチオール SAM の被覆率を求めた結果、約 80%であった。これらの結果により、タンパク質機能付加 SAM 作製の実験条件が整った。

②SAM 作製法の最適化

モデルタンパク質として鉄輸送タンパク質であるフェリチン、ヘムタンパクであるチトクロム C の溶液を 4 種類の有機単分子層 (4-ピリジンチオール、10-カルボキシル-1-デカンチオール、11-アミノ-1-ウンデカンチオールおよび 11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオール) を修飾した SAM と接触させ、SAM の電位-電流曲線と UV/VIS 吸光スペクトルが定常状態となる時間を求めた。接触時間を変えて電位-電流曲線と UV/VIS 吸光スペクトルを測定することにより、最適なタンパク質付加 SAM を作製できることが分かった。これらの結果により、タンパク質機能付加 SAM 作製法を最適化した。

③タンパク質機能付加 SAM 作製

1. ⑤で大量に抽出・精製したタンパク質を、4 種類の異なる有機単分子層(4-ピリジンチオール、10-カルボキシル-1-デカンチオール、11-アミノ-1-ウンデカンチオール及び 11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオール)で形成した SAM と反応させた後、UV/VIS 表面・界面測定装置による UV/VIS 吸光スペクトル及び電位-電流曲線を測定した。YCR012W、YJL052W、YLR109W 及び YMR116C は 10-カルボキシ

ル-1-デカンチオール上に吸着し、電位-電流応答が得られた。これにより、これら4種類のタンパク質を付加したSAMの作製に成功した。

④アクチノイド濃集試験

2. ③で作製したタンパク質機能付加SAMへのウランの吸着状況をUV/VIS吸光スペクトル及び電位-電流曲線で観測した。その結果、UV/VIS吸光スペクトルからはピークを観測できなかったが、電位-電流曲線からタンパク質にウランが吸着していると考えられるピークを検出した。吸着したウランの表面密度を計算するとYCR012W、YJL052W、YLR109W及びYMR116Cのそれぞれに対して

3.63×10^{-11} 、 1.25×10^{-9} 、 3.01×10^{-11} 及び 3.16×10^{-11} mol/cm²となった。この結果、これらのタンパク質機能付加SAMの中でもっとも濃集割合が高いのがYJL052Wで、もっとも濃集割合が低いのがYLR109Wであることを特定した。図1に熱耐性菌のYJL052WのX線結晶構造解析像を示す。このように三次元での大まかな像は解析出来ているが、分子量が数万以上あるタンパク質の原子一つひとつの位置を特定した構造解析は未だ成功していない。ウランはプラスに荷電しているので、タンパク質表面に存在するマイナスに荷電した官能基との相互作用により吸着していると考えているが、ウラン吸着とタンパク質の構造との関係解明はさらなる研究が必要である。

ウラン/ネプツニウムの分離係数を求めるため、ウランあるいはネプツニウムを含むアクチノイド溶液を調製し、その溶液にウラン濃集割合の一番高いYJL052Wあるいは一番低いYLR109Wタンパク質を添加した。溶液中のウラン及びネプツニウムの濃度変化から分配係数を算出し、その比からウラン/ネプツニウムの分離係数を求めた。その結果、ウランの濃集割合が最も大きかったYJL052Wの分離係数は約1000であり、最も小さかったYLR109Wの分離係数は約300であった。なお、溶液中のウランとネプツニウムの原子価は、それぞれ6価と5価であった。

約520 kGyのγ線を照射したSAMと未照射のSAMを比較した結果、電位-電流曲線に優位な差は現れず、この線量のγ線ではウラン濃集に対する放射線の影響はないことを確認した。また、同様に約240 kGyのヘリウムイオン(α線)を照射したSAMと未照射のSAMを比較した結果、この線量のα線ではウラン濃集に対する放射線の影響はないことを確認した。これらの結果は、照射した放射線量では、タンパク質付加SAMに構造上の変化は現れなかったことを示している。したがって、γ線及びヘリウムイオンすなわちα線では本試験で行った線量までは、ウラン濃集に対する影響はないと考えられる。実際の再処理過程での照射線量は、100 kGyから1000 kGyと考えられている。これらの線量と本試験で実施した照射線量を比較すると、タンパク質を付加したSAMは十分な耐放射線性を有していると考えられる。



図1 YJL052WのX線結晶構造解析像。四量体を形成している

(静岡大学のホームページより引用)

採択当初、本事業項目の④アクチノイド濃集試験における SAM の耐放射線性を試験する内容は想定していなかった。POコメントや中間フォロー等での議論により計画した内容であるが、この成果によりタンパク質は従来考えられているよりも耐放射線性が高いことが判明した。生体は放射線に弱く、生体物質も同様に放射線には弱いと考えられてきた。そのため、使用済み核燃料再処理システムへの生体物質の利用は否定的に受け止められてきたが、今回の結果から同システムへの生体物質の利用は大いに可能性があると考えられる。溶液中の pH、処理温度など、他にも考慮すべき条件はあるが、他の生体物質を利用した新たな研究の展開につながる成果が得られたと考える。

また、SAM からのウラン及びネプツニウムの回収は、タンパク質及び SAM の電極からの解離電位を利用する方法を考えている。結合性官能基（チオール化合物）を介して金電極と結合している SAM が解離電位を有することは知られており、一方、タンパク質もある電位で SAM から解離する。したがって、電位を制御することでタンパク質付加 SAM に吸着したウラン及びネプツニウムをタンパク質あるいはタンパク質付加 SAM とともに回収出来ると考えている。

【事業全体】を通じて

3年間の事業を通して、ウラン耐性酵母が特異的に発現するタンパク質を付加させたタンパク質機能付加 SAM がウランを濃集することを特定した。これにより、先進湿式再処理法の各プロセスへの適用が可能であることを確認した。特に、ウラン/ネプツニウムの分離係数が 1000 であることから、ウランを選択的に抽出できる可能性がある。

タンパク質機能付加 SAM によりアクチノイドの分離・回収を効率的に行えることを明らかにするとともに、本技術開発の第一目的である先進湿式再処理法へのタンパク質などの生体分子を利用した技術の開発が確立できた。核燃料再処理システムに生物・生化学の技術・知識を利用して新たな技術開発が可能であることを明らかにしたと考えている。

これら一連の成果により、事業全体の業務項目を実施し、所期の目標を達成した。

得られた成果の外部発表実績は、次の通りである。

○口頭発表

第2回原子力学会分離変換・MA リサイクル研究専門委員会、平成 20 年 1 月 16 日

坂本文徳、”FBR 燃料再処理のためのタンパク質機能付加 SAM の創生”

また、研究交流の実績として酵母研究の国内最先端機関である酒類総合研究所の研究者と活発に意見交換を行った。

<p>3. 事後評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 目的・目標の設定の妥当性 ・ 研究計画設定の妥当性 ・ 研究費用の妥当性 ・ 研究の進捗状況 ・ 研究交流 ・ 研究者の研究能力 	<p>【目的・目標の設定の妥当性】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 微生物および関連物質を用いた再処理プロセスの提案である、自己組織化単分子層（SAM）を利用する技術開発は、先進再処理システムへの生物・生化学プロセスの融合の可能性を探る意味から野心的なものであった。 ・ 到達目標としてのタンパク質を付加させた SAMを創生するという計画は適切であった。しかし、再処理の代替プロセスとして検討するためには、期間内に一定の見通しを示せるようにして欲しかった。 <p>【研究計画設定の妥当性、研究の進捗状況】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 酵母のスクリーニングからタンパク質の特定、さらに、そのタンパク質を用いたSAMの製造技術、そして、最終的に開発したSAMを用いたウランの分離と、ウラン耐性タンパク質の模索を網羅的・系統的になされており、短期間で計画的に遂行されている。 ・ SAMの創成という観点では、SAMに関する吸着挙動、電気化学的考察など、多角的な研究が計画的に進められている。 ・ しかし、現実の再処理プロセスとの整合性については、研究計画が十分であったとは言えない。 <p>【研究交流、人材育成、研究者の研究能力、成果】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 微生物や生体物質を扱う化学プロセスは、環境修復や食品製造などの分野で広く知られているが、既存の再処理工程の一部を担う手法の可能性を探る上で、今後注目したい電極が作成できたと思われる。しかし、収着量が低い、ウラン、ネプツニウム以外の核種についての選択性が明らかにされていないなどの問題が残っており、今後検討課題を残した。 ・ 本技術開発は、ウラン系廃液の吸着処理のような他分野への適用の観点で波及効果が期待できるとともに、新規でユニークな重金属濃集タンパク質の効率的な特定法の考案など、研究を進めていく上で副次的に得られた成果も含めて、学術・科学への波及効果も非常に大きい。 ・ 生物化学の専門家が原子力、核化学についての研究に従事する事により相応の知識を習得できたものと認められる。
--	---

4. その他	<ul style="list-style-type: none"> • 再処理廃液処理工程での具体的な応用分野を明確にした上で、それに沿った課題を抽出し、研究を進めていくことを望む。 • 今後、研究成果を外部へ発信していくよう期待する。
5. 総合評価	<ul style="list-style-type: none"> • ウラン／ネプツニウムの分離係数が1000であることから、ウランの精製に新たな可能性見いだした。アクチノド分離システムに生物・生化学の技術・知識を利用して新たな技術開発が可能であることを明らかにしたことは、この分野での新規な展開に寄与するものと考えられる。 • 独創的なアイデアのもとで予備検討的に行われた一連の実験および考察は、十分なものと思われる。ただ、SAM電極に関する一連の電気化学的理解を深めるために、データの解釈すなわちアクチノドの酸化還元反応機構について、さらに深く検討しておくことが必要であった。 • 今後、SAMの構造、吸着機構、電気化学的特性、ウランを選択的に吸着する選択性発現機構等について、詳細な解明がなされることを期待する。 • 新規性のある基礎的研究であったが、本手法の再処理プロセスへの適用という意味では克服すべき課題は多い。今後の研究の中で十分に検討をしてもらいたい。 <p style="margin-left: 40px;">A) 想定以上の成果が得られ、今後に期待できる。</p> <p><input checked="" type="radio"/> B) 想定通りの成果が得られ、今後に期待できる。</p> <p style="margin-left: 40px;">C) 想定通りの成果が一部得られなかった。</p> <p style="margin-left: 40px;">D) 想定通りの成果が全く得られなかった。</p>