

平成 2 3 年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業
総合研究報告書

廃食品性バイオマスを用いた
レアメタル高選択的分離技術の開発
(K2119, K22038, K2336)

平成 2 4 年 3 月
神戸大学 丸山達生
大向吉景
中島一紀

補助事業名	環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 21 年度～平成 23 年度）
所 管	環境省
国庫補助金	37,403,000 円
研究課題名	廃食品性バイオマスを用いたレアメタル高選択的分離技術の開発
研究期間	平成 2 1 年 4 月 1 日～平成 2 4 年 3 月 3 1 日
研究代表者名	丸山達生（神戸大学）
研究分担者名	大向吉景（神戸大学） 中島一紀（神戸大学）

目次

	頁
研究目的	3
第一章 序論	4
第二章 タンパク質に対する貴金属イオン吸着	26
第三章 タンパク質による金属イオン還元に関する検討	41
第四章 卵殻膜における貴金属イオン吸着現象の機構解明	68
第五章 精製タンパク質における吸着メカニズムの解明	79
第六章 ペプチドマッピング法を利用した吸着サイトの同定を目指した基礎的検討および精製タンパク質への適用	85
第七章 タンパク質性材料を用いた貴金属イオン分離回収システムの実用化に向けての検討	98
第八章 結論	109

研究目的

本研究の目的は、食品産業等で主に廃棄されていた、タンパク質高含有バイオマスレアメタルの吸着剤として利用する新しいレアメタルリサイクル基盤技術の確立である。対象とするレアメタルは、パラジウム、白金、インジウム、ロジウム、ルテニウムなど価格が高く、触媒等に広く利用されている金属とする。これらレアメタルイオンを、単金属存在下でタンパク質高含有バイオマスが如何に高選択的に吸着するかを明らかにする。このとき用いるタンパク質高含有バイオマスとしては食品産業で廃棄される卵殻膜、トウモロコシタンパク質、羽毛、廃棄獣肉、廃発酵菌体などを検討し、レアメタル吸着能力に優れた廃棄性バイオマスを発見する。同時に、これらタンパク質バイオマスをシート状や粒状に成形することにより、リサイクル現場で利用しやすい吸着剤に加工する。これらの検討を通して、廃食品性バイオマスによるレアメタルリサイクルの実現可能性を検証した。

第一章 序論

1.1 緒言

人類は便利で豊かな生活を送るために様々な産業分野において研究開発を進め、高度化社会を生み出した。工業技術において、貴金属・レアメタルはなくてはならない重要な材料である。また将来先端技術の進歩に伴い、さらなる需要の増加が予想される。しかし我が国においては貴金属・レアメタルの鉱山が極めて少なく、その供給のほとんどを海外からの輸入に頼っている現状であるが、これらの希少金属は産出地域が偏在していることから国際情勢や、投機的要因の影響を受け価格の乱高下が続いており、安定した供給が困難である。一方工場等から廃棄されている廃液にはこれらの貴金属・レアメタルを含有していることが多い。これは焼却・熱分解処理において難処理化を引き起こすだけでなく、リサイクル、省資源の観点から非効率であると考えられる。地球環境保全に対する関心が高まる中、このような廃液からの希少金属の回収は、資源の安定供給、有効利用といった面で非常に重要である。このような背景から近年、工業的に希少金属を分離・回収する技術に開発が盛んに行われており、数種類の手法が実際に工業的に利用されている。しかしこれらの手法においてもいくつかの課題が残っている。

一方、生体内では様々な微量金属が様々な生体分子と複合体を形成しており、それにより特異的な機能を発現している。このことは生体分子を用いて、金属を選択的に分離回収しうる可能性を示唆している。生体分子の一種であるタンパク質は赤血球中のヘモグロビンに代表されるように金属との親和性を有し、生体資源たるバイオマス中にさまざまな形で含まれている。よってバイオマスを用いた貴金属・レアメタルのリサイクルが実現できれば、従来の分離・回収システムと比較して、環境面、コスト面等で非常に有用であるといえる。これまでも様々なバイオマスを用いて貴金属イオンのリサイクルが試みられてきた。しかしながらその回収メカニズムは未だに不明な部分が多い。メカニズムの解明が進めばより戦略的な吸着剤の選定が可能になると考えられる。そこで本研究においては分子論的観点から吸着メカニズムの解明を試み、また実用化に向けさらなるバイオマスの検討およびバイオマスの加工技術の開発を行った。

1.2 貴金属・レアメタルについて

1.2.1 貴金属・レアメタルの用途¹⁾

貴金属とは、金(Au)、銀(Ag)、白金(Pt)、ルテニウム(Ru)、ロジウム(Rh)、パラジウム(Pd)、オスミウム(Os)、イリジウム(Ir)の 8 種類の元素をいう。またレアメタルとは一般に非鉄金属類のうち様々な事由により、産業界での流通量、使用量が少ない金属の事を指す。また、資源エネルギー庁所管の総合資源エネルギー調査会鉱業分科会レアメタル部会では、備蓄を行っている 7 鉱種ニッケル(Ni)、クロム(Cr)、コバルト(Co)、マンガン(Mn)、タングステン(W)、モリブデン(Mo)、バナジウム(V)をはじめとする 31 種類の金属元素をレアメタルと定義している²⁾。貴金属はその色の美しさから古くから宝飾品として利用されてきた。近年ではレアメタルとともに宝飾品としてだけでなく、様々な優れた化学的特性からエレクトロニクスをはじめとする産業用から医療用等幅広い分野で応用され、現在、我々にとってなくてはならない材料となっている。以下に代表的な貴金属・レアメタルである、金、白金、パラジウムについて述べる。

金について

金の需要は宝飾用、地金、金貨以外にも、金の持つ電導性、延性、非腐食性、抗酸・アルカリ性等優れた特性からハイテク産業用の資源として重要な役割を果している。また、医療分野においては、結核菌の発見者であるコッホが 1890 年、猛毒のシアン化金が結核菌の増殖を抑制する効果があることを発見し、当時は結核の一種だと考えられていたリウマチ性関節炎の治療にシアン化金を用いる研究がされ、その後金を含む金チオグルコースや金チオ硫酸ナトリウムが有効であることが明らかとなっている。

人類が始めて金を手にしたのは今から 6,000 年前と言われている。以来、これまでに採掘された総量は約 147,800 t である。金は年間 2,500 t 前後のペースで産出されており、その他市場からの回収等によって供給される量とあわせることで年間約 4,000 t 前後の世界の需要がまかなわれている。現在、地球に埋蔵されている金は約 7,600 t 程度とされているがその大部分が採掘困難な場所にあり、近い将来地上にある在庫を再利用し続ける以外に供給手段がなくなると予想されている。

Table1.1 日本の金需要(t)				
	2001	2002	2003	2004 (見込み)
<供給>				
国内生産	155.827	144.687	161.394	163.000
輸入	43.220	84.748	49.442	65.000
その他	133.732	144.290	152.176	160.000
(うち再生金)	19.831	21.160	22.549	23.000
供給合計	332.779	373.725	363.012	388.000
<需要>				
① 歯科・医療	20.813	21.765	22.373	22.500
電子・通信	70.916	80.415	85.112	86.500
メッキ用	22.615	22.513	23.512	25.000
金張用	1.118	1.168	1.172	1.000
宝飾用	37.512	37.128	20.489	21.000
勲章・バッジ用	1.474	1.392	1.499	1.500
陶磁器用	0.975	1.149	1.532	1.500
万年筆用	0.014	0.015	0.015	-
時計用	0.778	0.785	0.790	1.000
② 小計	135.402	144.565	134.121	137.500
③ 美術・工芸品	4.893	4.697	4.879	5.000
私的保有金	69.586	85.569	79.481	89.000
その他	31.801	46.587	47.145	51.000
④ 小計	101.387	144.565	134.121	137.500
需要合計(①~④)	262.495	303.183	287.999	305.000
輸出	70.284	70.542	75.013	83.000
政府記念金貨				
需要総合計	332.779	373.725	363.012	388.000

白金について

白金も金と同様に宝飾品として高い人気があるが宝飾品以外に約60%が工業用として利用されており、応用分野として科学、コンピュータ、医療、バイオ等多岐にわたる。医療の分野では Rosenberg が 1965年に白金化合物の抗ガン作用について発見³⁾して以来、シスプラチンやカルボプラチンが広く抗ガン剤として使用されている。また無公害燃料電池、自動車の排気ガスを抑える浄化触媒等地球環境を支える最先端技術にも利用され、21世紀の産業に不可欠な「未来の資源」として需要が高まっている。世界の白金の年間供給量は約185 tで、金の年間供給量の約4,000 tに比べ約1/21である。また採掘地も供給量

の約 91%を南アフリカ(75%)とロシア(16%)の 2 カ国で占めており、金よりもさらに特定の地域に偏在している。さらに鉱石内の含有量も原鉱石 1 t から約 3 g しか採取できないという。これらの事由から希少価値としては金をはるかに上回っている。

Table1.2 日本の白金需要(t)				
	2001	2002	2003	2004 (予測)
<供給>				
輸入	50.184	50.920	49.026	60.700
回収(自動車)	1.710	1.710	1.866	1.900
その他	0.300	0.300	0.300	0.300
供給合計	52.194	52.930	51.192	62.900
<需要>				
宝飾用	23.328	24.261	20.684	18.000
自動車触媒	10.757	13.375	15.863	17.000
電子工業	2.488	1.710	1.866	2.000
化学	0.778	0.933	1.244	1.250
石油	0.156	0.156	0.156	0.200
ガラス	2.644	1.866	1.555	1.700
その他	1.089	1.710	1.711	1.800
小計	41.058	44.011	43.079	41.950
投資	1.400	1.244	-0.311	2.000
輸出	10.201	6.149	7.435	8.000
調製	-0.465	1.526	0.989	10.950
需要総合計	52.194	52.930	51.192	62.900

パラジウムについて

パラジウムは白金族グループの金属であり、白金とともに産出され、類似した特性を持っている。需要としては自動車触媒、電子・電気材料用、歯科用等がある。このパラジウムも埋蔵量が少ない貴金属の一つとして数えられており、主にロシアと南アフリカ生産されているが、供給はほぼロシア一国に依存している現状にある。特に近年ロシアでの産出量が激減しているため、非常に入手が困難となってきている。

Table1.3 日本のパラジウム需要(t)				
	2001	2002	2003	2004
				(予測)
<供給>				
輸入	51.238	48.346	59.126	56.700
2次回収	1.244	1.244	1.244	1.300
その他	0.700	0.700	0.700	0.800
供給合計	53.182	50.290	61.070	58.800
<需要>				
電子工業	8.087	4.534	6.824	7.000
自動車触媒	15.707	16.173	16.796	17.200
歯科	14.774	15.707	12.597	13.600
宝飾品	4.354	5.132	4.977	5.000
その他	0.933	0.933	0.933	0.300
(小計)	48.855	42.478	42.147	43.100
輸出	38.164	23.409	12.732	15.000
調製	-28.837	-15.598	6.201	0.700
需要総合計	53.182	50.290	61.070	58.800

このように、貴金属・レアメタルは希少な資源であり、供給体制が不安定な現状であるにもかかわらず、工業的に優れた特性から今後もコンスタントに需要が伸びることが予想される。従ってより一層リサイクルすることが環境面からも資源の安定供給の面からも重要な意味をもつと考えられる。しかしながら、依然として2次回収による供給量は低く、貴金属イオンの効率的な回収技術の開発が切望される。

1.2.2 貴金属のリサイクルについて⁴⁾

我々の身近にある電子機器、電化製品、通信機器等には金や銀といった有価金属が使用されている。どの製品も故障や新製品の登場による買い替え等で廃棄処分される。かつては中古市場やリサイクル市場に回る一部製品を除き、多くがそのまま廃棄、埋め立て処分され、貴重な資源を喪失していた。しかし昨今の環境意識やリサイクル志向の高まりにより再資源化が進み、資源の乏しい我が国での新しい資源ソースとして注目を浴びてきている。採掘する鉱石中にはほんのわずかな貴金属しか含まれていないのに対し、我々の身のまわりにある自動車や電子機器等に使用されている貴金属の割合はそれ以上である。

例としてあげると、携帯電話に含有されている有価金属の量は、もちろん種類によって異なるが、平均して携帯電話 1 台あたり銅 6~9 g, 金 1.6~5 μg , 銀 16~32 μg , パラジウム 0.8~2.5 μg , である。またデスクトップ型パソコン本体 1 台当たりには、銅 0.92 kg, 金 0.65g, 銀 1.7 g 含有している。また、このような機器はライフサイクルが非常に短く、廃棄量が大量であるため、近年アメリカ等では「urban mine(都市鉱山)」という新語が盛んに語られるようになってきている。我が国においてもここ数年で、各種リサイクル法が制定され、家電製品等のリサイクルが義務付けられ、2005 年からは自動車もその対象となった。

金属は新地金もリサイクルされたものも化学的特性が全く変わらないため、古来より鉄、銅を中心にリサイクルが盛んに行われてきた。明治以降、非鉄精錬メーカーが相次いで設立され、初期から廃銅線、伸銅品等のリサイクルを行ってきた。また銅精錬工程において金、銀等の貴金属は銅と同じ挙動を示すという特性を活かし、20 年以上前から貴金属を含有する電子部品、プリント基盤等の異種複合材料からの貴金属の回収に取り組んできている。このような電子機器等のリサイクルにおいて非鉄精錬の技術は最適かつ不可欠であることから、昨今非鉄金属メーカーがあいつで環境リサイクルをコアビジネスとする傾向にある。

1.2.3 貴金属の分離回収法

前述のように貴金属のリサイクルは環境面からも資源の安定供給の面でも非常に重要である。しかしリサイクルには多大なコストを要し、また分離対象である金属濃度が低いのに対し、非対象物質が多量に共存し対象金属の分離回収が困難になる等に問題がある。そのため低コスト高効率分離回収プロセスの開発が大いに望まれている。従来、白金族金属の分離は沈殿法を用いて行われてきた。沈殿法は特別な試薬や装置等を用いていない点で汎用性を有しているが、処理工程の煩雑さ、回収率および純度の低さ、大量処理の困難さといった問題を抱えている。そこで現在、高選択的分離法として溶媒抽出による貴金属の分離が主流であり、すでにカナダや南アフリカ等の精錬所では商業的規模で稼働している^{5),6)}。例として INCO 社(カナダ)の白金族の分離プロセスを Fig. 1.1 に示す。また、越村らは自動車廃触媒からの白金およびパラジウムの回収に対し、Fig.1.2 に示される溶媒抽出プロセスを提出している⁷⁾。溶媒抽出法は沈殿法と比較して、選択性に優れることから工程数が減少し、また連続操作が可能であることから時間の

短縮および製品の均一化が図れる経済性に優れた分離法であると結論付けられている。

溶媒抽出において選択的な金属分離を達成するためには、適切な抽出剤を選定することが不可欠となる。現在白金族イオンの抽出剤としてはアミン系，ジアルキルスルフィド系，ジアルキルモノチオリン酸系等が一般的に用いられており、良好な選択制が示されている。しかしより高い選択制の追求のため、今もなお新規抽出剤の開発に関しては多くの研究が行われている⁸⁾。

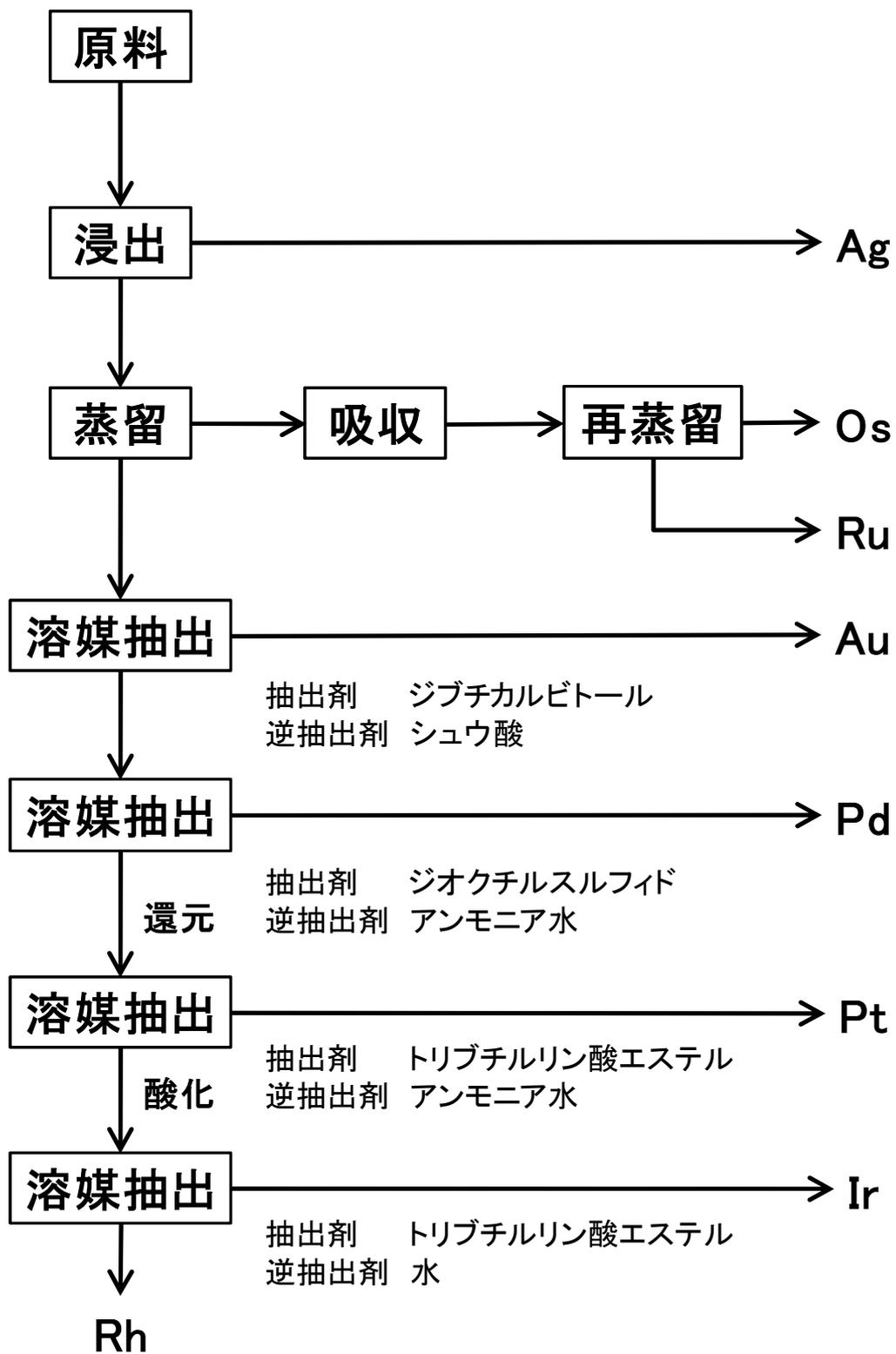


Fig1.1 INCO 社(カナダ)の白金族の分離プロセス

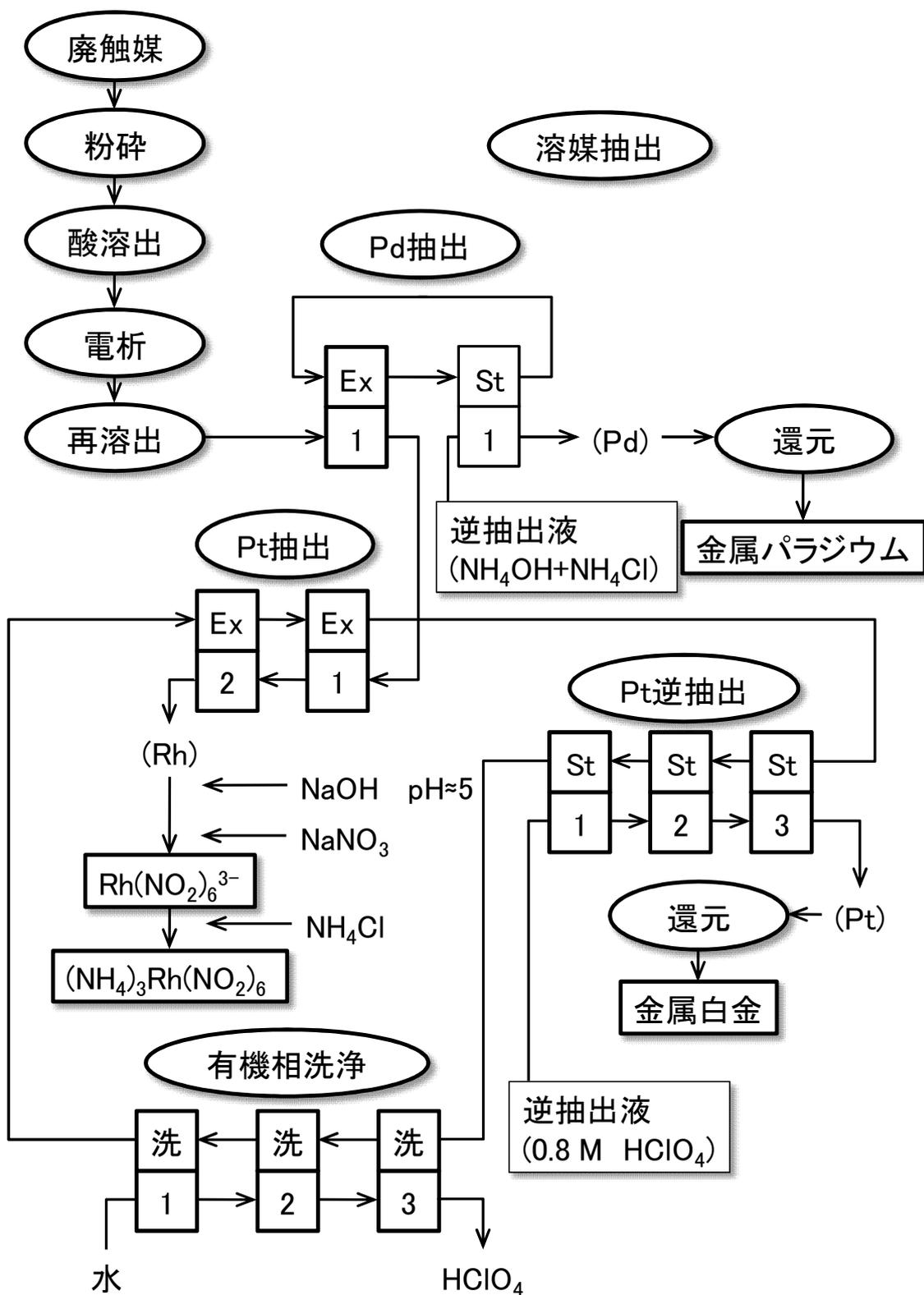


Fig. 1.2 自動車廃触媒からの白金およびパラジウムの回収

以上述べたように溶媒抽出法は高選択的分離法として、多く研究され実用化されてきた。しかしながらこの溶媒抽出法においても Fig. 1.1, 1.2 で示したように分離工程が複雑で、抽出後に行う逆抽出の困難さ、さらに処理に伴う薬品添加による多量の 2 次廃棄物の発生といった問題がある。したがって低コスト高効率かつシンプルな分離回収プロセスの開発が求められており、その解決法としてイオン交換樹脂を用いた方法が昨今注目を集めている。

イオン交換樹脂とは合成樹脂の 1 種で分子構造の一部にイオン基として電離する構造を有し、水などの溶媒中のイオンと交換作用を示す。高分子としての性質から非水溶であるため、水に溶けない酸、アルカリと考えることもできる。また高分子の分子鎖が網目構造を取る事で水やイオンの浸透が容易となり、活性炭などの吸着剤と同様大きな比表面積を持つ。一定量のイオン交換を行ったイオン交換樹脂はイオン交換能を失うが、交換させるイオンを含む水溶液に浸漬することで交換能力を再生することができる。

最も一般的なイオン交換樹脂の構造はスチレン・ジビニルベンゼンの共重合体からなる母体を持つものである。ポリスチレン長鎖分子がジビニルベンゼンの架橋により立体的網目構造の樹脂を形成する。このためイオン交換樹脂は一見してビーズの様な粒状であるが、内部は広い表面積を持つ。



Fig. 1.3 イオン交換樹脂

イオン選択性は常態では価数が大きく重いイオンほど大きく、イオン交換されやすくなる。このため水素イオンと水酸化物イオンで再生したイオン交換樹脂は様々なイオンを水中から取り除く能力を持つ。フッ素イオンは水酸化物イオンより選択性が小さいためイオン交換しにくい。

ボイラ内部に炭酸カルシウムなどを主成分とするスケールが生じることを防ぐ目的で、食塩水で再生したイオン交換樹脂を用いてボイラ補給水中の硬度成分であるカルシウムイオンやマグネシウムイオン等をスケールが生成されない食塩に変換（軟化、軟水化）させる装置を軟水器と呼ぶ。

このような特性からイオン交換樹脂は様々な分野においてイオン回収、除去を目的に用いられている。その用法の1種としてイオン交換樹脂を用いた貴金属イオンを回収する方法がある。これはキレート樹脂などを併用することにより、金、ウランなどの重金属から微量希少金属を回収する技術であり、すでに様々な工業施設で利用されている。しかし、イオン交換樹脂そのものは石油を原料とする高分子でつくられていることから、石油化学に依存した技術であり、環境への負荷、ならびに石油資源の枯渇などの課題の克服は困難である。そのため循環型社会の形成にはさらなる環境調和型の技術の開発が必須である。

1.3 アミノ酸と貴金属イオンの相互作用

金属酵素に代表されるように、生体内の金属イオンはタンパク質と結合して生理活性を示す。金属酵素はアミノ酸残基側鎖のアミノ基、イミダゾール基、カルボキシル基、チオール基などが生体内に極微量に存在する鉄や銅などの遷移金属イオンを捕捉することで機能している。また内分泌攪乱物質として知られるカドミウム、鉛、水銀はチオール基との親和性が強いことから、細胞内、外の膜や器官に広く存在する構造や機能に重要なタンパク質と結合する。その結果多くの酵素が不活性化し、構造タンパク質の形成異常や細胞の膜透過性の変化がおき、造血系、細胞内伝達系、遺伝子系、免疫系などあらゆる機能に影響が現れる⁹⁾。このようにタンパク質を構成しているアミノ酸は金属イオンと高い親和性を示す。遷移金属イオンと同様に生体内には

ほとんど存在しない貴金属イオンもまた、アミノ酸と強い相互作用を示す。したがって医療の分野においても貴金属イオンは使用されており、現在貴金属イオンとアミノ酸、ペプチド、タンパク質との相互作用に関する研究が盛んに行われている。その研究例をいくつか以下で紹介する。

Craig らは酸性領域においてオブアルブミンに金イオンが吸着されることを明らかにした¹⁰⁾。この中で筆者らはオブアルブミン 1 分子に吸着した金イオンの数と、オブアルブミン中に存在する塩基性アミノ酸であるアルギニン(Arg), リジン(Lys), ヒスチジン(His)の数が非常によく一致することから、塩基性アミノ酸側鎖のアミノ基が金イオンに配位することで金イオンがオブアルブミンに吸着していると推察している。

アミノ酸の中でも特に His は側鎖のイミダゾール基が様々な金属イオンと強い親和性を示す。貴金属イオンもまた His 残基と親和性を示すことから、貴金属イオンと His 残基が形成する錯体構造についての研究がなされている。Pneumatikakis らは、L-ヒスチジンメチルエステル(HisOMe)とパラジウムイオンが形成する Pd(HisOM)Cl₂ の構造を¹H-NMR および X-線結晶構造解析により明らかにした¹¹⁾。同様に Cuadrado らは、¹³C-および¹H-NMR を用いて金イオンと二つの His により形成される Au(III)-bis-L-His 錯体の構造について報告している¹²⁾。これらの研究から貴金属イオンと His の錯体は側鎖のイミダゾール基およびアミノ基の窒素原子が貴金属イオンへ配位結合することによって形成されていることが証明された。

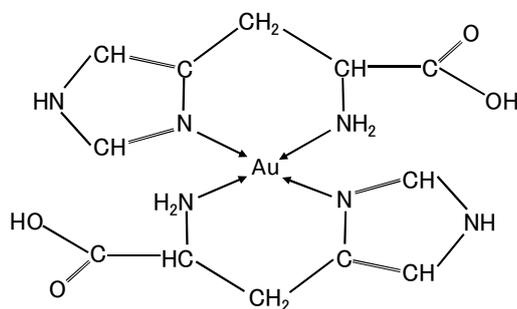


Fig. 1.4 Au(III)-bis-L-His 錯体の構造

His と貴金属イオンとの錯体形成に関する研究がなされる中、His 含有ペプチドによる錯体形成についても研究されている。Wienken らはジペプチド Gly-His が¹³⁾、Best らはトリペプチド Gly-Gly-His が金

イオンおよびパラジウムイオンと錯体を形成し、さらに $^1\text{H-NMR}$ および X-線結晶構造解析によりその錯体構造を明らかにした¹⁴⁾。この場合も His のイミダゾール基と金属イオンが配位結合しその後、ペプチド主鎖の窒素原子が金属イオンに配位して錯体を形成している。

Kostic らは過去に様々なパラジウム(II)錯体および白金(II)錯体を用いて、比較的温和な条件でペプチドやタンパク質を部位特異的に切断する人工プロテアーゼの構築を可能とした¹⁵⁾⁻²⁴⁾。これはパラジウムイオンや白金イオンが His, Met, Cys と選択的に配位するといった性質を利用したものである。この研究ではパラジウム(II)イオンと白金(II)イオンは化学的にほぼ同様であるにもかかわらず、異なる選択的加水分解能を有していることが明らかとなった。

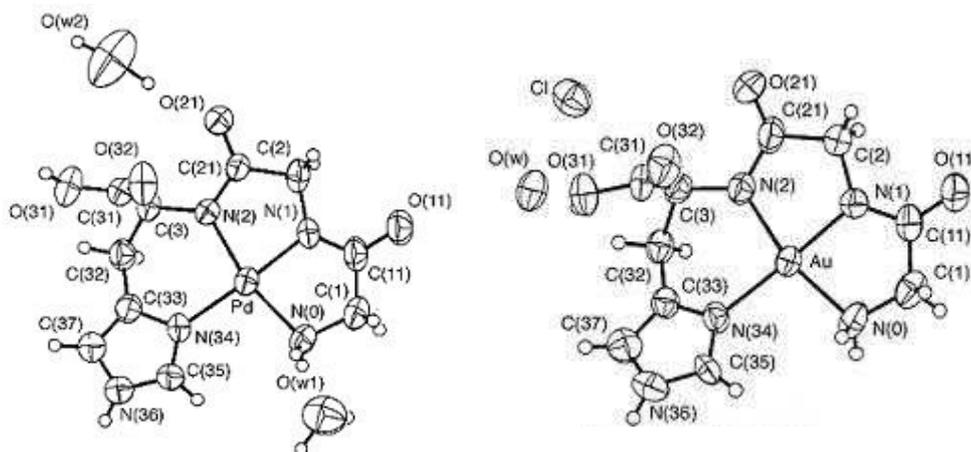


Fig. 1.5 トリペプチド GGH と金イオンおよびパラジウムイオンの結晶構造

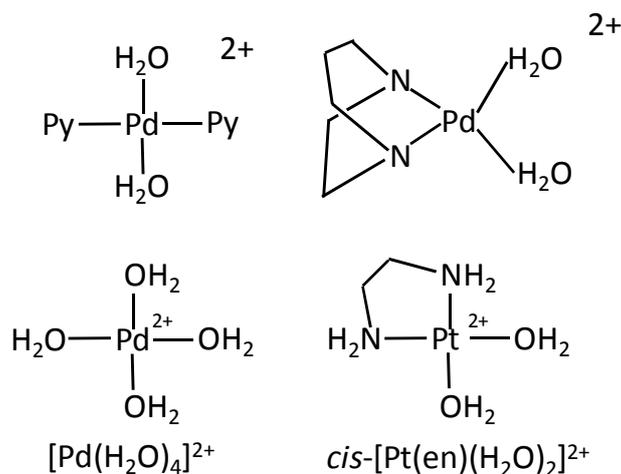


Fig. 1.6 加水分解能を有したパラジウム, 白金錯体

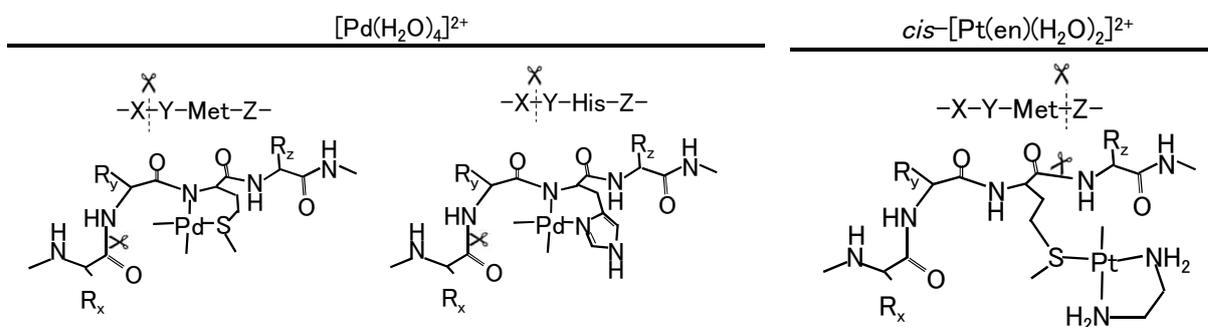


Fig. 1.7 パラジウム, 白金錯体によるペプチド鎖の部位特異的加水分解

また Hamachi らは、パラジウムイオンが His と強い親和性を有することを利用し、His 残基をターゲットにしたレセプターとしてパラジウムエチレンジアミン錯体 ($[\text{Pd(en)(HNO}_3)_2]$) を用い、配列選択的にペプチドの α -ヘリックス構造が安定化させることに成功した²⁵⁾。この研究では、ペプチド中に 2 つの His を持ち、それらがアミノ酸 3 および 4 残基離れているペプチドのみ α -ヘリックス構造が安定化され、1 つの His しか持たないペプチドや His 間の距離が 5 残基以上離れたペプチドで逆に α -ヘリックス構造が不安定化されることがあきらかになった。

近年、ナノテクノロジーの分野において金属ナノワイヤーやナノ粒子の開発に関する研究が盛んに行われている。その中で、DNA やペプチドなどの生体分子を用いたナノマテリアルの調整法が報告されている²⁶⁾⁻²⁹⁾。Djalai らは金属イオンと高い親和性を示す His を多く含まれているペプチド差を鋳型として用い、金イオンを His と結合させ

た後 NaBH_4 で金イオン還元処理することで金ナノワイヤーを構築した³⁰⁾。さらに Sastry らは、酵母菌を用いて金ナノ粒子、銀ナノ粒子の調整に成功している³¹⁾⁻³⁴⁾。この手法は化学的な還元処理を行わず、生物プロセスの中で金属を還元することができ、環境調和型の調整法として興味深い。このバイオプロセスにおける還元メカニズムについては非常に複雑であり、詳細についてはまだ明らかになっていない。

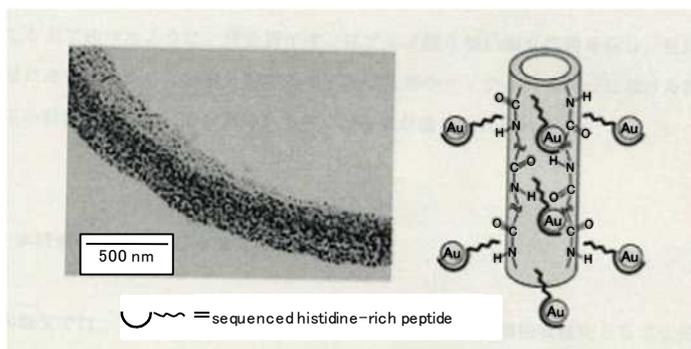


Fig. 1.8 His-rich peptide を鋳型とする金ナノワイヤーの調整

上記の菌体表面での貴金属イオンの還元メカニズムに関する詳細は明らかにされていないが、金イオンはシステインのチオール基、メチオニンのチオエーテル、ジスルフィドと反応することで還元されることが知られており、古くから研究が行われてきた³⁵⁾⁻³⁷⁾。1999年には Zou らが、金(III)イオンが Gly を酸化することにより還元されることを報告している³⁸⁾。

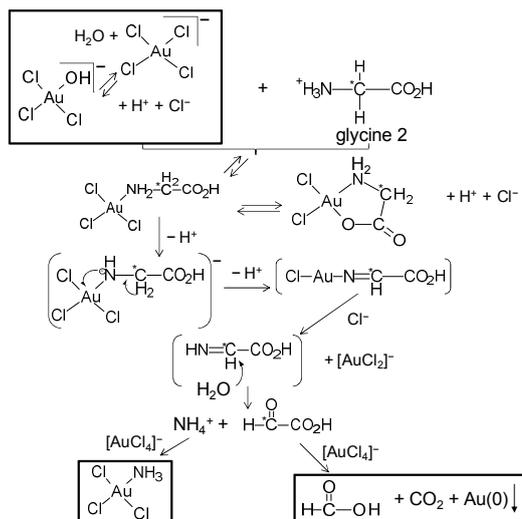


Fig. 1.9 金(III)イオンによる Gly 酸化のメカニズム

ここまで述べたように、貴金属イオンはアミノ酸と強い相互作用を示し、反応性も非常に高いことから、医療分野でのさらなる応用やナノテクノロジーにおける環境調和型の新規合成法としての期待から研究がすすめられている。

1.4 生体由来材料を用いた貴金属イオン回収プロセスの現状

生体由来材料(バイオマス)の中には合成キレート樹脂よりも優れた重金属イオン濃縮能を持ったものもあることから、様々な金属イオンの吸着剤としての利用が期待され、現在も研究が盛んに行われている。このバイオマスによる重金属イオンの回収に関する研究ではこれまで主にバイオマスとして海藻や菌体が、対象金属としてはカドミウム、クロム、水銀などの有害金属が多く検討されてきた³⁹⁾⁻⁴²⁾。また海水中のウランの回収を目的とした例も報告されている⁴³⁾。さらに近年では貴金属イオン等の有価希少金属イオンの回収への応用も検討されている。以下に貴金属イオンの回収に関する例をいくつか紹介する。

Table 1.1 バイオマスによる貴金属イオンの吸着に関する研究例

筆者	対象金属イオン	バイオマス	概要
Darnall ら 44)	Ag^+ , Au^{3+}	<i>Chlorella Vulgaris</i> (藻類)	<i>Chlorella Vulgaris</i> による吸着実験を 14 種類の金属を用いて行った。すべての金属イオンに対して高い吸着性能を示したが、特に Ag^+ , Au^{3+} および Hg^{2+} が低 pH (pH2.0) においても吸着されることが明らかとなった。
Antunes ら 45)	Au^{3+}	<i>Azolla filiculoides</i> (南アの水生植物)	<i>Azolla filiculoides</i> を金イオンの吸着媒体として、低濃度金属イオン水溶液 (2 ppm) からほぼ 100% の金イオンを回収できることを示した。
Guibal ⁴⁶⁾	Pd^{2+} , Pt^{4+}	キトサン	グルタルアルデヒド、チアウレア等を架橋させたキトサン誘導体を合成し、その誘導体で Pd^{2+} と Pt^{4+} の競争吸着実験を行い、競争吸着の場合単独での吸着と比べ、吸着量が減少することが分かった。
Yong ら 47)-51)	Pd^{2+} , Pt^{4+}	硫酸塩還元菌	硫酸塩還元菌による回収を行い Pd^{2+} , Pt^{4+} に対し高い捕捉能があることを示した。
Nakajima ら 52)	Au^+ , Au^{3+}	<i>Pseudomonas maltophilia</i> (微生物)	30 種の微生物を用いて金をもっとも回収する微生物についての検討

			<p>を行い <i>Pseudomonas maltophilia</i> が最も高い吸着能を示した。さらに Polyacryl-amide に固定化された <i>Pseudomonas</i> 細胞による吸着実験は、高い吸着性能を有したまま、繰り返し実験を行うことが可能であった。</p>
--	--	--	---

当研究室においても近年タンパク質高含有のバイオマスを用いて貴金属イオンの回収を目指す研究を進めてきた。その結果あるバイオマスにおいては高い貴金属吸着性を示すことが分かってきている。

1.5 本研究の目的と構成

これまで述べてきたように、生体由来材料を用いた貴金属イオン回収プロセスの研究は多方面から盛んに行われている。しかしながら、その吸着機構は未だに不明な部分が多い。そこで吸着機構の解明を分子論的観点から検討を行った。また未だに実際の工業化に至っていないため、実用化に向けての検討をすすめた。

第二章では、タンパク質に対する貴金属イオンの吸着挙動を調べ、金、白金、パラジウムイオンが各種タンパク質に吸着することを明らかにした。

第三章では、タンパク質の有する貴金属イオン還元能を調べ、貴金属イオン吸着操作における貴金属イオンのナノ粒子化の可能性を示した。

第四章では卵殻膜による吸着メカニズムの解明のため、一度吸着させた貴金属イオンを脱着させその吸着力を検討し、透過型電子顕微鏡によって貴金属イオンを吸着させた卵殻膜の観察を行った。さらに貴金属イオンの状態による影響をみるため、貴金属イオンの錯体構造を変化させてタンパク質高含有材料である卵殻膜へ吸着させる実験を行った。

第五章ではより一般的な吸着メカニズムの解明を目指し糖タンパク質における糖鎖の貴金属イオン吸着への寄与を検討した。具体的に

は酵素反応を用いて糖鎖を除去した糖タンパク質への吸着力の変化を検討した。またタンパク質の高次構造の影響をみるため変性剤を用いてタンパク質を完全に変性させて検討を行った。

第六章ではペプチドマッピング法を利用した吸着サイトの同定を目指し、その基礎的な実験および、精製タンパク質への適用を行った。

第七章ではタンパク質性材料を用いた貴金属イオンの分離回収システムの実用化を目指し、多種類バイオマスを用いて検討し最適な吸着剤を検討した。またハンドリング性の向上を目指し、シート状への加工法を検討した。

第八章では本研究の総括を行い、タンパク質高含有材料を用いた貴金属イオン回収システムの開発の可能性について述べた。

参考文献

- 1) 工業レアメタル, 120, アルム出版社 (2004).
- 2) 貴金属・レアメタルのリサイクル技術集成, 165, 株式会社エヌ・ティー・エス (2007).
- 3) B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, 205, 609 (1965)
- 4) 化学と工業, 55 (2002).
- 5) J. E. Bernes, J.D. Edwards, *Chem. Ind.*, 6, 151 (1982).
- 6) 井上勝利, ケミカルエンジニアリング, 37, 1001 (1982).
- 7) 越村英雄, 津田充利, 南保, “化学工学シンポジウムシリーズ 31”, 9 (1992).
- 8) F. Z. Aamrani, A. Kumar, L. Beyer, J.L. Cortina, A. M. Sastre, *Solvent Extr. Ion Exch.*, 16, 1389 (1998).
- 9) 生体と金属イオン, 学会出版センター.
- 10) J. P. Craig, Jr., A. G. Garrett, H. B. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 1570 (1954).
- 11) G. Pneumatitakakis, C. Chassapis, A. Rontoyianni, *J. Inorg. Biochem.*, 49, 83 (1993).
- 12) J. A. Cuadrad, W. Zhang, W. Hang, V. Majidi, *J. Environ. Monit.* 2, 355 (2000).
- 13) M. Wienken, B. Lippert, E. Zangrando, L. Randaccio, *Inorg. Chem.*, 31, 1983 (1992).
- 14) S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djuran, R. A. Palmer, P. J. Shadler, I. Sóvágó, K. Varnagy, *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, 15, 2587 (1997).
- 15) I. E. Burgeson, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.*, 30, 4299 (1991).
- 16) T. N. Parac, G. M. Ullman, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 3127 (1999).
- 17) T. N. Parac, G. M. Ullman, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 5946 (1996).
- 18) T. N. Parac, G. M. Ullman, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* 37, 2141 (1998).
- 19) N. M. Milovic, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4759 (2002).
- 20) L. Zhu, R. Bakhtiar, N. M. Kostic, *JBIC*, 3, 383 (1998).
- 21) T. N. Parac, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 51 (1996).
- 22) L. Zhu, N. M. Kostic, *Inorg. Chem. Chim. Acta*, 339, 104 (2002).

- 23) N. M. Milovic, L-M. Dutca, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.*, 42, 4036 (2003).
- 24) N. M. Milovic, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 781 (2003).
- 25) I. Hamachi, N. Kasagi, S. Kiyonaka, T. Nagase, Y. Mito-oka, S. Shinkai, *Chem. Lett.*, 1, 16 (2001).
- 26) E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature*, 391, 775 (1998).
- 27) F. Patolsky, Y. Welzmann, O. Lioubashevski, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 2323 (2002).
- 28) C. F. Monson, A. T. Wooley, *Nano Lett.*, 3, 359 (2003).
- 29) W. E. Ford, O. Harnack, A. Yasuda, I. M. Wessel, *Adv. Mater.*, 13, 1793 (2001).
- 30) R. Djalali, Y. Chen, H. Matsui, *J. Am. Chem.* 124, 13660 (2002).
- 31) P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S. R. Sainkar, M. I. Khan, R. Ramani, R. Parischa, P. V. Ajaykumar, M. Alam, M. Sastry, R. Kumar, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 3585 (2001).
- 32) P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, A. Ahmad, M. I. Khan, R. Kumar, M. Sastry, *ChemBioChem*, 3, 461 (2002).
- 33) P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S. R. Sainkar, M. I. Khan, R. Parischa, P. V. Ajaykumar, M. Alam, R. Kumar, M. Sastry, *Nano Lett.*, 1, 515 (2001).
- 34) A. Ahmad, S. Senapati, M. I. Khan, R. Kumar, M. Sastry, *Langmuir*, 19, 3550 (2003).
- 35) P. L. Witkiewicz, C. F. Shaw. *Chem. Comm.*, 21, 1111 (1981).
- 36) E. Bordignon, L. Cattalini, G. Natile, A. Scatturin, *Chem. Comm.*, 32, 878 (1973).
- 37) C. F. Shaw, M. P. Cancro, P. L. Witkiewicz, J. E. Eldridge, *Inorg. Chem.*, 19, 3198 (1980).
- 38) J. Zou, Z. Guo, J. A. Parkinson, Y. Chen, P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 1359 (1999).
- 39) T. J. Beveridge and S. F. Koval, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 325 (1981).
- 40) R. Pardo, M. Herguedas, E. Barrado, M. Vega, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 26 (2003).
- 41) W. Ma, J. M. Tobin, *Water Research*, 37, 3976 (2003).

- 42) P. Vasudevan, V. Padmavathy, S. C. Dhingra, *Bioresour. Technol.*, 89, 281 (2003).
- 43) P. F. Li, Z. Y. Mao, X. J. Rao, X. M. Wang, M. Z. Min, L. W. Qiu, Z. L. Liu, *Bioresour. Technol.*, 94, 193 (2004).
- 44) D. W. Darnall, B. Greene, M. T. Henzi, J. Michael Hosea, R. A. McPherson, *Environ. Sci. Technol.*, 20, 206 (1986).
- 45) A. P. M. Antunes, G. M. Watkins, J. R. Duncan, *Biotech. Lett.*, 23, 249 (2001).
- 46) E. Guibal, N. V. Offenbergs Sweeney, M. C. Zikan, T. Vincent, J. M. Tobin, *Biol. Macromole.* 28, 401 (2001).
- 47) J. R. Lloyd, P. Yong, L. E. Macaskie, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4607 (1998).
- 48) P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *Environ. Technol.*, 24, 289 (2003).
- 49) P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Lett.*, 24, 205 (2002).
- 50) P. Yong, N.A Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 77, 593 (2002).
- 51) I. Vargas, L. E. Macaskie, E. Guibal, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 79, 49 (2004).
- 52) A. Nakajima, *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 369 (2003).

第二章 タンパク質に対する貴金属イオン吸着

2.1 モデルタンパク質に対するレアメタルイオンの吸着実験

① タンパク質に対する各種金属イオンの吸着実験

ここではモデルタンパク質に対する各種金属イオンが共存した水溶液を用いた競争吸着について評価した。実験結果は Fig. 2.1 に示す。いずれのタンパク質を用いても、比較的 Pd, Au イオンを吸着し、選択的吸着が可能であることが示唆された。共存する卑金属イオンはあまり吸着されなかった。Pd, Au イオンは水溶液中では塩化物錯体を形成し、負の電荷を帯びており、また多くのタンパク質が等電点を pH 5 前後に有するため、正に帯電しているタンパク質表面と静電的な相互作用によって吸着されている可能性も考えられる。しかしながら、同じ白金金属イオンでありながら、Pt イオンはあまり吸着されなかった。従って、単に静電的相互作用でタンパク質へ吸着されているのではないことが推察された。

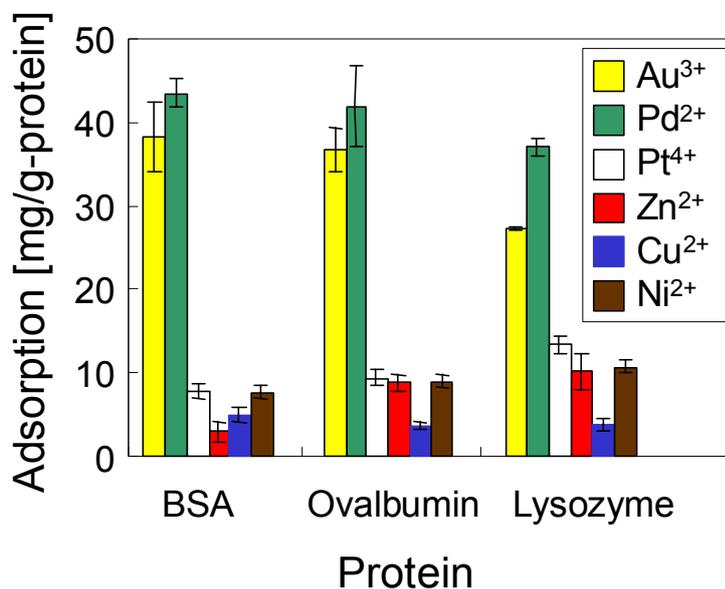


Fig. 2.1 金属イオン混合溶液中での精製タンパク質に対する金属イオンの競争吸着
(pH 1, 各種金属イオン 10 ppm, 各種タンパク質 0.2g/l)

② 精製タンパク質に対する Pd イオンと Au イオンの飽和吸着量

Pd イオンと Au イオンの精製タンパク質に対する飽和吸着量を調べた。タンパク質に対して金属イオンが過剰な条件下（吸着率が 40% 以下）で検討し、タンパク質 1 分子あたりに吸着された Pd イオンと Au イオン数を Table 2.1 に示す。この結果から、タンパク質 1 分子あたりに多くの Pd イオンと Au イオンが吸着され、タンパク質 1 分子に多数の吸着サイトが存在することが示唆された。

Table 2.1 タンパク質 1 分子あたりの Au, Pd イオンの吸着量

タンパク質	Lysozyme	BSA	Ovalbumin
Pd イオン吸着量	14 ± 2	65 ± 2	38 ± 3
Au イオン吸着量	3	25 ± 1	15 ± 2

③ Pd, Au, Pt イオン吸着におけるタンパク質濃度依存性

吸着媒体であるタンパク質の貴金属イオン（Au, Pd, Pt）に対する吸着能を評価するためにタンパク質濃度依存性を測定した。実験条件を Table 2.2 に示す。

Fig. 2.2, 2.3, 2.4 に示すように、金イオンおよびパラジウムイオンの吸着においてタンパク質濃度が上昇するにつれ吸着率は増大した。一方、白金イオンについては、金イオンおよびパラジウムイオン同様に、タンパク質濃度の上昇に伴う吸着率の増加が見られたものの、その吸着量は非常にわずかであり、他の 2 つの金属イオンに比べ吸着されにくいことが明らかとなった。

Table 2.2 実験条件

金属濃度	10 ppm
0.1 M HCl – NaOH 水溶液	pH 4.0
タンパク質濃度	0.05 ~ 2.0 g/l

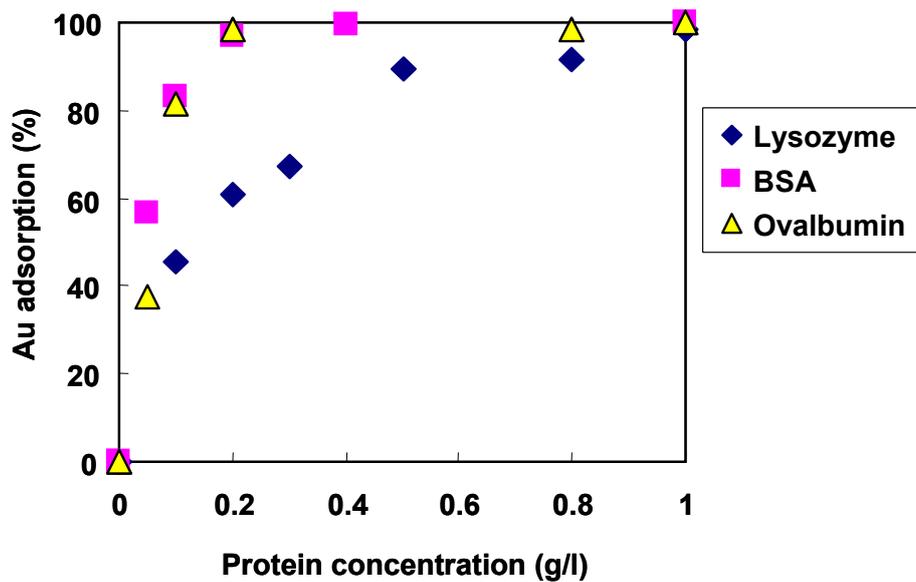


Fig. 2.2 金イオン吸着におけるタンパク質濃度依存性

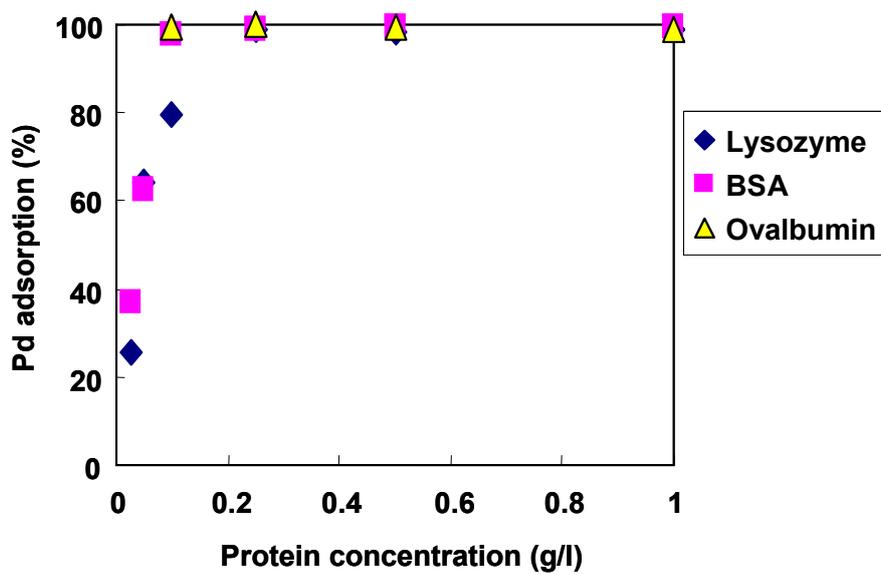


Fig. 2.3 パラジウムイオン吸着におけるタンパク質濃度依存性

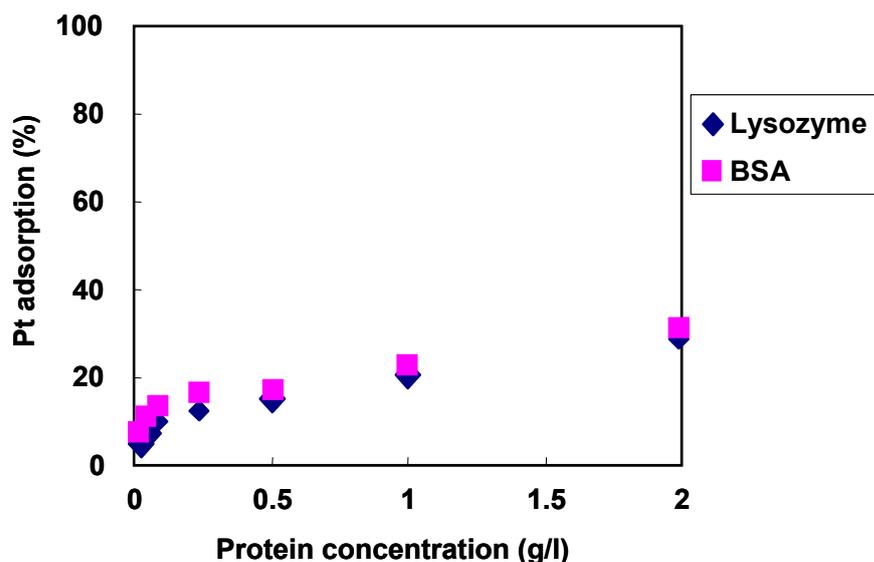


Fig. 2.4 白金イオン吸着におけるタンパク質濃度依存性

④ Au イオンおよび Pd イオン吸着における pH 依存性

次に、モデルタンパク質による金イオンおよびパラジウムイオンの吸着における pH の影響を評価した。実験条件を Table 3.3 に示す。

金イオンは、吸着率は pH 6.0 以下で 90 %以上の値を得た。一方、pH 6.0 以上では吸着率は減少した (Fig. 2.5)。この結果は、金イオンの水溶液中での溶存状態が関与しているものと考えられる。金イオンは、溶液中では塩化物イオンや水酸化物イオンと錯体を形成したアニオン状態で溶解している。そのため、低 pH (等電点以下の pH) ではタンパク質はカチオン状態にあるので、タンパク質と金イオン間の静電相互作用によって吸着されると推察される。しかしながら、pI 10.7 の Lysozyme と pI 4.6 の BSA, Ovalbumin で吸着挙動に明確な違いが見られなかった。また、Lysozyme と BSA は pH 1.0, 2.0 では吸着率が減少している。つまり、タンパク質による金イオン吸着はタンパク質の帯電状態に依存した単純な静電相互作用によるものだけではないことが示唆された。従って、この結果が得られたもう一つの要因として、pH の変化に伴う金イオンの溶存状態の変化が考えられる。本実験において使用した金イオン水溶液の場合、金イオンは pH 1.0 では $[\text{AuCl}_4]^-$ の状態で溶解しているが、pH が高くなるにつれ配位子置換が起こり、最終的に pH 6.0 以上ではほとんどが $[\text{AuOH}_4]^-$ 状態で溶解していると考えられる。この $[\text{AuOH}_4]^-$ 状態では、配位子

置換が起こりにくいため吸着されないのではないかと推察される。実際、金属酸化物への金イオンの吸着挙動が、pH や塩化物イオン濃度に依存するという結果が報告されており¹⁾、溶存種の吸着へ与える影響が示唆されている。

同様の実験をパラジウムイオンでも行った。Fig. 2.6 で示すように、pH が高くなるにつれ、吸着率も増大し、pH 4.0 以上ではほぼ 100 % 吸着した。pH 8.0 以上ではタンパク質を添加しなくても遠心限外ろ過することでパラジウムイオンがほとんど除去されてしまい、測定することができなかった。これは高 pH 領域では、パラジウムイオン同士が結合し、微粒子を形成したためではないかと思われる。パラジウムイオンも金イオンと同様に水溶液中ではアニオン状態で溶解している。そして、低 pH 領域での $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ が、pH が高くなるにつれ配位子置換が起こり、最終的に $[\text{PdOH}_4]^{2-}$ になる。パラジウムイオンは、溶媒抽出や吸着に関する研究が数多くなされて中で、Kondo らは、ジアルキルモノチオリン酸を用いて、種々の塩酸酸性溶液からのパラジウムイオンの抽出を行っている。彼らは水溶液中に存在する 4 種のパラジウム錯体種 (PdCl_4^{2-} , PdCl_3^- , PdCl_2 , PdCl^+) のそれぞれの抽出反応を考慮して抽出速度解析を行い、パラジウム-クロロ錯体の配位子置換反応に対する活性順位が $\text{PdCl}^+ > \text{PdCl}_2 > \text{PdCl}_3^- > \text{PdCl}_4^{2-}$ であり、 PdCl_4^{2-} は置換不活性のため抽出速度が減少することを報告している^{2), 3)}。本実験において得られた結果は、この報告と合致するものと考えられる。従って、貴金属イオンのタンパク質への吸着において、貴金属イオンの溶存状態は大きく影響することが示唆される。

Table 2.3 実験条件

金属濃度	10 ppm
0.1 M HCl - NaOH 水溶液	pH 1.0 ~ 8.0
タンパク質濃度	1.0 g/l

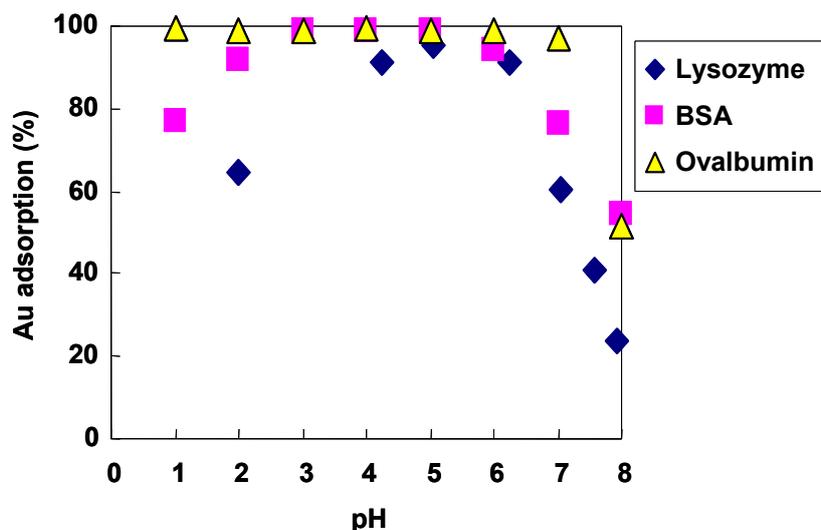


Fig. 2.5 金イオン吸着における pH 依存性

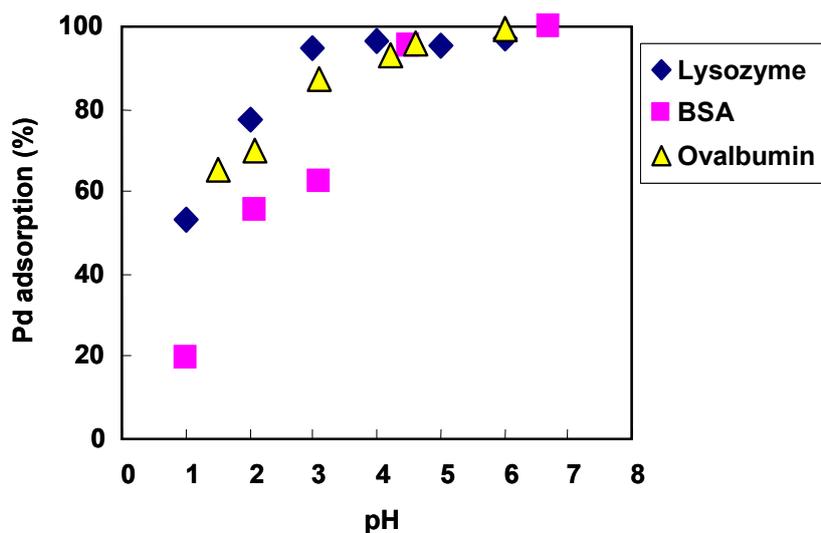


Fig. 2.6 パラジウムイオン吸着における pH 依存性

⑤ Pd イオンと Au イオン吸着における塩濃度の影響

タンパク質による貴金属イオンの吸着における静電的相互作用について検討するため、金イオンおよびパラジウムイオンの Lysozyme への吸着における塩濃度の影響について示した。塩として NaCl と NaCl₄O を選定した。実験条件は Table 3.4 に示す。まず NaCl については、NaCl 濃度が高くなるにつれ吸着率は減少し、金イオンは 57 %、パラジウムイオンは 18 %まで吸着が抑制された (Fig. 2.7 左)。吸着が抑えられた要因として、タンパク質

を構成するアミノ酸と金属イオン間の静電相互作用が抑えられたことと塩化物イオン濃度が増加により、金属イオンが置換不活性錯体を形成したことの二つが考えられる。そこで、塩化物イオン濃度を一定にするために塩を NaCl_4O に替えて同様の実験を行った。その結果、 NaCl_4O 濃度が増加しても金イオンおよびパラジウムイオンともに吸着率に影響が見られなかった (Fig. 2.7 右)。この結果から、タンパク質による貴金属イオンの吸着は、タンパク質と貴金属イオンが配位結合することにより吸着され、その際の貴金属イオンの溶存種により吸着挙動が大きく変化することが明らかとなった。また、吸着において、タンパク質と貴金属イオン間の静電相互作用はあまり影響しないことも示唆された。

Table 2.4 実験条件

金属濃度	各 10 ppm
0.1 M HCl – NaOH 水溶液	pH 4.0
塩濃度	0.05 ~ 1.0 M
タンパク質濃度	0.2 g/l

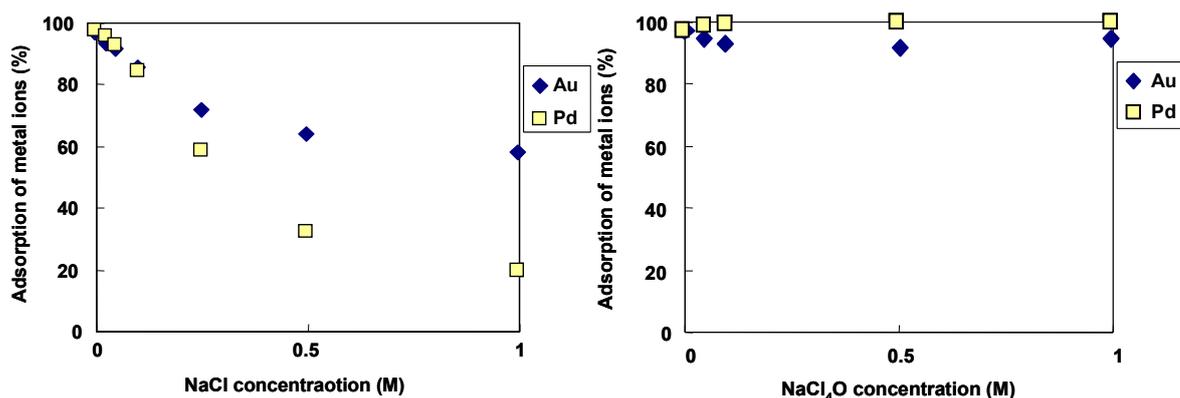


Fig. 2.7 金属吸着に及ぼす NaCl 濃度の影響 (左) と NaCl_4O 濃度の影響 (右)

2.2 モデルペプチドによる金イオン吸着サイトの同定

モデルペプチド配列の選定

第1章で述べたとおり、今まで多くの研究が貴金属イオンと His の強い親和性を報告している。また His 残基のイミダゾール環の窒素原子が金イオンに配位し、金イオンと G-G-H のトリペプチドが錯体を形成するという報告もある。これより、吸着サイトの同定がしやすいためモデルペプチド配列は Lysozyme (Fig. 2.8) 中の His 残基を含んだ配列を選定し、この配列を樹脂上に合成して吸着実験を行った。

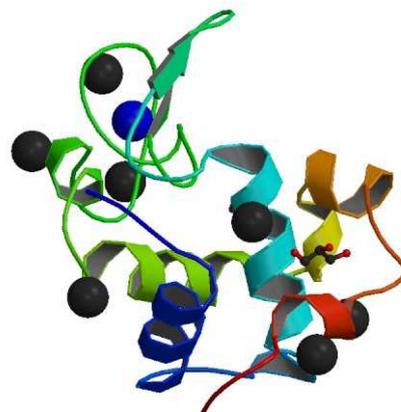


Fig. 2.8 Lysozyme の分子構造

```
KVFGR    CELAA    AMKRH    GLDNY    RGYSL    GNWVC
AAKFE    SNFNT    QATNR    NTDGS    TDYGI    LQINS    RWWCN
DGRTP    GSRNL    CNIPC    SALLS    SDITA    SVNCA    KKIVS
DGNGM    NAWVA    WRNRC    KGTDV    QAWIR    GCRL
```

Scheme 2.1 Lysozyme のアミノ酸 1 次配列(太字・下線がモデルとして選定した配列)

N 末端アセチル化トリペプチド樹脂を用いた金イオンの吸着実験

His-Gly-Leu で吸着における His 残基の影響を比較するため、N 末端アミノ酸(X)が異なるトリペプチド **X-Gly-Leu** を樹脂上に 10 種類合成した。しかし、N 末端がアミノ基であるため、N 末端アミノ基に金イオンが吸着することが考えられる。ここで固相合成における側鎖の脱保護操作の前に無水酢酸処理を施し、N 末端のアミノ基をアセチル化することで、**Ac-X-Gly-Leu-resin** を得た。実験条件を Table 2.5 に示す。

実験結果を Fig. 2.9 に示す。His を含むペプチドが金イオン、パラジウムイオン及び白金イオンに対して強い吸着能を示した。これは、His 残基側鎖にあるイミダゾール環の N 原子が貴金属イオンへの配位し錯体を形成することによるものと考えられる。この結果は、1956 年の金イオンのオブアルブミンへの吸着における Craig らの報告と合致する。一方、他のアミノ酸を含むペプチドについては Lys 残基を含むペプチドが金イオンに対して高い吸着率を示しただけであった。以上より、金、パラジウム及び白金イオンに対して吸着能を有するのは His を含むペプチドで、Lys を含むペプチドは金イオンのみを吸着することが明らかになった。

Table 2.5 実験条件

貴金属イオン濃度	10 ppm
0.1 M NaCl 水溶液	pH 4.0
ペプチド添加量	0.7 μ mol 分

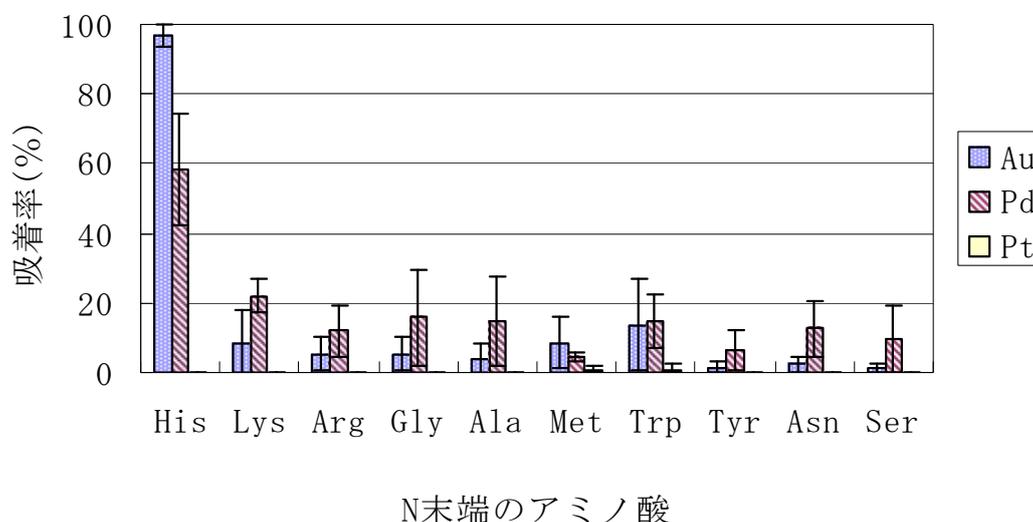


Fig. 2.9 N 末端アセチル化トリペプチド樹脂による金イオンの吸着実験

2.3 タンパク質性バイオマスのレアメタルイオン吸着剤としての利用

① バイオマスに対する各種金属イオンの競争吸着

吸着実験の結果を Fig. 2.10 に示す。このグラフよりいずれのバイオマスにおいても金属の吸着性能を有することが分かった。いずれのバイオマスに関しても Pd イオンを多く吸着する傾向にあり、その中でも卵殻膜、鶏挽肉、明太子の皮、羽毛粉末、鰹節は Au, Pd, Pt などの貴金属類を吸着し、Cu, Zn などの卑金属類をごくわずかししか吸着しないことから選択的に貴金属を吸着する能力を有していることが予想される。4 種類の中でもとくに卵殻膜は高い吸着量と高い選択性を有していることが分かった。また粗タンパク質量と吸着量や選択性に関連性が見られないことから、タンパク質そのものの量は吸着性能におおきな影響を与えてないことが確認された。

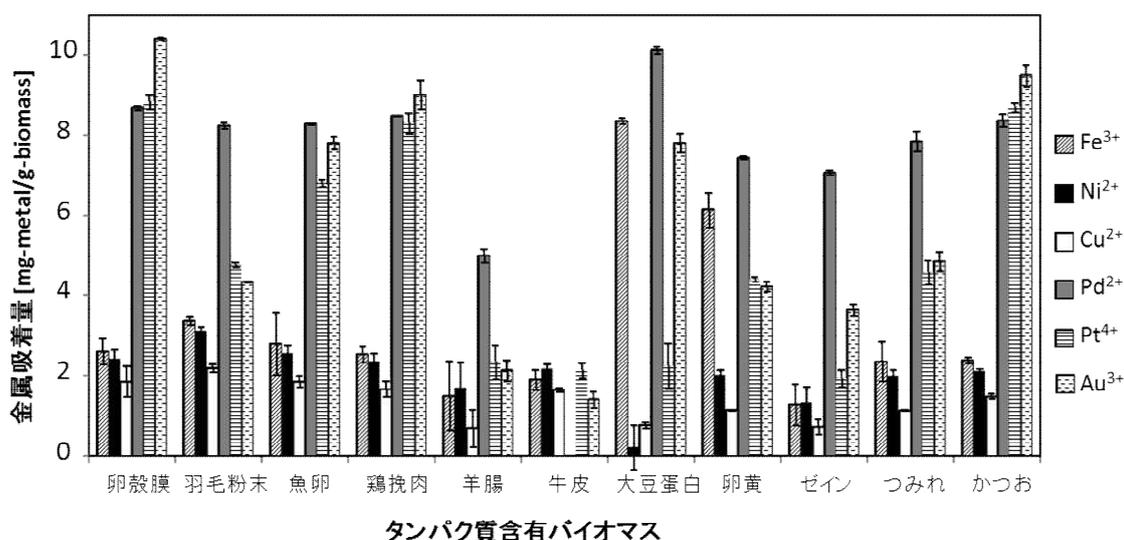


Fig. 2.10 混合モデル溶液からの競争吸着

② 単独吸着におけるタンパク質バイオマスの吸着能力の比較

前述の検討では比較的薄い金属イオン濃度かつ金属イオン混合溶液からの選択的吸着を検討したが、ここでは、Pd, Pt, Au イオンそれぞれに対する各種バイオマスの吸着能力を個別に調査した。比較的高濃度で個別の金属イオン水溶液を調製し、バイオマスを添加、24 時間後の減少量を測定した。結果を Fig. 2.11 に示す。Pd, Pt, Au イオンを比較した結果、競争吸着と同様単独吸着においても、どのバイオマス

も Au イオンに対して高い吸着能力を示すことがわかった。なかでも卵殻膜が最も高い吸着能力を示し、次に鰹節、鶏挽肉という順で吸着能が高かった。Pd や Pt イオンの吸着能力に関しては、Au イオンの吸着能力と若干違う順序になった。それぞれのバイオマスにおいて含まれるタンパク質成分の違いやタンパク質以外の微量成分の違いのために、金属イオン種間で吸着挙動に差が出たものと思われる。

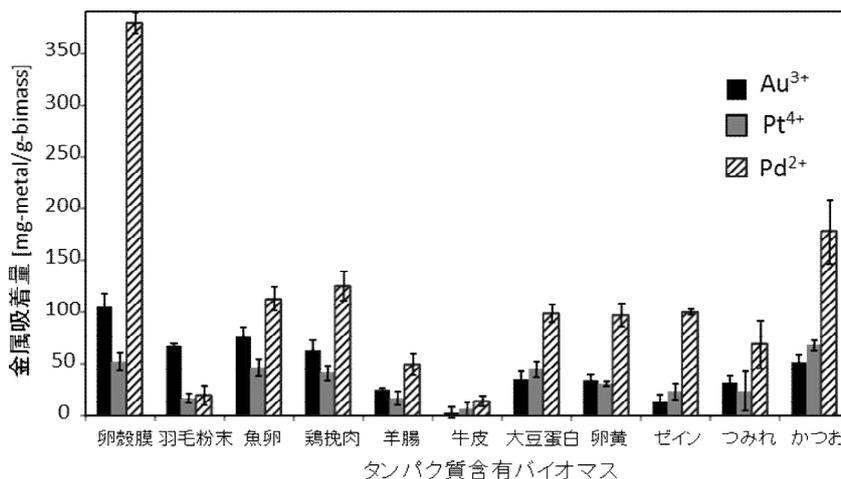


Fig. 2.11 Pd, Pt, Au イオン単独吸着におけるバイオマスの吸着能力 (バイオマス 0.4 g/l, 金属イオン 200ppm, pH~0.6, 室温 24 h)

③ 金属イオンの飽和吸着量

得られた吸着等温線を Fig. 2.12 に示す。この図よりおおよそではあるが卵殻膜の飽和貴金属イオン吸着量を得ることができ、Au, Pt は約 120 mg-金属/g-卵殻膜、Pd は約 275mg-金属/g-卵殻膜であることがわかった。

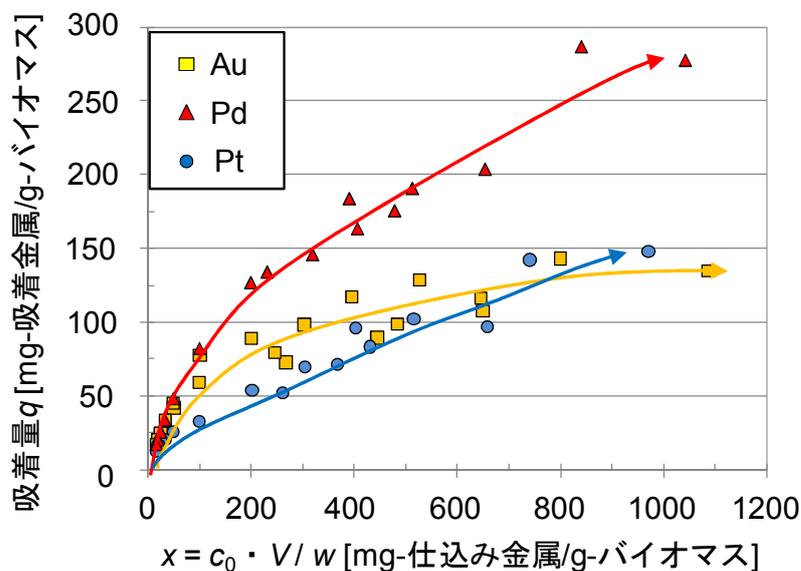


Fig. 2.12 卵殻膜の吸着等温線

本項における実験により特定のバイオマスを用いることによって貴金属・レアメタルを選択的に吸着、回収することが可能であることが示唆された。選択性が得られる原因として、混合溶液における吸着量および選択性と粗タンパク質量に相関性が見られないことから単純なタンパク質量だけではなく別の要因が考えられ、序論でも紹介したようにタンパク質の特定のアミノ酸配列による特異的な吸着サイトの存在が予想される。卵殻膜においては卵殻膜内にジスルフィド結合(S-S 結合)が豊富であることが知られている。そのため卵殻膜は高い機械的強度を有し、耐薬品性に優れていると言われている。この S-S 結合に用いられる硫黄原子は金属元素、とくに貴金属元素と高い親和性を有する。そのため高い貴金属吸着量、選択性を有するものと考えられる。また貴金属類が還元されやすいことも影響していると考えられる。タンパク質は低 pH では一般に弱い還元剤として作用するため、イオン化傾向が小さく、還元を受けやすい貴金属イオンは還元されタンパク質表面に吸着していることが予想される。一方卑金属イオンはイオン化傾向が高いため、タンパク質の弱い還元能では還元されずイオンとして液中に残存する。そのため貴金属類と卑金属類が分離できるものと考えられる。

卵殻膜の飽和吸着量の導出の試みは今後どれだけ卵殻膜に吸着が可能であるのか、理想状態と実在状態の差異を検討するためにも有用なものであると考えられる。吸着等温線の完成にはさらなる試行の必要性がある。しかし、現在一般的に貴金属リサイクルに用いられているイオン交換樹脂の性能が 1 リットルにつきおおよそ 100 g 程度で金属を回収できると言われるため、卵殻膜を用いる手法は高効率な手法であると考えられる。

2.4 タンパク質性バイオマスを用いた実在廃液からのレアメタルの回収

実際の金属精錬液およびメッキ廃液を企業2社から頂き、卵殻膜を用いて精錬液およびメッキ廃液からレアメタルを回収可能かどうか検討した。結果を Tables 2.7, 2.8 にまとめた。まず金属精錬液は、Ag, Pd, Pt, Cu, Pb が含まれている。興味深いことに Pd と Pt の吸着率が選択的に顕著であり、しかも卵殻膜投入量に応じ、吸着率が上昇している。Ag はわずかに吸着し、Cu と Pb はほとんど吸着していない様子がわかる。条件にもよるが、Pd イオン吸着量から概算すると卵殻膜 1 kg でおよそ 140 g 程度のパラジウムが回収可能であり、パラジウム価格にしておよそ 16 万円相当が 1000 円程度のバイオマスで回収可能であることを意味する。この計算は、材料費のみの計算であるため、実際はエネルギーコスト、人件費等をさらに考慮する必要がある。

一方、頂いたメッキ廃液 3 種は Pd, Pt, Au をそれぞれ含有しており、こちらも卵殻膜によりこれら金属イオンが吸着されていることがわかった。メッキ廃液 3 種は、液性 (pH) が大幅に違うものである。このことから、吸着能に差はあるが、広い pH 条件下で卵殻膜を用いて Pd, Pt, Au の金属イオンを吸着回収可能であることがあきらかになった。

この 3 種のメッキ廃液中の金属を吸着したバイオマスを濾別、洗浄したのち、600°C で二時間炭化させ、得られた灰を王水にて再溶解させた。得られた溶液中の金属イオンを測定したところ、吸着した Pd および Pt を全て回収することに成功した。Au は吸着したものの 30% 程度の回収率であった。これは王水による再溶解時間が不足していたためと考えられる。

Table 2.7 頂いた金属精錬液の金属濃度および吸着率

原液濃度 [ppm]	卵殻膜				
	7.5mg/ml	15mg/ml	30mg/ml	60mg/ml	
	吸着率 [%]	吸着率 [%]	吸着率 [%]	吸着率 [%]	
Ag	35000	1.7	1.5	4.3	10.0
Pd	4800	25.8	47.6	82.6	99.7
Pt	1500	1.0	4.9	17.0	32.0
Cu	7400	0.4	0.0	0.0	0.0
Pb	450	0.0	0.0	0.0	2.5

*7 M HNO₃ を含む。

Table 2.8 頂いたメッキ廃液の金属濃度

対象金属イオン	初濃度(g/l)	吸着率 (%)	pH
① Pt	5.7	85	0.7
② Pd	100	94	10.3
③ Au	5.3	71	6.2

*300 mg の卵殻膜を 5 ml の溶液に添加

参考文献

- 1) T. Ykoyama, Y. matusukado, A. Uchida, Y. Motomura, K. Watanabe, E. Izawa, *J. Coll.Interf. Sci.*, 233, 112(2001).
- 2) K. Kondo, H. Nishio, F. Nakashio, *J. Chem. Eng. Japan*, 22, 269(1989).
- 3) K. Kondo, J. Oishi, F. Nakashio, *J. Chem. Eng. Japan*, 23, 365(1990).

第三章 タンパク質による金属イオン還元に関する検討

3.1 緒言

これまでの検討結果から、タンパク質およびタンパク質バイオマスに多くの金イオン、パラジウムイオン、白金イオンが吸着していることがわかった。また、ペプチドを用いた検討からいくつかのアミノ酸あるいはペプチド配列がこれら金属イオン吸着に重要な役割を果たしていることが判明した。しかしながら、パラジウムや金イオンの吸着量は、タンパク質を構成するアミノ酸残基に比して大幅に多く、アミノ酸やペプチドによる金属イオンのキレートで全てを説明することができない。吸着金属イオンの多さを考えると、これら金属イオンがタンパク質上で還元している可能性が考えられる。そこで本章では、タンパク質によるこれら金属イオンの還元を検討した。

金を例にとると、金イオンを還元し金マイクロあるいはナノプレートを作製する報告例がみられる。この金マイクロプレート調製法の中に、生体分子を利用した例が、数例報告されている。Sastryらは、アロエの抽出物¹⁾、Leeらは海藻の抽出物²⁾を用いて金ナノプレートを合成した (Fig. 3.1)。また、Dongらは、アミノ酸の一種であるアスパラギン酸を用いてマイクロサイズの金プレートを合成に成功している³⁾。

そこで本章では、タンパク質を利用して金イオンを還元し、金マイクロプレート調製ができるかどうかの検討を行った。

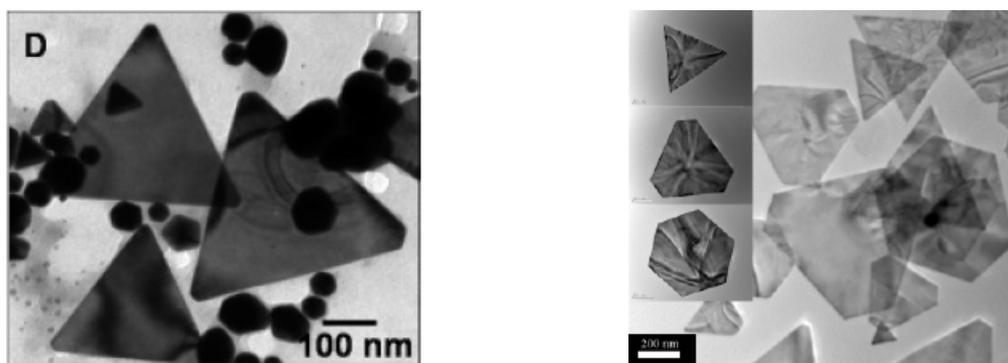


Fig. 3.1 生体分子を利用して調製された金ナノプレート
左：アロエの抽出物を利用、右：海藻の抽出物を利用

3.2 実験

試薬

原子吸光用金標準溶液 (5 mM HAuCl_4 in 2 M HCl) はメルク株式会社から購入した。塩化金 (4 水和物)、ピペリジン、アセトンはキシダ化学株式会社から購入した。ウシ血清アルブミン (BSA)、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP)、アミノ酸は、和光純薬工業株式会社から購入した。カゼイン、リゾチーム、リパーゼ (*Candida rugosa* 由来、Type VII)、リボヌクレアーゼ A (RNase A) は、シグマ - アルドリッチから購入した。

実験操作

タンパク質を利用した金マイクロプレートの調製

主な金マイクロプレート調製方法を以下に示す。5 mM 原子吸光用金標準液 (HAuCl_4 in 2 M HCl) 0.1 ml に、2.5 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液 0.4 ml を混合し、100°C において 3 時間反応させた (終濃度: 金イオン 1 mM、BSA 2 mg/ml)。反応後に、金色光沢を有する結晶の生成が目視により確認された。調製したサンプルを室温まで冷却後、8000 rpm で 60 秒間遠心分離して上澄みを除去した。ここに、1 M NaOH 水溶液を 0.5 ml 添加して数分間攪拌した後、再び遠心分離して上澄みを除去した。この操作は 3 回繰り返し行った。続いて、Milli-Q 水を 0.5 ml 添加して数分間攪拌した後、遠心分離して上澄みを除去した。この操作も 3 回繰り返し行い、BSA が除去された金マイクロプレートを得た。

金マイクロプレートのモルフォロジー観察

走査型電子顕微鏡 (SEM、SS-550、島津製作所) 測定及びエネルギー分散型 X 線 (EDX) 測定には、Milli-Q 水によく分散させた金マイクロプレートを、カーボンフィルム上に滴下して真空中で 1 晩乾燥させたものを用いた。観察は、加速電圧 15 kV で行った。

原子間力顕微鏡 (AFM) 測定には、Milli-Q 水によく分散させた金マイクロプレートを、マイカ壁開面上に滴下して真空中で 1 晩乾燥させたものを用いた。測定はダンピングモードで行った。

X線回折（XRD）測定には、エタノール中によく分散させた金マイクロプレートを、シリカ基板上に数回滴下した後、エタノールを蒸発させたものを用いた。測定は、CuK α 線（ $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ 、40 kV、40 mA）により行った。

金マイクロプレートの成長過程の観察

倒立型システム顕微鏡（IX 701、オリンパス）を用いた金マイクロプレートの観察には、5 mM HAuCl₄水溶液に BSA を 20 mg/ml になるよう添加して、よく攪拌したものをスライドガラス上に滴下したものを用いた。

動的光散乱（DLS）測定（ナノゼータサイザー、マルバーン）には、BSA 未洗浄のサンプルを用い、石英セル（光路長 10 mm）中で測定した。

金マイクロプレートの光学特性評価

UV-vis-NIR スペクトル（V-570、島津製作所）には、BSA 未洗浄のサンプルを用い、石英セル（光路長 10 mm）中で測定した。また、塩化金水溶液（HAuCl₄）を用いて調製した金粒子についても測定した。

蛍光スペクトル測定には、金マイクロプレート調製後冷却したサンプル、BSA 洗浄を行った金マイクロプレートを Milli-Q 水に分散させたサンプル、それぞれの溶液を 0.8 μm フィルター（Millipore）ろ過したサンプルを用いた。また、HAuCl₄ 水溶液を用いて調製した金粒子についても測定した。

アミノ酸を利用した金マイクロプレートの調製

原子吸光用金標準液（HAuCl₄ in 2 M HCl）または塩化金水溶液（HAuCl₄） 0.5 mL に、アミノ酸を添加した。必要に応じて、少量の有機溶媒の添加や窒素置換を行った。溶液を加熱して反応させた後、光学顕微鏡を用いて観察することにより金マイクロプレートの有無を確認した。

3.3 結果及び考察

ウシ血清アルブミン (BSA) により調製した金マイクロプレートの構造特性評価

調製した金マイクロプレートの SEM 写真を Fig. 3.2 に示す。この写真から、三角形や六角形の金マイクロプレートの生成が確認された。金マイクロプレートのサイズは数 μm であり、マイクロサイズの金プレートとしては、比較的サイズのばらつきが少なかった。同時に、100-200 nm のサイズの金粒子も生成している様子が観察された。また、SEM 付属の EDX により金マイクロプレートの分析を行った結果を、Fig. 3.3 に示す。これにより、金のピークが検出されたため、マイクロプレートが確かに金で構成されていることが確認できた。EDX では、金の他に、炭素、窒素、酸素などのピークも検出され、BSA は洗浄操作では完全に除去しきれなかったことが示唆された。

AFM による測定結果を、Fig. 3.4 に示す。これにより、金マイクロプレートの厚さは 70-100 nm 程度であることが明らかになった。厚さは、形状やサイズに依存した傾向は見られなかった。

金マイクロプレートの XRD 測定を行った結果を、Fig. 3.5 に示す。この結果からも、マイクロプレートが確かに金で構成されていることが確認され、面心立方晶系の金結晶の回折パターンが観測された^{4, 5)}。(111)面と(200)面のピーク強度比は 0.25 対 0.12、(111)面と(220)面は 0.25 対 0.069 であり、参照ファイルと比べると、他の面に対する(111)面のピーク強度が大きかった。このことは、(111)面の多くが測定用基盤表面と平行にキャストされていることを示しており、金マイクロプレートの底面が(111)面であると考えられる^{6, 7)}。

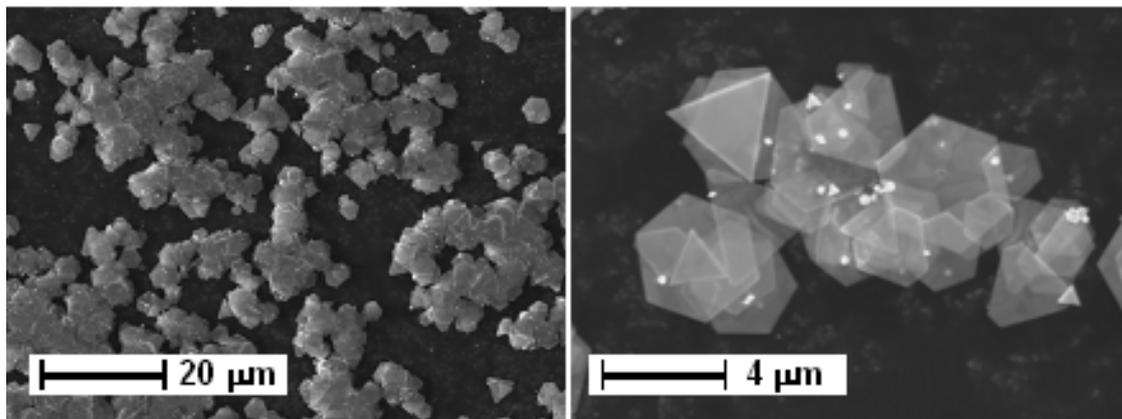


Fig. 3.2 金マイクロプレートの SEM 写真
左：1000 倍、右：5000 倍

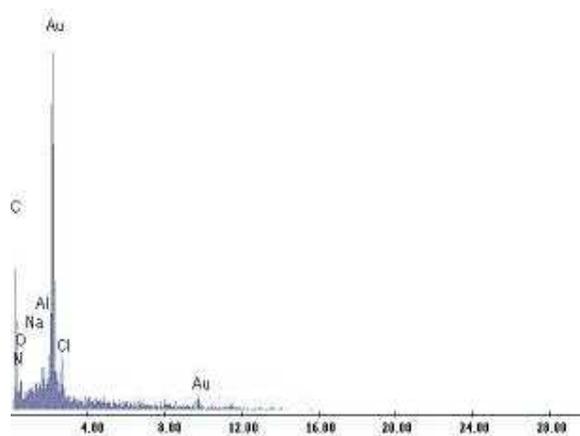


Fig. 3.3 金マイクロプレートの EDX スペクトル

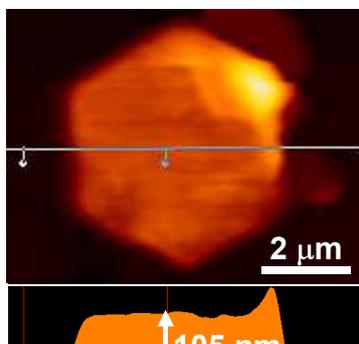


Fig. 3.4 金マイクロプレートの AFM 像

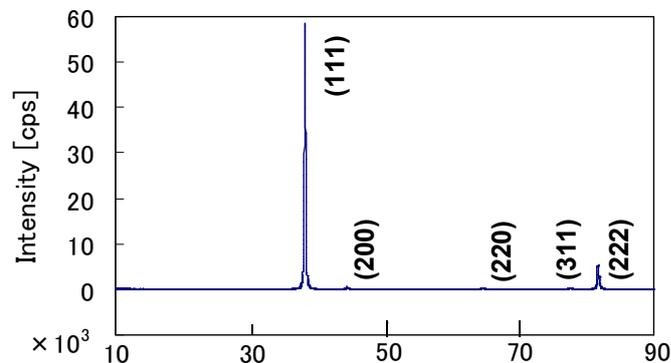


Fig. 3.5 金マイクロプレートの XRD 回折パターン

金マイクロプレート調製における反応条件の検討

① 金イオン濃度の影響

BSA 濃度が 2 mg/ml、金イオン濃度が 0.25、0.5、1、2、3、5 mM になるよう両者を混合したものを、それぞれ 100°C において 3 時間反応させた。冷却後、BSA 洗浄を行ったサンプルについて SEM 観察を行った。

結果を Fig. 3.6 に示す。金イオン濃度が 0.25、0.5、1、2、3 mM の場合に金プレートの生成が確認された。いずれの場合もプレートのサイズは不均一であり、直径が $10\ \mu\text{m}$ 前後のものが多く見られた。金イオン濃度 0.25 - 2 mM のサンプルの場合、金イオン濃度が増加するにつれて、金プレートの厚みが増すことが示唆された。金イオン濃度 0.25 mM で調製した金プレートは非常に薄く、X 線が金マイクロプレートを透過して、重なり部分の下にあるプレートが透けて見えるような SEM 写真が得られた。一方で、2 mM の場合では、厚みのある金マイクロプレートが観察された。このことから、金プレートの結晶は底面方向より側面方向に成長しやすいことが示唆される。金イオン濃度が 3 mM の場合では、非常に大きな金プレートが得られ、数十 - $150\ \mu\text{m}$ サイズのものが多く観察された。この場合は、金イオン量に対する BSA 濃度が少なく、核生成段階に使われる金イオンは限られており、多くの金イオンが結晶成長のために残されているため、大きな結晶が得られたと考えられる。また、金イオン濃度が 5 mM の場合では、金プレートはまったく生成せず、金プレート生成には金イオン濃度

に対して十分な BSA 量が必要であると考えられる。

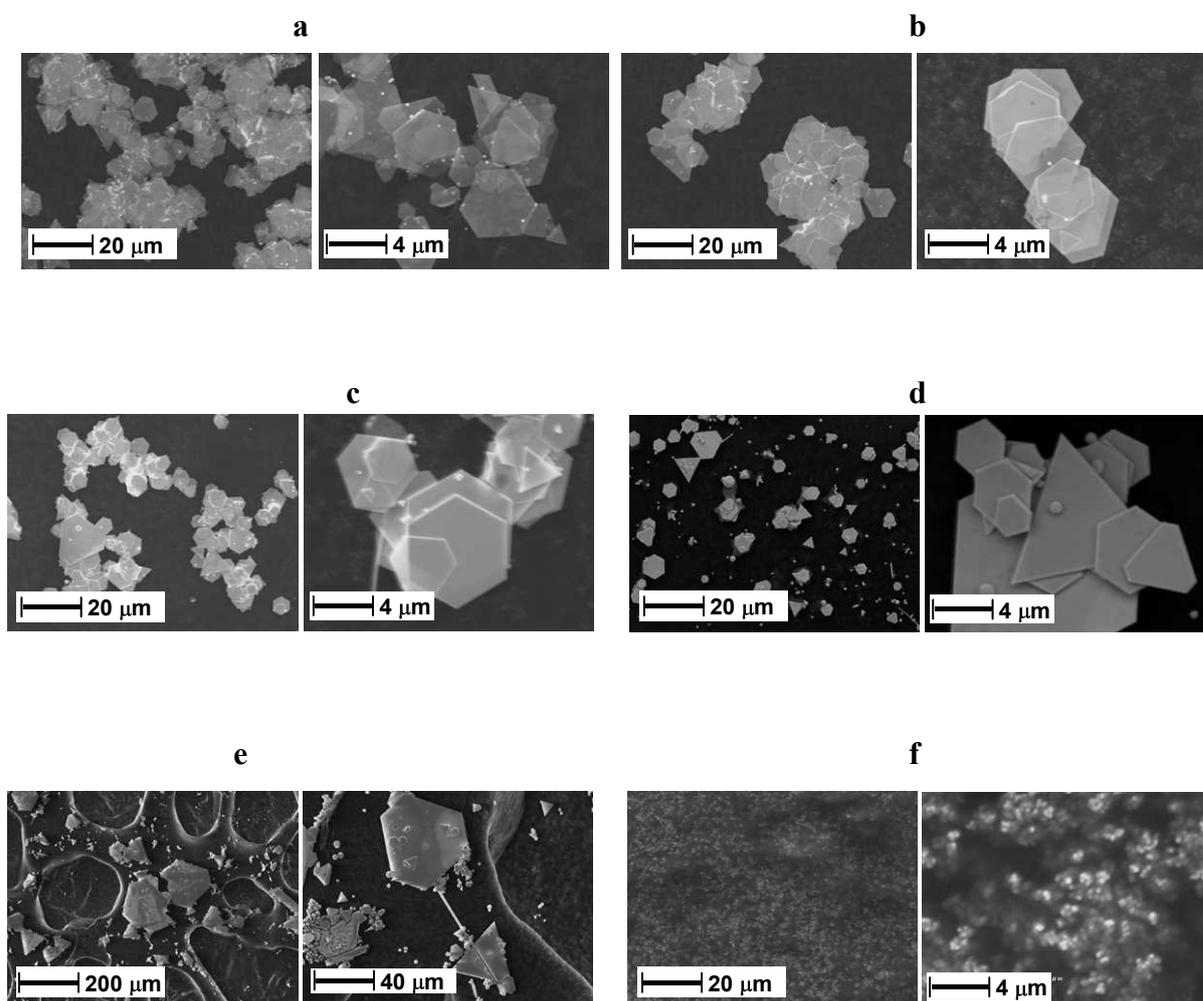


Fig. 3.6 金イオン濃度が金マイクロプレートの生成に与える影響についての検討

金イオン濃度：a=0.25 mM、b=0.5 mM、c=1 mM、d=2 mM、e=3 mM、f=5 mM、BSA 濃度はいずれも 2 mg/ml

② BSA 濃度の影響

金イオンを 1 mM、BSA を 0.2、1、2、5、10 mg/ml になるよう両者を混合したものを、それぞれ 100°C において 3 時間反応させた。室温まで冷却後、BSA 洗浄を行ったサンプルについて SEM 観察を行った。結果を Fig. 3.7 に示す。BSA 濃度が 0.2 mg/ml の場合では、金マイク

ロプレートは確認されず、BSA 濃度が十分ではないことが示唆された。BSA 濃度が 1、2、5、10 mg/ml の場合では、いずれの場合も金プレートが確認された。BSA 濃度が、1、2 mg/ml の場合では、数 μm の金マイクロプレートが観察され、サイズのばらつきが比較的少なかった。BSA の濃度が高くなると、より大きなサイズの金マイクロプレートが観察された。また、BSA 濃度が 10 mg/ml の場合では、角がとれて丸みを帯びたプレートが多数観察された。したがって、高すぎる BSA 濃度は金プレート調製には不適切と言える。

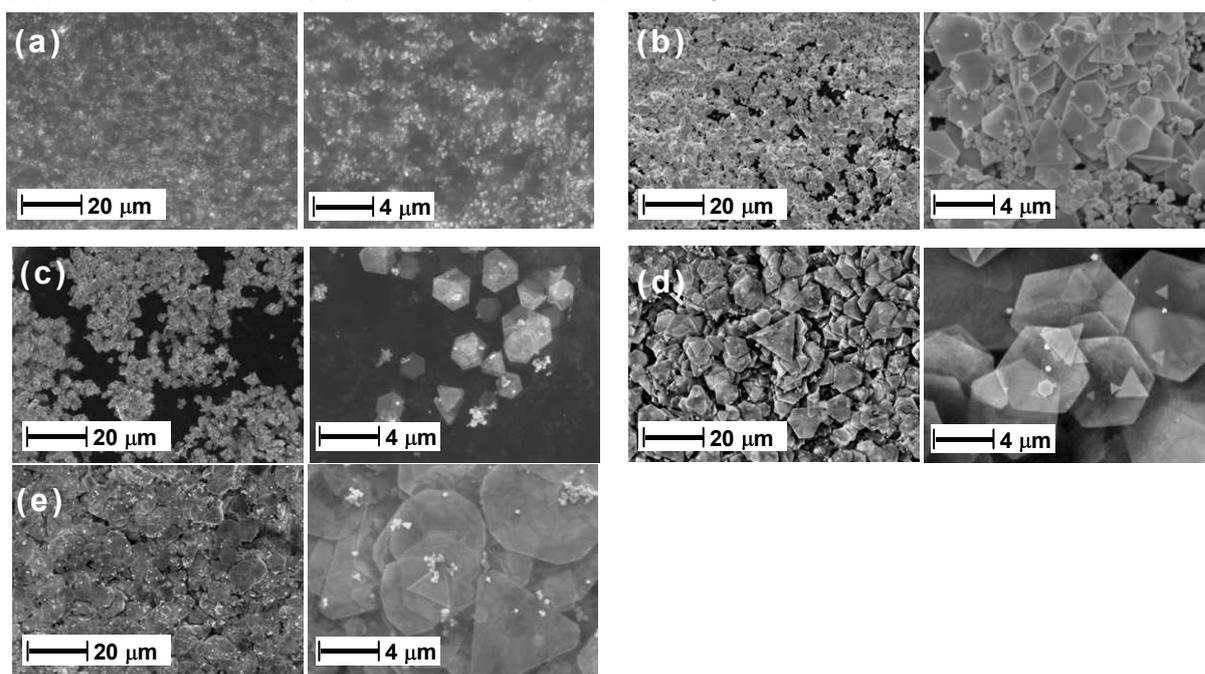


Fig. 3.7 BSA 濃度が金マイクロプレートの生成に与える影響についての検討

BSA 濃度 : a=0.2 mg/ml、b=1 mg/ml、c=2 mg/ml、d=5 mg/ml、e=10 mg/ml

※金イオン濃度はいずれも 1 mM

※a は、BSA 洗浄操作なし

③ 反応温度の影響

金イオン濃度 1 mM、BSA 濃度 2 mg/ml になるよう両者を混合したものを、室温、40、60、80、100℃において 3 時間反応させた。これらを室温まで冷却後、SEM 観察を行った。結果を Fig. 3.8 に示す。室温で反応させたものは、反応後の溶液の色が黄色から透明に変化しており、金イオン（3 価）が BSA により還元されたことが示唆された。しかし、目視による金色光沢の結晶の生成は確認できなかった。SEM による観察を行うと、ごくわずかではあるが Fig. 4-3a のような金結晶が観察された。40℃の場合も、目視による観察結果は室温の場合と同様であったが、SEM による観察された金結晶の数が増え、金結晶のサイズも大きかった。60℃以上で反応させたサンプルについては、いずれも目視により金色光沢の金結晶が確認でき、温度が高くなるほど生成量が多くなる様子が観察された。Fig. 3-8 を見ると、60℃の場合はサイズのばらつきが大きく、金粒子の会合体のようなものも多数観察された。80℃の場合も、100℃の場合に比べると金マイクロプレートのサイズのばらつきが大きかった。

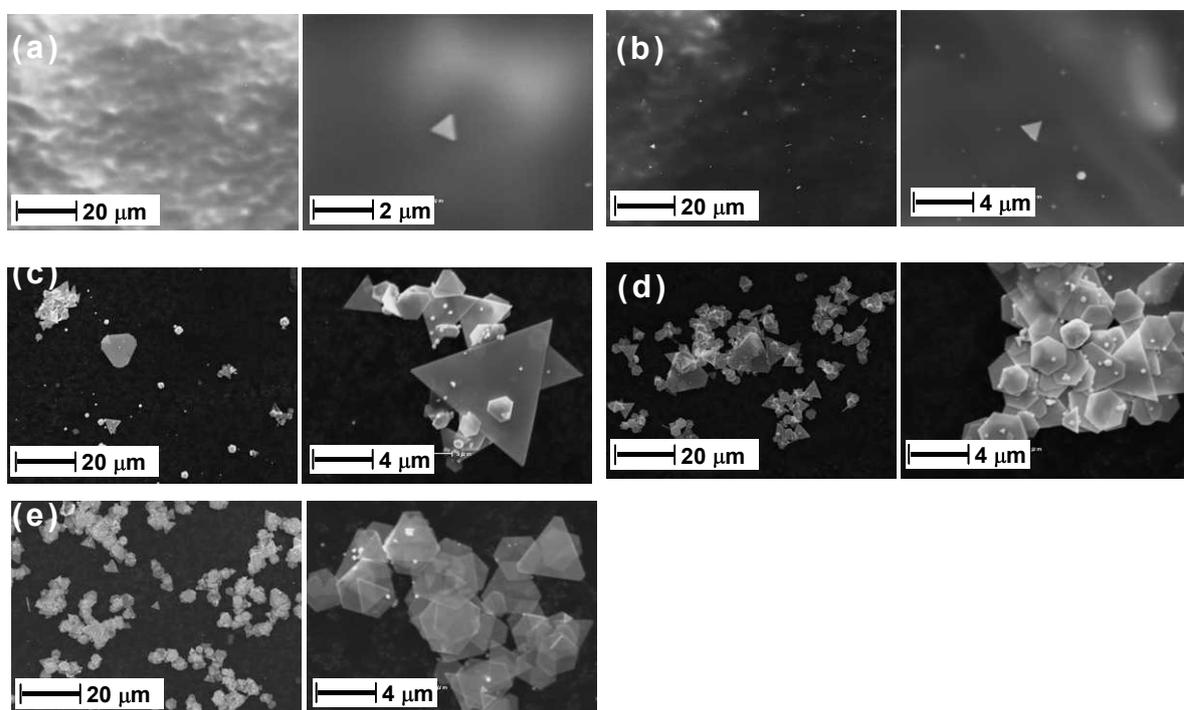


Fig. 3.8 反応温度が金マイクロプレートの生成に与える影響についての検討
反応温度：a=室温、b=40℃、c=60℃、d=80℃、e=100℃
金イオン濃度はいずれも 1 mM、BSA 濃度はいずれも 2 mg/ml

④ pH の影響

1 mM 原子吸光用金標準溶液 (HAuCl₄ in 0.4M HCl) と 1 mM 塩化金水溶液 (HAuCl₄) の pH は、それぞれ 0.27 と 3.22 である。この 2 種類の金イオン溶液を用いて、金マイクロプレート調製時の pH 条件について検討した。金イオン濃度 1 mM、BSA 濃度 2 mg/ml になるよう両者を混合した溶液を 100℃において 3 時間加熱した。それぞれの溶液の加熱前と加熱後の写真を、Fig. 3.9 に示す。加熱前は両方の溶液とも、黄色溶液であった。加熱後は、塩化金水溶液を用いた溶液は紫色を呈し、原子吸光用金標準液を用いた溶液は金色光沢の沈殿が生成した。

Fig. 3.10 に、反応後の 2 種類の溶液について、UV-vis-NIR スペクトルを測定した結果を示す。塩化金水溶液を用いた溶液の場合は、540 nm と 595 nm に極大値を持つ吸収が観測され、金ナノ粒子の生成が示唆された。一方、原子吸光用金標準液を用いた溶液の場合は、近赤外領域に金マイクロプレートの SPR に由来する吸収が観測された。

Fig. 3.11 には、塩化金水溶液を用いた溶液について DLS 測定を行った結果を示す。この結果より、塩化金水溶液を用いた場合では、120 nm 程度のサイズの金ナノ粒子が生成したことが示唆された。

これらの結果より、金マイクロプレートは非常に低い pH 条件下において生成し、高い pH 条件下では金粒子が生成することが明らかになった。金イオンは、低 pH 条件下では塩化物イオンが配位した四配位錯体で水中に溶存しており、pH が高くなるにつれ配位子が水酸化物イオンに置換されることが知られている。そのため、pH が低い方が金イオンは還元されにくいと推測され⁸⁾、塩化金水溶液を用いた場合に比べて原子吸光標準液を用いた場合の方が、金イオンはゆっくり還元されると考えられる。このことが金の結晶成長に有利に働いたため、原子吸光用金標準液を用いた場合では、金マイクロプレートが生成したと考察した。

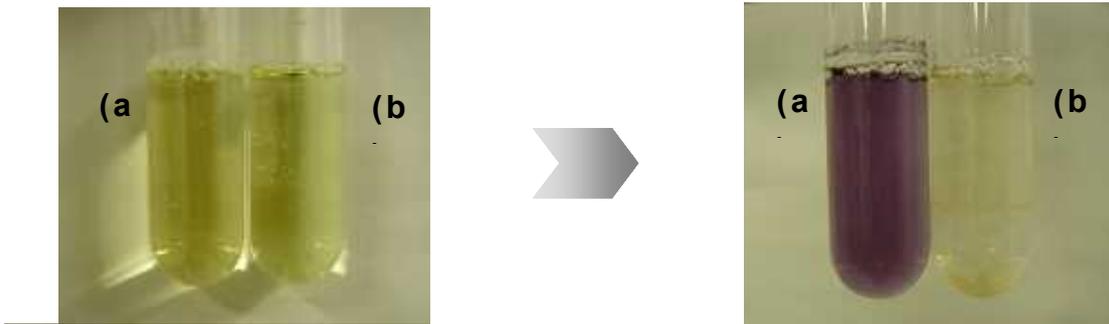


Fig. 3.9 100°C、3 時間加熱前後の溶液状態の変化
 右：過熱前、左：加熱後
 (a)塩化金水溶液、(b)原子吸光用金標準液

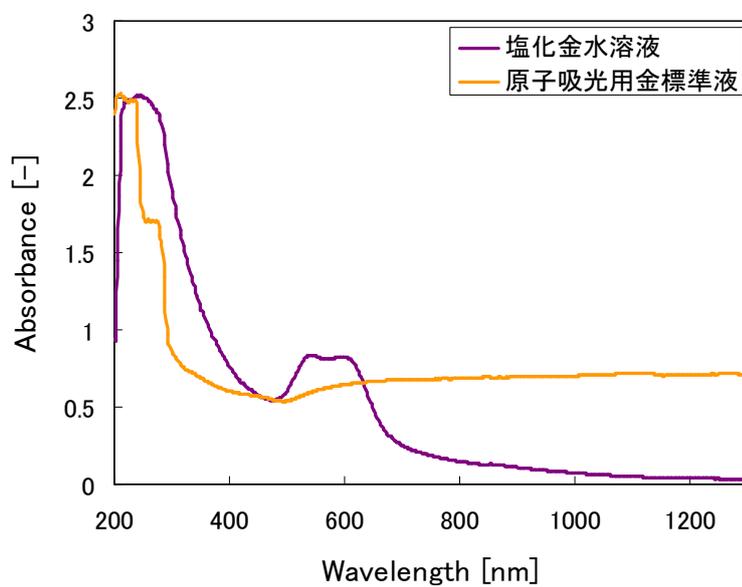


Fig. 3.10 反応後の溶液の UV-vis-NIR スペクトル

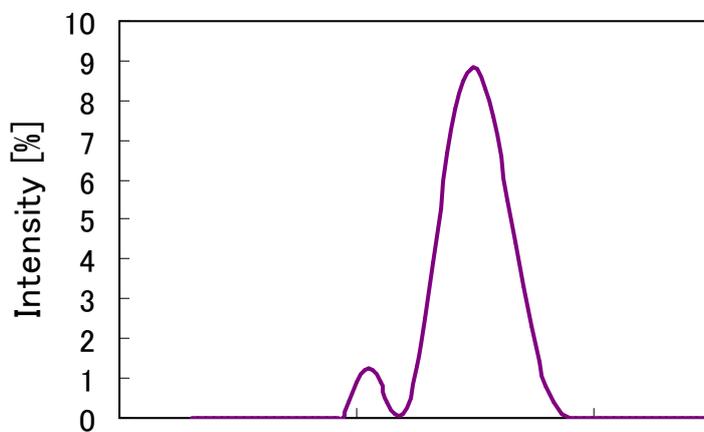


Fig. 3.11 塩化金水溶液を用いた場合の溶液の DLS

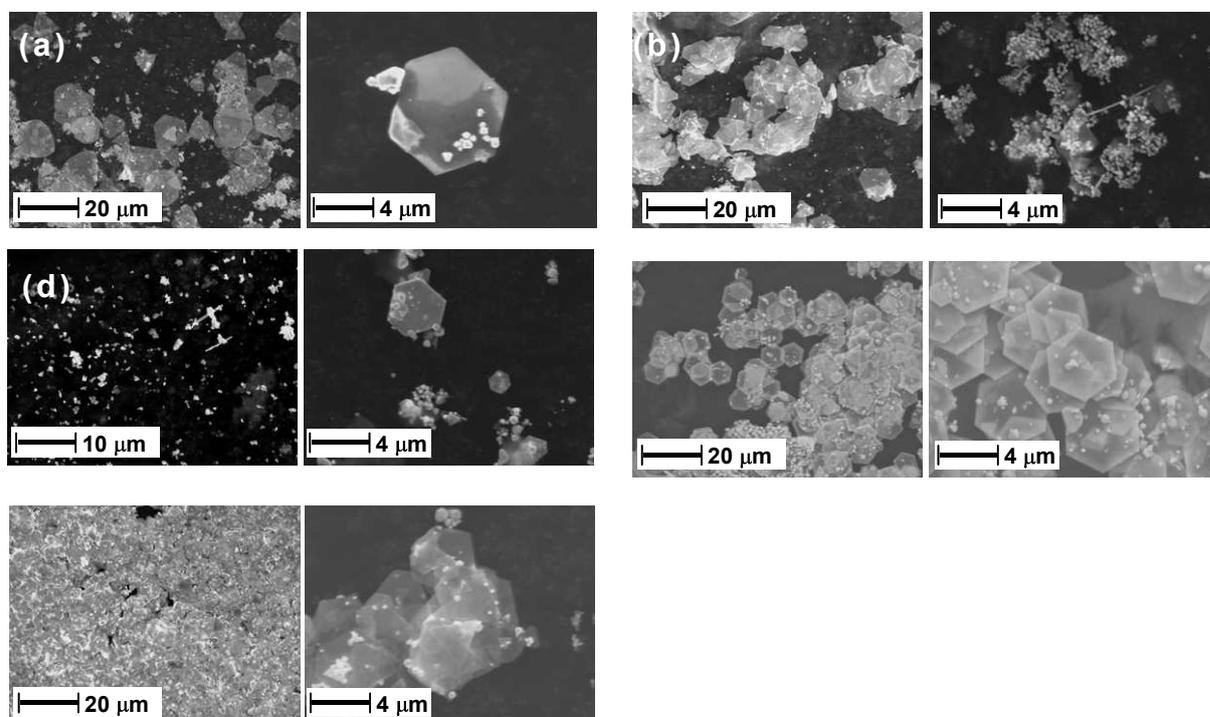
⑤ タンパク質の種類による影響

BSA の代わりにカゼイン、HRP、リパーゼ、リゾチーム、RNase A を用いて金マイクロプレートの調製を試みた。金イオン濃度 1 mM、タンパク質濃度 2 mg/ml (lysozyme のみ 6 mg/ml) になるよう両者を混合した溶液を 100°C で 3 時間反応させた後、SEM による観察を行った。結果を、Fig. 3.12 に示す。

Fig. 3.12a はカゼインにより調製した金マイクロプレートであり、丸みを帯びた金マイクロプレートが多数観測された。また、金粒子の生成量も多く、反応後の溶液の色は赤色であった。Fig. 3.12b は HRP を用いて調製した金マイクロプレートの SEM 写真である。この場合は、三角形や六角形の金マイクロプレートが多数生成していたが、Fig. 3.12b の右の写真のように金粒子も多数観察された。観察された金マイクロプレートの多くは 10-20 μm 程度のサイズであった。Fig. 3.12 c はリパーゼにより調製した金マイクロプレートの写真である。この場合には、少量の金マイクロプレートが観察され、金粒子の生成量の方が多かった。目視による観察結果では、全体としての金構造体（金マイクロプレート、金粒子などを全て含む）の生成量も少なかった。他のタンパク質の場合と比較して大きく異なる点として、リパーゼ溶液と金イオン溶液を混合した溶液は懸濁していることが挙げられ、金マイクロプレートの生成にはタンパク質 - 金イオン複合体が水に溶解することが必要と考えられる。Fig. 3.12d はリゾチームを用いて調製した金マイクロプレートの SEM 写真であり、BSA の場合と同様に、数 μm のサイズの比較的サイズのそろった金マイクロプレートが観察された。Fig. 3.12 e は RNase A を用いて調製した金マイクロプレートの写真である。この場合にも、数 μm のサイズの比較的サイズのそろった金マイクロプレートが得られたが、BSA、リゾチームの場合に比べて薄いプレートが観察された。

今回用いた 6 種類（BSA を含む）の全てのタンパク質を用いて金マイクロプレートの調製が可能であったが、生成する金マイクロプレートの形状及び生成量はタンパク質により異なっていた。100°C において反応させる際にはタンパク質は変性していると考えられるため、タンパク質の立体構造は金マイクロプレート生成に特別な影響を与えないと考えられる。そこで、金マイクロプレート生成量に影響を与える因子としては、上述したタンパク質 - 金イオン複合体の水への溶解性、タンパク質の種類により金イオン吸着能力の違いなどがあると考察している。また、タ

ンパク質の種類により、最適な濃度条件などが異なると考えられるため、反応条件の最適化を行えば、BSAの場合と同程度のサイズの均一性及び生成量が得られると期待できる。



4.3.3 金マイクロプレート生成

Fig. 3.12 タンパク質の種類が金マイクロプレートでの検討

タンパク質：a=カゼイン、b=HRP、c=リパーゼ、
 金イオン濃度はいずれも 1 mM、
 タンパク質濃度は 2 mg/ml (リゾチームのみ 6 m

走査型電子顕微鏡による観察

金イオン濃度 1 mM、BSA 濃度 2 mg/ml になるよう両者を混合した溶液を 100°C に加熱し、10、30、60、120、180 分ごとにサンプリングしたものについて SEM 観察を行った。結果を、Fig. 3.13 に示す。

反応時間が 10 分の場合は、ごくわずかな量の金マイクロプレートが観察された。形状は Fig. 3.13 a に示すように三角形や六角形をしており、サイズは 1-3 μm であった。反応時間 30 分では、観察された金マイクロプレートの数が多くなり、5 μm 以下のサイズの小さな金マイクロプレートが見られた。反応時間 60 分では、金マイクロプレートの生成量が増え、5 μm ほどのサイズの金マイクロプレートが多数観察された。120 分では、60 分で観察された金マイクロプレートに比べて、サイズが大きくなっていった。180 分の場合では、120 分で観察された、金マイクロプレートとあまり変わらないサイズの金マイクロプレートが得られ、金マイクロプレートの成長は 120 分程度で終息することが示唆された。

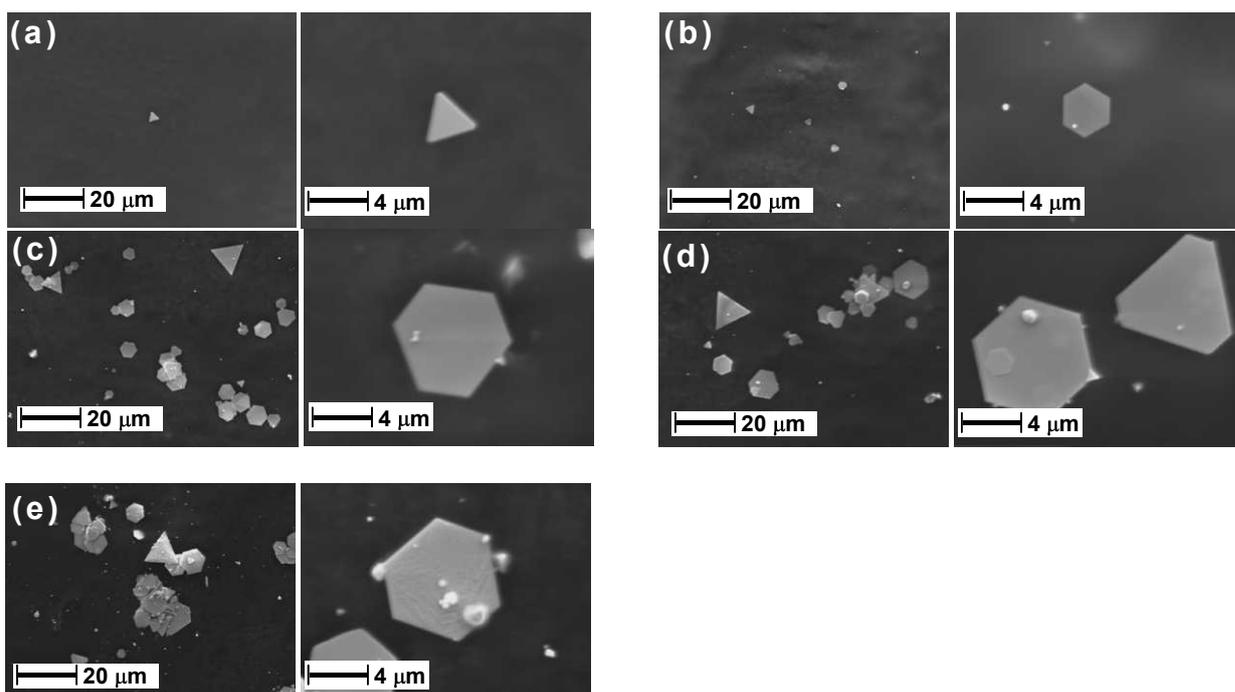


Fig. 3.13 反応時間が金マイクロプレートに与える影響
反応時間：a=10分、b=30分、c=60分、d=120分、e=180分
金イオン濃度はいずれも 1 mM、BSA 質濃度はいずれも 2 mg/ml

光学顕微鏡による観察

金イオン濃度 5 mM、BSA 濃度 20 mg/ml になるよう両者を混合して、よく攪拌したものをスライドガラス上に滴下して、光学顕微鏡を用いて観察した。六角形、三角形のプレートの成長過程を観察した結果を、それぞれ Fig. 3.14、3.15 に示す。金イオンと BSA を混合したときを 0 分として、30 分ごとに観察を続けたところ、2 時間経過したときに金マイクロプレートの核が確認された。その後も観察を続けると、金結晶が徐々に成長して大きくなっていく様子が観察された。結晶成長過程で、金結晶は初めの形状を保ったまま成長しており、金マイクロプレートの形状を決定づけるのは、核形成段階であることが明らかになった。

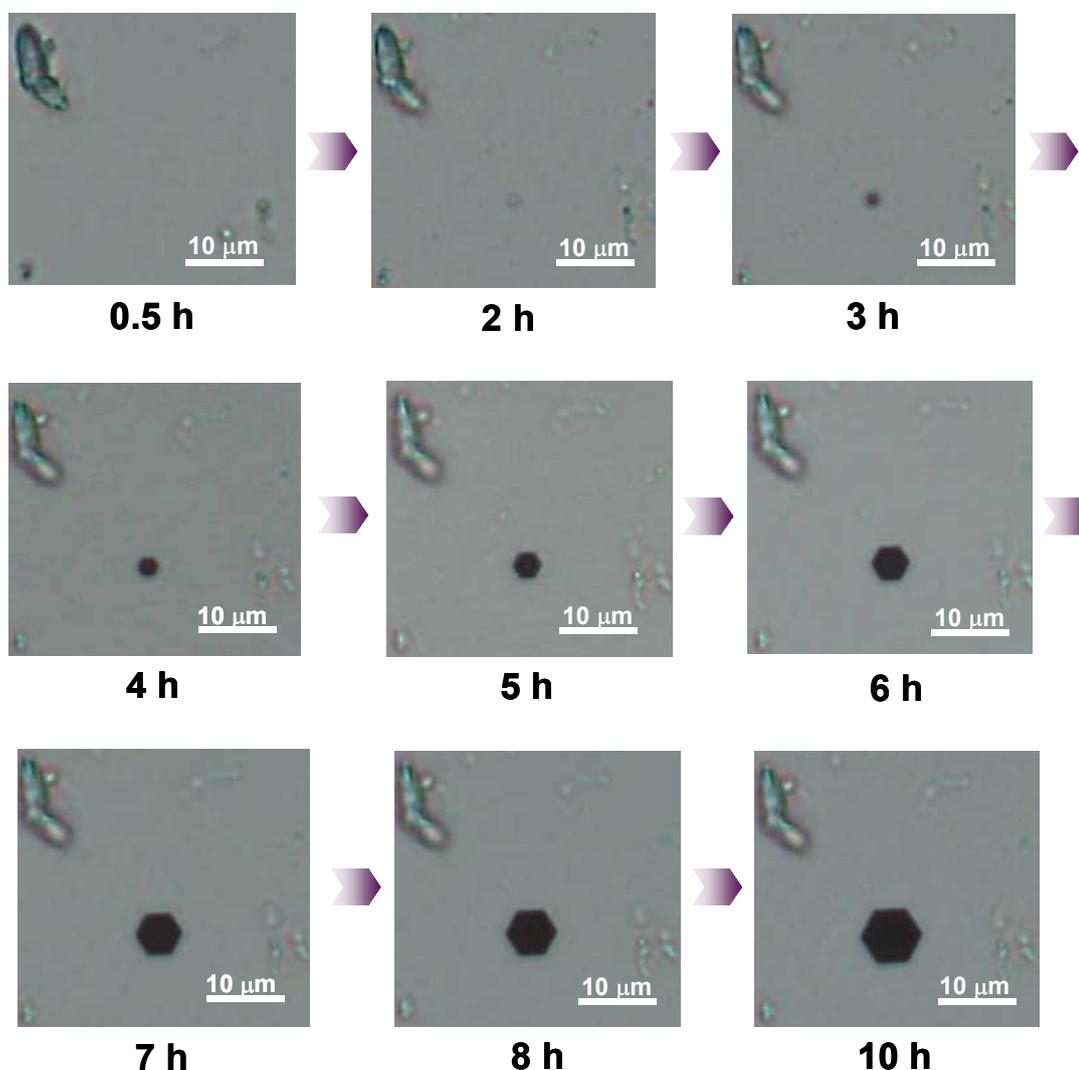


Fig. 3.14 光学顕微鏡による金マイクロプレートの成長過程の観察

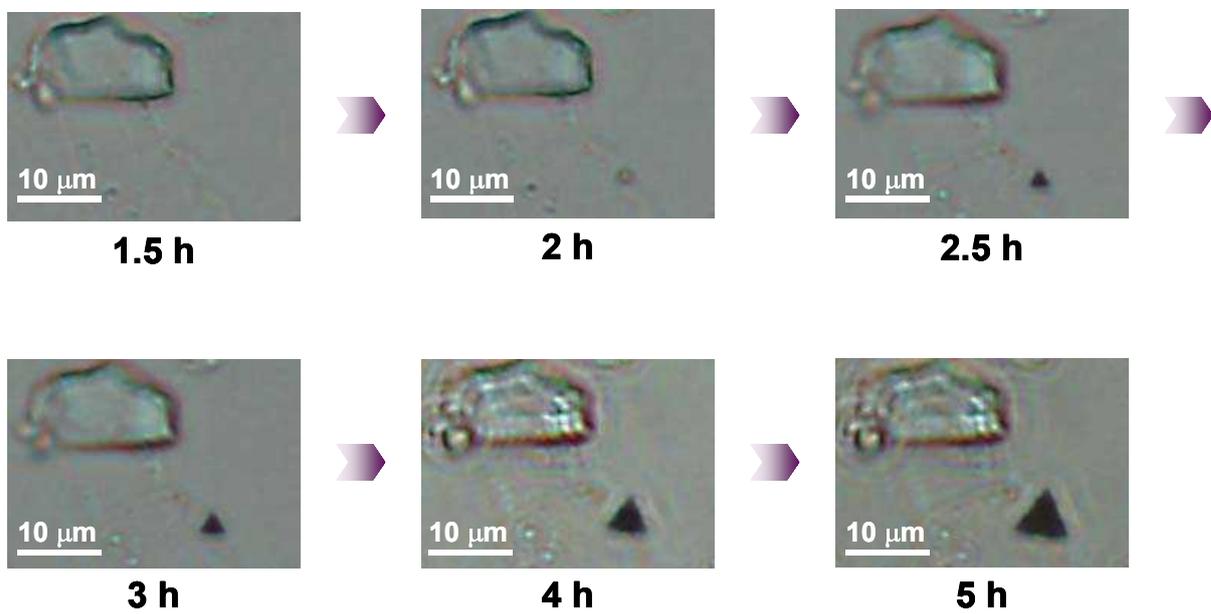


Fig. 3.15 光学顕微鏡による金マイクロプレートの成長過程の観察

金マイクロプレート形成初期段階における DLS の変化

金イオン濃度 2 mM、BSA 濃度 2 mg/ml になるよう両者を混合した溶液を 100°C に加熱し、5、10、15、20、30 分ごとにサンプリングしたものについて DLS 測定を行った。結果を Fig. 3.16 に示す。加熱前（0 分）の場合では 15 nm の位置にピークが観測され、これは BSA-Au 複合体によるピークであると考えられる。加熱後 15 分までは、このピークの粒径が徐々に大きくなり、粒径分布が広がっていった。20 分後のグラフではブロードしたピークが観測され、BSA-Au 複合体に劇的な変化が起こったことが示唆された。このことより、金マイクロプレートの核の大部分が加熱後 15-20 分間に形成するのではないかと考えられる。また、30 分後には 91、1280 nm にピークが観測され、溶液中に加熱前より大きなサイズの物質が存在することが示された。

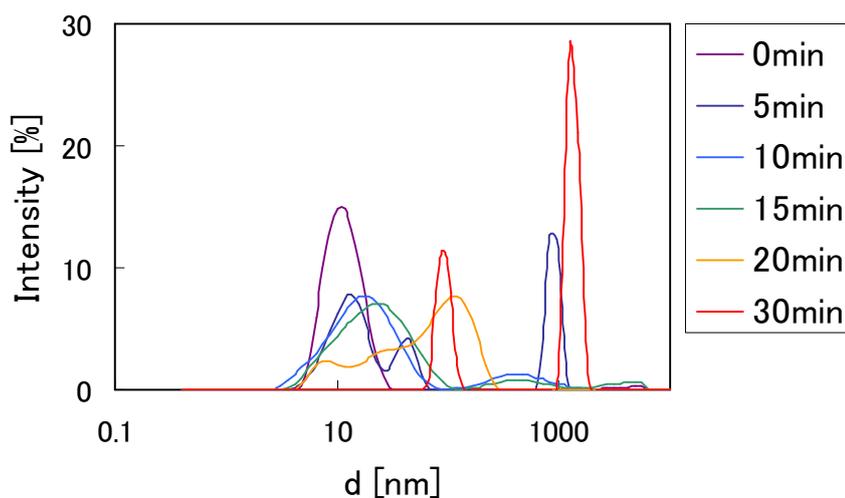


Fig. 3.16 金マイクロプレート形成初期段階における DLS の測定

金マイクロプレート生成メカニズムの考察

ここでは、これまでの検討により得られた知見及び過去の金マイクロプレートに関する報告例^{6, 7)}などを基に、金マイクロプレートの生成メカニズムに関する考察を行った。金マイクロプレートの生成過程は、次のように進行すると考察している。金イオンと BSA を混合すると、金イオンが BSA に吸着される（第一段階）。この溶液を加熱することにより、BSA による金イオンの還元が起こる（第二段階）。その後ある段階で核生成が起こり（第三段階）、続いて結晶が成長して（第四段階）マイクロサイズの金プレートが生成する。考察した金マイクロプレート生成過程を Fig. 3.24 に示す。

反応の第一段階は、BSA と金イオンを混合することによる BSA への金イオンの吸着である。主な実験条件（BSA 濃度：2 mg/ml、金イオン濃度：1 mM）においては、金イオンは BSA に対して 33 倍モル等量存在する。金イオンは BSA 1 分子につき約 18 個吸着することができるため⁸⁾、存在する金イオンのうち約半数が BSA に吸着すると考えられる。

この溶液を加熱すると、反応の第二段階である金イオンの還元が起こると考えられる。Fig. 3.17 の UV-vis-NIR スペクトルの結果に示すように、100°C 加熱開始から 5 分後には塩化金溶液に見られる 320 nm のピークが消失した。このことから、金イオンの還元は加熱開始から 5 分以内に起こることが示唆された。また、Fig. 3.13 に示した SEM による観察結果を見ると、加熱開始から 10 分後には小さな金プレートの生成が確認された。したがって、反応の第三段階と考えられる、核生成は金イオンの還元後即座に起こると考えられる。

さらに加熱を続けると、Fig. 3.16 に示すように 20 分後には劇的な粒径の変化が見られた。また、Fig. 3.17 の UV-vis-NIR スペクトルの結果を見ると、加熱開始から約 30 分で金マイクロプレートの SPR による近赤外領域の吸収が観測された。このことより、加熱開始から約 20 分後には大部分が結晶成長段階に入っており、Fig. 3.13 に示すように 3 時間加熱する間、結晶成長を続けると考えられる。

また、光学顕微鏡による結晶成長観察で示したように、金マイクロプレートは初期の形状を保ったまま結晶成長する。金マイクロプレートの(111)面は、他の面に比べて表面自由エネルギーが低いことが知られている^{1, 9, 10)}。このため金結晶成長段階において、BSAは、Fig. 3.17に示すように、金マイクロプレートの(111)面に吸着した状態で存在すると考えられる。そのため、(111)面では結晶の成長が抑制され、二次元的に結晶成長が進行すると推測される (Fig. 3.18)。

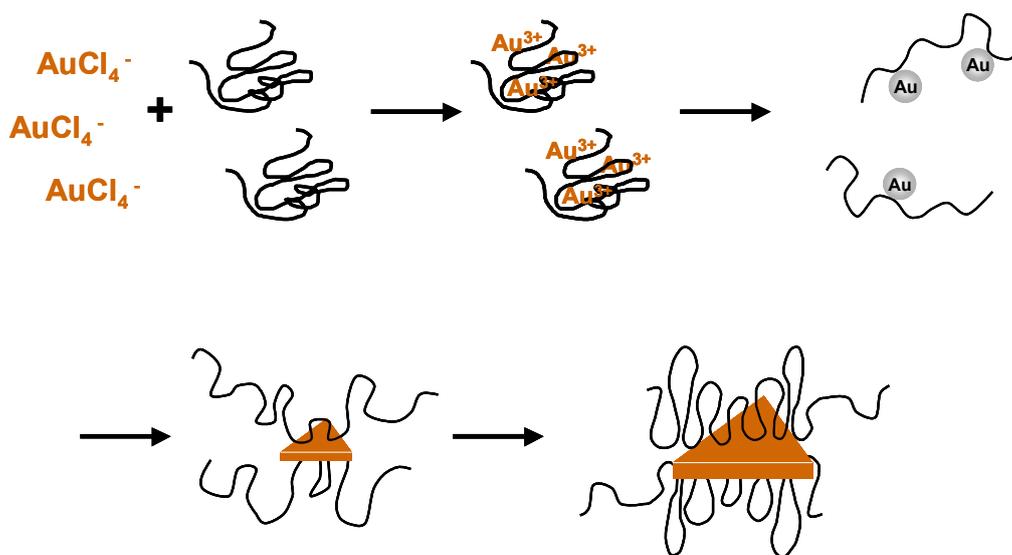


Fig. 3.17 金マイクロプレート成長過程の考察
 Step 1 : 金イオンの BSA への吸着
 Step 2 : BSA 上での金イオンの還元
 Step 3 : 金結晶の核生成
 Step 4 : 金結晶の成長

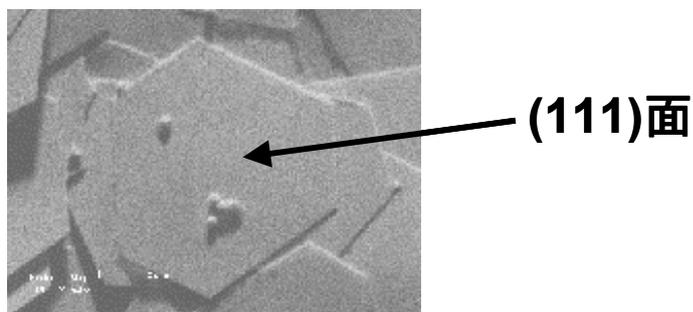


Fig. 3.18 金マイクロプレートの(111)面

アミノ酸を利用した金マイクロプレートの調製法の検討

①原子吸光用金標準溶液 (HAuCl₄ in 2M HCl) を用いた場合

原子吸光用金標準溶液とアミノ酸を用いて、金マイクロプレートの調製が可能であるかについて検討した。その結果、5 mM 金イオン溶液に 0.4 M Phe、100 μl/ml ピペリジンを添加し、100°Cで 6 時間加熱することにより、Fig. 3.19(a)のような金マイクロプレートが得られた。この金マイクロプレートはサイズが数十 μm と非常に大きく、同時に棒状の金ロッドも生成していた。また、金イオン濃度が 1 mM の場合は、Fig. 3.19 (b)に示すように、ごくわずかの金プレートや金ロッドが生成したが、生成物の多くは金コロイドの凝集体であった。このように、Phe を用いた場合でも、ピペリジンを添加することにより金マイクロプレートの調製は可能であったが、BSA を用いた場合に比べると、金マイクロプレートの生成量は非常に少なく、サイズのばらつきも大きかった。また、他のアミノ酸 (His、Gly、Tyr、Leu、Met、Trp) を用いて、Phe と同様の反応を行っても金マイクロプレートは生成しなかった。Fig. 3.20 に示すように、Gly と Leu では何も観察されず、His、Tyr、Met、Trp では金コロイドの凝集体が観察された。

ピペリジンの代わりに、アセトン、ジメチルホルムアミド、ベンジルアルコール、ベンズアルデヒド、ジエチルエーテル、ジエチルアミン、エタノールを用いて反応を行った場合、アセトンを用いた場合のみ、Fig. 3.21 (a)に示すような金マイクロプレートが生成した。しかし、Phe を添加せず、アセトンと原子吸光用金標準液を混合して加熱した場合でも、Fig. 3.21 (b)のような金マイクロプレートが生成した。

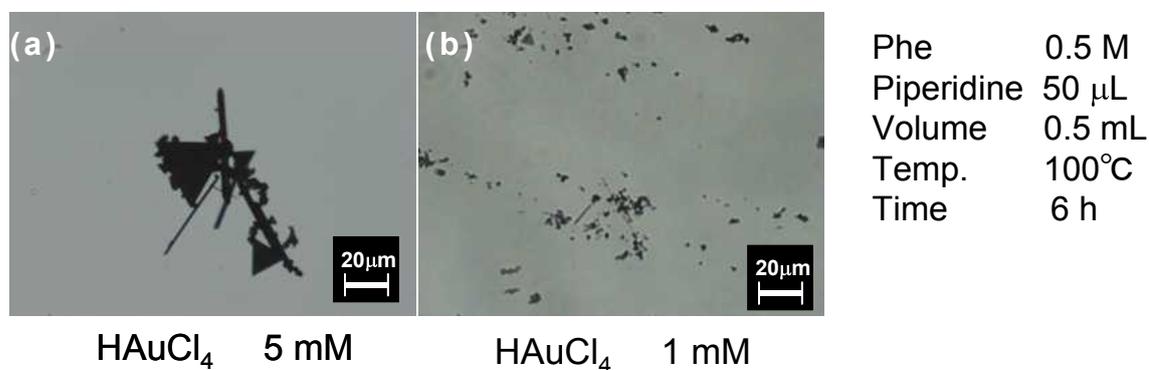


Fig. 3.19 Phe と金イオンを混合し、加熱して得られた溶液の顕微鏡写真

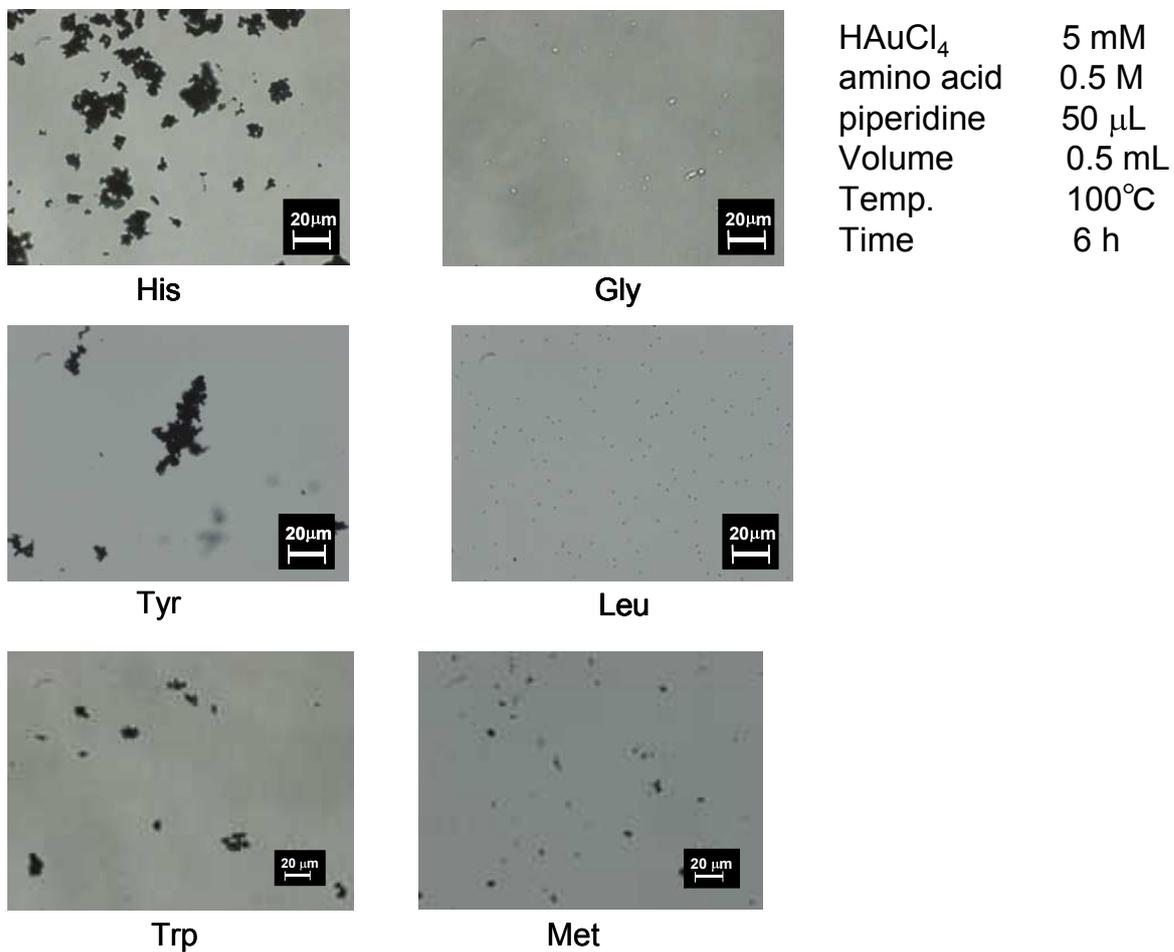


Fig. 3.20 6種類のアミノ酸と金イオンを混合後、加熱して得られた溶液の顕微鏡写真

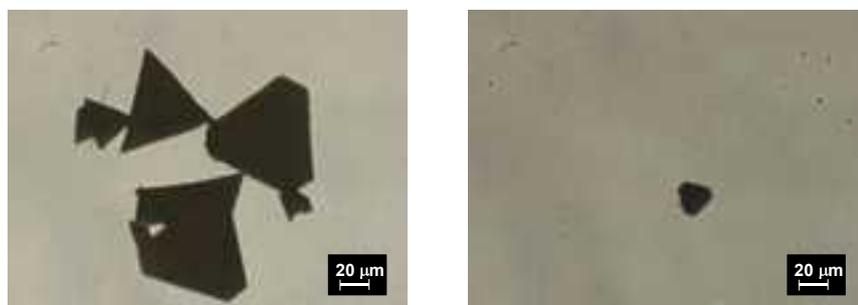


Fig. 3.21 (a)Phe、アセトンにより調製した金マイクロプレート
 (b)アセトンにより調製した金マイクロプレート

② 塩化金水溶液 (HAuCl₄) を用いた場合

原子吸光用金標準溶液の代わりに、塩化金を Milli-Q 水に溶かした溶液を用いて金マイクロプレートの調製が可能であるか検討した。塩化金水溶液を用いた場合には、ピペリジンなどの有機溶媒を添加したり、反応温度を 100℃まで上昇させたりすると、黒色沈殿が生成した。したがって、ここでは有機溶媒を添加せず、より低温条件下で反応を行った。アミノ酸は、Phe、Gly、Tyr、Leu、Glu、Asn、Met、Arg の 8 種類を用いて、塩化金水溶液 5 mM、反応温度 60、80℃の条件下で 6 時間反応させることにより、金マイクロプレートを調製可能であるか検討した。金マイクロプレートが得られた反応条件と生成した金マイクロプレートの顕微鏡写真を Fig. 3.22 に示す。Fig. 3.22(a)は、Gly を用いて 80℃において反応を行った場合で、数 μm の少量の金マイクロプレートが生成した。Fig. 3.22(b)は、Leu を用いて 80℃で加熱した場合で 20 μm 程度の金マイクロプレートが生成した。Glu を用いて 60℃で加熱した場合においても、極めて少量ではあるが Fig. 3.22(c)に示したような金マイクロプレートが観察された。他の条件の場合では金マイクロプレートは生成せず、多くの場合で褐色沈殿が生成するか溶液状態のままであった。

また、塩化金水溶液の濃度が 1 mM の場合は、いずれの条件においても金マイクロプレートは生成しなかった。ほとんどの条件において茶褐色もしくは黒色の沈殿が生成したが、いくつかの条件において有色の溶液が得られた。有色溶液が得られた条件及び有色溶液の性質については、次節で述べる。

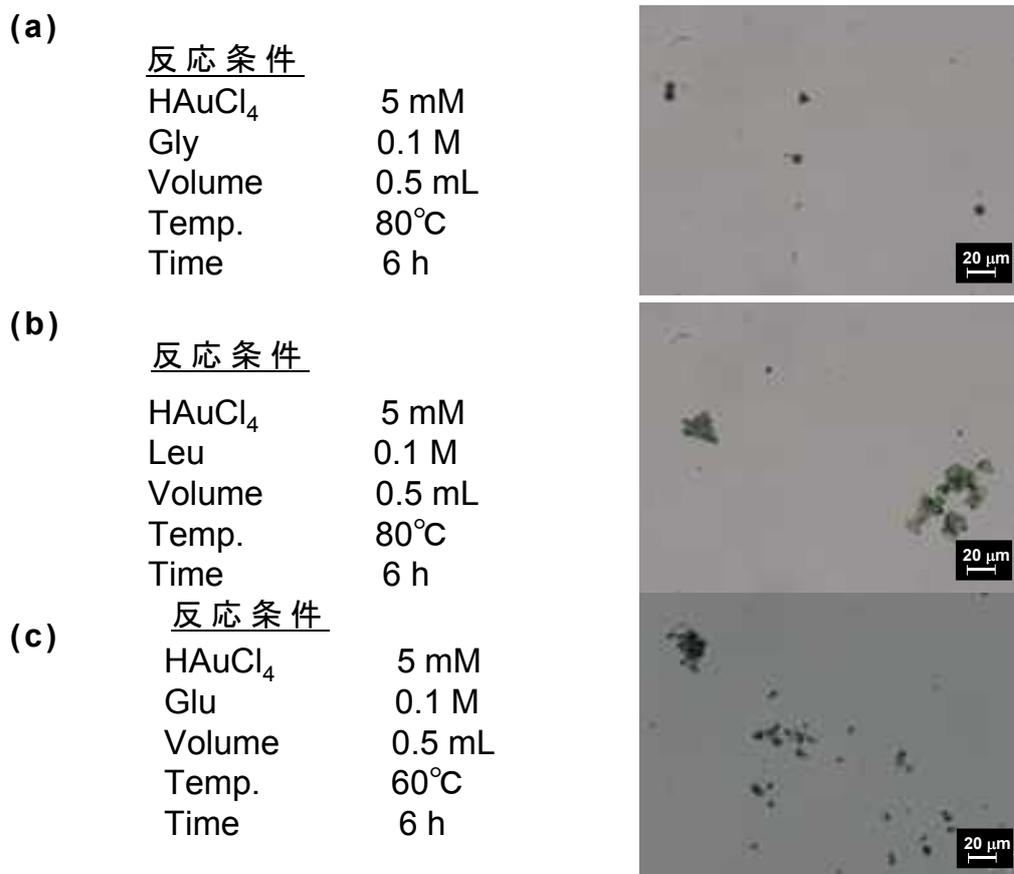


Fig. 3.22 5 mM 塩化金水溶液を用いた場合に金マイクロプレートが得られた反応条件と生成した金マイクロプレートの顕微鏡写真

塩化金水溶液 (HAuCl₄) と BSA 混合溶液の加熱による金ナノ粒子の生成

1 mM 塩化金、0.1 M His 混合溶液を 80°C において、30 分加熱すると Fig. 4-30 の左端に示すような紫色溶液が得られた。また、1 mM 塩化金水溶液と 0.1 M His、Arg、Met を混合して 3 時間加熱すると、Fig. 3.23 に順に示した薄紅色、薄青色、黄色の溶液が得られた。これらの溶液が着色したことから、加熱により塩化金が還元されて金ナノ粒子が生成した可能性が考えられる。そこで、それぞれの溶液について、DLS 測定と UV-vis スペクトル測定を行った。

Fig. 3.24 に、DLS 測定の結果を示す。His を用いて 80°C で反応させた場合は、530 nm 付近に単一のピークが得られた。His を用いて 60°C で反応させた場合には、17 nm 付近のピークに加え、5000 nm 付近に

ブロードしたピークが観測された。Arg を用いて 60°C で反応させた場合は、180nm 付近と 600 nm 付近にピークが見られた。また、Met を用いて 60°C で反応させた場合は 149 nm 付近に単一のピークが見られた。

Fig. 3.25 に、UV-vis スペクトルの結果を示す。His を用いて 80°C で反応させた場合は、金ナノ粒子の SPR に由来すると考えられる 570 nm 付近の吸収が観測された。His を用いて 60°C で反応させた場合にも 520 nm 付近にわずかなピークが見られ、この場合も金ナノ粒子の存在が示唆された。Arg と Met の場合は、金ナノ粒子特有のピークは観測されず、発色は別の要因によるものと考えられる。



Fig. 3.23 1 mM 塩化金水溶液とアミノ酸を混合後、加熱して得られた溶液
用いたアミノ酸と反応温度：左から、His 80°C、His 60°C、Arg 60°C、Met 60°C

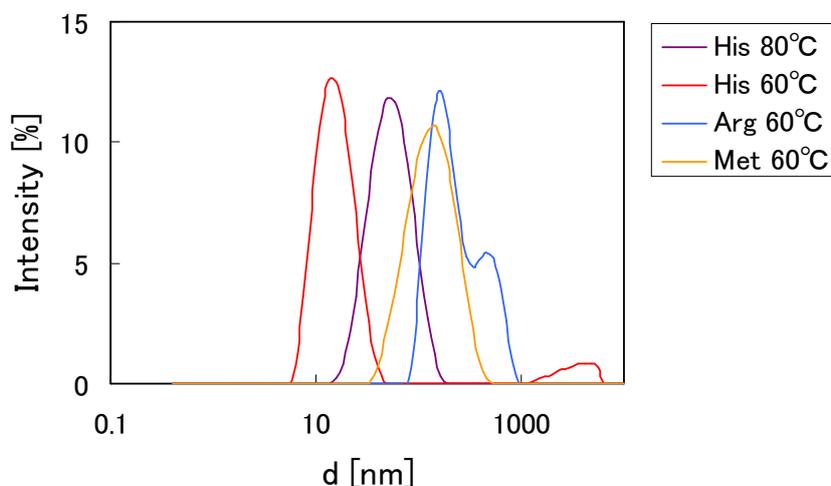


Fig. 3.24 Fig. 3.23 の溶液の DLS

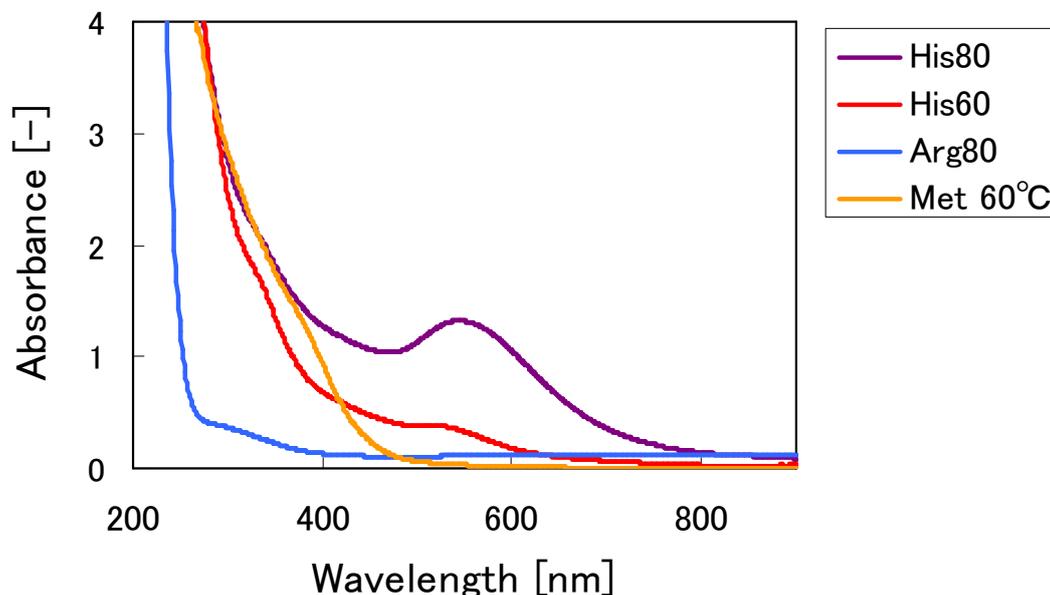


Fig. 3.25 Fig. 3.23 の溶液の UV-vis スペクトル

3.4 結言

本章では、タンパク質を利用した金マイクロプレートの開発を行い、金イオンと BSA をそれぞれ 1 mM、2 mg/ml になるように混合し、100°C において 3 時間反応させることにより、金イオンが還元され、金マイクロプレートが生成することを明らかにした。このとき得られた金マイクロプレートのサイズは数 μm 、厚さは 70-100 nm であった。金イオン濃度が低くなる程金マイクロプレートの厚みは薄くなり、金イオン濃度が高すぎると金マイクロプレートは生成しなかった。また、BSA 濃度が低すぎると金マイクロプレートは生成せず、BSA 濃度が高くなるとサイズが大きくなり、丸みを帯びた金マイクロプレートが生成した。さらに、金マイクロプレートは極めて低い条件下で生成することが明らかになった。

BSA 以外のタンパク質を用いた場合においても金マイクロプレートは生成したが、タンパク質によって金マイクロプレートよりも金粒子の方が多く生成するものもあった。また、アミノ酸である Phe を用いた場合には、少量のピペリジンまたはアセトンを添加することにより金マイクロプレートを得ることに成功した。

これらの検討結果から、バイオマスを用いた金属イオン吸着実験に

においても、金やパラジウムあるいは白金イオンの還元が生じている可能性が示唆された。

参考文献

- 1) S. P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 577 (2006).
- 2) B. Liu, J. Xie, J. Y. Lee, Y. P. Ting, J. P. Chen, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 15256 (2005).
- 3) Y. Shao, Y. Jin, S. Dong, *Chem. Commun.*, 1104 (2004).
- 4) E. Jette, F. Foote, *J. Chem. Phys.*, **3**, 605 (1935).
- 5) H. C. Chu, C. H. Kuo, M. H. Huang, *Inorg. Chem.*, **45**, 808 (2006).
- 6) X. Sun, S. Dong, E. Wang, *Langmuir*, **21**, 4710 (2005).
- 7) Z. Li, Z. Liu, J. Zhang, B. Han, J. Du, Y. Gao, T. Jiang, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 14445 (2005).
- 8) J. A. Tossell, *Geochem. Cosmochim. Acta*, **60**, 17 (1996).
- 9) M. Tsuji, M. Hashimoto, Y. Nishizawa, M. Kubokawa, T. Tsuji, *Chem. Eur. J.*, **11**, 440 (2005).
- 10) C. Kan, X. Zhu, G. Wang, *J. Phys. Chem B*, **110**, 4651 (2006).

第四章 卵殻膜における貴金属イオン吸着現象の機構解明

4.1 緒言

第一章でも述べたように貴金属イオンを生体由来材料、バイオマスで回収する技術の確立は多方面において盛んに行われている。当研究室においてもバイオマス、特にタンパク質を多く含有するタンパク質性材料を用いて貴金属イオンを回収する検討を行ってきた。Fig. 4.1に示すように、鶏卵の卵殻膜が貴金属イオンの吸着量、選択性ともに最も優れた能力を有することが分かっている。また卵殻膜を用いることで実際に工業廃液から貴金属イオンを分離回収することも可能であることを既に報告している。(Fig. 4.2)¹⁾

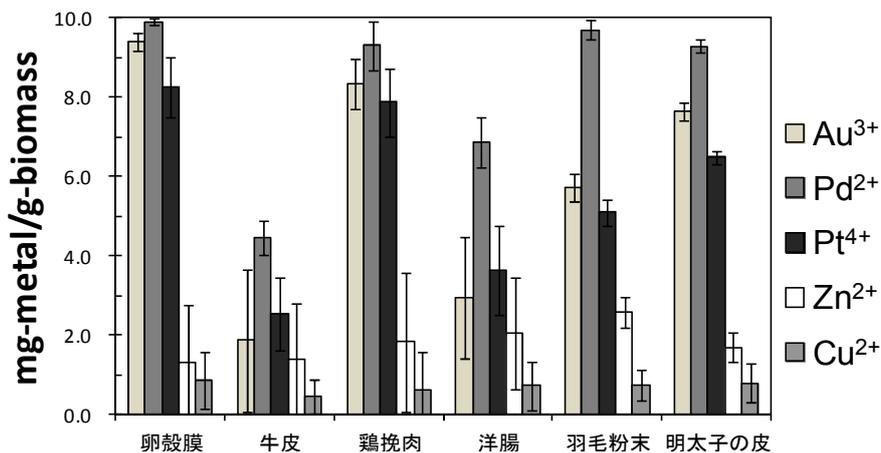


Fig. 4.1 混合モデル溶液からの吸着量

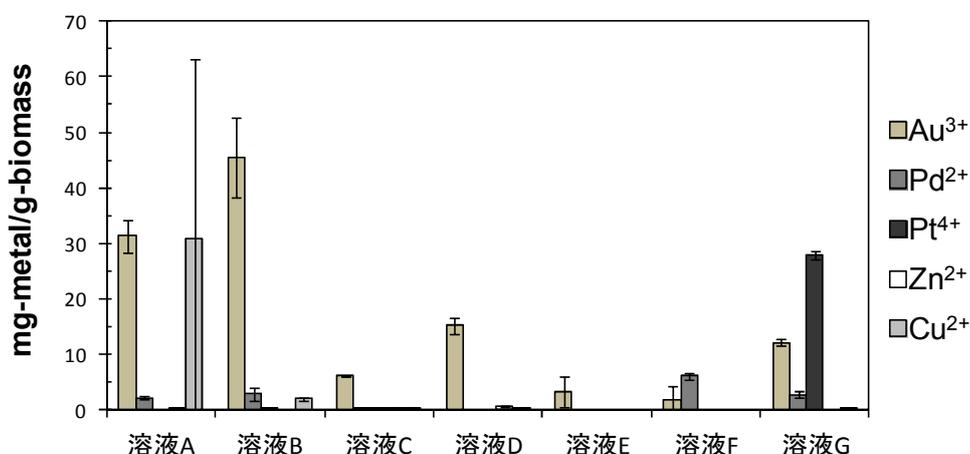


Fig. 4.2 卵殻膜による実在廃液からの貴金属イオンの吸着

しかしながら、卵殻膜による吸着が可能であることは分かっているが、どのような条件下においてどのように吸着しているかは未だ不明確である。一方で微生物などの生体材料を用いた貴金属イオン回収では貴金属イオンは還元されているという報告もある²⁾。そこで、本章では貴金属イオンを吸着させた卵殻膜から還元された貴金属微粒子あるいは貴金属イオンの脱着が可能か試み、さらに貴金属イオンを吸着した卵殻膜を透過型電子顕微鏡で観察し、金属微粒子が存在しないか検討した。また貴金属イオンは溶液中で様々な錯体構造を形成して存在する。これまで特定の錯体種のみしか検討されていないことから、錯体種の違いが吸着に及ぼす影響も検討した。

4.2 チオ尿素による金イオンの脱着

4.2.1 試薬

吸着させる Au^{3+} は HAuCl_4 を用い、Merck(株)からも購入した 1,000 ppm 原子吸光光度計測定用標準溶液を希釈して用いた。脱着剤として和光純薬工業(株)から購入した試薬特級のチオ尿素を用いた。吸着剤としてキューピー(株)から提供していただいた卵殻膜を用いた。卵殻膜の特徴を以下に示す。

卵殻膜

卵殻膜(Fig. 4.3)は卵殻の内側に存在する薄膜のことで、その構造は厚い外膜と薄い内膜から成り、それぞれ網目状になった繊維から構成されている。この卵殻膜は様々な卵加工品の製造過程において大量に発生する。主な成分は約 94% を占める水に不溶なタンパク質であり、コラーゲンなどの細胞間基質のようなものであると考えられている。卵殻膜は多くの架橋アミノ酸(プロリン, シスチン)を含有、S-S 結合で繊維同士が絡まっている。これまで大量に発生する卵殻膜のほとんどが廃棄処理されてきたが、近年様々な用途開発がすすめられ、生体親和性が良いなどの特性を持つことが明らかとなり、健康補助食、化粧品、ヘアケア製品、衣類などですでに製品化されている。



Fig. 4.3 卵殻膜

4.2.2 実験方法

Au^{3+} が 100 ppm となるように希釈した Au^{3+} 溶液 10 ml に卵殻膜を 100 mg 加え、吸着時間を 10 分, 1 時間, 24 時間と変化させて、卵殻膜に Au^{3+} を吸着させた。その後遠心分離し、上澄みを別の容器に分け濃度測定を行い、吸着量を計算した。分離した卵殻膜は純水で 3 回洗浄したのち、100 mM のチオ尿素水溶液に 1 時間浸漬し、 Au^{3+} を脱着させ濃度分析を行い、吸着量との比から脱着率を算出した。また脱着液の粒径測定を行い、金属微粒子が存在しないか検討した。

濃度分析には誘導結合プラズマ発光分光機(ICP-OES, SPS-3100, エスアイアイ・ナノテクノロジー(株))を用いて定量分析を行った。また粒径測定には動的光散乱計(DLS, ELSZ-2, 大塚電子(株))を用いた。

4.2.3 結果と考察

チオ尿素は金(III)イオンを金(I)イオンに還元し Fig. 4.4 のような錯体構造を形成して溶液中に分散させることが知られている³⁾。本実験では卵殻膜に吸着している金元素の脱着が可能か、またどのような状態で吸着しているか検討した。

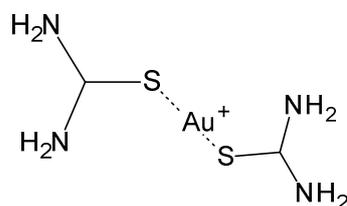


Fig. 4.4 金イオンとチオ尿素の

チオ尿素による金元素の脱着率を Fig. 4.5 に示す。吸着時間の増加に伴いわずかに脱着率の減少が見られた。しかし吸着に 24 時間吸着させても 80% 以上の金元素が卵殻膜から脱着したことが分かった。

このことからチオ尿素を用いて Au^{3+} を卵殻膜から脱着できることが分かり、また卵殻膜と金元素の相互作用はチオ尿素と金元素の相互作用にくらべ弱いことが分かった。

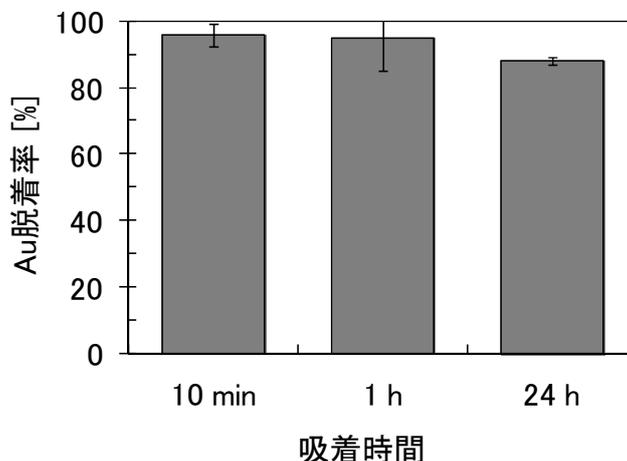


Fig. 4.5 チオ尿素による脱着

またチオ尿素により卵殻膜から金属微粒子も脱着できることを期待して DLS にて粒径測定を行ったが、測定は不可能であった。このことからチオ尿素では金属微粒子を脱着することはできないと考えられる。しかし Fig. 4.5 に示した通り、金元素は検出している。チオ尿素では 0 価の金をイオンに酸化しないと考えられるため、金元素は卵殻膜にイオンの状態で吸着していると考えられる。

4.3 金属イオンを吸着させた卵殻膜の TEM 観察

4.3.1 試薬

吸着させる金属イオンは HAuCl_4 , H_2PtCl_6 , $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ を用い、すべて Merck(株)から購入した標準溶液を希釈して用いた。吸着剤としてキューピー(株)から提供していただいた卵殻膜を用いた。

4.3.2 実験方法

初期金属イオン濃度 200 ppm の溶液 20 ml に卵殻膜を 20 mg 加え 24 時間攪拌を行った後、ろ過分離後、ろ紙上に残った卵殻膜を純水で 3 回洗浄し、 30°C で乾燥させた。乾燥した卵殻膜を高分解能透過型電子顕微鏡(HRTEM, JEM-2010, 日本電子(株))を用いて観察した。

4.3.3 結果と考察

Au^{3+} , Pd^{2+} , Pt^{4+} を吸着させた卵殻膜の HRTEM 画像をそれぞれ Fig.

4.6-8 に示す。

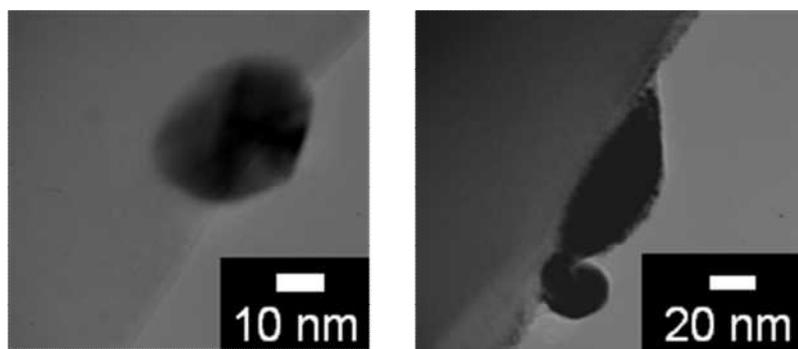


Fig. 4.6 卵殻膜によって還元さ

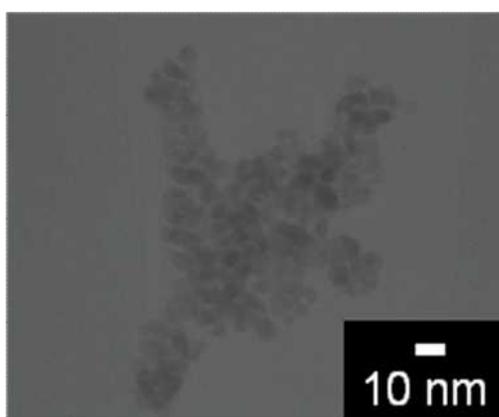


Fig. 4.7 卵殻膜によって還元されたパラジウム

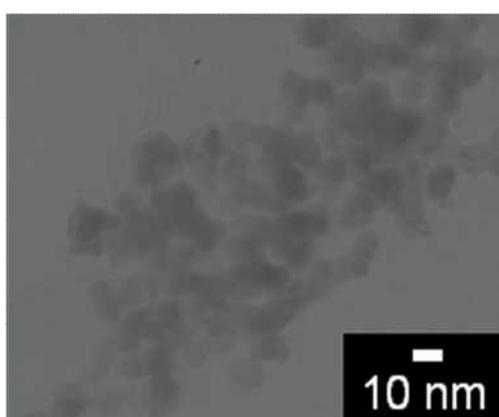


Fig. 4.8 卵殻膜によって還元された白金

観察の結果卵殻膜上に金では 10–100 nm 程度の、白金とパラジウムでは 10 nm 程度の金属微粒子が確認された。このことから貴金属イオンは卵殻膜によって還元されているものと考えられる。一方、前項で示した通り Au^{3+} はイオンの状態でも吸着していることが分かっている。このことから貴金属イオンは卵殻膜上にイオンと金属、両方の状態で吸着していると考えられる。また前項での吸着時間に伴う脱着率の低下は金属微粒子への還元が時間経過とともに進行しているからと予想される。

4.4 金属の錯体種による影響

4.4.1 試薬

本実験では以下の試薬使用し実験を行った。

Table 4.1 実験試薬

試薬名	購入元	等級(規格)	備考
1,000 ppm 金標準溶液	Merck(株)	原子吸光用標準溶液	塩化物錯体
1,000 ppm 白金標準溶液	Merck(株)	原子吸光用標準溶液	塩化物錯体
1,000 ppm パラジウム標準溶液	Merck(株)	原子吸光用標準溶液	硝酸塩
1,000 ppm パラジウム標準溶液	和光純薬工業(株)	原子吸光用標準溶液	塩化物錯体
テトラアンミンパラジウム(II)塩化物	和光純薬工業(株)		アンミン錯体
過塩素酸銀一水和物	Alfa Aesar(株)		
2 M 水酸化ナトリウム水溶液	和光純薬工業(株)	容量分析用	

4.4.2 実験方法

用いた錯体種を中心となる金属イオンごとに下記に記す。

金

金は2種類の錯体種で検討した。Merck(株)製の標準溶液には塩化物錯体を使用されているので、200 ppmに希釈して用いた。また水酸化物錯体を得るため、1 Mに希釈した水酸化ナトリウム水溶液に標準溶液を加え、 Au^{3+} が200 ppmとなるように混合して用いた。

パラジウム

パラジウムは5種類の錯体種で検討した。Merck(株)製と和光純薬工業(株)の標準溶液には硝酸塩と塩化物錯体がそれぞれ使用されているので、200 ppmに希釈して用いた。またまた水酸化物錯体を得るため、1 Mに希釈した水酸化ナトリウム水溶液にMerck(株)製の標準溶液を加え、 Pd^{2+} が200 ppmとなるように混合して用いた。また過塩素酸塩を得るため、100 ppmに希釈した和光純薬工業(株)製の標準液50 mlに過塩素酸銀一水和物を1.22 g塩化物イオンを銀イオンと接触させることにより塩化銀として沈殿させた。この溶液をろ過により沈殿ろ液に分離しろ液を過塩素酸パラジウム水溶液として実験に用いた。またテトラアンミンパラジウム(II)塩化物は Pd^{2+} が200 ppmとなるよう純水に溶解して実験に用いた。

白金

白金は2種類の錯体種で検討した。Merck(株)製の標準溶液には塩化物錯体を使用されているので、200 ppmに希釈して用いた。また水酸化物錯体を得るため、1 Mに希釈した水酸化ナトリウム水溶液に標準溶液を加え、 Pt^{3+} が200 ppmとなるように混合して用いた。

吸着剤としては卵殻膜を用いた。金属イオン濃度[ppm]が卵殻膜濃度[ppm]に対して1.2倍となるよう卵殻膜の質量と金属イオン溶液の体積を定め、実験を行った。この実験条件では金属イオンが大過剰であると考えられる。24時間攪拌した後ろ過分離し、ろ液をICP-OESもしくは原子吸光光度計(AAS, Z-2310, (株)日立ハイテクノロジーズ)を用いて金属濃度を測定し、吸着量を算出した。

4.4.3 結果と考察

Au^{3+} の錯体種による影響をFig. 4.9に、溶液のpHと吸着せずに溶

液中に残存していた Au^{3+} の比(残存率 [%])とを Table 4.2 に示す。

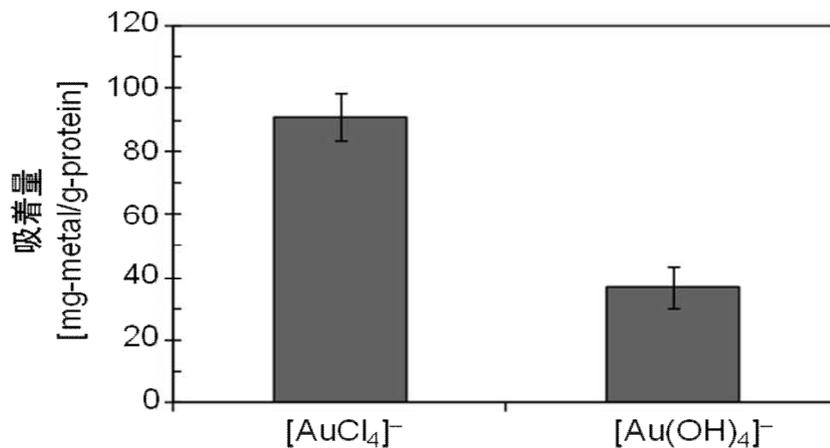


Fig. 4.9 金の錯体種の影響

Table 2.2 金溶液の pH と残存率

	pH	残存率 [%]
$[\text{AuCl}_4]^-$	0.47	92.9
$[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$	13.8	96.9

検討の結果 Au^{3+} では錯体種を水酸化物錯体にすると塩化物錯体にくらべ大幅に低下した。溶液中の pH が 13 にまで上昇しているため、一概には言えないが錯体種が大きく影響を及ぼしていると予想される。

パラジウムイオンの錯体種の影響を Fig. 4.10 に、溶液の pH と残存していた Pd^{2+} の残存率を Table 4.3 に示す。

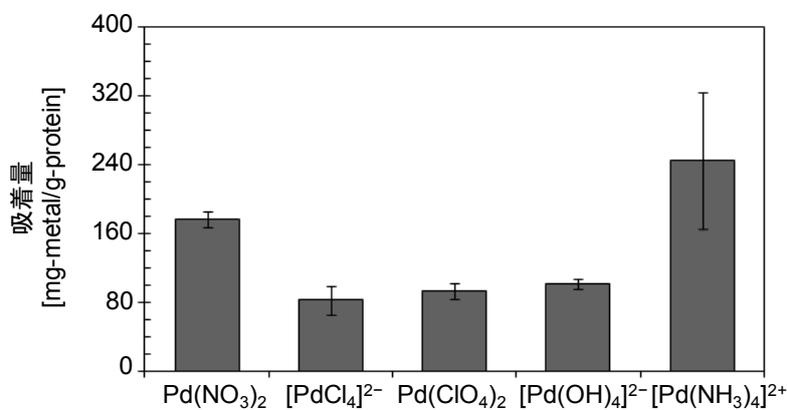


Fig. 4.10 パラジウムの錯体種の影響

Table 4.4 パラジウム溶液の pH と残存率

	pH	残存率 [%]
$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$	0.78	85.1
$[\text{PdCl}_4]^{2-}$	0.60	92.8
$\text{Pd}(\text{ClO}_4)^{2-}$	1.10	91.9
$[\text{Pd}(\text{OH})_4]^{2-}$	14.0	91.3
$[\text{Pd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$	8.11	75.2

検討の結果、硝酸塩とアンミン錯体が最も吸着量が高いことが分かった。塩化物錯体と過塩素酸塩，水酸化物錯体ではあまり吸着量に変化はなかった。

白金イオンの錯体種の影響を Fig. 4.11 に、溶液の pH と残存していた Pt^{4+} の残存率を Table 4.4 に示す。

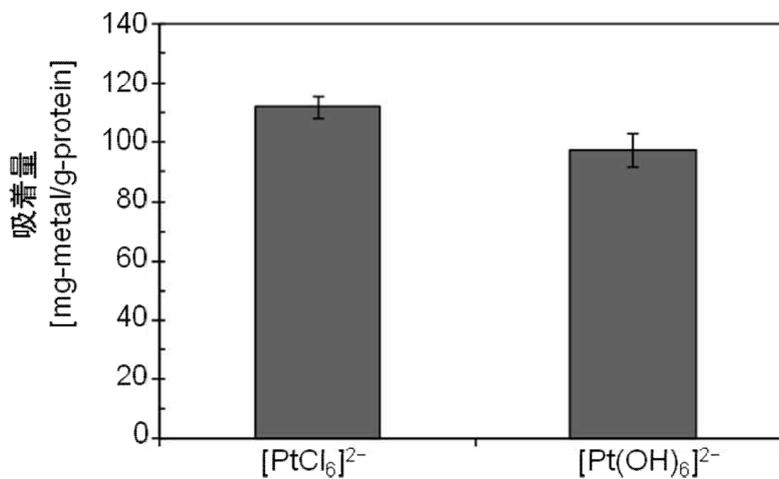


Fig. 4.11 白金の錯体種の影響

Table 4.4 白金溶液の pH と残存率

	pH	残存率 [%]
$[\text{PtCl}_6]^{2-}$	0.45	92.2
$[\text{Pt}(\text{OH})_6]^{2-}$	13.5	91.9

錯体種の組み合わせとしては Au^{3+} と同様であるが Au^{3+} 程顕著な変化

は見られなかった。このことから Au^{3+} と Pt^{4+} とでは吸着機構に違いがあることが示唆される。

4.5 結言

本章ではタンパク質性材料である卵殻膜を用いて貴金属イオン吸着にかかわる因子を検討した。その結果、卵殻膜に対して Au^{3+} はイオンの状態と還元された金属の状態両方で存在していることが分かった。またパラジウムや白金でも同様に還元された金属微粒子を表面上に観察することが出来た。また Au^{3+} と Pd^{2+} ではイオンの錯体種により大きくその吸着性能は変化しており、今後詳細な検討を進める必要があると考えられる。一方 Pt^{4+} ではあまり変化が見られなかった。このことから同じ貴金属でも吸着機構に違いがあることが示唆された。

参考文献

1. O. E. Piro, E. E. Castellano, R. C. V. Piatti, A. E. Bolzan, A. J. Arvia, *Acta Cryst.*, 58, 252 (2002).
2. A. L. Horwich, J. S. Weissman, *Cell*, 89, 499(1997).

第五章 精製タンパク質における吸着メカニズムの解明

5.1 緒言

第四章ではタンパク質性材料である卵殻膜に特化して検討を進めてきたが、卵殻膜は単一のタンパク質から構成されておらず、分子論的な検討は困難である。そこで本章では精製タンパク質を検討対象としてメカニズム解明を目指し、特にタンパク質の糖鎖、および高次構造に注目した。ここでまず、生体における糖鎖と糖鎖を有する糖タンパク質の役割について述べる。

生体における糖鎖

糖鎖とは Fig. 5.1 に示すような単糖がグリコシド結合することにより連なった一群の化合物をさす。糖鎖を構成する糖はアミノ酸やデオキシリボ核酸と違い、反応点が複数あることから、その化合物である糖鎖は複雑で立体的に多様な構造を形成し、DNA、タンパク質に続く生体を構成する第三の鎖と呼ばれる。糖鎖はタンパク質とも結合することができ、アミノ酸のセリンやスレオニンのヒドロキシル基と結合した糖鎖を *O*-型、アスパラギンのアミンに結合した糖鎖を *N*-型で結合している糖鎖と称す¹⁾。

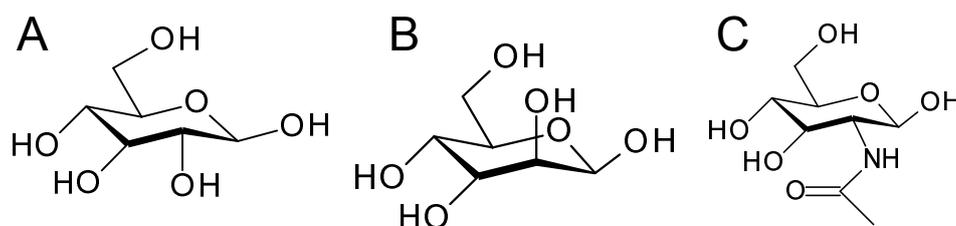


Fig. 3.1 糖鎖を構成する代表的な担当

A: グルコース, B: マンノース,
C: *N*-アセチルグルコサミン

糖タンパク質

糖タンパク質とは分子中に糖鎖を有するタンパク質である。先にも述べたとおり糖鎖はその複雑で多様な立体構造を有するため、糖タンパク質は糖鎖を利用してわずかに異なる構造を精密に認識させることにより様々な生理現象を司るタンパク質である。糖鎖はその構造中に金属イオンを配位させることができるヒドロキシル基やカルボニル基、自身が酸化されることにより還元することができるアルデヒド

が存在するため金属吸着因子である可能性がある。

またタンパク質の高次構造について説明する。

タンパク質の高次構造

タンパク質とは約 20 種類の α -アミノ酸が直列にアミド結合を繰り返すことにより構成される高分子である。しかし、ただアミノ酸が鎖状に連なっている構造(一次構造)では生体特有の機能は発揮されない。タンパク質は分子中で水素結合や S-S 結合を形成し折りたたまれ、また複数の分子が会合することにより特有の機能を発揮する。高次構造が崩壊したり、正確に構成されなかったりする場合は機能が発揮されないばかりか、狂牛病やアルツハイマーなどに代表されるフォールディング病を引き起こすことがあるとされている²⁾。金属イオンを吸着させるときその吸着サイトが立体的に近傍に存在するときより効果的な吸着がおこりうると考えられ、高次構造も金属イオンの吸着因子として考えられる。

以上のようにタンパク質に含まれる糖鎖や、タンパク質の高次構造は金属吸着に関係していると予想される。そこで糖鎖の影響を酵素反応を利用して検討した。また高次構造の影響を変性剤を用いて検討を行った。

5.2 糖タンパク質における糖鎖の影響

5.2.1 試薬

モデル糖タンパク質としてシグマアルドリッチジャパン(株)から購入した 卵白由来アルブミン(OVA)、和光純薬工業(株)から購入した西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)、ナカライテスク(株)から購入した *Aspergillus niger* 由来グルコースオキシダーゼ(GOD)、対照実験として糖鎖を有さないタンパク質である牛血清アルブミン(BSA)を和光純薬工業(株)から購入したものを用いた。また糖鎖をタンパク質から切除するため、ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン(株)から購入した Endo- α -N-acetylgalactosaminidase を用いた。また緩衝液に用いるため和光純薬工業(株)から購入した試薬特級のリン酸水素 2 ナトリウム と リン酸 2 水素 ナトリウム , 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (tris), 塩化ナトリウムと容

量分析用 1 M 塩酸を用いた。吸着させる金属は Merck(株)から購入した金標準液を用いた。

5.2.2 実験方法

まず購入した Endo- α -N-acetylgalactosaminidase 水溶液を pH 7.5 に調製した 20 mM tris-HCl, 50 mM NaCl 水溶液で 1,000,000 倍に希釈する。タンパク質を pH 6.0 に調製した 0.2 M リン酸緩衝液 10 ml に 1.5 mg 程度溶解させた後、1,000,000 倍酵素溶液を 10 μ l 加え 37°C で 16 時間振とうした。その後サンプル液をスペクトラムラボラトリーズ(株)製の分画分子量 10,000 の透析チューブ(Spectra/Por 7 membrane)に移し、純水で一晩透析した。その後透析した溶液をサンプル瓶に移した後 1,000 ppm の金標準液を 5 ml 加えたのち 24 時間攪拌し、日本ミリポア(株)から購入した分画分子量 10,000 の遠心限外ろ過膜(Amicon Ultra)を用いてタンパク質と溶液を分離し、溶液の Au^{3+} 濃度を ICP-OES で測定して吸着量を算出した。

5.2.3 結果と考察

検討の結果を Fig. 5.2 に示す。糖タンパク質である OVA, HRP は酵素反応後、 Au^{3+} の吸着性が低下することが分かった。一方、糖タンパク質である GOD および糖鎖を有さないタンパク質である BSA は吸着性にあまり変化は見られなかった。今回用いた酵素は O-型で結合している糖鎖をタンパク質から切断する酵素である。GOD は O-型ではなく N-型で結合しているため酵素反応が進行せず、糖鎖が切除されなかったため吸着性に変化が表れなかったと考えられる。また BSA は分子中に糖鎖が存在しないため、酵素反応の影響は受けず当然吸着性に変化は表れなかった。以上より OVA と HRP では糖鎖を切除されると Au^{3+} の吸着性が低下していることから糖鎖も Au^{3+} 吸着に関与しているものと示唆された。

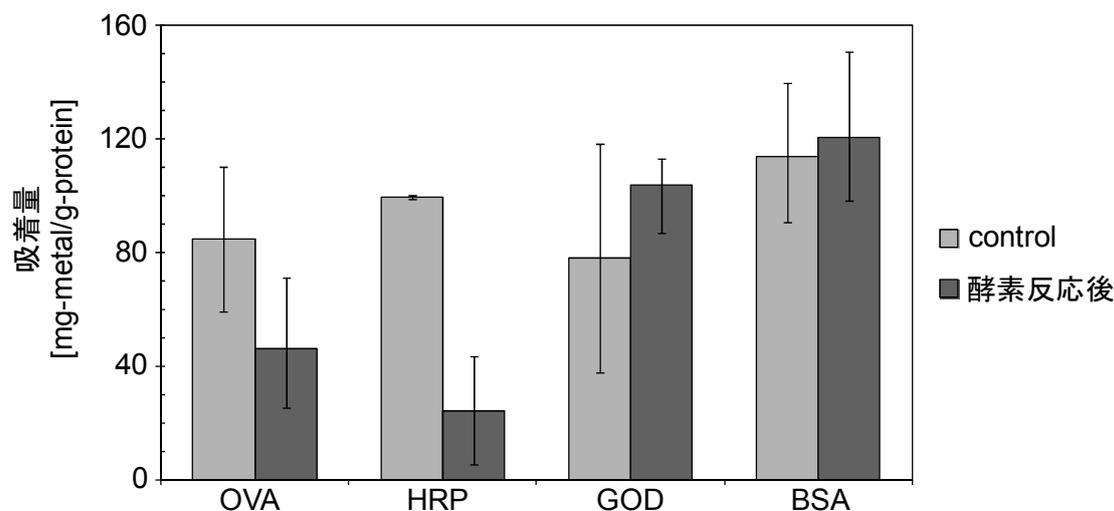


Fig. 3.2 糖鎖切除による Au³⁺の吸着性

5.3 タンパク質の高次構造の影響

5.3.1 試薬

モデルタンパク質として和光純薬工業(株)から購入した牛血清アルブミン(BSA)を用いた。また変性剤として和光純薬工業(株)から購入した試薬特級の尿素を用い、還元剤としてサーモフィッシャーサイエンティフィック(株)から購入した固定化 tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)ゲルを用いた。また緩衝液に生化学用 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (tris)と容量分析用 1 M 塩酸を用いた。吸着させる金属は Merck(株)から購入した金標準液を用いた。

5.3.2 実験方法

pH 7.5 に調製した 100 mM tris-HCl 緩衝液に尿素を濃度が 8 M となるよう溶解させ、変性液とした。変性液 10 ml に BSA 10 mg 溶解させ 1.0 mg/ml の BSA 溶液を作成した。また固定化 TCEP ゲルスラリーは一度等量の純水を加え洗浄したのち遠心分離により上澄みを除去した。BSA 溶液 1 ml に対してスラリー基準で 1 ml の固定化 TCEP ゲルを 3 時間接触させ、BSA を完全変性した。変性後固定化 TCEP ゲルは遠心分離およびろ過により完全に分離した。その後分離液 1 ml に対して 8M 尿素, 500 ppm Au³⁺溶液を 2.4 ml 加え 24 時間室温で攪拌し、日本ミリポア(株)から購入した分画分子量 10,000 の遠心限外ろ過膜 (Amicon Ultra)により BSA を分離した。ろ液は ICP-OES により濃度分析を行い、吸着量を算出した。対照実験として変性作業を行わなかつ

た BSA でも同様の検討を行った。

5.3.3 結果と考察

実験結果を Fig. 5.3 に示す。検討の結果変性させることにより BSA の Au^{3+} の吸着性能は低下することがわかった。このことより高次構造によって、吸着サイト同士の微妙な距離感が吸着に影響を及ぼすということが分かった。だが一方で完全に変性を行ってもある程度の吸着がみられている。8 M の尿素水溶液中ではタンパク質はその高次構造は完全に崩壊、直鎖状に存在すると言われる。今回はさらに S-S 結合も還元剤により切断しており、一次構造のみが吸着性に寄与すると考えられる。これにより特定のアミノ酸、もしくはアミノ酸配列が吸着に影響を及ぼすことが示唆された。

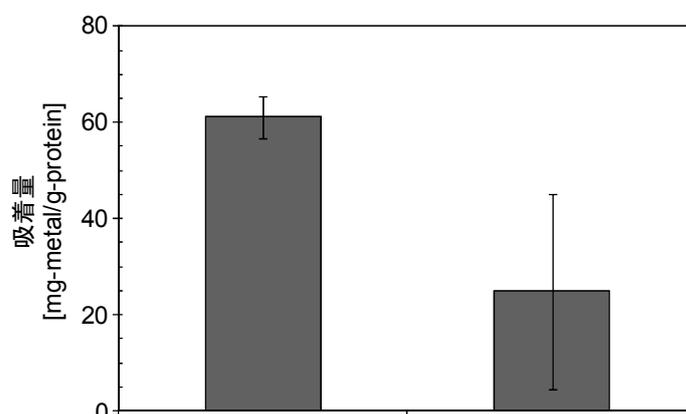


Fig. 3.3 タンパク質の変性の影響

5.4 結言

本章では精製タンパク質に対して Au^{3+} 吸着における糖鎖の影響と高次構造の影響を検討した。結果、糖鎖および高次構造はいずれも Au^{3+} 吸着に寄与しており、今後タンパク質性材料を貴金属吸着剤として用いるときの指針となると考えられる。また一方で高次構造が崩壊しても Au^{3+} 吸着性能を保持していることからアミノ酸配列にも吸着の因子が存在することが示唆された。

参考文献

- 1) 改定第3版 タンパク質実験ノート 下巻, 148, (2004).
- 2) A. L. Horwich, J. S. Weissman, *Cell*, 89, 499(1997).

第六章 ペプチドマッピング法を利用した吸着サイトの同定を目指した基礎的検討および精製タンパク質への適用

6.1 緒言

第五章で述べたとおり、タンパク質において金属イオン吸着には一次構造も関与していると考えられる。アミノ酸配列への金属イオン吸着の検討は多方面で進められている。丸山らは合成ペプチドを表面上に生やした樹脂に対して貴金属イオンを吸着させ、その配列によって吸着量に差異があることを突き止めている¹⁾。

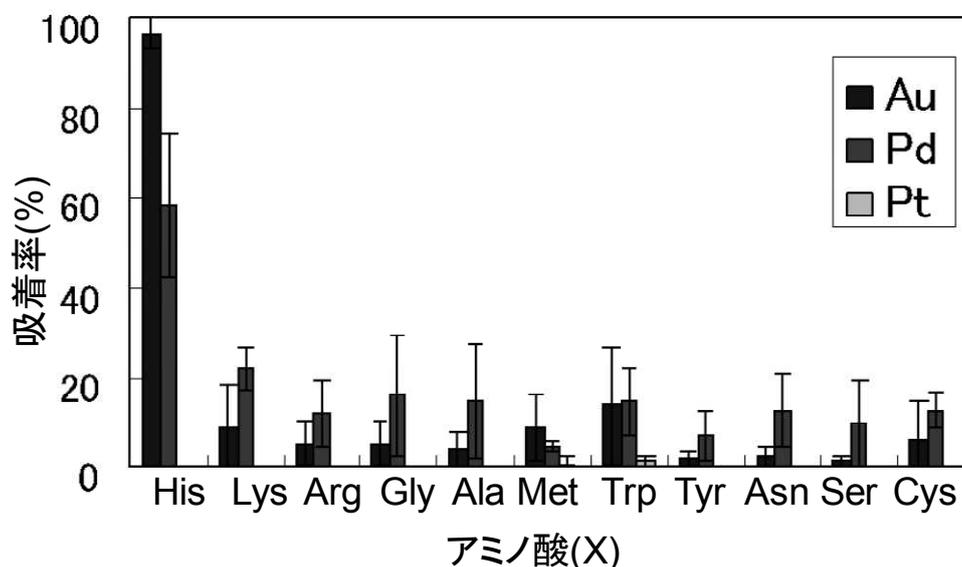


Fig. 6.1 N末端をアセチル化した X-Gly-Leu トリペプチドを表面にはやした樹脂の貴金属イオン吸着

これまでの検討ではペプチドを合成し、検討を進めるボトムアップ型の検討である。そこで本章ではペプチドマッピング法を利用してトップダウン的な手法により精製タンパク質の吸着サイトの同定を試みた。ここでペプチドマッピング法および酵素消化に用いた酵素であるトリプシンについて説明する。

ペプチドマッピング法

タンパク質の一次構造を決定する方法として用いられる。酵素消化や化学消化によって断片化させたペプチド混合物を分離しその分解特異性を考慮して理論的に考えられる断片との比較からアミノ酸配

列を決定する方法である。かつては高速液体クロマトグラフ(HPLC)などが分離に用いられてきたが近年は質量分析法が発達してきており、多種類のサンプルを短時間で検出できるマトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時型質量分析法(MALDI-TOF/MS)も利用されてきている²⁾。

トリプシン

膵臓から分泌されるトリプシノーゲンから生成されるタンパク質消化酵素の一種である。C末端側にプロリンが結合していない塩基性アミノ酸(リジンとアルギニン)のC末端側のアミド結合を加水分解することにより消化反応を進行させる³⁾。膵臓からは、同じくタンパク質消化酵素であるキモトリプシンの誘導體も同時に精製されるため、完全な分離は困難である。よって厳密な基質特異的消化を行うためにキモトリプシンの酵素活性を阻害する必要がある。近年はL-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK)によってキモトリプシンを不活性化したトリプシンも販売されており、大いに活用されている。

まず本検討が可能なのか確認するために予備実験としてグリシン(G)とヒスチジン(H)によってGGHGGHという配列に固相合成法で合成したキサペプチドを用いて検討を行った。また実際にトリプシンを用いて牛由来のRibonuclease A (RNase A)を分解して実験を行った。

6.2 合成ヘキサペプチドでの検討

6.2.1 試薬

固相合成用の樹脂としてすでにヒスチジンが表面上に固定化されているH-His(Trt)-Trt(2-Cl)-Resin (His-resin)、アミノ末端がFmocにより保護されているFmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, およびジメチルホルムアミド(DMF), トリフルオロ酢酸(TFA)、O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), 1-Hydroxy-1H-benzotriazole Hydrate (HOBT·H₂O), Triisopropylsilane (TIPS)を渡辺化学より、N,N-diisopropylethylamine (DIEA)を東京化成(株)から、ジクロロメタン(DCM), 試薬一級メタノール, ジエチルエーテルおよびカイザーテストキットを和光純薬工業(株)より購入して用いた。また吸着させる金属イオンとしてMerck(株)から購入した金標

準液を用いた。

6.2.2 実験方法

GGHGGH の合成

今回は固相合成法の一つである Fmoc 法を用いてヘキサペプチドを以下の手順で合成した。

HBTU 3.05 g, DMF 16 ml, HOBt·H₂O 1.25 g を混合し、反応液 A とする。

DIEA 2.75 ml, DMF 14.25 ml を混合し、反応液 B とする。

1. カラムに His-resin を 0.461 g (0.3 mmol 相当) 充填する。
2. DCM 約 5 ml で三回洗浄する。
3. DMF 約 5 ml で三回洗浄する。
4. 3 倍量 Fmoc アミノ酸 (G: 0.297 g, H: 0.620 g) をカラムに加える。
5. 反応液 A, 反応液 B を 2.1 ml ずつ加え、1 時間ボルテックスする。
6. 溶液を捨て、重合を確認するためカイザーテストを行う。
このときポジティブであったら 2 からの作業を繰り返す。
ネガティブであったら次の作業に移る。
7. DCM で三回洗浄する。
8. DMF で三回洗浄する。
9. Fmoc を切り離すため 20%ピペリジン/DMF を 5 ml 加え 1 分ボルテックスする。
10. 溶液を捨て再度 20%ピペリジン/DMF を 5 ml 加え 45 分ボルテックスする。
11. 溶液を捨て、DMF で三回洗浄する。
12. 任意の配列を形成するまで 2-11 の作業を繰り返す。
13. メタノールで三回洗浄する。
14. 24 時間真空乾燥する。
15. 樹脂から切り離すために TFA 2.8 ml, TIPS 0.1 ml, 純水 0.1 ml 加え 2 時間攪拌する。
16. 溶液を回収し、切り出しきれなかったペプチドを回収するためさらに 0.1 ml の TFA を加え溶液を回収する。この作業を 3 回繰り返す。
17. 回収した溶液に過剰量のジエチルエーテルを加え析出させる。
18. 遠心分離し上澄みを廃棄する。
19. 16-17 の作業を 4 回繰り返し、完全にペプチドを析出させ、さらに

有機溶媒を除去する。
20. 一晚真空乾燥する。

以上の操作より GGHGGH(分子量 520.5)の配列を有するヘキサペプチドを合成した。

合成したヘキサペプチドは逆相高速液体クロマトグラフシステム(RP-HPLC, 島津製作所(株))を用いて 10×30 mm の ODS カラム(Inertsil[®]ODS-3, ジーエルサイエンス(株))により精製を行った。精製の際に 0.1 wt% TFA/水溶液を A 液、0.1 wt% TFA/アセトニトリル溶液を B 液としてサンプルを A 液に 1.0 mg/ml となるよう溶解させ HPLC に投入し、Table 6.1 にしめすプログラムにより B 液のグラジエントをかけ、波長 230 nm の吸光度を測定することによりクロマトグラムを得るとともに、サンプルを分取した。

Table 6.1 グラジエントプログラム

時間 [分]	B 液濃度 [vol%]
0	0
5	0
5.01	40
15	80

また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時型質量分析装置(MALDI/TOF-MS, Voyager-DE PRO-FLO, Appliedbiosystems(株))およびプロトン核磁気共鳴装置(¹H NMR, Unity INOVA-400, Varian(株))を用いて同定を行った。MALDI/TOF-MS の際にはマトリックスとして α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を用い、¹H NMR の際の重溶媒としては重水を用いた。

GGHGGH の Au³⁺吸着性能

合成した GGHGGH の Au³⁺吸着性能を検討した。GGHGGH を A 液、もしくは Au³⁺ 100 ppm/A 液(Au³⁺: 0.508 μ mol/l)に 0.5 mg/ml(GGHGGH: 0.962 μ mol/l)となるよう溶解し 5 分以上接触させ、HPLC に投入した。Table 6.1 に示すグラジエントプログラムを用い、ピークを分取したのち、凍結乾燥器にて溶媒を除去し 2 M 塩酸 10 ml に溶解した。この溶

液を原子吸光光度計(AAS)にて Au^{3+} の濃度を測定し GGHGGH が Au^{3+} を吸着するか検討した。

6.2.3 結果と考察

GGHGGH の構造を Fig. 6.2 に示す。

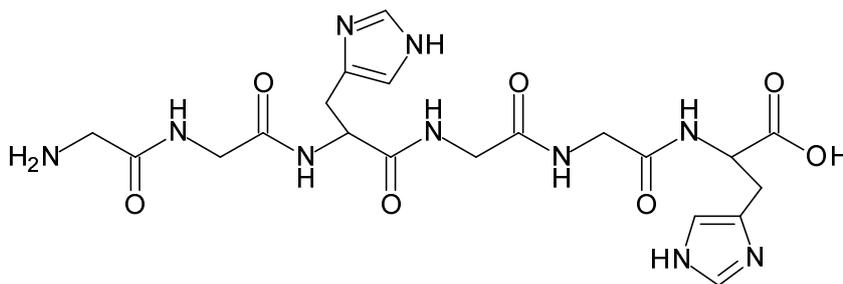


Fig. 6.2 GGHGGH の構造

MALDI-TOF/MS のスペクトルを Fig. 6.3 に示す。

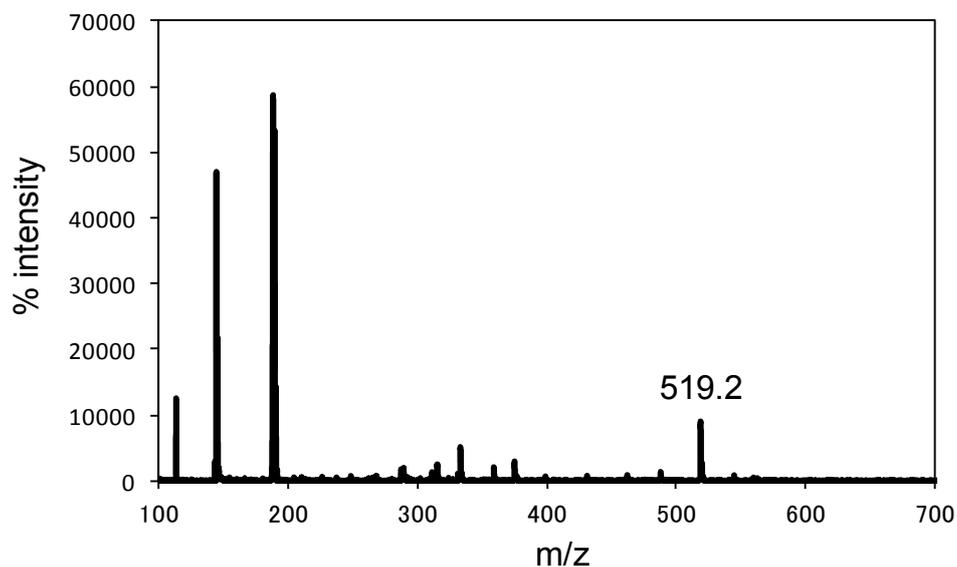


Fig. 6.3 MALDI-TOF/MS による同定(negative)

予想される分子量 520.5 にわずかに少ない分子量 519.2 の位置にピークが得られたことから合成に成功したと考えられる。観測された分子量と予想値の差は脱プロトンによって起きたと考えられる。また ^1H NMR によってもイミダゾール環中のプロトンおよびグリシンの α 位

にあるプロトン由来の特徴的なピークが観測されており合成の成功を支持している (Fig. 6.4)。

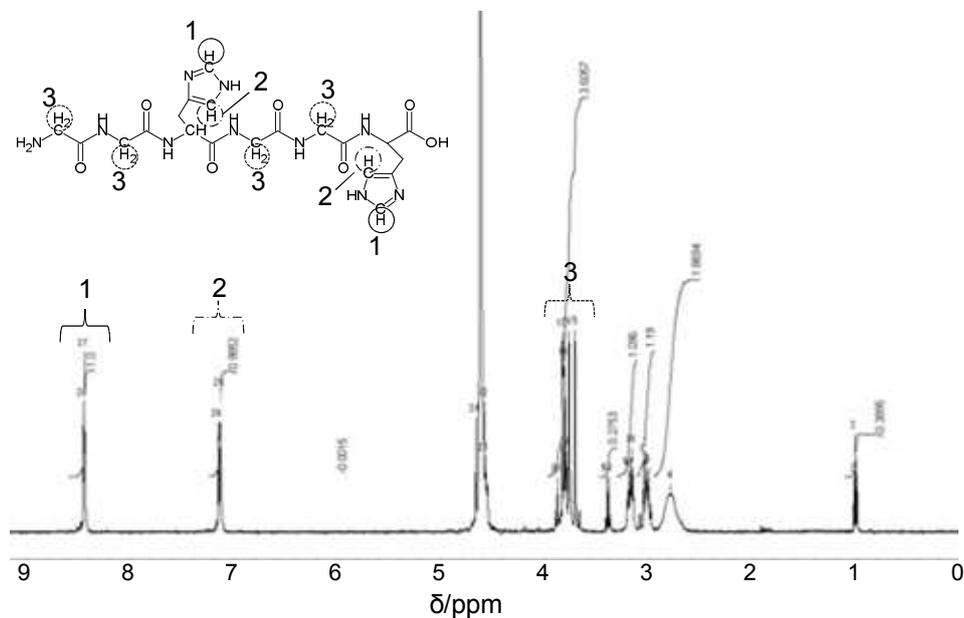


Fig. 6.4 ¹H NMR の結果

合成した GGHGGH および Au³⁺ を吸着させた GGHGGH の HPLC クロマトグラムを Fig. 6.5 に示す。今回は波長 230 nm の光の吸光度を観測することによりクロマトグラムを得た。

HPLC の結果から Au³⁺ の存在によらず保持時間に変化が起きないことが分かった。またこの保持時間約 9 分の鋭いピークが得られた部分を 5 ml 分取し、凍結乾燥後 AAS によって Au³⁺ の濃度を測定すると Table 6.2 のようになった。比較対象として保持時間約 7 分も同様に分取して検討した。

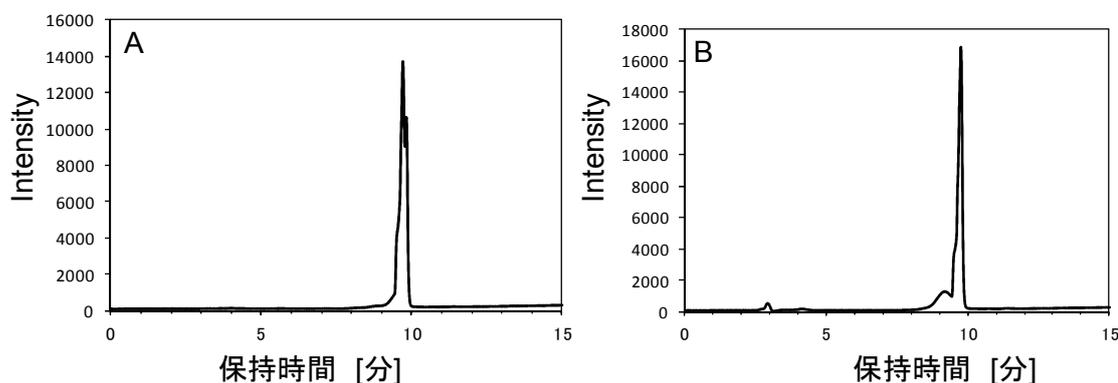


Fig. 6.5 A: GGHGGH のクロマトグラム,
B: Au³⁺を吸着させた GGHGGH のクロマトグラム

Table 6.2 GGHGGH による Au³⁺吸着

保持時間	測定 Au ³⁺ 濃度 [$\mu\text{mol/l}$]*	Au ³⁺ 物質質量 [nmol]
7 分	0.10	1.02
9 分	1.88	18.79

*再溶解させた 10 ml 中の濃度

今回は粗成生物を用いて実験しており正確な GGHGGH の物質量は計算できないが、吸光ピークが得られるフラクションと得られないフラクションで 10 以上 Au³⁺の物質質量に違いがあることから、GGHGGH が Au³⁺を吸着していると考えられ、また HPLC と Au³⁺濃度分析を併用することにより Au³⁺が吸着しているペプチドとしていないペプチドを識別することができ、吸着サイトの同定に利用できると考えられる。

6.3 精製タンパク質 RNase A で吸着サイトの同定

6.3.1 試薬

実験対象のウシ由来 RNase A はナカライテスク(株)から購入したものをを用いた。また酸化反応に用いるために 99%ギ酸をナカライテスク(株)から、脱水メタノール、30%過酸化水素水を和光純薬工業(株)から購入して用いた。消化反応の際にはサーモフィッシャーサイエンティフィクス(株)から購入した TPCK 処理済みウシ膵臓由来トリプシンを

用い、反応場として試薬特級単酸アンモニウムと容量分析用 2M 塩酸を用いた。また吸着させる金属イオンとして Merck(株)から購入した金標準液を用いた。

6.3.2 実験方法

RNase A を消化する為に酸化反応によって分子内 S-S 結合を切断した。タンパク質中の S-S 結合は過ギ酸酸化によりスルホン化され開裂される。過ギ酸酸化は Hirs らの手法を参考に行った⁴⁾。

1. 2.375 ml の 99%ギ酸に 0.125 ml の 30%過酸化水素水を加え過ギ酸を生成し、2 時間室温で放置し過ギ酸溶液とした。
2. RNase A 50 mg をギ酸 1.25 ml, 脱水メタノール 0.25 ml の混合液に溶解させた。
3. タンパク質溶液と過ギ酸溶液を 30 分間氷冷し、その後混合した。
4. 混合液を 2 時間 30 分氷冷した後、90 ml の氷冷水で希釈し、凍結乾燥した。
5. 乾燥したサンプルを 20 ml の純水に溶解させ再度凍結乾燥することで完全に有機溶媒を除去し酸化 RNase A を得た。

生成した酸化 RNase A は Alonso らの手法を元に以下のような方法でトリプシン消化、および HPLC での分離を行った。

1. 0.1 M 炭酸アンモニウム水溶液および 1 mM 塩酸水溶液を調整する。
2. 1 mg/ml となるようトリプシンを 1 mM 塩酸水溶液に溶解する。
3. 酸化 RNase A 11 mg を 1.6 ml の炭酸アンモニウム水溶液に溶解し、そこに 53.45 μ l のトリプシン溶液を加え 37°C で 2 時間振とうした。
4. さらに 53.45 μ l のトリプシン溶液を加え 4 時間 37°C で振とうし、その後凍結乾燥し消化物を得た。

消化物の分離に際して 0.1 wt% TFA/水溶液を A 液、0.1 wt% TFA/アセトニトリル溶液を B 液としてサンプルを A 液に 1.0 mg/ml となるよう溶解させ HPLC に投入し、Table 6.3 にしめすプログラムにより B 液濃度を変化させ、波長 214 nm の吸光度を測定し、分離を行った。

Table 6.3 HPLC グラジエントプログラム

時間 [分]	B 液濃度 [vol%]
0	0
5	0
85	32

トリプシン消化物の Au³⁺吸着性能

消化物の Au³⁺吸着性能を検討した。トリプシン消化物を A 液、もしくは Au³⁺ 100 ppm/A 液に 2.0 mg/ml となるよう溶解し 5 分以上接触させた後、HPLC に投入した。Table 6.3 に示す濃度プログラムを用い、ピークを分取したのち、凍結乾燥器にて溶媒を除去し 1 M 塩酸 2 ml に溶解した。この溶液を ICP-OES にて Au³⁺の濃度を測定しトリプシン消化物が Au³⁺を吸着するか検討した。

6.3.3 結果と考察

RNase A のアミノ酸配列を下に記す⁵⁾。

KETAAAK FERQHMDSSSTSAA SSSNYCNQMMK SR NLTK DR
CKPVNTFVHESLADVQAVCSQK NVACK GQTNCYQSYSTMSITDCR
ETGSSK YPNCAVK TTQANK HIIVACEGNPYVPVHFDASV

RNase A は分子中に 4 つの S-S 結合を有するため、変性が難しく消化反応を効率的に進めるためには S-S 結合の開裂が必要である。そのため今回は過ギ酸酸化法により開裂を行った。

消化物のクロマトグラムを Fig 6.6 に示す。

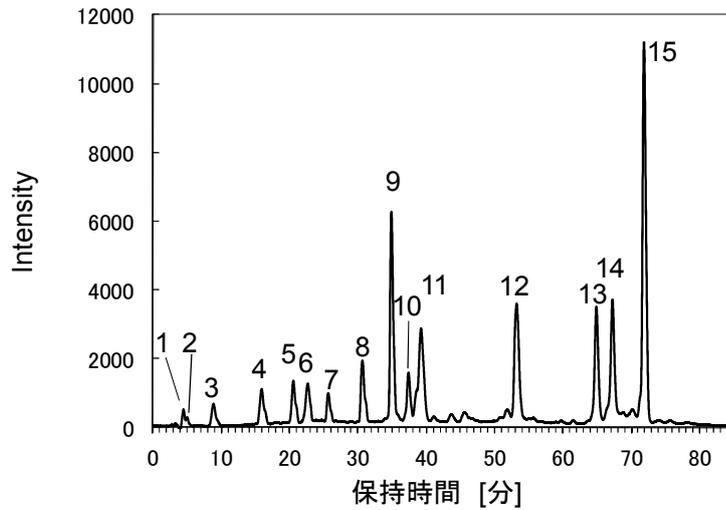


Fig. 6.6 トリプシン消化物のクロマトグラム

参照した Alonso らの HPLC の結果とは保持時間の変動は見られたがピーク数が同数であったため同様に消化できた考え、Alonso らの検討結果を元にピーク中に含まれるペプチド構造を考えると以下のようなになる。

Table 6.4 HPLC のピークとペプチド配列

ピーク番号	ペプチド配列
1	Ser-32-Arg-33
2	Asp-38-Arg-39
3	Glu-86-Lys-91
4	Thr-99-Lys-104
5	Lys-1-Lys-7
6	Asn-62-Lys-66
7	Asn-34-Lys-37
8	Phe-8-Arg-10
9	Gln-11-Lys-31
10	Ser-77-Arg-85
11	Tyr-92-Lys-98
12	Asn-67-Tyr-76
13	Asn-67-Arg-85
14	Cys-40-Lys-61
15	His-105-Val-124

トリプシン消化物に Au^{3+} を吸着させた後のクロマトグラムを Fig. 6.7 に示す。

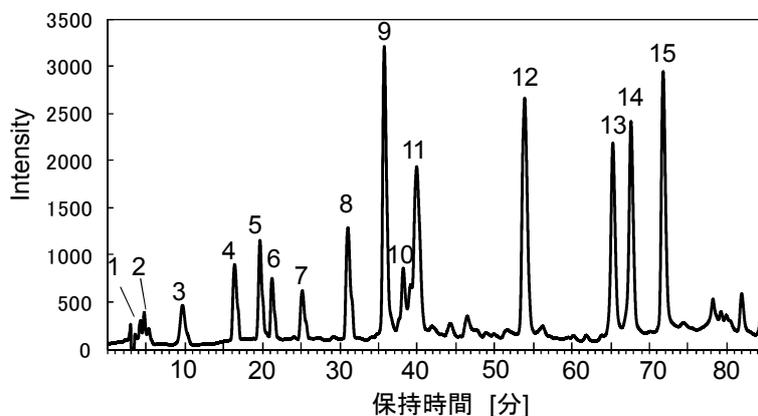


Fig. 6.7 Au^{3+} を吸着させたトリプシン消化物のクロマトグラム
GGHGGH における検討同様 Au^{3+} の存在によらず保持時間に大きな変化が起きなかった。またピークが得られた部分を 5 ml 分取し、ICP-OES によって Au^{3+} の濃度を測定すると Table 6.5 のようになった。

Table 6.5 トリプシン消化物の Au^{3+} 吸着

ピーク番号	測定 Au^{3+} 濃度 [$\mu\text{mol/l}$]*	Au^{3+} 物質質量 [nmol]	アミノ酸数
1	0.065	0.13	2
2	0.043	0.09	2
3	0.058	0.12	6
4	0.070	0.14	6
5	0.049	0.10	6
6	0.038	0.08	5
7	0.041	0.08	4
8	0.042	0.08	3
9	0.055	0.10	21
10	0.047	0.10	9
11	0.050	0.20	7
12	0.174	0.35	10
13	0.230	0.46	19
14	0.241	0.48	22
15	0.246	0.49	20

*再溶解させた 2 ml 中の濃度

ペプチド鎖長が増えるほど吸着量が上昇している傾向が見られた。また、ペプチド鎖中に Cys または His を 2 つ以上含むペプチドの吸着量が上昇している。しかし単純な結論を得ることは難しく、より詳細な検討が必要であると考えられる。

6.4 結言

本章ではペプチドマッピング法を応用した精製タンパク質の吸着サイトの同定を目指した。合成ヘキサペプチドを用いた検討により HPLC と金属濃度測定法を併用することにより Au^{3+} 吸着フラクションの検知が可能であることを示し、また実際に精製タンパク質であるウシ由来 RNase A を用いて吸着サイトの同定を試みた。タンパク質は複雑な因子がそれぞれ関わりあうため、単純に吸着サイトを決定することは困難であったが、本手法を用いて精彩的な検討を進めることでタンパク質の吸着サイトの同定が可能であると示唆される。

参考文献

- 1) T. Maruyama, H. Matsushita, Y. Shimada, M. Hnaki, S. Sonokawa, N. Kamiya, M. Goto, *Environ. Sci. Technol.* 41, 1359 (2007).
- 2) 細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ タンパク質実験プロトコール ①機能解析編, 202, 秀潤社 (1997).
- 3) 酵素ハンドブック, 545, 朝倉書店 (1982)
- 4) C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.* 219, 611 (1956).
- 5) UniProt, <http://www.uniprot.org/uniprot/P61824>, 2012年2月27日
閲覧

第七章 タンパク質性材料を用いた貴金属イオン分離回収システムの実用化に向けての検討

7.1 緒言

第一章で述べたとおり、様々な研究が進められているにもかかわらず、バイオマスを用いた貴金属イオン分離回収システムは実用化に至っていない。そこで実用化に向けさらなるバイオマスの探索を行い、より吸着剤として適切なバイオマスの発見を目指した。また、バイオマスのハンドリング性向上を目指し、シート上への新規な加工法の開発を行った。

7.2 多種類のバイオマスの検討

7.2.1 試薬

吸着させる金属イオンとして Merck(株)から購入した金、パラジウム、白金標準液を用いた。貴金属イオンを希釈する溶液には和光純薬工業(株)から購入した容量分析用 1 M 塩酸を用いた。競争吸着実験の際には非金属イオンとして鉄、ニッケル、銅の 1,000 ppm 原子吸光用標準溶液を Merck(株)から購入し、用いた。また本実験では吸着剤としていずれもタンパク質性材料である 11 種類のバイオマスを用いた。それぞれ紹介する。

卵殻膜

卵殻膜は第二章とおなじものを用いた。

羽毛粉末

鳥類から得られる羽毛(Fig. 7.1)はその構造から空気を多く保持することが可能なため保温機能が高く、古来より布団や上着などの防寒用具として用いられてきた。また、その形状や色合いにより装飾品として用いられたり、筆記具などに用いられたりしてきた。しかし、個体数として最も多く飼育されている鶏の羽毛に関しては廃棄されているものもある。



Fig. 7.1 羽毛粉末

明太子の皮

明太子の皮(Fig. 7.2)とは産卵前のメスのスケトウダラの腹からとれた「タラコ」を塩漬けにして調味液で味付け熟成したもので、明太子の主な成分は水分とタンパク質である。明太子の皮は明太子の加工過程で大量に産出されるため、近年再利用が模索されている。



Fig. 7.2 凍結乾燥した明太子の皮

鶏挽肉

挽肉(Fig. 7.3)とは十分に細かく切断されていたり、すりつぶされていたりするものをさす。食用品として用いられる場合、各種の鳥獣類の肉のうち見た目に難があったり、採取された量がごく微量であったりしたときに混合して挽肉として用いることが多いため非常に食用肉としては安価なものになる。とくに鶏のものは生産量や需要の関係上非常に安く、市販のものでは100gで100円を切ることもままある。一方で食用品であっても、実際の市場では売り残りや食べ残しなどによって廃棄されていることが多いが、活用方法は堆肥として用いる程度しかないのが現状である。



Fig. 7.3 凍結乾燥した鶏挽肉

羊腸

羊腸 (Fig. 7.4) とは羊の内臓のうちの腸であり、かつてはスポーツ用品の繊維として用いられていた。現在は工業的にソーセージなどの肉詰め用の袋として用いられている。ソーセージとして内部に各種鳥獣類の挽肉を味付けしたものを詰めるため、腸壁に欠陥や空孔があると食品加工に用いることはできない。そのため欠陥や空孔があるものは活用されないまま廃棄されている。



Fig. 7.4 凍結乾燥した羊腸

牛皮

牛皮 (Fig. 7.5) は牛の皮革であり、牛皮製品として広く鞆や小物など用いられている。牛皮は一度おおまかにはぎとられたのち、なめし処理を施し、各製品別に厚さを一定にする必要がある。そのため必ず廃棄物として削りぶしが発生し、このような廃棄物の活用方法はいまだ確立されていない。



Fig. 7.5 凍結乾燥した牛皮

大豆タンパク

大豆タンパク (Fig. 7.6) は乳化性、保水性、結着性などに優れており、ハム、ソーセージなどの畜肉加工品や蒲鉾などの水産練り製品の品質強化および安定目的に利用されている。近年その優れた栄養バランスから健康医療食品などに利用されているほか、新たな利用分野の開拓が注目されている材料である。



Fig. 7.6 大豆タンパク

卵黄タンパク

鶏卵の卵黄から生成されるタンパク質 (Fig. 7.7) で必須アミノ酸のバランスが良いことから近年健康食品材料として注目を集め始めている。しかし、適切な活用法がまだ確立されておらず、新規な活用法が望まれている。



Fig. 7.7 卵黄タンパク

ゼイン

ゼインとはトウモロコシ由来のタンパク質である(Fig. 7.8)。トウモロコシは食用から家畜用飼料として幅広く使用されており、大量に生産されている。プラスチックに近い性質を持つといわれ、タンパク質であることを活かした生分解性プラスチックとしても検討されている。



Fig. 7.8 ゼイン

つみれ

つみれ(Fig. 7.9)とは魚肉などを鶏卵やでんぷんなどのつなぎを加えた練り物である。これまでの検討では用いてこなかった魚肉の代表の一つとして本実験では市販のイワシのつみれを湯通しした後、凍結乾燥して用いた。



Fig. 7.9 凍結乾燥したつみれ

鯉節

鯉節とはカツオの肉を加熱した後乾燥させたものをさす。加工工程によってはただ干すだけでなく燻製にしたり、カビを着けることにより熟成させたりすることもある。乾燥品を薄く削った削り節は日本食の出汁の素材として欠かせない材料である。しかし出汁を取った後の出汁がらは廃棄されてしまっている。本実験では出汁がらを凍結乾燥し用いた(Fig. 7.10)。



Fig. 7.10 凍結乾燥した鯉節

粗タンパク質量

各バイオマス中にどの程度タンパク質が含まれているかを確認するために粗タンパク質量を算出した。粗タンパク質量とは元素分析によって得られる窒素元素質量比に窒素係数 6.25 をかけることにより得られる。この値によりその物質に含まれるおおよそのタンパク質の量がわかり、本研究の一つの指標となると考えられる。今回株式会社システムズエンジニアリングに依頼し各バイオマスの元素分析を行った。元素分析の結果と粗タンパク質量の計算値を Table 7.1 に示す。

Table 7.1 バイオマスの元素分析結果と粗タンパク質量

バイオマス	N 元素 [wt%]	S 元素 [wt%]	粗タンパク質量
卵殻膜	15.1	2.7	94.2
羽毛	11.7	1.7	73.2
明太子の皮	13.6	0.5	85.0
鶏挽肉	13.6	0.6	85.3
羊腸	14.3	0	89.3
牛皮	15.6	0	97.6
大豆タンパク	12.8	0	79.9
卵黄タンパク	10.6	0.3	66.1
ゼイン	14.7	1.4	91.8
つみれ	6.76	0.6	42.3
鯉節	13.9	0.7	87.1

計算の結果いずれのバイオマスに関しても高いタンパク質量が含まれていることがわかった。よってこれらのバイオマスを用いることで貴金属の吸着が可能であると期待される。

7.2.2 実験方法

標準溶液を 0.1M の塩酸で金属イオン濃度 200 ppm になるよう希釈した金属水溶液を Au^{3+} , Pd^{2+} , Pt^{4+} それぞれ別々に作製。金属水溶液 10 ml に対して各バイオマス を 4 mg 加え、24 時間室温で攪拌した。ろ過後、ろ液の金属イオン濃度を ICP-OES もしくは原子吸光光度計(AAS)で測定し、吸着量を算出した。また、吸着性の高かったバイオマス に関しては金、パラジウム、白金、鉄、ニッケル、銅の混合溶液にて競争吸着実験も以下の手順で行った。各金属が 10 ppm となるよう 0.1 M 塩酸で希釈し、その溶液 10 ml にバイオマス を 10 mg 加え 24 時間室温で攪拌した。ろ過後、ろ液の金属イオン濃度を ICP-OES もしくは AAS で測定し、吸着量を算出した。

7.2.3 結果と考察

各バイオマスの貴金属イオン吸着実験の結果を Fig. 7.11 に示す。

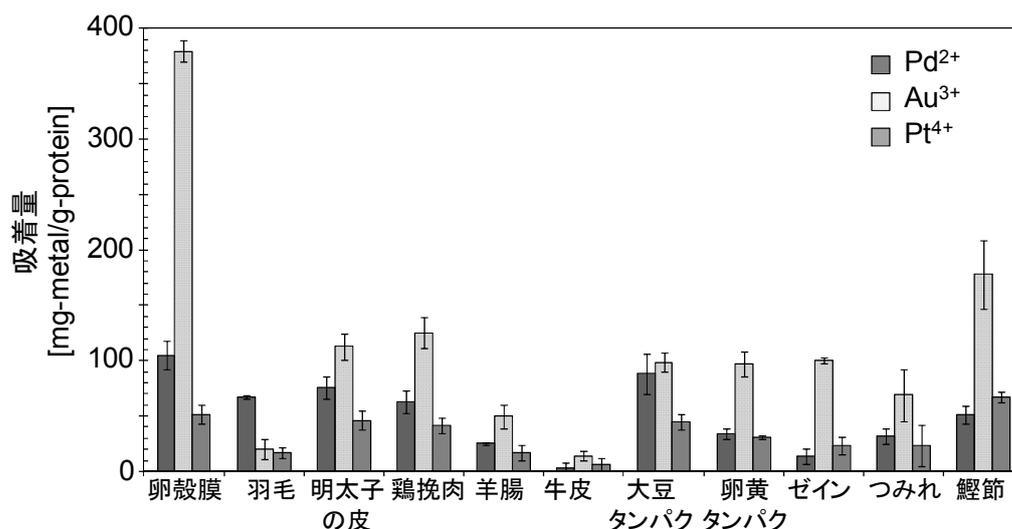


Fig. 7.11 多種類のバイオマスでの貴金属イオン吸着

検討の結果卵殻膜が高い貴金属イオン吸着性能を示した。また鰹節も高い吸着性能を示した。一般に使用されている金属リサイクル用のイオン交換樹脂が 1 g で 100 mg 程度の金属イオンを吸着するといわれていることから卵殻膜は実用的な吸着材であるといえる。また卵殻膜と鰹節で競争吸着実験を行ったところ Fig. 7.12 のようになった。

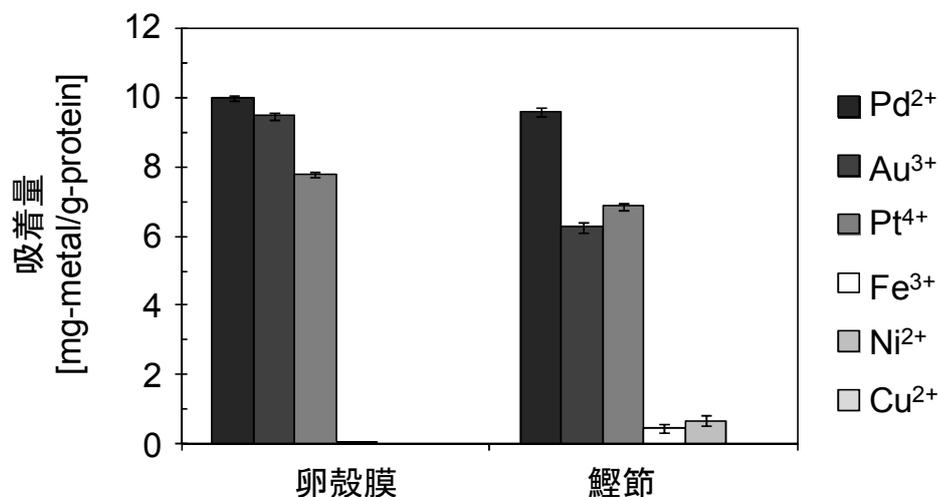


Fig. 7.12 卵殻膜と鰓節の競争吸着

Fe³⁺等の卑金属イオンがほとんど吸着していないのに比べ Au³⁺等の貴金属イオンは高い吸着性を示した。このことからバイオマスを用いて選択的に貴金属イオンを吸着回収できると考えられる。

7.3 新規バイオマス加工法の開発

前項で極めて高い吸着性能を示した卵殻膜であるが、卵殻膜はそのままと Fig. 4.3 に示した通りひらひらの状態であり、実用化を考えた際ハンドリング性に問題があるといえる。そこで本稿では卵殻膜の吸着性を損なうことなくバイオマスを用いて卵殻膜をシート状に加工する技術の開発を試みた。

7.3.1 試薬

キューピー(株)からいただいた卵殻膜を粉末状にしたものを用いた。また卵殻膜単体では加工が難しいのでバインダーとしてトウモロコシ由来タンパク質であるゼインを和光純薬工業(株)から購入して用いた。また架橋剤としてヘキサメチレンジイソシアネート(HMDI)を、溶媒として試薬特級エタノールを和光純薬工業(株)から購入して用いた。また吸着性能評価する為に Au³⁺, Pd²⁺, Pt⁴⁺の標準溶液を Merck(株)から購入して用いた。貴金属イオンを希釈する溶液には和光純薬工業(株)から購入した容量分析用 1 M 塩酸を用いた。

7.3.2 実験方法

バイオマスシートの作製

まず HMDI とエタノールを任意の比率で混合し、反応液とした。ゼイン 2 g と卵殻膜粉末 3 g と反応液 100 ml を混合し、混練しながら純水 1 ml と卵殻膜粉末 1 g をさらに加えた。一定の粘度が得られたら一定の厚みとなるよう伸ばし、一晚ドラフト中で乾燥した。

吸着性能の評価

標準溶液を 0.1 M の塩酸で金属イオン濃度が 200 ppm となるよう希釈した。その溶液 10 ml に 15 mg の作製したシートをいれ 24 時間室温で攪拌した。ろ過後、ろ液を ICP-OES もしくは AAS で金属イオン濃度を測定し、吸着量を算出した。対照実験として卵殻膜粉末 10 mg とゼイン 5 mg の混合粉末も同様に検討した。

7.3.3 結果と考察

バイオマスシートの作製

HMDI の組成をバイオマスに対して 0~8.3 wt% の間で変化させて検討を行った。HMDI は Fig. 7.13 のような構造を有しており、両末端のイソシアネート基がタンパク質のアミンとアミド結合を形成することにより架橋反応を進行させると考えられる (Fig. 7.14)。

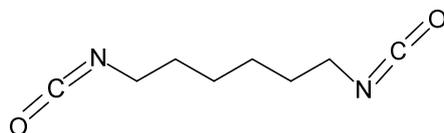


Fig. 7.13 HMDI の構造

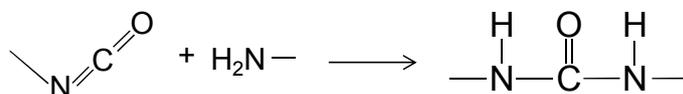


Fig. 7.14 HMDI とタンパク質の架橋反応

作製したバイオマスシートを Fig. 7.15 に示す。

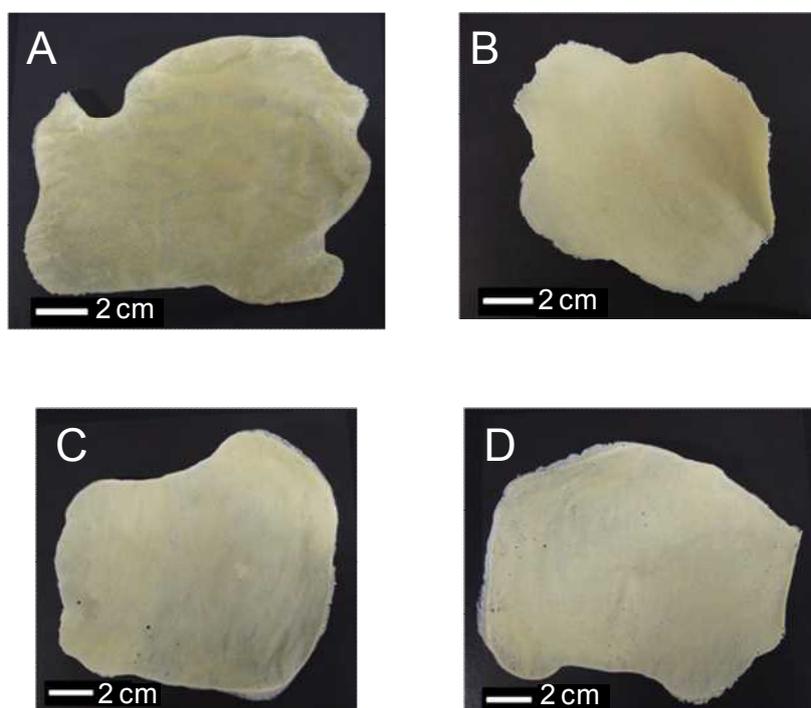


Fig. 7.15 作製したバイオマスシート
A: HMDI 0 wt%, B: 0.83 wt%,
C: 4.2 wt%, D: 8.3 wt%

どの HMDI の濃度でもバイオマスシートの作製に成功した。バインダーに用いたゼインは単体でもシート状に形成できるため、HMDI 0 wt%でも加工できたと考えられる。ただし、架橋剤を加えないと水中に入れるともろくなる傾向が見られた。

貴金属イオン吸着性能の評価

貴金属イオン吸着実験の結果を Fig. 7.16 に示す。

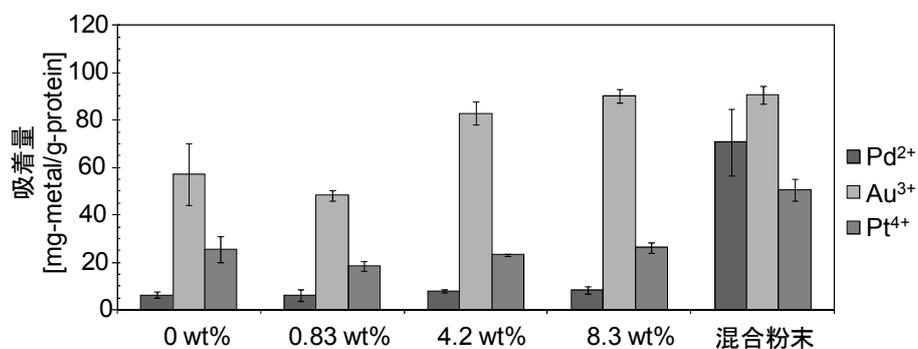


Fig. 7.16 バイオマスシートの貴金属吸着性能

架橋剤の比率を増加させると貴金属イオン吸着性能が上昇しており、HMDIが4.2 wt%あたりから未加工のものと変わらないAu³⁺吸着性能を示すことがわかった。しかし、Pt⁴⁺やPd²⁺は吸着量が低下することが分かった。これはシート化する際に架橋剤を用いているが架橋剤がタンパク質のアミンをアミド結合に使ってしまうため、吸着サイトが減少したためではないかと考えられる。

7.4 結言

バイオマスを用いた貴金属イオン回収プロセスの実用化に向け、11種類のバイオマスを検討した結果、卵殻膜が最も高い吸着性能を示すことが分かった。また卵殻膜は市販のイオン交換樹脂に匹敵する吸着量を示すことも分かった。またトウモロコシ由来タンパク質であるゼインと架橋剤を用いて、Au³⁺の吸着性能を維持して卵殻膜をシート状に加工する新規な加工法の開発に成功した。

第八章 結論

本研究ではタンパク質性材料を用いて貴金属イオン吸着回収プロセスの開発を目指し、その吸着機構の解明を試み、また実用化に向けての検討を行った。以下に得られた知見を示す。

1. 貴金属イオンはバイオマスにイオンの状態と還元された金属の状態の両方で吸着していることを明らかにした。
2. バイオマスへの貴金属イオン吸着性はその貴金属イオンの錯体種によって変化することが示唆された。ただし錯体種の影響力は各貴金属イオンで異なることが示唆された。
3. 糖タンパク質においては糖鎖が貴金属イオン吸着に関与していることが示された。
4. タンパク質の高次構造が貴金属イオンの吸着性に関与していることが示された。
5. 高次構造が完全に崩壊しても吸着性能がある程度あることから一次構造も貴金属イオン吸着にかかわっていることが示唆された。
6. 合成ヘキサペプチドを用いた検討により HPLC と濃度分析法を併用することで貴金属吸着部位を検知することが可能であることを示した。
7. 精製タンパク質である RNase A に対してトリプシン消化を行い検討した結果、His や Cys を複数有するペプチド鎖が多く Au^{3+} を吸着させる傾向があることが示唆された。
8. 11 種類のバイオマスを検討した結果、卵殻膜が最も高い貴金属イオン吸着性能を有することが示され、その吸着量は市販のイオン交換樹脂に匹敵することが示された。
9. ゼインと架橋剤を用いることで Au^{3+} 吸着性能を維持したまま卵殻膜をシート状に加工する新規な手法を開発した。

10. 加工したシートでは Pd^{2+} や Pt^{4+} の吸着量が低下したことから、 Au^{3+} とは吸着機構が異なることが示された。

以上のことからタンパク質性材料の貴金属イオン吸着は多様な因子が複雑に影響しあっていることが示唆された。今後アミノ酸配列の影響を精査していくことで吸着サイトの同定ができると予想され、さらなる吸着機構の解明が期待される。また加工技術の確立により実用化がより現実的になったと考えられ、今後の本研究の発展により環境調和型・循環型社会の実現が大いに期待される。

発表状況

原著論文

Y. Fukui, T. Maruyama, Y. Iwamatsu, A. Fujii, T. Tanaka, Y. Ohmukai, H. Matsuyama, Preparation of monodispersed polyelectrolyte microcapsules with high encapsulation efficiency by an electrospray technique. *Colloids and Surfaces A*. 370, 28-34 (2010).

T. Maruyama, S. Tabayashi, T. Honjo, K. Hoe, T. Tanaka, J. Shimada, M. Goto, H. Matsuyama, Task-specific membranes for the isolation of recombinant proteins with peptide-tags. *RSC Adv.*, 2, 125–127 (2012).

学会発表

藤本祐平、大向吉景、丸山達生、曾谷知弘、松山 秀人、アミノ酸を用いた金ナノ粒子合成方法の開発、第 12 回化学工学会学生発表会、九州大学（福岡市）、平成 22 年 3 月 6 日

寺島泰樹、丸山達生、後藤雅弘、大向吉景、松山秀人、タンパク質性素材を用いた環境調和型貴金属リサイクルシステムの開発、40 周年記念分離技術会年会 2010、明治大学(東京都千代田区)、平成 22 年 6 月 2~4 日(発表日 6 月 3 日)

寺島泰樹、丸山達生、後藤雅弘、大向吉景、松山秀人、動物由来バイオマスを用いた貴金属分離技術の開発、化学工学会第 42 回秋季大会、同志社大学(京都市)、平成 22 年 9 月 6 日~8 日(発表日 9 月 7 日)

藤本祐平、前川哲也、丸山達生、大向吉景、松山秀人、アミノ酸を用いた新規貴金属微粒子合成方法の開発
化学工学会 第 42 回秋季大会、同志社大学(京都市)、平成 22 年 9 月 6 日~8 日(発表日 2010 年 9 月 7 日)

Yuhei FUJIMOTO, Tatsuo MARUYAMA, Yoshikage OHMUKAI, Hideto MATSUYAMA,
Synthesis of gold nanoparticles by amino acids
PACIFICHEM 2010 (アメリカ合衆国ハワイ州ホノルル市)、2010 年 12 月 14~20 日(発表日 12 月 16 日)

Y. Terashima, T. Maruyama, M. Goto, Y. Ohmukai, H. Matsuyama, Novel environment-friendly recycling system of precious metals using protein-rich biomass, Pacificchem2010 (アメリカ合衆国ハワイ州ホノルル市)、2010年12月14~20日(発表日12月16日)

本庄崇文, 田林俊介, 室得一貴, 丸山達生, 田中 勉, 大向吉景, 松山 秀人

目的タンパク質分離機能を有する高分子多孔膜の開発
分離技術会年会 2011 明治大学(川崎市)、平成23年6月3日~4日
(発表日6月3日)

本庄崇文、田林俊介、室得一貴、丸山達生、田中勉、大向吉景、松山秀人
Porous Polymeric Membrane Discerning the Type of Proteins,
Affinity2012、Tavira市、平成23年6月16日

本庄崇文、田林俊介、室得一貴、丸山達生、田中勉、大向吉景、松山秀人
タンパク質の種類を認識可能な高分子多孔膜の開発、
第60回高分子学会年次大会、大阪国際会議場(大阪市)、平成23年5月25日~27日(発表日5月26日)

本庄 崇文、田林 俊介、室得 一貴、丸山 達生、嶋田 如、田中 勉、大向
吉景、後藤 雅、松山 秀人

タンパク質精製機能を有する高分子多孔膜の作製
化学工学会 第43回秋季大会、名古屋工業大学(名古屋市)、平成23年
9月14日~16日(発表日9月15日)

寺島 泰樹、武田 志奈乃、後藤 雅宏、松山 秀人、丸山 達生
タンパク質性材料を用いた貴金属イオン吸着回収システムの開発とその吸着
機構の解明
化学工学会第77年会、工学院大学(東京都)、平成24年3月14日~16
日(発表日3月16日)