

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13289

研究課題名(和文)人工設計ペプチド集合体を用いた放射性/安定レアメタル選択回収システム

研究課題名(英文) Recycling radioactive/stable rare metals by artificially designed peptide assemblies

研究代表者

田村 厚夫 (Tamura, Atsuo)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90273797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現代のハイテク社会で必要であるレアメタルは、希少かつ一部地域に偏在化しているため入手困難で、産業廃棄物からのリサイクルが必須である。また、原発事故で放出されたレアメタルを含む放射性元素の回収が喫緊の課題となっている。そこで、これらのメタルに結合するペプチドを人工設計した。この結果、設計ペプチドは目的金属のみに選択的に結合するだけでなく、呈色により目的メタルを感知するセンサー能を有することを発見した。さらにメタルを自己集合させて回収可能なナノ粒子に転換する機能を有していることが判明し、全く新しいリサイクル法への道を切り拓くこととなった。

研究成果の概要(英文)：Although the rare metals are used in various instruments, they will be depleted in the near future. Thus we have to recycle them from the urban mines. Here we present peptides that have capability of selectively binding and recycling the rare metals. One of the designed peptides is specific to gold, another is to platinum, and the other binds to various rare metals or rare earths such as Pd, Cs, Dy, and Nd. Furthermore the gold binding peptide was found to gradually interconvert the gold ion into the nano colloid concomitant with a change in color to magenta. This study will serve as a stepping stone to further development to recycling and sensing rare metals.

研究分野：ナノ材料設計

キーワード：ペプチド レアメタル 環境 リサイクル

1. 研究開始当初の背景

携帯電話や電気（ハイブリッド）自動車などの電磁気部品を回収した結果生じる所謂「都市鉱山」は種々の金属の混合物であり、天然資源産出の少ない我国では貴重な資源と目される。特に金（Au）、白金（Pt）、パラジウム（Pd）、イリジウム（Ir）などのレアメタル、およびジスプロシウム（Dy）やネオジム（Nd）などのレアアースは希少かつ鉱山が地球上の一部地域に集中して偏在化しているため、価格高騰や輸出規制が大きな問題となっている。例えば、保磁力を高めたり、赤色光技術に有用な Dy は高価な上 99% が中国産である。一方、福島第一原発から飛散した放射性元素の中に、レアメタル（アース）に分類可能なものが存在し、Nd、セシウム（Cs）など 10 種類以上に渡る（AERA2011.6.27 号朝日新聞社）が、これらの元素の非放射性同位体は産業界で広く利用されており、上記有用レアメタルとも重複している。そこで共通の方法論を用いて、「都市鉱山」「放射性飛散物」から目的メタルを検出回収する新技術を開発することで、既存技術では困難であった面を補完し、昨今の我国にとって大きな社会問題の解決に寄与することを目指すこととした。

この際、申請者が昨年世界に先駆けて成功したレアメタル結合能を付与した人工設計ペプチドの開発技術（特願 2012-47585, 2013-182954）を適用する。これは申請者が長年研究開発に取り組んできた、「人工設計したペプチド」を用いて自在に「ナノ構造や機能をデザイン」する機能性ペプチドデザイン技術（特許出願 15 件（うち外国 3 件）、取得特許 5 件（うち外国 1 件）をメタル結合に特化させて可能となったばかりであり、今まさに萌芽期にある新技術である。

2. 研究の目的

レアメタルは希少かつ鉱山が地球上の一部地域に集中して偏在化しているため、昨今、価格高騰や輸出規制が問題となっている。一方、原発事故で大きな社会問題となっている放射性元素についてレアメタルを含む金属イオンの回収が喫緊の課題となっている。そこで、これらのメタルを選択的に検出し回収する全く新規のリサイクル技術を開発することを目的とした。この際、申請者が開発した選択的レアメタル結合能を持った人工設計ペプチドの技術を適用して目的メタルのみを選択的に結合することに加え、そのメタルを集合させ容易に回収可能な形態に転換するシステムとする。ペプチド自体は生体物質であり、穏やかな条件で反応が進み、金属結合は可逆的に On/Off できることから、それ自体が生分解性で省エネルギーかつ再利用可能な新たな環境調和型材料の創製につながる研究となる。

3. 研究の方法

大きく分けて、以下の 5 項目を行った。

- 1) 種々のメタルとの結合ペプチドの設計
- 2) メタルの検出方法の開発
- 3) 選択性の向上
- 4) センシング力の獲得
- 5) 回収法の完成

1) については、特許出願技術であるレアメタル結合型人工設計ペプチドをスタート物質とし、合理的にアミノ酸変換を行うことでレアメタル結合能を持ったペプチドを創製する。

2) については、この分子を紙などの担体に固定化し、安定で容易に使える形態とすること、pH によってメタルを脱着し再利用可能にすること、および積層することでさらに選択分離能を向上させることを目指した。ただし、その後の研究の発展で 4) の新たな検出方法を見出したため代替可能となった。

3) の選択性については、24 アミノ酸残基

からなる α ヘリックス型構造体の金属イオン結合型人工設計ペプチド M2SAP3 および 12 残基からなる環状ペプチドを出発点とし、ペプチドの改良を行う。この際、種々のレアメタルに対する結合を、滴定型熱量測定による厳密な熱力学的パラメーターの獲得、および核磁気共鳴測定による原子レベルでの詳細な構造解析を行うことで、物理化学的に正しいデータを蓄積し、より精緻な設計を行うこととする。

4) については、ペプチドに自己集合性を持たせることで、メタルに結合した後に会合し、結果的にメタル自身も集合することでナノ粒子となるよう設計する。ナノ粒子は、大きさによって可視光を吸収し呈色するため、メタルの存在を目視が確認できるセンサー能を持つことになる。また、ペプチド分子を集合させる方法として、二次構造の基本単位である 2 種類、即ち α ヘリックス構造型と β シート構造型の両方をそれぞれ用いて形成させる。後者の自然界で存在する典型例としては、アミロイド線維が挙げられるため、この線維形成メカニズムについても解明を目指していく。

5) については、まず 4) のようなナノ粒子化の結果、遠心分離によって回収可能となることを利用する。また、ナノ粒子を形成しなくても、担体との相互作用を改良することによる吸着強化と再利用化を試す。つまり、ペプチド分子単体だけを利用するのではなく、紙などの担体と結合させ安定な素材とするため、以下の性能向上を図ることとする。このため、ヘリックスバンドルの安定化を目指す。具体的には、会合度を上昇させ、高分子化し、物理的に紙にからみやすくする。

さらに、レアメタル結合機構の解明について、新たにテラヘルツ領域の光を用いた物理化学的解析を適用した。この領域の分光測定の利点としては、結合機能に直接関与するペプチド分子のダイナミクスが検出できる点

がある。特に、温度を極低温から大きく変化させることで、熱エネルギーがペプチドのダイナミクスにどのように影響し機能発現に関与しているのかを明確にする。

4. 研究成果

この分子システムは、構造面からは、① α ヘリックス構造型と② β シート型の 2 種類が基本骨格となり、これが分子集合することでナノファイバー形態となることを狙って設計を行った。一方、機能面からは 1) 結合、2) 選択、3) センシング、4) 回収、の 4 段階から構成される。

まず構造面の結果を示す。ナノレベルでの構造解析は、原子間力顕微鏡 (AFM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて行った。例えば、①型の TEM 像は図 1 のようになった。

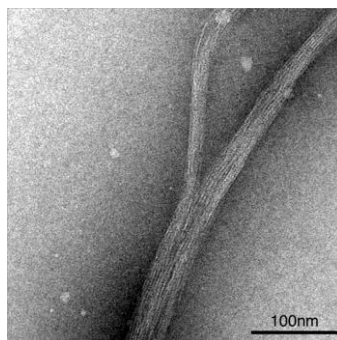


図 1 : ①の構造体で形成されたペプチドナノファイバーの TEM 像

この図のように、ペプチド分子が集合することで、まず直径数ナノメートルの細いファイバーが形成し、これが多数バンドル化することで最終的に太さ数十 nm のナノファイバーを形成していることがわかった。分子集合体は図 2 のように形成すると考えられる。

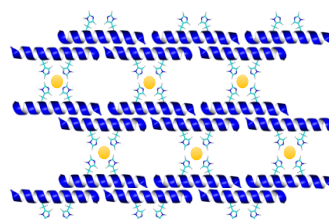


図 2 : ①型ファイバーの構造

ここで、青色らせん構造体が α ヘリックス型分子でこれらが集合していることを示す。また、黄色の球体はメタルを示し、これらが結合することでよりファイバー間の相互作用

が強まりバンドル化が促進される。一方、②のβシート型では、環状ペプチドを設計し、これが上下にβシート型水素結合によって積層することで図3のように内側が中空のナノチューブとなることを目指したものであり、実際、図4の通りそれを達成することができた。

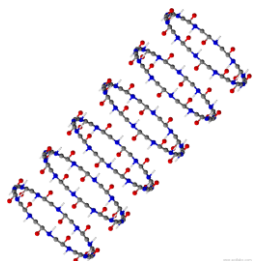


図3：②型ペプチド
ナノチューブの構造



図4：②型ペプチド
のAFM像（一辺5μm）、
直径数nmのファイバー
が観測された。

次に、機能面について示す。初めに述べた機能面1)～4)の内、1)については設計時には、図2のように①型のヘリックスで挟み込むものと、図5のように②型で環の内部の空隙に收容することを狙った。

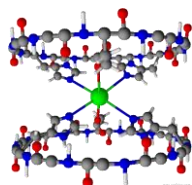


図5：上下の環状ペプチドで中央のメタル(緑の球体)を收容

この結果、①型で結合定数10の4乗以上の強さで結合したものは以下の通りであった。

①型でレアメタル：金(Au), 白金(Pt), パラジウム(Pd), ロジウム(Rh), イリジウム(Ir)

①型でレアアース：ネオジウム(Nd), ツリウム(Tm)

また、②型で結合が確認されたのは以下の通りである。

②型でレアメタル：セシウム(Cs), Pt

②型でレアアース：ジスプロシウム(Dy), Nd

2)の選択性については、結合性を示したペプチドはどれも1, 2種類のメタルのみ強

く結合したため、ほぼ達成できている。各メタルに対する結合の定量的解析を、滴定型熱量測定による厳密な熱力学測定を行うことで行った。この結果、同じメタルでもペプチドによって結合エンタルピーが負(発熱: -600cal/mol程度)であるものと、正(吸熱: +200cal/mol程度)であるものがあり、予想に反してエントロピーを駆動要因として結合しているものの存在が判明した。また、構造上のどこに結合しているか原子レベルの分解能で明らかにするため、核磁気共鳴測定を行った。この結果、ペプチド中のHisやTrpがAuと結合していることが明らかになり、選択性を生む構造的根拠が得られた。

3)のセンシング能については、図6のように金の水溶液にこのペプチドを入れると赤色呈色するセンシング能を見出している。

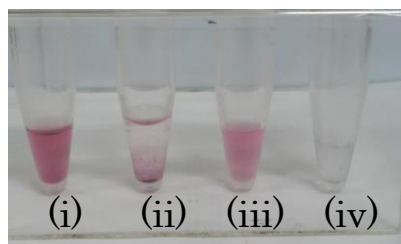


図6

ここで、(iv)の無色透明のAu溶液にこのペプチドを加え、静置すると(i)の金ナノ粒子となり赤色呈色したものである。さらに、(i)を遠心すると(ii)のように金粒子のみ沈殿し分離可能であることから、このペプチドは赤色呈色によって「金を検出」し、金を集合させることで4)の「回収可能な状態にする」という2つの重要な機能を併せ持っていることが明らかになった。

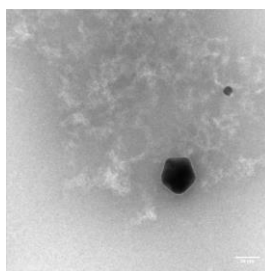


図7：TEM像
中央の黒色五角形が金ナノ粒子

実際に、ナノ粒子であることを図7のように確認することにも成功した。黒色の金ナ

ノ粒子の周りに、白色の網状に写っているペプチド集合体も見ることができる。

このようなナノ粒子形成能力は、他の一部のレアメタルにも拡張することに成功しており、現在詳細を解析中である。

この他、分子集合形成メカニズムの解明のため、典型的な②に相当するβシート型会合体である天然のインシュリンをモデルにアミロイド線維形成の中間体の検出を行った。また、結合メカニズムの解明のため、新たな物理化学的測定解析法の開拓を行った。つまり、まずペプチドが他分子と結合するためには、分子がダイナミックに動くことが必須である。このような揺らぎの検出法は極めて限られていたため、テラヘルツ領域の周波数成分を有する分光測定を行いた。この結果、結合機能発現に必要なだと考えられてきた、アンハーモニックなダイナミクスについて、新たな分子論的描像を得ることができた。

以上のように、生体物質であるペプチドを用いて、意外にもレアメタルやレアアースという希少金属を選択的に結合回収させることが多くのメタルで可能であることを示した。ハイテク化するとともに資源の枯渇に直面している現代社会に於いて、リサイクル法として新たな面を切り拓いたと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Naoki Yamamoto, Kaoru Ohta, Atsuo Tamura, & Keisuke Tominaga (2016) Broadband Dielectric Spectroscopy on Lysozyme in the sub-Gigahertz to Terahertz Frequency Regions: Effects of Hydration and Thermal Excitation *J. Phys. Chem. B*, **120** (21), pp 4743–4755 (2016)

山本直樹、太田薫、田村厚夫、富永圭介 (2016) タンパク質の動的挙動に及ぼす水とおよび熱活性の影響, 応用物理, 85,

689-692.

Naoki Yamamoto, Shoko Tshuhara, Atsuo Tamura, & Eri Chatani, A specific form of prefibrillar aggregates that functions as a precursor of amyloid nucleation, *Sci Rep.* **8**, 62-69 (2018)

〔学会発表〕(下記を含め計 22 件)

1) 田村 厚夫, 機能性ペプチドの人工設計: アミロイド分解能を持つミニチュア酵素の創製へ, ライフサイエンス ワールド 2015 (第 12 回 アカデミックフォーラム), 東京ビッグサイト 2015. 5.

2) 田村 厚夫, 飯田 禎弘, アミロイド線維分解能を持つミニチュア酵素の人工設計, 第 3 回日本アミロイドーシス研究会学術集会 東京都 2015. 8.

3) 飯田 禎弘, 田村 厚夫 Hydrolysis of lipid droplets by artificially designed peptides 第 53 回日本生物物理学会 金沢 2015. 9. 英語

4) 斎藤 康平, 田村 厚夫, 薬剤候補化合物を内包する自己集合ペプチド nano チューブの分子設計, 第 88 回日本生化学会大会 神戸国際会議場 2015. 12. ポスター

5) Yoshihiro Iida, Atsuo Tamura Artificially designed peptides that degrade amyloid fibrils. The Protein Society 2016 Annual Symposium, 2016 年 7 月 16 日~2016 年 7 月 19 日 Baltimore, MD, USA

6) 斎藤康平, 田村厚夫 ドラッグデリバリーを志向したペプチド nano チューブの分子設計 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25 日~2016 年 9 月 27 日 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス

7) Yoshihiro Iida, Atsuo Tamura Design of

peptides that specifically bind to the rare metal 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016. 11 つくば国際会議場

8) 山本 直樹, 津原 祥子, 田村 厚夫, 茶谷 絵理 線維前駆中間体を經由したアミロイド線維形成機構 -インスリン B 鎖が形成する初期会合体のキャラクタリゼーション- 第 16 回日本蛋白質科学会年会 福岡国際会議場 2016.6

9) 大津 知也;田村 厚夫,耐熱性 α -ヘリックス型ペプチドナノファイバーの人工設計,2017 年度生命科学系学会合同年次大会,,神戸 ,2017,12

10) 大津 知也;田村 厚夫,耐熱性ナノファイバーを形成する両親媒性ヘリックスペプチドの分子設計,第 64 回日本生化学会近畿支部例会,,大阪大学豊中キャンパス,2017,05
→「優秀発表賞受賞」

11) 山本 直樹;津原 祥子;田村 厚夫;茶谷 絵理,超音波照射によるインスリン B 鎖アミロイド前駆中間体の線維化誘導,第 17 回日本蛋白質科学会年会,,仙台国際センター,2017,06,

12) 滝田 茉央;田村 厚夫,カルシウムイオンとの結合能を持った自己集合型ペプチドの分子設計 (ポスター), 2017 年度生命科学系学会合同年次大会,,神戸,2017,12

13) 滝田 茉央;田村 厚夫,カルシウムイオンとの結合能を持った自己集合型ペプチドの分子設計(口頭), 2017 年度生命科学系学会合同年次大会,,神戸,2017,12

14) 滝田 茉央;田村 厚夫,カルシウムイオンと結合する自己集合型ペプチドの設計,第 64 回日本生化学会近畿支部例会,,大阪大学豊中キャンパス,2017,05

15) 滝田 茉央;田村 厚夫,炭酸カルシウム結晶制御を目指したカルシウムイオンと結合する自己集合型ペプチドの分子設計,神戸大学 研究基盤センター 若手フロンティア研究会 2017,,神戸大学,2017,12

16) 飯田 禎弘;田村 厚夫,アミロイド分解能を有する人工ペプチドの設計,第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本大学 黒髪北地区,2017,09

17) 飯田 禎弘;田村 厚夫,アミロイド線維を分解する人工設計ペプチド,第 17 回日本蛋白質科学会年会,,仙台国際センター,2017,06

〔図書〕 (計 2 件)

①田村厚夫 選択的レアメタル/アース回収能を持った人工設計ペプチドの創製 バイオベース資源確保戦略 -都市鉱山・海底鉱山に眠る貴金属・レアメタル等の分離・回収技術-Strategies for Ensuring Stable Supplies of Resources on the Basis of Biotechnology -Separation and Recovery Technologies for Precious and Rare Metals Untapped in Urban and Submarine Mines- (2015) 小西康裕監修 203-211, CMC 出版, 東京 ISBN978-4-7813-1075-6

②田村厚夫 ペプチドナノチューブの分子設計 ペプチド医薬品開発のためのスクリーニング・安定化・製剤化技術 (2017) 296-303, 技術情報協会, 東京 ISBN978-4-86104-687-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 厚夫 (TAMURA, Atsuo)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号 : 90273797