

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21853

研究課題名（和文）デザイン可能なバイオベースの貴金属吸着剤の創製

研究課題名（英文）Fabrication of designable bio-based adsorbents for precious metals

研究代表者

中島 一紀（Nakashima, Kazunori）

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：50540358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：セルロース結合タンパク質と貴金属結合ペプチド・タンパク質の融合タンパク質をセルロースに吸着したデザイン可能で低環境負荷の貴金属吸着材料を開発した。作製した吸着剤はいずれも水溶液中からAuイオンやPdイオンの回収が可能であった。また、融合タンパク質のデザインを改良することで貴金属イオンの吸着効率を増大させることができた。セルロースに吸着した貴金属イオンはソフトなりガンドを用いることで脱着・回収することが可能であったため、カラムを用いた連続吸着・脱着システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有価金属の回収や有害重金属の除去などに用いられる金属イオン吸着剤は、通常合成ポリマー（樹脂）を支持体として作製されているが、将来的な低炭素社会の構築およびSDGs達成のためには、石油化学品に置き換わる新たな材料・技術の開発が必要である。本研究で開発した貴金属回収剤はタンパク質と天然高分子のみからなり、さらにターゲット金属に応じて配位子を変えることができるグリーンかつ機能的な新たな概念の金属吸着材料である。この技術は、有価金属の回収のみならず、重金属汚染水の浄化、食品・医療分野での有害金属の除去など、資源・環境・食品・バイオメディカルなど様々な分野へ応用できる基盤技術になると期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed novel metal adsorbents composed of bio-based materials, cellulose and proteins. Many kinds of metal-binding proteins and peptides are reported in nature or by directed molecular evolution methods. However, proteins and peptide are usually dissolved in water and cannot be used for metal ion recovery from aqueous solution. Therefore, we tried to immobilize metal-binding proteins/peptides on water-insoluble cellulose via carbohydrate binding module (CBM), which is known to bind to cellulose. We constructed fusion proteins composed of metal-binding proteins/peptides and CBM, where a metal-binding part of the fusion proteins is variable or modifiable depending on target metal ions including Au and Pd. The fusion proteins were strongly adsorbed on cellulose and could be used for precious metal ion recover from aqueous solution. Adsorbed metal ions can be desorbed from cellulose by using stripping agents, and continuous metal recovery system using column was also developed.

研究分野：資源環境工学

キーワード：金属結合ペプチド 都市鉱山 ファージディスプレイ法 バイオベースマテリアル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

金や銀、白金族などの貴金属類は、電子・通信・情報、化学工業、エネルギー、医療など様々な産業に用いられており、現代社会においては不可欠な元素群である。日本は鉱物資源に乏しいものの、携帯電話・テレビ・パソコンなどに含まれる有用金属を資源と捉える都市鉱山という観点からは、日本は世界トップクラスの資源保有国ということになる。つまり、我が国の持続的な資源戦略において、都市鉱山からの有用金属の分離・回収は極めて重要な意味をもち、最優先すべき課題の一つである。

都市鉱山からの貴金属の回収においては、基本的には鉱石からの貴金属の精製・製錬方法が利用される。電子部品などに含まれる貴金属は、王水やシアン化アルカリ溶液(青化液)により浸出・溶解され、その後、イオン交換樹脂や活性炭による吸着、溶媒抽出、電解、晶析などの手法により回収される。貴金属イオンの希薄溶液の場合は、主にイオン交換樹脂や活性炭による吸着が用いられる。しかし、金属イオンに対する選択性はイオン交換樹脂の化学的性質に依存し、その選択性は一般に高くない。また、貴金属の浸出・溶解過程で目的金属以外の金属が溶解することもあり、それらの不純物の混入が純度や回収率の低下につながる。目的の貴金属を効率的に回収するためには、ターゲット金属に対する高い選択性が求められる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ターゲットの貴金属イオンを効率的に回収することができるデザイン可能で低環境負荷の貴金属イオン吸着剤を開発する。ファージディスプレイ法などの進化分子工学的手法を用いて、特定のターゲットに結合するペプチドを人工的に獲得することができる。本研究では、金属結合性ペプチドを貴金属イオンの分離・回収に用いる。しかし、ペプチドは水溶性であり、金属イオンと錯形成するのみで回収することはできない。そこで、金属結合性ペプチドを不溶性の担体に結合する必要がある。セルロースやキチンなどの天然バイオポリマーは、高い機械的強度を示し、酸・アルカリ・有機溶媒に対する化学的安定性を示し、環境負荷が小さい高機能材料と考えられる。本研究では、金属結合性ペプチドをバイオポリマーに結合させた吸着剤を製作する。そこで用いるのがバイオポリマー結合タンパク質である。天然には、セルロースに結合する多糖結合モジュール(CBM: carbohydrate binding module)やキチンに結合するキチン結合タンパク質(ChBP: chitin-binding protein)が存在する。つまり、金属結合性ペプチドにバイオポリマー結合タンパク質を融合することにより、バイオポリマー上に固定化するアプローチである。さらに、タンパク質は分子のデザインが可能であり、貴金属イオンの配位子の数や配置を自在に変更することができるため、吸着剤の高機能化が可能である。

本研究では、金属結合性ペプチド・バイオポリマー結合タンパク質・バイオポリマーから構成される全く新しい概念の金属イオン吸着剤を次項の(1)~(3)について研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ターゲットの結合と解離が可能なペプチド配列の獲得

ファージディスプレイ法を用いることで、あるターゲットに対して選択的に結合するペプチド配列を得ることができる。しかし、これまでの研究では結合にのみ着目しており、ターゲットからの離脱についてフォーカスした研究は報告されていない。有用金属の回収においては、ターゲット金属に結合し、その後のプロセスでは結合した金属を放出しなければならない。つまり、ターゲット金属イオンを結合し、解離できるペプチド配列を獲得できれば、純度の高い金属イオンをより簡便なプロセスで回収することができる、極めて有用な技術になりうる。

この技術を確認するために、本来のターゲットである貴金属イオンを検討する前段階として、これまでに様々な結合ペプチドが報告されているシリカ微粒子を用いて、結合・解離型のペプチドが取得できるか検討した。ランダムペプチドライブラリーはNEB社のファージディスプレイキット(10<sup>8</sup>種類のペプチドライブラリー)を用いた。

### (2) 貴金属イオン(Au, Pd)を回収可能なバイオベース材料

溶液中の貴金属を回収することができるバイオベースの吸着剤を作製した。金属結合ペプチドやタンパク質は水溶性であるため、それを不溶性担体に固定化する必要がある。担体として、物理的強度と化学的安定性を示すセルロースを選択し、そこにペプチド・タンパク質を固定化する。しかし、化学的な手法を用いて固定化すると、ペプチド・タンパク質の機能が損なわれたり、金属配位のための配向性が失われるという問題が生じる。そこで、ペプチド・タンパク質を温和かつ強固にセルロースに固定化するために多糖結合モジュール(CBM: carbohydrate binding

module) を用いた。具体的には、金結合タンパク質である *Tepidimonas fonticaldi* AT-A2 株由来の金結合タンパク質 (AuBP) やパラジウム結合ペプチド (PdBp) と CBM を分子レベルで連結した貴金属結合性-セルロース吸着性融合タンパク質を作製した。その融合タンパク質をセルロースに固定化するというアプローチである。また、セルロースナノファイバー (CNF) を担体とした貴金属吸着材料の開発も行った。

### (3) カラムを用いた連続吸着システムの構築

本研究では、上記(2)で作製した貴金属結合性-セルロース吸着性融合タンパク質を固定化するセルロースとしてろ紙を検討した。これにより、有用金属を含む溶液を作製したろ紙に通すだけで有用金属が回収できるシステムを構築できると思われる。一方、より効率的な金属回収を行う場合には多段プロセスの方が好ましい。そこで、融合タンパク質を固定化したセルロースをカラムに充填した連続吸着システムの構築を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ターゲットの結合と解離が可能なペプチド配列の獲得

本来のターゲットである Au や Pd などの貴金属を用いる前に、これまで多数の結合ペプチドが報告されているシリカ微粒子をターゲットとして、本手法が利用できるかどうかを確認した。M13 ファージを用いたファージディスプレイ法により、いくつかのペプチド配列を取得することができたが、目的としていた結合と解離が可能なペプチドを取得することはできなかった。選別・淘汰過程であるバイオパニングの方法を見直す必要があると思われる。

### (2) 貴金属イオン (Au, Pd) を回収可能なバイオベース材料

上記(1)の検討で所望のペプチド配列の取得が困難であったため、すでに論文で報告されている金結合タンパク質 (AuBP) とパラジウム結合ペプチド (PdBp) を金属配位子として利用することとした。

Aubp を不溶担体であるセルロースへと固定化するために、CBM を融合したタンパク質 (Aubp-CBM) を作製した。また、Aubp-CBM をベースとして、CBM の両端に 2 つの Aubp を融合した Aubp 両端型や、Aubp-CBM どうしを連結したダブルフュージョンなどの融合タンパク質群を作製し (図 1)、セルロースへの吸着挙動および Au<sup>3+</sup> の回収能力について検討した。

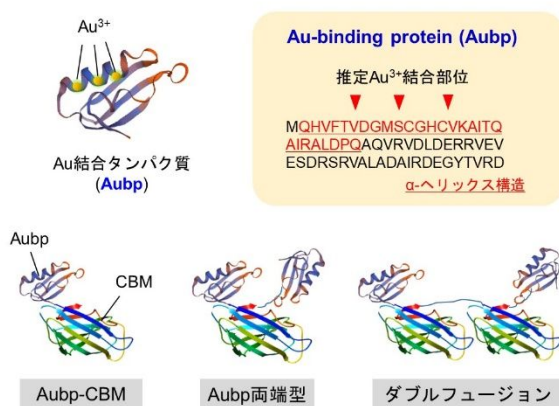


図 1 Au 結合タンパク質 (Aubp) と CBM からなる Au 回収のための融合タンパク質群

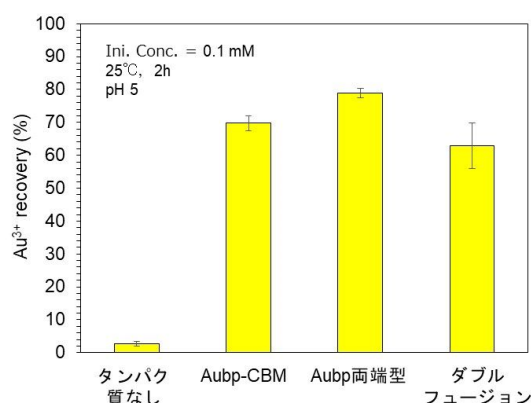


図 2 ろ紙単位重量あたりの Au<sup>3+</sup> 吸着率

図 2 にろ紙単位重量あたりの Au<sup>3+</sup> 吸着率、表 1 にろ紙単位重量あたりの融合タンパク質の吸着量と Au<sup>3+</sup> 吸着量を示す。融合タンパク質の吸着量については、Aubp-CBM の吸着量が最も高かった。これより、タンパク質の立体構造がセルロースへの吸着量に影響を与えることが考えられる。Au<sup>3+</sup> 吸着量については、タンパク質なしの通常のろ紙の Au 吸着量は無視できる程度であったのに対し、Aubp-CBM、Aubp 両端型、ダブルフュージョンを固定化したろ紙はそれぞれ Au の吸着が確認されたことから、Au<sup>3+</sup> イオンの吸着はセルロース上の融合タンパク質の機能であることを示している。融合タンパク質の中では Aubp 両端型が最も高い吸着能力を提示し、続いて Aubp-CBM、ダブルフュージョンの順であった。タンパク質あたりの Au 吸着量では、ベースとなる AuBP-CBM に比べて AuBP 両端型は 1.33 倍、ダブルフュージョンは 1.44 倍であった。どちらも 1 分子内の AuBP の数が AuBP-CBM よりも多いため、タンパク質あたりの Au 吸着量が増加したと考えられる。しかし、これらの融合タンパク質は分子中に AuBP 部位を AuBP-CBM の 2 倍含むため、Au<sup>3+</sup> 吸着量も AuBP-CBM に比べて 2 倍程度増加すると予想していたが、結果は

予想と大きく異なった。これは 1 分子中に融合されるタンパク質を増加したことによって構造に歪みが生じ、AuBP が Au<sup>3+</sup> を吸着するためのコンフォーメーションが崩れてしまい、吸着能力が低下してしまったのだと考えられる。以上より、本システムでの Au 回収を行う際には、ろ紙への融合タンパク質の吸着量と、融合タンパク質の Au<sup>3+</sup> 吸着量のいずれも考量する必要があることが示された。

表 1 融合タンパク質の吸着機能評価

	ろ紙あたりのタンパク質 吸着量 (nmol/mg)	ろ紙あたりの Au <sup>3+</sup> 吸着量 (nmol/mg)	タンパク質あたりの Au <sup>3+</sup> 吸着量 (nmol/nmol)
Aubp-CBM	0.574	3.32	5.81
Aubp 両端型	0.486	3.75	7.75
ダブルフュージョン	0.356	2.99	8.41

図 3 に Au 吸着セルロースの XPS 分析の結果を示す。コントロールであるタンパク質が固定化されていないろ紙に比べて、融合タンパク質を固定化したろ紙は、結合エネルギー 84~85 eV, 87~88 eV にてピークが見られた。84~85 eV は Au 4f<sub>5/2</sub>, 87~88 eV は Au 4f<sub>7/2</sub> であり、これらは Au(0) のピークに帰属される。つまり、タンパク質が Au<sup>3+</sup> を吸着する際に Au<sup>3+</sup> を Au(0) へと還元していることが示唆された。これには金結合タンパク質に含まれるアミノ酸が Au<sup>3+</sup> を還元していると考えられる。システインに含まれるチオール基やヒスチジンは還元性を示すことが確認されており、特にヒスチジンを Au<sup>3+</sup> を含む溶液に添加すると Au<sup>3+</sup> を還元し金ナノ粒子を形成することが知られている。AuBP の Au<sup>3+</sup> 吸着に関与するとされているアミノ酸配列中にはシステインやヒスチジンが含まれているため、これらのアミノ酸によって Au<sup>3+</sup> は Au(0) に還元されると考えられた。また、AuBP 両端型、AuBP-CBM、ダブルフュージョンの順で光電子強度が大きい傾向となり、XPS による表面分析の結果は Au<sup>3+</sup> 吸着量と相関関係が見られた。

図 4 に AuBP 両端型を用いた場合の各金属への選択性を示す。Au の吸着性が最も高く、Au と同じソフトな金属である Pd に対してもやや高い吸着性を示した。タンパク質側鎖には様々な化学官能基が存在しており、それらによって Au 以外の金属イオンについても吸着が見られたことが推察されるが、AuBP は Au に対して最も高い親和性を示すことが示された。

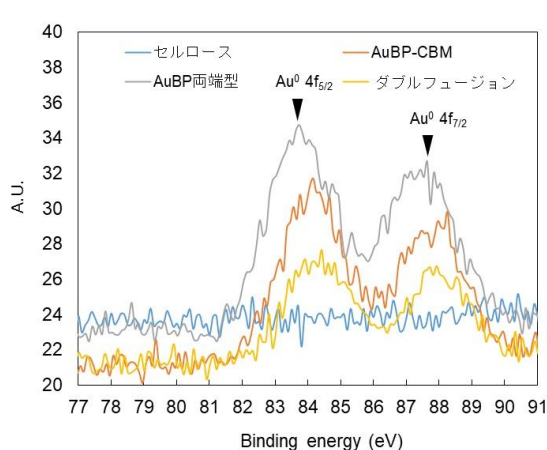


図 3 Au 吸着セルロースの XPS 分析

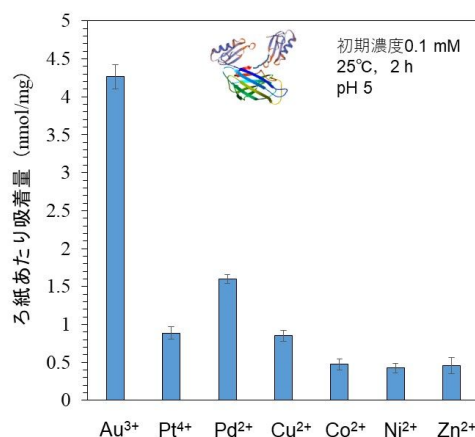


図 4 金属イオンに対する選択性

また、パラジウム結合ペプチド (PdBP) と CBM を融合した PdBP-CBM とセルロースナノファイバー (CNF) を用いたパラジウムの回収について検討した。図 5 にセルロースのタンパク質吸着実験の結果を示す。ろ紙、および CNF への PdBP-CBM の吸着率はそれぞれ 24 %, 92 %であった。BSA の CNF への吸着率は非常に低かったため、PdBP-CBM のセルロースへの吸着は CBM の機能によるものであることが確認された。ろ紙よりも CNF への PdBP-CBM 吸着率が高い理由については、CNF ではセルロース繊維がより解繊され、比表面積が大きく、CBM との吸着部位が多いからであると考えられる。

図 6 に各吸着材料によるパラジウム吸着実験の結果を示す。ろ紙、CNF とともに PdBP-CBM を固定化した系でのパラジウム吸着率が高かった。このことから、PdBP-CBM のパラジウム吸着能が確認された。一方、コントロールであるろ紙、CNF 単体の系でも多少の吸着率が確認されたが、これはセルロースの還元末端によるパラジウムイオンの還元と析出沈殿の可能性が考えられる。ろ紙の還元末端の 30-40% は、セルロース構造体の内部に埋もれており溶媒に触れない状態であるが、CNF ではより多くの還元末端が露出し、パラジウムイオンを還元したために見かけの吸着率が高くなったと考えられる。



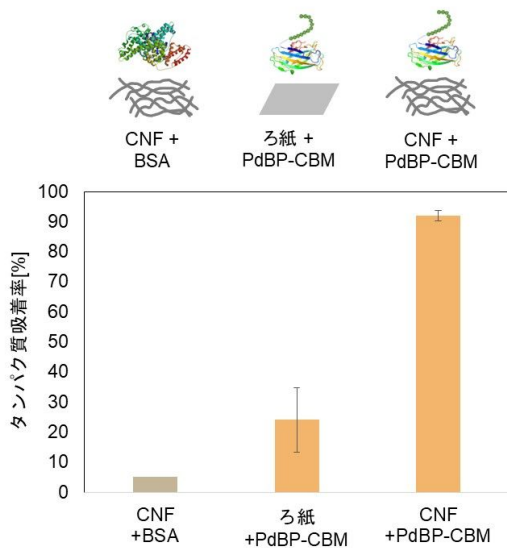


図5 セルロースのタンパク質吸着率

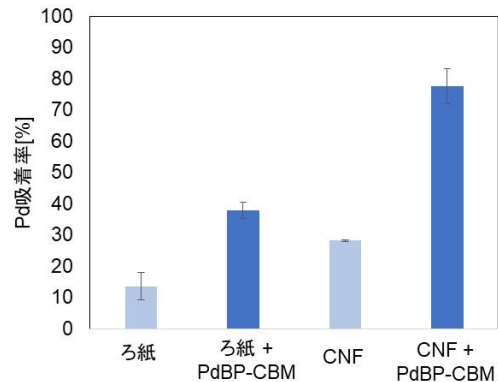


図6 各材料のパラジウム吸着率

図7にCNFに結合したパラジウムの脱着実験の結果を示す。今回用いたパラジウムイオンの脱着剤の中で、チオウレアが最も効率的にパラジウムを脱着できることが示された。チオウレアはHSAB側においてソフトなグループに属する硫黄元素を有するため、同じくソフトなグループに属するパラジウムと錯体を形成しやすい。一方、EDTAやクエン酸などの比較的ハードな配位子では効率的な脱着ができなかった。

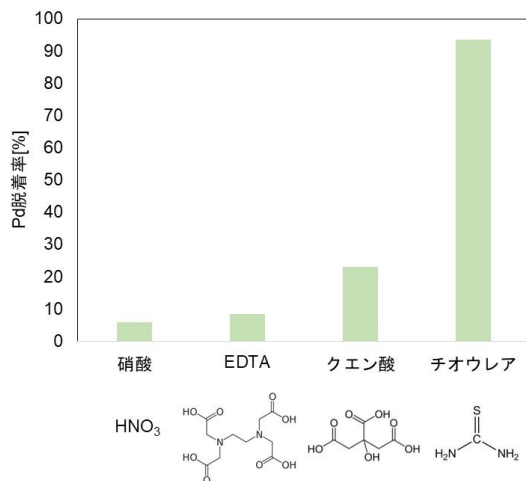


図7 セルロースからのパラジウム脱着

### (3) カラムを用いた連続吸着システムの構築

AuBP 両端型を固定化したセルロースを充填したカラムに  $Au^{3+}$  溶液 (1 mM) 20 mL を 5 回通液し、カラムの最大吸着容量を測定した。各過程後の積算吸着量はそれぞれ、4.87 nmol/mg, 9.21 nmol/mg, 11.7 nmol/mg, 11.9 nmol/mg, 12.0 nmol/mg であり、本実験で作製した AuBP 両端型を固定化したセルロースの  $Au^{3+}$  の最大吸着容量は、約 12.0 nmol/mg であることが示された(図8)。

さらに、約 12.0 nmol/mg の  $Au^{3+}$  を吸着したカラムに 1 M のチオ尿素溶液を通液し、カラムから、 $Au^{3+}$  を回収した。その結果、チオ尿素によるカラムからの脱着量は 10.8 nmol/mg であり、およそ 89% の  $Au^{3+}$  を回収することに成功した。

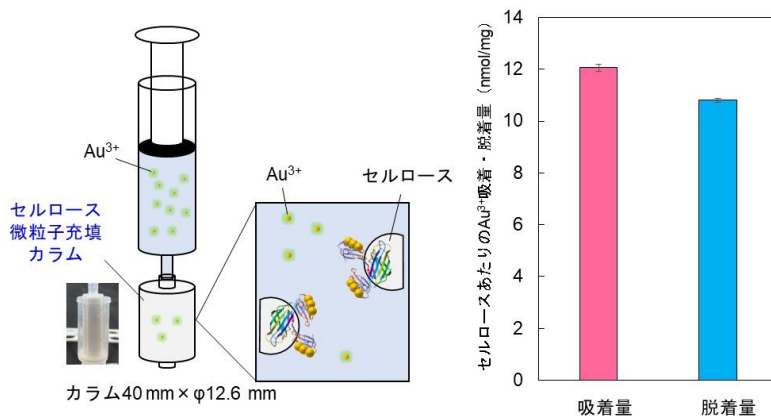


図8 (A)連続系でのAu吸着システムの概念図と(B)吸着・脱着の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青木 孝祐, 中島 一紀, 東郷 佑樹, 川崎 了
2. 発表標題 セルロースとタンパク質を用いた新たな貴金属回収法の開発
3. 学会等名 資源・素材2021（札幌）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 一紀
2. 発表標題 無機物と有機物の界面に着目した人工タンパク質のデザインと資源・環境分野への応用
3. 学会等名 資源・素材2021（札幌）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木孝祐, 中島一紀, 東郷佑樹, 川崎了
2. 発表標題 セルロースを担体とした Au <sup>3+</sup> 回収のための融合タンパク質のデザイン
3. 学会等名 生物学若手研究者の集い夏のオンラインセミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石渡 悠介, 中島 一紀, 五十嵐 健輔, 川崎 了
2. 発表標題 ファージディスプレイ法を用いた酸性条件下でシリカに結合するペプチドの探索
3. 学会等名 資源・素材 2020（仙台） オンライン開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 一紀
2. 発表標題 バイオベースの金属イオン吸着材料：基本概念と応用
3. 学会等名 JpGU 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島 一紀, 青木 孝祐, 東郷 佑樹, Wilson Mwandira, 高野 力, 川崎 了
2. 発表標題 セルロースとタンパク質からなる新たな金属イオン吸着材料
3. 学会等名 資源・素材2022 (福岡)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中島一紀, 監修: 川本克也	4. 発行年 2023年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 336
3. 書名 脱炭素と環境浄化に向けた吸着剤・吸着技術の最新動向, 第21章「タンパク質と多糖をベースとした金属イオン吸着剤」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関