

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21760613

研究課題名（和文） セルロースナノファイバーの化学修飾体の開発とタンパク質・ナノ粒子の高密度保持

研究課題名（英文） Development of chemically-modified cellulose nanofibers for high-density adsorption of proteins and nanoparticles

研究代表者

大島 達也（OSHIMA TATSUYA）

宮崎大学・工学部・准教授

研究者番号：00343335

研究成果の概要（和文）：微細繊維構造を有するバクテリアセルロース、解繊セルロースなどのセルロースナノファイバー（CNF）からなる吸着剤は、内部拡散できず表面でのみ吸着される生体高分子やナノ粒子などを高密度に吸着保持しうる。CNF に各種官能基を導入した化学修飾体を調製し、各種の生体高分子の吸着特性を評価した結果、CNF 誘導体がタンパク質等への高い吸着容量を示し、ナノオーダーの吸着種に対して優れた吸着剤となりうることを示した。

研究成果の概要（英文）：Adsorbents prepared using cellulose nanofibers (CNFs) such as bacterial cellulose and microfibrillated cellulose would be beneficial for the adsorption of biomacromolecules and nanoparticles which are only adsorbed at surface adsorption sites. From the results of adsorption tests, chemically-modified CNSs bearing various functional groups exhibited higher adsorption capacities for biomacromolecules such as proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：イオン交換

1. 研究開始当初の背景

代表的な天然多糖類であるセルロースは再生可能（カーボンニュートラル）なバイオマス資源としてこれまで以上に広範な利用が検討されているが、近年、マイクロフィブリルと呼ばれるセルロースの微細繊維を、高機能材料として利用することへの関心が高まっている。植物の高次構造形成においてセルロースマイクロフィブリルは基礎骨格となり、その繊維幅は数 nm ～ 数十 nm 程度である。極めて微細な繊維であるが、セルロース分子鎖が伸びきり鎖となり、かつ多点での水素結合が強固に作用し、高比表面積、高強度性など従来の植物セルロースに無い優れた材料特性を示す。

このような微細繊維からなるセルロースとして菌体が産出するバクテリアセルロース（BC）がある。BC は微細なネットワーク型の繊維構造（図 1）から構成され、その高強度性、高保水性などの特性を活かした用途開発

が進められてきた。同様に、微細繊維構造からなるセルロースとして、セルロース繊維に剪断力や衝撃力を加えることで機械的にマイクロフィブリルオーダーまで解繊する MFC（Microfibrillated Cellulose）がある。Yano らは MFC をアクリル樹脂やポリ乳酸と混抄したコンポジット材料が高強度かつ柔軟な透明材料として薄型ディスプレイの透明基板として有用であることを報告している（Adv. Mater. 17, 153 (2005) など）。

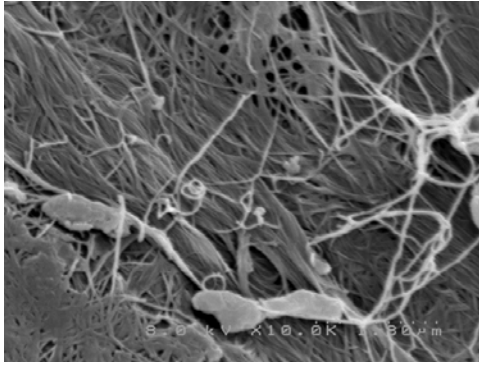


図1. BC の SEM 像(10,000 倍)

他方、筆者らは BC を化学修飾しイオン交換基を導入した BC 誘導体を調製し、吸着剤としての機能評価を行ってきた。その結果、金属イオンやアミノ酸等に対する BC 誘導体の吸着特性は植物セルロース(PC)由来の吸着材と同様であったが、微細繊維からなる BC 誘導体は分子量の大きいタンパク質に対して非常に大きい吸着容量を有することを見いだした。図2にリン酸化植物セルロース(PPC、リン酸基導入率 3.1%)とリン酸化 BC(PBC、リン酸基導入率 3.6%)におけるタンパク質(リゾチーム、分子量 14,300)の吸着等温線を示す。PBC と PPC はほぼ同程度のリン酸基を有するにもかかわらず、PBC は PPC の 1.6 倍以上のタンパク質への吸着容量を示した。金属イオンやアミノ酸などの小さな吸着種ではこのような差は見られない。すなわち、タンパク質のように、分子量が大きく、繊維の内部まで拡散することが困難で、繊維表面においてのみ吸着される吸着種は、比表面積の大きい微細なセルロース吸着剤により多く吸着保持されると考えられる。

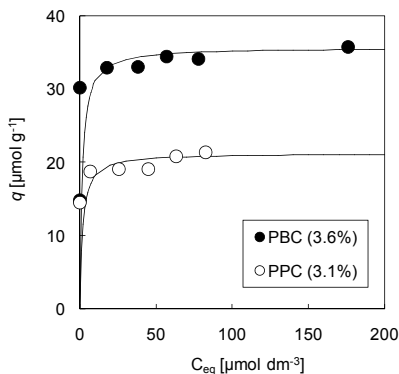


図2. PBCおよびPPCによるリゾチーム(分子量14,300)の吸着等温線

2. 研究の目的

上記の研究結果より、微細繊維構造を有する BC、MFC などのセルロースナノファイバー(CNF)からなる吸着剤は、ナノスケールの物質を高密度に吸着保持する材料としての可能性が期待される。本研究では高比表面積の CNF に各種官能基を導入した誘導体を調製し、タンパク質や DNA 等の生体高分子、および各種金属ナノ粒子など数 nm ~ 数十 nm 程度のサイズを有する化学種を高密度に吸着保

持させ、吸着保持を利用した分離濃縮や固定化酵素等に展開するための検討を行った。具体的には、以下の3つの小課題を中心に研究を実施した。

(i) IMAC(Immobilized Metal Affinity Chromatography)によるタンパク質の分離濃縮、固定化

イミノ二酢酸などのキレート基により Cu(II)、Ni(II)などの遷移金属を固定化させた吸着剤は、末端に数個のヒスチジン残基(His-Tag)が導入された遺伝子組み換えタンパク質の効率的な分離回収法として利用されている(図3)。アガロースゲルやセルロース等を担体とする IMAC ゲルが各社から市販されているが、CNF を吸着材の担体として用いれば、タンパク質の吸着容量が向上し、濃縮率を増大させることが期待できる。そこで、CNF の一例として BC にイミノ二酢酸基を導入した吸着剤を調製し、この吸着剤に Cu(II)等の遷移金属を固定化することにより IMAC のための吸着剤としての機能評価を行った。調製した吸着剤のタンパク質吸着特性を、PC を原料として調製した参照資料と比較することで、セルロース由来や繊維構造が吸着特性に及ぼす影響について検討した。

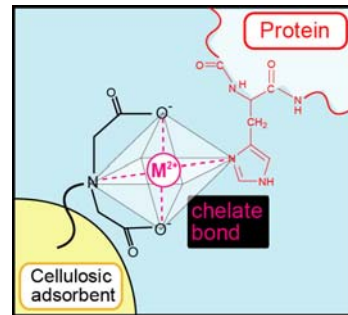


図3. IMAC の概念図

(ii) Fe(III)担持 CNF によるリン酸化タンパク質および DNA の吸着分離

リン酸化タンパク質は細胞内における様々なシグナル伝達や代謝の調節因子として機能することから、その分析における分離濃縮技術が重要となる。リン酸化タンパク質の有力な分離法としてリン酸との親和性の高い Fe(III)を担持した IMAC が利用されている。ここではリン酸基またはイミノ二酢酸基を導入したセルロース吸着剤に Fe(III)を吸着担持させ、Fe(III)との Metal Affinity に基づいたリン酸化タンパク質および DNA の吸着について検討した。

(iii) 4級アンモニウム化バクテリアセルロースの調製とタンパク質および DNA の吸着

アニオン性の化学種を吸着する強塩基性陰イオン交換体として4級アンモニウム化セルロース(QAセルロース)が知られる。タンパク質等を強力に捕捉できる QA セルロースは酵素等の各種タンパク質の精製や固定化酵素担体として利用されるため、その吸着容量を高めることができれば濃縮効率や固定化密度を高めることができる。BC に対して4級アンモニウム基を導入し、タンパク質、DNA、その他生体分子等の吸着特性を市販の QA セルロース等と比較して、微細繊維構造が吸着特性に及ぼす影響について検討した。

本研究で取り組んだ BC をはじめとした CNF の化学修飾体によるタンパク質等のナノス

ケールの吸着種への吸着特性に関する知見は、これまでに目立った報告例も見あらず CNF の利用範囲を広げるものと考えられる。なお、申請段階で計画していたナノ粒子吸着については検討に至っていない。

3. 研究の方法

(i) IMAC によるタンパク質の分離濃縮と固定化

IMAC では、吸着材に固定化する金属イオンとして第一遷移金属の Cu(II)、Ni(II)、Co(II)、Zn(II) が一般に用いられ、それらを吸着材に固定化するキレート基として多価カルボン酸系のイミノ二酢酸 (IDA)、トリス (カルボキシメチル)-エチレンジアミン (TED) などが用いられる。本研究では一部で TED を導入したセルロース吸着剤を合成したが、試薬の価格や導入率などを考慮して、IDA を導入した BC (IDA-BC) を中心に検討を行った。

IDA-BC の調製は図 4 のスキームに従って行った。ロットにより異なるが約 $100 \mu\text{mol g}^{-1}$ の Cu(II) 吸着容量を示す IDA-BC が調製された。同様のスキームで、植物セルロース由来の吸着剤 IDA-PC を調製した。調製した IDA-BC、IDA-PC について走査型電子顕微鏡 (SEM, KEYENCE VE-8800) で構造を観察するとともに、高精度ガス/蒸気吸着量測定装置 (日本ベル BELSORP-mini) による N_2 吸着量から比表面積を導出した。

調製した IDA-BC、IDA-PC を Cu(II) 水溶液とバッチ式で接触させることで Cu(II) を吸着

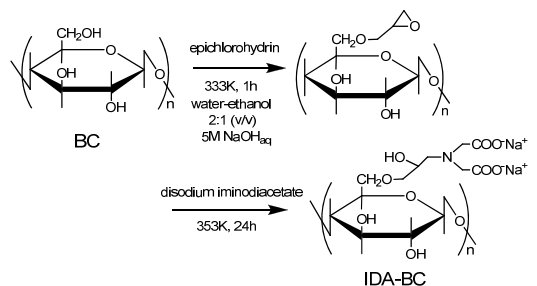


図4. イミノ二酢酸バクテリアセルロース (IDA-BC) の調製スキーム

させ、Cu(II) 担持 IDA-BC、IDA-PC (Cu-IDA-BC (図 5) および Cu-IDA-PC) を調製した。この際、Cu(II) の初濃度を変えることで Cu(II) 担持量の異なる Cu-IDA-BC、Cu-IDA-PC を調製している。

調製した吸着剤を用いて各種生体分子の吸着実験をバッチ法にて行った。所定量の吸着種を含む水溶液 15 cm^3 と吸着剤 20 mg をサンプル管で混合し、 30°C で 120 rpm 、 24 h 振とうさせた。振とう後ろ過し、紫外可視分光光度計、アミノ酸分析計などを用いて吸着種濃度を定量し、吸着前後の減少量から吸着剤への吸着率を算出した。

(ii) Fe(III) 担持 CNF によるリン酸化タンパク質および DNA の吸着分離

植物繊維 (パルプ) を解繊して得られる MFC を吸着剤の担体として用いた。IDA-BC と同様の調製法にて MFC にイミノ二酢酸基を導入した IDA-MFC を調製した。この IDA-MFC に Fe(III) を吸着担持させることで、Fe(III) 担持 IDA-MFC (Fe-IDA-MFC) を調製した。同様

の手順にて、IDA-BC、IDA-PC に Fe(III) を担持させた Fe-IDA-BC、Fe-IDA-PC を調製した。調製した各種吸着剤にてカゼイン、DNA、ホスホセリンなど、リン酸基を有する各種生体分子の吸着実験を行い、その吸着特性を比較した。

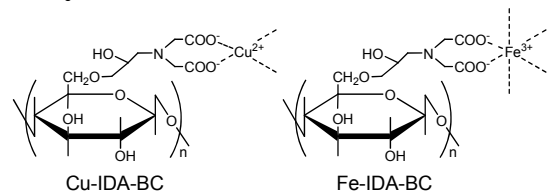


図5. Cu-IDA-BC および Fe-IDA-BC の構造

(iii) 4 級アンモニウム化バクテリアセルロースの調製とタンパク質および DNA の吸着

4 級アンモニウム化バクテリアセルロース (QABC) の調製は図 6 の 2 種類のスキームによって行った。初年度は、(3-chloro-2-hydroxypropyl)-trimethyl ammonium chloride を用いて官能基導入を行った (QABC1 とする) が、官能基導入量が低かったため、glycidyl trimethyl ammonium chloride を用いて QA 基を導入した (QABC2 とする) と、 0.6 mmol g^{-1} 程のイオン交換容量を有する QABC2 が得られた。同様の手順で植物セルロース由来の QA セルロース (QAPC) を調製した。

調製した吸着剤、および市販の QA セルロース (Wako 性、QACC とする) を用いて各種生体分子の吸着実験をバッチ法にて行った。所定量の吸着種を含む水溶液 15 cm^3 と吸着剤 20 mg をサンプル管で混合し、 30°C で 120 rpm 、 24 h 振とうさせた後ろ過し、紫外可視分光光度計などを用いて吸着種濃度を定量して吸着率を算出した。

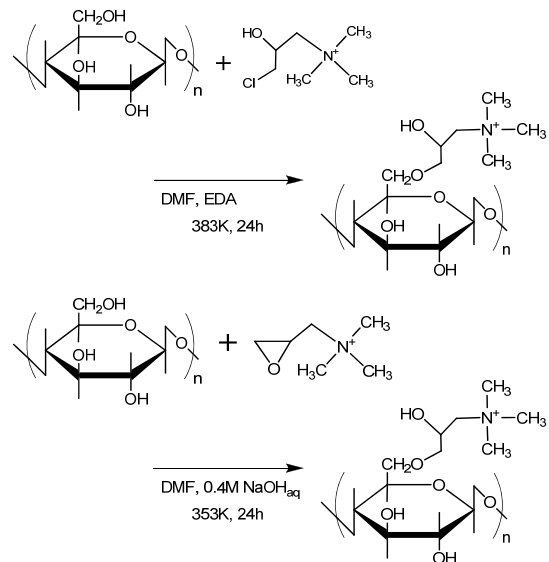


図6. 4 級アンモニウム化バクテリアセルロース (QABC) の調製スキーム (上) QABC1 (下) QABC2

4. 研究成果

(i) IMAC によるタンパク質の分離濃縮と固定化

図 7 に調製した IDA-BC の SEM 像を示す。

菌体由来の BC が本来有する微細繊維構造が IDA 基を導入したあともある程度保持されていることが確認できた。また、 N_2 吸着等温線を測定し BET 法により算出した比表面積は、PC が $1.0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 、BC が $27.3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 、IDA-PC が $1.4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 、IDA-BC が $24.0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ であった。すなわち、IDA-BC は BC と比較して少し減少しているものの比較的高い比表面積を有していることといえる。

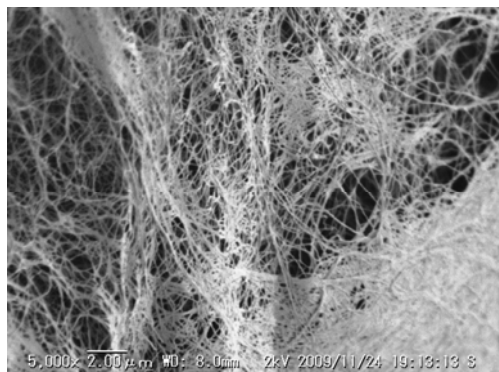


図7. IDA-BC の SEM 像(5,000 倍)

Cu(II) を吸着担持した Cu-IDA-BC は中性～弱塩基性条件下で His 残基への配位結合に基づいてタンパク質を吸着する。比較的 Cu(II) 担持量の近い Cu-IDA-BC ($63 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$)、Cu-IDA-PC ($73 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) によるヘモグロビンの吸着等温線を図 8 に示す。Cu-IDA-BC と Cu-IDA-PC では Cu(II) の担持量が比較的近いにもかかわらず、Cu-IDA-BC は Cu-IDA-PC の 1.5 倍程の吸着容量を示した。

タンパク質の吸着容量は Cu(II) の担持量に依存する。Cu(II) の担持量の異なる Cu-IDA-BC、Cu-IDA-PC を調製し、それぞれの吸着等温線から Langmuir 式に従って飽和吸着量を導出した。図 9 に Cu-IDA-BC および Cu-IDA-PC における Cu(II) 担持量とヘモグロビンの飽和吸着量との関係を示す。同程度の Cu(II) 担持量で比較すると Cu-IDA-BC は Cu-IDA-PC よりも大きい吸着容量を有していることが示された。

同様に、アミノ酸、ペプチド、タンパク質の飽和吸着量を比較した結果を表 1 に示す。Cu-IDA-BC は分子量の大きいタンパク質に対して相対的に大きな吸着容量を示しており、Cu-IDA-PC と比較してヘモグロビンでは 1.58 倍、ミオグロビンでは 4.61 倍、リゾチームでは 2.96 倍の吸着容量を示した。対照的に、分子量の小さいカルノシン、およびヒスチジンでは Cu-IDA-BC は特に大きな吸着容量を示さず、むしろ Cu(II) 担持量が少し低いために Cu-IDA-PC よりも吸着容量は小さくなった。

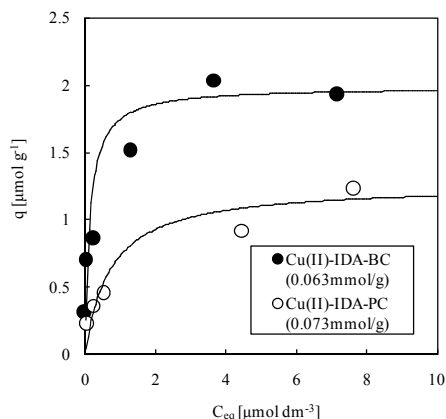


図8. Cu-IDA-BC および Cu-IDA-PC によるヘモグロビンの吸着等温線 (30°C): Adsorbent, 10 mg; Volume=15 cm^3 .

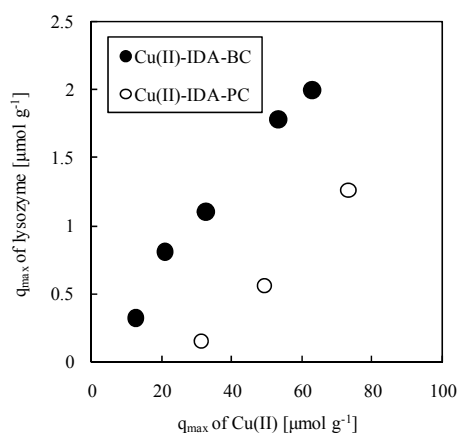


図9. Cu-IDA-BC および Cu-IDA-PC における Cu(II) 担持量とヘモグロビンの飽和吸着量との関係。

表 1. Cu-IDA-BC および Cu-IDA-PC による各種生体分子の吸着容量

吸着剤	Cu-ID		q_{max}	
	A-BC	A-PC		
Cu(II)担持量	63	73	q_{max}	
[$\mu\text{mol g}^{-1}$]			Cu-IDA-PC	
吸着種	分子量	q_{max} [$\mu\text{mol g}^{-1}$]		
ヘモグロビン	64,500	1.98	1.26	1.58
ミオグロビン	17,200	5.86	1.27	4.61
リゾチーム	14,300	8.87	2.99	2.96
カルノシン	226	71.8	77.1	0.931
ヒスチジン	155	33.9	49.9	0.679

(ii) Fe(III)担持 CNF によるリン酸化タンパク質および DNA の吸着分離

Fe-IDA-MFC および IDA-MFC による DNA 吸着の pH 依存性を図 10 に示す。DNA において Fe-IDA-MFC は低 pH 領域で IDA-MFC よりも高い吸着率を示した。従って、Fe-IDA-MFC による DNA の吸着は、Fe(III) と DNA のリン酸基との親和性に基づいた金属アフィニティ吸着によるものと考えられる。しかし DNA 飽和吸着実験を行った結果、Fe(III) 担持量あたりの Fe-IDA-MFC への DNA の吸着量は、Fe-IDA-BC、Fe-IDA-PC と比較して特に大きい

ものではなかった。

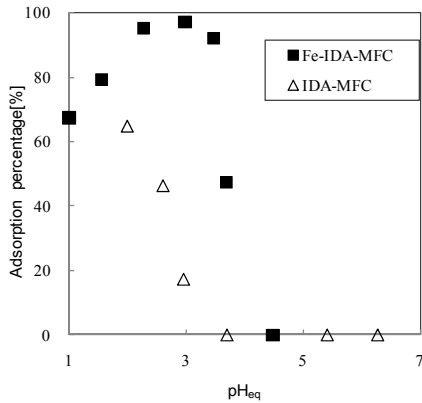


図10. Fe-IDA-MFCおよびIDA-MFCによるDNA吸着のpH依存性: Adsorbent, 100 mg, Volume=15 mL, $[DNA]_{ini}=0.05$ g/L.

(iii) 4級アンモニウム化バクテリアセルロースの調製とタンパク質およびDNAの吸着
 図11に調製したQABC1、QAPC1のSEM像を示す。QAPC1の外観とは異なり、QABC1が微細繊維構造を保持していることが確認できた。比表面積は、QABC1が $15.5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 、QABC2が $11.5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 、QAPC1が $1.8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 、QAPC2が $1.9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ となり、QA基の導入後もQABCは比較的高い比表面積を示した。

QABC2、QAPC2、QACC、BC、PCによるDNAの吸着等温線を図12に示す。QABC2は検討した吸着剤の中でDNAに対する最も大きい吸着容量を示した。図13には各種吸着剤によるATPの吸着等温線を示す。DNAの

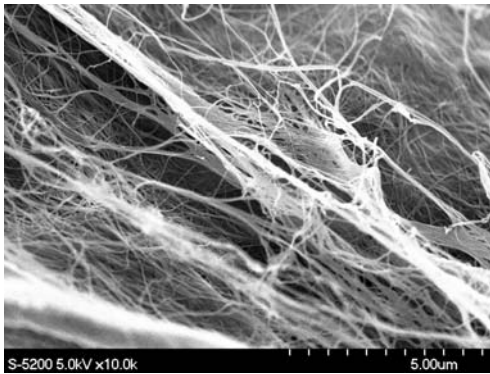


図11. QABC1およびQAPC1のSEM像 (10,000倍)

結果とは対照的に、ATPの吸着ではQABC2は特に大きな吸着容量を示さず、イオン交換容量の最も大きいQACCが最も吸着容量が大きかった。各吸着剤による種々のアニオン性吸着種について吸着等温線を求め、そこからLangmuir式に従って導出した飽和吸着量を表2に示す。QABC2は分子量の大きいDNAおよびヘモグロビンについて最も大きい吸着容量を示した。これに対して、分子量の小さいATP、メチルオレンジについてはイオン交換容量が最も大きいQACCが最も大きい吸着容量を示した。これらの結果より、BCの繊維構造は分子量の大きい化学種の吸着保持により適していると考えられる。

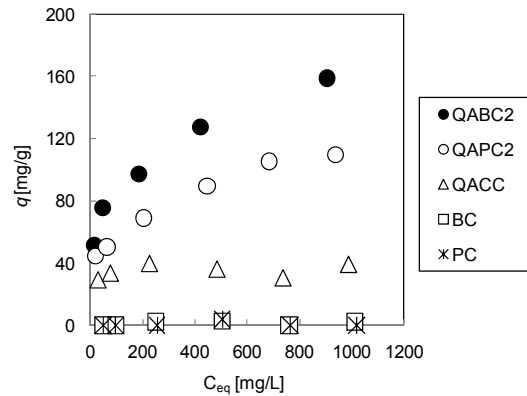


図12. 各種吸着剤によるDNAの吸着等温線 (30°C): pH_{ini} 10.0, Adsorbent, 10 mg, Volume=15 mL, $[DNA]_{ini} = 0.05-1.0$ g/L.

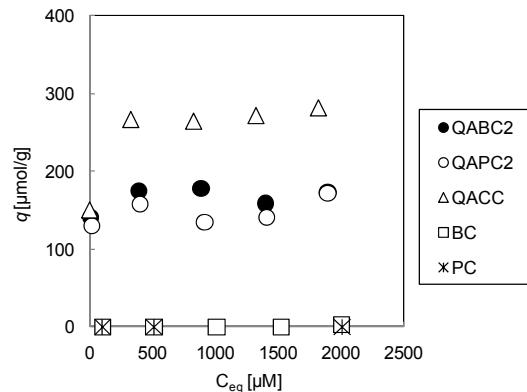


図13. 各種吸着剤によるATPの吸着等温線 (30°C): pH_{ini} 10.0, Adsorbent, 10 mg, Volume=15 mL, $[ATP]_{ini}=0.1-2.0$ mM.

表2. QABC、QAPC、およびQACCによる各種吸着種の吸着容量

吸着剤	QABC	QAPC	QACC	
イオン交換容量 [$\mu\text{mol g}^{-1}$]	610	850	1100	
吸着種	分子量	q_{max} [$\mu\text{mol g}^{-1}$]		
DNA	$\sim 1.0 \times 10^6$	<u>0.167</u>	0.124	0.039
ヘモグロビン	6.4×10^4	<u>18.2</u>	14.4	7.55
ATP	347	169	164	<u>278</u>
メチル オレンジ	327	714	667	<u>1110</u>

以上の研究結果より、微細繊維構造からなる BC を吸着担体とする吸着剤は、比較的分子量の大きい生体高分子に対する吸着容量が大きくなることが示された。分子サイズの大きな吸着種は吸着剤内部の吸着サイトへの accessibility に乏しい。このため比表面積が大きい吸着剤は、こうした粒子サイズの大きい生体高分子やナノ粒子の吸着保持に適していると考えられる。

これらの研究結果は、CNF の化学修飾体がナノスケールの化学種の高容量吸着保持に適した吸着剤になりうることを示しており、CNF の化学修飾体の吸着材料としての可能性を示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

T. Niide, H. Shiraki, T. Oshima, Y. Baba, N. Kamiya, M. Goto, Quaternary ammonium bacterial cellulose for adsorption of proteins, *Solv. Extr. Res. Dev. Jpn.*, 17, 73 - 81, 2010

T. Sakamoto, T. Oshima, S. Taguchi, K. Ohe, Y. Baba, Preparation of iminodiacetic acid bacterial cellulose for immobilized metal affinity chromatography, *J. Ion Exchange*, 21, 141 - 146, 2010

T. Oshima, S. Taguchi, K. Ohe, Y. Baba, Phosphorylated bacterial cellulose for adsorption of proteins, *Carbohydr. Polym.*, 83, 953 - 958, 2011

〔学会発表〕(計 6 件)

T. Oshima, K. Ohe, Y. Baba, Adsorptive recovery of physiologically important peptides from fish resources based on metal-affinity interaction, XIX International Chemistry Seminar Palm Oil and Sustainable Chemistry, 2009/5/20

坂本 俊彦、大島 達也、大柴 薫、馬場 由成、銅(II)担持セルロース系キレート吸着剤におけるカルノシン類吸着特性の評価、化学工学会 第 41 回秋季大会、2009/8/16-18

T. Oshima, T. Sakamoto, H. Tachiyama, K. Kanemaru, K. Ohe, Y. Baba, Dominant factors for adsorptive recovery of carnosine based on immobilized metal affinity adsorption, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC APBioChEC '09), 2009/11/25-28

T. Sakamoto, T. Oshima, S. Taguchi, K. Ohe, Y. Baba, Preparation of iminodiacetic acid bacterial cellulose for immobilized metal affinity chromatography, The 5th International Conference on Ion Exchange (ICIE '10), 2010/07/18-21

坂本 俊彦、大島 達也、大柴 薫、馬場 由成、銅(II)担持バクテリアセルロースを用いたタンパク質吸着特性の評価、化学工学会第 42 回秋季大会、2010/09/6-8

坂本俊彦、田口幸子、大島達也、大柴 薫、馬場由成、固定化金属アフィニティ吸着に適したバクテリアセルロース系吸着剤の開発、2010 年 日本化学会 西日本大会、2010/11/6-7

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 達也 (OSHIMA TATSUYA)
宮崎大学・工学部・准教授
研究者番号：00343335

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：