

機関番号：32692

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760710

研究課題名 (和文) 籠状タンパク質を用いた新規硝酸イオン還元触媒の開発

研究課題名 (英文) Fabrication of a novel catalyst for nitrate ion reduction using the protein cage of apoferritin

研究代表者

鈴木 義規 (SUZUKI YOSHINORI)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：20455281

研究成果の概要 (和文)：籠状の分子構造を有するタンパク質，アポフェリチン(apoFr)の内部に CuPd 粒子を含有する新規硝酸イオン還元触媒を作製した。作製した触媒を透過型電子顕微鏡(TEM)，粉末 X 線回折(XRD)，広域 X 線吸収微細構造(EXAFS)分光法などにより分析した結果，apoFr 内部に CuPd 合金ナノ粒子が形成されていることが確認できた。本触媒を用いた硝酸イオンの還元実験から，本触媒が硝酸イオン還元の触媒活性を有していることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：A novel catalyst for nitrate ion reduction was developed by synthesizing CuPd particles in the protein cage of apoferritin. The apoferritin containing CuPd particles (CuPd-apoFr) was analyzed using TEM, XRD, and EXAFS and it was revealed that CuPd alloy nanoparticles were formed inside of the apoferritin. CuPd-apoFr showed catalytic activity for nitrate ion reduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力学

キーワード：CuPd 合金，アポフェリチン，ナノ粒子，触媒，EXAFS，硝酸還元

1. 研究開始当初の背景

放射性廃液の処理・処分の実施において，廃液中に含まれる硝酸イオンが処分時の性能に影響を及ぼすことが懸念されている。そこで，廃液中の硝酸イオンを除去する技術の開発が望まれている。現在，生物処理法や吸着処理法による硝酸イオンの除去技術があるが，生物処理法は，処理速度が遅く，微生物の活性を保つための細かな制御が必要であり，吸着処理法は，さらに高濃度な硝酸イオンの

二次処理が必要となる。近年，活性炭などに CuPd 合金を担持した固体触媒を用いて，硝酸イオンを N_2 へと還元し除去する固体触媒法が注目されている。固体触媒法は，上記の二つの硝酸イオンの除去技術に比べて，簡便であることから最も有効な処理方法であると考えられている。しかしながら，この手法では触媒反応が固液界面に限られるため，実用化のためには，さらなる触媒効率の向上が望まれる。

触媒効率の向上には、触媒の微小化による固液界面の増加及び触媒を溶液中に高濃度に分散させることが求められる。そこで、CuPd ナノ粒子を触媒として用いる手法が考えられる。しかし、これまでに報告されている CuPd ナノ粒子は、安定化剤でナノ粒子表面をコーティングしなければ、溶液中に安定に分散することができず、この安定化剤が触媒反応を妨げることが懸念される。これらの問題点を解決するため、外径約 12 nm、内径約 8 nm の籠状分子構造を有する可溶性タンパク質アポフェリチンに注目した。これまでに、アポフェリチン内部に、Pd, Co, Cu などのナノ粒子の合成が報告されている。しかしながら、合金ナノ粒子の合成例はない。本研究では、可溶性であるアポフェリチン内部で CuPd 合金を合成することで、固体触媒の微粒子化と溶液への高濃度分散を同時に成し得、触媒反応効率を飛躍的に向上させる手法を提案する。

2. 研究の目的

本研究では、籠状分子構造の可溶性タンパク質であるアポフェリチン内に CuPd ナノ粒子を導入した新規硝酸イオン還元触媒を作製し、その構造および触媒活性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)CuPd 内包アポフェリチン (CuPd-apoFr) の作製

10 mM Tris-HCl(pH 8.5)溶液に、apoFr, K_2PdCl_4 , および $CuCl_2$ を最終濃度がそれぞれ 0.4 mg/mL, 0.2 mM, および 0.2 mM となるように順に加えた。30 分間攪拌し、十分な量の $NaBH_4$ を加え、Pd(II)および Cu(II) を還元させ、CuPd-apoFr を作製した。0.45 μm フィルターで apoFr の外にできた粒子を除去し、サンプルとした。サンプルの紫外可視吸収スペクトルを測定し、ナノ粒子の形成を確認した。

(2)サイズ排除カラム(SEC)-HPLC-ICP-MS による CuPd-apoFr の分析

カラムには Sephadex G200 を用い、溶離液には 10 mM Tris-HCl (pH 8.1)を用いた。流量は、1.0 mL/min とした。apoFr の検出には波長 280 nm の吸光度を測定し、Cu および Pd の検出には ICP-MS で質量数 63 および 105 の強度をそれぞれ測定した。

(3)透過型電子顕微鏡(TEM)による CuPd-apoFr の観察

CuPd-apoFr 溶液を分子量 10 万の限外濾過フィルターを用いて脱塩し、TEM による

観察を行った。また、エネルギー分散法 (EDS) による元素分析を行った。

(4)粉末 X 線回折(XRD)による CuPd-apoFr の分析

分子量 10 万の限外濾過フィルターを用いて CuPd-apoFr 溶液を濃縮・減溶した後、 N_2 ガス雰囲気中で水分を蒸発させた。残った固相をメノウ乳鉢で粉末状にし、XRD 測定を行った。

(5)広域 X 線吸収微細構造(EXAFS)分光による CuPd-apoFr の分析

SPring-8 の BL01B1 にて Cu および Pd の K 吸収端の EXAFS スペクトルの測定をした。CuPd-apoFr は 19 素子 Ge 検出器を用いた蛍光法で測定し、比較のための標準試料は透過法で測定した。EXAFS スペクトルの解析には解析ソフト REX2000 を用いた。

(6)CuPd-apoFr を触媒とした硝酸イオン還元実験

得られた CuPd-apoFr 溶液 4 mL に、1 g NO_3/L となるように硝酸カリウムを加えた。これを容量 22 mL のバイアル瓶に入れ、プチル栓とアルミキャップで密栓し、内部の気相を $H_2 : N_2 = 4 : 1$ の混合ガスで置換した。このバイアル瓶を 60°C, 100 rpm の条件で振とうした。24 時間後にサンプリングし、硝酸イオン濃度をブルシン・スルファニル酸法により定量した。

4. 研究成果

(1) CuPd-apoFr の作製

研究の方法で記載した方法に従って CuPd-apoFr を作製したところ、 $NaBH_4$ を加えるとすぐに溶液が黒くなった。紫外可視吸収スペクトルを測定した結果、紫外可視領域にわたりブロードな吸収が観測された。これは $NaBH_4$ により溶液中の Cu(II) および Pd(II) がそれぞれ Cu(0) および

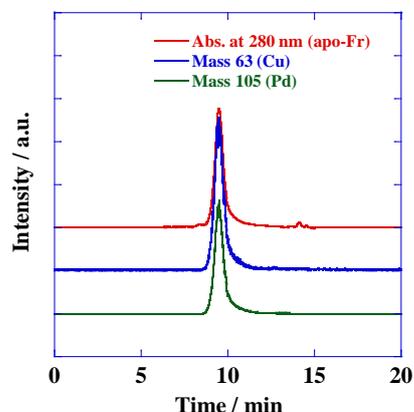


図 1. SEC-HPLC-ICP-MS による CuPd-apoFr の分析結果。

Pd(0)まで還元され、ナノ粒子が形成されたことにより、そのプラズモン吸収が観測されたためであると考えられる。

(2) SEC-HPLC-ICP-MS による分析

SEC-HPLC-ICP-MS による CuPd-apoFr の分析結果を図 1 に示す。apoFr, Cu, および Pd の保持時間はすべて 9.5 分程度であり、Cu および Pd がなんらかの形で apoFr と共存していることが示された。

(3) TEM による観察

TEM による観察で得られた画像を図 2 に示す。1-3 nm 程度の粒子が観察され、これらの粒子の EDS 分析を行ったところ、Cu および Pd が検出され、CuPd ナノ粒子ができていたことがわかった。SEC-HPLC-ICP-MS の分析結果と合わせて考えると、このナノ粒子は apoFr 内部にできていると考えられる。

(4) XRD による分析

得られた CuPd-apoFr の回折パターンを図 3 に示す。回折角がおおよそ 41.5° のところにブロードなピークが観測された。ピークの中心は、Pd(0) または Cu(0) の主要な回折ピークである 40.1° または 43.3° とはことなり、1:1 の CuPd 合金の回折ピークである 41.5° に一致していた。このことから、apoFr 内にできた粒子は CuPd 合金であることが示唆された。ブロードなピークは結晶子が小さいことを示しており、Scherrer の式を用いて粒径を求めたところ、1.5 nm 程度であった。この値は、TEM による観察で得られた粒子直径とよく一致していた。

(5) EXAFS 分光による分析

CuPd-apoFr と標準試料の Cu K 吸収端の EXAFS スペクトルおよびそのフーリエ変換スペクトルを図 4 に示す。CuPd-apoFr の各スペクトルは標準物質のそれとは異なっていた。解析の結果、Cu 原子を中心として、 2.46 \AA の Cu-Cu 結合が 2.2 個あり、 2.49 \AA の Cu-Pd 結合が 1.9 個あることがわかった。Cu foil に比べて結合の数が少なかったが、数ナノメートルサイズの微粒子では、表面

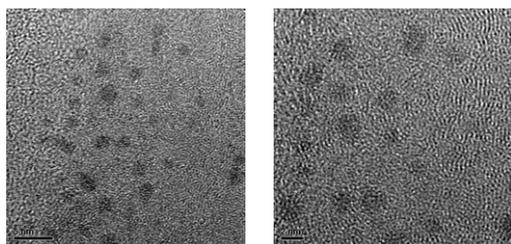


図 2. CuPd-apoFr の TEM 画像。

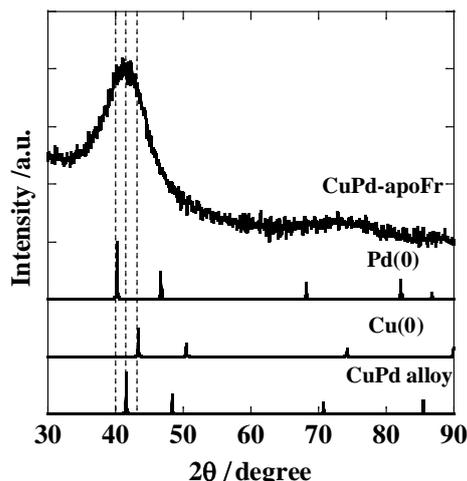


図 3. CuPd-apoFr の XRD 回折パターン。

効果により結合数が少なくなることが報告されている。したがって、apoFr 内の CuPd 粒子がナノ粒子であることを支持する結果である。同様に Pd K 吸収端の EXAFS スペクトルおよびそのフーリエ変換スペクトルを図 5 に示す。解析の結果、Pd を中心として、 2.70 \AA の Pd-Pd 結合が 2.1 個あり、 2.55 \AA の Cu-Cu 結合が 2.9 個あることがわかった。Pd K 吸収端でも結合数が少なく、ナノ粒子の形成を支持する結果であった。Cu および Pd の EXAFS 分析では、ともに Cu-Pd の結合を考慮することでよいフィッティングが得られたことから、CuPd-apoFr 内部の粒子は CuPd 合金であることが示された。

(6) CuPd-apoFr を触媒とした硝酸イオン還元実験

水素を還元剤として、CuPd-apoFr 共存下で硝酸イオンを還元したところ、24 時間で 20% の硝酸イオンが還元され、CuPd-apoFr が硝酸イオン還元触媒活性を有していることが示された。CuPd 触媒では、Cu-Pd 結合サイトが硝酸イオンの還元活性を示すことが分かっている。したがって、この結果は、本触媒が CuPd 合金ナノ粒子を含有していることを裏付けるものである。今後、apoFr 一

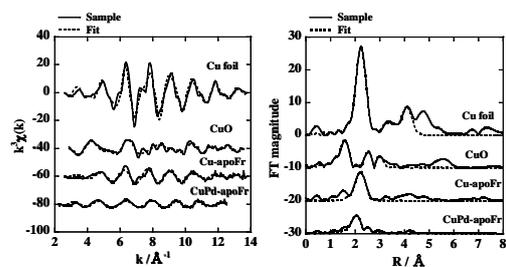


図 4. Cu K 吸収端の EXAFS スペクトルおよびそのフーリエ変換スペクトル

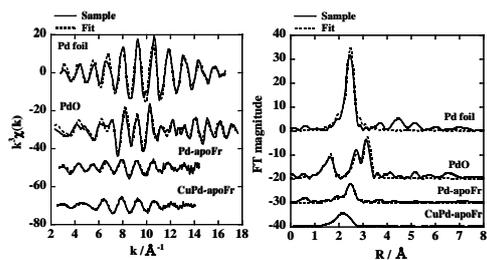


図 5. Pd K 吸収端の EXAFS スペクトル
およびそのフーリエ変換スペクトル

分子あたりの CuPd 含有量などを増加させることにより、さらに触媒性能を上げることが可能であると考えられる。

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 5 件)

- ① Y. Suzuki, Y. Kitatsuji, T. Ohnuki, S. Tsujimura, Flavin mononucleotide mediated electron pathway for microbial U(VI) reduction, Phys. Chem. Chem. Phys., (査読有), Vol.12, No.34, 2010, pp.10081-10087.
- ② Y. Suzuki, T. Nankawa, A. J. Francis, T. Ohnuki, Redox behavior of Ce(IV)/Ce(III) in the presence of nitrotri-acetic acid: A surrogate study for An(IV)/An(III) redox behavior, Radiochim. Acta, (査読有), Vol.98, No.7, 2010, pp.397-402.
- ③ Y. Suzuki, K. Tanaka, N. Kozai, T. Ohnuki, Effect of citrate, NTA, and EDTA on the reduction of U(VI) by *Shewanella putrefaciens*, Geomicrobiol. J., (査読有), Vol.27, 2010, pp.245-250.
- ④ T. Nankawa, Y. Suzuki, T. Ohnuki, In situ observation of reductive deposition of uranium on an electrode/electrolyte interface by optical waveguide spectroscopy, Chem. Lett., (査読有), Vol.38, 2009, pp.1090-1091.
- ⑤ K. Tanaka, Y. Suzuki, T. Ohnuki, Sorption and oxidation of tetravalent plutonium on Mn oxide in the presence of citric acid, Chem. Lett., (査読有), Vol.38, 2009, pp.1032-1033.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 鈴木義規, 田中和也, 古川雅志, 上石瑛伍, 宇都宮聡, 大貫敏彦, 球殻状タンパ

ク質内における CuPd 合金ナノ粒子の作製と構造解析, 第 62 回日本生物工学会大会, ワールドコンベンションセンターサミット, フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県), 2010 年 10 月 29 日.

- ② 鈴木義規, 田中和也, 大貫敏彦, Mingyu Jiang, 古川雅志, 宇都宮聡, 鉄還元菌による Se(IV)の還元, 日本原子力学会「2010 年秋の大会」, 北海道大学 (北海道), 2010 年 9 月 17 日.
- ③ Y. Suzuki, K. Tanaka, T. Ohnuki, Effect of iron on reduction of Se(IV) by *Shewanella putrefaciens*, Goldschmidt 2010, Knoxville, Tennessee, June 15, 2010.
- ④ M. Jiang, T. Ohnuki, K. Tanaka, Y. Suzuki, E. Kamiishi, S. Utsunomiya, Biomineralization of REE phosphate minerals by *Saccharomyces cerevisiae*, Migration 09, Kennewick, USA, September 21, 2009.
- ⑤ T. Ohnuki, Y. Suzuki, T. Nankawa, Effects of organic acids on microbial reduction of U(VI), The 238th ACS National Meeting, NUCL77, Washington, DC, August 17, 2009.
- ⑥ Y. Suzuki, T. Ohnuki, Flavin mononucleotide mediated reduction of U(VI), Goldschmidt 2009, Davos, Switzerland, June 24, 2009.
- ⑦ T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Nankawa, Y. Suzuki, A.J. Francis, Effect of organic acids on interaction of actinides with microorganisms, Goldschmidt 2009, Davos, Switzerland, June 22, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 義規 (SUZUKI YOSHINORI)
東京工科大学・応用生物学部・助教
研究者番号: 20455281

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し