

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18956

研究課題名(和文) 金属錯体-脂質界面におけるセシウム吸着機構の解明と高機能化

研究課題名(英文) Elucidation of the Cesium Adsorption Mechanism on the Metal Complex-Lipid Interface, and improvement of the function

研究代表者

大場 正昭 (Ohba, Masaai)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：00284480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：プルシアンブルー(PB)は高いセシウム吸着能を示す配位高分子であるが、PB ナノ粒子(NPs)は水中で容易に凝集するため、吸着能が低下してしまう。本課題では、PB-NPsの凝集を抑制し吸着能を向上させるため、PB-NPsとリポソームを複合化し、放射性 $^{137}\text{Cs}^+$ 吸着能を評価した。独自に開発したイオンチャンネルを通して、リポソーム内水相でPB-NPsを直接合成する手法により、PB-リポソーム複合体を作成した。その際に、 $\text{Fe}^{2+}$ が内水相に流入する速度の調整により、PB-NPsの凝集を抑制し、かつサイズを制御することで、高い $\text{Cs}^+$ 吸着能の発現に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の成果は、生体親和性材料の開発につながる重要な知見を与えるものである。イオンチャンネルを利用したリポソーム内水相における金属錯体ナノ粒子の直接合成法は、独創的かつ汎用性の高い手法である。内包する金属錯体およびリン脂質のヘッドユニットの組み合わせに加えて、ナノ粒子のサイズ、成長方向などを制御することができるため、それらの要素を最適化することで、多様な物質を対象にした選択的かつ高性能な生体親和性吸着材料の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Prussian Blue (PB) is one of important coordination polymers as a cesium ion adsorbent. Control of particle size and prevention of aggregation among PB nanoparticles (NPs) are important factors for improving their adsorption capability in water. We demonstrate here the potential of a liposome incorporating an antibiotic ion channel as a vessel for synthesizing PB-NPs. In the formation of PB-NPs within liposomes, the influx rate of  $\text{Fe}^{2+}$  ions into liposome containing encapsulated  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  through channels was fundamental for the control of NPs size. The optimized PB-NPs-liposome composite showed higher adsorption capacity of  $\text{Cs}^+$  ion and radioactive  $^{137}\text{Cs}^+$  ion than those of commercially-available PB (aggregated PB NPs).

研究分野：錯体化学

キーワード：セシウム吸着 リポソーム プルシアンブルー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射性物質の一種である  $^{137}\text{Cs}$  は、高エネルギーの  $\gamma$  線および  $\beta$  線を放出し、半減期が約 30 年と長い。また、放射性  $^{137}\text{Cs}$  は水溶性である  $^{137}\text{Cs}^+$  の形で地下水や海水を介して急速に環境へと拡散する。この汚染された水には  $\text{Na}^+$  や  $\text{K}^+$  などの様々なイオンが含まれているため、 $\text{Cs}^+$  を選択的に除去できる吸着剤の開発が望まれている。本課題では、セシウム吸着材の 1 つであるプルシアンブルー (PB;  $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) に着目した。PB は安価で水溶液中での合成が容易な化合物であり、酸性条件下でも比較的安定に存在できる。PB は欠損のある多孔性の面心立方格子構造を有しており、 $\text{Cs}^+$  に対して選択的に高い吸着能を示し、特に粒子が小さいほど高い吸着能を示す。これまでに、吸着能の向上を目指したナノ粒子化が研究されているが、PB はナノ粒子のままでは水溶液中で容易に凝集して沈殿し、吸着能が低下してしまう。そこで、本課題では、PB ナノ粒子を吸着能を低下させずに水中で分散させるために、脂質二重層の小胞体であるリポソームと複合化して、セシウム吸着能の向上を目指した。当研究グループでは、これまでに生体内でエネルギー移動、電子移動、触媒反応等の複数の反応を効率良く進行させる場として働く「脂質二重層膜」に着目して、細胞における生体膜に代えて、リポソームの表面および内部に目的に応じた機能性金属錯体を合理的に集積させた「階層的金属錯体メゾ空間」構築の研究を展開してきた。その中で、異なる機能性金属錯体をリポソームの界面反応場（外表面、疎水性の膜内部、内表面および内水相）に選択的に組み込む手法を開発した。従来、膜と無機物質や金属錯体との複合体では、殆どが親水性の界面のみを利用しており、膜の疎水領域を利用した例は少なく、リポソームの各部位に選択的に金属錯体を組込んだ例はなかった。本課題では、これまでに開発した「イオンチャネルを利用したリポソーム内水相における金属錯体ナノ粒子の直接合成法」を利用して、PB ナノ粒子とリポソームの複合化を行った（図 1）。

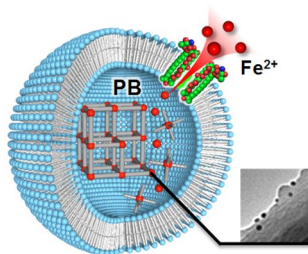


図 1 イオンチャネルを利用したリポソーム内水相における PB ナノ粒子の直接合成

### 2. 研究の目的

本課題では、金属錯体 - 脂質複合体の界面を利用した新たなイオン吸着材料の開発を目指した。我々がこれまでに開発した「イオンチャネルを利用したリポソーム内水相における金属錯体ナノ粒子の直接合成法」により、水への高分散性および生体適合性を有する PB - 脂質複合体を合成する。これまでの研究で、金属錯体 - 脂質界面において特異なイオン吸着が起きて、吸着能が向上する知見を得ており、本課題ではこの研究を深化させ、セシウムイオンを対象として、(1) 脂質二分子膜と金属錯体 PB ナノ粒子複合体の合成、(2)  $\text{Cs}^+$  および  $^{137}\text{Cs}^+$  吸着能の評価と高い吸着能の実現に向けた系の最適化、を実施した。

### 3. 研究の方法

これまでに、脂質膜に膜透過性チャネルを形成する抗生物質 Amphotericin B (AmB) に着目して、内水相で PB を直接合成する新規手法を開発した（図 2）。本課題では、手法と条件を改良して、PB 内包リポソーム (PB@Lipo) の合成を進めた。先ず、リン脂質 POPC に ergosterol を加えて、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  内包リポソーム ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ @Lipo) を単純水和法により合成した。続いて、室温でこの水溶液に  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  水溶液およびイオンチャネル形成物質である AmB を順に添加し、 $\text{Fe}^{2+}$  をリポソーム内へ流入させて PB 内包リポソーム (PB@Lipo) を合成した。合成段階において、 $\text{Fe}^{2+}$  イオンの流入速度を制御することで、PB ナノ粒子のサイズ制御および  $\text{Cs}^+$  吸着能の向上を検討した。

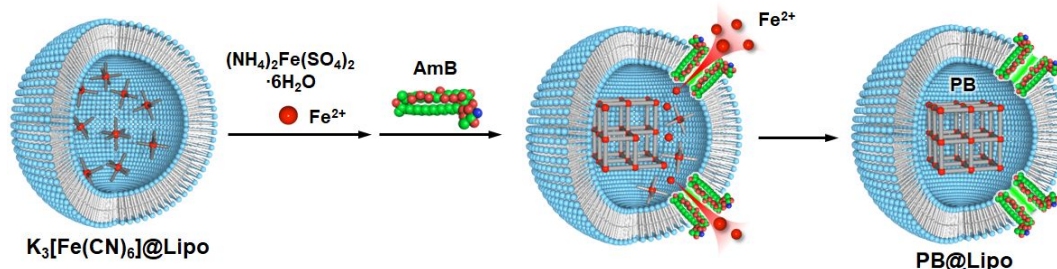


図 2 PB 内包リポソーム (PB@Lipo) の合成スキーム

#### 4. 研究成果

(1) PB@Lipo の合成は、IR スペクトルにおける AmB 添加後の  $\nu_{C=N}$  の低波数シフト、UV-vis スペクトルにおける PB 由来の吸収の出現、金属定量、粉末 X 線回折 (PXRD) パターンおよび TEM 観察より確認した。PXRD では、PB@Lipo のブロードな回折パターンの中に、市販の PB と同じ位置に (200)、(220)、(400) および (420) のピークが観測され、PB の形成が確認された。TEM 観察から、リポソーム内部において PB ナノ粒子の形成が確認された (図 3)。動的光散乱法 (DLS) により、内水相で生成した PB の粒子径は  $5.1 \pm 1.3$  nm と見積もられた。市販の PB と比較すると、明らかに PB 粒子の凝集は起きておらず、加えて、 $K_3[Fe(CN)_6]$ @Lipo と PB@Lipo のサイズが約 100 nm で殆ど変化していなかったことから、PB 形成によるリポソームの凝集も起きていないことを確認した

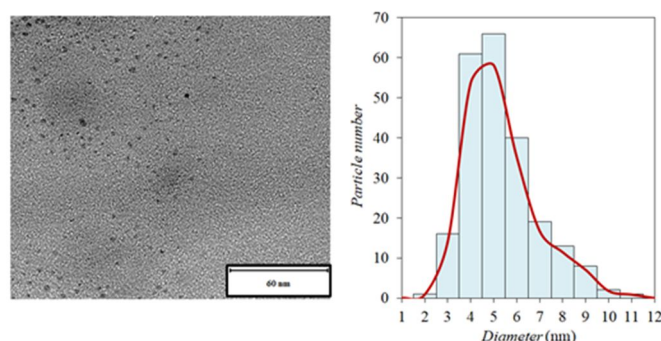


図 3 PB@Lipo の TEM 画像 (左) と粒子径分布のヒストグラム (右)

(2) PB@Lipo 水懸濁液に  $Cs^+$  を添加し、イオンチャネルを介して  $Cs^+$  を流入させた後に遠心分離を行い、上澄みの  $Cs^+$  の濃度変化を ICP-MS で追跡することで、 $Cs^+$  吸着能を評価した。また、放射性  $^{137}Cs^+$  を用いた吸着能の評価は、同様に上澄みの  $Cs^+$  に対して、放射線量の変化を測定した (図 4)

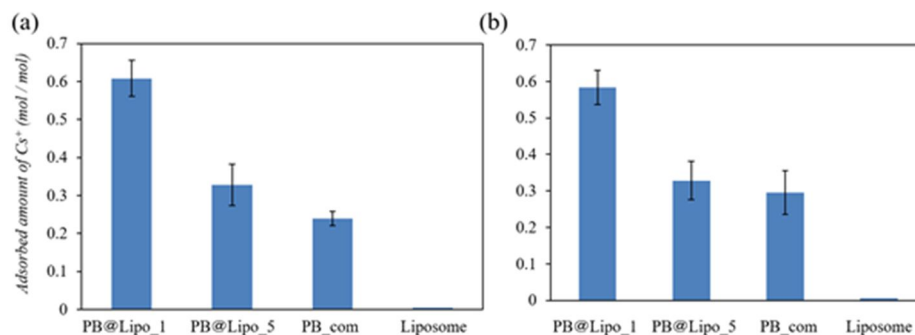


図 4 PB@Lipo、PB\_com およびリポソームの  $Cs^+$  吸着能 (a) ICP-MS による評価、(b)  $^{137}Cs^+$  を用いた放射線量による評価

図 4 (a) には、ICP-MS による結果を示す。対照として、市販の PB (PB\_com) と Liposome のみを用いて同様の実験を行った。その結果、Liposome のみでは  $Cs^+$  は殆ど吸着されないが、PB を内包すると、PB\_com を上回る吸着能が確認された。(PB@Lipo\_1 と PB@Lipo\_5 の違いについては、後述する) 図 4 (b) には、放射性  $^{137}Cs^+$  を用いて、放射線量から換算した  $^{137}Cs^+$  の濃度変化から吸着能を算出した結果を示す。この場合も、(a) と同様の結果を示し、リポソームとの複合化による吸着能の向上が確認された。これらは、別バッチのサンプルを用いて 2 種類の測定を複数回行って得られた結果であり、PB@Lipo の高い  $Cs^+$  吸着能を裏付けるものである。

吸着能向上のために、PB ナノ粒子のサイズ制御を検討した。まずは、AmB の添加量による  $Fe^{2+}$  イオンの内水相への流入速度の変化を以下の手順で評価した。 $Fe^{2+}$  イオンとキレート錯体を形成して可視部に呈色する Ferrozine (Fz) を導入した Fz@Lipo を  $K_3[Fe(CN)_6]$ @Lipo と同様の手順で合成した。カラムで処理した Fz@Lipo の水溶液に AmB を加えた。この時、加える AmB の濃度を  $1 \mu M$  と  $5 \mu M$  に変えて、 $0.8$  mM の  $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  水溶液を加えて、 $561$  nm の吸収強度により、 $Fe^{2+}$  流入による掲示変化を観測した (図 5)

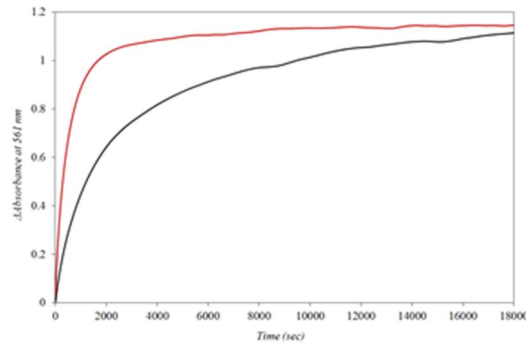


図5 Fz@Lipo の 561 nm の吸収強度の時間変化 ([AmB] = 1 μM (黒), 5 μM (赤))

図5に示すように、AmBの濃度を上げるとリポソーム上のチャネル数が増えるため、 $\text{Fe}^{2+}$ イオンの流入速度も上昇した。この経時変化を解析すると、速い過程  $A_1$  と遅い過程  $A_2$  があり、1 μM では  $A_1 = 1.00 \times 10^{-3}/\text{s}$  と  $A_2 = 0.15 \times 10^{-3}/\text{s}$ 、5 μM では  $A_1 = 2.50 \times 10^{-3}/\text{s}$  と  $A_2 = 0.42 \times 10^{-3}/\text{s}$  の値が得られ、5 μMの方が流入速度が速く、反応初期過程ではリポソーム内部では加えた AmB の濃度差以上の違いが生じていた。

この結果を踏まえて、同様の条件で PB@Lipo を作成した。AmB の濃度の違いにより、PB@Lipo\_1 と PB@Lipo\_5 と表記する。これらのサンプルの TEM 観測を行うと、PB の粒子径が PB@Lipo\_1 では  $5.1 \pm 1.3 \text{ nm}$  であったものが、PB@Lipo\_5 では、 $7.5 \pm 1.6 \text{ nm}$  と大きくなった。ヒストグラムでも 10 nm を超す粒子の数が増えており、流入速度を速くすることで、PB 粒子が凝集したことが示唆された。 $\text{Cs}^+$  吸着能を比較しても、PB@Lipo\_1 の方が PB@Lipo\_5 と比べて約 2 倍高かった。吸着能の向上に、PB とリポソームの複合化に加えて、粒子サイズを制御することが重要であった。AmB の濃度をより低くした実験や加える  $\text{Fe}^{2+}$  の濃度を変える実験も行ったが、これ以上の吸着能は出なかったため、ここでは割愛する。この吸着能の上昇には、リポソーム表面と粒子との界面が関係していることが示唆される。リン脂質のヘッドユニットを変えた同様の実験も行っており、ヘッドユニットに依存して吸着能が変化し、上記の PB@Lipo\_1 を超える吸着能も観測された。今後詳細な条件を詰めて、内包する金属錯体およびリン脂質のヘッドユニットを含めた系の最適化を行うことで、 $\text{Cs}^+$  に限らず、多様なイオンを対象にして、生体親和性があり、選択的かつ高性能な吸着材料の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Michiko Maeda, Tomomi Koshiyama, Masaaki Ohba
2. 発表標題 Formation of Calcium Phosphate in the Inner Aqueous Phase of Liposome Incorporated with Ion Channels
3. 学会等名 43th International Conference on Coordination Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田迪子、井上雄希、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 リポソーム内水相におけるリン酸カルシウム類の選択的形成の検討
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上雄希、淺田紗成、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 アンフォテリシンBへの金属配位部位の導入によるチャネル形成とイオン透過能制御
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越山友美、井上雄希、大場正昭
2. 発表標題 錯形成を利用したアンフォテリシンBチャネルの透過能制御
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田迪子、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 リボソーム内部空間におけるリン酸カルシウム形成の検討
3. 学会等名 錯体化学会第68回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田迪子、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 リボソーム内部空間および表面を利用したリン酸カルシウム類の形成制御
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯川 真悠子、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 プルシアンブルーナノ粒子内包リボソームの合成とセシウム吸着能の評価
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田迪子、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 リボソーム内水相におけるリン酸カルシウム類の選択形成におけるリン脂質頭部の効果
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田迪子、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 リボソーム内水相へのカルシウムイオン流入速度制御によるリン酸カルシウム類の選択形成およびサイズ制御
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

錯体物性化学研究室研究業績 <a href="http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/Sakutaibussei/page03.html">http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/Sakutaibussei/page03.html</a>
--

6. 研究組織

	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
研究分担者	杉原 真司  (Sugihara Shinji)  (10253402)	九州大学・アイソトープ総合センター(箱崎地区)・准教授   (17102)	
連携研究者	越山 友美  (Koshiyama Tomomi)  (30467279)	立命館大学・生命科学部・准教授   (34315)	