

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710065
 研究課題名（和文） 新規包摂ホスト分子-金属イオン複合体による人工分解酵素の創製と環境浄化
 研究課題名（英文） Novel host molecule-metal ion complexes for developing artificial enzymes and their application to environmental decontamination
 研究代表者
 松宮 弘明 (MATSUMIYA HIROAKI)
 名古屋大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：10362287

研究成果の概要：水中の汚染物質を吸着材に捕集して水質浄化し、さらに捕集した汚染物質をそのまま分解・無害化する高効率な環境浄化システムの構築を目指した。汚染物質のモデルとなる化学物質を用いた分解能力の評価および分解能力の向上、各種汚染物質の吸着材への取り込み、吸着材と浄化水の迅速な分離回収などについて、実用的システムを構築する上で基礎となる有用な知見が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	210,000	3,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：複核金属錯体・リン酸エステル・加水分解・界面活性剤・アドミセル・起泡分離

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年のバイオ技術の発展に伴い、天然の酵素や微生物を環境浄化に用いる試みが数多く行われている。しかし、生物的作用を利用するが故に、一般に生物分解は操作条件に敏感であり、また処理時間も長い。そのため、安定に高速処理を行うには未だ課題が多い。微生物の場合はそれ自身が汚染物質の捕集と分解の両方を行うが、酵素には物質捕集能が殆どないため、汚染物質との接触効率は極めて低く、特に処理速度は遅くなる。しかも、固相吸着材などの捕集媒体に天然酵素

を固定化して汚染物質との接触効率を向上させても、固定化処理の際に酵素活性が失活することも多く、その効果は低い。

(2) 一方、研究代表者は硫黄で架橋された新しいタイプのホスト分子“チアカリックスアレーン (TCA)”を金属イオンの分離分析試薬として研究してきた。例えば、TCAを固相担体に固定化すると、架橋硫黄の強力な配位能により重金属イオンを濃縮できる。このTCAの配位サイトは複核金属錯体を形成するのに適した構造をしており、1 nm以下の非常に近接した位置に複数の金属イオンを配

置できる。このような配位様式は天然の金属酵素の活性サイトによく見られるものであり、TCAをプラットフォームとして人工の分解酵素を調製できることを意味する。

(3) また物理化学の分野では、界面活性剤分子が自己組織化膜を形成しながら固-液界面に吸着して“アドミセル”と呼ばれる分子集合体を形成すること、そしてその界面活性剤分子の疎水鎖から構成されるマイクロ疎水場に疎水性化合物が取り込まれることが知られている。研究代表者は、微量計測工学の観点から、このアドミセルの特性を分離濃縮技術に利用することを検討している。

(4) そこで研究代表者は、(2) および (3) で述べた研究経緯から、TCA・金属イオン・界面活性剤・固体粒子を組み合わせることで、物質捕集能を有する人工加水分解酵素を開発し、(1) で述べた問題点を解決できるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、操作条件の些細な変動や固定化処理に際して活性が左右され難い“タフ”な人工酵素を調製し、これを捕集媒体と組み合わせることにより、水中の汚染物質を捕えた後そのまま分解・無害化する高効率な環境浄化システムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 人工酵素の調製と評価

TCAと金属イオンを水中で混合し、錯体(人工酵素)を形成させた。汚染物質の一例として有機リン系農薬のモデル基質である*p*-ニトロフェニルリン酸を錯体溶液に添加し、その加水分解生成物である*p*-ニトロフェノールを検出して触媒活性を評価した。

(2) 捕集媒体の調製と評価

界面活性剤と固体粒子を水中で混合し、アドミセル(捕集媒体)を形成させた。汚染物質の例として各種疎水性化合物を含む試料水にアドミセルを添加し、水中に残存する化合物を検出して捕集能を評価した。

4. 研究成果

(1) 人工酵素の調製と評価

天然のリン酸エステル加水分解酵素であるアルカリフォスファターゼの活性中心には二つの亜鉛(II)イオンがルイス酸触媒として存在している。これらの亜鉛(II)イオンは協同的に作用して基質のリン原子の電子密度を低下させ、求核攻撃を受けやすくし、加水分

解反応を効率的に促進している。そこで、TCAの亜鉛(II)複核錯体を調製し、人工のアルカリフォスファターゼとして検討した。

基質には、有機リン系農薬のモデルとして*p*-ニトロフェニルリン酸を用いた。有機リン系農薬は、そのリン酸エステル部位がコリンエステラーゼの活性部位に結合し、神経伝達物質であるアセチルコリンの加水分解を阻害して正常な刺激応答を困難にしている。従って、リン酸エステル部位を分解すると有機リン系農薬は著しく低毒性化される。ここではモデル基質として*p*-ニトロフェニルリン酸を選択したが、これは加水分解に伴い黄色の*p*-ニトロフェノールが生成し、分解反応を容易に追跡できるためである。

しかし、亜鉛(II)-TCA錯体と*p*-ニトロフェニルリン酸を水中で混合しても加水分解の促進はみられなかった。錯体中で亜鉛(II)イオンは架橋硫黄のみならず二つの水酸基の配位を受けている。水酸基の電子供与性は強いいため、亜鉛(II)イオンのルイス酸性が低下し、触媒活性が得られなかったと考えられる。

そこで、更にルイス酸性の高い金属イオンとしてセリウム(IV)を検討した。セリウム(IV)-TCA錯体の存在下では、*p*-ニトロフェニルリン酸の加水分解反応は著しく加速した。この反応加速は触媒的であり、錯体の物質質量以上の量の基質が分解された。触媒活性と錯体組成の関係を検討したところ、単核錯体に比べて二核錯体は約4倍の活性を示した。また、種々の金属イオンと単核錯体を形成する典型的な配位子であるエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を用いて比較実験を行った。その結果、セリウム(IV)-TCA単核錯体の活性はEDTA錯体と同程度であった。従って、天然のアルカリフォスファターゼと同様に、近接した位置に配位した二つのセリウム(IV)イオンが協同的に基質に作用して、加水分解を触媒しているものと考えられる。

このセリウム(IV)-TCA二核錯体の触媒活性は、錯体をミセルに封入すると更に約3倍向上した。界面活性剤の添加量と触媒活性との関係をマイクロ環境プローブであるペリレンの蛍光挙動と対比したところ、マイクロ疎水場を形成できないほど界面活性剤の添加量が少ない場合では、触媒活性は純水の場合と同等であり、界面活性剤集合体の形成が触媒活性の向上には不可欠であることが分かった。この要因としては、マイクロ疎水場に錯体と基質の両者が濃縮されており接触効率が向上したこと、また、疎水場では静電的な相互作用が強まるためルイス酸触媒の効果が更に向上したことが挙げられる。

また、セリウム(IV)-TCA二核錯体がイムノグロブリンGなどの疎水的なタンパク質にも取り込まれることを見出した。この知見を基に、*p*-ニトロフェニルリン酸の加水分解に

よる発色反応を検出に利用するイムノアッセイを開発し、尿中腫瘍マーカーの検出に応用することができた。

(2) 捕集媒体の調製と評価

シリカゲルは弱酸性～アルカリ性の幅広い pH 条件下で表面が負に帯電する（等電点：約 pH 2）。そこで典型的なカチオン性界面活性剤である塩化セチルトリメチルアンモニウム（CTAC）を用いてアドミセルを調製した。

CTAC 吸着量の pH 依存性をシリカゲル表面の帯電挙動と対比したところ、両者は良い相関を示し、弱酸性～アルカリ性の幅広い pH 条件下でアドミセルが形成された。また、吸着速度も pH に依存した。例えば、吸着平衡に達するまでに pH 4 では 30 時間を要したのに対し、pH 9 では 5 分しか掛からなかった。また、一度生成したアドミセルは安定であり、硝酸に浸しても剥離した CTAC は 0.1% 以下であった。

シリカゲル-CTAC アドミセルには、有機リン系農薬やカーバメイト系農薬が濃縮された。また、重金属イオンなど原理上濃縮が困難な物質についても、ジチゾンやピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウムなどのキレート試薬と反応させて、疎水性錯体としてアドミセルに濃縮することができた。

大量の汚染水にシリカゲル-CTAC アドミセルを分散させて汚染物質を捕集したのち、浄化水とアドミセルを迅速に分離する方法を検討した。その結果、懸濁水の下部から細かい気泡を導入してアドミセルを気泡表面に付着させ、液面に浮上・回収する起泡分離（フローテーション）が有効であった。アドミセルを気泡表面（気-液界面）に吸着させるため、飽和吸着量の半分の量の CTAC をシリカゲルに吸着させてアドミセルを調製した。これは、負に帯電したシリカゲル表面に CTAC が吸着するとき、先ずカチオン性の親水基が固相表面に配向して単分子膜を形成し、次いで疎水鎖同士が相互作用して、親水基がバルク水相に配向した二分子膜を形成するためである。即ち、二分子膜構造ではアドミセルの気泡表面への吸着が不利になる。そこで、CTAC を飽和吸着量の半分の量とすることにより、アドミセルとバルク水相との界面には CTAC の疎水鎖を向かせ、気泡表面に吸着しやすいようにした。

シリカゲル-CTAC アドミセルを河川水および湖沼水に分散させた場合、起泡分離を適用することによりアドミセルは速やかに浮上し、懸濁のない透明な水がわずか数分間の送気で得られた。しかし、アドミセルの浮上効率は試料水の塩濃度に大きく左右され、海水への適用は困難であった。

一方、濃縮された汚染物質は少量の適切な

溶離剤（例えば有機溶媒や酸）を用いることによりシリカゲル-CTAC アドミセルから回収された。従って本法は、水の浄化のみならず、機器分析に先立つ高効率な分離濃縮法としても有用である。

なお、アドミセルはイオン性界面活性剤のみならず、非イオン性界面活性剤を用いても調製できる。ポリオキシエチレン(20)ノニルフェニルエーテルと合成吸着材アンバーライト XAD-4 樹脂（スチレン-ジビニルベンゼン共重合体）を水中で混合すると、シリカゲル-CTAC アドミセルの場合とは逆に、界面活性剤の疎水鎖が固相表面に、親水基がバルク水相に配向したアドミセルを形成する。このアドミセルにはリンやヒ素を濃縮できた。水中のリンやヒ素はリン酸やヒ酸として溶存しているが、これらをモリブデン酸とのヘテロポリ酸化学種に変換すると、アドミセルの親水基であるポリオキシエチレン鎖と相互作用して取り込まれた。また、過剰のモリブデン酸も縮合してイソポリ酸となりアドミセルに取り込まれた。本法はリンやヒ素の除去法としてのみならず、機器分析のための前段濃縮法としても有用である。

(3) まとめ

本研究では、TCA をプラットフォームとして人工金属酵素を調製し、これをアドミセルと組み合わせることにより、水中の汚染物質を捕えた後そのまま分解・無害化する高効率な環境浄化システムの構築を目指した。実用的な段階までには至らなかったものの、モデル基質を用いた触媒活性の評価、マイクロ疎水場における触媒能の向上、各種汚染物質の取り込み、フローテーションによる迅速分離回収など、実用的システムに発展させる上で基礎となる有用な知見が得られた。

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）

- ① H. Matsumiya, T. Kikai, M. Hiraide, “Solid-phase extraction followed by HPLC for the determination of phosphorus(V) and arsenic(V)”, *Anal. Sci.*, **25**(2), 207-210 (2009). 査読有。
- ② H. Matsumiya, Y. Yatsuya, M. Hiraide, “Extraction of metal-APDC chelates into admicelles followed by flotation for water analysis”, *J. Ion Exchange*, **18**(4), 378-383 (2007). 査読有。
- ③ H. Matsumiya, Y. Yatsuya, M. Hiraide, “Admicelle-mediated collection followed by flotation for the preconcentration of trace metals in fresh waters”, *Anal. Chim. Acta*,

588(1), 82-87 (2007). 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

- ① M. Hiraide, T. Saitoh, H. Matsumiya, “Surfactant-mediated separation techniques for the analysis of environmental water and high-purity materials”, The 7th World Surfactants Congress, 2008 年 6 月 22-25 日, Palais des Congrès (Paris, France).
- ② 永井真二, 松宮弘明, 平出正孝, “チアカリックスアレーン金属錯体を用いる腫瘍マーカーのイムノアッセイ”, 第 69 回分析化学討論会, 2008 年 5 月 15-16 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).
- ③ 北方謙吾, 松宮弘明, 平出正孝, “アドミセルフローテーションによる水中微量元素の分離濃縮”, 第 69 回分析化学討論会, 2008 年 5 月 15-16 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).
- ④ 鬼海高明, 松宮弘明, 平出正孝, “アドミセル吸着分離/HPLC 吸光検出による鉄鋼分析”, 第 69 回分析化学討論会, 2008 年 5 月 15-16 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).
- ⑤ S. Nagai, H. Nakamura, H. Matsumiya, M. Hiraide, “Use of cerium(IV)-thiacalix[4]arene complexes for the immunoassay of tumor marker proteins”, International Symposium on Metallomics 2007, 2007 年 11 月 28-12 月 1 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).
- ⑥ 永井真二, 中村絃子, 松宮弘明, 平出正孝, “腫瘍マーカー検出におけるチアカリ

ックスアレーン金属錯体の利用”, 第 38 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2007 年 11 月 10-11 日, 三重大学 (三重県津市).

- ⑦ H. Matsumiya, Y. Yatsuya, M. Hiraide, “Extraction of metal-APDC chelates into admicelles followed by flotation for water analysis”, The 4th International Conference on Ion Exchange, 2007 年 10 月 15-19 日, 千葉大学 (千葉県千葉市).
- ⑧ M. Hiraide, T. Saitoh, H. Matsumiya, “Design and application of admicelle-mediated separation techniques for trace analysis”, Euroanalysis XIV, 2007 年 9 月 9-14 日, University of Antwerp (Antwerp, Belgium).
- ⑨ 松宮弘明, 中村絃子, 平出正孝, “チアカリックスアレーン金属錯体の加水分解触媒活性とそのイムノアッセイへの応用”, 第 68 回分析化学討論会, 2007 年 5 月 19-20 日, 宇都宮大学 (栃木県宇都宮市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松宮 弘明 (MATSUMIYA HIROAKI)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 10362287