

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20540470

研究課題名(和文)カオリナイトの溶解速度に及ぼす生体有機分子の影響の定量評価

研究課題名(英文) Quantitative Evaluation of Enhancement Effect of Biological Molecules on the Dissolution Rates of Kaolinite

研究代表者

河野 元治 (KAWANO MOTOHARU)

鹿児島大学・理工学研究科(理学系)・教授

研究者番号：80224814

研究成果の概要(和文):カオリナイトの溶解速度に及ぼす生体有機分子の影響を評価するため、無機系およびタンパク質(BSA)を含む反応系での溶解実験を行った。中性付近での反応の結果、無機反応系と比較して BSA 濃度 0.01, 0.02, 0.05, 0.1mg/ml を含む系では約 1.2, 1.4, 2.9, 3.9 倍の溶解速度の増大が認められ、カオリナイトの溶解速度はタンパク質との反応によって著しく増大することが確認された。

研究成果の概要(英文): To evaluate the effect of microbial organic molecules on the dissolution rates of kaolinite, experiments on kaolinite dissolution in solutions with and without protein (BSA) were performed. Results of the experiments in near neutral solutions showed that the dissolution rates of kaolinite increased progressively up to 3.9 times with increasing BSA concentrations of 0.01, 0.02, 0.05, and 0.1 mg/ml. This results indicated that the dissolution rates of kaolinite were extensively enhanced by interaction of protein with the surface of kaolinite.

交付決定額

(金額単位:円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2006年度 |           |           |           |
| 2007年度 |           |           |           |
| 2008年度 | 2,600,000 | 780,000   | 3,380,000 |
| 2009年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 2010年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・岩石・鉱物・鉱床学

キーワード：カオリナイト、溶解速度、タンパク質、鉱物、風化

## 1. 研究開始当初の背景

地球表層環境で進行している鉱物の溶解反応には微生物の作用が大きく関与していると考えられている。これまでの研究で、微生物の関与による鉱物の溶解は微生物細胞から放出されたタンパク質や多糖などの有機分子による表面錯体形成が主要な因子として機能していることが示唆されている。しかしながら、それらの実験

的な検証、定量評価、反応機構などは不明である。

## 2. 研究の目的

地殻表層環境に生息する微生物はその代謝過程で種々の有機分子(タンパク質、多糖類、アミノ酸、有機酸など)を外界に放出する。細胞外に放出された有機分子は間隙水に溶解し、周

辺環境の鉱物と表面錯体を形成することで溶解速度に著しい影響を与えていると考えられる。しかしながら、これらの反応に及ぼすタンパク質等の有機分子の影響の定量的な評価や反応機構の詳細な検討はこれまでほとんど行われていない。そのため、鉱物-微生物相互作用の反応機構レベルでの理解や見かけの溶解反応に対する反応因子の評価が困難な状況にある。そこで本研究では、このような鉱物-微生物相互作用のうち鉱物の溶解速度に及ぼすタンパク質の影響に焦点を絞り、タンパク質の作用によるカオリナイトの溶解促進の定量的評価と反応機構の解析を行う。

これまでカオリナイトおよびカオリナイト関連鉱物の溶解実験は多数行われているが、それらの大部分は無機系の反応である。これらの無機系反応はカオリナイトの本質的な溶解速度や溶解機構を明らかにするという観点ではきわめて重要な意味をもつ。しかしながら、地球最表層の天然環境での反応を想定した場合、微生物に代表される地球生命圏の影響を無視することはできない。本研究の特色は、このような鉱物の溶解に及ぼす地球生命圏の影響とそのメカニズムを反応機構のレベルで定量的に明らかにする点にある。これにより微生物の放出する主要有機分子によるカオリナイトの溶解速度への影響の定量的評価およびその反応機構が明らかとなり、全地球規模で進行している鉱物圏に対する生命圏の影響評価に向けた新たな研究分野の大きな進展となる。

### 3. 研究の方法

微生物によるカオリナイトの溶解速度への影響を明らかにするため、まず、実験 I として無機反応系での溶解実験を行い、カオリナイトの溶解速度に及ぼす pH の影響を検討した。次に、実験 II としてタンパク質(BSA)を含むタンパク質系での溶解実験を行い、タンパク質の影響の定量評価と

表 1. 無機反応系での溶液条件

| Run | Kaolinite | Solution              | pH  |
|-----|-----------|-----------------------|-----|
| A1  | 0.2       | 1.0mM NaCl+1.0mM HCl  | 3.1 |
| A2  | 0.2       | 1.0mM NaCl            | 8   |
| A3  | 0.2       | 1.0mM NaCl+0.1mM NaOH | 5.6 |
| A4  | 0.2       | 1.0mM NaCl+0.2mM NaOH | 8   |

表 2. タンパク質系での溶液条件

| Run | Kaolinite | Solution                 | pH  |
|-----|-----------|--------------------------|-----|
| B1  | 0.2       | 1.0mM NaCl+0.01mg/ml BSA | 6.6 |
| B2  | 0.2       | 1.0mM NaCl+0.02mg/ml BSA | 3   |
| B3  | 0.2       | 1.0mM NaCl+0.05mg/ml BSA | 6.7 |
| B4  | 0.2       | 1.0mM NaCl+0.1mg/ml BSA  | 7   |

反応機構の検討を行う。タンパク質はバクテリア細胞から放出されている主要有機分子として知られているため、タンパク質の作用による溶解速度の影響を評価することは、バクテリアによる影響の反応機構を考えるうえできわめて重要である。

溶解実験では、ジョージア産カオリナイト(KGa-1)を用い、タンパク質は牛血清アルブミン(BSA)を用いた。溶解実験は 1.0 mM NaCl 溶液を用いたフロースルー系で行い、カオリナイト: 0.2g、BSA 濃度 : 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 mg/ml とした。なお、無機反応系では pH 調整試薬で初期溶液 pH を 3-9 領域に調整し (表 1)、タンパク質系では pH 調整試薬の添加は行っていない (表 2)。反応期間は 10 日間とし、反応溶液の流速を 0.05 ml/min、温度を 25°C に保持した。反応期間を通して、24 時間間隔で溶液 pH と溶液中の Si 濃度の測定を行った。溶解速度の算出には溶解反応がほぼ定常に達したと判断された反応期間 5-10 日間の pH および Si 濃度を使用した。

### 4. 研究成果

#### 実験 I(無機反応系)

無機反応系での溶解実験では、溶液 pH および Si 濃度は反応期間数日で定常値に達し、反応期間 5-10 日ではほぼ一定の値を示した (図 1)。この期間の Si 濃度を用いて溶解速度を算出した結果、A1: -11.83, A2: -12.20, A3: -12.28, A4: -11.99  $M s^{-1} m^2$  の溶解速度が得られ、中性付近を境として酸性領域とアルカリ性領域で溶解速度の増大が確認された (図 2)。これらの溶解速度値から溶液 pH に対する速度式を算出すると、酸性領域では次の式が得られ、

$$(1) \quad R = 10^{-11.36} (aH^+)^{0.15}$$

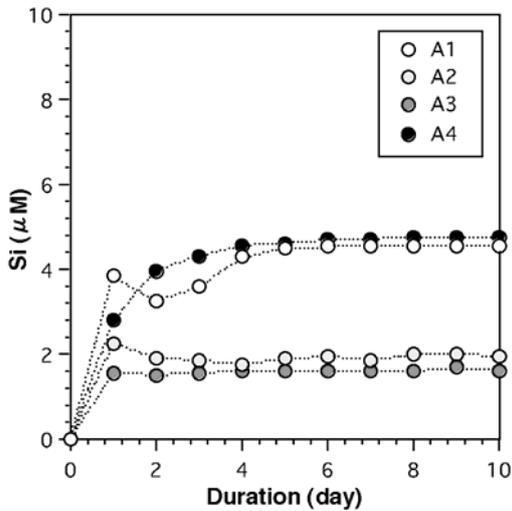


図 1. 無機反応系での si 濃度の変化

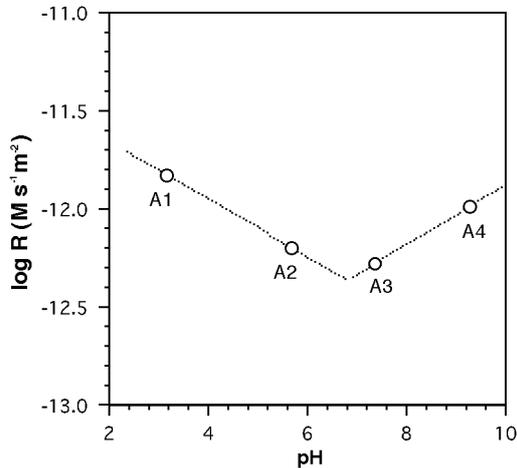


図 2. 無機反応系での溶液 pH に対するカオリナイトの溶解速度の変化

アルカリ性領域では次の式が得らる。

$$(2) \quad R = 10^{-13.39} (aH^+)^{-0.15}$$

これらの無機反応系での溶解速度をタンパク質系での溶解速度の対象系として使用する。

#### 実験 II (タンパク質系)

タンパク質系での溶解実験では、反応初期段階での溶液 pH の僅かな上昇が確認され、初期 pH6 から 4 日程度で pH6.6~6.9 領域の定常に達した。溶存 Si 濃度は初期段階に急激な上昇を示し、5 日以降では BSA 濃度に依存して 1.6~5.0 μM 程度の値に維持された (図 3)。これらの Si 濃度からタンパク質系での溶解速度を算出すると、B1: -12.27、B2:

-12.23、B3: -11.92、B4: -11.80  $M s^{-1} m^{-2}$  の値が得られる (図 4)。これらの結果はカオリナイトの溶解速度が溶液中の BSA 濃度に依存して 1.2~3.9 倍に増大することを示しており、BSA 分子との反応によりカオリナイトの溶解速度が著しく増大することを実験的に示したものである。

BSA は分子量 66 kDa、等電点 pI4.7、アミノ酸残基 582 のタンパク質で酸性アミノ酸としてアスパラギン酸 41、グルタミン酸 59、塩基性アミノ酸としてヒスチジン 17、リシン 59、アルギニン 23 を構造中にもつ。これらのアミノ残基の側鎖官能基は本溶解実験の pH 領域 (pH6.6~6.9) では、酸性アミノ酸はマイナス電荷、塩基性アミノ酸はプラス電荷を発生することから、これらの官能基とカオリナイト端面の電荷サイトとの反応によりカオリナイトの溶解速度が促進されたものと考えられる。

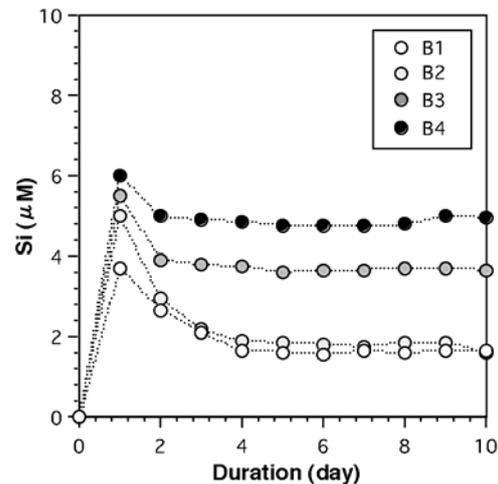


図 3. タンパク質系での si 濃度の変化

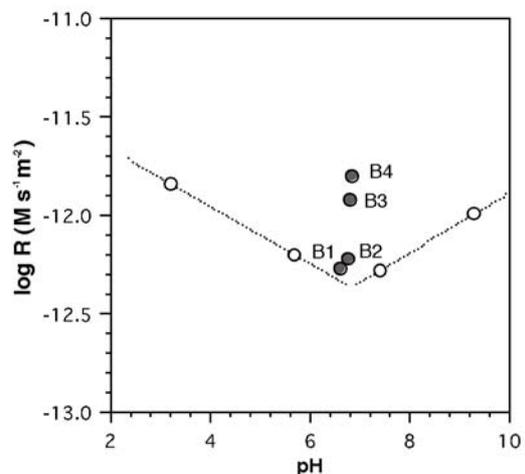


図 4. タンパク質系でのカオリナイトの溶解速度の変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① Kawano, M. and Tomita, K. Microbial enhancement of the dissolution rates of kaolinite by interaction of heterotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Clay Science, 査読有, Vol.15, 2011, 33-41.
- ② Kawano, M. and Hwang, J. Influence of guanidine, imidazole, and some heterocyclic compounds on dissolution rates of amorphous silica. Clays and Clay Minerals, 査読有, Vol.58, 2010, 757-765.
- ③ Kawano, M. and Hwang, J. Enhancement of dissolution rates of amorphous silica by interaction with bovine serum albumin at different pH conditions. Clays and Clay Minerals, 査読有, Vol.58, 2010, 272-279.
- ④ Kawano, M., Hatta, T. and Hwang, J. Enhancement of dissolution rates of amorphous silica by interaction with amino acids in solution at pH4. Clays and Clay Minerals, 査読有, Vol.57, 2009, 161-167.

[学会発表] (計6件)

- ① Kawano, M. Interaction of Extracellular Proteins on the Surface of Amorphous Silica, International Symposium "Asian Clay", 2010年9月6日, Nagoya.
- ② 河野元治・J. Hwang (2010) 炭酸カルシウム鉱物の生成速度および多形に及ぼす酸性多糖の影響. 粘土科学討論会, 2010年9月6日, 名古屋.
- ③ 河野元治・J. Hwang (2009) グアニジンおよびイミダゾールによるアモルファスシリカの溶解速度の増大, 粘土科学討論会, 2009年9月10日, 岩手.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 元治 (KAWANO MOTOHARU)

鹿児島大学・理工学研究科 (理学系)・教授