

平成22年 6月 2日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20760512  
 研究課題名（和文） 刺激応答型高分子の可逆的構造変化を利用したタンパク質の高度分離・回収法の構築  
 研究課題名（英文） Development of recovery process for proteins utilizing reversible structural change of stimuli-responsive copolymers  
 研究代表者  
 森貞 真太郎（MORISADA SHINTARO）  
 東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教  
 研究者番号：60401569

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、感温性を有する*N*-isopropylacrylamide (NIPA) とカチオン性を有する vinylbenzyl trimethylammonium chloride (VBTA) を共重合した感温性高分子吸着剤 (NIPA-VBTAゲルおよび poly(NIPA-co-VBTA) グラフトシリカ粒子) を作製し、モデル吸着質として牛血清アルブミン (BSA) を用いた温度スイング吸着実験を行った。その結果、いずれの吸着剤でも 298 K で BSA を吸着し、その一部を 313 K で脱着することができた。さらに、温度スイング操作を繰り返すことでこのような BSA の吸脱着を繰り返すことに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

The adsorption and desorption behaviors of bovine serum albumin (BSA) in water for the temperature-responsive adsorbents have been investigated by the temperature-swing operation. As the temperature-responsive adsorbents, the copolymer gels composed of *N*-isopropylacrylamide (NIPA) and vinylbenzyl trimethylammonium chloride (VBTA) and the poly(NIPA-co-VBTA) grafted silica particles were employed. As a result, it was found that both copolymer adsorbents can adsorb BSA at 298 K and desorb some of pre-adsorbed BSA at 313 K repeatedly by the temperature-swing operation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 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：吸着，脱着，温度スイング，タンパク質，感温性高分子，高分子ゲル，シリカ粒子，高分子修飾

## 1. 研究開始当初の背景

産業廃水や生活排水に含まれる有機性廃棄物は、水質汚染や悪臭の原因となるため、

環境中への放出前に適切な処理が必要となる。その一方で、有機性廃棄物の中には環境にとっては有害であっても、それらが濃縮・

精製された形で回収できれば、有価物として再利用できる場合もある。そのため、目的物質を分離除去するだけでなく、適切に回収する技術も必要となる。

従来の廃水処理法の一つとして、活性炭やイオン交換樹脂、キレート樹脂といった吸着剤を用いた吸着法があげられる。活性炭による吸着処理は活性炭自体が安価であるため広く用いられているが、その問題点として、再生処理時における活性炭の損失と膨大なエネルギーコストがある。他方、イオン交換樹脂およびキレート樹脂を用いた場合には、他の処理法では除去が困難と言われるイオン性の有害物質をほとんど全て除去できるが、その再生処理に多量の酸またはアルカリ溶液を必要とする問題点がある。また、いずれの方法においても、対象物質の“除去”だけが目的となっており、“回収”ということとは考慮されていない場合がほとんどである。

ここで、吸着法による廃水処理プロセスにおいて、用いる吸着剤が温度操作のような外部刺激によって分離対象物質に対する吸着特性を可逆的に制御できる性質を有していれば、吸着剤の再利用と目的物質の分離・回収が非常にシンプルなプロセスによって実現できると考えられる。

## 2. 研究の目的

ある種の高分子は、水溶液中において外部からの物理・化学的变化に応じ、その構造を可逆的に変化する性質を有する。このような刺激応答型高分子の代表例として、水中である温度以上に加熱すると凝集・析出し、その温度以下に戻すと再び溶解するという相転移挙動を示す感温性高分子があげられる。このような感温性高分子を応用することで、温度スイング操作によって吸着特性を可逆的に制御できる吸着剤を合成できると期待できる。

そこで本研究では、有機性の分離対象物質としてタンパク質を考え、その高度分離・回収と吸着剤自体の再生を温度スイング操作で可逆的に行うことを可能とする感温性高分子吸着剤の創製を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 感温性高分子吸着剤の作製

感温性高分子吸着剤の要となる感温性部位とタンパク質との吸着を担う相互作用部位としてどのようなモノマーを選定するかは、対象となるタンパク質の種類に依存する。そこで、本研究では対象となるタンパク質として、まずは広く研究に用いられているタンパク質である牛血清アルブミン (Bovine Serum Albumin, BSA) を用いることとした。

BSAは分子量が約67,000で、大きさが $4 \times 4 \times 15$  nmのタンパク質であり、変性温度は335–338 Kである。従って、この変性温度よりも低い306 Kに下限臨界溶液温度 (LCST) を有する*N*-isopropylacrylamide (NIPA) を感温性部位として用いた。また、BSAはpH 4.8付近に等電点を有しており、中性域では負に帯電していることから、相互作用部位となるモノマーとして正電荷を有する4級アンモニウム塩モノマーである vinylbenzyl trimethylammonium chloride (VBTA) を用いることとし、静電的相互作用により吸着を行うことを考えた。これらのモノマーから成る感温性高分子吸着剤としてNIPA-VBTAゲルと poly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子の2種類を以下のようにして作製した。

### ① NIPA-VBTAゲルの作製

モノマーであるNIPAおよびVBTA、架橋剤である*N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) を dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 mLに溶解させた。ただし、NIPAおよびVBTAの濃度はそれぞれ3.8, 0.2 Mとし、BISの濃度は0.01, 0.05, 0.1 Mとした。この溶液に重合開始剤である 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) を加え、内径15 mmの試験管中にて窒素雰囲気下、353 Kでラジカル重合を行った。24時間後、試験管からゲルを取り出し、蒸留水にて洗浄を行った。洗浄後、膨潤度測定用として円筒状のゲルから幅10 mm分を切り取り、残りは乾燥後に粉碎し、ふるいにて45–212  $\mu\text{m}$ に分級した。比較としてNIPAゲルも同様に作製した。

得られた幅10 mmの円筒状ゲルを水中に浸し、298 Kまたは313 Kの恒温槽中に静置した。各温度における直径を数時間おきに測定し、一定となった直径を求めた。膨潤度は、得られた直径 $d_T$ とゲル重合時に用いた試験管の内径 (15 mm)  $d_0$ との比として算出した。

### ② poly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子の作製

シリカ粒子表面へのポリマーの修飾は、ビニル基を有するシランカップリング剤 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (MPTS) を用いてシリカ粒子表面にビニル基を導入し、得られたビニル基導入シリカ粒子とNIPAおよびVBTAを共重合することで行った。

シリカ粒子表面へのMPTSの導入は次のようにして行った。平均粒径8  $\mu\text{m}$ のシリカ粒子25 gを1% HCl水溶液1 L中で12時間攪拌し、シリカ粒子表面を洗浄後、ろ別したシリカ粒子を蒸留水で洗浄し、383 Kで8時間乾燥させた。このシリカ粒子をエタノール440 mLと25%アンモニア水27 mLの混合溶液中に分散させ、2.5時間室温で攪拌し、MPTSを20 mL加え、さらに1時間攪拌した。その後、減圧下で約250 mLの溶媒を留去することでシリ

カ粒子表面のシラノール基とMPTSのシランカップリング反応を促した。減圧ろ過によって回収したシリカ粒子をエタノールによって十分に洗浄した後、323 Kで12時間乾燥させることでビニル基修飾シリカ粒子を得た。

続いて、ポリマーのグラフトは以下のようにして行った。NIPAとVBTAおよび重合開始剤AIBNをエタノールに溶解した。ただし、モノマーの全濃度を1.0 Mとし、全量を200 mLとした。また、NIPAとVBTAのモル比（仕込み比）は70/30–95/5とした。この溶液にビニル基導入シリカ粒子を10 g加え、窒素雰囲気下、333 Kにて攪拌しながらラジカル重合を行った。6時間後、得られたpoly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子を水およびエタノールで十分洗浄することで、未反応のモノマーを除去した。また、同様の方法でPolyNIPAグラフトシリカ粒子とPolyVBTAグラフトシリカ粒子も作製した。

示差熱・熱重量測定装置を用いてポリマーグラフトシリカ粒子およびビニル基導入シリカ粒子の熱重量測定を行った。得られた重量減少量からシリカ粒子へのポリマーの導入率（グラフト率）を算出した。また、298 Kおよび313 Kにおける各シリカ粒子の表面電位をゼータ電位測定装置を用いて測定したところ、未処理のシリカ粒子表面が負に帯電しているのに対し、poly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子は正に帯電していることがわかった。これより、シリカ粒子表面に正電荷を有するVBTAが導入されていることが確認された。ただし、poly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子のゼータ電位は298–313 Kにおいて明確な温度依存性は見られなかった。

#### (2) BSAの温度スイング吸着実験

##### ① NIPA-VBTAゲルによるBSA吸着実験

作製したゲル0.03 g（乾燥重量）を100 mLの水に加え、298 Kで約12時間攪拌した。その後、濃度が1000 ppmのBSA水溶液を100 mL添加し、298 Kおよび313 KにおけるBSA吸着量の経時変化を測定した。ただし、測定開始時のBSA濃度は500 ppm、ポリマー濃度は150 ppmである。温度スイング操作は、2時間おきに313 Kへの昇温と298 Kへの降温を繰り返して行った。任意の時間におけるBSA濃度は、紫外可視分光光度計を用いて測定した278 nmにおける吸光度から求め、初期濃度との差から吸着量を算出した。

##### ② poly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子によるBSA吸着実験

ポリマーグラフトシリカ粒子を100 mLの水に添加し、298 Kで約12時間攪拌した。このとき添加したシリカ粒子量は、熱重量測定より求めたポリマーグラフト率より、ポリマー量0.03 gに相当する。その後、1000 ppmの

BSA水溶液を100 mL添加し、298 Kおよび313 KにおけるBSA吸着量の経時変化を測定した。ただし測定開始時のBSA濃度は500 ppm、ポリマー濃度は150 ppmである。初期設定温度は298 Kとし、2時間おきに313 Kへの昇温、298 Kへの降温を繰り返した。BSA吸着量は先ほどと同様にして求めた。

## 4. 研究成果

### (1) NIPA-VBTAゲルの膨潤度

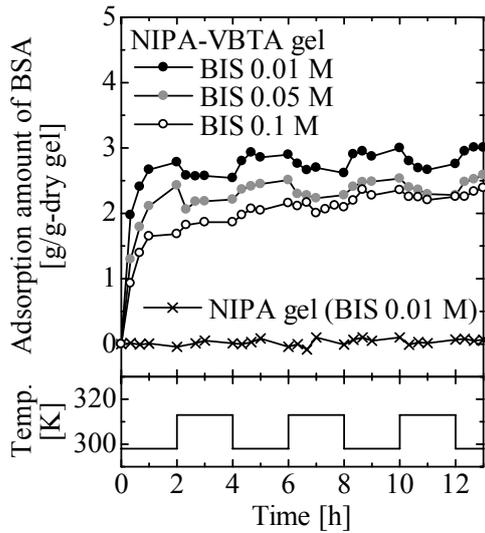
架橋剤であるBISの濃度が異なる3種類のNIPA-VBTAゲルおよびBIS濃度が0.01 MのNIPAゲルの膨潤度をTable 1に示す。多くの既往の研究において報告されている結果と同様に、NIPAゲルはLCST以下の298 Kでは膨潤し、LCST以上である313 Kでは収縮する様子が本研究でも観察された。NIPA-VBTAゲルでも同様の傾向が観察されたが、BIS濃度が0.01 Mにおける膨潤度はNIPAゲルに比べてかなり大きな値となった。これは、正電荷を有するVBTA同士の静電斥力が働くためだと考えられる。また、架橋剤であるBIS濃度が高いほど膨潤度は小さくなった。

**Table 1** Swelling degrees of the NIPA and the NIPA-VBTA gels.

Gel	BIS [M]	$d_{298}/d_0$	$d_{313}/d_0$
NIPA gel	0.01	2.0	0.9
NIPA-VBTA gel	0.01	3.5	3.1
	0.05	2.3	2.1
	0.1	1.8	1.6

### (2) NIPA-VBTAゲルによるBSA吸着挙動

BIS濃度の異なる3種類のNIPA-VBTAゲルおよびBIS濃度0.01 MのNIPAゲルを用いた温度スイング吸着実験の結果をFigure 1に示す。このように、全てのNIPA-VBTAゲルはBSAを吸着したが、NIPAゲルはBSAをほとんど吸着しなかった。これより、正電荷を有するVBTAをゲルに導入することで水溶液中で負に帯電しているBSAを静電的相互作用を介して吸着できたと考えられる。またNIPA-VBTAゲルの結果から、BIS濃度が低いほどBSAの吸着量は大きくなる傾向が見られた。さらに、BIS濃度が0.01 Mと0.05 MのNIPA-VBTAゲルの場合、298 Kから313 Kへの温度スイング操作によって、吸着したBSAの一部を脱着することに成功した。これは、PolyNIPAのLCST以上である313 Kにおいて高分子鎖の収縮が起こり、その結果、VBTAによるBSAの吸着が阻害されたことが原因だと推測される。このようなBSAの吸脱着挙動が繰り返し観察されたことから、温度操作によって再生可能な感温性吸着剤の作製に成功したといえる。一

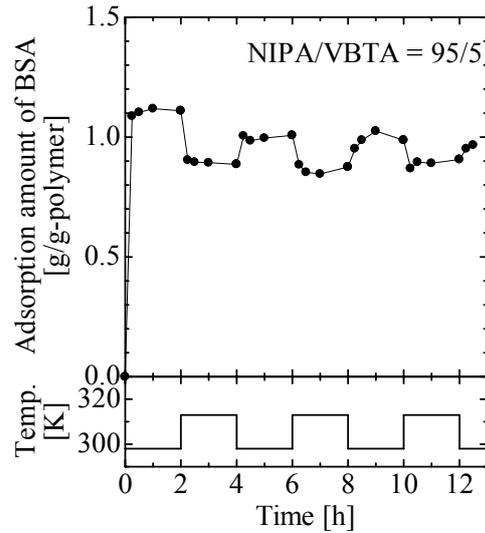


**Figure 1** Time and temperature dependences of amount of BSA adsorbed onto the NIPA gel and the NIPA-VBTA gels of different BIS concentrations.

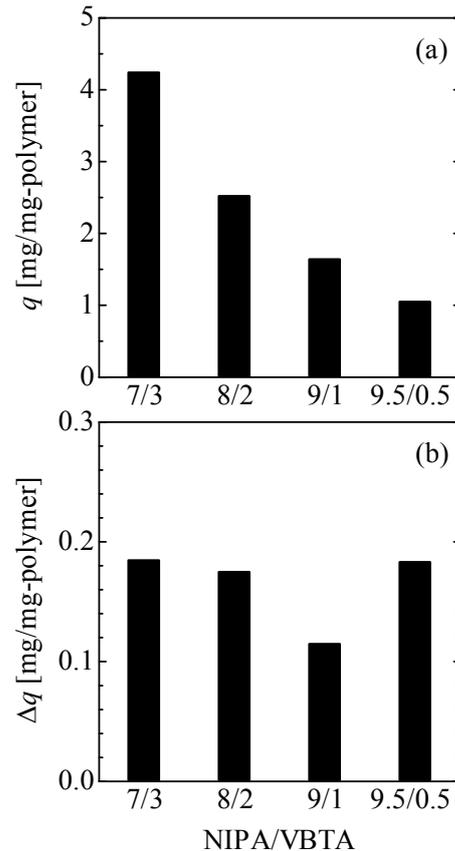
方、BIS濃度が0.1 MのゲルではそのようなBSAの脱着は見られなかった。これは、架橋剤の濃度が高いために高分子鎖の網目が小さく、また高分子鎖の自由度が低下するために、BSAの脱着が阻害されるのだと考えられる。

(3) poly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子によるBSA吸脱着挙動

重合時の仕込み比がNIPA/VBTA = 95/5のpoly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子を用いたBSA吸着実験の結果をFigure 2に示す。これより、poly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子により、BSAを298 Kで吸着し、その一部を313 Kで脱着できたことが分かる。温度スイング操作によりBSAの吸脱着が繰り返し観察されたことから、ポリマーグラフトシリカ粒子でも感温性吸着剤を作製することができたといえる。また、仕込み比がNIPA/VBTA = 70/30, 80/20, 90/10のpoly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子を用いても、同様のBSA吸脱着挙動が観察された。298 Kで2時間、313 Kで2時間の計4時間を1サイクルとしたときの各サイクルにおける吸着量 $q$ および脱着量 $\Delta q$  (吸着量の極大値と極小値の差)の平均値をFigure 3に示す。これより、VBTAの割合が高いほどBSA吸着量が大きいことが分かる。しかし、BSA脱着量とVBTAの割合に相関はみられなかった。一方、PolyNIPAグラフトシリカ粒子はBSAを全く吸着せず、PolyVBTAグラフトシリカ粒子はBSAを吸着するが、温度を変化させてもBSAを脱着することはなかった。これらの結果より、poly(NIPA-co-VBTA)グラフトシリカ粒子は、ゲルの場合と同様、



**Figure 2** Time and temperature dependences of amount of BSA adsorbed onto the poly(NIPA-co-VBTA) grafted silica particles.



**Figure 3** Adsorption and desorption amounts of BSA for the poly(NIPA-co-VBTA) grafted silica particles: (a) adsorption amount  $q$ ; (b) desorption amount  $\Delta q$ .

VBTAとの静電的相互作用によりBSAを吸着し、NIPAの感温性によりBSAを脱着すると考えられる。

(4) まとめ

本研究では、感温性を有するNIPAと正電荷を有するVBTAを用いることで、温度スイング操作によるBSAの吸脱着を可能とする高分子吸着剤を創製することができた。ただし、現状ではBSAの脱着量は吸着量に比べて非常に小さいため、その改善が今後の課題である。その解決策として、VBTAよりも正電荷の小さなモノマーを使用することにより、BSAとの静電的相互作用を弱めることや、ポリマーグラフトシリカ粒子において、原子移動ラジカル重合法(ATRP法)を用いることでポリマー鎖長等を制御することが考えられる。

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1件)

① S. Morisada, K. Namazuda, H. Kanda, Y. Hirokawa, Y. Nakano, Temperature-Swing Adsorption of Proteins in Water Using N-Isopropylacrylamide Copolymer Gel Particles, Advanced Powder Technology, 21, 28-33, 2010, 査読有

[学会発表] (計4件)

① 森貞真太郎, 機能性高分子を利用した吸着剤の開発 -イオンからナノ粒子まで-, (社)表面技術協会 第30回ナノテク部会研究会, 2009年5月28日, 東京理科大学

② K. Namazuda, S. Suzuki, S. Morisada, Y. Hirokawa, Y. Nakano, Development of Temperature-Responsive Adsorbent for Proteins in Aqueous Solution, 8th Japan-Korea Symposium on Materials & Interfaces, 2008年11月6日, Sapporo

③ 鯨田健一朗, 鈴木 淑, 森貞真太郎, 廣川能嗣, 中野義夫, 感温性高分子グラフトシリカによるタンパク質吸着挙動の検討, 分離技術会年会2008, 2008年6月7日, 明治大学

④ S. Morisada, S. Suzuki, K. Namazuda, Y. Hirokawa, Y. Nakano, Temperature-Swing Adsorption of Proteins in Water Using Polymer-Grafted Silica Particles, 5th International Conference Interfaces Against Pollution 2008, 2008年6月2日, Kyoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森貞 真太郎 (MORISADA SHINTARO)  
東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教

研究者番号: 60401569

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし