

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560855

研究課題名（和文）ナノ反応場を利用した白金族金属の革新的リサイクル技術の開発と  
ナノ粒子資源化研究課題名（英文）Innovative recycle systems of platinum group metals by  
nanoparticulation in nano reaction fields

研究代表者

三田村 久吉（MITAMURA HISAYOSHI）

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力基礎工学研究部門・研究員

研究者番号：80354869

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、希少性から安定確保が問題となっている貴金属を産業廃棄物からリサイクルし、さらにナノ粒子として再資源化することである。本研究では、配位子と界面活性剤からなる混合逆ミセルを用いて、模擬産業廃液から金イオンのみを選択的に抽出し、逆ミセルのナノ反応場内で還元することで、単一な金ナノ粒子を合成することに成功した。また、別の手法として、金結合性ペプチドを融合したタンパク質を用いることで、温和な条件で金ナノ粒子の合成とタンパク質の固定化を同時に行う新手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is recycling noble metals from industrial wastes as nanoparticles. In this study, gold ions were selectively extracted from model industrial wastes using mixed reverse micelles consisting of ligand and surfactant. Monodisperse gold nanoparticles were obtained by reduction of gold ions concentrated in water pool of reverse micelles. As another method, we have developed the new strategy that couples fabrication of gold nanoparticles and protein immobilization using protein fused with gold-binding peptide into one simultaneous process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学工学

科研費の分科・細目：総合工学、リサイクル工学

キーワード：再資源化、溶媒抽出、逆ミセル、貴金属、ナノ粒子、ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 貴金属は優れた物性（導電性、耐蝕性、耐熱性、展性など）により、電子部品、触媒といった様々な分野で工業的に使用されている。しかし、そのニーズの高まりと希少性から近年価格が急騰し、その安定確保が大きな課題となっている。

一方、我が国は金属資源に乏しく、海外か

らの輸入に依存している。しかし、産業廃棄物には金属鉱山と並ぶ優良な2次資源が含まれており、日本に蓄積している金属資源は世界有数の資源国に匹敵すると予想されている（金、銀、インジウムにおいては世界埋蔵量で第1位）。このような状況から金属資源のリサイクルは資源の安定確保、さらには廃棄物処理による環境保全にも繋がるため、

日本の産業にとって極めて重要な課題の1つである。

貴金属を分離精製する先行技術として、沈殿晶析法、吸着法、電解採取法、溶媒抽出法等がある。中でも溶媒抽出法は自動化や連続操作が可能で、生産性が高いことから工業的に応用されている。しかし、貴金属は化学的性質が類似しているため、既存の抽出剤でそれらを相互分離することは困難であり、数段階の工程を必要とする。そのため、高い分離性能を有する抽出剤の開発が望まれている。

(2) 金属ナノ粒子は数百から数千ほどの原子数からなるナノサイズの粒子である。この金属ナノ粒子は分子とも固体状態とも異なる特異的な化学・物理的性質を示す。例えば金は山吹色の金属光沢を示すが、ナノ粒子にすることで表面プラズモン共鳴が生起し、鮮やかな赤色を呈するようになる。また、その色彩は粒子の大きさや形に依存して変化する。さらには、金ナノ粒子は酸化還元反応において触媒としても働くため、センシング材料や触媒として様々な分野への応用が期待されている。

金属ナノ粒子の製法は様々な方法があるが、金属イオンを還元し、その凝集制御によってナノ粒子を製造する化学法が高精度で簡便なことから多く利用されている。しかし、ナノ粒子を合成するためには、高濃度かつ高純度な金属イオンを必要とするため、他金属などの不純物を含む水溶液から目的の金属ナノ粒子を製造することは難しい。

また、近年では金ナノ粒子の表面に生体分子を固定することで、金ナノ粒子特有の分光学的性質と生体分子の特異性を組み合わせたバイオマテリアルが注目されている。例えば、抗体を固定した金ナノ粒子は特定の抗原を検出するセンサーとして働くため、妊娠判定キットなどへ実用化されている。しかしながら、抗体のような変性しやすいタンパク質を金ナノ粒子に固定化する場合、抗体固有の構造・機能を損なうことなく、安定性や配向性を制御しながら固定することは困難であるため、新しい固定化手法が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、稀少性から安定確保が問題となっている貴金属を産業廃棄物からリサイクルすることで、環境保全および資源の有効利用を行うことである。特に、貴金属を回収するだけでなく、さらにナノテクノロジーへと応用するため、ナノ粒子として資源化する。具体的には配位子と界面活性剤からなる混合逆ミセルを用いて、溶媒抽出法により貴金属を選択的に回収する。さらに、逆ミセルによって形成されるナノスケールの内核水相をナノ反応場として利用し、抽出された金属をナノ粒子化する。

また、バイオセンサーへの応用を視野に入れ、金ナノ粒子の合成とタンパク質の固定化を同時に行う新手法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) 混合逆ミセルを用いた模擬工業用廃液からの金の抽出分離とナノ粒子資源化

廃液から金をリサイクルする場合、他に含まれる多種金属との分離を効率よく行う抽出プロセスを構築しなければならない。特に貴金属は高濃度の塩酸溶液中でクロロアニオン種として存在するため、貴金属間の分離が重要となる。ここでは金メッキ工場の模擬廃液として  $\text{AuCl}_4^-$ 、 $\text{PtCl}_6^{2-}$ 、 $\text{PdCl}_4^{2-}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  合計7種の金属を含む塩酸水溶液を用いた。抽出剤は非イオン性三座配位子である *N,N,N',N'*-tetra(*n*-octyl)diglycolamide (TODGA)を用いた。一方、溶媒抽出法を用いた金ナノ粒子の合成法として Brust 法が知られるが、これに使用されるカチオン性抽出剤 tetraoctylammonium bromide (TOAB)を用いた抽出を行い、両者を比較した。それぞれの抽出剤の構造を図1に示す。水相中に含まれる各金属イオン濃度をそれぞれ ICP-MS を用いて測定し、抽出率(=  $[\text{M}^{n+}]_{\text{org}}/[\text{M}^{n+}]_{\text{ini}} \times 100$ )、分配比(=  $[\text{M}^{n+}]_{\text{org}}/[\text{M}^{n+}]_{\text{aq}}$ )を算出した。

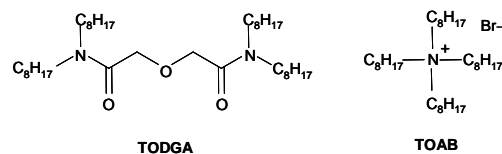


図1 抽出剤の構造と略号

また、金ナノ粒子の合成法として逆ミセル法を検討した。具体的には図2に示すように、アニオン性界面活性剤 AOT と TODGA で混合逆ミセルを形成させ、水相から金イオンを抽出することで逆ミセル中に形成されるナノサイズの水滴 (water pool) の中に金イオンを閉じこめる。次に有機相を分取し、還元剤であるヒドラジンを滴下する。この時、ヒドラジンは水溶性であるため、逆ミセルの water pool の中に取り込まれ、速やかに金イオンを

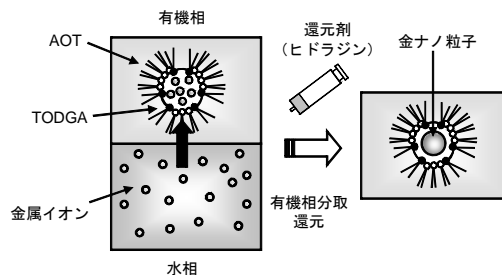


図2 混合逆ミセル法を用いた金ナノ粒子の合成

還元する。その結果、還元された金原子が凝集し、ナノ粒子を形成するが、逆ミセルによって保護されているのでナノ粒子間の凝集が抑制される。

検討した内容は以下の通りである。

- ① 模擬工場廃液からの金の選択的抽出
- ② 塩酸および抽出剤濃度依存性
- ③ 金ナノ粒子の合成

## (2) 金結合性ペプチド融合タンパク質を用いたタンパク質固定化金ナノ粒子のワンポット合成

金ナノ粒子を温和な条件で合成し、同時にタンパク質の固定化を行う手法を考案した。具体的には、抗体結合タンパク質 ZZ domain、保護タンパク質 thioredoxin、金結合性 A3 ペプチドを融合したタンパク質 (ZZ-Trx-A3) を遺伝子改変により調製した。所定濃度の ZZ-Trx-A3 を HEPES 緩衝液、HAuCl<sub>4</sub> 水溶液と混合することにより金ナノ粒子の合成と金ナノ粒子への ZZ domain の固定化を行った。得られた ZZ domain 固定化金ナノ粒子について、UV-vis、DLS、TEM 測定を行い、金ナノ粒子の物性と形状の評価を行った。この反応スキームを図 3 に示す。

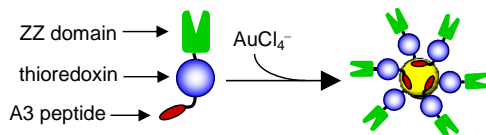


図 3 金ナノ粒子の合成スキーム

## 4. 研究成果

### (1) 混合逆ミセルを用いた模擬工業用廃液からの金の抽出分離とナノ粒子資源化

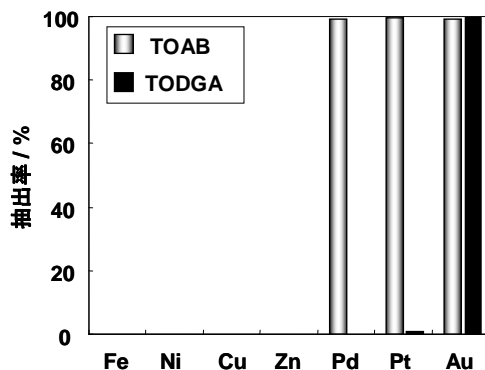


図 4 模擬工場廃液からの各種金属イオンの抽出

#### ① 模擬工場廃液からの金の選択的抽出

TODGA および TOAB を用いた模擬廃液 (AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>, PtCl<sub>6</sub><sup>2-</sup>, PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) からの各種金属イオンの抽出を行った (図 4)。その結果、TOAB 系では 7 種の金属

を含む水相から Pd, Pt, Au イオンを選択的に抽出し、遷移金属との分離が可能であった。しかし、クロロアニオン種として存在する貴金属間の分離が全くできない結果となった。一方、TODGA 系では Au イオンのみを選択的に抽出し、他の金属イオンは全く抽出されないため、1 バッチで分離が可能であることが明らかとなった。

#### ② 塩酸および抽出剤濃度依存性

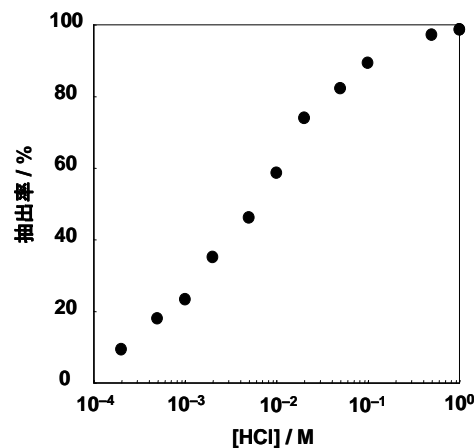


図 5 TODGA を用いた金イオン抽出における塩酸濃度依存性

図 5 は TODGA による金イオンの抽出における塩酸濃度依存性を示す。この結果、塩酸濃度の増加と共に抽出率が増加した。すなわち、TODGA による金イオンの抽出はプロトンと AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> がイオンペアを形成するイオン対抽出機構で抽出が進行していることが示唆された。

また、抽出錯体の化学量論比を解明するために、塩酸濃度依存性および TODGA 濃度依存性に関する Slope 解析を行った (図 6)。その結果、塩酸濃度依存性において塩酸濃度と分配比間の傾きが 1 となり、AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> 1 つが抽出される際に、プロトンが 1 つ関与していることが分かった。一方、TODGA 濃度依存性において TODGA 濃度と分配比間の傾きが 2 となり、AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> と TODGA が 1 : 2 錯体を形成していることが明らかとなった。以上より、TODGA による AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> の抽出平衡式は次式のように表すことができる。



貴金属間の分離が可能である理由は、AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>、PtCl<sub>6</sub><sup>2-</sup>、PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> 中で 1 価のアニオンである AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> がプロトンとのイオン対抽出に有利であるため、選択的に抽出されたものと考えられる。

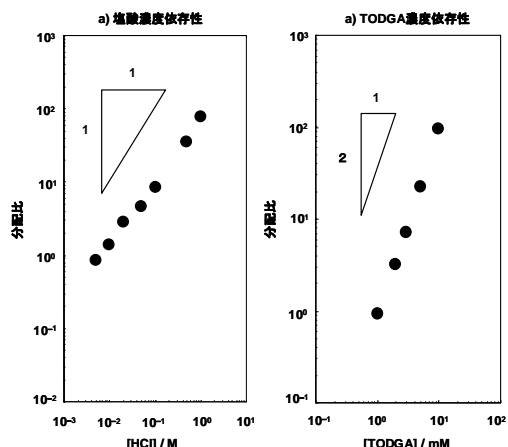


図6 TODGAを用いた金イオン抽出における Slope 解析  
 a) 塩酸濃度依存性 b) TODGA 濃度依存性

### ③金ナノ粒子の合成

TODGAとAOTから構成される混合逆ミセルによって模擬廃液から金イオンを選択的に抽出し、金ナノ粒子の合成を行った。その結果、金イオンを抽出した有機相は薄黄色をしているが、これにヒドラジンを滴下すると赤色へと変化した。これは金ナノ粒子特有の表面プラズモン共鳴に起因する吸収によるもので、金ナノ粒子ができていないことを示す。紫外・可視吸収スペクトルを測定した結果、520 nm の波長に表面プラズモン共鳴に起因する吸収ピークが観測された。また、透過型電子顕微鏡(TEM)により金ナノ粒子を観察したところ、均一で単分散な金ナノ粒子ができており、元素分析の結果、金のみが含まれていることを確認した(図7)。さらに動的光散乱法(DLS)により粒径測定を行った結果、平均粒径が約7 nm であることが分かった。

ここで得られた金ナノ粒子は有機溶媒中で分散状態が非常に安定であり、数ヶ月間経過しても沈殿や凝集が生じない。しかし、未

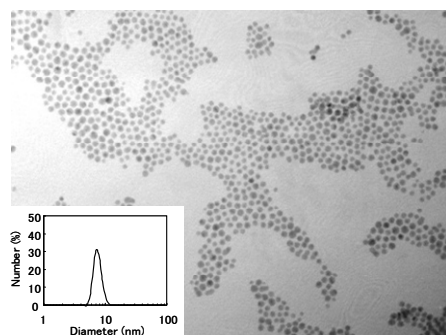


図7 金ナノ粒子のTEM画像  
 挿入図：DLSによる金ナノ粒子の粒径測定

配位のAOTおよびTODGAを取り除くため洗浄操作を行った場合、金ナノ粒子を保護している逆ミセルが壊れ、金ナノ粒子が凝集してしまう。そこで金ナノ粒子の安定性を増加させるため、Au-S結合によって強い保護作用を示すアルカンチオールを逆ミセルに保護された金ナノ粒子分散液に添加した。その結果、金ナノ粒子を安定化する保護剤が逆ミセルからアルカンチオールへと置換され、洗浄操作を行った後でも平均粒径が約7 nmの単分散な金ナノ粒子を得ることができた。

### (2) 金結合性ペプチド融合タンパク質を用いたタンパク質固定化金ナノ粒子のワンポット合成

A3ペプチドは金に対して高い結合能を有するペプチドである。このA3ペプチドをタンパク質に遺伝子改変により導入し、温和な条件で金ナノ粒子の合成とタンパク質の固定化をワンポットで行う手法を検討した。図8に融合タンパク質ZZ-Trx-A3を用いた金ナノ粒子の合成における反応溶液のpHの影響を示す。その結果、酸性条件では赤色の水溶液が得られ、525-530 nmに金ナノ粒子特有の表面プラズモン共鳴に起因する吸収バンドが観測された。酸性条件の中ではpH 4.0のHEPESを用いた時、最も短波長(525 nm)に吸収バンドが観測された。一方、pH 6.5のHEPESを用い場合は金ナノ粒子が得られず、沈殿が生じた。さらにpHを大きくすると水溶液は青色に変化し、吸収スペクトルは大きく長波長側にシフトした。pH 4.0およびpH 8.0で合成した金ナノ粒子のTEM観察を行ったところ、pH 4.0では単分散の金ナノ粒子(4.4 ± 1.6 nm)が得られ、一方、pH 8.0では金ナノ粒子の凝集体(56.7 ± 10.5 nm)が得られた。さ

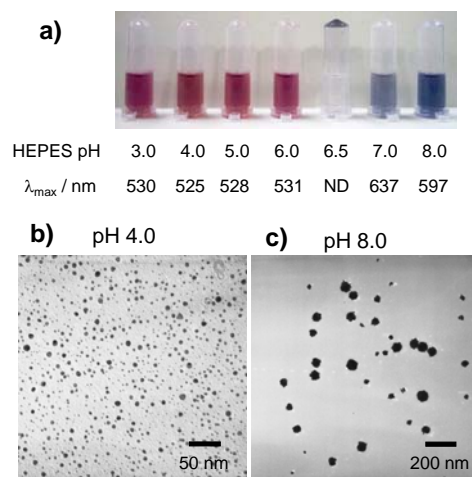


図8 融合タンパク質ZZ-Trx-A3を用いた金ナノ粒子の合成におけるpHの影響  
 a) 金ナノ粒子水溶液の外観 b) TEM画像(pH 4.0) c) TEM画像(pH 8.0)

らに、DLS による粒径測定を行ったところ、平均粒径はそれぞれ  $21.4 \pm 3.2$  nm (pH 4.0)、 $74.3 \pm 13.4$  nm (pH 8.0)であり、金ナノ粒子コアが ZZ-Trx-A3 によって被覆されていることを確認した。

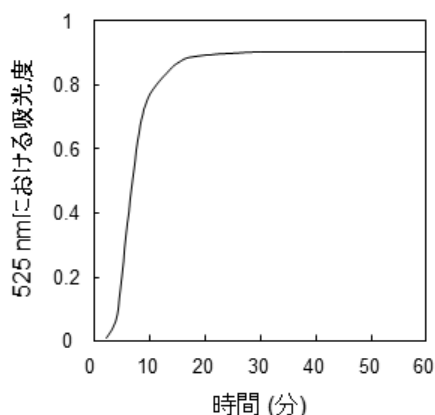


図9 金ナノ粒子合成における経時変化

さらに、最適条件 (pH 4.0, [HEPES] = 10 mM) において、金ナノ粒子の合成を行い、その経時変化を測定した (図9)。その結果、時間と共に吸光度の増大と短波長側へのシフトが観測され、反応が20分間で終了することが明らかとなった。通常の手法で金ナノ粒子の合成とタンパク質の固定化を行う場合、最低数日間を要するため、本手法は簡便かつ迅速な方法であり、高い優位性を有することが示された。

また、合成した金ナノ粒子を6ヶ月保存し、UV-vis 測定およびDLS 測定を行ったところ、全く変化が起こっておらず、凝集することなく安定に長期間保存できることが明らかとなった。

さらに、金ナノ粒子に固定された抗体結合タンパク質 ZZ domain を足場にするだけで、金ナノ粒子水溶液に抗体を加えるだけで、配向性を制御しながら抗体を金ナノ粒子に固定することを可能にした。

## 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1件)

① K. Shimojo, T. Niide, T. Taguchi, H. Naganawa, N. Kamiya and M. Goto  
"Facile, rapid and efficient biofabrication of gold nanoparticles decorated with functional proteins"  
*Analyst*, 137, 2300-2303 (2012), 査読有  
DOI: 10.1039/c2an35172b

[学会発表] (計4件)

① 下条晃司郎、"金結合性ペプチド融合タン

パク質を用いた抗体固定化金ナノ粒子のワンポット合成" 日本化学会第92春季年会、2012年3月26日、慶應大学日吉キャンパス (神奈川県)

② 下条晃司郎、"金結合性ペプチドを用いたタンパク質固定化金ナノ粒子のワンポット合成" 化学工学会第77年会、2012年3月16日、工学院大学 (東京)

③ 下条晃司郎、"希土類元素抽出における簡便かつ高機能性抽出剤 DODGAA の開発" 第27回希土類討論会、2010年5月27日、北九州国際会議場 (福岡県)

④ 下条晃司郎、"ジグリコールアミド酸型抽出剤によるランタノイドの高効率抽出分離" 第28回溶媒抽出討論会、2009年11月20日、大阪大学豊中キャンパス (大阪)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: タンパク質が固定化された金担体およびその製造方法

発明者: 下条晃司郎、長縄弘親、後藤雅宏、神谷典徳

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-013115

出願年月日: 平成24年1月25日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三田村 久吉 (MITAMURA HISAYOSHI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構

原子力基礎工学研究部門 研究員

研究者番号: 80354869

### (2) 研究分担者

下条 晃司郎 (SHIMOJO KOJIRO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構

原子力基礎工学研究部門 研究員

研究者番号: 50414587