

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23540561

研究課題名(和文)アモルファスシリカの溶解速度に及ぼすタンパク質の影響の定量評価

研究課題名(英文)Evaluation of effect of protein on dissolution rates of amorphous silica

研究代表者

河野 元治 (KAWANO, MOTOHARU)

鹿児島大学・理工学研究科・教授

研究者番号：80224814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：地球表層で進行している鉱物の溶解に及ぼす有機分子の影響を明らかにするため、タンパク質およびアミノ酸によるアモルファスシリカの溶解速度に及ぼす影響を検討した。実験方法として、タンパク質およびアミノ酸を含む溶液中(pH4、5、6)でのアモルファスシリカのフロースルー系溶解実験を行った。実験の結果、アモルファスシリカの溶解速度はタンパク質との反応で著しく増大することが確認され、塩基性アミノ酸によるアモルファスシリカとの静電的作用が主な溶解促進作用として寄与していることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Experiment on dissolution of amorphous silica in solutions (pH4, 5, 6) containing BSA and various amino acids including acidic, neutral, and basic amino acids were performed to evaluate the effect of organic molecules on dissolution of minerals in the earth's surface environments. Results indicated that BSA greatly enhanced the dissolution rate of amorphous silica. Basic amino acids also exhibited stronger enhancement effect relative to neutral and acidic amino acids. Therefore, the interaction of basic amino acid residues with the amorphous silica surface are likely to play an important role as rate enhancement mechanism of BSA.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：岩石・鉱物・鉱床学

キーワード：アモルファスシリカ 溶解速度 タンパク質 アミノ酸

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種々の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が、その定量的な評価や分子レベルの反応機構は不明な点が多い。そこで本研究では鉱物の溶解に及ぼす微生物の影響を定量的に評価するための基礎データを得るため、アモルファスシリカを用いた溶解実験を行った。このような問題を明らかにすることは、地球上で進行している生命の関与による物質の進化や地球惑星の特質を明らかにするうえできわめて重要な検討課題である。

2. 研究の目的

微生物細胞から放出される有機分子のうちタンパク質に焦点を絞り、鉱物-タンパク質相互作用による鉱物の溶解速度への影響の定量評価と溶解促進機構を明らかにするため、固相試料としてアモルファスシリカを用いてタンパク質を含む溶液中での溶解実験を行った。なお、アモルファスシリカ-タンパク質相互作用の素反応レベルでの反応機構を明らかにするため、タンパク質を構成する主要アミノ酸を用いた実験も行った。これらの実験結果から、アモルファスシリカの溶解速度に及ぼす各アミノ酸の影響を定量的に評価した。

3. 研究の方法

アモルファスシリカの溶解実験は、フロースルー溶解実験システムを用いて行った。アモルファスシリカ試料は関東化学非晶質シリカ、タンパク質試料は市販試薬のBSA(牛血清アルブミン：分子量=66,000、等電点=pH4.7)、アミノ酸試料も市販試薬の酸性アミノ酸(Cys, Asn)、中性アミノ酸(Ser, Trp, Ala)、塩基性アミノ酸(His, Lys, Arg)を使用した。アモルファスシリカ試料は粉碎後、5-100 μm サイズを分離して共存有機物の分解洗浄を行って実験に使用した。BET法による比表面積値は294 m²/gが得られている。

溶解実験は次の3つの系を基本として行った。反応系 I：タンパク質およびアミノ酸を含まない無機反応系、反応系 II：BSAを用いたタンパク質系、反応系 III：酸性から塩基性の種々のアミノ酸を用いたアミノ酸系。なお、すべての溶解実験の基本条件は、アモルファスシリカ量：0.1g/100ml、反応溶液は0.1mM NaCl、反応溶液の流速：0.05ml/分、反応期間：240時間程度、反応溶液の採取間隔：24時間、温度：25とした。この条件での反応溶液の滞留時間は16.6時間となる。無機反応系での反応では基本条件に加えてpH条件を3~10範囲に調整した反応溶液を用いたフロースルー溶解実験を行った。採取

した反応溶液についてはpHとSi濃度の測定を行い、Si濃度の値から無機反応系での溶解速度(R=mol/m²/s)の算出を行うとともに溶液pHの影響の評価およびpHをパラメータとする速度式を算出した。次に、タンパク質濃度0.01、0.1、1.0 mg/ml、NaCl濃度0.1mMに設定し、pH4、5、6に調整した反応溶液を用いたフロースルー溶解実験を行った。反応条件は無機反応系と同一とした。採取した反応溶液はpHとSi濃度の測定を行い、Si濃度の定常値から溶解速度(R=mol/m²/s)を算出した。最後に、酸性アミノ酸(Cys, Asn)、中性アミノ酸(Ser, Trp, Ala)、塩基性アミノ酸(His, Lys, Arg)を用いた溶解実験を行った。アミノ酸濃度は10.0mMとし、溶液pHはタンパク質系と同様の値に設定してフロースルー系での反応を行い、Si濃度の定常値からアモルファスシリカの溶解速度を算出した。

4. 研究成果

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日ではほぼ定常値を示した。定常期間でのSi濃度は溶液pHおよび溶液中のNa濃度に依存した上昇が認められ、この期間のSi濃度を用いて溶解速度を算出した結果、無機反応系でのアモルファスシリカの溶解速度は溶液pHおよびNa濃度の上昇に伴い一次関数的に増大することが確認された(Fig.1)。

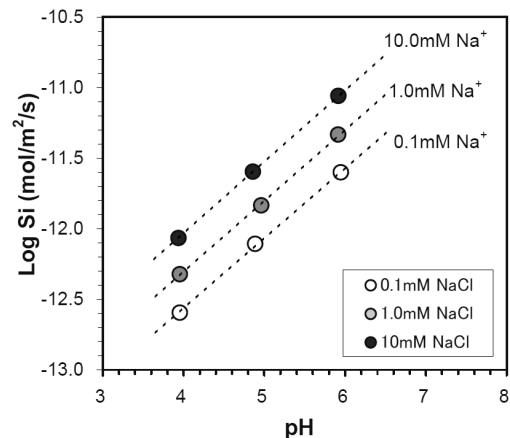


Fig.1 Dissolution rates of amorphous silica in 0.1, 1.0, and 10.0 mM NaCl at different solution pH of 4, 5, and 6.

なお、各Na濃度条件下での溶解速度式としては、次の結果が得られている。

$$R = 10^{-14.56} (aH^+)^{-0.498} \quad (1)$$

$$R = 10^{-14.33} (aH^+)^{-0.501} \quad (2)$$

$$R = 10^{-14.07} (aH^+)^{-0.501} \quad (3)$$

式(1)、(2)、(3)は各々Na濃度0.1、1.0、10.0 mM条件下での溶解速度を表している。

BSAを含むタンパク質系での溶解実験では、

BSA 濃度の上昇に伴う溶解速度の増大が認められた。このような BSA による溶解速度の増大効果は溶液 pH の低下により、一層大きく作用することが確認された(Fig.2)。例えば、BSA 濃度 1.0 mg/ml の場合、無機系に対する溶解速度の増大量は、1.6 倍(pH6)、5.8 倍(pH5)、10.9 倍(pH4)の値が得られ、低 pH 条件でより大きな溶解速度の増大効果が現れることが明らかとなった(Table 1)。

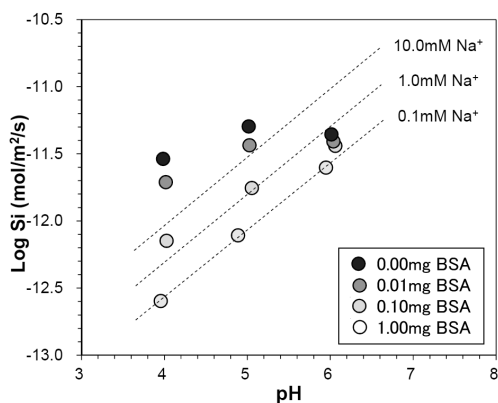


Fig.2 Dissolution rates of amorphous silica in solutions containing 0.01, 0.1, and 1.0 mg BSA at different solution pH of 4, 5, and 6.

Table 1. Dissolution rate of amorphous silica in solutions containing BSA.

Sample	pH	BSA(mg/ml)	Log Rate
A0	5.95	0.00	-11.60
A1	6.06	0.01	-11.44
A2	6.04	0.10	-11.41
A3	6.01	1.00	-11.35
B0	4.89	0.00	-12.11
B1	5.05	0.01	-11.75
B2	5.03	0.10	-11.44
B3	5.02	1.00	-11.30
C0	3.96	0.00	-12.59
C1	4.03	0.01	-12.14
C2	4.02	0.10	-11.71
C3	3.98	1.00	-11.54

次に、アミノ酸を用いた溶解実験では Table 2 に示す溶解速度値が得られた。これらの結果は塩基性アミノ酸と酸性および中性アミノ酸では溶解速度に対する影響に大きな違いがあることを示している。すなわち、塩基性アミノ酸では溶液 pH の変化に関わらず 5~7 倍程度の溶解速度の増大が認められ、塩基性アミノ酸は著しい溶解速度の増大作用を持つことが確認された。一方、酸性および塩基性アミノ酸は、pH6 では溶解速度の増大は認められず、pH の低下に伴って溶解速度の僅かな増大が認められ、アモルファスシリカの溶解速度に対する影響がきわめて小さいことが確認された(Fig.3)。

Table 2. Dissolution rate of amorphous silica in solutions of 10 mM amino acids.

Amino acids	pH	Log Rate
Cys	6.09	-11.52
Asn	5.93	-11.62
Ser	5.96	-11.61
Trp	5.95	-11.61
Ala	6.11	-11.50
Thr	6.04	-11.50
His	6.06	-10.99
Lys	6.09	-10.95
Arg	6.15	-10.82
Cys	5.07	-11.99
Asn	5.15	-11.92
Ser	5.05	-11.93
Trp	5.02	-11.96
Ala	4.98	-11.93
Thr	5.06	-11.77
His	5.02	-11.33
Lys	5.03	-11.37
Arg	5.07	-11.23
Cys	3.86	-12.30
Asn	3.86	-12.34
Ser	3.94	-12.27
Trp	4.06	-12.37
Ala	3.88	-12.42
Thr	3.88	-12.35
His	4.02	-11.96
Lys	3.91	-12.03
Arg	3.91	-12.00

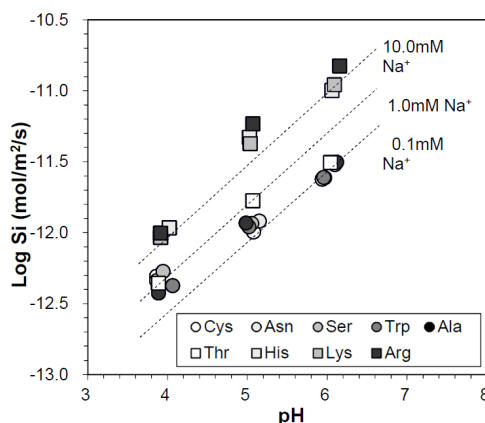


Fig.3 Dissolution rates of amorphous silica in solutions containing 10.0 mM amino acids at different solution pH of 4, 5, and 6.

地球化学コード ChemEQL 計算の結果、今回の溶液 pH 条件(pH4-6)では His、Lys、Arg 等の塩基性アミノ酸は陽イオン、その他のアミノ酸 (Cys、Asn、Ser、Trp、Ala) は中性又は陰イオンとして存在していることが確認された。よって、アモルファスシリカの溶解速度の増大は塩基性アミノ酸の陽イオン化学種とアモルファスシリカ表面の負電荷サイト(>Si-O⁻)との表面錯体形成が大きな因子

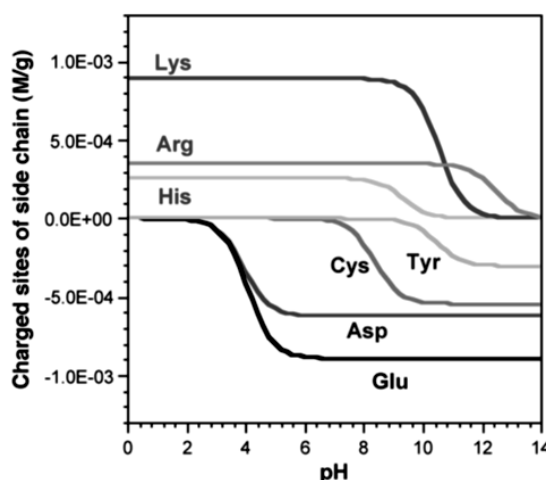


Fig.4 Numbers of side chain charged sites of amino acid residues in BSA molecule.

として機能していることが示唆された。一方 BSA を構成するアミノ酸側鎖の電荷状態を計算した結果、酸性から弱アルカリ性領域で塩基性アミノ酸(Lys, Arg, His)の正電荷発生が確認された(Fig.4)。これらの結果から、BSA によるアモルファスシリカ溶解速度の増大には、BSA を構成する塩基性アミノ酸の正電荷サイトとアモルファスシリカの負電荷サイトとの静電的作用が主な溶解促進メカニズムとして作用しているものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Kawano, M. and Hwang, J. (2011) Roles of microbial acidic polysaccharides in the precipitation rate and polymorph of calcium carbonate minerals. *Applied Clay Science*, 51, 484-490. (査読有)

Kawano, M. and Tomita, K. (2011) Microbial enhancement of the dissolution rates of kaolinite by interaction of heterotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Clay Science*, 15, 33-41. (査読有)

Kawano, M. (2011) Interaction of extracellular proteins on the surface of amorphous silica. *Clay Science*, 15, 139-145. (査読有)

[学会発表](計3件)

河野元治・床次美咲(2013) 炭酸カルシウム鉱物の生成速度および多形に及ぼす有機酸の影響. 第57回粘土科学討論会(9月4日, 高知市).

Kawano, M. (2012) Enhancement of dissolution rate of amorphous silica by interaction with heterocyclic compounds.

2nd Asian Clay Conference, Korea (招待講演)(9月6日, ソウル).

河野元治・島田和哉 (2011) Si含有フェリハイドライトのアミノ酸吸着特性. 第55回粘土科学討論会(9月14日, 鹿児島市)

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・教授

研究者番号：80224814