

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26400519

研究課題名(和文)カオリナイト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)Quantitative evaluation of effect of BSA on the dissolution rate of kaolinite

研究代表者

河野 元治 (Kawano, Motoharu)

鹿児島大学・理工学域理学系・教授

研究者番号：80224814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000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、タンパク質及びアミノ酸によるカオリナイトの溶解速度に及ぼす影響を検討した。実験方法として、タンパク質及びアミノ酸を含む溶液でのカオリナイトのフロースルー溶解実験を行った。実験の結果、カオリナイトの溶解速度はタンパク質との反応で増大することが確認された。アミノ酸との反応では、酸性アミノ酸との反応でより溶解速度の促進が確認された。よって、カオリナイトの溶解速度はカオリナイト表面の正電荷サイトと有機分子の負電荷サイトとの錯体形成により促進されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Experimental dissolution of kaolinite in solutions 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 the dissolution rate of kaolinite was enhanced by the interaction of BSA. Acidic amino acids also exhibited greater enhancement of dissolution rate relative to the neutral and basic amino acids. Therefore, the interactions between positive sites of kaolinite surface and negative sites of organic molecules would be play an important role as rate enhancement mechanism of this experiments.

研究分野：環境鉱物学

キーワード：カオリナイト 有機分子 タンパク質 アミノ酸 溶解速度

1. 研究開始当初の背景

地球物質圏の形成と進化、さらに地球環境の変遷、変動メカニズム、維持機構を地球システムを構成する様々なサブシステムの相互作用として総合的に理解するには、地球物質圏に対する微生物等の生命圏の影響を定量的に評価する必要がある。これまで、鉱物と微生物との相互作用については、主に微生物細胞表面でのイオン濃集や鉱物生成の観点から研究が進められてきた。しかしながら、地球生命圏バイオマスの大部分が存在する地殻表層の風化環境で進行している鉱物-微生物相互作用の定量化や素反応レベルの反応機構、さらに各素反応の反応全体の中での定量的な評価についてはほとんど検討されていない。例えば、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有機分子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、カオリナイトの溶解速度に及ぼすタンパク質やアミノ酸の影響について検討を行った。このような鉱物と有機分子との反応に関する問題は、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

今回の研究では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ことを目的として実験を行った。実験では、鉱物試料としてカオリナイト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、カオリナイト-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反応試薬として用いた溶解実験も行った。これらの実験結果から、カオリナイトの溶解速度に及ぼすタンパク質の影響の定量評価とその反応メカニズムについて検討を行った。

3. 研究の方法

カオリナイトの溶解実験は、フロースルー溶解実験システムを用いて行った。カオリナイト試料はジョージア産カオリナイト(KGa-1)、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アスパラギン酸(Asp:酸性アミノ酸)、アラニン(Ala:中性アミノ酸)、アルギニン(Arg:

塩基性アミノ酸)を使用した。カオリナイト試料は水簸法により、1.0 μm 以下の粒子サイズを分離し、共存有機物の分解洗浄を行って実験に使用した。BET法による比表面積は12.78 m^2/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、アカオリナイト量:0.2g/100ml、反応溶液の流速:0.05 ml/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、溶液pHを3、4、5、6に調整した反応溶液を用い、0.1、1.0、10.0 mM NaClの3種類の塩濃度溶液での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($R=\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)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、0.2、0.05、0.1 mg/ml、NaCl濃度1.0 mM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($R=\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)を算出した。最後に、アミノ酸(Asp、Ala、Arg)を用いた溶解実験を行った。アミノ酸濃度は10.0 mM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濃度の定常値からカオリナイト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の低下に依存して上昇する傾向を示し、この期間のSi

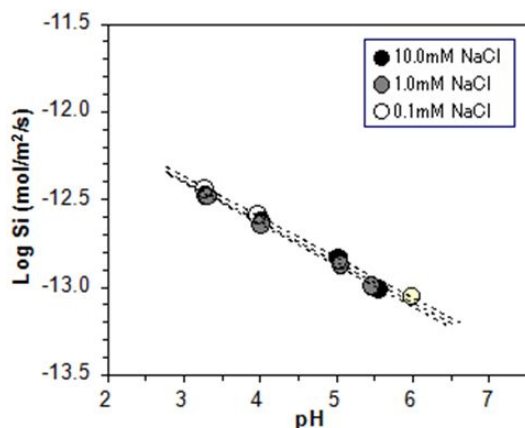


Fig.1 Dissolution rates of kaolinite in 0.1, 1.0, and 10.0 mM NaCl solutions at different pH of 3, 4, 5, and 6.

濃度を用いて溶解速度を算出した結果、無機反応系でのカオリナイトの溶解速度は溶液 pH の低下に伴い一次関数的に増大することが確認された (Fig.1)。なお、溶液中の塩濃度はカオリナイトの溶解速度にほとんど影響しないことも明らかとなった。これらの結果から、各 Na 濃度条件下でのカオリナイトの溶解速度式を算出すると、次の式が得られる。

$$R = 10^{-11.69} (aH^+)^{-0.229} \quad (1)$$

$$R = 10^{-11.71} (aH^+)^{-0.230} \quad (2)$$

$$R = 10^{-11.70} (aH^+)^{-0.235} \quad (3)$$

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 の低下により減少傾向を示し、中性領域においてより大きな溶解速度の増大効果が現れることが確認された (Fig.2)。例えば、BSA 濃度 0.1 mg/ml の場合、無機系に対する溶解速度の増大量は、pH4:1.2 倍、

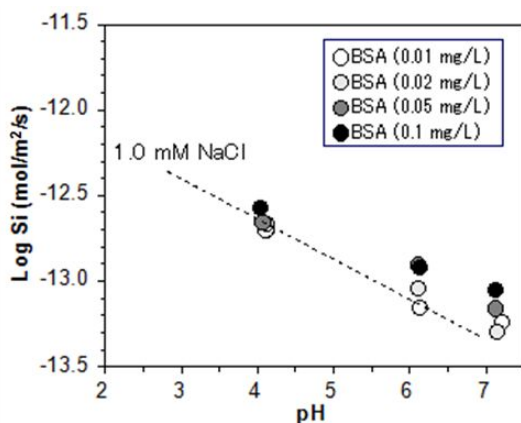


Fig.2 Dissolution rates of kaolinite in solutions containing 0.01, 0.02, 0.05, and 0.1 mg BSA at different solution pH of 4, 6, and 7.

Table 1. Dissolution rate of kaolinite in solutions containing BSA.

Sample	pH	BSA(mg/ml)	Log Rate
A1	7.21	0.01	-13.24
A2	7.15	0.02	-13.29
A3	7.13	0.05	-13.16
A4	7.13	0.10	-13.06
B1	6.13	0.01	-13.15
B2	6.11	0.02	-13.05
B3	6.11	0.05	-12.91
B4	6.14	0.10	-12.92
C1	4.11	0.01	-12.70
C2	4.12	0.02	-12.67
C3	4.06	0.05	-12.66
C4	4.03	0.10	-12.57

pH6 : 1.6 倍、pH7 : 2.0 倍の値が得られている (Table 1)。

次に、アミノ酸を用いたカオリナイトの溶解実験では Table 2 に示す溶解速度値が得られた。これらの結果はアミノ酸による溶解速度への明らかな影響を示しており、酸性アミノ酸の場合に溶解速度へのより大きな増大効果が認められた。すなわち、酸性アミノ酸の Asp では最大 2.7 倍 (pH6.5) ~ 1.5 倍 (pH3.0) の溶解度の増大が認められ、中性付近でより大きな溶解促進効果を示し、酸性領域での溶解促進効果はきわめて小さくなることが確認された (Fig.3)。

地球化学コード ChemEQL によるスペシエーション計算の結果、今回の溶液 pH 条件 (pH4 ~ 7) では Asp は陰イオン性、Ala は中性イオン性、Arg は陽イオン性化学種として存在していることが示唆された。よって、Asp によるカオリナイトの溶解促進作用はカオリナイト表面の正電荷サイト ($>AlOH_2^+$) への Asp 陰イオン化学種の表面錯体形成が主な溶解促進因子として機能しているものと思われる。BSA による溶解促進作用についても、BSA を

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

Amino acids	pH	Log Rate
Asp	6.72	-12.88
Asp	6.52	-12.77
Asp	4.02	-12.47
Asp	2.99	-12.22
Ala	6.53	-13.21
Ala	6.32	-12.86
Ala	3.99	-12.55
Ala	3.01	-12.40
Arg	6.61	-13.17
Arg	6.18	-13.06
Arg	3.98	-12.53
Arg	3.01	-12.31

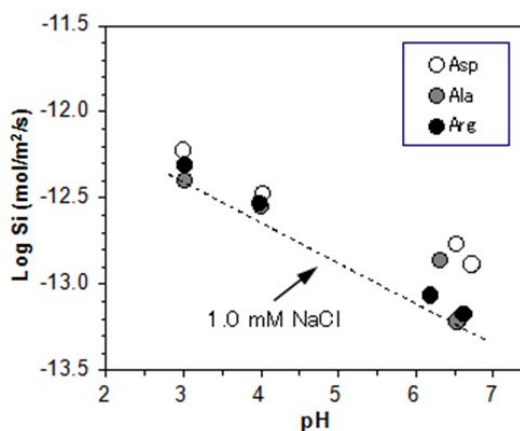


Fig.3 Dissolution rates of amorphous silica in solutions containing 10.0 mM amino acids at different solution pH of 4, 5, and 6.

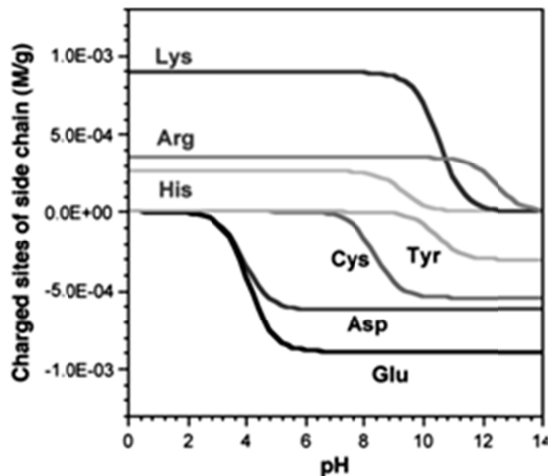


Fig.4 Numbers of side chain charged sites of amino acid residues in BSA molecule.

構成する酸性アミノ酸側鎖とカオリナイト表面との静電結合による溶解促進機構が機能している可能性が想定される。Fig.4 に ChemEQL により計算された BSA 構成アミノ酸側鎖の溶液 pH に対する電荷サイト数の変化を示した。その結果、pH>3 領域で酸性アミノ酸側鎖(Asp, Glu)の負電荷サイトの著しい増大が確認された。これらの酸性アミノ酸側鎖の負電荷サイトとカオリナイト表面の正電荷サイトとの錯体形成の結果、カオリナイトの溶解速度の増大が進行しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

河野元治・Jinyeon Hwang (2016) アロフェンのセシウム及びヨウ素酸イオン吸着に及ぼす Fe 沈着の影響. 第 60 回粘土科学討論会 (9 月 16 日, 福岡県福岡市)

河野元治・Jinyeon Hwang (2015) 南九州に産するアロフェンのセシウム及びヨウ素酸イオン吸着特性. 第 56 回粘土科学討論会 (9 月 4 日, 山口県山口市)

河野元治・高岩みか (2014) 火山灰土壌のセシウムおよびヨウ素吸着に及ぼす腐植酸の影響. 第 58 回粘土科学討論会 (9 月 26 日, 福島県福島市)

河野元治・Jinyeon Hwang (2014) 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. 2014 年日本鉱物科学会年会 (9 月 18 日, 熊本県熊本市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 元治 (KAWANO MOTOHARU)
鹿児島大学・理工学域理学系・教授
研究者番号: 80224814