

2017年度 科学技術共同研究センター 研究プロジェクト実績報告書

課 題	ペプチドを利用する異種金属イオン存在下からの金の選択的回収効率の評価
研究組織	富崎 欣也（理工学部・教授） 研究代表者 浅野 昌弘（理工学部・講師）
研究期間	1年研究

1. 2017年度の研究計画

申請者らは、異種金属イオン存在下からペプチドを用いて金を選択的に回収するプロセスについて研究開発を行っている。本研究では、金回収における効率を定量的に評価することを目的として下記に取り組んだ。本研究成果は、産業廃棄物からの段階的・選択的な希少金属回収法技術開発の基礎となりうる。

- ① 金イオンを選択的に還元鉱物化するペプチドの大量合成。
- ② ペプチドを用いる異種金属イオン存在下からの金選択的回収プロセスのスケールアップ。
- ③ ICP 発光分析法による反応溶液中の残留金属イオン濃度定量法の検討。
- ④ 金選択的回収プロセスにおける定量的な金回収効率評価（研究期間中の最終目標）。

2. 研究実績の概要(研究経過と成果)

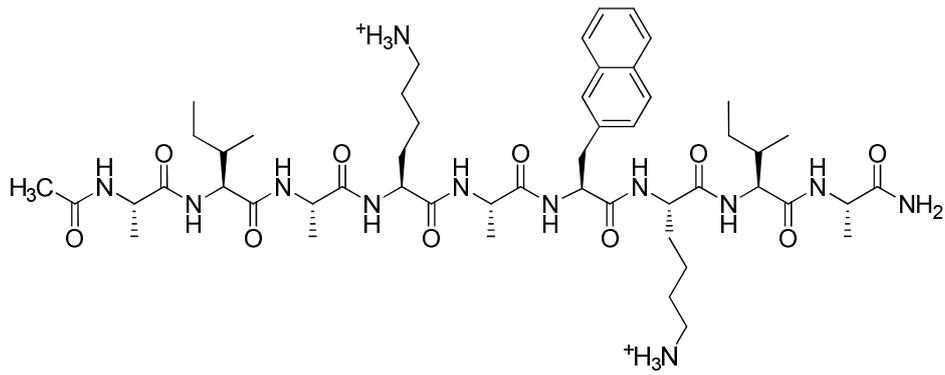
【緒言】

製鉄プロセスにおいて副生する鉄鋼スラグ等の産業廃棄物中にごく少量含まれる希少金属回収について、省資源・環境保全の観点から、簡便・低エネルギー・低コスト・低環境負荷な回収技術の開発が望まれる。申請者らは、希少金属のうち金に焦点を当て、金イオンの選択的還元鉱物化による鉄鋼スラグからの希少金属回収に関する技術開発に向けて既に研究に着手しており、現在、金イオンを選択的に還元し鉱物化できるペプチドが獲得されつつある。

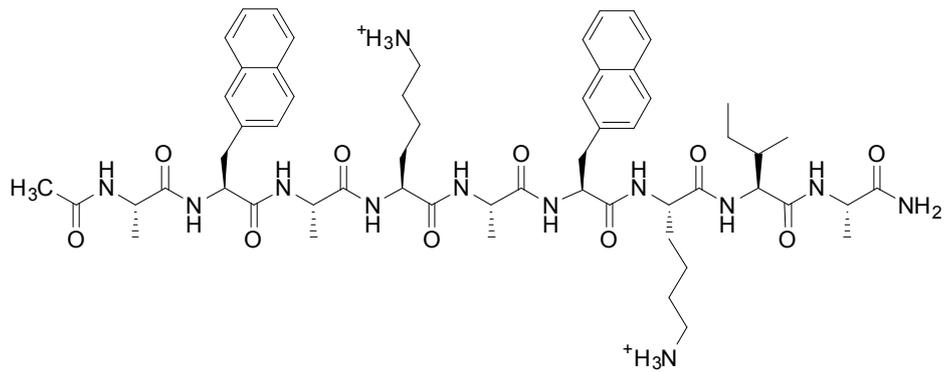
本研究課題では、それらペプチドを大量合成し、異種金属イオン（ここでは塩化白金酸）存在下において、金前駆体である塩化金酸の選択的還元鉱物化によって金を選択的に回収する方法の効率を定量的に評価することで、将来的には、産業廃棄物中からイオン化傾向の小さい金属元素から段階的・室温・バッチ式で分離回収することにより、産業廃棄物の利用価値の向上を目指すことを目的とした。

【実験】

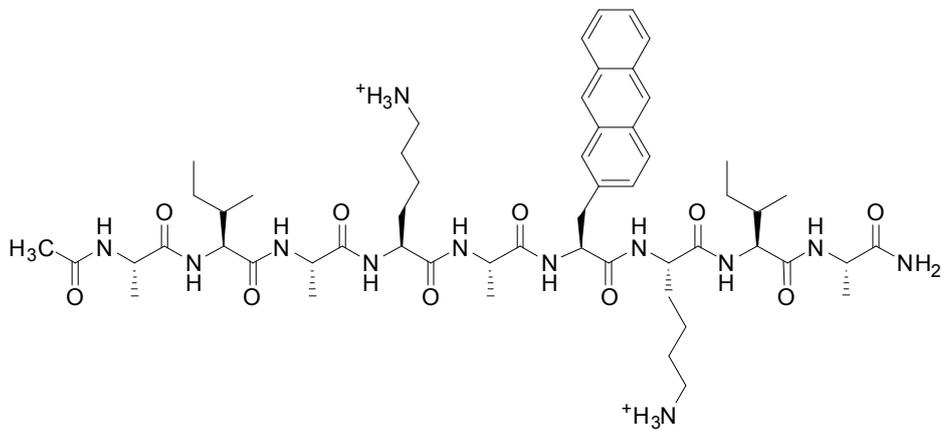
本研究では、塩化金酸と塩化白金酸の混合物から選択的に金を還元析出させるため、9アミノ酸から構成される自己組織化ペプチド RU006 (Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂, 2Naf = 2-naphthylalanine, Fig. 1)、[2Naf²]-RU006 (Ac-A-2Naf-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂, Fig. 2) および[2Ant⁶]-RU006 (Ac-A-I-A-K-A-2Ant-K-I-A-NH₂, 2Ant = 2-anthrylalanine, Fig. 3) の利用を検討した。RU006 および[2Naf²]-RU006 は、それぞれ1つまたは2つの2-ナフチルアラニンを含む。一方、[2Ant⁶]-RU006 は、前出の2つのペプチドとは異なり、2-ナフチルアラニンよりも還元力の強い2-アンスリルアラニンを配置した。これらのペプチドの疎水性表面には、ペプチドが自己集合する際に塩化金酸イオンを集合体内部に取り込み効率的に金イオンを還元することを期待して、正電荷を有するリシン残基を配置した。ペプチドは固相合成法により大量合成し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) により精製、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOFMS) により同定した。



(Fig. 1) RU006 のアミノ酸配列。



(Fig. 2) [2Naf²]-RU006 のアミノ酸配列。



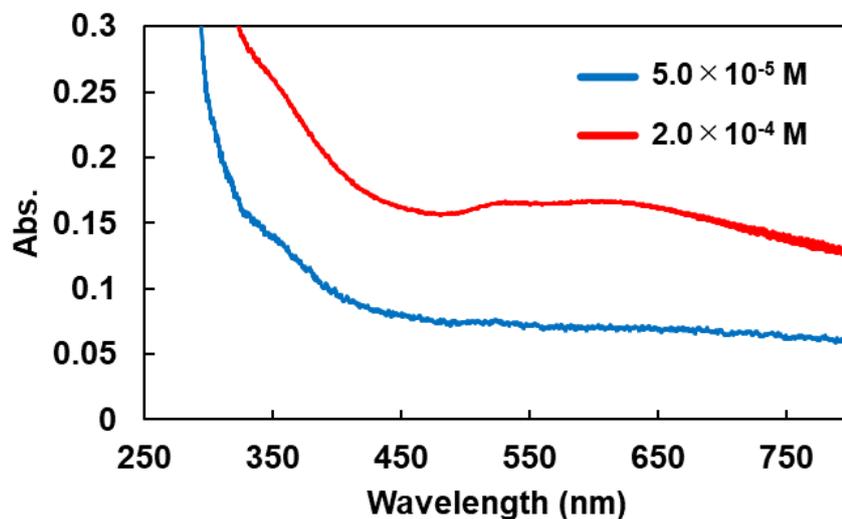
(Fig. 3) [2Ant⁶]-RU006 のアミノ酸配列。

ペプチド水溶液を 50℃で 2 分超音波処理することでペプチドを分散させ、水溶液をコスモスピンフィルターでろ過し、大きい粒子を除去した。得られたペプチド水溶液に、塩化金酸と塩化白金酸の混合水溶液 (Mix) をそれぞれ等量ずつ加え攪拌し、40 °Cで 1 日間反応させた (終濃度 : [Peptide] = 5.0×10⁻⁵ M または 2.0×10⁻⁴ M, [HAuCl₄] = [H₂PtCl₆] = 5.0×10⁻⁵ M)。反応溶液を UV-Vis 吸収スペクトルより反応進行度を評価し、その溶液を用いて透過型電子顕微鏡 (TEM) 試料を作製した。その後、反応溶液を遠心分離により上清と沈殿物に分離し、得られた沈殿物を、エネルギー分散型 X 線分析を装備した電界放出型走査型電

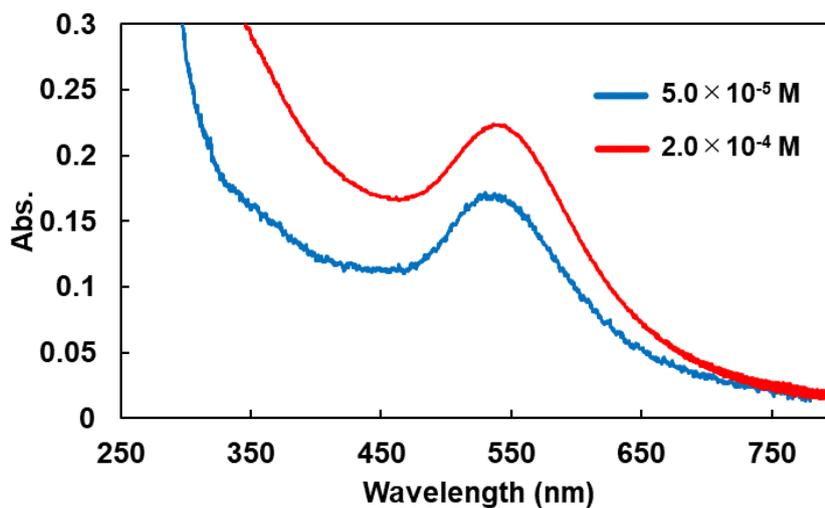
子顕微鏡 (FE-SEM-EDS) 試料とすることで、沈殿物の構成元素の特定とそれらの含有率の決定を行った。さらに、上清を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-OES) の試料とすることで、残存貴金属イオンの定量を行い、金および白金それぞれの回収率の定量評価を行った。

【結果と考察】

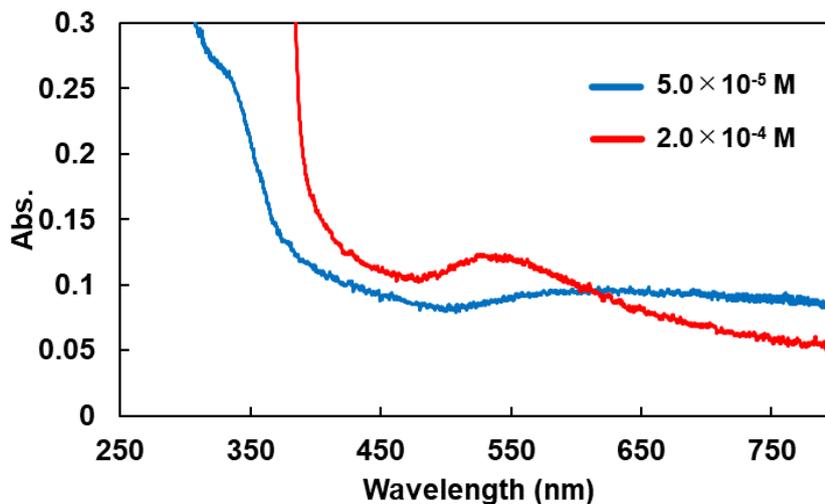
ペプチド水溶液と金属前駆体水溶液とを混合し 1 日間反応させた反応溶液を UV-Vis 吸収スペクトル分析したところ、ペプチドの終濃度が 5.0×10^{-5} M の溶液に比べ、ペプチドの終濃度が 2.0×10^{-4} M の反応溶液では概ね吸光度の上昇がみられた (Figs. 4, 5, and 6)。これは、ペプチドの濃度増加によって金属イオンに対してより多くの電子が供給され、効率よく還元されたためと考えられる。また、 $[2\text{Ant}^6]\text{-RU006} + \text{Mix}$ において、ペプチド濃度 5.0×10^{-5} M と比較すると、ペプチド濃度 2.0×10^{-4} M の反応溶液では 520 nm 付近の金の表面プラズモン共鳴に由来する吸収帯が強く、鋭くなっている。これは、ペプチドの濃度増加による還元力向上により、等方的な球状金ナノ粒子がより多く生成していることが原因ではないか考えられる。



(Fig. 4) RU006 + Mix 反応溶液の吸収スペクトル。

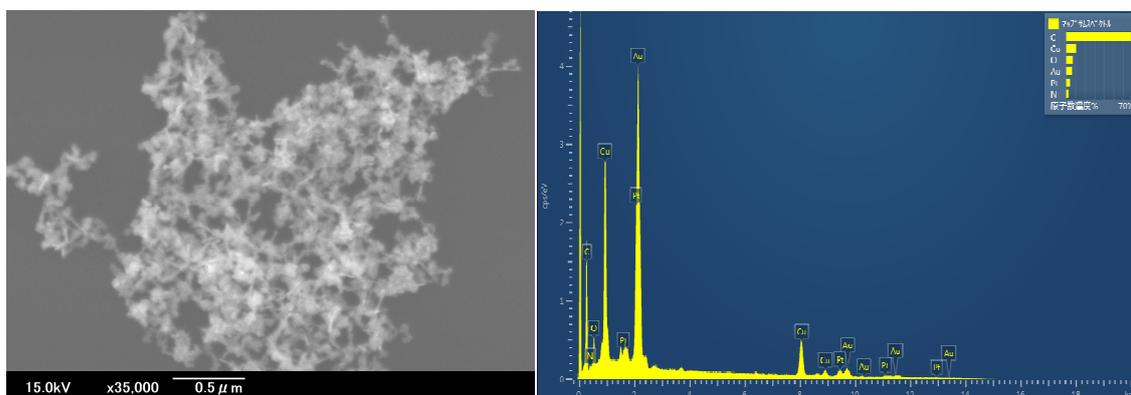


(Fig. 5) $[2\text{Naf}^2]\text{-RU006} + \text{Mix}$ 反応溶液の吸収スペクトル。

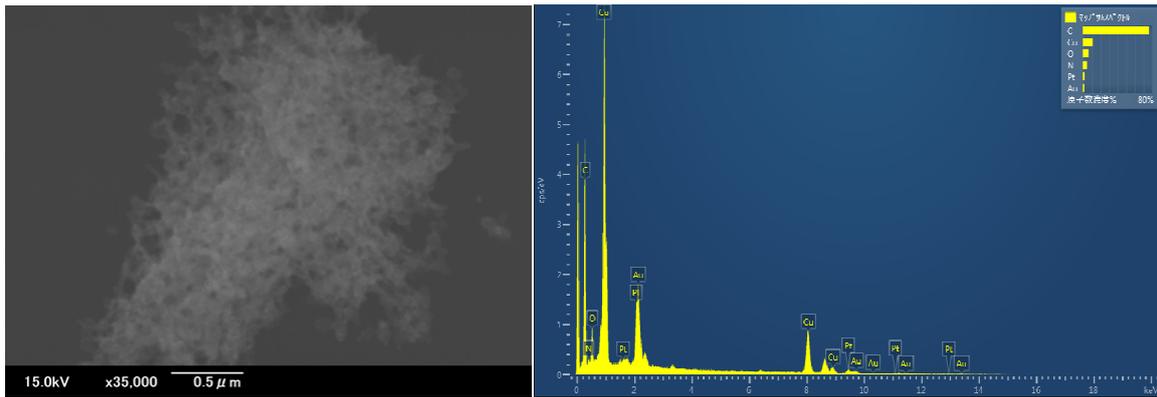


(Fig. 6) [2Ant⁶]-RU006 + Mix 反応溶液の吸収スペクトル。

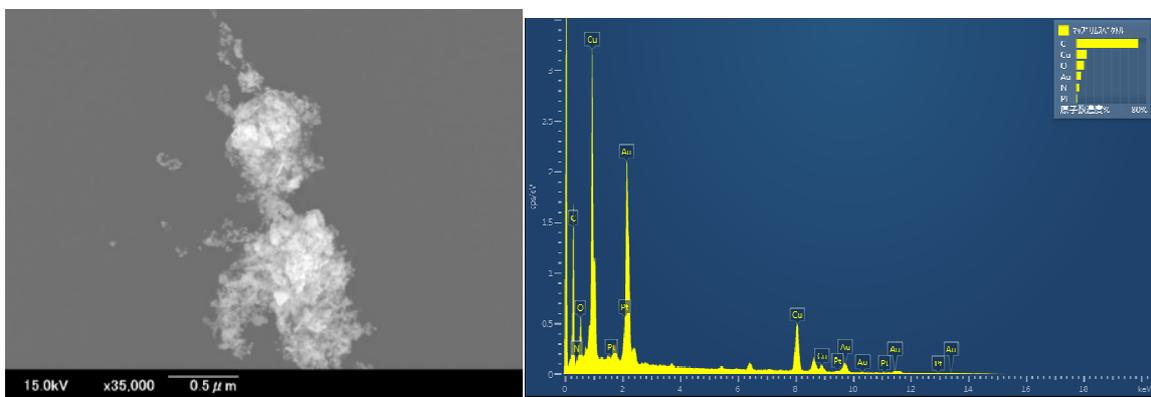
次いで、反応溶液（終濃度：[Peptide] = 2.0×10^{-4} M、[HAuCl₄] = [H₂PtCl₆] = 5.0×10^{-5} M）を遠心分離により上清と沈殿物に分離し、得られた沈殿物を FE-SEM-EDS 分析を行った。RU006 + Mix 反応溶液から得られた沈殿物について FE-SEM-EDS 分析を行ったところ、アスペクト比の大きいリボン状生成物の凝集が確認され、それらリボン状生成物の Au/Pt 原子数比は 2.2 ± 0.2 であった (Figs. 7 and 10、Cu メッシュ上での分析のため、Cu のピークが見られる)。また、[2Na⁺]-RU006 + Mix 反応溶液から得られた沈殿物の FE-SEM-EDS 分析では、アスペクト比の小さい等方的な球状粒子の凝集がみられ、それらの Au/Pt 原子数比は、 1.1 ± 0.2 であった (Figs. 8 and 10)。さらに、[2Ant⁶]-RU006 + Mix 反応溶液から得られた沈殿物について FE-SEM-EDS 分析を行ったところ、こちらもアスペクト比の小さい等方的な球状粒子の凝集がみられ、それらの Au/Pt 原子数比は、 7.5 ± 0.2 であった (Figs. 9 and 10)。以上より、沈殿物の FE-SEM-EDS 分析結果を基に元素選択性を評価したところ、[2Ant⁶]-RU006 を用いることで、金イオンを白金イオンに対して約 7.5 倍優位に回収可能であることが分かった。



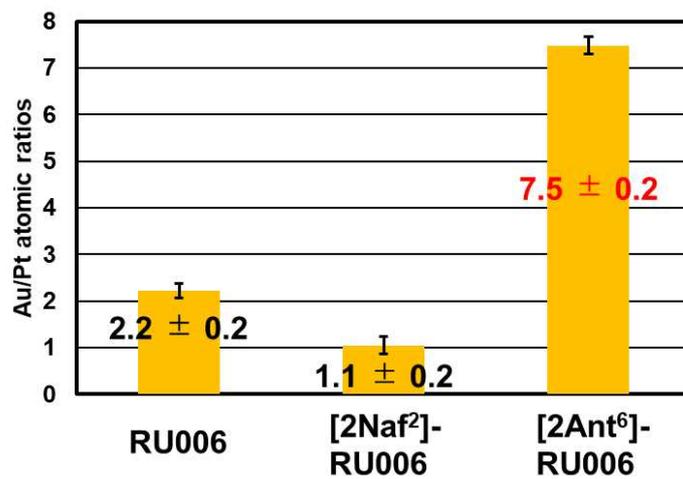
(Fig. 7) RU006 + Mix 反応溶液から得られた沈殿物の FE-SEM-EDS 分析。



(Fig. 8) [2Naf²]-RU006 + Mix 反応溶液から得られた沈殿物の FE-SEM-EDS 分析。

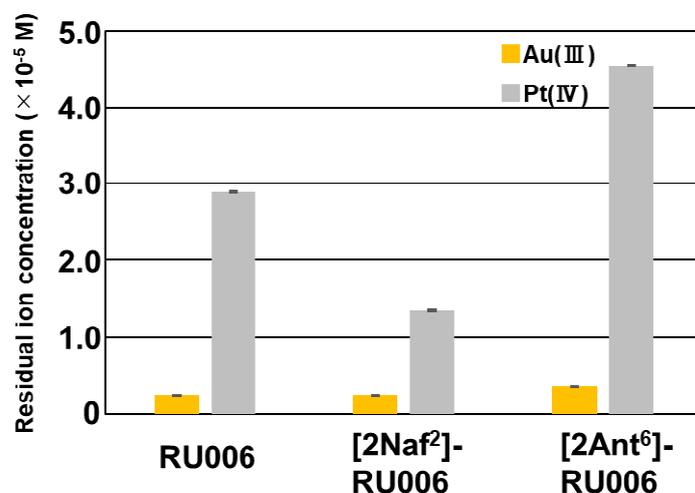


(Fig. 9) [2Ant⁶]-RU006 + Mix 反応溶液から得られた沈殿物の FE-SEM-EDS 分析。

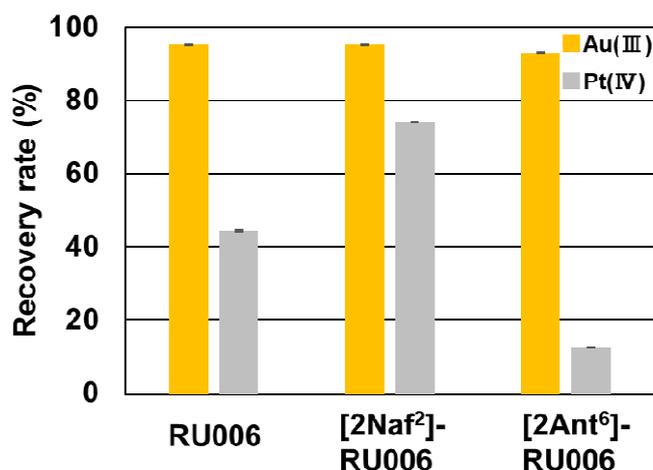


(Fig. 10) Peptide + Mix 反応溶液から得られた沈殿物の FE-SEM-EDS 分析による Au/Pt 原子数比の比較。

更に、反応溶液（終濃度：[Peptide] = 2.0×10^{-4} M、[HAuCl₄] = [H₂PtCl₆] = 5.0×10^{-5} M）を遠心分離により上清と沈殿物に分離し、得られた上清を ICP-OES 分析により定量評価を行った。その結果、すべてのペプチドについて上清に残存する金イオンの濃度は RU006、[2Naf²]-RU006 および [2Ant⁶]-RU006 の順に、 0.25×10^{-5} M、 0.24×10^{-5} M および 0.35×10^{-5} M であった。一方、残存白金イオンの濃度は 2.89×10^{-5} M、 1.35×10^{-5} M および 4.54×10^{-5} M であった (Fig. 11)。これらより、金イオンおよび白金イオンそれぞれの回収率をペプチド毎に計算したところ、RU006 (95.2%, 45.3%)、[2Naf²]-RU006 (95.3%, 74.1%) および [2Ant⁶]-RU006 (93.1%, 12.4%) であった (Fig. 12)。また、これら ICP-OES 分析結果を基に元素選択性を評価したところ、Au/Pt 原子数比は RU006、[2Naf²]-RU006 および [2Ant⁶]-RU006 の順に、2.1、1.3 および 7.5 であり、[2Ant⁶]-RU006 を用いることで、金イオンを白金イオンに対して約 7.5 倍優位に回収可能であることが分かった。これらの結果は、反応溶液から分離した上清および沈殿物を用いて分析した結果が一致しており、容易で再現性の高い回収プロセスであることを示唆している。



(Fig. 11) Peptide + Mix 反応溶液から得られた上清の ICP-OES 分析による残存貴金属イオン濃度の比較。



(Fig. 12) Peptide + Mix 反応溶液から得られた上清の ICP-OES 分析による残存貴金属イオン回収率の比較。

【まとめ】

本研究では、塩化金酸と塩化白金酸の希薄混合溶液 Mix から選択的に金を析出させるため、RU006、[2NaF²]-RU006 および[2Ant⁶]-RU006 の3種のペプチドを用いた。RU006 および[2NaF²]-RU006 の場合、沈殿物の Au/Pt 原子数比は1~2倍で金イオン選択性は大きくなかったが、[2Ant⁶]-RU006 を用いることで、沈殿物の Au/Pt 原子数比が約7.5となり、著しい選択性の向上がみられた。反応溶液の上清を ICP 分析したところ、すべてのペプチドにおいて金イオンの回収率は90%を超えていた。以上より、塩化金酸と塩化白金酸の希薄混合溶液から金イオンを回収する選択性を向上させるには、白金イオンの還元抑制が重要であることがわかった。本研究成果は、産業廃棄物からの段階的・選択的・簡便な希少金属回収法技術開発の基礎となりうると思う。

【謝辞】

本研究は、龍谷大学科学技術共同研究センターの支援のもと実施することができました。この場を借りて感謝申し上げます。

3. 研究発表

【査読付き学術論文、解説、図書、特許】

富崎 欣也

- (1) Tomizaki, K.-Y.; Hamada, Y.; Usui, K. “Editorial, Organic-Inorganic Hybrid Materials and Their Applications” in *Protein & Peptide Letters*, **2018**, *25(1)*, 2–3.
- (2) Tomizaki, K.-Y.; Yamaguchi, Y.; Tsukamoto, N.; Imai, T. “ α -Helical Peptide–Gold Nanoparticle Hybrids: Synthesis, Characterization, and Catalytic Activity” *Protein & Peptide Letters*, **2018**, *25(1)*, 56–63.
- (3) Tomizaki, K.-Y.; Nanbu, R.; Kasuga, M.; Imai, T. “Incorporation of an *N*-Methyl Amino Acid into a Template Peptide Alters Anisotropy in the Crystal Growth of Gold Nanoparticles Synthesized by the Peptide Template Method” *Protein & Peptide Letters*, **2018**, *25(1)*, 48–55.
- (3) Usui, K.; Yokota, S.-I.; Ozaki, M.; Sakashita S.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Modification of the N-Terminus of a Calcium Carbonate Precipitating Peptide Affects Calcium Carbonate Mineralization” *Protein & Peptide Letters*, **2018**, *25(1)*, 42–47.
- (4) Tomizaki, K.-Y.; Kishioka, K.; Kataoka, S.; Miyatani, M.; Ikeda, T.; Komada, M.; Imai, T.; Usui, K. “Non-Covalent Loading of Anti-Cancer Doxorubicin by Modularizable Peptide Self-Assemblies for a Nanoscale Drug Carrier” *Molecules* **2017**, *22*, 1916–1923.

浅野 昌弘

- (1) 浅野昌弘:排水処理装置, 特開 2017-104792, 特許庁 2017

【学会発表（国際学会）】

富崎 欣也

- (1) Kawamoto, K.; Yamasaki, M.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Fabrication of Titanium-Cell Interface by Peptide Nanofibers with Sequences for Titanium Binding and Cell Recognition” The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan, November, 2017 (P-129).
- (2) Uchiyama, T.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Synthesis of Noble Metal Nanoparticles by Peptides Containing Various Aromatic Side Chains under Light Irradiation Conditions” The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan, November, 2017 (P-126).
- (3) Tsukamoto, N.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Synthesis of Fatty Acid Containing Peptides and Their Use for Gold Nanocrystal Synthesis as Templates” The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan, November, 2017 (P-125).

- (4) Yamamoto, T.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Cell Adhesion onto Hydroxyapatite Surface Modified with Collagen Model Peptides with a Phosphate Group and a Cell Recognition Sequence” The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan, November, 2017 (P-124).
- (5) Kasuga, M.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Synthesis of Titania Nanostructures by Silica Etching of Silica-Peptide Complex” The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan, November, 2017 (P-123).
- (6) Okamoto, T.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Selective Recovery of Gold from Mixtures of Noble Metal Ions with Aromatic Ring-Containing Peptides” The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan, November, 2017 (P-122).
- (7) Kataoka, S.; Imai, T.; Usui, K.; Tomizaki, K.-Y. “Complexation of Nucleic Acids and Peptides Tethering a Nuclear Localization Signal for Intracellular DNA Delivery” The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan, November, 2017 (P-121).
- (8) Tomizaki, K.-Y.; Okamoto, T.; Imai, T.; Asano, M. “Selective Precipitation of Gold Nanocrystals from Aqueous Solution Containing Platinum Ion Contaminants by Peptides” The 25th American Peptide Symposium, Whistler, BC, Canada, June, 2017.

浅野 昌弘

- (1) Asano, M.: “Transition of wastewater treatment technology” Keynote lecture for Faculty of Chemistry, Rzeszow University of Technology, Rzeczpospolita Polska, March, 2014

【学会発表（国内学会）】

富崎 欣也

- (1) Uematsu, Y.; Kataoka, S.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Synthesis of Carrier Peptide to Improve Nucleic Acid Release Activity (2PB-117)” 日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）
- (2) Tsukamoto, N.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Effect of surfactant-like peptides on gold nanoparticle synthesis (2PB-116)” 日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）
- (3) Tonoda, T.; Imai, T.; Asano, M.; Tomizaki, K.-Y. “Minimization of peptides that selectively reduce gold ions in the presence of different noble metal ions (2PB-115)” 日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）
- (4) Uchiyama, T.; Imai, T.; Asano, M.; Tomizaki, K.-Y. “Effect of light irradiation on mineralization of noble metal ions by aromatic side chain-containing peptides (2PB-114)” 日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）
- (5) Yamamoto, T.; Yamasaki, M.; Ohyanagi, M.; Tomizaki, K.-Y. “Cell adhesion to hydroxyapatite modified with a collagen model peptide having a phosphate group and a cell recognition sequence (2PB-113)” 日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）
- (6) 春日誠・今井崇人・富崎欣也 「シリカーペプチドナノファイバーを鋳型としたチタニアナノ構造体の合成」3D6-50」日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）
- (7) 河本高志・山崎正幸・青井芳史・富崎欣也 「細胞認識配列(RGD)およびチタン結合配列(HKH)を提示したペプチドナノファイバーを界面とするチタン-細胞結合の評価(3D6-49)」日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）

- (8) 岡本卓也・今井崇人・浅野昌弘・富崎欣也「異種金属イオン存在下における芳香環含有ペプチドを用いた金の選択的回収(3D6-38)」日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）
- (9) 片岡駿佑・臼井健二・山崎正幸・富崎欣也「細胞核指向型ペプチド-プラスミドDNA複合体の合成と赤色蛍光タンパク質発現の試み(3D6-37)」日本化学会第98春季年会、2018年3月、日本大学（船橋市）
- (10) 内山隆博・今井崇人・富崎欣也「種々の芳香環側鎖を含有するペプチドを用いた光照射下における貴金属粒子の合成（2PB-61）」第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月、東京大学（東京都）
- (11) 塚本直幸・今井崇人・富崎欣也「脂肪鎖含有ペプチドの合成と金ナノ粒子合成における鋳型効果（2PB-60）」第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月、東京大学（東京都）
- (12) 山本拓実・今井崇人・富崎欣也「リン酸基および細胞認識部位を有するコラーゲンモデルペプチドの合成と性質(2PB-59)」第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月、東京大学（東京都）
- (13) 河本高志・今井崇人・富崎欣也「チタン結合部および細胞認識部位を有するペプチドナノファイバーによるチタン表面の修飾（2PB-58）」第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月、東京大学（東京都）
- (14) 春日誠・今井崇人・富崎欣也「シリカーペプチド複合体を鋳型とするチタニアナノ構造体の合成（2PB-57）」第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月、東京大学（東京都）
- (15) 岡本卓也・今井崇人・富崎欣也「異種金属イオン存在下における芳香環含有ペプチドを用いる金イオンの選択的還元（2PA-07）」第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月、東京大学（東京都）
- (16) 片岡駿佑・今井崇人・臼井健二・富崎欣也「細胞核薬剤送達機能を有するペプチド-核酸複合体の形成と細胞内取り込み（2PA-06）」第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月、東京大学（東京都）

浅野 昌弘

- (1) 浅野昌弘「工場排水浄化技術の新展開と技術相談-水中プラズマ反応を利用した水処理の新展開」2014年度 第8回 REC BIZ-NET 研究会、2015年2月、龍谷大学（滋賀県）
- (2) 浅野昌弘「水質管理実務講座-水処理技術②(生物処理)」2014年度 龍谷大学 REC イノベーションカレッジ、2014年7月、龍谷大学（大阪府）

4. 本研究課題のキーワード

- (1) ペプチド (2) 自己集合化 (3) 塩化金酸
- (4) 塩化白金酸 (5) 貴金属回収