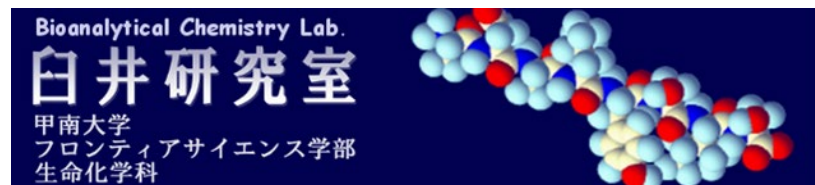


ペプチドを用いた水質浄化、環境測定への挑戦

甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科

バイオ計測化学研究室

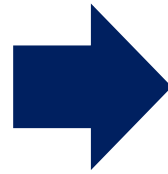
博士後期課程2年生 吉田秀平



生体・環境と有害金属

- ・ 自動車用バッテリー
- ・ 電子基板のはんだ
- ・ 有鉛ガソリン
- ・ 鉛管
- ・ 鉛系塗料

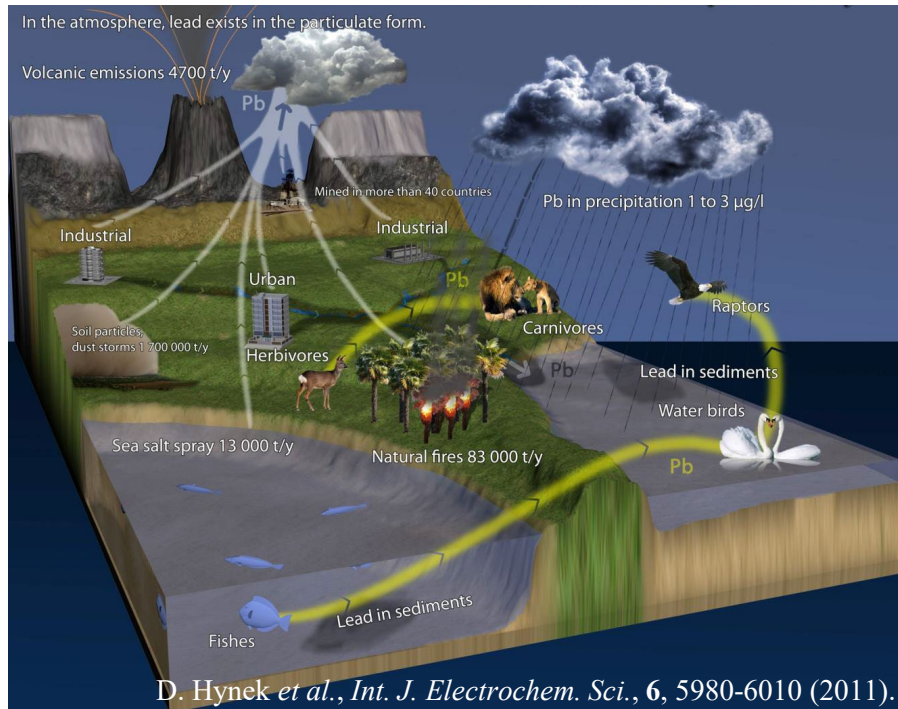
など



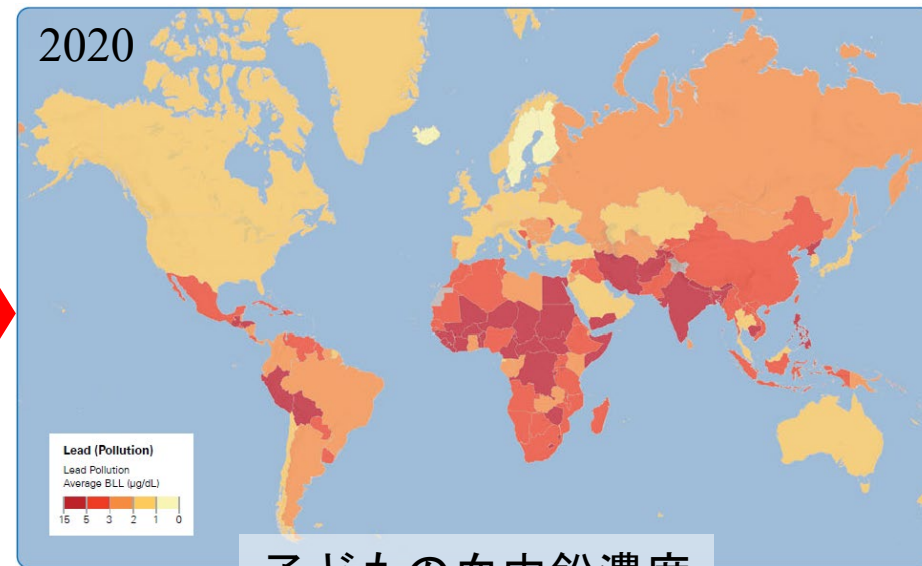
リサイクルの際に環境に放出し
水質・大気汚染が発生

生体調査や環境調査が必要

鉛汚染の輸送サイクル



鉛による健康被害



N. Rees and R. Fuller, *The Toxic Truth: Children's exposure to lead pollution undermines a generation of potential*, New York, 2020.

**鉛汚染が世界的に深刻な問題となっており
環境測定方法の開発が求められている**

鉛の環境測定

ICP-AES測定



日立ハイテクホームページより引用

濾過

大きな不純物の除去

有機物の除去

250°C、強酸条件など

Pbの乾固・溶解

250°Cで溶媒を除去、強酸でPbを溶解

ICP測定

アルゴンガス雰囲気下で測定

測定の問題点

- ・ 有機物の存在下で測定ができない
- ・ 有機物の除去に高温処理や酸分解が必要
- ・ 装置が大型で高価

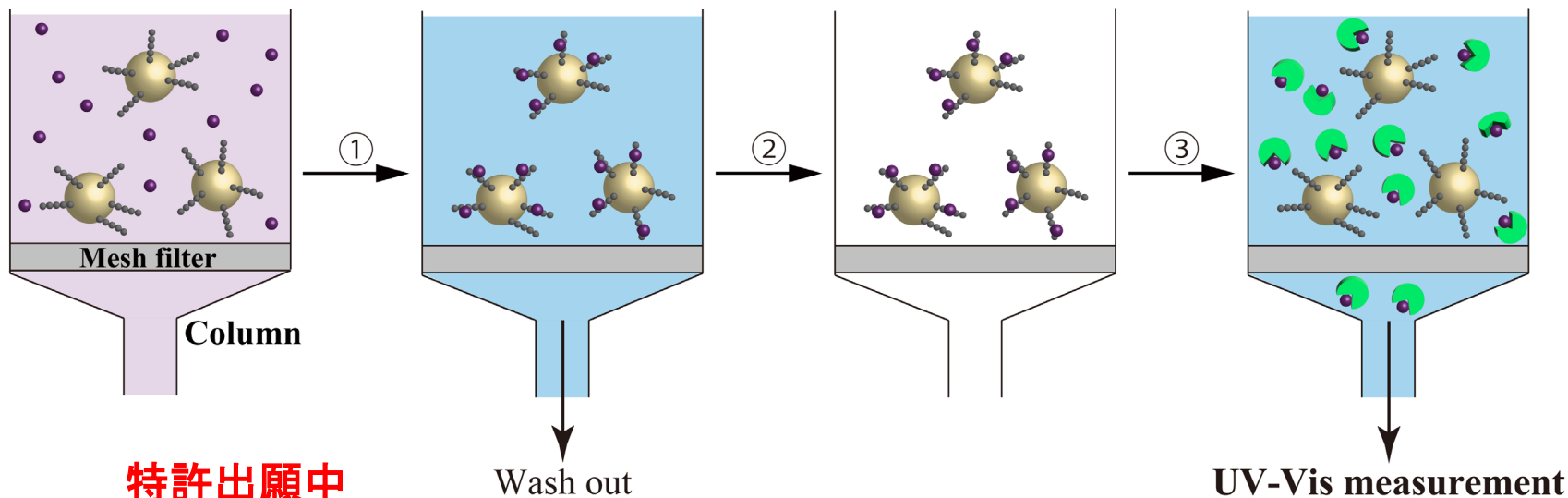


生体サンプルなどに含まれる
鉛イオン (Pb^{2+}) の測定が難しい

汎用性が高く、扱いやすい機器を用いた
 Pb^{2+} の測定方法が求められている

本研究の目的

ペプチド固定化ビーズを用いたPb²⁺の検出



特許出願中

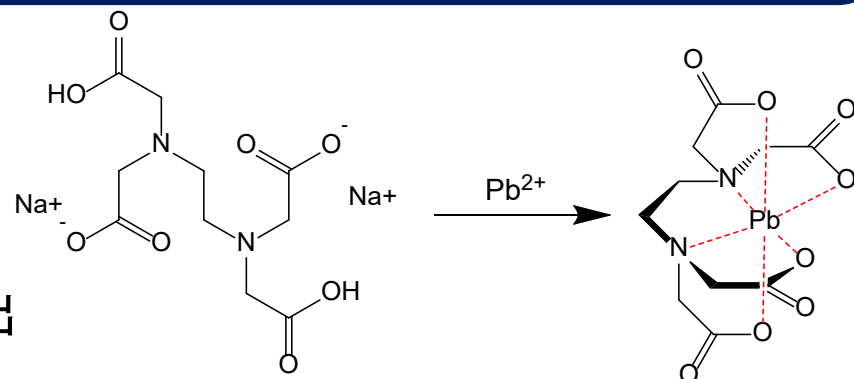
特願 2023-113327 鉛イオン結合用アフィニティ固相
発明者：吉田秀平、臼井健二

● Pb²⁺ ● PbBP-beads ● EDTA

① 溶液からのPb²⁺の分離

② 樹脂の洗浄操作

③ EDTA-Pb (II)を用いたUV吸収による検出



R. Li et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **542**, 379-386 (2019).

**マイクロビーズに固定化したペプチドを用いた
Pb²⁺の選択的な分離とUV吸収による検出・定量を試みた**

Pb²⁺結合ペプチド固定化ビーズの設計

Pb²⁺結合ペプチド

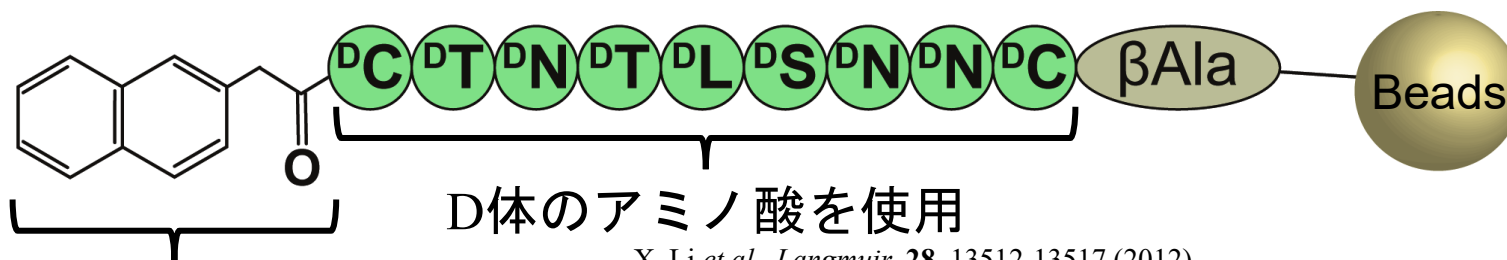


R. Nian et al., *J. Chromatogr. A*, **1217**, 5940-5949 (2010).

Pb²⁺を選択的に結合できることが示されている
ペプチド配列を選定した



PbBP-bead



X. Li et al., *Langmuir*, **28**, 13512-13517 (2012).

R. Tugyi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 413-418 (2005).

分解を防ぐ化学修飾

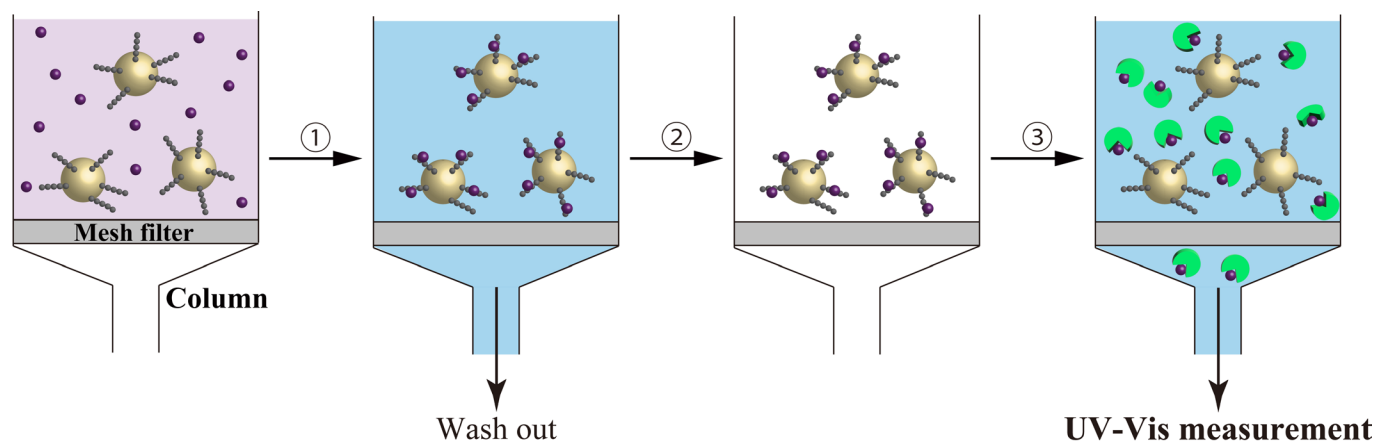
S. He et al., *Acta Biomaterialia*, **164**, 175-194 (2023).

環境中での利用を想定し、ペプチドの分解を防ぐ配列を設計した

Pb²⁺結合ペプチド固定化ビーズを用いてPb²⁺を選択的に分離する

ペプチド固定化ビーズとEDTAを用いた環境水中の Pb^{2+} の検出

Pb^{2+} の検出

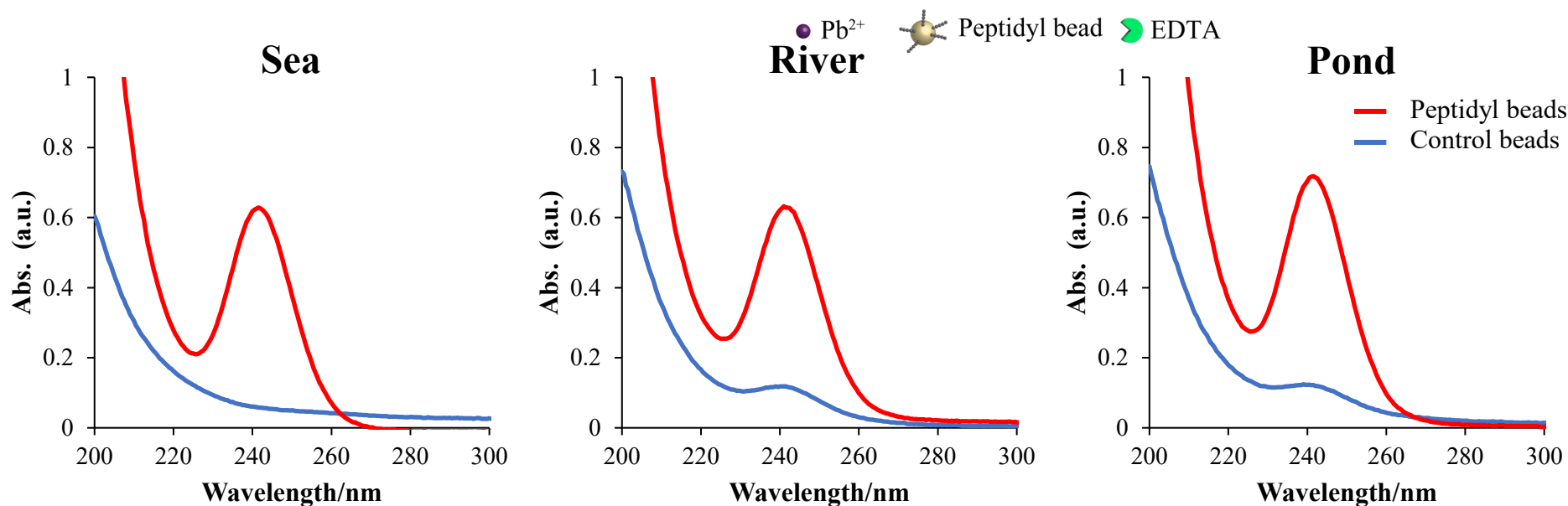


Reaction condition

[PbBP] = 100 μ M
[$Pb(NO_3)_2$] = 100 μ M
[MES (pH 6.0)] = 25 mM
in environmental water.
Incubation for 24 h at r.t..

Detection condition

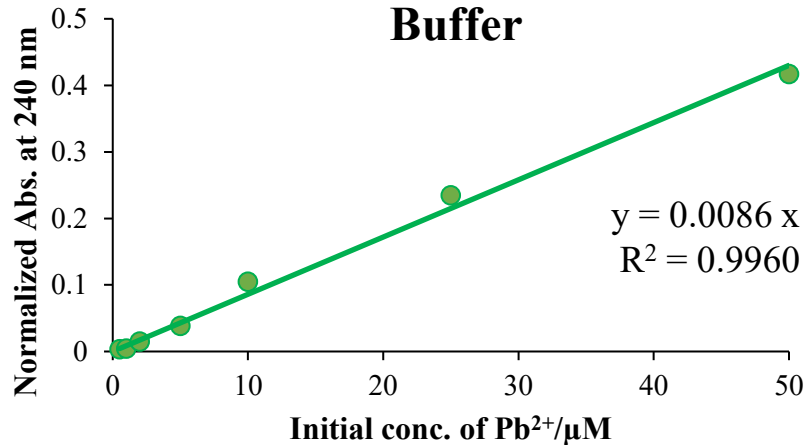
[EDTA] = 1 mM
Incubation for 30 min at r.t..



ペプチド固定化ビーズの条件でEDTA- $Pb(II)$ 由来のピークが確認できた

簡便な操作で環境水中の Pb^{2+} を検出することが可能となった

環境中のPb²⁺の定量



Pb²⁺の濃度と吸光度に
正の相関があることが示唆された

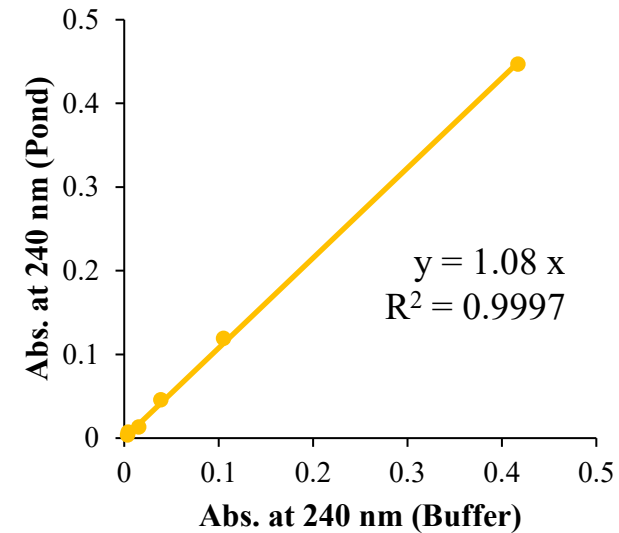
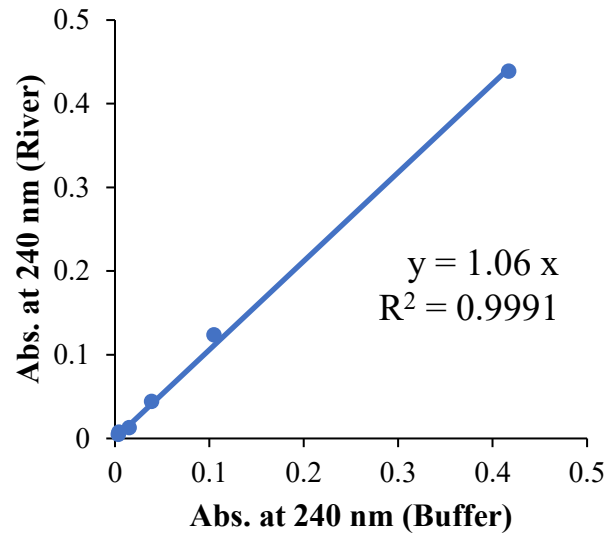
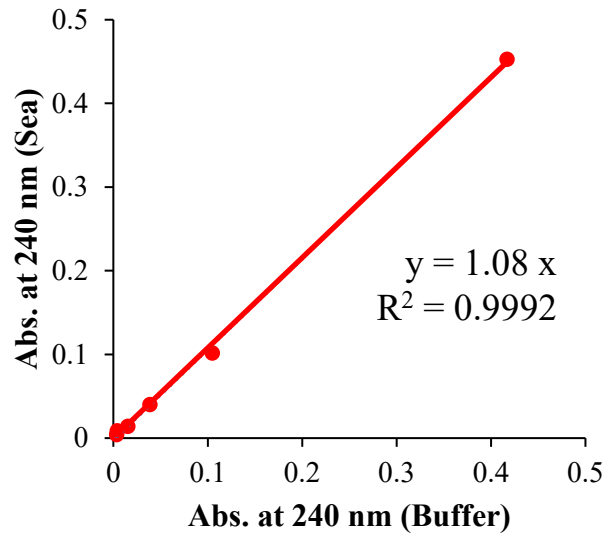
Reaction condition

[PbBP] = 100 μM, [Pb(NO₃)₂] = 0.5~50 μM, [MES (pH 6.0)] = 25 mM
Incubation for 24 h at r.t.

Detection condition

[EDTA] = 1 mM Incubation for 30 min at r.t..

純水と環境水の吸光度の比較

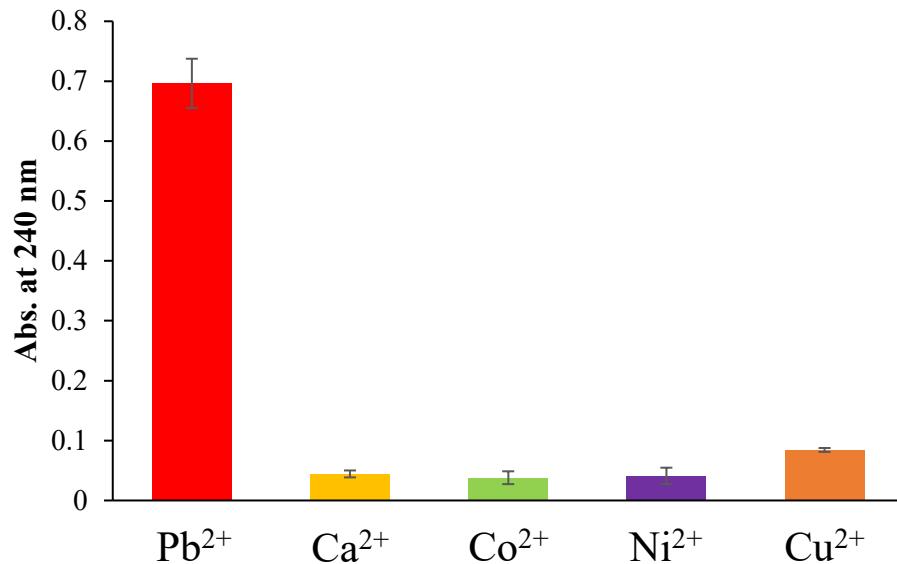


環境水と純水によらず吸光度が同様の変化を示した

簡便な操作と吸光度測定を用いた
環境水中のPb²⁺の定量が可能となった

ペプチド固定化ビーズの選択性

単一金属種ごとの選択性



Pb²⁺のみ選択的に
検出できることが明らかとなった

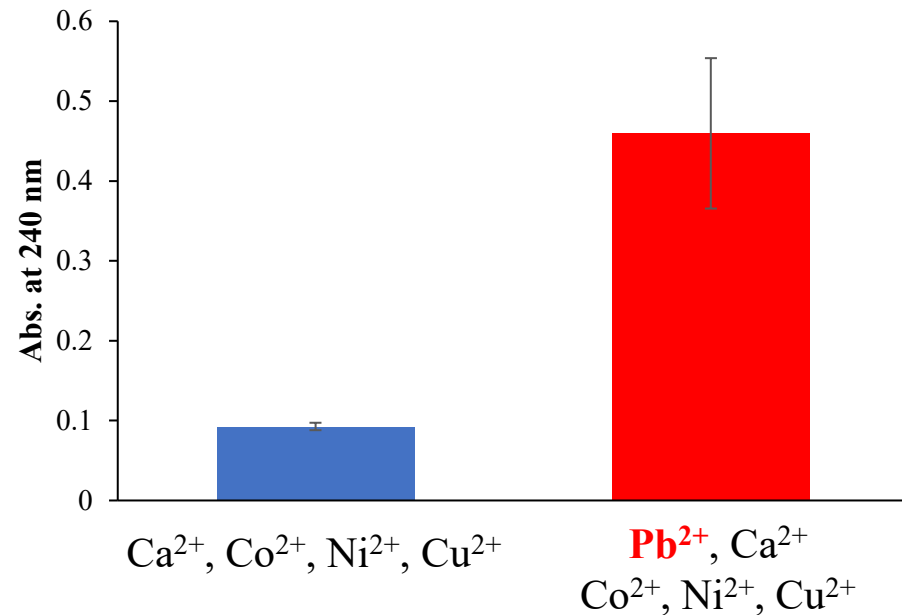
Reaction condition

[PbBP] = 100 μM
[Pb(NO₃)₂] or [CaCl₂] or [CoCl₂] or [NiSO₄] or [CuSO₄] = 100 μM
[MES (pH 6.0)] = 25 mM Incubation for 24 h at r.t.

Detection condition

[EDTA] = 1 mM Incubation for 30 min at r.t..

混合溶液での選択性



異種金属の混合条件においても
Pb²⁺特異的に検出することができた

Reaction condition

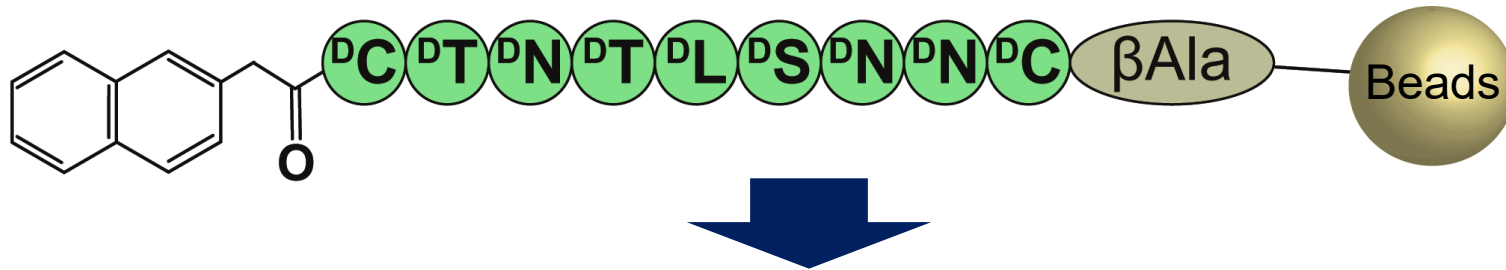
[PbBP] = 100 μM, [Pb(NO₃)₂] = 100 μM, [CaCl₂] = 100 μM,
[CoCl₂] = 100 μM, [NiSO₄] = 100 μM, [CuSO₄] = 100 μM
[MES (pH 6.0)] = 25 mM Incubation for 24 h at r.t.

Detection condition

[EDTA] = 1 mM Incubation for 30 min at r.t..

異種金属の混合条件においても
Pb²⁺を選択的に検出できることが明らかとなった

Pb²⁺結合ペプチドの検討



Sequence1



Sequence2



Sequence3



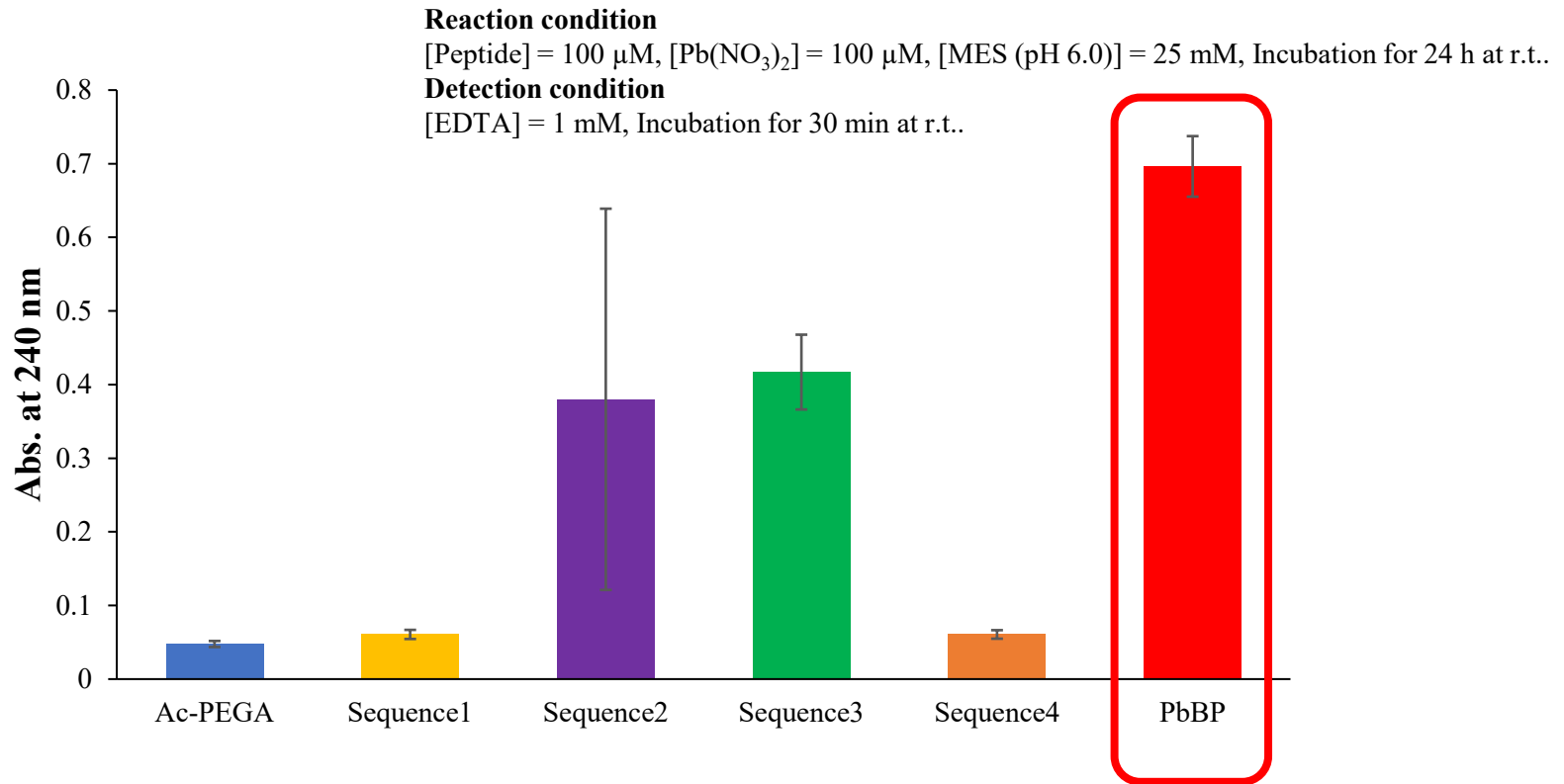
Sequence4



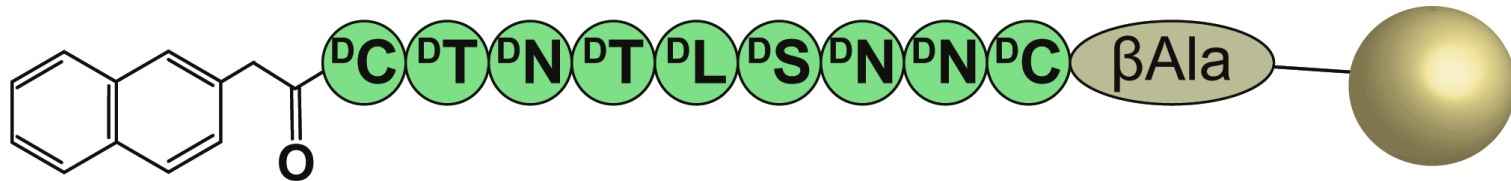
4種類のペプチドを合成し、
Pb²⁺の検出に与える影響を調査した

配列ごとの検出の比較

Pb²⁺の検出



PbBP



末端に修飾があり、D体のアミノ酸を使用した配列が最も検出感度が高いことが明らかとなった

結論

- ・ ペプチド固定化ビーズとEDTAを用いることで簡便に環境水中の Pb^{2+} を検出、定量することが可能となった
- ・ ICP-AESに匹敵する数百 nMの Pb^{2+} を検出、定量できることが明らかとなった
- ・ 検出や定量に適したペプチド固定化ビーズを作製できた

展望

- ・ 環境中の鉛濃度のモニタリング
- ・ ペプチド配列の変更による他の金属種の分離
- ・ 夾雑物存在下における目的金属の分離・除去
- ・ ビーズの材質の変更による検出感度の更なる向上
- ・ 環境から医療まで幅広い分野での応用

！ 特許出願中 ！