

# 牛骨由来アパタイト粉末の調製と異種タンパク質吸着特性によるキャラクタリゼーション\*1

吉田昌史\*2・赤澤敏之\*3・菅野 亨\*4  
堀内淳一\*4・小林正義\*4

## Characterization of Cattle Bone-Originated Apatite Powders by the Adsorption Behavior of Different Proteins

Masashi YOSHIDA\*2, Toshiyuki AKAZAWA\*3, Tohru KANNO\*4,  
Jun-ichi HORIUCHI\*4, Masayoshi KOBAYASHI\*4

### Abstract

Cattle bone-originated apatite (r-HAp) prepared by a dissolution-precipitation method had a  $\text{Ca}^{2+}$ -deficient structure containing small amounts of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  ions. The r-HAp powder, which consisted of aggregates of microcrystals 20~30 nm in size, was found to be more advantageous as an adsorbent than a hydroxyapatite powder synthesized from reagents, because of its large specific surface area  $100\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . For the r-HAp powder, the adsorption for each of the five different proteins – bovine serum albumin (BSA), myoglobin from horse skeletal muscle (MOG), ribonuclease A from bovine pancreas (RBN), lysozyme from chicken egg white (LSZ), and cytochrome *c* from horse heart (CTC) – obeyed the Langmuir equation. The saturated amounts of LSZ and CTC (isoelectric points ( $E_0$ ) < 7.0) adsorbed were 2~15 times larger than those of BSA and MOG ( $E_0$  < 7.0) adsorbed. The basic and acidic proteins can be selectively adsorbed on the P- and C-sites of the hydroxyapatite surface, respectively, suggesting that on the r-HAp surface, the number of P-sites would be greater than the numbers of C-sites.

### 1. 緒 言

生体の骨や歯等の硬組織主要成分を構成する水酸アパタイト (HAp:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) は、タンパク質、核酸、ウイルス等の生体高分子に対して、優れた親和性、吸着特性を有する機能性材料であり、クロマトグラフィー用吸着剤、微生物固定化担体及び生体埋入材料等様々な分野へ応用されている<sup>1-4)</sup>。特に、タンパク質分離精製を目的とする液体クロマトグラフィーへの応用では、

\*1：本研究の一部は化学工学会室蘭大会（1998年8月）で発表した。

\*2：北見工業大学 大学院（博士前期課程）化学システム工学専攻

\*3：北海道立工業試験場

\*4：北見工業大学 化学システム工学科

1965年にTiselius<sup>5)</sup>が生体高分子に対するHApの優れたクロマト分離特性を発見して以来、Kawasaki<sup>6,7)</sup>、Gorbunoff<sup>8,9)</sup>、Honda<sup>10,11)</sup>等、多くの研究者によってHApを用いたカラム吸着剤の研究開発が行われている。これらは、経験的な観点から、吸着質の活性を損なわない分離カラム用充填剤として、生化学、食品化学及び臨床医療機器分析の幅広い分野への展開を検討したものである。しかしながら、市販HApカラム充填剤は、耐久性が低く寿命が短い、試薬原料と製造コストが高いため多くのニーズに即応できない等の問題点を抱えている。

牛骨は畜産物の加工処理過程で多量に産出される北海道特有の地場資源であり、生体由来の $Mg^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 等の微量金属イオンを含有する天然アパタイトとしての応用が期待されている。

このような背景の中で、本研究では、従来の試薬合成HApによるカラム充填剤と異なる機能性を有する新規カラム充填剤の開発とその応用を目的として、溶解析出アパタイト (r-HAp) 粉末を調製し、その異種タンパク質吸着特性を明らかにするとともに、r-HAp表面機能の工学的評価法を検討した。

## 2. 実験方法

### 2-1. 牛骨由来アパタイト粉末の調製方法

図1に、溶解析出法によるr-HAp粉末の調製方法を示す。出発原料として牛大腿骨を用いた。それをオートクレーブ処理、空气中773~1473Kで焼成した後、0.2M- $HNO_3$ 水溶液に溶解した。その溶液に、 $NH_3$ 水を滴下し295K、pH10.5で24時間攪拌混合することにより、HAp相を再析出させた。それを濾過、蒸留水を用いてpH7.0まで洗浄、323Kで乾燥した後、微粉碎し393Kで24時間乾燥することにより、r-HAp粉末を調製した。

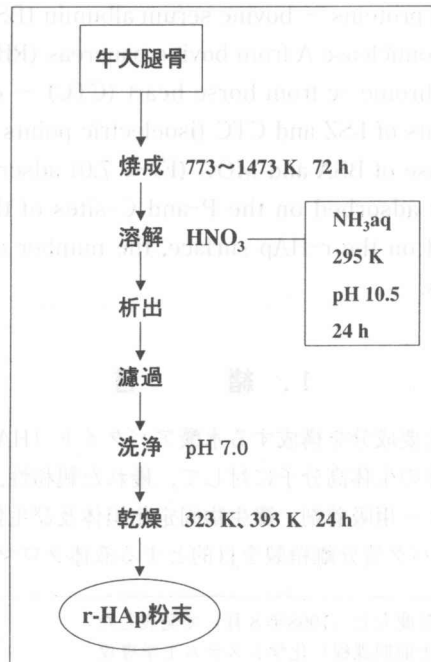


図1 r-HAp粉末の調整方法

## 2-2. 牛骨由来アパタイト粉末表面のキャラクターゼーション

得られたr-HAp粉末について、走査型電子顕微鏡 (SEM: JEOL製JSM-5800) による表面組織の観察, X線回折 (XRD: 理学製RAD-3R) による生成相の同定, 窒素吸着法 (BET: 島津製) による比表面積の測定, プラズマ発光分光分析 (ICP: セイコー電子製) による構成元素の定量を行った。

## 2-3. 牛骨由来アパタイト粉末の異種タンパク質吸着特性評価

図. 2 に, バッチ法によるr-HAp粉末の異種タンパク質吸着試験方法を示す. 構成アミノ酸の偏りが少ない代表的な市販5種タンパク質として, Sigma社製牛血清Albumin (BSA), 馬骨格筋Myoglobin (MOG), 牛脾臓Ribonuclease-A (RBN), 馬心臓Cytochrome-C (CTC), 卵白Lysozyme (LSZ) を用いた. r-HAp粉末0.1gを $20\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ のリン酸緩衝溶液 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) を含む $0.5\sim 3.0\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ の各種タンパク質水溶液へ添加し, バッチ法により295K, pH7.0で60~70時間攪拌混合を行った. 吸着平衡に到達したその懸濁液を重力沈降, 遠心分離 (15000rpm, 18000rpm各30分) した後, 紫外可視分析 (UV: 島津製UV-1600PC) により280nmの吸光度を測定し, 各タンパク質の平衡濃度と吸着量を算出した。

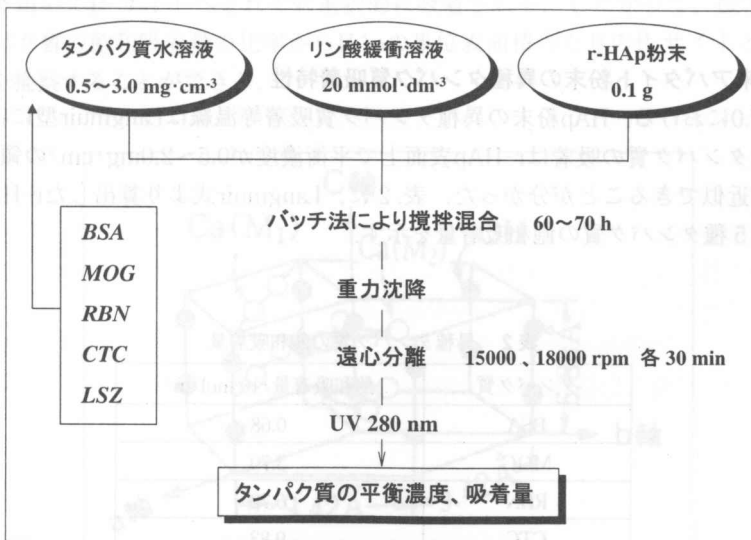


図2 異種タンパク質の吸着特性評価方法

## 3. 結果及び考察

### 3-1. 牛骨由来アパタイト粉末の物理化学的性質

溶解析出調製したr-HAp粉末は, XRDよりHAp単一相が得られ, SEMによる表面組織 (図. 3) では, 直径約20~30nmの球状微細結晶集合体が観察され, 試薬合成HApの針状結晶と著しく異なる表面形態であることが明らかになった. この粉末のBET比表面積は $100\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ であり, 試薬合成HApの値 ( $60\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>12)</sup> より大きな値であったことから, r-HAp粉末は吸着剤として有効な表面構造を有することが示唆された. また, ICPによる構成元素の定量分析結果 (表1) では,

Ca/Pのモル比は1.65を示し、化学量論性HApに比べてCa<sup>2+</sup>含有量がわずかに少ないMg<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>等の微量金属イオンを含有する、生体由来アパタイトであることが分かった。

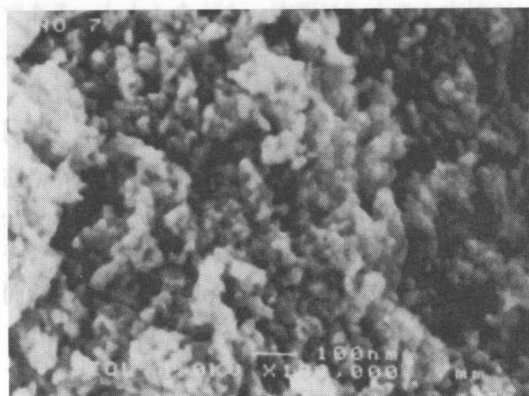


図3 r-HAp表面のSEM写真

表1 ICPによるr-HAp組成分析

成分	r-HAp
CaO	54.25
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	41.67
Na <sub>2</sub> O	0.05
MgO	1.00
SiO <sub>2</sub>	0.12
SrO	0.01
BaO	0.01
計	97.11
Ca/P	1.65
比表面積	100m <sup>2</sup> ・g <sup>-1</sup>

### 3-2. 牛骨由来アパタイト粉末の異種タンパク質吸着特性

295K, pH7.0におけるr-HAp粉末の異種タンパク質吸着等温線はLangmuir型にほぼ適合した。この結果からタンパク質の吸着はr-HAp表面上で平衡濃度が0.5~2.0mg・cm<sup>-3</sup>の領域では単分子層均一吸着に近似できることが分かった。表2に、Langmuir式より算出したr-HAp粉末単位表面積当たりの5種タンパク質の飽和吸着量を示す。

表2 異種タンパク質の飽和吸着量

タンパク質	飽和吸着量/10 <sup>6</sup> mol・m <sup>-1</sup>
BSA	0.68
MOG	3.70
RBN	6.72
CTC	9.83
LSZ	8.64

飽和吸着量の序列は、BSA<MOG<RBN<LSZ<CTCの順となった。一般に、HAp表面の吸着サイトは酸性サイトと塩基性サイトの2種類が存在する<sup>14)</sup>と言われていることから、このような異種タンパク質の飽和吸着量の差は、r-HAp粉末表面に分布する2つの吸着サイトの数と、吸着質の酸-塩基的な物理化学的特性の相関関係に起因するものと考えられる。表3に、5種タンパク質の物理化学的特性を示す。用いた5種タンパク質は、酸性(等電点<7.0)から塩基性(等電点>7.0)へと広い性質の分布をもち、分子量は12400~66000で分子サイズはBSA以外はほぼ同等であり、工学的にそれらの形状はMOGをディスク型、それ以外はいずれも回転楕円体に近似することができる。

表2 異種タンパク質の飽和吸着量

	等電点/pHi	分子量/mol·g <sup>-1</sup>	分子サイズ/nm
BSA	4.7~4.9	66000	4×4×14
MOG	6.8	16800	5.7×0.9
RBN	9.5~9.7	13700	3.8×2.8×2.2
CTC	10.7	12400	3.0×3.0×4.5
LSZ	11.0~11.4	14300	2.5×2.5×3.7

異種タンパク質の飽和吸着量の序列は、それぞれの等電点の序列とはほぼ一致し、等電点の大きなタンパク質、すなわち塩基性タンパク質ほど吸着量は増大した。r-HAp表面に対するタンパク質の、吸着機構を考察するため図.4に、HApの結晶構造と、吸着サイトの関係を表す模式図を示す<sup>13)</sup>。六方晶系の単位結晶は、平行六面体で120°の角度をなす2つの平行な軸（ $a = b = 9.42\text{\AA}$ ）とその軸に直角に交わる軸（ $c = 6.88\text{\AA}$ ）によって形成されている。2つの吸着サイトは、 $c$ 面の $\text{Ca}^{2+}$ に起因するP-サイトと $a$ 面の $\text{OH}^-$ に起因するC-サイトである。等電点7.0以下の酸性タンパク質は主にカルボキシル基を用いてC-サイトへ、等電点7.0以上の塩基性タンパク質は主にアミノ基を用いてP-サイトへそれぞれ選択的に吸着される。したがって、酸性タンパク質と塩基性タンパク質の飽和吸着量の比率からHApの単位表面積当たりのP-サイトとC-サイトの相対的な比率を推察することができる。

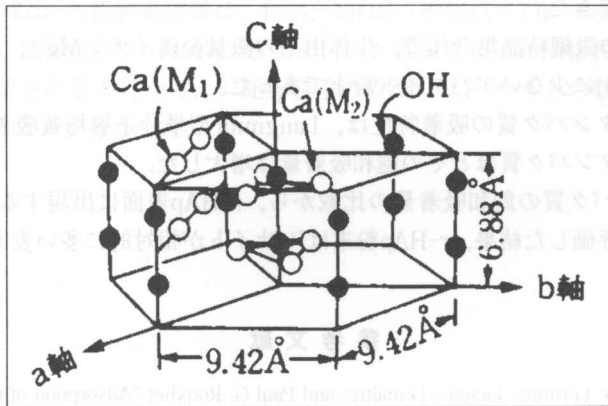


図4 HApの結晶構造と吸着サイトの模式図

図.5はr-HAp粉末における酸性タンパク質の飽和吸着量と塩基性タンパク質の飽和吸着量との相対比(R)を示したものである。等電点が最も小さい酸性タンパク質のBSAに対するそれぞれの塩基性タンパク質の値は、RBN( $R_{R/B}$ )が約9.9倍、CTC( $R_{C/B}$ )が約14.5倍、LSZ( $R_{L/B}$ )が約12.7倍となった。これは、r-HAp粉末の表面形態が、等方的な球状微細結晶の集合体であるにも拘わらず、塩基性タンパク質が選択的に吸着するP-サイトが相対的に多く出現し、その割合はC-サイトの約10~15倍であることを示唆している。MOGについては、等電点が6.8とほぼ中性であり、P-及びC-いずれのサイトにもほぼ同様の割合で吸着すると推測される。

以上の結果より、用いた異種タンパク質の吸着特性からr-HApの表面機能を定量的に評価する

ことが可能であり、吸着剤としての工学的な応用には、2つの吸着サイト数の比率を設計及び制御する調製条件の選択が重要と考えられる。

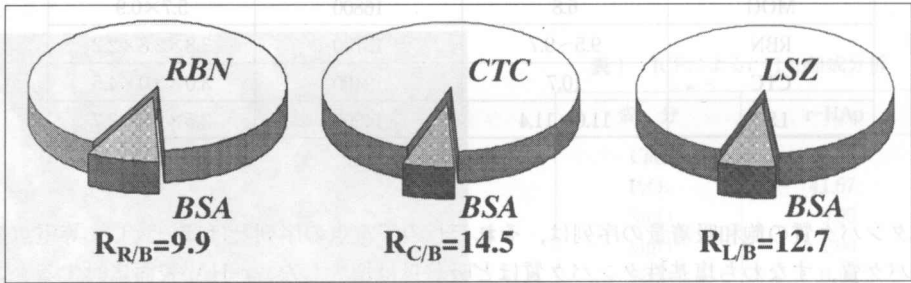


図5 酸性タンパク質の飽和吸着量と塩基性タンパク質の飽和吸着量の相対比

## 5. 結 言

溶解析出法により牛骨由来アパタイト粉末を調製し、異種タンパク質の吸着特性を検討した結果、下記の結論が得られた。

- ・295K, pH10.5, 24時間の湿式反応により、比表面積が試薬合成より大きなr-HAp単一相粉末を調製することができた。
- ・r-HAp粉末は球状の微細結晶集合体で、生体由来の微量金属イオン $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ を含む $Ca^{2+}$ 含有量が量論的にわずかに少ないアパタイト粉末であった。
- ・r-HAp粉末の5種タンパク質の吸着特性は、Langmuir型単分子層均質吸着に近似でき、等電点の大きい塩基性タンパク質ほどその飽和吸着量は増大した。
- ・酸性、塩基性タンパク質の飽和吸着量の比較から、r-HAp表面に出現するP-サイトとC-サイトの数を定量的に評価した結果、r-HAp粉末はP-サイトが相対的に多い表面であった。

## 参 考 文 献

- 1) Allal Barroug, Etienne Lernoux, Jacques Lemaitre, and Paul G. Rouxhet "Adsorption of Catalase on Hydroxyapatite", Journal of Colloid and Interface, 208, 147-152 (1998)
- 2) 青木秀希, 牧島亮男, "バイオセラミックス", 技報堂出版, 78~94 (1986)
- 3) 瀧川一也, 李团团, 吉沢和剛, 坂爪誠, 青木秀希, "脱灰骨基質とハイドロキシアパタイトゾルの骨髄腔内における組織反応", 生体材料, Vol. 13 No. 5
- 4) 金沢孝文, 梅垣高士, 門間英毅, 山下仁大, 石膏と石灰, No. 210. 261~273 (1987)
- 5) A. Tiselius, S Hjerten and O Levin, Arch. Biochem. Biophys, 65, 132~135 (1965)
- 6) T. Kawasaki, M. Niikura, Y. Kobayasi, J. Chromatogr, 515, 91~123 (1990)
- 7) T. Kawasaki, J. Chromatogr, 157, 7 (1978)
- 8) M. J. Gorbunoff, "The Interaction of Proteins with Hydroxyapatite I", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 136, 425~432, (1984)
- 9) M. J. Gorbunoff, "The Interaction of Proteins with Hydroxyapatite II", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 136, 433~439, (1984)
- 10) F. Honda, H. Honda, M. Koishi, T. Matuno, "Properties of cattle bone powder-coated composite particles as

- high-performance and open column liquid chromatographic column packings", *Journal of Chromatography A*, 813, 21~33 (1998)
- 11) F. Honda, H. Honda, M. Koishi, "Utilization of the dry impact blending method to prepare irregularly shaped particles for high-performance liquid chromatographic column packings", *Journal of Chromatography A*, 696, 19~30 (1995)
  - 12) 杉村弘美, "異種タンパク質吸着による水酸アパタイト表面のキャラクタリゼーション", 北見工業大学卒業論文 (1999)
  - 13) 谷沢善明, 鈴木喬, "アパタイトの表面反応特性 歯を中心として", 表面, Vol. 35, No. 3 (1997)
  - 14) T. Kawasaki, M. Niikura, and Y. Kobayashi, *J. Chromatogr.* 515, 91 (1991)
  - 15) T. Akazawa, M. Kobayashi, *J. Ceram. Soc. Jpn.* 104, 284~290 (1996)
  - 16) T. Akazawa, T. Kanno, M. Kobayashi, K. Kodaira, "Characterization of albumin and Lysozyme adsorption evaluated on two different prepared apatites", *Journal of Materials Science*. 33, 1927~1931 (1998)

### Abstract 訳

溶解析出法により牛骨を出発原料としたアパタイト粉末 (r-HAp) を調製した。得られた粉末は直径約20~30nmの球状粒子の集合体で、 $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ 等の微量金属イオンを含み、 $Ca^{2+}$ 含有量が量論的にわずかに少ないアパタイトであった。r-HApは比表面積が $100m^2 \cdot g^{-1}$ と大きく、試薬合成アパタイトに比べ吸着剤として優れた表面構造を有していることが分かった。このr-HAp粉末に対し、5種タンパク質、牛血清Albumin (BSA), 馬骨格筋Myoglobin (MOG), 牛脾臓Ribonuclease-A (RBN), 馬心臓Cytochrome-C (CTC), 卵白Lysozyme (LSZ) を用い吸着特性評価を行った。それぞれのタンパク質の吸着特性は、ラングミュア型単分子層吸着に適合し、LSZ, CTC (等電点 $>7.0$ ) の飽和吸着量は、BSA, MOG (等電点 $<7.0$ ) の飽和吸着量と比較し10~15倍大きかった。塩基性タンパク質、酸性タンパク質はそれぞれHAp表面のP-サイト、C-サイトに選択的に吸着されることから、r-HAp粉末の表面にはP-サイトの数がC-サイトの数に比べて相対的に多いことが分かった。