

## 9217 ホヤの金属濃縮機能を利用した海水からのレアメタル分取のための基礎研究

助成研究者:道端 斎(広島大学 理学部)

共同研究者:宇山 太郎(広島大学)

海産の無脊椎動物であるホヤは、その血球細胞中にレアメタル(希少金属)の一種であるバナジウムを高選択的に濃縮しており、その濃度は海水に含まれるバナジウム濃度の約1,000万倍にあたる350mMに達し、生理的な濃縮係数としては他の生物に例を見ない。本研究は、ホヤが具有するこの特異な金属濃縮機能に着目し、その機能の解明と応用によって、海水からの希少金属の選択的分取への道を拓こうとするものである。

すでにわれわれは、ホヤの血球細胞から分子量約1300Daのバナジウムと結合した粗抽出物(バナードピン)を得ている。この物質は、酸化型(5価)のバナジウム化合物を還元して還元型(4価)の化学種に転換し保持する新しいタイプの金属結合物質であり、高選択的なバナジウム濃縮のカギを握っている物質と考えられている。

今回は、バナジウムを高濃度に濃縮しているホヤのうち、*Ascidia gemmata*(バナジウムボヤ)からバナードピンを抽出し、この物質のバナジウム還元能を電子スピン共鳴法(ESR)によって検討するとともに、HPLCによって精製を試みた。

青森市浅虫所在の東北大学理学部附属臨海実験所の周辺でバナジウムボヤを採集し、還元気流中でその体腔液から遠心によって血球細胞を集めた。これに0.05% Trifluoroacetic acid (TFA)を加えてpH2.3に調製してホモジナイズし、得られたホモジェネイトを10000g、10分間遠心し、その上澄みをろ過した後、高速液体クロマトグラフィーにかけた。カラムはTSKgel G2000SWと TSKgel ODS-80Tmを用いた。溶出したフラクションのバナジウム含有量はフレームレス原子吸光分光光度計で測定し、バナードピン分画を決定した。

高速液体クロマトグラフィーのTSKgel G2000Sを用いた結果、保持時間30.7分に鋭い254nmの紫外吸収のピークが現れ、そのピーク位置でのバナジウム濃度は、2mMであった。また、このピークは示差屈折計で観察したピーク位置とも一致を見たことから、バナードピン分画と判断した。現在、このピークをさらにTSKgel ODS-80Tmを用いて精製中である。

一方、還元環境下でこのバナードピン分画に4mM、8mMそして16mM濃度の5価のバナジウム溶液を添加してESRシグナルを観察したところ、4価のバナジウムが増大することが判明した。このことは、バナジウムボヤから抽出したバナードピンにも5価のバナジウムを還元する能力があることを意味する。仮にアポバナードピン(バナードピンの非金属成分)にバナジウムが1:1で結合しているとすると、5モルのバナードピンは1モルのバナジウムを4価に還元するものと推測できる。



9217 ホヤの金属濃縮機能を利用した海水からのレアメタル分取のための基礎研究

助成研究者:道端 斎(広島大学 理学部)

共同研究者:宇山 太郎(広島大学)

研究目的

バナジウム(vanadium)は原子番号23の典型的な遷移元素で、地球上では20番目に多く地殻には広く分布している。しかし、バナジウムを高品位に含む褐鉛鉱(カルノー石)は限られた地域で少量しか産出せず、その大部分は磁鉄鉱などの鉱石スラグから分取されている。産出量の95%は南アフリカと旧ソ連邦に限られ、極端な偏在性を示す。

産業界では従来から、高抗張力鋼あるいは触媒として用いられてきたが、最近ではさらに超伝導材料、半導体、磁性体、蛍光体あるいはファインセラミックスなど次世代の産業技術を支える材料の一部として使われるようになり、重要性を増している。これらのことから、バナジウムはクロムやマンガン等とともに国家備蓄を必要とするレアメタル(希少金属)に選ばれている。

一方、海水に溶解しているバナジウムはきわめて希薄であり、35 nM(1.8ppb)にすぎない。ホヤはナトリウムを始めとして多くの共存イオンが溶解している海水中から、この希薄なバナジウムのみを高選択的かつ高濃度に濃縮している唯一の生物として知られている。本研究は、このホヤが具有する特異な生理作用を解明することにより、海水からレアメタルを効率よく分取するための基礎研究への道を拓くことを目的としている。

ホヤは脊椎動物に限りなく近い無脊椎動物であり、幼生の間だけ脊椎の原型といえる原索を有しているため原索動物と言われている。今世紀始め、Henze(1911)はナポリの臨海実験所で得たホヤの一種に多量のバナジウムが濃縮されていることを見出した。それ以降、他の生物に例を見ないこの特異な現象は、動物生理学者のみならず生化学、分析化学、錯体化学といった広い分野の多くの研究者から注目されてきた。

われわれはこの問題に近代的なメスを入れるため、バナジウムの分析に最も高感度な放射分析法を駆使して、種々のホヤの組織・器官別のバナジウム含有量を改めて測定し直した。その結果、3亜目に区分されているホヤ類の中、食用にするマボヤが属する褶鰓類にはバナジウムが少なく、海水濃度の100倍から1,000倍程度のバナジウムを濃縮しているにすぎないこと、しかし、管鰓類に属するホヤはいずれも高濃度のバナジウムを濃縮して

いることを明らかにした。その中でもアスキジア科のホヤが特に高濃度のバナジウムを濃縮しており、バナジウムボヤ *Ascidia gemmata* は、海水中に溶解しているわずか35nMのバナジウムを血球細胞中に1,000万倍の350mMにまで濃縮している。

水溶液中のバナジウムは、その濃度やまわりのpHに依存して単量体から2量体、4量体、5量体そして10量体構造をとり、原子価はI I I 価、I V 価そしてV 価を取り得ることが知られている。ホヤの血球細胞に含まれるバナジウムの化学形については、X線吸収微細構造法（EXAFS）、電子スピン共鳴法（ESR）あるいは核磁気共鳴法（NMR）による観察結果から、還元されたI I I 価あるいはI V 価であると報告されてきた。電子スピン共鳴法を用いた最近のわれわれの研究によって、バナジウム含有の血球細胞（バナドサイト）の中ではその98%がI I I 価に還元されており、I V 価はほんのわずかであることが判明した。このことは、海水中でV 価で溶解していたバナジウムがホヤに取り込まれると、I V を経てI I I 価にまで還元されて濃縮されていることを意味し、ホヤにはバナジウムの還元濃縮に関わる物質が存在することを示唆する。

われわれは、バナジウムがホヤの血球細胞中で何らかの錯化合物を形成していると考え、血球細胞からバナジウム化合物の抽出を試みてきた。これまでにスジキレボヤ *Ascidia sydneiensis samea* の血球細胞を還元気流中でホモジナイズし、分子ふるいにかけて得られた分画のバナジウム含有量を放射化分析法で定量するという方法で、バナジウムと結合した物質を検出し、それをさらにイオン交換カラムにかけて分子量約1300Daのバナジウム結合物質（バナドピン）を得ることに成功している。最近、バナドピンはスジキレボヤ以外にもバナジウムを含有するほとんどのホヤに含まれることが明らかとなり、これらのことから、バナドピンがホヤによるバナジウムの還元濃縮の重要なカギを握っていると考えられる。

そこで、最も高濃度のバナジウムを含有しているバナジウムボヤの血球細胞からバナドピンを抽出し、電子スピン共鳴法を用いてバナジウム還元能の有無を検討するとともに高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でバナドピンの精製を試みることにした。

## 研究方法

青森市浅虫の東北大学理学部附属臨海実験所の周辺でバナジウムボヤ *Ascidia gemmata* を採集し、窒素気流中で体腔液を取り出し遠心によって血球細胞を集めた。脱気後に窒素置換した2%アセトニトリル溶液に0.05% Trifluoro-acetic acid (TFA)を加えてpH2.3に調整し、この溶液を血球細胞に加えてホモジナイズした。得られたホモジェネイトを10,000gで10分間遠心し、得られた上澄みをろ過した後、高速液体クロマトグラフィーシ

システム（東ソーバイオHPLCシステム）にかけた。カラムは予め pH2.3の2%アセトニトリル溶液で平衡化させたゲルろ過用TSKgel G2000SWを用いた。溶出したフラクションのバナジウム含有量はフレームレス原子吸光分光光度計で測定し、バナードピン分画を決定した。ゲルろ過によって得られたバナードピン分画は逆相分配カラムで精製を試みた。カラムは上述の溶出液で平衡化させたTSKgel ODS-80Tmを用いた。濃縮したバナードピン分画をこのカラムに投入し、得られた分画中のバナジウム含有量はフレームレス原子吸光分光光度計で定量した。

次に、バナードピンにバナジウム還元能があるか否かを電子スピン共鳴法で観察した。還元気流中で血球細胞をホモジナイズし、Sephadex G-15によるゲルろ過を行った。得られたバナードピン分画にV価のバナジウム添加して還元能を電子スピン共鳴法で観察した。

### 研究結果と考察

高速液体クロマトグラフィーのゲルろ過カラムTSKgel G2000Sを用いた結果、保持時間49.7分に鋭い254nmの紫外吸収のピークが現れ、そのピーク位置でのバナジウム濃度は、 $160\mu\text{g}/\text{ml}$ であった（図1）。また、このピークは示差屈折計で観察したピーク位置とも一致を見たことから、バナードピン分画と判断した。ゲルろ過によって溶出したバナードピン分画をさらに逆相系カラムTSKgel ODS-80Tmを用いて精製したところ、14.1分と18.5分に溶出した2つのピークから高濃度のバナジウムが検出された（図2）。現在、これらの分画についてさらに詳しい検討を行っている。

バナードピンのバナジウム還元能は、精製を重ねると急減するので今回はゲルろ過分画で得られた粗抽出物について測定した。ゲルろ過の結果、5つのピークが得られたが、ピーク2にはゲルろ過で回収されたバナジウムの61%が含まれており、ここに粗バナードピンが含まれると思われる（図3）。電子スピン共鳴法ではI V価のバナジウムのみが検出可能である。このピーク2を電子スピン共鳴法で観察すると図4に見られるような典型的なバナジル（ $\text{VO}^{2+}$ ）のシグナルが検出できる。これに8mMのV価のバナジウム溶液を等量添加すると、シグナル強度は増強することがわかった。このことは添加されたバナジウムの一部がバナードピンによって電子スピン共鳴法で観察可能なI V価に還元されたことを意味する。図5にこの方法に基づいてバナードピンの還元能を産出した結果を示す。今回用いたバナードピン中のバナジウム濃度は25mMであり、バナードピンによって還元されたV価のバナジウムは5mMであったことから、仮にアポバナードピン（バナードピンの非金属成分）にバナジウムが1:1で結合しているとすると、5モルのバナードピンは1モルのバナジウムを4価に還元するものと推測できる。バナジウムを含まないピーク1では

このような還元能は観察されなかった。

#### 今後の課題

HPLCによるバナードビンの精製は始まったばかりであり、今後化学構造の決定に向けて努力していく必要がある。また、バナードビンの還元能はホヤに濃縮されたバナジウムの還元機構を解明する上できわめて重要なポイントであり、構造決定と相まって今後の興味深い研究課題である。

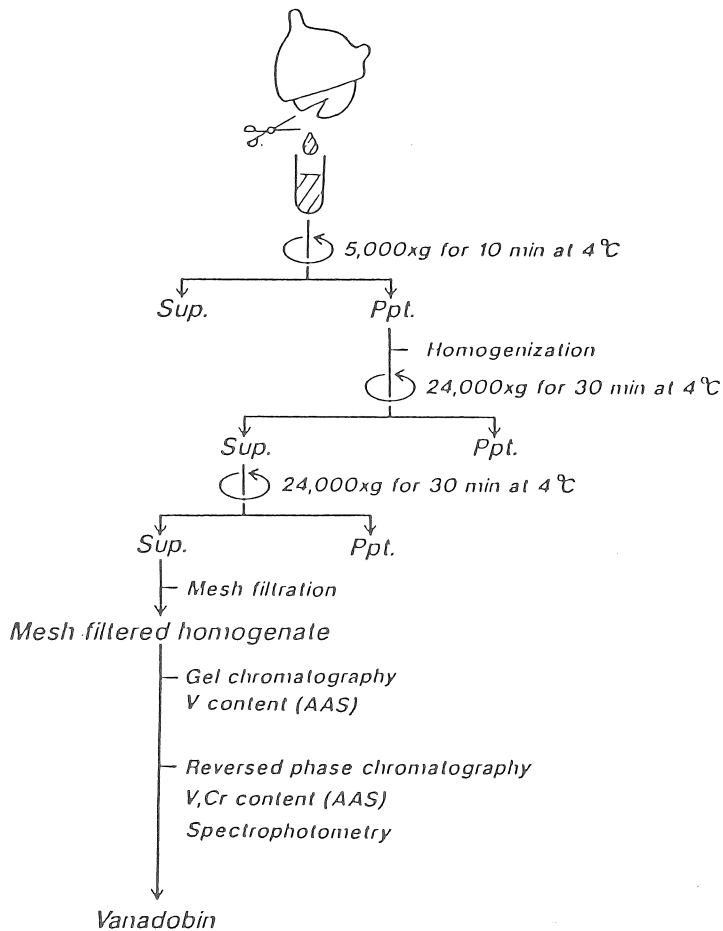
#### 参考文献

- 1 Michibata, H. and Uyama, T. (1990) Extraction of vanadium-binding substance (vanadobin) from a subpopulation of signet ring cells newly identified as vanadocytes in ascidians. *J. Exp. Zool.*, 254: 132-137.
- 2 Michibata, H., Hirose, H., Sugiyama, K., Ookubo, Y. and Kanamori, K. (1990) Extraction of a vanadium-binding substance (vanadobin) from the blood cells of several ascidian species. *Biol. Bull.*, 179: 140-147.
- 3 Hirata, J. and Michibata, H. (1991) Valency of vanadium in the vanadocytes of *Ascidia gemmata* separated by density-gradient centrifugation. *J. Exp. Zool.*, 257: 160-165.
- 4 Michibata, H., Iwata, Y. and Hirata, J. (1991) Isolation of highly acidic and vanadium containing blood cells from among several types of blood cells in Ascidiidae species by density-gradient centrifugation. *J. Exp. Zool.*, 257: 306-313.
- 5 Uyama, T., Nishikata, T., Satoh, N. and Michibata, H. (1991) Monoclonal antibody specific to signet ring cells, the vanadocytes of the tunicate, *Ascidia sydneiensis samea*. *J. Exp. Zool.*, 259: 196-201.
- 6 Michibata, H., Morita, A. and Kanamori, K. (1991) Vanadobin, a vanadium-binding substance, extracted from the blood cells of ascidian, can reduce vanadate(V) to vanadyl(IV). *Biol. Bull.*, 181: 189-194.
- 7 Hirata, J. and Michibata, H. (1992) Electron spin resonance spectrometry of vanadium ions in the blood cells of the ascidian, *Ascidia gemmata*. *Zool. Sci.*, 9: 207-209.

- 8 Michibata, H., Uchiyama, J., Seki, Y., Numakunai, T. and Uyama, T. (1992)  
Accumulation of vanadium during embryogenesis in the vanadium-rich ascidian, Ascidia gemmata. Biol. Trace Element Res., 34: 219-223.
- 9 Uyama, T., Uchiyama, J., Nishikata, T., Satoh, N. and Michibata, H. (1993)  
The accumulation of vanadium and manifestation of an antigen recognized by a monoclonal antibody specific to vanadocytes during embryogenesis in the vanadium-rich ascidian, Ascidia sydneiensis samea. J. Exp. Zool., 265: 29-34.
- 10 道端 齊 (1992) 海産無脊椎動物ホヤによる遷移金属元素バナジウムの濃縮. 放射線科学, 35: 261-265.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### Extraction of Vanadobin



All experiments were carried out under anaerobic conditions.

図1 ホヤ(*A. gemmata*)の血球細胞内に含まれるバナジウム結合物質(バナードピン:vanadobin)の抽出方法の概要



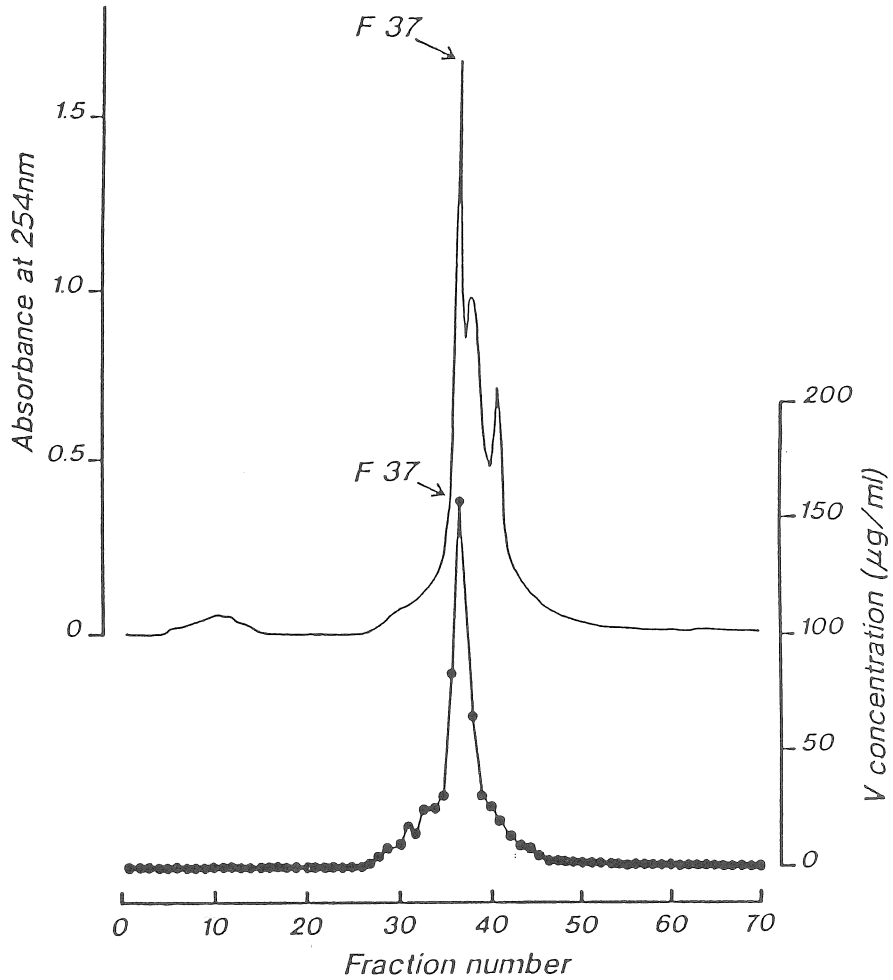


図2 ゲル濾過クロマトグラフにおける*A. gemmata*の血球細胞由来のパナードビンの溶出パターン

ホヤの血球細胞内に含まれるパナードピンを抽出するため、*A. gemmata*の血球細胞のホモジネイトをフィルターで濾過した後、ゲル濾過カラム (Tosoh TSK gel G2000SW Glass) に添加し、パナードビンの抽出を行った。溶出液には、pH 2.3の2%のアセトニトリルを用い、0.2mlずつ分取した。254nmで吸光度を観察すると、10番目、37番目、38番目、41番目の分画にピークがみられた。

折れ線グラフには、各分画に含まれるパナジウム含有量を示した。パナジウムは、主に37番の分画にピークをもつフラクションに含まれていた。

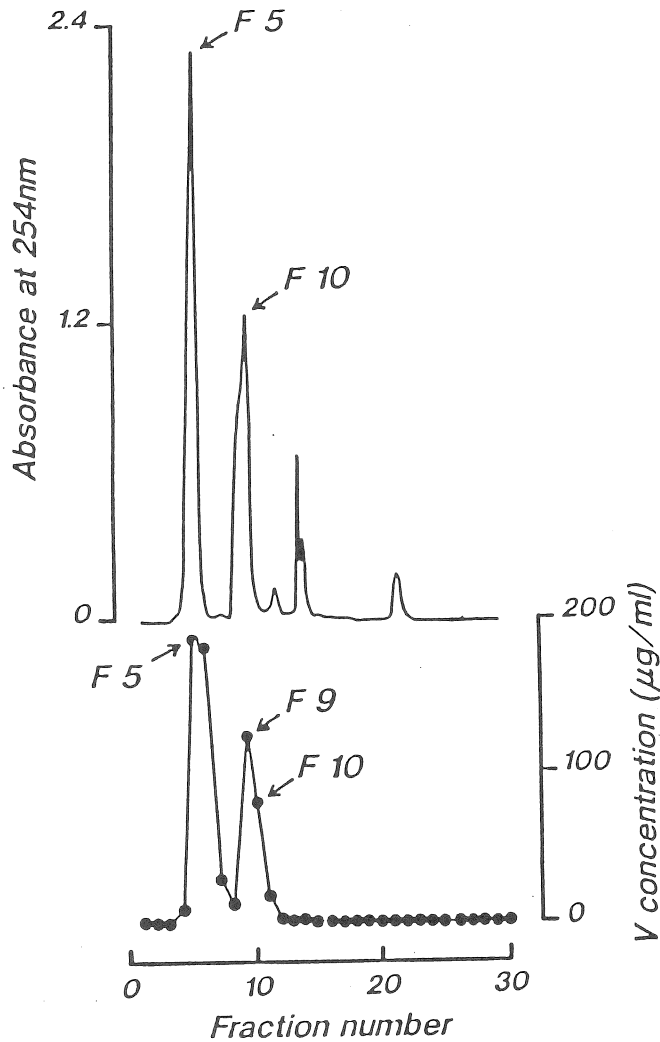
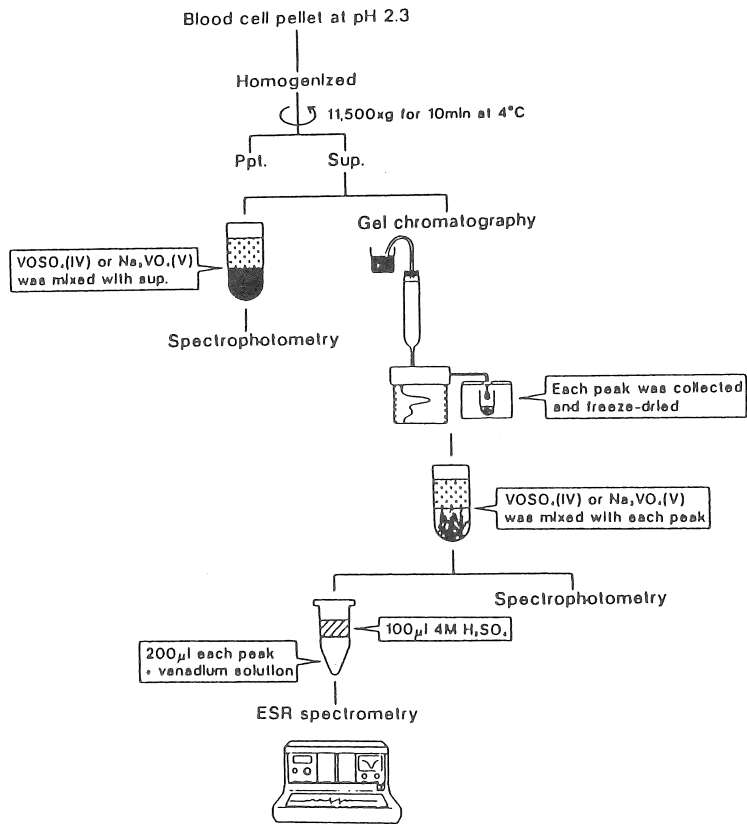


図3 逆相クロマトグラフにおける *A. gemmata* の血球細胞由来のバナジウムの溶出パターン

ゲル濾過により分離された高濃度のバナジウムを含む分画を、逆相系カラム (Tosoh TSKgel ODS-80TM) でさらに分離した。溶出液には、pH2.3の5%アセトニトリルを用いて、0.2mlずつ分取した。254nmで吸光度を観察すると、5番目、10番目、12番目、14番目、22番目の分画にピークがみられた。

折れ線グラフには、各分画に含まれるバナジウム含有量を示した。バナジウムは、主に5番目と9番目の分画にピークをもつフラクションに含まれていた。



All experiments were carried out under anaerobic conditions

図4 *A. gemmata* の血球細胞のホモジェネイトの上清およびバナジウム結合物質（バナードピン: vanadobin）によるバナジウム還元能の検討—実験方法の概要

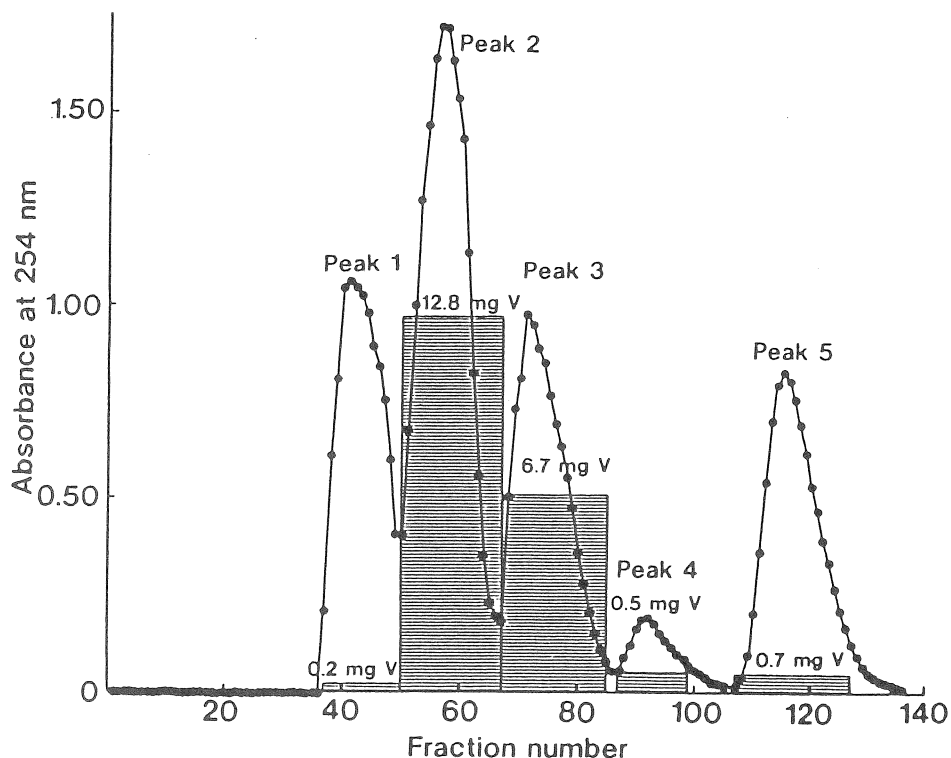


図5 V価からIV価へのバナジウム還元能の検討に用いたバナードピンの抽出

バナードピンにV価からIV価へのバナジウム還元能があるか否かを検討するために、*A. gemmata*の血球細胞のホモジェネイトの上清7mlをSephadex G-15を充填した $\phi 3.6\text{cm} \times 56\text{cm}$ のカラムにかけ、バナードピンを抽出した。溶出液にpH2.3の再蒸留水を用いて5mlずつ分取した。254nmで吸光度を観察すると41番目、56番目、71番目、92番目、115番目のフラクションにピークが見られた。

棒グラフには、各ピーク分画に含まれるバナジウムをESR分光法で定量をした結果を示す。ピーク2には回収されたバナジウム量の61%が、ピーク3には32%が含まれ、他のピーク分画にはほとんどバナジウムが含まれていなかった。

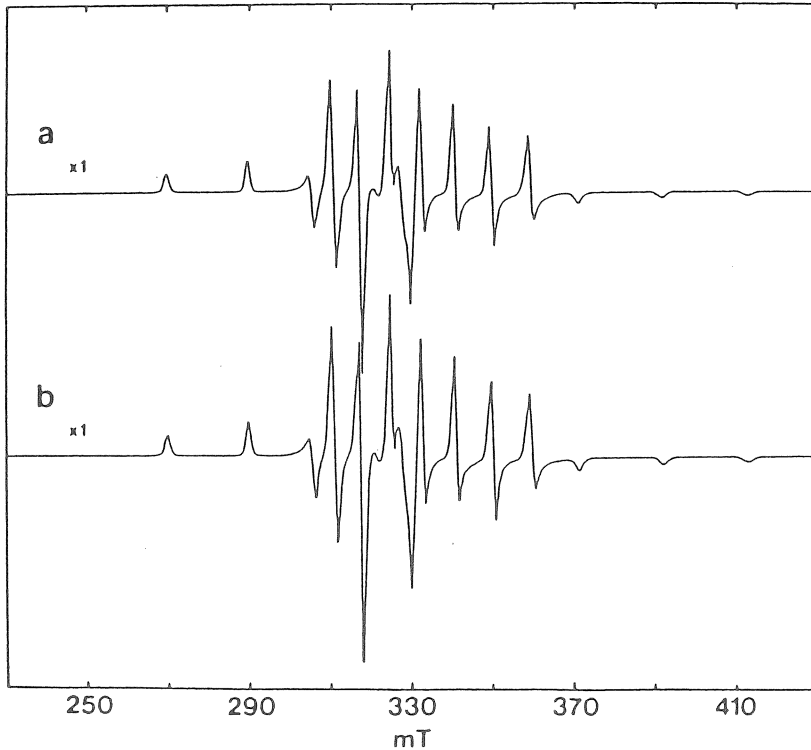


図.6 *A. gemmata*のバナードピンおよびそれに無機の 8mMのV価のバナジウム溶液を添加したときのESRスペクトル

バナードピン(図5のピーク2)に pH2.3の再蒸留水を添加した場合のESRのシグナル強度(a)に比べ、バナードピンに 8mMのV価のバナジウム溶液を添加した場合のシグナル強度は約1.2倍大きくなった(b)。このことは、添加したV価のバナジウムの一部がバナードピンによってESRで検出可能なIV価に還元されたことを意味する。測定条件は図2で示したのと同様である。

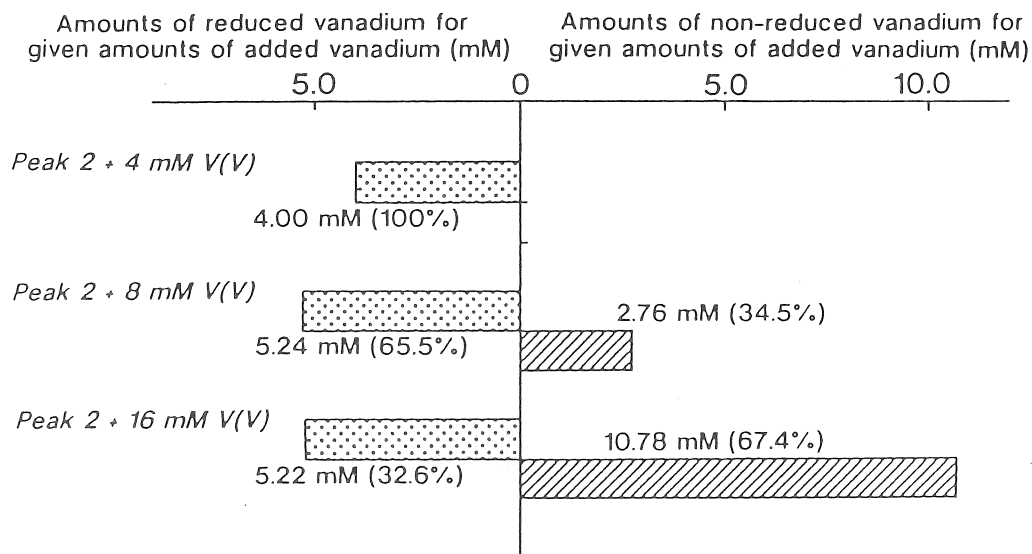


図7 *A. gemmata* のバナードピンを含むピーク2のバナジウム還元能のESR分光法による定量

図の左側のカラムは、バナードピンに添加したV価のバナジウムの中でIV価に還元された量を示し、右側のそれは還元されなかった量を表す。バナードピン(図5のピーク2)に4mMのV価のバナジウム溶液を添加した場合には、そのすべてが還元され、8mMの溶液を添加したときにはその65.5%に当たる5.24mMが、そして16mMの溶液を添加したときには、その32.6%に当たる5.22mMのV価のバナジウムがIV価に還元された。

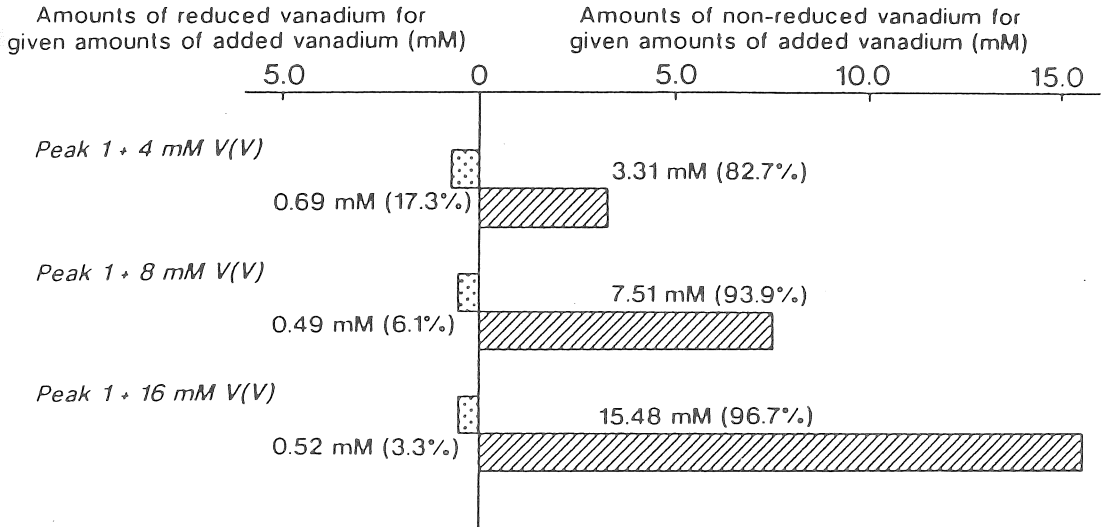


図8 *A. gemmata* のバナードピンを含まないピーク1のバナジウム還元能のESR分光法による定量

バナードピンを含まないピーク1(図5)に4mM, 8mMそして16mMの濃度のV価のバナジウム溶液を添加した場合には、いずれも0.5mM程度のバナジウムが還元されただけであった。図の表し方は、図7の場合と同様である。

Foundational Study on Selective Extraction of Rare Metal from Seawater, Based on the Mechanism of Accumulation of High Levels of Vanadium by Ascidians

Hitoshi Michibata and Taro Uyama, Mukaishima Marine Biological Laboratory, Faculty of Science, Hiroshima University, Mukaishima-cho, Hiroshima 722, Japan

Ascidians are marine animals that live under water, either free in the sand or attached to stones, rocks and solid surfaces. High levels of vanadium were found by mere chance in the blood cells of an ascidian by the German chemist M. Henze in 1911. Subsequently, many investigators revealed that ascidians are the only organisms in the animal kingdom able to accumulate vanadium at high concentrations. We reexamined the vanadium content of several tissues from 20 ascidian species, employing the extremely sensitive method of neutron-activation analysis for the quantification of this metal. The highest concentration of 350 mM vanadium was found in the blood cells of *Ascidia gemmata*, which concentration corresponds to 10,000,000 times the concentration in sea water. Furthermore, ESR measurements of the oxidation state in the blood cells revealed that the vanadocytes contained vanadium, about 98% of which was in the +3 oxidation state. We attempted to extract a vanadium-binding and/or -reducing substance from the blood cells. In the present experiment, it became clear that this substance is extractable and has the ability to reduce exogenous vanadate(V) to vanadyl(IV), employing HPLC and ESR spectrometry. Ascidians with these unusual physiological characteristics may help us to develop a technique for selective extraction of rare metals from sea water.