



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Effect of biomacromolecules on calcium carbonate formation and sand solidification induced by urease-based mineralization [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Nawarathna, Thiloththama Hiranya Kumari
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第13800号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75891
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Thiloththama_H._K._Nawarathna_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (工学) 氏名 Thiloththama Hiranya Kumari Nawarathna

審査担当者 主 査 准教授 中島 一紀
 副 査 教 授 川崎 了
 副 査 教 授 廣吉 直樹
 副 査 教 授 松本 謙一郎

学位論文題名

Effect of biomacromolecules on calcium carbonate formation and sand solidification induced by urease-based mineralization

(ウレアーゼを用いた炭酸カルシウム形成および砂質材料の固化における生体高分子の影響)

現在、世界各国において、急速な産業の発展と人口増加により、建造物建設に利用できる土地の面積が日々減少しており、そのため軟弱で問題のある土地の利用を余儀なくされている。このような土地は支持強度が低く、地盤沈下を引き起こすため、それらを利用するためにはいくつかの工学的な課題を解決しなければならない。したがって、安全で低コストの建設を行うためには適切な地盤改良技術の開発が必須である。現行の地盤改良技術には、環境問題も含めたいくつかの問題点がある。緩い地盤の処理には主に化学薬品あるいはセメントによるグラウトが効果的であるが、化学薬品は環境への影響が大きいことが多く、セメントの製造時には大量の二酸化炭素が放出される。このような状況において、現行法に代わる新たな手法として生物学的なアプローチが注目を集めており、特に微生物による炭酸塩析出技術 (MICP: microbially-induced carbonate precipitation) が効果的で環境に優しい地盤改良技術として期待されている。ラボレベルおよびフィールドでの実験により、MICP は土壌の強度と剛性を効果的に増強できることが示されている。MICP 法の効率が改善されるとともに持続可能性が示されれば、実用化に向けての大きな一歩となる。本論文では、MICP において生体高分子の影響を調査し、炭酸カルシウムの析出を増加させることで高効率なバイオ固化を目的とした。

第1章は序論であり、研究の背景、既往の研究の紹介、本研究の目的、独自性、および有用性について議論した。

第2章では、カチオン性およびアニオン性の合成ポリペプチドが炭酸カルシウムと砂の固化に及ぼす影響について検討した。ポリリジン (poly-Lys) とポリグルタミン酸 (poly-Glu) を用い、尿素分解菌 *Pararhodobacter* sp. の尿素加水分解によって引き起こされる炭酸カルシウム生成への影響を調査した。その結果、poly-Glu では炭酸カルシウム生成への影響がなかったのに対し、poly-Lys の添加により生成量が増大した。ポリカチオンである poly-Lys との静電的相互作用により重炭酸イオン濃度が局所的に増大し、炭酸カルシウムの核生成と結晶成長がより効率的に引き起こされたと考えられる。また、通常のカルサイトは菱面体晶あるいは多面体結晶であるのに対し、poly-Lys 添加系では楕円形の炭酸カルシウム結晶が観察され、poly-Lys が結晶のモルフォロジーを大きく変化させることが明らかとなった。これは、poly-Lys の構造がアルカリ条件下では α ヘリックスに変化することに由来すると考えられる。また、MICP による砂の固化における poly-Lys の影響を

種々の条件で調査したところ、poly-Lys 添加系ではより高い強度の固化供試体を得られた。ともにアニオン性を示す砂粒子表面とバクテリア細胞表層がカチオン性の poly-Lys によって静電的に架橋されたことが原因の一つとして考えられる。また、poly-Lys 添加による炭酸カルシウムのモルフォロジー変化と結晶量増大も効率的な固化に大きく影響したと推察される。

第3章では、炭酸カルシウム析出と砂の固化における天然高分子の影響について検討した。天然のカチオン性高分子であるキトサンの MICP における影響を調査した。キトサンの添加により炭酸カルシウムの析出量が増大した。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察により、この析出物は炭酸カルシウムとキトサンハイドロゲルからなることが分かった。尿素の加水分解により溶液がアルカリ性にシフトし、炭酸カルシウムだけでなく、キトサンゲルも生成したと考えられる。反応に用いるバクテリア細胞濃度が低い場合は菱面体晶のカルサイトとキトサンゲルが生成するのに対し、細胞濃度が高い場合には表面が粗く形状が歪んだカルサイトが得られた。カチオン性のキトサンは炭酸カルシウム結晶の核生成サイトとなりうると推察される。また、キトサン分子中の水酸基やアミノ基などの官能基が結晶表面に結合することにより結晶形状の変化を引き起こしたと推察される。また、砂の固化実験においても、キトサン添加により強く固化した砂供試体を得られ、供試体の上部では 38% の強度増加が見られた。キトサンゲルの生成により砂粒子間の結合が促進され、より効率的な固化につながったと考えられる。

第4章では、有機-無機ハイブリッド材料の作製を可能とする融合タンパク質の開発を行った。キチン結合ドメイン (ChBD) にカルシウム結合性ペプチド (CaBP) を融合することで、キチンマトリックス上で効率的な炭酸カルシウム形成が可能なタンパク質をデザインした。目的の融合タンパク質 (CaBP-ChBD) の遺伝子構築と大腸菌 *E. coli* によるタンパク質発現に成功した。CaBP-ChBD のキチン結合性を評価したところ、80% のタンパク質が3時間以内にキチン粒子に結合した。ナタマメ由来酵素分解酵素を用いた炭酸カルシウム形成におけるキチンおよび CaBP-ChBD の添加の影響を調査したところ、キチンの添加ではごくわずかな増加しか見られなかったのに対し、キチンと CaBP-ChBD の両方を添加することにより、析出量が 55% 増大することが示された。結晶のモルフォロジーも大きく変化し、CaBP-ChBD 添加によりダンベル型の結晶が得られ、キチン粒子が炭酸カルシウム結晶で完全に被覆される様子が観察された。一方、タンパク質を添加しない場合は、キチン粒子は炭酸カルシウム結晶で被覆されなかった。CaBP 中に存在するリジン、ヒスチジン、アルギニンなどの塩基性アミノ酸側鎖が炭酸カルシウム生成を促進したと考えられる。

第5章は結論であり、本研究によって得られた成果をまとめている。

以上を要するに、筆者は微生物や酵素を用いた炭酸カルシウム生成におけるバイオポリマーの影響について検討を行い、ポリリジンやキトサンが炭酸カルシウムの生成量を増加させるとともにモルフォロジーの変化を引き起こすことを明らかにした。さらに、遺伝子工学的手法により、キチン上で炭酸カルシウムを形成することができるタンパク質をデザインした。これらは、環境調和型の地盤改良技術の開発において新たな知見を与えるものであり、環境資源工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって筆者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格があるものと認める。