

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03181

研究課題名（和文）タンパク質高品位結晶化の実現に向けた物質拡散の時空間能動制御

研究課題名（英文）Temporal and Spatial Active-Control of Mass Diffusion for High Quality Crystallization of Protein

研究代表者

小宮 敦樹 (Komiya, Atsuki)

東北大学・流体科学研究所・教授

研究者番号：60371142

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質の液相内移動現象を能動制御し、タンパク質高品位結晶化の実現を目指すことを目的としている。マイクロスケールの細孔を有する膜（スマートメンブレン）を用い、膜を介してのタンパク質物質輸送現象を実験的に可視化し、その能動制御の可能性を評価した。可視化実験結果の検証には数値計算を援用し、膜近傍での非定常拡散場を定量評価することで、タンパク質物質拡散の時空間能動制御を可能とする支配因子を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、研究目的にも示したように、タンパク質高品位結晶化の実現を目指している。得られた研究成果から、自然対流が抑制された条件下で容易にタンパク質の高品質結晶を創り出すことが期待でき、タンパク質の分子構造情報を高精度に取得することが可能となる。これによりタンパク質の物性や機能の理解が進み、学術的には創薬や食品学の分野の発展に資する情報が提供でき、また、高品質の薬品等が効率よく生産できることから、社会的意義も大きいものとなる。

研究成果の概要（英文）：This research focused on the proposal of high-quality crystallization method for proteins by active control of protein mass transfer in liquid phase. Applying a special membrane which has micro-structured pores, a hindered diffusion field in the vicinity of membrane was experimentally visualized and the possibility of its active control was evaluated. Numerical simulation of transient diffusion field was also performed, and quantitative evaluation of mass diffusion process was done. Through the results from experiment and numerical simulations, the key factor for actively controlling protein mass transfer was evaluated.

研究分野：熱工学

キーワード：タンパク質 物質拡散 結晶成長 位相シフト干渉計 機能性膜

1. 研究開始当初の背景

(1) MEMS 技術の革新的な発展により、これまで不可能とされてきたマイクロ・ナノ空間における輸送現象の能動制御が実現化し、熱工学分野においても熱物質移動現象をマイクロ・ナノスケールオーダーで能動制御できる可能性が見出されてきているが、その研究は他の分野の応用展開と比較してみると十分進展があるとはいえない。特に結晶成長などの相変化を有する複雑系熱物質移動現象においては、現象の起こる領域がマイクロスケールであるにも関わらず、微視的視野の観点から現象を究明し、能動制御技術を確立する研究は散見される程度である。

(2) サブミリ領域における物質移動の高精度可視化技術が確立され、その移動現象論に特化した研究が進められてきている。具体的には、周囲環境が物質移動現象に及ぼす影響を定量評価し、特にタンパク質の構造的・物理的特徴がヒト体内の環境においてどのように変化するかの実験的研究が進められてきた。また、マイクロチャンネル群を有する薄膜を製作し、周囲環境によりタンパク質の薄膜透過量を制御する束縛拡散についての実験的研究も進められてきており、膜を介することでタンパク質の物質流束を自由拡散比の 50 - 150% 程度で促進・抑制制御できる可能性が見出された。

(3) これまでの結晶成長過程では種結晶近傍の濃度場が低くなり、結果として局所的に自然対流を生じることで、結晶の低品位化が問題とされてきた。近年の宇宙実験では、自然対流抑制環境下においてタンパク質結晶成長実験を実施し、地上実験結果と比較することで自然対流が結晶化に及ぼす影響について報告している。また、多成分系の拡散場において巨大分子の相互作用が微小分子の物質移動量を制御するという研究報告からもわかるように、物理的空間制御における局所物質流束制御の可能性が示されている。

2. 研究の目的

(1) マイクロチャンネル群を有する周囲環境応答性透過膜（スマートメンブレン）を製作し、その応答評価技術の確立および諸種タンパク質物質輸送能動制御技術を定量評価する。物質材料工学を専門とする海外研究協力者との意見交換をもとに、図 1 に示すような有孔透過膜およびポリマーに周囲環境応答機能を持たせ、マイクロチャンネルおよび空隙の平均径（幅）を変化させた拡散実験を行い、物質移動量と周囲環境の関係を実験的に明らかにする。

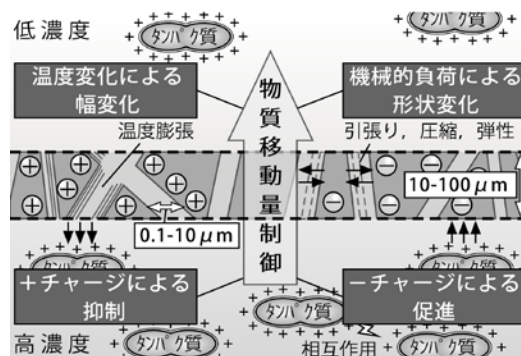


図 1 スマートメンブレン概念図

(2) タンパク質結晶成長実験を行い、浮力対流による濃度斑（ムラ）起因の結晶品位を評価する。評価には研究代表者所属機関に既存のラマン分光装置を用いる。その後、種結晶周囲に機能性膜を配置させた特性の結晶成長測定装置を製作し、近傍濃度場を完全制御することで均一濃度場を形成し、この条件下での結晶成長実験を行う。作成された結晶を比較することで、高品位化技術の評価を行う。

(3) 結晶成長学の観点に立脚して本提案を学際展開し、周囲環境の制御と結晶品位の関係を明らかにする。周囲環境の制御法はタンパク質の種類によって異なるため、パラメトリックな実験とその結果の整理が必要となるが、本提案技術を特定のタンパク質結晶成長に依らず一般化するべく、タンパク質の特性を考慮した濃度場制御技術の理論構築を行う。

3. 研究の方法

(1) 周囲環境応答性を有した透過膜（スマートメンブレン：機能膜）の製作と透過実験を行う。申請者既有的の高精度可視化システムに改良を施し、スマートメンブレン近傍をマイクロオーダーの空間的高解像度で計測可能にする。また、これまでの申請者の研究での知見を利用し、物質材料工学を専攻する海外研究協力者の助言のもと、複数種のスマートメンブレンの製作を行う。必要に応じて、東北大学マイクロ・ナノマシニング研究教育センターを利用して製作を行う。製作した上記透過膜群を用いて物質移動可視化実験を行う。これまでの研究で確認をした温度条件、濃度条件、pH 条件および電界条件の範囲を超えて実験実施を展開し、パラメトリックなデータの取得を行う。研究協力者の大学院生と協力して実験を遂行する。

(2) 膜内物質透過量の定量的評価および膜の応答評価法を確立する。製作したスマートメンブレ

ンを用いて諸種条件下による拡散実験を行う。温度調節システムを用いた環境温度の依存性、機械的負荷を与えることで透過膜の平均空間径を変化させた細孔径依存性を実験的に定量評価する。実験頻度の増加に伴い実験実施補佐員を雇用する。得られる実験結果から、周囲環境の条件を考慮した膜透過量の評価法および膜の応答評価法の確立を図る。

(3) 結晶成長実験を実施し、結晶品位の評価を行う。タンパク質飽和水溶液内に種結晶を配置し、セル内を急冷することで結晶成長実験を行う。本実験では、まず結晶成長時に生じる自然対流が結晶品位に及ぼす影響を評価する。セルの冷却速度は 10K/s で一定とし、濃度差レイリー数は 10^5 程度とする。続いて、自然対流を抑制させた実験を行う。種結晶周りを複数のセグメントに分割し、各セグメントにスマートメンブレンを配置し、外部から内部への物質流束を時間的空間的に制御する。

4. 研究成果

(1) タンパク質物質輸送能動制御技術を定量評価するためのスマートメンブレンのデザイン検討を行った。物質材料工学専攻の海外研究協力者の協力を得ながら、複数種のスマートメンブレンの仕様を決定した。具体的には多孔体形状のメンブレンと円柱状のアイソポアメンブレンの二種類を製作し、細孔形状およびそれらのパターンニングがタンパク質輸送現象に及ぼす影響を評価した。多孔体形状の代表孔径調整は、製作時のガス圧で精密制御できることを見出し、代表孔径と圧力の関係性を明らかにした。

(2) 既存の高精度可視化システムにレンズ群を付加し、スマートメンブレン近傍を空間高解像度 10 ミクロンのオーダーで計測可能な光学システムを開発した。有限の距離内で可視化レーザーを拡大するため、その拡大率が大きくなってしまったが、レーザーの出力を上げることにより視野と輝度情報の精度を維持し、あわせて CCD カメラを CMOS カメラに変更し、4K (4096×2160 ピクセル) 画像を取得できるようにした。

(3) 上述の改良したシステムを用いて、製作したスマートメンブレンを介したタンパク質物質拡散の可視化観察実験を行った。これらのメンブレンのうち、多孔体形状のメンブレンについては孔径の代表径が 100~460 マイクロメートルの範囲での実験を行い、また、代表孔径が 5~10 マイクロメートルのミリポア膜も用いて実験を行った。メンブレンの厚さは 0.5mm で一定とした。これらの実験結果を比較することで、孔径サイズが物質拡散に及ぼす影響について評価した。高解像度化したことにより、図 2 に示すようなメンブレン近傍の濃度勾配形成の細孔径依存性を計測できるに至った。これらの可視化実験結果から、多孔体形状のメンブレンにおいては、代表径が大きくなるほどメンブレン近傍の濃度勾配は大きくなり、物質流束も高くなることが実験的に示された。また、同孔径における多孔体形状とアイソポア形状の比較においては、両者の非常濃度拡散場には有意な差は生じず、形状よりも細孔の孔径が物質輸送量に強く影響を及ぼしていることが明らかとなった。

さらには、物質流束は自由拡散の場合は時間経過とともに減少していくが、膜を介した束縛拡散においては、初期の物質流束が維持されたまま拡散が進行していることが本可視化実験シリーズにより示された。その結果、スマートメンブレンの代表孔径はタンパク質の透過量を制御するだけでなく、物質流束の時間変化も制御することが可能であり、定常の物質流束となる第二種境界条件を実現できることを明らかにした。

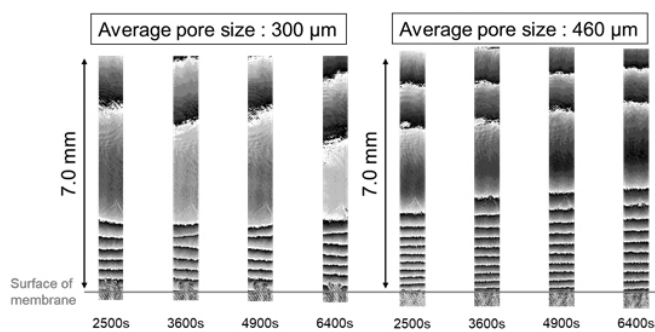


図 2 スマートメンブレン近傍の濃度場可視化

(4) 上述のように、メンブレンの細孔形状よりも孔径が物質輸送量に強く影響を及ぼしていることが明らかとなったため、孔径の違いがどのように物質輸送現象に影響を及ぼしているかを評価するため、アイソポア形状における可視化実験を進めた。細孔面積率が等しくも細孔の配置が異なるメンブレン群を MEMS 技術により製作し、定量評価を行ってきた。その結果、図 3 に示すように細孔径が小さく隣接細孔間距離が短いほど、メンブレン近傍の膜法線方向の濃度勾配は高く維持され、膜を介しての物質輸送量が大きくなることが実験的に示された。細孔面積率は同じでも細孔の隣接間距離がスマートメンブレン物質透過量を制御する因子となっていることが明らかとなった。これらの成果は国際会議で発表を行い、講演論文表彰を受けた。

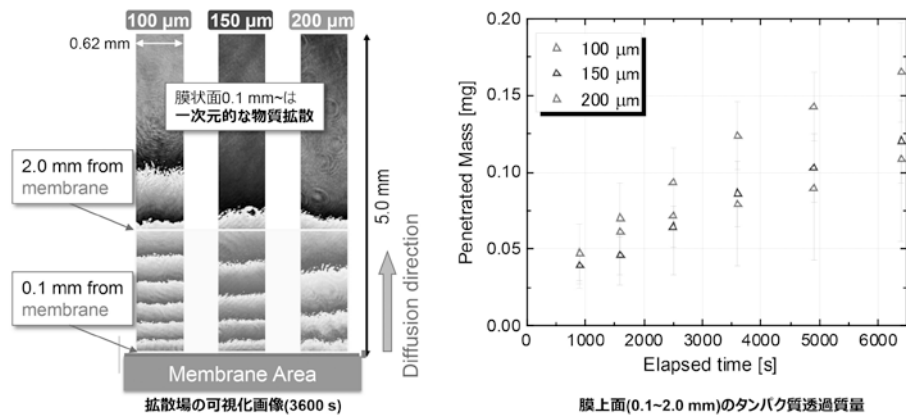


図3 細孔径の違いによる膜透過質量の違い

(5) 温度場を考慮した結晶成長に関する数値シミュレーションを行った。温度場濃度場同時シミュレーションコードを用いて、種結晶周りの結晶成長を進行させつつ自然対流を抑制させることのできる温度境界条件の検討を行ってきた。数値計算は三次元で行い、最適条件の検討を進めた。その結果、結晶成長が促進される周囲環境温度領域において、局所空間的に温度勾配を設けることにより、温度場起因の浮力と濃度場起因の浮力が相殺される温度分布が存在し、この条件を維持することで自然対流が抑制されることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Eita Shoji, Atsuki Komiya, Junnosuke Okajima, Masaki Kubo and Takao Tsukada	4. 巻 112
2. 論文標題 Three-step phase-shifting imaging ellipsometry to measure nanofilm thickness profiles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Optics and Lasers in Engineering	6. 最初と最後の頁 145-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.optlaseng.2018.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ke Junhao, Williamson N., Armfield S. W., Norris S. E., Komiya A.	4. 巻 902
2. 論文標題 Law of the wall for a temporally evolving vertical natural convection boundary layer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Fluid Mechanics	6. 最初と最後の頁 A31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/jfm.2020.621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Torres Juan F., Zhao Yongling, Xu Shuqi, Li Zhengyu, Komiya Atsuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Optical Method for Simultaneous High-Resolution Measurement of Heat and Fluid Flow: The Case of Rayleigh-Benard Convection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Review Applied	6. 最初と最後の頁 54038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevApplied.14.054038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Atsuki Komiya, Ryo Watanabe, Hani Alkitabi Aldaftari, Shuichi Moriya and Sebastien Livi
2. 発表標題 Evaluation of the Relations between Hindered Diffusion Process of Protein and Membrane Structure
3. 学会等名 The Second Pacific Rim Thermal Engineering Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Watanabe, Shuichi Moriya, Sebastien Livi and Atsuki Komiya
2. 発表標題 Measurement of protein mass flux through porous membrane
3. 学会等名 ELyT Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Watanabe, Shuichi Moriya, Sebastien Livi, Hani Alkitabi Aldaftari and Atsuki Komiya
2. 発表標題 Quantitative Evaluation of the Influence of Membrane Structure on Protein Mass Diffusion
3. 学会等名 16th International Conference on Flow Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hani Alkitabi Aldaftari, Ryo Watanabe and Atsuki Komiya
2. 発表標題 Numerical Simulation of Concentration Field around a Growing Crystal Subjected to Gravity
3. 学会等名 16th International Conference on Flow Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuki Komiya, Ryo Watanabe and Sebastien Livi
2. 発表標題 Protein Mass Transfer Control by Using Hindered Diffusion in Membrane
3. 学会等名 19th International Symposium on Advanced Fluid Information (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuki Komiya and Sebastien Livi
2. 発表標題 Experimental Study on Active Control of Protein Transport Phenomena by Membrane
3. 学会等名 The 28th International Symposium on Transport Phenomena (ISTP-28) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsuki Komiya and Sebastien Livi
2. 発表標題 Experimental Study on Active Control of Protein Mass Flux by Functional Membrane
3. 学会等名 ELyT Workshop 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuma Kogawa, Junnosuke Okajima, Atsuki Komiya and Shigenao Maruyama
2. 発表標題 Experimental Evaluation of Objective Function for Perdition of IR Camera's Sensitivity
3. 学会等名 20th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Junhao Ke, Nicholas Williamson, Steven W. Armfield and Atsuki Komiya
2. 発表標題 Integral Modelling of an Unsteady Natural Convection Boundary Layer
3. 学会等名 20th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuqi Xu, Yongling Zhao, Atsuki Komiya and Juan Felipe Torres Alvarez
2. 発表標題 Quantitative Visualization of Flow Bifurcation in Laminar Rayleigh-Bénard Convection with Combined PSI and PIV
3. 学会等名 20th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsuki Komiya, Ryo Watanabe, Yuki Kanda, Juan Felipe Torres Alvarez and Sebastien Livi
2. 発表標題 Effect of Micropores Patterning in Separated Plate on Protein Hindered Diffusion Phenomena
3. 学会等名 20th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邉峻, Juan Felipe Torres Alvarez, 神田雄貴, 小宮敦樹
2. 発表標題 マイクロ細孔を利用したタンパク質の物質拡散制御の可能性評価
3. 学会等名 日本機械学会熱工学コンファレンス2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岡島 淳之介 (OKAJIMA Junnosuke) (70610161)	東北大学・流体科学研究所・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------