

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04963

研究課題名(和文) 液液界面を利用した生体模倣型逆浸透膜の無欠陥・大面積製膜

研究課題名(英文) Defect-free and large-scale formation of biomimetic reverse osmosis membranes using a liquid-liquid interface

研究代表者

佐伯 大輔 (SAEKI, Daisuke)

信州大学・学術研究院工学系・助教

研究者番号：70633832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、無欠陥で、高い透水性と実用的強度を有する生体模倣型逆浸透膜の作製方法について検討した。Gramicidin AやAmphotericin Bのような構造が比較的単純な生体分子を水チャネルとして用い、これらの水チャネルを含む平面脂質二分子膜を、表面構造が制御された多孔体表面へ展開する方法を確立した。得られた生体模倣型逆浸透膜は、耐圧性を有しており、既往の生体模倣型逆浸透膜や市販の高分子系逆浸透膜より高い分離性能を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の高分子系逆浸透膜は、既に性能向上が難しい現状にある。一方で、生体模倣型逆浸透膜は、理論的には高い性能が実現できると期待されている。しかしながら、水チャネルの機能発現や安定な脂質二分子膜形成が難しいなどの問題から、これまで、市販の高分子系逆浸透膜の性能を超える報告例はほとんどなかった。本研究では、水チャネルの選定と支持体の最適化、製膜方法の改良により、市販膜を超える透水性および実用的強度を兼ね備えた逆浸透膜の作製に成功し、実用化の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The fabrication method of defect-free biomimetic reverse osmosis (RO) membranes with high water permeability and stability have been established. Simple structural biological molecules, gramicidin A or amphotericin B, were used as water channel. A supported lipid bilayer (SLB) containing these water channel molecules were formed onto a porous substrate with well-controlled surface structure and evaluated as RO membranes. The formed SLB had high stability against applied pressure and showed higher water permeability than the previously reported biomimetic RO membranes and commercial membranes.

研究分野：工学

キーワード：膜分離 逆浸透膜 生体模倣 リポソーム 脂質二分子膜

4. 研究成果

(1) 無欠陥脂質二分子膜の形成

支持体の表面構造が SLB 形成に及ぼす影響を評価した結果を図2に示す。図2(左)に示すように、孔径の異なる様々な支持体を作製した。これらを用いて水チャネルを導入した SLB を作製した結果、表面が緻密な支持体を用いた場合、塩阻止性は高いものの、透水性が低く、支持体の透水性が律速となることが分かった(図2右)。一方で、表面が疎な支持体を用いた場合、高い塩阻止性は得られず、脂質二分子膜に欠陥がある事が示唆された。孔径を適切に制御した場合においてのみ、高い透水性、塩阻止性が得られた。これらの結果から、脂質二分子膜を担持するために必要な細孔径が存在する事がわかった。

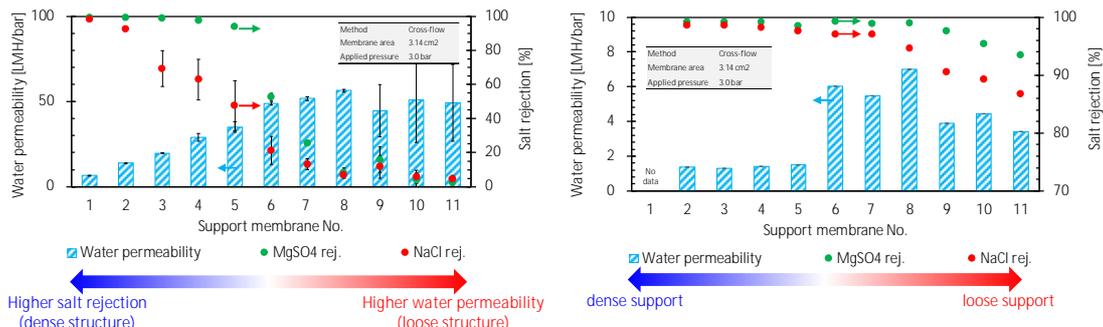


図2. 支持体の透水性・塩阻止性(左図)と得られたSLBの透水性・塩阻止性(右図) SLB形成はDOTAP20 mol%, GA 5 mol%を含むリポソームを用いて行った。

次に、水チャネルとしてGAを用い、リポソームの脂質組成がSLB形成に及ぼす影響を評価した。カチオン性脂質DOTAPの含有量が増加するほど透水性が低下する傾向が得られた(図3)。CDスペクトルでGAの立体構造を評価したところ、DOTAPの増加と共にGAのチャネル構造の形成を示すピークの減少がみられたことから(図4)DOTAPの正電荷がGAのチャネル構造形成を阻害したと考えられる。一方で、DOTAPを添加しない場合は、高い透水性は得られなかった。支持体との静電相互作用が働かず、SLBが形成されなかった、あるいはリポソームが吸着したのみの、欠陥のあるSLBが形成されていると考えられる。表面構造、DOTAP含有量を最適化した条件において、支持体に吸着したリン脂質量を定量したところ、ほぼ単層の脂質二分子膜に相当するリン脂質が吸着していることがわかった。

チャネルの導入量がSLB形成に及ぼす影響を評価したところ、GAを用いた場合、5 mol%導入した際に最も高い透水性が得られ、それ以上導入した場合は透水性の低下が見られた。CDスペクトルを測定したところ、GAの導入量が10 mol%以上ではチャネル構造由来のピークの減少が見られ、立体構造の形成に最適な導入量が存在することが分かった。この傾向はAmBを水チャネルに用いた場合もみられ、SLBにおける透水性、塩阻止性と、リポソームにおけるCDスペクトル測定やストップフロー法の結果には相関があることがわかった。これらの結果から、支持体表面に形成されたSLBはリポソームと同様の脂質膜環境を有しており、リポソームを用いた評価により、高い分離性能を示す水チャネル導入条件をスクリーニングできる可能性が示唆された。

上記のGAやAmBのような水チャネルは、SLBへの導入を直接的に評価する事は難しい。そこで、モデル水チャネルとして孔形成膜タンパク質であるstreptolysin O(SLO)を用い、蛍光標識抗体を用いた免疫染色によりSLOの導入を可視化する方法を確立した(W. Miyashita, 2018)。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により、SLOが導入された場合のみ免疫染色されたSLO由来の蛍光が検出でき、蛍光分子の流動性を解析したところ、脂質分子とSLO分子が同程度の流動性を有する、すなわち平面脂質二分子膜状態でSLOが導入されていることが評価できた。本手法は、SLBにおける水チャネル分子の導入状態の評価に応用できると考えている。

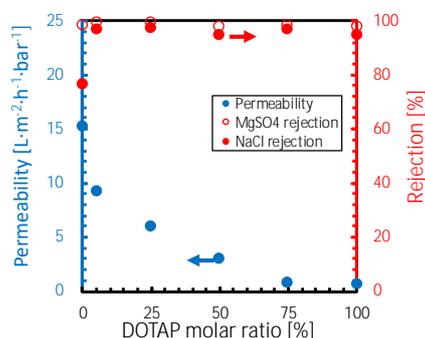


図3. DOTAPの含有量がSLBの透水性・塩阻止性に及ぼす影響

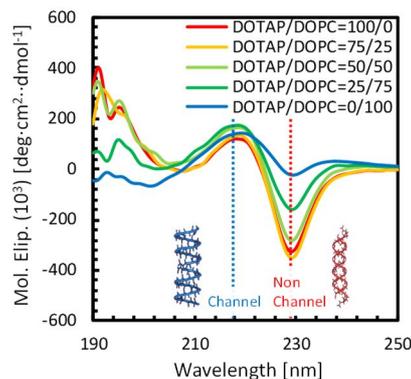


図4. DOTAPの含有量がGAの立体構造に及ぼす影響

(2) 物理的・化学的強度の付与

SLB の安定性を低下させる要因の一つ、担体自身の細孔径による不安定化、については、前述した支持体の表面構造の検討により、適切な条件により抑制できることが明らかになった。脂質二分子膜自体の不安定化、を解決するため、まず、脂質二分子膜の分子間架橋について検討した。分子間架橋の方法として、UV 光により架橋できることが知られている、1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (DiynePC) を用いた分子間架橋について検討した。CD スペクトルおよびストップフロー法の結果から、DiynePC を架橋する際に照射する UV 光が GA の構造を破壊するという結果が得られたため、架橋性の DiynePC と非架橋性脂質からなる SLB を形成させ、架橋後に GA を導入する方法を検討した。リポソームを用いた評価から、DiynePC と DOPC を混合することで、相分離構造が得られることが分かった(K. Okuno, 2020)。また、DOPC 相であれば GA を導入できるという結果が得られたため、DiynePC と DOPC の混合リポソームで SLB 形成を試みたが、研究期間中に最適な SLB 形成条件を得ることはできなかった。SLB 形成挙動を更に詳細に検討することで、光架橋により安定な SLB を得られると考えられる。次に、交互吸着法を用いた SLB の高分子被覆について検討した。交互吸着法の際に用いる高分子の構造を制御することで、流動性を有し、欠陥の無い SLB を形成する条件を確立できた (A. Seimei, 2020)。確立した条件を基に、SLB 表面に高分子保護層を形成することで、更なる安定性向上につながると考えられる。

(3) 実用化に向けた課題抽出

上記のようにして得られた SLB について、RO 膜として実プロセスで必要とされる耐圧性について評価したところ、高い透水圧においても透水性、塩阻止性は一定の値を示し、安定であることがわかった(図5)。また、実用化においては生産性向上(大面積化)が課題となり、脂質二分子膜をより効率的、経済的に形成させる必要がある。製膜時に用いる脂質溶液濃度の低減や、SLB 形成におけるリポソームの接触方法について最適化を行うなど、モジュール化に向けた検討も行った(特許出願済)。

最後に、本研究で得られた生体模倣型 RO 膜の分離性能を、市販の高分子系 RO 膜や aquaporin を水チャネルとした既往の生体模倣型 RO 膜と比較した結果を図6に示す。既往の報告よりも高い透水性、塩阻止性を達成する事ができた。この要因としては、aquaporin よりも構造が単純な生体分子を水チャネルとして用いたため、SLB における水チャネルの構造制御や機能発現につながった、支持体の表面構造の最適化により、欠陥の発生が抑制された、の2点が考えられる。さらに、市販の高分子系 RO 膜と比較しても、同程度の塩阻止性でより高い透水性が達成できた。

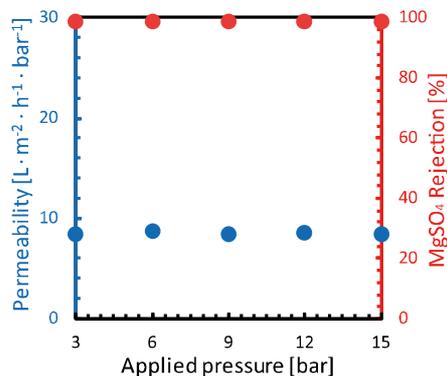
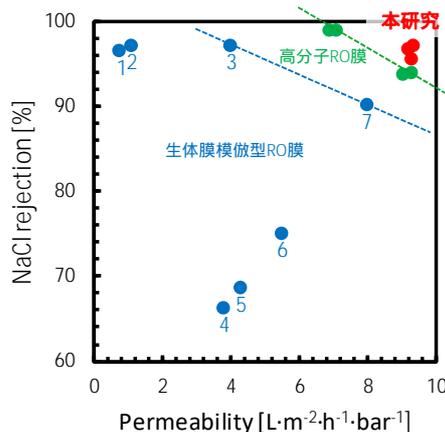


図5 . 得られた SLB の耐圧性評価



生体膜模倣型RO膜

1. Y. He et al., J. Appl. Polym. Sci., 2018
2. D. Saeki et al., Desalination, 2015
3. Y. Zhao et al., JMS, 2012
4. G. Sun et al., Colloids Surf B, 2013
5. H. L. Wang et al., JMS, 2013
6. M. Wang et al., Environ. Sci. Technol., 2015
7. X. Li et al., JMS, 2015

図6 . 本研究の生体模倣型 RO 膜と既往研究の分離性能の比較

(4) 結言

本研究の成果により、高い透水性と実用的強度を兼ね備え、既存の高分子系膜を超える性能を有する、生体由来の水チャネルを分離素子として用いた生体模倣型 RO 膜を作製する事ができ、生体模倣型 RO 膜の実用化につながる、重要な知見が得られた。しかしながら、現状では、理論的に達成しうる水チャネルの透水性には及ばず、透水性向上の余地がある。今後の展望として、支持体構造や水チャネル導入条件の更なる最適化により、透水性向上を目指した検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 H. Wu, T. Yoshioka, K. Nakagawa, T. Shintani, D. Saeki, H. Matsuyama	4. 巻 583
2. 論文標題 Molecular simulation of a modified amphotericin B-Ergosterol artificial water channel to evaluate structure and water molecule transport performance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Membrane Science	6. 最初と最後の頁 49-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.memsci.2019.04.021	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 A. Seimei, D. Saeki, H. Matsuyama	4. 巻 569
2. 論文標題 Effect of polyelectrolyte structure on formation of supported lipid bilayers on polyelectrolyte multilayers prepared using the layer-by-layer method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Colloid and Interface Science	6. 最初と最後の頁 211-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcis.2020.02.079	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 K. Okuno, D. Saeki, H. Matsuyama	4. 巻 1862
2. 論文標題 Phase separation behavior of binary mixture of photopolymerizable diacetylene and unsaturated phospholipids in liposomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2020.183377	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 佐伯大輔	4. 巻 96
2. 論文標題 生体膜を模倣した水処理膜	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 佐伯大輔	4. 巻 44
2. 論文標題 生体分子を透過孔とした生体模倣型逆浸透膜の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 22-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.44.22	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 W. Miyashita, D. Saeki, H. Matsuyama	4. 巻 538
2. 論文標題 Formation of supported lipid bilayers on porous polymeric substrates induced by hydrophobic interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 297-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2017.11.006	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 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 清明充, 佐伯大輔, 奥野健太, 川勝孝博, 藤村侑, 松山秀人
2. 発表標題 AmphotericinBを透過孔とした生体模倣型逆浸透膜の製膜条件が透水性能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本膜学会第40年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Seimei, D. Saeki, K. Okuno, T. Kawakatsu, Y. Fujimura, H. Matsuyama
2. 発表標題 Fabrication of biomimetic water purification membrane with Amphotericin B as a permeating pore
3. 学会等名 The 12th International conference of the Aseanian Membrane Society (AMS12) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯大輔
2. 発表標題 生体膜を模倣した逆浸透膜の開発
3. 学会等名 第2回COI学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Seimei, D. Saeki, T. Kawakatsu, Y. Fujimura, H. Matsuyama
2. 発表標題 Effect of an amount of lipids on water permeability of supported lipid bilayers with Amphotericin B as a permeating pore
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清明充, 佐伯大輔, 川勝孝博, 藤村侑, 松山秀人
2. 発表標題 リポソーム融合法による生体模型水処理膜の作製におけるリポソーム濃度の影響
3. 学会等名 膜シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 両頭佳佑, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 アニオン性表面への支持脂質二分子膜の形成に関する検討
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(東京大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷河怜, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 静電相互作用を用いたリポソーム融合法におけるSLB形成挙動に及ぼす脂質組成と融合誘発剤の影響
3. 学会等名 日本膜学会第41年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐伯大輔, 高井徹, 熊谷和夫, 松山秀人
2. 発表標題 脂質二分子膜のアルキル鎖長がAmphotericin Bの物質透過性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本膜学会第40年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清明充, 佐伯大輔, 奥野健太, 松山秀人
2. 発表標題 Layer-by-Layer法で作製した高分子多重層表面への脂質二分子膜形成における高分子種の影響
3. 学会等名 日本膜学会第40年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Saeki, Kenta Okuno, Takahiro Kawakatsu, Yu Fujimura, Hideto Matsuyama
2. 発表標題 Fabrication of biomimetic reverse osmosis membrane using a phospholipid bilayer and gramicidin A via electrostatic interaction
3. 学会等名 The 11th Conference of Aseanian Membrane Society (AMS11) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥野健太, 佐伯大輔, 川勝孝博, 藤村侑, 松山 秀人
2. 発表標題 ナノ細孔を有する支持体を用いた生体膜模倣型逆浸透膜の開発
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清明充, 佐伯大輔, 奥野健太, 川勝孝博, 藤村侑, 松山秀人
2. 発表標題 Amphotericin Bを透過孔とした生体模倣型逆浸透膜におけるチャンネル組成が透水性に及ぼす影響
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐伯大輔
2. 発表標題 生体膜の模倣による水処理膜の高機能化
3. 学会等名 信州大学工学部コロイド&界面科学研究センター第4回(2018年)研究討論会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥野健太, 佐伯大輔, 川勝孝博, 藤村侑, 松山 秀人
2. 発表標題 高い耐圧性を有するナノ細孔を持つ支持体を用いた生体膜模倣型逆浸透膜の開発
3. 学会等名 膜シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清明充, 佐伯大輔, 奥野健太, 川勝孝博, 藤村侑, 松山秀人
2. 発表標題 生体模倣型分離膜におけるAmphotericin Bチャンネルの組成が透水性能に及ぼす影響
3. 学会等名 膜シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Saeki, Kenta Okuno, Takahiro Kawakatsu, Yu Fujimura, Hideto Matsuyama
2. 発表標題 Fabrication of biomimetic reverse osmosis membranes composed of a lipid bilayer, gramicidin A, and nanoporous supports
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩井崇, 本村稔季, 通阪栄一, 鈴木祐麻, 比嘉充, 佐伯大輔, 松山秀人
2. 発表標題 リポソーム膜中の環状ペプチド会合体による水チャンネル形成
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐伯大輔, 奥野健太, 川勝孝博, 藤村侑, 松山 秀人
2. 発表標題 Gramicidin Aを透過孔に用いた生体模倣型逆浸透膜の開発
3. 学会等名 日本化学会第99回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥野健太, 佐伯大輔, 松山秀人
2. 発表標題 重合性脂質により構成される脂質二分子膜の膜構造評価
3. 学会等名 日本膜学会第39年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高井徹, 佐伯大輔, 熊谷和夫, 松山秀人
2. 発表標題 水処理膜を指向したAmphotericin Bのリン脂質二分子膜中での物質透過性評価
3. 学会等名 日本膜学会第39年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Takai, D. Saeki, K. Kumagai, H. Matsuyama
2. 発表標題 Characterization of membrane performance of supported lipid bilayers incorporating amphotericin B as water channels
3. 学会等名 2017 International Congress on Membranes and Membrane Processes (ICOM2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐伯大輔, 高井徹, 迫郁弥, 松山秀人
2. 発表標題 アルキル化多孔体を支持体とした平面脂質二分子膜の形成と物質透過性評価
3. 学会等名 第68回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清明充, 佐伯大輔, 奥野健太, 松山秀人
2. 発表標題 Layer-by-layer法を用いたナノ濾過膜の作製における高分子種の透水性への影響
3. 学会等名 第20回化学工学会学生発表会(広島大会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高井徹, 佐伯大輔, 熊谷和夫, 松山秀人
2. 発表標題 鎖長の異なる脂質二分子膜におけるAmphotericin Bの水/イオン透過性評価
3. 学会等名 化学工学会第83年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 選択性透過膜の製造方法および水処理方法	発明者 佐伯大輔、他	権利者 信州大学、他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-126965	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 選択性透過膜、選択性透過膜の製造方法および水処理方法	発明者 佐伯大輔、他	権利者 信州大学、他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-126966	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 選択性透過膜、その製造方法及び水処理方法	発明者 佐伯大輔、他	権利者 信州大学、他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-165418	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----