

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25709010

研究課題名(和文) タンパク質輸送を制御する -場の環境変化を利用した膜による能動制御-

研究課題名(英文) Control of Protein Mass Transfer -An Active Control by a Functional Membrane using a Variation of Surrounding Conditions-

研究代表者

小宮 敦樹 (Komiya, Atsuki)

東北大学・流体科学研究所・准教授

研究者番号：60371142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロチャネル群を有する膜を用いて、タンパク質の物質輸送制御技術を確立し、その能動制御可能性について実験的研究を進めてきた。様々な条件のもと束縛拡散実験を行い、これによりタンパク質物質流束を自由拡散比で5～20%程度に制御できることを明らかにした。膜の生成にはポリマー高次構造を基礎としたデザインを用い、マイクロチャネルの形状を変化させることで拡散現象を制御可能にした。また、周囲環境を変化させることで膜を透過する物質流束を制御し、この制御にはある程度の時間遅れが存在し、その遅れは膜の構造に依存することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, a possibility of active control of protein mass transfer using a functional membrane was experimentally investigated. The functional membrane has a micro-scale structure and protein molecule passes through micro-channels located in the membrane. Under parametric measurement experiments of transient mass diffusion fields, it is clear that the membrane could control protein mass flux with the range from 5 to 20 % of free diffusion flux. Additionally, it is obvious from experimental results that a time delay in mass flux control due to surrounding condition change relies on the micro-scale structure of membrane.

研究分野：熱工学

キーワード：タンパク質 物質移動 物質流束 機能性膜

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでにマイクロ領域における物質移動の高精度可視化技術を確立するとともに、その移動現象論に特化した研究を進めてきた。これらの研究成果から、タンパク質移動現象は場の pH や濃度に大きく依存し、物質拡散係数は数倍のオーダーで変化していくことを明らかにした。学術応用の点からこれらの知見を再確認すると、周囲環境の変化によりタンパク質物質移動制御が可能となることを意味しているが、これまでの研究では濃度や電位を制御する等の「場」の条件制御のみで、「自由拡散」から物理的空間が束縛される「束縛拡散 ( hindered diffusion )」に展開した制御までには至っていない。一方では、タンパク質の分子スケールであるサブマイクロ・ナノスケール領域での基盤技術が革新的に発展し、これまで困難であった微小空間における諸物理現象の能動制御が可能となりつつある。その応用は広範囲に亘り始めており、特に流体力学分野では、マイクロ流路内流れの制御を可能とし、マイクロ流体デバイスの研究開発が盛んに行われている。マイクロ構造を利用した伝熱促進等の熱移動に関する研究は多く報告されているが、物質移動については散見される程度である。

そこで、これまでに明らかにした周囲環境とタンパク質移動現象の関係性をもとに、物理的空間を直接制御することでもタンパク質移動を能動的に制御することが可能であると考え、本応募研究課題を提案するに至った。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでにタンパク質の輸送現象に関する研究を進めてきている。図 1 に研究代表者がこれまでに明らかにしたことと本研究で明らかにすることをまとめる。本研究では、周囲環境という「条件」を制御することでの拡散場制御から進展をさせ、「空間」を制御することでも拡散場を能動制御し、数値目標として、膜を通過する物質流速を同条件の自由拡散比で 10% ~ 200% の範囲で制御できる透過膜を製作する。本研究で行う点および明らかにする点は以下に示すとおりである。

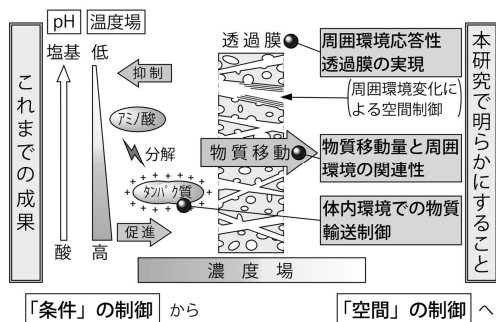


図 1 本研究で明らかにすること

(1) 周囲環境応答性透過膜の製作

物質材料工学を専門とする海外研究協力者の専門知識を生かして、孔径 0.1 ~ 10 $\mu$ m 程度の有孔透過膜および機能性ポリマーに周囲環境応答機能を持たせ、空孔の平均径 (幅) を変化させることのできる透過膜を製作する。膜厚は 10 ~ 100 $\mu$ m 程度とする。周囲環境条件としては温度場、電場および機械的負荷を考えている。

(2) 高精度可視化システムを用いた物質移動量と周囲環境の関連性評価

研究代表者既存の光学干渉計を改良利用し、上記透過膜を用いた拡散実験を行う。周囲環境をパラメトリックに変えた実験を展開し、物質移動量と環境の関連性を実験的に捉える。併せて、物質透過量の定量評価および透過膜の周囲環境との応答評価技術の確立を図る。

(3) ヒト体内環境下におけるタンパク質能動制御の可能性の追求

医工学の観点に立脚して本提案を展開し、周囲環境条件をヒト体内の条件に限定した拡散場観察実験を行う。生体内におけるタンパク質物質輸送現象の能動制御の可能性を実験的に追求し、薬学・医工学分野に新たな物質能動制御技術の提案を行い、国民生活の質の向上に貢献する。

3. 研究の方法

本研究の研究目的達成のためには、熱工学分野からの視点だけでなく、分野横断的な見地が重要な要素となってくる。本研究を遂行するにあたっては、分野外研究協力者と学際的な研究コミュニティを形成し、研究を効率的に進めていく。研究期間は 4 ヶ年と定め、以下に示すように研究フェーズを明確化し、焦点を絞って研究を進める。最終年度は本応募研究課題を医工学分野に展開し、新たな物質能動制御技術の提案を行う。

(1) フェーズ 1: 「条件検討」

- 1-1: 既存計測システムの空間高解像度化
- 1-2: 周囲環境条件の広範囲検討

研究代表者既存の干渉計に改良を施し、サブマイクロオーダーの空間的超高解像度で計測を可能にする。レーザー出力を増大し、エキスパンダー光学系を改良することで視野拡大を図る。また、CCD カメラを高解像度対応にし、イメージインテンシファイアを活用する。軸の僅かなずれが視野拡大に困難さをきたすと予想されるが、必要に応じて高剛性光学レールの増強で対応する。また、先行実験として、これまでの研究代表者の研究で測定を行っていない諸条件で、タンパク質の自由拡散場観察実験を行い、物質移動現象と強相互作用を示す条件パラメータおよびその範囲を明らかにする。

(2) フェーズ 2: 「膜の製作」

- 2-1: 周囲環境応答性透過膜のデザイン
- 2-2: 周囲環境応答性透過膜の製作

物質材料工学専門の海外研究協力者（フランス，INSA de Lyon）の協力のもと，タンパク質が強相互作用を及ぼす環境条件に顕著な応答性を有する材料の選定，およびポリマー高次構造を基礎とした膜のデザインを具体化する．図 2 に透過膜の概念図を

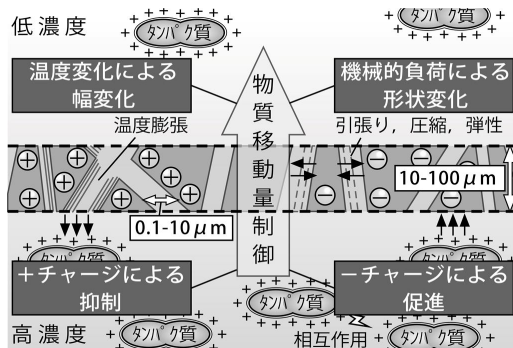


図 3 周囲環境応答性透過膜の概念図

示す．海外研究協力者の助言のもと透過膜を製作する．各周囲環境の条件に特化した複数種の透過膜が製作されるが，基本は単一透過膜で各実験を行い，必要に応じてハイブリッド膜を用いる．

### (3) フェーズ 3：「実験と評価」

3-1:条件一定での拡散実験の実施

3-2:変動条件での拡散実験の実施

3-3:膜内物質透過量の評価法確立と評価

周囲環境の諸条件を時間的に変化のない一定にした環境で実験を実施する．並行して同条件下における自由拡散の再実験も行い，透過膜性能評価のための比較用データとする．温度調節システム，ステッピングモータおよびレーザー変位計を用いて透過膜の平均空間径を変化させる．自由拡散との差異が微量である場合は評価に困難を生じる．その際は膜厚を変えるなど，必要範囲でパラメータを追加する．

製作した透過膜に変動環境条件を与えた実験を行う．一般的なタンパク質の自由拡散では， $100\mu\text{m}$ の移動に $10^2\text{ s}$ オーダーの時間を要していることから，1 オーダー長い $10^3\text{ s}$ で環境条件を変動させ，同一実験において拡散現象の変化を捉え環境の影響を調べる．

### (4) フェーズ 4：「応用展開」

4-1:in vivo 条件下での実験実施と評価

4-2:研究の総括

周囲環境条件として定義してきた温度条件や pH 条件等を in vivo 条件に限定した状態でのタンパク質物質移動能動制御の可能性を模索する．本研究で提案する手法が in vivo で適用可能かの議論を医工学系の研究協力者とともに行う．

得られた研究成果の総括を行うとともに，国内外の研究会・学会にて発表を行う．発表は最終年度のみではなく，必要に応じて研究期間途中においても行っていく．なお，

研究発表は熱工学分野にとどまらず，医工学分野等においても本研究課題の成果を公表していく．

## 4. 研究成果

本研究では，マイクロチャネル群を有する膜を用いて，タンパク質の物質輸送制御技術を確認し，物質移動量と周囲環境との関連性を評価してきた．タンパク質が特異に有する構造的特徴を利用することで，周囲環境応答性透過膜にタンパク質の諸性質と相互作用を及ぼす機能を持たせ，物質移動量の能動制御可能性について研究を進めてきた．研究初年度には，タンパク質物質移動と相互作用を及ぼす周囲諸条件の検討を行い，透過膜製作に向けた条件の検討およびデザインを行うことを具体目標とし，研究フェーズの初期ステップとなる「条件検討」および「膜の製作」に重点を置いて研究を進めた．「条件検討」では，先行実験としてこれまでの研究で測定を行っていない諸条件でタンパク質の非定常拡散場観察実験を行い，物質移動現象と強相互作用を示す条件パラメータの検討およびその範囲を明らかにした．また，これらの結果を用いて束縛拡散を実施し，初期段階の条件として，物理的空間を制御した実験および電場をかけた実験を実施した．これにより物質流束を自由拡散比で 40%程度まで制御できることを明らかにした．「膜の製作」においては，物質材料工学専門の海外研究協力者の協力のもと，タンパク質が強相互作用を及ぼす環境条件に顕著な応答性を有する材料の選定を行い，ポリマー高次構造を基礎とした膜のデザインを具体化した．

研究二年目には，研究初年度に検討した透過膜デザインをもとに透過膜の製作を行い，周囲環境一定条件の下でのタンパク質拡散実験を行うことを具体的な目的とし，研究計画書におけるフェーズ 2-2「周囲環境応答性透過膜の製作」とフェーズ 3-1「条件一定での拡散実験の実施」に重点を置き，研究を進めた．年度内に複数回海外研究協力者の研究室を訪問し，研究協力者の協力のもと複数種の透過膜を製作した．前年度に選定した Poly Lactic Acid を主材料として用い，代表平均膜内孔径が異なる膜サンプル(平均孔径:30-650 ミクロン)を製作し，かつ膜材質の機械的特性も留意して製作を行った．海外研究協力者の有する技術を駆使し，厚さ 0.1mm 程度の膜に加工することができつつ，かつ機械的負荷に柔軟に対応する膜を製作した．また，観察実験を進めた際に問題となった拡散場の画像解像度と視野の関係について，既存のカメラとレンズ群の組み合わせによって，空間的高解像度計測を維持しつつ高感度計測が可能な手法を見出した．その機構を付け加えた干渉システムを用いて，タンパク質の束縛拡散実験を行ったところ，膜を通過するタンパク質の物質流束は孔径に比例するが，時間の経過とともに孔径に依存せず，ある値に収束

し減少していくことが明らかとなった。

研究三年目は、フェーズ 3-2「変動条件下での拡散実験の実施」とフェーズ 3-3「膜内物質透過量の評価法確立と評価」に重点を置き、研究を進めた。タンパク質物質移動と相互作用を及ぼす周囲環境の検討を行い、平成 26 年度に引き続き、透過膜製作に向けた諸種条件下でのデザイン設計および束縛拡散の観察実験を行った。平成 26 年度に既に製作した透過膜を用いて、各周囲環境の条件に特化した膜を用いて実験を実施した。併せて、変動環境条件を与えた実験も並行して進めた。拡散時間において 1000 秒オーダーで環境条件を変動させ、同一実験において拡散現象の変化を捉え環境の影響を調べた。また、変動環境条件実験で得られた諸種条件下での実験データを分析し、膜内物質透過量の評価法の検討を行った。本研究においては、膜近傍の物質拡散係数と物質流束の経時変化を並行して評価することで、周囲環境の影響を評価していくこととし、その基準でデータ整理を行った。これにより膜のチャンネル形状が束縛拡散に大きな影響を与えることが明らかとなった。

研究最終年度は、研究計画書におけるフェーズ 4-1「in vivo 条件下での実験実施と評価」とフェーズ 4-2「研究の総括」に重点を置き、研究を遂行した。前年度に引き続き束縛拡散の観察実験をパラメトリックに行い、特に変動環境条件を与えた実験を進めた。これらの実験結果を整理し、周囲環境条件として定義してきた温度条件や pH 条件等を in vivo 条件に限定した状態でのタンパク質拡散実験を実施し、物質移動能動制御の可能性を模索した。タンパク質の自由拡散は  $10^{-10}$  [m<sup>2</sup>/s] 程度であるが、膜を介することでその値は 1/10 程度となり、併せてそこから周囲条件を変えることで 1/5 ~ 1/20 程度になることを実験的に明らかにした。また、周囲環境の変化は直ちに膜を透過する物質流束に影響を及ぼさず、ある程度の時間遅れが存在し、その遅れは膜の構造に依存することが分かった。さらに、膜の構造体表面と液相の濡れ性も大きな影響を及ぼすことが分かった。

以上、これまでの 4 年間で得られた諸種条件下での実験データをデータベース化し、かつ物質流束の制御可能性について、どの因子がもっとも影響を及ぼすかについて総括的な見地から解析を行った。その結果、膜の構造とチャンネル形状が束縛拡散に大きな影響を与えることが明らかとなった。これらの研究成果は本年度末の国際会議にて、基調講演で発表した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Eita Shoji, Atsuki Komiya, Junnosuke

Okajima, Hiroshi Kawamura and Shigenao Maruyama, High-speed phase-shifting interferometry using triangular prism for time-resolved temperature measurement, Applied Optics, 査読有, Vol.54-20 (2015), pp.6297-6304.

doi: <http://dx.doi.org/10.1364/AO.54.006297>

2. Juan Felipe Torres Alvarez, Atsuki Komiya, Danel Henry and Shigenao Maruyama, Measurement of Soret and Fickian diffusion coefficients by orthogonal phase-shifting interferometry and its application to protein aqueous solutions, Journal of Chemical Physics, 査読有, Vol.139 (2013), 074203. doi: 10.1063/1.4817682

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Atsuki Komiya, Precise measurement of thermal and mass transport properties of protein by optics, Asian Conference on Thermal Sciences 2017 (Keynote), 2017 年 3 月 29 日, Jeju (Korea)
2. Atsuki Komiya, Junnosuke Okajima and Shigenao Maruyama, Measurement of Precursor Film Thickness of Small Droplet by Phase-Shifting Ellipsometer, 11th Asian Thermophysical Properties Conference (ATPC2016), 2016 年 10 月 5 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
3. Atsuki Komiya, Trial of Optical Experiment for Precise Visualization of Protein Diffusion Field and Its Evaluation, 2015 年中国工程熱物理学会伝熱伝質学術会議(招待講演), 2015 年 11 月 1 日, 大連香州花園酒店, 大連(中国)
4. Atsuki Komiya, Evaluation of Several Dependencies of Protein Diffusion Coefficients by Precise Visualization of Diffusion Field, Twelfth International Conference on Flow Dynamics (ICFD2015) (Invited), 2015 年 10 月 29 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
5. Atsuki Komiya, Jérôme Chevalier, Sébastien Pruvost and Sébastien Livi, Mass Transfer Control of Protein by Hindered Diffusion Process, Abstract book of 2015 Annual ELyT Workshop, 2015 年 2 月 18 日, 松島センチュリーホテル (宮城県・松島町)
6. 小宮敦樹, タンパク質拡散場の計測とその制御, 日本機械学会 2014 年度年次大会ワークショップ「高度物理刺激と生体応答」(招待講演), 2014 年 9 月 10 日, 東京電機大学 (東京都・足立区)
7. Eita Shoji, Junnosuke Okajima, Atsuki Komiya, Hiroshi Kawamura, Shigenao Maruyama, Quantitative and High-speed Measurement of Temperature Field by Phase-shifting Interferometer, The 16th International Symposium on Flow Visualization (ISFV-16), 2014 年 6 月 25 日,

沖縄コンベンションセンター（沖縄県・宜野湾市）

8. 宋陽樹, 岡島淳之介, 小宮敦樹, 円山重直, 束縛拡散によるタンパク質物質移動制御の可能性に関する研究, 第14回日本伝熱学会東北支部学生発表会, 2014年5月10日, 東北大学流体科学研究所(宮城県・仙台市)
9. Eita Shoji, Ryota Nakaoku, Atsuki Komiya, Junnosuke Okajima and Shigenao Maruyama, Effect of Beam Deflection on Measurement of Boundary Layers Using Phase-shifting Interferometer, Tenth International Conference on Flow Dynamics, 2013年11月26日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
10. Atsuki Komiya, Jérôme Chevalier, Sébastien Pruvost and Sébastien Livi, Membrane and Hindered Diffusion of Protein –Quantitative Evaluation -, The Thirteenth International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration, 2013年11月26日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
11. Atsuki Komiya, Jérôme Chevalier, Sébastien Pruvost and Sébastien Livi, Quantitative Evaluation of Protein Mass Flux in the Vicinity of Thin Plate Surface, The 8th World Conference on Experimental Heat Transfer, Fluid Mechanics, and Thermodynamics (ExHFT8), 2013年6月18日, Instituto Superior Técnico, Lisboa (portugal)

〔図書〕(計1件)

1. 佐藤岳彦, 金澤誠司, 浜口智志, 小宮敦樹, 養賢堂, 機械の研究 連載口座 高度物理刺激の生成法と計測・予測, (2015), pp.673-683.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小宮 敦樹 (KOMIYA ATSUKI)

東北大学・流体科学研究所・准教授

研究者番号：60371142