

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19760128

研究課題名 (和文) 生体環境内でのタンパク質拡散現象評価

研究課題名 (英文) Evaluation of Protein Diffusion Phenomena in Intra-vital Condition

研究代表者

小宮 敦樹 (KOMIYA ATSUKI)

東北大学・流体科学研究所・講師

研究者番号：60371142

研究成果の概要：

本研究では、医学分野で必要とされるヒト体内環境下でのタンパク質物質拡散係数を測定し、諸条件下におけるデータベースの構築を図った。より重要とされる条件においては、更なる追加実験を施すことでデータベースの充実化を図った。データの不確かさも併せて行い、データの信頼性の向上を図った。

また、本研究で得られた実験結果から、ヒト体内ではタンパク質周囲の濃度・pH 環境が消化プロセスにおいて物質拡散現象に影響を及ぼし、pH の影響は濃度の影響よりも大きいことがわかり、系内におけるタンパク質同士の相互作用よりも電気的もしくは静電的作用が重要な要素となっていることを実験的に明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：タンパク質，拡散現象，光学干渉法，濃度依存

## 1. 研究開始当初の背景

物質拡散係数の測定は、諸々の熱物性値測定の中でも極めて困難であり、特にタンパク質においては多くの点で困難とされている。そのため、ヒトの体内だけでも数万種類ある生体高分子の諸物性値は散見される程度であり、医工学分野等で重要性が高まってきているのに対し、データが欠乏しているのが現状となっている。これは従来の拡散係数測定法を用いると、下記の点が

問題点となり需要に対応できない技術的課題が残存しているためである。

1. 精密な計測には数十時間～数日という長時間を要すること
2. 物質自体が稀有であるため、大量試料の投与ができないこと

上記問題点の 1. に対し、研究代表者はこれまでに光学系を駆使した非定常拡散場の短時間計測技術の開発を行い、物質拡散係数の高精度導出法の確立を行ってきた。ま

た、10 $\mu$ Lの容量で有機物物質拡散係数の高精度計測技術の確立も行ってきており、上記問題点2.の克服をしている。これらの技術を集約し、ショ糖 (Sucrose) および卵白リゾチーム (Egg White Lysozyme) を用いた計測実験を行った結果、一度の計測で物質拡散係数の濃度依存性を定性的に捉えることに成功した。しかし、その現象メカニズムおよび物質輸送特性に関する知見は未だに得られていない。同様に、ヒト体内環境で大きく異なってくる条件である pH 環境が物質拡散現象に及ぼす影響についての報告も皆無である。ヒト体内環境下での物質拡散現象の解明は、新薬の生成や消化メカニズム解明の一助に重要な役割を担うのに対し、このように実験データ・知見等が脆弱であるという問題点がある。

そこで、これまで研究代表者が培ってきた計測技術を駆使し、タンパク質のヒト体内環境での物質輸送過程の解明を行うこととした。一般にリゾチームのアミノ酸素組成はリシンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸に富んでおり、分子表面の状態は著しく正電荷に偏っている。このことからタンパク質分子は溶液中で周囲分子と非共有結合をし、見かけ上の分子量が増大することによって物質拡散現象に影響を及ぼしてることが推測できる。また、高濃度領域では、タンパク質分子自体が他のタンパク質分子と強相互作用を及ぼすことにより、やはり物質拡散現象に影響を及ぼすことが考えられる。以上のことから、周囲環境条件をパラメータとし、物質拡散現象のモデリングおよび機構を解明する必要性を見出し、本研究課題を提案するに至った。

## 2. 研究の目的

研究代表者がこれまでに技術開発を行ってきた方法を有効利用して、周囲環境がタンパク質の拡散現象にどのような影響を及ぼすかについて、パラメトリックに周囲環境を変えて観察実験を行い、その評価を行っていく。試料としては卵白より抽出されるリゾチームを用い、拡散現象の周囲濃度および緩衝液温度に対する感度を実験的に解明する。特にヒト消化液 pH 範囲における拡散場を観察し、その影響評価を行う。以上、本研究の目的は以下に示すとおりである。

### (1) タンパク質物質拡散係数の導出およびデータベースの構築

タンパク質物質拡散現象の濃度依存性評価は、高濃度差を有する溶液を合致して生じる非定常拡散場を高精度局所計測することによって行う。同条件で繰り返し実験を行うことにより偶然誤差による不確かさ評価を低減させ、

信頼度の高いデータベースを構築する。定量的に計測するには、現在の光学系を改良しなければならない、より精緻に計測が行えるよう改良を施した時点でパラメトリックな実験を開始する。

### (2) 溶液濃度および溶液 pH とタンパク質物質拡散現象の関連・依存性の評価

(1)にて得られた実験データをパラメータごとに整理し、溶液濃度および溶液 pH の拡散現象への影響を評価する。パラメータごとに評価を行い、タンパク質分子と周囲分子がどのような相互作用を有することで、マクロな現象としての物質拡散係数の差異をもたらすか、モデルの提案を行う。特にタンパク質には酵素活性の pH 依存性があり、リゾチームは pH4~6 で触媒効率が最大となるため、この領域に特化して酵素反応を考慮した解離基と周囲分子との相互作用をモデル化する。

### (3) ヒト体内環境が及ぼすタンパク質拡散現象のモデリング

ヒト体内ではタンパク質周囲の濃度・温度および pH の環境が大きく変わることから、消化プロセスに関連する代表的な臓器 (例えば口腔、胃など) の環境下でどのような物質拡散現象のモデリングが適用できるか検討を行う。また、そこから消化プロセス解明の一助となる物質輸送メカニズムの提案を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究課題の研究目的達成のためには、分野横断的な見地も重要な要素となってくるため、研究協力者と若手研究者間で学際的な研究コミュニティを形成し、学際的アプローチを図る。また、研究課題の円滑な遂行をするためには、研究フェーズを明確化し、「システム構築」・「観察実験実施」・「データベースの構築」・「拡散現象モデル化」に分類し、以下に示す研究計画で研究を遂行する。

### (1)高精度計測システムの構築

非定常拡散場の計測には、研究代表者が既に設計開発している拡散セルを用いて行う。計測システムに用いている位相シフト技術を高精度計測用に改良するため新たに光学部品を購入し、装置固有の測定誤差要因を除去する改良を行う。計測システムの改良後は実験手順の最適化を検討する。海外研究協力者からの助言により、全ての実験条件において擾乱が最小となるように実験運用方法を決定する。

(2) 拡散現象の周囲環境依存性評価  
溶液の濃度と緩衝液 pH 値を変化させ、観察実験を繰り返し行う。実験試料は初期段階として比較的データが存在するスクロースを用い、データの妥当性を評価する。パラメータとしての濃度および pH 値は、医学的見地からヒトの体内環境を模擬した範囲内で変化させ実験を行い、データを取得する。また、そこからタンパク質の拡散現象モデル化を思案する。

(3)物質拡散係数の DB 化とモデリング  
医学分野で必要とされるヒト体内環境条件下での物質拡散係数を測定し、データベースの構築を図る。パラメトリックな実験データを条件ごとに整理し、より重要とされる条件下においては、更に詳細なデータを取得するとともに、ニーズに対応できるデータベースの構築を行う。また、得られた物質拡散係数データベースをもとに、ヒト体内ではタンパク質周囲の濃度・温度および pH の環境が、消化プロセスにおいてどのように物質拡散現象に影響を及ぼし、どのようなモデリングが適用できるか検討を行い、消化プロセス解明の一助となる物質輸送メカニズムの提案を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、医学分野で必要とされるヒト体内環境下でのタンパク質物質拡散係数を測定し、諸条件下におけるデータベースの構築を図った。研究所年度は初期の2研究フェーズである「システム構築」および「観察実験実施」を実施した。高精度計測システムを構築し、システムの妥当性評価を行うとともに、データの取得を行った。非定常拡散場の計測を行うにあたっては、代表者が既に設計開発していた約 10 $\mu$ L の試料で物質拡散係数が測定可能な拡散セルを用い、位相シフト干渉計に設置することで拡散場を観察した。また、本システムに用いている位相シフト技術を高精度計測用に改良するため、新たに光学部品を購入し、装置固有の測定誤差要因を除去する改良を行った。この結果、ノイズによる実験誤差を低減し、高精度計測が可能なシステムの確立を図ることができた。

計測システムの改良後は実験手順の最適化を行った。本研究で使用した拡散セルは構造上、濃度場内に初期擾乱を生じる。この擾乱は、セルのせん断速度および内部流体の粘性に大きく依存することが容易に推測できるため、実験条件に則した内部微小流れ場を詳細に数値シミュレーションすることによって、擾乱が最小となる実験手順を決定した。

数値解析により実験運用手順の最適化が

見積もられた時点で、観察実験を実施した。研究初年度は溶液の濃度と緩衝液 pH 値を変化させ、観察実験を行った。パラメータとしての濃度および pH 値は、医学的見地からヒトの体内環境を模擬した範囲内で変化させ、データを取得した。得られた結果より溶液が酸側に偏ると拡散現象が促進され、その促進度合いは濃度に依存することを実験的に明らかにした。

研究二年目は、前年度構築した高精度計測システムを用いて、後半の2研究フェーズである「データベースの構築」および「拡散現象モデル化」に重点を置き、研究を遂行した。また、研究期間の最終年度であるため研究の総括を行った。「データベースの構築」においては、医学分野で必要とされるヒト体内環境下でのタンパク質物質拡散係数を測定し、データベースの構築を図った。昨年度実施したタンパク質物質拡散現象の濃度・pH 依存性の評価も併せて条件ごとに整理し、より重要とされる条件下においては、更なる追加実験を施すことでデータベースの充実化を図った。また、セル内における非定常拡散場の計測において、濃度場形成における初期条件の違いによるデータの不確かさを評価した。これにより、得られたデータの信頼性が向上された。

「タンパク質物質拡散現象のモデリング」においては、これまでに得られた実験結果から、ヒト体内ではタンパク質周囲の濃度・pH 環境が消化プロセスにおいてどのように物質拡散現象に影響を及ぼし、どのようなモデルが適応可能か検討を行った。パラメータとしての濃度および pH は、医学的見地からヒトの体内環境を模擬した範囲内で変化させ、評価を行った。得られた結果より、タンパク質の物質移動現象に係る pH の影響は濃度のそれよりも大きいことがわかり、系内におけるタンパク質同士の相互作用よりも電気的もしくは静電的作用が重要な要素となっていることを実験的に明らかにした。これにより、タンパク質表面に帯電する電荷を重要パラメータとしてモデル化を行った。

以上、研究年度内に得られた成果の一部は国内外の学術講演会にて発表を行っており、多くの評価を得た。

#### 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)

[学会発表] (計 7 件)

1. J. Okajima, A. Komiya and S. Maruyama, Determination Method of Concentration Dependency of Mass Diffusion Coefficient

by Phase Shifting Interferometer and Inverse Method, Proceedings of Fifth International Conference on Flow Dynamics, (2008.11.18), Sendai.

(3) 連携研究者  
なし

2. 岡島淳之介, 小宮敦樹, 円山重直, 位相シフト干渉計を用いた濃度計測と逆問題解析による物質拡散係数の導出, 第29回日本熱物性シンポジウム講演論文集, (2008.10.9), 東京.
3. A. Komiya, J. Okajima, S. Maruyama and S. Moriya, Estimation of Concentration Dependency of Mass Diffusion Coefficient by Conjugate Gradient Method, Book of Abstracts of 18th European Conference on Thermophysical Properties, (2008.9.2), Pau, France.
4. 岡島淳之介, 小宮敦樹, 円山重直, 逆問題解析による濃度依存性を考慮した物質拡散係数導出法の検討, 日本機械学会東北支部第43期総会・講演会講演論文集, (2008.3.15), 仙台.
5. 小宮敦樹, 岡島淳之介, 円山重直, 共役勾配法による濃度依存性を考慮した物質拡散係数の導出, 第28回日本熱物性シンポジウム講演論文集, (2007.10.25), 札幌.
6. A. Komiya, S. Maruyama and S. Moriya, Spatial-high-resolution Measurement of Diffusion Field for Evaluation of Concentration Dependency of Diffusion Coefficient, Proceedings of The 8th Asian Thermophysical Properties Conference, (2007.8.23), Fukuoka.
7. A. Komiya, S. Maruyama and S. Moriya, Development of Precise Visualization System for Small Transient Diffusion Field of Protein Using Phase Shifting Interferometer, Proceedings of ASME-JSME Thermal Engineering and ASME Summer Heat Transfer Conference, (2007.8.12), Vancouver, Canada.

## 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・講師  
研究者番号: 60371142

### (2) 研究分担者

なし