

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06827

研究課題名(和文) 脂質膜の構造変化に基づいたエアリフト型気泡塔のせん断速度分布と気泡表面電荷の測定

研究課題名(英文) Measurements of shear rate distribution and surface charge of bubbles in airlift bubble columns on the basis of structural change in lipid membranes

研究代表者

吉本 誠 (Yoshimoto, Makoto)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：80322246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：液中に気泡を分散させて操作する気泡塔を用いて細胞培養や分離・反応を合理的に設計するためには、せん断速度と気泡の荷電特性の定量的な評価が重要となる。本研究では、気液流動場に懸濁された脂質二分子膜小胞体(リポソーム)からの親水性色素の漏出速度に基づいて、各種外部循環式エアリフト型気泡塔内で発生するせん断速度を推定する手法の有用性を実証した。また、種々の荷電リポソームを気泡塔に懸濁して、それらの膜透過性の変化に基づいて気泡塔で生成する気泡群の荷電特性を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液体せん断ストレスは、生細胞の活性や分子集合体から形成される人工材料の構造と機能に影響を及ぼす。本研究ではこの現象に着目して、構造的に柔軟な脂質二分子膜が気液二相流から受ける影響を、脂質膜透過係数の変化に基づいて定量化して、せん断速度の推定に利用している。この知見を応用すると、せん断ストレスや気泡を利用してリポソーム内と外部の物質移動を制御できるため、リポソーム内に閉じ込めた酵素を反応器の流動特性に基づいて活性化する新しい化学反応プロセスの構築等への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bubble column bioreactors are operated by dispersing bubbles in liquid phase. Quantitative evaluation of shear rate and electrostatic property of bubbles is of importance to rationally design various separation and reaction processes using bubble columns. In this work, the shear rate generated in various types of external loop airlift bubble column was estimated on the basis of the release kinetics of the hydrophilic dye molecules from liposomes. Furthermore, the electrostatic property of bubbles was also evaluated on the basis of membrane permeability of various charged liposomes suspended in the bubble columns.

研究分野：化学工学

キーワード：エアリフト型気泡塔 せん断速度 気泡 リポソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞培養、分離、反応をはじめとする各種工業プロセスでは、攪拌や流動に伴う液体せん断ストレスが発生する。外部循環式エアリフト型気泡塔は、ガスの吹き込みのみで液循環流が生じ、気泡、液滴、固体を均一に混合・分散できるため各種バイオプロセスにおいて応用されている。細胞の構造や機能は液体せん断ストレスに影響を受けるため、任意の反応器内で発生するせん断速度を精密に実測する手法の開発が求められている。また、気液界面の性質はタンパク質の吸着特性に重要な影響を及ぼすことが知られており、気泡表面の荷電特性を明らかにすることはバイオプロセスを構築する上で重要となっている。

2. 研究の目的

液体せん断ストレスにより鋭敏に構造変化する脂質二分子膜小胞(リポソーム)を種々のリン脂質を用いて開発する。蛍光色素を内包させたりリポソームを実用反応器である外部循環式エアリフト型気泡塔に懸濁して、色素の脂質膜透過係数に基づいた気泡塔内の平均及び局所的なせん断ストレスの推定を行う。この際、形状やスケールが異なる種々の気泡塔を用い、リポソームを用いるせん断速度推定法の適用性を明らかにする。さらに、荷電脂質を種々のモル比で含有するリポソームを調製して、エアリフト型気泡塔の気液二相流を構成する気泡群の表面の荷電状態を推定する。

3. 研究の方法

(1) 5(6)-Carboxyfluorescein (CF)を封入したリポソームの調製

リポソーム膜を構成する双性脂質として、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)及び1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)を用いた。リポソーム表面に負電荷をもたせるために、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG)、正電荷をもたせるために、1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane chloride (DOTAP)を用いた。各双性脂質のみあるいは双性脂質に上述の荷電脂質のいずれかを混合した脂質をクロロホルムに溶解した。溶媒を留去後、ジエチルエーテルで溶解して溶媒を留去する操作を2回繰返した。凍結乾燥機を用いて脂質膜の乾燥を促進した。水酸化ナトリウム水溶液と50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用いてCFを溶解した ([CF] = 100 mM)。このCF溶液 2.0 mLを用いて上述の乾燥脂質膜を水和した。凍結融解操作を7サイクル行い、Extrusion法により粒子径を調整した。リポソーム内に封入されなかったCFはゲルクロマトグラフィーにより分離除去した。精製した5(6)-carboxyfluoresceinを封入したリポソームを以下では、CFLとする。粒子径分布と平均直径は動的光散乱(DLS)法、ゼータ電位はレーザドップラー法により測定した。

(2) 外部循環式エアリフト型気泡塔 (Fig.1)

レーザーとダウンカマーの内径はそれぞれ8.0 mmと4.8 mmであった。気泡塔の塔高、体積及びガス分散板として使用したガラスフィルターの細孔径が異なる3基のガラス製エアリフト型気泡塔 (Type A, B and C) を製作した。Table 1 に各気泡塔の特性を示す。気泡塔を恒温水槽に入れて塔内の液相温度を40 に維持した。ポンベ中の窒素ガスをフィルターと加湿器を通過させて気泡塔底部のガラスフィルターを通じて塔内に供給した。気泡塔内の流動特性はガス空塔速度 U_g 依存する。本研究では、 $U_g = 1.0-3.0$ cm/s で操作した。

Table 1 製作使用した気泡塔の特性

Type	塔高 [mm]	体積 [mL]	ガス分散板 細孔径 [μ m]
A	100	10	40-100
B	240	15	40-100
C	100	10	100-160

(3) エアリフト型気泡塔に懸濁させたリポソームからのCF漏出速度の測定

液相の粘度を調整するための0.3 wt% Carboxymethyl cellulose を可溶化したCFL懸濁液を気泡塔に仕込み、一定時間毎に少量をサンプリングして希釈後、蛍光分光光度計を用いて蛍光強度を測定した(励起波長 490 nm, 蛍光波長 517 nm)。なお、リポソーム内水相に高濃度に封入されたCFは自己消光しているため、蛍光強度への影響は無視できる。リポソーム膜をコール酸ナトリウムで溶解して、CFの透過平衡時の蛍光強度を測定した。透過平衡時と初期の蛍光強度の差を100%として、各時間において漏出したCFの割合 R_{CF} を算出した。 R_{CF} 値の経時変化を速度論的に解析して、 $-\ln(1 - R_{CF}) = P_{CF}at$ の関係に基づいて各気泡塔操作条件下におけるCFの

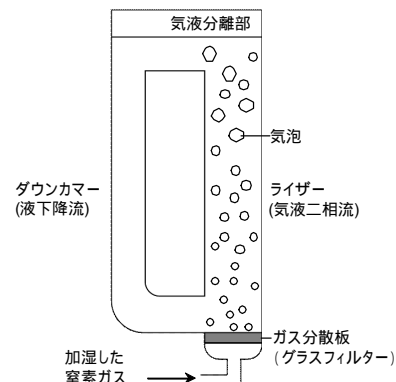


Fig. 1 外部循環式エアリフト型気泡塔の概念図

脂質膜透過係数 P_{CF} を決定した。なお、式中の a はリポソームの比表面積であり、粒子直径を DLS 法で実測して決定した。気泡塔内におけるリポソームの物理的安定性を評価するために、エアリフトで所定の時間懸濁前後の粒子径分布を DLS で測定した。

4. 研究成果

(1) 各種外部循環式エアリフト型気泡塔に懸濁されたリポソームからの CF 漏出速度

Fig.2 にエアリフト型気泡塔 Type A に懸濁された CFL からの蛍光色素 CF の漏出量の経時変化のガス空塔速度 U_G 依存性を示す。CFL の脂質膜は双性の POPC のみから構成されており、CFL の平均直径は 184 nm であった。各 U_G において時間経過とともに色素の漏出率 R_{CF} が増加している。また、各時間において U_G 値が大きいほど大きな R_{CF} 値が得られている。これらの結果より、CFL からの色素漏出速度が気泡塔の流動特性に影響を及ぼす操作条件 (U_G 値) に依存していることがわかる。Fig.2 のデータを解析して、各 U_G における膜透過係数 P_{CF} を算出した。なお、CFL の平均粒子径と粒子径分布は気泡塔懸濁前後でほとんど変化しなかった。すなわち、CFL のベシクル構造は気泡塔操作条件下において安定に維持された。Type B, C の気泡塔についても同様の測定と解析を行った。得られた結果をまとめたものを Fig.3 に示す。 P_{CF} 値の標準偏差はやや大きい場合があるが、各気泡塔において U_G 値の増大に伴い P_{CF} 値が大きくなる傾向が認められる。また各 U_G において P_{CF} 値が気泡塔の形状に依存していることがわかる。例えば、Type A と C を比較すると、ガス分散板の細孔径が大きな Type C の方が大きな P_{CF} 値が得られている。生成気泡径が懸濁リポソームの膜透過性に影響することが示唆される。また、Type A と B を比較すると、塔高が大きな Type B において P_{CF} 値が大きくなる傾向が認められる。このことは、気泡の上昇距離が大きい Type B において気泡の分散と合一が促進されることが懸濁リポソームの膜透過性を増大させる要因になることを示唆している。既に報告している膜透過係数とせん断速度の関係¹⁾に基づいて、各気泡塔内の平均せん断速度を推定できる。本研究では、各気泡塔の形状・スケール依存的なせん断速度を明らかにできたが、個別の気泡塔内の局所的せん断速度を詳細に検討するには至らなかった。しかし、Type A, B, C の各気泡塔において得られた結果から、せん断速度が気泡径や塔高に影響を受けることが示唆されており、装置の各部位における気泡の状態に関する知見と組み合わせれば局所的せん断速度の相対的な大きさの推定に繋がる可能性がある。各種エアリフト型気泡塔におけるせん断速度のデータを蓄積することにより、気泡塔を構成する各部位がせん断速度に及ぼす効果を推定できると考えられる。

(2) 気泡群とリポソームの静電相互作用

POPC に対して種々のモル比で負電荷脂質 POPG を含有させた脂質膜から形成される CFL を Type B のエアリフト型気泡塔に懸濁して、色素の漏出量の経時変化を実測した。Fig.4 に示すように、POPC/POPG リポソームは、POPG の含有量に依存した負のゼータ電位を示した。Fig.5 に POPC/POPG 膜から形成される CFL を $U_G = 1.0$ cm/s の気泡塔に懸濁して得られた R_{CF} 値に及ぼす POPG モル比の影響を示す。POPG 15 mol% まで

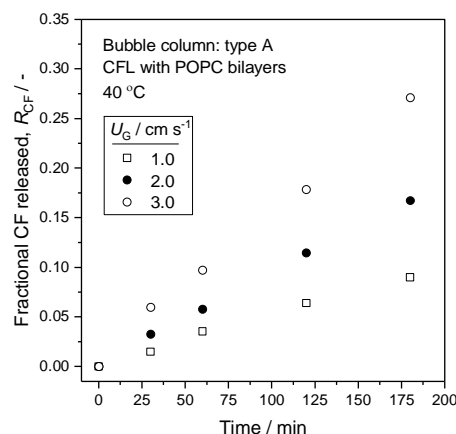


Fig.2 外部循環式エアリフト気泡塔 (Type A) に懸濁された CFL からの色素の漏出量の経時変化

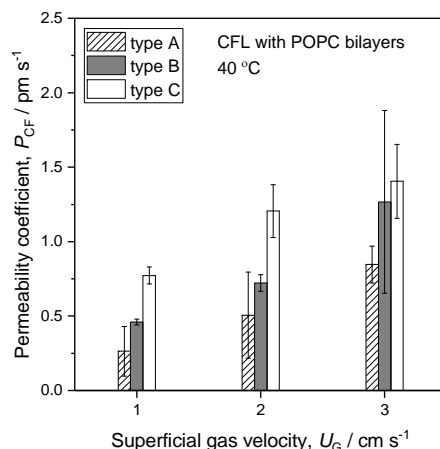


Fig.3 種々の U_G 値において各気泡塔に懸濁された CFL の膜透過係数 P_{CF}

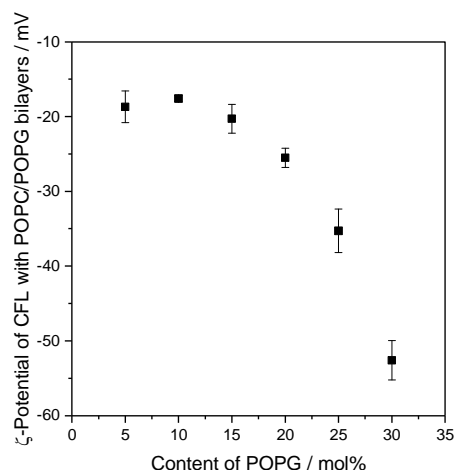


Fig.4 POPC/POPG 膜から形成される CFL のゼータ電位に及ぼす脂質膜中の負電荷をもつ POPG モル比の影響

は POPG 含有量の増加に伴い P_{CF} 値が明らかに減少している。このことより、気泡表面が負に帯電しており、静電反発により CFL 膜の透過性に及ぼす気泡近傍の流動の影響が低減したことが示唆される。一方、POPG 含有量がさらに高い場合、 P_{CF} 値が POPG 含有量の増加とともに増大している。これは、POPG 含有量が 30 mol% 程度以上では、脂質膜内において POPG 分子間の静電反発が起こり、脂質膜が不安定化されることが要因と示唆される。気泡表面の荷電状態をさらに詳しく調べるために、DOPC/DOTAP 膜から構成される正電荷をもつ CFL を調製して、気泡塔 Type B を用いて $U_G = 1.0$ cm/s において P_{CF} 値を決定した。なお、ここでは疎水部の炭素数と不飽和度が DOTAP と同一の双性脂質 DOPC を用いている。DOPC/DOTAP リポソームのゼータ電位に及ぼす脂質膜中 DOTAP モル比の影響を Fig.6 に示す。DOPC のみからなるリポソームの表面は僅かに負に帯電しているが、DOTAP を含有させると正に帯電しており、正電荷の程度は DOTAP 含有量の増加に伴い増大することがわかる。DOTAP 含有量が 30 mol% の膜から形成される CFL を気泡塔に懸濁したところ、180 min の操作時間において CF の漏出が著しく低レベルであった (Fig.7, with 0.3 wt% CMC)。気泡塔に懸濁前後の CFL の粒子径分布を測定した結果 (データ省略)、緩衝液に添加された Carboxymethyl cellulose (CMC) との静電相互作用によりリポソームの凝集体が形成されることがわかった。そこで、CMC を添加しない緩衝液を用いて DOPC/DOTAP リポソームを気泡塔に懸濁した。その結果、液相の粘度は CMC 添加系に比べて低下するもののリポソームからの CF の放出が促進され (Fig.7, without CMC)、DOPC/DOTAP 膜の P_{CF} 値 ($P_{CF} = 1.1$ pm/s) は POPC/POPG 膜の P_{CF} 値 (Fig.5) よりも大きいことがわかった。この結果より、正に帯電した DOPC/DOTAP 膜と負に帯電した気泡との静電相互作用により CF の放出が促進されたと推測される。上述の一連の結果は、気泡表面が負に帯電していることを強く示唆している。

以上、本研究において得られた結果は、蛍光色素を内包させた各種リポソーム (CFL) をせん断ストレス感受性のプローブとして用いることにより、各種の外部循環式エアリフト型気泡塔内で発生する平均せん断速度と気泡表面の荷電特性を推定できることを示している。

< 引用文献 >

- 1) Tomotaka Natsume and Makoto Yoshimoto, A method to estimate average shear rate in a bubble column using liposomes, *Ind. & Eng. Chem. Res.*, **2013**, *52*, 18498-18502.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Naoyuki Nagatomo and Makoto Yoshimoto*, High permeability of polyunsaturated lipid bilayers as applied to attoliter enzyme reactors. *ACS Appl. Bio Mater.*, accepted, DOI: 10.1021/acsabm.9b00165, 査読有

中野佑典, 吉本誠*, リポソームの膜透過性に基づく気泡塔内流動特性の評価, *分析化学*, **2018**, *67*, 711-717. 査読有

Takeshi Ohtsu, Saki Shigenari, Makoto Yoshimoto* and Hiroshi Umakoshi, Reactive bienzyme systems fabricated through immobilization of biotinylated glucose oxidase and peroxidase molecules onto neutralized avidin-conjugated liposomes. *Biochem. Eng.*

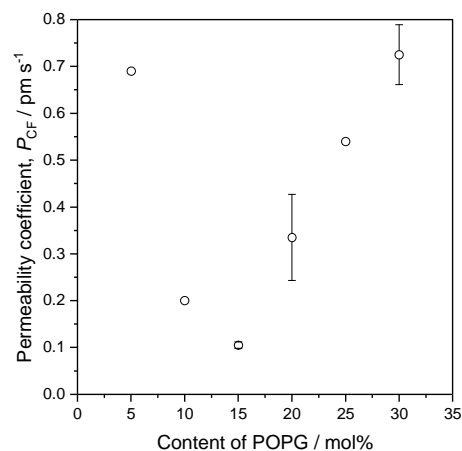


Fig.5 POPC/POPG 膜から形成される CFL の膜透過係数に及ぼす POPG 含有量の影響

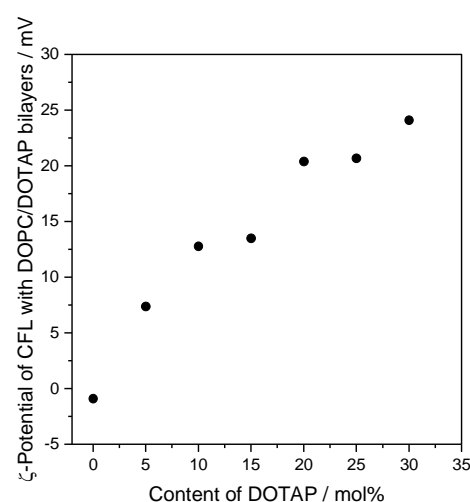


Fig.6 DOPC/DOTAP 膜から形成される CFL のゼータ電位に及ぼす脂質膜中の正電荷をもつ DOTAP モル比の影響

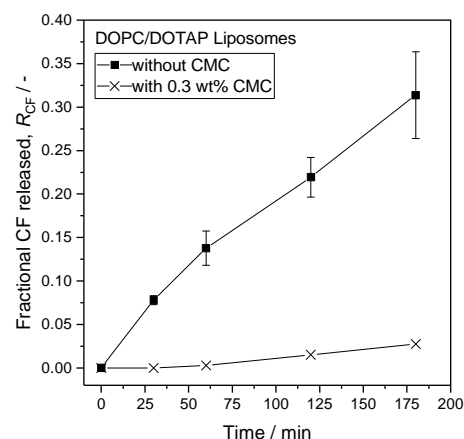


Fig.7 DOPC/DOTAP 膜から形成される CFL からの蛍光色素漏出量の経時変化に及ぼす 0.3 wt% CMC の影響

J., 2017, 125, 81-87. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

吉本誠, 藤江徹弥, 中野佑典, 気泡を利用したリン脂質ベシクルからの親水性物質の放出促進, 2018.化学工学会第50回秋季大会, 2018.9.18, 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

長友尚之, 吉本誠, 疎水鎖長が異なる多価不飽和リン脂質から形成されるリポソームの膜透過性, 2018.9.19, 化学工学会第50回秋季大会, 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

中野佑典, 吉本誠, リポソームを利用した外部循環式エアリフト型気泡塔のせん断速度と気泡表面電荷の推定, 2017.12.9, 化学工学会中国四国支部大会(山口大会), YIC Studio(山口県山口市)

吉本誠, 中野佑典, 夏目友誉, リン脂質ベシクルの構造柔軟性を利用したエアリフト気泡塔内流独特正の推定, 2016.8.8, 混相流シンポジウム2016, 同志社大学(京都府京都市)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。