

令和元年6月7日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13722

研究課題名(和文) ウルトラファインバブルの構造特性評価による生体効果の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of biological effect by structural characterization of ultra-fine bubble

研究代表者

平井 光博(Hirai, Mitsuhiro)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：00189820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：1 μm より小さい直径のガス充填超微細気泡(UFB)は、水溶液中で数週間安定であり、UFBは、最近、農業や漁業などの様々な分野や医学的治療において応用されている。しかし、UFBの機能のメカニズムは依然として不明であり、生体物質に対する影響の直接的な証拠は皆無であった。小角X線散乱を用いてUFBの構造とタンパク質および脂質膜構造に対するそれらの効果を調べ結果、UFBがガスの連続的放出および吸収のために動的拡散境界(界面)を示すこと、UFBはすべての階層構造レベルでタンパク質の構造には影響を及ぼさないこと、リポソーム中の炭化水素鎖の充填および変動に影響を及ぼすことを新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

100nm以下の微細微小気泡であるウルトラファインバブルは、長期間安定であるためその応用分野は、電子産業分野、洗浄分野、医療・薬品分野、農業・水産分野など極めて広範囲に及んでいる。しかし、産業利用が先行する一方、その物理化学的な性質や生成・消滅機構、存在状態の構造動態などに関する実験的研究や理論的解明は遅れており、本格的な産業応用には基礎物性研究や生体物質を含む各種物質との相互作用等に関する研究の進展が鍵を握っている。本研究の推進によって、ナノレベルでの構造解析により、ウルトラファインバブルの構造安定性に関する新たな動的構造モデルを提示し、生体物質に対するその効果のメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ultra-fine bubbles (UFBs) are defined as small gas-filled bubbles with a diameter smaller than 1 μm . UFBs are stable for several weeks in aqueous solutions due to their small size. Although industrial applications of UFBs have recently arisen in various fields such as agricultural and fishery industries, and medical therapy. However, the mechanism underlying the behavior of UFBs is still ambiguous and there is little direct evidence of the effect of UFBs on biological materials. By using small-angle X-ray scattering, we have investigated the structures of UFBs and their effect on protein and lipid membrane structures. We found that UFBs present a dynamic diffusive boundary (interface) due to the continuous release and absorption of gas. UFBs were found to not affect the structures of proteins at all hierarchical-structure levels, while they did influence the packing and fluctuation of the hydrocarbon chains in the liposomes but not their shapes.

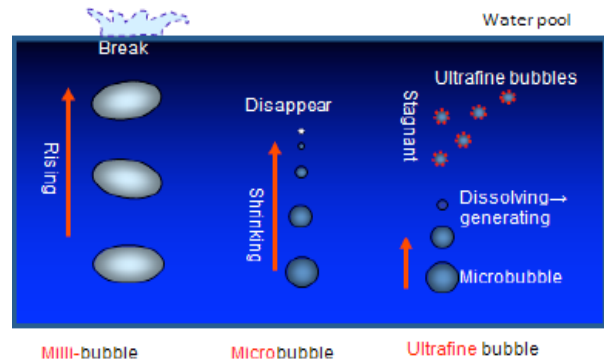
研究分野：生物物理学, 量子ビーム科学

キーワード：ウルトラファインバブル タンパク質 脂質 リポソーム 糖 X線散乱 中性子散乱

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

●国内外の開始当時の背景： 微細微小気泡の応用分野は、電子産業分野、洗浄分野、医療・薬品分野、健康分野、農業・水産分野、食品・飲料分野など極めて広範囲に及んでいる。大きさが1mm以下のマイクロバブルは、キャビテーション洗浄、廃水処理、湖水浄化、水産養殖の他にも食品工業や農業分野への応用が進んでいる。最近、長期間安定な浮遊状態を保てる大きさが1mm以下のウルトラファインバブルが作成可能となり、既に、電子産業分野の剥離装置や農業分野の水耕栽培に応用されている。また、ファインバブル技術の産業応用は、2020年には国内需要6兆100億円、グローバル需要は30.5兆へと急拡大すると予測され、経済産業省の平成25年戦略的国際標準化加速事業として日本発の国際標準化のための報告が提出されたばかりである。しかし、ウルトラファインバブルの産業利用が先行する一方、その物理化学的な性質や生成・消滅機構、存在状態の構造動態などに関する実験的研究や理論的解明は遅れており、動的散乱法やブラウン運動追跡法、レーザー顕微鏡観測による粒径計測や、ESRスピントラップ計測による寿命計測などに留まっている。本格的な産業応用にはウルトラファインバブルの基礎物性研究や生体物質を含む各種物質との相互作用等に関する研究の格段の進展が鍵を握っている。研究代表者の知る限り、今までに、放射光X線を用いたウルトラファインバブルを対象とした構造物性研究は行われていない。



微小気泡の分類とその名称

●着想の背景： 研究代表者は、タンパク質や脂質膜、界面活性剤マイクロエマルジョンや機能性ゲルなどの多様な物質を対象として、それらの構造、相互作用、構造転移などに関して、ナノスケールの構造研究に極めて有効な放射光X線・中性子散乱法を適用して多数の研究と報告をおこない、そのための装置建設や新規解析手法開発などを行って来た。これらの構造学的研究をベースとして着想に至った。

2. 研究の目的

●溶媒などの拘束条件に影響を受けない、ウルトラファインバブルの構造、界面構造、分散状態、有効電荷等が評価可能な新たな測定法を放射光X線散乱により実現、多様な溶液条件下での構造特性を解明する。その手法はウルトラファインバブル 国際標準化や産業利用の基盤技術の構築に貢献する。

●ウルトラファインバブルとタンパク質や生体膜などの生体物質との相互作用を解明する。本研究成果は、ウルトラファインバブルによる細胞の生理活性制御等の分子機構と関係するため、臨床医療への応用、さらに、微小気泡の気・液界面を利用したタンパク質の結晶化・濃縮、各種物質のドラッグデリバリー脂質リポソームへの内包など、生命科学・工学の新展開や、医療・薬品分野、健康分野、農業・水産分野、食品・飲料分野など広範囲の応用基礎研究として貢献できる。

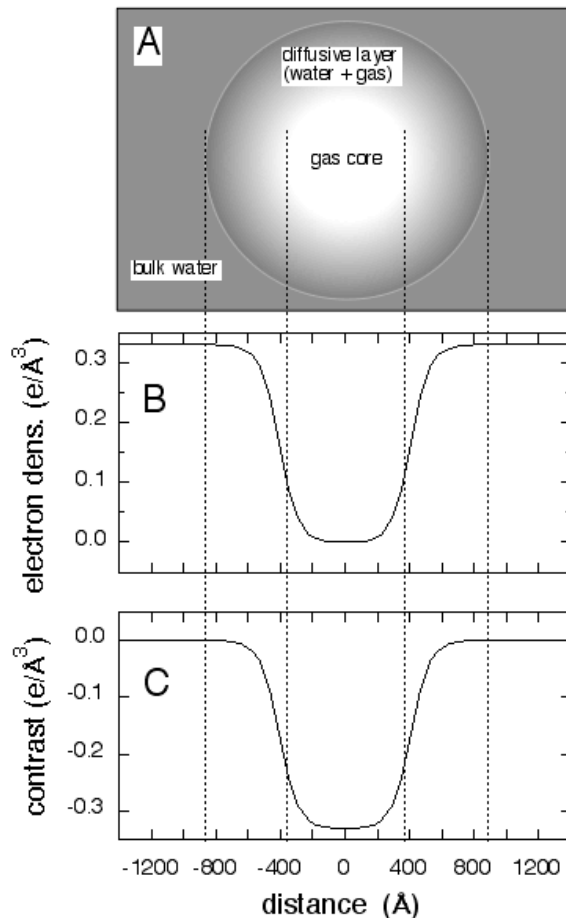
3. 研究の方法

ウルトラファインバブルのサイズ分布、構造安定性(生成・消滅)、滞留時間などは、溶媒条件によって変化すると考えられる。特に、気泡の有効電荷(表面電荷)は、pHやイオン強度に依存することが報告されていた。これらの報告は、ゼータ電位測定により間接的に得られたものである。その

ため微小気泡表面には電氣的引力あるいは疎水性をもつ溶質分子やイオンが吸着すると考えられているが、それらが事実であるとする、表面近傍の電子密度が変化するため、研究代表者が開発した多重シェルモデル解析法により、その領域を定量的に評価する。また、X線小角散乱では、ウルトラファインバブルの構造、粒径分布のみならず、粒子間の反発的な相互作用は明瞭な相関ピークとして現れるため、その平均距離と有効電荷も評価できる。pH、イオン強度、温度を変数として、ウルトラファインバブルの溶液物性を観測・解析し、その評価方法を確立することを目指した。本研究には、高輝度光科学研究センター(SPring-8)及び高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設(KEK-PF)のX線散乱装置を使用した。

4. 研究成果

本研究成果は下記のようにまとめられる。光散乱によるUFBの観察と比較して、使用されたUFBの数密度は、第3世代シンクロtron光源を利用した小角X線散乱法によってさえも詳細なUFB構造を決定するのに十分に高くはなかった。しかしながら、UFBの回転半径の値は決定された。X線散乱によって得られた回転半径値(O₂-UFBについては約 $6.6 \times 10^2 \text{ \AA}$ 、N₂-UFBについては約 $6.0 \times 10^2 \text{ \AA}$ 、および空気-UFBについては約 $7.5 \times 10^2 \text{ \AA}$)であった。光散乱分析によって測定されたものより2倍程度大きい(O₂-UFBについては約 $4.1 \times 10^2 \text{ \AA}$ 、N₂-UFBについては約 $3.8 \times 10^2 \text{ \AA}$ 、および空気-UFBについては約 $4.0 \times 10^2 \text{ \AA}$)。モデルX線散乱関数シミュレーションにより、この差は、ガスの放出および吸収のために動的平衡下にあると考えられる拡散境界領域(気液界面)によって囲まれているUFBモデル構造によって定量的に説明可能である(図1)。



[図1]

気液界面におけるガスの連続放出と吸収による拡散境界を持つUFBモデルの構造の概略図。A、拡散境界を持つUFBモデル。B、水溶液中のUFBの電子密度の動径分布関数。C、UFBのコントラスト(平均過剰電子密度)プロファイル。中心部分の電子密度は溶媒である水と比較してほぼ0である。明瞭な気液界面を想定する従来の構造モデルでは、光散乱で得られる平均半径から、X線散乱で得られる回転半径を全く説明できない。連続的な電子密度分布をもつ拡散境界モデルは定量的に両者を説明できる。

溶液中の微小気泡の安定性は、球面の内側と外側との間の圧力差、いわゆるラプラス圧力、およびランダムブラウン運動によって説明されることが広く認められてきた。すなわち、微小気泡の場合、より高い内圧のために、それらは飽和していない溶液中にガスを放出し、それによってそれらは収縮しやがて崩壊する。大きな気泡の場合、それらは過飽和溶液からガスを吸

収することによって成長し、それによってそれらは浮上して破裂する。UFB はその中間領域に位置する。最近、いくつかの実験的および理論的研究は、UFB のラプラス圧力および表面張力が、以前の報告よりはるかに小さいことを示した。これらの研究に基づいて、UFB 周辺の過飽和が表面張力を著しく低下させ、それによって安定した UFB を可能にする詳細な熱力学的考察が提示されている。動的平衡状態の液体 - 気体界面は、バルク水と比較して表面張力を大きく低下する可能性が示唆されている。上記の構造モデルは、これらの物理化学的説明と合致するものである。

我々はまた、広角および小角X線散乱を用いることによって、タンパク質および脂質膜構造に対する上記 UFB の効果を研究した。タンパク質としては、代表的な球状タンパク質であるリゾチーム、ミオグロビン、ヘモグロビン、および牛血清アルブミンを用いた。UFB は、多くの場合、機械剪断破碎、超音波破碎により作成されているが、その作成時のバブル破碎により形成されたラジカルを含むため、負に帯電したコロイド粒子であることが示されている。タンパク質を空気、O₂、および N₂ -UFB 溶媒に溶解した後の時間分割測定を行った結果、それらの散乱プロファイルの時間発展および回転半径の値はすべての場合において約 4.5 時間にわたってほぼ一定のままであり、UFB は、タンパク質の四次構造から三次構造、さらに二次構造に至るすべて階層構造に殆ど影響を与えない (Native 構造の維持) ことを見出した。一方、脂質混合物のリポソーム (ガングリオシドを含む脂質ラフトモデル) の場合、リポソームの形状には影響しないが、UFB が脂質炭化水素鎖のパッキングおよびそれらの揺らぎに影響を与えることがわかった。この効果は、O₂ -UFB 溶媒でより明白に見られた。これは、UFB の製造中に発生したフリーラジカル、活性酸素種 (ROS) の濃度に起因すると考えられる。O₂-UFB 溶媒中の ROS 含有量は空気-UFB および N₂-UFB 溶媒よりも著しく高い。生細胞では、ROS は正常な酸素代謝の副産物であり、細胞シグナル伝達と恒常性に関与しているが、同時に、ROS 濃度が高いと細胞構造に大きな損傷を与えることが知られている。本研究の結果は、UFB の生物学的効果は、細胞シグナル伝達に関連すると考えられる UFB の生体膜への影響を介して起こる可能性を示唆している。

さまざまな分野での UFB の実用化はすでに始まっており、特に、農業および水産業では、UFB による魚や植物の成長の促進はすでに認められている。一般に、バイオリクター内の細胞の成長に対する気泡の影響は、気泡中の酸素の細胞への移動 (細胞質から生化学反応部位への輸送) によって説明されている。さらに、UFB の医学療法やドラッグデリバリーシステムへの応用もすでに始まっている。ナノスケールおよび/または原子スケールレベルでタンパク質および膜に対する UFB の効果に関するさらなる実験的知見を得ることが今後さらに重要である。本研究は、放射光 X 線を用いて UFB の構造およびその生体物質への効果を研究した世界初の研究であり、UFB の基礎研究から応用研究の展開にとって、新たな解析法、手法を提示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

1) M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, T. Iwasa, X. Li, D. Wen, R. Hirai, N. Ohta, N. Igarashi, and N. Shimizu.

Structure of ultra-fine bubbles and its effect on protein and lipid membrane structures studied by small- and wide-angle X-ray scattering.

J. Phys. Chem. B **2019**, in press. doi: 10.2116/bunsekikagaku.68.43. (査読あり)

2) M. Hirai, S. Ajito, S. Arai, M. Adachi, R. Shimizu, K. Wakamatsu, S. Takata, and H. Iwase.

Observation of Protein and Lipid Membrane Structures in a Model Mimicking the Molecular-Crowding Environment of Cells Using Neutron Scattering and Cell Debris.

J. Phys. Chem. B **2019**, 123, 3189–3198. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b12546. (査読あり)

3) 味戸聡志, 平井光博* (*責任著者)

タンパク質の酸変性・凝集体に対するトレハロースによる回復作用

分析化学 **2019**, 68, 43-49. doi: 10.2116/bunsekikagaku.68.43. (査読あり)

4) M. Hirai, S. Ajito, H. Iwase, S. Takata, N. Ohta, N. Igarashi, and N. Shimizu.

Restoration of myoglobin native fold from its initial state of amyloid formation by trehalose

J. Phys. Chem. B **2018**, 122, 11962–11968. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b09379. (査読あり)

5) M. Hirai, S. Ajito, S. Sato, N. Ohta, N. Igarashi, N. Shimizu.

Preferential Intercalation of human amyloid- β peptide into inter-bilayer region of lipid-raft membrane in macromolecular crowding environment

J. Phys. Chem. B **2018**, 122, 9482–9489. doi:10.1021/acs.jpcc.8b08006. (査読あり)

6) S. Ajito, H. Iwase, S. Takata, and M. Hirai* (*責任著者)

Sugar-mediated stabilization of protein against chemical or thermal denaturation

J. Phys. Chem. B, **2018**, 122, 8685-8697. doi:10.1021/acs.jpcc.8b06572. (査読あり)

7) M. Hirai, S. Ajito, M. Sugiyama, H. Iwase, S. Takata, N. Shimizu, N. Igarashi, A. Martel, and L. Porcar.

Direct evidence for the effect of glycerol on protein hydration and thermal structural transition.

Biophysical Journal **2018**, 115, 313–327, 2018. doi:10.1016/j.bpj.2018.06.005. (査読あり)

8) N. Murase, Y. Uetake, Y. Sato, K. Irie, Y. Ueno, T. Hirauchi, T. Kawahara, and M. Hirai

Frozen state of sephadex® gels of different crosslink density analyzed by X-ray computed tomography and X-ray diffraction

Gels **2018**, 4, 44,1-12, doi:10.3390/gels4020044. (査読あり)

9) M. Hirai, S. Ajito, M. Sugiyama, H. Iwase, S. Takata, N. Shimizu, N. Igarashi, Anne Martel, L. Porcar. Macromolecular crowding effect on protein structure and hydration clarified by using X-ray and neutron scattering.

Physica B: Condensed Matter **2018**, 551, 212-217, doi.org/10.1016/j.physb.2018.02.020. (査読あり)

10) S. Ajito, M. Hirai*, H. Iwase, N. Shimizu, N. Igarashi, N. Ohta. (*責任著者)

Protective action of trehalose and glucose on protein hydration shell clarified by using X-ray and neutron scattering.

Physica B: Condensed Matter **2018**, 551, 249-255, doi.org/10.1016/j.physb.2018.03.040. (査読あり)

11) M. Hirai, S. Ajito, K. Takahashi, K. Takeuchi, R. Kimura, T. Iwasa

共鳴X線散乱を用いたタンパク質の変性・折畳みに於ける内部構造変化の解析 Analysis of

Intramolecular Structural Change of Protein Unfolding-Folding Process by Using Resonant X-ray Scattering.

SPring-8 Section A: Scientific Research Report **2017**, 4, 27-31. doi: 10.18957/rr.5.1.27. (査読あり)

12) 平井光博

(総説) 中性子・放射光 X 線を相補的に用いた生体膜の構造, タンパク質との相互作用の解析

オレオサイエンス **2016**, 16, 473-486. (査読あり)

[学会発表] (計 22 件)

(国際会議) 6 件

1) T. Iwasa, D. Wen, X. Li, M. Ozaki, M. Hirai

Structural Studies on the Perireceptor Proteins involving in the Chemoreception

19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress 11th European Biophysics Congress,
2017, 16-22 July 2017, Edinburgh, UK

2) S. Ajito, M. Hirai, H. Iwase, N. Ohta, N. Shimizu, N. Igarashi

How does trehalose affect protein structure and its stability?

International Conference on Neutron Scattering 2017, 12-16 July 2017, Daejeon, Korea

3) M. Hirai, S. Ajito, H. Iwase, N. Ohta, N. Shimizu, N. Igarashi

Effect of molecular crowding on protein structure clarified by neutron and X-ray scattering

International Conference on Neutron Scattering 2017, 12-16 July 2017, Daejeon, Korea

4) M. Hirai, S. Ajito, S. Arai, S. Takata, and H. Iwase

DETERMINATION OF PROTEIN STRUCTURE IN MIMIC-CELL MOLECULAR CROWDING

17TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON SMALL-ANGLE SCATTERING, 7-12 October 2018,
Traverse City, Michigan, USA

5) S. Ajito, H. Iwase, Shin-ichi Takata, N. Shimizu, N. Igarashi, and M. Hirai

SUPPRESSION OF SUGARS ON THE PROTEIN DENATURATION BY GUANIDINE

HYDROCHLORIDE

17TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON SMALL-ANGLE SCATTERING, 7-12 October 2018,
Traverse City, Michigan, USA

6) S. Ajito, N. Shimizu, N. Igarashi, M. Hirai

Wide-angle X-ray scattering studies of effects of sugars on thermal and chemical denaturation of protein

8th International Colloids Conference, 10-13 Jun 2018, Shanghai, China

(国内学会) 16 件

7) 平井光博, 味戸聡志

分子 crowding 環境下のタンパク質・生体脂質膜研究への中性子の応用

日本中性子科学会第 18 回年会, 2018.

8) M. Hirai, S. Ajito, H. Iwase, S. Arai

Quantitatively characterization of the hydration and/or solvation shell of protein

日本生物物理学会第 56 回年会, 2018.

他 14 件

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

無し。

6. 研究組織

(1)研究分担者

無し。

(2)研究協力者

無し。

※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。