

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05987

研究課題名(和文) 繊維状ウイルスからなる液晶性分離膜の構築と特性評価

研究課題名(英文) Construction and characterization of liquid crystalline separation membranes composed of filamentous viruses

研究代表者

澤田 敏樹 (Sawada, Toshiki)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：20581078

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)：様々な分子を自在に分離・濃縮できる分離膜の創製を目指した。ヘキサミンに溶解させた酸クロリド溶液をウイルス水溶液に重層し、界面重合によりその集合構造を固定化して不溶化させ、膜を構築した。分離特性を評価した結果、その分画分子量はファージ濃度や他の反応条件で制御することができ、自在な分離特性をもつ膜をファージから構築できた。さらに、ネオジムイオンに結合するペプチドを導入したファージを用いて膜を構築した結果、鉄と比較してネオジムイオンが選択的に吸着することがわかった。以上から、自在に機能改変できるファージを利用することで、望みの分離機能をもつ膜を構築できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜を用いた分離技術は、様々な分野で欠かすことのできない技術の一つである。近年では、望みの分子のみを迅速に分離して回収・除去できるような高性能な膜の開発が重要となっている。本研究では、自在に機能改変できる繊維状ウイルスを素材とし、望みの分子を選択的に回収可能な分離膜を構築した。様々な分子や物質に結合するウイルスを構築することができるため、望みの機能をもつ分離膜の構築に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Membranes with selective separation capability are desirable for use in energy-efficient processes. In this study, a filamentous virus-based membrane prepared by chemical cross-linking at liquid/liquid interfaces for selective molecular separation was achieved. The virus membrane composed of oriented virus assemblies showed a molecularly porous structure, enabling the size-selective separation of small organic compounds. Furthermore, the pore structure was controlled by the initial concentration of virus solution, enabling broad size selectivity. Membrane preparation using virus modified with neodymium ions (Nd³⁺)-binding peptides was performed. The membrane preferentially adsorbed Nd³⁺ over iron ions (Fe³⁺), demonstrating that the molecular recognition capability of the peptide clearly remained even after the chemical cross-linking reaction. This broad-spectrum separation membrane has potential applicability in various fields.

研究分野：高分子・繊維材料、生体高分子

キーワード：分離膜 繊維状ウイルス 液晶 界面重合 遺伝子工学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜を用いた分離技術は、工学や環境、さらに医療といった様々な分野で欠かすことのできない技術の一つである。従来は、分子のサイズや電荷に応じた膜分離が実施されてきたが、近年では、望みの分子のみを迅速に分離して回収・除去できるような、より高い付加価値をもつ高性能な膜の開発が重要となっている。中でも、多様な構造特性（分子量や電荷、疎水性など）をもつ分子が多量に含まれる細胞破碎液や血清・血漿のような混合溶液の中から、ガンなどの腫瘍もしくはアルツハイマー病などの疾病の存在や進行度を示すバイオマーカー分子を、新たな膜分離技術により選択的かつ効率的に捕捉して濃縮し、速やかに診断に適用することができれば、様々な腫瘍や疾病の超早期診断が達成されると期待される。しかしながら、バイオマーカー分子は多様な腫瘍や疾病に応じた無数の組合せが存在し、また近年の生命科学や分析化学、またバイオテクノロジーの発展に伴ってバイオマーカー探索技術の発展によりその数は益々増大しているため、診断の対象に応じて、望みのバイオマーカー分子のみを捕捉して濃縮できる分離膜を構築することが急務となっている。しかしながら、望みの分子のみを選択的に捕捉することは容易ではない。

一方で、大腸菌に感染するウイルスの一種であるバクテリオファージ（ファージ）は、遺伝子工学により様々な機能性ペプチド（あるいはタンパク質）を人工的に付加することができる担体として利用されてきたが、近年ではマテリアル素材としてファージを利用する研究が展開されている。このファージは、直径 5 nm、長さ 1 μm と巨大で細長い構造をもち、自身の繊維状構造に基づいて液晶形成するほど規則的に集合化する特性をもつ。この自在に機能導入できるファージを素材として分離膜を構築できれば、遺伝子工学を利用した自在な機能化に基づいて望みの分子を分離できる分離膜が創製できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ファージを構成要素とし、バイオマーカーなどの水溶性分子の膜分離に適用可能な分離能をもつ膜を構築することを目的とする。ファージは水溶性であるため、水溶性分子の膜分離を可能にするためには、その集合体を固定化してまずは不溶化しする必要がある。さらに、望みの分子の選択的な分離のためには、固定化後のファージ分子がオリジナルの機能を維持したまま膜として固定化されていることや、適切な分離特性をもつことを確認することも重要となる。そのため、ファージを適切に固定化し、固定化に基づいて構築されるファージ膜の分離特性や機能を制御する手法の確立を検討した。

3. 研究の方法

酸クロリド化合物をヘキサンに溶解させ、ファージ水溶液に重層して反応させた。様々な酸クロリドを用いた検討により適切に不溶化できることを見出した三分岐の酸クロリド化合物を用い、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）からなる支持膜にヘキサンに溶解させた三分岐の酸クロリドを含浸させ、その上にファージ水溶液をマウントすることで PTFE を支持膜としてファージ膜を構築した。様々なファージ濃度や反応時間で膜を構築し、その構造を走査型電子顕微鏡（SEM）、原子間力顕微鏡（AFM）、また偏光顕微鏡（POM）観察により集合構造を評価した。構築した膜に対して様々な分子量のタンパク質や低分子色素化合物をフローし、阻止率ならびに透過流速を決定した。さらに、ネオジムに結合するペプチドを導入したファージを用い、鉄イオンとの選択的な分離能を評価した。

4. 研究成果

様々な構造の酸クロリド化合物にファージ水溶液を重層させた結果、いずれも界面では白色の膜が生成する様子が観察され（図 1）、ファージが界面で酸クロリド化合物と反応していることが示唆された。この白色の膜は数日の間超純水中で静置しても溶解することなく、安定に維持されることがわかった。すなわち、界面重合を利用することで、溶解したファージの集合構造を固定化・不溶化できることがわかり、本手法によりファージからなる膜を構築できることが明らかとなった。最も膜形成効率が良く、また安定性も高かった三分岐の酸クロリド（トリメソイルクロリド）を用いることとした。PTFE からなる支持膜にヘキサンに溶解させた酸クロリドを含浸させ、その上にファージが溶解した超純水をマウントする手法により、PTFE を支持膜としてファージ膜を構築することにも成功し（図 2 上段）、取扱いの容易なファージ膜を構築できることがわかった。様々なファージ濃度で膜を構築して洗浄後に SEM により観察した結果、一定濃度以上で明らかに支持膜よりも密に集合化している構造体が観察され（図 2、下段）、ファージが不溶化して緻密な膜が形成されていることがわかった。POM による観察の結果、より高濃度条件下では明確な複屈折性が観察され、濃度によって液晶配向状態が異なることもわかった（図 3）。この膜の強度や集合構造はファージ濃度のみならず酸クロリドの濃度や反応時間によっても制御することができ、様々な構造や特性をもつファージ膜を自在に構築できることがわかった。



図 1 酸クロリドを利用したファージの界面重合

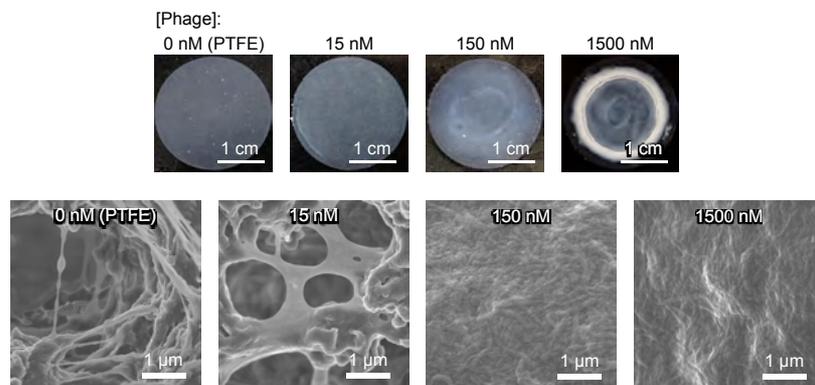


図 2 (上段) PTFE 膜上に調製したファージ膜の外観、(下段) SEM 像

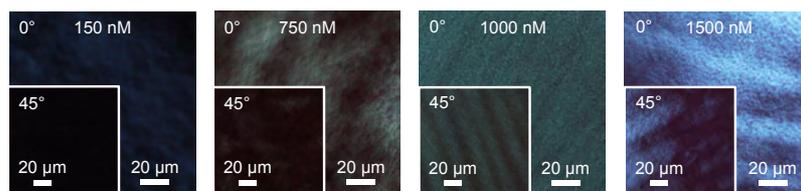


図 3 PTFE 膜上に調製したファージ膜の POM 像

構築したファージ膜の構造と分子分離効率を定量的に評価するため、血清タンパク質の一種であるウシ血清アルブミン (BSA、分子量約 66000) をフローし、その阻止率を評価した (図 4a)。その結果、ファージ膜を構築する際に使用したファージ濃度の上昇に伴って BSA の阻止率が増大し、集合構造の配向性や規則性が向上するほど阻止率が增大することがわかった。特に、ファージを 1500 nM で用いた場合には、99%以上の BSA の通過を阻止することができる分離膜をファージから構築できることがわかった。また、膜の流れやすさの指標となる透過流束を測定した結果 (図 4b)、ファージ濃度の上昇に伴って透過流束は減少するものの、1000 nM 以上では $10 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ 程度の値に落ち着き、阻止率の向上と相関関係はあるものの、完全には相関することはなく、水のある程度通過させながらも機能する分離膜であることがわかった。

より詳細に分離機能を評価するため、分子量 280 程度から 850 程度までの様々な低分子化合物の阻止率を評価した。その結果、膜を調製する際のファージ濃度が高い条件下で調製した高度に配向した膜を用いた場合には、分子量 450 程度の分子までの通過を 90%以上阻止することができ (図 4c)、極めて密にファージが集合化した高い分子分離能をもつ膜をこうちくできていることがわかった。興味深いことに、分子量 400 以下の分子の場合には正電荷の分子は 70%以上阻止されたのに対し、負電荷の分子は全く阻止されなかった。これは、ファージの表層が負電荷であり、さらに界面重合の際には正電荷をもつアミノ基を利用してアミド結合を形成しているため、その表層はより負に帯電するため、結果として静電相互作用や静電反発により、通過させる電荷の影響が大きく寄与しているものと考えられる。一方で、ファージ濃度が低い条件下で調製した無配向なファージ膜の場合には全体的に阻止率は低く、分子量の低下に伴って徐々に阻止率が低下した (図 4d)。これは、ファージが密に集合化していないため、通常の膜のように孔径のサイズに依存した阻止が生じていると考え

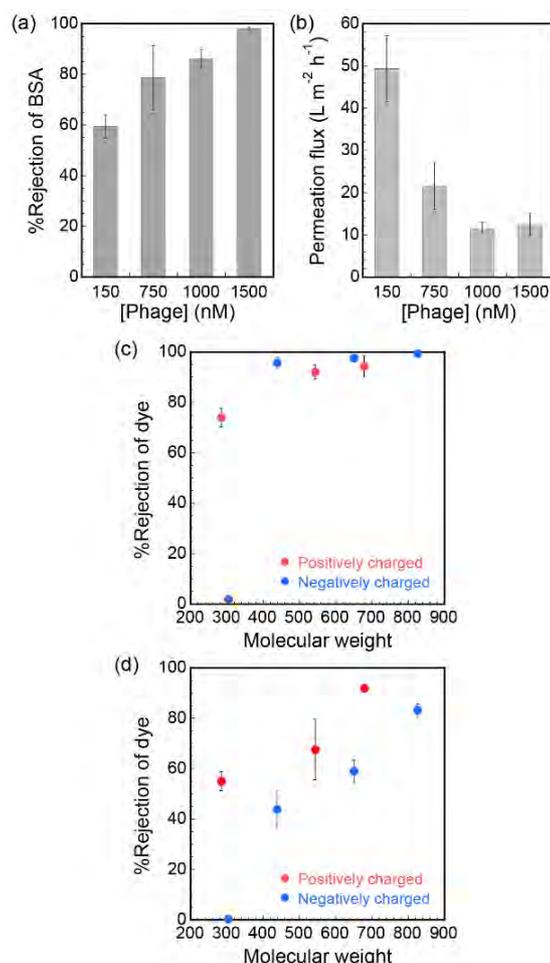


図 4 (a) ファージ膜に対する BSA の阻止率 (b) ファージ膜の透過流束 (c) 高度に配向したファージ膜に対する様々な分子の阻止率 (d) 無配向なファージ膜に対する様々な分子の阻止率

られる。また、この場合にも同様に正電荷の分子の方がより高い阻止率を示していることから、静電相互作用や静電反発が効果的にはたらいていることがわかった。以上のように、ファージの集合構造を制御しながら分離膜を構築することで、ウイルスの構造に応じた分離特性をもつ膜を構築できることを見出した。

ここまではファージの集合構造に依存した分子分離について評価してきたが、より小さな分子の自在な分離・回収を目指し、過去に同定しているネオジムイオン（レアアースの一種にあたる）に結合するペプチドを表層に提示したファージを調製し、同様に界面重合により膜を構築した。この際、効率良く媒体が通過する膜を構築するため、より低濃度のファージを用いて膜を構築した。様々な濃度でネオジムイオンあるいは分離対象である鉄イオンを通過させてその阻止率を評価した結果（図5）、ネオジムが高濃度（200 μM ）の際には、ペプチドの導入によりネオジムイオンがペプチドによって効率的にトラップされるのに対し、鉄イオンの場合にはそのような挙動は示さなかった。すなわち、ファージ表層に導入したペプチドがもつネオジムへの選択的な結合が、選択的な分離に寄与しているものと推察され、ネオジムイオンという極めて小さなサイズの分子を効率的に分離できる分離膜を構築できることが明らかとなった。

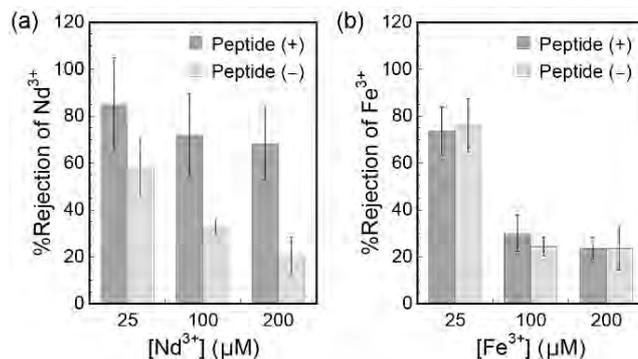


図5 (a) ファージ膜に対するネオジムイオンの阻止率 (b) ファージ膜に対する鉄イオンの阻止率

以上のように、繊維状ウイルスであるファージの集合化制御に基づき、適切に固定化・不溶化することで緻密な膜を構築することができ、さらにその分離特性を集合化に基づいて制御でき、分離膜として機能することがわかった。さらに、ファージに導入した機能性ペプチドは界面重合後にも機能を維持しており、サイズでは分離できないような小さなサイズの分子であっても、ペプチドの分子認識に基づいて選択的に分離できることを見出した。原理上、様々な分子を認識するペプチドを導入できるため、望みの分子選択的な分離膜構築システムに繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Hata Yuuki, Sawada Toshiki, Serizawa Takeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Macromolecular crowding for materials-directed controlled self-assembly	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6344 ~ 6359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8tb02201a	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 Toshiki Sawada	4. 巻 49
2. 論文標題 Filamentous virus-based soft materials based on controlled assembly through liquid crystalline formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 639 ~ 647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/pj.2017.35	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 Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa	4. 巻 91
2. 論文標題 Filamentous Viruses as Building Blocks for Hierarchical Self-Assembly toward Functional Soft Materials	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 455 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20170428	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 Sawada Toshiki, Inomata Haruhiko, Serizawa Takeshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Filamentous virus-based membrane prepared by chemical cross-linking at liquid/liquid interface for a tailored molecular separation system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Membrane Science	6. 最初と最後の頁 117595 ~ 117595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.memsci.2019.117595	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 澤田敏樹	4. 巻 43
2. 論文標題 ウイルスの階層的な集合化を利用したソフトマテリアル創製	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Colloid & Interface Communication	6. 最初と最後の頁 17~19
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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 液晶性繊維状ウイルスを利用したソフトマテリアルの構築
3. 学会等名 第22回液晶化学研究会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiki Sawada
2. 発表標題 Construction of Soft Materials Composed of Hierarchically Assembled Filamentous Viruses
3. 学会等名 1st International Conference on 4D Materials and Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスを素材としたソフトマテリアルの創製
3. 学会等名 平成30年度繊維学会若手交流セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスからなる 階層的な集合体の構築とその機能化
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田敏樹・猪俣晴彦・芹澤武
2. 発表標題 液晶性線維状ウイルスを素材としてゲル膜の調製とその分離機能の評価
3. 学会等名 第30回高分子ゲル研究討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスからなるソフトマテリアルの創製
3. 学会等名 平成29年度繊維学会年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 猪俣晴彦、澤田敏樹、芹澤武
2. 発表標題 繊維状ウイルスからなる液晶性メンブレンの分離特性評価
3. 学会等名 平成29年度繊維学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスを素材とするソフトマテリアルの構築
3. 学会等名 第2回ソフトマター工学分科会講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪俣晴彦、澤田敏樹、芹澤武
2. 発表標題 繊維状ウイルスからなる液晶性メンブレンの構築と分離特性評価
3. 学会等名 第55回高分子と水に関する討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪俣晴彦、澤田敏樹、芹澤武
2. 発表標題 液晶構造をもつ繊維状ウイルスに基づくメンブレンの分離特性
3. 学会等名 第27回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスを素材としたソフトマテリアルの構築
3. 学会等名 九州地区高分子若手研究会・冬の講演会2017（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスを利用したソフトマテリアルの創製とその機能開拓
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 ウイルスを素材とするソフトマテリアルの創製と機能開拓
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスの集合化制御とそれに基づくソフトマテリアル創製
3. 学会等名 第65回高分子研究発表会 [神戸]（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスからなるソフトマテリアルの創製とその機能開拓
3. 学会等名 第92回高分子若手研究会（関西）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田敏樹、猪俣晴彦、芹澤武
2. 発表標題 繊維状ウイルスからなるメンブレンの調製とその分離機能の評価
3. 学会等名 第69回高分子年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田敏樹、猪俣晴彦、芹澤武
2. 発表標題 界面重合によるウイルスメンブレンの構築とその分離特性評価
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 繊維状ウイルスを素材としたソフトマテリアルの構築と機能開拓
3. 学会等名 2020年度ゴム協会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

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