

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34412

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K14854

研究課題名(和文)機能性タンパク質を含む細胞破砕片懸濁液の濾過現象の解明とその高速濾過法の開発

研究課題名(英文)Filtration of cell debris suspension containing functional proteins

研究代表者

田中 孝徳(Tanaka, Takanori)

大阪電気通信大学・工学部・講師

研究者番号：30581889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンパク質のような水溶性の生体高分子と菌体などのソフトナノコロイドの濾過分離操作において濾過抵抗に寄与するタンパク質の影響を解明して、最適な分離手法、装置や操作の設計のための指針を得ることを目的として実施した。

酵母懸濁液の定圧濾過操作においてタンパク質の添加効果の濃度依存性を精査した。ソフトナノコロイドの一般的な挙動とは異なり、タンパク質の添加によりその傾向は解消され、十分添加時では圧力の増加に従い、濾過性の向上が見られた。また、高効率の濾過法の提案を行うため、濾材の影響を調べ、条件によっては濾材を変えるだけで、濾過性が1.5倍程度向上することも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子組換え・細胞融合などのバイオテクノロジーを応用して製造される、バイオ医薬品が注目されている。また、医療用のみに限らず、酵素や天然色素タンパク質などのタンパク質の様々な利用が増加している。機能性タンパク質の多くは、培養細胞や細菌内で生化学的に生成される。細胞内に産生される水溶性タンパク質を分離・精製するためには前処理として、細胞を破砕し、細胞片を除去する必要がある。

今回の研究成果で細胞片を除去する際にタンパク質は濾過操作の処理速度を促進する可能性があることを示した。このようなバイオナノコロイドの除去操作においての分離方法の改善につながる結果である。

研究成果の概要(英文)：The concentration dependence of the protein in the constant pressure filtration process of the yeast suspension was investigated. By adding proteins, the filtration efficiency improved as the filtration pressure increased. Furthermore, it was clarified that the filtration efficiency was improved by 1.5 times depending on the selection of the filter medium.

研究分野：プロセス工学

キーワード：固液分離 ソフトナノコロイド タンパク質 濾過比抵抗 濾材

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え・細胞融合などのバイオテクノロジーを応用して製造される、バイオ医薬品が注目されている。バイオ医薬品の一種であるインスリン、サイトカイン、抗体医薬品は現代の医療分野において重要な役割を担っている。また、医療用のみならず、酵素や天然色素タンパク質などのタンパク質の様々な利用が現在も増加している。機能性タンパク質の多くは、培養細胞や細菌内で生化学的に生成される[1]。細胞内に産生される水溶性タンパク質を分離・精製するためには前処理として、細胞を破碎し、細胞片を除去する必要がある(図1)。

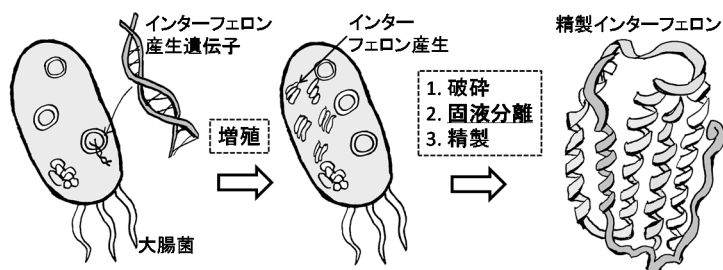


図1 機能性タンパク質の生産方法の例

タンパク質の精製工程は、タンパク質が蓄積された細胞の物理的または化学的手段による破碎と、細胞破砕片の除去から始まる。細胞破砕片の除去には、遠心分離や濾過等の固液分離技術が用いられるが、いくつかの問題が存在する。遠心分離操作の場合では、細胞破砕片は液との密度差が小さく、沈降し難いコロイド状物質であるため、超遠心と呼ばれる非常に大きな遠心力(重力の1万倍以上)が必要となる。工業規模での分離には高性能な遠心分離機が多数必要となり、コストアップの要因となる。濾過操作の場合では、細胞破砕片は圧縮性が高く、難濾過性であるため、濾過速度が非常に遅いうえ、濾材の目詰まりやファウリングが生じやすく、タンパク質の回収量が低下する。このように機能性タンパク質の生産プロセスの効率化には固液分離技術の精査が不可欠であるが、現状は経験則に依存しており、化学工学的な視点からの定量的な基礎検討は不十分である。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、成長しつつある親水性コロイドのケーキ層とタンパク質水溶液とを分離する際の挙動をクロマトグラフィ的な物質移動現象を考慮して明らかにするものである。固液分離工学の分野において、液中に溶解した分子は粘度・密度などの流体物性に影響を及ぼすもので、分子自体が流動抵抗に影響するとは扱われてきていない。また、含タンパク質懸濁液の濾過操作の高効率化も目指した。本課題において期待される十分な成果が得られた場合、含タンパク質懸濁液の濾過過程が明らかとなり、その学理を応用した機能性タンパク質の高速回収システムの構築が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 実験試料

本研究では菌体とタンパク質のモデル試料として、入手容易なパン酵母とウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。ドライイースト(オリエンタル酵母)をpH 7.0のMcIlvaine緩衝液に加えて攪拌し、遠心沈降管に注ぎ入れ、1000 rpmにて遠心沈降を行った。遠心沈降が終わる度に上澄み液を除去した。除去した質量分の緩衝液を加え重量を確認した。上記の操作を複数回実施し、洗浄を行った。タンパク質を添加する条件でのサンプル調製は、洗浄の最後に所定濃度のウシ血清アルブミンが含まれるMcIlvaine緩衝液を注ぎ入れて酵母菌を分散させた。

(2) 定圧濾過実験

定圧濾過実験はアドバンテック社のタンク付ステンレスホルダー KST-47(内径φ35 mm)を用いて、窒素ガスボンベで一定圧力を印加することで実施した。濾液質量の時間変化を電子天秤に接続したPCで記録した。得られたデータはRuthの定圧濾過式に従い整理し、濾過速度の指標となるRuthの定圧濾過係数 K を求めて評価した。濾材には濾紙 No. 5Cと各種の濾布をφ35 mmに揃えて使用した。

4. 研究成果

酵母懸濁液の定圧濾過操作においてタンパク質の添加の有無における、濾過圧力の影響を調査した。酵母懸濁液はソフトコロイドであるため、濾過圧力の増加に伴って流路が小さくなり、濾過性がむしろ低下することが一般的である。しかし、タンパク質の添加によりその傾向は解消され、十分添加時では圧力の増加に従い、濾過性の向上が見られた。この結果により、タンパク質が濾過効率をむしろ高める役割を持つことが示唆された。そこで、タンパク質である BSA 濃度の影響を精査した。濾過速度の指標である定圧濾過係数を求めるため Ruth プロット (図 2) を行い、BSA 添加量が定圧濾過係数に与える影響を示した (図 3)。BSA 濃度に対して定圧濾過係数の極大値が存在するため、BSA の酵母菌表面への吸着が濾過性にプラスの影響を及ぼし、粘度上昇などのマイナスの影響を打ち消しているものと推察される。この考察を支持するため、濾過前後の BSA 濃度を測定したところ、濾液中の BSA 濃度が懸濁液中のものよりも低いことを確認した。BSA の吸着実験や BSA 添加がゼータ電位や粒度分布に与える影響などの多面的な測定による更なる検証が必要である。

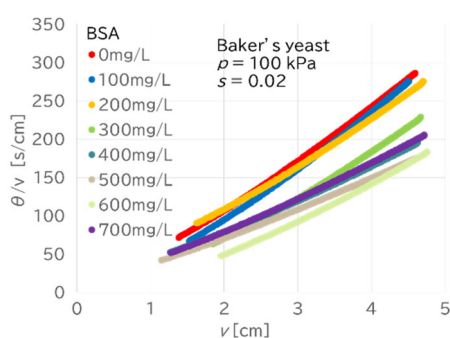


図 2 Ruth プロット

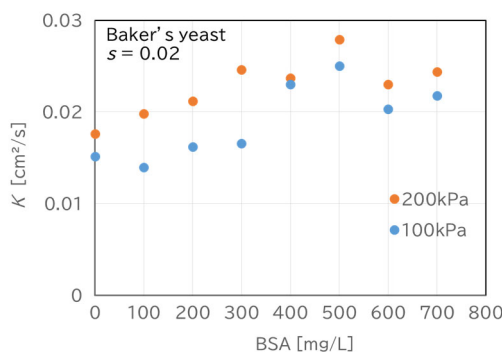


図 3 BSA 濃度の影響

この系の高効率的濾過法の提案を行うため、柔軟な濾過助剤を用いた試験を行ったところ、少量の添加で十分な濾過性向上の効果が認められた。一方で剛直な濾過助剤を用いた場合には、助剤粒子の間隙で難透水領域ができるため、濾過性向上の効果は高くはなかった。

また、濾材の効果を調べるため、織布、不織布を用いて、定圧濾過実験を様々な圧力で行い、その解析により定圧濾過係数を得た。織布、不織布の定圧濾過係数の比較を図 4 に示した。一般に定圧濾過係数は濾過圧力の増加に伴い、単調に増加することが知られている。不織布を用いた結果では濾過圧力が高くなるにつれ定圧濾過係数も高くなり続けている。しかし、織布の場合では 45kPa 付近に変曲点が見られ、それ以上の圧力では液移動の推進力である濾過圧力を高くしても定圧濾過係数は増大しないということが読み取れる。例えば 100 kPa 付近では定圧濾過係数の値が約 1.5 倍まで向上している。圧力上昇による推進力の向上効果と濾過比抵抗の増加効果が相殺していることが推察される。ある圧力領域においては、濾材の違いだけでケーキ層全体の抵抗が変化することを明らかにした。

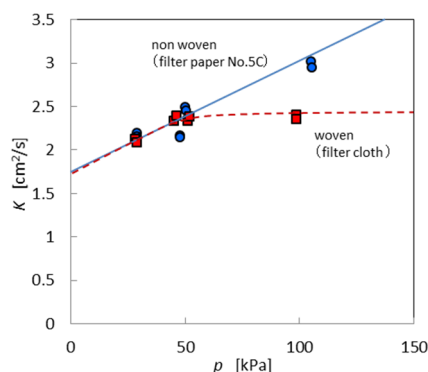


図 4 濾材の効果

<引用文献>

- [1] 科学技術振興機構 研究開発戦略センター, (戦略プロポーザル) 分離工学イノベーション～持続可能な社会を実現する分離の科学技術～, CRDS-FY2015-SP-04 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 孝徳・小林 隼也・須藤 慶哉
2. 発表標題 水溶性タンパク質を含むコロイド懸濁液の濾過過程
3. 学会等名 化学工学会第85年会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------