

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02502

研究課題名(和文) 生体膜を模倣した超選択的イオン分離膜の創製

研究課題名(英文) Development of super-selective ion separation membranes via biomimetic approach

研究代表者

佐伯 大輔 (Saeki, Daisuke)

信州大学・学術研究院工学系・助教

研究者番号：70633832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体膜の物質透過機構を模倣した、新規なイオン分離膜の可能性について検証した。生体由来のイオン透過性分子のイオン透過速度を、リポソームを用いて定量的に評価し、イオン透過性に関してイオン種ごとに速度差があることを明らかにした。これらの分子を含む支持平面脂質二分子膜を高分子多孔体表面に形成し、イオン分離膜として評価したところ、イオン分離を行える可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体模倣型の水処理膜は、近年、従来の高分子材料を超える性能が実現できると期待されている。しかしながら、その検討は水分子を選択的に透過するアクアポリンなどの水チャネルを用いた逆浸透膜が中心である。本研究は、生体模倣的アプローチによりイオン分離を試みた初めての研究であり、高分子系材料からなるイオン分離膜とは全く異なる構造、性能を持つ次世代のイオン分離膜の可能性を示した点は、分離工学において重要な学術的知見である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the possibility of new-generation ion separation membranes based on the biomimetic approach of the permeation mechanism of biological membranes. First, we quantitatively evaluated the ion permeation rate of biological ion channel molecules and clarified the difference of the permeation rate between ion species. Then, we formed supported lipid bilayers (SLBs) containing the biological ion channel molecules on a polymeric porous substrate. The evaluation of the fabricated SLBs as ion separation membranes showed the possibility of the ion separation.

研究分野：膜分離工学

キーワード：膜分離 イオン分離 生体模倣 脂質二分子膜 イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

液中から目的のイオンのみを分離する技術は、水処理を始めとして電池や医療など、様々な分野において求められているが、高効率、選択的かつ連続的に分離する技術は未だ確立されていない。一方、生体膜においては膜タンパク質などの機能性分子により効率的かつ選択的な物質輸送が行われている。近年、このような生体分子の持つ物質透過機構に着目し、Aquaporin のような生体由来の水チャンネルを孔とした生体模倣型 RO 膜の作製が試みられている。Aquaporin を用いた RO 膜の透水性能は、理論的には既存の RO 膜と比べて 2-3 桁高いと推算されている。本研究では、これらの手法を水チャンネルではなくイオンチャンネルへと適用することで、特定のイオンのみを分離可能なイオン分離膜が作製できるのではないかと考えた。液中から目的のイオンのみを分離する方法としては、現状、イオン交換樹脂のような吸着材を用いる方法や、固定電荷を有する高分子薄膜からなるイオン交換膜を透過させる方法が開発されている。バッチプロセスでの運用が中心のイオン交換樹脂と比べ、イオン交換膜は長時間の連続的な分離が可能であるという大きな利点があり、製塩や海水淡水化に用いられている。しかしながら、イオンが高分子膜中を拡散する形で透過するため透過抵抗が大きく、イオン種に対する選択性も低い。現状、特定のイオンのみを高効率、選択的に分離することは難しい。このような問題を生体模倣的アプローチにより解決できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、イオンチャンネルを分離素子とした生体模倣的アプローチにより、従来のイオン種に対する選択性のないイオン交換膜を超えた、特定のイオンのみを真に「分離」する、「超選択的イオン分離膜」の可能性を検証する事を目的とした。イオンチャンネルを導入した固定化平面脂質膜の形成方法を確立し(図1)、特定のイオンを選択的かつ連続的に透過するイオン分離膜として機能するか評価した。

本研究で目標とするイオン分離膜は、支持体表面に平面的な脂質二分子膜が担持され(supported lipid bilayer; SLB)、脂質膜にイオン透過能を持つイオンチャンネルが導入された構造を有する。

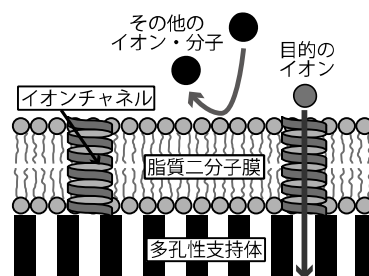


図1. 目標とする生体模倣型イオン分離膜の構造

## 3. 研究の方法

本研究は、3つの項目に分けて検討を行った。

### I) イオンチャンネルの導入方法および透過性評価方法の確立

イオンチャンネルが分離膜の透過孔として機能するかどうかは、報告例が無く、まずは透過孔としての性質を評価する必要がある。脂質膜への導入方法と脂質膜におけるイオン透過性の評価を行った。本研究では、SLBの形成に支持体と脂質膜間の静電相互作用を利用するため、荷電脂質が脂質膜に含まれることになる。Amphotericin B (AmB)などの脂質膜への導入が比較的容易なイオン透過性生体分子をイオンチャンネルのモデルとして用いて、荷電脂質を含む脂質二分子膜中における立体構造をCDスペクトルにより評価した。また、イオンの透過性をストップフロー分光測定装置(本研究費で導入)により評価する方法の確立を行った。これらにより、イオンチャンネルの機能が発現する条件を検討し、イオンチャンネルの透過孔としての性質を評価した。

### II) イオンチャンネルを導入したSLBの作製方法の確立

SLB形成においては、透過抵抗とならない多孔質体を支持体として用いる必要がある。脂質二分子膜には欠陥があってはならず、更に生体内と同様の物質透過能を維持した状態でイオンチャンネルを導入する必要があるが、このようなSLBの報告例はほとんどないため、形成方法から検討をする必要がある。SLB形成方法として、多孔質支持体と脂質二分子膜間の静電相互作用を利用したりポソーム融合法を用いた。透過性を有する支持体表面へイオンチャンネルを導入したりポソームを接触させ、イオンチャンネルを導入したSLBを形成させた。得られたSLBについて、支持体表面における脂質二分子膜の構造を評価するため、脂質分子の支持体表面における流動性を、共焦点レーザー顕微鏡を用いた光褪色後蛍光回復(FRAP)法により評価した。また、平面的な脂質二分子膜の形成を促進するため、ポリエチレングリコールなどの融合誘発剤についても検討した。

### III) イオン分離膜としての性能評価

イオンチャンネル導入SLBのイオン分離膜としての性能、安定性を検証する手法として、電気透析を検討した。小面積での評価が可能な電気透析装置を設計、作製した。市販のイオン交換膜を用いて正常に機能することを評価した後、作製したSLBのイオン分離膜として

の性能評価を行った。

\* SLB の作製方法や評価方法の詳細については、特許出願の関係で後日再提出する。

#### 4. 研究成果

##### I) イオンチャネルの導入方法および透過性評価方法の確立

カチオン性脂質および AmB を導入したリポソームの CD スペクトルを図 2 に示す。脂質組成や AmB 導入量により脂質膜における構造が変化した。また、調製後の経過時間や温度によっても構造は変化することが分かった。これらの結果から、チャネル構造の形成には特定の導入条件である必要があることが分かった。

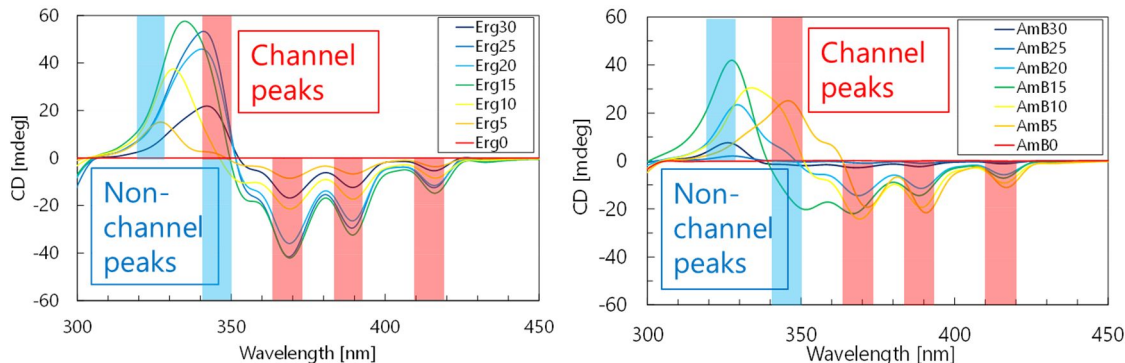


図 2 . AmB 導入リポソームの CD スペクトル測定結果

次に、AmB を導入したリポソームを用いて、脂質膜における AmB のイオン透過性を評価した。pH 感受性色素 HPTS を用いた、リポソーム内外における pH 差を駆動力としたイオン透過の評価系を用いた (図 3)。HPTS 及び各種カチオン塩 ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) を内水相に含み、AmB を脂質膜に含むリポソームを調製し (内水相 pH=外水相 pH=7.0) ストップフロー装置を用いて NaOH と混合し、外水相の pH を上昇させると、リポソーム内外で pH 勾配が生じる。AmB がイオンチャネルとして機能するならば、pH 勾配を解消するため、 $H^+$  が AmB を通り外水相へ流出する一方、対象カチオンが電気的中性を維持するため内水相へ流入する。 $H^+$  と対象カチオンの移動が起きた場合、HPTS の蛍光強度が増大する。CD スペクトルの結果からチャネル構造の形成が示された系における、実際の評価結果の一例を図 4 に示す。AmB を添加した場合のみ蛍光強度の増大が見られたことから、AmB はイオンチャネルとして機能することが分かった。解析により一次速度定数を求めたところ、カチオン種により透過性が異なり、また、脂質組成によっても透過性が変化することが分かった (表 1)。これらの結果より、脂質膜の調製条件によりイオン透過性を制御できる可能性があることが分かった。

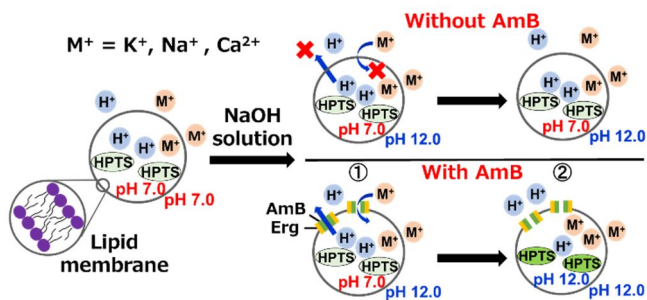


図 3 . pH 勾配を駆動力としたイオン透過の評価系

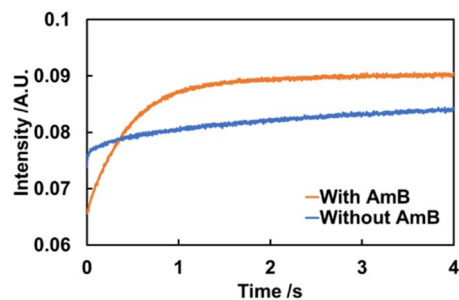


図 4 . AmB 導入脂質膜のカチオン透過性の評価例 POPC : Erg : AmB = 85 : 10 : 5 (mol%) で調製したリポソームの  $K^+$  透過性を評価

表 1 . AmB 導入リポソームの各種カチオンの透過性 (一次速度定数  $k$  [-/s]) の比較

Cation, $M^+$	$K^+$	$Na^+$	$Li^+$	$Ca^{2+}$
Ergosterol	$2.00 \pm 0.111$	$3.59 \pm 0.165$	$5.13 \pm 0.318$	$3.76 \pm 0.00240$
Cholesterol	$2.90 \pm 0.279$	$5.00 \pm 0.226$	$2.86 \pm 0.151$	$3.22 \pm 0.0194$

\* AmB 以外のイオンチャネルの評価結果や透過速度については、特許出願の関係で後日再提出する。

##### II) 生体模倣型イオン分離膜の製膜方法の確立

SLB 形成操作を行った高分子多孔体表面における脂質分子の流動性を FRAP で評価した。評価結果の一例を図 5 に示す。褪色部の蛍光が時間とともに回復したことから、支持体表面に脂質分子が存在し、それらが側方拡散性を有する、すなわち平面的な脂質膜構造を形成していることが分かった。回復速度は脂質の種類やイオンチャンネルの導入により変化し、特に、イオンチャンネルを導入した場合は回復速度が低下した（図 6）。イオンチャンネルと脂質分子の相互作用により、脂質分子の運動性が低下したと考えられる。ポリエチレングリコールなどの脂質膜に対する融合誘発剤を添加した場合、最終的に到達する回復率が増加したことから、融合誘発剤には平面化の促進効果があると考えられる。

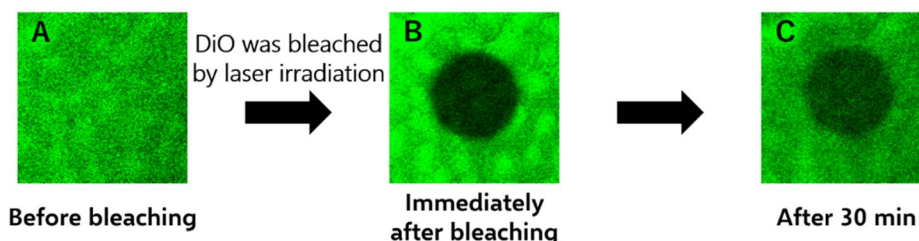


図 5 . FRAP 法を用いた SLB の流動性評価例

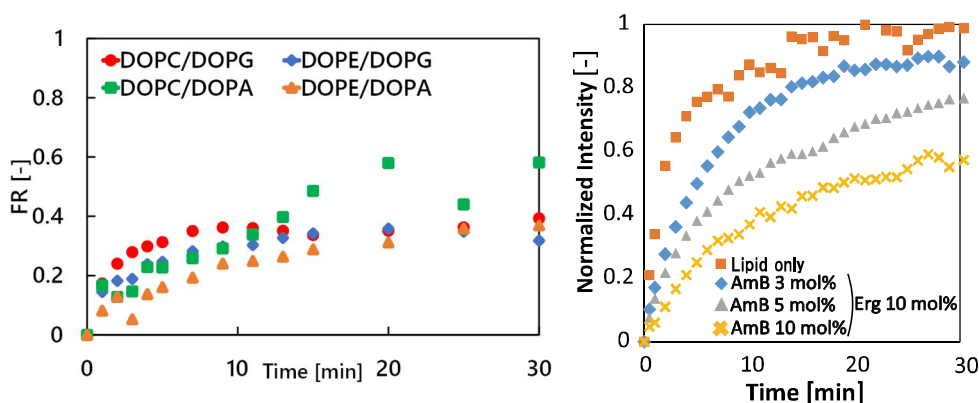


図 6 . 脂質組成やイオンチャンネルの導入が流動性に及ぼす影響 (左) 脂質組成の影響、(右) チャンネル導入の影響。

### III) イオン交換膜としての性能評価

作製した電気透析装置を図 7 に示す。有効膜面積  $12 \text{ cm}^2$  ( $2 \times 6 \text{ cm}$ ) で市販のイオン交換膜の評価を行える事を確認した。本装置を用いて SLB を評価したところ、イオン種ごとの透過性に差があり、イオンの選択分離を行える可能性があることがわかった。

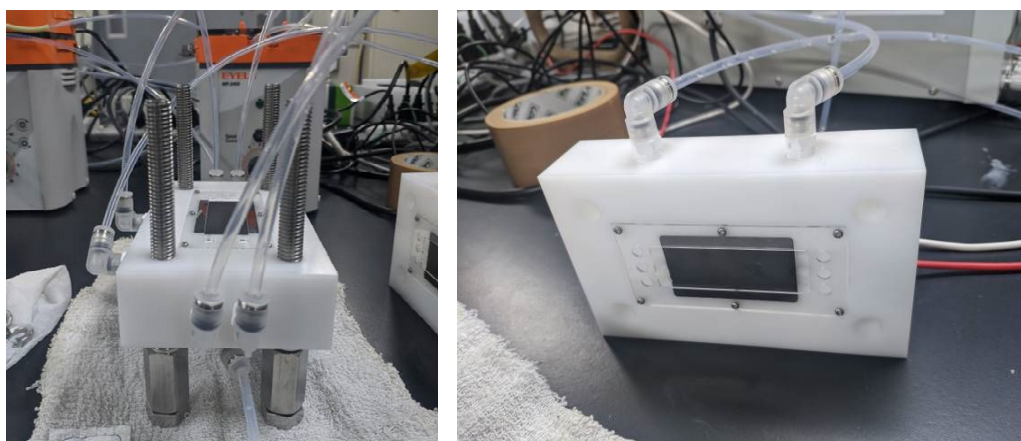


図 7 . 電気透析装置の俯瞰写真 (左)陽極側、(右)陰極側。

\* 作製した膜の評価方法や結果の詳細については、特許出願の関係で後日再提出する。

### IV) まとめ

本研究では、生体由来のイオンチャンネルを分離素子として用いた新規なイオン分離膜の作製について検討を行った。本研究は、生体模倣的アプローチによりイオン分離を試みた初めての研究であり、高分子系材料からなるイオン分離膜とは全く異なる構造、性能を持つ次世代のイオン分離膜の可能性を示した点は、分離工学において重要な学術的知見である。今後の展望として、イオン透過機構の評価や、実プロセスへの展開などを目指した検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 佐伯大輔	4. 巻 46
2. 論文標題 高分子固体表面への支持脂質二分子膜形成と応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 187-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5360/membrane.46.187	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13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤崎龍, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 脂質組成とポリエチレングリコール添加が静電相互作用を用いたリポソーム融合法によるSLB形成に与える影響
3. 学会等名 日本膜学会第43年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯大輔
2. 発表標題 ポリアミド系水処理膜の高機能化のための表面設計
3. 学会等名 表面技術協会関東支部第99回講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷河怜, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 静電相互作用を用いたリポソーム融合法におけるSLB形成挙動に及ぼす脂質組成と融合誘発剤の影響
3. 学会等名 日本膜学会第41年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷河怜, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 静電相互作用を用いたリポソーム融合法によるSLB形成における脂質組成と融合誘発剤の影響
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Tanigawa, Daisuke Saeki, Yukihiisa Okumura
2. 発表標題 The effect of the lipid composition and fusion-inducing reagents on SLB formation behavior in the liposome rupture method
3. 学会等名 International Congress on Membranes & Membrane Processes 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栃谷一樹, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 液液界面を利用した平面固体表面への支持脂質膜形成に関する検討
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤康太, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 ストップフロー法によるamphotericin Bのイオン透過性評価
3. 学会等名 第53回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤康太, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 pH感受性色素を用いたamphotericin Bのイオン透過性評価
3. 学会等名 膜シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤康太, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 Amphotericin Bが脂質膜のイオン透過性に及ぼす影響
3. 学会等名 第25回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤康太, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 pH感受性色素を用いたamphotericin B含有脂質膜のイオン透過性の定量的評価
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Ito, D. Saeki, Y. Okumura
2. 発表標題 Evaluation of the cation permeability of lipid membranes containing amphotericin B using a pH-sensitive dye and pH gradient
3. 学会等名 International Congress on Membranes & Membrane Processes 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤康太, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 Amphotericin B含有脂質膜のカチオン透過性にステロール種が及ぼす影響の定量的評価
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 選択性透過膜および水処理方法	発明者 佐伯大輔、他	権利者 国立大学法人信州大学、他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-078340	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂質膜の製造方法	発明者 佐伯大輔、他	権利者 国立大学法人信州大学、他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-034558	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>信州大学工学部物質化学科 分子集合体化学研究室  <a href="http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem004/">http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem004/</a></p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
---------	---------