

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01257

研究課題名(和文) 物質輸送の時空間受動能動制御によるタンパク質低モザイシティ結晶化の実現

研究課題名(英文) Low Mosaicity Crystallization of Proteins by Temporal and Spatial Active-Control of Mass Transfer

研究代表者

小宮 敦樹 (Komiya, Atsuki)

東北大学・流体科学研究所・教授

研究者番号：60371142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質物質拡散の制御性を定量的に評価し、タンパク質低モザイシティ結晶化の実現を目指すことを目的としている。複数のマイクロ細孔を有する膜(スマートメンブレン)を用い、膜を介してのタンパク質物質輸送現象を実験的に可視化し、低モザイシティ結晶成長が可能な結晶成長場の提案を行った。また、結晶成長速度を考慮した対流を含む濃度場の変化を温度場起因の対流場により相殺させ、膜近傍での濃度場を均一化を図り、スマートメンブレンを用いた物質流束制御による均一濃度場形成のための支配因子を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、研究目的にも示したように、タンパク質低モザイシティ結晶化の実現を目指している。得られた研究成果から、地球上では不可避の自然対流による濃度斑を極力低減させた高品質タンパク質結晶を創り出すことが期待でき、多くのタンパク質の分子構造情報を高精度に取得することが可能となる。これによりタンパク質の物性や機能の理解が進み、学術的には創薬や食品学の分野の発展に資する情報が提供でき、また、高品質の薬品等が効率よく生産できることから、社会的意義も大きいものとなる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to quantitatively evaluate the controllability of protein mass diffusion and to realize protein low-mosaicity crystallization. Applying a special membrane (smart membrane) which has micro-structured pores, a hindered diffusion field in the vicinity of membrane was experimentally visualized and a crystal growth field that enables low-mosaicity crystal growth was proposed. Additionally, the dominant factors for the formation of a uniform concentration field by controlling the material flux using smart membranes were evaluated, by offsetting changes in the concentration field including convection caused by the crystal growth rate with a convection field caused by the temperature field.

研究分野：熱工学

キーワード：タンパク質 物質拡散 結晶成長 低モザイシティ 有孔透過膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 「輸送現象」をキーワードとする学術領域では、計測技術や MEMS 技術の革新的な発展により、マイクロ・ナノ空間における輸送現象の時空間高精度可視化が可能となり、また能動的な輸送現象制御が実現化している、熱工学分野においても熱物質移動現象を微小スケールで能動制御できる可能性が見出されてきているが、その研究は他の分野の応用展開と比較してみると十分進展があるとはいえない。特に結晶成長などの相変化を有する複雑系熱物質移動現象においては、現象の起こる領域がマイクロスケールであるにも関わらず、微視的視野の観点から現象を究明し、能動制御技術を確立する研究は散見される程度である。

(2) タンパク質物質拡散現象の高精度可視化技術が確立され、その移動現象論に特化した研究が進められてきている。具体的にはタンパク質の束縛拡散に関して、物理的空間制御が物質移動現象に及ぼす影響を定量評価し、特にタンパク質の構造的・物理的特徴がヒト体内を模擬した環境においてどのように変化するかの実験的研究が進められてきた。また、物理的空間制御とタンパク質固有の特性の関係についても、相互作用の観点から実験の評価も進められてきており、膜を介し、空孔の配列を制御することでタンパク質の物質流束を自由拡散比の 50 - 150% 程度で促進・抑制制御できる可能性が見出されてきている。

(3) 結晶成長場全体の環境を変化させ高品位結晶を生成する研究はこれまでに数多く行われている。代表的なものは宇宙空間を利用した無重量環境下による結晶成長であり、また磁場印加による高品質タンパク質結晶の生成に関する報告もある。これらは場の制御により溶媒中のタンパク質配向を整えることで、モザイシティが低減された結晶成長を実現しているが、結晶成長は種結晶表面でのみ起こる現象であり、場全体の制御に限らず種結晶表面近傍の局所物質輸送を制御し、均一化された濃度場を形成することで高品位の結晶成長が可能であることが考えられる。

2. 研究の目的

(1) タンパク質の特異性を利用して透過膜を介した液相内の物質輸送現象を能動制御し、タンパク質の低モザイシティ結晶化の実現を目指す。本研究では種結晶表面近傍のみ着目し、MEMS 技術やマイクロスケール計測技術の援用を受け、物質輸送制御の観点から低モザイシティ結晶化を目指す。物質材料工学の研究者と議論を行い、図 1 に示すような有孔透過膜（スマートメンブレン）に周囲環境応答機能を持たせ、タンパク質のスマートメンブレン透過量と周囲環境の関係を実験的に明らかにする。

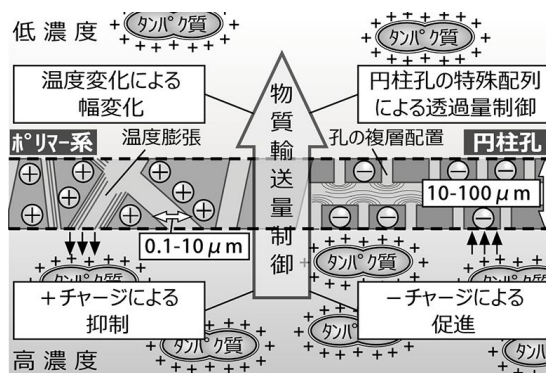


図 1 スマートメンブレン概念図

(2) スマートメンブレンを用いてタンパク質物質拡散の可視化実験を行い、透過膜近傍における物質透過量を定量評価する。対象となるタンパク質の溶解曲線を考慮した温度範囲を周囲条件として実験を行い、印加電場等の周囲環境依存性も併せて評価する。研究協力者の大学院生と協力してパラメトリックなデータの取得を行い、スマートメンブレンの仕様と実際のタンパク質物質透過量の関係をデータベース化する。

(3) 本研究で作成するデータベースを用いて、対象タンパク質の結晶成長速度をパラメータとした最適透過膜配置を数値シミュレーションにより行う。種結晶周りの飽和溶液を冷却することで種結晶を成長させるが、冷却速度と結晶成長速度および場の温度起因の複雑熱・物質移動現象となるため、計算機を援用した評価およびセルデザインを行う。しきい値として濃度レイリー数で 1000 以下となるような透過膜配置を試みる。

(4) タンパク質の電気的特性、構造的特徴および物質拡散係数の周囲環境依存性を包括的に考慮し、物質流束制御とタンパク質結晶成長の関係を理論的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) スマートメンブレンの製作とタンパク質透過実験を行う。既存の光学系を借改良し、視野が 0.5mm × 0.5mm の顕微干涉計を製作して高時空間精度有した測定系にて観察実験を行う。また、タンパク質物質輸送特殊観察セルを製作し、透過膜近傍の濃度分布をサブミリスケール (<100μm) で正確にとらえられるように光学系を改良する。カメラを 4K 高解像度対応にし、イメージイン

テンシファイア (I.I.) を活用する。スマートメンブレンの製作については、物質材料工学を専攻する海外研究協力者の助言のもと、複数種の有孔透過膜の製作を行う。材質は弾性を有するポリマー類であるが、物質材料研究者の更なる知見を融合し選定を行う。製作には、東北大学マイクロ・ナノマシニング研究教育センターを利用する。

(2) スマートメンブレンを用いてタンパク質物質拡散の可視化実験を行い、透過膜近傍における物質透過量を定量評価する。対象となるタンパク質の溶解曲線を考慮した温度範囲を周囲条件として実験を行い、印加電場等の周囲環境依存性も併せて評価する。場の温度制御に関しては、特注の温度制御システムを用い、0.1K の精度で場全体を制御する機構とし、温度依存を完全字排除した物質透過量測定実験を行い、スマートメンブレン構造と透過量の関係を明らかにする。

(3) 海外研究協力者の協力の下、種結晶周囲が常に一様濃度場となるように、対象タンパク質の結晶成長速度をパラメータとした最適透過膜配置を数値シミュレーションにより行う。図 2 に示すように種結晶周りを複数のセグメントに分割して有孔透過膜を配置し、外部から内部への物質流れを時間的空間的に制御するが、濃度場が一様となるような配置を試みる。種結晶周りの濃度場を完全に均一化することは不可能であると推測できるので、しきい値として濃度レイリー数で 1000 以下となるような透過膜配置を試みる。

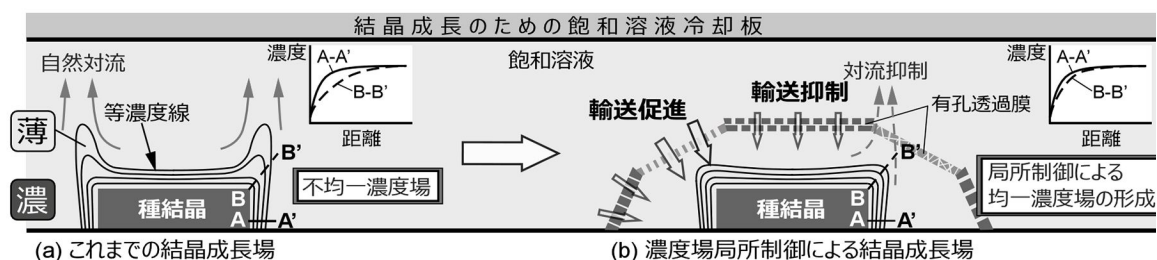


図 2 複数のスマートメンブレンによる濃度場均一セルの概念図

(4) 結晶成長実験を実施し、結晶品位の評価を行う。濃度場均一セル内にタンパク質飽和水溶液を充填し、その内に種結晶を配置してセル内を緩冷することで結晶成長実験を行う。本実験では、まず結晶成長時に生じる自然対流が結晶品位に及ぼす影響を評価する。セルの冷却速度は 10K/s で一定とし、濃度差レイリー数を大きめの 10^5 程度とする。続いて、自然対流を抑制させた実験を行う。濃度差均一セルによる濃度場の一様性を評価する。

4. 研究成果

(1) 既存の干渉計に改良を施し、光学系を付加することで視野が $0.5\text{mm} \times 0.5\text{mm}$ の顕微干渉計を製作した。また、これまでの研究で問題となっていた試料溶液の液漏れ問題を解決するために、ネジ機構を採用した特殊観察セルを製作し、透過膜近傍の過渡濃度分布をサブミリスケール ($<100\mu\text{m}$) で正確に捉えることに成功した。

(2) これまでの研究で明らかにしてきた知見を利用し、規則的に円柱状マイクロ孔が配置された有孔透過膜を、本学マイクロ・ナノマシニング研究教育センターを利用して製作し、実験を行った。マイクロ孔直径は $25 \sim 300\mu\text{m}$ とした。透過膜は複数製作し、孔径をパラメータにしているが、膜の総開口面積は等しくし、マイクロ孔のパターニングと孔径が物質透過量に及ぼす影響について評価した。その結果、図 3 に示すように総開口面積が等しいにも関わらず、大孔径で少数のパターニングの場合は膜透過量が少なく、反対に小孔径ではあるが多数の細孔を有する膜では透過量が多くなる傾向が得られた。この傾向は数値シミュレーションでも再現されており、物質透過量の可制御性が確認された。

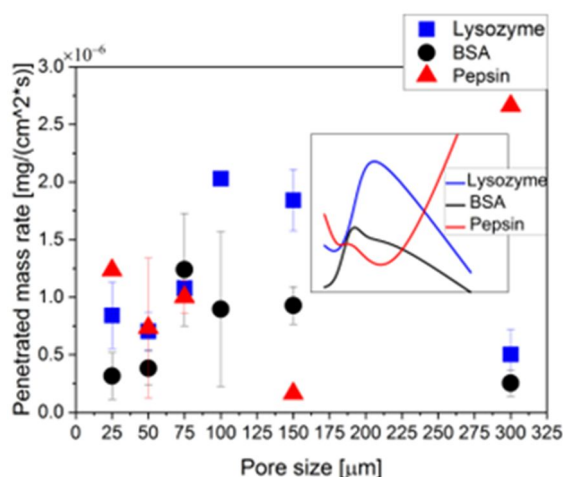


図 3 空孔サイズと膜透過量の関係

(3) タンパク質の結晶成長速度をパラメータとした最適透過膜配置の検討を数値シミュレーションにより行い、種結晶周囲の濃度場が周方向により均一となるような配置を検討した。

数値シミュレーション結果より、対流による濃度斑を温度勾配起因対流により抑制できる可能性が示唆され、結晶成長に影響を及ぼさない範囲での温度勾配を種結晶周囲に形成させ濃度斑の低減を図った。併せて、有孔透過膜の最適配置についても検討し、濃度勾配起因対流も併用可能であることを示唆した。

(4)数値シミュレーション結果により 5 セグメントに種結晶周囲を分割させ、独立した温度制御を行うことで濃度斑の低減が図れることが明らかとなったため、マルチチャンネル温度制御装置の製作を行った。研究室既存のアルゴリズムを有効利用することでシステム開発期間の短縮化を行い、年度内に $<0.1\text{K}$ の制御を有するマルチチャンネルの温度制御システムを製作した。

(5) 種結晶周囲の濃度場均一化については、種結晶の大きさ、つまりは自然対流の強さに関係なく周囲を 5 領域に分割した温度制御板で覆うことで、温度場および濃度場起因自然対流を概ね抑制でき、種結晶周りに一様濃度場の形成が可能であることが明らかとなった。しかしながら、その温度制御は高精度かつ時間変化が要求され、飽和溶液内での温度制御技術の確立が必須となる。

(6) 物質拡散評価実験では、同じ透過面積においても径と細孔配置により透過量が制御可能であること、および透過量の最大値の見積もりが可能であることを明らかにした。これらの知見は、これまでの数値計算と同傾向を示しており、細孔径と配置が物質透過量を制御せし得るパラメータとなる証左となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chen Lin, Zhang Qiaoge, Wu Qixian, Yang Dong, Zeng Gang, Zhang Yizhi, Komiya Atsuki	4. 巻 130
2. 論文標題 Measurement of transient transport process of different molecules across mixed fiber (CA-CN) membrane by pixelated-array masked phase-shifting interferometer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Thermal and Fluid Science	6. 最初と最後の頁 110490 ~ 110490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expthermflusci.2021.110490	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 該当する

1. 著者名 Wu Qixian, Chen Lin, Komiya Atsuki	4. 巻 174
2. 論文標題 Dynamic imaging and analysis of transient mass transfer process using pixelated-array masked phase-shifting interferometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Heat and Mass Transfer	6. 最初と最後の頁 121339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2021.121339	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件/うち国際学会 12件）

1. 発表者名 Atsuki Komiya
2. 発表標題 Visualization and Measurement of Rapid/Tiny Heat and Mass Transport Phenomena
3. 学会等名 Lyon Mini Workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuki Komiya
2. 発表標題 Possibility of Mass Diffusion Control - Effect of Pore Size of Separated Membrane -
3. 学会等名 12th Australasian Heat and Mass Transfer Conferene (12AHMTC) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuqi Xu, Atsuki Komiya, Ben Corry and Juan F. Torres
2. 発表標題 Scaling up thermodiffusive separation through a microchanne
3. 学会等名 The 23rd Australasian Fluid Mechanics Conference (23AFMC) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ruiyao Zhu, Juan F. Torres, Sebastien Livi, Yuki Kanda ¹ and Atsuki Komiya
2. 発表標題 Evaluation of hindered diffusion process affected by the different size of macro-pore membrane
3. 学会等名 19th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuki Komiya, Ruiyao Zhu, Juan Felipe Torres Alvarez, Yuki Kanda, Sebastien Livi
2. 発表標題 Experimental Evaluation of the Relationship between Pore Patterning and Protein Hindered Diffusion
3. 学会等名 The 21st International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuki Komiya
2. 発表標題 Evaluation of the possibility to control mass diffusion process by a membrane with macropore patterning
3. 学会等名 The 26th National and 4th International ISHMT-ASTFE Heat and Mass Transfer Conference (IHMT2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小宮敦樹
2. 発表標題 光学手法を用いた熱物質移動現象の可視化とマイクロ・ナノスケール高精度計測への挑戦
3. 学会等名 応用物理学会プラズマエレクトロニクス分科会 新領域研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuki Komiya
2. 発表標題 Control of Protein Mass transfer Using a Membrane with Patterned Pores
3. 学会等名 The 32nd International Symposium on Transport Phenomena (ISTP32)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ruiyao Zhu, Ryo Watanabe, Yuki Kanda, Juan Felipe Torres Alvarez, Sebastien Livi, Atsuki Komiya
2. 発表標題 Experimental evaluation of membrane pore pattern on the protein diffusion
3. 学会等名 The 32nd International Symposium on Transport Phenomena (ISTP32)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ZHU Ruiyao, TORRES Juan, 守谷修一, 神田雄貴, 小宮敦樹
2. 発表標題 有孔隔膜の細孔径の違いが拡散現象に及ぼす影響に関する実験的評価
3. 学会等名 第60回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ruiyao Zhu, Juan Felipe Torres Alvarez, Shuichi Moriya Yuki Kanda and Atsuki Komiya
2. 発表標題 Experimental evaluation of pore pattern on protein hindered diffusion in macro porous membranes
3. 学会等名 The 33rd International Symposium on Transport Phenomena (ISTP-33) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junxiang Zhang, Shuqi Xu, Juan Felipe Torres Alvarez and Atsuki Komiya
2. 発表標題 Measurement of isothermal diffusion of sodium chloride in blood plasma substitutes using phase-shifting interferometer
3. 学会等名 The 33rd International Symposium on Transport Phenomena (ISTP-33) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsuki Komiya, Valery Botton, Sophie Miralles and Ruiyao Zhu
2. 発表標題 Mass transfer enhancement and control by using ultrasound induced flow
3. 学会等名 20th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ruiyao Zhu, Juan Felipe Torres Alvarez, Sebastien Livi and Atsuki Komiya
2. 発表標題 Active control of protein mass transfer by membranes with various pore patterns
3. 学会等名 20th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2023) (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	神田 雄貴 (Kanda Yuki) (00885874)	東北大学・流体科学研究所・助教 (11301)	

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