

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010 年度～2011 年度
 課題番号：22656174
 研究課題名（和文） サイズ排除と吸着機能を併せもつ2色アイス型ポリマーブラシ搭載多孔性膜の作製
 研究課題名（英文） Preparation of Functional Porous Membranes Containing High-Performance Polymer Brush Capable of Size Exclusion and Adsorption
 研究代表者 斎藤 恭一 (Kyoichi Saito)
 千葉大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：90158915

研究成果の概要（和文）：多孔性中空糸膜の孔表面に取り付けたグラフト鎖に官能基導入反応の順番を工夫して2種類の官能基を導入した。低分子量イオンとタンパク質の吸着容量との間に明確な差が出た。グラフト鎖の長さ方向の上部に水酸基の2つ並んだ親水基，下部にイオン交換基の分布をつけたサイズ排除型グラフト鎖を多孔性膜孔表面に取り付けることに成功した。この作製法を基に，デュアルアフィニティリガンドやアミノ酸を固定した多孔性膜を作製し，タンパク精製や水処理の用途を開拓した。

研究成果の概要（英文）：A novel preparation scheme for size-exclusion polymer chain, capable of adsorbing low-molecular-mass targets while retarding proteins, was suggested. Phosphate ionic species were adsorbed to the resultant porous hollow-fiber membrane, whereas bovine serum albumin was not adsorbed to the membrane. The successive addition of the reactants in the modification of the epoxy group of the graft chain provided a size exclusion structure for the graft chain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2, 100, 000	0	2, 100, 000
2011 年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
年度			
年度			
年度			
総計	3, 100, 000	300, 000	3, 400, 000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：多孔性膜材料，放射線グラフト重合法，接ぎ木高分子鎖，サイズ排除，吸着，タンパク質，金属イオン

1. 研究開始当初の背景

基材の形状や材質を自由に選べるという，放射線グラフト重合法の利点の一つを活用して，私たちは20年程前からポリエチレン製の多孔性中空糸膜を基材にして分離機能を付与してきた。この多孔性中空糸膜は，内

径2mm，膜厚0.5mm，空孔率70%，そして孔径約0.3 μm である。この基材は μm サイズの粒子を濾過できる精密濾過(microfiltration, MF)膜として広く利用されている。

この多孔性中空糸膜に，放射線グラフト重

合法、なかでも前照射法を適用して、内面から外面まで均一にエポキシ基をもつ高分子鎖（ポリグリシジルメタクリレート鎖）を接ぎ木（グラフト）した。その後、エポキシ基をさまざまな官能基、例えば、イオン交換基、キレート形成基、疎水性リガンド、アフィニティリガンドに変換した。グラフト重合と官能基導入の結果、膜厚は1 mm 程度までに膨潤し、細孔が拡がり、グラフト高分子鎖（以後、グラフト鎖）の伸長を適度に抑えると、元の膜よりも液の透過性がよくなることもあった。

官能基を導入したグラフト鎖、例えば、イオン交換グラフト鎖、キレートグラフト鎖、疎水性グラフト鎖、アフィニティグラフト鎖は、さまざまな水溶液中から金属イオンやタンパク質を選択的あるいは特異的に捕集することができる。私たちの研究グループは、これまで超純水中に微量に溶けている金属イオンの捕集への利用を実現し、最近では培養液中に溶けているタンパク質の精製への適用をめざしている。

2. 研究の目的

タンパク質の分離は、静電的、疎水性、あるいはアフィニティ相互作用に基づいて行われる。例えば、イミノ二酢酸基（ $-N(CH_2COOH)_2$ ）にニッケルイオン（ Ni^{2+} ）を固定した官能基（これを固定化金属アフィニティリガンドと呼ぶ）を有するグラフト鎖を多孔性中空糸膜の細孔表面に付与して、その膜の細孔内にポリヒスチジンタグ付のタンパク質（これを His タグ融合タンパク質と

呼ぶ）を含む溶液を透過させることによって、タンパク質を特異的に捕集することができる。

分離の原理の一つとして有用であるのは“サイズ排除（size exclusion）”という仕組みである。分子やイオンをその大きさの差を利用してふるい分ける型式である。血液や尿といった生体液には、タンパク質という高分子イオンとともに低分子量の有機化合物や無機イオンが溶存している。それぞれを分けつつ定量し、私たちは生体内の情報を得ている。

ドーピング検査すなわちスポーツ競技で公正な成績をつけるため選手の血漿中に溶存する禁止薬物を定量する検査がおこなわれている。ドーピングをした選手から採取した血液の中には、タンパク質の一種である凝固因子、血球、禁止薬物、およびタンパク質が溶存している。凝固因子と血球を除去した液体が血漿であり、その血漿には禁止薬物およびタンパク質が溶存している。ここで、禁止薬物を分離するとき、禁止薬物だけを固体材料に吸着させた後、溶出させる。このようにドーピング検査には、血漿中に溶存するタンパク質を排除して禁止薬物を吸着できる材料が必要である。

血漿中に溶存するタンパク質と禁止薬物の例として、それぞれアルブミンとイブプロフェンを挙げる。アルブミンは浸透圧を維持する働きをもち、分子量および分子サイズは、それぞれ 66,000 および $4 \text{ nm} \times 4 \text{ nm} \times 12 \text{ nm}$ である。その濃度 35 g/L は、血漿中に溶存するタンパク質の中で最高値である。

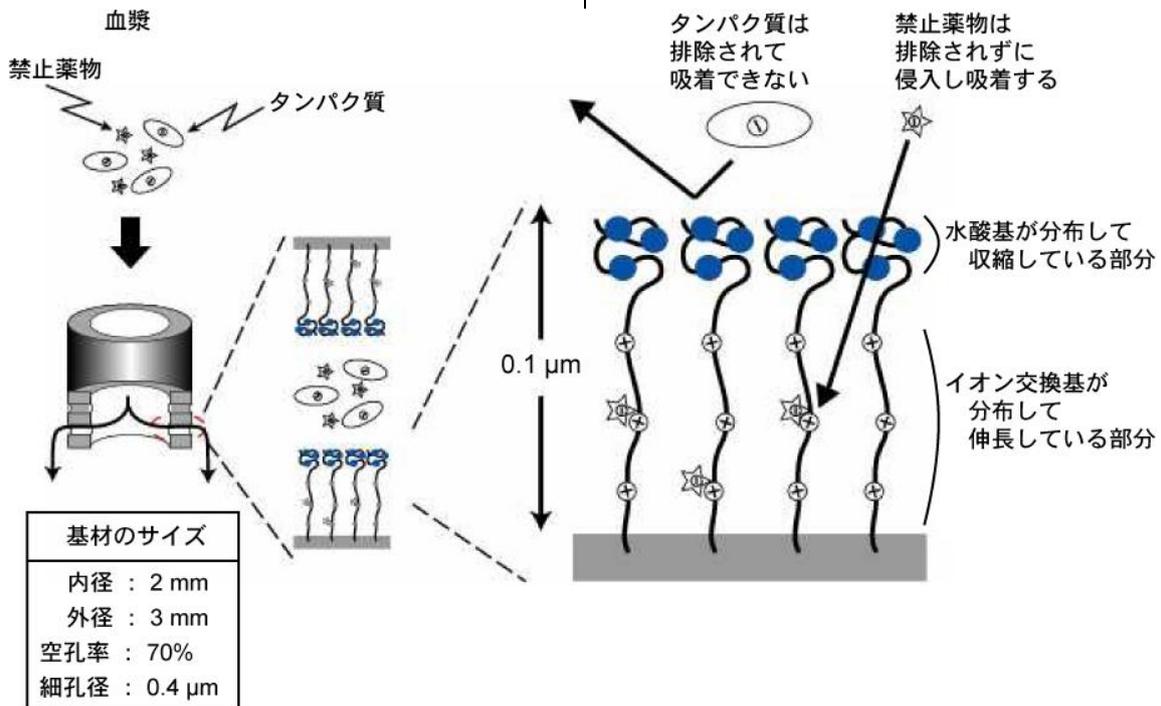


図1 サイズ排除型グラフト鎖モデル

一方、イブプロフェンは抗解熱作用をもち、分子量は206であり、イブプロフェンはアルブミンよりも分子サイズが1桁小さい。

ドーピング検査向けには、血漿中に溶存するサイズの大きなタンパク質を排除して、サイズの小さな禁止薬物を捕集できる材料がこれまで開発されてきた。代表的な従来材料には、サイズ排除型多孔性ビーズがある。このビーズの粒径は20 μm であり、表層部には水酸基が導入されていて高分子構造として膨潤しないため、サイズの大きなタンパク質を排除し、サイズの小さな禁止薬物（マイナス電荷をもつイオンとして溶けている）を通過させる。さらに、ビーズ内部にはイオン交換基が導入されているため、表層部を通過してきた禁止薬物を吸着できる。しかしながら、このビーズには、拡散距離が長いので、禁止薬物を迅速に捕集できないという欠点がある。そこで、私たちは迅速な捕集を達成できる新規材料として、“サイズ排除型グラフト鎖” 搭載多孔性膜を開発することにした。これまでに報告例のない新規の材料である。

3. 研究の方法

サイズ排除型グラフト鎖のモデルを図1に示す。このグラフト鎖はその上部に水酸基をもち、荷電をもたないので膨潤していない。そのため、サイズの大きなタンパク質を排除し、サイズの小さな禁止薬物を通過させる。さらに、下部にイオン交換基をもっているため、禁止薬物はイオン交換基に吸着する。グラフト鎖の長さは0.1 μm 程度であり、先ほどのビーズの半径10 μm の1/100に当たる。拡散時間は拡散距離の2乗に比例するので、

1/100の2乗なので1/10000となる。したがって、新規材料は禁止薬物の迅速捕集に向いている。

既往の研究ではグラフト鎖の長さ方向に官能基の分布をつけることを意識していなかったのに対して、本研究の材料開発では長さ方向に2つの官能基の分布をつけることを意識したグラフト鎖の作製をめざした。グラフト鎖の上下2段に官能基の分布をつける作製経路を図2に示す。水酸基とイオン交換基を導入する順番に気を配るところがポイントである。

ポリエチレン製の中空糸状多孔性膜に電子線を照射し、エポキシ基をもつモノマーであるグリシジルメタクリレート (GMA) を接ぎ木重合し、グラフト鎖を膜に付与した。ここで、グラフト鎖の重量を基材膜の重量で割って100を掛けた値をグラフト率と定義し、ここでは材料の強度を考慮して170%に設定した。言い換えると、GMAグラフト重合膜(以後、GMA膜)の重量を元の膜の重量の2.7倍にしたことになる。

目標の材料の1段めとして、グラフト鎖中のエポキシ基の一部に水を反応させて水酸基が二つ並んだ官能基 (diol 基) を導入し、2段めとして残りのエポキシ基にトリメチルアミンを反応させてトリメチルアンモニウム基 (TMA 基) を導入した。導入の順番に従って、得られた膜をDiol-TMA膜と呼ぶ。導入したTMA基のモル数を反応前のエポキシ基のモル数で割って100を掛けた値をエポキシ基からTMA基へのモル転化率と定義し、ここでは0から85%の範囲にした。比較の材料として目標の材料とは順番を入れ替えて、1

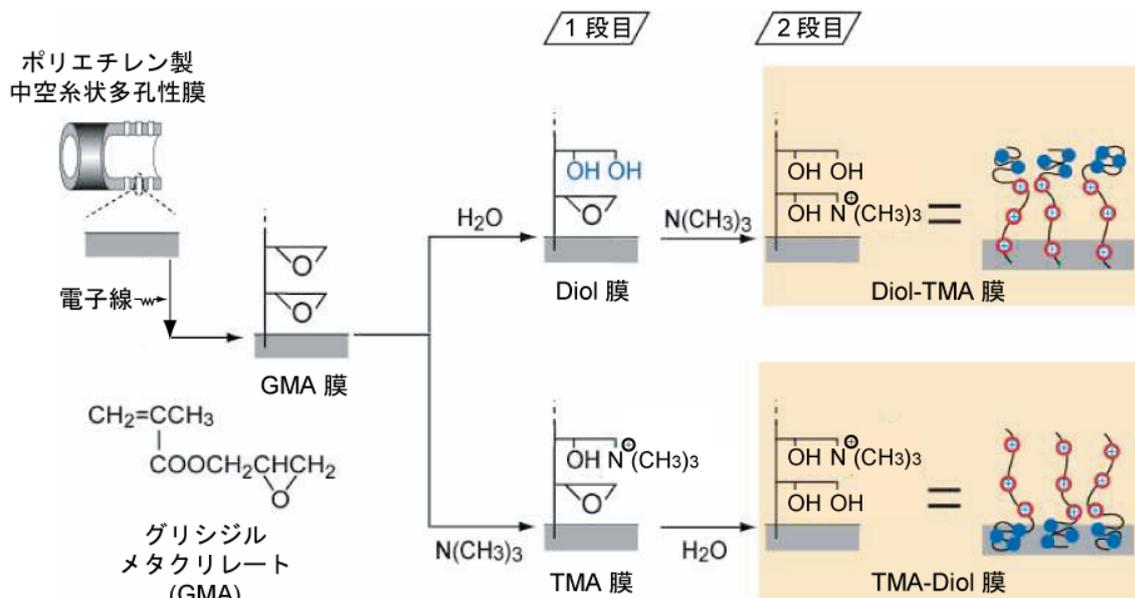


図2 グラフト鎖の上下2段に官能基の分布をつける作製経路

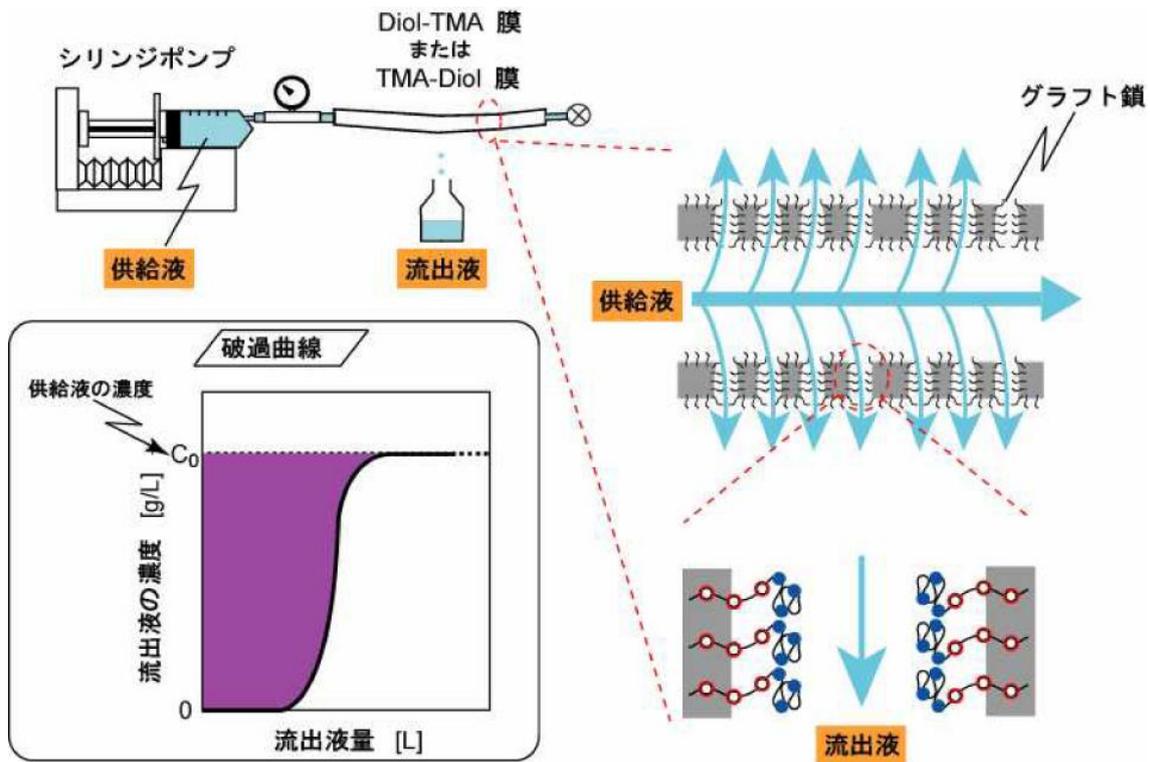


図 3 中空糸状多孔性膜へのモデル物質の吸着容量を測定するための実験装置

段めに TMA 基を，2 段めに diol 基を導入した。こちらの膜を TMA-Diol 膜と呼ぶ。

比較の材料とともに目標の材料が出来上がったので，いよいよ，グラフト鎖のサイズ排除能を実証する。ここで，低分子量のモデル物質としてリン酸イオン（分子量 100），高分子量のモデル物質としてアルブミン（分子量 66,000 のタンパク質）を用いた。膜へ供給する液中ではこれらの物質はいずれもマイナスに帯電している。

膜への物質の吸着容量を測定する実験装置を図 3 に示す。シリンジポンプに Diol-TMA 膜または TMA-Diol 膜をつなぎ，リン酸イオンまたはアルブミンを含む緩衝液を一定流量で透過させた。膜の内面から外面に向かって，孔を液が流れる。膜外面からの流出液を連続的に採取して流出液中のリン酸イオンおよびアルブミンの濃度を追跡した。流出液中のこれらモデル物質の濃度と流出液量との関係を破過曲線と呼ぶ。図中で色を塗った面積に相当する吸着量を GMA 膜の重量で割った値が平衡吸着容量である。

4. 研究成果

まず，“捕集すべき”リン酸イオンの平衡吸着容量を比較する。横軸にエポキシ基から TMA 基へのモル転化率を，縦軸にリン酸イオン平衡吸着容量をとり，図 4 (a) に示す。目標の材料である○プロットで示す Diol-TMA 膜へのリン酸イオン平衡吸着容量は，モル転

化率に比例した。同様に，比較の材料である△プロットで示す TMA-Diol 膜へのリン酸イオン平衡吸着容量もモル転化率に比例し，Diol-TMA 膜と結果が一致した。これは，グラフト鎖の上部または下部のどちらに TMA 基が分布していても，リン酸イオンはサイズが小さいためグラフト鎖内を通過して TMA 基に吸着できるからである。

つぎに，“排除すべき”アルブミンの平衡吸着容量を比較する。図 4 (b) では，横軸にモル転化率を，左の縦軸にアルブミン平衡吸着容量を，右の縦軸にアルブミン積層数をとった。ここで，積層数とは，アルブミンの平衡吸着容量を理論単層吸着容量で割った値として定義した。○プロットで示す目標の材料である Diol-TMA 膜へは，モル転化率が 60% まではアルブミンは単層にさえ吸着しなかった。一方，△プロットで示す比較の材料へは，モル転化率の増加に伴い積層数 15 まで上昇した。これは，目標の材料である Diol-TMA 膜はグラフト鎖の上部に分布している diol 基がグラフト鎖を膨潤させないためアルブミンを排除するからである。一方，比較の材料である TMA-Diol 膜は上部に TMA 基が分布しているため，タンパク質が吸着してグラフト鎖内を拡散移動しながら多層集積構造を形成するからである。

多孔性中空糸膜の孔表面に取り付けたグラフト鎖の長さ方向の上部に diol 基，下部にアニオン交換基の分布をつけたサイズ排

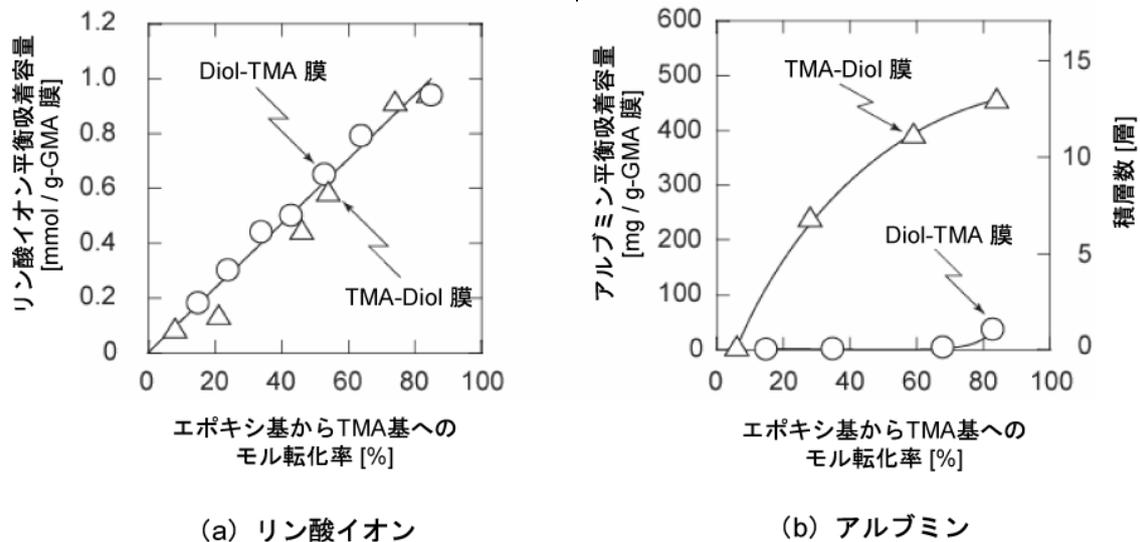


図 4 グラフト鎖搭載中空糸状多孔性膜へのモデル物質の平衡吸着容量

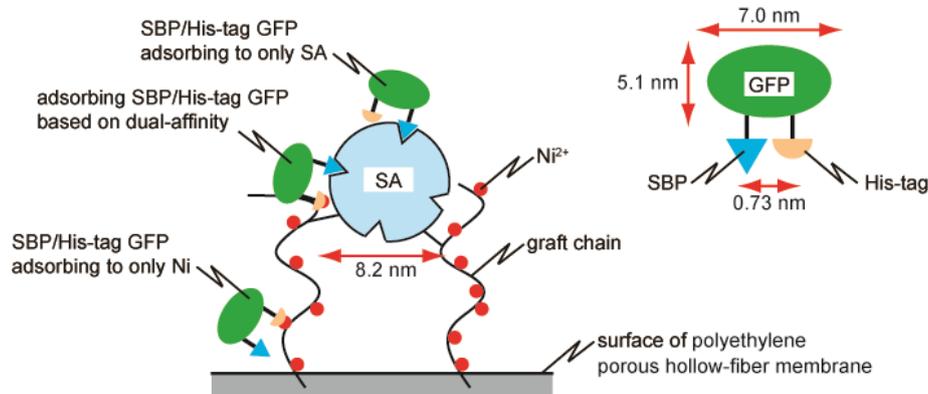


図 5 デュアルリガンド固定グラフト鎖へのデュアルタグタンパクの吸着

除型グラフト鎖を多孔性膜孔表面に取り付けることに成功した。

本研究の研究成果を基にして、デュアルアフィニティリガンドやアミノ酸を固定した多孔性膜を作製し、タンパク精製や水処理の用途を開拓している。デュアルアフィニティリガンドを固定した多孔性膜の孔表面の様子を図 5 に示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 田村慧, 松野伸哉, 片山栄作, 梅野太輔, 斎藤恭一, “デュアルリガンド固定多孔性中空糸膜を用いたタンパク質のデュアルアフィニティ吸着の提案”, 膜 (Membrane), 37 (2012) 95-101. 査読あり
- ② 門馬友紀, 梅野太輔, 斎藤恭一, 須郷高

信, “ガリウムイオン固定多孔性中空糸膜へのリン酸化チロシンの吸着”, 膜 (Membrane), 35 (2010) 242-247. 査読あり

- ③ 松野伸哉, 岩撫暁生, 梅野太輔, 斎藤恭一, 伊藤 一, 坂本雅司, “細孔表面に固定したカルボキシベタイン基による多孔性膜へのタンパク質の吸着の抑制”, 膜 (Membrane), 35 (2010) 86-92. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① 田村慧, 梅野太輔, 斎藤恭一, 徳島幹治, 森 茂之, “膜分離活性汚泥法のための放射線グラフト重合法を用いた親水性多孔性膜の開発”, 日本膜学会第 34 年会, 2012 年 5 月 8 日, 早稲田大学, 東京。
- ② 内山翔一郎, 石原量, 池沢秀和, 梅野太輔, 斎藤恭一, 山田伸介, 廣田英幸, “放射線グラフト重合での線量によるグラフト高分子鎖の多孔性シート内形成部位の制御”, 日本膜学会第 34 年会, 2012 年 5

- 月 8 日, 早稲田大学, 東京。
- ③ 田村慧, 梅野太輔, 斎藤恭一, “電子線グラフト重合法による多孔性膜へのアミノ酸の固定”, 第 27 回日本イオン交換研究発表会, 2011 年 11 月 25 日, フェニックスシーガイアリゾート, 宮崎。
 - ④ 石原量, 内山翔一郎, 梅野太輔, 斎藤恭二, 山田伸介, 廣田英幸, “放射線グラフト重合における溶媒がグラフト高分子鎖の形成部位に及ぼす効果”, 第 27 回日本イオン交換研究発表会, 2011 年 11 月 25 日, フェニックスシーガイアリゾート, 宮崎。
 - ⑤ 内山翔一郎, 石原量, 梅野太輔, 斎藤恭二, 山田伸介, 廣田英幸, “多孔性高分子に付与したポリマーブラシおよびルーツの形成比率の算出”, 第 27 回日本イオン交換研究発表会, 2011 年 11 月 25 日, フェニックスシーガイアリゾート, 宮崎。
 - ⑥ 田村慧, 松野伸哉, 片山栄作, 梅野太輔, 斎藤恭一, “デュアルリガンド固定多孔性中空糸膜を用いたタンパク質のアフィニティ吸着”, 第 48 回高分子と水に関する討論会, 2010 年 12 月 6 日, 東京工業大学, 東京。

[図書] (計 1 件)

「わかりやすい透析工学 (編集: 酒井清孝, 峰島三千男)」, pp. 162-169, 機能性高分子材料, 斎藤恭一 (分担執筆), 南江堂 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 恭一 (Kyoichi Saito)
千葉大学大学院工学研究科
教授
研究者番号: 90158915

(2) 研究分担者

梅野 太輔 (Daisuke Umeno)
千葉大学大学院工学研究科
准教授
研究者番号: 00400812