

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820340

研究課題名(和文) 生体膜構造を模倣した超高透水性逆浸透膜の開発

研究課題名(英文) Development of biomimetic reverse osmosis membranes with ultra-high permeability

研究代表者

佐伯 大輔 (SAEKI, Daisuke)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70633832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体膜の構成成分である脂質二分子膜と水分子のみを選択的に透過する水チャネルを分離素子として用いた超高透水性逆浸透膜の開発を行った。アルキル鎖を導入した多孔質支持体をリポソーム懸濁液に接触させることで、水チャネルが導入された脂質二分子膜(supported lipid bilayer; SLB)を形成することができた。水チャネルとして、Gramicidin AやAmphotericin Bなどの生体分子を導入できることを確認した。水チャネルを導入したSLBについて、透水性、塩阻止率を評価したところ、水分子のみを透過する分離膜を作製でき、市販膜を凌駕する高い性能を達成した。

研究成果の概要(英文)：Biomimetic reverse osmosis membranes with ultra-high permeability have been developed using a lipid bilayer and biological water channel molecules. A supported lipid bilayer (SLB) containing gramicidin A or amphotericin B as water channels was formed on a porous substrate modified with alkyl chains. The formed SLBs showed fluidity like as biological cell membranes and had no defect. The water permeation test of the formed SLBs showed higher water permeability and salt rejection than commercial membranes.

研究分野：工学

キーワード：膜分離 逆浸透膜 生体模倣 リポソーム 脂質二分子膜 水チャネル アクアポリン

### 1. 研究開始当初の背景

逆浸透(RO)膜は海水淡水化や廃水処理に広く用いられており、その需要は高まる一方である。現状のRO膜としては、ポリアミドと支持体からなる複合膜が、酢酸セルロース系の非対称膜が実用化されているが、その性能向上は既に頭打ちとなっており、近年では大幅な性能向上はみられていない。これは、これらの高分子系RO膜が、主に相分離や界面重合により作製されており、精密な構造制御やこれ以上の薄膜化が困難なためと考えられる。

一方、脂質二分子膜からなる生体膜では、タンパク質やペプチドを用いて効率的かつ選択的な物質輸送が行われている。中でも膜タンパク質の一種であるAquaporinは、水分子とほぼ同じ大きさである0.3 nmの細孔と、水分子に対する特異的結合部位を有しており、水チャンネルとして水分子のみを選択的に細胞内外へと輸送することができる(K. Murata, et al., *Nature*, 2000)。このような生体由来の水チャンネルの持つ高効率な水分子透過能に着目し、近年、Aquaporinを用いた水処理膜の作製が試みられている(Y. Kaufman, et al., *Langmuir*, 2010)。Aquaporinを用いたRO膜の透水性能は、理論的には従来の高分子系RO膜と比べて少なくとも2-3桁高く、従来のRO膜の性能限界を超えた、革新的RO膜を作製できる可能性がある。既に複数の研究が報告されているが、高透水性、高塩阻止率、強度を両立した分離膜の作製には至っていない。

以上の背景から、本研究では、生体膜構造の模倣による、高透水性を有するRO膜の作製について検討した。多孔性基材上に脂質二分子膜を展開し、Aquaporinより構造が単純で機能発現が容易なGramicidin A (GA) や Amphotericin B (AmB) を水チャンネルとして導入することで、水分子のみを透過する分離膜の作製を試みた(図1)。

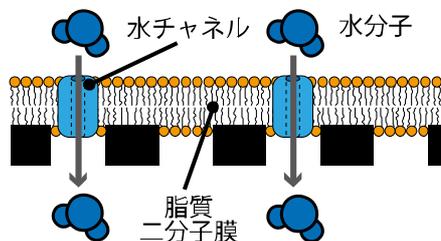


図1. 本研究で開発する生体模倣型RO膜

### 2. 研究の目的

本研究では、生体膜構造の模倣により、従来の高分子系RO膜を超越した透水性を有する、超高透水性RO膜の開発を目的とした。

支持体上への脂質二分子膜の固定化方法の確立、脂質二分子膜への水チャンネルの導

入、水処理膜としての性能評価、物理的強度の向上の四項目について検討を行った。

### 3. 研究の方法

多孔性基材上への脂質二分子膜の固定化方法の確立

多孔性基材上への脂質二分子膜の展開には、支持体表面とリポソームの間に静電相互作用や親疎水性相互作用を働かせることで固定化脂質二分子膜 (Supported lipid bilayer, SLB) を形成させる、リポソーム融合法を用いた。支持体には陽極酸化アルミナ膜を用いた。リポソームはエクストルージョン法により調製した。まず、支持体表面にシランカップリング剤を用いてアルキル鎖を導入した。アルキル化した支持体をリポソーム懸濁液に浸漬し、静置することで、支持体表面にSLBを形成させた。二分子膜の形成は、共焦点レーザー顕微鏡、及び光褪色後蛍光回復 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 法を用いて、脂質分子の支持体表面における流動性を測定することで評価した。FRAP法とは、脂質を蛍光標識し、顕微鏡下で局所的にレーザー光を照射することで蛍光を褪色させた後、褪色部位における蛍光強度の回復挙動を評価する方法であり、褪色部位において蛍光が回復した場合は、脂質分子が側方拡散できる状態、すなわち平面的な二分子膜構造を形成していることを示す。一方で、蛍光が回復しない場合は、脂質分子は側方拡散できない状態、すなわちリポソームの状態では吸着している。

#### 脂質二分子膜への水チャンネルの導入

脂質二分子膜からなるリポソームに対し、ペプチドの一種であるGA、もしくはポリエーテル系物質であるAmBを水チャンネルとして導入し、脂質二分子膜への透水性の付与を試みた。GA、及びAmBの導入は、円偏光二色性(CD)スペクトル、及びFRAP法により評価した。

#### 水処理膜としての性能評価

の方法で形成させたSLBに対し、GA、もしくはAmBを導入し、水処理膜としての性能を評価した。デッドエンド式透水試験装置を用いて透水性、NaCl阻止率を測定した。

#### 物理的強度の向上

生体膜模倣型RO膜において、物理的強度を向上させるため、支持体構造の観点から強度向上を検討した。

#### 4. 研究成果

##### SLB の形成手法の確立

まず初めに、支持体に導入するアルキル鎖が SLB 形成に及ぼす影響を評価した。支持体にアルキル鎖を導入しない場合は、支持体上の脂質分子は側方拡散性を示さなかったことから、脂質分子はリポソームが吸着した状態にあると考えられる。一方で、リポソームの構成脂質である 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) のアルキル鎖と同様の鎖長のアルキル鎖を支持体に導入した場合、支持体上の脂質分子は高い側方拡散性を示し、その側方拡散係数は  $9.8 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  と、リポソームにおける値と同様の値を示したことから、支持体上で二分子膜を形成していると考えられる。次に、リポソーム中の脂質分子の構造が SLB 形成に及ぼす影響を評価した (図 2)。POPC 以外の脂質を用いた場合も、脂質の流動性に応じた蛍光回復挙動が見られ、二分子膜を形成できることが分かった。

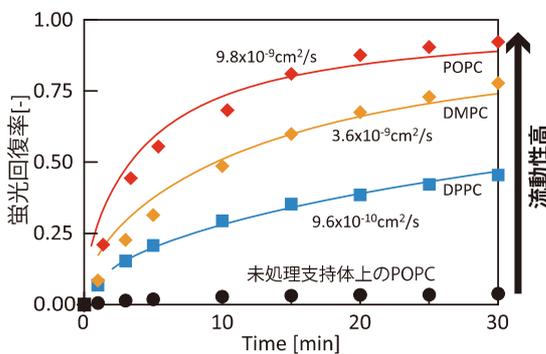


図 2. アルキル化した支持体上に形成した SLB 中の脂質分子の FRAP 法による流動性の評価

##### 脂質二分子膜への水チャンネルの導入

GA は脂質二分子膜において、特定の条件で二量体、すなわちチャンネル構造を形成し、イオノフォアとして機能する。チャンネル構造の形成は CD スペクトルにより評価することができる。GA を添加して調製したリポソームについて、CD スペクトルを測定した結果を図 3 に示す。218 nm の正のピークは GA が二分子膜に導入されたことを示し、230 nm の負のピークはチャンネル構造が形成されていないことを示す。GA の導入量を 5 mol% に固定し、リポソームの調製条件を制御することで、チャンネル構造が形成されることがわかった。また、GA の導入量を 10 mol% まで増加させると、チャンネル構造の割合が減少し、GA の導入量には最適値が存在することが示唆された。

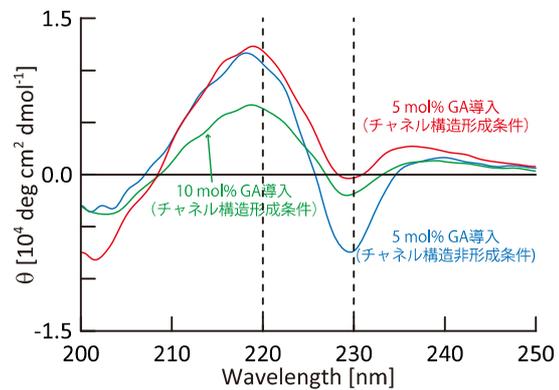


図 3. CD スペクトルによる脂質二分子膜中における GA の構造評価

次に、で確立した手法を用いて、水チャンネルを導入した SLB の形成について検討した。GA を導入した SLB について、FRAP にて評価したところ、GA 導入後も蛍光回復挙動が見られ、二分子膜が形成されていることが確認できた。GA の導入量の増加と共に、蛍光の回復速度は低下し、脂質分子の流動性の低下が示唆された。脂質分子と GA の相互作用によるものと考えられる。

以上の結果より、脂質二分子膜への GA の導入、チャンネル形成、SLB 形成を確認することができた。

##### 水処理膜としての性能評価

上記のように形成した GA 導入 SLB について、透水性、塩阻止性を評価した結果を図 4 に示す。すべての GA 導入条件において、98% 以上の非常に高い塩阻止率を示したことから、欠陥の無い SLB が形成できていると考えられる。透水性に関しては、GA を導入しない場合、もしくは GA 導入量が低い場合は、水分子はほとんど透過しなかったが、5 mol% 導入した場合に、市販膜より二桁高い値を示した。それ以上導入した場合は、透水性は徐々に低下した。CD スペクトルの結果からも、高濃度ではチャンネル構造の割合が減少する結果が得られており、透水性に関しても、GA 導入量の最適値があることが分かった。

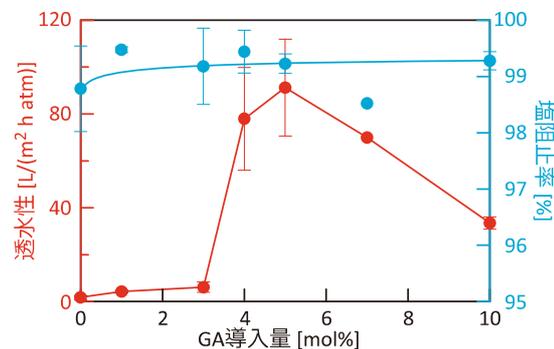


図 4. GA を導入した SLB の透水性と塩阻止率

GA 以外のチャンネル物質として、AmB についても同様の検討を行った。AmB を用いた場合も、適切な条件で脂質二分子膜に導入することで、水チャンネルとして機能することが分かった(図5、学会発表 )

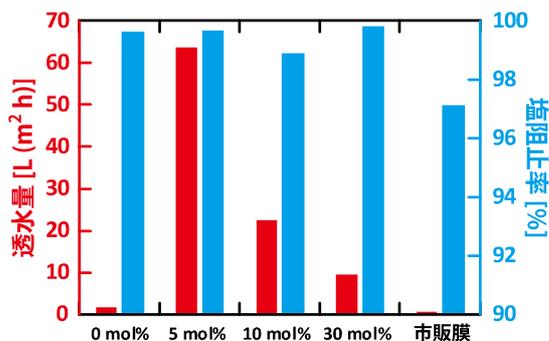


図 5. AmB を導入した SLB の透水量と塩阻止率

以上の結果より、GA や AmB といった生体由来の水チャンネルを導入した SLB を形成することができ、それらの分子が水分子のみを透過する分離膜の孔として機能し、非常に高い透水性を実現しうることが示された。

#### 物理的強度の向上

上記のように作製した SLB は非常に高い透水性を示すものの、柔軟性が低く膜厚の薄い陽極酸化アルミナ膜を支持体として用いるために、分離膜として用いるには物理的強度に問題がある。そこで、強度向上を目指し、様々な支持体への SLB の形成について検討した。多孔性のセルロース膜を支持体に用い、SLB の形成を試みたところ、リポソームの粒径、及びアルキル化処理の方法を最適化することで、FRAP により流動性を示す結果が得られ、SLB を形成できることが分かった(図6、学会発表 )。前述の透水試験装置により塩阻止性を評価したところ、塩はほとんど透過せず、欠陥のない脂質二分子膜が形成されていることが確認できた。また、ナノ濾過膜を支持体とすることで、RO 膜として用いるために十分な耐圧性を有する SLB を形成できることも分かった(論文 )。

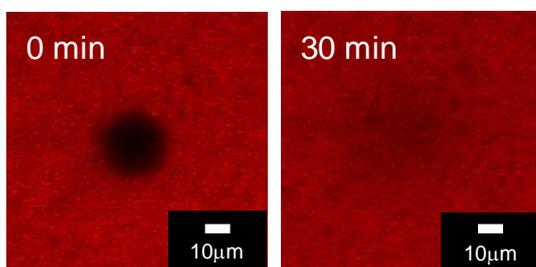


図 6. 再生セルロース膜を支持体とした SLB の FRAP 法による評価

本研究の成果により、生体膜の構成成分である脂質二分子膜と水分子を透過する生体

由来の水チャンネルを分離素子として用いることで、既存の分離膜より高い透過性を有する、水分子のみを透過する分離膜を作製できることが分かった。生体模倣的アプローチが分離膜の作製に有効であることを示す、重要な知見が得られた。作製した分離膜は、透水性や塩阻止性に関しては RO 膜として十分な性能を達成した。今後の展望として、耐圧性や安定性など、RO 膜としての実用化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)

D. Saeki, T. Yamashita, A. Fujii, H. Matsuyama, Reverse osmosis membranes based on a supported lipid bilayer with gramicidin A water channels, *Desalination*, 375, 2015, pp.48-53, 査読有  
DOI: 10.1016/j.desal.2015.07.030

[学会発表](計 12 件)

高井徹、佐伯大輔、松山秀人、水処理膜への応用を指向した supported lipid bilayer への Amphotericin B の導入に関する検討、第 18 回化学工学会学生発表会(福岡大会) 2016 年 3 月 5 日、福岡県

D. Saeki, F. Sako, H. Matsuyama, Development of forward osmosis membranes using lipid bilayer and gramicidin A on porous alumina via hydrophobic interaction, The 9<sup>th</sup> Conference of Aseanian Membrane Society, 2015 年 7 月 21 日, TAIWAN

W. Miyashita, D. Saeki, H. Matsuyama, Immobilization of phospholipid bilayers onto an organic porous substrate by hydrophobic interaction, The 9<sup>th</sup> Conference of Aseanian Membrane Society, 2015 年 7 月 20 日, TAIWAN

宮下若菜、佐伯大輔、松山秀人、疎水化セルロース膜上へのリン脂質二分子膜の形成、日本膜学会第 37 年会、2015 年 5 月 14 日、東京

佐伯大輔、迫郁弥、松山秀人、ポーラスアルミナ膜上へ展開したリン脂質二分子膜の特性評価、化学工学会第 80 年会、2015 年 3 月 20 日、東京

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐伯 大輔 (SAEKI, Daisuke)

神戸大学・大学院工学研究科・特命助教

研究者番号：70633832