分子間相互作用を利用したフィルター型分離リアクターの開発

藤　井　義　久[*1]　　松　島　綾　美[*2]　　三　浦　佳　子[*3]

Development of Filter-type Separation Reactors Using Biomolecular Interactions

Yoshihisa FUJII[*1], Ayami MATSUSHIMA[*2] and Yoshiko MIURA[*3]

Separation of biomacromolecules with continuous flow system is important in biotechnology. The ligand-receptor interaction are utilized for the separation of the important proteins suchas hormones. In this report, we developed a new membrane to utilize a filter-type separation reactor and analyzed the absorption ratio of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labed bovine serum albumin (BSA) against this membrane. Our ultimate goal is to develop a new filter-type separation reactors to handle the biological materials such as whole serum to remove undesired small molecules.

1．研究背景と狙い

精密な分子間相互作用を追求する松島、高分子材料化する三浦、フィルターデバイスを検討する藤井という三者の異なるバックグラウンドを利用して、分子同士の相互作用を用いた新しいデバイス開発を行う。本申請課題の共同研究は、「4日間もかかるデキストラン皮膜活性炭を用いた血清の生体ホルモン除去処理を効率的かつ簡便・安価に実施したい」という学術的ニーズに基づく。これまでに、疎水性相互作用を巧みに利用することで、油―水分離を行うことができ、石油精製や水精製に重要なデバイスを創製することに成功している。一方で、分子をもっと巧みに扱うことで、例えば抗体精製やタンパク質精製のような、高度文明化社会に必要となる用途を満たすデバイスの開発も可能になる。複雑な実学に近い医学・生物系において見過ごされがちな材料の作用機構について、工学・化学系の立場からメカニズムの解明に取り組む。一方、工学系において敬遠されがちな複雑な生体の振る舞いについて生物の視点から解きほぐしモデル化することで材料開発へと繋げる。こうして本共同申請では、異分野の協働による新領域の開拓を狙い研究を行った。

2．実験と結果

（1）タンパク質分離膜及びリアクターの調製、分離デバイスの開発　（藤井）

実験：15 ～ 25 wt%のポリスルホン(PSF)のN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)溶液をステンレス基板上にバーコーターを用いて製膜し、水に1時間浸漬させ、液液相分離現象を利用して分離膜を作製した。さらに、ポリスルホンのDMF溶液にシリカ微粒子を十数%添加し、液液相分離形態を変化させ、高い分離性能を維持し、高透水性の分離膜を作製に着手した。分離性能は、種々のサイズの金コロイド溶液の濾過実験から評価し、透水性は単位時間あたりの純水の透過量と有効濾過面積から算出した。さらに、タンパク質分離リアクターの創出には、膜表面へのタンパク質吸着抑制が必要不可欠である。そこで、作製した分離膜に蛍光色素でマーカーされたアルブミン-フルオレセインイソチオシアン酸コンジュゲート(FITC-BSA)を濾過し、流水洗浄後の膜表面に吸着したFITC-BSA量を蛍光顕微鏡測定に基づき観察した。

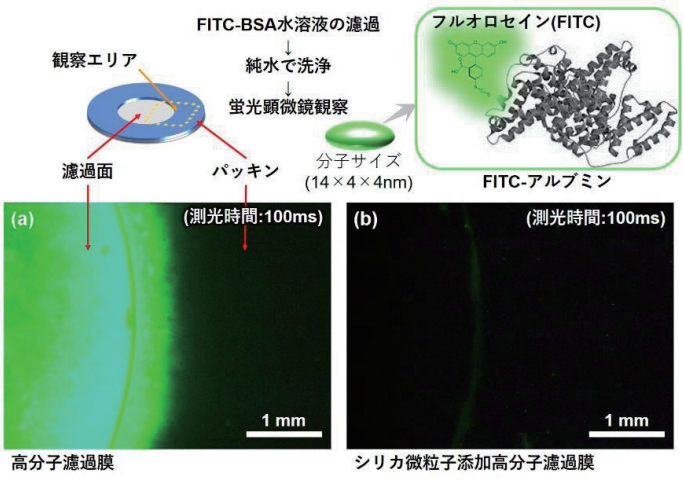

図1．タンパク質分離膜の開発

2019年4月4日 受理
*[1]三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻
*[2]九州大学大学院理学研究院化学部門
*[3]九州大学大学院工学研究院化学工学部門

結果：膜の分離性能は、全て15nmの金コロイドの阻止率が99%以上であり極めて高い分離能を示した。シリカを添加しないPSF分離膜の水の流束は約100 $L \cdot m^{-2}h^{-1}$であったのに対して、同じ作成条件でシリカ微粒子を20%程度添加したPSF分離膜の流束は約220 $L \cdot m^{-2}h^{-1}$で、シリカ微粒子を添加することで透水性が2倍以上向上した。さらに、蛍光顕微鏡観察から、PSFのみからなる分離膜表面には流水洗浄後もFITC-BSAの吸着による蛍光が観られた。一方、シリカ微粒子を添加したPSF分離膜表面には、流水洗浄後にFITC-BSAの吸着は殆ど観測されず、接液部とパッキンで覆われていた非接液部の区別がつかないほどであった。タンパク質分離リアクターにおいてタンパク質を回収するために必要な、非吸着性表面を有した分離膜を作製することが出来た。タンパク質の吸着性の違いの発現メカニズムについて、今後検討を重ね、明らかにしていく予定である。

（２）リガンドを結合させたタンパク質分離リアクターデバイスの開発　（三浦）

実験：生理活性リガンドとしてマンノースを用い、ポリアクリルアミドをベースとした、多孔材料を合成した。（１）と同様に、相分離を利用して多孔性のアクリルアミドにリガンドを結合させた高分子を合成した。相分離の溶媒としては、ジメチルスルホキシドとアルコール（エタノール、ブタノール、オクタノール）の混合溶液（体積比：7/3）を用いた。高分子の形状を電子顕微鏡、多孔形状を水銀圧入試験によって測定した。タンパク質として、マンノースのリガンドに結合するコンカナバリンA（ConA）、分子認識能のないコントロールサンプルとしてBSAを用いた

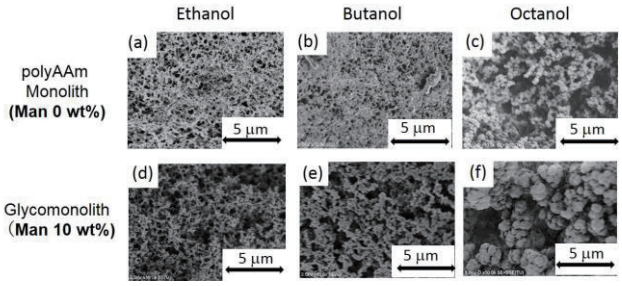

図２．多孔性高分子の走査型電子顕微鏡像。
リガンドを含まない材料（上段）、マンノースリガンドを含む材料（下段）

結果：モノマーはラジカル重合し、多孔体を得た。多孔体は、アルコールの種類によって異なり、長鎖アルコールほど孔径は大きく表面積は小さく、短鎖アルコールでは孔径は小さく表面積は大きくなった（孔径：オクタノール＞ブタノール＞エタノール、表面積：エタノール＞ブタノール＞オクタノール）。多孔体は全て通液可能であった。タンパク質の通液吸着を行ったところ、ConAは多孔体に吸着されて溶液から除去されるのに対して、BSAは溶液を導入すると直ぐに溶出されることがわかった。吸着された溶液は、酸性のバッファーを通液させることでタンパク質を剥離して回収することができた。

（３）血清の生体ホルモン除去処理と分離デバイスの検討　（松島）

女性ホルモン受容体に関わる研究においては、低分子のホルモン作用を調べる実験には活性炭を用いて前処理し、低分子化合物を取り除いた血清を培地に加え、細胞培養に用いる。活性炭処理をしない場合と比較すると、下記のように活性炭処理をした培地を用いたほうが、ホルモン活性がより明敏になることが明らかとなった（図３）。この処理には時間がかかる。そこでこの作業を簡単にするデバイス開発を目指す。血清のモデルとして、BSAを選択した。このようなタンパク質は通過、すなわち吸着しないことがわかった。
（１）（２）の研究と共同して、今後実際の低分子ホルモンの分離について検討を行う。

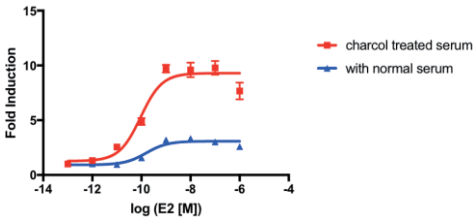

図３．活性炭による生体ホルモンの吸着分離の検討

３．展望

タンパク質分離について、最終的な生体ホルモンの分離向けた分離デバイスの開発を行った。フィルターデバイス、リアクターについてモデル系の構築に成功している。今後、実際のホルモン分離に向けた実践的な検討を行う。本検討では異なる３つの所属の研究者が共同することで、それぞれに新しい知見が生まれ、新しい化学材料の開発を進めることができた。材料化学、生物化学双方の要請と利点を活かした材料―デバイス開発を進める予定である。

文献

Matsushima, A. *International Journal of Molecular Sciences*, **19(5)** (2018). http://doi.org/10.3390/ijms19051377.
Seto, H. et al. *J. Mater Chem B*, **5**, 1148-1154 (2018).