

分子輸送および高分子分離のためのモザイクナノフィルター作製

平成22年12月10日

独立行政法人物質・材料研究機構

概要

1. 独立行政法人物質・材料研究機構（理事長：潮田 資勝）環境・エネルギー材料萌芽ラボ（ラボ長：原田幸明）のシェリフ・エルサフティ（Sherif El-Safty）らは、緻密なモザイクケージ・シリカナノチューブを陽極アルミナ膜（AAM）¹の細孔（チャンネル）内部に作製することに成功した。この材料は、高濃度の高分子をわずか数秒のうちにサイズ分けすることができるナノフィルターとして応用できるものである。
2. 今日、生物製剤や薬剤の分野において、タンパク質を均質なグループや均一なサイズに分離することは極めて重要である。そのニーズに応えるために、製造の容易さや迅速性、量産性及び低コスト性をもつ分離技術が求められている。また、このような細孔膜（メンブレン）フィルターにおいては、ナノチャンネル膜内に充填されるナノチューブ間にできる空隙は、フィルターのサイズ分離機能を低下させるだけでなく、ナノチューブの耐久性も制限してしまうため、空隙のない強固なフィルター膜の設計が課題であった。
3. 今回のモザイクナノフィルター膜では、その特性が、シリカナノチューブ内にある緻密に作られた3Dメソケージ構造²に基づいてコントロールされる。今回の設計では、陽極アルミナ膜の細孔チャンネルに多機能表面被覆³を施すことにより、陽極アルミナ膜内に生成したナノチューブの間に空隙がない極めて強固な「真のナノフィルター」膜が作製できた。この方法は、ナノフィルター応用に有用な、三次元的な連結メソケージ構造をもち、両端が開口し、膜面に垂直に配列した、安定な細孔組織を膜内に得るのに理想的なものである。
4. 今回の開発における重要なポイントは、このナノフィルターシステムが、タンパク質を含む様々なサイズの高分子を、広い濃度範囲において、濾過プロセスにおけるタンパク質の阻害効果にもかかわらず、タンパク質の種類によっては通常12時間以上かかる場所をわずか数秒という速さで効率的に分離できるという点である。
5. 従来の技術に比べ、今回私たちが作製したナノフィルターの固有特性（フィルターの寿命、長期安定性、分離効率、再利用性など）は、他のさまざまな分子のフィルタリングや多種分子の輸送膜をも可能にするナノフィルターの開発の鍵となるものである。
6. 今回の研究成果は、このモザイクナノフィルターが、現在使われている高分子の分析方法に代わる、時間的にもコスト的にも効率の高い代替ツールになりうることを示している。本成果は、さまざまな電子機器やセンサーなど、ナノテクノロジーにおける機器の設計において新たな識見を与えるものである。

研究の背景

今日、生物製剤や薬剤の分野において、タンパク質を均質なグループや均一なサイズに分離することは極めて重要である。そのニーズに応えるために、製造の容易さや迅速性、量産性及び低コスト性をもつ分離技術が求められていた。

陽極アルミナ膜 (AAM: Anodic Alumina membrane) は、イギリスのワットマン社が市販しているもので、陽極酸化プロセスを通して直径200 nm、厚み60 μm の均一細孔を有するアルミナ膜を形成することが出来る。Martinら (*Science* 1994) による陽極アルミナ膜内の1次元ナノチャネルの発見以来、陽極アルミナ膜は高分子のサイズ別分離につながるナノ細孔を介した1次元チャネルの製作に用いられ、例えば、生体分子やナノ粒子の分離技術に使用されてきた。

細孔を規則的に配置し、陽極アルミナ膜内の一次元ナノチャネルの形状や寸法を均一にできるようになったことで、生体分子やナノ粒子の分離技術が大きく進展したが、従来の材料ではまだいくつかの課題が残っている。

まず第一に、陽極アルミナ膜壁全体に堅固な管状構造を合成するのは困難である。第二に、今回のように細孔内への充填を伴う材料では、テンプレートを取り除いた後、膜壁からナノチューブ (NT) / ナノワイヤが脱離し、非連続の細孔や不規則な形状が形成されてしまう。第三に、高温焼成時に起こるナノ細孔の収縮から空隙が生じてしまう。このようなナノ細孔シリカナノチューブハイブリッド陽極アルミナ膜の製造欠陥は、長期に保存するとナノチューブの機能を徐々に劣化させ、高分子の濾過率や拡散係数を制御するナノ濾過システムの機能を低下させてしまう。これらのことから、高い未透過率でサイズの大きなタンパク質分子を分離するために、強く堅固な構造が求められていたのである。

研究の進展

本研究では、高濃度のタンパク質をサイズ別に分離することができるナノフィルターとして、陽極アルミナ膜の内部に密なメソケージ・シリカナノチューブ (細孔入口が 5nm、内空部が 12nm) を作製した。そして極性シランのカップリング剤⁴⁾を用いてメソケージ細孔チャネルに多機能表面被覆を施すことにより、ナノチューブ内部に空隙を生じさせることなく極めて堅固な連続体構造の膜を生成し、また膜壁による吸収や膜壁との結合なしにタンパク質を輸送することを可能にした。

今回のメソケージナノフィルターを固定された通常の濾過装置として用い (図1)、濾過試験を行った。3D ナノフィルター膜を通して、タンパク質溶液 (未透過率 $\geq 10^3 \text{ mol dm}^{-3}$) のリゾチーム (LYS) やシトクロム c (CytC)、ミオグロビン (Mb)、 β -ラクトグロブリン (β -LG)、ヘモグロビン (Hb) を 0.04MPa の弱い真空圧力で濾過する。これらのタンパク質は、紫外線可視・蛍光分光光度計を用いて調べることができる。分子の大きさが 5nm 以下のタンパク質 (CytC size $\approx 3 \text{ nm}$, LYS size ≈ 3.2 , Mb size $\approx 4 \text{ nm}$, and β -LG size ≈ 4.2) は、数秒の速さでケージの細孔を通過するのに対し、分子が大きいヘモグロビン (Hb) は、陽極アルミナ膜のナノチャネルを通過するのにより長い時間を必要とする。メソケージナノフィルターの濾過率と拡散率は、タンパク質分子が大きくなると低下するが、これはメソケージシリカナノチューブの入口 (約 5nm) が、分子をサイズでふるい分けていることによる。

今回開発したナノフィルターと同じ条件で市販の高性能限外濾過膜ディスクフィルター (オメガ限外濾過メンブレン・ディスクフィルター25mm 細孔直径 25-150 nm) を使用したタンパク質分離の比較試験では、大量のタンパク質を分離する際に今回開発したナノフィルターでは数秒しか要しないのに対し、市販材では数時間を必要とした。

波及効果と今後の発展

1. 今回の研究成果は、ナノチューブの縦軸に垂直に開くモザイクケージ細孔の開口部が、ナノ濾過膜における分子サイズでのふるい分けの鍵となることを示すものでもある。また、我々の考案したモザイクケージフィルターでは、タンパク質が入口を通り、より広い球形のケージ腔 (10nm) まで透過することにより、ナノチューブの内部全体においてタンパク質が移動しやすくなる (図 2)。この研究成果により、フィルターを長期間使用した際が目詰まりも大幅に回避することができるようになった。
2. 現在使われている生体分子のあらゆるナノフィルター技術に比べ、我々のアプローチは、膜の内部にナノスケールの頑丈な細孔を作ることによってフィルターを更に安定させ、数ヶ月にわたる長期的安定性に優れたモザイクケージナノフィルターを提供するものである。1年もの長期保管でも、ナノフィルターの濾過効率の低下は検知されなかった。また、このナノフィルターは、複数回再使用しても、タンパク質に対し高い濾過効率を保っている。
3. このモザイクナノフィルター膜は、品質保持期間、長期の安定性、分離効率、再利用性など、市販の濾過膜に対して求められる特性を備えていることが実証されている。我々は、特にナノ流体工学、触媒作用、放出制御デバイスの分野において、この一次元チャンネル内における有機-無機の複合構造体が、新たなナノスケールデバイスの開発に有望であるものと期待している。

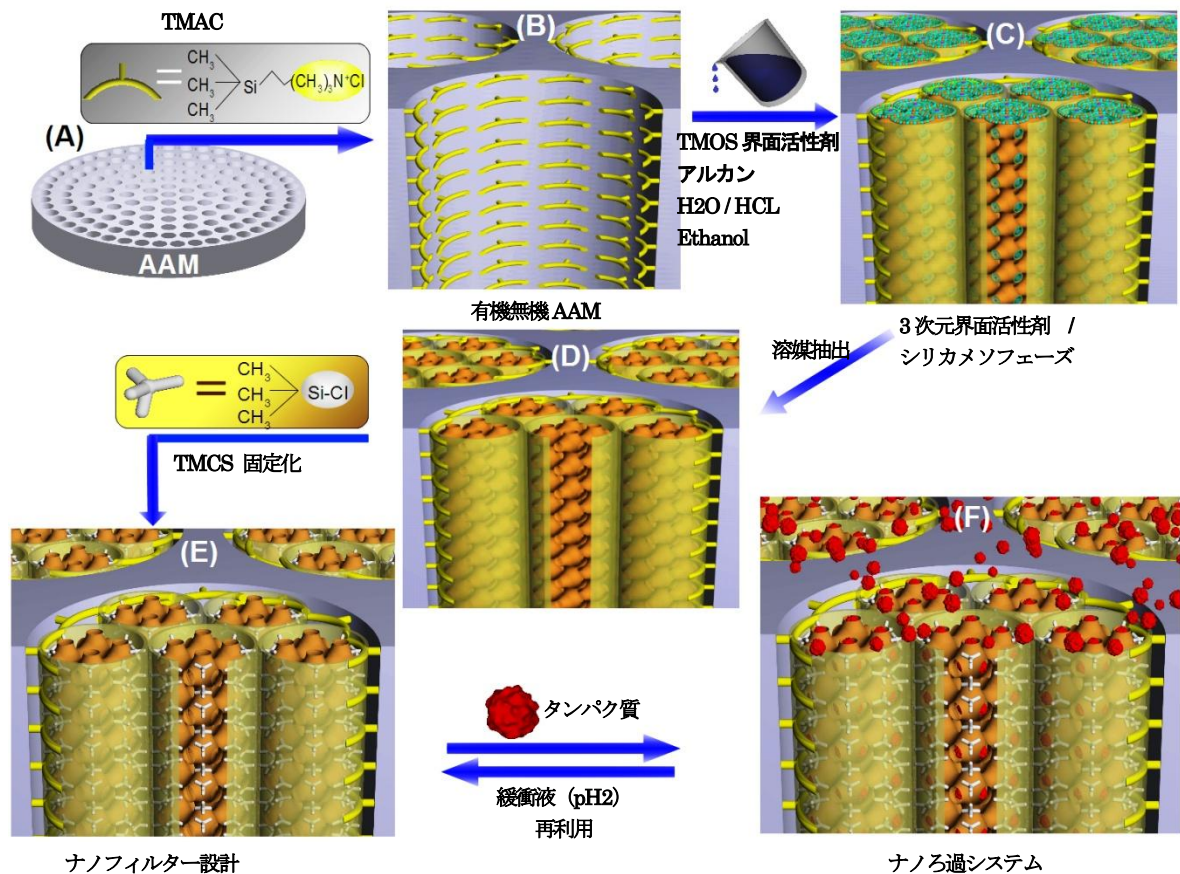


図1 タンパク質の分子配向およびサイズ排除を目的とした、ナノフィルターAAM 膜内の 3D モザイクケー
 ジシリカナノチューブにおけるの堅固かつ簡易な合成プロセス。

- (A) ナノチャンネルのホストポケットとなる陽極アルミナ膜 (AAM) は、TMAC (注：参照) の高密度シリ
 ラン化の条件のもと、AAM ナノチャンネル内部に陽極荷電したアイランドを生成する。荷電した AAM
 テンプレートによって、シリカドメインと AAM 膜壁の間に静電相互作用を発生させ、膜の内部に基
 幹となる蓄電された堅固なナノチューブを形成する。
- (B) 図はナノチャンネル (細孔) の拡大で TMAC に覆われている様子を表しており、トリブロック共重合体
 F127 (PEO₁₀₀PPG₇₀PEO₁₀₀) 界面活性剤、C₁₂ アルカン、テトラメチルオルトシリケート (TMOS)、酸
 性溶液(H₂O-HCl)組成の第 4 級マイクロエマルジョン液晶相鑄型法を用いて、メソケーージシリカナ
 チューブを合成する。
- (C) 荷電された AAM ホストポケットに組成領域を鑄造し、その下から始動圧力 0.04 メガパスカル以上で
 吸引することにより AAM の内部細孔に界面活性剤シリカナノチューブの制御析出が可能になる。
- (D) このステップが完了次第、通常焼成時にナノチューブ内に形成されやすいエアギャップの生成を防ぐ
 ため、F127 界面活性剤を溶媒抽出法にて除去する。
- (E) シリカナノチューブ内のメソケーージ細孔内部を疎水性トリメチルクロロシラン (TMCS) グループによっ
 てコーティングされ、有機層状表面が出来る。
- (F) メソケーージに TMCS グループが固定化することでナノチューブ内が TMCS で覆われ、ナノろ過プロセ
 ス中の均一に成形された細孔の変形を縮小する。このデザインに基づく膜製作は、幅広いタンパク質のろ過
 に対してナノフィルターの活用を広げる鍵となる。

注：N-trimethoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylammonium chloride (TMAC)、テトラメチルオルトシリケート
 (TMOS)、トリメチルクロロシラン(TMCS)

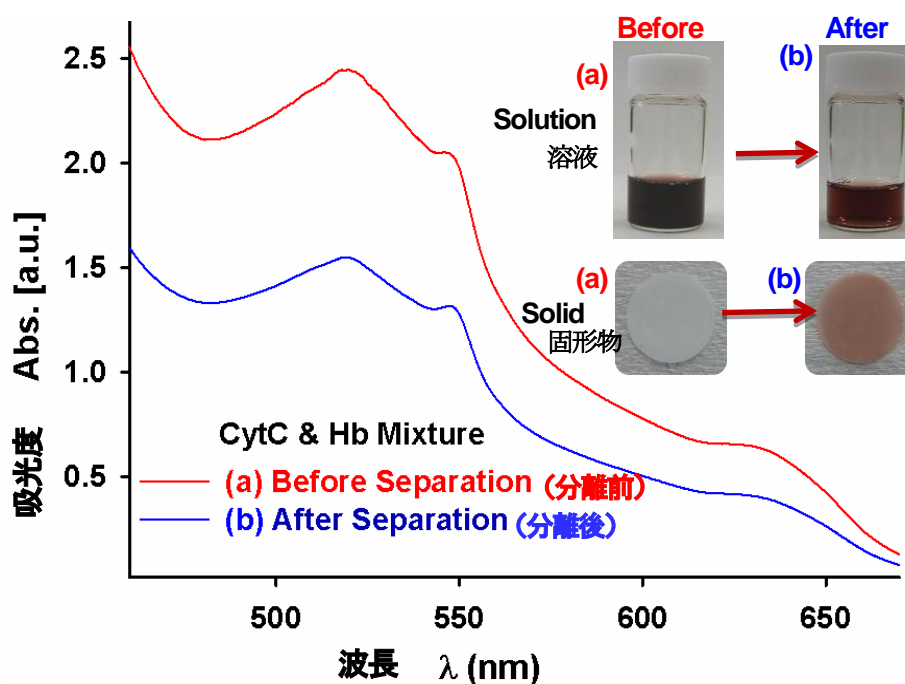


図2 CytC [2.5×10^{-5} M]とHb [2.5×10^{-6} M] の混合物に相当する吸光度スペクトルと写真 (挿入)。一定の実験条件(圧力0.04MPaと温度25°C)において、固体のモザイクケージナノフィルター膜を使用し、ナノ濾過分析を実施する前 (a) (赤) と実施後 (b) (青)。

【報道に関する問い合わせ】

独立行政法人物質・材料研究機構

〒305-0047 茨城県つくば市千現 1-2-1

企画部 広報室

TEL : 029-859-2026 FAX : 029-859-2017

【研究内容に関する問い合わせ】

独立行政法人物質・材料研究機構

環境・エネルギー材料萌芽ラボ

主幹研究員 EL-SAFTY Sherif (エル サフティ シェリフ) ※英語対応

TeL: 029-859-2135

E-mail: sherif.elsafty@nims.go.jp

【日本語対応】

独立行政法人物質・材料研究機構

環境・エネルギー材料萌芽ラボ

鬼澤 亮子

TeL : 029-859-2135

E-mail : ONIZAWA.Ryoko@nims.go.jp

【用語説明】

1. 陽極アルミナ膜

酸化アルミニウムの薄膜に垂直に精密な穴をあけた材料

2. メソケーシ構造

かご型の構造を持つメソスコピックレベル（ナノより大きくマイクロより小さい）の構造

3. 多機能表面被覆

いろいろな機能を持つ化学基を導入するような表面コーティング・修飾方法

4. 極性シランのカップリング剤

シリカ表面に共有結合できる試薬で、極性の官能基を持っているもの