研究報告集

第 28 集

2017年3月

公益財団法人 松籟科学技術振興財団

SHORAI FOUNDATION FOR SCIENCE AND TECHNOLOGY

研究報告集第28集発刊によせて

公益財団法人 松籟科学技術振興財団 理事長 長谷川 吉弘

第31回(2013年度)研究助成金を贈呈した研究者の方々による研究成果を収録した「研究報告集第28集」をお手許にお届けします。1983年3月の財団設立以来、科学技術に関する調査・研究・国際交流に対する助成・奨励を行うことを目的として活動を続けてまいりました。これも、ひとえに皆様方のご理解とご協力の賜物と厚くお礼申しあげます。

昨年、ノーベル生理学・医学賞を大隅良典東京工業大学栄誉教授が受賞しました。日本人のノーベル賞受賞は3年連続で25人目となります。ノーベル生理学・医学賞では2015年度の北里大学の大村智特別栄誉教授が受賞され2年連続して受賞するという快挙を成し遂げています。受賞の対象となった大隈先生の業績は、細胞が不要となった構成要素、たとえばタンパク質を分解して再利用する現象「オートファジー」のメカニズム解明です。生理学・医学賞には最大で3名の受賞枠がある中で単独受賞されています。自然科学分野の日本の受賞者21人の中で単独受賞は、湯川秀樹氏と利根川進氏の2名だけです。いかに独創的で優れていた研究であるかを示すものです。

近年の研究開発の潮流が出口志向を強めていて実用化を想定した応用研究に集中していく傾向にあります。大隈栄誉教授は細胞のオートファジーという基礎研究の分野で受賞できたことについて、「基礎研究だけでよいわけではないが、基礎研究がないと新しい進歩はない」と、基礎研究の重要性を説明されています。このような基礎研究の成果が、日本の基礎科学の発展に大きく寄与しています。

当財団では、現在、「植物有用成分およびバイオマス資源の高度利用に関わる研究」、「エレクトロニクス複合材料および次世代実装に関わる研究」、「持続可能な社会を実現する有機系新素材およびその機能化に関わる研究」の3課題を対象に研究助成事業を行っており、これまでに620件の研究を支援してきました。当財団が助成金を贈呈した研究者のうち、2001年に野依良治先生(現・科学技術振興機構研究開発戦略センター長)が、2010年には鈴木章先生(現・北海道大学名誉教授)が、それぞれノーベル化学賞を受賞されています。これからも科学技術の発展に寄与する研究開発への支援活動を行っていく所存です。皆様の一層のご指導とご支援をお願い申しあげます。

2017年3月

松籟(しょうらい):「松の梢に吹く風」の意味

設立の趣意

戦後、焦土と化した国土から立ち上がった我が国は、国民の勤勉さと旺盛な技術革新とを結合させ、驚異的な復興と成長を実現し、その国民総生産は今や全世界の1割を占めるまでに至りました。

この間、我が国の科学技術は、導入技術に依存しつつも逐次自主技術開発への努力を積み重ね、世界に誇り得る数多くの技術を創出し、先進国としての確実な地歩を固めてまいりました。

しかしながら科学技術全般に視点を移しますと、我が国は、とかく成果を期待する余り、応 用技術に直接結びつかない研究を軽視する傾向があり、基礎科学の立ち遅れが内外より指摘さ れております。このことは他国の基礎研究成果への我が国の只乗り論を招くなど、国際摩擦の 一因となっております。

今や我が国は、世界の経済大国として創造的な科学技術を広範に創出し、地球上のエネルギー 開発利用、科学技術の恩恵に十分浴さなかった国々への援助、生命科学の人間生活への応用な どを進め、世界経済の活力強化と社会の発展に貢献していく責務を負っています。

このような時代の要請を踏まえ、松籟科学技術振興財団は、科学技術に関し、調査・研究およびこれらに対する助成などを行い、全地球的な科学技術の振興に貢献しようとするものであります。

設立の経緯と財団の概況

設立の経緯

ハリマ化成グループ株式会社創業者の長谷川末吉は、はやくからトール油をさまざまな用途

に適応可能な素材として着目していました。そして、かねてからの考えを行動に移し、1952年

にはトール油の試験生産を開始しました。以来、トール油に対する研究開発を通じて、トール

油の持つ素晴らしさを全国に紹介し、その可能性を拓いていきました。その長年にわたる功績

が認められ、1982年に長谷川末吉は科学技術庁(現文部科学省)より"科学技術功労者賞"を

受賞しました。

ハリマ化成グループは、この栄誉を機に、さらなる科学技術の振興と世界文化の発展を願っ

て、科学技術に関する調査・研究・国際交流に対する助成・奨励を行うことを目的として、1983

年3月"財団法人松籟科学技術振興財団"を設立しました。

設立より30年を迎えた2013年4月1日をもって、公益法人の認定を受け「公益財団法人 松

籟科学技術振興財団」となりました。引き続き、科学技術の発展に寄与する研究開発への支援

事業活動を行ってまいります。

事業の概要

当財団では、科学技術の振興と世界文化の発展に寄与することを願い、以下の事業を行って

おります。

(1) 科学技術に関する調査・研究およびこれらに対する助成(研究助成事業)

(2) 科学技術に関する国際交流に対する援助(国際交流派遣事業)

(3) その他、当財団の目的を達成するために必要な事業

財団の概要

名

称:公益財団法人松籟科学技術振興財団

立:1983年3月12日

移行登記: 2013年4月1日

行 政 庁:内閣府

財務状況 (2016年3月31日現在)

正味財産 870,324,188円

iii

目 次

第31回(2013年度)助成金受領研究報告

バイオマスを利用した微粒子安定化エマルション粘着剤の開発

大阪工業大学 工学部 応用化学科 藤井 秀司、中村 吉伸 ……3

多様な植物セスキテルペノイドのコンビナトリアル生合成

大阪大学 大学院工学研究科 關 光 ……9

植物由来アコニチンアルカロイド類の合成研究

神戸大学 大学院工学研究科 岡野 健太郎……17

インドナガコショウ成分スクチホリアミドAの血管内皮賦活化 作用における新規標的受容体の同定と作用機構の解明

東北大学 大学院薬学研究科・細胞情報薬学分野 守屋 孝洋……21

甜菜由来ペクチンを架橋剤として利用した医療用ヒドロゲルの開発

鹿児島大学 大学院理工学研究科 武井 孝行……30

微細藻類バイオマスの高度利用を目指したビタミンBp代謝工学

首都大学東京 大学院理工学研究科 得平 茂樹……35

紙と紙抄き技術の応用によるフレキシブル電子デバイスの創製

大阪大学 産業科学研究所 セルロースナノファイバー材料分野 古賀 大尚……40

銅マイクロ粒子トナーの開発とそのレーザ焼結特性の評価

茨城大学 工学部機械工学科 山崎 和彦、柏 雄太……52

ナノスケール表面元素分析法XANAMの固体内原子への適用

名古屋大学 大学院工学研究科 鈴木 秀士……58

リン元素を機能発現の鍵とする新規π共役分子の開発

大阪大学 大学院工学研究科 武田 洋平……64

拡張型ポリアニリン誘導体の精密合成と有機デバイス応用

東京工業大学 物質理工学院 道信 剛志……70

省エネ有機ELディスプレイを指向した結晶化誘起型発光材料の開発

京都大学 大学院工学研究科 田中 一生……74

Electronic Infrared Light Absorption of Tri-palladium Complex

Containing Two π -Expanded Tetracene Ligands

東京大学 大学院工学系研究科 松尾 豊……80

素反応をプログラム化した重合反応による機能性アクリル樹脂の精密簡易合成

信州大学 繊維学部 髙坂 泰弘……89

ねじれたπ共役分子を基盤とする多機能性有機発光材料の開発

東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門 中野 幸司……98

ピロールの特異な反応性を利用した機能性 π 共役分子の開発

愛媛大学 大学院理工学研究科 髙瀬 雅祥 …102

第31回(2013年度)

助成金受領研究報告

バイオマスを利用した微粒子安定化エマルション粘着剤の開発

大阪工業大学 工学部 応用化学科 藤井 秀司、中村 吉伸

Abstract

Colloidal aqueous dispersions of poly(*n*-butyl acrylate) (PBA)-silica (SiO₂) nanocomposite particles were synthesized through free radical polymerization in the presence of SiO₂ nanoparticles and poly(*N*-vinyl pyrrolidone) colloidal stabilizer. The nanocomposite particles were stable colloids with a reasonably narrow size distribution and a SiO₂ content of 40%. Morphology of the nanocomposite particles was confirmed to involve a PBA-core/SiO₂ nanoparticle-shell using electron microscopies. Pressure-sensitive adhesive (PSA) films were prepared from blends of the nanocomposite particles and PBA homopolymer particles at various weight ratios. Probe tack tests at the standard probe rate, which is close to the actual peeling speed for PSAs, confirmed that maximum stress of tack adhesion improved 2.36 times and adhesion energy improved 1.39 times upon addition of nanocomposite particles compared to that of PBA homopolymer film. The nano-scale mechanical deformation and energy dissipation ability of the 'soft-hard' nanocomposite particles was expected to increase adhesion energy.

1. Introduction

From the late 20th century, there has been great interest in polymer-inorganic nanocomposite *colloidal particles*, which have a specific surface area that is much larger than that of bulky nanocomposites^(1,2). If the organic component is film-forming, such particles can be used to produce paints or coatings. Latex film prepared from an aqueous dispersion of film-forming organic polymer-silica nanocomposite particles possessed superior thermal, mechanical, and flame retardant properties compared to a similar organic polymer latex film⁽³⁾.

The present study demonstrates that an addition of "soft" $poly(n-butyl \ acrylate)$ (PBA) core-"hard" silica (SiO₂) shell nanocomposite particles as a filler significantly enhances the adhesion properties of a water-based PSA⁽⁴⁾. This type of "soft-hard" nanocomposite particle is fabricated easily through a one-step aqueous free-radical polymerization in the presence of SiO₂ nanoparticles. The resulting

colloidal nanocomposite dispersions were purified and extensively characterized in terms of particle size, morphology, silica content, and chemical composition. Adhesive films were prepared from blends of the nanocomposite particles and PBA homopolymer latex particles at various weight ratios. The effects of nanocomposite particle amount on tack adhesion properties were investigated using a probe tack tester. In the present study, probe tack studies were conducted at a rate of 10 mm/s to obtain stressdisplacement (S-D) curves. As a control experiment, polystyrene (PS)-SiO₂ nanocomposite particles and SiO₂ particles were used as a filler and the results on adhesion properties were compared with those obtained using the PBA-SiO₂ nanocomposite particles. A possible tack enhancement mechanism is proposed based on the probe tack results.

2. Experimental

2. 1. Materials

2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AIBA, 97%), *n*-butyl acrylate (BA, 99%), and styrene (St, 99%) were obtained from Sigma-Aldrich. The BA and St were used after passing through a column of basic alumina (activated, Brockmann 1, standard grade, ~150 mesh, 58 Å) to remove the inhibitor. Poly(*N*-vinyl pyrrolidone) (PNVP; nominal molecular weight=360,000) and ammonium persulfate (APS, 95%) were obtained from Wako Chemicals. An aqueous dispersion of SiO₂ nanoparticles (Bindzil2040; 20 nm amorphous SiO₂ nanoparticle aqueous dispersion, 40 wt% solid content) and SiO₂ particles (Snowtex® MP-2040; *D*: 180 nm amorphous SiO₂ particle aqueous dispersion, 40.4 wt% solid content) were donated by Eka Chemicals AB and Nissan Chemical Industries, Ltd, respectively.

2. 2. Synthesis of PNVP-PBA-SiO₂ and PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite particles

PNVP-stabilized PBA-SiO₂ (PNVP-PBA-SiO₂) nanocomposite particles were synthesized using aqueous free radical polymerization in the presence of SiO₂ nanoparticles⁽⁵⁾. PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particle synthesis (SiO₂ 80 wt% system) was conducted as follows: PNVP (0.25 g; 5.0 wt% based on BA monomer) was added to water (41.0 g) in a 100-mL round-bottomed flask and the mixture was stirred at 25°C until a homogeneous solution was obtained, followed by addition of aqueous SiO2 sol (10.00 g aqueous dispersion, equivalent to 4.00 g dry SiO₂). The reaction mixture was purged with nitrogen, and BA monomer (5.00 g) was added. Then, the AIBA initiator (50.0 mg; 1.0 wt% based on BA monomer) in deionized water (3.0 g) was added to the reaction mixture, giving a total water content of 50.0 g. This same procedure was used for the synthesis of other PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles (8 and 40 wt% SiO₂ systems) and PNVP-polystyrene (PS)-SiO2 nanocomposite particles. The polymerizations were conducted at 60℃ under nitrogen and were stirred at 250 rpm

for 24 h. APS-PBA latex particles were synthesized by surfactant-free emulsion polymerization using ammonium persulfate (APS).

2. 3. Characterization of PNVP-PBA-SiO₂ and PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite particles

Particle size in water media was determined using a particle size analyzer (Malvern Mastersizer 2000) equipped with a small volume sample dispersion unit (Hydro 2000SM; ca. 150 mL including flow cell and tubing), He-Ne laser (633 nm), and solid-state blue laser (466 nm). Stir rate was adjusted to 2,000 rpm. Mean particle diameter was used as volume mean diameter (D_{ν}) .

2. 4. Preparation of adhesive films

The purified and concentrated aqueous dispersion of PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles (14.36 wt%) was blended with the aqueous dispersion of charge-stabilized APS-PBA particles (13.57 wt%) at various weight ratios (PNVP-PBA-SiO₂/APS-PBA: 100/0, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 10/90, 5/95, 1/99 and 0/100 based on solid weight) and stirred well. Aqueous dispersions of the blended particles were cast on 38- μ m thick poly(ethylene terephthalate) sheets, followed by heating at 70°C for 5-6 h in an oven to evaporate the water. Then, the films were allowed to stand at 23-25°C for one day. Thickness of the resulting adhesive films was ca. 100 μ m, measured using a thickness gauge (Dial thickness gauge H-MT, Ozaki Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan).

2. 5. Probe tack test

Tack of the adhesive films was measured using a probe tack tester (TE-6002, Tester Sangyo, Saitama, Japan) with a stainless-steel (SUS 304) probe (5 mm diameter) with a flat end at $23\pm1^{\circ}$ C.

3. Results and discussion

3. 1. Characterization of PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles and APS-PBA latex particles

Optical microscopic images indicated no signs of coagulation for the 80 SiO_2 wt% system. The volume average diameter (D_{v}) of the nanocomposite particles was measured to be 140 ± 50 nm using the laser diffraction method, which suggests formation of a colloidally stable nanocomposite particle dispersion. In contrast, PNVP-PBA-SiO $_2$ nanocomposites were obtained as flocs in the 8 and 40 wt% systems, as indicated by the significant increases in apparent particle diameter and diameter distribution (D_{v} values

 $>60~\mu m$). Thus, characterization and adhesion property evaluations were performed using the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles synthesized in 80 wt% system, hereafter. A charge-stabilized APS-PBA latex particle aqueous dispersion, which was milky-white colored and colloidally stable for longer than one year without coagulation, was synthesized by surfactant-free emulsion polymerization using an APS initiator. Laser diffraction particle size analysis study indicated a $D_{\rm v}$ value of 350 ± 10 nm.

CHN elemental microanalysis studies revealed that the PNVP-PBA-SiO $_2$ nanocomposite particles consisted of 3.03 wt% PNVP, 57.07 wt% PBA, and 39.90 wt% SiO $_2$, which agreed well with the theoretical preparation

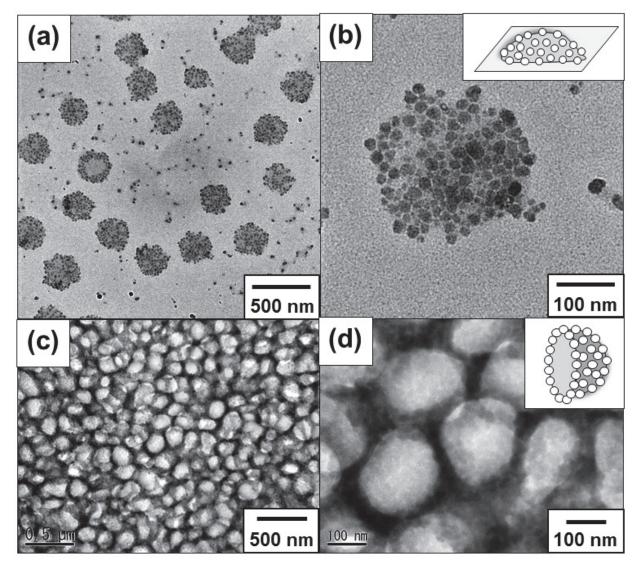


Figure 1. TEM images of (a, b) PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles (80 wt% SiO₂ system) and (c, d) thin cross section of the corresponding film prepared using the nanocomposite particles.

values (2.703 wt% PNVP; 54.054 wt% PBA; 43.243 wt% SiO₂). Nanomorphology of the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles and the corresponding film was investigated in detail using transmission electron microscope (TEM) (Figure 1). The TEM studies on sample prepared using diluted nanocomposite particle aqueous dispersion revealed submicrometer-sized nonspherical particles with a number-average Heywood diameter $(D_{\rm H})$, polydispersity, and circularity value of 239 nm, 1.02, and 0.48, respectively (Figure 1a). In addition, a magnified image (Figure 1b) clarified that the nanocomposite particles had a heterogeneous character consisting of PBA and SiO₂ components. Figures 1c and 1d show TEM images of the thin cross section of the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite latex film. A black network structure consisting of SiO2 nanoparticles was observed. These results confirm that the morphology of the nanocomposite particles consisted of a PBA-core/ SiO₂ nanoparticle shell structure.

3. 2. Characterization of adhesive films

Figure 2a shows that maximum stress increased upon incorporation of filler particles and reached a maximum value of 0.52 MPa at 71 number% (20 wt%) for the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particle system; maximum stress increased to 2.36 times as compared with that of the PBA homopolymer film. At values greater than 81 number% (30 wt%) PNVP-PBA-SiO2 nanocomposite filler particle content, maximum stress decreased rapidly. This should be because the number of nanocomposite particles at the interface between probe tip and adhesive layer was likely too high. Adhesion energy of the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particle system was greater than that of the PBA homopolymer film system at filler particle number% values at and less than 53% (10 wt%) (Figure 2b).

As a control experiment, adhesion properties of APS-PBA/PNVP-PS-SiO₂ and APS-PBA/SiO₂ (180 nm) composite films were investigated. These two fillers have hard core and could not be deformed under stress at room temperature. Maximum stress increased up

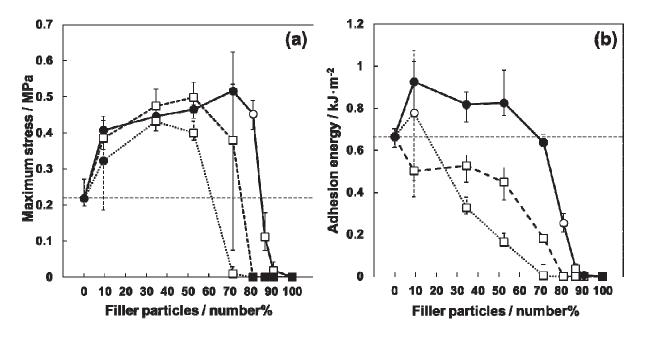


Figure 2. Effect of filler particle amount on (a) maximum stress and (b) adhesion energy for tack of adhesive films. The films were prepared from mixture of APS-PBA latex particles and PNVP-PBA-SiO $_2$ nanocomposite particles (solid line), mixture of APS-PBA latex particles and SiO $_2$ particles (D: 180 nm) (broken line), and mixture of APS-PBA latex particles and PNVP-PS-SiO $_2$ nanocomposite particles (dotted line). The tack was measured without prism. (● Cohesive failure; ○ Interfacial + Cohesive failure; □ Interfacial failure; ■ No tack)

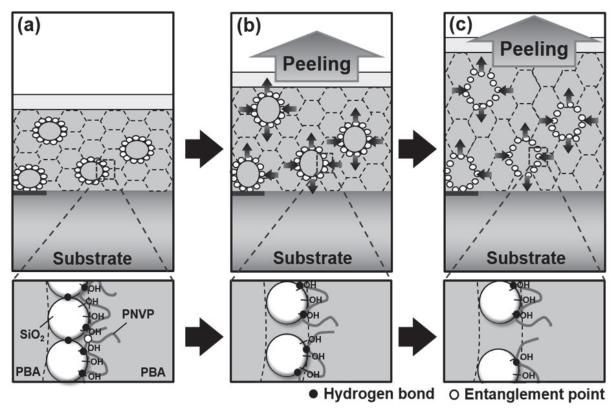


Figure 3. Possible scheme illustrating peeling of adhesion of the APS-PBA/PNVP-PBA-SiO₂ adhesive films: (a) before peeling and (b, c) during peeling. The shape of the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles changes with deformation of the adhesive film. Allows show stress direction against nanocomposite particles during their deformation.

to 128 or 98% upon incorporation of PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite particles or SiO₂ particles (*D*: 180 nm), respectively, in a similar manner to that for PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles. However, maximum stress decreased at lower filler particle amounts (53~71 number%) compared to that of the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particle system. Adhesion energies of PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite particles or SiO₂ particles systems were less than that of the PBA homopolymer film at all filler particle amounts, except 9.3 number% PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite system. These results strongly indicate that soft PBA core and hard SiO₂ nanoparticle shell morphology is essential to develop adhesion properties.

Possible tackiness improvement mechanism for the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particle system compared to the PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite particles or the SiO₂ particles (*D*: 180 nm) during peeling process is discussed below (Figure 3). Adhesion strength was affected by interfacial adhesion and cohesive strength of the adhesive. Nanocomposite particles increased cohesive strength by restricting molecular mobility of the surrounding PBA molecules. In contrast, the nanocomposite particles at the adhesivesubstrate interface decreased interfacial adhesion. The nanocomposite particles improved cohesive strength, but appeared to aggregate at high concentrations, as determined from film transparency, which caused a decrease in efficiency of cohesive strength. In addition, interfacial adhesion decreased at high filler content. Therefore, the optimal amount of PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles is critical for effectively improving the adhesion energy of adhesive film. In contrast, SiO₂ particles (D: 180 nm) or PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite particles as a filler did not increase adhesion energy at any filler particle amount, but instead decreased it.

Deformation and destruction of the SiO₂ shell of

the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles should occur under stress, as indicated by Bon and Keddie joint research group⁽⁶⁾. Relaxation of strain energy by deformation and destruction of the SiO₂ nanoparticle shell should improve tackiness. In contrast, the stress collecting in the filler-PBA matrix interface appeared to occur in the PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite particles or the SiO₂ particles systems. This mechanism indicates that the structural arrangement of PBA and SiO₂ within the core-shell particles was necessary to enhance adhesion.

4. Conclusions

In summary, the addition of PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particles as a filler for PBA latex waterborne PSAs markedly improves the tack adhesion properties such as maximum stress of tack adhesion and adhesion energy. In comparison, the adhesion energy for latex films prepared from the mixture of PBA latex and hard filler particles (*e.g.* PNVP-PS-SiO₂ nanocomposite particles and SiO₂ particles) at the same number% with the PNVP-PBA-SiO₂ nanocomposite particle system did not improve tack to the same extent. Only combining a "soft" polymer core and "hard" SiO₂ nanoparticle shell allows an increase in adhesion

energy. These useful nanocomposite particles can be synthesized using commercially available chemicals in an environmentally friendly aqueous media and easily scaled to industrial production level. Studies on the latex-based PSA materials containing biomass should be valuable and the investigation will be conducted.

Acknowledgements

This work was financially supported by Shorai Foundation for Science and Technology.

References

- (1) Bourgeat-Lami, E. J. Nanosci. Nanotechnol. **2002**, 2, 1–24.
- (2) Balmer, J. A.; Schmid, A.; Armes, S. P. *J. Mater. Chem.*, **2008**, *18*, 5722-5730.
- (3) Tiarks, F.; Leuninger, J.; Wagner, O.; Jahns, E.; Wiese, H. Surf. Coat. Int. **2007**, *5*, 221–229.
- (4) Yamamoto, Y.; Fujii, S.; Shitajima, K.; Fujiwara, K.; Hikasa, S.; Nakamura, Y. *Polymer* **2015**, *70*, 77–87.
- (5) Schmid, A.; Scherl, P.; Armes, S. P.; Leite, C. A. P.; Galembeck, F. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 3721–3728.
- (6) Wang, T.; Colver, P. J.; Bon, S. A. F.; Keddie, J. L. Soft Matter. 2009, 5, 3842–3849.

多様な植物セスキテルペノイドのコンビナトリアル生合成

大阪大学 大学院工学研究科 關 光

【背景と目的】

セスキテルペノイドは炭素数15のファルネシルニリン酸(FDP)を共通前駆体として生合成されるテルペノイドの一群であり、その構造多様性はテルペノイドの中で最大、かつ、その潜在的医薬品資源としての価値は極めて大きい。例えば、ヨモギ属の一種であるArtemisia annuaが「特異的」に生産するアルテミシニンは現在、抗マラリア薬原料として全世界的に最も重要なものとなっている。しかしながら、植物体中におけるおのおののセスキテルペノイド分子種の含有量は必ずしも高くなく、また、植物材料から特定のセスキテルペノイドのみを単離・精製することは、技術的・経済的にも容易ではない場合がある。そのため、特定のセスキテルペノイドを効率的かつ選択的に生産する新たな技術の開発は、「新規創薬資源の提供」に資すると考えられる。

セスキテルペノイドの生合成には、1)FDPを環化し多様なセスキテルペン骨格を形成するセスキテルペン合成酵素、および、2)各種セスキテルペン骨格の酸化修飾を触媒するシトクロムP450酸化酵素(P450)が重要な役割を果たしている。P450は、単純な1段階の水酸化を触媒するもの以外に、3段階の酸化反応を触媒しカルボキシル基を形成するものや、骨格の異なる部位への連続した水酸化を行うもの等が単離されている。複数のセスキテルペン骨格に対して酸化活性を持つP450も報告されていることから、P450の基質特異性は必ずしも厳密ではなく、セスキテルペン合成酵素によって生じた様々な骨格に対してP450の組み合わせを変化させることにより、多様な構造が形成されることが期待できる。

そこで本研究では、以下の2点を実行した。1)種々の植物種から単離されている各種セスキテルペン合成酵素とその修飾酵素(P450)を「様々な組み合せ」において酵母に導入し、組換え酵母を利用した「天然・非天

然型セスキテルペノイドのコンビナトリアル生合成」の 実行可能性を検証する。また、2) 多様なセスキテルペ ノイドを生合成するヨモギ属植物に注目し、これらを材 料として新規セスキテルペン合成酵素の単離と機能解析 を行った。

【結果および考察】

1) 既知セスキテルペン合成酵素とP450の組み合わせに よるセスキテルペノイド合成

本実験では3種類のセスキテルペン合成酵素遺伝子を使用した。それぞれ由来する植物種、遺伝子配列のGenBank登録番号および報告されている生成物の構造を表1に示した。また、6種の既知P450について、上記3種のセスキテルペン骨格に対する酵素活性を解析した。それぞれ由来する植物種、遺伝子配列のGenBank登録番号および、触媒することが報告されている反応を表2に示した。

5-Epi-aristolochene synthase、vetispiradiene snyhtaseおよびvalencene synthaseの3種類のセスキテルペン合成酵素と6種類のP450からなる計18通りの組み合わせについて、セスキテルペン合成酵素、シトクロムP450酸化酵素、シトクロムP450酸化酵素に電子を供給する)を共発現する形質転換酵母株を作出した。各形質転換酵母の培養液からセスキテルペノイドを酢酸エチルで抽出し、抽出物をガスクロマトグラフ-質量分析装置(GC-MS)を用いて分析した。GC-MSクロマトグラムおよびピークのマスフラグメンテーションパターンから、セスキテルペン酸化物と推定される化合物が生成したかを調べた。その結果、計18通りの組み合わせの内、6通りの組み合わせでセスキテルペン酸化物と推定されるピークが検出された。

表1 本実験に用いたセスキテルペン合成酵素

Sesquiterpene synthase	Product structure
5-epi-arisolochene synthase (EAS) Nicotiana tabacum (Tobacco) GenBank accession no. AAA19216	
Vetispiradiene synthase Hyoscyamus muticus (Henbane) GenBank accession no. U20187	
Valencene synthase Citrus sinensis (Orange) GenBank accession no. AF441124	

表2 本実験に用いたセスキテルペノイド生合成関連P450

P450 の名称等	触媒する反応		
5-epi-arisolochene hydroxylase CYP71D20 Nicotiana tabacum (Tobacco) GenBank accession no. AAK62342	5-epi-aristolochene capsidiol		
Premnaspirodiene oxygenase CYP71D55 Hyoscyamus muticus (Henbane) GenBank accession no. EF569601	premnaspirodiene (vetispiradiene) solavetivol solavetivone		
(+)-\(\delta\)-cadinene-\(\text{8-hydroxylase}\) CYP706B1 Citrus sinensis (Orange) GenBank accession no. AF332974	(+)-δ-cadinene 8-hydroxy-(+)-δ-cadinene		
Germacrene A oxidase CYP71AV3 Lactuca sativa (Lettuce) GenBank accession no. GU198171	germacrene A acid		
Costunolide synthase CYP71BL2 Lactuca sativa (Lettuce) GenBank accession no. HQ439599	germacrene A acid costunolide		
GAA-8β-hydroxylase CYP71BL1 Helianthus annuus (Sunflower) GenBank accession no. HQ439590	germacrene A acid 8-β-germacrene A acid		

1-1)5-*epi*-aristolochene synthaseとP450の組み合 わせ実験

5-epi-aristolochene synthaseとP450の組み合わせでは、CYP71D20およびCYP71AV3を組み合わせた場合

でセスキテルペン酸化物が検出された。CYP71D20は5-epi-aristolocheneの異なる2箇所を水酸化してcapsidiolに変換する反応を触媒することが報告されている(表2)。本実験においても、5-epi-aristolochene synthaseと

CYP71D20を組み合わせた酵母培養液からは、推定セスキテルペン酸化物として、保持時間14:43に主生成物ピーク (peak2)と、保持時間14:28および15:07に2つの副生成物ピーク (peak1, 3)が観測された(図1)。主生成物であるpeak2にはセスキテルペンジオールの分子イオンと推定されるm/z 236が確認されたため、capsidiolと推定された。一方、CYP71D55と組み合わせた場合では、保持時間12:01および13:31に推定セスキテルペン酸化物 (peak4, 5)が検出された。peak4には $[M-H_2O]^+$ のフラグメントイオンと推定されるm/z 202が観測され、さらに $[M-CH_3]^+$ のフラグメントイオンと推定されるm/z 205が確認されたことから分子イオン $[M]^+$ をm/z 220と推

定した。従ってpeak4はセスキテルペンアルコールと推定された。peak5には分子イオンと推定されるm/z 218 が確認されたことからセスキテルペンケトンもしくはアルデヒドであると推定された。peak4、5はCYP71D20 との組み合わせで観測された推定セスキテルペン酸化物ピークpeak1-3とは異なる保持時間で検出された(図1)。従って、5-epi-aristolochene synthaseを基質とした場合にCYP71D55はCYP71D20とは異なる部位を酸化していることが示唆された。

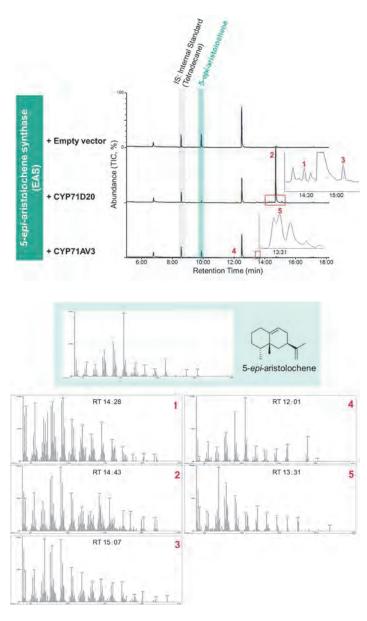


図1 5-epi-aristolochene synthaseおよびP450共発現酵母培養液の酢酸エチル抽出物のGC-MSクロマトグラム(TIC)及び推定セスキテルペン酸化物のマスフラグメンテーションパターン

1-2) Vetispiradiene synthaseとP450の組み合わせ実験

Vetispiradiene synthaseとP450の組み合わせでは、CYP71D20、CYP71D55およびCYP71AV3の3種類のP450を組み合わせた場合において推定セスキテルペン酸化物が検出された。CYP71D55はVetispiradieneの二段階の酸化を触媒し、solavetivolを介してsolavetivoneに変換する酵素であることが報告されている(表2)。Vetispiradiene synthaseとCYP71D20、CYP71D55およびCYP71AV3の3種類のP450を組み合わせて発現させた酵母の抽出液のGC-MSクロマトグラムを比較した結果、保持時間11:21、11:41、12:38および13:34に共通した推定セスキテルペン酸化物のピーク(peak6-9)が検出された。peak6-8には[M-H₂O]⁺のフラグメントイオン

と推定されるm/z 202が観測され、さらに $[M-CH3]^+$ の フラグメントイオンと推定されるm/z 205が確認されたことから分子イオン $[M]^+$ をm/z 220と推定した。従ってpeak6-8はセスキテルペンアルコールと推定された。peak9には分子イオンと推定されるm/z 218が確認されたことからセスキテルペンケトンもしくはアルデヒドであると推定された。CYP71D20との組み合わせからはpeak8, 9が、CYP71D55またはCYP71AV3との組み合わせからはpeak6-9がそれぞれ検出された(図2)。以上の結果から、解析した3種類のP450はVetispiradieneに対して同一の酸化活性を示すことが判明した。

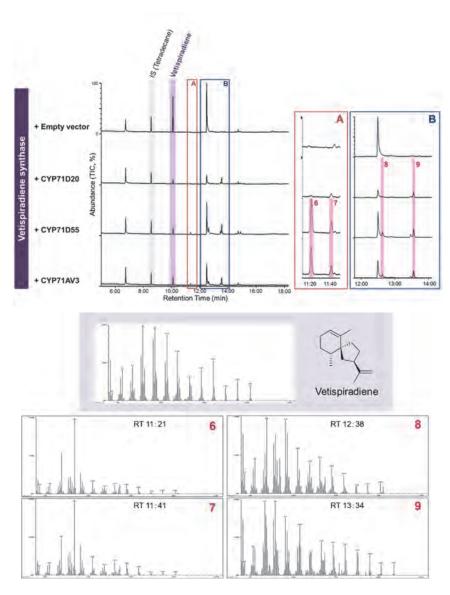


図2 vetispiradiene synthase及びP450共発現酵母培養液の酢酸エチル抽出物のGC-MSクロマトグラム (TIC) および推定セスキテルペン酸化物のマスフラグメンテーションパターン

1-3) Valencene synthaseとP450の組み合わせ実験

Valencene synthase とP450の組み合わせでは、CYP71D20との組み合わせのみで推定セスキテルペン酸化物のピークが2つ検出された。保持時間13:40に検出されたpeak10には分子イオンと推定されるm/z 218が確認されたことから、セスキテルペンケトンもしくはアルデヒドであると推定された。保持時間14:31に検出されたpeak11には分子イオンと推定されるm/z 220が確認されたことから、セスキテルペンアルコールであると推定された(図3)。Valenceneのケトン体であるnootkatone標品(東京化成工業)を入手し、valencene synthaseと

CYP71D20との組み合わせで観測された推定セスキテルペン酸化物との比較を行った。その結果、nootkatoneピークの保持時間及びマスフラグメンテーションパターンがpeak10と一致したため、peak10をnootkatoneと決定した(図3)。以上の結果から、CYP71D20がvalenceneからnootkatoneへの酸化反応を触媒することが判明した。

2) ヨモギ属植物からの新規セスキテルペン合成酵素遺伝子の同定

アジア原産のA. annua が特異的に産生するアルテミ

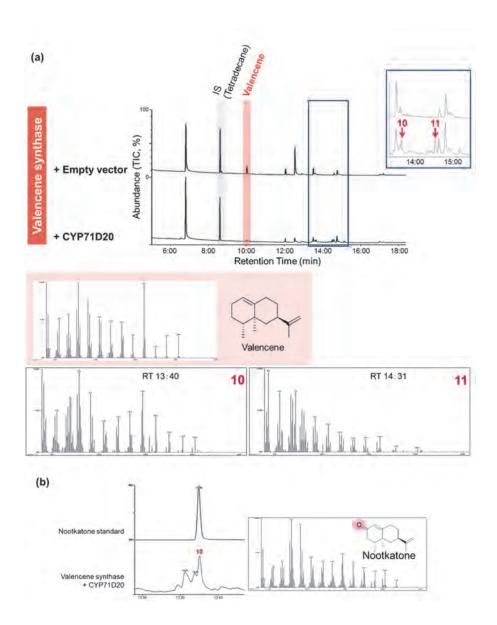


図3 (a) valencene synthaseおよびP450共発現酵母培養液の酢酸エチル抽出物のGC-MSクロマトグラム及び推定セスキテルペン酸化物のマスフラグメンテーションパターン。
(b) nootkatone標準品と推定セスキテルペン酸化物とのGC-MSクロマトグラムの比較およびnootkatone標準品のマスフラグメンテーションパターン。

シニンは現在、抗マラリア薬原料として極めて重要なものになっている。さらに、最近では抗がん薬原料としても期待されている。アルテミシニン生合成に特異的な生合成経路は、FDPがamorpha-4,11-diene synthase (ADS)と呼ばれるセスキテルペン合成酵素によって環化されamorpha-4,11-dieneが生成することから開始する。一方で、アルテミシニンを産生しないA. annua以外のヨモギ属植物については、化学的・分子遺伝学的知見が少ないのが現状である。そこで本研究ではアルテミシニン非産生ヨモギ属植物におけるADS相同遺伝子の有無とその酵素機能の解析を行った。

2-1) アルテミシニン非産生ヨモギ属植物からのADS相 同遺伝子断片の増幅と遺伝子構造解析

13種のアルテミシニン非産生ヨモギ属植物の葉から 調製したゲノムDNAを鋳型として、A. annuaのADS遺伝子の翻訳開始コドンと終結コドンの位置に相当す るプライマーを用いてPCRを行った。その結果、A. absinthium、A. kurramensis、A. maritimaから、ADS相同遺伝子の断片が増幅された(図4)。これらADS相同遺伝子のゲノム配列とA. annuaのcDNA配列を比較することで、それぞれのエキソン/イントロン構造を推定した。その結果、各相同遺伝子の推定エキソン配列はADS遺伝子に対して89%以上の同一性を示した(図5)。これらADS相同遺伝子のcDNAを単離した結果、ADS相同タンパクはADSタンパクに対して83~90%のアミノ

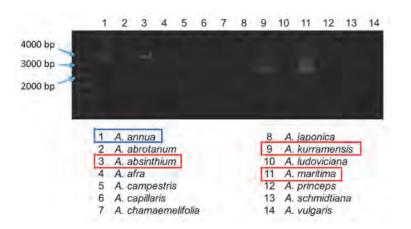


図4 ADS相同遺伝子ゲノム断片のPCR増幅

13種のアルテミシニン非産生ヨモギ属植物からのADS相同遺伝子断片の増幅を試みた。A. absinthium、A. kurramensis、A. maritimaからADS相同遺伝子断片が増幅された(レーン3、9および11)。A. annua(レーン1)はポジティブコントロールとして用いた。

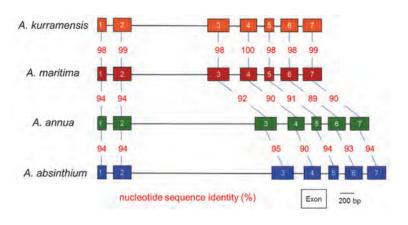


図5 ADS 遺伝子とADS相同遺伝子の構造比較

それぞれのADS相同遺伝子のエキソン(四角)とイントロン(直線)を推定し、模式的に示した。 各遺伝子間で対応するエキソンどうしの塩基配列同一性(%)を示した。

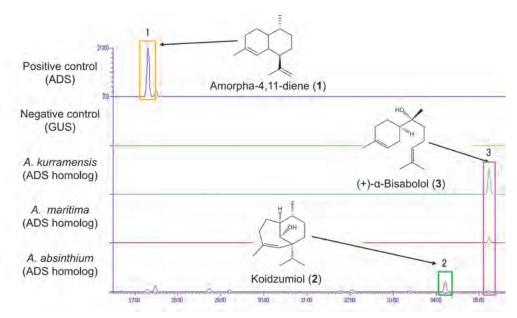


図6 ADS相同タンパクのインビトロ酵素活性試験反応生成物のGC-MS分析 セスキテルペン合成酵素の共通前駆物質であるFDPを基質として、各ADS相同タンパクの 精製リコンビナントタンパクを用いた酵素活性試験を行った。

酸配列同一性を示すことが判明した。

2-2) ADS相同タンパクの酵素機能解析

大腸菌発現系を用いて各ADS相同タンパクの精製リコンビナントタンパクを調製した。FDPを基質に用いてインビトロ酵素活性試験を行った。得られた反応生成物をGC-MSで解析した結果を図6に示す。ポジティブコントロールのA. annuaのADSの反応生成物からは予想どおりamorpha-4,11-dieneが検出された(peak1)。A. absinthiumのADS相同タンパクによる反応生成物からは、未知のセスキテルペノイド(peak2)が主生成物として検出された。また、すべてのADS相同タンパクによる反応生成物からa-bisabololと推定されるピークが検出された(peak3)。

得られた反応生成物を精製しNMRによる構造決定を行った結果、peak2をkoidzumiol、peak3をa-bisabololと同定した。a-bisabololにはエナンチオマーの(-)-a-bisabololと(+)-a-bisabololが存在することから、旋光度測定を行った。その結果、反応生成物の旋光度は+55.3°であり、(+)-a-bisabololであることが判明した(Muangphrom $et\ al.$, 2016)。Koidzumiolおよび(+)-a-bisabololを主生成物として与えるセスキテルペン合成酵素はいずれの植物種からも同定されておらず新規の酵素活性である。

【まとめ】

1) セスキテルペン合成酵素とP450の組み合わせによるセスキテルペノイド合成実験では、異種植物由来のセスキテルペン合成酵素とP450の組み合わせを酵母細胞内で生み出すことにより、複数の新規セスキテルペノイドと推定される化合物が検出され、組換え酵母を用いたセスキテルペノイドのコンビナトリアル生合成の実行可能性を示した。今後、構造未知化合物の構造決定が必要である。

2) ヨモギ属植物からの新規セスキテルペン合成酵素の同定では、アルテミシニン非産生ヨモギ属植物種から、A. annua におけるアルテミシニン生合成の鍵酵素であるADSの相同遺伝子を探索することにより、Koidzumiol合成酵素および(+)-a-bisabolol合成酵素といった新規セスキテルペン合成酵素を発見することに成功した。これらの新規酵素遺伝子を上記のセスキテルペノイドのコンビナトリアル生合成に利用することにより、得られる化合物の構造のバリエーションをさらに増やすことが可能である。

これらの手法を用いて生成した新規セスキテルペノイドについては、種々の生活性試験への展開が期待される。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益 財団法人 松籟科学技術振興財団に厚く御礼申し上げま す。

【成果発表】

- Muangphrom, P., <u>Seki, H.</u>, Suzuki, M., Komori, A., Nishiwaki, M., Mikawa, R., Fukushima, E.O. and Muranaka, T.: Functional analysis of amorpha-4,11-diene synthase (ADS) homologs from nonartemisinin-producing artemisia species: The discovery of novel koidzumiol and (+)-α-bisabolol synthases. *Plant Cell Physiol*. (in press)
- 2) Muangphrom, P., <u>Seki, H.</u>, Nishiwaki, M., Suzuki, M., Mikawa, R., Komori, A., Fukushima, E.O. and Muranaka, T.: Functional analysis of amorpha-4,11diene synthase homologs derived from artemisinin

- non-producing Artemisia species: the discovery of novel sesquiterpene synthases synthesizing koidzumiol and(+)-a-bisabolol. 第57回日本植物生理 学会大会(盛岡、2015年3月19日)
- 3) Muangphrom, P., Suzuki, M., <u>Seki, H.</u>, Fukushima, E.O. and Muranaka, T.: Functional analysis of orthologous artemisinic aldehyde Δ11(13)reductase reveals potential artemisinin-producing activity in non-artemisinin-producing *Artemisia* absinthium. Plant Biotechnol. 31(5): 483-491 (2014)
- 4) Muangphrom, P., Suzuki, M., <u>Seki, H.</u>, Komori, A., Fukushima, E. O. and Muranaka, T.: Functional analysis of double bond reductase 2 (DBR2) in *Artemisia absinthium*. 第55回日本植物生理学会大会(富山、2014年3月18日)

植物由来アコニチンアルカロイド類の合成研究

神戸大学 大学院工学研究科 岡野 健太郎

1. はじめに

多くのヘテロ原子を含む化合物には、有用な生物活性を示すものが数多く存在する。しかし、化学合成による供給が強く求められているにも関わらず、複雑な構造を有するために依然として合成困難である化合物も多い。今回、構造の類似した誘導体が数多く存在するアコニチン類を取り上げ、合成研究を行った。アコニチン(1)は、HesseらによりAconitum napellusから単離されたジテルペンアルカロイドである(Figure 1)。 1 1959年、Wiesnerらのグループにより平面構造が報告され、 2 1972年にBirnbaumがX線結晶構造解析により絶対立体配置を決定した。 3 1は、電位依存性ナトリウムチャネルを活性化することにより、強力な神経毒性を有することが報告されている。 4 構造上の特徴として、複雑かつ特異な炭素骨格上に多くの酸素官能基を有していることが挙げ

Figure 1 Aconitine family

られ、その特徴的な構造から多くの合成化学者の興味を引きつけているが、未だ全合成は達成されていない。これまでに多くのアコニチン類 5 が単離されているが、現在まで報告されているものは、Wiesnerらによるタラチサミン 6 、チャスマニン 7 、13-デスオキシデルフォニン 8 のラセミ全合成のみである。

2. 合成計画

複雑な縮環骨格を有するアコニチン(1)は、基本炭素 骨格を構築した四環性化合物2に対して、酸素官能基 を順次導入することで3を経由して合成可能であると 考えた(Scheme 1)。すなわち、最近報告されたBaran

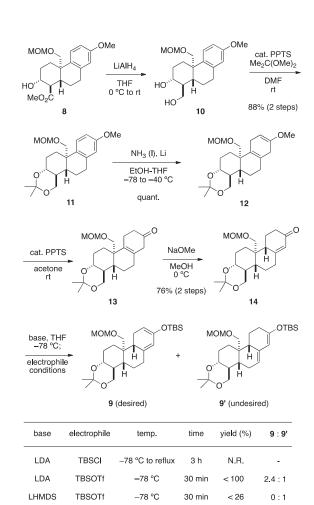
Scheme 1 Synthetic strategy for aconitine

やDongらの手法 9 を参考に、 2 の酸素原子を利用して、 3 C-H酸化を行うことで、二つのヒドロキシル基を導入できると期待した。また、窒素原子は、核間のアルコキシメチル基を利用して導入可能であると考えた。四環性化合物 2 は第 2 級アルコール誘導体 4 のWagner-Meerwein転位によって合成できると考えた。 4 は、シロキシジエン5と 2 2-クロロアクリロニトリル(6 6)との分子間Diels-Alder反応により 3 7とした後、官能基変換により得られると期待した。シロキシジエン5は、文献既知の 3 8-ヒドロキシエステル 3 10より数工程で誘導できると考えた。

3. 結果

3.1 Diels-Alder反応前駆体の合成

文献既知の方法により合成した8を出発原料として、 Diels-Alder反応を行うためのシロキシジエン9の合成を 行った(Scheme 2)。まず、 β -ヒドロキシエステル8を 還元した後、生じたジオール10をアセトニド11へと導い



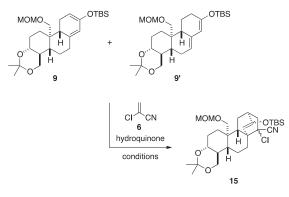
Scheme 2 Preparation of silyloxydiene for Diels-Alder reaction

た。Birch還元を行いメチルエノールエーテル12とした後、直ちに酸加水分解し β , γ -不飽和ケトン13を得た。塩基性条件下、二重結合を異性化させ、 α , β -不飽和ケトン14を合成した。次に、Diels-Alder反応の基質となるシロキシジエンへの変換を行った。エノン14に対して、LDAを作用させた後、TBSCIを加えたが望みの反応が進行しなかった。そこで、より強力な求電子剤であるTBSOTfを用いたところ、2.3:1の位置異性体混合物としてシロキシジエン9と9が得られた。次に、選択性の改善を目的とし、塩基としてLHMDSを用いたが、9'が得られるのみであった。なお、9は不安定であり、9'と分離が困難であったことから位置異性体の混合物のまま、次の変換を行うこととした。

3.2 Diels-Alder反応の検討

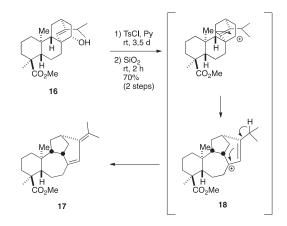
シロキシジエン9と9'の混合物を用いて、2-クロロアクリロニトリル(6)とのDiels-Alder反応を行った(Table 1)。まず、トルエン溶媒中 110° Cで反応を行ったところ、目的とする15が収率14%で得られた(entry 1)。次に、マイクロ波照射下反応を行ったところ、反応時間の短縮は見られたが収率は向上しなかった(entry 2)。また、無溶媒条件下反応を行ったところ、複雑な混合物を与えた(entry 3)。粗精製物の 1 H-NMRスペクトルを

 Table 1
 Diels-Alder reaction of siloxydiene and chloroacrylonitrile



entry	additive	solvent	temp. (°C)	time (h)	yield (%) ^{a)}
1	-	toluene	110 b)	64	14
2	-	toluene	110	1	11
3	=	-	110	2	complex mixture
4	NaHCO ₃	-	110	2	10
5	NaHCO ₃	-	60	2	33

a) 2 steps from **14**. b) MW (300 W).

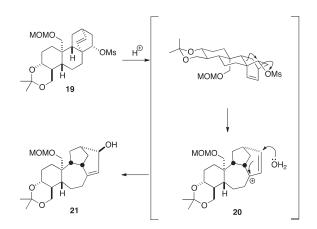


Scheme 3 Deshpande's previous report

解析したところ、アセトニドが除去されていることがわかった。そこで、反応系中を弱塩基性に保つために、炭酸水素ナトリウムを添加して反応を行ったが、目的の成績体の収率は向上しなかった(entry 4)。さらに、副反応を抑制するために、 60° Cで反応を行ったところ、2工程収率33%で15を合成することができた。なお、この成績体は(E)-アルケンのみであったが、便宜上、図のように表記している。

3.3 Wagner-Meerwein転位反応を利用する骨格構築

望みとする転位成績体を得るために、過去に報告されている転位反応に着目した。Deshpandeらは、第2級アルコール16をトシラートへと誘導後、シリカゲルを作用させると転位体17が得られることを報告している(Scheme 3)。¹¹この反応において、炭素-炭素結合の転位の後に生じるカチオンが第三級アリルカチオン18であることに着目した。すなわち、望みとする転位反応が進

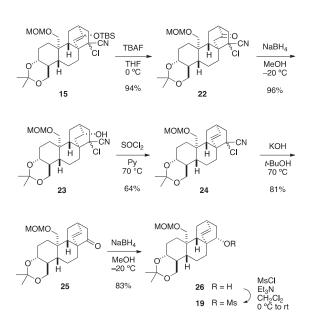


Scheme 4 Anticipated Wagner-Meerwein rearrangement

行するためには、転位後のカチオンの安定化が必要であると推測した。

そこで、内部アルケンを有する19を合成し転位反応を行えば、アリルカチオン中間体20を経由する望みの転位反応が進行すると考えた(Scheme 4)。また、転位後に生じるカルボカチオン20に、水が立体障害の小さい炭素原子に β 面から求核付加することで、アリルアルコール21が得られると期待した。

以上の考察より、転位反応を行うためのアルケン19を 合成した(Scheme 5)。Diels-Alder 反応の成績体15に対 しTBAFを作用させケトン22とした後、水素化ホウ素ナ トリウムによりβ面から立体選択的にカルボニル基を還 元し23を得た。なお、ヒドロキシル基の立化学は天然物 とは逆であったが、まずは骨格合成法の確立を目的と し、さらなる変換を行った。次に、第二級アルコール23 の脱水反応を試みた。はじめに、Burgess反応剤を用い る条件および光延条件を検討したところ、目的物は得 られなかった。一方、Martinスルフランを用いたとこ ろ、分離困難な副生生物とともに目的物24が得られた。 また、塩化チオニルとピリジンを用いて反応を行うと、 収率45%でアルケン24が得られた。さらに、反応温度を 70°Cに昇温し、短時間で反応を完結させることで収率 を64%まで向上させることができた。続いて、クロロニ トリル24の加水分解によりケトン25へと導いた。さら に、立体選択的なカルボニル基の還元により、第二級ア



Scheme 5 Preparation of mesylate for Wagner-Meerwein rearrangement

Scheme 6 Successful construction of aconitine skeleton

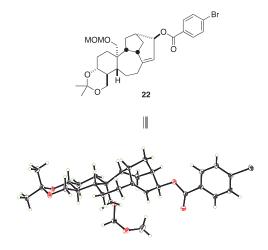


Figure 2 ORTEP diagram of 4-bromobenzoate 22

ルコール26を合成した。26のヒドロキシル基をメシル化 し、転位反応の基質19~導いた。

合成した内部アルケンを有する基質を用いて転位反応を行った(Scheme 6)。メシラート19に体して、酸性シリカゲルを作用させた。その結果、予期した通り望みとする転位反応と、生じたカルボカチオンに対する水の求核付加が進行し、四環性化合物21を単一の成績体として得ることができた。なお、21の構造はヒドロキシル基をカーブロモベンゾイル化した後、X線結晶構造解析により決定した(Figure 2)。

4. おわりに

基本炭素骨格を有する四環性化合物21は、分子間 Diels-Alder反応とWagner-Meerwein転位反応を鍵工程 として合成することができた。まず、文献既知の β -ヒドロキシエステル8から5工程の変換でエノン14を合成した後、対応するシロキシジエンへと変換し、2-クロロアクリロニトリル(6)との分子間Diels-Alder反応により15

を合成した。続いて、第二級アルコール16へと誘導後、ヒドロキシ基のメシル化と続くWagner-Meerwein転位 反応により四環性化合物21を単一の異性体として合成した。なお、詳細は割愛したが、望みの転位反応を進行させるためには、内部アルケンによるカルボカチオン中間 体の安定化が必須であることがわかった。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました、公益財団法人松籟科学技術振興財団に深く感謝申し上げます。

6. 参考論文

- (1) Geiger, P. L.; Hesse, O. *Annalen der Pharmacie* **1832**, *4*, 66–74.
- (2) Wiesner, K.; Götza, M.; Simmonsa, D. L.; Fowlera, L. R.; Bachelorb, F. W.; Brownb, R. F. C.; Büchib, G. Tetrahedron Lett. 1959, 1, 15–24.
- (3) Birnbaum, K. B. Acta Cryst. 1972, 28, 1551-1560.
- (4) Wang, S.Y.; Wang, G. K. Cell. Signal **2003**, 15, 151–159.
- (5) Wang, F.-P.; Chen, Q.-N.; Liu, X.-Y. Nat. Prod. Rep. 2010. 27, 529–570.
- (6) (a) Wiesner, K.; Tsai, T. Y. R.; Huber, K.; Bolton,
 S. E. J. Am. Chem. Soc. 1974, 96, 4990-4992. (b)
 Wiesner, K. Pure & Appl. Chem. 1975, 41, 93-112.
- (7) (a) Tsai, T. Y. R.; Connie, S. J.; Sy, W. W.; Shanbhag, M. N.; Liu, W. C.; Lee, S.-F.; Wiesner, K. *Heterocycles* 1977, 7, 217–226. (b) Lee, S.-F.; Sathe, G. M.; Sy, W. W.; Ho, P.-T.; Wiesner, K. *Can. J. Chem.* 1976, 54, 1039–1051.
- (8) (a) Wiesner, K.; Tsai, T. Y. R.; Nambiar, K. P. Can. J. Chem. 1978, 56, 1451-1454. (b) Wiesner, K. Pure & Appl. Chem. 1979, 51, 689-703.
- (9) (a) K. Chen, P. S. Baran, *Nature* 2009, 459, 824–828.
 (b) Y. Xu, G. Yan, Z. Ren, G. Dong, *Nat. Chem.* 2015, 7, 829–834.
- (10) Hutt, O. E.; Mander, L. N. J. Org. Chem. 2007, 72, 10130–10140.
- (11) Ayer, W. A.; Deshpande, P. D. Can. J. Chem. **1973**, 51, 77–86.

インドナガコショウ成分スクチホリアミドAの血管内皮賦活化 作用における新規標的受容体の同定と作用機構の解明

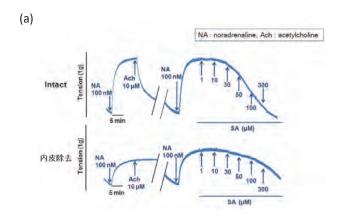
東北大学 大学院薬学研究科·細胞情報薬学分野 守屋 孝洋

1. 背景と目的

近年の過剰な冷暖房などにより、冷え性は罹患者が増加しており、社会的問題となっている。しかし、冷え性は西洋医学においては疾患という認識がされておらず、診断基準や治療法も確立されていない。人間はもともと恒温動物であるため、寒いところでも暑いところでも体温を一定に保つ機能が身体に備わっているが、冷え性は末梢の血流が十分に流れないことにより体温の調節機能が低下することで起こると考えられている。末梢の血液が十分に流れない原因として、自律神経の不調による血管の収縮、低血圧、血小板の凝集などが考えられる。

インドナガコショウはコショウ科の植物であり、古く より香辛料として広く利用されている。また、その果穂 の抽出物は冷え性に有効であるとされ、漢方やアーユル ヴェーダに用いられているだけでなく、近年は冷え性を 改善する健康食品としても国内で販売されている。イ ンドナガコショウにはピペリンなどの複数のピペリジン アルカロイドが成分として含まれることが知られている が、インドナガコショウ抽出物および、その成分である ピペロングミン(図1)が強力な血小板凝集抑制作用を 起こすことは本研究室で明らかになっており(Iwashita et al., 2007a; Iwashita et al., 2007b)、その他にも、ピペ ロングミンは粥状動脈硬化を抑制する作用(Son et al., 2012)、癌細胞に対する選択的な細胞毒性作用(Raj et al., 2012)など、多数の疾患に対して改善効果があるとの 報告もなされている(Kumar et al., 2010)。インドナガ コショウ中のどのような成分が、どのようなメカニズム で冷え性を改善しているのかについては全く明らかにさ れていない。

冷え性の原因は末梢血流の停滞とそれにともなう代謝 の低下であり、したがって「冷え」を解消するには末梢 血流障害を改善させることが有効であると思われる。と ころで血液循環器系を構成する細胞の一つであり、血管の内腔面を覆う血管内皮細胞は、血管弛緩作用をもつ一酸化窒素(NO)やプロスタサイクリンを分泌して血管の弛緩を引き起こすだけでなく、血管壁への炎症系細胞の接着、血管透過性、凝固・線溶系の調節などの多彩な血管調節機能を担い、その機能低下は冷え性だけでなく、高血圧や動脈硬化等を引き起こすことが知られている。



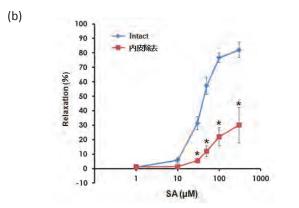


図1 ノルアドレナリン収縮に対するスクチホリア ミドAの弛緩作用と内皮細胞除去の影響 マグヌス装置を用いて100 nM ノルアドレナリ ンで収縮させた血管標本に、スクチホリアミ ドAを最終濃度1、10、30、50、100、300 μ Mで段階的に処理した。 (a) 代表的トレース. (b) 弛緩率. n=3-9. * p<0.05 vs. Intact (Tukey-Kramer's test)

そこで私たちはインドナガコショウ中に血管内皮細胞を活性化する物質が含まれているのではないかとの仮説をたて、血管内皮細胞の機能を賦活化する新規物質をインドナガコショウの果穂抽出物より探索したところ、メタノール粗抽出画分よりピペリジンアルカロイドであるスクチホリアミドAを同定した。すなわち、スクチホリアミドAは3 μMという比較的低濃度で内皮細胞依存的にラット大動脈血管を弛緩させることを見出した。しかしながら、スクチホリアミドAがどのような機序で内皮依存的な血管弛緩作用を惹起するのかについては明らかになっていなかった。そこで本研究では、スクチホリアミドAの内皮依存的な弛緩反応機序をラット大動脈標本を用いた血管収縮反応やヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いたin vitroの実験によって明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2-1 薬物および試薬

以下の薬物および試薬を用いた。スクチホリアミドAは、丸善製薬株式会社から提供されたものをジメチルスルフォキシド(dimethyl sulfoxide;DMSO)に溶解して用いた。DAF-2 DAは積水メディカル(型番:423727)より、Fluo 3-AMはDOJINDO(型番:121714-22-5)より、L-NAMEはSigma(型番:N5751)より購入した。GDPβ-Sは、和光純薬工業株式会社(型番:G7637-5MG)より購入した。その他の試薬については、市販の特級試薬あるいはこれに相当するものを用いた。

2-2. 実験動物

実験には雄性Wistarラット(8週令)(日本SLC)を用いた。全ての実験は日本薬理学会の動物実験指針に従い、東北大学動物実験専門委員会に承認された動物実験計画「課題名:天然物からの血液循環改善薬の探索およびその作用機序の解明に関する研究」(承認番号:2012薬動-2)、「課題名:血管に対する新規治療薬の開発基礎研究」(承認番号:2012薬動-6)に従って行った。

2-3. マグヌス装置を用いたラット胸部大動脈環状標本張力測定

イソフルラン吸入によって深く麻酔したラットより 胸部大動脈を摘出し、環状のまま3-4mmに切断して 環状標本を作製した。この標本を生理的栄養液である Krebs-Ringer液(120 mM NaCl、4.8 mM KCl、1.3 mM KH₂PO₄, 1.2 mM CaCl₂, 5.8 mM glucose, 25.2 mM NaHCO₃、pH 7.4) (37℃、95%O₂-5%CO₂混合ガス飽 和) 2.5 mlを満たしたマグヌス装置(いわしや岸本医科 産業株式会社)に懸垂し、その収縮力をトランスデュー サを介して圧アンプで増幅後、レコーダに記録した。 1gの静止張力をかけ、約30分後、張力が安定したとこ ろで、40 mM KClで3回収縮させ、コンディショニング をしてから実験を行った。薬物刺激は2.5 mlの生理的栄 養液を満たした装置内に、生理的栄養液で希釈した薬物 を添加するという方法で行った。薬物刺激後の薬物の wash outは2.5 mlの生理的栄養液で3回洗浄することで 行った。実験には、血管内皮細胞を竹串を用いて適度な 力でこすり落とすことによって内皮細胞を剥離した標本 も用いた。スクチホリアミドAは、設定した最終濃度と なるように6分間隔で蓄積的に添加した。弛緩率は、ノ ルアドレナリンによる収縮を分母に、化合物による弛緩 の度合をノルアドレナリンによる収縮で除し、さらにそ れを溶媒添加による弛緩の度合をノルアドレナリンによ る収縮で除したものを減ずることによって求めた。

2-4. 細胞培養

HUVECは、HuMedia-EG2(クラボウ)を培養液として用い、 CO_2 インキュベータ中 $(5\%CO_2, 37\%)$ にて培養した。継代は0.25%トリプシン-リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline;PBS) (-) (137 mM NaCl、 2.68 mM KCl、8.1 mM Na $_2$ HPO $_4$ 、1.47 mM KH $_2$ PO $_4$ 、pH 7.4)-EDTAを処理した後、ピペッティングによって細胞をはがし、遠心(1200 rpm、2 min)したものを培養液に懸濁し、Cellmatrix type I Cを用いてコラーゲンコートしたディッシュに播種するという方法で行った。

2-5. DAF-2 DAを用いたNO産生測定

150 mm dishに培養したHUVECを0.1% collagenase、1%BSA含有Tyrode buffer(137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.0 mM MgCl₂、1.8 mM CaCl₂、10 mM HEPES、5.6 mM glucose、pH 7.4)で処理し、浮遊細胞とした。遠心(1200 rpm、2 min)して細胞をTyrode bufferで2回洗浄し、最終濃度10 μMにTyrode bufferで調整したDAF-2 DA溶液2.5 mlに細胞を懸濁させた。37℃で20

分ローディングし、遠心(1200 rpm、2 min)して細胞 密度がHUVECは 3.0×10^4 cells/mlとなるようにTyrode bufferで調整した。薬物の希釈は最終濃度の100倍濃度 になるようにTyrode bufferで希釈した。反応は、細胞 浮遊液0.5 mlをスターラーを入れた5 mm角の石英セルに加え、蛍光分光光度計(日本分光FP6500)で測定を開始してから2分後にシリンジで薬物投与を行った。測定条件は、励起波長:495 nm(バンド幅5 nm)、蛍光波長:515 nm(バンド幅5 nm)、感度:Medium、レスポンス:0.5 sec、測定間隔:1 secで行った。

2-6. Fluo 3-AMを用いた細胞内Ca²⁺濃度測定

150 mm dishに培養したHUVECを0.1% collagenase、 1%BSA含有Tyrode buffer(137 mM NaCl、2.7 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 5.6 mM glucose、pH 7.4)で処理し、浮遊細胞とした。 遠心(1200 rpm、2 min)して細胞をTyrode bufferで2回 洗浄し、最終濃度4 μMにTyrode bufferで調整したFluo 3-AM溶液2.5 mlに細胞を懸濁させた。37℃で1時間ロー ディングし、遠心(1200 rpm、2 min)して細胞密度が HUVECは3.0×10⁴ cells/mlとなるようにTyrode buffer で調整した。薬物に希釈は最終濃度の100倍濃度にな るようにTyrode bufferで希釈した。反応は、細胞浮遊 液0.5 mlをスターラーを入れた5 mm角の石英セルに加 え、蛍光分光光度計(日本分光FP6500)で測定を開始し てから2分後にシリンジで薬物投与を行った。測定条件 は、励起波長:508 nm(バンド幅5 nm)、蛍光波長:527 nm(バンド幅5 nm)、感度: Medium、レスポンス: 0.5 sec、測定間隔:1 secで行った。

2-7. 細胞内cAMP量の測定

HUVECを 2×10^4 cells/mlで48 wellプレートに培養した。培養液をEMEM-20 mM HEPES(pH 7.4)300 μ L に置換し、37 $^{\circ}$ の恒温槽上で分間インキュベーションした。その後、100 μ M IBMXとEMEM-20 mM HEPES(pH 7.4)で最終濃度の10倍濃度に希釈した各薬物を加えて15分間反応させた後、培養液をアスピレートし、2.5%過塩素酸を170 μ L加えて反応を停止した。各wellより170 μ Lを回収し、4.2 N水酸化カリウムを15 μ L加えて中和して過塩素酸カリウムを沈殿させた。この上清を回収し、cAMP抽出液としてラジオイムノアッ

セイによる測定を行った。cAMPの測定は、サイクリッ クAMPキット「ヤマサ」を用い、そのプロトコールに 従って行った。cAMP抽出液15 μLとスクシニル化剤 15 µLを混合し、室温で10分間反応させた。10分後、イ ミダゾール緩衝液120 μLを加えて反応を停止した。ま た、cAMP標準液も同様にスクシニル化剤と混合し、 10分後にイミダゾール緩衝液を加え80 pmol/mLとし た。cAMP標準液は、希釈用緩衝液(水:スクシニル化 剤:イミダゾール緩衝液=1:1:8)を用いて希釈系列 (0.3125~80 pmol/mL)を作製した。サンプル、cAMP 標準液をそれぞれRIAチューブ(Cat# 2008、Becton Dickinson) に20 μLずつ分注した。また、総カウント・ ゼロ・ブランク標準液用に希釈用緩衝液を20 μLずつ分 注した。すべての試験管に [¹²⁵I] cAMPを20 μL加え た。総カウントとブランクにはイミダゾール緩衝液を20 μL加え、残りの試験管にはcAMP抗血清を20 μL加え た。よく撹拌して4℃にて24時間インキュベートした。 インキュベート後、総カウントには水を、残りの試験管 には分離用活性炭を100 µL加え、撹拌し、4℃にて10~ 30分間インキュベートした。1,500 x gにて遠心分離を行 い、上清を100 μ Lを新しい試験管にとり、 [125 I] の γ 線をAuto well gamma system(ARC300、Aloka)で測定 した。また、タンパク定量を行い、サンプル間のタンパ ク量の差異を補正した。

2-8. PCRアレイ

まず、HUVECからのtotal RNAの調製をRNeasy Mini Kit(QIAGEN、Ca# 74104)により行った。次に、得られたRNAサンプルの逆転写反応をRT² First Strand Kit(QIAGEN、Ca# 330401)により行った。RNAサンプル5 μLにBuffer GE 2 μL、RNase-free water 3 μLを加え、42℃で5分間反応させ、ゲノムDNAの除去を行った。その後、反応物に対して、5×Buffer BC3 4 μL、Control P2 1 μL、RE3 Reverse Transcriptase mix 2 μL、RNase-free water 3 μLを含むReverse-transcription mix 10 μを加えて、42℃で15分間、続いて95℃で5分間反応させた。その後、反応物20 μLに対してRNase-free water 91μL加えて、cDNAサンプルとした。cDNAサンプル102 μLに対して、RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix(QIAGEN、Ca# 330520)の2×RT² SYBR Green Mastermix 1350 μL、RNase-free

water 1248 µLを加えて、G Protein Coupled Receptors 384HT RT² Profiler PCR Array(QIAGEN)の各ウェルに25 µLずつ加えた。その後、リアルタイムPCR(95℃の反応を10分間行った後に、95℃で15秒間、60℃で1分間の反応を40サイクル)行った。

2-9. データ処理

実験結果については、平均値(mean) ± 標準誤差 (S.E.M.)で示した。有意差検定はTukey-Kramer's test、Student's t-test、Dunnett's testを用いて解析した (StatView® 5)。

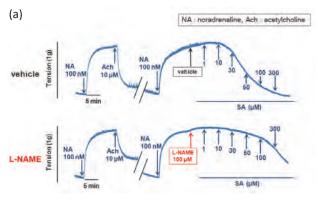
3. 実験結果

3-1. ノルアドレナリン収縮に対するスクチホリアミドAの弛緩作用と内皮細胞除去の影響

スクチホリアミドAが、交感神経伝達物質であるノルアドレナリンによる収縮に対してどのような作用を及ぼすのかを検討した。また、これらが血管内皮および血管平滑筋のどちらに作用しているのかを明らかにするため、血管内皮除去標本に対する血管拡張作用を検討した。スクチホリアミドAは、内皮細胞存在下で30 μ Mから300 μ Mにおいて濃度依存的に強い弛緩作用を示した(図1)。また、血管内皮細胞除去は、スクチホリアミドA 30 μ Mから300 μ Mによる血管弛緩作用を有意に抑制した(図1)。

3-2. スクチホリアミドAの弛緩作用に対する一化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬の影響

スクチホリアミドAは内皮細胞依存的に弛緩作用を示すことが明らかになった。内皮細胞からは血管平滑筋の弛緩を引き起こす複数の内皮由来弛緩因子(EDRF)が分泌されることが知られている。ガス状分子である一酸化窒素(NO)は、内皮細胞内のeNOSによって産生される代表的なEDRFであるが、スクチホリアミドAがNOの放出を介して弛緩反応を引き起こしているのかどうかを、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の阻害薬を用いて検討した。L-NAME (100 μ M) の前処理は、アセチルコリン刺激による弛緩作用を完全に抑制した(図2)。また、L-NAME (100 μ M) の前処理は、スクチホリアミドAの特に低濃度から中濃度域の弛緩作用を有意に抑制することが観察された(図2)。一方、スクチホリアミド



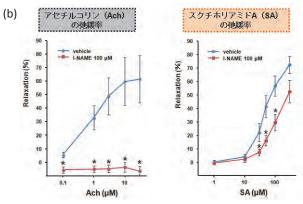


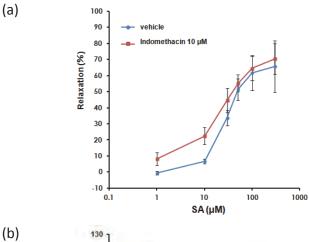
図2 スクチホリアミドAの弛緩作用に対する一酸化窒素 合成酵素阻害薬I-NAME前処置の影響

マグヌス装置を用いて100 nM ノルアドレナリンで 収縮させた血管標本に、1-NAMEあるいはその溶媒 を処置し、その6分後にスクチホリアミドAを最終 濃度1、10、30、50、100、300 μ Mで段階的に処理した。(a) 代表的トレース. (b) 弛緩率. n=3-7. *p<0.05 vs. vehicle (Tukey-Kramer's test)

Aの高濃度域における弛緩作用に対しては、L-NAME は弱い抑制作用しか示さなかった(図2)。スクチホリアミドAの高濃度域に対しては、L-NAMEの弛緩抑制作用が弱かったことから、アセチルコリンで同様の現象がみられるのかどうか検討した。内皮細胞存在条件下で、アセチルコリンの弛緩作用は低濃度域から高濃度域にわたり、L-NAMEによって完全に抑制されることが示唆された(図3)。

3-3. スクチホリアミドAの弛緩作用に対するインド メタシンおよびプロスタグランジンI₂受容体ア ンタゴニストの影響

血管内皮細胞からは、アラキドン酸カスケードによりプロスタグランジン I_2 (プロスタサイクリン)が産生され、これが血管平滑筋細胞膜上のプロスタグランジン I_2 受容体(IP)に作用して、血管の弛緩を惹起することが知



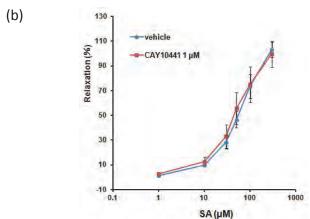


図3 スクチホリアミドAの弛緩作用に対するインドメタシンあるいはCAY10441前処置の影響

マグヌス装置を用いて100~nM ノルアドレナリンで 収縮させた血管標本に、インドメタシン (a) ある いはCAY10441 (b) を処置し、その6分後にスクチ ホリアミドAを最終濃度1、10、30、50、100、 $300~\mu$ Mで段階的に処理した。(a) 代表的トレース. (b) 弛緩率. n=3-5.

られている。ピペロングミンおよびスクチホリアミドAの弛緩作用にプロスタサイクリンのようなアラキドン代謝物が関与しているかどうかを明らかにするために、シクロオキシゲナーゼ(COX)阻害薬であるインドメタシンを用いて検討した。その結果、内皮細胞存在条件下で、COX阻害薬であるインドメタシン 10 μMの前処理は、スクチホリアミドAの弛緩作用に対してむしろ増強させる傾向にあったが、統計学的に有意差は認められなかった(図3)。

前述したように、血管内皮細胞からは、アラキドン酸カスケードによりプロスタグランジン I_2 (プロスタサイクリン)が産生され、これが血管平滑筋細胞膜上のプロスタグランジン I_2 受容体(IP)に作用して、血管の弛緩を惹起することが知られている。前実験から、スクチホリ

アミドAの弛緩作用にシクロオキシゲナーゼ(COX)は関与していないことが示唆された。そこで、下流にある血管平滑筋細胞膜上のプロスタグランジン I_2 受容体(IP)に作用しているかどうか、プロスタグランジン I_2 受容体(IP)阻害薬であるCAY10441を用いて検討した。内皮細胞存在条件下で、IP阻害薬であるCAY104411 μ Mの前処理は、スクチホリアミドAの弛緩作用に対して、抑制しないことが観察された(図3)。

3-4. アセチルコリンおよびスクチホリアミドAの弛緩作用に対する一酸化窒素(NO)-cGMP系阻害薬の効果

アセチルコリンは、血管内皮細胞膜上のアセチルコリン M_3 受容体に作用し、細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させ eNOSを活性化することで、内皮細胞からNOが産生され、NOが遊離して血管平滑筋に作用し、可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)と K^+ チャネルの活性化されて過分極が起こることで平滑筋が弛緩することが知られてい

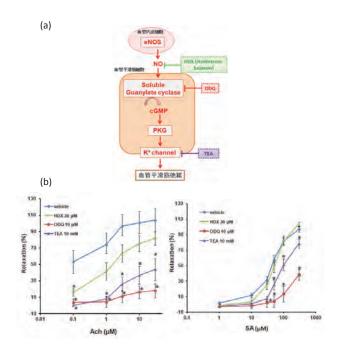


図4 アセチルコリンおよびスクチホリアミドAの弛緩作用 に対するNO-cGMP-PKG経路の阻害薬前処置の影響 マグヌス装置を用いて100 nM ノルアドレナリンで収 縮させた血管標本に、HDX (NOスカベンジャー) あるいはODQ (可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬)、TEA (K+チャネル阻害薬)、溶媒を処置し、その6分後にアセチルコリンあるいはスクチホリアミドAを蓄積的に添加した。(a) 各薬物の作用点. (b) 弛緩率. n=4-14. * p<0.05 vs. vehicle (Tukey-Kramer's test)

る。そこで、NOスカベンジャーのHDX、sGC阻害薬であるODQ、K⁺チャネルブロッカーであるTEAを用いて検討した。

まず、アセチルコリンによる弛緩作用は、ODQおよびTEAによって有意に抑制された。また、HDXによっては、抑制傾向がみられた(図4)。一方、ODQおよびTEAはスクチホリアミドAの弛緩作用を有意に抑制することが観察された。これより、NO-cGMP経路が弛緩作用に関与することが示唆された(図4)。

3-5. 血管内皮細胞(HUVEC)の一酸化窒素(NO) 産生に対するスクチホリアミドAの効果

前実験より、スクチホリアミドAが内皮細胞依存的に 一酸化窒素を産生していると考えられるので、血管内

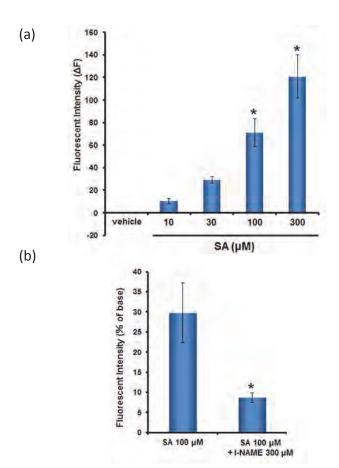


図5 血管内皮細胞内のNO産生に対するスクチホリアミ ドAの作用

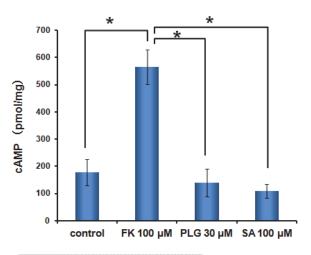
HUVECにDAF-2 DA($10~\mu$ M、37°C、20分)を取り込ませ、スクチホリアミドAを任意の濃度で刺激し、その際の蛍光強度変化を測定した。 (a) スクチホリアミドAの濃度依存性. n=3-6. *p<0.05 vs.0 (Tukey-Kramer's test) (b) l-NAME前処置の効果. n=3-4. *p<0.05 vs.vehicle (Student's t-test)

皮細胞からのNO産生に及ぼす影響を正常ヒト臍帯静脈 由来内皮株化細胞(HUVEC)を用いて検討した。また、 スクチホリアミドAのNO産生に対するNOS阻害薬、 L-NAME前処理の影響も検討した。

その結果、スクチホリアミドAは濃度依存的に細胞内のNO濃度を上昇させるおとが観察された(図5)。 したがって、NO産生が亢進することによって、血管拡張が引き起こされ弛緩作用があらわれることが示唆された。 さらに、スクホリアミドA $100~\mu$ Mの刺激は、L-NAME $300~\mu$ M前処理によって有意に減弱した(図5)。

3-6. 血管内皮細胞内cAMPレベルの測定

前項より、スクチホリアミドAが内皮細胞依存的に NOを放出し、それにはeNOSが関与していることが示唆された。eNOSの活性化にはいくつかの経路があるが、Gsタンパク質共役型受容体にスクチホリアミドAが作用し、内皮細胞内のcAMPレベルを上昇させることでeNOSが活性化する、cAMP-PKA経路の関与を検討した。その結果、ポジコンとして用いたアデニル酸シクラーゼ活性化薬のフォルスコリンは細胞内のcAMPレベ



FK:Forskolin PLG:ピペロングミン SA:スクチホリアミドA

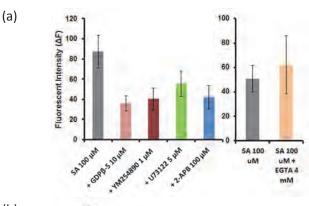
図 6 血管内皮細胞内cAMPレベルに対するスクチホリアミドAの作用

HUVECに、100 μ M IBMXとEMEM-20 mM HEPES (pH 7.4) で最終濃度の10倍濃度に希釈した各薬物を加えて15分間反応させた後、反応を停止した。各wellより回収した上清をcAMP抽出液としてラジオイムノアッセイによる測定を行った。 n=7-11. *p<0.05 vs. control (Tukey-Kramer's test)

ルを上昇させたものの、スクチホリアミドAおよびその 構造類縁体のピペロングミンはcAMPレベルに影響を与 えなかった(図6)。このことから、スクチホリアミドA はcAMP-PKA経路に影響を及ぼさないことが明らかに なった。

3-7. 血管内皮細胞の細胞内Ca²⁺濃度に対するスクチ ホリアミドAの影響

血管内皮細胞において、NO産生に不可欠なeNOSの活性化の機序として細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介することが知られている。 Ca^{2+} 濃度を上昇させる経路として、 $G_{q/11}$ タンパク質共役型受容体からのPLC- Ca^{2+} 系が知られている。そこで、血管内皮細胞へのスクチホリアミドA刺激によって細胞内の Ca^{2+} イオン濃度上昇が起こるか



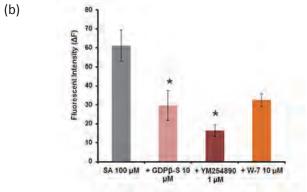


図7 スクチホリアミドAの内皮細胞の細胞内Ca²⁺濃度上 昇作用とNO産生における関与

(a) 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇。HUVEC細胞にFluo 3-AM (4 μ M、37 $^{\circ}$ C、1時間)を取り込ませ、各種阻害薬を前処理した後、スクチホリアミドA 100 μ Mで刺激した時の蛍光強度変化を平均値 \pm 標準誤差で示した。n=4-14. (b) NO産生における関与。HUVEC細胞にDAF-2 DA(10 μ M、37 $^{\circ}$ C、20分間)を取り込ませ、各種阻害薬を前処理した後、スクチホリアミドA 100 μ Mで刺激をした時の蛍光強度変化を平均値 \pm 標準誤差で示した。n=4-10. *p<0.05 vs. vehicle (Tukey-Kramer's test)

どうか検討した。その結果、スクチホリアミドAは内皮細胞において細胞内カルシウム濃度を一過性に上昇させることがわかった。また、このカルシウム応答は、Gタンパク質阻害薬のGDPG-S、GQタンパク質阻害薬のGM254890、ホスホリパーゼC阻害薬のGM254890、ホスホリパーゼC阻害薬のGM254890、ホスホリパーゼC阻害薬のGM254890、ホスホリパーゼC阻害薬のGM3122、GM3254890、ホスホリパーゼC阻害薬のGM3122、GM3254890、ホスホリアーゼC阻害薬のGM3354890、ホスホリアーゼC阻害薬のGM3364890、ホスホリアミドAはGM34890、したがって、スクチホリアミドAはGM364890、したがって、スクチホリアミドAはGM364890、したがった(図 G A)。したがって、スクチホリアミドAはGM36580の可能性が考えられた。

3-8. スクチホリアミドAによる血管内皮細胞内の Ca²⁺濃度上昇とNO産生の関与

前項より、スクチホリアミドAによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がNOレベルの上昇に関与しているのか、Gタンパク質阻害薬のGDP β -S、 G_q タンパク質阻害薬のYM254890、および、カルモジュリンアンタゴニストのW-7を用いて検討した。スクチホリアミドAによるNO産生は、これらの阻害薬によって有意に抑制された(図7b)。したがって、スクチホリアミドAによる内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、内皮細胞内NOレベルの上昇に関与している可能性が示唆された。

3-9. PCRアレイ法によるスクチホリアミドAの標的 受容体候補の探索

すでにHUVECの継代培養を5回以上繰り返すことにより、スクチホリアミドAのNO産生作用が消失することを確認しているが、これより継代によりスクチホリアミドAの標的受容体がダウンレギュレーションしている可能性が推察される。そこでスクチホリアミドA感受性の継代3回目の細胞と、非感受性の継代6回目の細胞よりそれぞれRNAを精製し、PCRアレイによってHUVEC特異的に発現しているGPCRをスクリーニングした。しかしながら、継代3回目の細胞と、非感受性の継代6回目の間で発現に差異のある遺伝子は検出されなかった(data not shown)。

4. 考察

本研究では、冷え性改善効果があるとされるインドナガコショウ抽出物の成分による血管弛緩作用を検討し、 さらにその作用機構を解明することを目的とした。

血管標本にインドナガコショウEtOH抽出成分である

スクチホリアミドAを濃度依存的に蓄積的に処理し、そ の血管弛緩作用を検討した結果、血管内皮細胞存在下 で濃度依存的に弛緩作用を示した。一方、血管内皮細 胞除去条件では、スクチホリアミドAにおいてその弛緩 作用が抑制されることが観察された。さらに、内皮細 胞存在条件のもと、一酸化窒素合成酵素阻害薬である L-NAMEを前処理してからアセチルコリンおよびスク チホリアミドAで刺激すると、アセチルコリンの作用は ほぼ抑制される一方、スクチホリアミドAの弛緩作用も L-NAMEによって部分的に抑制されたが、完全には抑 制されなかった。アゴニストに対するL-NAMEの相対 的な作用が弱いのかどうかを明らかにするために、様々 な濃度のアセチルコリンによる弛緩作用に対する効果を 調べたが、L-NAMEはアセチルコリンの低濃度域から 高濃度域にわたる弛緩作用を完全に抑制した。したがっ て、スクチホリアミドAは内皮細胞依存的に血管弛緩作 用を引き起こすのではないかと考えられるが、高濃度 域の弛緩作用に関しては、内皮細胞に作用するものの、 NO以外の経路を介した弛緩作用、または血管平滑筋に 直接作用して弛緩を引き起こす作用機構があるのではな いかと考えられた。

次に、スクチホリアミドAがどのようなメカニズムで 血管弛緩作用を引き起こすのかを探るために、血管内皮 由来弛緩物質として知られるプロスタグランジンIgの関 与を、COX阻害薬であるインドメタシンおよびプロス タグランジンI₂受容体の阻害薬であるCAY10441を用い て、これら2つの化合物の作用点を検討した。インドメ タシンを前処理してからスクチホリアミドAを蓄積的に 投与した結果、弛緩作用が全く抑制されず、逆に弛緩作 用が多少増強させる傾向にあった。また、CAY10441を 前処理してからスクチホリアミドAを蓄積的に投与して も、それらの弛緩作用は抑制されなかった。この結果か ら、スクチホリアミドAの弛緩作用に、プロスタグラン ジンI₂が関与していないことが示唆された。さらに、血 管平滑筋の弛緩作用に対して、血管内皮細胞で産生され た一酸化窒素(NO)が平滑筋に作用し、sGCを活性化し てcGMPレベルを上昇させK⁺チャネルを活性化すことで 過分極し、弛緩作用を引き起こすというNO-cGMP経路 に関与しているか検討した。その結果、ポジコンとして 用いたアセチルコリンと同様、スクチホリアミドAによ る弛緩作用も、この経路が関わっていることが示唆され た。これまでの結果から、スクチホリアミドAは、内皮細胞依存的に一酸化窒素を産生していると考えられる。内皮細胞からのNO産生にはeNOSが関与しており、内皮細胞で産生されたNOは血管平滑筋に作用してNO-cGMP系を活性化することで弛緩作用を引き起こすことが明らかとなった。スクチホリアミドAの標的受容体を同定するために、HUVECのピペロングミン反応性が継代数によって異なる点に着目し、PCRアレイ(GPCRシリーズ)によって発現に差異のあるGPCRを検索したが、残念ながら、有意な差のある遺伝子は見つからなかった。今後、HUVEC以外の内皮細胞を用いて、スクチホリアミドAの標的受容体を同定する必要がある。または、未知の細胞内受容体に作用している可能性もあわせて検討を重ねていく必要がある。

血管内皮細胞からの一酸化窒素産生には一酸化窒素 合成酵素(eNOS)の活性化が不可欠である。NO蛍光指 示薬であるDAF-2 DAを取り込ませた血管内皮細胞に スクチホリアミドAをそれぞれ刺激すると、蛍光強度が 濃度依存的に上昇することから細胞内のNO産生が亢進 していることがわかった。また、スクチホリアミドA共 に、NOS阻害薬であるL-NAMEを前処理するとNO産生 作用が抑制されることが明らかになった。これらのこと から、スクチホリアミドAは、内皮細胞において一酸化 窒素の生合成を促進し、一酸化窒素を内皮細胞から放出 することで血管平滑筋を弛緩させていると考えられる。 このNO放出までの細胞内シグナル経路を同定するため に、まずGタンパク質共役型受容体の可能性を検討し た。内皮細胞膜上にはいくつかの異なるGタンパク質共 役型受容体が存在するが、初めに細胞内のcAMPレベル を上昇させることでeNOSを活性化するGs共役型受容体 について検討した。しかし、スクチホリアミドAは細胞 内のcAMPレベルを上昇させなかったことから、Gsタン パク質共役型受容体からのcAMP-PKA経路は関与して いないと考えられる。次いで、スクチホリアミドAのG。 タンパク質共役型受容体に対する作用の可能性を検討し た。Ca²⁺蛍光指示薬であるFluo 3-AMを取り込ませた血 管内皮細胞にスクチホリアミドAで刺激すると、一過性 に細胞内のCa²⁺レベルが上昇した。また、この上昇作用 は、Gタンパク質阻害薬、ホスホリパーゼC、IP。受容体 阻害薬によって抑制され、Ca²⁺キレート剤であるEGTA によって抑制されなかったことから、スクチホリアミド Aによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は $PLC-Ca^{2+}$ 系が関与していることが示唆された。スクチホリアミドAによる血管弛緩作用は細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇によって引き起こされているかを検討した。 $NO蛍光指示薬であるDAF-2DAを血管内皮細胞に取り込ませ、スクチホリアミドA単独で刺激すると、細胞内の蛍光強度が上昇した。また、<math>PLC-Ca^{2+}$ 系に関わるGタンパク質阻害薬、カルモジュリンアンタゴニストW-7有意にNO産生が抑制されることがわかった。このことから、スクチホリアミドAは、細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、 $PLC-Ca^{2+}$ 系によりNO産生が亢進することが示唆された。

インドナガコショウは古くから伝承医学において用いられてきたが、今までにその血管に対する作用機構は明らかにされていなかった。本研究で、インドナガコショウEtOH抽出物が交感神経伝達物質であるノルアドレナリンの収縮に対して血管弛緩作用を示すことが見出された。この血管弛緩作用はインドナガコショウが冷え性を改善するメカニズムの一つであると考えられる。さらに、本研究では検討できなかったが、内皮障害に伴う高血圧症や動脈硬化に対するインドナガコショウ成分の有効性の検討もモデルマウス等を用いて検討していく必要がある。これらの研究を通して、未だに治療法が確立されていない冷え性の治療薬につながる可能性があると思われる。今後、さらなる検討を重ね、インドナガコショウにおける血管弛緩作用の詳細なメカニズムを究明するとともに、創薬に結び付けていきたい。

5. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご支援を賜りました 公益財団法人・松籟科学技術振興財団に心より感謝申し 上げます。

参考文献

Iwashita, M., Oka, N., Ohkubo, S., Saito, M., Nakahata, N. (2007a). Piperlongumine, a constituent of Piperlongum L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A_2 receptor antagonist. Eur J Pharmacol. 570, 38–42.

Iwashita, M., Saito, M., Yamaguchi, Y., Takagaki, R., Nakahata, N. (2007b). Inhibitory effect of ethanol extract of Piper longum L. on rabbit platelet aggregation through antagonizing thromboxane A_2 receptor. Biol Pharm Bull. 30, 1221–1225.

Kumar, S., Kamboj, J., Suman, and Sharma, S. (2010). Overview for various aspects of the health benefits of Piper longum linn. fruit. J Acupunct Meridian Stud 4, 134–140.

Raj, L., Ide, T., Gurkar, A.U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N.J., Golub, T.R., Carr, S.A., Shamji, A.F., Stern, A.M., Mandinova, A., Schreiber, S.L., and Lee, S.W. (2012). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. Nature 475, 231–234.

Son, D.J., Kim, S.Y., Han, S.S., Kim, C.W., Kumar, S., Park, B.S., Lee, S.E., Yun, Y.P., Jo, H., and Park, Y.H. (2012). Piperlongumine inhibits atherosclerotic plaque formation and vascular smooth muscle cell proliferation by suppressing PDGF receptor signaling. Biochem Biophys Res Commun 427, 349–354.

甜菜由来ペクチンを架橋剤として利用した 医療用ヒドロゲルの開発

鹿児島大学 大学院理工学研究科 武井 孝行

1. はじめに

近年、生体組織工学が脚光を浴びている。これは、細 胞を使ってヒトの生体組織を人工的に創り、それを種々 の難治性疾患治療に応用することを目的としている。ヒ ドロゲルは生体組織に近い物理特性を有していることか ら、細胞の増殖・機能発現の"場"として適している。こ のような背景から、生体組織工学分野において新規な 高性能のゲルの開発が切望されている。ヒドロゲルを調 製する場合、高分子を水に溶解し、その高分子同士を架 橋する必要がある。しかしながら、従来法では、高分子 の架橋にグルタルアルデヒドなどの毒性が高い化学架橋 剤や無機塩などが使用されており、そのような材料が細 胞や生体に与える悪影響が危惧される(1)。一方、これ までに我々は、水に溶解した甜菜由来ペクチンが、酵素 である西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)を触媒 とした酸化的重合反応により迅速に架橋し、ゲルを形成 することを見出している(2)。本法では、酸化剤として 毒性のある過酸化水素を使用しているものの、その使用 濃度は極めて低いため、細胞や生体への毒性は極めて低 い。また、過酸化水素自体が不安定であり、容易に水と 酸素に分解するため、仮に多少毒性があるとしても、そ れが持続することはない。この酸化反応により重合が起 こる甜菜由来ペクチンの官能基はフェルロイル基であ り、この官能基は同反応により、タンパク質中のアミノ 基やチロシン残基とも重合できる。これまで生体組織工 学分野においてヒドロゲル材料として使用されてきたタ ンパク質はアミノ基やチロシン残基を含む。したがっ て、我々は、同酵素反応を利用することで、甜菜由来ペ クチンが従来の毒性の高い化学架橋剤に代わる新たな高 分子架橋剤として利用できると考えた(図1)。そこで、 本研究ではゼラチンおよびアルカリ処理コラーゲンゲル

調製時の架橋剤としての甜菜由来ペクチンの有用性を評価した(3)。

2. 方法

ヒドロゲルの調製

ゼラチン(type A、シグマアルドリッチ社)および 甜菜由来ペクチン(フェルロイル基含有率:3.0×10⁻⁸ mol/mg、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社)をカルシ ウムイオンおよびマグネシウムイオン不含リン酸緩衝生 理食塩水(PBS)に溶解し、その水溶液にHRP水溶液お よび過酸化水素水を加え、撹拌した。なお、過酸化水素 水は最後に加え、3種の水溶液の混合体積比は8:1:1に固 定した。また、HRPと過酸化水素の最終濃度はそれぞ れ1 unit/mlおよび1 mMとした。ゲル化の確認には試験 管倒立法を用いた。

アルカリ処理コラーゲンゲルは以下の条件で調製し

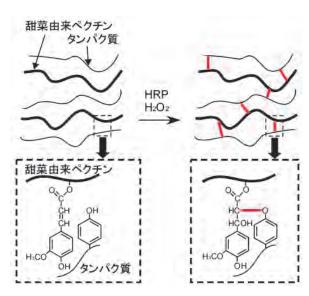


図1 予想される甜菜由来ペクチンと タンパク質との架橋機構

た。PBSにアルカリ処理コラーゲンおよび甜菜由来ペクチンを溶解し、その溶液とHRP水溶液および過酸化水素水を体積比で8:1:1の割合で混合した。

生体内分解特性

ゼラチン/甜菜由来ペクチン水溶液、HRP水溶液および過酸化水素水を混合後、注射器を用いて、その溶液 0.5 mlをウイスターラットの背部皮下に注入した。1週間後にゲル注入部を開き、ゲルの状態を観察した。

抗がん剤徐放材料としての応用

B16F1メラノーマ細胞をヌードマウス(BALB/cA Jcl-nu)の皮下に注入後、しばらく飼育を続けることで、体積360 mm^2 以上の腫瘍を作製した。抗がん剤であるドキソルビシンを溶解したゼラチン/甜菜由来ペクチン水溶液、HRP水溶液および過酸化水素水を混合後、その溶液0.1 mlを腫瘍に注入した(抗がん剤投与量:0.9 mg/匹)。腫瘍体積の変化を経時に測定した。

血管新生因子徐放材料としての可能性評価

濃度が1.5 mg/mlとなるようにシトクロムCを精製水に溶解し、0.01M水酸化ナトリウムを用いてそのpHを7.4に調整した。その水溶液内にアルカリ処理コラーゲン/甜菜由来ペクチンゲルを投入し37℃で振盪した。経時的に水溶液中のシトクロムC濃度を測定することで、ゲルへのシトクロムCの吸着量を算出した。

3. 結果と考察

ゼラチン/甜菜由来ペクチンゲル

これまでに我々は、HRPを触媒とした酸化的重合反応により、甜菜由来ペクチン水溶液が1分以内に迅速にゲル化することを示している(2)。このことは、本甜菜由来ペクチンゲルがインジェクタブルゲル(溶液状態で生体に注入した後にすぐに体内でゲル化するもの)として有用であることを示している。すでにゲル化したものを生体に埋植する従来法では埋植に切開手術が必要になるが、インジェクタブルゲルは注射器を使って生体に埋植できるため、患者の身体的負担の軽減につながる。そこでまずは、ゼラチン/甜菜由来ペクチンゲルのゲル化時間を調査することで、本ゲルがインジェクタブルゲルとして利用可能であるか評価した。図2に示すように、

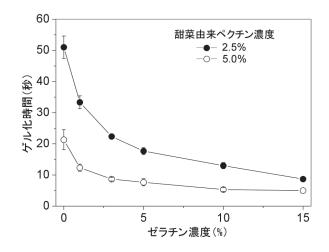


図2 高分子濃度とゲル化時間との関係

いずれの条件においても、過酸化水素水の添加後1分以内に迅速にゲル化した。この結果は、ゼラチン/甜菜由来ペクチンゲルがインジェクタブルゲルとして利用可能であることを示している。また、甜菜由来ペクチンを含まないゼラチン水溶液を同様の酸化処理することによって一時的にゲル化させることができたが、そのゼラチンのみのゲルを生体内温度 $(37^{\mathbb{C}})$ で静置したところ液化した(図3)。一方、ゼラチン/甜菜由来ペクチンゲルは、そのような液化は起こらなかった。このことは、甜菜由来ペクチンは架橋剤としてゲルの安定化に大きく寄与していることを示している。

ゼラチン/甜菜由来ペクチン水溶液にL929線維芽細胞をあらかじめ懸濁し、その水溶液を同酵素反応によりゲル化させた後に、ゲル内細胞の生存率をCellstain[®]試薬(同仁化学研究所)を用いて調査した。その結果、細胞生存率は98±1%であり、同ゲル化反応に大きな細胞毒性はなかった(図4)。

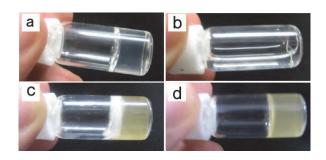


図3 酵素反応を利用して調製した15% (w/v)ゼラチン ゲル(a、b)および15% (w/v)ゼラチン/5% (w/v) 甜菜由来ペクチンゲル(c、d)の調製直後(a、c)お よび37℃で24時間静置した後(b、d)の状態

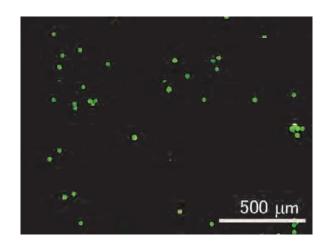


図4 15% (w/v)ゼラチン/5% (w/v)甜菜由来ペクチンゲル 内に包括した細胞の生存状態。赤色が死細胞、緑色が 生細胞を表す

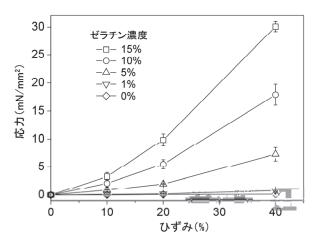


図5 ゼラチン/甜菜由来ペクチンゲルの強度。 甜菜由来ペクチン濃度は5%(w/v)に固定している

続いて、甜菜由来ペクチンの濃度を5%(w/v)に固定し、ゼラチン濃度を変えたゲルの強度をゲルの圧縮試験により求めた。その結果、ゼラチン濃度を変えることで、様々な強度のゲルを調製できることが分かった(図5)。生体組織工学分野においては、用途に応じてゲルに求められる強度は異なることから、強度の調整が可能な本ゲルの適用範囲は広いと期待する。

生体組織工学分野で使用されるゲルには、長期間生体内に残留し炎症反応を引き起こさないように、生体内で徐々に分解することが求められる。そこで、本検討では動物実験によりゲルの生体内分解性を調査した。15%(w/v)ゼラチン/5%(w/v)甜菜由来ペクチンゲルをラットに注入したところ、1週間後にはゲルが分解している様子を確認できた(図6)。

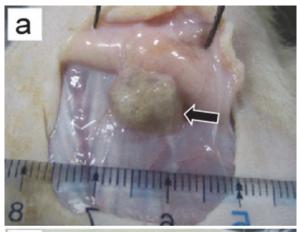




図6 ラット皮下に注入した15%(w/v)ゼラチン/5%(w/v) 甜菜由来ペクチンゲルの注入直後(a)および1週間後 (b)の状態

次に、抗がん剤徐放材料としての本ゲルの可能性を評価した。ドキソルビシン水溶液を腫瘍内に注入した条件は、ドキソルビシンを含まないゲルを注入した条件と同様に腫瘍の成長を抑えることはできなかった(図7)。これは、腫瘍内に注入したドキソルビシンがすぐに拡散

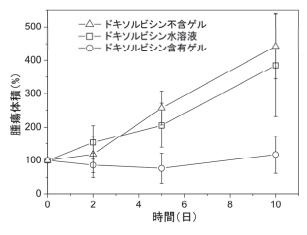


図7 ドキソルビシン含有15% (w/v)ゼラチン/5% (w/v) 甜菜由来ペクチンゲルの腫瘍成長抑制効果

し、長期間、腫瘍内ドキソルビシン濃度を高く保てなかったためであると考えられる。一方、ドキソルビシンを含むゲルを注入した条件では、腫瘍の成長を抑えることができた。この結果は、ゼラチン/甜菜由来ペクチンゲルが抗がん剤等の薬剤の徐放性を有していることを示している。

アルカリ処理コラーゲン/甜菜由来ペクチンゲル

本ゲルにおいても、ゲル化時間を調査することで、インジェクタブルゲルとして利用可能であるか評価した。なお、甜菜由来ペクチンおよびアルカリ処理コラーゲンの最終濃度をそれぞれ3.0%(w/v)および0.5%(w/v)に固定し、HRPおよび過酸化水素濃度がゲル化時間に及ぼす影響を調査した。その結果、適切なHRPおよび過酸化水素濃度を選定することで過酸化水素水の添加後1分以内に迅速にゲル化させることができた(図8)。この結果は、本ゲルもインジェクタブルゲルとして利用可能であることを示している。

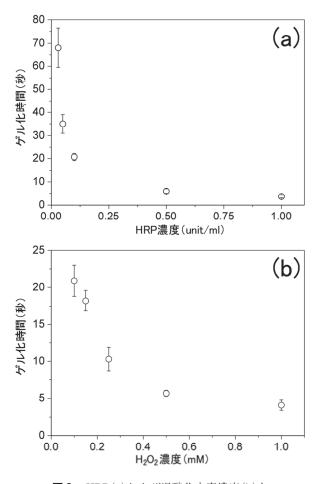


図8 HRP(a)および過酸化水素濃度(b)と ゲル化時間との関係

我々は以前、化学架橋剤であるグルタルアルデヒドを 用いてアルカリ処理コラーゲンゲルを調製し、そのゲル が、生体内で血管新生を促進するタンパク質である塩基 性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の徐放担体として有用で あることを示している(4)。アルカリ処理コラーゲンゲ ルがbFGFの徐放担体として機能する理由は以下のとお りである。アルカリ処理コラーゲンの等電点は5.0付近 である。一方、bFGFの等電点では9.6である。したがっ て、中性の水環境下において、アルカリ処理コラーゲ ンおよびbFGFはそれぞれマイナスおよびプラスに帯電 するため、bFGFはそのゲルに静電的に吸着する。その bFGF含有アルカリ処理コラーゲンゲルを生体に移植す ると、生体内に存在するコラーゲン加水分解酵素により コラーゲン分子が徐々に分解され、その分子断片がゲル より放出される。その際、bFGFもそのコラーゲン分子 断片に吸着した状態で徐々に放出される。このように、 アルカリ処理コラーゲンゲルがbFGFの徐放担体として 機能する主要原理は、生体内と同じ中性の水環境下にお いて、bFGFがコラーゲンゲルに静電的に吸着すること にある。そこで、本検討では同じ中性環境下において、 bFGFがアルカリ処理コラーゲン/甜菜由来ペクチンゲ ルに静電的に吸着するかを調査することにより、本ゲル のbFGFの徐放担体としての可能性を評価した。なお、 実際に使用するbFGFの量は極めて少なく(数µgから数 百ngのオーダー)、かつbFGFは容易に変性することか ら、正確な定量が極めて困難であるため、そのモデル タンパク質として等電点ならびに分子量がbFGF(等電 点:9.6、分子量:約180 kDa)に近いウシ由来シトクロ

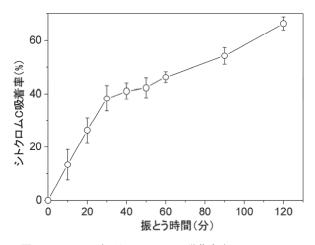


図9 アルカリ処理コラーゲン/甜菜由来ペクチンゲル へのシトクロムCの吸着挙動

ムC(等電点:9.6、分子量:約120 kDa)を採用した。図 9にゲルへのシトクロムCの吸着挙動を示す。中性の水環境下においてシトクロムCはゲルに吸着した。以上より、本ゲルはbFGFの徐放担体として有望であることが示唆された。

4. まとめ

本研究では、甜菜由来ペクチンがゼラチンおよびアルカリ処理コラーゲンゲル調製時の架橋剤として有用であることを示した。また、それらゲルの応用展開についても検討した。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人 松籟科学技術振興財団に心より御礼申し上げます。甜菜由来ペクチンをご提供頂いた三栄源エフ・エフ・アイ株式会社に心より御礼申し上げます。

6. 参考論文

- Nikonorov V. V., Ivanov R. V., Kil'deeva N. R., Bulatnikova L. N., Lozinskii V.I., Synthesis and characteristics of cryogels of chitosan crosslinked by glutaric aldehyde, Polym. Sci. Ser. A, 52:828–834 (2010)
- Takei T., Sugihara K., Ijima H., Kawakami K., In situ gellable sugar beet pectin via enzyme-catalyzed coupling reaction of feruloyl groups for biomedical applications, J. Biosci. Bioeng., 112:491–494 (2011)
- 福本 晃平, 吉冨 滉生, 武井 孝行, 大角 義浩, 吉田 昌 弘, 酵素反応を利用したアルカリ処理コラーゲン/ 甜菜由来ペクチン複合ゲルの作製, 科学・技術研究 4:173-176 (2015)
- Takei T., Yoshitomi H., Yoshida M., Alkali-treated collagen hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor for enhanced angiogenesis, J. Chem. Eng. Jpn., 47:424-428 (2014)

微細藻類バイオマスの高度利用を目指したビタミンBp代謝工学

首都大学東京 大学院理工学研究科 得平 茂樹

1. はじめに

光合成効率の高い微細藻類は、植物に替わる新たなバ イオマス資源として注目されている。その中でも増殖 が早く、大量培養が容易な藍藻スピルリナ(Arthrospira (Spirulina) platensis)は、実用化に最も近い微細藻類で ある(図1)。スピルリナはアフリカや中南米の低緯度地 帯のアルカリ性塩湖に棲息する藍藻で、現地の人々の食 料源として利用されてきた。タンパク質含量が高く、 様々な栄養素を含むスピルリナは、新しい食材として期 待されている(1)。また、スピルリナはデンプンを大量 に細胞内に蓄積することも知られている。スピルリナデ ンプンを原料としたバイオ燃料(エタノール)生産量は、 乾燥重量当たりでトウモロコシに匹敵することが報告 されている(2)。トウモロコシを原料としたバイオエタ ノール生産が実用化されていることを考えると、スピル リナバイオマスの生産コストをトウモロコシ並みに低減 することができれば、バイオマス資源としての利用が実 現すると期待できる。窒素源が制限された条件で培養さ

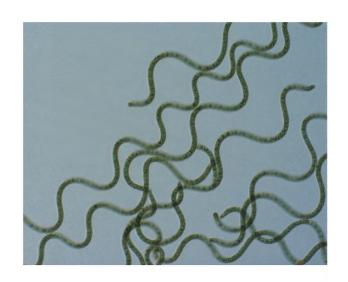


図1 藍藻スピルリナ(*Arthrospira platensis* NIES-39)

れたスピルリナは、乾燥重量のおよそ7割におよぶデンプンを細胞内に蓄積する(3)。したがって、スピルリナバイオマスの7割は発酵原料としてバイオエタノールなどの有用物質の生産に利用することができる。しかし、残りの3割のバイオマスの利用価値が低いことが、生産コストを高める原因となっている。

スピルリナは様々なビタミンなどの栄養素を多く含む ため、その粉末は栄養補助食品として、あるいは飼料な どの添加物として利用されている。特に、ビタミンBio の生産能力が高いことが知られており、スピルリナのビ タミンB₁₂含有量は動物性食品よりも高いことが知られ ている(4)。ビタミンB₁₂は、その欠乏により悪性貧血を 引き起こす必須栄養素の一つであり、医薬品、栄養補助 食品そして化粧品などに広く利用されている。ビタミン Bipは一部の限られたバクテリアのみが合成できるビタ ミンであり、通常ヒトは食物連鎖の中で蓄積したビタミ ンBioを肉や卵などの動物性食品から摂取している。ス ピルリナはビタミンB₁₂含有量が非常に高いため、ビタ ミンB₁₂の供給源として期待されてきたが、近年の研究 によりスピルリナの合成するビタミンB₁₂は、バクテリ アは利用できるが動物は利用することができない形のも の(偽ビタミン B_{12})であることが明らかとなった(5)。偽 ビタミンB₁₂とビタミンB₁₂の違いは、下部リガンドと呼 ばれる部分に結合する化合物の違いのみである。ビタ ミンB₁₂では5,6-dimethylbenzimidazole(DMB)が結合し ているのに対し、偽ビタミンB₁₂ではアデニンが結合し ている。下部リガンドを結合する酵素は、DMBとアデ ニンの両方を基質とすることが知られており、細胞内 のDMBの有無により、最終的に合成されるビタミンB₁₂ に違いが生じる(6)。スピルリナArthrospira platensis NIES-39のゲノム解析の結果、スピルリナにはDMBを 合成する酵素をコードする遺伝子が存在していないこと

が明らかとなった(7)。したがって、他のバクテリアから取得したDMB合成遺伝子をスピルリナに導入することができれば、スピルリナがもともと持つ高い偽ビタミンB₁₂合成能を利用して、ビタミンB₁₂を大量生産させることが可能になると考えられる。バイオエタノール生産に利用したスピルリナバイオマスの残渣を、家畜飼料としてあるいはビタミンB₁₂精製の原料として利用することで、スピルリナバイオマスの高度利用が実現可能となる。しかし、スピルリナへの遺伝子導入技術は確立されておらず、DMB合成遺伝子をスピルリナに導入することが難しいのが現状である。本研究では、この問題点を解決し、スピルリナバイオマスの高度利用を実現するため、スピルリナへの遺伝子導入技術の開発に取り組んだ。

2. 方法

本研究では、藍藻Arthrospira platensis NIES-39株を 実験材料として用いた。A. platensis NIES-39株の培養 は、30℃、30µmol photon/ m²/ secの白色光の連続照射 の下、SOT培地を用いて行った(8)。A. platensis NIES-39株の11個のメチル化酵素遺伝子の大腸菌用発現ベク ターへのクローニングは、以下のように行った。各メ チル化酵素遺伝子は、A. platensis NIES-39株のゲノ ムDNAを鋳型として、PCR法により増幅した。PCRに は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio)を 用いた。クローニングには、アラビノース誘導型プロ モーターを持たせたpACYC184とコールドショック発現 系プラスミドpCold II (Takara Bio)の2種類のプラスミ ドを用いた。クローニングの宿主には、全ての制限修 飾系とメチル化酵素DamおよびDcmを欠損させた大腸 菌HST04株 (Takara Bio)を用いた。プラスミドの精製 は、NucleoSpin Plasmid EasyPure (Takara Bio)を用い て行い、制限酵素はTakara Bio、New England Biolabs およびThermo Scientificから購入したものを用いた。

3. 結果と考察

3.1 スピルリナの制限修飾系

スピルリナは応用利用への期待から、数十年前からその遺伝子導入技術の開発が国内外の複数のグループにより進められてきた。しかし、形質転換に成功したという報告は限られ、いまだに安定した遺伝子導入技術は確立

表1 Arthrospira platensis NIES-39株のもつII型制限酵素

遺伝子番号	類似した制限酵素とその 認識配列		メチル化 酵素遺伝 子番号
A0353	BsaHI (Hin1I)	GRCGYC	A0354
A0582	SacII	CCGCGG	A0583
A0893	BsiWI	CGTACG	A0892
B0021	SnaBI	TACGTA	B0020
J0297	BspT107I	GGYRCC	J0296
K0404	Bpu10I	CCTNAGC	K0403
K0464	PstI	CTGCAG	K0465
L0170	NspI	RCATGY	L0171
O0259	AgeI	ACCGGT	O0260
Q0119	NsiI (EcoT22I)	ATGCAT	Q0118
Q0245	Bsp119I (NspV)	TTCGAA	Q0244

していない。多くのバクテリアの形質転換において問題になるのは、外部から進入したDNAを分解する制限修飾系の存在である(9)。藍藻においても、制限酵素によるDNAの分解が形質転換効率を低下させることが報告されている(10)。我々はArthrospira platensis NIES-39株のゲノム解析の結果から、スピルリナに11個のII型の制限酵素遺伝子が存在し、非常に発達した制限修飾系を持つことを明らかにした(表1)。また、全ての制限酵素遺伝子に対して、それぞれがコードする制限酵素が認識する配列をメチル化すると考えられるメチル化酵素遺伝子が隣接して存在していた。

3.2 大腸菌を用いたスピルリナ型メチル化DNAの作製

ゲノム解析の結果から、スピルリナは多くの制限酵素

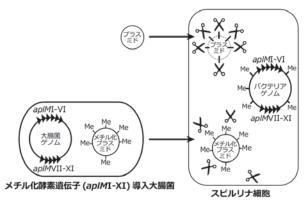


図2 スピルリナ型メチル化DNAを用いた 形質転換法の開発

を持っており、それらが外部からのDNAの侵入を妨げていると考えられた。しかし、例え外部から導入されたDNAであっても、スピルリナと同様のパターンでメチル化されたDNAは、スピルリナ内で自己のDNAと認識されるため制限酵素による分解を受けない。そこで、11個のメチル化酵素遺伝子を全て大腸菌に導入し、スピ

ルリナ型にDNAをメチル化する大腸菌の作製を目指した(図2)。この大腸菌から調整したプラスミドを用いてスピルリナの形質転換を行うことで、スピルリナ細胞内でのDNAの分解を防ぐことができると期待できる。まず、11個のメチル化酵素遺伝子が大腸菌内で発現・機能するのかを確かめるため、それぞれの遺伝子を導入した

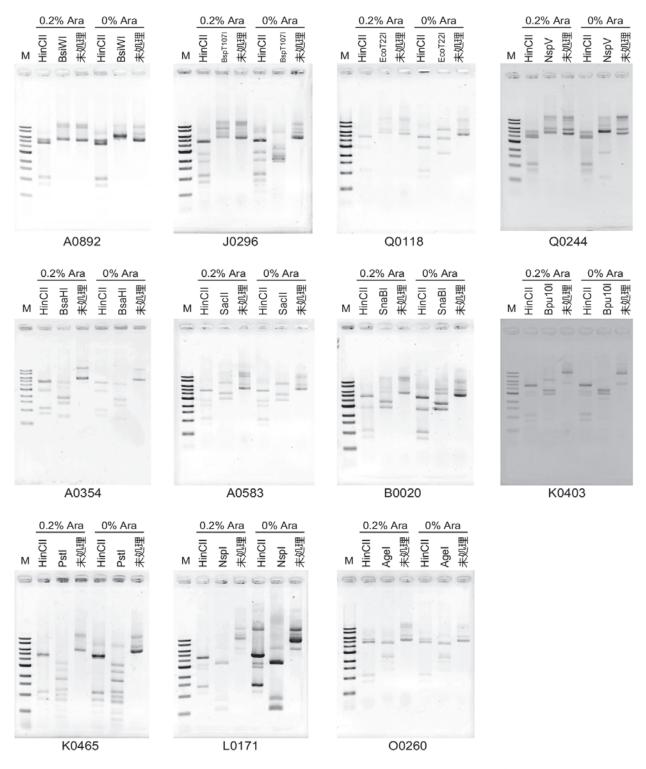


図3 メチル化酵素を発現させた大腸菌内でのDNAのメチル化

大腸菌を作製した。アラビノース誘導型のプロモーター から各メチル化酵素を発現する大腸菌からプラスミドを 精製し、制限酵素による切断から保護されるかを評価し た。その結果、A0892、J0296、Q0118およびQ0244を発 現させた大腸菌から調整したプラスミドでは、アラビ ノース存在下でそれぞれ対応する制限酵素による切断か らプラスミドが保護された(図3)。アラビノース非存在 下では切断されたことから、メチル化酵素が発現するこ とでプラスミドがメチル化され、制限酵素による切断を 受けなくなったことが分かる。しかし、その他の7個の メチル化酵素を発現させた大腸菌から精製したプラスミ ドでは、制限酵素による切断からの保護は見られなかっ た(図3)。アラビノース誘導型のプロモーターからのメ チル化酵素の発現に問題があった可能性を考え、次にこ れら7個のメチル化酵素をコールドショック発現系で発 現する大腸菌を作製した。その結果、さらに2個のメチ ル化酵素(A0354、K0465)を発現させた大腸菌から調整 したプラスミドにおいて、制限酵素による切断からの保 護が見られた。

以上のように、大腸菌においてスピルリナのメチル化酵素を発現させることで、制限酵素による切断からDNAを保護することができることが示された。しかし、スピルリナにある11個のメチル化酵素のうち5個に関しては、制限酵素による切断からの保護が見られなかった。実際にメチル化酵素が認識する配列と切断に用いた制限酵素が異なっている可能性はあるが、メチル化酵素を大腸菌内で充分量発現させることができなかったことが原因と考えている。メチル化酵素を誘導した大腸菌の総タンパク質をSDS-PAGEで分離し、CBB染色により可視化したが、メチル化酵素の大きさに相当する位置に誘導タンパク質を確認することができなかった。何らかの理由により大腸菌内でメチル化酵素が発現しにくいのか、あるいは速やかに分解されてしまっていると考えられる。

3.3 電気穿孔法によるスピルリナへの遺伝子導入条件 の検討

電気穿孔法とは、細胞懸濁液に電気パルスをかけることで細胞膜に微小な穴を開け、その穴からDNAを細胞内部に送りこむことによりDNAを導入する方法である。電気穿孔法は、バクテリアから動物細胞まで非常に

幅広い細胞に適用可能であることから、スピルリナにお いてもまず本方法による遺伝子導入を試みた。電気穿孔 法においては、用いる細胞懸濁液に塩が含まれると電流 が流れ過ぎ、細胞が死んでしまう。スピルリナの培養 に用いるSOT培地は高濃度のNa⁺イオンを含むため、ま ず塩の除去のための洗浄方法を検討した。SOT培地で 培養したスピルリナを遠心により集め、水および10%グ リセロールで1回あるいは3回洗浄した後、SOT寒天培 地に塗布した。その結果、全ての条件でスピルリナ細胞 が死んでしまっていた。洗浄過程での急激な塩濃度の変 化が原因ではないかと考えられた。そこで、培養時の塩 濃度を下げるために、淡水性のシアノバクテリアの培養 に用いられるBG-11培地での培養を試みた(11)。スピル リナはBG-11培地でも増殖が可能であったため、BG-11 培地で培養したスピルリナを実験に用いることにした。 BG-11培地で培養したスピルリナを10%グリセロール で1回洗浄した後、SOTおよびBG-11寒天培地に塗布し た。その結果、BG-11寒天培地上では細胞の増殖が観察 された。したがって、スピルリナを塩濃度の低いBG-11 培地を用いて培養することで、電気穿孔法による遺伝子 導入に必要な塩を除去した細胞懸濁液を調整することが 可能であることが示された。

4. まとめと今後の展望

本研究により、大腸菌内でスピルリナのメチル化酵素 を発現させ、DNAをメチル化することが可能であるこ とが示された。メチル化されたDNAは予想通り、制限 酵素による切断から保護されることも示された。大腸 菌内でスピルリナ型にメチル化したDNAを用いること で、スピルリナ細胞内において制限酵素による切断を受 けなくなると期待できる。今後は、スピルリナの持つ全 てのメチル化酵素遺伝子を導入した大腸菌を作製し、ス ピルリナ型にメチル化されたDNAを取得する。また、 電気穿孔法による遺伝子導入の条件検討を行い、電気穿 孔法に用いる細胞懸濁液の調整方法を確立した。本研究 で確立した方法で調整した細胞懸濁液に上記のスピル リナ型にメチル化されたDNAを混ぜ、電気パルスをか けることで、スピルリナにDNAを導入することができ ると期待している。また、DNAを導入する方法として は、電気穿孔法だけでなく大腸菌による接合法を試す。 Anabaena sp. PCC 7120などの一部のシアノバクテリア

では、大腸菌の接合能を利用した遺伝子導入法が確立されている。大腸菌内でメチル化したDNAを直接大腸菌による接合伝達により、シアノバクテリアに導入する。接合による遺伝子導入法は、制限酵素を多くもつシアノバクテリアで特に有効であることが示されている。スピルリナにおける接合法の有効性も検証していきたい。

5. 謝辞

本研究に対してご支援をいただきました公益財団法人 松籟科学技術振興財団および関係者の皆様に感謝申し上 げます。

6. 参考論文

- Ohmori M, Ehira S. 2014. Spirulina: an example of cyanobacteria as nutraceuticals, p. 103–118. In Cyanobacteria. John Wiley & Sons, Ltd.
- Aikawa S, Joseph A, Yamada R, Izumi Y, Yamagishi T, Matsuda F, Kawai H, Chang J-S, Hasunuma T, Kondo A. 2013. Direct conversion of Spirulina to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. Energy Environ. Sci. 6:1844.
- Aikawa S, Izumi Y, Matsuda F, Hasunuma T, Chang J-S, Kondo A. 2012. Synergistic enhancement of glycogen production in Arthrospira platensis by optimization of light intensity and nitrate supply. Bioresour. Technol. 108:211-5.
- Watanabe F, Takenaka S, Kittaka-Katsura H, Ebara S, Miyamoto E. 2002. Characterization and bioavailability of vitamin B₁₂-compounds from edible algae. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 48:325-31.
- 5. Watanabe F. 2007. Vitamin B₁₂ sources and

- bioavailability. Exp. Biol. Med. (Maywood). **232**:1266-74.
- Anderson PJ, Lango J, Carkeet C, Britten A, Kräutler B, Hammock BD, Roth JR. 2008. One pathway can incorporate either adenine or dimethylbenzimidazole as an alpha-axial ligand of B₁₂ cofactors in *Salmonella enterica*. J. Bacteriol. 190:1160-71.
- Fujisawa T, Narikawa R, Okamoto S, Ehira S, Yoshimura H, Suzuki I, Masuda T, Mochimaru M, Takaichi S, Awai K, Sekine M, Horikawa H, Yashiro I, Omata S, Takarada H, Katano Y, Kosugi H, Tanikawa S, Ohmori K, Sato N, Ikeuchi M, Fujita N, Ohmori M. 2010. Genomic structure of an economically important cyanobacterium, Arthrospira (Spirulina) platensis NIES-39. DNA Res. 17:85-103.
- Ogawa T, Terui G. 1970. Studies on the growth of Spirulina platensis. J Ferment Technol 48:361–367.
- Yasui K, Kano Y, Tanaka K, Watanabe K, Shimizu-Kadota M, Yoshikawa H, Suzuki T. 2009. Improvement of bacterial transformation efficiency using plasmid artificial modification. Nucleic Acids Res. 37:e3.
- Elhai J, Vepritskiy A, Muro-Pastor AM, Flores E, Wolk CP. 1997. Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J. Bacteriol. 179:1998-2005.
- 11. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. **111**:1-61.

紙と紙抄き技術の応用によるフレキシブル電子デバイスの創製

大阪大学 産業科学研究所 セルロースナノファイバー材料分野 古賀 大尚

Fast, Scalable, and Eco-Friendly Fabrication of Energy Storage Paper Electrode

Hirotaka Koga^a, Hidetsugu Tonomura^a, Masaya Nogi^a, Katsuaki Suganuma^a, and Yuta Nishina^b

^aThe Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University ^bResearch Core for Interdisciplinary Science, Okayama University

Abstract

Recent progress in portable and wearable electronics has promoted a growing demand for high-performance and flexible energy-storage devices that are abundant and affordable. Because reduced graphene oxide (rGO), originating from inexpensive graphite, serves as higher-performance energy-storage electrode than conventional activated carbons and carbon nanotubes, research and development of rGO/polymer composite electrodes for flexible supercapacitors have become a center of attraction. However, the fabrication of rGO-based flexible electrodes frequently requires long time with high-temperature treatment or toxic chemical treatment, resulting in the lack of scalability and eco-friendliness. Here we show fast, scalable, and environment-compatible route to fabricate high-performance rGO/cellulose paper supercapacitor electrode. Single-layer graphene oxide (GO) sheets and recycled waste pulp fibers were successfully fabricated into a paper composite by a well-established scalable papermaking process, followed by a room-temperature, chemical-free, and millisecond-timescale flash reduction process. The as-prepared rGO/paper electrode had high specific capacitance, up to 212 F g⁻¹, for an all paper-based flexible supercapacitor, comparable to those of state-of-the-art rGO-based electrodes, while dramatically decreasing the reduction time of GO from the conventional hour timescale to milliseconds. This work will pave the way for green, flexible, and mass-producible energy-storage papers in future wearable electronics.

Introduction

Since the invention of paper approximately 2000 years ago, it has been traditionally fabricated from an aqueous suspension of cellulose fibers by papermaking, which is a sequential process of filtration, dewatering, and drying. The current papermaking process enables high-speed and large-area fabrication of paper materials up to 18,000 m² min⁻¹. Therefore,

paper materials are mass-producible and inexpensive, and they have been used for many purposes, such as writing, printing, and packaging applications, in daily life. Recently, the application of paper has been extended to electronics; [1,2] electronic devices have been fabricated on paper substrates, including inorganic and organic transistors, [5] complementary metal oxide semiconductors, [6,7] triboelectric nanogenerators, [8]

memory,^[9,10] transparent conductive films,^[11,12] and antennas.^[13,14] Paper electronics provides new possibilities for next-generation devices with flexible, biodegradable, biocompatible, and eco-friendly electronics.

Recent years have seen remarkable progress in wearable electronics: [15,16] portable consumer electronics are becoming flexible, lightweight, and even wearable. Because wearable electronics essentially require energy-storage devices with thin, lightweight, flexible, and conformable properties, such flexible energystorage devices have become the focus of major research.[17-19] Of various energy-storage devices, supercapacitors have attracted much attention because of their high power density, long life cycle, and environmental friendliness.[20,21] Because electrode materials play essential roles in energy-storage devices, enormous efforts have been devoted to the research and development of high-capacitance electrodes for flexible supercapacitors. Reduced graphene oxide (rGO), which can be obtained by the reduction of graphene oxide (GO) extracted from inexpensive graphite, offers much higher specific capacitance than conventional activated carbons and carbon nanotubes. [22,23] Thus, flexible rGO/polymer composites have emerged as one of the most promising electrodes for future supercapacitors.[24-31]

The forthcoming widespread use of portable and wearable electronics will provide a strong demand for making flexible energy-storage devices more abundant and affordable. It is therefore highly desired to develop mass production processes for low-cost and high-performance rGO-based electrodes for flexible supercapacitors. Paper serves as a favorable matrix for flexible binder-free rGO electrodes [24-28] because of its high affinity for nanocarbons via a CH- π interaction between the axial plane of the cellulose and the graphene π -conjugated system, [11,32] as well as its excellent availability. The papermaking process can also boast excellent scalability and benefit from techniques and equipment common in the established

paper industry. However, the fabrication of rGO remains challenging to processing speed, scalability, and environmental compatibility because the reduction of GO frequently requires hour-scale time with hightemperature treatment[24-26,29,30,33] or toxic chemical treatment.[22,23,27,28,31,34,35] Here, we show the highspeed, scalable, and eco-friendly fabrication of rGO/ cellulose paper composite electrodes for flexible supercapacitors using a combination of papermaking and flash reduction techniques. First, single-layer GO sheets were effectively composited with virgin pulps or recycled waste pulps to prepare a flexible GO/ cellulose paper composite by a scalable papermaking process. Then, room-temperature, chemical-free, and millisecond-timescale reduction of GO was achieved in situ in the paper composite by high-intensity pulsed light irradiation. The rapidly reduced GO/cellulose paper composite electrodes achieved high specific capacitance, up to 212 F g⁻¹, and were successfully applied for an all paper-based flexible supercapacitor.

Results and discussion

Fabrication of the rGO/cellulose paper composite by a combination of papermaking and flash reduction

Fast fabrication of the rGO/cellulose paper composite was carried out by papermaking with a filtration time of 4 s and successive flash reduction for 0.036 s (Fig. 1). First, an aqueous dispersion of negatively charged single-layer GO sheets (Table 1) with widths of 10-30 μm, which were extracted from graphite powder according to the modified Hummer's method. [36] was mixed with an aqueous suspension of virgin cellulose pulp fibers with widths of several 10 μ m and lengths of several millimeters. Because pulp fibers have weakly negative charges on their surfaces (**Table 1**), the brown-colored GO and white-colored pulp fibers were then clearly separated from each other in water as a result of electrostatic repulsion. For preparation of the paper composite by the papermaking process, the resulting aqueous mixture was filtered through a #300 wire mesh. While the pulp fibers were effectively

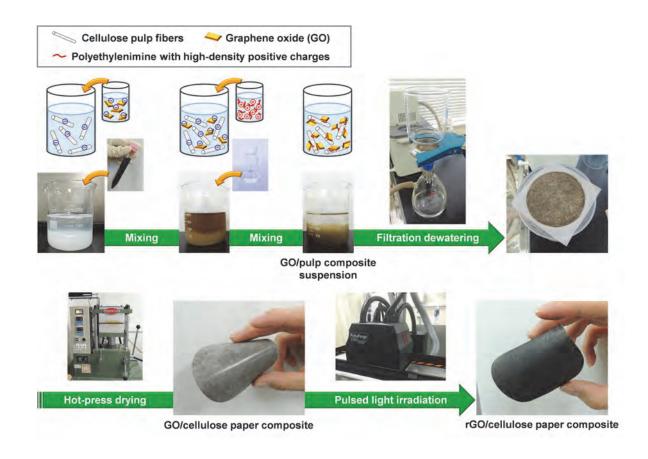


Fig. 1 Preparation procedure for the rGO/cellulose paper composite by papermaking and successive flash-reduction processes. Size of the paper composite: 75 mm in diameter, 100 μm in thickness.

retained on the wire mesh, most of the GO dropped through the mesh because of its small size, suggesting that a simple mixture of GO and pulp fibers presents significant difficulty in fabricating uniform composites using the papermaking process. To overcome this difficulty, in this study, a branched polymer with high-density positive charges, *i.e.*, polyethylenimine (PEI), was added in the mixture to connect nano-dispersed

GO with pulp fibers through electrostatic interaction (**Fig. 1** and **Table 1**). Subsequently, the prepared aqueous suspension of the brown-colored GO/pulp fiber composite was rapidly dewatered through the mesh within 4 s with excellent retention of nearly 100%. The wet paper obtained was dried by hot pressing to prepare a GO/cellulose paper composite with paper-like flexibility. The process time for this

Table 1. Zeta potential values of GO, cellulose pulp fibers, PEI, and their composite.

	Zeta potential / mV	
GO	-35.8	
Pulp	-6.13	
PEI	36.0	
GO/pulp/PEI composite	-0.303	

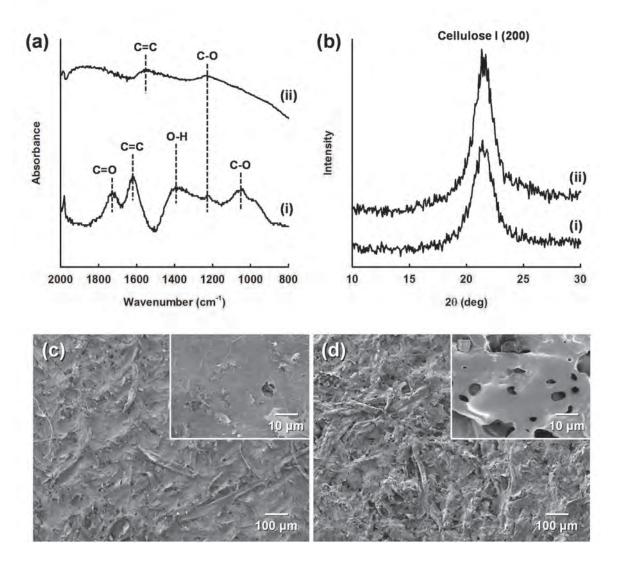


Fig. 2 Characterization of the flash-reduced GO/cellulose paper composite. (a) FT-IR/ATR spectra of GO without cellulose paper matrix (i) before and (ii) after pulsed light irradiation, (b) X-ray diffraction spectra and (c, d) field-emission scanning electron microscope images of the GO/cellulose paper composite (i) before and (ii) after pulsed light irradiation. Light intensity: 0.986 J cm⁻². Irradiation time: 0.036 s.

sequential procedure was as short as the conventional papermaking process for preparation of cellulose paper, indicating the potential for industrial-level scalability. Finally, the GO/cellulose paper composite was treated with high-intensity pulsed light using xenon flash lamps (light intensity: 0.986 J cm⁻²) for 0.036 s under ambient conditions, while maintaining its flexibility.

Flash reduction of GO to rGO was confirmed by Fourier transform infrared attenuated total reflection (FT-IR/ATR) analysis. FT-IR/ATR spectra of GO without the cellulose paper matrix before and after the irradiation of high-intensity pulsed light are shown in **Fig. 2a**. After pulsed light irradiation for 0.036 s,

most of the peaks derived from oxygen functional groups of the original $GO^{[37]}$ disappeared, and the C=C stretching vibration peak at ca. 1600 cm⁻¹ for the GO shifted to 1560 cm⁻¹, indicating the formation of rGO.^[37] Thus, the millisecond-scale rapid reduction of GO was successfully conducted at atmospheric conditions using high-intensity pulsed light. The *in situ* flash reduction of GO in the cellulose paper matrix was also achieved to prepare the flexible rGO/cellulose paper composite while keeping the crystalline structure of native cellulose (cellulose I^[38]) (**Fig. 2b**). Then, GO sheets with widths of 10–30 μ m, which were embedded in the paper matrix (**Fig. 2c, Fig. 4**), formed porous structures

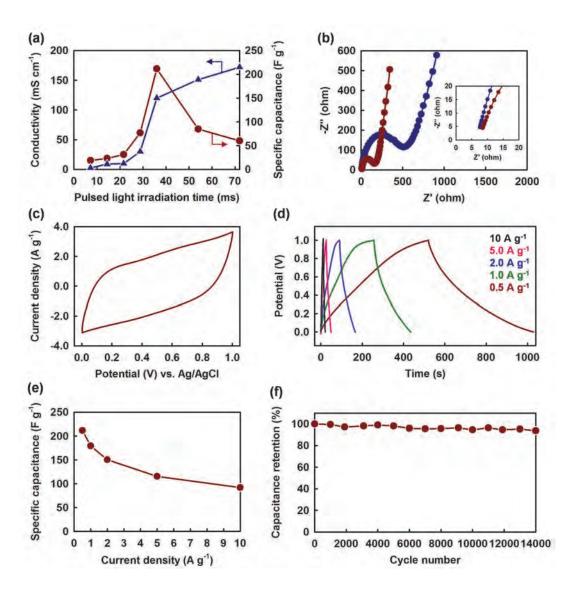


Fig. 3 Flash-reduced GO/cellulose paper electrode for flexible supercapacitor. (a) Electrical conductivity and specific capacitance at a current density of 0.5 A g⁻¹ of the rGO/cellulose paper composite as a function of pulsed-light irradiation time, (b) Nyquist plots of the rGO/cellulose paper electrode prepared by pulsed light irradiation for 0.036 s (red) and 0.072 s (blue), (c) CV curve at a scan rate of 20 mV s⁻¹ and (d) charge-discharge curves at current densities of 0.5–10 A g⁻¹ for the rGO/cellulose paper electrode prepared by pulsed light irradiation for 0.036 s, (e) specific capacitance versus current density for the rGO/cellulose paper electrodes prepared using virgin pulps, (f) specific capacitance retention of the rGO/cellulose paper composite as a function of the charge-discharge cycle number at a current density of 10 A g⁻¹. Light intensity: 0.986 J cm⁻².

after the flash reduction (**Fig. 2d**), as reported by Cote et al.^[39] The flash reduction mechanism of GO could involve photo-thermal ultrafast heating^[39] and/or electron supply from photo-ionized moisture.^[40]

Flash-reduced GO/cellulose paper electrode for a flexible supercapacitor

The prepared flash-reduced GO/cellulose paper composite was applied as an electrode material for a flexible supercapacitor. The electrical conductivity and specific capacitance of the rGO/cellulose paper composite were evaluated as a function of the pulsed-light irradiation time (**Fig. 3a**). The electrical conductivity of the paper composite increased with increasing irradiation time because of the conversion of electrically insulating GO to conductive rGO by the flash reduction. Then, the rGO/cellulose paper composite with thickness ca. 100 μ m was conductive in 3D, indicating that the flash-reduced GO formed a percolation network not only on the surface but also

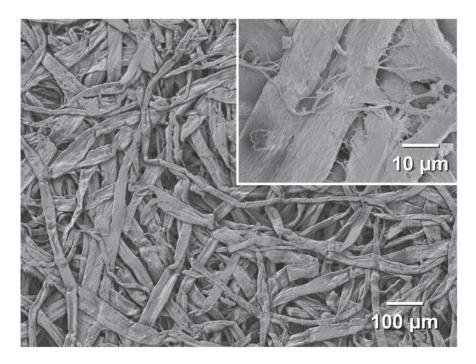


Fig. 4 Field-emission scanning electron microscope image of the cellulose paper without GO. By comparing Fig. 2c with Fig. S1, it was confirmed that GO sheets were embedded into the cellulose paper matrix.

inside the paper composite. The conductivity reached 172 mS cm⁻¹ after the flash reduction for 0.072 s. Thus, the rGO/cellulose paper composite was free-standing and 3D conductive and could be used as a flexible electrode material, without any additives, for a supercapacitor. It should be noted that the maximum specific capacitance of 212 F g⁻¹ (areal capacitance: 24 mF cm⁻², volumetric capacitance: 2.4 F cm⁻³) was

recorded at a flash reduction time of 0.036 s, while the specific capacitance values decreased over 0.036 s (**Fig. 5**). To elucidate this phenomenon, electrochemical impedance spectroscopy measurements were conducted to discuss the electrical resistance and ion-transport behavior of the rGO/cellulose paper electrodes. **Fig. 3b** shows Nyquist plots of the rGO/cellulose paper electrodes prepared by the flash reduction for 0.036 s

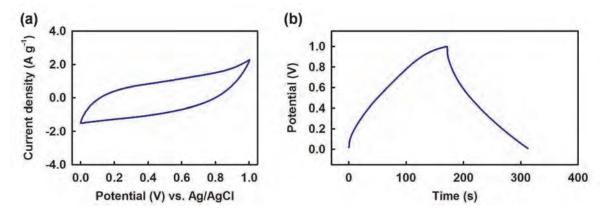


Fig. 5 (a) Cyclic voltammetry curves at a scan rate of 20 mV s⁻¹ and (b) charge-discharge curves at current densities of 0.5 A g⁻¹ for the rGO/cellulose paper electrode prepared at a flash-reduction time of 0.072 s. The rGO/cellulose paper composite prepared by the flash reduction for 0.072 s demonstrated a rectangular-shaped cyclic voltammetry curve with slight distortion and somewhat non-linear charge-discharge curve, indicating electric double-layer capacitor behavior with slight pseudo-capacitance possibly due to the presence of a few oxygen-containing functional groups. The specific capacitance of the rGO/cellulose paper composite prepared at a flash-reduction time of 0.072 s was ca. 60 F g⁻¹, which was lower than that prepared at 0.036 s (212 F g⁻¹).

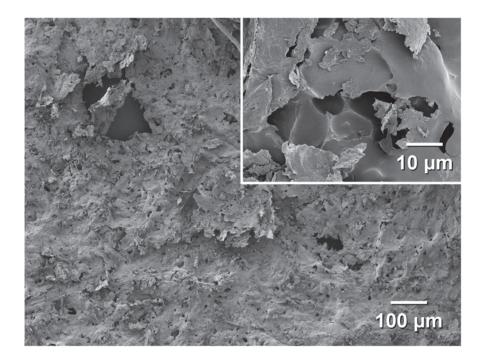


Fig. 6 Field-emission scanning electron microscope image of the rGO/cellulose paper composite prepared at a flash reduction time of 0.072 s. This image suggested that the excess irradiation of the pulsed light could cause the damage to the structure of the rGO/cellulose paper composite.

and 0.072 s. The equivalent series resistance (ESR), the charge-transfer resistance, and the diffusion resistance of electrolyte ions in the electrode materials can be separated by the complex plane plots corresponding to different frequency regions. In general, the intersection of the curve at the real resistance (Z') axis represents the ESR, which determines power density of the supercapacitors. The charge-transfer resistance at the electrode-electrolyte interface is determined by the width of semicircle plotted at higher frequencies. The inclined line with a slope of 45° to the Z' axis at lower frequencies is related to the diffusion of electrolyte ions, which is called the Warburg impedance. Then, the projected length of the Warburg line on the Z' axis (Warburg length) represents the diffusion resistance of electrolyte ions in the electrode materials. [24] As shown in Fig. 3b, the Warburg length of the rGO/ cellulose paper electrode prepared at a flash-reduction time of 0.036 s was shorter than that of the rGO/ cellulose paper electrode prepared at a flash-reduction time of 0.072 s, while there were no large difference between their ESR values (ca. 8 Ω). These results suggested that the excess irradiation of the pulsed light could cause the increased diffusion resistance of electrolyte ions inside the paper electrode possibly due to the aggregation of rGO by π - π re-stacking and the damage to the paper structure (Fig. 6), resulting in a decrease in the specific capacitance. It is well known that nano-dispersed GO sheets suffer from severe re-stacking after reduction, and the resulting rGO loses its excellent functionalities. [22, 36] Lee et al. has recently addressed the chronic restacking issues of rGO by doping with melamine resin monomers to enlarge the interlayer spacing between rGO sheets, achieving efficient ion diffusion and an improvement in the specific capacitance from 110 to 210 F g^{-1} at 0.5 A g^{-1} Thus, it is implied that the insitu flash-reduction of GO immobilized inside the paper matrix, demonstrated in this study, can suppress the re-stacking of GO sheets to some degree by controlling the flash-reduction time. The rGO/cellulose paper composite prepared at the optimum flash-reduction time (0.036 s) demonstrated a rectangular-shaped cyclic voltammetry (CV) curve with slight distortion (Fig.

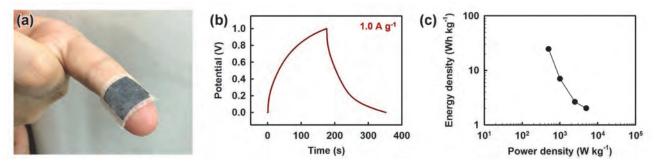


Fig. 7 All paper-based flexible supercapacitor. (a) An optical image of the all paper-based flexible supercapacitor, (b) Charge-discharge curve at a current density of 1.0 A g⁻¹ for the paper-based supercapacitor, (c) Ragone plot at a voltage of 1.0 V for the paper-based supercapacitor.

3c) and somewhat non-linear charge-discharge curves (Fig. 3d), indicating electric double-layer capacitor behavior with slight pseudo-capacitance possibly due to the presence of a few oxygen-containing functional groups.[37] Based on the charge-discharge curves, the specific capacitance values were plotted as a function of current density (Fig. 3e). The rGO/cellulose paper composite prepared using virgin pulp fibers achieved high specific capacitances ranging from 212 to 100 F g⁻¹ with current densities ranging from 0.5 to 10 A g⁻¹. In addition, the paper composite electrodes offered excellent charge-discharge cyclic durability; the retention of the specific capacitance was ca. 94%, even after 14,000 cycles (Fig. 3f). As shown in Fig. 7a, an all paper-based flexible supercapacitor was also successfully prepared using two pieces of the rGO/ cellulose paper composite electrode and one piece of the paper separator; the specific capacitance of a single

paper electrode was estimated to be 177 F g⁻¹ at a current density of 1.0 A g⁻¹ (**Fig. 7b**). **Fig. 7c** shows Ragone plot for the paper-based supercapacitor. The specific energy density and specific power density at a voltage of 1.0 V of the paper-based supercapacitor were 24.6 Wh kg⁻¹ and 503 W kg⁻¹, respectively. These results suggest that the flash-reduced GO/cellulose paper composite is promising for energy-storage paper devices in portable, flexible, and wearable electronics.

Eco-friendly fabrication of the paper supercapacitor electrode by using recycled waste pulps

Efficient recycling of waste paper materials has a significant role in sustainable development because it contributes to low-cost, low-energy consumption, and environmentally benign paper industries. Compared with virgin pulps, recycled pulps from waste paper can save ca. 17 trees, 3.3 cubic yards of landfill space,

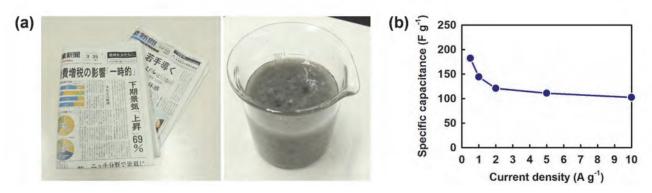


Fig. 8 Paper supercapacitor electrode prepared using recycled waste pulps. (a) Optical images of Japanese newspapers (left) and an aqueous suspension of their recycled waste pulps (right), (b) specific capacitance versus current density for the rGO/cellulose paper electrodes prepared using recycled waste pulps.

360 gallons of water, 100 gallons of gasoline, 60 pounds of air pollutions, and 10.401 kW of electricity per production of one ton of paper. [41] In this study, as shown in Fig. 8, the high electrode performances of the paper composite were achieved even when prepared using recycled waste pulps from newspapers instead of virgin pulps. In conjunction with a wellestablished scalable papermaking process, therefore, the use of recycled waste pulps can contribute to ecofriendly fabrication of more affordable GO/cellulose paper composites. Furthermore, the flash-reduction process achieved a drastic shortening of the GO reduction time from the conventional hour timescale to milliseconds; after reduction, the flash-reduced GO/ cellulose paper composite in this study offered high specific capacitance, comparable to those of state-of-theart rGO-based electrodes prepared by chemical reducti on. [22,23,27,28,31,34,35] thermal reduction. [24-26,29,30,33] and flash and successive thermal reduction,[37] including matrix-free rGO, [22,23,33-35,37] paper-based rGO, [24-28] and other polymerbased rGO electrodes^[29-31] (Fig. 9). In addition, our paper supercapacitor electrode achieved higher capacitance (212 F g⁻¹) than previously reported carbon nanotubebased supercapacitor electrode (51 F g⁻¹)^[42]. It has been reported that the flash-lamp irradiation process can be extended to large-area and roll-to-roll photonic sintering and manufacturing of metal nanoparticle conductive lines printed on flexible substrates. [43-46] Thus, the

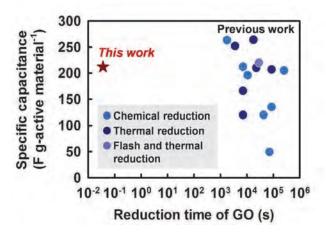


Fig. 9 Specific capacitance versus reduction time of GO for the state-of-the-art rGO-based electrodes.

combination of papermaking and flash reduction is expected to be a promising approach for the high-speed and roll-to-roll production of high-capacitance and flexible rGO-based electrodes.

Conclusions

In conclusion, we have demonstrated the fast and scalable fabrication of high-performance rGO/cellulose paper electrodes by combining papermaking and in situ flash-reduction techniques. Both virgin pulps and recycled waste pulps can be used as a flexible matrix for GO to prepare GO/cellulose paper composites by a facile papermaking process. Then, room-temperature, chemical-free, and millisecond-timescale flash-reduction of GO was successfully performed in situ in the paper matrix, providing the paper electrodes with a specific capacitance up to 212 F g^{-1} for a flexible supercapacitor. These findings open up a new window for green and mass production of energy-storage papers towards future wearable electronics.

Experimental

Materials

Virgin pulps (never-dried softwood dissolving sulfite pulps), which were provided by Nippon Paper Group. Inc., Japan, and recycled waste pulps obtained from newspapers were used as cellulose pulp fibers. PEI (average molecular weight: 1800) and an aqueous dispersion of single-layer GO sheets (GO-TQ2, 1 wt%, width: 10-30 μ m) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan and NiSiNa materials, Co. Ltd., Japan, respectively. The aqueous GO dispersion (0.5 g) was diluted with distilled water (15 mL), followed by sonication for 4 min using an ultrasonic homogenizer equipped with a 7-mm probe tip (US-300T, Nihon Seiki, Co. Ltd., Japan) before use. All reagents were used without further purification.

Preparation of the GO/cellulose paper composite using a papermaking technique

An aqueous suspension of cellulose pulp fibers (0.15

wt%, 200 mL) was mixed with an aqueous dispersion of GO (0.032 wt%, 15.5 mL, GO content: 5 mg) and an aqueous solution of polyethylenimine (1.0 wt%, 0.4 mL) in that order, with each step being carried out at an interval of 10 min. The resulting suspension of the GO/pulp fiber composites was dewatered for 4 s by suction filtration through a #300 wire mesh. The wet paper on the wire mesh was sandwiched between a hydrophobic glass plate and paper towel and dried by hot pressing at 110 ° C for 10 min (1.1 MPa). The obtained sample was then peeled from the wire mesh to prepare the GO/cellulose paper composite with a diameter of 75 mm and thickness of ca. 100 μ m.

Flash reduction of the GO/cellulose paper composite

The GO/cellulose paper composite was subjected to a flash reduction process at room temperature in air using a PurseForge 3300 equipped with xenon flash lamps (Novacentrix Corp., USA). Typically, the irradiation of high-intensity pulsed light for 0.0018 s was carried out 10 times at a frequency of 2 Hz for each surface of the paper composite (light intensity: 0.986 J cm⁻²; net time of pulsed light irradiation: 0.036 s).

Analyses

The conductivity and sheet resistance values were measured using a resistivity meter with a four-point probe (Loresta-GP, MCP-T610, Mitsubishi Chemical Analytech Co., Ltd., Japan). Surface observations of the paper composites were conducted using a field-emission scanning electron microscope (JSM-6700F, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 1.0 kV. FT-IR/ATR spectra were obtained using a KJP-05120S instrument (PerkinElmer Co. Ltd., Japan). X-ray diffraction patterns were recorded using a Rigaku MiniFlex600 with a scanning angle (2 θ) range of 10–35°, at 40 kV and 15 mA. The zeta potential values of GO, cellulose pulp fibers, PEI, and GO/pulp/PEI composite were measured using a Zeta-potential & Particle size Analyzer ELSZ-2000N (Otuska Electronics,

Co. Ltd., Japan).

Electrochemical measurements

The electrochemical measurements were conducted using a conventional three-electrode system with an aqueous electrolyte (1 M Na₂SO₄). The rGO/cellulose paper composite was set on Al foil as a current collector and was used as the working electrode. A platinum electrode and Ag/AgCl electrode were used as the counter electrode and reference electrode, respectively. The weight and dimensions of the active material (GO) in the working electrode were 0.113 mg and 1.0 cm², respectively. Cyclic voltammetry at a scan rate of 20 mV s⁻¹ and galvanostatic chargedischarge behavior at an operation voltage range of 0-1.0 V were performed using a potentio/galvanostat (1255WB, Solartron Co. Ltd., UK). Specific capacitance values were calculated based on the galvanostatic discharge curve and the weight of the active material. Electrochemical impedance spectroscopy was recorded from 1 MHz to 0.1 Hz at 0 V with an amplitude of 10 mV. For evaluation of the paper-based supercapacitor, a cellulose nanofiber paper separator with a thickness of 50 μ m, which was prepared according to a previous report.[47] was sandwiched between the rGO/cellulose paper electrodes on the Al-foil current collector, followed by soaking with the aqueous electrolyte (1 M Na₂SO₄) and setting into a cell (TBH3-CELL, Toyo Corp., Japan). The specific energy density and specific power density were calculated by using $E = CV^2/2$ and $P = E/\Delta t$, respectively, where C is the specific capacitance, V is the cell voltage, Δt is the discharge time in the galvanostatic charge/discharge curves. [48]

References

- D. Tobjörk and R. Österbacka, Adv. Mater., 2011,
 23. 1935–1961.
- H. Zhu, Z. Fang, C. Preston, Y. Li and L. Hu, *Energy Environ. Sci.*, 2014, 7, 269–287.
- 3 L. Pereira, D. Gaspar, D. Guerin, A. Delattre, E. Fortunato and R Martins, *Nanotechnology*, 2014,

- **25**, 094007.
- D. Gaspar, S. N. Fernandes, A. G. de Oliveira, J. G. Fernandes, P. Grey, R. V. Pontes, L. Pereira, R. Martins, M. H. Godinho and E. Fortunato, *Nanotechnology*, 2014, **25**, 094008.
- Y. Fujisaki, H. Koga, Y. Nakajima, M. Nakata, H. Tsuji, T. Yamamoto, T. Kurita, M. Nogi and N. Shimidzu, Adv. Funct. Mater., 2014, 24, 1657-1663.
- 6 Barquinha, R. Costa, I. M. M. Ferreira, A. Nathan and E. E. M. C. Fortunato, Adv. Funct. Mater., 2013, 23, 2153–2161.
- 7 R. Martins, A. Nathan, R. Barros, L. Pereira, P. Barquinha, N. Correia, R. Costa, A. Ahnood, I. Ferreira and E. Fortunato, *Adv. Mater.*, 2011, 23, 4491–4496.
- 8 P.-K. Yang, Z.-H. Lin, K. C. Pradel, L. Lin, X. Li, X. Wen, J.-H. He and Z. L. Wang, ACS Nano, 2015, 9, 901–907.
- R. Martins, P. Barquinha, L. Pereira, N. Correia,
 G. Gonçalves, I. Ferreira and E. Fortunato, *Appl. Phys. Lett.*, 2008, 93, 203501.
- 10 K. Nagashima, H. Koga, U. Celano, F. Zhuge, M. Kanai, S. Rahong, G. Meng, Y. He, J. D. Boeck, M. Jurczak, W. Vandervorst, T. Kitaoka, M. Nogi and T. Yanagida, Sci. Rep., 2014, 4, 5532.
- H. Koga, T. Saito, T. Kitaoka, M. Nogi, K. Suganuma and A. Isogai, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 1160–1165.
- 12 H. Koga, M. Nogi, N. Komoda, T. T. Nge, T. Sugahara and K. Suganuma, *NPG Asia Mater.*, 2014, **6**, e93.
- 13 M. Nogi, N. Komoda, K. Otsuka and K. Suganuma, *Nanoscale*, 2013, 5, 4395–4399.
- 14 T. Inui, H. Koga, M. Nogi, N. Komoda and K. Suganuma, *Adv. Mater.*, 2015, 27, 1112–1116.
- 15 X. Tao, Wearable Electronics and Photonics, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 2005.
- 16 W. Zeng, L. Shu, Q. Li, S. Chen, F. Wang and X.-M. Tao, Adv. Mater., 2014, 26, 5310–5336.
- 17 Y. He, W. Chen, C. Gao, J. Zhou, X. Li and E. Xie,

- Nanoscale, 2013, 5, 8799-8820.
- 18 T. H. Nguyen, A. Fraiwan and S. Choi, *Biosens*. *Bioelectron*. 2014, **54**, 640–649.
- X. Wang, X. Lu, B. Liu, D. Chen, Y. Tong and G. Shen, Adv. Mater., 2014, 26, 4763–4782.
- 20 B. E. Conway, Electrochemical Supercapacitors: Scientific, Fundamentals and Technological Applications, Plenum, New York, USA, 1999.
- 21 P. Simon and Y. Gogotsi, *Nat. Mater.*, 2008, **7**, 845–854.
- 22 M. D. Stoller, S. Park, Y. Zhu, J. An and R. S. Ruoff, Nano Lett., 2008, 8, 3498–3502.
- 23 H. Feng, R. Cheng, X. Zhao, X. Duan and J. Li, *Nat. Commun.*, 2013, 4, 1539.
- 24 Z. Weng, Y. Su, D.-W. Wang, F. Li, J. Du and H.-M. Cheng, *Adv. Energy Mater.*, 2011, 5, 917–922.
- 25 Y.-R. Kang, Y.-L. Li, F. Hou, Y.-Y. Wen and D. Su, *Nanoscale*, 2012, **4**, 3248–3253.
- 26 K. Gao, Z. Shao, J. Li, X. Wang, X. Peng, W. Wang and F. Wang, J. Mater. Chem. A, 2013, 1, 63-67.
- 27 B. Andres, S. Forsberg, A. P. Vilches, R. Zhang, H. Andersson, M. Hummelgård, J. Bäckström and H. Olin, Nord. Pulp Pap. Res. J., 2012, 27, 481-485.
- 28 L. Liu, Z. Niu, L. Zhang, W. Zhou, X. Chen and S. Xie, Adv. Mater., 2014, 26, 4855–4862.
- 29 Y. Zhu, S. Murali, M. D. Stoller, K. J. Ganesh, W. Cai, P. J. Ferreira, A. Pirkle, R. M. Wallace, K. A. Cychosz, M. Thommes, D. Su, E. A. Stach and R. S. Ruoff, *Science*, 2011, 332, 1537–1541.
- 30 J. H. Lee, N. Park, B. G. Kim, D. S. Jung, K. Im, J. Hur and J. W. Choi, ACS Nano, 2013, 7, 9366-9374.
- 31 J. Zang, C. Cao, Y. Feng, J. Liu and X. Zhao, Sci. Rep., 2014, 4, 6492.
- 32 S. Yokota, T. Ueno, T. Kitaoka and H. Wariishi, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 2593–2598.
- 33 W. Lv, D.-M. Tang, Y.-B. He, C.-H. You, Z.-Q. Shi, X.-C. Chen, C.-M. Chen, P.-X. Hou, C. Liu and Q.-H. Yang, ACS Nano, 2009, 3, 3730–3736.
- 34 Y. Wang, Z. Shi, Y. Huang, Y. Ma, C. Wang, M. Chen and Y. Chen, J. Phys. Chem. C, 2009, 113, 13103–13107.

- 35 Y. Meng, K. Wang, Y. Zhang and Z. Wei, Adv. Mater., 2013, 25, 6985–6990.
- 36 D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski and R. S. Ruoff, Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 228-240.
- 37 Y. J. Oh, J. J. Yoo, Y. I. Kim, J. K. Yoon, H. N. Yoon, J.-H. Kim and S. B. Park, *Electrochim. Acta*, 2014, 116, 118–128.
- 38 R. H. Atalla and S. C. Nagel, *Science*, 1974, **185**, 522–523.
- 39 L. J. Cote, R. Cruz-Silva and J. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11027–11032.
- 40 R. Y. N. Gengler, D. S. Badali, D. Zhang, K. Dimos, K. Spyrou, D. Gournis and R. J. D. Miller, *Nat. Commun.*, 2013, 4, 2560.
- 41 M. O. Rahman, A. Hussain and H. Basri, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2014, **11**, 551–564.
- 42 L. Ci, S. M. Manikoth, X. Li, R. Vajtai and P. M. Ajayan, Adv. Mater., 2007, 19, 3300–3303.
- 43 M. Hösel and F. C. Krebs, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 15683–15688.
- 44 D. Angmo, T. T. Larsen-Olsen, M. Jørgensen, R. R. Søndergaard and F. C. Krebs, Adv. Energy Mater.,

- 2013, 3, 172-175.
- 45 Y. Jo, S.-J. Oh, S. S. Lee, Y.-H. Seo, B.-H. Ryu, J. Moon, Y. Choi and S. Jeong, *J. Mater. Chem. C*, 2014, **2**, 9746–9753.
- 46 R. Abbel, P. Teunissen, E. Rubingh, T. van Lammeren, R. Cauchois, M. Everaars, J. Valeton, S. van de Geijn and P. Groen, *Transl. Mater. Res.*, 2014, 1, 015002.
- 47 M.-C. Hsieh, C. Kim, M. Nogi and K. Suganuma, *Nanoscale*, 2013, 5, 9289–9295.
- 48 Y.J. Kang, S.-J. Chun, S.-S. Lee, B.-Y. Kim, J. H. Kim, H. Chung, S.-Y. Lee and W. Kim, ACS Nano, 2012, 6, 6400–6406.
- 49 H. Koga, H. Tonomura, M. Nogi, K. Suganuma, Y. Nishina, *Green Chem.*, 2016, **18**, 1117–1124.

Acknowledgements

H. K. was partially supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (Grant No. 15H05627) from the Japan Society for the Promotion of Science and by Shorai Foundation for Science and Technology.

銅マイクロ粒子トナーの開発とそのレーザ焼結特性の評価

茨城大学 工学部機械工学科 山崎 和彦、柏 雄太

1. はじめに

絶縁基板上に印刷した金属ナノ粒子をレーザ焼結することで機能性導電膜や微細配線を形成する技術^{1,2)}は、金属材料の使用効率が高く、かつドライプロセスであることから、従来のウェットプロセスの代替、または補完するプリンテッドエレクトロニクス技術として実用化段階にある。

高周波伝搬用の微細配線には、配線表面において信号を効率よく伝搬させるため、 7μ m以上の膜厚が要求される。しかし、金属ナノ粒子の焼結によって得られる焼結膜の膜厚は、最大 3μ m程度である。またインクジェット(IJ)印刷法を用いて大面積に金属ナノ粒子ペーストの微細配線パターンを形成するために時間を要することも課題となる。

そこで本研究では、銅マイクロ粒子トナーの開発、ならびにそのレーザ焼結技術の確立を目指す。銅は、金や銀と比較して安価で、比抵抗1.68 μΩcmを示すために微細配線材料に適する。一方でパターン形成においては、電子写真方式で銅マイクロ粒子トナーを定着してレーザ焼結することで、バルクの機能性膜や導電パターンを形成する。これまでに、一般的な定着法方法を前提とした金属トナー³⁾や、レーザ焼結用ナノ粒子クラスタトナー⁴⁾が提案されている。また、導体である金属粒子そのものを静電気で移動させ、マスクレスでパターン形成に関する研究も行われている⁵⁾。

本研究では、銅マイクロ粒子からトナーを作製する。 銅マイクロ粒子は、ナノ粒子のように焼結温度が大幅に 低下する寸法効果⁶⁾は発現しないものの、瞬間的に高い エネルギを付与できるレーザ焼結法を用い、トナーに含 まれる添加物の蒸発・除去と、銅マイクロ粒子のバルク 金属化が可能となれば、既存のレーザプリンティング技 術を用い、膜厚7μmを超える微細配線の形成が可能に

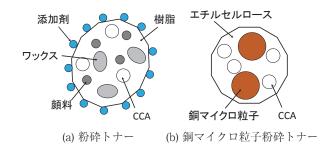


図1 トナーの模式図

なると考えられる。

レーザプリンティング用トナーは一般的に、図1に示すような顔料とバインダ材料である樹脂、帯電制御剤(CCA)、添加剤などから構成される。またその粒径は3~10μm程度である。本研究では、配線形成および焼結性の観点から、銅マイクロ粒子とバインダ、CCAのみで銅マイクロ粒子トナーを作製する。電子写真方式法を用いた銅マイクロ粒子トナーによるパターン形成に向け、トナーの静電特性の評価や、基板への塗布特性、レーザ焼結特性、焼結膜と基板との密着性、膜の面積率や比抵抗を評価し、レーザ焼結法による機能性膜、微細配線の形成法としての妥当性を見極める。

2. 実験

2.1 銅マイクロ粒子トナーの作製

トナーのコアとなる導電材料として、銅マイクロ粒子 (日本アトマイズ加工株式会社、平均粒子径1.12 μ m)を 使用した。図2に、銅マイクロ粒子の走査型電子顕微鏡 (SEM、キーエンス、VE-9800)像を示す。トナーに使用するCCAは、帯電ロールとして用いられるアルミニウムが正に帯電しやすいことから、負帯電のサリチル酸 亜鉛塩(中央合成化学、CHUO-CCA801)を使用した。

まず、不活性ガスである窒素を充填したドライボック

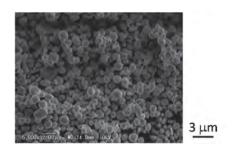


図2 銅マイクロ粒子のSEM像

表1 トナー観察実験に用いたサンプルの配合量

括	料	銅マイクロ	エチル	サリチル酸亜
		粒子、g	セルロース、g	鉛塩 (CCA)、g
4:H	1		0. 15	
観察	2	1. 15	0. 20	0. 120
示	3		0. 25	
帯	4			0.028
電	5	3. 45	0. 21	0.066
評価	6	J. 40	0.21	0. 108

ス内で、銅マイクロ粒子にバインダであるエチルセルロース ($10 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 、密度 1.17 g/cm^3)と、CCA、溶媒のエタノールを加えてペースト化した。表1 c、銅マイクロ粒子トナーペーストの配合量を示す。本研究では、外添剤や酸化防止剤、ワックスは使用していない。トナー試料 $1 \sim 3$ は、トナーの観察用としてバインダ量を調整し、試料 $4 \sim 6$ は、帯電性評価用としてCCAであるサリチル酸亜鉛の量を調整した。

次に、作製した銅マイクロ粒子ペーストを剥離シート上に取り、十分に乾燥させた後、乳棒と乳鉢を用いてサブミリメートル以下になるまで粉砕した。作製したトナーの光学顕微鏡やSEM観察を行うことで粒子径を確認した。

2.2 銅マイクロ粒子トナーの定着性評価

バインダであるエチルセルロース量の異なるトナー試料 $1 \sim 3$ の熱定着特性を評価した。アルミナ基板(日本ファインセラミックス、 $50 \times 50 \times t1$ mm)上に、マスキングテープ(3M、厚さ 50μ m)を4枚重ねてマスクを作製した後、その内側に銅マイクロ粒子トナーペーストを流し込み、スキージ法によって均一に塗布した。その後、ホットプレートを用いてエチルセルロースの融点である230℃で10秒間保持し定着させた。その後、膜表面

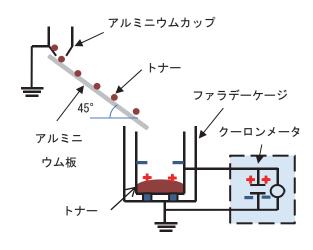


図3 銅マイクロ粒子トナーの帯電量評価方法

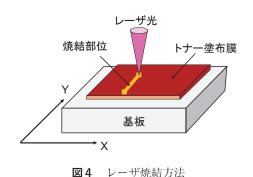
のSEM観察を行い、熱定着工程におけるバインダ配合量を検討した。

2.3 銅マイクロ粒子トナー帯電性評価

CCAであるサリチル酸亜鉛の量の異なる試料4~6の銅マイクロ粒子トナーを、図3に示すように接地したアルミニウムカップに入れ、45°に傾斜させたアルミニウム板の上から自重で転がしながら摩擦帯電させた。ファラデーケージ(春日電機、KQ-1400)の測定カップ内のトナーの帯電量を、クーロンメータ(春日電機、NK-1002A)を用いて測定した。

2.4 銅マイクロ粒子トナーの焼結実験と密着性評価

図4にレーザ焼結方法の概要を示す。アルミナ基板上に熱定着させた銅マイクロ粒子トナー塗布膜(試料6)に、図5に示すパルス発振Nd:YAGレーザ装置(日立建機、LU300、波長1064 nm、最大出力1.8 J、発振周波数80 Hz、パルス幅0.1~10 ms、ビームスポット径約0.2 mm、ガウス分布)から発振されたレーザ光を、焦点距



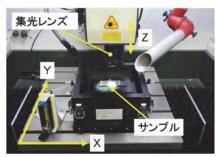


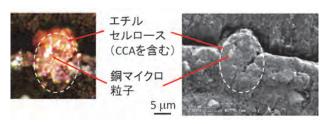
図5 レーザ加工機の外観

離100 mmのレンズを用いて集光照射した。このとき、出力 $7.0 \text{ mJ} \sim 37 \text{ mJ}$ のレーザパルスを、ステージ走査速度0.33 mm/sで走査しながら照射した。焦点は、サンプルから離れる方向に $0\sim 6 \text{ mm}$ デフォーカス(ビーム径 $0.2 \text{ mm} \sim 0.4 \text{ mm}$)させた。また焼結時の酸化を抑制するため、チャンバー内にArガスを流量2 L/minで導入しながら照射した。

焼結後の密着性試験として、メンディングテープを焼 結部に貼り付けて剥がすピール試験、およびエタノール を湿潤させた綿棒を用いた焼結膜の払拭試験を行った。 また、画像解析ソフト(ImageJ)を用いて焼結膜表面の 面積率を計測した。

2.5 銅マイクロ粒子焼結膜の電気特性評価

アルミナ基板上に形成したレーザ焼結膜の直流抵抗値を抵抗計(日置電機、抵抗計3541、ピン形リード9455)を用いて四端子法で測定した。このとき測定長さ2.5 mm および焼結膜断面から得られた断面積から比抵抗を見積



(a) 光学顕微鏡像

(b) SEM 像

図7 銅マイクロ粒子トナー断面の様子: 試料3 (エチルセルロース配合量 0.25 g)

もった。

3. 実験結果および考察

3.1 銅マイクロ粒子トナー作製および観察

図6 に、作製した銅マイクロ粒子トナー試料 $1 \sim 3$ の SEM像を示す。エチルセルロース配合量は、試料 1 が 0.15 g(エチルセルロース/銅の重量割合 13%)、試料 2 が 0.20 g(同17%)、試料 3 が 0.25 g(同22%)となる。これらのSEM像から、銅マイクロ粒子トナーの大きさは約 2 μ m程度で、使用した銅マイクロ粒子の $1\sim 2$ 倍である。このことからCCAを含むエチルセルロースが、銅マイクロ粒子 1、2 個の周囲に付着していると推測される。図 6 (c)の試料 3 のように、エチルセルロース/銅の重量割合が 22% を超えると、トナー同士の凝集体が形成する。試料 3 のトナー断面像(図 7 参照)からも、複数の銅マイクロ粒子がバインダに覆われた様子が確認でき、CCAが 20% までならばトナーの分散が促せる。

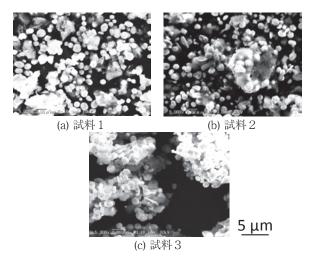


図6 銅マイクロ粒子トナーのSEM像:エチルセルロース 配合量(a) 0.15 g、(b) 0.20 g、(c) 0.25 g

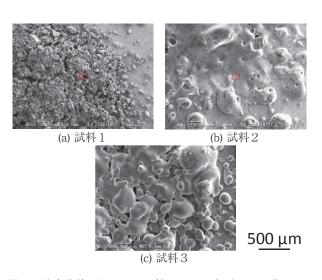


図8 熱定着後の銅マイクロ粒子トナー表面のSEM像: エチルセルロース配合量(a) 0.15 g、(b) 0.20 g、(c) 0.25 g

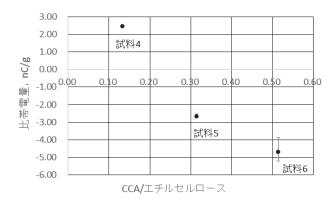


図9 CCA量に対するトナーの比電荷量(試料4~6)

3.2 銅マイクロ粒子トナーの定着性評価

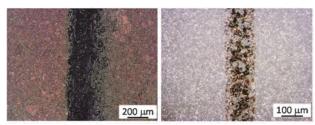
作製したトナー試料1~3を、それぞれアルミナ基板上に塗布し、ホットプレートで230℃に加熱して基板への熱定着を行った。図8に熱定着後のトナー表面のSEM像を示す。その結果、トナー試料1、2の塗布膜は、一部がアルミナ基板から剥離した。一方、エチルセルロース量/銅の重量割合が22%のトナー試料3は、アルミナ基板に定着した。このことから、熱定着に必要な銅に対するエチルセルロースの割合は20%前後と分かる。このときの銅マイクロ粒子に対するエチルセルロースの体積は、銅の密度8.96 g/cm³とすると約1.4倍と見積もられる。

3.3 銅マイクロ粒子トナー帯電性評価

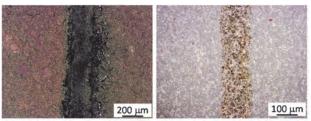
CCA量を調整した試料 $4\sim6$ の銅マイクロ粒子トナーの帯電量を、ファラデーケージおよびクーロンメータで測定した。図 9 にトナー試料 $4\sim6$ の比電荷量を示す。トナー試料 4 はCCA量が0.028 g(CCA/エチルセルロース重量割合13%)と少ないため、トナー全体が正に帯電したものの、CCA量を増加させた試料 5 (CCA量0.066 g、同31%)、試料 6 (CCA量0.108 g、同51%)では、比電荷量は $-3\sim-5$ nC/g程度と負に帯電した。このことからCCA配合量によってトナー帯電量が変化し、CCAに対するエチルセルロースの重量割合が30%を超えると負帯電トナーとして機能することが分かる。

3.4 銅マイクロ粒子トナーの焼結実験と密着性評価

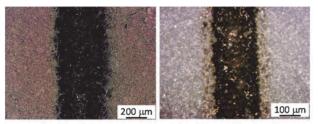
図10に、アルミナ基板上に熱定着させた試料6の銅マイクロ粒子トナー塗布膜に、パルス発振Nd:YAGレーザを集光照射し、エタノール含ませた綿棒で洗浄および払



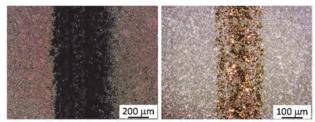
(a) パルスエネルギー約 7.0 mJ、 デフォーカス 4.0 mm(フルエンス約 2.5 J/cm²)



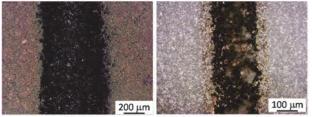
(b) パルスエネルギー約 7.0 mJ、 デフォーカス 6.0 mm(フルエンス約 1.6 J/cm²)



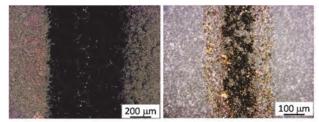
(c) パルスエネルギー約 19 mJ、 デフォーカス 4.0 mm(フルエンス約 3.7 J/cm²)



(d) パルスエネルギー約 19 mJ、 デフォーカス 6.0 mm(フルエンス約 2.7 J/cm²)



(e) パルスエネルギー約 37 mJ、 デフォーカス 4.0 mm(フルエンス約 4.5 J/cm²)



(f) パルスエネルギー約 37 mJ、 デフォーカス 6.0 mm(フルエンス約 3.8 J/cm²)

図10 レーザ焼結後のトナー粒子塗布膜のレーザ顕微鏡像(左:レーザ照射後右:洗浄・払拭試験後)

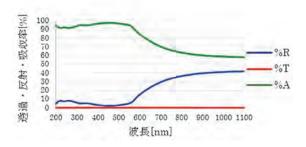


図11 銅マイクロ粒子塗布膜の光学特性

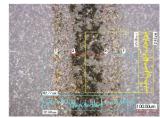
拭試験後の様子を示す。レーザ光は、図10の上下方向に 走査している。

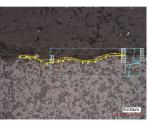
レーザ照射後では、特にビーム強度の高い中心部分が 黒色に変化した。照射するレーザのパルスエネルギー が小さいとき、焼結膜形成を確認できなかったが、図 10(b)のようにパルスエネルギー約7.0 mJ、デフォーカ ス6 mm(フルエンス約1.6 J/cm²)の条件では、基板表面 に幅約0.2 mmの焼結膜が形成した。図10(a)のパルスエ ネルギー約7.0 mJ、デフォーカス4 mm(フルエンス約2.5 J/cm^2) や、図10(d) のパルスエネルギー約19.0 mJ、デ フォーカス6 mm(フルエンス約 2.7 J/cm^2)の条件では、 払拭・摩擦試験後に剥離のない光沢膜が形成し、フルエ ンスの増加で焼結膜の幅も0.3 mmまで増加している。 しかしながら、焼結膜中央部分の面積率を測定したとこ ろ約37~40%と多孔質膜であることが分かる。また、 図10(c)のパルスエネルギー約19 mJ、デフォーカス4.0 mmや図10(e)のパルスエネルギー約37 mJ、デフォーカ ス4.0 mmなど、フルエンスが 4.0 J/cm^2 あたりから、ア ルミナ基板への損傷も観察される。

このように、ミリ秒パルスレーザによる銅マイクロ粒子の焼結が確認された。そこでCCAを含まない銅マイクロ粒子ペースト塗布膜の光学特性を、分光光度計(株式会社日立ハイテクノロジーズ、U-4100)で測定したところ、波長532 nmの吸収率は約95%以上、レーザ波長の1064 nmでは60%と得られた(図11参照)。アルミナ基板の吸収率は、レーザ波長の1064 nmではわずかなため、照射されたほとんどのレーザ光が銅マイクロ粒子に吸収されることで焼結に至ると推測される。

3.5 銅マイクロ粒子焼結膜の電気特性評価

アルミナ基板上に形成したレーザ焼結銅膜の直流抵 抗値を、四端子法で測定したところ、測定長さ2.5 mm





(a) 表面

(b) 断面

図12 レーザ焼結後のトナー粒子塗布膜のレーザ 顕微鏡像:パルスエネルギー約37 mJ、デ フォーカス6.0 mm (フルエンス約3.8 J/cm²)

のとき、パルスエネルギー約7.0 mJ、デフォーカス4 mm(フルエンス約2.5 J/cm²)で約39.2 M Ω 、エネルギ約19 mJ、デフォーカス4 mm(フルエンス約3.7 J/cm²)で約37.4 M Ω 、エネルギ約37 mJ、デフォーカス6 mm(フルエンス約3.8 J/cm²)で約0.8 M Ω であった。抵抗値はいずれも40 M Ω 程度と大きい。これは、塗布膜の均一性や焼結膜中の気孔が原因と考えられる。ちなみに図10(f)の条件で得られた焼結膜の幅は約294 μ m、焼結膜断面のレーザ顕微鏡像(図12参照)から得られた最大膜厚は約5.5 μ m、膜の断面積は約3490 μ m²であることから、比抵抗は約112 Ω cmと見積もられる。

以上のことから膜厚 7μ m程度の焼結膜の形成は可能であるが、マイクロ粒子トナーの均一な印刷・塗布方法の開発や、気孔のないレーザ焼結条件の獲得が課題となる。

4. 結論

本研究では、銅マイクロ粒子トナーの開発と帯電性評価、レーザ焼結の特性評価を行った。以下に今回の実験で得られた結果を述べる。

- 1) 銅マイクロ粒子トナーの分散特性や熱定着に必要な 銅に対するエチルセルロースの重量割合は、約20% (体積比で約1.4倍)
- 2) 銅マイクロ粒子トナーの帯電特性が発現するエチル セルロースに対するCCAの重量割合は31%以上で、 数nC/g程度の比電荷量が測定された
- 3) パルスエネルギー約37 mJ、デフォーカス6 mm(フルエンス約3.8 J/cm²)のNd:YAGレーザの照射で得られた焼結膜の比抵抗は、約112 Ωcmと高い
- 4) 膜厚7μmを超える均一な焼結膜形成のためには、 トナーの塗布方法や、レーザ焼結条件の確立が課題

である

5. まとめ

銅マイクロ粒子トナーを用いたプリンテッドエレクトロニクス技術の確立によって、厚膜の機能性膜や部分めっき製造技術、フレキシブル基板上への3次元パターン形成が可能となる。銅マイクロ粒子トナーと絶縁層となる樹脂トナーによる多重印刷・レーザ焼結/熱圧着、封止プロセスに拡張できれば、フルドライプロセスによる3次元電子モジュール製造技術への応用も期待できる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました 公益財団法人松籟科学技術振興財団には、心より深く御 礼申し上げます。また、本研究のトナー作製に多大なご 助力をいただいた、株式会社M&M研究所の御田護氏に 感謝の意を表します。

参考文献

- N.R. Bieri, J. Chung, D. Poulikakos, C.P. Grigoropoulos, "An experimental investigation of microresistor laser printing with gold nanoparticle-laden inks," Appl. Phys. A 80 (2005) pp. 1485–1495.
- 2) 前川克廣、山崎和彦、新関智丈、御田護、松葉頼 重、寺田信人、齊藤寛、プリンテッドエレクトロニ クス用レーザ焼結技術:銀ナノ粒子ペーストを用い た微細配線および機能性膜形成、エレクトロニクス 実装学会誌、Vol.15、No. 1 (2012) pp. 96-105.
- 3) 株式会社リコー、特開2013-41195
- 4) 茨城大学、特開2014-27199
- 5) 平原秀昭、金属粒子描画電子写真プリンタ 「ZEOMET」(新たな地平線を目指す印刷技術)、コ ンバーテック、40(7)、2012-07 (2012) pp. 82-85.
- Ph. Buffat, J-P. Borel, "Size Effect on the Melting temperature of gold particles," *Physical Review A*, Vol. 13, No. 6, (1976), pp. 2287–2298.

ナノスケール表面元素分析法XANAMの固体内原子への適用

名古屋大学 大学院工学研究科 鈴木 秀士

1. 緒言

次世代の触媒や半導体材料の新材料開発には、複合化 した元素成分・構造の特異な物性・化学反応性を如何 に制御するかが重要である。その中で、「表面原子実 空間観察」と「単原子操作」が可能という特徴を備え る走香トンネル顕微鏡(STM)や非接触原子間力顕微鏡 (NC-AFM)は非常に有用である。しかし、これらの顕 微鏡の観察対象の元素種や化学種を知る方法論の確立は 道半ばである。近年提案されてきたさまざまな手法にお いても[1-7]、測定の汎用化にはまだまだ課題がある。 そこで、本研究では、絶縁体表面にも適用可能なNC-AFMを土台に、汎用的な元素分析法として既に確立し た放射光X線元素分析を組み合わせ、X線支援非接触原 子間力顕微鏡XANAM(X-ray aided non-contact atomic force microscopy)の開発を行ってきた。これは、エネ ルギー可変の放射光X線の特徴を活かし、NC-AFM像 中の元素種をX線吸収端エネルギーによって識別する手 法である(図1)。NC-AFMは、カンチレバーと呼ばれ る探針プローブと固体試料表面との間に働く引力相互作 用を検知し、画像化する手法である。近年の理論計算、

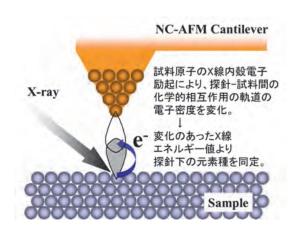


図1 XANAMの概念図

理論研究から、相互作用力には長距離力である分散力、 静電的な力の他、短距離力であるvan der Waals力に加 えて、共有結合力などの化学的相互作用も含まれてい ることが明らかとなっている。この化学結合力は探針先 端原子と試料表面原子の電子軌道HOMOとLUMOが関 与するものである。そこで、この探針プローブと試料表 面間に働く共有結合の相互作用力をX線により制御する 事、すなわち、試料中の内殻電子を励起し、HOMOあ るいはLUMOに作用させて電子密度を変化させる事が できれば、化学結合力を制御する事ができると仮説を立 てた(図1)。そして実際、この仮説に従い実験を進め、 探針-表面間の引力相互作用が試料元素X線吸収端エネ ルギーのX線照射によって変化し、それによって探針で 元素種を識別可能な事(図2)[8-10]を示してきた。そし て、少なくとも2つの異なるX線誘起の力場変化が生じ ていることを報告してきた。そして先述のように、探 針-試料間の相互作用には共有結合力が含まれるという NC-AFMの理論的解釈を踏まえて、バイアス電圧(Vs)

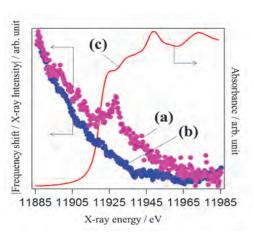


図2 a) Au表面およびb) Si表面で測定したXANAMの 力信号のX線エネルギー依存性。Auの吸収端で のみ変化が現れている。c) Au L₃吸収端X線吸収 スペクトル

に応答する成分は静電的な力、Vsに応答しない成分を 共有結合力に由来すると解釈できるとしてきた。しかし ながら、上記の解釈に理論的裏付けを与えるには至って おらず、より詳細な解析を行う必要があった。

またさらに、図2の現象を空間的に捉えることもXANAMの原理を考える上で大事である。この根幹は、探針と試料間に生じる化学結合、共有結合の電子準位であるHOMO、LUMOに対する試料からの内殻電子励起過程の解釈にある。XANAMの信号は、表層だけの原子であるのかあるいは固体内の深さ方向に幾つかの原子層が必要なのか、表層だけであって探針の直下の原子からの信号だけをみているのか、あるいはある程度の範囲にある原子の集合としての信号なのか、などをはっきりさせる必要がある。これらはさらに前述の力の成分によっても異なるであろう。すなわち、XANAMの元素イメージング能の根本を理解する必要があり、3次元的に成分毎に分けて解釈できるようになる方法が必要である。

以上を踏まえ本研究では、上記のスペクトル、イメージングにおける課題を克服する(1)スペクトル計測法・解析法および(2)元素イメージング像観察法の確立を目的に、XANAM測定装置を刷新し、NC-AFM理論に立脚した解析法ならびにX線下特有の現象の新たな展開、ナノ空間における新しい物理の存在の可能性について検討を行った。

2. 実験方法

XANAM測定の実験は全て、放射光実験施設高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設(KEK-PF、つくば市)にて行った。XANAM装置(図3)はKEK-PFに保管されており、超高真空(UHV)に排気されたNC-AFM室と試料処理室の二室で構成される。また放射光X線光路上に、AFM探針と試料がアプローチした状態を位置調整できる機構が備わっている。探針は qPlus sensor[11]技術を、独自設計して導入してある。 qPlus sensorは、音叉型水晶振動子にSTM様の探針を取り付けたAFMプローブである。尖った探針ほど共有結合力に対する感度が高いため[12]、XANAM測定に適している。また一般的なAFM光学系が不要なので、外部から光を導入する実験との相性がよい。探針作成等は、マイクロマニピュレータ等を用いて、音叉型水晶振

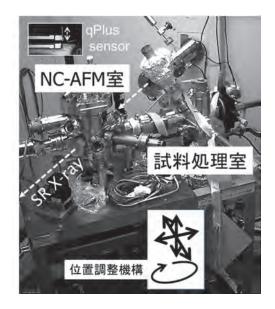


図3 KEK-PFに設置した現有装置

動子の組み付け、振動子の端へのW線材の取り付け、電解研磨等を行って作成した。W線材へは、別途トンネル電流検出用の配線も取り付けることで、STMとしての動作も可能である。これはXANAM実験においては、X線照射に伴う二次電子、光電子放出の検出に用いることができる。またX線航路上への探針および試料の精密位置合わせに利用できる。SPMコントローラはNanonis社(現SPECS)製フルデジタルコントローラを導入しており、電気ノイズ・騒音の多い実験施設においても、安定に動作することができる。これはナショナルインスツルメンツ製LabVIEWを動作させるPXIコントローラおよびFPGAユニット、NC-AFM用の探針制御を行うPLLコントローラ、信号調整システムで構成され、多チャンネルリアルタイム計測が可能な仕様となっている。

上記の装置を用いて、目的で述べた(1)スペクトル計測 および(2)元素イメージング像観察を行った。

(1)新たなスペクトル計測法の確立

ここでは図4に示す測定方法-フォーススペクトルの入射X線エネルギー依存性の測定-を行った。試料は、Auを蒸着したSi(自然酸化膜付)基板を用いた。なお、Au表面側が試料ステージと等電位になるようにセッティングした。フォーススペクトルは、探針-試料間の力依存性を、AFM探針の周波数変化で記録する方法である。X線によって力変化が誘起されれば、スペクトル形状も変化する。この測定によって、図2に含まれない距離の情報を含めたX線エネルギー依存性を議論で

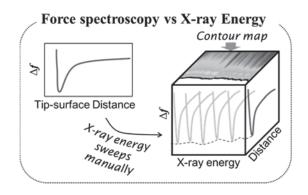


図4 フォースカーブのエネルギー依存性測定法

きるようになる。NC-AFM理論より、周波数変化から 力の大きさを知ることができる(Sader法)[13]。これを 静電的な力、van der Waals力、共有結合力の理論式を 元にした解析により、成分分離が可能となる。またX線 照射下の影響を表現する方法として、二次電子放出に伴 う電荷の空間分布の偏り、ポテンシャルに起因する力成 分を解析に取り込んだ。

一連の計算にはWolfram社製Mathematicaソフトウェアで解析コードを作成し半自動化し行った。解析の手順は、まずはX線照射下の影響を考慮しつつ静電的な力を、カイ自乗誤差が最小となるよう測定データにフィッティングし最適解を求め、測定データとの差分を求める。そしてその差分から、同様にX線照射下の影響を考慮しつつvan der Waals力成分の最適解を求める。最後に残る残渣に、化学結合を表すモース関数のフィッティングを行い、共有結合力成分としての妥当性を検証して解とする。これにより、測定データから共有結合力成分を抽出した。

(2) 元素イメージング像観察法の確立

ここでは上記の定点で行う(1)スペクトル計測法を試料表面に対して2次元的に行うことで、XANAMの本来の目的である元素イメージングへ発展させる検討を行った。すなわち、図5に示すように、表面をグリッド状に区分けし、各グリッド上でフォーススペクトル測定を行い3次元的な情報を得る。この測定手段自体は、近年のNC-AFM研究分野では、超高真空から液中の測定において、固体表面あるいは分子吸着表面に対して行うことで、NC-AFMで分子像が構成されるメカニズムの解釈[14]や、水和層の実験的観測[15, 16]など大きくの成果を挙げている手法である。XANAMではこの測定技術

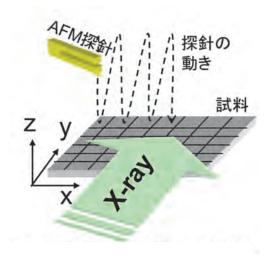


図5 XANAMの元素情報の二次元画像化法の概念図

を応用し、X線による変化のプロファイルを3次元的に取得することを試みた。これにより、力成分が分離可能な情報を空間的にマッピングし、元素イメージングが可能となると期待した。

試料は、リソグラフィー法により部分的なAu領域を作製したSi(自然酸化膜付)基板を用いた。Au領域はおよそ800x800 nm²である。またAu領域の膜厚を部分的に変えることで、おおまかであるが表層、固体内原子の影響の検討を行うことができる。そこでAu領域内の厚みが部分で20~40 nmと異なるようにした。XANAMで取得されるデータに膜厚が反映されるかの検討を行った。

3. 研究成果

(1) 定点XANAMスペクトル計測とその解析結果

Auを蒸着したシリコン基板表面に対して、Au L-3吸収端付近のエネルギー掃印で測定した結果を図6(a)に示す。X線エネルギー(横軸)および探針-試料間距離(縦軸)に対する力信号を示している。探針は表面に近づくにつれ、引力(負値)および斥力(正値)を感じ、それが色分けで示されている。エネルギーによって、同じ距離でも引力あるいは斥力の強さが変わることがわかる。すなわち、濃淡から、Au-L3吸収端エネルギー前後および吸収端エネルギー付近では、低いエネルギー前後および吸収端エネルギー付近では、低いエネルギーから高いエネルギーに向かって、強い引力→弱い引力あるいは斥力→強い引力という変化が現れていることがわかる。ここで、以前の測定データである図2の結果との対応関係を考える。図2では吸収端エネルギー位置では弱い引力、吸収端後のエネルギーでは強い引力という対応であると

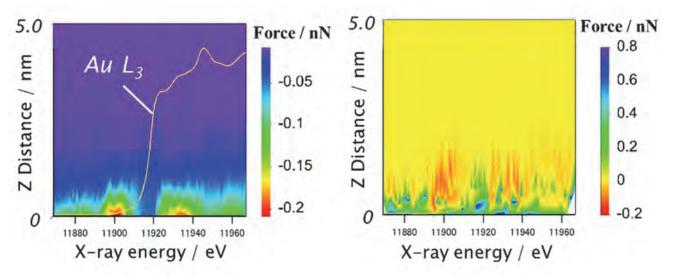


図6 X線エネルギー(横軸)および探針-試料間距離(縦軸)に対するXANAM力信号のX線エネルギー依存性。負側が引力領域の力を表す。a)測定データを力単位に変換後の変化の様子。b) a)より抽出した共有結合力の成分

解釈できる。一方で、吸収端前の引力変化が観測されていない。これは実験初期に条件の最適化が不十分で、試料と探針間距離がドリフト(シフト)し大きな変化がバックグラウンドとして現れて、失われてしまったためとすれば説明できる。実際、同様のバックグラウンドはSiでも観測されていた。このように、大きなバックグランドを抑制できたことで、今回の測定では吸収端前の引力変化を含めて計測できたと言える。

次に、図6(a)を構成する一つ一つのフォーススペク トルを解析し、統合し直すことで描画した共有結合力 成分の結果を図6(b)に示す。前述の図6(a)で吸収端 付近に現れている変化は、図6(b)の共有結合でも同様 に、引力→斥力→引力となっていた。同様に抽出を行っ た静電的な力とvan der Waals力にはこうしたX線エネ ルギーに依存性する明確な傾向はみられなかった。以上 より、図6(a)で吸収端付近に現れた変化は、主に図6 (b)での共有結合成分に由来しているということを示す ことができた。すなわち、XANAMの原理として見つ けた現象の解釈、すなわち内殻の電子励起により探針-試料間の共有結合に変化を与えるとする解釈に理論的裏 付けを与えることができた。共有結合が引力→斥力→引 力と変化するのは、言い換えれば、結合的→反結合的→ 結合的に変化が起きるとみることができる。今後はこの 結合力の変化の解釈を、内殻電子励起と結びつける理論 計算等を検討したいと考えている。

(2) 元素イメージング像観察の結果

元素イメージングについての結果を図7に示す。この場合はX線エネルギーを任意の値に固定し、区画として画面全体を64×64の格子に分け、それぞれの区画の中心でフォーススペクトル測定を画面全体に対して行った。これにより、左列の形状像の信号と同時に、右列のフォーススペクトル像を取得した。右列のフォーススペクトル像は試料表面からの距離を同じ位置で切り出して再構成することで、相互作用の大小を表す画像になっている。さらに図7では上段に吸収端エネルギーよりも低

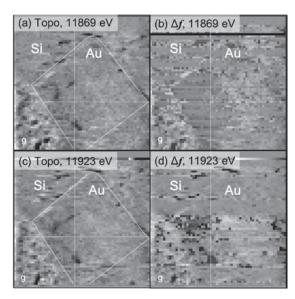


図7 図6の方法で取得した予備実験結果。(左)トポ グラフ情報、(右)原子間力の情報。上段、下段 では、2つのX線照射エネルギーの場合を示す

い場合、下段に吸収端付近の場合を示す。測定領域は、 $2\times2~\mu m^2$ で、中心付近に方形のAu領域がある。また方形の右上半分でAuの膜厚が厚くなっている領域に当たる。その他の領域はSi(自然酸化膜付)が露出した領域になる。

形状像およびフォーススペクトル像に対するX線エネルギーの影響を画像から評価すると、まず左列の形状像では、明瞭な違いは見られないことがわかる。一方で、右列のフォーススペクトル像では不鮮明な点はあるが、異なる傾向は現れているとみることができると考えている。しかしながら、結論として明瞭な違いを言うには至らなかった。膜厚の効果についても、薄い領域で色の濃い領域が部分的にでも現れてはいるが、今後の検討課題としたい。この改善方法としては、現データから形状効果を除く処理を施すことが挙げられる。形状の差が相互作用の差を見かけ上、不明瞭にしているならば、解析プログラムの改良により形状情報を除くことで可能である。また、形状のより小さなナノ構造を試料に今回の計測方法の適用を検討したいと考えている。

4. まとめと今後の展開

本研究では、これまで懸案であったXANAMの原理 的側面および元素イメージングについて実験的、理論的 成果を得た。これまでのXANAMの測定で乱されてい た共有結合力に由来するX線誘起の変化に対して、解釈 の理論的裏付けを与えることが出来た。またX線照射下 でのフォーススペクトルの力成分解析を行う方法が確立 できた。さらに、この方法を試料表面に2次元展開する ことで、X線による変化のプロファイルを3次元的に取 得する方法論を確立した。ただし、この方法は、探針先 端が常に試料表面と衝突する危険性があり、実験的難易 度は非常に高く、なかなか探針形状の変化の影響を除く のも大変であった。これを解決するためには、より正確 かつ精密に探針-試料間距離を制御できれば良く、今後 の改良が必要である。またX線エネルギー毎に取得した 情報は膨大であり、計算時間を短縮する解析方法の改良 も必要である。これらの改良により、より的確な計測を 可能になり応用面での共同研究などへつながっていくこ とを期待している。今後も継続して開発研究を行いた 61

(謝辞)

本研究を遂行するに当たり、北海道大学触媒科学研究所 朝倉清高教授、高エネルギー加速器研究機構 野村 昌治教授(現理事)、国際基督教大学 田旺帝教授、東京 大学物性研究所 長谷川幸雄准教授、同新領域創成科学研究科 杉本宜昭准教授にご助言、ご支援を賜りました。ここに感謝の意を表します。

(参考文献)

- [1] T. Matsushima, T. Okuda, T. Eguchi, M. Ono, A. Harasawa, T. Wakita, A. Kataoka, M. Hamada, A. Kamoshida, Y. Hasegawa, T. Kinoshita, Rev. Sci. Instrum. 75(6) (2004) 2149–2153.
- [2] T. Okuda, T. Eguchi, T. Matsushima, M. Hamada, X.D. Ma, A. Kataoka, A. Harasawa, T. Kinoshita, Y. Hasewgawa, J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom. 144 (2005) 1157–1161.
- [3] T. Eguchi, T. Okuda, T. Matsushima, A. Kataoka, A. Harasawa, K. Akiyama, T. Kinoshita, Y. Hasegawa, M. Kawamori, Y. Haruyama, S. Matsui, Appl. Phys. Lett. 89(24) (2006) 243119.
- [4] A. Saito, J. Maruyama, K. Manabe, K. Kitamoto, K. Takahashi, K. Takami, S. Hirotsune, Y. Takagi, Y. Tanaka, D. Miwa, M. Yabashi, M. Ishii, M. Akai-Kasaya, S. Shin, T. Ishikawa, Y. Kuwahara, M. Aono, Jpn. J. Appl. Phys., Part 1 45(3B) (2006) 1913–1916.
- [5] A. Saito, Y. Takagi, K. Takahashi, H. Hosokawa, K. Hanai, T. Tanaka, M. Akai-Kasaya, Y. Tanaka, S. Shin, T. Ishikawa, Y. Kuwahara, M. Aono, Surf. Interface Anal. 40(6-7) (2008) 1033-1036.
- [6] Y. Sugimoto, P. Pou, M. Abe, P. Jelinek, R. Perez, S. Morita, O. Custance, Nature 446 (7131) (2007) 64-67.
- [7] T. Okuda, T. Eguchi, K. Akiyama, A. Harasawa, T. Kinoshita, Y. Hasegawa, M. Kawamori, Y. Haruyama, S. Matsui, Phys. Rev. Lett. 102(10) (2009) 105503.
- [8] S. Suzuki, M. Nakamura, K. Kinoshita, Y. Koike, K. Fujikawa, N. Matsudaira, W.J. Chun, M. Nomura, K. Asakura, J. Phys.: Conf. Ser. 61 (1) (2007) 1117.

- [9] S. Suzuki, Y. Koike, K. Fujikawa, N. Matsudaira, M. Nakamura, W.J. Chun, M. Nomura, K. Asakura, Catal. Today 117 (1-3) (2006) 80-83.
- [10] S. Suzuki, Y. Koike, K. Fujikawa, W.J. Chun, M. Nomura, K. Asakura, *Chem. Lett.* 33(5) (2004) 636–637.
- [11] F.J. Giessibl, *Appl. Phys. Lett.* 76(11) (2000) 1470–1472.
- [12] T. Eguchi, Y. Hasegawa, Phys. Rev. Lett. 89(26) (2002) 266105.
- [13] J.E. Sader, S.P. Jarvis, *Appl. Phys. Lett.* 84(10) (2004) 1801–1803.
- [14] C. Moreno, O. Stetsovych, T.K. Shimizu, O. Custance, *Nano Lett.* 15(4) (2015) 2257–2262.
- [15] T. Fukuma, Journal of Nano Research 4 (2008)
- [16] T. Fukuma, *Jpn. J. Appl. Phys.* 48(8) (2009) 08[A01.

5. 主な成果

論文

- (1) "Development of a novel surface elemental analysis methodology X-ray aided noncontact atomic force microscopy (XANAM)", <u>S. Suzuki</u>, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 88 (2015), 240–250.
- (2) "Force components in XANAM measurements for surface chemical analysis", <u>S. Suzuki</u>, S. Mukai, Y. Koike, K. Kinoshita, K. Fujikawa, W.J. Chun, M. Nomura, and K. Asakura, Proceedings of 10th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices' 15 (ALC'15). 2015.

国際会議発表

- (1) <u>S. Suzuki</u>, S. Mukai, W. J. Chun, M. Nomura, K. Asakura, ALC 2015, Matsue, Shimane, 10/25–30, 2015.
- (2) S. Suzuki, S. Mukai, W. J. Chun, M. Nomura, K.

- Asakura, NC-AFM2015, Cassis, France, 9/7-11, 2015
- (3) <u>S. Suzuki</u>, The 4th Carbon Based Nano-Materials (CBNM4), Nagano, 3/16–18, 2015.
- (4) S. Suzuki, S. Mukai, W. J. Chun, M. Nomura, K. Asakura, The 7th International Symposium on Surface Science (ISSS-7), Matsue, Shimane, 11/2-6, 2014.

国内会議

- (1) <u>鈴木秀士</u>,向井慎吾,田旺帝,野村昌治,朝倉清高,第 63回応用物理学会春季学術講演会,東京工業大学 (大岡山), 3/19-22, 2016.
- (2) <u>鈴木秀士</u>,向井慎吾,田旺帝,野村昌治,朝倉清高, 2015年真空・表面科学合同講演会(第35回表面科学 学術講演会・第56回真空に関する連合講演会),つ くば国際会議場(つくば),12/1-3,2015.
- (3) <u>鈴木秀士</u>, 第7回 岩澤コンファレンス「サスティナブル社会のための最先端触媒化学・表面科学」, 千葉大学, 9/28-29, 2015.
- (4) <u>鈴木秀士</u>,向井慎吾,田旺帝,野村昌治,朝倉清高,第 76回応用物理学会秋季学術講演会,名古屋国際会議 場(名古屋),9/13-16,2015.
- (5) <u>鈴木秀士</u>,向井慎吾,田旺帝,野村昌治,朝倉清高, 2015年第7回埋もれた界面のX線・中性子解析研 究,名古屋国際会議場(名古屋),9/14,2015.
- (6) <u>鈴木秀士</u>,向井慎吾,田旺帝,野村昌治,朝倉清高,平成26年度放射光表面科学研究部会・顕微ナノ材料科学研究合同シンポジウム,あいち産業科学技術総合センター(瀬戸市),7/31-8/1,2014.
- (7) <u>鈴木秀士</u>,向井慎吾,田旺帝,野村昌治,朝倉清高,第 34回表面科学学術講演会,松江,11/6-8,2014.
- (8) <u>鈴木秀士</u>,向井慎吾,田旺帝,野村昌治,朝倉清高,第75回応用物理学会秋季学術講演会,北海道大学(札幌),9/17-20,2014.
- (9) <u>鈴木秀士</u>,向井慎吾,田旺帝,野村昌治,朝倉清高,第 62回応用物理学会春季学術講演会,東海大学湘南 キャンパス,3/11-14,2015.

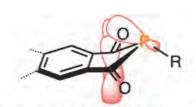
リン元素を機能発現の鍵とする新規π共役分子の開発

大阪大学 大学院工学研究科 武田 洋平

1. 緒言

昨今、エレクトロニクス分野の発展は大変目覚まし く、身近な生活においても、パソコンや携帯電話が年々 軽量化・小型化されていく状況は、SF的な近未来を予 感させてくれる。当然、エレクトロニクス分野の発展に は、機能材料の進歩が欠かせないわけであるが、近年特 にπ電子共役有機化合物から成る有機材料が注目されて いる。無機材料と比較して材料製造やデバイス作製にか かるコストが潜在的に低いことに加え、軽量性・柔軟性 をデバイスに附与できる点は大きな利点である。従っ て、有機機能性化合物の創出は、材料開発に繋がり得る 重要な基礎研究と位置付けられる。光・電気的機能は、 主にπ共役電子系により発現されることから、これまで 芳香族炭化水素化合物やそれらのユニットから構成され る共役高分子が有機エレクトロニクス材料の主たる候補 として研究されてきた。その一方で、炭素や水素以外の 元素(ヘテロ元素)をπ共役骨格、または周辺部へ導入す ると、電気陰性度・原子半径・結合に関与する軌道の変 動によりπ電子系に摂動が与えられることで、対応する 炭化水素分子の光・電気的機能とは大きく異なる機能を 創出することができる。

我々は最近、このような観点から15族元素であるリン



i) α*-π*超共役による空軌道エネルギーの安定化、電子受容性の向上
 ii) 強力な電子求引基(カルボニル基)による化学安定性の向上
 iii) リン原子の多様な原子価を活用するポスト官能化
 iv) ピラミッド反転を活かした"しなやかな"機能システム

原子を機能発現の鍵とする新規 π 共役系分子、高分子の 創出に成功した $^{1.4.6)}$ 。以下の機能発現を期待し、カルボ ニル基二つで芳香環ユニットとリン中心を架橋したジケ トホスファニル化合物(図1)を設計した。

- i) 結合軸方向へ大きく張り出したリンー炭素 $(P-R)\sigma^*$ 結合と芳香族 – ジカルボニルユニットで形成される π^* 軌道間に負の超共役が働くことで、空軌道エネル ギー安定化、電子受容性の向上が期待できる。
- ii) 強力な電子求引基であるカルボニル基二つがリン原子に直接結合していることで、誘起効果を通じてリン原子上の電子密度が既知のトリオルガノホスフィンよりも低下し、結果的に酸素や水など酸化条件に対する化学安定性の向上が予想できる。
- iii) 第三周期に位置するリン元素は同族第二周期の窒素とは異なり、様々な原子価(2~6価まで可能)をとることが知られており、この多様性を活用することで、化学修飾に基づく立体・電子構造制御を目指した。
- iv) 一般的に、3価の有機リン化合物はピラミッド構造をとっていることが知られているが、反転障壁はア

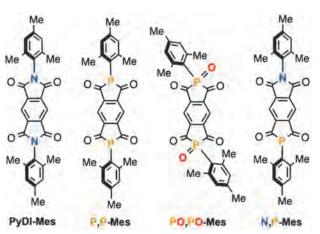


図2

図1

a) Synthetic route to P,P-Mes and PO,PO-Mes

図3

ミン化合物よりも大きい。しかし、カルボニル基の存在による反転遷移状態の安定化(2p-3p相互作用)により"しなやかさ"を獲得できれば、ダイナミックな機能制御を実現できる可能性がある。

2. 芳香族ビス (ジケトホスファニル) 化合物の創成

まず最初に設計したのは、主に電子受容性の機能色素として有名な芳香族ジイミド化合物群のうち、 π 共役コアが最小で、かつn型有機半導体材料としても実際に駆動することが知られているピロメリット酸ジイミド(PyDI)のリン等価体である(図2) 1)。合成ルートを図3に示す。3価の五員環ジケトホスファニル化合物(P,P-MesおよびN,P-Mes)は、ジシリルホスフィン反応剤と酸塩化物の縮合反応で合成した。また、5価のホスフィンオキシド(PO,PO-Mes)は、P,P-MesをmCPBAで酸化して得た。

これらリン化合物の希薄溶液のUV-Visスペクトルを 測定したところ、リン化合物の吸収波長ならびに吸収 末端($\lambda_{\rm edge}$)は窒素類縁体(**PyDI-Mes**)のそれよりも著 しく長波長シフトしていることがわかった(例えば、 $\lambda_{\rm edge}$ (**PyDI-Mes**)344 nm; $\lambda_{\rm edge}$ (**P,P-Mes**)385 nm; $\lambda_{\rm edge}$ (**PO,PO-Mes**)455 nm)。これらの化合物は3価の有機リン化合物であるにも関わらず、空気中で安定であり、その熱的安定性も比較的高いことがわかった($T_{\rm d}$ (5 wt% loss, under air) ~ 300 °C)。これは、おそらく予想通り、ジカルボニル基の強い電子求引効果により安定化が向上したと考えられる。また、**P,P-Mes**の単結晶X線構造解析からは、この分子が固体中においては中心のベンゼン環平面に対して二つのリン原子が互いに逆側に位置する *anti*体として存在していることがわかった(図4)。

固体中の構造とは対照的に、**P,P-Mes**の温度可変³¹P NMR測定からは、この分子が溶液中ではピラミッド反

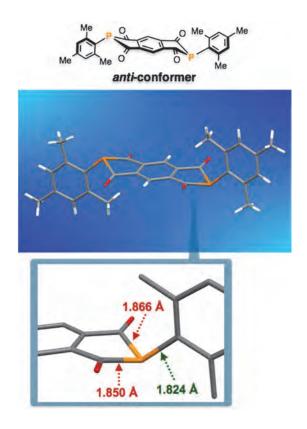


図 4

転を高速で繰り返してanti-syn体の平衡混合物として存在していることがわかった(図5)。動的NMR解析から算出したピラミッド反転障壁は $\Delta G_{25}^{\, \pm}=11.7$ kcal/molであり、過去に報告されている様々な3価の有機リン化合物の反転障壁 2 に比べて相当低いことがわかった。この値は有機リン化合物の反転障壁というよりは、アミン化合物のそれに近い(5 \sim 10 kcal/mol)ことは注目に値する。この異常なまでに低い反転障壁は、反転における遷移状態(リン原子がベンゼン平面上に位置する構造)が、2p(CO)-3p(P)相互作用により安定化された結果と

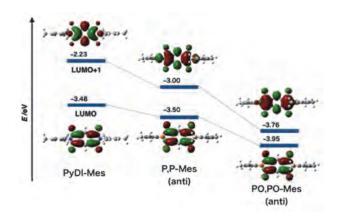
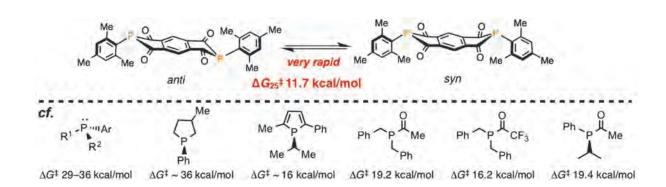


図6

考えている。

また、理論計算(DFT法) からは、リン原子を導入することでLUMOおよびLUMO+1のエネルギー準位が低下することがわかった(図6)。とりわけ、リン原子上を酸化してホスフィンオキシドに変換すると、LUMO+1は顕著に安定化された。本結果は、リン原子上の化学修飾により電子状態の制御が可能であることを示している。本結果は、電気化学的測定(サイクリックボルタンメトリー法)における還元電位のポジティブシフトとも一致する(例えば、 $^{\text{red}1}E_{1/2}(\mathbf{PyDI-Mes})$ -1.30 V, $^{\text{red}2}E_{1/2}(\mathbf{PyDI-Mes})$ -1.68 V; $^{\text{red}1}E_{1/2}(\mathbf{PO,PO-Mes})$ -0.76 V, $^{\text{red}2}E_{1/2}(\mathbf{PO,PO-Mes})$ -1.26 V)。以上の結果から、ピロメリック酸イミドのリン等価体は、優れた電子受容体として働くことが示唆され、将来的には有機 $^{\text{N}2}$ 型材料としての応用も期待できる。



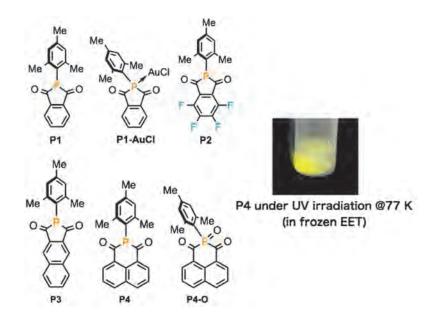


図 7

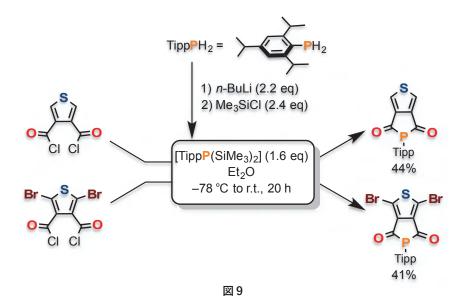
3. ベンゼンまたはナフタレン縮環ジケトホスファニル 化合物の物性調査

過去に合成だけは報告されている 3 が、物性が未解明なジケトホスファニル骨格を有する化合物を合成し、それらの基礎物性を調査した $(図7)^{4}$ 。窒素類縁体と物性比較すると、やはりこれらの化合物が対応するイミド分子よりも電子受容性に優れていることが明らかになった。また、興味深いことに、一部のジケトホスファニル化合物は低温 $(77\ K)$ で大きなStokesシフトを示す蛍光を発することが明らかになってきた(例えば、 λ_{em} (P4 $) = 577\ nm; au_{1} = 0.63\ ns (12%), au_{2} = 5.1\ ns (88%); Stokesシフト~5012\ cm^{-1}$ 、(図7)。現在のところ、この異常に大きなStokesシフトを示す蛍光の起源は不明ではあるが、励起状態における大きな構造緩和に由来するものであると考えている。

4. リン含有狭バンドギャップ共役ポリマーの創成、お よびポスト官能化⁶⁾

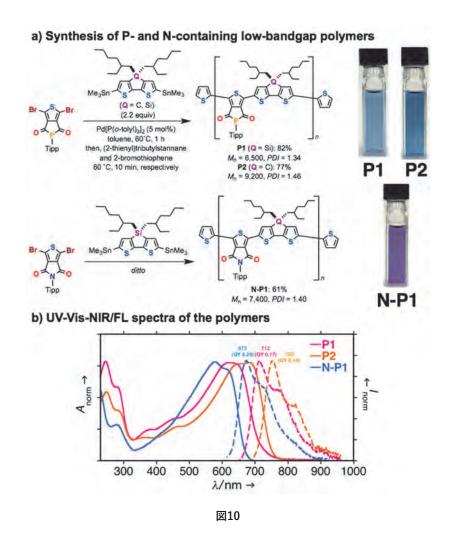
ジケトホスファニル骨格が対応するイミド化合物よりも電子受容性を向上させるのに適していることがわかったことから、これらをドナー・アクセプター型狭バンドギャップ高分子のアクセプタービルディングブロックとして活用できないかと考えた。チエノ[3,4-c]ピロール-4,6-ジオン(TPYRDOs)は、チオフェンの2,5-位での官能化しやすさ、高い平面性、キノイド構造の寄与による有効共役長の伸長のしやすさ、などからドナー・アクセプター型狭バンドギャップ高分子のアクセプターユニットとして活用されている(図8)⁵⁾。発想はいたって単純で、TPYRDO骨格の窒素をリンで置換すれば(TPHODOs)、アクセプター性の向上によるバンド幅の減少や、ポリマー化後にリン中心を化学修飾(ポスト官能化)することで、バンド幅を変調できることが期待で

図8



きる。

モノマーは、系中で発生させたジシリルホスフィンと チオフェンジカルボン酸の酸塩化物との縮合で合成した (図9)。 得られたモノマーを用いて、ドナーユニットとクロスカップリング重合させたところ、ドナー・アクセプター型のポリマー**P1**, および**P2**がジケトホスファニル基を損なうことなく、高収率で得られた(図10a)。対応する窒



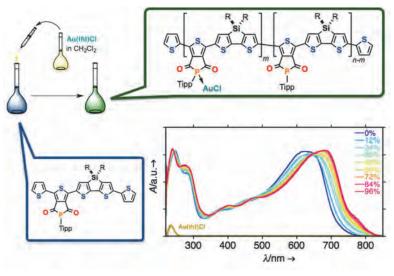


図11

素等価体のポリマーN-P1も同様の手法で合成した。合成したポリマーの吸収・発光スペクトルを比較すると、予想した通り、リン含有ポリマーP1およびP2は窒素類延体よりも、吸収・発光いずれにおいても長波長シフトすることが明らかとなった(図10b)。

合成したリンポリマー(ジクロロメタン溶液)に金錯体の希薄溶液を加えていくと、次第に長波長側の吸収帯が長波長シフトし、バンドギャップを変調できることがわかった(図11)。これは、ポリマー中の一部のリン中心が金と錯形成した結果と考えている。

以上、我々は芳香族イミド分子のリン等価体としてのジケトホスファニル化合物を創成し、これらの基礎物性を明らかにするとともに、ジケトホスファニル化合物の特徴を活用した機能性ポリマーの創出にも成功した。今後、これらの知見を駆使し、より高次機能化リン含有機能性物質の創出を目指したい。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援賜りました公益財団法人 松籟科学技術振興財団に深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- Takeda, Y.; Nishida, T.; Minakata, S. Chem. Eur. J. 2014, 20, 10266-10270.
- 2) Mislow, K. Trans. N. Y. Acad. Sci. **1973**, 35, 227–242.
- Barron, A. R.; Hall, S. W.; Cowley, A. H. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1987, 1753–1754.
- Takeda, Y.; Nishida, T.; Hatanaka, K.; Minakata, S. Chem. Eur. J. 2015, 21, 1666-1672.
- Pron, A.; Berrouard, P.; Leclerc, M. *Macromol.* Chem. Phys. 2013, 214, 7-16.
- Takeda, Y.; Hatanaka, K.; Nishida, T.; Minakata,
 S. Chem. Eur. J. 2016, Early View (doi: 10.1002/ chem.201602392).

拡張型ポリアニリン誘導体の精密合成と有機デバイス応用

東京工業大学 物質理工学院 道信 剛志

1. はじめに

有機電界効果トランジスタ(OFET)や有機薄膜太陽電池(OPV)などの有機半導体を用いたデバイスは、軽量・フレキシブル・大面積化が容易・低コストなどの利点から近年、既存の無機デバイスに代わる次世代デバイスとして注目を集めている。しかし、性能面で無機デバイスに劣っていることからいまだ実用化には至っておらず、性能向上を目指した新しい分子骨格の開発が続けられている。最近の研究ではイソインジゴやジケトピロロピロールなどの有機顔料分子が優れたアクセプター(n型半導体)となることが報告されており、化学修飾や高分子化によってさらなる性能向上が試みられている。

カルバゾールは含窒素芳香族化合物であり、平面性が高く高性能反応代材料の基幹構造と位置付けられる。例えば、有機ELにおけるホスト材料として用いられてきたPVKや色素増感太陽電池の増感色素MK-2は試薬会社から市販されている。また、2,7-位で連結したカルバゾールとベンゾチアジアゾールの交互共重合体PCDTBIは高性能半導体としてアモルファスシリコンに迫る移動度と優れた光電変換特性が報告されている[1,2]。我々のグループでも独自のアプローチで1,8-位連結のカルバゾール高分子を合成し、その物性を詳細に調査してきた[3,4]。

本研究では、これらカルバゾールを含む機能性有機材料の可能性を広げるため、新たなカルバゾール含有構造としてカルバゾールジオキサジンに着目した。カルバゾールジオキサジン誘導体は紫色の顔料であり、古くから水彩絵具や塗料として使用されてきたが、有機デバイスへの応用例はない。アルキル長鎖を置換して溶媒可溶となったカルバゾールジオキサジン誘導体はp-フェニレン連結型の縮環オリゴアニリンと捉えることができる。m-フェニレン連結型の縮環ポリアニリンは既報で

あるが、構造明確なp-フェニレン連結体は未開拓である[5,6]。薄膜状態でのトランジスタ特性を調査し、新規半導体としての可能性を整理した。

2. 実験

合成は市販の有機・無機試薬を用いて行った。構造は 1 H-NMR、 13 C-NMR、IR、MALDI-TOF MSより確認した。紫外可視吸収スペクトルはJASCO V-670を用いて測定した。サイクリックボルタモグラムはITO基板上に作製した薄膜を $\mathrm{CH_3CNP}(+0.1\ \mathrm{M}\ (n\mathrm{C_4H_9})_4\mathrm{NPF_6})$ 中で測定した。参照電極は $\mathrm{Ag/AgCl}$ 、対極は Pt 線を用いた

トップコンタクト/ボトムゲート型の薄膜トランジスタは以下のように作製した。まず、Si基板を純水、アセトン、2-プロパノールで洗浄した。その後、UV-O₃洗浄装置を用いて20分間オゾン洗浄を行った。この基板上にトリメトキシオクタデシルシラン (OTMS)のトリクロロエチレン溶液 $(1.4~\mu L~mL^{-1})$ ををスピンコート (3000~rpm、15~s) した後、アンモニア水を入れたフラスコ中で3~5時間真空下に置いた。基板を取り出して純水、アセトンで洗浄後、カルバゾールジオキサジン誘導体のクロロホルム溶液 $(8~mg~mL^{-1})$ をArを満たしたグローブボックス中でスピンコート (2000~rpm、30~s) した。必要に応じて5分間の熱アニール処理をした。最後にマスクを用いて金電極を真空蒸着した後、大気下でトランジスタ特性を評価した。

微小角入射X線広角回折(GIWAXD)測定はBruker D8 DISCOVERを用いて行った。

3. 結果および考察

カルバゾールを出発物質としてN位アルキル化、3位 ニトロ化、還元によるアミノ化を経た後、ベンゾキノ

Scheme 1 Synthesis of carbazoledioxazine derivatives.

ン誘導体との縮合反応により**5I-5III**を得た(Scheme 1)。 TsCIを用いて脱水素閉環させ目的化合物**6I-6III**の合成を 完了した。得られたカルバゾールジオキサジン誘導体は 分岐アルキル基が置換しているため高い溶解性を示し、 クロロホルムやジクロロメタン等の汎用有機溶媒に均一 溶解した。そのため、IRやMALDI-TOF MS測定に加 えて¹H NMRおよび¹³C NMRより確実に構造同定した。 **5I-5III**を閉環させると直線型とジグザグ型の2種類の構 造生成が予想されたが、ジグザグ型のみが選択的に得ら れた。 6I-6IIIの吸収スペクトルおよび酸化還元電位よりエネルギー準位を見積もったところ、ハロゲン置換基によらず全てのカルバゾールジオキサジン誘導体はほとんど同じHOMO、LUMO準位を有していた。6I-6IIIのクロロホルム溶液を作製して吸収スペクトルを測定したところ、610nm付近に非常に強い吸収極大を示し、吸収端から計算したバンドギャップは約1.9eVとなった(Fig. 1a)。また、サイクリックボルタモグラム測定では明確な酸化還元波が観測され、HOMOおよびLUMO準位はそれぞれおよそ-5.3 eV、-3.5~-3.6 eVと算出された(Fig. 1b)。

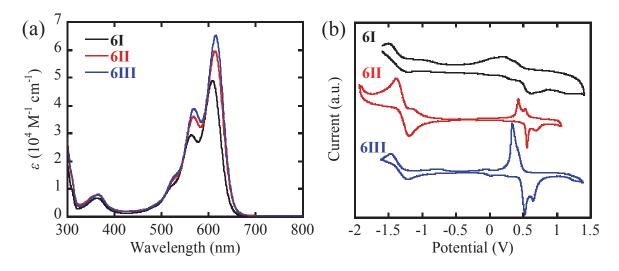


Figure 1. (a) UV-vis absorption spectra and (b) CV curves of 61-6111.

OTMS処理したSi基板上に**6I-6III**をスピンコートして 薄膜トランジスタを作製し、特性を調査した。全てのカ ルバゾールジオキサジン誘導体でp型特性を示した(Fig. 2)。ホール移動度は熱アニーリング処理することで向 上した。例えば、**6I**のトランジスタはアニーリング処 理無しでは移動度 $9.7 \times 10^{-7}~\text{cm}^2~\text{V}^{-1}~\text{s}^{-1}$ であったが70℃で アニーリング処理すると $2.3 \times 10^{-6}~\text{cm}^2~\text{V}^{-1}~\text{s}^{-1}$ へ向上した (Table 1)。さらにアニーリング温度を110℃へ上げると 移動度も向上し、最終的には $3.1 \times 10^{-5}~\text{cm}^2~\text{V}^{-1}~\text{s}^{-1}$ に到達した。同様の特性は611および6111でも見られ、最も高い

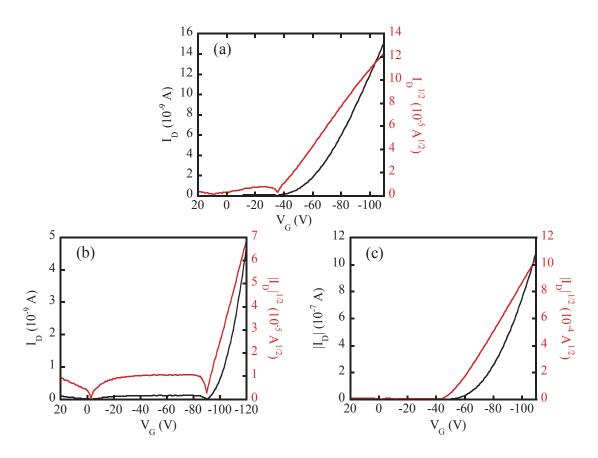


Figure 2. Transfer characteristics of (a) 61, (b) 611, and (c) 6111 under optimized conditions.

Table 1. Summary of thin film transistor performances of 61-6111

	Annealing temp. (°C)	$\mu_{av}\left[\mu_{max}\right]\left(cm^{2}\;V^{\text{-}1}\;s^{\text{-}1}\right)$	$V_{\mathrm{th}}\left(V\right)$	$I_{ m on}/I_{ m off}$
6I	-	$9.7 \times 10^{-7} [9.7 \times 10^{-7}]$	-47	1.6×10^{2}
	70	$2.3 \times 10^{-6} \ [2.9 \times 10^{-6}]$	-32	2.2×10^2
	110	$3.1 \times 10^{-5} [4.4 \times 10^{-5}]$	-60	8.4×10^2
6II	-	$1.2 \times 10^{-5} [2.6 \times 10^{-5}]$	-78	8.9×10^{1}
	70	$7.1 \times 10^{-6} \ [1.2 \times 10^{-5}]$	-78	6.7×10^2
	150	$2.7 \times 10^{-5} \ [7.0 \times 10^{-5}]$	-100	5.4×10^{1}
	200	$1.2 \times 10^{-5} [1.2 \times 10^{-5}]$	-50	3.3×10^{3}
6III	-	1.4×10 ⁻⁴ [3.9×10 ⁻⁴]	-52	2.7×10^3
	140	$4.0 \times 10^{-3} [4.9 \times 10^{-3}]$	-70	1.1×10^4
	220	$3.2 \times 10^{-3} [3.8 \times 10^{-3}]$	-60	1.9×10^{2}

移動度は**6川**のデバイスを140°C でアニーリング処理した際に得られた $(4.0 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$ 。

エネルギー準位がほぼ同じであるにも関わらずトランジスタ特性が異なっている理由を解明するため、6I-6IIIの薄膜をGIWAXS測定した。6Iと6IIの薄膜中では分子は層状構造を形成しているのに対し、6IIIの薄膜は単斜晶構造を示唆するピークを示した。すなわち、6IIIの薄膜中ではキャリアの伝導経路が複数存在していることに対応しており、それによって優れたトランジスタ特性が得られたと考えられる。

4. おわりに

拡張型ポリアニリン誘導体のオリゴマーモデルとなるカルバゾールジオキサジン誘導体の合成に成功し、それらの薄膜トランジスタ特性を評価した。ハロゲン置換基の種類によって薄膜中の分子配列構造が異なり、Br誘導体で最も高い移動度を示した。今後はこの知見をもとにポリアニリン型に拡張した高分子の合成を目指す。

5. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご支援を賜りました 公益財団法人松籟科学技術振興財団に心より御礼申し上 げます。

6. 参考論文

- [1] S. Cho, A. J. Heeger et al., Adv. Mater. 2010, 22, 1253.
- [2] S. H. Park, K. Lee, A. J. Heeger et al., *Nat. Photon.* 2009, 3, 297.

- [3] T. Michinobu, H. Osako, K. Shigehara, Macromolecules 2009, 42, 8172.
- [4] S. Habuchi, H. Fujita, T. Michinobu, M. Vacha, J. Phys. Chem. B 2011, 115, 14404.
- [5] T. Michinobu, H. Kumazawa, K. Shigehara, *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 620.
- [6] T. Michinobu, H. Kumazawa, E. Otsuki, H. Usui, K. Shigehara, J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 2009, 47, 3880.

7. 関連論文

- H. Fujita, T. Michinobu, Heterocycles 2014, 89, 2346–2355. Stepwise Syntheses of 3,6-Carbazole-Based Conjugated Oligomers.
- [2] Y. Wang, T. Kadoya, L. Wang, T. Hayakawa, M. Tokita, T. Mori, T. Michinobu, J. Mater. Chem. C 2015, 3, 1196–1207. Benzobisthiadiazole-Based Conjugated Donor-Acceptor Polymers for Organic Thin Film Transistors: Effects of π-Conjugated Bridges on Ambipolar Transport.
- [3] T. Michinobu, Macromol. Chem. Phys. 2015, 216, 1387-1395. Click Functionalization of Aromatic Polymers for Organic Electronic Device Applications.
- [4] T. Michinobu, N. Yamada, Y. Washino, K. Nakayama, J. Nanosci. Nanotechnol. in press. Novel Design of Carbazole-Basesd Donor-Acceptor Molecules for Fullerene-Free Organic Photovoltaic Devices.

省エネ有機ELディスプレイを指向した 結晶化誘起型発光材料の開発

京都大学 大学院工学研究科 田中 一牛

Boron Diiminate with Aggregation-Induced Emission and Crystallization-Induced Emission Enhancement Characteristics

Ryousuke Yoshii, Amane Hirose, Kazuo Tanaka, and Yoshiki Chujo

Abstract

Boron diiminates exhibit not only aggregation-induced emission property but also crystallization-induced emission enhancement property resulting from molecular motions of the boron-chelating rings and the phase transition from crystalline state to amorphous state. Furthermore, the optical properties can be repeatedly controlled by simple external stimuli such as fuming-heating or heating-cooling cycles.

Solid-state fluorescent organic dyes have attracted a great deal of attention because of their fundamental importance and applicability in various modern technologies such as organic light-emitting diodes, 1 photodynamic therapy² and fluorescent sensors.³ While the emission of fluorescent organic dyes is usually quenched in solid states by aggregation-caused quenching (ACQ) effect owing to the formation of delocalized excitons or excimers,4 several molecules which exhibit aggregation-induced emission (AIE) property were first reported by Tang et al. in 2001.5 In addition, Tang et al. have also presented some fluorescent organic dyes with crystallization-induced emission enhancement (CIEE) characteristics:⁶ The strong emission of π -conjugated system can be induced efficiently only in the crystal states. This behavior is exactly opposite to the common ACQ effect of usual chromophores. Thus, CIEE-active molecules



Chart 1. Boron diketonate derivatives.

are promised to be multi stimuli-responsive materials such as thermal and vapor sensors. However, only a limited number of CIEE-active organic compounds have been discovered yet. Therefore, an exploration in new CIEE chromophores is still of great interest.

Boron diketonate derivatives are an important class of organoboron dyes due to their prominent photoproperties.⁷ Fraser *et al.* have found prominent fluorescence and room temperature phosphorescence from boron diketonates^{8a, 8b} and further intriguing reversible mechanochromic fluorescence from boron avobenzone between solid and melt states.^{8c} Previously,

we have also embarked on a keynote aimed at preparing high luminescent materials based on boron diketonate derivatives. However, in the solid state, the emissions of those boron diketonate moieties usually decreased via the ACQ effect caused by intermolecular π - π stacking interaction. On the other hand, we have reported that boron ketoiminates were AIE-active materials, and their AIE properties were strongly affected by the boron-chelating ring including a boron-nitrogen (B-N) bond. Don't be a keynote aimed at the properties were strongly affected by the boron-chelating ring including a boron-nitrogen (B-N) bond.

In this research, we focus on boron diiminate derivatives, which are an analogue to boron diketonate, as a new class of AIE- and CIEE-active organoboron complexes because boron diiminates have a boron-chelating ring containing two B-N bonds (Chart 1). Furthermore, comparing to boron diketonates and boron ketoiminates, there is room in boron diiminates for functionalization deriving from their two nitrogen atoms which can bond various substituents. Since the regulation of intermolecular interactions in solid state is very important to develop a CIEE property, boron diiminates with high functionality have a high potential as CIEE-active materials, although the synthesis and the optical property of boron diiminate have been only a few reported.¹¹

We describe herein the efficient synthesis, the photoproperties of boron diiminate derivatives and the verification of their AIE properties. They exhibited not only AIE characteristics but also CIEE characteristics (in THF: Quantum yield of photoluminescence $\Phi_{\rm PL} < 0.01$, in the crystal states: $\Phi_{\rm PL} = 0.11 \sim 0.23$, in the amorphous states: $\Phi_{\rm PL} = 0.02$), resulting from suppression of molecular motions involving boronchelating rings and difference of the packing structure in the solid states. In addition, we demonstrate the reversible regulations of optical properties by simple external stimuli such as fuming-heating or heating-cooling cycles.

To synthesize 1,3-diaryldimine derivatives, the reaction of *N*-phenylimine **1** and imidoyl chloride **2** (Scheme 1) was employed. As a result, the diimine

Scheme 1. Synthetic route of boron diiminate 4.

derivatives were successfully obtained. Finally, the desired boron diiminates (**4a** and **4b**) were prepared by boron-complexation using BF₃·OEt₂. It is proposed that this synthetic strategy should be valid for the preparation of boron diiminates with bulky groups at the nitrogen atoms.

The optical properties of 4a and 4b were investigated by UV-vis absorption spectroscopy in acetonitrile (Concentration $c = 1 \times 10^{-5}$ M, Figure S4). Compound 4a showed strong absorption corresponding to $\pi \rightarrow \pi^*$ transition in the longer wavelength region $(\lambda_{abs} = 376 \text{ nm in THF and } 368 \text{ nm in acetonitrile})$ than that of 4b. The absorption behavior implies 4a has a higher degree of π -conjugation than that of **4b** owing to the substituted four phenyl units on 4a. The AIE properties of the boron diiminates were evaluated by the measurements of the dependence of the optical properties on solvent compositions with acetonitrile/ $\rm H_2O$ mixture system ($c = 5 \times 10^{-5}$ M). Slight changes in the UV-vis absorption spectra of 4a and 4b were observed upon addition of H₂O up to 80 vol%. In the spectra, level-off tail gradually appeared in the visible region, and the decrease in the absorbance was obtained as increasing the content of H₂O above 80 vol%. In addition, the white turbidity appeared in the sample (the content of $H_2O \ge 80$ vol%). These data suggest that the aggregation should occur up to 80 vol% of the water content. The peak shifts to the long-wavelength region were observed from both samples by increasing water contents. The strong electronic interaction via π -stacking in the aggregates should be responsible for

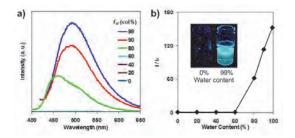


Figure 1. Dependence of a) PL spectra and b) emission intensity ratio of **4a** on solvent compositions of the acetonitrile / $\rm H_2O$ mixture (c = 5×10^{-5} M) upon excitation at the peak position in the absorption spectra.

these alterations.

The PL spectra of **4a** and **4b** exhibited drastic increases in the emission intensities as the formation of aggregates ($H_2O \ge 80$ vol%, Figure 1a). Figure 1b shows the dependency of the emission intensity ratio (I/ I₀) of **4a** on solvent compositions with the acetonitrile/ $\rm H_2O$ mixture system ($c = 5 \times 10^{-5}$ M). The $\rm I/I_0$ values in the low proportion of H_2O (< 80 vol%) were suppressed at the low level ($I/I_0 \approx 1$). The I/I_0 values significantly increased by much increasing the water content over 80 vol% (**4a**: $I_{99}/I_0 = 152$, **4b**: $I_{99}/I_0 = 52$). The optical properties of 4a and 4b are summarized in Table 1. The peak positions of the PL maxima (λ_{PL}) showed good correlations with the order of their absorption maxima. That is, the PL maxima of 4a exhibited larger bathochromic shifts than that of 4b. These data indicate efficient extension of π -conjugation in **4a**. The boron diiminate derivatives showed much higher quantum yields in the crystal states (4a: $\Phi_{\rm PL}$ = 0.23, 4b: $\Phi_{\rm PL}$ = 0.11) than those in THF ($\Phi_{\rm PL}$ < 0.01). These results

Table 1. Optical properties of 4a and 4b a,b

	λ _{abs.THF} [nm] ^c	$\lambda_{PL} \ [nm]^d$	λ_{PL} $[nm]^e$	$\Phi_{PL}{}^d$	$\Phi_{PL}{}^e$
4a	376	473	547	0.23	0.02
4b	355	448	478	0.11	0.02

[a] Excited at $\lambda_{\rm abs.}$. [b] Determined using integrated sphere method. [c] Measured in THF ($c=1\times10^{-5}\,{\rm M}$) [d] Measured in crystalline states. [e] Measured in amorphous states.

strongly indicate that the boron diiminate derivatives are apparent AIE-active materials. Peak shifts to the long-wavelength region were also observed by adding water similarly as shown in the absorption spectra. Strong π -stacking should induce these alterations.

To ensure the contribution of the boron diiminate rings to the AIE properties, the PL properties of **4a** were compared with 1,2,4,5-tetraphenylbenzene which has similar structure to **4a**. While the PL intensity of **4a** increased 152-fold as the formation of aggregates ($H_2O \ge 99 \text{ vol}\%$), the PL intensity of 1,2,4,5-tetraphenylbenzene was hardly changed by the formation of aggregates ($H_2O \ge 99 \text{ vol}\%$, $I_{99}/I_0 \approx 1$). It is implied that the boron-chelating ring in the boron diiminate plays an important role in the AIE property.

Next, the dependencies of the optical properties of the boron diiminates on solvent viscosity and temperature were examined. The PL intensities of boron diiminates dramatically increased in the highlyviscous solvent (ethanol/glycerol = 1/4 (v/v)) than that in the lower-viscous solvent (ethanol). Moreover, in 2-methyltetrahydrofuran (2Me-THF), the PL intensities was much higher at low temperature (77 K) than that at room temperature (298 K). These data suggest that the enhanced emission should be less influenced by the environmental changes such as polarity in aggregation states and formation of excimer. Since high viscosity or low temperature environments can suppress molecular motions such as torsion and vibration, 5c,5f the emission enhancement in the solid states would be caused by the prevention of the molecular motions especially in the boron-chelating ring.

During the sample preparation, it was found that the solid sample of **4a** exhibited uneven emission pattern under the UV irradiation. To explore this behavior, the relationship between their morphologies and the emission properties in the solid state were investigated. Thereby, two types of solid samples were prepared; crystal sample and amorphous sample. The crystal sample was grown from MeOH, and the amorphous sample was prepared by rapidly quenching its melt in

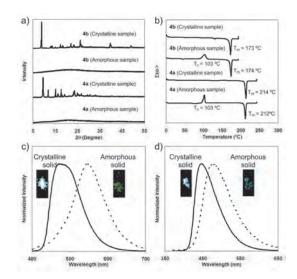


Figure 2. a) XRD patterns and b) DSC curves of the boron diiminates in the amorphous states and the crystalline states. PL spectra of c) **4a** and d) **4b** in the amorphous states and the crystalline states.

a refrigerator at -20° C. 6a,6b Initially, the powder X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC) with both samples were performed. The XRD results of the crystal samples of 4a and 4b exhibited sharp and intense reflection patterns (Figure 2a). These data indicate these samples involve regulation structures. In contrast, less significant reflections were observed in the amorphous samples. Hence, these samples should be amorphous. Furthermore, from the DSC measurements (Figure 2b), the crystal samples of 4a and 4b showed a strong endothermic peaks corresponding to melting points (4a: $T_{\rm m} = 214^{\circ}{\rm C}$, **4b**: $T_{\rm m} = 173^{\circ}{\rm C}$). The amorphous samples showed glass transition points and strong endothermic peaks as melting points (4a: $T_{\rm g} = 68 {\rm °C}$, 4b: $T_{\rm g} = 38 {\rm °C}$) and exothermic peaks assigned to a crystallization point (4a: $T_c = 103^{\circ}\text{C}$, **4b**: $T_c = 103^{\circ}\text{C}$), respectively. These results represent that the crystal and amorphous samples determinably form crystal and amorphous states, respectively.

Their PL properties of each sample were examined (Figure 2c and Figure 2d). In the PL spectra, a strong emission was observed from the crystal samples of **4a** and **4b** (**4a**: $\lambda_{PL} = 473$ nm, $\Phi_{PL} = 0.23$, **4b**: $\lambda_{PL} = 448$ nm,

 $\Phi_{\rm PL}=0.11$). On the other hand, the amorphous samples showed weaker emission in longer wavelength regions (**4a**: $\lambda_{\rm PL}=547$ nm, $\Phi_{\rm PL}=0.02$, **4b**: $\lambda_{\rm PL}=478$ nm, $\Phi_{\rm PL}=0.02$) than those from the crystal samples. From these results, it is clearly indicated that the boron diiminates are not only AIE-active but also CIEE-active. These data suggest that the amorphous samples could form excimers via π - π stacking of phenyl units, which often cause red-shifts of PL spectra and quenching.

To explain the difference of the PL behaviors between crystal and amorphous states, the molecular conformations in the single crystals were investigated by X-ray analysis (Figures S9-S10 and Tables S1-S2, CCDC-991936 (**4a**), CCDC-991937 (**4b**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www. ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.). In the packing structures of **4a** and **4b**, less π - π interactions were observed between their phenyl rings. The molecular conformation in the crystal is stabilized and locked by the multiple CH···F hydrogen bonds, leading to the larger quantum yields of the crystal samples.

The results of the time-resolved fluorescence measurement also support the speculation. While the fluorescence decay of the crystal sample of 4a at 470 nm was found as a single exponential decay (fluorescence lifetime $\tau = 1.9$ ns), the amorphous sample exhibited a double-exponential fluorescence decay at 538 nm: $\tau_1 = 1.2$ ns (31%) and $\tau_2 = 3.2$ ns (69%). It is implied that the excited state of amorphous sample decays through two pathways. The fast pathway should be identical to the intrinsic decay in the crystal ones including intermolecular energy transfer. The slow dominant pathway could be assigned to the decay involved excimers states.12 Compound 4b also showed similar trend to 4a. That is, the slow pathway becomes dominant in the amorphous sample. These results propose that the weaker and red-shifted emission of the amorphous samples is strongly affected by the formation of excimers.

The repeated switching of their PL properties was performed via fuming-heating and heating-cooling cycles because these processes have a potential to change morphologies of organic dyes. At the fuming-heating cycle, the amorphous samples of 4a and 4b coated on quartz cell were placed in a small container saturated with CH₂Cl₂ vapors for 0.5 h. The fumed samples of 4b showed blue-shifted and stronger emissions than those of the parent samples. It was confirmed by the XRD measurements that morphologies were changed from amorphous states to crystalline states by the vapor fuming process. The fumed samples were heated above the melting points and then quickly cooled in the freezer (-20°C) to prepare the amorphous sample again. The PL properties of the heated samples thus exhibited almost same PL properties to the parent amorphous samples.

Finally, a reversible control of the PL properties was executed using a heating-cooling process. After the amorphous sample was heated above their crystallization points, the heated samples showed blue-shifted and stronger emission in comparison with the parent samples resulting in crystallization. Furthermore, the crystallized samples were converted into the amorphous samples according to the same method in the fuming-heating cycle. The PL properties were also returned to those of the parent sample after the cooling process. These switching of **4b** via fuming-heating and heating-cooling cycles can be repeated many times (Figure 3).

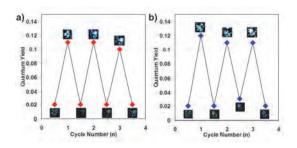


Figure 3. Repeated switching of the emission of **4b** between amorphous and crystalline states by a) fuming–heating and b) heating–cooling cycles upon.

In summary, we have designed the boron diiminate derivatives and revealed that they possess not only AIE property but also CIEE property. The behaviors can be explained by the molecular motions of the boron-chelating rings and the phase transition from crystalline state to amorphous states. Furthermore, the optical properties can be repeatedly controlled by simple external stimuli such as fuming-heating or heating-cooling cycles. To the best of our knowledge, this is the first example to offer both AIE- and CIEE-active organoboron complexes. The boron diiminate derivatives with prominent AIE and CIEE properties have a large potential to be multi stimuli-responsive materials such as thermal and vapor sensors.

Acknowledgements

This study was partially supported by Shorai Foundation For Science and Technology.

References

- U. Mitschke, P. Bäuerle, J. Mater. Chem. 2000, 10, 1471 – 1507.
- C. -C. Chang, M. -C. Hsieh, J. -C. Lin, T. -C. Chang, Biomaterials, 2012, 33, 897-906.
- a) T. Han, X. Feng, B. Tong, J. Shi, L. Chen, J. Zhi, Y. Dong, Chem. Commun. 2012, 416–418; b) F. Sun, G. Zhang, D. Zhang, L. Xue, H. Jiang, Org. Lett. 2011, 13, 6378–6381; c) X. Xu, J. Huang, J. Li, J. Yan, J. Qin, J. Li, Chem. Commun. 2011, 12385–12387; d) K. Shiraishi, T. Sanji, M. Tanaka, Tetrahedron Lett. 2010, 51, 6331–6333; e) M. Wang, G. Zhang, D. Zhang, D. Zhu, B. Z. Tang, J. Mater. Chem. 2010, 20, 1858–1867.
- S. A. Jenekhe, J. A. Osaheni, Science 1994, 265, 765-768.
- a) J. Luo, Z. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu, D. Zhu, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* 2001, 1740–1741; b) J. Chen, C. C. W. Law, J. W. Y. Lam, Y. Dong, S. M. F. Lo, I. D. Williams, D. Zhu, B. Z. Tang, *Chem. Mater.* 2003, 15, 1535–1546; c) J. Chen, Z. Xie, J. W.

- Y. Lam, C. C. W. Law, B. Z. Tang, *Macromolecules* **2003**, *36*, 1108–1117; d) J. Chen, B. Xu, X. Ouyang, B. Z. Tang, Y. Cao, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 7522–7526; e) H. Tong, Y. Q. Dong, M. Häußler, J. W. Y. Lam, H. H. Y. Sung, I. D. Williams, J. Z. Sun, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2006**, 1133–1135; f) H. Tong, Y. Hong, Y. Dong, M. Häußler, J. W. Y. Lam, Z. Li, Z. Guo, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2006**, 3705–3707; g) Q. Zeng, Z. Li, Y. Dong, C. Di, A. Qin, Y. Hong, L. Ji, Z. Zhu, C. K. W. Jim, G. Yu, Q. Li, Z. Li, Y. Liu, J. Qin, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2007**, 70–72; h) Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2009**, 4332–4353.
- a) Y. Dong, J. W. Y. Lam, A. Qin, J. Sun, J. Liu, Z. Li, J. Sun, H. H. Y. Sung, I. D. Williams, H. S. Kwok, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* 2007, 3255–3257; b) Y. Dong, J. W. Y. Lam, A. Qin, Z. Li, J. Sun, H. H. –Y. Sung, I. D. Williams, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* 2007, 40–42.
- a) H. Maeda, Y. Mihashi, Y. Haketa, Org. Lett.
 2008, 10, 3179-3182; b) K. Ono, K. Yoshikawa, Y. Tsuji, H. Yamaguchi, R. Uozumi, M. Tomura, K. Taga, K. Saito, Tetrahedron 2007, 63, 9354-9358; c)
 A. G. Mirochnik, E. V. Fedorenko, V. G. Kuryavyi, B. V. Bukvetskii, V. E. Karasev, J. Fluoresc. 2006, 16, 279-286; d) E. Cogné-Laage, J. -F. Allemand, O. Ruel, J. -B. Baudin, V. Croquette, M. Blanchard-

- Desce, L. Jullien, Chem. Eur. J. 2004, 10, 1445-1455
- a) G. Zhang, J. Chen, S. J. Payne, S. E. Kooi, J. N. Demas, C. L. Fraser, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 8942–8943; b) G. Zhang, R. E. Evans, K. A. Campbell, C. L. Fraser, Macromolecules 2009, 42, 8627–8633; c) G. Zhang, J. Lu, M. Sabat, C. L. Fraser, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 2160–2162.
- a) A. Nagai, K. Kokado, Y. Nagata, M. Arita, Y. Chujo, J. Org. Chem. 2008, 73, 8605-8607.
 b) A. Nagai, K. Kokado, Y. Nagata, Y. Chujo, Macromolecules 2008, 41, 8295-8298. c) K. Tanaka, Y. Chujo, Macromol. Rapid Commun. 2012, 33, 1235-1255. d) K. Tanaka, K. Tamashima, A. Nagai, T. Okawa, Y. Chujo, Macromolecules 2013, 46, 2969-2975.
- a) R. Yoshii, A. Nagai, K. Tanaka, Y. Chujo, *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 4506–4512. b) R. Yoshii, A. Nagai, K. Tanaka, Y. Chujo, *Macromol. Rapid Commun.* 2014, DOI: 10.1002/marc.201400198. c) R. Yoshii, K. Tanaka, Y. Chujo, *Macromolecules* 2014, 47, 2268–2278.
- F. P. Macedo, C. Gwengo, S. V. Lindeman, M. D. Smith, J. R. Gardinier, Eur. J. Inorg. Chem. 2008, 3200–3211.
- Y. Tsuji, Y. Morisaki, Y. Chujo, *Polym. Chem.* 2013, 4, 5361–5367.

Electronic Infrared Light Absorption of Tri-palladium Complex Containing Two π -Expanded Tetracene Ligands

Tsuyoshi Suzuki^a, Takafumi Nakagawa^a, Kei Ohkubo^b, Shunichi Fukuzumi^b, and Yutaka Matsuo^a

^aDepartment of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo ^bDepartment of Material and Life Science, Graduate School of Engineering, Osaka University

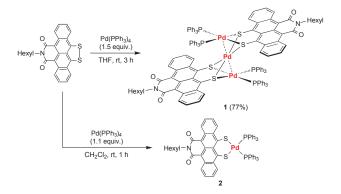
Abstract

A large π -electron conjugated system consisting of bridging three palladium metals and two π -expanded tetracene derivatives was synthesized to have a narrow HOMO-LUMO gap for long-wavelength light absorption. The product, Pd₃(TIDS)₂(PPh₃)₄ (TIDS = narrow HOMO-LUMO gap tetracene ligand) showed far long-wavelength light absorption reaching the infrared region (absorption maximum = 1,982 nm, ε = 4.0 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ in CH₂Cl₂ solution; 2,500 nm in solid state). X-ray crystallography revealed the tri-metallic structure composed of three square-planar Pd coordination planes. The total oxidation number of the three Pd atoms is +4. Quantum chemical calculation was used to elucidate wholly delocalized π -conjugation in the non-coplanar structure and HOMO-LUMO transition for this unique absorption band. Time-resolved flash photolysis exhibited the excited state dynamics characterized with a triplet excited state (lifetime = 400 ps, λ_{max} = 1,280 nm). A mononuclear Pd complex, Pd(TIDS)(PPh₃)₂ was also synthesized as a reference compound, and characterized with spectroscopic and X-ray crystallographic analyses.

Introduction

Long-wavelength light absorption and large molar absorption coefficient—unique characteristics of expanded π -electron conjugated compounds have attracted chemists to develop various photo-functional materials. This has led to producing numerous π -expanded compounds such as functionalized porphyrinoids,1 perylene dyes,2 acene analogues,3 and so on, toward organic electronic devices, bio-imaging labels,⁵ and chemosensors⁶ applications. In addition, chemists have tried a different approach to realize long-wavelength light absorption, that is, the use of transition metal atoms utilizing interaction between metallic $d\pi$ and organic $p\pi$ orbitals. One example is a metal bis(dithiolene) complex, in which a transition metal atom bridges laterally two organic π -conjugated units to have a narrow HOMO-LUMO gap.7 Another example is a multiple-decker phthalocyanine that has longitudinally alternative stacking of metals and phthalocyanines. These studies suggest that the metal-bridging method have great potential to create functional light-absorbing materials. Such kind of researches on π -extended metal complexes have, however, been less explored, compared with a fevered research for π -expended organic compounds.

In our recent work, we synthesized a π -expanded tetracene derivative, tetracene imide disulfide (TIDS) bearing electron-withdrawing and -donating groups for lowering LUMO and raising HOMO levels, respectively, to have narrow HOMO-LUMO gap for long-wavelength light absorption (up to 850 nm, offset). We then examined complexation of an N-(n-hexyl)-substituted TIDS (HexylTIDS) ligand through oxidative addition with a platinum atom to obtain



Scheme 1. Synthesis of the trinuclear (1) and mononuclear palladium complexes (2).

a mononuclear platinum complex, Pt(HexylTIDS) (PPh₃)₂, which showed long-wavelength light absorption extended to 950 nm.¹² Herein, we report the synthesis, characterization, computational investigation, and time-resolved photophysical study of a trinuclear palladium complex as well as a prototype mononuclear palladium complex. The isolated palladium trinuclear complex electronically absorbed long-wavelength light extended to the infrared region with absorption peaks at 1,982 nm in solution and 2,500 nm in solid state. This unique absorption band is due to HOMO–LUMO transition with a wholly delocalized π-conjugated system.

Results and discussion

Synthesis and characterization of the tri-palladium bis(HexyITIDS) π -conjugated system.

The reaction of HexylTIDS with 1.5 equiv. of $Pd(PPh_3)_4$ in THF at room temperature for 3 h produced a trinuclear palladium complex $Pd_3(HexylTIDS)_2(PPh_3)_4$ (1) as black crystals (Scheme 1). The appearance of the reaction mixture changed from blue suspension to dark-red solution. Trinuclear complex 1 was purified by recrystallization in CH_2Cl_2/n -hexane in 77% yield. The single crystal X-ray analysis unambiguously revealed its trimetallic structure (Fig. 1). Additionally, complex 1 was characterized by spectroscopic measurements, elemental analysis, and electrochemical studies. In the cyclic voltammetry, we observed three reversible reduction waves at $E_{1/2}$ =

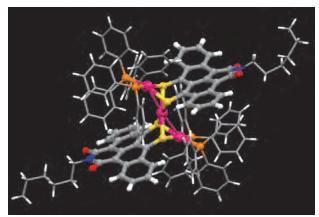


Fig. 1 X-ray crystallographic structure of **1**. The phenyl and hexyl groups are drawn with thin sticks. Solvent molecules (CH,Cl,) are omitted for clarity.

–0.50 V, –0.76 V, –1.12 V vs. Fc/Fc^+ in CH_2Cl_2 (Fig. 2). These reduction potentials of **1** were much positively shifted compared with those of the TIDS ligand ($E_{1/2}$ = –1.21 V)¹⁰ and the mononuclear Pt-TIDS complex ($E_{1/2}$ = –1.45 V).¹² Oxidation peak was not detected, even after considerable cyclic voltammetric measurements with different conditions using various solvents and working electrodes.

By modifying the synthetic method, a mononuclear complex $Pd(HexylTIDS)(PPh_3)_2$ (2) was synthesized as a reference compound. Separately prepared CH_2Cl_2 solutions of HexylTIDS and $Pd(PPh_3)_4$ were slowly mixed at room temperature instead of using THF suspension of HexylTIDS. The blue HexylTIDS solution and the yellow $Pd(PPh_3)_4$ solution reacted to give black solution of 2. Characterization and X-ray crystal

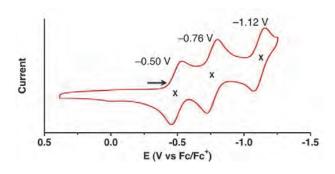


Fig. 2 Electrochemical properties of 1. Conditions of cyclic voltammetry: solvent, $\mathrm{CH_2Cl_2}$: concentration, 5.0 x 10^{-4} M; scan rate, 100 mV/s; working electrode, glassy carbon.

structure of 2 was noted in the latter section.

According to the X-ray crystal structural analysis of 1, two square planar mononuclear Pd(HexylTIDS)(PPh₃)₂ units are connected by a central palladium atom, and the three palladium atoms are linearly aligned in this structure (Fig. 1). Distances between the two palladium atoms are 2.8818(5) and 2.9241(5) Å, which are longer than the Pd-Pd metallic bond distance (2.76 Å) but shorter than the sum of the two Van der Waals radii of palladium (3.26 Å), suggesting there are weak Pd-Pd interactions (see natural bond orbital analysis in the latter section). In comparison with linearly aligned trinuclear palladium complexes reported in the literatures, 13 the observed Pd.-Pd distances in complex 1 are close to those in a dithiadiazolyl palladium complex (Pd···Pd = 2.86 Å).14 Each HexylTIDS ligand in 1 bridges two palladium atoms like the reported naphthalene-dithiolate dinuclear complexes. 15 The trinuclear structure of 1 is formally isoelectronic to the reported multimetallic Pt(II)···Ag(I)···Pt(II) complex having two naphthalene dithiolate ligands. 16 A major difference between 1 and the silver(I) complex is the distance between metal atoms. Compound 1 has ca. 0.3-Å shorter Pd···Pd distance than the distance between Ag(I) and Pt(II) of the reported compound (3.0739(13), 3.2044(13) Å). Though the literature did not discuss about light absorption properties, the difference of metal-to-metal distances would afford a critical effect on the π -conjugated structure and photophysical properties.

The NMR signals of **1** were observed and there was no signal in ESR measurement, indicating this complex does not contain paramagnetic Pd(I) species. The central palladium atom can be considered as Pd(0) with an 18-electron configuration, sandwiched between two mononuclear complexes **2** that have a 16-electron configuration at the Pd(II) center.

In the UV-vis-NIR absorption spectrum of **1**, two intense absorption bands were observed around at 922 nm (ε = 2.1 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹) and 1,982 nm (0.626 eV) with large absorption coefficient (ε = 4.0 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹) (Fig.

3a), while the absorption peak of HexylTIDS in the longest wavelength is at 784 nm. In the IR absorption spectrum measured in the solid state, a broad absorption peak was observed in the infrared region with a maximum at 2,500 nm (0.496 eV, 4,000 cm⁻¹) (Fig. 3b). Because we usually do not observed such a broad peak in this region in the IR spectra, we assigned this peak to the same electronic transition observed in the solution. Observed 0.13 eV shift to small energy is attributable to electronic interaction between the molecules in the solid state. The extended absorption range and enhanced absorption coefficient indicate the existence of a massively extended π -conjugated system (vide infra). The highest absorption coefficient of 1 is almost twice of that of Pt(HexylTIDS)(PPh₃)₂ at 843 nm ($\varepsilon = 2.2 \text{ x } 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). This is reasonable because **1** contains two mono-metallic 2 moieties.

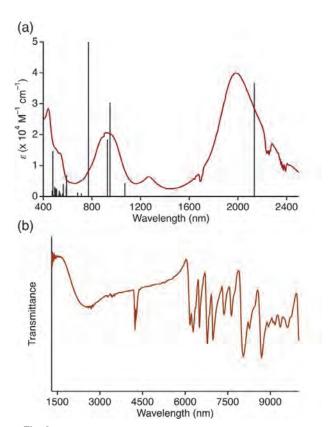


Fig. 3 Absorption spectra of **1**. (a) UV-vis-NIR spectrum and simulated absorption bands calculated at the B3LYP/SDD/6-31G(d) level. The spectrum was measured in CH₂Cl₂. (b) IR spectrum. A broad electronic absorption maximum was observed at 4,000 cm⁻¹ (2,500 nm)

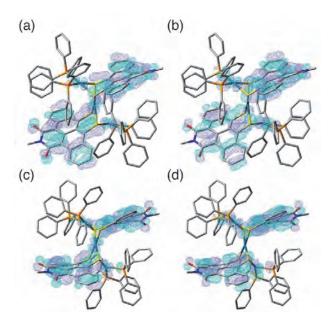


Fig. 4 Optimized structures and molecular orbitals of 3.

(a) HOMO. (b) LUMO. (c and d) HOMO and LUMO from different viewpoints. The calculations were performed at the B3LYP/SDD/6-31G(d) level.

Theoretical calculations for the tri-palladium bis(HexyITIDS) π -conjugated system.

To gain further insight into the light absorption properties of 1, we performed DFT calculation of a simplified methyl-substituted model analogue (Pd₃(MeTIDS)₂(PPh₃)₄) (3). The optimized structures are almost identical to the structure of 1 obtained by X-ray crystallography. As shown in the Fig. 1, the π -orbitals of the TIDS ligands are bound in parallel but lie in different planes. Nevertheless, the theoretical calculation showed that the HOMO and LUMO of the model complex 3 are delocalized on the two TIDS ligands (Fig. 4), thus providing a narrow HOMO-LUMO gap (0.68 eV). The TD-DFT calculation for light absorption simulation revealed that the strong absorption band observed at 1,982 nm mainly corresponds to a HOMO-LUMO transition, while the absorption band at 922 nm was assigned to charge-transfer (CT) band between the palladium atoms and the TIDS ligand. The parallel coordination of the ligands would be a key to bring the fully delocalized HOMO and LUMO even in the noncoplanar structure. Accordingly, thorough investigation of electronic structures in the HOMO and the LUMO is essential to cultivate a deep understanding of the photophysical properties of **1**.

The structures of HOMO and LUMO in **1** were successfully explained by molecular orbital interaction analysis, which described how to construct the quite narrow HOMO-LUMO gap. For the analysis, Pd₃(MeTIDS)₂(PPh₃)₄ molecule was divided into three subunits: two mononuclear palladium complex subunits Pd(MeTIDS)(PPh₃)₂ like compound **2** and one central Pd. According to this analysis, we propose that the HOMO of **1** is composed of orbital interaction of HOMO of the central Pd (dxy orbital) with LUMOs of Pd(MeTIDS) (PPh₃)₂ (as seen in Fig. 4c); LUMO of **1** is derived from another LUMOs of Pd(MeTIDS)(PPh₃)₂, giving narrow HOMO-LUMO gap (as seen in Fig. 4d).

The interactions between the central palladium atom and its peripheral atoms were further investigated by natural bond orbital (NBO) analysis. The Wiberg bond indexes of Pd···Pd were 0.133 and 0.144 suggesting the presence of weak Pd···Pd interactions. In addition, the central palladium is regarded as being more electron-rich than other palladium atoms. This is good agreement with our consideration for the oxidation numbers of palladium atoms in 1 as Pd(II)-Pd(0)-Pd(II).

Characterization of the mono-palladium HexylTIDS complex (2).

Different from **1**, complex **2** was not able to be purified because of the instability of **2** without free PPh₃. A UV-vis-NIR absorption spectrum of **2** in the presence of PPh₃ showed that absorption of **2** was almost consistent with that of the mononuclear platinum complex we previously reported (Fig. 5). Complex **2** showed no infrared light absorption. TD-DFT calculation supported this experimental observation.

In addition, after many attempts to recrystallize complex **2**, we obtained a crystal which was suitable for X-ray structural analysis (Fig. 6). The crystal structure of **2** showed a bending structure caused by the large radius of sulfur atoms and a square planar coordination

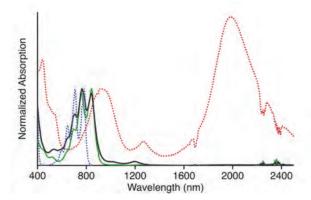


Fig. 5 Normalized UV-vis-NIR absorption spectra of HexylTIDS (blue dot), mononuclear complex
2 with triphenylphosphine (black solid line), trinuclear complex
1 (red dot) and Pt(HexylTIDS)(PPh_a)_a (green solid line).

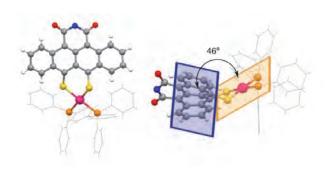


Fig. 6 Crystal structures of the mononuclear 2.

mode of the palladium atom. The dihedral angle is ca. 46°, which is similar to those of Pd(HexylTIDS)(PPh₃)₂ moiety in **1** (55°, 47°). This bending structure provides a coordination site at the disulfide moiety to form trinuclear complex **1**.

DFT calculations for Pd(MeTIDS)(PPh₃)₂ revealed a delocalized π -orbital over the entirety of the molecule (Fig. 7). Here, mononuclear complex **2** did not show intense infrared absorption. The calculation represents that full π -conjugation over mono-metallic moiety is not enough to show infrared absorption. Consequently, the two mono-metallic subunit Pd(HexylTIDS)(PPh₃)₂ in **1** should be π -conjugated through the central palladium atom to extend the light absorption range up to the infrared region. In other words, the narrow HOMO-LUMO gap and electronic infrared light absorption of **1** are concluded to arise from the π -orbitals of the two

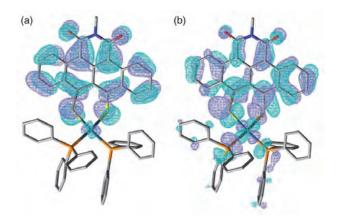


Fig. 7 Optimized structures and of the mononuclear Pd(MeTIDS)(PPh₃)₂ calculated at the B3LYP/LANL2DZ/6-31G(d) level. (a) HOMO and (b) LUMO.

HexylTIDS units being linked through three palladium atoms.

Time-resolved photophysical characterization for the tri-palladium bis(TIDS) π -conjugated system.

Finally, we characterized the photoexcited state of the tri-palladium complex **1**. To investigate excited state of **1** in the photoinduced processes, we conducted femtosecond time-resolved transient absorption measurements of **1** in the vis-NIR region by photoexcitation at 800 nm (Fig. 8). This wavelength is in the shoulder of the CT absorption band ($\lambda_{max} = 922$

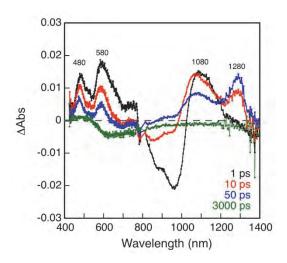


Fig. 8 Transient absorption spectra of 1 in THF after femtosecond laser excitation ($\lambda \square = 800 \text{ nm}$) at 1, 10, 50, and 3000 ps.

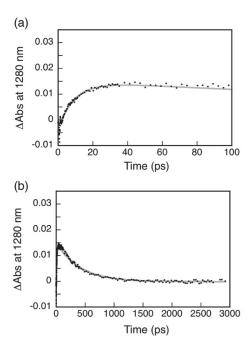


Fig. 9 Time-depending profile of an absorption peak at 1280 nm in the transient absorption spectra shown in Fig. 8.

nm); laser instrument for excitation at ca. 2,000 nm was unavailable. The spectra measured in THF displayed prompt increases in absorption bands at 480, 580 and 1,080 nm with ground-state bleaching band at 970 nm (black line in Fig. 8). Then, the absorption band at 1,080 nm decreased quickly, accompanied by the appearance of a new near-infrared absorption at 1,280 nm with an isosbestic point at 1,200 nm with a rate constant of 1.1 x 10¹¹ s⁻¹ (Fig. 9). These characteristics strongly suggest that the singlet CT state corresponding to the peak at 1,080 nm was converted by intersystem crossing to form the triplet CT state corresponding to the peak at 1,280 nm. The lifetime of the singlet CT state was determined to be 9 ps. The triplet CT lifetime was determined from the decay of the absorption band at 1,280 nm to be 400 ps $[= (2.5 \times 10^9 \text{ s}^{-1})^{-1}]$. In contrast, HexylTIDS does not show any transient absorption peak corresponding to a triplet state. 12 Moreover, the lifetime of the triplet state in 1 is relatively short, indicating that the forbidden relaxation process S₀ <-T₁ is also accelerated by the heavy atom effect. The transient absorption was measured in toluene as well. The kinetic constants calculated from the timedepended changes of the singlet and triplet peaks (1.2 x 10^{11} s⁻¹, 3.7 x 10^9 s⁻¹) are slightly larger than those in THF. The small dependence of the rate constants on solvent polarity implies that the excited states have small polarities because of the symmetric molecular structure and the symmetrically delocalized π -orbitals.

Conclusions

In summary, we have demonstrated the construction of a large $d\pi/p\pi$ -conjugated systems by tri-palladation of the TIDS ligands. The obtained tri-palladium complex showed electronic infrared light absorption at 1,982 nm with a high absorption coefficient (λ = 4.0 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹) in CH₂Cl₂ solution as well as at 2,500 nm in the solid state. In contrast, mono-metallic palladium complex with one HexylTIDS ligand mainly absorbs visible and near-IR region. With quantum chemical calculation, we found that the origin of the intense infrared light absorption is HOMO-LUMO transition at entirely delocalized HOMO and LUMO. The d-orbitals of palladium atoms connect two HexylTIDS ligands in a non-coplanar parallel fashion to form a large π -conjugated system. In addition, the triplet excited state (lifetime = 400 ps, λ_{max} = 1,280 nm) of the trinuclear palladium complex was characterized by femtosecond laser flash photolysis. The present work suggests the applicability of trimetallic connection for bridging organic π -conjugated systems to construct narrow HOMO-LUMO gap materials for long-wavelength light absorption. This achievement would provide a new design concept of functional organic dyes used in various applications.

Experimental section

General

All NMR spectra were taken at 500 MHz (JEOL ECA-500 spectrometer). NMR spectra were recorded in parts per million (ppm, \Box scale) from residual protons of the CD₂Cl₂ for 1 H NMR (δ 5.32 ppm for dichloromethane) and from an external standard for 31 P NMR (δ 29.41 ppm of OPPh₃ for all solvents). The

 $\mathrm{CD_2Cl_2}$ was distillated with $\mathrm{CaH_2}$ prior to use and stored under argon with molecular sieves (4 Å). The data were presented as following space: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet and/or multiplet resonances, br = broad), coupling constant in hertz (Hz), and signal area integration in natural numbers, assignment (italic). Elemental analysis was performed at the University of Tokyo, Department of Chemistry, Organic Elemental Analysis Laboratory. IR absorption was measured on JASCO FT/IR-6100 equipped with an attenuated total reflection (ATR) with ZnSe, and was reported as wavenumber in cm⁻¹.

Synthesis of Pd₃(HexyITIDS)₂(PPh₃)₄ (1).

A mixture of HexylTIDS (100 mg, 0.225 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (391 mg, 0.338 mmol, 1.50 equiv.) was stirred in THF (6.6 mL) at room temperature for 3 h. The n-hexane was added to precipitate the crude product, which was purified by crystallization from CH₂Cl₂/n-hexane to give dark-red crystals in 77% yield (196 mg, 0.0869 mmol). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ = 9.37 (br, tetracene), 7.41 (br, tetracene), 6.99 (t, J = 7.3 Hz, 4H, p-Ph), 6.81–6.73 (m, 16H, o-Ph, m-Ph), 6.11 (br, tetracene), 4.26 (t, J = 6.9 Hz, 4H, CH₂ in hexyl), 1.99–1.92 (m, 4H, CH₂ in hexyl), 1.62–1.54 (m, 4H, CH₂ in hexyl), 1.38–1.51 (m, 8H, CH₂CH₂ in hexyl), 0.95 (t, J = 7.1 Hz, 6H, Me in hexyl). Anal. calcd for C₁₂₄H₁₀₂N₂O₄P₄Pd₃S₄: C, 66.03; H, 4.56; N, 1.24. Found: C, 66.13; H, 4.71; N, 1.14.

¹H NMR peaks corresponding to tetracene moiety were broadened at room temperature. This would be resulted from the thermal dynamic behavior. According to the same reason, neither ³¹P nor ¹³C NMR were clearly recorded. Low temperature ¹H NMR measurement even at -30 °C exhibited broaden peaks.

Synthesis of Pd(HexyITIDS)(PPh₃)₂ (2).

 $Pd(PPh_3)_4$ (127 mg, 0.110 mmol, 1.1 equiv.) in CH_2Cl_2 (6.5 mL) was added dropwise to a solution of HexylTIDS (44.5 mg, 0.100 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) for 25 min. The appearance of the solution changed

from blue suspension to black solution. It was stirred at room temperature for 1 h. This solution was used for each analysis. 1 H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ = 9.81 (d, J = 9.2 Hz, 2H, tetracene), 8.45 (d, J = 9.2 Hz, 2H, tetracene), 7.57–7.54 (m, 2H, tetracene), 7.43 (t, J = 7.5 Hz, 6H, p-Ph), 7.27-7.24 (m, 12H, o-Ph, m-Ph), 7.12–7.08 (m, 2H, tetracene), 4.28 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂ in hexyl), 1.80–1.74 (m, 2H, CH₂CH₂ in hexyl), 1.48–1.44 (m, 2H, CH₂ in hexyl), 1.40–1.31 (m, 4H, CH₂CH₂ in hexyl), 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H, Me in hexyl). 31 P NMR (202.4 MHz, CD₂Cl₂): \Box = 27.66 (s, 2P, PPh₃).

Electrochemical analysis.

Cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were performed using HOKUTO DENKO HZ-5000 voltammetric analyzer. All CV measurements were carried out in a one-compartment cell under argon gas, equipped with a glassy-carbon working electrode, a platinum wire counter electrode, and an Ag/Ag⁺ reference electrode. The supporting electrolyte was a 0.1 mol/L dichloromethane solution of tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF₆). Only for the CV measurements of tri-palladium complex 1, platinum and gold working electrode were additionally used to result in the identical CV charts to that obtained with glassy-carbon electrode. The electrochemical data equipped with a grassy-carbon working electrode are presented in this report.

X-ray crystallographic analysis.

X-ray crystallographic analyses for complexes **1** and **2** were performed using a RIGAKU R-AXIS RAPID II (imaging plate detector) with monochromic CuKa ($\lambda = 1.5406$ Å) radiation. The positional and thermal parameters were refined by a full-matrix least-squares method using the SHELXL97 program on the Yadokari-software. The CCDC numbers of complexes **1** and **2** were 881159 and 978047, respectively.

Computational Studies.

All calculations were carried out by Gaussian09

package at the B3LYP level. Palladium atoms were represented by the LANL2DZ or SDD basis set and a 6-31G(d) basis set was used for other atoms (C, H, N, O, S, and P). The calculation levels are described as "B3LYP/LANL2DZ/6-31G(d)" and "B3LYP/SDD/6-31G(d)".

Time-resolved Transient Absorption Measurements.

Femtosecond transient absorption spectroscopy experiments were conducted using an ultrafast Integra-C (Quantronix Corp.), a TOPAS optical parametric amplifier (Light Conversion Ltd.), and a commercially available Helios optical detection system provided by Ultrafast Systems LLC.

Acknowledgements

This work was supported by the Funding Program for Next-Generation World-Leading Researchers, Shorai Foundation for Science and Technology (Y.M.), and the Advanced Leading Graduate Course for Photon Science (T.S.). The computations were performed at the Research Center for Computational Science, Okazaki, Japan.

† This results were reported in *Chemical Science*, **2014**, 5, 4888–4894. Electronic supplementary information (ESI) available: Details of synthesis and characterization of compounds. See DOI: 10.1039/c3nj00430a

Notes and references

- (a) I. M. Blake, L. H. Rees, T. D. W. Claridge and H. L. Anderson, Angew. Chem. Int. Ed., 2000, 39, 1818–1821. (b) A. Tsuda and A. Osuka, Science, 2001, 293, 79–82. (c) K. Kurotobi, K. S. Kim, S. B. Noh, D. Kim and A. Osuka, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3944–3947. (d) N. K. S. Davis, A. L. Thompson and H. L. Anderson, J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 30–31. (e) T. Sarma and P. K. Panda, Chem. Eur. J., 2011, 17, 13987–13991.
- 2. (a) Y. Avlasevich and K. Müllen, Chem. Commun.,

- 2006, 4440–4442. (b) N. G. Pshirer, C. Kohl, F. Nolde,
 J. Qu and K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006,
 45, 1401–1404. (c) M.-J. Lin, B. Fimmel, K. Radacki and F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50, 10847–10850.
- (a) L. Qiu, C. Yu, N. Zhao, W. Chen, Y. Guo, X. Wan, R. Yang and Y. Liu, Chem. Commun., 2012, 48, 12225–12227. (b) M. Nakao, H. Mori, S. Shinamura and K. Takimiya, Chem. Mater., 2012, 24, 190–198.
 (c) M. Más-Montoya, R. P. Ortiz, D. Curiel, A. Espinosa, M. Allain, A. Facchetti and T. J. Marks, J. Mater. Chem. C, 2013, 1, 1959–1969. (d) T. Mori, T. Nishimura, T. Yamamoto, I. Doi, E. Miyazaki, I. Osaka and K. Takimiya, J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 13900–13913.
- (a) H. E. Katz, Z. Bao and S. L. Gilat, Acc. Chem. Res., 2001, 34, 359–369.
 (b) M. Bendikov, F. Wudl and D. F. Perepichka, Chem. Rev., 2004, 104, 4891–4946.
 (c) J. E. Anthony, Chem. Rev., 2006, 106, 5028–5048.
 (d) K. Takimiya, I. Osaka and M. Nakano, Chem. Mater., 2014, 26, 587–593.
- (a) Y. Ma and Y. Wang Coord. Chem. Rev., 2010,
 254, 972–990. (b) K. K.-W. Lo, K. Y. Zhang and S. P.-Y. Li, Eur. J. Inorg. Chem., 2011, 3551–3568. (c)
 S. Yao and K. D. Belfield, Eur. J. Org. Chem., 2012, 3199–3127.
- (a) T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci, P. E. Kruger and F. M. Pfeffer, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, 250, 3094–3117.
 (b) E. M. Nolan and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 3443–3480.
 (c) J. J. Bryant and U. H. F. Bunz, *Chem. Asian J.*, 2013, 8, 1354–1367.
 (d) X. Li, X. Gao, W. Shi and H. Ma, *Chem. Rev.*, 2014, 114, 590–659.
- (a) U. T. Mueller-Westerhoff, B. Vance and D. I. Yoon, *Tetrahedron*, 1991, 47, 909–932. (b) A. Kobayashi, M. Sasa, W. Suzuki, E. Fujiwara, H. Tanaka, M. Tokumoto, Y. Okano, H. Fujiwara and H. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 426–427. (c) V. Madhu and S. K. Das, *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 5055–5070. (d) S. Dalgleish, M. M. Matsushita, L. Hu, B. Li, H. Yoshikawa and K. Awaga, *J. Am.*

- Chem. Soc., 2012, 134, 12742-12750.
- (a) N. Ishikawa, T. Okubo and Y. Kaizu, *Inorg. Chem.*, 1999, 38, 3173–3181. (b) T. Fukuda, T. Biyajima and N. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 6278–6279. (c) T. Fukuda, W. Kuroda and N. Ishikawa, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 11686–11688. (d) H. Wang, K. Qian, K. Wang, Y. Bian, J. Jiang and S. Gao, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 9624–9626. (e) H. Wang, N. Kobayashi and J. Jiang, *Chem. Commun.*, 2012, 18, 1047–1049. (f) T. Fukuda, K. Hata and N. Ishikawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 14698–14701. (g) T. Fukuda, K. Matsumura and N. Ishikawa, *J. Phys. Chem. A*, 2013, 117, 10447–10454.
- (a) M. D. Watson, A. Fechtenkötter and K. Müllen, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 1267 1300. (b) K. Kawasumi, Q. Zhang, Y. Segawa, L. T. Scott and K. Itami, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 739–744.
- (a) T. Okamoto, T. Suzuki, H. Tanaka, D. Hashizume and Y. Matsuo, *Chem. Asian J.*, 2012,
 7, 105–111. (b) T. Suzuki, T. Okamoto, A. Saeki, S. Seki, H. Sato and Y. Matsuo, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, 5, 1937–1942. (c) S. Kojima, T. Okamoto, K. Miwa, H. Sato, J. Takeya and Y. Matsuo, *Org. Electron.*, 2013, 14, 437–444.
- (a) W. P. Bosman and H. G. M. van der Linden, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1977, 714–815. (b)
 A. W. Gal, J. W. Gosselink and F. A. Vollenbroek,

- Inorg. Chim. Acta, 1979, 32, 235–241. (c) S. M. Aucott, H. L. Milton, S. D. Robertson, A. M. Z. Slawin, G. D. Walker and J. D. Woollins, Chem. Eur. J., 2004, 10, 1666–1676.
- T. Nakagawa, T. Suzuki, M. König, D. M. Guldi and Y. Matsuo, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 10394–10396.
- (a) T. Murahashi, Y. Higuchi, T. Katoh and H. Kurosawa, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 14288-14289.
 (b) M. Ohashi, J. Yi, D. Shimizu, T. Yamagata, T. Ohshima and K. Mashima, J. Organomet. Chem., 2006, 691, 2457-2464.
 (c) L. Brunet, F. Mercier, L. Ricard and F. Mathey, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, 33, 742-745.
 (d) S. Kannan, A. J. James and P. R. Sharp, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 215-216.
- A. J. Banister, I. B. Gorrell, J. A. K. Howard, S. E. Lawrence, C. W. Lehman, I. May, J. M. Rawson, B. K. Tanner, C. I. Gregory, A. J. Blake and S. P. Fricker, J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1997, 377–384.
- (a) H. Xu and J. H. K. Yip, *Inorg. Chem.*, 2003,
 42, 4492–4494. (b) S. M. Aucott, H. L. Milton, S. D. Robertson, A. M. Z. Slawin and J. D. Woollins,
 Dalton Trans., 2004, 3347–3352. (c) A. P. S. Samuel,
 D. T. Co, C. L. Stern and M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 8813–8815.
- S. D. Robertson, A. M. Z. Slawin and J. D. Woollins, Eur. J. Inorg. Chem., 2007, 247–253.

素反応をプログラム化した重合反応による 機能性アクリル樹脂の精密簡易合成

信州大学 繊維学部 高坂 泰弘

1. 緒言

Szwarcによるリビング重合の発見¹から60年が経過し、分子量とその分布の制御をはじめ、末端基や立体規則性、トポロジーを制御した高分子の精密合成が達成されている。今日では精密重合は学術的な基礎研究にとどまらず、国内外の企業で工業化が実現し、エラストマーや粘着剤、界面活性剤など多様な機能高分子材料が生産されている²。

しかしながら、従来の精密重合法には技術的な限界も存在する。例えば、リビング重合を官能性停止剤で停止すると、停止末端に官能基を導入したポリマーを合成することができる(停止剤法)が³、その実験手順はやや煩雑である。すなわち、停止剤法では初めに開始剤とモノマーを混合し、モノマーの消費後に停止剤を逐次的に添加する必要がある[Figure 1 (a)]。モノマーが完全に消費される前に停止剤を加えると、成長鎖が目標分子量に未到達であるうえ、場合によっては成長反応と停止

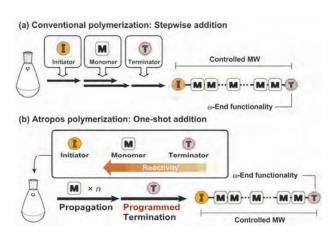


Figure 1. Synthesis of end-functional polymer by termination method: (a) conventional protocol (stepwise addition of reagents) and (b) Atropos polymerization.

反応が競争し、分子量分布が増大する。また、リビング 重合ではしばしば成長種の寿命が議論の対象となるよう に、長い時間スケールでは成長種が自発的に停止反応や 連鎖移動を起こす場合がある。例えば、本研究で扱うア クリル酸エステル類のアニオン重合では、back-bitingと 呼ばれる自己停止反応が存在する⁴。この停止反応はモ ノマー消費後に特に顕著になるため、停止剤を加える時 期は遅すぎると、末端官能基の導入率が低下する。以上 の事由から、停止剤を加える時期には細心の注意を要す る。また、高分子量体の合成では、反応系の粘度が高ま り、ゲル化することすらある。この場合、停止剤の混合 が本質的に難しくなるため、停止剤法による末端修飾が 適用できない。

申請者は最近、アクリル酸エステル類の立体特異性リビングアニオン重合において、 α -(ハロメチル)アクリル酸エステルが優れた停止剤として働き、末端にアクリロイル基を有する立体規則性ポリマーを与えることを報告した(Scheme 1) $^{5\cdot11}$ 。導入したアクリロイル基はMichael付加型チオールーエン・クリック反応に活性であるため、生成ポリマーに多様な官能性チオールを反応させることで、定量的な末端の官能基化が達成できる。以上は、分子量とその分布、立体規則性と末端官能基を同時に制御した初めての例である。しかしながら、停止剤法による末端修飾には前述のような課題が存在し、その解決が望まれていた。

そこで、停止剤を重合開始時に添加する方法を考案した[Figure 1 (b)]。開始剤と停止剤を混合すると、遅かれ早かれ重合は停止するため、高分子は生成しないと思われるが、もし停止剤がモノマーに比して十分に低い反応性を有し、かつ重合を停止するには十分な活性を持つ場合、重合初期にはモノマーが選択的に反応し、モノ

Scheme 1. Synthesis of end-functional *st*-PMMA via termination of stereospecific living anionic polymerization and the subsequent click reaction.

マー消費後に停止反応が進行すると予想される。すなわち、停止剤の存在下でもリビング重合は可能で、成長反応の完了後に、自発的に停止反応が生じて末端機能化ポリマーが生成する。停止反応のプログラム化が鍵となることから、このような重合を古代ギリシア神話の生命を断ち切る女神Ατροποσの名を冠し「アトロポス重合」と命名した。アトロポス重合では必要な試薬を重合開始時に一斉添加するため、技術的にも非常に簡便な精密重合が実現する。本研究では、申請者らが得意とするアクリル酸エステル類のアニオン重合を対象に、適切な停止剤設計によりアトロポス重合を達成した。

2. メタクリル酸メチルのアトロポス重合

2.1 アトロポス重合に適した停止剤の設計

メタクリル酸メチル (MMA) のアニオン重合を a -リチオイソ酪酸イソプロピル (Li-iPrIB) 12 / エチルアルミニウムビス (2,6-tert-ブチルフェノキシド) [EtAl(ODBP) $_2$] 13 の2成分系開始剤を用いて開始すると、シンジオタクチック特異性リビング重合が進行する。申請者は最近、 a -(クロロメチル) アクリル酸エチル (**T1**) がこの重合を効率よく停止することを見出した $^{5.6}$ 。しかしながら、**T1**はメタクリル酸メチル (MMA)

Scheme 2. Terminating reaction of syndiotactic-specific living anionic polymerization of MMA.

より高い反応性を示し⁵、アトロポス重合には不適である。

T1による停止反応は、まず成長アニオンがMichael付加し、ついでアリル位の塩素原子が脱離する付加-脱離 $(S_N 2)$ 機構で進行する 5 。第1段階のMichael付加反応は成長反応に類似しており、同条件におけるアクリル系モノマーの反応性に関する知見が、停止剤の反応性制御にも適用できると考えられる。また、申請者らの過去の研究で、a-(アルコキシメチル)アクリル酸エステルが、T1 に比して穏和な停止剤として働くことが明らかになっている 14 。以上の知見から、停止剤の反応性は ① β -置換基 R^1 の立体障害 ② エステル置換基 R^2 の立体障害 ③ 脱離基の脱離能力 の3箇所で調整できると考え、エステル置換基にかさ高いtert-ブチル基を導入したT2、脱離基を臭素原子からメトキシメチル基に変更したT3、 β 位にメチル基を導入したT4を合成した(Scheme 2、なお、T4は異性体混合物(E/Z=52/48)である)。

はじめに、新規に合成した停止剤が機能することを確認するため、成長アニオンに対して停止剤を逐次添加する従来法による末端修飾を検討した。トルエン中、 $\text{Li-}i\text{PrIB/EtAl}(\text{ODBP})_2$ 開始剤に-78 $\mathbb C$ で $\text{MMAを加え、24時間後に$ **T2**を添加してさらに24時間反応させた(Table 1)。Figure 2に、生成ポリマー

Table 1. Termination efficiency of syndiotactic-specific living Aanionic polymerization of MMA initiated by Li-*i*PrIB / EtAl(ODBP)₂ in toluene at −78 ℃.

Terminator	Conditions and content of end-functionality				
	-78 °C, 1) -78 °C, 24 h 1) -78 °C, 24 h				
	24 h 2) 0 °C, 1 h 2) 0 °C, 24 h				
T2	77%	89%	-		
Т3	33%	65%	-		
T4	1%	30%	66%		

の¹H NMRスペクトルを示す。主鎖メチレンの信号が 1。82 ppm付近に一重線として観測され、シンジオ タクチックポリメタクリル酸メチル(st-PMMA)の生 成が確認され、立体規則性を反映したα-メチル基の 信号の分裂とそれぞれの強度比から、シンジオタク チック度は87%と求められた。オレフィン領域を拡大 すると、停止末端のビニリデン基の信号 ω 1、 ω 2が末 端2連子の立体規則性を反映した分裂を示した信号と して観測され、停止反応の進行が確認された。この うち、信号 ω 1と開始末端由来のO-メチン基の信号 α の積分強度比から、末端導入率はF = 77%と見積もら れた。同様の条件でT3を用いると、末端導入率はF=34%まで低下し、**T4**はF=1%と停止剤としてほとん ど機能しなかった(Table 1)。一方、停止剤添加後に -78 ℃で24時間反応させた後、さらに0 ℃に昇温して 1時間反応させたところ、末端導入率は**T1**でF = 90%、 **T2**で*F* = 65%、**T3**で*F* = 30%まで増加した。0 ℃に昇温 後の反応時間を24時間に延長したところ、**T3**による末 端導入率はF = 66%に達した。これらの結果から、停止 剤の反応性はT1 > T2 > T3 > T4であり、いずれの場合 も0℃で停止反応を起こしうることが明らかになった。

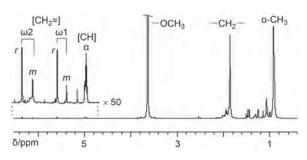


Figure 2. ¹H NMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, 55 ℃) of PMMA terminated with **T2**. Labels for signals correspond to those in Scheme 2. *r* and *m*: terminal diad.

Table 2. Atropos polymerization of MMA initiated by Li-iPrIB / EtAl(ODBP)₂ in toluene at -78 °C for 24 h and then at 0 °C for 24 h.^a

Run	Т	Conv.b/%	$M_{\rm n}^{\rm b}$	$M_{\rm w}/M_{\rm n}^{\rm b}$	₽ /%
1	-	95	4100	1.13	-
2	T2	12	700	1.48	89
3	T3	95	6500	1.45	65
4 ^d	T4	98	6500	1.15	69

- a) Toluene 5.0 mL, MMA 5.0 mmol, [T]₀ / [MMA]₀ / [EtAIODBP]₀ / [Li-/PrIB]₀ / = 3 / 25 / 5 / 1
- b) Determined by ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 55 °C)
- c) Determined by SEC (THF, 40 °C, PMMA standards).
- d) MMA 3.0 mmol, $[T]_0$ / $[MMA]_0$ / $[EtAIODBP]_0$ / $[Li-iPrlB]_0$ / = 3 / 30 / 5 / 1.

2.2 昇温過程を経たアトロポス重合

Li-iPrIB / EtAl(ODBP)2を開始剤に用い、Li-iPrIBに 対して3当量の**T2-T4**の存在下で-78℃で24時間、さら に0℃に昇温して24時間、MMAのアニオン重合を行っ た(Table 2)。停止剤なしの対照実験(Run 1)ではほぼ 完全なモノマー転化率(95%)と狭い分子量分布($M_{\rm w}$ / $M_n = 1.13$)が得られたのに対し、**T2**存在下の重合(Run 2)ではモノマー転化率は12%に過ぎず、オリゴマー (M_n) = 700)が得られたのみで、成長反応が完結する前に停 止反応が併発したことが示唆された。T3(Run 3)ではモ ノマー転化率は対照実験と同等まで高くなり(95%)、ポ リマーが得られたものの、分子量分布は依然として広く $(M_n = 6500, M_w / M_n = 1.45)$ 、活性種が重合終盤まで 残存していた一方で、早い段階から停止反応が起こっ たことが示唆された。これらの結果は、サイズ排除ク ロマトグラム(SEC)の低分子量側にテーリングが見られ たことからも支持された。一方、T4を用いた場合(Run 4)は、対照実験(Run 1)と比して遜色のないモノマー転 化率(98%)と狭い分子量分布($M_{\rm w}$ / $M_{\rm n}$ = 1.15)が達成さ れ、さらに末端導入率も比較的高かったことから(F= 69%)、**T4**がアトロポス重合に最適であることがわかっ た。

2.3 温度一定条件下でのアトロポス重合

T4は-78 $\mathbb C$ ではほとんど機能しないため(Table 3、Run 5)、先の実験では重合の後半で0 $\mathbb C$ に昇温する必要があった。このような昇温過程を経ず、重合開始から停止まで温度を一定に保った状態でアトロポス重合が実現すれば、操作も簡便化され理想的である。そこで、**T4**によるアトロポス重合を-40 $\mathbb C$ で48時間行ったところ、昇温せずとも高い末端導入率が得られた(Run 6、F

Table 3. Effects of temperature in the Atropos polymerization of MMA.^a

Run	Temp / °C	Conv.b/%	M _n ^c	$M_{\rm w}/M_{\rm n}^{\rm c}$	F/%
5 ^b	-78	76	5900	1.14	1
6	-40	100	5700	1.13	64
7	0	99	5700	1.28	76
8 ^b	30	98	6400	1.34	59

a) Toluene 5.0 mL, MMA 5.0 mmol, $[T]_0 / [MMA]_0 / [EtAIODBP]_0 / [Li-PrIB]_0 / = 3 / 25 / 5 / 1, 48 h.$

b) Determined by SEC (THF, 40 °C, PMMA standards).

c) Determined by ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 55 °C)

b) 25 h.

Table 4. Atropos polymerization of MMA with various feed ratio.^a

Run	$[M]_0/[I]_0$	Temp	Conv. b	$M_{\rm n}^{\rm c}$	$M_{\rm w}/M_{\rm n}^{\rm c}$	F b/ %
		/ °C	/ %			
9 ^d	30	-40	100	2600	1.13	64
10	30	0	99	2800	1.28	76
11	100	-40	99	30000	1.19	30
12	100	0	100	32200	1.11	57
13	200	-40	100	64200	1.17	2
14	200	0	99	106000	1.23	18

^a MMA 3.0 mmol, toluene 5.0 mL, [Li-*i*PrlB]₀ / [EtAl(ODBP)₂]₀ / [**T4**]₀ = 1 / 5 / 3, 70 h.

^b Determined from ¹H NMR spectra (500 MHz, CDCl₃, 55 °C).

° Determined from SEC (THF, 40 °C, PMMA standards).

^d 48 h.

= 64%)。さらに高温の0 \mathbb{C} では末端導入率がF = 76%に増加したが $(Run\ 7)$ 、分子量分布は広くなり $(M_{\rm w}\ /\ M_{\rm n}$ = 1.28)、30 \mathbb{C} まで温度を上げた場合には分子量分布も停止効率も悪くなった $(Run\ 8)$ 。

アトロポス重合では、成長反応と停止反応の選択性が鍵を握る。当然ながら、目標とする分子量が大きくなるほど、成長反応の回数が増加し、停止反応が競争する確率が上昇する。そこで、開始剤/モノマー比を変えて、アトロポス重合による高分子量体の合成を検証した(Table 4)。[MMA]₀/[Li-iPrIB]₀ = 100として、**T4**

によるアトロポス重合を-40℃で70時間行ったところ $(Run\ 11)$ 、狭い分子量分布のポリマーが得られたが (M_{\bullet}) = 30 000、 $M_{\rm w}$ / $M_{\rm n}$ = 1.19)、末端導入率がF = 30%に低 下した。同様の条件で0℃で重合すると(Run 12)、狭い 分子量分布 $(M_n = 32\ 200 \ M_w / M_n = 1.11)$ と中程度の 末端導入率(F = 57%)でポリマーが得られた(Run 7)。 $[MMA]_0/[Li-iPrIB]_0 = 200 \text{ ct. } -40 \text{ cm}_0 = 64$ 200, $M_{\rm w}$ / $M_{\rm n}$ = 1.17(Run 13), F = 2%, 0 °C °C $M_{\rm n}$ = 106 000、 $M_{\rm w}$ / $M_{\rm n}$ = 1.23、F = 18%であった(Run 14)。 重要なことに、Runs 13、14の条件では反応系がゲル化 した。停止剤を逐次添加する従来法では、反応系がゲル 化すると、停止剤を混合することができない。一方、停 止剤を重合開始時に添加するアトロポス重合では、反応 系がゲル化しても、停止反応が進行した。末端導入率の 向上については改善の余地があるが、これらの結果は、 アトロポス重合が従来法では合成困難な高分子量体の末 端機能化にも有効であることを示している。

2.4 アトロポス重合における副反応の検討

以上のように、**T4**はアトロポス重合を実現する停止 剤であるが、末端導入が定量的ではなく、改善の余地を 残している。末端導入率が100%に達しない理由を明ら かにするため、MMAのアニオン重合と**T4**の逐次添加に よる停止反応をRun 7の条件で行い、さらに反応系にメ タクリル酸エチル(EMA)を追加添加してリビングアニ オンの残存を確認した。その結果、EMAを追加添加し なかった対照実験と生成ポリマーの分子量に差は見られ ず、またEMAの転化率は0%であったことから、少なく ともEMAを添加した段階で成長種は失活していること

Scheme 3. Reactions between T4 and EtAl(ODBP), under the conditions of Atropos polymerization with/without MMA.

がわかった。この結果は、想定される停止反応以外の副 反応の存在を示唆する。

副反応について検討するため、T4とEtAl(ODBP)2の みを混合し、0 ℃で24時間反応させたところ(Scheme 3)、2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの2種類のFriedel-Crafts反応生成物およびWilliamson反応で生じるエーテ ルがGC-MSにて確認された。以上のことから、この重 合にはT4とEtAl(ODBP)。による副反応が存在すると考 えられる。EtAI(ODBP)2には成長種の安定化とアクリ レート種(モノマー/停止剤)の活性化という二つの働 きがあり、いずれも重合や停止反応の進行に欠かせな い。0℃以上では前述の副反応によりEtAl(ODBP)っが 分解し、成長種の失活ないしアクリレート活性化機構 の消失が生じ、結果として末端導入率が100%に達しな かったと推測している。重要なことに、T4とMMA、 EtAl(ODBP)₂を混合し、0 ℃で24時間反応させたとこ ろ、前述の副反応は全く起こらず、原料がそのまま回収 された。これは、EtAl(ODBP)2がもっぱらMMAと会合 し、安定化しているためであると考えられる。したがっ て、この副反応はMMAが消費された重合の後半で生じ ると想定される。末端導入率が100%に達しない原因に ついては引き続き検討が必要だが、これらの副反応の存 在が少なからず寄与していると考えられる。

2.5 生成ポリマーの末端機能化反応

先行研究で、**T1**による停止反応で導入したアクリロイル末端を、官能性チオールを用いたMichael付加型チオールーエン・クリック反応により定量的に機能化できることが明らかになっている⁵。**T4**により導入した停止末端も同様に機能化できると推測されるが、停止末端の

Scheme 4. End-functionalization of *st*-PMMA via thiol-ene click reaction catalyzed by base.

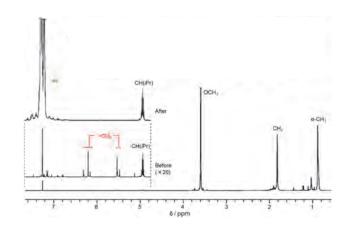


Figure 3. ¹H NMR spectra (500 MHz, CDCl₃, 55 °C) of PMMA terminated with **T4** before and after thiol-ene click reaction with benzyl mercaptan.

アリル位に分岐が存在するため、反応性が低下している 懸念がある。そこで、アセトニトリル中、触媒量のトリエチルアミンの存在下で、**T4**による重合停止で得たst-PMMAを過剰のベンジルメルカプタンと室温で3日間反応させた(Scheme 4)。Figure 3に反応前後の¹H NMRスペクトルを示すが、オレフィン領域の末端ビニリデン基の信号がほぼ完全に消失し、フェニル基の信号が観測されたことから、定量的に末端にベンジル基が導入されたことが明らかになった。結果的に**T1**による停止末端と比べて長時間の反応を要したものの、同様の手法で末端機能化が可能なことがわかった。

3. アクリル酸エステルのアトロポス重合

3.1 停止剤の最適化によるアトロポス重合の成立

Li-*i*PrIB/EtAl(ODBP) $_2$ によるアクリル酸ブチル(BA)のアニオン重合はリビング的に進行し、**T1**で重合を停止することにより末端機能化ポリアクリル酸ブチル(PBA)を与える 15 。前節で、**T1**はMMAより高い反応性を示すため 5 、MMAのアトロポ重合に不適である旨を述べた。一方、BAは**T1**より高い反応性を示すことから、BAのアトロポス重合には適用できると考えた。開始剤にLi-*i*PrIB / EtAl(ODBP) $_2$ を用い、30当量のBAと3.0当量の**T1**を同時に加えて、トルエン中、-60 $^{\circ}$ Cで2時間反応させ、さらに0 $^{\circ}$ Cで1時間反応を行った(Scheme 5; Table 5、Run 16)。**T1**を用いない対照実験(Run 15、 $M_n = 3500$ 、 $M_w/M_n = 1.22$)と比べて分子量が若干増加し($M_n = 4400$ 、 $M_w/M_n = 1.49$)、その分布も広くなったものの、SEC溶出曲線は単峰性で、モノマー転化率は

Scheme 5. Atropos polymerization of BA in the presence of EtAl(ODBP)₂.

Table 5. Anionic polymerization with BA initiated with Li-iPrIB/ EtAl(ODBP) $_2$ in toluene at -60 °C for 1 h. a

Run	Т	Conv. /%b	<i>M</i> _n ^c	$M_{\rm w}/M_{\rm n}^{\rm c}$	F [®] /%
15	-	100	3500	1.22	-
16	T1	100	4400	1.49	93
17	T5	21	9400	1.99	94
18 ^d	T1	100	12100	1.12	80

a) Toluene 5.0 mL, BA 3.0 mmol, [Li-iPrlB] $_0$ / [EtAl(ODBP) $_2$] $_0$ / [BA] $_0$ / [T] $_0$ = 1 / 5 / 30 / 3.

- b) Determined by ¹H NMR.
- c) Determined by SEC (40 °C, THF, PMMA standards).
- d) [Li-iPrlB] $_0$ / [BA] $_0$ = 1 / 50, T2 was added stepwise after propagation for 1 h (Not Atropos polymerization).

100%に達したことから、モノマーが完全に消費される まで成長種が残存していたことが示唆された。対照実験 より分子量が増加し、開始剤効率が低下したことから、 開始剤であるLi-iPrIBが**T1**と反応した可能性が考えられ る。すなわち、成長反応における選択性は十分に高く、 アトロポス重合が達成された一方で、開始反応におけ る**T1**とBAの選択性は完全ではない。生成ポリマーの¹H NMRスペクトル(Figure 4)では、末端ビニリデン基の 信号が5.51ppmと6.15 ppmに観測され、開始剤由来のイ ソプロピル基のメチン水素の信号(5.00 ppm)との強度比 から、末端基導入率(F)はF=93%と求められた。この 値は、停止剤を逐次添加した際(Run 4)の末端基導入率 (F=80%)より大きい。詳しい議論が必要ではあるが、 BAのアニオン重合ではモノマー消費後に成長種が自己 失活している可能性がある。この場合、重合開始時に停 止剤を加えるアトロポス重合では、成長反応から円滑に

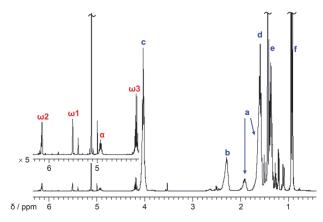


Figure 4. ¹H NMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, 55 ℃) of PBA by Atropos polymerization with **T1**. Labels corresponds to those in Scheme 5.

停止反応へ誘導可能で、逐次添加と比べて末端導入率が改善したと推測される。次に、停止剤にa-(プロモメチル)アクリル酸エチル($\mathbf{T5}$)を用いて同様の実験を行ったところ(Run3)、SEC溶出曲線は広幅化し(M_n = 9400、 M_w/M_n = 1.99)、モノマー転化率も21%に低下した。この結果は、停止反応が成長反応と競争し、成長種が重合終盤まで残存しなかったことを示している。アクリレートの β -炭素の 13 C NMR化学シフト値は、求核付加に対するビニリデン基の反応性を評価する指標として有効である。BAの130.6 ppmに対し、 $\mathbf{T1}$ は128.4 ppm、 $\mathbf{T5}$ は129.1 ppmであり、BAと $\mathbf{T1}$ は反応性差が比較的小さいことが示唆され、重合結果をよく説明している。

3.2 開始剤の最適化によるアトロポス重合の洗練

申請者らは最近、 $EtAl(ODBP)_2$ の存在下におけるアクリル酸エチル(EA)のアニオン重合において、テトラブチルアンモニウムメタクリレート(TBAMA)が穏和な開始剤として機能し、狭い分子量分布でポリマーを与えることを見出した。従来、カルボキシラートアニオンは求核性が低く、EAの重合を開始できないとされてきたが、この重合系では $EtAl(ODBP)_2$ がEAを活性化し、その求電子性を高めているため、重合が円滑に開始される。また、 $EtAl(ODBP)_2$ はアクリル酸エステルを選択的に活性化することから、開始反応により生じるメタクリル酸エステルは、少なくともEAがほぼ完全に消費されるまでは反応しない。

さて、BAのアトロポス重合において、Li-*i*PrIBと**T1** の直接的な反応により分子量分布が増大した可能性に

Scheme 6. Atropos polymerization of EA with TBAMA and **T1**, and the subsequent double end-functionalization via thiol-ene click reaction catalyzed by base.

ついて述べた。TBAMAはLi-iPrIBに比べて穏和な反応 性を示すことから、開始反応における選択性の改善に有 効であると考えられる。そこで、開始剤にTBAMAを 用いて、50等量のEAと5等量のT1を加えて、トルエン 中、EtAl(ODBP)2の存在下、-60 ℃でアトロポス重合 を行った(Scheme 6)。30分後のモノマー転化率は92% で、分子量とその分布は $M_n = 7800$ 、 $M_w / M_n = 1.07$ で あったが、停止末端は導入されていなかった。反応時 間を2時間に延ばすと、モノマー転化率は100%に達し、 $M_{\rm n} = 9600$ 、 $M_{\rm w} / M_{\rm n} = 1.06$ で、末端導入率はF = 90%であった。この結果は、穏和な開始剤の使用により、開 始反応における選択性が向上し、非常に狭い分子量分布 のポリマーが得られることを示している。また、30分ご と2時間後の末端導入率の比較から、停止反応が期待通 りに重合の最終盤で生じたことが明らかになった。な お、**T1**はメタクリル酸エステルに優先して停止反応を 起こすことが明らかになっているが、今回の実験でも開 始剤由来のメタクリロイル基は未反応のまま残存し、両 末端にアクリロイル基を有するポリマーが得られた。さ らに、Michael付加型チオール-エン・クリック反応に よる両末端の定量的な修飾にも成功した。

4. アトロポス重合の応用

4.1 末端機能化ブロック共重合体のone-shot合成

Scheme 7. Monomer-selective Atropos copolymerization of BA and MMA with Li-*i*PrIB and **T5** to afford end-functional block copolymer.

BAとMMAをEtAl(ODBP) $_2$ の存在下で重合すると、BAがEtAl(ODBP) $_2$ に選択的に活性化されて重合し、BA消費後にMMAの重合が続いて、ブロック共重合体が得られる 4)。この重合系の発展として、BA、MMA、**T2**をLi-iPrIB / EtAl(ODBP) $_2$ 開始剤に加え、-40 $\mathbb C$ で17時間、さらに0 $\mathbb C$ で24時間重合を行ったところ、狭い分子量分布($M_n = 9500$ 、 $M_w/M_n = 1.25$)と比較的高い末端導入率(F = 84%)でブロック共重合体PBA-block-(st-

Scheme 8. Monomer-selective Atropos copolymerization of BA and MMA with Li-*i*PrIB and **T6** (methacrylate-bearing terminator) to afford graft copolymer.

PMMA)が得られ、アトロポス重合によるモノマー配列、分子量、立体規則性、末端官能基の四元同時制御が達成された(Scheme 7)。

4.2 モノマー担持型停止剤を用いたアトロポス重合 によるグラフト共重合体のone-pot合成

これまで述べてきたように、T1は過剰量のMMAの存在下でも選択的に重合を停止する。また、前述のようにBAはT1の存在下でも選択的に成長反応を起こす。そこで、T1とMMAを連結したメタクリレート担持型停止剤T6を設計し、Li-iPrIB / $\text{EtAl}(\text{ODBP})_2$ 開始剤に対し [BA]_0 / $[\text{T3]}_0$ / $[\text{MMA]}_0$ / $[\text{Li-}i\text{PrIB}]_0$ = 50 / 0.70 / 14 / 1 の仕込み比でアトロポス重合を行った。反応は CH_2Cl_2 中、-60 $\mathbb C$ で2時間、さらに-40 $\mathbb C$ で7日間実施した。この重合では、反応初期にはBAの重合が選択的に進行し、次いで成長アニオンの一部がT3と反応してメタクリレート担持型マクロモノマーに変換される。重合後半では、残存する成長アニオンをマクロ開始剤とする、マクロモノマーとMMAの共重合が進行し、最終的にpolyMMAを幹鎖、polyBAをグラフト鎖に有するグラフト共重合体が得られた(Run 8)。

5. 結言

モノマーに比して開始剤、成長種に対する反応性が十分に低い停止剤を設計することで、アトロポス重合が達成された。停止剤存在下におけるリビング重合と、プログラム化された停止反応に基づくアトロポス重合は、従来の重合化学の常識を覆す発見である。特に、第4節で述べた応用例では、分子量や末端基のみならず、モノマー配列や分岐構造までが、必要な試薬を混合するだけで自発的に精密制御される。本研究はアクリル酸エステル類のアニオン重合を対象に展開したが、アトロポス重合の概念は他の重合系にも適用できると考えられ、さらなる研究の発展が望まれる。

反応有機化学では同様の先駆的なアイディアが提案されている。すなわち、カスケード反応やドミノ反応と呼ばれる化学反応では、第1の反応で生じた化学種が、第2、第3の反応を引き起こし、結果として巨大分子を高い選択性で与える。また、いわゆる多成分連結反応では、複数の分子を同時に混合するだけで、複雑な構造を有する単一分子が生成する。アトロポス重合はこれらの概

念と類似しているが、その実像はさらに困難である。まず、無数の回数で繰返される成長反応に対して、一度でも停止反応が生じれば、重合が失活してしまう。すなわち、重合の簡潔には完全な反応の選択性が要求される。さらに、分子量分布を小さくするためには、迅速開始/緩慢成長の原理が不可欠である。したがって、反応の順序だけでなく、その速度にも留意する必要がある。これらの事情から、アトロポス重合は有機反応化学においても意義深く、その成功は大きな金字塔であると言える。

謝辞

貴財団から賜った研究助成により、MMAのアトロポス重合における重要な結果を得ることができました。その後、この先行実験がきかっけとなり、本研究は文部科学省科研費の挑戦的萌芽研究に採択され、当初の計画にはなかったアクリル酸エステルのアトロポス重合や、ブロック共重合体、グラフト共重合体のone-pot合成といった応用展開に至りました。本来、貴財団への報告書へは、当該助成で得られた初期の成果のみ記載するべきではございますが、研究が大きく開花したことに感謝し、現在進行中の発展的な成果も含めて記載致しました。

〔参考文献〕

- 1 M. Szwarc, Nature, 1956, 178, 1168.
- 【CSJカレントレビュー20 精密重合が拓く高分子合成 高度な制御と進む実用化-』(日本化学会編),「17章 実用化された精密重合」,pp. 168-177,化学同人,(2016年).
- M. Tasdelen, M. Kahveci and Y. Yagci, *Prog. Polym. Sci.* 2011, 36, 455.
- 4 B. Schmitt, H. Schaad, A. H. E. Müller, *Macromolecules*, **1998**, *31*, 1705.
- 5 Y. Kohsaka, T. Kurata, T. Kitayama, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 5043.
- Y. Kohsaka, T. Kurata, K. Yamamoto, S. Ishihara, T. Kitayama, Polym. Chem. 2015, 6, 1078.
- 7 Y. Kohsaka, K. Yamamoto, T. Kitayama, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 3601.
- 8 高坂泰弘, 北浦健大, 北山辰樹, *高分子論文集*, **2015**. *72*. 385.

- 9 高坂泰弘, 北山辰樹, 日本ゴム協会誌, **2015**, 88, 80.
- 10 髙坂泰弘, *高分子論文集*, **2016**, 早期公開(DOI: 10.1295/koron.2016-0024).
- 11 高坂泰弘,北浦健大,北山辰樹,「クリック反応性基を有するアクリル系ポリマーの精密合成と反応」、『クリックケミストリー -基礎から実用まで-』、高田十志和、小山靖人、深瀬浩一編、シーエムシー出版、pp137-148 (2014年).
- 12 T. Kitaura, T. Kitayama, Macromol. Rapid Commun. 2007, 28, 1889.
- 13 T. Kitayama, T. Hirano, K. Hatada, Tetrahedron, **1997**, *53*, 15263.
- 14 Y. Kohsaka, K. Suzawa, T. Kitayama, *Macromol. Symp.* **2015**, *350*, 86.
- 15 Y. Kohsaka, S. Ishihara, T. Kitayama, *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, *216*, 15349.

ねじれたπ共役分子を基盤とする多機能性有機発光材料の開発

東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門 中野 幸司

1. はじめに

ヘリセンは、芳香環が螺旋状に縮環することでねじれ た構造をもつキラルπ共役分子であり、円二色性(CD) や円偏光発光(CPL)などキラリティに由来した光学特性 や非平面 π 共役系に由来する機能に興味が持たれてい る。また、高次構造の形成による機能増幅の可能性も 知られている。例えば、長鎖アルキル基をもつヘリセ ン類縁体は、自己組織化によって一次元螺旋状のカラム 構造を形成し、螺旋状の分子がさらに螺旋状の高次構 造を形成することで、顕著なCPL特性や非線形光学効果 (NLO)を発現することが報告されている¹。しかしなが ら、その特徴を活かした機能性材料開発はそれほど進展 していない。その一つの要因として、ヘリセンの合成手 段が限られていたことが挙げられる。報告されているへ リセンのほとんどは、ベンゼン環のみ、もしくはベンゼ ン環とチオフェン環が縮環したものであり、導入する元 素と機能との相関や、高次構造形成に関する知見は極限 られている。

われわれはこれまでに、ヘリセンの合成と機能について研究をおこなってきた。これまでに、独自の手法によって多様なヘリセン**1**の合成に成功している(図1)²⁻⁵。また、機能面では、既報のヘリセンに比べて高い蛍光量子収率やCPL特性を実現している。さらに、双極子-双極子相互作用を利用した分子配列などにも成功してい

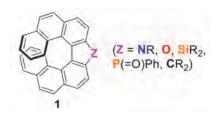


図1 これまでに合成したヘリセンの例

る。このような背景に基づき、ヘリセンを基盤とする革 新的な機能性材料の開発を目指して、新規ヘリセンの合 成とヘリセンを組込んだ集積体の構築について研究をお こなった。

2. 新規ヘリセンの合成と光学特性

へリセンに導入するヘテロ芳香環の種類と数が構造や物性に及ぼす効果を明らかにするために、これまでに合成に成功しているヘリセン類縁体1(Z = CR₂)のベンゼン環二つがチオフェン環に置換したヘリセン類縁体2を設計した。ヘリセン類縁体2の合成スキームを図2に示す。新規に設計、合成したビナフト[2,1-b]チオフェンを原料として、チオフェン骨格のα位をリチオ化した後、クロロギ酸メチルを作用させることで、メトキシカルボニル基一つを導入した化合物3を得た。次に、アリールマグネシウム反応剤を作用させ、フェニル基や4-tert-ブチルフェニル基を導入した第三級アルコール4を得た。最後に、酸触媒による分子内環化反応によって、目的のヘリセン類縁体2の合成に成功した。

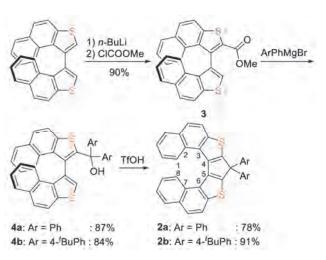


図2 ヘリセン類縁体の合成

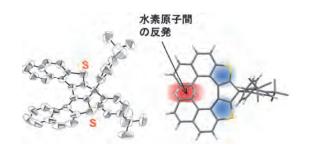


図3 ヘリセン類縁体2bのX線結晶構造解析

得られたヘリセン類縁体**2b**のX線結晶構造解析をおこなった(図3)。分子全体のねじれの度合いを見積もるために、内側の螺旋構造を形成する八つの炭素原子で定義される五つの二面角の和を計測したところ、約62°であった。この値は、ヘリセン類縁体**2b**のチオフェン環二つがベンゼン環に置き換わったヘリセン類縁体**1**($Z = CPh_2, 90.8°)$ のものに比べると、かなり小さい。これは、六員環であるベンゼン環から五員環であるチオフェン環に置き換わったことで、末端ベンゼン間どうしの重なりが小さくなり、分子のねじれがほぼ末端ベンゼン環の水素原子間の反発によってもたらされているためと考えられる。

次に、今回合成した**2a**の紫外可視吸収スペクトル測 定をおこなったところ、360 nmに最長極大吸収をもつ スペクトルが得られた(図4)。部分構造であるナフトチ

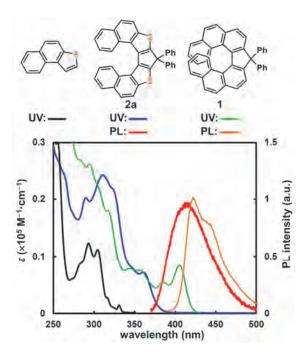


図4 紫外可視吸収および蛍光スペクトル

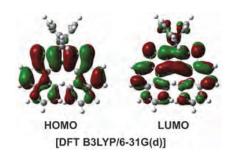


図5 ヘリセン類縁体2bの分子軌道

オフェンの吸収スペクトルと比較すると、今回合成した 2aでは大きく長波長シフトしている。したがって、2a では分子がねじれているが、共役系は分子全体に広がっ ていると考えられる。このことは、密度汎関数法を用 いて最適化した構造の最高被占軌道(HOMO)および最 低空軌道(LUMO)からも示唆される(図5)。すなわち、 HOMOおよびLUMOは分子全体に広がっており、特に LUMOでは、二つのチオフェン環にまたがるような軌 道が確認できる。また、今回合成した2aのチオフェン 環がベンゼン環に置き換わったヘリセン類縁体1(Z = CPh_o)の紫外可視吸収スペクトルと比較したところ、2a の方が大きく短波長側にシフトしていた。これは、ベン ゼン環がチオフェン環に置き換わったことにより、効 果的 α 共役が阻害されたためと考えられる。また、 両者の蛍光スペクトルを比較したところ、2aのStokes $> 7 + (3680 \text{ cm}^{-1}) \text{ lt} (Z = \text{CPh}_2) \text{ OStokes} > 7 +$ (760 cm⁻¹)よりも大きく、励起状態での構造変化が起 こりやすいと考えられる。また、1が比較的高い蛍光量 子収率($\phi \sim 0.40$)を示すのに対して、今回合成した**2a** では、大きく低下することが分かった(Φ < 0.05)。

3. ドナー-アクセプター構造を持つヘリセンの合成と 光学特性

高い発光効率を示すヘリセンの開発を目指して、ドナーとしてアザ[7]ヘリセン、アクセプターとしてシアノ基を導入した分子内ドナー-アクセプター構造を持つヘリセン誘導体5を設計した。密度汎関数法を用いた分子軌道計算の結果[B3LYP/6-31G(d)]、設計通りにHOMOはドナーであるアザ[7]ヘリセン骨格側に、LUMOはアクセプターであるシアノ基側に局在化していることが分かった(図6)。設計した分子は、アザ[7]ヘリセンとジフルオロフタロニトリルとの反応で、高収率

で得ることに成功した(図7)。蛍光スペクトルを測定したところ、用いる溶媒の極性パラメーターの向上に伴って発光極大が長波長シフトした(図8)。これは、ドナーーアクセプター構造に基づく分子内電荷移動の効果と考えられる。また、絶対蛍光量子収率を測定したところ、低温(77 K)において Φ = 0.61を示した。これは、既存のヘリセンと比べて極めて高い値であり、ドナーーアクセ

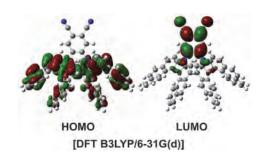


図 6 ドナー-アクセプター構造を持つヘリセン**5**の 分子軌道

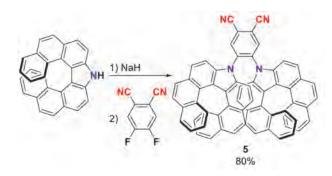


図7 ドナー-アクセプター構造を持つヘリセン5の合成

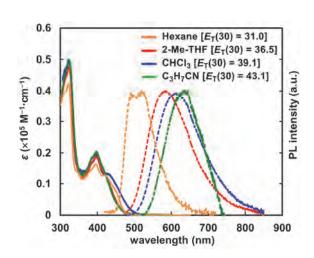


図8 ドナー-アクセプター構造を持つヘリセン**5**の 蛍光スペクトル

プター構造が蛍光量子収率向上に有効な手法となりうる ことを示す結果である。

4. ヘリセンを側鎖に導入したヘリカルポリアセチレン の合成

高分子主鎖が形成する螺旋構造に沿ってヘリセンが螺旋状に配列されたヘリセン集積体の構築を目指して、側鎖にヘリセンを導入したヘリカルポリアセチレンを設計した。動力学計算によると、アザ[7]ヘリセンが螺旋状に配列できることが示唆された(図9)。そこで、まず重合部位となるエチニル基を導入したラセミ体のアザ[7]ヘリセンrac-6を設計し、その合成に成功した(図10)。ロジウム触媒をもちいてrac-6の重合をおこなったところ、モノマーが完全に消費され、数平均分子量39,800(PDI = 3.7)の有機溶剤に可溶な高分子量体7を得た。紫外可視吸収スペクトル測定の結果、モノマーよりも長波長領域にポリアセチレンの生成を示唆する吸収を確認した。一方、光学的に純粋なモノマーを用いた場合には、不溶性の生成物を得た。光学的に純粋なモノマーを用い

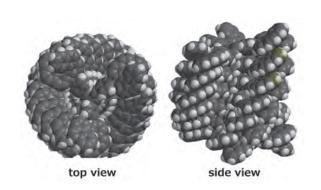


図9 動力学計算によって得られたアザ[7]ヘリセン を側鎖に持つヘリカルポリアセチレンの構造

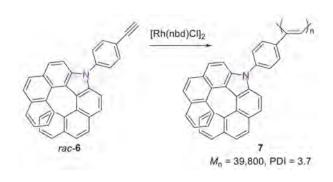


図10 アザ[7] ヘリセンを側鎖に持つヘリカルポリ アセチレンの合成

たことで、より規則性の高いヘリカルポリアセチレンが 生成したため、溶解度が著しく低下したと考えられる。

5. まとめ

今回、ヘリセンに導入するヘテロ芳香環の種類と数が 及ぼす効果を明らかにするために、新規へリセンを合成 し、構造や電子状態に及ぼす効果を明らかにした。ま た、この合成を通じて、ヘリセン骨格の新たな構築法も 開拓することに成功した。さらに、ドナー-アクセプ ター構造が、ヘリセン誘導体の発光特性向上に有用な手 法となりうることを示すことができた。これらの結果 は、ヘリセンを基盤とする機能性材料の開発において、 分子設計指針を与えるものとして期待できる。一方、へ リセン集積体として、アザ[7]ヘリセンを側鎖に有する ヘリカルポリアセチレンの合成に成功した。現段階で は、溶解性等の問題があるが、置換基導入などによって 可溶化し、光学活性体での構造解析ならびにキロプティ カル特性評価をおこなうことで、ヘリセンの集積化によ る大きなキロプティカル特性の発現が可能かを見極める 予定である。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご支援を賜りました 公益財団法人松籟科学技術振興財団に心より感謝申し上 げます。

7. 成果発表

- 1. 植松啓輔・<u>中野幸司</u>,「炭素で架橋された1,1'-ビナフト[2,1-b]チオフェンの合成と物性」,日本化学会第96春季年会,2016年3月27日,同志社大学 京田 辺キャンパス(京田辺市・京都府)
- 2. Ko Takase · <u>Koji Nakano</u>, 「Synthesis and Optical Properties of Donor-Acceptor Molecules with Aza[7]helicenes], The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

- (Pacifichem2015), 2015年12月18日, Hawaii Convention Center(ホノルル・ハワイ州・米国)
- 3. Ko Takase · <u>Koji Nakano</u>, 「Synthesis and Optical Properties of Aza[7]helicene-substituted Donor-Acceptor Molecules」, 12th International Symposium on Functional π-Electron Systems, 2015年7月19~24日, ワシントン大学(シアトル・ワシントン州・米国)
- 4. 高瀬 昂・<u>中野 幸司</u>, 「アザ[7]ヘリセンを電子ドナーとするドナー・アクセプター型分子の合成と光学特性」, 日本化学会第95春季年会, 2015年3月28日, 日本大学理工学部船橋キャンパス(船橋市・千葉県)
- 5. 窪田 紗英・<u>中野 幸司</u>,「ヘリセンを側鎖に導入した螺旋高分子の合成と光学特性」,平成27年度繊維学会年次大会,2015年6月10日,タワーホール船堀(江戸川区・東京都)
- 6. 窪田 紗英・<u>中野 幸司</u>,「アザ[7]ヘリセンを側鎖に 有するポリアセチレンの合成と物性,第64回高分子 学会年次大会,2015年5月27日,札幌コンベンショ ンセンター(札幌市・北海道)

8. 参考文献

- 1. Verbiest, T.; Elshocht, S. V.; Kauranen, M.; Hellemans, L.; Snauwaert, J.; Nuckolls, C.; Katz, T. J.; Persoons, A. *Science* **1998**, *282*, 913.
- Nakano, K.; Hidehira, Y.; Takahashi, K.; Hiyama, T.;
 Nozaki, K. Angew. Chem., Int. Ed. 2005, 44, 7136.
- Nakano, K.; Oyama, H.; Nishimura, Y.; Nakasako, S.;
 Nozaki, K. Angew. Chem., Int. Ed. 2012, 51, 695.
- 4. Oyama, H.; Nakano, K.; Harada, T.; Kuroda, R.; Naito, M.; Nobusawa, K.; Nozaki, K. *Org. Lett.* **2013**. *15*, 2104.
- Oyama, H.; Akiyama, M.; Nakano, K.; Naito, M.; Nobusawa, K.; Nozaki, K. Org. Lett. 2016, 18, 3654.

ピロールの特異な反応性を利用した機能性π共役分子の開発

愛媛大学 大学院理工学研究科 高瀬 雅祥

1. はじめに

 π 電子系化合物は、 π 電子の非局在化によって電気・磁気・光学的に特徴的な性質を示す事から、新たな物質科学を切り拓くため、世界中で新規化合物探索が行われている。このような背景の下、我々は新規 π 電子系化合物の合成とその基礎物性解明(吸収・発光・芳香族性・酸化還元・超分子集合体形成など)に取り組んできた。なかでもピロールの基本的な性質と合成化学的な反応性に興味を持ち、含ピロール拡張 π 電子系1-6、ピロールの芳香族求核置換(S_N Ar)反応を利用した機能性分子7-9といったオリジナルな π 電子系の合成を行ってきた(図1)。従来ピロールを含む π 電子系に関する研究は、ポルフィリンやフタロシアニンに関連する化学を中心に、色素や半導体として、近年インディゴやジケトピロロピロール類も多く見られるが、概念的に新しい π 電子系の創出という点で進展があるとは言い難い。一方、電子不

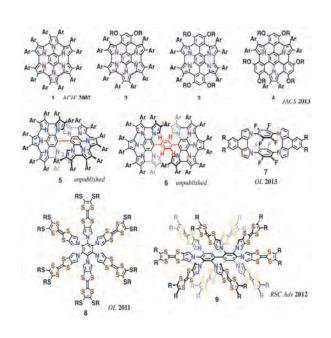


図1 申請者らがこれまでに合成した機能性π共役分子1-9

足フルオロアレーン類に対するピロールの S_N Ar反応により、立体的に込み入った箇所(例えば $\mathbf{9}$)や選択的な置換基導入(例えば $\mathbf{7}$)が可能であることを明らかにしており、特異な物性発現が期待される新規化合物創製への足がかりとなり得ることを見出している。

そこで本研究課題では、これまでの研究成果をもとに、(1)分子内に明確なドナー(D)・アクセプター(A) 界面を有する分離積層型分子の開発、ならびに(2)スピン非局在型中性ラジカル分子の開発を行った。

2. 研究概要

2.1 分子内に明確なドナー(D)・アクセプター(A)界 面を有する分離積層型分子の開発

バルクへテロジャンクション(BHJ)型太陽電池においては、ドナー(D)、アクセプター(A)分子の2成分を混合することで分離積層構造を構築し、光励起に伴う電荷分離、それに続く電極への電荷移動により光電変換機能を実現させている。本研究では、D/A両方の部位を有する分子を基本ユニットとして用い、それをオリゴマー化させることで、分子レベルで明確な構造を有するD/A分離積層構造の構築を目指した。

目的化合物12-14の合成は、 S_N Ar反応により前駆体11を合成し、その後、酸化剤を用いた分子内環化および分子間カップリングにより行った。興味深いことに、1等量のDDQと 3.5等量の $S_C(OTf)_3$ を用いて1.5 mMの塩化メチレン溶液として室温で反応させた際には、ほぼ12aしか得られなかったのに対して、1.5等量のDDQと 3.5等量の $S_C(OTf)_3$ を用いて5.0 mMのアセトニトリル溶液として65度で反応させた際には、二量体、三量体が同時に得られた(スキーム1)。合成した化合物12a, 13bについては単結晶が得られたため、結晶構造解析により構造の同定を行った(図2)。近接したC1-C2 間の距離は、

スキーム1 クリップ型分子12-14a,b の合成スキーム

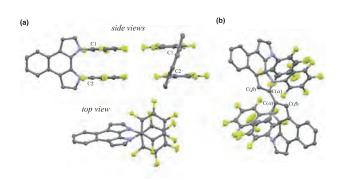


図2 化合物12a(a)と13b(b)の結晶構造

結晶中の独立した二つの構造に対して、3.119(3)Å、3.148(3)Åであり、二つのペンタフルオロフェニル基が強くスタックしていることを示唆している。またペンタフルオロフェニル基とナフトビピロールがなす角度は、65-70度であった。これらの結果は既報の**7b**とほぼ同じで、片方のナフトビピロール部位がなくても構造的に大きな変化をもたらさないことが分かった。一方、三量体

13bの $C(\square)$ - $C(\square)$ - $C(\square)$ - $C(\square)$ の二面角は、104.0(4)°であり、二つのスタックしたフルオロフェニル基間にスタッキングがない事が分かった。

図3に¹H-, ¹⁹F-NMRスペクトルを示す。ピロール部位の縮環に伴う芳香族ピークの低磁場シフトが観測され、それぞれ、ナフトビピロール環の形成とスタッキングしたフルオロフェニル基の立体圧迫効果によるものと考えられた。合成した分子は様々なコンフォメーションをとることが予想されたため、DFTを用いた構造最適化計算を行った(図4)。結晶構造とは異なり、二つのスタックしたフルオロフェニル基間にスタッキングが観測され、四つのペンタフルオロフェニル基がほぼ平行に位置する構造が見積もられた。最適化構造をもとにフロンティア軌道を表示させたところ、HOMOはオリゴピロール部位に拡がり、多量化に伴う有効な共役系の伸長が確認された。一方LUMOにおいても、スタックしたペンタフルオロフェニル基部位に共役系の伸長が確認

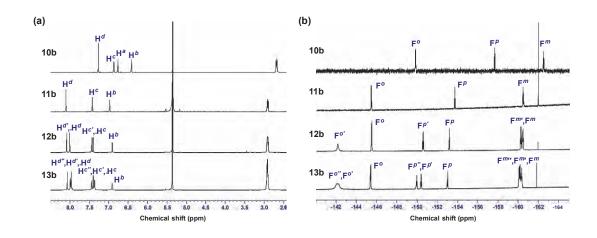


図3 化合物10–13bの¹H NMR(a)と¹⁹F NMR(b)スペクトル(CD_2Cl_2 溶液)

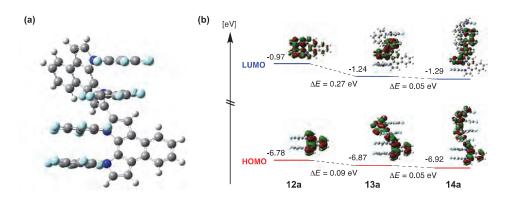


図4 化合物**12b**のDFT最適化構造(a)と**12-14a**のDFT最適化構造に基づくフロンティア軌道 (M06-2X/6-31G(d))

された。実際、温度可変 19 F-NMRスペクトルを測定したところ、低温にするにつれて F^{0} と F^{m} のシグナルがブロード化した後、二つに分かれて観測された。さらにその分裂の程度が、 $F^{0'}$ と $F^{m'}$ のシグナルにおいてより顕著であることから、隣接するペンタフルオロフェニル基部位からの環電流効果がこのような効果をもたらしていることが推測された。これは、今回合成したD/A分離積層型の共役分子が、溶液中において、図4bに示すようなコンフォメーションを有している事を強く示唆している。またコアレス温度から見積もられた二つの分子の回転障壁エネルギーは、いずれも9-10 kcal/molであった。

一般に、π共役分子において共役長が長くなると HOMOの上昇とLUMOの低下に伴うHOMO-LUMO ギャップの減少が引き起こされる。しかしながら今回合成した分子においては、ナフトビピロール部位が適度に 捻れることで、LUMOはスタックしたペンタフルオロ

フェニル部位に局在化したまま多量化することに成功した。つまり、D/A分離積層型のまま π 共役系の伸長に成功した。今後、更なる共役長の伸長と末端官能基化による電極表面への接続を検討していきたい。

2.2 スピン非局在型中性ラジカル分子の開発

電子スピンが π 電子系に広く分布(非局在化)した電子構造を有する「非局在型」有機ラジカルは、非結合性の分子軌道を有していることから、両極性の酸化還元特性や狭いHOMO-LUMOギャップと言った特徴を有しており、有機エレクトロニクス材料としての展開が大いに期待される化合物群である。しかしながら、非局在型ビラジカル構造を有する π 電子系の報告例は限られており、構造-物性相関の解明、汎用性への考慮などの点において、新しい基本骨格の開発が必要不可欠である。本研究では、我々によって既報のピロール縮環アザコロネン1-6の骨格をもとに、中性ジラジカル電子構造を有する

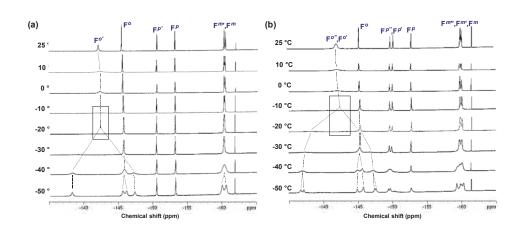


図5 化合物13b(a)と14b(b)の温度可変¹⁹F NMRスペクトル (CD₂Cl₂溶液)

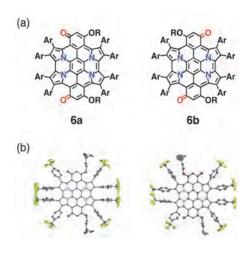


図6 カルボニル基をπ電子系に直接導入した **15a,b**の構造式(a)とその単結晶構造(b)

分子の開発を行った。

具体的には、π電子系に直接カルボニル基を導入した分子15a,bの合成に取り組んだ(図6a)。化合物の合成は、化合物3の合成に従って行った。すなわち、一つのベンゼン環に導入された二つのアルコキシル基のうち、片方のみを選択的に水酸基へと変換し、これをカルボニル基へと変換することで達成した。この際、カルボニル基の方向が同じ向きをした擬シス体15a、ならびに擬トランス体15bが得られるが、わずかながらも極性が異なるために、カラムクロマトグラフィーで分離精製することが可能であった。これらの構造は単結晶X線結晶構造解析により明らかにした(図6b)。

吸収スペクトルを測定したところ、既報の3が約570 nmの吸収末端(HOMO-LUMOギャップ2.18 eV)を有しているのに対し、15a,bの吸収端は約1590 nmまで長波長シフトすることが明らかとなった。また、サイクリックボルタモメトリー(CV)を測定したところ、既報の3が可逆的な酸化波しか与えないのに対し、15a,bは可逆的な酸化波と還元波の両方を与えることが分かった。この結果から見積もられるHOMO-LUMOギャップ(0.80 eV)は、非常に小さいことが分かった。DFT計算からもこれらの結果が示唆されている(図7)。特に既報の類似化合物3と比べて、劇的なLUMO準位の低下が見られ、これは、π共役系に直接カルボニル基が導入されていることを大きく反映している。また、擬シス体15aと擬トランス体15bのエネルギー準位に大きな変化が見られなかったが、3のHOMOの軌道は15a,bのLUMOの軌道

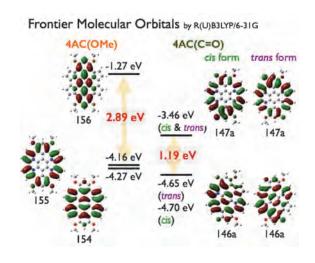


図7 (a)4AC(OMe) (**3**)と(b)4AC(C=O) (**15a,b**)の フロンティア-分子軌道とそのエネルギー準位

と非常に良く一致し、**3**のHOMO-1の軌道は**15a,b**の HOMOの軌道と良く一致した。これは、アルコキシルキからケトン基への変換、つまり二電子酸化の結果を良く反映している。

一方、15a,bのNMR を測定したところ、ブロードニ ングしたスペクトルしか得られず、粉末固体のESR を 測定したところ、ブロードではあるがフラットなシグナ ルを与えた。この結果は、**15a,b**が中性状態において開 殻系の寄与を有している事を示している。DFT計算か らも開殻一重項種が閉殻種や開殻三重項種よりも安定 化学種であることが示唆されている。また、単結晶構造 解析結果から擬トランス体15bのカルボニル部位である 炭素一酸素結合間距離に着目したところ、1.256(8) Å、 1.259(5) Å であり、この値は既報の閉殻系化学種であ るベンゾフェノン系の炭素--酸素二重結合(1.23 Å)より やや長く、フェノキシラジカル系の炭素--酸素結合間距 離と近い値であった。さらにピロール部位の結合間距離 においても、結合交替が見られたことから、**15a,b**が非 常に珍しい熱力学的に安定化された非局在型の中性ジラ ジカル種であることを意味している。今後さらに誘導体 を合成し、その基礎物性を明らかにすることで、類似の 非局在型ビラジカル電子構造を有する π 共役系化合物の 分子設計指針を確立する事が期待される。

3. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益 財団法人 松籟科学技術振興財団に深く感謝いたしま す。

4. 参考文献

- Torands Revisited Metal Sequestration and Self-Assembly of Cyclo-2,9-tris-1,10-phenanthroline Hexaaza Macrocycles,
 - Schwab, M. G.; <u>Takase, M.</u>; Mayrinsky, A.; Pisula, W.; Feng, X.; Gámez, J. A.; Thiel, W.; Mali, K. S.; de Feyter, S.; Müllen, K.*
 - Chem. Eur. J. 2015, 21, 8426-8434.
- Pyrrole-fused Azacoronene Family: The Influence of Replacement with Dialkoxybenzenes on the Optical and Electronic Properties in Neutral and Oxidized States,
 - <u>Takase, M.*</u>; Narita, T.; Fujita, W.; Asano, M. S.; Nishinaga, T.*; Benten, H.; Yoza, K.; Müllen, K.* *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8031-8040.

 (Highlighted in *SYNFACT*)

- Donor-acceptor Segregated Paracyclophanes Composed of Naphthobipyrrole and Stacked Fluoroarenes,
 - <u>Takase, M.</u>*; Inabe, A.; Sugawara, Y.; Fujita, W.; Nishinaga, T.*; Nomura, K.
 - Org. Lett. 2013, 15, 3202-3205.
- Sterically Congested Pyrrole-fused Tetrathiafulvalene Decamers as Highly Conductive Amorphous Molecular Materials,
 - <u>Takase, M.</u>*; Yoshida, N.; Narita, T.; Fujio. T.; Nishinaga, T.; Iyoda, M.*
 - RSC Adv. 2012, 2, 3221-3224.
- Star-shaped Pyrrole-fused Tatrathiafulvalene Oligomers: Synthesis and Redox, Self-assembling, and Conductive Properties,
 - <u>Takase, M.*</u>; Yoshida, N.; Nishinaga, T.; Iyoda, M.* *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3896–3899. (Highlighted in *SYNFACT*)

研究報告集 第28集 (非売品)

2017年3月1日発行

発行所 公益財団法人松籟科学技術振興財団 〒541-0042 大阪市中央区今橋4丁目4-7 (淀屋橋ビル)

> ハリマ化成グループ株式会社内 TEL 06-6229-0966