研究報告集

第 30 集

2019 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30集発刊によせて

公益財団法人　松籟（しょうらい）科学技術振興財団
理事長　長谷川　吉弘

第33回（2015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30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、本庶佑・京都大学特別教授がノーベル医学生理学賞を受賞されました。日本人のノーベル医学生理学賞の受賞は、2016年の大隅良典・東京工業大学栄誉教授に続く快挙です。本庶先生は、免疫を抑制するタンパク質「ＰＤ－１」を発見し、画期的ながん免疫治療薬「オプジーボ」の開発につなげたことで、がん治療に新たな道を開かれました。

本庶先生の受賞で、平成の30年間に自然科学分野での日本人の受賞者は18人となり、日本の科学水準の高さが伺えます。

一方で、本庶先生は、「基礎研究が応用につながることは決してまれではないことが実証できた。サイエンスは未来への投資だ」と述べられ、国内の基礎研究を取り巻く環境に対する危機感を強く訴えています。日本の未来のために、自然科学の土台ともいえる基礎研究を探求する若い研究者への支援の必要性は明確と言えます。

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656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。

2019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。

⑴　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）

⑵　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）

⑶　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

設　　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（2018年３月31日現在）

正味財産　11億29百万円

目　次

第33回（2015年度）助成金受領研究報告

植物を宿主とした有用物質大量生産に向けた代謝経路設計法の開発
～合成生物学によるマラリア特効薬の生産改善～
国立研究開発法人理化学研究所　環境資源科学研究センター
バイオ高分子研究チーム　吉積　毅…… 3

新規エタノール発酵細菌を利用した木質系バイオマスからの有用テルペン生産システムの開発
鳥取大学　大学院工学研究科　原田　尚志…… 9

植物寄生性農害虫孵化促進物質の合成研究
名古屋大学　大学院生命農学研究科　安立　昌篤…… 15

リグニンとポリ乳酸からなる一次構造の明確な木材代替プラスチックの精密合成
大阪産業技術研究所　森ノ宮センター　門多　丈治…… 22

新規多糖誘導体を用いた薬剤徐放量を最適化できる臓器粘着型生分解性シートの開発
北海道大学　大学院歯学研究院　阿部　薫明…… 28

共生微細藻類の機能を利用した新規骨粗鬆症の開発
昭和薬科大学　天然物化学研究室　久保田　高明…… 33

植物資源の多様性拡大抽出物を活用した新規天然化合物類縁体ライブラリーの構築
東北大学　大学院薬学研究科　菊地　晴久…… 38

適応代謝産物モミラクトン生産植物におけるアレロパシー耐性機構の解明とその利用
東京大学　生物生産工学研究センター　岡田　憲典…… 42

蛍石型強誘電体薄膜の創製とドメインエンジニアリング
東北大学　金属材料研究所　木口　賢紀…… 49

スピントロニクスを目指した単分子磁石内包カーボンナノチューブの創製と構造・磁性評価
東北大学　大学院理学研究科　中西　亮…… 54

低エネルギー循環型プラスティックセンサの開発
大阪大学　産業科学研究所　関谷　毅…… 59

Hisタグタンパク質を特異的に分解できるハイブリッド分子の開発
国立医薬品食品衛生研究所　有機化学部　出水　庸介…… 63

真空系プラズマエッチング装置・プロセスを不要にできる
感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料の開発
富山県立大学　工学部医薬品工学科　竹井　敏…… 72

分子内触媒移動重合法を用いた全共役p型/n型半導体ブロック共重合体の開発と
非フラーレン系有機薄膜太陽電池への応用
山形大学　大学院有機材料システム研究科　東原　知哉…… 78

ナノスケールフォトスピントロニクスを指向した有機ラジカルナノシートの創製
東京大学　大学院理学系研究科　草本　哲郎…… 83

発光性Pt(II)錯体配位子からなる環境マルチセンシングナノ集積体の構築
北海道大学　大学院理学研究院　小林　厚志…… 89

材料間の直接接合に着目した異種材料間接着
大阪大学　高等共創研究院理学研究科　髙島　義徳…… 93

第33回（2015年度）

助成金受領研究報告

申請者　国立研究開発法人理化学研究所　吉積　毅

植物を宿主とした有用物質大量生産に向けた代謝経路設計法の開発 ～合成生物学によるマラリア特効薬の生産改善～

国立研究開発法人理化学研究所　環境資源科学研究センター　バイオ高分子研究チーム
吉積　毅

1．緒言

有用物質を蓄積する植物、例えば薬用植物などは、多くの場合、育種されていないため、栽培が困難であったり、特別な生育環境でのみ有用成分を蓄積するなど問題点も多い[1)]。近年、精力的なメタボローム解析などの基礎研究により、多くの有用物質生合成の代謝経路と、それらを構成する酵素が明らかにされている[2)]。公開されている多くのゲノム情報を利用すれば、より生産に向いた酵素遺伝子や発現制御に最適なプロモーターなどを選択することも可能となっている。そのため、遺伝子組換え技術を利用し、生産が容易な作物に代謝経路を移植することが、有用物質増産の最も効果的な方法の一つである[3)]。植物の形質転換は、モデル植物だけでなく、多くの作物でも確立されており、一般的な技術になっている。しかし、これまで確立された形質転換植物を見ると、遺伝子の転写制御は過剰発現を引き起こすプロモーターに頼っており、遺伝子発現の調整まで含めた導入する遺伝子の構造を設計した報告は多くない[4)]。このことは、「大は小を兼ねる」のような発想に基づいた、過剰に発現させることで概ね外来遺伝子の発現は十分機能しているといった思い込みがあると推測している。

微生物を宿主として行われた研究から、代謝経路を構成する遺伝子の発現量を適切に調整することが非常に大切であることが知られている[5)]。しかしながら、現在のところ、導入する遺伝子の至適な組み合わせや発現を設計する系統立った手法は開発されていない[4)]。これまでの研究では、候補遺伝子を導入した安定的な形質転換体を作成し、解析しなければならなかった。たった1遺伝子について、複数のプロモーターを安定的な形質転換体を作成して試すだけで、モデル植物を用いた場合ですら膨大な労力と時間が必要である。ところが、モデル植物で得られた結果が、標的とする宿主植物（作物）では反映されない可能性もある。そのため、植物種問わず、簡便に解析する手法の開発が急務であった。しかし、従来の遺伝子導入法では、複数遺伝子導入や導入効率などに問題があり、目的とするような結果を得るための再現性の高い一過的発現解析は困難であった。

報告者らが開発した融合ペプチドはカチオン性のペプチドと細胞内局在シグナルから構成される[6, 7)]。この融合ペプチドを核酸と混合すると、カチオン性ペプチドが静電相互作用で核酸と結合することで複合体を形成する。そして複合体表面には、細胞内局在シグナルが配向する。細胞膜の透過に必要なペプチド（細胞透過性ペプチド）を融合させた場合には、細胞質へ核酸を送達することができる。実際に、このペプチドを利用してレポーター遺伝子を植物細胞へ送達し、一過的に発現させることに成功している[6)]。本研究では、この技術を応用し、導入する複数遺伝子のモル比を変化させ植物細胞へ送達する。そして、異なるプロモーターによって誘導された遺伝子量、もしくは酵素量による反応を一過的に実現することを計画した（図1）。

この研究で植物細胞に一過的に構築する代謝経路として、抗マラリア原虫薬として利用されているアルテミシニンの生合成経路をモデルとして選択した。アルテミシニンは、ヨモギ属植物である*Artemisia annua*（和名：クソニンジン）から得られる[1)]。しかし、クソニンジンは日本の河原でも生育する、いわゆる「雑草」であるが、薬効成分のアルテミシニンは特定の時期に、特定の組織でのみ蓄積されることが知られている。そのため、世界中の様々な研究者が生合成経路を微生物や植物に移植しアルテミシニン生産を試みているが、最終産物の大量生産に成功した報告はない[1, 3)]。アルテミ

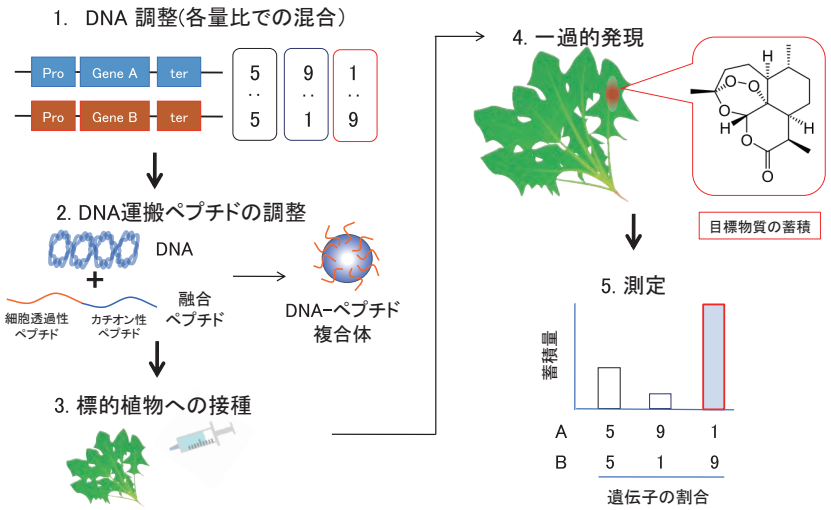


図1　融合ペプチドによる一過的発現解析の流れ

シニンはセスキテルペンであるファルネシル２リン酸(FPP)からADS、CYP71AV、DBR2、ALDH1の４酵素で生合成されることが知られている(図2)。FPPは植物で共通に存在しており、これら合成酵素遺伝子を導入出来れば、様々な植物でアルテミシニンを生産することが理論上可能である。CYP71AVはADSの代謝産物であるAmorpha-4, 11-dieneに水酸基を連続的に付加する。しかし、３回反応した場合、アルテミシニン酸(AA)と呼ばれるアルテミシニンには代謝されない物質を不可逆的に生産する(図2)。これまでの微生物や植物を宿主とした研究でも、この反応が問題となって、アルテミシニンの生合成が成功していない。そこで、CYP71AVの２回目の反応後に、いかに代謝の流れをDBR2の反応に向けるかが重要になる。本研究では、特にADB、CYP71AV、そしてDBR2の遺伝子量の調整に焦点を当て、アルテミシニンを高蓄積する至適な条件を見出すことを最初の目標とした。

２．実験および方法

２.１　コンストラクトの作成

クソニンジン由来の4種類の酵素遺伝子(*ADS*、*CYP71AV*、*DBR2*、*ALDH1*)のcDNAクローンは、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻細胞工学領域 村中 俊哉 教授から譲渡いただいた。これらcDNAの開始コドンと終止コドンを含む領域をPCR法により増幅し、Gatewayクローニングテクノロジーに対応したエントリーベクターであるpDONR207(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)へBP反応によりクローニングした。得られたエントリークローンは、デスティネーションベクターであるpMDC32へLR反応によりクロー

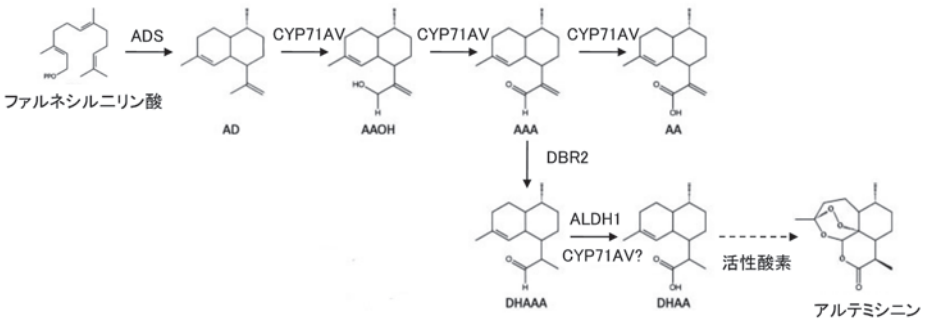


図2　アルテミシニン生合成経路
アルテミシニンはファルネシル2リン酸からADS、CYP71AV、DBR2とALDH1の4酵素によりジヒドロアルテミシン酸(DHAA)を生合成する。その後、生体内の活性酸素によりアルテミシニンとなる。過去、人工的にCYP71AVを過剰発現させた場合、amorpha-4,11-diene(AD)を連続的に触媒するため、アルテミシニン酸(AA)が生合成されることが知られている。

ニングした。

2.2　遺伝子導入

ベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)は30度のインキュベーター内で、長日条件下(16時間明)で生育させた。

融合ペプチドとして、細胞膜透過性ペプチドが融合したKH9-BP100(KHKHKHKHKHKHKHKHKKLFKKILKYL-NH2)を用いた[6]。3 μLのデスティネーションベクターに挿入したクローン(1 μg/μL濃度)と1 μL の融合ペプチド(1 μg/μL濃度)を混合し、室温で10分静置することで複合体を形成させた。複合体に96 μLの滅菌水を加えた複合体溶液を作成した。複合体溶液は、遺伝子の複数のモル比になるように調整し、100 μLのモル比調整済複合体溶液を、注射筒(針は用いない)で、ベンサミアナタバコ本葉の裏から接種した。

2.3　Real-time PCR解析

接種12時間後に植物体からRNAをPlantRNeasy mini kit(Qiagen社)を用いて抽出した。逆転写はSuperScript III(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を、realtime PCRはSYBR Green realtime PCR master Mix(東洋紡社)を用いた。Realtime PCR法を用いた各遺伝子の検出には以下のプライマーを使用した；*ADS*(ADS-F:AGTAGAGCAAGGGGTGGAAC, ADS-R:AGCGGTCACCATTCCAGTTA)；*CYP71AV*(CYP-F:CCTTGGTTCTGCCAAGAGAG, CYP-R:TCCAGGACACATCCTTCTCC)；*DBR2*(DBR-F:GCAACCTATGGCACGTATCC, DBR-R:ATTGCTGCAGATACCGCTTG;*ACT2*(ACT-F:AAGTCCTCTTCCAGCCATCC, ACT-R:CAGCAATACCGGGGAACATG)。

3．結果および考察

3.1　酵素遺伝子の整備

アルテミシニン生合成酵素遺伝子は、実際に植物体に導入する場合には、転写活性が異なるプロモーターを用いることで、転写量の最適化を行うことを計画している。そのため、はじめにクローニングの自由度が高いGatewayクローニングテクノロジーに対応したエントリーベクターへの導入を行った(図3)。しかし本研究では、すべての酵素遺伝子の発現を一定にする必要がある。そこで、植物で一般的に過剰発現に利用される恒常性プロモーターであるCaMV 35Sプロモーターの下流に酵素遺伝子を挿入した。これらクローンはリソースとしての側面を持っており、特にエントリーベクターにクローニングした遺伝子は、異なるプロモーターを有するデスティネーションベクターへ移し替えることも容易となる(図3)。

3.2　遺伝子発現は遺伝子導入の条件を再現する

植物への遺伝子導入には、酵素遺伝子4種類のうち、アルテミシニンの生合成に理論上必須と推測されている*ADS*、*CYP71AV*、そして*DBR2*の3種類を用いた。植物へ接種する複合体溶液は、融合ペプチドと各遺伝子との複合体を作製した後、異なる量比で混合することで調

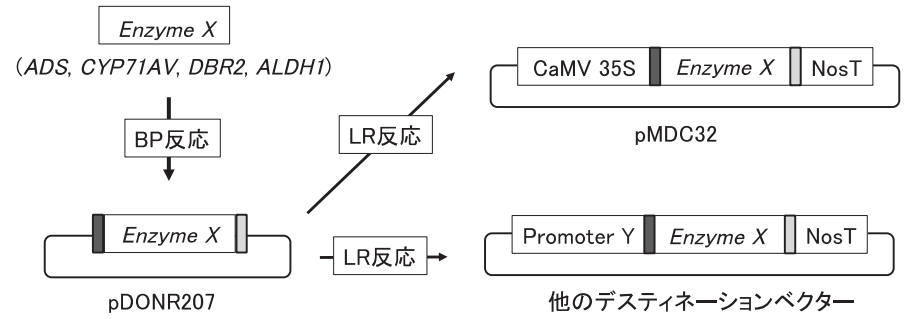


図3　アルテミシニン酵素遺伝子のGatewayクローニングテクノロジー対応ベクターへのクローニング
酵素遺伝子は、まずエントリーベクターであるpDONR207へBP反応を介してクローニングした。その後、植物で過剰発現させるデスティネーションベクターであるpMDC32へLR反応を介してクローニングした。pDONR207に挿入されたエントリークローンは、目的に応じたデスティネーションベクターへ移し替えることが可能である。

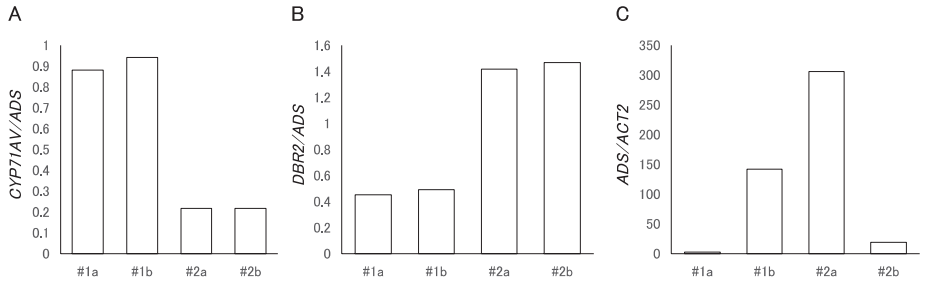


図4　Realtime PCRを用いたアルテミシニン酵素遺伝子の転写解析
A. *ADS*の転写量で標準化した*CYP71AV*の転写量
B. *ADS*の転写量で標準化した*DBR2*の転写量
C. *ACT2*の転写量で標準化した*ADS*の転写量
グラフのX軸にある#1と#2は異なる遺伝子の混合比を示す。aやbは独立した２反復の処理を意味する。

整した。本研究では、2種類の量比で調整した複合体溶液を準備しており、#1として*ADS*:*CYP71AV*:*DBR2*が3:2:1で混合した溶液と、#2として*ADS*:*CYP71AV*:*DBR2*が3:1:2で混合した溶液を準備した。植物への接種は、それぞれ2反復行った。処理したサンプルからRNAを抽出し、逆転写を行った後、realtime PCRにより導入遺伝子の転写量を確認した。#1および#2のどちらも溶液中のADS量は等しいため、量比を変更した*CYP71AV*もしくは*DBR2*の転写量を*ADS*の転写量で標準化することで評価した(図4)。転写量はどちらの遺伝子も再現の良い結果が得られた。*CYP71AV*の転写量は、#1では#2の約4倍となった(図4A)。一方で、*DBR2*の転写量でも同様の結果が得られている(図4B)。試験に供したコンストラクトは、遺伝子の塩基配列長やコドン使用頻度が異なるため、遺伝子において転写量が一致するとは限らない。しかし、同じプロモーターで全ての酵素遺伝子を転写調節していることから、大きな転写調節の違いはないと推測している。#1と#2では*CYP71AV*と*DBR2*の量比を逆転させていることから、これらの結果は融合ペプチドを利用することで、異なる混合比で調整した複合体溶液を、特定の遺伝子に偏向することなく植物細胞に導入できることを示唆している。本来、realtime PCRは、対象とする転写物の量を内部標準となる遺伝子の転写量で標準化する手法である。そこで、*ADB*の転写量を植物で一般的に使われる内部標準遺伝子である*ACT2*で標準化した。その結果、処理区ごとに転写量に大きな差が現れた(図4C)。#1と#2では導入した*ADB*の量に違いはないため、処理区ごとに導入効率が著しい差があることが推測できる。最終目標であるアルテミシニンの生産量を測定する場合、このような処理区間の差を補正することが必要である。その場合、定量化が可能なレポーター遺伝子、例えば、ルシフェラーゼやβ-グルクロニダーゼなどの導入を検討しなければならない。

融合ペプチドにより導入した遺伝子の転写物は、接種した葉全体から抽出している。そのため、それぞれのコンストラクトが同じ量比で一つの細胞に導入されているのか、それとも異なる細胞に導入されているのか判断できない。そこで、2種類の蛍光タンパク遺伝子の導入を融合ペプチドで行った。導入した蛍光タンパク質遺伝子は、Green Fluorescent Protein(GFP)とYellow Fluorescent Protein(YFP)となる。共焦点レーザー顕微鏡による観察を行ったが、両蛍光タンパク質を発現している細胞を確認することが出来なかった。さらに、それぞれの蛍光タンパク質が認められる細胞は観察できたが、その頻度は非常に低いものであった。このことから、融合ペプチドを用いた植物への外来遺伝子送達の効率は低いものであることが推測される。これまでに行ったルシフェラーゼ遺伝子を用いた解析からも、融合ペプチドを用いた遺伝子送達効率の低さと、処理区間の大きなばらつきに関して同様の結果が得られている[6)]。これら原因の一つに、植物の状態に大きく依存しているであろうと考えている。そのため、融合ペプチドによる遺伝子送達に適した組織、もしくは細胞を選択することが重要である。動物細胞に対して融合ペプチドを用いて遺伝子を送達すると、非常に高い効率を示す[8)]。動物細胞は細胞壁を有しないため、植物細胞への遺伝子送達効率の

低さは細胞壁の存在が起因しているかもしれない。一つの方法として、タバコの培養細胞であるBY-2など安定して供給が可能な植物細胞を用いること、さらに細胞壁を除いた細胞であるプロトプラストとして利用することで遺伝子送達の効率を著しく上げる可能性があると考えている。報告者の所属する研究室では、植物細胞に高い効率を示す細胞透過性ペプチドを同定した[9]。同定した植物細胞最適化細胞透過性ペプチドを利用した融合ペプチドを新たに設計することで、遺伝子導入効率を上げることが可能となるであろう。

4．結論と展望

本研究では、アルテミシニン生合成酵素をコードする4遺伝子をGatewayクローニングテクノロジーに対応したベクターにクローニングした。これにより作成したコンストラクトは、エントリークローン4種類と、植物で過剰発現するCaMV 35Sプロモーターにより発現を制御しているデスティネーションクローン4種類となる。次に、作成したコンストラクト3種類を、融合ペプチドを用いて植物細胞に送達し、導入した遺伝子の量と導入遺伝子の発現量に相関があることを明らかにした。しかし、導入効率が低く、また同一細胞に複数遺伝子を導入できていない可能性が示唆された。そのため、本来の目的であるアルテミシニンの一過的生合成と生合成経路の最適化の研究を遂行できなかった。考察の項でも論じたが、植物への遺伝子送達用の融合ペプチドの改良を進めているため、今後の進展次第では、予定していた研究が可能になるかもしれない。合成生物学的研究を展開するには、代謝経路を設計して、対象とする宿主へ導入する手法は必須である。さらには代謝経路の設計のみならず、今後は反応に適した細胞内小器官を選択する必要がある。実際に葉緑体を反応場とすることでアルテミシニンを生産した報告がある[10]。融合ペプチドは、細胞質に外来遺伝子を送達するだけでなく、葉緑体やミトコンドリアへ遺伝子を送達することも可能である[7]。遺伝子導入の効率を上げることで、融合ペプチドの技術は、遺伝子の設計ツールとしてだけではなく、細胞内において生産の場を区画化するような自由度の高い遺伝子送達法を生み出す可能性を秘めていると考えている。

5．謝辞

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

6．引用文献

1）Ikram NKBK and Simonsen HT. (2017) A Review of Biotechnological Artemisinin Production in Plants. ***Front. Plant Sci.*** 8:1966.

2）Cho K, Mahieu NG, Johnson SL, Patti GJ. (2014) After the feature presentation: technologies bridging untargeted metabolomics and biology. Curr. Opin. Biotechnol. 28:143-148.

3）Paddon CJ et al. (2013) High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. ***Nature*** 496:528-532.

4）Liu W, Stewart CN Jr. (2015) Plant synthetic biology. ***Trends Plant Sci.*** 20:309-317.

5）van Summeren-Wesenhagen PV, Voges R, Dennig A, Sokolowsky S, Noack S, Schwaneberg U, Marienhagen J. (2015) Combinatorial optimization of synthetic operons for the microbial production of p-coumaryl alcohol with *Escherichia coli*. ***Microb. Cell Fact.*** 14:79.

6）Lakshmanan M, Kodama Y, Yoshizumi T, Sudesh K, Numata K. (2012) Rapid and efficient gene delivery into plant cells using designed peptide carriers. ***Biomacromolecules*** 14: 10-16.

7）Yoshizumi T, Oikawa K, Chuah JA, Kodama Y, Numata K. (2018) Selective Gene Delivery for Integrating Exogenous DNA into Plastid and Mitochondrial Genomes Using Peptide-DNA Complexes. ***Biomacromolecules*** 19: 1582-1591.

8）Chuah JA, Matsugami A, Hayashi F, Numata K. (2016) Self-Assembled Peptide-Based System for Mitochondrial-Targeted Gene Delivery: Functional and Structural Insights. ***Biomacromolecules*** 17:3547-3557.

9）Numata K, Horii Y, Oikawa K, Miyagi Y, Demura T, Ohtani M. (2018) Library screening of cell-penetrating peptide for BY-2 cells, leaves of

Arabidopsis, tobacco, tomato, poplar, and rice callus. ***Sci. Rep.*** 8:10966.

10) Fuentes P, Zhou F, Erban A, Karcher D, Kopka J, Bock R. (2016) A new synthetic biology approach allows transfer of an entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop. ***Elife*** 5:e13664.

申請者　鳥取大学　原田　尚志

新規エタノール発酵細菌を利用した
木質系バイオマスからの有用テルペン生産システムの開発

鳥取大学　大学院工学研究科
原田　尚志

1．研究背景と目的

テルペン(テルペノイド・イソプレノイド)は、これまでに様々な生物種から約4万種類以上単離されており[1]、生理活性物質や機能性物質など、市場価値の高い化合物が数多く含まれることから、様々な分野で活用されている。一方、天然より抽出、精製して得られるテルペン化合物の量は一部の例外を除き少なく、有用なテルペン化合物を大量に得ることは困難な場合が多い。化学合成は重要な生産方法の一つであるが、合成のみによる生産法では複雑な構造を持つ化合物の実用生産は困難な場合が多い。そのため、テルペン化合物の微生物生産研究が盛んに行われてきた。テルペン類生産宿主としては、大腸菌や出芽酵母などの遺伝子資源や情報が充実したモデル微生物を中心に研究が行われている。一方、これらがテルペン生産宿主として最適かどうかという議論に対する結論は判然としておらず、これらに代わる新規生産宿主の探索も行われている。

*Zymobacter palmae*はヤシ樹液より単離されたグラム陰性菌であり、出芽酵母等の従来菌種と比較して優れたエタノール発酵特性や幅広い糖資化性を示す[2]。また本菌はピルビン酸を出発物質として、好気条件で2,3-ブタンジオール(2,3-BDO)を、嫌気条件下ではエタノールを対糖収率90%以上の高効率で生合成し、異種糖化酵素の機能発現によるリグノセルロース系バイオマスを出発物質としたエタノール生産研究なども行われている[3,4]。また、当研究室により全ゲノム配列情報も明らかにされており、プラスミドベクターなどの遺伝子ツール、ゲノムへの遺伝子導入やノックアウトなどの手法についてのノウハウも蓄積されてきたことから、様々な有用物質生産宿主としての活用が期待できる。そこで本研究では、*Z. palmae*の持つ優れた発酵および糖代謝機能を活かした、独自のテルペン化合物の効率的生産システムの開発を試みた。

2．結果と考察

2.1　モデルテルペン化合物生産株の作出

全ゲノム配列検索により*Z. palmae*は、テルペン基本代謝経路として非メバロン酸(メチルエリスリトールリン酸経路、2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, MEP経路)のみを有しており、この経路を利用してC5のイソプレン(isoprene)単位となるイソペンテニル二リン酸(isopentenyl diphosphate, IPP)と、その異性体であるジメチルアリル二リン酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)を合成していると推定された(図1)。また、それ以降の代謝経路については大腸菌とほ

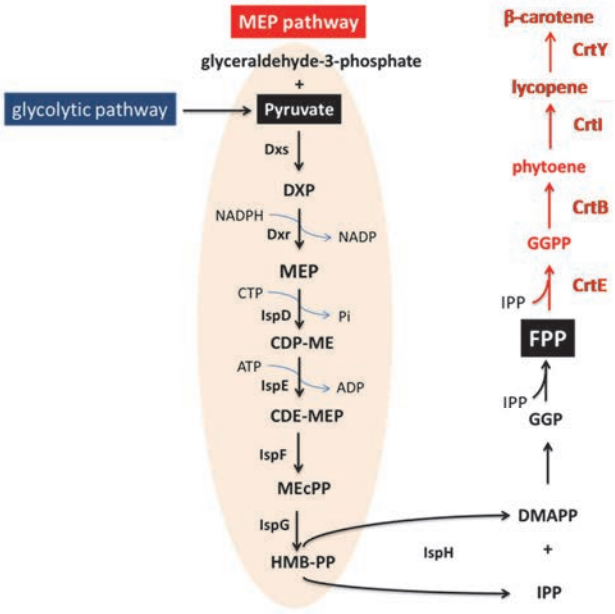


図1　*Zymobacter palmae*における推定テルペン生合成経路
赤字はカロテノイド合成に必要な外来酵素を示す。

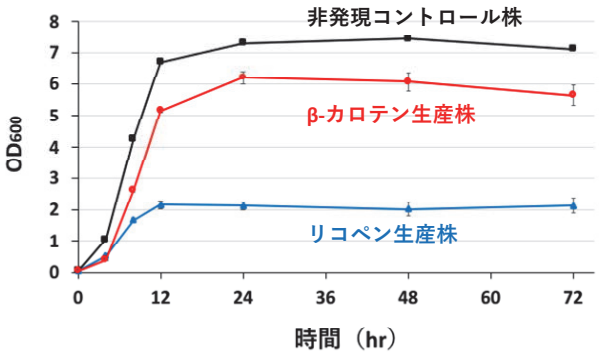


図2　カロテノイド生産株の増殖特性評価

ぼ同様であり、プレニル基転移酵素（prenyltransferase）によりC10のゲラニル二リン酸（geranyl diphosphate, GPP）と、それに続く C15のファルネシル二リン酸（farnesyl diphosphate, FPP）まで代謝されており、さらにFPP以降のテルペン類やカロテノイド合成に関する酵素遺伝子は保有していないと予測された（図1）。したがって、FPP以降のテルペン合成酵素遺伝子の導入により、様々なテルペン化合物の生産が可能になると考えられた。そこで本研究においては、カロテノイドの一種であるリコペン（lycopene）ならびにβ-カロテン（β-carotene）をモデルテルペン化合物とし、FPP以降の遺伝子を機能発現することで生産を試みた。

土壌細菌*Pantoea ananatis*由来のカロテノイド生合成遺伝子群（*crtE*、*crtB*、*crtI*、および*crtY*）を用いて、リコペンならびにβ-カロテン発現プラスミドを構築し、これを*Z. palmae*野生株に導入した。得られた形質転換株のうち3クローンを用いて増殖特性評価を行った結果、リコペン生産株においては非発現コントロール株と比較して顕著な生育の低下を示し、定常期における菌体量が非発現コントロール株と比較して1/3以下に減少した（図2）。リコペンなどの低極性物質は細胞膜などの菌体内脂溶性組織へ蓄積し、一定量を超えるリコペンの蓄積は菌体生育に影響を及ぼすことが報告されていることから[5]、この生育低下はリコペンそのものが持つ細胞毒性による影響である可能性が示唆された。一方、β-カロテン生産株は非発現コントロール株とほぼ同等の生育を示したことから、β-カロテンでは膜毒性による生育阻害は認められないことが確認された。そのため、以降の実験ではβ-カロテンを本菌の生産指標化合物として用いることとした。

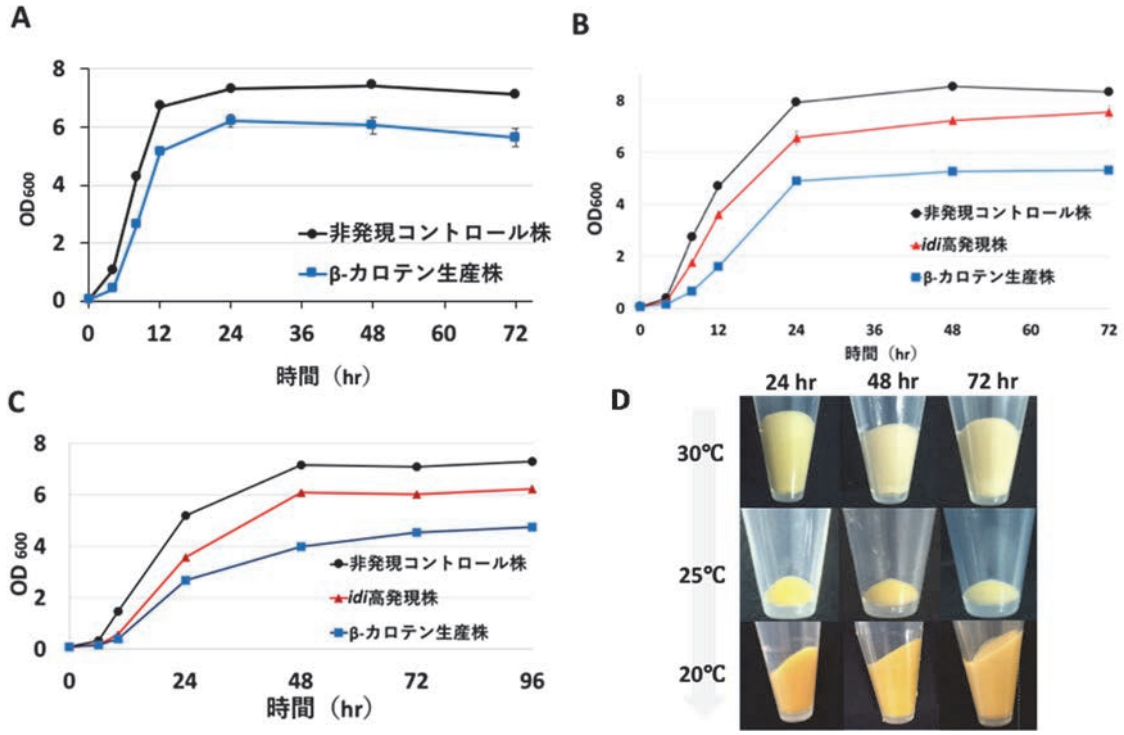


図3　各培養温度における増殖特性評価による指摘培養温度の検討　A：30℃ 、B：25℃、C：20℃、D：各温度・時間での菌体呈色の様子

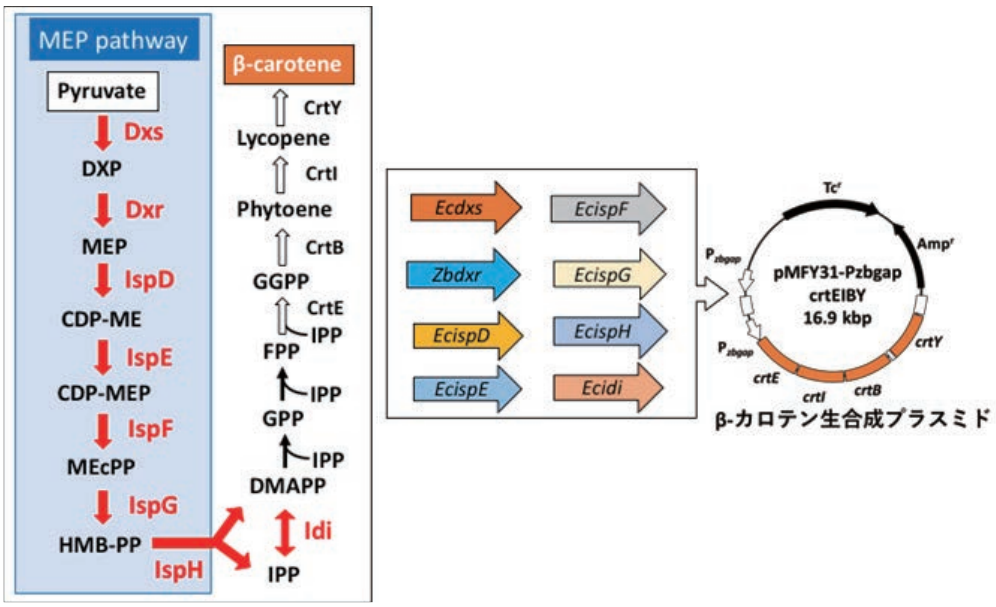


図4　内在MEP経路強化の概要

2.2　至適培養温度条件の検討

最も強い呈色を示した*idi*高発現株を用い、至適培養温度条件の検討を行った。培養温度(30℃、25℃、および20℃)を検討した結果、30℃および25℃の培養温度条件では何れも24時間後、20℃では48時間後に定常期に達するとともに、温度の下降に伴い菌体呈色が強くなる傾向が見られた(図3)。これは、培養温度を下げることで生育速度が遅くなり、生育エネルギーを物質生産へ移行したことが原因であると考えられた。以上の結果より、20℃が最も増殖と生産のバランスがとれていると判断し、*Z. palmae*におけるテルペン生産至適培養温度として以降の実験に用いた。

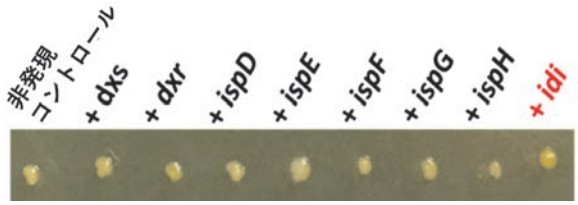


図5　MEP経路遺伝子高発現株の呈色強度比較

2.3　内在テルペン生合成経路の強化

次に、テルペン化合物の生産量増加を目的に、*Z. palmae*の内在テルペン生合成経路であるMEP経路のボトルネック特定を行った。MEP経路を担う8つの酵素(Dxs、Dxr、IspD、IspE、IspF、IspG、IspH、および

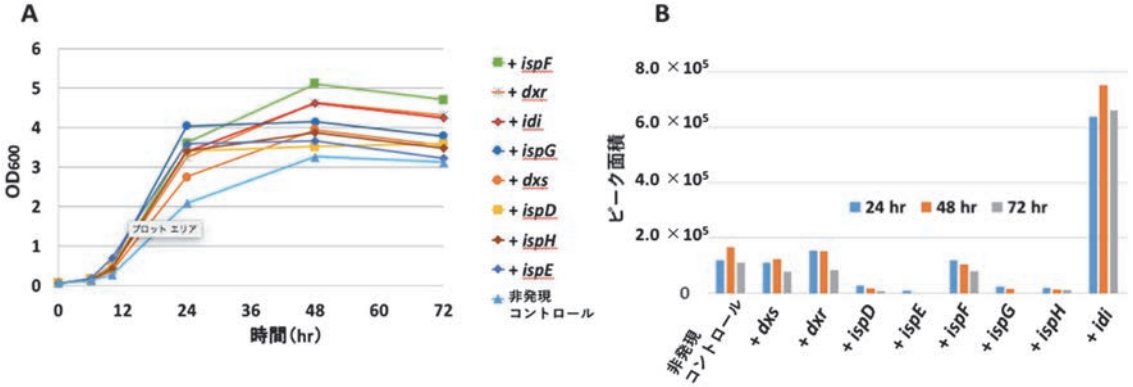


図6　MEP経路遺伝子高発現株の増殖特性およびβ-カロテン生産量評価
A：各高発現株の増殖曲線　B：培養24, 48, 72時間後のβ-カロテン生産量

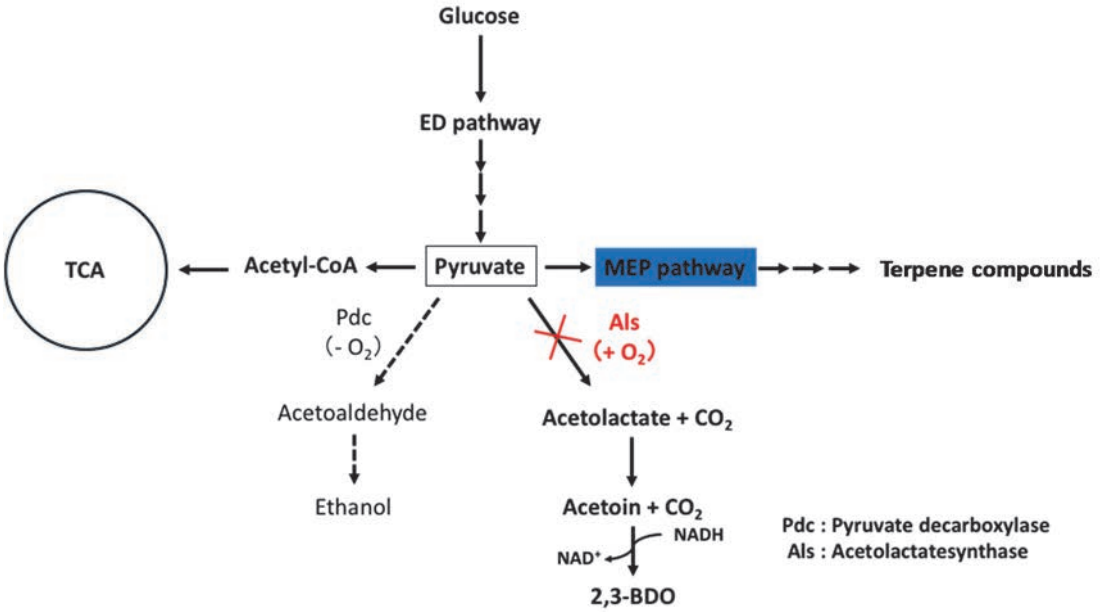


図7　アセト酢酸合成酵素欠損による分岐代謝経路の遮断

Idi)をコードする遺伝子の高発現株を作出し、各株間で生産量を比較することで、テルペン生産に重要な鍵酵素の特定を試みた(図4)。その結果、*dxs*、*dxr*、*ispD*、*ispF*、*ispG*、および*ispH*高発現株は、非発現コントロール株と比較しても呈色の顕著な変化は見られなかったが、*idi*高発現株にて最も強い呈色を示した。また*ispE*高発現株においては、明らかに弱い呈色が確認された(図5)。

さらに、各MEP経路酵素遺伝子高発現株について詳細な生産評価を行った。その結果、全ての高発現株において非発現コントロール株と比較して生育の向上が見られた(図6A)。生産量を評価したところ、*idi*高発現株においてコントロール株の約5倍と顕著な増加を示した(図6B)。IdiはDMAPPとIPPを両方向に触媒する異性化酵素であり、IPPはDMAPPおよびGPPの縮合反応基質となるため、産物合成が進むにつれその量は不足してくる。そのため、Idiを高発現することにより、過剰量のDMAPPから不足分のIPPが補われることで代謝ボトルネックが解消され、生産量が増加したと考えられた。これについて、大腸菌においてもIdi高発現による増産効果は報告されており[6]、今回の結果より*Z. palmae*においてもIdiがテルペン生産のボトルネックの一つであることが示された。一方、それ以外の遺伝子高発現株においては、生産にネガティブな結果を示した(図6B)。これは、遺伝子高発現化に伴うプラスミド安定性の欠如、あるいは代謝中間体の過剰蓄積による生育阻害効果が原因として考えられるが、現時点で詳細は不明である。また、Dxs、Dxr、ならびにIspFの高発現株は、生産にポジティブな影響は与えなかったものの、高発現化により生育の向上が見られたことから、Idiとの共発現によりさらなる生産量の増加が見込めることが期待された。

2.4　分岐代謝経路の遮断

好気条件下でテルペン類の生産性をさらに向上させるため、前駆体であるピルビン酸の競合経路であるアセト乳酸合成酵素遺伝子(*als*)の欠損が有効であると考え、*als*遺伝子のノックアウト株作出による分岐経路の遮断

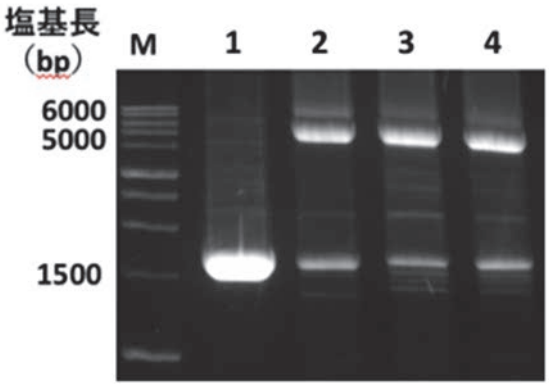


図8　ゲノミックPCRによる*Δals*株の作出確認
M：1 kb DNA ladder
1：野生型　2-4：*Δals*株

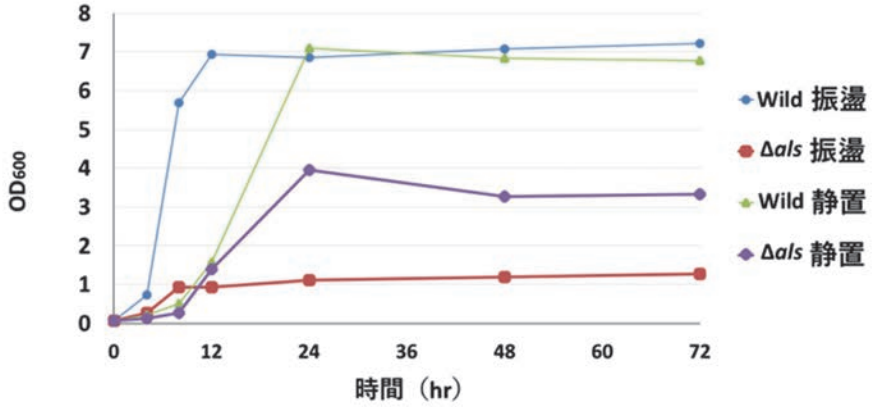


図９　*Δals*株の好気および静置条件における増殖特性評価

を試みた(図7)。

*als*遺伝子ノックアウトプラスミドを構築後、エレクトロポレーションにより*Z. palmae*へ導入し、シングルクロスオーバーによるノックアウト株の作出を試みた。取得した*als*遺伝子のノックアウト株(*Δals*株)3クローンについて、ゲノムDNAを鋳型としたPCRによるals遺伝子欠損確認を行った結果、欠損株では*als*遺伝子中に挿入されたプラスミドの領域を含むバンドが確認されたことから、*Δals*株の作出に成功したと判断した(図8)。

構築した*Δals*株について好気および微好気条件下おける増殖特性評価を行った。その結果、*Δals*株においては何れの条件においても野生株と比較して顕著な生育阻害が見られた(図9)。*Δals*株においては、ピルビン酸の過剰蓄積による影響やEntner–Doudoroff(ED)経路で生産されるNADHの蓄積に伴う酸化還元バランスの崩壊が原因となり、生育阻害を引き起こしていると考えられた。したがって、代謝経路内で過剰蓄積したピルビン酸を非メバロン酸経路へと導くことができれば、テルペン生産性向上が期待できると推察された。

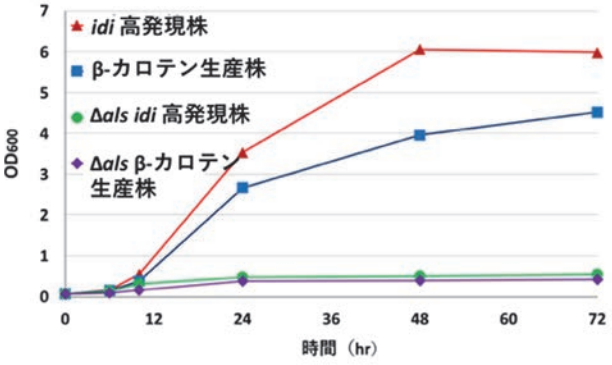


図10　*idi*高発現化*Δals*株における増殖特性評価

次に、*Δals*株を宿主として*idi*高発現化を組み合わせた生産評価を行った。増殖特性を評価したところ、*Δals*株においては前述と同様に生育阻害に伴い菌体量が大幅に減少したことから、生産培養を行うことが困難であった(図10)。この結果より、生育阻害の原因はピルビン酸の過剰蓄積によるものではなく、酸化還元バランスの崩壊に起因している可能性が高いと推察された。つまり、2,3-BDO生産経路は、本菌の生育に不可欠な経路であることが示唆された。

以上の結果より、テルペン類の高生産を達成するためには、BDO合成経路を完全に遮断するのではなく、Alsの活性低下が有効であると結論づけた。

３．まとめと展望

本研究では*β*-カロテンを生産指標化合物とし、内在テルペン生合成経路の強化ならびに競合経路の遮断による生産強化を目指した。その結果、IPPイソメラーゼの高発現株化により約5倍の顕著な生産量の増加を示され、本菌のMEP経路における代謝ボトルネック酵素がIdiであることを特定した。一方、競合経路である2,3-BDO生合成経路の遮断を試みた結果、宿主株の大幅な生育低下が認められた。そのため、NADHからNAD^+の変換を担う2,3-BDO生合成経路は本菌の増殖には不可欠な代謝経路であり、完全に遮断する方法は望ましくないと結論づけた。

今後の展望として、内在MEP経路のボトルネックである*idi*遺伝子をより高活性なII型遺伝子[7]に変更することが有効であると考えられる。また、分岐経路の遮断

に関しては、*als*遺伝子への変異導入、またはプロモーター置換による転写強度の減弱化が有効であると考えられる。また、*als*欠損に伴うエネルギーバランス崩壊を解消可能な酵素あるいは代謝経路の導入も解決策になり得ると予想される。別の方策として、前駆体となるIPPおよびDMAPPの供給量を増加させるために、アセチルCoAを出発物質とする異種メバロン酸経路遺伝子の導入により、さらなる生産量増加が図れる可能性がある。これらの課題を克服することで、木質系バイオマス資化と組み合わせた生産系の構築への進展が期待される。

4．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心より感謝申し上げます。また本研究成果は、鳥取大学大学院工学研究科生体触媒工学研究室において、簗瀬英司教授と岡本賢治准教授(現教授)の協力の下、石田哲也君を中心とした学生の尽力により成されたものです。この場を借りて深く感謝申し上げます。

5．参考文献

1. Roberts, S.C. (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.* 3: 387-395.
2. Okamoto, T., Taguchi, H., Nakamura, K., Ikenaga, H., Kuraishi H., Yamasato, K. (1993) *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. Nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch. Microbiol.* 160: 333-337.
3. Yanase, H., Sato, D., Yamamoto, K., Matsuda, S., Yamamoto, S., Okamoto, K. (2007) Genetic engineering of *Zymobacter palmae* for production of ethanol from xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2592-2599.
4. Kojima, M., Okamoto, K., Yanase H. (2012) Direct ethanol production from cellulosic materials by *Zymobacter palmae* carrying *Cellulomonas* endogulucanase and *Ruminococcus* β-glucosidase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 5137-5147.
5. Sikkema, J., Bont, J., Poolman, B. (1995) Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydorocarbons. Microbiol. Rev. 59: 201-222.
6. Kajiwara, S., Fraser, P.D., Kondo, K., Misawa N. (1997) Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324: 421-426.
7. Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y., Seto, H. (2001) An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 932-937.

申請者　名古屋大学　安立　昌篤

植物寄生性農害虫孵化促進物質の合成研究

名古屋大学　大学院生命農学研究科
安立　昌篤

1．研究の背景と目的

ジャガイモシスト線虫(potato cyst nematode、以下PCNと略す)は、ジャガイモやナス科植物に寄生する農害虫である。ヨーロッパで発生が確認されて以来、世界各地に伝搬し世界規模での作物被害が発生している。特に、ジャガイモは重要な農作物の一つであり、その生産量の低下は深刻な問題である。

PCNの孵化促進物質の研究の歴史は古く、1922年Baunackeらはジャガイモ根滲出液が孵化の際に重要であることを明らかにし、孵化促進物質の存在を提唱した。孵化促進物質の探索は多数のグループによって行われ、1986年オランダのMulderらはジャガイモ水耕栽培液からPCNに対する強力な孵化活性を持つ化合物ソラノエクレピンAを単離することに成功した[1)]。さらに、1999年Schenkらによりソラノエクレピンの相対構造がX線結晶構造解析によって決定された[2)]。ダイズシスト線虫孵化促進物質として知られ絶対立体配置が既知であるグリシノエクレピンAの類似性から、図1のように推定された。

世界的規模で甚大な被害を与えているPCNの効果的な防除法は、現在のところない。このシスト線虫の卵はシストと呼ばれる固い殻に包まれ休眠し、春になるとジャガイモの根から分泌されるソラノエクレピンAを感受して孵化し寄生する。そのため、この特徴的な現象を利用し、宿主作物が存在しない時期に孵化促進物質を散布して、シスト線虫を孵化させ駆除する方法が有効な手段として期待されている。しかし、2011年谷野らによりソラノエクレピンAの全合成が達成されたが[3)]、天然から極微量しか得られず(1000株のジャガイモ根滲出液から245 mg)、詳細な生理活性やPCNの特異な生態機能に関する研究は現在も全く進展していない。そのため、化学合成によりソラノエクレピンAを合成して、孵化機構解明のための量的供給が唯一の手段であり必要不可欠である。

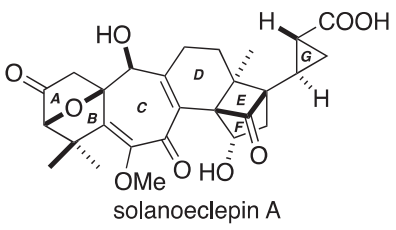
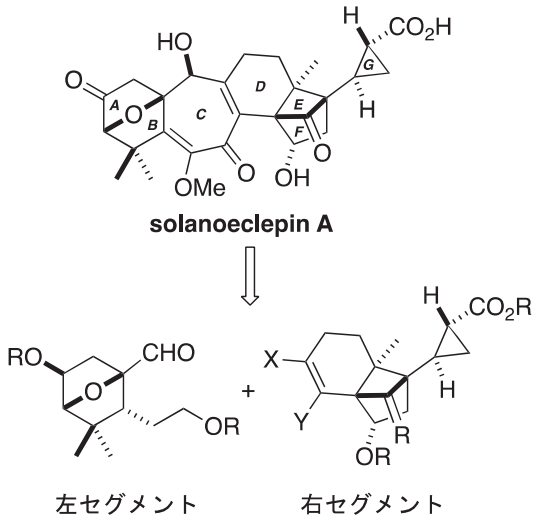


Figure 1. Structure of solanoeclepin A.

本研究では、生理活性の詳細が明らかにされていないソラノエクレピンAに着目して、高度に歪んだシクロブタン骨格の構築法の開発とソラノエクレピンAの合成を目的とした。ソラノエクレピンAは、三員環から七員環までの全ての炭素環から構成された非常に特異な化学構造を有している。特に、生理活性発現に必須であると考えられる右側部分は、連続する不斉四級炭素を含み高度に歪んだシクロブタンからなるトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカン構造であるため、その合成は極めてチャレジングである。

ソラノエクレピンAの興味深い生理活性と特異な構造から、世界中の有機合成科学者がその合成研究を行なっている[4-5)]。既に我々は、ソラノエクレピンAの合成において最も困難であると予想されるシクロブタン骨格構築に焦点を絞り種々検討した結果、Hajos-Parrishケトンから四段階で合成したアルデヒドに対して、SmI_2を作用させたところ4-*exo*-*trig*型ラジカル共役付加反応が速やかに進行し、トリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカン骨格の構築に成功している(スキーム3参照)[6)]。そこで本研究では、確立した共役付加による4-*exo*-*trig*型ラジカル環化反応および橋頭位のラジカルによる炭素—炭素結合反応を機軸として、連続する不斉四級炭素を含み高度に歪んだシク



Scheme 1. Synthetic plan of solanoeclepin A.

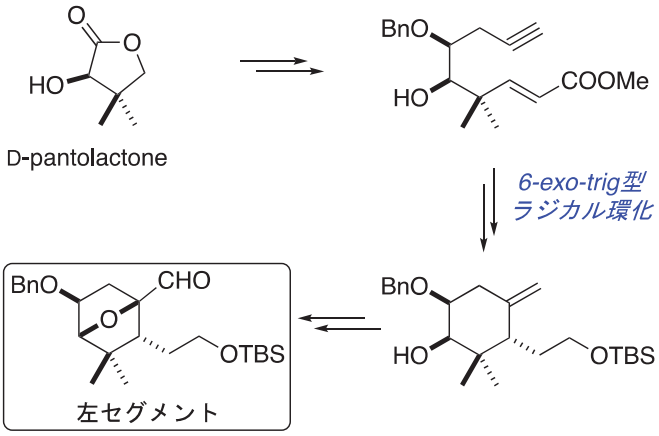
ロブタンから構成されるトリシクロ[5.2.1.0^{1,6}]デカン構造の効率的な合成法の確立と同時に、ソラノエクレピンAの特異なシクロブタン構造と活性発現の関係を明らかにするための合成的基盤を形成することを目的とした。

2．方法および結果

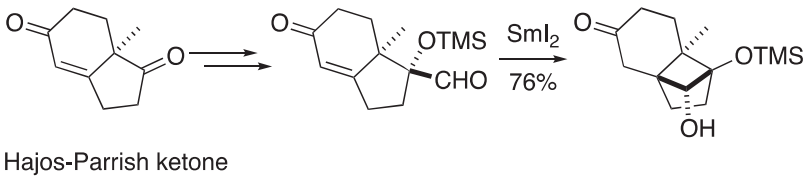
本研究では、ソラノエクレピンAとその類縁体の効率的な合成を可能にするため、左右セグメントを連結した後、合成の最終段階で七員環(C環)を構築する収束的な合成を計画した(スキーム1)。その際、オキサビシクロ骨格(AB環)を持つ左セグメントと右セグメントの基本骨格に相当するトリシクロ[5.2.1.0^{1,6}]デカン(DEF環)は、ごく最近開発したラジカル環化を鍵反応として短工程で合成する。各セグメントを最後に連結して、ソラノエクレピンAの全合成を行う計画である。

既に、ラジカル反応の中性条件かつ高い反応性を利用して、オキサビシクロ骨格(AB環)を持つ左セグメントの合成を達成している(スキーム2)。D-パントラクトンから不飽和エステルを合成し、*n*-Bu_3SnHとAIBNによる6-*exo*-*trig*型ラジカル環化反応とヨードエーテル化反応を経ることで、オキサビシクロ骨格(AB環)を持つ左セグメントの合成に成功している[7]。

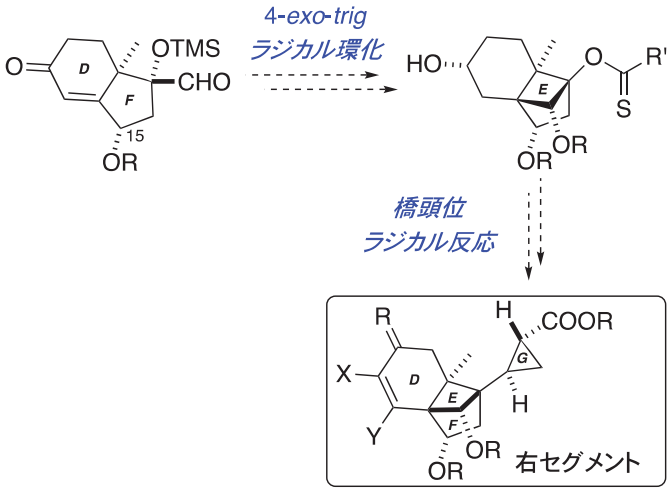
また右セグメントは、光学活性なHajos-Parrishケトンから四段階で合成したアルデヒドに対して、SmI_2でケチニルラジカルを発生させたところ速やかに環化反応が進行して、望むトリシクロデカンを76%の収率で合成することに成功した(スキーム3)[6]。これによって、ラジカル環化によるシクロブタンの構築を鍵反応とする独自の



Scheme 2. Synthesis of left-hand nucleus of solanoeclepin A.



Scheme 3. Synthesis of right-hand nucleus of solanoeclepin A.



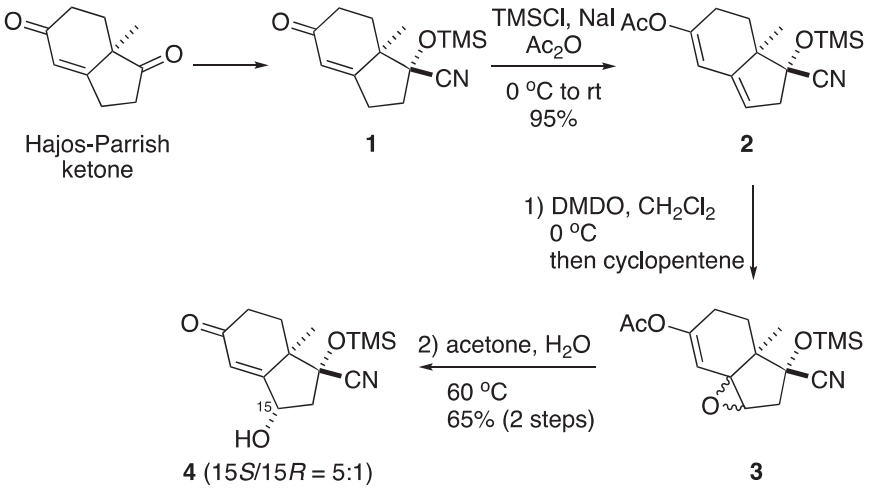
Scheme 4. Synthetic plan of right-hand nucleus of solanoeclepin A.

合成法を見出すことができ、高度に歪んだシクロブタンを持つトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカン骨格の構築法を確立した。

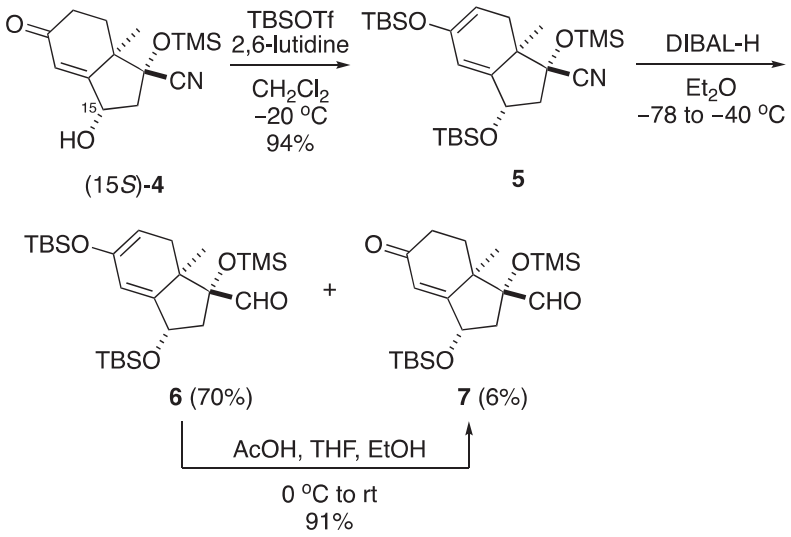
シクロプパン側鎖の有無や酸化度の違いはあるが、得られたシクロブタンはソラノエクレピンAの右セグメントの基本骨格であり、本反応は連続不斉中心を含み高度に歪んだシクロブタン骨格をラジカル環化によって構築した初めての例である。

そこで、我々が見出した4-*exo*-*trig*型ラジカル反応および橋頭位のラジカルによる炭素—炭素結合反応を利用すれば、鍵中間体であり高度に官能基化された右セグメントの効率的な合成が短行程で実現できると考えた。すなわち、F環上の15位に酸素官能基を導入したアルデヒドの4-*exo*-*trig*型ラジカル環化によって、シクロブタン骨格(E環)を構築し、チオカルボニル誘導体とした後、ラジカル還元剤によって反応性が高い橋頭位ラジカルを発生させることで、不斉四級炭素の構築を伴った側鎖導入を計画した(スキーム4)。

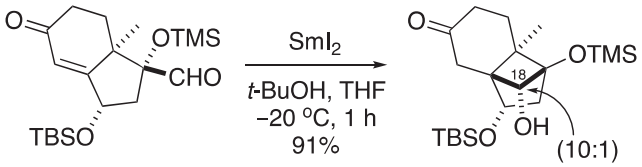
まず、Hajos-Parrish ケトンを出発原料として、15位への水酸基導入を検討した。17位ケトンをシアノヒドリン化にした後、TMSCl, NaI, Ac_2Oを用いてジエノールアセテート**2**に変換した(スキーム5)。次に、別途調製したジメチルジオキシラン(DMDO)によって末端オレフィンをエポキシ化した。単離したエポキシド**3**を水とアセトンの混合溶媒で加熱還流することにより、ヒドロキシエノン**4**を得ることができた。



Scheme 5. Synthesis of hydroxyl enone **4** from Hajos-Parrish ketone.

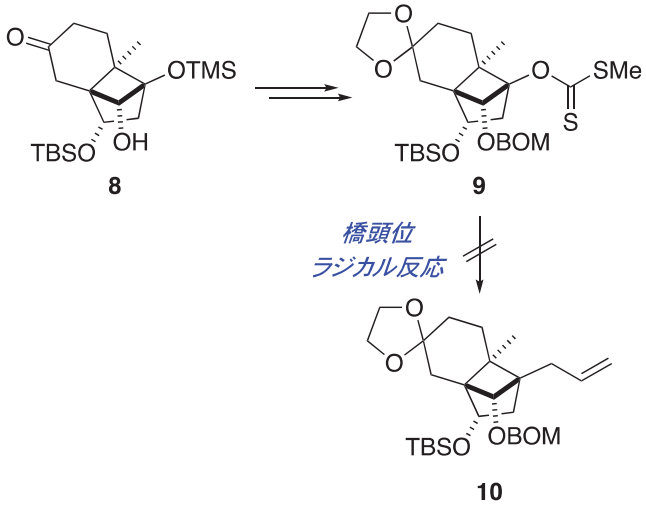


Scheme 6. Synthesis of ald-enone **7**, a precursor for radical cyclization.

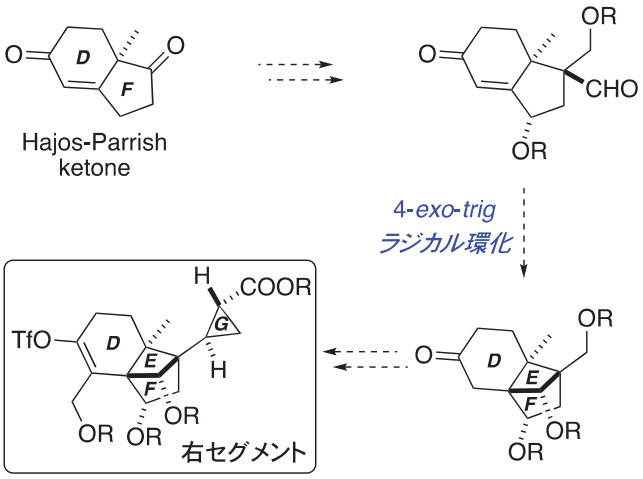


Scheme 7. Synthesis of tricyclo[5.2.1.0^{1,6}]decane **8** by samarium(II)-mediated radical cyclization.

次に、ラジカル環化の前駆体であるエノン**7**を合成した(スキーム6)。ヒドロキシエノン**4**のエノン部位と15位水酸基をTBS基で保護した後、ジエチルエーテル中DIBAL-Hによってニトリルを還元し、アルデヒド**6**を収率良く得た。この際、中性シリカゲルを用いた精製によって、アルデヒド**6**のシリルエノールエーテルが一部脱保護され、環化前駆体であるエノン**7**も得られた。最後に、酢酸/THF/エタノールによって、シリルエノールエーテルを選択的に脱保護することで、環化前駆体であるエノン**7**に変換した。



Scheme 8. Keck allylation by utilizing a bridgehead radical.

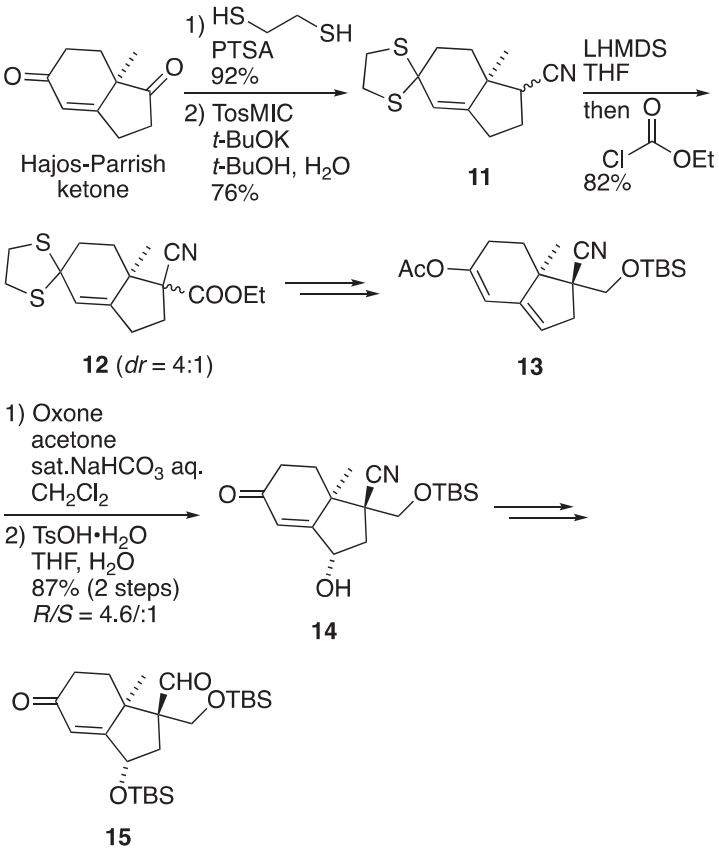


Scheme 9. New synthetic plan of right-hand nucleus of solanoeclepin A.

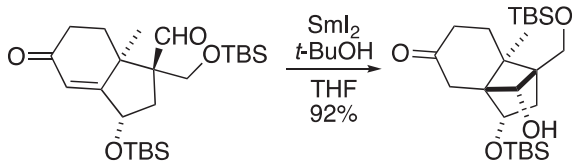
確立された方法に従い、ヨウ化サマリウムを用いたラジカル環化反応を検討した。エノン**7**に対して、4当量のヨウ化サマリウムと*t*-BuOHを－20℃で作用させると、ラジカル環化反応は速やかに進行し、トリシクロデカン**8**が高収率で得られた(スキーム7)。

そこで、得られたトリシクロデカン**8**を用いたKeckアリル化反応を検討した。環化体**8**を五段階の変換によって、キサンテート**9**を合成した。得られた**9**に対し、ラジカル開始剤であるAIBNまたはEt_3Bとアリルトリブチルスズを用いてKeckアリル化反応を試みたが、アリル基の導入には至らなかった(スキーム8)。

そこで、新たな右セグメントの合成を計画した(スキーム9)。Hajos-Parrish ケトンを出発原料として、予め17位に側鎖が導入された環化前駆体を合成した後、ヨ



Scheme 10. Synthesis of ald-enone **15**, a precursor for radical cyclization.



15　　16

Scheme 11. Synthesis of tricyclodecane **16** by radical cyclization.

ウ化サマリウムを用いたラジカル環化反応を行う。その後の変換によって、高度に官能基化された右セグメントを合成する計画である。

環化前駆体**15**の合成を検討した(スキーム10)。Hajos-Parrish ケトンをジチオアセタールで選択的に保護した後、TosMICによって一段階でニトリルを導入し**11**とした。次に、LHMDSとクロロギ酸エチルによって側鎖を導入して、エステル**12**を得た。15位水酸基を導入するために、ジエノールアセテート**13**へ変換した後、DMDOによるエポキシ化と続く加水分解によって、ヒドロキシエノン**14**を高収率で得た。さらに数段階の官能基変換によって、環化前駆体**15**を合成した。

確立された方法に従い、ヨウ化サマリウムを用いたラジカル環化反応を検討した(スキーム11)。エノン**15**に対して、ヨウ化サマリウムと*t*-BuOHを−20℃で作用させると、ラジカル環化反応は速やかに進行しトリシクロデカン**16**が高収率で得られた。

以上のように、本研究ではソラノエクレピンAの右側部分に相当するシクロブタンを含むトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカンの合成法の確立を目的として研究を行った。光学活性なHajos-Parrishケトンから合成したアルデヒドに対して、SmI_2を用いたラジカル環化反応を行ったところ、望むトリシクロデカンを高収率で合成することに成功した。しかし、Keckアリル化反応による側鎖導入を試みたが、アリル基の導入には至らなかった。そこで、予め17位に側鎖が導入された環化前駆体を合成した後、ヨウ化サマリウムを用いたラジカル環化反応を検討した結果、望むトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカンが得られた。一連の検討により、連続する不斉四級炭素を含み高度に歪んだシクロブタンから構成されるトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカン構造の効率的な合成法の確立に成功した。

現在ソラノエクレピンAの全合成に向けて、七員環(C環)構築を検討中である。今後は、ソラノエクレピンAおよびその関連化合物(構造単純アナログ)の化学合成によって、孵化の分子機構解明とシスト線虫駆除剤のリード化合物の創出を目指したい。

3．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社団法人松籟科学技術振興財団に深く感謝申し上げます。

参考文献

(1) Mulder, J. G.; Diepenhorst, P.; Brüggemann-Rotgans, I. E. M. PCT Int. Appl. WO 93/02,083; *Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 185844z.

(2) Schenk, H.; Driessen, R. A. J.; de Gelder, R.; Goubitz, K.; Nieboer, H.; Brüggemann-Rotgans, I. E. M.; Diepenhorts, P. *Croat. Chem. Acta* **1999**, *72*, 593-606.

(3) Tanino, K.; Takahashi, M.; Tomata, Y.; Tokura, H.; Uehara, T.; Narabu, T.; Miyashita, M. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 484-488.

(4) (a) Blaauw, R. H.; Brière, J.-F.; de Jong, R.; Benningshof, J. C. J.; van Ginkel, A. E.; Rutjes, F. P. J. T.; Fraanje, J.; Goubitz, K.; Schenk, H.; Hiemstra, H. *Chem. Commun.* **2000**, 1463-1464. (b) Benningshof, J. C. J.; Blaauw, R. H.; van Ginkel, A. E.; J. H.; Rutjes, F. P. J. T.; Fraanje, J.; Goubitz, K.; Schenk, H.; Hiemstra, H. *Chem. Commun.* **2000**, 1465-1466. (c) Blaauw, R. H.; Brière, J.-F.; de Jong, R.; Benningshof, J. C. J.; van Ginkel, A. E.; Fraanje, J.; Goubitz, K.; Schenk, H.; Rutjes, F. P. J. T.; Hiemstra, H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 233-242. (d) Brière, J.-F.; Blaauw, R. H.; Benningshof, J. C. J.; van Ginkel, A. E.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2371-

2377. (e) Blaauw, R. H.; Benningshof, J. C. J.; van Ginkel, A. E.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2250-2256. (f) Benningshof, J. C. J.; Blaauw, R. H.; van Ginkel, A. E.; van Maarseveen, J. H.; Rutjes, F. P. J. T.; Hiemstra, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1693-1700. (g) Benningshof, J. C. J.; IJsselstijn, M.; Wallner, S. R.; Koster, A. L.; Blaauw, R. H.; van Ginkel, A. E.; Brière, J.-F.; van Maarseveen, J. H.; Rutjes, F. P. J. T.; Hiemstra, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1701-1713. (h) Hue, B. T. B.; Dijkink, J.; Kuiper, S.; Larson, K. K.; Guziec Jr., F. S.; Goubitz, K.; Fraanje, J.; Schenk, H.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4364-4366. (i) Hue, B. T. B.; Dijkink, J.; Kuiper, S.; van Schaik, S.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 127-137. (j) Lutteke, G.; Kleinnijenhuis, R. A.; Jacobs, I.; Wrigstedt, P. J.; Correia, A. C. A.; Nieuwenhuizen, R.; Hue, B. T. B.; Goubitz, K.; Peschar, R.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3146-3155. (k) Tsao, K.-W.; Cheng, C.-Y.; Isobe, M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5274-5277. (l) Chuang, H.-Y.; Isobe, M. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4166-4169. (m) Lin, Y.-T.; Lin, F.-Y.; Isobe, M. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5948-5951. (n) Lutteke, G.; Kleinnijenhuis, R. A.; Beuving, R. J.; de Gelder, R.; Smits, J. M. M.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 5845-5854. (o) Chuang, H.-Y.; Isobe, M. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2054-2058. (p) Chuang, H.-Y.; Isobe, M. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *73*, 2705-2714.

(5) (a) Tojo, S.; Isobe, M. *Synlett* **2005**, 1237-1244. (b) Adachi, M.; Yamauchi, E.; Komada, T.; Isobe, M. *Synlett* **2009**, 1157-1161.

(6) Komada, T.; Adachi, M.; Nishikawa, T. *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 287-289.

(7) Adachi, M.; Torii, M.; Nishikawa, T. *Synlett* **2015**, 965-969.

申請者　大阪市立工業研究所（現　大阪産業技術研究所）　門多　丈治

リグニンとポリ乳酸からなる一次構造の明確な木材代替プラスチックの精密合成

大阪産業技術研究所　森ノ宮センター
門多　丈治

1．背景と目的

近年、環境問題への対応策の一つとして、金属を含まない重合触媒の開発が注目されている。重合触媒能を有する酵素[1)]はその有力候補の一つであるが、コスト等により工業化には至っていない。そこで我々は、リパーゼ触媒開環重合の酵素活性部位に着目し、その協奏的酸塩基触媒作用にヒントを得た新しい有機触媒を開発した。リパーゼ触媒開環重合の鍵段階では、アミノ酸残基中のプロトン供与基とプロトン受容基が、モノマーに対して協奏的に作用することにより触媒サイクルを形成していると考えられている。そこで、ラクチド開環重合触媒としてプロトン供与基/受容基の共存が可能な、すなわち酸[2)]と塩基[3)]が同時に働く有機化合物の組み合わせを探索した結果、4,4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）とその塩を同時に用いると、DMAP単独[3a)]より高活性な触媒作用を示し、分子量と化学構造を正確に制御した“精密ポリ乳酸”が得られることを見出した[4)]。この新規有機触媒の推定される反応機構を示す（図１）。

まず、触媒と開始剤アルコール（求核剤）が存在すると、脱プロトン化によりアルコールが活性化される。そこに、モノマー（求電子剤）が存在すると、プロトン化され活性化する。その協奏的酸塩基触媒作用によって、開環が高効率、選択的に進行し、分子量の揃った精密ポリ乳酸へと至る。溶液重合、バルク重合ともに可能であり、モノマー/開始剤比から計算される理論値通りの分子量の“精密ポリ乳酸”を、実用性のある高重合度のものまで定量的に得ることができる。さらに、用いる開始剤によって、直鎖および任意の分岐構造の導入、開始・停止両末端基の修飾、ブロック共重合化まで、従来になく正確かつ任意に構造を制御した様々なポリマー設計が可能になる[5)]。

開発した有機触媒の利点にバイオマス有効活用の観点を取り入れ、植物資源由来の新素材リグノフェノール[6)]（図２）を開始剤とするオールバイオマス材料の設計およ

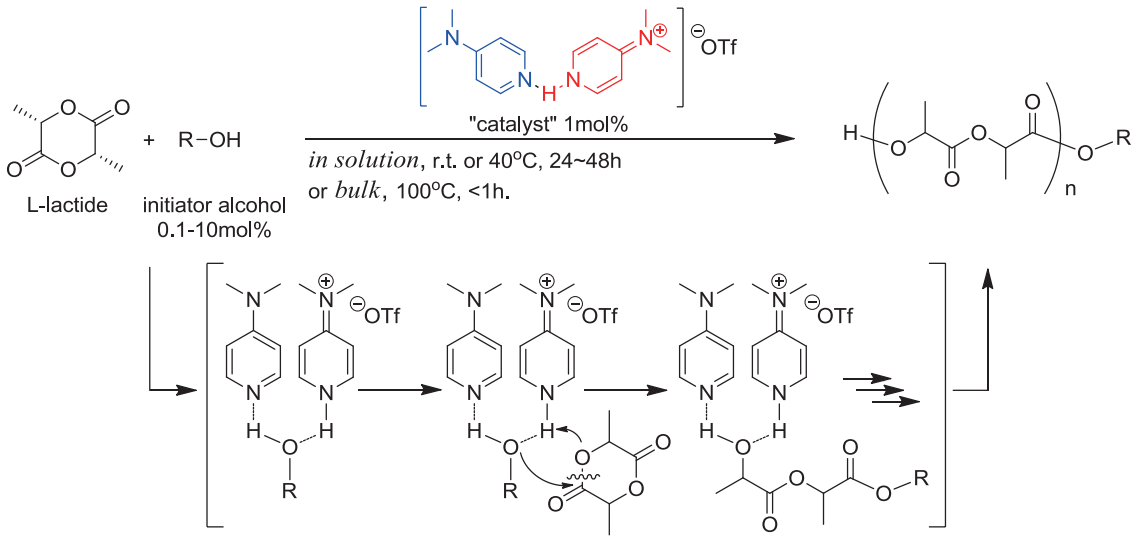


図１　反応機構：酸塩基有機触媒（DMAP+DMAPH.OTf）によるポリ乳酸の精密合成

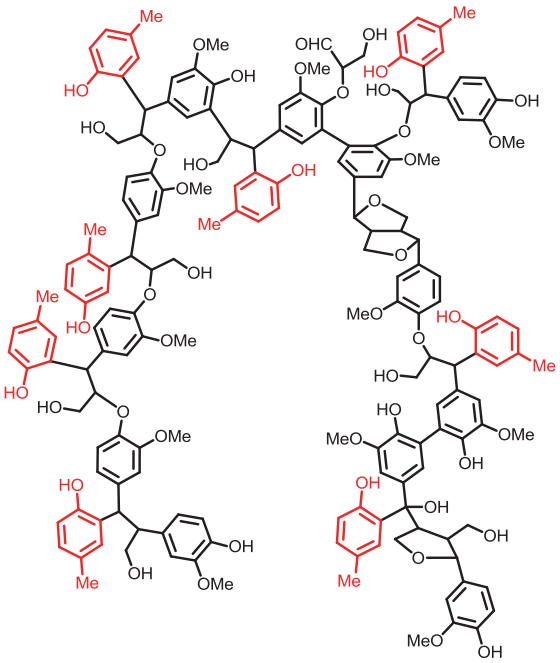


図２　リグノフェノール（LP）の推定構造

び合成を試みた。リグノフェノールは、三重大学の舩岡教授が開発したリグニン精密抽出法(相分離システム)で製造され、植物資源のフル活用を可能とする新素材として注目されている。リグニン由来の化学構造をほぼ保持しつつ３次元網目構造をピンポイントで開裂させた点で従来のリグニン材料と全く異なり、明確に構造解析されていることも含め、既存の化学工業プロセスとの親和性が高い。我々は、1999年から三重大学と共同で、他の研究機関に先駆けて、リグノフェノールの工業的用途の開拓に着手し、エポキシ樹脂[7ab]、ポリウレタン樹脂[7c]、木材用接着剤[7d]等を開発してきた実績を有し、現在も企業への技術移転、工業製品化に挑戦し続けている。

リグノフェノールはアルコール性水酸基を多く有するポリオールであるため、アルコール系開始剤として利用可能である。剛直なリグノフェノール骨格中の水酸基を起点に、柔軟なポリ乳酸鎖を結合させることで、様々な構造のリグノフェノール/ポリ乳酸複合体が簡便に得られると期待される。本研究では、リグノフェノール中の水酸基を開始剤、乳酸二量体ラクチドをモノマーとして、剛柔両立させうるブラシ状の特殊構造ポリマーを精密合成し、成形可能な木材代替プラスチックの開発を目指した。

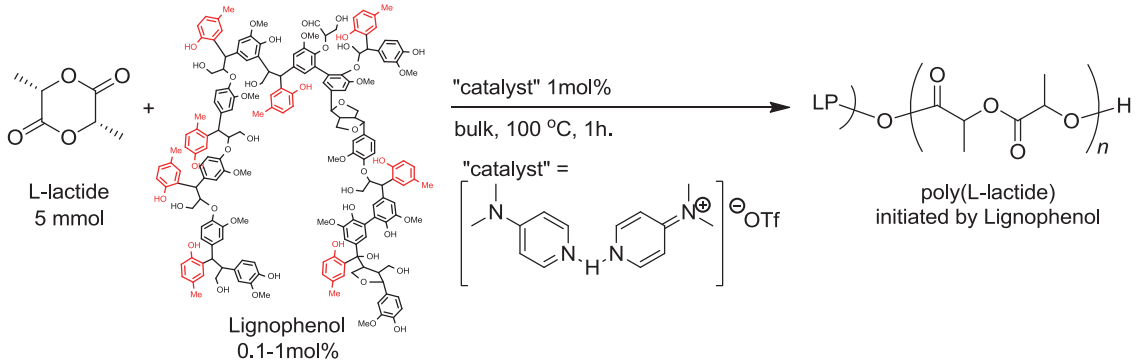


表１　ブナ由来リグノフェノールLPc(B)、ヒノキ由来LPc(H)を開始剤とするポリ乳乳酸の分子量

Lignophenol (Origin)	(mol%)	[M]/[I]	conv. (%)	DP (n)	Mn(th)	Mn(GPC)	Mw(GPC)	PDI
	-	-	-	0 *	-	2,360 *	4,500 *	1.90 *
LPc(B) (Beech)	1	100	77	74	13,000	12,200	20,500	1.68
	0.5	200	96	182	28,600	29,400	40,200	1.37
	0.2	500	98	468	69,800	70,000	86,300	1.23
	0.1	1000	93	893	131,000	114,000	142,000	1.23
	-	-	-	0 *	-	3,660 *	11,500	3.13 *
LPc(H) (Hinoki)	1	100	31	31	8,070	7,440	12,600	1.70
	0.5	200	72	144	24,400	22,200	34,300	1.54
	0.2	500	94	471	71,500	68,600	88,000	1.28
	0.1	1000	94	935	138,000	108,000	129,000	1.20

* Molar mass of Lgnophenol only was measured.

2．結果と考察

2.1　リグノフェノールを開始剤とする分子量の揃ったポリ乳酸の精密合成

リグノフェノールは、ブナまたはヒノキを原料としクレゾールで抽出されたリグノクレゾール（*Type p-Cresol*、Two Step Process II、舩岡研、ブナの場合LPc（B）、ヒノキの場合LPc（H）と略）を用いた。モノマーにL-ラクチド、開始剤にLPc（B）またはLPc（H）（1, 0.5, 0.2, 0.1mol%）、触媒にDMAPおよびDMAPトリフラート（1mol%）を用い、窒素雰囲気下、100℃バルク条件で1時間反応させることで、淡褐色透明固体を得た。モノマー転換率および得られたポリマーの数平均分子量、分子量分布を、それぞれNMR、GPCにより測定した。また、DSC測定から求めたガラス転移温度は、いずれも55℃付近で差は見られなかった。得られたポリマーの分子量、分子量分布を表１にまとめた。

いずれの場合も高収率であり、かつ数平均分子量は使用したモノマー/開始剤比から下式で計算される理論分子量（*M*n（th））に一致していることが分かった。ここで［*M*］=モノマー量（mmol）、［*I*］=開始剤量（mmol）、M_{LA}=144.13（モノマー分子量）、$M_{initiator}$=開始剤分子量を表す。

$$Mn\ (th) = \frac{[M]}{[I]} \cdot \frac{conv.\ (\%)}{100} \times M_{LA} + M_{initiator}$$

表１の重合度に対して分子量をプロットしたグラフを示す（図３）。丸印がGPC測定による数平均分子量、プラス印はその分子量分布、四角印は理論分子量を表す。図３から、モノマー/開始剤比100～1000の範囲で、仕込み比のみで分子量を制御可能なことが分かる。同時にその分子量分布（*PDI*）は、重合度が大きくなるほど減少している。これは、重合開始時には開始剤自体の分子量分布（1.9または3.1）に起因する分布があるものの、分子鎖が短いほど分子運動性が高く反応性も高いため、重合が進

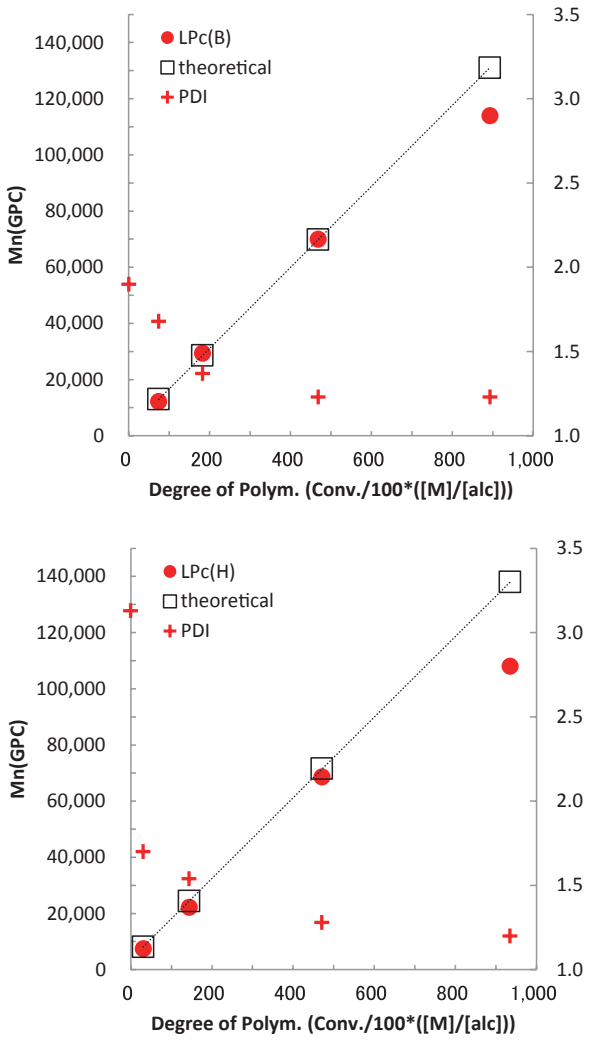


図３　リグノフェノールを開始剤に用いたポリ乳酸の重合度に対する分子量（上：LPc（B）、下：LPc（H））

写真１　リグノフェノール（LPc（B））, 市販のアルカリリグニン、脱アルカリリグニン

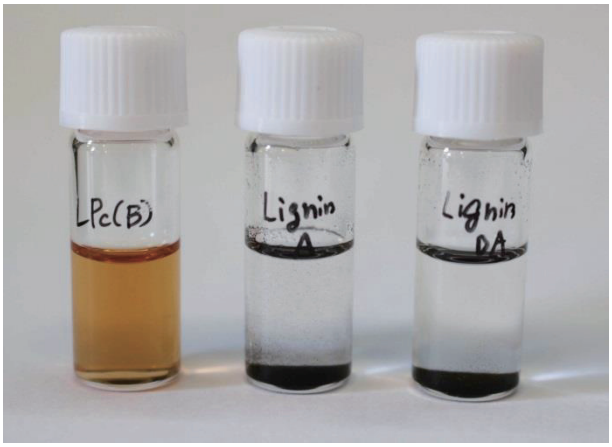


写真２　リグノフェノール（LPc（B））, 市販のアルカリリグニン、脱アルカリリグニンのTHFへの溶解性

表2　市販のアルカリリグニン、脱アルカリリグニンを開始剤とするポリ乳酸の分子量

Lignin Origin	(mg)	*conv.* (%)	*M*n(GPC)	*M*w(GPC)	*PDI*
Alkaline	50	83	9,100	12,000	1.33
	10	78	29,000	48,000	1.70
Dealkaline	50	82	10,000	15,000	1.50
	10	74	27,000	47,000	1.74

行するにつれて鎖長が揃う(＝分子量分布が狭くなる)現象を明確にとらえたものと考えられる。

2.2　市販リグニンとリグノフェノールの比較

リグノフェノールと比較する目的で、試薬グレードで市販されているリグニンについても、同様の重合を試みた。市販リグニンには、ナカライテスク製リグニン(アルカリ性)(LG(a)と略)および、東京化成工業製リグニン(脱アルカリ)(LG(da)と略)を用いた(写真１)。

まず、重合する前にTHFへの溶解性を確認した。リグノフェノール(LPc(B))、LG(a)、LG(da)それぞれ5mgにTHF1mLを加え撹拌したところ、リグノフェノールが完全に溶解するのに対し、LG(a)、LG(da)はほとんど溶解しなかった(写真２)。この結果から、リグニンの製法によって全く異なる性質になってしまっていることが推測される。

モノマーに*L*-ラクチド、開始剤にLG(a)またはLG(da)(50, 10mg)、触媒にDMAPおよびDMAPトリフラート(1mol%)を用い、窒素雰囲気下、100℃バルク条件で1時間反応させることで、褐色固体を得た。モノマー転換率および得られたポリマーの数平均分子量、分子量分布を、それぞれNMR、GPCにより測定した(表２)。

いずれの条件でもポリマーが得られたものの、それらのGPC測定ではUV吸収が全く観測されなかったため、リグニン由来のポリマーではないと推測される。しかし、得られたポリマーの分子量がリグニン使用量に比例していることから、おそらく、リグニンに含まれている不純物、又は水が開始剤となったものと考えている。

2.3　分子量未知の開始剤の分子量測定手法

リグノフェノールを開始剤とするポリ乳酸の精密合成の結果から、この精密重合技術は、分子量未知の開始剤アルコールの分子量測定に適用可能な精度を有していることが分かった。得られるポリマーの分子量(*M*n)は下式で表される。ここで[*M*]=モノマー量(mmol)、[*I*]=開始剤量(mmol)、M_{LA}=144.13(モノマー分子量)、$M_{initiator}$=開始剤分子量を表す。

$$Mn = \frac{[M]}{[I]} \cdot \frac{conv.\ (\%)}{100} \times M_{LA} + M_{initiator}$$

$$[I] = \frac{W_{initiator}}{M_{initiator}}$$

を代入し($W_{initiator}$=開始剤質量(mg))、変形すると、

$$M_{initiator} = \frac{Mn}{\frac{[M]}{W_{initiator}} \cdot \frac{conv.\ (\%)}{100} \times M_{LA} + 1}$$

ここで、表１中のLPc(B)0.2mol%の結果を基に(他の結果でも同様に計算可能)、[*M*]=5(mmol)、*conv.*(%)=98(%)、$W_{initiator}$=23.7(mg)、*M*n(by GPC)＝７0,000を代入すれば、$M_{initiator}$≒2,300となり、GPCで実測した、*M*n=2,360とほぼ一致する。すなわち、分子量未知のアルコールを開始剤に用いて得られるポリマーの分子量を測定すれば、上式より簡単に分子量を計算することができる。

2.4　リグノフェノールを開始剤とするポリ乳酸のフィルム化

得られたリグノフェノール/ポリ乳酸複合体について、溶媒キャスト法、熱プレス法によるフィルム化を試みた。リグノフェノール/ポリ乳酸複合体として、表1中のLPc(B)を開始剤とするMn11.4万、LPc(H)を開始剤とするMn10.8万の２種類を用いた。

(１)　溶媒キャストフィルム化　内径約27mmのガラス製シャーレに合成したリグノフェノール/ポリ乳酸複合体5mgを量り取り、ジクロロメタン0.5mLを加えて溶解させた後、そのまま静止、風乾させることで薄膜フィルムを得た。破れることなく剥がすことができ、膜厚は約10μmであった(写真３　上)。

(２)　熱プレスによるフィルム化　100℃に設定した熱プレス機を用いて、上下にアルミ板、PETフィルムで挟み、圧さ調整のため100μm厚のアルミ枠の中に合成したリグノフェノール/ポリ乳酸複合体100mgを入れ、10秒熱プレスすることで直径約40mm、100μm厚の

写真３　リグノフェノール/ポリ乳酸複合体(LPc(B)(左)、LPc(H)(右))の、キャストフィルム(上)、熱プレスフィルム(下)

フィルムを得た(写真３　下)。

本研究で得られたリグノフェノール/ポリ乳酸複合体は、従来のポリ乳酸に比較して容易に薄膜化、フィルム化が可能であった。おそらく、その特殊な構造の特性によるものと考えている。本研究中には物性の解析には至らなかったが、今後スケールアップして、詳細に力学的、熱的物性を調べる予定にしている。

３．まとめ

ポリ乳酸は、植物(デンプン)を出発原料として、植物→糖→乳酸→乳酸二量体(ラクチド)→ポリ乳酸という経路で合成されているが、近年では非食物系のセルロースからの糖化も試みられており、リグノフェノールの工業的活用経路と合流させることで、植物の有用成分を余すことなく有効活用できる、新たな資源活用経路の開拓に繋がると期待される。本研究では、その一例として、分子量制御されたリグノフェノール/ポリ乳酸複合体の精密合成が可能であることを示せた。また、しなやかさと強靭さを両立させている植物体に見倣って、リグノフェノールの剛直鎖に多数のポリ乳酸鎖を“生やす”形で芳香族・脂肪族両成分を強固に複合化させることができ、柔軟性、強靭性、成形加工性に優れた木材代替プラスチックの開発に向けて、一歩前進したと考えている。今後、本研究の成果も含めて様々なユニークな構造の精密ポリ乳酸の物性を調べることで、柔軟かつ強靭なポリ乳酸新素材の開発に繋げていきたい。

４．謝辞

本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団2015年度研究助成を受けて行われたものです。ここに深く御礼申し上げます。

５．参考文献

1) a) Kobayashi, S.; Uyama, H.; Kimura, S. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3793. b) Gross, R. A.; Kumar, A.; Kalra, B. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2097. c) Kobayashi, S. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 237.

2) a) Shibasaki, Y.; Sanda, H.; Yokoi, M.; Sanda, F.; Endo, T. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4316. b) Endo, T.; Shibasaki, Y.; Sanda, F. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2190. c) Bureau, S. G.; Delcroix, D.; Martin-Vaca, B.; Bourissou, D.; Navarro, C.; Magnet, S. *Macromolecules* **2008**, *41*, 3782. d) Basko, M.; Kubisa, P. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 7071. e) Bourissou, D.; Martin-Vaca, B.; Dumitrescu, A.; Graullier, M.; Lacombe, F. *Macromolecules* **2005**, *38*, 9993.

3) a) Nederberg, F.; Connor, E. F.; Möller, M.; Glauser, T.; Hedrick, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2712. b) Myers, M.; Connor, E. F.; Glauser, T.; Möck, A.; Nyce, G. W.; Hedrick, J. L. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 844. c) Dove, A. P.; Pratt, R. C.; Lohmeijer, B. G. G.; Waymouth, R. M.; Hedrick, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13798. d) Zhang, L.; Nederberg, F.; Pratt, R. C.; Waymouth, R. M.; Hedrick, J. L.; Wade, C. *Macromolecules* **2007**, *40*, 4154. e) Koeller, S.; Kadota, J.; Deffieux, A.; Peruch, F.; Massip, S.; Léger, J.-M.; Desvergne, J.-P.; Bibal, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *109*, 15088. f) Koeller, S.; Kadota, J.; Peruch, F.; Deffieux, A.; Pinaud, N.; Pianet, I.; Massip, S.; Léger, J.-M.; Desvergne, J.-P.; Bibal, B. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4196. g) Becker, J. M.; Tempelaar, S.; Stanford, M. J.; Pounder, R. J.; Covington, J. A.; Dove, A. P. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6099. h) Alba, A.; Schopp, A.; Delgado, A. P. D.; Cherif-Cheikh, R.; Martin-Vaca, B.; Bourissou, D. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 959. i) Zhang, L.; Pratt, R. C.; Nederberg, F.; Horn, H. W.;

Rice, J. E.; Waymouth, R. M.; Wade, C. G.; Hedrick, J. L. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1660.

4) a) Kadota, J.; Pavlovic, D.; Desvergne, J.-P.; Bibal, B.; Peruch, F.; Deffieux, A. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 8874. b) Kadota, J.; Pavlovic, D.; Hirano, H.; Okada, A.; Agari, Y.; Bibal, B.; Deffieux, A.; Peruch, F. *RSC Adv*., **2014**, *4*, 14725.

5) 門多, 岡田, 平野, 上利, 日本接着学会誌, **2014**, *50*, 123.

6) a) Funaoka, M.; Abe, I. *Tappi J*.,**1989**, *72*, 145. b) Funaoka, M. *Polymer International*, **1998**, *47*, 277.

7) a) 門多, 長谷川, 舩岡, ネットワークポリマー, **2006**, *27*, 118. b) 門多, 長谷川, 舩岡, ネットワークポリマー, **2010**, *31*, 152. c) 門多, 長谷川, 舩岡, *日本接着学会誌*, **2004**, *40*, 380. d) 門多, 長谷川, 舩岡, 鷲見, 日本接着学会誌, **2004**, *40*, 101.

申請者　北海道大学　阿部　薫明

新規多糖誘導体を用いた薬剤徐放量を最適化できる臓器粘着型生分解性シートの開発

北海道大学　大学院歯学研究院
阿部　薫明

1．緒言

近年、我が国は超高齢化社会の到来に伴い、医療・福祉など増加する高齢人口の問題に対応することが課題となっている。例えば、高齢者の薬の飲み過ぎが挙げられ、臓器機能の衰えにより薬物有害事象の発生が増加している。常時5種類以上の投薬を行っている患者は、前期高齢者で約44%、後期高齢者では約69%にも至っている。また、2疾病以上の慢性疾患を有する高齢者は平均約6種類もの処方が行われている。そして、高齢者では6種類以上の投薬で有害事象の発生が増加しているため、今後高齢者が増え続ける現代社会では解決せざるを得ない問題となっている[1)]。そこで考えられているのが、薬物を効率よく適切な部位に適切な量送り込む薬物伝達システム（DDS）である。DDSを考えることで、薬の効果を高め、投薬回数や投薬量の減少、副作用を抑えることによる患者の負担の軽減が期待できる。例えば、抗がん剤など副作用の強い薬剤を用いた治療では、「薬剤による副作用」→「患者のダメージ」→「体力の低下」→「治療効果の激減」→「死」へと至るため、薬剤の機能を最大限に利用することはできない。それ故、副作用軽減は抗がん医療などの究極の課題である。薬剤ターゲッティングの究極の効率化の方策としては、患部組織・臓器への薬剤の留置が考えられる。臓器粘着型生分解性シートに薬剤徐放性を付加させることが出来れば、長期間に渡り患部へと薬剤を供給し得る、副作用を軽減した効率的な治療法の確立が期待される。現在、DDSにおいて高分子は薬物の担体として多く活用されている[2)]。中でも多糖類は生体に対する親和性や、体内での挙動、誘導体が合成しやすいなどの点で薬物担体として優れている。

そこで我々は、天然高分子であるプルラン（PL）をリン酸化したリン酸化プルラン（PPL, Fig. 1）に着目した。プルランはグルコースがα（1→4）（1→4）（1→6）結合で繋がった構造を持ち、水に容易に溶解して、低粘性の溶液を与える他、粘着性、造膜性、生体安全性等の性質を示す事から、化粧品・医薬品・食料品などに利用されている[3)]。また、リン酸基は生体内で歯や骨などを構成するハイドロキシアパタイトへの高い吸着性を示す。そのため、PPL - 薬物複合体を患部組織やその周辺に接着させ薬物を徐々に放出させる事で、少量の薬物で効果的かつ

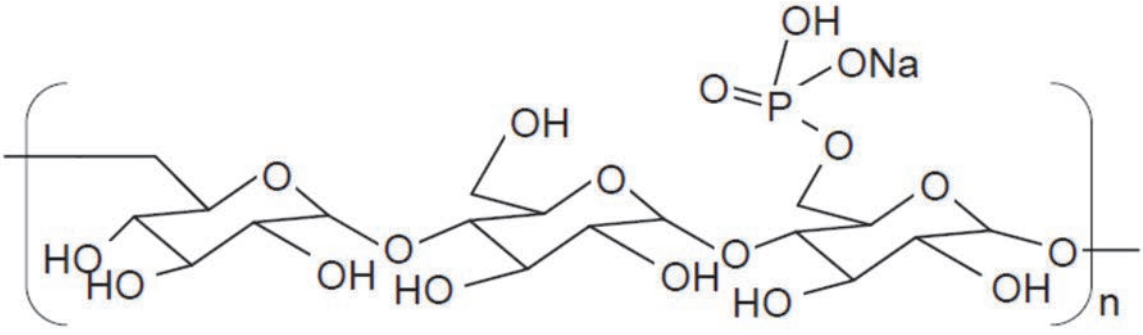


Figure 1.　リン酸プルラン（PPL）の化学構造

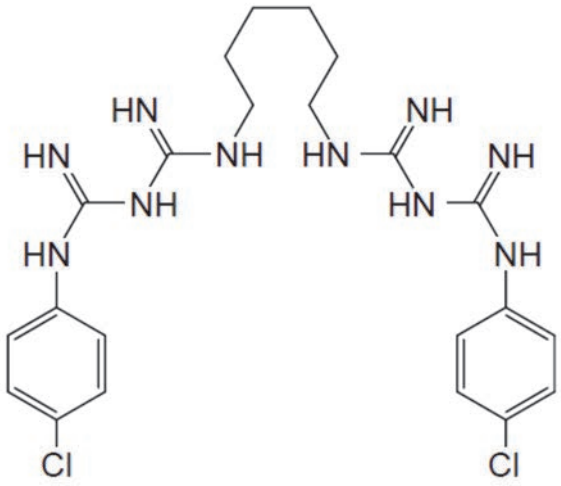


Figure 2. クロロヘキシジン(CHG)の化学構造

持続的に薬効を発揮させるDDSが実現可能であると考えられる。

本研究では、PPLを薬物担体として薬物との複合体を作製し、吸光度測定等によりその複合体の形成量・形成メカニズムと薬物徐放の制御について検討した。またインプラント等の生体材料として用いられるTi表面に形成し、PPL-薬物複合体フィルムからの薬物分子の徐放挙動について、報告する。今回は徐放挙動を観察する薬物として、医薬用殺菌薬であり、水溶性を示すカチオン性分子のクロルヘキシジン(CHG, Fig.2)を用いた。

2．実験操作

2-1. 多糖への官能基修飾

2-1-1. PPLの合成

局方プルラン20g(PL 林原製、lot：6F07)とNaOHを超純水にそれぞれ溶解させ、混合し、一晩攪拌を行った。ビーカーを氷浴に浸し、水温を5℃まで下げた。水温確認後、塩化ホスホリル($POCl_3$)を少量ずつ加え、6時間反応させた。反応後の溶液にリン酸を加え中和した後、透析、濾過、濃縮を行い、凍結乾燥により生成物を得た[4]。得られた生成物についてICP発光分光分析装置(VISTA-PRO、セイコーインスツルメンツ製)によりリン含有量を測定した。その結果より、糖鎖中の水酸基がリン酸基へ置換された割合(Degree of Substitution、以下DSと略記)を算出した。すべての水酸基がリン酸基に置換されたときを1としている。

2-1-2. アセチル化PPLの合成

2-1-1で合成したPPL 1gをホルムアミド30mLに溶解させた。溶解後、54℃のウォーターバス内でピリジンと無水酢酸を3:2の割合で加え、攪拌しながら48時間反応させた[5]。その後、飽和食塩水を20mL加え、エタノール約300mLに流し入れ沈殿を析出させた。得られた沈殿を吸引ろ過により取り出し、超純水に溶解させ透析を行った後、凍結乾燥により生成物を得た。得られた生成物についてIR測定、^{1}H-NMR測定を行った。

2-2. PPL-CHG複合体形成量の評価

2-1-1で合成したPPL(DS_P=0.04, 0.09)について所定の濃度の水溶液とCHG水溶液とを混合させ、超純水で洗浄した。限外ろ過膜を有する遠心濾過デバイス(Nanocep、分画分子量 10kDa、PALL社)を用い、混合溶液を遠心分離で限外濾過した。ろ液中の薬物濃度を吸光度測定で定量し、複合体形成量を評価した。

2-3. $CaCl_2$添加によるPPL-CHG複合体形成量への影響

PPL-CHG混合溶液(400ppm：100ppm)を調製し、所定のCa^{2+}濃度になるように$CaCl_2$水溶液を加え、2-2と同様の操作で複合体形成量を評価した。PPLはDS_P=0.04の試料を用いた。

2-4. 尿素添加によるPPL-CHG複合体形成量への影響

PPL-CHG-$CaCl_2$混合溶液(200ppm：50ppm：50 μM)を調整し、所定の濃度になるように尿素水溶液を加え、2-2と同様の操作で複合体形成量を評価した。PPLはDS_P=0.04の試料を用いた。

2-5. PPL-CHG複合体の徐放性の評価

4000 ppmのPPL水溶液(DS_P=0.09)と1000 ppmのCHG水溶液をそれぞれ調製し、同量ずつ混合した溶液をTi板上に滴下し、乾燥させてキャストフィルムを形成した。乾燥後、超純水または生理食塩水に浸け、時間経過ごとに溶出液を取り出し、吸光度測定により定量することで徐放性を評価した。

2-6. アセチル化PPL-CHG複合体形成量の評価

2-1-2で合成したアセチル化PPLを用いて、2-2と同様の操作で複合体形成量を評価した。

Table 1. PLへのリン酸化反応の結果

entry	NaOH (g)	$POCl_3$ (mL)	P (%)[a]	DS_P [b]
1	16.6	7.7	2.3	0.04
2	49.8	23.1	3.4	0.07
3	166	77	4.4	0.09

[a] Determined by ICP
[b] Degree of substitution.

2-7. アセチル化PPL-CHG複合体の徐放性の評価

2-1-2で合成したアセチル化PPLを用いて、2-5と同様の操作で徐放性を評価した。

3．結果と考察

3-1-1. PLのリン酸化反応

リン酸化反応を行ったPL中に含まれるリン含有量をICP発光分析に基づき算出した結果を、Table 1に示す。ここでDS_Pは、すべての水酸基がリン酸基に置換されたときを1として表記している。結果より、塩化ホスホリルの量を変化させることで、リン酸化度DS_Pを制御できることが分かった。

3-1-2. アセチル化PPLの合成結果

3-1-1.で得られたPPLに対して、アセチル化反応を行い、生成物の^{1}H-NMR測定を行った。2.2ppm付近にアセチル基由来の顕著なピークが見られたことから、アセチル基の導入を確認できた。更に、アセチル基由来のピークと水酸基由来のピーク(3.5～4.3ppm)の積分値を比較

Table 2. PPLへのアセチル化反応の結果

entry	PPL	pyridine (mL)	acetic anhydride (mL)	DS_A [a,b]
1	DS_P = 0.04	3.0	2.0	0.64
2		2.25	1.5	0.45
3	DS_P = 0.09	3.0	2.0	0.62
4		2.25	1.5	0.45
5		1.5	1.0	0.29
6		0.75	0.5	0.12

[a] Determined by NMR
[b] Degree of substitution.

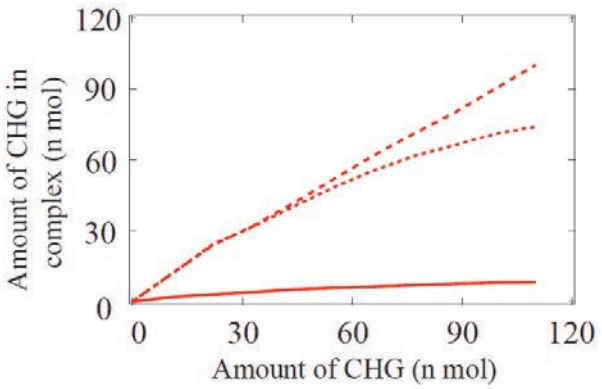


Figure 3. PPL-CHG 複合体に含有されたCHG量（破線：DS_P=0.09、点線：DS_P=0.04、実線：PL（DS_P=0））

によりアセチル置換度を算出した。その結果をTable 2に示す。ここで、DS_Aはすべての水酸基がアセチル基に置換されたときを1として表記している。

この結果、PPLのリン酸置換度に関係なく、無水酢酸とピリジンの仕込み量の増加に伴い、アセチル基への置換度DSAが上昇した。

3-2. PPL-CHG複合体形成量

PPL-CHG複合体形成量をFig. 3に示す。Fig. 3よりPPLとは複合体を形成し、リン酸置換度が高いと形成量が増加し、一方、PLの場合には複合体を形成しないことが分かる。 また、CHGの代わりにアニオン性の薬剤分子を添加した場合には、PPLと複合体を形成しないことが分かった。これらの結果より、複合体形成においてリン酸基が重要なファクターとなっており、更にカチオン性であるCHGとは複合体を形成し、アニオン性分子とは形成しないことから、電気的な相互作用が働いていると考えられる。

3-3. $CaCl_2$添加によるPPL-CHG複合体形成量への影響

3-3-1. $CaCl_2$の添加

PPL-CHG混合溶液に$CaCl_2$水溶液を添加した際の複合体形成量をFig. 4に示す。混合溶液中のCa^{2+}の濃度が上昇すればするほど、複合体形成量は減少している。これは、PPLとCHGが相互作用を起こしているが、相互作用のより強いCa^{2+}の添加により、PPLとCa^{2+}の相互作用に置き換わったからだと考えられる。PPLとCa^{2+}の相互作用は電気的な力であることから、複合体の形成時にリ

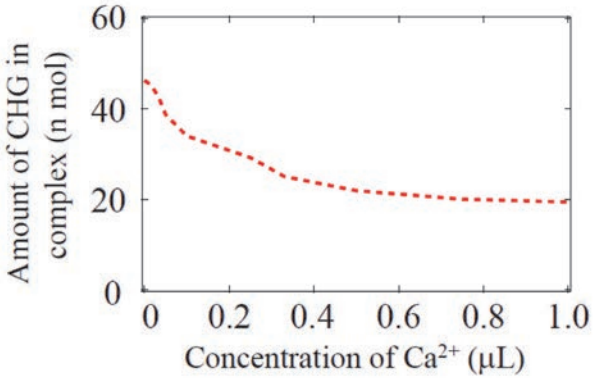


Figure 4. Ca^{2+} 添加によるPPL-CHG 複合体に含有されるCHG量への影響

ン酸基のアニオンとカチオン性であるCHGの電荷の中和が働いていることが示唆される。

しかしながら、Ca^{2+}の濃度が0.5μM以上になると複合体形成量が減少しなくなっている。つまり、複合体形成において電荷の中和だけではなく、他の要因も関与していると考えられる。

3-3-2. 尿素添加の添加

PPL-CHG-$CaCl_2$混合溶液に尿素を添加した際の複合体形成量をFig. 5に示す。$CaCl_2$を添加しても複合体形成量が減少しなかった範囲で尿素を添加することで、複合体形成量は減少した。尿素は構造破壊性分子であり、疎水性相互作用を阻害する働きを持つ[3)]。つまり、複合体形成時に疎水性相互作用が働いていると示唆される。

以上のことをまとめると、PPL-CHG複合体は静電相互作用と疎水性相互作用の双方が働くことで形成されているといえる。

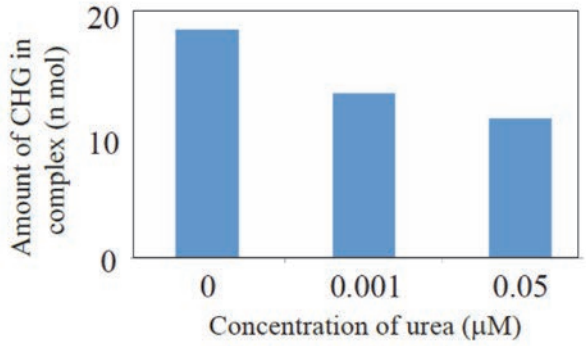


Figure 5. 尿素添加によるPPL-CHG 複合体に含有されるCHG量への影響

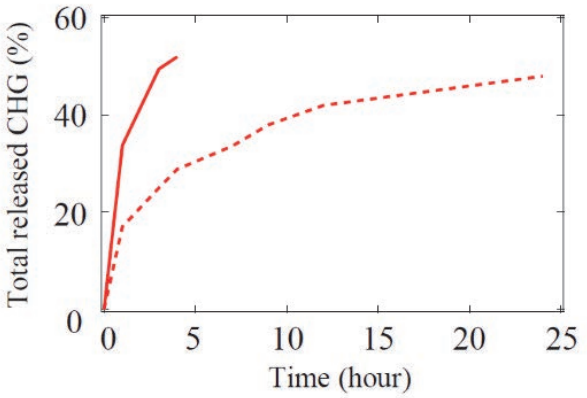


Figure 6. PPL-CHG キャストフィルムからのCHGの徐放挙動(破線：蒸留水、実線：生理食塩水)

3-5. Ti表面に形成したPPL-CHG複合体キャストフィルムからのCHG徐放性の評価

Ti 表面に形成したPPL-CHG複合体キャストフィルムからのCHGの徐放挙動をFig. 6に示す。超純水中では24時間薬物を放出し続けているのに対し、生理食塩水中では浸漬から数時間のうちにCHGが放出された。これは、超純水中に比べイオン強度の高い生理食塩水中で、リン酸基とTi板間の相互作用と、リン酸基とCHG間の相互作用の双方が阻害されたためであると考えられる。しかし、生理食塩水中での薬物放出が早すぎるため、多糖を溶け難くして放出を遅くする目的でアセチル化PPLを用いて、同様の評価を行った。

3-6. アセチル化PPL-CHG複合体形成量の評価

DS_P=0.04のPPLとそのアセチル化物とでは、複合体形成量に違いは見られた。混合溶液中のCHGの増加に伴い、DS_P=0.04のアセチル化PPL**-CHG**複合体が析出することにより、それ以上複合体を形成できなくなったためだと考えられる。これは、複合体形成量の増加に伴い、CHGと相互作用を起こしていないリン酸基の量が減少することで水和しにくくなり、アセチル基による疎水化と相まって、十分な溶解性を保てなくなったためと考えられる。一方、DS_P=0.09のアセチル化PPLでは、混合溶液中の薬物の量が多くなり相互作用を起こしていないリン酸基が減少しても、元から多くのリン酸基を携えているため溶解状態を保ち、PPLと同等の挙動を示した。低薬物濃度ではPPLとアセチル化PPLの複合体形成量に差異はなかったため、リン酸置換度・アセチル置換度に関

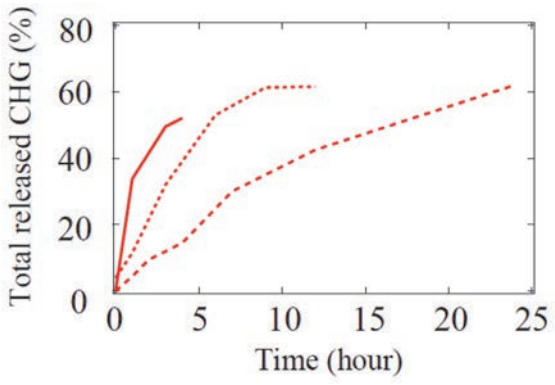


Figure 7. 生理食塩水中でのアセチル化PPL-CHG キャストフィルムからのCHGの徐放挙動（破線：DS_A=0.62、点線：DS_A=0.29、実線：DS_A=0）

わらず同様に複合体を形成する薬物濃度で薬物放出挙動を評価した。

3-7. アセチル化PPL-CHG複合体の徐放性の評価

Ti基板上に形成されたPPL-CHGまたはアセチル化PPL-CHG複合体フィルムからの生理食塩水中へのCHGの徐放挙動をFig. 7に示す。アセチル基を導入することで薬物の放出が遅くなった。なおかつ、アセチル基の導入量が増えるほど薬物の放出が遅くなった。これは、アセチル基の導入により溶液への溶解性が低下したためだけではなく、CHGとの疎水性相互作用が増加する事により放出し難くなったためであると考えられる。つまり、薬物放出挙動はアセチル基の導入量によりコントロールでき、アセチル基の導入量も制御可能であることから、PPLはアセチル化することで局所的に効果を示すDDS担体への応用が期待できる。

4．まとめ

本研究では、PPLをホルムアミドに溶解させ、ピリジンと無水酢酸を加えることでアセチル化PPLもその置換度を制御しながら合成することに成功した。PPLはカチオン性薬剤分子（CHG）とのみ、複合体を形成した。そして、PPL-CHG複合体へCa^{2+}、尿素の添加により複合体形成量が減少したことから、この複合体形成には静電相互作用と疎水性相互作用の双方が働いていることが示唆された。Ti表面に形成したPPL-CHG複合体キャストフィルムは生理食塩水中では急速に薬物を放出したが、PPLのアセチル化により放出機関の長時間化に成功し、アセチル化の置換度の調整により、その徐放挙動を制御できることも示された。

5．謝辞

本研究の遂行にあたり多大なご協力を賜りました岡山大学大学院自然科学研究科高分子材料科学研究室沖原巧講師に深く感謝いたします。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂き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。

6．参考文献

1）Kojima T, Akishita M, Kameyama Y, et al., *Geriatrics Gerontology Int.*, **12** (4), pp 761-762 (2012).
2）K. Ulbrich, V. Subr, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56** (7), pp 1023-1050 (2004).
3）J.M. Choia・B. Lee, *J. of Ind. and Eng. Che.*, **48**, 108 (2016).
4）亀ノ上翔吾, 岡山大学大学院, 自然科学研究科, 修士論文 (2013)., S. Abe, Y. Okajima, et al., Advances in Functional Maters 2017
5）H. Zhang, et al., *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **71**, pp 19-26 (2009).

申請者　昭和薬科大学　久保田　高明

共生微細藻類の機能を利用した新規骨粗鬆症の開発

昭和薬科大学　天然物化学研究室
久保田　高明

1．はじめに

日本における骨粗鬆症の患者は1,000万人以上とされ、特に50歳以上の女性の3人に1人は骨粗鬆症に罹患していると言われている。人口の高齢化に伴い患者数が増加することが予想され、骨粗鬆症による骨折から要介護状態になるケースも多いことから、今後さらに深刻な問題になることが危惧されている。

Norzoanthamineは、1995年に上村大輔先生らによって、奄美大島近海で採取されたスナギンチャク(*Zoanthus* sp.)から単離、構造決定された炭素数29のアルカロイドで、マウスを用いた活性試験により骨密度および骨重量の低下を強力に抑制することが見いだされている。また、現在、骨粗鬆症の治療に用いられている薬剤とは作用機序が異なることが示唆されており、新しいタイプの骨粗鬆症治療薬のリード化合物として注目されている(Figure 1)。[1-4]

Norzoanthamineは5 kgのスナギンチャクから得られる量が約20 mgとわずかであり、天然からの供給が困難であるため合成研究が盛んに行われ、2004年には宮下正昭先生、谷野圭持先生らにより見事な全合成が達成されている。[5] しかし、合成には40以上の工程を要するため化学合成による供給が容易であるとは言えない。

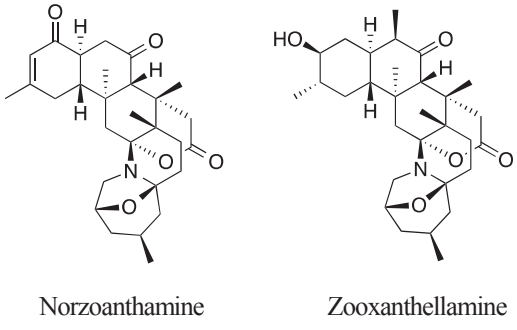


Figure 1. Structures of Norzoanthamine and Zooxanthellamine.

一方、1995年に中村英士先生らは、無腸動物*Amphiscolops* sp. の共生渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp.(Y-6株)から、Norzoanthamineと構造が類似する炭素数30のアルカロイドであるZooxanthellamineを単離、構造決定している(Figure 1)。[6] また、申請者が2012年に沖縄で採取した *Amphiscolops*属の無腸動物から分離した渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp.(7-4S株)も、予備実験の結果からNorzoanthamine関連化合物を生産することが示唆されており培養法も確立していたため、渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp.(7-4S株)から新しいタイプの骨粗鬆症治療薬のリード化合物となるNorzoanthamine関連化合物を獲得することを目的として研究を開始した。

2．結果と考察

2-1. Compound Aの単離

沖縄県で採取した無腸動物*Amphiscolops* sp.の体内より分離した*Symbiodinium*属の渦鞭毛藻7-4S株を、海水培地を用いて24℃で16時間明期、8時間暗期のサイクルで3週間静置培養した。培養上清25 Lをダイアイオン HP20カラムに付した後、水で無機物を除き、メタノールおよびアセトンで有機物を溶出させた。この操作を4回繰り返して得られたメタノール溶出画分を有機溶媒(*n*-ヘキサン、トルエンおよび*n*-ブタノール)と水で順次分配した。*n*-ヘキサン可溶画分およびトルエン可溶画分を各種クロマトグラフィーを用いて分離し、各画分に含まれる化学成分の精査を行なったが、Norzoanthamine関連化合物の単離には至らなかった。しかし、トルエン可溶画分をシリカゲルカラムおよびC_{18} HPLCを用いて分離した結果、新規12員環マクロリドであるCompound A を単離することに成功した。

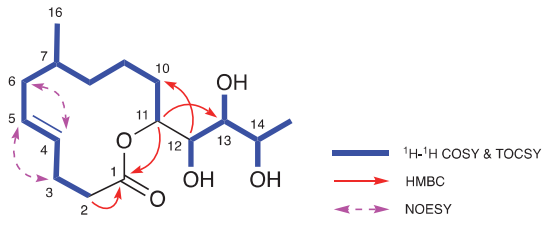


Figure 2. Selected 2D NMR correlations for Compound A.

2-2. Compound Aの平面構造の解析

Compound Aは、光学活性な無色の非結晶性固体として得られた。IRスペクトルにおいては、水酸基やカルボニル基に由来すると考えられる吸収が観測された。また、高分解能ESIMSより分子式は$C_{16}O_5H_{25}$であることが明らかになった。

重クロロホルム中で測定した^{1}H NMRスペクトルでは、5.35 ppmに二重結合の水素のシグナル、5.27 ppmにエステル結合したオキシメチンの水素のシグナルが観測された。2.3~4.0 ppmには水酸基が結合したオキシメチンの水素のシグナルとそれらに結合した水酸基の水素のシグナルが観測された。また、1.7~2.6 ppmにはカルボニル基あるいは二重結合に隣接するメチレンの水素、0.9~2.4 ppmにはその他のメチレンおよび末端または分岐メチル基の水素のシグナルが観測された。

^{1}Hおよび^{13}C NMRデータとHSQCスペクトルの解析から、Compound Aは、1個のカルボニル炭素、2個のsp^{2}メチン、5個のsp^{3}メチン、6個のsp^{3}メチレン、2個のsp^{3}メチルから構成されていることが明らかになった。

Compound Aの平面構造は2D NMRの解析により明らかになった(Figure 2)。^{1}H -^{1}H COSYおよびTOCSYスペクトルにおける相関から、C-2~C-11、C-7－C-16およびC-12~C-15、C-12－12-OH、C-13－13-OH、C-14－14-OHの2個の部分構造の存在が明らかになった。これらの部分構造のつながりは、HMBCスペクトルの解析により帰属した。HMBCスペクトルにおいてH-11(δ_H 5.26)とC-13(δ_C 72.7)、H-12(δ_H 3.45)とC-10(δ_C 50.2)の間に相関が観測されたことから、11位と12位が結合していることが分かった。エステル結合した11位のオキシメチン(δ_H 5.26; δ_C 71.0)の水素およびカルボニル炭素に隣接する2位のメチレン(δ_H 2.53, 2.41; δ_C 35.5)の水素と1位のカルボニル炭素(δ_C 174.6)の間にHMBC相関が観測されたことから2位と11位はエステル結合を介して結合していると帰属した。また4位の二重結合は、NOESYスペクトルにおいてH-3(δ_H 2.39)とH-5(δ_H 5.35)の間およびH-4(δ_H 5.35)とH-6b(δ_H 1.75)の間に相関が観測されたことから*E*配置であると帰属した。

以上の解析結果から、Compound Aの平面構造が明らかになった(Figure 2)。

2-3. Compound Aの相対立体配置の解析

Compound AのC-11~C-14部分の相対立体配置は、*J*-based configuration analysis(JBCA)法[7]を適用することにより帰属した。^{1}H -^{1}H間の結合定数は分解能向上^{1}H NMR(ウィンドウ関数としてsine-bell関数を用いた)より算出し、^{1}H -^{13}C間の結合定数は、HETLOCおよび*J*-resolved HMBCスペクトルより算出した。

^{1}H NMR、HETLOCおよび*J*-resolved HMBCスペクトルの解析から得られた結合定数に加えNOESYスペクトルで観測された相関をまとめ、JBCA法の判断基準と照らし合わせると、C-11－C-12、C-12－C-13、C-13－C-14のコンホメーションはそれぞれFigure 3に示したNewman投影式のようになり、これらをつなぎ合わせることにより、C-11~C-14部分の相対立体配置を11*R**、12*R**、13*R**、14*S**と帰属した。

7位の相対立体配置は以下の様にして推定した。分子モデリングソフトウェアSpartan'16を用いて、Compound Aの7*R**, 11*R**, 12*R**, 13*R**, 14*S**体と7*S**, 11*R**, 12*R**, 13*R**, 14*S**体について、それぞれ10,000個のコンホマーを発生させ、MMFF94力場を用いて力場計算を行った。安定なコンホマー上位100個を選択し、

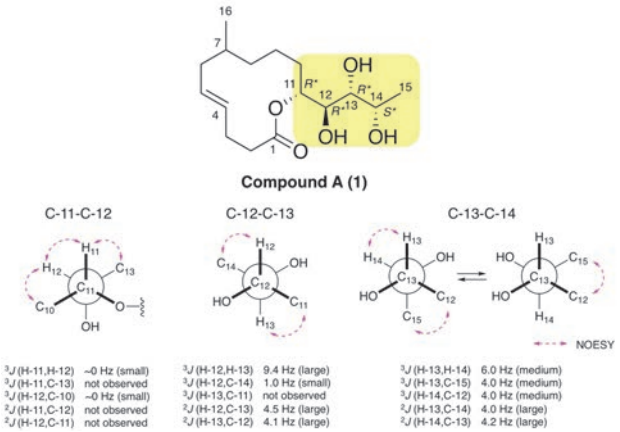


Figure 3. Relative configuration for C-11~C-14 part of Compound A.

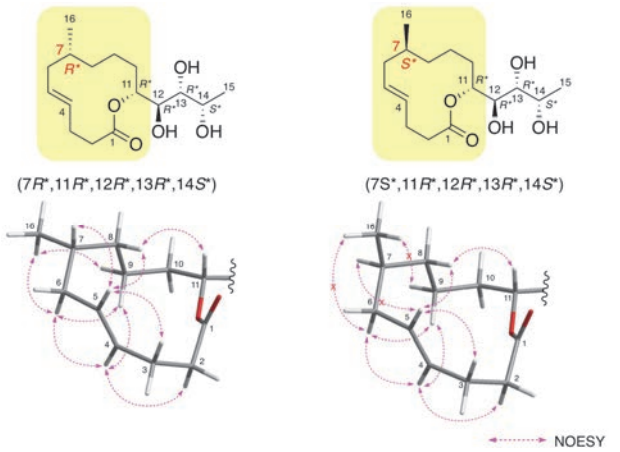


Figure 4. Most stable conformers for 7*R** and 7*S** isomer of Compound A with observed NOESY correlations for Compound A.

Hartree-Fock(3-21G)計算およびDFT(EDF2/6-31G*)計算により、さらに構造最適化を行った。7*R**体と7*S**体それぞれについて、Bolzmann分布が0.1%以上のコンホマー(それぞれ18個、20個)のコンホメーションを比較したところ、両ジアステレオマーとも全てのコンホマーのマクロラクトン環部分のコンホメーションはほぼ同一であった。Figure 4には両ジアステレオマーの最安定コンホマーのマクロラクトン環部分と実際のNOESYスペクトルから得られた相関を示している。NOESY相関は7*R**体の構造を良く支持しており、特にH-5とH-7の間、H-6bとH_3-16の間、H-9とH_3-16の間のNOESY相関は、7*S**体で観測されないと考えられるため、7位の相対立体配置を*R**配置であると帰属した。

さらにDFT計算を用いたNMRケミカルシフト値の予測からも7位の相対立体配置を検証した。DFT計算で構造最適化したコンホマーのうち、Bolzmann分布が0.1%以上のコンホマーについて存在比を加味したケミカルシフト値の予測を行い、重クロロホルム中で測定したCompound Aのマクロラクトン環部分の^{13}C NMRのケミカルシフト値と計算により得られたケミカルシフト値の差を求めた。Figure 5に示す通り7*R**, 11*R**, 12*R**, 13*R**, 14*S**体の方が実測値と計算値の差が小さく、本結果からも7位の相対立体配置が*R**配置であることが支持された。

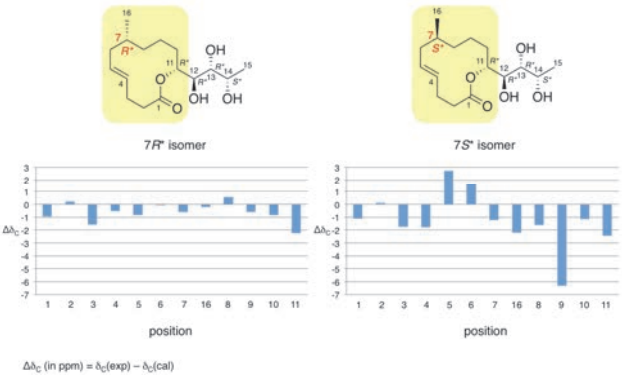


Figure 5. Differences between experimental and calculated ^{13}C NMR chemical shifts of Compound A.

2-4. Compound Aの絶対立体配置に関する考察

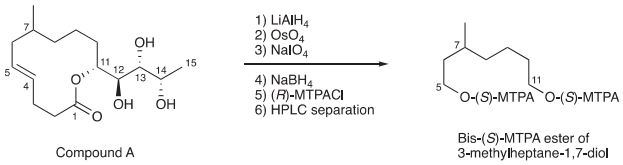
Compound Aの絶対立体配置は、12位、13位、14位に連続して存在する3個の2級水酸基のうち２個をアセトナイドで保護した後、残る1個の2級水酸基の絶対立体配置を改良Mosher法[8]により決定することで、相対立体配置から帰属できると考えている。

また、Compound Aの7位の絶対立体配置を、以下のような方法で直接決定することも考えている。すなわちCompound Aのエステル結合を$LiAlH_4$で還元しOsO_4で二重結合を酸化した後、$NaIO_4$で酸化分解して得られるアルデヒドを$NaBH_4$で還元してアルコールへと導く。得られたアルコールを(*R*)-MTPAClで処理した後HPLCで精製し、3-methylheptane-1,7-diolのBis-(*S*)-MTPAエステル体を得る。

Compound A から得られた3-methylheptane-1,7-diolのBis-(*S*)-MTPAエステル体の^{1}H NMRスペクトルが、別途合成した(*R*)-3-methylheptane-1,7-diolのBis-(*S*)-MTPAエステル体のものと一致すればCompound Aの7位の絶対立体配置は*R*配置、Bis-(*R*)-MTPAエステル体のものと一致すれば*S*配置と決定できる。

2-5. Compound Aの生合成に関する考察

渦鞭毛藻の生産するポリケチドは、他の生物種がもっている既知のポリケチド生合成経路だけでは説明できな



Scheme 1. Degradation of Compound A.

い未解明の特異なポリケチド生合成経路により生合成されていることが知られている。[9] 既知のポリケチド生合成経路で生合成されるポリケチドのポリケチド鎖は、酢酸の2炭素がそのまま直列に繋がって構成されている。その結果、ポリケチド鎖の炭素数は通常偶数である。また、酸素原子に結合した炭素は、通常酢酸のカルボニル炭素に由来するため、末端のカルボニル基の炭素から数えてポリケチド鎖の奇数番目に位置する。一方、分岐メチル基をもつ炭素は、通常酢酸のメチル基の炭素に由来するため、ポリケチド鎖の偶数番目に位置する。

Figure 6には、^{13}Cラベル酢酸の投与実験により明らかにされたAmphidinolide　T１(*Amphidinium*属の渦鞭毛藻が生産するマクロリド)を構成する炭素の由来を示している。[10] Amphidinolide Ｔ１のポリケチド鎖には、そのまま取り込まれた酢酸の2炭素に加え、酢酸のメチル基に由来する1炭素のみが単独で取り込まれた箇所が複数存在する。また、酸素原子に結合した炭素は、そのまま取り込まれた酢酸のカルボニル炭素に加え、単独で取り込まれた酢酸のメチル基由来の1炭素にも由来し、分岐メチル基をもつ炭素は、そのまま取り込まれた酢酸のカルボニル炭素または単独で取り込まれた酢酸のメチル基由来の1炭素に由来する。

これらの現象は、他の属の渦鞭毛藻が生産するポリエーテル毒などにも共通して見られる特徴で、これにより渦鞭毛藻の生産するポリケチドのポリケチド鎖の炭素数は必ずしも偶数ではなく、酸素原子や分岐メチル基に結合した炭素の位置も制約を受けない。

Compound Aの構造の特徴として、ポリケチド鎖の炭素数が15であること、11位、12位、13位、14位に酸素原子が結合した炭素が連続して存在すること、7位に分岐メチル基をもつことが挙げられる。これらの特徴は、Compound Aが渦鞭毛藻の特異なポリケチド生合成経路により、生合成されていることを示唆している。

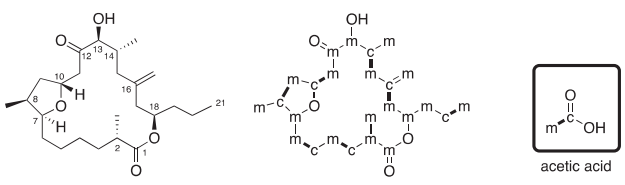


Figure 6. Structure and origin of carbons of Amphidinolide T1.

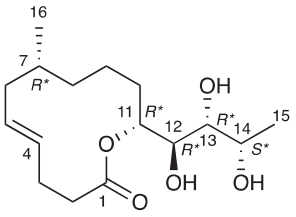


Figure 7. Structure of Compound A.

3．まとめ

沖縄県で採取した*Amphiscolops*属の無腸動物から分離した*Symbiodinium*属の渦鞭毛藻7-4S株の培養上清から、新規12員環マクロリドであるCompound Aを単離し、各種スペクトルデータに基づき、相対立体配置を含めて構造を明らかにした。Compound Aは、4位に*E*配置の二重結合、7位に分岐メチル基、12、13、14位に連続して水酸基をもつ炭素鎖長15の新規12員環マクロリドである(Figure 7)。

現在、Compound Aの生物活性の評価に向けて準備を進めている。また、新しいタイプの骨粗鬆症治療薬のリード化合物となるNorzoanthamine関連化合物の獲得を目指し、渦鞭毛藻*Symbiodinium* sp.(7-4S株)の培養上清から得られた未分離の画分および藻体に含まれる化学成分の精査を継続して行なっている。

4．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。

5．文献

1) Fukuzawa, S.; Hayashi, Y.; Uemura, D.; Nagatsu, A.; Yamada, K.; Ijuin, Y. *Heterocycl. Commun.* **1995**, *1*, 207-214.

2) Kuramoto, M.; Hayashi, K.; Fujitani, Y.; Yamaguchi, K.; Tsuji, T.; Yamada, K.; Ijuin, Y.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5683-5686.

3) Kuramoto, M.; Hayashi, K.; Yamaguchi, K.; Yada, M.; Tsuji, T.; Uemura, D. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 771-779.

4) Yamaguchi, K.; Yada, M.; Tsuji, T.; Kuramoto, M.;

Uemura, D. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 920-924.
5) Miyashita, M.; Sasaki, M.; Hattori, I.; Sakai, M.; Tanino, K. *Science* **2004**, *305*, 495-499.
6) Nakamura, H.; Kamase, Y.; Maruyama, K.; Murai, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 781-787.
7) Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866-876.
8) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.
9) Van Wagoner, R. M.; Satake, M.; Wright, J. L. C. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1101-1137.
10) Kobayashi, J.; Kubota, T.; Endo, T.; Tsuda, M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 134-142.

申請者　東北大学　菊地　晴久

植物資源の多様性拡大抽出物を活用した新規天然化合物類縁体ライブラリーの構築

東北大学　大学院薬学研究科
菊地　晴久

1．はじめに

天然物化学は、新規な分子骨格と薬理活性を有する天然由来化合物を生命科学の様々な分野に提供するという重要な役割を担っている。創薬においても、これまでに数多くの天然由来化合物が医薬品そのものとして、あるいはそのシード化合物として利用されてきた。このような天然由来化合物の有用性をもたらしている要因はいくつか挙げられるが、最も大きい要因はその高度な構造多様性であると考えられている。[1] しかし、天然由来化合物の探索は膨大な種類の生物資源を材料として古くから旺盛におこなわれているため、新規骨格を含む化合物の発見が困難になっているのが現状であり、創薬における役割も相対的に低下している。したがって、今後も天然物化学が創薬に貢献していくためには、多様な構造を有した天然化合物あるいは天然化合物類縁体を提供していくための新たな手法を開発する必要がある。

一方、多様性指向型合成(diversity-oriented synthesis)は、共通の中間体に対してその分子骨格を変化させる反応をおこなうことで、構造多様性の高い化合物群を取得するための戦略である。[2] 多様性指向型合成によって得られた化合物群は、天然由来化合物と同等あるいはそれ以上の構造多様性を示すことから、創薬における有用な化合物ライブラリーとして近年注目されている。

我々は、従来から行われてきた天然由来化合物の探索研究に多様性指向型合成の考え方を組み合わせた新たな手法である「多様性拡大抽出物(diversity-enhanced extract)」を開発してきた(図１)。[3-5] 本手法では、天然資源の抽出物に対して直接、化合物の分子骨格を変化させるような反応を行うことで、それに含まれる化合物の構造多様性が一層高められた多様性拡大抽出物が得られる。これをカラムクロマトグラフィ等で各化合物を単離・精製することで、構造多様性の高い天然化合物類縁体ライブラリーを取得するという手法である。

本手法は新規骨格を有する化合物群を得る手段として有用であるが、実際に創薬等に役立つような化合物ライブラリーとするためには、単に分子骨格が新しいというだけでは不十分である。そこで、本研究では、これまでに知られている薬理活性天然化合物や医薬品の構造を参考にして薬理活性指向型化合物ライブラリーの構築を行うことを目的とした。

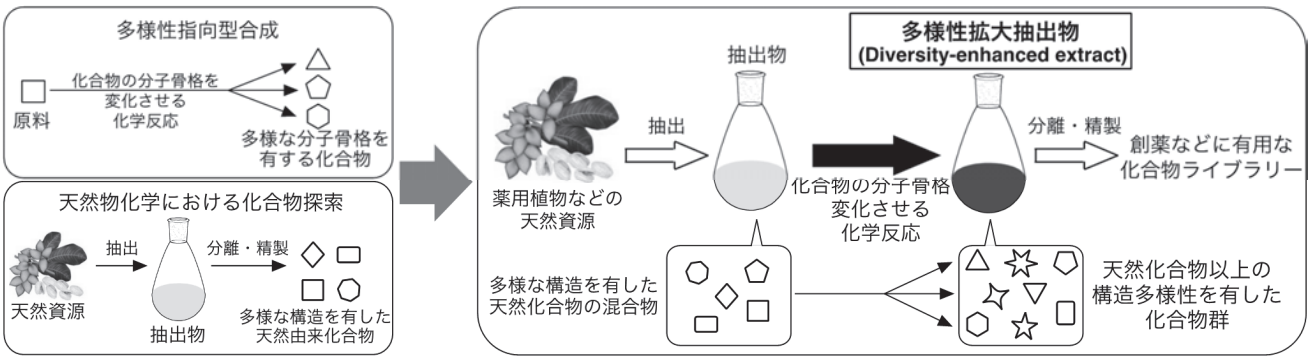


図１　多様性拡大抽出物のコンセプト

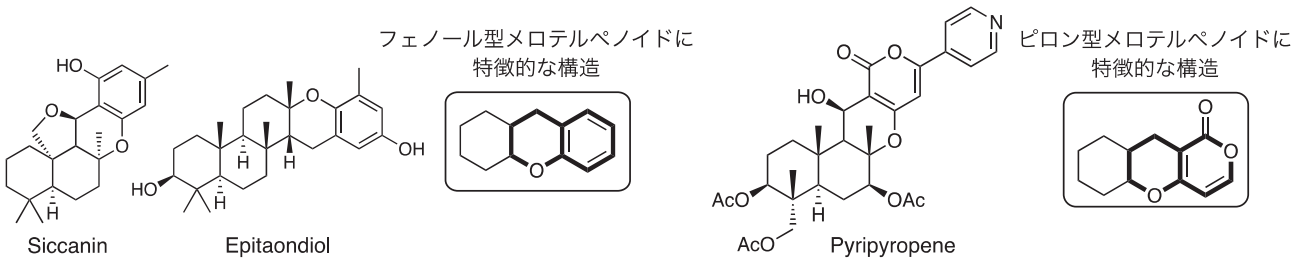


図2　メロテルペノイドに見られる特徴的な構造

2．メロテルペノイド型化合物ライブラリー

メロテルペノイドは、テルペノイドとそれ以外の生合成経路由来の構造を併せ持つハイブリッド型天然化合物であり、強力な薬理活性を示す化合物も数多く知られている。[6] その大部分はテルペノイドとポリケチドとが融合した構造をもっているが、そのなかでも、例えばsiccaninやpyripyropene Aのように、立体的な広がりをもったテルペノイド部分と平面性の高いポリケチド部分(ベンゼン環・ピロン環など)とが環状エーテル構造を介して結合している化合物が多く存在する。したがって、多様性拡大抽出物を利用して、天然に存在するテルペノイド型化合物にフェノール類またはヒドロキシピロン類を結合・環化させれば、非天然型のメロテルペノイド類縁体を得ることができると考えた(図2)。

原料となる天然資源としてガジュツ*Curcuma zedoaria*やハマスゲ*Cyperus rotundus*(生薬名コウブシ)、オケラ*Atractylodes japonica*(生薬名ビャクジュツ)を用いた。これらの植物はいずれもケトン構造をもったセスキテルペン類を多く含んでいるため、まずその抽出物に対してDIBALを作用させて、含まれる化合物中のケトンを第二級アルコールへと還元した。つづいて、光延反応によって*o*-ヨードフェノール誘導体**A**とエーテル結合させ、さらにパラジウム触媒存在下、溝呂木-Heck反応をおこない、環状エーテル構造を形成させることで多様性拡大抽出物とした。これを分離することで、非天然型骨格を有するフェノール型メロテルペノイド類縁体**1-7**を得た。また、*o*-ヨードフェノール誘導体**A**の代わりにヒドロキシヨードピロン誘導体**B**を用いることで、ピロン

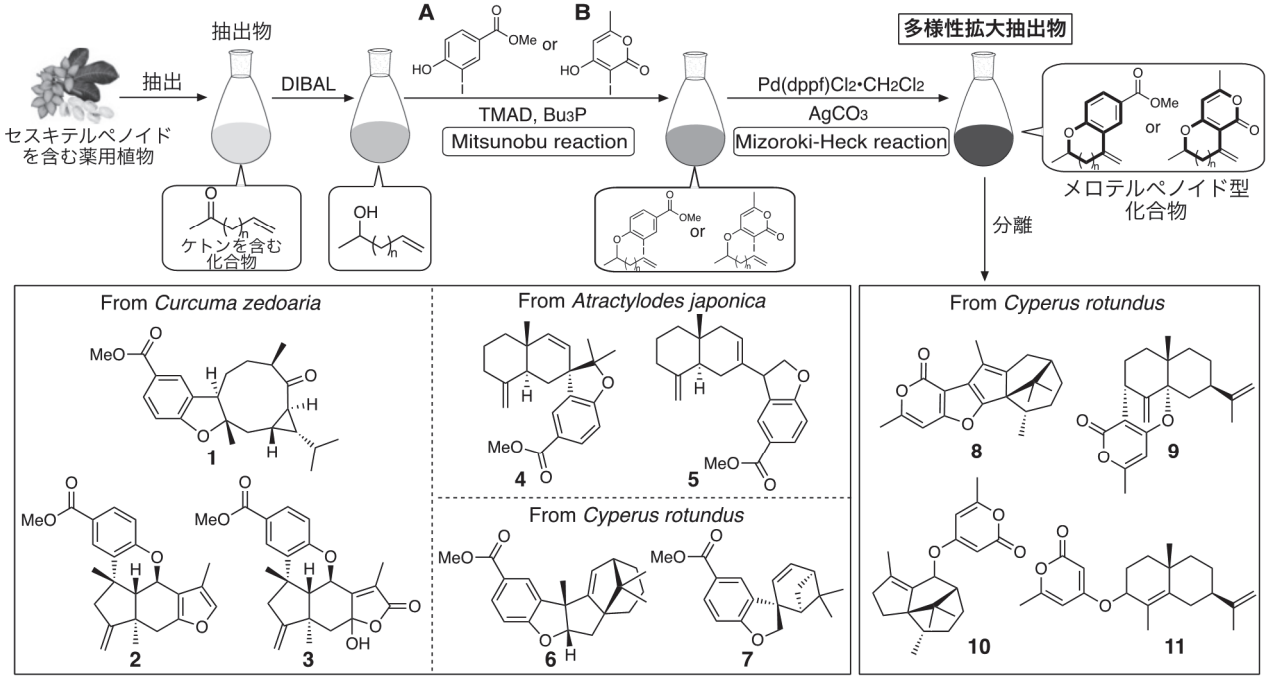


図3　多様性拡大抽出物より得られたメロテルペノイド型化合物群

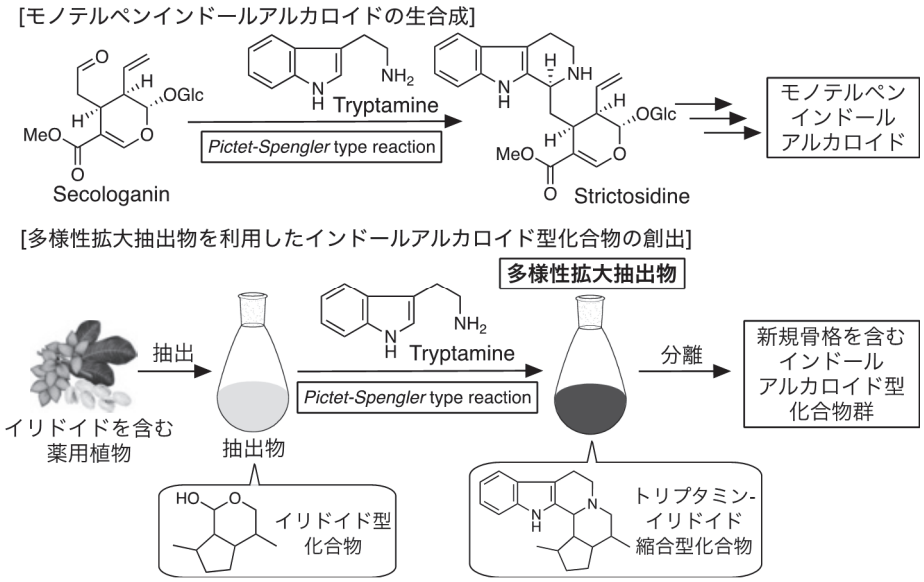


図4　新規骨格を有するインドールアルカロイド型化合物を取得するための戦略

型メロテルペノイド類縁体**8-11**を得た(図３)。

３．モノテルペンインドールアルカロイド型化合物ライブラリー

モノテルペンインドールアルカロイドは、天然由来化合物の中でも特に多様な薬理活性を有する化合物群であり、医薬品あるいはそのリード化合物として利用されている化合物も数多く知られている。[7] 天然に存在するほぼ全てのモノテルペンインドールアルカロイドは、tryptamineとセコイリドイド配糖体secologaninとのPictet-Spengler型反応によって生じるstrictosidineを経由して生合成される。[7] ここでもし、secologaninではなく他のモノテルペノイドをtryptamineと縮合させることが出来れば、非天然型の骨格を有したモノテルペンインドールアルカロイドを得ることができる。そのような試みを、多様性拡大抽出物を用いておこなうことにした(図４)。

原料となる天然資源として、イリドイド配糖体を多く含む植物(サンシュユ(*Cornus officinalis*)、クチナシ(*Gardenia jasminoides*))を用いた。これらの抽出物は大量の糖を含むため、まず活性炭を用いたカラムクロマトグラフィによって糖を除いた後、β-グルコシダーゼを作用させて抽出物中に含まれるイリドイド配糖体を脱グルコシド化した。さらにルイス酸触媒下tryptamineを作用させることでPictet-Spengler型に縮合した化合物群を含む多様性拡大抽出物を得た。これを分離した結果、モノテルペンインドールアルカロイド類縁体としてサンシュユから**12-15**を、クチナシから**16-22**をそれぞれ得た(図５)。[8] また、イリドイド配糖体を含む植物センブリ(*Swertia japonica*)の抽出物についても同様に処理することで化合物**23**を得た。これらの化合物のうち、化合物**11**および**15-17**は天然に存在するモノテルペンインドールアルカロイドには見られない非天然型五環性骨格を、化合物**18**はより複雑な非天然型六環性骨格を有していた。

得られたモノテルペンインドールアルカロイド型化合物ライブラリーの応用として、近年新たながん治療法として注目されている免疫チェックポイント阻害作用[9] に関するスクリーニングをおこなった。その結果、化合物**12**が免疫チェックポイント分子CTLA-4の遺伝子発現とそれに関連する免疫制御性サイトカインIL-10の産生に対して有意に阻害作用を示し、低分子による免疫チェックポイント阻害剤のリード化合物になりうることが明らかとなった。このことは、多様性拡大抽出物に基づく天然化合物類縁体ライブラリーが、創薬研究にも応用可能であることを示す結果である。

以上のように、多様性拡大抽出物を用いることで、薬用植物などの容易に入手可能な天然資源から、新規骨格を有する多くの天然化合物類縁体を得ることができた。

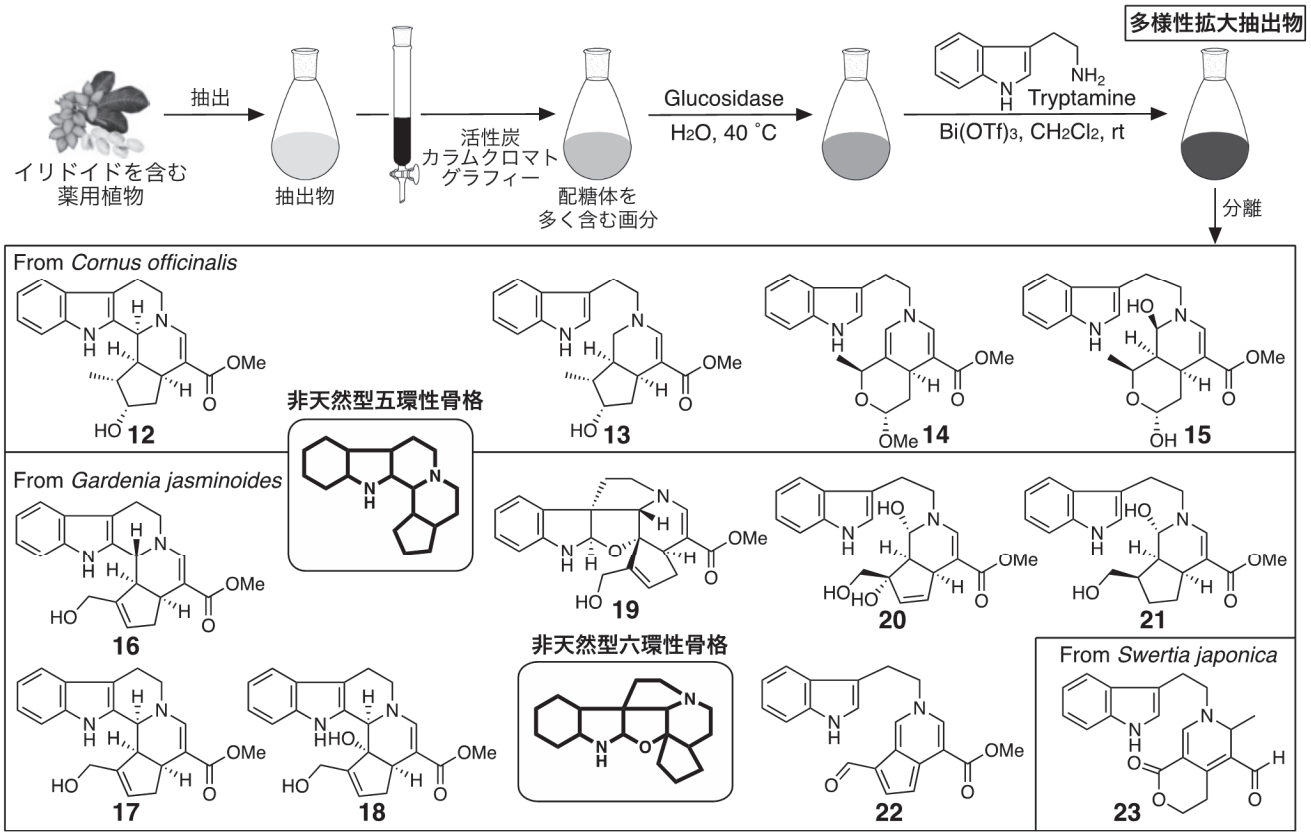


図5　多様性拡大抽出物より得られたモノテルペンインドールアルカロイド型化合物群

今後さらに、創薬研究に十分利用できる構造多様性の高い化合物ライブラリーの構築を進めていきたい。

謝辞

本研究は東北大学大学院薬学研究科医薬資源化学分野でおこなわれたものであり、多くのご助言をいただいた大島吉輝教授(現・名誉教授)、ならびに昼夜を問わず実験を進めてくれた多くの学生諸氏に心より御礼申し上げます。また、本研究は松籟科学技術振興財団の支援を受けておこなわれたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. M. Feher and J. M. Schmidt, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 218-227.
2. (a) S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *287*, 1964-1969. (b) M. D. Burke, E. M. Berger and S. L. Schreiber, *Science* **2003**, *302*, 613-618. (c) M. D. Burke and S. L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 46-58.
3. H. Kikuchi, K. Sakurai and Y. Oshima, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1916-1919.
4. H. Kikuchi and Y. Oshima, 有機合成化学協会誌 **2017**, *75*, 349-359.
5. H. Kikuchi and Y. Oshima, *Heterocycles* **2018**, *in press* (DOI: 10.3987/REV-18-885).
6. R. Geria and J. S. Thomas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1063-1094.
7. S. E. O'Connor and J. Maresh, *J. Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 532-547.
8. H. Kikuchi, K. Ichinohe, S. Kida, S. Murase, O. Yamada and Y. Oshima, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5948-5951.
9. (a) D. M. Pardoll, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 252-264. (b) P. Sharma and J. P. Allison, *Science* **2015**, *348*, 56-61. (c) J. L. Adams, J. Smothers, R. Srinivasan and A. Hoos, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2015**, *14*, 603-622.

申請者　東京大学　岡田　憲典

適応代謝産物モミラクトン生産植物における アレロパシー耐性機構の解明とその利用

東京大学　生物生産工学研究センター
岡田　憲典

1．はじめに

ジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトンは、イネが生産する二次代謝産物（ここでは適応代謝産物と称する）であり、病原菌感染時の防御物質として、また、近傍の植物の生育を妨げるアレロパシー物質として機能する。イネ以外のモミラクトン生産植物としては、最近、水田雑草のイヌビエが、いもち病菌の感染によって誘導的にモミラクトンを生産することが明らかになった[1)]。また、アジアに広く生育している蘚類ハイゴケは、下等植物では唯一のモミラクトン生産植物として報告されている。これらの植物は生物的・非生物的ストレスに応答しモミラクトンを生産誘導することから、その生産制御機構の解明は、耐病性向上や雑草耐性向上の観点からイネの有用形質の増強につながる戦略のひとつとして着目されている。筆者らはこれまでに、イネとハイゴケにおいてストレス応答的に生産されるモミラクトンの生合成経路と制御機構に関する研究を進めてきた。

モミラクトンなどの植物の適応代謝産物の中には、高等生物では希有であるが、ゲノム上において生合成遺伝子群がクラスターを形成する場合がある。筆者らは、イネのモミラクトン生合成遺伝子探索の過程で、ジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトンの生合成遺伝子クラスターの存在を、その酵素活性と共に証明した[2)]。現在までに高等植物における適応代謝産物の遺伝子クラスターが10例以上報告されている[3, 4)]。また、多くのクラスター内の遺伝子群は、ある特定の組織での同調的な発現を示すことが報告されているものの、その転写制御機構は明らかにされていない。一方、筆者らは、イネの病害抵抗性発現時にファイトアレキシンの生産が誘導を受けることから、病害応答性の転写因子に着目し、ファイトアレキシンの生産制御に関与するbZIP型転写因子としてOsTGAP1を見出した[5, 6)]。これにより、イネのモミラクトン生合成遺伝子クラスターの同調的な転写制御の解明の糸口が開かれ、高等植物の遺伝子クラスターを転写制御の観点から解析した数少ない研究のひとつとなった。筆者らによるこれまでの研究によって、主にイネの根で働くOsTGAP1のゲノム上の結合領域を特定し、ファイトアレキシン生合成の上流経路であるメチルエリスリトールリン酸経路の初発酵素遺伝子*OsDXS3*の制御がOsTGAP1の機能の一つであることを明らかにしている[6, 7)]。また、さらに多くのファイトアレキシン生産制御に関与する転写因子も見出しており、ファイトアレキシン生合成遺伝子クラスターの転写制御解析において、世界をリードしつつ研究を展開している[8, 9)]。

イネにおいてモミラクトンは病原菌感染などで誘導されるが、アレロパシー物質としては根において恒常的に生産・分泌され、実際に水田雑草の成育に影響を与える[10)]。一方、蘚類ハイゴケにおいても、アレロパシー物質としてモミラクトンが恒常的に生産されることが報告されていたが、その生合成経路についての情報はなかった。筆

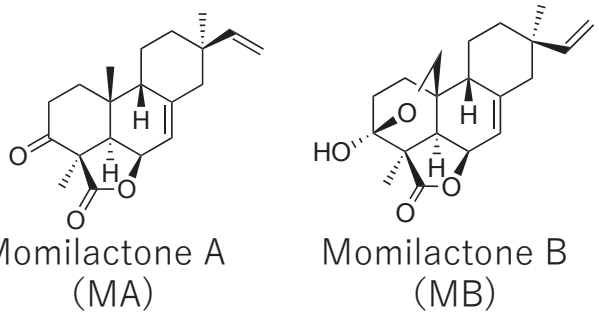


図1　Momilactoneの化学構造
イネではMAが植物体内では多く蓄積し、根からの滲出はMBの方が多く、アレロパシー活性もMBの方が強いとされる。

者らはハイゴケのモミラクトン生産が塩化銅処理により誘導を受けることから、誘導条件下でのRNAシーケンスを行い、モミラクトン生合成に関わるピマラジエン合成酵素遺伝子*HpDTC1*とモミラクトン合成酵素遺伝子*HpMAS*を同定した。さらに、これら2つの遺伝子の発現は、灰色カビ病菌*Botrytis cinerea*の感染によっても誘導を受けることから、モミラクトンはハイゴケの病害抵抗性にも関与することを示した[11]。

このような背景のもと本研究では、進化的にかけ離れたハイゴケとイネが、いつ、どうやってモミラクトン合成能を獲得してきたのかと言う疑問を明らかにすること、また、このようなモミラクトン生産植物自身が、どのように生物活性の高いモミラクトンに対する耐性能を発揮しているのかについて明らかにすることを目指した。

2．結果と考察

2.1　ハイゴケのゲノムシーケンス

クラスター起源について、イネとはかけ離れたモミラクトン生産植物であるハイゴケのゲノム情報を得るため、次世代シーケンスを駆使したゲノム配列情報の取得を浙江大学との国際共同研究として進めた。その結果、モミラクトン生合成遺伝子の2種の他に、シトクロムP450酸化酵素遺伝子を含む遺伝子クラスターの存在が明らかになってきた。シトクロムP450酸化酵素遺伝子は、アミノ酸配列の比較から、イネの酵素とは異なるクラスに属す遺伝子であり、その酵素反応について、現在機能解析を進めているところである。これらの遺伝子群がすべてモミラクトン生産に必要な機能を保持しているならば、ゲノム上に集まり機能的なクラスターを形成していることになり、下等植物のコケにおいてはじめての二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの存在を示すことになる。現在、論文報告に向けて機能解析を急いでいる。

2.2　野生イネのモミラクトン生産能とクラスター保持の進化的保存性

モミラクトン生合成遺伝子クラスター出現の起源を調べるために、進化的な距離を保つ複数の野生イネを用いて、野生イネにおけるモミラクトン生合成遺伝子クラスターの存在とモミラクトンのストレス誘導的な生産についての関係を検討した。その結果、AAゲノムの野生イネである*Oryza rufipogon*, BBゲノムの*O. punctata*まではモミラクトン生産能とクラスターの保持が確認されたことから、*Oryza*属ではBBゲノムに分岐する祖先種で、すでにモミラクトン生合成遺伝子クラスターが構成されていたものと考えられた。

このように、モミラクトン生合成遺伝子のクラスター化については、*Oryza*属における進化的な起源が明らかになりつつあり、また、ハイゴケの例から、モミラクトンの生合成経路は必ずしも水平伝播による遺伝子クラスターの取り込みが起こったわけではなく、収斂進化によって、モミラクトンの生産能を遺伝子のクラスター化と共に獲得したものと思われる。

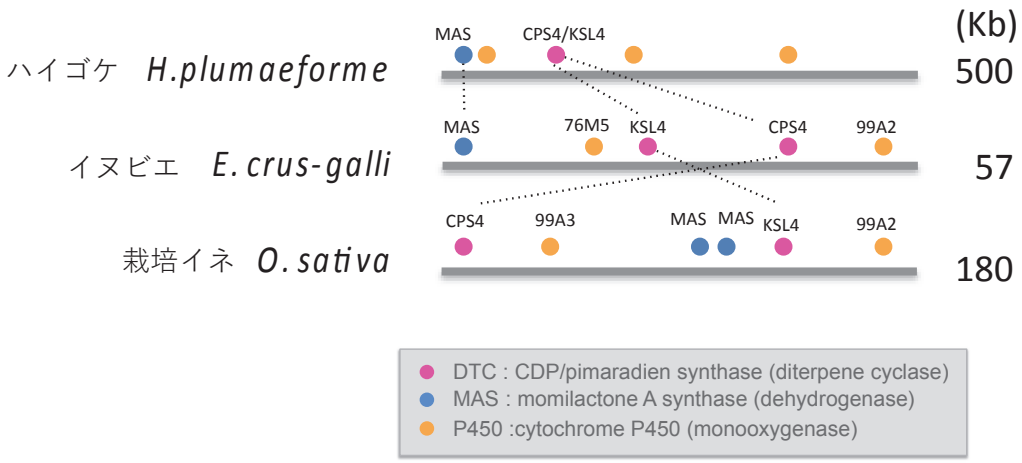
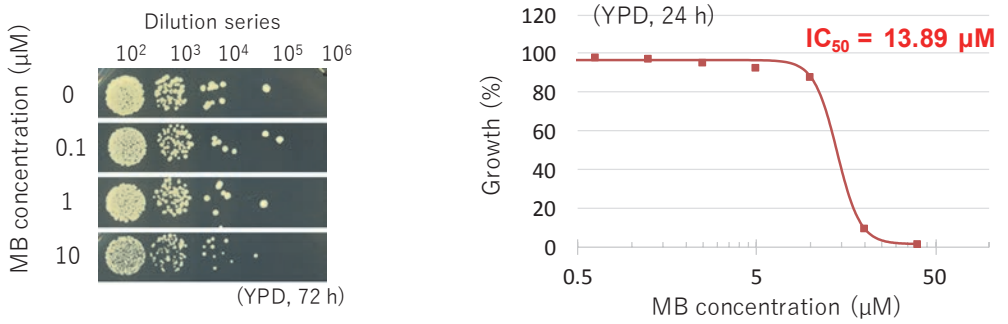


図2　現在までに見出されている3つのmomilactone生合成遺伝子クラスター
下等植物のハイゴケから水田雑草イヌビエと栽培イネに存在するmomilactone　生合成遺伝子クラスターには、生合成遺伝子のほとんどが認められるがシンテニーは低い。

・*Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (*MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*)



・*Schizosaccharomyces pombe* L972 (h^-)

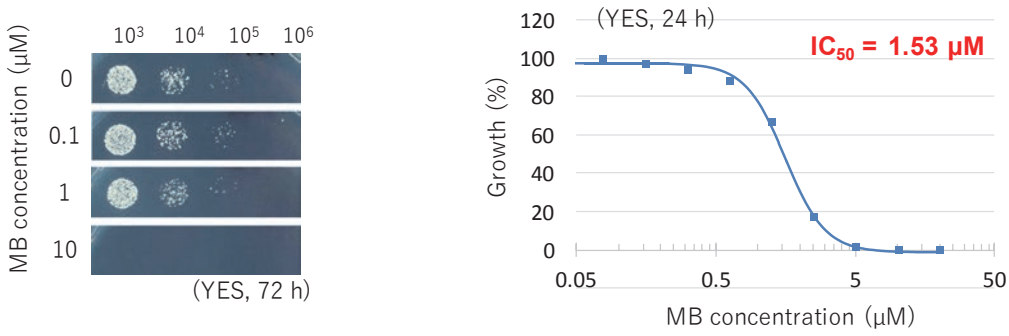


図3　Momilactoneによる酵母の生育阻害効果
Momilactone　Bは出芽酵母と分裂酵母のどちらにも生育抑制効果を示すが、分裂酵母において、より低濃度で効果が現れる。

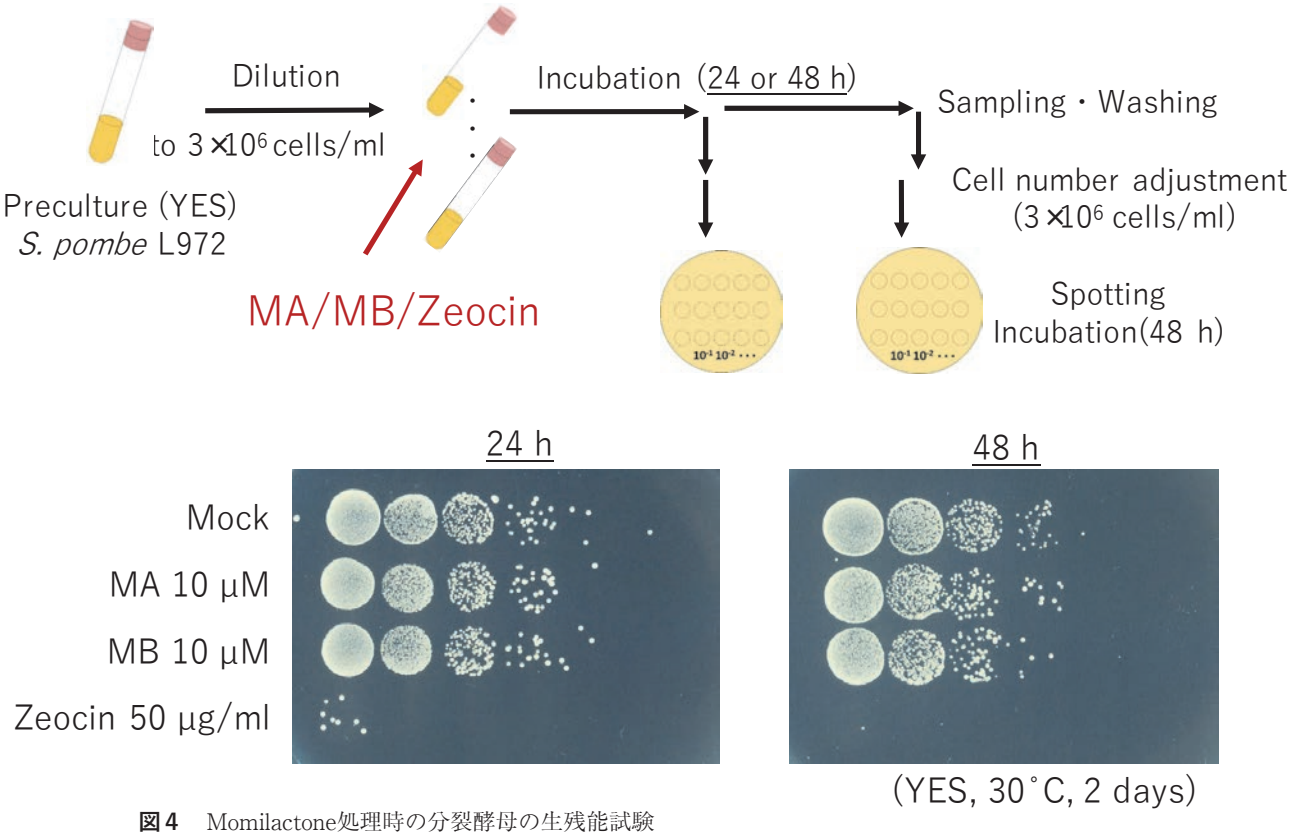


図4　Momilactone処理時の分裂酵母の生残能試験
Momilactone処理によって生育抑制を受けた酵母は、死滅しておらず、生育は未処理と同等に回復する。

2.3　酵母におけるモミラクトンの抗菌活性

モミラクトン生合成遺伝子クラスターの起源については、これまでの研究で多くの情報が得られたが、モミラクトンの作用メカニズムや耐性機構については依然として不明の点が多い。そこで、本研究では、酵母を用いた実験系を利用し、モミラクトンの生物活性と耐性機構に影響を与える遺伝子情報の取得を試みた。まず、モデル実験酵母として出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*と分裂酵母*Shizosaccharomyces pombe*に対するモミラクトンの抗菌効果について調べてみた。その結果、どちらの酵母に対しても，モミラクトンは抗菌効果を示しIC50値は1.5～13μMとなったが、分裂酵母におけるモミラクトン感受性がより高い傾向を示した。また、生残性試験の結果から、このようなモミラクトン効果は酵母に対して致死的には作用しておらず、一時的に生育を抑制していることが明らかとなった。

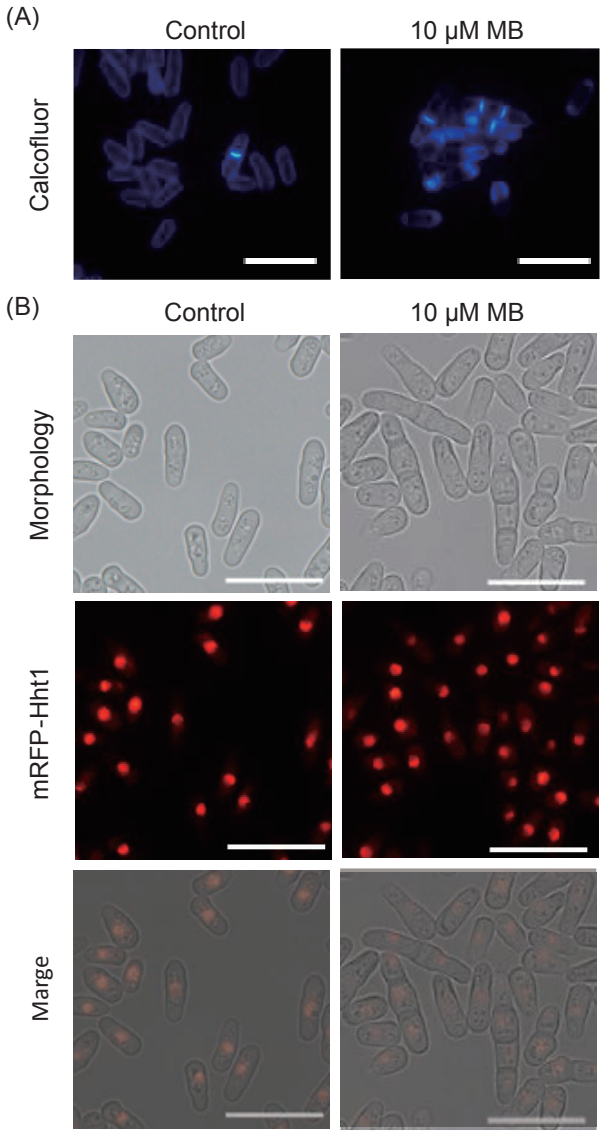


図5　Momilactone処理時の分裂酵母の形態変化
MomilactoneB処理により、異常なセプタム形成が引き起こされ、細胞がつながった酵母が認められる。核の分配は正常に進んでいることがわかる。

2.4　モミラクトン処理による分裂酵母の形態および核相の変化

モミラクトンの生物活性について、動物細胞を用いた研究から細胞増殖や細胞周期に影響を与えることが報告されていた。すなわち、モミラクトンＢ処理後にＧ１アレストやアポトーシスが引き起こされることが示されていた[12]。そこで、モミラクトンＢに対してより感受性の高い*S. pombe*に着目し、顕微鏡下での形態変化および細胞周期の状況を調べた。ヒストンH3であるHht1とのRFP融合タンパク質または核内局在が知られているアクチン関連タンパク質Arp8とのGFP融合タンパク質を発現させた株にモミラクトンＢ処理を行い、核と細胞の状態を蛍光顕微鏡観察したところ、核の分離は正常に進んでいるが、細胞分裂が進まず細胞がつながったマルチセプタムを持つ細胞が見られた。また、セルソーターによる核相の変化を調べてみると、モミラクトンＢ未処理の細胞では2nが多いのに対し、処理によって多核化して4n~8nの核相を示すことがわかった。これらの結果から、モミラクトンＢ処理によって、分裂酵母ではDNAの複製と分離が進み、細胞壁が構築されるが、細胞周期の後半において細胞分離が正常に進んでいないものと思われる。

2.5　モミラクトン耐性酵母のスクリーニング

このような分裂酵母におけるモミラクトンB感受性を回避して耐性を示す酵母のスクリーニングから、その原因遺伝子を取得して、モミラクトンB作用解明の足がかりを得ることを試みた。スクリーニングでは、分裂酵母の遺伝子約5000種が個別に過剰発現した分裂酵母ライブラリーを用い、得られた耐性株が保持する過剰発現遺伝子を特定した。その際、ホストの分裂酵母には、薬剤耐性に関わるABCトランスポーターのPmd1とBfr1を欠損した株を用いて、より低濃度のモミラクトンBでのスクリーニングが可能な系を用いた。その結果、679個を耐性株として取得し、過剰発現遺伝子を同定したところ、その内の約400個は欠損したトランスポーター*pmd1*自

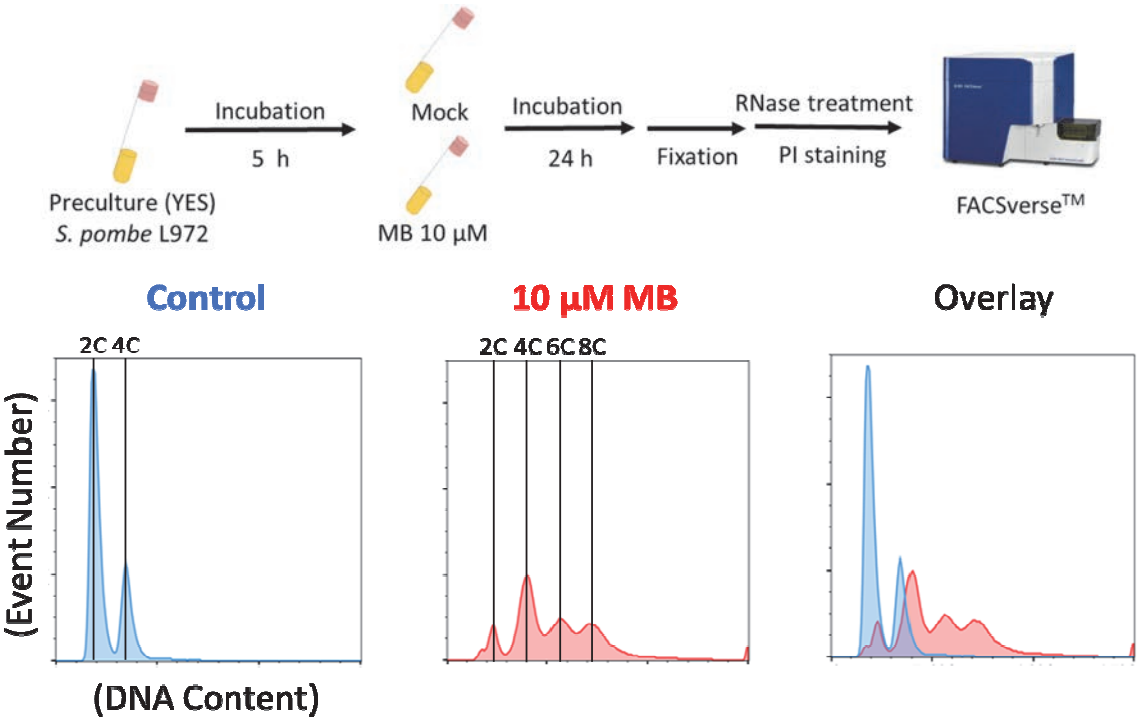
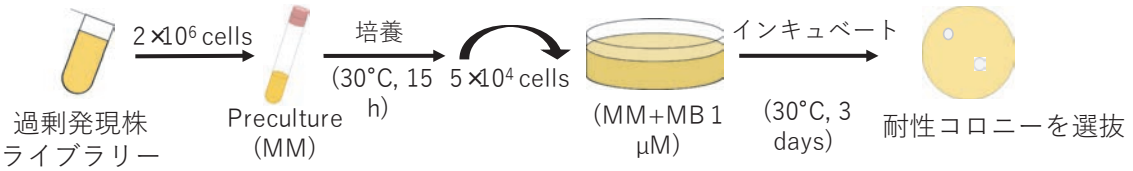
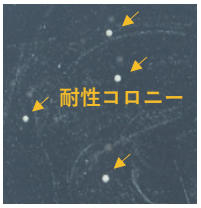


図 6　Momilactone処理時の分裂酵母における核相変化
フローサイトメーターによる観察において、モミラクトンB処理区の分裂酵母では、 DNA含量が倍加した細胞が検出される。

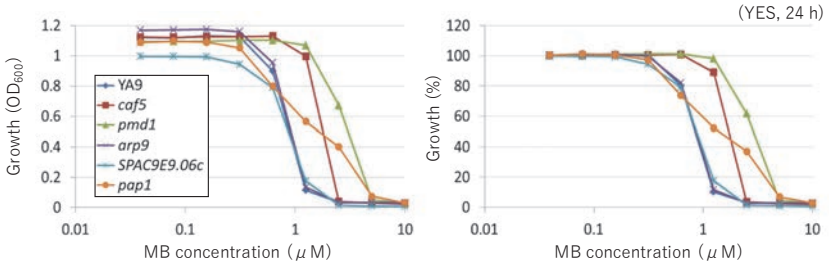




耐性株に組み込まれていた遺伝子

Gene name	Product	Colony number
pmd1	Leptomycin transmembrane transporter	403
caf5	Spermine family transmembrane transporter	243
pap1	AP-1 like transcription factor	31
arp9	SWI/SNF and RSC complex subunit	1
SPAC9E9.06c	Threonine synthase (predicted)	1

MB耐性の再現性確認



各株のIC$_{50}$値

Strain	IC50 (µM)
YA9 (vector control)	0.81
pmd1	2.72
caf5	1.56
pap1	1.45
arp9	0.83
SPAC9E9.06c	0.86

図 7　マルチコピーサプレッションスクリーニングによるmomilactone B耐性因子の探索
２つのトランスポーターがモミラクトンに耐性を付与する遺伝子として得た。また、その制御因子の高発現によってもMB耐性が引き起こされる。同様にmomilactone生産植物がトランスポーターの機能によって自己耐性能を獲得している可能性が考えられる。

身であった。また、カフェインの排出能をもつトランスポーター遺伝子として報告されている*caf5*が、次に多い遺伝子として約200個得られた。さらに、AP-1タイプの転写因子遺伝子としてPap1が約30個得られた。Pap1は*caf5*の転写を誘導する転写因子のCaf3として同定されていたことから、Pap1過剰発現によるトランスポーターCaf5の誘導によって、モミラクトンB耐性が付与されたのではないかと考えられる。その他、いくつかの因子が一次選抜で得られたが、最終的な再現性試験において、ベクターコントロール株と同様の感受性となり、本スクリーニングにおいては、全てトランスポーターそのものか、その発現に関わる制御因子が分裂酵母にモミラクトンB耐性を付与することが明らかになった。

3．まとめと展望

今回の酵母を用いたスクリーニングでは、モミラクトンの作用機作を解き明かすために必要な、直接的なターゲット分子の同定には至らなかった。一方で、分裂酵母の保持するABCトランスポーターが、ジテルペノイドであるモミラクトンBを輸送できることが明らかになり、同様なトランスポーターの植物オルソログを探索することで、モミラクトン生産植物におけるアレロパシー耐性機構の解明につながる糸口が見つかるかも知れない。今後は、モミラクトン耐性を示すコムギなどのモミラクトン生産植物以外の植物を対象とした、モミラクトン処理時の転写変動を調べるなどして、どのようにアレロパシー物質であるモミラクトンBの効果を回避しているのかを明らかにしたい。また、分裂酵母を用いた実験系においては、変異剤処理によっても、モミラクトン耐性株が取得されており、現在、その変異箇所の特定を急いでいる。これらのモミラクトン耐性酵母の解析から、トランスポーターではない新たなモミラクトンBのターゲット分子が見つかることが期待される。

4．謝辞

本研究を進めるにあたり分裂酵母の過剰発現ライブラリーを分与頂き、研究をサポートして頂きました、東京大学 農学生命科学研究科の吉田稔先生、理化学研究所環境資源科学研究センター ケミカルゲノミクス研究グループの八代田陽子先生ならびに松本健先生に感謝申し上げます。分裂酵母の変異体解析では、島根大学 生物資源科学部の川向誠先生、松尾安浩先生にお世話になりました。この場をかりて感謝申し上げます。

5．引用文献

1）Guo L, Qiu J, Ye C, Jin G, Mao L, Zhang H, Yang X, Peng Q, Wang Y, Jia L, Lin Z, Li G, Fu F, Liu C, Chen L, Shen E, Wang W, Wu S, Xia C, Zhang Y, Zhou X, Wang L, Wu L, Song W, Wang Y, Shu Q, Aoki D, Yumoto E, Yokota T, Miyamoto M, Okada K, Kim DC, Cai D, Zhang C, Lou Y, Qian Q, Yamaguchi H, Yamane H, Kong CH, Timko MP, Bai L, Fan L "Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) genome analysis provides insight into its adaptation and invasiveness as a weed." *Nature Communications*. 8(1):1031 (2017)

2）Shimura K, Okada A, Okada K, Jikumaru Y, Ko KW, Toyomasu T, Sassa T, Hasegawa M, Kodama O, Shibuya N, Koga J, Nojiri H, Yamane, H. “Identification of a biosynthetic gene cluster in rice for momilactones" *Journal of Biological Chemistry*, 282, 34013-34018 (2007)

3）Osbourn A. “Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology.” *Plant Physiol*. 154 (2):531-5. (2010)

4）Kliebenstein DJ, Osbourn A. “Making new molecules - evolution of pathways for novel metabolites in plants.” *Curr Opin Plant Biol*. *Aug;15*(4):415-23. (2012)

5）Okada A, Okada K, Miyamoto K, Koga J, Shibuya N, Nojiri H, Yamane H. "OsTGAP1, a bZIP transcription factor, coordinately regulates the inductive production of diterpenoid phytoalexins in rice." *J Biol Chem*. Sep 25;284(39):26510-8. (2009)

6）Miyamoto K, Matsumoto T, Okada A, Komiyama K, Chujo T, Yoshikawa H, Nojiri H, Yamane H, Okada K "Identification of target genes of the bZIP transcription factor OsTGAP1, whose overexpression causes elicitor-induced hyperaccumulation of diterpenoid phytoalexins in rice cells" (2014) *PLOS ONE* Aug 26;9(8):e105823

7）Yoshida Y, Miyamoto K, Yamane H, Nishizawa Y,

Minami E, Nojiri H, Okada K (2017) “OsTGAP1 is responsible for JA-inducible diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice roots with biological impacts on allelopathic interaction.” *Physiol Plant*. Aug 30. doi: 10.1111/ppl.12638.

8) Miyamoto K, Shimizu T, Okada K. "Transcriptional regulation of the biosynthesis of phytoalexin: a lesson from specialized metabolites in rice" (2014) *Plant Biotechnology* 31,377-388 (2014)

9) Schmelz EA, Huffaker A, Sims JW, Christensen SA, Lu X, Okada K, Peters RJ."Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins." (2014) *Plant J* 79(4):659-678

10) Toyomasu T, Usui M, Sugawara C, Otomo K, Hirose Y, Miyao A, Hirochika H, Okada K, Shimizu T, Koga J, Hasegawa M, Chuba M, Kawana Y, Kuroda M, Minami E, Mitsuhashi W, Yamane H.: "Reverse-genetic approach to verify physiological roles of rice phytoalexins: characterization of a knockdown mutant of OsCPS4 phytoalexin biosynthetic gene in rice." (2013) *Physiol Plant*. 150: 55-62

11) Okada K, Kawaide H, Miyamoto K, Miyazaki S, Kainuma R, Kimura H, Fujiwara K, Natsume M, Nojiri H, Nakajima M, Yamane H, Hatano Y, Nozaki H, Hayashi K. HpDTC1, a Stress-Inducible Bifunctional Diterpene Cyclase Involved in Momilactone Biosynthesis, Functions in Chemical Defence in the Moss Hypnum plumaeforme. *Sci Rep*. 2016 May 3;6:25316.

12) Park C, Jeong NY, Kim GY, Han MH, Chung IM, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH. “Momilactone B induces apoptosis and G1 arrest of the cell cycle in human monocytic leukemia U937 cells through downregulation of pRB phosphorylation and induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21Waf1/Cip1.” *Oncol Rep*. Apr;31(4):1653-60. (2014)

申請者　東北大学　木口　賢紀

蛍石型強誘電体薄膜の創製とドメインエンジニアリング

東北大学　金属材料研究所
木口　賢紀

1．研究の背景と目的

ZrO_2、HfO_2及び関連材料は、常圧下で高温側から立方相-正方相-単斜相と逐次相転移を起こす常誘電体である。近年、強誘電性を発現するHfO_2基超薄膜材料が発見され、非鉛かつ非ペロブスカイト型構造の新奇強誘電体材料として注目されている[1-4]。この材料はc軸方向の空間対称性が破れた斜方相HfO_2（空間群$Pca2_1$）を持つ。このHfO_2ベースの強誘電性超薄膜は、膜厚が薄くなってもサイズ効果を示さない画期的な材料である。この事実は、電気双極子である自発分極の長距離相互作用がこの材料の極性発現の直接的な起源ではないことを示しており、ペロブスカイト型強誘電体とは異なる間接型強誘電体であることを示唆している。よって、斜方晶相の結晶構造の対称性が破れるような原子変位、弾性場によって相安定性を制御できうることを示している。ここに、本材料の面白さと革新的特徴がある。しかし、未だ斜方相の単相化や詳細な結晶構造等に関する知見は理解が進んでいないため、斜方相の相・結晶構造の安定性の基礎学理の究明が求められている。

一方、強誘電体・圧電体には、今世紀の大きな課題である電力消費や環境問題解決に向けて、振動発電に代表されるエネルギーハーベスティングや圧電体超薄膜と圧抵抗半導体を利用した低消費電力圧電トランジスタなど大きな役割が期待される。しかし、実用化されているペロブスカイト型強誘電体は、低い絶縁性やサイズ効果による極性の消失など超薄膜化には大きな困難を伴う。本研究で対象とするHfO_2-ZrO_2固溶体薄膜ではこれらの問題を解決可能であることから、上記のデバイスに加えて、二次元ナノレイヤ強誘電体の創製によってこれまで実現困難とされてきた不揮発性と超低消費電力での高速動作性を兼ね備え、高密度化が可能な強誘電体トンネル（Ferroelectric Tunnel Junction; FTJ）メモリを実現することも可能となる。ZrO_2やHfO_2は既にHigh-kゲート絶縁膜材料として超薄膜の形態で既にSiデバイスで実用化されているので、デバイス開発にとっても既存のシリコンプロセスとの親和性が高く応用の観点からも優位性を持つ材料であると言える。

当該研究分野では、世界的に見ると半導体ゲート絶縁膜の分野を中心に主に多結晶無配向膜の電気特性評価の研究が主流であり、材料化学的な観点からの取り組みは極めて少ない。これらの研究に対し、我々は最先端の収差補正電子顕微鏡を活用し、HfO_2-ZrO_2固溶体薄膜のエピタキシャル成長と回折実験では評価が困難なドメイン構造、2相共存組織などの微細組織の局所構造解析を切り口にして研究を進め、自己弾性場を利用したイオンビームスパッタリング法によるHfO_2-ZrO_2固溶体薄膜の成膜を試み、固相エピタキシーにより斜方晶相がエピタキシャル成長可能なこと、斜方晶相のドメイン構造、結晶相制御、結晶性の向上、微細組織について検討した[5,6]。

2．実験方法

$Zr_xHf_{1-x}O_2$（x=0.3-0.7）薄膜は以下の手順で成膜した。$Zr_xHf_{1-x}O_2$（x=0.3-0.7）組成となるようにZrO_2及びHfO_2粉末原料を混合し、ディスク状に成形した後1200℃で焼成してスパッタリング用ターゲットを作製した。YSZ基板、SiO_2ガラス基板上にイオンビームスパッタリング法で$Zr_xHf_{1-x}O_2$（x=0.3-0.7）薄膜を室温下で堆積した。赤外線ランプアニール炉中、酸素フロー条件で700-1000℃でポストアニールを行い、熱応力や格子ミスマッチといった自己弾性場の下で$Zr_xHf_{1-x}O_2$（x=0.3-0.7）超薄膜を結晶化した。高分解能X線回折（XRD）法により相同定と構造解析を行った。収差補正電子顕微鏡によるhigh-angle annular dark field-scanning transmission electron microscopy（HAADF-STEM）法を併用し、超薄膜の原

子分解能観察を行った。斜方晶相及び単斜晶相の方位や相同定はマルチスライス法によるHAADF-STEM像シミュレーションにより行った。薄膜の組成は、Energy Dispersive X-ray Spectroscopy（STEM-EDS）法で行った。

3．結果と考察[5,6]

Fig. 1にSiO_2ガラス基板上に成膜・結晶化したHZO薄膜のXRDプロファイルとシミュレーションによる単斜晶相、斜方晶相、正方晶相、立方晶相のプロファイルを示す。SiO_2ガラス基板上では単斜晶相111, 11-1ピークに加え斜方晶相の111ピークのみが確認されたことから、111の一軸配向膜であると考えられる。ガラス基板

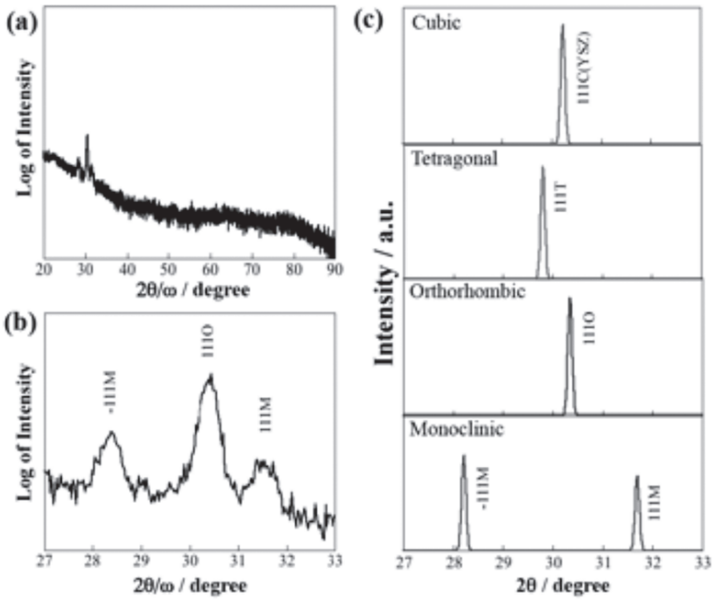


Figure 1 XRD $2\theta/\omega$ profile of an $Hf_{0.5}Zr_{0.5}O_2$ thin film deposited on SiO_2 glass substrates followed by annealing at 1073 K, (b) enlarged profiles of (a) around 30 deg, and (c) simulated powder diffraction patterns.

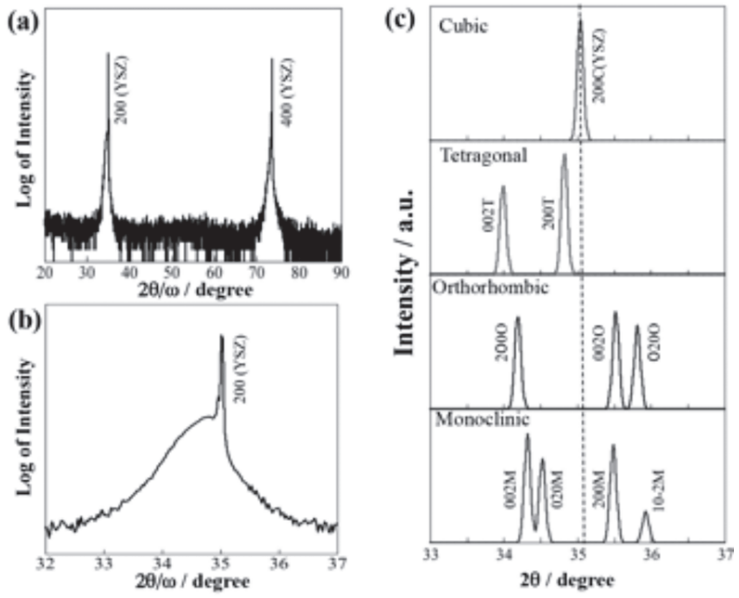


Figure 2 (a) XRD $2\theta/\omega$ profile of an $Hf_{0.5}Zr_{0.5}O_2$ thin film deposited on YSZ (100) substrates followed by annealed at 1073 K, (b) enlarged profiles of (a) around 35 deg, and (c) simulated powder diffraction patterns.

上への結晶成長であることから、薄膜基板間の格子マッチングの影響は小さく、蛍石型構造の最稠密面である(111)面が優先的に成長したと理解できる。ZrO_2を同様の膜厚まで成膜を行うとほぼ単斜晶相が形成されることから、このHZO薄膜において不完全ながら斜方晶相が得られたことは、Zr中へのHfの固溶の効果が考えられる。ただし、バルク結晶ではHfO_2はZrO_2の安定化剤になり得ないことから、いわゆる安定化剤とは異なり、薄膜化の際に現れる弱い効果であろうと推測される。既往の研究では、SiO_2やAl_2O_3等安定化剤ではない元素の固溶でも斜方晶相が報告されており、HfO_2も同様の役割を果たしているものと考えられる。

次に、YSZ単結晶基板上に成膜・結晶化したHZO薄膜のXRDプロファイルとシミュレーションによる単斜晶相、斜方晶相、正方晶相、立方晶相のプロファイルをFig. 2に示す。YSZ基板002, 004ピークの低角側のテールに重なる形で薄膜のブロードなピークが見られる。このピーク位置に相当するピークとしては、シミュレーションパターンの2θ=34-35degに存在する単斜晶相002/020、斜方晶相200、正方晶002の可能性が挙げられるが、XRDパターンのみではこれ以上の判別は困難である。そこで、Fig. 3に薄膜断面構造を観察したHAADF-STEM像と制限視野電子回折図形を示す。制限視野電子回折図形からYSZ基板に帰属されるスポッ

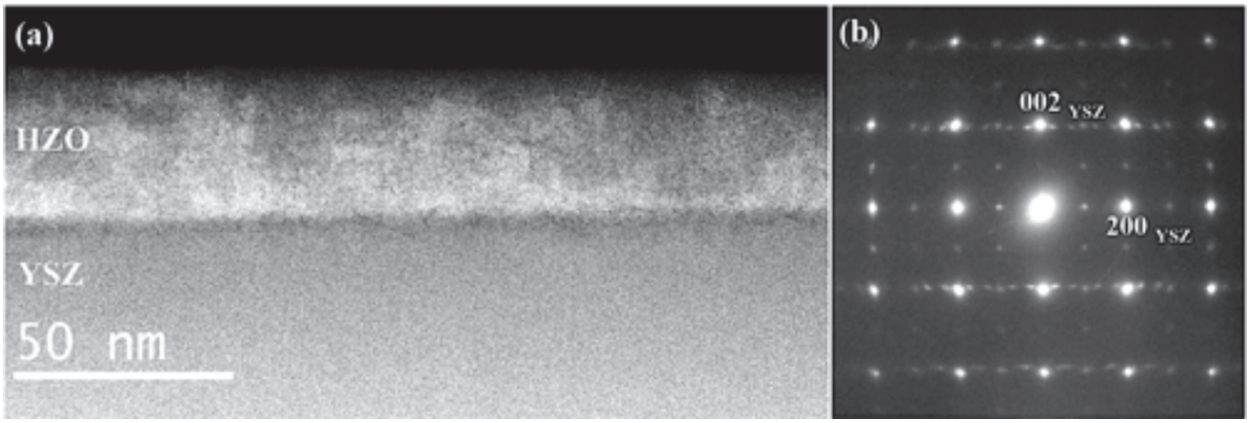


Figure 3 (a) HAADF-STEM image of $Hf_{0.5}Zr_{0.5}O_2$ thin film and (b) selected area electron diffraction pattern.

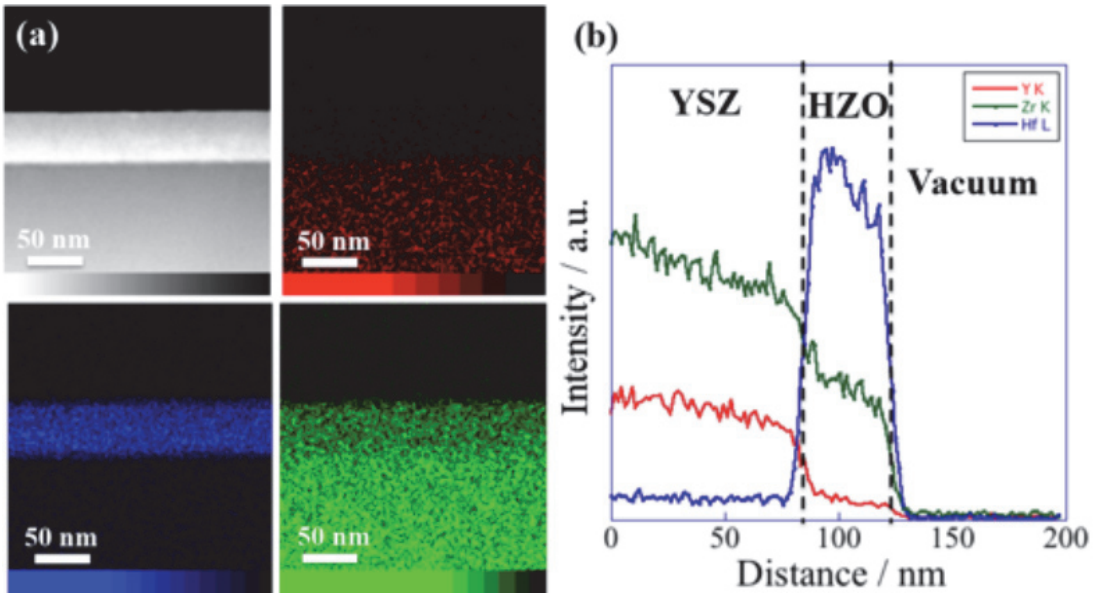


Figure 4 (a) STEM-EDS mapping, using the net intensity of Y-K, Zr-K, and Hf-L characteristic X-rays, with a HAADF-STEM image obtained simultaneously, and (b) the line profiles of Y-K, Zr-K, and Hf-L elemental maps, which were integrated along the in-plane direction.

トに加え、複数相のスポットが観察され、基板に対して特定の方位関係を示しCube-on-cubeライクなエピタキシャル成長している。HAADF-STEM像は10nm程度の不均一なコントラストを示している。HAADF-STEM像は、一般に原子番号コントラストを強く反映するが、粒界、ドメイン構造、配向の乱れに起因した回折コントラストも無視できない。そこで、Fig. 4に薄膜断面のSTEM-EDS観察結果を示す。HfとZrの元素マップからいずれの元素も均一に分布していることから、Fig. 3のHAADF-STEM像のコントラストは回折コントラストに起因すると判断できる。また、組成はHf:Zr=47:53(at%)であり、スタンダードレスEDS定量分析では、ターゲット仕込み組成に50:50とよい一致を示しており、ほぼ1:1組成のHZO薄膜が成長していることを示している。

ここで、この回折コントラストの起源について考える。Fig. 5は、HZO薄膜の(a)原子分解能HAADF-STEM像と各ドメインに拡大像と対応した(b)拡大像とDiffractogramを示す。薄膜はPca21の斜方晶相と$P2_1/c$の単斜晶相の2相共存組織を形成し、いずれの相も数nm-10 nm程度のドメインに分かれていることが分かった。ここで、ドメインの配向を示すため、記号Axy(A：相(M：単斜晶相、O：斜方晶相)、x：面外方向を向く結晶軸、y：面内方向を向く結晶軸)を定義する。斜方晶相のドメイン境界は(110)、(100), (001)等の特定の結晶面に平行に入り、境界は原子レベルで急峻であることから、軸比に伴うドメイン境界の歪みは小さい。斜方晶相の長軸であるa軸が約8°傾斜して単斜晶相の長軸であるc軸に変化することから、単斜晶相の核生成・成長には巨大な応力が発生する。その結果、単斜晶相のみならず、周囲の斜方晶相も大きく変形し、結晶面の回転が起きている。ゆえに、エピタキシャル薄膜の結晶完全性の低下をもたらしたと考えられる。したがって、単斜晶相の抑制により単相化や配向の完全性の向上、直方晶相のドメインの配向制御、つまり、ドメインエンジニアリングのためにも重要となる。

本研究から、斜方晶相の相安定化には基板界面の格子整合や熱応力による基板の拘束が必要であること、また異種元素の固溶の効果が関係すると考えられる。既存の研究や本研究では斜方晶相単相の薄膜は得られていない。斜方晶相は、正方晶相から単斜晶相へのマルテンサイト変態の中間状態であることから、斜方晶相から単斜晶相への応力誘起変態を抑制するようなドーパント、いわゆるバルクのZrO_2の安定化剤が相変態制御に有効であると推察される。現在、結晶化条件により斜方晶相の配向完全性の向上が可能であることを見出しており、条件を精査している。これらの条件と安定化剤のドープによって単斜晶相の生成を完全に抑制できれば、斜方晶相

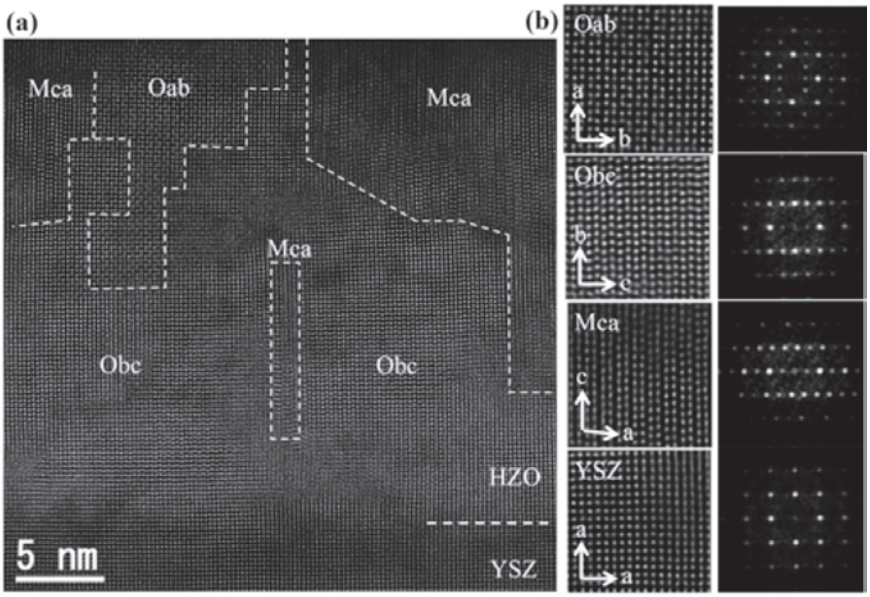


Figure 5 (a) an atomic-resolution HAADF-STEM image of thin film with (b) enlarged images of typical region in (a) for orthorhombic, monoclinic, and cubic phases (YSZ) with corresponding diffractograms. Here, the notation "Axy" signifies A (orthorhombic or monoclinic) phase with the orientation x-axis and y-axis in the out-of-plane and in-plane directions.

単相化の実現が可能となる。紙面の関係で省略するが、Zr/Hf組成比の異なる斜方晶相エピタキシャル薄膜の作製や、XANS・EELSなどの吸収分光法によって局所的な配位構造、結合状態の特異性に基づいた斜方晶相安定性の議論や添加元素が強誘電相安定化に及ぼす効果に関する系統的な研究を進めている。

4．結論

本研究では、固相エピタキシーによるHZO薄膜のエピタキシャル成長を初めて実現し、添加元素と弾性的拘束の二つの効果が斜方晶相形成に不可欠であることを明らかした。エピタキシャル薄膜においては、既往の研究で重視されていた薄膜表面キャッピング効果は斜方晶相安定化の本質ではなく、基板による弾性的拘束も同等の効果を示す。また、ナノサイズの斜方晶相ドメイン構造を持つと同時に単斜晶相が共存すること、単斜晶の成長が斜方晶相の結晶完全性を低下させることを初めて明らかにした。添加元素と弾性的拘束の二つの効果を最適化することによって、斜方晶相の更なる安定性向上が期待でき、本研究はその方向性を示唆する先駆け的な成果であると言える。本研究成果を発展させ、非鉛・非ペロブスカイト型の強誘電体超薄膜材料創製を実現できれば、サイズ効果や絶縁性の問題が無く、Siプロセスへの適合性を活かして、強誘電・圧電デバイスと半導体デバイスと融合させた新奇電子デバイスの創出への展開が期待される。

5．謝辞

本研究は、公益財団法人 松籟科学技術振興財団の研究助成を受けて実施しました。同財団に深甚なる謝意を表します。また、東北大学金属材料研究所、今野豊彦教授、白石貴久 助教、赤間章裕 氏、指導学生である東北大学大学院工学研究科知能デバイス材料学専攻 中村奨梧氏、Sujin Choi氏の協力の下に実施されました。ここに謝意を表します。

6．参考文献

(1) T. S. Böscke, J. Müller, D. Bräuhaus, U. Schröder and U. Böttger, *Appl. Phys. Lett.*, 99, 102903 (2011).

(2) J. Müller, U. Schröder, T. S. Böscke, I. Müller, U. Böttger, L. Wild, J. Sundqvist, M. Lemberger, P. Kücher, T. Mikolajick, and L. Frey, *J. Appl. Phys.*, 110, 114113 (2011).

(3) T. Shimizu, K. Katayama, T. Kiguchi, A. Akama, T.J. Konno and H. Funakubo, *Appl. Phys. Lett.*, 106, 112904 (2015).

(4) T. Shimizu, K. Katayama, T. Kiguchi, A. Akama, T.J. Konno and H. Funakubo, *Appl. Phys. Lett.*, 107, 032910 (2015).

(5) T. Kiguchi, S. Nakamura, A. Akama, T. Shiraishi, T.J. Konno, *J. Ceram. Soc. Jpn.* 124, 689-693 (2016).

(6) T. Kiguchi, T. Shiraishi[1], T. Shimizu[2], H. Funakubo[2], and T. J. Konno, *Jpn. J. Appl. Phys.* (2018) in printing.

申請者　東北大学　中西　亮

スピントロニクスを目指した単分子磁石内包カーボンナノチューブの創製と構造・磁性評価

東北大学　大学院理学研究科
中西　亮

1．はじめに

単分子磁石(Single-Molecule Magnet: SMM)は一分子が一磁石として働く量子磁石であり、磁気メモリ等への応用が期待される新奇分子である。1993年に見出されたマンガン(Mn)イオン12個からなる錯体Mn12[1]をはじめ、これまで様々なSMMが報告されてきた。希土類金属(Ln)のSMMも数多く報告されており、その先駆けとなったものは2003年に現大阪大学の石川直人教授らにより見出された、テルビウムイオン(Tb^{3+})が二つのフタロシアニンにサンドイッチされた分子であるダブルデッカー型Tb-フタロシアニン($TbPc_2$)[2]である。Tb^{3+}の基底状態$^7F_6$が上下に配位したフタロシアニンにより配位子場分裂を起こし、生じたJ_z=±6と±5 間のギャップ(ΔE)により二極小ポテンシャルが形成され、ΔEを越えない低温時においてスピンが上向き・下向きの２つの状態を最安定としてとることで磁石として働く(図1)。Ln-SMMの大きな特徴として、例えば$TbPc_2$においては分子内に一つの金属イオンしか含まないにも関わらず約400 cm^{-1}と比較的大きなΔEを有するなど、非常に優れたSMMになり得る点が挙げられる。その他、分子サイズを小さくできる点や、昇華性を持つものもある点も重要なポイントである。

SMMは分子性磁石であり、例えば$TbPc_2$は分子メモリとして機能することも確認されているが[3]、実際に個々の分子を孤立した磁石として扱うためにはSMM間の相互作用の制御が必須であり、またその実用化にはナノスケールの分子をマクロスコピックな我々の世界と繋げる架け橋が必要である。そのような架け橋の一つにカーボンナノチューブ(Carbon Nanotube : CNT)が挙げられる[4]。CNTは炭素から成るチューブ状物質であり、高い電子物性や一次元の内部ナノ空間を有するという特徴を有するため、SMMと組み合わせることで、スピントロニクス等の応用的な研究が期待できる。実際、そのような応用研究例として、単層CNT表面に$TbPc_2$の誘導体を付着させ、$TbPc_2$上のスピンにより単層CNTの伝導電子を制御することで300%もの巨大磁気抵抗効果を実現した例や[5]、あるいは多層CNTにMn12を内包することでスタッキングを一次元的に制御し、SMM特性の

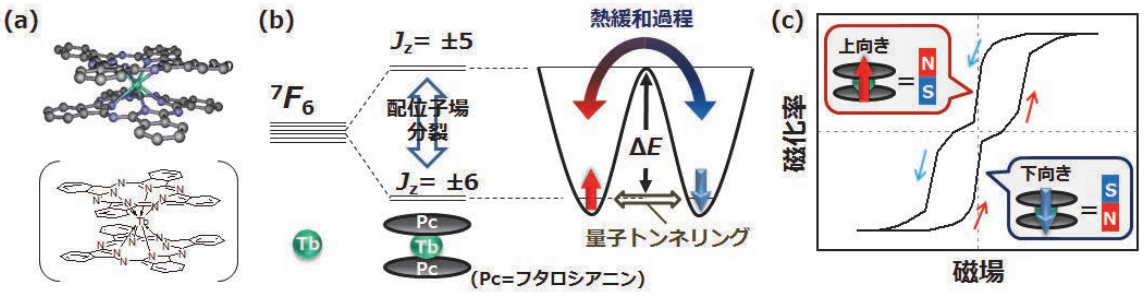


図１．(a)$TbPc_2$の構造モデルおよび分子構造。(b)$TbPc_2$の二極小ポテンシャルモデル。Tb^{3+}の基底状態が配位子場分裂し、生じた最安定の副準位において、熱緩和過程を無視可能な時に上向き・下向きスピンを保持可能になり、磁石として働く。(c)単分子磁石の磁気ヒステリシス。量子トンネリングの影響によりステップ状になる。

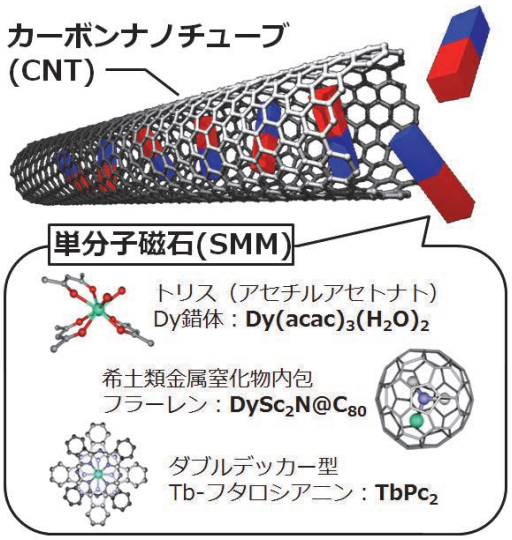


図2． カーボンナノチューブ、および内包させる単分子磁石の構造モデル。

制御に成功した例が報告されている[6]。しかしながら、SMMとCNTの複合的な研究は主としてこの2例のみであり、その発展にはさらなる探求が必要である。そこで本研究では、トリス(アセチルアセトナト)ジスプロシウム(Dy)錯体$Dy(acac)_3(H_2O)_2$や金属窒化物内包フラーレン$DySc_2N@C_{80}$といったLn-SMMに着目し、これらを多層および単層CNTへ内包することで新たな複合体を創製し、さらなるSMMの制御を試みた。

2．$Dy(acac)_3(H_2O)_2$内包多層CNT [7]

$Dy(acac)_3(H_2O)_2$は2010年に報告されたLn-SMMである[8]。1つのDy^{3+}イオンのみで比較的高い特性を示し、かつ市販されているため入手性も良い。そこで、多層CNTへ内包を行い、複合化を試みた。CNTは平均内径5nmの多層CNTを用い、酸素雰囲気下で加熱することで開端した。これを$Dy(acac)_3(H_2O)_2$の1,2-ジクロロエタン溶液中に浸すことで、毛細管現象により内包した。図3(b)に示す透過型電子顕微鏡(TEM)像より多層CNT内に$Dy(acac)_3(H_2O)_2$錯体と思われるコントラストを確認でき、またエネルギー分散型X線分析からDyを検出することもできたため、内包に成功したといえる。交流磁化率測定の結果周波数依存性を確認することが出来たため(図3(c))、CNT内においてもSMM特性を保持していると思われる。明瞭なピークが確認できなかったため詳細な特性は不明であるが、Kramers-Kronigの式より頻度因子が10^{-6} - 10^{-7} s、活性化障壁が4 - 5 cm^{-1}であると見積もることが出来た(図3(d))。バルクの状態と比べてSMM特性が変化していることから、CNTへの内包により$Dy(acac)_3(H_2O)_2$の構造およびスタッキングが変化したためであると予測され、すなわちSMM特性を制御することが可能であることを示す一例と言える。

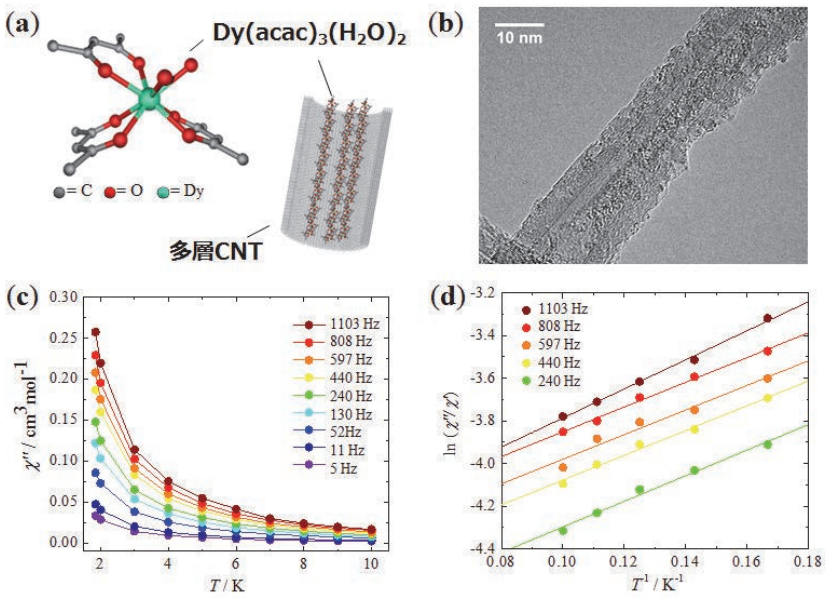


図3． $Dy(acac)_3(H_2O)_2$内包多層CNTの(a)構造モデル、(b) TEM像、(c) χ″ vs. T^{-1}プロット、および(e) 6-10 Kにおけるχ″ / χ′ vs. T^{-1}プロット。実線はKramers-Kronigの式によるフィッティング。

3．$DySc_2N@C_{80}$内包単層CNT

金属内包フラーレンとはその名の通り、C_{2n}（$2n$ = 60, 70, 72, 74, …）で表されるフラーレンケージ内部に金属が取り込まれた分子であり、その特異な構造により興味深い物性を示し、種々の応用が期待されている。金属窒化物内包フラーレン$DySc_2N@C_{80}$はC_{80}（I_h）ケージフラーレンにDyイオンとスカンジウム（Sc）イオンがNイオンと共に内包されたもので、2012年にSMM特性を示すことが見出された[9]。ここで、フラーレンはCNTと同様にπ共役系が構造全体に広がっており、両者の親和性は非常に高く、高効率でCNT内部に導入されてナノピーポッド（＝さやえんどう）とも呼ばれる「フラーレン内包CNT」を容易に形成する[10]。そこで、$DySc_2N@C_{80}$においてもCNT内部への導入が可能であると考え、その創製を試みた。

$DySc_2N@C_{80}$の合成は一般的な金属内包フラーレンの合成法であるアーク放電法を用いた。ただし、空フラーレンの抑制など合成の効率化のために窒素源としてNH_3ガスを用いる必要があり[11]、専用の装置を構築した（図4）。そして陽極側にDyとScを含有した炭素棒を用い、NH_3およびHeガス雰囲気下、140 Aでアーク放電を行うことで目的物を含むススを得た。ここから二硫化炭素等でフラーレン類を抽出し、HPLCにより$DySc_2N@C_{80}$を単離した。

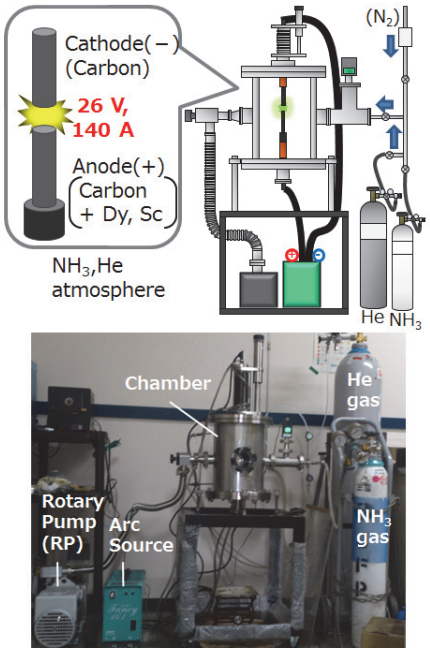


図4．構築したアーク放電装置。

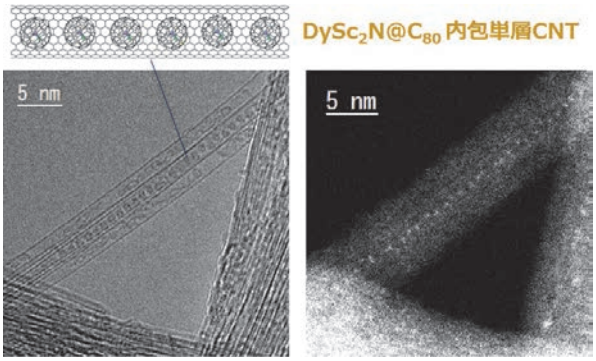


図5．$DySc_2N@C_{80}$内包単層CNTの（a）TEM像および（b）走査TEMによる高角度散乱暗視野像。

次に、単層CNTへの内包を試みた。単層CNTはアークプラズマジェット法[12]で合成された1.4 ± 0.1 nmの狭い直径分布を有するもの（株式会社名城ナノカーボン製、Meijo-SO）を選択し、塩酸洗浄および高真空下での加熱により金属不純物を十分に除去した後、大気下で550 ℃で30分程度加熱することで開端して用いた。その後単層CNTと$DySc_2N@C_{80}$を10^{-5} Paの高真空下で封じ、550 ℃で加熱することで$DySc_2N@C_{80}$を昇華させ単層CNT内部へ導入した。図5（a）に得られたサンプルのTEM像を示す。単層CNTに由来する2本の線の間にフラーレン由来の丸いコントラストを確認できる。エネルギー分散型X線分析からDyとScも確認でき、$DySc_2N@C_{80}$の内包に成功したと言える。また、図5（b）に走査TEMによる高角度散乱暗視野像を示す。この手法では高角側に散乱された電子のみを取得するため原子番号の二乗に比例したコントラストを得ることができる。得られた像においてはDy由来の白いコントラストが単層CNT内に一列に並んでいる様が確認できたため、すなわち$DySc_2N@C_{80}$を一次元的に配列させることに成功した。

そこで得られた$DySc_2N@C_{80}$内包単層CNTについて磁化測定を行った。図6に得られた磁化の磁場依存性を示す。SWCNT内包後においても特異なステップ状のヒステリシスを示し、SMM特性を失っていないことが確認できた。さらに、内包前後で比較した際、内包前は0.5 kOe程度であった保磁力が、内包後においては約4 kOeと大幅に上昇していることが確認できた。これは、単層CNTへ内包されることで$DySc_2N@C_{80}$が一次元的に並びSMM間のカップリングが制御された、あるいはSWCNTと$DySc_2N@C_{80}$の間に電子移動が生じ、結果と

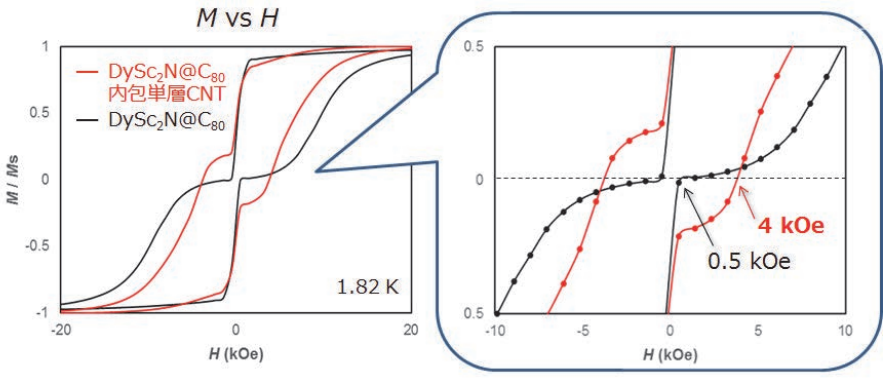


図6． 単層CNTへの内包前(黒)と後(赤)における$DySc_2N@C_{80}$の磁気ヒステリシス。

してQTMが抑制されたためであると類推される。

4．今後の展望

その他、$TbPc_2$や希土類塩化物$DyCl_3$など、種々のSMMの内包も試みている。特に$TbPc_2$は一次元的にスタックした場合に高いSMM特性を示すことも報告されているため、CNT内で同様の効果が期待できる。また、CNTの特徴として、その内部ナノ空間内は外界から隔絶されているため内包した物質はCNTにより保護されるという特徴がある。そこで、「高い特性を有するも大気中で不安定なSMM」等にも着目し、単層CNTへの内包・解析を試みている。さらに展望として、創製したSMM内包単層CNTを用いたデバイスの形成についても試行中である。まずは図7に示すように孤立したSMM内包単層CNTについて、基板上に担持し両端に電極をつけ、磁場下で伝導度を測定することで巨大磁気抵抗効果等が見られるか検討する予定である。これにより、スピンバルブ等のスピントロニクスへの応用展開を目指す。

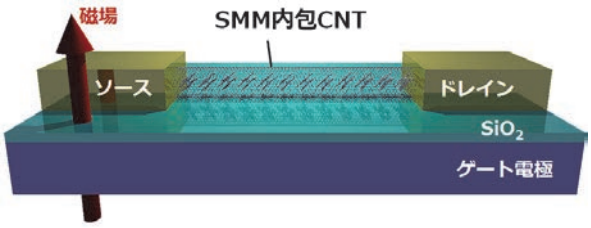


図7． SMM内包CNTによるデバイスモデル。

謝辞

本研究は名古屋大学大学院理学研究科物理化学(篠原久典教授)研究室との共同研究です。また本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 松籟科学技術振興財団に多大なご支援を賜りました。深く感謝申し上げます。

参考文献

[1] R. Sessoli, D. Gatteschi, A. Caneschi, M. A. Novak, *Nature* **1993**, *365*, 141-143.

[2] N. Ishikawa, M. Sugita, T. Ishikawa, S.-y. Koshihara, Y. Kaizu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8694-8695.

[3] T. Komeda, H. Isshiki, J. Liu, Y.-F. Zhang, N. Lorente, K. Katoh, B. K. Breedlove, M. Yamashita, *Nat. Commn.* **2011**, *2*, 217.

[4] S. Iijima, *Nature* **1991**, *354*, 56-58.

[5] M. Urdampilleta, S. Klyatskaya, J. P. Cleuziou, M. Ruben, W. Wernsdorfer, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 502-506.

[6] M. del Carmen Giménez-López, F. Moro, A. La Torre, C. J. Gómez-García, P. D. Brown, J. van Slageren, A. N. Khlobystov, *Nat. Commn.* **2011**, *2*, 407.

[7] R. Nakanishi, M. Yatoo, K. Katoh, B. Breedlove, M. Yamashita, *Materials* **2017**, *10*, 7.

[8] S.-D. Jiang, B.-W. Wang, G. Su, Z.-M. Wang, S. Gao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7448-7451.

[9] R. Westerström, J. Dreiser, C. Piamonteze, M. Muntwiler, S. Weyeneth, H. Brune, S. Rusponi, F.

Nolting, A. Popov, S. Yang, L. Dunsch, T. Greber, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9840-9843.

[10] K. Hirahara, K. Suenaga, S. Bandow, H. Kato, T. Okazaki, H. Shinohara, S. Iijima, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 5384-5387.

[11] L. Dunsch, M. Krause, J. Noack, P. Georgi, *J. Phys. Chem. Solids* **2004**, *65*, 309-315.

[12] Y. Ando, X. Zhao, K. Hirahara, K. Suenaga, S. Bandow, S. Iijima, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *323*, 580-585.

申請者　大阪大学　関谷　毅

低エネルギー循環型プラスティックセンサの開発

大阪大学　産業科学研究所
関谷　毅

1．はじめに

あらゆるモノをインターネットに接続することで、社会を最適化することを目的として、「生活環境に様々なセンサを配置する試み」が注目を集めている。Internet of Things（IoT）と呼ばれ、実空間と情報空間をシームレスにつなげることで社会を最適化する社会システムでもあり、少子高齢社会を迎えた我が国において重要な成長戦略の一つと考えられている。

膨大なセンサが生活環境に入り込み、実世界の情報を正確に収集するためには、広い面積を覆い、かつフレキシブル、低消費電力のセンサが求められている。しかしIoT実現にはもう一点重要な側面がある。それは、センサが役割を果たした後には膨大な量の廃棄物が生じる問題である。

IoTを支えるセンサには、低環境負荷、低エネルギーでリサイクルできる要素が求められており、持続可能な社会基盤を構築する上で欠かせない。この様なエレクトロニクスは、シリコンテクノロジーでは実現が困難である。

そこで本研究では、低エネルギー・低環境負荷で分

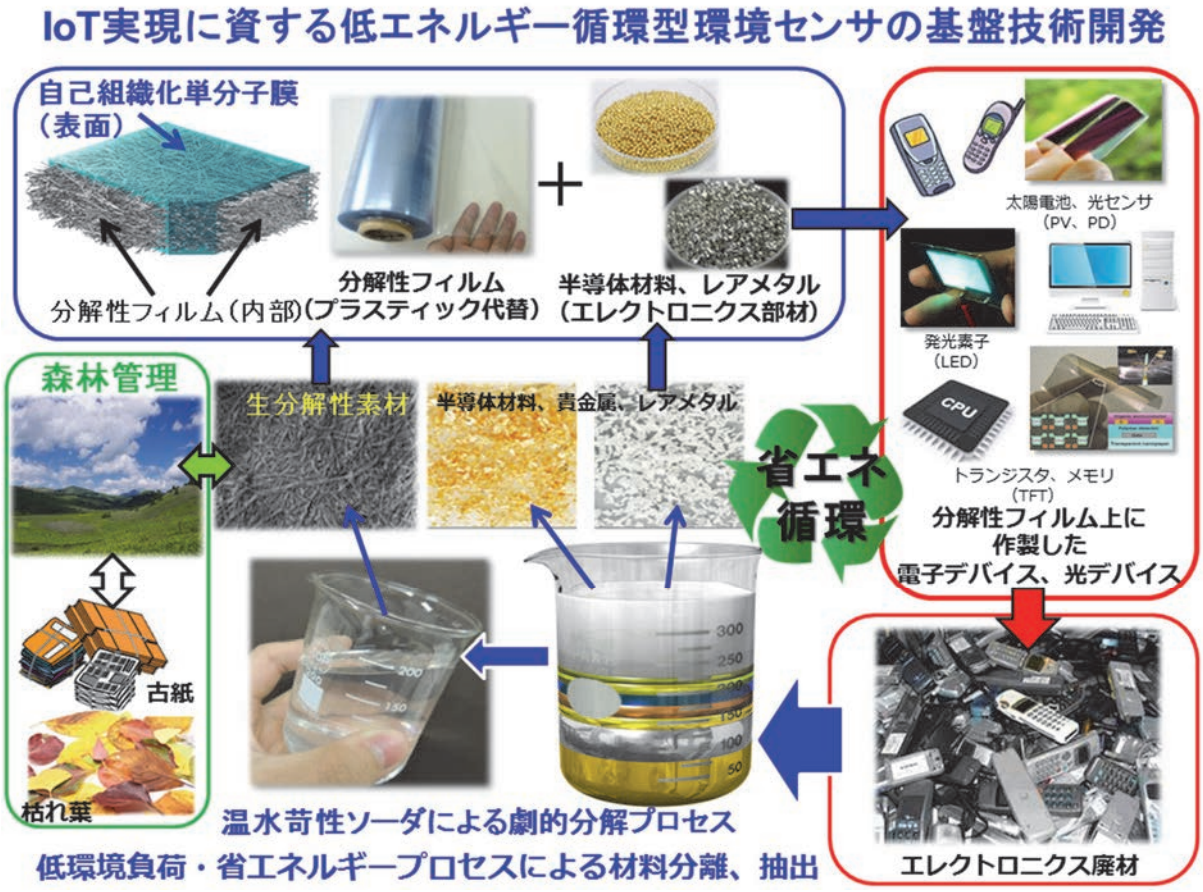


図１：本取り組みの目指す概要を示す図

解、再構築可能な“生分解性プラスティックフィルム”を高機能化し、この上に環境(インフラ)モニタリングセンサを開発し、その有用性を実証することを最終目標とした。

IoT時代の低環境負荷製造に資する低エネルギー循環型プラスティックセンサシステムの開発を行うことで、膨大に増え行くエレクトロニクス産業廃棄物を高効率に回収、再利用することでサステイナブルなIoT社会実現に向けた基盤技術開発を進めた。

【本研究の意義】

生活環境におけるエレクトロニクスの数は急激に増えており、この材料を地下資源(石油由来などの天然資源)だけでまかなうには限界がある。

本研究では、地下資源に頼らない「材料循環型エレクトロニクス」の概念を創出し、持続可能かつ豊かな社会生活の実現に貢献する。

2．本研究での取り組み概要

【本研究の創意：自己組織化単分子による生分解性プラスティックの平坦化と高耐久化】

生分解性プラスティックは水により容易に分解できるため、低環境負荷でリサイクル可能である。その一方で環境耐久性がないこと、表面の平坦性が低いこと、からエレクトロニクスには使われてこなかった。

本研究では、自己組織化単分子膜や気相成長高分子膜により、このプラスティック表面を修飾し、平坦化を実現する試みを行った。さらに、特殊な水溶液によりエレクトロニクス基板を溶解し、材料分離するプロセス開発を進めた。

3．具体的な取り組みと成果

本研究が目指す「低エネルギー循環型環境センサ」を実現するためには、6つの課題があると認識し、これらを研究開発項目と定め、取り組んだ。

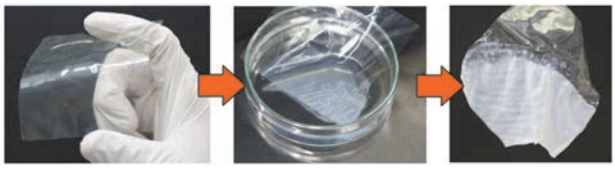


図２：生分解性基材が、水で溶解していく様子を示す写真

「研究開発項目１．環境(インフラ)センサの設計と作製技術」、「研究開発項目２．センサ性能計測」、「研究開発項目３．通信モジュール、信号処理モジュール、電源モジュールの構築と環境(インフラ)センサとの集積化によるシステム化」、「研究開発項目４．高効率リサイクル材料開発」、「研究開発項目５．デバイスの信号品質解析と改善」、「研究開発項目６．“低エネルギー循環型環境センサシステム”の材料循環効率、エネルギー効率の検証」という6点の技術課題に取り組む必要がある。

関谷らのグループでは、これまでの研究活動を通して、「研究開発項目１」から「研究開発項目３」までの技術開発に成功しており、必要不可欠な要素技術が確立している。

そこで本研究期間では「研究開発項目４」、「研究開発項目５」、「研究開発項目６」に集中的に取り組み、環境センサシステムを社会実装可能なレベルまで磨き上げる取り組みを進めた。

研究開発項目４．

「高効率リサイクル材料開発」

研究開発項目５．

「デバイスの信号品質解析と改善」

分解性プラスティックの多くは、表面の平滑性が十分ではないため、容易に劣化するのでこれまでエレクトロニクス基材には用いられてこなかった。本研究では、この表面に自己組織化単分子膜(SAM)および気相成長可能な高分子パリレン膜を薄膜成膜させる二つの手法を検討し、この二つの課題に取り組んだ。

その結果、自己組織化膜を付与するための液体プロセスが生分解性基板フィルムに大きなダメージを与えることが分かった。自己組織化膜のプロセス溶剤を複数種類試したものの、生分解性フィルムの表面が数十ナノメートルレベルで荒らされてしまうため、本プロセスは困難であるとの結論に達した。

一方で、薄膜パリレンを気相成長した生分解性プラスティックの最表面では、極めて高い平坦性が見られ、その平滑性は数ナノメートルに達することを確認した。

これを基材として、有機薄膜トランジスタの作製を行った。薄膜パリレンをコートしたのち、100nmのアル

ミを蒸着し、ゲート電極とした。そののちに改めて、パリレンを30nm製膜し、ゲート絶縁膜とした。有機半導体層には30nmのDNTT(dinaphtho- thienothiophene)を真空製膜し、p型半導体チャネル層とした。最後に50nmの金薄膜を蒸着製膜することで、ソース・ドレイン電極を形成した。ボトムゲート・トップコンタクト型の有機薄膜トランジスタを蒸着製膜により試作した。その結果、生分解性基板フィルム上において移動度0.4cm^2/Vs、ON/OFF比10^5 以上を実現した。特性ばらつきも30%程度と従来のプラステティックフィルム上の有機薄膜トランジスタとそん色のない特性が得られることを確認した。

研究開発項目６．

「低エネルギー循環型環境センサシステムの材料循環効率、エネルギー効率の検証」

この有機薄膜トランジスタが作製されている生分解性プラスティック基板を水溶液へ漬け込み分解させる実験を行った。

最表面に数十ナノメートル程度のパリレン平滑化層があるため、そのまま漬け込むだけでは溶解しない。一方で、表面を軽く研磨し、パリレン平滑化層をはがしたのち、水溶液へ浸漬し、撹拌機により攪拌したところ溶解を確認することが出来た。有機半導体は極めて薄膜なため材料の抽出は難しいが、金属膜などは回収できる可能性があることを確かめた。

４．今後の取り組み

これまでに開発してきた技術を集積化し、一つのシステムとして機能させる。これにより環境センサとしての有用性を評価していく予定である。具体的には、研究協力をしている東京電力ホールディングス(株)、東電設計(株)、富山市などと連携し、大規模インフラへ展開し、コンクリート表面で見られる劣化の様子を評価するシステムへ一部組み込み、その有用性を検証する予定である。

図３：将来的に目指すべきエレクトロニクスリサイクルの在り方を示す図。大面積環境センサシステムのリサイクルプロセスの概念模式図。分解性プラスティックを用いることにより、Si-LSI回路以外はすべて低エネルギーにより分離され、エレキトロニクス部材を抽出し、再び環境センサを作製できることを実証する。これにより、“低エネルギー循環型エレクトロニクス”の基盤技術を確立する。

5．おわりに

超少子高齢化を迎える我が国においてIoTやAIの活用は欠かせない取り組みである。この環境の中でエレクトロニクスは多様化しており、これまでのように5~10年間使い続けるものばかりではなく、1年以内であったり、場合によっては数時間で使い切る用途も増えている。すなわち、エレクトロニクスを構成する希少材料はもちろんのこと、あらゆる材料をリサイクルして用いることが必須である時代がやってくる。これまでのように大きなエネルギーや温度をかけてリサイクルするようではリサイクルコストが高くなりすぎて、現実的でない。

本研究では、分解性の高いシルクフィブロインを中心としたプラスティック基材を用いて、その上に低エネルギーで作製可能な有機薄膜トランジスタをベースとしたエレクトロニクス回路を作製してきた。溶液に溶解させた金属や半導体材料をどのようにして高純度に効率よく抽出するかについては今後の取り組みが必要であるが、低エネルギーで溶解可能な基材上に高性能なエレクトロニクス回路を作製すること、さらに低エネルギー、低環境負荷のプロセスで容易に溶解させる手法を開発することが出来た意義は大きい。

リサイクルなどですでに実績がある製紙会社等との連携を行いながら、今後このような取り組みを加速させて、社会に浸透させていくことを使命としていきたい。

6．謝辞

本研究を遂行するにあたり、大阪大学産業科学研究所関谷研究室の教員である植村隆文特任准教授、和泉慎太郎特任准教授、荒木徹平助教、野田祐樹特任助教、吉本秀輔招へい教員、研究室メンバーに心から感謝いたします。最後になりますが、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。

参考文献

1） Tsuyoshi Sekitani, et al., *Nature Materials* 6, 413 (2007).
2） Tsuyoshi Sekitani, et al., *Science* 321, 1468 (2008).
3） Tsuyoshi Sekitani, et al., *Nature Materials* 8, 494 (2009).
4） Tsuyoshi Sekitani, et al., *Science*, 326, 1516 (2009).
5） Tsuyoshi Sekitani, et al., *Nature Materials* 9, 1015 (2010).
6） Martin Kaltenbrunner, Tsuyoshi Sekitani, et al., *Nature* 499,458 (2013).
7） Matthew S. White, Tsuyoshi Sekitani, et al., *Nature Photonics* 7,811 (2013).
8） Sungwon Lee, Tsuyoshi Sekitani, et al., *Nature Communications*, 5,5898 (2014).
9） Michael Melzer, Tsuyoshi Sekitani, et al., *Nature Communications* 6,6080 (2015).
10） Naoji Matsuhisa, Tsuyoshi Sekitani,et al., *Nature Communications*, 6,7461 (2015).

申請者　国立医薬品食品衛生研究所　出水　庸介

Hisタグタンパク質を特異的に分解できるハイブリッド分子の開発

国立医薬品食品衛生研究所　有機化学部
出水　庸介

1．背景と目的

生体内においてタンパク質は様々な機能を担っている。そのためタンパク質を質的、及び量的に制御することはそのタンパク質機能の解明の手がかりとなり、生体機能の理解や病気の治療に繋がる。細胞内タンパク質の発現量を制御する方法にはRNAi、CRISPR/Cas9、遺伝子ノックアウト法が汎用されている。しかしながら、これらの手法は複雑な操作が必要であることや試薬が不安定であること、タンパク質の減少までのタイムラグがあることといった課題を持つ。そこでこの課題を解決するため、化合物を作用させることで、細胞内のタンパク質分解系の1つであるユビキチン-プロテアソーム系(Ubiquitin-Proteasome System; UPS)によって任意のタンパク質を分解させる手法がケミカルバイオロジー分野を中心に注目されている。UPSは細胞の備えている機能であるが、近年、有機分子を用いることで人工的にUPSを適用させ、任意のタンパク質(Protein Of Interest; POI)を分解する手法(プロテインノックダウン法)が注目されている。この手法では翻訳後のタンパク質の存在量を制御することができるため、任意のタイミングでタンパク質の存在量を減少、及び回復させることが期待でき、さらに小分子を使用するため、試薬の安定性、導入の簡便さという点も特徴的である。現在、Yale大学のCrewsらのグループからPROTACs(Proteolysis Targeting Chimeric molecule)法、東京大学の橋本らや国立医薬品食品衛生研究所の内藤らのグループからSNIPER(Specific and Non-genetic IAP-dependent Protein Eraser)法が報告されている。PROTACs法、SNIPER法は、標的タンパク質のリガンドとE3のリガンドを適する長さのリンカーで連結させた有機分子を用い、標的タンパク質のユビキチン化を誘導し、プロテアソームにより分解させる手法である(**Fig. 1**)。2001年から現在までに様々なタンパク質をターゲットとしたものや様々なE3リガンドを用いたものが報告されている。筆者らも内藤博士との共同研究により、エストロゲン受容体、BCL-ABL、NOTCH1などの疾病関連タンパク質の分解誘導分子の開発に成功している。

このようにプロテインノックダウン法は疾患に関わるタンパク質の発現そのものを減少させることができるので、タンパク質機能解明のツールとしてだけではなく、これまでにない新しいタイプの治療薬となる可能性がある。しかしながら、現在の手法では標的タンパク質に

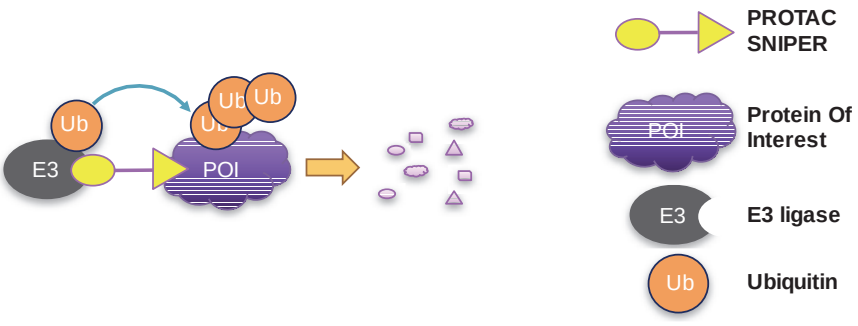


Fig. 1. PROTAC、SNIPER法によるプロテインノックダウン

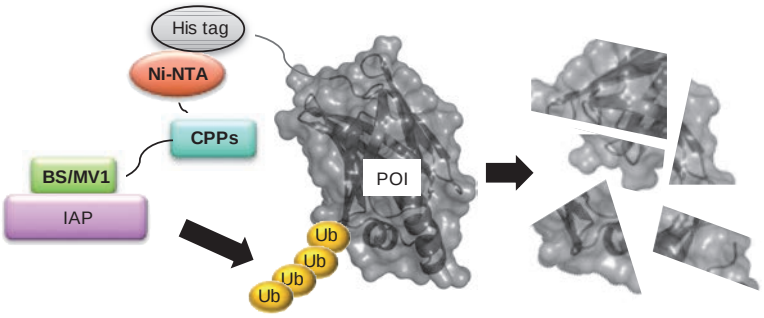


Fig. 2. Hisタグ融合タンパク質のプロテインノックダウン

合わせたリガンドを用いなければならず広い範囲に適用が困難、リガンドが不明なタンパク質には適用不可などの問題点が挙げられる。またUPSを介したタンパク質分解の適用可能範囲は未解明であり、網羅的に解析する手法は確立されていない。そこで本研究では、標的タンパク質に融合させたHisタグをターゲットとすることで標的タンパク質のリガンドを用いないプロテインノックダウン法を開発することを目的とした。Hisタグは小分子タグでタンパク質に融合することが容易であり、様々なHisタグ融合タンパク質が報告されている。従って本手法を開発することで、UPSを介したタンパク質分解の適用可能範囲を網羅的に解析することが可能となると考えた(**Fig. 2**)。

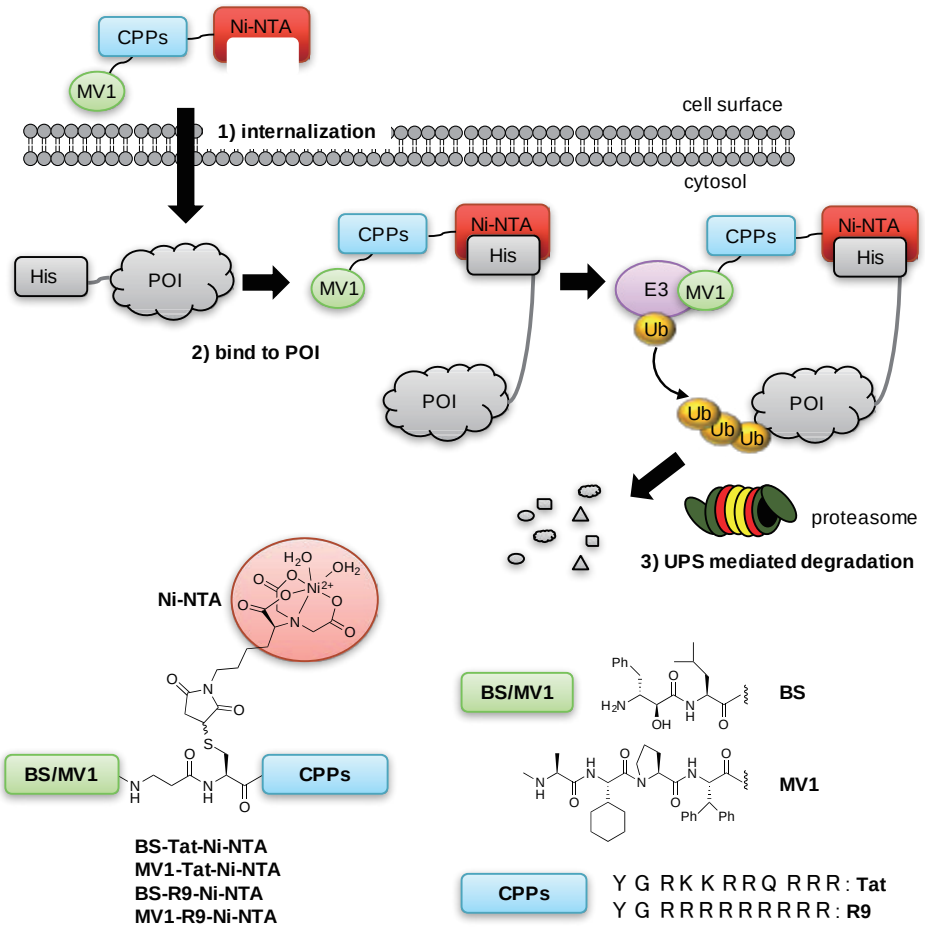
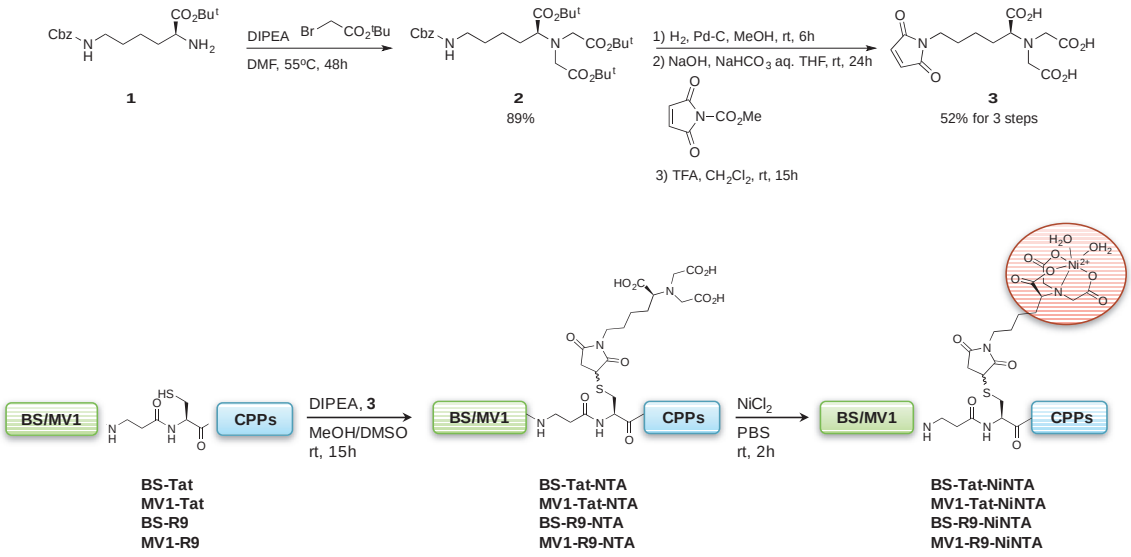


Fig. 3. 分子設計とHisタグ融合タンパク質の分解誘導の推定機構



Scheme 1.　ハイブリッド分子の合成ルート

2．実験、結果、考察

2-1 Hisタグタンパク質分解誘導作用を有するハイブリッド分子の開発

2-1-1. 分子設計

目的を達成するためには、UPSを介したプロテインノックダウン誘導化合物を標的タンパク質へ運搬、相互作用させること、プロテインノックダウン誘導化合物が標的タンパク質のノックダウンを行うこと、の2つが課題となる。これらの課題を解決するため本手法ではプロテインノックダウン誘導化合物としてHisタグと相互作用する**NiNTA**(nickel-nitrilotriacetic acid)とユビキチンリガーゼリガンド(**BS/MV1**)、および細胞膜透過ペプチド(**CPPs: Tat, R9**)をコンジュゲートしたハイブリッド分子(**BS/MV1-CPPs-NiNTA**)を設計した。**Ni-NTA**は極性が高く細胞内へ導入されないが、**CPPs**とコンジュゲートすることで細胞内への導入効率を高めることが可能となる。細胞内では、**NiNTA** がHisタグタンパク質と相互作用することで**MV1**を標的タンパク質のHisタグに相互作用させることができ、標的タンパク質のポリユビキチン化それに続くプロテアソームの分解を誘導できると考えた(**Fig. 3**)。

2-1-2. ハイブリッド分子合成

ハイブリッド分子(**BS/MV1-CPPs-NiNTA**)は**Scheme 1**に示すルートで合成した。すなわち、L-リジン誘導体**1**を出発原料として合成したマレイミド体**3**とペプチド固相法により合成した**BS/MV1-CPPs**をコンジュゲートさせ、最後に**Ni**を**NTA**に配位させることで目的とする**BS-Tat-NiNTA**、**MV1-Tat-NiNTA**、**BS-R9-NiNTA**、**MV1-R9-NiNTA**を合成した(**Scheme 1**)。

2-1-3. Hisタグタンパク質の分解誘導能評価

プロテインノックダウンの検討は、Hisタグ融合タンパク質を安定発現させた細胞に対して化合物処理を行いウェスタンブロット法によって細胞内タンパク質を定量的に確認することで評価した。標的タンパク質には、既にUPSによるプロテインノックダウンが可能であることが知られているcellular retinoic acid binding protein 2(CRABP2)を選択した。CRABP2のN末端に10残基のヒスチジン(His)、C末端にT7タグを融合した**10xHis-CRABP2-T7**をHT1080細胞に安定発現させた。次いで、合成した化合物(**BS-Tat-NiNTA**、**MV1-Tat-NiNTA**、**BS-R9-NiNTA**、**MV1-R9-NiNTA**)を細胞に添加し、37℃、6時間インキュベート後、各種抗体を用いてウェスタンブロッティングを行うことで細胞内タンパク質を検出し、その存在量の変化を評価した(**Fig. 4**)。

CRABP2分解誘導作用がある**MV1-ATRA**(レーン3)と同様に、合成した全ての化合物は**10xHis-CRABP2-T7**を分解した(レーン5～20)。ユビキチンリガーゼリガンドとしては**BS**よりも**MV1**を導入した化合物がより高い活性を示し、CPPsに関しては**Tat**と**R9**間に顕著な活性の差は見られなかった。また、プロテアソーム阻害剤で

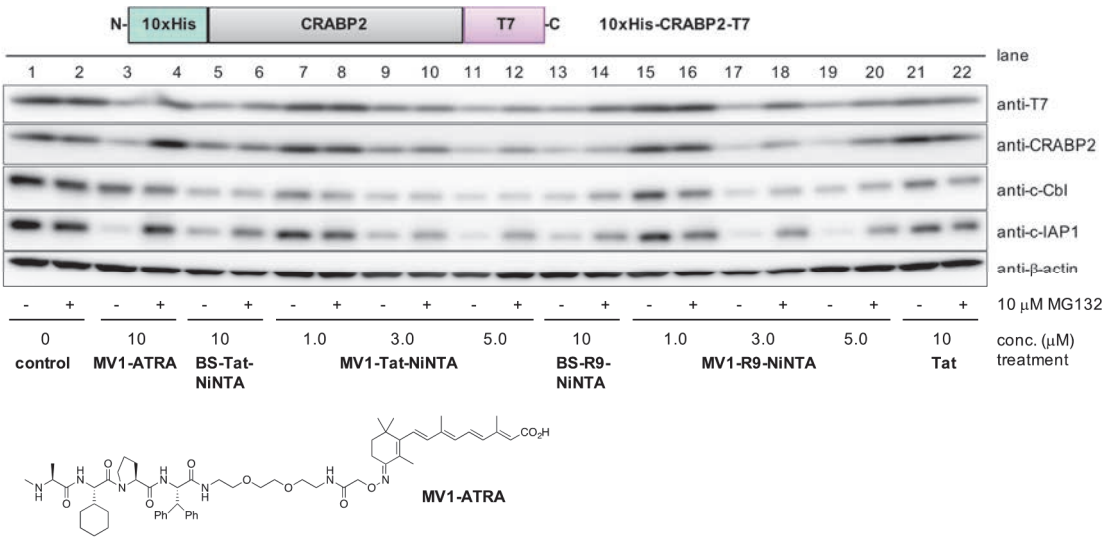


Fig. 4. ハイブリッド分子のHisタグ融合タンパク質分解誘導評価

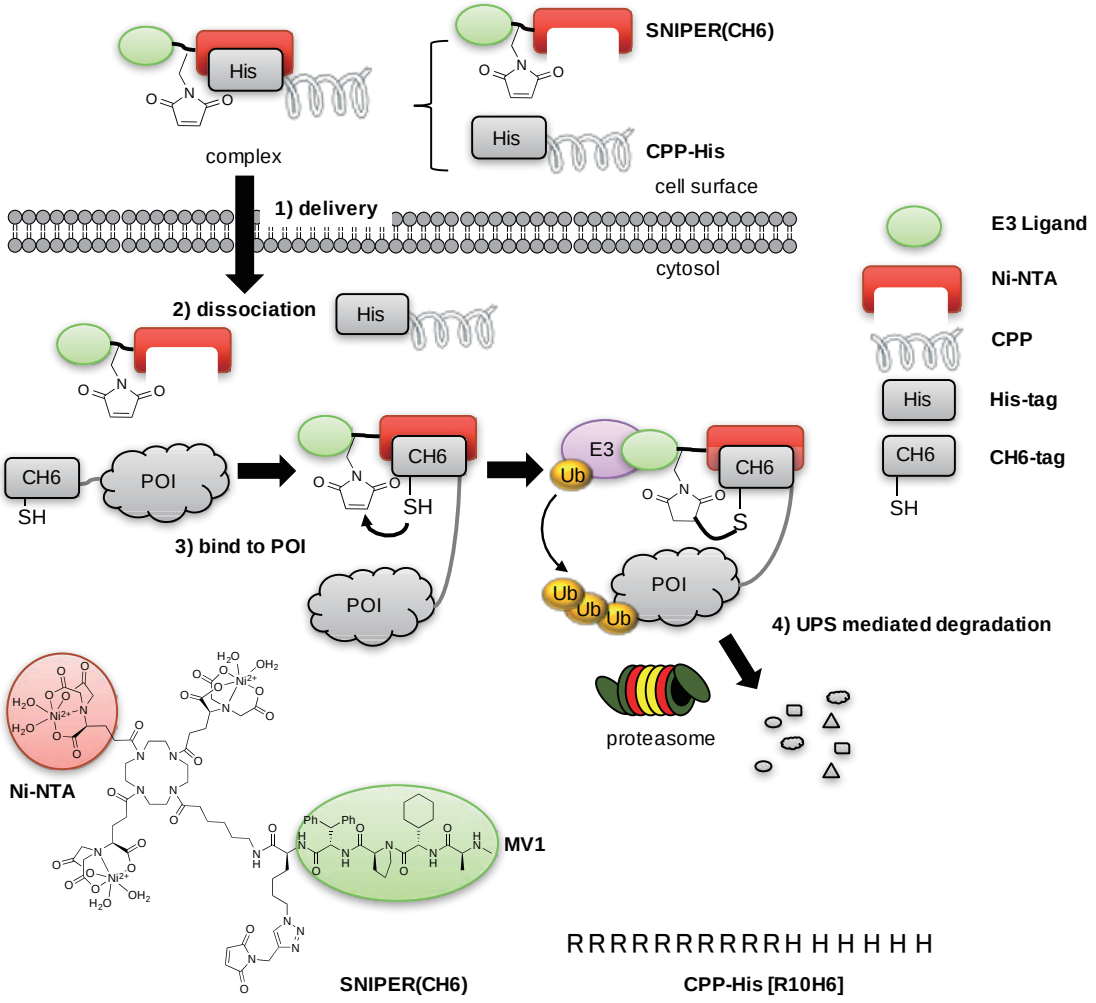


Fig. 5. 分子設計とHisタグ融合タンパク質の分解誘導の推定機構

あるMG132共存下では化合物の活性が低下したことからCRABP2の分解にはプロテアソームが関与していることが示唆された。

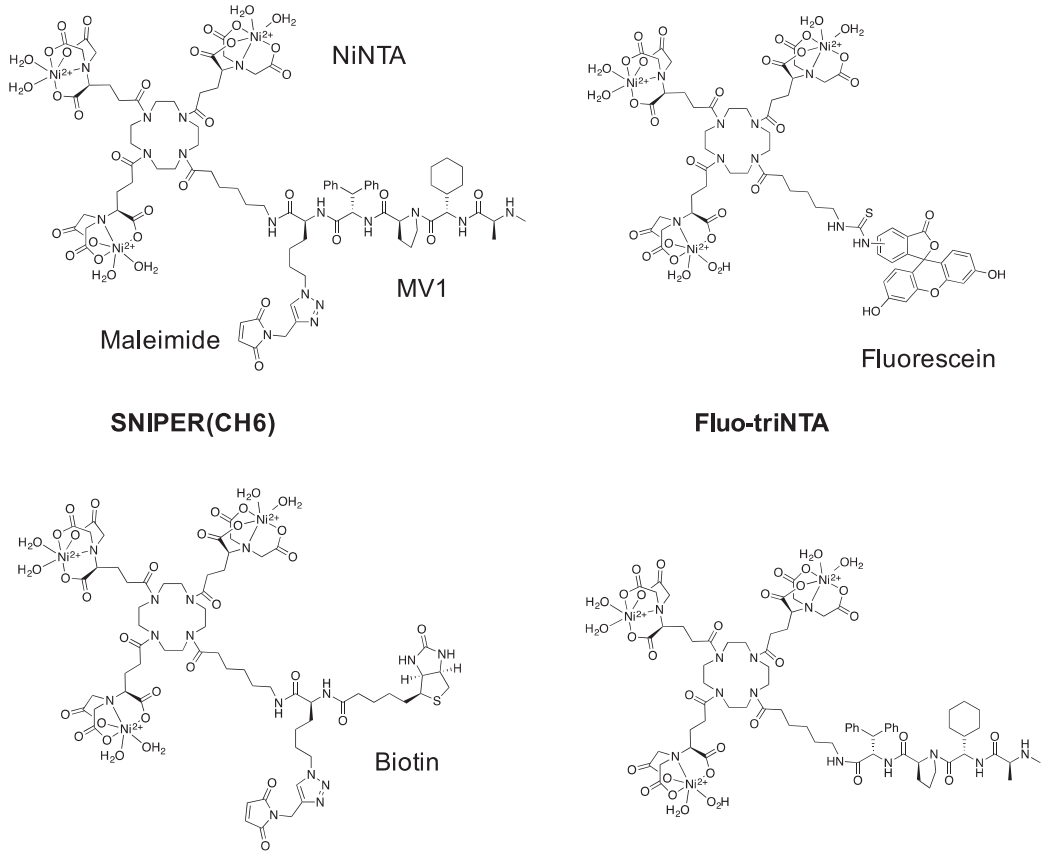
今回開発したハイブリッド分子は、Hisタグ融合タンパク質の分解を誘導することができたが、合成が煩雑であり評価に必要な量を安定して供給することが困難であることから、これらの問題点を克服するためにCPPsとリガンド部を切り離した新たな分子設計と評価系の構築を検討した。

2-2 Hisタグタンパク質分解誘導作用を有する分子およびデリバリーペプチドの開発

2-2-1. 分子設計

新たに設計した分解誘導分子、デリバリーペプチド、及びこれらの分子によるHisタグ融合タンパク質の推定分解機構を**Fig.5**に示す。分解誘導分子は、Hisタグと相互作用する**NiNTA**、ユビキチンリガーゼリガンド（**MV1**）、さらにCH6タグのシステインと共有結合するためのマレイミド基を導入した分子（**SNIPER(CH6)**）を設計・合成した。また、デリバリーペプチドとしてHisタグを導入した膜透過ペプチド（**R10-H6**、**R10-H4A2**）を用いることにより**SNIPER(CH6)**の細胞内への導入効率を高めることを計画した。標的タンパク質としては、CRABP2のN末端にシステインとヒスチジンから構成されるCH6タグと検出用のFLAGタグを融合した**2x(CH6)-FLAG-CRABP2**タンパク質をHT1080細胞に安定発現させた系を構築することで、**SNIPER(CH6)**による分解誘導を評価することとした。

さらに、タンパク質の分解メカニズムを解析するために以下の分子を設計した。即ち、デリバリーペプチ



$Ac\text{-}YRRRRRRRRRRGHHHHHH\text{-}NH_2$ **R10-H6**

$Ac\text{-}YRRRRRRRRRRGHAHAHH\text{-}NH_2$ **R10-H4A2**

Fig. 6. 分子設計

ドによる**NiNTA**搭載分子の細胞内導入を評価するために**MV1**をFluoresceinに置換した**Fluro-triNTA**、分子中のマレイミド基とCH6タグ融合タンパク質の結合を評価するためにBiotinを導入した**Biotin-mal-triNTA**、タンパク質の分解におけるマレイミド基の効果を確認するための**SNIPER(His)**、分解誘導分子の細胞内デリバリー効果を評価するための2種類のペプチド**R10-H6**、**R10-H4A2**を設計した(**Fig.6**)。

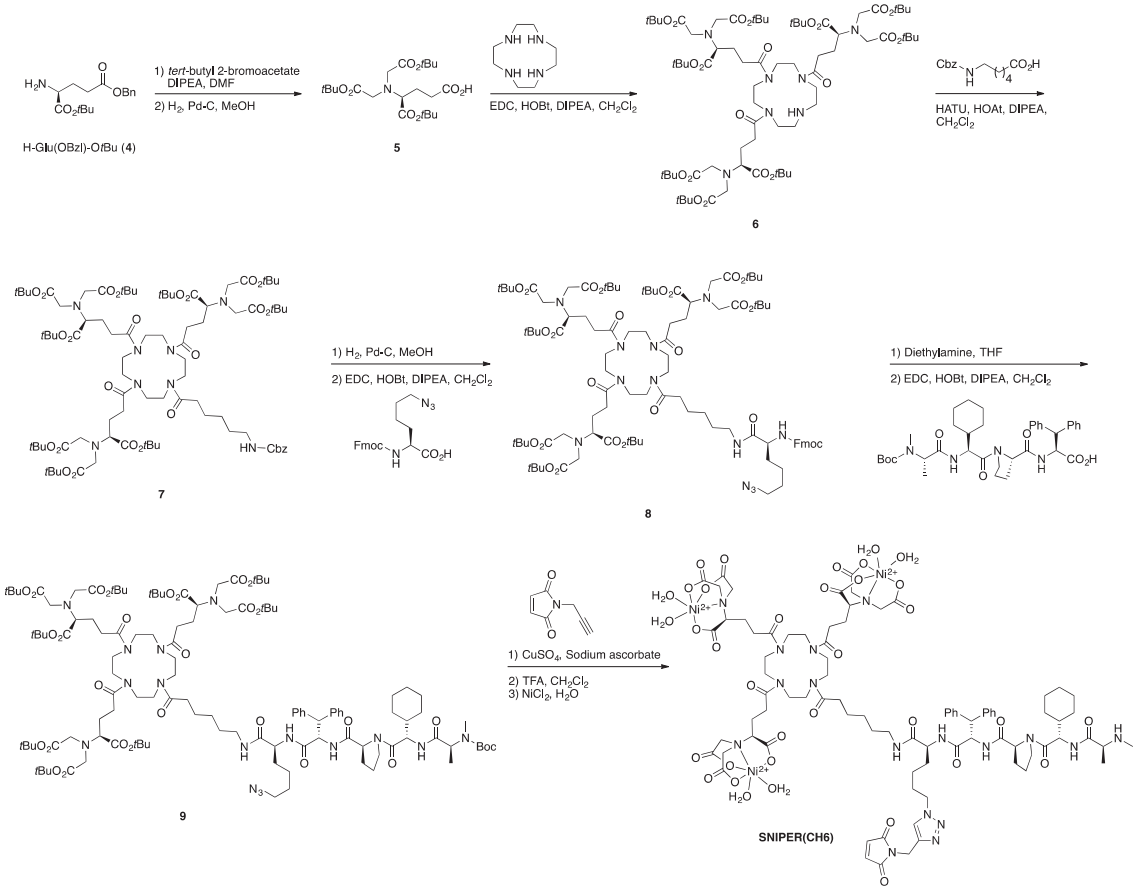
2-2-2. 分解誘導分子の合成

Hisタグとの親和性を向上させることを狙って**NiNTA**を3分子導入した分解誘導分子**SNIPER(CH6)**は**Scheme 2**に示すルートにより合成した。さらにマレイミド基は合成の終盤でクリック反応を利用することで効率的に導入した。メカニズム解析を行うための他の分子も同様のルートで合成し、デリバリーペプチドはマイクロ波を利用した固相法により効率的に合成した。

2-2-3. NiNTA搭載分子の細胞内導入評価および分解誘導分子のCH6タグ融合タンパク質結合評価

2x(CH6)-FLAG-CRABP2を安定発現させたHT1080細胞に、3μMの**Fluro-triNTA**、及び6μMのデリバリーペプチド**R10-H4A2**を添加し37℃で3 時間インキュベートした後、蛍光顕微鏡を用いて**Fluro-triNTA**の細胞内導入を観察した。その結果、**Fluro-triNTA**単独では細胞内の蛍光は観察されず、デリバリーペプチドとの共添加により細胞内輸送が達成された(**Fig. 7(a)**)。

標的タンパク質へのリガンド結合を評価するために、ビオチンを導入した**Biotin-mal-triNTA**を用いて**2x(CH6)-FLAG-CRABP2**のビオチン化を検討した。**2x(CH6)-FLAG-CRABP2**を安定発現させたHT1080細胞に3μMの**Biotin-mal-triNTA**／**R10-H4A2**複合体を添加し37℃、2時間インキュベート後、ビオチンのプルダウンアッセイを行った。その結果、ビオチン化したCRABP2が検出されたため、本手法によって標的タンパク質に対して**Biotin-mal-triNTA**が共有結合していることが示唆された(**Fig. 7(b)**)。



Scheme 2. SNIPER(CH6)の合成

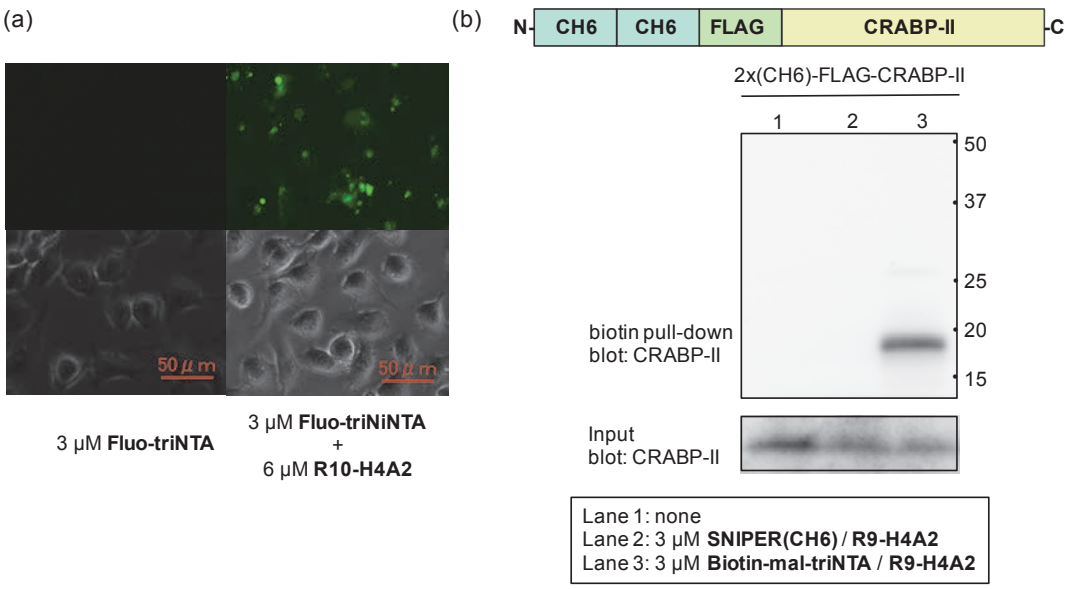


Fig. 7. (a)NiNTA搭載分子の細胞内導入評価、(b)CH6タグ融合タンパク質のプルダウンアッセイ

2-2-4. CH6タグ融合タンパク質の分解誘導能評価

2x(CH6)-FLAG-CRABP2を安定発現させたHT1080細胞を用いて、合成した化合物の活性を評価した。本実験では3μMの化合物および3μMのペプチドを細胞に添加し、37℃、6時間インキュベート後、各種抗体を用いてウェスタンブロッティングを行うことで細胞内タンパク質を検出し、その存在量の変化を評価した。**Fig. 8(a)**のレーン2に示すように、**SNIPER(CH6)**と**R10-H4A2**を共

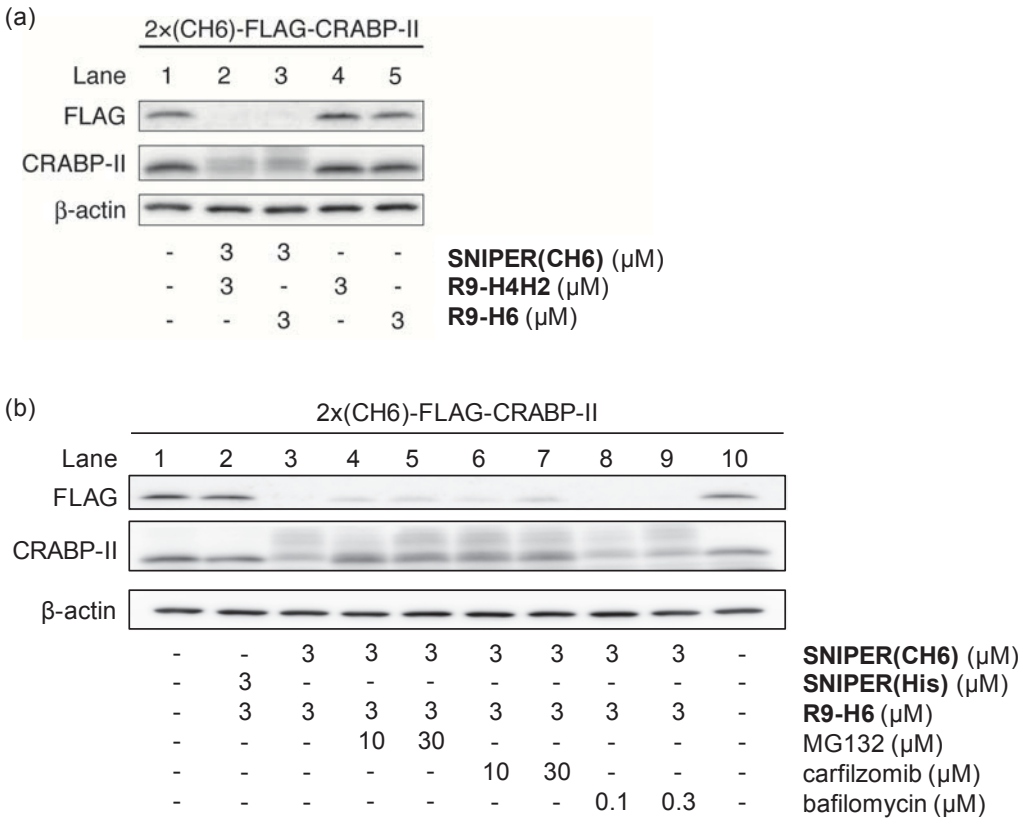


Fig. 8. CH6タグ融合タンパク質分解誘導評価

Fig. 9. CH6タグ融合Smad2分解誘導評価

添加することで**2x(CH6)-FLAG-CRABP2**が分解することが明らかとなった。また、**R10-H4A2**と**R10-H6**間での活性の差は見られなかった(レーン2および3)。

続いて、**SNIPER(CH6)**による分解がプロテアソーム由来であることを確認するため、プロテアソーム阻害剤であるMG132、carfilzomibとリソソーム阻害剤であるbafilomycinを用いて、評価を行った。同時に、**SNIPER(CH6)**と**SNIPER(His)**を用いて標的タンパク質への共有結合が分解誘導活性に与える影響を検討した(**Fig.8(b)**)。なお、本実験では化合物添加前、予め細胞に阻害剤を添加して37℃、30分インキュベートした後、化合物を添加し37℃、6時間インキュベートし、ウェスタンブロッティングにより評価を行った。実験の結果、プロテアソーム阻害剤により**SNIPER(CH6)**の活性が低下した(レーン5、7)。また、**SNIPER(His)**の活性は見られなかった(レーン2、ただし20μMにおいては分解活性が見られた)。よって**SNIPER(CH6)**による**2x(CH6)-FLAG-CRABP2**の分解にはプロテアソームが関与していることが示唆された。加えて**SNIPER(His)**では活性が見られないことから、分解誘導剤は共有結合により標的タンパク質への親和力を高めることが活性に重要であることが示唆された。

次いで汎用性を確かめるために、CH6タグを2回繰り返したタグ、抗体検出用に2回繰り返しFLAGタグをN末端に融合した**2x(CH6)-2xFLAG-Smad2**を安定発現するHT1080細胞を用いて、本化合物の活性を評価した。その結果、**SNIPER(CH6)**は3μMで**2x(CH6)-2xFLAG-Smad2**の存在量を減少させた(**Fig.9**)。最後に本手法で用いている化合物群の細胞毒性を確認し、汎用可能な化合物であるか検討した。本実験では各濃度(1, 3, 10μM)に調整した**SNIPER(CH6)**、**R10-H6**、**R10-H4A2**及びその複合体溶液でHT1080細胞を処理し、24時間37℃でインキュベート後、細胞生存率をCell Counting Kit-8を利用して450nmの吸光度から算出した。その結果、プロテインノックダウンの有効濃度範囲では顕著な細胞毒性は示されていないため、本手法は汎用可能なプロテインノックダウン法になり得ることが示唆された。

3．まとめ

多種多様なタンパク質に対しUPSを介したプロテインノックダウンを簡便に行うため、CH6タグを標的タンパク質に融合し、タグ特異的に結合する分解誘導剤を開発し、用いることで課題の解決を試みた。各条件での評価結果から**SNIPER(His)**は分解活性を示さないが、**SNIPER(CH6)**はUPSを介した分解活性を示すことが明らかとなった。この結果から分解誘導剤が標的タンパク質に共有結合で結合することが重要であることが示唆された。これは非共有性の結合であると標的タンパク質のユビキチン化が十分に行われる前に標的タンパク質から分解誘導剤が乖離してしまうことが原因であると推測される。今回報告したシステムは、今後のUPSによるプロテインノックダウン法の発展のみならず、新規医薬品開発へ繋がることで創薬、医学、生理学等の研究分野に貢献することを期待する。

4．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。

発表論文

1. Development of a small hybrid molecule that mediates degradation of His tag-fused proteins, K. Okitsu, T. Hattori, T. Misawa, T. Shoda, M. Kurihara, M. Naito,* Y. Demizu,* *J. Med. Chem.*, *61*, 576-582 (2018).
2. Simple and efficient knockdown of His-tagged proteins by ternary molecules consist of His-tag ligand, ubiquitin ligase ligand and cell penetrating peptide, T. Hattori, K. Okitsu, N. Yamazaki, N. Ohoka, N. Shibata, T. Misawa, M. Kurihara, Y. Demizu,* M. Naito,* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *27*, 4478-4481 (2017).
3. Development of an ON/OFF switchable fluorescent probe targeting His tag fused proteins in living cells, K. Okitsu, T. Misawa,* T. Shoda, M. Kurihara, Y. Demizu,* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *27*, 3417-3422 (2017).

関連学会発表

1. 沖津航陽，服部隆行，三澤隆史，栗原正明，内藤幹彦，出水庸介，Hisタグ融合タンパク質分解誘導分子の設計と合成，ケミカルバイオロジー第12回年会，札幌(2017．6)．
2. 沖津航陽，服部隆行，出水庸介，三澤隆史，正田卓司，内藤幹彦，栗原正明，ユビキチンープロテアソーム系を介したHisタグタンパク質分解誘導分子の開発，日本薬学会第137回年会，仙台(2017．3)．
3. 出水庸介，沖津航陽，服部隆行，三澤隆史，内藤幹彦，栗原正明，Hisタグ融合タンパク質分解誘導分子の開発，第42回反応と合成の進歩シンポジウム，静岡(2016．11)．
4. 沖津航陽，服部隆行，出水庸介，三澤隆史，正田卓司，内藤幹彦，栗原正明，Design and synthesis of degradation of inducers targeted on His-tag fused proteins，第53回ペプチド討論会，京都(2016．10)．
5. 沖津航陽，服部隆行，出水庸介，三澤隆史，正田卓司，内藤幹彦，栗原正明，Hisタグ融合タンパク質分解誘導分子の開発，第60回日本薬学会関東支部大会，東京(2016．9)．
6. 沖津航陽，出水庸介，三澤隆史，栗原正明，Hisタグ融合タンパク質分解誘導分子の開発，第48回若手ペプチド夏の勉強会，東京(2016．8)．
7. 沖津航陽，服部隆行，出水庸介，三澤隆史，正田卓司，内藤幹彦，栗原正明，Hisタグタンパク質分解誘導分子の開発，日本薬学会第136回年会(2016．3)．

申請者　富山県立大学　竹井　敏

真空系プラズマエッチング装置・プロセスを不要にできる感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料の開発

富山県立大学　工学部医薬品工学科
竹井　敏

1．背景と目的

現在、半導体やディスプレイ等の製造で必須である無機薄膜表面のナノパターンは、あらかじめ無機物質を蒸着やスパッタなど真空を必要とする装置で成膜後、レジストを塗布・露光・有機溶媒またはアルカリで現像・再び真空装置内で反応性ガスを用いてエッチング・レジスト剥離という非常に複雑な工程で形成されている。この工程で用いる有機溶媒やアルカリ現像液は環境に優しいとは言えず、真空装置は一般に高価である。

本研究は、高価な真空装置による製膜、有機溶媒やアルカリを用いた現像工程を不要とする、全く新規な感光性有機無機ハイブリッドナノパターニング材料に関するものである。バイオマス資源であるプルランや糖鎖材料などの水溶性材料を用いて水現像可能な感光性有機無機ハイブリッドナノパターニング材料を開発し、環境配慮型の無機物質パターンニングプロセスの実現を目指した。本技術により、半導体、ディスプレイなどの電子デバイス、センサー、MEMSなど様々な分野に展開可能な種々の無機物質のパターンニングが可能となり、現行プロセスに代わる新規な環境適応型・省エネルギープロセスが達成できる。

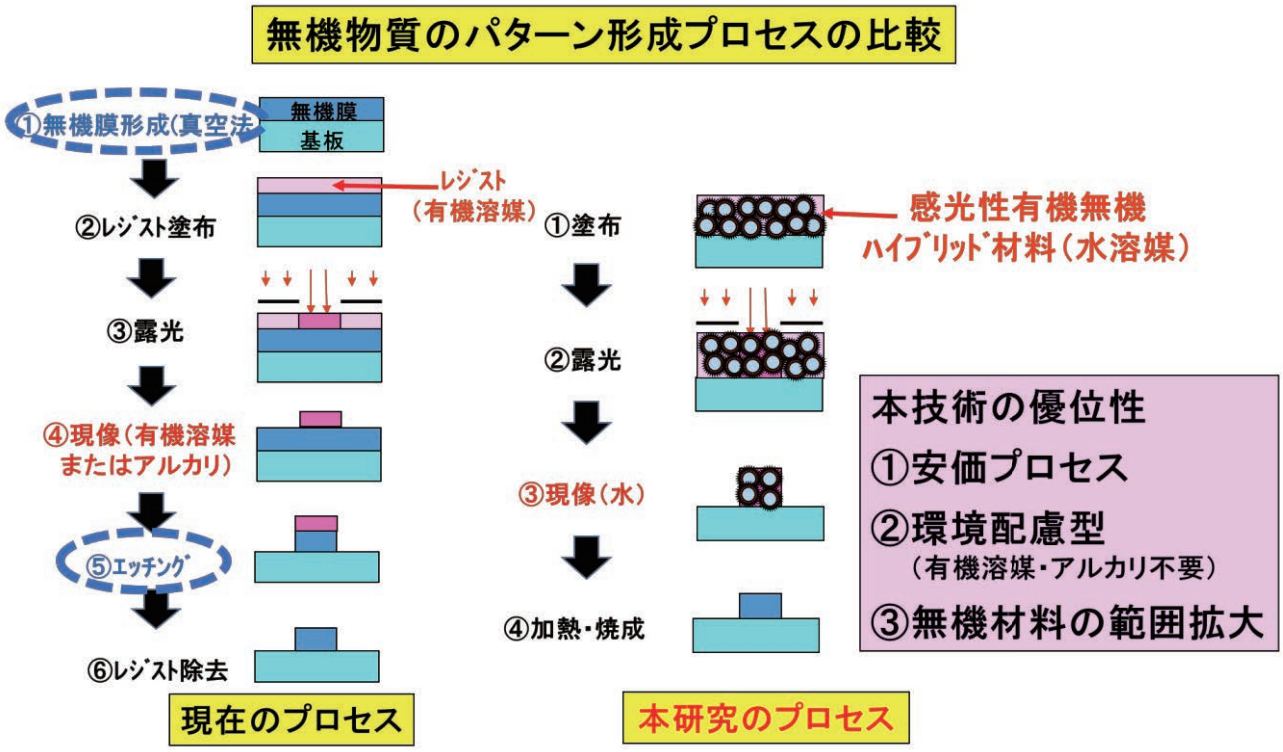


図1　感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料によるエッチングレスパターン形成技術の優位性

2．環境配慮型の無機物質パターンニングプロセス

環境配慮型の無機物質パターンニングプロセスを現在のプロセスに比較して図１に示す。①従来の無機膜形成➡レジスト塗布➡露光➡有機溶媒またはアルカリによる現像➡エッチング➡レジスト剥離という複雑かつ高コストな工程に比べて、感光性有機無機ハイブリッド材料を塗布➡露光➡水現像➡加熱・焼成という極めてシンプルかつ安価なプロセスで無機物質のパターンが形成できる。

また、②有機材料としてバイオマス由来の材料を使用することで、従来のプロセスで用いられていた有機溶媒、アルカリ、エッチング用ガスといった環境に優しくない材料をすべて水に変えることができ、環境配慮型プロセスが可能となる。

更に、③パターンを形成できる無機材料の範囲拡大ができる。現在の無機物質のパターン形成法のさらなる問題点は、パターン形成できる無機物質の種類が限定されることであった。蒸着やスパッタなどの真空法で均一な薄膜ができる材料や、反応性ガスでエッチングできる材料以外の無機材料の微細パターンを形成するには極めて特殊な材料やプロセスが必要であったが、環境配慮型の無機物質パターンニングプロセスにより改善できる利点がある。

3．感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料の開発

次の方法を含む、新たな水現像可能な感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料の開発を進めた。通常の感光性ペーストは、感光性樹脂や感光性モノマーなどの有機成分に感光性を持たない無機粒子を分散したものである。我々は無機粒子にも感光性を付与することにより、無機粒子自身が有機成分と、あるいは無機粒子同士で硬化反応するようにした。このことにより、露光部での硬化が促進され、少ない露光量でも十分硬化する高感度化が達成できると共に、極めて強固な硬化膜が形成できた。

1）有機成分

バイオマス由来の材料として水溶性のHydroxypropylcellulose（HPC）、架橋剤として2-methacryloyloxyethylisocyanate（MOI）等を使用することで、架橋機構を有する熱または光硬化性セルロースを開発した。HPCとは、セルロースの水酸基を酸化プロピレンでエーテル化することで得られるセルロースの誘導体である。HPCはセルロース骨格にヒドロキシプロポキシ基を導入してセルロースの水素結合を妨げることで溶媒に可溶である。さらに反応性も良く高い分子量を

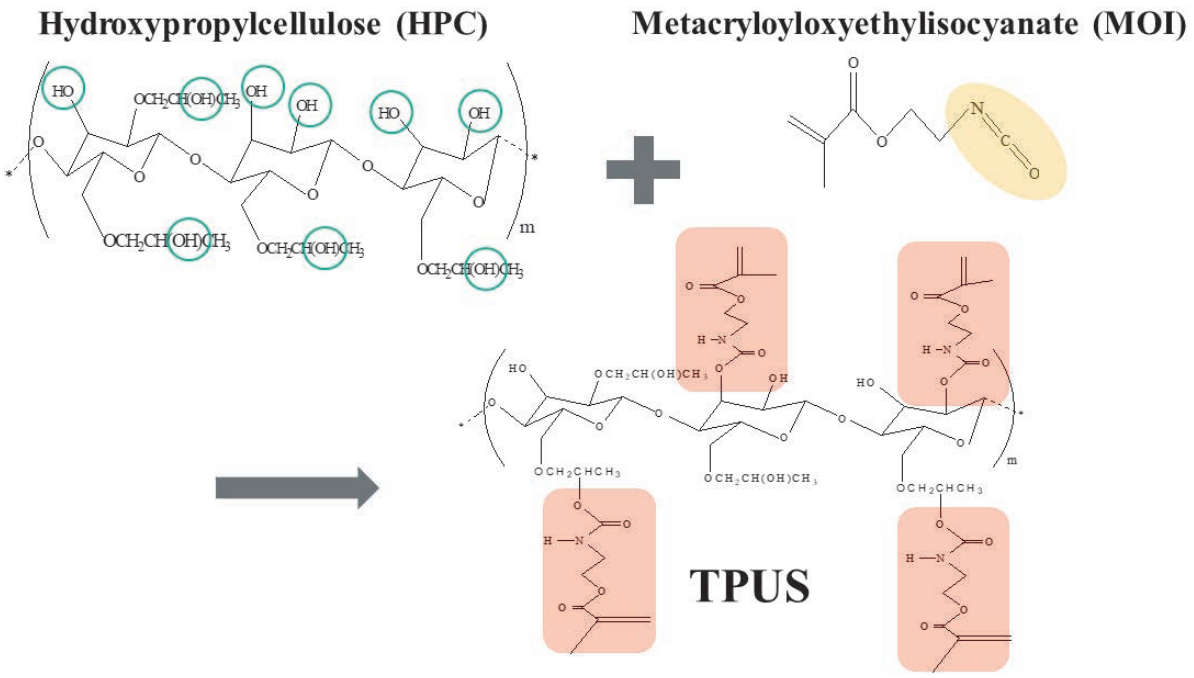


図２　バイオマス由来のセルロースへの感光性基の導入

持つことからラジカル重合の機構を有するモノマーを付与させる主材料として用いられている。

MOIは一方に二重結合を有しておりウレタン結合誘導体においてアクリレート並の光硬化性があるUV硬化モノマーである。またもう一方にはイソシアネート基を有しており、水酸基と反応することでウレタン結合するイソシアネートモノマーでもある。MOIのイソシアネート基と、HPCの水酸基を先に反応させることで、HPCに二重結合を残し、架橋性を持たせることができる。HPCとMOIの構造、およびそれらの反応式を図２に示す。

HPCの水酸基の一部がMOIに置換された熱または光硬化性セルロースを、**TPUS**と名づけた。得られたTPUSはメチルエチルケトンに可溶で黄色の均一な液体物が得られた。

２）無機成分

図３に示す無機粒子への感光性の付与方法により、感光性の付与は無機物粒子の表面に存在するヒドロキシル基などにシランカップリング剤を介して導入した。

３）感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料の調整

得られた両成分を複合化して、感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料とした。上記１）の有機成分TPUSと２）の無機成分を適度に配合することにより有機成分、無機成分の双方に感光性を付与する感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料を複数調整した。

４．感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料による垂直現像法

有機成分、無機成分の双方に感光性を付与する感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料により、露光量を少なくすること(高感度化)ができ入射光の散乱がかなりの程度抑えられるが、粒子による入射光の吸収がある限り、ペースト底部での硬化不足は依然として存在する。そこで底部まで硬化させるのではなく、硬化は表面部分のみとし、底部は未硬化のままでパターンニングする方法を本研究で採用した。図２と３で合成した有機成分、無機成分の双方に感光性を付与する感光性有機系ハ

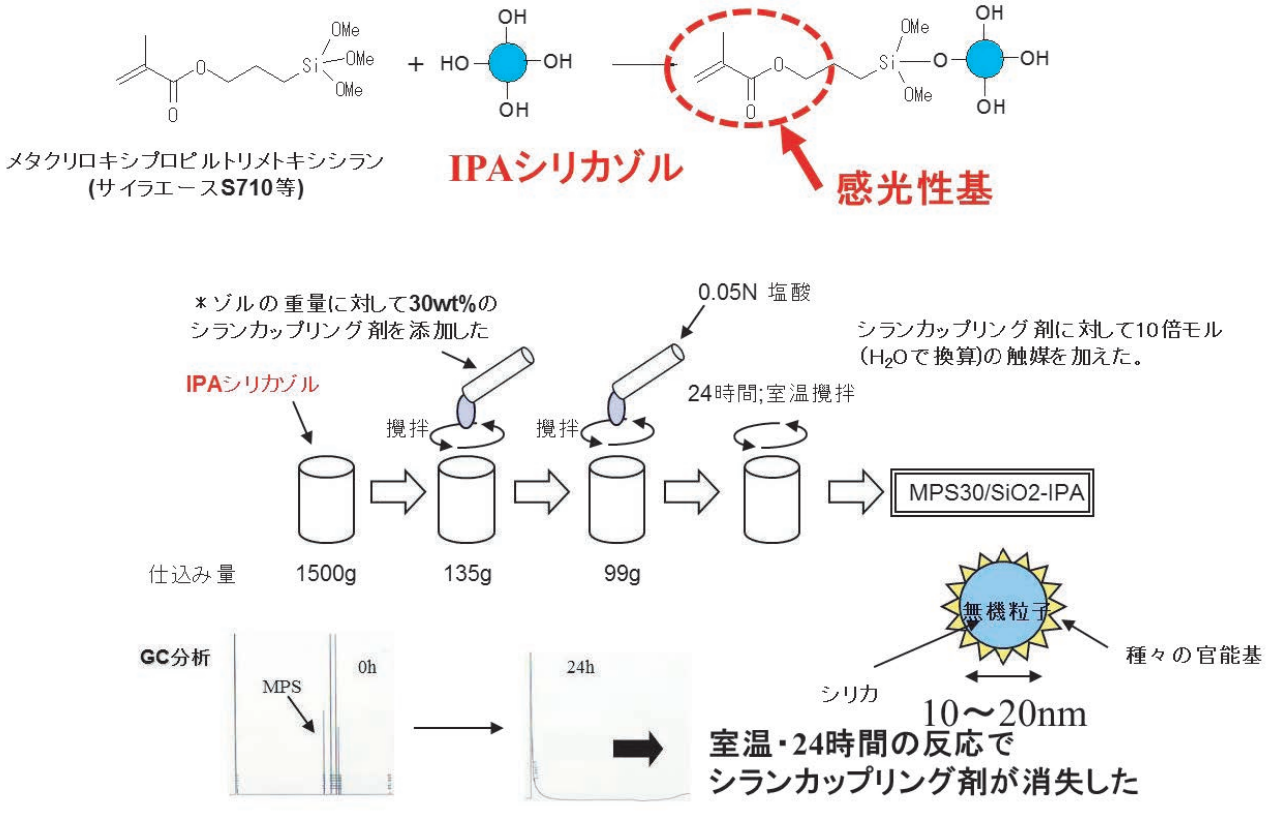


図３　無機粒子への感光性基の導入

イブリッドナノパターニング材料による垂直現像法を開発した。

表面部分には極めて強固な硬化膜(表面難溶化層)が形成されているので、これをマスクにして露光されていない非硬化部分を現像しながら基板に対して垂直方向にエッチングできれば、露光部分の底部が十分硬化していなくても良好な垂直形状のパターンが得られるはずである。種々の現像液や現像方法を試みた結果、超高圧水を基板に対して垂直方向に照射すると、非露光部は現像と共にエッチングされ、露光部のみに良好な矩形性を持つパターンを形成することができた。

基板に対して垂直方向に照射することから我々はこの現像を「垂直現像」と名付けた。極めて興味深いことに、この現像時の条件、たとえば水圧や水噴射ノズルの形状、照射する方向や時間を適度に調整することにより、種々の断面形状を有するパターンが得られることが明らかになった。

具体的には、水圧が高い場合は図４の左側の絵のような逆台形に、また水圧を時間経過と共に徐々に低くすることにより右側の台形状のパターンとなった。また斜面の部分を湾曲させることも可能であった。また、水の照射角度を基板に対して斜め方向にすることにより、非対称形状のパターンも得られた。

特に、図２と３で合成した有機成分、無機成分の双方に感光性を付与する感光性有機無機ハイブリッド材料(フォーミレーション最適化品　TPUS-hybrid)によるエッチングレスパターン(ディスプレイパネルの隔壁)形成例を図５に示す。

ディスプレイパネルの隔壁の場合は、ディスプレイパネルの発光効率を高めるため隔壁間に配置される蛍光体の表面積ができるだけ大きくなるように、側壁が湾曲した富士山型の隔壁形状が好ましい。無機粒子として感光性を付与した無機粒子を用い、さらに粒径を制御、これらを高充填(90重量％以上)した感光性ペーストを塗布、露光後、垂直現像によりパターンニングすることにより、所望の形状のパターンを得ることができた。

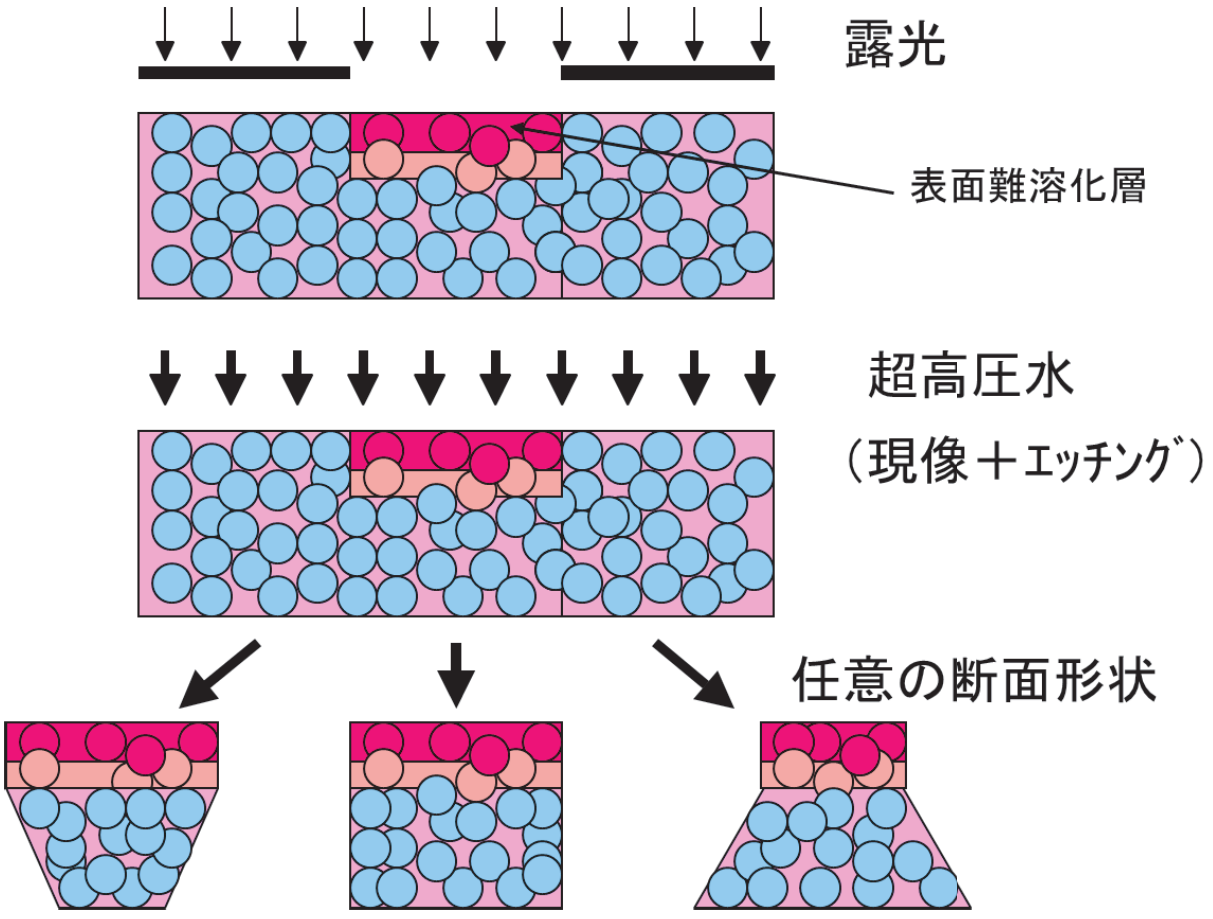


図４　感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料による垂直現像法

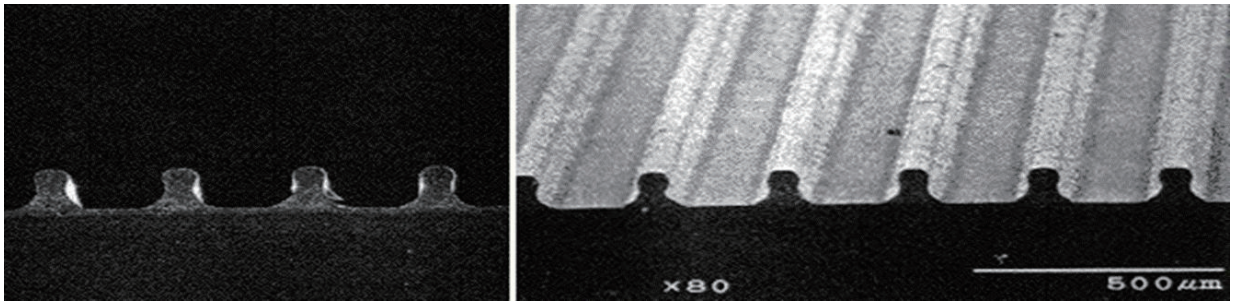


図5　感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料によるエッチングレスパターン形成例

ペースト材料や露光量を調整して表面難溶化層の強度(硬化度)や厚さを変え、またこれらと現像条件の組み合わせにより、さらに種々の形状を持つパターンが得られ、これらを利用した感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料によるエッチングレスパターン形成の種々の展開に活用できる。

5．本研究の成果（まとめ）

「高価な真空装置による製膜、有機溶媒やアルカリを用いた現像工程を不要とする感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料」の試作品を開発した。具体的には、①バイオマス材料である水溶性のセルロース材料を用い、②無機物質に感光性を付与し、③水現像に適合する有機成分、無機成分の双方に感光性を付与する感光性有機無機ハイブリッド材料(TPUS-hybrid)のサンプルワークを開始した。

6．謝辞

本研究では目的とした、「真空系プラズマエッチング装置・プロセスを不要にできる感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料の開発」の開発をほぼ計画通り進めることができた。公益財団法人松籟科学技術振興財団の関係者様に心から感謝申し上げる。

7．成果公開

学術論文

- Satoshi Takei, Shinya Nakajima, Makoto Hanabata: “High-resolution patterning of silver nanopaste containing volatile solvents achieved with gas-permeable mold” *Microelectronic Engineering*, 190(2018) 68-72.
- Shinya Nakajima, Satoshi Takei, Soichiro Takamatsu, Kento Mizui, Toshitaka Oka, Yoko Matsumoto, Atsushi Sekiguchi, Makoto Hanabata: “Ultraviolet nanoimprint gas-permeable templates derived from cellulose with acrylate and methacrylate groups to reduce void defects” accepted to *Jpn. J. Appl. Phys.*, 57 (2018).
- Satoshi Takei, Naoto Sugino, Makoto Hanabata, Akihiro Oshima, Miki Kashiwakura, Takahiro Kozawa, and Seiichi Tagawa: “Ecofriendly ethanol-developable processes of electron beam lithography using positive-tone dextrin resist material” *Appl. Phys. Express*, 10 (2017) 076502:1-076502:4.
- Satoshi Takei and Makoto Hanabata: “High-resolution nanopatterning of biodegradable polylactide by thermal nanoimprint lithography using gas permeable mold” *AIP adv.*, 7 (2017) 035110.1-7.

国際会議発表

- Satoshi Takei, Naoto Sugino, Makoto Hanabata: “Organic-inorganic hybrid resist materials in advanced lithography” Proc. SPIE (2017) 103541Q.1-103541Q.6.

展示会発表

- 竹井　敏、「真空系プラズマエッチング装置・プロセスを不要にできる感光性有機系ハイブリッドナノパターニング材料」Nano tech 2018 第17回 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議、東京ビックサイト、平成30年2月14-16日(2018)小間番号：6X-08

- 竹井　敏、「グリーンリソグラフィを用いた植物系機能性材料の開発」Nano tech 2017 第16回 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議、東京ビックサイト、平成29年2月15-17日(2017)小間番号：５S-08

受賞

- Satoshi Takei, World Academic Championship -2018 in Nanotechnology, Outstanding scientific contributions in Nanotechnology International Agency for Standards and Ratings, Feb. 7, 2018
- 竹井　敏、第34回とやま賞、「植物由来高付加価値機能材料」、2017年5月30日、富山県ひとづくり財団

申請者　山形大学　東原　知哉

分子内触媒移動重合法を用いた全共役p型/n型半導体ブロック共重合体の開発と非フラーレン系有機薄膜太陽電池への応用

山形大学　大学院有機材料システム研究科
東原　知哉

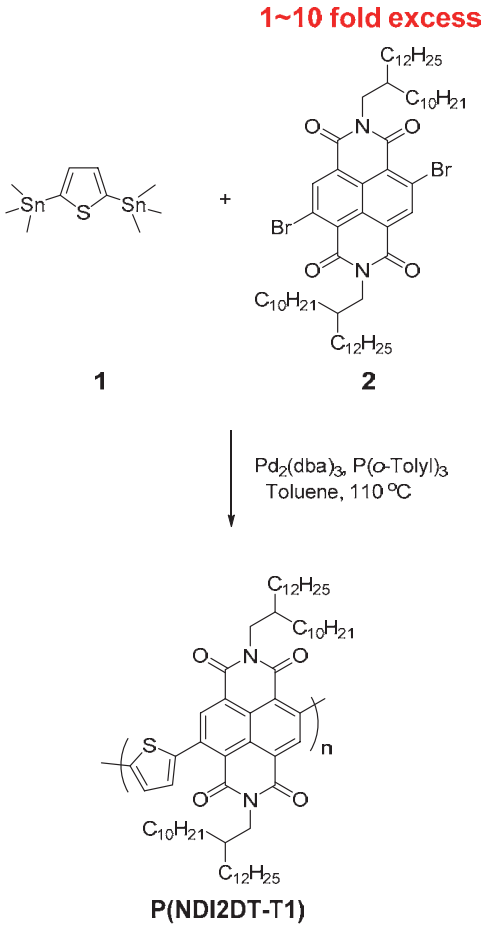
1．目的と背景

本研究では、光電変換機能を有するエネルギー材料の創出を目的とした。製造プロセスの容易な太陽電池として、有機太陽電池やペロブスカイト太陽電池が注目されており、国内外で効率競争や低温プロセス化が進んでいる。ペロブスカイト太陽電池は高効率（エネルギー変換効率PCE～22.7%[1]）であるが、一般には約500℃のTiO_2コンパクト層焼成温度が必要である。一方、有機太陽電池は低温製造プロセス（＜150 ℃）が可能で、印刷による安価な製造プロセスやフレキシブル性付与が期待されるものの、まだ効率改善の余地がある（PCE~15%[2]）。

最近のトレンドとして、分子設計や合成の容易な非フラーレン系n型半導体材料を用いた全ポリマー型有機薄膜太陽電池が注目されており[3-8]、PCE~9%が達成されている[9]。ただし、用いる半導体高分子材料の分子量や分子量分布が規制された例は非常に少ない。半導体高分子の分子量や分子量分布は半導体性能に影響を及ぼすことが知られているため[10]、これらパラメーターの制御は極めて重要である。本研究では、分子内触媒移動[11-20]を利用した全共役ｐ型/ｎ型半導体ブロック共重合体群の合成法の開発および一部材料についてホール移動度および太陽電池評価を行った。

2．分子内触媒移動を用いた末端官能基化ナフタレンジイミド含有ポリマーの合成

π共役系高分子は、主にAA型モノマーとBB型モノマーの重縮合により合成さる。例えば、ジスタニル含有モノマー（AA型モノマー）とジブロモ含有モノマー（BB型モノマー）の右田-小杉-スティルカップリング重縮合により、ドナー・アクセプター型交互共重合体が得られる。一方、高い重合度のポリマーを得るため、AA型モノマーとBB型モノマーは厳密に等モル使用する必要がある。ところが、2,5-ビス（トリメチルスタニル）チオフェン（**1**）とナフタレンジイミド含有ジブロモモノマー（**2**）との右田-小杉-スティルカップリング重縮合（Scheme 1）において、**2**を**1**に対して1～10当量用いても高分子量のn型半導体ポリマー（P（NDI2DT-T1））が得られることを発見した（Table 1）[15,16]



Scheme 1. Nonstoichiometric Migita-Kosugi-Stille coupling polycondensation between **1** and **2**.

Table 1. Results of nonstoichiometric Migita-Kosugi-Stille coupling polycondensation between **1** and **2**[a]

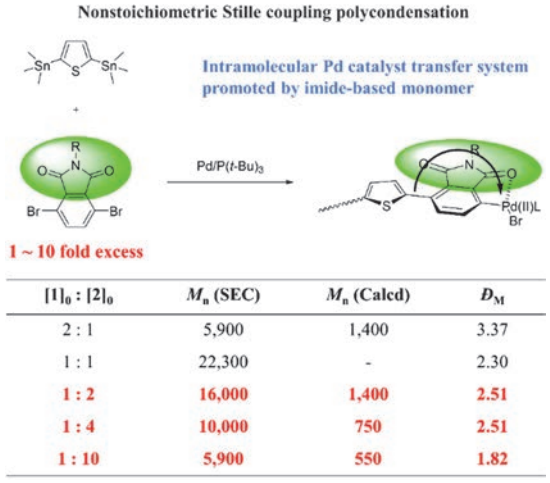
$[\mathbf{2}]_0/[\mathbf{1}]_0$[b]	M_n[c]	$Đ_M$[c]
0.5	-[d]	-[d]
1	23,500	2.00
1.25	17,800	1.93
2	14,500	1.64
4	10,200	1.46
10	8,500	1.42

[a]The polymerization yields were almost quantitative based on the feeding quantity of **1** when $[\mathbf{2}]_0/[\mathbf{1}]_0>1$. [b]The feeding molar ratio of **2** and **1**. [c]Determined by SEC in *o*-dichlorobenzene at 140 ℃ using polystyrene standards. [d]The polymerization was not proceeded.

これは、辻-トロストアリル化反応による非等モル下重合で報告された分子内Pd(0)触媒移動[11,12]と同じ機構によるものと考えられ、ポリマー鎖末端のブロモ基が成長反応に完全消費されるまで、過剰のジブロモモノマーが重合に関与しないためと考察できる。同様の現象が、鈴木-宮浦カップリング重縮合系でも発見されている[17,18]。

得られたP(NDI2DT-T1)の両末端は過剰量用いたナフタレンジイミド骨格になっており、ブロック共重合体のビルディングブロックとしての利用可能性を示した[16]。

ごく最近、マレイミド骨格やエステル骨格を有するジブロモモノマーをジスタニルモノマーよりも過剰に用いた右田-小杉-スティルカップリング重縮合系においても非等モル下での重合が進行し高分子量体が得られることが分かった[19,20]。反応点であるブロモ基近傍のカルボニル基の存在が、分子内Pd(0)触媒移動を促進していると示唆される結果を得ており(Figure 1)、今後、両末端官能基の特定とブロック化への応用が期待される。



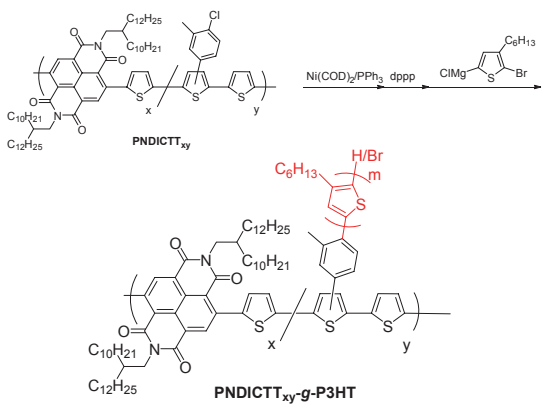
$[\mathbf{1}]_0 : [\mathbf{2}]_0$	M_n (SEC)	M_n (Calcd)	$Đ_M$
2 : 1	5,900	1,400	3.37
1 : 1	22,300	-	2.30
1 : 2	16,000	1,400	2.51
1 : 4	10,000	750	2.51
1 : 10	5,900	550	1.82

Figure 1. Nonstoichiometric Migita-Kosugi-Stille Coupling Polycondensation via Intramolecular Pd(0) catalyst transfer promoted by imide-based monomer.

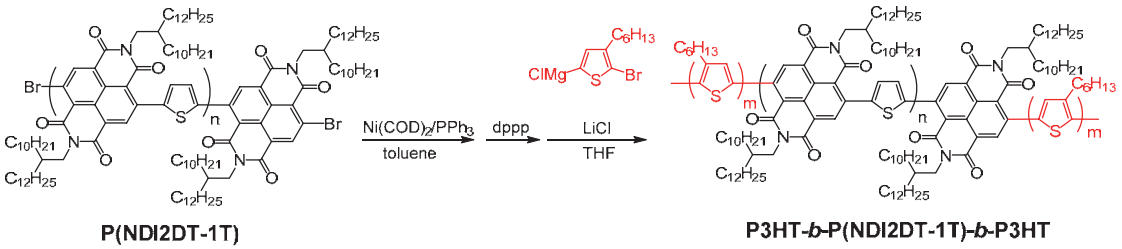
3．全共役系p型/n型半導体ブロック共重合体の合成

全共役系p型/n型半導体ブロック共重合体の合成例は少ない。p型半導体高分子とn型半導体高分子のカップリング反応により、ポリ(3-オクチルチオフェン)-*b*-ポリ(キノキサリン)-*b*-ポリ(3-オクチルチオフェン)[21]、ポリ(3-ヘキシルチオフェン)(P3HT)-*b*-PFTBTT[22]、およびP3HT-*b*-PF8TBT[23]が合成されたものの、高分子量体同士のカップリング反応収率は一般に低くなる。また、鎖末端にブロモ基を有するP3HTとn型モノマーを共重合させる方法が開発され、P3HT-*b*-ポリ(ピリジニウムフェニレン)[24]、P3HT-*b*-ポリ(ナフタレンジイミド)-*b*-P3HT[25]、およびP3HT-*b*-ポリ(ジケトピロロピロール-ターチオフェン)[26]の合成が報告されている。しかし、方法論的にABジブロック共重合体とABAトリブロック共重合体が混在する恐れがある。

我々は、鎖末端にブロモ基を有するP(NDI2DT-T1)をマクロ開始剤として使用し、チオフェンモノマーを重合する開始法を開発した。Scheme 2に、全共役p型/n型半導体グラフトポリマーの合成経路を示す。ナフタレンジイミド含有モノマーと*o*-クロロトリル基含有チオフェンモノマーとの共重合体をマクロ開始剤とし、3-ヘキシルチオフェンモノマーの分子内触媒移動重縮合[13]により、目的のグラフトポリマーの合成に成功した[27]。



Scheme 2. Synthetic route of an all-conjugated graft polymer initiated by n-type polymer backbone.



Scheme 3. Synthetic route of an p/n/p-type all-conjugated block polymer initiated by n-type polymer.

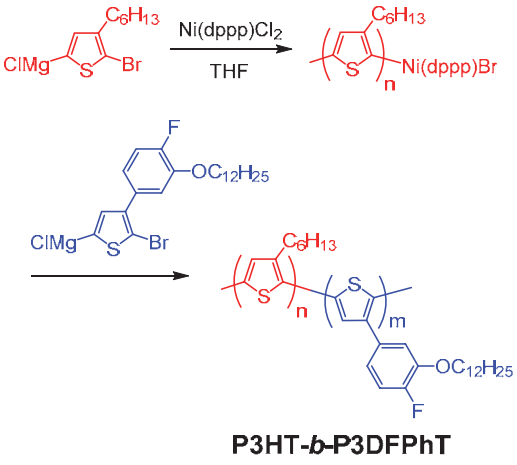
また、同様のマクロ開始剤を使用する方法論によりp/n/p型トリブロック共重合体(P3HT-*b*-P(NDI2DT-T1)-*b*-P3HT)の合成に成功した(Scheme 3)[28]。実際に、数平均分子量26,400-33,700(P3HT: 25-45 wt%)および比較的狭い分子量分布1.15-1.29を有するブロック共重合体が得られた。

一方、より簡便なモノマー逐次添加法によるドナー・アクセプターブロック共重合体合成の検討を行った(Scheme 4)。チオフェン環の3位に4-フルオロ-3-アルコキシアリール基を導入することにより、P3HTよりもHOMO/LUMOエネルギー準位の深いポリ(3-(3'-ドデシロキシ-4'-フルオロフェニル)チオフェン)(P3DFPhT)を新たに開発した。3-ヘキシルチオフェンモノマーを重合後に、開発したフッ素含有チオフェンモノマーを添加することで、鎖延長反応によるABジブロック共重合体の合成に成功した[29]。

本手法の特徴は、すべての反応系に分子内触媒移動を利用していることより、数平均分子量が厳密に制御され、分子量分布が極めて狭くなることである。SEC曲線(Figure 2)より、1stモノマーの重合終了後に2ndモノマーを加えると、狭い分子量分布を保ったままトップピークが高分子量側にシフトしていることから、構造の明確なP3HT-*b*-P3DFPhT(M_n = 24,700, $Đ_M$ = 1.08)が得られたことを確認した。現在、得られたブロック共重合体の詳細解析、薄膜状態のモルフォロジー、および非フラーレン系有機太陽電池の評価を行っている。

4．非フラーレン系有機太陽電池の評価

前章で得られたP3HT-*b*-P(NDI2DT-T1)-*b*-P3HT(M_n = 42,900, $Đ_M$ = 1.51)の単一薄膜を使用した有機電界効果トランジスタおよび有機薄膜太陽電池デバイスを作製した。それらデバイスの評価の結果、ホール移動度=3.93×10^{-4}($cm^2V^{-1}s^{-1}$)、開放電圧値=0.45(V)、短絡電流密度値=0.106(mA/cm^2)、FF値=0.333、PCE=1.6×10^{-2}(%)となり、単一膜での光電変化機能を確認した[30]。しかしながら、特に短絡電流密度が低く、効率が低いため、光吸収や電荷分離・捕集効率の向上が急務である。



Scheme 4. Synthetic route of p/n-type all-conjugated block polymer by sequential monomer addition technique based on condensative chain-growth polymerization.

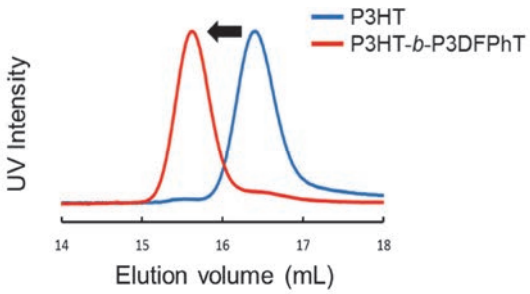


Figure 2. The SEC UV curve trace of P3HT(blue)1st block(P3HT)(M_n = 12,200, $Đ_M$ = 1.09)and(red)P3HT-*b*-P3DFPhT(M_n = 24,700, $Đ_M$ = 1.08).

5．まとめ

分子内触媒移動を利用することで、非等モル下での重縮合や縮合的連鎖重合を利用した全共役p型/n型半導体グラフト/ブロック共重合体の合成が可能になった。特にn型半導体ポリマーの鎖末端制御や分子量分布の狭い全共役系ブロック共重合体の合成の簡便化に成功した。全共役p型/n型半導体ブロック共重合体を単膜として使用した非フラーレン系有機太陽電池の作製および初期評価も行い、光電変換機能を有することを示した。

6．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松籟科学技術振興財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたり、ポリマー合成・解析を担当した山形大学大学院有機材料システム研究科Jin Wang博士、後藤栄祐博士、落合優登氏、寺山幸佑氏、ホール移動度および非フラーレン系有機太陽電池の評価にご協力いただきました国立台湾大Chien Lu氏、Wen-Chang Chen教授に感謝申し上げます。

参考文献

[1] Efficiency chart from NREL HP. https://www.nrel.gov/pv/assets/images/efficiency-chart.png

[2] Che, X.; Li, Y.; Qu, Y.; Forrest, S. R. *Nature Energy* **2018**, *3*, 422–427.

[3] Zhou, Y.; Kurosawa, T.; Ma, W.; Guo, Y.; Fang, L.; Vandewal, K.; Diao, Y.; Wang, C.; Yan, Q.; Reinspach, J.; Mei, J.; Appleton, A. L.: Koleilat, G. I.; Gao, Y.; Mannsfeld, S. C. B.; Salleo, A.; Ade, H.; Zhao, D.; Bao, Z. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3767-3772.

[4] Zhou, N.; Lin, H.; Lou, S. J.; Yu, X.; Guo, P.; Manley, E. F.; Loser, S.; Hartnett, P.; Huang, H.; Wasielewski, M. R.; Chen, L. X.; Chang, R. P. H.; Facchetti, A.; Marks, T. J. *Adv. Energy Mater.* **2014**, *4*, 1300785.

[5] Kang, H.; Kim, K. H.; Chio, J.; Lee.; Kim, B. J. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 1009-1014.

[6] Lee, C.; Kang, H.; Lee, W.; Kim, T.; Kim, K. H.; Woo, H. Y.; Wang, C.; Kim, B. J. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 2466-2471.

[7] Benten, H.; Nishida, T.; Mori, D.; Xu, H.; Ohkita, H.; Ito, S. *Energy Environ. Sci.* **2016**, *9*, 135-140.

[8] Gao, L.; Zhang, Z.; Xue, L.; Min, J.; Zhang, J.; Wei, Z.; Li, Y. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 1884-1890.

[9] Fan, B.; Ying, L.; Wang, Z.; He, B.; Jiang, X. -F.; Huang, F.; Cao, Y. *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10*, 1243-1251.

[10] Spoltore, D.; Vangerven, T.; Verstappen, P.; Piersimoni, F.; Bertho, S.; Vandewal, K.; den Brande, N. V.; Defour, M.; Mele, B. V.; Sio, A. D.; Parisi, J.; Lutsen, L.; Vanderzande, D.; Maes, W.; Manca, J. V. *Org. Electron.* **2015**, *21*, 160-170.

[11] Nomura, N.; Tsurugi, K.; Okada, M. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1932-1935.

[12] Nomura, N.; Tsurugi, K.; RajanBabu, T. V.; Kondo, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5354-5355.

[13] Yokoyama, A.; Miyakoshi, R.; Yokozawa, T. *Macromolecules* **2004**, *37*, 1169-1171.

[14] Sheina, E. E.; Liu, J. M.; Iovu, C.; Laird, D. W.; McCullough, R. D. *Macromolecules* **2004**, *37*, 3526-3528.

[15] Goto, E. Unpublished results. **2013**, laboratory notebook 2: P.54 and P.68.

[16] Goto, E.; Ando, S.; Ueda, M.; Higashihara, T. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 1004-1007.

[17] Nojima, M.; Kosaka, K.; Ohta, Y.; Yokozawa, T. *Polym. Prepr. Jpn.* **2015**, *64*, 1Pa011.

[18] Nojima, M.; Kosaka, K.; Kato, M.; Ohta, Y.; Yokozawa, T. *Macromol. Rapid Commun.* **2016**, *37*, 79-85.

[19] Terayama, K.; Goto, E.; Higashihara, T. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *219*, 1800175.

[20] Terayama, K.; Higashihara, T *Polym. Prepr. Jpn.* **2018**, *66*, in press.

[21] Woody, K. B.; Leever, B. J.; Durstock, M. F.; Collard, D. M. *Macromolecules* **2011**, *44*, 4690-4698.

[22] Mulherin, R. C.; Jung, S.; Huettner, S.; Johnson, K.; Kohn, R.; Sommer, M.; Allard, S.; Scherf, U.; Greenham, N. C. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 4846-4851.

[23] Sommer, M.; Komber, H.; Huettner, S.; Mulherin, R.; Kohn, P.; Greenham, N. C.; Huck, W. T. S. *Macromolecules* **2012**, *45*, 4142-4151.

[24] Izuhara, D.; Swager, T. M. *Macromolecules* **2011**,

44, 2678-2684.

[25] Nakabayashi, K.; Mori, H. *Macromolecules* **2012**, *45*, 9618-9625.

[26] Ku, S. -Y.; Brady, M. A.; Treat, N. D.; Cochran, J. E.; Robb, M. J.; Kramer, E. J.; Chabinyc, M. L.; Hawker C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16040–16046.

[27] Wang, J.; Lu, C.; Mizobe, T.; Ueda, M.; Chen, W. -C.; Higashihara, T. *Macromolecules* **2013**, *46*, 1783-1793.

[28] Wang, J.; Ueda, M.; Higashihara, T. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 506-510.

[29] Ochiai, Y.; Higashihara, T. *Polym. Prepr. Jpn.* **2017**, *66*, 3M13.

[30] Wang, J.; Lu, C.; Higashihara, T.; Chen, W. -C. *Microsyst. Technol.* **2017**, *23*, 1183-1189.

申請者　東京大学　草本　哲郎

ナノスケールフォトスピントロニクスを指向した有機ラジカルナノシートの創製

東京大学　大学院理学系研究科
草本　哲郎

1．はじめに

二次元シート構造を有するグラフェンは、2004年の登場以来、次世代の電子デバイス（エレクトロニクス・スピントロニクス・フォトニクスデバイス）を担う分子性物質の主役となっている。その理由は、グラフェンが炭素のみで構成された単純な構造を有し優れた物性を示すことに合わせて、二次元シート構造が既存の半導体デバイス作製技術に容易に適用できるからである。様々な望みの性質や機能を示す二次元シート材料の創製は、低コスト、低消費電力、高機能のシステムの実現につながる重要課題である。

分子性二次元シート材料を得る手法として、三次元結晶から剥離するトップダウン法と、分子（あるいは原子）を構成単位としてこれを連結して組み上げるボトムアップ法がある。ボトムアップ法には、○構成単位となる分子を様々にデザインできる、○適切な分子設計により、構成単位同士の結合様式や方向、次元性を自在制御できる、のように、グラフェンや無機系ナノシート材料とは一線を画す特長があり、ボトムアップ法により多様な分子性ナノシート物質を合成することができる。これまで電気伝導性や光電変換特性などの機能を示す分子性ナノシートのボトムアップ合成が報告されてきたが、その研究例（特に電子機能解明に関する研究例）は未だ少なく、黎明期にある。

不対電子を有する有機ラジカルは、強磁性、超伝導、長距離電子移動など様々な物理物性を示す機能物質である。これらの物性はラジカルの配列様式や次元性に大きく依存する。これまで、ラジカルの三次元結晶における電気特性および磁気特性が精力的に研究されてきた一方で、ラジカルの発光性に関する研究は皆無である。その理由は(1)ほとんどすべてのラジカルは発光性を示さない、(2)ラジカルが光励起状態において分解する、という2点に集約されるが、申請者は2014年に、高い光安定性を有する発光性ラジカルPyBTM（図1a）を開発した[1]。PyBTMは二重項を基とする発光特性という未開拓研究分野を切り開くことができる有力物質である。

本研究では、新たな分子性ナノシート材料として、ナノスケールで二次元集積化されたラジカル材料（＝ラジカルナノシート）を創製し、将来のフォトスピントロニクスの創出につながるような新機能の開発と解明を目指し、(1)PyBTMの化学修飾ならびに刺激応答性を利用して、本系において発光機能を支配する要因を明らかにし、より優れた発光機能をしめす新奇ラジカルを創出する、(2)(1)の知見を基に、発光ラジカルを構成要素とす

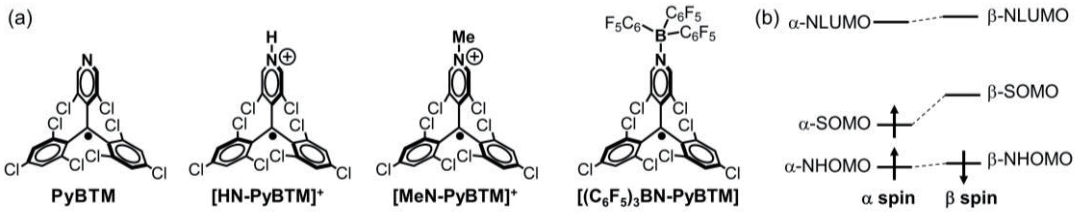


図1．(a)ラジカルの分子構造と(b)フロンティア軌道のエネルギーダイアグラム。

る二次元ラジカルナノシートを開発する、の二点を目的として研究を行った。

2．化学刺激によるPyBTMの機能制御と電子状態変化の解明[2]

PyBTMの窒素部位の刺激応答性に着目し、プロトン(H^+)、ルイス酸である$B(C_6F_5)_3$、Au^Iイオンへの配位を利用して、PyBTMの光物性、電気化学特性、電子状態がどのように変化するか、を調べた。PyBTMを含むジクロロメタン溶液に$B(C_6F_5)_3$を滴下すると、442 nmと575 nmにあらたな吸収帯が現れた(図2a)。最低エネルギー電子遷移である575 nmの吸収帯は$D_0 \rightarrow D_1$遷移に相当し、PyBTMのそれよりも長波長シフトした。この長波長シフトは$B(C_6F_5)_3$がPyBTMの窒素原子に付加した(=[$(C_6F_5)_3$BN-PyBTM](図1a)が生成した)ことにより、ピリジン環上の電子密度が下がったことに起因していると考えられる。吸収スペクトルの形状は[MeN-PyBTM]BF_4や[HN-PyBTM]OTf(図1a)のそれらと同様であった。この溶液にルイス塩基としてNEt_3を滴下した結果、スペクトルはPyBTMのそれと似通ったものに変化した(図2b)。これはNEt_3の滴下により$B(C_6F_5)_3$がPyBTMから解離しPyBTMが再生成したことを示している。$B(C_6F_5)_3$とNEt_3の滴下の繰り返し実験により$B(C_6F_5)_3$の配位と脱離は可逆的であることが明らかとなった。同様の吸収スペクトルの変化は、化学刺激としてプロトンを用いた際にも観測された。

一方、発光スペクトル測定の結果、$B(C_6F_5)_3$の滴下により発光極大は586 nmから666 nmへと長波長シフトし(図2c)、NEt_3の添加に伴い元のPyBTMの発光スペクトルと同様のスペクトル変化となった(図2d)。この結果もPyBTMと$B(C_6F_5)_3$のルイス酸—塩基反応の可逆性を示している。一方で、PyBTMの溶液にプロトンを滴下した際は発光強度が一義に低下するのみであった。この違いは、窒素原子と$B(C_6F_5)_3$の結合定数(2.8(5)×$10^5 m^{-1}$)が窒素とプロトンとの結合定数よりも大きいことに起因している。$B(C_6F_5)_3$を2等量添加したPyBTMのジクロロメタン溶液の発光量子収率は3%であり、発光寿命は5.5 nsであった。これらの値はPyBTMと大きくは変わらない。

サイクリックボルタンメトリー(CV)測定を用いて、PyBTMへの、$B(C_6F_5)_3$の添加が電気化学特性にどのような影響を与えるか、を調べた。その結果、もともと−0.74 V(vs Fc^+/Fc)に観測されていたPyBTMの可逆な還元波が、$B(C_6F_5)_3$の添加によって−0.14 Vにまでシフトすることを見出した。このシフトは、$B(C_6F_5)_3$により電子を受け取る空軌道のエネルギーが大きく減少した結

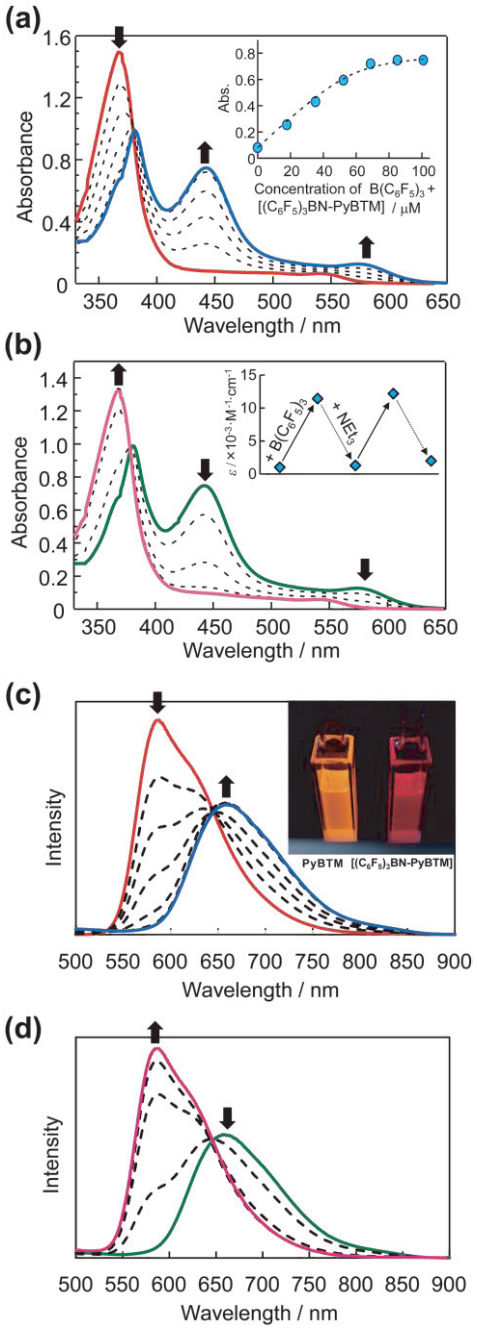


図2．(a)PyBTMのジクロロメタン溶液に$B(C_6F_5)_3$を0～1.8等量加えた時の吸収スペクトルの変化、そして(b)さらにNEt_3を0～5.2等量加えた時の吸収スペクトルの変化。(c)PyBTMのジクロロメタン溶液に$B(C_6F_5)_3$を0～1.8等量加えた時の発光スペクトルの変化、そして(b)さらにNEt_3を0～5.2等量加えた時の発光スペクトルの変化。励起波長：380 nm。

果、ラジカルの電子受容能が向上したことを意味している。

DFTおよびTDDFT法に基づく分子軌道計算により、[$(C_6F_5)_3$BN-PyBTM]とPyBTMの電子状態の比較を行い、この二つのラジカルの物性の違いが何に起因するのか、を調べた。その結果、B$(C_6F_5)_3$への配位により、PyBTMのβ-SOMO(129β)の軌道エネルギーが相対的に大きく減少することが明らかとなった(図3)。この軌

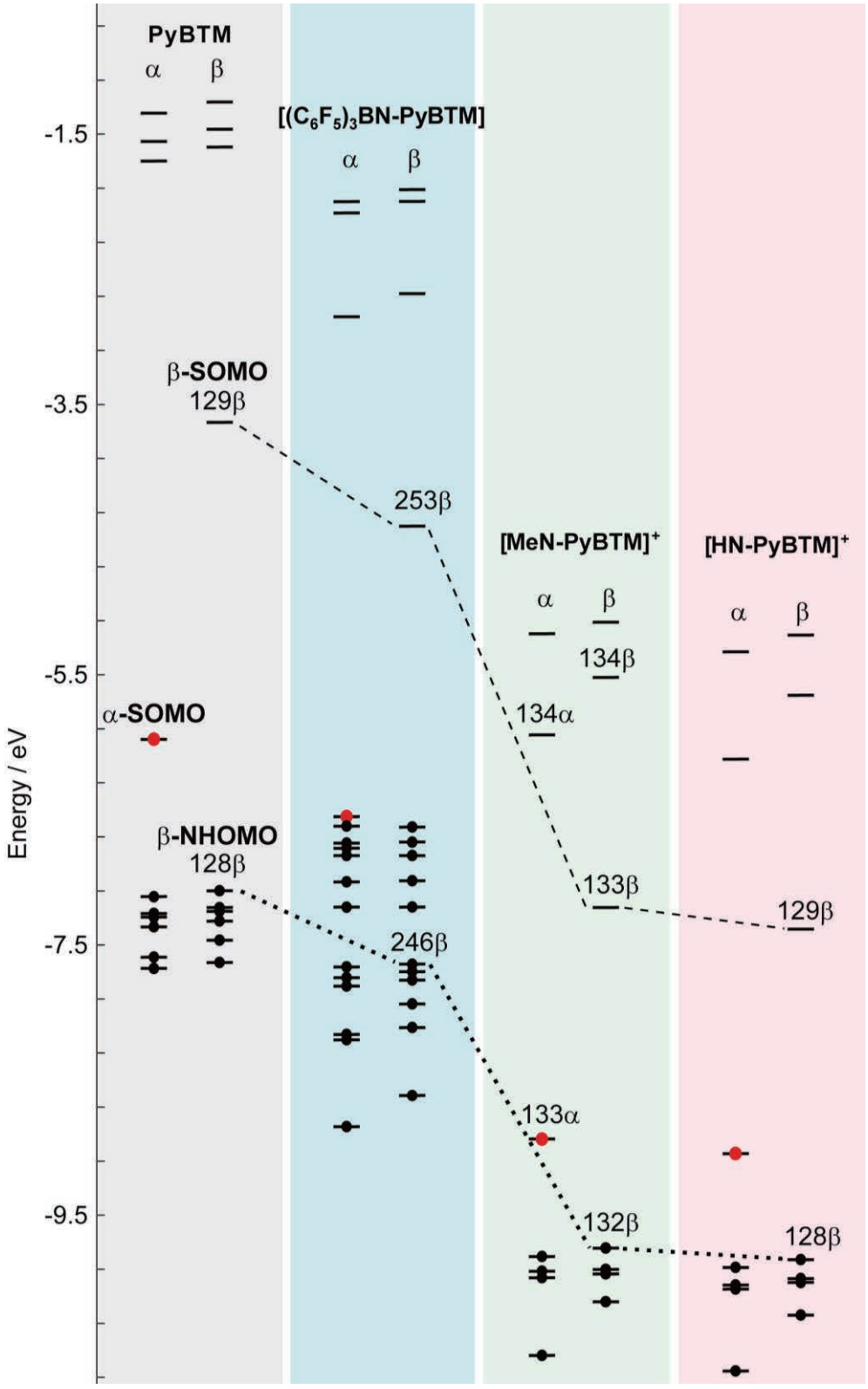


図3. DFT法により計算されたラジカルの分子軌道のエネルギーダイアグラム。黒丸は電子を示す。赤丸はα-SOMOにある電子を示す。

道は、ラジカルの電気化学特性(CVにおける還元電位)を決める重要なエネルギー準位である。また本系においては128β→129βの電子遷移により軌最低励起状態(D_1状態)が形成されることから、129βは吸光・発光特性についても支配的に関与する軌道である。これらの実験および理論計算の結果から、PyBTMの窒素原子のプロトンやルイス酸への配位により、主にPyBTMの最低エネルギー空軌道である129βのエネルギー準位が下がること、これに伴い発光波長は長波長シフトし、還元電子は正にシフトすることが分かった。これは、化学刺激を適切に選ぶことで本発光ラジカル系の物性を望み通りに制御できることを意味している。一方で発光量子収率に関してはこの通りではなく、結合の強さや分子構造のフレキシビリティなど他の要素が支配的であることが予想される。これらの他、PyBTMの窒素原子がAu^Iイオンに配位することにより発光量子収率が20%を超えることや[3,4]、ラジカルの二重項蛍光では重原子による発光失活が起こらない可能性を指摘した[5]。

3．ピリジン環を二つ導入した新規な発光ラジカルの創製と物性評価[6]

PyBTMではトリアリルメチル骨格へのピリジン環の導入が、光安定性向上の要因と考えられてきたが、その妥当性は明らかでなかった。本研究では、2個のピリジン環がトリアリルメチルラジカル骨格に導入されたbisPyTM(図4) を新たに合成し、その物性をPyBTMのそれと比較することで、ピリジン環の更なる導入が光物性や光安定性にどのような影響を与えるかを調べた。

bisPyTMは図4のスキームに従い合成し、元素分析、高分解質量分析、ESRや単結晶構造解析により同定した。bisPyTMのジクロロメタン溶液のESRスペクトルは複雑な超微細結結合を示した(図5)。解析の結果、スピン密度が炭素や水素原子のみならず二つの窒素原子上まで広がってることが分かった。これはDFT法を用いた計算結果とも一致する。

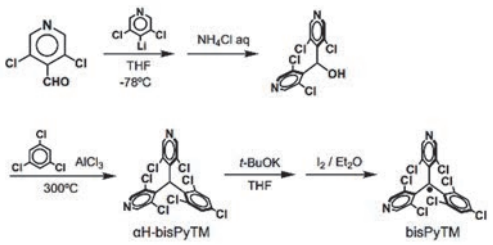


図4． bisPyTMの合成経路。

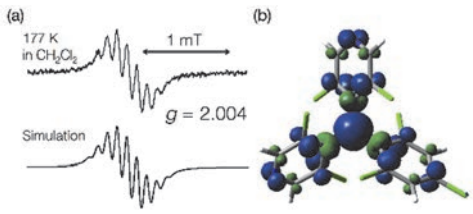


図5． (a)bisPyTMのジクロロメタン溶液の177KにおけるESRスペクトルとそのシミュレーション。(b)　DFT法により計算されたスピン密度分布(UB3LYP/6-31G(d,p))。

bisPyTMのジクロロメタン中における発光スペクトルを測定したところ、650 nmを極大とする発光帯が観測された。発光量子収率は0.9%であり、PyBTMと比べて低い量子収率であった。量子収率と発光寿命からD_1状態からの放射速度(k_r)と無輻射失活の速度(k_{nr})を算出した結果、PyBTMに比べk_rは小さくk_{nr}は大きいことが分かった。二重項発光では無輻射失活の原因として項間交差の寄与は無視できるくらい小さく内部転換が支配的であると考えられる。そこで振電相互作用密度解析を用いてbisPyTM とPyBTM の内部転換について理論的に調べ、実験から得られた無輻射失活速度 (k_r)と比較した結果、(1)算出された非対角振電相互作用定数からk_{nr}を推測できること、さらに(2) k_{nr} を小さくする(= ϕ_{em}を大きくする)にはD_1→D_0遷移に関わる軌道の波動関数が分子骨格上により非局在化していることが重要であること、を見出した。これは発光ラジカルの無輻射失活の主因が内部転換であることを強く示唆し、それを詳細まで解析・解明した初めての例である。光放射速度(k_r)に関してはTD-DFT 法で計算されるD_1→D_0遷移の振動子強度から見積もられることを明らかにした。

ジクロロメタン、アセトニトリル、アセトン、ヘキサン、クロロホルム、メタノール、エタノール中においてbisPyTMの光安定性をPyBTMとTIPSペンタセンのそれと比較した。TIPSペンタセンは高い光安定性を示す有機半導体でありベンチマークとしても用いられる。実験の結果、bisPyTMは光照射下においてアルコール中では分解が見られるものの他の溶媒中では総じてPyBTMとTIPSペンタセンよりも高い光安定性を示し

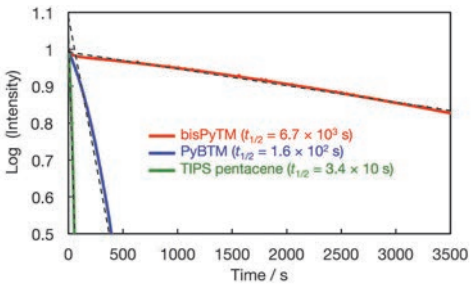


図6．ジクロロメタン中、継続的な光照射下における発光強度の時間変化。

た。ジクロロメタン中継続的な光照射下における発光強度の時間依存性を調べた結果を図6に示す。bisPyTMはPyBTMやTIPSペンタセンに比べ長時間光照射下においても発光強度の減少が少なく、高い光安定性を有することがわかる。これは、窒素原子の導入により空軌道のエネルギー準位が低下したことと関連していると考えている。この実験結果は、ヘテロ原子の導入が発光性ラジカルの光安定性向上に有力な手法であることを示唆している。

4．ラジカルナノシートの創製

有機ラジカルを構成要素とするナノシート＝ラジカルナノシートをボトムアップ合成するために図7のような方法を考えた。アルデヒドとアミンを用いたイミン結合生成に基づくこの方法は、これまでも有機ナノシート合成にしばし用いられてきた有力な合成手法である。この手法ではラジカル構成単位同士がπ共役系で連結されるため、ラジカル不対電子が広く非局在化し、有効なスピン―スピン間相互作用が期待できる。さらにトリフェニルメチルラジカル（TPM）骨格を用いることで発光特性を導入できる可能性がある。

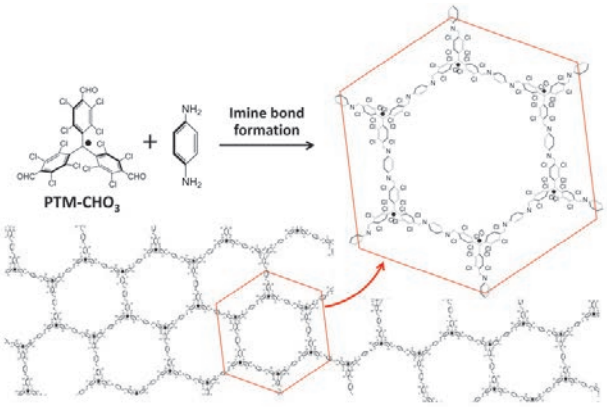


図7．ラジカルナノシートの合成。

PTM-CHO$_3$を合成し1,4-ジアミノベンゼンとの脱水縮合反応を酢酸共存下ジオキサンを溶媒として150度の温度で試みたところ、得られた化合物のスピン量は予想していた量の0.1％以下であり、目的とするラジカルポリマーは得られなかった。この縮合反応を様々な温度で行い、反応の進行を溶液の吸収スペクトルで追跡した結果、この反応条件下では**PTM-CHO$_3$**が80度以上の温度において急速に分解することがわかった。そこで反応温度を80度以下として様々な反応条件を検討したところ、スカンジウム塩をルイス酸触媒として用いた場合に室温で反応が進行することが明らかとなった。元素分析、FT-IR、ESR、CV測定の結果は生成物質がTPM骨格を有するラジカルナノシートであることと矛盾しない。ラジカルナノシートのスピン量は60％であり、不対電子を有するTPM骨格の中心炭素原子の一部がC-Hとなっていると考えられる。SQUIDの測定結果から、スピン間に反強磁性的な相互作用が働いていることが示唆された。今後ラジカルナノシートの不対電子に基づく酸化還元特性、多孔性を活かした応用として、電極材料へ導入することを考えている。

5．終わりに

ラジカルの二重項に基づく発光特性は研究例が少なく、構造―物性―電子状態の相関といった基礎科学的理解もまだまだ未解明である。本研究では、発光性ラジカルPyBTMの化学刺激存在下における電子状態や物性を調べ、プロトンや$B(C_6F_5)_3$の付加がPyBTMの最低エネルギー空軌道である129 βのエネルギー準位を下げることを見出した。これが原因となり、発光波長が長波長シフトし還元電位が正にシフトする。bisPyTMとPyBTMの比較により、ピリジン環のトリアリルメチルラジカル骨格への導入が光安定性を向上させることを明らかにした。これらの結果はラジカルの発光機能の基礎理解を大きく前進させるものである。新しい二次元材料として、ラジカルを構成要素とするラジカルナノシートを合成した。二次元材料は三次元バルク材料とは異なる物性や機能を示すとして大きな注目を集めている。本研究ではラジカルナノシートの特異な物性を見出すには至らなかったが、今後この材料の磁性、伝導性、電子移動特性、物

質輸送能、熱電特性などを調べ、二次元構造に基づくユニークな物性を明らかにするとともに、ナノシートの特性を生かした応用、例えば電池材料への応用などを進める予定である。

6．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。

7．参考文献

1. Y. Hattori, T. Kusamoto, and H. Nishihara "Luminescence, Stability, and Proton Response of an Open-Shell (3,5-Dichloro-4-pyridyl)bis(2,4,6-trichlorophenyl)methyl Radical" *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 11845–11848 (2014).
2. T. Kusamoto, S. Kimura, Y. Ogino, C. Ohde, and H. Nishihara "Modulated Luminescence of a Stable Open-shell Triarylmethyl Radical: Effects of Chemical Modification on its Electronic Structure and Physical Properties" *Chem. Eur. J.* 22, 17725–17733 (2016)
3. Y. Ogino, T. Kusamoto, Y. Hattori, M. Shimada, M. Tsuchiya, Y. Yamanoi, E. Nishibori, K. Sugimoto, and H. Nishihara "Solvent-Controlled Doublet Emission of an Organometallic Gold(I) Complex with a Polychlorinated Diphenyl(4-pyridyl)methyl Radical Ligand: Dual Fluorescence and Enhanced Emission Efficiency" *Inorg. Chem.* 56, 3909–3915 (2017).
4. Y. Hattori, T. Kusamoto, T. Sato, and H. Nishihara "Synergistic Luminescence Enhancement of a Pyridyl-substituted Triarylmethyl Radical Based on Fluorine Substitution and Coordination to Gold" *Chem. Comm.* 52, 13393–13396 (2016).
5. Y. Hattori, S. Kimura, T. Kusamoto, H. Maeda, and H. Nishihara "Cation-responsive turn-on fluorescence and absence of heavy atom effects of pyridyl-substituted triarylmethyl radicals" *Chem. Comm.* 54, 615–618 (2018).
6. S. Kimura, A. Tanushi, T. Kusamoto, S. Kochi, T. Sato, and H. Nishihara "A Luminescent Organic Radical with Two Pyridyl Groups: High Photostability, Dual Stimuli-Responsive Property, and Theoretical Analyses of Photophysical Processes" *Chem. Sci.* 9, 1996–2007 (2018).

申請者　北海道大学　小林　厚志

発光性Pt(II)錯体配位子からなる環境マルチセンシングナノ集積体の構築

北海道大学　大学院理学研究院
小林　厚志

1．研究背景と目的

クロミズムはある外部刺激に対して可逆的に物質の色が変化する現象であり、光、温度、圧力や蒸気といった様々な物理パラメータを目に見える色として出力できることから「センサー」を構築する中枢現象であり、様々な分野で応用されている。我々はこれまでに、ジイミン白金(II)錯体を発色/発光団として用いて、ガスや蒸気の吸脱着に基づいて可逆的に色変化を起こすベイポクロミック錯体を数多く開発してきた。[1-3] これらはいずれも平面型白金(II)錯体の分子間Pt-Pt相互作用を発色団として活用したものであり、蒸気吸脱着という微細な構造変化を本発色団が鋭敏に検出可能な優れたプローブである事を明確に示している。一方、これらのベイポクロミズムは、結晶構造に強く依存したバルク固体としての性質であり、また高価な白金を多量に使用してしまう。

そこで本研究ではこれらの問題点を克服するべく、優れた発光団かつセンサー機能を発現するジイミン白金(II)錯体分子を、酸化物ナノ粒子表面へ固定化しながらナノ薄膜化させることで使用白金量を極少量に抑えつつ、固体状態のみならず分散状態でもそのセンサー機能を発現し得る「発光性ナノセンサー」の開発を目指して研究を行った。

2．分子設計と合成

我々はこれまでに、カルボン酸基を有するジイミン系Pt(II)錯体が水蒸気などの高極性溶媒蒸気に対して鋭敏な発光色変化を示すことや、その発光色変化が分子間白金間相互作用の変動に基づくものであることを見出してきている。[1-3] 本研究では、高価な白金資源の使用量削減と結晶構造非依存型クロミズムを目指し、ジイミン系Pt(II)錯体骨格に対し、酸化物固体に対して安定な結合力を有するホスホン酸基を導入した錯体１(図１)を新規に合成した。用いる有機配位子4,4′-ジホスホン酸-2,2′-ビピリジンは既報に参考に行い、[4] ジシアニド白金(II)とアンモニア水中で２日間加熱還流することで得た。X線構造解析に適する単結晶は、得られた粗生成物を最小量の水に溶解させ、アセトン蒸気を用いた気-液拡散法により、５水和物を含むオレンジ色結晶(１・$5H_2O$)として得た。また、このオレンジ色結晶を最小量の水に溶解させ、エタノール蒸気を用いた気-液拡散法により、水和水を含まない無色結晶(１)も得た。

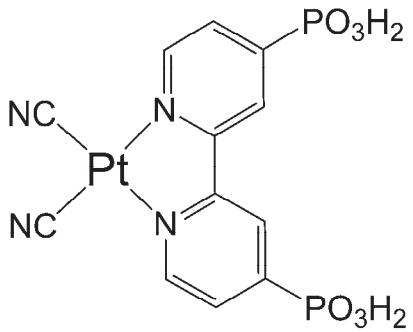


図１． 錯体１の分子構造

3．結晶構造

得られた錯体１の無水物相と５水和物相の結晶構造を図２に示す。いずれも平面四配位型Pt(II)錯体がa軸方向へ積層した結晶構造を有していたが、分子間白金間相互作用という観点では著しく異なっていた。すなわち、無水物相では積層軸がジグザグ型になった結果、隣接Pt(II)イオン間の距離が4.59Åと非常に長い一方(図２a)、５水和物相では直鎖型に積層しており、隣接Pt(II)イオン間の距離が3.39Åと顕著に短くなっていた(図２

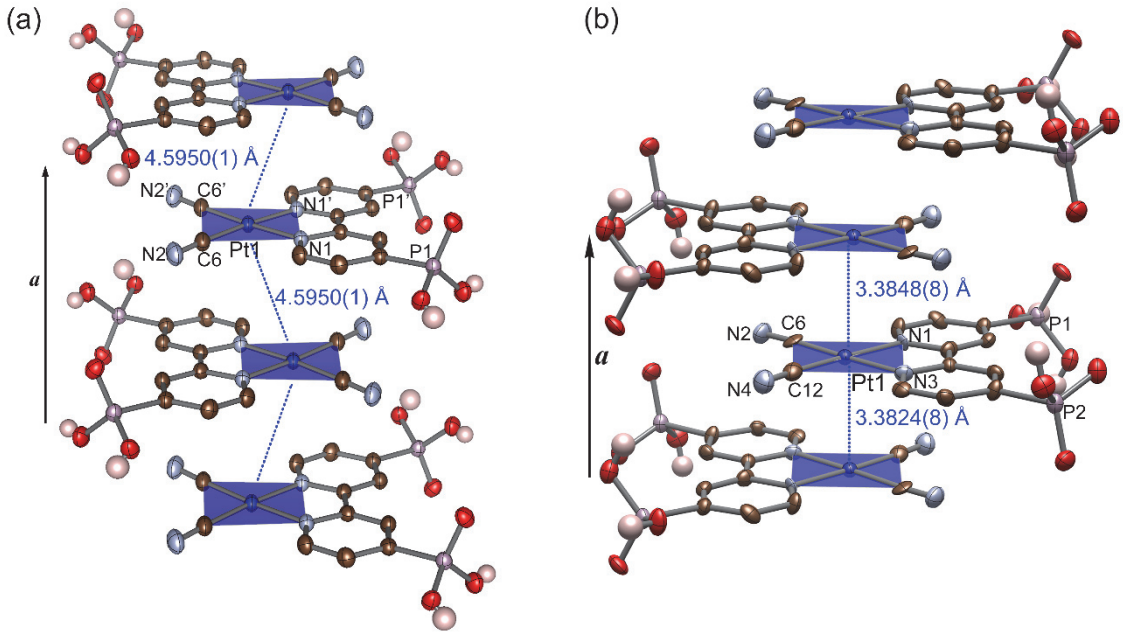


図２． (a)無水物相１と(b)５水和物相１・5H_2Oの結晶構造

b)。これは、白金間相互作用を示すしきい値3.5Åよりも短いことから、水和水の有無により分子間白金間相互作用のON-OFF制御が可能なことを示す有望な結果と考えられる。ホスホン酸基のP-O結合距離に注目すると、無水物相ではいずれのホスホン酸基にも２つのプロトンが結合しており分子全体として中性を保っていたが、５水和物相では２つのホスホン酸基のうち片方は１つしかプロトンが結合していないことが示唆された。したがって、高い酸性度を有するホスホン酸基は、水和水を取り込む際に水和水の一部をプロトン化する可能性があり、本錯体１が分子間白金間相互作用のON-OFF制御と同時にプロトン脱着が連動する稀有な例になりえることが示唆された。

４．発光特性

錯体１が無水物で無色、５水和物ではオレンジ色と顕著に異なる色を示したことから、水和数に応じて発光色が大きく変化することを期待して、発光スペクトル変化を検討した。図３に、５水和物結晶と、５水和物結晶を加熱乾燥(**1-H**)または減圧乾燥(**1-V**)した固体サンプルの発光スペクトルを示す。乾燥前の５水和物結晶は585 nmにブロードな発光帯を示す黄色発光体であったが、加熱により水和水を取り除くと、469 nmを極大とする振動構造を伴う青緑色発光体へ変化することが分かった。これは無水物結晶の発光スペクトルと酷似しており、加熱乾燥により全ての水和水が取り除かれた結果、分子間白金間相互作用が消失したことで、発光起源が白金間相互作用に基づく^{3}MMLCT(Metal-Metal-to-Ligand Charge Transfer)発光から配位子中心の$^3\pi$-π^*発光へ切り替わったためと考えられる。一方、５水和物結晶を室温減圧条件下で乾燥させると、701 nmを発光極大とする赤色発光体へと変化した。減圧乾燥体の結晶構造は未だ不明なものの、発光極大波長がレッドシフトしたことから、分子間白金間相互作用が増強されたことで

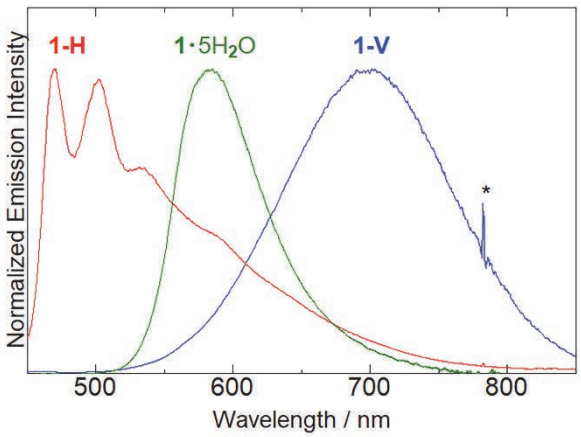


図３． 錯体１の発光スペクトル変化（室温、固体状態、λ_{ex} = 400 nm）*分光器ノイズ

^{3}MMLCT発光状態が安定化したことが、発光色変化の一因として考えられる。いずれの乾燥サンプル**1-H**, **1-V**も飽和水蒸気下において徐々に元の５水和物結晶へ戻ることから、錯体１が乾燥過程を認識可能なベイポクロミック発光を示す稀有な例であることが確認できた。

いずれの乾燥過程も水和水を取り除くという観点では同じであるにもかかわらず、加熱乾燥と減圧乾燥で全く異なる変化を示したということは非常に興味深い。現在そのメカニズムを解明するべく検討を進めているが、IRスペクトルなどを用いた予備検討から、減圧乾燥体では水和水の一部が脱離せずに残存するのに対して、加熱乾燥体では完全に無水物へ変化しているという違いが示唆されており、残存する水分子の存在が乾燥過程を識別する鍵であろうと推測している。

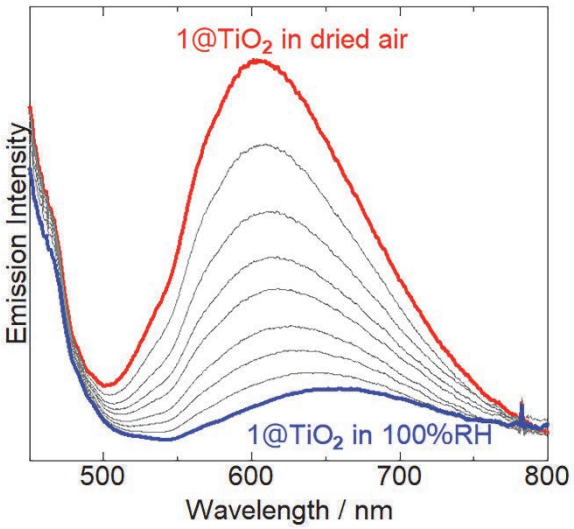


図４． **1**@TiO_2の発光スペクトル変化（室温、固体状態、λ_{ex} = 400 nm）

５．発光性ナノ集積体の構築と水蒸気応答性

錯体１が固体状態において、乾燥と水蒸気に応答した興味深い発光特性を示したことから、相対湿度変化の検出に対して有望な発光団と期待される。しかしながら、この機能は固体中における分子間白金間相互作用に基づくものであり、溶液中などの希薄条件下では機能しない可能性がある。そこでこのような欠点を克服する目的で、錯体１を酸化物ナノ粒子表面へ固定化し、分子間白金間相互作用が発現し得るのかを検討した。酸化チタンナノ粒子（堺化学工業社製SSP-M、粒子径約15 nm）を錯体１の水溶液に懸濁させ、室温で１日撹拌した後に、超遠心分離によって、目的とする錯体１担持TiO_2ナノ粒子（**1**@TiO_2）を単離した。この際、分離した上澄み液に残存している錯体１の濃度をUV-Vis吸収スペクトルから算出し、TiO_2ナノ粒子表面積と錯体１の分子体積から錯体１の被覆率を概算すると97％となり、TiO_2ナノ粒子表面は錯体１によりほぼ完全に被覆されていることが示唆された。図４に**1**@TiO_2の発光スペクトルを示す。**1**@TiO_2は減圧乾燥条件下において、TiO_2ナノ粒子には存在しない616 nmにブロードな発光帯を示したことから、錯体１がTiO_2ナノ粒子表面に固定化され、発光団として機能することが確認された。注目すべきことに、観測された発光極大波長616 nmは錯体１の５水和物結晶よりもレッドシフトしており、TiO_2ナノ粒子表面においても強い白金間相互作用を保持していると考えられる。それに加えて、**1**@TiO_2の^{3}MMLCT発光帯と考えられる発光バンドは、飽和水蒸気に晒すことで徐々に発光強度が減少しつつレッドシフトし、７時間暴露後は約30 nmも長波長シフトすることが確認できた。この発光帯のレッドシフトに関するメカニズムは現在検討中であるが、錯体１をTiO_2ナノ粒子に固定化しても、水蒸気の存在を鋭敏に感知可能な発光団として機能し得ることが確認されたことは、非常に意義深い。今後、このメカニズムを解明しつつ、水蒸気のみならず多様なゲスト分子（有機溶剤、金属イオンなど）をより鋭敏に検知可能なナノセンサーの開発へとつなげていきたい。

６．まとめと今後の展望

本研究では、優れたセンシング機能を発現し得る発光性Pt(II)錯体をより実用的なセンサー系へと適応させるべく、高い親水性と酸化物表面への強い結合力を有する新たな発光性白金錯体１を合成し、その結晶構造を決定するとともに興味深い水蒸気応答型ベイポクロミック特性を示すことを見出した。従来型のカルボン酸を有する系と比較して、水和水を取り除く過程を認識する能力があること、またそれがホスホン酸基の高い酸性度に関連していることを明らかとした。さらに、酸化チタンナノ粒子に錯体１を固定化しても、水蒸気に応答したベイポクロミック発光性を示すことを確認し、本研究戦略の有効性が実証できた。今後は、固定化に用いるナノ粒子の粒径や組成、錯体１の担持量などを系統的に制御し、水蒸気のみならず様々なゲスト分子を認識可能なナノセン

サーの開発を目指し、さらに研究を展開させていく予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究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感謝申し上げます。また、本研究に対してご助言頂きました北海道大学大学院理学研究院の加藤昌子教授と吉田将己助教、精力的に実験を進めてくれた北海道大学大学院総合化学院の学生諸氏（重田泰宏氏、大泉詩織氏、山本尚孝氏）に深く御礼申し上げます。

参考文献

[1] A. Kobayashi, M. Kato, *Eur. J. Inorg. Chem*. **2014**, 4469-4483.

[2] Y. Shigeta, A. Kobayashi, T. Ohba, M. Yoshida, T. Matsumoto, H.-C. Chang, M. Kato, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2682-2690.

[3] A. Kobayashi, S. Oizumi, Y. Shigeta, M. Yoshida, M. Kato, *Dalton Trans*. **2016**, *45*, 17485-17494.

[4] W.-S. Han, J.-K. Han, H.-Y. Kim, M. J. Choi, Y.-S. Kang, C. Pac, S. O. Kang, *Inorg. Chem*. **2011**, *50*, 3271-3280.

発表論文

[1] A. Watanabe, A. Kobayashi, E. Saitoh, Y. Nagao, S. Omagari, T. Nakanishi, Y. Hasegawa, W. M. C. Sameera, M. Yoshida, M. Kato, *Inorg. Chem*. **2017**, *56*, 3005–3013.

[2] Y. Shigeta, A. Kobayashi, M. Yoshida, M. Kato, *Cryst. Growth Des*. **2018**, *18*, 3419-3427.

[3] A. Kobayashi, N. Yamamoto, Y. Shigeta, M. Yoshida, M. Kato, *Dalton Trans*. **2018**, *47*, 1548-1556.

申請者　大阪大学　髙島　義徳

材料間の直接接合に着目した異種材料間接着

大阪大学　高等共創研究院理学研究科
髙島　義徳

【序論】

人間は古から「もの」と「もの」の接着に必ず接着剤を利用しており、科学技術は発展した現代社会においても、材料間の接合に接着剤は欠かすことができない材料になっている。通常、材料間の接着には同種の材料間を接着させることは容易であり、柔らかく、平滑でない材料の接着は比較的容易と考えられている。これは材料間の接着には主にアンカー効果による寄与が大きいためである(図１)。ファンデルワールス力による効果も提唱されているが、明確に接着を制御できるわけではない。よってガラスや金属など硬度の高い材料と有機物からなる高分子材料を接着させるには特殊な技術が必要となる。

二つの材料の接合に接着剤を使用しない接合が実現できれば、作業工程を軽減できだけでなく、材料が一体となることで高強度を示すことが期待される。

本研究課題では材料間の接合に接着剤を用いるのではなく、接触界面で直接共有結合形成や非共有結合形成を行うことで、「もの」と「もの」との直接接合させる革新的な方法を提案する。特にこのような非共有結合・共有結合といった結合形成を通した接合は二つの材料が化学的に融合された材料であり、新たな複合材料の創製に繋げる。

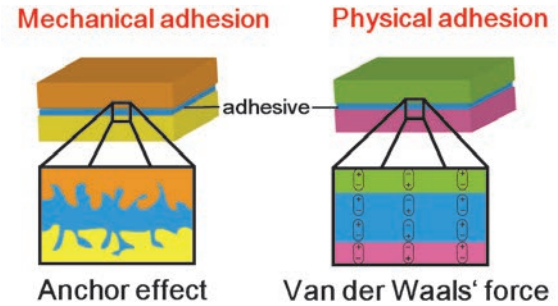


図１．材料間の接着界面の想定図

【研究の背景】

これまでに我々は高分子ヒドロゲルに環状多糖のシクロデキストリン(CD)を修飾したCD gelと対応する疎水性ゲスト分子を修飾したGuest gelとが分子選択的に接着することを発見した(*Nat. Chem.* **2011**、図２)[1]。さらにこのような分子認識に基づいた接着は異種材料間においても対応し、ゲスト分子修飾ガラス基板とCD gelとの間で接着制御を達成した(*Macromol. Rapid Commun.* **2014**、図３)[2]。このような異種材料間の接着に非共有結合を通した接着から共有結合を通した接着に展開するため、鈴木カップリング反応をもちいた共有結合形成に

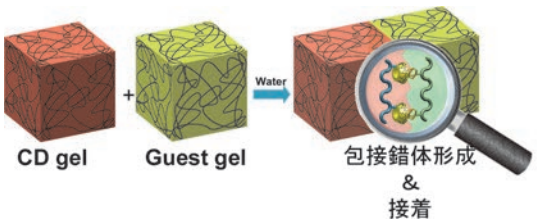


図２．分子認識に基づいたゲルの接着。

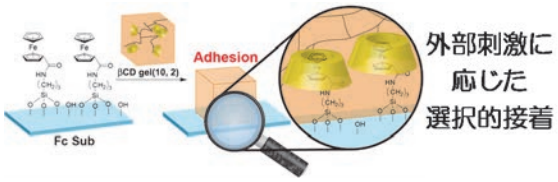


図３．分子認識を通した異種材料の接着。

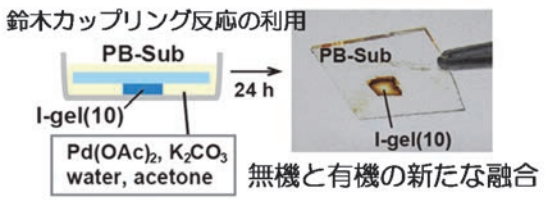


図４．共有結合形成を通した異種材料の接着。

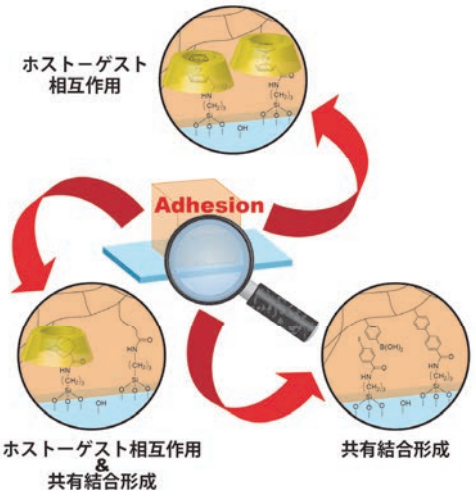


図５． 本研究の共有結合と非共有結合を組み合わせた異種材料間接着の概念図

よるガラス基板とゲルの異種材料間の直接接着に成功した。このような直接接着は従来の接着剤を用いた接合とは異なり、接着層が存在しないため、より強い直接接着を達成した(*Sci. Rep.* **2014**、図４)[3]。これらの研究は共有結合を通した接着は二つの物質が共有結合で接合していることから、新たな有機・無機融合材料を創製する方法と考えられる。

【本研究課題の目的】

材料間の接着は積極的に化学結合を利用することにある。通常の接着では、接着層が存在しており、その接着層の凝集破壊や被着体破壊が接着強度低下の要因である。本研究課題は究極の接合強度向上の方策は二つの異種材料を化学結合で接着することと考えた。これによって接着層の凝集破壊はなくなる。我々は異種材料間の接着において、これまでのガラスと高分子材料間の接着から、製造において要求の高い①金属基板(アルミおよび鉄)と高分子材料との異種材料直接接着や②金属基板間の直接接着を試みた。さらにこの材料間の接着に③非共有結合(ホスト－ゲスト相互作用)と共有結合を組み合わせ直接接合に取り組む。非共有結合を利用することで熱力学的に安定な結合形成と可逆性が付与できる(図５)。よって、自己修復的接着機能が付与できる。さらに結合の自由度が高いために、急激な界面剥離を抑制できる。このように熱力学支配の非共有結合と速度論的支配の共有結合を組み合わせることで、生体系に近い、より理想的な接着が構築できると考えた。

【本研究課題の成果】

（１）共有結合形成を通した異種材料間接着

膨潤したゲルを薗頭クロスカップリング反応に用いた接着実験を試みた。この反応では、パラジウム触媒、銅触媒、塩基の存在下でアルキンとハロゲン化アリールがクロスカップリングして共有結合を形成する[4,5]。

オルガノゲルの主鎖には有機溶媒に親和性のあるポリスチレンを選択した。接着の反応性官能基としてヨウ化アリール基を導入したI-Sty-gelとエチニル基を導入したE-Sty-gelをそれぞれラジカル共重合で作製した(図６)。I-Sty-gelとE-Sty-gelに対して、アルゴン雰囲気下、トリエチルアミン存在下でパラジウム触媒、銅触媒を添加したところ両者の接着を確認した。その際に、触媒、ヨウ

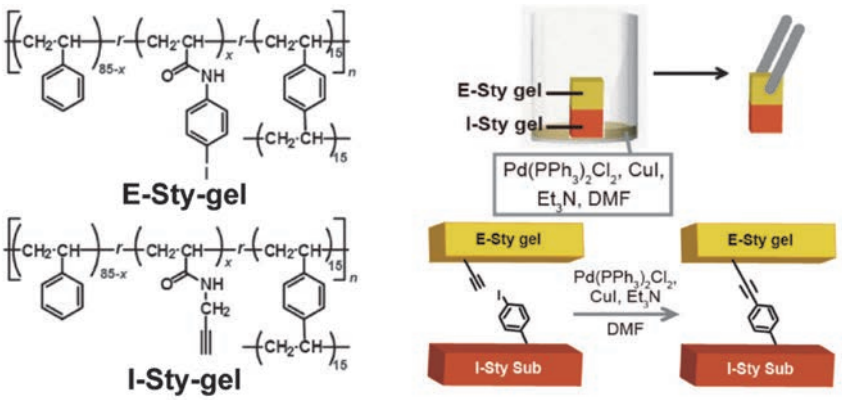


図６． 薗頭クロスカップリング反応をそれぞれ用いてゲル間に共有結合を直接生成させて、接着層の存在しない強靭な接合体を得ることに成功した。

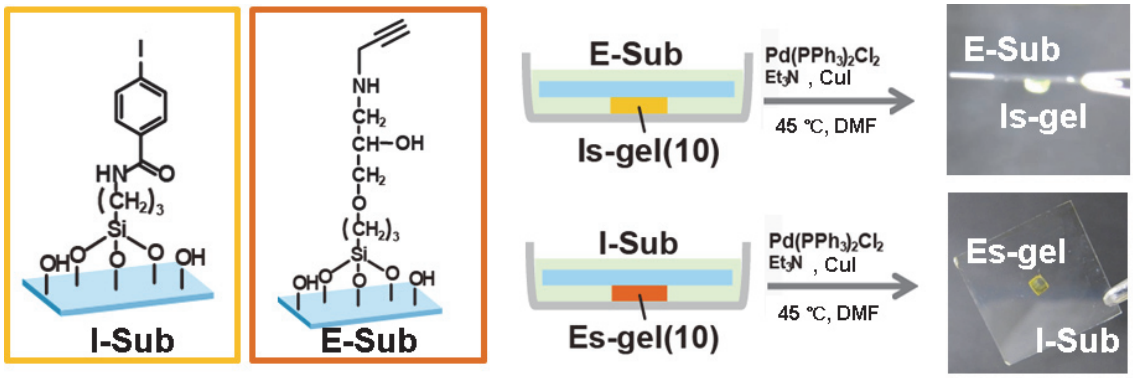


図7．(a)表面に反応性官能基を修飾したガラス基板材料の化学構造。(b)薗頭クロスカップリング反応をそれぞれ用いたガラス基板と高分子ゲル間の異種材料間接合。

化アリール、エチニル基のいずれかの要素を欠いた場合は接着しなかった。また、I-Sty-gelとE-Sty-gelの接着強度をクリープメーターによる引っ張り試験で評価したところ、反応性官能基の導入量の増加に従いゲル間の接着強度が増加しており、オルガノゲル間の接着が薗頭クロスカップリング反応で形成された[6]。

さらに、薗頭クロスカップリング反応を用いて高分子ゲルと無機ガラス基板の接着を行った。高分子ゲルには**I-Sty-gel**と**E-Sty-gel**を選択した。ガラス基板は**I-Sub**、もしくは**E-Sub**を用いた(**図7(a)**)。アルゴン雰囲気下で**I-Sty-gel**の上に**E-Sub**を重ね、トリエチルアミン存在下でパラジウム触媒、銅触媒を添加したところ、反応開始24時間後には両者は接着した。基板とゲルの反応性官能基の組み合わせを逆にした**E-Sty-gel**と**I-Sub**の組み合わせにおいても接着が確認された。一方で、触媒、エチニル基、ヨウ化アリール基のいずれかがない場合、基材は接着しなかった。同様に摩擦試験により接着強度を評価したところ、ゲルの反応性置換基の導入量が増加するに伴い、接着強度の増加が観測された。さらに、この薗頭クロスカップリング反応を用いた場合でも、接合を有機溶媒に浸漬しても接着が保持されることが確認された[6]。

これらの異種材料間の接着では、両者が共有結合で直

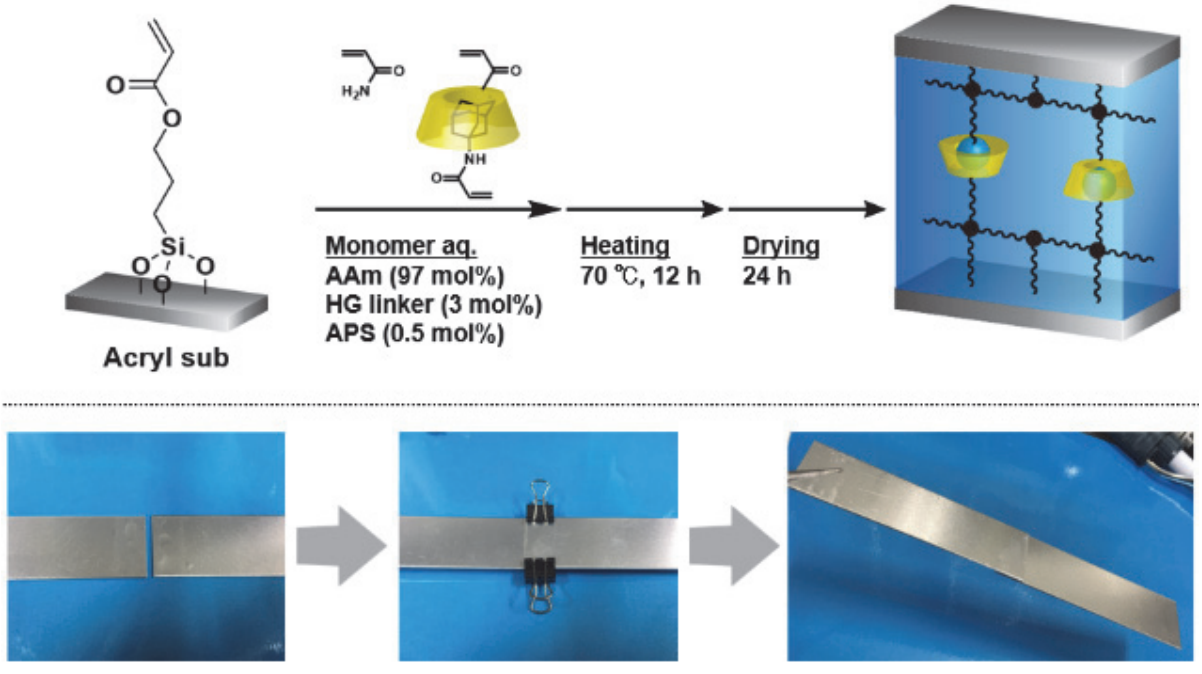


図8．ホストゲスト架橋接着法の模式図と実際の接合の様子。

接に接合されているために接合層が存在せず、接合体があたかも新しい一つの物質であるかのような強靭な接合を示した。

（2）分子認識と共有結合形成を通した異種材料間の接着

さらに強力かつ柔軟な接着技術の開発を目指し、接着の対象を金属基板としてホストゲスト相互作用での架橋、接着を試みた。**図8**に示したように、アルミニウム合金の基板にプラズマ処理を施して親水化した後、シランカップリング剤の3-(アクリルオキシ)プロピルトリメトキシシランで処理して、表面に重合性のアクリレート官能基を修飾した基板**Acryl sub**を得た。続いて、βCDとアダマンタンの各ビニル誘導体を水中で混合して包接錯体を形成させ、さらに、AAmとペルオキソ二硫酸アンモニウムを加え、ホストゲスト超分子マテリアルのモノマー溶液を調製した(モノマー濃度 4mol/kg)。**Acryl sub**上にモノマー水溶液を15μL塗布し、もう一枚の**Acryl sub**で塗布面を挟み込むように被せて圧着した。この状態にて70℃で12時間加熱してモノマー溶液の重合反応を進行させた後、真空乾燥して溶媒の水を除去した。乾燥後、1対の**Acryl sub**は強固に接合されており、ホストゲスト架橋接着体**HG**が得られた。比較サンプルとして、ホストゲスト架橋の代わりにMBAAmを架橋剤とした化学架橋接着体**CC**も作製した(**図9**)。

HGと**CC**について引張試験を行いったところ、**HG**の接合部の剪断応力は6.0MPa、**CC**の接合部では3.7MPaであり、**HG**の方が1.6倍の高い値を示した。両者の破断面を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、どちらも**Acryl sub**上に接着層が残っていた。この剪断は凝集破壊であり、被着体との接合部は接着状態を保っていたことが確認された。

ここで、一度破断した**HG**、**CC**のそれぞれについて、破断面にイオン交換水15μLを塗布してから、その面を元通り合わせた状態で圧着した。圧着状態で終夜静置後に、真空乾燥して水を除去すると、基板同士は再接着していた(**図10(a)**)。このサンプルの引張剪断試験と再接着を繰り返し行った。ここで、第N回目のせん断応力(N^{th} stress)を第1回目の剪断応力(モノマー溶液を重合させて得た初回値)で除した値を剪断応力回復率として算出、評価した(**図10(b)**)。2^{nd} stressで**CC**の剪断応力回復率が10%であったのに対し、**HG**は100%の回復を示した。その後、破断と再接着を5回繰り返しても、**HG**は80%以上の剪断応力回復率を維持していた。

HGを一度剪断後に、その破断面に競争阻害ゲスト分子であるアダマンタンカルボン酸ナトリウムの0.1M水溶液を塗布して圧着し、再接着を試みたところ、**HG**の剪断応力回復率は21%にとどまった。これは、**HG**の再接合にはホスト-ゲスト相互作用の重要性を示唆する結

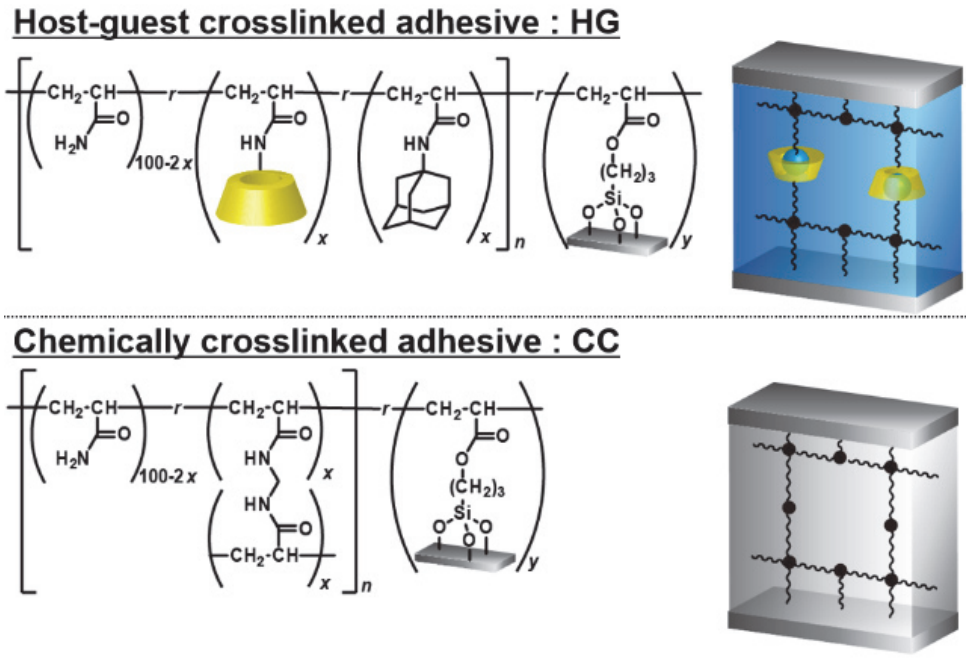


図9．ホストゲスト架橋接着層、および、比較対象の化学架橋接着層のそれぞれの推定化学構造。

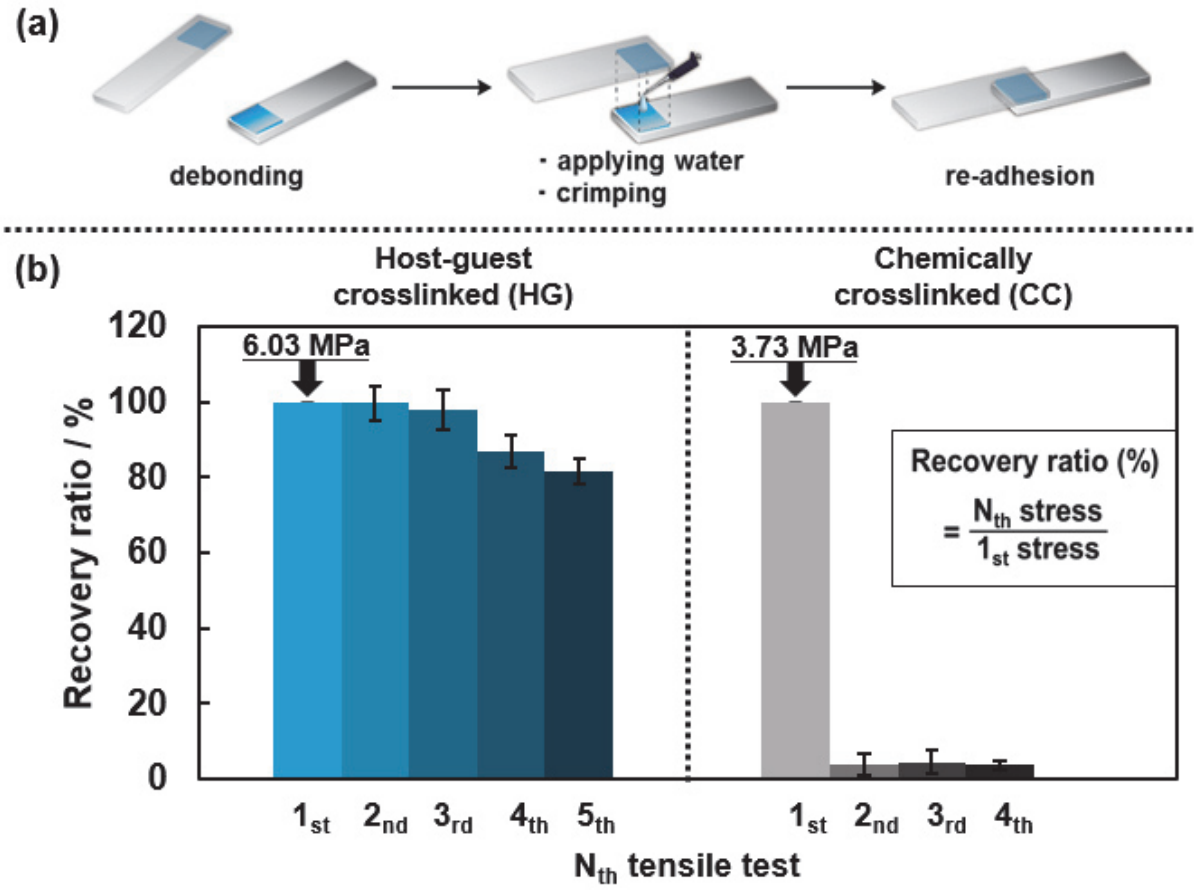


図10. (a)再接着評価試験の手順。(b)引張剪断による再接着時の接着力の回復評価。ホストゲスト架橋(左)では5回の接着を繰り返しても80%もの接着強度を維持している。一方、比較対象の化学架橋接着(右)では一度破断が起こると以降の接着力にはほとんど回復がみれらない。

果である。

以上の結果より考察すると、**HG**が破断するときは、高分子鎖の共有結合よりも非共有結合であるホスト-ゲスト架橋点が優先的に切断され、そのため、再接着操作では界面間にて再度ホストゲスト架橋点が形成して材料強度の回復に繋がったとみられる。また、ここに競争阻害剤を添加した場合は、**HG**のホストゲスト錯体形成が抑えられ、接着強度が低下したものと考えられる。一方、**CC**の破断では化学架橋が剪断によって不可逆に破壊されており、**CC**がわずかに示した非常に低い剪断応力回復率は、表面のポリマーの絡み合い効果によるものと考えられる。

（3）自己修復性の接着層の開発

近年、高分子材料の作製に当たり、従来の化学架橋を駆使した材料設計ではなく、可逆的な非共有結合を利用した材料設計が盛んに行われている。このような可逆的な結合は応力が加えられたときに、ある一点に応力が集中するのではなく、分散が図れることで、材料自身の破断歪が向上するという点である。また可逆的な結合であるため、材料内部で結合が切れたとしても、再形成により、材料強度の回復や再接着などの自己修復が期待できる。当研究室では、シクロデキストリン(CD)と疎水性のゲスト分子からなる包接錯体をゲルの架橋点とすることで、自己修復性や高靱性を有する超分子材料を作製した。本研究では、高分子側鎖に様々なゲスト分子を導入し、CDとゲスト分子の会合定数等の違いが力学物性へと及ぼす影響について検討した。

αCDまたはβCDに対して*N*-ヒドロキシメチルアクリルアミドを修飾したホストモノマー(CDAAmMe)を用いた。αCDAAmMeに対する直鎖アルキルゲストモノマーはブチルアクリレート(Bu)、ヘキシルアクリレート(Hex)、オクチルアクリレート(Oct)、ドデシルアクリレート(Dod)を選択した。またβCDAAmMeに対し

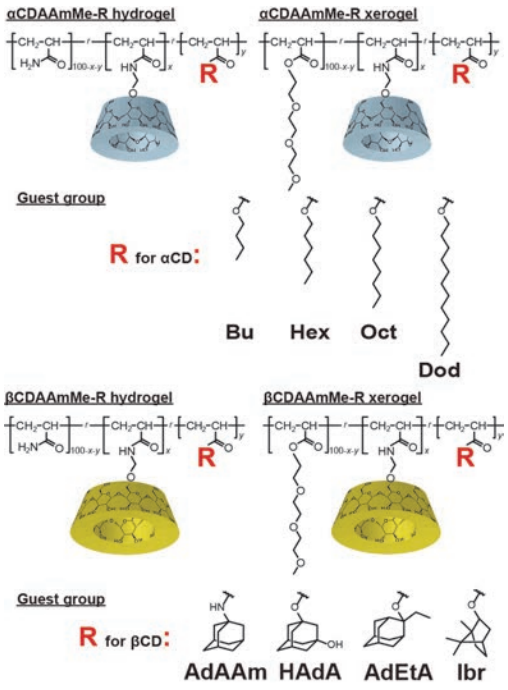


図11. CDAAmMe-R hydrogels と xerogelsの化学構造

てはイソボロニルアクリレート(Ibr)、アダマンチルアクリルアミド(AdAAm)、ヒドロキシアダマンチルアクリレート(HAdA)、エチルアダマンチルアクリレート(AdEtA)を用いた。超分子ヒドロゲル(CDAAmMe-R hydrogels)はCDAAmMeと適切なゲストモノマーを混合し、アクリルアミド(AAm)、または低T_gモノマーであるトリエチレングリコールアクリレート(TEGA)とのラジカル共重合により得た。さらに乾燥体のCDAAmMe-R xerogels も得た(図11)。力学特性は引っ張り試験により評価した。

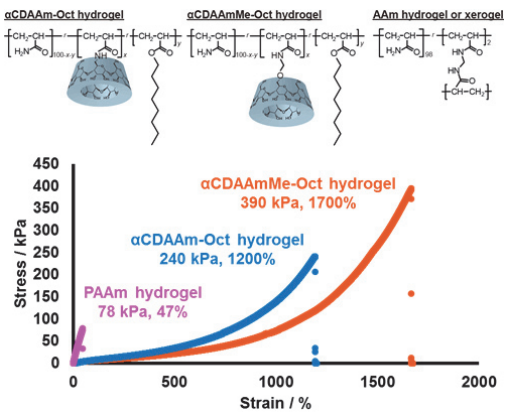


図12. α CDAAmMe-Oct hydrogel, α CD AAm-Oct hydrogel、 reference hydrogelの力学特性。

＜CDAAmMe-R gelとCDAAm-R gelの比較＞

CDから主鎖までのリンカーの長さが長いαCDAAmMeと短いαCDAAmで材料物性を比較した。その結果、αCDAAmMe-Oct hydrogelとαCDAAm-Oct hydrogelは化学架橋型のAAm hydrogelよりも高い応力と歪を示した(図12)。また、αCDAAmMe-Oct hydrogelのほうがαCDAAm-Oct hydrogelよりも高い破断応力と歪を示した。これは、αCDAAmMeの方がポリマー主鎖からの距離が長いため、CD部位の可動性が向上したためと考えた。

＜αCDAAmMe-R gelにおける置換基と力学物性の関係＞

αCDAAmMe-Oct hydrogelをシート状に整形後、固定したカッターの刃に強く押し付けたところ、刃はゲルシートを貫通せず、高靱性を示した(図13)。このような高靭性の起源を調べるために、種々のアルキル側鎖を有するαCDAAmMe-R hydrogelsの力学物性を比較した。図14aに導入率1-3mol%のヒドロゲルでの破断応力を破断歪を比較した。アルキル鎖長の上昇に応じて破断応力が上昇する傾向が見られた。破断応力と会合定数の関係を見ると、会合定数の上昇に伴い、破断応力が上昇する挙動が見られた。通常、応力が上昇すると、破断歪は減少するが、αCDAAmMe-Dod hydrogelにおいて高い破

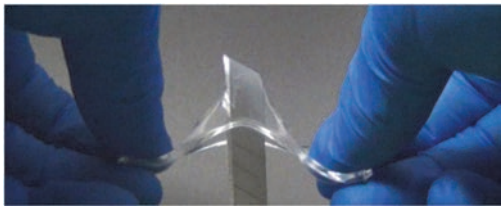


図13. Highly toughness of α CDAAmMe-Oct hydrogel.

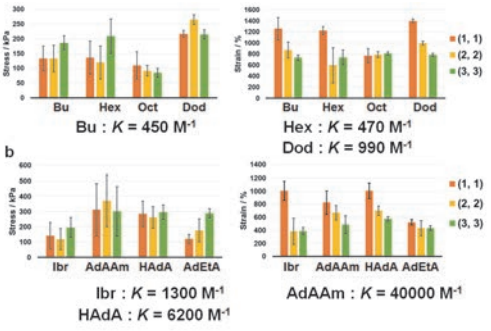


図14. Comparison of stress and strain of **(a)** α CDAAmMe-R hydrogels and **(b)** β CD AAmMe-R hydrogels and each assistant constants between CD and guest molecule.[5,6]

断応力と破断歪の両方が上昇する傾向が見られた。αCDAAmMe-Bu hydrogelとαCDAAmMe-Dod hydrogelを比較すると破断歪が上昇しており、アルキル側鎖の分子鎖長が破断歪に影響していた。

＜βCDAAmMe-R gelにおける置換基と力学物性の関係＞

βCDAAmMe-R hydrogelsの力学物性を図14bに示した。導入率1-3mol%のヒドロゲルでの破断応力と破断歪を比較した。βCDと各々のゲスト分子の会合定数の上昇に伴って、βCDAAmMe-R hydrogelsの応力が上昇する挙動が観察された。一方で、βCDAAmMe-R hydrogelsはαCDAAmMe-R hydrogelsで観察されたような高い破断歪は観測されなかった。選択したシクロアルキル基のゲスト分子は棒状の構造ではない。その結果、応力が加えられたときにβCDはゲスト分子を可動する領域を持たないため、破断歪が比較的抑制されたと考えられる。

＜βCDAAmMe-R TEGA xerogelの自己修復特性＞

CDAAmMe-R hydrogelsの大きな特徴として、化学架橋を含まず、可逆的な結合で架橋されているところが特徴である。このような可逆的結合を利用して、αCDAAmMe-Oct hydrogelの自己修復性を調べた。αCDAAmMe-Oct hydrogelをカッターで破断し、破断面どうしを接触させると、再接着した(図15a)。ヒドロゲルで確認された自己修復性を乾燥状態でも実現するために、ガラス転移点の低いTEGAを主鎖成分に選択し、βCDAAmMe-R TEGA xerogelを作製した。切断したキセロゲルの破断面を接触させると、再接着することが分かった。自己修復率はβCDAAmMe-AdAAm xerogelが最も高く、初期の材料強度に対して、25%まで回復することが分かった(図15b)。このようは再接着を通した自己修復性は化学架橋されたTEGA xerogelでは観察され無かった。βCDAAmMe-AdAAm xerogelに導入されたβCDとアダマンチル基の錯体形成を通して、自己修復が発現していると考えられる。

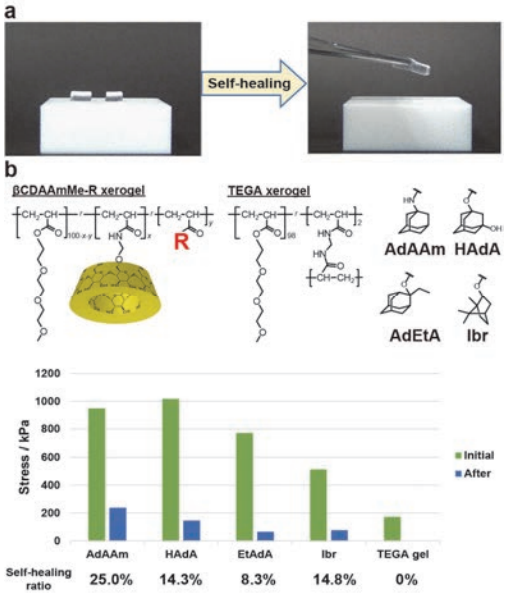


図15. **(a)**Self-healing of αCDAAmMe-Oct hydrogel. **(b)**Self-healing ratio of βCD AAm Me-Guest xerogels.

（4）力学的刺激を可視化する材料の開発

本研究ではCDのゲスト分子としてフェノールフタレイン(PP)を選択した。塩基性水溶液中においてPPは赤色だが、CDに包接されることで無色透明になる。この性質を利用して外部刺激によって色調変化を示す材料の作製を行った。さらにTgの低い主鎖を用いることで乾燥状態での自己修復性の付与を行った。

【実験結果と考察】

ポリヒドロキシエチルアクリレート(pHEA)を主鎖としたヒドロゲルにCDとPPを導入したHEA βCD-PP gel(x,y)を作製した(図16)。xとyはそれぞれβCDモノマーとPPモノマーの仕込み率を示している。HEA βCD-PP gel(2,2)を乾燥させたキセロゲルについて自己修復性を確認した。一度切断したゲルを切断面で接触させ24時間静置したところ、ピンセットで持ち上げても剥がれ落ちることなく持ち上げることができた(図17)。乾燥状態でも自己修復性を付与することに成功した。

同様にポリアクリルアミド(pAAm)を主鎖とした

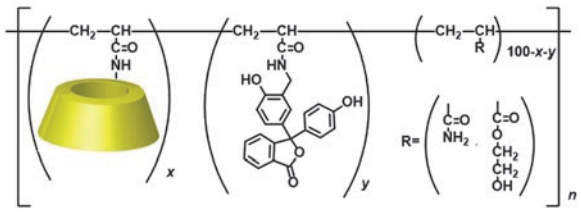


図16. Chemical structure of βCD-PP gel.

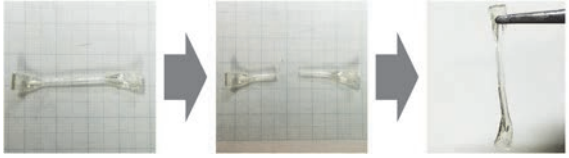


図17. Self-healing experiment of HEA βCD-PP gel (2,2).

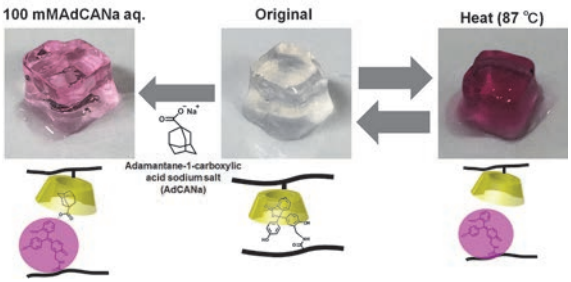


図18. Color change experiment of AAm βCD-PP gel (2,2).

AAm βCD-PP gel(2,2)を作製した。このゲルに競争分子(PP以外の別のゲスト分子)や熱を与えたところ、無色透明から赤色に呈色した(図18)。これらの刺激がβCDとPPの包接錯体を解離させることによるものだと考えられる。

【結言】

研究課題全体を通して、超分子錯体形成を通した異種材料間接合と新たな接着層の構築のため、超分子接着材料の開発に取り組んだ。超分子接着材料の特徴として、昇温によってポリマーの運動性が上がると、ホストゲスト錯体の結合・解離によるホストゲスト架橋の組み換えも活発になる。結果、外力によりポリマー鎖が引き伸ばされながら架橋点が組み換わるので、初期ネットワーク架橋とは異なるホストとゲストの対で架橋点が形成され、大きなヒステリシスを生じたと考えられ、従来の接着剤にはない特徴が生み出せた。これは化学架橋接着材料では化学結合の架橋点は定常であるため、弾性変形挙動を示すものの、結合の組み換えは期待できない。超分子接着材料は外部応力による変形に対して動的に架橋点を組み換えられるという性質は、超分子接着材料が高い破断応力、破断歪みを示した実験事実を支持するものと言え、今後、さらなる発展のため、研究課題を継続させる(図19)。

【参考文献】

(1) Harada, A.; Kobayashi, R.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 34-37.
(2) Takashima, Y.; Sahara, T.; Sekine, T.; Kakuta, T.; Nakahata, M.; Otsubo, M.; Kobayashi, Y.; Harada, A. *Macromol. Rapid Commun.*, **2014**, *35*, 1646-1652.
(3) Sekine, T.; Kakuta, T.; Nakamura, T.; Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Harada, A. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6348.
(4) K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron*

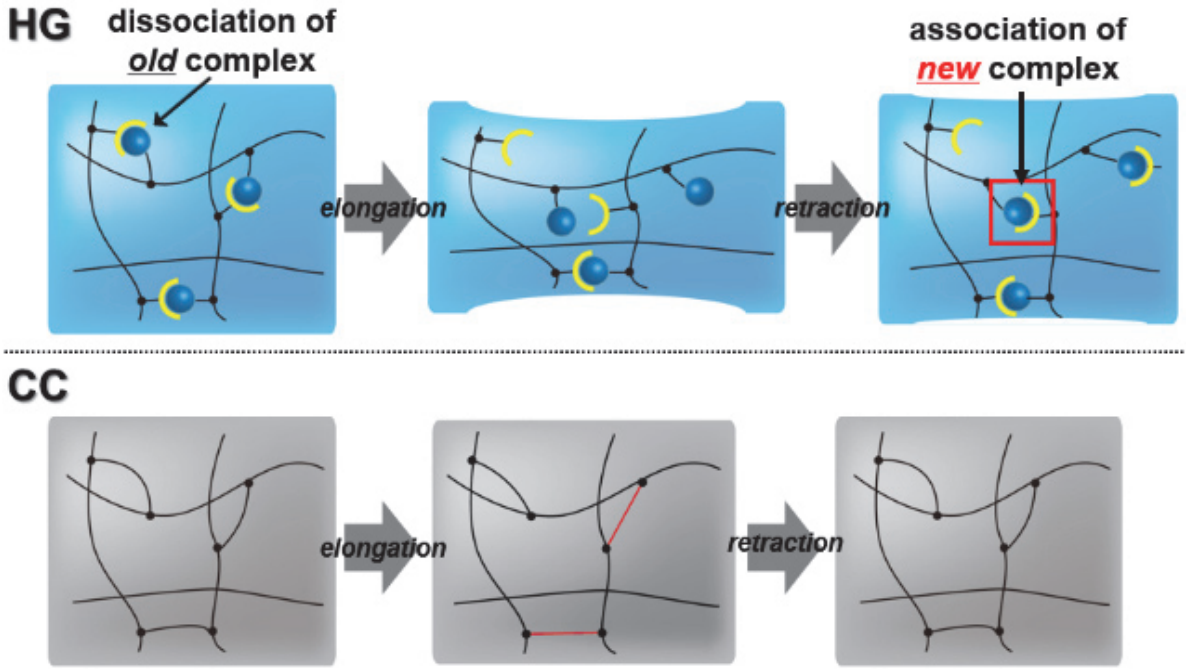


図19. ホストゲスト架橋の接着層破壊の推定機構。ホストゲスト架橋部は外部からの応力に対して、結合の生成・解離を起こすことで応力を分散させ、柔軟かつ強靭な接着を実現しているものと考えられる。一方、化学架橋では架橋の破壊は不可逆であり、応力の集中に弱く、再修復も示さない。

Lett. **1975**, *50*, 4467.

(5) K. Sonogashira, *J. Organomet. Chem*., **2002**, 653, 46.

(6) T. Sekine, Y. Takashima, H. Yamaguchi, A. Harada, *Chem. Lett*., **2016**, 45, 1250.

(7) Takashima, Y.; Shojima Y.; Sekine T.; Osaki M.; Kobayashi Y.; Yamaguchi H.; Sekito T.; Hatano K.; Nakajima K.; Harada, A. *Chem. Lett.* **2018**, accepted (doi.org/10.1246/cl.180528).

(8) Takashima, Y.; Sawa, Y.; Iwaso, K.; Nakahata, M.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Macromolecules*, **2017**, *50*, 3254-3261.

(9) Takashima, Y.; Yonekura, K.; Koyanagi, K.; Iwaso, K.; Nakahata, M.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Macromolecules*, **2017**, *50*, 4144-4150

研究報告集　第30集　（非売品）
2019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