

ISBN 0368-6280

公益財団法人
日本化学繊維研究所

講 演 集

第 76 集

2019 年 3 月

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol.76
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.76)
March 2019

【沿革・目的・背景】

本財団は、繊維商社社長（当時）伊藤萬助氏による京都帝国大学への寄附金 20 万円を基に、化学繊維の学術と産業の振興を目的として 1936 年 9 月 1 日に同大学内に設立されました。それ以来 76 年の長きにわたり、旧民法に基づく財団法人として、代々の京大総長を理事長に招き、その活動を継続してきました。2008 年の新法人法の施行に伴い、2013 年 4 月 1 日より、京都大学とは独立した新たな公益財団法人として生まれ変わり、現在に至っています。

本財団の目的と事業内容は時代とともに変化しましたが、現在は、広く高分子科学分野の学術及び科学技術の振興を目的とし、当該分野における研究成果の公開及び専門知識の普及、産学間及び国際的学術交流、並びに研究教育の支援に関する諸事業を行っています。具体的には、公開講演会、研究者育成講座、国際研究集会などの開催、学術講演集の刊行、及び公募型研究助成を主事業としています。

前記の歴史的経緯が示すとおり、本財団は、京都大学の繊維・高分子関連分野（旧工学部工業化学教室・繊維化学教室、現大学院工学研究科高分子化学専攻・材料化学専攻及び協力研究室）との連携が強く、また現京都大学の高分子科学研究者を主要メンバーとする非営利学術組織 **Kyoto Institute of Polymer Science (KIPS)** と連携・協力関係にあります。一方、産業界からは、財団の維持会員企業として年会費（寄付金）の拠出を受けています。これらの連携・協力と支援が、本財団の一貫した背景をなしています。

【事業内容】

（1）日本化学繊維研究所講演会および同講演集

本講演会および講演集は、歴史的には、櫻田一郎先生によるビニロンの発明や堀尾正雄先生の二浴緊張紡糸法の発明など、往年の京大学派が産み出した数々の輝かしい研究成果に関し、その逸早い発表の場を提供するという貴重な使命を果たしてきました。

現在は、上記の京都大学高分子関連研究室の担当教授を網羅する講師陣と関連産業界から招く特別講師による、毎年 1 回の公開学術講演会の開催およびその詳録（講演集）の刊行により、高分子科学に関する最新の研究成果等を一般に公開しています。講演会終了後の懇親会は、産・学・市民交流の場となっています。

（２）国際研究集会

上記の KIPS および京都大学高分子化学専攻との連携の下で、2 年に 1 回の頻度で国際高分子研究集会を開催し、最新研究情報の交換と緊密な学術交流を行っています。パートナーとなる国外の特定の大学または研究組織との共同による、連続 2 回（初回は京都、第 2 回は相手方都市で）の開催を原則とし、講演と講演予稿集を一般に公開しています。

（３）若手研究集会

高分子科学の先導的研究者の養成と持続的な学術振興を目的とし、KIPS の若手メンバーを運営主体として京都地域内外の若手研究者を招いて 2 年に 1 回、開催しています。

（４）研究者育成講座：KIPS 高分子講座

企業の若手研究者を主な対象とする通年の育成講座です。KIPS の教授メンバー約 20 名が、初級者にも理解しうる基礎から最先端の応用に至る幅広い領域についての専門知識と学術情報を、延べ 20 余回にわたって平易に解説します。若手研究者の育成のみならず、産学間の交流と連携を推進するための持続的ネットワークの形成を目指しています。

（５）研究助成（公募型）

京都府、滋賀県および奈良県下の大学の繊維・高分子化学分野における先端的な研究に対して、公募によって申請のあった研究について、有識者からなる選考委員会に諮り、申請資金の全部または一部を助成しています。

公益財団法人 日本化学繊維研究所 講演集目次 (第76集)

(第76回講演会：平成30年11月14日 京都大学桂キャンパス・桂ホール)

3.00 高強度繊維の用途展開と更なる極限物性追求	…	4
東洋紡株式会社機能材開発研究所グループリーダー 福島 靖憲		
3.01 延伸下におけるポリエチレンの構造物性相関	…	33
京都大学化学研究所 ○竹中幹人、三田一樹、藤井澄明、西辻祥太郎		
3.02 重合誘起相分離によるモノリス型粒子の合成とその機能	…	38
京都大学化学研究所 ○辻井敬亘、榊原圭太		
3.03 ラジカル重合を用いた多分岐ポリアクリレート of 構造制御重合	…	43
京都大学化学研究所 ○山子茂、路楊天		
3.04 環化重合による交互配列高分子の合成と配列機能の創出	…	47
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○大内誠、亀谷優樹		
3.05 高分子水溶液の希薄溶液物性 — ポリ- <i>N,N</i> -ジエチルアクリルアミド	…	51
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○吉崎武尚、井田大地、千布堅一朗		
3.06 分子ダイポールを組織化したペプチド材料の電気的特性解析	…	55
京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 ○木村俊作、宇治広隆、田畑友基、大村紘司、釜野雄輔		
3.07 ブレンド膜における共役高分子の電荷輸送特性の向上	…	59
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○大北英生、入口亮		
3.08 環状ブラシ状高分子の剛直性パラメータ	…	65
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○中村洋、月見亮介、高野敦志、辻陽介、松下裕秀		
3.09 反復凍結解凍法で作製したポリビニルアルコールゲルの力学特性	…	69
京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 ○瀧川敏算、堀中順一、矢尾晃一		
3.10 プロテオリポソーム工学とバイオ応用	…	72
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○秋吉一成、安藤満、佐々木善浩		
3.11 環状ポリマーブラシの摩擦の分子シミュレーション	…	76
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○古賀毅、古谷勉、林慎二郎		
3.12 光による幹細胞運命操作法	…	83
京都大学ウイルス・再生医科学研究所 永樂元次、○大串雅俊		
3.13 薬物徐放化フィブリンハイドロゲルによるマクロファージ機能の修飾	…	87
京都大学ウイルス・再生医科学研究所 ○田畑泰彦、田中隆介、城潤一郎		
4.00 謝辞	…	91

2018年11月14日

日本化学繊維協会研究所 第76回講演会



▶ 高強度繊維の用途展開と更なる極限物性追求

東洋紡株式会社
機能材開発研究所
スーパー繊維開発グループ
福島 靖憲

本日の内容

- 東洋紡の企業紹介
- スーパー繊維について
- スーパー繊維の用途紹介
- 高強度化や高性能化に向けたアプローチ
- 最近の開発状況

事業構成



化成品部門



機能材部門

繊維・商事部門



ヘルスケア部門

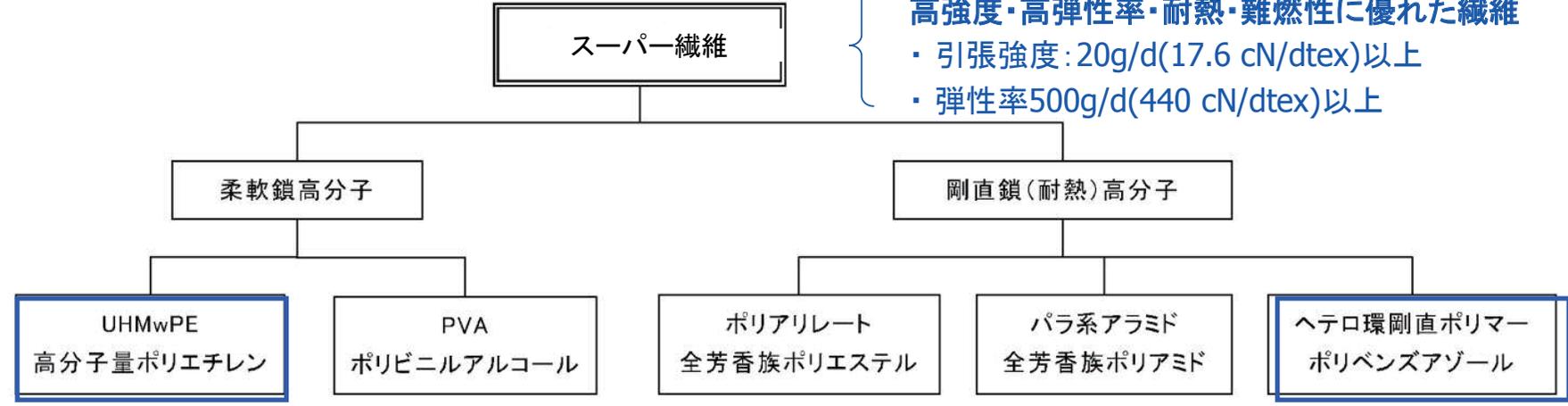


スーパー繊維について

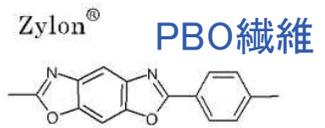
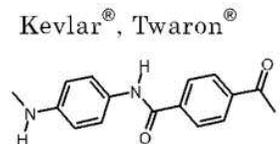
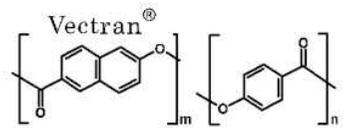
スーパー繊維について

一般的な定義

- 高強度・高弾性率・耐熱・難燃性に優れた繊維
- ・ 引張強度: 20g/d(17.6 cN/dtex)以上
 - ・ 弾性率500g/d(440 cN/dtex)以上



超高分子量ポリエチレン繊維



Dyneema® (DSM)
IZANAS® (東洋紡)
Spectra® (Honeywell)

クラロンK-II® (クラレ)

ゲル紡糸

Tensylon™ (DuPont)
Endumax® (帝人)

固相圧延製膜
(半熔融成形)



熔融紡糸

Vectran® (クラレ)

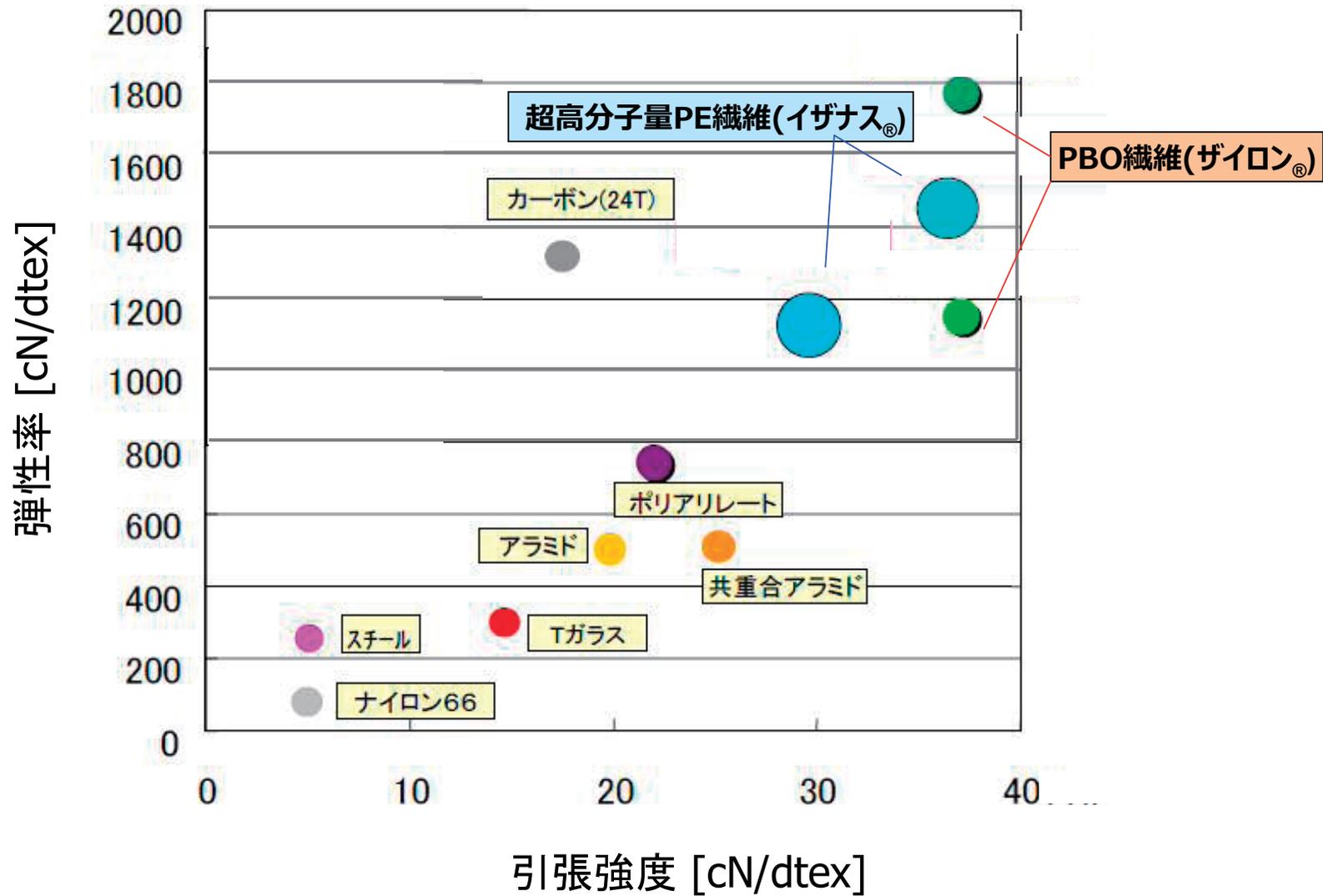
液晶紡糸

Kevlar® (DuPont)
Twaron® (帝人)
Armos® (LIRSOT)
Technora® (帝人)

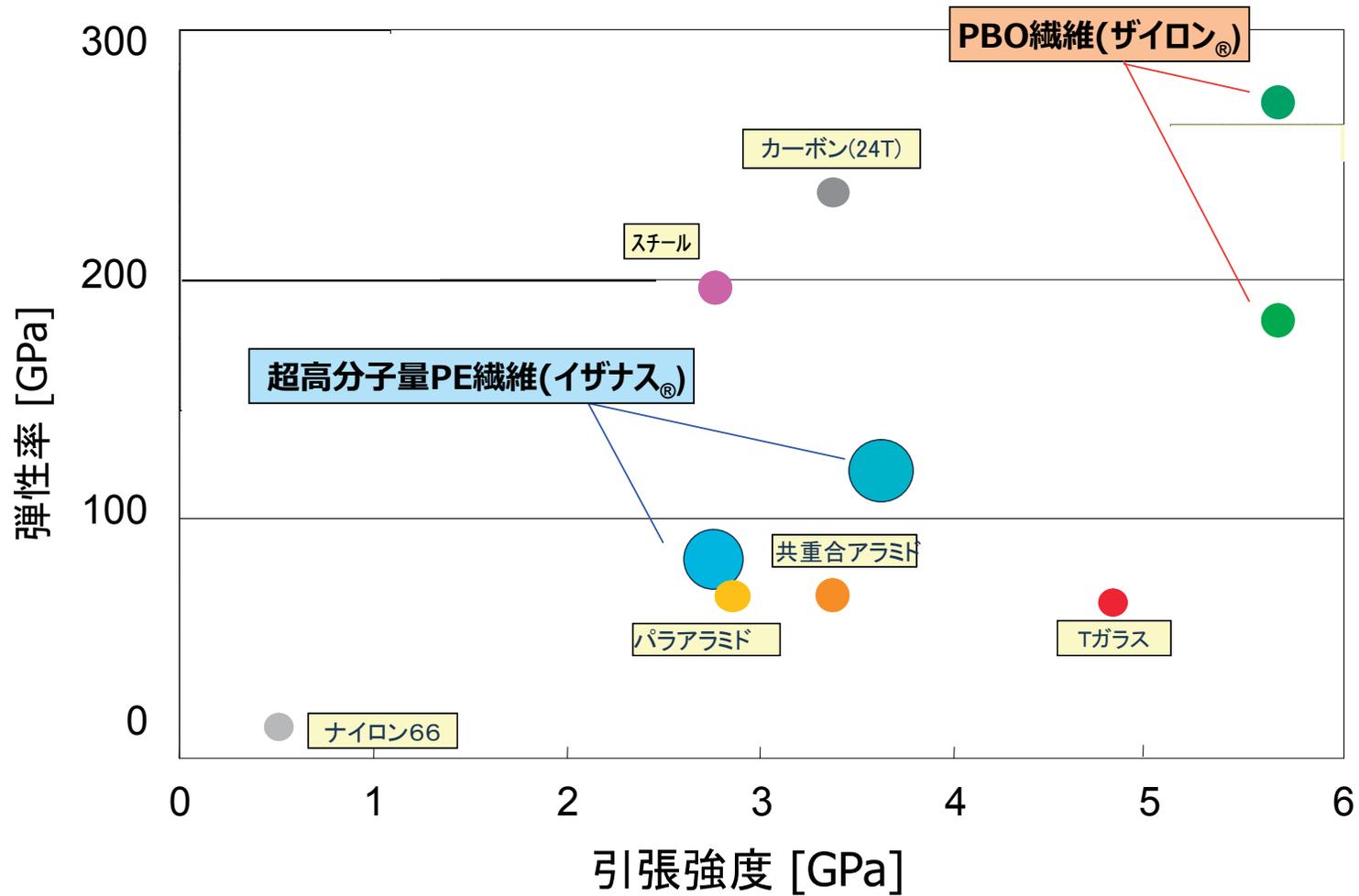
Zylon® (東洋紡)
M5® (DuPont)



スーパー繊維の力学物性 (織度あたり)



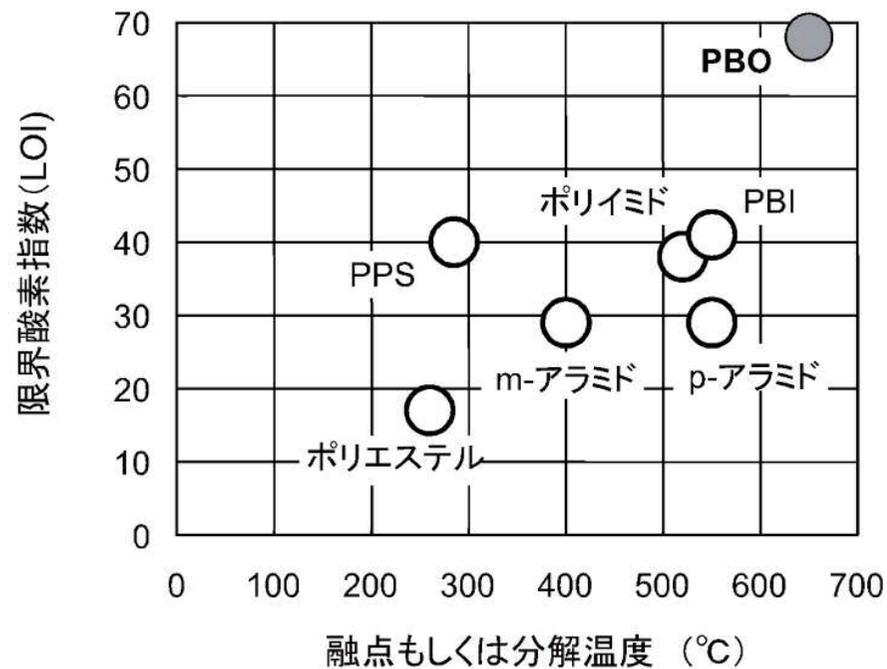
スーパー繊維の力学物性(断面積あたり)



PBO纖維

PBO繊維の特性

- 引張強度 (5.8GPa, 37cN/dtex)
- 引張弾性率 (270GPa, 1720cN/dtex)
- 耐熱性 (分解温度: 650°C)
- 難燃性 (限界酸素指数: 68)



耐熱・難燃製品分野

消防服

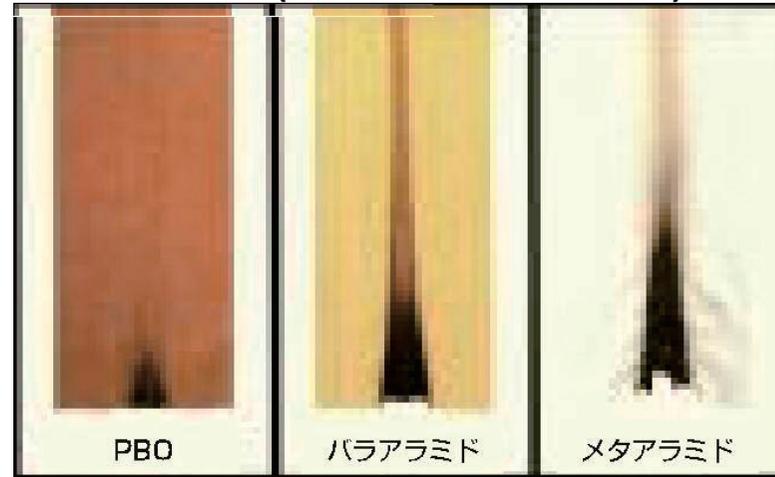
- 安全性 (接炎後の強度保持率)
- 耐久性

耐熱資材

- 耐久性 (メンテナンスコストの削減)
- ソフトな表面 (製品の品質向上)
- 環境にやさしい (焼却処分できる)



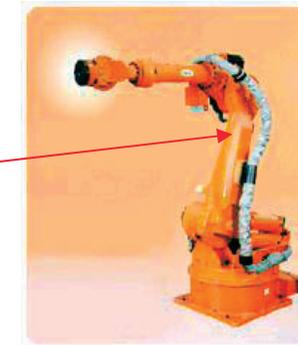
燃焼試験(JIS L1091 A-4垂直法)



炭化長 0.5cm

3cm

6cm



複合材料分野

- 軽量化（高強度・高弾性率）
- 低誘電率（電気電子材料）
- 負の線膨張係数（ゼロ膨張材料）
- 耐摩耗性（高寿命）



卓球ラケット



テニスラケット



バドミントンラケット



自転車スポーク



自転車タイヤ



ヨットロープ



スノーボード



ライダースーツ



レーシングカー

PBO繊維の製法

理論弾性率計算からの分子構造選定

cis-PBO

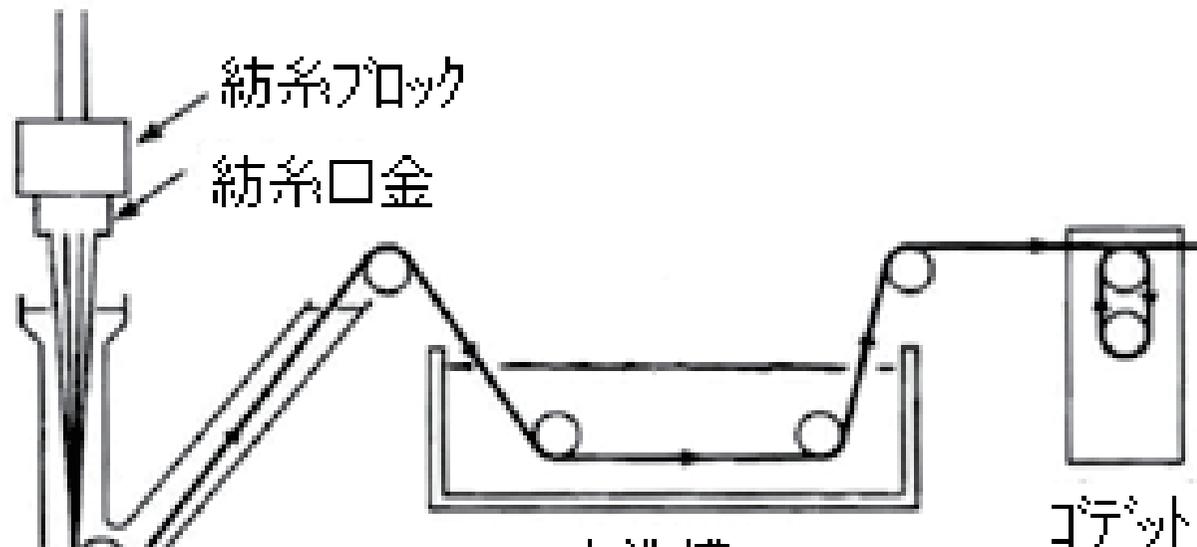
Wierschkeによる弾性率の計算値と
結晶弾性率や繊維弾性率との比較

	理論計算値	結晶実測値	繊維弾性率
cis-PBO	730 GPa	475 Gpa	350 GPa
trans-PBO	707		
trans-PBZT	605	385	300
trans-PBI	665		
PPP	456		
PPPI	520		
ポリエチレン	362	240	140
p-アラミド	182	156	158
ポリアセン	945		
グラファイト	1500	830	770

※S.G.Wierschke,J.R.Shoemaker,P.D.Haaland,R.Pachter
,W.W.Adams;Polymer,33,3557(1992)

PBO繊維の紡糸法

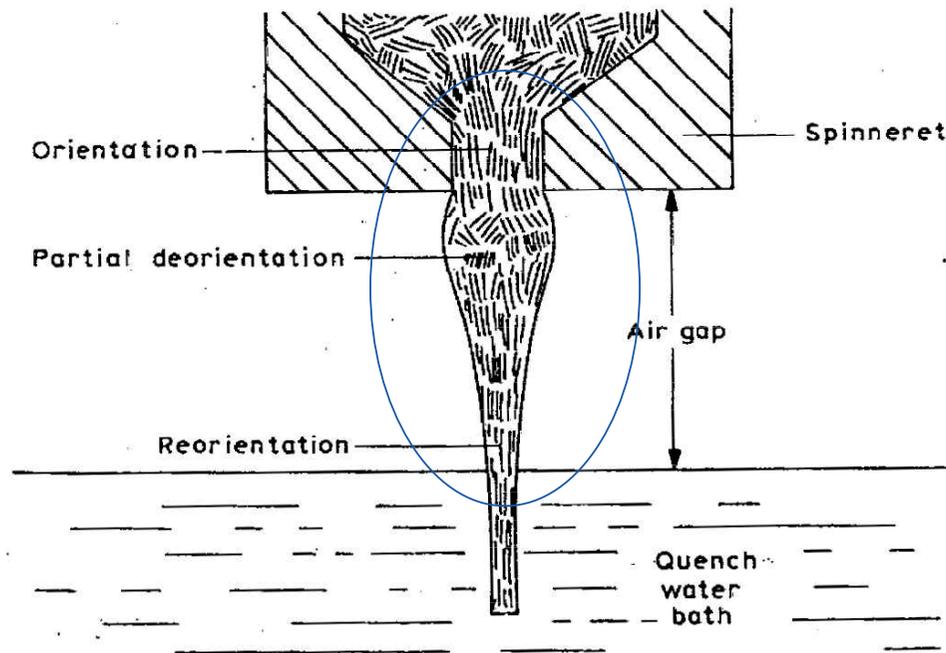
乾湿式紡糸法



※新世代構造材料の最新技術,シーエムシー出版,P263(2008)

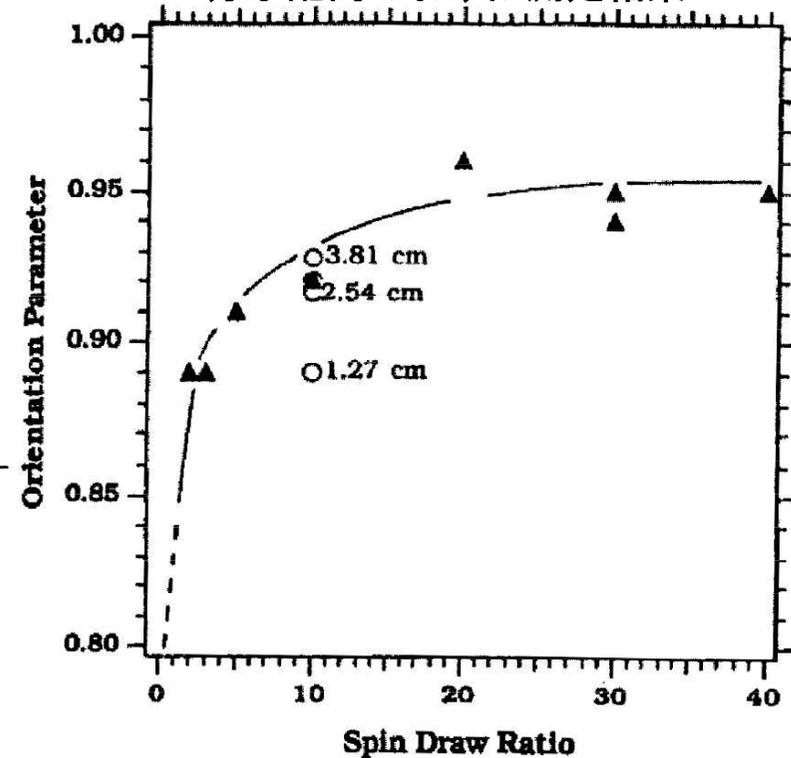
PBO繊維の紡糸工程での構造形成

リトピック液晶の紡糸における構造発現の模式図



※R.S.Irwin; Symposium on Developments in Materials for Composites, New Delhi, INDIA, Jan. 1984

PBO繊維の紡糸における分子配向のオンライン測定結果



※R.A.Bubeck et al; A.C.S.PMSE, 71, 328 (1994)

超高分子量ポリエチレン繊維

釣糸、船舶ロープ用途

- 高強度 : 小径化が可能
- 軽量化 : 水に浮く
- 耐磨耗 : 擦れても破損しにくい



大型船舶用の係留ロープ

- 高強度 : 小径化が可能
- 高弾性率 : 感度が高い
- 耐磨耗 : 擦れても破損しにくい



釣り糸 (PEライン)

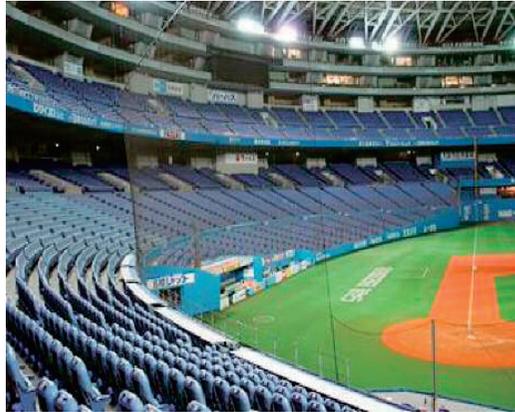
※東洋紡ホームページ>製品情報>イザナス®>用途

TOYOBO Confidential

17

ネット・耐切創手袋分野

- 高強度 : 小径化が可能
- 耐磨耗 : 擦れても破損しにくい
- 耐候性 : 太陽光・UVによる劣化がしにくい



防球ネット



山間部の防獣ネット

- 耐切創 : 刃物に対して切断しにくい
- 耐磨耗 : 擦れても破損しにくい



作業用の耐切創手袋

出典：ショーワグループ株式会社ホームページ＞現場の問題別ソリューション＞切創事故対策

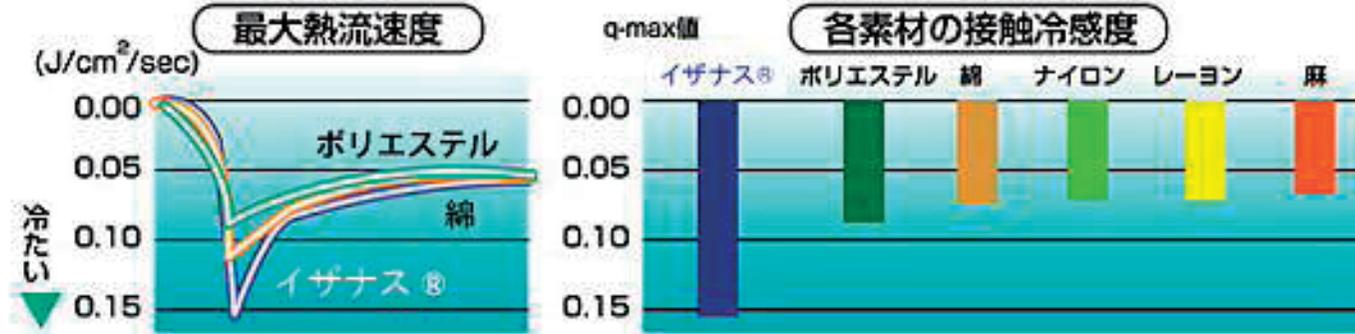
TOYOBO Confidential

※東洋紡ホームページ＞製品情報＞イザナス®＞用途

18

接触冷感用途

各素材の接触冷感度



- 汎用の他素材と比較して、接触冷感が強い。
- 接触冷感性能を利用した作業着や寝装具に用途展開している。



※東洋紡ホームページ>製品情報>イザナス®>用途

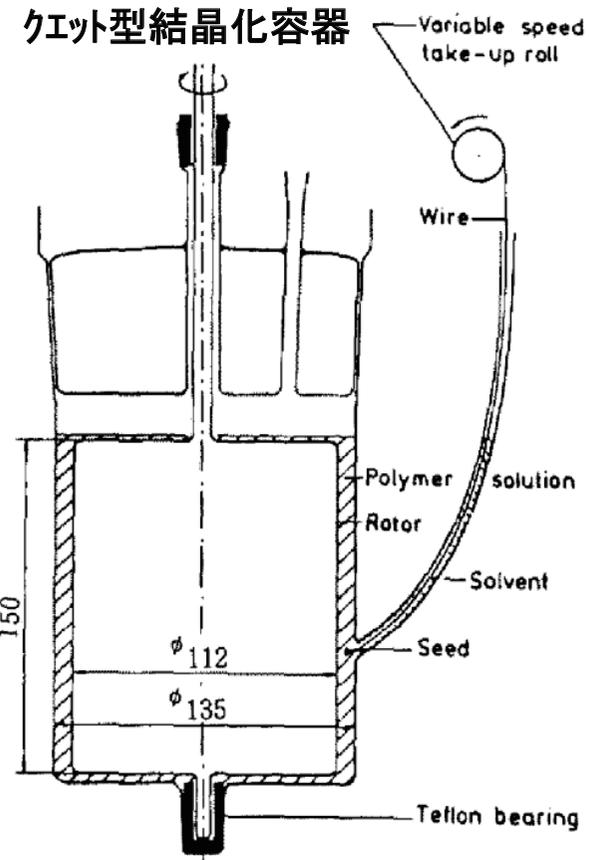
超高分子量ポリエチレン繊維の製法

超高分子量ポリエチレン繊維の歴史

高分子鎖の極限強度ポリマーの結晶弾性率

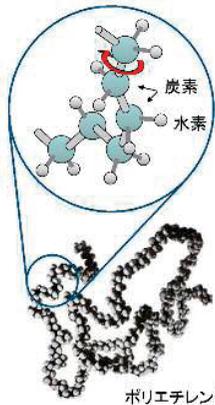
ポリマー	分子断面積 (nm ²)	極限強度		結晶弾性率	
		g/d	Si GPa	g/d	GPa
PE	0.193	372	32	2720	235
Nylon 6	0.192	316	32	1560	165
POM	0.185	264	33	420	53
PVA	0.228	236	27	2180	250
PPTA	0.205	235	30	1240	153
PET	0.217	232	28	890	108
PP	0.348	218	18	500	41
PAN	0.304	196	20		
PVC	0.294	169	21		

※安田浩,Rob Kirschbaum,繊維学会誌,43,P139(1987)

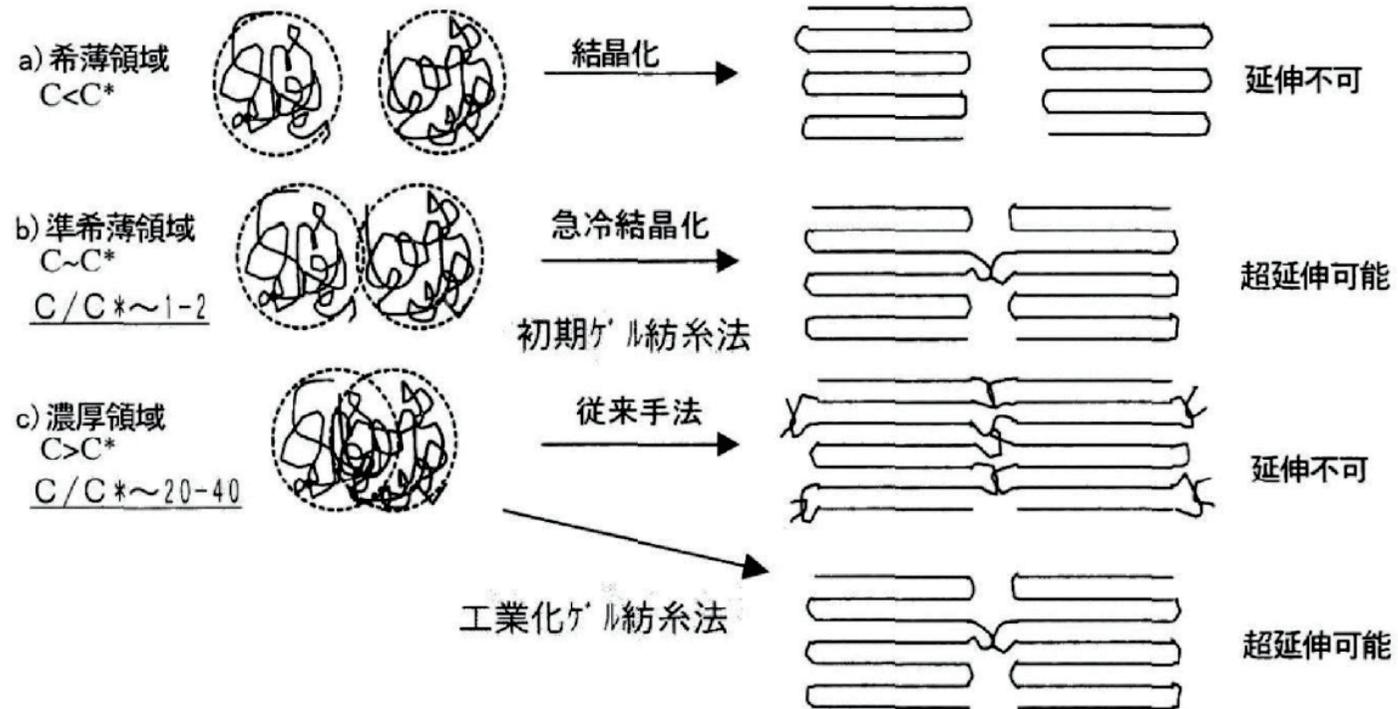


※太田利彦 SEN'I GAKKAISHI
(繊維と工業)Vol.40.P-410(1984)

超高分子量ポリエチレン繊維の製法①



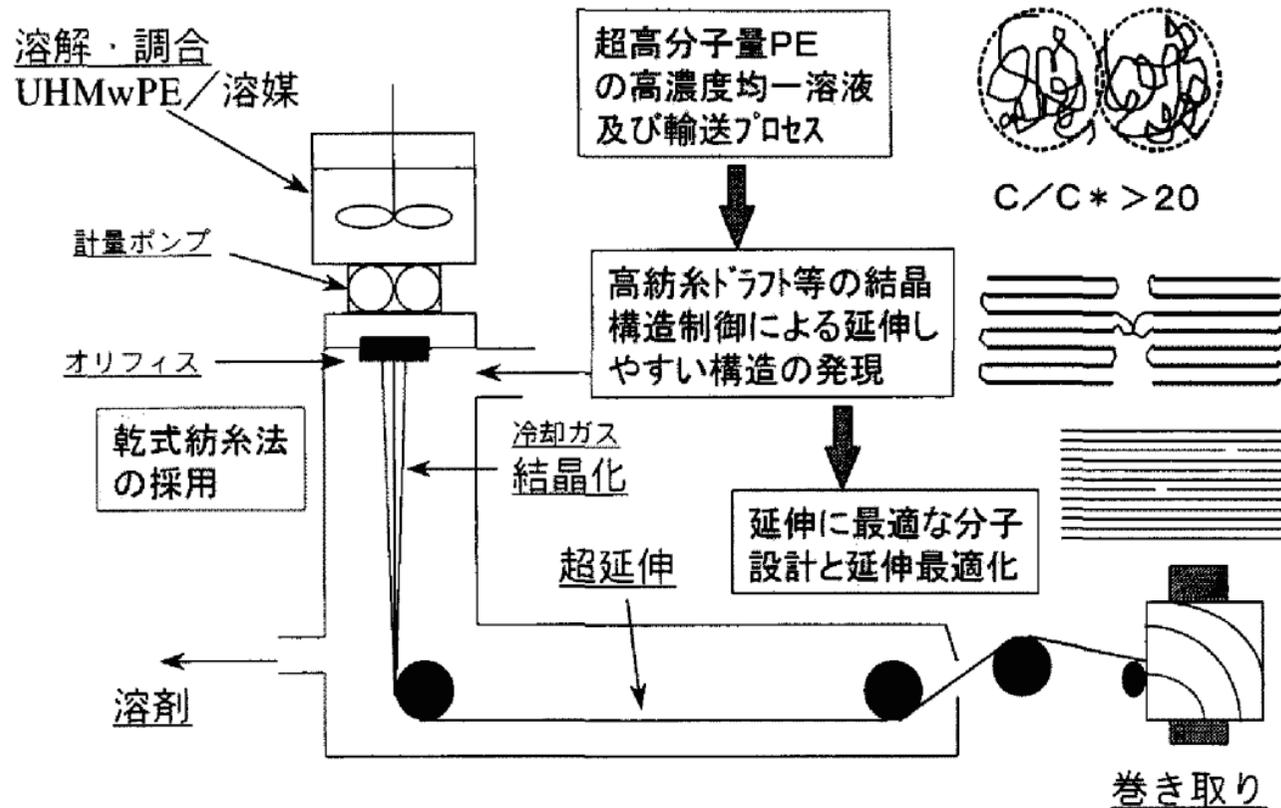
ゲル紡糸の基本概念と工業化された高濃度プロセスの模式図



※大田康雄 SEN'I GAKKAISHI(繊維と工業)Vol.55.P-413(1999)

超高分子量ポリエチレン繊維の製法②

工業化されたゲル紡糸法の概念図

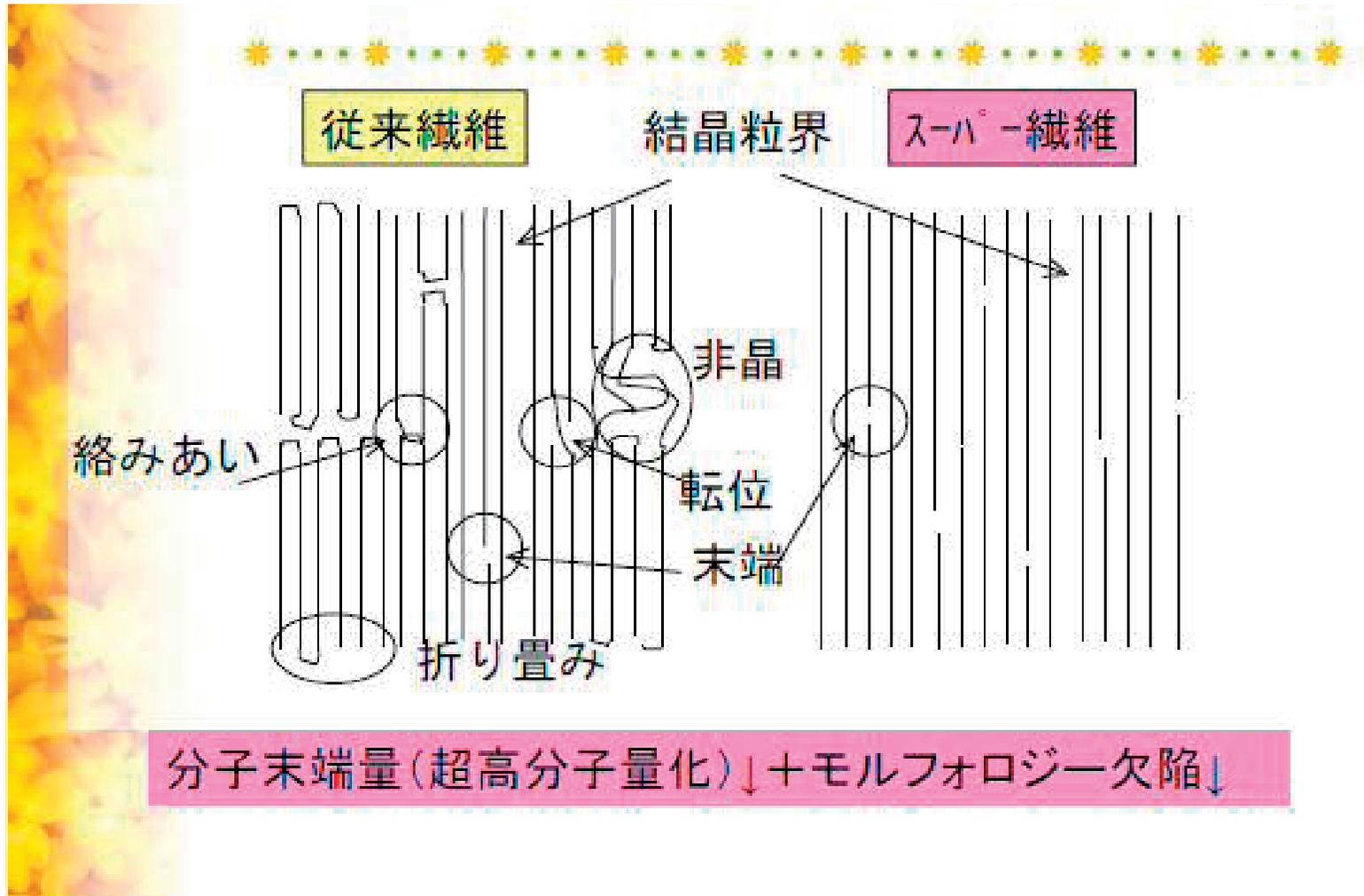


※大田康雄 SEN'I GAKKAISHI(繊維と工業)Vol.55.P-413(1999)

TOYOBO Confidential

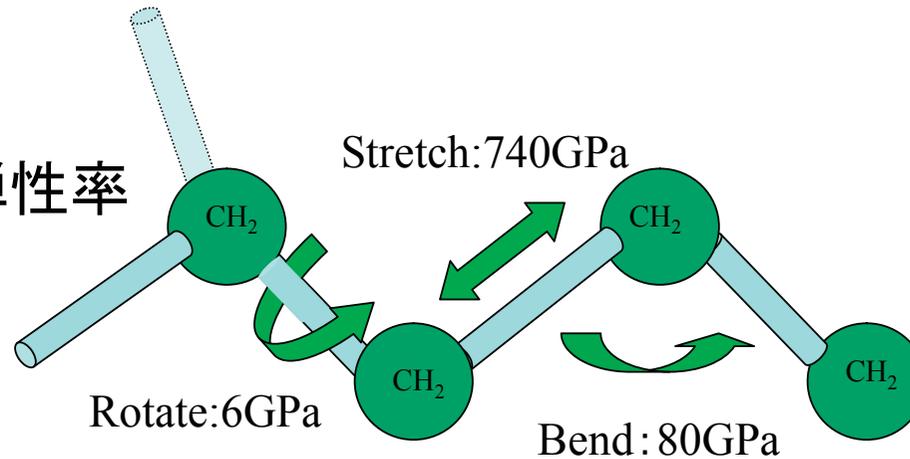
更なる高強度化のアプローチ

繊維中の各種欠陥と高強度繊維の構造



理論強度に関して

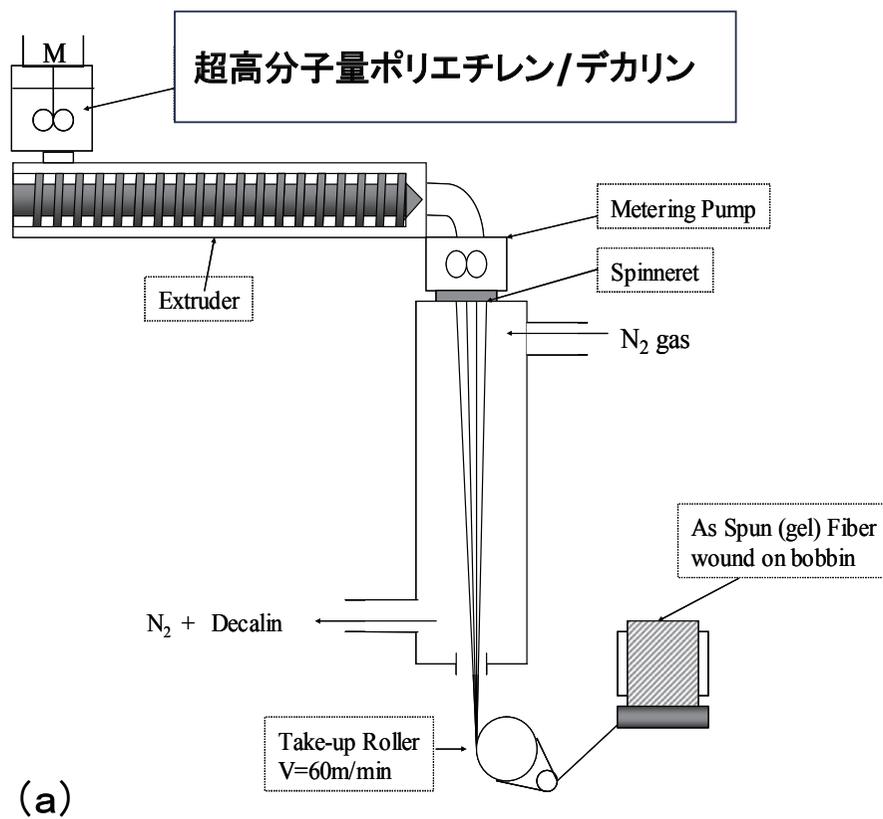
ポリエチレン結晶の弾性率
230-260GPa



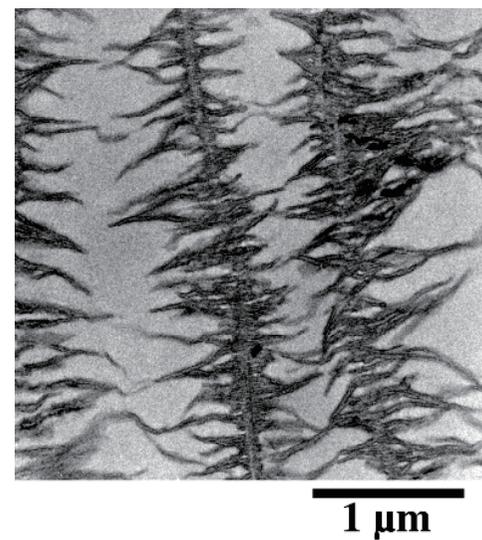
高強度・弾性率化の条件
①分子鎖を構成する結合が強固である
②分子の直線性が良く、嵩高な側鎖が無い
③分子鎖で変角あるいは回転等の自由度が少ない（伸びの少ない構造）

ポリマー	理論強度 (GPa)	結晶弾性率 (GPa)	結晶密度 (g/cm ³)	融点 (°C)
ポリエチレン (PE)	32	240	1.01	141
ポリプロピレン (PP)	18	34	0.94	176
ポリビニルアルコール (PVA)	27	255	1.35	244
ナイロン6 (NY6)	32	142	1.23	220
ポリエチレンテレフタレート (PET)	28	125	1.52	265

シシケバブ構造について

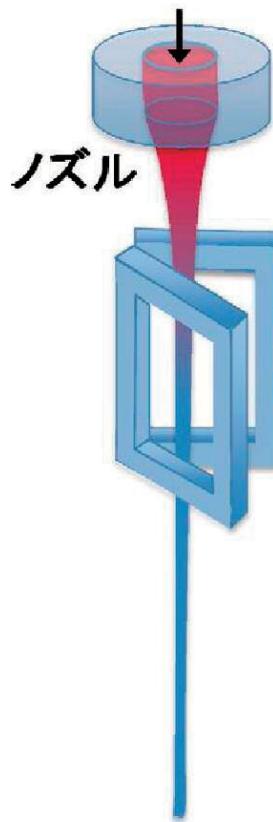


シシケバブ構造

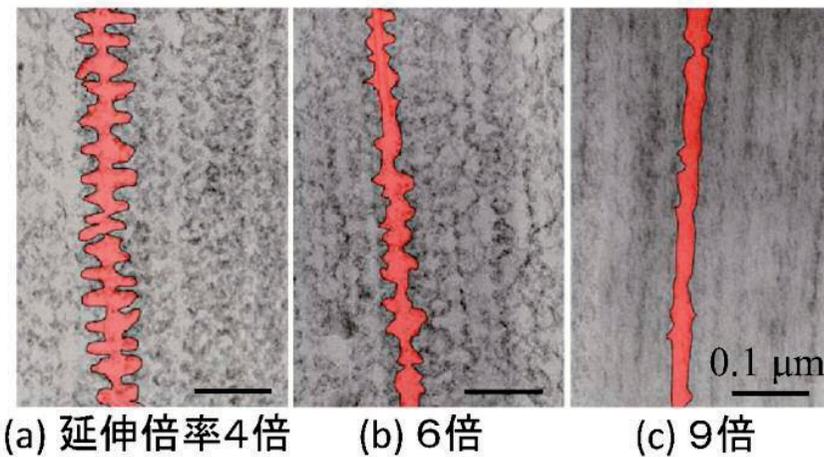
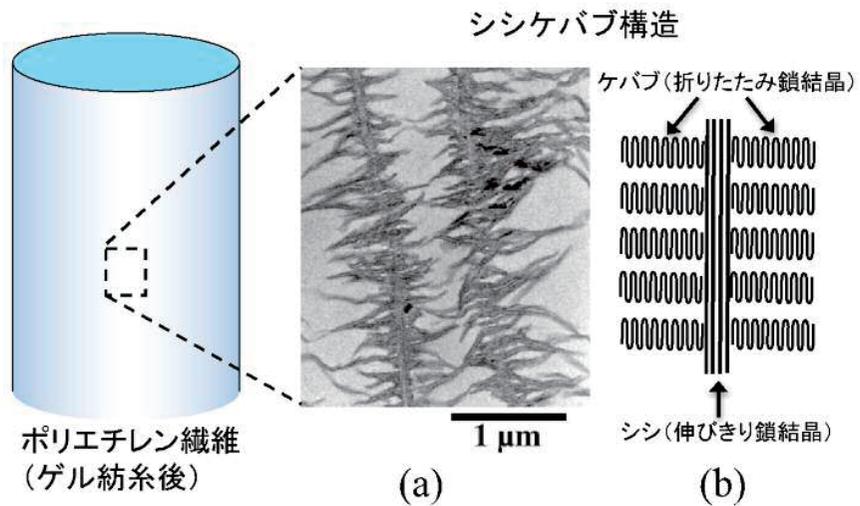


超高分子量ポリエチレン繊維の構造形成

ポリエチレン溶液



はさみ取り
急冷による
構造固定



※村瀬浩貴 日本結晶学会誌 56, 109-114(2014)

TOYOBO Confidential



Ideas & Chemistry

本資料中の数値およびデータに関する記載事項
は、本資料作成時点において入手可能な情報に
基づいて作成したものです。
本資料の無断複製・転載を禁じます。

All Rights Reserved

延伸下におけるポリエチレンの構造物性相関

Structure property relationships in polyethylene

竹中 幹人^{1,2}・三田 一樹³・藤井 澄明⁴・西辻 祥太郎⁵

Mikihito TAKENAKA, Kazuki MITA, Sumiaki FUJII, Shotaro NISHITSUJI

¹Institute for Chemical Research, Kyoto University

²Structural Materials Science Laboratory, SPring-8 Center, RIKEN Harima Institute Research

³Mitsui Chemicals Inc.

⁴Prime Polymer Co., Ltd

⁵Department of Polymer Science and Engineering, Yamagata University

Structure property relationships of polyethylene in very wide spatial scale from 0.1 nm to 1000 nm was investigated by means of ultra-small angle X-ray scattering (USAXS), Small angle X-ray scattering (SAXS) and wide angle X-ray scattering (WAXS) under the uniaxial stretch. In submicron scale, the heterogeneous density fluctuation developed with strain. The development of the fluctuation was anisotropic; the fluctuation along the stretch direction was larger than that along the perpendicular direction to the stretch direction. The former fluctuation developed by two steps; the development before the yield point was larger than that after the yield point. On the other hand, the lamella structure and the crystal lattice were deformed and oriented proportionally to strain, respectively.

1. 緒言

ポリエチレン(PE)は日常的に広く使用されている高分子材料の一つである。PEは結晶化によって階層構造を形成する。Figure 1にPE球晶の階層構造の模式図を示す。PE球晶は高分子鎖が規則正しく折り畳まれた結晶領域、その結晶と非晶領域によるラメラ構造、ラメラ構造が集まって中心からせん状に伸びた分岐構造、そのラメラ相の分岐構造が広がった数 μm の大きさを持つ球晶、という階層構造を有している。力学特性は結晶化によって形成される階層構造に強く依存する。そのため、目的の力学特性を得るためにはこの階層構造を制御することが極めて重要となる。結晶格子構造とラメラ構造と力学物性の相関に関しては、それぞれ広角X線散乱(WAXS)法と小角X線散乱(SAXS)法を

用いて変形下での構造の観察により、多くの研究がなされてきた¹⁻¹⁰。

しかし、ラメラ構造より大きな構造であるサブミクロンスケールの構造と力学物性の相関に関しては、変形下でこのスケールの構造を直接観察する有効な手法がなかったため、研究が十分には進んでいなかった。近年、放射光における強力なX線と長いパス長を用いることによって超小角X線散乱(USAXS)法が実現され、X線散乱法を用いてサブミクロンスケールの構造の観察が可能となった。

本稿では、変形下におけるPEの階層構造をUSAXS, SAXS, WAXS法を用いて0.1 nm~1000 nmに渡る幅広い空間スケールにおいて調べ、階層構造と力学特性の相関を調べた結果について示す。

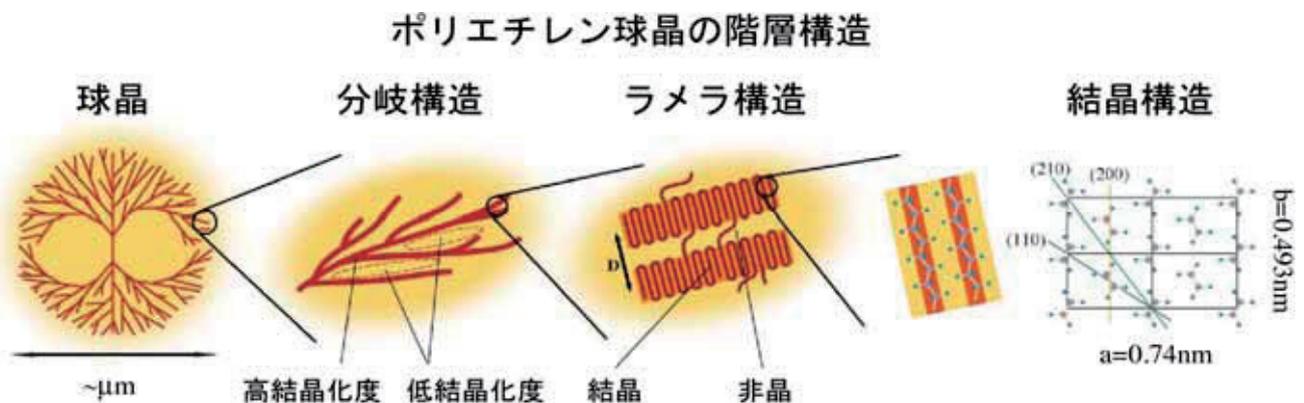


Figure 1 Hierarchical structure of PE.

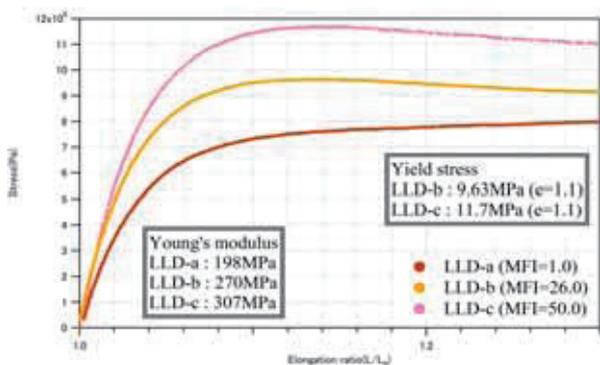


Figure 2 Stress-strain curves of three kinds of LLDPE.

2. 実験

PE試料として、直鎖状低密度ポリエチレン(LLDPE)を用いた。LLDPEはLLD-a(密度0.918g/ml (25°C), Melt Index 1.0g/10min (190°C /2.16kg)), LLD-b(密度0.926g/ml (25°C), Melt Index 50.0g/10min (190°C /2.16kg)), LLD-c(密度0.931g/ml(25°C), Melt Index 26.0g/10min (190°C /2.16kg))の三種類である。Melt Indexの値から、分子量はLLD-a, c, bの順に大きくなる。共重合するモノマーとして、LLD-aはヘキセンを、LLD-b, cはブテンを使用している。サンプルはメルトプレスにより成型し、LLD-aは120°C、LLD-b, cは110°Cで2時間アニールした後氷冷した。

Figure 2に三種類の試料の応力を延伸率に対してプロットしたグラフを示す。伸長比 e は(延伸後の試料長/延伸前の試料長)で定義した。延伸率の比較的低い領域では、試料

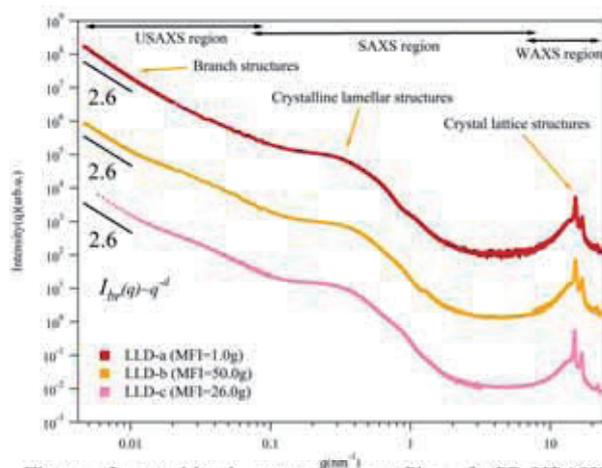


Figure 3 combined scattering profile of SR-USAXS, SR-SAXS, SAXS and WAXS

によって異なる最大応力を示した点や、降伏点がない点で延伸挙動の違いが見られた。

USAXS測定は、SPring-8のBL20XUおよびBL19B2にて実施した。BL20XUおよびBL19B2における観測 q 領域はそれぞれ0.004~0.026 nm^{-1} および0.0065~0.2 nm^{-1} である。ここで、ここで q は散乱ベクトルの大きさであり次式で定義される。

$$q = (4\pi/\lambda)\sin\theta \quad (1)$$

ここで、 λ 、 θ はそれぞれ入射光の試料中の波長および散乱角である。SAXS測定およびWAXS測定は、それぞれBL45XUおよび本学極微細構造解析システム室のNANO-Viewerを用いて行った。SAXS測定の観測 q 領域は

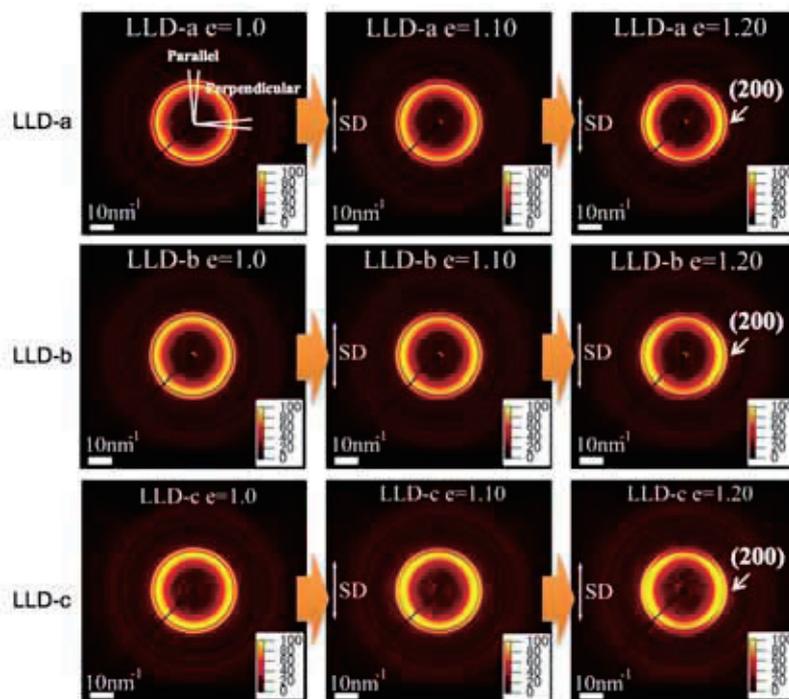


Figure 4 WAXS patterns obtained at $e = 1.00, 1.10, \text{ and } 1.20$. Arrows indicate the stretch direction

0.07~10 nm⁻¹であり、WAXS測定の見測 q 領域は7~24 nm⁻¹である。

3. 結果・考察

3-1. 未延伸状態における散乱

Figure 3に未延伸状態でのUSAXS、SAXS、WAXSの各散乱測定の結果を一つのグラフとして示す。サブミクロンスケールの領域においては、 $q < 0.01 \text{ nm}^{-1}$ の領域で散乱光強度 $I(q)$ は次式で表されるべき乗則に従うことが分かった。

$$I(q) \sim q^{-2.6} \quad (2)$$

これは、マスマフラクタル次元2.6のサブミクロンスケールの密度揺らぎが系内に存在していることを示している。さらに、LLD-b,cにおいては、矢印の位置にラメラ構造より一回り大きなサイズの不均一構造を示唆するショルダー状のピークも観測された。

$q = 0.3 \text{ nm}^{-1}$ 付近にはラメラ構造の長周期に由来したピークが、 $10 \text{ nm}^{-1} < q$ の領域にはポリエチレンが形成する斜方晶型結晶格子の110, 200, 210面に由来する回折ピークが観察された。これらのことから、いずれのサンプルにおいてもPEに特徴的な階層構造が形成されていることが確認できた。

SAXSの測定結果より、結晶-非晶ラメラの長周期 $D(1)$ (LLD-a:20.5nm, LLD-b:15.9nm, LLD-c:16.6nm) を求めることができた。またWAXS測定結果から求めた結晶化度は

LLD-a:41.9%, LLD-b:44.8%, LLD-c:48.7%であった。

3-2. 延伸に伴う散乱の変化

Figure 4にLLDPEの一軸延伸下における、二次元WAXS散乱像の変化の様子を示す。全てのLLDPEにおいて延伸に伴い、200面と110面の回折強度が赤道方向に増大し、結晶格子の c 軸が伸長方向に平行に配向することが見出された。また、延伸によって結晶格子のピークの波数は変化しなかったことから、格子面間隔は、延伸によって変わらないということも明らかになった。

Figure 5には一軸延伸下における、二次元SAXS散乱像の変化の様子を示す。いずれのサンプルにおいても歪み印加前に等方的であった散乱パターンが、歪みが大きくなるにつれ伸長方向を短軸とした楕円形のパターンに変化した。これは印加した延伸に伴ってラメラ構造の長周期の変化が起こったことを示している。Figure 6に伸長方向に平行方向と垂直方向の長周期と変形前の長周期 $D(1)$ の比を e に対してプロットした。Figure 6中の実線と破線はアフィン変形を仮定して計算した値である。低い延伸率ではどのサンプルもアフィン変形に近い均一的な変形をすることがわかる。

以上に示した様に、延伸下での結晶格子構造や結晶ラメラ構造の変化について、サンプル間で大きな違いは見出されなかった。

一方、USAXSで観測されるサブミクロンスケール延伸後の散乱パターンはLLDPEの種類によって大きく異なった。

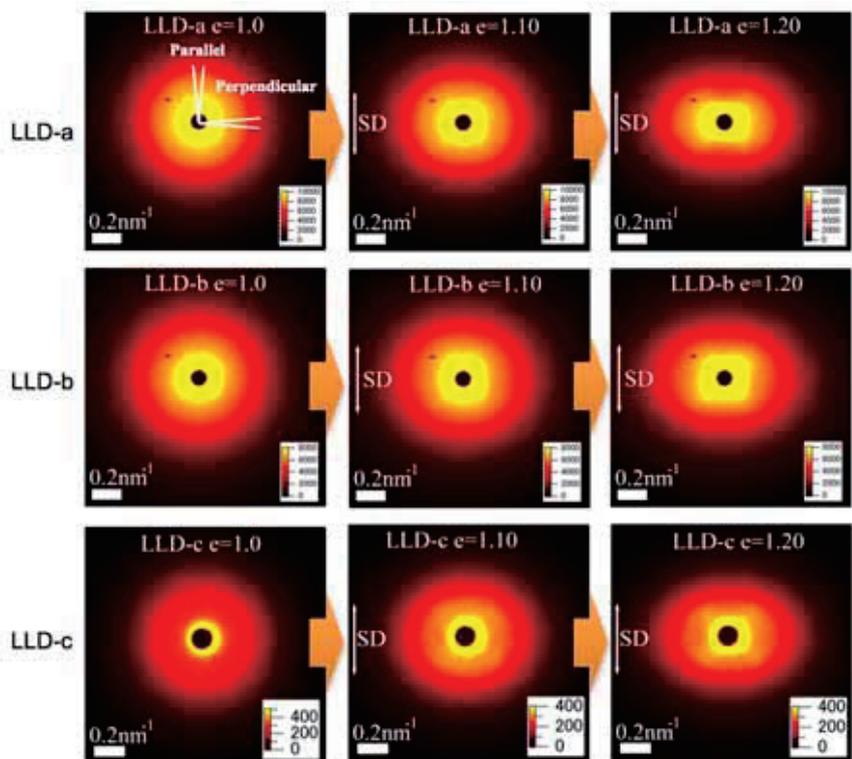


Figure 5 SAXS patterns obtained at $e = 1.00, 1.10,$ and 1.20 . Arrows indicate the stretch direction

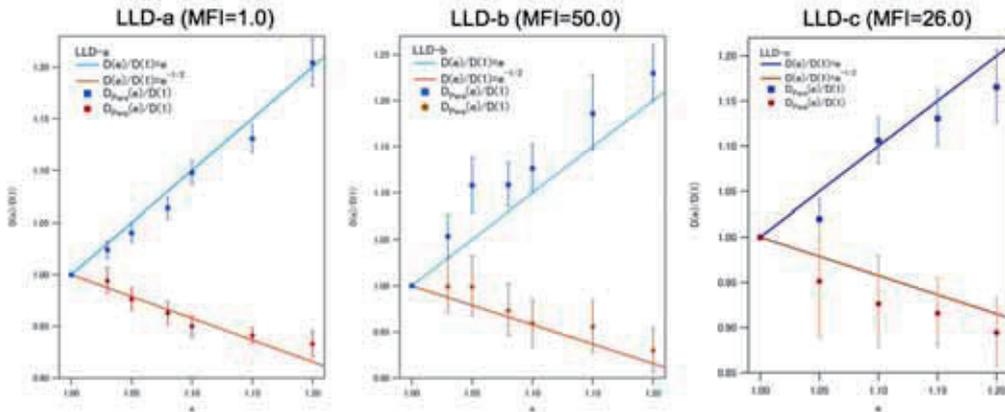


Figure 6 $D(e) / D(1)$ are plotted as a function of e . The solid and dashed line correspond to $D(e) / D(1)$ calculated under the assumption of affine deformation.

Figure 7に示すようにLLD-aの延伸状態での散乱像は延伸方向に対して垂直方向に伸びた楕円形の散乱像となった。これは延伸により球晶内部の樹枝状構造が延伸方向に対して平行方向に、均一に延伸されたことを示している。これに対して延伸後のLLD-b, cの散乱像は延伸方向に対して平行方向に伸びたバタフライパターンを示した。バタフライパターンの現れる例としては、不均一変形したゲルが挙げられる。架橋の強い部分と弱い部分の延伸下での変形挙動が異なるため、延伸方向の不均一性がより大きく増加し、低い q 領域での散乱強度が増加することによってバタフラ

イパターンが現れることが知られている。この場合は延伸により樹枝状構造内の結晶密度の高い相と低い相が不均一な変形を起こすことにより、このような散乱像が現れたと考えられる。さらにLLD-b, cの延伸後の散乱強度は延伸方向に対して平行方向ばかりでなく垂直方向でも増加しており、密度揺らぎの増大も起こっていることを示している。以上の結果よりLLDPEの延伸によるサブミクロンスケールの構造の変化は分子構造によって大きく異なることがわかる。

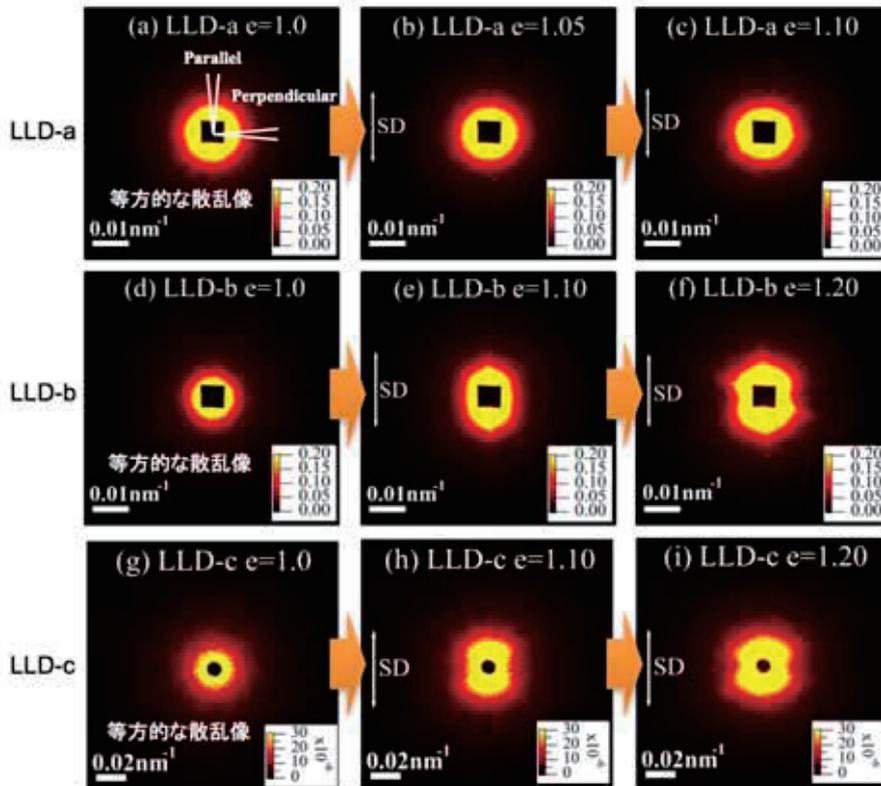


Figure 7 USAXS patterns obtained at $e = 1.00, 1.10,$ and 1.20 . Arrows indicate the stretch direction

4. 結論

延伸に伴うLLDPEの階層構造の変化を明らかにした。サブミクロンスケールでは、延伸によりLLD-aではアフィン変形が起こったのに対し、LLD-b, cでは不均一変形が起こった。これは球晶内部のラメラ相の密度の低い部分の弾性率が、分子量や分岐構造などの違いによって異なるためと考えられる。LLD-b, cにおいては、樹枝状構造中のHC領域とLC領域の力学的な性質に大きな相違があることによって、HC領域のみが大きく変形したと考えられる。それに対してLLD-aにおいては、LC領域の弾性率が高く、HC領域とLC領域の弾性率の差がLLD-bより小さいため不均一な変形を起こさなかったと考えられる。しかし、結晶ラメラの長周期はいずれのLLDPEにおいてもアフィン変形に従い変形し、結晶単位胞のサイズは変化せず結晶ラメラの配向のみが起こった。この3種類のポリエチレンの、延伸下での力学的挙動に変化を与えているのは、サブミクロンスケールの階層構造の変化の違いであり、その原因はポリエチレンの分子構造の違いによるものではないかと考えられる。

謝辞

本研究は、高輝度光科学研究センターで採択された研究課題(2008B1538, 2014A7217, 2014A0072)としてSPring-8のBL19B2, BL03XU, BL45XUを利用して得られた成果である。またこの研究の一部は光量子融合プログラムの支援によって行われた。

参考文献

- 1) T. Oda, S. Nomura, and H. Kawai. *J. Polym. Sci. A. Gen. Pap.* **3**, 1993 (1965).
- 2) T. Oda, N. Sakaguchi, and H. Kawai. *J. Polym. Sci. C. Polym. Symp.* **15**, 223 (1967).
- 3) S. Nomura, A. Asanuma, S. Suehiro, and H. Kawai. *J. Polym. Sci. A2. Polym. Phys.* **9**, 1991 (1971).
- 4) V. I. Gerasimov, Y. V. Genin, and D. Y. Tsvankin. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Edit.* **12**, 2035 (1974).
- 5) P. B. Bowden, and R. J. Young. *J. Mater. Sci.* **9**, 2034 (1974).
- 6) K. Fujita, S. Suehiro, S. Nomura, and H. Kawai. *Polym J* **14**, 545 (1982).
- 7) M. F. Butler, A. M. Donald, W. Bras, G. R. Mant, G. E. Derbyshire, and A. J. Ryan. *Macromolecules* **28**, 6383 (1995).
- 8) M. F. Butler, A. M. Donald, and A. J. Ryan. *Polymer* **38**, 5521 (1997).
- 9) M. F. Butler, A. M. Donald, and A. J. Ryan. *Polymer* **39**, 39 (1998).

- 10) R. Hiss, S. Hobeika, C. Lynn, and G. Strobl. *Macromolecules* **32**, 4390 (1999).

重合誘起相分離によるモノリス型粒子の合成とその機能

Preparation of Monolith Particles via Polymerization-Induced Phase Separation and their Functions

辻井敬亘・榊原圭太

Yoshinobu TSUJII, Keita SAKAKIBARA
Institute for Chemical Research, Kyoto University

Epoxy resin-based monoliths with bicontinuous structure consisting of a porous channel and a resin skeleton, have a broad range of applications such as chromatography; especially, the preparation of spherical particles of them has been limited so far in spite of expected high performance. We have developed a versatile and facile preparation method for surface-skinless monolith particles with micrometer diameters by polymerization-induced phase separation in an oil-in-oil emulsion system. The key to success was the addition of a well-defined block-copolymer surfactant, compatible for both the dispersed and continuous phases in suspension polymerization. In essence, the volume fraction and length of the block copolymers were crucial to control the stability of emulsion and the suppression of the unwanted skin layer on the surface of the produced particles. The monolith particles have been demonstrated to exhibit interesting chromatographic performance derived from the peculiar flow-through structure.

1. はじめに

“モノリス”とはひとつつながりの岩石、一枚岩という意味であるが、化学、とくにクロマトグラフィーの分野では、骨格と空隙がそれぞれ1つにつながっている3次元ネットワークの共連続構造を有する多孔質体をあらわす名称として定着している(図1)。これまで、様々な材質のモノリス、例えば、シリカなどの無機物や(メタ)アクリル樹脂、エポキシ樹脂などのポリマーからなるモノリスが報告されている。それらの合成には多成分溶液中での重合反応や温度変化によって誘起される相分離が利用される。ポリマーモノリスは、空隙率が高く(約60%)、細孔径(0.1~10 μm)が均一な共連続構造をもつため、流体透過性や力学強度に優れる。この特性は、高速液体クロマトグラフィー用カラムに最適である¹⁻³⁾。本稿では、主に重合誘起相分離を経由して得られるエポキシ樹脂型ポリマーモノリスに注目し、表面スキン層を有しないエポキシモノリスの合成と粒子化、およびそのクロマトグラフィー応用に関する

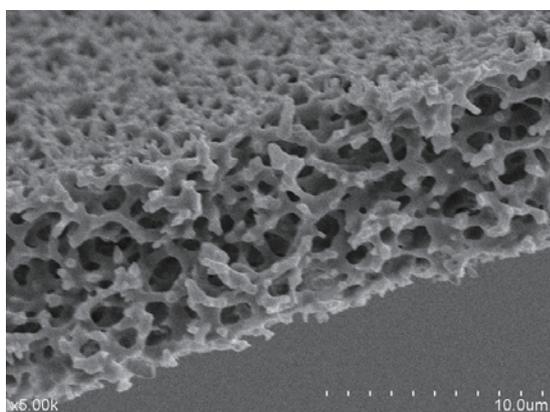


Fig. 1 SEM image of a representative monolith in the form of sheet with a thickness of around 10 μm .

る取り組みについて紹介する。なお、本稿では、スピノーダル分解型の相分離により得られる、共連続構造を有する多孔体のことをモノリス(あるいはモノリス構造)と呼ぶこととする。

2. エポキシモノリスの合成と形態制御

2-1. エポキシモノリスの合成とサイズ制御

エポキシモノリスは、エポキシモノマー、硬化剤、ポロゲン(細孔形成剤)からなる重合溶液から合成される^{4,5)}。ポロゲンには低分子量ポリエチレングリコール(PEG)がよく用いられる。重合が進行すると、生成するエポキシ樹脂とポロゲンとの間の相互溶解性が低下し相分離が起こる。この時、バイノーダル分解型(不安定状態からの核生成・成長型)の相分離が一般的であるが、好適条件下ではスピノーダル分解型の相分離となる。前者は海-島構造となるが、後者は相分離した二相が過渡的に共連続した構造を形成する(図2)。相分離が進むと共連続構造は粗大化し、やがては崩壊にいたるが、エポキシ樹脂の場合は硬化も同時に進行するため、共連続構造が固定される

重合誘起相分離によるポリマーモノリスの作製において、重合速度あるいは相分離速度をコントロールすること

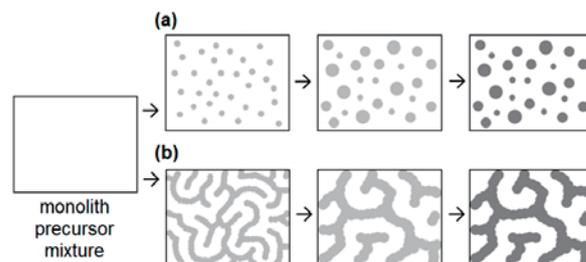


Fig. 2 Schematics of (a) nucleation and growth-type and (b) spinodal decomposition-type phase separation.

で、細孔・骨格サイズの精密な制御が可能である。例えば、重合温度を増加させると、相分離が大きく成長する前に重合・架橋が終了し、細孔サイズは小さくなる(図3)。また、ポロゲンの分子量によっても、細孔サイズを制御しうる。さらに、エポキシド含有セグメント (poly (glycidyl methacrylate) : polyGMA) とポロゲン親和性セグメント (poly(2-hydroxyethyl methacrylate):polyHEMA) から成るブロック共重合体 (polyGMA-*b*-polyHEMA) をエポキシモノマー溶液に添加したところ、界面活性効果により従来では困難であった微細孔化 (<50 nm) も実現された⁶⁾。

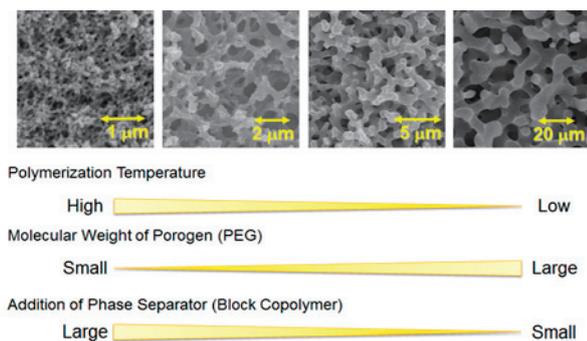


Fig. 3 Control of pore size.

2-2. 表面スキン層の形成抑制とモノリスの形態制御

モノマー溶液を適当な型に流し込み熱硬化させることで望みの成型体を合成できるが、通常、成型体の表面には無多孔なスキン層が形成してしまう。スキン層は液体や溶質の流れや拡散を妨害するため、多くの場合、不所望である。我々は、界面科学的な手法に基づき、表面スキン層を有しない形態制御型モノリス材料(バルク、ロッド、粒子、シート、薄膜コートなど)の創製に取り組んだ。例えばシート成型の場合、犠牲膜として機能するポリビニルアルコール(PVA)をコートした基材を利用することで、表面スキン層レスを達成した⁶⁾。もしポロゲンと基材のぬれ性が悪いと、重合誘起相分離の過程でポロゲンがモノリス内部に留まってしまい、スキン層が形成すると考えられる。実際、PVAコート基板およびエポキシ樹脂の接触角を測定したところ、対水接触角はそれぞれ75°と99°であったが、対ポロゲン接触角はそれぞれ38°と77°であった。すなわち、PVAコート基材はポロゲンに対してよくぬれるために、基板とモノリス骨格の間にポロゲンが浸潤し、スキン層が形成されないと考察した。また、薄膜コートにおいてシリカ粒子を添加することでも、表面スキン層形成の制御を達成している。

3. モノリス粒子の合成と機能

3-1. 背景

先述の通り、ポリマーモノリスは流体透過性や力学強度

に優れ、低圧損かつ高分解能な液体クロマトグラフィー用カラムとして利用される。一方、大口径カラム内でモノリスを合成する場合、熱の分布が悪いために内部構造が不均一となり、結果的にはクロマトグラフィー性能が低下する。また、クラッド層形成の制御も困難である。モノリスの粒子であれば、攪拌による懸濁重合で得られるために、温度管理しやすく、均一な内部構造を作製できる。また、従来法でカラム充填が可能となるため、モノリスロッド型カラムの弱点を克服できる。そのような背景の下、NguyenとIrgumは、重合液からなる水中油滴型(O/W)エマルジョンを調製し、懸濁重合によりエポキシ系モノリス粒子を合成した⁷⁾。しかしながら、粒子表面には無多孔なスキン層が形成され、大きな課題であった。我々は、エポキシモノリスの粒子化を目標に、重合液と非相溶かつ反応しない長鎖アルカン(ドデカン)を連続相とした油中油滴型(O/O)エマルジョンを調製し、熱硬化による粒子化を企図した(図4)。

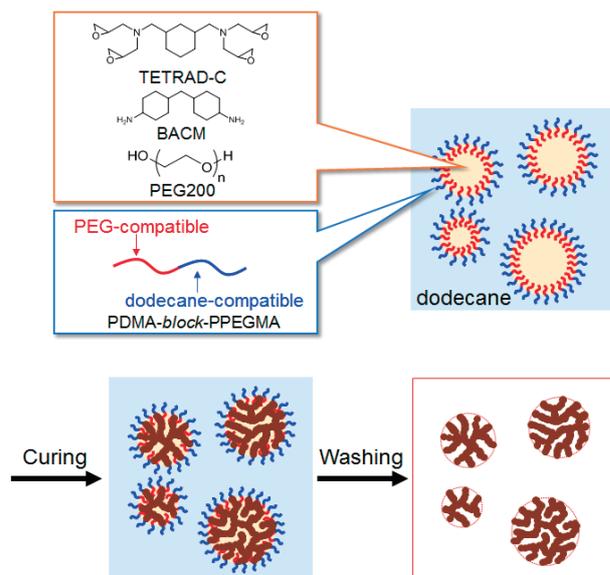


Fig. 4 Schematic illustration of the preparation of monolith particles.

3-2. 粒子の合成

O/Oエマルジョンの調製にあたり、ドデカンに可溶な汎用の界面活性剤を安定化剤として用いたが、そのエマルジョンはいずれも不安定であった。そこで、安定化剤として機能しうるブロック共重合体を新たに設計・合成することにした。連続相と分散相に親和性のあるブロックをそれぞれ poly(*n*-dodecyl methacrylate) (polyDMA) および poly[poly(ethylene glycol)methyl ether methacrylate] (polyPEGMA) と定め、リビングラジカル重合によりジブロック共重合体 polyDMA-*b*-polyPEGMA を合成、連続相で

あるドデカンに溶解させた。その結果、機械的攪拌により安定なO/Oエマルジョンを形成し、これを熱硬化させることでモノリス粒子を合成した⁸⁾。ブロック比 (x:y) が30:10, 30:15, 40:20のpolyDMA-*b*-polyPEGMA活性剤を用いた時に得られた粒子の構造を図5に示す。30:10の場合、表面にスキン層が形成、40:20の場合、重合プロセスにおいてエマルジョンが崩壊、不定形状のモノリスとなったが、30:15において、表面スキン層のない球状粒子を得ることに成功した。

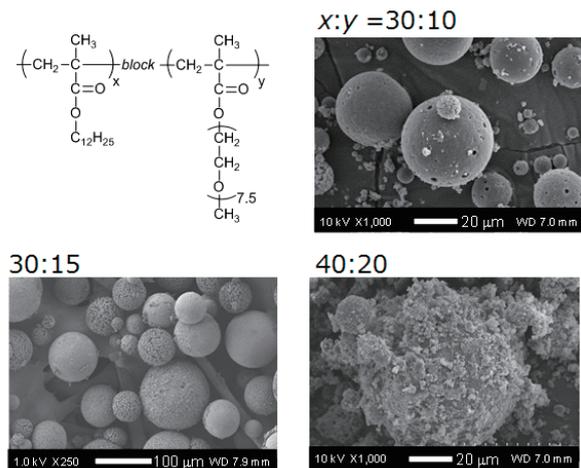


Fig. 5 SEM images of the epoxy resin-based monolith particles prepared using polyDMA-*b*-polyPEGMA.

Kumachevaらによれば、ポリマー多孔体粒子におけるスキン層形成の有無は油水界面の界面張力 (γ_{12}) に依存する⁹⁾。すなわち、 γ_{12} が大きければ重合の進行と共にポロゲンは粒子内部に押し込まれてスキン層が形成されるが、ポロゲンの極性を変えたり界面活性剤を添加したりすれば γ_{12} が小さくなりスキン層は形成しない。そこで、重合液-ドデカンの γ_{12} を調べたところ、polyDMA-*b*-polyPEGMAを添加しない場合は $\gamma_{12} = 6.6 \text{ mN m}^{-1}$ だったが、添加により 3.5 mN m^{-1} まで低下することがわかった。ゆえに、polyDMA-*b*-polyPEGMAは液滴の安定化とスキン層制御の二つの役割を担うことが明らかとなった。

図6に粒子断面のSEM写真を示す。構造明確な多孔構造を確認した。懸濁重合の条件 (温度、回転速度など) によ

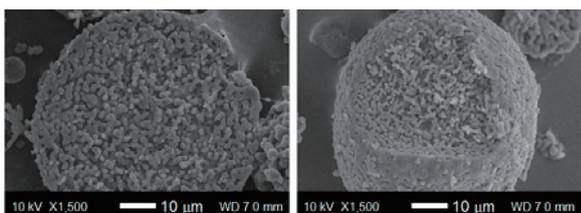


Fig. 6 Cross-sectional SEM images of individual monolith particles.

り、粒径と細孔径を制御することも可能であった。

本合成は、エポキシ系だけでなく、アクリル系やスチレン系、無機材料であるシリカ系にも適用が可能である。いずれも、界面活性剤としてリビングラジカル重合で分子量を精密に制御されたブロックコポリマーの利用が成功の鍵となった。モノリスカラムの特徴である高い比表面積と大きな孔径は、高分解能と低圧損といった利点を有するが、本研究により粒子化が可能となったことで、分離の短時間化やスケールアップが実現されるものと期待できる。

3-3. モノリス粒子のクロマトグラフィー特性

従来多孔粒子からなるクロマトカラムにおいて、粒子内物質移動は主に拡散であるが、モノリス粒子のような多孔粒子の場合、ある条件が揃うと粒子内流れが生じる (図7)。具体的には、(i) 細孔サイズが非常に大きい、(ii) 溶質の拡散係数が非常に小さい (すなわち高分子)、(iii) 粒径が小さい、(iv) 流速が大きい¹⁰⁾。このような効果は、intra-particle convection や perfusion と呼ばれる。Afeyan らは、貫通孔粒子における粒子内流れを試算し、高線速度 (例えば 1000 cm/h) では数%の粒子内流れが生じることを示した¹¹⁾。たとえ数%であっても、高分子が溶質の場合、拡散移動より大きな利得を得られる。

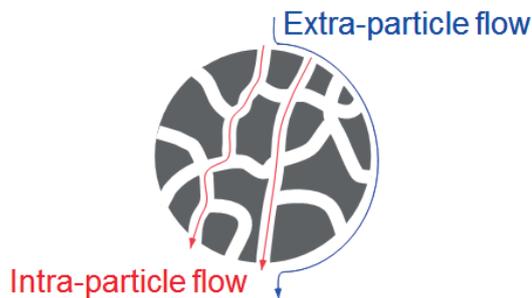


Fig. 7 Possible extra-particle and intra-particle flow for a monolith particle in a chromatography column.

細孔内流れの特徴を理解するために、表1に示すシリカモノリス粒子の充填カラムを作製し、そのクロマトグラフィー特性を調べた。モノリス粒子の粒径 (D_p) は $10.4 \mu\text{m}$ 、マクロポア ($D_{\text{macropore}}$) は 395 nm 、メソポア (D_{mesopore}) は 11 nm だった。なお、シリカ系の場合、ポリマー系とは異なり骨格にメソポアが存在する。一方、比較対象となる従来型多孔粒子として、粒径およびメソポアがモノリス粒子のそれに近いシリカ粒子を用いた。

それぞれの充填カラム ($4.6 \text{ mm i.d.} \times 150 \text{ mm}$) を使い、分子量1千万~数百の標準ポリスチレン (PS) を溶質としたinverse Size Exclusion Chromatography (iSEC) の結果を図8に示す。従来の多孔粒子と異なり、モノリス粒子は分子

量の大きな高分子(数万~数百万)を分離した。すなわち、高分子量PSはモノリスのマクロポアに到達できることを示唆している。排除限界分子量は約1000万であり、そのランダムコイルの流体力学的直径は120 nmと見積もられることから、モノリス粒子のマクロポアの約1/3程度に到達できたと計算された。

次に、線速度と負荷圧の関係を図9に示す。流速の増大に伴い、モノリス粒子カラムのほうが従来型粒子カラムよりも負荷圧が小さかった。一般に、負荷圧は粒径や空隙率で決まるが、それらのパラメータはモノリス粒子と従来多孔粒子でほぼ同じであることから、この結果はモノリスの細孔内への液流れを示唆している。

最後に、粒径で規格化した換算理論段高 (reduced HETP = HETP / D_p) と粒径および溶質の拡散係数で規格化した換算流速 (reduced velocity = velocity $\times D_p / D_0$) の関係を図10に示す。通常、高流速においては理論段高は速度に比例する(すなわち分離が悪くなる)。これは、物質移動効果として理解され、従来型多孔粒子に顕著である。一方、モノリス粒子は高流速になるにつれて非線形な挙動を示した。これは、流体モデル解析により提案されている convection flow と理解できる¹²⁾。

今後、異なる細孔サイズや粒径のモノリス粒子の特性を比較検証することで、多孔体粒子内の物質拡散や流れの学術的解明に貢献したい。

4. 最後に

エマルジョン内での重合誘起相分離によりモノリス構造を持つ貫通孔粒子の合成に成功した。合成に際し、ブロック共重合体界面活性剤は重合時のエマルジョンの安定化だけでなく、界面自由エネルギーの低下による表面スキン層形成の抑制に寄与した。本アプローチはシリカ系・アクリル系・スチレン系モノリス粒子の合成に適用可能であった。本材料は、大きな分子の分離や捕集に有用であることから、酵素や抗体医薬品、ウイルス様粒子などの巨大分子の分離精製への応用(高速・大量精製)に期待がもたれる。

謝辞

本研究の一部は、エマオス京都・石塚紀生博士と共同で推進したものであり、ここに深く感謝の意を表す。シリカモノリス充填カラムは株式会社ワイエムシーより提供いただいた。

Table 1 Characterization of silica monolith particles and reference beads.

	D_p (mm)	$D_{\text{macropore}}$ (nm)	D_{mesopore} (nm)
Monolith	10.4	395	11.3
Ref.	9.4	-	11.7

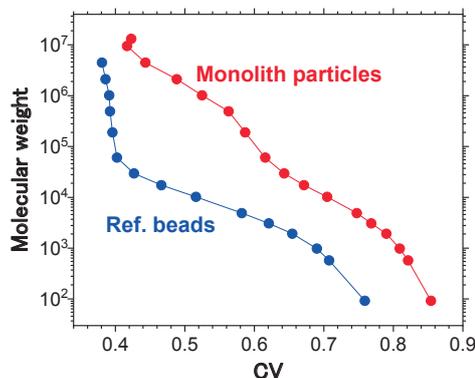


Fig. 8 iSEC curves derived from elution of polystyrene standards in tetrahydrofuran using monolith (red circles) and reference-particle (blue circles) columns. The mobile phase velocity for iSEC was 360 cm/h.

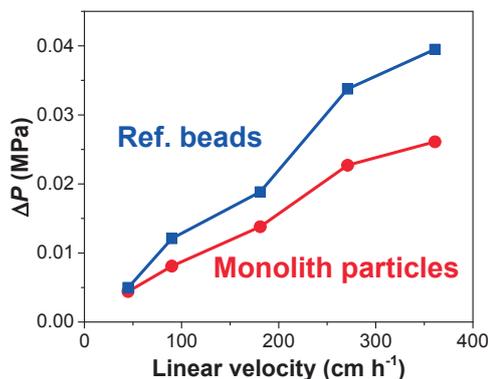


Fig. 9 Pressure flow curves for silica monolith-particle (red circles) and reference-particle (blue squares) columns.

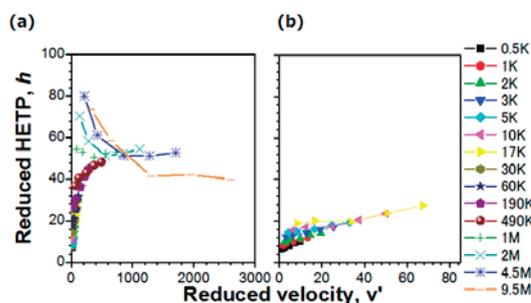


Fig. 10 Reduced HETP (height equivalent to a theoretical plate) vs reduced velocity for (a) monolith-particle and (b) reference-particle columns.

参考文献

- 1) H. Aoki, N. Tanaka, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.* **32**, 341 (2009).
- 2) D. Wu, D.; Xu, F.; Sun, B.; Fu, R.; He, H.; Matyjaszewski, K. *Chem. Rev.*, **112**, 3959 (2010).
- 3) F. J. Svec, *Chromatography A*, **1217**, 902 (2010).
- 4) N. Tsujioka, N. Hira, S. Aoki, N. Tanaka, K. Hosoya, *Macromolecules*, **38**, 9901 (2005).
- 5) N. Tsujioka, N. Ishizuka, N. Tanaka, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **46**, 3272 (2008).
- 6) K. Sakakibara, H. Kagata, N. Ishizuka, T. Sato, Y. Tsujii, *J. Mater. Chem. A*, **5**, 6866 (2017).
- 7) A. M. Nguyen, K. Irgum, *Chem. Mater.*, **18**, 6308 (2006).
- 8) K. Sakakibara, K. Konishi, N. Ishizuka, A. Goto, Y. Tsujii, *Polym. Chem.*, **9**, 414 (2018).
- 9) S. Dubinsky, J. I. Park, I. Gourevich, C. Chan, M. Deetz, E. Kumacheva, *Macromolecules*, **42**, 1990 (2009).
- 10) “Protein Chromatography”, G. Carta and A. Jungbauer, Wiley-VCH, Weinheim (2010).
- 11) N. B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Varady, S. P. Fulton, Y. B. Yang, F. E. Regnier, *J. Chromatography*, **519**, 1 (1990).
- 12) Y. Wu, J. Simons, S. Hooson, D. Abraham, G. Carta, *J. Chromatography A*, **1297**, 96 (2013).

ラジカル重合を用いた多分岐ポリアクリレートの構造制御重合

山子 茂・路 楊天

Shigeru YAMAGO, Yangtian LU

Institute for Chemical Research (ICR), Kyoto University

Highly branched polymers (HBPs) have attracted significant attention because of their characteristic topological structure associated with their unique physical properties compared with those of the corresponding linear polymers. While the structural control of HBPs, i.e., molecular weight, dispersity, number of branching points, branching density, and chain-end functionalities, would significantly improve and modify the polymer properties, there is no practical method available to synthesize structurally controlled HBPs. Here we report a novel concept to realize one-step synthesis of dendritic HBPs by the copolymerization of a newly designed vinyl telluride monomer and acrylates using organotellurium mediated radical polymerization method. The molecular weight, number of branching points, and branching density are easily controlled by changing the relative amount of organotellurium chain transfer agent, the vinyl telluride, and acrylates with keeping narrow dispersity. The method opens new possibilities for materials design based on HBPs.

1. 序

多分岐高分子 (HBP) は線状高分子に比べて流体力学半径が小さい、粘度が低い、末端置換基の数が多い等の特徴を持つことから、粘度調節剤、潤滑剤、触媒、薬品輸送システムなど、多くの分野で興味を持たれている。¹⁾ HBPの最も典型的な合成法は、 AB_n モノマー**1**を縮重合である (Figure 1a)。²⁾ A、Bは互いに反応する官能基、 n はB官能基の数を表す。AとBとが反応を繰り返すことでHBPが生成する。その延長として、Aとしてビニル基、Bとして重合開始基を持つモノマー**2**を用いる、自己縮合ビニル (共)重合反応も開発されている (Figure 1b)。³⁾ リビングカチオン、リビングラジカル (可逆的不活性化ラジカル) 重合条件を用いることで、HBPが得られる。いずれも、図に示した望みの成長反応のみが進行すれば、「世代」を増やしながら分子量、分散度、分岐数、分岐間隔といった三次元 (3D) 構造の制御が可能となる。しかしいずれの方法も逐次重合の寄与のため構造制御は困難であり、これまで汎用性の高い方法はなかった。⁴⁾

3D構造の制御されたHBPとして、樹木の枝のように規則的な分岐構造を持つ高分子である dendrimer、dendron が知られている。発散的合成法と収束的合成法が知られているが、いずれも多段階合成に依っている。⁵⁾ 例えば、発散的合成法は AB_2 モノマーのB官能基の保護と脱保護を利用することに相当する。単分散の生成物が得られるが、大量合成には不適であることから、その利用は極めて限定的である。

単段階合成の簡便さを維持したまま、3D構造の制御は行えないのであろうか？我々は、この問題を解く鍵はAとB官能基の反応性の制御にあると考えた。すなわち従来法では、AとBの反応性は独立しているため、それぞれ「勝手に」反応していた。そこで、AとBの反応性を関連づけることを考えた。例えばAが反応して初めてBが反応するモノマー設計である。

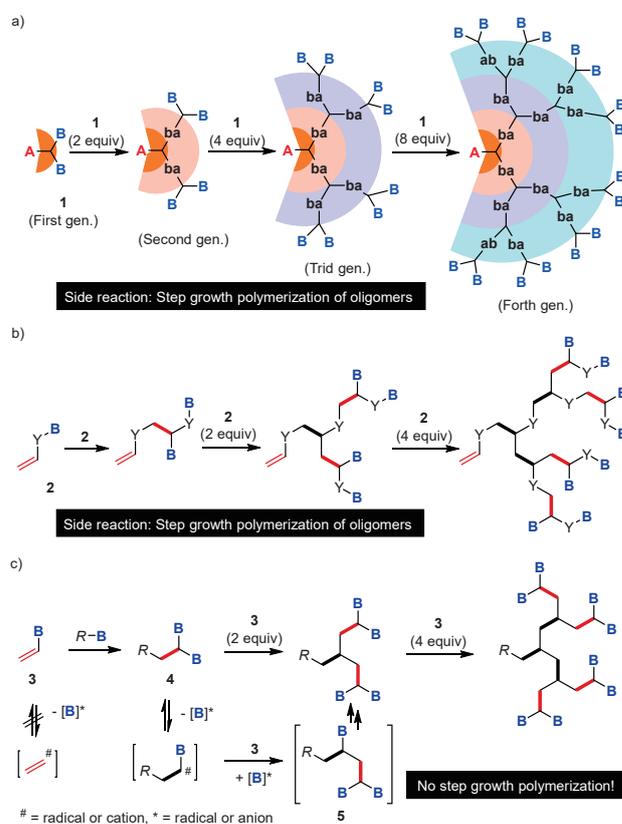


Figure 1. Synthetic strategy of highly branched polymers (HBPs). a) condensation polymerization of AB_n -monomer method, b) self-condensing vinyl polymerization of AB-monomer where A is a vinyl group, and c) a new AB monomer having hierarchy of reactivity for controlled HBP synthesis.

これを実現するためにはB官能基がビニル基に直接導入されたモノマー**3**が適していると予想した (Figure 1c)。すなわち、ビニルカチオン、ビニルラジカルは極めて不安定な活性種であることから、**3**のC-B結合開裂による活性種生

成は極めて困難である。一方、**3**がドーマント種R-Bと反応して**4**が生成すると、そこからのアルキルカチオン、アルキルラジカルの生成は、通常のカチオン、ラジカル重合と同様に容易であると期待される。**4**の二つのC-B結合が順次活性化されれば分岐構造が生じる。我々はこれまで有機テルル化合物を用いるリビング（可逆的不活性化）ラジカル重合TERPを開発していたことから、B置換基として有機テルル基を持つビニル化合物を用いたラジカル重合について検討を行った。⁶⁾

2. 結果と考察

2-1. モノマーの設計

ビニルテルリド**6**を分岐モノマーの候補として選び、まず**6**と中間体**4**と**5**のモデル化合物である**7**、**8**のC-Te結合解離エネルギー（BED）をDFT計算により見積もった（Figure 2）。その結果、**6**のBDEは**7**、**8**よりも約50 kJ mol⁻¹高く、反応性が十分違うことが示唆された。さらに、**7**と**8**のBDEがほぼ同じであることから、**4**が生成すると二つのC-Te結合の活性化にほとんど差がないことが示唆された。

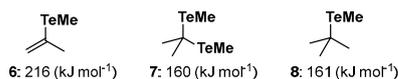


Figure 2. C-Te bond dissociation energy of vinyl telluride **6** and polymer-end model compounds **7** and **8** obtained by the DFT calculation at B3LYP/6-31G(d,p)(C,H), LANL2DZ(Te).

2-2. HBPの合成

既知法を参考にして**6**を合成し、アクリル酸メチル（MA）との共重合を、有機テルル連鎖剤**9**とAIBNを加えた加熱条件下で検討した（Figure 3a）。重合は中間体**10**、**11**を経て**12a**（X = TeMe）を生成すると考えられる。理想的に重合が進んだ場合、**9**と**6**の量比により生成する**12**の世代（*N*）が決まる（ $[\mathbf{6}]_0/[\mathbf{9}]_0 = 2^N - 1$ ）。さらに、第*N*世代の**12**は $[2^{(N+1)} - 1]$ 本の分岐鎖を持つことから、分岐密度、すなわち分岐点間の数平均モノマー単位 (\overline{X}_{br}) は以下の式で予想できる。

$$\overline{X}_{br} = \frac{[\mathbf{MA}]_0}{[\mathbf{9}]_0[2^{N+1} - 1]} \times Conv \quad (\text{eq. 1})$$

そこでまず、 $[\mathbf{MA}]_0/[\mathbf{9}]_0 = 500$ に固定し*N* = 0, 2-6の**12**の合成について検討した（Table 1, runs 1-6）。第2、4、6世代の**12**の簡略した理想的な構造をFigure 3bに示した。なお、*N* = 0はリニアポリマーである。

第6世代の**12**の合成について詳しく述べる（run 6）。モノマー消費を追跡したところ、**6**の消費がMAのそれよりも少し早いものの、ほぼ同じ割合で消費されていたことから、統計的に共重合が進行していることが分かった（Figure 3c）。なお、重合の進行が遅かったことから、80時間後にAIBN（0.2 equiv）を再び加えることで、120時間後には**6**が定量的に消費された。SECで**12**の数平均分子量（ $M_n[\text{SEC}]$ ）

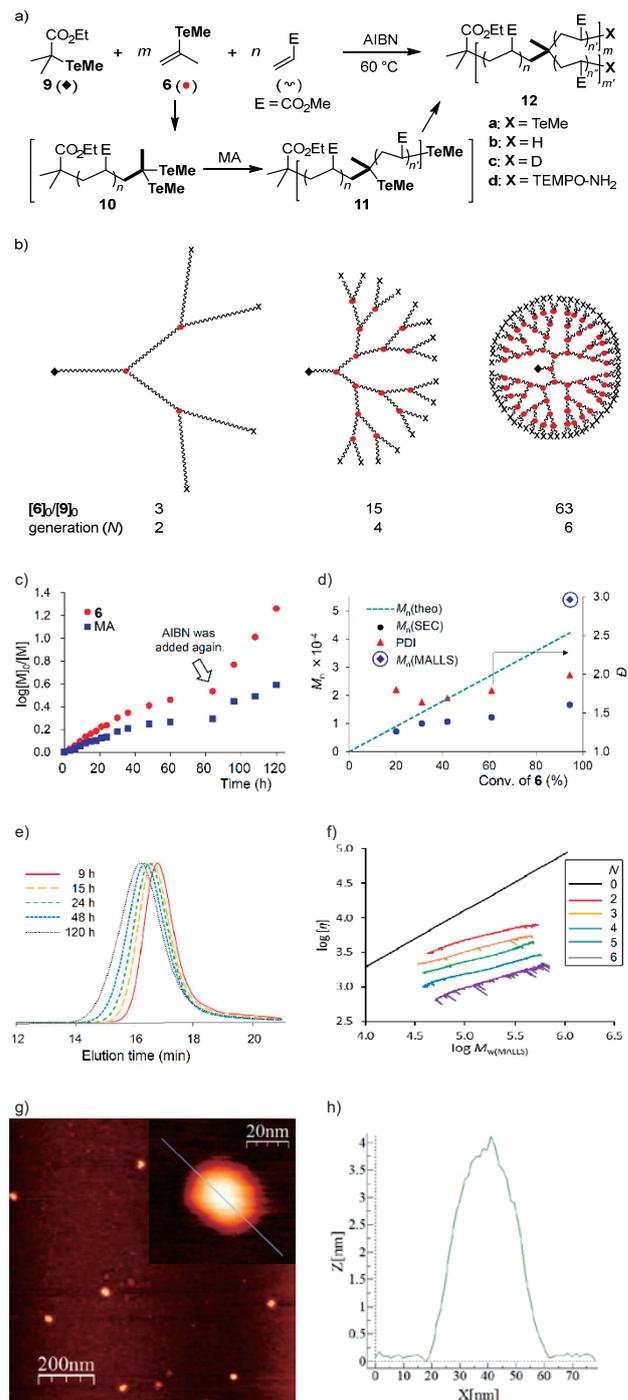


Figure 3. Synthesis and characterization of dendritic HBPs. a) Synthesis of **12** by the copolymerization of **6** and MA in the presence of **9**. b) Schematic structures of ideal polymer structure corresponding to the 2, 4, and 6th dendritic generation. c) Time evolution of the consumption of **6** and MA, d) correlation among the monomer conversion, M_n , and dispersity, and e) time evolution of the SEC traces for the synthesis of the 6th generation (Table 1, run 6). f) Mark-Houwink-Sakurada plot for linear PMA (*N* = 0) and HB-PMA with *N* = 2, 3, 4, 5, and 6. g) Height image and h) cross-sectional profile obtained by AFM for the 7th generation **12b** (Table 1, run 10) prepared by spin-casting onto a mica surface.

Table 1. Synthesis of HBP **12** by copolymerization of **6** and MA in the presence of **9**

Run	[9]/[6]/[MA] (Generation <i>N</i>)	Time (h)	Conv. (%)		$M_{n[\text{theo}]}$ (g/mol)	$M_{n[\text{SEC}]}$ ^a (g/mol)	D ^a	$M_{n[\text{MALLS}]}$ ^b (g/mol)	\overline{X}_{br} ^c
			6a	MA					
1	1/0/500 (0)	2	-	90	39000	39600	1.12	37200	--
2	1/3/500 (2)	24	>99	95	41200	42100	1.55	53700	68
3	1/7/500 (3)	30	>99	94	41000	32700	1.62	53500	31
4	1/15/500 (4)	43	>99	90	39600	25600	1.71	57300	16
5 ^d	1/31/500 (5)	84	>99	90	40300	17100	1.97	56000	7.1
6 ^e	1/63/500 (6)	120	95	74	34006	9800	1.99	53900	2.9
7	1/15/100 (4)	66	>99	92	8600	5600	1.40	9100	3.0
8	1/15/250 (4)	66	>99	94	20700	12000	1.87	24000	7.6
9	1/15/2000 (4)	80	>99	93	160800	74700	1.91	162200	60
10 ^f	1/127/2000 (7)	132	>99	90	16.01	5.69	2.08	17.65	7.3
11 ^g	1 ^h /21/500 (3)	168	>99	84	3.73	1.73	1.44	5.66	9.3
12	1 ⁱ /15/500 (4)	43	>99	92	4.04	2.95	1.49	5.42	15

^aDetermined by SEC calibrated against poly(methyl methacrylate) standards. ^bWeight average molecular weight obtained by MALLS ($M_{w[\text{MALLS}]}$) was divided by D (M_w/M_n) obtained by SEC. ^cBranchin density calculated by eq. 1. Conversion of MA was used as *Conv.* ^dAIBN (0.2 equiv.) was further added after 24 h. ^eAIBN (0.2 equiv.) was further added after 84 h. ^fAIBN (0.2 equiv.) was further added after 11 h and 71 h. ^gAdditional AIBN (0.2 equiv.) was added after 72 h. ^h**13** was used instead of **9**. ⁱ**15** was used instead of **9**.

を求めたところ、モノマー消費が増えるにつれ理論値 $M_{n[\text{theo}]}$ に比べて低分子量側に大きくずれた (Figure 3d)。HBP はリニアポリマーに比べて流体力学半径が小さいことから、これはHBPの生成を示唆する結果である。実際、MALLSで推定した $M_{n[\text{MALLS}]}$ は理論値に近かった。なお、この値はMALLSで求めた重量平均分子量とSECで得られた分散度 (D) から算出した。SEC曲線は常に単峰性であり、モノマー消費と共に高分子量側にシフトした (Figure 3e)。さらに、分散度は常に2以下であった。これらの結果は、いずれも望みの構造制御されたHBPが生成していることを示唆する結果である。なおSEC解析は、**12a**の成長末端を MeTeH で還元して水素化物 **12b** として後に行った。

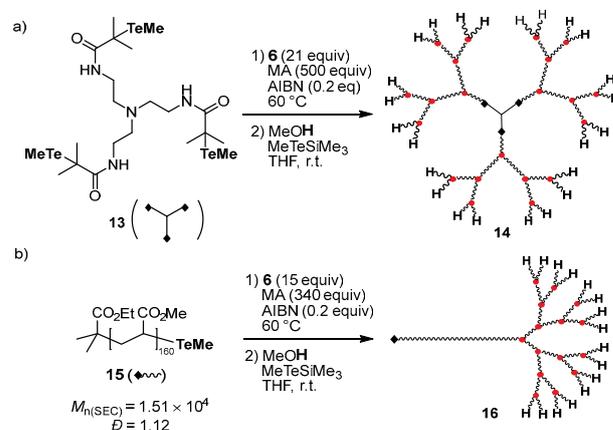
第2-5世代の**12**の合成においても、重合過程の解析と生成物の分析から、望みの構造の制御されたHBPが得られたことが強く示唆された。すなわち、 $M_{n[\text{SEC}]}$ は $M_{n[\text{theo}]}$ よりも小さく、世代が上がるにつれてその差は大きくなった。一方、 $M_{n[\text{MALLS}]}$ はいずれも場合でも理論値と良い一致を示していた。さらに、SECは常に単峰性であり、分散度は2以下であった。

合成した**12b**の固有粘度をMark-Houwink-Sakurada (MHS) プロットから求めた。その結果、分岐ポリマーはいずれもリニア体よりも低粘度であると共に、粘度は分岐数が増えるにつれて減少した (Figure 3f)。さらに、第2-6世代**12b**のMHS式における指数 a は0.36-0.44であり、リニアPMAの値 (0.82) よりかなり小さかった。これらの結果もすべて分岐構造の制御されたHBPの生成を支持する結果である。

分岐密度と分子量の制御も可能であることが分かった。例えば、第4世代 ([**6**]₀/[**9**]₀ = 15) の**12**の合成において [**6**]₀/[**9**]₀ を 100 – 2000 に変えたところ、 \overline{X}_{br} = 3.0 – 60、

$M_{n[\text{MALLS}]}$ = 9100 – 162200 の対応するHBPが構造制御を伴って合成できた (runs 7-9)。さらに、[**9**]₀/[**6**]₀/[MA]₀ = 1/127/2000 の条件で重合を行うことで、分子量16万の第7世代**12**の制御合成にも成功した (run 10)。得られたポリマー分子をAFM測定により観測することが可能であり、予想通り球状の構造を取ることもわかった (Figures 3g and h)。

有機テルル連鎖移動剤の構造を変えることで、より複雑な構造の合成にも成功した。例えば、三テルル置換連鎖移動剤**13**を用いることで、 dendromer **14** の合成に成功した (Figure 4a, Table 1, run 11)。また、PMAマクロ連鎖移動剤**15**を用いることで、オタマジャクシ構造を持つリニア HBブロック共重合体**16**が合成できた (Figure 4b, Table 1, run 12)。さらに成長末端の官能基化も可能であり、例えば第4世代の**12a**と4-amino-TEMPOとの光カップリング反応により、**12d**が高選択的に得られた。

**Figure 4.** Synthesis of a) dendritic HB-polyacrylate and b) tadpole PMA.

2-3. 分岐構造の確認

分岐構造に関する直接的証拠を得るため、同位体ラベル実験を検討した。まず、第4世代の**12a**を表1、run 4の条件で合成した後、成長末端をMeTeDで還元することで重水素化体**12c**を得た。²H NMRを測定したところ、**11**が還元されて生じるアルキル基に由来する重水素は全く観測されず、エステルα位に相当する2.3 ppmのみにブロードなシグナルが観測された。このことから、分岐効率は>99%であることが示された。

さらに、ビニル炭素が¹³Cでラベルされた、H₂C=¹³C(Oct-*n*)TeMeを合成し、これを用いて第3世代のHBPの合成を行った。成長末端をMeTeHで還元した後に¹³C NMRを測定したところ、予期に反して二つの新たなシグナルが観察された (Figure 5a)。DEPT(135°)測定により、39 ppmの主シグナルが消失したことから、これが4級炭素中心であり、期待通りにビニルテルリドに由来する分岐炭素であることが示された。すなわち、ラジカル**17**から成長反応が進行して得られる構造である (Figure 5b)。一方、33 ppmのマイナーシグナルは3級炭素中心である。これは、アクリレート重合に特徴的なバックバイティングにより生じたためと考えている。MeTeHの代わりにMeTeDで還元したHBPにおいても¹³C NMRに違いがないことも、この機構を支持する結果である。ラジカル**18**からさらに成長反応が進行し、異なる分岐構造が生成したと考えている。

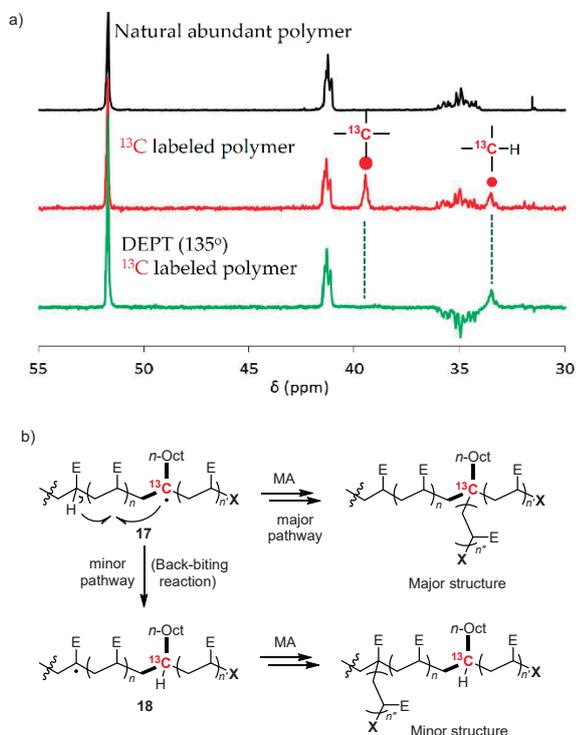


Figure 5. Structural analyses of branching by ¹³C labeling experiments. a) ¹³C NMR and DEPT 135° of the labeled HBP and b) a proposed mechanism for the formation of the major and minor branched structures.

3. まとめ

新しい発想に基づき、 dendroliマー構造を持つ多分岐ポリアクリレート単段階で合成する方法の開発に成功した。連鎖移動剤、ビニルテルリド、アクリレートとの量比を制御することで、構造の制御を保ったまま自由に分岐数と分岐密度を制御できる点が最大の特長である。可逆的不活性化(リビング)ラジカル重合機構で進行することから、ブロック共重合体や末端変換体の合成も行えた。さらに、本稿では示さなかったが、ラジカル重合の持つ高い官能基との共存性を保っている。一方、**6**をモノマーとした場合には、重合制御可能なのはアクリレート、アクリルアミド系であることも明らかになってきている。今後、他の反応性の異なるモノマーへの展開を図ることで、分岐ポリマーを用いる高機能性高分子材料の設計に大きな貢献ができるものと考えている。

謝辞

本研究は科研費JP24109005により行われた。AFM測定を行って頂いた登阪雅聡ICR准教授と根本隆ICR助教、MALLS測定をご指導頂いた中村泰之ICR特定准教授、分岐ポリマーの物性について議論およびご提言を頂いた渡辺宏ICR教授に深謝する。

参考文献

- a) D. Yan, C. Gao, H. Frey, *Hyperbranched Polymers: Synthesis, Properties, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2011); b) C. Gao, D. Yan, *Prog. Polym. Sci.* **29**, 183 (2004); c) B. I. Voit, A. Lederer, *Chem. Rev.* **109**, 5924 (2009).
- a) P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2718 (1952); b) Y. H. Kim, O. W. Webster, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4592-4593 (1990).
- a) J. M. J. Fréchet, M. Henmi, I. Gitsov, S. Aoshima, M. R. Leduc, R. B. Grubbs, *Science* **269**, 1080 (1995) b) G. I. Litvinenko, P. F. W. Simon, A. H. E. Müller, *Macromolecules* **32**, 2410 (1999).
- a) Y. Ohta, S. Fujii, A. Yokoyama, T. Furuyama, M. Uchiyama, T. Yokozawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 5942 (2009); b) Y. Shi, R. W. Graff, X. Cao, X. Wang, H. Gao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7631 (2015).
- a) D. A. Tomalia, J. Christensen, U. Boas, *Dendrimers, Dendrons, and Dendritic Polymers*, Cambridge University press, New York (2012); b) A. W. Bosman, H. M. Janssen, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **99**, 1665 (1999); c) S. M. Grayson, J. M. J. Fréchet, *Chem. Rev.* **101**, 3819 (2001).
- Lu, Y.; Nemoto, T.; Tosaka, M. Yamago, S. *Nat. Commun.* **8**, 1863 (2017).

環化重合による交互配列高分子の合成と配列機能の創出

Syntheses of Alternating Copolymers via Cyclopolymerization and Functions Derived from the Alternating Sequence

大内 誠・亀谷 優樹

Makoto OUCHI, Yuki Kametani

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Control of alternating sequence for two functional units, i.e., methacrylic acid and *N*-isopropyl acrylamide (NIPAM), was realized via selective cyclopolymerization of a special divinyl monomer and cleavage of the repeating cyclo-units in the resultant cyclopolymer. Here, two types of cleavable bonds, i.e., 3° ester and activated ester, were embedded in the designed divinyl monomer: the former is cleaved into carboxylic acid under acidic condition, whereas the latter is substituted by primary amine giving amide bond. The design using the activated ester also contributed to selectivity in the cyclopropanation, because the radical reactivity of the activated ester-pendant acrylate to methacrylate double bond was increased, which was confirmed by reactivity ratio of the model comonomers. The obtained cyclopolymer was transformed into the alternating copolymer via transformation of the activated ester into amide by isopropyl amine and cleavage of the 3° ester by trifluoroacetic acid. The resultant alternating copolymer was soluble in water at lower temperature to give the transparent solution but the solution turned into turbid upon heating. The thermal response behavior was different from the 1:1 random copolymer as well as the homopolymers.

1. 合成高分子に対する配列制御

生命機能を担うDNAやタンパク質などの高分子は、繰り返し単位が同じで、様々な側鎖置換基から成る共重合体であり、その機能発現で重要な構造因子はアミノ酸の並び方、すなわち配列（シーケンス）である。一方、合成高分子材料において、特性や機能の複合や調整を目的として、複数種類のモノマーから合成した共重合体がよく用いられる。しかし、タンパク質とは異なり、配列は制御されず、様々な配列を有した組成分布のある共重合体しか合成できない（図1）。

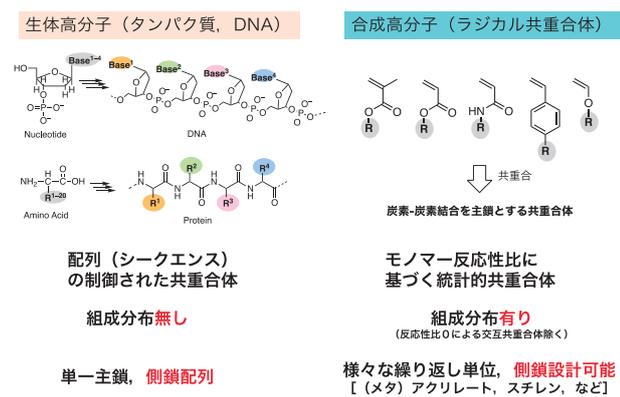


Fig. 1 Difference between natural polymers and synthetic polymers (vinyl polymers) in terms of sequence.

特に連鎖共重合で用いるモノマーとして、(メタ)アクリル酸エステル、アクリルアミド、スチレンなどがあり、これらは様々な特性に関する側鎖を導入でき、その組み

合わせによって多様に共重合を設計できる。モノマーを同時に仕込んで共重合を行うことで、ランダム共重合体が合成され、リビング重合を用いることでブロック共重合体が合成されてきた（図2）。もし、配列を制御した配列制御共重合体を合成できれば、配列に由来する新たな特性や機能が期待できるため、最近配列制御に対する感心が高まっている¹⁻³。しかし、分布を伴って成長する連鎖重合は配列制御には不向きな重合機構であり、特殊な組み合わせを除いて、単純な交互配列制御さえ困難である。

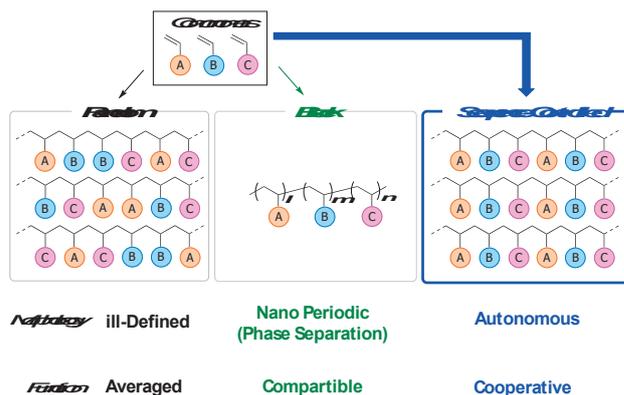


Fig. 2 Comparison among random, block and sequence-controlled copolymers

我々はビニルポリマーの配列制御に対し、可逆的不活性化ラジカル重合（リビングラジカル重合）をベースとして、「鑄型を用いる手法」^{4,5}、「環化反応を繰り返す手法」⁶、「変換可能なかさ高さによって一分子付加を繰り返す手

法」⁷, 「環化重合によって交互配列を制御する手法」⁸⁻¹²などを提唱し, 配列制御につながるコンセプトを実証してきた。本稿では「環化重合によって交互配列を制御する手法」によってメタクリル酸 (MAA) と*N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM) という汎用性かつ機能性のモノマーユニットの交互配列を制御した例¹²について述べる。

2. 環化重合によって交互配列を制御する手法

この手法では, 切断可能な結合でAB二種類のモノマーをつないだジビニルモノマーを設計し, 選択的な環化ラジカル重合を制御して環化ポリマーを得て, スパーサーを切断することで交互シーケンス制御ポリマーに変換する (図3)。ここで, 通常のコモ重合に比べて希釈条件で重合すると, 分子内環化成長を制御でき, さらに組み合わせるモノマーの反応性比を設計すると選択的な分子間成長を制御できる。交互シーケンスの精度を高めるためには, 特にBラジカル種からAモノマーの二重結合に成長するようなモノマーの組み合わせが重要であり, AモノマーをM₁, BモノマーをM₂とした時のモノマー反応性比 r_2 がゼロに近い組み合わせが好ましい。また, 切断可能な結合の設計も重要であり, 分解によって異なる側鎖官能基を与えるような結合が設計される。

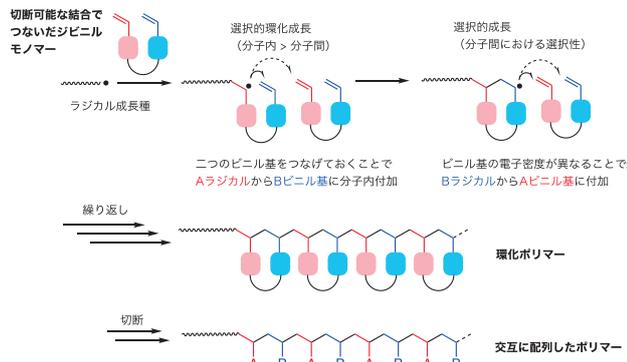


Fig. 3 General scheme to control AB alternating sequence via selective cyclopolymerization of a divinyl monomer carrying cleavable spacer.

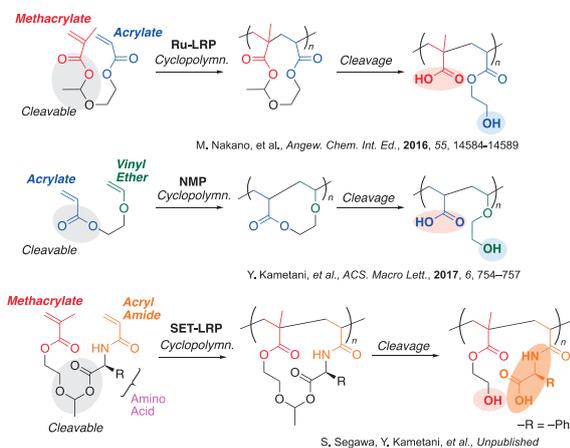


Fig. 4 Some examples on control of alternating sequence via the selective cyclopolymerization approach.

例えば, これまでにメタクリレートとアクリレートへヘミアセタールエステル結合でつなげた設計¹⁰, アクリレートとビニルエーテルをエステル結合でつなげた設計¹¹, メタクリレートとアミノ酸アクリルアミドをヘミアセタールエステル結合でつなげた設計の組み合わせで交互配列制御を実現している (図4)。

興味深いことに, メタクリル酸と2-ヒドロキシエチルアクリレートの交互配列共重合体は, ジメトキシエーテル中で低温で濁り, 高温で溶解する温度応答性を示した (図5)¹⁰。このような温度応答性はランダム共重合体では見られず, 配列を制御してはじめて生じた特性であり, 配列特有の特性として興味深い。

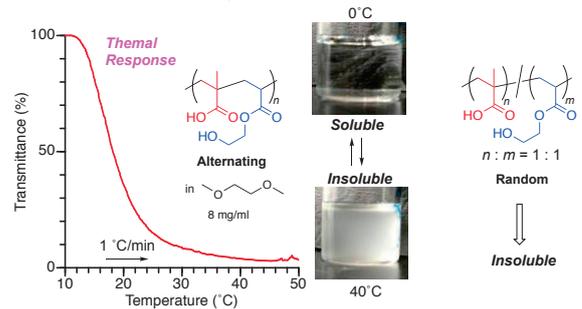


Fig. 5 Transmittance measurement of DME solution of the alternating copolymer (8 mg/ml) as a function of temperature. Heating process at 1 °C/min from 10 °C to 50 °C.

3. メタクリル酸とNIPAMの交互配列制御

次に, より明確な機能を有する2つのモノマー単位の交互配列制御を目指し, 三級エステル型メタクリレートと活性化エステル型アクリレートの側鎖がつながったジビニルモノマーを設計した (図6)。三級エステルは酸性条件下で切断してカルボン酸に, 活性化エステルはアミンとの反応によってアミドに変換できる。そのため, この選択的環化重合を制御して, スパーサーを切断すると, MAAとアクリルアミドの共重合体に変換できる。また, ジビニルモノマーに組み込まれた*tert*-ブチルメタクリレート (M₁) と*para*-ニトロフェニルアクリレート (M₂) をモデルモノマーとして合成し, モノマー反応性比を求めたところ, r_2 は0.15とゼロに近くなった。この小さい反応性比は環化重合を選択

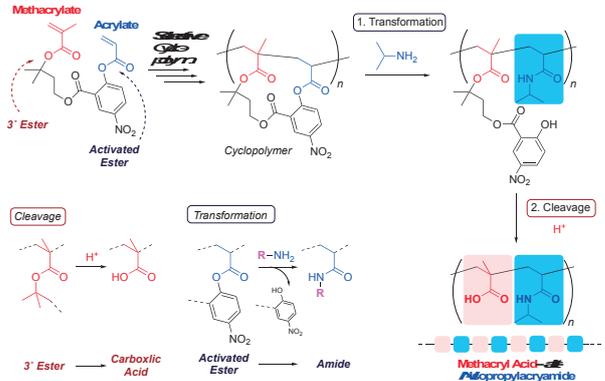


Fig. 6 Selective cyclopolymerization to synthesize alternating copolymer of MAA and NIPAM.

的に進行させる上で重要となる。アクリレートに組み込まれた活性化エステルは電子吸引性基であり、上述した変換反応のみならず、選択的な環化重合の進行にも寄与することが示された。

モノマー濃度100mMに対し、ヨウ素型開始剤とルテニウム触媒を組み合わせることで、2つの二重結合は等速度で消費され、ゲル化することなく重合が進行した(図7)。生成ポリマーの分子量分布は狭く($M_w/M_n = 1.2-1.3$)、 ^1H NMRスペクトルは環化ポリマー特有のブロードなピークで、目的の環化ポリマーの生成を示唆していた。

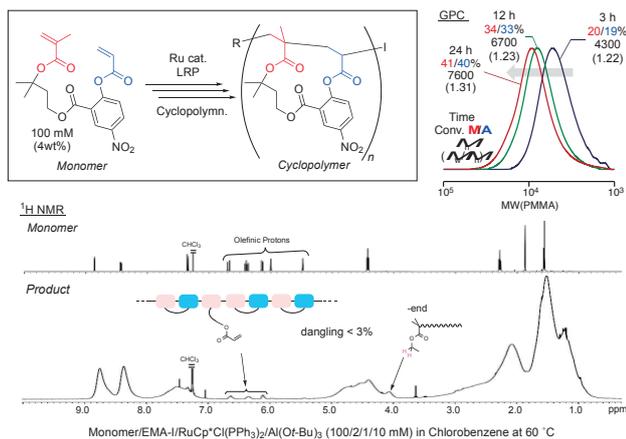


Fig. 7 Selective cyclopolymerization via ruthenium-catalyzed living radical polymerization and ^1H NMR spectrum of the resultant cyclopolymer.

ここで、メタクリル酸というpHに応答するモノマーと*N*-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)という温度に応答するモノマーの交互共重合へ変換するために、得られたポリマーにイソプロピルアミン、トリフルオロ酢酸を反応させることで、MAAとNIPAMの共重合体へと変換した。実際に生成ポリマーの ^1H NMRスペクトルはMAAとNIPAMの1:1ランダム共重合体と類似しており、組成比も1:1と見積もられたことから、狙いとする官能基変換が起こっていることがわかった。

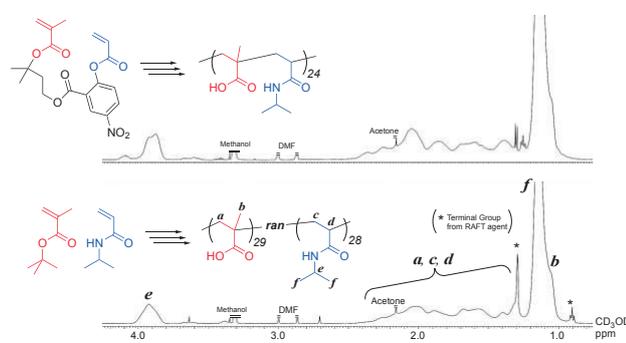


Fig. 8 Comparison of ^1H NMR spectrum with random copolymer of MAA and NIPAM.

一方、 ^{13}C NMRスペクトルのカルボニル側鎖のピークを、ランダム共重合体、それぞれのホモポリマーと比較したところ、それぞれのホモシーケンスピークは観測されず、重合挙動と合わせて、交互シーケンスが制御されていると結論づけた。

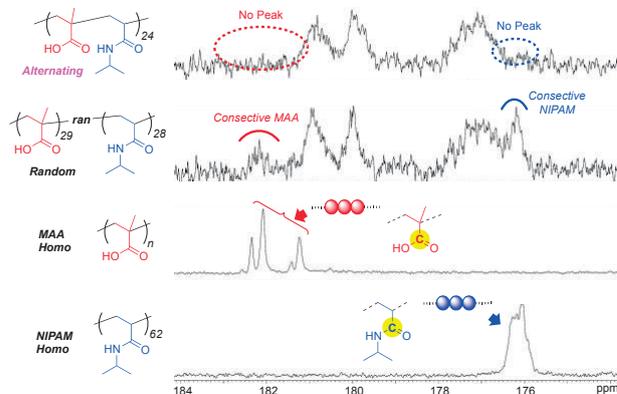


Fig. 9 ^{13}C NMR spectrum from the repeating C=O peaks for characterization of sequence in comparison with the random copolymer and the homo polymers.

4. 交互配列に基づく刺激応答

生成したMAAとNIPAMの交互共重合体は室温で水に溶解し、ポリNIPAM(PNIPAM)同様に温度応答性を示し、温度を上げると透明な水溶液が濁った。この温度応答性挙動を詳細に調べるために、中性の水に溶解させた溶液(2 mg/mL)に対し、温度可変UV-Vis測定($\lambda = 600$ nm)を行い、透過度の温度依存性を調べ、それぞれのホモポリマー(PNIPAM, PMAA)、MAAとNIPAMの1:1ランダム共重合体と比較した。

温度を $10^\circ\text{C}/\text{分}$ で上昇させると、PNIPAMは 40°C 付近で急激に透過率が減少し、シャープな温度応答性を示した(図10)。一方、MAAとNIPAMの交互共重合体の場合は、温度の上昇に対して、ゆっくり透過率を下げた。この変化は目視でも確認された。それに対し、MAAとNIPAMの1:1ランダム共重合体の水溶液は温度に応答して少量の沈殿が底に生じ、

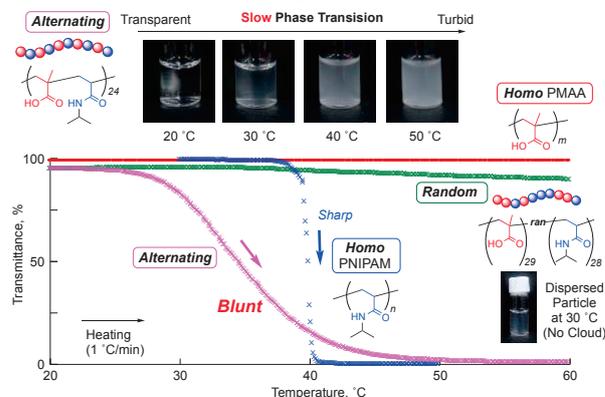


Fig. 10 Temperature valuable transmittance measurement with the aqueous solution of alternating copolymer in comparison with the random copolymer and homopolymers (PMAA and PNIPAM).

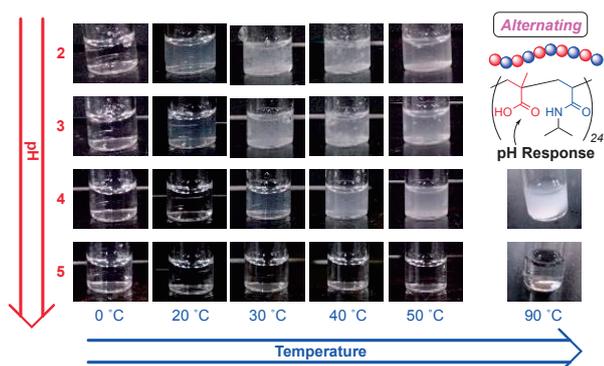
上澄みはほぼ透明のままであった。そのため、透過率測定においては透過率はほとんど変化しなかった。PMAAは全く温度応答性を示さなかった。

温度応答性挙動についてまとめると以下ようになる

- 平均組成は同じであるにも関わらず、配列が異なることで温度応答性挙動が大きく変わり、配列由来特性が見出された。
- PNIPAMと異なり、ゆっくり濁った。
- PMAAはいかなる温度でも溶けており、親水性とみなせる。NIPAMベースのポリマーに親水基を導入すると、濁らなくなるか、濁る温度が高くなると予想されたが、NIPAMとMAAの交互共重合体が濁り始めた温度はPNIPAMより低温であった。

NIPAMユニットは温度に応答して凝集しようとするが、隣接するMAAユニットの電気的発散により、凝集が進行せず、温度の上昇に対して、ゆっくり濁ったと考えられる。なお、上記透過率測定の昇温速度を下げた1°C/minにしても、ほぼ同じ透過率曲線が得られたことから、温度に応じて決まったサイズの凝集体の生成が生成していると考えられる。実際に温度を変えながら動的光散乱(DLS)で凝集体の大きさを調べたところ、温度に対応して凝集体のサイズが徐々に大きくなっていることが最近の測定で明らかになった。

さらに緩衝液を用いて、pHの違いが温度応答性に与える影響を調べたところ、pHが低いほど、低温で濁ったが、ゆっくり濁る挙動は同じであった。また、pHが5以上になると温度応答性はなくなり、どの温度でも透明のままであった。これはpHが大きくなって、MAAユニットの親水性が高まったためと考えられる。



1 mg/mL in Buffer Solution (pH2,3:C₈H₅KO₄-HCl, pH4,5:C₈H₅KO₄-NaOH), Heating Process

Fig. 11 Effects of pH on thermal response of the MAA-NIPAM alternating copolymer: the appearances of the some buffer solutions (pH = 2, 3, 4, and 5) at different temperatures (concentration: 1 mg mL⁻¹).

5. まとめと今後の展開

三級メタクリレートと電子吸引性基を有するアクリレートがつながったジビニルモノマーの設計により、pH応答に関与するMAAユニットと温度応答に関与するNIPAMユニ

ットを交互に並んだ配列制御共重合体が合成された。さらに両者が1:1でランダムに導入されたランダム共重合体も合成し、平均組成が同じで配列の制御されたポリマーと制御されていないポリマーの温度応答性挙動を比較できた意義は大きい。

生体分子の配列制御に迫るために、多種置換基に対する配列制御も重要だが、同種繰り返し単位のみを用いて側鎖配列を制御することも重要であろう。最近我々はアクリルアミドのみからなり、水酸基側鎖と任意側鎖を交互に並べた配列制御にも成功しつつあり、配列に由来する機能の創出が期待される。

参考文献

- 1) Lutz, J. F.; Ouchi, M.; Liu, D. R.; Sawamoto, M. *Science*, **341**, 1238149 (2013).
- 2) Ouchi, M.; Badi, N.; Lutz, J. F.; Sawamoto, M. *Nat. Chem.*, **3**, 917 (2011).
- 3) Ouchi, M.; Sawamoto, M. *Polym. J.*, **50**, 83 (2018).
- 4) Ida, S.; Terashima, T.; Ouchi, M.; Sawamoto, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10808 (2009).
- 5) Ida, S.; Ouchi, M.; Sawamoto, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 14748 (2010).
- 6) Hibi, Y.; Ouchi, M.; Sawamoto, M. *Nat. Communications*, **7** (2016).
- 7) Oh, D. Y.; Ouchi, M.; Nakanishi, T.; Ono, H.; Sawamoto, M. *ACS Macro Lett.*, **5**, 745 (2016).
- 8) Hibi, Y.; Tokuoka, S.; Terashima, T.; Ouchi, M.; Sawamoto, M. *Polym. Chem.*, **2**, 341 (2011).
- 9) Hibi, Y.; Ouchi, M.; Sawamoto, M. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **50**, 7434 (2011).
- 10) Ouchi, M.; Nakano, M.; Nakanishi, T.; Sawamoto, M. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **55**, 14584 (2016).
- 11) Kametani, Y.; Nakano, M.; Yamamoto, T.; Ouchi, M.; Sawamoto, M. *ACS Macro Lett.*, **6**, 754 (2017).
- 12) Kametani, Y.; Sawamoto, M.; Ouchi, M. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **57**, 10905 (2018).

高分子水溶液の稀薄溶液物性—ポリ-*N,N*-ジエチルアクリルアミド

Dilute Aqueous Solution Properties of Polymers: Poly(*N,N*-diethyl acrylamide)

吉崎 武尚・井田 大地・千布 堅一郎

Takenao YOSHIZAKI, Daichi IDA, Kenichiro CHIFU

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

The dependence of the second virial coefficient A_2 along with the mean-square radius of gyration (S^2), both determined from static light scattering measurements, on temperature T was examined for poly(*N,N*-diethylacryl amide) (PDEA) samples in water in the range of weight-average molecular weight M_w from 3.86×10^5 to 1.22×10^6 . It was found for all samples that A_2 decreases continuously and steeply from a positive value to a negative one with increasing T ; in particular, A_2 vanishes at $T = 29.5$ °C. The quantity $(S^2)/M_w$ is shown to decrease monotonically with increasing T and become almost independent of M_w at $T = 29.5$ °C. The Θ temperature may then be determined to be 29.5 °C for PDEA in water, being consistently with the value estimated from extrapolation of the critical temperature of aqueous PDEA solutions to infinite M_w .

1. はじめに

極性があまり高くない有機溶媒に高分子を溶かした系の多くは、上限臨界相溶温度 (UCST) 型相挙動を示す。その典型例であるアタクチックポリスチレン (a-PS) /シクロヘキサン系の相分離温度の溶質濃度 (体積分率 ϕ) に対するプロット (共存曲線) を図1に示す。通常、共存曲線と曇点曲線は一致する。いずれの重量平均分子量 M_w の場合も、共存曲線は上に凸になり、黒丸で示す臨界点を持つ。 M_w が大きくなると共存曲線は高温側にずれ、臨界点は低濃度側にずれる。臨界温度の M_w が無限大の極限における外挿値は Θ 温度に一致する。このような系については、詳細な稀薄溶液物性研究が行われ、溶質高分子繰返し単位間相互作用の温度依存性など、分子論的理解が進んでいる²⁾。

一方で、非イオン性高分子水溶液の多くは、下限臨界相溶温度 (LCST) 型相挙動を示すと言われている。LCST型相挙動を示す場合の標準的な相図は、図1に示したUCST型相挙動を示す系の相図を上下反転させたような形状になり、共存曲線は下に凸になり、分子量が大きくなるのにもない、共存曲線は低温側にずれ、臨界点は低濃度側にずれるものと思われる。このようなLCST型相挙動を示す系の分子論的理解にも、UCST型相挙動を示す場合と同様に、稀薄溶液物性研究が必要である。しかし、予想される標準的なLCST型相挙動を示す系はポリエチレンオキシド水溶液³⁾が知られるのみであったが、相分離温度が100 °Cを超えるため、相分離温度付近において稀薄溶液物性測定が難しい。また、曇点が体温付近にあり実験が容易なポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミド^{4,6)}やポリ-2-(2-エトキシ)エトキシエチルビニルエーテル⁷⁾の水溶液の場合、曇点曲線が明確な臨界点を持たない。前者に関しては、分子量依存性も予想とは逆転し、曇点曲線と共存曲線が一致しないことが明らかになっている^{4,6)}。稀薄溶液物性測定に適した温度範囲において標準的なLCST型相挙動を示す系が望まれて

いた。

最近、長ら⁸⁾は、ポリ-*N,N*-ジエチルアクリルアミド (PDEA) 水溶液が常温において上述のような標準的なLCST型相挙動を示すことを報告した。図2には、報告されたPDEA水溶液の溶質重量分率 w に対する曇点のプロットを示す (破線については後述)。本研究では、非イオン性高分子水溶液物性の分子論的理解に向けて、静的光散乱 (SLS) 測定により水中におけるPDEAの第2ビリアル係数 A_2 を決定し、その温度依存性がLCST型相挙動に対応するのか、 Θ 温度が存在するのか否かを明らかにする。また、得られた結果を、標準的なUCST型相挙動を示すa-PS/シクロヘキサン系の場合と比較し、水中における溶質高分子間相互作用の温度依存性の特徴について考察する。

2. 実験

以前の研究⁹⁾において、ベンゼン中アゾビスイソプロピロニトリルを開始剤としてラジカル重合された原試料から、アセトンを溶剤、*n*-ヘキサンを沈殿剤とする分別沈殿法により調製された、 M_w が相異なり、 M_w と数平均分子量 M_n の比が1に近い、三つのPDEA測定試料B39、B51、およびB122を用いた。表1に用いた測定試料の M_w 、 M_w/M_n 、およびラセモダイアドの分率 f_r の値を示す。なお、 M_w はメタノール中25.0 °C (良溶媒条件) におけるSLS測定により、 M_w/M_n は0.1 Mの臭化リチウムを含むジメチルホルムアミドを溶離液

Table 1. Values of M_w , M_w/M_n , and f_r for the PDEA samples

sample	$10^{-5}M_w$	M_w/M_n	f_r
B39	3.86	1.16	—
B51	5.08	1.20	—
B122	12.2	1.33	0.51 ₉

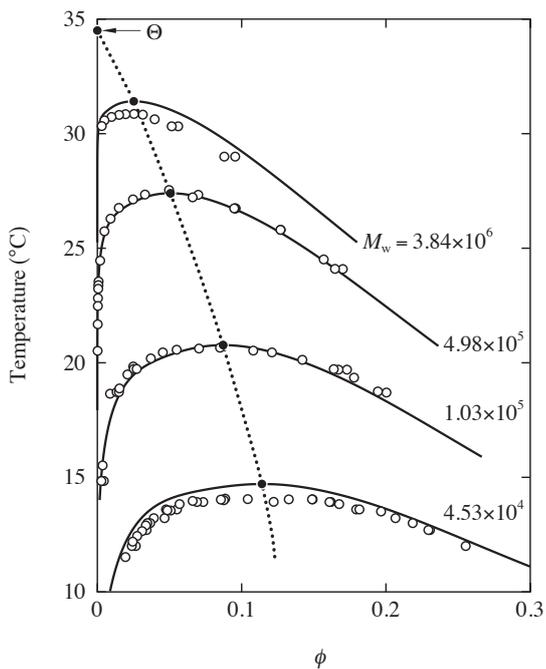


Figure 1. Coexistence curves of a-PS in cyclohexane¹⁾

とするゲル浸透クロマトグラフィー測定 (PDEA換算) により、 f_i は重クロロホルム中50°Cにおける¹³C核磁気共鳴測定 (150.9 MHz) により決定され、また f_i は M_w にほとんど依存しないことが確認されている。

SLS測定には、溶媒として超純水を用い、波長436 nmの垂直偏光を入射光とするFica50型光散乱光度計を用いた。測定データとして得られる非偏光過剰還元散乱光強度 ΔR_{UV} をBerry平方根およびBawnプロットを用いて解析し、平均二乗回転半径(S^2) (M_w)、 A_2 、および第3ビリアル係数 A_3 を決定した。

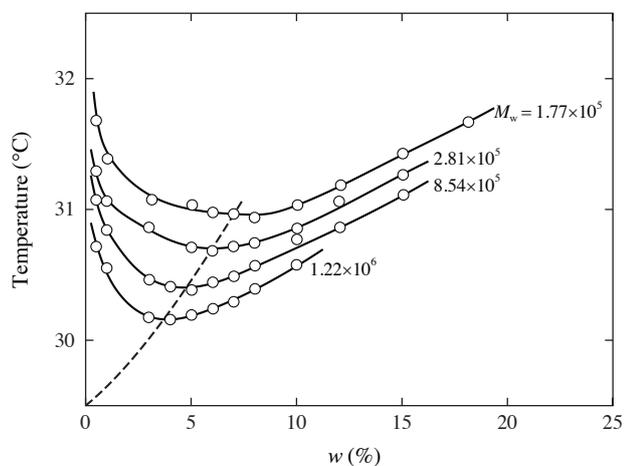


Figure 2. Cloud-point curves for aqueous PDEA solutions⁸⁾

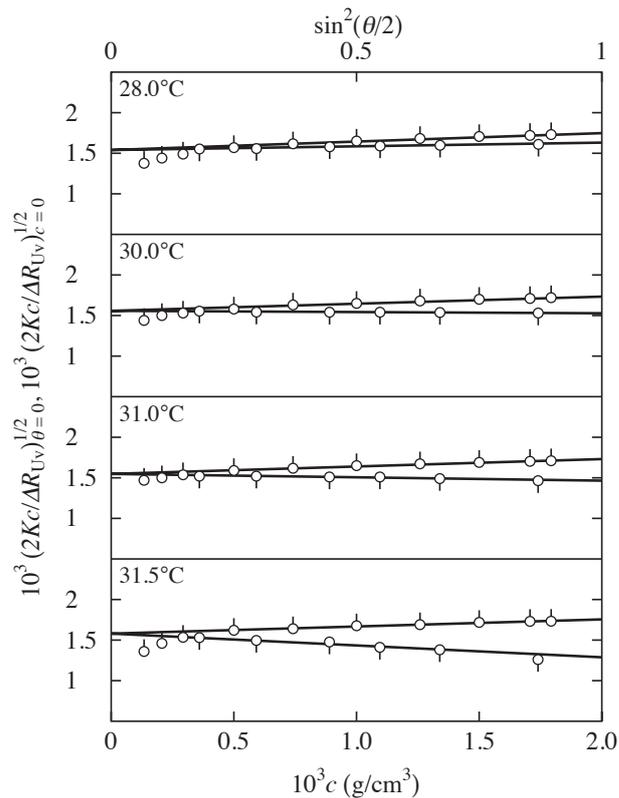


Figure 3. Berry square-root plots for the PDEA sample B39 in water

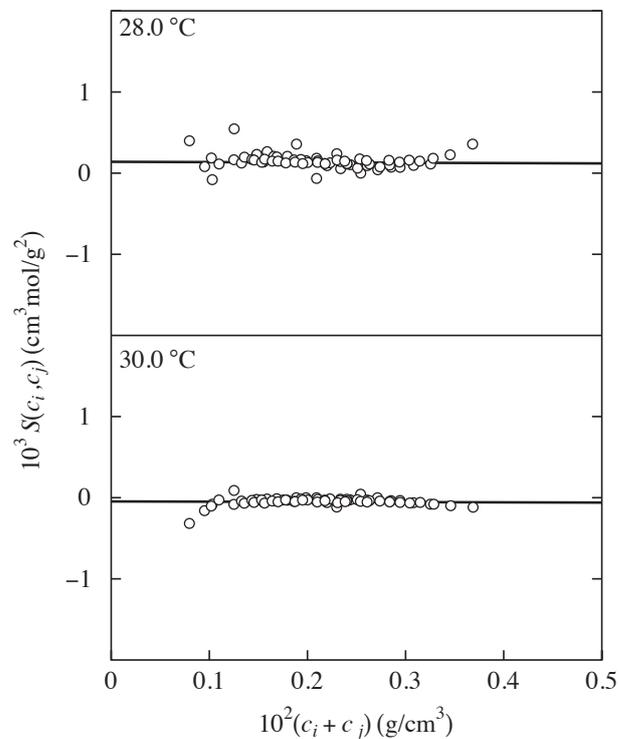


Figure 4. Bawn plots for the PDEA sample B39 in water

3. 結果と考察

図3に、図中に示した各温度における水中B39に対するBerry平方根プロットを示す。縦軸の量 $(2Kc/\Delta R_{UV})_{\theta=0}$ および $(2Kc/\Delta R_{UV})_{c=0}$ は、それぞれ、 $2Kc/\Delta R_{UV}$ の c および散乱角 θ が0の極限への外挿値を表し、 K は次式により定義される光学定数である。

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (1)$$

ここで、 n_0 は溶媒屈折率、 N_A はAvogadro定数、 $\partial n/\partial c$ は溶液の示差屈折率増分である。図中、下ピップ印が $(2Kc/\Delta R_{UV})_{\theta=0}$ 、上ピップ印が $(2Kc/\Delta R_{UV})_{c=0}$ の値を表す。いずれの温度においても、 $(2Kc/\Delta R_{UV})_{c=0}$ のプロットの低角領域を除けば、 $(2Kc/\Delta R_{UV})_{\theta=0}$ および $(2Kc/\Delta R_{UV})_{c=0}$ のいずれの場合のプロットも共通切片を持つ直線となり、次式に従い各直線の傾きから、それぞれ、 A_2 および $\langle S^2 \rangle$ を、共通切片から M_w を評価できる。

$$\left(\frac{Kc}{\Delta R_{UV}} \right)_{\theta=0}^{1/2} = \frac{1}{M_w^{1/2}} (1 + A_2 M_w c + \dots) \quad (2)$$

$$\left(\frac{Kc}{\Delta R_{UV}} \right)_{c=0}^{1/2} = \frac{1}{M_w^{1/2}} \left(1 + \frac{1}{6} \langle S^2 \rangle k^2 + \dots \right) \quad (3)$$

ここで、 $k = (4\pi n_0/\lambda_0) \sin(\theta/2)$ である。 $(2Kc/\Delta R_{UV})_{\theta=0}$ 対 c のプロットの傾き、すなわち、 A_2 は温度が高くなるのにもともない正から負に転じることが分かる。

図4に、図中に示した各温度における水中B39に対するBawnプロットを示す。縦軸の量 $S(c_i, c_j)$ ($c_i < c_j$) は次式のように定義され、 $(c_i + c_j)$ の関数として展開できる。

$$\begin{aligned} S(c_i, c_j) &= \frac{(Kc/\Delta R_{UV})_{\theta=0, c=c_j} - (Kc/\Delta R_{UV})_{\theta=0, c=c_i}}{c_j - c_i} \\ &= 2A_2 + 3A_3(c_i + c_j) + \dots \end{aligned} \quad (4)$$

図中、白丸が実験データを表す。いずれの温度においても、実験データのプロットは直線に従っており、式(1)下段を用いて A_2 および A_3 を評価することができる。このプロットから評価される A_2 は、図1に示したBerry平方根プロットから評価される A_2 と一致する。28.0 °Cにおいては、 $A_2 > 0$ であるにも関わらず $A_3 = 0$ ないしは < 0 となった。この結果は、2体相互作用が斥力的であるにも関わらず3体相互作用が引力的になり得るといふ、既存の分子間平均力ポテンシャルに関する理論の枠内では説明不可能なく新しい実験的発見である。30.0 °Cにおいては、 $A_2 < 0$ か

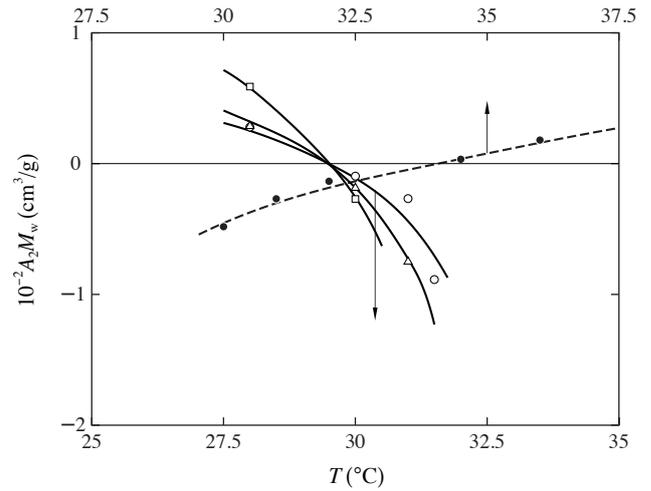


Figure 5. Plots of $A_2 M_w$ against T for the PDEA samples B39 (○), B51 (△), and B122 (□) in water along with the a-PS sample with $M_w = 1.27 \times 10^6$ and $M_w/M_n = 1.03$ in cyclohexane (●)

つ $A_3 < 0$ であり、温度が高くなるのにもともない分子間相互作用がより引力的なることが分かり、当然ながら図3の結果と矛盾しない。

図5に、水中におけるB39 (○)、B51 (△)、およびB122 (□) に対する $A_2 M_w$ 対 T のプロットを示す。比較のため、シクロヘキサン中のa-PS ($M_w = 1.27 \times 10^6$, $M_w/M_n = 1.03$) に対するプロット (●) も併せて示す。実線および破線は、それぞれ、付随するPDEAおよびa-PSに対するデータ点を滑らかにつないだものである。温度が高くなるのにもともない、UCST型相挙動を示すa-PS/シクロヘキサ

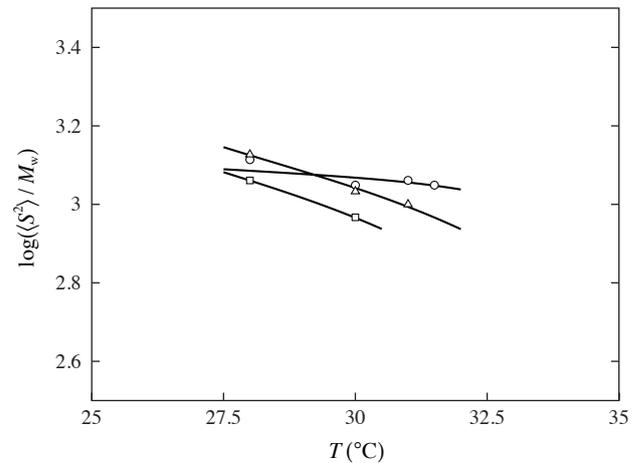


Figure 6. Plots of $\log(\langle S^2 \rangle / M_w)$ against T for the PDEA samples ($\langle S^2 \rangle$ in Å²). All symbols have the same meaning as those in Figure 5.

ン系 ($\Theta = 34.5\text{ }^\circ\text{C}$) の A_2 は負値から正值へと単調に増加するのに対して、LCST型相挙動を示すPDEA水溶液の A_2 は正值から負値へと単調に減少する。温度上昇にともなう A_2 の変化は、a-PSの場合は緩やかであるが、PDEAの場合は急激である。この急激な変化は、図3に示したように $A_2 > 0$ であっても $A_3 < 0$ となることから、3体引力相互作用により2体間相互作用の斥力的から引力的への変化が促進されるためと思われる。各実線は約 $29.5\text{ }^\circ\text{C}$ において交わり、その温度において $A_2 = 0$ となる。この結果と、用いたPDEA試料の M_w が 10^5 から 10^6 のオーダーであるという事実を併せると、PDEA水溶液の Θ 温度は約 $29.5\text{ }^\circ\text{C}$ であると言える。

図6に、水中におけるB39、B51、およびB122に対する $\log(\langle S^2 \rangle / M_w)$ 対 T のプロットを示す ($\langle S^2 \rangle$ の単位は \AA^2)。図中の各印および実線は、図5の場合と同一の意味を持つ。いずれの M_w の場合も温度上昇にともない $\langle S^2 \rangle / M_w$ は単調に減少し、 $T = 29.5\text{ }^\circ\text{C}$ において $\langle S^2 \rangle / M_w$ は M_w にあまり依存しない。この結果は、図3に示す A_2 の温度依存性から見積もられた $\Theta = 29.5\text{ }^\circ\text{C}$ という結果と矛盾しない。

以前の研究⁸⁾において得られたPDEA水溶液の曇点曲線の臨界温度の分子量無限大の極限における外挿値は約 $29.5\text{ }^\circ\text{C}$ となり (図2中破線)、本研究において見積もられた Θ 温度と一致する。

4. おわりに

高分子量のPDEA水溶液に対して 28.0 、 30.0 、 31.0 、および $31.5\text{ }^\circ\text{C}$ においてSLS測定を行い、各温度における A_2 および $\langle S^2 \rangle$ を決定した。PDEA水溶液のLCST型相挙動に対応して、温度が高くなるのにもない A_2 は正值から負値へと連続的ではあるが急激に減少し、 M_w によらず $29.5\text{ }^\circ\text{C}$ において $A_2 = 0$ となった。 $29.5\text{ }^\circ\text{C}$ において $\langle S^2 \rangle / M_w$ 値は M_w にほとんど依存せず、その温度とPDEA水溶液の臨界温度の分子量無限大における外挿値が一致することを併せると、PDEA水溶液の Θ 温度を $29.5\text{ }^\circ\text{C}$ であると結論できる。

参考文献

- 1) Y. Einaga, S. Ohashi, Z. Tong, and H. Fujita, *Macromolecules*, **17**, 527 (1984).
- 2) H. Yamakawa and T. Yoshizaki, *Helical Wormlike Chains in Polymer Solutions*, 2nd Ed. (Springer, Berlin, 2016).
- 3) S. Saeki, N. Kuwahara, M. Nakata, and M. Kaneko, *Polymer*, **17**, 685 (1976).
- 4) T. Kawaguchi, Y. Kojima, M. Osa and T. Yoshizaki, *Polym. J.*, **40**, 455 (2008).
- 5) T. Kawaguchi, Y. Kojima, M. Osa and T. Yoshizaki, *Polym. J.*, **40**, 528 (2008).
- 6) T. Kawaguchi, K. Kobayashi, M. Osa, and T. Yoshizaki, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 5440 (2009).
- 7) Y. Matsuda, Y. Miyazaki, S. Sugiura, S. Aoshima, K. Saito and T. Sato, *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.*, **43**, 2937 (2005).
- 8) R. Watanabe, K. Takaseki, M. Katsumata, D. Matsushita, D. Ida, and M. Osa, *Polym. J.*, **48**, 621 (2016).

分子ダイポールを組織化したペプチド材料の電気的特性解析

Electronic Properties of Peptide Materials Based on Organization of Molecular Dipoles

木村 俊作・宇治 広隆・田畑 有基・大村 紘司・釜野 雄輔
Shunsaku KIMURA, Hirotaka UJI, Yuki TABATA, Hiroshi OHMURA, Yusuke KAMANO
Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Peptide materials have been drawing much attention because of their environmentally benign and biocompatible properties. The coming society of the trillion-sensors universe require tiny sensors and devices being installed at all the places and things including human bodies. Peptide nano-materials have advantages to construct such devices with highly and precisely organized structures as evidenced by the biologically active proteins in a wide range of functions. As an example for the peptide nano-materials, we have been studying peptide nanotubes which are molecular assemblies of cyclic β -peptides stacking one over the other, because the spatial arrangement of the peptide nanotubes as the peptide nano-materials can be precisely controlled along the materials design based on the amide bonds and the chromophores at the component amino acids. Especially, macrodipoles generated by the peptide nanotubes and the specific arrangement of chromophores along the nanotubes are very useful factors to be utilized for the functional nano-materials.

1. 序

ペプチド材料は、アミノ酸の重縮合化合物をベースとする材料であり、基本的に環境に優しく、生体にも親和性の高い材料設計が可能である。また、タンパク質にみれるように、精密な三次元構造の構築が可能であり、さらに、タンパク質の四次構造を有するオリゴマータンパク質のように、構造の階層的組織化が可能である。これらの構造上の特徴は、アミド基が平面構造をとり、アミド基を繋げる炭素との結合周りの二面角に制限があり、さらに、水素結合を主とする構造の安定化を考えることで、目的とする四次構造を有する材料を設計することを可能にしている。つまり、材料設計をアミノ酸の配列である一次構造に落とし込むことができる。

ペプチド材料では、多くのアミド基の空間配置や配向を精密に制御できることから、特に、アミド基に基づく機能材料開発に優位性があると考えられる。例えば、アミド基はダイポールを有しており、ダイポールを自発分極を示す様に配置することで焦電性材料へ展開できる。また、中心対称性のない配置にダイポールを配置すれば、圧電性材料となる。このようなエネルギー変換材料としてだけでなく、アミド基を一次元に並べると、電子ホッピングによる導電性を10 nmの長距離でも示すことが可能であり¹、アミド基のダイポールによる電子移動の加速（整流性）も起こる²。ヘリックスペプチドを介した電子移動では、電子のスピン選択の起こることも指摘されている³。トリリオンセンサーユニバースに向かう社会では、センサーやデバイスの微小化が必須であり、ペプチド材料はそれらの要求に応えるナノ材料として最も期待できると考えられる。

ヘリックスペプチドでは、分子内水素結合でアミド基がヘリックス軸方向に並んでおり、N端に正の部分電荷を有するマクロダイポールが発現する⁴。このようなマクロダイ

ポールは機能材料の構築に利用できると考えられ、我々は、環状 β -ペプチドがスタックした分子集合体であるペプチドナノチューブが同様のマクロダイポールを発現することに注目してきた⁵。また、環状ペプチドの環骨格のアミド基の配列制御に加えて、構成アミノ酸残基の側鎖の規則的配置を可能とする分子設計も確立し、幅広い機能を担うペプチドナノ材料の開発へ繋がりたいと考えている。

本稿では、環状ペプチドがペプチドナノチューブへと分子集合化する際に、側鎖官能基が規則的に並ぶための分子設計を二種類紹介し、ナノ材料としての電気的特性に触れる。

2. エチレンジアミン-コハク酸配列の挿入

環状トリ β -ペプチドとして、ナフチル β -アラニンと2個の β -アラニンで構成される環状ペプチドを考え、この環状ペプチドがスタックしたダイマーのエネルギーをDFT計算してみる。環状ペプチド間に3個の分子間水素結合が形成さ

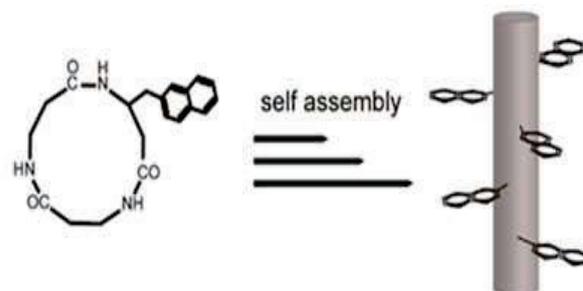


Fig.1 The schematic illustration of the peptide nanotube self-assembled by cyclic tri- β -peptide containing naphthyl β -alanine and two β -alanines. The naphthyl groups are arranged randomly.

れるダイマーがエネルギー的に安定であり、2個の環状ペプチドのナフチル基の配向が120度ずつずれた三種類の回転異性体がほぼ等エネルギーとなる。このダイマーにさらに環状ペプチドが次々とスタックすることでペプチドナノチューブへと成長していくことから、ペプチドナノチューブ上のナフチル基の配向はランダムとなる (Fig.1)。

一方、ナフチルβアラニンとエチレンジアミン-コハク酸配列で構成される環状ペプチドのダイマーについてエネルギー計算を行うと、三種類の回転異性体の中で、ナフチル基が重なるダイマーのみが、3個の分子内水素結合を形成して安定構造となる。従って、この環状ペプチドが分子集合化したペプチドナノチューブでは、ナフチル基が直線上に近い形状 (左巻らせん状) に並ぶ (Fig.2)⁶。

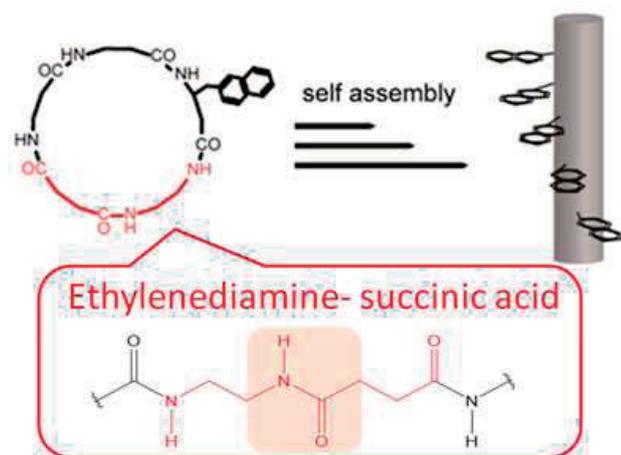


Fig.2 The schematic illustration of the peptide nanotube self-assembled by the cyclic peptide composed of naphthyl β-alanine and the sequence of ethylenediamine and succinic acid. The naphthyl groups are arranged in a left-handed helical way along the peptide nanotube axis.

3. αアミノ酸とβアミノ酸との組み合わせ

4個のβアラニンとD-α-アミノ酸およびL-α-アミノ酸とを組み合わせた環状ヘキサペプチドのダイマー構造を考えてみる⁷。α-アミノ酸のCβが、環骨格平面に対してアキシャル配向となると、環状ペプチドが分子間水素結合を形成してダイマーを形成する際、立体障害となりスタックを妨げる。これに対して、エクアトリアル配向で環状ペプチドがスタックできると立体障害を回避できる。2個のCβが共にエクアトリアル配向となるダイマー構造には、環状ペプチドが同じ向きでスタックした構造と、反転してスタックした構造の二種類があり、いずれの場合でも、二種類のα-アミノ酸がそれぞれ重なった配置となる。一方、4個のβアラニンと2個のD-α-アミノ酸、あるいは、4個のβアラニンと2個のL-α-アミノ酸とを組み合わせた環状ヘキサペプチドでは、6個の分子間水素結合が形成されるダイマー

構造には、必ずアキシャル配向となるCβが存在し、ダイマー構造が安定にならない。従って、4個のβアラニンとD-α-アミノ酸およびL-α-アミノ酸とを組み合わせた環状ヘキサペプチドを分子設計することで、二種類のα-アミノ酸に導入した官能基を、それぞれペプチドナノチューブの表面に、直線上に並べることができる (Fig.3)。

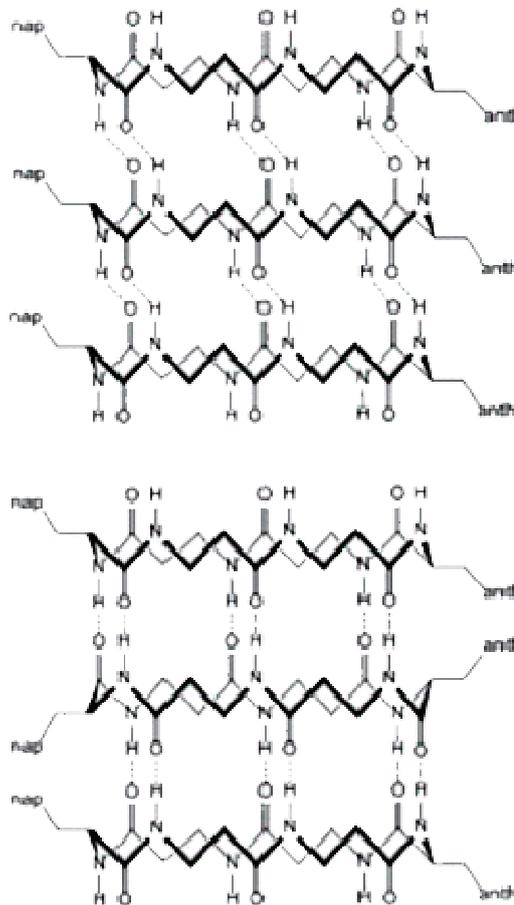


Fig.3 The molecular stacking modes of cyclic hexapeptide composed of four β-alanines and D-α-amino acid and L-α-amino acid. The cyclic peptides stack one over the other with keeping the same orientation of the cyclic ring (upper panel) and with flipping the orientation alternately (lower panel).

4. 基板上で垂直配向したペプチドナノチューブ

基板上でのペプチドナノチューブの配向と物性について、解析した。

Fig.4に示す様に、ペプチドナノチューブが金基板に垂直に近い配向で固定化できたとき、ペプチドナノチューブのマクロダイポールが垂直配向となり、自発分極が発生すると表面電位が観察される。しかしながら、マクロダイポールは、逆平行でならぶことによりエネルギー的に安定化するため、垂直配向をとったとしても自発分極の発生に繋がるわけではない。そこで、マクロダイポールの向きを揃え

るため、金基板表面に、水素結合が可能な幾つかの官能基を配置し、表面電位測定を行った。その中で、グアニジウム基が金基板表面にあると正の表面電位が観察され、ペプチドナノチューブのマクロダイポールの向きがある程度揃えられることが示された。この表面電位は温度変化を示し、焦電性ナノ材料であることがわかった。

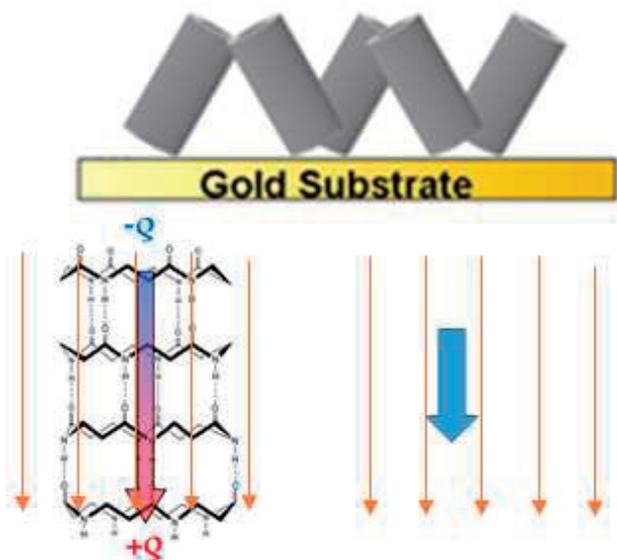


Fig.4 Schematic illustration of the peptide nanotubes standing up on a gold substrate. The lower panel shows the applied electric field designated by the thin arrows and the macrodipole of the peptide nanotube. The lower right panel shows no torque is generated on the macrodipole because of its parallel orientation with the applied electric field.

一方、金基板上に垂直配向したペプチドナノチューブの圧電性をPFMを用いて測定したところ、その圧電係数は、ポリフッ化ビニリデンなどと比べて低い値であることがわかった。これは、電場応答部位であるペプチドナノチューブのマクロダイポールの向きが、電場と平行であり、トルクが発生せず、構造変形が起こりにくいことが原因であると考えられる。

5. 基板上で平行配向したペプチドナノチューブ

ペプチドナノチューブを形成した分散液を金基板上にキャストすることで、金基板上に横たわったペプチドナノチューブを作製できる。ペプチドナノチューブのマクロダイポールは金基板表面と平行配向であることから、表面電位には殆ど寄与しない。しかしながら、マクロダイポールは印加電場と垂直配向となり、大きなトルクが発生する。このため、構造に中心対称性がなければ圧電性を示すナノ材料となる (Fig.5)。ナフトイルβアラニンと2個のβアラニンで構成される環状ペプチドとナフトイルβアラニンとエチレンジアミン-コハク酸配列で構成される環状ペプチド

を用いて、二種類のペプチドナノチューブを調製して圧電性を評価した。その結果、前者の方が高い圧電性を示すことがわかった。この違いは、ナフトイルβアラニンと2個のβアラニンで構成される環状ペプチドは、3本の連続する水素結合が同じ向きでペプチドナノチューブに存在するのに対し、ナフトイルβアラニンとエチレンジアミン-コハク酸配列で構成される環状ペプチドでは、連続する水素結合の1本が逆向きであるため、実質的に1本の連続する水素結合が存在するため、と考えられる。つまり、大きなマクロダイポールが存在すると電場に対する感受性も高くなり、圧電性が向上したと説明できる。

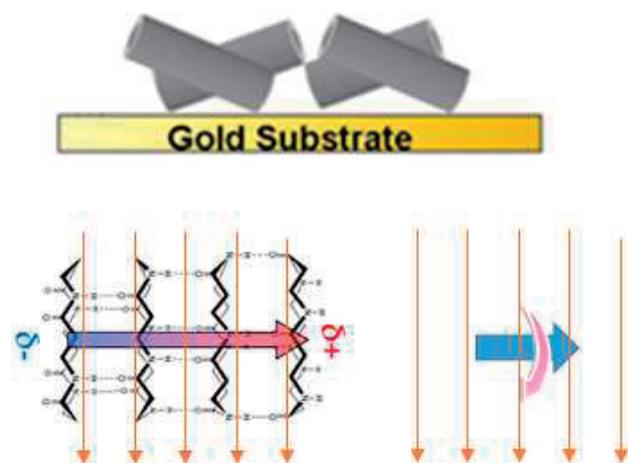


Fig.5 Schematic illustration of the peptide nanotubes lying flat on a gold substrate. The lower panel shows the applied electric field designated by the thin arrows and the macrodipole of the peptide nanotube. The lower right panel shows torque is generated on the macrodipole because of its perpendicular orientation to the applied electric field

6. フラビンを導入したペプチドナノチューブ

生体系での酸化還元反応に使われる官能基にフラビンがある。これを側鎖に導入したβアミノ酸を用いて二種類の環状ペプチドを合成した。一つは、2個のβアラニンと組み合わせた環状トリβペプチドで、他方はエチレンジアミン-コハク酸配列と組み合わせた環状ペプチドである (Fig.6)。

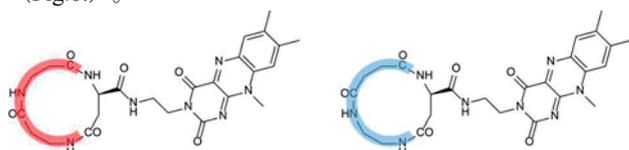


Fig.6 Molecular structures of cyclic peptides having a flavin group at the side chain. Combinations are with two β-alanines (left) and the ethylenediamine-succinic acid sequence (right).

いずれのペプチドナノチューブも圧電性は低い結果となった。しかしながら、金基板上でペプチドナノチューブを

熱アニールしたところ、エチレンジアミン-コハク酸配列を組み入れた環状ペプチドのナノチューブの圧電性が向上し、ポリフッ化ビニリデンより少し低い程度の圧電性を示した。フラビンのダイポールは、15 debyeと計算され、ペプチドナノチューブの電場応答部位として、エチレンジアミン-コハク酸配列を組み入れた環状ペプチドで構成されるペプチドナノチューブのマクロダイポール（実質的に1本の連続する水素結合）と匹敵する。フラビン官能基が左回りのヘリックス状に配置することで中心対称性が失われ、熱アニールにより、ペプチドナノチューブのバンドル構造が整うことで圧電性が向上したと考えられる。一方、2個のβアラニンと組み合わせた環状ペプチドで構成されるペプチドナノチューブでは、フラビン官能基の配置はランダムであり、熱アニールでも配置が整うことがなく、圧電性が変化しなかったと考えられる。

表面電位については、2個のβアラニンと組み合わせた環状ペプチドで構成されるペプチドナノチューブが、熱アニール後に、エチレンジアミン-コハク酸配列を組み入れた環状ペプチドのナノチューブよりも大きな正の表面電位を示した。ペプチドナノチューブは金表面に横たわっていることから、表面電位はフラビンのダイポールが配向したためと考えられる。2個のβアラニンと組み合わせた環状ペプチドのナノチューブでは、フラビンがランダムに表面に出ているにも拘わらず、金基板に垂直方向に自発分極が発生するのは、金基板表面の異方性環境が原因と考えられる。特に、ペプチドナノチューブのマクロダイポールと、金基板中に生じるミラーイメージダイポールとの相互作用が、フラビンの配向に異方性をもたらしたと考えられる。

7. 結語

ペプチドナノ材料では、材料を構成する多くのアミド基が、例えば、Fig.7のように規則正しく向きを揃えて並んでいる骨格を基に、構成アミノ酸残基の側鎖官能基の空間配置も精密制御され、様々な機能ナノ材料に展開されると期待される。

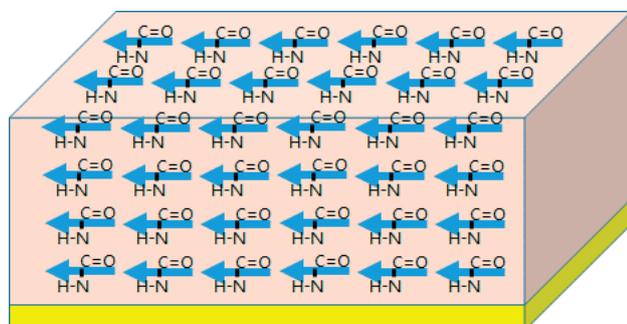


Fig.7 A schematic illustration of peptide nano-materials which have a basic structure of the regular alignment of amide bonds in the materials. Chromophores at the side chains are also precisely determined on the arrangement.

金基板に再近接で位置するペプチドナノチューブは、そのマクロダイポールと金基板中に発生するミラーイメージダイポールとの相互作用により、両者の距離が小さいほど安定化する。その安定化エネルギーは、ペプチドナノチューブを構成する環状ペプチド間の水素結合を切断するほどには大きくないが、側鎖官能基の配向を変化させるほどには十分な大きさである。このことが原因となって、側鎖がランダムに配向しているペプチドナノチューブについても、金基板垂直方向へのダイポールが形成され、表面電位の発生に繋がっていると考えられる。このように、数10 nm程度の厚みを有するペプチドナノ材料では、それ自身の構造に加えて、金基板との相互作用についても考慮する必要がある。

参考文献

1. Arikuma, Y.; Nakayama, H.; Morita, T.; Kimura, S., Electron Hopping over 100 angstrom Along an alpha Helix. *Angew Chem Int Edit* **2010**, *49* (10), 1800-1804.
2. Uji, H.; Morita, T.; Kimura, S., Molecular direction dependence of single-molecule conductance of a helical peptide in molecular junction. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, *15* (3), 757-760.
3. Tassinari, F.; Jayarathna, D. R.; Kantor-Uriel, N.; Davis, K. L.; Varade, V.; Achim, C.; Naaman, R., Chirality Dependent Charge Transfer Rate in Oligopeptides. *Adv Mater* **2018**, *30* (21), 1706423.
4. Hol, W. G. J., The Role of the Alpha-Helix Dipole in Protein Function and Structure. *Prog Biophys Mol Bio* **1985**, *45* (3), 149-195.
5. Kimura, S., Molecular dipole engineering: new aspects of molecular dipoles in molecular architecture and their functions. *Org Biomol Chem* **2008**, *6* (7), 1143-1148.
6. Tabata, Y.; Mitani, S.; Kimura, S., Peptide nanotube aligning side chains onto one side. *J Pept Sci* **2016**, *22* (6), 391-396.
7. Tabata, Y.; Uji, H.; Imai, T.; Kimura, S., Two One-Dimensional Arrays of Naphthyl and Anthryl Groups along Peptide Nanotube Prepared from Cyclic Peptide Comprising α - and β -Amino Acids. *Soft Matter* **2018**, *14*, 7597-7604.

ブレンド膜における共役高分子の電荷輸送特性の向上

Improved Charge Transport of Conjugated Polymers in Blend Films

大北 英生・入口 亮

Hideo OHKITA, Ryo IRIGUCHI

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Herein, we have studied hole transport properties in a conjugated polymer blended with an insulating polymer by measuring macroscopic and local current density–voltage (J – V) characteristics. More specifically, we employed a quinoxaline–thiophene-based conjugated polymer (PTQ1), a fullerene derivative (PCBM), and an insulating polystyrene (PS). For PTQ1/PCBM blend films, hole conductivity was improved with decreasing PTQ1 weight fractions down to 50 wt%. This is partly due to the improvement in mobility and partly due to the increase in the carrier density. For PTQ1/PS blend films, hole conductivity was improved with decreasing PTQ1 weight fractions down to 20 wt%. This is mainly due to the improvement in mobility because there is no change in the carrier density. With decreasing PTQ1 weight fractions, PTQ1/PS blend films exhibited narrower absorption bands and less excimer emissions. The activation energy for the hole conductivity is smaller in PTQ1/PS blend films than in PTQ1 neat films. These findings suggest that interchain interaction between PTQ1 chains is weakened in PTQ1/PS blend films. Our C-AFM study has shown that low conductive image is found in PTQ1 neat films while many highly conductive spots are separately found in PTQ1/PS blend films. We therefore conclude that PTQ1 chains are less likely to form trap sites because of dilution in the PS matrix and hence exhibit more conductive transport in PTQ1/PS blend films than in PTQ1 neat films. Such a dilution in amorphous polymers would be beneficial for flexible electronics based on highly crystalline conjugated polymers.

1. はじめに

共役高分子は、その優れた吸収・発光特性、電気伝導特性のため有機エレクトロニクスの基幹材料として、有機太陽電池、有機エレクトロルミネセンス、有機トランジスタなどへの応用が活発に研究されている。なかでも電気伝導特性はこれらに共通する最も重要な基本物性であり、古くから研究がなされているものの、未解明な部分もまだ多く残されている。電気伝導特性に関しては、主に高分子ニート膜について伝導機構に関する研究が展開されてきたが、有機太陽電池や有機エレクトロルミネセンスなどブレンド膜状態での電気伝導特性が重要となるケースも多い。特に、ブレンド膜での電荷輸送特性は、ニート膜の電荷輸送特性とは必ずしも一致しないので、相分離構造に由来する局所的な電気伝導物性の理解が求められている。

これまでにも正孔輸送性のドナー共役高分子と電子輸送性のフラレン誘導体のブレンド膜では、ニート膜とは異なる電荷輸送特性がいくつか報告されている。例えば、共役高分子であるポリパラフェニレンビニレン誘導体のMDMO-PPVとフラレン誘導体であるPCBMとのブレンド膜では、電子輸送性のPCBM組成が増えるにつれて、電子移動度と正孔移動度の両方がともに向上することが示されている¹⁾。MDMO-PPVのコンフォメーションがニート膜中とブレンド膜中で異なることが、正孔輸送特性の違いの要因であるとの解釈がなされた²⁾。その後、分光測定によりブレンド膜中の電荷キャリアを測定すると、正孔キャリアはMDMO-PPVからPCBMへ一部移動し、PCBMも正孔

輸送を担っていることが明らかにされた³⁾。MDMO-PPVのHOMO準位が比較的深く、不均一性のため準位に広がりをもっていることが要因の一つとして考えられる。最近の例では、ドナー性の共役高分子とアクセプター性のフラレン誘導体の二元ブレンド膜よりも、第三成分として新たなドナー性共役高分子を加えた三元ブレンド膜において電荷輸送特性が向上し、高い曲線因子を示すことが報告されている^{4,5)}。第三成分の共役高分子を加えることにより相分離構造が変化していると考えられるが、詳細な機構については未だ十分には理解されていない。

ブレンド膜における電気伝導特性を理解するには、空間的な不均一性を直接観測することが重要である。最近になり、導電性のカンチレバーを用いた電流計測原子間力顕微鏡(C-AFM)によって、局所的な電気伝導特性をマッピングすることが可能となり、空間的に不均一な電気伝導構造を可視化できるようになった。われわれの研究室でも、ポリチオフェンニート薄膜の熱処理前後での局所電気伝導特性やドナーポリマーとアクセプターポリマーのブレンド膜の局所電気伝導特性をC-AFMにより観測し、膜全体ではなく局所的に導電特性が向上することで、全体の伝導特性が改善していることをこれまでに明らかにしている^{6,7)}。

本研究では、非晶性のドナー性共役高分子であるキノキサリンとチオフェン骨格を主鎖に有するPTQ1 (図1a)に着目し、電子輸送性のPCBM (図1b) とのブレンド膜、絶縁体であるポリスチレンPS (図1c) とのブレンド膜における正孔輸送特性がブレンド組成に応じてどのような変化す

るかについて系統的に検討した。その結果、ニート膜に比べてブレンド膜中において正孔輸送特性が向上していることを明らかにした。

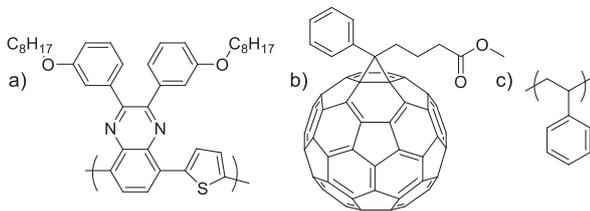


Figure 1. Chemical structures of materials employed in this study: a) PTQ1, b) PCBM, and c) PS.

2. マクロ電気伝導特性

2-1. PTQ1/PCBM膜

PTQ1/PCBMブレンド薄膜の正孔輸送特性は、図2aに示

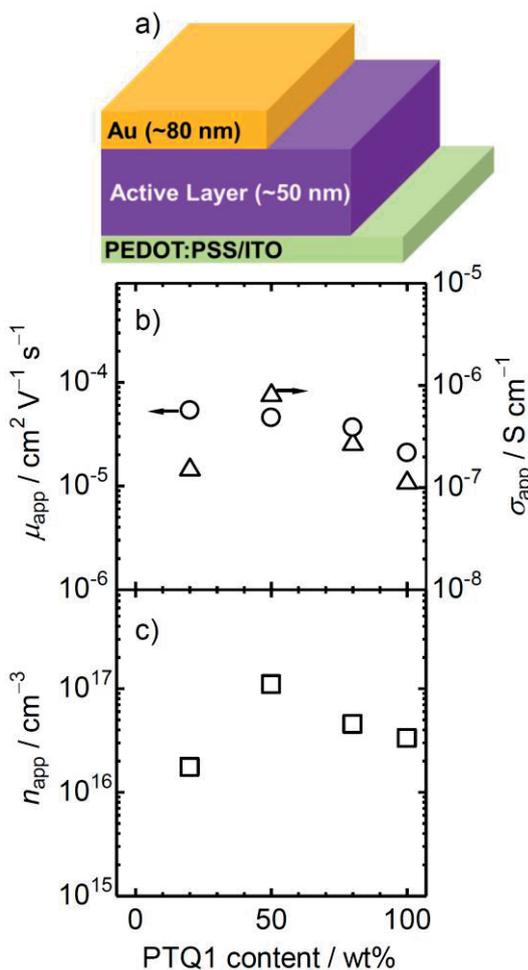


Figure 2. a) Hole-only device with a layered structure of ITO/PEDOT:PSS/Blend/Au, which is employed for macroscopic J - V measurements. b) Apparent mobility (left axis) and conductivity (right axis) and c) carrier density in PTQ1/PCBM blend films plotted against the weight fraction of PTQ1 in the blend. The mobility and conductivity were evaluated from macroscopic J - V characteristics of the hole-only device.

すように、透明導電膜であるPEDOT:PSSをコートしたITO基板と金電極により構成される素子を用いて評価した。このように仕事関数の大きな電極を用いることで、正孔キャリアのみの電気伝導特性を測定できる。低電圧印加条件では、電流密度 J と電圧 V は比例関係にあるオーミックな挙動を示し、膜厚 L を用いて傾きから電気伝導率 σ が評価できる。

$$J = \sigma \frac{V}{L} \quad (1)$$

一方、高電圧印加条件では、電流密度が電圧の二乗に比例する空間制限電流 (space-charge limited current: SCLC) が観測される。トラップが無視できる材料では、SCLC領域の電流密度 J と電圧 V は、Mott-Gurney式にしたがう。

$$J = \frac{9}{8} \epsilon_r \epsilon_0 \mu \frac{V^2}{L^3} \quad (2)$$

ϵ_0 は真空の誘電率、 ϵ_r は比誘電率であり、ここでは $\epsilon_r = 3$ とおいた。電流密度と電圧の両対数プロットにおいて傾きが2の直線領域の切片から移動度 μ が求められる。また、伝導率 σ は、キャリア濃度 n 、電気素量 e 、移動度 μ を用いて、 $\sigma = ne\mu$ と表されるので、式1および2により求めた伝導率 σ と移動度 μ からキャリア濃度 n が見積もられる。

ブレンド膜の見かけの伝導率 σ_{app} は、図2bに示すように、正孔輸送材料であるPTQ1組成が減少するにつれて増加していることが分かる。PTQ1ニート膜の伝導率が $\sim 10^{-7} \text{ S cm}^{-1}$ であるのに対して、PTQ1組成が50%のブレンド膜の伝導率が $\sim 10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ と一桁高い値を示すことが分かった。この値は、体積分率による補正を行っていない見かけの伝導率であり、実際には正孔輸送を担うPTQ1は全体積の半分しかないため、PTQ1ドメインでの伝導率はさらに高い値を示していると推察される。同様に、見かけの移動度 μ_{app} もPTQ1ニート膜よりもPTQ1組成が減少したブレンド膜中において増加する傾向を示しており、PTQ1ドメインでの移動度は見かけの増加以上に向上していると推察される。見かけの伝導率 σ_{app} と見かけの移動度 μ_{app} を用いて、見かけのキャリア濃度 n_{app} を算出すると、伝導率と類似の傾向を示したことから、伝導率の組成依存性は主にキャリア濃度変化に起因していると考えられる。ドナーであるPTQ1とアクセプターであるPCBMの組成が同じ50wt%の時に最大値を示していることから、基底状態で形成したCT錯体状態からキャリアが一部生成していることが考えられる。

2-2. PTQ1/PS膜

キャリア濃度の組成依存性の影響を排除するため、PCBMにかえて絶縁体であるPSとのブレンド膜を作製し、同様の実験を行った。その結果、PTQ1/PSブレンド膜の見かけの伝導率 σ_{app} は、図3aに示すように、正孔輸送材料であるPTQ1組成が減少するにつれて増加することが分かった。PTQ1ニート膜の伝導率が $\sim 10^{-7} \text{ S cm}^{-1}$ であるのに対して、PTQ1組成がわずかに20%のブレンド膜の伝導率は $\sim 10^{-6} \text{ S}$

cm^{-1} と一桁高い値を示すことが分かった。このブレンド膜中には正孔輸送を担うPTQ1は全体積のおよそ20%しかないため、PTQ1ドメインでの伝導率はかなり向上していると推察される。同様に、見かけの移動度 μ_{app} もPTQ1ニート膜よりもPTQ1組成が減少したブレンド膜中において緩やかに増加する傾向を示しており、PTQ1ドメインでの移動度もニート膜に比べて向上していると推察される。見かけの伝導率 σ_{app} と見かけの移動度 μ_{app} を用いて、見かけのキャリア濃度 n_{app} を算出すると、キャリア濃度は組成によらずほぼ一定であったことから、このブレンド膜ではCT錯体状態を経由したキャリア生成はほとんど生じていないことが分かる。すなわち、PSで希釈されたPTQ1ドメインでの伝導率ならびに移動度がニート膜よりもかなり向上していることを示しており、PTQ1鎖の凝集形態がニートとブレンド膜中で異なることを示唆している。

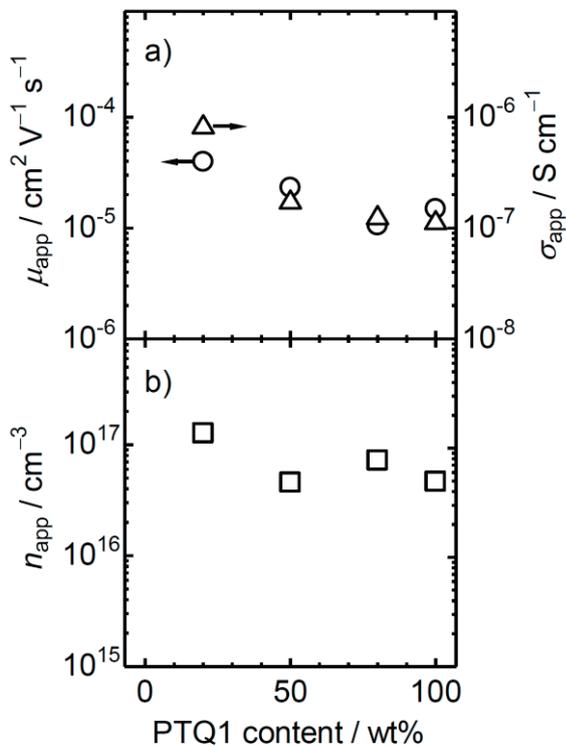


Figure 3. a) Apparent mobility (left axis) and conductivity (right axis) and b) carrier density in PTQ1/PS blend films plotted against the weight fraction of PTQ1 in the blend. The mobility and conductivity were evaluated from macroscopic J - V characteristics of the hole-only device.

3. PTQ1/PS膜の吸収・蛍光特性

3-1. 吸収・蛍光スペクトル

PS膜中にて希釈されたPTQ1鎖の凝集形態が組成によりどのように変化しているのかを検討するため、各組成のフィルムに対して吸収・蛍光スペクトルを測定した。破線は

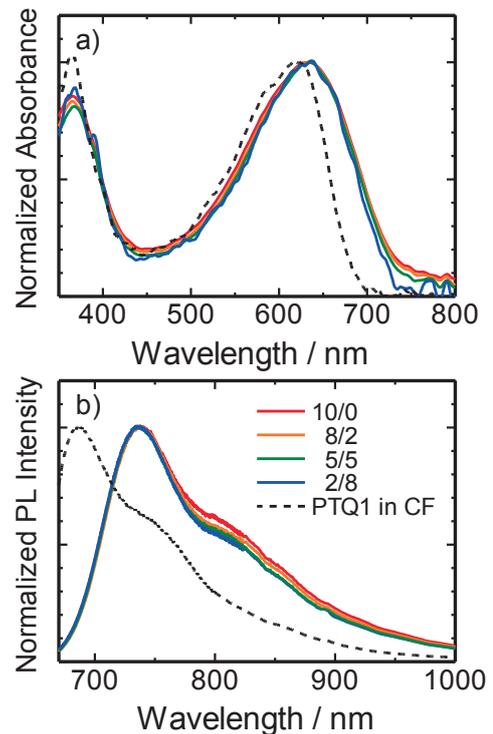


Figure 4. a) Absorption and b) photoluminescence (PL) spectra of PTQ1/PS blend films with different PTQ1 fractions: 100 wt% (red), 80 wt% (orange), 50 wt% (green), and 20 wt% (blue). The broken lines represent absorption and PL spectra of PTQ1 in chloroform solution.

クロロホルム溶液中におけるPTQ1の吸収・発光スペクトルであり、実線はフィルム中におけるPTQ1の吸収・発光スペクトルである。吸収スペクトルを比較すると、フィルムの吸収スペクトルは溶液中のスペクトルと比較すると、PTQ1組成の増加とともに、長波長シフトすると同時に吸収幅が広くブロードニングしていることが分かる。発光スペクトルを比較すると、フィルムの発光スペクトルは溶液中のスペクトルと比較すると、PTQ1組成の増加とともに、長波長シフトすると同時に800 nm付近のショルダーが増加していることが分かる。これらの結果はいずれも、PTQ1組成が増加するにつれて、分子間相互作用が増大していることを示唆している。特に、発光スペクトルに観測された800 nm付近のショルダーはエキシマー発光に由来すると考えられ、分子間でスタックした構造が形成していると予想される。

3-2. 時間分解蛍光スペクトル

発光スペクトルの800 nm付近に観測されたショルダーの帰属を行うため、時間分解蛍光スペクトルの測定を行った。測定に用いる試料には、スペクトルの差が最も顕著なPTQ1ニート膜とPTQ1の組成分率が20 wt%のPTQ1/PSブレ

ンド膜を選んだ。図5aに示すように、PTQ1ニート膜では励起直後には735 nm付近にピークを示す発光が観測され、時間経過とともに800 nm付近のショルダーに対応する発光が相対的に大きくなることから分かる。すなわち735 nm付近の発光と800 nm付近のショルダーは別の発光種に帰属される。前者をモノマー発光に、後者をエキシマー発光に帰属した。一方、図5bに示すように、PTQ1の組成分率が20 wt%のPTQ1/PSブレンド膜でも、励起直後には735 nm付近にピークを示す発光が観測されるが、時間経過とともに800 nm付近のショルダーに対応する発光の増大は、ニート膜ほど顕著ではなかった。この結果は、PS膜中に希釈されたPTQ1は、ニート膜に比べてエキシマー形成サイトが少ないことを示唆している。エキシマー形成サイトでは二量化により励起子が安定化するので、このようなサイトに正孔キャリアが存在すると、二量化によりダイマーカチオンを形成し、電荷に対するトラップサイトとして作用すると予想される。

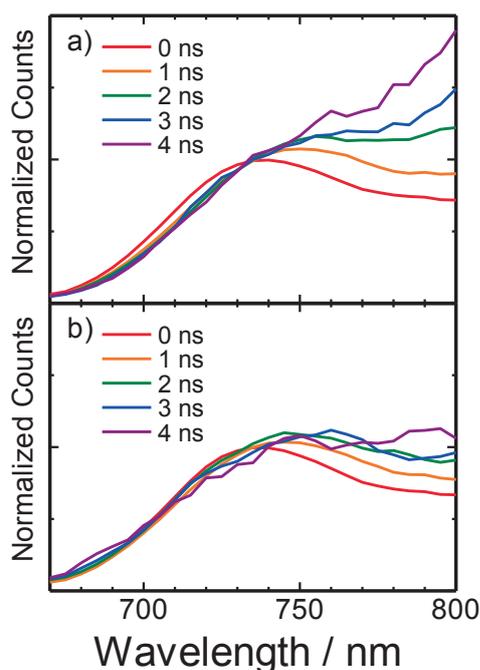


Figure 5. Time evolution of PL spectra for a) PTQ1 neat and b) PTQ1/PS blend films with a fraction of 20 wt% PTQ1 measured at 0 ns (red), 1 ns (orange), 2 ns (green), 3 ns (blue), and 4 ns (purple).

4. PTQ1/PS膜の伝導率の温度依存性

これまでの測定結果を総合すると、PS膜中に希釈されたPTQ1鎖は、ニート膜中に比べると、分子間相互作用が抑制されることでエキシマーなどのトラップサイトが減少していると考えられる。エキシマーサイトは電荷キャリア

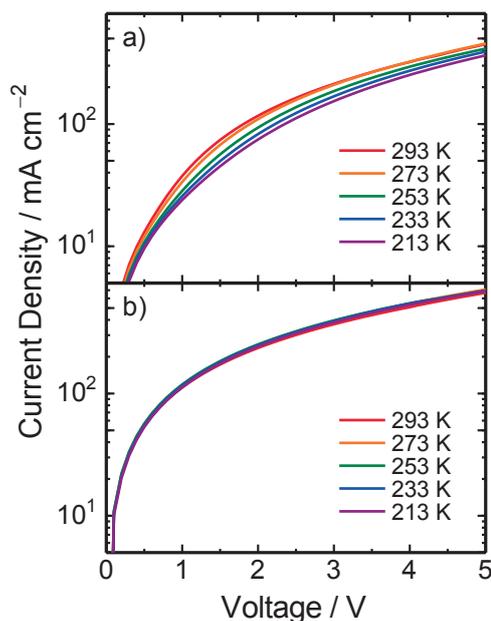


Figure 6. Temperature dependence of J - V characteristics for a) PTQ1 neat and b) PTQ1/PS blend films with a fraction of 20 wt% PTQ1 measured at 293 K (red), 273 K (orange), 253 K (green), 233 K (blue), and 213 K (purple).

に対してもトラップサイトとして作用しうるので、電荷輸送特性に影響を与えていると予想される。そこで、PTQ1ニート膜とPTQ1の組成分率が20 wt%のPTQ1/PSブレンド膜に対して、電流-電圧特性の温度依存性を測定し、伝導率の温度変化を比較した。図6に示すように、PTQ1ニート膜では電流-電圧特性に明確な温度依存性が見られたのに対して、PTQ1/PSブレンド膜では温度依存性がほとんど見られなかった。各温度での電流-電圧特性から見かけの伝導率を求め、温度の逆数に対してプロットしたところ、

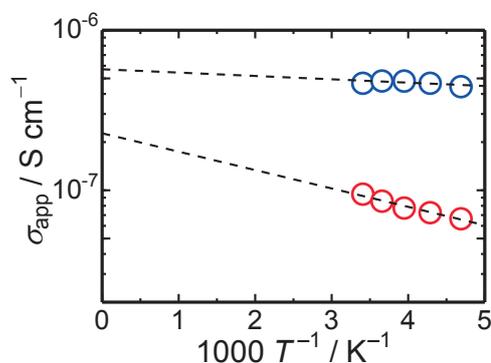


Figure 7. Arrhenius plots of apparent conductivity σ_{app} measured for PTQ1 neat (red) and PTQ1/PS blend (blue) films with a fraction of 20 wt% PTQ1. The broken lines represent fitting curves with the Arrhenius equation.

図7に示すように、アレニウス型の温度依存性を示した。傾きから活性化エネルギー E_a を評価すると、PTQ1ニート膜では23 meV、PTQ1/PSブレンド膜では4 meVとなり、ブレンド膜の電荷輸送に対する活性化エネルギーが小さいことが分かった。この結果は、PTQ1/PSブレンド膜においてトラップサイトが少ないこととも一致する。また、切片は両者で一致していないことから、伝導率の違いはトラップ深さや濃度のみによるものではなく、トラップフリーと見なせる十分高温域においてもPTQ1/PSブレンド膜におけるPTQ1の正孔輸送特性が高いことを示唆している。つまり、PTQ1鎖の凝集形態が異なり、ニート膜よりも電荷輸送特性の高い鎖形態をとっているものと推察される。

5. PTQ1/PS膜の電流計測AFM測定

PTQ1/PSブレンド膜におけるPTQ1ドメイン内での局所電気伝導を直接評価するために、電流計測原子間力顕微鏡(C-AFM)測定を行った。試料は平滑なITO基板上にスピ

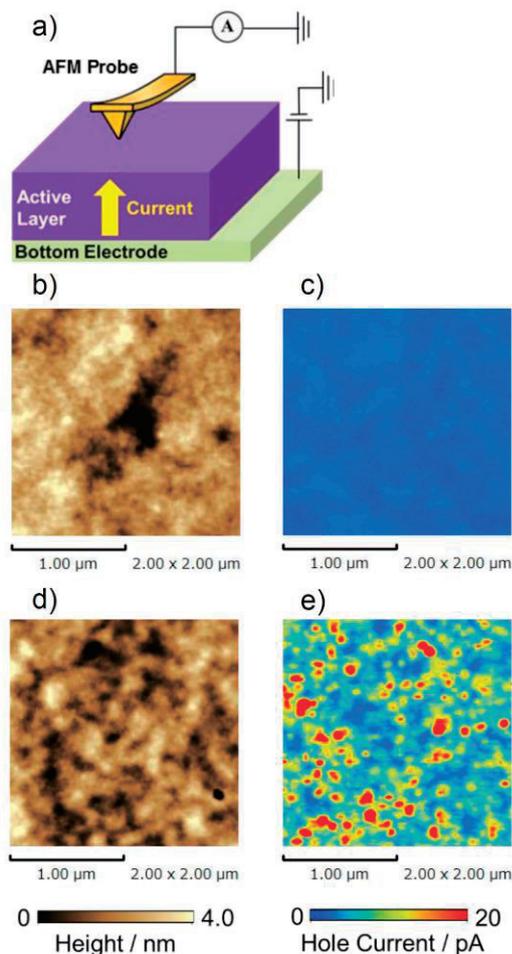


Figure 8. a) Hole-only device with a layered structure of ITO/Blend, which is employed for C-AFM measurements. AFM height images of b) PTQ1 neat and d) PTQ1/PS blend films with a fraction of 20 wt% PTQ1. C-AFM images of c) PTQ1 neat and e) PTQ1/PS blend films with a fraction of 20 wt% PTQ1.

ンコートにより製膜したものを使用した。この薄膜の局所電流を、金でコートした導電性プローブを用いて測定することで、AFM像と正孔電流に起因するC-AFM像を同時に観測することができる。測定結果を図8に示す。図8bと8cはPTQ1ニート膜のAFM像とC-AFM像をそれぞれ表し、図8dと8eはPTQ1/PSブレンド膜のAFM像とC-AFM像をそれぞれ表す。カラースケールは両者で共通である。AFM像では、PTQ1ニート膜に比べてPTQ1/PSブレンド膜において数百nmスケールの凹凸構造が観測されている。一方、C-AFM像では、同じカラースケールではPTQ1ニート膜では電流がほとんど観測されないのに対して、PTQ1/PSブレンド膜では局所的に高電導を示すドメインが観測された。AFM像での凹凸構造とC-AFM像での高電導ドメインには明瞭な相関が見られないことから、凹凸構造がPTQ1とPSドメインに必ずしも対応していないと考えられる。むしろ両者は分子レベルでよく混合している可能性が高い。以上のことをまとめると、PTQ1ニート膜では、分子間相互作用に由来するトラップサイトが多数形成されるため、伝導率の活性化エネルギーが大きく、室温では伝導率、移動度ともに低い値を示す。これに対して、PTQ1/PSブレンド膜ではPSと混合することにより、分子間相互作用が弱まりトラップサイトを形成しにくく、PTQ1鎖も電荷輸送に有利な形態をとっていると予想される。

まとめ

キノキサリンおよびチオフェンを主鎖骨格に有する非晶性の共役高分子PTQ1について正孔輸送特性を検討した。その結果、PTQ1ニート膜よりも絶縁体であるPSとのブレンド膜において、電気伝導率、移動度ともに向上することが分かった。吸収および発光スペクトルを比較すると、PSとの混合により希釈するにつれて、スペクトル幅は狭く、エキシマーに由来する発光成分が減少することが示された。この結果は、PSとの混合により分子間相互作用が小さくなることを示唆している。伝導率の温度依存性から活性化エネルギーを見積もると、PTQ1ニート膜では23 meV、PTQ1/PSブレンド膜では4 meVとなり、PSとの混合によりトラップサイトの形成が抑制されていること示している。C-AFMにより局所伝導特性をマッピングしたところ、PTQ1ニート膜では一様に低い電流しか示さないのに対して、PTQ1/PSブレンド膜では局所的に高い伝導性を示す領域が存在することが分かった。このような領域では、分子間相互作用が小さく電荷輸送に適した鎖形態をとっているものと推察される。

今回の実験より、ポリスチレンのような非晶性のポリマーマトリックスに導電性高分子を少量ブレンドしたフィルムにおいて、ニート膜よりも優れた電荷輸送特性を実現可能であることが実証された。一般に、高い電気伝導特性を示すには、高結晶性の共役高分子が用いられるが、これ

らは柔軟性に向けウェアラブル素子への応用が難しいと
考えられている⁸⁾。今回の研究成果を基に、高結晶性の共
役高分子と非晶性高分子とのブレンド膜について適切な
組合せを見出せば、高い電気伝導特性と柔軟性を両立した
膜を実現できると期待される。

謝辞

本研究は、入口亮君の修士課程での研究テーマとして取
り組んだ課題です。研究指導ならびにご議論いただいた伊
藤紳三郎先生（現京都大学名誉教授）、辨天宏明先生（現
奈良先端科学技術大学院大学准教授）に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) S. M. Tuladhar, D. Poplavskyy, S. A. Choulis, J. R. Durrant, D. D. C. Bradley, J. Nelson, *Adv. Funct. Mater.*, **15**, 1171 (2005).
- 2) C. Melzer, E. J. Koop, V. D. Mihailetschi, P. W. M. Blom, *Adv. Funct. Mater.*, **14**, 865 (2004).
- 3) S. Yamamoto, J. Guo, H. Ohkita, S. Ito, *Adv. Funct. Mater.*, **18**, 2555 (2008).
- 4) N. Gasparini, X. Jiao, T. Heumueller, D. Baran, G. J. Matt, S. Fladisscher, E. Spiecker, H. Ade, C. J. Brabec, T. Ameri, *Nat. Energy*, **1**, 16118 (2016).
- 5) H. D. Kim, R. Shimizu, H. Ohkita, *Chem. Lett.*, **47**, 1059 (2018).
- 6) M. Osaka, H. Benten, H. Ohkita, S. Ito, *Macromolecules*, **50**, 1618 (2017).
- 7) M. Osaka, D. Mori, H. Benten, H. Ogawa, H. Ohkita, S. Ito, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 15615 (2017).
- 8) G.-J. N. Wang, A. Gasperini, Z. Bao, *Adv. Electron. Mater.*, **4**, 1700429 (2018).

環状ブラシ状高分子の剛直性パラメータ

Stiffness Parameter of Ring-Shaped Brush-Like Polymer

月見亮介¹・中村 洋¹・高野敦志²・辻 陽介²・松下裕秀²
Ryosuke TSUKIMI,¹ Yo NAKAMURA,¹ Atsushi TAKANO,² Yosuke TSUJI,²
Yushu MATSUSHITA²

¹Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

²Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University

Three linear polyisoprene chains were grafted by polystyrene chains with degree of polymerization about 50 and 75 to make linear comb polymers and one ring polyisoprene chain grafted polystyrene chains with degree of polymerization about 55 to make ring comb polymer. The grafting ratio for all polymers were close each other. Light scattering measurements were made on toluene solutions of these samples to determine the mean-square radius of gyration (S^2) as functions of weight-average molecular weight. The $\langle S^2 \rangle$ data were analyzed with the aid of the theory for wormlike chain model. With the molecular weight per unit trunk chain calculated for a molecular model, the stiffness parameter λ^{-1} for each polymer was determined. The λ^{-1} for the linear comb polymer with the same side chain length as that of the ring comb polymer was estimated and found that λ^{-1} for the latter polymer was larger than that for the former polymer. The curvature of the ring comb polymer larger than that of the linear comb polymer was attributed to the origin of the higher stiffness parameter.

1. 序

最近、領木ら¹は直鎖および環状アミロースの各種誘導体を合成し、それらの溶液中における広がり、粒子散乱関数に関する研究をおこなった。その結果、いくつかの誘導体において、環状鎖の剛直性パラメータ λ^{-1} が直鎖に比べて小さくなることを示した。彼らはこれらの結果が、曲率の高い環状鎖において、アミロースのらせん構造に変化が生じることによるものと推測した。一方で、環状DNAや環状ポリスチレンなどについてはこのような現象は確認されていない。

辻ら²は環状ポリマーを合成し、ポリスチレン鎖をグラフト反応により結合することで、楕形の環状鎖を作成した。このような環状鎖の λ^{-1} が同じ構造をもつ直鎖と一致するかどうかを調べることは興味深い。そこで、本研究では近いグラフト率を持つ直鎖および環状の楕形高分子を合成し、それらの溶液中における広がりを測定することで、両者の剛直性パラメータを評価した。

2. 実験

ポリマー試料

環状の楕形高分子は環状ポリイソプレンにポリスチレン鎖をグラフト反応により結合することで合成した。まず、イソプレンを-78℃のTHF中で2官能性開始剤であるナフタレンカリウムを用いて重合した。モノマー消費後、1,1-diphenylethyleneユニットを挿入することで活性を落としたのち、1-[3-(3-chloropropyl)dimethylsilyl] phenyl-1-phenylethylene]と反応させることにより、両末端にdiphenylethylene (DPE)基を導入した。NMRによって主鎖構

造を調べたところ、1,2-, 3,4-, 1,4-結合の割合が36:60:4であった。このようにして得たポリマーの環化反応をジオキサン中でナフタレンカリウムと反応させることで行った。反応スキームをScheme 1に示す。得た生成物からサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) および相互作用クロマトグラフィー (IC) により分取し、環状ポリマーを単離した。単離物に対するICの結果より、環状鎖の純度が90%以上であることを確認した。得た環状ブタジエンの1,2-または3,4-結合部位にある二重結合にchlorodimethylsilaneをdichloro(1,5-cyclooctadiene) platinum(II)の存在下で反応させ、クロロシリル基を導入した。sec-butyllithiumを開始剤としてスチレンを重合して得たリビングポリスチレンを上で導入したクロロシリル基に反応させた。反応スキームをScheme 2に示す。生成物をSEC分取することで楕形の環状鎖を得た。これらの反応はすべて高真空化で行った。

環状楕形高分子とともに、環化反応せずに、ポリスチレンをグラフト反応により結合した直鎖状楕形高分子も合成した。幹鎖の長さが環状鎖とおなじものと約2倍のものを作成した。さらに、幹鎖の長さが環状鎖と同じで、側鎖長が約1.5倍の試料も作成した。

幹鎖、側鎖、楕形高分子の分子量はSEC-多角度光散乱測定により決定した。楕形高分子の幹鎖のモノマーユニット数に対する側鎖数の割合をグラフト率とし、これを各鎖の分子量から算出した。

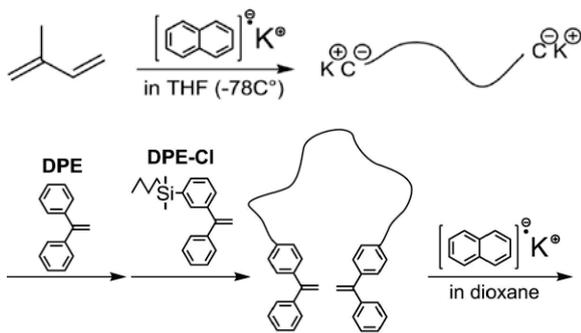
それぞれの高分子に対する、幹鎖、側鎖の分子量およびグラフト率をTable 1に示す。

測定

測定試料それぞれをトルエンに溶解し、多角度光散乱

(MALS) 検出器を用いて静的光散乱測定を行った。セルの温度調整が可能なWyatt 社製のDAWN EOS を用い、光源は波長690 nm の垂直偏光とした。各試料について、最大濃度約0.1 mg/ml として濃度既知の溶液を5 点調製した。孔径0.45 μm のテフロン製フィルタを通して溶液を測定セルに注入し、セル内を溶液で完全に置換して測定を行った。測定温度は25 $^{\circ}\text{C}$ とした。溶液と溶媒の散乱光強度の差から散乱角 θ における過剰還元散乱光強度 R_{θ} を決定し、Berry平方根プロットを用いて、重量平均分子量 M_w 、平均二乗回転半径を決定した。

Scheme 1. Synthesis of Ring Polyisoprene.



Scheme 2. Grafting Reaction to Polyisoprene.

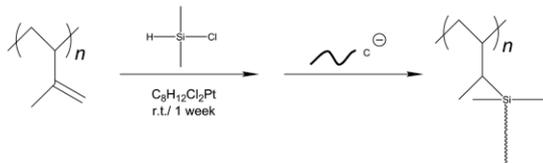


Table 1. Molecular weights of the components and the grafting ratio for the graft polymers.

Sample	trunk chain $10^{-4} M_w$	side chain $10^{-3} M_w$	grafting ratio (%)
R-g-S1 92k	9.2	5.8	40
L-g-S1 92k	9.2	5.2	43
L-g-S2 92k	9.2	7.8	45
L-g-S1 178k	17.8	5.2	38

3. 結果

Figure 1に各試料に対する $\langle S^2 \rangle$ の重量平均幹鎖重合度 N_w に対する両対数プロットを示す。白抜きの記号は環状楕円高分子に対するデータを、黒塗りの記号は直鎖楕円高分子に対するデータを示す。後者のうち、丸印は側鎖分子量が5,200のものに対するデータを、四角は側鎖分子量が7,800のものに対するデータを示す。幹鎖重合度が同じ3試料を比較すると、環状鎖の $\langle S^2 \rangle$ が一番小さく、直鎖については側鎖重合度が高くなるにしたがって $\langle S^2 \rangle$ が大きくなっている。幹鎖重合度、側鎖分子量ともに等しい環状楕円高分子の $\langle S^2 \rangle$ を直鎖の値で割ると0.71となった。これは、非摂動の環状高分子に対して知られている値³⁾0.5よりもはるかに大きくなった。

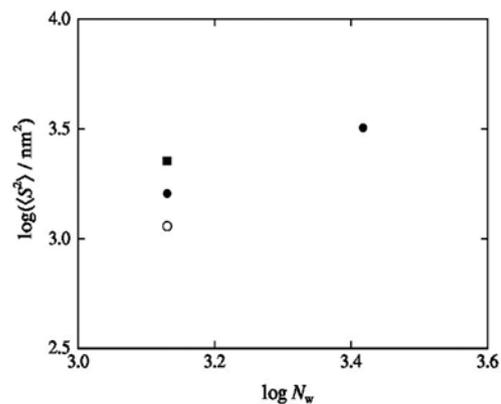


Figure 1 Mean-square radius of gyration for brush-like polymers plotted against the weight-average degree of polymerization of the trunk chain..

4. 考察

4-1. 直鎖楕円高分子の剛直性パラメータ

直鎖楕円高分子の $\langle S^2 \rangle$ に対するデータをみみず鎖モデルに対する次のBenoit-Dotyの式⁴⁾を用いて解析した。

$$\langle S^2 \rangle = \frac{L}{6\lambda} - \frac{1}{4\lambda^2} + \frac{1}{4\lambda^3 L} - \frac{1}{8\lambda^4 L} (1 - e^{-2\lambda L}) \quad (1)$$

式中で L は幹鎖の経路長を示す。 $\langle S^2 \rangle$ に対する太さの効果の寄与 $\langle S^2 \rangle_c$ は楕円高分子をシリンダーと考えると、その断面直径が d であるときに $d^2/8$ で与えられる。楕円高分子の断面の直径は側鎖が伸び切りコンフォメーション (ポリスチレン鎖においてはトランスジグザグ鎖) を取った時に最大値 d_{max} をとると考えられる。側鎖分子量より伸び切り鎖の両末端間距離を計算し、この2倍が d_{max} と等しいとすると、 $\langle S^2 \rangle_c$ の $\langle S^2 \rangle$ への寄与が3%以下であることがわかった。これを十分小さいとみなし、 $\langle S^2 \rangle$ に対する太さの効果は無視して解析した。

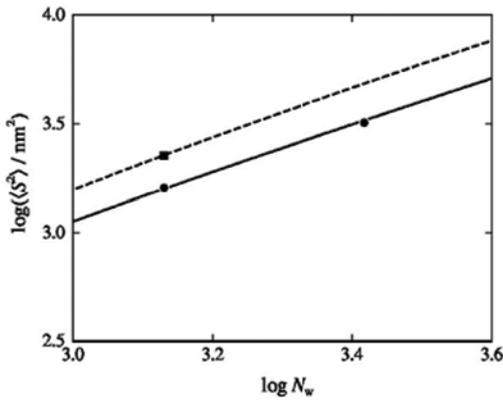


Figure 2 Mean-square radius of gyration for brush-like linear polymers plotted against the weight-average degree of polymerization of the trunk chain..

各櫛型高分子の L は幹鎖の繰り返し単位当たりの経路長 h と幹鎖の重合度との積から計算することができる。1,2-および3,4-結合に対する h を0,25 nm、1,4-結合に対しては0.44 nmと見積もった。これらは平面的なコンフォメーションを取った時のモデル値である。これらの値と、各結合の存在比より、 h の平均値0.26 nmを得た。これを N_w に掛けることにより L を求めた。式(1)において、 L が決まれば $\langle S^2 \rangle$ は λ^{-1} のみの関数となり、実験データに計算値をフィッティングすることにより λ^{-1} を決めることができる。

Figure 2に直鎖櫛形高分子の $\langle S^2 \rangle$ に対する式(1)を用いたフィッティングの結果を示す。破線が側鎖分子量7,800の試料のデータに対するフィッティングを実線が側鎖分子量5,200の使用のデータに対するフィッティングの結果であり、それぞれの試料に対する λ^{-1} を49 nmおよび32 nmと決定した。

求めた λ^{-1} より、各鎖に対する λL を計算すると、L-g-S2 92k, L-g-S1 92k, L-g-S1 178kに対する値はそれぞれ7.2, 11, 22となった。 λL が5を超えると $\langle S^2 \rangle$ に分子内排除体積効果の影響が現れることが知られているが、ここではその影響を無視した。

4-2. 直鎖櫛形高分子の剛直性パラメータ

みみず鎖モデルに基づけば、環状鎖の $\langle S^2 \rangle$ は次の様に表される⁵⁾。

$$\langle S^2 \rangle = \frac{(\lambda L)^2}{4\pi^2} \left[1 - 0.1140(\lambda L) - 0.0055258(\lambda L)^2 + 0.0022471(\lambda L)^3 - 0.00013155(\lambda L)^4 \right] \quad \text{for } \lambda L \leq 6$$

$$\langle S^2 \rangle = \frac{\lambda L}{12} \left[1 - \frac{7}{6\lambda L} - 0.025 \exp[-0.01(\lambda L)^2] \right] \quad \text{for } \lambda L > 6 \quad (2)$$

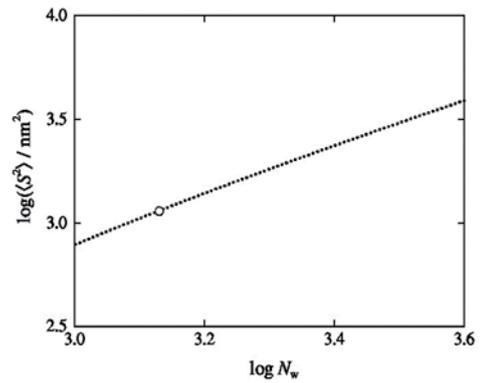


Figure 3 Mean-square radius of gyration for the brush-like ring polymer plotted against the weight-average degree of polymerization of the trunk chain..

Figure 3中の点線は環状櫛形高分子の $\langle S^2 \rangle$ に対する式(2)の計算値によるフィッティングの結果を示す。計算に用いたパラメータより、 λ^{-1} を51 nmと決定した。

このようにして求めた λ^{-1} を側鎖重合度 n に対してプロットしたものをFigure 4に示す。図中で黒丸が直鎖櫛形高分子に対する値を、白丸が環状櫛形高分子に対する値を示す。実線は直鎖櫛形高分子に対する2点を直線で結んだものである。この直線より環状櫛形高分子の n に対応する λ^{-1} を求めると36 nmとなった。環状櫛形高分子に対する値51 nmはこれよりはるかに大きく、環状櫛形高分子が同じ主鎖長の直鎖櫛形高分子に比べ堅いことを示す。これは、アミロース誘導体に対する領木らの結果とは異なる傾向となった。

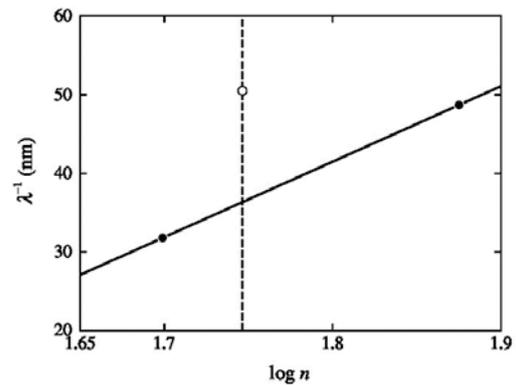


Figure 4 Stiffness parameter for brush-like polymers plotted against the weight-average degree of polymerization of the side chain..

みみず鎖の λ^{-1} は経路長 L の鎖を直線状態から曲率半径 R_c で曲げた時、1分子あたりの自由エネルギーの増分 ΔF を用いて次の式で与えられる。

$$\lambda^{-1} = 4R_c^2 \frac{\Delta F}{Lk_B T} \quad (3)$$

ここで、 k_B と T はそれぞれボルツマン定数と絶対温度を表す。 ΔF は R_c^{-1} のべき級数として、次の様に表されると考えられる。

$$\Delta F = \frac{C_1}{R_c^2} + \frac{C_2}{R_c^4} + \dots \quad (4)$$

ここで、 C_1 、 C_2 は定数である。細いワイヤのような分子の場合、 λ^{-1} は R_c に依らないと考えられ、 ΔF は右辺第一項のみで表されるが、ブラシ状高分子においては曲率が高くなればなるほど曲がった部分の内側の側鎖密度が増大し、 ΔF が非線形に増大することが考えられる。その様な場合、 C_2 は正となる。環状分子においては直鎖分子に比べて局所的に曲率が高いことが考えられ、それによって剛直性が高くなったと考えられる。

5. 結論

重合度の異なる2種の直鎖ポリイソプレンを用い、重合度の低いものについては重合度約50および75のポリスチレン鎖を、重合度の高いものについては重合度約50のポリスチレン鎖をグラフト反応により結合し、楕形高分子とした。すべての高分子のグラフト率はほぼ一定とした。さらに環状ポリイソプレンに重合度約55のポリスチレン鎖を結合し、環状楕形高分子とした。これらの高分子のトルエン溶液に対して光散乱測定をおこない、 M_w および $\langle S^2 \rangle$ を決定した。 $\langle S^2 \rangle$ のデータをみみず鎖モデルに基づく理論式を用いて解析し、それぞれの高分子の λ^{-1} を決定した。側鎖重合度の異なる2つの直鎖状楕形高分子に対する λ^{-1} を用いて、環状楕形高分子と同じ側鎖重合度を持つ高分子に対する λ^{-1} を内挿して求めた。その結果、環状楕形高分子の λ^{-1} が直鎖状楕形高分子の λ^{-1} に比べてはるかに大きいことがわかった。環状高分子は直鎖分子に比べて局所的に曲率が大きいと考えられ、このことによって環状高分子の λ^{-1} が直鎖高分子に比べて大きくなったと考えた。

参考文献

- 1) A. Ryoki, H. Yokobatake, H. Hasegawa, A. Takenaka, D. Ida, S. Kitamura, and K. Terao, *Macromolecules.*, **50**, 4000 (2017).
- 2) 辻陽介、高野敦志、永野修作、松下裕秀、高分子基礎物性研究会・高分子計算機科学研究会・高分子ナノテクノロジー研究会合同討論会要旨集、1 (2016).
- 3) B. H. Zimm and W. H. Stockmayer, *J. Chem. Phys.*, **17**, 1301 (1949).
- 4) H. Benoit and P. Doty, *J. Phys. Chem.*, **57**, 958 (1953).
- 5) J. Shimada and H. Yamakawa, *Biopolymers.*, **27**, 657 (1988).

反復凍結解凍法で作製したポリビニルアルコールゲルの力学特性

Mechanical Properties of Poly(vinyl alcohol) Gels Prepared by Repeated Freezing and Thawing Cycles

瀧川 敏算・堀中 順一・矢尾晃一

Toshikazu TAKIGAWA, Jun-ichi HORINAKA, Koichi YAO

Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Mechanical properties of poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogels were examined. Firstly, we prepared PVA hydrogels by modified the repeated freezing and thawing cycles, where we used an added salt to use the salting-out effect at low temperatures. We found that the salting-out effect successfully shortens the repeated cycles. PVA gels thus obtained were opaque so that the gels were easily squeezed by uniaxial compression, giving highly condensed gels. When the compressed gels were stretched the gels showed interesting mechanical behavior due to the anisotropy of the materials: Extension of the gels parallel to compression gives lower modulus than that perpendicular to compression. This originates from the difference in the Poisson ration of the gel material.

1. はじめに

固体試料を一軸圧縮すると、通常、試料は圧縮に垂直な方向には伸びる。しかし、中村らは円筒状のジェランハイドロゲルを軸方向に非常にゆっくりと圧縮すると、ゲルの直径がほぼ一定で圧縮が進行することを見出した¹⁾。これは、圧縮によりゲル中の溶媒がゲル外に排出されるからであるが、このような現象は”均一な高分子ゲル”と”汎用引張試験機”の組み合わせではそう簡単には起こらない。溶媒をゲル外に排出され易くするには、ゲルを不均一にすればよい。

ポリビニルアルコール (PVA) 水溶液は、凍結・解凍を繰り返すとゲル化することが知られている²⁾。このゲルの作製法は、現在では反復凍結・解凍法とよばれている。この方法により得られたゲルは白濁はしているものの優れた力学特性を示す。また、このゲルは不均一ゲルなので、一軸圧縮すると溶媒は容易に外に排出されると考えられる。

本研究では、凍結解凍サイクルでのPVAのゲル化に塩析効果を活用し、ゲル化サイクルの短縮を試みる。また、PVAハイドロゲルを汎用引張試験機を用いてうまく圧縮できるかどうかについても調べる。圧縮することで得られるゲルは力学的異方性を示すことになる。この力学的異方性について詳細に調べることも目的とする。

2. 実験

実験に用いたPVAは市販品 (VM-17, 日本酢ビ・ポパール (株)) であり、その重合度とケン化度は各々、1700および95~97mol%である。溶媒には蒸留水 (Wako) を、添加塩には、 K_2CO_3 (Wako) を用いた。PVAハイドロゲルは反復凍結・解凍法により作製した。最初にPVA水溶液を

95°Cで作製した。このPVA溶液に、事前に作製しておいた K_2CO_3 水溶液を加えて、所定の添加塩濃度 (c_s) のプレゲル溶液を調整した。 c_s は0~4wt%としたが、PVA濃度 (c) はいつも10wt%とした。

ゲルの作製には2種類の金型を使用した。1つは円筒形のゲル (直径と高さは共に10mm) を、他のものはシート状 (厚さは5mm) あるいは立方体 (一辺の長さが10cm) のゲルを作製するためのものである。プレゲル溶液を流し込んだ金型は-25°Cの冷凍庫で10時間冷却した後、室温で2時間静置して解凍した。この冷凍・解凍サイクルを3回繰り返すことでPVAゲルを作製した。

最適な c_s を決めるため、一定荷重下でのクリープ (スクリュー) テストを行った。実験には円筒状の試料を用い、129gの荷重を加えた。荷重印加後6時間経過したときのゲルの直径 (d) と高さ (h) を測定した。最適 c_s 決定後の詳細なクリープテストでは印加荷重は39gとした。各クリープ挙動はビデオカメラとDVDレコーダーを用いて録画し解析を行った。

力学試験用の濃縮ゲル試料 (c は約50wt%) は2種類の方法で作製した。1つは空気中での自然乾燥により作製したもので、以降これをiso-gelとよぶ。他方は立方体試料を二軸拘束一軸圧縮により濃縮したものである。以降、このゲルをcomp-gelとよぶ。これらの濃縮ゲルの力学試験にはテンシロンRTM-500 (Orientec) を用い、空気中で10mm/minの速度で伸長した。comp-gelについては、圧縮方向と同じ方向に伸長した試料をcomp-gel(//)とよび、圧縮方向と垂直な方向に伸長した試料のコードはcomp-gel(⊥)とした。

3. 結果と考察

Table 1は最適な c_s を決めるために行ったクリープテストの結果をまとめたものである。サンプルコード中の3桁の数字のうち、左からの2桁の数字は c (wt%) を、右端の数字は c_s (wt%) を表している。また、 w/w_0 と d/d_0 は、クリープ（クリープ時間は6時間）によるゲルの重量 (w) と d の相対変化量である。ここで、 w_0 と d_0 は、それぞれ w と d の初期値（荷重印加前の値）を表している。重量に関してはいずれの場合もクリープにより減少することがわかる。また、減少の程度は c_s の増加と共に大きくなっている。一方、直径に関しては、PVA104以外はどれも増加しているが、この増加は荷重印加による弾性変形に起因している。

Sample Code	w/w_0	d/d_0
PVA101	0.035	0.16
PVA102	0.045	0.11
PVA103	0.17	0.020
PVA104	0.24	0.10

Table 1 Sample code, change in weight ($\Delta w/w_0$) and change in diameter ($\Delta d/d_0$) by creep.

PVA104では、クリープ中に溶媒がゲル外に流出することにより重量だけでなく、直径にも溶媒流出の影響が現れている。この実験より、クリープ中に直径の変化が最も少なく、重量の変化も比較的少ない $c_s=3\text{wt}\%$ をクリープ実験の最適塩濃度とした。

Fig. 1は $c_s=3\text{wt}\%$ でのクリープ挙動を長時間にわたり詳細に調べた結果である。ここで、 h_∞ は長時間経過後の h の一定値である。図からわかるように、 h の時間 (t) 変化は以下の指数関数

$$- \quad (1)$$

でうまく記述できることがわかる。ここで、 h は定数で、このクリープ実験では $(\Delta h+h_\infty)$ が荷重印加前の h にほぼ等しくなっている。また、遅延時間 τ は、 $\tau=7.0 \times 10^3 \text{s}$ となった。

Fig. 2は濃縮PVAゲル試料の工学応力 (σ) 対伸長比 (λ) 曲線をまとめたものである。iso-gelの曲線は2種類のcomp-gelの曲線とは異なり、降伏挙動が明確に現れている。これは、comp-gelでは試料作製のための圧縮過程でゲル中の構造が破壊されるのに対し、自然乾燥により濃縮されるiso-gelでは構造が壊れることがないためである。iso-gelの曲線の応力レベルが極端に高いのもこれと関係しているものと思われる。Fig. 3に応力比 ($\sigma_\perp/\sigma_\parallel$) を λ に対してプロットした結果を示す。ここで、 σ_\perp はcomp-gel(\perp)の σ であり、 σ_\parallel はcomp-gel(\parallel)の σ である。 λ の小さいところでは応力比がほぼ一定になっていることがわかる。この一定値は約1.8

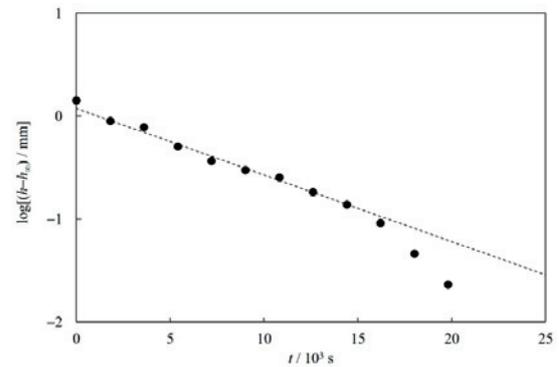


Fig. 1 Semi-logarithmic plot of $(h - h_\infty)$ vs τ .

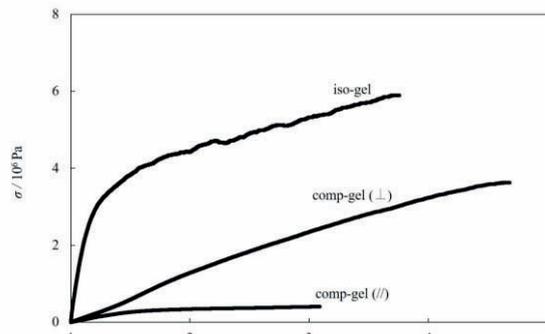


Fig. 2 Stress (σ) plotted against stretch ratio (λ) for iso-gel, comp-gel(\parallel) and comp-gel(\perp).

であり、これは2つの試料のヤング率の比に対応している。これは、 λ の小さい領域 (λ が1に近い領域) では、 $\sigma_\parallel = E_\parallel(\lambda - 1)$, $\sigma_\perp = E_\perp(\lambda - 1)$ が成り立つので、 $\sigma_\perp/\sigma_\parallel = E_\perp/E_\parallel \approx 1.8$ となるからである。このヤング率の差異についてはまだ明確にはなっていないが、ポアソン比の異方性に起因しているのかもしれない。

一軸性材料では、圧縮方向と同じ方向に伸長したときに

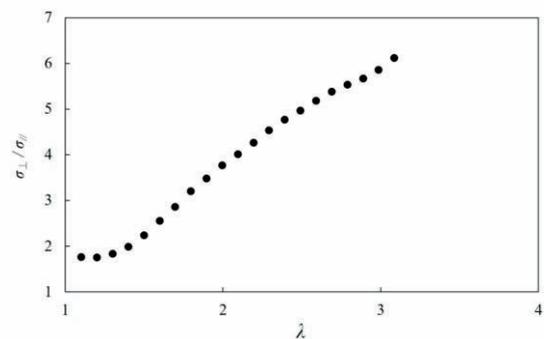


Fig. 3 Stress ratio ($\sigma_\perp/\sigma_\parallel$) plotted against stretch ratio (λ).

得られるポアソン比を $\mu_{//}$ 、それと垂直な方向に伸長したときに得られるポアソン比を μ_{\perp} とすると

$$\frac{\mu_{\perp}}{E_{\perp}} = \frac{\mu_{//}}{E_{//}} \quad (2)$$

という関係がある³⁾。これから、**comp-gel(//)**の低いヤング率は、平行方向のポアソン比が垂直方向のそれよりも低いこと（つまり、 $\mu_{//} < \mu_{\perp}$ ）に起因していることがわかる。試料の圧縮により形成された多孔質構造は圧縮方向に広がっている。この構造体を圧縮と平行な方向に伸長すると広がった構造体を元に戻すような構造変化が起こらなければならない。しかしながら、このような変化は容易ではないため $\mu_{//}$ が低い値にとどまるのであろう。

参考文献

- 1) K. Nakamura, E. Shinoda, M. Tokita, *Food Hydrocolloids*, **15**, 247 (2001).
- 2) M. Watase, K. Nishinari, M. Nambu, *Cryo. Lett.*, **4**, 197 (1983).
- 3) K. Terzaghi, *Erdbaumechanik auf Bodenphysikalischer Grundlage*, Franz Deuticke, Leipzig-Vienna (1925).

プロテオリポソーム工学とバイオ応用

Proteoliposome Engineering for Bio-applications

秋吉 一成・安藤 満・佐々木 善浩

Kazunari AKIYOSHI, Mitsuru ANDO, Yoshihiro SASAKI

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Membrane proteins play central roles in various superior functions of biological membranes. Recently, medicines targeting the membrane proteins have been extensively studied. However, misfolding and aggregation of membrane proteins induced by their own hydrophobic surfaces have hampered the advance of their research. Developments of chaperoning function of efficient reconstitution of membrane proteins into liposomes as active forms are important issues. We report here recent studies of proteoliposome engineering to apply membrane proteins as new nanodevices to nanomedicine such as drug delivery system and bioanalysis.

1. はじめに

生体膜は、細胞内外、あるいは、ミトコンドリアやリソソームなどの細胞小器官と細胞質を隔てる機能性ナノ薄膜である。その構成成分は、生物種やその器官によって異なるが、リン脂質、糖脂質、コレステロール、タンパク質などであり、それらの自己組織化により脂質二重層を基本とする膜構造を形成している。生体膜の機能は単に内外を物理的な境界線で区別するだけでなく、構成される各区内で選択的物質輸送、エネルギー産生、シグナル伝達、物質代謝など様々な機能を示す場としての役割を担っている。膜タンパク質の機能異常は細胞の恒常性の崩壊を引き起こし、疾患へと繋がることから、現在上市されている医薬品の半数以上が膜タンパク質を標的としたものである。膜タンパク質の構造と機能に関する研究は、生物学的に重要であるとともに、疾患、創薬と治療、さらに、様々な機能を有する分子ナノデバイスとしての工学的利用など幅広い分野で盛んに行われている。

膜タンパク質は生体膜の二分子膜中に配向、集積制御されて機能を発揮するので、一般に脂質小胞体ベシクルであるリポソームに再構成することで機能評価が行われている。しかし、疎水性が高いために凝集しやすく、正しいフォールディングや単離精製の困難さとリポソームへの再構成率の低さなど課題も残されている。そのため、水溶性タンパク質と比べ研究が遅れているのが現状である。我々は、これらの問題解決のために、リポソーム存在下で無細胞膜タンパク質合成を行うことで、合成された膜タンパク質を自発的にリポソーム膜に組み込むリポソームシャペロン法（人工細胞法）を開発してきた。

2. リポソームシャペロン法を用いた膜タンパク質組み込みプロテオリポソーム構築法

近年、細胞内のタンパク質合成システムを抽出、精製し、望みのタンパク質の遺伝子を遺伝子工学により調製して、その抽出系に添加することで、試験管内でタンパク質を自在に

作り出せるようになってきた。この無細胞タンパク質合成系を用いて、多くの水溶性タンパク質の合成がなされてきたが、膜タンパク質の合成の報告は限られてきた。その理由は、先にも述べたように膜タンパク質は疎水性が高く容易に凝集してしまうからである。

生体系では、膜タンパク質合成と同時に小胞体の二分子膜中に組み込むという戦略を取っている。例えば、合成装置であるリボゾームが小胞体近傍に運ばれて合成を開始し、新生膜タンパク質は翻訳と同時に小胞体膜への組み込みが行われ、凝集の抑制とフォールディング制御が行われている。脂質二分子膜がタンパク質構造形成に関する分子シャペロンとして働いている。我々は、この生体システムに倣って、リポソームをシャペロンとして、無細胞タンパク質合成を開始することで、新生膜タンパク質が脂質二重膜に直接組み込まれる手法を開発した。(Fig. 1)

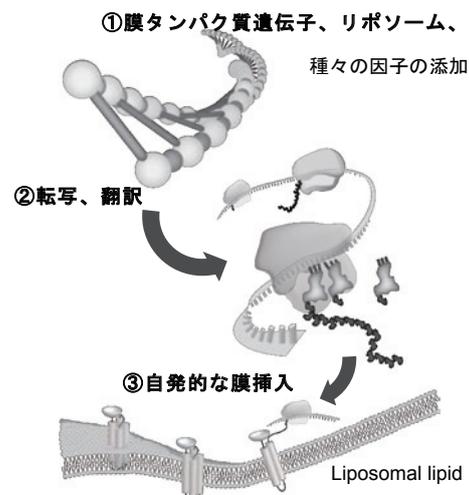


Fig. 1 Preparation of proteoliposome by using cell-free protein translation system under the coexistence of liposome.

我々は、まず小麦胚芽無細胞タンパク質合成系において、リポソームシャペロン法の有用性を示す実験を2002年から開始した。蛍光性タンパク質であるGFPを結合した1回膜貫通のアポチトクロームb5の遺伝子プラスミドを調製し、細胞サイズのジャイアントリポソーム存在下で、膜タンパク質合成を行った。共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察を行ったとこと、合成された膜タンパク質の蛍光がジャイアントリポソームの膜上に観察され、チトクロームb5が合成されるにつれてリポソーム上に組み込まれることを明らかにした。¹⁾さらに、このチトクロームb5を疎水性タグとして用い、酵素（ジヒドロ葉酸レグターゼ(DHFR))を融合することで、リポソーム表面に酵素を提示しえることを示し、リポソームを用いたマイクロリアクターとしての応用の可能性を示した。

次に、ウサギ網状赤血球無細胞タンパク質合成系やPUREシステム無細胞タンパク質合成系を用いて、細胞間でギャップジャンクション(GJ)と呼ばれるチャネルを形成する四回膜貫通型膜タンパク質であるコネキシン(Cx)43のリポソームへの組み込みに成功した。^{2,3)}このCx43提示プロテオリポソームをCx43発現細胞に添加したところ、GJを介した蛍光物質やペプチド輸送が認められ、細胞質へ直接薬物を送達するドラッグデリバリーシステムとして機能し得ることが明らかになった。³⁾

3. 人工細胞法によるイオンチャネルプロテオリポソームの構築と機能解析

イオンチャネルの一種であるカリウムチャネルはカリウムを選択的に通過させることで細胞内外のカリウム濃度を調整している。その機能は細胞種によって異なり、神経細胞の活動電位の調整、心筋細胞での細胞間同調、また、膵β細胞におけるインスリン分泌など様々な生理現象と密な関係にある。そのことから、カリウムチャネルの構造・機能解析は生命現象の理解、カリウムチャネルに対する創薬開発に有益な情報をもたらすものと考えられる。放射菌 *Streptomyces Lividans* のカリウムチャネルであるKcsAは、二つの膜貫通ドメインを持ち、4量体を形成することでチャネルとして機能することが知られており、カリウムチャネルのモデル膜タンパク質として広く研究されている。リポソーム/無細胞膜タンパク質合成システムの汎用性と有用性を調べる目的で、KcsAプロテオリポソームの調製におけるリポソームのシャペロン様活性評価、KcsAプロテオリポソームの機能を電気生理学的計測により評価した。

N末端にHisタグを融合したN-His KcsA発現プラスミドDNAを構築し、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) リポソーム存在下、あるいは非存在下で37°C無細胞膜タンパク質合成を行った。プロテオリポソームの精製は、超遠心分離後の上清分画を回収することで行った。リポソームへの組込み効率、KcsAの4量体形成を評価することで、リポソームのシャペロン様活性を評価した。KcsAプロテオリポ

ソームを脂質平面膜に融合し、脂質平面膜法を用いて、KcsAの電位依存性、pH依存性を評価した。

DOPCリポソーム添加、あるいは、無添加の条件で無細胞膜タンパク質合成を行った結果、リポソーム無添加の系においては発現したKcsAは全て凝集沈殿したのに対し、リポソームを添加した系においては上清分画にKcsAの存在が認められた。このことから、発現したKcsAは自発的にリポソームに組込まれたと考えられる。また、リポソームの添加によってKcsAの合成量が増大することが明らかとなった。(Fig. 2)

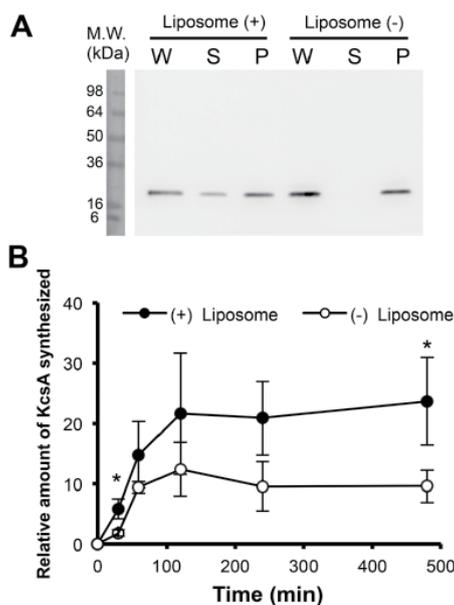


Fig. 2 Western blot analysis of KcsA protein expression after ultracentrifugation. (A) Cell-free protein synthesis was performed in the presence or absence of liposomes. The expressed whole sample (W) was ultracentrifuged and the supernatants (S) and pellets (P) were collected. (B) Time-course of KcsA synthesis in the presence or absence of DOPC liposomes.

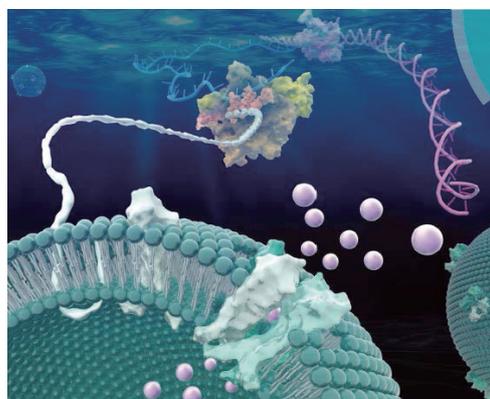


Fig. 3 Schematic illustration of preparation of proteoliposome by artificial cell system.

沈殿分画に存在するKcsAは2量体、3量体といった不完全な構造体しか形成できないのに対し、上清分画に存在するKcsAは4量体を形成することも明らかとなった。これらの結果は、リポソームのシャペロン様活性によって自発的に組み込まれたKcsAが正確な立体構造を取り、リポソーム膜上を水平拡散することで4量体形成を促進したと考えられる。(Fig. 3) また、脂質平面膜法を用いて電気生理学的評価を行った結果、負電荷に応答したチャネルの開口、また、酸性条件に応答したチャネル開口が認められた (Fig. 4)。これらの結果より、リポソーム/無細胞膜タンパク質合成システムを用いて調製したKcsAプロテオリポソームはKcsA特有の電位依存性、pH依存性を有することが明らかとなった。

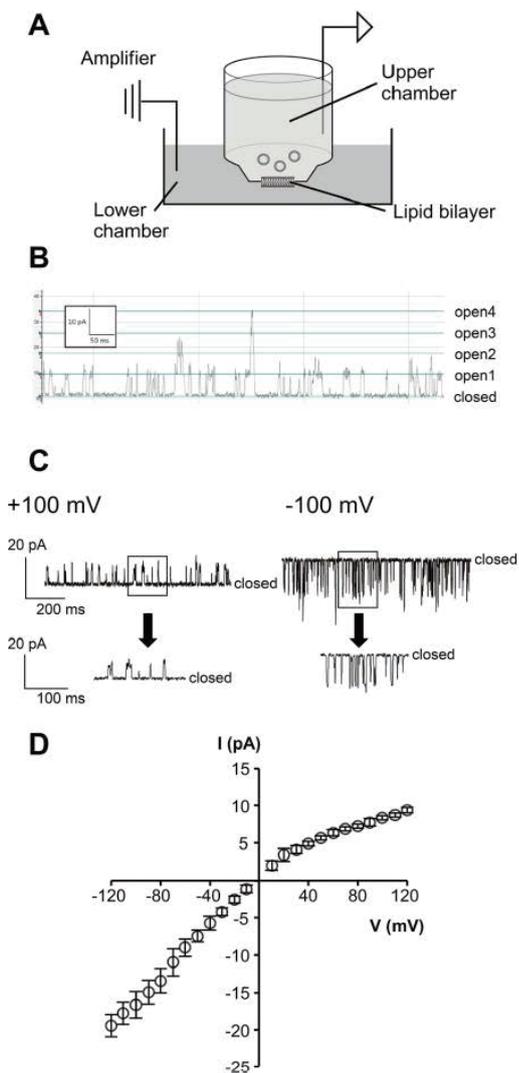


Fig. 4 Voltage dependence of KcsA channel activities. (A) Schematic illustration of the lipid bilayer method (B) Multiple channel analysis (C) The currents were recorded by the lipid bilayer method at +100 mV or -100 mV under symmetric pH conditions (D) Singlechannel I-V plots were calculated.

4. 合成膜タンパク質のリポソームへのソーティング技術の開発

生体系では、膜タンパク質の膜小胞への組み込みを補助する機構としてシグナルペプチド (SP)、シグナル認識粒子 (SRP) とその受容体 (SR)、トランスロコンを利用するSP-SRP経路が広く知られている。我々が開発した無細胞膜タンパク質合成/リポソームシステムでは、疎水性の膜タンパク質ペプチド鎖が、疎水性二子膜に疎水的相互作用により、自発的に取り込まれる特性を利用したものであり、SP-SRP経路のような積極的な膜タンパク質のソーティング制御は行われていない。したがって、膜タンパク質のソーティング制御可能な因子を無細胞膜タンパク質合成/リポソームシステムに導入することで、より効率よくプロテオリポソームの調製が可能になると考えられる。そこで、人工的にSP-SRP経路を模倣した手法として、ヒスチジンタグとNi²⁺とのキレート形成能を利用する方法を考案した。先にも述べた四回膜貫通型膜タンパク質であるコネキシン43 (Cx43) にヒスチジンタグを融合したNHis-Cx43膜タンパク質の設計、および、脂質頭部にNiを有するリン脂質 (Ni脂質) を含有したリポソームを調製することで人工SP-SRP経路を構築した。

Ni脂質を含有していないリポソームを用いた場合にはNHis-Cx43の組み込み効率は非常に低いものであったが、リポソームのNi脂質含有量依存的にNHis-Cx43の組み込み効率の増大が認められ、このような増大はヒスチジンタグを融合していないCx43では認められなかった。(Fig. 5)

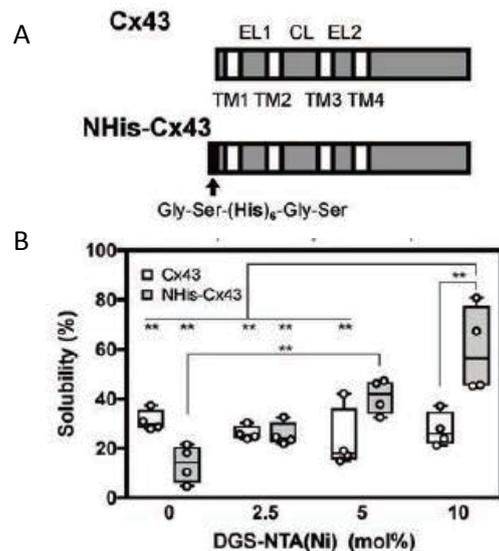


Fig. 5 (A) Schematic illustration of Cx43 and NHis-Cx43 genes. EL, CL, and TM represent extracellular loop, cytoplasmic loop, and transmembrane, respectively. (B) Solubility of Cx43 and NHis-Cx43 in the presence of nickel-chelating liposomes

Cell-free membrane protein synthesis

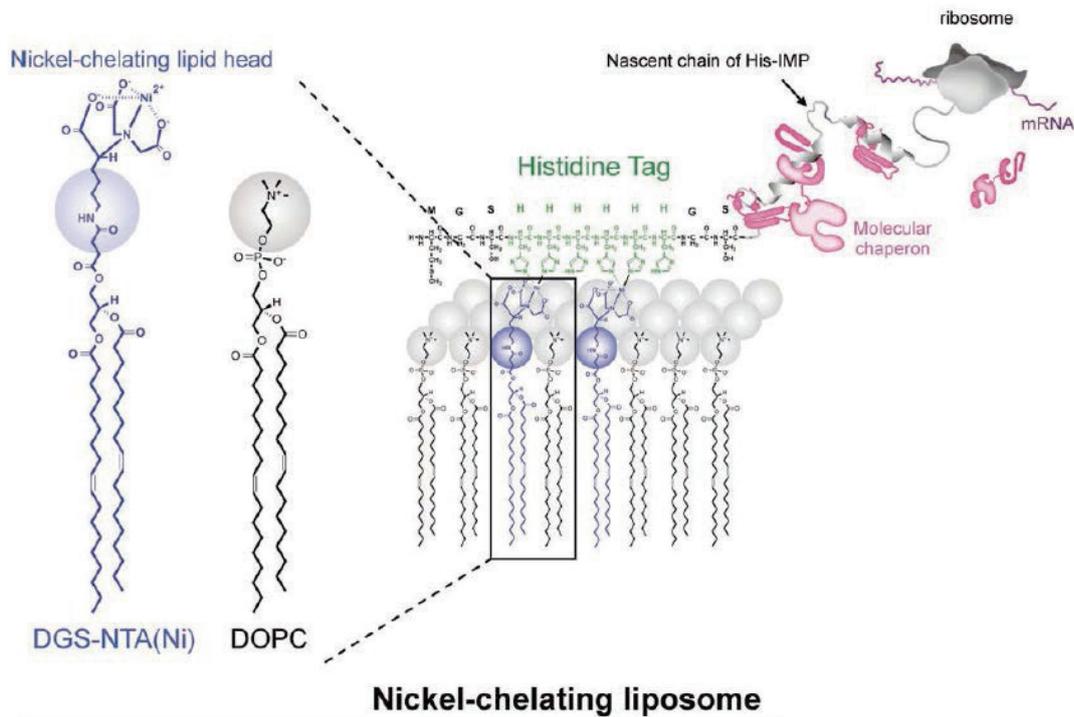


Fig. 6 Schematic illustration of His tag-fused membrane protein sorting system in cell-free membrane protein synthesis

また、反応溶液中にイミダゾールを共存させることで、合成途中の Ni^{2+} とヒスチジンタグのキレート形成を阻害したところ、NHis-Cx43でのみ組み込み効率が減少した。このことより、合成途中のNHis-Cx43のヒスチジンタグがSP様に働き、リポソーム表面にある Ni^{2+} を目印として翻訳複合体をリポソーム表面に集積した結果、効率的にリポソーム膜への組み込みが起きたと考えられる。また、ヒスチジンタグと Ni^{2+} とのキレート形成を利用してリポソームに組込んだN-His Cx43は、単にリポソームに組込まれただけでなく正確な立体構造を保持しており、Cx43の活性本体である6量体形成が認められた。さらに、本手法と天然分子シャペロンDnaKJEを併用することで、組込まれる膜タンパク質の配向性が制御しえることがも明らかとなった。

NHis-Cx43プロテオリポソームの膜透過特性を調べたところ、蛍光物質の透過も認められ、組込まれたNHis-Cx43は、脂質膜上で6量体を形成して、本来のチャネル機能を保持していると言える。さらに、Cx43以外の膜タンパク質においてもHisタグ融合膜タンパク質を設計することで、ソーティング制御が可能であった。例えば、大腸菌由来膜タンパク質発現実験において可溶化が困難であった膜タンパク質を含め、 α -ヘリックス型、 β -バレル型を問わず膜タンパク質のソーティング制御が可能であることを明らかになった。

6. 最後に

本稿では、セントラルドグマに関わる因子を再構成した再構成型無細胞タンパク質合成システムを用いて、脂質小胞膜であるリポソーム存在下、無細胞膜タンパク質合成反応を行うことで、合成した膜タンパク質が変性・凝集することなくリポソーム膜に組込まれる手法を述べた。今後、様々な膜タンパク質をテーラーメイドに搭載、集積することで得られるプロテオリポソームは、ドラッグデリバリーシステムやバイオ計測分野での応用が期待される。

参考文献

- 1) S.M. Nomura, S. Kondoh, W. Asayama, A. Asada, S. Nishikawa, K. Akiyoshi, *J. Biotechnol.*, **133**, 19019 (2008)
- 2) Y. Moritani, S.M. Nomura, I. Morita, K. Akiyoshi, *FEBS J.*, **277**, 3343 (2010)
- 3) M. Kaneda M, S.M. Nomura, S. Ichinose, S. Kondo, K. Nakahama, K. Akiyoshi, I. Morita, *Biomaterials*, **30**, 3971 (2009)
- 4) M. Ando, M. Akiyama, D. Okuno, M. Hirano, T. Ide, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Biomaterials Science*, **4**, 258 (2016)
- 5) M. Ando, S. Shikura, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Advanced Science*, **5**, 1800824 (2018)

環状ポリマーブラシの摩擦の分子シミュレーション

Molecular Simulation of Friction of Ring Polymer Brush

古賀 毅・古谷 勉・林 慎二郎

Tsuyoshi KOGA, Tsutomu FURUYA, Shinjiro HAYASHI

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

The markedly low frictional properties of ring polymer brushes compared to linear polymer brushes has been reported by Divandari *et al.* [*Macromolecules*, **50**, 7760 (2017)]. In order to elucidate the molecular origins of the low friction, the static structures and the friction properties of ring polymer brushes and those of linear polymer brushes are studied by a coarse-grained molecular dynamics simulation. The ring polymer brushes show the same graft density dependence of brush thickness as that of the linear polymer brushes. However, the mushroom region and the concentrated polymer brush region are wider than those of the linear polymer brushes. In addition to the enhancement of the denseness of the ring polymer brushes, the reduction of frictional force by the characteristic topological effects of the ring polymers are confirmed.

1. 緒言

高分子を材料表面にグラフトして形成されるポリマーブラシは潤滑性^{1,2)}、接着性^{1,3)}、生体適合性^{1,4)}、及び微粒子分散性^{1,5)}等の様々な界面特性の改質に有効であることから、幅広い分野で注目を集めている。ポリマーブラシの構造や物性に影響する重要なパラメータとして高分子のグラフト密度が挙げられる。末端官能性高分子やブロック共重合体を表面と反応させるGrafting-to法と呼ばれる方法では、一般的にグラフト密度をある一定値以上に増大させることは困難であり、準希薄ポリマーブラシ(SDPB)と呼ばれる構造が得られる。辻井らは表面リビングラジカル重合によるGrafting-from法により、濃厚ポリマーブラシ(CPB)と呼ばれる高グラフト密度のポリマーブラシの合成に成功し、CPBの構造や特性がSDPBのそれらとは大きく異なることを示した⁶⁻¹⁰⁾。例えば、CPB中のポリメチルメタクリレート(PMMA)は良溶媒中で高度に伸長しており、その平衡膜厚は伸びきり長の80~90%に達する^{7,8)}。また、摩擦係数は0.0005を下回り、潤滑性が著しく向上することも報告されている^{9,10)}。

近年、ポリマーブラシの性質を制御する新しい手法として、高分子のトポロジーの効果が報告されている¹¹⁻¹³⁾。Benettiらは直鎖及び環状のpoly-2-ethyl-2-oxazoline(PEOXA)を用いたGrafting-to法でポリマーブラシを合成し、環状高分子から形成される環状ポリマーブラシ(RPB)は、環状高分子の流体力学的半径が小さいため、直鎖高分子を用いた直鎖ポリマーブラシ(LPБ)よりもグラフト密度が高くなることを示した。また、RPBはLPBに比べて高い立体安定性、生体適合性、及び潤滑性(摩擦係数は約0.007)を示すことを報告している。これらのRPBの性質は相対的に高いグラフト密度とグラフト高分子の末端が無い構造によるものと考えられている。

環状高分子間には、合成時の結合形態が維持されることにより、トポロジカル相互作用と呼ばれる斥力相互作用が働くことが知られている。トポロジカル相互作用によって、環状高分子溶液の第2ビリアル係数 A_2 は理想状態においても正になることが理論¹⁴⁾、実験¹⁵⁾、及び計算機シミュレーション¹⁶⁾により示されている。RPBの特徴的な性質の発現にも、このトポロジカル相互作用が重要な役割を担っていると考えられる。

本稿ではRPBの特徴的な性質の起源を解明することを目的として、RPB及びLPBの構造及び摩擦係数について粗視化分子動力学シミュレーションを用いて計算し、その考察結果について報告する。このような詳細な分子的起源の解析にはポリマーブラシの重合度やグラフト密度を精緻に制御する必要があるため、計算機シミュレーションが非常に有用な手段となる。

2. シミュレーションモデル

高分子のモデルにはKremer-Grestモデル¹⁷⁾と呼ばれるバネ・ビーズモデルを用いた。結合ビーズ間の弾性エネルギーには有限の伸びきり長を有する非線形弾性(FENE)ポテンシャルを用いた：

$$U_{\text{FENE}}(r_{ij}) = -\frac{1}{2}k_b R_0^2 \ln \left[1 - \left(\frac{r_{ij}}{R_0} \right)^2 \right] \quad (1)$$

ここで、 r_{ij} はビーズ*i*とビーズ*j*間の距離、 k_b はばね定数、 R_0 は最大結合長である。また、ビーズ間の排除体積効果には斥力Lennard-Jones(LJ)ポテンシャルを適用した：

$$U_{\text{LJ}}(r_{ij}) = \begin{cases} 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 + \frac{1}{4} \right], & (r_{ij} \leq 2^{1/6}\sigma) \\ 0, & (r_{ij} > 2^{1/6}\sigma) \end{cases} \quad (2)$$

ここで、 σ 及び ε はそれぞれ長さ及びエネルギーの単位である。本研究では $k_b = 30 \varepsilon / \sigma^2$ 及び $R_0 = 1.5 \sigma$ とした。ビーズの運動は以下のLangevin方程式に従って計算した：

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(t) - m\zeta \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} + \mathbf{R}_i(t) \quad (3)$$

ここで、 m はビーズの質量、 $\mathbf{r}_i(t)$ は時間 t におけるビーズ i の位置ベクトル、 $\mathbf{F}_i(t) = -\partial U_i(t) / \partial \mathbf{r}_i(t)$ はビーズ i に働く力、 $\mathbf{R}_i(t)$ はランダム力、 $U_i(t)$ はビーズ i に作用するポテンシャルの総和である。ランダム力 $\mathbf{R}_i(t)$ は揺動散逸定理を満たすように $\langle \mathbf{R}_i(t) \rangle = 0$ 及び $\langle \mathbf{R}_i(t) \cdot \mathbf{R}_j(t') \rangle = 6\zeta k_B T \delta_{ij} \delta(t - t')$ の性質を有する。ここで、 k_B はBoltzmann定数であり、 T は絶対温度である。本研究では、 m 及び $\tau \equiv \sigma \sqrt{m / \varepsilon}$ をそれぞれ質量及び時間の単位として使い、規格化温度は $k_B T / \varepsilon = 1$ とした。また、ビーズの摩擦係数は $\zeta = 0.5 / \tau$ とし、時間間隔 $\Delta t = 0.005$ で速度Verlet法を用いてLangevin方程式を計算した。

図1に示すように、基材表面はビーズを x - z 平面上に格子定数 σ の正方格子に配列することによって表し、直鎖高分子の末端もしくは環状高分子の一つのビーズを壁面と結合させてグラフト高分子のモデルとした。グラフト高分子の配置はランダムに決定した。シミュレーションボックスの x -方向及び z -方向には周期境界条件を適用した。

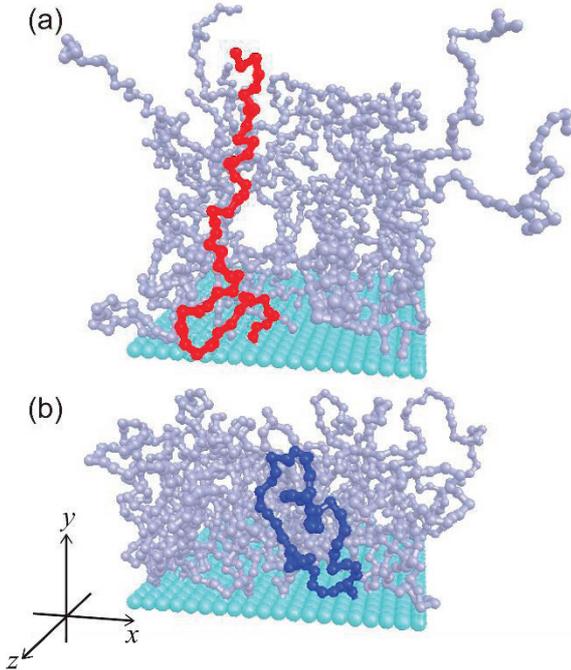


Fig. 1 Models of polymer brushes: (a) linear polymer brush (LPB) and (b) ring polymer brush (RPB). The graft density σ_g is equal to 0.05.

本研究ではポリマーブラシの平衡構造の計算にはシミュレーションボックス中に一つの表面と一つのポリマーブラシを有する系(片面系)を用いた。また、摩擦特性の計

算には二つの表面上のポリマーブラシが対向するように間隔 D で配置された系(両面系)を用いた。ここで、片面系ではシミュレーションボックスの y -方向の長さは高分子の伸びきり長よりも長く設定した。

高分子当たりのビーズ数 n は $n = 51$ とし、グラフト密度 $\sigma_g \equiv N_p / N_w$ を系統的に変化させてRPBとLPBの構造と摩擦特性について計算した。ここで、 N_p は高分子の本数であり、 N_w は基材表面を構成するビーズ数である。

3. 結果と考察

3-1. ポリマーブラシの構造

最初に片面系を用いた平衡状態におけるポリマーブラシの構造解析の結果を示す。図2にはポリマーブラシ厚さとグラフト密度 σ_g の関係を示した。ここで、ポリマーブラシ厚さはグラフト高分子の平均二乗両末端間距離の y 成分 $\langle R_y^2 \rangle^{1/2}$ を用いて評価した。また、RPBにおいては基材表面と結合しているビーズとそのビーズから高分子に沿って最も遠いビーズ間の距離より平均二乗両末端間距離を求めた。図2より、LPB及びRPB共に低グラフト密度ではポリマーブラシ厚さがグラフト密度 σ_g に依存しないマッシュルーム構造(希薄領域)を取ることが分かる。また、中程度のグラフト密度ではポリマーブラシ厚さが $\sigma_g^{1/3}$ に比例するSDPBとしての挙動を示し、高グラフト密度ではポリマーブラシ厚さが $\sigma_g^{1/2}$ に比例するCPBとして振る舞うことが分かる。これらの結果は報告されている実験結果^{8,10}及び理論予測¹⁸⁻²⁰と一致している。

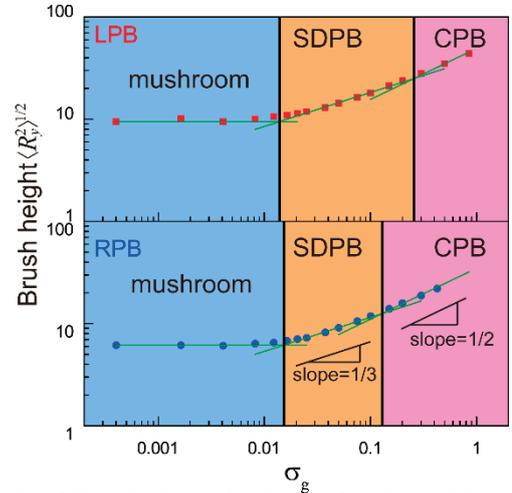


Fig. 2 Heights of polymer brushes as functions of the graft density σ_g and the three regions: mushroom (dilute), semi-dilute polymer brush (SDPB), and concentrated polymer brush (CPB).

図2には各領域(マッシュルーム、SDPB、及びCPB)の接線の交点から計算した領域間の境界グラフト密度も合わせて示している。図2より、RPBはLPBと比較してマッシュルーム領域とCPB領域が広く、SDPB領域が狭いことが分かる。これより、RPBは希薄と濃厚という相反する性質が共に強調されていると言える。

RPBとLPBのマッシュルーム領域及びCPB領域における高分子の広がりを解析するために、図3には一本の高分子鎖の密度分布を示した。ここで、高分子と結合している表面上の点を原点とし、着目した高分子を構成するビーズの $-\sigma/2 \leq z \leq \sigma/2$ における密度 $\rho(x,y)$ を示している。図3より、マッシュルーム領域では環状高分子は直鎖高分子と比較して広がりが小さいことが分かる。これより、RPBのマッシュルーム領域が拡大したと考えられる。CPB領域では直鎖高分子及び環状高分子共にy-方向に強く伸長されていることが分かる。また、環状高分子の方が揺らぎが小さく、中心部分の密度が高いことが分かる。これは、環状高分子の方が伸びきり近くまで伸長された場合の断面積が大きいためである。ここで、直鎖高分子及び環状高分子の断面積 s_p をそれぞれ $s_p \approx 1$ 及び $s_p \approx 2$ と近似し、規格化グラフト密度(表面占有率¹⁰⁾ $\sigma^* \equiv s_p \sigma_g$ を導入すると、LPB及びRPB共にSDPBからCPBへのクロスオーバー規格化グラフト密度が $\sigma^* \approx 0.26$ となる。これからもRPBのCPB領域の拡大は環状高分子の大きい断面積に依存していることが分かる。

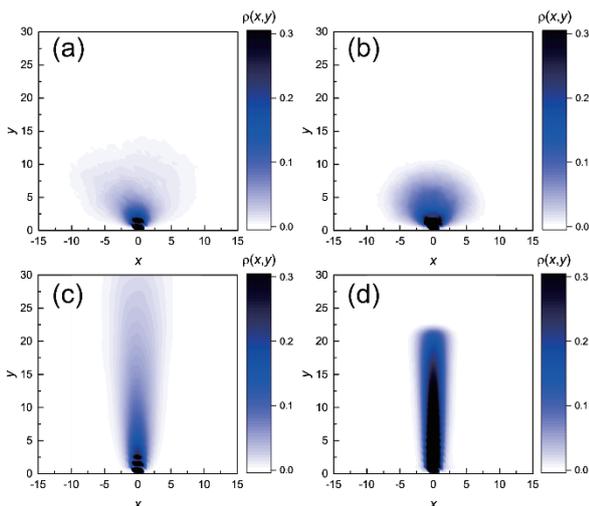


Fig. 3 Density distribution of beads of a graft polymer: (a) a single linear polymer, (b) a single ring polymer, (c) one polymer of linear polymer brush (LPB) at $\sigma_g = 0.3$, and (d) one polymer of ring polymer brush (RPB) at $\sigma_g = 0.3$.

3-2. ポリマーブラシ間の摩擦

次に、両面系を用いたポリマーブラシ間の摩擦特性に関する結果を示す。ここでは、二つのポリマーブラシを相対速度 $V = 0.002$ で動かし、ポリマーブラシ間に働く荷重 W を変化させた場合の摩擦力 F を計算した。また、ポリマーブラシ間に働く荷重 W は二つの表面間の間隔 D を変化させることで制御した。

Benettiらの実験ではポリマーブラシはGrafting-to法で合成されているため、LPBは中程度のグラフト密度 ($\sigma_g = 0.20 \text{ nm}^{-2}$) を示し、RPBは流体力学的半径が小さいため比較的高いグラフト密度 ($\sigma_g = 0.29 \text{ nm}^{-2}$) を示している¹³⁾。

PEOXAの密度、モノマー分子量、及びモノマー当たりの長さを用いた規格化グラフト密度 σ^* の推算より、実験におけるLPBはSDPBであり、RPBはCPBだと考えられる。このような実験条件を再現するために、シミュレーションにおけるLPB及びRPBのグラフト密度をそれぞれ $\sigma_g = 0.1$ および $\sigma_g = 0.15$ に設定して摩擦力の計算を行った(図4)。図4より、LPBの摩擦力 F は荷重 W の増加によって急激に増加するのに対して、RPBの摩擦力 F は緩やかに増加することが分かる。この結果は実験結果¹³⁾ と定性的に一致している。

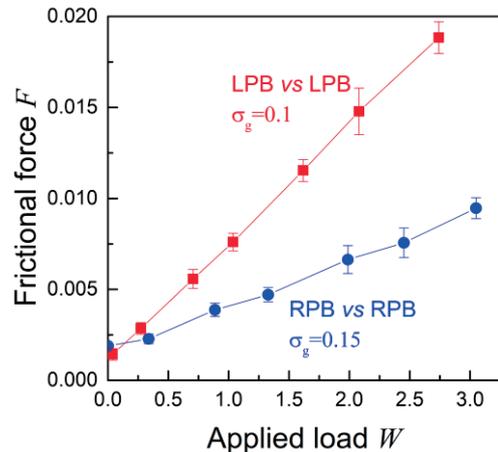


Fig. 4 Frictional forces F against load for the LPB pair (LPB vs LPB) and the RPB pair (RPB vs RPB). The graft density of the LPB is $\sigma_g = 0.1$ and that of the RPB is $\sigma_g = 0.15$.

一般的にポリマーブラシではポリマーブラシ間の相互貫入によって摩擦が大きくなり、濃厚ポリマーブラシでは相互貫入が抑制されることによって摩擦が低減されることが知られている。この相互貫入について解析するために、以下の式より相互貫入量 I を計算した：

$$I = nN_p \left[\frac{\int_{D/2}^D \rho_l(y) dy}{\int_0^D \rho_l(y) dy} + \frac{\int_0^{D/2} \rho_u(y) dy}{\int_0^D \rho_u(y) dy} \right] \quad (4)$$

ここで、 $\rho_l(y)$ 及び $\rho_u(y)$ は下側及び上側のポリマーブラシのy-方向の高分子ビーズ密度分布であり、相互貫入量 I は対向するポリマーブラシ中に存在する高分子ビーズの個数を示している。図5には相互貫入量 I を荷重 W の関数として示した。これより、LPBではRPBの2倍以上の相互貫入が発生しており、相互貫入によって摩擦力が高くなっていることが分かる。

RPBの低摩擦力の起源を明らかにするために、図6及び図7には規格化グラフト密度 σ^* が一定の場合の計算結果を示した。ここで、規格化グラフト密度 $\sigma^* = 0.1$ ではLPB及びRPB共にSDPBであり、 $\sigma^* = 0.3$ ではLPB及びRPB共にCPBである。いずれの条件においてもRPBの方が摩擦力 F が低く、相互貫入量 I が小さいことが分かる。この結果はRPBの低摩擦力の起源にはグラフト密度以外の因子があること

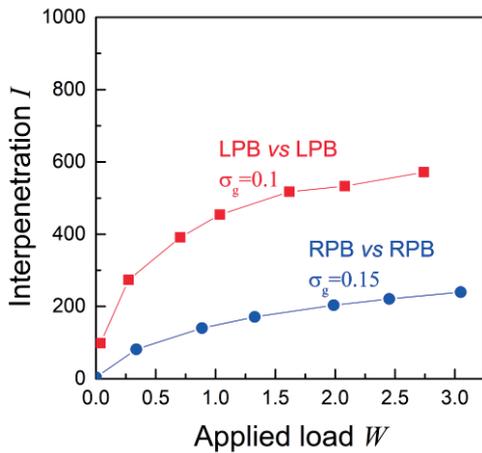


Fig. 5 Amounts I of interpenetration against load W for the LPB pair (LPB vs LPB) and the RPB pair (RPB vs RPB). The graft density of the LPB is $\sigma_g = 0.1$ and that of the RPB is $\sigma_g = 0.15$.

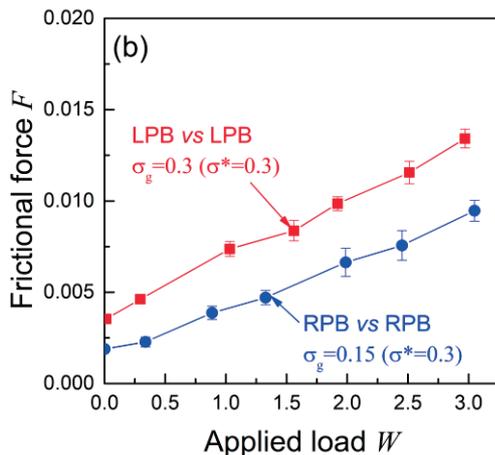
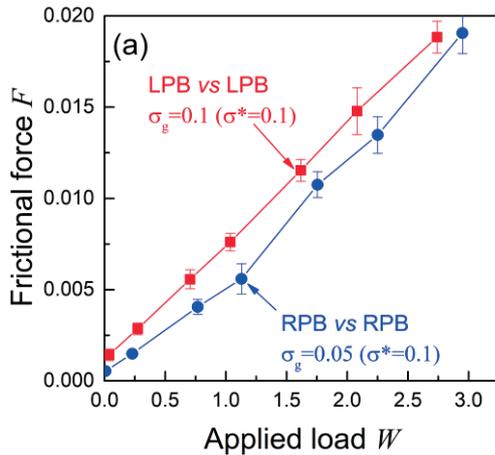


Fig. 6 Frictional forces F against load W for the LPB pair (LPB vs LPB) and the RPB pair (RPB vs RPB). The normalized graft densities of the LPB and the RPB are (a) $\sigma^* = 0.1$ and (b) $\sigma^* = 0.3$.

を示している。

前述したように環状高分子間にはトポロジカル相互作用が働く。トポロジカル相互作用の摩擦特性に及ぼす効果

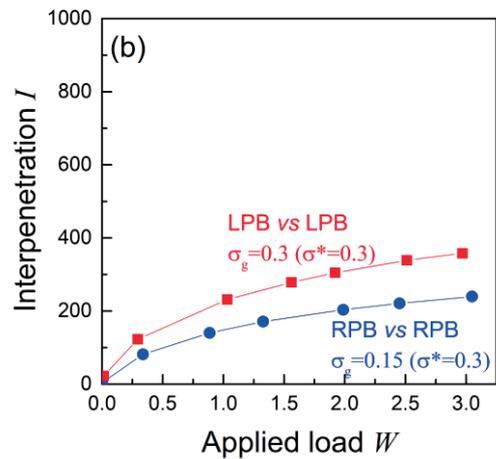
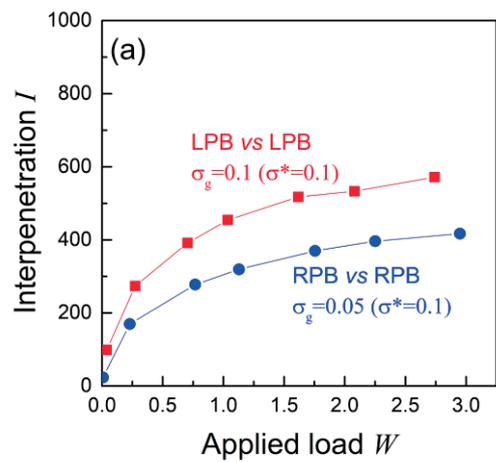


Fig. 7 Amounts I of interpenetration against load W for the LPB pair (LPB vs LPB) and the RPB pair (RPB vs RPB). The normalized graft densities of the LPB and the RPB are (a) $\sigma^* = 0.1$ and (b) $\sigma^* = 0.3$.

について検証するために、図8に示すようなグラフト点から高分子に沿って最も速い結合で環状高分子を切断した形態を有するグラフト高分子(以下ではカット型高分子と呼ぶ)を導入し、カット型高分子から形成されるポリマーブラシ(CTPB)の摩擦特性について評価する。カット型高分子の伸びきり状態での断面積は環状高分子と同じであるため、RPBとCTPBの摩擦特性の比較によって、トポロジカル相互作用の効果を推測することが出来る。

図9及び図10にCTPBの摩擦力 F と相互貫入量 I を荷重 W に対して示した。いずれの条件においてもCTPBの摩擦力 F と相互貫入量 I はLPBとRPBの間の値を示した。これらの結果から、環状高分子の切断によって、相互貫入が促進され、摩擦力が向上すると言える。すなわち、環状高分子のトポロジカルな効果によって相互貫入が抑制されて、摩擦が小さくなる。ただし、図9(b)に示したようにCTPB領域におけるRPBとCTPBの摩擦力 F の差は大きくないことから、実験的に報告されているLPBとRPBの大きな摩擦力の差はグラフト密度の違いに依るところが大きいと考えられる。すなわち、RPBはGrafting-to法でもグラフト密度を効果的に向上出来ることが重要なのである。

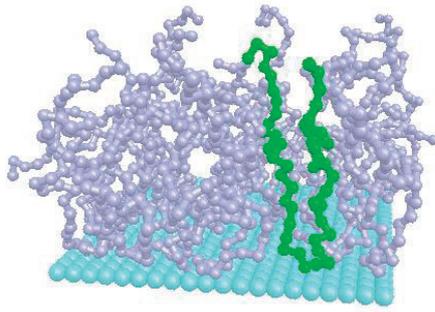


Fig. 8 Snapshot of cut-type polymer brush (CTPB). The graft density σ_g is equal to 0.05.

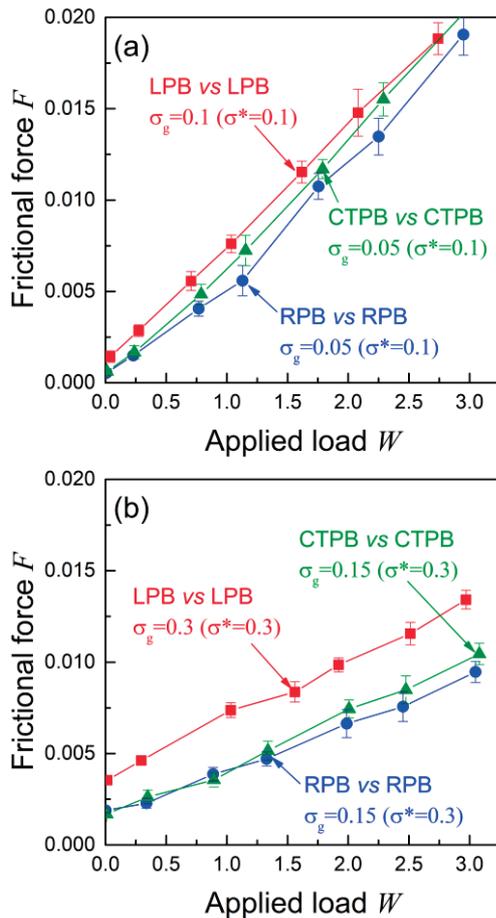


Fig. 9 Frictional forces F against load W for the LPB pair (LPB vs LPB), the RPB pair (RPB vs RPB), and the CTPB pair (CTPB vs CTPB). The normalized graft densities are (a) $\sigma^* = 0.1$ and (b) $\sigma^* = 0.3$.

最後にRPBとCTPBを接触させた場合の摩擦特性について議論する(図11及び図12)。図11に示すようにRPBとCTPBを接触させた場合の相互貫入量 I はCTPB間とRPB間の間の値を示した。RPBとCTPB間の相互貫入量 I がCTPB間のもよりも小さくなったのは、高分子の貫入方法の違いを反映していると考えられる。すなわち、カット型高分子であれば二つの末端は別々に対向するポリマーブラシに

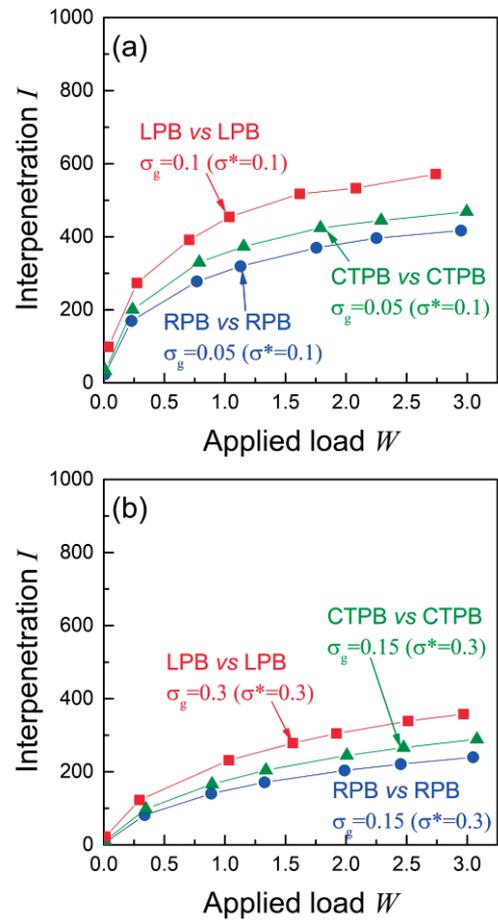


Fig. 10 Amounts I of interpenetration against load W for the LPB pair (LPB vs LPB), the RPB pair (RPB vs RPB), and the CTPB pair (CTPB vs CTPB). The normalized graft densities are (a) $\sigma^* = 0.1$ and (b) $\sigma^* = 0.3$.

貫入出来るのに対して、環状高分子は隣接するピーズが同時に貫入する必要がある。よって、CTPB間の方がRPBとCTPB間よりも高分子の相互貫入が容易になる。これより、RPBとCTPB間には環状高分子の結合が交差出来ないことから生じるトポロジカルな相互作用は生じないが、貫入方法の違いによってトポロジーの効果が残ることが分かる。

図12(b)に示すようにCPB領域ではRPBとCTPB間の摩擦力 F はRPB間とCTPB間の間の値を示した。この摩擦力 F の挙動は相互貫入量 I で説明することが出来る。一方、SDPB領域ではRPBとCTPB間の相互貫入はRPBのトポロジーの効果によって、CTPB間よりも抑制されているにも関わらず、その摩擦力 F はCTPB間よりも大きくなった(図12(a))。この結果より、SDPB領域ではRPBとCTPB間に面ファスナーに似た構造(図12(a)中の挿入図)が形成されていると考える。この面ファスナー効果は相互貫入した環状高分子と直鎖高分子の間で発現するため、相互貫入が抑制されているCPB領域では起こらず、SPDB領域でのみ起こる。この効果は材料表面の潤滑性は低下させるが、条件を適切に選ぶことで、接着性を向上させることが出来ると考えられる。すなわち、ポリマーブラシによる分子面ファスナー²¹⁾の実

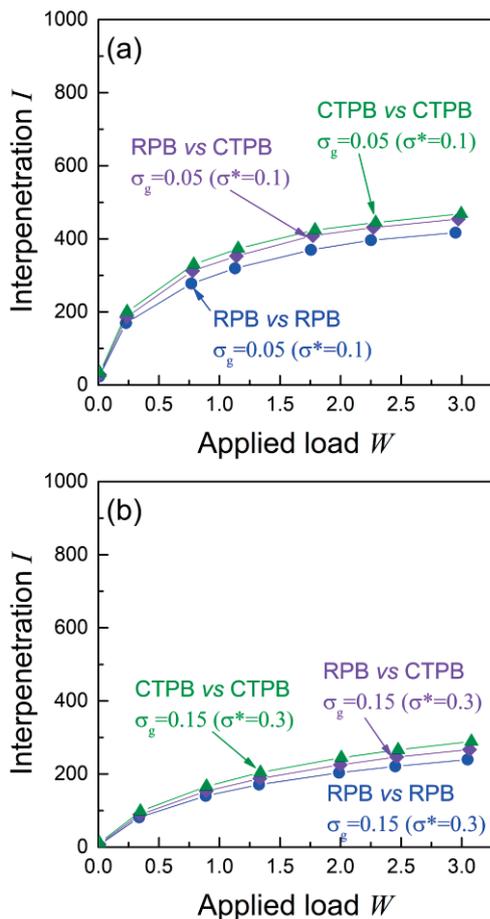


Fig. 11 Amounts I of interpenetration against load W for the RPB pair (RPB vs RPB), the CTPB pair (CTPB vs CTPB), and the pair of the RPB and the CTPB (RPB vs CTPB). The normalized graft densities are (a) $\sigma^* = 0.1$ and (b) $\sigma^* = 0.3$.

現の可能性を示唆している。

4. 結言

環状ポリマーブラシ (RPB) の低摩擦性の起源を解明するために粗視化分子動力学シミュレーションを行った。平衡状態でのポリマーブラシの構造及び剪断変形下でのポリマーブラシの摩擦特性を解析した。マッシュルーム領域、準希薄ポリマーブラシ (SDPB) 領域、及び濃厚ポリマーブラシ (CPB) 領域におけるポリマーブラシ厚さのグラフト密度依存性は直鎖ポリマーブラシ (LPB) に対して報告されている実験結果及び理論計算結果と定性的に一致した。環状高分子は回転半径が小さく、伸びきり状態での断面積が大きいため、そのポリマーブラシがマッシュルーム及び濃厚ポリマーブラシとなるグラフト密度範囲は直鎖ポリマーブラシと比較して広がった。環状ポリマーブラシの広いマッシュルーム領域がグラフト密度の高いポリマーブラシの合成を容易にし、広い濃厚ポリマーブラシ領域が環状ポリマーブラシの濃厚であるという性質を強調

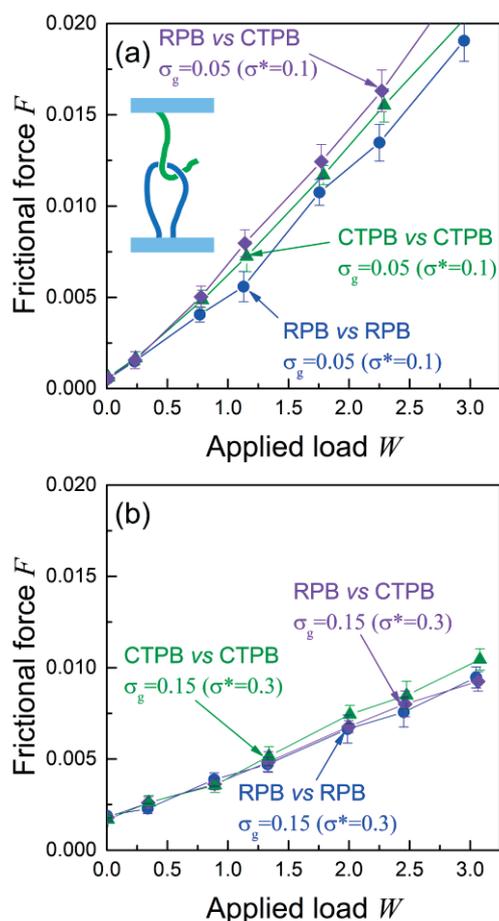


Fig. 12 Frictional forces F against load W for the RPB pair (RPB vs RPB), the CTPB pair (CTPB vs CTPB), and the pair of the RPB and the CTPB (RPB vs CTPB). The normalized graft densities are (a) $\sigma^* = 0.1$ and (b) $\sigma^* = 0.3$.

する。これらの特徴的な性質が環状ポリマーブラシ間の相互貫入を抑制し、摩擦力を低減することを示した。

環状ポリマーブラシのトポロジーの効果を検証するために、環状高分子を切断した形態を有するグラフト高分子 (カット型高分子) から形成されるカット型ポリマーブラシの摩擦特性を計算した。環状高分子を切断することにより、摩擦力及び相互貫入量が大きくなった。これより、環状高分子のトポロジーの効果が相互貫入を抑制し、摩擦力を低減していることを明示した。各因子の摩擦力に及ぼす影響の比較より、環状ポリマーブラシはGrafting-to法でもグラフト密度を効果的に向上出来ることが潤滑性向上に重要であることを示した。

環状ポリマーブラシとカット型ポリマーブラシ間の摩擦特性の計算より、準希薄ポリマーブラシ領域では、異種ポリマーブラシ間の相互貫入量はカット型ポリマーブラシ間よりも減少するにも関わらず、摩擦力が向上することを示した。これは、カット型高分子の末端が環状高分子の環内部に入り込んだ面ファスナーに似た構造をとるため

と考えられる。このような面ファスナー効果は表面間の接着性向上に応用できると考えられる。

参考文献

- 1) 辻井敬亘、大野工司、榊原圭太、「高分子基礎科学 One Point 5: ポリマーブラシ」(高分子学会 編)、共立出版(東京) (2017)
- 2) H. J. Taunton, C. Toprakcioglu, L. J. Fetters, J. Klein, *Nature*, **332**, 712 (1988).
- 3) M. Kobayashi and A. Takahara, *Polym. Chem.*, **4**, 4987 (2013).
- 4) C. Yoshikawa, A. Goto, Y. Tsujii, T. Fukuda, T. Kimura, K. Yamamoto, A. Kishida, *Macromolecules*, **39**, 2284 (2006).
- 5) K. Ohno, T. Morinaga, S. Takeno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, **39**, 1245 (2006).
- 6) M. Ejaz, S. Yamamoto, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, **31**, 5934 (1998).
- 7) S. Yamamoto, M. Ejaz, Y. Tsujii, M. Matsumoto, T. Fukuda, *Macromolecules*, **33**, 5602 (2000).
- 8) S. Yamamoto, M. Ejaz, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, **33**, 5608 (2000).
- 9) Y. Tsujii, A. Nomura, K. Okayasu, W. Gao, K. Ohno, T. Fukuda, *J. Phys.: Conf. Ser.*, **184**, 012031 (2009).
- 10) A. Nomura, K. Okayasu, K. Ohno, T. Fukuda, Y. Tsujii, *Macromolecules*, **44**, 5013 (2011).
- 11) G. Morgese, L. Trachsel, M. Romio, M. Divandari, S. N. Ramakrishna, E. M. Benetti, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 15583 (2016).
- 12) E. M. Benetti, M. Divandari, S. N. Ramakrishna, G. Morgese, W. Yan, L. Trachsel, *Chem. Eur. J.*, **23**, 12433 (2017).
- 13) M. Divandari, G. Morgese, L. Trachsel, M. Romio, E. S. Dehghani, J.-G. Rosenboom, C. Paradisi, M. Zenobi-Wong, S. N. Ramakrishna, E. M. Benetti, *Macromolecules*, **50**, 7760 (2017).
- 14) F. Tanaka, *J. Chem. Phys.*, **87**, 4201 (1987).
- 15) A. Takano, Y. Kishida, Y. Ohta, K. Masuoka, Y. Matsushita, *Polymer*, **50**, 1300 (2009).
- 16) D. Ida, D. Nakatomi, and T. Yoshizaki, *Polym. J.*, **42**, 735 (2010).
- 17) K. Kremer and G. S. Grest, *J. Chem. Phys.*, **92**, 5057 (1990).
- 18) S. Alexander, *J. Phys. France*, **38**, 983 (1977).
- 19) P. G. de Gennes, *J. Phys. France*, **37**, 1445 (1976).
- 20) P. G. de Gennes, *Macromolecules*, **13**, 1069 (1980).
- 21) Y. Ahn, Y. Jang, N. Selvapalam, G. Yun, K. Kim, *Angew. Chem.*, **125**, 3222 (2013).

光による幹細胞運命操作法

Manipulation of stem cell fate by optogenetics

永樂 元次・大串 雅俊

Mototsugu EIRAKU, Masatoshi OHGUSHI

Laboratory of Developmental System, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Human pluripotent stem cells, including embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, hold huge potential as reproductive resources for cell-therapies as well as for drug discovery. For the direct generation of desired types of functional cells from these stem cells, a variety of differentiation-evoking methods have been reported, but it is still difficult to control cell fate decision in a spatially restricted manner. In our laboratories, we try to establish the unique differentiation protocol to induce the spatially controlled differentiation under the uniform culture environment by applying an optogenetic tools. Here, we introduce a PA-Tet system, in which target gene expressions are triggered by a photo-sensitive artificial transcriptional factor rtTA.

1. 多能性幹細胞とは

胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells, ES細胞) は、哺乳類の初期胚に存在する多能性組織、内部細胞塊を特殊な培養条件化で培養することで得られる多能性細胞株である¹⁻³⁾。内部細胞塊の性質を保持しているため、私たちの体を構成する全ての細胞へと分化できるポテンシャルを有している。すなわち、適切な誘導を行うことで様々な有用細胞へと導くことができ、発生の試験管内研究やドラッグスクリーニングに有用な正常細胞を得るための細胞供給源として期待されている。また、ES細胞と同等の性質を持つ誘導多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cells, iPS細胞) の開発により、疾患患者自身のゲノム情報を持つ機能的細胞を試験管内で作出す道が拓かれ、移植や細胞治療を目指す再生医療への社会的期待が大きく高まっている (図1)²⁻³⁾。このような期待を背景に、ES/iPS細胞の研究はこの数十年で爆発的に発展してきた。特にES/iPS細胞を任意の有用細胞に導くための培養手法の開発が世界中で活発に行

われた結果、現在では神経細胞や筋肉細胞、ベータ細胞や生殖細胞など、多様な細胞種への誘導法が一通り整いつつある⁴⁾。

2. 多能性幹細胞の運命操作法

ES細胞とiPS細胞は由来となる細胞が異なるものの、基本的には同等の性質を持つ²⁾。分化誘導法の研究についても、ES細胞を用いた解析が先行していたが、同じストラテジーがiPS細胞に対しても適応可能である。多能性幹細胞の運命選択を操作するための方法として、主に以下に述べる2つにアプローチが考えられてきた^{2,4)}。

2-1. 培養環境の制御による運命操作法

ES細胞の由来組織である内部細胞塊は、細胞外からの様々な刺激や内因的な遺伝プログラムの発動を経て、種々の機能性体細胞へと分化する。受精卵から個体が形作られるプロセスを一つ一つ紐解く発生生物学進展の恩恵を受け、どのような刺激をどのようなタイミングで与えると細胞がどのような分化系譜を辿るのかの知見が蓄積してきた。このような発生における分化現象を模倣するため、増殖因子やサイトカイン、細胞内シグナル経路の活性化・不活性化を制御する小分子化合物などを必要に応じて培地中に添加して、ES/iPS細胞に望んだ分化・運命選択を導くために培養レシピの検討・開発が進められている。

2-2. 遺伝子導入による運命操作法

細胞の分子生物学的理解が深まるにつれ、細胞アイデンティティが遺伝子発現パターンにより規定されることが明らかとなり、特的に遺伝子群を細胞内に導入することで強制的に細胞形質を変化させることが出来るようになってきた。その成果の一つが、多能性分子を導入して作ったiPS細胞である。同様のアプローチで、線維芽細胞を心筋細胞や神経細胞へと変化させることができ、生体内では起こり得ない細胞分化も人工的に誘起できるようになってきている。

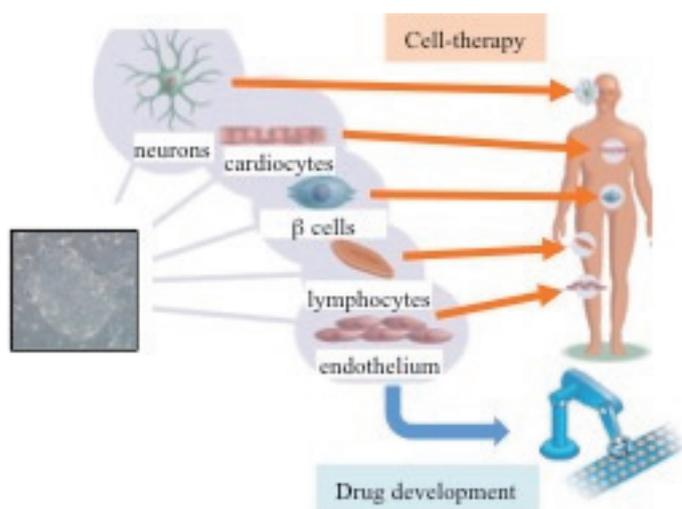


Figure 1. ES/iPS cells in medicines and pharmaceuticals

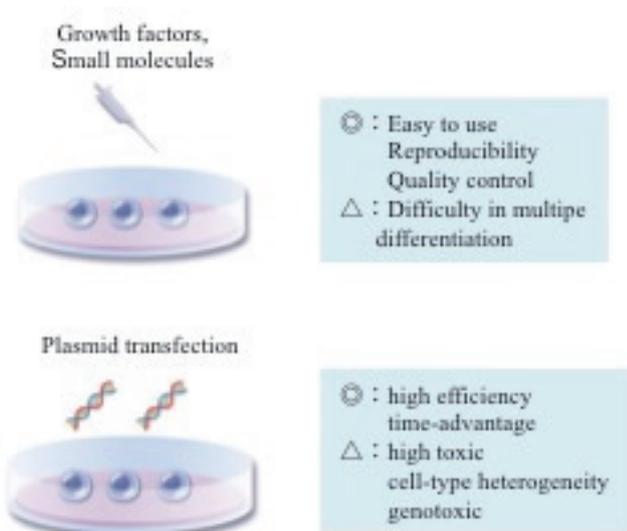


Figure 2. current strategy in stem cell differentiation

2-3. 新規運命操作法の開発に向けて

培養添加物による分化誘導法は、簡易性や品質管理などに優位であるのに対し、遺伝子導入による方法では分化経路のショートカットが可能など、それぞれにメリット・デメリットがある（図2）。現在のところ目的に応じてそれぞれを使い分けることが多いが、この2つがいずれも不得手としているのは、「同じ培養場内で異なる形質の細胞を同時誘導すること」である。

この10年ほどの間に、ES/iPS細胞から狙った細胞腫を誘導するだけでなく、異なる細胞腫から構成される臓器様の複合組織（オルガノイド）を作成する研究が大きな飛躍を見せた⁴⁾。これまでに、脳や網膜などの感覚器官、下垂体や膵島などのホルモン産生期間、甲状腺や胃腸などの管組織などのオルガノイド作成が報告されており、臓器移植医療における深刻なドナー不足への対策となりうるものとして大きな期待を集めている。しかしながら、上記の標準法では異なる細胞を狙って作り出すことは難しく、偶然に頼っているというのが現在の到達点といえる。そのため、培養場の狙った位置に狙った細胞分化を誘導することが可能な、時間的・空間的な解像度が高い分化誘導技術の開発が望まれてきた。

本研究では、従来の細胞透過性薬剤による導入遺伝子発現誘導の手法に、近年発展著しい光遺伝学（オプトジェネティクス）⁵⁾の手法を取り込むことで、幹細胞の運命操作技術に高い空間解像度を導入することを試みた。

3. 光による遺伝子発現制御の原理

植物や微生物が持つ光刺激による生体応答を支える分子機構の解析が進み、光によって活性制御を受けるシグナル装置の実態が明らかとなってきた⁵⁾。これを多細胞生物

の研究に取り込もうという試みも活発であり、チャンネルロドプシンを用いた光による神経細胞の活動制御は大きな成功を収めている⁵⁻⁶⁾。最近では、光感受に伴う構造変化に依存した多量体形成を利用したオプトジェネティクス手法の発展も著しく、導入遺伝子の発現スイッチオンオフを光照射の有無で制御することも可能となってきた⁷⁻⁹⁾。その中の1つに、京都大学生命工学研究科の今吉格准教授のグループが開発したシステム、PA-Tetシステムでは、細胞透過性薬剤による活性制御が可能な反転転写因子rtTA/rtTAを転写活性領域とDNA結合領域でスプリット化し、光刺激によるrtTA/rtTAの細胞内結合を光操作することに成功した¹⁰⁾。ここでは、tet-onシステムで頻用されるrtTAに光制御感受性を付加したPA-rtTA（photo-activatable rtTA）について詳しく述べる。

PA-rtTAは、シロイヌナズナで同定された青色光応答系Cry2-CIB1を利用している¹¹⁾。Cry2は分子内に色素団としてプリテンとフラビンとを有しており、プリテンが光子を受け取ることによる電子放出が誘起され、この電子がフラビンに吸収され、Cry2の構造変化を導く。構造変化を起こしたCry2は転写因子であるCIB1と結合してこれを活性化し、種々の光応答反応を駆動する。そこで、rtTA分子を転写活性ドメインとDNA結合ドメインに切り分けて、それぞれをCry2、CIB1との融合遺伝子として細胞内に導入、細胞内で合成されたそれぞれの遺伝子産物は暗環境下では転写誘導活性を持たないが、青色光によりCry2部位とCIB1部位が結合することにより全長rtTAが再構成されるという系を構築した（図3）。

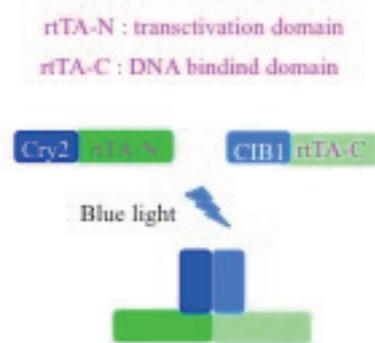


Figure 3. rtTA reconstruction by light-induced Cry2-CIB1 interaction

PA-rtTAの長所の1つに、光による全長再構成のみでは転写活性化には至らず、従来通りにテトラサイクリン（またはその誘導体である4-ヒドロキシタモキシフェン）による核への移行が必要なことである¹²⁾。すなわち、光刺激と薬剤刺激がともに入った時にのみシステムが動き出すこととなるため、偶発的な遺伝子誘導のリスクを抑えることができる。この点は、一旦プログラム発動すると引き返しが難しい細胞分化現象を扱うには非常に有用である。

このようなPA-rtTA遺伝子セットを共に、rtTA駆動性プロモーターにより分化誘導遺伝子を駆動する発現カセットを導入することにより、「狙った細胞に、狙ったタイミングで、狙った細胞分化を誘導する」ことを期待した。

3. ヒトES細胞を用いた光による遺伝子発現制御の proof-of-concept実験

私たちのグループでは、主にヒトES細胞を材料として用いているため、今回も京都大学樹立のヒトES細胞株 KhES-1をモデル細胞として用いた。まずはproof-of-conceptのための実験系として、光刺激による遺伝子発現を蛍光観察できる系を構築した

3-1. モデル細胞の調整

遺伝子発現の簡便に検出するため、rtTA標的のプロモーター下流に赤色蛍光分子遺伝子を組み込んだレポーター細胞を調整した(図4)。なお、PA-rtTA遺伝子セット、レポーター遺伝子の導入にはともにpiggy bacトランスポゾンベクターを採用し、薬剤選択を終えた定常安定細胞を用いて実験を行った。

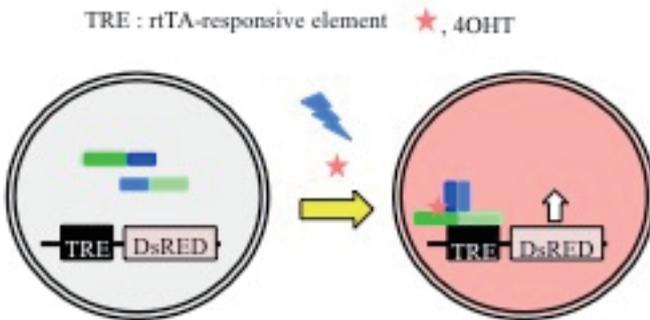


Figure 4. photo- and 4OHT-dependent transcription within cells

3-2. 光刺激システムの構築

ライブイメージング顕微鏡システム(オリンパス社IX-81型倒立顕微鏡)に局所的な特定波長の光照射を可能とするmosaicシステム(フォトニックインストゥルメンツ社)、デジタル光量調整に対応した青色LED抗原を導入し、ライブイメージングと光刺激を同時に実施できる実験系を構築した(図5)。また、細胞にダメージや異常挙動を引き起こさない光照射の強度、時間、パルス間隔などの詳細な条件検討を行った。

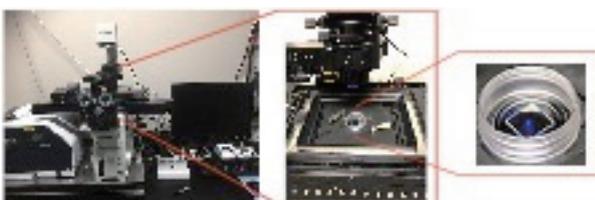


Figure5. Microscopic system for live imaging and photo-activation

3-3. モデル細胞を用いた局所的遺伝子操作実験

上記で述べたモデル細胞と光照射システムを用いて、均質な細胞群・均一な培養場内で「局所的に」遺伝子発現を操作することを試みた。図6は、橙円で囲った領域に特異的にブルーライトを照射し、経時変化をタイムラプス観察した結果である。照射範囲内の細胞のみで赤色蛍光タンパク質が検出される一方で、範囲外ではほとんど検出されていない。この例では、ヒトES細胞コロニーの中心部に円形に照射範囲を設定しているが、位置や広さ、形状などはある程度自由に規定することが可能である。また、光刺激を開始して約5時間後には赤色傾向が明瞭に検出できることから、増殖因子の添加による標的遺伝子の発現誘導とほぼ同程度のタイムラグを持ってタンパク質合成が誘起されていることがわかる。

以上の観察結果から、当初の目的通り局所的な遺伝子発現誘導が達成できていることが確認できた。

4. 今後に向けて

これまでの過程で、均一培養場内の「狙った位置」に「狙ったタイミング」で遺伝子発現を誘導できるシステムの構築を終えた。今後は、ES細胞に特定系譜への分化を促す因子を用いた局所的発現誘導実験を実施し、光による細胞分化誘導という世界に例のない新規細胞操作法の確立に向けた検討を実施する。

オプトジェネティクス手法による細胞活動の操作というアイデア自体はさほど新しいものではなく、神経活動の操作や筋組織の収縮などに大きな成功を収めている。しかしながら、これらの細胞活動は数分から長くとも数時間の時間スケールのものであり、細胞分化のような数日間に渡る細胞活動を局所的に操作した例はほとんど知られていない。このような時間スケールでは、細胞は絶えず運動し分裂するため、長時間に渡って同じ細胞に光を当て続けることが難しいという点が大きな問題となってくる。この技術上の困難を乗り越えるため、今後さらなる工夫も必要となるだろう。

また、本項で紹介した手法は、成長因子やウイルスなどによる遺伝子導入などのベースとした従来法に比べると、調製が煩雑な上にゲノムへのダメージが避けられないという大きなデメリットを持ち、細胞治療への適用や産業化に向けたハードルは高い。その反面、これまでは考えられなかった厳密さでの局所操作が可能となるため、今まで大きなブラックボックスとなっていた個々の細胞間のコミュニケーションや均一場に生じた局所性の組織構築における役割など、細胞社会が環境に応じて自律的に織りなす生命現象への突破口となりうるだろう。現時点では培養ディッシュ上での2次元培養でのアプリケーションにとどまっているが、3次元培養への適応にもチャレンジし、異なる細胞系譜からなる立体的組織構築を達成したい。

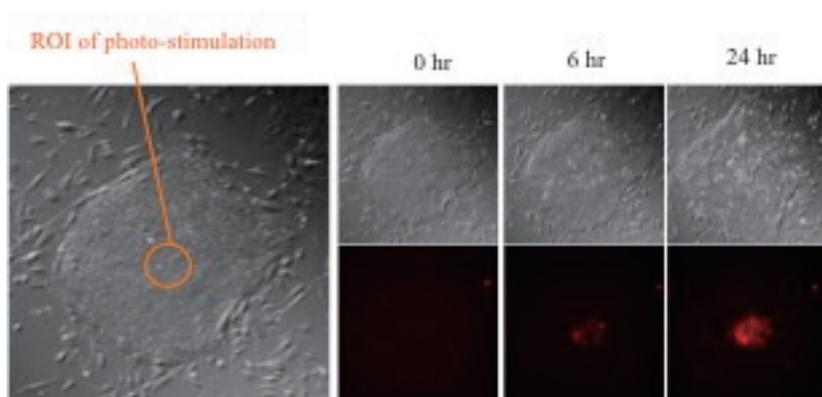


Figure 6. Localized induction of gene expressions by light

- 11) X Yu, H Liu, J Klejnot, C, Lin, *Arabidopsis Book*, **8**, e0135, (2010)
- 12) AT Das, L Tenenbaum, B Berkhout, *Curr. Gene Ther.*, **16**, 156-167, (2016)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、資金提供をいただいた日本医療研究開発機構（再生医療実現拠点ネットワークプログラム 幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム）に感謝申し上げます。また、PA-rtTAシステムをご提供、オプトジェネティクスに関する様々が助言をいただきました京大生命科学研究科今吉格准教授に厚く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) J Nichols, A Smith, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, **4**, a008128. (2012)
- 2) K Takahashi, S Yamanaka, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 183-193 (2016)
- 3) H Niwa, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **28**, 25-31. (2014)
- 4) Y Sasai, Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell* **12**, 520-530 (2013)
- 5) CK Kim, A Adhikari, K Deiseeroth, *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 222-235, (2017)
- 6) NA Repina, A Rosenbloom, A Mukherjee, DV Schaffer, RS Kane, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **8**, 12-39. (2017)
- 7) S Koneremann, MD Brigham, A Trevino, PD Hsu, M Heidenreich, L Cong, RJ Platt, DA Scott, GM Church, F Zhang, *Nature*, **500**, 472-476 (2013)
- 8) LB Motta-Mena, A Reade, MJ Mallory, S Glantz, OD Weiner, KW Lynch, KH Gardner, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 196-202. (2014)
- 9) X Wang, X Chen, Y Yang, *Nat. Methods*, **9**, 266-269, (2012)
- 10) Yamada M, Suzuki Y, Nagasaki SC, Okuno H, Imayoshi I, *Cell Reports*, **25**, 487-500e6.

薬物徐放化フィブリンハイドロゲルによるマクロファージ機能の修飾

Modification of Macrophages Biological Functions by Fibrin Hydrogel Capable for Drug Controlled Release

田畑 泰彦・田中 隆介・城 潤一郎

Yasuhiko TABATA, Ryusuke TANAKA, Jun-ichiro JO

Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

The objective of this study is to prepare a material which enables to modify the biological functions of macrophages. Fibrin hydrogel scaffolds to induce macrophages of anti-inflammatory phenotype was combined with SEW2871, a sphingosine-1 phosphate receptor 1 agonist of a monocytes/macrophages recruiting agent, solubilized in water by micelles formation with a cholesterol-grafted gelatin. The gelatin micelles incorporating SEW2871 retained a monocyte migration activity while SEW2871 was released in vitro from the fibrin hydrogels in a controlled fashion. On the other hand, the culture condition using fibrin hydrogels without micelles incorporating SEW2871 decreased the secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α), a pro-inflammatory cytokine, and increased the secretion of interleukin-10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine, in mouse bone marrow-derived macrophages. In addition, most of cells infiltrating into fibrin hydrogels without SEW2871 incorporated micelles were macrophages expressing CD163 and CD204 of anti-inflammatory macrophages markers, in the fibrin hydrogels-bearing mice model. These findings indicate that the fibrin hydrogel has a property to allow macrophages to recruit and convert into the anti-inflammatory phenotype.

1. 緒言

疾患や組織傷害によって生じる組織の欠損や機能不全に対する新しい治療法の研究開発が望まれている。その1つである組織工学では、細胞、細胞足場、および生理活性物質を組み合わせることで、損傷組織の再生治癒をもたらす¹⁾。効率の高い再生治癒には、細胞の接着、増殖、および分化のための局所環境を提供する細胞足場のデザインや生理活性物質の活性を高めるドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の開発が必要不可欠である。このような状況の中、これまでに、生体材料を用いた細胞足場およびDDS技術の開発が数多く行われてきた²⁾。

組織修復過程は、損傷組織の炎症が生理学的に終焉することで開始される^{3, 4)}。マクロファージ (M ϕ) は、この炎症で働く重要な細胞の1つであり、炎症と再生修復との両方に関与することが知られている⁵⁾。M ϕ は、炎症に関する生物機能の観点からM1とM2の2つの表現型に分類される⁶⁾。M1 M ϕ は、速やかに損傷組織へ侵入し、炎症促進サイトカインを産生する。一方、M2 M ϕ は、炎症促進サイトカインの産生の抑制と抗炎症性サイトカインの産生により、損傷組織の再生修復を促進する。以上のことから、M ϕ の損傷組織へ動員し、動員M ϕ の表現型を制御することによって、組織再生を促進できることが考えられる⁷⁾。

本研究では、M ϕ を動員する因子である、1型スフィンゴシン1-リン酸受容体のアゴニストである、5-[4-フェニル-5-トリフルオロメチルチオフェン-2-イル]3-[3-トリフルオロメチルフェニル]1, 2, 4-オキサジアゾール (SEW2871)⁸⁾、およびM ϕ の表現型をM2型へ変化 (分極) させることが報告

されているフィブリンハイドロゲル⁹⁾を用いて、M ϕ を動員し、表現型をM2型とする細胞足場ができないかと考えた。SEW2871は難水溶性であるため、ゼラチンミセルに内包することで水可溶化し、フィブリンハイドロゲルへ組み込んだ。得られたSEW2871担持フィブリンハイドロゲルの生物機能を *in vitro* で調べるとともに、マウス背部皮下へ埋入されたSEW2871内包フィブリンハイドロゲルへ動員されたM ϕ の表現型を調べた。

2. 実験方法

2-1. SEW2871内包ゼラチンミセルの作製

コレステロールのヒドロキシル基をN, N'-ジスクシンイミジルカーボネートおよび4-ジメチルアミノピリジンによって活性化させた後、ゼラチン (重量平均分子量: 100,000、等電点: 5.0、新田ゼラチン株式会社より供与) のアミノ基とジメチルスルホキシド (DMSO) 中で反応させた。反応液を2回蒸留水に対して3日間透析し、水可溶化部分のみ遠心分離、凍結乾燥することにより、コレステロール導入ゼラチンを得た。フルオレスカミン法により、ゼラチン分子へ導入されたコレステロールの個数を算出したところ、 110 ± 5 個であった。

コレステロール導入ゼラチンと異なる濃度のSEW2871とをDMSO中で混合し、2回蒸留水に対して3日間透析した。透析物の水可溶化部分のみを分離し、凍結乾燥することでSEW2871内包ゼラチンミセルを得た。得られたSEW2871内包ゼラチンミセルの見かけのサイズを動的光散乱にて測定した。また、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、

ミセルに内包されたSEW2871を定量した。

2-2. SEW2871内包ゼラチンミセルの単球動員活性の評価

常法¹⁰⁾にてC57BL/6nマウスの骨髄から単離した単球を、メンブレンで仕切られたトランスウエルチャンバーの上部に播種し、チャンバー下部にはDMSOに溶解させたSEW2871、SEW2871内包ゼラチンミセル、あるいはSEW2871を内包していないコレステロール導入ゼラチンミセルを添加した。添加4時間後にメンブレンに侵入した細胞を4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)にて核染色し、蛍光顕微鏡下で計数することで、添加物の単球動員活性を評価した。

2-3. フィブリンハイドロゲルの作製ならびにハイドロゲル上に培養されたマクロファージの生物機能評価

種々の濃度のフィブリノーゲンのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, カルシウムおよびマグネシウムイオン含有) 溶液 (8, 16, 32, および64 mg/ml) とトロンビンの生理食塩水溶液 (フィブリノーゲン1 mgあたり0.2 U)を混合することでフィブリノーゲンを重合させ、種々のフィブリンハイドロゲルを調製した。得られたフィブリンハイドロゲル上に、C57BL/6nマウスの骨髄から単離したマクロファージ (2×10^5 細胞) を播種した。炎症性への分極を抑制する作用を評価するために、炎症誘導因子のリポ多糖 (LPS, 100 ng/ml) を添加、マクロファージを培養した。24時間後、炎症性マーカーである腫瘍壊死因子- α (TNF- α) の培養上清中の濃度を定量した。また、抗炎症性への分極を促進する作用を評価するために、LPSを添加せずにマクロファージを24時間培養した後、抗炎症性マーカーであるインターロイキン-10 (IL-10) の培養上清中の濃度を、酵素結合免疫吸着法にて定量した。

2-4. SEW2871内包ゼラチンミセルを組み込んだフィブリンハイドロゲル (SEW2871担持フィブリンハイドロゲル) の作製とSEW2871の徐放挙動の評価

SEW2871内包ゼラチンミセルを含むフィブリノーゲンのPBS水溶液をトロンビンの生理食塩水と混合、ゲル化させることによって、SEW2871内包ゼラチンミセルを組み込んだフィブリンハイドロゲル (SEW2871担持フィブリンハイドロゲル) を調製した。得られたSEW2871担持フィブリンハイドロゲルをPBS中に浸漬した。経時的にPBSを回収し、ハイドロゲルへ新しいPBSを添加した。24時間後、フィブリン分解酵素であるプラスミン (25 mU/ml) 含むPBSを添加し、同様に経時的にPBSを回収とプラスミン含有PBSの添加を繰り返した。回収したPBS中に存在する、ハイドロゲルから溶出したSEW2871をHPLCにて定量した。一方、ddYマウスの背部皮下にSEW2871担持フィブリンハイドロゲルを埋入した。経時的にハイドロゲルを回収、プラスミンにて完全に溶解させ、内部に残存しているSEW2871をHPLCにて定量した。

2-5. マウス皮下へ埋入したSEW2871担持フィブリンハイドロゲルに対するマクロファージの浸潤および生物機能の評価

ddYマウスの背部皮下へのSEW2871担持フィブリンハイドロゲル埋入14日後、ハイドロゲルを周囲の組織とともに回収した。ハイドロゲル内部へのマクロファージの浸潤および生物機能を免疫組織化学的染色にて評価した。

3. 結果と考察

3-1. SEW2871内包ゼラチンミセルの物性ならびに単球動員活性の評価

図1は、異なる仕込み濃度で作製したSEW2871内包ゼラチンミセルのSEW2871内包効率を示す。SEW2871内包効率は、SEW2871仕込み濃度125 $\mu\text{g/ml}$ のとき最大となった。SEW2871内包ゼラチンミセルのみかけのサイズは、SEW2871の仕込み濃度によらず一定であった。以降の実験では、仕込み濃度125 $\mu\text{g/ml}$ で作製したSEW2871内包ゼラチンミセルを用いた。

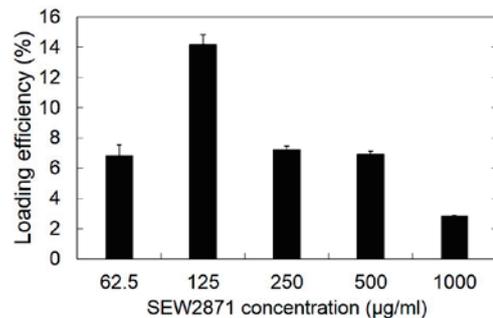


Fig. 1. The loading efficiency of SEW2871 incorporated in SEW2871-micelles prepared at different SEW2871 concentrations.

図2は、SEW2871内包ゼラチンミセルの単球動員活性を示す。他の群と比較して、トランスウエルチャンバー下部にSEW2871内包ミセルを添加した群では有意に動員細胞数が増加した。この結果から、ミセルに内包されているSEW2871は、単球動員活性を有していることがわかった。また、ミセルに内包されたSEW2871と同量の遊離SEW2871との間に単球動員活性の有意な差が見られなかったことから、ミセルへの内包はSEW2871の活性に影響を与えないと考えられる。

3-2. フィブリンハイドロゲル上に培養されたマクロファージの生物機能評価

図3は、種々のフィブリノーゲン濃度で作製したフィブリンハイドロゲル上で24時間培養したマクロファージからの炎症性マーカーTNF- α (図3A) および抗炎症性マーカーIL-10 (図3B) の産生量を示す。汎用培養ポリスチレン基材と比較して、フィブリンハイドロゲル上で培養すると、マクロファージからのTNF- α 産生量は有意に減少し、IL-10産生量は有意に増加した。また、ハイドロゲル作製

時のフィブリノーゲンの濃度を増加させると、マクロファージからのTNF- α 産生量は減少、IL-10産生量は増加する傾向が見られた。フィブリノーゲンの濃度が64 mg/mlの時には、IL-10産生量が有意に低下した。これは、高濃度のフィブリノーゲン溶液から調製されたフィブリンハイドロゲル上では、細胞が接着しにくかったためと考えられる。以上の結果より、フィブリンハイドロゲルがマクロファージの炎症性分極を抑制し、抗炎症性分極を促進する作用をもつことを示している。

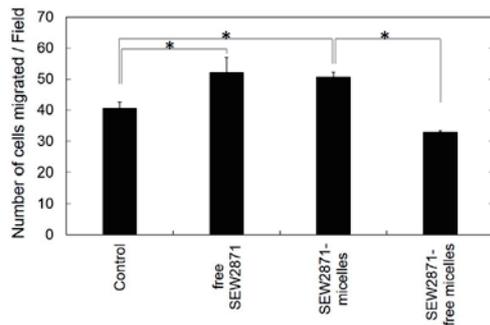


Fig. 2. The number of migrated cells induced by free SEW2871, SEW2871-micelles, and SEW2871-free micelles. The data are presented as the mean \pm SD. *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups.

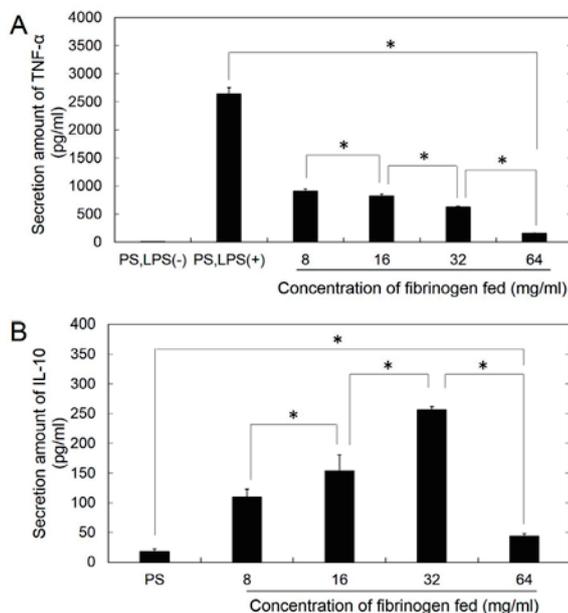


Fig. 3. (A) Macrophages were stimulated with LPS on polystyrene plate (PS) and described concentration of fibrinogen-derived fibrin hydrogels for 24 hr, followed by determination of TNF- α secretion by enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA). (B) Macrophages were cultured on PS and described concentration of fibrinogen-derived fibrin hydrogels for 24 hr, followed by determination of IL-10 secretion by ELISA. The data are presented as the mean \pm SD. *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups.

3-3. SEW2871 担持フィブリンハイドロゲルからの SEW2871 の徐放挙動の評価

図4Aは、in vitroでのSEW2871徐放試験の結果を示す。PBS中では、初期に約15%のSEW2871がハイドロゲルから放出されたが、その後さらなる放出は見られなかった。フィブリン分解酵素であるプラスミンを添加すると、時間とともにSEW2871の放出が見られ、プラスミン添加4時間後にはハイドロゲルが完全に溶解、全てのSEW2871が放出された。これらの結果から、SEW2871担持フィブリンハイドロゲルは、フィブリンの分解、水可溶化とともにSEW2871を徐放できるシステムであると考えられる。SEW2871担持フィブリンハイドロゲルをマウス背部皮下へ埋入すると、SEW2871は速やかに放出された(図4B)。これは、生体内には様々な因子が存在するためと考えられる。

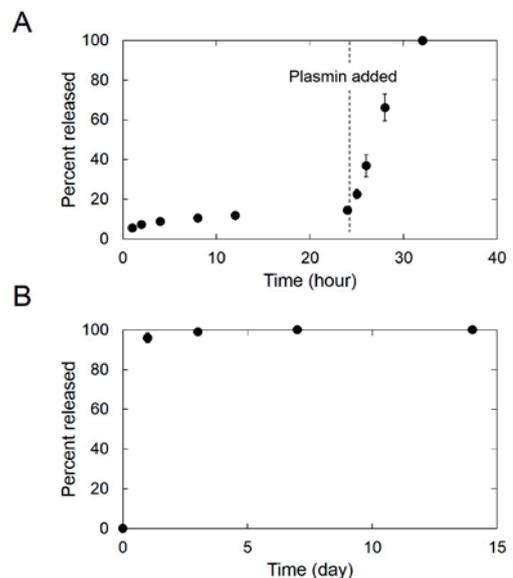


Fig. 4. (A) The in vitro release profile of SEW2871 from fibrin hydrogels incorporating SEW2871-micelles. (B) The in vivo release profile of SEW2871 from fibrin hydrogels incorporating SEW2871-micelles after implantation into the back subcutis in mice.

3-4. マウス皮下へ埋入したSEW2871担持フィブリンハイドロゲルに対するマクロファージの浸潤および生物機能の評価

図5は、マウス皮下埋入14日後のSEW2871担持フィブリンハイドロゲルと周囲の組織を免疫組織化学染色した結果である。フィブリンハイドロゲル内に単球由来のマクロファージが浸潤していることが観察された。また、浸潤マクロファージは抗炎症性マーカーを強く発現していることがわかった。しかしながら、浸潤およびマーカー発現の程度は、SEW2871内包ゼラチンミセルの組み込みの有無によって変化しなかった。また、ゼラチンハイドロゲルをマウス皮下に埋入した群における単球由来マクロファージの浸潤度は、フィブリンハイドロゲルと比較して有意に低か

った。これらの結果から、フィブリンハイドロゲルがマクロファージ動員を促し、その抗炎症性分極を誘導する生物機能をもつことが示された。

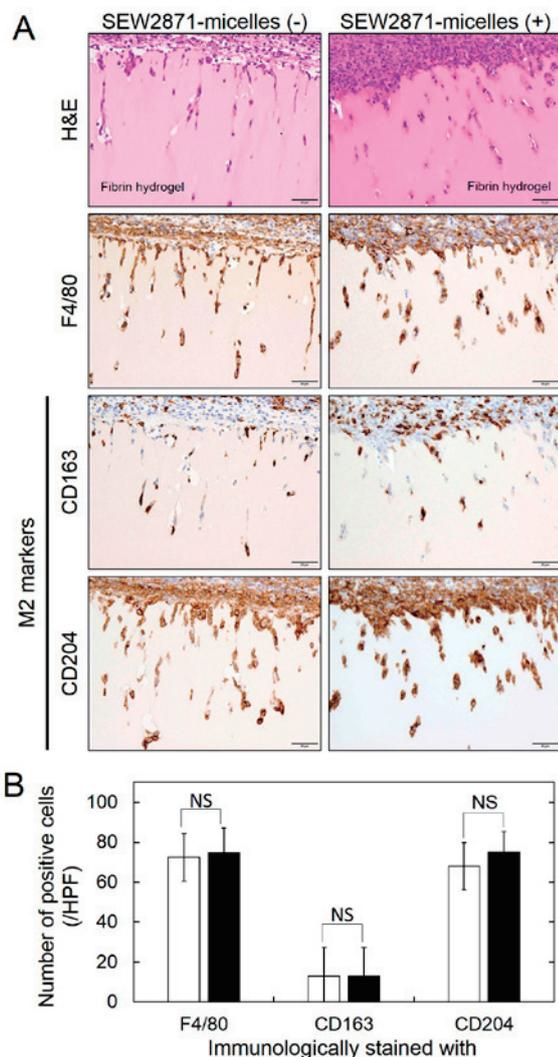


Fig. 5. Macrophage phenotype marker expression on infiltrated macrophages into fibrin hydrogels implanted in mice. (A) Hematoxylin and Eosin or immunohistochemical staining images of subcutaneous tissue after implantation of fibrin hydrogels incorporating SEW2871-micelles into subcutis in mice for 14 days. (B) The number of F4/80, CD163 and CD204-positive infiltrated macrophages into fibrin hydrogels without (\square) with SEW2871-micelles (\blacksquare). The data are presented as the mean \pm SD. NS, not statistically significant vs. hydrogels without SEW2871-micelles.

謝辞

マウス組織の免疫組織化学的染色に関してご協力を賜りました、熊本大学大学院生命科学研究部の西東洋一先生および藤原章雄先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Langer R, et al., Science. 260, 920-926 (1993)
- 2) Tabata Y, J R Soc Interface. 6 Suppl 3, S311-324 (2009)
- 3) Chung L, et al., Adv Drug Deliv Rev. 114, 184-192 (2017)
- 4) Julier Z, et al., Acta Biomater. 53, 13-28 (2017)
- 5) Ogle ME, et al., Exp Biol Med (Maywood). 241, 1084-1097 (2016)
- 6) Mosser DM, et al., Nat Rev Immunol. 8, 958-969 (2008)
- 7) Mantovani A, et al., J Pathol. 229, 176-185 (2013)
- 8) Lien YH, et al., Kidney Int. 69, 1601-1608 (2006)
- 9) Hsieh JY, et al., Acta Biomater. 47, 14-24 (2017)
- 10) Kim YH, et al., J Biomed Mater Res A. 104, 942-956 (2016)

謝辞

本講演会の講師各位ならびに本講演会を含む当財団諸事業にご支援をいただいている維持会員各社に厚くお礼申し上げます。

公益財団法人 日本化学繊維研究所

理事長 福田 猛

維持会員

旭化成（株）

帝人（株）

東洋紡（株）

東レ（株）

松本油脂製薬（株）

三菱ケミカル（株）

ユニチカ（株）