

ISBN 0368-6280

公益財団法人
日本化学繊維研究所

講 演 集

第 78 集

2021 年 3 月

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol.78
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.78)
March 2021

公益財団法人 日本化学繊維研究所の概要

【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78集)

3.01	透過性ペプチドポリマーベシクルと人工高分子チャネルの設計と機能 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	秋吉一成、西村智貴、佐々木善浩	… 4
3.02	幹細胞からのオルガノイド 形成 京都大学ウイルス・再生医科学研究所	永樂 元次	… 8
3.03	臭化マグネシウムを触媒とするビニルエーテルのリビングカチオン重合と 環拡大カチオン重合 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	大内誠、大東侑司	… 11
3.04	非フラーレン高分子太陽電池における開放電圧 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	大北英生、キムヒョンド、井手拓弥	… 16
3.05	メチルセルロース水溶液への多点会合性有機塩の添加効果 —粘度・光透過率同時測定法による解析— 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	古賀毅、柴田基樹、西田幸次	… 21
3.06	水—アセトニトリル混合溶媒系で膨潤したポリアクリルアミドゲルの膨潤度の温度依存性 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、服部和輝	… 26
3.07	ポリエチレンの一軸伸長変形における粘弾性効果 京都大学化学研究所	竹中幹人、岸本瑞樹	… 28
3.08	柔軟なホウ素錯体含有刺激応答性高分子の開発 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	田中一生	… 31
3.09	モレキュラービーコンとドラッグデリバリーシステムを応用した細胞増殖能イメージング技術の開発 京都大学ウイルス・再生医科学研究所	田畑泰彦、村田勇樹、城潤一郎	… 35
3.10	位置選択型セルロース系ポトルブラシの精密合成と構造解析 京都大学化学研究所	辻井敬亘、黄瀬雄司、榊原圭太	… 41
3.11	ポリ(γ-L-グルタミン酸ナトリウム)の希薄溶液物性 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	岡紗帆、帖佐智也、中村洋	… 46
3.12	ペプチドの自己組織化によるナノキャリア創生 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻	沼田圭司、大前仁、宇治広隆、土屋康佑 及川和聡、藤田聖矢、Choon Pin Foong 寺田佳世	… 50
3.13	活性ラジカルと安定ラジカル間の停止反応におけるカップリング・水素引き抜き反応の粘度効果 京都大学化学研究所	山子茂、Li Xiaopei、中村泰之	… 54
4.00	謝辞		… 60

透過性ペプチドポリマーベシクルと人工高分子チャネルの設計と機能 Design and Function of Permeable Peptide Polymer Vesicles and Synthetic Macromolecular Channels

秋吉 一成・西村 智貴・佐々木 善浩

Kazunari AKIYOSHI, Tomoki NISHIMURA, Yoshihiro SASAKI

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

Intrinsically molecular permeable polymer vesicles have recently attracted considerable attention due to their fundamental properties and potential applications as *e.g.* nano/micro biocatalytic reactors and artificial cell/organelle models. So far, research in this field has focused on the development of permeable polymer vesicles, while the enhancement of the permeability has attracted substantially less attention. Moreover, clear design strategies for the enhancement molecular permeability remain elusive. Here, we describe the design and synthesis of amphiphilic peptide polymers for biologically inspired polymer vesicles of with enhanced permeability. We also present an approach for the construction of molecular permeable liposomes by incorporating the peptide polymers.

1. はじめに

天然のリン脂質からなるリポソームや両親媒性ポリマーからなるポリマーベシクルなどの中空集合体は、人工細胞モデルやDDSナノキャリアとしての応用が幅広く研究されている¹⁾⁻⁵⁾。一方で、リン脂質、両親媒性ポリマーが形成するベシクルは、物質の透過能が著しく低いという欠点を有する⁶⁾。そのため、内包されている酵素基質やエネルギー源が枯渇すると反応が停止し、長期的に反応を進行させる事が困難である。したがって、ベシクルを高効率な反応場として利用する上で、透過能の付与は大きな課題である。そのような中、我々は、親水基としてマルトペンタオース、疎水基としてポリプロピレンオキサイド (PPO) からなる両親媒性ブロックポリマーが、分子透過性のベシクルを形成し、外部から基質を供給できる酵素反応場として

機能することを見出した⁷⁾。また、酵素内包ベシクルが腫瘍周囲で、抗がん剤プロドラッグを抗がん剤へと変換するDDSナノファクトリーとして機能することも明らかにしている(Fig. 1)。その一方で、基質がベシクルの二分子膜を透過することが律速となるため、酵素反応速度は、低下することが課題であった。

生体系での酵素反応場に注目すると、コンパートメントへの基質の取り込み速度は、コンパートメントの細孔特性によって制御されていることが知られている。例えば、シアノバクテリアなどに存在し、二酸化炭素を濃縮するカルボキシソームは、正に荷電した細孔と重炭酸イオンとの静電相互作用を介してコンパートメント内への効率的な取り込みを実現している^{8),9)}。このことは、細孔の特性と基質の間の相互作用を上手く利用することで、酵素反応の速度を向上させることができることを示唆している。

本研究では、このような生体系のシステムに着想を得て、ベシクル表面と基質間の静電相互作用を介して基質の透過を促進させるために、親水性セグメントに電荷を有するオリゴアスパラギン酸を導入した両親媒性ブロックポリマーを新たに設計し、その水溶液中での自己組織化挙動ならびに分子透過挙動を調べた(Fig.2)。さらに、この両親媒性ブロックポリマーをリン脂質ベシクルへと組み込むことにより、人工分子チャネルとしての機能評価も行った¹⁰⁾。

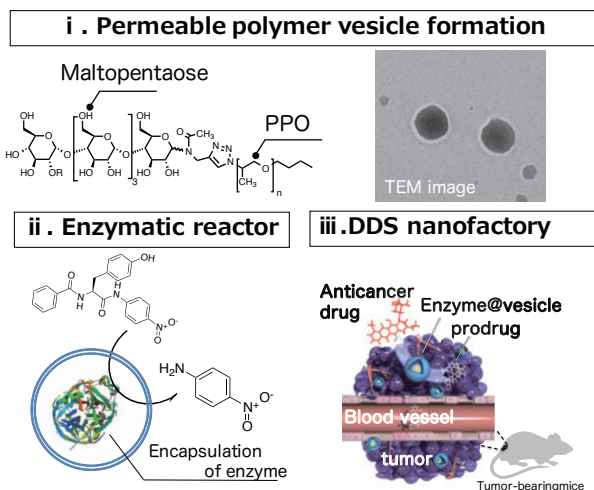


Fig. 1 the formation of molecular permeable polymer vesicles by the self-assembly of maltopentaose-*block*-poly(propylene oxide) and functions as enzymatic reactors and DDS nanofactories.

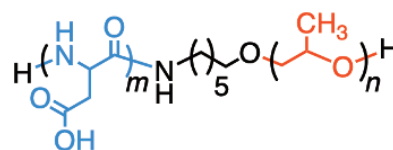


Fig. 2 chemical structure of oligo(aspartic acid)-*block*-poly(propylene oxide)

2. 分子透過性ペプチドポリマーベシクルの特性

両親媒性ポリマーは、アジド基修飾PPO(M_n (NMR) = 2.0×10^3 g mol⁻¹, M_w/M_n (SEC) = 1.04)をStaudinger反応により還元し得たアミノ基修飾PPOをマクロイニシエーターとして、 β -benzyl L-aspartic acid *N*-carboxy anhydrideの重合、引き続き脱保護反応により合成した。NMR測定より得られたポリマーのオリゴアスパラギン酸、ならびにPPOの重合度は、それぞれ4と43であった。

合成したペプチドポリマーは、下限臨界溶液温度(LCST)型の温度応答挙動を示すPPOを有することから、温度応答性を示すことが予想できる。そこで、5°Cから30°Cまでの昇温過程でのポリマー溶液の濁度変化を追跡したところ、8°C前後より急激に濁度が増加することが判明した。このことから、合成したポリマーも温度応答性を示すことが明らかとなった。なお、濁度が50%となった温度を相転移温度とした(11°C)。また、オリゴアスパラギン酸の見かけのpKaを滴定実験より算出したところ、pKa=6前後であった。

次に、この温度応答能を利用して、ポリマー溶液の作製を行なった。ポリマーにリン酸緩衝液(PBS; pH = 7.4)を加え、ポリマーの相転移温度以下に冷却し、全てのポリマーをPBS中に溶解させた。その後、溶液を室温まで昇温することでポリマー溶液を得た。得られたポリマー溶液の動的光散乱(DLS)測定を行なったところ、114 nmの流体力学的半径を有する粒子を形成していることがわかった(Fig.3a)。また、透過型電子顕微鏡(TEM)観察から、膜構造を有する球状集合体を形成していること(Fig.3b)、さらに放射光X線小角散乱(SAXS)による解析から二分子膜構造を有するポ

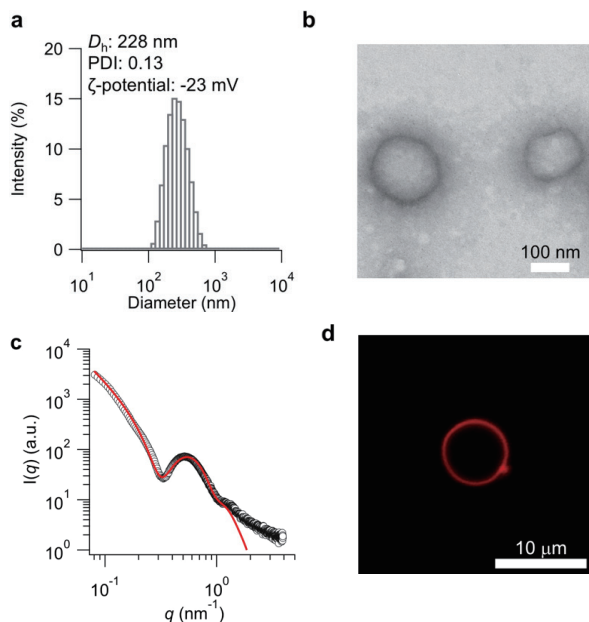


Fig. 3 (a) size distribution of the polymer vesicles, (b) TEM image of the polymer vesicles, (c) SAXS profile of the polymer vesicles (open circles) and a theoretical curve of bilayer membrane model, (d) confocal laser scanning microscopy image of a giant polymer vesicle.

リマーベシクルを形成することが明らかになった(Fig.3c)。二分子膜モデルを用いてSAXSプロファイルを解析したところ、親水層、疎水層の厚みは、それぞれ2.3 nm, 6.8 nmであった。さらに、ポリマー溶液をフィルム水和法により作製することにより、マイクロメートルサイズのジャイアントベシクルを作製することができることも明らかとなった(Fig.3d)。

次に、種々の電荷を有する色素に対するポリマーベシクルの分子透過性を調べた。ここでは、中性のFITC-PEG(分子量550)、アニオン性のfluorescein sodium salt, カチオン性のRhodamine 6Gを用いた。ポリマーベシクルにこれらの色素を封入し、単離したのちに透析過程での色素の放出挙動を調べた(Fig.4)。その結果、カチオン性のrhodamine 6Gと中性のFITC-PEGは、速やかに放出された。一方で、アニオン性のfluoresceinは、放出速度が大幅に減少した。これは、ベシクル表面の負電荷とアニオン性低分子との静電反発に起因するものと考えられる。これらの結果から、我々が開発したポリマーベシクルは、電荷選択的な分子透過性を示す高分子ベシクルであることが判明した。

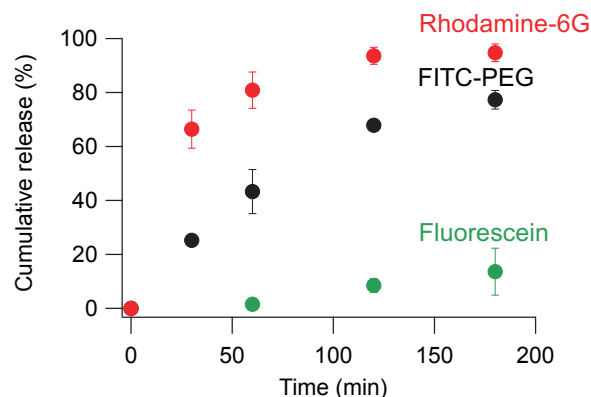


Fig. 4 Time course of the release of rhodamine 6G (red circles), FITC-PEG (black circles), and fluorescein (green circles) from the polymer vesicles in 150 mM NaCl solution (pH = 7) at 25 °C.

さらに、このベシクルにAcetylcholine esterase(AchE)を封入し酵素反応場としての機能評価を行った。その結果、ベシクルに封入していない酵素に比べ、acetyl thiocholineの加水分解反応はわずかに遅いものの、極めて速やかに酵素反応が進行することが明らかになった。一方で、 β -glucuronidaseを封入したベシクルでは、アニオン性の基質である β -glucuronidase-TokyoGreenの加水分解反応は、ほとんど進行せず、本実験においてもアニオン性分子の透過は極めて遅いことが明らかとなった。以上より、透過分子とベシクル表面との相互作用を利用することにより、分子透過性ベシクルに選択性を付与することができること、さらに、透過速度を向上させることができることを明らかにした。

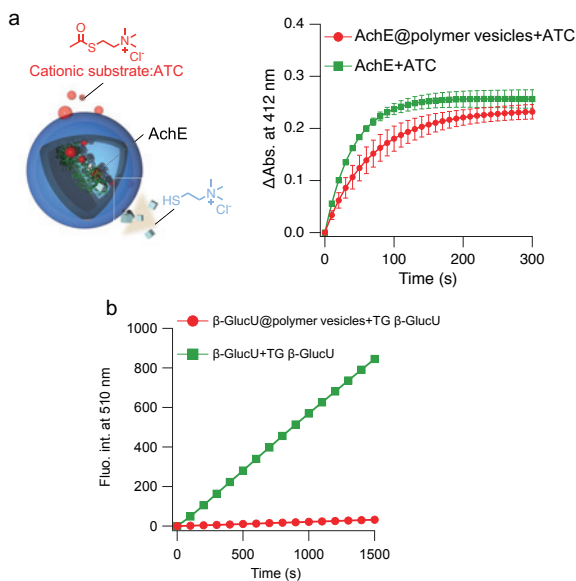


Fig. 5 (a) Time course of the absorbance at 412 nm in PBS buffer at 25 °C for acetylcholine esterase in the presence of acetyl thiocholine and enzyme-loaded vesicles in the presence of acetyl thiocholine, (b) β -glucuronidase activity assay

3. 人工分子チャンネルとしての機能

緒言で述べたように通常のベシクル(例えば、リン脂質リポソーム)は、極めて分子透過性が低いことが知られている。したがって、リポソームを酵素反応場として利用する際には、外部から基質を供給する工夫が必要となる。これまでは、チャンネル型膜タンパク質のリポソームへの組み込みなどが試みられてきたが、タンパク質の安定性の低さや大量に作製できないなどの課題があった。このような背景のもと、我々が開発した両親媒性ポリマーをリポソームへと組み込むことができれば、分子透過性の付与ができるのではないかとこの着想に至った。

そこで、まず、オリゴアスパラギン酸を有する両親媒性ポリマーが、リン脂質ベシクルに組み込まれるか評価を行った。ここでは、rhodamineを化学修飾したブロックポリマーをNBDが化学修飾されたDOPEおよびDOPCからなるリン脂質と混合した後、静置水和法によりジャイアントベシクルを作製した。得られたベシクルを共焦点顕微鏡により観察したところ、ポリマーリッチなドメインを形成している事がわかった。これは、リン脂質の膜厚(~5 nm)とポリマー二分子膜厚(11.4 nm)に大きな差があるために、リン脂質膜上で均一に分布できず、相分離により不均一にポリマーが分布したためと考えられる。また、FRET解析によっても、ポリマーリッチなドメインを形成していることを確認した。

両親媒性ポリマーが、DOPCリン脂質とハイブリッド膜

を形成することから、次に、リン脂質二分子膜上で人工分子チャンネルとして機能評価を行った。ここでは、DOPCを90 mol%, ポリマーを10 mol%含有するジャイアントハイブリッドベシクルを用いて、rhodamine 6GとFITC-PEGを添加した際のハイブリッドベシクルの透過能を評価した。Fig. 6よりハイブリッドベシクル内のFITC-PEGおよびrhodamine 6Gの蛍光強度が、添加して4時間後には増大していることがわかる。これらの結果は、組み込まれたポリマーを介して、FITC-PEGおよびrhodamine 6Gがベシクル内に取り込まれたことを意味する。この結果から、リポソームへ組み込まれたポリマーは、人工分子チャンネルとして機能することが明らかとなった。

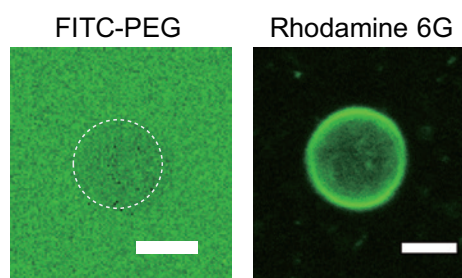


Fig. 6 The permeability tests of the hybrid vesicles for two hydrophilic molecules. CLSM images of oligo(aspartic acid)-*b*-PPO/DOPC hybrid vesicles 4 h after the addition of the fluorophores; scale bar = 10 μ m.

次に、分子透過性を有するハイブリッドベシクルの酵素反応場としての機能評価を行った。ここでは、ポリマーを10 mol%と脂質DOPCからなるハイブリッドベシクルに静置水和によりacetyl choline esterase(AchE)を内包し、ゲル濾過法により、内包されていないAchEを除去した。次いで、acetyl thiocholine(ATC)およびElmans試薬をハイブリッドベシクル溶液に添加し、酵素反応をUV-vis分光法を用いて追跡した。412 nmの吸光度は、時間とともに増加していることから、ATCがベシクルの内部に供給され、AchEによって加水分解を受け、Elmans試薬と反応したことを示している(Fig. 7)。一方、透過性を示さないDOPCベシクル系では、412 nmでの吸光度は、上昇しなかった。さらに、AchE含有ポリマーベシクル(Fig. 5a)とAchE含有ハイブリッドベシクルの初期反応速度(dA/dt)を比較したところ、AchE含有ポリマーベシクルの初期反応速度($dA/dt = 3.4 \times 10^{-3} \pm 1.7 \times 10^{-4}$)は、AchE含有ハイブリッドベシクルの初期反応速度($dA/dt = 2.0 \times 10^{-4} \pm 1.1 \times 10^{-4}$)の17倍であった。ハイブリッド膜に組み込まれたポリマーがベシクル表面の約10%を占めると仮定した場合、AchE含有ハイブリッドベシクルの速度はAchE含有ポリマーベシクルの速度の約10倍遅くなることが予想される。ハイブリッドベシクルでの酵素反応の初速度と予想される初速度との差がわずかであることから、膜の透過性は、ポリマードメインが主に寄与

していることを示唆している。以上の結果より、組み込まれたポリマーが分子チャネルとして機能し、ハイブリッドベシクルが酵素ナノリアクターのコンパートメントとして機能することができることを実証した。

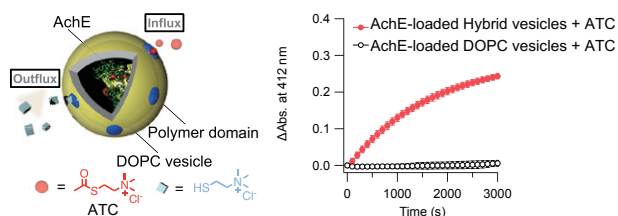


Fig. 7 time course of the absorbance at 412 nm in PBS buffer at 25 °C for AchE-loaded liposome in the presence of ATC (open circles) and AchE-loaded hybrid vesicles in the presence of ATC (red circles).

4. おわりに

本研究では、電荷を有するオリゴアスパラギン酸とポリプロピレンオキサイド鎖からなる両親媒性ブロックポリマーが、基質の電荷選択的な分子透過性を示す高分子ベシクルを形成すること、また、カチオン性分子に対して高い透過能を持つことを明らかにした。このように、基質とベシクル表面との相互作用を利用して、透過の選択性・速度を向上させるアプローチは、汎用性が高く、今後、より高い選択性を有する分子透過性高分子ベシクルを設計する上で、重要な概念となると考えられる。

さらに、このポリマーは、リポソームに組み込むことが可能で、組み込まれたポリマーは、人工分子チャネルとして機能することを世界で初めて見出した。本手法は、脂質膜上に膜タンパク質や合成人工チャネルを組み込むなど、以前に記載された方法と比較して、より簡便、安価や高い安定性など様々な利点がある。このようにして得られた分子透過性を有するハイブリッドベシクルは、プロドラッグの活性化や毒性物質の変換などが可能なDDSナノファクトリーへの展開などが期待できる。

参考文献

- 1) Y. Tanaka, M. Miyachi, Y. Kobuke, *Angew. Chem., Int. Ed.* **138**, 504 (1999)
- 2) D. E Discher, A. Eisenberg, *Science*, **297**, 967 (2002)
- 3) M. Antonietti, S. Förster, *Adv. Mater.* **15**, 1323 (2003)
- 4) J. J. Richardson, J. Cui, M. Björnmalm, J. A. Braunger, H. Ejima, F. Caruso, *Chem. Rev.* **116**, 14828 (2016)
- 5) K. Harano, E. Nakamura, *Acc. Chem. Res.* **52**, 2090 (2019)
- 6) T. Nishimura, K. Akiyoshi, *Adv. Sci.* **5**, 1800801 (2018)

- 7) T. Nishimura, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Adv. Mater.* **29**, 1702406 (2017)
- 8) C. A Kerfeld, M. R. Sawaya, S. Tanaka,; C. V. Nguyen, M. Phillips, M. Beeby,; T. O. Yeates, *Science* **309**, 936 (2005)
- 9) J. N. Kinney, S. D. Axen, C. A. Kerfeld, *Photosynth. Res.*, **109**, 21 (2011)
- 10) T. Nishimura, S. Hirose, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 154 (2020)

幹細胞からのオルガノイド形成

Self-organized formation of complex organoids from stem cells

永樂 元次

Mototsugu EIRAKU

Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Since the first report on the technology for forming cerebral cortical tissue in culture dishes from mouse and human embryonic stem cells (ES cells) (Eiraku et al., 2008), competition for the development of neural organoids technology has spread worldwide. At present, neural organoids are used in a wide range of research fields, including regenerative medicine, pathological models, applications of drug discovery platforms, and those that show usefulness as evolutionary and developmental biological models of human brain formation, and many reports have been made. Neural organoids are often formed from pluripotent stem cells (ES / iPS cells). Multicellular phenomena such as nerve induction, neuroepithelium formation, neural pattern formation, neurogenesis, tissue morphogenesis, and layer structure formation are recapitulated in a culture dish. Here, I explain the process of mammalian neural development and the principle of formation of neuronal organoids, and introduce our recent achievement, olfactory organoid formation technology.

1. はじめに

マウスおよびヒト胚性幹細胞 (ES細胞) から培養ディッシュ内で大脳皮質組織を形成する技術について初めて報告されて以降 (Eiraku et al., 2008)、神経オルガノイド研究は世界的に広がり、現在では再生医療の移植用途や病態モデル、創薬プラットフォームなどの応用を目指したことから、ヒト脳形成の進化発生生物学的モデルとしての有用性を示すものまで、幅広い研究分野で受け入れられ多くの報告がなされている。神経オルガノイドは多くの場合、多能生幹細胞 (ES/iPS細胞) をソースとして使用し、神経誘導、神経上皮形成、パターン形成、神経産生、組織形態形成、層構造形成などの多細胞現象を培養ディッシュ内で再現する。以前から、神経幹細胞は1細胞からニューロスフェアと呼ばれる神経細胞塊を形成することは知られていたが、ニューロスフェアでは層構造形成や組織形態形成などの生体の神経発生過程において観察される複雑な多細胞現象を再現することはできない。この点は、腸管オルガノイドなどの体性幹細胞をソースとし1細胞からオルガノイド形成が可能な実験系とは異なる。本講演では、哺乳類の神経発生過程と神経オルガノイドの形成原理を概説し、われわれの最近の成果である嗅上皮オルガノイドの形成とその応用について概説したい。

2. 哺乳類神経発生過程

ほ乳類の胚盤胞において、内部細胞塊 (inner cell mass)

はエピブラスト (epiblast) と呼ばれる多能性を有した上皮組織へと分化する。エピブラストの後方ではWntシグナルおよびNodalシグナルの作用により原条 (primitive streak) が誘導される。原条では上皮間葉転換を介して中内胚葉系の細胞が産生される。一方、エピブラストの前方ではこれらの誘導シグナルの活性が阻害因子であるDkkやLeftyの発現により抑制され、神経外胚葉を形成する。このような神経組織誘導メカニズムは哺乳類だけでなく、アフリカツメガエルを用いた古典的な発生生物学的研究から明らかにされてきたように、脊椎動物では共通してみられる機構で「神経誘導のデフォルトモデル」として知られている (Sasai et al., 1994)。つまり初期胚の多能性上皮組織は外部からの刺激がない状態に置かれると、細胞に内在した時計に応じて自発的に神経上皮組織へと細胞状態が遷移するという考え方である。このようにして誘導された神経外胚葉は、神経管形成が起こる以前に既に胚の前後軸に沿ってパターン化されており、Dkk1などのWntシグナル抑制因子やOtx2やSix3などの転写因子が初期の前方神経上皮形成に重要な役割を果たす事が変異マウスの表現系解析や最近のゲノムワイドなエピジェネティクス解析から示唆されている (Acampora, 1995, Metzis et al., 2018)。また、胚体外組織であるvisceral endodermも神経外胚葉の前後パターンニングの形成に関与していることも知られている。その後、チューブ状の神経管が形成され、様々なパターンニング因子が働くことで前後・背腹・

内外側の3つの軸が形成され、その位置情報に応じて神経の各領域が形成される。この時、神経管に位置情報を与えるオーガナイザーとして、前方神経境界領域 (anterior neural ridge: ANR) からのFGFシグナルや中脳後脳境界部 (isthmus) からのWnt・FGFの各シグナルが前後軸形成に関与し、背側正中領域 (盖板、roof plate) からのBMPシグナルや腹側正中領域 (床板、floor plate) からのShhシグナルが背腹軸形成に関与することがニワトリのオーガナイザー移植実験やマウス遺伝学的研究により明らかになっている。

3. 神経オルガノイド誘導の技術的背景

神経オルガノイドは、上述した神経発生過程を再現することで誘導される。以下に、神経発生の3つのステップに分けて説明する。

1) 神経誘導過程

多能性幹細胞の培養系において、神経外胚葉は上述した「神経誘導のデフォルトモデル」に従い、Wntシグナル、BMPシグナルおよびNodalシグナルなどの後方の中内胚葉組織を誘導するために働く各種シグナルを抑制することによって誘導される。また、このような多能性幹細胞からの神経細胞への自発的な分化は、培養液に血清やBMPを加えることによって抑制されることが知られている。これらの実験結果は多能性幹細胞の培養系においても、神経外胚葉が分化の“デフォルト”であることを示唆している。無血清培地で多能性幹細胞を培養することによって効率よく神経細胞へと分化誘導することが可能になるが、この場合大きく分けて二通りの手法が広く用いられている。一つはES細胞あるいはES細胞から分化させた胚様体をトリプシンなどで分散し接着培養する方法、もう一つは胚様体を作製し浮遊培養を行う方法である。神経オルガノイドは主に後者の手法を用いて行う。前者の特徴として培養の簡便さや再現性の良さなどが挙げられるが、後者で得られるような三次元組織の形成を再現することはできない。また、モルフォゲン濃度勾配のような三次元組織特有の発現現象をin vitroで再現することは後者でのみ可能である。

2) パターン形成過程

上述したように、脊椎動物の胚発生において神経上皮組織は前後軸、あるいは背腹軸に沿って異なった特徴を持った神経細胞へと分化する。我々は既知の知見をもとに、特定の種類の神経細胞をin vitroで誘導する試みを行ってきた。その試みの中で、KSR (knockout serum) を含む無血清培地でES細胞を浮遊培養すると、終脳 (telencephalon) を含む前脳 (forebrain) の特徴を持った神経細胞が誘導されてくることがわかった。また、血清に加えてインシュリンも含まない培地 (CDMI) でES細胞を浮遊培養すると、間脳前部とくに視床下部の神経細胞が効率よく誘導された。こういった実験事実は、WntやFGFなどの特定の位置情報シグナルを含まない環境においては、神経管のより前方の特徴を有した神経組織が優先的に分化誘導されることを示唆している。実際、初期の培養条件に後方化シグナル因子として知られるWntやFGFあるいはレチノイン酸を加えると、小脳を含む後脳領域や脊髄などのより後方の神経組織を効率よく誘導することが出来る。このように、目的の神経オルガノイドを誘導するためには、適切な基本培地を選定し、適切なタイミングで外部から増殖因子等の刺激を導入することが重要である (図2)。

また、これまでの研究により、神経上皮組織は自己組織化的にパターン形成を行うことがわかってきた。我々が開発してきたSFEBq法 (Serum-free culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation) を開発した (Eiraku et al., 2008) ではES/iPS細胞を低吸着性のウェルを用いて素早く再凝集させ無血清培地で浮遊培養する。SFEBq法を用いる利点として、同じサイズのES細胞塊を大量に作成できること、また高い再現性を持って効率よく神経上皮組織へと分化させることが挙げられる。SFEBq法では培地の組成によって大脳や小脳、網膜といった脳の様々な領域を誘導する事が出来るが、特定の領域の神経組織を100%の効率で誘導できる訳ではない。多くは複数の領域の混じった神経オルガノイドとして誘導される。例えば、CDM (Chemically Defined Medium) と呼ばれる培地を用いて神経誘導を行なった場合、ES細胞はSix3を発現する前脳領域とIrx3を発現する中脳領域の2つの領域に相互排他的に分割された神経オルガノイドを形成する (Wataya et al., 2008, Takata et al., 2017)。このような自発的なパターン形成は、初期の分化誘導ステージにおいて、FGF

シグナル活性の異方性がまず生じ、そのことが引き金となってSix3の局所的な発現およびWntシグナルのパターン形成を誘導することがわかっている。SFEBq法では外部環境は均一であり、比較的均一なES細胞からなる多細胞体から、細胞間相互作用によつてのみ一連の複雑な現象が自己組織的に起こることは非常に興味深い。しかしながら、FGFシグナルの極性を自己組織的に誘導する分子機構について不明である。また、Oct4とSix3の相互排他的な発現は初期のマウス胚においても確認されたことから、個体発生過程でも今回明らかになった組織自律的な前後軸形成機構が働いている可能性が考えられる。

2. 嗅上皮オルガノイドの形成

上記のようにこれまでに様々な脳オルガノイド形成手法が開発されてきたが、同時に神経同様に外胚葉由来組織である感覚器官オルガノイドの研究も進められてきた。嗅覚組織や内耳、レンズなどの感覚器官はプラコードと呼ばれる外胚葉由来組織から発生する。多能性幹細胞からプロコード組織を誘導する手法はこれまでも報告されているが、嗅組織の発生を模倣する技術はまだ開発されていなかった。今回、我々は嗅上皮及び鼻腔呼吸上皮を含む鼻腔オルガノイドをマウス体性幹細胞及びヒト多能性幹細胞から誘導する方法論を新たに確立した。マウス胎生14日の嗅上皮から幹細胞を単離し、適切な培養条件で培養することで上皮構造を維持したまま成熟した嗅組織へと分化した。これらの構造体は生体の嗅組織と同様の構造を持っていた。

1細胞RNAシーケンス法により細胞のサブタイプを解析した結果、嗅上皮に存在する全ての細胞サブタイプを含んでいることが明らかになった(図1)。さらに系譜解析により全ての細胞サブタイプはHBCと呼ばれる幹細胞から発生することが明らかになった(図2)。また、同様の手法をヒト多能性幹細胞に適用することにより、ヒトES細胞から鼻腔オルガノイドを誘導することにも成功した。ヒト鼻腔オルガノイドに新型コロナウイルスSARS-CoV2に感染させ、1細胞RNAseq解析を行うことで、感染ターゲット細胞を同定した。今後は、新型ウイ

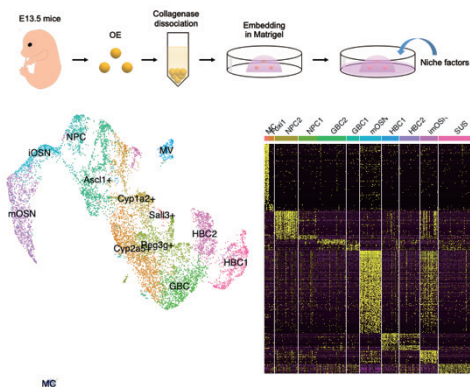


図1：マウス体性幹細胞からの嗅オルガノイド形成とscRNAseq解析

ルスに感染させ、1細胞RNAseq解析を行うことで、感染ターゲット細胞を同定した。今後は、新型ウイ

ルスの嗅覚障害の発症機構を解明することにつながることを期待される。

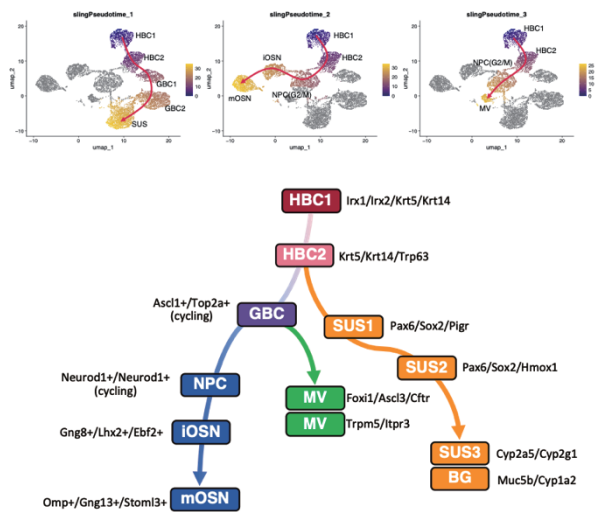


図2：嗅オルガノイドにおける細胞分化系譜解析

しかし用いることができる開始剤系は開始剤1とルイス酸SnBr₄の組み合わせに限られ、開始剤設計による環状高分子の機能化や構造制御は難しかった。しかし、最近になって、これまでリビングカチオン重合の触媒として用いられてこなかった臭化マグネシウム (MgBr₂) が環拡大カチオン重合の触媒として機能し、1以外の環状分子も開始剤として用いることができることを見出したので報告する¹²⁾。

2. MgBr₂を用いたリビングカチオン重合

HAE結合を含む環状開始剤を用いてVEの環拡大カチオン重合を実現するためには、類似の非環状開始剤を用いて高度に制御されたリビング重合が進行しなければいけない。HAE結合の可逆的活性化に対して、酸素親和性の高い臭化マグネシウム (MgBr₂) に着目し、ビニルエーテルのカチオン重合を検討した。マグネシウムをリビングカチオン重合の触媒として用いた例はこれまでに報告されていない。

イソブチルビニルエーテル (IBVE) の酢酸付加体2を用い、MgBr₂を組み合わせるとIBVEのカチオン重合を行ったところ (トルエン中、0°C)、リビングカチオン重合が進行し、生成ポリマーの分子量は開始剤とモノマーの比から予想される計算値とよく一致し、分子量分布は極めて狭かった (図2: $M_w/M_n < 1.1$)。

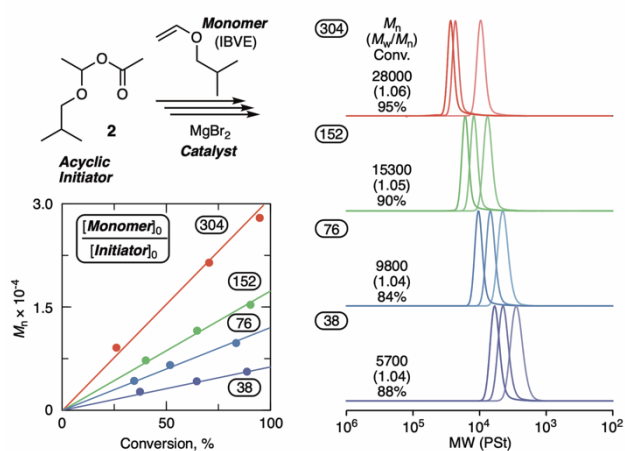


Fig. 2 Living cationic polymerization of IBVE with 2/MgBr₂: [IBVE]₀/[2]₀/[MgBr₂]₀/[DTBMP]₀ = 1520 or 760 or 380 or 190/5.0/10/0.15 mM in toluene/Et₂O = 9/1 at 0°C

生成ポリマーの構造を¹H NMRで解析したところ、IBVEの繰り返し単位に基づくメインピークに加えて、末端構造に起因するマイナーピークが観測され、そのピーク位置から末端構造は停止剤に用いたメタノールが反応して生成するアセタール末端であった (図3A)。HAE結合を維持した際に観測されるHAE末端に基づくピークは観測されなかった。また、MALDI-TOF-MS解析からも、アセタール末端の構

造が確認された (図3B)。このように、MgBr₂を用いて重合は制御されたものの、停止剤を工夫しなければ環拡大重合への展開が難しいことが判明した。

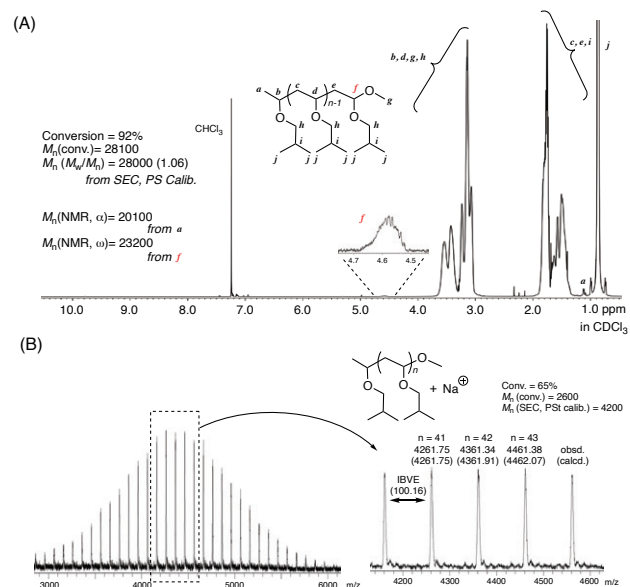


Fig. 3 (A) Structural analysis by ¹H NMR (A) and MALDI-TOF-MS (B). The sample of poly(IBVE) was prepared via living cationic polymerization of IBVE with 2/MgBr₂, followed by quenching with methanol. M_n = 28000 for ¹H NMR, M_n = 4200 for MALDI-TOF-MS.

また、MgBr₂以外にMgCl₂, MgI₂を検討したが、MgBr₂を用いた場合のような重合制御には至らなかった (図4)。また、Mg(OTf)₂を用いた場合は、重合が進行しなかった。以上から、環拡大カチオン重合の展開には、停止剤の検討を要するものの、MgBr₂が特異的にHAE結合型開始剤を用いたリビングカチオン重合の触媒として機能することがわかった。

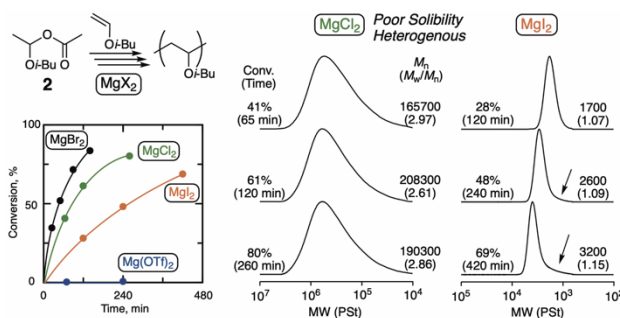


Fig. 4 Effects of the magnesium catalyst in cationic polymerization of IBVE with 2 as an initiator: [IBVE]₀/[2]₀/[Mg Lewis acid]₀/[DTBMP]₀ = 380/5.0/10/0.15 mM in toluene/Et₂O = 9/1 at 0°C

3. MgBr₂を用いた環拡大カチオン重合

3-1. 開始剤1を用いた重合

非環状開始剤2にMgBr₂を組み合わせると、非常に分子量分布の狭いポリマーが得られたことから、MgBr₂は可逆的にHAE結合を活性化し、重合中の不可逆な副反応は抑制できていると考えられた。しかし、停止剤に用いたメタノールが反応してHAE結合を保持できなかったことから、環状開始剤1を用いた重合では停止剤の検討を行い、環状高分子の合成を検討した。環拡大重合によって環状高分子を合成するための停止剤として求められる要件は以下のとおりである。

- ・ルイス酸を失活させるルイス塩基性を示す
- ・成長カチオンとなる炭素に置換反応しない
- ・成長カチオンのβ水素を引き抜かない

環状開始剤1を用いても、重合は進行し、IBVEはスムーズに消費された。これまで用いてきたメタノールを添加して重合を停止させると、非環状開始剤2を用いた場合と同じような分子量分布の狭いポリマーが得られた。一方、停止剤としてDMFやDMSOを用いると、SnBr₄を用いてメタノールで停止した時と同様に、単分散ピークと高分子量側の多峰ピークから成るGPC曲線が得られた(図5)。環状高分子が生成した場合、強い酸を加えて処理すると、HAE結合が不可逆に切断され、直鎖高分子に変換される。その結果、GPC曲線に大きな変化が見られ、融合鎖に基づく高分子量側のピークがなくなり、単環状鎖と考えられるGPCピークは溶出時間が早くなり、ピークトップ分子量が大きくなる。それぞれの停止剤で停止して得られたポリマーに少量のトリフルオロ酢酸(TFA)を加えたところ、メタノールで停止した場合はGPC曲線に変化が見られなかったが、DMFやDMSOで停止した場合は上記の変化を示した。

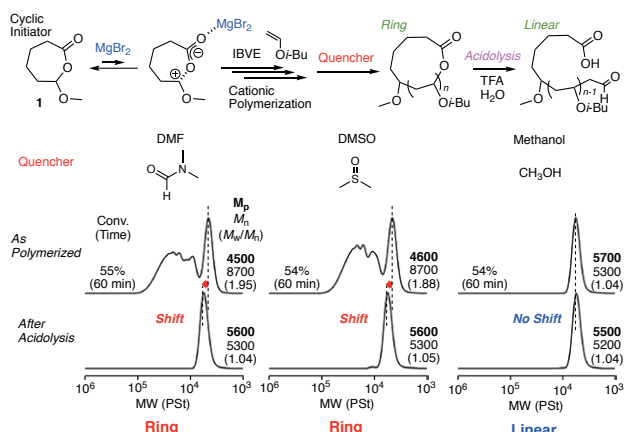


Fig. 5 Effects of quencher on SEC curve of poly(IBVE) prepared via ring-expansion cationic polymerization of IBVE with **1**/MgBr₂: [IBVE]₀/[**1**]₀/[MgBr₂]₀/[DTBMP]₀ = 380/5.0/10/0.15 mM in toluene/Et₂O = 9/1 at 0°C.

さらに、¹H NMRによって構造解析を行うと、メタノール

で停止したポリマーは非環状開始剤2で得られたポリマーと同じようにメタノールで停止したアセタールに基づくピークが観測されたが、DMFやDMSOで停止するとこのピークは観測されず、HAE結合のメチンプロトンのピークが観測された(図4)。ピークの面積比から仕込み比と重合率から予想される割合のHAE結合が導入されていた。また、MALDI-TOF-MSによるピーク解析もNMRの結果をサポートしていたことから、本重合では環拡大重合が進行し、適切な停止剤を選択することで、環状高分子が合成できることが示された。おそらく、MgBr₂のルイス酸性はメタノールを加えてもそれほど低下しない上に、メタノールは炭素カチオンと反応してしまうが、DMFやDMSOはルイス酸性を効率よく低下させたと考えられる。なお、SnBr₄を用いた環拡大重合に対してもDMFは停止剤として機能することがわかった。

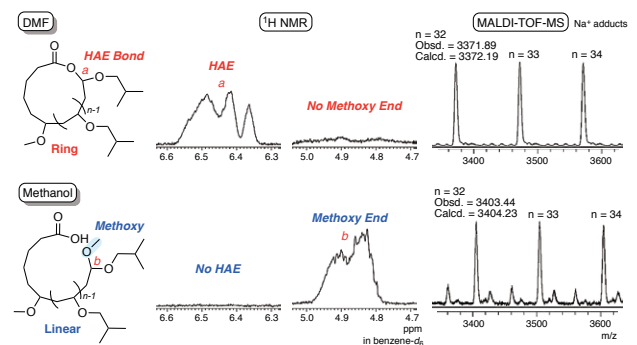


Fig. 6 Effects of quencher on NMR spectrum of terminal group of poly(IBVE) prepared via ring-expansion cationic polymerization of IBVE with **1**/MgBr₂: [IBVE]₀/[**1**]₀/[MgBr₂]₀/[DTBMP]₀ = 380/5.0/10/0.15 mM in toluene/Et₂O = 9/1 at 0°C.

3-2. 1以外の他の環状分子の開始剤としての検討

上述したとおり、SnBr₄を用いた場合、**1**以外のHAE結合を含む環状分子を開始剤として用いても、環拡大重合の制御は難しい。例えば6員環環状分子**3**を用いた場合、多分散ピークが得られるものの、酸による加水分解後のピークは単分散にならず、ピークトップの移動も比較的小さかった(図7)。また、**1**を用いた場合に比べて、重合速度の低下が見られた。しかし、MgBr₂を用いた場合は、より安定と考えられる**3**を用いても、重合速度の低下はなかった。DMFで停止して得られるポリマーのGPC曲線は**1**を用いた場合と同様に多分散であり、酸による加水分解後のピークは単分散で、ピークトップは高分子量側に移動した。MgBr₂を用いた場合、開始剤の環状構造によらず、ほぼ同様の環拡大重合が進行したと考えられる。また、生成ポリマーの構造を¹H NMRによって解析したところ、HAE結合由来のピークは定量的に観測され、環状高分子の生成が確認された。

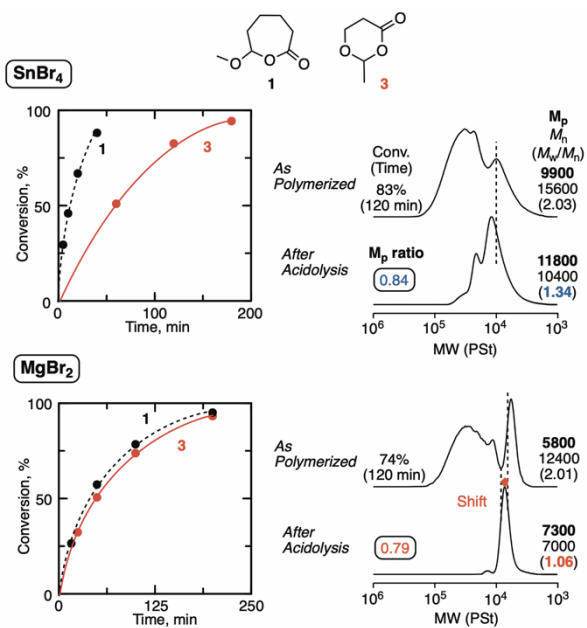


Fig. 7 Comparison of SnBr_4 and MgBr_2 as a catalyst for ring-expansion cationic polymerization of IBVE with **3** as an initiator: $[\text{IBVE}]_0/[\mathbf{3}]_0/[\text{MgBr}_2]_0/[\text{DTBMP}]_0 = 380/5.0/10/0.15$ mM in toluene/ $\text{Et}_2\text{O} = 9/1$ at 0°C .

さらに、マイケル付加反応やラジカル反応に活性を示すと考えられるメタクリレートタイプの二重結合を含む環状分子**4**¹³⁾も開始剤として機能し、環状高分子が生成したと考えられるGPC曲線が得られた。この開始剤についても、 SnBr_4 では環状高分子の生成効率も低かった。

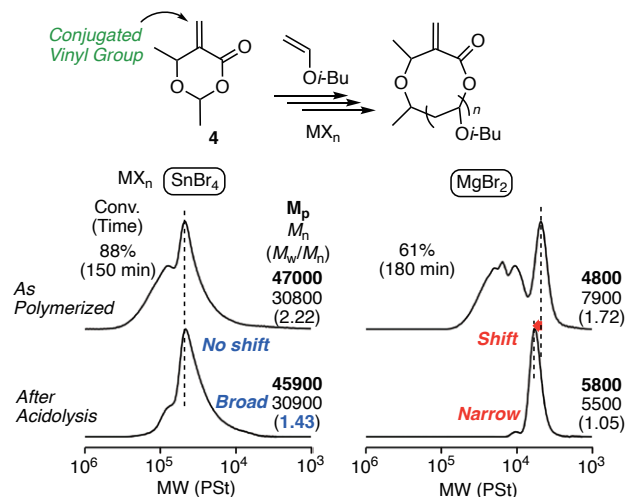


Fig. 8 Comparison of SnBr_4 and MgBr_2 as a catalyst for ring-expansion cationic polymerization of IBVE with **4** as an initiator: $[\text{IBVE}]_0/[\mathbf{4}]_0/[\text{MgBr}_2]_0/[\text{DTBMP}]_0 = 380/5.0/10/0.15$ mM in toluene/ $\text{Et}_2\text{O} = 9/1$ at 0°C .

ここで、**4**から得られた環状高分子に対し、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ を触媒として、チオールエン反応によってチオグリセロールを反

応させた(図9)。反応後に得られた高分子のSEC曲線は反応前の形状を維持しており、一方で $^1\text{H NMR}$ のスペクトルに変化が見られたことから、環状構造を維持したままグリセロール基が導入されたと考えられる。導入後の酸加水分解による直鎖高分子への変換から、グリセロール導入後も環状構造は維持されていたと考えられる。

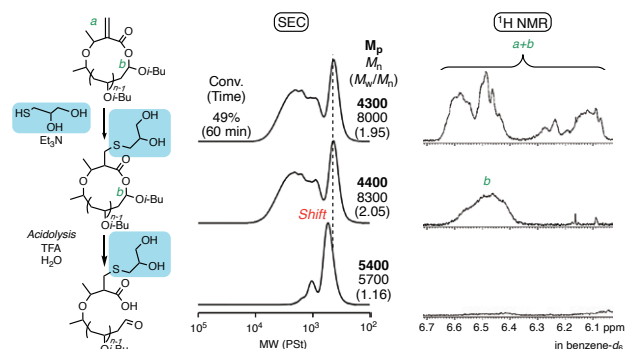


Fig. 9 Thiol-ene reaction of the conjugated double bond with thioglycerol. Polymerization: $[\text{IBVE}]_0/[\mathbf{4}]_0/[\text{MgBr}_2]_0/[\text{DTBMP}]_0 = 380/5.0/10/0.15$ mM in toluene/ $\text{Et}_2\text{O} = 9/1$ at 0°C . Thiol-ene Reaction: α -Thioglycerol (100 eq.), Et_3N (50 eq.) in THF at r.t.

3-3. モデル反応による MgBr_2 のHAE結合親和性評価

開環性の低いHAE結合含環状分子として**5**を設計し、**5**と MgBr_2 の混合溶液の $^1\text{H NMR}$ を測定することで、両者の相互作用を $^1\text{H NMR}$ で評価し、 SnBr_4 と比較した。その結果、 SnBr_4 に比べて、 MgBr_2 はHAE結合と強く相互作用し、電子密度を低下させていることがわかった。 MgBr_2 を用いることで、様々な環状分子が開始剤として機能したのは、この強い相互作用によって重合初期に開始剤同士、あるいは環状オリゴマーと開始剤の環融合がおこって、安定な環状開始剤を用いても円滑な開始反応が起こったためと推察している。

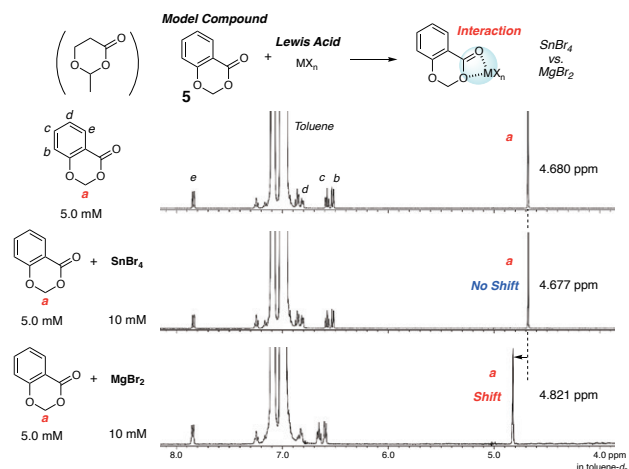


Fig. 10 $^1\text{H NMR}$ evaluation of the interaction of MgBr_2 with the HAE-bond in a cyclic molecule with the model compound (**5**).

4. まとめ

触媒としてMgBr₂を用いたビニルエーテルのリビングカチオン重合を初めて実現し、停止剤を工夫することで、環拡大カチオン重合による環状ポリマー合成へ展開した。従来の環拡大カチオン重合に使われてきたSnBr₄に比べて、開始剤の適用範囲が広く、環拡大重合触媒として優れていることがわかった。

参考文献

- 1) M. T. Dang, L. Hirsch, G. Wantz, J. D. Wuest, *Chem. Rev.*, **113**, 3734 (2013). Y. Tezuka, *Polym. J.*, 2012, **44**, 1159-1169.
- 2) B. A. Laurent and S. M. Grayson, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2202-2213.
- 3) H. Kammiyada, A. Konishi, M. Ouchi and M. Sawamoto, *ACS Macro Lett.*, 2013, **2**, 531-534.
- 4) H. Kammiyada, M. Ouchi and M. Sawamoto, *Macromol. Symp.*, 2015, **350**, 105-116.
- 5) H. Kammiyada, M. Ouchi and M. Sawamoto, *Polym. Chem.*, 2016, **7**, 6911-6917.
- 6) H. Kammiyada, M. Ouchi and M. Sawamoto, *Macromolecules*, 2017, **50**, 841-848.
- 7) H. Kammiyada, M. Ouchi and M. Sawamoto, *J Polym Sci Pol Chem*, 2017, **55**, 3082-3089.
- 8) M. Ouchi, H. Kammiyada and M. Sawamoto, *Polym. Chem.*, 2017, **8**, 4970-4977.
- 9) H. Kubota, S. Yoshida and M. Ouchi, *Polym. Chem.*, 2020, **11**, 3964-3971.
- 10) S. Aoshima and T. Higashimura, *Macromolecules*, 1989, **22**, 1009-1013.
- 11) T. Hashimoto, T. Iwata, A. Minami and T. Kodaira, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 1998, **36**, 3173-3185.
- 12) Y. Daito, R. Kojima, H. Kusuyama, Y. Kohsaka, and M. Ouchi, *Polym. Chem.*, 2021, DOI: 10.1039/D0PY01584A.
- 13) Y. Kohsaka, Y. Matsumoto, T. Y. Zhang, Y. Matsuhashi and T. Kitayama, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2016, **54**, 955-961.

非フラーレン高分子太陽電池における開放電圧

Open-Circuit Voltage in Nonfullerene-Based Polymer Solar Cells

大北 英生・キム ヒョンド・井手 拓弥

Hideo OHKITA, Hyung Do KIM, Takuya IDE

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

Herein, we have studied open-circuit voltage (V_{OC}) of polymer solar cells based on a blend of a crystalline conjugated polymer (PTzBT) and two different acceptor molecules: one is a fused-ring nonfullerene acceptor (ITIC) and the other is a fullerene derivative acceptor (PCBM). The energy level of frontier orbitals was evaluated for these blend films by cyclic voltammetry measurements. As a result, we found that there is no difference in the energy level of highest occupied molecular orbital (HOMO) of PTzBT and that ITIC has an energy level of lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) lower than PCBM. In other words, the energy difference between donor HOMO and acceptor LUMO ΔE_{DA} was estimated to be 1.56 eV for PTzBT/ITIC and 1.72 eV for PTzBT/PCBM, suggesting that the charge transfer (CT) state would be lower in PTzBT/ITIC than in PTzBT/PCBM. Interestingly, however, PTzBT/ITIC solar cells exhibited larger V_{OC} than PTzBT/PCBM solar cells even though the LUMO of ITIC is lower than that of PCBM. In order to address the origin of the different V_{OC} , we measured temperature dependence of V_{OC} of these polymer solar cells. From an extrapolated value of V_{OC} at 0 K, we evaluated an effective bandgap energy $\Delta E_{D/A}$ of the CT state formed at a donor/acceptor interface in these polymer solar cells. We found that $\Delta E_{D/A}$ is different from ΔE_{DA} for the two polymer solar cells, suggesting that there should be some driving force to raise the interfacial CT state in PTzBT/ITIC blend films. We discussed two possible scenarios with the assumption that ITIC molecules are perpendicularly oriented to polymer chains as reported for similar nonfullerene-based polymer solar cells. One is due to smaller Coulomb binding energy in PTzBT/ITIC blend films because of longer charge separation distances in the CT state. The other is due to a quadrupole moment of ITIC molecules, which would raise energy levels at the interface. We believe that these findings could be applied to new strategy for improving V_{OC} in nonfullerene-based polymer solar cells.

1. はじめに

人類が直面している喫緊の課題である地球温暖化への対策が迫られる中、各国は2050年までに温室効果ガスの排出をゼロにするカーボンニュートラルの達成を目指している。1 kWhあたりのCO₂の排出量は、天然ガスや石炭などの化石燃料ではそれぞれ400–500 g kWh⁻¹、900–1000 g kWh⁻¹であるのに対して、再生可能エネルギーであるシリコン太陽電池ではわずか50 g kWh⁻¹程度であり、有機薄膜太陽電池ではさらに5–9 g kWh⁻¹程度にまで削減可能との試算も報告されている¹⁾。有機薄膜太陽電池の実用化を目指して、高効率化、高耐久性の実現に向けた研究が世界各国で加速度的に進められている。

有機薄膜太陽電池の中でも、発電層に共役高分子半導体を用いた高分子太陽電池のエネルギー変換効率 (power conversion efficiency: PCE) は、近年急速に向上している。この急速な効率向上に大きな役割を果たしているのが、非フラーレン系の電子アクセプター性の分子である。従来のフラーレン系電子アクセプター分子は電子輸送性が高いことから広く用いられてきたが、対称性の高い分子構造のため可視光領域の吸収帯は禁制であり光捕集特性が低いという課題を有していた。そのため、フラーレン系電子アクセプター分子を用いた高分子太陽電池の効率は12%程度にとどまっていた。ペリレンジミド化合物に代表される縮環構造を有する芳香族系電子アクセプター分子は強い吸収帯を有し、電子アクセプター性材料として古くから用

いられているが、スピンコート法などの溶液プロセスにより製膜すると、過度な凝集が起こり高い効率を実現することは困難であった。最近になって、過度な凝集を効果的に抑制することのできる縮環系電子アクセプター分子^{2,3)}が開発されるようになり、高分子太陽電池の効率は飛躍的に向上するようになった。2020年には単セル構造の素子に対しても18%以上の効率^{4,5)}が報告されるようになり、変換効率20%の実現が現実味を帯びてきたといえる。

太陽電池のエネルギー変換効率は、入射した太陽光エネルギーに対して最大出力できる太陽電池の電力で定義され、短絡電流密度 (J_{sc}) と開放電圧 (V_{oc}) と曲線因子 (FF) の積で与えられる。したがって、太陽電池の効率を向上させるには、これら三つのパラメータをバランスよく増加させることが求められる。このうち V_{oc} は、発電層に生成した正孔と電子のエネルギー準位差に律速される。高分子太陽電池では、正孔は正孔輸送性材料 (電子ドナー性材料) の最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital: HOMO) に、電子は電子輸送性材料 (電子アクセプター性材料) の最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital: LUMO) にそれぞれ存在する。そのため、 V_{oc} は電子ドナー (D) のHOMO準位と電子アクセプター (A) のLUMO準位のエネルギー差 ΔE_{DA} に律速されることになる。実際、高分子太陽電池の開放電圧エネルギー qV_{oc} (q は電気素量) は、 ΔE_{DA} と線形関係を示すことが報告されている⁶⁾。本稿では、電子ドナー性の結晶性共役高分子に対して、LUMO準位がほぼ同程度のフラーレン系電子アクセプター分子と非フラ

ーレン系の電子アクセプター分子を用いた高分子太陽電池の開放電圧について議論した研究成果を報告する。

2. 太陽電池特性

本研究で用いた結晶性共役高分子 (PTzBT) と電子アクセプター分子 (ITICおよびPCBM) の構造式を図1に示す。電子ドナー性共役高分子であるPTzBTの主鎖構造は、電子吸引性ユニットであるチアゾロチアゾール (TzTz) と電子供与性ユニットであるピチオフェン (BT) から構成されており、分子内電荷移動相互作用により吸収帯域の長波長化が図られている。また、溶解性高めるためチオフェンユニットに枝分かれ側鎖である2-butylloctyl基 (BO) と2-hexyldecyl基 (HD) を有している。電子アクセプター分子には、縮環系の非フラレーン電子アクセプター分子であるITICとC₆₀フラレーン誘導体であるPCBMを用いた。ITIC

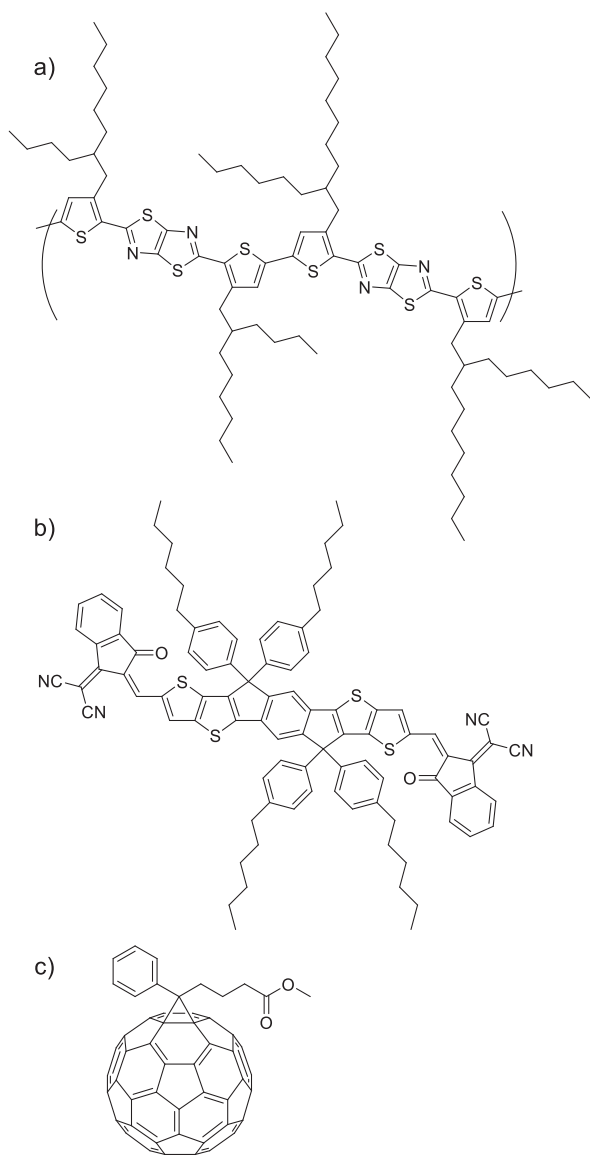


Figure 1. Chemical structures of materials employed in this study: a) PTzBT-BOHD, b) ITIC, and c) PCBM.

は中央のコア骨格部分の電子ドナー性ユニットにかさ高いフェニルアルキル基を四つ導入することにより過度な凝集を抑制している。コア骨格の両末端には強い電子アクセプター性ユニットが連結されており、A-D-A型の分子構造により吸収帯の長波長化を実現するとともに、末端の電子アクセプター性ユニットが隣接分子間でスタックすることにより電子輸送性を担保している。

PTzBT/ITICおよびPTzBT/PCBMブレンドからなる高分子太陽電池の素子特性を表1に示す。この中で注目すべき点は V_{oc} の違いである。電子ドナー材料は両者ともにPTzBTと共通であるので、 V_{oc} は電子アクセプター材料のLUMO準位に依存すると考えられる。既報によると、上述したように、両者のLUMO準位はほぼ同程度あるいはPCBMの方がやや浅いと報告されている^{7,8)}。したがって、 ΔE_{DA} の観点からはPTzBT/PCBM素子の方が高い V_{oc} を与えると予想されるが、実際の素子ではPTzBT/ITIC素子の方が高い V_{oc} を示すことが分かった。この開放電圧の違いには再現性があり、有意な差であるといえる。

Table 1. Photovoltaic parameters of PTzBT/ITIC and PTzBT/PCBM solar cells.

Acceptor	$J_{sc} / \text{mA cm}^{-2}$	V_{oc} / V	FF	PCE / %
ITIC	8.77	0.972	0.550	4.68
PCBM	8.37	0.882	0.687	5.07

3. 各材料の電子準位評価

まず、本研究で用いた各材料の電子準位の評価を行った。図2は各材料の薄膜試料の光電子収量分光 (PYS) 測定の結果である。PTzBT/ITICブレンド膜、PTzBT/PCBMブレンド膜、PTzBT膜の三種類の薄膜の測定結果をまとめて

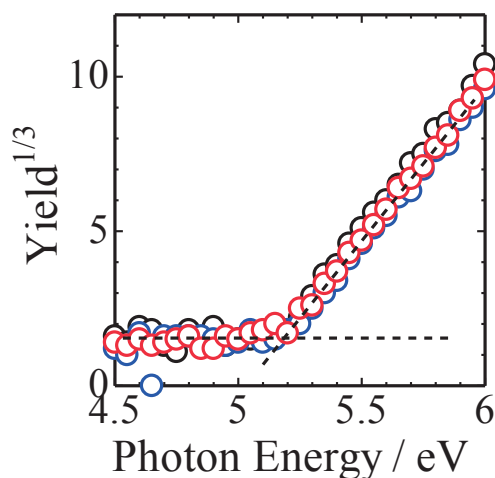


Figure 2. Photoelectron emission yield spectra of PTzBT/ITIC blend (red circles), PTzBT/PCBM blend (blue circles), and PTzBT neat (black circles) films.

いるが、これらすべての膜のPYSの結果はほぼ重なっており、しきい値から評価するイオン化エネルギーはいずれも5.2 eVと見積もられた。結晶性共役高分子薄膜では表面は結晶性が高い相が偏析する傾向にあるので、これらは主に結晶相のHOMO準位を観測していると考えられる。すなわち、いずれの膜状態においてもPTzBTの結晶相のHOMO準位はほぼ等しいと考えられる。

次に、PTzBT薄膜、PTzBT/ITICブレンド膜、PTzBT/PCBMブレンド膜のサイクリックボルタンメトリー (CV) 測定を行い、薄膜における電子準位を評価した。図3にその結果を示す。この図の横軸は、基準試料であるフェロセン/フェロセニウムイオン (Fc/Fc⁺) の酸化還元電位を同時に測定し、既報により同電位を基準として真空からのエネルギー準位に換算した値である⁹⁾。グラフの左側に観測された酸化還元波は電子アクセプター分子のITICおよびPCBMの還元電位に帰属できる。ピーク位置からLUMO準位を評価すると、ITICは-3.91 eV、PCBMは-3.75 eVと見積もられた。すなわち、PCBMの方がLUMO準位は浅く、ITICよりも高い V_{oc} を与えることを示唆している。一方、グラフ右側に観測された酸化還元波は電子ドナー分子のPTzBTの酸化電位に帰属できる。最も低電位の酸化波は-5.20 eV付近に立ち上がりとして観測され、PYSの結果と良い相関を示すことから結晶相のHOMO準位に対応すると考えられる。第二の酸化波の立ち上がりは-5.47 eV付近に観測され、これは非晶相のHOMO準位に対応すると考えられる。これら二つの酸化電位はPTzBT/ITICおよびPTzBT/PCBMブレンド膜においてほぼ同じ値を示しており、ブレンド膜中におけるPTzBTのHOMO準位には差がないといえる。以上の結果を表2にまとめる。低分子であるITICやPCBMはPTzBT非晶相に存在し混合相を形成していると考えられるので、非晶相の値を用いて ΔE_{DA} を計算すると、PTzBT/ITICでは

Table 2. Energy levels of PTzBT, ITIC, and PCBM.

	crystalline PTzBT	amorphous PTzBT	ITIC	PCBM
LUMO / eV			-3.91	-3.75
HOMO / eV	-5.20	-5.47		

1.56 eV、PTzBT/PCBMでは1.72 eVと見積もられる。すなわち、各材料単独の薄膜の電子準位から見積もった ΔE_{DA} の値からはPTzBT/PCBMブレンド素子の方が高い V_{oc} を与えると予想され、表1に示す実際に得られた V_{oc} を説明できない。このことは、ブレンド膜中のヘテロ接合界面において形成する電荷移動 (CT) 状態の電子準位 E_{CT} は、電子ドナーのHOMO準位と電子アクセプターのLUMO準位以外の要因の影響を受けていることを示唆している。

4. ヘテロ接合界面での E_{CT} の評価

ブレンド膜中のヘテロ接合界面において形成するCT状態の実効的なバンドギャップである ΔE_{DA} と qV_{oc} の間には一般に以下の関係式が成立するので、 qV_{oc} の値を0 Kへ外挿した値から ΔE_{DA} を見積もることができる。

$$qV_{oc} = \Delta E_{DA} - k_B T \ln \left(\frac{N_C N_V}{np} \right) \quad (1)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 N_C および N_V はそれぞれ伝導帯および価電子帯の状態密度、 n および p は発電層における電子および正孔の密度をそれぞれ表す。図4に示すように、 qV_{oc} の0 Kへの外挿値から ΔE_{DA} を評価すると、PTzBT/ITIC素子では1.34 eV、PTzBT/PCBM素子では1.29 eVと見積もられた。すなわち、これらのブレンド膜中のヘテロ接合界面において形成するCT状態の電子準位はPTzBT/ITICの方が高く、各ニート材料に対して測定した値

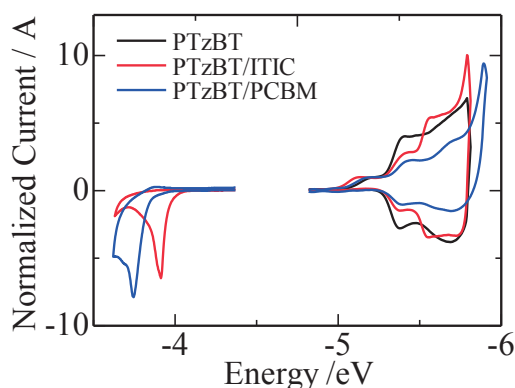


Figure 3. Cyclic voltammogram of PTzBT neat (black lines), PTzBT/ITIC blend (red lines), and PTzBT/PCBM (blue lines). The scan rate was 5 mV s⁻¹. The x axis is a relative energy assuming that the redox potential of Fc/Fc⁺ is -4.8 eV.

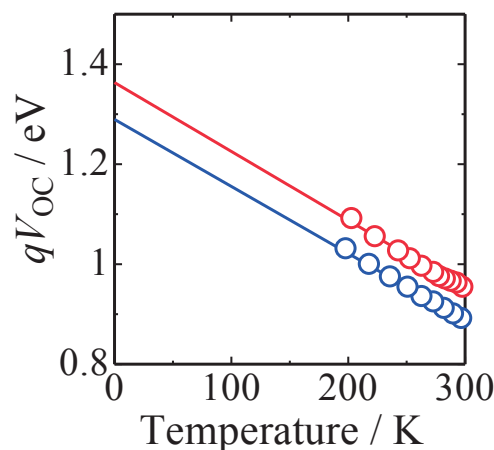


Figure 4. Temperature dependence of qV_{oc} for crystalline polymer solar cells: PTzBT/ITIC (red circles) and PTzBT/PCBM (blue circles). The solid lines represent the fitting curves with Eq. 1.

から見積もった ΔE_{DA} とブレンド膜に対して見積もった $\Delta E_{D/A}$ が異なることを示している。表3に両者の違いをまとめる。

Table 3. Energy levels of PTzBT/ITIC and PTzBT/PCBM.

	ΔE_{DA} / eV (Neat)	$\Delta E_{D/A}$ / eV (Blend)	Difference / eV
PTzBT/ITIC	1.56	1.34	0.22
PTzBT/PCBM	1.72	1.29	0.43

5. CT準位を変化させる要因は？

これまでに示した実験結果より、PTzBT/ITICブレンド膜とPTzBT/PCBMブレンド膜では、ヘテロ接合界面において形成するCT状態の電子準位に影響を及ぼす要因がそれぞれ異なることを示唆している。ここでは、考えられるいくつかの要因について議論する。ITICとPCBMの分子構造を比べると、前者は直線状の異方性のある形状であるのに対して、後者は球状であり異方性がほとんど無い形状である点が大きく異なる。両分子とも凝集性を示すことからヘテロ接合界面における配向状態の違いが原因の一つとして考えられる。実際、PBDB-Tとよばれる共役高分子とITICのブレンド膜のヘテロ接合界面では、ITICがPBDB-T主鎖に対して垂直に配向することが報告されている^{10,11}。以下では、図5に示すように、PTzBT/ITICブレンド膜においても同様にPTzBT主鎖に対してITICが垂直配向していると仮定して議論を進める。

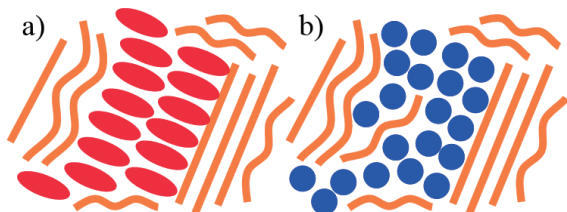


Figure 5. Schematic illustration of molecular orientation at a donor/acceptor interface in a) PTzBT/ITIC and b) PTzBT/PCBM blend films. The orange lines, red ellipses, and blue circles represent PTzBT polymer chains, ITIC molecules, and PCBM molecules, respectively.

各材料に対して測定した値から見積もった ΔE_{DA} とブレンド膜に対して見積もった $\Delta E_{D/A}$ が異なる要因としては、後者では正電荷と負電荷が界面で近接した状態であることである。すなわち、 $\Delta E_{D/A}$ には正電荷と負電荷のクーロン相互作用の寄与が含まれる。表3に示す ΔE_{DA} と $\Delta E_{D/A}$ との差がクーロン束縛エネルギーによるものとする、正電荷と負電荷の距離は、PTzBT/ITICブレンド膜では1.87 nm、PTzBT/PCBMブレンド膜では0.96 nmと見積もられる。ここで、比誘電率は3.5と仮定した。この距離の差は、以下に示すように、分子配向の違いにより説明ができる程度である。ITICおよびPCBMともにLUMOの軌道は分子全体に広

がっている、負電荷も分子全体に非局在化すると予想される。したがって、正電荷と負電荷の距離を分子の重心位置にとると、直線状分子であるITICではヘテロ接合界面からPCBMよりも離れた位置に負電荷が実効的に存在するとみなせる。ITICの分子長軸の長さはおよそ3 nm程度、PCBMのフラーレン部位の直径はおよそ1 nm程度であるので、分子末端から重心までの距離はITICが1.5 nm、PCBMが0.5 nm程度と見積もられる。PTzBT側を0.4 nmとすれば上述の値にほぼ一致するので説明可能な範囲であるといえる。

次に、ITICの分子構造に着目すると、A-D-A型の分子構造であるので $A^{\delta-}-D^{2\delta+}-A^{\delta-}$ の分極構造に由来する四重極を有する点が特徴である。このような四重極を有する分子が配向すると界面での電位が変化することが報告されている^{11,12}。ITICについて、DFT計算により中央のコア部位および末端アクセプター部位のMulliken電荷を評価すると、それぞれ0.32および-0.16と見積もられ、 $A^{\delta-}-D^{2\delta+}-A^{\delta-}$ の分極構造を有することが分かった。また、四重極モーメントを同じくDFT計算により評価すると、表4に示すように、分子長軸の Q_{xx} が最も大きい負の値を有することが分かった。四重極分子が界面に対して垂直に配向した簡単なモデル構造に対して四重極の効果を実算すると、界面における電位が数百meVのオーダーで上昇することが分かった。したがって、四重極の効果によっても表3に示す電子準位の差をある程度説明できるといえる。

Table 4. Quadrupole moments of ITIC.

	Q_{xx} / ea_0^2	Q_{yy} / ea_0^2	Q_{zz} / ea_0^2
Quadrupole moment	-105.3	31.8	73.5

x: long axis of the molecule, y: short axis of the molecule, z: axis normal to the molecular plane.

6. まとめ

電子ドナー性の結晶性共役高分子PTzBTに対して異なる二種類の電子アクセプター分子を用いた高分子太陽電池の開放電圧について検討した。電子アクセプター分子には縮環系非フラーレンアクセプター分子であるITICとフラーレン誘導体であるPCBMを用いた。PTzBT/ITICおよびPTzBT/PCBMブレンド膜に対してCV測定を行い、電子ドナーであるPTzBTのHOMO準位ならびに電子アクセプター分子のLUMO準位を評価した。その結果、PTzBTのHOMO準位はいずれのブレンド膜においてもほぼ同じであり明確な差は見られなかった。これに対して、電子アクセプター分子のLUMO準位には明確な違いが見られ、ITICのLUMO準位は-3.91 eV、PCBMのLUMO準位は-3.75 eVと見積もられた。この結果からはPTzBT/PCBMブレンド素子において高い V_{oc} が観測されると期待されるが、実際にはPTzBT/ITICブレンド素子の方がおよそ0.1 V高い V_{oc} を示

した。この違いの起源を明らかにするためブレンド膜中のヘテロ接合界面において形成するCT状態の実効的なバンドギャップである $\Delta E_{D/A}$ を V_{oc} の温度依存性から評価した。その結果、PTzBT/ITICブレンド膜の方が $\Delta E_{D/A}$ の値は0.05 eV程度も大きな値を示し、 V_{oc} の大小関係と一致した。つまり、PTzBT/ITICブレンド膜における高い V_{oc} はヘテロ接合界面において形成するCT準位が上昇する機構が存在していることを示唆している。現在のところ明確な機構を明らかにするには至っていないが、球対称なPCBMと異なり直線状のITICがヘテロ接合界面に対して垂直に配向した分子集合状態をとっていると仮定すると、実効的なクーロン束縛エネルギーの低下や四重極の影響によりCT準位が上昇する可能性があると考えられる。今後は、ヘテロ接合界面での分子配向状態を明らかにするとともに、配向状態を制御する要因を解明することが必要である。

謝辞

本研究で用いたPTzBTは、広島大学大学院工学研究科の尾坂格教授、斎藤慎彦助教よりご提供いただいた。また、本研究はJSTのALCAプログラム（JPMJAL1404）の支援を受けて実施したものである。この場を借りて御礼申し上げる。

参考文献

- 1) M. Riede, D. Spoltore, K. Leo, *Adv. Energy Mater.*, in press. DOI: 10.1002/aenm.202002653
- 2) G. Zhang, J. Zhao, P. C. Y. Chow, K. Jiang, J. Zhang, Z. Zhu, J. Zhang, F. Huang, H. Yan, *Chem. Rev.*, **118**, 3447–3507 (2018).
- 3) F. Zhao, H. Zhang, R. Zhang, J. Yuan, D. He, Y. Zou, F. Gao, *Adv. Energy Mater.*, **10**, 2002746 (2020).
- 4) Q. Liu, Y. Jiang, K. Jin, J. Qin, J. Xu, W. Li, J. Xiong, J. Liu, Z. Xiao, K. Sun, S. Yang, X. Zhang, L. Ding, *Sci. Bull.*, **65**, 272–275 (2020).
- 5) Y. Lin, M. I. Nugraha, Y. Firdaus, A. D. Scaccabarozzi, F. Aniés, A.-H. Emwas, E. Yengel, X. Zheng, J. Liu, W. Wahyudi, E. Yarali, H. Faber, O. M. Bakr, L. Tsetsetis, M. Heeney, T. D. Anthopoulos, *ACS Energy Lett.*, **5**, 3663–3671 (2020).
- 6) M. Scharber, D. Mühlbacher, M. Koppe, P. Denk, C. Waldauf, A. Heeger, and C. Brabec, *Adv. Mater.*, **18**, 789–794 (2006).
- 7) L. Benatto, C. F. N. Marchiori, C. M. Araujo, M. Köhler, *J. Mater. Chem. C*, **7**, 12180–12193 (2019).
- 8) Q. Zhang, X. Yuan, Y. Feng, B. W. Larson, G. M. Su, Y. M. Maung, N. Rujisamphan, Y. Li, J. Yuan, W. Ma, *Sol. RRL*, **4**, 1900524 (2020).
- 9) C. M. Cardona, W. Li, A. E. Kaifer, D. Stockdale, G. C. Bazan, *Adv. Mater.*, **23**, 2367–2371 (2011).
- 10) W. Köntges, P. Perkhun, J. Kammerer, R. Alkarsifi, U. Würfel, O. Margeat, C. V.-Ackermann, J.-J. Simon, R. R. Schröder, J. Ackermann, M. Pfannmöller, *Environ. Energy Sci.*, **13**, 1259–1268 (2020).
- 11) M. Schwarze, K. S. Schellhammer, K. Ortstein, J. Benduhn, C. Gaul, A. Hinderhofer, L. P. Toro, R. Scholz, J. Kublitski, S. Roland, M. Lau, C. Poelking, D. Andrienko, G. Cuniberti, F. Schreiber, D. Neher, K. Vandewal, F. Ortmann, K. Leo, *Nat. Commun.*, **10**, 2466 (2019).
- 12) A. Sugie, W. Han, N. Shioya, T. Hasegawa, H. Yoshida, *J. Phys. Chem. C*, **124**, 9765–9773 (2020).

メチルセルロース水溶液への多点会合性有機塩の添加効果

— 粘度・光透過率同時測定法による解析 —

Effect of Organic Salt Possessing Multiple Association Sites on Aqueous Methylcellulose

— Analysis by Simultaneous Measurements of Viscosity and Light Transmittance —

古賀 毅・柴田 基樹・西田 幸次

Tsuyoshi KOGA, Motoki SHIBATA, Koji NISHIDA

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

We have studied addition effect of sodium tetraphenylborate (NaBPh₄) on thermoresponsive behavior of aqueous methylcellulose (MC) solution. In order to evaluate the gelation and phase separation temperature we have constructed a device for the simultaneous measurements of viscosity and light transmittance. Whereas aqueous MC solution without NaBPh₄ formed gels below the phase separation temperature, the phase separation occurred below the gelation temperature when the concentration of added NaBPh₄ exceeded ca. 0.05 M. With further addition of NaBPh₄, the phase separation temperature decreased initially, but it turned upward when the concentration of added NaBPh₄ exceeded ca. 0.15 M. Namely, the addition effect of NaBPh₄ to the phase separation switched from salting-out to salting-in. This interesting behavior is explained by a particular structure of NaBPh₄, which possesses multiple hydrophobic sites.

1. 緒言

水溶性の高分子には、室温において均一透明な溶液であったものが昇温することでゲル化や相分離、あるいは、その両方を示すものがある。そこにNaClなどの無機塩を添加すると、多くの場合、ゲル化や相分離を起こす温度が低下する。よく知られた塩析という現象である。一方、塩析に比べて例は少ないが、NaIの場合のように添加することで逆にゲル化や相分離を起こす温度を上昇させる無機塩も存在する（塩溶）¹⁻³⁾。塩析現象は、イオンの方が着目している溶質の水溶性高分子よりも水和され易いことで、溶質の溶解性が相対的に低下したものと考えれば理解できる。これに対して、塩溶現象についてはいまだに議論が絶えないところであるが⁴⁻⁶⁾、無機塩の場合、Γのようにアニオンのイオン半径が大きい場合に塩溶性を示す傾向が強いことが現象的な特徴である。イオン半径が大きいと、表面電荷密度が低くなる。表面電荷密度が低いと、そのアニオンは表面電荷密度が高いものに比べて相対的に水和され難くなる⁷⁾。水和され難くなったアニオンは溶質の疎水性を帯びた部位と会合する傾向を持つようになる。水溶性の高分子自体は非電解質であっても電荷を帯びたアニオンがまとわりつくことで、脱水を受けにくくなり水への溶解性が増したものと考えれば一応理解できる。

上述の塩溶のメカニズムに基づくと、例えばスチレンスルホン酸ナトリウム (NaSS) (Fig. 1a) のような有機塩のアニオンは、疎水性の部位を有し、溶質の疎水性を帯びた部位と会合し易いものと推測される。実際、NaSSが強い塩溶性を示すことが確かめられている⁸⁾。

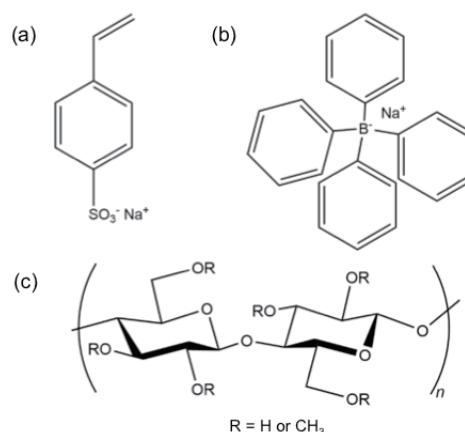


Fig. 1 Chemical formulae of (a): sodium styrene sulfonate (NaSS), (b): sodium tetraphenylborate (NaBPh₄), (c): methylcellulose (MC).

本研究では、疎水性を帯びた部位が立体的に異なる4つの方向に突き出した形のアニオンからなる有機塩のテトラフェニルホウ酸ナトリウム (NaBPh₄) (Fig. 1b) をメチルセルロース水溶液に添加した際の挙動を調べた。当初の研究過程では、NaBPh₄を添加することで大変複雑なゲル化や相分離の挙動が見出され⁹⁾、その複雑な挙動を説明する過程で「多点会合性」の考え方を導入し、現象を合理的に説明することができた¹⁰⁾。本稿では、簡潔のため、多点会合性のアニオンというものが存在し、それを水溶性の高分子に添加するとどうなるかという筋書きにまとめ直して解説する。

本研究で扱うメチルセルロース (MC) (Fig. 1c) の水溶液は、昇温することでゲル化と相分離を起こす典型的な物質の一つである^{11,12)}。天然物由来のセルロースは、モノマー単位当たり3つの-OH基を有する。-OH基を多数有することから、セルロースは一見ポリビニルアルコールの如く水溶性であるように思えるが、-OH基間の強い水素結合のために実際は水に不溶である。そこで、-OH基の一部を-OCH₃基に置換し、水素結合を弱めることで水に可溶化したのがMCである。しかし、過度の-OCH₃基への置換は疎水性を増大させてしまうので、水溶性を示すのは適度な置換度の範囲に限られる。このような親水性の-OH基と疎水性の-OCH₃基を併せ持つMCは、親水性と疎水性の微妙なバランスを内包しており、昇温することで水和の度合い（脱水和の度合い）が変化することになる。脱水和を起こしたセグメント同士は会合し合う傾向を有し、ゲル化や相分離の引き金となる¹³⁻¹⁵⁾。

一般にMC水溶液の昇温によるゲル化は白濁を伴う。そのため、MC水溶液におけるゲル化と相分離は、原因やタイミングが同じと考えられがちである。しかし、我々は、ゲル化と相分離を引き起こすのに必要な脱水和の度合いには違いがあると考え、そのことを立証すべく、昇温過程において、ゲル化を検出する粘度測定と相分離を検出する光透過率測定とを同時に行うことができる装置を作製した¹⁶⁾。これにより、塩無添加のMC水溶液や多点会合性有機塩であるNaBPh₄を添加したMC水溶液に対してゲル化が先に（低温側で）起こる現象なのか相分離が先に起こる現象なのかを明らかとし、NaBPh₄の添加濃度に依存して二つの現象が交差することも見出した。

2. 実験

2-1. 試料

水溶性の高分子試料としては信越化学工業（株）製のメチルセルロース（型番 SM-4）を、多点会合性の有機塩としてナカライテスク（株）製のNaBPh₄をそれぞれ用いた。SM-4では、セルロースのモノマー単位当たり3つある-OH基のうちの-OCH₃基への平均置換度（DS）は1.77、重量平均分子量（M_w）は2.5×10⁴である。濃度 4.0 wt% のMC水溶液を調製し、これとNaBPh₄を混合し、塩濃度 0 ~ 0.40 M の溶液を得た。

2-2. 測定

粘度・光透過率同時測定には、当研究室で作製した装置を用いた。その模式図をFig. 2に示す。粘度測定部位には、A&D社から市販されているSV-10型粘度計のヘッド部分を台座から切り離して用いた。粘度の測定範囲は、0.3~10000 mPa・sである。元の市販装置では容量10 mlのポリカーボネート製の試料容器に一对の円盤型の粘度測定プローブとそれらのプローブ間に配置された温度センサーを試料溶液に浸すことで粘度と温度が測定される。本研究で

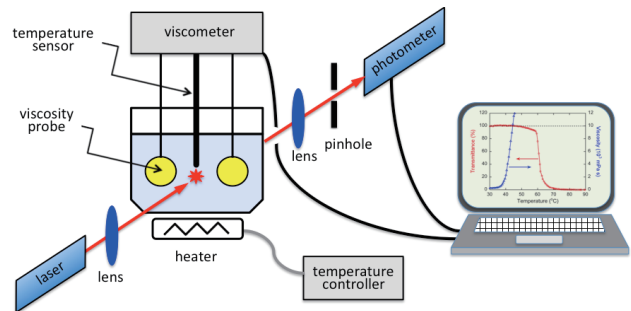


Fig. 2 Sketch of the device for simultaneous measurements of viscosity and light transmittance.

は、一定速度で試料を昇温しつつ、光透過率との同時測定が必要であるため、アルミ製のブロックをくり抜き、そこに光学窓とヒーターおよび温度センサーを取り付けた容器を作製し試料用キュベットとした。光透過率測定用のレーザー光源には、Edmund Optics社から市販されている波長635 nm、出力3.0 mWのCW 635NM X 3MW型フォトダイオードを用いた。透過光の検出には、Mothertool社から市販されているLX-1128SD型フォトメーターを用いた。これらの光源と検出器を2枚のレンズを用いて上述の試料用キュベット内に浸した一对の円盤型のプローブの間の位置および検出器前に設置したピンホール位置とでレーザー光が一点に集光するジオメトリーに配置した。前者の集光は、一对の粘度測定プローブ間の狭い領域に光軸を通すことで、粘度測定プローブの位置と透過光測定のための光軸が通る位置とを極力近づけ、両者の位置での試料溶液の温度差を極力小さくすることに寄与する。後者の集光は透過光だけピンホールを通過させ、低角度の散乱光の混入を低減させるのに寄与する。

この粘度・光透過率同時測定装置の性能評価のために、よく知られた卵白の加熱による固化現象の観察を行った。

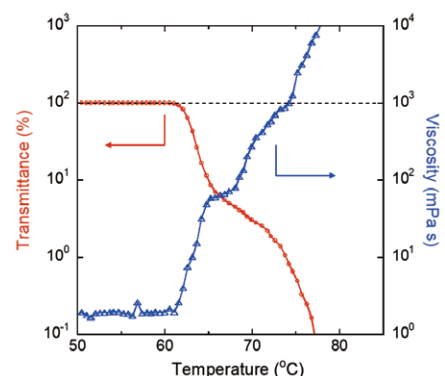


Fig. 3 Simultaneous measurements of viscosity and light transmittance of egg white as a function of temperature upon heating at a constant heating rate (1.0 °C/min) presented in logarithmic scales.

卵白を1.0 °C/minで昇温した際の結果をFig. 3に示す。63 °C付近で粘度が上昇し始めている。これは卵白に含まれるマイナー成分のコナルブミン（トランスフェリン）の凝

固によるものである。75 °C付近での急上昇が主成分の卵白オвалブミンの変性による凝集である^{17,18)}。これらの粘度の変化に呼応して、光透過率も多段階に変化することが見てとれる。したがって、卵白の場合は、白濁と固化が多段階ではあるが同時に起こる現象であることがわかる。

3. 結果と考察

3-1. メチルセルロースと多点会合性有機塩との会合

セルロースの-OH基を-OCH₃基へ置換する反応は一般に不均一に起こると考えられ、平均の置換度を中心として比較的-OH基に富んだ(比較的親水性の)セグメントから比較的-OCH₃基に富んだ(比較的疎水性の)セグメントまでが混在している。Fig. 4aは、簡単のためMC分子が青球で示す親水性セグメントと赤球で示す疎水性セグメントと緑球で示す中間の性質を有するセグメントの3種類で構成されている様子を模式的に描いたものである。ここに、長球形で模式的に表した多点会合性有機塩から解離したアニオンが添加された様子をFig. 4bとFig. 4cに示す。

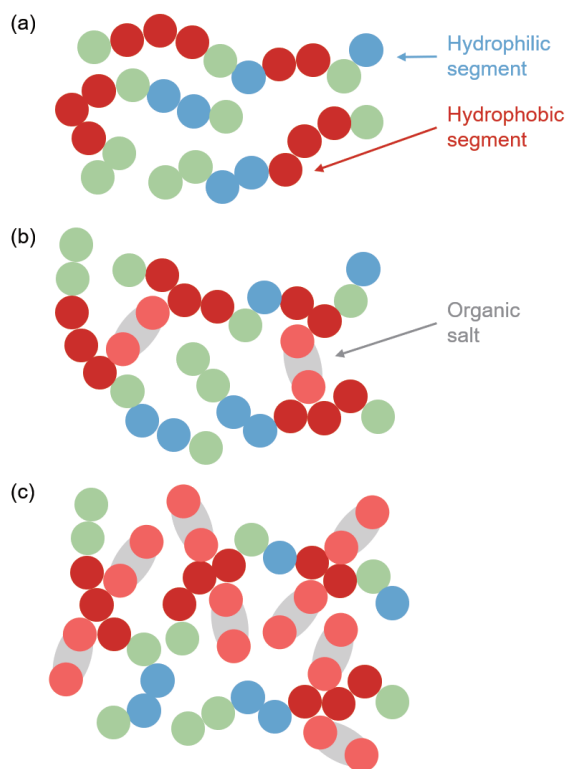


Fig. 4 Schematics of (a): methylcellulose (MC), (b): MC with sodium tetraphenylborate (NaBPh₄) of a deficient concentration, (c): MC with NaBPh₄ of a sufficient concentration.

長球形の両末端の赤色は、MCの疎水性セグメントの場合と同様に疎水性を帯びていることを示す。なお、Fig. 4bは、系内のMCの疎水性セグメントの数に比して、多点会合性有機塩の疎水性の部位の数が少ない(枯渇)状態を示

しており、塩から解離したアニオンの疎水性の部位を複数のMCが奪い合うことから、このアニオンとの会合を介して複数のMC鎖が架橋したような構造となる。この会合は流動により脱会合可能な程度の強さではあるが、粘度の増加を引き起こす。Fig. 4cは、系内のMCの疎水性セグメントの数に比して、多点会合性有機塩の疎水性の部位の数が過剰となった状態を示しており、多点のうちの片側の疎水性部位だけがMC鎖と会合した構造となる。こうなると、架橋構造は解消し、粘度も低下することになる。

Fig. 5は、4.0 wt%のMC水溶液へのNaBPh₄の添加濃度を変化させて、室温における粘度を測定したものであるが、上述の特徴がよく現れている。

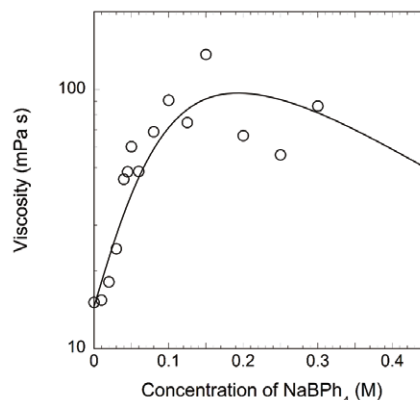


Fig. 5 Viscosity of 4.0 wt% aqueous methylcellulose (MC) at 25 °C, as a function of added NaBPh₄ concentration.

3-2. 粘度・光透過率同時測定

はじめに、多点会合性の有機塩のNaBPh₄を添加していない4.0 wt%のMC水溶液の粘度・光透過率同時測定の例をFig. 6に示す。グラフ上欄と下欄の横軸は共通の温度軸であり、昇温速度は、1.0 °C/minである。上欄の左の縦軸は光透過率(赤丸プロット)を、右の縦軸は粘度(青三角プロット)の測定値を示している。下欄は、光透過率の微分値を示した物である。溶液の曇点の決定法には、光透過率が一定の値(例えば90%)にまで低下する温度とする手法がしばしば用いられる。光透過率がある温度で急峻に低下するような試料の場合は、そのような決定法で問題はないが、本測定にあるようにMC水溶液の光透過率は、昇温の初期において緩慢に、そして、ある温度を超えると急峻に低下する挙動が見られる。この特徴は、光透過率曲線を微分することでより明確になる¹⁹⁾。我々は、初期の緩慢な低下は、ゲル化による系の不均一化によって光が散乱されたことが原因であると考えている。実際、粘度曲線が急に立ち上がる温度と光透過率が緩慢に低下し始める温度とは良く一致している。一方、一般に相分離が起こると激しく白濁することが知られており、光透過率が急激に低下する温度、すなわち、光透過率の微分が極小を与える温度がMC水溶液の相分離温度であると考えられる。

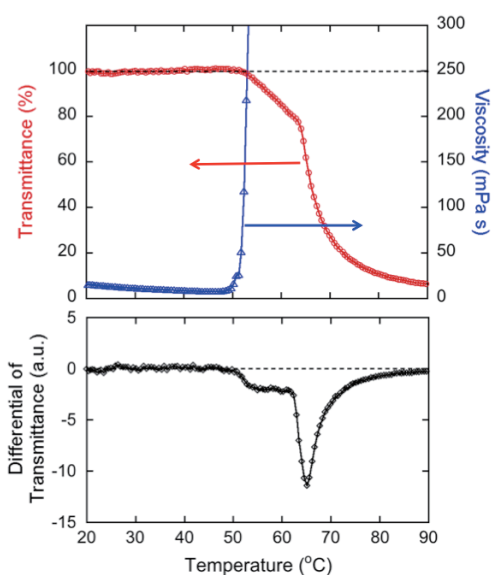


Fig. 6 Simultaneous measurements of viscosity and light transmittance of 4.0 wt% MC solution as a function of temperature upon heating at a constant heating rate (1.0 °C/min). The lower panel shows a differential of the transmittance curve.

つぎに、4.0 wt%のMC水溶液に多点会合性の有機塩のNaBPh₄を0.20 M添加した際の粘度・光透過率同時測定の様子をFig. 7に示す。Fig. 6に示したNaBPh₄無添加の場合と比べると、光透過率と粘度の挙動が大きく異なる。大きな特徴は、NaBPh₄の添加によりゲル化温度が80°C以上の高温へシフトするとともに相分離温度が40°C付近にまで低下していることである。すなわち、NaBPh₄を添加していない場合と比較して、ゲル化温度と相分離温度との上下関係が逆転していることになる。また、相分離と同時に粘度が低下していることが分かる。これは濃厚相と希薄相との境界で滑りが生じたためと推察される。なお、60°C付近で光透過率が一旦回復しているように見えるが、これは液-液相分離の過程でどちらか一方の液相をビームが貫いたときに観測される現象である²⁰。

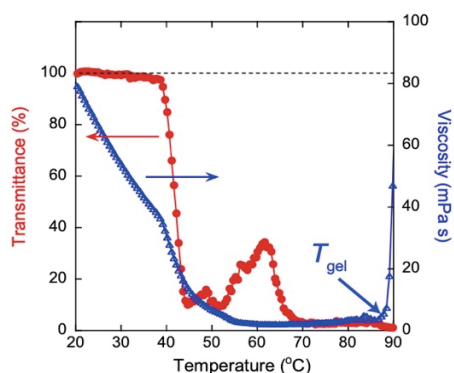


Fig. 7 Simultaneous measurements of viscosity and light transmittance of 4.0 wt% MC solution with 0.20M NaBPh₄ as a function of temperature upon heating at a constant heating rate (1.0 °C/min).

3-3. ゲル化温度と相分離温度のまとめ

Fig. 6やFig. 7に示したような測定をNaBPh₄の様々な添加濃度に対して行い、抽出した相分離温度とゲル化温度をNaBPh₄の添加濃度に対して描くとFig. 8が得られる。黒菱形がゲル化温度を、赤丸がゲルの相分離温度を、青四角が液-液相分離の温度を示す。

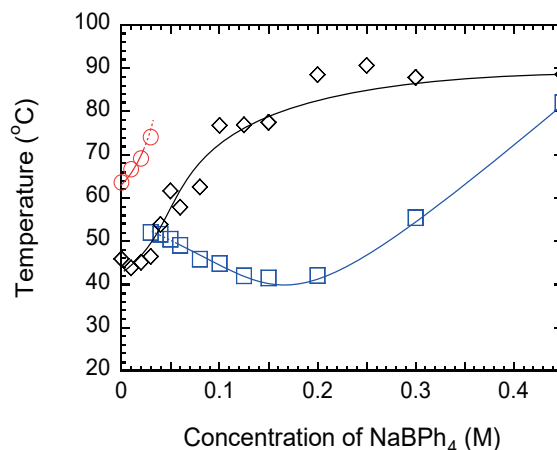


Fig. 8 Gelation (T_{gel} : ◇) and phase separation ($T_{ph, gel}$: ○ and $T_{ph, liq}$: □) temperatures of 4.0 wt% aqueous MC solution as a function of added NaBPh₄ concentration.

NaBPh₄の添加濃度が0.05 M未満の領域では、相分離温度とゲル化温度ともに若干の添加濃度依存性があるものの本質的には、NaBPh₄無添加のMC水溶液の挙動と同じでゲル化が先に（低温側で）起こり、高温側で相分離が起こっていることが分かる。このようなゲルの相分離の場合は、一般的な液-液相分離の場合と異なり、相分離構造の粗大化が起こらず小角光散乱で観測されるいわゆるスピノーダルリングの位置がほとんど変化しなかった¹⁰。

NaBPh₄の添加濃度が0.05 Mを越えると挙動が一変する。相分離が先に（低温側で）起こるようになり、ゲル化温度は急激に高温側へシフトする。青四角以上で黒菱形以下の領域では典型的な液-液相分離の挙動が観測され、小角光散乱によりスピノーダルリングが時々刻々と小さく（小角側に）なっていく様子が観測された¹⁰。NaBPh₄の添加濃度にもよるが、ゲル化温度が80 °C以上にまで上昇している。MCのゲル化は緒言で述べたように昇温による脱水和が引き金となる。NaBPh₄のアニオン（BPh₄⁻）が会合したMCの場合、昇温により脱BPh₄⁻が起こってはじめてゲル化が可能となる。このことから、脱水和が起こる温度よりも脱BPh₄⁻が起こる温度の方が高いと考えられる。

NaBPh₄の添加濃度が0.05 Mを越えた後の相分離温度の挙動が大変興味深い。相分離温度が一旦低下した後、上昇に転じている（青四角）。当初、塩析であった挙動が途中から塩溶に転じていることになる。この現象もFig. 4を用いて説明することができる。Fig. 4bのように多点会合性有

機塩を介して複数のMC鎖が架橋したような構造となるNaBPh₄の添加濃度域では、実効的な重合度が上がった状態となる。重合度の上昇は相分離を助長する効果として働くため、この濃度域では塩析効果が現れる。NaBPh₄の添加濃度が十分に大きくなると、**Fig. 4c**のように架橋構造が解消するようになる。すると、実効的な重合度が低下し塩溶の挙動に転じたものと考えられる。

以上見てきたように、多点会合性の有機塩の添加濃度に依存して塩析から塩溶へ転じるという特異な現象に対して定性的な説明を与えたが、理論的側面からの合理的説明やシミュレーションによる再現も進めたい。

本稿で示さなかった装置の詳細、種々の添加濃度のデータや小角光散乱のデータ等は原著論文^{10,16}をご参照ください。また、NaBPh₄のような多点会合性を示さない有機塩の添加効果に関しては既報⁸)をご参照ください。

謝辞

メチルセルロース試料をご提供くださいました信越化学工業株式会社に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **24**, 247 (1888).
- 2) P. Alexandridis, J. F. Holzwarth, *Langmuir*, **13**, 6074 (1997).
- 3) Y. Xu, L. Li, *Polymer*, **46**, 7410 (2005).
- 4) N. Vlachy, B. Jagoda-Cwiklik, R. Vacha, D. Touraud, P. Jungwirth, W. Kunz, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **146**, 42 (2009).
- 5) D. Michler, N. Shahidzadeh, M. Westbroek, R. van Roij, D. Bonn, *Langmuir*, **31**, 906 (2015).
- 6) N. Isobe, S. Shimizu, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 15999 (2020).
- 7) Y. Xu, C. Wang, K.C. Tam, L. Li, *Langmuir*, **20**, 646 (2004).
- 8) K. Nishida, T. Hirabayashi, K. Tanaka, H. Morita, G. Matsuba, T. Kanaya, *Sen'i Gakkaishi*, **71**, 297 (2015).
- 9) K. Nishida, H. Morita, Y. Katayama, R. Inoue, T. Kanaya, K. Sadakane, H. Seto, *Process Biochem.*, **59**, 52 (2017).
- 10) J.M. Shibata, T. Koga, K. Nishida, *Polymer*, **178**, 121574 (2019).
- 11) M. Hirrien, C. Chevillard, J. Desbrières, M. A. Axelos, M. Rinaudo, *Polymer*, **39** 6251 (1998).
- 12) M. L. Coughlin, L. Liberman, S. P. Ertem, J. Edmund, F. S. Bates, T. P. Lodge, *Prog. Polym. Sci.*, **112**, 101324 (2021).
- 13) T. Kato, M. Yokoyama, A. Takahashi, *Colloid Polym. Sci.*, **256**, 15 (1978).
- 14) N. Sarkar, *J. Appl. Polym. Sci.*, **24**, 1073 (1979).
- 15) E. Heymann, *Trans. Faraday Soc.*, **31**, 846 (1935).
- 16) M. Shibata, K. Nishida, T. Koga, *J. Fiber Sci. Technol.*, **75**, 58 (2019).
- 17) J. W. Donovan, C. J. Mapes, J. G. Davis, J. A. Garibaldi, *J. Sci. Food. Agric.*, **26**, 73 (1975).
- 18) Y. Ozawa, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **33**, 813 (1986).
- 19) K. Nishida, M. Saiga, Y. Fujishima, H. Ogawa, T. Kanaya, *J. Fiber Sci. Technol.*, **72**, 251 (2016).
- 20) K. Nishida, M. Shibata, T. Kanaya, K. Kaji, *Polymer*, **42**, 1501 (2001).

水-アセトニトリル混合溶媒系で膨潤したポリアクリルアミドゲルの膨潤度の温度依存性

Temperature Dependence of the Swelling Ratio of Polyacrylamide Gels swollen by Water/Acetonitrile Mixtures

瀧川 敏算・堀中 順一・服部和輝

Toshikazu TAKIGAWA, Jun-ichi HORINAKA, Kazuki HATTORI

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

Swelling behavior of polyacrylamide gels in water/acetonitrile system was examined. The linear swelling ratio of the gels decreased with increasing temperature when the water content of the mixtures was low. At high temperatures, the swelling ratio increased with increasing water content of the mixtures. On the other hand, swelling ratio at low temperatures showed interesting behavior. Namely, the temperature dependence curves of the linear swelling were merged into a single curve for the gels in the mixed solvents, which can be explained by the Gibbs phase rule.

1. はじめに

高分子ゲルの体積相転移は温度などの示強変数のわずかな変化で体積が不連続的に変わる現象であり、高分子ゲルに普遍的な現象であると言われている。しかし、実際に相転移がみられる系の数は多くはなく、温度の変化させたときにみられるのポリ(プロピルアクリルアミド)ゲル水系に限られている。また、ポリ(プロピルアクリルアミド)ゲル水系では、体積が不連続的に変化しないゲルでも、体積が不連続的に変化しないゲルの相転移温度付近に吸熱あるいは発熱のピークが現れる。これはゲル-溶媒系の相分離に関係したものであり相転移とは直接的な関係はないが、体積相転移と誤解している研究者も多い。

我々は今までポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPA)ゲル水系の体積相転移を調べてきたが、この系以外で体積相転移を示す系の探索も進めている。高分子ゲルを二相分離が起こるような混合溶媒で膨潤させ、相分離温度付近で相分離誘起の体積相転移の可能性についても調べてきた。ポリアクリルアミド(PAAm)ゲルを水と2-ブトキシエタノールの混合溶媒で膨潤させたゲルでは、溶媒の相分離温度誘起の体積相転移は起こらなかったが、その理由は明らかにすることはできなかった。本研究では、上記の混合溶媒とは別の相分離が起こる混合溶媒系、水-アセトニトリル系、を用いて相分離誘起の相転移現象の発現について調べた。なお、本研究で用いた水-アセトニトリルの混合溶媒はUCST型の相図を示す系であるのに対し、水と2-ブトキシエタノールの混合溶媒はLCST型の相図をもつ系である。

2. 実験

アクリルアミド(AAm), *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(BIS), 過硫酸アンモニウム(開始剤, INI), *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン(反応促進剤, TEMED),

蒸留水, アセトニトリルは和光から購入したものをを用いた。最初にAAm, INI, BISを水に溶かしてからTEMEDを加えることでプレゲル溶液を調整した。AAmの濃度は20wt%で, AAmのBISおよびINIに対する比は, 各々, 6400, 1000とした。プレゲル溶液を内径0.8 mmのキャピラリーを入れて4 °Cの冷蔵庫で24時間静置することでゲル化させて円柱状のPAAmゲルを作製した。その後, ゲルをキャピラリーから取り出し, 蒸留水に浸漬して未反応物を除去した。得られたゲルを約3 mmの長さに切り, 50 °Cの乾燥器で24時間乾燥させた。ゲルの膨潤溶媒には種々の組成で調整した水-アセトニトリル混合溶媒を用いた。乾燥ゲルを種々の組成の混合溶媒に入れて膨潤させた後, ゲルの直径 d を測定して膨潤度 Q の溶媒組成依存性を調べた。ここで, Q は $Q = (d/d_{\text{dry}})^3$ から算出した(d_{dry} は乾燥ゲルの d である)。混合溶媒で膨潤したゲルの d を温度 T を変えて測定することにより, Q の T 依存性も調べた。ゲル内部および外部の混合溶媒の温度変化による相分離挙動も観察した。

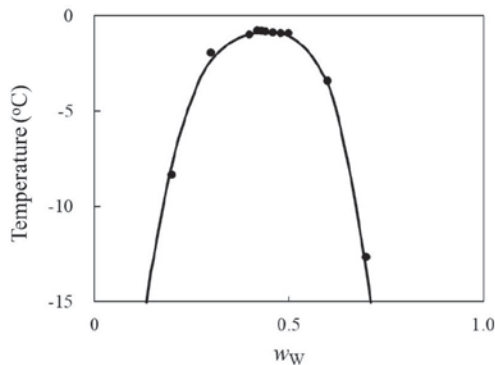


Fig. 1 Phase diagram of the mixtures of water and acetonitrile.

3. 結果と考察

Fig. 1に水-アセトニトリル混合溶媒系の相図を示す。この系の相図はUCST型であることがわかる。臨界温度は約 -1°C 、臨界組成は水の重量分率 (w_w) で表すと0.45付近であることがわかる。この結果は文献値とほぼ一致している。

種々の組成の混合溶媒中での Q の T 依存性をFig. 2に示す。測定はすべて降温過程で行った。白抜き符号はPAAmゲル外部の溶媒が相分離した状態を、塗りつぶしの符号は外部溶媒が一相状態であることを表している。塗りつぶしの符号から白抜き符号に変わる T は純溶媒での相分離温度 T_{ps} とよく一致している。どの組成(混合溶媒中の水の重量分率を w_w で表している)の白抜き符号の領域でもゲル内部の溶媒では相分離は見られなかった。室温付近では Q はほぼ一定で w_w が大きいほどゲルはよく膨潤している。しかし、どの w_w でも T の低下とともに Q は増加し、 w_w が小さいほど Q の変化が大きくなっている。 -10°C 以下の領域ではどの w_w の Q も同一曲線上にあることがわかる。この重なっている部分の符号は白符号である。すなわち、重なっている部分の温度域では外部の溶媒は相分離している。

白抜き符号の領域では相分離している外部溶媒の組成は T だけで決まる。このとき、ゲルも外部溶媒と平衡状態にあるため、ゲル内部の溶媒組成も T により一意的に決まる。つまり、 -10°C 以下の温度域で Q - T 曲線に重なりが見られるのは、外部溶媒が相分離状態にあるときは T を定めると一意的に内部の溶媒組成が決まるためと考えられる。

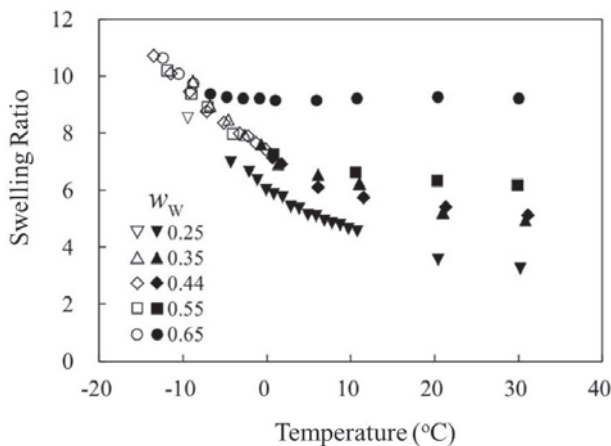


Fig. 2 Temperature dependence of swelling ratio of the PAAm gels in the mixed solvents.

Gibbsの相律によれば、系の自由度 F は

$$F = C - P + 2 \quad (1)$$

で表される。ここで、 C と P はそれぞれ成分の数、相の数である。相分離した混合溶媒中にあるゲルでは、 $C=3$ 、 $P=3$ であるので $F=2$ となるが、この $F=2$ は圧力と温度で使っているため、相分離した溶媒中にあるゲルの組成は一義的に決まってしまうことになる。すなわち、相分離した溶媒中のゲルの体積は温度だけで決まり、最初に調整された時の溶媒組成には依存しなくなるのである。このことを図で表したのがFig. 3である。これは、ゲルの内部にある溶媒の組成(ここでは、水の重量分率を ϕ としている)と T との関係をプロットしたもので、一種の相図と考えることができる。高温で ϕ_1 および ϕ_1' の組成の混合溶媒(これらは同じ温度 T_1 で相分離する溶媒とする)で膨潤したゲルを徐々に冷却してゆくと温度 T_1 で同じ溶媒組成のゲルになる。ゲル内部では組成は相分離した溶媒のうち的一方のものしかとれないのである。さらに、温度を下げてゆくとどのゲルも同じ経路をたどって、溶媒組成が変化することになる。この経路が図中の太い実線である。

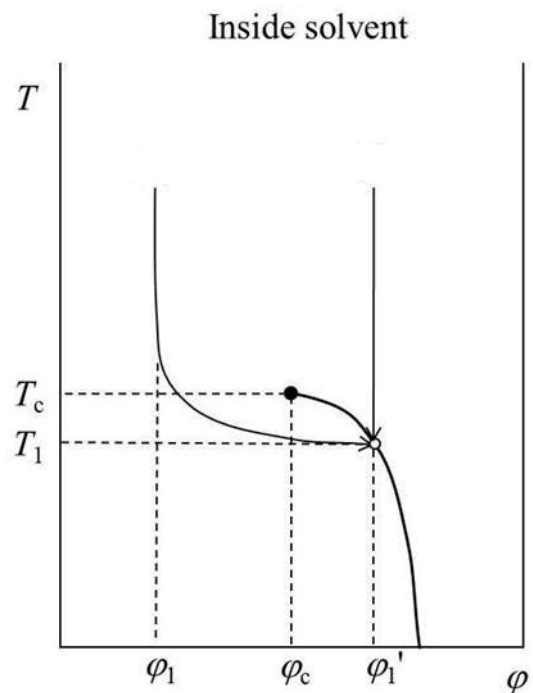


Fig. 3 Phase diagram of the mixed solvent inside the PAAm gels.

参考文献

- 1) D. N. Pence, T. Gu, *Separations Technology*, 6, 261 (1994).

ポリエチレンの一軸伸長変形における粘弾性効果

Viscoelastic effects during uniaxial stretching of polyethylene

竹中 幹人・岸本 瑞樹

Mikihito TAKENAKA, Mizuki KISHIMOTO

Institute for Chemical Research, Kyoto University

We investigated changes in hierarchical structures of polyethylene (PE) during tensile testing by means of time-resolved ultra small-angle, small-angle, and wide-angle X-ray scattering (USAXS, SAXS, and WAXS, respectively). We discovered the enhancement of density fluctuation on the submicron scale by USAXS, which led to the generation of voids and necking. The spatial inhomogeneity of the stress fields associated with density or crystallinity fluctuation on the submicron scale induced the inhomogeneous flow during stretching. In other words, the change in the higher order structure than the lamellar structure dominated the mechanical properties of PE. The enhancement of the fluctuation in linear low-density polyethylene (LLDPE) was smaller than that in high-density polyethylene (HDPE). Mechanical melting in the LLDPE suppressed the inhomogeneous flow and delayed the generation of voids and necking. As a result, the LLDPE exhibited two yield points on a S-S curve, while the HDPE exhibited one yield point.

1. 「講演集」原稿のご執筆にあたって

ポリエチレン (PE) は、優れた力学特性および成形性から日常的に最も広く用いられる高分子材料の一つである。PE中では、Figure 1に示すように分子鎖が規則正しく折りたたまれた結晶格子構造、結晶相と非晶相が交互に積層したラメラ構造、成長したラメラ構造が形成する分岐構造、分岐構造が充填されてできる球晶構造、といった構造が階層的に存在する。

冷延伸過程における応力-ひずみ曲線 (S-Sカーブ) 上に、2つの降伏点を示すPEがある。それぞれの降伏点が、ラメラ構造中のslip挙動を反映していると考えられてきた。slip挙動は大きく interlamellar slip と intralamellar slip に分けられる。前者は結晶間の非晶質が伸長により変形する挙動を示す。後者はさらに coarse slip と fine slip に分けられる。coarse slip では、結晶のフラグメンテーションにより、モザイクブロックへと変化する。fine slip は結晶の均一なせん断を表し

ており、ときに準安定相である単斜晶への転移を起こす。Ryanらは、その場観察小角X線散乱/広角X線散乱 (SAXS/WAXS) 測定により、第1降伏点 (1YP) を fine slip、第2降伏点 (2YP) を coarse slip によるものと帰属した²⁾。しかし slip 挙動だけではなく、上で述べた階層構造における分岐構造、すなわちサブミクロンスケール (100 nm–1 μm) の構造変化も降伏挙動に影響を及ぼす可能性がある。

近年、放射光を用いた超小角X線散乱 (USAXS) 法が確立され、変形下におけるサブミクロンスケールのその場観察が可能となった。本研究では、USAXS/SAXS/WAXS法による一軸伸長変形下におけるPEの降伏点前後でのサブミクロンスケールの変化を用いて明らかにすることを目的とした。

2. 実験

直鎖状低密度ポリエチレン (LLDPE) および高密度ポリ

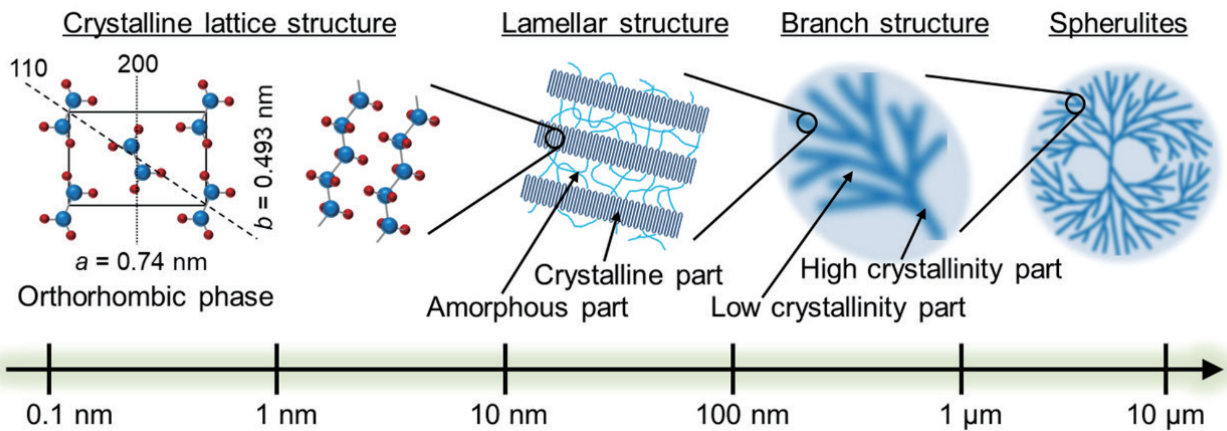


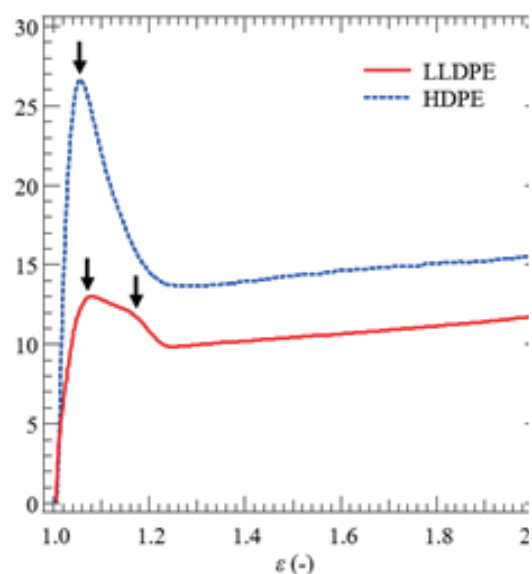
Fig.1 Schematic illustration of the hierarchical structure of polyethylene spherulites.

Table 1 Characterization of the materials used herein

5.2 g/10 min	0.964 g/c
--------------	-----------

エチレン (HDPE) を用いた。ペレットの密度およびMelt Flow Index (MFI) をTable 1に示す。プレス機 (MINI TEST PRESS-10、東洋精機製作所) を用いて、熔融状態 (180 °C) で10分間加圧した後、25 °Cに急冷しプレスシートを作製した。そこから砂時計型の試験片を打ち抜いた。自作の延伸機を用いて、延伸下におけるPEの階層構造の変化のその場観察をUSAXS,SAXS,WAXS測定により行った。引張速度は1 mm/minとした。

USAXS測定は、SPring-8のビームラインBL03XUの第2ハッチにおいて、入射波長2.0Åで行った。LLDPEのカメラ長は7.5m、露光時間は850msであった。HDPEについては、厚さ100 μmのAl板をアッテネータとして使い、試料と検出器の距離を7.9mとして測定を行った。露光時間は900msであった。SAXSとWAXSの同時測定は、USAXS測定と同様にビームラインBL03XUの第2ハッチで行った。SAXS/WAXS測定では、試料から検出器までの長さ、露光時間、検出器はそれぞれ2.4 m/119 mm、330 ms/330 ms、Pilatus/フラットパネル検出器を使用した。HDPEについては、10 μm厚のAuプレートのアッテネータとして使用し、入射波長は0.8Åとした。SAXS/WAXS測定では、試料から検出器までの長さは2.4 m/120 mm、露光時間は670 ms/570 ms、検出器はPilatus/Sophiasとした。



indicate the yield points.

3. 結果・考察

X線散乱測定時に得られたS-SカーブをFigure 2に示す。ここで応力は公称応力、ひずみは $\epsilon = L/L_0$ (L はサンプル長さ、 L_0 は伸長前のサンプル長さ) である。LLDPEでは2つ、HDPEでは1つの降伏点が観測された。LLDPEでは2YPから、HDPEでは降伏点からネックが発生した。ネック発生後は、常にネック部にX線を照射して測定を行った。Figure 2に一軸伸長変形下におけるLLDPEの2D散乱パターンを示す。伸長前 ($\epsilon = 1.00$) の2DパターンはUSAXS/SAXS/WAXSいずれも等方的であったため、散乱強度を円環平均した1Dプロファイルをそれぞれ得た。

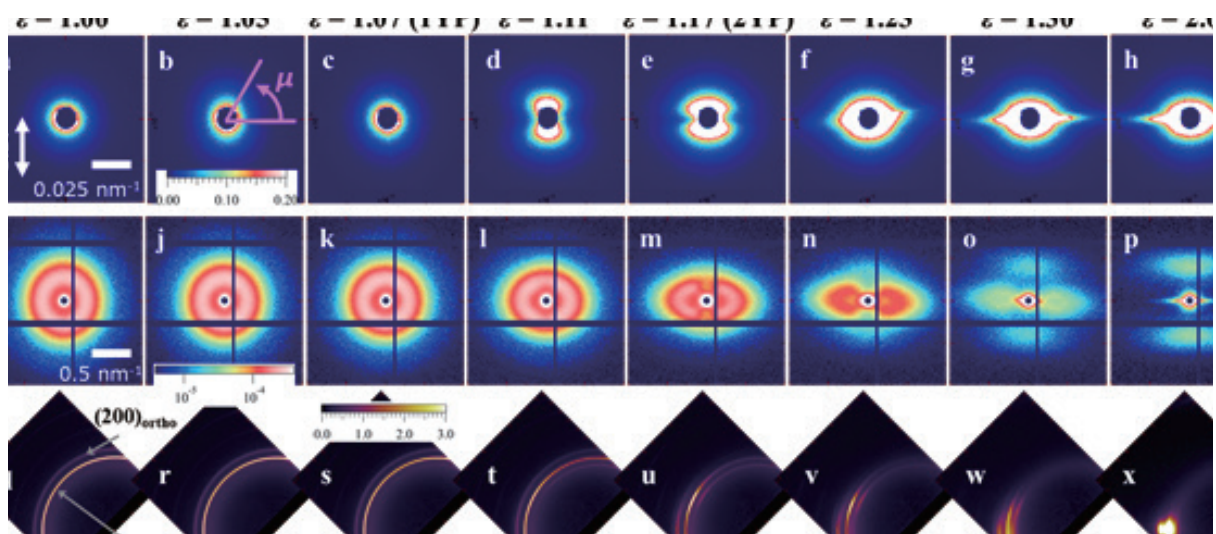


fig. 3 (a)-(h) USAXS, (i)-(p)SAXS, and (q)-(x)WAXS 2D patterns of the LLDPE with strain. The arrow in part(a) corresponds to the stretching direction.

USAXS 1Dプロファイルから、球晶内部にマスマフラクタル次元2.7の不均一性が存在すること³⁾、SAXS 1Dプロファイルおよび自己相関関数から結晶厚み6.21 nm、長周期15.8 nmのラメラ構造を有すること、⁴⁾WAXS 1Dプロファイルから結晶化度が36.0%であることがわかった。延伸過程におけるLLDPEの階層構造変化は散乱の変化より、次の4つの領域に分離できることがわかった。I) 1YPに至るまで ($\epsilon < 1.07$)、II) 1YP~2YP ($1.07 < \epsilon < 1.17$)、III) ネットの形成 ($1.17 < \epsilon < 1.30$)、IV) 繊維構造の形成 ($1.30 < \epsilon$)。領域IのUSAXSパターンはわずかに横に広がる変化を示し、サブミクロンスケールにおいて均一に変形したことを示している。また、SAXSパターンに見られるラメラ長周期由来のピーク位置の変化より、ラメラ構造はアフィン変換に従っていることがわかった。

領域IIのUSAXSパターンでは、明瞭なバタフライパターンが観測された。ラメラ分岐構造のスケールで、高結晶化度領域(HCP)と低結晶化度領域(LCP)の変形量が異なるような不均一変形が生じたと解釈できる。SAXSパターンでは、全体の強度が減少しながら、斜め4方向にスポット上の散乱が見られた。これは伸長により結晶が力学的に融解したこと、coarse slipによるラメラ構造のフラグメンテーションおよび回転により、chevron型のモルフォロジーが形成されたことを示している。WAXSパターンを見ると、直方晶(110)由来の回折も斜め方向に配向したことがわかる。また同じ方向に単斜晶(001)由来の回折も見られた。これはfine slipによりマルテンサイト型の転移も起こっていることを示している。領域IIIにおけるUSAXSパターンでは、ネットの発生とともに、伸長に対し垂直方向の散乱強度が増大し、ストリーク状の散乱パターンへと変化した。これはサブミクロンスケールの不均一変形により誘起されたボイドが、伸長方向に引き伸ばされたことを示している。SAXS強度はさらに減少し、WAXSのスポットは伸長に垂直方向へ、つまりc軸が伸長に平行となる向きへ配向が進行した。

領域IVにおいてUSAXSパターンはほとんど変化しなかった。SAXSパターンでは、伸長と平行方向にスポット上の散乱が生じた。再結晶化により生成したラメラ構造が伸長方向に配向した繊維構造の形成に対応している。

以上より、1YPにおいてラメラ構造のcoarse slipおよびfine slipが起こる一方で、より高次のサブミクロン構造の変化が降伏挙動を直接支配していることが示唆された。USAXSで見られたバタフライパターンの発展は、密度揺らぎと結合した応力場の空間不均一性に伴う粘弾性効果を反映しており、それがボイドおよび2YPをもたらしたと考えられる。

参考文献

- 1) Seguela, R.; Rietsch, F., *Journal of Materials Science Letters* 1990, 9 (1), 46-47.
- 2) Butler, M. F.; Donald, A. M.; Ryan, A. J., *Polymer* 1997, 38 (22), 5521-5538.
- 3) Takenaka, M.; Shimizu, H.; Nishitsuji, S., *Physical Review E* 2007, 75 (6), 061802.
- 4) Strobl, G., *The Physics of Polymers*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.

柔軟なホウ素錯体含有刺激応答性高分子の開発

Development of Stimuli-Responsive Polymers Containing Excitation-Driven Boron Complexes

田中 一生

Kazuo TANAKA

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

Organoboron conjugated molecules including polymers have attracted attention as a key material in modern organic optoelectronic devices. However, most of emissive properties are often spoiled in the solid state by the aggregation-caused quenching. To solve this problem, one of promising strategies is the application of AIE properties in “flexible” organoboron complexes for receiving solid-state emission. In this presentation, the recent progresses of the AIE-inducible organoboron complexes and resulting AIE-active materials including polymers are presented. Initially, we illustrate the discovery of the idea of “flexible boron complexes” which show larger degree of structural relaxation in the excited state. Based on this concept, the transformation of commodity fluorescent organoboron dyes to the AIE-active molecules is explained. Based on this result, the conjugated polymers with AIE properties were obtained. The optical properties of conjugated polymers involving boron element are illustrated. Moreover, the applications of these AIE-active polymers for the film-type sensors are mentioned. Next, as another instance of the AIE-active “element-blocks” composed of organoboron molecules, the AIE behaviors observed in the carborane materials are presented. Unique solid-state emission of the carborane derivatives is demonstrated.

1. 緒言

無機元素から成る機能性ユニットを“元素ブロック”と呼ぶ¹⁾。本講演では、ホウ素元素ブロックによる発光性材料開発について述べる。一般的な有機発光色素の開発では、分子の剛直性を増加させ、分子運動による失活を抑制することと、平面性を向上することで共役系の伸長を促し、発光過程の電子遷移の確率を増加させるという指針に基づき、分子設計が行われている。この観点から、ヘテロ元素による錯体形成に伴う架橋は、有機分子に発光特性を付与することに有効な戦略である。多価の配位子は錯体形成により固定され、運動性が低下する。したがって、振動失活過程を抑制できる。また、共役系を配位子に組み込むことで、配位金属元素を含んだ電子の非局在化が錯体中で起こり、共役系の伸長に伴い、それらが強い発光を示すことがある。これらの特異な電子状態では、りん光発光や環境応答性など、元素の特性に応じた特異な発光挙動が観測される場合も多い。特に、13族元素で最も原子番号が小さいホウ素を含む錯体では、電子受容性を持つホウ素と電子供与性のユニットを組み合わせることで分子内電荷移動(CT)が起こり、発光を得ることができる。実際、これまでに様々な種類の発光色素が合成され、特に化学修飾や配位子の設計により発光色や強度変化、ピーク幅、安定性など、様々な性質の調節法も見出されてきた。これらの優れた発

光特性から、有機ホウ素錯体は発光材料作成の際の有用な元素ブロックであり、有機電子素子やバイオプローブの基盤材料として実際に産業応用もされている。

例えば、ボロンジピロメテン錯体(BODIPY、Figure 1)は高い蛍光量子収率に加え、非常に狭い波長領域で発光を示す。この性質に着目し、近赤外発光を示すBODIPY誘導体の合成を行った²⁾。イソインドール骨格から誘導したBODIPY誘導体(BODIN)を用いて、ポリマーを合成した。得られたポリマーにおいて発光スペクトルの長波長化がみられ、近赤外領域(758 nm)に強い発光が得られた。さらに蛍光量子収率は37%となり、特に発光スペクトルにおける半値幅も極めて狭い(24 nm)発光材料を得ることが出来た。すべてのポリマーはUV光(365 nm)を1週間以上継続的に照射しても退色が見られない程高い耐久性を有していることが分かった。さらに、X線により励起しても、光励起の場合と同様の波長領域に発光がみられたことから、液体シンチレーター材料としての応用も期待される³⁾。

2. 柔軟なホウ素錯体

次に、ホウ素のクラスター化合物であり、近年、特異な発光特性を示す元素ブロックである σ -カルボランについて説明する。 σ -カルボラン(Figure 1)は正二十面体型のホウ素クラスター化合物であり、三中心二電子結合によって骨格電子がクラスター全体に非局在化している特異な電子構造を持つ。三次元芳香族性を有していると言われており、熱的・化学的に非常に安定な化合物であることが知られている。また、炭素原子上に様々な置換基や機能性分子団の導入が可能であり、共役系中では σ -カルボラン部位が強い電子求引基として働く。このような特性を持つ σ -カル

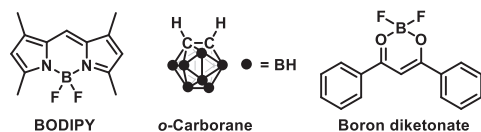


Figure 1. Boron element-blocks for luminescent materials.

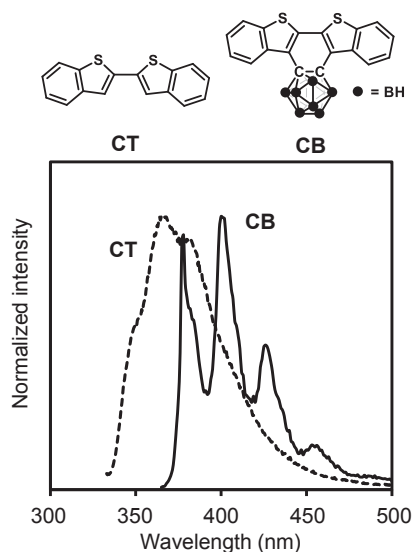


Figure 2. Luminescent properties of dibenzothiophene derivatives.

ボランはリンカーとして剛直な π 平面骨格形成に有用である。例えば、ジベンゾチオフェンを o -カルボランにより架橋した分子を作成した (Figure 2)⁴⁾。紫外-可視吸収スペクトルと発光スペクトルの測定より、ジベンゾチオフェン部位からの振動構造に由来するピークが得られた (Figure 2)。これは、 o -カルボランの剛直性に由来して、分子振動が高度に抑制されたためであると説明できる。

このように、耐熱材料としても利用可能な程、高い剛直性を有するカルボランであるが、励起状態では逆に“柔らかい”分子であることを示唆する結果が報告されてきた。2009年、 o -カルボランのジフェニル体を高分子主鎖に組み込んだ共重合体が合成された⁵⁾。このポリマーは、THF等の汎用有機溶媒には可溶であるが、蛍光発光はほとんど示さなかった。一方、ここに貧溶媒である水を添加していくとポリマーの凝集が始まり、興味深いことに水99%/THF1%の溶媒中ではオレンジ色の強い発光が観測された。量子収率を算出すると、THF溶液中では0.02%以下であったが、水99%/THF1%中では12%に上昇した。一般の有機発光色素が濃度消光 (aggregation-caused quenching, ACQ) のために溶液状態でしか発光しないことに対し、 o -カルボラン含有ポリマーが示した凝集状態でのみ発光する現象は、凝集誘起型発光 (aggregation-induced emission, AIE) と呼ばれ、非常に珍しい特性である。AIE性が発現した機構としては、以下のような説明ができる。 o -カルボランの炭素原子上の反結合性軌道に、フェニル基上の π 軌道が重なることができる。その結果、励起状態においてこの反結合性軌道に電子が流れ込み、 o -カルボランの炭素-炭素間結合が伸びることが量子化学計算の結果より明らかとなっている。溶液中では分子の運動性が高いことから、この部分の伸縮運動により励起状態の失活が促進され、結果として発光が見られない。一方、固体状態では分子運動が抑制され、 o -カル

Table 1. Optical properties of o -carboranes

R	THF		water		crystal	
	λ_{em} (nm)	Φ_{PL}	λ_{em} (nm)	Φ_{PL}	λ_{em} (nm)	Φ_{PL}
H	631	0.16	596	0.40	618	0.80
Me	611	0.41	584	0.60	545	0.99
TMS	632	0.19	599	0.73	579	0.99

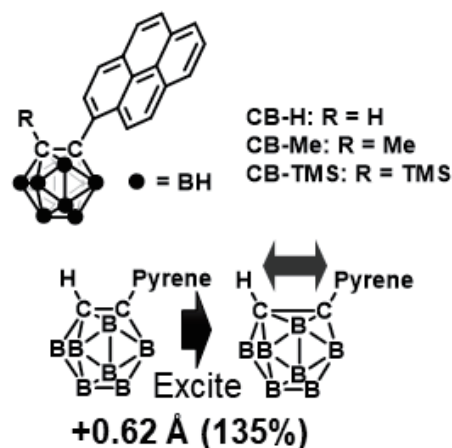


Figure 3. Structural transformation in the excited state of pyrene-tethered o -carborane.

ボランを電子受容性ユニットとしたCT性の発光が見られたと考えられる。すなわち、剛直なはずの o -カルボランは、励起状態では逆に“変形”することができ、そのため励起状態の失活過程が生まれ、結果としてAIEという特異な光学物性を発現したといえる。

3. 刺激応答性発光材料の開発

この o -カルボランにおける“励起状態での変形”を制御することで、様々な光学材料を得ることができる。例えば、 o -カルボランの炭素部位にピレンと種々の置換基を有するカルボラン誘導体を設計した (Figure 3)⁶⁾。ピレンは代表的な多環芳香族炭化水素であり、構造が単純であるため隣接する置換基による影響を評価しやすいと考えられる。さらにピレン自体が優れた発光特性を有するが、ピレンをカルボランに直接結合させた際、ピレンとのCT性に由来した強い発光が期待できる。特に、励起状態でも構造変化を起こさないようにあらかじめもう片方の炭素上に嵩高い置換基を導入することで、高効率固体発光が実現できることを期待した。

光学測定の結果をTable 1に示す。全ての分子においてTHF溶媒中に比べ貧溶媒である水が過剰な凝集状態においてその発光強度が増大した。さらに、結晶状態において絶対蛍光量子収率の大幅な増大が観られ、特に**CB-Me**、**CB-TMS**において、固体状態における絶対蛍光量子収率が99%以上という極めて優れた固体発光特性を示すことが明らかとなった。単結晶中の構造およびTD-DFT計算から、これらの違いはピレン部位の配向度合い、置換基の嵩高さ、置換基のフロンティア軌道に対する相互作用の有無に起因することが示唆された。

4. 他のホウ素錯体における刺激応答性

次に、*o*-カルボランが示した“励起状態での変形”について、より一般的なホウ素錯体でも同様に“変形”を誘導し、AIE性を発現させることを目指した。このようなホウ素錯体を“AIE性元素ブロック”とし、様々な機能性固体発光性材料の開発につなげていくことと、特に、*o*-カルボランを高分子主鎖に導入した場合、共役系は途切れてしまうが、AIE性ホウ素元素ブロックを得ることで、AIE性共役系高分子を開発することを目的として分子設計を行った。

ホウ素ジケトネート錯体はホウ素錯体の中でも安定で簡便な構造を持つものの一つであり、高い発光の量子収率を示すものが多い⁷⁾。一方、他の一般的な有機発光色素と同様にACQを示すことから、固体状態では発光がみられないことが多い。したがって、ホウ素ジケトネート錯体を高分子化し薄膜を調製しても、効率の良い発光材料を得ることは難しい。そこで、有機ホウ素錯体が持つ優れた発光特性を固体状態でも得るために、このホウ素ジケトネート錯体を基盤としてAIE性の分子に変換することを試みた⁸⁾。ホウ素と配位結合を形成している酸素原子のうち片方を窒素原子に入れ替えたホウ素ケトイミネート錯体を設計した (Figure 4a)。ホウ素-酸素間の結合に比べ窒素との結合は弱いため、溶液中では分子運動により励起エネルギーの失活が起こると考えられる (Figure 4b)。一方、固体状態では錯体の構造が固定されるため、振動失活が抑制されると予想される。さらに、窒素上の置換基により凝集状態でACQの原因となり易い分子間相互作用を阻害することが可能となるため、発光が回復すると期待した。これらの考えの元、ホウ素ケトイミネート錯体分子を実際に合成し、*o*-カルボランの場合と同様にTHF中に貧溶媒である水を添加し、凝集形成を促進したところ、試料に白濁がみられるにつれて発光強度の増強がみられた (Figure 4c, 4d)。これらの結果から、ホウ素ケトイミネートはAIE性を示すことが分かった。

ここで得られたAIE性のホウ素ケトイミネート錯体を共役主鎖に有する高分子を作成し、光学特性を調べた⁹⁾。その結果、小分子と同様にAIE性を示すことが明らかとなった。これらのことから、ホウ素ケトイミネート錯体はAIE性元素ブロックとして利用可能であり、それらを含む高分子でもAIE挙動を観測することができた。最後にAIE性共役系高分子の応用として、プラスチックフィルム型のセンサーを開発したので、それらについて説明する (Figure 5)⁹⁾。上述のホウ素ジケトネート錯体においてスルフィド基を窒素上のフェニル基に導入した分子をモノマーとして、フルオレンとの共重合体を作成した。得られた共役系高分子は550 nmに極大発光波長を有するAIE性の物質であった (Figure 5a)。ここに、生体中で活性酸素種の一つである過酸化水素を作用させると、スルフィド基が酸化され、スルホキシドに変換される。この酸化反応に伴い、置換基が

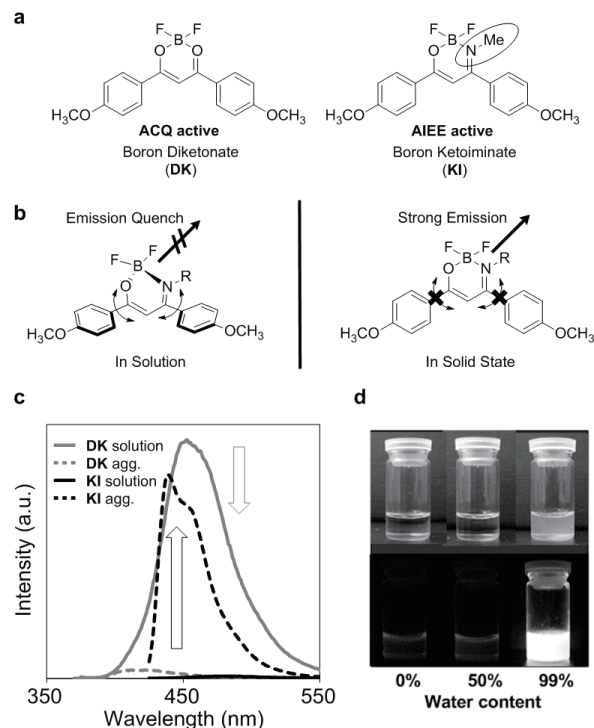


Figure 4. (a) Chemical structures of boron diketonate and ketoiminate. (b) Plausible mechanism on AIE. (c) Emission spectra of boron ketoiminate in THF and THF/water = 1:9 and (d) their pictures.

電子供与性から求引性に変化する。その結果、ホウ素ジイミネート部位の電子受容性が高まり、共重合ユニットであるフルオレンとの間での電子的相互作用が強まり、結果的にAIE強度が高まる。最終的に、フィルム状態のポリマーを浸すだけで、発光強度を高めるセンサーを開発することができた。このような材料は、簡便に対象物を検出することや、特に樹脂材料に微量に添加しておき、それらの材料の劣化を発光によって調べることで、早期検出に役立つと期待できる。また、同様に主鎖共役を酸・塩基性のガスにより制御することでフィルム状態の発光色変化を達成した (Figure 5b)。可逆的な変化が見られたことからフィルム型センサーとしての利用が想定できる。

5. 最後に

冒頭で述べたように、これまでの研究では有機分子の共役系の剛直性を向上するためにホウ素が使われてきた。一方、我々は逆にホウ素錯体により共役系を“柔らかく”することもでき、その発想で分子設計を行うことによりAIE性元素ブロックとなる種々のホウ素錯体を見出した。これらを利用することで、高効率固体発光材料、メカノフルオロクロミズムなどの固体状態での刺激応答性、AIE性共役系高分子とフィルム型センサーなど、数々のユニークな固体発光性を持つ“元素ブロック高分子材料”を開発するに

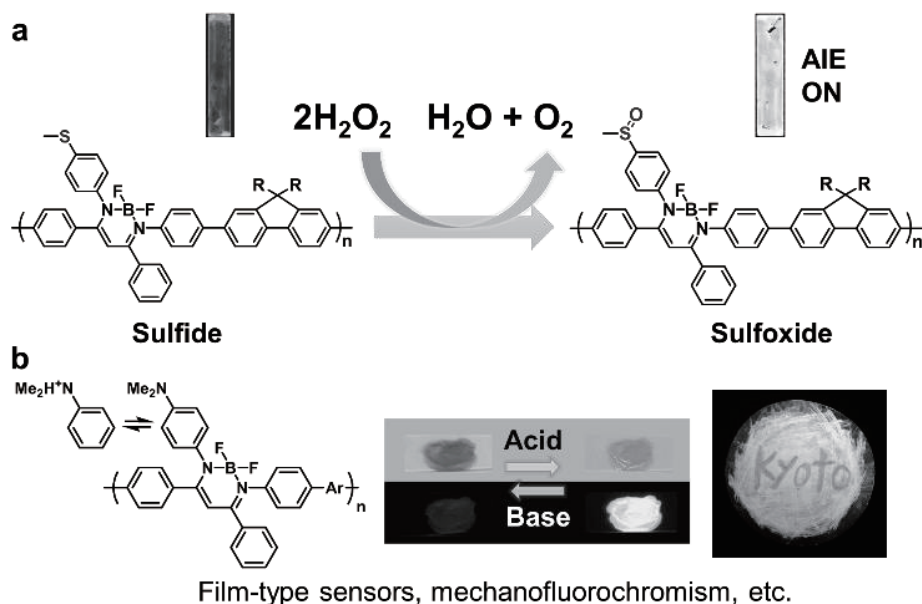


Figure 5. (a) Schematic illustration of film-type sensors for H_2O_2 based on sulfide-substituted boron diiminate conjugated polymers with oxidation-induced AIE properties. (b) Other applications of boron ketoiminates and diiminates as luminescent chromism materials.

至った。これらの一連の研究は、ホウ素のみならずヘテロ元素含有共役系分子の新しい視点に基づく研究分野を拓くものでもあり、さらに機能のエッセンスを一つのユニット内に詰め込み、“元素ブロック化”することができれば、様々な機能性材料を生み出すことができるという、“元素ブロック高分子材料”の考え方の有効性を示す一例としても見ることができる。引き続き、研究を進めている。

参考文献

- (a) Chujo, Y.; Tanaka, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2015**, *88*(5), 633–643; (b) Gon, M.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Polym. J.* **2018**, *50*(1), 109–126; (c) Gon, M.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, *92*(1), 7–18; (d) Tanaka, K.; Chujo, Y. *Polym. J.* **2020**, *52*(6), 555–566.
- Yoshii, R.; Nagai, A.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2013**, *51*(8), 1726–1733.
- Tanaka, K.; Yanagida, T.; Yamane, H.; Hirose, A.; Yoshii, R.; Chujo, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*(22), 5331–5334.
- Nishino, K.; Hashimoto, K.; Tanaka, K.; Morisaki, Y.; Chujo, Y. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*(19), 2025–2028.
- Kokado, K.; Chujo, Y. *Macromolecules* **2009**, *42*, 1418.
- Nishino, K.; Yamamoto, H.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Org. Lett.* **2016**, *18*(16), 4064–4067.
- Tanaka, K.; Chujo, Y. *NPG Asia Mater.* **2015**, *7*, e223.
- Yoshii, R.; Nagai, A.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*(14), 4506–4512.

- Yoshii, R.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Macromolecules* **2014**, *47*(7), 2268–2278.
- Hirose, A.; Tanaka, K.; Yoshii, R.; Chujo, Y. *Polym. Chem.* **2015**, *6*(31), 5590–5595.

モレキュラービーコンとドラッグデリバリーシステムを応用した 細胞増殖能イメージング技術の開発

Development of Imaging Technology to Visualize the Cell Proliferation Ability Based on the Combination of Molecular Beacons and Drug Delivery System

田畑 泰彦・村田 勇樹・城 潤一郎

Yasuhiko TABATA, Yuki MURATA, Jun-ichiro JO

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

The objective of this study is to visualize the cell proliferation ability based on the combination of molecular beacons (MB) and drug delivery system. Ki67 MB of a target for cell proliferation and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) MB as a control of stable fluorescence in cells are incorporated into cationized gelatin nanospheres (cGNS). After the incubation for the cell internalization of cGNS incorporating MB (cGNS_{MB}), the cells were further incubated with different concentrations of basic fibroblast growth factor (bFGF) to enhance the proliferation ability. The expression of Ki67 and the resulting proliferation ability of cells were detected by the fluorescence of cGNS_{Ki67 MB} based on the intracellular controlled release of MB. It is concluded that the cGNS_{MB} are a promising system for the chronological visualization of proliferation ability in living cells.

1. 緒言

基礎生物学および細胞研究の急速な進展にともない、細胞の能力を人為的に修飾・改変することで得られた、高い能力をもつ細胞への注目が高まっている。加えて、近年の細胞培養技術および組織工学の発展により、生存能、増殖能、分化能など、細胞のもつ生物学的機能(=細胞機能)を発揮する適切な環境を与えることで、*in vitro*および*in vivo*でさえも細胞の能力を維持することが可能となりつつある。このような状況の下、高い能力をもつ細胞と、その周辺環境を制御する技術により、細胞機能を最大限活用した研究(オルガノイド研究、創薬研究、がん免疫治療、および細胞移植治療など)が盛んに行われている。これらの研究分野のさらなる発展には、細胞機能の評価が必要不可欠であることは言うまでもない。

なかでも、基本的な細胞機能である増殖能を評価することは医学生物学研究にとって極めて重要である。例えば、悪性腫瘍の特徴の一つにがん細胞のもつ高い増殖能が挙げられる。また、細胞移植治療においては、移植後の生体内における細胞の増殖能を向上させることで治療効果が高まることが期待される。しかし、現状として、生きた細胞のもつ増殖能を経時的に評価することは技術的に困難である。Ki67は、基礎細胞研究および病理学研究分野において広く用いられる代表的な増殖マーカーである。これまでのKi67の評価方法には、ウェスタンブロッティング法、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法、および免疫染色法などの生化学的および組織学的手法が用いられてきた。しかしながら、これらの実験手法は細胞を固定あるいは破壊する必要があり、スナップショットとしての一時的な情報しか

得られない。そこで、個々の細胞がもつ増殖能を、細胞を破壊することなく経時的に可視化する分子イメージング技術の研究開発が強く望まれている。

モレキュラービーコン(MB)は、細胞機能を制御する標的分子であるmRNAを検出するイメージングプローブである。MBは、両末端に蛍光分子と消光分子をもつステムループ構造を有する核酸誘導体であり、単独では消光状態を保っている。その一方で、標的mRNA存在下では、配列特異的なハイブリダイゼーションを介して構造が変化し蛍光発光することで、様々な細胞内mRNAを検出することができる¹⁾。しかしながら、単独のMBは不安定であり、細胞内に導入されにくい。加えて、MBを細胞内で用いる課題として、その蛍光検出活性が一過的であることが挙げられる。これは、MBが細胞内に取り込まれた後の細胞内残存期間が短いためである^{2,3)}。そこでわれわれは、この問題を解決する一つのアプローチとしてMBの細胞内徐放技術を開発してきた。徐放技術は、生物活性をもつ因子を生体材料と組み合わせることにより、体内で徐々に放出(=徐放)し、因子作用の持続と増強を実現するドラッグデリバリーシステム(DDS)技術の一つである。生分解性高分子であるゼラチンからなるナノ粒子にMBを内包させることで、MBを細胞内に効率よく送達することが可能となる。加えて、キャリアであるゼラチンの分解にともなってMBが細胞内で徐放される。これにより、MBの細胞内濃度が高く保たれ、細胞内MB活性およびmRNA検出期間が延長されることを報告している⁴⁾。そこで本研究では、このMBとDDS徐放技術を組み合わせたMB細胞内徐放技術を応用することで、細胞の増殖能を“生きたまま”かつ“経時的

に”可視化することを試みた。増殖マーカーであるKi67および細胞内で常に一定量の発現が知られる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) のmRNAに対するMBを設計した。これらのMBを内包するカチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS) を作製し、細胞に効率よく取り込ませた。その後、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を細胞に添加することで増殖能を向上させ、蛍光顕微鏡によって細胞を観察した。加えて、bFGF添加による増殖能の経時変化を可視化するために、タイムラプスイメージングによって経時的に細胞を観察した。

2. 実験方法

2-1. cGNSの作製

ゼラチン (等電点9.0、重量平均分子量99,000、新田ゼラチン株式会社より供与) のカルボキシル基に対して、スペルミンを結合させることでカチオン化ゼラチンを作製した。2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸法によってカチオン化ゼラチンのアミノ基を定量したところ、カルボキシル基に対するスペルミンの導入率は59.8 mole%であった。

次に、カチオン化ゼラチン水溶液 (50 mg/ml、1.25 ml) にアセトン5 mlを滴下することでコアセルベーションを形成させた。その後、25 wt%グルタルアルデヒド水溶液 (20 μ l) によってカチオン化ゼラチンを化学架橋することで、カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS) を得た。過剰量のグリシン水溶液により未反応のアルデヒド基をブロックし、遠心分離 (16,000 g、30分間、25 $^{\circ}$ C) および2回蒸留水への再分散を3回繰り返すことでcGNSを洗浄した。

2-2. cGNS_{MB}の作製および物性評価

cGNS (200 μ g/ml) およびMB (Ki67およびGAPDHのmRNAに対する、それぞれ4 μ M) を混合し (20 pmole MB/ μ g cGNS)、cGNSにMBを水溶液状態で含浸させた。その後、遠心分離 (16,000 g、15分間、25 $^{\circ}$ C) および2回蒸留水への再分散によってKi67およびGAPDH MB内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{Ki67 MB}およびcGNS_{GAP MB}) を作製した。

得られたcGNS_{MB}の見かけのサイズとゼータ電位は、動的光散乱法および電気泳動光散乱法によってそれぞれ測定した。また、放射性同位体 (¹²⁵I) によって標識したMBを用いることで、cGNSへのMB内包量を放射活性より測定した。

2-3. Ki67 mRNA発現評価および免疫蛍光染色

マウス間葉系幹細胞株であるKUM6細胞を6ウェル培養プレートに播種、24時間培養した後、異なる濃度の塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF、科研製薬株式会社より供与) を添加した (0、5、10、20、40、および100 ng/ml)。さらに培養を続け、bFGF添加24時間後に細胞からトータルRNAを抽出し、相補DNAへと逆転写した。得られた相補

DNAとKi67およびGAPDHに特異的なプライマーを混合し、SYBR Green法による定量リアルタイムPCRを行った。Ki67のmRNA発現量は、GAPDHのmRNA発現量によって標準化し、 $\Delta\Delta$ Ct法によってbFGF無添加細胞 (0 ng/ml) に対するmRNA発現量を評価した。

Ki67のタンパク発現は免疫蛍光染色法によって評価した。細胞をガラスボトムディッシュに播種、24時間培養した後、bFGFを異なる濃度で24時間添加した。その後、4 vol% パラホルムアルデヒドによって細胞を固定し、0.2 vol% TritonX-100によって透過処理を行った。続いて、ブロッキング処理の後、Ki67に対する1次抗体およびAlexa Fluor[®] 546結合2次抗体を細胞に添加した。その一方、細胞核は4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) によって染色し、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

2-4. 細胞増殖の評価

異なる濃度のbFGF (0、5、および20 ng/ml) を添加した条件で、細胞を6ウェル培養プレートに1ウェルあたり 5×10^4 の細胞数で播種した。培地は3日毎に交換し、1、2、3、5、および7日間培養を続けた。その後、トリプシン処理によって細胞を剥離し、0.4 vol%トリパンプルー溶液によって死細胞を染色し、血球計算盤を用いて生細胞数を計数した。

2-5. cGNS_{MB}の細胞内導入および細胞増殖能の蛍光イメージング

細胞をガラスボトムディッシュに播種、24時間培養した後、培地をOPTI MEMに交換した。続いて、cGNS_{MB} (cGNS_{Ki67 MB}あるいはcGNS_{GAP MB}) を10 μ g/mlの濃度で添加し、1時間培養することで細胞にcGNS_{MB}を取り込ませた。その後、細胞を洗浄し、bFGF (0、5、および20 ng/ml) を添加した条件で、さらに24時間培養を続け、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。6視野を無作為に撮像し、得られた蛍光像の平均輝度を画像解析によって定量することで蛍光強度を評価した。その一方で、bFGFを添加した後の細胞をタイムラプスイメージングによって観察し (10分間隔で24時間)、MB蛍光の経時変化を評価した。

3. 結果と考察

3-1. cGNS_{MB}の物性評価

図1に、作製したcGNS_{Ki67 MB}およびcGNS_{GAP MB}のMB内包量、見かけのサイズ、およびゼータ電位を示す。これらの値は、いずれもMBの配列によらず一定であった。これは、MBの配列によらずcGNS_{MB}の物理化学的性質が同じであることを示している。cGNS_{MB}の見かけのサイズおよびゼータ電位は、それぞれ約230 nmおよび8.8 mVであり、細胞に取り込まれやすいサイズと表面電荷であることがわかった^{5,6)}。

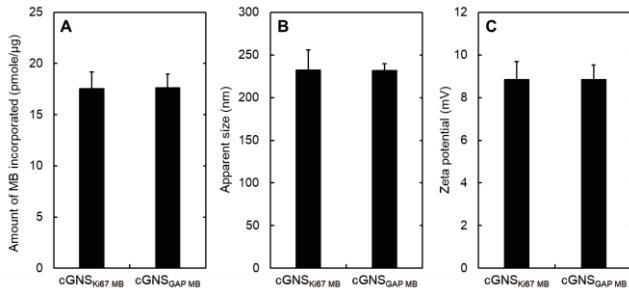


Fig. 1. Characterization of cGNS_{MB}. Amount of MB incorporated in cGNS (A), apparent size (B) and zeta potential of cGNS_{MB} (C).

3-2. Ki67発現および細胞増殖に対する添加bFGF濃度の影響

図2および図3は、異なる濃度のbFGFを細胞に24時間添加した後のKi67 mRNA発現および免疫蛍光染色像である。bFGF濃度の増加とともにKi67のmRNA発現量は有意に増加し、20 ng/ml以上では一定の値となった。mRNA発現と同様に、免疫蛍光染色によって検出されたKi67のタンパク発現は添加bFGF濃度の増加とともに増加し、20 ng/ml以上の濃度ではKi67の発現レベルは同程度であった。

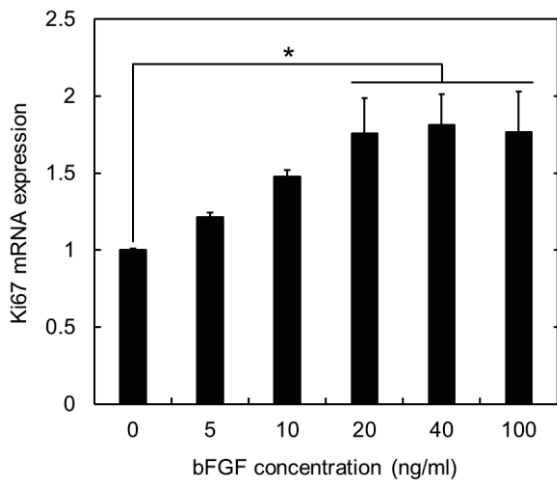


Fig. 2. Effect of bFGF concentration on the mRNA expression of Ki67. The cells were cultured at different concentrations of bFGF for 24 hr. *, $p < 0.05$; significant against the expression level at 0 ng/ml bFGF.

図4は、異なる濃度のbFGFを添加して培養した細胞の増殖曲線である。bFGF無添加 (0 ng/ml) の細胞と比較して、bFGFを添加した条件で培養した細胞数は2および3日後の時点で有意に大きく、bFGFによって細胞増殖が加速されることがわかった。しかしながら、bFGF濃度20および40 ng/mlの間において、細胞増殖の加速は同程度であった。これは、Ki67のmRNAおよびタンパク発現の結果 (図2および図3) とよく一致し、Ki67がMBのターゲットとして有用であることを示す。これらの結果より、0、5、および20 ng/mlのbFGF濃度を以降の実験で用いた。

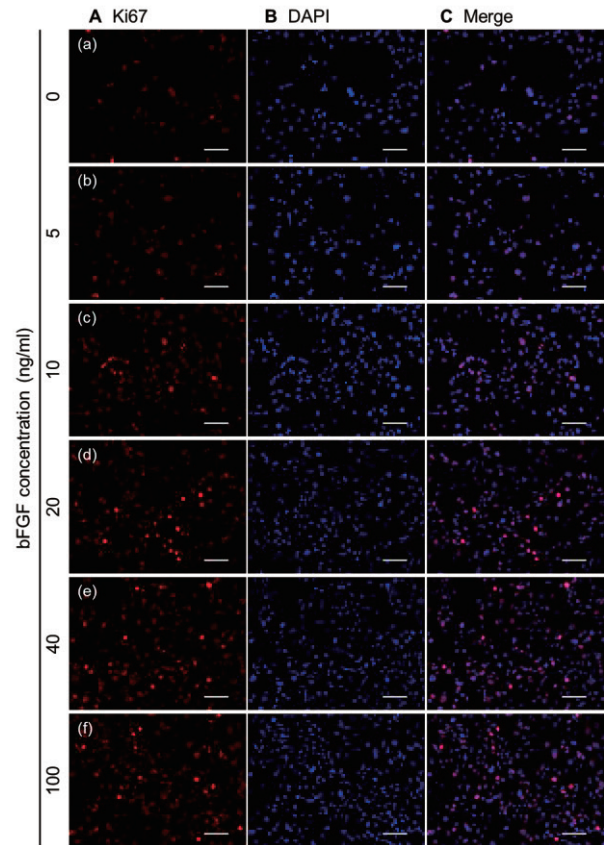


Fig. 3. Immunofluorescent staining of Ki67: (A) Red: Ki67, (B) Blue: DAPI (nuclei), and (C) Merged fluorescent images. The cells were cultured with 0 (a), 5 (b), 10 (c), 20 (d), 40 (e), and 100 ng/ml bFGF (f) for 24 hr. Scale bar is 100 μ m.

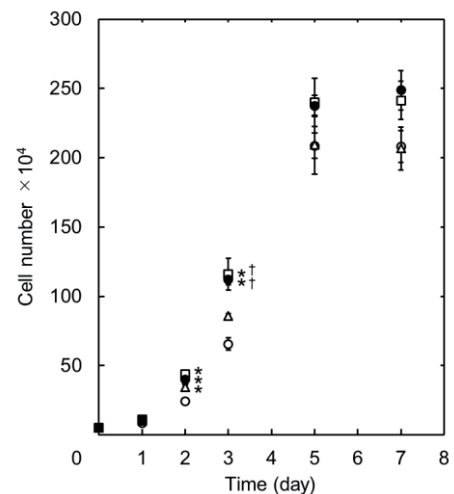


Fig. 4. Time profile of cell proliferation at different concentrations of bFGF. The cells were cultured with 0 (○), 5 (△), 20 (□), and 40 ng/ml bFGF (●), and were trypsinized to count the cell number at different time points. *, $p < 0.05$; significant against the cell number cultured with 0 ng/ml bFGF at the corresponding time point. †, $p < 0.05$; significant against the cell number cultured with 5 ng/ml bFGF at the corresponding time point.

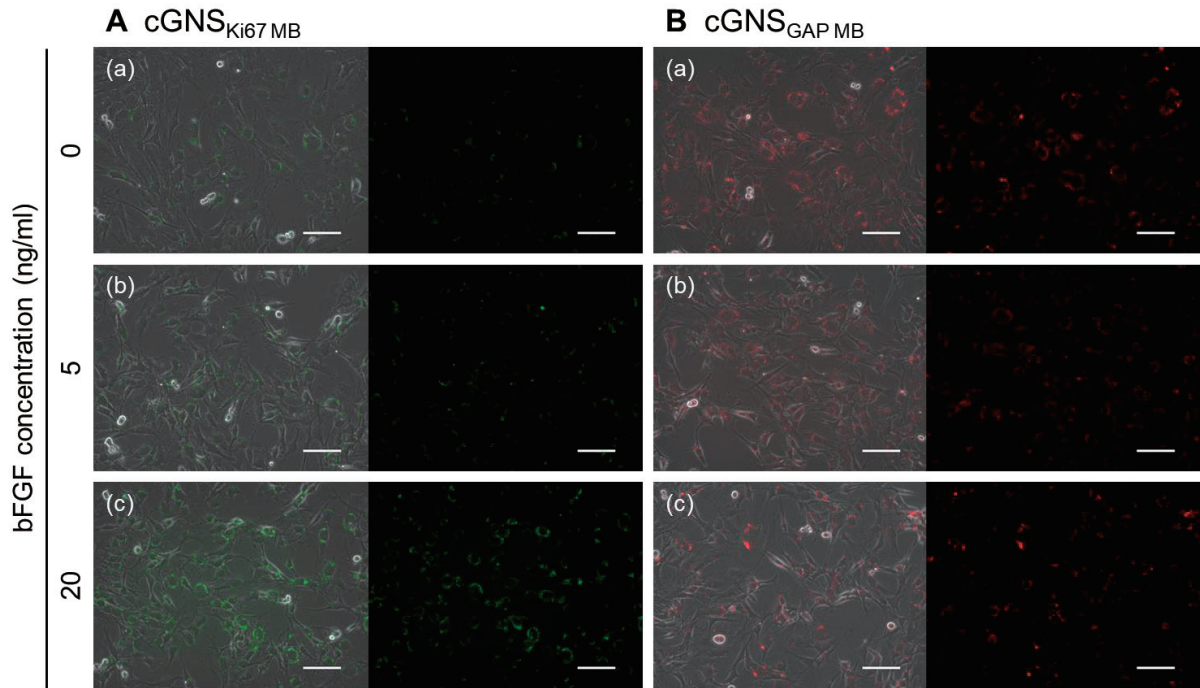


Fig. 5. Fluorescent microscopic images of cGNS_{MB}-incubated cells cultured with or without bFGF. The cells were incubated with 10 μg/ml cGNS_{Ki67 MB} (A) and cGNS_{GAP MB} (B) for 1 hr, and further for 24 hr in the presence of 0 (a), 5 (b), and 20 ng/ml bFGF (c). Scale bar is 100 μm.

3-3. cGNS_{MB}の細胞内導入および細胞増殖能の蛍光イメージング

細胞にcGNS_{MB}を添加し、1時間培養することでcGNS_{MB}を細胞に取り込ませた。放射性同位体で標識されたMBを用いることで、MBの細胞内導入量を測定したところ、cGNS_{Ki67 MB}およびcGNS_{GAP MB}は同程度の細胞内導入量であることがわかった。これは、cGNS_{MB}の物理化学的性質がMBの配列によらず同じであるためであると考えられる(図1)。以前の研究において、cGNS_{MB}はエンドサイトーシス経路によって細胞に取り込まれ、エンドソームから脱出することで細胞質のmRNAを検出できることを報告している^{4,7}。加えて、本研究で用いたcGNS_{MB}の取り込み条件(10 μg/ml, 1時間)では、細胞毒性は示されなかった。

続いて、cGNS_{MB}を取り込んだ細胞に異なる濃度のbFGFを24時間添加し、蛍光顕微鏡で観察した(図5)。cGNS_{GAP MB}の蛍光はbFGF濃度によらず同様に観察された。その一方で、cGNS_{Ki67 MB}の蛍光は、bFGF添加濃度の増加とともに強く観察された。画像解析によってその蛍光強度を評価したところ(図6)、cGNS_{GAP MB}の蛍光強度は一定であったのに対して、cGNS_{Ki67 MB}の蛍光強度はbFGF濃度の増加とともに大きくなった。このcGNS_{Ki67 MB}の蛍光強度増加は、Ki67のmRNA発現量の増加とよく一致した(図2)。これらの結果は、cGNS_{Ki67 MB}がbFGF添加によって増加した細胞内のKi67 mRNAを特異的に検出することで、細胞の増殖能を可視化できることを示している。

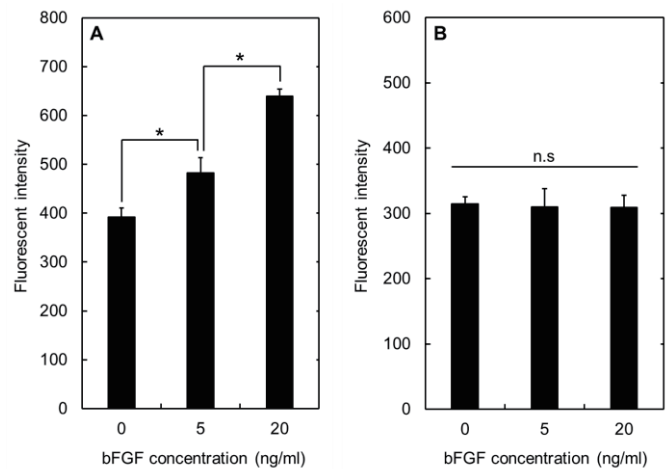
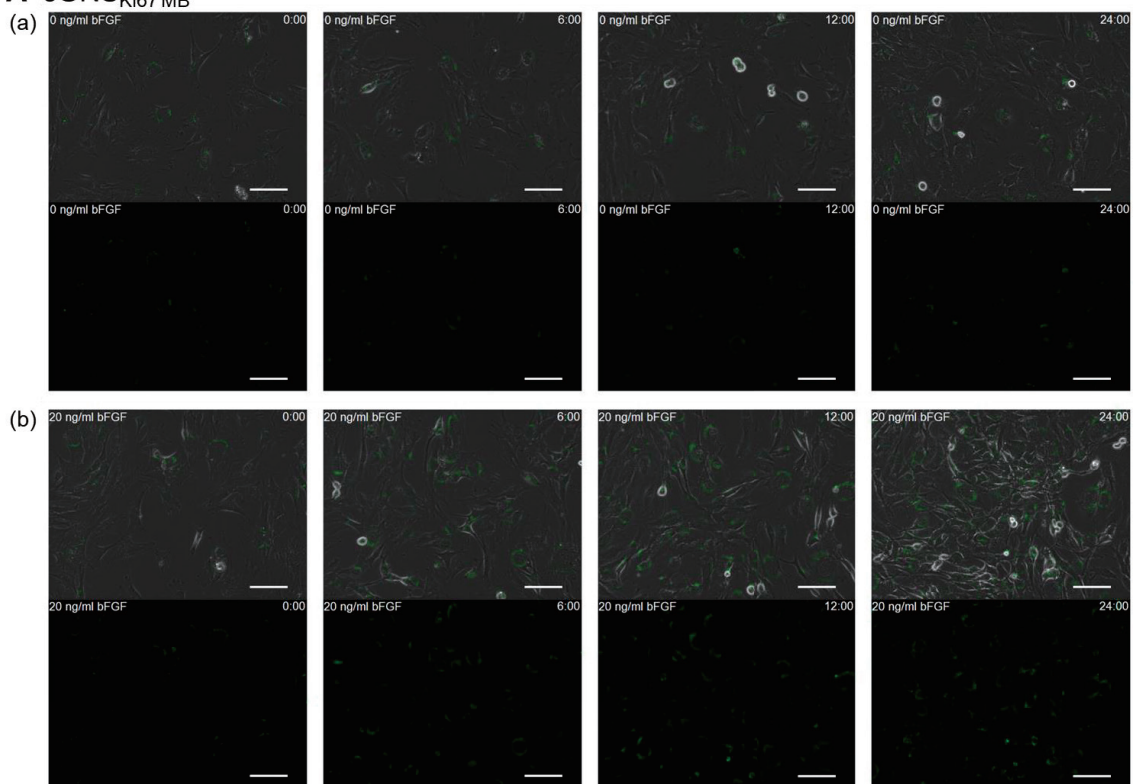


Fig. 6. Fluorescent intensity of cGNS_{MB}-incubated cells cultured with or without bFGF. The cells were incubated with 10 μg/ml cGNS_{Ki67 MB} (A) and cGNS_{GAP MB} (B) for 1 hr, and further for 24 hr in the presence of 0, 5, and 20 ng/ml bFGF. n.s.; not significant. *, p < 0.05; significant between the groups.

A cGNS_{Ki67 MB}



B cGNS_{GAP MB}

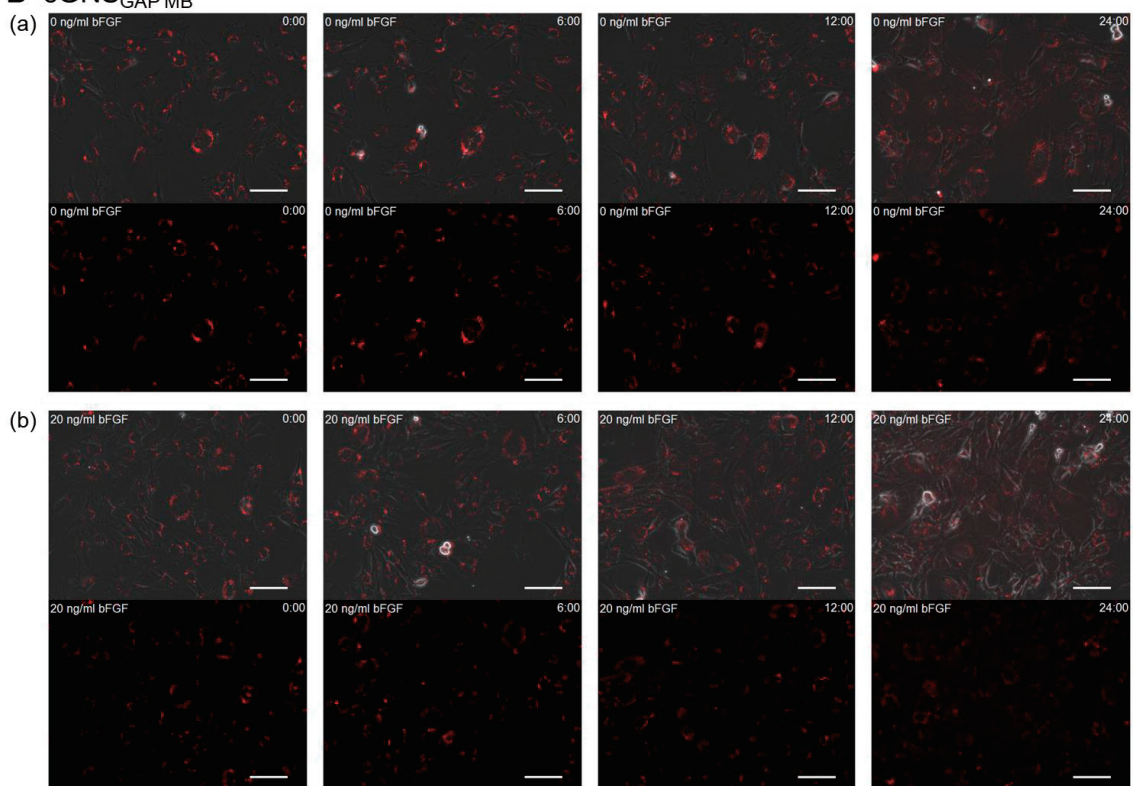


Fig. 7. Timelapse imaging of cGNS_{MB}-incubated cells cultured with or without bFGF. The cells were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ cGNS_{Ki67 MB} (A) and cGNS_{GAP MB} (B) for 1 hr, and further for 24 hr in the presence of 0 (a) and 20 ng/ml bFGF (b). The fluorescent images at the time point of 0, 6, 12, and 24 hr after bFGF addition are shown. Scale bar is 100 μm .

図7は、cGNS_{MB}を取り込んだ細胞にbFGF（0および20 ng/ml）を添加し、タイムラプスイメージングによって24時間まで観察した蛍光顕微鏡画像である。cGNS_{GAP MB}の蛍光はbFGF添加にかかわらず、どの観察時点においても同様に観察された（図7B）。さらに、cGNS_{GAP MB}の蛍光強度は細胞分裂の前後でさえも一定に保たれることがわかった。一般的に、イメージングプローブの細胞内シグナルは、細胞分裂によってその細胞内濃度が希釈されるため、時間とともに減弱することが知られている⁸⁾。これに対して、cGNS_{MB}では、標的mRNAに対して過剰量のMBが消光状態で細胞質に徐放される。これにより、細胞内mRNAを十分に検出可能な“アクチベータブル”MBが継続的に徐放され、細胞分裂前後でもその濃度が高く維持されると考えられる。このように、イメージングプローブであるMBとDDS徐放技術を組み合わせることで、プローブのもつ能力を最大限に発揮したイメージングシステムを構築することが可能となった。cGNS_{Ki67 MB}の蛍光は、bFGF無添加細胞（0 ng/ml）よりも20 ng/mlのbFGFを添加した細胞において強く観察され、数時間以内に蛍光強度が増加することが観察された（図7A）。これらの結果は、bFGF添加によって細胞内のKi67 mRNA発現が数時間程度のタイムスケールで増加し、cGNS_{MB}によってこれを検出できる可能性を示している。cGNS_{MB}による細胞増殖能可視化のメカニズムを明らかにするために、詳細なmRNA発現の時間変化、MBの細胞内濃度変化、およびMBの細胞内局在について今後さらに調べる必要がある。

4. 結論

異なる配列をもつMBを内包するカチオン化ゼラチンナノ粒子（cGNS_{MB}）を作製した。bFGFによってKi67のmRNAおよびタンパク発現は増加し、細胞増殖がその添加濃度に応じて加速された。作製したcGNS_{MB}は効率よく細胞内に取り込まれ、異なる濃度のbFGF添加によるKi67発現および細胞増殖能の増加を感度よく検出することが可能となった。加えて、タイムラプスイメージングを用いることで、生きた細胞の経時的な増殖能の増加を可視化することができた。今後、本研究で開発したMBのDDS技術を応用することで、増殖能にとどまらず、様々な細胞機能が可視化されると期待される。

参考文献

- 1) S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nat Biotechnol.*, 14, 303-308 (1996).
- 2) H.V. Desai, I.S. Voruganti, C. Jayasuriya, Q. Chen, E.M. Darling, *Tissue Eng Part A.*, 20, 899-907 (2014).
- 3) D. Yeo, C. Wiraja, Y.J. Chuah, Y. Gao, C. Xu, *Sci Rep.*, 5, 14768 (2015).
- 4) Y. Murata, J. Jo, Y. Tabata, *Tissue Eng Part A.*, 25, 1527-1537 (2019).
- 5) K.Y. Win, S.S. Feng, *Biomaterials*, 26, 2713-2722 (2005).
- 6) C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, *Biomaterials*, 31, 3657-3666 (2010).
- 7) Y. Murata, J. Jo, Y. Tabata, *Sci Rep.*, 8, 14839 (2018).
- 8) E.C. Jensen, *Anat Rec (Hoboken).*, 295, 2031-2036 (2012).

位置選択型セルロース系ボトルブラシの精密合成と構造解析

Precision Synthesis and Structural Analysis of Regioselective Cellulosic Bottlebrushes

辻井敬亘・黄瀬雄司・榊原圭太

Yoshinobu TSUJII, Yuji KINOSE, Keita SAKAKIBARA

Institute for Chemical Research, Kyoto University

A graft polymer with dense side chains is known as molecular bottlebrush. In addition, a bottlebrush with two kinds of side chains immiscible is called Janus bottlebrush. The self-assembly of side chains of Janus bottlebrush leads to fascinating properties in its higher-order structure, such as micelle in a solution, surfactant at interface and microphase separation in bulk. We expected that the bottlebrushes (including Janus type) with cellulose as a main chain take novel conformations owing to the cellulosic rigidity, regularity, and helicity. Herein, we developed the precision synthesis routes of novel cellulosic bottlebrushes regioselectively having polystyrene, poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene oxide) side chains and revealed their characteristics of main- and side-chain conformation in dilute solution and higher-order structure in microscale morphologies in bulk.

1. はじめに

高密度に側鎖を有する櫛形ポリマーは、分子ボトルブラシと呼ばれる。ボトルブラシは、高密度な側鎖の化学的特性に加え、その排除体積効果による主鎖の剛直化、それに伴う液晶化や絡み合いの低下などの特異な特性を示し、興味深い分子鎖形状の一つである。また、ボトルブラシの側鎖を構成するポリマーを複数種とすることで、単一成分側鎖からなるボトルブラシ（ホモ型ボトルブラシ）が有する特徴に加え、新たな特性・機能を付与することができる。

主鎖に沿って異種側鎖がランダムに導入されたボトルブラシはミックスボトルブラシと分類され、特に、異種側鎖が非相容で分子内相分離したボトルブラシは、その形態からヤヌス型ボトルブラシと呼ばれる²⁾。ヤヌス型ボトルブラシは液中、界面、バルク中で自己組織化し、高次構造を形成させるビルディングブロックとして注目されている。ヤヌス型ボトルブラシの特異性の一つとして、異種側鎖が主鎖に拘束され、主鎖を挟むように配列している点が挙げられる。このため、マイクロ相分離構造を形成しやすく、ドメインサイズの小さな高次構造の形成が可能となる。

本研究では、これまでに焦点が当てられてきた、異種側鎖の重合度、密度、化学構造、および主鎖の重合度に加え、主鎖の立体配置や立体配座を制御することで、ヤヌス型ボトルブラシのなす高次構造の多様性を拡張することを企図して、セルロース鎖に着目した。セルロースは半剛直かつキラルな天然高分子で、繰り返しグルコース単位当たり3種の水酸基を有する³⁾。セルロースやその誘導体はコレステリック液晶やキラルカラム固定相などとして用いられる。このような特性を有するセルロース鎖に位置選択的に異種側鎖を導入できれば、異種側鎖がキラルな主鎖に、らせん状に拘束された二次構造を、さらにはそれらの分子間相互作用により新規の高次構造を形成すると期待される

(図1)。本稿では、これまでに取り組んできた、位置選択的に側鎖を導入したセルロース系ボトルブラシ（ホモ型およびヤヌス型）の合成、および、それらの二次構造および高次構造に関する研究成果をまとめる。

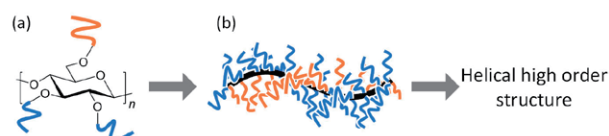
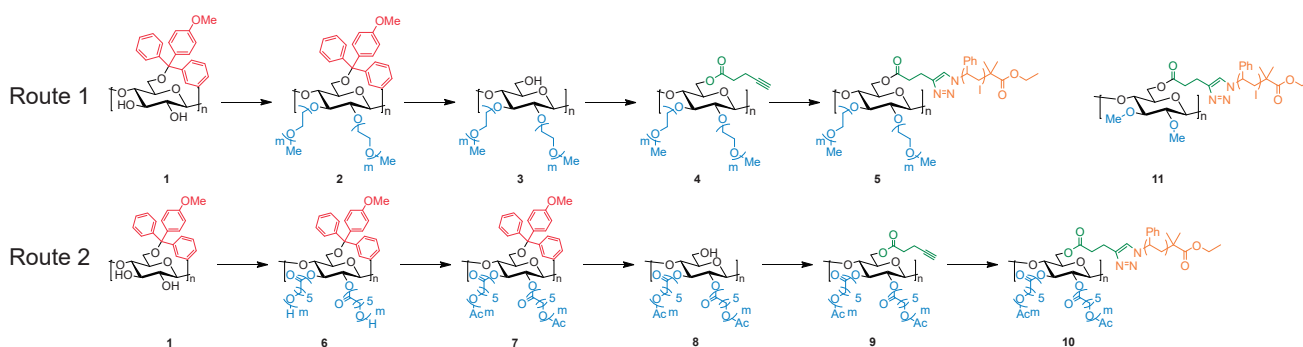


Fig. 1 (a) Cellulosic Janus bottlebrush and (b) its expected higher-order structure.

2. 構造明確なセルロース系ボトルブラシの合成⁴⁾

いくつかのセルロース鎖の修飾法が報告されているが、本研究では微結晶セルロースを原料として位置選択的保護基の導入と続くgrafting-to法およびgrafting-from法による側鎖の導入を試みた。セルロースには、いくつかの位置選択的保護基が開発されている。その中で、6位水酸基を位置選択的に保護する4-methoxytrityl (MeOTr) 基⁵⁾を選択し、6位水酸基が位置選択的に保護されたセルロース誘導体1を出発原料として、2通りの方法で異種側鎖を位置選択的に導入したセルロース系ヤヌス型ボトルブラシの合成を試みた（スキーム 1）。

Route 1では、ウィリアムソンエーテル反応により、ポリエチレンオキシド (PEO) をセルロースの2,3位に導入した(2)。MeOTr基のHClによる脱保護(3)と、続く6位へのpentynoyl基の導入(4)の後、ポリスチレン (PSt) 鎖をクリック反応により導入し、PEO鎖とPSt鎖を有するヤヌス型セルロース系ボトルブラシ (PEO-PSt-cellulose, 5) を合成した。セルロース鎖の繰り返し単位あたりの側鎖導入量すなわち置換度 (degree of substitution; DS) は、PEO鎖 (DS_{PEO}) については3のpropanoyl化物の¹H NMRスペクト



Scheme. 1 Synthetic routes of homo- and Janus-type cellulosic bottlebrushes

ルから、PSt鎖 (DS_{PSt}) についてはサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による未反応PSt鎖の定量から算出した (表1)。

Route 2では、開環重合によりポリ (ε-カプロラクトン) (PCL) をセルロースの2,3位水酸基により導入した (6)。PCLの重合度 (DP_{PCL}) は、6の¹H NMRスペクトルにおけるε-メチレンプロトンとω末端に位置するε-メチレンプロトンのピーク比から算出した。また、PCLのDSは重合開始時の[CL]と[OH]比から算出される理論重合度とDP_{PCL}の比から見積もった。PCL末端をアセチル基で保護した (7) 後、ルイス酸 (FeCl₃) によりMeOTf基の選択的な加水分解を達成した (8)。さらに、pentynoyl基の導入 (9)、続く

クリック反応によりPSt鎖を導入し、ヤヌス型ボトルブラシPCL-PSt-cellulose (10) を合成した (表2)。

Route 1および2により、位置選択的に異種側鎖を導入する合成経路の開拓に成功した。Route 1では高密度な側鎖の導入が、route 2では分子量が大きな側鎖の導入が達成され、目的に応じた合成経路の選択が可能となった。また、位置選択的ホモ型ボトルブラシとして、合成経路上で得られるPEO鎖、PCL鎖のみを有するものに加えて、Route 1にて2,3位にPEO鎖ではなくMe基を導入することによりPSt鎖を有するもの (PSt-cellulose、11) も合成した (表1)。

3. ホモ型ボトルブラシのコンフォメーション解析⁶⁾

セルロース系ヤヌス型ボトルブラシに先立ち、そのリファレンスともなるPSt-cellulose (11a-c) を対象として、希薄溶液中の側鎖および主鎖のコンフォメーションの解析を行った。溶媒としては、ヤヌス型ボトルブラシの異種側鎖の相分離を企図してDMF (10mM LiBr含有) を選択した。DMFは、PSt鎖に対する貧溶媒である。

側鎖コンフォメーションを議論すべく、小角X線散乱 (SAXS) プロファイルの断面Guinier近似⁷⁾により、ボトルブラシ径を評価した。算出された直径 d のPSt鎖重合度 (DP_{PSt}) 依存性を図2に示す。半径 $d/2$ は隣接側鎖間距離 h (~主鎖繰返ユニット長0.5 nm) よりも大きく、隣接側鎖同士が相互作用していることを意味する。貧溶媒中におけるボトルブラシの側鎖コンフォメーションは、溶媒の温度が低い順に、(i) 側鎖が強い引力により主鎖に沿って不均一に凝集した「pinned cluster」状態、(ii) 側鎖間の引力が弱まり、半径方向に対し側鎖の密度が一定となる「collapsed brush」状態、(iii) 側鎖同士の斥力により側鎖が伸長した「swollen brush」状態を取る⁸⁾。図2における d の傾きは0.50と算出され、半径が側鎖重合度の1/2乗に比例、すなわち半径方向に対し側鎖の密度が一定であることが示され、PSt-celluloseの側鎖はDMF中「collapsed brush」状態であることが明らかになった。

Table. 1 Molecular characteristics of PEO-PSt-cellulose **5**, PSt-cellulose **11** and PEO-cellulose **4**.

sample	Grafted PEO or Me			Grafted PSt-N ₃				Bottlebrush	
	MW _{PEO} or MW _{Me} (g mol ⁻¹)	DP	DS	M _n ^a (g mol ⁻¹)	PDI ^a	DP	DS	DP _w ^b	M _w /M _n ^b
5a	732	16	1.6	6.4×10 ³	1.1	60	1.0	1.2×10 ²	2.3
5b	732	16	1.6	3.3×10 ³	1.1	30	1.0	1.3×10 ²	2.4
5c	732	16	1.6	2.2×10 ³	1.1	20	1.1	1.3×10 ²	2.4
11a	14	—	1.8	6.4×10 ³	1.1	60	1.1	1.1×10 ²	1.6
11b	14	—	1.8	3.3×10 ³	1.1	30	1.1	1.2×10 ²	1.7
11c	14	—	1.8	2.2×10 ³	1.1	20	1.2	1.1×10 ²	1.7
4	732	16	1.6	—	—	—	—	4.4×10 ² ^c	1.5 ^c

^aDetermined by GPC in THF using PSt standards.

^bDetermined by SEC-MALS in DMF/LiBr. ^cEstimated by SEC in DMF/LiBr with PMMA standards.

Table. 2 Molecular characteristics of PCL-PSt-cellulose **10**.

Sample	Grafted PCL				Grafted PS-N ₃				Bottlebrush
	M _n ^a (10 ⁵ g mol ⁻¹)	PDI ^a	DP ^b	DS ^b	M _n ^a (10 ³ g mol ⁻¹)	PDI ^a	DP	DS	
10a	2.7	3.2	50	1.0	4	1.1	38	0.84	0.20 : 0.80
10b	4.9	1.8	104	1.0	9.2	1.1	90	0.75	0.44 : 0.56
10c	7.3	1.5	100	1.5	16	1.1	158	0.64	0.54 : 0.46

^aDetermined by GPC in THF using PSt standards.

^bDetermined by ¹H-NMR. ^cVolume fraction ratio of PS and PCL, determined by ¹H-NMR.

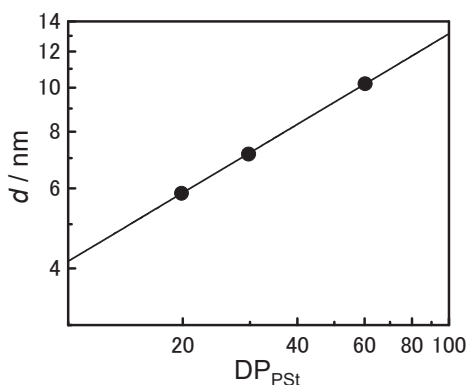


Fig. 2 Double-logarithmic plot of bottlebrush diameter (d) vs the degree of polymerization of PSt-side chain (DP_{PSt}) for **11** in DMF/LiBr: the line represents a power law fit of the data.

主鎖のコンフォメーションに関して、回転二乗半径の主鎖重合度依存性をサイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱 (SEC-MALS) 測定により評価した。各試料の実験データをみみず鎖モデルにより解析して、剛直性パラメータ λ^{-1} を評価した。 λ^{-1} の DP_{PSt} 依存性を図3に示す。図中の点線は、対比のため、主鎖側鎖ともにPStからなり、PSt-celluloseと同じ側鎖密度を有する仮想的なボトルブラシ^{9,10} (柔軟主鎖系) の予測値を示す。セルロース系の λ^{-1} は、測定した側鎖分子量範囲において、柔軟主鎖系より大きいながらも無置換セルロースの文献値 (図中の矢印)^{11,12}と同程度あり、柔軟主鎖系のような、側鎖重合度に伴う顕著な剛直性の増大は認められなかった。

以上より、貧溶媒 (DMF) 中、測定した側鎖重合度の範囲内において、PSt-celluloseの側鎖は「collapsed state」なる状態となりつつも、セルロース鎖本来の剛直性により、伸張した分子鎖構造を維持していることが明らかになった。これは、PS-celluloseが側鎖間に引力が働くものの分子内ミセルを形成していないこと意味し、PSt側鎖を有するヤヌス型セルロース系ボトルブラシの分子内相分離を誘起する溶媒としてDMFが有望であることが示唆された。

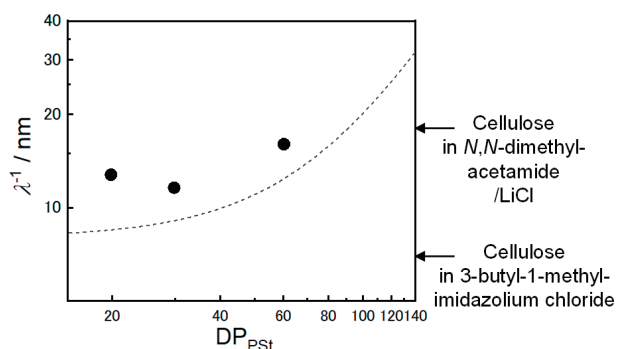


Fig. 3 Double-logarithmic plot of λ^{-1} vs DP_{PSt} for **11** in DMF/LiBr. The broken curve represents the theoretical curve for the PSt-PSt bottlebrush calculated with $h = 0.52$ nm in a Θ -solvent.

4. ヤヌス型ボトルブラシの分子内相分離¹³⁾

ヤヌス型ボトルブラシは、非相溶な異種側鎖間および溶媒との相互作用により、溶液、界面およびバルクにおいて凝集体として自己組織化による高次構造を形成する。しかしながら、これらの構造と比較して、希薄溶液中における孤立分子鎖のコンフォメーションに関する知見は少ない。そこで、DMF (10mM LiBr 含有) 中において、PEO-PSt-cellulose (**5**) の断面構造の評価を試みた。具体的には、側鎖重合度の異なるPEO-PSt-cellulose (**5a-c**)、PSt-cellulose (**11a-c**) およびPEO-PSt-celluloseの前駆体であるPEO-cellulose (**4**) に対して、SAXSプロファイルの断面Guinier近似により断面の回転二乗半径 ($S_{c,\text{SAXS}}^2$) を算出し、繰り返し単位あたりのPSt分子量 ($MW_{\text{AGU,PSt}}$) に対する依存性を、各種のシリンダー状モデル (図4) を仮定した理

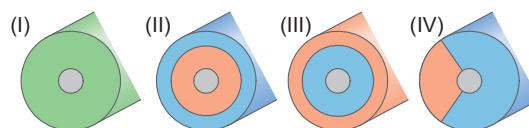


Fig. 4 Cross-sectional structure model of PEO and PSt side chains surrounding the main-chain core; (I) homogeneous mixture, (II) (III) radial phase separation and (IV) Janus-like phase separation (gray: cellulosic backbone; blue: PEO region; orange: PSt region).

論値との比較を試みた。

PSt-celluloseの $S_{c,\text{SAXS}}^2$ の $MW_{\text{AGU,PSt}}$ 依存性を図5に示す。セルロース鎖がコアを、PSt鎖がシェルをなすモデルを用いて解析した結果、セルロースコアドメインの密度 ($d_{\text{cellulose}}$) およびシェルドメイン中のPSt鎖の密度 ($d_{\text{PSt,solvent}}$) は、それぞれ1.17、0.26 g/cm^3 と見積もられた。続いて、PEO-PSt-cellulose (**5a-c**) の $S_{c,\text{SAXS}}^2$ の $MW_{\text{AGU,PSt}}$ 依存性 (図6) に関して検討した。第一に、コアがセルロース、シェルがPEO鎖とPSt鎖の均一に混合したモデル (図4 I) を用いて解析すると、いずれの場合も $d_{\text{PSt,solvent}}$ の値が0.26 g/cm^3 より大きくなった。これは、PSt鎖とPEO鎖が混合し同じドメインを占めているとの前提に矛盾する。よって、PEO鎖とPSt鎖はマイクロ相分離していると判断した。そこで、図4 II-IVで示すように、PSt鎖とPEO鎖が分子内で相分離しているモデルを用いてPEO-PSt-celluloseおよびPEO-celluloseの $S_{c,\text{SAXS}}^2$ 実験データの再現を試みた (図6破線)。しかしながら、いずれのモデルでも十分に満足する結果には至らなかった。そこで、溶媒中に存在するLiBrがPEOドメインに集積し、PEOドメインの電子密度が増大していると仮定し、実測値の再現を試みた。均一混合モデル (図4 I) および相分離モデル (図4 II-IV) において、PEOドメインへのLiBrの集積を加味して検討した結果、PEO鎖とPSt鎖がヤヌス状に相分離したモデルが最も精度高く実測値に対応し

た(図6赤実線)。以上の結果より、PEO-PSt-celluloseの異種側鎖はDMF中において相分離しており、その構造がヤヌス状であると結論した。DMFは、PStに対して貧溶媒、PEOに対して良溶媒の選択溶媒であることから妥当であると考えている。

さらに、PEO-PSt-celluloseのSEC-MALS測定結果について、モデルIVで算出されたPEOドメイン中のPEO鎖の密度($d_{PEO,solve} = 0.48$)、および、 $d_{cellulose}$ 、 $d_{PSt,solvent}$ の値から算出された半径を加味してみみず鎖モデルで解析すると、いずれのPEO-PSt-celluloseも主鎖は剛直であり、単分子ミセルを形成せず、図4で示したシリンダー状のモデルによる検討が妥当であったことが確認された。

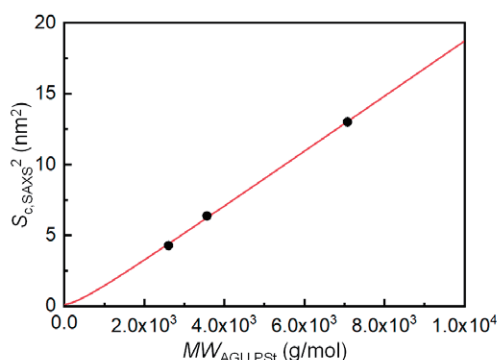


Fig. 5 Plot of $S_{c,SAXS}^2$ vs $MW_{AGU,PSt}$ for PSt-cellulose (11): the red curves represent the theoretical curve of core-shell model.

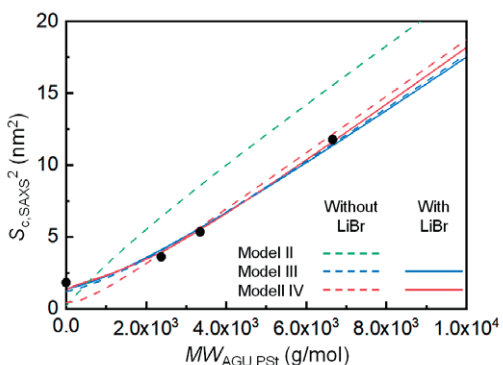


Fig. 6 Plot of $S_{c,SAXS}^2$ vs $MW_{AGU,PSt}$ for PEO-cellulose (4) and PEO-PSt-cellulose (5). The purple, blue, green and red curves represent the theoretical curves for the models (II), (III) and (IV) illustrated in Fig. 4, respectively, and the broken and solid curves represent those for the models without and with LiBr, respectively.

5. ヤヌス型ポトルブラシのマイクロ分離¹⁴⁾

適用可能な分子量範囲が広く、かつ、大量合成に向く Route 2で合成したヤヌス型ポトルブラシPCL-PSt-cellulose (10) のバルク中における微細構造を評価した。具体的には、側鎖重合度の異なる試料のキャスト膜を120 °Cで24 h

熱処理した後、SAXS測定および透過型電子顕微鏡 (TEM) を行った。得られたSAXSプロファイルを図7に示す。PCLとPStの電子密度の差が小さいため、ピーク強度は小さかったものの、10bおよび10cは1:2の位置にピークを与え、ラメラ構造の形成が示唆された。一方、10aはブロードなピークのみを示し、秩序構造は形成されていないと判断した。

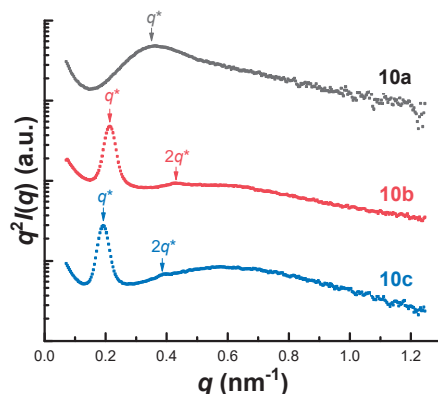


Fig. 7 SAXS profiles for 10a-c in bulk films. Downward arrows indicate the peak positions of the estimated lattice structure with theoretical factor.

続いて、RuO₄染色した試料をTEM観察するとラメラ状の黒色、灰色、白色領域が認められた(図8a,b)。RuO₄は二重結合を優先的に染色するため、白色領域が結晶状PCLドメインと判断される。また、示差走査熱量測定の結果から、PCLの結晶化度は約55%と見積もられ、黒色および灰色の領域は、それぞれアモルファスのPCLおよびPStドメインであると帰属した(図8c)。マイクロドメイン構造は均一配向には至っていないが、TEM画像から、10bと10cのドメイン間距離は26および29 nm、また、それぞれPCLのアモルファス領域、結晶領域およびPSt領域の幅は5、6、

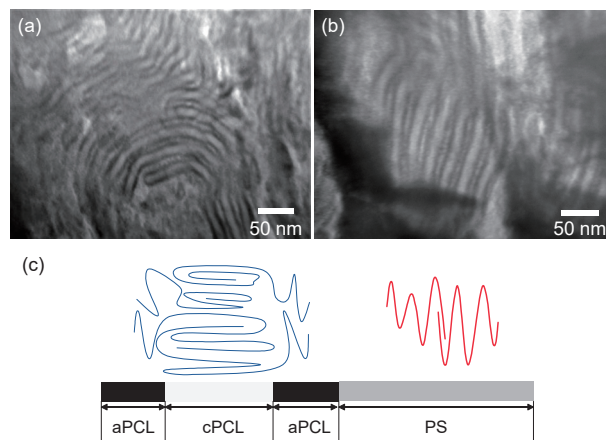


Fig. 8 TEM images of (a) 10b and (b) 10c in bulk films annealed at 120 °C for 24h. (c) Schematic illustration of the packing of the Janus bottlebrush with the stained regions. cPCL: crystalline PCL; aPCL: amorphous PCL.

10 nm および5、6、13 nmと見積もられた。PSt側鎖の分子量が異なるにもかかわらず、PCLドメインサイズが等しいことから、PCLおよびPStドメインが主鎖であるセルロース鎖に束縛されていることが示唆された。そのため、主鎖近傍のPCLは結晶化できず、アモルファス領域を形成したと考えられる。

6. 最後に

セルロース主鎖に側鎖が位置選択的に導入されたセルロース系ポトルブラシ（ホモ型およびヤヌス型）の合成経路を開拓した。貧溶媒中、PSt鎖を有するセルロース系ポトルブラシ（PSt-cellulose）は側鎖間に引力が働きながらも凝集構造を形成せず、セルロース鎖本来の剛直性により伸張コンフォメーションを維持していることを明らかにした。さらに、PEO鎖およびPSt鎖を有するセルロース系ヤヌス型ポトルブラシ（PEO-PSt-cellulose）は貧溶媒中、異種側鎖が相分離し、ヤヌス状断面形状を形成していることを実証した。また、PCL鎖およびPSt鎖を有するセルロース系ヤヌス型ポトルブラシ（PCL-PSt-cellulose）がバルク中でマイクロ相分離によるミクロンオーダーのモルフォロジーを形成することを明らかにした。今後、セルロースに内在する剛直性およびらせん性がより顕著に反映されたモルフォロジーや機能を検証する予定である。

謝辞

SAXS測定は高輝度光科学研究センター（JASRI）の承認を受け、Spring-8のビームラインBL40B2で行った（課題番号：2016B1208、2017B172）。測定にあたり多大なる協力を頂いたJASRIの太田昇博士、京都大学化学研究所の小川紘樹准教授に深謝する。

参考文献

- 1) G. Xie, M.R. Martinez, M. Olszewski, S.S. Sheiko, K. Matyjaszewski, *Biomacromolecules*, **20**, 27 (2019).
- 2) K. Chen, X. Hu, N. Zhu, K. Guo, Design, *Macromol. Rapid Commun.*, **41**, 2000357 (2020).
- 3) D. Klemm, B. Heublein, H.P. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **44**, 3358 (2005).
- 4) K. Sakakibara, Y. Kinose, Y. Tsujii, in “Cellulose Science and Technology: Chemistry, Analysis, and Applications”, Eds. T. Rosenau, A. Potthast, J. Hell, Eds., Wiley, Chapter 3 (2018).
- 5) J.A.C. Gómez, U.W. Erler, D.O. Klemm, *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 953 (1996).
- 6) Y. Kinose, K. Sakakibara, H. Ogawa, Y. Tsujii, *Macromolecules*, **52**, 8733 (2019).
- 7) “Small Angle X-ray Scattering”, O. Glatter, O. Kratky, Academic Press, London, 1982.
- 8) S.S. Sheiko, O.V. Borisov, S.A. Prokhorova, M. Moller, *Eur. Phys. J. E.*, **13**, 125 (2004).
- 9) Y. Nakamura, T. Norisuye, *Polym. J.* **33**, 874 (2001).
- 10) T. Konishi, T. Yoshizaki, T. Saito, Y. Einaga, H. Yamakawa, *Macromolecules*, **23**, 290 (1990).
- 11) X. Jiang, S. Kitamura, T. Sato, K. Terao, *Macromolecules*, **50**, 3979 (2017).
- 12) M. Yanagisawa, A. Isogai, *Biomacromolecules*, **6**, 1258 (2005).
- 13) Y. Kinose, K. Sakakibara, Y. Tsujii, to be submitted.
- 14) K. Sakakibara, H. Ishida, Y. Kinose, Y. Tsujii, submitted to Cellulose.

ポリ(γ -L-グルタミン酸ナトリウム)の希薄溶液物性 Dilute Solution Properties of Sodium Poly(γ -L-glutamate)

岡 紗帆・帖佐智也・中村 洋

Saho OKA, Tomoya CHOSA, Yo NAKAMURA

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

Light scattering measurements on sodium poly(γ -L-glutamate) (P γ LGA) samples in aqueous NaCl were made using a multi-angle light scattering (MALS) detector connecting to size-exclusion chromatography (SEC-MALS) or disconnecting (MALS batch). By the SEC-MALS measurements, radii of gyration $\langle S^2 \rangle$ at five salt concentrations C_s from 0.005 to 0.1 M were determined as functions of the weight average molecular weight M_w . By the MALS batch measurements, $\langle S^2 \rangle$ and the second virial coefficients at $C_s = 0.01$ and 0.1 M were determined for P γ LGA samples with different M_w . The data obtained were analyzed by theories for the wormlike chain model to determine the persistence length and the excluded-volume strength. It was shown that the C_s dependence of these molecular parameters cannot be explained by current theories.

1. 序

ポリ(γ -グルタミン酸) (P γ GA) はL-グルタミン酸のアミノ基と γ 位のカルボキシル基が結合することによって形成される高分子であり、納豆菌等によって産出される。この高分子はペプチド結合によって連結したポリペプチドとは異なり、溶液中でこの高分子がどのような形態を取るのかについては、あまりよくわかっていない。Rydon¹⁾はポリ(γ -D-グルタミン酸) (P γ DGA) に対し旋光分散測定 (ORD) をおこない、pH < 4ではヘリックス状態、pH > 4ではランダムコイル状態を取っていると報告した。一方で、Kajtár と Bruckner²⁾はP γ DGAのオリゴマーについてORD測定をおこない、その重合度依存性の解析からこのポリマーがpHに関わらずランダムコイル状態にあると結論した。室賀ら³⁾はNaCl水溶液中のポリ(γ -L-グルタミン酸) (P γ LGA) に対して電位差滴定をおこない、滴定曲線の形状からこの高分子がpHによらずランダムコイル状態にあると結論した。これらの研究例はすべて高分子のマイクロ構造に関するものであり、上の結論について高分子全体の構造を反映する測定から検討する必要があると考えられる。そこで、本研究ではFigure 1に構造式を示すNaCl水溶液中のポリ(γ -L-グルタミン酸ナトリウム) (NaP γ LGA) に対して光および小角X線散乱測定をおこない、そのコンフォメーションについて調べた。

2. 実験

NaP γ LGA試料

東洋紡(株)より提供された、好塩古細菌(*Natrialba aegyptiaca*)が産生した分子量の異なる3つのNaP γ LGA試料を用いた。分子量の高い順にNaP γ LGA-A、NaP γ LGA-1、NaP γ LGA-2と呼ぶ。標準ポリエチレンオキシドから求めた較正曲線を使用して、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー測定をおこなったところ、NaP γ LGA-1および

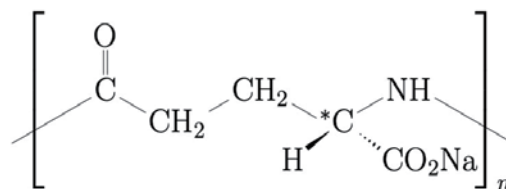


Figure 1. Chemical structure of NaP γ LGA.

NaP γ LGA-2に対する重量平均分子量 M_w はそれぞれ 3.2×10^5 および 1.0×10^5 、数平均分子量 M_n に対する M_w の比はそれぞれ3.3および2.4であった。

これらの試料を0.1 Mもしくは0.5 M NaCl水溶液に溶解し、アセトンまたはエタノールを沈殿剤として、逐次沈殿法による分子量分別をおこなった。NaP γ LGA-1から得た15区分のうち3区分 (Fraction A~C) およびNaP γ LGA-2から得た5区分 (Fraction D~H) を測定に用いた。これらの区分すべてに対してイオン交換をおこない、中和することによりNa塩型とし、純水に対して透析したのちに凍結乾燥をして逐次注入光散乱測定用試料とした。また、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)-多角度光散乱測定(MALS)測定用にNaP γ LGA-Aを純水に溶解し、イオン交換カラムを通したのち、中和、透析、凍結乾燥をしたものを準備した。

逐次注入光散乱測定

各測定試料を0.1 Mおよび0.01 M NaCl水溶液に溶解し、高分子濃度既知の溶液を多角度光散乱(MALS) 検出器に逐次注入することにより、静的光散乱測定を行った。MALS 検出器にはセルの温度調整機能付きのWyatt 社製DAWN EOS (光源波長690 nm) を用いた。測定温度は25.0°Cとした。各試料に対して、最大濃度約1~5 mg/cm³ として5つ

の高分子質量濃度 c の異なる溶液を調製した。孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ の親水性PVDF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。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 ΔR_θ を決定した。MALS検出器の装置定数は分子量既知のポリエチレンオキシドの水溶液に対する散乱光強度から決定した。この様にして求めた光散乱データをBerry平方根プロットを用いて解析した。すなわち、各溶液に対する $(Kc/\Delta R_\theta)^{1/2}$ を散乱ベクトル q の2乗に対してプロットし、 $q^2 \rightarrow 0$ への外挿値 $(Kc/\Delta R_\theta)^{1/2}$ を求め、 $(Kc/\Delta R_\theta)^{1/2}$ 対 c のプロットを直線で近似したときの $c \rightarrow 0$ への外挿値および直線の傾きよりそれぞれ各試料に対する M_w 、第2ビリアル係数 A_2 を決定した。また、各 θ における $(Kc/\Delta R_\theta)^{1/2}$ を c に対してプロットし、 $c \rightarrow 0$ への外挿値 $(Kc/\Delta R_\theta)_{c=0}^{1/2}$ を求め、 $(Kc/\Delta R_\theta)_{c=0}^{1/2}$ の q^2 に対するプロットを直線で近似したときの傾きよりz-平均二乗回転半径 $\langle S^2 \rangle$ を求めた。ここで、 K は次式で定義する光学定数である。

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

式中、 n_0 、 λ_0 、 N_A はそれぞれ溶媒の屈折率、入射光波長、アボガドロ定数を示す。各塩濃度 C_s における屈折率増分 $(\partial n/\partial c)$ は以下の様に決めた。 c が $1.05\ \text{mg}/\text{cm}^3$ 以下の5~7濃度のNaP γ LGA溶液を調製し、同 C_s の塩水溶液に対して透析したのち、溶媒と溶液との屈折率差 Δn を波長690 nmの光源を持つWyatt社製OPTILAB DSPにより測定した。 Δn を c に対してプロットし、その直線勾配より C_s が0.005, 0.01, 0.02, 0.1 Mにおける $(\partial n/\partial c)$ をそれぞれ0.164, 0.166, 0.167, 0.175 cm^3/g と決定した。その他の C_s における $(\partial n/\partial c)$ は内挿によって求めた。

サイズ排除クロマトグラフィー—多角度光散乱測定

0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 MのNaCl水溶液を溶離液として、NaP γ LGA-A試料に対するサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) —多角度光散乱 (MALS) 測定をおこなった。溶離液に高分子試料を溶解し、約 $4\ \text{mg}/\text{cm}^3$ の溶液を調製し、 $20\ \mu\text{L}$ のサンプルループを用いてSECシステムに注入した。SECカラムには昭和電工社製Shodex OHpak SB806M-HQを2本直列につないで用いた。MALS検出器としてWyatt社製DAWN EOSを、屈折率 (RI) 検出器としてWyatt社製OPTILAB DSPを用いた。測定は室温 (約 25°C) でおこなった。

3. 結果

Figure 2に一例として $C_s = 0.1\ \text{M}$ におけるSEC-MALS測定結果を示す。逐次注入測定と同様にBerry平方根プロットを用いて実験データを解析し、各流出時間 t における M_w および $\langle S^2 \rangle$ を求めた。

Figure 3に各試料に対する $\langle S^2 \rangle$ の M_w に対する両対数プロットを示す。図中、○と●はそれぞれ塩濃度0.01 Mおよび

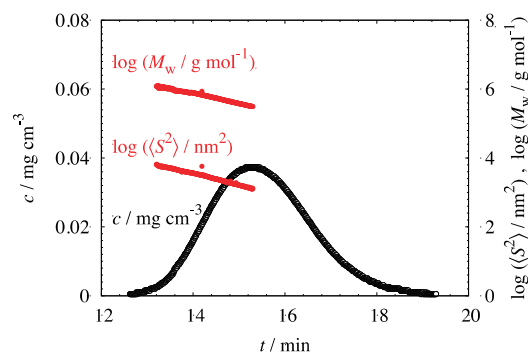


Figure 2. Results of SEC-MALS measurement for NaP γ LGA at $C_s = 0.1\ \text{M}$.

0.1 Mにおける逐次注入測定による結果を、それ以外の記号は図中に示す塩濃度におけるSEC-MALS測定の結果を

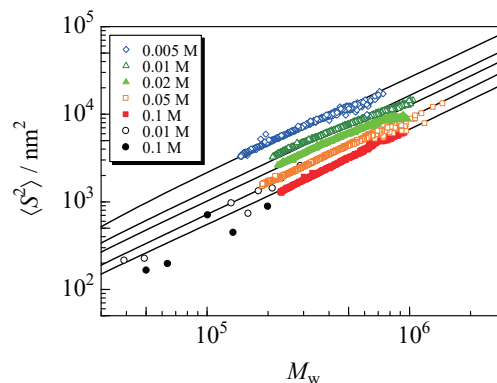


Figure 3. $\langle S^2 \rangle$ for NaP γ LGA at the indicated C_s .

示す。 C_s の増加とともに $\langle S^2 \rangle$ が小さくなっていることがわかる。実験データを直線で近似したときの傾きは約1.1である。逐次注入測定結果はばらついているが、概ねSEC-MALS測定データの延長上にある。

4. 考察

4-1. 平均二乗回転半径

Figure 3のデータをみみず鎖モデルに基づく理論を用いて解析した。同モデルに基づく、排除体積効果の働かない非摂動状態にある直鎖楕円高分子の $\langle S^2 \rangle$ は次のBenoit-Dotyの式⁴⁾で表される。

$$\langle S^2 \rangle_0 = \frac{L}{6\lambda} - \frac{1}{4\lambda^2} + \frac{1}{4\lambda^3 L} - \frac{1}{8\lambda^4 L^2} (1 - e^{-2\lambda L}) \quad (2)$$

式中で L は鎖の経路長を、 λ^{-1} は剛直性パラメータを示す。下付きの0は鎖が非摂動状態にあることを示す。分子内排除体積効果が働くと、回転半径膨張因子 α_s を用いて $\langle S^2 \rangle$

は次の様に書ける。

$$\langle S^2 \rangle = \alpha_S^2 \langle S^2 \rangle_0 \quad (3)$$

準二定数理論によれば、Domb-Barrett式⁵⁾を用いて α_S は次の様に表される。

$$\alpha_S^2 = \left[1 + 10\tilde{z} + \left(\frac{70\pi}{9} + \frac{10}{3} \right) \tilde{z}^2 + 8\pi^{3/2} \tilde{z}^3 \right]^{2/15} \times [0.933 + 0.067 \exp(-0.85\tilde{z} - 1.39\tilde{z}^2)] \quad (4)$$

式中、 \tilde{z} は次式で表される修正排除体積パラメータ⁶⁾である。

$$\tilde{z} = \frac{3}{4} K(L) z \quad (5)$$

$K(L)$ は L の関数として知られており⁶⁾、 z は次式で定義する排除体積パラメータである。

$$z = \left(\frac{3}{2\pi} \right)^{3/2} \lambda B (\lambda L)^{1/2} \quad (6)$$

B は排除体積強度を示す。 L は次式を用いて分子量 M と関係づけられる。

$$L = M / M_L \quad (7)$$

ここで、 M_L は単位経路長当たりの分子量である。

SEC-MALS測定から求めた実験データに計算値が最もよく合うように λ^{-1} と B を選んだ時の理論値をFigure 3中の実線で示す。ただし、NaP γ LGAの M_L に対しては、主鎖を形成する原子が同一平面上にある場合の値 207 nm^{-1} を使用した。得た λ^{-1} と B をTable Iにまとめる。

Table I. λ^{-1} and B for NaP γ LGA.

C_s [M]	λ^{-1} [nm]	B [nm]
0.005	28	1.3
0.01	16	0.9 ₂
0.02	12	0.6 ₈
0.05	8.0	0.5 ₄
0.1	6.3	0.2 ₇

4-2. 第2ビリアル係数

Figure 4に逐次注入測定より求めた A_2 の M_w に対する両対数プロットを示す。 $C_s = 0.01 \text{ M}$ の時の A_2 が 0.1 M の時に比べて大きくなっていることがわかる。

直鎖高分子の A_2 は次の様に鎖の中心部同士の相互作用による寄与 $A_2^{(0)}$ と末端が関与する相互作用の寄与 $A_2^{(E)}$ の和として表されることが知られている。

$$A_2 = A_2^{(0)} + A_2^{(E)} \quad (8)$$

$A_2^{(0)}$ は次の様に表される。

$$A_2^{(0)} = 4\pi^{3/2} N_A \frac{\langle S^2 \rangle}{M} \Psi \quad (9)$$

みみず鎖に対する Ψ は λL と λB の関数として表される⁶⁾。

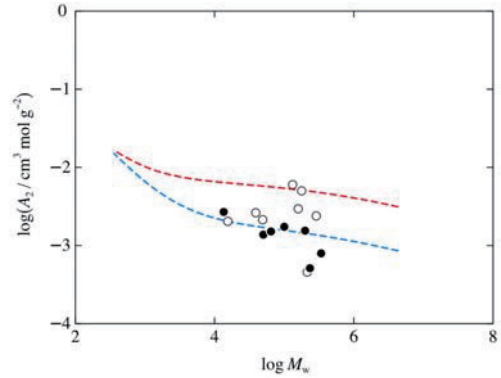


Figure 4. A_2 for NaP γ LGA double-logarithmically plotted against M_w (○, 0.01 M; ●, 0.1 M).

方、 $A_2^{(E)}$ は次の様に表されることが知られている⁶⁾。

$$A_2^{(E)} = a_1 / M + a_2 / M^2 \quad (10)$$

Figure 4中の破線はTable I中のパラメータを用い、式(8)–(10)より計算した理論値を示す。ただし、 $a_1 = 5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 、 $a_2 = 0$ とした。理論値は概ね実験値を表しており、 $\langle S^2 \rangle$ から求めたパラメータを用いて、矛盾なく A_2 のデータも説明することができた。

4-3. 剛直性パラメータの塩濃度依存性

Figure 5にNaP γ LGAの持続長 ($q = \lambda^{-1/2}$) を $C_s^{-1/2}$ に対してプロットしたものを示す。図中の赤丸がNaP γ LGAに対する実験値を、四角がヒアルロン酸(HA)⁷⁾、三角がポリスチレンスルホン酸ナトリウム(NaPSS)⁸⁾に対するデータ点を示す。NaP γ LGAに対するデータ点は $C_s^{-1/2} < 10$ ではHAに対する値よりもやや小さくなっているが、 $C_s^{-1/2}$ がそれ以上ではHAの値より大きくなり、上に離れていく。一方で、NaPSSに対する q はこれらの高分子に対する値よりも小さい。

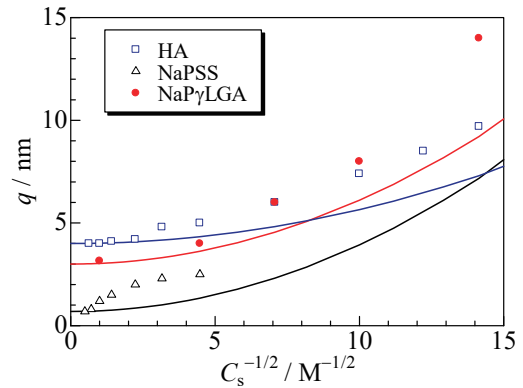


Figure 5. Persistence lengths for polyelectrolytes plotted against $C_s^{-1/2}$.

高分子電解質の q は次の様に高分子固有の固さによる q_0 と電荷間相互作用による寄与 q_{el} の和として表されると考えられている^{9,10}。

$$q = q_0 + q_{el} \quad (10)$$

図中の実線は q_{el} に対してOdik-Skolnick-Fixman理論^{9,10}を用い、NaP γ LGA、HA、NaPSSに対する q_0 をそれぞれ3.0 nm, 4.0 nm, 0.69 nmとして計算した値を示す。 $C_s^{-1/2} < 5$ におけるNaP γ LGAとHAに対する理論値は概ね実験値を表すが、 $C_s^{-1/2}$ がこれより大きくなると理論値は実験値よりも小さくなる。一方で、NaPSSに対する理論値は $C_s^{-1/2} < 5$ においても実験値から大きく外れる。

4-4. 排除体積強度の塩濃度依存性

Figure 6にNaP γ LGAの排除体積強度 B を $C_s^{-1/2}$ に対してプロットしたものを示す。記号はFigure 5と同じものを用いている。NaP γ LGAに対する B はNaPSS、HAに比べてかなり小さくなっている。

高分子電解質の B は次式の様ハードコア斥力による寄与 B_0 と電荷間相互作用による寄与 B_{el} の和として表されると考えられる¹¹。

$$B = B_0 + B_{el} \quad (11)$$

$C_s^{-1/2} \rightarrow 0$ に外挿することにより B_0 を0.2 nmと見積り、Fixman-Skolnickの理論¹¹による B_{el} を加えて計算した値を図中の赤線で表す。理論値は実験結果よりもはるかに大きくなる。図には示さないが、HA、NaPSSに対する理論値も同様に実験値を説明することができない。

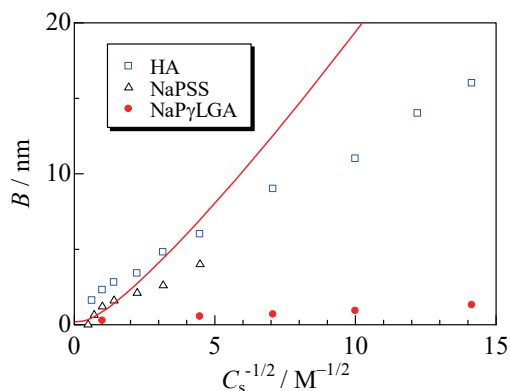


Figure 6. Excluded-volume strengths for polyelectrolytes plotted against $C_s^{-1/2}$.

5. 結論

塩水溶液中のNaP γ LGAに対し、逐次注入法とSEC-MALS法による光散乱測定をおこない、0.005Mから0.1Mの範囲にある5つの C_s における $\langle S^2 \rangle$ を M_w の関数として求めた。得たデータをみみず鎖モデルに基づく理論を用いて解析し、各 C_s における α^{-1} と B を求めた。HA、NaPSSと同様に、これらのパラメータの C_s 依存性は既存の理論によって表すことができなかった。

参考文献

- 1) H. N. Rydon, *J. Chem. Soc. (London)*, 836 (1964).
- 2) W. Kajtár and V. Bruckner, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 4813 (1966).
- 3) Y. Muroga et al., *Biopolymers*, **105**, 191 (2015).
- 4) H. Benoit and P. Doty, *J. Phys. Chem.*, **57**, 958 (1953).
- 5) C. Domb and A. J. Barrett, *Polymer*, **17**, 179 (1976).
- 6) H. Yamakawa and T. Yoshizaki, *Helical Wormlike Chains in Polymer Solutions* 2nd Ed., Springer, Heidelberg, 2016.
- 7) K. Hayashi, K. Tsutsumi, T. Norisuye, and A. Teramoto, *Polym. J.*, **28**, 922 (1996).
- 8) Y. Iwamoto, E. Hirose, and T. Norisuye, *Polym. J.*, **32**, 428 (2000).
- 9) T. Odijk, *Polymer*, **19**, 989 (1978).
- 10) J. Skolnick and M. Fixman, *Macromolecules*, **10**, 944 (1977).
- 11) M. Fixman and J. Skolnick, *Macromolecules*, **11**, 863 (1978).

ペプチドの自己組織化によるナノキャリア創生

Molecular Design and Synthesis of Nanocarriers via Peptide Self-Assembly

沼田 圭司・大前 仁・宇治 広隆・

土屋 康佑・及川 和聡・藤田 聖矢・Choon Pin Foong・寺田佳世

Keiji NUMATA, Masashi OHMAE, Hirotaka UJI, Kousuke TSUCHIYA, Kazusato OIKAWA,
Seiya FUJITA, Choon Pin FOONG, Kayo TERADA

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

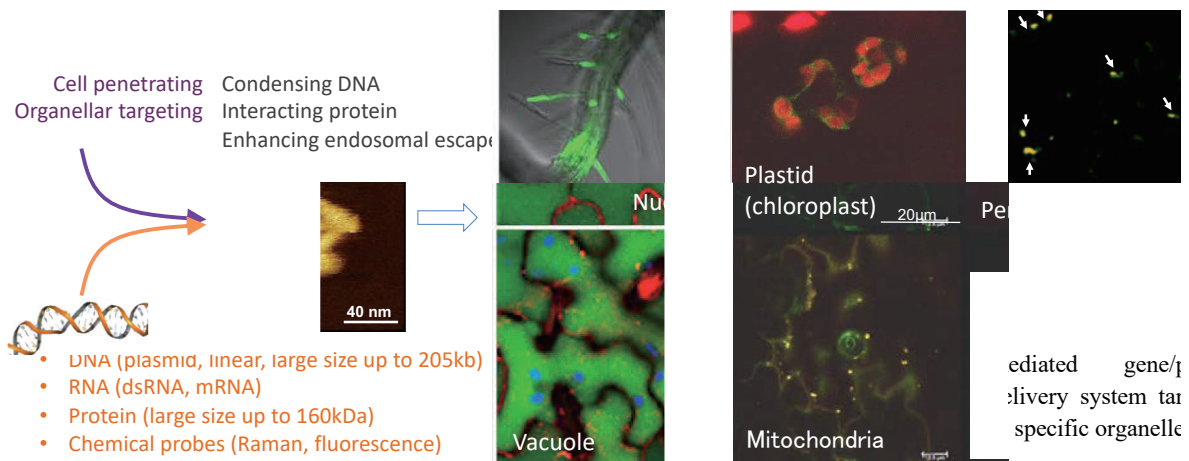
Peptides and polypeptides are versatile tools in biotechnology, especially in gene/protein delivery area. The individual character of each amino acid can be combined, resulting in huge advantage for targeted delivery systems. Targeted delivery to essential organelles such as the mitochondria can be achieved with mitochondrial-targeting peptides, which are typically N-terminal motifs predicted to form amphiphathic helices and enriched in positively charged basic residues. The combination of cationic, cell-penetrating and mitochondria-targeting components reported here is an exciting new design parameter that enabled cellular uptake, localization and expression of exogenous DNA in the mitochondria of living plants. We rationally developed dual-domain peptides containing DNA-condensing/cell-penetrating and mitochondria-targeting sequences. This advance in plant biotechnology not only provides a stable transformation method but will also facilitate organelle genome editing to maximize biomass production via plant breeding.

1. 社会的背景と研究目的

多様な自然環境において、植物を利用した革新的な食料生産および物質生産を達成するためには、核ゲノムに加えて、幅広い機能を有する葉緑体やミトコンドリアを改変し、分子レベルから設計された植物を構築する必要がある。しかしながら、選択的に複数の目的遺伝子を核、葉緑体、およびミトコンドリアへ導入する技術は確立されていない。さらに、時間的に制御した一過性の導入と、ゲノムへ挿入する安定的な導入を制御する技術も求められている。そこで本研究では、ペプチドが有する生物学的・化学的機能を工学的な視点から最大限に活用することで、選択的に遺伝子やゲノム編集ツールを導入可能なペプチドナノキャリアを構築し、植物が有する3種類のゲノム（核、葉緑体、ミトコンドリア）の編集および改変を可能にすることを目指している（Fig. 1）。

2. ペプチドによる遺伝子導入（ペプチド法）

植物への遺伝子導入法は、導入効率や対応植物種の制限等に問題を抱えている。植物科学において最も広く用いられているアグロバクテリウム法は、核ゲノムに限定した手法であると共に、アグロバクテリウムが感染しない植物種へは利用できない。オルガネラの形質転換において強力な手法であるパーティクルガン法は、数万個の細胞から形質転換に成功した数個の細胞を用いる戦略は長期的な研究としては可能であるが、植物による効率のかつ安定的な物質生産系を構築するには十分な技術とは言い難い。加えて、組織培養を経由するため偶発的かつ期待しない変異などを抑制する必要もある。本研究では、ペプチドと核酸のイオン性複合体、もしくはペプチドの自己組織化を利用したベシクルをナノキャリアとして使い、核酸やタンパク質を植物に導入することを目指した。これらは、水溶液の形状であるため、植物にインフィルトレーション（湿潤法）



で導入する。物理的な導入手法であり、植物種による制限は基本的に存在しない。シロイヌナズナ、タバコなどのモデル植物に加えて、ポプラやトマトなどの産業植物へも利用できることが判明している。

カチオン性のペプチドとアニオン性の核酸を複合化することにより遺伝子を導入する技術は、東京大学の片岡一則先生をはじめとした幅広い研究者によって確立されてきた。我々は、ポリカチオン配列と機能性ペプチドを融合し、一分子とすることで、標的特異的なペプチドを構築した。細胞膜透過配列 (CPP) とポリカチオンを組み合わせ合わせた融合ペプチドは、ポリカチオン配列 (正に帯電) が核酸 (負に帯電) とイオンの相互作用し、水溶液中でミセル状の複合体を形成する。このイオン性複合体は、100から300 nm程度の粒径を有し、細胞壁を有する植物細胞へもDNAを導入できる²⁾。これまでに、プラスミドDNA、二重鎖DNA (dsDNA)、二重鎖RNA (dsRNA) および100kbpを超える巨大DNAを導入することに成功している^{3,4)}。

また、葉緑体およびミトコンドリアは、ゲノムの相同組換えが比較的頻繁に起こることが知られており、相同組換え用の配列を有するDNAを用いることで、外来遺伝子をゲノムに挿入することが可能になってきた。実際、我々の研究グループでも、葉緑体ゲノムとミトコンドリアゲノムの相同組換えを利用した遺伝子導入に成功している⁵⁾。

3. ミトコンドリアを標的とするペプチド

上述したように、ミトコンドリア移行配列 (MTS) を融合ペプチドへ加えることで、植物ミトコンドリアへ遺伝子を導入することができる。酵母Cytochrome *c* oxidase subunit IV由来のMTSと、ミトコンドリア特異的プロモーター*cox2*を持つレポーター遺伝子 (GFPもしくは*Renilla*ルシフェラーゼ) が挿入されたプラスミドDNA (pDONR*cox2p:rluc/gfp*) との複合体を利用することで、ミトコンドリア選択的な遺伝子導入が可能となることが報告されている⁶⁾。Cytcoxをはじめとした多くのMTSは、ヘリックス構造を形成することが知られている⁷⁾。MTSは、ミトコンドリアタンパク質をミトコンドリア内に輸送する際、ミトコンドリア外膜に存在するTOM複合体を構成するTom20によって認識される。Tom20が認識するMTSのコンセンサス配列として、 $\sigma\phi\chi\beta\phi\phi$ (σ : 親水性, ϕ : 疎水性, χ : 任意のアミノ酸残基, β : 塩基性) の6残基が報告されている (Fig. 2a)。本研究では、高効率かつ安定的にミトコンドリアに移行するミトコンドリア移行性人工ペプチドの開発を目的に、コンセンサス配列から(LARL)₃を設計した (Fig. 2b)。また、ヘリックス構造の安定化によるミトコンドリア移行性の向上を目指し、 α -アミノイソブタン酸 (Aib, U) を導入した(LURL)₃、(LURR)₃、(LURS)₃を設計した。顕微鏡による観察のため、全てのペプチドはフルオレセイン (FAM) により蛍光ラベル化して用いた。

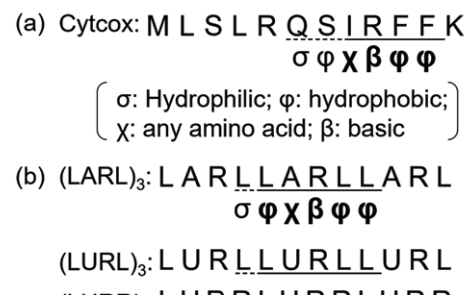
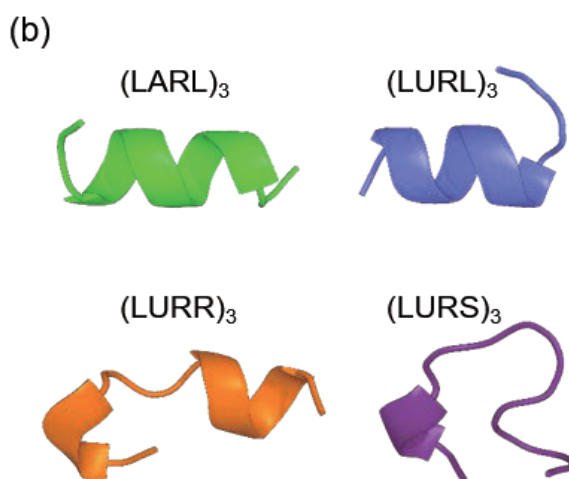
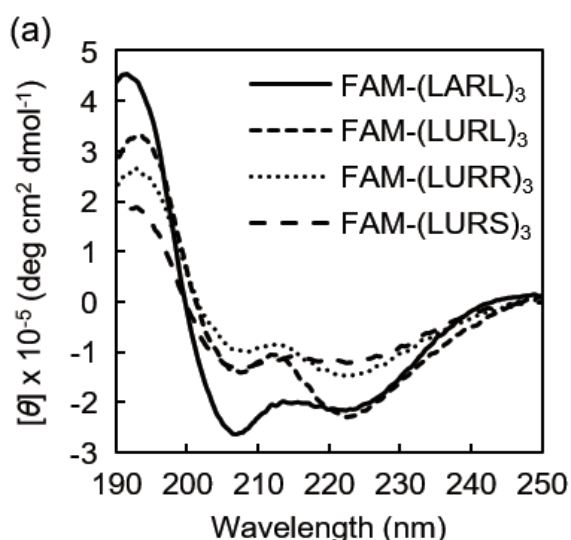


Fig. 2 (a) Tom20-recognition motif with Cytcox. (b) peptide sequences designed by imitating the Tom20-recognition motif.

まず、ペプチドのミトコンドリア外膜近傍における二次構造を調べるために、膜環境を模倣した1.0% SDS水溶液中で円二色性 (CD) スペクトル測定を行った (Fig. 3a)。Aibを修飾しないFAM-(LARL)₃では、222 nmと207 nmに負、192 nmに正のピークが観測され、 α -ヘリックス構造を形成することが分かった。一方、FAM-(LARL)₃のアラニンにAibに置換したFAM-(LURL)₃は、FAM-(LARL)₃と同様に222、207 nmに負、194 nmに正のピークを示したが、222 nmと207 nmのピーク強度比が大きく、 α -ヘリックス構造を形成してバンドル化していることが示唆された。FAM-(LURR)₃もバンドル化した α -ヘリックスを形成していることが分かったが、その強度は小さかった。FAM-(LURR)₃のヘリックス構造は、アルギニン同士のカチオン反発により、FAM-(LURL)₃に比べて不安定であると考えられる。また、FAM-(LURS)₃は強度は小さいものの、FAM-(LARL)₃と同様のピークを示し、 α -ヘリックス構造の形成が分かった。拡張サンプリング法の一つであるGaussian Accelerated MD (GaMD) 法により安定構造を計算すると、(LARL)₃と(LARL)₃は安定なヘリックス構造の形成を示唆する結果が得られ、CDスペクトルの結果と一致していた (Fig. 3b)。次に、ペプチドのミトコンドリア移行性の評価として、金粒子 (直径0.6 μ m) の表面にFAM-ラベル化ペプチドをコートし、パーティクルガン法を用いてタマネギ表皮細胞の細胞質に導入した。その後、MitoTracker® Red CMXRosを用いてミトコンドリアを染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により細胞内局在を観察した。(LARL)₃では、FAM由来の蛍光がMitoTracker® Red CMXRosの蛍光とも共局在している一方で、細胞全体に広がった蛍光が観察された。一部の(LARL)₃はミトコンドリアへ移行している一方で、大部分は液胞に局在していた。(LURL)₃では、FAM由来の蛍光とMitoTracker® Red CMXRosの蛍光が高い頻度で共局在した。さらに、液胞など他のオルガネラにFAM由来の蛍光は観察されず、(LURL)₃はミトコンドリアに選択的に移行することが明らかとなった。ミトコンドリア外膜近傍でバンドル構造をとることで、Tom20との高効率な相互作用が実現したと考えられる。



4. PICsome

ミトコンドリアゲノムが、相同組換えを利用できる一方で、核への導入においては、核ゲノムの相同組換え頻度が極端に低いことから、異なる戦略が必要である。そこで、本研究では、CRISPR/Cas9をRibonucleoprotein (RNP) として利用することで、核ゲノムの編集を行う。RNPを利用するメリットは、核ゲノムにCas9遺伝子を導入する必要がなく、また編集後も、Cas9遺伝子を抜く必要がないためである。我々はこれまでも、CPPとタンパク質を、イオン性相互作用により複合化させることで、植物細胞への導入に成功してきた⁸⁾。しかし、目的のタンパク質が細胞内で分解されるため、長期間にわたる機能発現は困難であった。このような背景のもと、長期的に機能発現し、植物に形質を付与できる輸送技術が求められている。

そこで、我々は、医療用の薬物送達などを目的として開発されているポリイオンコンプレックスベシクル (PICsome) に着目した。PICsomeは正と負のブロック共重合体の自己集合からなるカプセル状集合体として調製される。また、PICsomeは半透性を有し、内包されたタンパク質は外部環境から保護されたまま機能発現できるという利点を有する。この性質から、ミセルと比較して、長期的に機能発現させるためのキャリアとして優れている。

本研究では、酵素を内包させたPICsomeを調製し、その表面にCPPを提示した後、これを植物細胞へ導入することにより植物への新規形質付与を検討した (Fig. 4)。酵素として、抗生物質カナマイシンヘアデノシン三リン酸 (ATP) のリン酸基を転移させ不活性化させるNeomycin phosphotransferase II (NPTII) を選択し、NPTIIを内包したPICsomeの植物への導入および長期的なカナマイシン耐性の発現について検討を行った⁹⁾。

アルキンを有するブロック共重合体であるAlkyne-TEG-*b*-P(Lys-(COOH))およびポリリジン (PLys) を合成した。これらの水溶液を1:1で混合させ10 分間静置後、動的光散乱 (DLS) 測定を行なった。その結果、150 nm程度の粒径を持つ集合体が形成することが分かった。また電界放出型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) 観察により、球状の集合体の形成が確認された。次に、集合体の安定性を向上させるために、1当量の縮合剤EDCを用いてペプチド側鎖の架橋を行なった。架橋後の集合体を包埋した樹脂の切片をFE-SEM観察したところ、内部に空洞有する球状の集合体が多数確認され、PICsomeの形成が確認された。

次に、ローダミン修飾したNPTII (RhB-NPTII) をPICsomeに封入した。RhB-NPTII存在下の水溶液中においてPICsomeを構築させ、RhB-NPTIIをPICsomeに内包させた。PICsomeに内包されなかったRhB-NPTIIを透析により除去し、蛍光相関分光 (FCS) 測定を行ったところ、PICsome非存在下ではRhB-NPTIIの拡散時間は0.243 msであったのに対して、PICsome存在下での拡散時間は6.09 msであった。PICsome存在下でのRhB-NPTIIの拡散時間の増大が確認されたことから、RhB-NPTIIはPICsomeへ内包されていると判断した。

PICsomeをシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の芽生えに対して導入実験を行なった。まず、RhB-NPTIIを内包させたPICsomeの表面に提示しているアルキンに対してアジドを有するCPP であるN₃-(LysAibAla)₃をクリック反応により修飾した¹⁰⁾。得られたPICsome水溶液に芽生えを加え、減圧・加圧処理を施し、CLSM観察を行なった。CPP修飾前ではローダミン由来の蛍光が観察されなかった一方、CPP修飾後では細胞内部から蛍光が観察された。この結果から、PICsomeにCPPを修飾することで、植物細胞への導入が可能であることを示した。

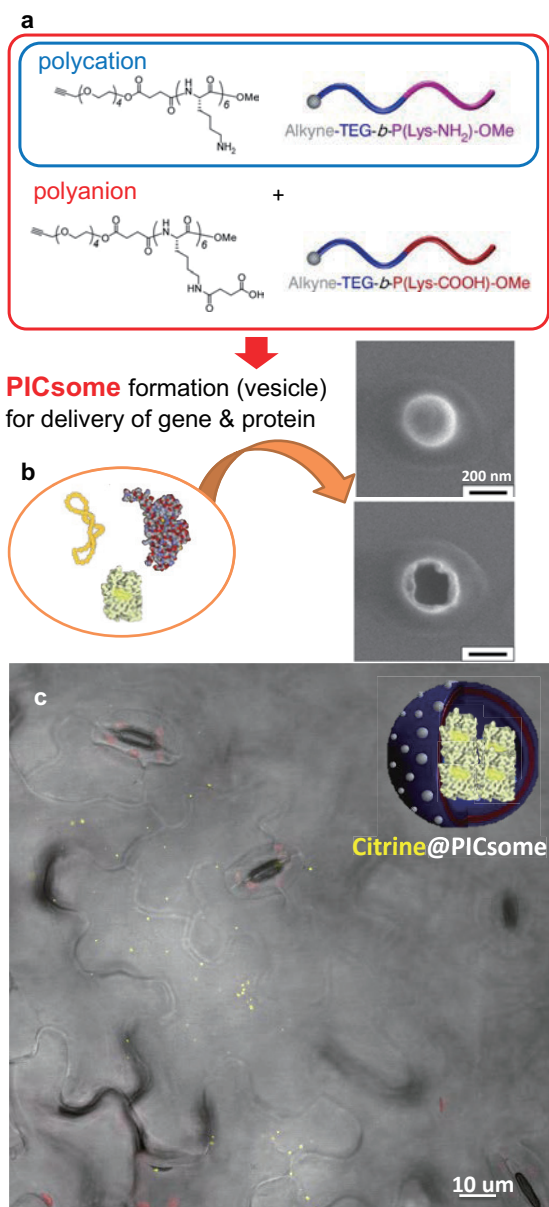


Fig. 4 Experimental scheme of PICsome study with intact plants. (a) a pair of peptide to form PICsome. (b) FE-SEM images of PICsome before and after the electron beam irradiation. (c) CLSM image of *A. thaliana* leaf infiltrated with PICsome containing Citrine. Gray scale: DIC, yellow: Citrine, and red: chloroplast. The internalization of PICsome is recognized based on the localization of Citrine fluorescence signal.

最後に、NPTIIを内包したCPP-PICsomeを植物へ導入しカナマイシン耐性を評価した。NPTIIのみとNPTIIを内包したCPP-PICsome溶液をそれぞれ芽生えへ導入した。その後、カナマイシン培地（10 mg/L）上で1週間生育し、乾燥重量を測定した。NPTIIを内包したCPP-PICsome溶液を導入した芽生えの乾燥重量はNPTIIのみを導入したものよりも有意に高かった。この結果より、NPTIIを内包したPICsomeを導入することで、芽生えへカナマイシン耐性の付与に成功した。この技術により、遺伝子を組み換えることなく、植物

の形質を付与することが可能となる。

現在は、PICsome内部に、Cas9のRNPを封入し、植物に導入することでゲノム編集を進めている。既に、ゲノム編集に起因する欠損などが確認されており、更なる効率化を進めている。

5. まとめと将来展望

本研究では、工学的な材料設計の観点から、ペプチドが有する化学的および生物的機能を最大限に活かし、植物の新しい遺伝子導入技術を確認することを目指している。特に、植物が有する3種類のゲノム（核、葉緑体、ミトコンドリア）を選択的に改変するだけでなく、PICsomeを利用することでKnock-Inを可能にする技術を確認していく必要がある。ペプチドを利用する手法は、物理的な導入であり、利用可能な植物種について制限が無いと考えられるため、本研究は、植物科学における次世代基盤技術としても必須であり、核、葉緑体、およびミトコンドリアという細胞を十二分に利用した物質・食料生産技術は、低炭素社会の実現や食糧問題の解決、そして二酸化炭素の有効利用という緊急性の高い環境分野へ貢献できる。標的を動物ミトコンドリアまで拡張することができれば、ミトコンドリア病などの研究への展開も期待され、糖鎖を表面修飾するなどの分子設計を進める必要がある。

参考文献

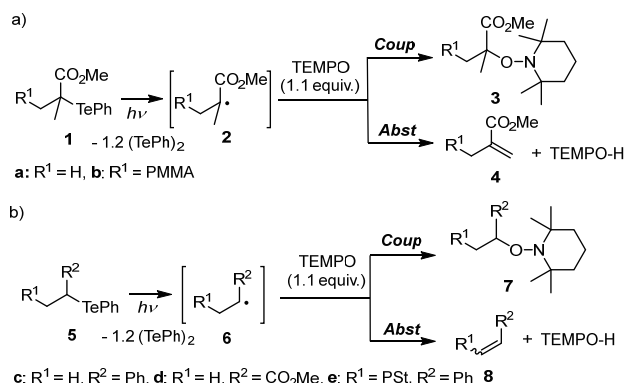
- 1) C. Thagun, J. Chuah, K. Numata, *Adv. Sci.*, **6**, 1902064 (2019).
- 2) M. Lakshmanan, Y. Kodama, T. Yoshizumi, K. Sudesh, K. Numata, *Biomacromolecules*, **14**, 10 (2013).
- 3) K. Numata, M. Ohtani, T. Yoshizumi, T. Demura, Y. Kodama, *Plant Biotechnol. J.*, **12**, 1027 (2014).
- 4) Md M. Islam, M. Odahara, T. Yoshizumi, K. Oikawa, M. Kimura, M. Su'tsugu, K. Numata, *ACS Synthetic Biol.*, **8**, 1215 (2019).
- 5) T. Yoshizumi, K. Oikawa, J. Chuah, Y. Kodama, K. Numata, *Biomacromolecules*, **19**, 1582 (2018).
- 6) J. Chuah, T. Yoshizumi, Y. Kodama, K. Numata, *Sci. Rep.*, **5**, 7751 (2015).
- 7) J. Chuah, A. Matsugami, F. Hayashi, K. Numata, *Biomacromolecules*, **17**, 3547 (2016).
- 8) K. Numata, Y. Horii, Y. Motoda, T. Hirai, C. Nishitani, S. Watanabe, T. Kigawa, Y. Kodama, *Plant Biotechnol.*, **33**, 403 (2016).
- 9) S. Fujita, Y. Motoda, T. Kigawa, K. Tsuchiya, K. Numata, *Biomacromolecules*, accepted and available online.
- 10) K. Terada, J. Gimenez-Dejoo, Y. Miyagi, K. Oikawa, K. Tsuchiya, K. Numata, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **6**, 3287 (2020).

まで難しかった。

それに対し、最近我々は、構造の制御された成長末端ラジカルの反応により得られる生成物の分析による、新しい停止機構解明の方法を提案した。³⁷⁻⁴²その一つの重要な成果が*Comb/Disp*選択性に対する極めて大きな粘度効果の発見である。⁴⁰例えば、ポリスチレン (PSt) 末端モデルラジカルである1-フェニルエチル)の停止機構は、粘度の低いベンゼン中60 °Cでは90%の*Comb*選択性だが、高粘度のPEG400中25 °Cでは99%*Disp*選択性へと変化した (Scheme 1b)。

停止機構における粘度効果は、すでに三級炭素ラジカルである*tert*-ブチルラジカルと2-ヒドロキシ-2-プロピルラジカルで知られているが、⁴³⁻⁴⁵その変化は小さいため、重要性は十分に認識されていなかった。しかし、成長末端ラジカルでは極めて大きな効果があることを明らかにした。さらに、粘度に関しては、バルク粘度よりも拡散係数の逆数であるマイクロ粘度の方がより良いパラメータであることも明らかにした。⁴¹Tylerらはラジカルの拡散速度がバルク粘度よりもマイクロ粘度が良いパラメータになることを明らかにしているが、^{46,47}反応の選択性にマイクロ粘度が大きく影響することを明らかにしたのは最初の例である。

上記のことを背景として、本研究では、有機テルル化合物**1**および**5**の光活性化により生じる重合末端ラジカル、あるいはその小分子モデルラジカル**2**および**6**とTEMPOとの反応における*Coup/Abst*選択性の粘度効果について検討した (Scheme 2)。さらに、PSt末端ラジカル及びポリメタクリル酸メチル (PMMA) 末端ラジカルの*Coup/Abst*選択性に対する粘度の影響と、そのTEMPO休止種の熱安定性から、NMPによるStとMMAとの重合挙動の違いについても明らかにした。なお、停止反応における*Comb*と*Disp*は、Scheme 1aの場合の*Coup*と*Abst*に相当する。



Scheme 2. TEMPO trapping experiments for the radicals generated from organotellurium precursors.

2. 実験方法

2-1. 一般的な手順: 反応はパイレックスガラス管、あるいはNMR管を用い、窒素雰囲気下で実施した。光源として500 W高圧水銀ランプを用い、カットオフフィルターを

組み合わせた。反応溶液の粘度は電磁回転粘度計を用いて測定した。拡散定数 (*D*) はDOSY-NMRにより求めた。

2-2. 代表的な実験例: **1a** (R¹ = H, 4.6 μL, 0.030 mmol) とTEMPO (5.2 mg, 0.033 mmol) のC₆D₆ (0.60 mL) 溶液に、470nmカットオフフィルターを通して500W高圧Hgランプを60 °Cで1時間照射した。¹H NMRにより、**1a**の完全な消費と、**3a**および**4a**の収率 (それぞれ99%, 0.6%) を求めた (Table 1, run 1)。

3. 結果と考察

3-1. 小分子モデルラジカルを用いた検討: PMMA末端を模倣するラジカル**1a**とTEMPOとのでの反応では、C₆D₆中、60 °Cにおいて*Coup*生成物**3a**と*Abst*生成物**4a**がそれぞれ99%、0.6%の収率で得られた (Table 1, run 1)。**3a**と等量のTEMPO-Hが生成すると考えられるが、特徴的な¹H NMR共鳴が無いことと収率が低いため、同定はできなかった。*Coup*と*Abst*の選択性 (*Coup/Abst* = 99.4/0.6) は、**3a**と**4a**の収量から求めた。この高い*Coup*選択性は、MMAのNMPにおける*Abst*が進行する事実 (Scheme 1a) と矛盾するようにも考えられる。この点については、次節で述べる。

次に温度効果について検討した。⁴⁰および25 °Cで同じ実験を行ったところ、*Coup/Abst*選択性は60 °Cでの選択性とほぼ同じであった (runs 2 and 3)。この結果は、バルク粘度 (η_{bulk}) および拡散定数 (*D*) がこの温度範囲でほとんど変わらないことが主要因であると考えられる。

次に、粘度の効果についてDMSO-d₆を用いて検討した (runs 4-6)。その結果、いずれの場合も**3a**の収率は93%を超える一方、**4a**の収率はC₆D₆を用いた場合よりもわずかに増加した。さらに、*Coup/Abst*選択性は、反応温度の低下、すなわち、粘度の上昇により低下した (98/2~96/4)。

さらに粘度の高いPEG400を使用した場合、C₆D₆やDMSO-d₆を用いた場合に比べ、同じ温度において**3a**の収率は減少する一方、**4a**の生成は増加した (runs 7-9)。さらに、PEG400中の反応においても、温度の低下、すなわち粘度の上昇により、**3a**の収量が減少し**4a**が増加した。なお、ここでは、**4a**とほぼ同じ量のTEMPO-Hの生成が確認された。

*Coup/Abst*選択性と温度の逆数、バルク粘度との相関を見たところ、それぞれの溶媒において高い線形相関を持つことが示された (Figure 1a and 1b. Squares)。さらに、*Coup/Abst*の選択性は、溶媒の種類にかかわらず、拡散係数の逆数 ($1/D$) と高い相関があることも示された (Figure 1c. Squares)。この結果は、活性ラジカル同士の停止反応の結果と一致している。⁴¹

次に、PSt末端ラジカルのモデルラジカル**6c** (R¹ = H, R² = Ph) を生じる**5c**を用い、**1a**を用いた場合と同じ条件で粘度効果を検討した (runs 10-20)。その結果、特にC₆D₆とDMSO-d₆を用いた場合には98%以上の高い収率で、*Coup*生成物**7**が得られた。しかし、細かくデータを比較すると、粘

Table 1. Effect of bulk and microviscosity in the reaction between transient and persistent radicals^a

Run	Precursor	Solvent	Temp (°C)	η_{bulk}^b (mPa·s)	D^c ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Yield ^d (%)		Coup/Abst ^e
						3 or 7	4 or 8	
1	1a	C ₆ D ₆	60	0.41	3.27	99	0.6	99.4/0.6
2	1a	C ₆ D ₆	40	0.61	2.38	99	0.5	99.5/0.5
3	1a	C ₆ D ₆	25	1.1	2.01	99	0.6	99.4/0.6
4	1a	DMSO-d ₆	60	1.2	1.45	97	2.1	97.9/2.1
5	1a	DMSO-d ₆	40	1.7	1.09	96	2.5	97.5/2.5
6	1a	DMSO-d ₆	25	2.3	0.88	95	3.8	96/4
7	1a	PEG400	60	21	0.56	90	8.9	91/9
8	1a	PEG400	40	44	0.47	84	9.4	88/12
9	1a	PEG400	25	84	0.41	79	13.4	85/15
10	5c	C ₆ D ₆	60	0.41	2.01	99	0.2	99.8/0.2
11	5c	C ₆ D ₆	40	0.61	1.45	99	0.3	99.7/0.3
12	5c	C ₆ D ₆	25	1.1	1.09	99	0.5	99.5/0.5
13 ^f	5c	C ₆ D ₆	25	1.1	1.09	99	0.6	99.4/0.6
14	5c	DMSO-d ₆	60	1.2	0.88	98	1.3	98.7/1.3
15	5c	DMSO-d ₆	40	1.7	0.56	98	1.7	98.2/1.8
16	5c	DMSO-d ₆	25	2.3	3.27	97	2.3	97.7/2.3
17	5c	PEG400	60	21	2.01	91	4.1	96/4
18	5c	PEG400	40	44	2.01	89	7.3	93/7
19	5c	PEG400	25	84	1.45	84	9	89/11
20 ^f	5c	PEG400	25	84	1.45	83	8	89/11
21	5d	C ₆ D ₆	60	0.41	3.27	99	0.4	99.6/0.4
22	5d	C ₆ D ₆	40	0.61	2.38	99	0.6	99.4/0.6
23	5d	C ₆ D ₆	25	1.1	2.01	99	0.6	99.4/0.6
24	5d	DMSO-d ₆	60	1.2	1.45	98	0.8	99.2/0.8
25	5d	DMSO-d ₆	40	1.7	1.09	98	1.2	98.8/1.2
26	5d	DMSO-d ₆	25	2.3	0.88	96	2.3	97.7/2.3
27	5d	PEG400	60	21	0.56	90	4.5	95/5
28	5d	PEG400	40	44	3.27	85	6.0	92/8
29	5d	PEG400	25	84	2.38	82	10	89/11
30	1b	C ₆ D ₆	25	1.38	n.d. ^g	99 ^h	0.4	99/1
31	1b	C ₆ D ₆ /PSt (8/2)	25	808	n.d. ^g	66 ^h	34	66/34
32	1b	C ₆ D ₆ /PSt (1/1)	25	3980	n.d. ^g	50 ^h	50	50/50
33	5e	C ₆ D ₆	25	1.53	n.d. ^g	99	0.2	99/1
34	5e	C ₆ D ₆ /PSt (8/2)	25	780	n.d. ^g	82	9.0	90/10
35	5e	C ₆ D ₆ /PSt (1/1)	25	3580	n.d. ^g	78	15	84/16

^aA solution of the precursor (0.030 mmol) and TEMPO (1.1 equiv.) in a solvent (0.60 mL) was irradiated by a 500 W Hg lamp through a <470 nm cut-off filter. ^bBulk viscosity determined by a viscometer. ^cDiffusion constant of methyl isobutyrate, which is a model compound of radical **2a**, determined by the DOSY NMR experiments. The same diffusion constants were used for radicals **6c** and **6d** due to the low concentration of the reaction. ^dDetermined by the ¹H NMR. ^eOnly the ratio obtained using **1A** and **5A** was calculated because of the presence of side reaction when **1B** and **5B** were used. ^fTIPNO was used instead of TEMPO. ^gNot determined. ^hYield was estimated by subtracting the yield of **4b** after confirming the quantitative conversion of **1bA** to PMMA having same M_n by size exclusion chromatography.

度が高くなるにつれて7の収量が減少し、Abst生成物8の収率が高くなった。さらに、PEG400中ではその傾向がさらに大きくなり、25°CではCoup/Abstの選択性が89/11に低下した。また、この場合も、Coup/Abst選択性はそれぞれの溶媒において温度の逆数とバルク粘度に良い線形相関を持つと共に、拡散定数の逆数に対しては溶媒に依らずに高い相関を持つことが示された (Figure 1. Triangles)。観察された高いCoup選択性は、NMPを用いてスチレンの制御重合が可能であるという知見と良い一致を示している。

TEMPOの代わりに、2,2,5-トリメチル-4-フェニル-3-アザヘキサン-3-ニトロキシド (TIPNO, Figure 2) を用いて粘度効果の一般性について検討した (runs 13 and 20)。その結果、Coup/Abst選択性はTEMPOを用いた場合と同じであった。こ

**Figure 2.** Structure of TIPNO.

の結果は粘度効果の一般性を示している。

最後に、**5d** ($R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{CO}_2\text{M}$)³⁹から生成するポリ (メチルアクリレート) モデルラジカル**6d**とTEMPOとの反応を検討した (runs 21-29)。**1a**、**5c**を用いたときと同様に、非常に高いCoup選択性を示すが、Coup/Abst選択性は溶媒の温度の低下および粘性の上昇につれて低下し、それぞれの溶媒において温度の逆数およびバルク粘度と良い比例関係を示した (Scheme 1a and 1b, Circles)。さらに、これも同様に、マイクロ粘度に対応する拡散係数の逆数がより一般的なパラメータで

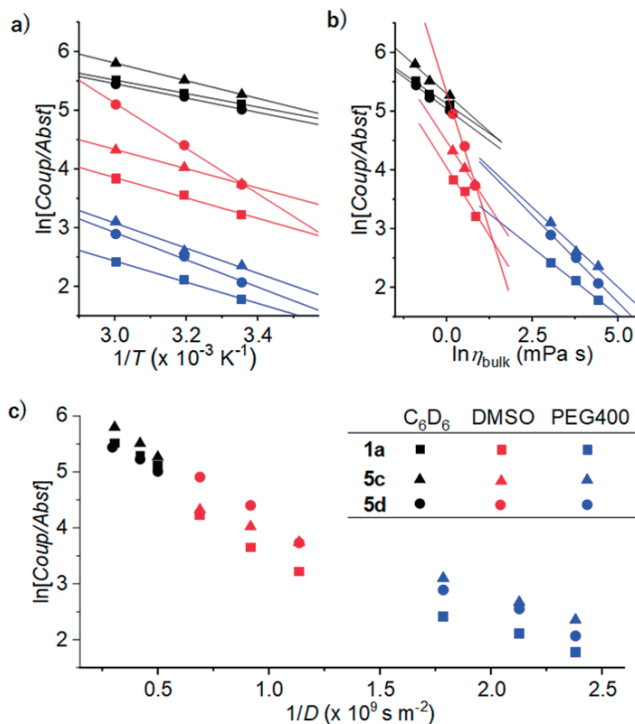
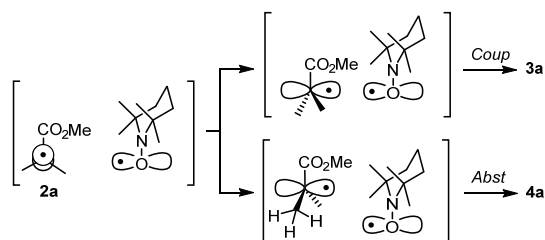


Figure 1. Correlation of *Coup/Abst* selectivity and a) inverse of temperature, b) bulk viscosity, and c) inverse of diffusion constant in the reaction of **1a**, **5c**, or **5d** with TEMPO

あることも分かった (Scheme 1c)。ポリアクリル酸末端ラジカルは選択的に *Disp* で停止するため、この停止反応における粘度効果は明らかではなかったことから、³⁸この結果はポリアクリル酸末端ラジカルの粘度効果を明らかにした最初の例である。

以上の結果は、ラジカル種に関係なく粘度の増加は *Abst* または *Disp* 経路を増加させる、という一般性を示しており、すでに提唱している衝突モデルにおけるラジカルペアの相対的な構造変化により説明できる。^{40,43} ラジカル**2a**とTEMPOとの反応例をScheme 3に示した。停止反応はラジカルペアが一重項へと項間交差を起こすのに必要な、互いに直交した配置から始まる。そこから *Coup*、*Abst* が進行するための配置へと構造変化を起こすため、周囲の溶媒分子もそれに合わせて再配向する必要がある。 *Coup* が進行するためにはラジカルSOMOが同一線上にある一つの配向しか取れないのに対し、 *Abst* はC-H結合とTEMPOのSOMOが同一線上にある配向が複数あると共に、それに至る分子間の構造変化も小さい。このため、溶媒の濃度が高くなると、 *Coup* は不利となる。



Scheme 3. The collision model for explaining the viscosity effect.

3-2. 重合末端ラジカルを用いた検討: 次に、PMMA **1b** ($R^1 = \text{PMMA}$, $M_n = 3,400$, $D = 1.14$)、あるいはPSt **5e** ($R^1 = \text{PSt}$, $M_n = 2,900$, $D = 1.16$) から生成する重合末端ラジカル**2b**、あるいは**6e**とTEMPOとの反応について、25°Cで検討した (runs 30-35)。反応終了後には、¹H NMRとSECを用いて生成物の解析を行った。

その結果、 C_6D_6 で溶媒として使用したところ、**2b**および**6e**のいずれもが選択的に *Coup* 生成物**3b**および**7e**を与えた (*Coup/Abst* = > 99/1)。この結果は小分子モデルを用いた結果と良い一致を示している。一方、 C_6D_6 にPSt ($M_n = 96,000$, $D = 1.46$)を加えて粘度を増した媒体中では、いずれも *Abst* の寄与が大きくなった。さらに、その程度はPMMAラジカル**2b**の方がPStラジカル**6e**よりも顕著であり、 $\text{C}_6\text{D}_6/\text{PSt}$ の1/1混合物 ($\eta_{\text{bulk}} = 3980 \text{ mPa s}$) 中では、**2b**は50/50の *Coup/Abst* 選択性であったのに対し、**6e**は84/16の選択性であった。いずれの場合も *Coup/Abst* 選択性はバルク粘度と良好な線形相関があることから、 *Coup/Abst* 選択性に影響を与える粘度の重要な役割がここでも示された (Figure 3)。この結果は、ラジカル種の違いによる *Coup/Abst* 選択性の粘度依存性がNMPでのMMAとスチレンの異なる重合挙動の原因の一つであることを示唆している (Scheme 1a)。しかし、NMPにおけるStとMMA重合の有意な違いを考慮すると、ここで観測された違いはかなり小さいように考えられる。

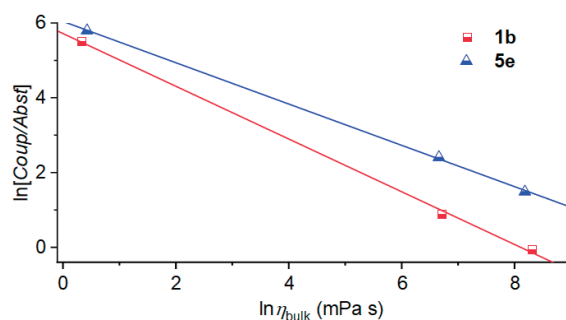
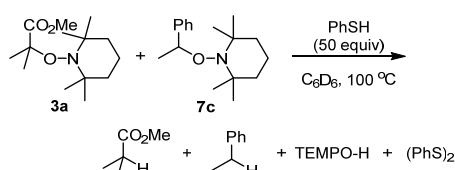


Figure 3. Correlation of *Coup/Abst* selectivity and bulk viscosity in the reaction between **1b** or **5e** and TEMPO

この点を明確にするため、PMMA-TEMPOおよびPSt-TEMPO休止種の熱安定性を小分子モデル**3a**および**7c**を用いて検討した (Scheme 4)。すなわち、**3a**と**7c**と大過剰のベンゼンチオール (50当量) の C_6D_6 溶液を100°Cで加熱したところ、**3a**は約10分以内に完全に消費され、2-メチルプロピオン酸メチルが定量的に生成した。一方、**7c**の消失は遅く、完全に消費するには約12時間必要であった (Figure 4)。なお、生成物としてエチルベンゼンが定量的に生成した。また、**3a**および**7c**のTEMPO部位とベンゼンチオールは、それぞれTEMPO-Hとジフェニルジスルフィドに変換された。

分解速度は1次反応速度式に従うことから、反応の律速段階が**3a**および**7c**の炭素-酸素結合のホモリシスによるラジカルペアの生成であることが示唆された。見かけの一次速度定数は、**3a**と**7c**でそれぞれ 2.7 s^{-1} と 0.03 s^{-1} であった。**3a**と**7c**から生

じたラジカルペアの一部は、溶媒ケージ内で再結合すると考えられることから、熱安定性を厳密に比較するにはその寄与を考慮する必要がある。しかし、その割合はラジカル種によりさほど影響を受けないと考えられることから、観測された90倍の分解速度の違いは、それぞれの休止種の活性化の頻度の差とほぼ等しいとみなせる。一方、MMAの成長反応速度はスチレンに比べて3倍大きい。従って、同じ鎖長の高分子を形成するまでに、PMMA末端ラジカルはPSt末端ラジカルよりもTEMPOにより約30倍頻繁に不活性化反応を起こしていることになる。さらに、重合が進むと粘度の上昇により、スチレンよりもMMAの重合でより $Abst$ が増加する傾向がある。これらの結果は、MMA重合の方がスチレン重合よりもはるかに速く成長末端の失活が起こることと良い一致を示している。



Scheme 4. Thermal decomposition of TEMPO adducts **3a** and **7c** in the presence of benzenethiol.

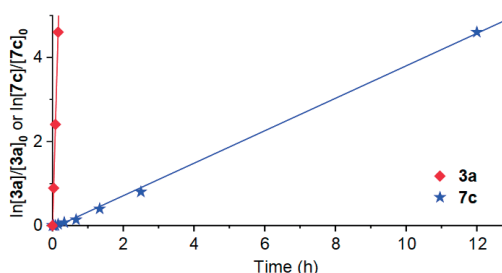


Figure 4. The decomposition kinetics of **3a** and **7c**.

4. 結論

活性ラジカルと安定ラジカルとの反応は粘性の低い溶媒中では、ほぼ完全に $Coup$ が進行する。しかし、粘度の上昇により、 $Abst$ が増えることを明らかにした。この傾向は、活性ラジカルの自己停止反応における $Comb/Disp$ 選択性に対する粘度の影響と同じであることから、粘度効果の一般性が示された。これらの結果は、有機合成とポリマー合成の両方で効率的なラジカルカップリング反応を設計するのに役立つものと考えている。⁵¹

謝辞

この研究は日本学術振興会科研費（助成番号19K05593（YN）および16H06352（SY））および京都大学化学研究所共同研究プログラム（助成番号2020-20）の支援を受けました。

参考文献

1. A. S. Lindsey, H. Jeskey, *Chem. Rev.* **1957**, *57*, 583-620.
2. H. J. Schäfer, *Recent contributions of Kolbe electrolysis to organic synthesis*, *Electrochemistry*. Editor, Steckhan E., Springer, Berlin, Heidelberg, **1990**.

3. J. Inanaga, H. Furuno, *Comprehensive Chirality* Editor, Elsevier, Amsterdam **2012**.
4. T. Wirth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 61-63.
5. A. Chatterjee, N. N. Joshi, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 12137-12158.
6. J. Nicolas, Y. Guillaneuf, C. Lefay, D. Bertin, D. Gigmes, B. Charleux, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 63-235.
7. M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, G. K. Hamer, *Macromolecules* **1993**, *26*, 2987-2988.
8. G. S. Ananchenko, H. Fischer, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2001**, *39*, 3604-3621.
9. S. Yamago, E. Kayahara, H. Yamada, *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 416-423.
10. G. Wang, J. Huang, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 277-308.
11. S. Yurteri, I. Cianga, Y. Yagci, *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 1771-1783.
12. T. Sarbu, K.-Y. Lin, J. Ell, D. J. Siegwart, J. Spanswick, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3120-3127.
13. Y. Qin, C. Cui, F. Jäkle, *Macromolecules* **2007**, *40*, 1413-1420.
14. A. F. Voter, E. S. Tillman, *Macromolecules* **2010**, *43*, 10304-10310.
15. A. Bunha, M. C. Tria, R. Advincula, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9173.
16. K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2012**, *45*, 4015-4039.
17. A. Debuigne, C. Jérôme, C. Detrembleur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1422-1424.
18. A. Debuigne, R. Poli, J. D. Winter, P. Laurent, P. Gerbaux, P. Dubois, J.-P. Wathélet, C. Jérôme, C. Detrembleur, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1799-1811.
19. A. Debuigne, R. Poli, J. D. Winter, P. Laurent, P. Gerbaux, J.-P. Wathélet, C. Jérôme, C. Detrembleur, *Macromolecules* **2010**, *43*, 2801-2813.
20. A. Debuigne, R. Poli, C. Jérôme, R. Jérôme, C. Detrembleur, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 211-239.
21. Y. Nakamura, T. Arima, S. Tomita, S. Yamago, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5536-5539.
22. Y. Nakamura, T. Arima, S. Yamago, *Macromolecules* **2014**, *47*, 582-588.
23. W. Fan, Y. Nakamura, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17006-17010.
24. S. Yamago, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5051-5068.
25. S. Yamago, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2020**, *93*, 287-298.
26. S. Yamago, K. Iida, J. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2874-2875.
27. K. Masuda, M. Nagatomo, M. Inoue, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 207-212.
28. T. Kawamata, A. Yamaguchi, M. Nagatomo, M. Inoue, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 18907-18912.
29. S. Coiai, E. Passaglia, F. Cicogna, *Polym. Int.* **2019**, *68*, 27-63.
30. S. Holmberg, P. Holmlund, R. Nicolas, C.-E. Wilén, T. Kallio, G. Sundholm, F. Sundholm, *Macromolecules* **2004**, *37*, 9909-9915.
31. A. Debuigne, J.-R. Caille, R. Jérôme, *Macromolecules* **2005**, *38*, 5452-5458.
32. Y. Lu, T. Nemoto, M. Tosaka, S. Yamago, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1836-1844.
33. Y. Lu, S. Yamago, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 3952-3956.
34. G. Odian, *Principles of Polymerization Fourth Edition*. Editor, Wiley-Interscience, Canada, **2004**.
35. G. Moad, D. H. Solomon, *The Chemistry of Radical Polymerization 2nd Edition*. Editor, Elsevier, Amsterdam, **2006**.
36. D. W. V. Kvelen, K. T. Nijenhuis, *Properties of Polymers Their Correlation with Chemical Structure; their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group*

- Contributions 4th Edition*. Editor, Elsevier Science, Slovenia, **2009**.
37. Y. Nakamura, S. Yamago, *Macromolecules* **2015**, *48*, 6450-6456.
38. Y. Nakamura, R. Lee, M. L. Coote, S. Yamago, *Macromol. Rapid Commun.* **2016**, *37*, 506-513.
39. Y. Nakamura, T. Ogihara, S. Yamago, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 248-252.
40. Y. Nakamura, T. Ogihara, S. Hatano, M. Abe, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 1299-1305.
41. X. Li, T. Ogihara, M. Abe, Y. Nakamura, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 9846-9850.
42. X. Li, T. Ogihara, T. Kato, Y. Nakamura, S. Yamago, Evidence for Polarity- and Viscosity-controlled Domains in the Termination Reaction in the Radical Polymerization of Acrylonitrile, **2021**, submitted.
43. H.-H. Schuh, H. Fischer, *Helv. Chim. Acta.* **1978**, *61*, 2463-2481.
44. H. Fischer, H. Paul, *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 200-206.
45. D. D. Tanner, P. M. Rahimi, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 225-229.
46. J. T. Barry, D. J. Berg, D. R. Tyler, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9389-9392.
47. J. T. Barry, D. J. Berg, D. R. Tyler, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14399-14405.
48. S. Brumby, *J. Mag. Res.* **1973**, *10*, 203-210.
49. A. Kajiwara, A. K. Nanda, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2004**, *37*, 1378-1385.
50. D. Benoit, V. Chaplinski, R. Braslau, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3904-3920.
51. X. Li, T. Kato, Y. Nakamura, S. Yamago, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2021** in press (doi.org/10.1246/jbsj.20200398).

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）