

ISBN 0368-6280

公益財団法人
日本化学繊維研究所

講 演 集

第 8 0 集

2023 年 3 月

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol.80
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.80)
March 2023

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 80 集)

1. 付加重合による分解性高分子の合成：主鎖分解を誘発するトリガーの導入 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	大内誠、西川剛、Haiwang Lai、 窪田博之、牧野寛、木村太知 黒田啓太	・・・ 5
2. ホウ素クラスター元素ブロックによる機能性発光材料開発 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	田中一生、権正行、伊藤峻一郎	・・・ 10
3. クモ糸研究の現状と展望 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻	沼田圭司	・・・ 14
4. 高分子ソフト材料の動的き裂の解析 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻	浦山健治、Mai Thanh Tam	・・・ 18
5. ゴム充填系の補強効果における粒径依存性について 京都大学化学研究所 *大阪大学大学院理学研究科	竹中幹人、狩谷柊、熊川大幹、 渡辺幸、仲村快太、中西洋平、 井上正志*、浦川理*	・・・ 22
6. 自己組織化ナノゲル DDS を用いたワクチン開発 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	秋吉一成、澤田晋一、佐々木善浩	・・・ 26
7. 両親媒性高分子のセルフソーティングの分子機構 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	古賀毅、佐藤菜美	・・・ 29
8. 超分子ポリマーの精密合成 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	杉安和憲	・・・ 33
9. ラジカル重合によるデンドリマー状多分岐高分子形成過程の確率論的シミュレーション 京都大学化学研究所	山子茂、竹内雛子、木船雅人、 全天翔、朱南屹、登坂雅聡	
著者の都合により上記を変更し、論文題目と著者名、内容を以下のように差し替えて収録： 「有機テルル媒介エマルジョンラジカル重合によるホモポリスチレンおよびポリスチレン含有ブロック 共重合体の制御合成法」		
京都大学化学研究所	山子茂、Yuhan Jiang、 Weijia Fan、登坂雅聡	・・・ 37
10. 4級化したポリ (2-ビニルピリジン) 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	中村洋、帖佐智也	・・・ 43
11. 絶縁性高分子と結晶性共役高分子のブレンドによる電荷輸送特性の向上 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、堀内宥也	・・・ 47

12.	ポリマーブラシ界面における防着氷特性の理解と制御 京都大学化学研究所 *日本ペイント・サーフケミカルズ(株) #横浜国立大学大学院環境システム学専攻	辻井敬亘、玉本健*、黄瀬雄司、 長谷剣人#、中野健#	．．． 52
13.	1 細胞解析のための細胞表面修飾手法の開発 京都大学医生物学研究所	永樂元次、橋本みなみ	．．． 58
14.	オートファジー可視化のための高分子ナノ粒子を用いた核酸の細胞内徐放 京都大学医生物学研究所	田畑泰彦、竹花祥、鷺坂太一	．．． 62
	謝辞		．．． 66

付加重合による分解性高分子の合成：主鎖分解を誘発するトリガーの導入

Degradable Polymers via Addition Polymerization:

Introduction of Trigger for Backbone Degradation

大内 誠・西川 剛・Haiwang Lai・窪田 博之・牧野 寛・木村 太知・黒田 啓太

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

It is difficult to synthesize degradable polymers via addition polymerization of vinyl monomers because the monomer units are connected with carbon-carbon bonds of higher bond energies dislike ester bonds in polyester and amide bonds in polyamide. Recently polymer chemists have made efforts to introduce “trigger” at the terminal, pendant, and backbone for preparation of “on-demand degradable polymers”. Particularly, such on-demand cleavage of the covalent bonds in polymer chains has become increasingly important for the development of environmental-friendly polymer materials to alleviate the current polymer-waste pollution resulting from the polymer dependence of society, as well as the construction of smart nano-delivery systems. In this paper, some examples of comonomer design for introduction of triggers are described.

1. 緒言：分解性高分子

ポリエチレン，ポリプロピレン，ポリスチレンなど付加重合で合成される高分子は材料として広く用いられている。その理由の一つとしてこれら高分子の主鎖は結合エネルギーが高い炭素—炭素結合でできており，安定性に優れた高分子であることが挙げられる。一方でこれら高分子を使用後に分解させる，あるいは別の分子に変換することは難しく，マテリアルリサイクルの可能性はあっても，ケミカルリサイクルの展開は難しい。マイクロプラスチックの海洋汚染問題解決や様々な材料開発に対して，安定な高分子を好きなタイミングで分解させる研究が注目されている。¹⁻²⁾我々は付加重合の共重合によって分解のトリガー（引き金）を末端，側鎖，主鎖に導入することで，付加重合で得られる高分子を分解させる研究を行っており（図1），このような研究は我々以外の研究グループでも盛んに研究されている。³⁻⁹⁾

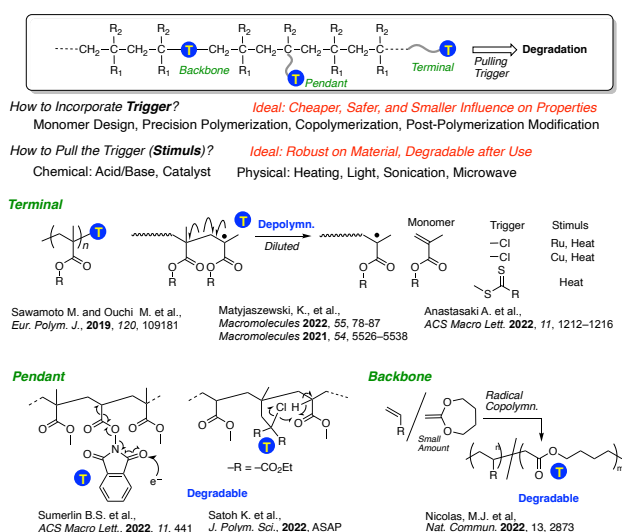


Fig. 1 Degradable polymers carrying trigger at terminal, pendant, or backbone.

2. 炭素—塩素結合をトリガーとする分解

我々はこのまでの研究で塩素型開始剤を用いた原子移動ラジカル重合（ATRP）で得られる塩素を末端に有するポリメタクリル酸メチル（PMMA-Cl）に対し，ATRPで用いる触媒と同じ触媒を低濃度，高温で作用させると，末端で生じたラジカル種から解重合が進行し，MMAが生成することを見出している。¹⁰⁾この解重合はリビング重合の逆反応とい

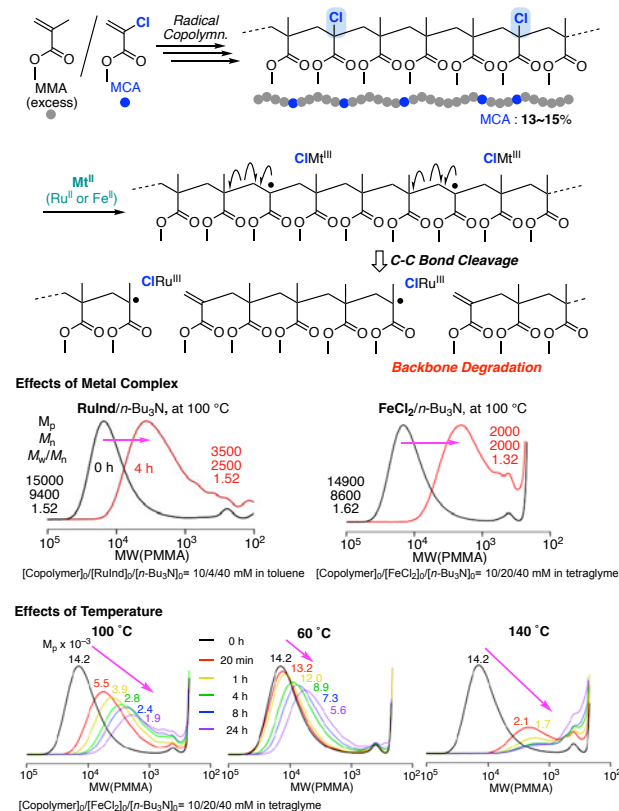


Fig. 2 Radical copolymerization of MMA with MCA for incorporation of C-Cl bond trigger and the degradation by metal complex.

う観点で興味深い、解重合を促進するためには低濃度にする必要があり、分解という観点では実用性に乏しい。そこで、MMAの重合に対し、塩素を有するモノマー（ α -クロロアクリレート、MCA）をコモノマーとして用いた共重合を行い、生成ポリマーに対してATRPの重合触媒（ルテニウム錯体、鉄錯体）を作用させると、共重合体の主鎖に含まれる炭素塩素結合が活性化され、ポリマーを分解できることを見出した（図2）。¹¹⁾特に鉄錯体は安価でありながら、分解効率が高かった。さらに温度を上げることで、速やかにオリゴマーまで分解した。

3. 炭素—水素結合をトリガーとする分解

近年、炭素—水素（C—H）結合に対し、水素原子移動を伴って炭素ラジカル活性種を与えるHAT反応が新しい分子変換手法として注目を集めている。我々は高分子鎖中の特定のC—H結合をトリガーとして用い、選択的なHAT反応による高分子の分解を実現するための高分子鎖設計を検討した。具体的には酸素に隣接するC—H結合がHAT反応に活性があることに着目し、選択的に活性化されるC—H結合を含むユニットとしてビニルエーテルを検討した。MMAと n -ブチルビニルエーテル（NBVE）のラジカル共重合を行い、NBVEユニットを18 mol%含むMMA/NBVE共重合体を合成した。この共重合体に対し、光触媒のbenzophenoneを加えてMeCN中80°Cに加熱し、UV（365 nm）を照射したところ、GPC曲線が低分子量側へ顕著にシフトした（図3）。また¹H NMRによる構造解析からはビニル基末端およびアルデヒド基に由来すると考えられるピークが見られたこと、および様々なVEを用いた結果から、主に酸素に隣接する側鎖のメチレン水素が活性化され、そのラジカルが主鎖に移動することで分解していることがわかった。

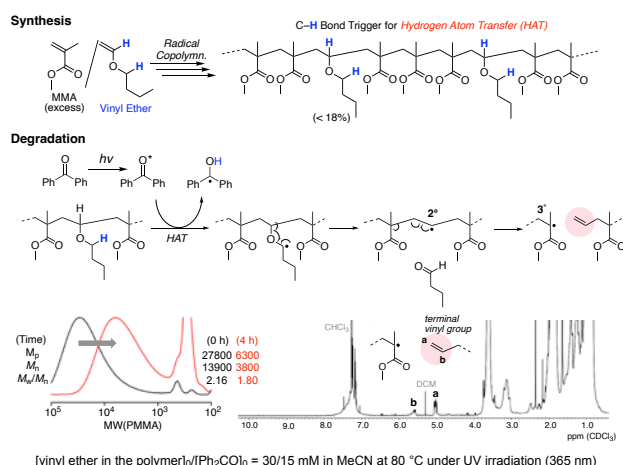


Fig. 3 Radical copolymerization of MMA with NBVE and the degradation of the copolymer by HAT catalyst via activation of C—H bond on the NBVE units.

4. ホウ素側鎖をトリガーとする分解

我々はホウ素側鎖が直接二重結合に結合したモノマー

がラジカル重合できること、さらに重合後の炭素—ホウ素（C—B）結合の変換によってビニルアルコール、ビニルアミン、エチレンなどのユニットを含むポリマーを合成できることを見出してきた。カップリング反応で使われるなど、C—B結合は様々な官能基に変換するための有用な結合であるが、最近ではC—B結合をホモリティックに切断し、アルキルラジカル種を経た変換も報告されている。そこで我々はC—B結合も高分子の分解反応のトリガーになると考えた。実際にピナコールで保護されたボロン酸側鎖を有するビニル型（VBpin）、あるいはイソプロペニル型（IPBpin）のモノマーをコモノマーとしてMMAのラジカル共重合を行い、得られたポリマーに対し、C—B結合をホモリティックに切断する求核剤（アンモニウムフルオリド、TBAF）、マンガニ錯体、カテコール（TBC）を作用させると、分解が起こって分子量は次第に低下した。¹²⁾熱安定性はPMMAと変わらず、またこれら三成分のうち一成分でも欠けると分解効率が低下すること、さらに他のコントロール実験からC—B結合がトリガーとなって、ラジカル生成を経て分解が進行していることがわかった。

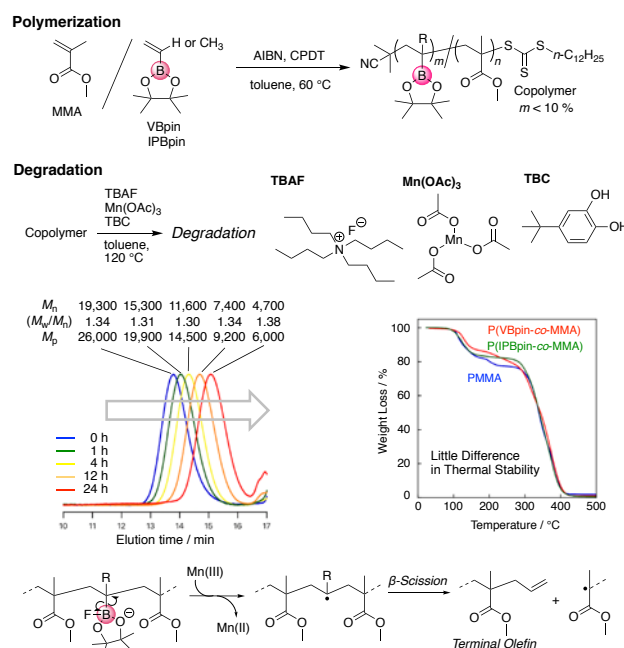


Fig. 4 Radical copolymerization of MMA with Bpin monomer (VBpin or IPBpin) and the degradation of the copolymers by nucleophile (TBAF), Mn complex, and catechol.

5. 異性化重合によるトリガー導入

ラジカル付加重合で得られるポリマーの主鎖は結合エネルギーの大きい炭素—炭素結合でつながった構造を有する。もし付加重合の過程で成長活性ラジカル種が側鎖と反

応して異性化すれば、主鎖にヘテロ原子を含むポリマーが生成しうる。主鎖にヘテロ原子を導入できれば、付加重合機構で得られたポリマーでありながら分解性を付与できる可能性がある。二重結合を有する環状モノマーをコモノマーとして用い、開環を伴う異性化ラジカル共重合によって分解性高分子を合成した研究が報告されており、当研究室でも、環状ケテンアセタールである5,6-benzo-2-methylene-1,3-dioxepane (BMD0) とペンタフルオロフェニルメタクリレート (PFMA) のラジカル重合で得られる交互リッチポリマーが重合中の異性化によってエステル結合を主鎖に有するポリマーを与え、塩基条件で分解できるポリマーを合成できることを報告している (図5)。¹³⁾

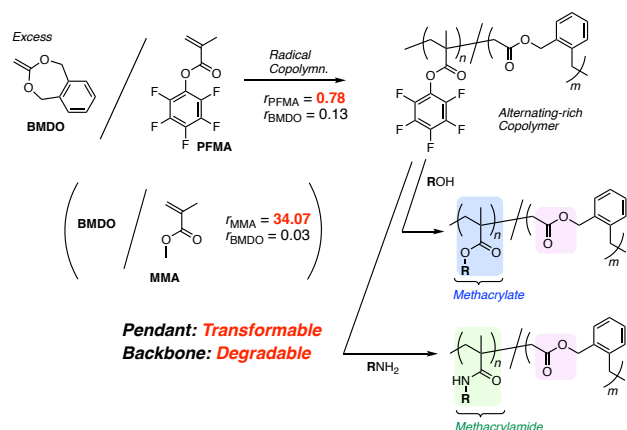


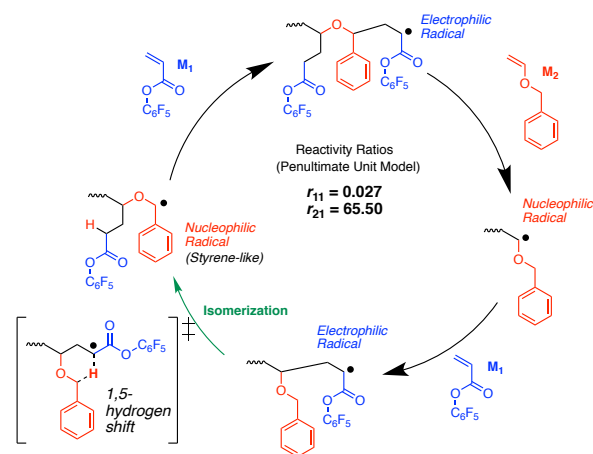
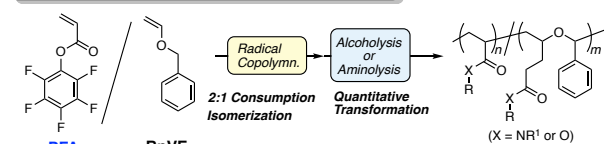
Fig. 5 Radical copolymerization of PFMA with BMD0 and subsequent alcoholysis/aminolysis transformation for syntheses of degradable polymers.

BMD0のような特殊なモノマーではなく、汎用モノマーを用いた異性化重合によって分解性高分子を合成した例はほとんどない。我々は環状モノマーを使わずに直鎖状のモノマーで側鎖への異性化を狙って、二重結合は適度なラジカル反応性を有し、生成する成長ラジカル種は不安定であり、側鎖へ異性化しやすいモノマーとして非共役モノマーであるベンジルビニルエーテルに着目した。ビニルエーテルとのラジカル共重合が可能であるアクリレートを用い、共重合性が高く重合後に側鎖変換が可能である電子不足アクリレートであるペンタフルオロフェニルアクリレート (PFA) を用いて、ベンジルビニルエーテル (BnVE) とのラジカル共重合を行った。

PFAとBnVEのラジカル共重合はスムーズに進行したが、ここで重合率から計算されるBnVEの導入率は常に約33%となりPFAとBnVEが約2:1の割合で消費されることがわかった。この消費挙動はBnVEに特異的であり、他のアルキルビニルエーテルを用いた共重合ではVEの導入率は約40%となった。得られたポリマーの構造を¹H NMR, ¹³C NMR, 二次元NMR (HSQC) で解析したところ、スチレン様のベンジルラジカルを与える1,5シフトに基づく異性化によって生成する

繰り返し単位を含むことがわかった。

Unique AAB Copolymerization and Transformation



Degradation via Acidolysis

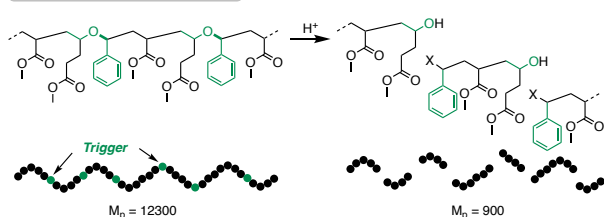


Fig. 6 AAB sequence-specific radical copolymerization of PFA with BnVE and subsequent alcoholysis/aminolysis transformation for syntheses of degradable polymers via acidolysis reaction.

さらにPFA (M_1) とBnVE (M_2) を種々の仕込み比で仕込んでラジカル共重合を行い、前末端モデルを用いたモノマー反応性比を算出した。得られたポリマーの¹H NMRからBnVEの組成比を算出すると仕込み比に関わらず0.33に近い値が得られた。BnVEには単独重合性がないことから $r_{12} = 0$, $r_{22} = 0$ として前末端モデルモノマー反応性比を算出したところ $r_{11} = 0.174$, $r_{21} = 6600$ という値が得られた。これらの値から M_1 と M_2 がAABの順に周期的に成長し、配列の制御された共重合体を与えていることがわかった。NMRによる構造解析の結果と合わせて、図6のような重合サイクルで共重合が進行しており、6員環遷移状態を経由する異性化が起こることで特異な周期性で重合が進行すると考えられる。

得られた共重合体のPFAユニットはアミノリシスやアルコールリシスによって置換基修飾が可能であるため、重合後反応によって置換基修飾が可能である。実際に、得られた共重合体に過剰のアルコールやアミンを反応させたところ、PFAエステル側鎖は定量的にエステルやアミド側鎖に変換された。変換後の共重合体には主鎖には分解性のベンジル

ビニルエーテル結合が含まれることから、酸によって効率的に低分子に分解できると考え、TFAを加え、40℃で放置したところ、時間の経過とともにGPC曲線は低分子量側へとシフトし、24時間後には1000以下にまで分解した。また、示差熱・熱重量同時測定 (TG-DTA) によってコポリマーの熱安定性を評価したところ、熱分解温度 (5%質量減少温度) は約300℃であり、高い熱安定性が確認されたことから、熱的には安定でありながら、酸の刺激によって分解できるポリマーであることがわかった。なお、BnVEをNBVEにして得られた共重合体では異性化構造と分解挙動は確認されなかったことから、BnVE共重合体に特異的な分解挙動であることも示された。

6. 光分解させるためのトリガー導入

o-ニトロベンジルエーテルに光を照射すると、*o*-ニトロソベンズアルデヒドが脱離して対応するアルコールに変換される。この反応はアルコールの保護基として用いられてきた。我々は*o*-ニトロベンジル基を有するビニルエーテル (α NBnVE) を新規に合成し、ベンズアルデヒドとの交互共重合ができれば、生成するアセタール結合が光照射によって不安定なヘミアセタール結合に変換され、速やかに分解すると考えた。¹⁴⁾

ビニルエーテルとベンジルアルデヒドのカチオン交互共重合の既報に従い、エチルスルホン酸を開始剤、塩化ガリウムをルイス酸、ジオキサンを添加塩基としてトルエン中、-78℃で α NBnVEとパラメチルベンジルアルデヒドのカチオン共重合を行った (図7)。共重合はスムーズに進行し、両モノマーは等速に消費され、狙いとする交互共重合の進行が示唆された。生成ポリマーの¹H NMRスペクトルにはアセタールメチン水素に基づくピークが明確に観測さ

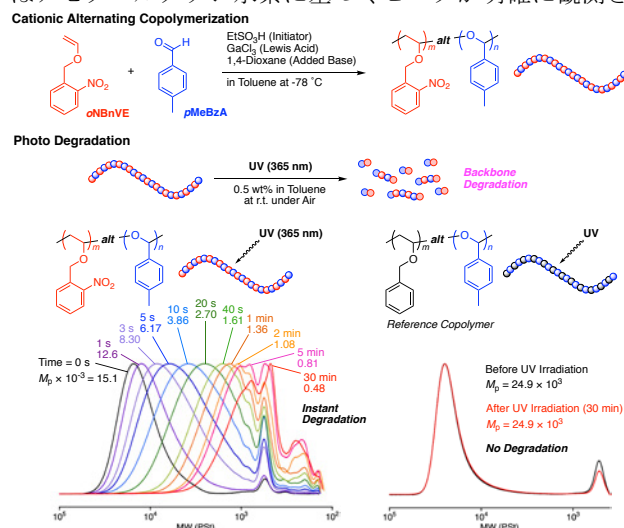


Fig. 7 Synthesis of an alternating copolymer with an α NBn-capped acetal backbone via cationic copolymerization of α NBnVE with *p*-tolualdehyde and the rapid degradation into lower-molecular-weight compounds upon exposure to UV irradiation.

れ、積分比などから狙いとするアセタール結合が繰り返された交互共重合体が生成していることがわかった。生成ポリマーは酸によって分解するものの、熱的には安定であった。このポリマーのトルエン溶液に対し、UV照射するとわずか30分でポリマーはオリゴマーまで分解し、光照射によって速く分解することがわかった。ニトロ基を含まない交互共重合も合成し、これにUV照射をしても分解しなかったことから、 α NBnVEユニットに特異的に光分解することがわかった。この共重合は制御重合であるため、ブロック共重合も可能であり、光による選択的セグメント分解も可能であった。

7. まとめ

ビニル化合物をモノマーとする付加重合で得られるポリマーは炭素-炭素結合から成るため、一般に分解させるのが難しいが、分解のトリガーを末端基、主鎖、側鎖に導入できればそれを起点に分解させるのが可能である。様々な刺激で活性化されるトリガーの導入のために種々のモノマーを設計し、様々な分解性ポリマーの合成に成功した。

参考文献

- Geoffrey W. Coates and Yutan D. Y. L. Getzler *Nat. Rev. Mater.*, **2020**, 5, 501–516.
- Farihah M. Haque, Jacob S. A. Ishibashi, Claire A. L. Lidston, Huiling Shao, Frank S. Bates, Alice B. Chang, Geoffrey W. Coates, Christopher J. Cramer, Paul J. Dauenhauer, William R. Dichtel, Christopher J. Ellison, Ethan A. Gormong, Leslie S. Hamachi, Thomas R. Hoye, Mengyuan Jin, Julia A. Kalow, Hee Joong Kim, Gaurav Kumar, Christopher J. LaSalle, Stephanie Liffland, Bryce M. Lipinski, Yutong Pang, Riffat Parveen, Xiayu Peng, Yanay Popowski, Emily A. Prebhalo, Yernaidd Reddi, Theresa M. Reineke, Daylan T. Sheppard, Jeremy L. Swartz, William B. Tolman, Bess Vlasisavljevich, Jane Wissinger, Shu Xu, and Marc A. Hillmyer, *Chem. Rev.*, **2022**, 122, 6322–6373.
- Michael R. Martinez, Sajjad Dadashi-Silab, Francesca Lorandi, Yuqi Zhao, and Krzysztof Matyjaszewski, *Macromolecules* **2021**, 54, 5526–5538.
- Michael R. Martinez, Ferdinando De Luca Bossa, Mateusz Olszewski, and Krzysztof Matyjaszewski, *Macromolecules* **2022**, 55, 78–87.
- Hyun Suk Wang, Nghia P. Truong, Glen R. Jones, and Athina Anastasaki, *ACS Macro Letters*, **2022**, 11, 1212–1216.

- 6) James B. Young, Jared I. Bowman, Cabell B. Eades, Alexander J. Wong, and Brent S. Sumerlin, *ACS Macro Letters*, **2022**, *11*, 1390-1395.
- 7) John B. Garrison, Rhys W. Hughes, and Brent S. Sumerlin, *ACS Macro Letters*, **2022**, *11*, 441-446.
- 8) Sota Yamamoto, Tomohiro Kubo, Kotaro Satoh, *J. Polym. Sci.*, **2022**, *60*, 3435. <https://doi.org/10.1002/pol.20220250>.
- 9) Amaury Bossion, Chen Zhu, Léa Guerassimoff, Julie Mougin, and Julien Nicolas, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 2873. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30220-y>.
- 10) Yuki Sano, Takahiro Konishi, Mitsuo Sawamoto and Makoto Ouchi, *Eur. Polym. J.*, **2019**, *120*, 109181.
- 11) Taichi Kimura, Keita Kuroda, Hiroyuki Kubota and Makoto Ouchi, *ACS Macro Lett.*, **2021**, *10*, 1535–1539.
- 12) Hiroshi Makino, Tsuyoshi Nishikawa, and Makoto Ouchi, *Chem. Commun.*, **2022**, *58*, 11957-11960.
- 13) Haiwang Lai and Makoto Ouchi, *ACS Macro Lett.*, **2021**, *10*, 1223–1228.
- 14) Hiroyuki Kubota, Makoto Ouchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, e202217365.

ホウ素クラスター元素ブロックによる機能性発光材料開発

Development of Stimuli-Responsive Luminochromic Materials Based on Boron Clusters

田中一生・権 正行・伊藤峻一郎

Kazuo TANAKA, Masayuki GON, Shunichiro ITO

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

Recent reports have shown potential applicability of boron complexes and clusters as an element-block, which is a minimum functional unit containing inorganic element, for advanced stimuli-responsive optical materials in the solid state. Here, we develop stimuli-responsive luminochromic materials based on aggregation-induced emission (AIE)-active element-blocks, which can provide intense emission only in the solid-state. Initially, we show that the thiophene-substituted boron complex can demonstrate multi-step mechanochromic luminescent properties. In particular, even by weak mechanical forces, luminescent chromism can be observed. Next, by introducing a single *o*-carborane unit to pyrene, luminochromism originating from switching of different emission mechanisms triggered by mechanical stimuli are explained. Furthermore, multi-step mechanochromic luminescence was observed. In this study, it is demonstrated that the AIE-active boron complexes and clusters plays a role in stimuli-responsive luminescent element-blocks.

1. 元素ブロック材料

発光特性を持った有機化合物の多くでは、希薄溶液状態で強い吸光・発光を示し、濃縮溶液や固体状態では発光性が減衰する濃度消光(Aggregation-caused quenching : ACQ)という現象が起きることが知られている。一般にこの濃度消光の原因は分子間の相互作用や分子内の振動緩和などによって様々な無輻射失活経路が優位になることだとされている。しかし、近年ではそれらの有機分子を改変することによって、濃縮溶液や固体といった凝集状態で特に強い吸光性・発光性を持たせる凝集誘起型発光(Aggregation-induced emission : AIE)についての研究が数多く報告されている¹⁾。ここで、無機元素を含む機能性ビルディングブロックを元素ブロックと呼ぶ。当研究室ではこれまで、数多くの発光性ホウ素元素ブロックを見出し、さらにAIE性を示すものも見出し²⁾。さらにこれらの固体状態でもACQを回避できる発光性元素ブロックの中で、力学的刺激にตอบสนองして固体状態での発光色を変化させる分子が見出されてきた^{3,4)}。本稿では特に弱い力でも発光色変化を示す元素ブロック材料について説明する。

2. ホウ素元素ブロックによる材料開発

ケトイミンホウ素錯体(Boron Ketoiminate : BKI)もAIE特性を持つ元素ブロックであることを当研究室では報告してきた(Fig. 1)²⁾。この化合物を縮環させた縮環ケトイミンホウ素錯体(Fused Boron Ketoiminate : FBKI)は剛直であり、高い平面性を持つ。またそのリガンド構造の剛直故に分子内の振動緩和が抑制されることから、単純なBKIと比べて、希薄溶液状態および凝集状態両状態で高い発光強度を維持するなどの特異な発光特性を示すことがわかっている³⁾。加えて、その高い平面性は分子間の相互作用の影響

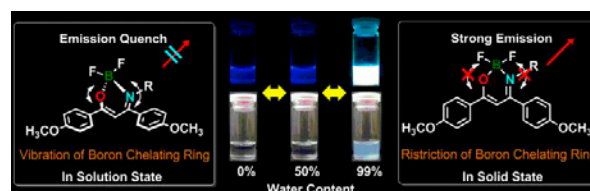


Fig. 1 AIE property of BKI.²⁾

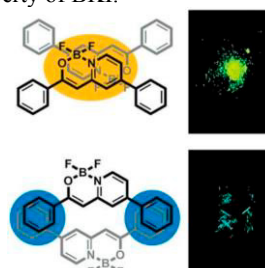


Fig. 2 Two crystal structures of FBKI.³⁾

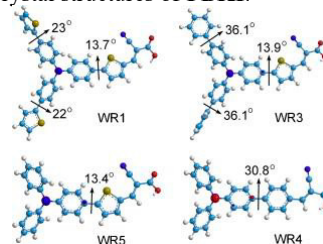
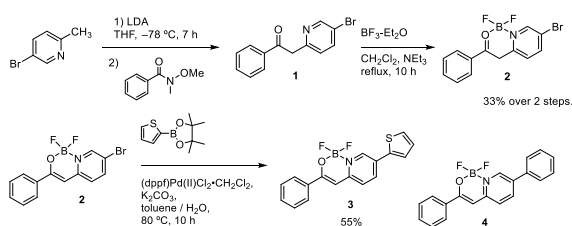


Fig. 3 Comparison of molecular planarity between thiophen and benzene.⁴⁾

を強めるので、FBKIは固体状態における分子間相互作用を鋭敏な色変化という形で出力する有用な分子骨格であるといえる。例えば当研究では、FBKIを適切に修飾することで同一分子から発光色が異なる二つの結晶構造を誘起したと報告した(Fig. 2)³⁾。

チオフェン環の特徴として、芳香族性分子にチエニル基を置換すると効率よく共役平面を拡張することができる



Scheme 1. Synthesis of **3**.

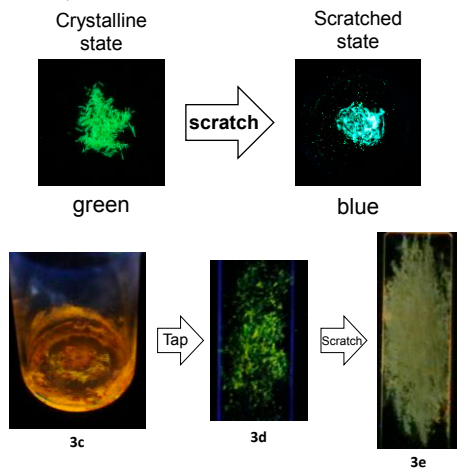


Fig. 4 Mechanochromic color changes from **3**.

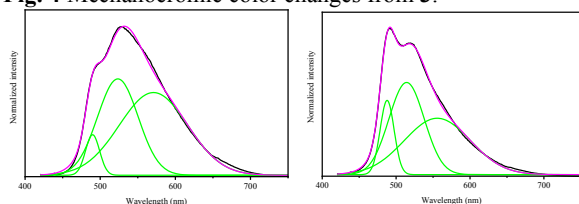


Fig. 5 Peak separation of **3d** (left) and **3e** (right).

ことが知られている^{4,5)}。例えばFig. 3の分子ではベンゼン環にフェニル基を置換したものよりもチエニル基を置換したものの方が π 平面同士のねじれ角が小さく、平面が効率よく拡張されている様子が見てとれる。この特徴を生かして、チオフェン環は共役高分子のコモノマーやスペーサーとして盛んに利用されてきた^{4,5)}。このチオフェン環が隣の共役平面を拡張するという特徴は、分子全体の平面性や光学特性にも大きな影響を与えることがわかっている⁶⁾。共役平面拡張されている分子ほど平面性が高く発光波長が長い傾向にある。また、別の研究では相互作用の変化を誘起することでチオフェン環を含んだ分子が8個の結晶相を発現したことを報告されている^{7,8)}。

本研究では、分子間相互作用を鋭敏に反映して色変化を引き起こすFBKIにチオフェン環を導入することで、チオフェン環がつくる高い平面性、分子間相互作用の増幅などの性質を付与し、同一分子から複数の発光色を発現させることを目指した。また、それらの発光色変化を機械的刺激というマクロな刺激によって発現させた。機械的刺激の強度を変えることで発光色が段階的に変化する多段階メカノクロミズム特性を発現させることを目的とした。

5-Bromo-2-methylpyridineを出発物質にしてScheme 1に示

した合成手順で(L)FBKI-Br (**2**)を合成した。この**2**と2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)thiophene に対してパラジウム触媒を用いた鈴木-宮浦クロスカップリングを行うことで(L)FBKI-thio (**3**)を合成した。得られた**3**は¹H NMR, ¹³C NMR, ¹¹B NMR, HRMS及び元素分析によって同定した。**4**は比較のために既報に従い合成した³⁾。

3及び**4**はともに安定な結晶として得られた。ここで化合物**3**をテトラヒドロフランにより再結晶化した場合、緑色結晶**3a**が得られ、機械的刺激により青色にメカノクロミズム発光を示し、**3b**が得られた(Fig. 4)。次に、化合物**3**をメタノールから再結晶して得られた**3c**は軽くたたいて結晶を壊すと、発光色がオレンジから黄色(**3d**)に変化した。この黄緑色の**3d**を瑪瑙鉢ですりつぶすと、発光色がさらにブルーシフトして黄緑色(**3e**)になった(Fig. 4)。

スペクトル解析より**3c**を軽くたたいて砕くと、発光波長が約40 nm短波長シフトして**3d**になった。さらに**3d**をすりつぶすと発光波長は更に40 nm短波長シフトして**3e**になった。この**3c**のドラスティックなメカノクロミズム挙動は**4**のそれと異なる。第一に**4**は一段階でしか色変化を起こさなかったのに対し³⁾、**3c**は二段階で色変化が起こった。第二に、**3c**は比較的にブロードなピークがその構成要素の割合を変化させながら短波長シフトしている。この構成成分の比率の推移を追跡するために**3d**、**3e**のピークに対してガウス関数を用いたピーク分離を行なった。その結果がFig. 5である。ピーク分離は**3c**–**3e**のピーク波長 $\lambda_{em} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm, $\lambda_{em} = 570$ nmの3つの波で行なった。このピーク分離の結果を見ると、**3d**と**3e**では $\lambda_{em} = 490$ nmの成分の比率が5.64 %から13.0 %と変化し、 $\lambda_{em} = 570$ nmの成分の比率が55.7 %から46.4 %へと変化している。これは $\lambda_{em} = 520$ nmの波の比率の変化(38.6 %から40.6 %)に比べて十分に大きい。発光スペクトル全体の変化を引き起こしているのは $\lambda_{em} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 570$ nmの2つの波の比率の変化である。**3c**では $\lambda_{em} = 570$ nmの成分が支配的であるが、機械的刺激によって分子状態が変化して、その相互作用由来の成分が減少する。併せて $\lambda_{em} = 490$ nmの成分が増加しており、これは分子配向がバラバラの状態からの発光と考えられる。つまり、**3c**から**3d**を経由して**3e**に至る一連の色変化は、分子状態の変化に起因した複数の発光機構の足し合わせとして表現される。**3c**は $\lambda_{em} = 570$ nmの波が支配的であるとみなせるので、この成分の蛍光寿命は**3c**のそれにほぼ等しく、約4 nsである。この蛍光寿命は、これまでに報告されてきたFBKIのモノマー発光よりも長い。このことからTICT発光やJ-aggregation由来の発光の可能性が示唆された。

以上、ベンゼン環を導入したFBKI (**4**)との比較によりチオフェン環を導入したFBKI(**3**)の構造的、光学的、熱的な特徴を明らかにした。チオフェン環を導入したFBKIは分子全体として高い平面性を持っており、さらにその分子平面同士がより近接した構造をとっている。このような構造に起

因して、より長波長シフトした発光や高い熱安定性などを持っていることがわかった。はアルコールを用いた溶媒の蒸発による再結晶を行うことによって、より長波長側に発光ピークを持つ結晶多形(3c)を発現した。この結晶多形は叩くという刺激とすりつぶすという刺激を識別して応答することがわかった。この結晶多形及び多形多段階のメカノクロミズム発現のメカニズムについては、より密な分子パッキングによる結晶相や複数の発光機構の存在が強く示唆されている。

3. カルボラン元素ブロックによる材料開発

次に、AIE性元素ブロックとして知られているオルトカルボラン類について説明する⁹⁾。代表的な π 共役系分子であるアントラセンやピレンなどの多環芳香族炭化水素(PAH)は、有機固体発光材料の分野でよく利用されており、その材料設計は大きく二つに分けられる。一つは、強い発光特性を利用した高輝度発光材料である。もう一つは、 π 平面の重なりの違いによって発光色を変化させる機能性を志向した材料である。オルトカルボランは化学式 $C_2B_{10}H_{12}$ で表される正二十面体型のクラスター型化合物である(Fig. 6)。オルトカルボランは骨格全体に三中心二電子結合の電子が非局在化しているため、一般の水素化ホウ素化合物とは異なり、高い熱安定性を有し、強酸、酸化剤、還元剤に対しても高い耐性を示す。また近年オルトカルボランの炭素部位が強い電子求引性を持つことが明らかとなり、オルトカルボランを用いた光学材料の開発が注目されている。当研究室ではこれまでに、オルトカルボランの炭素部位に π 共役系ユニットを導入することで、溶液状態に比べ固体やフィルムなどの凝集状態で強く発光する凝集誘起型発光(AIE)特性を示すことを見出し⁹⁾、オルトカルボランを用いた固体発光材料の有用性を示した¹⁰⁾。本研究ではPAHにオルトカルボランを導入した化合物を合成し、それらの固体状態における発光特性を評価した。

ピレンは高いモル吸光係数を持ち優れた発光を示す分子である。しかし、固体状態などの凝集状態では濃度消光によって発光強度が大きく減少する。そこでピレンの強い発光を固体状態においても維持するため、AIE特性を示すオルトカルボランをピレンに直接修飾した化合物CBP-H(Fig. 7)を合成した。Fig. 7に固体状態およびTHF溶液中における発光スペクトルを示す。オルトカルボランを修飾することで600 nm周辺に新たにブロードな発光ピークが見られた。この発光は、光励起されたピレンからオルトカルボランへの分子内電荷移動(ICT)発光であることが光学測定及び量子化学計算から明らかとなった。また、固体状態の発光量子収率は非常に高い値を示し($\Phi_{PL}=0.80$)、高効率のAIE特性を示した。

さらに、オルトカルボラン中の隣接炭素上にメチル基及びトリメチルシリル基を修飾した化合物CBP-Me、CBP-

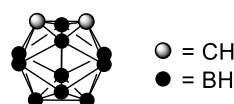


Fig. 6 Structure of *o*-carborane.

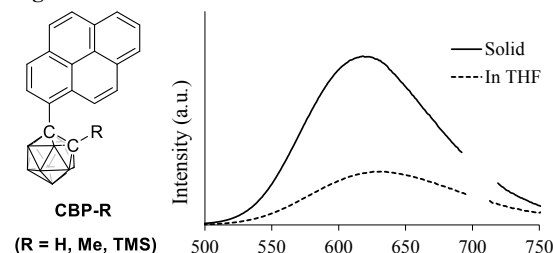


Fig. 7 Structures of CBP-R and PL spectra of CBP-H in solid state and THF (1.0×10^{-5} M).

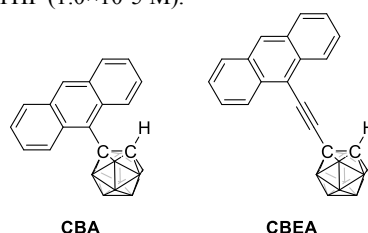


Fig. 8 Structures of CBA and CBEA.

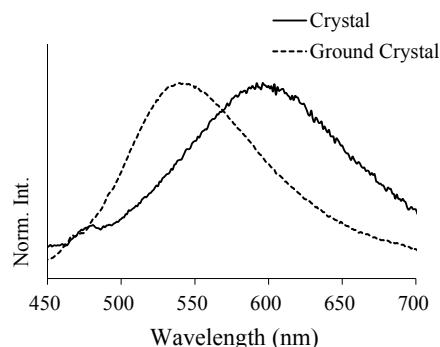


Fig. 9 PL spectra of CBEA in various solid states.

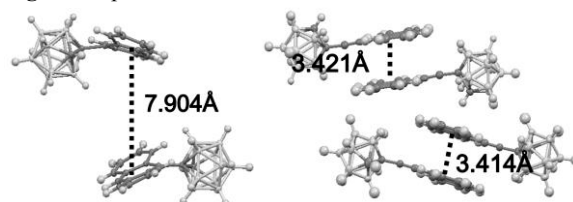


Fig. 10 Intermolecular packing of CBA (left) and (b) CBEA (right).

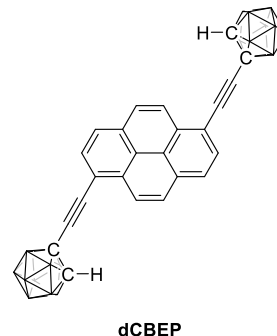


Fig. 11 Chemical structure of dCBEP.

TMS (Fig. 7) を合成した。その結果固体の発光量子収率は99%以上となり、さらなる発光効率の上昇を達成した。これは置換基の嵩高さによってオルトカルボラン部位の回転運動に伴う無放射失活を抑制したことにより起きていると考えられる。このようにオルトカルボランを多環芳香族に直接修飾した化合物は高輝度固体発光を示すという知見が得られた。

オルトカルボランを直接PAHに修飾した化合物は、固体状態で非常に強いICT発光を示すことが明らかとなった。その一方で、この発光は様々な刺激に対して全く発光色変化を起こさなかった。これはオルトカルボランの嵩高い球体構造によって、分子間相互作用が阻害されたためと考えられる。近年オルトカルボランを用いた発光分子の開発が注目されているが、高輝度発光を志向した研究が多くを占めており、刺激応答性など機能性を付与することを目的としたカルボラン誘導体の開発は極めて少ない。そこでPAHのもう一つの特性である π 平面の重なり合いの違いによる発光色変化に着目した。芳香族間の相互作用を促進させるため、アントラセンとオルトカルボランの間にエチニル基をスペーサーとして導入した化合物CBEA (Fig. 8) を合成した。剛直なエチニル基を導入し、アントラセンと嵩高い σ -カルボランとの距離を増大させ、分子内・分子間の立体障害を抑制することで、オルトカルボランの固体発光特性とPAHの刺激応答性を併せ持つ機能性材料の開発に繋がることを期待した。

Fig. 9にCBEAの固体状態における発光スペクトルの結果を示す。結晶状態では590 nm周辺にICT発光が見られ、アントラセンにオルトカルボランが直接結合した化合物CBAと類似の発光特性を示した¹¹⁾。興味深いことに、この結晶を粉砕するとICT発光が消失し、540 nm周辺に新たな発光ピークが出現した。蛍光寿命測定などの光学測定の結果、この発光はアントラセン間の相互作用に由来したエキシマー発光であることが明らかとなった。またXRD測定やDSC測定の結果から、粉砕した結晶はアモルファス状態であることが分かった。以上よりCBEAは結晶状態からアモルファス状態へと相転移することで、ICT発光からエキシマー発光へと異なる発光メカニズムを発現することが示唆された。エキシマー発光の発現に関するメカニズムを考察するために、単結晶X線構造解析を行った。分子間パッキングを比較すると、剛直なエチニル基によって π 共役部位の平面性が向上し、かつアントラセン間の距離が大きく近づいていることが明らかとなった (Fig. 10)。また単位格子を比較すると、CBEAはCBAより充填率が低下しており、疎な構造であることが分かった。これらの結果から、エチニル基を導入することによって、芳香族間の相互作用が生じたこと、分子配置が変化しやすくなったことが、刺激によってエキシマー発光を生じた理由だと推測される。

さらなる知見を得るため、次にピレンの1,6位にエチニル

オルトカルボランを修飾した化合物dCBEPを合成した (Fig. 11)。光学測定の結果、この化合物も刺激応答性を示すことが明らかとなった。結晶状態では640 nmとより長波長側のICT発光を示し、結晶を粉砕したアモルファス状態では540 nmのエキシマー発光を示した。その差は100 nmと非常に大きな発光シフトが見られ、さらに発光量子収率はCBEAに比べ10倍増加し、高輝度かつ高機能性の材料が得られた。

以上、AIE性元素ブロックの環境応答性を増強するという戦略で鋭敏な応答性を持つ機能性発光材料の開発に成功した。これらの物質を用いることでセンシング材料を得ることにつながると期待される。

参考文献

- 1) J. Mei, Y. Hong, J. W. Y. Lam, A. Qin, Y. Tang, B. Z. Tang, *Adv. Mater.* **2014**, 26, 5429–5479.
- 2) R. Yoshii, A. Nagai, K. Tanaka, Y. Chujo, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 4506–4512.
- 3) K. Suenaga, K. Tanaka, Y. Chujo, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 35, 5191–5196.
- 4) G. Li, B. Zhao, C. Kang, Z. Lu, C. Li, H. Dong, W. Hu, H. Wu, Z. Bo, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 10710–10711.
- 5) H. Watanabe, M. Hirose, K. Tanaka, K. Tanaka, Y. Chujo, *Polym. Chem.* **2016**, 7, 3674–3680.
- 6) S. Wang, J. Guo, L. He, H. Wang, J. Zhao, C. Lu, *Syn. Met.* **2013**, 15, 1–8.
- 7) S. Chen, I. A. Guzei, L. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9881–9885.
- 8) M. Tan, A. G. Shtukenberg, S. Zhu, W. Xu, E. Dooryhee, S. M. Nichols, M. D. Ward, B. Kahr, Q. Zhu, *Faraday Discuss.* **2018**, 211, 477–491.
- 9) K. Kokado, Y. Chujo, *Macromolecules* **2009**, 42, 1418–1420.
- 10) K. Nishino, H. Yamamoto, K. Tanaka, Y. Chujo, *Org. Lett.* **2016**, 18, 4064–4067.
- 11) H.; Naito, K.; Nishino, Y.; Morisaki, K.; Tanaka, Y. Chujo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 254–259.

クモ糸研究の現状と展望

Current reviews and perspectives on spider silk and its spinning mechanism

沼田 圭司

Keiji NUMATA

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

Structural protein is one of the key molecules to realize the unique properties and functions of natural tissues and organisms. However, use of structural proteins as structural materials in human life is still challenging. One of the major drawbacks of protein/polypeptide-based materials is their limited synthesis/process method. Our research group is interested in marine purple photosynthetic bacteria as ideal organisms and platforms for production of useful materials to reduce production costs and to contribute sustainable society, because they can utilize sun energy, seawater and carbon dioxide and nitrogen gas in the air for their growth. To establish the fundamental platforms for photosynthetic bacterial technology, we are currently developing peptide-mediated transformation and protein introduction methods for alga and photosynthetic bacteria. These new methodologies will be able to support the high-throughput characterizations for biopolymer productions. Our research group also reported the new finding in spider silk spinning, which is essential to clear the hierarchical structure of spider silk. The scalable and sustainable synthesis method along the clarified structure-function relationship of natural proteins provides a new insight for structural and functional material design of amino acids-based polymers.

1. はじめに

シルク繊維は、シルクと呼ばれる構造タンパク質を主成分とする繊維である。近年では、自然界に存在するシルク繊維だけでなく、人工的に合成・紡糸されたシルク繊維も注目を集めている。古くから、人工的に合成したシルクは研究されてきたが、遺伝子組み換え技術や生物工学的手法の発展に伴い、多くの研究者が自由な発想で研究できる時代となった。自然界に分布するシルクタンパク質は、幅広い生物種が生産する構造タンパク質の一種であり、結晶性のアミノ酸配列と非晶性のアミノ酸配列が交互に存在する一次構造が特徴である1-3)。結晶性の配列は、アラニンを中心としたアミノ酸配列がベータシート構造を形成し、微小な結晶が繊維軸に沿って高度に配向する4)。全ての結晶性配列が結晶化する訳ではない。非晶性の配列はグリシンを多く含み、多様なアミノ酸から構成される。クモやカイコに限らず、多様な生物種がシルクを生産する一方で、そのアミノ酸配列は同一ではない。結晶成分としてベータシート構造を形成する点は類似しているが、アミノ酸配列や物性などは必ずしも同一ではない。

クモの糸は、複数のタンパク質から構成されているが、分子量や含有率が低いタンパク質成分については未解明な点が多い5)。ほとんどのクモは複数種の糸を出すことが知られており、多いものでは物性や組成の異なる7種類の糸を紡ぐ。円網状の巣の枠組みや、命綱として利用される牽引糸は、高いタフネスをはじめとした優れた力学物性を示す。力学物性の歪み速度依存性や、超収縮という水分子との相互作用に関する物性など、特徴的な物性も多い6,7)。牽引糸以外にも、用途に応じて、非晶性のエラストマーのような糸や、エッグケースを構成する結晶性の高い糸など、物性の異なる糸が存在する。

シルクタンパク質の一種であるMajor Ampullate Spidroin (MaSp) は、その鎖状分子の両末端であるN末端構造 (NTD) とC末端構造 (CTD) が分子間の相互作用に寄与することで、糸の形成が進行すると考えられている (Fig.1a)。特に、NTDは紡糸過程のpHの低下により二量化し、CTDはシステインのジスルフィド結合により、分子間の結合を誘起すると考えられている。一方で、N末端とC末端の間に存在する、結晶領域 (結晶化した硬い領域＝ベータシート構造) と非晶領域 (結晶化していない軟らかい領域) の繰り返し配列 (Repetitive domain) は、分子量で考えるとMaSpの大部分を占め、繊維中の結晶化や分子配向に寄与する8,9)。牽引糸は複数のMaSpにより構成されており、いくつかのタンパク質が関与しているかは、世界的にも議論の最中である。現状、少なくともMaSp1とMaSp2の二種類は広く承認されており、そのアミノ酸配列の違いから、異なる物性に寄与していると考えられている (Fig.1b)。

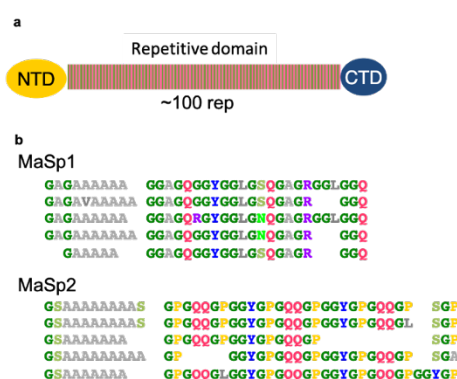


Fig. 1 (a) Schematic illustrations of the domain structure of Major Ampullate Spidroin (MaSp). (b) Typical amino acid sequences of MaSp1 and MaSp2.

クモ糸の階層構造や、その紡糸機構を明らかにし、実用的な構造材料や新規繊維素材へと応用しようという試みは、古くから行われてきた。しかし、科学的に明らかにされていない素材を模倣もしくは開発することは容易ではない。実際、天然の牽引糸が示す強度と伸びを兼ね備えた高タフネスな素材は開発されておらず、紡糸機構を理解せずに、合成繊維の技術をベースとしてシルクタンパク質を繊維化するだけでは不十分なのだろう。シルクタンパク質が元来有する機能を活かさなくては、物性の発現に必要とされる階層構造が形成できない。MaSpは多様なクモの種において確認されているが、その構造と物性への寄与は、直接的には明らかになっていない。特に、タフネスに代表される力学物性を決定している主たる要因は、実験的に証明されておらず、生物学だけでなく、材料化学においても興味深い研究テーマの一つになっている。このような状況のもと、シルクタンパク質MaSpが本来有する生化学的特性を理解し、利活用することができれば、強度と伸びを兼ね備えた高タフネスな構造タンパク質材料の創出に繋がり、既存の研究例とは一線を画す独自性を示すことができる。

2. 階層構造

我々の研究グループは、クモの牽引糸を構成する主成分であるMaSpの自己組織化挙動、特に、クモ糸の階層構造の形成過程を明らかにすることを目指して研究を進めた。クモ糸が形成される過程を解明することは、人工的なクモ糸の創出だけでなく、高温高压条件や有機溶剤を使わない、環境低負荷型の加工プロセスの実現に向けても、非常に重要である。ジョロウグモの牽引糸に含まれる主要なシルク

タンパク質MaSpの中でも、MaSp2は親水性が比較的高い。MaSp2は、ジグルタミン配列（グルタミンが二つ連続した配列）およびプロリンが周期的に存在するため、水への感受性が高く、水溶性も高い傾向がある7)。そこで、MaSp2の配列を用いたMaSpを遺伝子組換え大腸菌により調製した。対照実験の試料として、NTDまたはCTDを欠損させた、さらには両方を欠損させたMaSpも調製し、NTDとCTDの機能を解析した8)。中性のpH条件において、MaSpにリン酸カリウムを一定濃度以上添加したところ、白濁する様子が確認された。白濁したサンプルは、動的な融合を行っている0.1~10マイクロメートルサイズの不均一な無数の球状液滴が存在する液液相分離（LLPS）の状態であることが確認できた。また、pHの低下に応じて（酸性条件で）NTDが二量体化することで、微小な繊維（マイクロフィブリル）が網目状に形成されることも確認された（Fig.2）。

対照実験として、NTD、CTD、もしくはその両方を欠損させたMaSpを同様の条件により自己組織化を誘起させたところ、LLPSにはCTDと繰り返し配列が必要であり、繊維化による網目構造の形成にはNTDと繰り返し配列が必要であることが明らかとなった。蛍光退色後回復測定、レオロジー解析、ラマン分光法などの測定結果から、中性から弱酸性条件においてCTDと繰り返し配列の存在により、分子間相互作用が誘起され、LLPSが生じることが明らかとなった。さらに、LLPSを経て形成されたマイクロフィブリルの網目構造に剪断応力を加えることで、繊維化を試みた結果、マイクロフィブリルが束状に集まった階層構造が形成された。この際の二次構造変化を追従したところ、剪断応力により繊維化する過程ではなく、その後の脱水の過程で

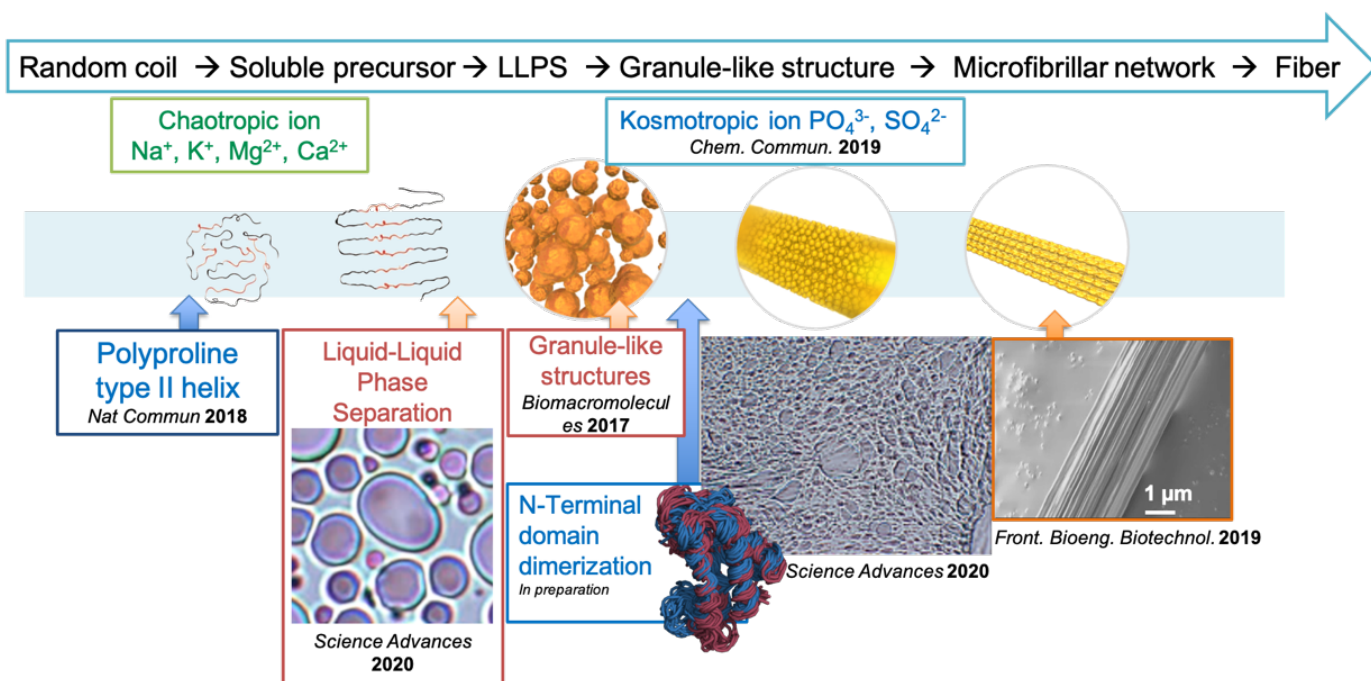


Fig. 2 Schematic illustrations of the domain structure of Major Ampullate Spidroin (MaSp).

ベータシート構造が形成されていることが示唆された。天然のクモ牽引糸が形成するマイクロフィブリルの束状構造と同様に、マイクロフィブリルが束状になった構造がLLPSを経由して調製された糸試料において確認された。このように、LLPSを経由し、MaSpの自己組織化を利用することで、マイクロフィブリルが束状に繊維化した階層構造を再現することに、世界に先駆けて成功した8)。

3. Silkomeとマテリアルインフォマティクス

クモ糸は高い強度とタフネスを示す天然繊維であり、既存の石油由来高分子材料に代わるバイオ素材として注目を集めている。クモの種類やクモ糸を構成するタンパク質の違いによって幅広い物性を示すことから、人工的に合成したクモ糸は次世代の高強度構造材料をはじめ、さまざまな用途への展開が期待されている。しかし、天然のクモ糸タンパク質の種類やアミノ酸配列がどのような物性を与えるのかは完全には解明されていなかった。複数の種類があるクモ糸の中で特に高いタフネスを示す牽引糸のタンパク質について、アミノ酸配列と物性の関係について調べた報告はあるものの限定的であり、材料物性を制御した人工クモ糸材料を合理的に設計するには、天然クモ糸の構造と物性の相関に関する包括的な知見が必要であった。

我々は、世界中に分布しているさまざまな種類のクモを集め、多様なクモ糸タンパク質の構造と物性についてデータベースを構築することにより、得られたデータを総合的に解析することを目指した。クモの分布が世界中に拡散しているため、国際共同研究グループを構築し、アジアやアメリカ、ヨーロッパなど世界の各地域に生息する1,000種以

上のさまざまなクモを採集した後、それぞれのクモの細胞からRNAを抽出し、クモ糸に含まれるクモ糸タンパク質の種類やアミノ酸配列などの遺伝子情報を解析した。また、それぞれのクモから採取した牽引糸について、力学物性（引張強度、破壊のび、タフネス、ヤング率）や熱分解性、糸の直径・形態など12種類の物性等を測定した。採集したクモは系統的に分類され、RNAによる遺伝子情報（RNA塩基配列とアミノ酸配列と物性データ）とをひも付けることでデータベースを作成し、公開した（Fig. 3）12)。

これまでにアミノ酸配列が明らかにされているクモ糸タンパク質は52種のクモに由来し、タンパク質の種類も限定的だったが、今回のデータベースはそれをはるかに上回る種類のクモからクモ糸タンパク質のデータを取得することに成功した。これは世界で初めて網羅的にクモ糸タンパク質の構造とクモ糸の物性を組み合わせたデータであり、「Spider Silkome Database」として公開している。学術研究者に限らず、誰でも利用可能であり、マテリアルインフォマティクスなど多様な用途に応用することができる。

我々は手始めに、作成したデータベースを用いて、クモ糸タンパク質のアミノ酸配列と力学物性の相関について調べた。まず、クモ糸の物性について解析したところ、クモ牽引糸のタフネスはクモの種類によって幅広いレンジの数値をとることが示された（Fig. 3a）。また、クモ糸を構成するタンパク質の種類に着目すると、牽引糸を構成するMaSpタンパク質の種類により、タフネスの値に有意な差が得られ、MaSpタンパク質のサブタイプがクモ糸のタフネスに大きく寄与していることが示唆された。

さらに、MaSpタンパク質に含まれるいくつかのアミノ酸

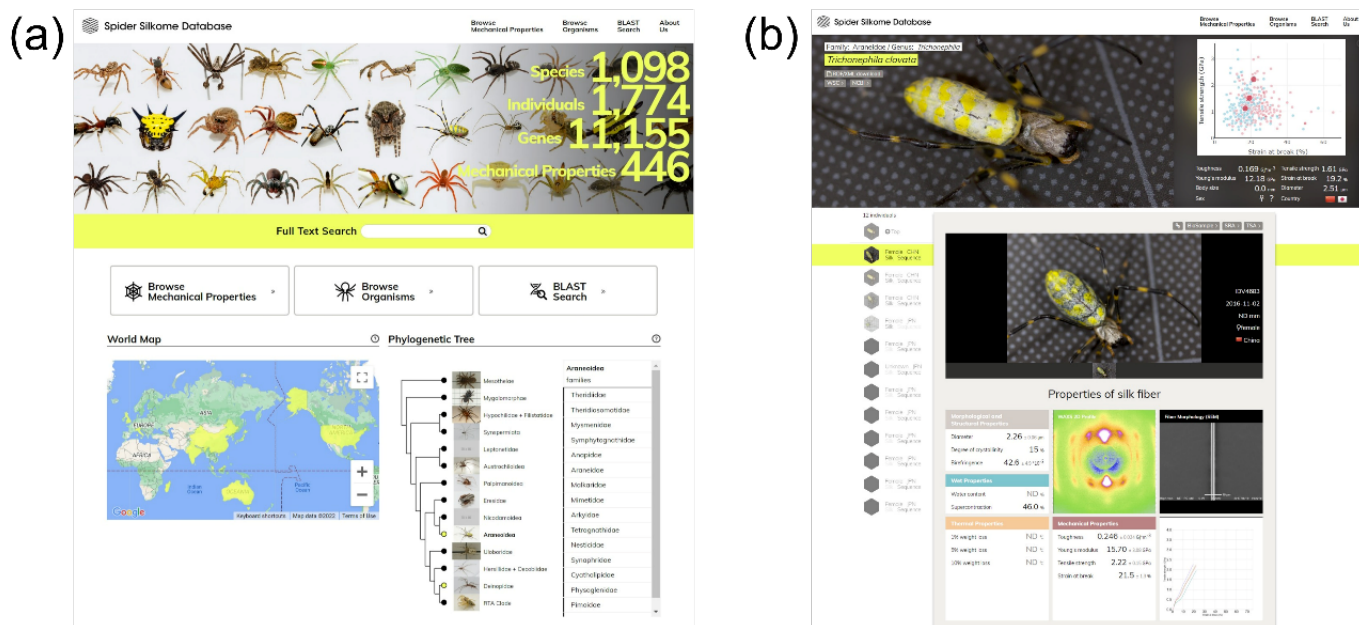


Fig. 3 Silkome database. (a) The top page of Silkome website. (b) One of the spider pages shows the information of spider and the mechanical, physical, and biological properties in addition to the sequence information of spider silk.

モチーフがタフネスなどの物性に強く相関することが明らかになった。特にMaSpタンパク質に含まれる特定のアミノ酸モチーフが、タフネスの値と正の相関があることが示され、今後の分子設計にとって重要な指針となる (Fig. 3b)。

6. 最後に

本研究では、水溶性とpH応答性に優れたクモ糸シルクタンパク質MaSpを利用した、一連の研究成果により、天然のクモ糸に非常に類似した紡糸機構を再現すると共に、クモ糸の形成機構におけるLLPSの重要性を明らかにすることに成功した。クモ糸に限らず、シルクタンパク質の研究において、pHとある一定のイオン種に応答して自己集合するシルクタンパク質が、LLPSを形成することを世界に先駆けて報告した。分子論的には、上述のようにCTDと繰り返し配列の相互作用を中心に相分離が誘起され、NTDがpHの低下に応答して二量体化し、さらには、繰り返し配列がせん断応力と脱水に呼応してベータシート構造を形成する機構が明らかとなった。本稿では、クモの糸の例を示したが、繊維状タンパク質から構成される生物素材や繊維素材は、非常に魅力的な物性を示す例が多い。天然のタンパク質素材の分子機構や階層構造を明らかにし、材料設計に活かすという戦略が更に広がることを期待している。

クモ糸シルクのような構造タンパク質を生合成するために、さまざまな宿主細胞を利用した手法が提案されている。今後は、光合成生物を利用した環境低負荷型の合成系が求められるため、宿主生物の改変技術も同時に研究開発を進めている13-16)。

本研究の後半で紹介したSilkomeデータベースは、既存の研究手法を大きく変える可能性のある成果である。具体的には、世界各地域の1,000種を超えるクモからクモ糸タンパク質のアミノ酸配列とクモ糸の力学物性のデータを集めることでデータベースを作成した。このデータから、クモ糸の持つ高いタフネスに寄与するアミノ酸モチーフを同定することに成功した。これらの知見に基づいて、今後アミノ酸配列から物性を予測した合理的な分子設計をすることで、自在に人工クモ糸材料を創製できるものと期待できる。

謝辞

本研究は、革新的研究開発推進プログラム (ImPACT) 「超高機能構造タンパク質による素材産業革命 (プログラム・マネージャー: 鈴木隆領、研究課題責任者: 沼田圭司)」、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業ERATO 「沼田オルガネラ反応クラスタープロジェクト (研究総括: 沼田圭司)」、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業学術変革領域研究 (B) 「高分子材料と高分子鎖の精密分解科学 (領域代表者: 沼田圭司)」、文部科学省デ

ータ創出・活用型マテリアル研究開発プロジェクトFSおよび本格型拠点 (研究代表者: 沼田圭司)、JST COI-NEXT共創の場 ゼロカーボンバイオ産業創出による資源循環共創拠点 (プロジェクトリーダー: 沼田圭司)、京都大学創立125周年記念ファンド【くすのき・125】による支援を受けて行われました。この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- 1) K. Numata. Biopolymer science for proteins and peptides. 1st Edition. Elsevier, 2021. ISBN: 9780128205556
- 2) C. Holland, K. Numata, J. Rnjak-Kovacina, P. Seib. *Adv. Healthcare Mater.*, 1800465 (2019).
- 3) K. Numata. *Polym. J.*, **52**, 1043 (2020).
- 4) K. Numata, R. Sato, K. Yazawa, T. Hikima, H. Masunaga. *Polymer*, **77**, 87-94 (2015).
- 5) N. Kono, H. Nakamura, M. Mori, Y. Yoshida, R. Ohtoshi, D. A. Pedrazzoli Moran, M. Tomita, K. Numata, K. Arakawa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 118 (31) e2107065118, (2021).
- 6) K. Yazawa, A. D. Malay, H. Masunaga, Y. Norma-Rashid, K. Numata. *Commun. Mater.*, **1**:10 (2020).
- 7) A. D. Malay, K. Arakawa, K. Numata. *Plos One*, **12**(8), e0183397 (2017).
- 8) A. D. Malay T. Suzuki, T. Katashima, N. Kono, K. Arakawa, K. Numata. *Sci. Adv.*, **6**, 45, eabb6030 (2020).
- 9) N. A. Oktaviani, A. Matsugami, A. D. Malay, F. Hayashi, D. L. Kaplan, K. Numata. *Nat. Commun.* **9**, 2121 (2018).
- 10) N. A. Oktaviani, A. Matsugami, F. Hayashi, K. Numata. *Chem. Commun.* **55**, 9761 (2019).
- 11) H. Sogawa, K. Nakano, A. Tateishi, K. Tajima, K. Numata. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**:231, (2020).
- 12) K. Arakawa et al. *Science Advances*, **8**, eabo6043, (2022).
- 13) T. Miyamoto et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **61**, e202204234, (2022).
- 14) S. Law et al. *Nature Communications*, **13**, 2417, (2022).
- 15) C. Thagun, et al. *ACS Nano*, **16**, 3, 3506–3521, (2022).
- 16) C. Thagun et al. *Advanced Science*, **6**(23), 1902064, (2019).

高分子ソフト材料の動的き裂の解析

Analysis of Moving Crack in Polymer Soft Materials

浦山 健治・Mai Thanh Tam

Kenji Urayama, Thanh Tam Mai

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

We investigate (1) the subsonic-to-supershear crack transition, (2) the effect of strain-induced crystallization (SIC) on crack propagation, and (3) the stationary crack under various types of biaxial strain, for the rubbers. Regarding (1) and (2), we employed a Mode-I geometry in which a wide-width specimen was uniaxially stretched to a target elongation (λ), and then the crack was initiated from the sidewall of the specimen. The steady-state growth velocity of crack (V), and the crack-tip properties such as crack-tip opening displacement and strain singularity were investigated as a function of λ . For (3), a sample sheet having an initial notch with a control length was subjected to various types of biaxial strain, and the crack-tip properties were investigated as a function of imposed biaxial strain.

1. はじめに

近年、ゴムやゲルなどの高分子ソフト材料の強靱化が様々なアプローチによって試みられている。強靱性の尺度として、き裂の進展に対する耐性は重要である。き裂の進展は材料の主要な破壊形態のひとつであり、発生したき裂が系全体に進展すると材料の破壊に至る。き裂進展に対する耐性を向上させる材料設計の指針の確立のためには、き裂の進展メカニズムを明らかにすることは重要である。材料のき裂特性を扱う破壊力学の歴史は長い、大変形や粘弾性を示す高分子ソフト材料のき裂特性は複雑であり、金属やガラスなどのハードマテリアルと比べると、不明な点が依然として多く残されている。一方で、近年の測定技術の進歩により、高速で進展するき裂についても多角的な特性化が可能になり、当該の研究分野は新たな局面を迎えている。

我々は、破壊力学でモードIとよばれるき裂の開口様式に着目し、ゴムやゲルで進展するモードIき裂の特性を高速カメラ観察とデジタル画像相関法 (Digital Image Correlation; DIC法) によって明確化する研究を行なっている[1]。本講演では、(1) ゴムのせん断波速度 (横波の音速) を超える高速で進展するき裂[2], (2) ゴムのき裂の進展に及ぼすひずみ誘起結晶化の効果[3], (3) 二軸伸長されたゴム・ゲルの静止き裂[4], についての最近の研究結果について述べる。

2. 測定法

本研究で用いるモードIき裂の進展挙動の測定の模式図をFig. 1に示す[1]。幅(x)180mm/高さ(y)20mm/厚さ(z)1mmの幅広形状のゴム試料に、y方向に一定の伸び(λ)を与えて保持した状態で、試料側面からき裂を挿入し、自走するき裂を高速カメラで観察する。また、一定の伸び λ を与えた状態で、試料表面にスペックルパターンとよばれるランダムな模様を塗布しておく。画像解析により、そのパターンの

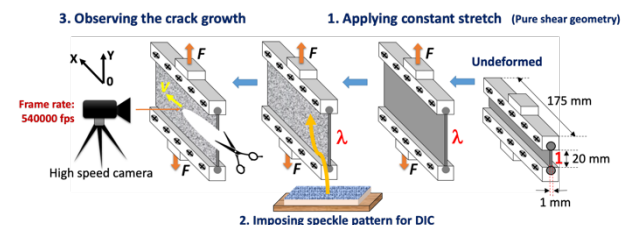


Fig. 1. Schematic for the experimental setup for crack-growth observation.

2次元の変位情報から、き裂によって生じた2次元のひずみテンソルを得ることができる。他の二方向に比べて試料の厚さは十分に薄いため、平面ひずみ条件とみなすことができ、厚さ方向の影響は無視して解析できる。また、試料幅は十分に長いため、試料中心部の100mm程度の領域ではき裂の進展速度は位置に依存せず、定常状態の進展過程となることを確認している。

λ を変数として、き裂の定常状態の進展速度(V)、き裂の開口度(CTOD)、き裂によって生じたひずみ場の面積(A_{yy})、ひずみ特異性指数(α)などを評価することができる。

3. 結果と考察

(1) き裂進展速度の亜音速-超音速転移[2]

図2にカーボンブラックフィラー(体積分率17%)を充填した加硫スチレンブタジエンゴムの V の λ 依存性を示す。1が増加するにつれて、 V は増加し、 $\lambda=4$ では V は60m/s (～240km/h)に達している。図中に、このゴムのせん断波速度 (横波の音速) C_s を示す。一般的に、未変形状態の材料の C_s はせん断弾性率と密度の比の平方根として得られる。ここではゴムは伸長されており、伸長された状態の C_s を用いる必要がある。非線形弾性率を考慮した理論[5]を用いて伸長状態の C_s を計算しているが、図からわかるように、 C_s の λ 依存性はそれほど大きくなく、おおよそ一定とみなすことができる。

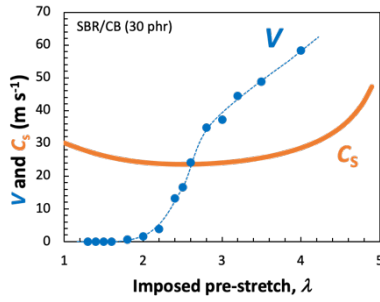


Fig. 2. Steady-state velocity of crack growth as a function of imposed pre-stretch for a CB filled SBR. The λ dependence of shear wave speed is also shown.

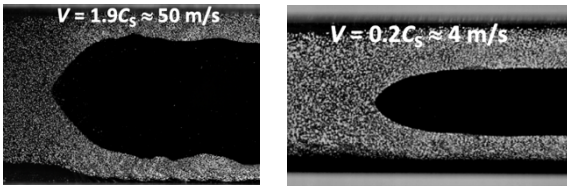


Fig. 3. Snapshots of (Left) super-shear and (Right) subsonic cracks.

$V < C_s$ (亜音速域) と $V > C_s$ (超音速域) では、き裂の進展機構が大きく異なることがわかった。 $V < C_s$ では、き裂は直線的に進展し、き裂はおおよそ放物線形で近似できる形状である。 V が C_s を超えると、き裂は振動波を伴いながら進展し、き裂の先端は尖った形状をもつようになる (Fig. 3)。両者のき裂の進展の違いは、文献2のSupporting Informationの動画でより明確に確認できる。

き裂によって生じた y 方向のひずみの増分 $\Delta\epsilon_{yy}$ に着目し、 $\Delta\epsilon_{yy}$ が 2% 以上であるひずみ領域の面積 A_{yy} を評価した。Fig. 4 に A_{yy} の V 依存性を示す。 $V < C_s$ では、 A_{yy} は V とともにゆるやかに増加する傾向があるが、 V が C_s を超えると A_{yy} は V の増加とともに急激に減少している。これは、超音速域では、高速になるほど、き裂によるひずみが生じなくなることを意味している。

$\Delta\epsilon_{yy}$ はき裂の先端に近づくにつれ急激に増加し、その挙動はひずみ特異性とよばれる。き裂先端を原点とし、 $y=0$ の軸上の $\Delta\epsilon_{yy}$ の先端からの距離 (r_x) 依存性を Fig. 5a に示す。 $\Delta\epsilon_{yy}$ のき裂先端近傍での増大挙動は、 $\Delta\epsilon_{yy} \sim r_x^{-\alpha}$ のべき乗則のべき指数で表すことができる。Fig. 5b に α の V 依存性を示す。 $V < C_s$ では α は約 1.5 であり V にほとんど依存しない。しかし、 V が C_s を超えると、 α は V とともに急激に増加する。

以上のように、 V が C_s を超えると、衝撃波が発生し、き裂発生前に入力したひずみエネルギーが、ゴムの変形よりも衝撃波の伝播に消費されていることがわかる。言い換えると、超音速域で進展するき裂では、材料が応答する時間が十分になく、材料特性よりも衝撃波による慣性力の効果が支配的になる。このように、超音速域のき裂の進展は、材料の力学特性が色濃く反映される亜音速域[1]とは物理が全く異なっている。超音速域のき裂進展の機構の解明につ

いて、今後の進展が期待される。

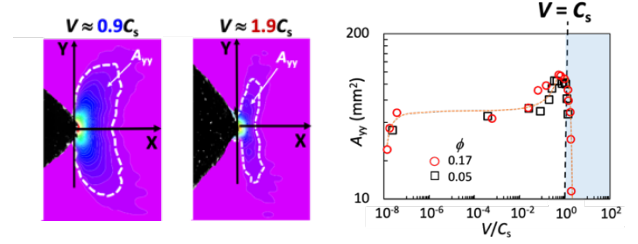


Fig. 4. Area of finite strain caused by the crack growth (A_{yy}) as a function of λ .

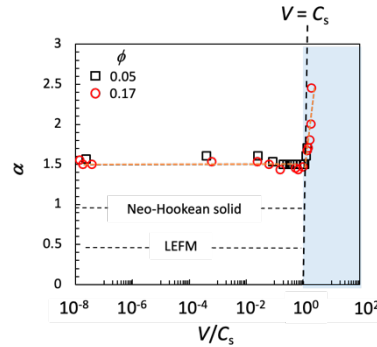
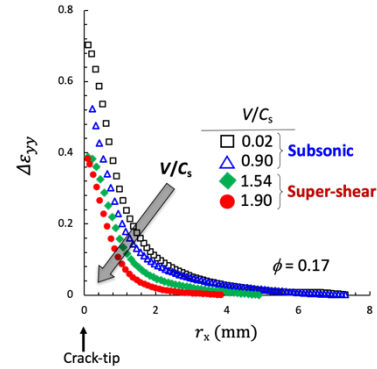


Fig. 5. (Top) Strain increment caused by crack growth as a function of the distance from the crack-tip (r_x) at $y = 0$. (Bottom) Strain singularity exponent as a function of crack growth velocity.

(2) ゴムのき裂進展に及ぼすひずみ誘起結晶化の効果[3]

天然ゴムに代表される cis-1,4 ポリイソプレンの架橋ゴムは十分な大きさの伸長を与えると、結晶化が生じることが知られている[6]。このひずみ誘起結晶化 (Strain Induced Crystallization; SIC) は、同時にひずみ硬化挙動を生じる自己補強効果をもつため、SIC 性ゴムは非 SIC 性ゴムとは一線を画した優れた力学特性を有している。特に、静止き裂では、大きなひずみが生じる先端で SIC が生じ、き裂の進展を抑制することが知られている。一方で、進展するき裂に対する SIC の効果はよくわかっていない。

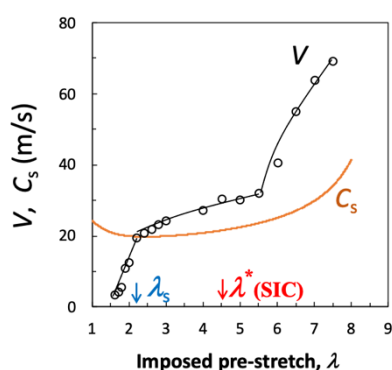


Fig. 6. Steady-state velocity of crack growth as a function of imposed pre-stretch for a synthetic cis-1,4-polyisoprene rubber. The λ dependence of shear wave speed is also shown. λ^* denotes the onset stretch for SIC.

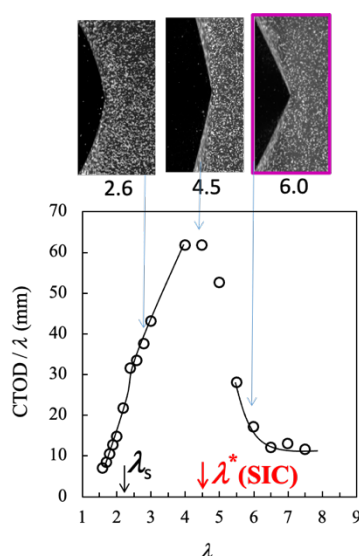


Fig. 7. Crack tip opening displacement (CTOD) as a function of imposed stretch. λ^* denotes the onset stretch for SIC.

Fig. 1と同様の実験を、SIC性ゴムである合成イソプレンゴムを試料として行った。広角X線散乱測定により、この伸長条件で、 $\lambda^* = 4.5$ 付近でSICが生じることを確認している。すなわち、 $\lambda > \lambda^*$ の場合、き裂を挿入する前からゴムマトリックスでSICが生じている。

Fig. 6に V の λ 依存性を示す。図から明らかなように、2種の屈曲点がみられる。 $\lambda = 2.5$ 付近の屈曲点は、前項で述べた亜音速-超音速転移に由来するものである。高伸長側にみられる屈曲点は λ^* 付近で生じており、SICに由来している。 λ^* を超えると、 V の λ 依存性は強くなっており、SICによってひずみ硬化が生じているゴムマトリックスでは、 V が加速されることがわかる。

Fig. 7に、き裂の開き度 (CTOD) の λ 依存性を示す。き

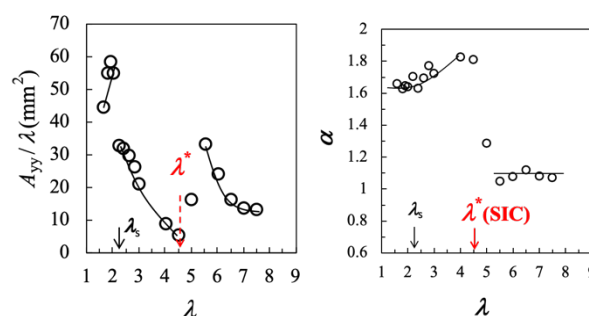


Fig. 8. (Left) Area of finite strain caused by crack growth and (Right) strain singularity exponent as a function of imposed stretch. λ^* denotes the onset stretch for SIC.

裂挿入前に加えた伸長 (λ) の効果を考慮するために、CTODを λ で割ったものを縦軸量としている。図中の写真からもわかるように、 $\lambda < \lambda^*$ の領域ではCTODは λ とともに大きくなる。しかし、 λ が λ^* を超え、SICが生じるとCTODは不連続的に減少し、 λ とともに低下する傾向に転じる。

Fig. 8にそれぞれ、 A_{yy} および α の λ 依存性を示す。これらの特性値についても λ^* を境に不連続的な変化がみられる。 A_{yy} は λ^* を超えると不連続的に増加し、 α は非晶状態では1.7前後で一定あるのに対してSICが生じると不連続的に1.0付近に減少する。このように、ゴムマトリックスにSICが生じると、進展するき裂の特性が大きく変化することがわかった。 λ^* でSICが生じると、結晶化度は λ とともに0から連続的に増加していく。しかし、進展するき裂の種々の特性値は、 λ^* 付近もしくはそれよりもやや大きな λ 付近で不連続的な大きな変化を示している。この結果は、これらのき裂の特性値の変化は結晶化度のみでは単純に解釈できないことを示している。SICがある程度進行し、巨視的な力学物性に影響しはじめる結晶化度の閾値が存在するようにみえる。

(3) 二軸伸長されたゴムの静止き裂の特性[4]

これまでゴムのき裂の特性は、あらかじめ切り欠きを入れた試料に対して一軸伸長、あるいはFig. 7のような平面伸長下で調べられてきた。破壊力学では、き裂の進展に際して失われるエネルギー、ひずみエネルギー解放率 G が重要なパラメータとなり、一軸伸長と平面伸長ではそれぞれ G の表式が導かれている[7]。一方で、複雑なひずみ状態下のき裂特性についてはほとんど調べられていない。ゴム製品が複雑なひずみ下で使用されることを考えても、様々なひずみ下でのき裂の特性を調べることは重要である。

我々は、様々なひずみの組み合わせが可能な二軸伸長装置を用いて、切り欠き入りのシート状ゴム試料のき裂特性を様々なひずみ状態で調べた。用いた伸長モードは、平面伸長(PE)、ひずみ比が2:1の非均等二軸伸長(UB)、均等二軸

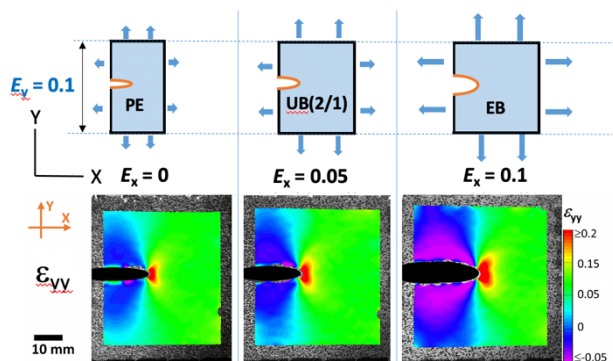


Fig. 9. Crack-tip strain field of ε_{yy} under planar (PE), unequal biaxial (UB), and equibiaxial (EB) stretching compared at the same degree of imposed strain in the y-direction ($E_y = 0.1$) for a PDMA gel.

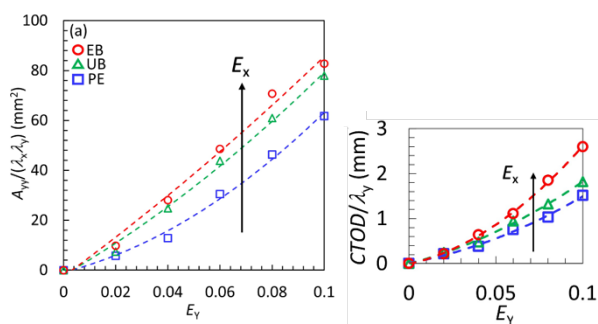


Fig. 10. (Left) Area of finite strain caused by crack growth and (Right) crack tip opening displacement as functions of imposed nominal strains in the x- and y-directions.

伸長(EB)の3種であり、き裂が進展する直前までの静止き裂の特性に着目した。

Fig. 9に、切り欠き入りのポリジメチルアクリアミドゲル試料が、y方向に10%のひずみをうけた状態の3種の伸長モード下のy方向のひずみの分布の比較を示す。x方向のひずみは、平面伸長ではゼロ、非均等二軸伸長では5%、均等二軸伸長では10%である。明らかに、き裂先端近傍のひずみ分布は伸長モードに依存して異なっており、x方向のひずみの効果、すなわち二軸ひずみの効果をうけていることがわかる。

Fig. 10に、 A_{wp} およびCTODについて、各方向のひずみ E_y および E_x の依存性を示す。き裂の各特性値は E_y だけでなく E_x の影響をうけており、同じ E_y で比べると E_x が大きいほど大きいことがわかる。

各伸長モードの様々なひずみ状態におけるひずみエネルギー解放率 G を、 E_y と E_x を変数として別の測定から求めた。 G は様々な切り欠き長をもつ試料の荷重-変位曲線の解析、および各変形モードでき裂が進展して破断した残存試料片が受けているひずみエネルギーとの差分からの計算、

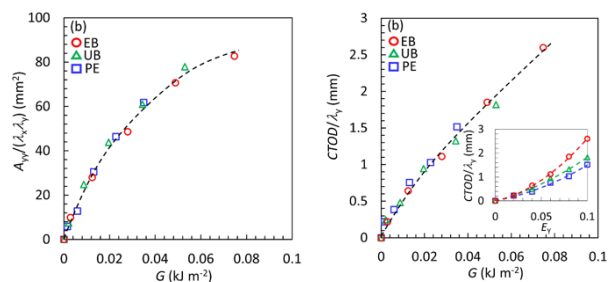


Fig. 11. (Left) Area of finite strain caused by crack growth and (Right) crack tip opening displacement as a function of energy release rate (G).

の2つの方法で求め、それぞれの方法で求めた G の値が誤差範囲内で一致することを確認した。

Fig. 10の各特性値のデータを G を変数として、プロットした結果をFig. 11に示す。図からわかるように、 G を変数とすると、様々なひずみ状態のデータが1本のマスター曲線で表せることがわかる。これは、様々な二軸ひずみ状態のき裂特性はそのひずみ状態のひずみエネルギー解放率 G に支配されていることを明確に示している。この結果は、 G を支配変数とする破壊力学の基本原則と合致しており、当然の帰結ともいえるが、実証した実験はこれまでなかった。この知見によって、複雑なひずみ場でのき裂特性の予測やシミュレーションにおいて、当該のひずみ場での G の重要性が明確化された。

謝辞

SICのき裂進展への効果は、京都工芸繊維大学の角崎輔氏、櫻井伸一教授のグループとの共同研究の成果であり、ここに感謝いたします。ゴム試料の提供ならびに結果に対する討論について、(株)ブリヂストンの角田克彦博士に感謝いたします。JST-CREST「ナノ力学」の研究支援に感謝いたします。

参考文献

- 1) T.-T. Mai, Y. Morishita, K. Tsunoda, K. Urayama, *Adv. Polym. Sci.*, **289**, 239-272 (2021).
- 2) T.-T. Mai, K. Okuno, K. Tsunoda, K. Urayama, *ACS Macro Lett.*, **9**, 762-768 (2020).
- 3) R. Osumi, T. Yasui, R. Tanaka, T.-T. Mai, H. Takagi, N. Shimizu, K. Tsunoda, S. Sakurai, K. Urayama, *ACS Macro Lett.*, **11**, 747-752 (2022).
- 4) T.-T. Mai, K. Urayama, *Macromolecules*, **54**, 4792-4801 (2021).
- 5) L. A. Mihai, A. Goriely, A., *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, **473**, 20170607 (2017),.
- 6) J. R. Katz, *Naturwissen- schaften*, **13**, 410-416 (1925)
- 7) A. G. Thomas, *Rubber Chem. Technol.*, **67**, 50-67 (1994).

ゴム充填系の補強効果における粒径依存性について

Particle Size Dependence in Reinforcing Effects of Rubber Filling Systems

竹中 幹人・狩谷 柊・熊川 大幹・渡辺 幸

仲村 快太・中西 洋平・井上 正志・浦川 理

Mikihito TAKENAKA¹⁾, Shu KARITANI²⁾, Daiki KUMAGAWA²⁾, Yuki WATANABE²⁾

Kaita NAKAMURA²⁾, Yohei NAKAMURA¹⁾, Tadashi INOUE³⁾, Osamu URAKAWA³⁾

¹⁾Institute for Chemical Research, Kyoto University

²⁾Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

³⁾Department of Macromolecular Science, Graduate School of Science, Osaka University

The effects of the particle size on the reinforcement of the fillers in vulcanized poly(styrene-co-butadiene) (SBR) at glassy region. In the case of SBR/ carbon black (CB) with smaller CB, the voids in the aggregations increases the volume fraction in SBR/CB particles so that the enhancement of the modulus become stronger than the prediction of the Eshelby/Mori-Tanaka model. On the other hand, the enhancement of SBR/CB with larger CB particles agrees with the theory because the voids working as filler does not exit. The enhancement of SBR/Silica obeys the theory though Silica particles forms aggregation. This is because the silica particles forms branch structures with mass-fractal and the voids are not formed in aggregations.

1. 「講演集」原稿のご執筆にあたって

ゴムは、シリカやカーボンブラック(CB)などを充填剤として混ぜた後に加硫をすることで、その力学的特性を向上させており、充填剤を加えることによってゴムの引張強さ、引裂強さなどが向上されることは、充填剤の「補強効果」として知られている。この補強効果はゴム弾性領域では充填材の粒径が小さいほど大きくなることが知られている。しかし、ガラス転移や転移領域における補強効果における粒径の効果はあまり明確にされてこなかった。タイヤの転がり抵抗等においては、タイヤ・トレッドと路面との間で実際に生じる変形が大きなせん断変形と、それに直交する高振動数の微小振動(30℃、104kHz)での粘弾性特性が重要となる^{1,2)}。そのため、ガラス領域、転移領域での粘弾性特性もタイヤの性能向上において重要となってくる。本研究では、充填剤のガラス領域における補強効果の粒径依存性を、よく用いられているCBおよびシリカにおいて明らかにすることを目的とした。

2. 原稿作成と送付について

サンプルとしては、スチレンブタジエン共重合体(SBR)/CBおよびSBR/Si充填系を用いた。SBRはSBR1502である。また用いたCBとしてはN220(平均粒径 \bar{D} =21.0nm)、N330(\bar{D} =30.7nm) N660(\bar{D} =62.8nm)、#8(\bar{D} =1.20×10²nm)、N990(\bar{D} =2.46×10²nm)、SiとしてはNipsil AQ(\bar{D} =1.6×10 nm)を用いた。SBR/CBにおいては硫黄(1.5phr)、亜鉛華(3.0phr)、ステアリン酸(2.0phr)、加硫促進剤(2.0phr)を配合した。各CBの充填量は、5.0~90phrである。また、SBR/Siにおいては硫黄(1.4phr)、亜鉛華(3.0phr)、ステアリン酸(2.0phr)、加硫促進剤(CBS:2.0phr, DPG:1.5phr)、シランカップリング剤(8.0phr)配合した。Siの充填量は20~40phrである。バンバリ

ーミキサーで硫黄と加硫促進剤を除く材料を混合し、二軸ロールにて硫黄と加硫促進剤を混合した。加硫は170℃にて20分行った。

引張振動粘弾性測定により線形動的弾性率を測定した。動的粘弾性測定装置DVA-220を用いて、正弦ひずみを一定温度で周波数0.25Hzから63Hzまで変化させ、測定温度を-60~70℃の間で、約5℃刻みに測定を行うステップ昇温で測定を行った。線型性をチェックしてひずみは0.005とした。

ガラス領域における高分子鎖のダイナミックスの不均一性をパルスNMRにより調べた。ソリッドエコー法により得られたFIDをワイブル関数によりフィティングすることによりスピン-スピン緩和時間と分率を求めた。

3. 結果と考察

図1にN330とN990の時間温度換算則を用いて作成した貯蔵弾性率 E' と損失弾性率 E'' のマスターカーブである。N330においては E' は、どの周波数領域においても充填量の増加に伴い大きくなるが、ゴム弾性領域がガラス領域より上昇が顕著である。 E'' も E' と同様に充填量の増加に伴って上昇しているが、ガラス転移領域の緩和ピークが低周波数側に広がり、ブロードになっていくことも観測される。これは、CB近傍においてCB表面に吸着されたSBRの層(バウンドラバー層)が存在し、拘束されたSBRがマトリックス部分よりもガラス転移温度が高くなることによって、ガラス転移温度に分布ができるためと考えられる。N990においても同様に E' はおおよび E'' が充填量の増加に伴い大きくなるが、その増加量はN330ほど大きくない。また、ガラス転移領域の緩和ピークのブロードニングは観測されず、バウンドラバー層があまり存在しないことが確認される。このブロードニングの違いは、これは、粒径が大きくなるに

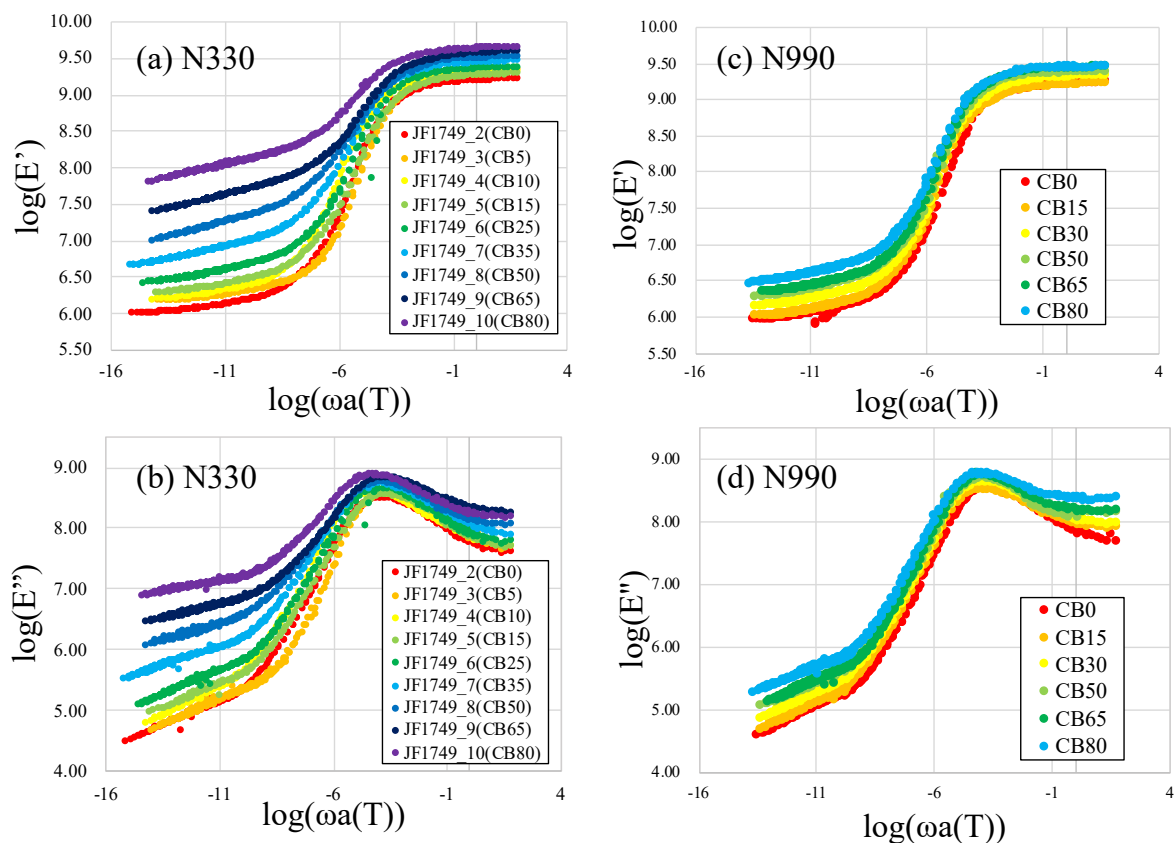


Figure 1 Effects of PHR of CB on the viscoelasticity for N330(a) (b) and N990(c)(d). XX in CB XX stands PHR of CB. The reference temperature is -60°C .

従い比表面積が減少するためと考えられる。

大阪大学の井上正志先生らは、充填剤の補強効果を、次式によって示されるEshelby/森-田中理論から導いた次式と比較している³⁾。

$$E_{\text{fil}}^* = \frac{1 + 1.5M^*\phi}{1 - M^*\phi} E_{\text{unfil}}^* \quad (1)$$

ここで E_{fil}^* はフィラー込みの、 E_{unfil}^* はフィラー未充填のものの動的弾性率を表す。また、 ϕ はフィラーの体積分率である。

M^* は次式で表され、フィラーとマトリックスの組み合わせで決まる値である。

$$M^* = \frac{2E_F^* - 3E_{\text{unfil}}^*}{3E_{\text{unfil}}^* + 2E_F^*} \quad (2)$$

E_F^* はフィラーの動的弾性率を表し、CBとSBRでは $E_F^* \gg E_{\text{unfil}}^*$ となり $M^* \cong 1$ となる。よって

$$E_{\text{fil}}^* = \frac{1 + 1.5\phi}{1 - \phi} E_{\text{unfil}}^* \quad (3)$$

となる。これを展開すると

$$E_{\text{fil}}^* = E_{\text{unfil}}^* (1 + 2.5\phi + 2.5\phi^2 + 2.5\phi^3 + \dots) \quad (4)$$

となり、高い体積分率においてGuth-Goldに式より弱い依

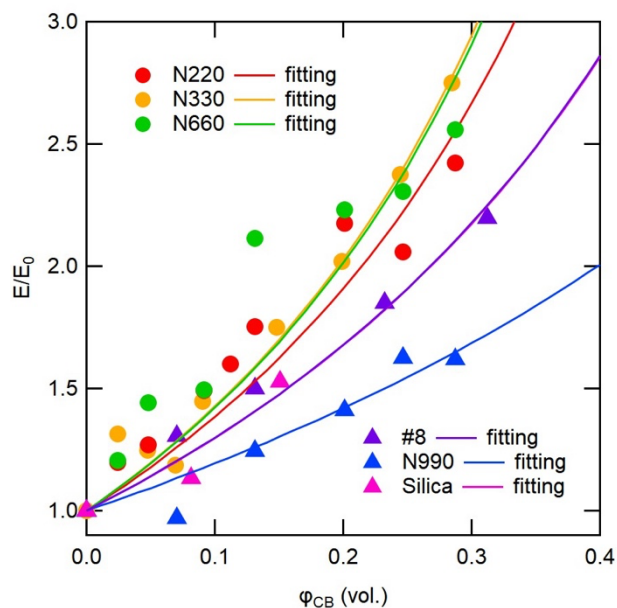


Figure 2 Changes of $E'_{\text{fil}}/E'_{\text{unfil}}$ with volume fraction of CB.

存性を示すことになる。そこで、まずガラス領域の -60°C におけるCBの補強効果の粒子依存性を調べた。ガラス領域においてはバウンドラバーの効果は無視できると考えられ、CBの体積分率が補強効果に直接現れるはずである。そこで、まずこのバウンドラバーの効果が無視できるかについてパルスNMRによるスピン-スピン緩和時間を調べた。緩和関数 $M(t)$ を2つのワイブル関数

$$\frac{M(t)}{M(0)} = F_{SS} \exp \left[\left(t/T_{2,SS} \right)^{WSS} \right] + F_{SL} \exp \left[\left(t/T_{2,SL} \right)^{WSL} \right] \quad (5)$$

にてフィッティングした。ここで F_{SS} 、 $T_{2,SS}$ 、 WSS はそれぞれ速い成分の分率、緩和時間、ワイブル定数であり、 F_{SL} 、 $T_{2,SL}$ 、 WSL はそれぞれ遅い成分の分率、緩和時間、ワイブル定数である。フィッティングの結果、緩和はほぼ100%速いガラス成分のみで表されており、測定条件においてはSBRマトリックスは動的に均一と考えられ、バウンドラバーの影響はないと考えられる。

図2に充填系の E' (E'_{fil})を未充填の E' (E'_{unfil})にて規格化した $E'_{\text{fil}}/E'_{\text{unfil}}$ のCBおよびSiの体積依存性を示す。図中に式(3)で計算される補強効果を破線により示している。図を見ると大粒径のN990、#8およびSiにおいてはほぼ理論に従っているが、小粒径のN220、N330、N660においては理論より大きな補強効果が得られている。ガラス領域においては、バウンドラバーの効果がないにも関わらず、小粒子において理論より強い補強効果が得られている理由としてeffectiveな体積分率が増加していると考えた。そこで、(3)式においてeffectiveな体積を $\alpha\phi$ とした場合のCBおよびSiの結果を

$$\frac{E'_{\text{fil}}}{E'_{\text{unfil}}} = \frac{1 + 1.5\alpha\phi}{1 - \alpha\phi} \quad (6)$$

によりフィッティングを行い α を求めた。その結果をTable 1に示す。この値を見てわかるように小粒径の場合は α は1以上となり、effectiveな体積分率が大きいことがわかる。ここで体積分率が小粒径において増えている理由としては2つの可能性が考えられる。1つは小粒径における凝集体中の空隙がeffectiveな体積を増加させているという可能性である。今までの散乱実験において、N330等においてCB粒子が凝集体を組んでいることが明らかにされている。球形の粒子において最密充填した場合において空隙を含めた体積分率は球の1.35倍となる。当然、空隙部分（充填系ではオクルードラバー部分）は変形しないので粒子と考えることで（この仮定は少し疑問である）、effectiveな体積が増えているのではと考えられる。

2つ目の可能性としては、凝集体の形状の異方性があるということである。ここで使われている式は充填剤は休憩

Filler	α
N220	1.33
N330	1.46
N660	1.44
#8	1.07
N990	0.78
Silica	1.06

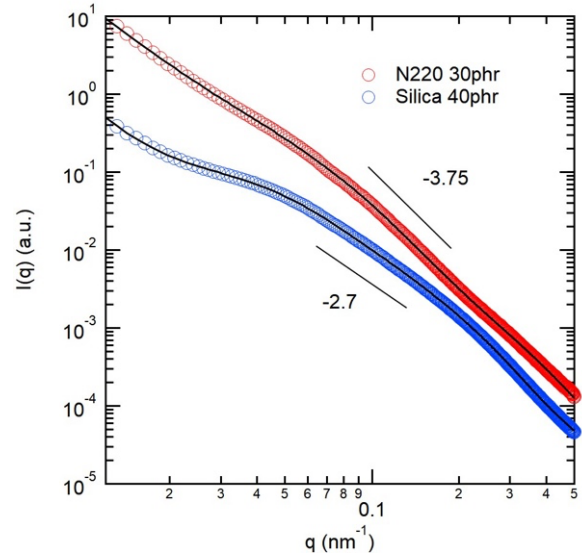


Figure 3 USAXS profiles of Si(40phr)/SBR and N220 (30phr)/SBR

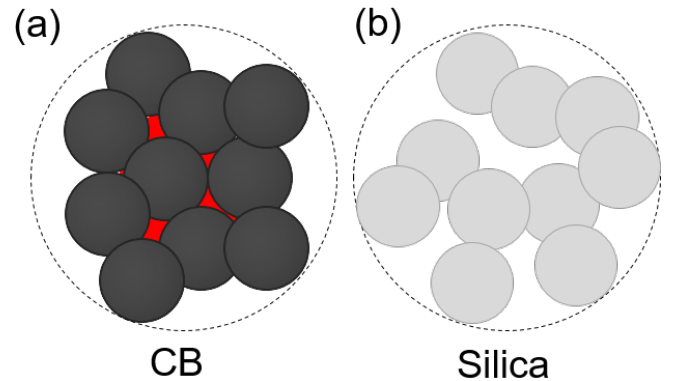


Figure 4 Schematic pictures of the aggregation of CB and Silica. (30phr)/SBR

であることを仮定しており、楕円体等の異方性を持つと体積効果が強くと考えられる。これについては、TEM像の画像解析等によって明らかにする必要がある。

それから、Siの結果をみると、Nipsil AQの粒径は16nmであり、CBのN220程度の大きさであるにも関わらず、理論によくあっている。これはまだデータ点が少ないので確定的ではないが、シリカとCBでは補強効果が違うようにみえる。このシリカにおいては凝集体を形成しており、なぜ凝集体を形成しているにも関わらず、CBのような補強効果が得られないのかが興味深い。そこで、構造的に何か違うのかを明らかにするために、USAXS法によって得られた散乱関数を比較することにした。

Figure 3はN220/SBRとSi/SBRのUSAXS関数である。どちらにおいても $q=0.06\text{nm}^{-1}$ 付近にショルダーが観測され、凝集体を形成しているのがわかる。しかし、ショルダーの後の傾きがCBでは-3.75となっているのにも関わらず、Siでは-2.7となっている。この結果が示すのは、CBは表面フラクタルとなり、凝集体が粒子同士が密に詰まっている状態をとり、その表面フラクタルを示しているのに対して、シリカはマスフラクタルとなり、凝集体が多岐的な構造になっていると考えられる。

よってシリカの場合には凝集体中のゴムがオクルードラバーになっておらず、effectiveな体積を増加させないのではと考えられる。このイメージを描いたものをFigure 4に示す。

4. まとめ

SBR/CBおよびSBR/Siのガラス状態の線形粘弾性における補強効果について研究を行った。小粒径CBでは理論よりも強い補強効果が見られ、大粒径CBでは理論に従った補強効果が見られた。Siでは小粒径にも関わらず、補強効果は理論に従っていた。小粒径CBではオクルードラバーがeffectiveな体積となって補強効果に寄与すること。それに対してSiでは凝集体の構造の違いからオクルードラバーとして働かないため、理論に従っていると考えられる。転移領域からは話が複雑になってくるのでどうすべきかにはよくわからない。転移領域に関しては、バウンドラバーがさらにeffectiveに体積増加につながって、ガラス状態とは異なる依存性を示すはずである。ここらあたりから時間温度換算則が厳密には成り立たなくなるとか、色々と面倒な問題が出てくる。ゴム状領域に関しては凝集体の拡散過程が関わってくるので話の取り扱いがますます面倒である。

謝辞

本研究は、大阪大学の井上先生にはレオロジー測定で大変にお世話になりました。また、パルスNMR測定では岡山県工業技術センターの岩薮仁博士にお世話になりました。暑く御礼を申し上げます。また、横浜ゴム株式会社網野直也博士および国立研究開発法人産業技術総合研究所長谷

朝博博士にはSBR/CBサンプルの準備をしていただきました。暑く御礼を申し上げます。また、この実験においては本研究の一部はフロンティアソフトマター開発専用ビームライン(FSBL)産学連合体プロジェクトにおいて行われました。(課題番号:2019A7218, 2019B7267)

参考文献

- 1) 五十野善信(2009)「高分子複合材料の粘弾性評価」
- 2) Hess, W. M.; McDonald, G. C.; *Rubber Chem. Technol.*, **56**, 892.(1983)
- 3) Tadashi Inoue, Yoshinori Narihisa, Takuya Katashima, Satoshi Kawasaki, and Toshio Tada: *Macromolecules*, **50**, 8072-8082(2017)

自己組織化ナノゲルDDSを用いたワクチン開発

Development of vaccine using self-assembled nanogel DDS

秋吉 一成・澤田晋一・佐々木 善浩

Kazunari AKIYOSHI, Shin-ichi SAWADA, Yoshihiro SASAKI

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

In the development of next-generation vaccines, it is important to develop drug delivery system (DDS) technology that selectively delivers antigens and adjuvants to antigen-presenting cells and other immune-related cells to efficiently activate the immune system. We have developed a self-assembled nanogel DDS based on hydrophobized polysaccharides with molecular chaperone functions. Subcutaneous administration of a cancer antigen protein/peptide complexed nanogel vaccine is useful for cancer treatment by induction of killer T cells. We also developed intranasal vaccine using cationic nanogel containing a pathogen antigens for preventive vaccines against infectious diseases and lifestyle-related diseases. Recently, the development of a COVID-19 protein vaccine using nanogel DDS is also underway.

1. はじめに

近年、生理活性タンパク質、抗体、核酸、細胞外小胞エクソソームなどの様々なバイオ医薬品が注目され、その中でバイオ医薬品のドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術開発が重要な課題の一つとなっている。コロナパンデミックにおいて、大きな貢献を果たしているCOVID-19 mRNAワクチンにおいては、体内で容易に分解されやすいmRNAを安定に製材化し、筋肉注射したのちに細胞に取り込まれ、細胞質内のタンパク質合成装置に効率よく組み込まれて目的タンパク質を発現させるという高度なデリバリーシステムが用いられている。この目的を達成させるために、カチオン性脂質とmRNAとの複合体形成、さらに、リン脂質とポリエチレングリコール (PEG) 脂質との混合によるリポソーム様の集合体形成という、いわゆる自己組織化現象を利用したナノ微粒子設計が行われている。

このような分子、高分子の自己組織化によるナノ組織体の形成は、生命現象に見られる普遍的な原理であり、高分子科学の分野でも、この原理を利用したバイオインスパイアードナノ材料が様々設計されている。我々は、生体分子システムを規範としたナノゲル工学、プロテオリポソーム工学、そして細胞外小胞エクソソーム工学を駆使して、種々のバイオ医薬品や分子マーカーの徐放制御や選択的輸送を行える機能性ナノ微粒子 (バイオナノトランスポーター) (ナノゲル^{1, 2)}, 高分子ベシクル³⁾, プロテオリポソーム⁴⁾, エクソソーム⁵⁾) の創製とそのバイオ、医療応用に関する研究を展開してきた。

その中で、両親媒性高分子の一つの形態であるグラフト化水溶性高分子 (会合性高分子) が、水中で自己組織化することでナノサイズのゲル (ナノゲル) を形成することを世界に先駆けて報告した。興味深いことに、自己組織化ナノゲルは、主に疎水的な駆動力によりタンパク質をナノネットワーク内に取り込む現象を見出した。また、ナノゲル

を崩壊させるシクロデキストリンの添加や過剰の他のタンパク質存在下における交換反応などの外部刺激により、取り込まれたタンパク質は、天然状態タンパク質として放出し得るという人工分子シャペロン機能を有することが分かった。¹⁾

我々は、分子シャペロン機能 (タンパク質の凝集を防ぎ、そのフォールディングを助ける機能) はタンパク質の簡便な製剤化とDDSナノキャリア設計にブレイクスルーをもたらす概念であることを提唱した。²⁾ 特に、ワクチン抗原DDSとしての有用性を実証してきたので、その成果を紹介する。

2. ワクチンDDSの開発

インフルエンザワクチンやCOVID-19ワクチンなどの様々な感染症ワクチンが開発されている。また、免疫系を活性化して、がん細胞を排除する様な新規ながんワクチン治療研究も続けられている。ワクチンは、一般に病原体が持つタンパク質抗原、あるいはタンパク質の設計図であるDNAやmRNAを外部からあらかじめ投与することで、病原体に対する効率的な免疫応答を誘導して予防や治療を行うものである。近年の分子生物学の進歩により、免疫系の様々な仕組みが解明されている。また、薬学、高分子科学の進歩により、ドラッグデリバリーシステム研究も大きく発展し、それに伴って、抗原デリバリーの様々な戦略が可能となりつつある。

ワクチン開発においては、抗原の種類と免疫系を活性化するアジュバント (不完全フロイントアジュバント、自然免疫系 (Toll-like 受容体) を活性化するアゴニスト)、さらに、抗原提示細胞に抗原を輸送し、取り込まれた抗原の細胞内でのプロセッシング過程を制御するDDSが重要である。

3. がんワクチンの開発

我々は1998年、三重大学医学部珠玖教授との共同研究により、コレステロール置換プルラン多糖 (CHP) からなる自己組織化ナノゲルを用いた新規な治療用がんワクチン（皮下投与型ナノゲルがんワクチン治療法）を世界に先駆けて報告した。⁶⁾ 動物実験を経て、2000年に入って臨床治験も行われ、珠玖教授らによるベンチャーの起業も含め精力的な研究が続けられている。自己組織化ナノゲルは分子シャペロン機能を有する日本独自の抗原DDSである（図1）。このナノゲルDDSの特徴は、抗原タンパク質の包接安定化（製材化）、皮下投与によるリンパ節抗原提示細胞への抗原デリバリー機能、そして、細胞内取り込み後の抗原提示機能制御（MHC クラスI提示）により、高いキラーT細胞誘

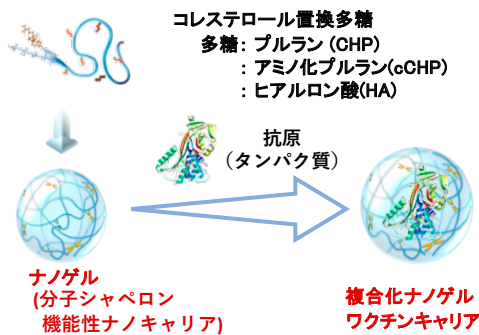


図1 ナノゲルDDSワクチン開発

導による抗腫瘍効果の増強などが挙げられる。⁷⁾

第二世代として抗原タンパク質の代わりに、合成可能な長鎖ペプチド抗原が設計され、適切なアジュバントの組み合わせで高い抗腫瘍効果が得られている。⁸⁾ また、本庶教授により見出されたチェックポイント抗体によるがん治療法とがんワクチンを併用することで、さらに高い抗腫瘍効果も動物実験では認められている。⁹⁾

一方で、チェックポイント抗体でも効果が得られないがん症例も数多く報告されている。我々は、動物モデルを用いて、がん組織に存在する免疫細胞の一種「腫瘍関連マクロファージ（通称TAM）」が不活性化状態にあり抗原提示機能を発揮していないことが、がんが免疫チェックポイント阻害薬に抵抗性になる原因の一つである可能性を明らかにした。⁸⁾ さらに、ナノゲルDDSを用いて人工がん抗原ペプチド（攻撃対象であるがん細胞の識別情報）を腫瘍関連マクロファージに選択的に送達し、その抗原提示機能を人為的に誘発したところ、がん内部が炎症性環境になり、免疫療法に抵抗性であったがんを感受性に変換できることを発見した（図2）。

免疫チェックポイント阻害薬を初めとする免疫療法が一部のがんで目覚ましい治療成績を挙げているが、多くのがんは抵抗性であると言われており、抵抗性の原因究明と解決策が強く求められている。本研究のナノゲルを用いた

腫瘍関連マクロファージの機能制御技術を用いて、免疫療法抵抗性のがんの治療成績の向上を実現できる可能性が期待される。¹⁰⁾

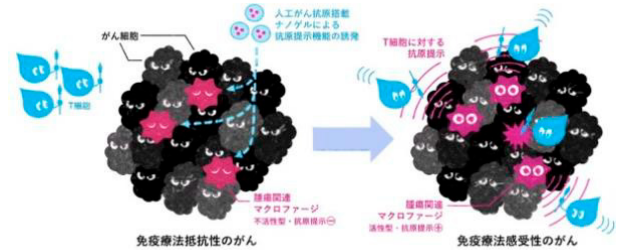


図2 ナノゲルDDSによる免疫療法に感受性のがんに変換

4. 経皮投与型粘膜ワクチンの開発

一般的な筋肉注射、皮下注射によるワクチンの投与と違って、鼻からの噴霧による経鼻粘膜ワクチンが注目されている。外界病原体と直接触れる粘膜組織には、全身免疫システムとは異なる独自の免疫システムが働いている。例えば、皮下投与では、全身系の免疫が活性化され、一般によく知られているIgG抗体産生が誘導され、ウイルスの中和による防御機構が働く。一方で、粘膜投与の場合には、IgG抗体だけではなく、さらに、粘膜近傍で分泌され、粘膜経由で感染するような病原体を排除することができるIgA（二量体抗体）と呼ばれる特別な抗体が産生される（図3）。また、粘膜ワクチンは、注射器を用いたこれまでのワクチン投与に比べ非侵襲的かつ簡便であり、医療廃棄物削減など社会的なメリットも大きい。

一般に、経鼻ワクチン投与では、消化酵素などによる分解から抗原を保護しつつ、外界から粘膜バリアを通過して、粘膜関連リンパ組織（mucosa-associated lymphoid tissue: MALT）に到達させる必要があり、粘膜免疫系を活性化するのは容易ではなかった。

我々は、粘膜免疫を専門とする清野教授（東大医科研、現千葉大）との共同研究を2005年頃から開始した。当時は、粘膜ワクチンとして効果的な免疫応答を誘導するために粘膜アジュバントとして無毒化したコレラ毒素等が用い

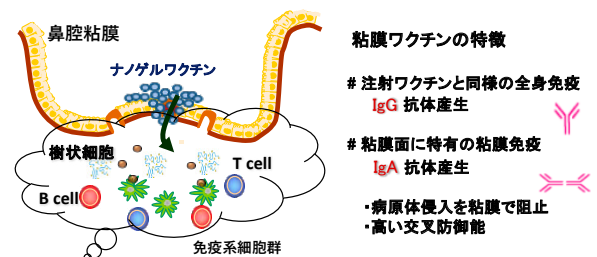


図3 経鼻粘膜ワクチン開発

られていたが、効率や脳への影響など課題が残されていた。まず、CHPナノゲルを用いたワクチンによる実験を行ったが、粘膜の透過が十分に達成できず大きな効果は得られなかった。しかし、CHPナノゲルよりも細胞内デリバリー機能が優れているカチオン性基を導入したCHP (cCHP) ナノゲルを用いたところ、アジュバントを必要としない優れた新規経鼻ワクチンとして機能することを見いだした。¹¹⁾

この手法の実用化を目指して、これまで課題もあった肺炎を引き起こす原因となる肺炎球菌の予防ワクチンに着目し、肺炎球菌表面タンパク質 (PspA) をcCHPナノゲルに内包させた汎用性に高いワクチン開発研究が行われた。このワクチンをマウスおよびサルに経鼻投与したところ、複合体は鼻腔粘膜上に長時間保持され徐々に透過して、粘膜下の免疫系を活性化して、PspA特異的なIgGおよびIgAが効率的に産生された。結果として、肺炎球菌感染に対する防御機能が高まることを見出された。^{12, 13)} 2016年に清野教授らによってベンチャー企業も設立され、ナノゲル経鼻ワクチンシステムの実用化を目指した研究が続けられている。

これら感染症に加えて、cCHPナノゲルを用いた経鼻ワクチンが肥満や高血圧などの生活習慣病にも適用できることが示された(畔上博士(慶應大学)、清野教授との共同研究)。¹⁴⁾ 食物摂取を刺激しエネルギー消費を減少させるホルモンであるグレリンに対するIgG抗体を産生させることで、グレリン量を減少させてマウスの肥満予防効果が認められた。また、血圧上昇作用を持つタンパク質 (AT₁R) に対する経鼻ワクチンにより、AT₁Rの量を減らすことでマウスの高血圧発症の抑制が確認された。¹⁵⁾ 生活習慣病ワクチンというユニークな次世代ワクチンの開発が期待される。

5. COVID-19タンパク質ワクチンの開発

COVID-19mRNAワクチンは、優れたワクチン効果が認められているものの、副作用や製剤保存上(低温での保存)の課題などがある。また、日本発のワクチンがいまだ開発されていないのも、経済上、国防上などにおいても大きな問題である。これらの課題を解決し得るタンパク質ワクチンの開発も進められている。

我々は、これまでのCHPナノゲルのがんワクチンの知見を生かして、ウイルススパイクタンパク質を抗原とした新規COVID-19タンパク質ワクチンの開発を進めている(愛知県がん研村岡博士、東大モイ教授、UI社との共同研究)。また、CHPナノゲルのみならず、ヒアルロン酸を基盤多糖としたコレステロール置換ヒアルロン酸ナノゲルを用いたCOVID-19タンパク質ワクチンの有効性も明らかになってきた(島根大浦野教授、三重大珠玖教授、旭化成との共同研究)。ヒアルロン酸ナノゲルは、アニオン性多糖であるヒアルロン酸を基盤としたもので、その水溶性の高さから導入するコレステロール基の数を増加することができ、

様々な特性を有する製剤化が可能であることが特徴である(図4)。¹⁶⁾ 一方、経鼻投与による従来にないCOVID-19タンパク質ワクチンの開発も進められつつあり(現千葉大清野教授、シオノギ製薬)、その成果が期待される。

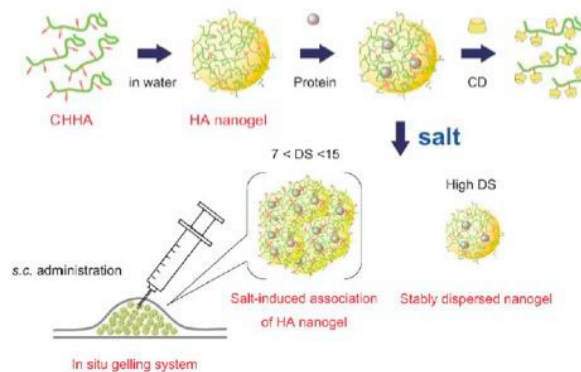


図4 ヒアルロン酸ナノゲルの特性
DS:100多糖あたりの導入量

6. 最後に

我々の開発した自己組織化ナノゲルは、ワクチンDDSのみならず、様々なサイトカインなどの封入、徐放も可能であり、ナノゲルを集積したナノゲル架橋ゲル材料を作成することで、再生医療様ゲルマテリアルとして有用であることも報告している。²⁾ また、自己組織化ナノゲルと細胞外小胞エクソソームとの複合化による機能制御、¹⁷⁾ 鉄ナノ微粒子との複合化による磁気誘導DDSの開発¹⁸⁾ など、様々な材料とのハイブリッド化による新規バイオマテリアル研究が進んでいる。

参考文献

- 1) Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *The Chemical Record* **2010**, 10, 366.
- 2) Y. Hashimoto, *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, 23, 1800729.
- 3) T. Nishimura et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 154.
- 4) M. Ando et al., *Adv. Sci.* **2018**, 5, 1800824.
- 5) N. Seo et al., *Nat. Commun.* **2018**, 9, 435.
- 6) X-G. Gu et al., *Cancer Res.* **1998**, 58, 3385.
- 7) Y. Tahara, K. Akiyoshi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, 95, 65.
- 8) D. Muraoka et al., *J. Clinical Investigation* **2019**, 129, 1278.
- 9) R. Miura et al., *RSC Advance* **2020**, 10, 8074.
- 10) D. Muraoka et al., *J. Controlled Release* **2022**, 347, 175.
- 11) T. Nochi et al., *Nature Materials* **2010**, 9, 572.
- 12) Y. Fukuyama et al., *Mucosal Immunol.* **2015**, 8, 1144.
- 13) Y. Yuki et al., *Mol. Pharmaceutics* **2021**, 18, 1582.
- 14) T. Azegami et al., *Mucosal Immunol.* **2017**, 10, 1351.
- 15) T. Azegami et al., *J. Hypertens.* **2018**, 36, 387.
- 16) T. Nakai et al., *Macromol. Bioscience* **2012**, 12, 475.
- 17) S. Sawada et al., *Biomater Sci.*, **2020**, 8, 619–630.
- 18) R. Mizuta, *Bioconjug Chem.*, **2019**, 30, 2150–2155.

両親媒性共重合体のセルフソーティングの分子機構

The molecular mechanism of self-sorting of amphiphilic copolymers

古賀 毅・佐藤 菜美

Tsuyoshi KOGA, Nami SATO

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

Amphiphilic copolymers with hydrophilic and hydrophobic chains induce self-recognition and self-assembly into the most thermodynamically stable micelles comprising hydrophobic cores and hydrophilic surfaces in water. When copolymers with different contents or chain length of hydrophobic chains are mixed, the copolymers recognize chains with identical content or identical length, and preciously self-assemble into thermodynamically stable micelles, which is known as self-sorting. We study the molecular mechanism of the self-sorting phenomena by using all-atom molecular dynamics simulation methods.

1. はじめに

疎水性と親水性の側鎖を有する両親媒性共重合体は水中で疎水性側鎖の長さや組成といった疎水基のわずかな違いを認識して自己集合し、疎水性のコアが親水基で覆われた均一なサイズのみセルを形成することが実験的に示されている^{1)–3)}。この現象はセルフソーティングとして知られているが、その分子論的機構は未だ説明されていない。そこで本研究では、セルフソーティングの分子論的機構を説明することを目的として、全原子分子動力学 (MD) シミュレーションによる研究を行った。実験では多分子系の溶液が用いられているが、分子内ミセルでも同じような挙動を示すと考えられるので、分子内ミセル形成を対象としてシミュレーションを行い、そのセルフソーティングの分子機構を考察した。

2. 方法

本研究では、水分子を陽に考慮した検討を行うために、実験^{1)–3)}と同様の分子構造・条件での全原子 MD シミュレーションを行った。具体的には、親水性 PEG を側鎖に持つ親水性メタクリレート (PEGMA) と疎水性アルキルメタクリレートの共重合体 (疎水基としてドデシル基をもつ

PEGMADMA、ブチル基をもつ PEGMABMA) を用い、疎水基分率はそれぞれ 1/3 と 2/3 とした。重合度も実験に合わせて PEGMADMA は 57 量体、PEGMABMA は 102 量体とした。高分子に対する力場として GAFF 力場を用い、部分電荷として RESP 電荷を用いた。また、水のモデルとして TIP4P を用いた。MD シミュレーションは、Gromacs2020.4 を用いて行った。尚、エネルギーと長さの単位はそれぞれ kJ/mol と nm である。

3. 結果と考察

3-1. ミセル形成

まず、それぞれの両親媒性高分子鎖のミセル形成について検討した。図 1 に PEGMADMA の慣性半径の時間変化を示している。黒線が高分子鎖全体、赤が PEGMA、緑が DMA のみの慣性半径を示している。初期に疎水基である DMA の慣性半径が急激に減少し、300ns 程度でもう一度減少が起きている。一方親水鎖 PEGMA の慣性半径には大きな変化はない。

この挙動から疎水基が凝集したミセルが形成していると考えられる。実際にスナップショット (図 2) を見ると、疎水鎖が凝集したコアが親水鎖のコロナによって覆

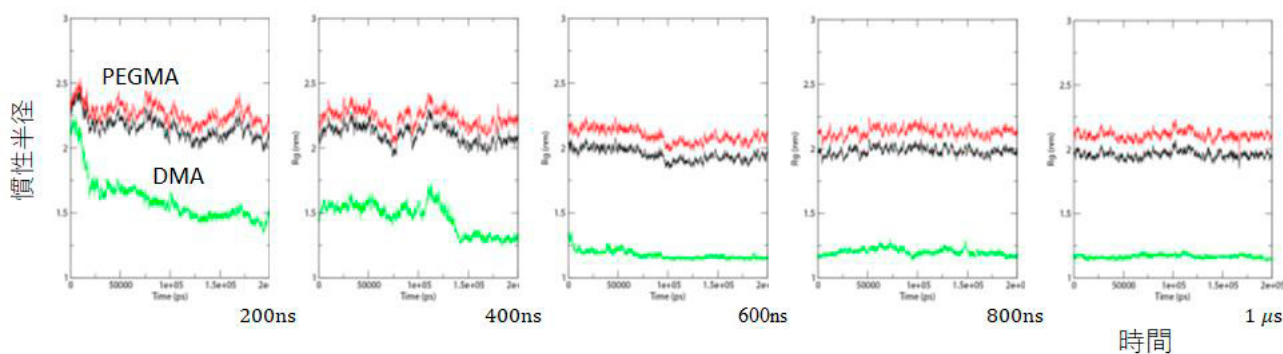


Fig. 1 Time dependence of the radius of gyration of a PEGMADMA chain. The radius of gyration of the whole PEGMADMA chain, PEGMA and DMA groups are shown by black, red, and green lines, respectively.

われたきれいなコア・シェル構造のミセルを形成していることが確認できる。図 2 (a) では、水分子も含めたスナップショットを、図 2 (b) にはミセル構造が見やすいように高分子のみのスナップショットを示している。

ミセル構造の更に定量的な解析を行うために、高分子鎖の重心からのモノマーの数密度分布を計算した (図 2 (c))。この図から、疎水鎖が重心付近に集まり、その周りに親水鎖が分布していることが分かる。水分子はコア領域から排除され、水の数密度は親水鎖のコロナ領域

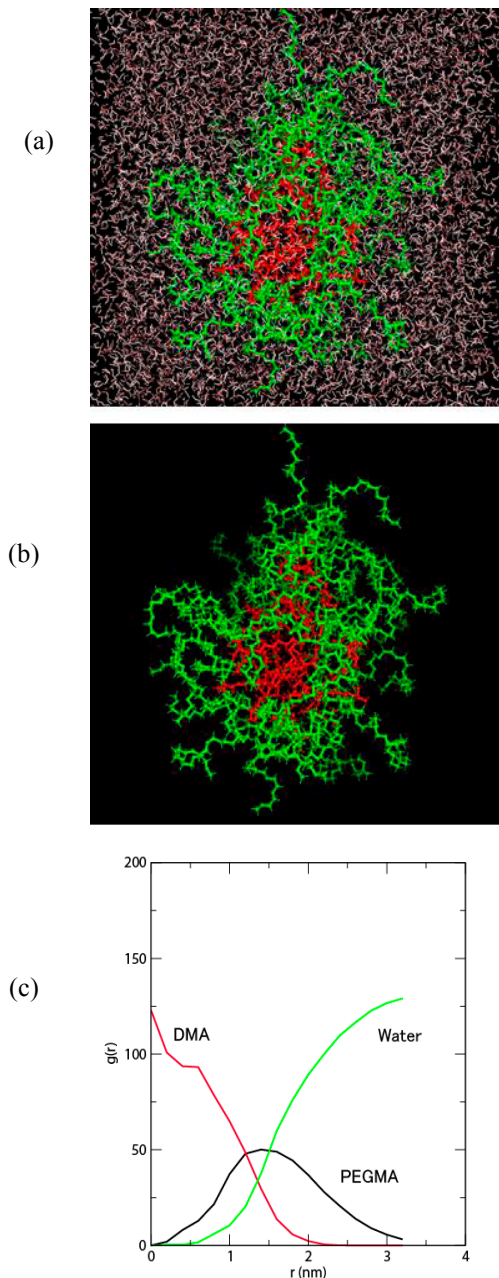


Fig. 2 Snapshots (a,b) and the number density profiles (c) of intramolecular micelle of PEGMADMA by all-atom MD simulation. PEGMA and DMA groups are shown by green and red in the snapshots.

域から急激に大きくなり、ミセル外部のバルクの値に近づいていることが分かる。

疎水基の違いによるミセル構造への影響を調べるために、疎水基としてブチル基 BMA を有する PEGMABMA についても同様の計算を行った。図 3 (a) に示しているように、PEGMABMA の場合にもコア・シェル構造のミセルが形成していることが分かる。しかし、疎水基が長い PEGMADMA の場合に比べると、疎水基のコア領域への凝集の程度は小さく、全体として緩く疎水凝集したミセルが形成しているように見える。実際、DMA と同様に重心からのモノマーの数密度分布 (図 3 (b)) を見ると、DMA の場合に比べると、疎水基 BMA と親水鎖 PEGMA の分離の程度は緩やかで、親水鎖や水分子がミセルの中心付近まで入り込んでいることが分かる。

これらの結果から、疎水鎖長の異なる 2 種類の高分子が混合したミセルを形成すると、それぞれにとって最適なミセル構造をとることができなくなるので、自由エネルギー的に不利になると考えられる。これがこれら 2 種類の高分子鎖が混合ミセルを形成しないで別々にミセルを形成するセルフソーティング現象の分子論的起源であると考えられる。

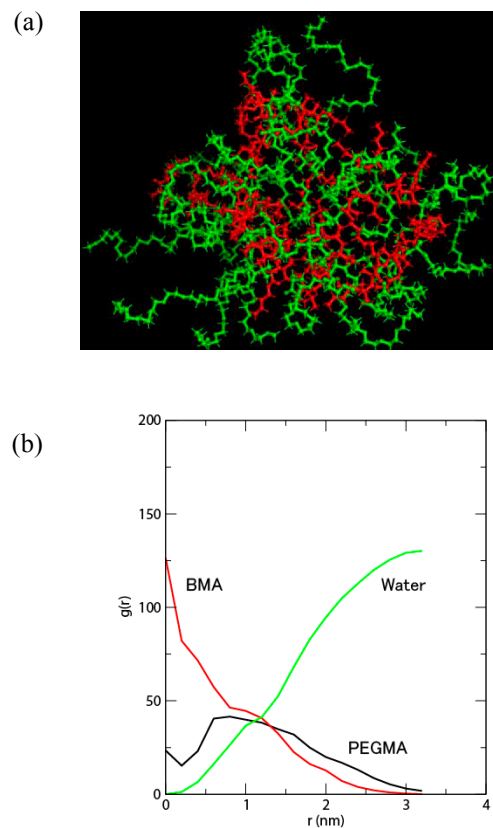


Fig. 3 Snapshot (a) and the number density profiles (b) of intramolecular micelle of PEGMABMA by all-atom MD simulation. PEGMA and BMA groups are shown by green and red in the snapshot.

3-2. セルフソーティング

前節での考察を検証するために、全原子 MD シミュレーションでセルフソーティング現象の再現を検討した。ここでは、前節で用いた疎水基 BMA の分率が 2/3 で 102 量体の PEGMABMA と疎水基 DMA の分率が 1/3 で 57 量体の PEGMADMA の末端を結合したブロック共重合体 PEGMABMA-*b*-PEGMADMA を用いた計算を行った。このブロック共重合体の MD シミュレーションから得られたスナップショットを図 4 に示す。2 種類の高分子がそれぞれ凝集してコアが二つのミセルを形成しており、全原子シミュレーションで分子内ミセル形成におけるセルフソーティング現象を再現できたと考えられる。

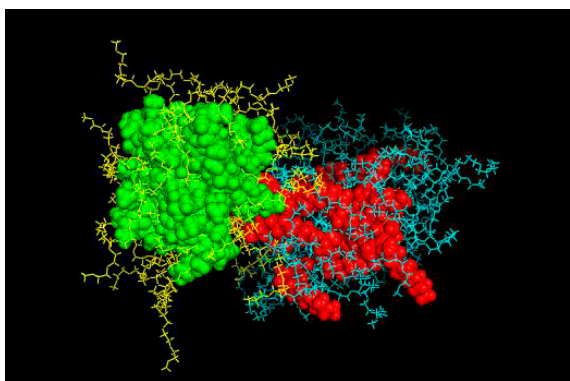


Fig. 4 Snapshot of PEGMADMA-*b*-PEGMABMA copolymer by all-atom MD simulation. Hydrophobic groups (BMA and DMA) are shown by green and red, respectively.

3-3. 張力・伸長関係

前節までの考察で、疎水基の違いによるミセルの構造の違いがセルフソーティングの起源であることが示唆されたが、さらに定量的な解析を目的として、高分子鎖の末端引っ張った時の、高分子鎖の伸長と張力の関係を考察した。高分子物性ではよく知られているように、一本の高分子鎖の示す弾性的性質は、高分子材料の力学特性を決める重要な因子である。また、この関係から自由エネルギーを計算することも可能である。

本研究で対象としている高分子の全原子モデルは非常に複雑なので、疎水凝集が高分子鎖の張力・伸長関係に及ぼす影響を示すために、単純なバネ・ビーズモデルを用いたモンテカルロシミュレーションの研究結果を図 5 に示している⁴⁾。モデルとして、図 5(a) に示しているような周期的に会合基を配置した高分子（周期会合性高分子）を用いた。これは親水性と疎水性のモノマー単位から成るマルチブロック共重合体に対応するので、会合基を疎水基と呼ぶことにする。疎水基の配置の周期を p 、疎水基同士の間の会合性相互作用の強さを ϵ_a とし、以後では無次元化された

量 $\beta\epsilon_a$ を用いる。ここで、 $\beta \equiv 1/k_B T$ で、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度である。会合相互作用を強くしていくと高分子鎖のコンホメーションは、広がったランダムコイル状態から疎水基を内側にした分子内ミセルの状態（図 5(b)）に変化する。

この高分子の両末端を引っ張った時の張力と伸長の関係を図 5(c) に示している。図 5(c) には点線で理想鎖の一種である自由連結鎖の張力 f と末端間距離 R の関係：

$$\beta f a = L^{-1}(R/na) \quad (1)$$

も同時に示している。ここで、 $L^{-1}(x)$ はランジバン関数 $L(x) = \coth(x) - 1/x$ の逆関数、 n と a はそれぞれ高分子鎖を構成する統計単位の数と大きさである。周期会合性高分子 ($\beta\epsilon_a = 0$) の張力が同じ伸長での理想鎖の張力より小さくなっているのは、排除体積効果のために鎖が広がろうとする性質があるためである。分子内ミセルを形成している場合 ($\beta\epsilon_a = 4$) の張力・伸長関係は理想鎖の場合と大きく異なっている。まず、伸長が小さな領域 ($R/na < 0.05$) では、傾き（つまり弾性率）が非常に大きくなっている。

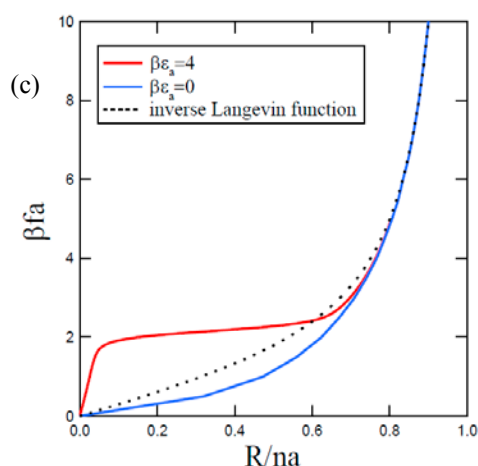
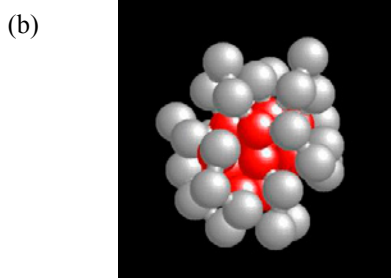


Fig. 5 (a) Schematic figure of periodic associating polymers. Associating groups are shown by red spheres. (b) Snapshot of intramolecular micelle of a periodic associating polymer at $\beta\epsilon_a = 4$ and $n = 40$. (c) The length-force relation of the periodic associating polymer.

この部分はいわゆるエントロピー弾性ではなく、エンタルピー弾性である。会合基同士の相互作用で鎖が小さなミセルを作ろうとしているので少し引き伸ばすのに大きな力が必要であることを示している。力がある閾値 (図 5(c) の場合は $\beta fa \approx 2$) まで達すると急激にミセルの崩壊が起き、鎖が引き伸ばされる。その後は、引き伸ばされているために近距離の引力の影響をあまり受けないので、鎖の張力と伸長の関係は相互作用がない理想鎖の場合と同じになる。これから張力・伸張関係に分子内ミセル形成が強い影響を及ぼすことが分かる。

高分子鎖の統計力学で知られているように、張力・伸長関係 $f(R, T)$ が分かれば、それを積分することでヘルムホルツエネルギー $F(R, T)$ を計算することができる。

$$F(R, T) = \int_0^R f(R', T) dR' \quad (2)$$

この関係式を用いて図 5(c) に示している疎水凝集をしている場合 ($\beta \varepsilon_a = 4$, 赤線) と疎水凝集がない場合 (青線, $\beta \varepsilon_a = 0$) との差から、疎水凝集による自由エネルギー変化を計算できると考えられる。

これらの知見に基づいて、全原子 MD シミュレーションを用いて図 2 と図 3 に示している分子内ミセルを形成する条件で PEGMADMA と PEGMABMA の両末端を引っ張り、張力と伸長の関係を調べた。

張力をかけた場合のスナップショットを図 6 に示している。鎖の末端を引っ張ることでミセルが崩壊し、引き伸ばされていく様子が分かる。PEGMADMA と PEGMABMA に対して、与えられた末端距離 R で末端を固定して長時間の計算を行い、平衡状態での張力 $f(R, T)$ を計算した。結果を図 7 に示している。PEGMADMA の場合には、図 5(c) に示した粗視化シミュレーションの結果と同様に、中程度の伸長領域で平坦な領域が現れており、この張力がミセルの崩壊に必要な張力であると考えられる。PEGMABMA の場合にも同様の振る舞いが見られるが、ミセルを崩壊させるのに必要な張力の値は DMA の場合に比べると小さくなっている。これは、

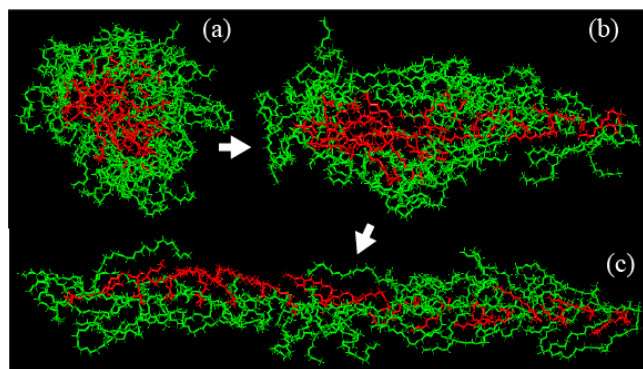


Fig. 6 Snapshot of elongation process of a PEGMADMA chain. PEGMA and DMA groups are shown by green and red respectively.

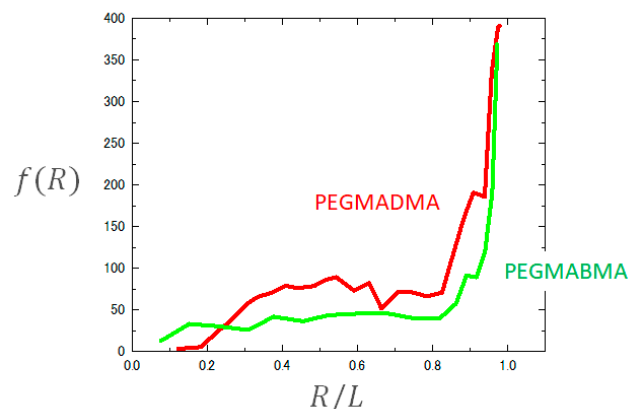


Fig. 7 The length-force relation of PEGMADMA (red line) and PEGMABMA (green line).

図 3 でスナップショットや数密度分布で示したように、BMA の方が弱い疎水性効果で緩く凝集したミセルを形成しているので、小さな張力でミセルが崩壊したためであると考えられる。つまり、図 7 では疎水性効果の強さが張力の大きさという形で明確に表れている。

式 (2) を用いれば原理的には図 7 の張力・伸長関係からミセル形成に伴う自由エネルギーが計算できるが、このためにはさらに精度の高い張力の計算が必要であり、これについては継続して検討を進めている。

4. まとめ

両親媒性共重合体の分子内ミセル形成の全原子 MD シミュレーションを行い、分子内ミセルでのセルフソーティングを再現することに成功した。また、疎水鎖長の異なる両親媒性高分子のミセル構造を詳しく解析した結果、疎水鎖長に依存してミセル構造が大きく変化することが分かった。この構造の違いがセルフソーティングの分子論的起源であると考えられる。

高分子の高次構造をその一次構造から再現・予測することは高分子計算科学の目標であるが、本研究では、実験で用いられた高分子の一次構造を忠実に反映した全原子モデルを用いた分子動力学シミュレーションにより、疎水基の僅かな性質の違いによるセルフソーティング現象の再現に成功しており、学術的意義は大きいと考えられる。

参考文献

- 1) Y. Hirai, T. Terashima, M. Takenaka, and M. Sawamoto, *Macromolecules*, **49**, 5084 (2016).
- 2) S. Imai, M. Takenaka, M. Sawamoto, and T. Terashima, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 511 (2019).
- 3) S. Imai, Y. Hirai, C. Nagao, M. Sawamoto, and T. Terashima, *Macromolecules*, **51**, 398 (2018).
- 4) T. Koga, *Eur. Phys. J. E* **17**, 381 (2005).

超分子ポリマーの精密合成

Precision synthesis of supramolecular polymers

杉安 和憲

Kazunori SUGIYASU

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

Since 2014 we have developed living supramolecular polymerization, reminiscent of living polymerization in polymer chemistry, which has permitted to synthesize supramolecular polymers with controlled length and narrow length distribution. The key to this success was to control supramolecular polymerization under kinetic control, which was achieved by transforming active monomers into a dormant state. Originally, this was possible using porphyrin-based monomers, but the concept has been generalized using other monomers which undergo in a similar supramolecular polymerization mechanism. With the mechanistic insight into mind, we have also succeeded in the synthesis of block supramolecular polymers and two-dimensional supramolecular polymers which were otherwise impossible to obtain in the conventional supramolecular polymerization under thermodynamic control.

1. はじめに

超分子ポリマーは、モノマー分子が水素結合などの分子間相互作用によって連結された1次元の超分子集合体であり、1990年代後半から活発に研究されてきている。分子間相互作用の可逆性を反映したダイナミックな重合・解重合挙動は、刺激応答性やリサイクル性、自己修復能を有する新しいポリマー材料を設計する上で有用である。2000年代に入るとナノテクノロジーの勃興に伴い、超分子ポリマーの機能性にも注目が集まった。超分子ポリマーに特有の秩序高い分子集積構造や特異なモルフォロジーを活用して、ナノエレクトロニクス材料やバイオ関連材料の開発が展開されている^[1]。

このように物性および機能の観点から、多彩な魅力を備えた超分子ポリマーではあるが、その精密合成技術はほぼ未開拓の状況にある。高分子化学においては1956年のSzwarcによるリビングアニオン重合の発見以来、様々な重合法に対してリビング重合法が確立されてきた。リビング

重合法は分子量分布の狭いポリマーやブロックポリマーの合成を可能とするため、学術的・産業的にきわめて重要な高分子合成法である。一方で、超分子ポリマーの成長は、自発的かつ可逆的な重合・解重合を経て進行し、熱力学的平衡に支配された言わば“分子まかせ”のプロセスであり、制御することが非常に難しいと考えられていた。

高分子化学におけるリビング重合では、開始反応速度が成長反応速度に比して著しく大きい場合に分子量の制御が可能となる。つまり、分子量制御の鍵は速度論にある。一方、前述の通り超分子ポリマーの成長は平衡論によって理解される。この点で両者の重合メカニズムに大きな違いがある。『リビング超分子重合』を実現するためには、超分子ポリマーの成長を速度論的に制御しなければならないことは明白である。

われわれは、速度論に支配された超分子重合を偶然に発見した (Fig. 1)。そのメカニズムを明らかにすることによってリビング超分子重合に成功した^[2]。

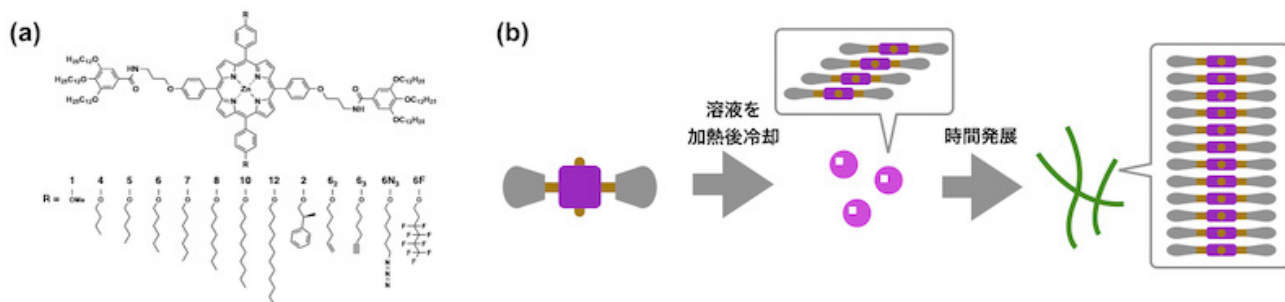


Fig. 1 (a) Structures of porphyrin-based monomers used in this study. (b) Supramolecular polymerization of **1** under kinetic control.

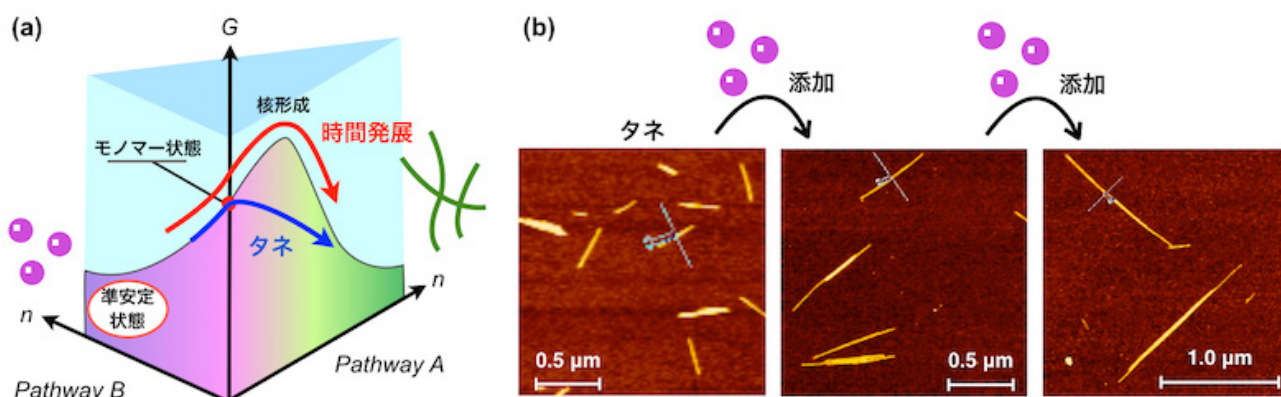


Fig. 2 (a) Energy landscape of self-assembly of **1**. (b) AFM images of seeds (left) and supramolecular polymers (middle and right) obtained by seeded/living supramolecular polymerization actualized using monomer **1**.

2. 速度論に支配された超分子重合

われわれは、2009年頃から超分子ポリマーの研究を進める中で、ポルフィリン誘導体**1**のユニークな自己集合挙動を発見した (Fig. 1b)。

自己集合性のポルフィリン誘導体**1**を有機溶媒に加熱溶解し、その後放冷すると直径が10 nm以下のナノ粒子を形成した。非常に興味深いことに、数時間のラグタイムの後、このナノ粒子が1分子幅のナノファイバー (超分子ポリマー) へと形態転移することを発見した。自己集合のメカニズムを熱力学モデルに基づいて詳細に評価した結果、そのエネルギーランドスケープはFig. 2aのようになっており、2種類の集合体の安定性が絶妙にバランスしていることを突き止めた。具体的には、まずPathway Bに沿って速度論的にナノ粒子が形成される。しかし、熱力学的にはナノファイバー (超分子ポリマー) の方が安定であり、時間発展的に形態転移する (Pathway A)。この形態転移の律速段階はナノファイバーの核形成過程であった。

核形成過程が超分子ポリマー化の引き金になっているということは、核が形成する前に核の代わりになるような「タネ」を添加することによって形態転移を「開始」できるということを意味している (Fig. 2a: 青の矢印の経路)。このようなプロセスはもはや「分子まかせ」などではなく、リビング超分子重合の実現を示唆している。

超音波照射によって**1**の超分子ポリマーを短く分断し、「タネ」として用いた (Fig. 2b左)。このタネを準安定状態にある**1**のナノ粒子の溶液と混合すると、ただちにナノ粒子は消費され、超分子ポリマーが成長した (Fig. 2b中央および右)。重合速度解析の結果、タネの濃度についての反応次数は1であり、超分子ポリマーはタネから連鎖重合的に成長していることが確かめられた。重合中の溶液にナノ粒子を加えるたびに、それは消費され、超分子ポリマーが成長した。AFM観察から求めた数平均長さ重量平均長さは、タネとナノ粒子状態会合体の仕込み比に対して直線性を示した。また、各段階で多分散度は1.1であった。以上の実

験を通して世界で初めてリビング超分子重合を実証した^[2]。

3. 2次元超分子重合への展開

リビング超分子重合を達成する上で、**1**の分子構造の何が鍵であったのかを明らかにするために40種類以上のポルフィリン誘導体を合成し、モノマー構造と準安定状態との相関を精査した (Fig. 1a)。その結果、Fig. 2aのようなエネルギーランドスケープをもつ自己集合挙動は稀であり、ほとんどの系でリビング超分子重合ができなかった。しかしながらこのような系統的な評価を繰り返す中で、**1**の2つのメトキシ基をヘキシルオキシ基に置換したポルフィリン分子**6**がナノシートを形成することを発見した (Fig. 3)。

種々の測定から、このナノシートはポルフィリン分子の π スタッキングとヘキシル基のファンデルワールス力を駆動力として成長することがわかった。さらに、我々の初報と同様の手法で、ナノシートのタネを用いれば、2次元的なリビング超分子重合ができることを実証した。特筆すべきは、得られたナノシートはその面積だけでなくアスペクト比まで制御されていることである (Fig. 4a)^[3]。

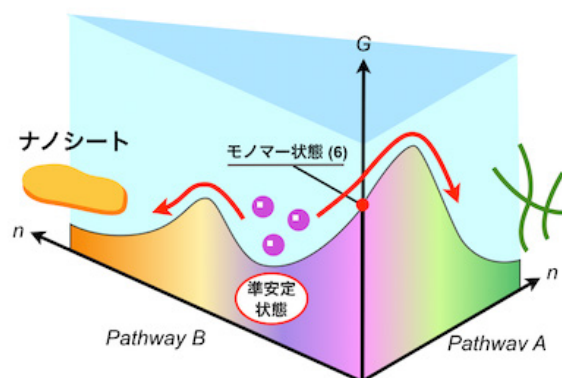
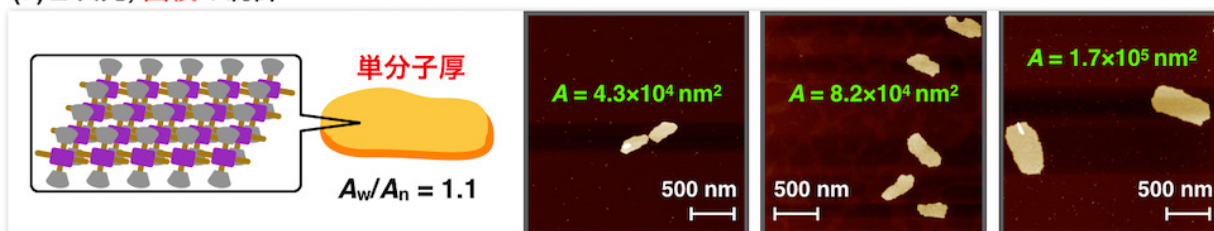


Fig. 3 Energy landscape of self-assembly of **6**.

(a) 2次元, 面積の制御



(b) 2次元, アスペクト比の制御

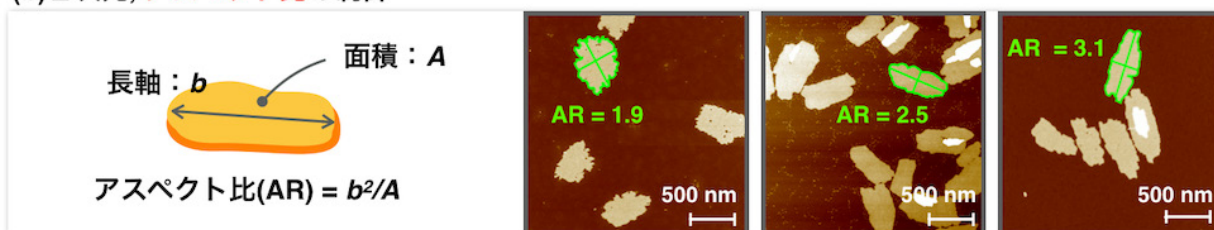


Fig. 4 Two-dimensional living supramolecular polymerization, which permitted to synthesize supramolecular nanosheets with controlled (a) area and (b) aspect ratio.

さらにFig. 3に示したユニークなエネルギーランドスケープによって、1次元にも2次元にもリビング超分子重合ができることがわかった。このような系は、高分子化学においてもこれまで知られていない。本研究は、分子の自己集合を自在に操る新しいコンセプトを提示するものであり、ナノサイエンスの観点からも大きな意義を有している。

1次元ポリマーの基本的な構造パラメータは「長さ」である。一方、2次元ポリマーでは「面積」に加え「かたち」があらわれる。この「かたち」を制御することは可能であろうか？われわれは、この新たな問いに答えを出すべく、リビング超分子重合法の高度化に注力した。

Fig. 4a左に示した通り、6の2次元超分子ポリマー（ナノシート）はポルフィリン分子の π スタッキングとヘキシル基のファンデルワールス力を駆動力として成長する。この2種類の相互作用はナノシート面内で直交しており、これらを駆動力とした成長速度の比が、結果としてナノシートのアスペクト比を規定していると考えた。

以上の仮説をもとに、新たにモノマー分子7、8、10、12、62、63、6N₃ (Fig. 1a) を合成した。これらのモノマーの2次元的な自己集合においては、上述のファンデルワールス力の強さが異なることを反映して、得られるナノシートのアスペクト比が変化すると期待した。7、62、63、6N₃のモノマーはナノシートを形成し、中でも6N₃が非常に安定なナノシートを形成することを見出した。8、10、12がナノシートを形成できなかった理由は、長いアルキル鎖のコンフォメーションエントロピーに起因するものと考えている。6N₃を用いて、2次元超分子ポリマー（ナノシート）のアスペクト比を制御して合成できることを実証した (Fig. 4b) [4]。

4. コンセプトの一般化

ポルフィリン誘導体の自己集合メカニズムを詳細に精査し、1次元および2次元のリビング超分子重合へと繋げた一連の研究から、リビング超分子重合を実現するための基本原理を明らかにした。すなわち鍵となるのは、自己集合のエネルギーランドスケープに準安定状態を組み込み、超分子ポリマーの自発的な核形成過程を速度論的に阻害することである。候補者はこのコンセプトを一般化するために、光異性化反応を組み込んだリビング超分子重合や (Fig. 5) [6]、"ダミーモノマー"を用いるリビング超分子重合法など [7]、新しいリビング超分子重合法を提案し、実現した。これらの研究から、速度論に支配された超分子重合プロセスを利用すれば、リビング超分子重合が可能であるという一般性の高いコンセプトを示すことができた。

5. まとめ

超分子ポリマーは、既存の共有結合性の高分子とは異なる物性・機能を有する新素材として高い注目を集めている。本研究は、このような超分子ポリマーの精密合成に先鞭をつけたものである。リビング超分子重合の発展によって、熱力学的安定性に支配された自己集合プロセスからは得ることが困難な高次構造の創出が可能になる。さらに、高分子化学が例証するように、ブロック超分子ポリマーの合成やマイクロ相分離構造の発現、それに関する高分子物理やナノテクノロジーなど、広範な研究領域のひろがり期待させる [8,9]。高分子化学と超分子化学を発展的に融合させて、新物質・新材料の開発につなげたい。

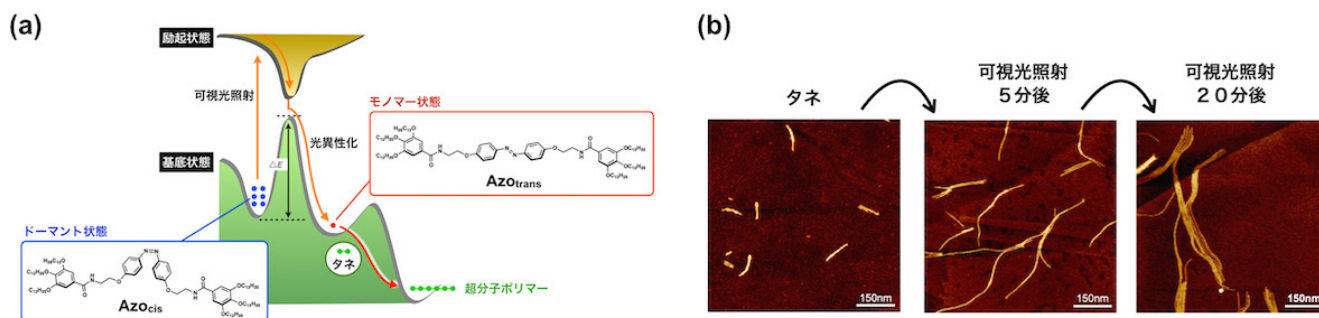


Fig. 5 Photoregulated living supramolecular polymerization^[6]. (a) Energy landscape of supramolecular polymerization in which nucleated-supramolecular polymerization is coupled with photoisomerization. (b) AFM images of supramolecular polymers of which the lengths are controlled by changing the photoirradiation time.

謝辞

本研究は、京都大学に着任前の物質・材料研究機構で行われたものであり、分子機能化学グループの竹内正之グループリーダーと、共同研究者の方々に感謝します。また、科学研究費補助金（15H05483、19K05592、20H04682）、公益財団法人泉科学技術振興財団および日本化学繊維研究所からの研究助成に深謝いたします。

参考文献

- 1) T. Aida, E. W. Meijer & S. Stupp, Functional Supramolecular polymers. *Science* **335**, 813-817 (2012).
- 2) S. Ogi, T. Fukui, M. L. Jue, M. Takeuchi & K. Sugiyasu, Kinetic control over pathway complexity in supramolecular polymerization through modulating the energy landscape by rational molecular design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 14363-14367 (2014).
- 3) S. Ogi, K. Sugiyasu, S. Manna, S. Samitsu & M. Takeuchi, Living supramolecular polymerization realized through a biomimetic approach. *Nat. Chem.* **6**, 188-195 (2014).
- 4) T. Fukui, S. Kawai, S. Fujinuma, Y. Matsushita, T. Yasuda, T. Sakurai, S. Seki, M. Takeuchi & K. Sugiyasu, Control over differentiation of a metastable supramolecular assembly in one and two dimensions. *Nat. Chem.* **9**, 493-499 (2017).
- 5) N. Sasaki, J. Yuan, T. Fukui, M. Takeuchi & K. Sugiyasu, Control over the aspect ratio of supramolecular nanosheets by molecular design. *Chem. Eur. J.* **26**, 7840-7846 (2020).
- 6) M. Endo, T. Fukui, S. H. Jung, S. Yagai, M. Takeuchi & K. Sugiyasu, Photoregulated living supramolecular polymerization established by combining energy landscapes of photoisomerization and nucleation-elongation processes. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 14347-14353 (2016).
- 7) T. Fukui, N. Sasaki, M. Takeuchi & K. Sugiyasu, Living supramolecular polymerization based on reversible deactivation of a monomer by using a ‘dummy’ monomer. *Chem. Sci.* **10**, 6770-6776 (2019).
- 8) S. H. Jung, D. Bochicchio, G. M. Pavan, M. Takeuchi & K. Sugiyasu, A block supramolecular polymer and its kinetically enhanced stability. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 10570-10577 (2018).
- 9) T. Fukui, T. Uchihashi, N. Sasaki, H. Watanabe, M. Takeuchi & K. Sugiyasu, Direct observation and manipulation of supramolecular polymerization by high-speed atomic force microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 15465-15470 (2018).

有機テルル媒介エマルションラジカル重合によるホモポリスチレン

およびポリスチレン含有ブロック共重合体の制御合成法

Controlled synthesis of polystyrene and its block copolymers by emulsion organotellurium-mediated radical polymerization

山子 茂・Yuhan Jiang・Weijia Fan・登阪 雅聡

Shigeru YAMAGO, Yuhan Jiang, Weijia Fan, Masatoshi Tosaka

Institute for Chemical Research, Kyoto University

Structurally controlled high-molecular-weight (HMW) polystyrenes (PSts) and block copolymers consisting of HMW PSt segments were successfully synthesized by emulsion organotellurium-mediated radical polymerization (TERP). The hydrophilicity of the organotellurium group of TERP chain transfer agents (CTAs) was important, and CTAs **1b** and **1c** with di- and tetraethylene glycol units were suitable. By using **1b** and **1c** and using hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) as a surfactant, PSts with MWs over 1 million and with low dispersity ($D < 1.6$) were synthesized with $>96\%$ monomer conversion. Because of the high degree of monomer conversion, high end-group fidelity, and rapid monomer diffusion to polymer particles, block copolymerization could be carried out by the addition of a second monomer after the conversion of the first monomer. The desired HMW block copolymers with low dispersity were successfully synthesized. Despite recent developments in reversible-deactivation radical polymerization (RDRP), which is also called living radical polymerization, the synthesis of HMW polymers has been a formidable challenge. This method provides a valuable route for fabricating polymer materials based on HMW PSts.

1. 緒言

リビングラジカル重合とも呼ばれる可逆不活性化ラジカル重合 (RDRP) の最近の進歩は、ラジカル重合において構造や配列の制御を可能にしたことから、高分子材料開発に大きな変革をもたらした。¹⁻⁴しかし、RDRPでは完全に停止反応をなくすことができないこともあり、高分子量体 (HMW) のポリマー合成は大きな問題となっている。機械的強度や熱安定性など、いくつかの重要な物理的特性は通常、ポリマーの分子量を上げることで改善できるため、この問題の解決が強く望まれている。

数は多くは無いが、特殊な条件や限られたモノマーでは、すでに分子量が百万を超える超高分子量体の合成が報告されている。⁵例えば、超高压条件下において、HMWポリアクリレートやポリスチレン (PSts) の合成が報告されているが、特殊な装置を使用するために大量生産には不向きである。常圧の均一系の重合条件下では、(メタ) アクリレートをモノマーとした場合、原子移動ラジカル重合 (ATRP)、^{6,7}有機ビスマス媒介ラジカル重合 (BIRP)、⁸可逆的付加脱離連鎖移動重合 (RAFT)^{9,10} による高分子量体の合成が報告されている。一方、もう一つの重要なモノマーであるスチレンにおける例は極めて限られており、十万以上の分子量を持つ高分子量PStsの合成例でさえわずかである。¹³⁻¹⁵この問題はブロック共重合体の合成においてさらに顕著になり、十万を超える分子量の合成例はさらに少なくなる。¹⁶これは、アクリレートの成長反応速度定数 k_p (k_p [methyl acrylate] = $2.4 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) が、スチレン

(k_p [styrene] = $3.4 \times 10^2 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) と比較して高く、¹¹前者では短時間で重合が完了するので、停止反応の寄与が小さいためと考えられる。¹²

分子量が百万を超えるPStのRDRPによる合成は、重合誘起自己組織化 (PISA) 条件において、¹⁷⁻¹⁹ 有機テルル媒介ラジカル重合 (TERP)²⁰とRAFT^{21,22}を用いた例に限られる。PISAでは成長反応が高分子ミセル内で起こるため、乳化重合でよく知られている隔離効果により、停止反応が減少したためであると考えられる。^{23,24}したがって、界面活性剤を用いて重合を行う単純な乳化重合においても、高分子量体のPStの合成が可能であると期待される。単純な乳化重合系では、ブロック共重合体の合成においても、PISAよりも自由度高く分子設計が行えることも期待できる。そこで、単純な乳化重合条件を用いる超高分子量体のホモPStと高分子量体のPStを含むブロック共重合体の合成について検討を行った。

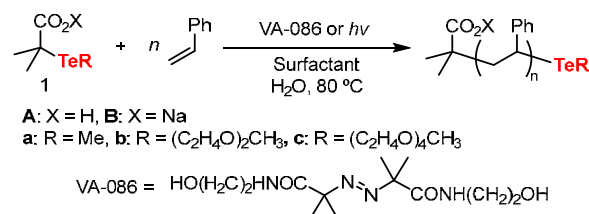


Fig. 1. Emulsion TERP of styrene using water-soluble TERP agents.

具体的には、RDRPの方法として我々が開発しているTERPを利用した。²⁵⁻²⁷特に最近、カルボン酸を持つTERP連鎖移動剤 (CTA) **1A**の中和により生じる水溶性のナトリ

ウム塩**1B**を用いることで、メタクリレートとアクリレートのエマルジョンTERPに成功している (Figure 1)。^{28,29}そこで、エマルジョンTERPによるHMW PStの合成を検討した。

2. 実験法

典型的な重合反応の手順

1Aa (9.2 mg, 40 μmol)、2,2'-azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamide] (VA-086, 5.8 mg, 20 μmol) およびhexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB, 400 mg, 5 wt% to water) を脱気した脱イオン水 (8.0 mL) に混合した後、NaOH水溶液 (0.51 mol L⁻¹, 80 μL , 40 μmol) を添加することで、**1A**を水溶性の**1Ba**へと変換した。そこに St (0.92 mL, 8.0 mmol) を加えた後、溶液を攪拌しながら 80 °Cで加熱した。反応液の一部 (約 100 μL) を定期的に抜き取り、有機成分を CDCl₃ で抽出した後、¹H NMR測定によりモノマー転換率を求めた (Fig. 2)。同じ CDCl₃ 溶液を SEC 分析にも使用した。また、乳液を脱イオン水で希釈した後、動的光散乱装置 (DLS) により粒子径も求めた。2時間後、モノマー変換率は94%に達し、SEC分析により M_n (20,300) と D (1.28) を求めた。また、得られたPSt粒子は粒子径 d = 334 nm、多分散度 PDI = 0.36であった。

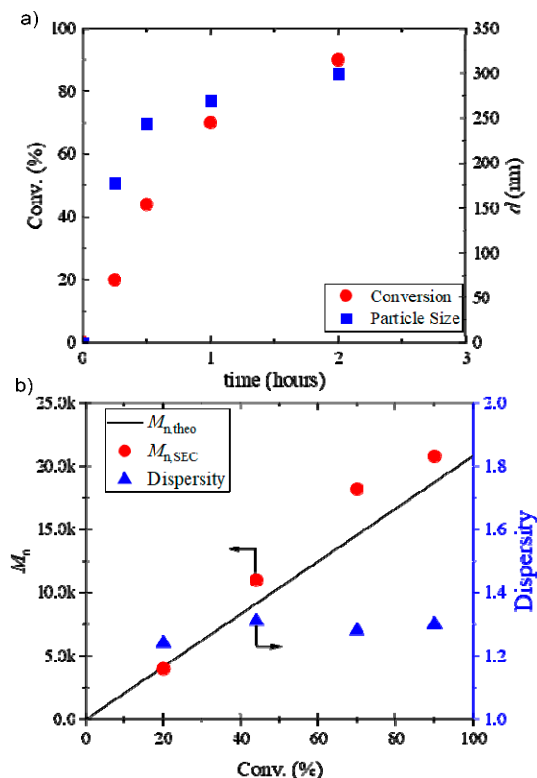


Fig. 2. a) Conversion of St (red) and polymer particle size (blue) vs. time, and b) molecular weight (red) and dispersity (blue) vs. conversion of St.

3. 結果と議論

3-1. エマルジョン重合の条件検討

まず界面活性剤の効果を調べるために、ノニオン系界面活性剤であるポリオキシエチレン (20) セチルエーテル (Brij58)、イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) とヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) を用いた重合を検討した。それぞれの界面活性剤を水に対して5 wt%用い、**1Aa** (X = H, R = Me) と NaOH (1.0 equiv.) から in-situ で生成した **1Ba** (X = Na, R = Me) と、アゾ開始剤であるVA-086 (0.50 equiv.) を用い、200当量のSt (10 wt% to water) を80 °Cで加熱した。その結果、Brij58を用いた場合では、分子量とポリマー粒子の分散性のいずれも制御が低かった一方、SDSとCTABを用いた場合、制御が著しく向上した。特に、CTABを用いた場合、特徴的なリビング挙動、すなわち、モノマー転化率が擬一次速度に従うと共に、数平均分子量 (M_n) はモノマー転化率に比例し、分散度 D も低かった (Fig. 2, Table 1, run 1)。また、粒子径 (d) も分子量に対し $M_n^{1/3}$ の依存性を示したことから (Fig. 2a)、粒子中に補足された休止種が活性化されることで成長反応が進行していることが示唆された。なお、Brij58を用いた場合はポリマー粒子の沈殿が観測されたことから、ミセルの安定性と均一性が重合制御に重要である可能性が示された。^{23,24}また、休止種の活性化法としてとして、6 W LED ランプを用いた Photo-TERP 条件でも同様の乳化重合が進行した。³⁰⁻³² この条件ではアゾ開始剤が不要なため、以下の実験では Photo-TERP を選択した。

次に、CTAB の濃度を検討した。水に対して 5 wt% (140 mmol L⁻¹) という濃度はCTABの臨界ミセル濃度 (1 mmol L⁻¹) よりも極めて高いため、³³ CTABの濃度を2あるいは 1 wt%に減らして重合を行った。しかし、重合速度が低下すると共に、分散度 D の制御が低下した。この場合においてもポリマー粒子の凝集が観測されたことから、以下の実験では、5 wt% の CTAB を使用した。

これらの検討過程において、**1Ba**、スチレン、および CTABの混合物が重合をする以前にミセルを形成することが明らかとなった。すなわち、1時間程度溶液を攪拌 (予備混合) すると、溶液は不透明となり、DLS分析により、直径約55 nmで単峰性のサイズ分布を持つミセルの形成が確認された。また、DLSでは、モノマー液滴に対応する直径~7000 nmの大きな粒子が少量存在することも明らかになった。これらの結果は、現在の状態がマイクロエマルジョン系であることを示唆している。さらに、ここで得られたミセル混合物に光照射すると重合が進行し、ポリマーラテックスが形成された。モノマー転化率は4時間後に91%に達し、分子量と分散度とが制御されたPStが得られた。この制御の程度は予備混合を行わない場合とほぼ同じであ

った。また、2時間の予備混合を行った場合も、実質的に同じ結果が得られたことから、以下の実験では予備混合を行わずに重合を行った。

Table 1. Emulsion TERP of styrene using water-soluble TERP agents under photo-irradiation^a

Run	1B	Equiv.	Conv. ^b %	M_n^c $\times 10^3$	\bar{D}^c	d^d nm	PDI ^d
1	a	1,000	90	100	1.16	426	0.27
2	a	2,000	92	106	1.66	501	0.24
3	b	2,000	90	202	1.17	556	0.43
4	b	5,000	92	491	1.19	577	0.30
5	b	10,000	91	966	1.45	628	0.36
6	c	4,000	94	396	1.25	485	0.24
7	c	10,000	93	974	1.34	573	0.40
8	c	15,000	94	1250	1.38	635	0.42
9 ^e	c	20,000	73	1320	1.57	601	0.43
10 ^f	c	5,000	96	538	1.31	388	0.34
11 ^{ef}	c	15,000	90	1200	1.49	412	0.31
12 ^g	c	10,000	90	912	1.53	316	0.33
13 ^g	c	15,000	93	1470	1.57	368	0.37
14 ^h	c	500	59	34.3	1.18	497	0.34

^a A mixture of 1B, monomer (10 wt% to water), and surfactant (5 wt% to water) in water was stirred at 80 °C by irradiating a 6 W white LED light. ^b Determined by ¹H NMR. ^c Determined by SEC calibrated against PSt standards. ^d Determined by DLS. ^e 10 wt% of CTAB in water was used. ^f *p*-ClSt was used instead of St. ^g *p*-MCSt was used instead of St. ^h *p*-MeOSt was used instead of St.

次に、1Baに対してスチレンの量を増やして分子量が10万を超える高分子量PStを合成した。1,000当量のStを用いた場合、高いモノマー転化率で重合を制御できたが (Table 1, run 1)、スチレンの量をさらに2,000当量に増やすと制御性がかなり低下した (run 2)。一方、粒子径制御は分子量制御とは無関係であった。

我々は既に、乳化重合においてCTA及び休止種におけるテルル基上の極性置換基の重要性を明らかにしている。²⁹ すなわち、極性基はポリマー粒子の内部よりもむしろ表面に優先的に存在するため、休止状態の化学種を効率的に活性化することができる可能性を提唱している。³⁴ そこで次に、極性基であるジエチレングリコール基およびテトラエチレングリコール基を各々有するCTA 1Bbおよび1Bcを用いて検討を行った。1Bbを2,000 - 10,000当量のStの重合に用いたところ、20万~100万の理論値に近い M_n と、1.2~1.5の低い分散度を持つ、構造の制御されたPStの合成に成功した (run 3 - 5, Fig. 3)。すべての場合でモノマー転

換率が90%以上と高い事は、実用性の点で重要である。

1Bcは1Bbよりもさらに優れており、4,000~15,000当量のStを使用することにより、90%以上のモノマー転化率で分子量が40万~130万の超高分子量PStを構造制御しながら合成できた (run 6 - 8, Fig. 3)。20,000当量のStを用い、CTAB濃度 (水中10wt%) を上げることににより、 M_n 1,320,000のPStも合成できた (run 9)。 M_n が理論値からわずかにずれ分散度もやや広がったが (1.57)、SECトレースは単峰性であったことから、十分な制御が行えたと判断している。なお、粒子径については、いずれの場合も良好な制御が行えた。

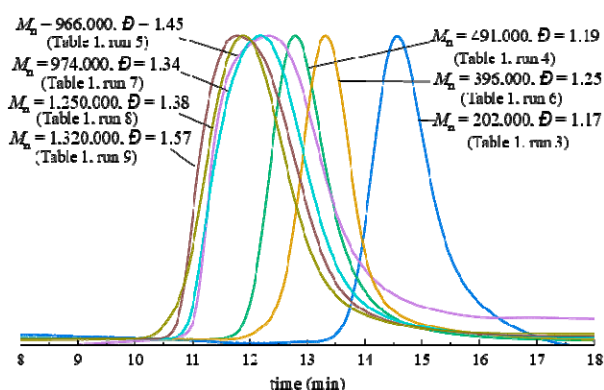


Fig. 3. SEC traces of HMW PSts synthesized using CTAs 1Bb (Table 1, runs 3-5) and 1Bc (Table 1, runs 6-9).

3-2. エマルジョン重合の一般性の検討

次にこの方法の一般性を、置換スチレンを用いて検討した (run 10-14)。電子吸引性基を持つSt、すなわち *p*-クロロスチレン (*p*-ClSt) や *p*-メトキシカルボニルスチレン (*p*-MCSt) は非常に適しており、5,000から15,000当量のモノマーを用いたところ、モノマー転化率は90%以上に達し、分散度が1.31~1.57の構造の制御された重合体を得ることができた (run 10-13)。SEC分析の適切な標準サンプルがないため、分子量の制御に関しては厳密に評価することはできなかったが、生成した重合体のSECはいずれも単峰性であり、高度に制御されていた。一方、電子供与基を有するスチレン、すなわち *p*-メトキシスチレン (*p*-MeOSt) は高分子量体の合成に不向きであり、分子量が5万程度までしか重合制御ができなかった (run 14)。

3-3. ブロック共重合体の合成

このエマルジョン条件はモノマー転化率が概ね90%以上と高いと共に、モノマーのポリマー粒子への拡散が速いことから、ブロックコポリマーの合成に非常に適してい

Table 2. Synthesis of HMW block copolymers consisting of PSt by emulsion TERP^a

Run	1 st monomer (equiv.)	2 nd monomer (equiv.)	First block				Second block					
			t (h)/ Conv. (%) ^b	M _n ^c ×10 ⁻³	<i>D</i> ^c	<i>d</i> ^d (nm)	PDI ^d	t (h)/ Conv. (%) ^b	M _n ^c ×10 ⁻³	<i>D</i> ^c	<i>d</i> ^d (nm)	PDI ^d
1	'BMA ^f (1000)	St (1000)	3/95	143	1.28	309	0.25	20/91	215	1.43	420	0.31
2	'BMA ^f (2000)	St (2000)	3/95	216	1.40	324	0.24	40/90	361	1.45	520	0.24
3	MMA ^f (500)	St (500)	3/94	47.1	1.34	20.4	0.14	20/99	76.6	1.25	31.3	0.12
4	MMA ^f (1000)	St (1000)	3/95	103	1.27	32.2	0.18	20/92	173	1.47	39.5	0.21
5	MMA ^f (2000)	St (2000)	3/95	194	1.31	30.6	0.12	40/91	309	1.49	41.3	0.13
6	BA (1000)	St (1000)	24/95	78.8	1.18	240	0.21	46/96	154	1.30	310	0.39
7	BA (2000)	St (2000)	24/93	145	1.21	293	0.22	46/95	329	1.44	389	0.36
8	<i>p</i> -ClSt (2000)	St (2000)	6/92	183	1.27	190	0.20	6/90	343	1.28	211	0.22

^a The first block was synthesized by heating a solution of **1Bc**, the first monomer (10 wt%), and CTAB (5 wt%) under irradiation with an LED lamp. After monomer conversion reached >90%, the second monomer was added, and the resulting mixture was stirred with irradiating an LED lamp. For methacrylates and acrylates, a 3 W LED lamp was used at 65 °C. For St and its derivatives, 6 W LED lamp was used at 80 °C, except for runs 2, 5 and 7, in which a 3 W LED lamp was used. ^b Determined by ¹H NMR. ^c Determined by SEC. ^d Determined by DLS. ^e CTA **1Bb** was used instead of **1Bc**. ^f Ditelluride **2** shown in Fig. 1a (1.0 equiv.) was added.

る。そこで、ジブロック共重合体の合成を検討した (Fig. 4a, Table 2)。^{26,34}

まず**1Bb**を用いてSt (200 equiv.)と*tert*-butyl methacrylate ('BMA, 200 equiv.) からなるブロック共重合体の合成を行った。なお、'BMAを重合する際には、すでに報告しているように分散度の制御を高めるため、ジテルライド **2b** (R = (C₂H₄O)₂CH₃, CTA に対して 1.0 equiv.) を添加した。^{26,36} ブロック共重合体の合成では、重合するモノマーの順番が重要となる。実際、まずStを重合した後に'BMAを重合した場合、20%程度のPStマクロ開始剤の残存が確認された。そこで、重合する順を変えると、すべてのPtBMAマクロ開始剤は消失し、望みのブロック共重合体が合成できた。

そこで次に、同じブロック共重合体の高分子量化を検討するため、それぞれのモノマー量を1,000当量に増やした (Table 2, run1)。なお、ホモ重合体合成の結果から、CTAとして**1Bb**の代わりに**1Bc**を、ジテルライドとしては**2b**の代わりに**2c**を使用した。PtBMAマクロCTA (M_n = 143,000, *D* = 1.28) を95%の'BMA転換率で合成した後、得られた乳液にStを加えて加熱・攪拌することでブロック共重合を行った。その結果、Stの転換率は91%に達し、目的通りにM_n = 215,000, *D* = 1.43を持つ構造の制御された高分子量体ジブロックコポリマーが得られた。同じ組成を持つより高分子量体のジブロック共重合体 (M_n = 361,000, *D* = 1.45) についても、各モノマーを2,000当量使って合成することができた (run 3)。ブロック共重合前後のSECからも、マクロ開始剤の消失と、新たなブロック共重合体の生成が確認された (Fig. 4b)。

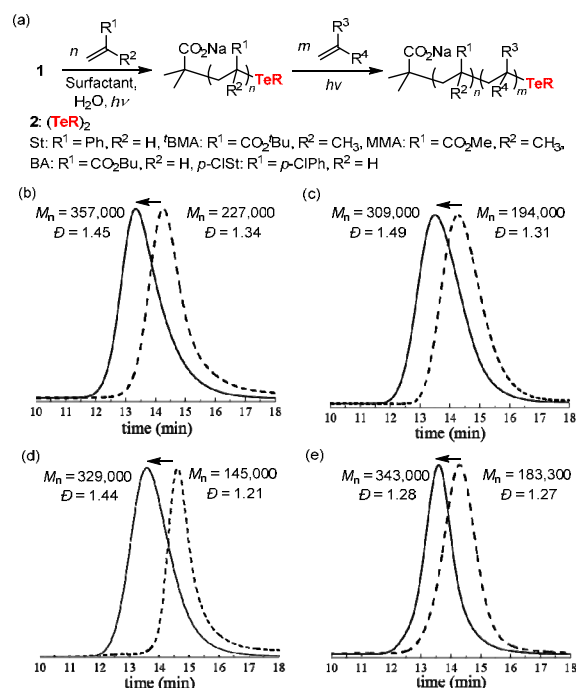


Fig. 4. Synthesis of block copolymers by emulsion TERP. a) Procedure and SEC traces before and after block copolymerization for the results shown in Table 2, b) run 2, c) run 5, d) run 7, e), and run 8. The dashed and solid lines represent macroinitiators and block copolymers, respectively.

同様な方法で、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) とPSt (runs 3-5)、ポリ (ブチルアクリレート) (PBA) とPSt (runs 6 and 7)、*Pp*-ClStとPSt (runs 8 and 9) からなる高分子量体のブロック共重合体の合成に成功した。いずれの場合も、マクロ開始剤が消失すると共に、低い分散度を持つ (*D* < 1.5) 単分散のブロック共重合体が合成できた (Fig.

4c, 4d, and 4e)。また、マクロ開始剤合成におけるモノマー変換率は93%を超えており、マクロ開始剤を単離精製する必要がなかった。さらに、ブロック共重合においても、モノマー転化率は90%を超えていることから、実用的な合成法であると言える。

ポリマー粒子のDLS測定では、いずれの場合も妥当な制御が確認された (PDI = 0.15 - 0.40)。P'BMA-*b*-PSt合成 (表2, run5) における粒子の成長は、ブロック共重合前後のTEM観察でも確認された (Fig. 5)。

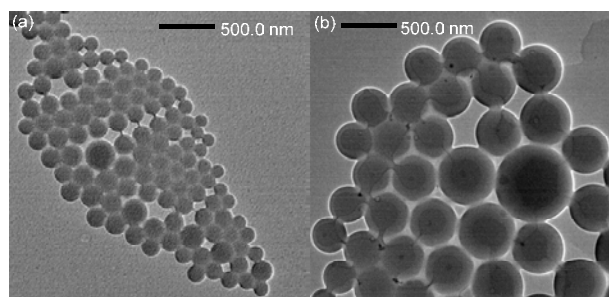


Fig. 5. TEM observations for the block copolymer synthesis with a monomer ratio of 2000:2000, a) P'BMA, and b) P'BMA-*b*-PSt.

4. 結言

親水性テルル基を持つCTAを用いたエマルジョンTERPにより、分子量と分散度が制御された、分子量が100万を超える超高分子量のPStが合成できた。また、この方法は数十万の分子量を持つブロック共重合体の制御合成にも有効である。これらの結果は、エマルジョンTERPが高分子量のPStセグメントを持つポリマー材料を設計するための非常に魅力的な方法であることを示している。³⁷

5. 謝辞

本研究は、日本学術振興会科研費21H05027 (SY.) およびJST SPRING、助成金番号JPMJSP2110 (YJ) の支援を受けて行ったものである。

References

- (1) Moad, G.; Solomon, D. H. *The Chemistry of Radical Polymerization*; Elsevier: Amsterdam, 2006.
- (2) Chatgililoglu, C.; Studer, A. *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*; Wiley, 2012; Vol. 4.
- (3) Matyjaszewski, K.; Möller, M. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*; Elsevier BV: Amsterdam, 2012; Vol. 3.
- (4) Corrigan, N.; Jung, K.; Moad, G.; Hawker, C. J.; Matyjaszewski, K.; Boyer, C. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *111*.
- (5) Mueller, L.; Jakubowski, W.; Matyjaszewski, K.; Pietrasik, J.; Kwiatkowski, P.; Chaladaj, W.; Jurczak, J. *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 730–734.
- (6) Percec, V.; Guliashevili, T.; Ladislav, J. S.; Wistrand, A.; Stjern Dahl, A.; Sienkowska, M. J.; Monteiro, M. J.; Sahoo, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14156–14165.
- (7) Nicolay, R.; Kwak, Y.; Matyjaszewski, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 541–544.
- (8) Kayahara, E.; Yamago, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2508–2513.
- (9) Rzaev, J.; Penelle, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1691–1694.
- (10) Carmean, R. N.; Sims, M. B.; Figg, C. A.; Hurst, P. J.; Patterson, J. P.; Sumerlin, B. S. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 613–618.
- (11) Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A. *Polymer Handbook, 4th Edition*; Wiley-Interscience, 2003.
- (12) Nakamura, Y.; Kitada, Y.; Kobayashi, Y.; Ray, B.; Yamago, S. *Macromolecules* **2011**, *44*, 8388–8397.
- (13) Gray, M. K.; Zhou, H. Y.; Nguyen, S. T.; Torkelson, J. M. *Macromolecules* **2003**, *36*, 5792–5797.
- (14) Jakubowski, W.; Kirci-Denizli, B.; Gil, R. R.; Matyjaszewski, K. *Macromol Chem Phys* **2008**, *209*, 32–39.
- (15) Mapas, J. K. D.; Thomay, T.; Cartwright, A. N.; Ilavsky, J.; Rzaev, J. *Macromolecules* **2016**, *49*, 3733–3738.
- (16) Mapas, J. K. D.; Thomay, T.; Cartwright, A. N.; Ilavsky, J.; Rzaev, J. *Macromolecules* **2016**, *49*, 3733–3738.
- (17) Charleux, B.; Delaittre, G.; Rieger, J.; D'Agosto, F. *Macromolecules* **2012**, *45* (17), 6753–6765.
- (18) Penfold, N. J. W.; Yeow, J.; Boyer, C.; Armes, S. P. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 1029–1054.
- (19) Liu, C.; Hong, C. Y.; Pan, C. Y. *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 3673–3689.
- (20) Kitayama, Y.; Okubo, M. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 2573–2580.
- (21) Truong, N. P.; Dussert, M. v.; Whittaker, M. R.; Quinn, J. F.; Davis, T. P. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 3865–3874.
- (22) Zhang, X.-Y.; Liu, D.-M.; Lv, X.-H.; Sun, M.; Sun, X.-L.; Wan, W.-M. *Macromol Rapid Commun* **2016**, *37*, 1735–1741.
- (23) Zetterlund, P. B.; Kagawa, Y.; Okubo, M. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3747–3794.
- (24) Zetterlund, P. B.; Thickett, S. C.; Perrier, S.; Bourgeat-Lami, E.; Lansalot, M. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 9745–9800.
- (25) Yamago, S.; Iida, K.; Yoshida, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2874–2875.
- (26) Yamago, S.; Iida, K.; Yoshida, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13666–13667.
- (27) Yamago, S. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5051–5068.
- (28) Fan, W. J.; Tosaka, M.; Yamago, S.; Cunningham, M. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 962–966.
- (29) Jiang, Y.; Fan, W.; Tosaka, M.; Cunningham, M. F.; Yamago, S. *Macromolecules* **2021**, *54*, 10691–10699.
- (30) Yamago, S.; Ukai, Y.; Matsumoto, A.; Nakamura, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2100.
- (31) Nakamura, Y.; Yamago, S. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2013**, *9*, 1607–1612.
- (32) Yamago, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2020**, *93* (2), 287–298.
- (33) Mukerjee, P.; Mysels, K. J. *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*; National Standard reference data system, 1971.
- (34) Candau, F. *Polymeric Dispersions: Principles and Applications*; Asua, J. M., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1997.
- (35) Goto, A.; Kwak, Y.; Fukuda, T.; Yamago, S.; Iida, K.

Nakajima, M.; Yoshida, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8720–8721.
(36) Kwak, Y.; Tezuka, M.; Goto, A.; Fukuda, T.; Yamago, S.

Macromolecules **2007**, *40*, 1881–1885.
(37) Jiang, Y.; Fan, W.; Tosaka, M.; Yamago, S. *ACS Macro Lett.* **2022**, *11*, 1331–1335.

4 級化したポリ(2-ビニルピリジン)の希薄溶液物性

Dilute Solution Properties of Quaternized Poly(2-vinyl pyridine)

帖佐智也・中村 洋

Tomoya CHOSA, Yo NAKAMURA

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

Six Poly(*N*-methyl-2-vinylpyridinium chloride) (MeP2VPCl) samples with different weight-average molecular weights M_w ranging from 9×10^3 to 2×10^3 were prepared by methylation of poly(2-vinylpyridine) samples. Light scattering measurements were made on these samples in aqueous NaCl to determine the mean-square radius of gyration $\langle S^2 \rangle$ and the second virial coefficient A_2 as functions of M_w and the salt concentration C_s . Small-angle X-ray scattering measurements were carried out on a sample with the lowest M_w to determine $\langle S^2 \rangle$ and the particle scattering function at different C_s . Analyzing the obtained data, the stiffness parameter λ^{-1} and the excluded-volume strength B were determined as functions of C_s . Although the values of B for MeP2VPCl were close to those for sodium poly(styrene sulfonate) (NaPSS), the values of λ^{-1} for MeP2VPCl were much larger than those for NaPSS. This was attributed to the position of the ionizing group of MeP2VPCl much closer to the main chain than that of NaPSS.

1. 序

希薄溶液中の高分子電解質は、解離状態にある電離基間に働く斥力相互作用により中性の高分子とは異なった挙動をすることが知られている。この斥力相互作用は鎖の剛直性を高め、排除体積効果を強める2つの働きをする¹⁻³⁾。両相互作用を分離して評価する試みが則末らによって行われ、ヒアルロン酸⁴⁾、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム⁵⁾ (NaPSS)、2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸ナトリウム⁶⁾ (PAMPS)の持続長 q 、排除体積強度 B が添加塩濃度 C_s の関数として決定された。その結果、 q および B の C_s 依存性が既存の理論で定性的に表されることが示された。しかしながら、低 C_s におけるデータは定量的に表されず、のちに山川ら⁷⁾が電荷間相互作用にDebye-Hückelポテンシャルを仮定したコンピューターシミュレーションにより検討したが、 C_s が0.2 M以下における実験結果を表すことはできなかった。希薄溶液中の高分子電解質に関しては検討の余地があり、実験的にも対象高分子を広げてさらなる研究が必要である。

ポリビニルピリジン (PVP) を4級化すると高分子電解質になることが知られている。2-ビニルピリジン (P2VP) ははアニオン重合に依って重合することができ、広い分子量範囲にわたる分子量分布の狭い試料を得ることができる。4級化反応も温厚な条件で進行し、高分子電解質の研究に適したサンプルであるといえる。

4級化P2VPの希薄溶液物性に関する代表的な実験的研究として、山口らとBeerらの結果がある。山口ら⁸⁾は、重量平均分子量 $M_w = 9.8 \times 10^4 - 2.7 \times 10^6$ のPVPをメチル化剤により4級化し、高分子電解質とした。これらの試料のNaCl水溶液中の固有粘度を C_s を変えて測定し、静電的排除体積パラメータの C_s による変化として実験データを説明した。

Beerら⁹⁾は $M_w = 1.7 \times 10^5 - 8.8 \times 10^5$ のP2VP試料をエチル化剤、ブチル化剤、オクチル化剤、ベンジル化剤を用い

て4級化し、臭素化塩とした。NaBr水溶液中のこれらのサンプルの根平均二乗回転半径 $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ の M_w および C_s 依存性を調べ、実験データの添加塩濃度依存性が排除体積効果の電離基の解離度に伴う変化として説明できるとした。

両グループともに排除体積効果に関するパラメータのみで実験データを説明しているが、これはこれらのデータが比較的高分子量領域のみに限られるためと考えられる。静電的持続長までを議論するためには低分子量試料を含む、広い範囲にわたるデータが必要である。

そこで本研究では $M_w = 9.0 \times 10^3 - 2.0 \times 10^6$ の分子量範囲にわたるメチル化P2VP、poly(*N*-methyl-2-vinylpyridinium chloride) (MeP2VPCl) を合成し、光および小角X線散乱により粒子散乱関数、 $\langle S^2 \rangle$ 、および第二ビリアル係数 A_2 を C_s の関数として決定し、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、剛直性パラメータ λ^{-1} ($= 2q$) および B を分離評価することを試み、これらの分子パラメータの C_s 依存性を既存の理論と比較した。

2. 実験

PVP試料

本研究で使用したP2VP試料のうち3試料 (P2VP-A, P2VP-2, P2VP-C) は名古屋大学の高野敦志博士より提供され、残りの3試料 (P607-2VP, P7538-2VP, P19937-2VP) はPolymer Source社製のものを購入した。名古屋大学から提供された試料の高分子鎖末端にはcumylが存在し、Polymer Source社の試料には1,1-diphenyl-3-methyl pentyl基が存在する。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 測定の結果、P607-2VPは分子量分布が広く、またP2VP-A、P2VP-Bには二量体や分解物と思われる副ピークが見られたため、分別沈殿法による逐次分子量分別を行い、その中心フラクションを用いた。その際、溶媒として2-ブタン、沈殿剤としてリグロインまたはシクロヘキサンを使用した。

MeP2VPCl試料の調製

P2VP のメチル化反応は山口ら⁸⁾の報告を参考に行った。内部をアルゴンガスで置換した二ツロナス型フラスコ内で P2VP を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解させ、10 倍等量の硫酸ジメチルを加えて 25℃ 下で 24 時間攪拌し、ピリジン環を構成する窒素原子のメチル化を行った。反応後、生成物をアセトン中に沈殿させ、ガラスフィルターで減圧ろ過して沈殿を取り出し、アセトンで洗浄し、真空乾燥した。得た試料を水に溶解し、1 M NaCl 水溶液に対して 3 ～ 5 日透析をおこなうことで対イオンを Cl⁻に置換した。その後、純水に対して 4 ～ 7 日間透析を行い、試料中の過剰な塩を取除いたのち、凍結乾燥を行い白色の MeP2VPCl 試料を得た。

P2VP 中の窒素原子のうちメチル化されたものの割合である 4 級化度は紫外可視吸光測定と中和滴定により決定した。あらかじめ MeP2VPCl 試料の一つ (MeP2VPCl-654k) を使用して高分子質量濃度 c の異なる 6 つの溶液を作成し、吸光ピークである波長 267 nm における吸光度 ΔA を測定し、吸光係数 $\Delta A/c$ を $6.10 \times 10^3 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ と決定した。次に、試料溶液の約 0.1 wt% の濃度の水溶液を作成し、陰イオン交換樹脂 (オルガノ社製 Amberlite IRA400J Cl) に通して対イオンを OH⁻に交換し、この溶液の一部を定量的に 3 倍に希釈し、紫外可視吸光測定により、高分子濃度を定量した。また、溶液 40.0 mL を取り、0.010 mol/L の標準塩酸溶液により pH メーターを用いて滴定し、滴定曲線の変曲点から中和点を決めた。これにより 4 級化された窒素原子の定量をした。これらの測定により、4 級化度 DQ を求めた。

小角 X 線散乱測定

$C_s = 0.1, 0.05, 0.01 \text{ M}$ の NaCl 水溶液に MeP2VPCl-6k を溶かし、25℃ における小角 X 線散乱測定を高輝度放射光実験施設 SPring8 のビームライン BL40B2 で行った。検出器として Dectris 社製 PLATUS3S 2M を使い、入射 X 線波長 0.1 nm、カメラ長約 4.2 m とした。 c が $1.0 - 5.0 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}$ の 4 溶液および溶媒である NaCl 水溶液に対して測定を行った。1 つの溶液に対し 3 分間の測定を連続して 3 回おこない、3 回の円環積分後のデータが一致していることを確認後、各散乱ベクトルの絶対値 q における散乱強度の平均値をとった。それぞれ透過強度補正をした溶液の散乱強度から溶媒の散乱強度を差し引き、過剰散乱強度 $\Delta I(q)$ を求めた。各 q における $[c/\Delta I(q)]^{1/2}$ を c に対してプロットし、 $c \rightarrow 0$ への外挿値 $[c/\Delta I(q)]_{c \rightarrow 0}^{1/2}$ を求めた。さらに $[c/\Delta I(q)]_{c \rightarrow 0}^{1/2}$ を q^2 に対してプロットし、 $q \rightarrow 0$ への外挿値 $[c/\Delta I(0)]_{c \rightarrow 0}^{1/2}$ を求めた。粒子散乱関数 $P(q)$ は次式から求めた。

$$P(q) = \frac{[c/\Delta I(0)]_{c \rightarrow 0}}{[c/\Delta I(q)]_{c \rightarrow 0}} \quad (1)$$

静的光散乱測定

$C_s = 0.1, 0.05, 0.01 \text{ M}$ の NaCl 水溶液に MeP2VPCl 各試料を

溶解し、25℃ において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が付いた Wyatt 社製 DAWN EOS (光源波長 690 nm) を用いた。測定温度は E 型熱電対を用いて測定した。各試料溶液は孔径 0.45 μm 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純トルエンからの散乱光強度から決定した。各散乱角における検出器感度の補正は、東ソー社製ポリエチレンオキシド標準試料 SE-2 ($M_w = 2.36 \times 10^4$) 水溶液を用いて行った。

得られた光散乱データを 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 $(Kc/\Delta R_\theta)_{c \rightarrow 0}^{1/2}$ を求め、 $(Kc/\Delta R_\theta)_{c \rightarrow 0}^{1/2}$ 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。

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

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。 $C_s = 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 \text{ M}$ の NaCl 水溶液に MeP2VPCl620 を溶解し、 $c = 5.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-3}$ の範囲にある 5 ～ 6 濃度の溶液を調整し、温度 25℃、波長 690 nm における溶媒との屈折率差 Δn を Wyatt Technology 社製 Optilab DSP で測定した。選択吸着の影響を考慮して各 C_s における最高濃度の溶液は溶液調整に用いた溶媒と同塩濃度の塩水溶液に対して約 1 週間透析をおこなった後に測定した。各溶液は透析膜外液を用いて希釈した。各 C_s における Δn を c に対してプロットし、その直線勾配より C_s が 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 M における $(\partial n/\partial c)$ を決定した。その他の C_s における $(\partial n/\partial c)$ は直線内挿によって求めた。また、 C_s が 0.1, 0.05, 0.01 M における溶液密度を Anton Paar 社製密度計 DMA5000 を用いて測定し、溶質の部分比容 \bar{v} を測定した。

3. 結果および考察

3-1. みみず鎖モデルに基づく実験データの解析

Figure 1に $C_s = 0.1, 0.05, 0.01$ MにおけるMeP2VPCI-6k粒子散乱関数を還元Holtzerプロットによって表す。みみず鎖モデルに基づく理論¹⁰⁾によれば、 $P(q)$ は鎖の直径 d 、剛直性パラメータ λ^{-1} 、鎖の経路長 L を用いて次の様に表される。

$$P(q) = P(q; \lambda L, \lambda d) \quad (3)$$

L は単位経路長あたりの分子量 M_L を用いて次式より分子量と関連付けられる。

$$L = M_w / M_L \quad (4)$$

図中の実線は $d = 2.2$ nm、 $M_L = 1150$ g mol⁻¹とし、Table Iに示したパラメータを用いて計算した理論値を表す。 $C_s = 0.1$ Mおよび 0.05 Mにおけるデータは実線によってほぼ表されている。一方で $C_s = 0.01$ Mの $q > 0.5$ nm⁻¹におけるデータ点は理論線によって表すことができない。このような低塩濃度においては散乱強度の高分子濃度依存性が強く、 $q > 0.5$ nm⁻¹におけるデータの濃度0への外挿値が正確に求まらなかった可能性がある。 $q < 0.5$ nm⁻¹におけるデータを使用し、 $[c / \Delta I(q)]^{1/2}$ の q^2 に対するプロットを直線近似し、その

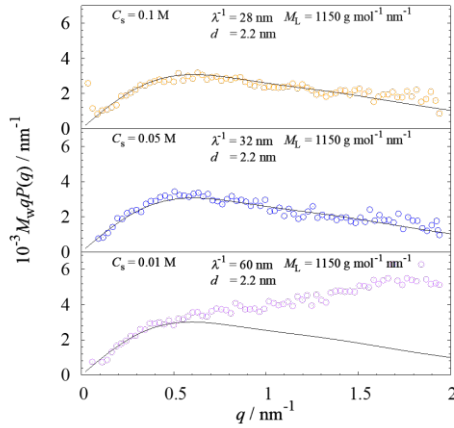


Figure 1. Holtzer plots for MeP2VPCI-6 in aqueous NaCl solutions with the indicated salt concentrations.

直線の勾配より各 C_s における $\langle S^2 \rangle$ を求めた。

Figure 2に $\langle S^2 \rangle$ 対 M_w の両対数プロットを示す。最低分子量試料のデータ点はSAXSによる実験値で、他は光散乱による測定値である。 $M_w > 10^5$ において、 $\langle S^2 \rangle$ は C_s の減少に従って増大している。排除体積効果を考慮すると、みみず鎖モデルの $\langle S^2 \rangle$ は次式で表される¹⁰⁾。

$$\langle S^2 \rangle = \alpha_s^2 \left[\frac{L}{6\lambda} - \frac{1}{4\lambda^2} + \frac{1}{4\lambda^3 L} - \frac{1}{8\lambda^4 L^2} (1 - e^{-2\lambda L}) \right] \quad (5)$$

α_s は回転半径膨張因子であり、 λL と λB の関数として表される。図中の実線は式(5)による理論値を表し、実験値は理論値によって表すことができる。

Figure 3は光散乱によって決定した A_2 の分子量依存性を示す。 A_2 は C_s の減少に伴い増加している。みみず鎖モデル

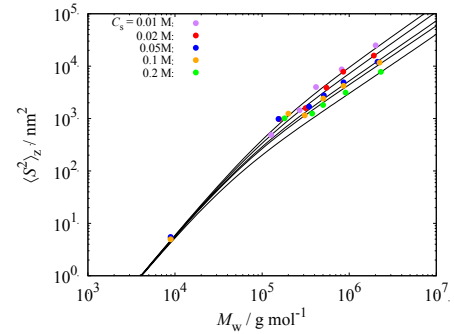


Figure 2. Mean-square radius of gyration for MeP2VPCI in NaCl aq. with the indicated salt concentrations plotted double-logarithmically against M_w .

に基づく理論¹⁰⁾によると、 A_2 は次式で表される。

$$A_2 = 4\pi^{3/2} N_A \frac{\langle S^2 \rangle^{3/2}}{M^2} \Psi(\lambda L, \lambda B) \quad (6)$$

Ψ は貫入度関数である。図中の実線は式(6)による計算値を表し、実験値は理論値によってよく表すことができる。

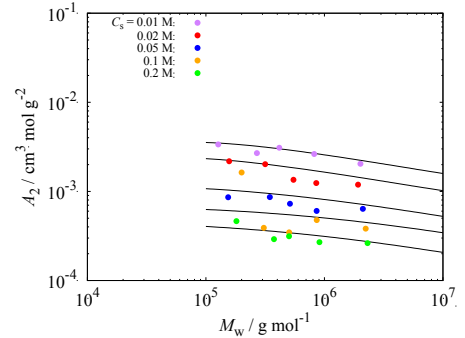


Figure 3. Second virial coefficient for MeP2VPCI in NaCl aq. with the indicated salt concentrations plotted double-logarithmically against M_w .

3-2. 分子パラメータの塩濃度依存性

Figure 4の白丸印は本研究で決定したMeP2VPCIの λ^{-1} の $C_s^{-1/2}$ に対するプロットを示す。図中にNaPSSおよびPAMPSに対するデータ点をそれぞれ黒丸および三角で示す。NaPSSとPAMPSに対する値は近いが、MeP2VPCIに対する値はこれらよりはるかに大きくなっている。MeP2VPCIに対するデータは図中の破線で表す直線で近似することができ、これより $C_s^{-1/2} \rightarrow 0$ への外挿値より、高分子固有の剛直性パラメータ λ_0^{-1} を求めた。

高分子電解質の λ^{-1} は λ_0^{-1} と電荷間相互作用による寄与 λ_{el}^{-1} の和として表されると考えられている^{1,2)}。

$$\lambda^{-1} = \lambda_0^{-1} + \lambda_{el}^{-1} \quad (7)$$

Figure 4 中の実線は上で求めた λ_0^{-1} を使い、Odik-Skolnick-Fixman(OSF)理論^{1,2)}により計算した λ_{el}^{-1} を用いて計算した値を示す。理論値はMeP2VPCIよりもむしろNaPSSとPAMPSのデータに近くなっている。NaPSSとPAMPSの電離基は主鎖から離れた位置に存在するが、MeP2VPCIのそれは主鎖に近くなっている。この違いが、電荷間相互作用の主鎖剛直性への寄与の違いを生じさせたものと考えられる。

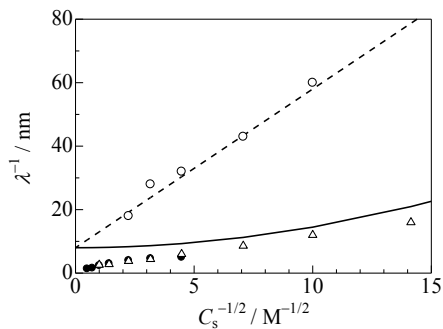


Figure 4. Stiffness parameters for MeP2VPCI (unfilled circles), NaPSS (filled circles), and PAMPS (triangles) in NaCl aq. plotted against $C_s^{-1/2}$. Dashed line, fitted line to MeP2VPCI data; solid line, calculated values by the OSF theory.

Figure 5にMeP2VPCI、NaPSS、PAMPSの排除体積強度 B の $C_s^{-1/2}$ に対するプロットを示す。記号はFigure 4と同じものをを用いている。 $C_s^{-1/2} < 5$ におけるMeP2VPCIに対する B はNaPSS、PAMPSと近くなっているが、 $C_s^{-1/2}$ が5以上になると後者の2つのポリマーに対する値よりもやや大きくなる。

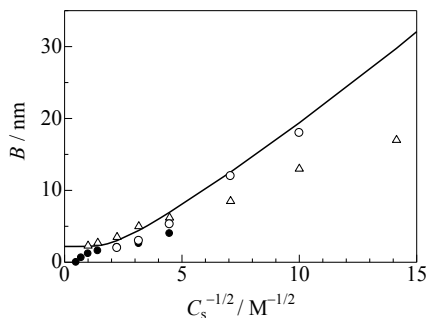


Figure 5. Excluded-volume strengths for MeP2VPCI (unfilled circles), NaPSS (filled circles), and PAMPS (triangles) in NaCl aq. plotted against $C_s^{-1/2}$. Solid line shows the calculated values by the FS theory.

高分子電解質の B は次式の様に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³⁾。

$$B = B_0 + B_{el} \quad (8)$$

上で求めた M_L と溶液密度測定から求めたMeP2VPCIに対する部分比容の値 $0.76 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ より鎖のハードコア直径 d_c を 1.4 nm と見積り、次式より B_0 を 2.2 nm と求めた。

$$B_0 = \frac{\pi}{2} d_c \quad (9)$$

求めた B_0 に Fixman-Skolnick (FS) の理論³⁾ による B_{el} を加えて計算した値を図中の実線で表す。理論値はMeP2VPCIに対する実験値と近くなっている。

4. 結論

塩水溶液中のMeP2VPCIに対し、SAXSおよび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 $\langle S^2 \rangle$ および A_2 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 λ^{-1} と B を求めた。MeP2VPCIに対する λ^{-1} はNaPSSおよびPAMPSに対する値もしくはOSF理論による計算値よりもはるかに大きくなった。これはMeP2VPCIの電離基の位置が他のポリマーに比べて主鎖に近いことからくるものと考えた。一方で、MeP2VPCIの B は他のポリマーに対する値に近く、FS理論によってほぼ定量的に表すことができた。

謝辞 本研究で使用しましたP2VP試料を提供してくださいました名古屋大学工学研究科の高野敦志博士に感謝いたします。

参考文献

- 1) T. Odijk, *Polymer*, **19**, 989 (1978).
- 2) J. Skolnick and M. Fixman, *Macromolecules*, **10**, 944 (1977).
- 3) M. Fixman and J. Skolnick, *Macromolecules*, **11**, 863 (1978).
- 4) K. Hayashi, K. Tsutsumi, T. Norisuye, and A. Teramoto, *Polym. J.*, **28**, 922 (1996).
- 5) Y. Iwamoto, E. Hirose, and T. Norisuye, *Polym. J.*, **32**, 428 (2000).
- 6) R. Hagino, J. Yashiro, M. Sakata, T. Norisuye, *Polym. J.*, **38**, 861 (2006).
- 7) H. Yamakawa, T. Yoshizaki, and D. Ida, *J. Chem. Phys.*, **139**, 204902 (2013).
- 8) M. Yamaguchi, Y. Yamaguchi, Y. Matsushita, and I. Noda, *Polym. J.*, **22**, 1077 (1990).
- 9) M. Beer, M. Schmidt, and M. Muthukumar, *Macromolecules*, **30**, 8375 (1997).
- 10) H. Yamakawa and T. Yoshizaki, *Helical Wormlike Chains in Polymer Solutions* 2nd Ed., Springer, Heidelberg, 2016.

絶縁性高分子と結晶性共役高分子のブレンドによる電荷輸送特性の向上

Improved Charge Transport of Crystalline Conjugated Polymer Blended with Insulating Polymer

大北 英生・キム ヒョンド・堀内 宥也

Hideo OHKITA, Hyung Do KIM, Yuya HORIUCHI

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

Herein, we have studied hole transport properties in a crystalline conjugated polymer blended with an insulating polymer by measuring macroscopic and local current density-voltage (J - V) characteristics. More specifically, we employed a benzodithiophene-based crystalline conjugated polymer (PBDB-T), and insulating polystyrenes with low and high weight-average molecular weights (PS-L and PS-H). With decreasing PBDB-T weight fractions, hole mobility was slightly improved for PBDB-T/PS-L and more clearly increased for PBDB-T/PS-H blend films. Absorption spectra of these films show that PBDB-T is more molecularly ordered in the order of PBDB-T solution, in PBDB-T neat, PBDB-T/PS-H blend, and highest in PBDB-T/PS-L blend films. In addition, two-dimensional grazing incidence X-ray diffraction (2D-GIXD) patterns of them show that PBDB-T is more crystallized in the order of in PBDB-T neat, PBDB-T/PS-H blend, and in PBDB-T/PS-L blend films. Thus, these findings suggest that highest hole mobility is not simply due to highest crystallinity of PBDB-T. We further studied local conductivity of these films by using conductive atomic force microscopy (C-AFM). As a result, we found that hole conductivity is modestly improved homogeneously in PBDB-T/PS-L films while it is significantly increased locally at phase-separated PBDB-T rich domains in PBDB-T/PS-H films. We therefore conclude that hole mobility would be enhanced in phase-separated PBDB-T rich domains where PBDB-T crystallites are concentrated and hence connected together by tie chains.

1. はじめに

2019年の日本化学繊維研究所第76回講演会では、非晶性の導電性共役高分子であるキノキサリンとチオフェン骨格を主鎖に有するPTQ1と絶縁性高分子であるポリスチレンPSとのブレンド膜における正孔輸送特性が、PTQ1ニート膜よりも向上することを報告した¹⁾。この系では、非晶性共役高分子PTQ1がPSマトリックス中に導入されると、PTQ1の分子間相互作用が抑制されることによりトラップサイトが減少するとともに、電荷輸送に適した主鎖形態をとることにより電荷輸送特性が向上することを明らかにした²⁾。

本研究では、結晶性共役高分子であるベンゾジチオフェンを主鎖骨格に有するPBDB-T (図1a) と絶縁性高分子であるPS (図1b) とのブレンド膜に着目し、正孔輸送特性が

ニート膜と比較してどのように変化するのか検討し、結晶性の観点からその原因について考察した。また、マトリックス高分子であるPSは分子量の異なるものを用い、相分離構造による電荷輸送特性の違いについても検討した。

2. マクロ電気伝導特性

用いた高分子材料の分子量を表1に示す。共役高分子であるPBDB-Tは M_w が10万程度、マトリックスとして用いる絶縁性高分子PSは M_w が数千程度のもものと10万程度のもものをそれぞれ用いた。PBDB-TとPSのブレンド膜は、重量組成比を10 : 0, 8 : 2, 5 : 5, 2 : 8と系統的に変化させたものを作製した。

Table 1. Molecular weights of polymers employed.

	M_w	M_n	M_w/M_n
PBDB-T	80,000	57,000	1.4
PS-L	3,610	3,470	1.04
PS-H	131,000	127,000	1.03

高分子薄膜の正孔輸送特性は、透明導電膜であるPEDOT:PSSをコートしたITO基板と金電極により構成される素子を用いて評価した。PEDOT:PSSおよび金はいずれも大きな仕事関数を有するため正孔キャリアのみを注入することになるので、正孔に関する電気伝導特性を選択的に測定できる。図2aに示すように、低電圧側では電流密度 J と電圧 V が比例関係にあるオーミックな挙動 (傾き1の傾

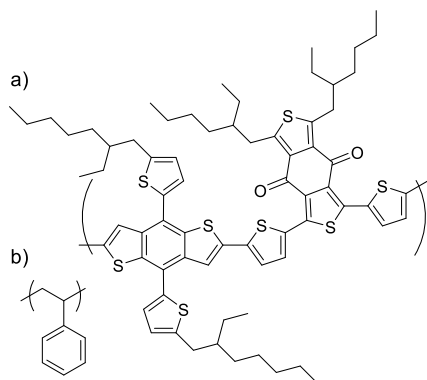


Figure 1. Chemical structures of materials employed in this study: a) PBDB-T and b) PS.

域)を示し、式1の関係から膜厚 L を用いて電気伝導率 σ が評価できる。

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

一方、高電圧側では J が V の二乗に比例する空間制限電流(space-charge limited current: SCLC)の挙動(傾き2の領域)が観測される。トラップが無視できる材料では、SCLC領域の J と V は、Mott-Gurney式にしたがう³⁾。

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

ここで、 ϵ_0 は真空の誘電率、 ϵ_r は比誘電率であり $\epsilon_r = 2.8$ と仮定した。

ブレンド膜の正孔移動度 μ_h は、図2bに示すように、絶縁体材料であるPS組成の増加とともに向上することが分かる。マトリックスが低分子量のPBDB-T/PS-Lブレンド膜の場合、PS-Lの増加とともに移動度はやや増加したのちほぼ一定の値を示した。これに対して、マトリックスが高分子量のPBDB-T/PS-Hブレンド膜の場合、PS-Hの増加とともに移動度は2倍以上に増加したのちPS分率が80 wt%では大

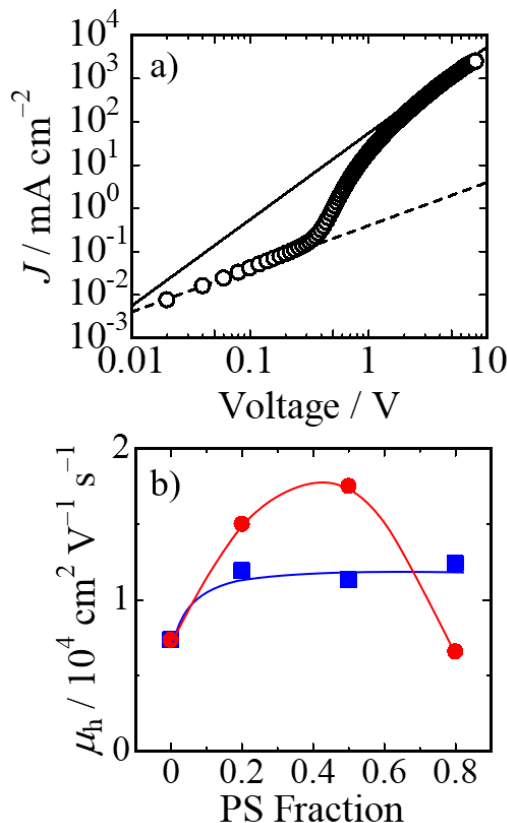


Figure 2. a) J - V characteristics of a hole-only device based on PBDB-T neat film. Broken and solid lines represent fitting lines by using equations 1 and 2, respectively. b) Hole mobility in PBDB-T/PS blend films plotted against the weight fraction of PS in the blend: blue squares and red circles represent the mobility in PBDB-T/PS-L and PBDB-T/PS-H blend films, respectively.

く減少した。したがって、絶縁体高分子として用いるマトリックスの分子量によりブレンドする共役高分子のマクロな電荷輸送特性が変化することが分かった。

3. PBDB-T/PS膜のモルフォロジー

3-1. 吸収スペクトル

PS膜中にて希釈されたPBDB-T鎖の凝集形態が組成によりどのように変化しているのかを検討するため、PBDB-Tクロロベンゼン溶液、PBDB-Tニート膜、組成5:5のPBDB-T/PSブレンド膜に対して吸収スペクトルを測定した。灰色実線はクロロベンゼン溶液中におけるPBDB-Tの吸収スペクトルであり、他の実線はPSフィルム中におけるPBDB-Tの吸収スペクトルである。スペクトル形状を比較するため400 nmでの付近の吸光度をおおむねそろえた上で、薄膜に対しては600 nmにて規格化している。0-0バンドのピーク波長を比較すると、PBDB-T溶液、PBDB-Tニート膜、PBDB-T/PS-H、PBDB-T/PS-Lブレンド膜の順に、より長波長へシフトしていることが分かる。また、各フィルムの吸収スペクトルを比較すると、0-1バンドに対する0-0バンドの強度比がこの順に増加している。したがって、PBDB-Tニート膜、PBDB-T/PS-H、PBDB-T/PS-Lブレンド膜の順にPBDB-Tの結晶性あるいは主鎖の秩序性が向上していることを示唆している⁴⁾。この結果は、PBDB-T/PS-Hブレンド膜において正孔移動度が最も高い値を示した前節の結果とは対応していない。

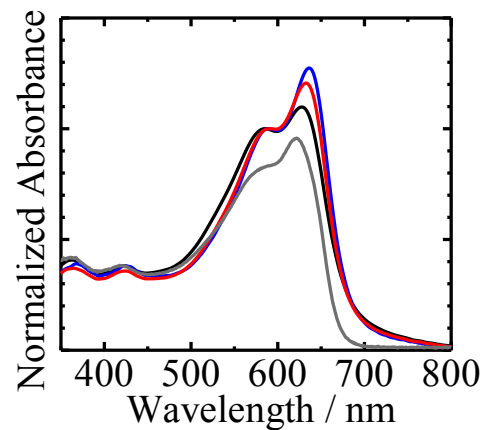


Figure 3. Absorption spectra of PBDB-T in chlorobenzene (gray line), PBDB-T neat (black line), PBDB-T/PS-H (red line), and PBDB-T/PS-L (blue line) blend films.

3-2. 2D-GIXD像

PBDB-Tニート膜、PBDB-T/PS-H、PBDB-T/PS-Lブレンド膜におけるPBDB-Tの結晶性を評価するため、各薄膜試料に対して二次元斜入射X線回折(2D-GIXD)測定を行った。図4に示すように、いずれの試料に対しても面外方向の $q_z = 17.2 \text{ nm}^{-1}$ に共役高分子の π スタック周期構造に帰す

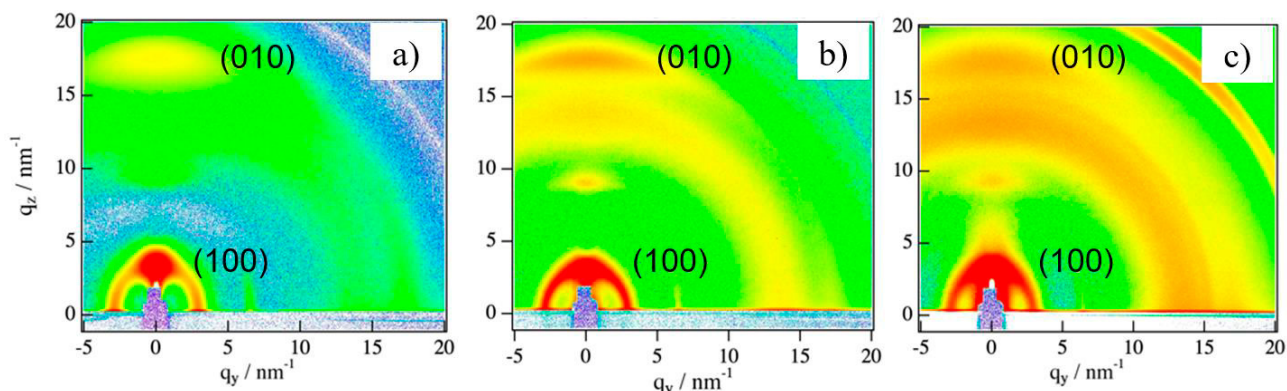


Figure 4. 2D-GIXD patterns of a) PBDD-T neat, b) PBDB-T/PS-L blend, and c) PBDB-T/PS-H blend films.

る(010)の回折ピークが、 $q_z = 3.1 \text{ nm}^{-1}$ には共役高分子のラメラ周期構造に帰する(100)の回折ピークが観測され、面間隔はそれぞれ0.35 nmおよび2.02 nmと見積もられた。面外方向に(010)および(100)の回折ピークがともに観測されたことから、Face-on配向とEdge-on配向が共存した状態であるといえる⁹⁾。また、(100)の回折ピークの半値幅よりScherrerの式を用いて結晶子のコヒーレンス長 (L_c) を見積もった結果を表1にまとめる。ここで、装置による半値幅の広がりなどの補正は行っていない。表に示すように、 π スタック方向の L_c は、PBDB-T/PS-Lブレンド膜が最も大きく、PBDB-T/PS-Hブレンド膜とPBDB-Tニート膜ではほぼ同程度である。ラメラ方向の L_c は、PBDB-T/PS-Lブレンド膜が最も大きく、PBDB-T/PS-Hブレンド膜、PBDB-Tニート膜の順に減少することが分かった。すなわち、PBDB-Tの結晶性はPBDB-T/PS-Lブレンド膜において最も高く、次いでPBDB-T/PS-Hブレンド膜が高く、PBDB-Tニート膜において最も低いことを示している。この結果は、吸収スペ

クトルの結果と一致しているものの、正孔移動度の結果とは対応していない。したがって、前節で示した電荷輸送特性は共役高分子の結晶性だけでは説明できないことを示している。

Table 1. Coherence length of PBDB-T crystallites in films.

	Coherence length L_c / nm	
	Lamella (100)	π -stack (010)
PBDB-T	4.33	1.98
PBDB-T/PS-L	13.3	2.81
PBDB-T/PS-H	7.21	1.91

4. PBDB-T/PS膜の電流計測AFM測定

PBDB-T/PSブレンド膜における局所電荷輸送特性を直接評価するために、電流計測原子間力顕微鏡 (C-AFM) 測定を行った。図5はPBDB-T/PS-Lブレンド膜のAFMの高さ像 (上段) とC-AFMの電流像 (下段) である。上段の高さ

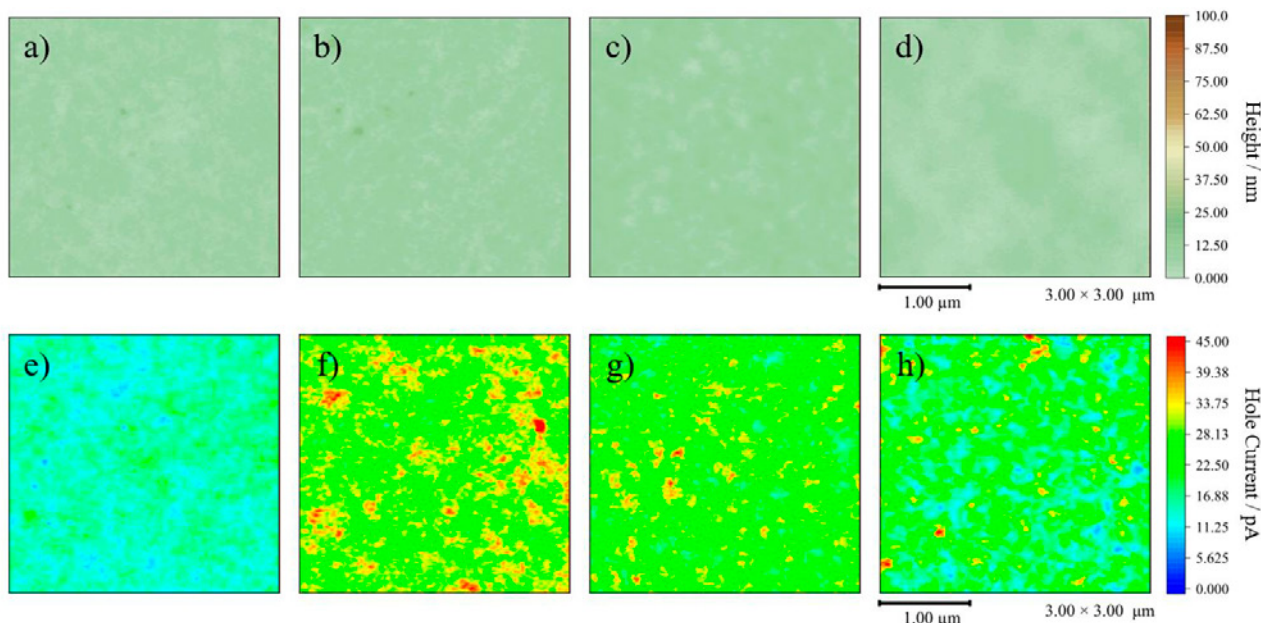


Figure 5. AFM images of PBDB-T/PS-L films with different PS fractions: a) and e) 0 wt%, b) and f) 20 wt%, c) and g) 50 wt%, and d) and h) 80 wt%. Upper and bottom images are height and hole current images, respectively.

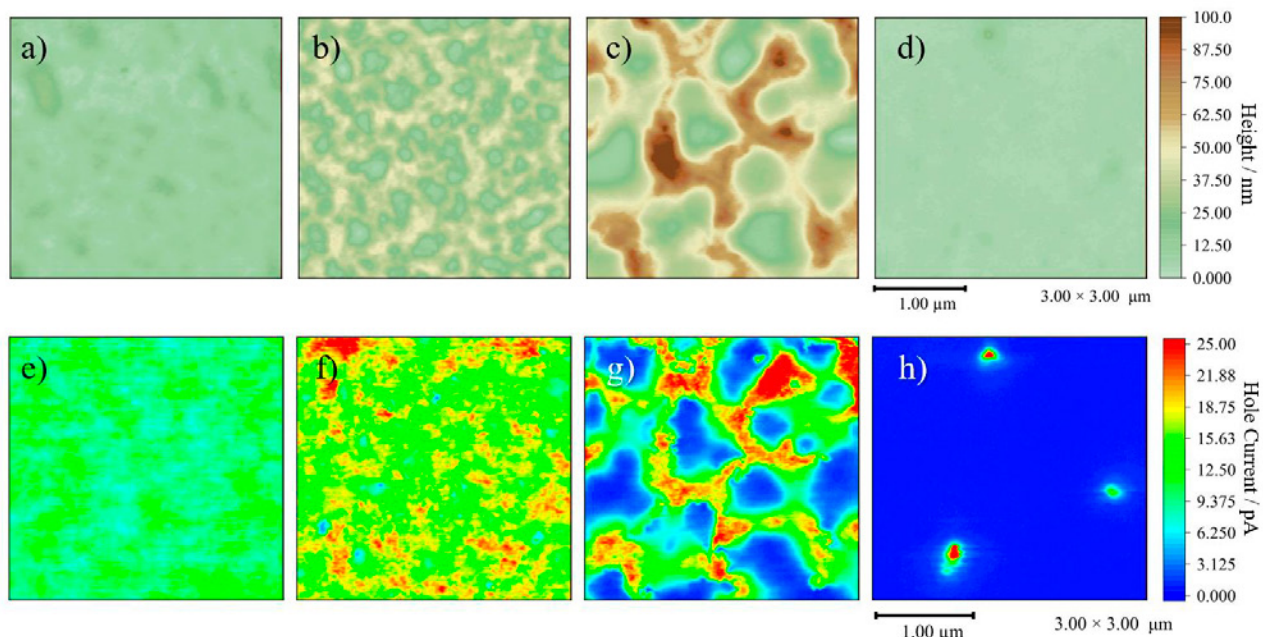


Figure 6. AFM images of PBDB-T/PS-H films with different PS fractions: a) and e) 0 wt%, b) and f) 20 wt%, c) and g) 50 wt%, and d) and h) 80 wt%. Upper and bottom images are height and hole current images, respectively.

像ではブレンド組成比によらず均一で様な像が得られており、PBDB-TとPS-Lは比較的均一に相溶していることが分かる。下段の電流像においてもところどころに電流値が高いドメインが部分的に観測されるものの比較的均一に膜全体の電流値がPSの導入とともに増大していることが分かる。また、この傾向は図2bに示すマクロな電気伝導特性の傾向と一致している。

図6はPBDB-T/PS-Hブレンド膜のAFMの高さ像（上段）

とC-AFMの電流像（下段）である。上段の高さ像ではPSの導入とともにマイクロメートルスケールの海島構造からなる相分離形態が観測されている。PSの重量比が50 wt%までは相分離構造が増大するものの80 wt%ではニート膜のような均一な形態を示している。下段の電流像においても同様に海島構造の相分離形態が観測され、膜厚の厚い島状ドメインにおいて大きな電流値が観測されている。電流値は、PSの重量比が50 wt%の時に最大であり、80 wt%では

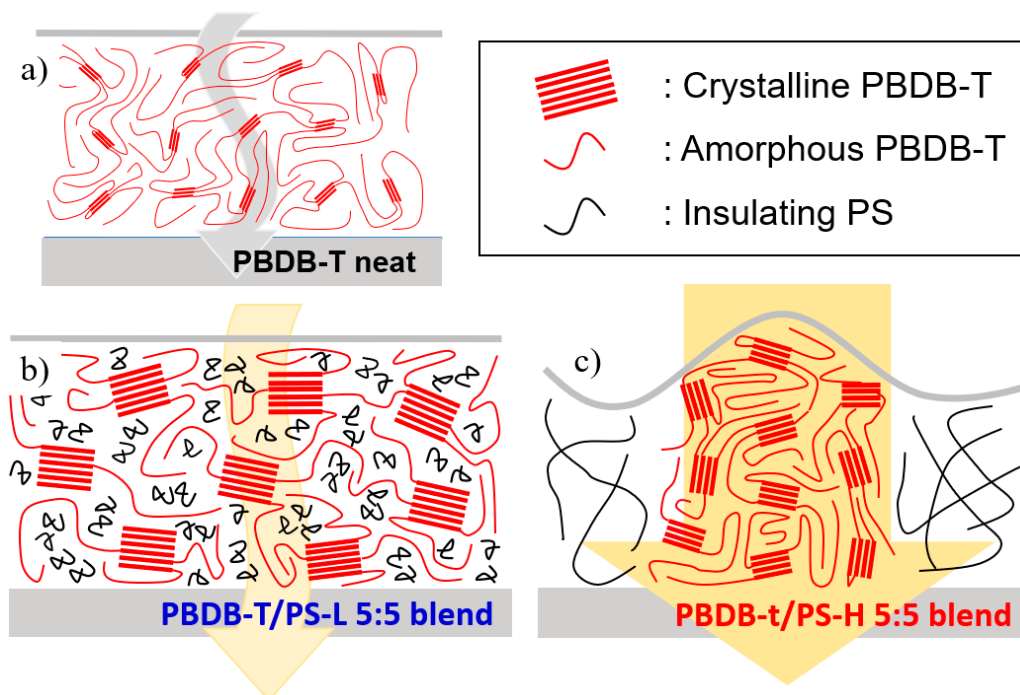


Figure 7. Schematic illustration of hole transport in a) PBDB-T neat, b) PBDB-T/PS-L blend, and c) PBDB-T/PS-H blend films.

ほぼ電流値がゼロにまで急激に低下している。この傾向は、PBDB-T/PS-Lブレンド膜と同様に、図2bに示すマクロな電気伝導特性の傾向と一致している。PS組成が80 wt%のブレンド膜において電流値がほぼゼロとなったのは、膜垂直方向にPBDD-TとPS-Hが相分離したために、PBDB-Tの電流経路が遮断されたためであると考えられる。マトリックスに用いるPSの分子量が大きい場合には相分離構造が発達し、表面エネルギーの小さな高分子が膜表面に偏析することで膜垂直方向の相分離構造を形成すると考えられる⁶⁾。

以上の結果をまとめると、PBDB-Tニート膜、PBDB-T/PS-Lブレンド膜、PBDB-T/PS-Hブレンド膜における電荷輸送性の違いは、図7に示すような、PBDB-Tの結晶化ならびに相分離構造の違いに起因していると考えられる。PBDB-Tニート膜では、PBDB-Tの結晶性が低く各結晶子は膜全体に均一に分散しているため電荷輸送は主に非晶ドメインに律速されることになる。PBDB-T/PS-Lブレンド膜では、PBDB-Tの結晶性が最も高いものの膜全体に均一に分散するため各結晶子は離れて存在しており、PBDB-Tニート膜同様に電荷輸送は主に非晶ドメインに律速されることになる。これに対して、PBDB-T/PS-Hブレンド膜では、PBDB-Tの結晶性はニート膜よりは高くPBDB-T/PS-Lブレンド膜よりは低く中程度であるものの、相分離によりPBDB-Tリッチドメインに結晶子が濃縮されているため各結晶子が近接してtie chainにより結ばれるため電荷輸送が効率よく行われると考えられる⁷⁾。

まとめ

ベンゾジチオフェンを主鎖骨格に有する結晶性の共役高分子PBDB-Tについて正孔輸送特性を検討した。その結果、PBDB-Tニート膜よりも絶縁体であるPSとのブレンド膜において移動度が向上することが分かった。低分子量のPS-Lよりも高分子量のPS-Hをマトリックスに用いた場合に、より顕著に正孔移動度が向上することが分かった。吸収スペクトルならびに2D-GIXD測定の結果では、低分子量のPS-Lとのブレンド膜においてPBDB-Tの結晶性が最も高く、次いで高分子量のPS-Hとのブレンド膜、PBDB-Tニート膜の順に結晶性は低下していることが分かった。すなわち、PBDB-Tの正孔輸送特性はPBDB-Tの結晶性では説明できない。そこで、各薄膜の局所電荷輸送特性を調べるためC-AFM測定を行ったところ、PBDB-Tニート膜とPBDB-T/PS-Lブレンド膜では均一な薄膜形態であることからPBDB-Tの結晶子が分散した状態であるため、電荷輸送は主に非晶相に律速されていると考えられる。これに対して、PBDB-T/PS-Hブレンド膜ではマイクロメートルスケールの海島構造からなる相分離形態を示し、島ドメインがPBDB-Tリッチ相を形成していることが分かった。この

PBDB-Tリッチ相において正孔輸送特性が顕著に向上していることから、PBDB-T/PS-Hブレンド膜ではPBDB-Tの結晶性はPBDB-T/PS-Lブレンド膜ほど高くはないもののPBDB-Tリッチ相にて濃縮されるため、各結晶子が近接することでtie chainにより結びつく可能性が高まり、正孔輸送特性が向上したと推察される。したがって、結晶性共役高分子に関しては相分離により結晶子を濃縮することにより電荷輸送特性を向上させることができると期待される。

参考文献

- 1) 大北英生, 入口亮, 日本化学繊維研究所第76回講演会予稿集, **76**, 1171 (2005).
- 2) H. D. Kim, R. Iriguchi, T. Fukuhara, H. Benten, H. Ohkita, *Chem. Asian J.*, **15**, 796 (2020).
- 3) M. Pope, C. E. Swenberg Eds., *Electronic Processes in Organic Crystals and Polymers* (Oxford University Press, New York, 1999) 2nd ed., p. 381.
- 4) K. Midori, T. Fukuhara, Y. Tamai, H. D. Kim, H. Ohkita, *ChemPhysChem*, **20**, 2683 (2019).
- 5) I. Osaka and K. Takimiya, *Polymer*, **59**, A1 (2015).
- 6) A. C. Arias, N. Corcoran, M. Banach, R. H. Friend, J. D. MacKenzie, W. T. S. Huck, *Appl. Phys. Lett.*, **80**, 1695 (2002).
- 7) K. Gu, C. R. Snyder, J. Onorato, C. K. Luscombe, A. W. Bosse, Y.-L. Loo, *ACS Macro Lett.*, **7**, 1333 (2018).

ポリマーブラシ界面における防着氷特性の理解と制御

Understanding and Controlling of Anti-Icing Characteristics at Polymer-Brush Interfaces

辻井 敬亘・玉本 健^(*)・黄瀬 雄司・長谷 剣人[#]・中野 健[#]

Yoshinobu TSUJII, Ken TAMAMOTO, Yuji KINOSE, Kento HASE, Ken NAKANO

Institute for Chemical Research, Kyoto University

^{*}Nippon Paint Surf Chemicals Co., Ltd.

[#]Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University

This study demonstrated for the first time that a hydrophilic concentrated polymer brush (PolyPEGMA-CPB) provided more effective anti-icing characteristics as compared with the corresponding cross-linked polymer film or semi-dilute polymer brush (PolyPEGMA-SDPB). In order to discuss the factors responsible for this, the properties of water inside the concentrated polymer brush were investigated using direct differential scanning calorimetry, indicating a sufficient decrease in the melting point of bound water inside the CPB as a key factor correlating with anti-icing characteristics. In addition, the force profiles and in-situ interface observations during ice adhesion tests suggest that the CPB-ice interface was not iced over. These findings are very important for novel design of ice control surfaces and thereby various applications.

1. はじめに

日本国土の約半分、人口比にして約1/5程度が豪雪地帯であり、これらの地域では、インフラ設備や公共輸送システムへの着雪氷が事故や災害などを引き起こす要因となっている。例えば、信号機や道路表示板への着雪氷は、車輛運転時の視認性低下に繋がり、交通事故のリスクを高める。その他、太陽光パネル上への積雪によって発電効率が著しく低下するなど、その損失は多岐にわたる^{1),2)}。現在、着雪氷への対策としては、ヒーターによって着雪部を加熱する手法や融雪剤（プロピレングリコールやエチレングリコール等）を塗布する手法などが採られている。しかし、ヒーター導入には設置面やコストにハードルがあり、融雪剤を用いる場合には、環境負荷が課題となっている。こうした背景から近年、雪や氷の付着を防止する「防着雪氷表面」の開発ニーズが高まってきた。

また、雪や氷だけでなく、霜の付着抑制技術も強く求められている。例えば、寒冷地の冬季においては、エアコン暖房運転時に室外機の熱交換器に外気よりも低温な冷媒を流して熱交換させるために、その表面に霜が付着する。霜が付着すると熱交換効率が著しく低下するため、除霜工程が必要となるが、この工程においては、エネルギーが余分に必要になる他、その間、暖房運転が停止してしまうことが課題となっている³⁾。また、車輛分野でも、そのEV化に伴い、エンジンから得る熱を暖房運転に利用できなくなるため、室外機熱交換器への着霜は大きな問題となりつつある。

上述の背景の下、基礎研究を通して、『雪』・『氷』・『霜』の付着防止における共通項を理解することは、理想的な防着雪氷霜表面を創製する上で肝要である。

2. 着氷制御表面の研究動向

Aizenbergらは、近年の着氷制御表面の研究動向をFig. 1のように、乾燥状態表面と湿潤状態表面に分類してまとめている⁴⁾。乾燥状態表面としては、表面自由エネルギーの低いフッ素系および炭化水素系材料の単分子層膜⁵⁾やポリマーコーティング⁶⁾、ナノ構造体表面⁷⁾などが挙げられる。これらの表面の特徴は環境に配慮した材料である一方で、着氷制御機能自体が比較的低いことが課題であった。他方で、ナノ構造体やポリマー架橋膜にシリコンオイルを含浸させるなどして得られる湿潤状態の表面^{8),9)}は、高い着氷制御機能を有している。しかし、含浸させたオイルが経時で漏出することによる性能低下や漏出オイルによる環境汚染が課題となっている。こうした課題は、湿潤状態を保つのに用いる溶媒を氷や空気中の水分から得ることで解決可能であるが、機械的強度が著しく低いことが依然として課題であった¹⁰⁾。






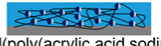
Dry State	Wet State
 Self-assembled monolayer • Environmentally tolerant • Lower performance	 Nanostructured • Low ice adhesion (10-100 kPa) • Poor resistance to lubricant depletion • Environmental Pollution by Lubricants
 Bulk coatings • Environmentally tolerant • Lower performance	 Infused polymer(Silicone) • Low ice adhesion (10-100 kPa) • Environmental Pollution by Lubricants
 Nanostructured • Environmentally tolerant • Poor durability	 Hydrated(poly(acrylic acid sodium salt)) • Low ice adhesion (10-100 kPa) • Environmentally tolerant • No friction resistance

Fig. 1 Recent R&D trends toward anti-icing surfaces.

3. 親水性濃厚ポリマーブラシを用いた着氷制御

当研究室では、従来よりも一桁以上厚い濃厚ポリマーブラシ (CPB: Concentrated Polymer Brush) の合成に成功しており¹¹⁾、さらに、この厚膜CPBが実機運転状態に近いマクロ接触下においても優れた潤滑特性を発現できることを見出している。また、特に、ブラシの持つ、明確なサイズ排除効果によって、親水性濃厚ポリマーブラシが、内部での氷核形成が抑制されたり、側鎖親水基と相互作用している結合水などの水和状態が通常のポリマー溶液とは異なることにより¹²⁾、**Fig. 1**におけるそれぞれの課題を克服する優れた着氷制御表面になり得ると期待される (**Fig. 2**)。しかしながら、既報の双性イオンモノマー¹³⁾や電解質モノマー¹⁴⁾を用いて作製した濃厚ポリマーブラシの凝着氷応力¹⁵⁾ (着氷制御表面を評価する手法としてよく用いられる) は、100 kPa (@-18 °C~-20 °C) より大きく、十分な着氷制御表面であるとは言えない現状にある。また、**Fig. 2**に示しているようなコンセプトが有効に機能しているかには言及されていない上、ポリマーブラシの密度といった構造的因子を含めた議論は未だ不足している。

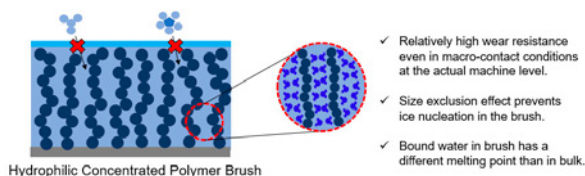


Fig. 2 Expected effects of the hydrophilic concentrated polymer brush.

そこで、本研究では、ポリマーブラシにおける着氷制御特性について、グラフト密度などの構造的因子やブラシ内部の水の分析などを通して、詳細に理解することを目指した。具体的にはまず、対応するポリマー架橋膜とポリマーブラシの着氷制御効果を比較することで、ポリマーブラシの着氷制御優位性を示すことを企図した。さらに、密度の異なるポリマーブラシの着氷応力を測定することで、着氷制御特性におけるポリマーブラシ化効果を明らかにしようと考えた。モノマーとしては、低温での温度応答性がなく、側鎖PEGの水和効果が期待できるPEGMA: poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate ($M_n=500$)に着目した。また、**Fig. 2**に示すコンセプトの裏付けとして、ブラシ内部の水の特性を示差走査熱量測定により評価することとした。従来のポリマーブラシ膜厚では、ブラシ内部の水を対象とした示差走査熱量測定は、測定感度の観点から非常に困難であったが、濃厚ポリマーブラシの厚膜化 (nmから μm オーダーへ) により、その実施を試みた。

4. ポリマーブラシならびにポリマー架橋膜の作製

4-1. 密度や鎖長の異なるPolyPEGMA-Brushの作製

重合開始基を有する3-(trimethoxysilyl)propyl 2-bromo-2-methylpropanoateを各種基材 (si-wafer、ガラス

基板、DSC用アルミパンなど) に固定化した後、各種条件下、PEGMA ($M_n=500$) の表面開始原子移動ラジカル重合を実施した (**Table. 1**)。Run 1-4では、重合圧力や時間を調整することで鎖長の異なる (nm~ μm) 濃厚ポリマーブラシを作製した。なお、重合開始基を固定化する際にダミーのシランカップリング剤 (acetoxypentyl trimethoxysilane) を混合して表面開始基密度を制御することで、密度の異なるポリマーブラシも得た¹⁶⁾ (Run 5-9)。

Table. 1 Synthetic scheme/conditions and molecular characteristics of PolyPEGMA-Brush with different densities and chain lengths.

Run	PPEGMA status	Reaction conditions		BPM/APTMS mol%	M_n^a	\bar{D}^b	Thickness (nm) ^c	σ^d
		Pressure (MPa)	Time (h)					
1	CPB	0.1	0.5	100/0	2.2×10^5	1.1	25	0.23
2	CPB	0.1	6	100/0	9.4×10^5	1.3	185	0.39
3	CPB	400	0.5	100/0	1.9×10^6	1.2	405	0.43
4	CPB	400	2	100/0	6.2×10^6	1.4	1102	0.33
5	CPB	400	2	75/25	6.7×10^6	1.4	734	0.22
6	CPB	400	2	50/50	6.7×10^6	1.4	482	0.15
7	CPB	400	2	25/75	6.6×10^6	1.5	299	0.09
8	SDPB	400	2	10/90	6.6×10^6	1.5	99	0.03
9	SDPB	400	2	5/95	6.6×10^6	1.5	52	0.02

a) Determined by GPC-MALS. b) Determined by PMMA-calibrated GPC. c) Measured by ellipsometer. d) Surface Occupancy.

4-2. Poly(PEGMA-*ran*-MOPS)架橋膜の作製

比較とする架橋膜を得るために、2,2'-azobis(isobutyronitrile)存在下、PEGMA ($M_n=500$) と架橋性モノマー3-(trimethoxysilyl)propylmethacrylate (MOPS) をランダム共重合¹⁷⁾することで、前駆体となる架橋性ポリマーを得た (**Fig. 3**)。このポリマーをアセトンに溶解後、希塩酸で加水分解した溶液をスピコート法にてコーティングし、続いて、120 °Cで30 分間アニールすることで、対応するランダム架橋ポリマーネットワーク膜を作製した (Run 10)。なお、水での膨潤度が濃厚ポリマーブラシ相当となるよう、共重合組成ならびに熱処理条件を調整した。

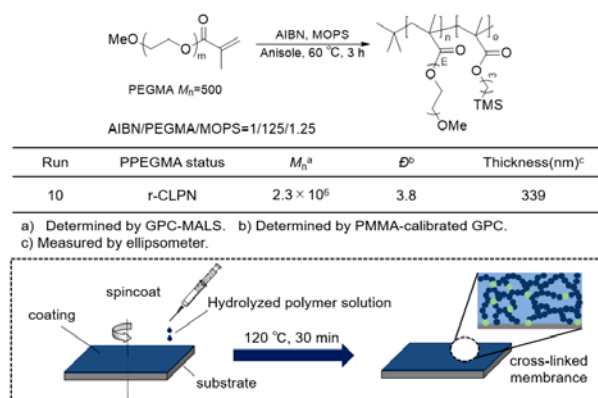


Fig. 3 Preparation of randomly cross-linked polymer network (r-CLPN) of Poly(PEGMA-*r*-MOPS).

5. 各種サンプルの基礎特性評価

5-1. 接触角評価

参照用も含めて各種サンプルの表面特性が大きく異なることを確認する目的で、濡れ性の指標として接触角を測定した。水接触角として、液滴サイズを2.0 μL とし、着滴から20秒後の（経時の接触角変化がない）状態における値を用いた。また、水中気泡法を用いて、膨潤状態における接触角も合わせて測定した（8 μL ）。Table. 2に示すように、いずれのサンプルにおいても、濡れ性に大きな差はなく、基板の影響は抑制されていることを確認した。

Table. 2 Wettability of various samples.

Run	status	Thickness (nm) ^a	σ^{ab}	WCA (°) ^c	ACA (°) ^d
4	CPB	1102	0.33	48	141
8	SDPB	99	0.03	53	140
10	r-CLPN	339	-	45	139

a) Measured by ellipsometer. b) Surface Occupancy. c) Water contact angle. d) Air contact angle.

5-2. 原子間力顕微鏡による各種評価

水膨潤度ならびに表面凹凸も凝着氷応力に影響を与えると考えられるため、原子間力顕微鏡（JPK社製）を用いて、これら进行评估した。膨潤度は、サンプル膜を一部削り取り、その境界領域の高さプロファイルを乾燥状態と水膨潤状態において測定し、両者の比とした。また、表面凹凸に関しては、タッピングモードにて表面凹凸像を取得することで検証した。Fig. 4 leftに、ポリマー架橋膜とCPBにおける膨潤度測定結果を示す。いずれも同等の膨潤度を与えた。続いて、Run10の表面凹凸像をFig. 4 rightに示す。図からも分かるように、表面に目立った凹凸は観察されなかった。以上の結果より、水膨潤度ならびに表面凹凸が凝着氷応力に与える影響も無視でき、濃厚ポリマーブラシ効果を検証する上で相応しい参照サンプルが作製できたと判断した。

5-3. 示差走査熱量評価

前述の手法を用いて、DSCパンにCPBおよびr-CLPNを付与した。ただし、前工程として、Tetraethyl orthosilicate tetraethoxysilane (TEOS) の加水分解溶液によるシリカコートを実施した。得られたDSCパン内を純水で満たしてサンプルを十分に膨潤させた後、ペーパーウエスによって余剰な水を吸い取って測定を実施した（Fig. 5）。この測定

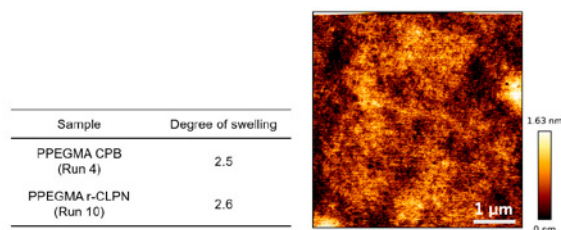


Fig. 4 left : Degree of swelling of samples in water, right : AFM topographic image on randomly crosslinked polymer film.

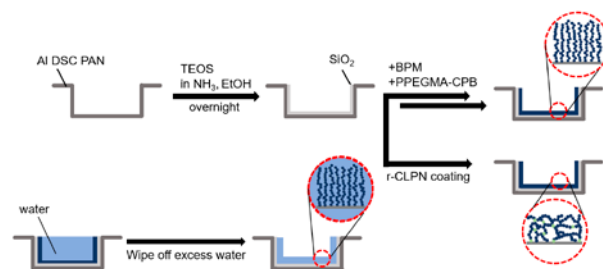


Fig. 5 Preparation of samples for differential scanning calorimetry.

では、前述のように、濃厚ポリマーブラシの厚膜化が鍵であり、ブラシ内部の水が増加することによって測定可能となった。測定は、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した後、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ で15分間保持し、再び $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで昇温させるという手順で行った。昇温時のDSC曲線をFig. 6に示す。まず、上段のCPB（飽和膨潤時の含水量を100 wt%とした際の含水量をFig. 6に記載）の結果に着目すると、 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近と $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近に二種類の吸熱ピークが観測された。 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近のピークは、より低温で融解していることからブラシとより強く相互作用している結合水の融解ピークであると考えられる¹⁸⁾。続いて、下段のr-CLPNの結果について見ると、結合水の融解に起因するピークがより高温側かつ広範囲に観測されている。これは、網目鎖が不均一であることに由来していると考えている。結合水の内、不凍水と中間水の定量は今後の課題であるが、予備実験ながら、CPB系の方が不凍水が多いと見積もられている。こうした膜内部の水和状態が、着氷制御にいかに影響を与えるか次章で見ていく。

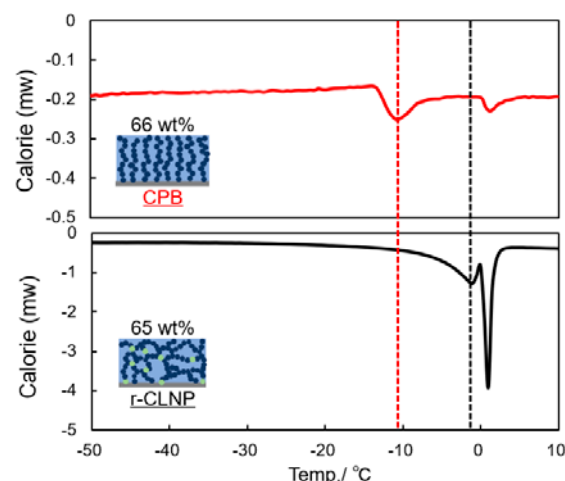


Fig. 6 DSC heating traces showing melting of water.

6. 親水性濃厚ポリマーブラシの着氷制御優位性

6-1. 凝着氷応力測定装置

Si-wafer上に成膜した各種サンプルを顕微鏡用加熱冷却機能付き延伸ステージ（ジャパンハイテック社製）上にセットし、凝着氷応力測定を実施した。氷柱は、端面にシリコングリスを塗ったアルミ製円筒（内径6 mm）をサンプル

上に乗せ、内側に純水60 μL を注入、これを3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速さで、 -20°C まで冷却、30分保持することで作製した。その後、ステージの設定温度を3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速さで各測定温度まで昇温させて30分間保持した後、試験を行った（Fig. 7 left）。延伸ステージの移動に伴ってステージに取り付けたL字型の治具が氷円柱を押すようにセットし、氷柱が剥離して動いた際にロードセルにかかった荷重から凝着氷応力を算出した（Fig. 7 right）。ステージ移動速度は0.2 mm/secとした。

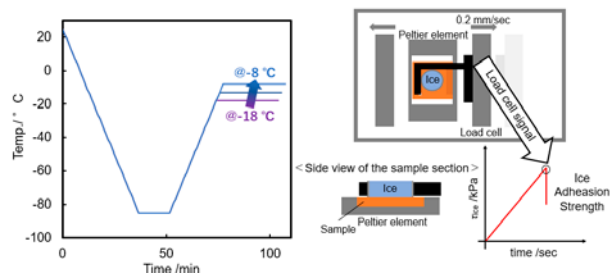


Fig. 7 left : Temperature history and right : schematic illustration of ice adhesion tests.

6-2. 各種サンプルの凝着氷応力測定

CPB, SDPB, r-CLPNについて、 -18°C 、 -13°C 、 -8°C にて凝着氷応力を測定した結果をFig. 8に示す。r-CLPNでは、 -8°C から -13°C にかけて凝着氷応力が一挙に大きくなった。一方で、濃厚ポリマーブラシや準希薄ポリマーブラシでは、ほぼ横ばいとなった。さらに温度を低下させていくと、凝着氷応力の立ち上がりが確認され、両者を比較すると濃厚ポリマーブラシの方がより氷の凝着を制御できていることが分かった。

次に、 -18°C における凝着氷応力のブラシ密度依存性をFig. 9に示す。横軸の表面占有率 σ^* は、ポリマー鎖断面あたりのグラフト鎖の数であり、最大値は1（伸びきり鎖の最密充填状態）となる。凝着氷応力は、 $\sigma^* > 0.1$ ではほぼ一定、低 σ^* 値で急激な増大が認められる。凝着氷応力が急激に変化する密度領域は、濃厚ポリマーブラシと準希薄ポリマーブラシの密度境界（ $\sigma^* \sim 0.1$ ）にほぼ対応しており、凝着氷応力の低下が濃厚ポリマーブラシ効果に起因していると考えている（後述）。なお、グラフト鎖長（分子量）

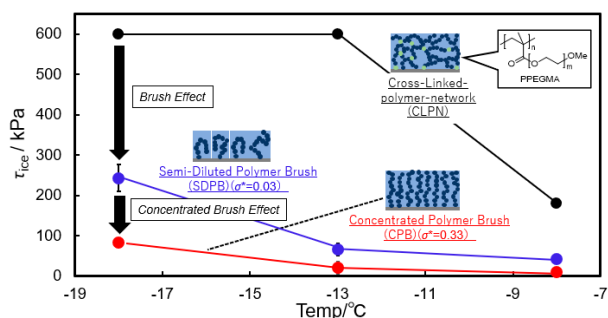


Fig. 8 Ice adhesion strength measurement results for various samples

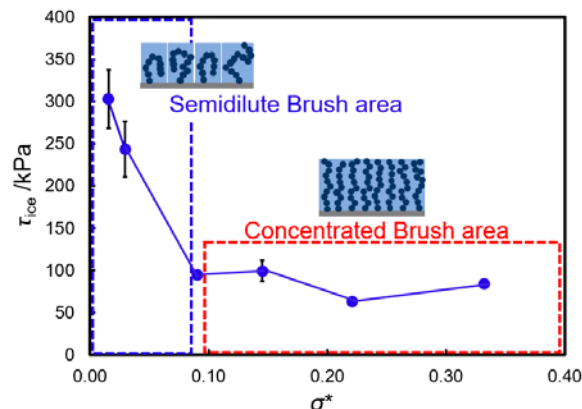


Fig. 9 Dependence of ice adhesion strength on polymer brush density(@ -18°C).

が同じ場合、グラフト密度の低下にともない膜厚が減少する。この結果が、単純な膜厚差に起因しないことを示すために、nmから μm のオーダーの膜厚を有するCPB（Run1-4）を作製し、 -18°C における凝着氷応力を測定した。いずれの膜厚においても凝着氷応力はほぼ一定となり、膜厚の影響は無視できると結論した。

最後に前述のDSC結果と凝着氷応力の温度依存性を合わせて考察する。CPBでは -18°C から -13°C にかけて、ポリマー架橋膜では -13°C から -8°C にかけて、凝着氷応力の大きな低下が観測されている。これらの温度域はそれぞれ、DSC測定で得られたブラシ内結合水の融解温度域に対応している。すなわち、ポリマー膜内の水和状態が着氷制御効果に大きな影響を与えていることが示唆される。なお、CPBがより低温でも低い凝着氷応力を与えたことは、不凍水の影響ではないかと考えている（今後、詳細検討予定）。

7. 凝着氷界面／破壊現象のその場観察

上述の結果からすれば、ブラシ内部の水は低温でも大部分が氷結していないことが想定される。また、凝着氷応力の測定結果も加味すれば、この影響は界面にまで反映されているものと推察される。そこで、界面に凍っていない水¹⁹⁾が存在することを確認するために、凝着氷応力測定をその場観察できるシステムを構築した（Fig. 10@横国大）。基板を透明ガラス板として下部に高速度カメラを設置し、

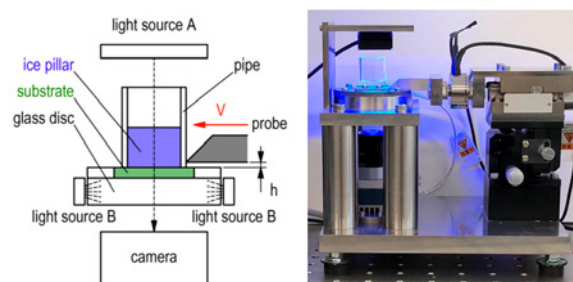


Fig. 10 System for in-situ observation of ice adhesion strength measurements.

氷柱直上の光源Aにより透過光観察、サンプル直下のガラス円板側面の光源Bにより全反射光観察が可能なシステムとなっている。このシステムを用いて、CPB付与サンプルならびに未処理サンプルの凝着氷応力測定 (@ -15°C) をその場観察した。また、その場観察した際に得られた画像を定量的に評価するために、透過像の時間微分像を二値化し、輝度が急落した画素数 ΔN と氷柱底面を構成する画素数 N_0 の比を輝度変化率と定義した。**Fig. 11**に結果を整理した。ガラス基板の凝着氷応力測定を可視化した場合、破壊的な亀裂進展が確認された。これは、界面で固体破断を示唆する。また、輝度変化率を見ても分かるように、界面での破断は一度に起こるわけではなく、複数回に分かれて起きていた。一方、CPBの凝着氷応力測定を行った際に得られた可視化画像、輝度変化率や測定プロファイルは、いずれも大きく異なる結果を与えた。詳細は鋭意検討中であるが、CPB界面には、 -15°C においても氷結しない水が存在することが強く示唆される結果となった。

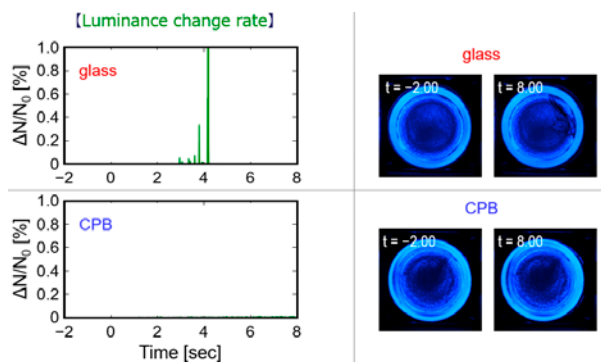


Fig. 11 Visualization of ice fracture process at the sample interface during ice adhesion tests.

8. おわりに

着氷制御表面の重要性や近年の研究報告について触れた上で、親水性濃厚ポリマーブラシの着氷制御面での有用性とその作用機構の理解について概説した。今後、様々な分析ツールを利用することで、さらに詳細な機構解明を実施し、材料設計にフィードバックする予定である。また、産業化を見据えた産学共同研究により、大面積処理を視野に入れた当該材料のコーティング化検討も同時に進行しており、一定の成果を挙げ始めている。こうして得られた高機能表面が社会課題の解決に大きく貢献できるのではないかと期待を寄せている。

謝辞

本研究成果の一部は、SRT²コンソーシアムの協賛企業、大学との共同研究により得られたものである。ここに深く感謝の意を記す。

参考文献

- (1) Ryerson, C. C. Ice Protection of Offshore Platforms. *Cold Reg. Sci. Technol.* **2011**, 65 (1), 97–110.
- (2) Wang, F.; Zhou, Y.; Yang, W.; Ni, M.; Zhang, X.; Liang, C. Anti-Frosting Performance of Sprayable Superhydrophobic Coating Suitable for Outdoor Coil of Air Source Heat Pump. *Appl. Therm. Eng.* **2020**, 169, 114967.
- (3) Pei, Z.; Yi, J.; Li, Y.; Cheng, P.; Zhu, Y.; Feng, D. Material Design and Performance Analysis of the Anti-Ice and Antiskid Wear Layer on Pavement. *Constr. Build. Mater.* **2021**, 282, 122734.
- (4) Kreder, M. J.; Alvarenga, J.; Kim, P.; Aizenberg, J. Design of Anti-Icing Surfaces: Smooth, Textured or Slippery? *Nat. Rev. Mater.* **2016**, 1 (1), 15003.
- (5) Petrenko, V. F.; Peng, S. Reduction of Ice Adhesion to Metal by Using Self-Assembling Monolayers (SAMs). *Can. J. Phys.* **2003**, 81 (1–2), 387–393.
- (6) Sojoudi, H.; McKinley, G. H.; Gleason, K. K. Linker-Free Grafting of Fluorinated Polymeric Cross-Linked Network Bilayers for Durable Reduction of Ice Adhesion. *Mater. Horiz.* **2015**, 2 (1), 91–99.
- (7) Cao, L.; Jones, A. K.; Sikka, V. K.; Wu, J.; Gao, D. Anti-Icing Superhydrophobic Coatings. *Langmuir* **2009**, 25 (21), 12444–12448.
- (8) Wong, T.-S.; Kang, S. H.; Tang, S. K. Y.; Smythe, E. J.; Hatton, B. D.; Grinthal, A.; Aizenberg, J. Bioinspired Self-Repairing Slippery Surfaces with Pressure-Stable Omniphobicity. *Nature* **2011**, 477 (7365), 443–447.
- (9) Urata, C.; Dunderdale, G. J.; England, M. W.; Hozumi, A. Self-Lubricating Organogels (SLUGs) with Exceptional Syneresis-Induced Anti-Sticking Properties against Viscous Emulsions and Ices. *J. Mater. Chem. A* **2015**, 3 (24), 12626–12630.
- (10) Chen, J.; Luo, Z.; Fan, Q.; Lv, J.; Wang, J. Anti-Ice Coating Inspired by Ice Skating. *Small* **2014**, 10 (22), 4693–4699.
- (11) Hsu, S.-Y.; Kayama, Y.; Ohno, K.; Sakakibara, K.; Fukuda, T.; Tsujii, Y. Controlled Synthesis of Concentrated Polymer Brushes with Ultralarge Thickness by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization under High Pressure. *Macromolecules* **2020**, 53 (1), 132–137.
- (12) Yamazoe, K.; Higaki, Y.; Inutsuka, Y.; Miyawaki, J.; Cui, Y.-T.; Takahara, A.; Harada, Y. Enhancement of the Hydrogen-Bonding Network of Water Confined in a Polyelectrolyte Brush. *Langmuir* **2017**, 33 (16), 3954–3959.
- (13) Liang, B.; Zhang, G.; Zhong, Z.; Huang, Y.; Su, Z. Superhydrophilic Anti-Icing Coatings Based on Polyzwitterion Brushes. *Langmuir* **2019**, 35 (5), 1294–1301.
- (14) Chernyy, S.; Järn, M.; Shimizu, K.; Swerin, A.; Pedersen, S. U.; Daasbjerg, K.; Makkonen, L.; Claesson, P.; Iruthayaraj, J. Superhydrophilic Polyelectrolyte Brush Layers with Imparted Anti-Icing Properties: Effect of

Counter Ions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6 (9), 6487–6496.

- (15) He, Z.; Zhuo, Y.; Zhang, Z.; He, J. Design of Icephobic Surfaces by Lowering Ice Adhesion Strength: A Mini Review. *Coatings* **2021**, 11 (11), 1343.
- (16) Wang, H.; Pemberton, J. E. Direct Nanoscopic Measurement of Laminar Slip Flow Penetration of Deformable Polymer Brush Surfaces: Synergistic Effect of Grafting Density and Solvent Quality. *Langmuir* **2019**, 35 (42), 13646–13655.
- (17) Kim, D. W.; Moon, J.-M.; Park, S.; Choi, J. S.; Cho, W. K. Facile and Effective Antibacterial Coatings on Various Oxide Substrates. *J. Ind. Eng. Chem.* **2018**, 68, 42–47.
- (18) Tanaka, M.; Hayashi, T.; Morita, S. The Roles of Water Molecules at the Biointerface of Medical Polymers. *Polym. J.* **2013**, 45 (7), 701–710.
- (19) Nagata, Y.; Hama, T.; Backus, E. H. G.; Mezger, M.; Bonn, D.; Bonn, M.; Sazaki, G. The Surface of Ice under Equilibrium and Nonequilibrium Conditions. *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52 (4), 1006–1015.

1細胞解析のための細胞表面修飾方法の開発

Development of Multiplex Technology with DNA-lipid for Single Cell RNA Sequence

橋本 みなみ、永樂 元次

Minami Hashimoto^{1,2}, Mototsugu EIRAKU^{1,2}

¹Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto University

² Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

In recent years, single cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis has been used frequently in biological research. scRNA-seq can comprehensively analyze all gene expression patterns for each of thousands of cells. However, the high cost of reagents for scRNAseq still remains an issue. Recently, multiplexing analysis technology (multiplex) for scRNAseq has been developed to simultaneously obtains transcriptome from multiple samples in a single sequence. The cell hashing method, in which individual cells are labeled with a barcode DNA-antibody conjugates. However, this method can only be used in a limited number of cell types because DNA-antibodies require the presence of a protein on the cell surface that binds specifically to the antibody. In this study, we have developed a new method using DNA-lipid conjugates as a simpler and more versatile multiplexing analysis method. This method is expected to stimulate the use of scRNA-seq in research and to advance biological research.

近年、次世代シーケンサー（NGS）の発展に伴い、シングルセルRNAシーケンス（single cell RNA sequence ; scRNA-seq）解析が生物学研究で頻繁に利用されるようになった。scRNA-seqでは、数千～数万個の細胞1つ1つに対して、全遺伝子の発現パターンを網羅的に解析することができるため、複数の細胞に関して全遺伝子の発現をまとめて解析するバルクのRNAシーケンスでは難しかった、細胞の不均一性の検出や希少細胞集団の遺伝子発現情報の取得、細胞系譜の追跡などが可能である。しかし、NGSの運用や付随する試薬は高額であり、sc-RNAseqを頻繁には行えないのが現状である。そこで最近では、各サンプルに標識を行うことで一度のシーケンスで複数のサンプルの遺伝子発現情報を取得し、解析時にサンプルごとの結果を分離できるようにするという多重化解析技術 (multiplex) に関する研究も盛んに行われている。multiplexを行うこと

で、本来サンプルごとに1回ずつ行わなければならない解析を一度にまとめることができるため、コストの削減につながる。multiplex手法はさまざま提案されており、barcode DNAをウイルスやポリマーなどのベクターを介して細胞に取り込ませ、遺伝子発現ライブラリとは別にbarcode DNAライブラリを作製し、その配列を読むことでサンプル区別を行う手法などがある[1]。その中でも、barcode DNA-抗体試薬を用いて個々の細胞を標識することでサンプル区別を行う手法（Cell Hashing法）[2]が広く利用されている。しかし、DNA-抗体を用いるためには抗体と特異的に結合するタンパク質が細胞表面に存在する必要があるため、この方法が利用できる細胞種は限られる。また、抗体の合成は高価であり、依然として解析費用は高いままである

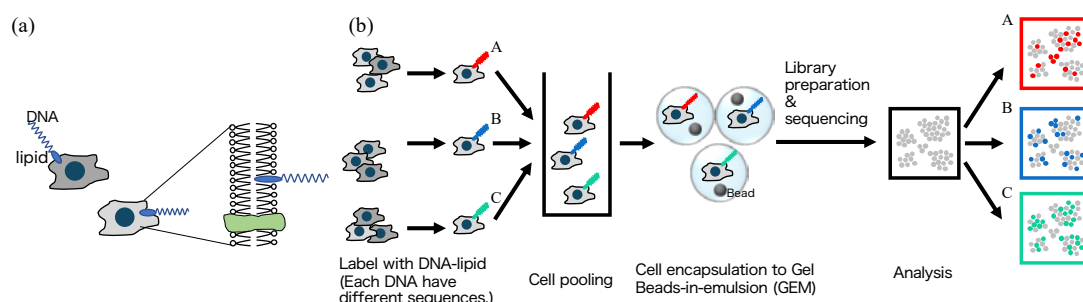


Figure 1. (a) Schematic view of labelling cells with DNA-lipid. (b) Concept of this work.

そこで本研究では、抗体よりも安価な脂質（DPPE）を用いてscRNA-seq多重化解析を行うことを提案する。DNA-脂質複合体（DNA-PEG-DPPE）は両親媒性分子であり、細胞の脂質二分子膜との疎水性相互作用により、図1のように細胞膜に安定にアンカーされることが知られている[3]。また、PEIといったカチオン化ポリマーなどを用いる他の細胞修飾法に比べて、細胞の生存性を損なわずに修飾が可能である[4]。DNA-脂質を用いたより簡便かつ任意の細胞種に利用できるmultiplex手法の開発により、scRNA-seqの研究利用がより活発になり、生物学研究の発展が期待される。

1. DNA-脂質の合成

マレイミド基を末端に持つポリエチレングリコール（PEG）と1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine（DPPE）の反応物（Maleimide-PEG-DPPE）をEDTA/PBSに溶解したのち、25°Cで一晩ssDNA（HS-ssDNA-FAM）と反応させ、DNA-脂質（ssDNA-PEG-DPPE（図1b））を得た。続いて、DNA-脂質をマウスES細胞（mESC）と混合し、37°Cで30分インキュベートした。ssDNAの3'末端に導入した蛍光分子FAMの蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、細胞がDNA-脂質で修飾されていることを確認した（図2a）。

次に、異なる蛍光分子、FAMとTexasRedを結合したDNA-脂質で標識した細胞を混ぜて、フローサイトメトリーで細胞表面の蛍光強度を測定したところ、1時間後でも蛍光シグナルは混ざり合うことなく検出された（図2b）。この結果から、DNA-脂質の標識は混ざることなくサンプル同士を区別できることが示唆された。

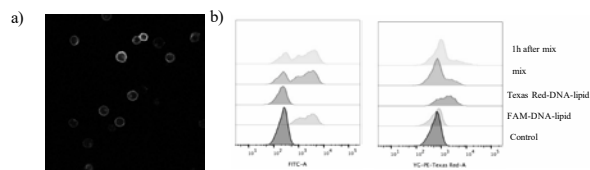


Figure 2. a) Cell surface modification using FAM-DNA-lipid. b) Flow cytometry analysis of mix of cells labelled with FAM-DNA-lipid or TexasRed-DNA-lipid.

2. 脂質-DNAを用いたscRNA-seq多重化解析の実行

配列が異なるbarcode DNAを持ったDNA-脂質3種類を用いて、遺伝子発現の異なる3種類の細胞をそれぞれ修飾した。その後、10x Genomics社のDNA-抗体ライブラリ調製プロトコルを参考に、scRNA-seq用のcDNAライブラリとDNA-脂質ライブラリの調製を行った。これらのライブラリを混合

し、NGSでシーケンスを行ったところ、DNA-脂質ライブラリに基づいて分割された細胞クラスターは、それぞれの細胞種に特異的な遺伝子発現を示していた（図3）。このことから、DNA-脂質を用いてscRNA-seqの多重化解析を行えることが示唆された。

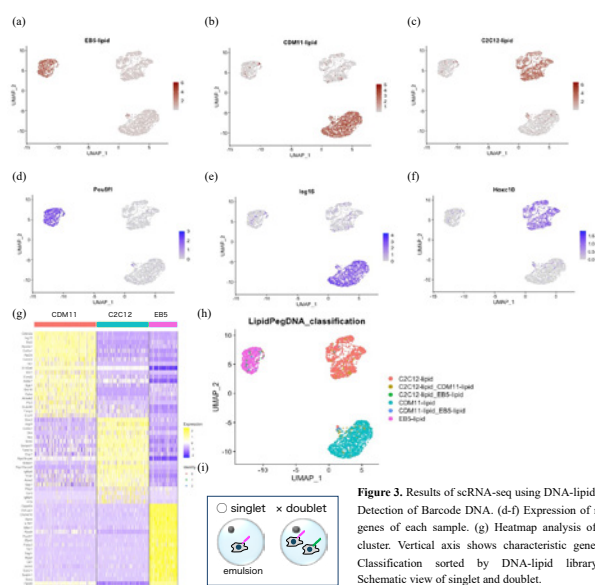


Figure 3. Results of scRNA-seq using DNA-lipid. (a-c) Detection of Barcode DNA. (d-f) Expression of maker genes of each sample. (g) Heatmap analysis of each cluster. Vertical axis shows characteristic genes. (h) Classification sorted by DNA-lipid library. (i) Schematic view of singlet and doublet.

3. より簡単に合成可能な細胞修飾物質の探索~DNA-SHによる細胞膜修飾~

上記の結果からDNA-脂質によってscRNA-seq 多重化解析が行えることが分かったが、DNA-脂質の材料となるMaleimide-PEG-DPPEの合成には窒素置換や凍結乾燥機などの装置が必要である。scRNA-seqを利用するような研究室にはそのような合成装置がないこともあるため、より簡単に合成可能な細胞修飾物質の探索を行ったところ、Maleimide-PEG-DPPEと同様にDNA-脂質の原料となるチオール化DNA（DNA-SH）でも細胞膜を修飾できることがわか

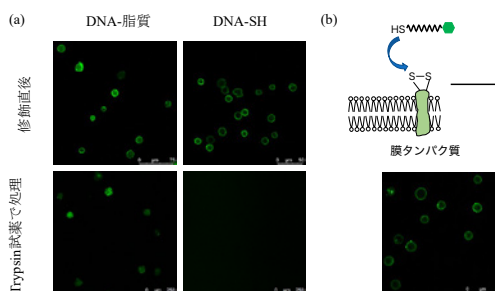


Figure 4. (a) mESC labelled with DNA-lipid or DNA-SH before and after Trypsinization. (b) Diagram of thiol-disulfide exchange reaction. (c) FAM-complementary DNA hybridized to Barcode I-SH on mESC.

った (図4右上)。そこで、DNA-SHがどのような仕組みで細胞膜と結合しているのか検証した。DNA-脂質およびDNA-SH (いずれも SeqA を利用) で修飾した EB5 細胞を TrypLE Express で処理したところ、DNA-脂質で修飾した細胞は細胞周縁部の蛍光が保持されていたのに対し、DNA-SH で修飾された細胞では蛍光を観察することができなかった (図8a)。このことから、DNA-SH は細胞膜上のタンパク質と thiol-disulfide 交換反応 (図4) を介して結合していたことが示唆された。また、SeqA よりも鎖長の長い barcode DNA-SH (Barcode1-SH) および FAM-Complementary DNA を作用させた場合にも細胞周縁部の蛍光を観察することができた (図4)。

4. DNA-SHを用いたシングルセルRNAシーケンス

DNA-SH 単体でも細胞膜を修飾できることが分かったため、barcode DNA-SH を用いて scRNA-seq の multiplex ができるか検証した。DNA-脂質を用いた scRNA-seq と同様に、EB5/CDM11/C2C12 の3種類の細胞を表2のように異なる Barcode DNA で標識し、scRNA-seq を行った。各細胞の barcode DNA の検出量および各サンプルのマーカー遺伝子の発現量を調べたところ、DNA-脂質の場合と同様に、EB5-lipid が検出された細胞では mESC 未分化マーカーである Pou5f1 の発現が高くなっていたように、各細胞で検出された barcode DNA とマーカー遺伝子の発現が一致していた (図5)。この結果から、DNA-SH を用いる場合でも、DNA-脂質と同様に scRNA-seq における多重化解析が可能であると考えられる。また、各細胞で検出された barcode DNA についてさらに調べたところ、複数の barcode DNA が検出された doublet が存在していたが、EB5 と CDM11 の doublet であるというように、doublet がどのサンプルとどのサンプルの doublet なのかということの判別することができた (図5)。したがって、DNA-SH で細胞を修飾した場合でも DNA-脂質と同様に scRNA-seq の multiplex と正確な doublet の判定が可能であると考えられる。

4. 結言

DNA-脂質を用いて細胞を修飾することで、scRNA-seq における複数のサンプルの同時解析・サンプル分離 (多重化解

析: multiplex) が行えることがわかった。DNA-脂質を用いることで、従来法である DNA-抗体よりも低コストかつ細胞種によらない scRNA-seq multiplex が可能になると考えられる。また、DNA-脂質よりも合成が簡単な DNA-SH を用いることで、特別な合成装置がない場合でも利用可能な scRNA-

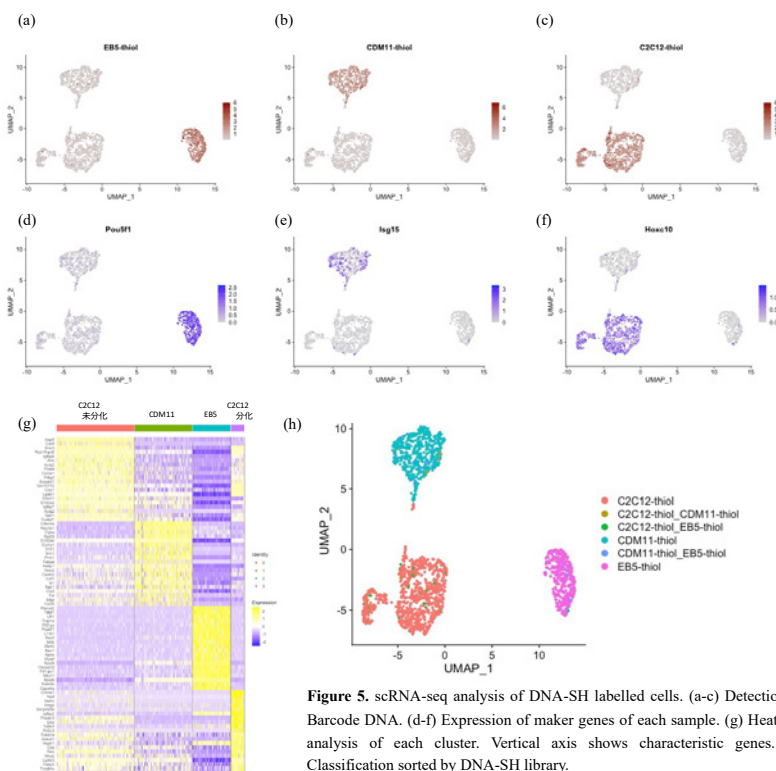


Figure 5. scRNA-seq analysis of DNA-SH labelled cells. (a-c) Detection of Barcode DNA. (d-f) Expression of marker genes of each sample. (g) Heatmap analysis of each cluster. Vertical axis shows characteristic genes. (h) Classification sorted by DNA-SH library.

seq multiplex 技術を開発することができた。

5. 参考文献

- [1] A. Dunn, Y. Cai, et al. Stem Cell Reports, 2021, 16, 2149-2158
- [2] M. Stoeckius, S. Zheng, et al. Genome Biol, 2018, 19, 224
- [3] Y. Teramura, H. Iwata, et al. Soft Matter, 2010, 6, 1081-1091
- [4] Y. Teramura, Y. Kaneda, et al. Biomaterials, 2008, 29, 1345-1355
- [5] BioLegend, Inc (2022). Multiplex and TotalSeq™ Reagents. <https://www.biolegend.com/ja-jp/totalseq> (accessed 2020-10-07)
- [6] Y. Teramura, H. Chen, et al. Biomaterials, 2010, 31, 2229-2235
- [7] I. Hoffecker. Maleimide-PEG-DPPE synthesis protocol. 2015, Kyoto, Japan: Kyoto University.
- [8] 10x Genomics (2021). Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 with Feature Barcoding

technology for Cell Surface Protein (CG000206 RevD)

[9] R. Zhang et al., DRUG DELIVERY, 2019, VOL. 26, NO. 1, 328-342

[10] M. Stoeckius, C. Hafemeister, et al. Nat Methods, 2017, 14, 865-868.

[11] T. Itagaki, Y. Arima, et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, 135, 765-773

[12] Gavins, G.C., Gröger, K. et al. Nat. Chem, 2021, 13, 15-23.

オートファジー可視化のための高分子ナノ粒子を用いた核酸の細胞内徐放

Intracellular controlled release of nucleic acids with polymeric nanospheres to visualize autophagy

田畑 泰彦・竹花 祥・鷺坂 太一

Yasuhiko TABATA, Sho TAKEHANA, and Taichi WASHISAKA

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

The objective of this study is to visualize an autophagy activity with cationized gelatin nanospheres incorporating molecular beacon (MB) (cGNS_{MB}) in alive conditions. When autophagy was reproduced by a serum-free medium, the expression levels of autophagy-related genes, SQSTM1 and CTSF, increased with an increase of autophagy induction time. When cells were incubated with cGNS incorporating MB targeted SQSTM1 and CTSF genes and autophagy was induced, the fluorescence intensity increased with an increase of autophagy activity. In the culture system in which a concentration gradient of amino acids was generated, the autophagy activity was higher in the starved regions with low amino acid concentrations. These results indicate that our cGNS_{MB} system can visualize autophagy activity in a spatiotemporal manner.

1. 緒言

オートファジーは、細胞質や細胞小器官を細胞内のオートファゴソームが取り込み、分解する機構である。オートファジーには、タンパク質を分解し栄養とすることで飢餓に対して耐性をもつことや損傷・機能低下した不要物を分解する役割がある。近年、このオートファジーが癌や心疾患、老化に関連している報告がある¹⁾。オートファジーを治療標的とした薬剤の開発には、治療薬の開発だけでなく、その治療効果を正確に評価する方法が必要である。従来のタンパク・遺伝子レベルの評価方法では、いずれも細胞を破壊することが必須であり、時間的・空間的な情報が喪失し正確な治療効果を評価することが困難であった。

モレキュラービーコン (MB)は末端に蛍光物質と消光物質をもったステム-ループ構造をとる核酸誘導体である。また、相補的なmRNAが多いと蛍光発光を示すイメージングプローブである²⁾。MBを細胞に取り込ませることで、細胞増殖や細胞死、細胞内代謝などの生物機能の変化を生きた細胞を用いて評価することができる³⁻⁵⁾。しかし、MBは負電荷をもつ核酸であるため、同じく負電荷をもつ細胞膜との親和性が低く単独で細胞内へ導入することが難しい⁶⁾。

カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS)は生体吸収性高分子であるゼラチンにポリアミンを化学修飾したカチオン化ゼラチンを材料とし、コアセルベーション法を用いて得られる。このナノ粒子は、siRNAやpDNAといった核酸の細胞内導入が容易であり、長期の細胞内徐放による生理活性の維持が可能である^{7,8)}。

本研究の目的は、オートファジーに関連する遺伝子であるSQSTM1とCTSFを標的とするMBを内包したカチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{MB})を用いて、生細胞におけるオートファジー活性を可視化することである⁹⁾。

2. 材料と方法

2-1. カチオン化ゼラチンの作製

カチオン化ゼラチンの作製は、まず、ゼラチン (新田ゼラチン (株)より供与、等電点 9.0, 重量平均分子量 100,000)水溶液にゼラチンのカルボキシル基に対して50倍モル等量でスぺルミンを添加した。濃塩酸を用いて混合溶液のpHを5.0に調整した。その後、ゼラチンのカルボキシル基に対して3倍モル等量の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を添加した。この溶液を40℃で18時間攪拌した後、室温で2回蒸留水に対して3日間の透析を行った。透析後、溶液を凍結乾燥しカチオン化ゼラチンを得た。ゼラチンのカルボキシル基に導入されたスぺルミンの割合を測定するために、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸法により1級アミノ基を定量した。スぺルミンの導入率は43.2±1.1%であった。

2-2. MB内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{MB})の作製とその評価

カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS)は、コアセルベーション法により作製した。コアセルベートを形成するために、カチオン化ゼラチン水溶液にアセトンを40℃で添加した。その後、25 wt% グルタルアルデヒドを加え、カチオン化ゼラチンを化学架橋した。40℃で6時間反応させた後、過剰量のグリシンを添加し未反応のアルデヒド基を不活化した。得られた溶液を室温で一晩攪拌し、残存するアセトンを除去した。続いて、cGNSを遠心分離により回収した。

MB内包cGNS (cGNS_{MB})はMBとcGNSを20 pmole MB/ 1.0 µg cGNSの割合で混合することで調製した。室温で15分間混合した後、混合溶液を遠心分離した。上清を除去し、沈殿したcGNS_{MB}を2回蒸留水に再懸濁させた。

cGNS_{MB}の見かけの大きさは動的光散乱法、ゼータ電位は電気泳動光散乱法により測定した。MB内包率は消光物質の無いMBを使用して決定した。

2-3. 細胞培養

マウス胚由来線維芽細胞株 (NIH/3T3細胞)は10 vol %のウシ胎児血清 (FCS)と1.0 vol%のペニシリンストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)で37 °C、5.0 % CO₂で培養した。

2-4. オートファジー誘導

6ウェルプレートもしくは35 mmガラスボトムディッシュに2.0×10⁵個/ウェルの密度で細胞を播種した。24時間の培養後、培地を2.0 mLの血清とアミノ酸を含まないEarle緩衝塩類溶液 (EBSS)培地 (飢餓培地)で異なる時間培養した。飢餓培地で培養した細胞を以下の実験に使用した。

2-5. 免疫染色によるオートファジー活性の評価

35 mmガラスボトムディッシュに2.0×10⁵個/ディッシュの密度で細胞を播種し、24時間培養した。cGNS_{MB}添加または無添加の条件で細胞を3時間培養し、細胞をPBSで洗浄した。上記のように、細胞を飢餓培地で0~450分間培養した後、4.0 vol%パラホルムアルデヒドで固定し、ジギトニンにより細胞膜透過処理をした。次に、処理した細胞を1次抗体であるLC3B抗体と4°Cで一晩反応させた。次に、Alexa Fluor 488TMを結合した2次抗体と室温で1時間反応させた。細胞核を300 nM 4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI)により染色した後、蛍光顕微鏡により蛍光画像を撮影した。オートファジー活性を評価するために、ImageJを用いて、細胞内のLC3B小胞 (LC3ドット)の数を数えた¹⁰⁾。

2-6. 遺伝子発現によるオートファジー活性の評価

飢餓培地中で培養しオートファジー誘導した細胞のRNAを抽出した。抽出したRNAを相補的DNA (cDNA)に逆転写した。その後、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)を実施し、オートファジー関連遺伝子であるSQSTM1とCTSFの遺伝子発現を定量した^{11,12)}。遺伝子発現は、GAPDHの発現で正規化し $\Delta\Delta C_t$ 法により解析した。

2-7. MB内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{MB})によるオートファジーの可視化

35mmガラスボトムディッシュに2.0×10⁵個/ディッシュの密度で細胞を播種し、24時間培養した。cGNS_{MB}と3時間共培養した後、上述のようにオートファジー誘導した。蛍光顕微鏡により細胞の蛍光画像を撮影した。MBの蛍光強度はImageJにより定量し、オートファジー誘導をしていない細胞の蛍光強度で正規化した。

2-8. 生体内模倣サンプルのオートファジーの可視化

アミノ酸濃度勾配はチャネルスライドを用いて調製した。5.0×10⁵個/mLの細胞懸濁液をチャネルスライドに注入し、24 時間培養した。続いて、飢餓培地でチャネルスライドを完全に満たし、チャネルスライドの半分の体積の血清

含有DMEMを片側から加え同じ体積の飢餓培地をもう一方から吸引した。細胞は上述と同じ条件で免疫染色もしくはcGNS_{MB}と培養し蛍光顕微鏡による蛍光画像の撮影を行った。

細胞凝集体は、ポリビニルアルコールコートをしたU底96ウェルプレートに細胞を400個/ウェルの密度で播種し、3日間培養することで調製した。調製した細胞凝集体は、SQSTM1またはGAPDHを内包したcGNS_{MB}と培養した後、共焦点顕微鏡により蛍光画像を撮影した。

3. 結果と考察

3-1. cGNS_{MB}の物性評価

表1は、cGNS_{MB}の物性を示す。cGNS_{MB}の見かけの大きさは、約200 nmであり細胞がナノ粒子を取り込むのに適した大きさであった¹³⁾。また、ゼータ電位は正であり、静電相互作用により細胞膜との親和性が向上し細胞に取り込まれやすくなると考えられた¹⁴⁾。MB内包率はほぼ100 %であった。

Apparent Size (nm)	Zeta potential (mV)	MB incorporation (%)
227 ± 7.4 ^{a)}	10.3 ± 0.51 ^{a)}	99.7 ± 0.010 ^{a)}

a) average ± standard deviation

3-2. 免疫染色によるオートファジー活性の評価

図1は免疫染色を施した飢餓培地中で培養した細胞の蛍光画像、図2はLC3ドット数の定量結果である。オートファジー誘導することで、細胞内のLC3ドット数が増加し90分で最大となった。その後、誘導時間の経過とともにLCドット数は減少した。誘導前と比較して、オートファジー活性が高くなっていることが示された。

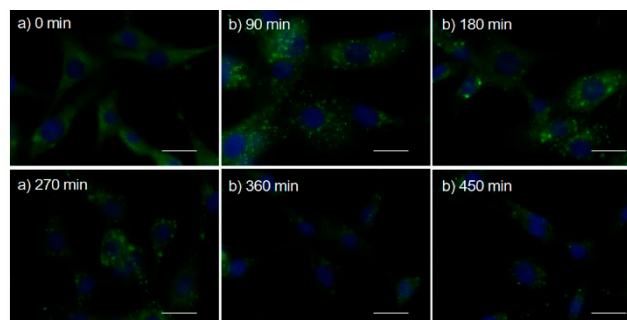


Fig. 1 Immunofluorescent images of LC3B in cells incubated with the serum-free medium for 0, 90, 180, 270, 360, and 450 min. Green: LC3B. Blue: nuclei by DAPI. Scale bar is 20 μ m.

また、図2B)はcGNS_{MB}添加または無添加のときのLC3ドット数を示している。cGNS_{MB}添加の有無によらず、オートファジー誘導時間の変化とともにLC3ドット数が増加し2つの群に有意な差は見られなかった。cGNS_{MB}はオートファジー活性に影響を及ぼさず、オートファジー可視化に適したシステムであることがわかった。

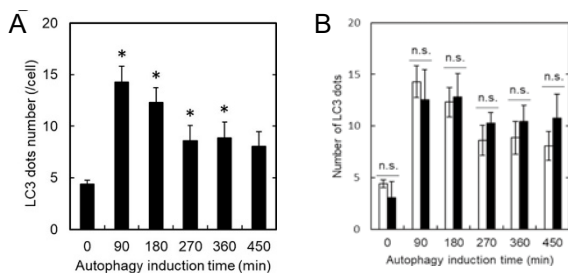


Fig. 2 Effect of autophagy induction time on the number of LC3 dots. (A) Time course of LC3 dots number in cells cultured in the serum-free medium for 0, 90, 180, 270, 360, and 450 min. (B) Effect of autophagy induction time on the number of LC3 dots in cells (□) with or (■) without cGNSMB incubation. *: $p < 0.05$, significant against the number of LC3 dots of the cells cultured in serum-containing medium at the corresponding time. n.s.: not significant.

3-3. 遺伝子発現によるオートファジー活性の評価

図3はSQSTM1およびCTSFの遺伝子発現を示している。SQいずれもオートファジー誘導時間の変化とともに有意に遺伝子発現が増加した。本研究では、SQSTM1およびCTSFのオートファジー関連遺伝子をオートファジー可視化のための標的として選択した。

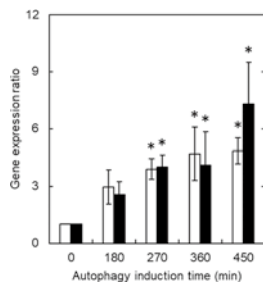


Fig. 3 Time course of autophagy-related gene expression: SQSTM1 (□) and CTSF (■) genes. The gene expression levels are normalized to that of cells cultured in the serum-containing medium. *: $p < 0.05$, significant against the expression level of cells cultured in the serum-containing medium at the corresponding gene.

3-4. MB内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNSMB)によるオートファジーの可視化

図4AはcGNSMBを添加しオートファジー誘導した細胞の蛍光画像、図4Bは蛍光強度の定量結果を示している。SQSTM1およびCTSFを標的とするMBの蛍光強度は、いずれもオートファジーの誘導時間の変化とともに有意に増加した。一方で、GAPDHを標的としたコントロールMBでは、蛍光強度に変化はなかった。これらの結果から、cGNSMBは分解・非特異的反応により蛍光変化せず、標的遺伝子の種類による制約を受けないことがわかった。また、以上の結果は、従来法である図3のPCRにより決定した遺伝子発現の結果と対応しており、cGNSMBを用いることでオートファジーを可視化できることを示している。

3-5. 生体内模倣サンプルのオートファジーの可視化

図5Aおよび図5Bは、cGNSMBを添加しアミノ酸濃度勾配

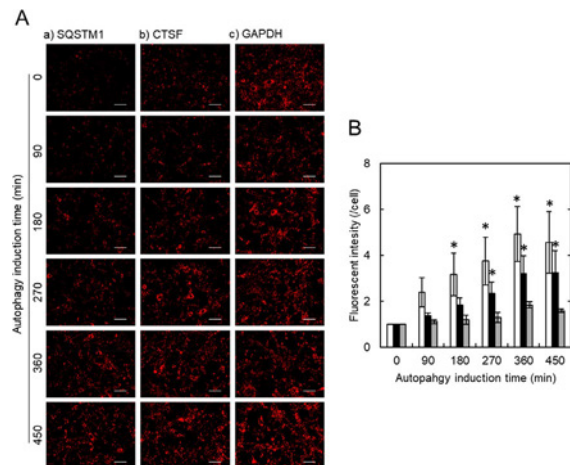


Fig. 4 Fluorescent imaging of cells incubated with cGNSMB as a function of autophagy induction time. (A) Fluorescent images of cells incubated with cGNSMB targeted to (a) SQSTM1, (b) CTSF, and (c) GAPDH after 0, 90, 180, 270, 360, and 450 min incubation in the serum-free medium. Scale bar is 100 μ m. (B) Fluorescent intensity of autophagy-induced cells incubated with cGNSMB: SQSTM1 (□), CTSF (■), and GAPDH (■). The fluorescent intensity is normalized to that of cells incubated in the serum-containing medium at 0 min. *: $p < 0.05$, significant against fluorescent intensity of cells incubated in the serum-containing medium at the corresponding gene.

を調製したチャンネルスライド上のオートファジー誘導前後の細胞の蛍光画像、図6は蛍光強度の定量結果を示している。アミノ酸濃度が低く飢餓状態が強いほど細胞内のLCドット数が増加した (図5A)。また、飢餓状態が強いほどオートファジーを標的としたMBの蛍光が強くなった (図5B、図6)。これらの結果は、cGNSMBを用いることで細胞の不均一な状態を破壊することなく、オートファジー活性を検出できることを示している。

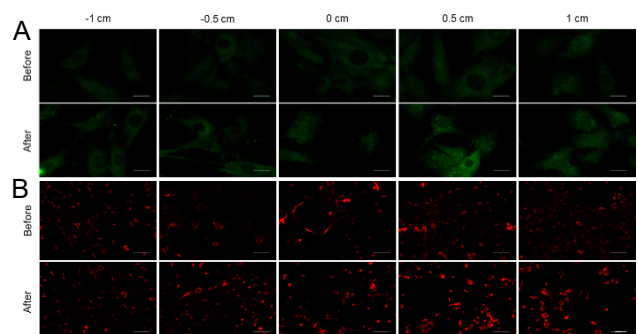


Fig. 5 Fluorescent images of LC dots and MB in cells incubated in the amino acids-gradient condition. (A) Immunofluorescent images of LC3B in cells before and after incubation in the channel slide filled with serum-free medium for 360 min. The center of channel slide was defined as 0 cm. Scale bar is 20 μ m. (B) Fluorescent images of cells incubated with cGNSMB targeting to CTSF and induced autophagy for 360 min. Scale bar is 100 μ m.

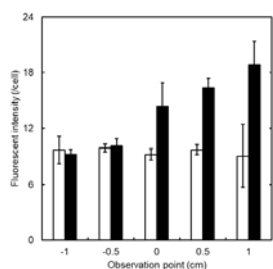


Fig. 6 Fluorescent intensity of MB in cells incubated in the amino acids-gradient condition: before (□) and after 360 min (■) incubation. *: $p < 0.05$, significant against fluorescent intensity of cells at -1 cm at the corresponding time.

図7はcGNS_{MB}を添加した細胞凝集体の蛍光画像、図8は蛍光強度の定量結果を示している。SQSTM1を標的としたMBはオートファジー誘導時間の変化とともに、蛍光強度が増加した。特に、細胞凝集体の中心で強い蛍光が観察された。これは、細胞凝集体の中心に栄養が行き届かず、飢餓状態となっているためであると考えられる¹⁵⁾。一方で、GAPDHを標的としたMBの蛍光に変化はなかった。このように、cGNS_{MB}を用いた可視化技術は細胞研究および創薬研究に活用できる。

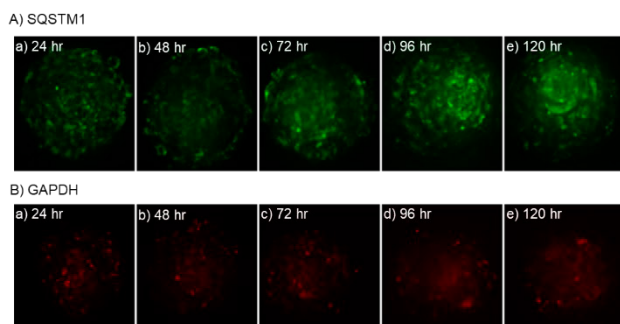


Fig. 7 Fluorescent images of cell aggregates incubated with cGNS_{MB} after 24, 48, 72, 96, and 120 hr incubation: (A) SQSTM1 and (B) GAPDH.

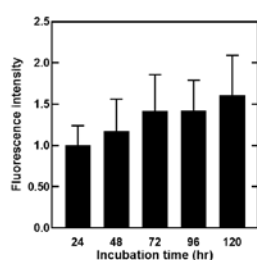


Fig. 8 Fluorescent intensity of MB in cell aggregates. The fluorescent intensity of SQSTM1 is normalized to that of GAPDH at the corresponding time.

4. まとめ

cGNS_{MB}は細胞機能に影響を与えず、細胞が生きた状態でオートファジーの活性を可視化できることがわかった。また、cGNS_{MB}は生体模倣培養システムにおいても細胞機能の可視化できた。このように、がんの基礎研究の1つと

して用いられてきたMBによる可視化技術と高分子ナノ粒子を組み合わせることで、その可視化効率を高めることができると考えられる。これまでも、cGNS_{MB}はさまざまな細胞機能の可視化に有効であることがわかっており、今後、炎症状態や組織の修復状態の可視化により再生治療評価への貢献が期待される。

参考文献

- 1) P. Jiang, N. Mizushima, *Cell Res.*, **24**, 69-79 (2014)
- 2) S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303-8 (1996)
- 3) Y. Murata, J.I. Jo, Y. Tabata, *Sci. Rep.*, **8**, 14839 (2018)
- 4) Y. Murata, J.I. Jo, Y. Tabata, *Tissue Engineering Part A*, **25**, 1527-1537 (2019)
- 5) Y. Murata, J.I. Jo, Y. Tabata, *Tissue Engineering Part A*, **27**, 526-535 (2021)
- 6) R. Monroy-Contreras, L. Vaca, *Journal of Nucleic Acids*, **2011**, 1-15 (2011)
- 7) H. Ishikawa, Y. Nakamura, J.I. Jo, Y. Tabata, *Biomaterials*, **33**, 9097-9104 (2012)
- 8) N. Doi, J.I. Jo, Y. Tabata, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **23**, 991-1004 (2012)
- 9) S. Takehana, W. Yang, Y. Tabata, *ACS Applied Bio Materials*, **5**, 2965-2975 (2022)
- 10) N. Mizushima, *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2491-502 (2004)
- 11) M. Sardiello, M. Palmieri, A. di Ronza, D.L. Medina, M. Valenza, V.A. Gennarino, C. Di Malta, F. Donaudy, V. Embrione, R.S. Polishchuk, S. Banfi, G. Parenti, E. Cattaneo, A. Ballabio, *Science*, **325**, 473-7 (2009)
- 12) C. Settembre, C. Di Malta, V.A. Polito, M. Garcia Arencibia, F. Vetrini, S. Erdin, S.U. Erdin, T. Huynh, D. Medina, P. Colella, M. Sardiello, D.C. Rubinsztein, A. Ballabio, *Science*, **332**, 1429-33 (2011)
- 13) K.Y. Win, S.S. Feng, *Biomaterials*, **26**, 2713-22 (2005)
- 14) C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, *Biomaterials*, **31**, 3657-66 (2010)
- 15) E.T. Verjans, J. Doijen, W. Luyten, B. Landuyt, L. Schoofs, *J Cell Physiol*, **233**, 2993-3003 (2018)

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 伊藤 紳三郎

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）

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol.80
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.80, 2023)

Published by
Nippon Kagakusen-i Kenkyusho
Kyoto, Japan

日本化学繊維研究所 第80回講演集
2023年3月1日 発行
発行所 公益財団法人 日本化学繊維研究所
〒606-8305 京都市左京区吉田河原町 14
