

研究報告集

第 37 集

2022年度助成研究

2026 年 3 月

公益財団法人 松籟科学技術振興財団

SHORAI FOUNDATION FOR SCIENCE AND TECHNOLOGY

研究報告集第37集発刊によせて

公益財団法人 ^{しょうらい}松籟科学技術振興財団

理事長 長谷川 吉弘

第40回(2022年度)研究助成金を贈呈した研究者の方々による研究成果を収録した「研究報告集第37集」をお手許にお届けします。本報告集は、研究助成を受けられた皆様より提出された研究報告を中心に構成されており、財団のホームページに掲載すると共に国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)に送付し、所蔵文献の一部として保管いただいております。

当財団では、1983年3月創立以来、科学技術に関する調査・研究・国際交流に対する助成・奨励を行うことを目的としてまいりました。助成金額は、採用した研究テーマに対し、例年1件当たり100万円と設定しておりましたが、2022年度については財団創立40周年を記念し、助成金の上限を1件当たり300万円として26名の採択者に総額6,080万円を助成し、翌年の2023年度から1件当たりの助成金を200万円に増額いたしました。2025年3月現在、助成金の累計は823件、総額9億3,290万円です。

さて、昨年発表されたノーベル賞の受賞者に生理学・医学賞に坂口志文先生、化学賞に北川進先生が選ばれました。日本の研究力の底力を世界に示した一方、研究環境の重要性も浮き彫りになりました。両先生は、「基礎研究に対する支援が不足している」「特徴を持った民間の財団による科学への支援を期待したい」、また、「若い研究者の研究時間を確保する施策が必要」と話されています。当財団でも、1件当たりの助成金額を増やしたところ、応募者が大幅に増加しており、これも、研究環境を整えるため、競争的資金の確保に組織を挙げて取り組まれている結果と思われる。

また、2024年の日本の博士号取得者は、推定で人口100万人あたり123人で、英国・米国・ドイツなど主要国と比べると半分以下となっており、製造業で博士号を持つ人についても約4%で、こちらも米国の半分以下です。日本の研究者にとってアカデミアに残るにしても企業に勤めるにしても、博士号取得のメリットは見いだしづらくなっています。こうした状況下でも、研究者の皆さんには、挑戦し続けていただきたい。坂口先生は「興味のあることを大切に、そして続けるように」、北川先生は、パスツールの言葉「幸運は準備された心に宿る(Chance favors the prepared mind)」を紹介され、チャンスは自分でつくり上げるものであると説かれています。

今後とも当財団では、基礎研究および先進的で独創的な研究に焦点を当てた研究助成事業を通じ、細やかながら研究者の皆さんへの支援活動を続けていく所存ですので、皆様の一層のご指導とご支援をお願い申し上げます。

2026年1月

松籟(しょうらい):「松の梢に吹く風」の意味

設立の趣意

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

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

しかしながら科学技術全般に視点を移しますと、我が国は、とかく成果を期待する余り、応用技術に直接結びつかない研究を軽視する傾向があり、基礎科学の立ち遅れが内外より指摘されております。このことは他国の基礎研究成果への我が国の只乗り論を招くなど、国際摩擦の一因となっております。

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

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

設立の経緯と財団の概況

設立の経緯

ハリマ化成グループ株式会社創業者の長谷川末吉は、はやくからトール油をさまざまな用途に適応可能な素材として着目していました。そして、かねてからの考えを行動に移し、1952年にはトール油の試験生産を開始しました。以来、トール油に対する研究開発を通じて、トール油の持つ素晴らしさを全国に紹介し、その可能性を拓いていきました。その長年にわたる功績が認められ、1982年に長谷川末吉は科学技術庁（現文部科学省）より“科学技術功労者賞”を受賞しました。

ハリマ化成グループは、この栄誉を機に、さらなる科学技術の振興と世界文化の発展を願って、科学技術に関する調査・研究・国際交流に対する助成・奨励を行うことを目的として、1983年3月“財団法人松籟科学技術振興財団”を設立しました。

設立より30年を迎えた2013年4月1日をもって、公益法人の認定を受け「公益財団法人 松籟科学技術振興財団」となりました。引き続き、科学技術の発展に寄与する研究開発への支援事業活動を行ってまいります。

事業の概要

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

- (1) 科学技術に関する調査・研究およびこれらに対する助成（研究助成事業）
- (2) その他、当財団の目的を達成するために必要な事業

財団の概要

名 称：公益財団法人松籟科学技術振興財団

設 立：1983年3月12日

移行登記：2013年4月1日

行 政 庁：内閣府

財務状況（2025年3月31日現在）

正味財産 11億52百万円

目 次

第40回(2022年度)助成金受領研究報告

- 強害根寄生雑草の自殺発芽誘導活性物質に関する研究
埼玉大学 研究機構 米山 香織…… 3
- 植物ホルモン・ジベレリン合成をやめた植物の成長制御機構の解明とその応用
東京電機大学 理工学部 宮崎 翔…… 5
- 植物および微生物資源からの脂質酸化を介した細胞死を制御する天然物の探索
香川大学 農学部 原 康雅…… 8
- 微生物育種による植物アルカロイド医薬品の創出
東京電機大学 理工学部 高橋 俊介…… 14
- 光エネルギーを利用する海洋バイオマスからのグリーン水素製造
九州大学 大学院工学研究院 松本 崇弘…… 18
- 自己免疫疾患予防効果を発揮する植物由来成分の探索と作用機序の解明
岡山県立大学 保健福祉学部 柴田 紗知…… 21
- 希少植物由来「香り」のサステイナブル生産プラットフォーム構築
神戸大学 大学院工学研究科 田中 勉…… 26
- 抗がん性テルペンラクトン類を網羅する可視光応答型標識化反応の開発
静岡大学 学術院工学領域 仙石 哲也…… 30
- 植物内生プロゲステロンの機能解明とその応用
東京農業大学 生命科学部バイオサイエンス学科 伊藤 晋作…… 34
- シロイヌナズナにおけるフェアリー化合物の生理的役割の解明
静岡大学 大学院農学専攻 崔 宰熏…… 37
- 固体担持ビスマス触媒の創製と植物由来アルコール類を原料とした
触媒的ヘテロ環合成とフロー反応系への展開
山形大学 大学院理工学研究科 皆川 真規…… 41
- 植物バイオマスの飛躍的増産に向けたケミカルバイオロジー
理化学研究所 環境資源科学研究センター 草野 修平…… 45
- 植物の腺性毛状突起で高付加価値テルペノイドを生合成する
筑波大学 生命環境系 木下 奈都子…… 48
- 植物由来ヒスチジンリッチ分子を活用した植物機能改変技術の開発
鳥取大学 農学部 岩崎 崇…… 52
- 二次元半導体デバイスへの分子ドーピングを志向した含リン三次元 π 共役化合物の創製
大阪公立大学 大学院理学研究科 津留崎 陽大…… 57
- 「土に還る」土壌含水率センサデバイス及びセンシングシステムの開発
大阪大学 産業科学研究所 春日 貴章…… 60
- 高強度を有する新奇ペプチドハイドロゲルの創製と医療材料への応用
宮崎大学 工学教育研究部 稲田 飛鳥…… 64

| | |
|---|--------------------------------|
| 超音波の周波数で制御する音響応答性ハイドロゲルマイクロ複合材料の生成 | 東京農工大学 工学研究院 倉科 佑太…… 67 |
| 有機系材料のアップグレードを可能とする重水素化反応開発 | 九州大学 高等研究院 矢崎 亮…… 76 |
| 有機蛍光色素への電気学的な保護基の導入と中間種の分解抑制による電気化学発光の増強 | 香川大学 創造工学部 田原 圭志朗…… 81 |
| 非貴金属水電解触媒への応用を志向したキラル共有結合性有機構造体の創製 | 名古屋大学 大学院理学研究科 須田 理行…… 86 |
| 高耐久性アモルファス発光体を利用した固体センシング発光材料の開発 | 京都大学 大学院工学研究科 権 正行…… 90 |
| スピロビピリジンの機能開拓豊富な炭化水素資源の効率的かつ選択的官能基化 | 理化学研究所 環境資源科学研究センター 浅子 壮美…… 95 |
| 昆虫の発色機構から学ぶ外部刺激で色調変化する金属光沢材料の開発 | 千葉大学 大学院工学研究院 桑折 道済……100 |
| リサイクル可能なオール有機多孔質材料の創製と低濃度CO ₂ の分離・回収 | 東北大学 多元物質科学研究所 岡 弘樹……103 |

第36回(2018年度)助成金受領研究報告

| | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| ナノ空間に単分子磁石を内包した透明フィルムの開発とpHによる磁石特性制御 | 大阪公立大学 大学院理学研究科 亀渕 萌……108 |
|--------------------------------------|---------------------------|

第40回(2022年度)

助成金受領研究報告

強害根寄生雑草の自殺発芽誘導活性物質に関する研究

埼玉大学 研究機構
米山 香織

根寄生雑草は宿主となる他の作物の根に寄生し、養分を奪って生活する強害雑草であり、世界の農業生産に甚大な被害を与えている。そのうち *Orobanche* 類 (*Orobanche* および *Phelipanche* 属) は双子葉植物を宿主とし、亜寒帯から温帯まで広く分布している。1991年の調査では、*Orobanche* 類に汚染された農耕地は、地中海沿岸諸国や西アジアだけで1,600万haと推定され、日本の国土面積3,779万haのおよそ半分にもあたり、汚染地域は現在も拡大し続けている。日本でも、おそらく *Orobanche* に汚染された輸入種子によって外来植物として河川敷などに定着しているのが観察されるものの、目立った農業被害は報告されていない。しかし、地球温暖化やグローバル化の進行に伴う被害拡大も重大であり、その存在は日本農業にとって潜在的な脅威である。また農作物を他国からの輸入に依存している現状を考慮すると、根寄生雑草による深刻な農業被害は、対岸の火事では済まされない。

根寄生雑草の効果的な防除方法の一つとして、自殺発芽誘導が挙げられる。長径0.2mm程度の微小な根寄生雑草の種子は、特殊な発芽メカニズムを有しており、宿主植物の根から分泌される発芽刺激物質を感知して初めて発芽する。宿主への寄生無くして生活できない根寄生植物にとっては、発芽は生きるか死ぬかの賭けであり、発芽刺激物質はその命をつなぐ鍵とも言える。自殺発芽誘導は、その鍵を逆手に取った防除法で、宿主植物が存在しない状態で発芽誘導物質を散布し、強制的に発芽を誘導して枯死させ、埋土種子を減らす方法である。

植物の根から分泌されるストリゴラクトンは代表的な根寄生雑草種子発芽誘導物質の一つである。植物はリン酸や窒素などが欠乏するとストリゴラクトンの生産・分泌を顕著に促進する。宿主植物にリン酸や窒素などの無機養分を供給する役割があり、陸上植物の80%以上と共

生関係を持つアーバスキュラー菌根菌(AM菌)との共生を促進するためである。根寄生雑草は、植物がAM菌との共生を開始するために分泌するストリゴラクトンを、生きた根の存在を感知するシグナル物質として利用するように進化したと考えられている。

一方、私たちはこれまでに、*Phelipanche ramosa* による農業被害が深刻なフランスのNantes大学との共同研究により、フランスで重要な作物の一つであるナタネ (*Brassica napus*) の根浸出液から、*P. ramosa* の発芽刺激物質として、2-phenylethyl isothiocyanate (2PE-ITC) を単離・同定した (Auger et al. MPMI. 2012)。その後、約20種類の既存ITCを用いて、*Phelipanche* 属の種子発芽誘導における構造活性相関を明らかにし、数fM (10^{-15} M) という低濃度で発芽誘導活性を示す5-phenylpentyl ITC (5PP-ITC) を創出することに成功した (Miura et al. Plants. 2021)。さらに興味深いことに、ITCは *Phelipanche* 属にだけ特異性を示し、アフリカで猛威を奮っている *Striga* 属や日本にも自生する *Orobanche* 属に対しては種子発芽誘導活性を示さない。全ての根寄生雑草の発芽誘導を示すストリゴラクトンとITCにおける受容体相互作用を調査する上でも、低濃度で活性を示すよう改良された5PP-ITCは有効なツールとしても利用可能である。

植物由来のITCは、アブラナ科に特徴的な二次代謝産物であるグルコシノレートから酵素反応によって生成され、ワサビ、マスタード、大根などの辛味成分として知られている。ITCは、抗がん作用、殺菌作用、動脈硬化などを防ぐ機能性成分としても注目されている。またITCは、土壤燻蒸剤として農薬登録されており、殺菌・殺種子剤として利用されている。このようにITCは、人体にはむしろ有用で、すでに農薬として広く使用されていることから農業生産において応用展開するためのハー

ドルが低い注目すべき化合物であると言える。

本課題では、5PP-ITCを実際に*Phelipanche*自殺発芽誘導剤として応用展開することを最終目標に、5PP-ITCが作物、土壌微生物、人体に与える影響を調査した。

①作物生育への影響評価

5PP-ITCが宿主植物の種子発芽や生育初期に与える影響を調べた。allyl ITCやphenethyl ITCはレタスの種子発芽を阻害すると報告されている(Matsunaga et al. 日本農薬学会 2020)が、レタス (*Lactuca sativa*)、トマト (*Solanum lycopersicum*) の種子発芽では、 10^{-8} ~ 10^{-4} M の範囲で5-PP ITCは影響を与えなかった。一方、明条件下ではカブ (*Brassica rapa*) の種子発芽は抑制されるが、5-PP ITC処理により発芽促進が認められた。

また、5PP-ITCは濃度依存的にトマトの胚軸および根の伸長を促進した。レタスではそのような正の効果は認められなかった。

以上のように、5PP-ITCによる作物生育に対してポジティブな影響が確認された。現在はそのメカニズム解明のために、活性酸素種発生による休眠打破効果やアブシシン酸/ジベレリンのバランス制御に関して精査している。

②根粒形成への影響評価

5PP-ITCがアカローバーの根粒形成および生育に与える影響を調べるため、5PP-ITCを土壌散布直後および散布1週間後にアカローバーを播種し、5PP-ITCおよびその分解物が与える影響を評価した。その結果、5PP-ITCおよびその分解物は根粒形成、生育量に正にも負にも影響を与えないことが確認された。

③*C.elegans*を用いた殺線虫効果

一般的な線虫に対する毒性評価を調べた。5PP-ITCはEC₅₀が150 μMであった。殺線虫農薬であるfosthiazate (化学合成された強力な土壌殺線虫剤)やabamectin (天然由来で強力な殺線虫剤であるが水生生物に毒性あり)などはEC₅₀が1-10 μM程度であることを考えると、殺線虫効果が高いとは言えないが、天然由来の成分、環境負荷の低い物質としては意味のある活性と考えられる。

④HL細胞を用いた細胞毒性評価

H L細胞(ヒト白血病細胞株)において、5PP-ITCは

EC₅₀が70 μMと中程度の細胞毒性を示した。抗癌剤はnMのEC₅₀と高い活性を示すが、天然物や食事性成分の場合は、50-200 μM程度のEC₅₀でも潜在的抗癌活性ありと評価される。

⑤アンサンブルドッキング

*P. ramosa*受容体とITCの相互作用を予測するために、YARASAのアンサンブルドッキングを行った。なお、*O. minor*受容体およびGR24 (合成ストリゴラクトン)を比較対象として含めた。*P. ramosa*受容体はGR24およびITC数種類と高い結合エネルギーを示した。一方、*O. minor*受容体はGR24とは結合が良好であったが、ITCに対しては低い親和性を示した。*O. minor*はITCで発芽が誘導されないことから、結合親和性が発芽応答に直結している可能性が高く、*P. ramosa*受容体は広いリガンド受容性を、*O. minor*受容体はより特異的なリガンド選択性を持つ可能性が示唆された。

⑥その他

より簡便な5PP-ITC合成を確立させたが、目標の一つであった*Orobanchae*種子発芽誘導型ITCの作成にはまだ至っていない。ITCによる受容メカニズム解明に繋げるためにも、今後の課題の一つであると考えている。

フランスでポット試験を遂行してもらったが、暑さなどの影響でコントロールも寄生されない状況で終わってしまった。今秋もう一度遂行予定である。これらの結果は投稿論文としてまとめる予定である。

謝辞

本研究の遂行にあたり、福井康祐博士(東京理大)およびJean-Bernard Pouvreau博士(Nantes大学/フランス)にご協力頂きました。研究助成を賜りました松籟科学技術振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Auger et al. Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Molecular plant-Microbe Interactions*. 25 : 993-1004. 2012
- Miura et al. Germination stimulant activity of isothiocyanates on *Phelipanche* spp. *Plants*. 11 : 1-10. 2022

植物ホルモン・ジベレリン合成をやめた植物の成長制御機構の解明とその応用

東京電機大学 理工学部
宮崎 翔

テルペノイド化合物の中で、炭素数が20のジテルペノイド化合物は植物の生存戦略において重要な役割を果たしており、多くの植物で様々な構造の化合物が報告されている。しかし、従来知られていた構造とは大きく異なるものが特定の植物群から発見されている。これらの植物群は、進化の過程で独自の成長制御機構を獲得し、従来の生合成経路とは異なる戦略を採用していると考えられる。

コケ植物の独特な成長制御機構

ジテルペノイド型植物ホルモンであるジベレリン(GA)は種子の発芽や伸長を促す活性を保有し、『あらゆる植物から共通構造の生理活性分子として検出される植物成長制御物質』とも定義されているが、この定義に合わない植物群の存在が知られている。コケ植物は陸上植物の中でも最も古い系統の一つであり、現時点での知見では顕花植物でみられるGA生合成経路を完全に保有していない(図1)。しかし、これらのコケ植物はGA生合成の中間体から、GA起源物質と換言できる生理活性物質を生産することを明らかとしている¹⁻⁵⁾。コケ植物における成長制御機構の解明は、植物ホルモンの進化的起源を理解する上で重要な手がかりとなる。

ナンヨウスギ科植物の多様なジテルペノイド化合物

もう一つの興味深い植物群として、ナンヨウスギ科植物が挙げられる。本植物群は、これまで知られていたジテルペノイド化合物の鏡像異性体関係(左手と右手の関係)を生産することが報告されている(図2)⁶⁾。この植物は「生きている化石」と呼ばれ、1~2億年前から地球上に生息し続けている古代植物群である。

ジテルペノイド化合物における鏡像異性体は、植物の

代謝的多様性を示す重要な知見である。天然有機化合物において鏡像異性体の生物活性が変わる例は数多く知られているが、これまで知られていない鏡像異性体を利用した固有な生活環制御機構を有する可能性が示唆される。

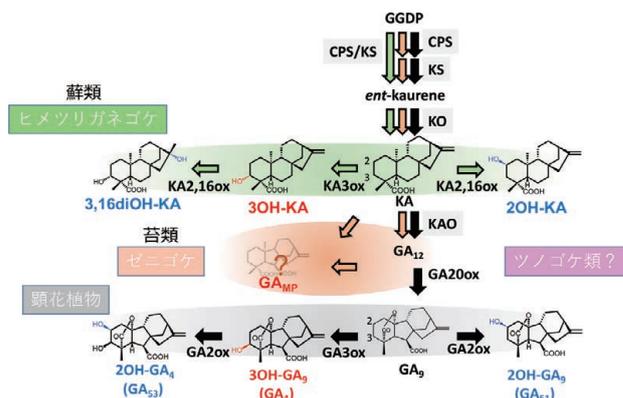


図1. GA起源物質類の生合成経路

蘚類ヒメツリガネゴケはKAの3位に水酸基を導入して活性型分子3OH-KAを合成し、2位に水酸基を導入して不活性化を制御する(緑矢印)。顕花植物も3位と2位の水酸基の導入で活性を制御する(黒矢印)。苔類ゼニゴケはGA₁₂下流に活性型の生理活性物質(GA_{MP})を合成する(橙矢印)。ツノゴケ類もGA₁₂までの生合成経路を保有している、生理活性等は不明である。

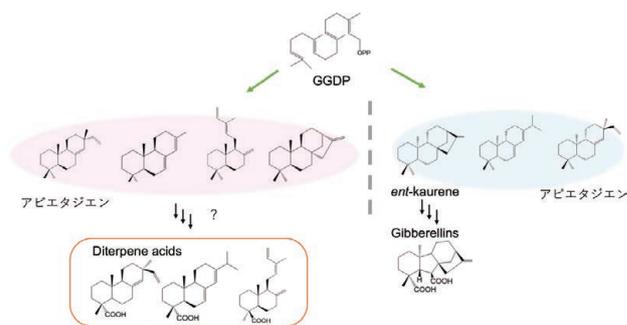


図2. ナンヨウスギ科植物のジテルペン代謝経路

本研究で明らかにしたナンヨウスギ科植物で生産するジテルペノイド類。左右のアビエタジエンは鏡像異性体関係である。

研究目的

本研究では、ジテルペノイド型植物ホルモンGAの生合成経路を完全に保有しない植物群としてコケ植物と、ユニークなジテルペノイド代謝を有するナンヨウスギ科植物の成長制御機構を解明することを目的とした。

手法

1. ジテルペノイド化合物の分析

コケ植物は蘚類、苔類、ツノゴケ類から成り立つ。複数種のコケ植物から代謝産物を有機溶媒で抽出・精製後、LC-MS/MSで分析を実施し、GA関連化合物および中間体の同定を試みた⁷⁾。

ナンヨウスギ科植物の各種部位を用いて水蒸気蒸留抽出を行い、立体異性体を含む多種類の炭化水素ジテルペンとジテルペン酸に関して、鏡像異性体を分割するカラムを利用したGC-MS分析により、検出を試みた。

2. ジテルペン合成酵素遺伝子の同定

mRNA用いた次世代シーケンス解析を行い、データ解析を通してジテルペン合成酵素(diTPS)の候補遺伝子を探索した。候補遺伝子に関しては、cDNAを調製してクローニングし配列を確認した。

3. ジテルペン合成酵素の機能解析

大腸菌による組換え酵素を調製し、基質特異性と反応生成物の解析を行った。生成物を有機溶媒で抽出・精製し、GC-MSで分析を実施した。

結果

1. ジテルペンプロファイルの解明

コケ植物のうち蘚類ヒメツリガネゴケはGA類を生産しない。他の蘚類(ギンゴケ、ホソバオキナゴケ等)に関して、分析を進めたが、ヒメツリガネゴケと同様にGA類は検出されなかった(未発表)。最近、多くのコケ植物の遺伝子発現データが報告されており、それらを参照しても蘚類はGA合成酵素を保有していないことが追認できた。一方で、共同研究により苔類ゼニゴケは顕花植物が生産する活性型GAの構造に似た、一部のGA類を生合成することを見出している³⁾。そこで、残りのコケ植物のグループであるツノゴケのGA生合成研究に着手した。遺伝情報から苔類ゼニゴケと同様のGA生合成プロファ

イルが示唆されており、顕花植物で知られている活性型GA類の検出には至っていない。

他方、ナンヨウスギ科植物の若葉からの抽出物から、多種類の炭化水素ジテルペンを検出した。また、その代謝産物であるジテルペン酸も確認できた。鏡像異性体を分割するカラムを利用した分析も実施したところ、鏡像異性体を複数検出することができた。特にGAの生合成中間体であるカウレンの鏡像異性体も追認した(農芸化学会2024年度大会)。

2. ジテルペン合成酵素遺伝子の同定

コケ植物ではツノゴケを用いて進めている。まず、GA酵素遺伝子の酵素活性を確認するために、酵素遺伝子のクローニングを行った。偽遺伝子も多く含まれており想定より時間を要しているが、*in vitro*での酵素活性を確認した後に、欠損変異体作出実験へと繋げる予定である。

ナンヨウスギ科植物から多様なジテルペンを検出したため、それらの生合成に関与する酵素遺伝子の取得を試みた。いくつかの部位由来のRNAを調製し、RNA-seqを実施したところ、diTPSの候補遺伝子を複数見出した。

3. 環化酵素の機能解析

ナンヨウスギ科植物に関して、RNA-seqより見出した酵素遺伝子に関して、組換え酵素を調製し、機能解析を行った。ジテルペンの多様な骨格の多くは共通基質であるgeranylgeranyl diphosphateから2段階で構築される。1段階目で基本的な立体化学が決定し、3種の立体異性体(CDP)が合成され、2段階目で主として環状のジテルペンが合成される。クローニングした合成酵素遺伝子に関して、大腸菌を利用して組換え酵素を調製し、geranylgeranyl diphosphate、およびCDPとの反応を行い、GC-MSで生成物の分析を行った。その結果、GAの合成に関与する合成酵素遺伝子等、ジテルペンの合成活性を確認することができた。そのうちの一つ(KSL)がアビエタジエン類を合成する単機能型環化酵素であることを見出した。アビエタジエン類を合成するジテルペン環化酵素はこれまで多機能型酵素としてのみ知られている。すなわち、アメリカオオモミ由来のアビエタジエン合成酵素(AgAS)は1段階目と2段階目の環化機構を一つの酵素で併せ持つ。AgASと同じアビエタジエン類を

合成することをAgAS生成物との直接比較で同定した。(農芸化学会2024年度大会)。さらに驚くべきことに、KSLは鏡像異性体基質(CDP)を認識し、その環化反応生成物は基質の立体構造に対応した鏡像異性体であることを、キラルカラムを用いたGC-MS分析から明らかにした。多機能型のAgASは特定の鏡像異性体基質のみを認識した。

今後の展開

本研究で得られた知見は、ジテルペン化合物の生合成機構と機能の多様性を理解する上で重要な基盤を提供する。特に、ナンヨウスギ科植物から発見されたKSL酵素による鏡像異性体認識機構は、従来の多機能型酵素とは異なる単機能型の環化反応を示しており、この発見は植物が進化の過程で獲得した代謝柔軟性の証拠である。また、GAの生合成中間体の鏡像異性体も検出された。ジテルペン生合成経路の多様化メカニズムを解明する重要な手がかりとなり、古代植物群における独特な代謝システムの理解を深める。

今後は、検出されたジテルペン化合物の下流代謝産物の同定を重点的に進め、特に構造決定と詳細な生理活性評価を行う。コケ植物における原始的な成長制御機構とナンヨウスギ科植物の高度に特化した代謝システムの比較解析により、植物ホルモンの進化的変遷を包括的に理解したい。これらの研究成果を統合することで、ジテルペン化合物を基盤とした新規植物成長制御剤の開発や、

作物の成長と生殖を精密に制御する革新的技術の創出が期待される。

謝辞

本研究の実施にあたり、公益財団法人松籟科学技術振興財団より研究助成金を賜り、深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) S. Miyazaki, M. Hara, S. Ito, K. Tanaka, T. Asami, K. Hayashi, H. Kawaide & M. Nakajima : *Mol. Plant*, **11** : 1097-1100 (2018).
- 2) M. Nakajima, S. Miyazaki & H. Kawaide : *Plant Cell Physiol.*, **61** : 1861-1868 (2020).
- 3) R. Sun, M. Okabe, S. Miyazaki, T. Ishida, K. Mashiguchi, K. Inoue, Y. Yoshitake, S. Yamaoka, R. Nishihama, H. Kawaide et al., : *Plant Cell*, **35** : 4111-4132 (2023).
- 4) S. Miyazaki, H. Kawaide & M Nakajima : *J Plant Growth Regul.*, **43** : 2937-2943 (2024).
- 5) 宮崎翔、川出洋、中嶋正敏 : 化学と生物、**63** : 211-217 (2025).
- 6) J. Brophy, R.J. Goldsack, W. O'Sullivan : *Biochem Syst Ecol.*, **32** : 867-873 (2004).
- 7) S. Miyazaki, H. Kimura, M. Natsume, T. Asami, K. Hayashi, H. Kawaide & M. Nakajima : *Biochem Biophys Rep.*, **2** : 103-107 (2015).

植物および微生物資源からの脂質酸化を介した細胞死を制御する天然物の探索

香川大学 農学部
原 康雅

1. 背景と目的

近年、これまで知られていたアポトーシスやネクローシスといった細胞死のほかにも多様な細胞死が存在することが明らかになりつつある。2012年に、Stockwellらは、抗がん剤エラスチン等による鉄依存的な脂質酸化を介した新規細胞死、フェロトーシスを報告した¹⁾。フェロトーシスは、主に鉄 (Fe^{2+}) の蓄積と脂質酸化により誘導され、グルタチオンペルオキシダーゼ4 (GPx4) などによって抑制される。GPx4はリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン (GSH) 依存的に直接還元する酵素であり、GSHを利用して脂質の酸化を抑制している。GSHは、シスチン/グルタミン酸トランスポーター (SLC7A11) を介して細胞内に取り込まれたシスチンから合成される。そのため、SLC7A11が阻害されると、細胞内のシスチン、システイン、GSHが枯渇し、GPx4活性が低下する。これにより、鉄依存的なフェントン反応によって生体膜のリン脂質の酸化が亢進し、フェロトーシスが引き起こされる²⁾。近年の研究では、フェロトーシスがヒトの疾患と密接に関連していることが報告されている。たとえば、アルツハイマー病では、記憶を司る海馬の鉄濃度が顕著に上昇し、脂質過酸化や鉄誘導性の酸化ストレスへの関与が示唆されている^{3,4)}。また、非アルコール性脂肪肝炎においては、肝組織内の鉄濃度の上昇によりフェロトーシスが誘導され、肝細胞の損傷が進行することが報告されている⁵⁾。さらに、がん細胞は細胞増殖を維持するために、鉄や活性酸素種のレベルが上昇していることがあり、このような場合、がん細胞は正常細胞に比べてフェロトーシスが引き起こされやすいことが示唆されている⁶⁾。加えて、既存の抗がん剤に抵抗性を示すがんのいくつかは、フェロトーシスに対して感受性が高いことも報告されている⁷⁾。一方、フェロ

トーシス以外の脂質酸化を介した細胞死として、今井らはフェロトーシスを制御する酵素GPx4欠損やビタミンE低下を伴う鉄非依存的な脂質酸化依存的細胞死、リポキシトーシスを見出した²⁾。このリポキシトーシスは、男性不妊症との関連が報告されている⁸⁾。

このように、脂質酸化を介した細胞死は、様々な疾患と関連していることから、これらの細胞死を制御する化合物は、有用な医薬シーズとなり得ると考えられる。これまでに、フェロトーシスを誘導する化合物としてerastinやsorafenib、(1S,3R)-RSL3などが、フェロトーシスを阻害する化合物としてferrostatin-1やliproxstatin-1が報告されている⁹⁾。また、天然由来有機化合物 (天然物) においても、キク科植物*Artemisia annua*由来のartemisinin¹⁰⁾、海綿由来のlepadin類¹¹⁾などにフェロトーシス誘導作用が見出されている。一方、真菌*Trichocladium* sp. XZ8より単離されたtrichindole類¹²⁾やハス科植物*Nelumbo nucifera*由来のisoliensinine¹³⁾などには、フェロトーシス阻害作用が見出されている。しかし、これらの脂質酸化を介した細胞死を制御する創薬シード化合物の探索・創出は依然として十分な状況ではなく重要な課題の1つである。

そこで、本研究では、独自に保有する植物や微生物資源などから、脂質酸化を介した細胞死を制御する天然物を探索することとした。

2. 方法

2.1 使用細胞株

細胞株は、TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) 耐性をもつヒト胃腺がん細胞株AGSを使用した。本細胞の培養には10% fetal bovine serum (FBS) 含有RPMI1640 (L-グルタミン、フェノー

ルレッド含有)を用いた。

2.2 細胞生存率

細胞生存率は、fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA法)¹⁴⁾により測定した。96ウェル黒色マイクロプレートを用い、各ウェルに細胞を播種した。この際、既報^{15,16)}を参考に、サンプル添加後24時間の培養時間では初期細胞数を 3×10^4 cells/wellとし、72時間の培養時間では初期細胞数を 4×10^3 cells/wellとした。細胞播種24時間後にサンプルを添加し、サンプル添加後の各培養時間後に培地を除去した。各ウェルに、 $3.5 \mu\text{g/mL}$ fluorescein diacetate (FDA) 含有phosphate-buffered saline (PBS) 溶液を $200 \mu\text{L}$ 加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で1時間培養した。培養後、生体内酵素によりFDAから生じるfluoresceinの蛍光量を、マイクロプレートリーダー Fluoroskan Ascent (Thermo) にて測定した (Ex: 485 nm 、Em: 538 nm)。AGSの細胞生存率の評価は、1次スクリーニングでは $n = 1$ 、2次スクリーニングでは $n = 3$ で行った。コントロールには、ジメチルスルホキシド (DMSO) を適宜調整して用いた。ポジティブコントロールとしてフェロトーチス誘導化合物である(1S,3R)-RSL3 (RSL3) を用いた。

なお、細胞生存率は、次の式で求めた。細胞生存率 (%) = $100 \times [\text{サンプルの蛍光量}] / [\text{コントロールの蛍光量}]$ 。

2.3 天然物ライブラリー

化合物は、当研究室にて単離した天然物とHirota Collection of Natural Product (HCNP) を用いた。各化合物を 100 mM DMSO溶液に調製し、これを天然物ライブラリーとした。スクリーニングの際には、 $100 \mu\text{M}$ に調製して用いた。

2.4 植物コレクション

植物は、これまでに共同研究者と採取し保管していたバングラデシュ産植物コレクション (KKB) を用いた。各植物をメタノール (MeOH) で抽出した後、得られたMeOH抽出物を 50 mg/mL DMSO溶液として調整した。これをKKBエキスコレクションとし、スクリーニングの際には、 $50 \mu\text{g/mL}$ または $200 \mu\text{g/mL}$ に調整し用いた。

2.5 微生物コレクション

微生物は、これまでに日本国内で採取した土壌より分離した真菌コレクション (FKK) を用いた。単離した各真菌を玄米培地にて 28°C 、静置にて、14日間培養した。培養後、 30 mL のMeOHを加え、1日抽出した。得られたMeOH抽出液に水を加え $10\% \text{MeOH}$ 水溶液とし、酢酸エチル (EtOAc) で液々分配した。EtOAc層を乾固した後、 50 mg/mL DMSO溶液として調整した。これをFKKエキスコレクションとし、スクリーニングの際には、 $50 \mu\text{g/mL}$ に調整し用いた。

2.6 脂質過酸化の検出

脂質過酸化の検出は、Lipid Peroxidation Probe -BDP 581/591 C11- (同仁化学研究所, BDP 581/591 C11) を用いた。96ウェルクリアマイクロプレートに、細胞を 3×10^4 cells/wellで播種し、細胞播種24時間後にサンプルを添加した。サンプル添加から24時間後に培地を除去し、FBS含有RPMI1640培地で2回洗浄した。次に、無血清RPMI1640培地 (L-グルタミン、フェノールレッド含有) を用いて2000倍に希釈したBDP 581/591 C11溶液を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で30分間培養した。培養後、PBSで各ウェルを2回または3回洗浄し、各ウェルにPBSを $100 \mu\text{L}$ 加えた後、蛍光顕微鏡BZ-9000 (KEYENCE) にて細胞を観察した。蛍光顕微鏡による観察は、明視野、red: TRITCフィルタ (Ex: $530\text{-}550 \text{ nm}$ 、Em: $580\text{-}630 \text{ nm}$)、green: GFP-BPフィルタ (Ex: $450\text{-}490 \text{ nm}$ 、Em: $515\text{-}560 \text{ nm}$) を用いて実施した。コントロールにはDMSOを、ポジティブコントロールにはRSL3 ($6.25 \mu\text{M}$) を用いた。

3. 結果

3.1 脂質酸化細胞死誘導作用評価系の構築

AGS細胞を使用したFMCA法による脂質酸化誘導作用評価系を構築するために、下記の3条件について検討した。

a) サンプル添加後の培養時間

脂質酸化を介した細胞死である2種の細胞死にかかる時間は、それぞれ、フェロトーチスは24時間程度であり、リポキトーチスは72時間程度と報告されている¹⁷⁾。そこで、サンプル添加後の培養時間について、24時間および72時間の2種を検討した。

b) ポジティブコントロールの濃度

ポジティブコントロールであるRSL3が、AGS細胞に対して脂質酸化を介した細胞死を誘導する濃度を、24時間の培養時間では1.25-100 μ Mの範囲で、72時間の培養時間では0.05-10 μ Mの範囲で検討した。

c) 脂質酸化細胞死を抑制する化合物

本実験系にて、サンプル単独群と、サンプルおよび脂質酸化細胞死を抑制する化合物の併用群の細胞生存率の比較にて、脂質酸化を介した細胞死が誘導された（脂質酸化細胞死誘導）か否かを評価する。そこで、本評価系に用いる化合物として、フェルトーシス抑制化合物である、deferasirox⁷⁾および α -tocopherol¹⁸⁾の2種を検討した。

上記の条件を詳細に検討した結果、サンプル添加後の培養時間は72時間よりも24時間の場合に、脂質酸化細胞死を抑制する化合物との併用群の細胞生存率の上昇が顕著であった。このことから、サンプル添加後の培養時間を、24時間と決定した。また、脂質酸化を介した細胞死誘導作用を選択する指標として、12.5 μ M RSL3と100 μ M α -tocopherolの併用群を用いることとした。

3.2 天然物ライブラリーからの脂質酸化を介した細胞死誘導化合物の探索

天然物ライブラリー中の309種について、一次スクリーニングを実施した。AGSの細胞生存率が50%以下を示した化合物をヒット化合物としたところ、65種の化合物をヒット化合物として見出した。次に、脂質酸化を介した細胞死誘導作用を示すサンプルを選択するため、 α -tocopherol併用群を用いた2次スクリーニングを実施した。このスクリーニングでは、フェルトーシス阻害剤である α -tocopherol併用時の細胞生存率が、サンプル単独時より上昇した場合、脂質酸化を介した細胞死誘導作用を有すると評価した。その結果、1次スクリーニングでのヒット化合物65種のうち、HCNPに含まれる10種を、脂質酸化細胞死誘導化合物として見出した (Fig. 1)。

次に、ヒット化合物添加による脂質過酸化発生の有無の検出を行った。BDP 581/591 C11は、脂質が過酸化される際に発生する脂質ラジカルなどと反応し、未反応時の赤色の蛍光から緑色の蛍光へ変化する。そのため、未処理である細胞群 (control) では、緑色蛍光を有する細胞はほとんど観察されないが、フェルトーシスを誘導す

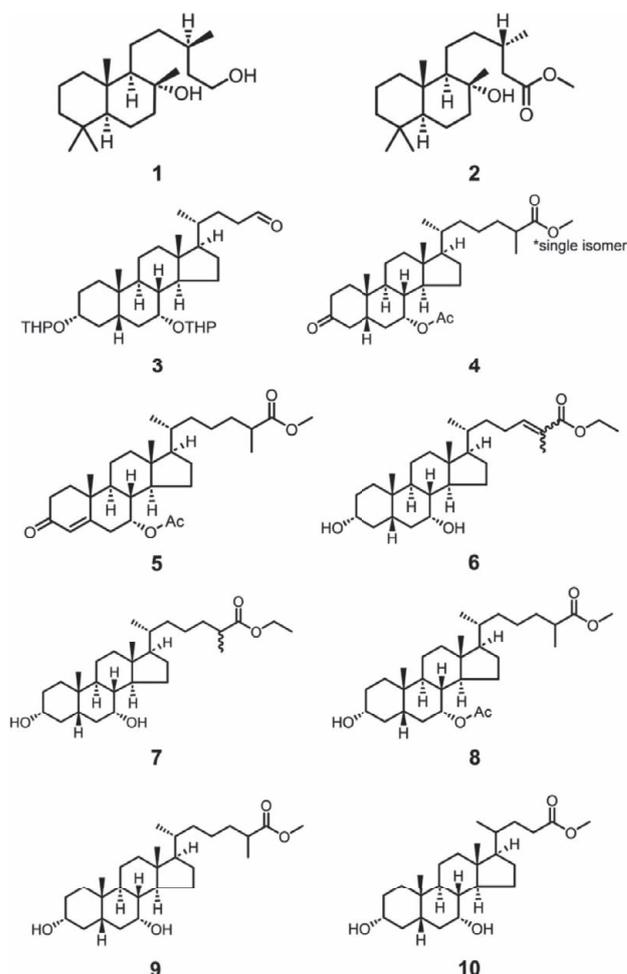


Fig.1 化合物1-10の化学構造

るRSL3では、緑色蛍光を有する細胞の割合が増加しているのが観察される (Fig. 2)。

ヒット化合物10種は、大きくラプタン型ジテルペン (1, 2) とステロイド骨格を有するトリテルペン (3-10) に分類された。そこで、これら2種の化合物群より、化合物1と化合物4をそれぞれ選択し、脂質過酸化の発生の有無を検出した。その結果、フェルトーシス誘導作用を有すると評価した化合物1 (40 μ M) および4 (40 μ M) を添加した細胞群では、緑色蛍光を発する細胞の割合が増加した (Fig. 2)。このことから化合物1および4はいずれも脂質過酸化の発生により、細胞死を促進していることが示唆された。

3.3 植物からの脂質酸化を介した細胞死誘導作用をもつ天然物の探索

KKBエキスコレクション内の202種について、1次スクリーニングを実施した。AGSの細胞生存率が50%以下を示したサンプルをヒットサンプルとしたところ、サ

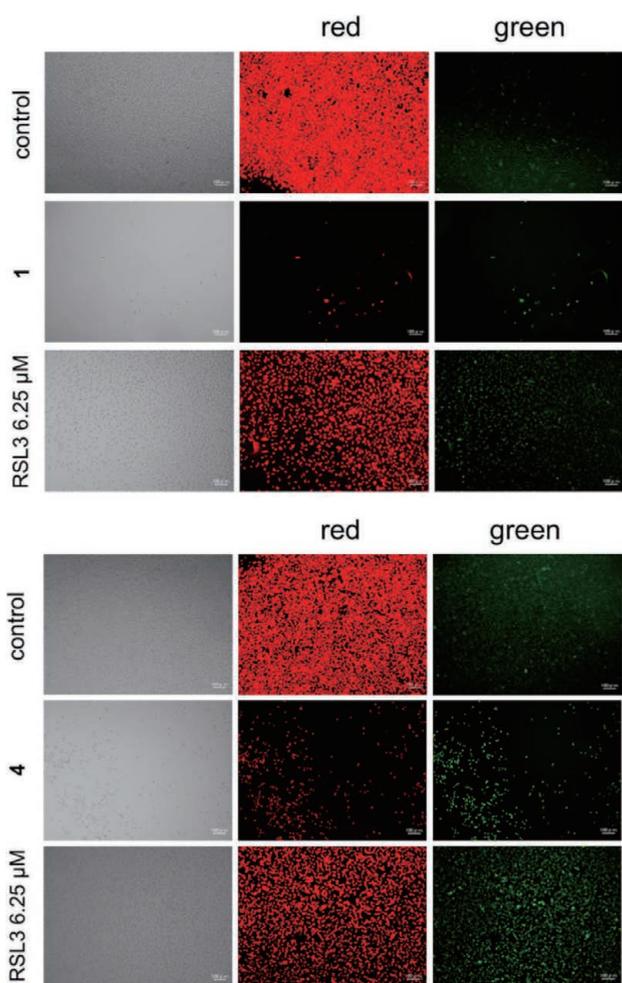


Fig.2 BDP 581/591 C11による化合物1および4の脂質過酸化の検出

Control : DMSO, Scale bar = 100 μ m

ンプル濃度50 μ g/mLで29種、サンプル濃度200 μ g/mLで40種をヒットサンプルとして見出した。次に、脂質酸化を介した細胞死誘導作用を示すサンプルを選択するため、 α -tocopherol併用群を用いた2次スクリーニングを実施した。その結果、1次スクリーニングでのヒットサンプル69種のうち、4種をヒットサンプルとして得た。1種は50 μ g/mLで、3種は200 μ g/mLで脂質酸化を介した細胞死誘導作用を示した。このうち、最も低濃度で活性を示したショウガ科植物KKB 369 *Curcuma zedoaria*の地下部からの脂質過酸化の発生の検出および、成分探索を行った。

脂質酸化を介した細胞死誘導作用を有すると評価したKKB 369 *Curcuma zedoaria*の地下部の抽出物についてBDP 581/591 C11を用いて、脂質過酸化の発生の有無を検出した。その結果、KKB 369 (50 μ g/mL)を添加した細胞群では、緑色蛍光を発する細胞の割合が増加した (Fig. 3)。このことから、KKB 369 *Curcuma zedoaria*

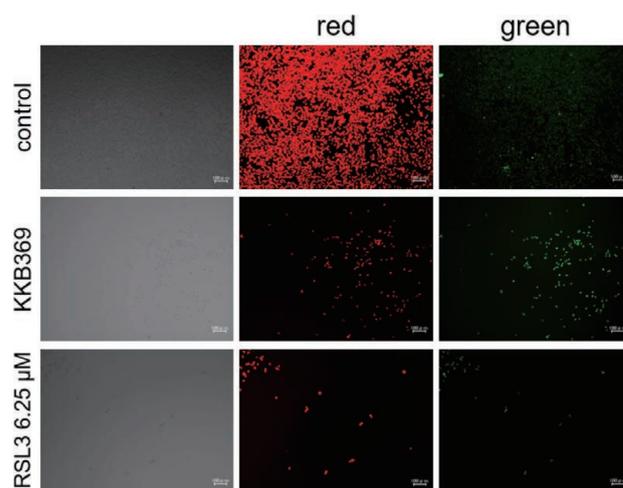


Fig. 3 BODIPY 581/591 C11によるKKB 369 *Curcuma zedoaria*抽出物の脂質過酸化の検出

Control: DMSO, Scale bar = 100 μ m

の地下部は脂質過酸化の発生により、細胞死を促進していることが示唆された。

次に、KKB 369 *Curcuma zedoaria*の地下部から成分探索を行った。本植物の地下部215 gを計1.4 LのMeOHで抽出した。得られたMeOH抽出物14.9 gを、10% MeOHに懸濁し、*n*-ヘキサン (*n*-hexane)、EtOAc、*n*-ブタノールで順次液々分配を行った。各層について、脂質酸化細胞死誘導活性を評価したところ、*n*-hexane層、EtOAc層に活性が移行した。このうち、*n*-hexane層 (4.3 g) について、*n*-hexane/EtOAc系溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を行い、1A-1Jを得た。各画分について、脂質酸化細胞死誘導活性を評価したところ、1C (*n*-hexane/EtOAc = 50/1 画分) は25 μ g/mLの濃度で、1G-1J (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-0/1 およびMeOH画分) は、いずれも50 μ g/mLの濃度で脂質酸化細胞死誘導活性が見られた。1H (1.3 g, *n*-hexane/EtOAc=2/1 画分) について、アセトン (acetone) /H₂O系溶媒を用いてオクタデシルシリル (ODS) カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、2A-2Mを得た。各画分について、活性を評価したところ、2C-2E (60-80% acetone画分) に、12.5-25 μ g/mLの濃度にて、脂質酸化細胞死誘導活性を見出した。

3.4 微生物からの脂質酸化を介した細胞死誘導作用をもつ天然物の探索

FKKエキスコレクション内の66種について、一次スクリーニングを実施したところ、13種をヒットサンプル

として見出した。次に、二次スクリーニングを実施したところ、FKK 56の抽出物1種がヒットサンプルとして得られた。この真菌は2019年に千葉県千葉市青葉の森公園で採集した土壌サンプルより単離した株であった。

4. 結論

本研究にて、脂質酸化を介した細胞死を誘導する化合物10種、植物抽出物を4種、微生物抽出物を1種見出した。今後、天然資源からの脂質酸化を介した細胞死を誘導する化合物の単離を目指すとともに、単離した化合物の作用機序を解析する。また、今回、実施が叶わなかった脂質酸化を介した細胞死を抑制する天然物の単離も進めることで、脂質酸化を介した細胞死を制御する創薬シードを見出したいと考える。

5. 謝辞

本研究に対して多大なご支援を賜りました公益財団法人松籟科学技術振興財団に、心より御礼申し上げます。また、熱帯植物をご恵与いただいた千葉大学 石橋 正己 博士、ダッカ大学 Firoj Ahmed博士、クルナ大学 Samir K. Sadhu 博士、HCNPライブラリーをご恵与いただいた 廣田 洋 博士に厚く御礼申し上げます。本研究は、香川大学農学部活性構造化学研究室にて行われたものであり、学生諸氏に御礼申し上げます。

6. 参考文献

1. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht M R, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis : an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **2012**, 149, 1060-1072.
2. Fujii J, Imai H. Oxidative metabolism as a cause of lipid peroxidation in the execution of ferroptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 7544.
3. Rizzolo F, More S, Vangheluwe P, Agostinis P. The lysosome as a master regulator of iron metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **2021**, 46, 960-975.
4. Li J, Cao F, Yin H-L, Huang Z-J, Lin Z-T, Mao N, Sun B, Wang G. Ferroptosis : past, present and future. *Cell Death Dis.* **2020**, 11, 88.
5. Qi J, Kim J-W, Zhou Z, Lim C-W, Kim B. Ferroptosis affects the progression of nonalcoholic steatohepatitis via the modulation of lipid peroxidation-mediated cell death in mice. *Am. J. Pathol.* **2020**, 190, 68-81.
6. Chen Z, Wang W, Abdul Razak SR, Han T, Ahmad NH, Li X. Ferroptosis as a potential target for cancer therapy. *Cell Death Dis.* **2023**, 14, 460.
7. Zhou Q, Meng Y, Li D, Yao L, Le J, Liu Y, Sun Y, Zeng F, Chen X, Deng G. Ferroptosis in cancer : from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, 9, 55.
8. Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.* **2001**, 64, 674-683.
9. Du Y, Guo Z. Recent progress in ferroptosis : inducers and inhibitors. *Cell Death Discov.* **2022**, 8, 501.
10. Wang Y, Yuan X, Ren M, Wang Z. Ferroptosis : a new research direction of artemisinin and its derivatives in anti-cancer treatment. *Am. J. Chin. Med.* **2024**, 52, 161-181.
11. Wang W, Ma F, Cheung Y T, Zeng G, Zhou Y, Chen Z, Liang L, Luo T, Tong R. Marine alkaloid lepadins E and H induce ferroptosis for cancer chemotherapy. *J. Med. Chem.* **2023**, 66, 11201-11215.
12. Duan X-Q, Wang X-Y, Qi H-C, Zhai Y-J, Han W-B. Neuroprotective indole alkaloids from the soil-derived fungus *Trichocladium* sp. XZ8. *J. Nat. Prod.* **2025**, 88, 175-182.
13. Song Y, Li M, Li Y, Zhang T, Zhang J, Han D, Lian F, Liu X, Fang X. Identification of isoliensinine as a Ferroptosis suppressor with iron-chelating activity. *J. Nat. Prod.* **2025**, 88, 245-254.
14. Lindhagen E, Nygren P, Larsson R. The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nat.*

- Protoc.* **2008**, 3, 1364-1369.
15. Ahmed F, Ohtsuki T, Aida W, Ishibashi M. Tyrosine derivatives isolated from *Streptomyces* sp. IFM 10937 in a screening program for TRAIL-resistance-overcoming activity. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1963-1966.
 16. Hara Y, Tanimura D, Manome T, Arai MA, Yaguchi T, Ishibashi M. Isolation of peptidolipin NA derivatives from the culture of *Nocardia arthritidis* IFM 10035^T in the presence of mouse macrophage cells. *Heterocycles* **2022**, 104, 185-190.
 17. Tsuruta K, Matsuoka M, Harada S, Enomoto A, Kumagai T, Yasuda S, Koumura T, Yamada KI, Imai H. Slowly progressive cell death induced by GPx4-deficiency occurs via MEK1/ERK2 activation as a downstream signal after iron-independent lipid peroxidation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2023**, 74, 97-107.
 18. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, Schreiber SL, Stockwell BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, **2014**, 156, 317-331.

微生物育種による植物アルカロイド医薬品の創出

東京電機大学 理工学部
高橋 俊介

1. はじめに

人類は古来より、薬用植物を利用して病気の予防や治療を行ってきた。現代においても、植物由来の成分は多くの医薬品の原料として広く用いられており、我々の健康と生活に大きな恩恵をもたらしている。特に、鎮痛薬や抗がん剤として高い薬理効果を示す化合物には、ベンジルイソキノリンアルカロイド(BIA)と総称される一群の植物二次代謝産物が含まれており、その医薬品としての重要性は極めて高い。しかしながら、これらの有用化合物の多くは化学構造が複雑であるため、化学合成による工業的生産は依然として困難である。そのため、現在でも多くが植物からの抽出によって供給されているが、そこには大きな課題が存在する。すなわち、大規模な植物栽培と収穫、抽出と精製に多大な労力と時間がかかること、植物中の有効成分の含有量が極めて低く安定供給が困難であること、さらには輸送や加工におけるエネルギー負荷や環境負荷が大きいことなどである。これらの課題は、医薬品の価格や供給体制を不安定にする要因となり、持続可能な医療の実現において深刻な障害となっている。

このような背景のもと、近年ではゲノム解析やゲノム編集、さらにはDNAの人工合成技術などの革新的なバイオテクノロジーと、人工知能や情報科学といったデジタル技術との融合によって、新たな産業構造としてのバイオエコノミー社会の到来が世界的に注目されている。我が国においても、2030年に世界最先端のバイオエコノミー社会の実現を国家目標として掲げており、医療・健康分野を含むバイオ産業の強化は重要な政策課題となっている。その中でも、生命機能を設計・再構成することを目指す合成生物学は、生物を自在に改変し、目的に応じた化合物を生産する基盤技術として急速に発展している。特に、微生物を用いて植物由来の医薬品成分を発酵

によって生産する技術は、持続可能かつスケラブルなバイオものづくりとして期待されている。BIAについても、モルヒネやノスカピン、ベルベリンなどの薬効成分の発酵生産に関する研究が進められており、その代表的な成果としてLiらによる報告がある(1)。

本研究では、こうした背景を踏まえ、植物に代わる新たな医薬品生産手段として、大腸菌を用いたベルベリンの微生物発酵生産を試みた。大腸菌の代謝経路を人工的に設計・改変し、BIAの一種であるベルベリンを効率的に生産するための基盤技術の確立に取り組んだ。

2. 大腸菌によるベルベリン生産

合成生物学の進展により、細胞内の代謝経路を人為的に設計・改変し、従来は生物内で得られなかった物質の創出や、希少天然物の持続的供給が現実のものとなりつつある。なかでも、BIAは、モルヒネやノスカピン、ベルベリンなどに代表される植物特有の二次代謝産物であり、抗菌・抗炎症・抗腫瘍などの薬理活性を持つことから、重要な医薬品原料として位置付けられている。とりわけベルベリンは、医療・健康分野において注目されるアルカロイドの一つであるが、その供給はいまだに植物からの抽出に依存しており、生産の不安定性、コスト高、環境負荷といった課題を抱えている。こうした課題を解決すべく、本研究では植物に依存しないベルベリンの微生物発酵生産を実現することを目的に、大腸菌を宿主とした人工代謝経路の再構築に取り組んだ。

報告者はこれまでに、計算科学と機械学習を融合した酵素機能予測アルゴリズムを開発し、合成生物学におけるDBTL(Design-Build-Test-Learn)サイクルの高速化を実現してきた。この手法により、植物由来BIA合成経路の「ミッシングリンク」となる未同定酵素や、代謝効率を向上させる酵素バリエーションの同定に成功しており、

これを応用することで、大腸菌におけるBIA前駆体レクチリンの効率な生産株を世界に先駆けて確立している(2、3)。

本研究ではこの成果を基盤に、前駆体レクチリンからベルベリンまでの完全な生合成を大腸菌内で実現すべく、4種の植物酵素Berberine Bridge Enzyme(BBE)、Scoulerine 9-O-Methyltransferase(9OMT)、(S)-Canadine Synthase(CAS)、および(S)-Tetrahydroprotoberberine Oxidase(STOX)の機能発現と代謝連結に挑戦した。まず、ベルベリン特有の蛍光特性(励起350 nm/蛍光560 nm)を活用し、プレートリーダーによる高感度蛍光定量法およびゲル電気泳動撮影装置による可視化によって、培養中のベルベリン蓄積量を簡便かつリアルタイムに評価可能な分析系を確立した(図1)。これは、今後の高スループットスクリーニングにおいて大きな利点をもたらすものである。

次に、植物特異的な4種の酵素を異種発現させるにあたり、構造ベースでの予測ツールを用いて、酵素の選定と最適化を行った(図2)。

各遺伝子を搭載した発現ベクターを構築(図3)し、大腸菌レクチリン生産株に段階的に導入することで、ベルベリン生合成経路の完全再構成を実現した。初期の生産

試験においては、蛍光解析によりベルベリン生成が明瞭に確認され、人工代謝経路が機能していることを示した(図3)。

今後は、質量分析装置を用いたベルベリンの化学的同一および精密定量を進めるとともに、律速反応の特定、補酵素供給系の整備、ストレス応答の制御などを通じて、さらなる生産性向上を図る計画である。また、本研究で

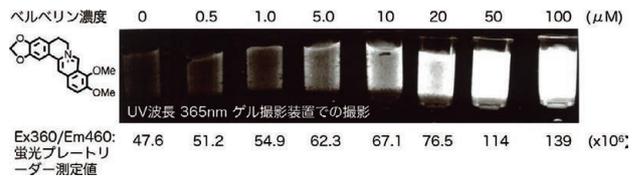


図1 ベルベリン化合物の蛍光特性評価

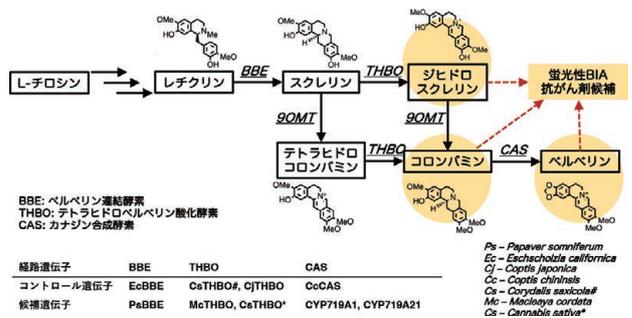


図2 ベルベリン生合成のための人工代謝経路設計

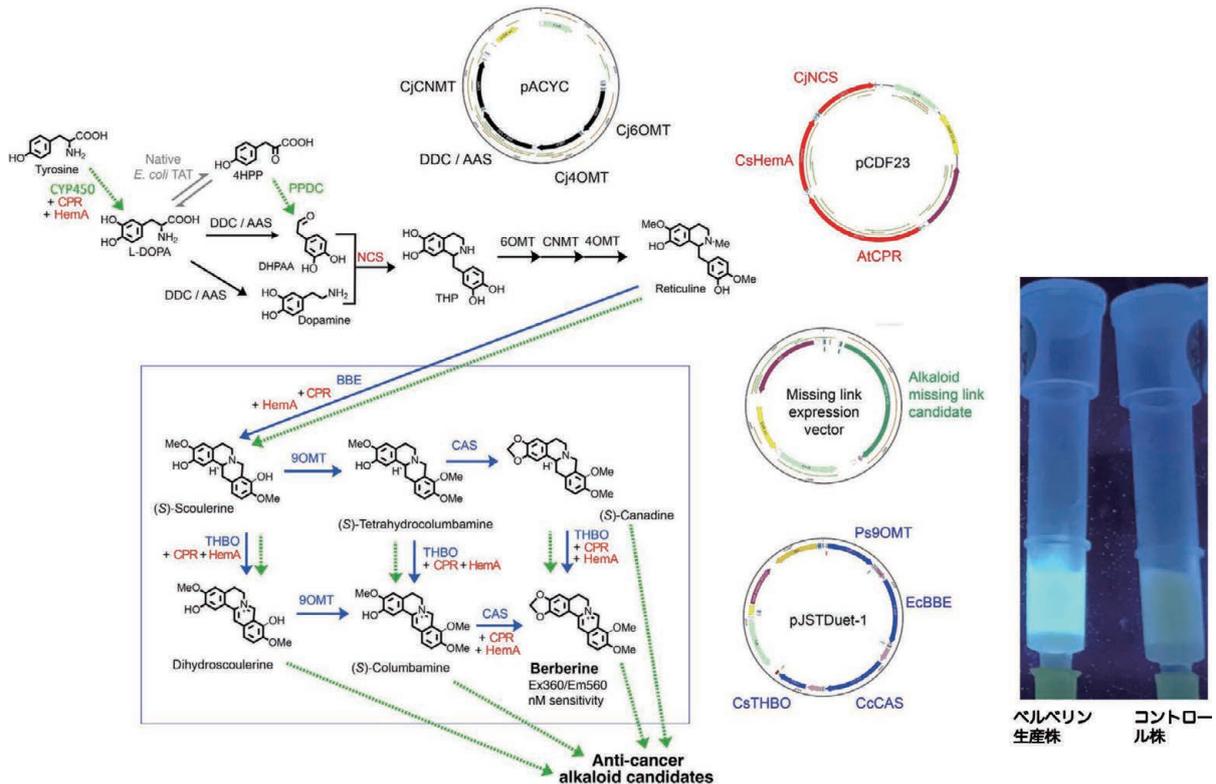


図3 大腸菌によるベルベリン生産試験評価

得られた知見と技術は、ベルベリンにとどまらず他のBIAや医薬品候補物質への展開可能性を有しており、微生物を用いた持続可能なバイオ医薬品製造の技術基盤として極めて高い汎用性と波及性を備えている。

3. 大腸菌によるL-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-DOPA)生産の効率化

本研究においては、BIAの微生物合成系を確立する上で、上流工程における律速反応として、L-チロシンからL-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-DOPA)への変換が生産性を制限する重要な要因であることを明らかにした。L-DOPAは、BIA骨格を構成するカテコール構造を導入する上で不可欠な中間体であり、当該反応の効率化は、全体の代謝フラックスを押し上げ、下流物質の収量向上に直結する鍵技術である。

このL-チロシンからL-DOPAへの水酸化反応は、芳香族モノオキシゲナーゼである4-hydroxyphenylacetate 3-mono-oxygenase(HpaB)と、その電子供与体であるHpaCにより触媒される(図4)。

本研究では、これらの酵素に対し、構造情報に基づく合理的な分子改変を行うことで、触媒能の向上とBIA合成経路への適合性の向上を図った。まず、統合計算化学アプリケーションを用いて、*Escherichia coli*由来(EcHpaB)および*Pseudomonas aeruginosa*由来(PaeHpaB)のHpaBに対し、L-チロシンとの結合親和性予測を行った。この解析により、基質認識部位において機能的に重要とされるアミノ酸残基を同定し、部位特異的変異体の設計・構築を実施した。

構築した各HpaBC変異体をL-DOPA生産用大腸菌株に導入し、発酵条件下でのL-DOPA生産性を評価した。定量には、L-DOPAを酸化して発色させる過ヨウ素酸ナ

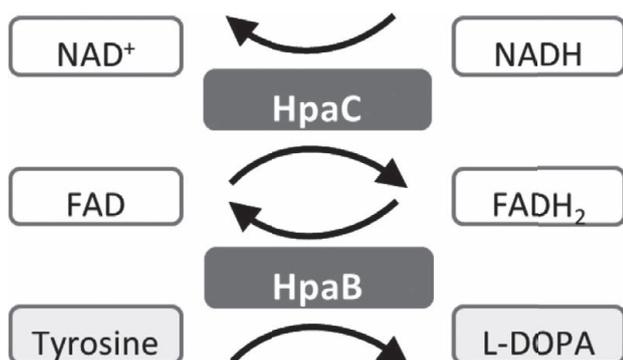


図4 HpaBCの触媒反応

トリウム反応に基づいた簡便な比色評価法を用い、変異体のスクリーニングと比較を行った(4,5)。その結果、PaeHpaBC変異体のひとつであるPaeHpaBC-1MTが最も高いL-DOPA生産量(約25 mM)を示し、次点として野生型PaeHpaBC(約23 mM)、PaeHpaBC-2MT(約20 mM)、EcHpaBC野生型(約20 mM)が確認された(図5)。これにより、特定部位の構造改変によって酵素の基質親和性と触媒効率が向上し、L-DOPA合成反応が加速されたことが明確となった。

本成果は、構造情報と計算科学を融合した酵素改変アプローチにより、人工代謝経路の律速段階を開闢することが可能であることを示したものであり、今後のBIA類生産に限らず、他の有用物質の合成にも応用可能な汎用性の高い戦略技術として位置付けられる。

4. おわりに

本研究では、植物由来の医薬品として高い薬理効果を示すBIAの持続的かつ高効率な生産を目的として、植物に依存しない微生物発酵による代替的な生産技術の確立に取り組んだ。特に、抗菌・抗炎症作用を有する代表的BIAであるベルベリンの微生物生産をモデルとし、酵素設計・代謝経路構築・生産評価という合成生物学的アプローチを統合的に適用することで、新たな生産基盤の構築を試みた。ベルベリン合成に必要な4酵素(BBE、9OMT、CAS、STOX)を大腸菌内で段階的に発現させることにより、植物依存型の生合成経路を微生物内で再

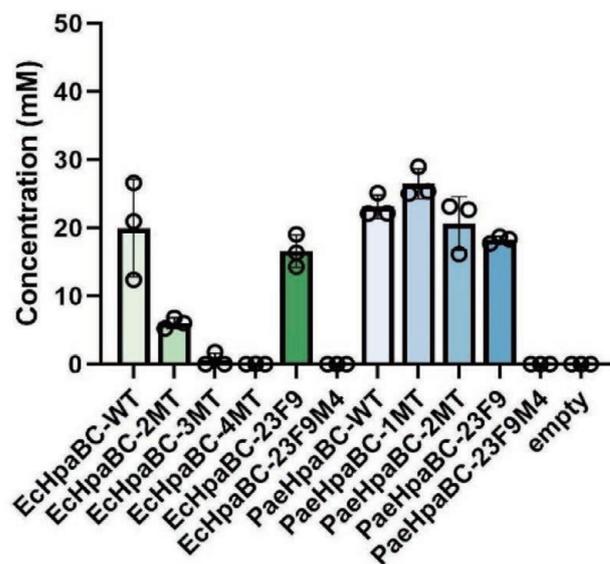


図5 HpaBC野生型及び変異体によるL-チロシンからL-DOPAへの水酸化反応評価

現することに成功した。また、ベルベリン特有の蛍光特性を活用した簡便かつ高感度な評価系を確立し、これを活用することで代謝フローの可視化と最適化が可能となった。さらに、本経路の上流に位置するL-DOPAの生合成に着目し、L-Tyrosineからの変換を担うHpaBおよびHpaCの酵素工学的改変に取り組んだ。構造情報に基づく変異導入および簡便な比色スクリーニング法を組み合わせることで、従来型より高い活性を示す酵素変異体を得ることに成功し、25 mMに達する高濃度でのL-DOPA生産を実現した。これにより、BIA合成全体における上流律速の解消に寄与し、代謝フラックスの増強を通じて下流合成物質の収量向上にも道を拓いた。本研究成果は、合成生物学的手法を活用したバイオ医薬品創出の新たな戦略を示すものであり、植物資源への依存を脱却した持続可能な医薬品生産の実現に向けた重要なステップである。今後は、得られた知見を基盤として、さらなる経路改良やスケールアップ、他BIA類への応用展開を図ることで、バイオエコノミー社会の実現に貢献する次世代型生産技術の確立を目指す。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人松籟科学技術振興財団より2022年度研究助成を賜りましたことに、心より御礼申し上げます。本助成により、酵素改変を中心とした人工代謝経路の構築と生産評価系の確立に取り組むことができ、合成生物学による医薬品原料生産の新たな展開に寄与する成果を得ることができた。ここに厚く感謝の意を表す。

6. 参考文献

- (1) Li Y, Smolke CD. Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast. *Nat Commun.* 2016, 7, 12137.
- (2) Vavricka CJ, Yoshida T, Kuriya Y, Takahashi S, Ogawa T, Ono F, Agari K, Kiyota H, Li J, Ishii J, Tsuge K, Minami H, Araki M, Hasunuma T, Kondo A. Mechanism-based tuning of insect 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase for synthetic bioproduction of benzyloquinoline alkaloids. *Nat Commun.* 2019, 10(1), 2015.
- (3) Vavricka CJ, Takahashi S, Watanabe N, Takenaka M, Matsuda M, Yoshida T, Suzuki R, Kiyota H, Li J, Minami H, Ishii J, Tsuge K, Araki M, Kondo A, Hasunuma T. Machine learning discovery of missing links that mediate alternative branches to plant alkaloids. *Nat Commun.* 2022, 13(1), 1405.
- (4) Chen W, Yao J, Meng J, Han W, Tao Y, Chen Y, Guo Y, Shi G, He Y, Jin JM, Tang SY. Promiscuous enzymatic activity-aided multiple-pathway network design for metabolic flux rearrangement in hydroxytyrosol biosynthesis. *Nat Commun.* 2019, 10(1), 960.
- (5) Chen W, Yao J, Meng J, Han W, Tao Y, Chen Y, Guo Y, Shi G, He Y, Jin JM, Tang SY. Promiscuous enzymatic activity-aided multiple-pathway network design for metabolic flux rearrangement in hydroxytyrosol biosynthesis. *Nat Commun.* 2019, 10(1), 960.

光エネルギーを利用する海洋バイオマスからのグリーン水素製造

九州大学 大学院工学研究院
松本 崇弘

諸言

日本政府は2020年10月、「2050年のカーボンニュートラル」実現を宣言し、環境保護と経済成長を両立するための産業政策「グリーン成長戦略」を策定している。本戦略では、水素とアンモニアがカーボンニュートラル社会構築のための中核的役割として位置付けられ、技術革新と成長分野への集中投資が進められている。そのような日本のカーボンニュートラル政策において、グリーン水素やグリーンアンモニアの製造技術の実用化が喫緊の課題であり、そのため、水の光分解や水の電気分解によるグリーン水素製造技術の実証実験が精力的に進められている。そのようなグリーン水素製造技術が確立されれば、ハーバー・ボッシュ法によって水素と窒素から製造されているアンモニアはグリーンアンモニアとして取り扱うことが可能となる。しかし、現状では、水素の代替となる電子源による窒素分子の還元によってアンモニアを製造する技術開発も進められていることから、多角的なアプローチによって、環境配慮型の水素やアンモニアの製造技術が確立することが重要であり、そのようなアプローチによって、日本政府が目標とする「2050年カーボンニュートラル」の達成に近づくことが可能となる。本研究では、自然界のポリマーの中ではセルロースの次に存在量が多い有機化合物であり(セルロースの次はリグニンという説もある)、かつ、窒素含有有機化合物では最も存在量が多いと言われるキチンに着目し、キチン

からの水素とアンモニアの製造反応の開発を目的とした(図1)。キチンは、自然界で年間1000億トン生成されていると推定されており、甲殻類や昆虫の外殻の主成分であり、生命維持のために、化学的・物理的に剛直で頑丈な性質を有している。キチンはN-アセチルグルコサミンが連なったポリマーであり、分子内にアルコール性水酸基を多く有することから、アルデヒド基への嫌氣的酸化の際に水素を発生させることが原理的に可能である。また、キチンに含まれる窒素を加水分解で取り出すことができれば、酸化剤や還元剤を添加することなく、バイオマスからアンモニアを製造することが可能となる。

結果と考察

キチンからの水素発生反応を検討する前に、低級アルコールからの水素発生反応について検討を行った。触媒として塩化鉄(III)を用い、メタノールを基質として、紫外光(250-385 nm、10 mW)を照射することによって、水素が生成することを発見した。この反応は偶然発見したものであり、これまでの先行研究には全く基づいていない。遷移金属錯体を用いたアルコールからの脱水素反応を検討していた中で、コントロール実験で水素が発生したことがきっかけで見つかった反応である。さらに、水酸化ナトリウムを添加することで、水素発生触媒回転数(発生した水素のモル数/用いた鉄イオンのモル数)が増加することを見出した。水酸化ナトリウムの濃度の

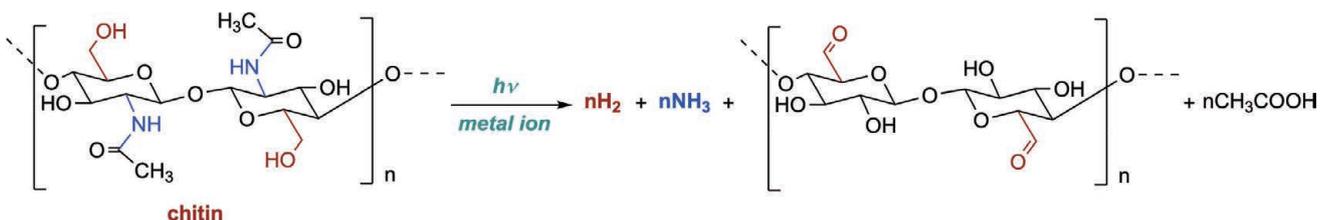


図1 本研究の目的

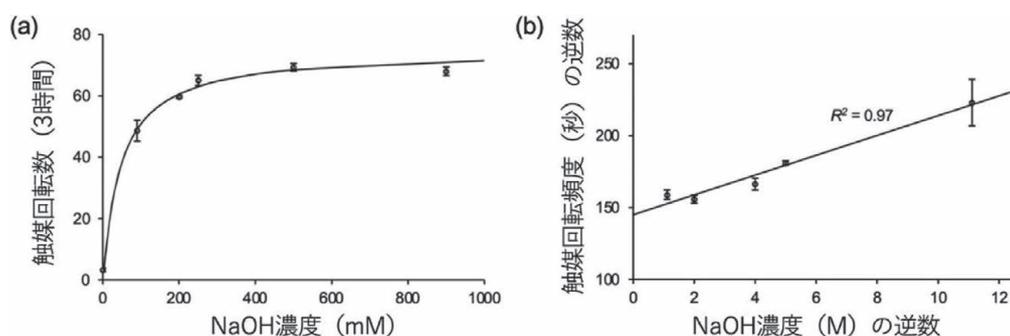
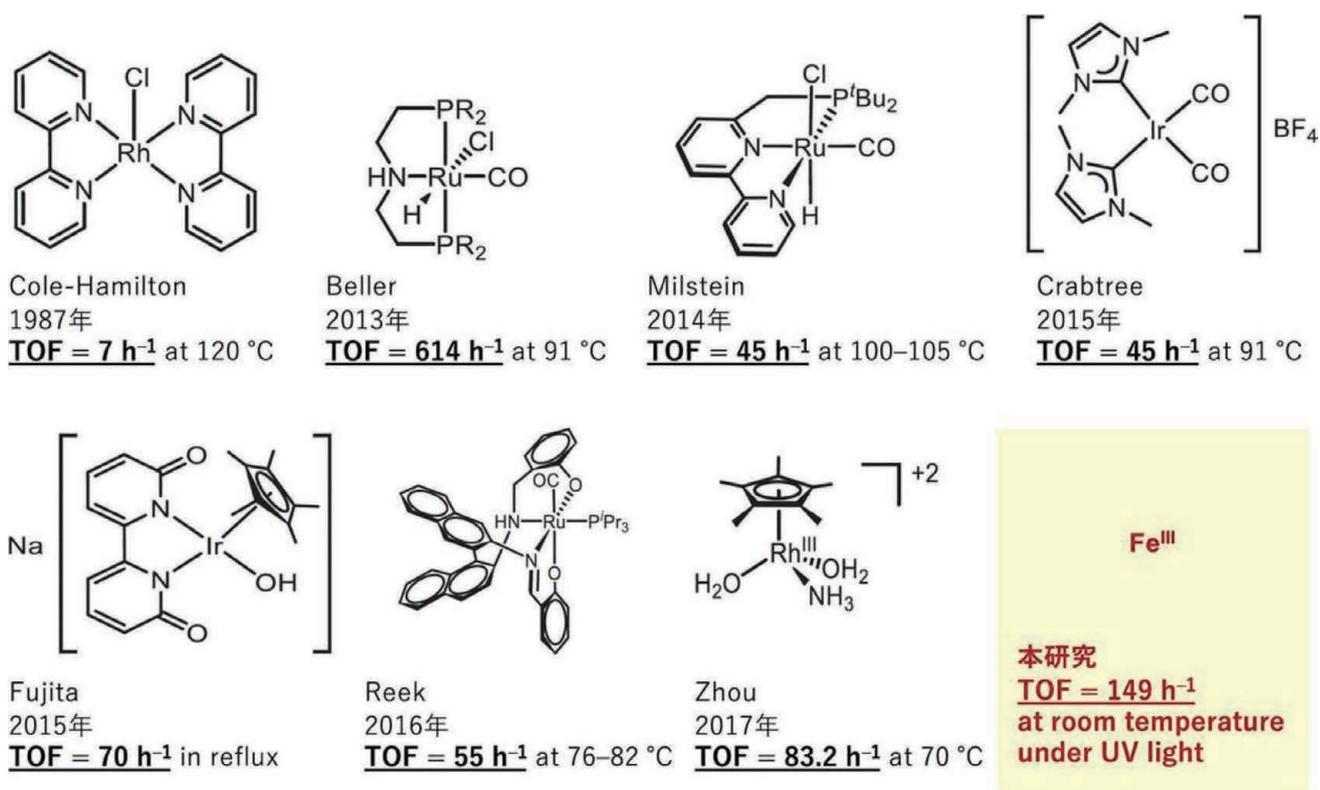


図2 定常状態近似を用いた速度論的解析：(a) NaOH濃度(0~900 mM)に依存した触媒回転数(水素のモル数/用いた鉄イオンのモル数)。反応条件は次のとおりである、溶媒兼反応基質：メタノール、触媒：Fe^{III}Cl₃(0.17 mM)、添加物：NaOH(0~900 mM)、照射光：紫外光(波長250~385 nm、10 mW)、反応時間：3時間。(b) (a)のデータの二重逆数プロット。(a)および(b)の実線は、ミカエリス・メンテン型速度論によりフィッティング、エラーバーは3回の測定から算出された標準偏差を示している。



TOF = turnover frequency (触媒回転頻度、1時間あたりの触媒回転数)
触媒回転数 = 水素発生量 (mol) / 触媒量 (mol)

図3 メタノールからの脱水素反応に用いられる遷移金属触媒と本研究¹⁻⁸

増加に対して、触媒回転数が飽和挙動を示したことから、定常状態近似で処理を行ったところ、ミカエリスメンテン型の反応であることが示唆された(図2)。すなわち、水酸化ナトリウムによるメタノールの脱プロトン化過程を前平衡に含む反応であると考えられる。塩化鉄(III)濃度、紫外光強度、反応時間などの条件検討を行ったところ、最適条件における最大の触媒回転頻度(1時間あたりに発生した水素のモル数/用いた鉄イオンのモル数)

は149 h⁻¹であることを明らかにした¹。この値は、従来の均一系金属錯体触媒に匹敵する性能を示している。

これまでのメタノールからの脱水素反応においては貴金属触媒を用いるものがほとんどであり、全てが支持配位子を持つ遷移金属錯体である(図3)。遷移金属は、金属イオン自体が有する特異的性質(d軌道の電子数、配位子場分裂、エネルギー準位、有効核電荷、ルイス酸性度、酸化還元電位)を配位子によって合目的に引き出す

ことによって、目的反応にターゲティングすることが可能である。これまで、金属中心と合成配位子の無数の組み合わせによって、反応制御を目的とする研究が発展してきたが、遷移金属錯体は、配位結合の脆弱さに起因する耐久性の低さにより、ほとんど実用化されていない。一方、本研究では、支持配位子を含まない鉄(III)イオンのみでアルコールから水素を発生させることが可能である。支持配位子を含まないことから安定性は高く、また、汎用性も高く、幅広い分野で利用可能である。さらに、先行研究と触媒活性を比較すると(TOFで比較、図4)、配位子を含まない鉄イオンは先行研究とほぼ同等の活性を示すことが明らかとなっている²⁻⁸。

この極めてシンプルな反応システムは、メタノールだけでなく、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールにも適応可能である。しかし、基質が嵩高くなるにつれ、水素発生反応の速度が低下する現象が見られた。最終的には、低級アルコールをキチンに変えて、様々な実験条件の検討を行ったところ、キチンからの水素生成を確認することができた(当該実験条件の詳細は、特許に関連する情報であるため、現時点では非開示)⁹。極めてシンプルな触媒系でキチンからの水素発生を見出したことは、学術的価値だけでなく実用化の点において社会的意義も大きい。また、金属イオンを用いる類似の反応条件において、極めてシンプルな方法でキチンからのアンモニア製造反応の開発に成功した(当該実験条件の詳細は、特許に関連する情報であるため、現時点では非開示)¹⁰。

結論

以上、本研究において、当初目的としていたキチンからの水素発生反応を達成し、さらに、キチンからのアンモニア製造反応についても見出すことができた。キチンはセルロースの次に地球上で存在量の多い有機化合物であるだけでなく、窒素含有有機化合物としては最も存在量が多く、年間1000億トンが自然界で生成していると言われている。そのように大量に存在する有機化合物から水素やアンモニアを簡単に合成可能な手法を開発できたことは、学術的意義だけでなく社会的意義も極めて大きいと考える。今後は、本研究をさらに追及し、反応メカニズムの解明や実用化に向けて検討を行っていく予定である。

文献

- (1) Sakurai, M.; Kasawaki, Y.; Matsumoto T. Simple Iron Ion Enables Photocatalytic Hydrogen Evolution from Methanol. *ChemRxiv*, 10.26434/chemrxiv-2025-zdjsx, 論文投稿中.
- (2) Morton, D.; Cole-Hamilton, D. J. Rapid Thermal Hydrogen Production from Alcohols Catalysed by [Rh(2,2'-Bipyridyl)₂] Cl. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 248–249.
- (3) Nielsen, M.; Alberico, E.; Baumann, W.; Drexler, H. J.; Junge, H.; Gladiali, S.; Beller, M. Low-Temperature Aqueous-Phase Methanol Dehydrogenation to Hydrogen and Carbon Dioxide. *Nature* **2013**, *495*, 85–89.
- (4) Hu, P.; Diskin-Posner, Y.; Ben-David, Y.; Milstein, D. Reusable Homogeneous Catalytic System for Hydrogen Production from Methanol and Water. *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2649–2652.
- (5) Campos, J.; Sharninghausen, L. S.; Manas, M. G.; Crabtree, R. H. Methanol Dehydrogenation by Iridium N-Heterocyclic Carbene Complexes. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 5079–5084.
- (6) Fujita, K.; Kawahara, R.; Aikawa, T.; Yamaguchi, R. Hydrogen Production from a Methanol-Water Solution Catalyzed by an Anionic Iridium Complex Bearing a Functional Bipyridonate Ligand under Weakly Basic Conditions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 9057–9060.
- (7) van de Watering, F. F.; Lutz, M.; Dzik, W. I.; de Bruin, B.; Reek, J. N. H. Reactivity of a Ruthenium-Carbonyl Complex in the Methanol Dehydrogenation Reaction. *ChemCatChem* **2016**, *8*, 2752–2756.
- (8) Zhan, Y. L.; Shen, Y. B.; Li, S. P.; Yue, B. H.; Zhou, X. C. Hydrogen Generation from Methanol Reforming under Unprecedented Mild Conditions. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, *28*, 1353–1357.
- (9) 松本崇弘、櫻井将也、川崎 雄大、田中良之介、水素ガスの製造方法、2023年10月23日出願、特願2023-181619、PCT/JP2024/037444.
- (10) 松本崇弘、古澤和己、アンモニアの製造方法、2025年3月27日出願、特願2025-053763.

自己免疫疾患予防効果を発揮する植物由来成分の探索と作用機序の解明

岡山県立大学 保健福祉学部
柴田 紗知

背景と目的

自己免疫疾患は、免疫系の異常により自己の組織を攻撃する疾患群であり、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、乾癬などがその代表例である。これらの疾患の多くは原因が未解明であり、根本的な予防法や治療法は確立されていないのが現状である。

報告者はこれまでに、植物由来成分や食品由来成分が加齢性疾患および運動器疾患の予防に及ぼす効果について研究を進めてきた。特に、ヒノキ科サワラに含まれるピシフェリン酸(pisiferic acid : PA)に注目し、同成分が変形性関節症の進行と関連する遺伝子の発現を制御し、軟骨細胞保護作用を有することを明らかにした。また、骨粗鬆症の病態において重要な破骨細胞の分化に対しても抑制的に作用することを見いだした。

破骨細胞の分化は骨粗鬆症のみならず、関節リウマチの病態形成にも関与している。予備的検討においてPAは関節リウマチの予防効果を示す可能性が示唆された。また、自己免疫疾患の発症・進行に深く関わりとされる $\alpha 9$ インテグリンなどの接着分子の発現に対し、複数の植物由来成分が抑制的に作用することを確認した [1]。

そこで本研究では、代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬への植物由来成分の有効性を明らかにすることを目的に検討を行った。

植物由来成分の関節リウマチへの有効性の検討

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis : RA)は、関節滑膜の異常増殖によりパンス形成を来し、関節の疼痛、変形、さらには機能障害を引き起こす慢性炎症性疾患である。その発症には自己免疫機構の破綻が関与していると考えられており、日本国内における推定患者数は約60万人に上る。現在もなお、発症原因の全容は十分に解明

されていない。RAに対する薬物療法として生物学的製剤の有効性が認められつつある。しかしながら、生物学的製剤は高額であり、加えて免疫抑制に伴う感染症リスクなどの副作用が課題として残されている。このような背景から、日常の食生活を通じたRAの予防および進行抑制の可能性に注目が集まっている [2]。特に、副作用が少なく継続的な摂取が可能な植物由来成分は、予防的介入の観点から有望な素材と考えられる。

本研究では、植物由来成分によるRA病態の悪化抑制効果について検討し、その有効性と作用機序の一端を明らかにすることを目的とした。

実験は、7週齢の雌性BALB/cマウスを用いて行った。関節リウマチモデルとしてコラーゲン抗体誘導性関節炎(collagen antibody-induced arthritis : CAIA)を作製した。成分は、飼料への混合、飲料水への溶解による自由摂取、あるいは経口ゾンデによる投与のいずれかにより供給した。マウスは①CAIAを誘導しない対照群、②CAIAを誘導するCAIA群、③CAIA誘導と各植物由来成分を併用する成分投与群に分けて飼育した。対照群とCAIA群には通常飼料、飲料水を自由摂取にて投与した。関節炎の重症度は、指、足背、踵部における炎症の有無を5段階スコアで評価し、四肢の合計スコアを最大16点とした。

いくつかの植物由来成分の有効性を検討した結果、PAの有効性が示唆されたため、さらなる追加検討を行った。

関節炎誘導処理後17日目に後肢の関節を摘出しパラフィン包埋した。切片を作製し、HE染色およびSafranin O染色を行った。HE染色により炎症性細胞の浸潤を、Safranin O染色により軟骨内プロテオグリカンの保持状態を評価した。HE染色において、CAIA群で

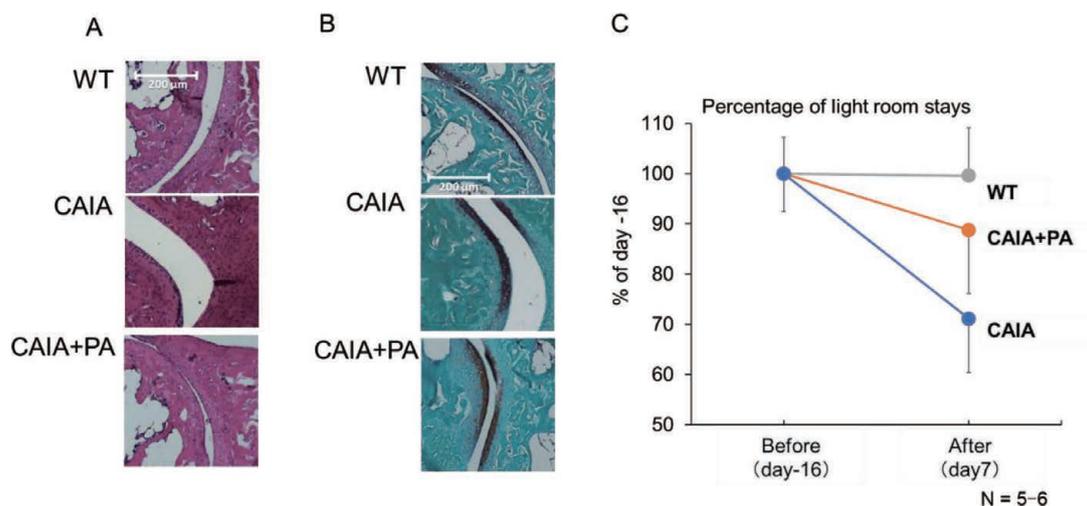


図1 植物由来成分の関節リウマチへの有効性の検討

は対照群と比較して関節周囲における炎症性細胞の浸潤が著明に認められた。一方、PA投与群では炎症性細胞の浸潤が顕著に抑制した(図1A)。また、Safranin O染色では、CAIA群でプロテオグリカンの脱失が観察されたのに対し、PA投与群ではプロテオグリカンの保持が認められ、軟骨組織の保護効果が示唆された(図1B)。

また、カクテル投与8日目に脾臓を摘出しRNAを抽出し、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行った。炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)の発現量を評価した。その結果、TNF- α の発現量はCAIA群で有意に増加しており、炎症応答の活性化が確認された。

さらに、血管新生や破骨細胞の分化誘導に関与するサイトカインであるIL-6の血清中濃度をELISA法により測定した。血清中IL-6濃度は、対照群と比較してCAIA群で有意に上昇していた一方で、PA投与群では有意な抑制効果が認められた。

加えて、関節炎に関連する精神・神経系症状を評価するため、明暗箱試験を実施した。マウスは暗所を好む習性をもつため、明室への滞在時間の延長は不安軽減効果があるといえる [3]。関節炎誘導の前後で明室滞在時間を比較した結果、CAIA群では関節炎誘導後に明室滞在時間が有意に短縮し、不安様行動の増加が示された。対照的に、PA投与群では明室滞在時間の短縮が抑制され、不安レベルの上昇を抑える傾向が認められた(図1C)。

本研究により、PAが関節リウマチモデルにおいて炎症反応を抑制し、軟骨保護作用および不安様行動の改善効果を有することが示された。PAは、関節リウマチに対する新たな予防的介入素材として有望であると考えら

れる。

植物由来成分の多発性硬化症(実験的自己免疫性脳脊髄炎)への有効性の検討

多発性硬化症(Multiple Sclerosis :)は、中枢神経系における慢性炎症性脱髄を特徴とする自己免疫疾患であり、病変部位に応じて運動障害、感覚障害、視覚障害など多様な神経症状が出現する。日本国内における推定患者数は約2万人とされており、その発症機序は未だ十分に解明されていない。加えて、根治に至る治療法も確立されておらず、病態進行を抑制する新たな治療・予防手段の開発が求められている。そこで本研究では、多発性硬化症の病態と類似した症状を呈する動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis : EAE)を用い、植物由来成分の有効性の検討を進めた。いくつかの予備実験から、特にローズマリー由来カルノシン酸(Carnosic acid : CA)の有効性が示唆されたため詳細な検討を行った。CAは血管新生抑制作用や抗酸化作用、炎症抑制作用など多様な生理活性が報告されている [4]。加えて、先行研究においてDSS誘導大腸炎モデルや関節リウマチモデルに対して有効に作用することが報告されている [5,6]。

実験は、8週齢の雌性C57BL/6系統マウスを用い、EAE誘導の7日前(Day -7)から、CAを自由摂取により投与した。EAEの誘導は、MOGペプチドを完全フロイントアジュバントと混合し皮下注射することでを行い、4時間後および2日後に百日咳毒素を静脈内投与した。各群の臨床スコアはEAE誘導日(Day 0)から評価を開始

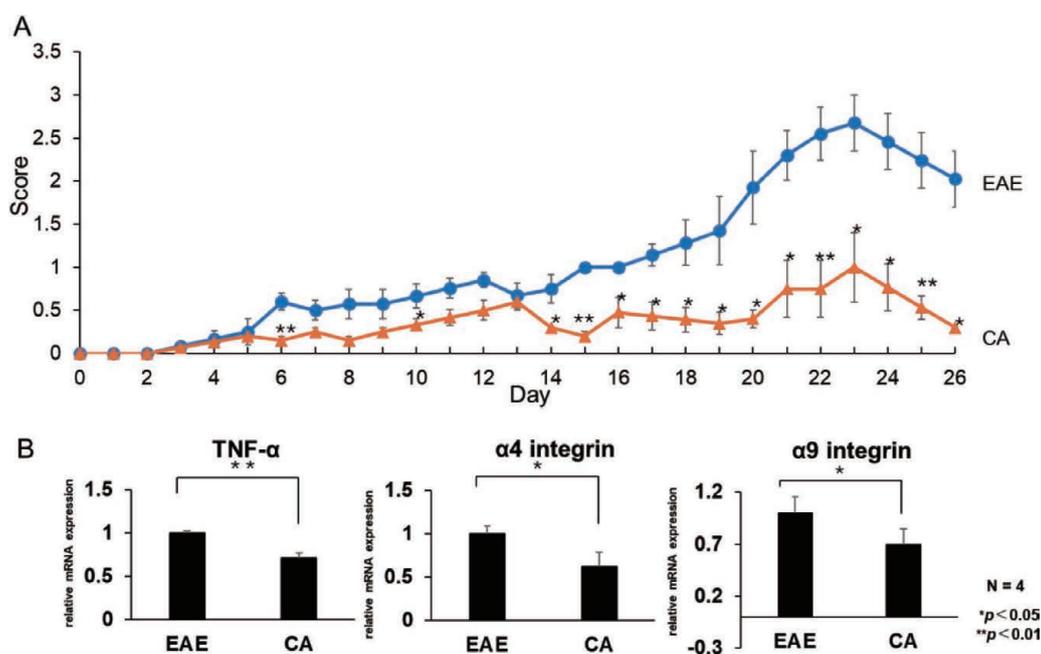


図2 植物由来成分の実験的自己免疫性脳脊髄炎への有効性の検討

し、Day 26に解剖を行って臓器を回収し、組織学および分子生物学的解析を実施した。

EAEの進行に伴い体重減少が認められることは先行研究において報告されている [7]。本研究においても、CA投与群では、EAE群と比較して体重減少が有意に抑制され、対照群と同程度の体重変動が維持された。これらの結果から、CAの摂取がEAEに伴う体重減少を抑制する効果を有することが示唆された。さらに、臨床スコアの経時的変化において、EAE群ではスコアの上昇が明確に認められたが、CA投与群ではスコアの上昇が有意に抑制された(図2A)。これにより、CA摂取がEAE病態の進行を抑制する可能性が示された。組織学的解析として、脊髄をパラフィン包埋し、HE染色およびLuxol Fast Blue(LFB)染色を実施した結果、LFB染色において対照群の脊髄では髄鞘が青く染色されたのに対し、EAE群では脱髄により染色性が著しく低下していた。CA投与群では青色の染色が維持され、髄鞘構造の保持が確認された。これにより、CAの摂取がEAEに伴う脱髄病変の形成を抑制することが明らかとなった。

分子生物学的解析として、Day 26に回収した鼠径リンパ節からRNAを抽出し、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行った。炎症性サイトカインであるTNF- α 、および接着分子である α 4インテグリン、 α 9インテグリンについて検討した。その結果、EAE群ではこれら3遺伝子の発現がいずれも有意に上昇していた

が、CA投与群ではその発現上昇が有意に抑制された(図2B)。特に α 4インテグリンおよび α 9インテグリンは、自己免疫疾患におけるT細胞の組織浸潤やTh17細胞分化に関与することが報告されており、本研究結果はCAがこれら分子の発現制御を通じてEAE病態の抑制に寄与している可能性を示唆している。

以上の結果から、CAが多発性硬化症に対する新たな予防・治療戦略の一つとして有望であることが明らかになった。

植物由来成分の乾癬への有効性の検討

乾癬(Psoriasis)は、表皮の過増殖および慢性的な炎症を特徴とする自己免疫性皮膚疾患であり、皮疹、鱗屑、紅斑などの皮膚症状を呈する。世界全体では約1億2500万人の患者が存在するとされ、日本国内においても約40~60万人が罹患していると推定されている。近年では、食生活の欧米化や生活習慣の変化などを背景に、日本においても患者数の増加が懸念されている。

乾癬の治療には、ステロイド外用薬や抗体医薬を含む生物学的製剤が用いられており、これらにより一定の治療効果が得られているものの、高額な医療費および長期使用に伴う副作用が課題とされている。このような背景から、より安全で継続的に摂取可能な植物由来成分による予防的介入が注目されている。本研究では、ベセルナクリーム®(持田製薬株式会社)に含まれるイミキモドを

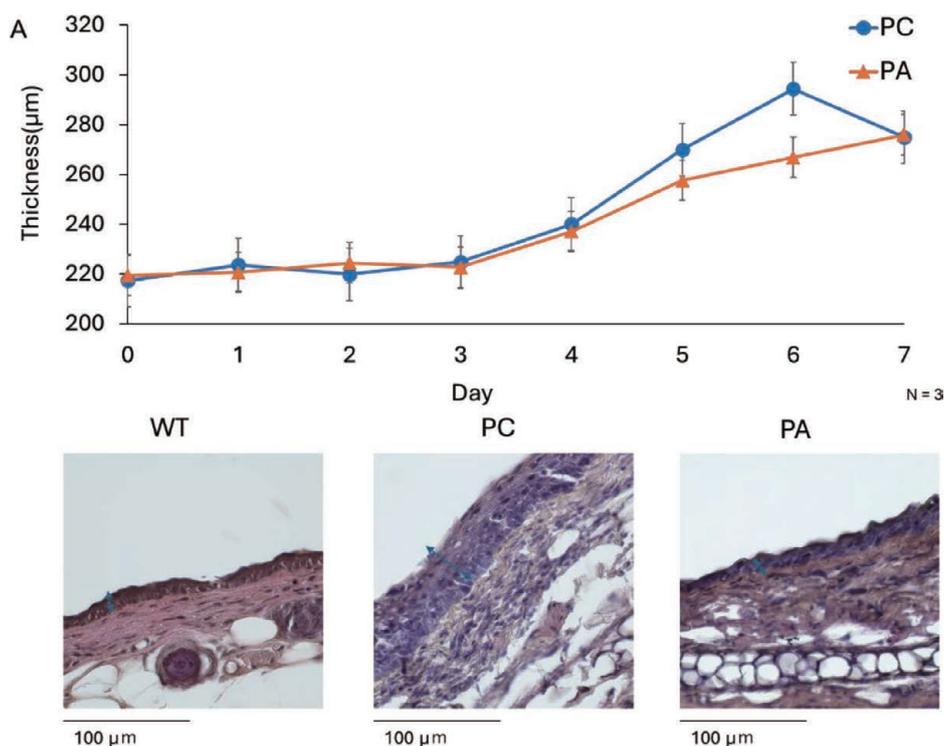


図3 植物由来成分の乾癬への有効性の検討

用いた乾癬モデルを作製し、PAの有効性を評価した。

実験は、8週齢の雌性BALB/cマウスを使用し、ベセルナクリームを1日1回、両耳および背中に塗布することで乾癬様皮疹を誘導した。飼料および飲料水は自由摂取とした。PAは実験開始7日前より事前投与を開始し経口投与した。モデルの評価として、耳の厚さをアニマルメーターにより計測し、皮膚炎の進行度を客観的に評価した。耳の厚さの変化に関して、乾癬誘導群ではDay6時点で有意な増加が観察されたのに対し、PA投与群では耳の厚さの増加が有意に抑制されていた(図3A)。さらに、試験終了後には皮膚組織の病理解析(HE染色)を行い、表皮肥厚や炎症細胞浸潤の有無を確認した。その結果、PA投与群では乾癬誘導群と比較して表皮肥厚や炎症細胞の浸潤が軽減されていた(図3B)。また、IL-17AおよびTNF- α といった炎症性サイトカインの発現について、RT-PCRおよびELISAを用いて定量的評価を行った。遺伝子発現解析の結果、PA投与群ではIL-17AおよびTNF- α の発現がいずれも低下傾向を示し、PAが炎症応答の抑制に寄与する可能性が示された。

これらの結果より、PAはイミキモド誘導乾癬モデルマウスにおいて皮膚炎の進行を抑制し、炎症性サイトカインの発現制御を通じて皮膚組織の保護効果を発揮することが明らかとなった。従って、PAは乾癬に対する新

たな予防的介入素材として有望であると考えられる。

まとめ

本研究では、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬といった代表的な自己免疫疾患を対象に、植物由来成分の予防的効果およびその作用機序の解明を目的として、マウスモデルを用いた包括的な実験を実施した。

本研究の結果から、植物由来成分、とりわけPAおよびCAは、複数の自己免疫疾患モデルにおいて共通して有効性を示し、疾患特異的な病態だけでなく、炎症性サイトカインの発現制御や接着分子の発現抑制といった共通的作用機序が存在することが示唆された。これらの植物由来成分は、安全性が高く、長期的な摂取が可能であるという特性から、今後の予防的介入手段としての応用が期待される。本研究の成果は、自己免疫疾患に対する新たな予防・治療戦略の構築に寄与するものであり、今後はヒト臨床への応用可能性を含めた更なる検討が求められる。

謝辞

本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団からの研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

参考・引用文献

- [1] S Shibata, K Yamada, S Kon. Carnosic acid inhibits integrin expression and prevents pulmonary metastasis of melanoma, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 89 (2025) 284-293.
- [2] S Shibata, S Kon. Functional Ingredients Associated with the Prevention and Suppression of Locomotive Syndrome : A Review, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 47 (2024) 1978-1991.
- [3] M Bourin, M Hascoët. The mouse light/dark box test, *European journal of pharmacology*, 463 (2003) 55-65.
- [4] T Kayashima, K Matsubara. Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76 (2012) 115-119.
- [5] JP Veenstra, B Vemu, R Tocmo, et al. Pharmacokinetic Analysis of Carnosic Acid and Carnosol in Standardized Rosemary Extract and the Effect on the Disease Activity Index of DSS-Induced Colitis, *Nutrients*, 13 (2021).
- [6] G Xia, X Wang, H Sun, et al. Carnosic acid attenuates collagen-induced arthritis in db/db mice via inflammation suppression by regulating ROS-dependent p38 pathway, *Free radical biology & medicine*, 108 (2017) 418-432.
- [7] S Bittner, AM Afzali, H Wiendl, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice, *Journal of visualized experiments : JoVE*, (2014).

希少植物由来「香り」のサステイナブル生産 プラットフォーム構築

神戸大学 大学院工学研究科
田中 勉

1. 研究の背景と目的

バニリン(4-ヒドロキシ-3-メトキシベンズアルデヒド)は、バニラの香りの主成分であり、食品や化粧品の香料として使用される重要なフレーバー化合物である。また、バニリンは様々な化学修飾が可能なホルミル基及びフェノール性水酸基を有することから、エポキシ樹脂を合成するうえで有用な原料となり得る。エポキシ樹脂とは接着や表面処理に不可欠な材料であり、持続可能な社会形成の観点から天然物を出発材料とした製造が必要とされる物質の一つでもある。2007年時点で、フレーバー及びフレグランス化合物の世界市場は年間11~12%の成長率で200億ドルにまで達しており、バニリンはその内1億8000万ドルを占める。バニリンは天然ではラン科のバニラ属植物から得られるが、1 kgの生産には約500 kgのバニラのさやが必要であり、これは約40,000の花が受粉して生産可能となる量に相当する。よって、天然由来のバニリンは抽出可能量に限りがあり、年間販売される16,000トンのうち40トン、つまり0.25%のみがバニラのさや由来のバニリンとなっている。残りのほとんどはリグニンや化石炭化水素であるグアイアコールを原料とした化学合成により生産されている。しかし、市場価格は天然バニリンが1 kgあたり1,200ドルから4,000ドルであるのに対し、化学合成バニリンは1 kgあたり15ドルであり、天然バニリンの価値の高さがうかがえる。これは、欧米の食品法の下では化学合成によるバニリンは「不自然な」バニリンとされ、天然物に対する需要がますます高まっているからである。そこで、天然バニリンと同等の価値を持つバニリンの生産方法として新たに期待されているのがバイオプロセスを用いたバニリン生産である。実際に、植物由来の成分であるフェルラ酸を原料とし、バイオプロセスによって生産されたバニリンは

Rhodia OrganicsによってRhovanil Naturalという商品名で1 kgあたり700ドルで販売されている。さらにコストパフォーマンスを上げるべく注目されているのが、原料としてのグルコースの利用である。フェルラ酸が1 kgあたり5ドルであるのに対し、グルコースは1 kgあたり0.30ドル未満であり、かつ再生可能資源でもある。よって、グルコースを原料としたバイオプロセスによるバニリンの高生産を実現できれば、持続可能な社会形成に役立つと共に、天然バニリンの需要を満たすことができる可能性がある。しかし、バニリンが微生物に示す高い毒性及び低い溶解度はその高生産を行うにあたって阻害要因である。そこで、本研究ではバニリンをグルコシド化させ、より低い毒性と高い溶解度を示すバニリングルコシドを最終目的物質として生産することを目標とした。バニリングルコシドは唾液中または皮膚微生物叢中の酵素によってバニリンへと変換されるため、フレーバー化合物としての役割を果たすことが可能である。本研究では、グルコースからのバニリングルコシド生産プロセスを達成するための宿主として分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)を選択した。分裂酵母は実験室での操作が容易で、増殖が速く、病原性を示さないことから、物質生産に優れた宿主の一つと考えられている。しかし、現状は出芽酵母や油性酵母など他の酵母種に比べ、分裂酵母を用いた高付加価値化学物質の生産に関する研究はほとんど存在しない。

2. 方法

目的物質の生産性向上にあたって主要な副産物の生産を抑制する必要があるため、副産物であるエタノールの合成に関与するアルコール脱水素酵素(ADH)とピルビン酸脱炭酸酵素(PDC)をコードする遺伝子を破壊した

株を親株として使用した。バニリン生産のための発酵試験については前培養、本培養の順に実施し、30℃、220 rpmの振とう条件下で前培養はYM + Ade培地により24時間、本培養はEMM最小培地により48 or 72時間行った。作製株の評価は分光光度計(600 nm)を用いた菌体成長(OD)及びHPLCを用いた生成物生産量の測定に基づいて行った。

3. 結果

3.1 バニリン関連化合物グリコシド誘導体生産経路の構築

分裂酵母は元来バニリングルコシド(VG)生産能を有しておらず、VGの4つ前の中間体であるデヒドロシキミ酸(DHS)までしか生産できない。よって、本研究では外来遺伝子の導入により、グルコースからのVG生産を目指した。DHSは3-デヒドロシキミ酸デヒドラターゼ(DSD)が作用することでプロトカテク酸(PAC)になり、さらにO-メチルトランスフェラーゼ(OMT)と芳香族カルボン酸レダクターゼ(ACAR)が作用することでそれぞれバニリン酸(VA)とプロトカテクアルデヒド(PAL)となる。さらにVAにACAR、PALにOMTが作用することでバニリン(VAN)が生産される。そしてVANにUDP-グリコシルトランスフェラーゼ(UGT)が作用することでVGが生産される。そこで本研究では、分裂酵母にDSD、OMT、ACAR、UGT遺伝子を導入することで、培養72時間後のVG-1株においてVG生産に成功した(31.0 mg/L)。

分裂酵母においてバニリンからバニリルアルコールへの変換に関与する遺伝子を破壊することによりバニリンに対するアルコール化の作用を軽減させ、グリコシル化

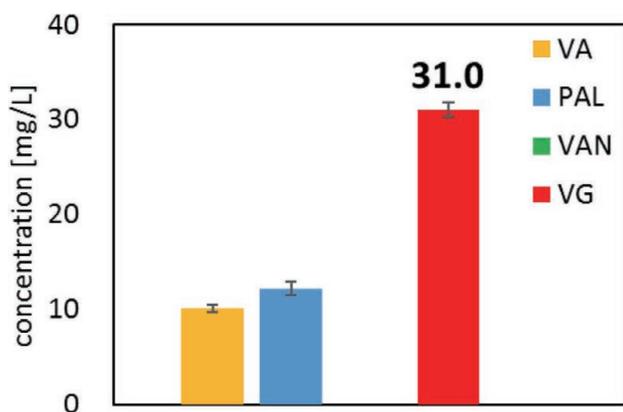


図1 バニリングルコシド生産試験

を促進させる必要があるが、分裂酵母においてその遺伝子は特定されていない。Saccharomyces cerevisiaeを用いた先行研究において、バニリンからバニリルアルコールへの変換に関わる酵素として、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)をコードする遺伝子の一つであるADH6が重要な役割を果たしていることが報告されている。また、Escherichia coliを用いた先行研究において、バニリンからバニリルアルコールへの変換に関わる酵素として、アルドケトレダクターゼ(AKR)をコードする遺伝子のいくつか重要な役割を果たしていることも報告されている。そこで、本研究においても分裂酵母においてADH及びAKRをコードする遺伝子をバニリン生産株において破壊もしくは過剰発現させることで、バニリルアルコール生産に重要な役割を果たしている遺伝子の特定を試みた。VAN-1株に対してプラスミド導入を利用して、ef1a-cプロモーターを制御元としたadh1, adh8, adhA, akr3, yak3組み込み pDUAL-FFH61プラスミドをそれぞれ導入した株を作製した。さらに、VAN-2株(後述)に対してCRISPR-Cas9システムを利用して、AKRをコードするakr1, akr4遺伝子座を破壊した株も作製した。得られた菌株を培養した結果、培養48時間後のバニリルアルコール生産量はいずれもコントロール株のバニリルアルコール生産量と差が見られなかった。これにより、遺伝子adh1, adh8, adhA, akr3, yak3, akr1, akr4はバニリンからバニリルアルコールへの変換に重要な役割を果たしている可能性が低いことが示唆された。

3.2 バニリン生合成経路の強化

バニリングルコシド生産の前駆体であるバニリンの供給量を増加させるため、VAN-1株の中間体の残存量に着目した。48時間後において中間体であるプロトカテクアルデヒドが81.4 mg/L残存していることから、プロト

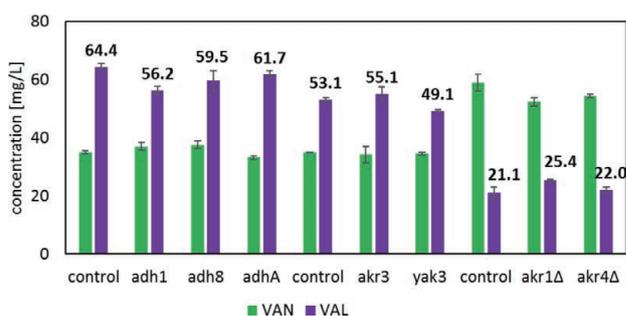


図2 バニリルアルコール生産遺伝子特定

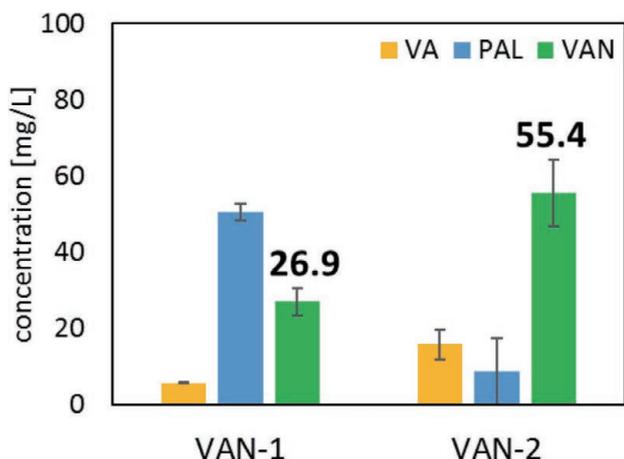


図3 OMTの2コピー目導入によるバニリン生産性向上試験

カテクアルデヒドからバニリンへの変換効率向上を図るため、VAN-1株にOMTを追加導入した株の作製に取り組んだ。VAN-1株に対して相同組み換えを利用して、*efla-c*プロモーターを制御元としたOMT遺伝子を、*Leu*をコードする*leu*遺伝子座に組み込んだVAN-2株を作製した。得られた菌株を培養した結果、培養48時間後に55.4 mg/Lのバニリンを生産した。OMTの2コピー目の導入により、プロトカテクアルデヒドからバニリンへの変換率が向上し、バニリン生産性が向上したと考えられる。

先行研究により、NADPHの供給量を向上させた場合にバニリン生産性が向上する場合があるとされているため、本研究においてもNADPHの供給量増加に取り組むこととした。ペントースリン酸経路(PPP)上流ではG6Pから6-ホスホグルコノ-1,5-ラクトンが生産される際、及び6-ホスホグルコン酸からリブローズ-5-リン酸が生産される際に、同時にNADPHも生産される。先行研究により、PPPの下流フラックスを強化すると、PPP全体のフラックスが強まり、結果としてNADPHの供給量を向上させることができるとされている。そこで、VAN-3株に対してプラスミド導入を利用して、*efla-c*プロモーターを制御元としたPPPの下流遺伝子である*zwf1*, *xfpk*, *tkt1*組み込み pDUAL-FFH61プラスミドをそれぞれ導入した株を作製した。得られた菌株を培養した結果、培養48時間後のバニリン生産量は*xfpk*導入株でそれぞれ86.2 mg/Lとなり、コントロール株のバニリン生産量である83.4 mg/Lをやや上回った。そこで、バニリン生産性を向上させるにあたってこれまではプロトカテク酸以降の経路に着目していたが、プロトカテク酸以前の上流

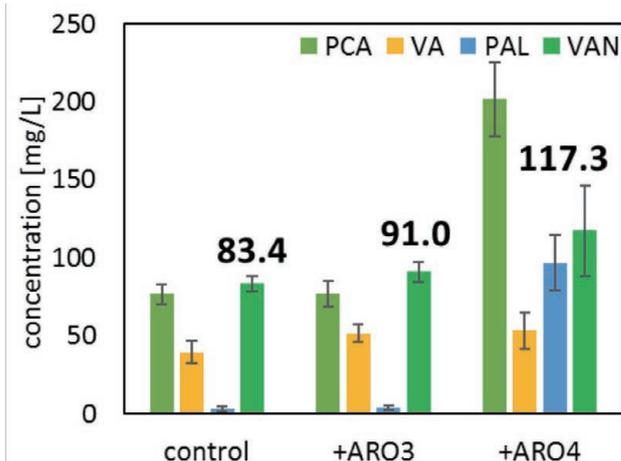


図4 DAHPシターゼコード遺伝子過剰発現によるバニリン生産性向上試験

経路にも着目することとした。Saccharomyces cerevisiaeを用いた先行研究において、デヒドロシキミ酸(DHS)を利用した物質生産では、エリトローズ4-リン酸(E4P)とホスホエノールピルビン酸(PEP)の縮合反応を促進させると目的物質の生産性向上が見込めると報告されている。VAN-3株に対してプラスミド導入を利用して、*efla-c*プロモーターを制御元としたARO3K222L, ARO4K229L組み込み pDUAL-FFH61プラスミドをそれぞれ導入した株を作製した。培養48時間後のバニリン生産量はARO3K222L, ARO4K229L導入株でそれぞれ91.0, 117.3 mg/Lとなり、コントロール株のバニリン生産量である83.4 mg/Lを上回った。特にARO4K229L導入株ではバニリン生産量に加えてプロトカテク酸及びプロトカテクアルデヒドの生産量も増加しており、DAHP供給量が増加したことによってプロトカテク酸以降の物質を生産しやすくなった可能性及びNADPH供給量が増加したことによってACARの作用が向上した可能性が考えられる。

メチル化反応においてはSAMの他に補酵素として金属イオンMg⁺及びピリドキサル5-リン酸(PLP)も必要となる。Escherichia coliを用いた先行研究において、ホモセリンからホモシステイン(Hcys)の生成を司る硫化転位経路が機能するにあたって、補酵素としてPLPが必要であり、これを培地中に添加した場合、メチル化反応が促進されると報告されている。また、MetからSAMの反応時に必要である金属イオンMg⁺を培地中に添加した場合にも、メチル化反応が促進されると報告されている。さらに、Metの添加はメチル化反応促進に効

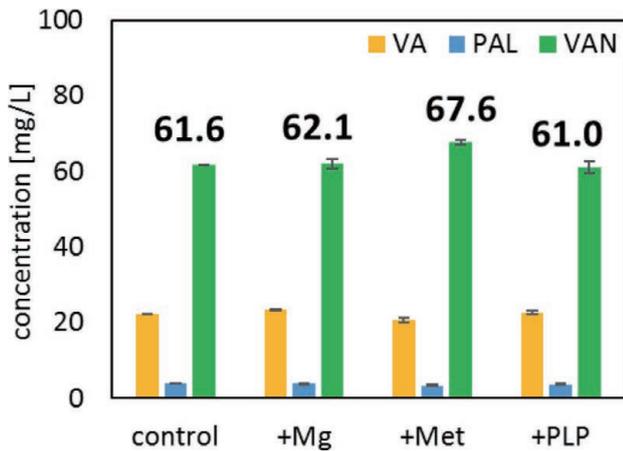


図5 Mg⁺, Met, PLPの添加によるバニリン生産性向上試験

果があると報告されている。そこで、VAN-4株培養時に培地中にMg⁺(EMM含有量込みの最終濃度248 mg/L)、PLP(最終濃度25 mg/L)、及びMet(最終濃度225 mg/L)を添加し、培養試験を行った。培養した結果(図5)、培養48時間後のバニリン生産量はMetを添加した場合67.6 mg/Lとなり、コントロール株のバニリン生産量である61.6 mg/Lを上回った。

分裂酵母はバニリンをアルコール化させ、バニリルアルコールを生成することのできる内在遺伝子を保有しているため、VAN-1株において30.5 mg/Lのバニリンの生成と同時に53.8 mg/Lのバニリルアルコールの生成も達成している。さらに、バニリルアルコールにUGTが作用することでVG-1株において36.1 mg/Lのバニリングルコシドの生成と同時に359.0 mg/Lのバニリルアルコールグルコシドの生成も達成している

4. まとめ

本研究ではゲノム編集技術であるCRISPR-Cas9 system及び相同組み換え法、プラスミド導入法を駆使し、分裂酵母におけるバニリングルコシド生産株の構築に成功し、前駆体の一つであるバニリンの生産量を向上させることがバニリングルコシド生産性の向上に有効であることを見出した。また、プロトカテック酸以降の経路調整をした後でなければ、プロトカテック酸上流の経路に対する戦略に効果が出ないことも発見した。さらに、バニリングルコシド生産株培養時に培地にヘキサデカン

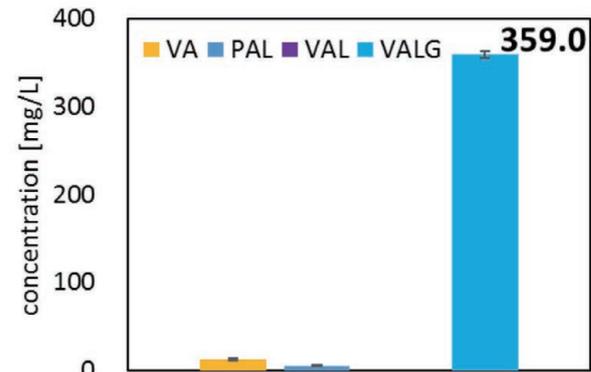


図6 バニリルアルコールグルコシド生産

重層することにより、生産性が向上することも示された。加えて、分裂酵母内在遺伝子を活用することにより、バニリルアルコール及びバニリルアルコールグルコシドの生産も達成した。分裂酵母でのバニリン関連化合物グリコシド誘導体生産においてバニリン生産性の向上、副産物の生成抑制、培地の検討に取り組んだ例は未だ報告されておらず、本研究が初めての例である。今後はバニリルアルコール生成遺伝子を特定し、破壊もしくは過剰発現することでバニリングルコシドもしくはバニリルアルコールグルコシドに生産フラックスを集中させること、OMT及びACARを2コピーずつ導入した上でARO4K229Lを導入することで、更に高い生産量が期待できると考える。また、他の菌株を用いたバニリン生産において、バニリン耐性を高めることの重要性も示されているため、分裂酵母においても耐性の増強を図る価値があると考えている。

5. 謝辞

本研究に対して、多大なご支援を賜りました公益財団法人松籟科学技術振興財団に深く感謝申し上げます。

6. 発表文献

Koshiba, A., Nakano, M., Hirata, Y., Konishi, R., Matsuoka, Y., Miwa, Y., Mori, A., Kondo, A., Tanaka, T. (2024) Enhanced production of isobutyl and isoamyl Acetate using *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnology Progress*, 40(6), e3499

抗がん性テルペンラクトン類を網羅する 可視光応答型標識化反応の開発

静岡大学 学術院工学領域
仙石 哲也

1. 背景

天然物の一群として、メチレンカルボニル化合物がある。その中でも、メチレンラクトン構造をもつ化合物群は薬剤リードとして魅力的であり、ジオルキノライド¹やアルグラビン²に代表されるテルペンラクトン類は、抗がん活性を示す。今後も新規天然物の偶発的発見が期待される。一方、その鍵構造自体は求核付加を受けやすい共役カルボニルに加え、酸・塩基処理により分解しうるラクトンを有しており、単離過程での各処理による損壊の結果、微量天然物は見逃されている可能性が高い。

上記背景から、申請者は資源成分中のメチレンカルボニル型天然物を識別する新手法を確立することで、見逃されていた微量天然物の発見が可能になると同時に、偶発性に強く依存していた単離・構造決定研究から必然性を伴った研究へと展開できると発想した。他方、申請者は重金属触媒不使用の可視光下での炭素ラジカル発生法³を見出しており、これが上記アイデアを実現する鍵となると考えた。本研究では、この反応のメチレンラクトンへの適用を行い、標識化への応用を検討した(図1)。

2. 標識化用スルホンの構造探索

本研究で合成した標識化用スルホンを図2に示す。AおよびBは薄層クロマトグラフィー (TLC) 上でピレン基由来の蛍光がわずかに確認された。吸収スペクトルは349 nmで最大吸収を示し、発光スペクトルでは349 nm

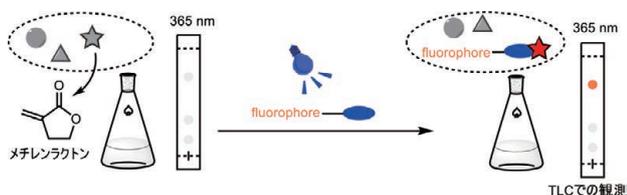


図1. テルペンラクトン類の可視光応答型標識化の模式図

の励起で強い発光強度を示したものの365 nmではほとんど発光がみられなかった。Cについても、吸収スペクトルでは346 nmで最大吸収を示したが、365 nmの励起では蛍光をほとんど示さなかった。これらのことから、TLC上での発光観測による分析が可能であることが示された。

続いて3種の標識化用スルホンを用いて、当研究室で開発した反応条件のもと、アクリル酸tert-ブチルをモデル化合物とするラベル化を試みた(図3)。直鎖型であるAとBを用いた反応では、反応溶液のTLC分析において365 nmの光照射で新たに発光するスポットの生成が確認できた。一方、Cを用いたときは、新しく生成された化合物は確認されなかった。AとBから新たに得られ

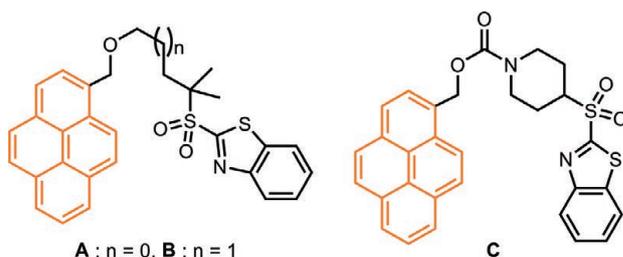


図2. 合成した標識化用スルホンの構造

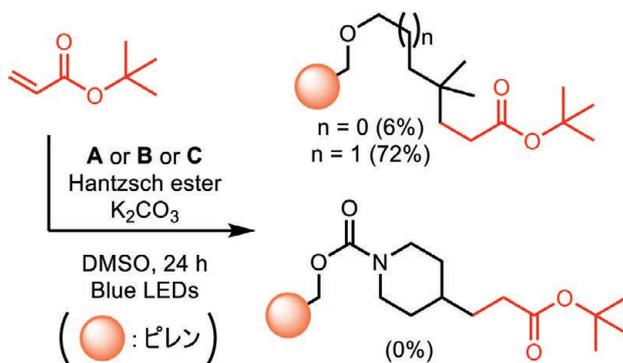


図3. 標識化用スルホンによるモデル実験

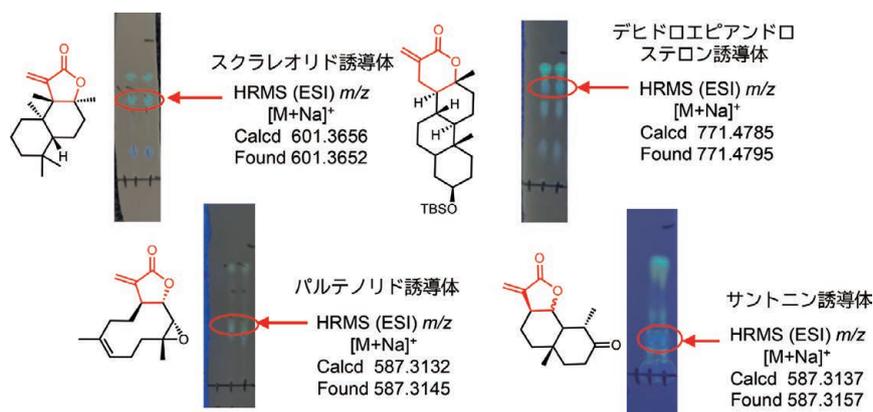


図 4. 天然物誘導体の標識化の反応溶液のTLCの様子 (365 nmで観察)

た発光スポットをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより単離し、NMR分析したところ、目的の標識化体であることが確認でき、収率はそれぞれ6%と72%であった。以上より、本研究の標識化用スルホンとしてBを採用した。

3. メチレンラクトン類の標識化

Bを用いてスクラレオリド誘導体⁴、パルテノリド、デヒドロエピアンドロステロン誘導体、サントニン誘導体⁵との反応を試みた。各反応には5~7 mgの試料を用いた(図4)。スクラレオリド誘導体への反応では、反応溶液のTLC分析(ヘキサン/酢酸エチル = 3/1)にて、365 nmの光照射で発光するスポットが三つ確認された。TLC上で最も極性の高いスポットはHantzschエステルであったため、より低極性の二つのスポットのどちらかが目的物であると考えられ、これらの発光スポットをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて単離した。HRMS解析を行ったところ、より高極性の発光スポットに m/z 601.3652のピークが観測され、これは目的物の計算値 m/z 601.3656 $[M + Na]^+$ に良い一致を示した。さらにこのスポットの¹H NMR解析を行った結果、目的物由来のシグナル(8.50-8.00 ppmにプローブのピレンの芳香環、5.20 ppmにベンジルのメチレン基、0.85 ppmにメチル基)が確認できたことから、目的の標識化体であることが支持された。¹H NMRの積分比より算出した収率は、最大11%であった。

パルテノリドへの反応では、ごく弱い発光であるものの、Hantzschエステルと重なる新たな発光スポットが現れた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにてHantzschエステルとの混合物として得られた成分の

HRMS解析を行ったところ m/z 587.3145のピークが観測され、これが目的物の計算値587.3132 $[M + Na]^+$ と良い一致を示した。また、¹H NMRスペクトルにおいて、8.50-8.00 ppmにピレンの芳香環、5.22 ppmにベンジルのメチレン基、そして3.65 ppmに酸素原子の付け根のプロトンシグナルが確認できたことから、目的の標識化体であることが支持された。¹H NMRの積分比より算出した収率は、最大32%であった。

デヒドロエピアンドロステロン誘導体への反応では、反応混合物のTLCに365 nmの光を照射したとき、試薬由来の反応副生成物を除く一つの新たな発光スポットが現れた。このスポットをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分離してHRMS解析を行ったところ、Hantzschエステルとの混合物として得られた成分に m/z 771.4795のピークが観測され、これが目的物の計算値771.4785 $[M + Na]^+$ と良い一致を示した。また、¹H NMRスペクトルにおいて、8.50-8.00 ppmにピレンの芳香環、0.87 ppm及び0.07 ppmにメチレンラクトンのTBS基が確認できたことから、目的の標識化体が含まれることが支持された。¹H NMRの積分比より算出した収率は、最大35%であった。

サントニン誘導体への反応では、反応混合物のTLCに365 nmの光を照射したとき、試薬由来の反応副生成物と新たな発光スポットが重なって現れた。重なっている発光スポットをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分離してHRMS解析を行ったところ、Hantzschエステルとの混合物として得られた成分に m/z 587.3157のピークが観測され、これが目的物の計算値587.3137 $[M + Na]^+$ と良い一致を示した。また、¹H NMRスペクトルにおいて、8.50-8.00 ppmにピレンの芳香環、5.20 ppm

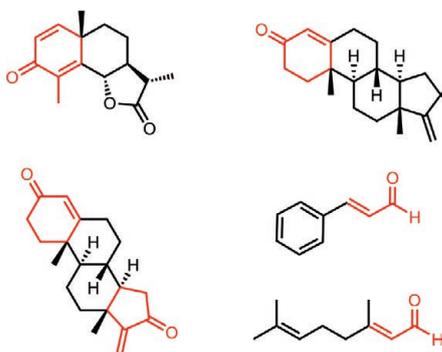


図5. 反応が進行しなかった化合物

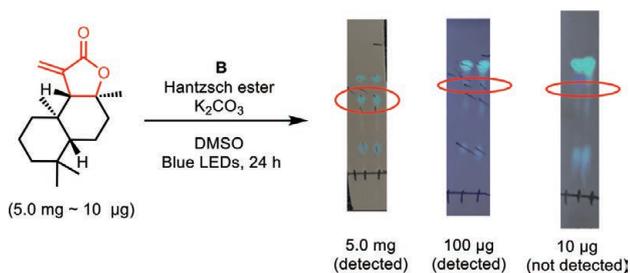


図6. メチレンラクトンを用いた検出限界調査

にベンジルのメチレン基、そして3.60 ppmに酸素原子の付け根のプロトンシグナルが確認できたことから、目的の標識化体であることが支持された。¹H NMRの積分比より算出した収率は、最大27%であった。

メチレンラクトンへの選択性の有無を確かめる実験では、種々の電子不足アルケン構造をもつ天然物またはその誘導体への反応を試みた。図5に示す一連の化合物で反応の進行は確認されなかったことから、標識化用スルホンの優れた選択性が確認できた。

上記検討では5~7 mgの天然物またはその誘導体を用いていたため、微量サンプルの検出についても確認した。スクラレオリド誘導体を5.0 mg、100 µg、10 µgと減らして反応を行い、その混合物のTLC分析を行ったところ、100 µgを用いた場合には発光が微弱ではあるもののラベル化体の存在を目視で確認することができた。一方、10 µgでは発光スポットを視認することは出来なかった(図6)。よって、本ラベル化では、100 µg程度のメチレンラクトン天然物を含む混合物であればTLC上で認識できることが判明した。

4. 高極性Hantzschエステルによる改善検討

成分分析の際にラベル化反応に利用したHantzschエステルが365 nmの青色光照射下で発光を示したことから、

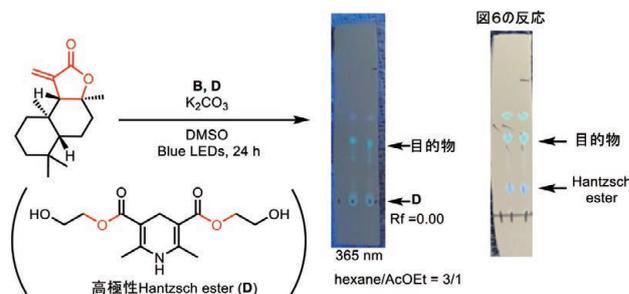


図7. 高極性Hantzschエステルによる視認性の改善

ら、TLC上でラベル化体の検出を妨げる欠点があった。そこで、Hantzschエステルの代替として高極性Hantzschエステル⁶を用いることで、発光成分の視認性の向上を検討した。既知の高極性HantzschエステルDを用いて、スクラレオリド誘導体の反応を試みた。反応溶液のTLCでは、高極性HantzschエステルDは、展開溶媒ヘキサン/酢酸エチル = 3/1でR_f値0.00で観測され、標識化体と容易に区別することができた(図7)。反応後の粗抽出液を分取TLCにより分離して、それぞれのスポットをろ過し、溶出液を濃縮後、マススペクトルによる解析を行うと、*m/z* 601.3652を与え、目的物であることが確認できた。

5. まとめ

蛍光色素ピレンを標識タグとしたスルホン体を新たに開発し、天然物から誘導したメチレンラクトンに青色LED光照射下で付加させることで標識化に成功した。反応溶液をTLCで展開し、365 nmの光を照射することでラベル化体の発光が確認できた。メチレンラクトン以外の電子不足アルケンではラベル化体は得られず、本反応条件はメチレンラクトンのラベル化に選択性があるといえる。また、反応試薬に用いるHantzschエステルに極性官能基を導入することで、反応混合物からの目的物の視認性を改善することにも成功した。今後は、これらの知見をもとに、天然資源の粗抽出液でのメチレンラクトン類の可視化を検討していきたい。

6. 謝辞

本研究を実施するにあたりご支援下さいました公益財団法人松籟科学技術振興財団および関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究は静岡大学大学院工学領域有機合成化学研究室で行われたものであり、精力的に研究を行ってくださった小田有紗氏、西岡駿氏に感謝申し上げ

げます。

7. 参考文献

- 1) Uemura, D. ; Hirata, Y. *Chem. Lett.* **1974**, *3*, 819.
- 2) Adekenov, S. M. ; Mukhametzhanov, M. N. ; Kagarlitskii, A. D. ; Kupriyanov, A. N. *Chem. Nat. Compd.* **1982**, *18*, 623.
- 3) Sengoku, T. ; Ogawa, D. ; Iwama, H. ; Inuzuka, T. ; Yoda, H. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 9858.
- 4) Riofski, M. V. ; John, J. P. ; Zheng, M. M. ; Kirshner, J. ; Colby, D. A. *J.Org.Chem.* **2011**, *76*, 3676.
- 5) Li, D. ; Higuchi, Y. ; Kobayashi, T. ; Shimoma, F. ; Bai, Y. ; Ando, M. *Bioorg. Chem.* **2021**, *108*, 104642.
- 6) Uldrikis, R, Y. ; Dubur, Y, G. ; Dipan, V, I. ; Chekavichus, S, B. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1975**, *11*, 1070.

植物内生プロゲステロンの機能解明とその応用

東京農業大学 生命科学部バイオサイエンス学科
伊藤 晋作

1. 背景と目的

プロゲステロンはヒトなどの哺乳動物においては黄体ホルモンとして知られており、月経周期や妊娠維持などに重要な働きを果たしている。さまざまな植物種においてもプロゲステロンが検出されることから (Iino et al. 2007; Janecko et al. 2013)、プロゲステロンが植物においても生理的に重要な機能を有していると予想されている。現在までに外部からのプロゲステロン処理による実験から、種子発芽や根、胚軸の伸長、ストレス応答への関与が示唆されてきているものの (Iino et al. 2007; Yang et al. 2005; Turk, 2021)、プロゲステロンがどのようにしてこれらの生理作用を制御しているのか、また、内生のプロゲステロンの働きについては明らかになっていない。

プロゲステロンの生合成は哺乳動物においてよく研究されており、コレステロールを出発物質としてコレステロール側鎖切断酵素(P450sc)により側鎖部分が切断されプレグネノロンとなる。その後、3 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素(3 β HSD)によりプロゲステロンが合成される(図1)。一方、植物においてはジギタリスにおいてプレグネノロンをプロゲステロンへと変換する3 β HSDが同定されていることから(Finsterbusch et al. 1999; Herl et al. 2007)、哺乳動物とよく似た経路であると予想されているものの、ほとんど解析されていないのが現状である。また、プロゲステロン受容及びシグナル伝達も哺乳動物においては核内受容体および膜受容体の存在が知られているが植物においてその存在は明らかになっていない。シロイヌナズナにおいて膜結合型プロゲステロン結合タンパク質が報告されているものの、その機能や重要性についてはほとんど解析されていないのが現状である。

これまでに我々は、外部からのプロゲステロン処理に

よって植物の枝分かれを負に制御する植物ホルモンであるストリゴラクトンの生合成が抑制されることを見出してきた。さらにプロゲステロン処理によりストリゴラクトン内生量が低下するにも関わらず、枝分かれにはほとんど影響しないことから、プロゲステロンはストリゴラクトン生合成以外にも様々な生理作用を有していると予想された。

そこで、本研究では、プロゲステロンの植物における機能を明らかにするために、プロゲステロン生合成経路の解析、およびプロゲステロン受容体の探索を行なった。

2. プロゲステロン生合成経路の解析

ジギタリスの3 β HSDの配列をクエリとし、イネにおける3 β HSD様遺伝子を探索したところ、三遺伝子を候補として見出すことができた。見出した遺伝子をそれぞれ

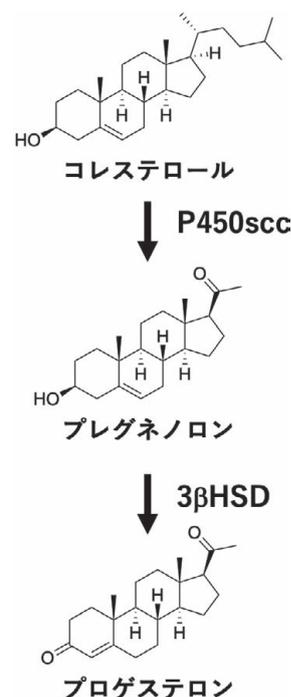


図1. 哺乳動物におけるプロゲステロン生合成経路

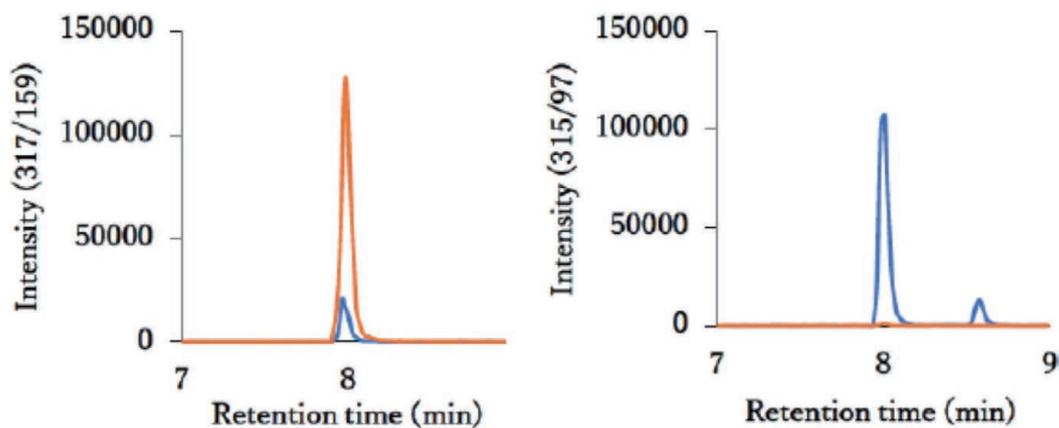


図2. 酵素反応後のプレグネノロン(左)、プロゲステロン(右)の抽出クロマトグラム
m/z=317/159(プレグネノロン)、315/97(プロゲステロン)。オレンジ：酵素未添加、青：酵素添加

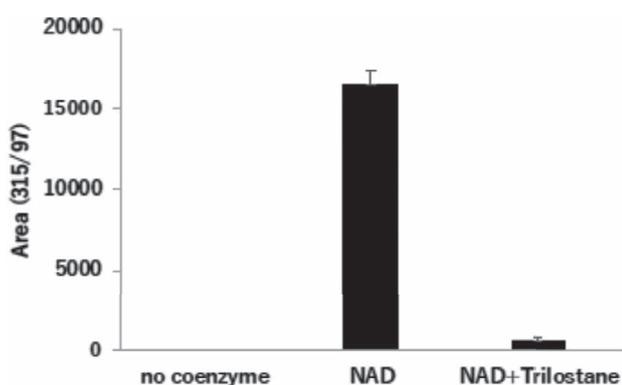


図3. Trilostane添加による酵素活性の阻害酵素とプレグネノロンを用いて酵素反応をおこなった後、LC-MS/MSによりプロゲステロンの面積値を算出し、阻害活性を評価した。No enzyme：補酵素なし、NAD：1 mM NAD添加、NAD+Trilostane：1 mM NADに50 μ M trilostane添加

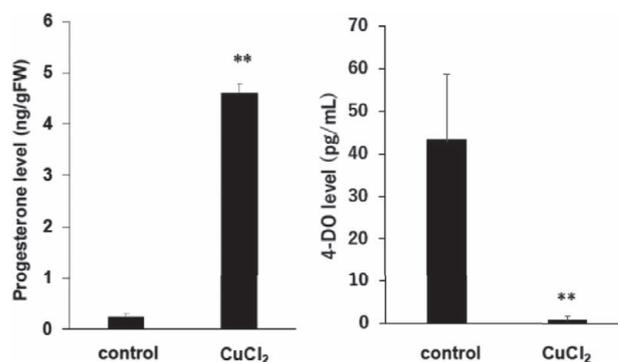


図4. 塩化銅によるプロゲステロン(左)とストリゴラクトン(4-Deoxyorobanchol：4DO)(右)内生量への影響
CuCl₂：1 mM CuCl₂

れHSD1, HSD2, HSD3とし、大腸菌を用いて組み換えタンパク質を発現させた。発現したタンパク質を用いて、プレグネノロンを基質としてNADもしくはNADPを補酵素として使用し、酵素活性を測定した。活性は生成物と予想されるプロゲステロン量をLC-MS/MSにより定量することで測定した。その結果、どの組み換えタンパク質でも、酵素反応によって基質であるプレグネノロン量が低下し、反応前には検出されなかったプロゲステロンのピークが確認されたことより、これらの3種類の酵素は3bHSD活性を示すことが明らかとなった(図2)。また、NADを補酵素とした場合と比較してNADPを補酵素とした場合では、ほとんどプロゲステロンへの変換が確認できなかったことから、これらの酵素はNADを補酵素として利用していることが明らかとなった。さらに哺乳動物の3bHSD阻害剤であるトリロスタンによっ

て酵素反応が阻害されたことから(図3)、本酵素が3bHSDであると結論づけた。

続いてこれらの酵素のイネにおける発現量を測定した。RAP-DBより3bHSDの発現変動を調べたところ、どの遺伝子もジャスモン酸処理により発現量が上昇していた。ジャスモン酸量を増加させるエリシター(塩化銅)処理でもこれらの遺伝子発現量が上昇し、さらにプロゲステロン内生量が増加していたことから(図4)、HSDs遺伝子発現量の上昇がプロゲステロン内生量を増加させており、植物体内でもこれらの遺伝子がプロゲステロンの生合成に関与する可能性が示唆された。さらに塩化銅処理時にはストリゴラクトン生合成遺伝子の発現量およびストリゴラクトン内生量も抑制されていた。これらの結果はプロゲステロン内生量の変化がストリゴラクトン生合成量を変化させていることを示している。現在、これらの遺伝子の機能を植物レベルで解析するために過剰発現体やゲノム編集による機能欠損体の作出を行なっている。

3. プロゲステロン結合タンパク質の探索

続いてプロゲステロン受容体の同定を目指して、プロゲステロン結合タンパク質の探索を行なった。これまでにシロイヌナズナにおいてプロゲステロン結合タンパク質が同定されている(Yang et al. 2005)。そこでこのホモログをイネで探索したところ、二遺伝子をホモログとして見出すことができた。これらの遺伝子をプロゲステロン受容体候補遺伝子と考え、大腸菌にて発現させ、プロゲステロンとの結合を観察することとした。トリチウム標識プロゲステロン(Perkin Elmer)と候補タンパク質をインキュベート後NAP-5カラムによりタンパク質と結合したプロゲステロンを含む画分を回収し、その放射活性を測定したところ、標識プロゲステロン添加による有意な活性の向上は観察されなかった。また、サーマルシフトアッセイによりプロゲステロン添加によるタンパク質の変性温度の変化を観察したものの、候補タンパク質の変性温度の変化がプロゲステロンの有無により観察されなかったことから、候補タンパク質はプロゲステロンと結合しないと結論づけた。

4. まとめ

上記の通り、本研究ではプロゲステロンの生合成と情報伝達に着目していくつかの研究をおこなった。生合成経路に関しては哺乳動物と同様に3bHSDが関与していることが明らかとなり、プロゲステロンの外部からの処理だけでなく、内生量の調節によりストリゴラクトン量の制御が可能になる結果を示唆することができた。プロゲステロン受容体に関しては、今回検討したタンパク質はプロゲステロンと結合しないことが明らかとなった。哺乳動物においてプロゲステロン受容体は核内受容体と膜受容体の2種類が報告されている。核内受容体は植物においてその存在は報告されていないものの、膜受容体に関しては相同性検索から候補タンパク質を見出すことができている。今後これらの解析を行うことで、プロゲ

ステロンの植物における生理作用やその作用機序が明らかになると考えている。

5. 謝辞

本研究に対して、多大なご支援を賜りました公益財団法人松籟科学技術振興財団に深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- Finsterbusch A, Lindemann P, Grimm R et al., D⁵-3b-Hydroxysteroid dehydrogenase from *Digitalis lanata* Ehrh. – a multifunctional enzyme in steroid metabolism? *Planta*, **209**, 478-486 (1999)
- Herl V, Frankenstein J, Meitinger N, et al., Delta5-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta HSD) from *Digitalis lanata*. Heterologous expression and characterization of the recombinant enzyme. *Plant Med.*, **73**, 704-710 (2007)
- Iino M, Nomura T, Tamaki Y, et al., Progesterone : its occurrence in plants and involvement in plant growth. *Phytochem.*, **68**, 1664-1673 (2007)
- Janeczko A, Oklest'kova J, siwek A, et al., Endogenous progesterone and its cellular binding sites in wheat exposed to drought stress. *J. Steroid Biochem. Mol.*, **138**, 384-394 (2013)
- Turk H, Progesterone promotes mitochondrial respiration at the biochemical and molecular level in germinating Maize seeds. *Plants*, **10**, 1326 (2021)
- Yang XH, Xu ZH, and Xue HW. Arabidopsis membrane steroid binding protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. *Plant Cell*, **17**, 116-131 (2005)

シロイヌナズナにおけるフェアリー化合物の生理的役割の解明

静岡大学 大学院農学専攻
崔 宰熏

1. 研究背景と目的

公園やゴルフ場など様々な場所で芝生が輪状に繁茂または枯死し、後にキノコが発生する現象がある(図1)¹⁾。この現象は、古くから世界各地で確認されており、神話や伝承などにも登場する。西洋にある伝説では、妖精が輪を作りその中で踊るとされており、フェアリーリング現象と呼ばれている。

静岡大学の職員宿舎で、コムラサキシメジがフェアリーリングを形成していることを偶然発見した。その後、フェアリーリングの原因が菌の産生する植物成長調節物質にあると考え研究を行った。その結果、コムラサキシメジ菌糸体の培養濾液から 2-azahypoxanthine(AHX) および imidazole-4-carboxamide(ICA) を発見した(図2)^{2,3)}。更に、AHXを処理したイネからその代謝産物と

して2-aza-8-oxohypoxanthine(AOH)が発見された(図2)。その後の研究から、AHXは植物体内で共通してAOHに変換されることも明らかとなり、AOHもイネ及びシバに対してAHX同様の成長調節活性を示した⁴⁾。これら3種類の化合物は、Nature誌が当研究グループの研究成果の一部を紹介した記事の見出し「fairy chemicals」に因んで、“フェアリー化合物(fairy chemicals、FCs)”と称している(図2)。

FCs(フェアリー化合物)は、分類学上の科に関係なく、試験したすべての植物に対して成長調節活性を示し、さらに高温・低温・乾燥・塩などの様々な非生物学的ストレスに対する耐性を向上させることが明らかとなっている³⁻⁶⁾。これらの知見から、FCsが植物ホルモンである可能性が強く示唆された。

植物ホルモンには明確な定義は存在しないが、一般的には以下の4つの特徴が挙げられている：

- 1) 植物体内で産生される化合物であること
- 2) 微量で作用する生理活性物質・情報伝達物質であること
- 3) 植物種に普遍的に存在すること
- 4) 化学構造と生理作用が明らかにされていること

様々な植物種を対象に、超高速高分離液体クロマトグラフ(UPLC)とエレクトロスプレーイオン化連結質量分析計(LC-MS/MS)を用いてFCsの分析を行った。その結果、AHXはすべての植物種において、AOHとICAは多くの植物種において検出された。これはFCsが植物に普遍的に存在する可能性を示している⁷⁾。一部の植物でAOHおよびICAが検出されなかったのは、検出限界以下で内生しているか、あるいは植物の成長段階によってFCsの内生量が変動する可能性があるためである。

また、イネにおけるFCsの定量では、AHXが新鮮重量(FW)あたりpmol/gレベルで存在しており、これは既



図1 フェアリーリング現象

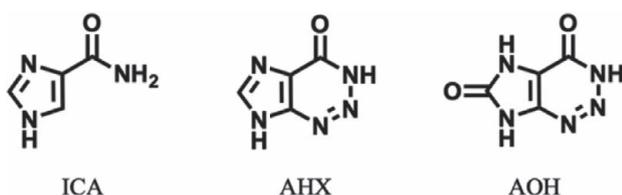


図2 フェアリー化合物の構造

知の植物ホルモンと同程度である。したがって、FCsは微量で作用する生理活性物質であると強く示唆される(4,7)。その成長調節作用やストレス耐性付与、さらにはイネの収量増加効果により、農業分野での応用も期待されている。FCsは様々な植物体に対して成長調節作用を示すことが確認されている。例えば、ベントグラスに対しては、AHX、AOH、そしてその前駆体であるAICAの処理によって伸長促進活性が認められた一方、ICAの処理では生長抑制活性が見られた。興味深いことに、構造が類似しているキサンチンやヒポキサンチンでは生長に影響を与えなかったことから、2位の炭素原子が窒素原子に置換されている構造的特徴が生理活性において重要な要因と考えられる(2)。同様にイネにおいても、AHXは生長促進、ICAは生長抑制を示した。さらに、FCs処理後のイネにおけるマイクロアレイ解析の結果、ストレス応答に関連する遺伝子の発現が変動しており、FCsが成長調節のみならず、環境応答にも関与することが示唆された。特に、AHXおよびAOHがストレス耐性遺伝子の発現を上昇させたのに対し、ICAは発現を抑制することが確認された。これらの結果より、イネにおいてはAHXおよびAOHが植物の成長を促進し、ICAは逆に抑制するように機能していることが明らかとなった。

しかしながら、現時点ではFCsが植物体内でどのように受容・伝達され、代謝や遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのかは明確には解明されていない。

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は、世界中に広く分布する草本植物であり、2000年にはその全ゲノム配列が解読されている。染色体数 $2n=10$ 、ゲノムサイズ125 Mbという小ささ、ライフサイクルの長さ(約2か月)、交配・遺伝子編集の容易さなどから、現在ではモデル植物として広く遺伝学実験に用いられている。本研究では、これまでFCsの対象とされてこなかった*Arabidopsis thaliana*(Col-0)に着目し、その表現型、代謝系、遺伝子発現系に対するFCsの影響を明らかにし、FCsの機能の解明を目的とした。

2. 結果・考察

FCsの前駆体化合物である5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide(AICAR)はプリン代謝経路で代謝されることが知られている(図3)。

本研究では、FCsおよびその関連化合物(AHX、

AOH、ICA、AICA)がシロイヌナズナの地上部形態に及ぼす影響を検討した。まず、図4においては、FCsを含む1/2 MS寒天培地(0.8%、100 μ M、500 μ M、1 mM)上に種子を播種し、2週間培養した個体の表現型を比較した。その結果、AHXおよびAOH処理区では濃度依存的に発芽および初期生育の促進が認められた。特に500 μ Mおよび1 mM AHXでは葉の展開が良好で、コントロールと比較して個体の密度および大きさが顕著に増加していた。一方、ICA処理区では500 μ M以上で著しい生育抑制が認められ、1 mMではほとんどの個体が発育停止または枯死状態となった。また、AICAは中程度の促進効果を示したが、濃度が高くなると生育への影響は限定的であった。

次に、図5では、1/2 MS寒天培地で1週間初期培養を行った後、土壌に移植し、定着後1回のみ30 mLの1 mM FCsを処理した。さらに1週間後の地上部の表現型を比較した。その結果、AHXおよびAOH処理区では葉数の増加と展開の促進が観察され、生長促進効果が顕著であった。これに対し、ICA処理区では葉の小型化、展開不良、黄化などの生育抑制効果が認められた。AICA処理では葉の展開が良好であり、AHXおよびAOHと同様に軽度の促進効果が見られた。

以上の結果から、FCsは濃度および化合物の構造に依存してシロイヌナズナの生育に異なる影響を与えることが明らかとなった。特に、AHXおよびAOHは植物成長促進因子としての可能性を示す一方、ICAは強い成長抑制因子として作用することが示唆される。これらの活性差は、構造中のアミノ基・窒素原子の配置などが植物生理において極めて重要な因子である可能性を示している。

Ethyl methyl sulfonate(EMS)処理によって誘発した突然変異個体群を対象に、FCs処理培地を用いた表現型スクリーニングを行い、各化合物に対する耐性株の選抜を試みた。特に、AHXおよびAICA処理条件下で有意な伸長抑制の低下が認められたサンプルについて、FCsの代謝酵素あるいはシグナル伝達に関与する遺伝子の探索を目的として解析を行った。

まず、得られた変異体が本当にFCsに対する耐性を有するかを確認するため、各株について無処理条件および処理条件下(AHX: 300 μ M、AICA: 200 μ M)での根の長さを測定した。その結果、処理時に野生型(WT)と比較して有意に根が長かった個体を、AICA耐性株から8

株、AHX耐性株から20株選抜することができた。

さらに、無処理と処理条件下における根の長さから算出した伸長抑制率を評価したところ、WTを100%とした場合に抑制率が50%以下であった株は、AICA耐性株で3株、AHX耐性株で8株存在していた。これらは、FCsによる根の生長抑制に関与する因子が欠損している可能性を示唆する。一方で、伸長抑制率が90%以上であった株も観察されたが、これらはFCsとは無関係に生長を抑制する変異を持つ可能性が高いため、目的とするFCs関連遺伝子の同定には不適と考えられる。しかしながら、これらの株も以降の解析においてAHX・AICA耐性候補株として継続的に評価を行った。

次に、これらの耐性候補株の地上部表現型を評価するため、寒天培地で初期生育させた後、土壌に移植し、3週間の土壌培養を実施した。その結果、WTではロゼット葉の形成が確認され、茎や花の形成は見られなかったのに対し、耐性株の中にはロゼット葉の形成がWTよりも遅延している、あるいは異常形態を示す株(AHX耐性株：#680, #946, #1210、AICA耐性株：#152, #944, #1194)が存在した。また、逆に地上部の形成が促進され、茎の形成が始まっている株(AHX耐性株：#624, #712, #1333)も確認された。

これらの結果から、AHXおよびAICA耐性株の中には、FCsの処理とは直接関係なく、植物の生長や形態形成に関与する遺伝子に変異を有する株が含まれている可能性が高いことが示唆された。

3. まとめ

本研究では、FCs(AHX、AOH、ICA、AICA)がシロイヌナズナの地上部の形態に与える影響を調べた。寒天培地での2週間培養(図4)では、AHXおよびAOHは濃度依存的に生長促進効果を示し、ICAは高濃度で生育を強く抑制した。AICAは中程度の促進効果を持つが、濃度依存性は限定的だった。土壌に移植後1 mMのFCsを処理した実験(図5)でも、AHX・AOHは葉の展開を促進し、ICAは抑制、AICAは軽度の促進効果を示した。

さらに、EMS処理により作出した突然変異体をFCs処理培地でスクリーニングし、AHXおよびAICAに対する耐性株を選抜した。根の伸長試験の結果、AICAで8株、AHXで20株が耐性候補として選ばれ、特に伸長抑制率

が50%以下の株も複数確認された。一方、90%以上の抑制を示す株は、FCsとは無関係な変異を持つ可能性が高い。

最後に、耐性株を土壌で3週間育成し、地上部の形態を観察した結果、一部ではロゼット葉の形成遅延や異常形態、一部では茎の形成が早まる株も見られた。これにより、FCs応答とは別に植物の形態形成に関与する遺伝子変異を有する株が存在する可能性が示唆された。

4. 謝辞

本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団からの研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Couch, H. B. Fairy rings. *Diseases of Turfgrasses 3rd Ed*, 181-186 (1995)
2. Smiley, R. W. et al. Fairy rings. *Compendium of Turfgrass Diseases 2nd Ed*, 61-63 (1992)
3. Choi, J.-H. et al. Plant-growth regulator, imidazole-4-carboxamide, produced by the fairy ring forming fungus *Lepista sordida*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9956-9959 (2010)
4. Choi, J.-H. et al. The source of "fairy rings" : 2-azahypoxanthine and its metabolite found in a novel purine metabolic pathway in plants. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 1552-1555 (2014)
5. Mitchinson, A. Fairy chemicals. *Nature* 505, 298 (2014)
6. Kawagishi, H. Are fairy chemicals a new family of plant hormones? *Proc. Japan Acad. Ser. B* 95, 29-38 (2019)
7. Kawagishi, H. Fairy chemicals - a candidate for a new family of plant hormones and possibility of practical use in agriculture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, 752-758 (2018)
8. Takemura, H. et al. A Fairy Chemical, Imidazole-4-carboxamide, is Produced on a Novel Purine Metabolic Pathway in Rice. *Sci. Rep.* 9, 9899, 1-8 (2019)

固体担持ビスマス触媒の創製と植物由来アルコール類を原料とした触媒的ヘテロ環合成とフロー反応系への展開

山形大学 大学院理工学研究科
皆川 真規

1. はじめに

ヘテロ環骨格は、医薬品や有機電子材料の機能性分子として必要不可欠な基礎骨格である。しかしながら、通常ヘテロ環化合物合成には多段階を要するため、多種多様なヘテロ環化合物を直接的・効率的に合成する手法の開発は重要である。申請者は、環境に調和した直接的かつ効率的な触媒的ヘテロ環合成法の開発を行ってきた¹。その結果、ヘテロ環骨格を入手容易な原料から触媒的・効率的に構築する均一系触媒反応の開発に成功してきた²。一方、フロー反応は反応・エネルギー効率や安全・経済面に優れており、これからのデジタル化社会を見据えた自動制御可能な反応システムとしても注目されている。近年、フロー型医薬品合成が達成され、持続可能な次世代型有機合成システムとして期待されている³。しかしながら多種多様な機能性分子構造を効率的にフロー合成するには未だ至っていない。様々な機能性分子をフロー合成するために新しい直接的かつ効率的な機能性分子基礎骨格を構築する触媒反応系の開発は非常に重要であり、新規フロー合成への鍵となる。本研究では、申請者が独自に開発してきた均一触媒反応系、すなわち安価で低毒性のビスマス触媒を用いたヘテロ環化合物合成、を不均一触媒反応系およびフロー反応への展開を目的とした。具体的には、(1) 安価で低毒性のビスマス固体担持触媒創製 (2) 医薬品や有機電子材料の機能分子として必要不可欠な基礎骨格であるヘテロ環化合物の、植物由来成分を活用した不均一触媒合成反応系への展開 (3) フロー型ヘテロ環合成実現を目的とした。

2. 結果と考察

固体担持ビスマス触媒として、現在までにシリカゲル担持ビスマストリフレート触媒； $\text{Bi}(\text{OTf})_3/\text{SiO}_2$ のみが

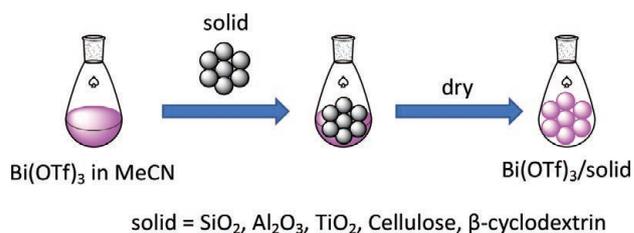


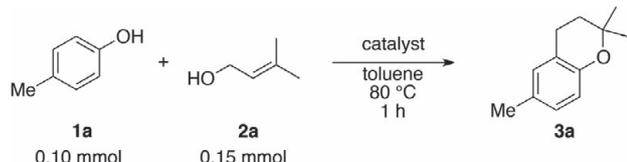
Figure 1. Preparation of solid-supported bismuth catalyst

1例報告されている⁴。この既存の手法を基に、シリカゲル(SiO_2)とアルミナ(Al_2O_3)、酸化チタン(TiO_2)、セルロースパウダー(Cellulose)、および β -シクロデキストリン(β -CD)担持ビスマストリフレート触媒をそれぞれ調製した(Figure 1)。

得られた固体担持ビスマス触媒を触媒反応に適用し、触媒能を検討した。具体的には、モデル反応として4-メチルフェノール(1)と植物由来アルコール(プレノール2)を原料とした含酸素ヘテロ環合成について、トルエン溶媒中80℃、1時間の反応条件において、調製した固体担持ビスマス触媒として用いた(Figure 1)。

均一系のビスマストリフレートを触媒として用いた場合、目的化合物2,2,6-トリメチルクロマン(3a)を51%の単離収率で得た(Table 1, entry 1)。調製したシリカゲル担持ビスマストリフレートを触媒として用いた場合、目的物3aの収率は40%であった(Table 1, entry 2)。アルミナ担持ビスマス触媒を用いた場合、目的物は¹H-NMR分析で確認できなかった(Table 1, entry 3)。酸化チタン担持ビスマス触媒を用いた場合、目的環化物を70%単離収率で得ることができた(Table 1, entry 4)。セルロースおよび β -シクロデキストリン(β -CD)担持ビスマス触媒では、反応は進行しなかった(Table 1, entries 5 and 6)。市販の固体酸触媒DOWEX、または酸化チタンのみを用いた場合、目的物は確認できなかった

Table 1. Catalytic Preparation of an *O*-heterocycle **3a** from 4-methylphenol (**1a**) and prenol (**2a**)^a

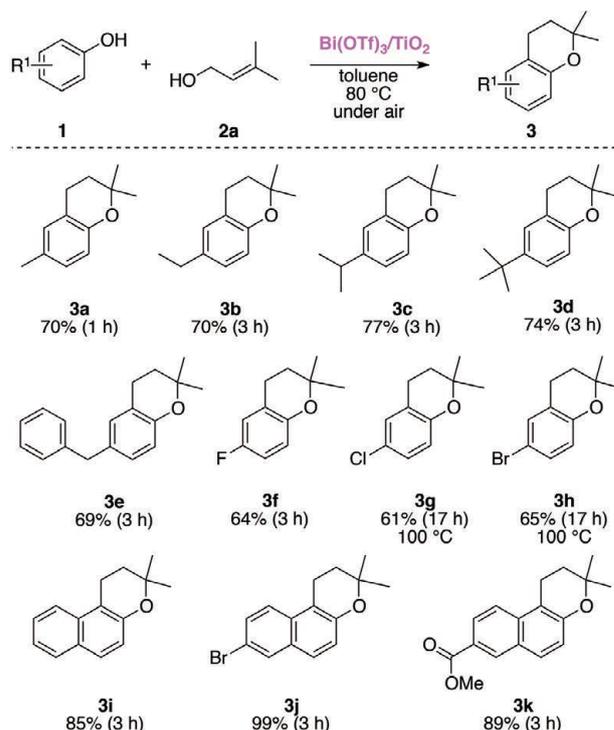


| entry | catalyst (5.0 mol%) | yield of 3 (%) ^b |
|-------|--|------------------------------------|
| 1 | Bi(OTf) ₃ | 51 |
| 2 | Bi(OTf) ₃ /SiO ₂ | 40 |
| 3 | Bi(OTf) ₃ /Al ₂ O ₃ | (< 1) |
| 4 | Bi(OTf) ₃ /TiO ₂ | 70 |
| 5 | Bi(OTf) ₃ /Cellulose | (< 1) |
| 6 | Bi(OTf) ₃ /β-CD | (< 1) |
| 7 | DOWEX | (< 1) |
| 8 | TiO ₂ | (< 1) |

^aReaction conditions : 4-methylphenol **1** (0.10 mmol) and prenol (**2a** : 0.15 mmol) in toluene (0.2 mmol) was stirred at 80 °C for 1 h in the presence of 5.0 mol% of catalyst (based on **1**) under air.
^bisolated yield and NMR yield in parentheses.

た (Table 1, entries 7 and 8)。これらの結果より、酸化チタン担持ビスマストリフレート触媒がフェノールとアリルアルコールを原料とした含酸素ヘテロ環の合成において、有効な不均一触媒であることが示唆された。したがって、不均一触媒としての酸化チタン担持ビスマス触媒の基質汎用性を検討した。すなわち、酸化チタン担持ビスマス触媒存在下、さまざまなフェノール類とプレノールの環化反応について検討した (Scheme 1)。

酸化チタン担持ビスマス触媒存在下、4-エチルフェノールとプレノール (**2a**) をトルエン溶媒中、80 °C、3時間で攪拌した場合、目的環化物6-エチル-2,2-ジメチルクロマン (**3b**) を70%単離収率で得ることができた。同様の触媒反応条件下、4-イソプロピルフェノールおよび4-ターシャリーブチルフェノールを用いた場合も、環化反応は良好に進行し、ヘテロ環化合物**3c**および**3d**をそれぞれ77%と74%単離収率で得た。出発物質として4-ベンジルフェノールを用いた場合、対応するヘテロ環化合物**3e**を69%収率で得た。また、4-フルオロフェノールを用いた場合、同様の反応条件下、目的ヘテロ環化合物**3f**を64%単離収率で得た。一方、4-クロロフェノールと4-ブromoフェノールを出発物質として用いた場合、目的物の収率は3割程度にとどまった。しかしながら、反応温度を80 °Cから100 °Cに上げて17時間攪拌することで、対応するヘテロ環化合物 **3g**、**3h**をそれぞれ61%および65%の収率で得ることができた。原料にナフトール**1i-k**



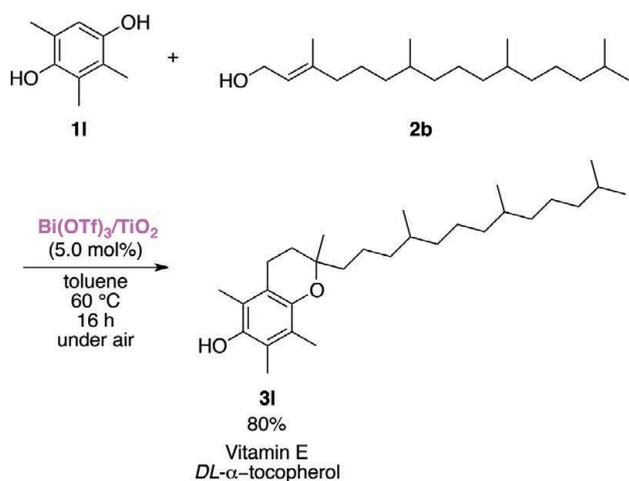
を用いた場合、酸化チタン担持ビスマス触媒存在下、反応温度80 °C、3時間の条件で目的としたヘテロ環化合物**3i-k**を85–99%単離収率で得ることができた。これらの結果より、今回調製した酸化チタン担持ビスマス触媒は、さまざまなフェノール類と植物由来成分プレノールを用いた環化反応に有効であった。

Scheme 1. Cyclization of phenols **1** with prenol (**2a**) in the presence of Bi(OTf)₃/TiO₂ catalyst^a

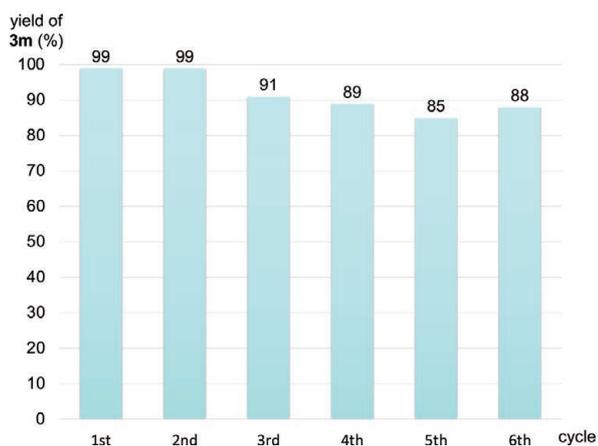
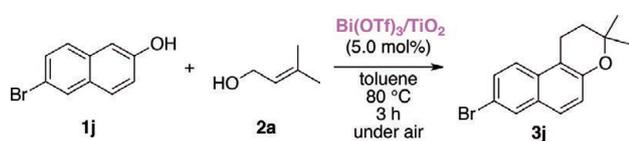
を用いた場合、酸化チタン担持ビスマス触媒存在下、反応温度80 °C、3時間の条件で目的としたヘテロ環化合物**3i-k**を85–99%単離収率で得ることができた。これらの結果より、今回調製した酸化チタン担持ビスマス触媒は、さまざまなフェノール類と植物由来成分プレノールを用いた環化反応に有効であった。

次に、この触媒反応条件のビタミンE合成への適用を試みた。すなわち、酸化チタン担持ビスマス触媒存在下、2,3,5-トリメチルベンゼン-1,4-ジオール (**1l**) と植物由来成分フィトール (**2b**) を用いた環化反応による、ビタミンE (*DL*- α -トコフェノール : **3l**) の一段階合成を検討した (Scheme 2)。この環化反応は、反応温度60 °Cで16時間攪拌することにより良好に進行し、目的ヘテロ環化合物ビタミンE (*DL*- α -トコフェノール : **3l**) を80%の単離収率で得ることができた。したがって、今回調製した酸化チタン担持ビスマス触媒は、長い側鎖を有するアリルアルコールの環化反応にも適用可能であり、良好な収率でビタミンEの一段階合成に成功した。

また、酸化チタン担持ビスマス触媒を用いたヘテロ環



Scheme 2. Cyclization of 2,3,5-trimethylbenzene-1,4-diol (**1l**) with phytol (**2b**) in the presence of $\text{Bi}(\text{OTf})_3/\text{TiO}_2$ catalyst



Scheme 3. Catalyst recycling

合成の回収再利用実験を行なった(Scheme 3)。具体的には、6-プロモナフタレン-2-オール(**1j**)とプレノール(**2a**)を、酸化チタン担持ビスマス触媒存在下、トルエン溶媒中温度80 °C 3時間での反応における触媒の回収再利用実験を行なった。反応後の触媒回収には、遠心分離機を用いた。その結果、最初の実験では99%収率で生成した目的ヘテロ環化合物**3j**は、2回目の再利用でも99%収率で目的物**3j**を得ることができた。回収再利用3回目は91%、4回目は89%、5回目は85%で6回目は88%収率であった。したがって、今回調製した酸化チタン担持ビスマス触媒は、回収再利用が可能であり、脱水反応を伴う環化反応に対しても継続的な効果を発揮でき

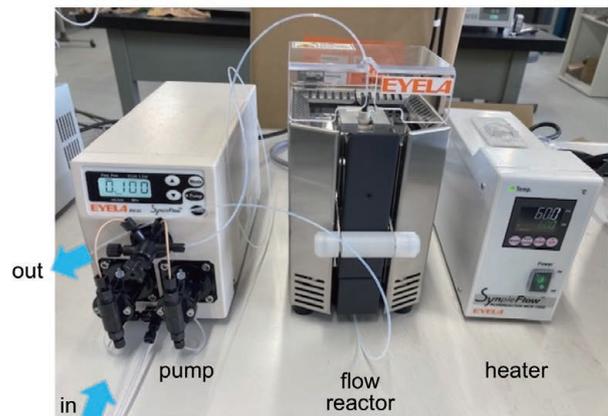
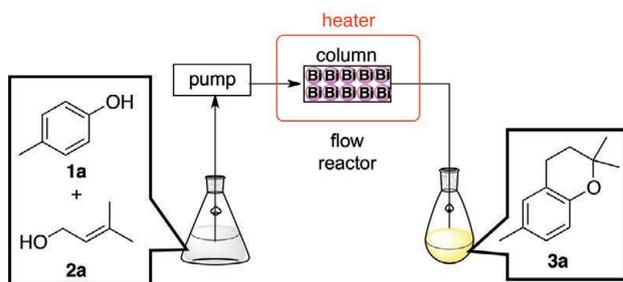
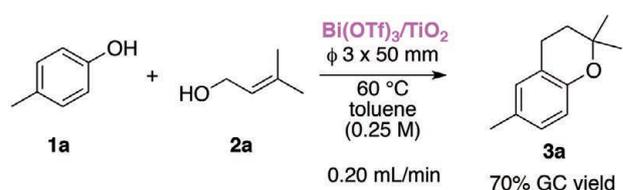


Figure 2. Flow reaction of 4-methylphenol with prenol

ることがわかった。

継続的に利用できることが確認できたため、調製した酸化チタン担持ビスマス触媒のフロー反応への展開を試みた。具体的には、4-メチルフェノール(**1a**)とプレノール(**2a**)のトルエン溶液(0.25mM)を、60 °Cに加熱した酸化チタン担持ビスマス触媒をつめた ϕ 3 x 50 mmのカラムに、流速0.20 mL/minで流し、環化反応を試みた(Figure 2)。その結果、目的ヘテロ環化合物**3**が70%収率で生成していることを確認した。

3. まとめ

新規ビスマス固体担持触媒を調製し、その触媒活性を検討した。調製した固体触媒の中では、酸化チタン(TiO_2)担持ビスマストリフレート触媒が、フェノールと植物由来アリルアルコール(プレノール)を用いた環化反応による含酸素ヘテロ環合成に有効であった。また、同様の反応条件では、ビスマストリフレートのみを用いた均一触媒反応系や市販の固体酸DOWEXを用いた不均一触媒反応系よりも、酸化チタン担持ビスマストリフ

レート触媒が含酸素ヘテロ環合成に有効であった。この酸化チタン担持ビスマストリフレート触媒は、さまざまなフェノール類とプレノールを用いた含酸素ヘテロ環合成に適用することができた。また、植物由来成分フィトールを用いたビタミンEの一段階合成も達成することができた。この酸化チタン担持ビスマストリフレート触媒は、回収再利用が可能であり、収率をあまり損なうことなく、6回のヘテロ環合成に利用することができた。さらに、酸化チタン担持ビスマス触媒による不均一触媒反応系はフロー合成に展開することができ、4-メチルフェノールとプレノールを用いた環化反応により、ヘテロ環化合物を良好な収率で得ることができた。今後は、不均一触媒反応系のさらなる基質汎用性や触媒反応条件の検討、およびフロー反応への展開を行っていきたい。

4. 謝辞

本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団からの研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼

申し上げます。

5. 参考文献

- (1) (a) Minakawa, M.; Watanabe, K.; Toyoda, S.; Uozumi, Y. *Synlett* **2018**, *29*, 2385–2389. (b) Minakawa, M.; Minami, K.; Sato, Y. *Synlett* **2021**, *32*, 1869–1873. (c) Minakawa, M.; Sakurai, Y. *Synlett* **2022**, *33*, 694–698. (d) Minami, K.; Minakawa, M.; Uozumi, Y. *Asian J. Org. Chem.* **2022**, *11*, e202200211.
- (2) (a) Minakawa, M.; Sato, S. *Asian J. Org. Chem.* **2023**, e202300446. (b) Minakawa, M.; Inaba, T.; Oikawa, S. *Synlett* **2025**, *36*, 181–185. (c) Minakawa, M.; Sato, S. *ChemistrySelect* **2025**, *10*, e202501529.
- (3) T. Tsubogo, H. Oyamada, S. Kobayashi *Nature* **2015**, *520*, 329–332.
- (4) Babu, J. L.; Khare, A. Vankar, Y. D. *Molecules*. **2005**, *10*, 884–892

植物バイオマスの飛躍的増産に向けたケミカルバイオロジー

理化学研究所 環境資源科学研究センター
草野 修平

1. 背景と目的

カーボンニュートラルに向けた取り組みが世界各国で進められるなか、植物バイオマスの需要が急速に伸びている [1]。世界の植物バイオマス需要を満たしていくためには、バイオマス生産性の増強が欠かせない。事実、植物の高バイオマス化に向けて、バイオマス増収をもたらす遺伝資源情報の整備を進めて、品種改良によって高バイオマス植物を作出しようとする機運が高まっている [2]。しかし、多層的に制御された複雑な植物の生長機構において、どの工程を狙えば植物を高バイオマス化できるのか、未だ明確な指針は打ち立てられていない。

研究代表者はこれまで、バイオマス増産に向けた有望な指針を化合物に見出してきた。すなわち、イネの表現型スクリーニングを通じて、イネの収量を約30%も向上させる化合物Aの同定に成功した(図1A)。また特筆すべきは、化合物Aは、イネの他にアブラナ科やマメ科にも同様の効果をもたらす点である。つまり、化合物Aの作用機構を解明できれば、あらゆる作物種のバイオマス生産性強化につながる画期的な作物設計指針を同定できる可能性が高い。上記背景を踏まえて、本研究では独自に見出してきた化合物Aを起点に、その作用機構解明研究を通じて、植物生長の未知なる分子機構に切り込み、植物のバイオマス生産性を引き出すための糸口を探ることとした(図1B)。

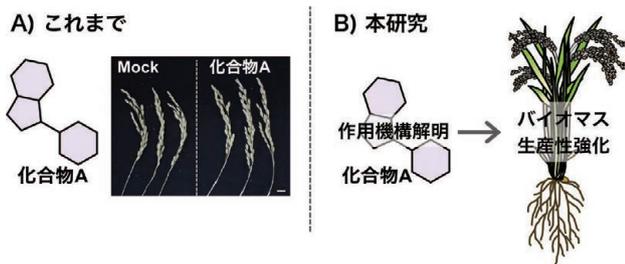


図1. 本研究の概要

2. 結果と考察

2-1. 標的候補タンパク質の同定

化合物Aの作用機構解明に向けて、まず植物内における化合物Aの作用点となる標的タンパク質の同定から着手した。標的タンパク質の同定には、一般的な研究手法であるアフィニティ法を採用した [3]。すなわち、化合物Aをビーズ上に固定化したアフィニティプローブを作成し、イネ抽出物の中からビーズ上に結合するタンパク質を分離し、質量分析によって同定するという方法である(図2)。はじめに、アフィニティプローブを作成するべく、構造活性相関解析を実施し、化合物A本来の生物活性に干渉しない官能基修飾位置を決定した。この情報を踏まえて、リンカーを介して固相担持の足掛かりとなるアミノ基を導入した化合物Aの誘導体を合成した

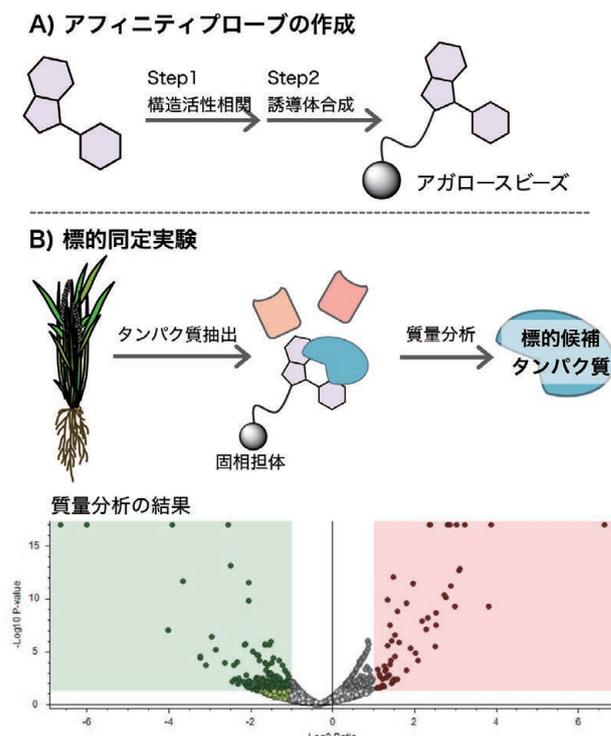
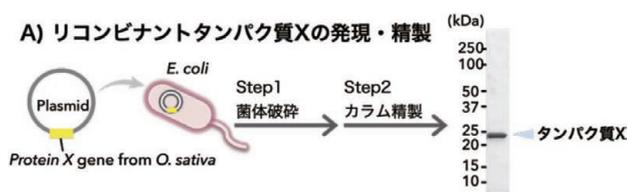


図2. 標的タンパク質の同定実験

[4]。これをアガロースレジン上へ縮合反応によって担持することで、標的特定用のアフィニティプローブを作成した(図2A)。本プローブを用いて標的特定実験を進めた。具体的には、播種後10日目のイネ(日本晴)からタンパク質を抽出し、上記のプローブに結合するタンパク質のon-beadトリプシン消化した後、得られたペプチド断片を液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)によって解析した(図2B)。その結果、有力な標的候補として分子サイズ約24 kDの機能未知タンパク質Xを特定することに成功した(論文未発表であるため、タンパク質Xに関する詳細の記載は控える)。相同性解析の結果、タンパク質Xは植物種を超えて広く保存された酵素であることも明らかになった。

2-2. in vitroにおけるタンパク質Xの機能解析と化合物Aの作用様式の検討

機能未知であるイネ由来タンパク質Xの酵素機能を検証するべく、in vitroにおいて酵素活性試験を実施した。本実験に必要となるリコンビナントタンパク質は、大腸菌を宿主として発現させ、大量かつ高純度に得ることができた(図3A)。酵素活性試験を実施した結果、他の植物種で報告されているように、イネ由来タンパク質Xにも同様の酵素活性が確認された(図3B)。続いて、タンパク質Xに対する化合物Aの作用効果を検討した。化合物Aの存在下/非存在化において酵素活性評価試験を実施したところ、化合物Aはタンパク質Xの阻害剤として機能することが明らかとなり、そのIC₅₀値は0.5 μM程度



B) 酵素活性試験

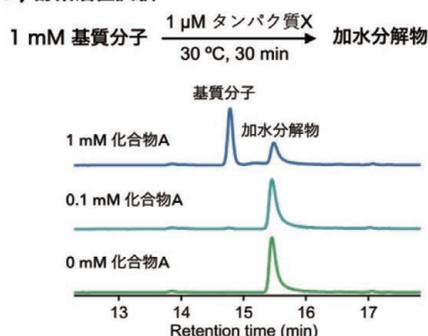


図3. 酵素活性試験

であった。

2-3. 植物内における化合物Aの阻害活性の検証

in vivo(植物)においても化合物Aはタンパク質Xを阻害し得るのか検証するべく、タンパク質Xの基質分子の定量実験を実施した。すなわち、in vivoにおいても化合物Aがタンパク質Xの阻害剤として機能するのであれば、植物中のタンパク質Xの基質分子の量が増加すると考えた。基質分子の定量は、LC-MS/MSによって行った[5]。図4に示すように、化合物A処理した植物では未処理の植物と比較して、基質量が約1.4倍増加することが明らかとなった。この結果を踏まえて、イネ中で増加した基質が下流の遺伝子発現に摂動を与えているのではないかとこの仮説のもと、化合物Aおよび基質分子を処理したイネの遺伝子発現解析を実施した。予備的ではあるが、化合物Aと基質分子処理時に同じ遺伝子群の発現量が上昇することが確認できた。これらの結果は、タンパク質Xが化合物Aの有力な標的候補であることを強く支持するものと考えている。

3. まとめ

本研究では、ケミカルバイオロジーの手法を駆使して、植物バイオマスの増産に向けた新知見を得ることを目指した。本研究に先立って見出してきた化合物Aを研究基盤として、イネにおける化合物Aの作用機構解明を進めた。その結果、化合物Aの有力な作用標的候補として、タンパク質(酵素)Xを特定することに成功した。リコンビナントタンパク質Xを用いたin vitroでの酵素活性の結果から、化合物Aはタンパク質Xの阻害剤であることが明らかになった。加えて、化合物Aはin vivoにおいてもタンパク質Xを阻害し、その結果蓄積する基質分子が下流の遺伝子発現に摂動を与えていることが示唆され

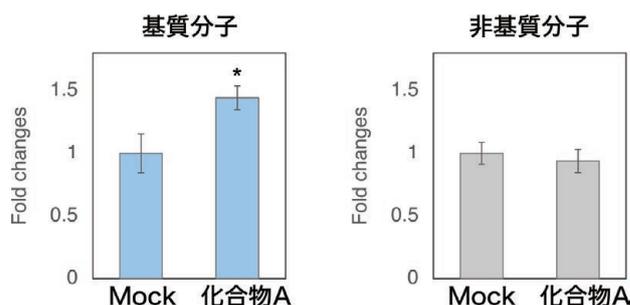


図4. 基質分子の定量実験. ±SE, n = 6, p<0.05

た。以上の結果を統合して、タンパク質Aがイネの生長制御に関わる新規因子である可能性が高いと考えている。またタンパク質Xをコードする遺伝子は、植物種を超えて広く保存されている。タンパク質Xの機能解明はあらゆる作物種のバイオマス増産に繋がる可能性を秘めているかもしれない。今後、ゲノム編集技術を用いたタンパク質Xの機能欠損変異体の作出等、化合物Aの作用機構解明、タンパク質Xの機能解明に向けてさらなる検証を進めていく。

4. 謝辞

本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団からの支援を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

5. 参考文献

- [1] Henry R. J. (2010): Evaluation of plant biomass resources available for replacement of fossil oil. *Plant Biotechnol. J.*, 8, 288-293.
- [2] Long S. P., Marshall-Colon A., Zhu X. G. (2015): Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell*, 161, 56-66.
- [3] Schenone M, Dancík V., Wagner B. K., Clemons P. A. (2013): Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat. Chem. Biol.*, 9, 232-240.
- [4] Chen X., Wang Y., Ma N., Tian. J., Shao Y., Zhu B., Wong Y. K., Liang Z., Zou C., Wang J. (2020): Target identification of natural medicine with chemical proteomics approach: probe synthesis, target fishing and protein identification. *Sig Transduct. Target. Ther.* 5, 72.
- [5] Liu Z., Rochfort S. (2014): Recent progress in polar metabolite quantification in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Integrative Plant Biol.*, 56, 816-825

植物の腺性毛状突起で高付加価値テルペノイドを生合成する

筑波大学 生命環境系
木下 奈都子

本報告では、生育地及び適応環境が異なる複数のユーカリ (Ep) 属樹種におけるテルペン合成酵素の配列比較、および機能的アミノ酸残基の構造的保存性について解析した。特にEpのテルペン合成酵素を中心に、同族酵素群との比較配列解析、機能部位の保存性、立体構造モデルの相同性比較に基づいて、各種ユーカリ属の触媒特性の共通性と多様性を明らかにした。

さらに、植物での発現には大腸菌での発現とコンストラクトの構築、アグロバクテリウムでの発現を介して植物細胞での発現が達成されるが、今回、ユーカリのテルペン合成酵素は大腸菌での発現に適しないことが判明した。この点に関しても、議論する。

最後に、毛状突起という閉鎖された空間で、高濃度で分泌して精製することを最終的な目的としている点に関して、外からの刺激で更に高濃度で蓄積させる手法に関する解析を行った。

配列比較からは、59-70番のRRSANYKPNVW配列がGPP (geranyl diphosphate) からLPP (linalyl diphosphate) への異性化を誘導する重要なモチーフであることが確認された。この配列はEpおよび他のEucalyptus種において高い保存性を示しており、異性化反応の共通基盤を担っていることが示唆される。また、 Mg^{2+} クラスターの補助結合に関与するDEARモチーフ (274-277) や、主金属クラスターDDXXDの一部であるIDDVY (314-318)、疎水性ポケットの形成に寄与するFWNCAMVFEPQYTA (336-349) は、いずれも構造的・機能的保存性が高く、酵素の立体構造を安定化させ、炭化水素骨格の誘導反応に寄与していると考えられる。さらにC末端付近のARGDNFK (~490) などはFGPPリン酸基との直接的な相互作用が予想され、これらの部位の種間変異が基質選択性や生成物分布に影響を与えている可能性がある。

立体構造モデルとの照合では、Mentha spicataの (4S)-limonene synthaseのPDBデータ (2ONG) およびAlphaFoldによる予測構造と比較することで、ユーカリ属TPSにおける保存された構造ドメインの同定が可能となった。特にC末端に位置するR495に相当する残基が、リガンド認識や触媒部位の精密な調整に関与している可能性があることが示唆された。R495近傍は疎水性ポケット形成やリン酸基との静電的相互作用を担うと考えられ、活性中心のダイナミクスに寄与していると予測される。

このような保存ドメインと変異領域の並存は、テルペン骨格の多様性と進化的適応性を反映していると考えられ、種ごとの代謝産物の差異にも直結する。今後は、これらの部位に対する部位特異的異導入による機能検証や、*in vitro* 酵素活性試験と組み合わせた解析により、より詳細な構造機能相関が明らかになることが期待される。

以上の比較解析により、Epに特異的な合成酵素が、複数のEucalyptus種にわたって保存された機能ドメインを持つ一方で、C末端近傍における残基の違いにより、各種酵素の触媒特性に差異が生じる可能性が示唆された。これらの知見は、テルペン合成酵素の構造と機能の相関解析において重要な情報となるだけでなく、工業的な応用に向けた酵素改変や品種選抜のターゲットとしての基盤となる。

植物由来のテルペン合成酵素、とくにユーカリ属のものは、大腸菌 (*Escherichia coli*) における発現が一般に困難であることが知られている。主な要因として以下の点が挙げられる。

第一に、コドン使用の最適化の不一致がある。植物と大腸菌では翻訳に利用されるtRNAの頻度が異なるため、植物由来遺伝子のままでは発現効率が低下すること

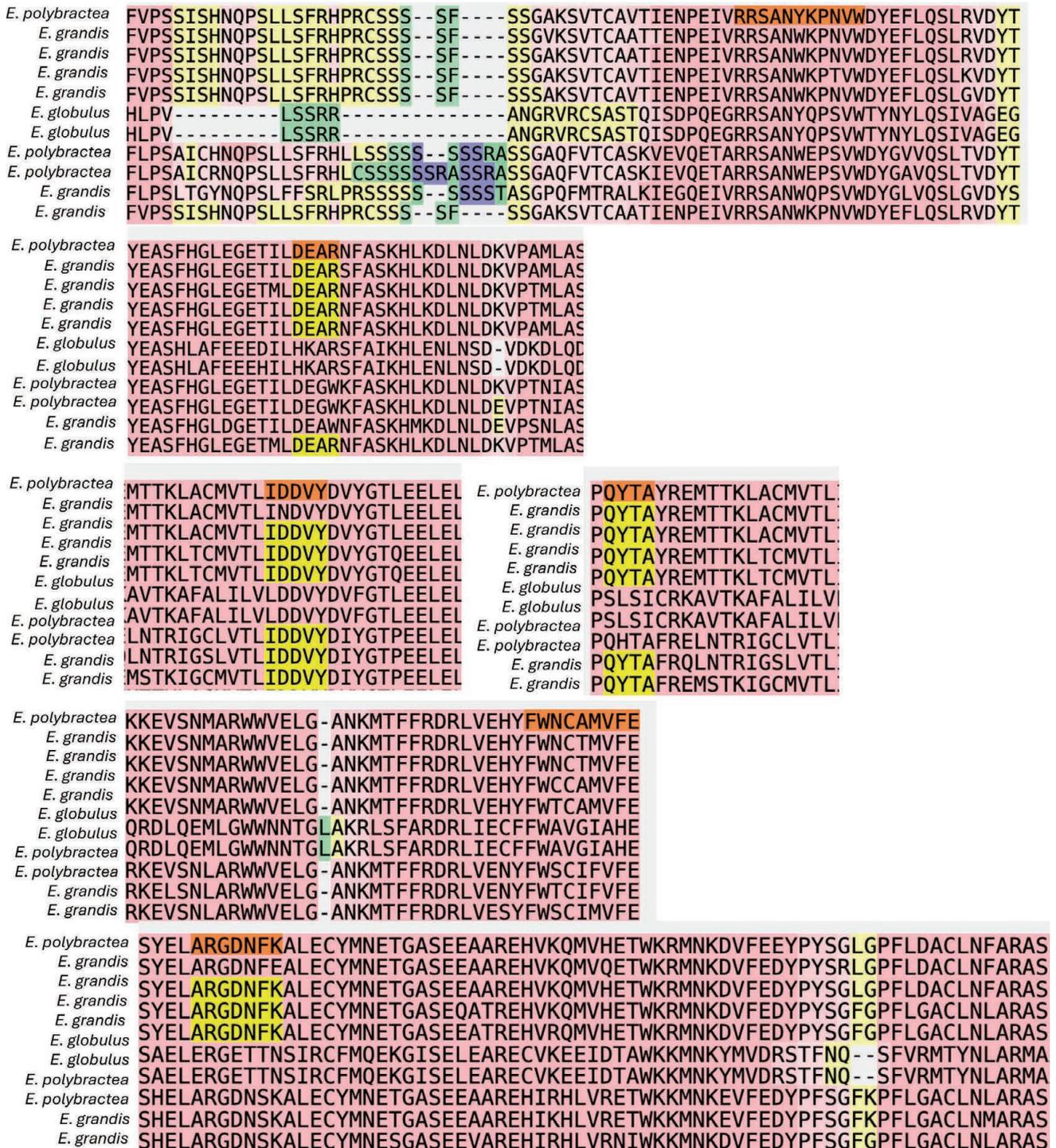


図1 ユーカリの異なる種におけるテルペン合成酵素のアミノ酸配列の保存性

アラインメント図および機能残基分布

RRSANYKPNVWなど、GPPからLPPへの異性化誘導に関わる残基の保存性とMg²⁺クラスター補助結合(DEAR)、疎水性ポケット(FWNCAMVFE/PQYTA)、主金属クラスター(IDDVY)などの位置

が多い。とくにAGGやAGAなどの希少コドンは大腸菌で十分に供給されず、リボソームの停止や読み枠ずれを引き起こす原因となる。

第二に、タンパク質の立体構造形成(フォールディング)と翻訳後修飾の違いが挙げられる。テルペン合成酵素は多くが高い疎水性領域を持ち、正しい構造形成には

植物細胞の特異なシャペロンや小胞体などの分子環境が必要である。大腸菌にはこれらの補助因子が存在しないため、合成されたタンパク質は不溶性のインクルージョンボディとして沈殿することが多く、可溶性かつ活性型としての発現が難しい。

第三に、TPS酵素の多くは金属イオン(Mg²⁺やMn²⁺)

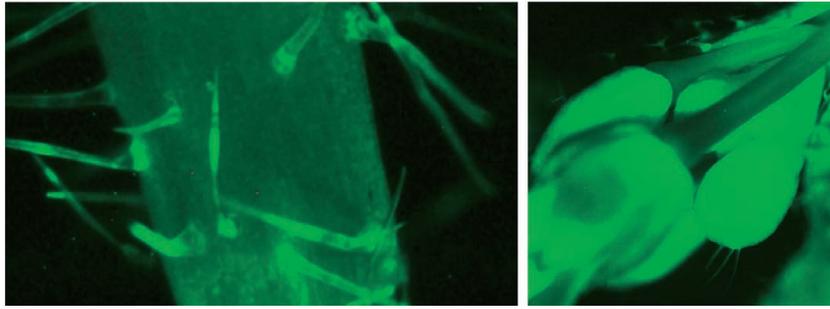


図2 揮発性有機化合物への暴露による毛状突起での高付加価値化合物の効率の良い生合成及び蓄積法の開発
左：茎における毛状突起での蛍光シグナルの発現、右：花芽における蛍光シグナルの蓄積

を補因子として必要とし、また疎水性の基質(例：geranyl diphosphate, farnesyl diphosphate)を受容するため、適切な補因子環境や膜状構造を持たない大腸菌では活性を持った形での発現が困難となる。これに加えて、テルペン類は大腸菌にとって細胞毒性を持つことも多く、細胞死や代謝抑制を引き起こす可能性も否定できない。

加えて、特徴的なN末端側のシグナル配列(例：plastid targeting signal)がタンパク質の発現や安定性を阻害することもある。この配列は植物細胞での小器官局在を担っているが、大腸菌では不要であり、逆に翻訳の効率低下や誤フォールディングの原因となる。

これらの課題に対処するためには、コドン最適化、N末端配列の除去、融合タンパク質化(例：MBP, GSTタグ)、シャペロン共発現、低温誘導発現系の利用、あるいは植物由来の細胞フリータンパク質合成系(wheat germ systemなど)の利用が必要である。

今後の展望としては、特定残基の部位特異的変異導入による活性変化解析や、組換え発現による精密な機能解析を通じて、性合成酵素の構造機能相関を明らかにする必要がある。また、テルペン合成系の合成生物学的应用、特に高収量化や新規化合物の創出を目指した酵素工学的アプローチにも、本研究の知見は有用であると考えられる。

最後に、植物体内で高付加価値な二次代謝物(例：精油成分やテルペン類)を効率的かつ局所的に蓄積・分泌させる方法の開発を目指し、その誘導因子として揮発性アルデヒド類の応用可能性を検討した。特に、本手法の適用対象として、代謝産物を濃縮・分泌する構造である毛状突起に注目し、刺激による形態学および機能的応答の可視化と評価を行った。

アルデヒド類を植物体に短時間暴露した後、蛍光イメージングにより代謝応答を観察した結果、茎や葉の表面に存在する毛状突起において強い蛍光シグナルが局所的に蓄積していることが確認された。この蛍光は、代謝物が細胞内で蓄積していること、あるいは細胞外への分泌が起こっていることを示唆する。特に、トリコームの先端や基部など、構造的に輸送や蓄積が期待される部位で蛍光が集中的に検出されたことから、細胞内の小胞輸送や膜輸送活性の変化が関与している可能性がある。

興味深いことに、毛状突起先端からの蛍光物質の滲出も観察された。これは、外的刺激によって代謝産物が蓄積されるだけでなく、能動的な分泌反応が誘導されていることを示すものであり、トリコームが単なる貯蔵器官ではなく、化学的防御や分泌型生合成拠点としての役割を果たすことができる可能性を示唆する。

さらに重要なのは、茎葉部だけでなく花芽においても明瞭な蛍光シグナルが観察された点である。これらのシグナルが毛状突起由来のものか、それとも花卉、雌蕊、雄蕊、あるいは花粉など、花器官の代謝的活性部位に由来するものかは未確定であるが、花部にも高い代謝反応性がある可能性が示された。とくに、トリコームと同様の局所的な蓄積能が花卉などの器官に存在する場合、毛状突起に比べてより面積が大きく、処理が容易な花卉で化合物を回収する戦略が新たな選択肢となる。これは、植物の生産部位として花器官を活用するという新たな応用の可能性を開くものである。花は容易に切り取ることができ、植物本体を傷つけずに非破壊的かつ選択的な回収が可能であり、工業的応用においても操作性と再現性に優れる。

さらに、白色光下での連続観察では、毛状突起様の新たな突起構造が形成され、それが破裂・崩壊して内部内

容物を放出する様子が明瞭に確認された。この現象は、化学刺激が既存の分泌構造に蓄積を誘導するだけでなく、トリコームの新生そのものを誘導していることを示すものであり、細胞分裂や分化プログラムの再活性化が関与している可能性がある。加えて、破裂型の放出機構は、細胞壁リモデリングや細胞内圧の制御といった応答を介して、分泌能を構造的に増強する戦略の一部である可能性も考えられる。このように、アルデヒドによる刺激は、代謝物蓄積、分泌能活性化、構造新生という三重の応答を同時に誘導しうる極めて強力な外因性調節因子であることが明らかとなった。

以上の結果から、揮発性アルデヒド類は、植物体内において毛状突起および花器官の二次代謝活性を高め、目的とする高付加価値化合物の蓄積と分泌を空間的に制御可能とする新たな化学刺激手法として、十分な可能性を有することが示された。今後は、観察された蛍光蓄積がどのような化学物質に由来するかを明らかにするため、質量分析やクロマトグラフィー等を用いた定性・定量分析が必要である。また、刺激条件(アルデヒドの種類・濃度・暴露時間)の最適化、植物種の選定、さらにはトリコーム形成能の品種間比較などを通じて、本手法を汎用性のある生産誘導技術として確立していくことが期待される。

トリコームからの揮発性有機化合物は実際、害虫からの被害によってその生合成が活性化され、周辺の植物はこの揮発性有機化合物を認識すると免疫反応が活性化する。この揮発性有機化合物にはアルデヒドも含まれている。周辺での植物のトリコームに高付加価値性の揮発性有機化合物が蓄積している可能性は十分にある。実際、

これら2次的に揮発性有機化合物を感受した植物は害虫からの被害に関して耐性を示すこともこの可能性を示唆している。この植物群全体における揮発性有機化合物の放出と生産の可視化はメディアでも広く取り上げられた。例えば、2023年には、NHKのアメリカ版ストーリーミングサービス、Curiosity StreamでNatures Hidden Miracles Episode 1でも紹介された。このドキュメンタリーは、第64回科学技術映像祭において内閣総理大臣賞も受賞した。さらに、2024年には、講談社のムック植物新訂版(動く図鑑MOVE)で取り上げられ、Amazonではカテゴリー内のベストセラーになっている。この研究結果をフランス政府によるExploration Franceで採択され、パリ高等師範学校(Ecole Normale Supérieure Paris)とソルボンヌ大学で招待公演を行った(2023年)。この技術は、大学見本市「イノベーションジャパン」(2023)で好評を得たのみでなく、米国農学学会(Agriculture Society of America)(2023)や農研機構(農業・食品産業技術総合研究機構)(2024年)でも研究発表を行なった。また、茨城テックプランターでファイナリスト(2023)となり、得られた画像は在日フランス大使館の在日フランス大使館第4回サイエンスフォトコンテスト「科学の幽玄-Beauté Cachée de la Science」で、ファイナリスト並びに、Prix du Public(観客賞)(2024)を受賞した。日本未来館では、第1回から第4回までのサイエンスフォトコンテスト科学の幽玄-Beauté Cachée de la Scienceの作品から選ばれた10作品の一つとして展示された。このように、学術面でも、一般市民に対するアウトリーチでの貢献も期待できる成果が得られた。

植物由来ヒスチジンリッチ分子を活用した植物機能改変技術の開発

鳥取大学 農学部
岩崎 崇

1. 研究背景・目的

脱炭素社会の構築は喫緊の課題であり、全球規模でその実現が声高に叫ばれている。脱炭素社会を実現する鍵のひとつとして「植物の品種改良」が挙げられる。品種改良によって植物の成長速度やバイオマスを強化し、栽培しやすい品種を作出することで、大気中のCO₂吸収を促進し、再生可能エネルギーの増産を実現することができる。しかし、遺伝子組換え技術に依存した従来の品種改良法では、国内における社会的受容の低さや、社会実装までに長い時間を要するといった課題が存在する。そこで本研究では、迅速な脱炭素社会の構築を目指し、植物を迅速に品種改良する「植物機能改変技術」の技術基盤の開発を目指す。

具体的には、古典的な育種法(交配や遺伝子組換えによる品種改良)に代わる新しい高速育種法として、「非遺伝子組換えゲノム編集技術」を利用した植物の育種法を開発する。ゲノム編集酵素(タンパク質)を植物細胞内へ直接かつ効率的に導入することで、遺伝子組換えを使わずに、植物細胞の性質を自在に改良する技術を創出する。この手法を実現するために、本研究では、植物細胞内にタンパク質を効率的に輸送することができるタンパク質輸送キャリアーの探索・開発を目的とする。

本研究では、タンパク質輸送キャリアーとしてヒスチジンを高度に含有するヒスチジンリッチペプチド/タンパク質(Histidine-rich peptide/protein: HRP)に着目した。これまでに我々は、ヒスチジンのみを連続して人工合成したHRP(人工HRP)が植物細胞に対するタンパク質輸送キャリアーとして有効であることを報告している(図1)^[1]。人工HRPの中でも、ヒスチジンが20残基連続したH20配列を融合したタンパク質は、さまざまな植物細胞の細胞壁と細胞膜を通過して細胞内へ取り込まれる

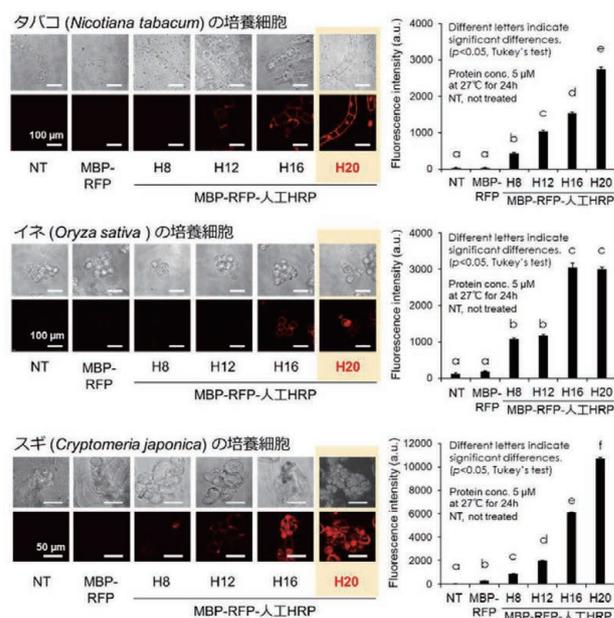
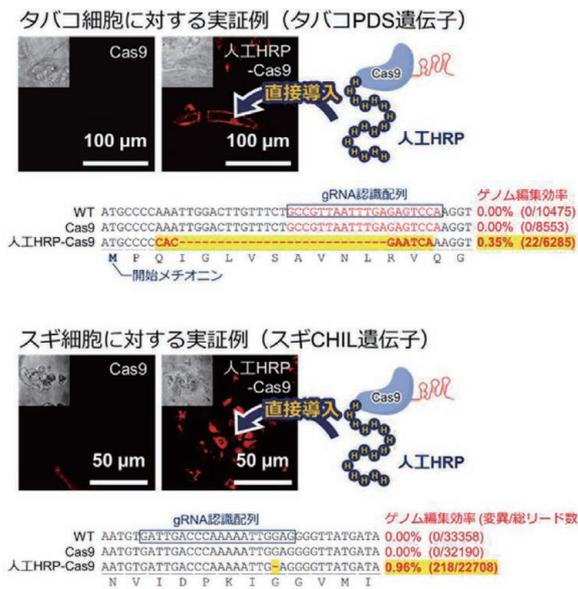


図1. 植物細胞に対する人工HRPの分子輸送能

ことから、人工HRPであるH20配列は植物細胞に対する有力なタンパク質輸送キャリアーである。

さらに我々は、この人工HRP(H20配列)をゲノム編集酵素に融合することで、遺伝子組換えを使わずに植物細胞をゲノム編集する「非遺伝子組換えゲノム編集技術」の概念実証に成功している(国際出願PCT/JP2021/046845)(図2)。しかし、上記技術はゲノム編集効率が低いため、実用化には至っていない。その原因として、上記技術は人工HRPを利用しているため、植物細胞のHRP取込み機構の本来のポテンシャルを存分に引き出せていない(人工HRPでは植物細胞のHRP受容体との結合親和性が不十分である)可能性が挙げられる。上記技術を実用化レベルにまで改善するために、植物細胞のHRP取込み機構の本来のリガンド(植物由来の天然HRP)を利用する必要がある。



PCT/JP2021/046845 細胞膜透過ペプチドを利用した遺伝子組換えに頼らない植物ゲノム編集技術

図 2. 人工HRPを利用した非遺伝子組換えゲノム編集技術

そこで、本研究では、「高い分子輸送能を有する植物由来の天然HRPを探索し、ゲノム編集酵素の輸送キャリアーとして利用する」ことを目指し研究開発を行った。

2. 研究方法

2.1. 生化学的手法による天然HRPsの探索

モデル植物であるタバコ *N. tabacum* に内在する天然HRPsに着目し、生化学的なアプローチにより高いタンパク質輸送能を有する天然 HRPを探索し、その同定を試みた。タバコの植物組織からタンパク質抽出画分を調製した。次いで、Niイオン固定化カラムを用いたアフィニティー精製により、ヒスチジンを高度に含有する天然HRPs画分を得た。この天然HRPs画分をBiotin標識し、タバコ培養細胞に添加することで、Biotin標識天然HRPsを細胞内へ取り込ませた。その後、タバコ細胞の細胞壁を除去し(プロトプラスト化し)、細胞破碎液をAvidinカラムにてアフィニティー精製することで、細胞内に取り込まれたBiotin標識天然HRPsを回収した。上記にて得られたBiotin標識天然HRPs画分をLC-MS/MS質量分析によりアミノ酸配列を決定し、分子輸送キャリアーとして利用可能な天然HRPsの同定を試みた(図3)。

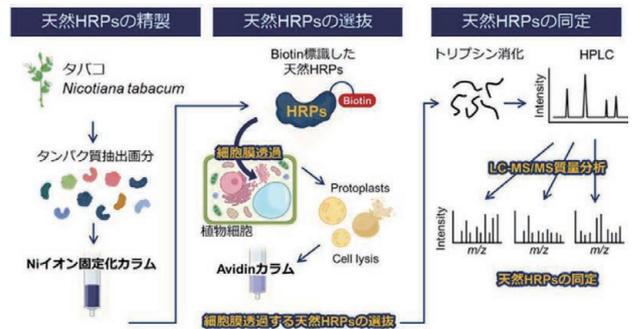


図 3. 生化学的手法による天然HRPsの探索方法

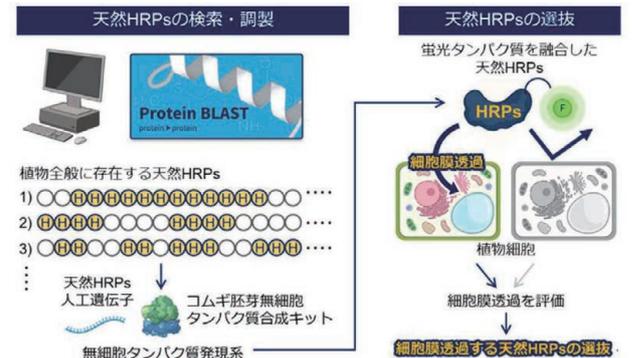


図 4. BLAST検索による天然HRPsの探索方法

2.2. BLAST検索による天然HRPsの探索

植物全般に存在する複数の天然HRPsに着目し、バイオインフォマティクス解析と生化学的アプローチにより高いタンパク質輸送能を有する天然 HRPを探索し、その同定を試みた。NCBI Protein BLAST検索により、植物全般に存在する天然HRPsのアミノ酸配列情報を得た。これら天然HRPsをコードする人工遺伝子を合成し、無細胞タンパク質発現系により、蛍光タンパク質を融合した天然HRPsを調製した。上記にて得られた「蛍光タンパク質を融合した天然HRPs」を、さまざまな植物細胞に添加し、天然HRPsの細胞内取込みを定量した。人工HRPと比較をすることで、人工HRPを超える細胞膜透過能を有する天然HRPs(分子輸送キャリアーとして利用可能な天然HRPs)の同定を試みた(図4)。

3. 結果・考察

本研究では、下記の二通りのアプローチにより、植物に存在する複数の天然HRPsの中から、タンパク質(ゲノム編集酵素)の効率的な輸送キャリアーとして利用可能な分子を探索した。それぞれの結果を示す。

3.1. 生化学的手法による天然HRPsの探索

タバコ *N. tabacum* に内在する複数の天然HRPsをアフィニティー精製により回収し、Biotin標識した後に、タバコ培養細胞に対してBiotin標識天然HRPsを取り込ませた。次いで、Biotin標識天然HRPsを添加していない未処理細胞と、Biotin標識天然HRPsを取り込ませた細胞をそれぞれ破碎し、Avidinカラムを用いて膜透過を示すBiotin標識天然HRPsを回収した。その結果、未処理細胞由来のControl画分とBiotin標識天然HRPsを処理した細胞由来の天然HRPs画分から、それぞれ1668.2 μg と2034.1 μg のタンパク質を検出した(図5)。この結果から、両者の差である365.9 μg が細胞膜透過を示

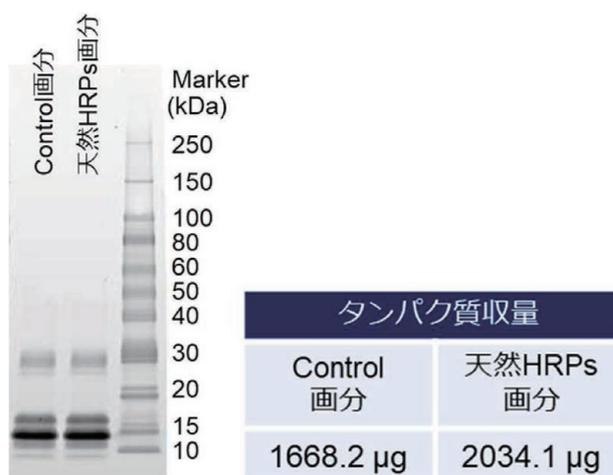


図5. 生化学的手法による天然HRPsの探索結果

表1. BLAST検索による天然HRPsの探索結果

| mRuby3-HRP # | Species | # of AA | # of His | % of His | 相対的な細胞膜透過 {人工HRP (H20) を1.00とした場合} | | | |
|----------------|---------------------------------|------------|-----------|--------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| | | | | | タバコ <i>N. tabacum</i> | オオムギ <i>H. vulgare</i> | イネ <i>O. sativa</i> | スギ <i>C. japonica</i> |
| FLAG | - | - | - | - | 0.24 ± 0.00 | 0.22 ± 0.02 | 0.16 ± 0.01 | 0.08 ± 0.00 |
| 人工HRP (H20) | - | - | - | - | 1.00 ± 0.05 | 1.00 ± 0.05 | 1.00 ± 0.01 | 1.00 ± 0.02 |
| HRP1 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 196 | 32 | 16.3% | 0.46 ± 0.01 | 0.48 ± 0.01 | 0.59 ± 0.02 | 0.40 ± 0.01 |
| HRP2 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 172 | 22 | 12.8% | 0.49 ± 0.01 | 0.31 ± 0.02 | n.d. | n.d. |
| HRP3 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 178 | 22 | 12.4% | 0.80 ± 0.02 | 0.66 ± 0.04 | 0.70 ± 0.01 | 0.44 ± 0.01 |
| HRP4 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 334 | 38 | 11.4% | 0.17 ± 0.01 | 0.25 ± 0.03 | n.d. | 0.24 ± 0.01 |
| ▶ HRP5 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 212 | 22 | 10.4% | 1.61 ± 0.01 | 1.17 ± 0.06 | 2.61 ± 0.01 | 2.37 ± 0.84 |
| HRP6 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 881 | 87 | 9.9% | 0.44 ± 0.01 | 0.24 ± 0.02 | 0.23 ± 0.01 | 0.42 ± 0.01 |
| HRP7 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 593 | 50 | 8.4% | 0.64 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.42 ± 0.01 |
| HRP8 | <i>Hordeum vulgare</i> | 96 | 21 | 21.9% | 0.10 ± 0.01 | 0.50 ± 0.02 | 0.23 ± 0.01 | 0.27 ± 0.01 |
| HRP9 | <i>Hordeum vulgare</i> | 318 | 36 | 11.3% | 0.19 ± 0.01 | 0.25 ± 0.03 | n.d. | n.d. |
| HRP10 | <i>Hordeum vulgare</i> | 301 | 28 | 9.3% | 0.28 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.15 ± 0.01 |
| HRP11 | <i>Hordeum vulgare</i> | 797 | 73 | 9.2% | 0.24 ± 0.01 | 0.14 ± 0.01 | n.d. | n.d. |
| HRP12 | <i>Hordeum vulgare</i> | 485 | 39 | 8.0% | 0.21 ± 0.01 | 0.18 ± 0.04 | n.d. | 0.16 ± 0.01 |
| HRP13 | <i>Hordeum vulgare</i> | 752 | 58 | 7.7% | 0.15 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.41 ± 0.01 |
| HRP14 | <i>Hordeum vulgare</i> | 509 | 37 | 7.3% | 0.39 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.55 ± 0.01 |
| HRP15 | <i>Hordeum vulgare</i> | 726 | 47 | 6.5% | 0.48 ± 0.01 | 0.23 ± 0.01 | 0.24 ± 0.01 | 0.30 ± 0.02 |
| ▶ HRP16 | <i>Oryza sativa</i> | 137 | 44 | 32.1% | 1.90 ± 0.03 | 1.48 ± 0.02 | 1.40 ± 0.03 | 2.83 ± 0.05 |
| HRP17 | <i>Oryza sativa</i> | 118 | 35 | 29.7% | 0.96 ± 0.03 | n.d. | 0.27 ± 0.01 | 0.40 ± 0.01 |
| ▶ HRP18 | <i>Oryza sativa</i> | 235 | 35 | 14.9% | 1.43 ± 0.01 | 1.95 ± 0.01 | 2.13 ± 0.01 | 2.22 ± 0.01 |
| HRP19 | <i>Oryza sativa</i> | 342 | 49 | 14.3% | 0.37 ± 0.01 | 0.29 ± 0.04 | n.d. | 0.89 ± 0.02 |
| HRP20 | <i>Oryza sativa</i> | 285 | 34 | 11.9% | 0.13 ± 0.01 | 0.23 ± 0.01 | n.d. | 0.16 ± 0.01 |
| HRP21 | <i>Oryza sativa</i> | 800 | 75 | 9.4% | 0.17 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.35 ± 0.01 |
| HRP22 | <i>Panicum miliaceum</i> | 382 | 31 | 8.1% | 0.16 ± 0.01 | 0.09 ± 0.01 | n.d. | 0.40 ± 0.02 |
| HRP23 | <i>Vigna unguiculata</i> | 130 | 27 | 20.8% | 0.58 ± 0.02 | 0.63 ± 0.03 | 0.45 ± 0.01 | 0.40 ± 0.01 |
| HRP24 | <i>Vigna unguiculata</i> | 308 | 35 | 11.4% | 0.31 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01 | n.d. | 0.32 ± 0.01 |
| HRP25 | <i>Vigna unguiculata</i> | 408 | 40 | 9.8% | 0.59 ± 0.02 | n.d. | 0.25 ± 0.01 | 0.47 ± 0.01 |
| HRP26 | <i>Arachis duranensis</i> | 519 | 31 | 6.0% | 0.45 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.46 ± 0.01 |
| HRP27 | <i>Prosopis cineraria</i> | 523 | 35 | 6.7% | 0.44 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.27 ± 0.01 |
| HRP28 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 684 | 46 | 6.7% | 0.50 ± 0.02 | n.d. | 0.28 ± 0.01 | 0.65 ± 0.01 |
| HRP29 | <i>Brassica napus</i> | 567 | 120 | 21.2% | 0.31 ± 0.01 | n.d. | n.d. | n.d. |
| HRP30 | <i>Brassica napus</i> | 535 | 44 | 8.2% | 0.37 ± 0.02 | n.d. | n.d. | n.d. |
| HRP31 | <i>Gossypium raimondii</i> | 463 | 30 | 6.5% | 0.62 ± 0.01 | 1.01 ± 0.06 | 0.53 ± 0.02 | 0.42 ± 0.01 |
| HRP32 | <i>Hibiscus trionum</i> | 535 | 41 | 7.7% | 0.51 ± 0.02 | n.d. | 0.16 ± 0.01 | 0.44 ± 0.01 |
| HRP33 | <i>Theobroma cacao</i> | 748 | 42 | 5.6% | 0.52 ± 0.01 | n.d. | 0.26 ± 0.01 | 0.66 ± 0.01 |
| HRP34 | <i>Populus alba</i> | 517 | 30 | 5.8% | 0.27 ± 0.01 | 0.29 ± 0.01 | n.d. | n.d. |
| HRP35 | <i>Spirodela intermedia</i> | 113 | 49 | 43.4% | 0.25 ± 0.01 | 0.18 ± 0.01 | n.d. | n.d. |
| HRP36 | <i>Spirodela intermedia</i> | 61 | 23 | 37.7% | 0.50 ± 0.02 | n.d. | 0.37 ± 0.01 | 0.41 ± 0.01 |
| HRP37 | <i>Amaranthus tricolor</i> | 159 | 40 | 25.2% | 0.91 ± 0.01 | 0.14 ± 0.02 | 0.40 ± 0.01 | 0.48 ± 0.01 |
| HRP38 | <i>Chenopodium quinoa</i> | 826 | 44 | 5.3% | 0.41 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.50 ± 0.01 |
| HRP39 | <i>Cannabis sativa</i> | 140 | 28 | 20.0% | 0.30 ± 0.01 | 0.32 ± 0.04 | n.d. | n.d. |
| HRP40 | <i>Elaeis guineensis</i> | 514 | 37 | 7.2% | 0.33 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.36 ± 0.01 |
| HRP41 | <i>Mangifera indica</i> | 221 | 27 | 12.2% | 0.32 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.46 ± 0.01 |
| HRP42 | <i>Cinnamomum micranthum</i> | 490 | 34 | 6.9% | 0.14 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.45 ± 0.01 |
| HRP43 | <i>Carya illinoensis</i> | 315 | 37 | 11.7% | 0.40 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 1.53 ± 0.04 |
| HRP44 | <i>Ricinus communis</i> | 150 | 39 | 26.0% | 0.16 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.39 ± 0.01 |
| HRP45 | <i>Tarenaya hassleriana</i> | 521 | 36 | 6.9% | 0.34 ± 0.01 | n.d. | n.d. | 0.36 ± 0.01 |
| HRP46 | <i>Cephalotus follicularis</i> | 163 | 36 | 22.1% | 0.25 ± 0.01 | 0.24 ± 0.03 | n.d. | n.d. |

※特許出願を控えているため、天然HRPsの詳細情報は非公開とさせていただきます。

すBiotin標識天然 HRP5であることが示唆された。しかしながら、SDS-PAGEにて解析したところ、両者に明確な差異(天然 HRP5画分に特異的なバンド)は見られなかったことから、以降のLC-MS/MS質量分析によるアミノ酸配列解読を断念した。

3.2. BLAST検索による天然HRP5の探索

当初予定していた上記計画による計画遂行が困難になったため、異なるアプローチ(BLAST検索)を用いて、植物全般に存在する複数の天然HRP5を対象として、高いタンパク質輸送能を有する天然 HRP5の探索を試みた。NCBI Protein BLAST検索により、ヒスチジンの連続配列を有する計46種類の天然HRP5を選出した。これら46種類の天然HRP5をコードする人工遺伝子を合成し、蛍光タンパク質mRuby3を融合した天然HRP5ライブラリーを調製した。46種類の天然HRP5について、さまざまな植物細胞内へのタンパク質輸送能(細胞膜透過能)を評価した結果、従来の分子輸送キャリアーである人工HRP5(H20)と比べて、タバコ*N. tabacum*由来のHRP5が最大2.61倍、イネ*O. sativa*由来のHRP16およびHRP18がそれぞれ最大2.83倍および2.22倍高いタンパク質輸送能(細胞膜透過能)を示すことが明らかになった(表1)。特筆すべき点として、HRP5、HRP16およびHRP18のすべてが、さまざまな植物細胞(タバコ*N. tabacum*、オオムギ*H. vulgare*、イネ*O. sativa*、スギ*C. japonica*)に対して人工HRP5(H20)を超えるタンパク質輸送能(細胞膜透過能)を示した。すなわち、HRP5、HRP16およびHRP18はさまざまな植物種に有効なオールラウンダーな分子輸送キャリアーである可能性が示唆された。

さらに、一次スクリーニングにて人工HRP5(H20)を超える細胞膜透過を示した天然HRP5(HRP5, 16, 18)について、低分子化による分子改変を試みた。その結果、HRP5とHRP18は低分子化によりタンパク質輸送能(細胞膜透過能)が低下する結果となったが、一方でHRP16は全長(137アミノ酸残基)から69アミノ酸残基へ低分子化することで、タンパク質輸送能(細胞膜透過能)の大幅な改善に成功した(図6)。

以上の過程により、イネ*O. sativa*由来のHRP16を低分子化することで、従来の分子輸送キャリアーである人工HRP5(H20)を超える分子輸送キャリアーの開発に成功した。低分子化したHRP16を、植物細胞に対するゲノム

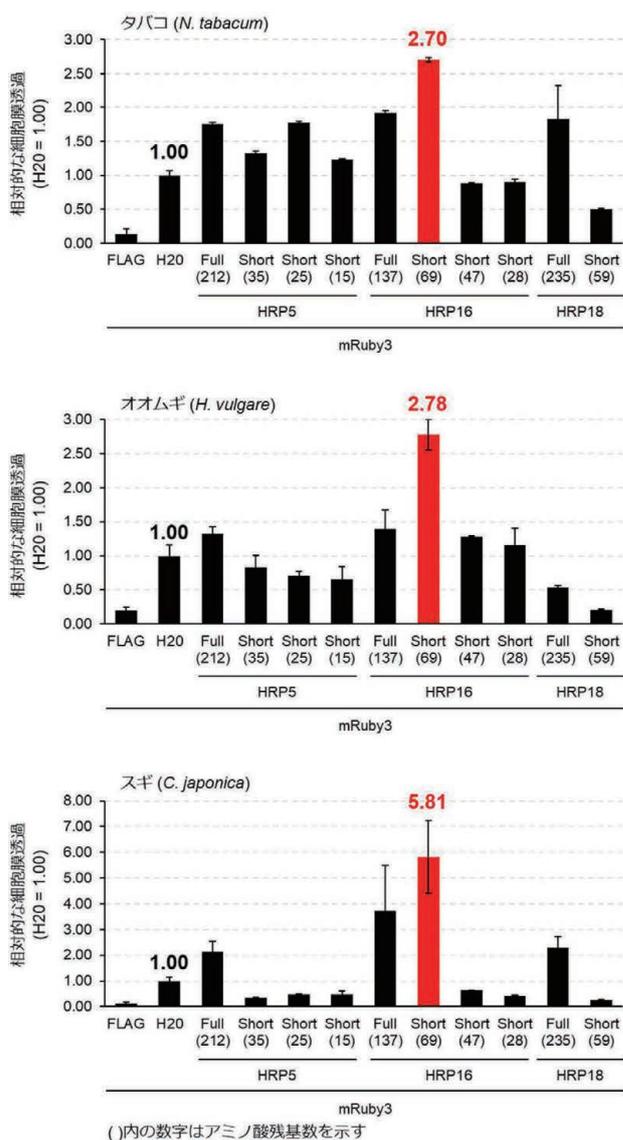


図6. BLAST検索による天然HRP5の探索結果

編集酵素の輸送キャリアーとして利用することで、効率的な非遺伝子組換えゲノム編集技術の創出が期待できる。

本研究成果は特許出願を控えているため、本研究において得られた天然HRP5の詳細情報は非公開とさせていただきますが、本研究では「植物細胞のHRP5取込み機構の本래のポテンシャルを最大限引き出すために、天然HRP5を利用する」という戦略の有用性を実証することができた。

4. 謝辞

本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団からの研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

5. 参考文献

- [1] Y. Tanaka, Y. Nanasato, K. Omura, K. Endoh, T. Kawano, T. Iwasaki. Direct protein delivery into intact plant cells using polyhistidine peptides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 85, 1405-1414 (2021)

二次元半導体デバイスへの分子ドーピングを志向した 含リン三次元 π 共役化合物の創製

大阪公立大学 大学院理学研究科
津留崎 陽大

1. 研究背景

遷移金属ダイカルコゲナイドなどに代表される二次元半導体デバイスは、化学的・機械的・電子的な耐久性を有し、かつサブナノメートルの厚みでフラットな結晶表面を持つことから、原子レベルにまで薄くできる光電子デバイスとしての応用が期待されている。これをさらなる高機能デバイスへと発展させるためには、半導体内部や電極/半導体の界面におけるキャリア濃度の変調が必要である^[1]。新たな物質群である遷移金属ダイカルコゲナイド群においては、方法論は確立しておらず、化学的な視点からの試みは限られている。ただし、適切な分子を半導体界面に作用させる分子ドーピングの手法は、浸漬、スピコート、蒸着といった簡便かつスケーラブルなプロセスが可能となり、非常に魅力的である。しかしながら、適切なドーピング分子の選択や高機能化に関する系統的な知見は十分には見出されていない。

申請者は、リン原子が sp^2 炭素で架橋された分子の一つであるジベンゾ [b,e] ホスフィンドリジン1を、二つのビニル基を有するベンゾ [b] ホスホールの閉環メタセシス反応により合成することに成功した(Figure 1)。本化合物は、インドリジンの高周期類縁体の初めての例であり、この分子の湾曲構造、分子全体への p 共役の拡張、非共有電子対誘導体におけるリン原子の反転挙動を明らかにした^[2]。また類似の手法により、三種類のナフタレン縮環誘導体2a-cも合成し、その構造と性質を解明している^[3]。これらの化合物では、界面との効果的な相互作用を引き起こしうる剛直な p 平面と大きな双極子モーメントを持つ $P=E$ ($E = O, S, Se$)を兼ね備えており(Figure 2)、遷移金属ダイカルコゲナイドに対するドーピングに有効であるものと期待できる。そこで本研究では、中心骨格の異なる含リン三次元 p 共役化合物を

開発するとともに、 MoS_2 などの遷移金属ダイカルコゲナイドに対するドーピング分子としての利用の可能性を探索した。

2. 結果

2-1. 化合物の合成

まず、六員環骨格から形成されたホスフィノリジン誘導体3の合成を検討した。ナフタレン縮環ホスフィンドリジン2におけるナフタレン骨格の縮環部位を1,2位/2,3位から、1,8位に変更した化合物であり、類似の合成手法が適用可能である。既知化合物である8-プロモ-1-ナフ

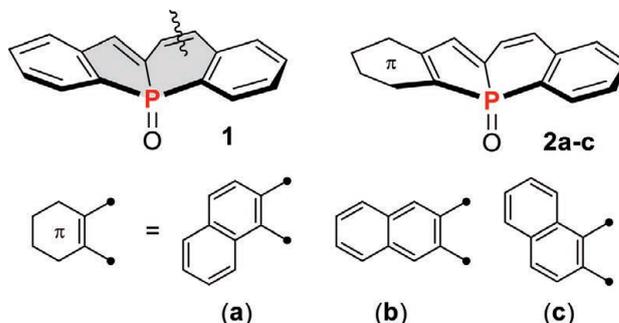


Figure 1. ジベンゾホスフィンドリジン1および3種類のナフタレン縮環ホスフィンドリジン2 (ホスフィンドリジン骨格を灰色、閉環メタセシス適用部位を波線で記載)。

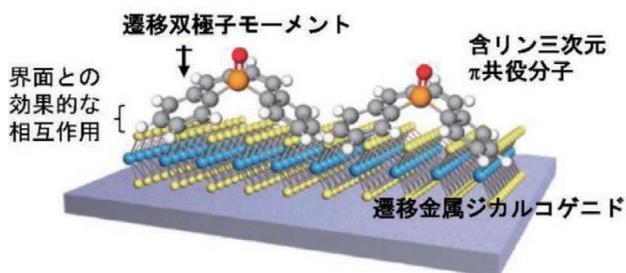
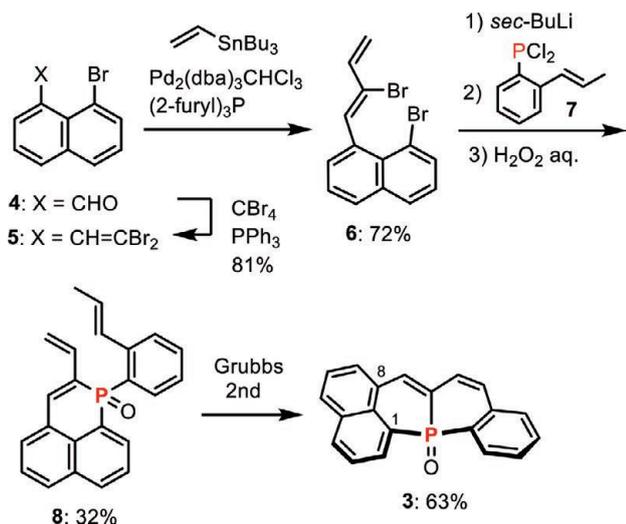


Figure 2. 遷移金属ダイカルコゲナイドと含リン三次元 p 共役化合物の相互作用モデル。

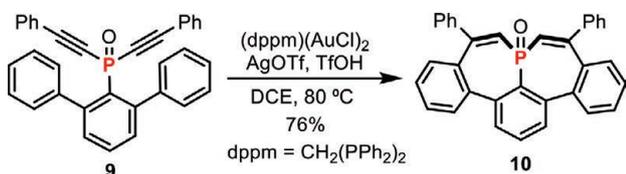


Scheme 1. ナフタレン縮環ホスフィノリジン **3** の合成。

トアルデヒド(**4**) のジブromoオレフィン化とStilleカップリングにより、ビニル基を導入した化合物 **6** を合成した(Scheme 1)。続いてジリチオ化、1-プロペニル基を有するクロロホスフィン **7** との反応、酸化を経て1-ホスファフェナレン **8** へと変換した。最後に **8** の閉環メタセシス反応により **3** を63%の収率で得ることができた。

また、未開拓の含リン三次元p共役化合物の一つであるホスファベンゾヘプタレンの合成も検討した。前駆体 **9** は、ヨードテルアリアルに対するメタル化、リン原子とアルキニル基の導入、酸化を経て合成した。その後、申請者が報告した金(I)触媒を用いた分子内ヒドロアリール化反応によるホスフェピン(含リン7員環化合物)の合成法を活用することにより^[4]、トリベンゾホスファベンゾヘプタレン誘導体 **10** を76%の収率で得ることができた。

化合物 **3** と **10** のX線結晶構造解析の結果をFigure 3に示す。炭素-リン-炭素の結合角の和は、319.9(2)[°] (化



Scheme 2. トリベンゾホスファヘプタレン **10** の合成。

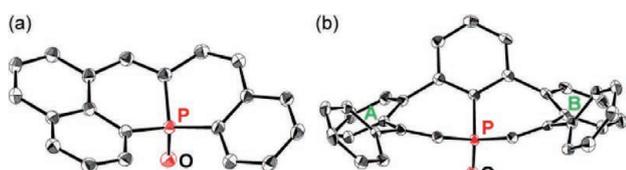


Figure 3. (a) 化合物 **3** および (b) **10** の分子構造。

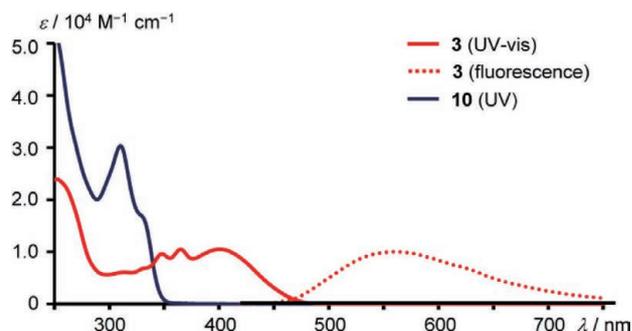


Figure 4. 化合物 **3**, **10** の紫外可視吸収および発光スペクトル (ジクロロメタン溶液)。

合物 **3**)、306.5(5)[°] (化合物 **10**) であり、化合物 **3** ではホスフィンドリジン誘導体^[3] (306.3(4)–310.1(2)[°]) と比較して開いた構造をとっていた。化合物 **10** においては、2つのホスフェピン環の折れ曲がり構造を取っているために、縮環したベンゼン環 **A**, **B** が P=O と同じ側に位置していた。

ジクロロメタン中において、化合物 **3** および化合物 **10** の紫外可視吸収スペクトルを測定した(Figure 4)。その結果、化合物 **3** では、401 nm (ϵ , 10500) を極大とする幅広い吸収と360 nm付近に振動単位を示唆する吸収が観測された。化合物 **10** では、310 nm (ϵ , 30300) に極大と334 nmに肩を有する吸収が観測された。理論計算を行ったところ、最長吸収帯はいずれも分子骨格全体に広がった π および π^* 軌道に対応する遷移であることが分かり、電子求引性の P=O 部位との軌道相互作用も存在することが分かった。

化合物 **3** では溶液中で弱い黄色発光が観測された。最長吸収極大波長である401 nm を励起波長として発光スペクトルを測定したところ、470から750 nm付近に、560 nmを極大とするブロードな波形を与えた。大きなストークスシフトを示したことから、励起状態において、大きな構造変化が生じているものと考えられる。蛍光量子収率は2.9%、発光寿命は0.58 nsであった。ホスフィンドリジン **2b** と比較して若干の量子収率の向上が見られた(**2b**; 蛍光量子収率: 1.6%、発光寿命: 0.60 ns)^[3]。

Table 1. 化合物の光物性データ

| | 3 | 4 | 1 ^[2] | 2b ^[3] |
|---|----------|--------------------|-------------------------|--------------------------|
| λ_{\max}/nm (ϵ) | 401 | 334 ^[a] | 397 | 399 |
| | (10500) | (16200) | (3410) | (7200) |
| $\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$ | 365 | 310 | 308 | 312 ^[a] |
| | (10500) | (30300) | (3730) | (20500) |
| $\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$ | 560 | – ^[b] | – ^[b] | 536 |

a) Observed as a shoulder. b) No emission.

2-2. 遷移金属ジカルコゲナイドに対するキャリアドーピングの検討

剥離法によって260 nm SiO₂基板上に転写した単層MoS₂に対し、スピコート法によって化合物1を堆積させ、その前後でラマンスペクトル、およびフォトルミネッセンス(PL)スペクトルを測定した(Figure 5a,b)^[5]。その結果、ラマンスペクトルからは面外方向の振動モードであるA'モードの低波数側へのシフトが確認され、PLスペクトルからは発光強度の減少と低エネルギー側へのピークシフトが確認された。さらに、260 nm SiO₂基板上的単層MoS₂をチャンネル部分に用いたMOSFET (metal-oxide-semiconductor field-effect transistor)の伝達特性においても、化合物1の処理によって、閾値電圧の負側へのシフトとドレイン電流の増加が確認された(Figure 5c)。これらの結果から、分子処理によりMoS₂中に電子が誘起されたことが示唆された。一方、*P*-フェニルベンゾ [b] ホスホールオキシド(Figure 1における波線の二重結合有さない化合物)を用いて、同様の実験を行っても変化が見られなかったことから、含リン三次元p共役化合物に特異であることが示唆された。

化合物2bに対しても同様に検討した。化合物1と同濃度である1 mg/mLのエタノール溶液を調整したが、ベンゼン環の増加による大幅な溶解性の低下のために一

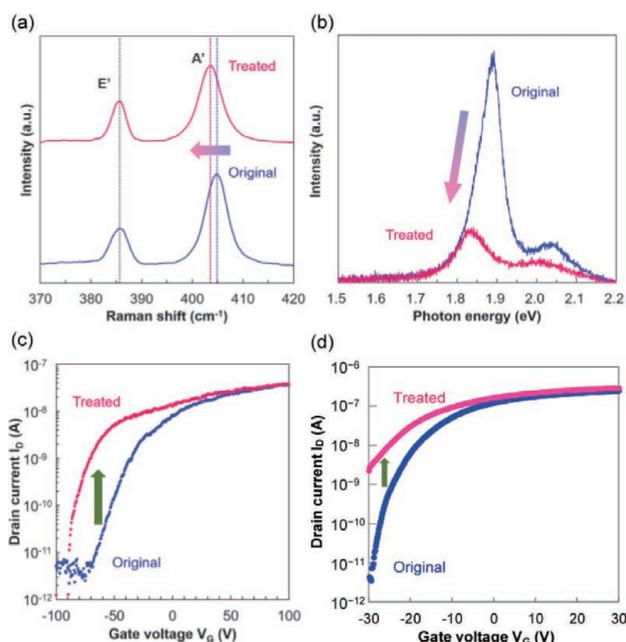


Figure 5. 化合物1による未処理(original)と処理(treated)の単層MoS₂。(a) ラマンスペクトル、(b) PLスペクトル、(c) MOSFETにおける伝達特性。(d) 化合物2bのMOSFETにおける伝達特性。

部残存してしまった。得られた飽和溶液を単層MoS₂に滴下、100 °Cで10分加熱後に、伝達特性を測定した(Figure 5d)。その結果、化合物1と同様に閾値電圧の負側へのシフトとドレイン電流の増加が確認された。しかしながら、両化合物間において顕著な差は見られなかったため、ベンゼン環1枚の増加のみでは半導体界面のキャリア濃度の大幅な変調が困難であることが分かった。

3. まとめ

本研究では、新たな含リン三次元p共役化合物であるホスフィンオリジン3およびトリベンゾホスファベンゾヘプタレン10の合成に成功し、その構造と性質を明らかにした。また、ホスフィンオリジン誘導体1と2bについては、MoS₂に対するキャリアドーピング分子として利用を実施した。デバイスの表面修飾しうる結果を得たものの、明確なキャリアドーピングには至らなかった。今後、含リン三次元p共役化合物の新たな活用法を探索する予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援をいただいた公益財団法人松籟科学技術振興財団に心より御礼申し上げます。また、分子ドーピングによるデバイス評価を実施くださいました東京大学大学院総合文化研究科桐谷乃輔准教授、福井暁人博士、酒井正弘氏、直井涼一郎氏に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] K. Cho, J. Pak, S. Chung, T. Lee, *ACS Nano*, **2019**, *13*, 9713-9734.
- [2] A. Tsurusaki, H. Matsumoto, K. Kamikawa, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 4909-4912.
- [3] A. Tsurusaki, S. Tahara, M. Nakamura, H. Matsumoto, K. Kamikawa, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202203321.
- [4] A. Tsurusaki, M. Kishimoto, A. Komura, R. Ura, K. Kamikawa, *Chem. Eur. J.* **2025**, *31*, e202404731.
- [5] P. Jain, S. Yotsuya, T. Y. T. Hung, K. Nagashio, D. Kiriya, *ACS Applied Electronic Materials*, **2025**, *7*, 2298-2304.

「土に還る」土壤含水率センサデバイス及び センシングシステムの開発

大阪大学 産業科学研究所
春日 貴章

1. はじめに

近年、AIや機械学習といった情報処理技術の発展に伴い、農業、都市管理など様々な領域において環境情報の収集・利活用が進められている。センサデバイスは現実空間と情報空間を接続する窓口のような存在であり、センサデバイス設置数は情報処理精度と密接に関わっている。データ収集・利活用のみを考慮するのであれば、センサデバイスを必要な場所に、できる限り大量に設置することが望ましい。しかし現実的には、センサデバイスの数が増えれば増えるほど管理/回収コストは増大する。また、環境中では必ずしも管理しやすい場所にセンサデバイスを設置できるとは限らない。設置数の増加に応じて回収が困難なセンサデバイスも増え、環境負荷も増大する。つまり現状では、センサデバイスの設置・管理・回収にかかるコストを考慮し、許容できる範囲の数・場所のデータのみを収集していると言える。

設置後の回収というボトルネックを解消し、超高密度なセンサネットワークを構築するために、環境中で分解するセンサデバイスの開発が進められている。既に、動物性たんぱく質、多糖類、生分解性プラスチックなど持続可能なバイオマス由来の生分解性材料の電子デバイス応用が報告されている¹⁻³。関連分野では素子単体に関する研究が多く、素子と素子を組み合わせて情報発信機能を搭載したセンサデバイスに関する報告は限られている。これは、センサデバイスとして求められる機能と分解性の両立が困難であることに起因する。センサデバイスの必須機能はセンシングとデータ発信機能の二つである。加えて、センサデバイスで収集した情報は、設置した位置情報と紐づくことで初めて価値をもつ。環境中に大量に設置する場合位置を予め記録することは困難であるため、センサデバイスから発信される情報には正確な

位置情報を含まなければならない。即ち、センシングと位置情報を含めたデータの発信を、環境に配慮した生分解性素子のみを用いたセンサデバイスで実現する必要がある。これは市販の素子の組み合わせでは不可能な試みであり、既存のセンサデバイスの枠に囚われない新たな回路設計及びシステム設計が必要となる。

そこで本研究では、超高密度センサネットワークの実現に向けた分解性センサデバイス及びセンシングシステムの開発を行った⁴。本研究では、次の2つの目標を掲げた。1) センサデバイス本体の大部分が生分解し、残留物も環境に悪影響を与えないこと、2) センシングした環境情報が、位置情報と紐づいた形で遠隔から得られること、の2点である。本研究では土壤含水率センサをターゲットとし、上記2つの目標の達成に向けて研究に取り組んだ。

2. 基板及び配線材料の検討

本研究では、センサデバイスの基板材料としてナノペーパーを使用した⁵⁷。ナノペーパーは植物由来の微細繊維であるセルロースナノファイバー(CNF)100%で構成されたフィルムであり、高強度、平滑な表面、高耐熱性といった特徴と、生分解性を併せ持つ。元々自然環境中に存在する植物繊維のみで構成されているため、生分解に特別な高温、多湿条件は必要なく、自然環境中で落ち葉や枯草と同様に分解される。

センサデバイス設置後の回収を行わない場合、配線材料の残留が問題となる。既存のセンサデバイスでは銅や銀配線が一般的に使用されている。しかし検証の結果、これらの金属は抗菌性を有するため基板生分解を阻害することが明らかとなった(図1)。加えて、土壤に残留した際、濃度によっては植害が生じることも確認された(図

2)。そこで、本研究では分解性デバイスに適した新たな配線材料として、錫に着目した。錫は抗菌性が低く、植害影響が少ないことが知られており、実際に、基板生分解を阻害せず、植害も引き起こしにくいことが確認された(図1.2)。加えて、低融点である特徴を活用する事で、印刷及びホットプレスによってナノペーパー基板上に導電性配線を実装する事にも成功した(図3)。

3. 土壌含水率センサの実装

センサデバイスへの電力供給は、無線給電方式の一つである磁界共振結合方式を用いることとした^{8,9}。磁界共

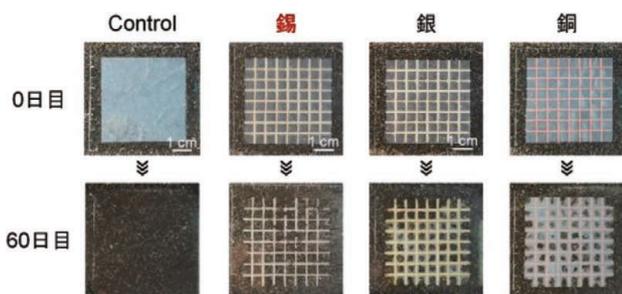


図1 生分解性試験結果



図2 植害試験結果

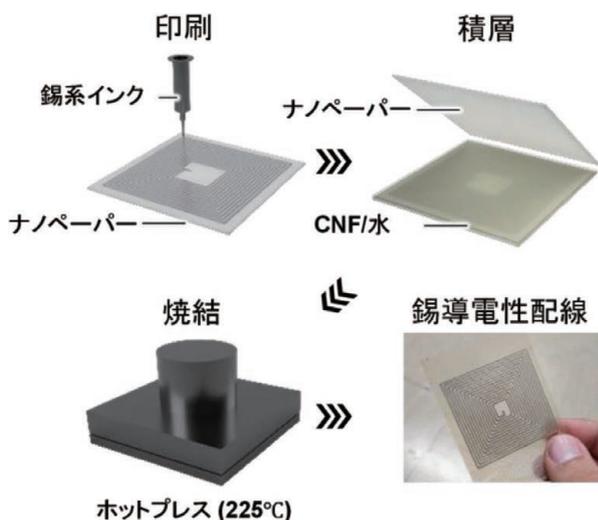


図3 錫配線実装プロセス

振結合方式においては、受信コイルへの伝送効率率は送信コイルと受信コイルが共振している際に最大となる。即ち、送受信効率は送信コイルと受信コイルの自己共振周波数の一致度に左右される。そこで、ナノペーパー基板上に錫印刷配線を用いて受信コイルを実装し、土壌上に設置した受信コイルの自己共振周波数をネットワークアナライザを用いて測定した(図4a)。受信コイルは生分解性ワックスによってコーティングすることで、環境湿度の影響を排除した。ナノペーパー基板上に実装した受信コイルの自己共振周波数は、含水率5%の土壌上に設置した際、36.5 MHz程度であった(図4a)。土壌含水率の異なる土壌上に設置した場合、自己共振周波数は土壌含水率の上昇に応じて低下し、含水率40%の土壌上に設置した際には31 MHz程度まで低下した(図4a)。受信コイルの自己共振周波数はコイルのインダクタンス及び寄生容量によって決定される。コイルの寄生容量はコイル周囲の誘電体の誘電率によって決定される。土壌の誘電率は含水率によって変化することが知られている。受信コイルの寄生容量が土壌含水率によって変化したことで、自己共振周波数が変化したと考えられる。次に、受信コイルの下方10 cmの位置に送信コイルを設置し、送信コイルから受信コイルへの伝送効率を測定した(図4b)。送信コイルの自己共振周波数は36.5 MHzとした。その結果、含水率6%の土壌上に設置した受信コイルへの伝送効率は45%程度だった(図4b)。土壌含水率の上

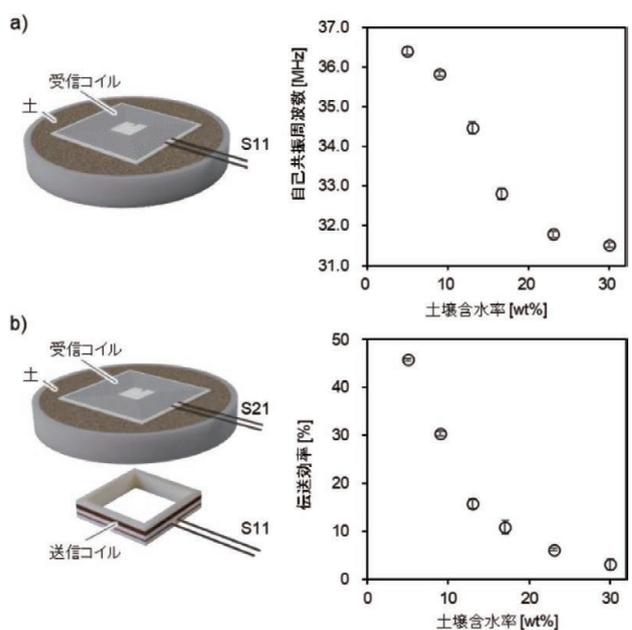


図4 異なる含水率の土壌上に設置した際のa) 受信コイルの自己共振周波数変化、及びb) 電力伝送効率の変化

昇に伴って伝送効率は低下し、土壌含水率40%時には伝送効率は3%程度まで低下した(図4b)。自己共振周波数の低下は自己共振周波数の不一致によるものと考えられ、受信コイルへの電力伝送効率は設置した土壌の含水率によって変化することが確認された。

センサデバイスへの電力伝送効率の変化を外部への信号として取り出すために、ヒーター素子とサーマルカメラを使用することとした。受信コイルの外周部に実装したプローブコイルに接続する形で炭素ベースの発熱素子を実装することで、含水率センサを実装した(図5)。自己共振周波数を36.5 MHzに調整した送信コイルから、土壌上に設置した含水率センサへ無線で電力供給を行った。その結果、含水率5%の土壌上に設置した際、ヒーター素子は受信電力を熱へと変換し、1分後には約75℃まで加熱された(図6)。また、土壌含水率の上昇に伴い、ヒーター素子の発熱温度は低下した(図6)。このことか

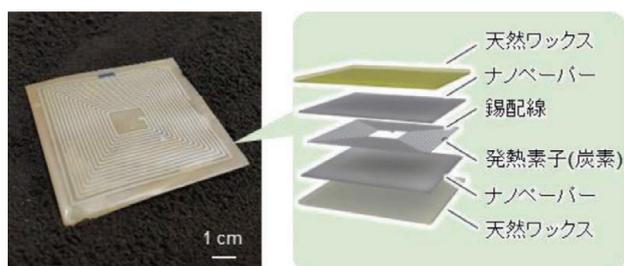


図5 土壌含水率センサデバイスの外観および構成

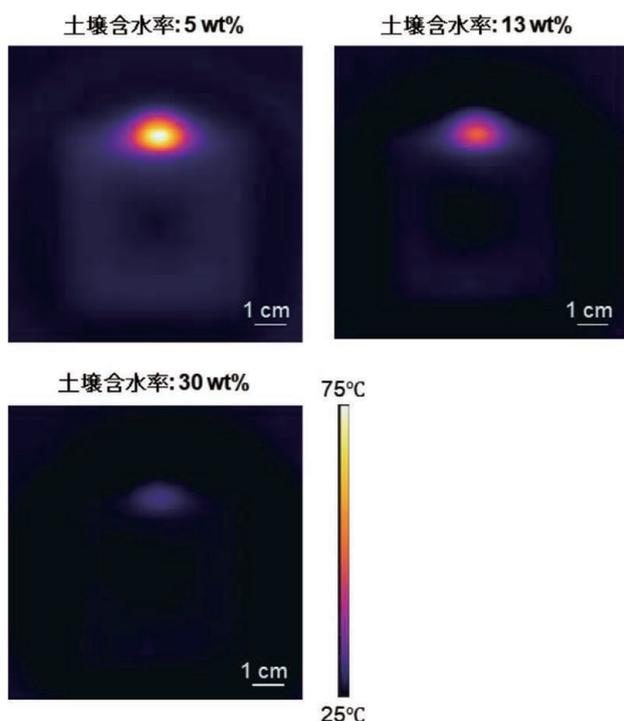


図6 含水率による発熱素子の温度変化

ら、開発したセンサデバイスは土壌含水率の変化をヒーター素子の発熱温度として発信する機能を備えていることが確認された。

4. 土壌含水率マッピング及び分解性試験

開発したセンサデバイスは、発熱によってセンシングした土壌含水率を発信できる。そのため、温度の測定にサーマルカメラを用いることで、発熱位置からセンサの設置位置を、発熱温度から土壌含水率を同時に取得できる。センサ情報の取得を画像処理的に行う事でセンサデバイス側の構成要素を単純化できるだけでなく、センサデバイス設置数の増加にも対応しやすい。本コンセプトのデモンストレーションとして、0.4 m×0.6 mのフィールド上に12個の含水率センサを設置し、土壌含水率を観測した(図7)。フィールドの下方10 cmの位置に自己共振周波数36.5 MHzの送信コイルを設置した。送信コイルは、可能な限りフィールド上に均一な電磁場を発生させるために、スパイラルコイルを採用した。赤外線カメラは設置個所の上空1 mの位置に設置した。フィールド上の土壌の含水率が全て30 wt%の時、フィールド上に

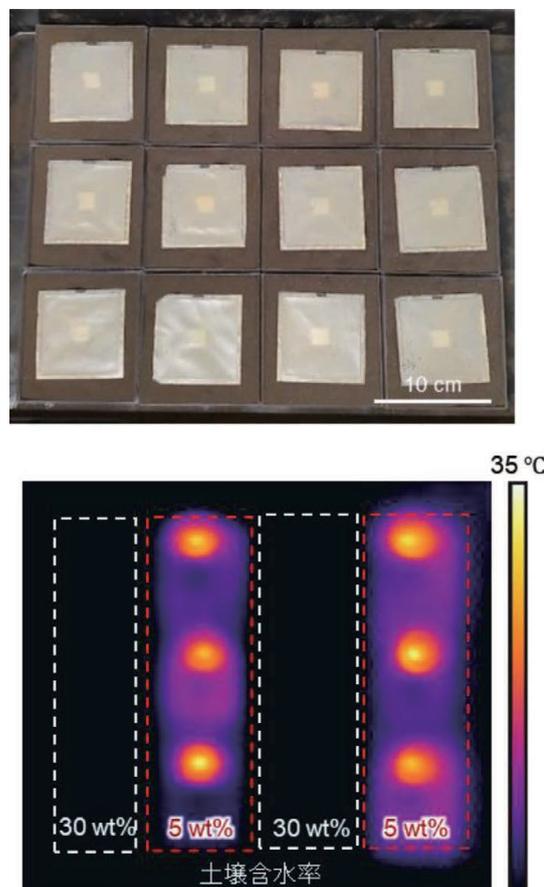


図7 複数のセンサデバイスを用いた土壌含水率マッピング

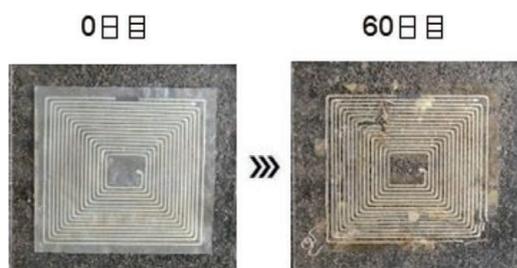


図8 センサデバイスの生分解

設置された含水率センサはほとんど発熱せず、IRカメラではホットスポットは確認できなかった。一方で、フィールド上の土壌の一部が乾燥状態のとき、乾燥土壌上に設置された含水率センサは熱信号を発し、IRカメラ画像上でホットスポットとして観察された(図7)。本コンセプトにより、大量のセンサデバイスを高密度に設置しているにもかかわらず、位置情報と紐づいたセンシング情報を効率的に取得できることが確認された。

既存のセンサデバイスでは使用後の回収が前提となるため、回収漏れのリスクや回収後の処分の観点から大量かつ高密度にセンサデバイスを設置することは難しい。本研究で開発したセンサデバイスは、植物繊維及び生分解性ワックス、環境影響の比較的軽微な錫配線及びカーボン電極のみで構成されている。よって、土壌に漉き込んでも配線以外の大部分は生分解され(図8)、残留した成分も農作物に悪影響を与えにくい。これまでにない新たなコンセプトの環境調和型センサデバイスとして、持続可能な社会の実現への貢献が期待できる。

5. 結言

本研究では、センシングした情報と位置情報を発信し、且つ全体が分解するセンサデバイスおよび新規センシングシステムを開発した。本研究では農業利用を前提としてコンセプトを報告したが、その用途は農業用途だけに限定されない。大量使用が必要となる物流や、センサデバイス使用後の回収が困難な災害地域等での使用も考えられる。構成要素を極限まで単純化することで分解性を付与したセンサデバイスおよび超高密度なセンシングシステムは、既存のボトルネックに囚われない次世代センシングシステムの構築に貢献する。

6. 謝辞

本研究を助成していただいた公益財団法人松籟科学技術振興財団に厚く感謝いたします。

7. 参考文献

- [1] Hwang, S.-W. et al. High-performance biodegradable/transient electronics on biodegradable polymers. *Adv. Mater.* **26**, 3905–3911 (2014).
- [2] Salvatore, G. A. et al. Biodegradable and highly deformable temperature sensors for the Internet of Things. *Adv. Funct. Mater.* **27**, 1702390 (2017).
- [3] Kasuga, T., Yagyu, H., Uetani, K., Koga, H. & Nogi, M. “Return to the soil” nanopaper sensor device for hyperdense sensor networks. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 43488–43493 (2019).
- [4] Kasuga, T., Mizui, A., K., Koga, H. & Nogi, M. Wirelessly Powered Sensing Fertilizer for Precision and Sustainable Agriculture. *Adv. Sustain. Syst.* 2300314 (2023).
- [5] Fujisaki, Y. et al. Transparent nanopaper-based flexible organic thin-film transistor array. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 1657–1663 (2014).
- [6] Nogi, M., Karakawa, M., Komoda, N., Yagyu, H. & Nge, T. T. Transparent conductive nanofiber paper for foldable solar cells. *Sci. Rep.* **5**, 17254 (2015).
- [7] Kasuga, T., Isobe, N., Yagyu, H., Koga, H. & Nogi, M. Clearly transparent nanopaper from highly concentrated cellulose nanofiber dispersion using dilution and sonication. *Nanomaterials* **8**, 104 (2018).
- [8] Kurs, A. et al. Wireless power transfer via strongly coupled magnetic resonances. *Science* **317**, 83–86 (2007).
- [9] Cannon, B. L., Hoburg, J. F., Stancil, D. D. & Goldstein, S. C. Magnetic resonant coupling as a potential means for wireless power transfer to multiple small receivers. *IEEE Trans. Power Electron.* **24**, 1819–1825 (2009).

高強度を有する新奇ペプチドハイドロゲルの創製と医療材料への応用

宮崎大学 工学教育研究部
稲田 飛鳥

1. 研究背景

ペプチドを基材とした超分子ゲルはその生体適合性、生分解性、多様な配列による調整因子の自由度の高さから、医療材料分野では極めて重要な研究課題となっている。これまでに、保護基や高疎水性置換基で修飾されたペプチドが水溶液中でゲル化する現象は多数報告されている。多くの場合は高親水性ペプチド(酸性・塩基性アミノ酸を連続して並べた配列をもつペプチド)に脂肪酸やFmoc保護基などの高疎水性置換基を修飾することで得られる人工的な両親媒性ペプチド誘導体を用いてハイドロゲルを形成させている。しかしながら、本研究のように、トリペプチドというこれほどまでに鎖長の短い、かつ保護基など一切修飾していないペプチドが、金属イオンに応答して透明性の高い均一なハイドロゲルを形成する事例は世界的にも見当たらず、非常に興味深い現象である。

著者らは最近、3残基の特定配列(His-Ile-Thr)の未修飾トリペプチドが銅イオンに応答して錯体を形成してゲル化し、そのアミノ酸配列の違いにより、透明度や強度

等、特性の異なるハイドロゲルの創製に成功している¹⁾。臨界ゲル化濃度は約0.5%と非常に低いことも明らかになった。本研究では、レオメーターを用いてハイドロゲル強度・粘弾性の追跡や、種々の条件で調製したハイドロゲルのレオロジーを詳細に解析した。

2. 実験操作

10種類のトリペプチド、His-Ile-Ala(HIA)、His-Ile-Asp(HID)、His-Ile-Glu(HIE)、His-Ile-Ile(HII)、His-Ile-Asn(HIN)、His-Ile-Gln(HIQ)、His-Ile-Ser(HIS)、His-Ile-Thr(HIT)、His-Ile-Val(HIV)、His-Ile-Tyr(HIY)をFmoc固相合成法により合成した。Fig.1に合成した10種類のペプチドの構造式を示す。次に、15 μmol のペプチドをはかりとり、100 μL の150 mM金属水溶液、200 μL 酢酸・酢酸Na緩衝液(pH 4.0)をそれぞれ混合し、サーモシェイカーで60 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間加熱後、室温で放冷してハイドロゲルの成否を倒置法で確認した。また、出来上がったハイドロゲルの粘弾性をレオメーターで測定して評価した。

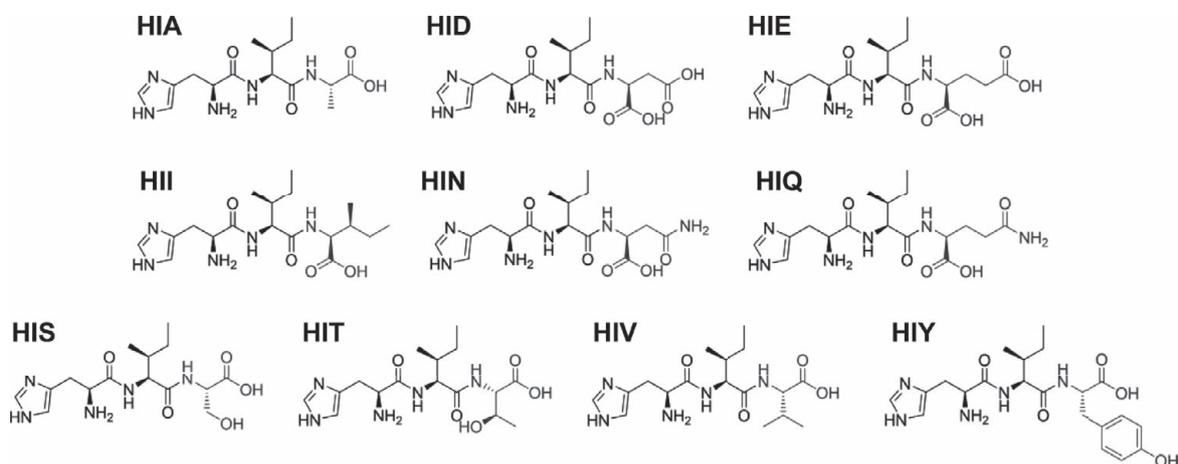


Fig.1 本研究で合成した10種類のトリペプチドの構造。

続いて、50 μL の2.5 mMペプチド水溶液、50 μL の4.0 mM酢酸銅水溶液、900 μL の酢酸緩衝液(50 mM, pH 4.0)を混合し、サーモシェイカーで60 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間加熱後、室温で放冷し円二色性分散計で測定し、ペプチドの超分子構造を評価した。

3. 研究の成果

今回合成した10種類のペプチドはいずれもESI-MSによって合成が成功していることが確認された。これらの10種類のトリペプチドと酢酸銅水溶液を混合し、加熱した結果、本試験で合成した10種類のペプチド全ての配列でゲル化し、Cu(II)応答性を示した。実際に合成したゲルの写真をFig.2に示す。いずれのゲルも、同濃度の酢酸銅水溶液よりもやや濃い青色のゲルであった。

これらのペプチドが水溶液中でどのような構造をしているかを調査するため、銅(II)イオンの存在下における円偏光二色(CD)スペクトルを測定し、構造を推測した(Fig.3)。

Fig.3より、ペプチドのみのCDスペクトルはHIYを除くすべてのペプチドが水溶液中でランダムコイルであることを示唆している。HIYについては、チロシンの芳香環に由来するCDスペクトルが得られた。他方、銅(II)を添加した際のCDスペクトルについても、HIYを除くすべてのペプチドのCDスペクトルにおいて、220 - 230 nm付近に β シート・ β ストランドなどの規則構造を示

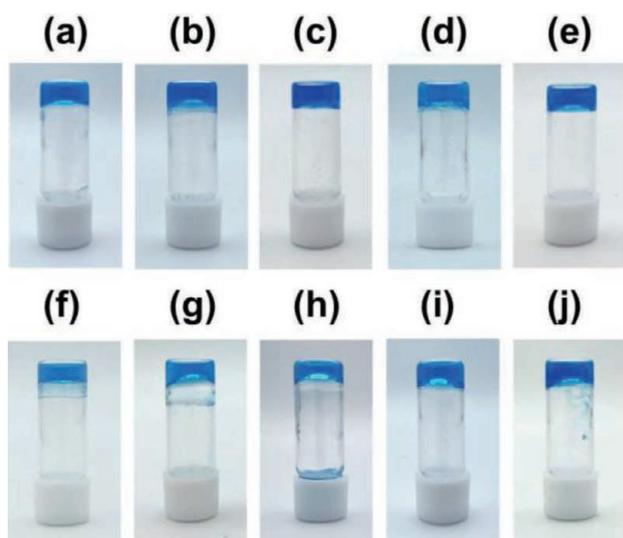


Fig.2 10種類のペプチドと酢酸銅(II)水溶液を混合して合成したゲルの写真。(a)HIA、(b)HID、(c)HIE、(d)HII、(e)HIN、(f)HIQ、(g)HIS、(h)HIT、(i)HIV、(j)HIYを示している。

すCDピークが観測された。HIYについては、220 - 230 nm付近においてチロシンの芳香環に由来する正の大きなピークがあることから、これらの規則構造に関する情報は得られなかった。しかしながら、HIYについても銅(II)添加時に水ゲルを形成していることから、他

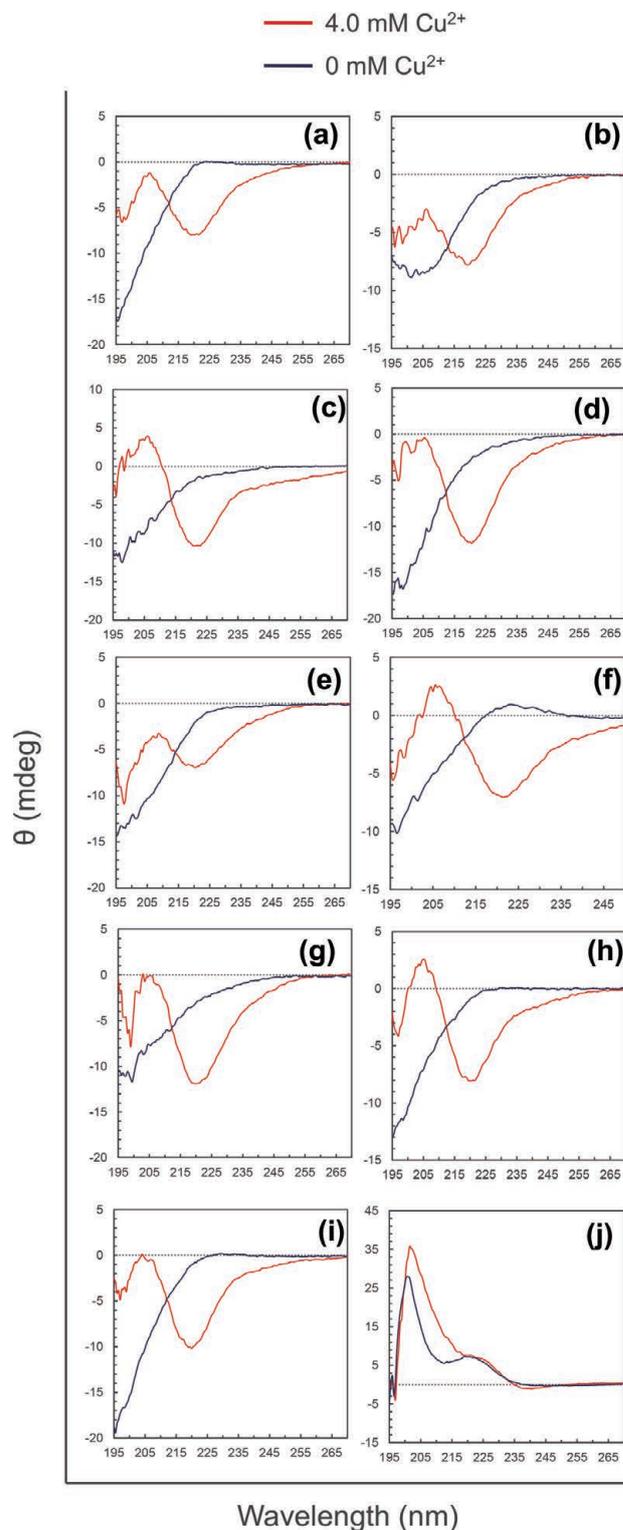


Fig.3 10種類のペプチドと銅(II)を加えた際のCDスペクトル。(a)HIA、(b)HID、(c)HIE、(d)HII、(e)HIN、(f)HIQ、(g)HIS、(h)HIT、(i)HIV、(j)HIYを示している。

のペプチド同様に β シート・ β ストランドなどの規則構造を取っている可能性が高く、また、芳香族由来の π - π スタッキング相互作用なども作用していると考えられる。

以上の結果から、10種類のペプチドは銅(II)イオンを介して超分子的な構造を形成し、これらがハイドロゲルを形成する駆動力となっていることが示唆された。ペプチドのN末端にあるヒスチジンに由来するイミダゾールが銅(II)に配位しているものと推察される。

つづいて、レオメーターによるハイドロゲルの粘弾性評価を行った(Fig.4)。Fig.4の結果から、ペプチドの配列によって、ひずみに対する貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' は大きく変化することが確認された。貯蔵弾性率 G' はゲルの硬さ(固体的な性質)を示す指標とされるのが一般的であるが、特に G' はHIE、HID、HII、HIYが非常に高い値を示した。これは、HIE、HIDについては、ペプチド配列内のグルタミン酸、アスパラギン酸に由来するカルボキシ基が銅(II)イオンと静電的相互作用によってゲルの強度が向上していることが示唆される。また、HIIについては、疎水性相互作用、HIYについては、 π - π スタッキング相互作用によってハイドロゲルの強度が向上していることが示唆された。

本研究では、未修飾トリペプチドが銅イオンに反応してハイドロゲルを形成する現象に注目し、ヒスチジンをN末端に含む10種類を合成・解析した。すべての配列で銅添加により均一なゲル形成が確認され、CDスペクトル測定により超分子構造の形成が示唆された。さらに、レオロジー測定により、 G' の違いから配列依存的にゲルの機械的特性が大きく異なることが明らかとなった。これはカルボキシ基、疎水性残基、芳香族残基などの側鎖の性質によって規定されており、簡便なトリペプチド配列の違いのみで多様なゲル特性を創出できる可能性を示すことができた。

参考文献

- 1) A. Inada, A. Motomura, T. Oshima, Water-Based Synthesis of β -Sheet-Like Supramolecular Metallohydrogel Organized by Using a Native

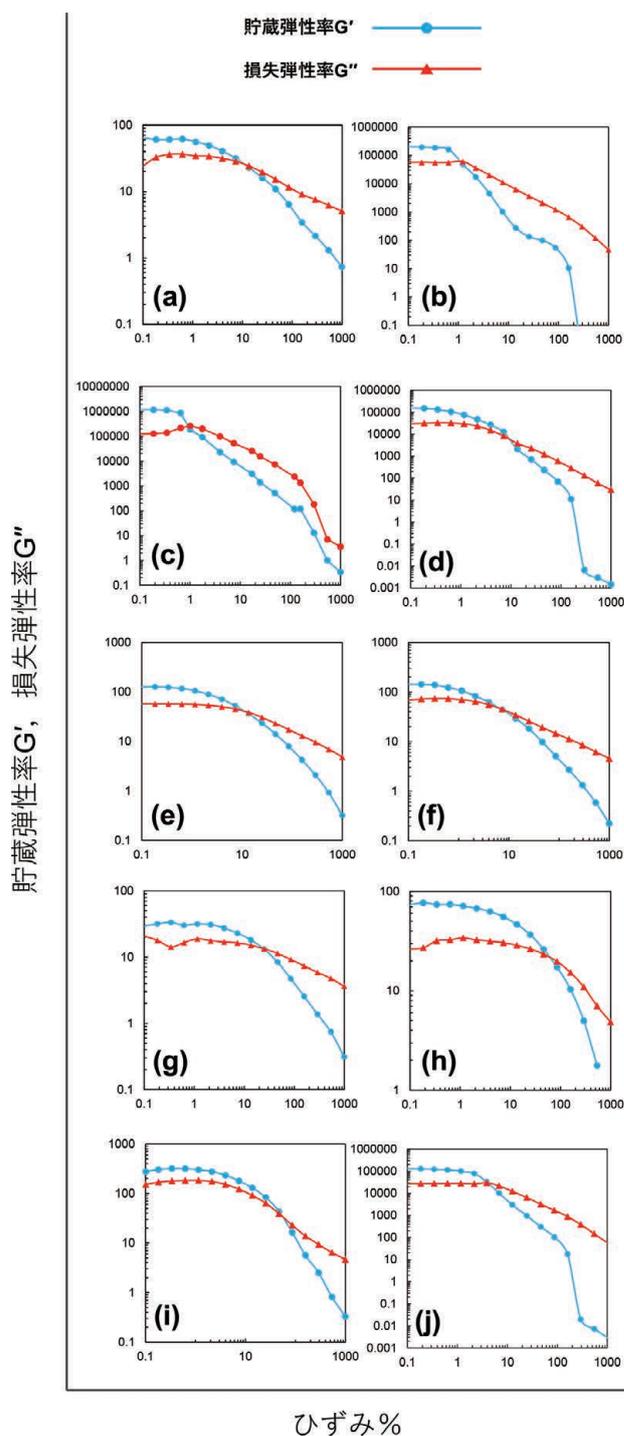


Fig.4 10種類のペプチドと銅(II)で合成されたハイドロゲルのひずみに対する貯蔵弾性率と損失弾性率。(a) HIA、(b) HID、(c) HIE、(d) HII、(e) HIN、(f) HIQ、(g) HIS、(h) HIT、(i) HIV、(j) HIYを示している。

Ultrashort Peptide Sequence, *Chem. Eur. J.*, 30 (11), e202303160 (2024)

超音波の周波数で制御する 音響応答性ハイドロゲルマイクロ複合材料の生成

東京農工大学 工学研究院
倉科 佑太

This study presents the development of an ultrasound-responsive hydrogel-based drug delivery system (DDS) that enables on-demand drug release. Traditional stimuli-responsive DDSs rely on thermal or optical inputs, which face challenges in biological applications due to poor tissue penetration or non-specific diffusion. In contrast, ultrasound energy offers deeper tissue penetration and better spatial precision. However, its application in DDS has been limited due to the lack of materials that effectively respond to acoustic energy.

To overcome this, a composite hydrogel material that incorporates microbubbles capable of vibrating in response to specific ultrasound frequencies was fabricated. This vibration induces structural changes in the hydrogel, promoting controlled drug release. The study demonstrates that drug release was significantly enhanced when ultrasound was applied, especially near the resonance frequency of the microbubbles (~2.4 MHz), achieving up to 4.5 times greater release than controls.

Two types of hydrogel carriers were developed : a disk-type for initial verification and a microbead-type for future in vivo applications. The microbeads were successfully loaded with drug models and coated with PLL to suppress passive release, ensuring release only upon ultrasound stimulation. Additionally, a hybrid actuator system combining thermo-responsive hydrogels and 3D-structured polymer scaffolds was fabricated for localized drug deployment and actuation. Mechanical interlocking between the hydrogel and the

scaffold ensured stability over repeated thermal cycles.

This study shows the potential of ultrasound-responsive hydrogels as smart biomaterials for precise, non-invasive, and controllable drug delivery systems in advanced medical applications.

1. 緒論

工学と医学の融合により創出されるイノベーションは医療の発展を劇的に促す一つの解決策である。工学と医学の融合により生まれたイノベーションの例として、外部からの刺激に応答する高分子を用いた薬剤送達の研究が行われてきた。ハイドロゲルの技術は温度・光応答性高分子のような熱や光エネルギーの入力で駆動する“応答性マテリアル”により創出された最先端の医療技術である。近年ではこれらの技術を応用した4Dプリンティングなども開発されている。しかし、これらの入力エネルギーは薬剤送達のために生体内で使用する際には無視できない欠点がある。具体的には熱エネルギーは拡散しやすく、光エネルギーは生体への透過性が低いといった点である。これらは緻密な医療には大きな問題点であり、次世代の高度先進医療を推し進める上で大きな障害となる。

一方で、“音響”エネルギーは物質の振動を介して伝達され、固体・液体間での伝達効率が高いことから人体へ照射した際の透過効率が高く、超音波(> 20 kHz)帯域ではその指向性も高いため、生体内での利用と親和性が高いエネルギーといえる。しかしながら、超音波の透過性が高いことから、応答性マテリアルとして用いることはこれまで達成されていない。これは、温度・光応答性高分子のように音響エネルギーを受信する高感度な音響応答性材料が開発されていないためである。

一方で、申請者はこれまでに、超音波を用いた非接触アクチュエータ技術とマイクロ・ナノ加工を用いたハイドロゲルマテリアルの生成技術を融合した新材料・デバイスを生み出す研究に従事している。これまでの研究を通じて生じた疑問や新規性や上記の背景を鑑みて、本研究全体の最終的な目標を、持続可能な未来社会で実装できる音響エネルギーを受信する新たな音響応答性ハイドロゲル複合材料の創出とした。その上で、本研究では、一つのハイドロゲルのマイクロビーズから複数の薬剤放出をオンデマンドで可能とするため、超音波により駆動する機構を具備した音響応答性の薬剤徐放材料をハイドロゲルと気泡核の複合材料から生成することを本研究の最終的な目的とし、超音波応答性に優れたマイクロゲル粒子の生成と、その粒子のキャリアとなる温度応答性ハイドロゲルアクチュエータについて報告する。

近年、薬剤を局所的に作用させ、副作用を低減するためにドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System, DDS)の研究が盛んに行われている。このDDSの放出制御の一つとして、熱、光、磁場、超音波など外部からの刺激に反応して薬剤を放出する刺激応答性DDSの研究がされている。本研究は其中でも、優れた指向性と透過性を兼ね備えた超音波刺激を用いた刺激応答性DDSに着目した。超音波を用いた薬剤放出には、ハイドロゲルを薬剤キャリアとして用いた研究⁽¹⁾が報告されている。ハイドロゲルは高い生体適合性を持つ一方で、音響特性が生体組織と近いことから、超音波が透過してしまい、効率的な薬剤放出が困難である。さらに、従来のハイドロゲルキャリアでは、超音波刺激応答性を向上させるために、高出力の超音波や低周波数帯域で発生するキャビテーションなどが利用されていた。そのため、キャビテーション発生による生体組織の損傷など、超音波刺激応答性と生体安全性を両立することが難しかった。

そこで本研究では、生体安全性を具備した超音波刺激応答性ハイドロゲルキャリアの開発を目指し、マイクロバブルが超音波刺激によって振動することで、ハイドロゲルの構造を変化させ、効率的に薬剤を放出できるハイドロゲルキャリア(Fig. 1)を提案した⁽²⁾。加えて、このハイドロゲルキャリアを小型化し、生体内で利用できるようにする積載用のハイドロゲルアクチュエータを開発した。



Fig. 1. Concept of hydrogel carrier. (a) Microbubbles and drugs were encapsulated in the hydrogel carrier. (b) Microbubbles in the hydrogel carrier were promoted to vibrate by ultrasound. (c) Drugs were released from the hydrogel carrier because of the vibration of microbubbles.

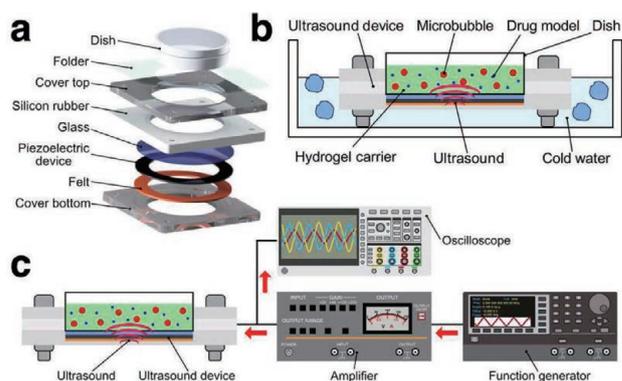


Fig. 2. Experimental setup of ultrasound irradiation device. (a) Components of ultrasound irradiation device. (b) Cooling of the ultrasound irradiation device and (c) peripheral equipment during ultrasound irradiation.

2. 実験方法

2.1. 超音波照射デバイスの製作

ハイドロゲルキャリアに超音波照射するために、超音波照射デバイスを製作した。超音波照射デバイスは、圧電素子とガラスを接着して製作した振動子を、フェルトとシリコンゴムで挟み、カバーとディッシュを固定するホルダーをボルトで固定した(Fig 2a)。振動子の厚みが振動特性に大きく寄与するため、ガラスの厚みを変えて圧電素子に接着させ、共振周波数を変化させるようにした。さらに、フェルトとシリコンゴムに挟むことにより、デバイス外部と剛体化させずに振動できる構造にした。製作した超音波照射デバイスの共振周波数は、インピーダンスアナライザを用いて測定した。超音波照射時にはデバイスの発熱により生じるハイドロゲルキャリアからの薬剤モデル放出を防ぐため、冷水に静置した状態で実験を行った(Fig. 2b)。また、ファンクションジェネレータで超音波周波数と印加電圧を決定し、アンプで電圧を増幅して超音波照射デバイスに入力した。さらに、オシロスコープを用いて、超音波照射デバイスに流れる電圧

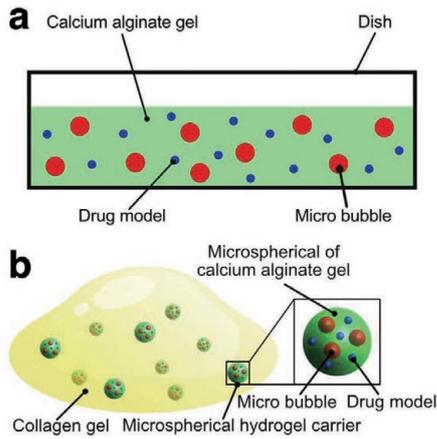


Fig. 3 Two types of hydrogel carriers. (a) Disk-shaped hydrogel carrier. (b) Microspherical hydrogel carrier.

と電流をリアルタイムで観測することで、適切な超音波照射が行われていることを確認した(Fig. 2c)。

2.2. ハイドロゲルキャリアの製作

本研究では、マイクロバブルと薬剤モデルを含有した2種類のハイドロゲルキャリアを製作した。ハイドロゲルキャリアには、生体適合性が高く、生体組織と似た柔軟性と流動性を持つアルギン酸カルシウムゲルを用いた。まず、超音波刺激とマイクロバブルの効果を検証するために、ハイドロゲルをディッシュに密着させたディスク型ハイドロゲルキャリアを製作した(Fig.3a)。ディスク型ハイドロゲルキャリアの製作時には、あらかじめディッシュにハイドロゲル薄膜を形成することで、剥離を防ぎ、均一なディスク型ハイドロゲルキャリアを製作した。次に、臨床応用を見据えて、提案したハイドロゲルキャリアを、マイクロサイズで球形状にした、微小球状型ハイドロゲルキャリアを遠心分離法⁽³⁾により製作した(Fig. 3b)。また、超音波照射時や観察時に微小球状型ハイドロゲルキャリアが動かないよう、コラーゲンゲルで担持した。加えて、微小球状型ハイドロゲルキャリアが正しく製作できているかを確認するために、共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察した。

2.3. マイクロバブルの観察と評価

ハイドロゲルキャリアにマイクロバブルが含有されている様子を確認するために、ハイドロゲル中のマイクロバブルを位相差顕微鏡で観察した。また、これらのマイクロバブルは、ハイドロゲルの網目構造によって3次元

的に捕捉されているため、共焦点顕微鏡によるzスタック画像を用いて、ImageJで解析を行い、平均粒径を得た。

2.4. 薬剤モデル放出率の測定

ディスク型ハイドロゲルキャリアおよび微小球状型ハイドロゲルキャリアからの薬剤モデル放出実験では、ディッシュ上に形成されたハイドロゲルキャリアに、5 mMの塩化カルシウム水溶液1 mLを散布した。その後、超音波照射後に塩化カルシウム溶液を取り出し、分光蛍光光度計で蛍光強度を測定した。これにより、ハイドロゲルキャリアから放出された薬剤モデルの蛍光強度を得た。この蛍光強度を、ディスク型ハイドロゲルキャリアおよび微小球状型ハイドロゲルキャリアを製作したときに含まれる、薬剤モデル全量の蛍光強度でそれぞれ割ることで、薬剤モデル放出率を算出した。薬剤モデル全量の蛍光強度は、アルギン酸カルシウムゲルをアルギン酸リアーゼで溶かし、溶液化したハイドロゲルキャリアを分光蛍光光度計で測定することで得た。

2.5. ハイブリッドアクチュエータの製作手法

製作したハイドロゲルキャリアを積載することを目的としたソフトマテリアルによるハイブリッドアクチュエータを開発した。このハイブリッドアクチュエータに使用した材料は、温度応答性ハイドロゲルのPoly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAM)と、光硬化性樹脂のOff stoichiometry thiol enes(OSTE)である。pNIPAMは、親水性の性質を示すアミド基と、疎水性の性質を示すイソプロピル基をもつため、温度変化によって膨潤・収縮する可逆的な体積変化が得られる。膨潤と収縮が切り替わる温度は、下限臨界溶液温度(Lower critical solution temperature : LCST)と呼ばれ、水中では体温近傍の約32°Cで相転移が生じる。OSTEは、多方向フォトリソグラフィ^(3,4)にて三次元構造を形成した。多方向フォトリソグラフィは、傾斜面に設置したアルミコートミラーにより、真上から入射したUVが反射することで斜めから露光する手法である。

三次元格子構造の格子径によるハイブリッドアクチュエータの変形挙動を観察するために、三種類の高分子格子骨格を製作した。三次元格子構造の設計は、安定して製作することが可能な格子間隔(p)1000 μm 、格子径(w)200 μm , 300 μm , 400 μm とした。製作した三次元格子構

造は2本のカッターを用いて八面体格子15ユニット分を切りとり、プラズマ処理を施し表面を親水性にした。高分子格子骨格はモールド底面に固定し、その上からプレゲル溶液を流し込んだ。その後モールド上面をOHPフィルムで蓋をして、20時間程度静置し、ハイブリッドアクチュエータを製作した。

使用したモールドは、 $15.3 \times 1.3 \times 3.1$ mmの直線状溝と、中心角(θ)が 120° と 180° の二種類の円弧溝が切削されたアクリルモールドである。pNIPAMと高分子骨格の界面観察に適した形状として、直線状のアクチュエータを製作した。変形挙動を観察するにあたり、十分な変位量が得られる形状として、曲線状のアクチュエータを製作した。

2.6. 実験セットアップ

ハイドロゲルと高分子材料間の親和性評価では、加熱・冷却時間の異なる二種類の熱刺激応答実験より、材料間の剥離を評価した。

ロングインターバル熱刺激応答実験のセットアップとして、サーモプレートを用いた(Fig. 4a)。ディッシュに観察用治具、超純水、アクチュエータ、熱電対を入れ、真上から実体顕微鏡にて観察した。アクチュエータは、ディッシュ底面にサーモプレートを設置して30分間加熱した(Fig. 4a)。30分後、アクチュエータはサーモプレートから移動させ、室温にて30分間冷却した。合計1時間の熱刺激応答実験を1サイクルとし、1日1サイクル実施することで3サイクル評価した。温度範囲は、pNIPAMの収縮が開始するLCST(= $\sim 32^\circ\text{C}$)を含む 25°C から 40°C とした。

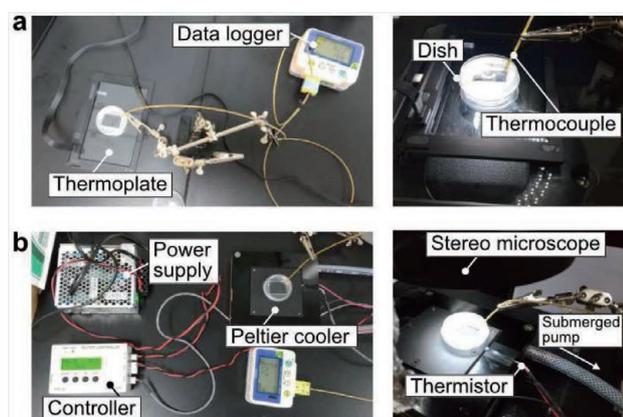


Fig. 4 Experimental setup. (a) Thermoplate. (b) Peltier cooler.

ショートインターバル熱刺激応答実験のセットアップとして、ペルチェ冷却加熱兼用プレートを用いた(Fig. 4b)。ハイブリッドアクチュエータは、15分間の加熱、15分間の冷却からなる合計30分の熱刺激応答実験を1サイクルとし、1日10サイクル実施することで30サイクル評価した。温度範囲は、 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ から $38 \pm 2^\circ\text{C}$ であり、初期状態として実験開始前に 17°C におけるハイブリッドアクチュエータ画像を取得した。

また、ハイブリッドアクチュエータの変形挙動の評価では、サーモプレートを用いて熱刺激応答実験を実施した。ハイブリッドアクチュエータは、高分子格子骨格の中心を原点とし、八面体格子が連なる方向に x 軸、ハイドロゲルが積層している方向に z 軸をとった。 x - z 平面から観察したときのハイブリッドアクチュエータの両端と中心がなす角を側面角(ψ)、 x - y 平面から観察したときのアクチュエータ両端と中心がなす角を円弧角(ϕ)とし、 ψ と ϕ から変形平面と変形挙動を評価した。

3. 実験結果および考察

3.1. 超音波照射デバイスの共振周波数

超音波照射デバイスは、使用するガラスの厚みが 0.5 mmまたは 2 mmで構成したものの2種類を製作した。インピーダンスアナライザを用いて、製作した超音波照射デバイスの共振周波数を測定し、構成するガラスの厚みを変えることで、共振周波数を変化させることに成功した。さらに、製作した超音波照射デバイスは、 0.1 MHzから 3.0 MHzの間で複数の共振周波数を示した。この中から、実験で使用する超音波照射デバイスの周波数は、照射する音圧の強さを考慮し、 400 kPaが安定的に出力できる共振周波数を選択することにした。また、医療超音波では一般的に、キャビテーションの発生が抑制される $1.5\sim 3.0$ MHz程度の周波数が用いられていることを考慮して、本デバイスの共振周波数の中から、 $1.5\sim 3.0$ MHz付近の 1.8 MHzと 2.5 MHzを照射する超音波の周波数として採用した。さらに、コントロールとして 0.3 MHzの共振周波数も採用した。

3.2. ディスク型ハイドロゲルキャリアの製作

超音波とマイクロバブルの効果を検証するために、ハイドロゲルをディッシュに密着させた、ディスク型ハイドロゲルキャリアを製作した。ディッシュにハイドロ薄

膜を形成する、前処理をしなかった場合には、ハイドロゲルがディッシュ上に均一に生成されず、剥離も確認された。一方で、前処理を行ったディッシュでは、ハイドロゲルがディッシュに密着して、剥離を防ぐことができ、均一なディスク型ハイドロゲルキャリアを製作することができた。ディッシュに密着させることで、ハイドロゲルキャリア自身がディッシュに衝突して薬剤モデルが放出されることを防いだ。

3.3. 超音波とマイクロバブルの効果検証

マイクロバブルと超音波照射の複合効果を確かめるために、マイクロバブル(MB)と超音波照射(US)の併用、超音波照射のみ、マイクロバブル含有のみ、Controlの4つの条件を用意して、ディスク型ハイドロゲルキャリアからの薬剤モデルの放出率を評価した(Fig. 5a)。なお、Controlはマイクロバブルを含有せず、超音波照射もしなかった。超音波の照射条件は、周波数が1.8 MHzで5分間とした。また、ディッシュ中心での最大音圧が400 kPaになるように設定し、Duty比0.5で、ディスク型ハイドロゲルキャリアに超音波を照射した。

定量測定の結果、マイクロバブルと超音波照射の併用条件では、薬剤モデル放出率が10.2%、超音波照射のみでは3.1%、マイクロバブル含有のみでは2.9%、Controlでは2.3%という結果が得られた。また、マイクロバブルと超音波照射の併用条件では、他の条件と比較して有意($p < 0.01$)に高い薬剤モデル放出率を示した。提案したマイクロバブルと超音波照射の併用は、Control条件に比べて、薬剤モデル放出率が4.5倍ほど高い結果となった。

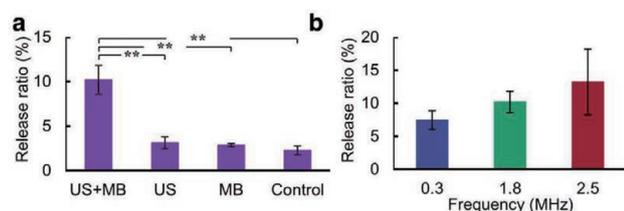


Fig. 5 Drug model release from microbubble encapsulating disk-shaped hydrogel carrier by ultrasound irradiation. (a) The effects of ultrasound irradiation (US) and microbubbles (MB) on the release ratio of drug models were evaluated. (b) The effects of various frequencies of ultrasound irradiation on the release ratio of drug models were evaluated. Error bars : mean \pm S.D., $n = 3$. ** $p < 0.01$.

3.4. 異なる超音波周波数における薬剤モデル放出率

ハイドロゲルキャリアの周波数応答性について評価するために、照射する超音波の周波数を変化させ、薬剤放出効率に与える影響を測定した。超音波照射デバイスの3つの共振周波数、0.3 MHz、1.8 MHz、2.5 MHzで、マイクロバブルを含有したディスク型ハイドロゲルキャリアに超音波を照射した。照射超音波は、音圧が400 kPaで、Duty比を0.5に制御し、照射時間は5分間とした。各周波数の超音波を照射した結果(Fig. 5b)、超音波周波数2.5 MHzにおいて、最も高い薬剤モデル放出率が得られた。0.3 MHzと比較すると、薬剤モデル放出率が1.8倍程度増加することが確かめられた。さらに、1.8 MHzと2.5 MHzでの結果を比較しても、平均放出率は2.5 MHzの方が多いと示された。これらの結果から、マイクロバブルを含有したハイドロゲルキャリアからの薬剤モデルの放出率は、照射する超音波の周波数に依存することが示唆された。

ここで、ハイドロゲル中に含有されたマイクロバブル(Fig. 6a)に着目すると、共焦点顕微鏡によるZスタック画像(Fig. 6b)から、マイクロバブルの平均粒径が $2.4 \mu\text{m} \pm 2.2 \mu\text{m}$ であることが示された。そこで、ミナートの式⁽⁵⁾を用いて、ハイドロゲルに含有されたマイクロバブルの共振周波数を算出した結果、 ~ 2.4 MHzと求められた。つまり、マイクロバブルの共振周波数に近づくほど薬剤放出効率が向上することが示唆された。

3.5. 微小球状型ハイドロゲルキャリアの製作

ハイドロゲルのマイクロ粒子を用いることで、フレキシブルに生体に埋め込むことができる薬剤放出デバイスが開発⁽⁶⁾されていることから、本研究で示したハイドロ

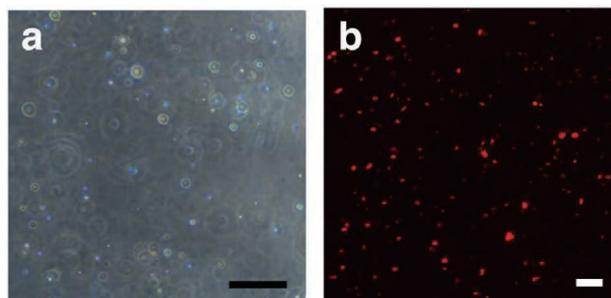


Fig. 6 Microbubbles encapsulated in a hydrogel disk-shaped carrier were observed by (a) phase-contrast and (b) confocal microscopes. Scale bars of (a, b) = 15 μm .

ゲルキャリアがマイクロサイズでも応用が可能であることを確かめた。そこで、提案したハイドロゲルキャリアを、マイクロサイズで球形状にした、微小球状型ハイドロゲルキャリアとして製作した。微小球状型ハイドロゲルキャリアにマイクロバブルや薬剤モデルが適切に封入できているかを確認するために、アルギン酸カルシウムゲル、マイクロバブル、薬剤モデル、コラーゲンゲルをそれぞれ緑、赤、青、黄色に蛍光染色して、共焦点顕微鏡で蛍光観察した(Fig. 7)。観察結果から、マイクロバブルと薬剤モデルが適切に微小球状型ハイドロゲルキャリアに封入されていることが確認できた。さらに、微小球状型ハイドロゲルキャリアがコラーゲンゲルにより担持されていることも確認できた。

また、生体内での実用性を考慮して、超音波刺激を加えていない状態での薬剤放出を抑えるために、微小球状型ハイドロゲルキャリアをPLLでコーティングした。PLLコーティング時には、コラーゲンゲルの蛍光染色は行わず、PLLを黄色に蛍光染色した。また、アルギン酸カルシウムゲル、マイクロバブル、薬剤モデルはそれぞれ緑、赤、青に蛍光染色した。これらを共焦点顕微鏡で蛍光観察することにより、微小球状型ハイドロゲルキャリアへのPLLコーティングが確認できた(Fig. 8)。

次に、PLLコーティングした微小球状型ハイドロゲルキャリアでの薬剤放出性能を調べるために、超音波照射の有無による薬剤モデル放出量の違いを評価した。これ

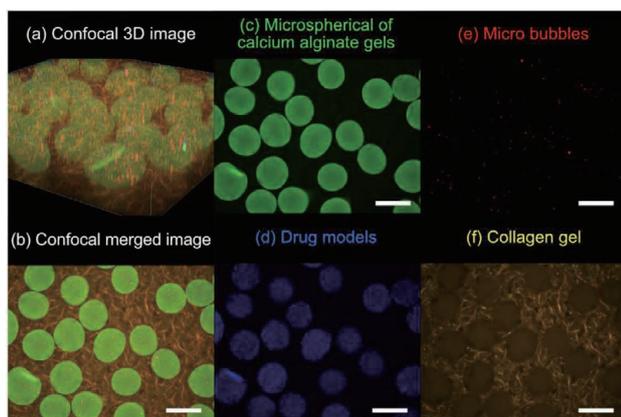


Fig. 7 Confocal microscope images of microspherical hydrogel carriers loaded on collagen gel. (a) 3D image and (b) Z-stacked image of microspherical hydrogel carriers. (c) Microspherical calcium alginate gels. (d) Drug models and (e) microbubbles encapsulated in calcium alginate gels. (f) Collagen gel carrying microspherical hydrogel carriers. Scale bar = 300 μ m.

までの薬剤モデル放出実験と同様に、照射する超音波の音圧は400 kPaで、Duty比は0.5とした。さらに、5分間の超音波照射を3サイクル行うことで、微小球状型ハイドロゲルキャリアの超音波刺激への繰り返し応答性を確認した(Fig. 9)。1サイクル目の薬剤モデル放出に着目すると、超音波照射した条件では薬剤放出率が12%と、Controlの薬剤放出率(=0.2%)に対して、顕著に薬剤放出性能が向上することが示された。繰り返しの超音波照射においてもControlとの薬剤放出率の差が見られた。これは、PLLでコーティングされた微小球状型ハイドロゲルキャリアが、超音波刺激により必要に応じて、薬剤モデルを放出できることを示している。また、超音波刺激を与えていないControlに注目すると、3サイクルを通した最終的な薬剤放出率が1.1%に抑制されており、PLLコーティングによって定常時での薬剤放出を制御できることが示された。したがって、マイクロサイズにおいても、超音波に反応してオンデマンドでの薬剤放出が可能であることが示された。

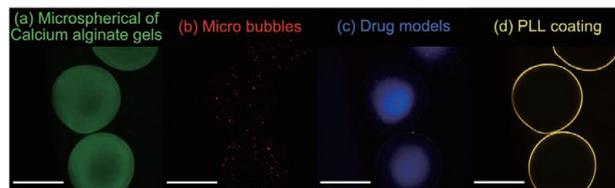


Fig. 8 Cross-sectional image of PLL-coated microspherical hydrogel carriers. (a) Microspherical calcium alginate gels. (b) Microbubbles and (c) drug models encapsulated in calcium alginate gels. (d) Microspherical hydrogel carrier coated with PLL.

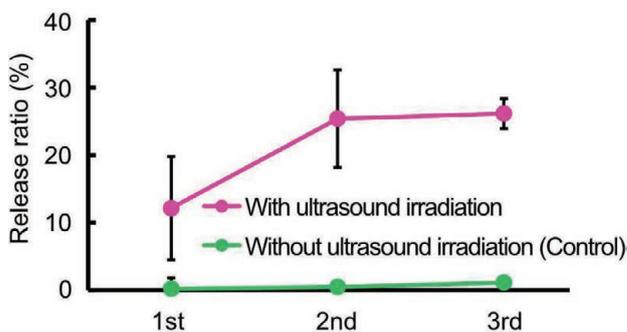


Fig. 9 Repeated release evaluation of drug models from the PLL-coated microspherical hydrogel carriers by multiple ultrasound irradiation. Error bars : mean \pm S.D., $n = 3$.

3.6. ハイドロゲル-高分子骨格間における機械的嵌合

ハイドロゲルと高分子骨格間の機械的嵌合を評価するために、高分子レイヤー骨格を用いたバイレイヤアクチュエータと、高分子格子骨格を用いたハイブリッドアクチュエータを比較した。

バイレイヤアクチュエータとハイブリッドアクチュエータにて、1サイクル1時間のロングインターバル熱刺激応答実験を合計3サイクル実施した(Fig. 10a-c)。バイレイヤアクチュエータ(Fig. 10a)のハイドロゲル-高分子レイヤー骨格間は、1サイクル終了時点で9.1 mmの剥離が生じた。高分子レイヤー骨格は長さ15 mmであるため、初期状態の密着割合を100%とすると39%に減少した(Fig. 10c)。2サイクル終了するとハイドロゲル-高分子レイヤー骨格間は完全に剥離し、密着割合は0%となった。一方で、高分子格子骨格を用いたハイブリッドアクチュエータ(Fig. 10b)のハイドロゲル-高分子格子骨格間は、3サイクル終了後も0.9 mmの剥離に留まり、密着割合は94%であった(Fig. 10c)。

また、1サイクル30分のショートインターバル熱刺激応答実験にて、30サイクル終了後もハイブリッドアクチュエータは構造が維持することを確認した(Fig. 10d)。

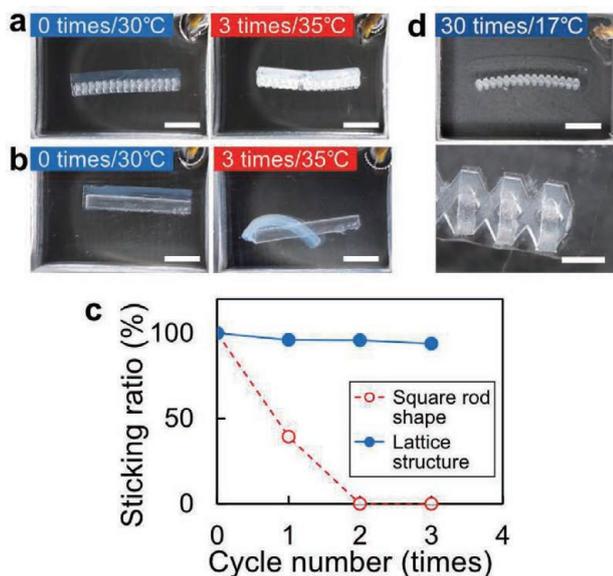


Fig. 10 Evaluation of affinity between hydrogel and polymeric skeleton of hybrid soft actuator. (a-c) Results of short interval experiment. (a) Hybrid actuator using lattice structure and (b) conventional composite actuator using square rod-shaped polymer. (c) Sticking ratio between the hydrogel and the polymer for each thermal stimulation. (d) Results of long interval experiment. All scale bars = 5 mm.

ロング/ショートインターバルの結果より、高分子骨格を三次元格子構造にすることでハイドロゲルと高分子骨格間の親和性が向上することが示された。従来のハイドロゲルと高分子材料の二層構造アクチュエータでは、ハイドロゲルと高分子材料界面での強固な結合を促す接着手法が用いられてきた。具体的には、高分子材料への接着レイヤー積層^[11]や、重合開始剤添加による、ハイドロゲル-高分子材料間をグラフト重合するための処理^[12]などが挙げられる。本研究におけるプラズマ処理と、先行研究におけるグラフト重合処理は、ハイドロゲル-高分子材料界面での架橋の有無で区別することができる。本研究の高分子骨格へのプラズマ処理は、高分子骨格表面を親水にし、プレゲル溶液滴下時のバブルを防ぐための処理である。ハイブリッドアクチュエータの拡大画像(Fig. 10d)からも、ハイドロゲル-高分子骨格界面には部分剥離が生じており、先行研究のような架橋は存在しない。本研究のハイブリッドアクチュエータでは、ハイドロゲルが格子構造内部に流れ込んだ状態で重合し、格子の内部と外部で機械的嵌合をしたために、親和性の向上に寄与したことが推察される。

3.7. ハイブリッドアクチュエータの変形挙動制御

高分子格子骨格の三次元格子構造を変えることによるハイブリッドアクチュエータの変形挙動を評価するために、熱刺激応答実験における ϕ を計測した。 $w = 200 \mu\text{m}$, $300 \mu\text{m}$, $400 \mu\text{m}$, $\theta = 120^\circ$, 180° の計六種類の曲線状ハイブリッドアクチュエータにて、1サイクル1時間の熱刺激応答実験を実施した(Fig. 11)。これより、曲線状ハイブリッドアクチュエータの変形挙動を三種類に分類した。

一つ目は、ハイブリッドアクチュエータの円弧が閉じる方向への変形である(Fig. 11a)。これは $w = 200 \mu\text{m}$ のアクチュエータにて観察され、 ϕ は単調減少を示す。初期状態の曲線状に従って全体が収縮するため、三次元格子構造は x 軸に対して潰れるような変形が確認できた。

二つ目は、ハイブリッドアクチュエータの円弧が開く方向への変形である(Fig. 11c)。これは $w = 400 \mu\text{m}$ のアクチュエータにて観察され、 ϕ は単調増加減少を示す。加熱によって直線状になり、その後初期状態と x 軸で対象な曲線状へと移行する。

三つ目は、ハイブリッドアクチュエータの立体的な変

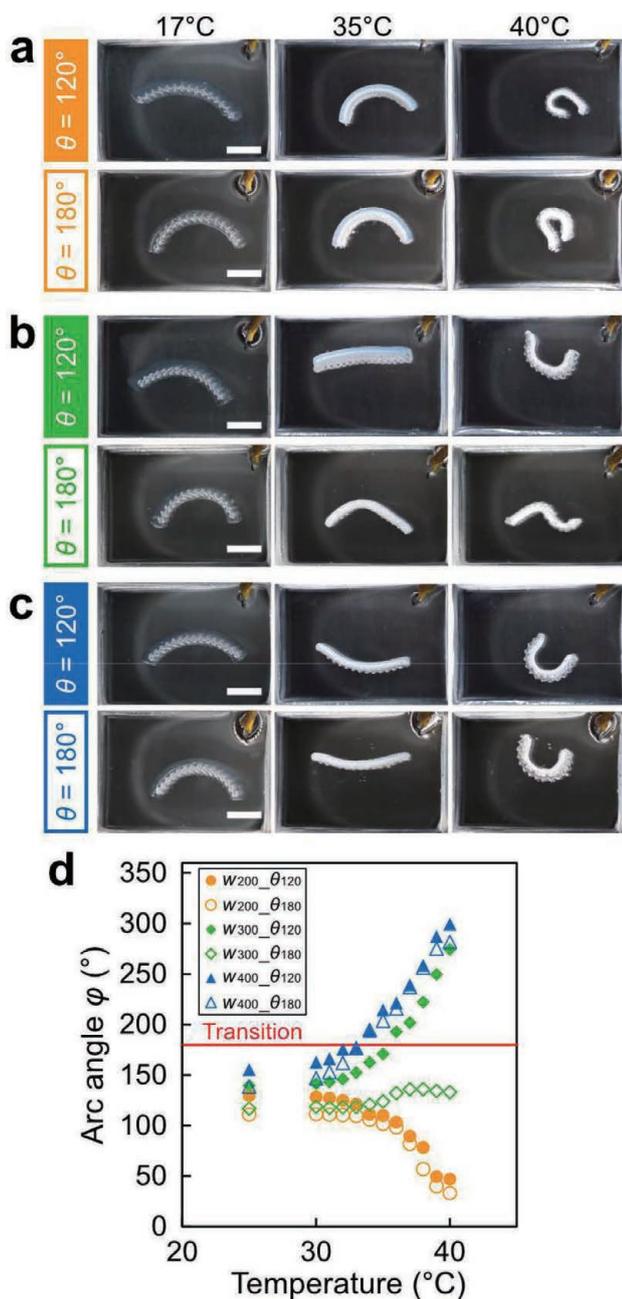


Fig. 11 Evaluation of deformation behavior of hydrogel-polymer hybrid actuator with varying pillar width of lattice skeleton. (a-c) Macroscopic images and (d) measurement of arc angle ϕ on the hybrid actuator at $w =$ (a) 200, (b) 300, and (c) 400 μm . All scale bars = 5 mm.

形である (Fig. 11b)。これは $w = 300 \mu\text{m}$ のアクチュエータにて観察され、変形平面は x - y 平面、 x - z 平面の両方となる。特に、 $\theta = 120^\circ$ のときは x - z 平面にて、 $\theta = 180^\circ$ のときは x - y 平面にて波打つ変形が得られた。

また、ハイブリッドアクチュエータが球面に対してどのように変形するかを評価するために、金属球を用いて熱刺激応答実験を実施した (Fig. 12)。曲線状ハイブリッドアクチュエータは加熱によって金属球の形状に沿って



Fig. 12 Shape-conforming demonstration of the hydrogel-polymer hybrid actuator. Scale bar = 5 mm.

変形し、冷却によって解放する動作を確認した。これより、曲線状ハイブリッドアクチュエータはソフトロボット⁽⁷⁾の特徴である表面追従性を有していることが示された。

4. 結論

本研究では、生体安全性を具備した超音波刺激応答性ハイドロゲルキャリアの開発を目指し、マイクロバブルが超音波刺激によって振動することで、ハイドロゲルの構造を変化させ、効率的に薬剤を放出できるハイドロゲルキャリアを開発した。加えて、このハイドロゲルキャリアを小型化し、生体内で利用できるようにする積載用のハイドロゲルアクチュエータを開発した。実際にマイクロバブルと超音波の複合作用が薬剤モデルの放出率を向上させた。さらに、超音波周波数がマイクロバブルの共振周波数に近づくにつれて薬剤放出効率の向上が示唆された。また、微小球状型ハイドロゲルキャリアを製作し、マイクロサイズへの応用と、超音波刺激への繰り返し応答性を実証した。すなわち、超音波応答性の有するハイドロゲルキャリアを構築した。また、ハイドロゲルと高分子骨格間の機械的嵌合では、加熱・冷却時間の異なる二種類の熱刺激に対しても構造を維持することが示された。また、三次元格子構造による変形制御では、格子形状を $w = 200 \mu\text{m}$, $300 \mu\text{m}$, $400 \mu\text{m}$ の三段階で調整することで、アクチュエータの円弧が閉じる方向への変形、開く方向への変形、ねじれ変形の三つの変形挙動が得られた。これにより、ハイドロゲルキャリアを搭載したマイクロソフトロボットの実現に向けたデモンストラーションを実施することができた。

文献

- (1) T. Kubota, *et al.*, "Ultrasound-triggered on-demand drug delivery using hydrogel microbeads with release enhancer," *Materials and Design*, 2021, 203, p.109580.

- (2) R. Yamakawa, *et al.*, “Hydrogel carrier with bubble vibration enhancer for ultrasound-triggered drug release,” *Ultrasonics Sonochemistry*, **2025**, 112, 107173.
- (3) H. Yasuga, E. Iseri, X. Wei, K. Kaya, G. Di Dio, T. Osaki, K. Kamiya, P. Nikolakopoulou, S. Buchmann, J. Sundin, S. Bagheri, S. Takeuchi, A. Herland, N. Miki, W. van der Wijngaart, *Nat. Phys.* **2021**, *17*, 794.
- (4) J. Hansson, H. Yasuga, T. Haraldsson, W. van der Wijngaart, *Lab Chip* **2016**, *16*, 298.
- (5) M. Devaud, *et al.*, “The Minnaert bubble : an acoustic approach,” *Eur. J. Phys.*, **2008**, *29*, 6, pp. 1263–1285.
- (6) Y. Kurashina *et al.*, “Adeno-Associated Virus-Encapsulated Alginate Microspheres Loaded in Collagen Gel Carriers for Localized Gene Transfer,” *Advanced Healthcare Materials*, **2024**, *13*, 12, p. 2303546.
- (7) D. Terutsuki, H. Yoroizuka, S. Osawa, Y. Ogihara, H. Abe, A. Nakagawa, M. Iwasaki, M. Nishizawa, *Adv Healthcare Materials* **2022**, *11*, 2201627.

本研究の業績

- (1) Ryuto Yamakawa, Hiroaki Onoe, Yuta Kurashina*, “Hydrogel carrier with bubble vibration enhancer for ultrasound-triggered drug release,” *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 112, p. 107173, 2025.
- (2) Haruna Kozuki, Koki Yoshida, Hiroki Yasuga*, Yuta Kurashina*, “Hydrogel-polymer hybrid actuator with soft lattice skeleton for excellent connectivity,” *Sensors and Actuators B : Chemical*, Vol. 430, 137377, 2025.

有機系材料のアップグレードを可能とする重水素化反応開発

九州大学 高等研究院
矢崎 亮

1. 背景・目的

水素の安定同位体である重水素(D)は、通常の水素(軽水素:H)のおよそ2倍の質量で放射性を持たず、取り扱いが容易である。重水素で置換された化合物は、分子全体の性質の変化を最小限に抑えながら安定性の向上が可能となり、光ファイバーなどの高分子材料、医薬品など、近年において応用範囲は拡大し続けている。これらの重水素化材料を用いることで、製品の長寿命化、高耐久性を獲得、資源の有効利用や環境負荷低減を実現できる。よって重水素化合物のケミカルスペース拡張は、持続可能な新たな有機系材料イノベーションの礎となる。

一方、重水素化合物の市販品ラインナップは溶媒などの単純な低分子化合物に限定されている。一般に重水素化合物は、入手可能な低分子の重水素化原料(重水素化ヨウ化メチル(CD₃I)や重水素化ヨードベンゼン(C₆D₅I)等)を用いた多段階合成で得られる。この古典的な合成手法は、重水素を高純度に導入できる信頼性の高い手法である。しかしながら、多段階合成による潜在的な重水素化率の低下、入手可能な重水素化原料に合わせた新たな合成ルートの再構築が不可避であるといった懸念がある。そのため、現状の高コストな重水素化合物がその利用拡大や実用化への障壁となっている。そのため近年では、最も簡便かつ実用的な水素-重水素(H-D)交換反応による重水素の触媒的導入反応の開発が盛んに行われている^{1,7)}。しかし、実用的な触媒的導入反応への課題として、イリジウムやパラジウムなどの貴金属触媒が必要、高温・加圧条件、強酸性・強塩基性などの過酷な反応条件が必要、重水素を導入可能な位置が限定的、重水素化効率が低いなどが残されている。

以上より重水素化有機系材料の利用拡大には、これらの課題を解決する革新的な重水素化反応の確立及び、容易にアクセス可能な重水素化合成素子ライブラリーの拡

充が必須である。そこで本研究では、ユビキタスなエステルやアミドの実用的な触媒的導入反応を開発し、重水素化合物への容易なアクセスを可能とする合成基盤の構築を目的とする。

2. 結果と考察

アミド1aをモデル基質として重水素源の検討を行ったところ、重アセトニトリルを用いた際に重水素化反応が効率的に進行することが確認できた。さらにケイ素試薬と塩基の検討を行ったところ、ケイ素触媒としてトリフルオロメタンスルホン酸トリイソプロピルシリル(TIPSOTf)、塩基として1,4-ジアザビシクロ [2.2.2] オクタン(DABCO)を用いた際に、高い重水素化率で目的物を得る条件を見出した(図1)。

続いて重水素化ライブラリーの構築を行った(図2)。今回の検討では高い重水素率で目的物を得るために、反応時間を48時間と設定して検討を行った。モデル反応のアミド1a以外にも多様な構造の二級アミン由来のアミドも問題なく重水素化反応が進行した(2-11)。さらに、従来法では重水素化困難であった、酸性度の高いNH結合を有する一級アミド由来のアミドの加熱条件にて重水素化することに成功した(12)。さらに酸性度の高いアニリドや、アンモニア由来のアミドに関しては、TIPSOTfとDABCOを化学量論量用いることで高い重水素化率を達成した(13,14)。その他、アミノ酸や他の官能基共存化においても目的物を高い重水素化率で得ることに成功

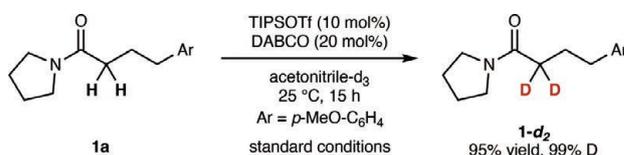
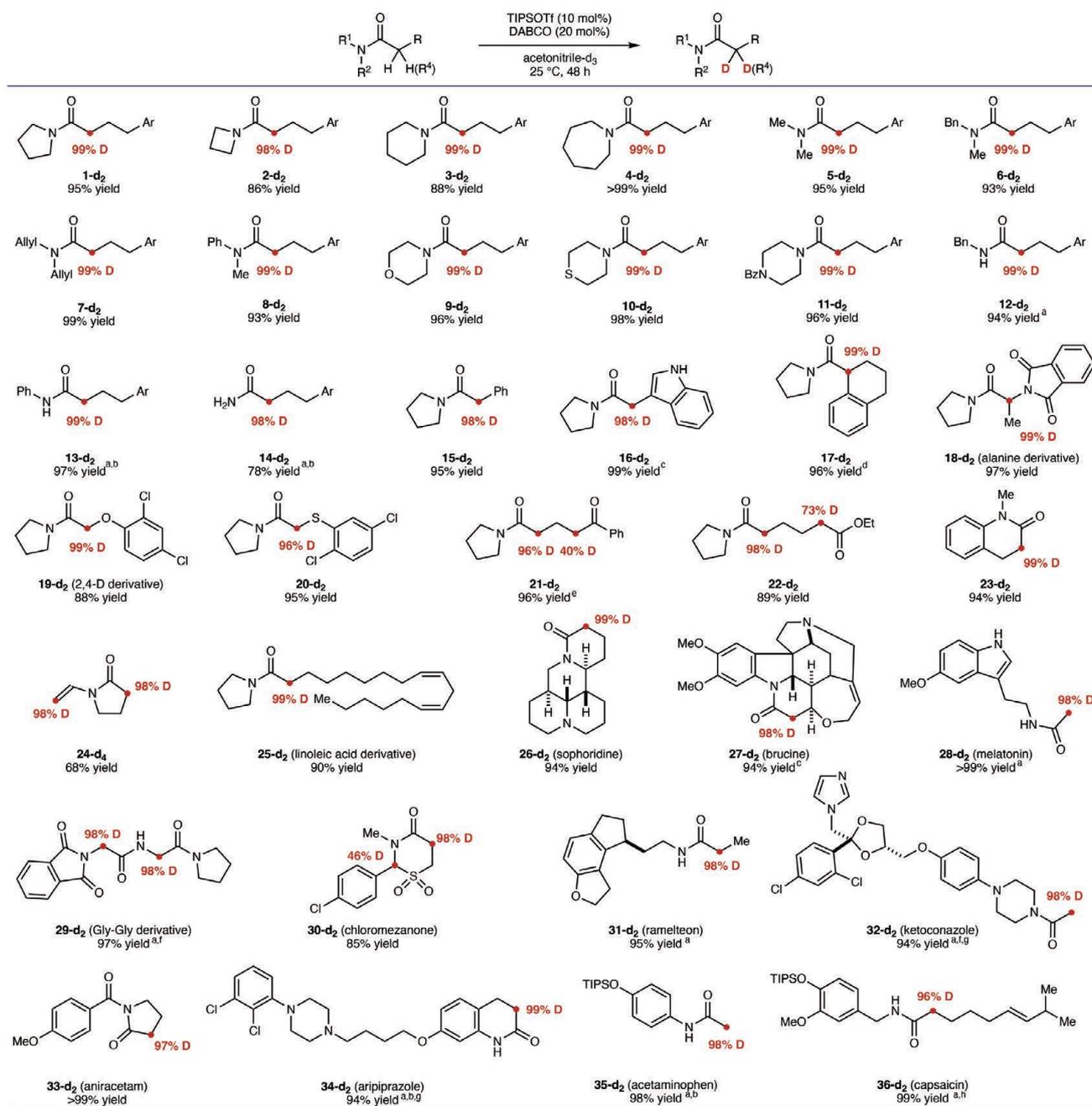


図1. ケイ素触媒を用いたアミドの重水素化

した(15-20)。

立体障害の大きな α -二置換のアミドを用いた際は、触媒を立体障害の小さなトリフルオロメタンスルホン酸トリエチルシリル(TESOTf)に変更することで高い重水素化率を達成できた(17)。エステルやケトンを含む基質を用いて反応を行ったところ、アミドと同様に、ケトン、エステルの重水素化反応も進行することが確認された(21,22)。エステルを有する基質に関して、種々検討を行ったところ、塩基を1,8-ジアザビシクロ [5.4.0] -7-

ウンデセン(DBU)に変更することで、アミドの α 位のみを選択的重水素化させることにも成功し、塩基を使い分けることで触媒活性の制御も可能であった。機能性材料のモノマーであるビニルピロリドンも問題なく重水素化反応が進行し、各種モノマーへの応用も可能であることが確認できた(24)。その他に、天然物や医薬品など、複雑な炭素骨格や多官能基性のアミドを用いて重水素化反応を行った(25-34)。いずれもアミドの α 位選択的に重水素を導入することが可能であり、本研究で開発した



Reactions were conducted on 0.20 mmol scale using 1.0 ml of acetone-d₆. Isolated yields are shown ^a 60 °C. ^b TIPSOTf (3.0 equiv), DABCO (6.0 equiv). ^c THF was added as cosolvent.

^d TESOTf (20 mol%), DABCO (40 mol%). ^e Quinuclidine was used. ^f TIPSOTf (30 mol%), DABCO (60 mol%) ^g Chlorobenzene was added as cosolvent.

^h TIPSOTf (3.0 equiv), DABCO (6.0 equiv). ⁱ TIPSOTf (1.1 equiv), DABCO (2.2 equiv). Ar = *p*-MeO-C₆H₄

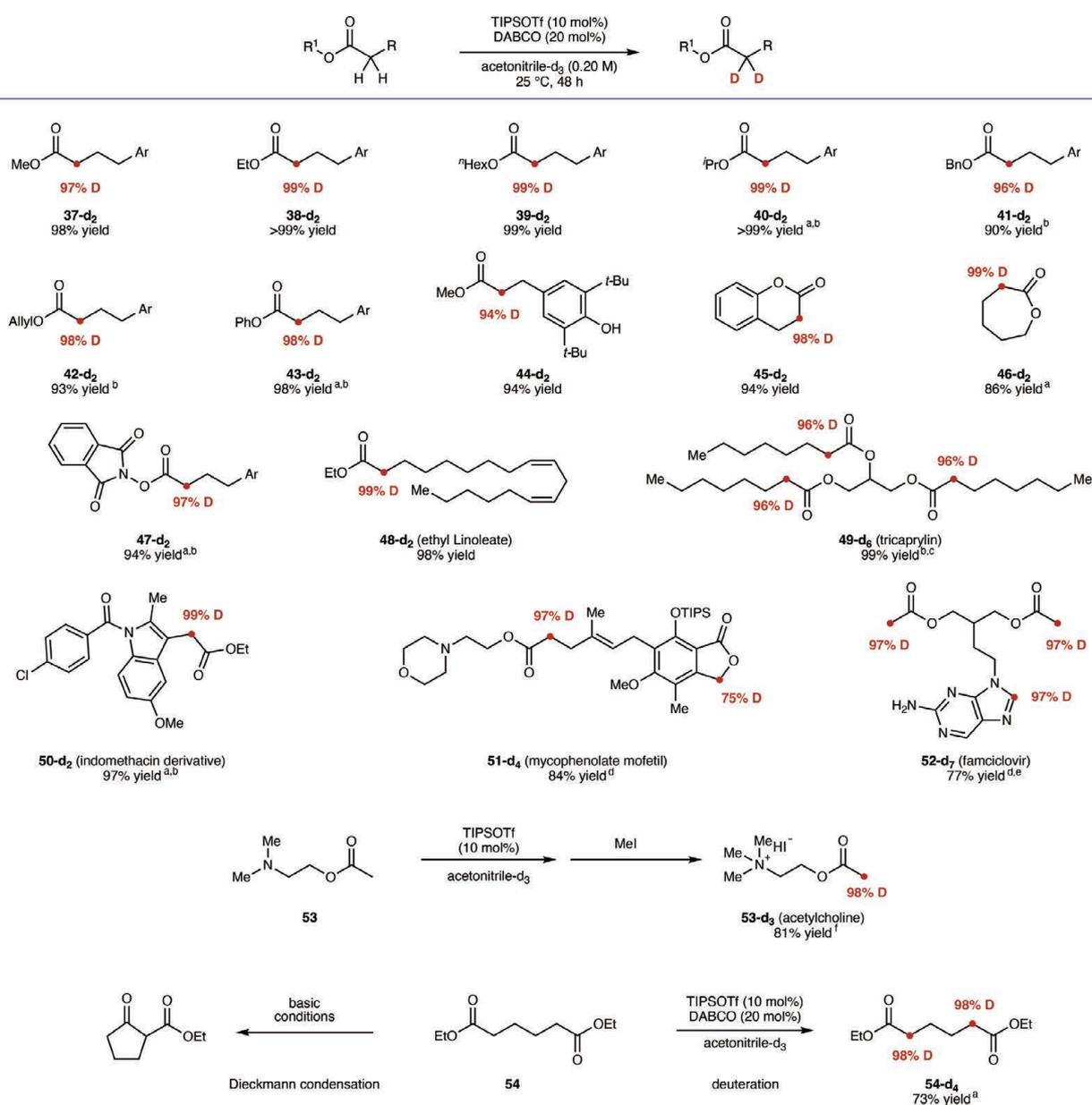
図 2. ケイ素触媒を用いたアミドの重水素化ライラリ構築

触媒的重水素化反応が、極めて温和で多様な化合物へ応用可能であることが確認できた。無保護のヒドロキシル基を持つ化合物は、1当量以上のケイ素触媒を用いることで、反応系中で保護を行いながら重水素化反応を進行させることができた(35,36)。

続いて、アミドと同様に機能性材料などに多くみられるエステルの重水素化ライブラリー構築を行った(図3)。エステルを用いた場合にもアミドと同様に高い重水素化率で目的物を得ることが可能であった(37,38)。活性化されていない単純なエステルを触媒的に活性化する方法はこれまで報告例が無く、本触媒的な重水素化反

応が世界で初の例となる。本重水素化手法は、ほぼ中性条件の極めて温和な条件で重水素化可能で、多様なアルコール由来のエステルを用いることが可能であった。エタノールやメタノール以外に、ヘキサノール、立体障害の大きなイソプロピルアルコール、脱保護可能なベンシルアルコールやアリルアルコール由来の各種エステルは、高い収率と重水素化率で目的物へと変換された(39-42)。特筆すべきことに、酸塩基条件で不安定なフェノール由来のエステルも加水分解されることなく重水素化体へと変換された(43)。

立体的に遮蔽されたフェノール官能基は保護すること



Reactions were conducted on 0.20 mmol scale using 1.0 ml of acetonitrile-d₃. Isolated yields are shown ^a TIPSOTf (30 mol%), DABCO (60 mol%) ^b 60 °C. ^c TIPSOTf (90 mol%), DABCO (180 mol%). ^d TIPSOTf (3.0 equiv), DABCO (6.0 equiv). ^e Isolated after treatment of NEt₃·HF (3.0 equiv). ^f 40 °C. Ar = *p*-MeO-C₆H₄

図3. ケイ素触媒を用いたエステルの重水素化ライブラリー構築

なく重水素化可能であった(44)。各種ラクトンも問題なく重水素化反応が進行し、機能性材料のモノマーであるカプロラクトンも重水素化体へと変換できた(45,46)。また、アルキルラジカル前駆体として機能するレドックス活性エステルも加熱することで、重水素化することが可能であった。本結果より、多様な重水素化アルキル源を合成できることが確認され、さらなる重水素化ライブラリーを拡大することが可能であることがわかった(47)。

その他、天然物や医薬品などのエステルを選択的に重水素化可能であった(48-52)。市販の原料から2段階で重水素化アセチルコリンを合成することにも成功した(53)。塩基性条件では、Dieckmann縮合が進行するジエステル基質においても、2箇所のエステルの α 位を重水素化することができた(54)。

続いて、開発した触媒反応の実用性を確認するためグラムスケールでの検討を行った。実用性を考慮し、触媒量の低減と重水素源である重アセトニトリルの低減を行った。検討の結果、共溶媒としてトルエンを用いることで、カラムクロマトグラフィーを用いることなく7g以上の重水素化体を得ることに成功した。また、重水素化したアミド、エステルの変換反応も行った。アミド2-d2を原料として用いることで、ケトンやアルデヒドなど酸化状態を自在に変化させることに成功した。各種複素環合成を可能とするチオアミドへの変換も容易であった。還元反応条件によって、 β 位に重水素が導入されたアルコール、アミンへと高収率で変換された。エステルも同様にエーテルや立体障害の大きなアルコールへと変換可能であった。いずれの変換反応においても、重水素化率の低下を伴うことなく目的物を得ることができ、重水素化ライブラリーの迅速な拡大が可能であることが確認できた。

最後に、開発したケイ素触媒を用いて、機能性材料の直接重水素化の検討を行い、ポリカプロラクトンを用いることで、エステルの α 位を選択的に重水素化することに成功した(図4)。現在のところ、反応後の精製条件などの最適化を行えていないため、収率は30-40%程度で

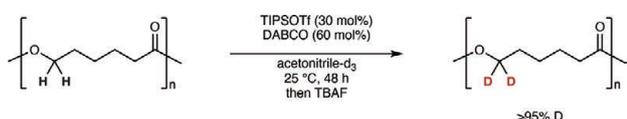


図4. ポリカプロラクトンの重水素化

はあるものの、95%以上の高い重水素化率で重水素化ポリカプロラクトン単離することに成功した。本反応はポリマーを直接用いた世界初の触媒的軽水化反応であり、学術的にも新規性が極めて高い⁸⁾。

3. 結論

従来法では困難であったアミド、エステルの触媒的軽水化反応の開発に成功した。さらに、多くの軽水化合物を合成できるだけでなく、詳細な反応機構解析によってアミド選択的に軽水化可能であることも見出した。また、ケイ素触媒による軽水化反応としても世界初の例となる。さらに本触媒反応をポリカプロラクトンに適用することで、高い軽水化率で目的物を得ることに成功し、本触媒反応がポリマーに適用可能であることを確認することができた。

4. 謝辞

本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団の助成を受けて行われました。深く感謝申し上げます。

5. 参考論文

- (1) Atzrodt, J., Derdau, V., Fey, T. & Zimmermann, J. The Renaissance of H/D Exchange. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 7744-7765 (2007).
- (2) Atzrodt, J., Derdau, V., Kerr, W. J. & Reid, M. C-H Functionalisation for Hydrogen Isotope Exchange. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 3022-3047 (2018).
- (3) Prakash, G., Paul, N., Oliver, G. A., Werz, D. B. & Maiti, D. C-H deuteration of organic compounds and potential drug candidates. *Chem. Soc. Rev.* **51**, 3123-3163 (2022).
- (4) Kopf, S. et al. Recent Developments for the Deuterium and Tritium Labeling of Organic Molecules. *Chem. Rev.* **122**, 6634 (2022).
- (5) Dey, J. & Van Gemmeren, M. Late-Stage C-H Deuteration of Organic Compounds via Ligand-Enabled Palladium-Catalyzed Hydrogen Isotope Exchange. *Synlett* 2191-2200 (2023).
- (6) Li, H., Shabbir, M., Li, Wu. & Lei, A. Recent Advances in Deuteration Reactions. *Chin. J. Chem.*

- 42, 1145 (2024).
- (7) Ogasahara, R., Ban, K., Mae, M., Akai, S. & Sawama, Y. Deuterated Alkyl Sulfonium Salt Reagents : Importance of H/D Exchange Methods in Drug Discovery. *ChemMedChem*, **19**, e202400201 (2024).
- (8) Koga, Y., Fukumoto, I., Masui, K., Tanaka, T., Naganawa, Y., Hayashi, M., Ohshima, T. & Yazaki, R. Silicon frustrated Lewis pairs catalyse α -deuteration of amides and esters. *Nat. Catal.* **8**, 1062–1071 (2025).

有機蛍光色素への電気学的な保護基の導入と 中間種の分解抑制による電気化学発光の増強

香川大学 創造工学部
田原 圭志朗

1. 緒言

電気化学発光(Electrochemiluminescence, ECL)は、免疫測定法などのバイオ分野からディスプレイ用途に至るまで、広範な応用が期待される電気化学的発光現象である¹。フォトルミネッセンス(PL)と比較して光源が不要なため光学系が簡略であり、化学発光(CL)に対しては発光の時間的・空間的制御が容易である点が利点として挙げられる。ルテニウムやイリジウム、白金などの貴金属錯体が代表的な分子性ECL発光体として知られているが、近年では低コスト、安全性、構造による色調制御の容易さなどから、貴金属を含まない純有機色素の開発が進んでいる。一方で、有機ECL材料においては、電気化学的に生成されるラジカルカチオンおよびラジカルアニオンの不安定性が課題となっており、これらの中間体が反応に至る前に分解することが大きな障壁となっている。

有機エレクトロニクス分野では、軽量かつ可撓性に富んだフレキシブルデバイスの実現を目指し、有機材料を用いた素子の研究が活発に進められている。中でも有機半導体は中核的役割を担う材料であり、高移動度の達成に向けた分子設計や印刷技術が一部確立されてきている。近年では、電気化学との学際的融合が注目されており、有機半導体と電解質を組み合わせた有機電気化学トランジスタ²や、有機エレクトロルミネッセンスに電解質を導入した有機発光電気化学セルなどが開発され、従来のECL研究との関連性も見出されている。

我々は、p型有機半導体の一つとして、大気安定性と高いホール移動度を示すベンゾチエノベンゾチオフェン(BTBT)を基幹物質に据え、錯体化学のアイデアを組み合わせることで、新規金属錯体やBTBT誘導体を開発してきた(図1)。中でも、ピリジンを電子アクセプターに

用いたドナー・アクセプター型有機色素1mの研究では、高高いLewis酸のトリスペンタフルオロフェニルボラン(TPFB)との複合化により、ホウ素錯体1m-TPFBを開発している。興味深いことに、TPFBは電気化学的な保護基として作用し、BTBTのピリジル誘導体のラジカルイオンの安定性を著しく向上させることを見出した³。このTPFBによる安定化により、ECLの強度を最大で

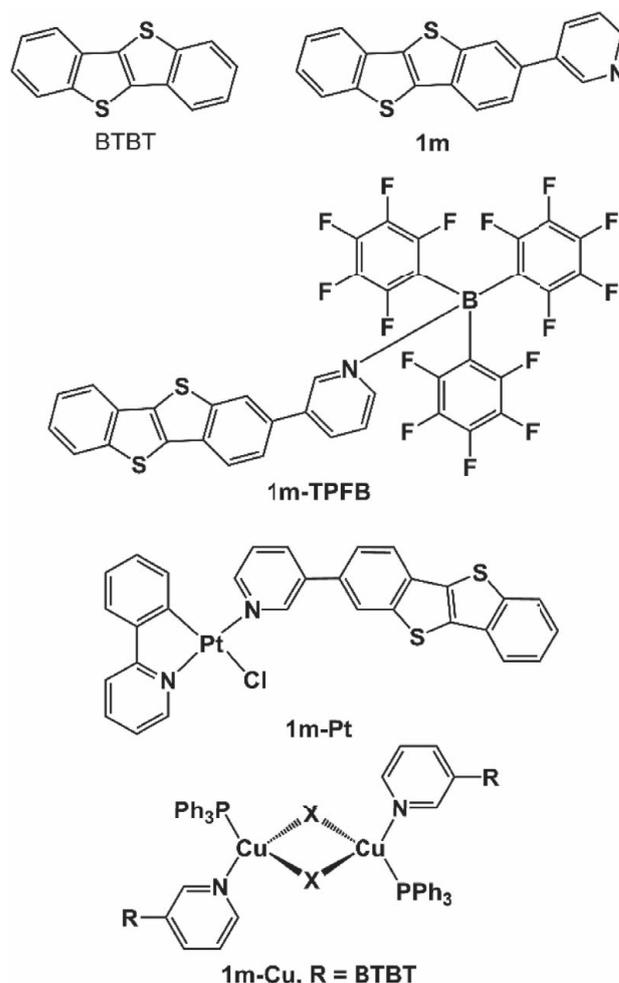


図1. BTBT誘導体およびBTBT骨格を配位子に導入した金属錯体の構造。

156倍にまで向上させることに成功した。そこで本研究では、BTBTのピリジル誘導体を配位子として用い、別の金属中心を有する新規金属錯体の開発と物性評価を目的とした。

2. BTBT骨格を配位子に導入したシクロメタル化白金錯体の開発と物性評価

平面四配位構造をとるPt(II)錯体の中でも、Pt-C結合を含むシクロメタル化錯体は、優れた発光特性を持つエレクトロルミネッセンス(EL)材料として注目されている。近年、2-フェニルピリジン(ppy)を単座および二座配位子として導入したPt(II)錯体が、光照射により単座配位子のC(sp²)-H結合を活性化できることが報告された⁴。このC-H活性化は、配位子由来の三重項 $\pi-\pi^*$ 励起状態から誘起される反応であり、この錯体における励起状態の電子的性質への関心が高まっている。

前駆体として用いた二核白金錯体 [Pt₂Cl₂(ppy)₂] と、有機分子であるBTBT-pyを、エトキシエタノールを溶媒とした条件下で反応させることにより、目的とする新規白金錯体 **1 m-Pt** を合成することに成功した(図1)。この合成反応は、比較的穏やかな条件下で進行し、収率良く目的物が得られた。合成後に得られた生成物は、¹H NMR(核磁気共鳴)分光法およびESI-MS(エレクトロスプレーイオン化質量分析)によって構造同定が行われ、その分子構造と分子量の正確性が確認された。

さらに、量子化学計算であるDFT(密度汎関数理論)法を用いて目的錯体 **1 m-Pt** の最適化構造を算出し、その結果をもとに電子構造の詳細な検討を行った。その考察の結果、目的錯体は、BTBT骨格のない参照錯体錯体とBTBT-pyそれぞれが有する特徴的な電子的性質の両方を兼ね備えていることが明らかとなった。

参照錯体においては、HOMO(最高被占軌道)が約50%の電子密度をppy配位子に、約38%を白金中心に持つ分布を示しており、一方LUMO(最低空軌道)は約89%がppy部位に局在していた。目的錯体においては、これらの錯体 **1** のHOMOおよびLUMOに相当する軌道がそれぞれHOMO-1およびLUMO+1として現れ、それらの軌道分布およびエネルギー準位は極めて近接しており、明確な対応関係が認められた。

一方、**1 m** に関しては、HOMOの93%がBTBT部位に、7%がピリジル部に局在しており、LUMOはBTBTに

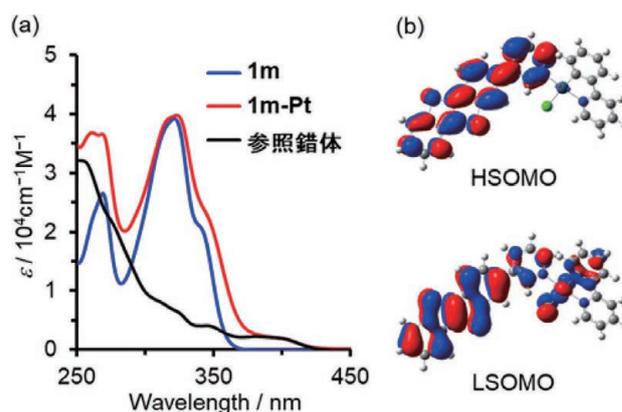


図2. (a) シクロメタン中の **1 m-Pt** および関連化合物の吸収スペクトル。(b) T₁状態における **1 m-Pt** のHSOMOおよびLSOMO。

80%、ピリジル基に20%分布しているという特徴が見られた。目的錯体では、これらのBTBT-pyのHOMOおよびLUMOに対応する軌道が、それぞれHOMOおよびLUMOとして現れ、軌道分布および準位において非常に良く一致していた。目的錯体の極大吸収波長は、参照錯体および **1 m** と比較してもほとんど差が認められず、似たような吸収特性を有することが分かった(図2)。

続いて、目的錯体の励起状態における電子構造をより詳細に調べるために、TD-DFT(時間依存密度汎関数理論)計算を用いて三重項励起状態(T₁)の構造最適化を実施した。その結果得られたSOMO(単占軌道)の分布解析から、参照錯体のT₁状態は、主としてppy配位子を中心とした³ $\pi-\pi^*$ 励起であることが明確となった。一方、BTBT-pyのT₁状態は、BTBT部分からピリジル基への電荷移動に起因する³ICT(三重項電荷移動)状態であることが確認された。目的錯体のT₁状態においては、明確にBTBT-py部位に励起が偏在しており、³ICT特性が顕著に現れていることが分かった(図2b参照)。これは、目的錯体の励起に際して、BTBT-pyの性質が優位に現れることを示している。また、目的錯体のT₂状態については、ppy配位子を起点とした³ $\pi-\pi^*$ 状態であると特定された。

発光特性に関しては、アセトニトリル溶液中における参照錯体は、波長513 nmにおいて、ppy配位子に起因する³ $\pi-\pi^*$ 状態由来のリン光を示した。一方、**1 m** 単体は384 nm付近で¹ICT状態に由来する蛍光を示しており、蛍光量子収率は0.181、蛍光寿命は0.45ナノ秒であった。目的錯体については、明確な蛍光またはリン光の観測は困難であったものの、わずかに発光が検出された。この

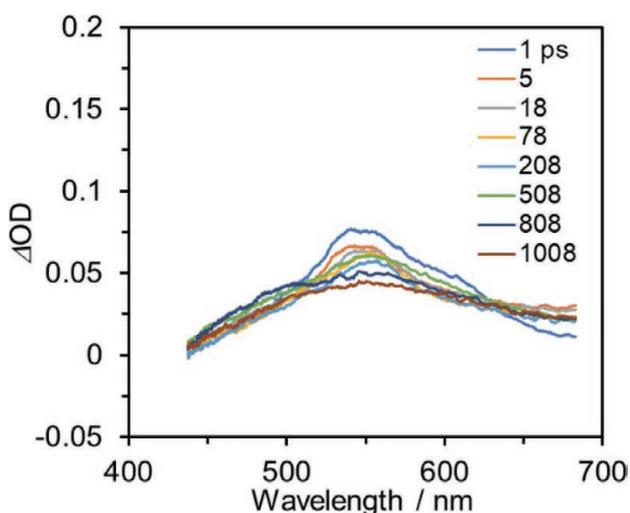


図3. アセトニトリル中での1 m-Ptの過渡吸収スペクトル。

発光のスペクトルや寿命、量子収率が1 mと極めて近い値を示したことから、合成過程で1 mが完全には除去されず、不純物として残留していた可能性が高いと考えられる。さらに、1 mがPt(II)中心と配位することで、いわゆる重原子効果が誘起され、 ^1ICT から ^3ICT への効率的な系間交差(ISC)が促進されたと推察される。その結果として、 ^1ICT 状態からの蛍光は著しく消光された可能性がある。加えて、目的錯体の過渡吸収スペクトルを測定した結果、そのスペクトル形状が1 mのものと非常によく似た特徴を示していた(図3)。これは目的錯体の励起状態が主として1 m部位に由来することを裏付けるものであった。さらに、時間分解過渡吸収測定により、励起種の時間変化挙動を追跡した結果、目的錯体の励起状態は1 m部位に局在した ^3ICT 状態であると帰属された。この観察結果は、TD-DFT計算によって得られた理論的知見ともよく一致していた。

以上の結果から、目的錯体においては、理論的にも実験的にも、最低励起三重項状態(T_1)は明確に1 m部位に偏在した ^3ICT 状態であると結論づけられた。錯体2では、配位されている二種の配位子—ppyと1 m—のいずれもが三重項励起状態を形成可能であるが、エネルギー的な観点からは、1 m由来の ^3ICT 状態がより安定であり優先的に形成される。実際、発光エネルギーの比較においても、参照錯体の $^3\pi-\pi^*$ 状態の方が1 mの ^1ICT 状態よりも低エネルギー側にあることが示されている。それにもかかわらず目的錯体においては ^3ICT が T_1 として現れていることから、配位子中心における異常なシフトが生じていると考えられる。

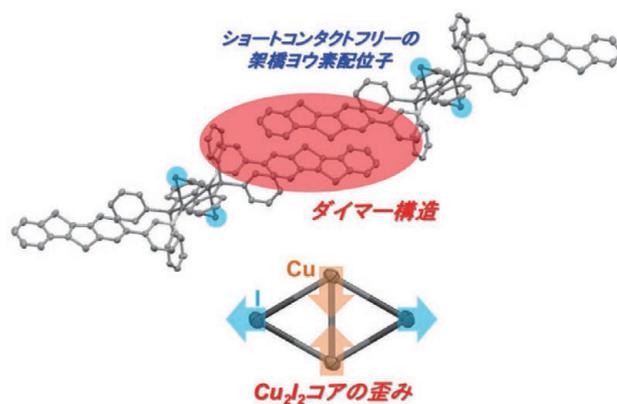


図4. 1 m-Cuの単結晶X線構造解析。

3. BTBT骨格を配位子に導入した銅二核錯体の開発と物性評価

本研究では、有機半導体として高性能かつ安定性に優れたBTBTを含有する新規ヨウ素架橋二核銅(I)錯体 $[\text{Cu}_2\text{I}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{BTBT-py})_2]$ (以下、1 m-Cu)を合成し、その構造的特徴および固体発光特性を明らかにした(図1)。出発物質には、既報の参照錯体 $[\text{Cu}_2\text{I}_2(\text{PPh}_3)_2(3\text{-ピコリン})_2]$ を用い、配位子交換反応によってBTBT誘導体であるBTBT-pyを導入することで合成された。得られた錯体1 m-Cuは、黄色結晶として分離され、X線結晶構造解析、光物性測定、電気伝導度測定、さらに理論計算(DFT、ADF)により詳細に評価した。

X線構造解析の結果、錯体1 m-Cuは PPh_3 およびBTBT-py配位子2分子ずつを有する二核構造を取ることが確認された(図4)。中心の $[\text{Cu}_2\text{I}_2]$ コアは、従来の類似錯体に比べてCu...Cu距離が顕著に短く(2.69 Å)、I-I距離が長く(4.60 Å)なるような「潰れた」菱形構造を示した。これはBTBTの立体的および電子的効果に起因すると考えられる。また、結晶中にはクロロホルム分子が共結晶化しており、1 mユニットが $\pi-\pi$ スタックを形成しつつ一方に配列され、1次元チャンネル構造が形成されていた。このようなパッキング様式が分子間の電子的相互作用を助長することが示唆された。

理論計算では、1 m-Cuと参照錯体の最適化構造を比較し、結晶中の異常に短いCu...Cu距離は分子間パッキングに起因することが明らかとなった。さらに、HOMOは両錯体とも主に Cu_2I_2 コアに局在し、LUMOはピリジル部に位置した。BTBT導入によってLUMO準位が著しく低下し(BTBT-pyでは-1.58 eV、3-ピコリンでは-0.48 eV)、金属-配位子間電荷移動(MLCT)に必要な

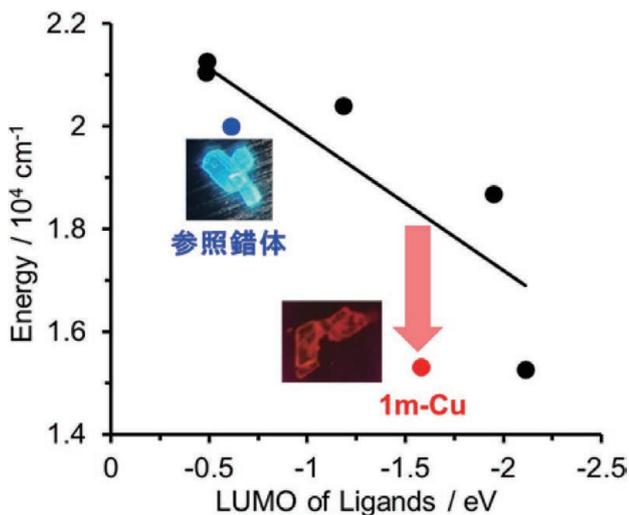


図5. 1 m-Cuおよび類似錯体のシリーズにおける、配位子のLUMO準位と発光エネルギーの相関。

な励起エネルギーが減少することが示された。また、分子間のLUMOの重なりによってトランスファー積分は18.9 meVと大きく、電子が分子間で非局在化することが示唆された。

電気伝導度測定では、1 m-Cuおよび1 m単体ともに 10^{-8} S cm^{-1} 程度であり、これは真空蒸着薄膜で測定されたC8-BTBTより2桁低い値であった。この差は、結晶性や試料の形態(粉末 vs. 薄膜)に起因すると考えられ、同様の導電度オーダーはBTBTを含む他の金属錯体でも観測されている。

光学特性としては、固体状態で365 nmのUV照射下において錯体1 m-Cuは653 nmに強いリン光を示し、参照錯体の443 nmに比べて著しくレッドシフトした(図5)。この発光は、 Cu_2I_2 コアから1 mへの三重項X/MLCT ($^3\text{X}/\text{MLCT}$)由来であり、DFTおよびADFによる励起状態計算により裏付けられた。興味深いことに、1 m自体は451 nmにICT由来の蛍光を示すが、錯体1 m-Cuの発光とは明確に区別され、錯体1 m-Cuにおける最低励起三重項状態 T_1 は、1 mベースの励起状態ではなく、金属中心からの電荷移動によるものであった。また、これまでの類似の錯体シリーズでは、ピリジン配位子のLUMOエネルギーが増加するにつれて、発光エネルギーは直線的に減少することが知られていた。このシリーズにおいても、1 m-Cuの発光は著しくレッドシフトしていた。

この異常なレッドシフトの要因は、(i) 結晶中における1 mユニットの π - π スタックによる分子間電子カップリング、(ii) 三重項励起状態における構造緩和の2点

で説明できる。特に、 T_1 状態ではCu...Cu距離がわずかに伸長し、I...I距離が短縮、さらに1 m部位のねじれ角が約 9° 減少して平面化するという構造変化が見られた。一方、参照錯体では結晶中でのI...Hショートコンタクトにより、こうした構造緩和が抑制されていたと考えられる。1 m-Cuでは、1次元チャンネル構造によってBTBTユニットの自由度が確保されていたため、発光状態での構造緩和が可能であり、結果として低エネルギーの発光が得られた。

総じて、本研究は、多核銅(I)錯体においてBTBT誘導体を配位子として導入することで、結晶構造、分子間相互作用、電子状態、光物性が密接に関連し、新たな発光機構とチューニング可能な材料設計が可能であることを示した。また、 π - π 相互作用やチャンネル構造が光物性に与える影響を明確に示した点は、今後の発光材料や電子機能性材料の開発にとって有意義な知見を提供するものである。

4. 結論

本研究では、BTBT骨格を有するドナー・アクセプター型分子1 mを配位子として利用し、BTBT骨格を発光性白金錯体や銅錯体に導入した。シクロメタル化白金錯体においては、溶液中でのPt(II)中心の重原子効果によって、系間交差が促進され、1 m部位の ^3ICT 状態を過渡吸収スペクトルによってとらえることができた。菱形銅(I)二核錯体では、結晶状態で、1 m部位ではなく、 $^3\text{X}/\text{MLCT}$ 由来の発光が観測された。BTBT部位間の電子カップリングが一つの要因となり、従来の錯体シリーズよりも著しく発光がレッドシフトしていた。このように、ドナー・アクセプター型分子と錯体化学の組み合わせにより、BTBT骨格が関与するユニークな光物理的性質を明らかにすることができた。今後、さらに、電気化学的な知見を得ることで、多様化する有機エレクトロニクスにおけるデバイス活性層の開発に貢献することが期待される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人松籟科学技術振興財団に深く感謝申し上げます。本研究は、兵庫県立大学大学院理学研究科構造物性学講座との共同研究により、実施しました。兵庫県

立大学大学院理学研究科の池田貴志君、理学部物質科学研究科の小林彬人君、堀尾巴人君に厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

1. Z. Zhang, P. Du, G. Pu, L. Wei, Y. Wu, J. Guo and X. Lu, *Mater. Chem. Front.*, 2019, **3**, 2246.
2. Y. Sasaki and T. Minami, *Phys. Status Solidi A*, 2023, **220**, 2300469.
3. T. Ikeda, K. Tahara, R. Ishimatsu, T. Ono, L. Cui, M. Maeda, Y. Ozawa and M. Abe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, **62**, e202301109.
4. F. Juliá and P. Gonzalez-Herrero, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 5276.
5. K. Tahara, A. Kobayashi, M. Fujitsuka, Y. Osakada, K. Tokunaga, T. Ikeda and M. Abe, *Organometallics*, 2024, **43**, 840.
6. T. Ikeda, K. Tahara, T. Kadoya, Y. Ozawa and M. Abe, *Chem. Lett.*, 2024, **53**, upae092.

非貴金属水電解触媒への応用を志向した キラル共有結合性有機構造体の創製

名古屋大学 大学院理学研究科
須田 理行

1. はじめに

電子の持つ「スピン角運動量」の自由度を利用したスピントロニクスにおいては、主として無機材料からなる強磁性材料や電磁石などによる強力な外部磁場を用いることが不可欠である。一方で従来、有機材料はそのスピン軌道相互作用の小ささから、電流/スピン流変換材料への応用には本質的に不利であるというのが常識であった。

ところが近年、キラル分子をトンネルした電子におけるスピン選択性: Chiral-induced Spin-selectivity (CISS) 効果が発見され、有機分子による強磁性体や外部磁場の不要な新たな電流-スピン流変換原理の可能性が示された [1]。申請者はCISS効果を用いたスピントロニクス素子創出の可能性を着想し、世界に先駆けて分子キラリティ制御による電流-スピン偏極電流(以下、スピン流とする)変換やスピン流の外場制御が可能なデバイスの開発に取り組んできた [2,3]。これらの素子ではスピン偏極率として~95%程度を実現し、この値は一般的な強磁性金属のスピン偏極率を凌駕する値である。

更に、申請者らはCISS効果によって生成したスピン流を利用することで、スピン一重項基底状態とスピン三重項基底状態が競合する電気化学反応下におけるスピン多重度選択性を着想し、これを利用したスピン流による効率的酸素発生(水電解)反応を実現している [4,5]。以上のように、キラルな有機物質において、CISS効果に基づく分子スピントロニクスおよびスピン依存電気化学という新たな学問分野の開拓が期待されている。

そこで本研究では、二次元多孔性高分子(Covalent Organic Frameworks: COF)の骨格に、キラリティを導入することで、キラル二次元多孔性高分子を創製し [6]、高効率な電流からスピン流への変換機能を創出す

キラル二次元多孔性高分子

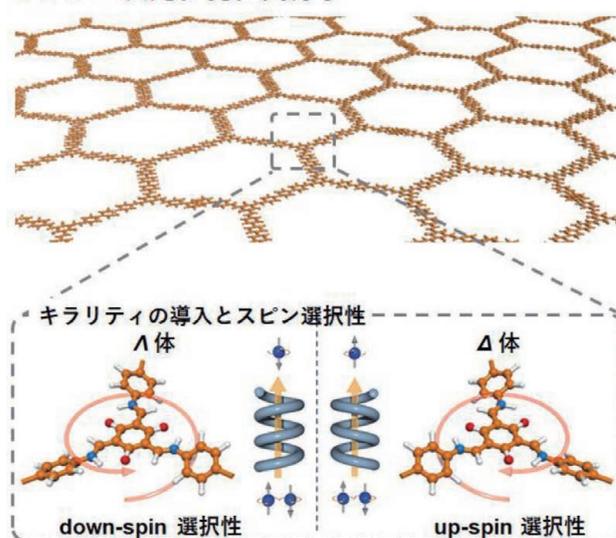


図1. 本研究計画の概要

るとともに、生成したスピン流によるスピン多重度選択性と二次元多孔性高分子が元来有する水電解反応への触媒活性との相乗効果による超効率の水電解への応用を実現すること目的とした(図1)。

2. 研究方法・結果

(1)キラル二次元多孔性高分子の合成

図2に示すように、COFの合成を行った [7]。アルデヒドコア分子である2,4,6-triformylphloroglucino (5.2 mg, 0.025 mmol) およびキラルモジュレーターである(R/S)-(+/-)-1-phenylethylamine (8.0 μ L, 0.063 mmol) (キラリティ誘起を行わないものについてはaniline (5.7 μ L, 0.063 mmol)を加えた)をmesitylene / 1,4-dioxane (12 mL / 3 mL)に溶解させた後、反応容器にアミンリンカーとして4,4'-diamino-p-terphenyl (Tp) (9.62 mg, 0.037 mmol)、4,4'-(1,2,4,5-tetrazine-3,6-diyl) bis

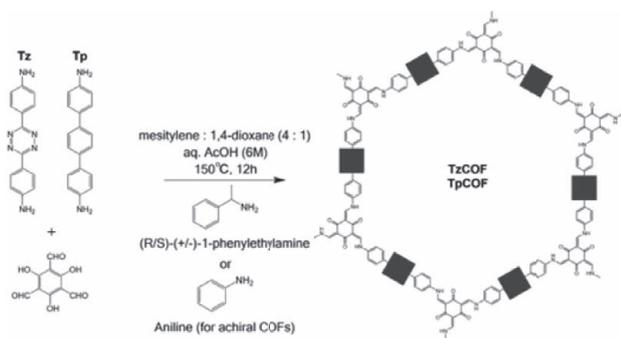


図2. キラルCOFの合成

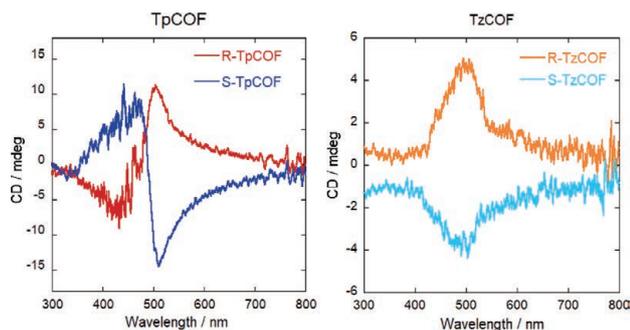


図3. TpCOF (左), TzCOF (右)のCDスペクトル

[benzenamine] (Tz) (9.78 mg, 0.037 mmol) のいずれかを加えた。反応容器にacetic acid (6 M, 1.5 mL) を滴下し、洗浄した石英基板を立てかけ、150 °Cで12時間加熱し合成を行った。反応後、室温まで冷却したのち、石英基板上に合成されたもの、および反応容器の壁面から剥がしとったものとして、フィルム状のCOFを得た。生成物は、N,N-dimethylacetamide、acetone、tetrahydrofuranで洗浄を行った。以上の手順で、2種類のアミンリンカーを用いた2種類のCOF(以下、使用したリンカーの種類に応じてTpCOF, TzCOFとする)について、R体あるいはS体のモジュレーターによるキラリティ誘起を行ったものと、キラリティ誘起を行わなかったものの3種類、計6種のCOFを合成した。

(2) 円二色性スペクトル測定

円二色性 (CD) スペクトルを測定することにより、合成したキラルCOFのキラリティの評価を行った。図3に、TzCOF、TpCOFのCDスペクトルを示す。どちらにおいても、ミラーイメージのCDシグナルが観測された。したがって、キラルモジュレーター導入により合成されたCOFにキラリティが誘起されたと推察できる。本研究で用いたキラルモジュレーターである(R/S)-(+/-)-1-phenylethylamineは、250-270 nm付近に特徴的

なCDシグナルを示す。本研究で合成したCOFのスペクトルでは、この波長域ではCDシグナルおよび吸収は見られず、代わりにCOFの極大吸収波長付近と考えられる領域にCDシグナルが見られた。このことから、実際にキラルモジュレーターからCOF骨格にキラリティが転写されているということが推察される。

③コンダクティブAFMを用いた電流—電圧測定によるスピン選択性の評価

コンダクティブAFMを用いて測定したTpCOFの電流—電圧曲線を示す(図4)。赤線はカンチレバーを上向きに磁化させたときの電流値、青線はカンチレバーを下向き磁化させたときの電流値を示す。R/S体どちらにおいても、カンチレバーの磁化方向に依存して電流値が変化していることがわかる。この結果は、キラルCOF中を通る電流でスピン偏極が起こっていることを示唆する。また、キラリティの反転に伴って、スピン偏極の傾向、すなわちスピン選択性が判定していることがわかる。したがって、この測定におけるスピン偏極は、COFのキラリティに起因するものであることが推察できる。

次に、TzCOFの電流—電圧曲線を示す(図5)。TzCOFにおいても、カンチレバーの磁化方向に依存した電流値の違いが観測され、また、R体で上向きスピン選択性、S体で下向きスピン選択性を持つという、スピン選択性の傾向もTpCOFと類似していた。

Conductive-AFMによる電流—電圧測定の結果から、キラルCOF中のスピン偏極率を算出することができる。スピン偏極率(SP)の算出は、以下の式によって行うことができる。

$$SP (\%) = 100 \times \frac{I_{up} - I_{down}}{I_{up} + I_{down}}$$

ここで、 I_{up} はカンチレバーを上向き磁化にした時の電流値、 I_{down} はカンチレバーを下向き磁化にした時の電流値である。この式を用いて、図4、5で示した電流—電圧特性から、スピン偏極率をそれぞれの電圧において算出したものを図6に示す。どちらの図においても、R体で上向きスピン選択的、S体で下向きスピン選択的になっていた結果を反映するものである。

CISS効果によるスピン偏極率は、通過した分子の長さ依存することが明らかになっている [8]。したがって、得られたスピン偏極率を合成したCOFの膜厚で規

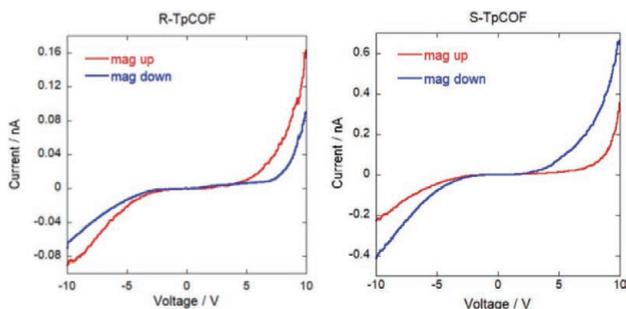


図4. R-TpCOF (左), S-TpCOF(右)におけるスピンの偏極コングラティブAFM測定によるスピン選択性の評価

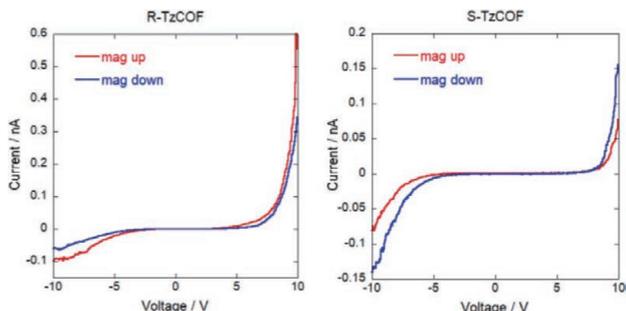


図5. R-TzCOF (左), S-TzCOF(右)におけるスピンの偏極コングラティブAFM測定によるスピン選択性の評価

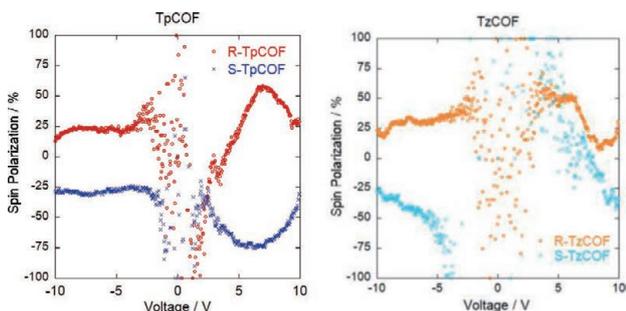


図6. R-TpCOF (左), S-TpCOF(右)におけるスピンの偏極率のバイアス依存性

表1. 膜厚で規格化したスピン偏極率

| | R-TpCOF | S-TpCOF | R-TzCOF | S-TzCOF |
|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Thickness / nm | 230 | 200 | 100 | 130 |
| SP @-8 V / % | 23 | -30 | 31 | -37 |
| Normalized SP / % nm ⁻¹ | 0.10 | -0.15 | 0.31 | -0.28 |

格化することで、異なるサンプル間での比較が可能になると考えられる。

表1に、それぞれのCOFの膜厚と、測定結果のスピン偏極率、膜厚で規格化したスピン偏極率を示す。

典型的に、TpCOFはTzCOFの2倍程度の膜厚で合成されていた。また、スピン偏極率は、二種のCOF間で同程度、あるいは、TzCOFの方が大きくなっていた。それらの結果を反映して、規格化されたスピン偏極率は、

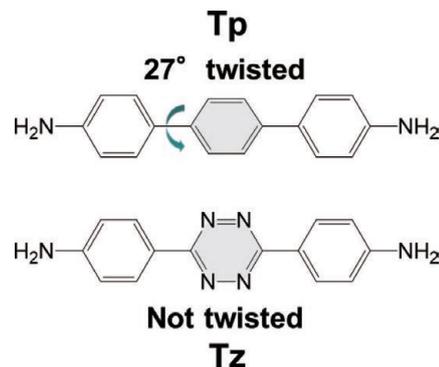


図7. Tp, Tzリンカーのねじれ角の比較

TzCOFの方がTpCOFより2～3倍程度となり、TzCOFはTpCOFと比較して2～3倍のスピン偏極能を有していると推察される。

このようなスピン偏極能の違いを、本研究で用いたアミンリンカーの構造の違いの観点から考察する。本研究で用いたアミンリンカーであるTpとTzは、中央に位置するベンゼン環様ユニットが、隣接ベンゼン環の水素との立体障害によってねじれていることがわかっている(図7)。Tpでは、27°ねじれており、Tzではねじれていないと考えられる。

COFへのキラリティ誘起は、アミンリンカー—アルデヒドコア分子間のC-N結合にねじれが生じることによって行われる、その際、TpCOFにおいては、中央のベンゼン環のねじれ方向は揃えられないので、ランダムな方向にねじれていると考えられる。したがって、コア分子を中心とした小さなプロペラ型のキラルなユニットを形成する。対して、TzCOFでは、アミンリンカーの3つの環のねじれ方向・角度がすべてそろっているので、より大きなプロペラ型ユニットを形成し、それが結果として大きなスピン偏極に現れていると考えられる。

3. まとめと今後の展望

本研究では、キラリティを導入したキラル多孔性高分子を合成し、リンカー分子のねじれ角とスピン選択性の相関を検証した。今後は、キラル多孔性高分子材料を触媒としたスピン多重度選択的反応による効率的な水電解の実証に取り組み、キラル二次元多孔性高分子電極によるスピン多重度選択的水電解反応を実証する。

参考文献

[1] B. Göhler et al., *Science* 2011, 18, 894.

- [2] M. Suda, et al., *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2455.
- [3] A. Inui et al., *Phys. Rev. Lett.* **2020**, *124*(16), 166602 (2020).
- [4] Z. Bian et al., *Adv. Sci.* **2022**, *9*(17), 2201063.
- [5] Z. Bian et al., *Adv. Mater.* **2023**, *35*, 2306402.
- [6] X. Han, et al., *Nat Commun*, **2018**, *9*, 1294.
- [7] S. Ghosh, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 21, 9752-9762.
- [8] S. Mishra, et al., *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 10776.

高耐久性アモルファス発光体を利用した 固体センシング発光材料の開発

京都大学 大学院工学研究科
権 正行

1. はじめに

固体発光センサーは、その優れた検出感度、応答速度、および測定の手軽さから、その開発には大きな需要がある。一方で、一般的な有機色素は、固体状態での発光体間の分子間相互作用により濃度消光を起こしやすく、発光の視認性が低下するという課題がある。さらに、特定の分子を検出するためには、検出対象を捕捉する認識部位の導入が必要となる。これらの要素を満たした発光センサーの開発戦略として、剛直な三次元構造を π 共役系高分子に組み込みむことで、濃度消光を抑制しつつ分子認識が可能な空間の確保ができることが報告されている^[1]。

本研究では、固体発光性と刺激応答性の両立のために、発光団を配置する足場骨格としてかご型シロキサンオキシサン(POSS)に着目した(図1左)。POSSはシロキサン結合(-Si-O-)からなる剛直な立方体状の分子で、各頂点に有機置換基を修飾することができる^[2]。すなわち、POSSは発光団を放射状に配置することができ、固体状態でも発光団間の相互作用を抑え、高効率発光が期待できる。さらに、剛直な構造により側鎖間に空間が生じやすいため、検出対象の捕捉に有効と期待できる。加えて、 dendritic 様の構造は結晶性が低下した低密度のアモルファス状態を形成できるため、標的物質がアクセスしやすい環境を構築できる(図1右)。

以上の分子的特徴から、POSSは固体発光センサーを作製するための重要な足場として見なすことができる。さらに当研究室では、ピレン、アントラセン、ナフタレンなどの発光団を柔軟な側鎖を介して導入したPOSS誘導体が、発光団間の分子内相互作用に由来するエキシマー発光を示すことを見出している^[3]。エキシマー発光とは、励起された分子が励起されていない分子と二量体

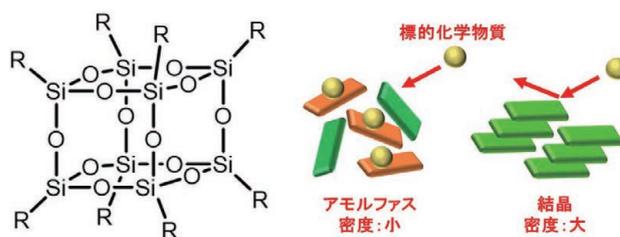
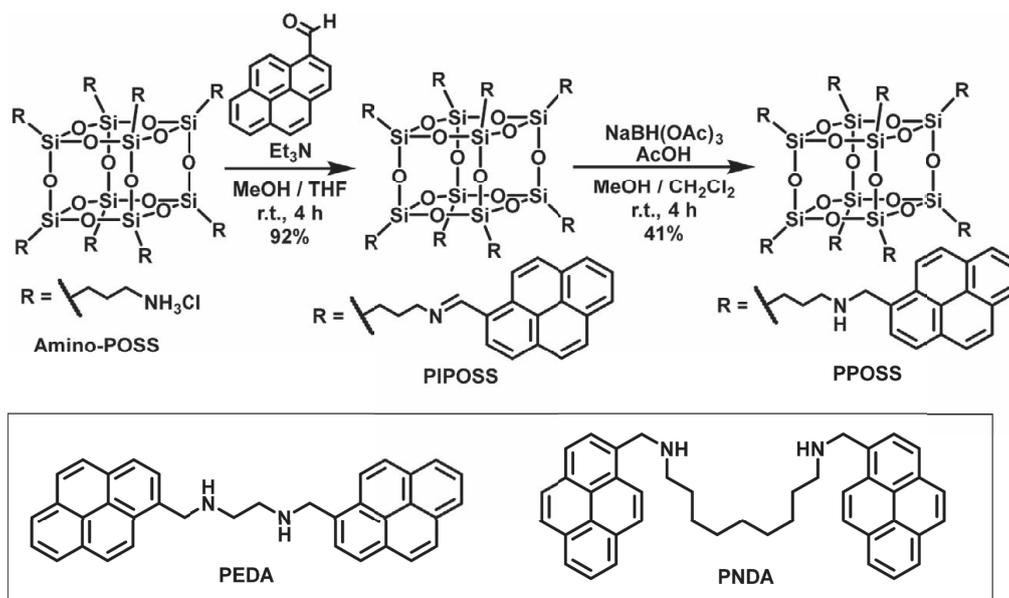


図1. POSSの構造と形態による標的化学物質のアクセスのしやすさ

を形成し、その後発光する現象であり、わずかな環境変化によって発光挙動が変化する発光センサーとして有用である。

これらの研究背景に基づき、固体発光センサーの開発に向け、柔軟な側鎖を介してピレンを導入したPOSS誘導体を設計した。さらにピレンとは電子的に独立したアミノ基を側鎖に導入し、酸応答性部位として機能させた。従来の酸応答性の固体発光センサーは、発光団を直接プロトン化して電子状態変化を誘導するものが多く、プロトン化を駆動力として側鎖間相互作用を誘起する我々のシステムは珍しいと言える。この設計により、芳香環に結合していないアミノ基の塩基性の強さを活かした発光センサーの高感度化が期待できる。

結果として、ピレンを修飾したPOSS誘導体がエキシマー発光に起因する緑色の固体発光性を示し、酸蒸気に曝露することで100 nm以上の長波長シフトを伴いながら橙色へと発光色を変化させる酸応答性を示すことが分かった^[4]。これは、アミンのプロトン化によって分子内静電相互作用が大きく変化し、続いて固体の集合状態が変化することに起因すると考えられる。以下、本研究の内容について詳述する。



式1. 柔軟な側鎖を介してピレンを修飾したPOSS(PPOSS)の合成方法とモデル化合物の分子構造

2. 合成方法

POSS骨格を利用した固体発光センサー開発に向けた目的化合物の合成方法を式1に示す。イミン形成反応を利用することで、8置換型POSSが容易に得られることが報告されているため、この方法を参考に目的化合物の合成を試みた^[5]。柔軟なプロピル基を介してピレンを導入した8置換型POSS(PPOSS)は、アンモニウム基を持つAmino-POSSからのイミン形成反応と続く還元的アミノ化を2段階で行うことで合成することができた。それぞれの反応の単離収率は92%と41%であり、高収率で目的化合物を得ることができた。得られた化合物に対して、NMR分光法および高分解能質量分析法を用いて構造解析を行い、8つのピレンが導入されたことを確認した。さらに、比較のために、2つのピレン分子がアルキル鎖を介して結合したモデル化合物であるPEDAおよびPNDAも、同様の手法により合成を行った。PNDAは2つのピレン間の原子数が13であり、PPOSSと同様の原子数となるように設計した。

3. 結果・考察

合成した化合物の光学特性を評価するため、クロロホルム希釈溶液中(1.0×10^{-6} M)における紫外・可視(UV-vis)吸収および発光(PL)スペクトル測定を行った。結果を図2および表1に示す。吸収スペクトルでは、各化合物に由来するピレンの吸収帯が観測され、PPOSSとモデル化合物の間に大きな差は見られなかつ

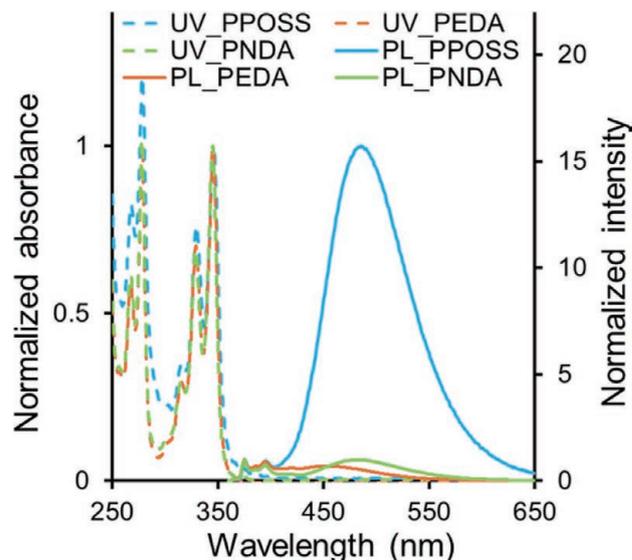


図2. クロロホルム希薄溶液中におけるPPOSS (1.0×10^{-6} M), PEDAs (4.0×10^{-6} M), PNDA (4.0×10^{-6} M)の紫外・吸収および発光スペクトル。励起波長: 346 nm。

た。PPOSSの発光スペクトルでは、約375 nmにモノマー由来の振動構造をもつ発光帯(LE発光)と、約492 nmにブロードな発光帯がそれぞれ観測された。このブロードな発光帯は、蛍光寿命測定により18.6 nsという長い蛍光寿命を持つことが分かり、ピレンのエキシマー発光であると帰属できた。希釈条件下であるため、観測されたエキシマー発光はPOSSの分子内側鎖間相互作用に起因すると考えられる。

モデル化合物であるPEDAsおよびPNDAにおいても、

表 1. 希薄溶液中におけるピレン誘導体の光学特性 a

| | λ_{abs} (nm) | ϵ ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ_{em} (nm) | I_e/I_m | Φ_{PL} | τ (ns) | λ_{detect} (nm) | χ^2 |
|-------|--------------------------------|--|-------------------------------|-----------|--------------------|----------------|-----------------------------------|----------|
| PPOSS | 346 | 22.2 | 375, 485 | 16 | 0.29 | 18.6 | 485 | 1.09 |
| PEDA | 346 | 7.5 | 375, 451 | 0.70 | 0.08 | 15.0 | 451 | 1.00 |
| PNDA | 345 | 7.8 | 375, 481 | 0.99 | 0.22 | 19.0 | 481 | 1.06 |

a Measure in CHCl_3 (PPOSS ($1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$), PEDA ($4.0 \times 10^{-6} \text{ M}$), and PNDA ($4.0 \times 10^{-6} \text{ M}$)) excited at 346 nm.

LE発光に加えて長波長側にエキシマー発光に由来する発光帯が観測された。エキシマー発光とLE発光の強度比(I_e/I_m)を計算したところ、PPOSSは16であったが、PEDAおよびPNDAでは1以下であった。この結果は、コンパクトなPOSS構造が分子内相互作用を促進するのに有利であることを示唆している。また、PEDAのエキシマー発光は、PPOSSおよびPNDAのものよりも少し短波長側に観測され、これは短いリンカーによる立体的制約により、ピレン間の重なりが制限されているためであると考えられる^[6]。

続いて、各化合物に対して固体状態における光学測定を行った。結果を図3に示す。PPOSSの発光スペクトルでは、約490 nmにエキシマーに由来するブロードな発光帯のみが観測された。これは、凝縮状態においてピレン部位が互いに近接しており、エキシマー形成が促進されていることを示している。PEDAの場合、約405 nmにLE発光帯が観測され、一方でPNDAではLE発光とエキシマー発光の両方が確認された。PPOSSの絶対発光量子効率 Φ_{PL} は0.37であり、3つの化合物の中で最も高い値を示した。この高い発光量子効率は、立体的にかさ高いPOSS骨格の存在によって濃度消光が抑制されたことに起因すると考えられる。これらの結果は、POSS骨格を用いることによって、固体状態においても発光特性が保持され得ることを示している。

次に、PPOSSの酸応答特性を評価するために、トリフルオロ酢酸(TFA)蒸気曝露前後の薄膜状態における光学測定を行った。結果を図4に示す。薄膜はスピコート法によって作製した。その結果、100 nmを超える顕著な発光帯の長波長シフトを観測した(図4 a,b)。この長波長シフトのメカニズムを考察するために、励起スペクトル測定を行った。結果として、約460 nm付近にTFA蒸気に曝露する前には存在しなかった新たな吸収帯が生じていることを観測した(図4 c)。すなわち、これらの光学特性の変化は基底状態におけるピレンユニッ

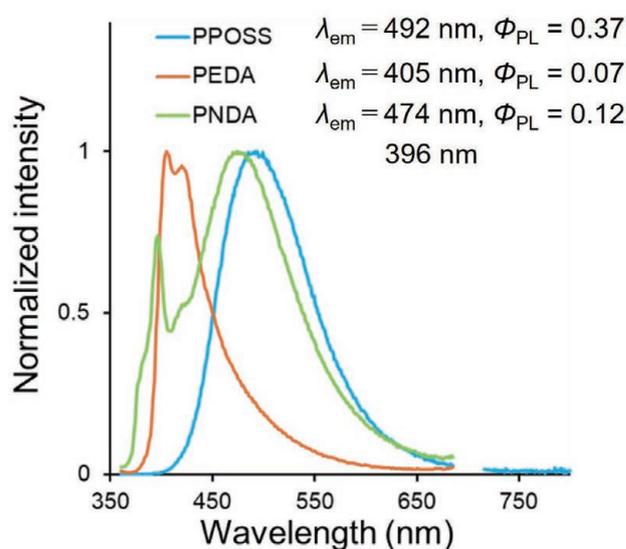


図3. PPOSS, PEDA, PNDA の固体発光スペクトル。励起波長：346 nm。

ト間の相互作用(静的エキシマー形成)によって引き起こされていると解釈できた^[7]。

応答の可逆性を評価するため、まず、TFA蒸気に曝露した薄膜について、トリエチルアミン(TEA)蒸気による中和を試みた。結果として、発光波長は元の薄膜と同じ状態には完全には戻らなかった。これは、中和による塩の生成が薄膜中での完全な中和反応を妨げている可能性があると考えられる。そこで、可逆的な応答を実現するために、TFA蒸気に曝露したPPOSS粉末を溶解し、溶液中においてTEAにより中和を行った。その結果、元の薄膜と中和後に作製した薄膜の光学測定結果が一致することを確認した。この結果により、化合物の分解は起こっておらず、試料の再生が可能であることが分かった(図4 d)。

続いて、プロトン化が電子状態に与える影響を評価するために、PPOSS、PEDA、およびPNDAのTFA塩PPOSS-TFA、PEDA-TFA、およびPNDA-TFAを合成した。これらの化合物について、溶液状態および固体状態での光学測定を行った。結果を図5に示す。

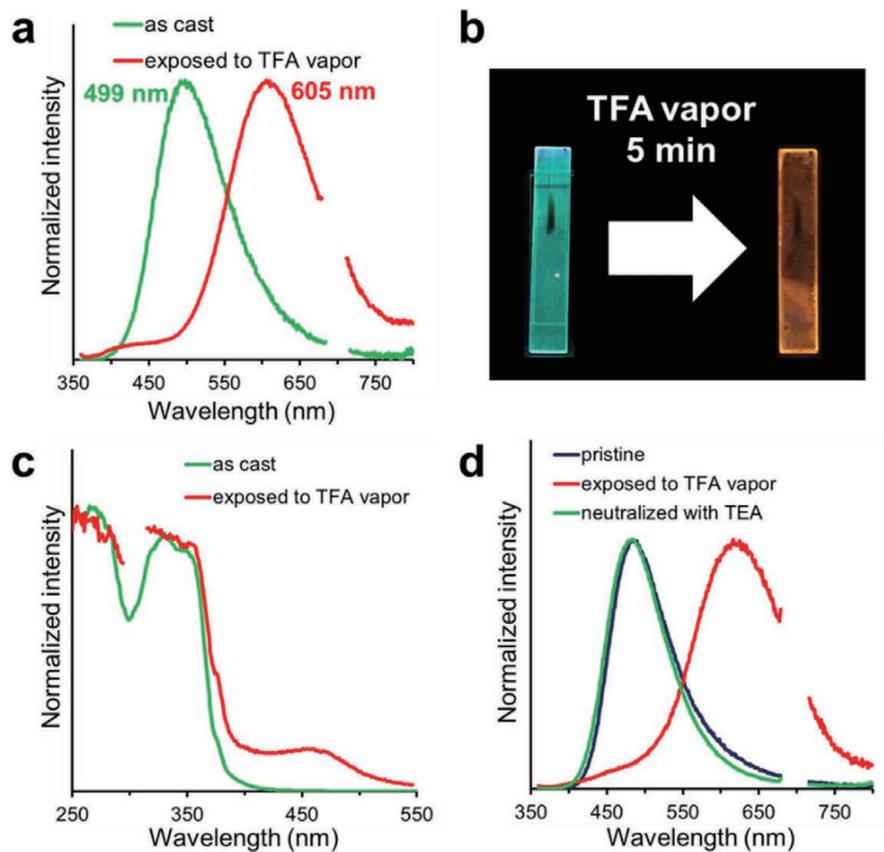


図 4. PPOSSの薄膜状態における光学測定結果。(a) 発光スペクトル(励起波長：346 nm)。(b) UV(365 nm)照射下における酸応答性の様子。(c) TFA蒸気曝露前後(曝露時間は5分間)におけるPPOSS 薄膜の励起スペクトル。(d) PPOSS粉末における、初期状態、TFA曝露後、TEAによる中和後の発光スペクトル(励起波長：346 nm)。

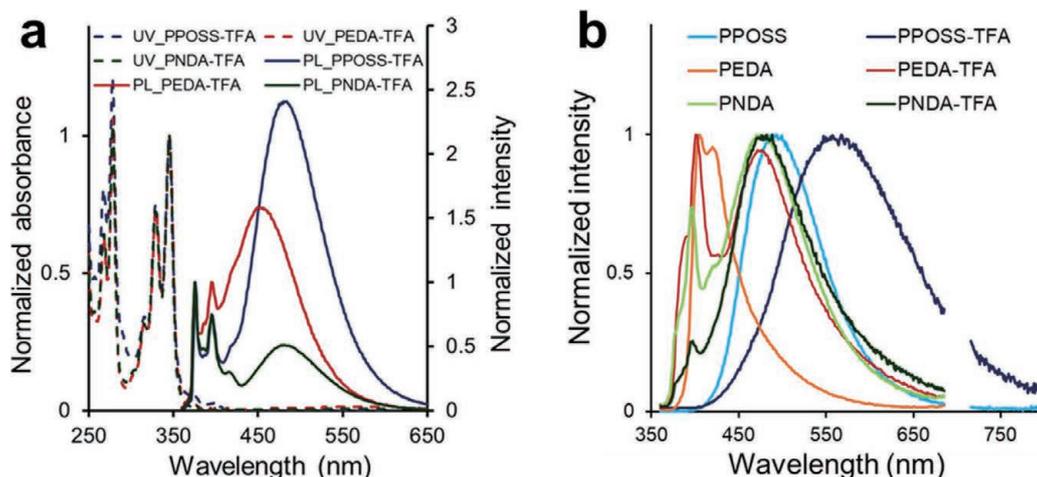


図 5. (a) クロロホルム希薄溶液中におけるPPOSS-TFA (1.0×10^{-6} M), PEDA-TFA (4.0×10^{-6} M), PNDA-TFA (4.0×10^{-6} M)の紫外・可視吸収および発光スペクトル。励起波長：346 nm。(b) PPOSS-TFA, PEDA-TFA, PNDA-TFAの固体発光スペクトル。励起波長：346 nm。

溶液状態においては、PPOSSとそのTFA塩の吸収スペクトルの間に有意な差は見られなかった(図5a)。また、3つの化合物のTFA塩の発光スペクトルでは、約600 nm付近の橙色の発光は溶液状態では観測されなかった。これらの結果から、固体状態における発光の長波長シフトは、ピレン部位の電子状態の変化によって生

じたものではないと解釈された。実際に固体状態での発光スペクトルでは、PPOSSは約600 nm付近に長波長シフトした発光を示した(図5b)。PEDAおよびPNDAのTFA塩ではそのような長波長シフトした発光は観測されなかったことから、POSS骨格がこの橙色の発光において重要な役割を果たしていると考えられる。

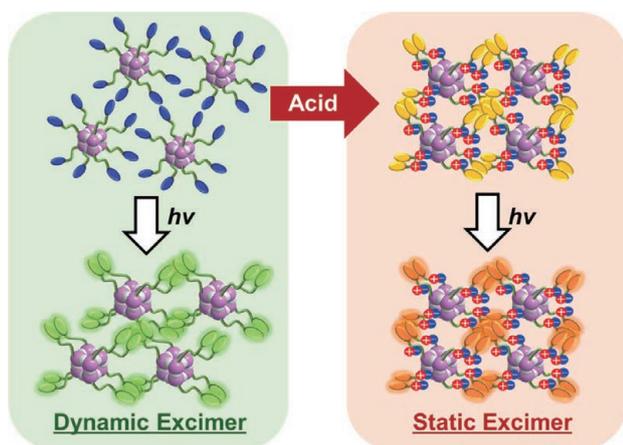


図6. 動的エキシマー(Dynamic Excimer)と静的エキシマー(Static Excimer)形成に由来するPPOSSの酸応答性のメカニズム。

以上の結果を踏まえ、最後に酸応答性のメカニズムについて考察を行った(図6)。酸蒸気曝露前には、POSS側鎖におけるピレンユニットは基底状態において互いに独立して存在し、その後の光励起によってエキシマー形成する(動的エキシマー形成)と考えられる。一方で、酸蒸気曝露後には、アンモニウム塩の生成に伴い基底状態での集合状態が大きく変化し、ピレンユニットが強く相互作用することで、基底状態でも二量体を形成している(静的エキシマー形成)と考えられる。静的エキシマー形成における強いピレン間の相互作用の結果として、約600 nmの長波長シフトした発光が誘起されるのだと解釈できる。類似の長波長領域におけるピレンの静的エキシマー発光は、ピレン修飾 dendrimer の凝集状態でも報告されており、本メカニズムの妥当性を示している^[8]。また、粉末X線回折の結果、PPOSSはアモルファスを形成することが分かり、酸曝露による顕著な応答性の原因になっていると示唆された(図7)。

4. 結言

以上、柔軟な側鎖を介して発光団であるピレンを修飾したPOSSを合成し、その固体発光性と刺激応答性を評価した。結果として、100 nm程の顕著な発光色変化(緑色⇒橙色)によって、優れた固体発光性と鋭敏な酸応答性を実現することができた。これらは、POSSが堅牢な無機骨格であること、および色素を放射状に配置可能な足場であることに起因すると考えられる。さらに dendrimer 様の構造を持つアモルファス状態を実現すること

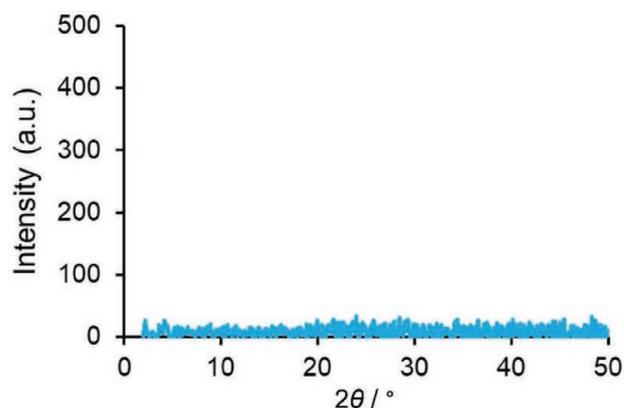


図7. PPOSSの粉末X線回折の結果。

で、化学物質が容易にアクセス可能な空間の確保とそれに付随した鋭敏な応答性を実現したのだと考えられる。本研究結果は、POSS骨格を用いた固体発光センサーという新しい分子設計を提示することにつながり、より有用な発光化学センサーの開発に寄与すると期待している。

謝辞：本研究を進めるにあたり、研究助成という形で多大な支援を頂きました公益財団法人松籟科学技術振興財団に厚く御礼申し上げます。

本結果の発表論文：

H. Narikiyo, M. Gon, K. Tanaka, Y. Chujo, *Asian J. Org. Chem.* **2025**, *14*, e202400508.

5. 参考文献

- [1] J.-S. Yang, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11864–11873.
- [2] D. B. Cordes, P. D. Lickiss, F. Rataboul, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2081–2173.
- [3] H. Narikiyo, M. Gon, K. Tanaka, Y. Chujo, *Mater. Chem. Front.* **2018**, *2*, 1449–1455.
- [4] H. Narikiyo, M. Gon, K. Tanaka, Y. Chujo, *Asian J. Org. Chem.* **2025**, *14*, e202400508.
- [5] H. Imoto, S. Wada, K. Naka, *Chem. Lett.* **2016**, *45*, 1256–1258.
- [6] K. Zachariasse, W. Kühnle, *Z. Phys. Chem. Neue Folge* **1976**, *101*, 267–276.
- [7] F. M. Winnik, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 587–614.
- [8] P. K. Lekha, E. Prasad, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8609–8617.

スピロビピリジンの機能開拓 豊富な炭化水素資源の効率的かつ選択的官能基化

理化学研究所 環境資源科学研究センター
浅子 壮美

1. はじめに

2,2'-ビピリジンは、約130年前の発見以降さまざまな誘導体が設計・合成され機能開拓されてきた。光触媒やクロスカップリング触媒、発光材料等に用いられる金属錯体の二座配位子として重要な役割を果たし続けている。従来のビピリジン修飾法は、ビピリジン平面周縁に置換基を導入したり π 拡張したりするものが主流であった(図1 A)。それに対し、申請者らは最近、平面的なビピリジンを3次元拡張したスピロビピリジン(SpiroBpy)誘導体の機能開拓に着手し、遠隔位立体制御を可能にすることでその有用性の一端を示した(図1 B)¹⁾。すなわち、スピロビピリジンに「屋根」となるBpin基を取り付けたルーフ配位子(SpiroBpy-Bpin)を設計し、イリジウム触媒と併せ用いることで、多様な置換ベンゼン類のメタ位選択的ホウ素化が円滑に進行することを見出した。触媒活性種が基質置換基との立体反発によりパラ配向の基質の接近を防ぐが、メタ配向で接近する基質のみを触媒ポケットに収容することが選択性発現の鍵となっている。この反応は、遷移金属触媒反応においてスピロビピリジンを配位子として利用した初めての例であり、平面的なビピリジンを用いては達成困難であった諸課題の解決へ向けさらなる応用が期待される。

本研究では、スピロビピリジンにさまざまな非共有結合性相互作用による分子認識能を付与した二官能性スピロビピリジンを創製し、さらなる触媒機能の探索を試みた(図1 C)。その結果、炭化水素資源の高度利用を可能にするイリジウム/スピロビピリジン触媒系を新たに開発し、C-Hホウ素化反応の反応性および選択性の精密制御が可能であることを実証した。

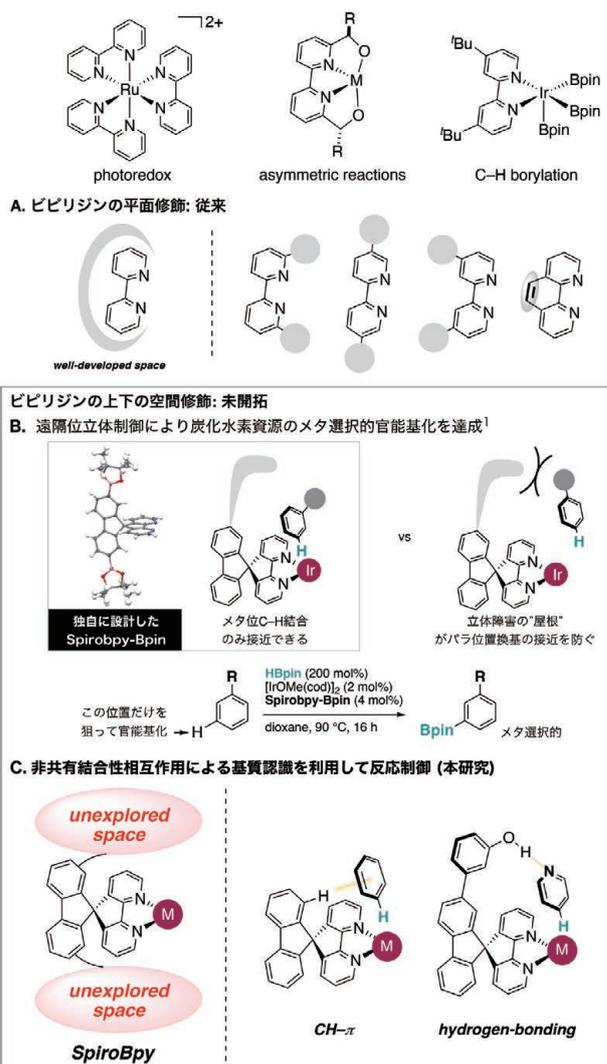


図1 平面的な2,2'-ビピリジン配位子vs スピロビピリジン配位子

2. 結果と考察

SpiroBpy配位子と基質の間に働くCH- π 相互作用や水素結合相互作用などの非共有結合性相互作用が触媒活性や選択性発現の鍵となる2つの反応を開発した。以下に詳細を述べる。

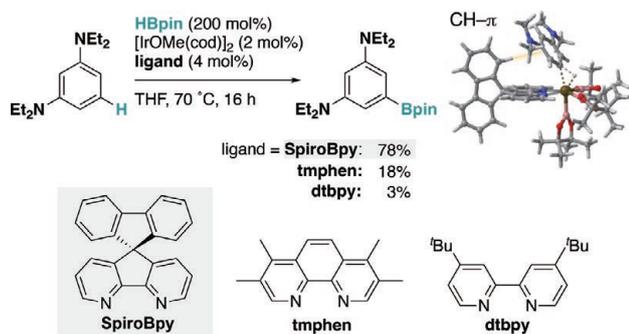


図2 SpiroBpy配位子のC-Hホウ素化反応に対する加速効果

CH- π 相互作用による π 電子の認識

遠隔位立体制御によるメタ位選択的なC-Hホウ素化反応を検討する中で、SpiroBpy-Bpin配位子が、C-Hホウ素化によく用いられる配位子(dtbpy: 4,4'-di-*tert*-butyl-2,2'-bipyridylやtmphen: 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)よりも高い位置選択性を示すだけではなく、高い反応性も併せ持っていることを見出した。さらなる検討を進めた結果、「屋根」を取り除いたSpiroBpy骨格自身に反応促進効果があることを突き止めた(図2)²⁾。イリジウム触媒によるC-Hホウ素化反応において、電子豊富なアレーンを基質として用いた場合に、酸化的付加によるC-H結合切断段階が遅くなるために、反応効率が低下することが知られている。それに対し、SpiroBpy配位子は顕著な反応加速効果を示し、電子豊富なジアミノベンゼンのホウ素化も円滑に進行した。ジアルコキシベンゼンのホウ素化においても同様の傾向が見られ、無置換SpiroBpy配位子が、dtbpy、tmphen、bpyCH₂ (メチレン架橋した2,2'-ビピリジン)のような平面的な配位子よりも高収率で対応するホウ素化生成物を与えた(図3)。

SpiroBpy配位子とイリジウム錯体からなる触媒、およびホウ素化剤としてHBpinを用いると、電子豊富なアニリン誘導体、フェノール誘導体、アルキルベンゼン誘導体のホウ素化反応が温和な条件で円滑に進行し、多くの場合にdtbpyやtmphen配位子よりも良好な収率でホウ素化生成物を与えた(図4)。SpiroBpy配位子は、電子不足アレーンに対しても反応促進効果を示したが、その効果は電子豊富アレーンに対してより顕著に現れた。さらに、医薬品分子や生物活性物質のホウ素化にも適用可能であり、グラムスケールでも問題なく反応が進行した。

SpiroBpy配位子のもつ反応促進効果に関する知見を

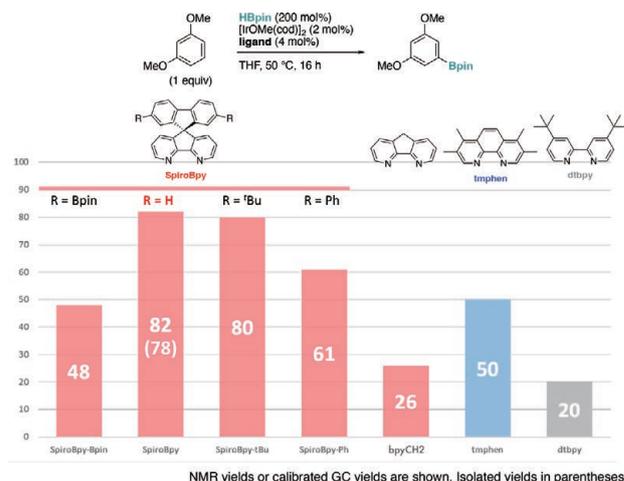


図3 1,3-DimethoxybenzeneのC-Hホウ素化反応における配位子効果

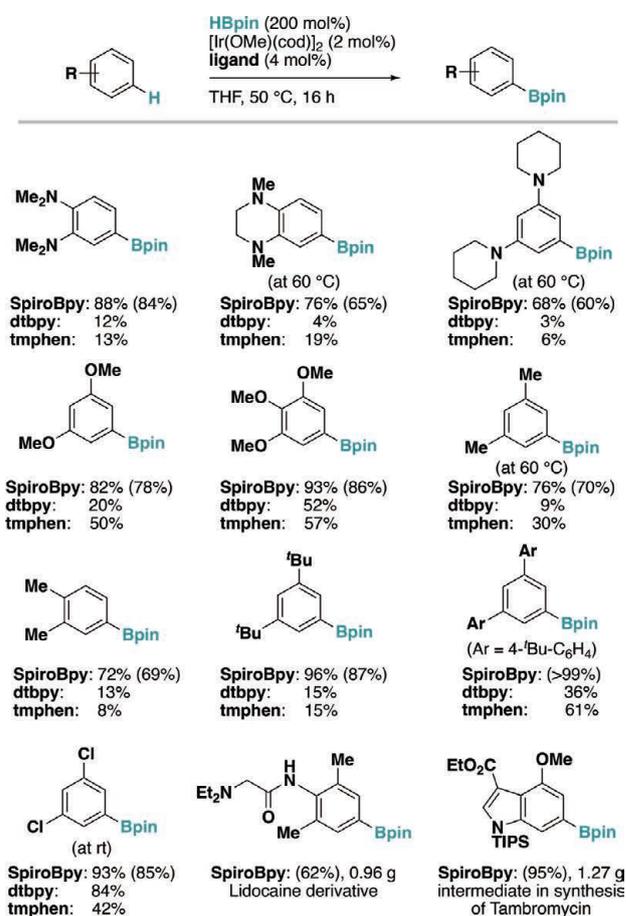


図4 基質適用範囲

得るためにDFT計算による検討を行った(図5a)。1,3-ビス(ジメチルアミノ)ベンゼンをモデル基質として用い、SpiroBpy、bpyCH₂、tmphenを配位子にもつLIrBpin₃錯体の反応性を比較した。その結果、(SpiroBpy)IrBpin₃のC-H結合切断段階の活性化エネルギー

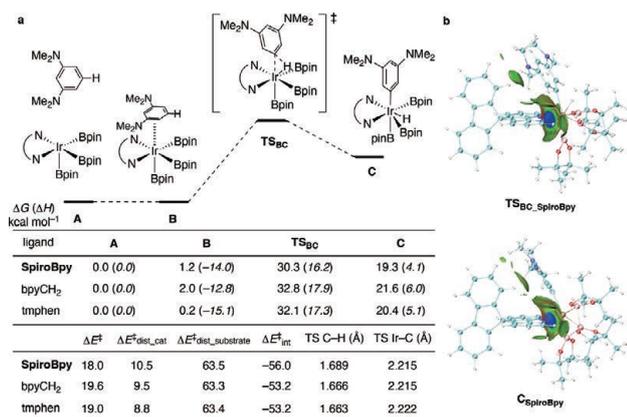


図5 (a) DFT計算 (b) IGMH解析

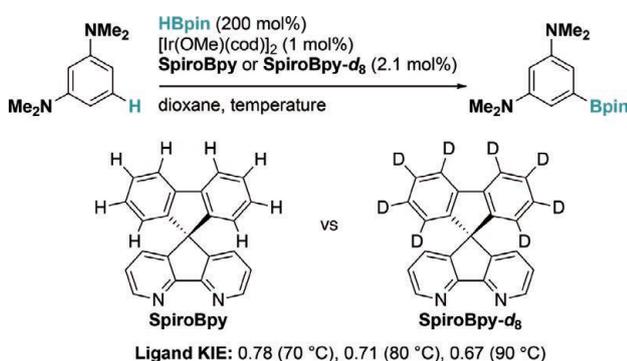


図6 配位子速度論的同位体効果実験

ギー障壁が平面型ピリジン配位子よりも低いことがわかり、実験結果をよく再現した。IGMH (Independent gradient model based on Hirshfeld partition) 解析により、SpiroBpy配位子とアレーン基質の間のCH-p相互作用が可視化され、加速効果の要因のひとつであることが示唆された(図5 b)。本相互作用は、アレーンの π 軌道とSpiroBpy C-H s^* 軌道間のドナー・アクセプター相互作用の寄与が大きいことがNBO解析から示され、これは電子豊富な基質に対してSpiroBpy配位子がより大きな加速効果を示す実験事実と矛盾しない。

続いて、CH-p相互作用の関与を実験的に証明するために重水素化配位子(SpiroBpy-d8)を合成し、配位子骨格のHをDに置き換えることによる反応速度への影響(配位子KIE)を調べた(図6)。イリジウム触媒とSpiroBpyまたはSpiroBpy-d8配位子を用いて、1,3-ビス(ジメチルアミノ)ベンゼンとHBpinの反応を行ったところ、負の速度論的同位体効果³⁾を観測した。この結果は、配位子のC-H結合とアレーン基質の間に相互作用があることを示唆している。本反応におけるCH-p相互作用を介した基質認識は、SpiroBpyの3次元的な分子骨格に

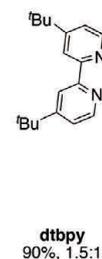
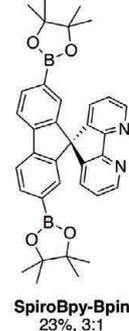
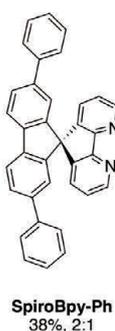
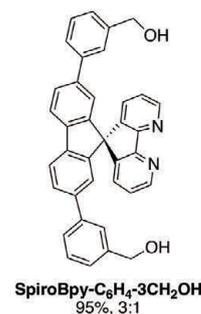
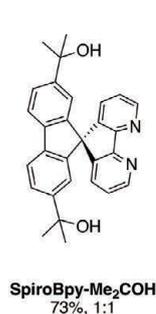
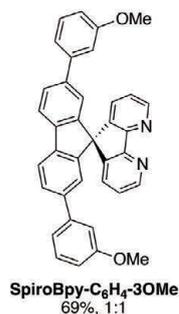
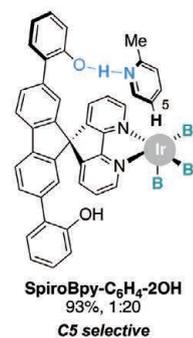
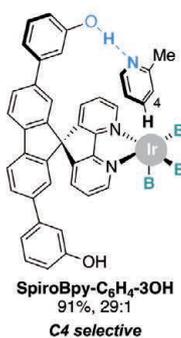
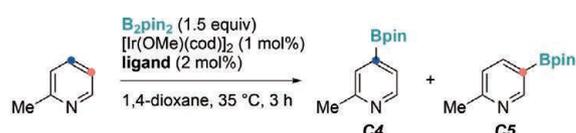
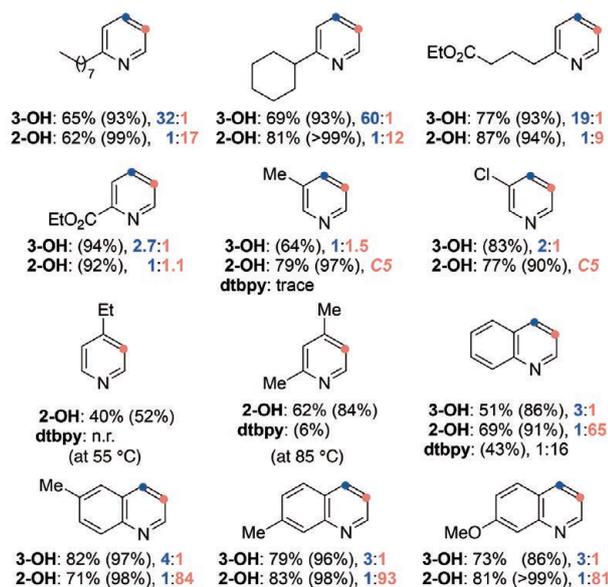


図7 2-MethylpyridineのC-Hホウ素化反応における配位子効果

より初めて実現されるものであり、その特長がよく現れた好例と言える。

水素結合相互作用によるピリジン類の認識

水素結合を通して基質を認識するためのOH基を導入したヒドロキシスピロピリジン配位子を2種類設計し、ピリジンおよびキノリン類の位置選択的C-Hホウ素化反応を達成した⁴⁾。すなわち、SpiroBpy-C6H4-3OH配位子とSpiroBpy-C6H4-2OH配位子を用いた場合に、それぞれ、C4位もしくはC5(3)位の官能基化がサイト選択的に進行した(図7)。OH基の有無(SpiroBpy-C6H4-3OMe、SpiroBpy-Phでは低選択性)および空間配置(SpiroBpy-Me2COH、SpiroBpy-C6H4-3CH2OHでは低選択性)が極めて重要であり、一置換ベンゼンの「形」



The yields were determined by isolation: yields determined by ¹H NMR are shown in parentheses. The isomer ratio was determined by GC.
3-OH = SpiroBpy-C₆H₄-3OH; 2-OH = SpiroBpy-C₆H₄-2OH.

図8 基質適用範囲

の認識に有効であったSpiroBpy-Bpinループ配位子や平面的なdtbpyを用いた場合にもサイト選択性は低く留まった。これまでも、C-Hホウ素化反応において水素結合供与能を有する二官能性配位子が報告されているが、多くはアミド基質を二重の水素結合で強固に捕捉するものに限られており⁵⁻⁷⁾、水素結合によるピリジン類の効率的な認識の例はなかった。開発した2種類の配位子の3次元骨格と水素結合供与能によって形成される基質認識空間が、ピリジン類の特異的認識および活性化の鍵となる。

基質適用範囲を調査したところ、2位および3位に置換基をもつピリジン類やキノリン類のホウ素化の位置選択性を、2種類の配位子を使い分けて制御できることを見出した(図8)。立体的に混み合うため本来反応性の低い、置換基隣接位でのホウ素化も進行した。さらに、開発した配位子は、選択性を制御するだけでなく、水素結合相互作用により反応を加速すること、また、競合するアミド基質の存在下でもピリジン基質のみを選択的に認識する基質特異性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、本配位子が酵素様人工触媒として機能していることを示している(図9)。

鍵となる配位子と基質間の水素結合は、NMR実験により観測され、ピリジンをモデル基質とするDFT計算からも関与が示された。また、DFT計算は、SpiroBpy-C₆H₄-3OH配位子によるC4選択性、および、

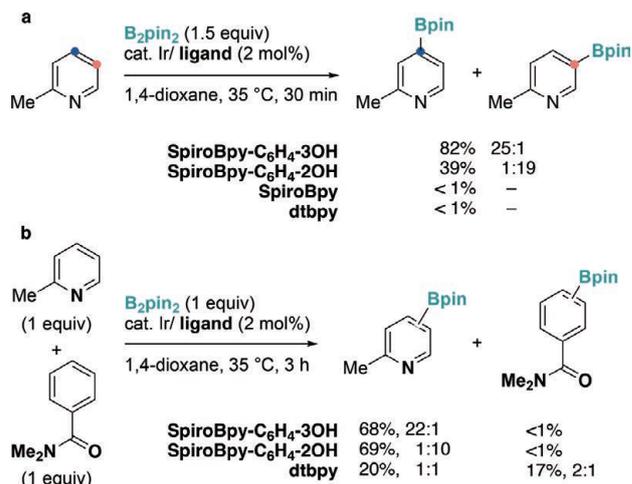


図9 イリジウム触媒によるC-Hホウ素化反応における (a) SpiroBpy-C₆H₄-OH配位子の反応加速効果、および (b) 基質特異性

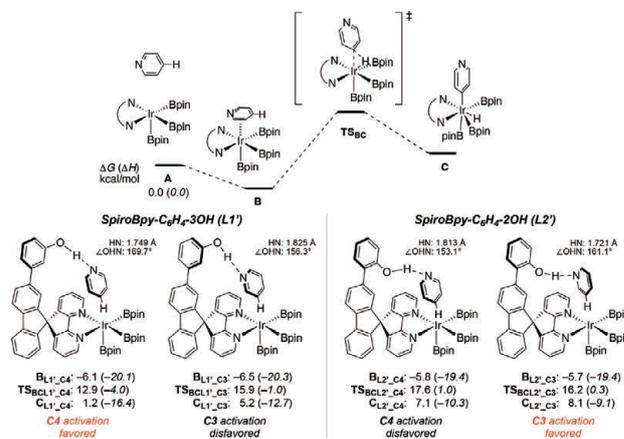


図10 DFT計算

SpiroBpy-C₆H₄-3OH配位子によるC3選択性をよく再現し、水素結合がより強く(短いOH...Nの結合距離)、より直線的なC-H結合切断遷移状態が有利になる様子が明らかとなった(図10)。

3. まとめ

本研究では、2,2'-ビピリジンの3,3'位へフルオレンをスピロ結合で導入したスピロビピリジン(SpiroBpy)骨格を利用し、ビピリジンの上下にある未開拓空間の探索を通してビピリジン配位子の新機能を開拓した。その結果、「CH-p相互作用」「水素結合」という非共有結合性相互作用による分子認識を鍵とする、効率的かつサイト選択的な炭化水素資源の精密官能基化法を開発した。とりわけ、本研究を通して、最も弱い非共有結合性相互作用の1つであるCH-p相互作用が触媒反応を促進しうること

を実験的、理論的に証明できたことは意義深いものであると考えている。有機分子の普遍的な構成要素である C-H結合や p 電子を活用できることから、今後の応用展開に大きな可能性を秘めている。また、有機金属化学や錯体化学におけるピピリジン配位子の普遍性を踏まえると、スピロピピリジン配位子の機能開拓による周辺分野への波及効果は大きく、触媒科学や材料科学への新たな展開が期待される⁸⁻⁹⁾。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を頂きました公益財団法人松籟科学技術振興財団に厚く御礼申し上げます。

5. 参考文献

- (1) “Remote Steric Control for Undirected *meta*-Selective C-H Activation of Arenes” , Ramadoss, B. ; Jin, Y. ; Asako, S. ; Ilies, L. *Science* **2022**, *375*, 658-663.
- (2) “Noncovalent Interaction with a Spirobipyridine Ligand Enables Efficient Iridium-Catalyzed C-H Activation” , Jin, Y. ; Ramadoss, B. ; Asako, S. ; Ilies, L. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 2886.
- (3) “Ir-Catalyzed, Nitrogen-Directed C(sp³)-H and C(sp²)-H Borylation with a Spiro-Fluorene-Indenoindenyl Ligand” , Inoue, T. ; Sato, Y. ; Nagashima, Y. ; Tanaka, K. *ACS Catal.* **2025**, *15*, 4061-4068.
- (4) “Remote Hydrogen Bonding Between Ligand and Substrate Accelerates C-H Bond Activation and Enables Switchable Site Selectivity” , De, P. B. ; Okamoto, K. ; Sekar, J. ; Asako, S. ; Ilies, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2025**, *64*, e202419144.
- (5) “A *meta*-Selective C-H Borylation Directed by a Secondary Interaction Between Ligand and Substrate” , Kuninobu, Y. ; Ida, H. ; Nishi, M. ; Kanai, M. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 712-717.
- (6) “Hydrogen Bond Directed *ortho*-Selective C-H Borylation of Secondary Aromatic Amides” , Bai, S.-T. ; Bheeter, C. B. ; Reek J. N. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 13039-13043.
- (7) “Computationally Designed Ligands Enable Tunable Borylation of Remote C-H Bonds in Arenes” , Chang, W. ; Chen, Y. ; Lu, S. ; Jiao, H. ; Wang, Y. ; Zheng, T. ; Shi, Z. ; Han, Y. ; Lu, Y. ; Wang, Y. ; Pan, Y. ; Yu, J.-Q. ; Houk, K. N. ; Liu, F. ; Liang, Y. *Chem* **2022**, *8*, 1775-1788.
- (8) “Spirobipyridine Ligands as a Unique Platform for Substrate Recognition and Reaction Control through Noncovalent Interactions” , Asako, S. ; Ilies, L. *ACS Catal.* **2025**, *15*, 6372-6379.
- (9) “配位子設計による選択的・効率的な炭素-水素結合変換反応の開発” , 浅子壮美, イリエシュラウレアン有機合成化学協会誌 **2025**, *83*, 100-107.

昆虫の発色機構から学ぶ外部刺激で色調変化する 金属光沢材料の開発

千葉大学 大学院工学研究院
桑折 道済

1. はじめに

持続可能な社会に向けた材料開発において、生物の優れた機能を模倣した生物模倣的な観点からの材料設計／開発は一つの有効な手段である。金属光沢、なかでも金色と銀色が有する高級感はヒトの目を強く惹きつける。このため古くから絵画、着物、食器、仏具などの塗装に金箔や銀箔が利用されてきた。しかし、高級感が表現できる一方で高価であるため用途が限られ、大面積での利用は困難などの課題がある。そこで、実際の金属を用いない金属光沢材料の開発が多数なされているが、金色と銀色の反射特性は特異であることから報告例は少なく、特に刺激に応じて色調が変化する金属光沢材料はほとんどない。

そのような中、我々はこれまでに、外部刺激によって金色から赤色に色調が変化する昆虫(ジंगाサハムシ)の発色機構に倣い、色素による吸収と平滑な表面由来の鏡面反射を組み合わせることで、色調変化が可能な金属光沢材料を作製した¹⁾。色素部位として黄色色素であるアゾベンゼン誘導体を導入することで金色光沢が発現し、光と熱刺激により金属光沢を維持した状態での色調制御を達成した。

本研究では、一種類の材料で光刺激により金色と銀色を自在に表現可能な、従来には例のない金属光沢材料を開発し、多様な応用展開への道筋を開拓することを目的とした。可視光領域に吸収の無いスチルベン部位を両末端に導入したジアセチレン誘導体DS-DAn ($n = 1 - 6$)を合成し、光沢感の有無やUV光照射による色調変化と結晶構造について詳細に検討した(Figure 1)。

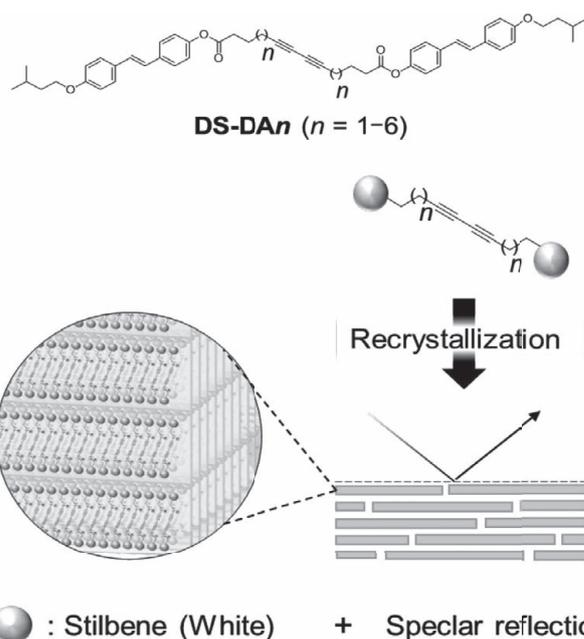


Figure 1. Schematic illustration of preparation of metallic luster materials by a combination of white color and specular reflection from layered microcrystals of diacetylene derivatives with different linker chain length bearing stilbene molecules.

2. 実験

DS-DAn ($n = 1 - 6$)を6段階の反応により合成し、再結晶により結晶を析出させた。次に、析出した結晶を吸引ろ過により直径8 mmのろ紙上に堆積させ、結晶フィルムを得た。その後、UV光照射によりジアセチレン部位の固相重合を行った。作製したサンプルの光沢感を反射率測定およびSEM観察、色調変化を拡散透過率測定およびRaman分光測定、結晶構造をXRD測定によって調査した。



Figure 2. Photographs show metallic luster films of DS-DAn-films ($n = 1-6$) before and after UV irradiation.

3. 結果と考察

可視光領域に吸収を持たないスチルベン部位を持ち、リンカー部位の炭素数が異なる6種類のジアセチレン誘導体DS-DAn ($n = 1-6$)を合成した。合成した化合物を再結晶および吸引ろ過することで得られた結晶フィルムは、リンカー部位の炭素数によって光沢の度合いや有無が異なった(Figure 2)。DS-DAn-film ($n = 1-6$)のうち、DS-DAn-film ($n = 1$)は強い光沢感を有する銀光沢、DS-DAn-film ($n = 2, 4$)はわずかな銀光沢を示したのに対し、DS-DAn-film ($n = 3, 5, 6$)は金属光沢を示さない白色の外観であった。これは各フィルムの結晶形状に由来する結果であり、DS-DAn ($n = 1, 2, 4$)は板状結晶が積層した平滑な結晶表面で鏡面反射が強められることで金属調光沢を発現したのに対し、DS-DAn ($n = 3, 5, 6$)では繊維状結晶が集積した凹凸のある結晶表面で拡散反射が強められることで光沢のない外観を示した。

得られた結晶フィルムにUV光を照射すると、リンカー部位の炭素数によって様々な色調変化が生じた。DS-DA1-filmはUV光の照射によって光沢感を維持したまま銀光沢から金色へと色調変化した。DS-DAn-film ($n = 2, 4$)も薄い金色へと色調変化したが、DS-DA1-filmよ

りも色調変化が小さく、光沢感を示さなかったDS-DAn-film ($n = 3, 5, 6$)は赤色や紫色へと非常に大きな色調変化を示した。DS-DAn/UV-film ($n = 1-6$)を乳鉢ですりつぶしたところ、光沢感は失われるが色調は維持したことから、光沢感は板状結晶の形状由来であるのに対し、色調は分子の吸収由来であることが分かった。

UV光照射時間ごとのRamanスペクトルから、UV光照射時間が伸びるにつれてジアセチレン部位の重合が進行していることを確認した。PDA由来のピークの出現の速さから、DS-DAn ($n = 3, 5, 6$)の方が重合が進行しやすいことが分かった。それぞれの結晶フィルムにおける結晶構造を1D-XRD測定、分子計算および2D-XRD測定によって調査したところ、全ての結晶フィルムにおいてラメラ層の形成が確認でき、特にリンカー部位の炭素数が短いDS-DAn-film ($n = 1, 2$)では10次以上の回折ピークが見られ、長距離秩序の高度に分子が積層した分子層構造を形成していることが示唆された。またジアセチレン部位の傾斜角を算出すると、DS-DAn-film ($n = 3, 5, 6$)が最も重合最適角に近く、色調変化の起こりやすさと一致する結果となった。

リンカー部位の炭素数が最も短いDS-DA1-filmは、銀光沢から金光沢へと珍しい色調変化を示した。再結晶操作によって得られる板状結晶を偏光顕微鏡によって観察したところ、正の異方性が確認されたことから単結晶であることが分かり、DS-DA1-filmは単結晶の積層体であることが分かった。得られた単結晶を用いてSC-XRD測定を行ったところ、状態の異なる2種類の分子(状態Aおよび状態B)が交差してパッキングしている珍しい結晶構造を確認した(Figure 3)。得られた結晶構造を用いてジアセチレンの炭素間距離の算出を行い、重合方向および部位の予測を行った。予測される重合方向はa軸方向またはb軸方向の2種類あり、(i) a軸方向の場合は状態B同士で1、4付加重合が、(ii) b軸方向の場合は状態Aと状態Bで1、4付加重合と1、2付加重合の両方が進行すると予測された。(i)の場合は $r(C1-C1)$ が重合至適条件の範囲外であること、(ii)の場合は1、2付加重合が進行することにより、共役系が伸びにくく、反射率の高い黄色(金色)へと色調変化したと考えられる。

以上のことから、嵩高い側鎖の導入やリンカー部位の炭素数を変化させることによりジアセチレンの重合挙動をチューニングすることができ、銀光沢から金光沢へと

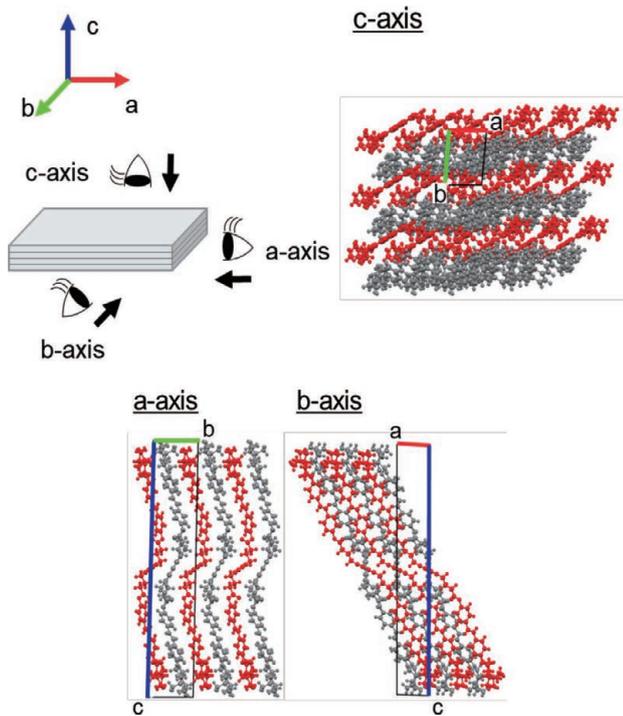


Figure 3. (a) Illustration of the relationship between platelet crystals and axial direction. (b)-(c) Molecular packing model of **DS-DA1** obtained by SC-XRD measurement of (b) c-axis, (c) a-axis, (d) b-axis orientation.

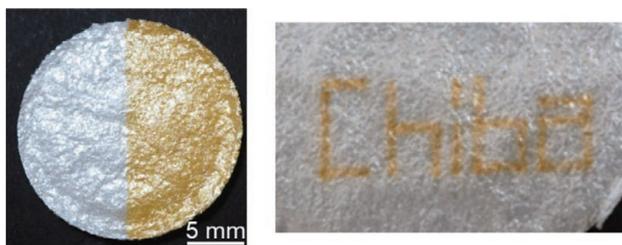


Figure 4. Patterning and drawing of **DS-DA1-film** using a photomask and UV laser.

色調変化する金属調光沢材料の作製に成功した。本材料は金属を使用していないことから従来の材料における問題点を一掃する可能性があり、フォトマスクや紫外線レーザーによって微細な描画も可能である (**Figure 4**)。加飾色材や特殊インクとしての応用が期待される。

4. まとめ

本研究は、スチルベン部位を有するジアセチレン誘導体を用いて、外部刺激によって銀から金へと色調が変化するこれまでにない金属調光沢材料を得た²⁾。また、本研究を発展し、フィルム状の金属光沢材料にランタノイド元素をドーピングするとジアセチレン部位の配列モルフロジーが変化し、金属光沢が消失することもわかっ

た³⁾。一方で、これらの材料は、再結晶および吸引ろ過を行わないと金属調光沢が発現しないという課題もある。今後、材料利用に向けた検討を行う上では、インク状で基板上に塗布できるような材料の作製が必要であるため、高沸点溶媒に溶解させて基板上に塗布し、徐々に乾燥する際に光沢を発現させるなど、新たな光沢発現手法の確立が求められる。また、**DS-DAn-film** ($n = 1 - 6$) の色調変化はジアセチレン部位の重合進行によるものであることから、不可逆な変化である。繰り返し使用できる材料の作製を目指し、スチルベン部位の酸化還元反応などにより可逆的に色調変化可能な金属調光沢材料の作製も可能であろう。金属を使用せず、外部刺激によって銀光沢から金光沢へと2種類の希少価値の高い色調を表現可能な金属調光沢材料であり、さらなる発展が期待される。

謝辞

本研究に対して、多大なご支援を賜りました公益財団法人松籟科学技術振興財団に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Stimuli-responsive biomimetic metallic luster film using dye absorption and specular reflection from layered microcrystals, Y. Kojima, K. Kishikawa, S. Ichikawa, J. Matsui, K. Hirai, Y. Kondo, and *M. Kohri, *ACS Appl. Polym. Mater.*, 3, 1819-1827 (2021).
- 2) Silver to gold metallic luster changes in stimuli-responsive diacetylene derivatives uniquely arranged within crystals, K. Tachibana, Y. Kojima, H. Masu, N. Ichikuni, H. Takahashi, K. Akiyama, K. Nakamura, N. Kobayashi, S. Ichikawa, Y. Kondo, Y. Oaki, J. Matsui, S. Okada, T. Omatsu, K. Kishikawa, and *M. Kohri, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 16, 63904-63913 (2024).
- 3) Changes in crystal morphology induced by lanthanide doping into diacetylene lamellar crystals, *M. Kohri, S. Isomura, K. Tachibana, R. Hikichi, Y. Oaki, H. Wadati, H. Kanoh, and K. Kishikawa, *Polym. J.*, 56, 765-775 (2024).

リサイクル可能なオール有機多孔質材料の創製と 低濃度CO₂の分離・回収

東北大学 多元物質科学研究所
岡 弘樹

1. はじめに

持続可能な社会の実現に向け、CO₂排出量全体の30%以上を占める天然ガス由来の火力発電や工場からの排ガスに含まれる低濃度CO₂(< 10%)を選択的に回収可能な固体の吸着材料の開発が急務である¹。これに加え、実用化に向け低コストで大量作製が可能であることや、環境負荷の低減のために材料自体の使用後のリサイクルが求められている。

以上の背景の中で、有機分子を用いた多孔質材料は、分子設計に基づき緻密な構造制御と機能付与が可能であるためガス分離など応用に向けた研究・開発が進む²。中でも、非共有結合性の有機多孔質材料は、常温常圧下での簡便な再結晶により調製でき、特定の極性溶媒を用いて容易に分解・再構築できることから優れたリサイクル性を示す³。一般に、非共有結合は配位結合や共有結合

よりも弱い結合とされているが、強塩基と強酸間の水素結合はイオン性が高く堅牢である。したがって、スルホ基とアミノ基間に働く強固なイオン性水素結合により構築されたスルホン酸アンモニウム塩の多孔質構造は、非共有結合性であるにも拘わらず優れた構造安定性を示す⁴。

我々は、これまでにTriphenylmethylamine (TPMA)と4',4''',4''''',4''''''-methanetetrayltetrakis(([1,1'-biphenyl]-4-sulfonic acid)) (MTBPS)が、堅牢なダイヤモンド型ネットワークを形成し、複数のネットワークが相互貫入を通じて、200℃以上でも構造の維持が可能な高い構造安定性を有するダイヤモンド型の多孔質有機塩 (*d*-POS) を形成することを報告している⁵ (図1a)。この多孔質構造の空孔表面にはTPMAおよびMTBPSの芳香環が多数露出しているため、芳香環と

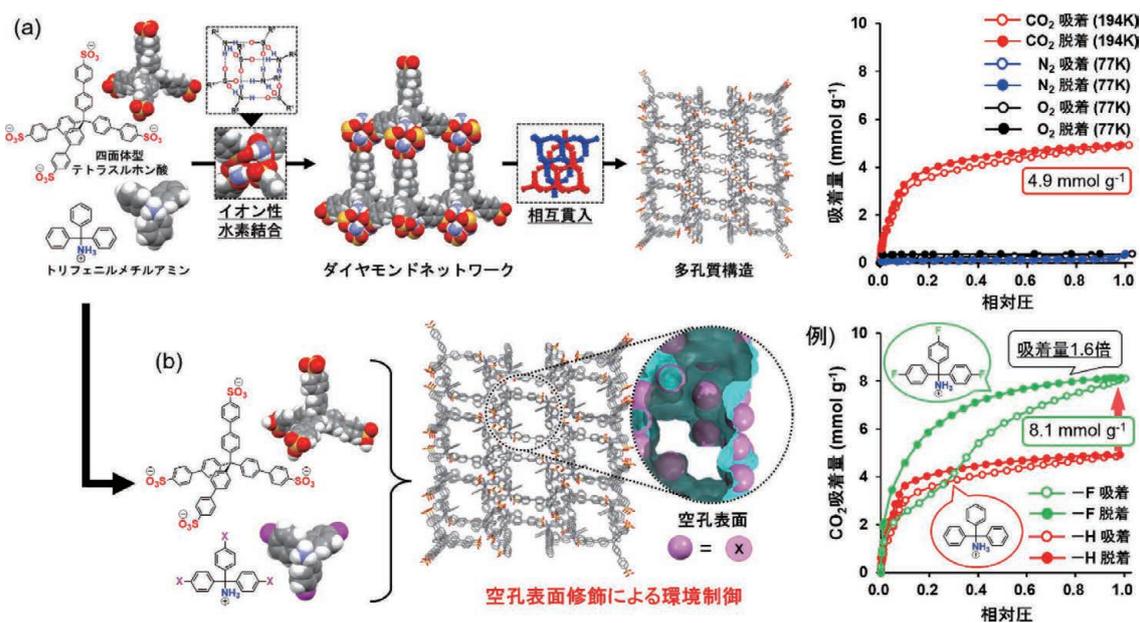


図1. (a) TPMAとMTBPSから成る*d*-POS (TPMA/MTBPS) の階層的構築と選択的CO₂吸着および (b) TPMAの芳香環の設計による空孔表面修飾を通じたCO₂吸着能の向上

CO₂分子間に働く四重極子相互作用を介してCO₂を選択的に吸着する (図1 a右)。さらに、多孔質構造表面に露出するTPMAの芳香環の修飾により修飾部位による選択的な空孔表面修飾が可能であり、多孔質構造の空孔環境を変化させることで、CO₂吸着能を大きく向上できることを明らかにした (図1 b)。

本研究では、潜在的に優れたCO₂吸着剤であるd-POSの空孔表面修飾を通じて塩基性部位を導入し、CO₂吸着能を向上できると着想した。特定の極性溶媒への高い溶解度に起因する簡便な材料作製および分解手法に基づくd-POSの温和なりサイクル法の確立と併せて、SDGsや持続可能な社会の実現に大きく貢献できる革新的な固体材料の創出を目指した。

2. 研究方法

本研究では、d-POSの空孔内部とCO₂分子との親和性を高め、CO₂吸着能を向上するために、CO₂分子と化学的に相互作用できる塩基性部位をd-POSの空孔表面に導入した。具体的には、図2に示すように、TPMAの芳香環の1つを、メタ位に2つの塩基性窒素を有するピリミジン環に置換したDiphenyl(pyrimidine-5-yl)methylamine (DPPMA) を合成し、MTBPSと1:4の比で組み合わせた有機塩を作製した。この有機塩を極性溶媒である*N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA) に多孔質構造の鑄型としてはたらくベンゾニトリルと共に溶解させ、70℃で徐々に溶媒を蒸発させながら再結晶することで空孔表面に塩基性部位を有するd-POS (DPPMA/

MTBPS) の多孔質結晶を作製した。単結晶X線構造解析によって、DPPMA/MTBPSの結晶構造を決定した後、粉末X線回折 (PXRD) によって熱および様々な溶媒中での化学的安定性を調べた。さらに、ガス吸着測定によりDPPMA/MTBPSのCO₂吸着特性および、N₂、O₂に対する吸着選択性を評価し、CO₂雰囲気下*In situ*フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) を用いて、多孔質構造の空孔表面とCO₂分子との相互作用や親和性を評価した。

3. 結果と考察

3.1. DPPMA/MTBPSの構造決定

単結晶X線構造解析から得られた結晶構造データから、DPPMA/MTBPSの構造は、2つのダイヤモンドネットワークが反対方向に深く相互貫入した熱力学的に安定した構造を形成しており、TPMAの芳香環の一つをピリミジン環に置換する前のTPMA/MTBPSと同型の多孔質構造が形成していることが示された (図2)。したがって、ピリミジン環の塩基成分 (窒素原子の孤立電子対) は多孔質構造の形成に影響を及ぼしておらず、塩基であるにも拘らずアミノ基とスルホン酸基間のイオン性水素結合には干渉しないことが明らかになった。これは、ピリミジンの塩基性が1級アミンよりも弱いため、DPPMAのアミノ基と比べ、スルホ基との水素結合が弱いことに起因する。さらに、当初の目的通り、多孔質構造の空孔表面に置換したピリミジン環の塩基成分が露出しており、単位格子あたり48個の窒素原子が空孔表面に露出していることが確認できた (図2右)。PLATONに

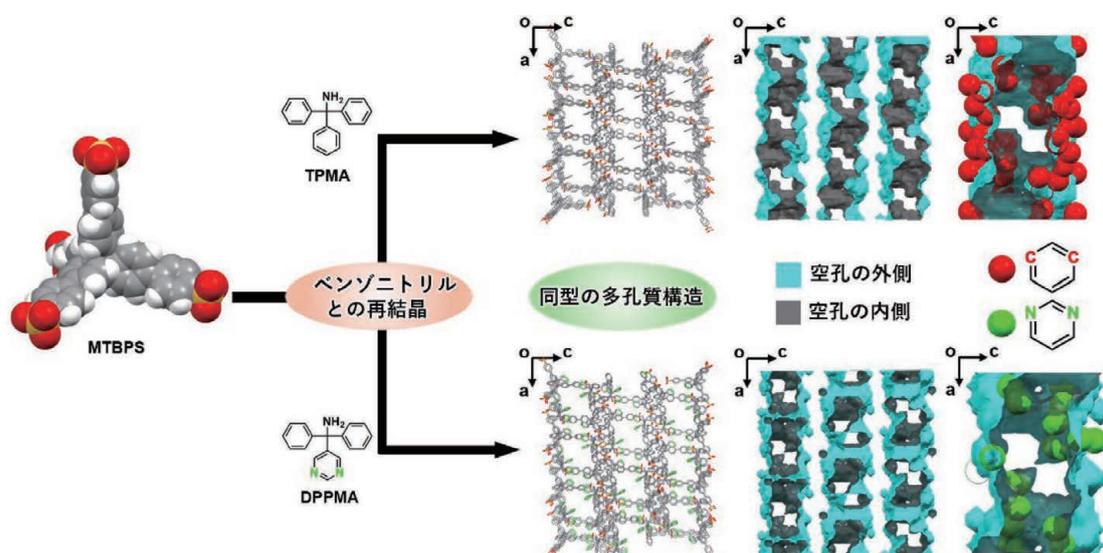


図2. 塩基性部位を導入したd-POS (DPPMA/MTBPS) の階層的構築と空孔表面環境

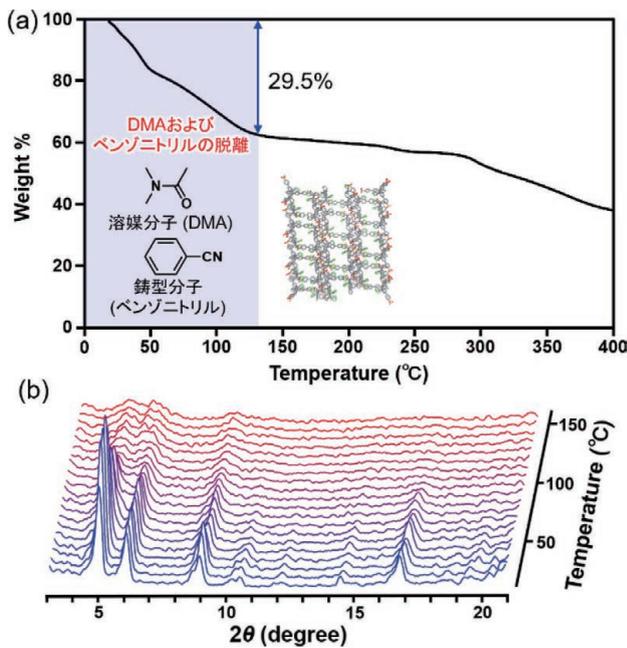


図3. DPPMA/MTBPSの (a) TGAデータおよび (b) 温度可変のXRDパターン

より最終的なDPPMA/MTBPSの多孔質構造における空隙率は43.8%と計算され、元のTPMA/MTBPSの多孔質構造の40.7%に比べてやや高い値を示した。これは、芳香環をピリミジン環に置換することで、芳香環メタ位の水素原子が失われることにより空隙率が増加するためである。さらに、DPPMA/MTBPの空隙率（43.8%）は、他の報告されているダイヤモンドネットワークを有する有機多孔構造と比較しても最も高い値を示した。

3.2. DPPMA/MTBPSの熱分析および化学安定性

熱重量分析 (TGA) により、DPPMA/MTBPSの多孔質結晶の昇温に対応する重量変化を確認した。図3aに示すTGAデータから、120°C前後で29.5%の重量減少が見られる。単結晶X線構造解析によってDPPMA/MTBPSの結晶構造中には1分子のMTBPSと4分子のDPPMAあたり6分子のDMAと3分子のベンゾニトリルが含まれていることが明らかになっており、構造全体におけるこれらの分子の重量割合は29.5%に一致することから、この重量減少は溶媒および鑄型分子の脱離によるものであると考えられる。図3bに示す温度可変のPXRDでは、DPPMA/MTBPSの多孔質構造は100°Cまで維持されることが示された。

さらに、DPPMA/MTBPSを2時間の間、様々な溶液に浸漬し、浸漬前後のPXRDを比較することで、多孔質

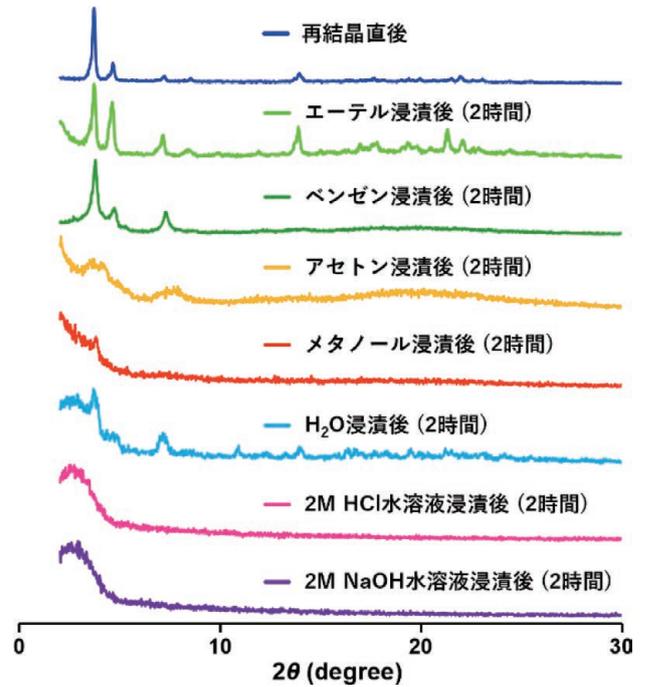


図4. DPPMA/MTBPSの化学安定性

構造の化学安定性を確認した。図4に示すように、DPPMA/MTBPSはアセトンやメタノールのような極性溶媒および酸性/中性/アルカリ性水溶液では、浸漬後に結晶性が低下した。これは、極性溶媒中で酸/塩基間の水素結合が攻撃され、DPPMA/MTBPSが部分的に溶液中に溶解することが原因であると考えられる。一方で、ジエチルエーテルやベンゼンなどの非極性溶媒では、浸漬前後の構造に変化は見られず、高い安定性を示すことが確認できた。

3.3. DPPMA/MTBPSのCO₂吸着能

DPPMA/MTBPSのガス吸着測定を行うにあたり、超臨界流体二酸化炭素処理により、多孔質構造中に含まれる鑄型分子および溶媒分子を除去した。活性化前後でPXRDのピークに変化はなく、多孔質構造を維持したまま、活性化されていることを確認した。

DPPMA/MTBPSのCO₂吸着測定では、 $P_e/P_0 = 1.0$ で2.2 mmol g⁻¹の吸着量を示した (図5a)。これに対し、N₂およびO₂吸着測定では、それぞれ $P_e/P_0 = 0.97$ で0.13 mmol g⁻¹、 $P_e/P_0 = 0.99$ で0.048 mmol g⁻¹の吸着量を示し、N₂およびO₂に対してCO₂を選択的に吸着することが示された。DPPMA/MTBPSのCO₂吸脱着等温線間に観察される大きなヒステリシスから、CO₂分子が空孔表面に導入したピリミジン環の塩基性部位と相互作用し、 P_e/P_0

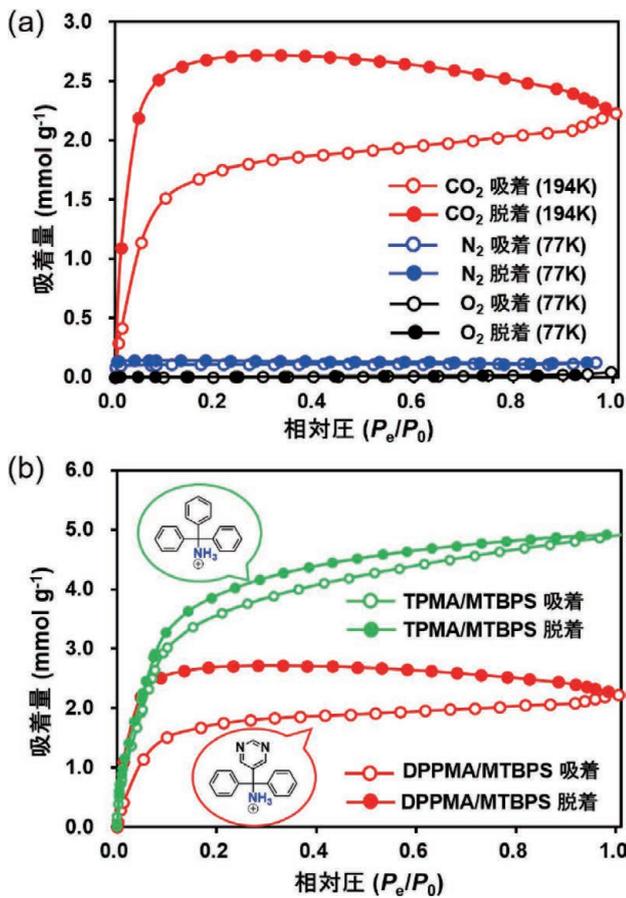


図5. DPPMA/MTBPSの (a) CO₂吸着選択性および (b) TPMA/MTBPSとのCO₂吸着特性の比較

= 0.05の低相対圧領域まで $P_e/P_0 = 1.0$ で吸着したCO₂分子が空孔表面に保持されていることが示唆された (図 5 a)。DPPMA/MTBPSのCO₂吸脱着等温線を、塩基性成分を含まないTPMA/MTBPSと比較すると、TPMA/MTBPSは $P_e/P_0 = 0.05$ までに吸着したCO₂の約50%を脱着していることから、ピリミジン環への置換によって目的通り空孔表面とCO₂分子の親和性が向上した (図 5 b)。一方で、吸着量はDPPMA/MTBPSとTPMA/MTBPSでそれぞれ2.2 mmol g⁻¹と4.9 mmol g⁻¹であり半分以下となっている。これは空孔表面にCO₂分子と強く相互作用する部位がないTPMA/MTBPSではCO₂分子が空孔の奥まで浸透し、均一に分布するのに対し、DPPMA/MTBPSでは、塩基性のピリミジン環の窒素部位で固定されるため、あとから空孔内部に侵入するCO₂分子がスタックし、見かけ上の細孔容積が小さくなってしまったことに起因すると考えられる。

DPPMA/MTBPSおよびTPMA/MTBPSの空孔内部におけるピリミジン環あるいは芳香環とCO₂分子との相互作用の強さは、CO₂雰囲気下での*In situ* FT-IR測定によ

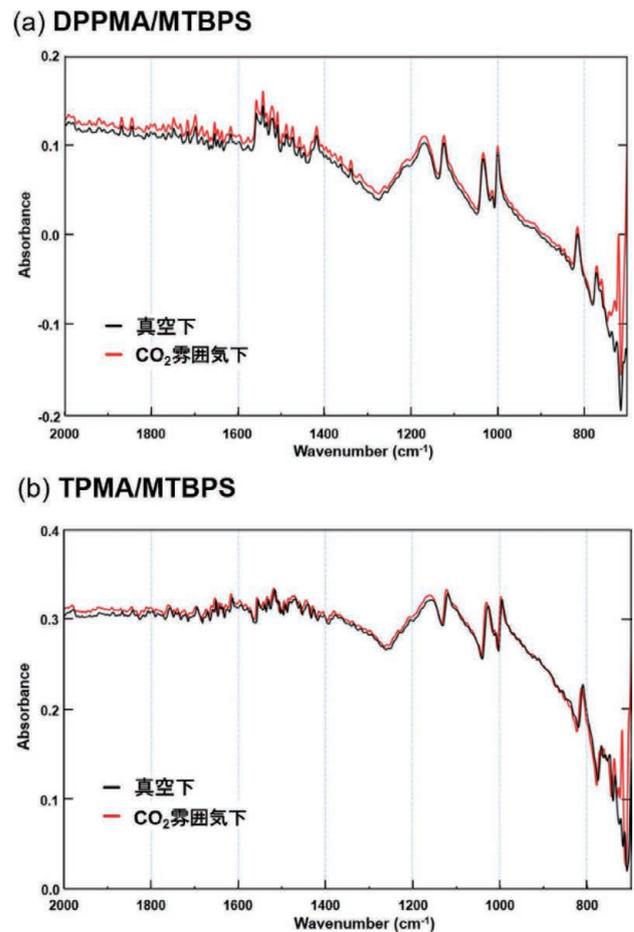


図6. (a) DPPMA/MTBPSおよび (b) TPMA/MTBPSのCO₂雰囲気下*In situ* FT-IRスペクトル

り評価した。結果として、図 6 に示すように、真空下とCO₂雰囲気下で測定されたFT-IRスペクトルの間に有意な差は見られなかった。これは、各多孔質構造の空孔表面とCO₂分子との相互作用が一般的な化学的相互作用よりも弱いことを示唆している。

したがって、DPPMA/MTBPSは吸着したCO₂を $P_e/P_0 = 0.05$ の低相対圧まで保持できるにも拘らず、 $P_e/P_0 < 0.05$ の相対圧領域では容易に脱着することができる。広範な圧力範囲 (0.05–1.0 atm) でCO₂を保持できるCO₂貯蔵能と吸着したCO₂を簡便に脱着可能な高いサイクル性は、CO₂の貯蔵と利用プロセスにおいて非常に重要な役割を果たすことが期待できる。

4. 結論

本研究では、TPMAの1つの芳香環のメタ位置に2つの窒素原子とその孤立電子対を導入したピリミジン環に置換したDPPMAと四面体型のテトラスルホン酸であるMTBPSを組み合わせることで、空孔表面に塩基性部位

が導入されたd-POS (DPPMA/MTBPS)を作製した。DPPMA/MTBPSは、CO₂分子と空孔表面に存在する芳香環およびピリミジン環との四重極子相互作用を介して、主要な空気成分 (N₂とO₂) に対しCO₂を選択的に吸着する。さらに、ピリミジン環とCO₂分子との相互作用に起因して、吸着したCO₂を空隙内に $P_e/P_0 = 0.05$ の低相対圧領域まで保持で、 $P_e/P_0 < 0.05$ で吸着したCO₂を容易に脱着した。したがって、DPPMA/MTBPSは、廃棄物焼却炉と同等の0.08–0.13 atmや天然ガス複合サイクル発電所と同等の0.05 atmの比較的低濃度のCO₂圧力下でも、CO₂を吸着・保持できる^{6,7}。これらから、TPMAの芳香環に塩基性成分を導入することで、POSの空孔表面とCO₂分子との親和性を増加し、CO₂吸着能が向上した。今後は、スルホン酸骨格の設計による空孔径制御やより強い塩基性部位 (ピリジン環, アミノ基) の導入を通じて、低圧におけるCO₂吸着量を改善し、CO₂吸着能のさらなる向上を目指すとともに実用化へ向けた大量合成法の確立にも挑戦する。

5. 成果

- 1) T. Ami, K. Oka, K. Tsuchiya, W. Kosaka, H. Miyasaka, N. Tohnai, *CrystEngComm*, **25**, 2321–2325, 2023.
- 2) R. Akai, K. Oka, T. Ami, N. Okada, N. Tohnai, *Eur. J. Org. Chem.*, **26**, e202300417, 2023.
- 3) T. Ami, K. Oka, S. Kitajima, N. Tohnai, *Angew.*

Chem. Int. Ed., **63**, e202407484, 2024.

6. 謝辞

本研究は、公益財団法人松籟科学技術振興財団からの研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

7. 参考文献

- 1) R. Chang, X. Wu, O. Cheung, W. Liu, *J. Mater. Chem. A*, **10**, 1682–1705, 2022.
- 2) Q. Qian, P. A. Asinger, M. J. Lee, G. Han, K. Mizrahi Rodriguez, S. Lin, F. M. Benedetti, A. X. Wu, W. S. Chi, Z. P. Smith, *Chem. Rev.*, **120**, 8161–8266, 2020.
- 3) R.-B. Lin, Y. He, P. Li, H. Wang, W. Zhou, B. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, **48**, 1362–1389, 2019.
- 4) A. Yamamoto, S. Uehara, T. Hamada, M. Miyata, I. Hisaki, N. Tohnai, *Cryst. Growth Des.*, **12**, 4600–4606, 2012.
- 5) T. Ami, K. Oka, K. Tsuchiya, N. Tohnai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **134**, e20222597, 2022.
- 6) H. Lee, S.-M. Yi, T. M. Holsen, Y.-S. Seo, E. Choi, *Waste Management*, **73**, 247–255, 2018.
- 7) J.-M. G. Amann, C. Bouallou, *Energy Procedia*, **1**, 909–916, 2009.

ナノ空間に単分子磁石を内包した透明フィルムの開発と pH による磁石特性制御

大阪公立大学 大学院理学研究科
亀渕 萌

1. 緒言

単分子磁石とは、1つの分子で磁石の性質を示す分子のことである。一般的な磁石(古典磁石)の場合では、磁石の基本単位の「スピン」が協調して同じ方向を向くことでエネルギー的に安定な構造を作り、スピンの揃った状態(強磁性状態)を作る。単分子磁石の場合、そのメカニズムはかなり異なり、磁化が一旦ある方向を向いた場合に、逆の方向に磁化が向くようになるまでの時間(緩和時間)が他の分子に比べて非常に長いことが特徴である。従って、いったんある方向を向いた分子磁石は、長い間その磁石としての特性を保持できる。1993年に Mn_{12} クラスタが初めて遅い磁化緩和を示すことが報告されて以来、分子メモリーに適した物質群であることから分子磁性・材料科学の分野に大きなインパクトを与えてきた。^[1] この遅い磁化緩和は、分子スピン状態の二重井戸型ポテンシャルにおけるエネルギー障壁によって説明され、強い異方性を有する金属中心は磁化反転に対して高い障壁を形成し、結果として磁化緩和が大幅に遅延する。

Mn_{12} クラスタは、単分子磁石研究の端緒を開いた。しかし、そのプロッキング温度(磁化が保持される温度)は数K程度に留まり、実用化には不十分であった。これを克服するため、強いスピン-軌道相互作用を持つランタニド錯体の開発が進められた。例えばジスプロシウムイオン(Dy^{III})は、 $J_z = \pm 13/2$ の基底に由来する強い異方性を示すため、単分子磁石として極めて有望である。代表的な研究例として、Ishikawa らによる $[Pc_2Dy]^-$ ($Pc =$ フタロシアニン)錯体は、室温付近でも非常に長い磁気緩和時間を示すことが報告され、この分野の大きな転換点となった。^[2] 近年では、液体窒素温度を超えるプロッキング温度の達成が報告され、大きな話題と

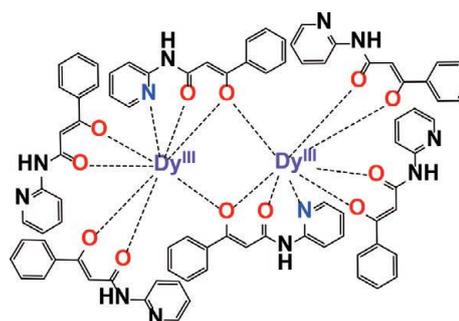


図 1. $[Dy^{III}_2(PBA)_6]$ の分子構造

なった。^[3]

本研究では、 β -ジケトンが配位したジスプロシウム 2 核錯体 $[Dy^{III}_2(PBA)_6]$ (図 1; HPBA = *N*-(2-pyridinyl)benzoylacetamide) を基盤物質として用いた。この物質は、これまでの研究において報告した希土類 2 核錯体 $[Ln^{III}_2(PBA)_6]$ ($Ln = Eu, Tb$) の一連のシリーズである。^[4] このユーロピウム(III)およびテルビウム(III)錯体は pH に応答して発光特性をスイッチできる物質であり、 Tb^{III} 錯体を酸性条件にすれば緑色発光($^5D_4 \rightarrow ^7F_J$)を示し、塩基性では発光を示さない。一方、 Eu^{III} 錯体は酸性条件では消光し、塩基性条件のみ赤色発光($^5D_0 \rightarrow ^7F_J$)を示す。このようなプロトン応答の性質を利用して、 $[Eu^{III}_2(PBA)_6] / [Tb^{III}_2(PBA)_6]$ @Nafion なる 2 成分系フィルムに対して、pH が 2-12 の緩衝溶液を作用させ、発光の様子を観察した。その結果、酸性条件(pH 2-5)では緑色、塩基性条件(pH 9-12)では赤色、中間条件では黄色に発光するフィルムであることが確認できた。また、直流電圧をかけることでプロトン伝導を誘起させ、+極から-極にかけて赤色発光の流れを観測できた。このように、Nafion の陽イオン交換能やプロトン伝導性^[5]などを活用して、機能性透明材料の開発を提案してきた。^[4,6-10] このような背景のもと、

[Dy^{III}₂(PBA)₆] をNafionへ導入した材料を作成すれば、プロトンによってDy^{III}イオンの遅い磁化緩和特性を制御可能になるのではないかと期待し、研究を行った。

2. 方法

[Dy^{III}₂(PBA)₆] 錯体は既に報告したEu^{III}およびTb^{III}錯体と同様に、^[4] 水酸化ナトリウム(NaOH)存在下でHPBAと硝酸ジスプロシウム(III)六水和物をメタノール中で拡散させることによって、3日後に淡黄色結晶が得られた。

過酸化水素水で洗浄済みのNafion 117をNaOH水溶液に浸漬することで、Nafionのスルホン酸基が有する陽イオンをNa⁺に置換させたもの(Na-form)を調製した。このNa-form Nafionを[Dy^{III}₂(PBA)₆]のジメチルホルムアミド(DMF)溶液に室温で24 h浸し、真空乾燥を行った。磁気測定に際しては、このようにして得られたフィルム[Dy^{III}₂(PBA)₆]@NafionをBritton-Robinsonの広域緩衝液^[11]に浸漬することによって、Nafion内部のプロトン量を調節した。

3. 結果

[Dy^{III}₂(PBA)₆]の173 Kにおける単結晶 X 線構造解析の結果、*Orthorhombic, Pbca*, $a = 15.0339 \text{ \AA}$, $b = 17.8936 \text{ \AA}$, $c = 29.056 \text{ \AA}$, $V = 7816.4 \text{ \AA}^3$, $Z = 8$, $R_1 (I > 2\sigma(I)) = 0.0446$, $wR_2 (\text{all data}) = 0.0649$, $\text{GOF} = 1.072$ であった。フィルムへの導入については、Nafionが極性溶媒によって膨潤している場合、内部に直径約4 nmのナノ空間(逆ミセル空間)が、5 nm程度の間隔で繋がったチャンネルを形成することで分子性化合物やプロトン、その他イオン等を膜内へ輸送することができる。研究の開始当初は、先行研究に沿ってエタノールを溶媒として[Dy^{III}₂(PBA)₆]の導入を行ったが、磁化率測定において十分な信号強度を得られないことが分かった。そこで、Nafionに対する膨潤度がより大きいDMFを溶媒に用いて錯体導入量の増大を狙った結果、[Dy^{III}₂(PBA)₆]の導入量が74.03 μmol/g(Nafion)と見積もられた。これは従来の8~10倍程度の濃度であり、磁気測定でも十分信頼できる信号強度が得られることが分かった。

次に、[Dy^{III}₂(PBA)₆]の結晶に対して交流磁化率測定を行ったところ、ゼロ磁場で明確な周波数応答が観測でき(図2上)、単分子磁石挙動を示した。また、直流磁

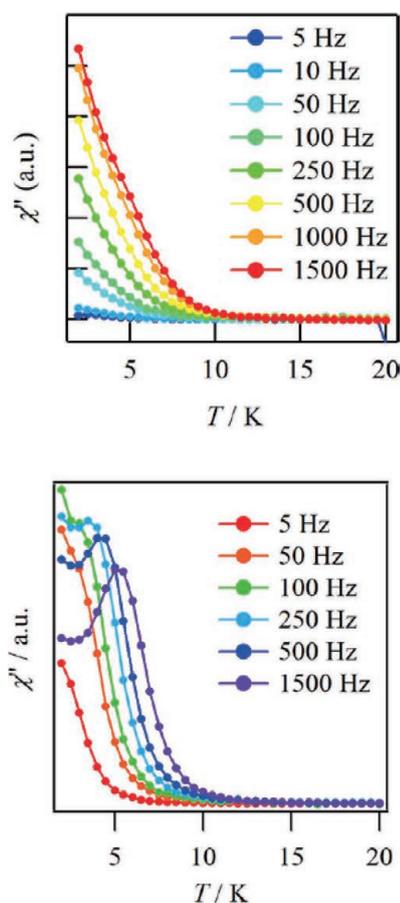


図2. [Dy^{III}₂(PBA)₆]の交流磁化率の温度依存性(上: $H_{dc} = 0 \text{ T}$, 下: $H_{dc} = 0.2 \text{ T}$)

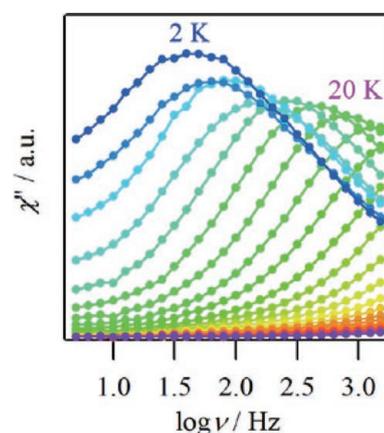


図3. [Dy^{III}₂(PBA)₆]の交流磁化率(虚数部)の周波数依存性($H_{dc} = 0.2 \text{ T}$)

場0.2 T下において(図2下)、実数部(χ')と虚数部(χ'')の温度および周波数依存性から、活性化障壁(Δ/k_B)は24.0 K, 緩和時間 $\tau_0 = 1.69 \times 10^{-6} \text{ s}$ と分かった(図3下)。

フィルム[Dy^{III}₂(PBA)₆]@Nafionは直流磁場0.3 T下において遅い磁化緩和の顕著なpH依存性を示した。[Dy^{III}₂(PBA)₆]@NafionをpH 12の緩衝液で処理した試料では、 χ' は殆ど温度および周波数依存性を示さず、

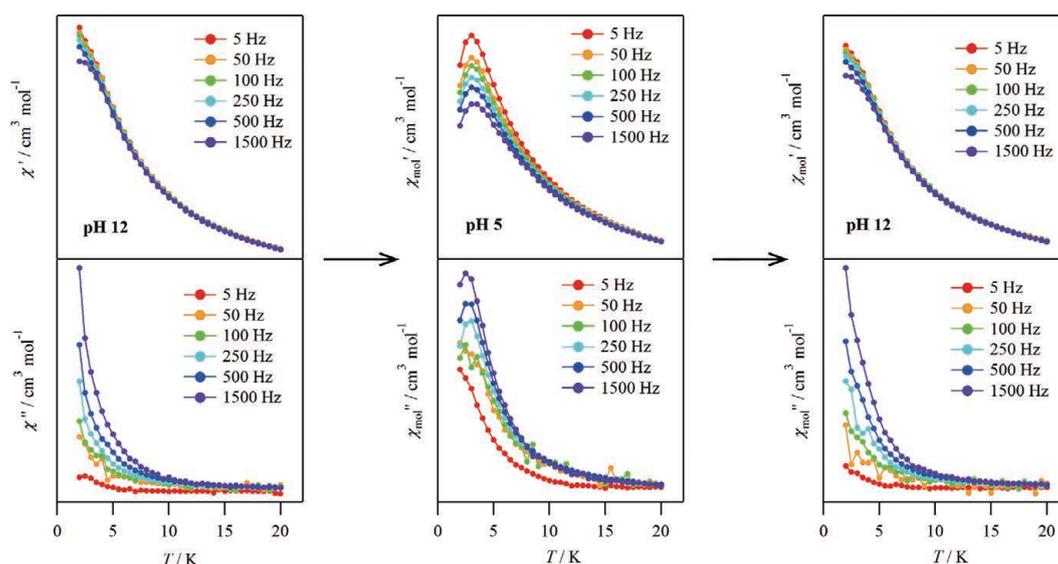


図4. 膜内のプロトン量を緩衝液で制御した $[\text{Dy}^{\text{III}}_2(\text{PBA})_6]$ @Nafionの交流磁化率の温度および周波数依存性 ($H_{\text{dc}} = 0.3 \text{ T}$).

χ'' にはピークが観測されなかった(図4)。このとき、modified Arrhenius解析^[12]から $\Delta/k_B = 3.31 \text{ K}$, $\tau_0 = 6.61 \times 10^{-6} \text{ s}$ と見積もられた。この試料をpH 5の緩衝液で処理して膜内へプロトンを提供すると、 χ' と χ'' は明瞭なピークを示し、再びpH 12の条件へ戻すと初期状態の交流磁化率のプロファイルへと回復した。pH 5の条件では、 $\Delta/k_B = 3.65 \text{ K}$, $\tau_0 = 2.57 \times 10^{-5} \text{ s}$ と見積もられ、活性化障壁に大きな差は無いものの、緩和時間が1桁上昇した。以上のような変化は、緩衝液によって膜内のプロトン量が制御され、 $[\text{Dy}^{\text{III}}_2(\text{PBA})_6]$ に対してプロトン付加・脱離が起きたためであると考えられる。このように、外部のpH条件を制御することによって透明フィルム材料における遅い磁化緩和挙動を可逆的にコントロール可能であることが示された。

4. まとめ

プロトン応答性のジスプロシウム2核錯体 $[\text{Dy}^{\text{III}}_2(\text{PBA})_6]$ の結晶固体の磁化緩和特性を明らかにした。また、この物質をイオン交換膜Nafionへ取り込んだ試料の磁化緩和特性を、緩衝液に由来するプロトン付加・脱離を利用して可逆的に制御することに成功した。遅い磁化緩和現象は、高密度情報記録・量子情報処理・分子スピントロニクスといった分野で基礎量子物理と応用技術開発の両面で重要な位置を占める。本研究は、簡便な手法によってプロトンを用いて遅い磁化緩和特性を制御した例であり、高分子の機能と小分子の物性が相乗効果を発揮した機能性材料と言える。今後の量子情報科学やナ

ノ材料開発分野における重要なプラットフォームとなることが期待される。

5. 謝辞

本研究の遂行に際して、多大なるご支援を賜りました公益財団法人松籟科学技術振興財団に心より御礼申し上げます。また、本研究は東京理科大学理学部第一部化学科・田所誠教授の研究室にて行われたものです。ご協力いただきました皆様に感謝申し上げます。

6. 参考文献

- [1] R. Sessoli, D. Gatteschi, A. Caneschi, M. A. Novak, *Nature* **1993**, *365*, 141-143.
- [2] N. Ishikawa, M. Sugita, T. Ishikawa, S. Y. Koshihara, Y. Kaizu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8694-8695.
- [3] F.-S. Guo, B. M. Day, Y.-C. Chen, M.-L. Tong, A. Mansikkamäki, R. A. Layfield, *Science* **2018**, *362*, 1400-1403.
- [4] H. Kamebuchi, T. Yoshioka, M. Tadokoro, *Materials Advances* **2020**, *1*, 569-573.
- [5] K. A. Mauritz, R. B. Moore, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4535-4585.
- [6] H. Kamebuchi, S. Tamaki, A. Okazawa, N. Kojima, *Membranes* **2021**, *11*, 400 (14 pages).
- [7] H. Kamebuchi, Y. Fujimura, T. Yoshioka, A. Okazawa, M. Tadokoro, N. Kojima, *Crystals* **2020**,

- 10, p.653 (9 pages).
- [8] H. Kamebuchi, M. Enomoto, N. Kojima, "PROGRESS OF MULTIFUNCTIONAL SPIN CROSSOVER COMPLEX FILM BASED ON NAFION", *Nafion: Properties, Structure and Applications*, Nova Science Publishers, **2016**, 119-140.
- [9] A. Nakamoto, H. Kamebuchi, M. Enomoto, N. Kojima, *Hyperfine Interactions* **2012**, 205, 41-45.
- [10] H. Kamebuchi, T. Jo, H. Shimizu, A. Okazawa, M. Enomoto, N. Kojima, *Chemistry Letters* **2011**, 40, 888-889.
- [11] H. T. S. Britton, R. A. Robinson, *J. Chem. Soc.* **1931**, 1456-1462.
- [12] J. Bartolomé, G. Filoti, V. Kuncser, G. Schinteie, V. Mereacre, C. E. Anson, A. K. Powell, D. Prodius, C. Turta, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **2009**, 80, 014430 (16 pages).

研究報告集 第37集 (非売品)

2026年3月1日発行

発行所 公益財団法人松籟科学技術振興財団
〒541-0042 大阪市中央区今橋4丁目4-7
(京阪神淀屋橋ビル)
ハリマ化成グループ株式会社内
TEL 06-6229-0966
