

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05245

研究課題名(和文)加水分解反応を起こす高分子を用いた抗酸化物質の放出制御

研究課題名(英文)Controlled release of antioxidants using hydrolyzable polymers

研究代表者

森川 浩(Morikawa, Hiroshi)

神奈川工科大学・工学部・教授

研究者番号：10434416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：加水分解により、抗酸化物質を放出可能な分子をデザインした。抗酸化物質として、L-アスコルビン酸を選んだ系では、フェニルボロン酸とのエステル形成能を評価した。また、抗酸化物質としてニトロキシドラジカルTEMPOを選んだ系では、数段階の反応を経て、TEMPO部位-非環状アセタール部位-反応性官能基で連結されたモノマーを合成できた。このモノマーとポリエチレンイミンを反応させることにより、TEMPO部位とアセタール部位を共存させた多分岐高分子を合成できた。合成したモノマーや高分子を用い、酸性条件の水溶液中で、アセタール部位の加水分解によって、TEMPO化合物が放出されることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗酸化物質自身の化学修飾とその反応性の評価、加水分解可能なモデル物質の評価、目的モノマーおよび高分子の合成を実証できた。これらを通じ、外部刺激をトリガーとして、抗酸化物質を放出できる材料設計が可能であることを実証した。また、抗酸化部位を保持したまま、各種化合物が創製できる合成方法論を提示できた。これらの結果は、抗酸化物質の分子設計ならびに機能化に新たな知見と指針を与えることができ、新たなバイオマテリアル創製及び高機能化への基盤になると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We designed novel materials exhibiting release of antioxidant triggered by hydrolysis reaction. For L-ascorbic acid as the antioxidant, reaction behavior of formation of the ester bond between L-ascorbic acid and phenylboronic acid was evaluated. For nitroxide radical (TEMPO) as the antioxidant, new monomers having TEMPO, noncyclic acetal moiety, and reactive group were synthesized via several steps. The monomer and polyethyleneimine were reacted to afford a hyperbranched polymer carrying both TEMPO and acetal moieties. It was confirmed that, under acidic aqueous media, a TEMPO molecule was released from the TEMPO-tethered monomer or polymer by hydrolysis reaction of the acetal moieties.

研究分野：高分子化学

キーワード：抗酸化物質 ラジカル 加水分解 モノマー 高分子

## 1. 研究開始当初の背景

生体内には、ペプチド、酵素やビタミンなどの過剰な活性酸素を消去する抗酸化物質が存在するが、活性酸素の発生と消去のバランスが崩れると疾病を発症することが知られている。過剰な活性酸素は、その高い反応性のためにタンパク質、細胞膜脂質やDNAなどを酸化する。すなわち、ありとあらゆる生体組織及び細胞に重篤なダメージを与える。ゆえに、疾病と活性酸素との深い関係性が指摘されており、そのメカニズムや影響度が盛んに研究されている。したがって、この過剰の活性酸素を適切な場所で消去することは、病気の予防や治療に極めて重要である。

ある種の抗酸化物質は、脳梗塞時に発生する活性酸素種を捕捉して脳神経を保護する働きを持ち、実用化されている。さらにこの物質は、ALS（筋萎縮性側索硬化症）に対し、進行抑制のための活性酸素消去剤として承認された。このように、抗酸化物質（活性酸素消去剤）の新規開発や高機能化は、傷病の治療や予防に向けて、重要度がより一層増している。

## 2. 研究の目的

抗酸化物質の機能の最大化を図るために、高分子の側鎖に開裂可能な結合を用いて抗酸化物質を担持させる系をデザインした。水溶液中、高分子に抗酸化物質が担持され、酸性条件では、抗酸化物質が放出される系である。ここでは、「抗酸化物質の放出と拡散」が計画の中心かつ核心である。高分子主鎖からの抗酸化物質の解放は、抗酸化物質周辺の立体障害の緩和による活性酸素消去能の増加につながる。また、抗酸化物質の拡散による反応点の増加、すなわち消去速度の増加につながると期待した。

今回、このような系の基盤となる抗酸化物質自身の化学修飾、加水分解可能なモデル物質の評価、目的モノマーおよび高分子の合成を行った。

## 3. 研究の方法

目的とする抗酸化物質として、L-アスコルビン酸AAとニトロキシドラジカルTEMPO（2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル）を選んだ。開裂可能な部位としてボロン酸エステル及びアセタール構造を選択した。

(1) L-アスコルビン酸では、フェニルボロン酸PBとのエステル結合能の評価を行った。これはPB部位を有するポリマーに、AAを担持させることを考慮したものである。

(2) 一方で、TEMPO化合物では、TEMPO部位-アセタール部位-反応部位から連結したモノマーを分子設計し、合成に取り組んだ。反応部位を重合させることによって、目的とする高分子になりうることを期待した。

## 4. 研究成果

(1) AAとPBとのエステル化挙動を、H-NMRスペクトル（30°C、50 mM DMSO-*d*<sub>6</sub>）により評価した。また、比較対象として、ジオール部位を保護した2つの物質、5,6-ジオールAAと2,3-ジオールAAを準備した。AAの濃度平衡定数は、5,6位ジオール体が反応する場合の値に近く、2,3位ジオール体のそれに比べて160倍大きかった。AAとPBがエステル形成する場合、AAに2か所あるジオール部位のうち、5,6位ジオールが優先的に反応することを明らかにした。

(2)-1 化合物の合成について： TEMPO-アセタール-反応部位から連結するモノマーとして、まず、環状アセタール構造を有するTEMPO化合物（図1）を合成した。しかし、環構造の安定性に起因して、アセタール部位の加水分解性は低かった。そこで、次に非環状のアセタール化合物をターゲットとした。

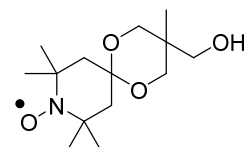


図1. 環状アセタール化合物

図2に示すように、ヒドロキシTEMPOを出発物質として、三段階の反応を経て、末端にヒドロキシ基を有する化合物TEMPO-AAを通算収率17%で得ることができた。このTEMPO-AAのヒドロキシ基を修飾することで、反応性モノマーの合成を試みた。種々の試薬や反応条件を検討した結果、エポキシ化合物であるTEMPO-AEの合成に成功した。また、メタクリル部位を有する化合物TEMPO-AMも合成することができた。これらの化合物はラジカル部位を有するため、ヒドラジン化合物または

L-アスコルビン酸で、ラジカル部位をヒドロキシシルアミン (N-OH) に還元して、NMR等にて同定を行った。

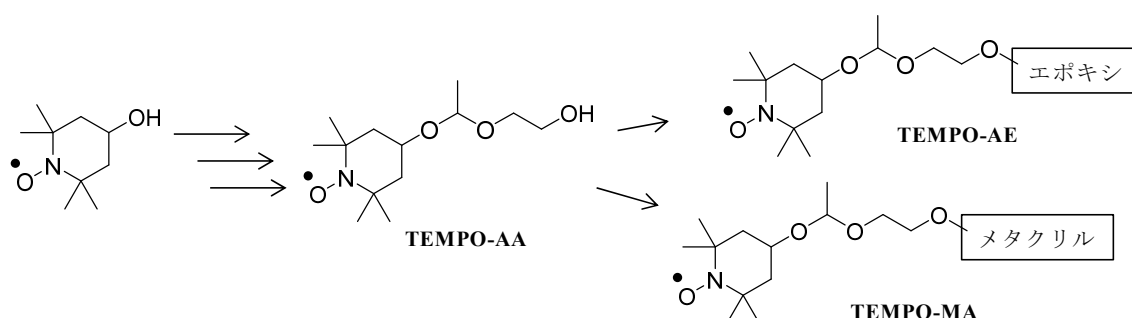


図2. TEMPO部位とアセタール部位を有する化合物の合成

先に合成できたTEMPO-AEを使って、エポキシ部位のアニオン重合反応を試みた。しかし、*t*-BuOKなどの種々の試薬を用いても反応は進行しなかった。そこで、ポリエチレンジアミンPEI (分岐型,  $M_n=600$ ) と反応させることで、PEI部位をコア、TEMPO-AE部位をシェルとする多分岐型高分子の合成を試みた (図3)。PEIとグリシドールとTEMPO-AEの3成分を混合し、反応させることで、目的とするTEMPO部位含有の多分岐高分子を合成することができた。NMR、UV-Vis、ESR測定によって、TEMPO部位の導入を確認でき、その含有量を見積もった。一方で、現在、TEMPO-MAの重合には成功しておらず、重合方法の検討が必要となっている。

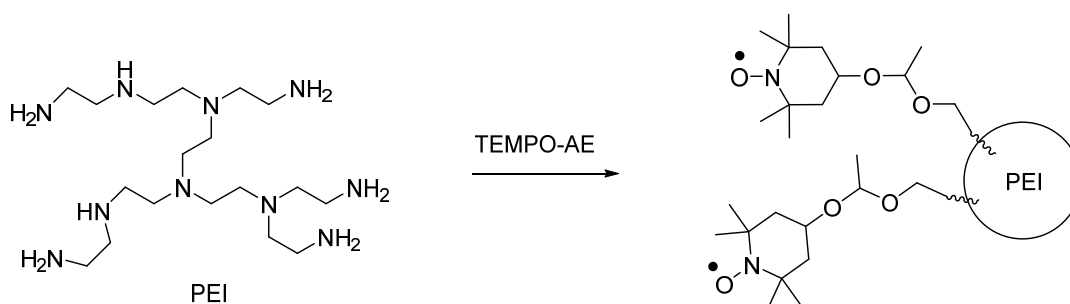


図3. TEMPO 部位とアセタール部位を有する多分岐高分子

#### (2)-2 加水分解特性について :

モノマーTEMPO-AA (図2) は十分に水溶性があり、加水分解反応を試みることができた。pH=4, 5, 6の緩衝液にTEMPO-AAを溶解させ、時間経過とともに、TLC上、遊離するヒドロキシTEMPOを追跡した。その結果、pH値に応じて、ヒドロキシTEMPOが放出されることを確認できた。pHが酸性側(4<6)になるにつれて加水分解反応は早く、室温下、pH=4ではおよそ2日で定量的に、pH=5では半分程度のヒドロキシTEMPOが放出された。この加水分解反応の抽出液を、ガスクロマトグラフGCに打ち込んだが、TEMPO-AAが熱分解し、ヒドロキシTEMPOが生じた。おそらくアセタール部位が不安定なためであり、定量的な加水分解率を求めることができなかった。

一方で、緩衝液を用いて、TEMPO部位含有の多分岐高分子(図3)の酸性溶液を作成しようとしたが、溶液のpHが安定しなかった。その高分子骨格内に三級アミン部位を多数持っているためと考えられる。そこで、塩酸を加えてこの高分子水溶液のpHを強酸性下(pH=約2)にしたところ、すぐにヒドロキシTEMPOの放出が確認された。

以上より、TEMPO部位を保ったまま、加水分解性モノマー及び高分子を合成することができた。また、酸性下において、TEMPO化合物を放出することを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 武田唯子、森川浩	4. 巻 44
2. 論文標題 L-アスコルビン酸とフェニルボロン酸との反応挙動の評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 神奈川工科大学研究報告 B 理工学編	6. 最初と最後の頁 61-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沼尾悠汰、山口淳一、森川浩
2. 発表標題 ニトロキシド部位と分解可能なリンカーを有する化合物の合成とその重合反応の試み
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 淳一 (Yamaguchi Jun-ichi) (00256661)	神奈川工科大学・工学部・教授  (32714)	
研究分担者	本九町 卓 (Motokucho Suguru) (70404241)	長崎大学・工学研究科・助教  (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------