

機関番号：82401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20350072

研究課題名 (和文)

外部刺激に応答して生分解性を誘起する新規周期共重合高分子材料の創成

研究課題名 (英文) Synthesis of novel periodic copolymers with a function inducing biodegradability as responsive to outer stimulus

研究代表者

阿部 英喜 (ABE HIDEKI)

独立行政法人理化学研究所・バイオプラスチック研究チーム・チームリーダー

研究者番号：70271541

研究成果の概要 (和文)：

3-ヒドロキシブタン酸をベースとし、第二モノマーとしてアスパラギン酸を規則的な周期連鎖配列にて導入した新規共重合体の合成に成功した。この周期共重合体に対し、アスパラギン酸ユニットの側鎖へアルキルアミンを導入するとポリエステル加水分解酵素による分解を抑制することができ、酸性条件下でアルキルアミンを解離することにより分解性を再獲得することを実証した。このように、pH 或いは塩濃度を外部刺激として生分解反応が誘起される新規機能性分子の創成を達成した。

研究成果の概要 (英文)：

Synthesis of copolymers with periodic sequence structure was achieved by two-step polycondensation reaction from 3-hydroxybutyrate and aspartate. When the copolymers reacted with alkyl amine to form ion-complex at side-chain of aspartate units, the enzymatic degradation reaction by polyester-degrading enzyme was inhibited. It was found that the enzymatic degradability of copolymers was regained by the washing under the acidic condition. From the obtained results, we proposed new methodology to control the starting point of biodegradation for the periodic copolymers by changing the pH as outer stimulus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：周期性共重合体、連鎖構造制御、生分解性、3-ヒドロキシブタン酸、スイッチ機能、重縮合、イオンコンプレックス

1. 研究開始当初の背景

有限化石資源の有効利用と環境保全の観点から、再生可能なバイオマス資源を原料として作られ、環境中で分解される生分解性という機能を併せ持つ次世代型のバイオベースポリマーの開発が必要とされている。高分子の生分解性は環境負荷低減に向けた優れた機能にひとつであるが、その反応の進行は

材料の性能劣化を促す。理想的な生分解性高分子材料とは、使用している間は安定にその構造を維持して優れた性能を持続的に発揮し、使用期間が終了した後には速やかに分解され、自然界の循環サイクルへ組み込まれる材料である。したがって、生分解性高分子材料の分解反応を自在にコントロールできる方法論の構築が望まれている。使用後にある

特定の外部刺激を加えることによりはじめて生分解反応が開始するようなスイッチ機能をプログラムした分子ができれば、生分解性高分子材料の利用・応用が飛躍的に展開するものと予想される。

2. 研究の目的

本研究では、バイオマス資源を原料として作られるバイオベースポリマーをターゲットとし、使用後に特定の外部刺激を加えることによりはじめて生分解性を誘起するスイッチ機能を付与した新規高分子素材の創製技術を提案し、材料寿命を自在にコントロールできる方法論の構築を目指す。共重合連鎖の精密化によるナノ構造制御とバイオポリエステル加水分解酵素の基質認識機構に着目し、ポリヒドロキシアルカン酸分子鎖中に第二モノマー成分として特殊な分子を規則性周期連鎖で導入した新規周期性共重合体の合成を試みる。ここで、第二モノマー分子を、刺激応答性官能基を有し、刺激に応じて分子構造変化を引き起こし、構造変化に伴い分解酵素の基質として認識されるよう分子設計する。得られた新規高分子素材の構造と機能との相関を解明し、バイオベースポリマーの高機能化に向けた分子設計法の構築を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず、ポリマーと分解酵素との反応について最も知見の多い、バイオポリエステルをターゲットとして研究を開始した。バイオポリエステル加水分解酵素の本来の基質である 3-ヒドロキシブタン酸をモノマーの一つとし、第二モノマー成分としてリンゴ酸あるいはアスパラギン酸を用いることを計画した。リンゴ酸あるいはアスパラギン酸の β 位のカルボン酸を水酸基と縮合すると、ちょうど 3-ヒドロキシブタン酸と主鎖炭素数が同じで側鎖にカルボン酸を持つモノマーユニット構造となる。この β -リンゴ酸或いは β -アスパラギン酸ユニットのフリーな側鎖カルボン酸を利用し、側鎖にかさ高い置換基を導入する。置換基導入において、アルキルアミンなどを用いてイオン性結合を利用すると、共有結合の場合とは異なり、その置換基を pH 変化あるいは塩濃度変化により結合・解離できるものと予想し、第二モノマーユニットとアルキルアミンとのイオン性結合の解離・形成を生分解反応の On-Off のスイッチとして働かせることを想定した。

共重合体の合成法としては、2段階の縮重合反応を利用した。まず、二種類のモノマーの縮合反応により調製したオリゴマーを、超臨界流体クロマトグラフィーによって単一分散オリゴマーとして分別回収し、この単一分散オリゴマーをさらに縮合させることに

より、3-ヒドロキシブタン酸 2 ユニットごとにリンゴ酸（あるいはアスパラギン酸）1 ユニット、3-ヒドロキシブタン酸 2 ユニットごとにリンゴ酸（あるいはアスパラギン酸）2 ユニットといった、周期性連鎖構造を精密に制御した共重合ポリエステルを調製することを目指した。

得られた試料の連鎖構造および分子量を調べ、周期性を維持した高分子量物を調製し得る合成条件を探索した。

ついで、得られた生成物に外部刺激を加え、目的とする構造変化が誘導されるかを評価するとともに、バイオポリエステル加水分解酵素を用いた分解試験を行い、生分解性スイッチ機能が効果的に働くことを評価した。

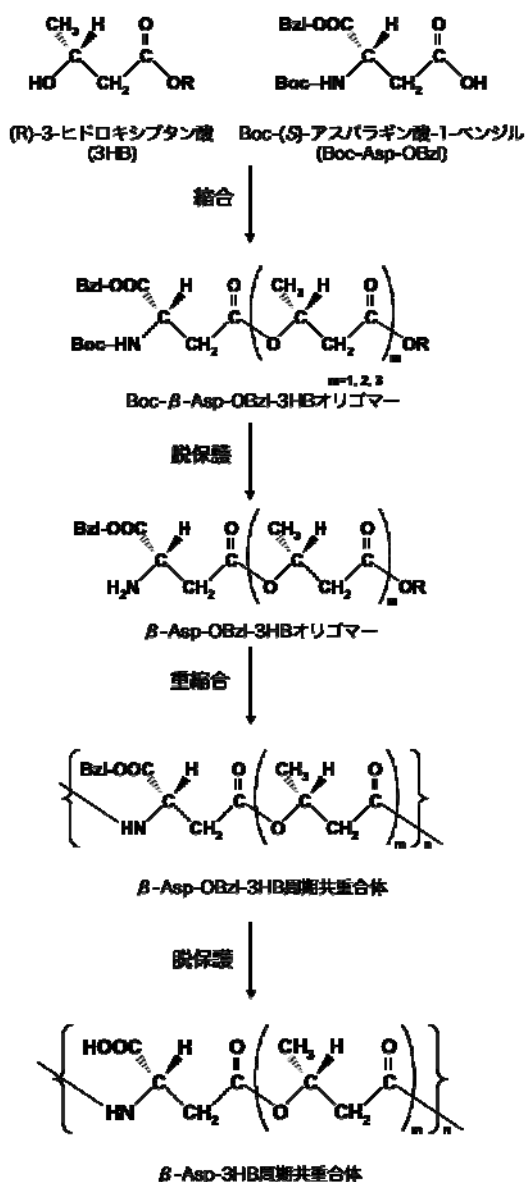
4. 研究成果

本研究では、ポリエステル加水分解酵素本来の基質である 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) をベースとして、第二モノマーユニットを規則性連鎖で導入した新規共重合体を設計することにより、その分解反応の開始点を制御することを試みた。

まず当初の研究計画にしたがい、3-ヒドロキシブタン酸とリンゴ酸の縮合反応によるオリゴマーの調製条件を検討した。しかしながら、エステル同士である両モノマーを用いると副反応としてエステル交換が進行し、高効率で単一オリゴマーを調製できる条件を見いだすことが困難であった。そこで、リンゴ酸の代わりに、アミド結合を生成するアスパラギン酸をモノマーとして利用し、単一分散オリゴマーの合成を試みた。

縮合反応によるオリゴマーの合成法を利用したが、分子内に二種類の反応性官能基を持つヒドロキシ酸およびアミノ酸を原料とするため、それぞれの反応性官能基の保護-脱保護を組み込んだ多段階の操作を駆使する必要があった。アミノ末端と α -カルボン酸末端を保護基によってプロテクトしたアスパラギン酸 (Boc-アスパラギン酸 1-ベンジルエステル) を用いることにより、アスパラギン酸ユニット片末端に 3-ヒドロキシブタン酸ユニットが連結した単一分散オリゴマーを、高効率で生成する技術を確立した。その後、Boc 基を脱保護したオリゴマーを利用して、触媒不在下で、二段階目の縮合反応を行うことにより、単一分散オリゴマーの連鎖構造を維持した周期教重合体の合成に取り組んだ。反応温度、反応時間などの条件を変化させて重合を行ったが、当初、いずれの条件においても、反応途中から自己環化反応が優先して起こり、分子量 1,000 程度の生成物しか得られなかった。そこで、平衡を鎖長伸長側に移動させることを目的として、オリゴマーのカルボン酸末端をフェニルエステル化した分子鎖末端の活性化処

理を施した。フェニルエステル化したオリゴマーを用いることにより、生成物の分子量を5,000程度まで上げることに成功した。アスパラギン酸ユニットの側鎖ベンジルエステル基の脱保護はパラジウム触媒存在下で還元反応を行うことによって達成でき、分子量の低下を最小限に抑え、目的とする周期共重合体を得ることに成功した。



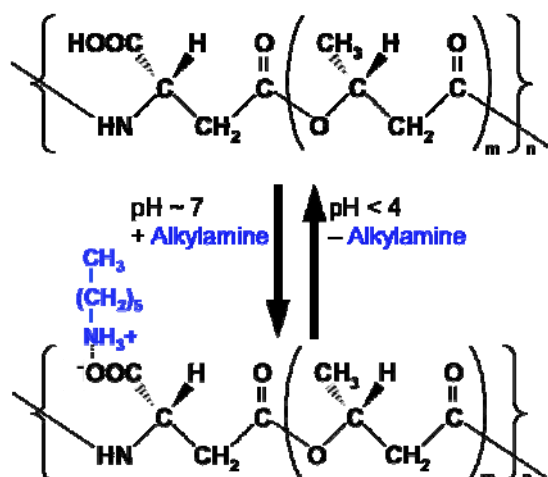
Scheme 1. 3-ヒドロキシブタン酸とアスパラギン酸から成る周期共重合体の合成スキーム

得られた周期共重合体は、広い組成範囲で結晶性を示す素材であった。3-ヒドロキシブタン酸ユニットの連鎖長が1-3の共重合体の熱的性質を調べたところ、その融点は、3-ヒドロキシブタン酸ユニットの連鎖長が1-3まで伸長するとともに、114°C-91°Cまで低下した。また、ガラス転移点は、32°C-14°Cまで3-ヒドロキシブタン酸ユニットの連鎖長の増加とともに変化することを確認した。

得られた周期共重合体の分解性を評価するために、*Ralstonia pickettii* T1由来ポリエステル加水分解酵素による分解試験を行った。側鎖ベンジルエステル基を持つ脱保護前のアスパラギン酸ユニット周期共重合体は、酵素による分解反応を受けないのに対し、側鎖ベンジルエステル基の脱保護を施すと酵素による加水分解反応が進行することを明らかにした。すなわち、アスパラギン酸ユニットの側鎖に導入された置換基のかさ高さにより、共重合体の酵素分解反応が抑制されていることを実証できた。ついで、ベンジルエステル基脱保護後の共重合体に対して、炭素数6の直鎖アルキルアミンを有機溶媒中で混合し、アスパラギン酸ユニットの側鎖にアルキルアミンの導入を行った。共重合体中のアスパラギン酸ユニットの側鎖カルボン酸は、添加したアルキルアミンとイオンコンプレックスを形成し、その側鎖のかさ高さによって、酵素による分解を抑制する効果を示すことが明らかとなった。すなわち、目的通り、アルキルアミン導入による側鎖かさ高さを利用することにより、共重合体への酵素の分解反応を抑制が可能であることが実証できた。

このアルキルアミンとのイオンコンプレックスは、酸性条件下あるいは高塩濃度の水溶液中で共重合体を処理することにより解離がおき、再び酵素による分解性を獲得することが期待できる。アルキルアミンを用いた側鎖置換処理を施し、pHあるいは塩濃度を外部刺激として調節することにより、この周期共重合体の酵素分解開始点を制御することが可能になるものと考えられる。そこで、アルキルアミンを導入した共重合体をpH2.5の酸性条件下で洗浄した後、酵素による分解性の評価を行った。その結果、アルキルアミンとのイオンコンプレックスの形成条件において、用いる有機溶媒の種類により、その酵素分解性の再獲得に相違が現れることを見出した。有機溶媒として、クロロフォルムを用いてイオンコンプレックスを形成させると、酸性条件下で洗浄後も酵素分解性は抑制されたままであるのに対し、テトラヒドロフランを有機溶媒として用いると、酵素分解性の再獲得が可能になるという結果である。これは、周期性共重合体の有機溶媒への溶解性の相違に依存するものである。すなわち、クロロフォルムに完全に溶解する共重合体は、アルキルアミンと均一に反応し、分子鎖中のすべてのアスパラギン酸ユニットの側鎖へアルキルアミンが導入される。結果として、酸性条件下での洗浄に対し、試料表面のイオンコンプレックスは解離するものの、内部のアルキルアミンは安定に存在しているものと考えられる。一方、共重合体が完全に溶解しないテトラヒドロフラン中でアルキルア

ミンと反応させると、試料表面に存在するアスパラギン酸ユニットにのみアルキルアミンが導入される。表面に存在するイオンコンプレックスは、酸性条件下での洗浄により、容易に除去され、再び酵素による加水分解反応を可能にするものと結論できる。以上のように、アルキルアミンとのイオンコンプレックス形成に用いる有機溶媒の種類を選択することにより、酵素分解性の再獲得をコントロールできることがわかった。



Scheme 2. 3-ヒドロキシブタン酸とアスパラギン酸から成る周期共重合体の pH 応答型生分解性制御反応のスキーム

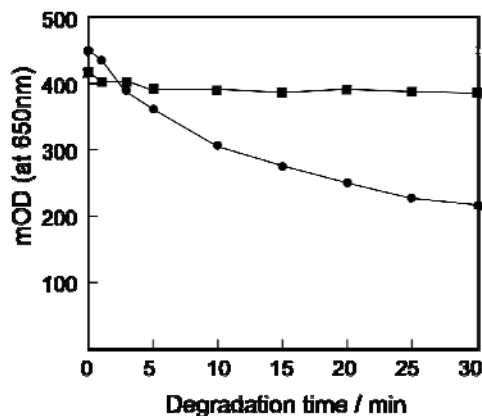


Figure 1. 3-ヒドロキシブタン酸とアスパラギン酸から成る周期共重合体のポリエステル加水分解酵素 (*Ralstonia pickettii* T1 由来) による酵素分解性 (ポリマー懸濁液の濁度変化にて評価)。テトラヒドロフラン中で炭素数 6 のアルキルアミンと反応した試料 (■)、その後、pH2.5 の塩酸溶液中で洗浄した試料 (●)。

さらに、導入するアルキルアミンの炭素鎖数を変えて、イオンコンプレックスを形成し、そのアルキル鎖長と生分解性スイッチ機能の発現に関する評価を行った。炭素鎖数 4 以上のアルキルアミンを導入した場合はいず

れにおいても、アスパラギン酸側鎖のカルボン酸とイオンコンプレックスを形成し、酵素による分解反応を抑制することができた。しかしながら、炭素鎖数 10 以上のアルキルアミンを導入した場合、pH あるいは緩衝溶液の塩濃度を変化させても、酵素分解反応の再発現はできなかった。これは、長鎖アルキルアミンが水溶液中へ溶出しないうえに、ポリマー分子鎖からの脱離ができなかったためと考えられる。また、アルキルアミンに変えて、アルキルジアミンを導入した場合、主にポリマーの分子鎖間でイオンコンプレックスを形成し、有機溶媒中において三次元ネットワーク構造をとったゲル状物質を得ることに成功した。この結果は、ポリマー鎖そのものの分子量が充分に大きくなるとも、固体材料としての利用を可能にする新たな方法論となることを示している。

以上のように、3-ヒドロキシブタン酸とアスパラギン酸を規則性周期連鎖構造にて連結した共重合体は、アルキルアミン等のかさ高い置換基をイオンコンプレックスにて導入すると、その生分解性を抑制することができ、pH あるいは塩濃度などの変化を外部刺激として、イオンコンプレックスを解離させることによって生分解性を再発現できる、スイッチ機能を付与した新たな機能性分子であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 阿部英喜、「Synthesis and function of periodic copolymers consisting 3-hydroxybutyrate and aspartate units」、2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010)。平成 22 年 12 月 17 日、USA
- 2) 阿部英喜、「Chemosynthesis and function of 3-hydroxybutyrate-based periodic copolymers」、International Symposium on BioPolymers 2010、平成 22 年 10 月 7 日、ドイツ
- 3) 阿部英喜、「周期配列バイオポリマーの合成、物性、生分解性に関する研究」第 59 回高分子討論会、平成 22 年 9 月 15 日、北海道
- 4) 阿部英喜、「3-ヒドロキシブタン酸をベースとする周期共重合体の合成と生分解性制御技術の開発」、第 59 回高分子年次大会、平成 22 年 5 月 28 日、横浜
- 5) 阿部英喜、「Chemical synthesis and functionalization of 3-hydroxybutyrate-based copolymers with

periodic sequence structure」、The 2nd International Conference on Bio-based Polymers 2009 (ICBP2009)、平成 21 年 11 月 13 日、マレーシア

6) 阿部英喜、永井彩香、「3-ヒドロキシブタン酸をベースとする周期共重合体の合成と新規機能発現」第 58 回高分子討論会、平成 21 年 9 月 18 日、熊本

7) 阿部英喜、「Syntheses and characterization of novel periodic copoly(ester-amide)s derived from renewable resources」、International Symposium on Biological Polyesters (ISBP 2008)、平成 20 年 11 月 26 日、New Zealand

8) 永井彩香、阿部英喜、「3-ヒドロキシブタン酸と β -リンゴ酸から成る新規共重合体の合成」第 57 回高分子討論会、平成 20 年 9 月 26 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 英喜 (ABE HIDEKI)

独立行政法人理化学研究所・バイオプラス
チック研究チーム・チームリーダー

研究者番号：70271541