

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620174

研究課題名(和文) 結晶性セルロースを重合触媒とする高分子合成

研究課題名(英文) Polymer Synthesis Using Crystalline Cellulose as Polymerization Catalysts

研究代表者

芹澤 武 (Serizawa, Takeshi)

東京工業大学・理工学研究科・教授

研究者番号：30284904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：セルロース原料の塩酸処理により調製したセルロースナノ結晶(CNC)の共存下、L-アラニンエチルエステル塩酸塩の重合反応について検討した。その結果、二量体および三量体といったアラニンオリゴマーに相当する生成物が高速液体クロマトグラフ質量分析計により検出され、CNCが重合触媒として機能する可能性が示唆された。生成量は常温、弱酸性あるいは中性条件において最大であった。いくつかのアミノ酸モノマーの重合反応について検討した結果、CNCは疎水的なアミノ酸モノマーの重合反応を特異的に触媒する可能性が示唆された。しかしながら、いずれのモノマーもオリゴマーへの転化率は数%以下であり、今後の改善が望まれた。

研究成果の概要(英文)：Polymerization of L-alanine ethyl ester hydrochloride in the presence of cellulose nanocrystal (CNC) prepared by treatment of cellulose sources with hydrochloric acid was investigated. Alanine oligomer products, such as alanine dimer and trimer, were successfully detected by a liquid chromatography-mass spectrometer, suggesting the potential of CNC as a polymerization catalyst. The product amounts were maximal at ambient temperature under weakly acidic or neutral conditions. When several amino acid monomers were applied, CNC accelerated specifically the polymerization of hydrophobic amino acid monomers. Unfortunately, the conversions of monomers to oligomers were less than several %, which should be improved in the near future.

研究分野：化学

キーワード：セルロース 加水分解 重合触媒

1. 研究開始当初の背景

セルロースは、D-グルコースが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合でつながった構造をもつ天然高分子である。天然のセルロースは、分子鎖が同一方向に配列した結晶性繊維として存在する。このセルロース繊維を常法に従って酸処理すると、針状のナノ結晶 (セルロースナノ結晶、CNC) の安定な水分散液が調製できる。

研究開始当時に応募者らは、常温・常圧・中性の条件下、有機化合物中のエステル、リン酸、アミド結合が CNC 表面で触媒的に加水分解される現象を見出した。基質の適用範囲は広く、*p*-ニトロフェニル基で活性されたモデル基質のみならず、ペプチドやタンパク質、スクレオチドも加水分解された。

セルロースが示すこのような酵素様の加水分解触媒活性は、反応溶液に添加する物質や反応条件の選択により、有機化合物の合成反応 (縮合反応など) に利用できる可能性を秘めていると仮説を立てた。

2. 研究の目的

高分子合成のための重合触媒として CNC が機能することを明らかにする。

3. 研究の方法

常法に従って前処理したマボヤ被囊を 4 M 塩酸中、80°C、8 時間、加熱処理した後、遠心分離操作による溶媒置換をもとに精製することにより、水分散性が高いセルロースナノ結晶 (CNC) を調製した。

p-ニトロフェニル基で活性化されたエステル基をもつ低分子モデル基質を用いて、CNC が示す加水分解活性を評価した。基質の高濃度溶液を準備し、ごく少量を CNC 分散液に添加し、反応させた。所定の反応時間後、遠心分離操作により CNC を沈澱させ、上清中の生成物 (*p*-ニトロフェノール) を可視紫外吸収スペクトル装置により検出した。

CNC の重合触媒としての性質を評価するために、L-アラニンエチルエステル塩酸塩、L-ロイシンエチルエステル塩酸塩、L-トリプトファンエチルエステル塩酸塩、L-セリンエチルエステル塩酸塩をモノマーとして、ペプチドの合成反応について評価した。モノマー濃度を 0.7 M もしくは 10 mM、CNC 濃度を 0.5% (w/v) とし、30°C 下で pH 4.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 の緩衝液中で反応させた。反応後に反応液を遠心分離し、得られた上清を高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) により解析し、生成物を同定した。

4. 研究成果

幅 10~20 nm、長さ数 μm のウィスカー状の形態をもつマボヤ由来 CNC が調製でき (図 1)、また、これらは天然セルロース特有の I 型結晶構造であった。この CNC はモデルエステル基質に対して従来と同様の加水分解活性を示した。

CNC の重合触媒としての機能を評価するた

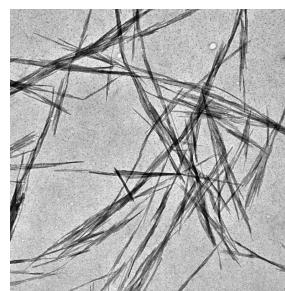


図 1 マボヤ由来 CNC の透過型電子顕微鏡写真

めに、L-アラニンエチルエステル塩酸塩を 0.7 M の濃度で、HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 中、30 °C で CNC とインキュベーションした。所定時間後、LC-MS により生成物を定量した結果、アラニンオリゴマーに相当する二量体及び三量体の生成が確認された。CNC を添加しなかった場合と比較して CNC を添加した場合の方が二量体及び三量体の生成量が大きかったことから、CNC が L-アラニンエチルエステルの重合反応を触媒する可能性が明らかとなった。二量体及び三量体の生成量を経時的に定量した結果、二量体の生成量は 14 日目で、三量体の生成量は 7 日目で最大となり、その後減少した (図 2)。このことから、反応初期ではペプチドの生成反応が進行するものの、反応後期ではペプチドが CNC による触媒反応や自発な反応により加水分解された

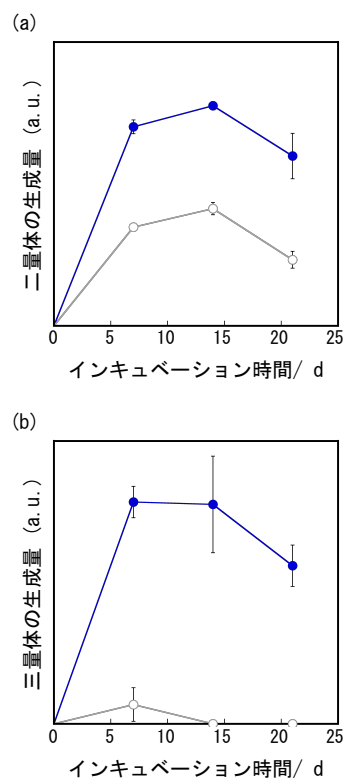


図 2 アラニンオリゴマーの生成量

(a) 二量体、(b) 三量体

CNC 共存下と非共存下の生成量をそれぞれ青とグレーで示した。

ものと考えられる。

反応溶液の pH がペプチドの合成反応に与える効果を検討した。pH 4.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 の緩衝液中で L-アラニンエチルエステル塩酸塩を 0.7 M の濃度で CNC と混合して 26 日間インキュベーションし、LC-MS により二量体及び三量体の生成量を定量した (図 3)。さらに CNC 共存下の二量体の生成量を CNC 非共存下での二量体の生成量で除することで、CNC による二量体の相対生成量を算出した (図 4)。その結果、二量体の相対生成量は pH 5.0 の場合が最大であることがわかった。pH が 5.0 から増大すると二量体の相対生成量が減少し、pH 9.0 ではおよそ 1 であり CNC による合成反応の促進は観察されなかった。また、pH 4.0 においても二量体の相対生成量はおよそ 1 であり、CNC による促進は見られなかった。これより CNC は中性から弱酸性において合成反応に対する活性をもつことが明らかになり、その活性の大きさは pH 5.0 が最大であり、次いで pH 7.0 が高いことが示された。なお、pH 11.0 では二量体及び三量体は全く検出されなかった。モノマーも全く検出されなかったことと併せて考えると、pH 11.0 では加水分解速度が大きく、本実験における反応時間では基質及び生成物が全て加水分解されてしまったと考えられる。上述した通り、pH 7.0 及び pH 5.0 のいずれにおいても CNC により三量体の生成が促進されたが、生成量は pH 7.0 の方が大きかった。一方で、

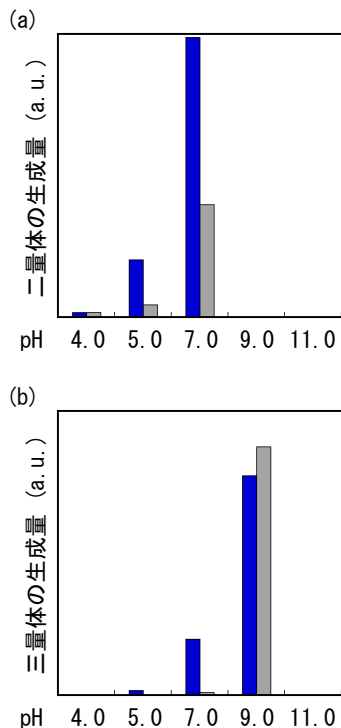


図 3 アラニンオリゴマー生成量の pH 依存性

(a) 二量体、(b) 三量体

CNC 共存下と非共存下の生成量をそれぞれ青とグレーで示した。

pH 9.0 においては CNC による促進は見られなかったが、CNC を添加しない場合の三量体の生成量は pH 7.0 より多かった。従ってペプチドの合成反応は、pH が高いほど有利であることが示唆された。これは pH が高いほど脱プロトン化したアミンの割合が増大し、反応速度が大きくなったためと考えられる。以上の結果より、(1) CNC によるペプチドの合成反応は中性及び弱酸性で促進される、(2) pH が高いほどペプチドの合成反応は有利となるが、アルカリ条件下では CNC の活性がほとんどない、(3) pH 4.0 では反応がほとんど進行せずさらに CNC の活性はほとんどない、ことが明らかとなった。

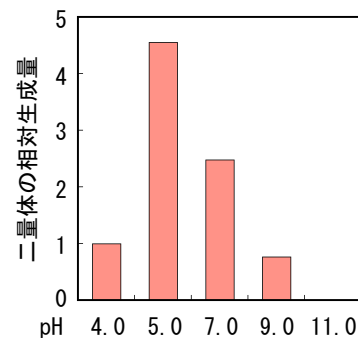


図 4 アラニン二量体の相対生成量の pH 依存性

モノマーのアミノ酸種が CNC による反応に与える効果を検討した。L-アラニンエチルエステル塩酸塩、L-ロイシンエチルエステル塩酸塩、トリプトファンエチルエステル塩酸塩、L-セリンエチル塩酸塩をモノマーとして 10 mM の濃度で CNC と混合して所定時間インキュベーションし、LC-MS により二量体の生成量を定量した。L-アラニンエチルエステル塩酸塩を用いた場合は、CNC 非共存下では二量体が生成されなかったが、CNC 共存下では二量体が生成された (図 5a)。このことより、モノマー濃度が 0.7 M の場合と比較して二量体の相対生成量が大きく、モノマー濃度が 10 mM の方が CNC による触媒効果が高いことがわかった。さらに L-ロイシンエチルエステル塩酸塩を用いた場合も、CNC により二量体の生成が促進された (図 5b)。L-ロイシンエチルエステル塩酸塩では CNC 非共存下でも二量体が生成されたことから、L-アラニンエチルエステル塩酸塩の場合より二量体の相対生成量が低いことがわかった。一方で、L-トリプトファンエチルエステル塩酸塩及び L-セリンエチルエステル塩酸塩を用いた場合は、CNC による二量体の生成の促進はほとんど観察されなかった (図 5c, d)。以上の結果より、CNC はモノマーに用いるアミノ酸種依存的にペプチドの合成反応を触媒することが明らかになった。本実験で用いたアミノ酸ではロイシン、アラニン、トリプトファン、セリンの順に疎水性が高いことが知られている。こ

これらのうち、疎水性が比較的高いロイシン及びアラニンのみ CNC により二量体の生成が促進されたことから、CNC は疎水性が高い基質を選択的に触媒する可能性が示唆された。ま

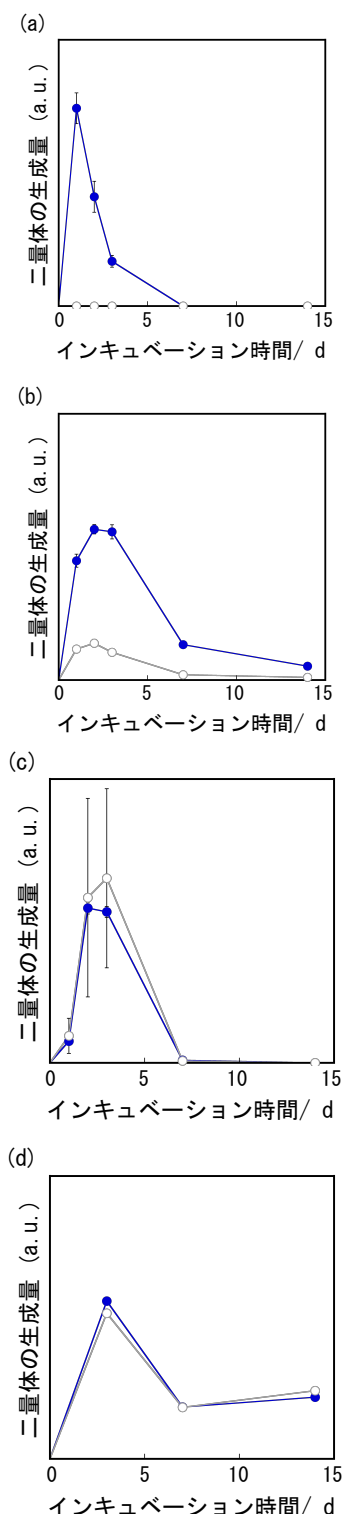


図5 二量体の相対生成量の
アミノ酸種依存性

(a) アラニン、(b) ロイシン、
(c) トリプトファン、(d) セリン

CNC 共存下と非共存下の生成量をそれぞれ
青とグレーで示した。

た、ロイシンと比較してアラニンの方が CNC の効果が大きかったことから、疎水性がそれほど高くないこと、もしくは側鎖が小さいことが重要であると考えられた。

応募者らはこれまでに、アミノ酸と *p*-ニトロアニリン (*p*NA) がアミド結合により結合した基質 (*p*NA 誘導体化アミノ酸) を用いた場合、CNC による加水分解の速度はトリプトファン、アラニン、ロイシンの順に速いことを明らかにしている。一方、本研究の結果より、アミノ酸エチルエステルを用いたペプチドの合成反応における CNC の活性はアラニン、ロイシン、トリプトファンの順に高いことが明らかとなり、*p*NA 誘導体化アミノ酸の加水分解の速度の順と一致しなかった。この原因としては、(1) 合成反応と加水分解反応では CNC の活性サイトが異なるため、基質分子と CNC の相互作用が変化し触媒されやすい基質が変わった、(2) 加水分解反応では水が求核種として働くのに対して、本合成反応ではアミノ酸誘導体が求核種であり、嵩高い置換基を有するため立体障害により反応に影響を及ぼした、などの可能性が考えられる。今後、CNC による合成反応をより詳細に検討することで、CNC の触媒としての適用範囲が明らかになると共に、加水分解反応と比較することで CNC による触媒機構の解明につながると考えられる。

一連の結果より、CNC がペプチドの重合触媒として機能する可能性が示唆されたが、重合度は最大でも 3 であった。この原因として、水中では生成物であるペプチドが CNC による触媒反応や自発な反応により加水分解されたためと考えられる。そこで、加水分解反応を抑制することができればさらに高い重合度のポリペプチドを合成できる可能性があるとして、有機溶媒中での合成を検討した。溶媒としてジメチルスルホキシドもしくは 2-プロパノールを用いて重合反応を検討した結果、ペプチドの生成は確認できなかった。この原因として、有機溶媒中では CNC の触媒活性点の構造が変化し、CNC の触媒活性がなくなった可能性が考えられる。現在のところ有機溶媒中での重合反応は達成できていないが、今後さらに多様な有機溶媒で検討することで、ペプチドの合成反応が進行する溶媒を発見することができれば、ポリペプチドの合成が期待できる。

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 2 件)

- ① Yusuke Yataka, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Chem. Commun., 査読有, Vol. 51, 2015, pp. 12525-12528
DOI: 10.1039/C5CC04378F

- ② Takeshi Serizawa, Mari Kato, Hironichi Okura, Toshiki Sawada, Masahisa Wada, Polym. J., 査読有, Vol.48, 2016, pp. 539-544
DOI:10.1038/pj.2015.125

[学会発表] (計 2 1 件)

- ① Takeshi Serizawa, IUPAC 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, 平成 2 7 年 1 0 月 2 2 日, 招待講演
- ② Takeshi Serizawa, 2015 MRS Fall Meeting & Exhibit, 平成 2 7 年 1 2 月 1 日, 招待講演

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称:セルロースナノ構造体及びその製造方法
発明者: 芹澤 武、澤田敏樹、家高佑輔、三橋秀一、西澤 剛
権利者: 東京工業大学、JX エネルギー
種類: 特許
番号: PCT/JP2015/071047
出願年月日: 平成 2 7 年 7 月 1 6 日
国内外の別: 国外
- ② 名称:セルロース三次元構造体及びその製造方法
発明者: 芹澤 武、澤田敏樹、大倉裕道、秦 裕樹、小泉太郎、三橋秀一、西澤 剛
権利者: 東京工業大学、JX エネルギー
種類: 特許
番号: PCT/JP2016/057253
出願年月日: 平成 2 8 年 3 月 2 日
国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.serizawa.polymer.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芹澤 武 (SERIZAWA, Takeshi)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 8 7 3 1 8 3 0 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

和田 昌久 (WADA, Masahisa)
東京大学・農学生命研究科・准教授
研究者番号: 4 0 2 7 0 8 9 7