

令和元年5月31日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K17963

研究課題名(和文) 蜘蛛糸の構造をモチーフとした高分子材料の創製と機能発現

研究課題名(英文) Synthetic Approach to Polymer Material with Spider-Silk Motif

研究代表者

山田 修平 (YAMADA, Shuhei)

近畿大学・分子工学研究所・助教

研究者番号：00615932

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)：本研究では蜘蛛糸の構造をモチーフとする高分子の合成手法の確立を目指し、アミノ酸N-フェノキシカルボニル誘導体の連鎖重縮合を利用してポリプロピレングリコールおよびポリブタジエンのアミノ基末端から重合を開始することにより、種々のポリペプチド鎖を導入した。ポリペプチド鎖の化学構造がポリマーの力学強度に与える影響を明らかとなりポリペプチド材料の設計に有用な知見を得られた。さらに側鎖反応性を有するアミノ酸N-フェノキシカルボニル誘導体の合成に着手し、これら化合物の重縮合により得られる反応性ポリマーを利用する事で容易に重合後修飾が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蜘蛛糸を構成するたんぱく質をモチーフとして、汎用に合成高分子に種々のポリペプチド鎖を連結させた高分子合成法を確立した。分子設計も非常に容易であるためポリペプチドの特徴である生体適合性・生分解性を付与した新規な高分子材料を設計する上で有用な手法になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, synthetic approach to polymer material with spider-silk motif was investigated. By using chain growth polycondensation of N-phenoxy carbonyl - amino acid from amine-containing poly(propylene glycol) or poly(butadiene) as macroinitiator, various kinds of polypeptide chains was introduced to give a desired polypeptide-based materials. Clarifying the relationship between the chemical structure of the introduced polypeptide chain and the mechanical strength of the polymer, useful knowledge for designing polypeptide material was obtained. Furthermore, the synthesis of new N-phenoxy carbonyl derivatives - amino acid having reactive side chain was investigated. The polycondensation of these compounds provided easily a chemically modifiable unit, contributing to the further functionalization of the polymers material.

研究分野：高分子化学

キーワード：ポリペプチド ネットワークポリマー アミノ酸 ウレタン 炭酸ジフェニル エラストマー 架橋 蜘蛛糸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然界に存在する生体高分子では分子内・分子間水素結合を巧みに利用することで優れた特性を示すことが知られている。なかでも蜘蛛糸は高張力鋼の 260 倍、炭素繊維の 15 倍、アミド繊維の 6 倍の機械的強度に加え、高い伸縮性を有することが知られている。このような優れた物性を合成化学的手法により発現させることは大変興味深い課題である。一方でポリペプチド材料の設計において従来のポリペプチド合成では毒性の高い化合物や化学的に不安定な化合物を利用するなどの課題を抱えていた。

### 2. 研究の目的

本研究では申請者がこれまでに取り組んできたアミノ酸の  $N\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体を用いた環境調和型のポリペプチド合成法 (日本接着学会誌, 2016, 52, 333-341) を活用することで上記のような合成上の課題を克服し、蜘蛛糸の機能性を付与した新規材料の合成を目的とした。

### 3. 研究の方法

蜘蛛糸を模倣した高分子の合成法の確立に重点を置き、以下のように検討を行った。

#### (1) ポリアラニン鎖を導入したマルチブロックコポリマーの合成と性質

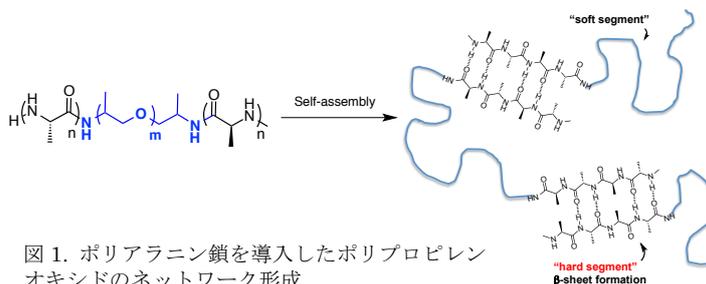
蜘蛛糸のタンパク質ではポリアラニン鎖が固体状態で安定な  $\beta$ -シート構造によりハードセグメントを形成し強度の発現に寄与している。そこでポリプロピレングリコールおよびポリブタジエンをソフトセグメントとして選択し、ポリアラニンの導入を検討した。末端アミンが導入されたポリプロピレングリコールおよびポリブタジエンを重合開始剤として活用し、種々の  $N\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体を用いてマルチブロックコポリマーを合成した。さらにその機械的強度を測定した。

#### (2) 重合後修飾を指向した $N\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体の合成と重合

高分子合成後に架橋反応が可能となるように反応性(側鎖)官能基を有する  $N\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体類の合成に着手した。反応性側鎖としてアルケン、アルキン、スチレン構造を含むアミノ酸の活性ウレタン誘導体を合成し、その重縮合反応を行った。さらに  $N\alpha$ 、 $N\epsilon$ -フェノキシカルボニル L-リジンの重縮合による側鎖反応性ポリリジン合成を検討した。

### 4. 研究成果

L-アラニンおよび L-メチオニンに炭酸ジフェニルを作用することにより  $N\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体を既報に従い合成した (J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem., 2012, 50, 2527-2532)。続いてこれらの  $N\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体を用いて両末端にアミノ基を有するポリプロピレングリコール



を重合開始剤として用いて連鎖重縮合反応を行った。末端アミンに対する  $N\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体の割合を変化させてアルゴン雰囲気下 60 °C で 12 時間反応させたところ  $^1\text{H NMR}$  スペクトルから  $N\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体は効率良くポリマーへと転化されていることが確認された。仕込みの割合に対応して目的の重合度をもつ ABA 型ブロックコポリマーが得られた。種々の有機溶媒に対する溶解性を調べたところ、テトラヒドロフラン、アセトン、クロロホルムなどの一般的な有機溶媒にはいずれも不溶であった。ポリペプチド鎖間で水素結合が働くために不溶性となることが考えられる。一方、トリフルオロ酢酸やヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) のような水素結合を阻害するような溶媒には可溶であった。そこでポリマーの HFIP 溶液を調製しテフロン基板上で溶媒を留去させたところ、透明で柔軟性のあるフィルムが得られた。原料であるポリプロピレングリコールは粘性液体であったがポリアラニン鎖がハードセグメント ( $\beta$ -シート) として機能することでネットワーク構造を形成している事が示唆される (図 1)。フィルムの機械的強度を測定するためにダンベル型試験片(7号型)を作製して引張り試験を行った。ポリアラニン鎖の導入量の増加に伴い伸び率が減少し、ヤング率が増加する傾向であることが分かった。ポリペプチドの高次構造の影響を調べるため、 $\alpha$ -ヘリックス構造を優先的に形成する事が知られているポリメチオニン鎖を導入したポリマ

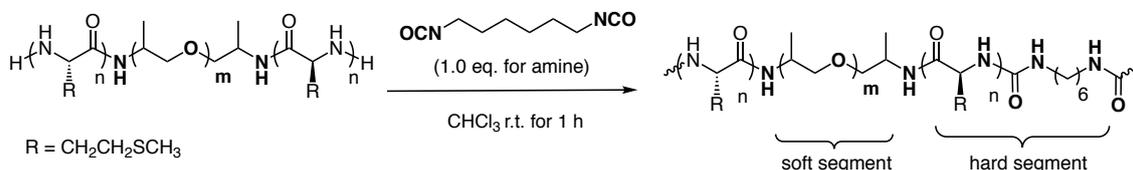


図 2. ジイソシアナートを用いたマルチブロックコポリマーの合成

一を作製した。同一の分子量で比較したところポリアラニン鎖の方が高い強度を示した。これはβ-シート構造の分子間水素結合によって強固なネットワークが形成されていると考えられる。ポリメチオニン鎖の場合はα-ヘリックス構造に由来する高い溶解性を示すため、これらのポリマーの末端アミンに対して等モル量のジソシアナートを作用させることによりウレア構造を介してマルチブロックコポリマーが得られた(図2)。反応後のポリマーフィルムを作製して機械的強度を測定したところ、反応前と比較して伸び・強度ともに大きく増加する傾向が見られた。マルチブロック化によりポリマーの分子量が増大しポリマー鎖間の絡み合いが増加したためであると考えられる。

同様に末端アミン変性ポリブタジエンからN $\alpha$ -フェノキシカルボニル誘導体連鎖重縮合反応により、重合度の異なるポリアラニン鎖(5-20量体)を導入したブロックコポリマー合成した。これらのブロックコポリマーはクロロホルムに良好な溶解性を示したことから、ジソシアナートを作用することでウレア結合を介したマルチブロックコポリマーが容易に得られた。ポリブタジエン鎖がソフトセグメントとして働き、ポリアラニン鎖がハードセグメントとして分子間水素結合により架橋されたネットワークを形成することが明らかとなった。機械的強度はポリブタジエン鎖およびポリアラニン鎖の重合度に大きく依存しており、それらを変化させることによって容易にチューニング可能であった(引張り強度: 4.7-9.8 MPa, 破断伸び: 200-500%)。以上のように合成の手法を確立し、化学構造と機械的強度の関係が明らかとなった。今後のポリペプチド材料の設計に有用となる知見を得ることができた。

ネットワークポリマーのさらなる強度の向上のため、ハードセグメントに部分的に化学架橋を組み込めないかと考え高分子合成後に架橋反応が可能な反応性(側鎖)のモノマー類の合成に着手した。チオール-エン反応は高い転化率で機能団を導入できる有効な反応として多く利用される。ポリペプチドのチオール-エン反応ではアリルグリシンやペンテニルグリシンのような側鎖に反応性二重結合を有するアミノ酸が知られており、これらアミノ酸類のN-フェノキシカルボニル誘導体(1)の合成と重合を検討した(図3)。その結果、重合後も側鎖の二重結合を保持したポリペプチド(2)が容易に得られることが分かった。高

分子の側鎖はチオール-エン反応により定量的に進行して対応するポリマー(3)を得ることが可能であった。また、4-クロロメチルスチレンとシステインから一段階で合成されるアミノ酸のN-フェノキシカルボニル誘導体(4)は重合後もスチレン骨格を保持したままポリペプチド(5)を合成することが可能であった(図4)。側鎖のスチレン構造はその後の高分子反応(ラジカル付加やチオール-エン反応)により架橋反応に利用できる可能性が示唆された。さらにL-リジンのようにアミノ基を2箇所もつアミノ酸に対して2当量の炭酸ジフェニルを作用させると、N $\alpha$ -、N $\epsilon$ -アミノ基にフェノキシカルボニル構造が導入された化合物(6)を合成することができた。この化合物はアミン開始剤共存下における重合性について検討したところ、N $\alpha$ -のフェノキシカルボニルのみが選択的に重合に消費され側鎖の構造が保持されたポリリジン(7) (M $_n$ =3,000~20,000, M $_w$ /M $_n$ ~1.3)を合成できることが明らかとなった(図5)。さらに、得られたポリペプチドに対して種々のアミン類(1級, 2級, 芳香

ネットワークポリマーのさらなる強度の向上のため、ハードセグメントに部分的に化学架橋を組み込めないかと考え高分子合成後に架橋反応が可能な反応性(側鎖)のモノマー類の合成に着手した。チオール-エン反応は高い転化率で機能団を導入できる有効な反応として多く利用される。ポリペプチドのチオール-エン反応ではアリルグリシンやペンテニルグリシンのような側鎖に反応性二重結合を有するアミノ酸が知られており、これらアミノ酸類のN-フェノキシカルボニル誘導体(1)の合成と重合を検討した(図3)。その結果、重合後も側鎖の二重結合を保持したポリペプチド(2)が容易に得られることが分かった。高

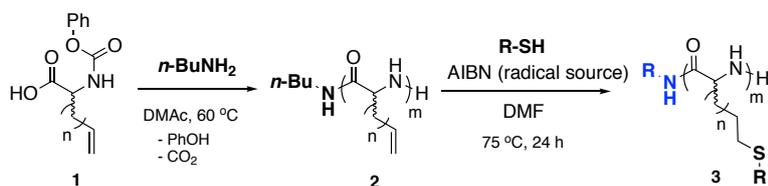


図3. 反応性二重結合を有するポリペプチドの合成と側鎖修飾

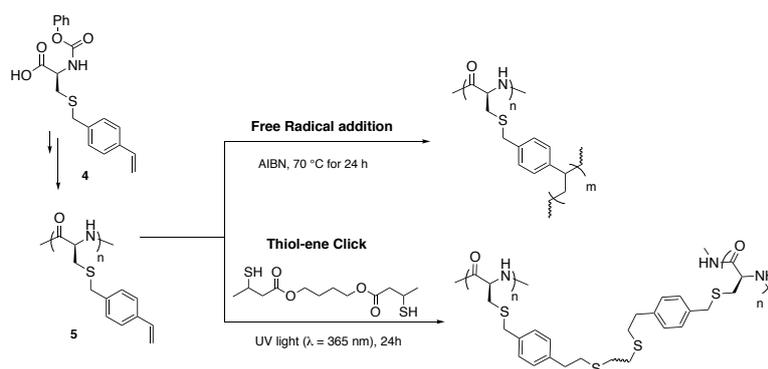


図4. スチレン構造を有するポリペプチドの合成と架橋反応

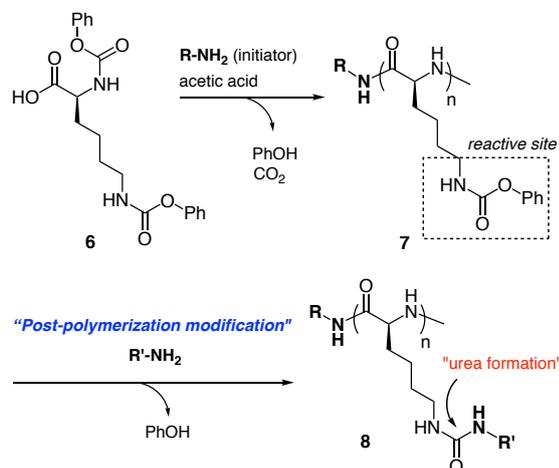


図5. N $\alpha$ 、N $\epsilon$ -フェノキシカルボニルL-リジンの重縮合によるポリリジン合成と側鎖修飾

族アミンが利用可能)を作用させた場合、側鎖で効率よくアミノリシス反応が進行し、ウレア結合を介した側鎖修飾ポリマー(8)が得られた。加えて、二官能性のアミンを作用させた場合は架橋ポリペプチド(フィルムまたはゲル)を調製することが可能であった。本研究で見出した新規な側鎖反応性ポリマーは今後の材料設計に利用することでさらなる機能性の付与が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① “水素結合を駆動力とするネットワーク形成を示すオリゴアラニン鎖を導入したポリブタジエンマルチブロックポリマーの合成と性質” 山田修平, 遠藤剛, ネットワークポリマー誌, 投稿済み (2019)
- ② “Synthesis of Functional Polypeptide by Phosgene-free Method” Takeshi Endo, Shuhei Yamada, *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 76, 615–621 (2018)
- ③ “Synthesis of poly(*N* $\epsilon$ -phenoxycarbonyl-L-lysine) by polycondensation of activated urethane derivative and its application for selective modification of side chain with amines” Huseyin Akbulut, Shota Ando, Shuhei Yamada, Takeshi Endo, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 56, 2522–2530 (2018)
- ④ “水素結合を駆動力とするネットワーク形成を示すオリゴペプチド鎖を導入したポリプロピレンオキシドブロックコポリマーの合成と性質” 山田修平, 遠藤剛, ネットワークポリマー誌, 39, 102–110 (2018)
- ⑤ “Convenient synthetic approach to poly(*N*-Methyl L-alanine) through polycondensation of activated urethane derivative of *N*-methyl L-alanine” Yusuke Shiraki, Shuhei Yamada, Takeshi Endo, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 55, 1674–1679 (2017)
- ⑥ “Phosgene-Free Synthesis of Poly(L-cysteine) Containing Styrene Moiety as a Reactive Function” Huseyin Akbulut, Shuhei Yamada, Takeshi Endo, *Macromol. Chem. and Phys.*, 218, 1700078–1700078 (2017)

[学会発表] (計 14 件)

- ① “*N* $\alpha$ , *N* $\epsilon$ -フェノキシカルボニル L-リジンの重縮合による側鎖反応性ポリリジン合成とネットワークポリマー形成への展開” 山田修平, 安藤翔太, Akbulut Huseyin, 遠藤剛, 第 68 回ネットワークポリマー講演討論会 (2018)
- ② “*N* $\alpha$ , *N* $\epsilon$ -フェノキシカルボニル L-リジンの重縮合によるポリリジン合成と側鎖修飾” 山田修平, 安藤翔太, Akbulut Huseyin, 遠藤剛, 第 67 回高分子討論会 (2018)
- ③ “*N* $\epsilon$ -フェノキシカルボニル構造をもつリジンの活性ウレタン誘導体の重縮合による側鎖反応性のポリリジンの合成” 山田修平, 高嶋綾香, Akbulut Huseyin, 遠藤剛, 第 67 回高分子年次大会 (2018)
- ④ “水素結合を駆動力としたネットワーク形成を示すオリゴアラニン鎖を導入したポリブタジエンマルチブロックポリマーの合成と性質” 山田修平, 遠藤剛, 第 67 回ネットワークポリマー講演討論会 (2017)
- ⑤ “Controlled synthesis of oligoalanine-incorporated multi-block copolymer by phosgene-free system” 山田修平, 白木裕介, 遠藤剛, 第 66 回高分子討論会 (2017)
- ⑥ “Phosgene-free synthesis of poly(L-cysteine) containing styrene moiety as reactive function” Huseyin Akbulut, Shuhei Yamada, and Takeshi Endo, *Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (ベルギー) 2017*
- ⑦ “Controlled synthesis of polypeptide by phosgene-free system” Shuhei Yamada, Huseyin Akbulut, and Takeshi Endo, *Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (ベルギー) 2017*

- ⑧ “オリゴペプチド鎖の $\beta$ シート形成を架橋点とするネットワークポリマーの合成” 山田修平, 白木裕介, 後藤光昭, 遠藤剛, 第 66 回ネットワークポリマー講演討論会 (2016)
- ⑨ “Synthesis of Cysteine-Substituted Poly(styrene) Zwitterionic Polymer” Huseyin Akbulut, Shuhei Yamada, Takeshi Endo, 第 65 回高分子年次大会 (2016)
- ⑩ “*N*-メチルアラニンの活性ウレタン誘導体からの簡便なポリペプチドの合成” 白木裕介, 山田修平, 遠藤剛, 第 65 回高分子討論会 (2016)
- ⑪ “オリゴペプチド鎖の $\beta$ -シート形成によるネットワークポリマーの設計と合成” 山田修平, 後藤光昭, 遠藤剛, 第 65 回高分子討論会 (2016)
- ⑫ “Synthesis of Cysteine-Substituted Poly(styrene) Zwitterionic Polymer” Huseyin Akbulut, Shuhei Yamada, Takeshi Endo, 第 65 回高分子年次大会 (2016)
- ⑬ “*N*-メチルアラニンの活性ウレタン誘導体からの水溶性ポリペプチドの合成” 白木裕介, 山田修平, 遠藤剛, 第 65 回高分子年次大会 (2016)
- ⑭ “オリゴアラニン鎖を導入したマルチブロックポリマーの合成と $\beta$ -シート構造の自己組織化によるネットワークポリマーの形成” 山田修平, 後藤光昭, 遠藤剛, 第 65 回高分子年次大会 (2016)

[その他]

ホームページ等

<http://www.moleng.fuk.kindai.ac.jp/index.html>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。