

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380092

研究課題名(和文) 超分子構造を惹起するバイオマスハイブリッド材料の開発と新規機能開拓

研究課題名(英文) Development and new functions of biomass hybrid materials with supramolecular structures

研究代表者

上高原 浩 (Kamitakahara, Hiroshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10293911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：分子レベルのバイオマスハイブリッド材料を合成した。具体的には、セルロースアセテート-b-ポリ(γ -ベンジル-L-グルタメート)を合成し、世界に先駆けてセルロース系材料のマイクロ相分離構造形成を達成した。また、イオン性オリゴアミノ酸、ヘミセルロース成分とメチルセルロースからなるジブロック型コポリマーを合成し、10以上の連続する2,3,6-tri-O-glucofuranose残基および水素結合形成能を有する無保護二糖あるいはアミノ酸二量体を有する化学構造が超分子構造形成のための十分条件であることを見いだした。さらに、ヒドロゲルに医薬品徐放性を担持させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We synthesized biomass hybrid materials in a molecular level. Cellulose triacetate-b-poly(γ -benzyl-L-glutamate) was synthesized, and, for the first time, exhibited microphase separation as cellulosic materials. Diblock methylcellulose derivatives having ionic oligo(amino acid)s and oligomers of hemicelluloses were also synthesized. As a result, we found sufficient conditions for methylcellulose-based supramolecular hydrogels: a sequence of, at least, 10 tri-O-methyl-glucosyl residues for hydrophobic blocks, and functional groups for hydrogen bonds for hydrophilic blocks. Moreover, thermoresponsive supramolecular hydrogels comprising end-functionalized methylcelluloses showed properties of slow drug release.

研究分野：生物材料化学

キーワード：バイオマス メチルセルロース

1. 研究開始当初の背景

セルロース系ジブロックコポリマーの合成は古くから報告されているが、当時の分析技術には限界があり化学構造が不明確と言わざるを得ない。(Ceresa R. J. 1961 *Polymer* 2: 213-219.; Mezger T. and Cantow H. J. 1983. *Angewandte Makromolekulare Chemie* 116: 13-27.) また、近年ほとんど関連する文献が見られなかった。そのような状況下、申請者は MALDI-TOF MS といった最新の分析機器を用い、構造の明確なセルロースアセテート系ブロックコポリマーの調製とその性質について報告した (Kamitakahara et al. *Cellulose*, **12**(2), 209-219 (2005)., *Cellulose*, **12**(5), 531-545 (2005), *Cellulose*, **13**(4), 437-448 (2006))。さらに、メチルセルロース系ジブロックコポリマーの調製も開始し、構造-物性相関に関して知見を蓄積してきた (例えば、Kamitakahara et al. *Cellulose*, **13**(4), 375-392 (2006))。このように、研究開発当初、セルロース系ジブロックコポリマーに関する研究は世界的に見て申請者らの研究グループがリードしている状況であった。一方、セルロースナノファイバーやナノクリスタルなど天然セルロースをから得られるナノ構造体は世界的に極めて多くの研究が行われているが、セルロース誘導体から得られるナノ構造体に関する研究はドイツの Heinze グループなど少数に限られていた。さらに、構造の明確なセルロース誘導体からなる超分子構造体の調製と機能に関する研究は申請者の知る限り見当たらなかった。

2. 研究の目的

本研究では、セルロースやセルロース誘導体を 1 セグメントとしたジブロックコポリマーの合成手法の確立し、マイクロ相分離薄膜あるいは熱応答性ヒドロゲルといった超分子構造を得るために必須の化学構造を明らかにする。さらに、それら超分子構造により発現する新規な機能を開拓する。

3. 研究の方法

得られた化合物の化学構造は ^1H -、 ^{13}C -NMR、二次元 NMR (Varian NMR system 500PS, Varian INOVA300 NMR), MALDI-TOF MS (Bruker autoflex III), GPC (Shimadzu HPLC システム; columns: Shodex K802, K802.5, K805; polystyrene standards; solvent: CHCl_3) により解析した。化合物水溶液の熱的性質を示差走査熱量測定 (DSC, model: 823e; sensor: HSS7; Mettler Toledo) および目視観察により検討し、動的光散乱およびゼータ電位の測定を ELS-Z2 (大塚電子) により行った。化合物水

溶液の界面活性能は自動表面張力計 CBVP-A3 型 (協和界面科学) を用い、Wilhelmy plate 法により調べた。分子末端機能化メチルセルロースの水中での初期会合状態を酢酸ウラニルにより負染色して透過型電子顕微鏡 (TEM JEM-1400, 加速電圧 100 kV, JEOL) を用いて観察した。ヒドロゲルなどの形態観察は、光学顕微鏡 (BX51, Olympus), 走査型電子顕微鏡 (SEM JSM-6060, 加速電圧 5 kV, JEOL), 電界放出形走査型電子顕微鏡 (FE-SEM S-4800, 加速電圧 1.5 kV, Hitachi) により行った。結晶構造は湾曲イメージングプレート単結晶自動 X 線構造解析装置 (R-AXIS RAPID-II, Rigaku) を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) セルロースアセテート-*b*-ポリ (γ -ベンジル-L-グルタメート) の合成とマイクロ相分離構造の発現

分子末端にアジド基を導入したセルロースアセテートを調製した。また、プロパルギルアミンを開始剤として γ -ベンジル-L-グルタメート *N*-カルボキシ無水物を脱炭酸重合させ、分子末端にアルキン基を有するポリ (γ -ベンジル-L-グルタメート) を調製した。次いで、銅触媒アジド-アルキン付加環化反応 (CuAAC) により上記両セグメントを結合させ、セルロースアセテート-*b*-ポリ (γ -ベンジル-L-グルタメート) を合成した (発表論文)。

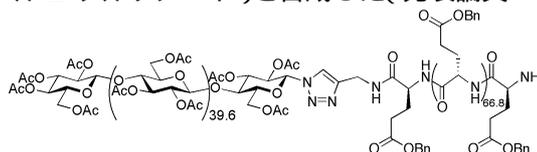


Figure 1.

この化合物のジクロロメタン溶液からスピコート法により薄膜を調製し、 $180^\circ\text{C}/24\text{ h}$ アニーリング処理を施した。その結果、マイクロ相分離構造を発現している事を原子間力顕微鏡 (AFM) により確認した。

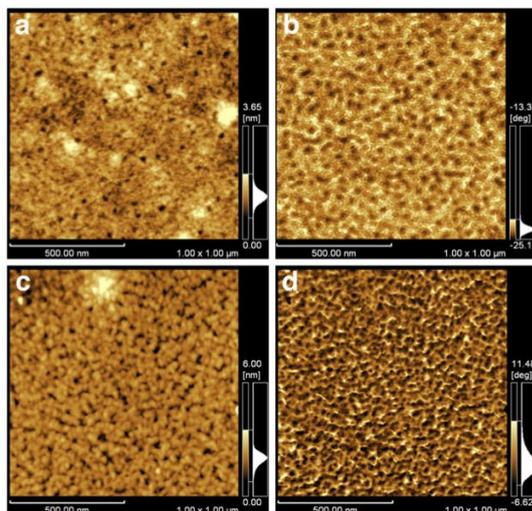


Figure 2.

また、透過型電子顕微鏡(TEM)、電界放出形走査電子顕微鏡観察(FE-SEM)により、薄膜およびバルクサンプル内部の相分離状態を観察した。

(2) 2-*O*-methyl, 3,6-di-*O*-methyl cellulose の合成

位置選択的置換メチルセルロースは、1 置換誘導体として、2-*O*-methyl, 3-*O*-methyl, 6-*O*-methyl cellulose の3種類が、2 置換誘導体として、2,3-di-*O*-methyl, 2,6-di-*O*-methyl, 3,6-di-*O*-methyl cellulose の3種類が、3 置換誘導体として、2,3,6-tri-*O*-methyl cellulose の1種類が存在する。これらのうち、我々の研究により、これまでに2,6-di-*O*-methyl cellulose が合成されていたが、本研究により2-*O*-methyl, 3,6-di-*O*-methyl cellulose の二種類が新たに合成された(発表論文)。ここに、全種類の位置特異的置換メチルセルロースの合成が可能となった。この方法は、あらゆるセルロースエーテルへ適用可能であり、セルロース誘導体の構造-物性相関研究への貢献が将来的に期待される。

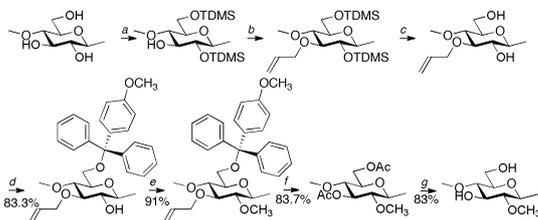


Figure 3.

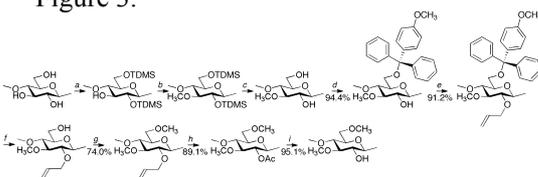


Figure 4.

(3) 両親媒性ジブロック型メチルセルロースの合成と超分子構造の発現

ブロック的メチル化セルロースの構造-物性相関を検討した。その結果、市販のメチルセルロースと同様に熱応答性ヒドロゲルを形成する化学構造を特定した。すなわち、10以上の連続する2,3,6-tri-*O*-glucopyranose 残基と無保護のセロビオースが結合したジブロックがた構造が熱応答性ヒドロゲルを形成するための十分条件であることが判った(発表論文)。

そこで、そのヒドロゲルのナノ構造を詳細に調べ、分子の集合状態を明らかにすることを目的に、cryo-TEMによるヒドロゲルの観察を行った。その結果、ブロック的メチル化セルロースが自己組織化し、リボン状ナノ構造体を形成することが判った(発表論文)。化学構造が明確なブロック的メチル化セル

ロースは、ナノからマイクロメートルレベルの大きな構造体を形成し、温度によりその自己組織化現象をコントロールできる事は極めて興味深い。

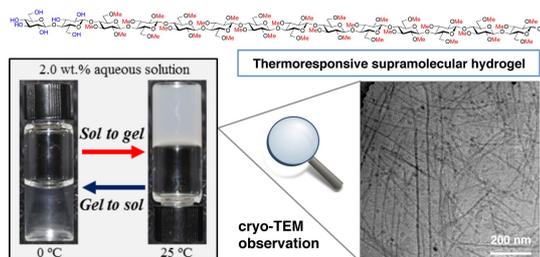


Figure 5.

(4) イオン性オリゴアミノ酸を分子末端に有する2,3,6-tri-*O*-methyl cellulose の合成

これまでに、2,3,6-tri-*O*-methyl cellulose の分子末端に糖鎖を導入したジブロック型メチルセルロースを合成していたが、糖鎖ではなく、イオン性オリゴアミノ酸を導入した化合物を合成した。具体的には、カチオン性のオリゴアルギニン、アニオン性のオリゴグルタミン酸の導入を行った。

結果として得られた化合物は熱応答性ヒドロゲルを形成したことから、ヒドロゲルを形成するためには親水性セグメントに水素結合を形成し得る官能基が必要である事が判った。

(5) マンノースを分子末端に有する2,3,6-tri-*O*-methyl cellulose の合成

親水性セグメントとして、セロオリゴ糖、イオン性オリゴアミノ酸が導入されたジブロック型メチルセルロース誘導体を合成してきた。しかしながら、グルコース以外の糖が親水性セグメントとして導入された化合物の構造-物性相関に関する知見は存在しなかった。

そこで、マンナンを構成する単糖であるマンノースの導入がジブロック型メチルセルロース誘導体の物性に与える影響を調べた。その結果、マンノース誘導体の方がグルコースと比較して高い界面活性を示し、また分子鎖間の会合も起き易いことがわかった。水酸基の立体が異なるだけで、マクロな物性に違いが生じることは興味深い。

(6) キシランを分子末端に有する2,3,6-tri-*O*-methyl cellulose の合成

ジブロック型メチルセルロースの親水性セグメントとして、セロオリゴ糖、オリゴアミノ酸、マンノースが導入された化合物を合成してきた。木材を構成するヘミセルロースの1種であるキシランはセルロースの6位ヒドロキシメチル基が欠落した化学構造を

有する。そのキシランを分子末端に有するジブロック型メチルセルロースの物性を知る事は、セルロースとキシランの木材中での分子の役割を知る上でも意義深い。そこで、キシロオリゴ糖を分子末端に導入したメチルセルロース誘導体を合成し、その構造-物性相関を調べた。その結果、特に、その化合物は高い界面活性を有する事が判明した。

(7) 分子末端機能化メチルセルロースが超分子構造を発現するために必須の化学構造

メチルセルロースの分子末端に親水性セグメントとして水素結合能を有さないトリエチレングリコールモノメチルエーテルを導入し、その化合物の構造-物性相関を調べた。その結果、水素結合形成能を有さない親水性セグメントを有するジブロック型メチルセルロースからヒドロゲルは形成されない事が示された。換言すれば、ヒドロゲル形成のためには水素結合する官能基が必須であることが実証された。

(8) 熱応答性超分子ヒドロゲルからの薬物徐放性

合成したイオン性オリゴアミノ酸を分子末端に有する 2,3,6-tri-O-methyl cellulose からなるヒドロゲルからの、イオン性薬物の放出挙動を調べた。その結果、分子末端にのみ導入されているイオン性官能基がイオン性薬物と相互作用し、ヒドロゲルからの薬物の徐放性を発現させる事が判った。

(9) 木質バイオマスを原料とするスプレードライヤーを用いたバイオマスハイブリッドナノ材料の調製

これまで、精製された木材の構成成分、例えばセルロース、キシランなどを用いたジブロック型メチルセルロースを調製してきた。しかしながら、未利用バイオマスの高付加価値化を目指すならば、木材そのものから、分子レベルのハイブリッド材料であるジブロック型メチルセルロースなどを簡便に得る方法を開発する必要があると考えた。

そこで、京都大学北海道研究林から入手したカラマツの鋸屑から直接ジブロック型メチルセルロースの疎水性セグメントを調製する方法を検討した。その結果、最近開発されたセルロース溶剤を用いれば、木材から簡便に粗メチルセルロースを得ることが出来る事が判った。

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 8 件)

A. Nakagawa, H. Kamitakahara, T. Takano:

Synthesis and thermoreversible gelation of diblock methylcellulose analogues via Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. *Cellulose* (2012), **19** (4), 1315-1326. DOI: 10.1007/s10570-012-9703-7

A. Nakagawa, C. Ishizu, V. Sarbova, A. Koschella, T. Takano, Th. Heinze, H. Kamitakahara (2012) 2-O-methyl- and 3,6-di-O-methyl-celluloses from natural cellulose: synthesis and structure characterization. *Biomacromolecules* **13**(9), 2760-2768. DOI: 10.1021/bm300754u

Nakagawa, A.; Steiniger, F.; Richter, W.; Koschella, A.; Heinze, Th.; Kamitakahara, H. (2012) Thermoresponsive hydrogel of diblock methylcellulose: Formation of ribbon-like supramolecular nanostructures by self-assembly. *Langmuir* **28** (34), 12609-12618. DOI: 10.1021/la3026528

上高原 浩 (2012) セルロース系ブロックコポリマー・コオリゴマーの精密合成と機能発現、*Cellulose Communications*, **19** (2), 57-62.

上高原 浩 (2013) セルロース誘導体の精密合成 -合成戦略と機能発現-、*応用糖質科学*, **3** (3), 205-209.

ロジャース有希子、上高原 浩、高野俊幸、ノリーン フンダドル、岩田忠久 (2013) セルロース、キシランおよびグルコマンナン誘導体の合成とその材料化、*高分子論文集*, 70 (10), 529-538.

上高原 浩 (2014) セルロース誘導体の置換位置制御と機能化、*木材学会誌*, 60 (3), 144-168. DOI: 10.2488/jwrs.60.144

Kamitakahara, H., Baba, A., Yoshinaga, A., Suhara, R., Takano, T. (2014) Synthesis and crystallization-induced microphase separation of cellulose triacetate-block-poly(γ -benzyl-L-glutamate). *Cellulose*, 21 (5), 3323-3338. DOI: 10.1007/s10570-014-0383-3

〔学会発表〕(計 21 件)

馬場啓弘、上高原 浩、高野俊幸: セルロース誘導体とオリゴペプチド誘導体からなるジブロックコポリマーの合成とその性質、セルロース学会第19回年次大会 2012年7月12日(木)・13日(金) 名古屋大学 野依記念学術交流館

須原 遼、上高原 浩、高野俊幸: アミノ酸含有セロピオースエーテル誘導体の合成と水中での会合挙動、セルロース学会第19回年次大会 2012年7月12日(木)・13日(金) 名古屋大学 野依記念学術交流館

Hiroshi Kamitakahara: Cellulosic diblock copolymers with fascinating properties, European-Japanese Workshop "Cellulose

and Functional Polysaccharides", Nakashima Hall, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 3-4 October, 2012, (Invited Lecture)

Hiroshi Kamitakahara, Akihiro Baba, Arata Yoshinaga, Toshiyuki Takano: Design, synthesis, and nanostructure of cellulose triacetate-*block*-poly(γ -benzyl L-glutamate), International Cellulose Conference 2012 Chateraise Gateaux Kingdom SAPPORO Hotel & SPA Resort, Sapporo, Japan, October 10-12, 2012.

上高原 浩, 須原 遼: セルロース系ジブロックポリマーの合成と機能開拓, [第10回]積水化学 自然に学ぶものづくりフォーラム, イノホール&カンファレンスセンター, 東京, 2012年10月15日

上高原 浩: 細胞表面糖脂質の構造からヒントを得た糖のみからなる界面活性剤の開発, ネイチャー・インダストリー・アワード ~若手研究者からの発信~, 2012年11月20日 (ポスター), 大阪科学技術センタービル

上高原 浩: セルロース誘導体の精密合成: 合成戦略と機能発現, 第37回糖質科学懇話会, 2012年11月30日-12月1日, KKR江ノ島ニュー向洋 (招待講演)

須原 遼, 上高原 浩, 高野 俊幸: オリゴペプチド鎖を分子末端に有するメチルセルロース誘導体の合成, セルロース学会第20回年次大会, 2013年7月18-19日, 京都大学宇治キャンパス おうばくプラザ

山上 真緒, 上高原 浩, 高野 俊幸: アミノ基を有するブロック的メチル化セルロース類縁体の合成, セルロース学会第20回年次大会, 2013年7月18-19日, 京都大学宇治キャンパス おうばくプラザ

須原 遼, 上高原 浩, 高野 俊幸: オリゴペプチド鎖を分子末端に有するメチルセルロース誘導体からなるヒドロゲルの調製, 第32回日本糖質学会年会 2013年8月5日-8月7日, 大阪国際交流センター, P-072

上高原 浩: 新しいセルロース誘導体の合成 -精密重合, 連結反応, 位置選択的置換反応-, 第83回高分子材料セミナー (第167回高分子材料部門委員会 (公開), 2013年9月20日, 京都 (招待講演)

上高原浩, 須原遼, 山上真緒, 川野陽子, 吉永新, 田中義正, 高野俊幸: 分子末端機能化メチルセルロース誘導体の合成と構造-物性-機能相関, 第64回日本木材学会大会, 2014年3月13-15日, 愛媛大学, 松山

Hiroshi Kamitakahara, Ryo Suhara, Mao Yamagami, Haruko Kawano, Akihiro Baba, Arata Yoshinaga, Toshiyuki Takano: Design, synthesis, and self-assembly of

end-functionalized polysaccharide derivatives based on natural resources, 247th ACS Spring meeting at Dallas, March 16-20, 2014

上高原浩, 須原遼, 山上真緒, 川野陽子, 吉永新, 田中義正, 高野俊幸: 両親媒性末端機能化セルロース誘導体: ゲル化を誘導する構造因子と超分子ヒドロゲルの性能評価, セルロース学会第21回年次大会, 2014年7月17-18日, 鹿児島大学, 鹿児島

上高原 浩: バイオマス由来の熱応答性超分子ヒドロゲルの開発, 第3回ネイチャーインダストリーアワード, 2014年12月12日, (ポスター), 大阪科学技術センタービル

Hiroshi Kamitakahara, Ryo Suhara, Mao Yamagami, Haruko Kawano, Yoshimasa Tanaka and Toshiyuki Takano: Thermoresponsive supramolecular hydrogels based on end-functionalized methylcellulose derivatives, IAWPW2015, 2015年3月16日, タワーホール船堀

三木健太郎, 飛松裕基, 上高原浩, 高野俊幸: カラマツ鋸屑からの両親媒性ナノ粒子の調製, 第65回木材学会, 2015年3月, 東京 (ポスター賞受賞)

岡西諒子, 飛松裕基, 上高原浩, 高野俊幸, 親水部としてグルコース・マンノースを有する分子末端機能化メチルセルロースの合成とその性質, 第65回木材学会, 2015年3月, 東京

Hiroshi Kamitakahara, Atsushi Nakagawa, Ryo Suhara, Mao Yamagami, Haruko Kawano, Toshiyuki Takano: Synthesis and properties of end-functionalized methyl cellulose derivatives; bridging the gap between oligo- and polysaccharides, Frontiers in Glycoscience, 249th ACS national meeting, Denver, March 22-26, 2015 (Invited Lecture)

Hiroshi Kamitakahara: Synthetic strategies for cellulosic diblock copolymers, Cellulose in Solid State and Solution - Structure, Chemistry and Reaction Mechanisms: Anselme Payen Award Symposium in Honor of Thomas Rosenau -, 249th ACS national meeting, Denver, March 22-26, 2015 (Invited Lecture)

- 21 Hiroshi Kamitakahara, Atsushi Nakagawa, and Toshiyuki Takano: Thermoresponsive supramolecular hydrogels based on diblock methylcellulose derivatives, Next Generation Smart Materials, 249th ACS national meeting, Denver, March 22-26, 2015 (Invited Lecture)

〔図書〕(計 1件)

「セルロースのおもしろ科学とびっくり活用」(セルロースから作る新しいノニオン

性界面活性剤、p. 194-195、セルロース学会編、
講談社、2012年

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

URL: <http://www.chembio.kais.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上高原 浩 (KAMITAKAHARA, Hiroshi)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10293911

(2) 研究分担者

高野 俊幸 (TAKANO, Toshiyuki)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50335303

吉永 新 (YOSHINAGA, Arata)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：60273489

田中 義正 (TANAKA, Yoshimasa)

長崎大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・

准教授

研究者番号：90280700

飛松 裕基 (TOBIMATSU, Yuki)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：20734221

(平成26年度より研究分担者)

(3) 連携研究者

早乙女 周子 (SAOTOME, Chikako)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00447963