

崇城大学大学院工学研究科応用化学専攻 機能性高分子化学講座

博士論文

超分子の会合/解離を利用した
刺激応答性の制御と機能性材料の開発

令和3年度

黒田 尚史

目次

第1章 緒言

1-1. 序	2
1-2. π 共役系分子による超分子の形成と構造制御	2
1-3. π 共役系骨格を持つ超分子の光化学的特性変化を利用した検出系	4
1-3-1. 凝集誘起発光(AIE)特性を用いた検出系	4
1-3-2. ピレンのエキシマー形成を利用した検出系	5
1-4. 超分子ポリマーの選択的らせん構造形成によるキラル抽出	5
1-5. ペプチド構造を組み込んだ超分子会合体の形成について	6
1-5-1. ペプチド配列に依存した超分子ファイバーの形成	7
1-5-2. ペプチド導入型 π 共役系分子による超分子ファイバー形成	7
1-6. 超分子ゲル系の構築と刺激応答性について	9
1-7. 問題提起と本論文の構成	12
1-8. 本研究で使用した装置	13
1-9. 参考文献	14

第2章 自己修復材料への応用を指向した超分子ゲル化剤の開発と自己修復特性の制御

2-1. 序論	16
2-2. Th4 型超分子ゲル化剤候補分子のゲル化試験	25
2-2-1. Th4-FK のゲル化実験	26
2-2-2. Th4-FY のゲル化実験	27
2-2-3. Th4-FS のゲル化実験	28
2-2-4. Th4-FQ のゲル化実験	29
2-2-5. Th4-FN のゲル化実験	30
2-2-6. Th4-FR のゲル化実験	31
2-2-7. Th4 型超分子ゲル化剤候補分子のゲル化試験結果に関する考察	32
2-3. OPV 型化合物のゲル化試験	34
2-3-1. OPV-FK のゲル化実験	35
2-3-2. OPV-FY のゲル化実験	36
2-4. Th4 型および OPV 型超分子ヒドロゲルの物理特性の評価と自己修復能の発現・制御	38
2-4-1. Th4-FK ゲルの動的粘弾性の評価	38
2-4-2. OPV-FK ゲルの動的粘弾性の評価	40
2-4-3. 単独ヒドロゲルの自己修復能調査	41

2-4-4. Th4-FK/OPV-FK 複合ゲルによる自己修復特性の制御	41
2-5. 結論	46
2-6. 合成項	47
2-7. 参考文献	97

第 3 章 超分子ヒドロゲルのゲスト応答的なゾル-ゲル相転移を利用したアニオン性多糖類の識別

3-1. 序論	99
3-2. Th4-FK の pH 応答性の評価	101
3-3. アニオン性高分子添加に伴う Th4-FK の応答性の評価	103
3-4. アニオン性高分子添加に伴う Th4-FK のゲスト応答的なゲル化試験	106
3-5. 結論	108
3-6. 参考文献	108

第 4 章 π 共役系骨格を有する両親媒性分子の錯形成に伴うアニオン性多糖類の識別

4-1. 序論	110
4-2. Th4-FR 、 Th4-FK 、 Th4-FD 、 Th4-FS 、 Th4-FY の pH 応答性の評価	112
4-3. Th4-FR 水溶液にアニオン性多糖類を添加することによるスペクトル変化を利用する系の構築	118
4-4. Hep 水溶液への Th4-FR 水溶液添加に伴うアニオン性多糖類の識別系の構築	120
4-4-1. 実験条件の検討	120
4-4-2. Th4-FR を用いたアニオン性多糖類の識別	123
4-5. 96 穴プレートによる簡易的なアニオン性多糖類の検出系の構築	125
4-5-1. Th4-FR の濃度条件の最適化	125
4-5-2. Hep に混入する OSCS の簡易検査系の構築	126
4-6. 結論	129
4-7. 参考文献	129

第 5 章 蛍光性高分子/蛍光分子の錯形成を利用したアニオン性多糖類の識別

5-1. 序論	131
5-2. PT-1 単独による多糖類の応答性の評価	135
5-2-1. 天然由来らせん性多糖類との錯形成の評価	135
5-2-2. アニオン多糖類との錯形成の評価	136
5-3. pH 7.2 での PT-1/1-PyS の錯形成	141

5-4. pH 7.2 での PT-1/1-PyS 錯体からの 1-PyS とアニオン性多糖の交換に与える温度 の効果	144
5-5. pH 7.2 で PT-1/1-PyS 錯体を示すアニオン性多糖に対する応答挙動	145
5-5-1. 室温での Hep 添加に伴うスペクトルの変化	145
5-5-2. 加熱条件でのアニオン性多糖添加に伴うスペクトル変化	146
5-6. pH 7.2 での PT-1/1-PyS 錯体によるアニオン性多糖類の識別	149
5-7. pH 7.2 での PT-1/1-PyS を用いたアニオン性多糖に対する応答性の評価に関する まとめ	152
5-8. PT-1/PyS 系のアニオン性多糖に対する応答性に及ぼす pH の効果	153
5-8-1. pH 2.2 での PT-1 単独のアニオン性多糖類への応答性の評価	153
5-9. 結論	156
5-10. 参考文献	157
第 6 章 結言	158

第 1 章

緒言

1-1. 序

分子間相互作用とは、2つ以上の分子間において作用する非共有結合的な引力、または斥力であり、その駆動力の違いによって様々な分子間相互作用が存在する。例えば、正電荷・負電荷間に働くクーロン力を駆動力にした静電相互作用や、水素結合(双極子相互作用)などのように電気陰性度の異なる原子間の結合において生じる部分電荷間の弱い引力がある。他にもファンデルワールス力や疎水性の分子が周囲の水を避けて集合しようとする疎水性相互作用などもある。これら分子間相互作用は生命現象の発現のほとんどに関与しており、例えば、選択的な水素結合の形成による DNA の相補的ニ重らせん構造の構築や、疎水性相互作用を利用した脂質二重膜の形成、タンパク質の3次元構造などの形で見られる。また、それらの分子が特有の機能を発現するためには、多様な分子間相互作用の総和として形成される秩序ある分子構造、分子集合体構造が重要であることが明らかにされてきた。

人工の分子間で形成する分子間相互作用を巧みに制御することで、秩序のある分子集合体の構築と機能の制御を目指す超分子化学の分野は、日々発展を続けている。超分子とは、複数の分子が分子間相互作用を駆動力として会合することによって新たな機能を発現する分子集合体を指す。超分子の中でも、小分子が直鎖状に自己組織化した構造体は超分子ポリマーと呼ばれており、共有結合によって連結されている高分子ポリマーと比較して、可逆的な集合体の形成・解離が可能であるという点で優れた特性を持つ。このような特性は、環境変化に応答して機能を変化する「スマートソフトマテリアル」の構築に有用であるため、超分子の新たな機能化を目指して、超分子ゲルや分子センサーの開発およびそれらの生体分野への応用をはじめ、電子デバイスへの応用に至るまで、様々な研究が現在も盛んに進められている。本章では、超分子化学的戦略に基づく、超分子ポリマー形成やその刺激応答性に関する研究および、これらを応用した検出系の開発研究について、既往の成果をまとめる。

1-2. π 共役系分子による超分子の形成と構造制御

π 共役系分子が自己組織化することで形成する分子集合体の構造制御は、光捕集、光電変換、光触媒システムなどの開発において重要であることから、依然として盛んに検討されている研究課題である¹⁻¹⁾。これらの開発のためには、分子が自己組織化したナノサイズの構造体における分子のパッキングとその構造体が示す特徴的な物性との相関などについて知見を集めていく必要がある。超分子構造体の形成には、上述した様々な分子間相互作用を駆使する必要があるが、さらに電気的特性を制御するためには π 共役系分子の π - π スタッキングをうまく制御していくことが重要である。

Hirsch らは、両親媒性分子である **1-1** が、一次元的な会合によって伸長した、長いチューブ状の超分子ポリマーを形成することを報告した (Figure 1-1a, b)¹⁻²⁾。この超分子ポリマーは水・THF 混合溶媒系で形成するが、水溶液系では、85 °C で数時間アニーリングしても、特に目立った会合体を形成することはない。

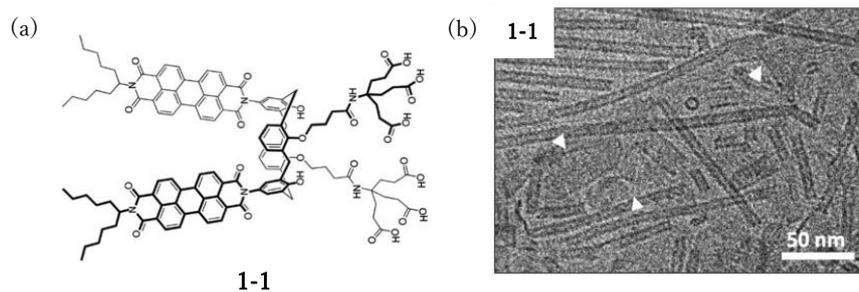


Figure 1-1. (a) 1-1 の分子構造。 (b)水・THF 混合溶媒系で形成した 1-1 会合体の透過型電子顕微鏡像。

Patra らは、テトラチオフェン(**1-2** Figure 1-2a)の水-THF 混合溶媒系における自己組織化について検討を行い、その溶媒組成の変化によって **1-2** の会合体の構造を制御可能であることを報告している¹⁻³⁾。**1-2** は水：THF=1：1 の混合溶媒中で繊維状会合体を形成し (Figure 1-2b)、その際、会合の進行に伴う紫外可視吸収スペクトルのブロード化が確認された。一方、水：THF=9：1 の組成では、H 会合体の形成を示す吸収帯の急激なブルーシフトが観測され、アモルファス状の構造体の形成が確認された (Figure 1-2c)。H 会合体とは π 共役系の分子骨格がずれることなく上下に積層することで形成される構造体であり、特徴的な吸収帯のブルーシフトを伴うため、 π 共役系分子骨格の会合状態を評価する指標となる。

この系では、貧溶媒である水の含量が上昇するに伴って、**1-2** は繊維状構造体からアモルファス性の構造体へと変化した。これは、貧溶媒の含量が高いと **1-2** 同士が強力的に凝集することが原因である。このような研究成果は、標的分子の一次元的会合による繊維状構造体形成のためには、 π - π スタッキングを活用できる π 共役系骨格は有用であるが、溶媒などの外的条件も強く影響を及ぼすことを示している。

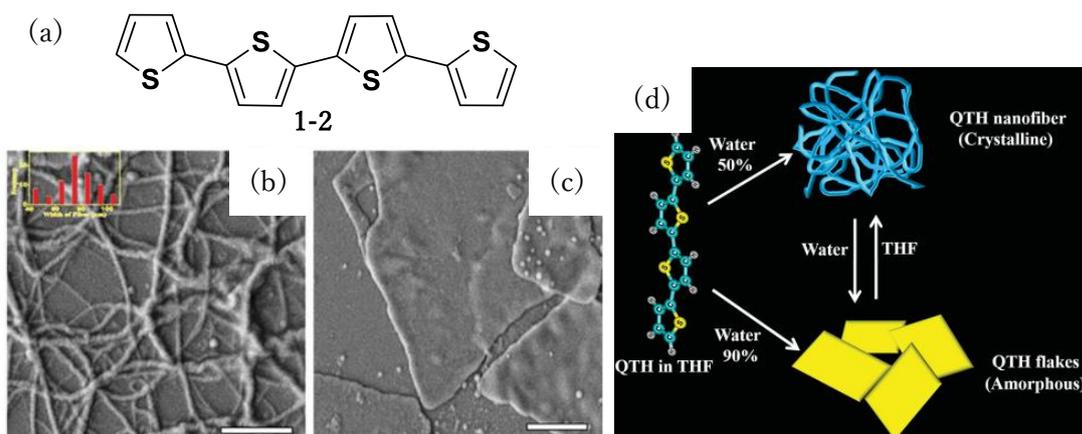


Figure 1-2. (a) 1-2 の分子構造、(b) 水：THF=1：1 の条件で形成した 1-2 会合体の走査型電子顕微鏡像、(c) 水：THF=9：1 の条件で形成した 1-2 会合体の走査型電子顕微鏡像、(d) 1-2 の会合体形成の模式図。

1-3. π 共役系骨格を持つ超分子の光化学的特性変化を利用した検出系

π 共役系骨格は、その構造に依存して様々な光化学的特性を有しており、分子の会合/非会合を制御することで、その特性を制御することができる。つまり π 共役系骨格は π - π スタッキングの発現による超分子の会合形態の制御だけでなく、 π 共役系の特性による超分子の機能発現とその応用の拡張にも寄与することができる、有用な分子骨格といえる。とりわけ、会合体形成に伴って特徴的な光化学的特性を発現する π 共役系分子は、会合体形成前後で、顕著な蛍光増強などの明瞭な変化が伴うことが多いため、標的分子の検出系の構築に有用であり、多くの研究例が報告されている¹⁻⁴⁾。

1-3-1. 凝集誘起発光(AIE)特性を用いた検出系

シアノ基が導入されたフェニレンビニレンは、凝集誘起発光(AIE)特性を有しており、過去にもこの AIE 特性を利用した検出系の開発がなされている。新海らは、オキシムクリック反応と AIE 特性を組み合わせることでケト酸(特に α -ケト酸)を検出する系を構築している¹⁻⁵⁾。化合物 **1-3** はシアノ基導入フェニレンビニレン (OPV) を中心骨格として末端にアミノ基を有する。このアミノ基がケト酸とオキシムクリック反応を起こすことで、末端にカルボン酸アニオンを有する **1-5a~d** が形成する。ここで、この反応系にあらかじめカチオン性の **1-4** を共存させることで、**1-4** と **1-5** 間で静電相互作用による錯形成が誘起され、これをきっかけとした OPV 骨格間の π - π スタッキングによる会合体形成が進行する。その結果、AIE による蛍光増強が観測されるため、ケト酸を鋭敏に検出することが可能となる (Figure 1-3b)。

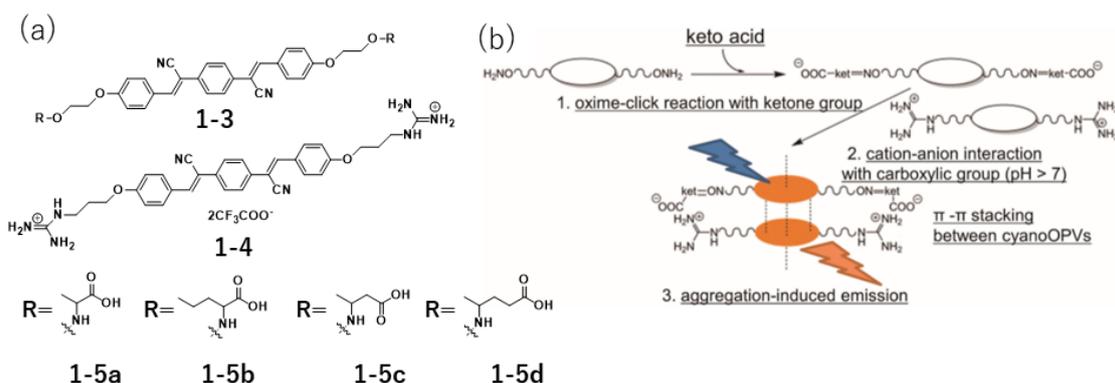


Figure 1-3. (a) **1-3**, **1-4**, **1-5a~d** の構造。 (b) **1-4/1-5a** 錯体の形成に伴う AIE 特性の発現を利用したケト酸の検出の機構。

1-3-2. ピレンのエキシマー形成を利用した検出系

ピレンのエキシマー形成も特徴的な蛍光変化を示すため、検出系によく活用される¹⁻⁶⁾。例えば、Jin らは、アデノシン結合アプタマーの2つの RNA フラグメントの末端にピレンを導入することで、ピレン骨格が有するエキシマー発光特性を利用したアデノシン三リン酸(ATP)の検出系を報告した¹⁻⁷⁾。あらかじめ混合した2つのアプタマー断片は、標的分子である ATP と錯形成することで二重らせん構造を形成し、ピレン部位同士が隣接した状態となる。ここで疎水性のピレン2分子は、ちょうど γ シクロデキストリン (γ -CD) に収まるサイズであるので、 γ -CD を共存させることでピレンエキシマーの形成が促進された (Figure 1-4)。一方、 γ -CD 不在下では、微弱なエキシマー発光しか観測されなかった。この系では、ATP に対して構造的に類似した他のヌクレオチド三リン酸塩は蛍光変化を示さず、ATP の検出を妨害されることもなかった。

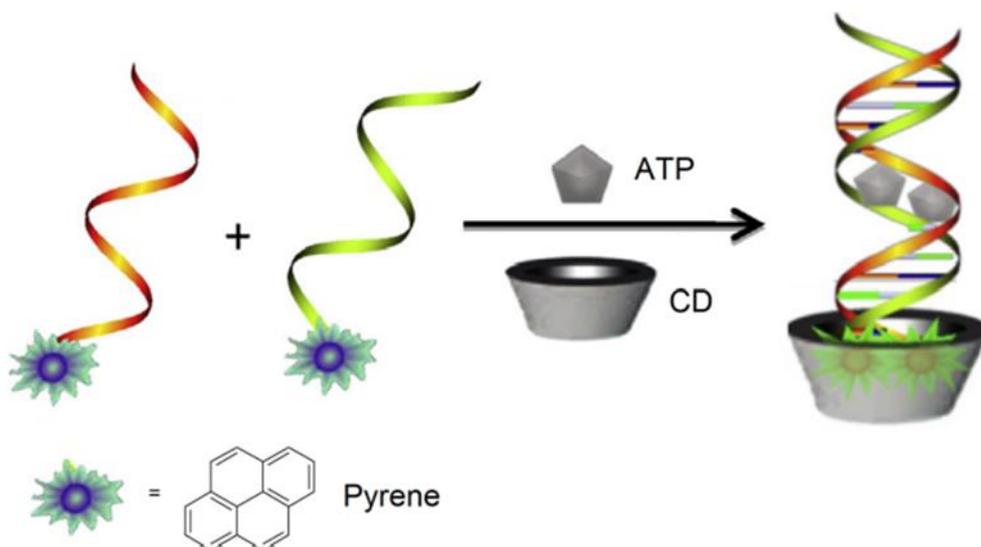


Figure 1-4. ATP アプタマー導入ピレンのエキシマー発光を利用した ATP 検出。

1-4. 超分子ポリマーの選択的らせん構造形成によるキラル抽出

超分子構造体は、小分子の分子間相互作用によって形成されるため、その構造は分子間相互作用に適度な摂動を与える第2の分子の共存によって影響を受ける。このことを応用することで、超分子化学的な分子識別が可能となる。例えば、石田らは **1-6** がキラルなゲスト分子である **1-7** や **1-8** と共存することで、ゲストのキラリティを反映した超分子構造体を形成することを見出した。**1-6** と **1-8** からなる超分子構造体 **1-6/1-8** は溶媒への溶解性が悪く、時間の経過とともに沈殿するものの、**1-6** と **1-7^S** からなる超分子構造体 **1-6/1-7^S** は溶解したまま沈殿しない。興味深いことに、**1-6/1-7^S** と **1-6/1-8^S** の超分子構造体を混合する

と、**1-6/1-7^S/1-8^S**の超分子構造体が得られ、この錯体は溶媒である dodecane への高い溶解性を示した。これに対して、**1-8^S**の光学異性体である **1-8^R**を用いて同様な実験を行うと、**1-6/1-7^S/1-8^R**の錯形成は進行せず、時間の経過にともなって **1-6/1-8^R**だけが沈殿することが明らかとなった。以上を元に、**1-6/1-7^S**溶液に対して **1-6/1-8^S**と **1-6/1-8^R**を等量加えた結果、系内には **1-6/1-7^S/1-8^S**と **1-6/1-8^R**が形成されることになり、**1-6/1-8^R**のみが沈殿された。得られた溶液中の **1-8^S**の割合は90%を超えるものとなったことから、本系は超分子化学的なキラル分割に成功した興味深い研究例である¹⁻⁸⁾。

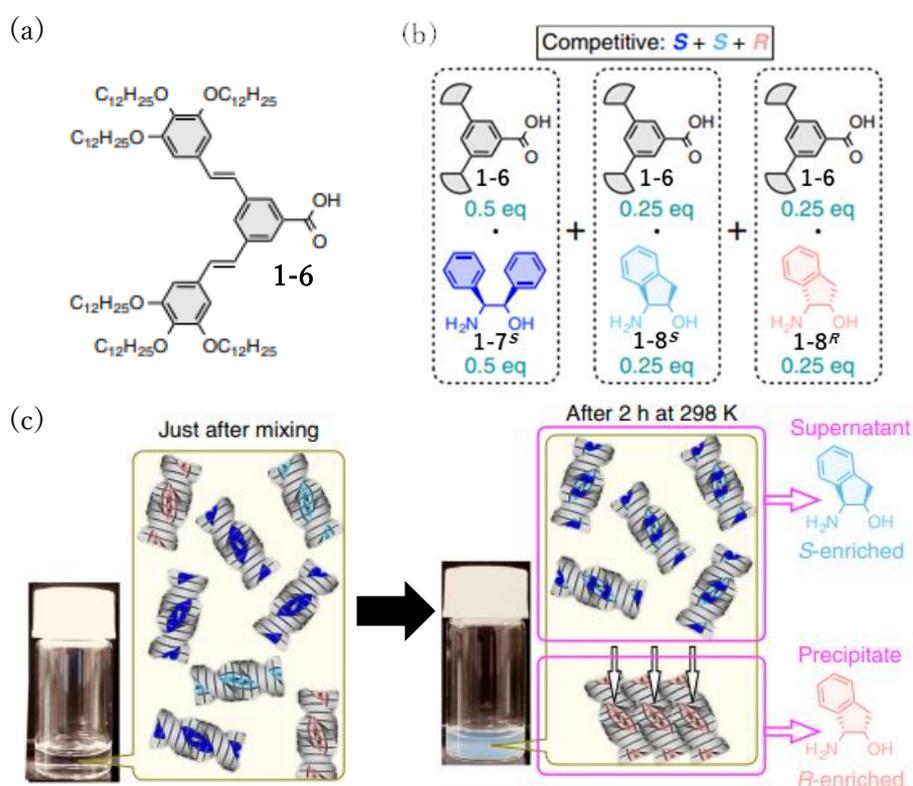


Figure 1-5. ヘテロ超分子構造形成過程を利用したキラル識別。(a) **1-6**の構造。(b) キラル分割実験における各ゲストと **1-6**の混合条件。(c) 各キラルゲストと **1-6**が形成する超分子の混合による、キラル分割の模式図。

1-5. ペプチド構造を組み込んだ超分子会合体の形成について

ここまで記したように、 π 共役系骨格は超分子ポリマー形成のための一次元的な会合体の形成を誘導するために有用である。このような一次元的な会合を誘導する分子間相互

作用は π - π 相互作用だけではなく、方向性の高い分子間相互作用である水素結合も有効である。ペプチドは主鎖のアミド結合など、多数の水素結合サイトを持つため、一次元会合を意図した超分子の構築において、極めて強力な分子モジュールであり、ペプチド系超分子に関する研究成果も多数報告されている¹⁻⁹⁾。

1-5-1. ペプチド配列に依存した超分子ファイバーの形成

Stupp らは、ペプチド導入両親媒性分子 (1-9) が、水中で非常に長い一次元ナノロッドやナノファイバーを形成することを報告した¹⁻¹⁰⁾。このペプチド導入両親媒性分子は、脂肪族炭化水素鎖 (ドメイン I) と、疎水性シート形成配列 (ドメイン II)、水溶性アミノ酸配列 (ドメイン III)、および生物活性シグナル伝達配列ドメイン IV) を含むペプチドブロックからなる (Figure 1-6a)。ナノファイバーの形態は透過型電子顕微鏡を用いて確認されている (Figure 1-7b)。さらに円偏光二色性(CD)スペクトル等での評価から、会合体の内部構造は β -シートがナノファイバーの長軸方向に平行に配向していくことで構築されていることが示唆されており (Figure 1-6c)、ペプチドの配列がファイバー構造形成に大きく影響していることが確認された。

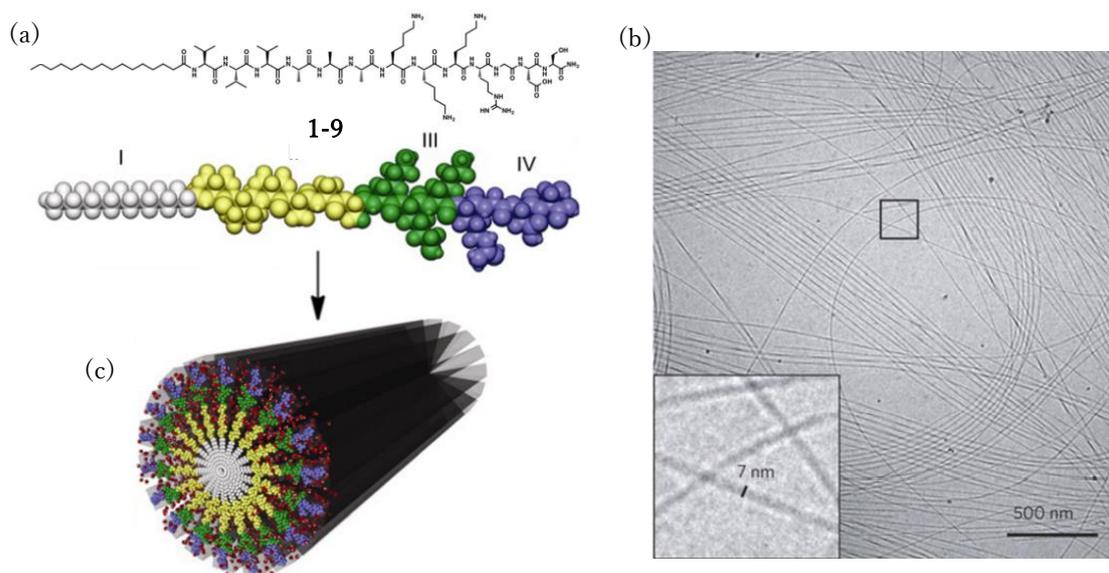


Figure 1-6. (a) 1-9 の構造。(b) 1-9 が形成するナノファイバーの透過型電子顕微鏡観察像。(c) 1-9 が形成するナノファイバー構造の模式図。

1-5-2. ペプチド導入型 π 共役系分子による超分子ファイバー形成

ここまでに、 π 共役系骨格とペプチドは、いずれも分子の一次元会合を誘導するために、極めて有用な分子骨格であることを紹介してきた。よって、これらを融合したペプチド導入

型 π 共役系分子は、超分子構築のためにより好ましい分子構造と言える。

Stupp らは、トリチオフェン骨格にジペプチド構造を導入した化合物 (**1-10**, Figure 1-7a) が水中で形成する自己組織化体の構造について調査した。透過型電子顕微鏡観察の結果、**1-10a** は平面に近い針状の構造体、**1-10b** はロッド状の構造体、**1-10c** はチューブ状の構造体、**1-10d** は巨大なシート状構造体をそれぞれ形成することが確認された (Figure 1-7b)。これら構造体の紫外可視吸収スペクトルから、いずれの自己組織体もトリチオフェン骨格が H 会合体を形成していることが確認された。**1-10a** は僅かなブルーシフトと吸収帯のブロード化が確認でき、**1-10b** は 37 nm、**1-10d** は 44 nm の強力なブルーシフトを示した。**1-10c** のスペクトルは僅かなブルーシフトを伴って強くブロード化した。これらの結果から、**1-10** 骨格の π - π 相互作用は **1-10a** が最も弱いことが示唆された。IR スペクトルからペプチド構造の NH の伸縮振動を示すシグナルが **1-10b**、**1-10d**、**1-10c**、**1-10a** の順に大きくレッドシフトしていた。一般的に、レッドシフトの大きさは水素結合の強さに依存することが分かっているため、**1-10b**、**1-10d**、**1-10c**、**1-10a** の順に水素結合が強固であることが示唆された (1-11)。

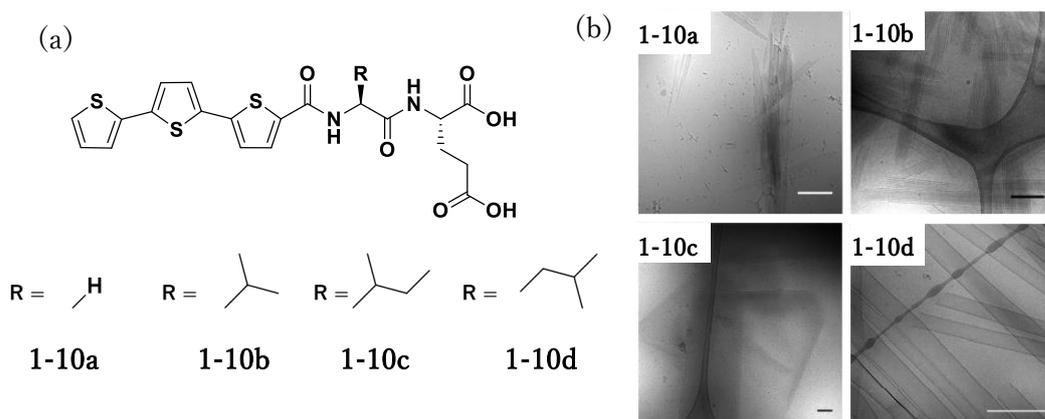


Figure 1-7. (a) **1-10a~d** の構造。(b) **1-10a~d** が形成する会合体の透過型電子顕微鏡観察像。

Tovar らは、同一ペプチド構造を有する **1-11** と **1-12** (Figure 1-8a) を合成し、これら分子の pH 応答的な自己組織体の形成について報告した (1-12)。pH 10 では、いずれの分子も負電荷を持つため親水性が高く、単分子的に溶解するが、pH 2 ではプロトン化により負電荷を失うため、水溶性が低下し、秩序ある一次元会合体を形成した (Figure 1-8b)。CD、紫外可視吸収スペクトルなどの分光法による検討から、ドナー (**1-11**) からアクセプター (**1-12**) へのエネルギー移動が、励起子移動、共鳴エネルギー移動などの複数のメカニズムで起こることが示された。これは **1-11** と **1-12** が、同一のペプチド配列をもつため、分子間のパッキングの効率が良いことが要因であると報告されている。

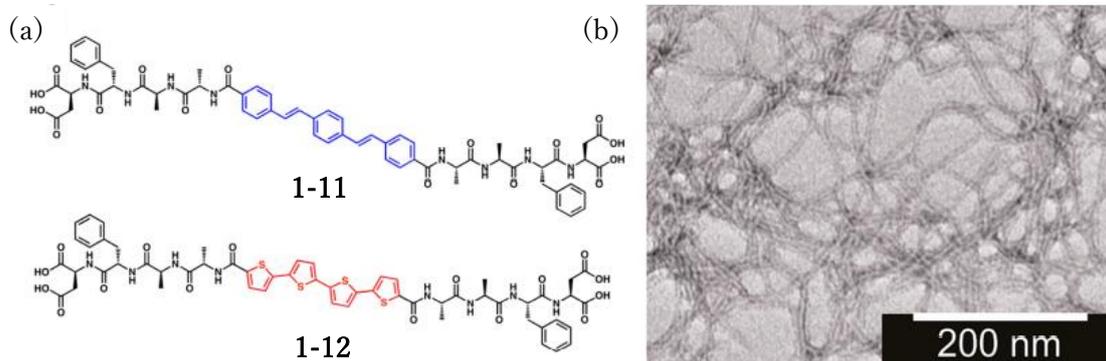


Figure 1-8. (a) 1-11 と 1-12 の構造。(b) 1-11/1-12 が形成する会合体の透過型電子顕微鏡観察像。

1-6. 超分子ゲル系の構築と刺激応答性について

小分子が自己組織化した超分子ポリマーが三次元網目状に絡み合い、溶媒を閉じ込めることで形成されるゲルを超分子ゲルと呼ぶ。ゲルを形成する三次元網目構造がすべて共有結合で連結されている高分子ゲルとは異なり、超分子ゲルは周囲の刺激に応答することで可逆的なゾル-ゲル相転移が可能である。そのため、様々な外部刺激応答性を示す超分子ゲル系の研究は盛んに進められている。下記に示すように、超分子ゲルを形成するゲル化剤の構造内に、外部刺激応答が可能になる部位を導入することで、様々な機能が付与された超分子ゲルが報告されている¹⁻¹³⁾。

Hao らは、天然の葉酸(folic acid: **FA**)が DMSO : 水 = 6 : 4 の混合溶媒下で超分子ゲルを形成することを報告した¹⁻¹⁴⁾。この **FA** は混合溶媒中で自己組織化し、らせん状の 1 次元会合体を形成しており、**FA** ゲルは熱・pH に応答する。**FA** は DMSO : 水 = 6 : 4 の混合溶媒中で最も安定したゲルを形成するが、DMSO の含量がより過多の条件では溶解し、一方、水の含量がより過多の条件では沈殿する(Figure 1-10b)。走査型電子顕微鏡観察の結果、この **FA** はゲル形成の際に超分子ファイバーを形成することが確認された(Figure 1-10c)。

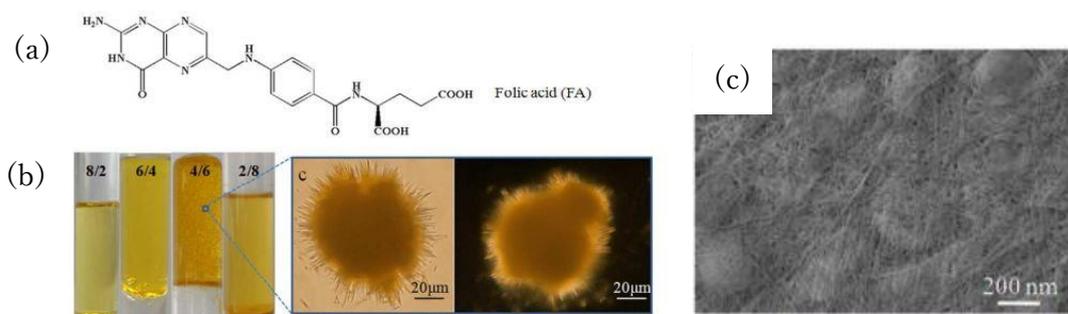


Figure 1-10. (a) FA の構造。(b) 溶媒組成別の FA のゲル化実験結果。(c) ヒドロゲル形成時の FA 会合体の走査型電子顕微鏡観察像。

また、紫外可視吸収スペクトル測定結果から、FA がゲル形成段階での J 会合体形成を示す長波長シフトが確認され (Figure 1-11a)、CD スペクトル測定結果から形成されるファイバーがらせん状の構造を有していることが示された (Figure 1-11b)。更に IR スペクトル測定結果からゲル形成に際して、プテリン環同士が水素結合を形成していることが確認された。またカルボン酸はカルボキシレートの特称-非対称伸縮振動が確認されたことから、イオン化した状態で存在していることが示された (Figure 1-12)。

また FA ゲルは pH 応答性を示し、FA ゲルに対して濃塩酸や水酸化ナトリウムを加えるとすぐさまゲルが崩壊し溶液に戻ることが確認された (Figure 1-13b)。また NaOH 存在下においてゲル化実験を行ったところ、NaOH 濃度が極小であっても、ゲルをほとんど形成しなかったことから、FA ゲルは塩基に対

してはかなり鋭敏に応答するゲルであった (Figure 1-13c)。一方、HCl 存在下においては、ある程度の濃度範囲において、凝集体が大きくなり、ゲルの強度がより強力になるという興味深い pH 応答を示した (Figure 1-13d)。

Xie らは L-グルタミン酸由来の両親媒性物質 (1-13) とアゾベンゼン含有ピリジニウム塩 (1-14) を混合したヒドロゲル系を報告した¹⁻¹⁵⁾。このヒドロゲルは、常温では収縮、加熱時には膨潤という熱可逆的な膨潤を示したが、紫外線照射することにより常温で膨潤状態に

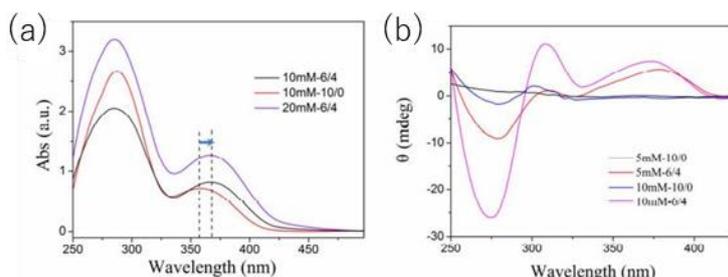


Figure 1-11. (a) 紫外可視吸収スペクトル測定結果。 (b) CD スペクトル測定結果。

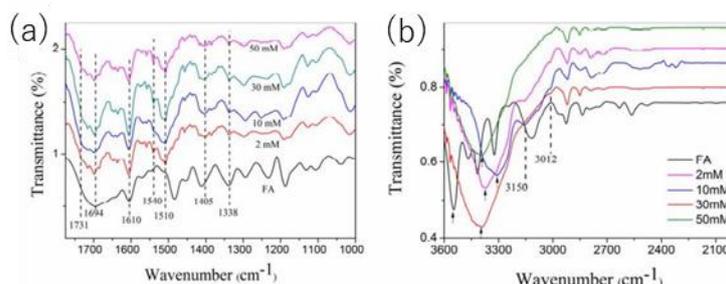


Figure 1-12. FT-IR スペクトル測定結果。 a) $1750\text{ cm}^{-1} \sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 。 b) $3600\text{ cm}^{-1} \sim 2050\text{ cm}^{-1}$ 。

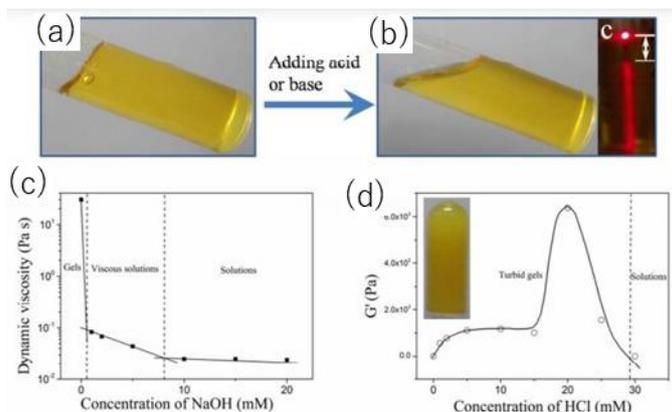


Figure 1-13. FA ゲルの pH 応答実験結果。 a) 酸、塩基添加前のゲル状態。 b) 酸、塩基添加後の溶液状態。 c) FA ゲルの状態と NaOH 濃度の関係。 d) FA ゲルの状態と HCl 濃度の関係。

変換された(Figure 1-14b)。紫外可視吸収スペクトルによってこの相転移について調査すると、紫外線照射により、収縮したゲルの $\lambda = 344 \text{ nm}$ 付近の吸収帯の吸光度が徐々に減少し、 $\lambda = 420 \text{ nm}$ に新しい吸収帯が現れた。このことは、アゾベンゼンのトランス体からシス体への異性化を示している。光照射により膨潤したゲル中に見られる超分子ファイバーは、光照射前のゲル中のものよりも幅が広く、ねじれた構造を持つことが確認された(Figure 1-14c)。

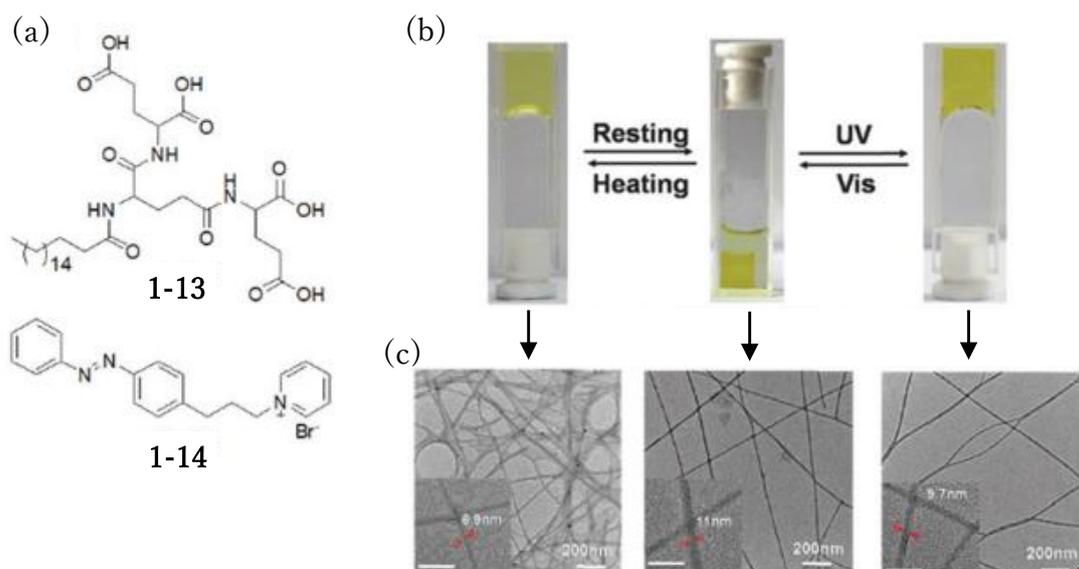


Figure 1-14. a) 1-13 と 1-14 の構造。b) 1-13/1-14 ヒドロゲルが示す熱・光可逆的な膨潤・収縮。c) 各膨潤・収縮状態での 1-13/1-14 が形成する繊維状会合体の走査型電子顕微鏡観察像。

Yang らは、ペントペプチドヒドロゲル化剤 **1-15** に対して、チロシンキナーゼ触媒によるリン酸化反応とアルカリホスファターゼによる脱リン酸化反応を順次行い、自己組織体の構造を制御するキナーゼ/ホスファターゼスイッチについて報告した¹⁻¹⁶⁾。アデノシン三リン酸 (ATP) 存在下で調製したヒドロゲル(Figure 1-15a)にチロシンキナーゼを加えると、チロシンのフェノール水酸基がリン酸化されて溶液状態に相転移することが確認された(Figure 1-15b)。リン酸化された **phosphate-1-15** は、ホスファターゼ処理によって脱リン酸化されることでチロシンのフェノール水酸基が再生され、時間経過に伴って再度ゲルへの相転移を引き起こすことが明らかとなった(Figure 1-15c)。

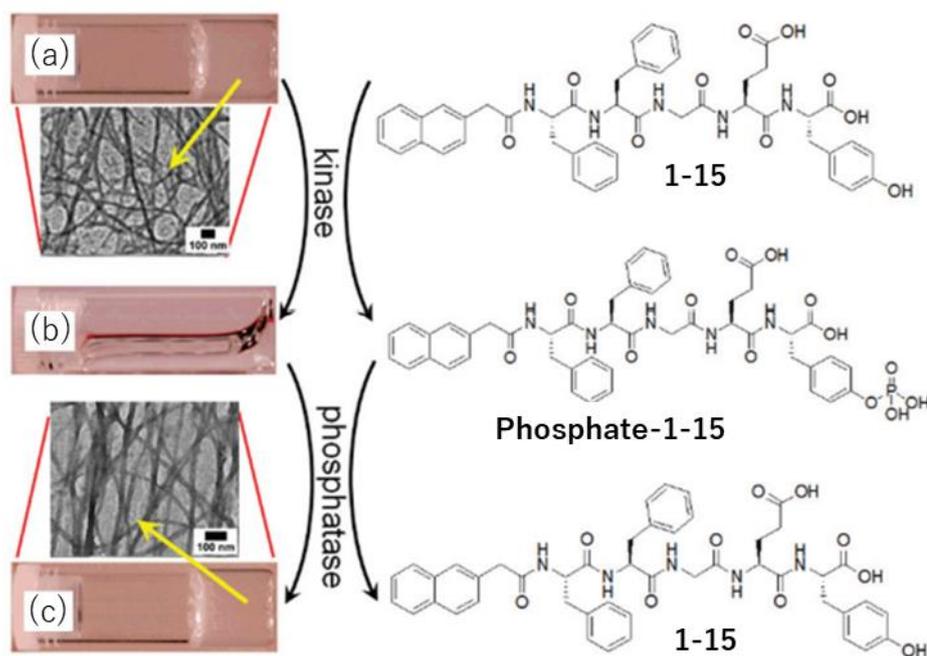


Figure 1-15. (a) 1-15 が形成するヒドロゲル。(b) チロシンキナーゼの酵素反応による 1-15 ゲルの崩壊。c) ホスファターゼ添加による 1-15 ゲルの再形成。

1-7. 問題提起と本論文の構成

これまでに紹介した研究例で示されたように、様々な外部刺激に応答性を示すゲル系の開発や、構造が類似する化合物が多く検出困難な標的分子に対する検出系の開発に代表される新たな機能性材料の開発に対して、超分子化学的な戦略は大変有効なアプローチであることがわかる。これらの研究例を参考に、今後も様々な分子間相互作用を利用し、高機能化された超分子材料が開発されていくことが期待される。一方で、超分子材料の性質をより精密に発揮させるためには、 π - π 相互作用や静電相互作用などの様々な分子間相互作用を複数組み合わせた超分子集合体の挙動を精密に制御していく必要がある。しかし、目には見えないナノスケールの分子の分子間相互作用を制御し、思い通りの性質を示すように調節することは極めて困難であるといえる。

以上のことを踏まえて本論文では、 π 共役系骨格に種々のアミノ酸配列を導入することで、疎水性相互作用の形成点や水素結合サイト、静電相互作用点などを導入した化合物群を系統的に合成することとした。得られた化合物の性質と構造的特徴を照らし合わせることで、様々な条件下での超分子集合体の性質に関する知見を蓄積することを計画した。こうして得られた知見をもとに、超分子の応用例の拡張として超分子ヒドロゲルの自己修復特性の制御と実用化に足りうる性能を示す超分子材料の開発として検出系の構築を試みた。

本論文では、 π 共役系骨格を有する有機分子が形成する超分子を利用した系の構築について、2章「超分子ヒドロゲルによる自己修復特性の発現と制御」、3章「超分子ヒドロゲルのゲスト応答的なゾル-ゲル相転移を利用したアニオン性多糖類の識別」、4章「 π 共役系

骨格を有する両親媒性分子の錯形成に伴うアニオン性多糖類の識別」、5章「蛍光性高分子/蛍光分子の錯形成を利用したアニオン性多糖類の識別」、6章「結言」で報告する。

以下に本章以外の各章についての概要を示す。

第2章

π 共役系中心骨格に **Th4** もしくは **OPV** 骨格を有し、両末端にジペプチド構造を導入した双頭型両親媒性分子を合成し、ヒドロゲル化試験を行った。その結果、 π 共役系小分子に自己修復特性を有するヒドロゲル形成能を付与するための汎用性の高いジペプチド配列を見出した。それぞれのゲル化剤を混合した複合ゲルにおいて自己修復特性を制御することに成功した。

第3章

第2章で得られたヒドロゲル化剤のゲスト応答的なゾル-ゲル相転移を利用したアニオン性多糖の識別を行った。その結果、スルホ基を有するアニオン性多糖を添加した場合のみヒドロゲルを形成するという形式でアニオン性多糖類を識別できる系の構築に成功した。

第4章

カチオン性置換基を有する両親媒性分子とアニオン性多糖類の錯形成に伴う溶解性の変化を利用した検出系の構築を行った。その結果、アニオン性多糖上のアニオン電荷の数に基づいてアニオン性多糖を識別可能であることが確認された。さらに96穴プレートを用いてプレートリーダーによる測定という簡便な手順であるにもかかわらず、20%未満の **OSCS** 混入 **Hep** の **OSCS** 含有濃度を決定することができることが示された。

第5章

蛍光性高分子(**PT-1**)と蛍光性小分子(**1-PyS**)の錯形成と解離に伴う劇的な色調変化を利用したアニオン性多糖類の識別系の構築を行った。中性条件では、**PT-1/1-PyS** 錯体を用いて、応答性を示す濃度条件と色調変化の大きさの2つの観点からアニオン性多糖を識別することができることが示された。一方で酸性条件では、**PT-1** とアニオン性多糖との錯形成に伴いアニオン性多糖構造の違いに応じた顕著なスペクトル変化を示し、pH 7.2 の条件と比較すると、その色調変化の大きさの序列が逆転するという興味深い結果が得られた。

第6章

本研究で得られた成果を総括する。

1-8. 本研究で使用した装置

^1H NMR および ^{13}C NMR スペクトルは、日本電子株式会社製 JNM-ESC400 により測定

した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI TOF MS) は、Bruker 社製 Autoflex II を用いて行った。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察は、キーエンス社製 VE-9800 を用い、蛍光スペクトルは PerkinElmer 社製 LS55、紫外可視吸収スペクトルは ThermoFisher Scientific 社製 Evolution™ 260 Bio、円偏光二色性スペクトルは日本分光株式会社製 J-820 をそれぞれ用いて測定した。動的粘弾性測定は、Anton-Par 社製 MCR302e により測定した。

1-9. 参考文献

- 1-1) Elisha Krieg, Maartje M. C. Bastings, Pol Besenius, and Boris Rybtchinski., *Chem. Rev.* 2016, **116**, 2114-2477.
- 1-2) Rodler, F. Schade, B. Jager, C. M.; Backes, S. Hampel, F. Böttcher, C. Clark, T. Hirsch, A. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, **137**, 3308–3317.
- 1-3) Santanu Bhattacharyya, Bikash Jana, Sumanta Sain, Monoj Kumar Barman, Swapan Kumar Pradhan, Amitava Patra. *Small*, 2015, **11**, 6317-6324.
- 1-4) Jie Li, Jianxing Wang, Haoxuan Li, Nan Song, Dong Wang and Ben Zhong Tang. *Chem. Soc. Rev.* 2020, **49**, 1144-1172.
- 1-5) Daisuke Yoshihara, Takao Noguchi, Youichi Tsuchiya, Bappaditya Roy, Tatsuhiro Yamamoto, and Seiji Shinkai, *Chem. Lett.* 2015, **44**, 812-814.
- 1-6) Erendra Manandhar, Karl J. Wallace, *Inorganica Chimica Acta*, 2012, **381**, 15-43.
- 1-7) Jin, F. Lian, Y. Li, J. Zheng, J. Hu, Y. Liu, J. Huang, J. Yang, R. *Anal. Chim. Acta*, 2013, **799**, 44-50.
- 1-8) Krishnachary Salikolimi, Vakayil K. Praveen, Achalkumar Ammathnadu Sudhakar, Kuniyo Yamada, Noriko Nishizawa Horimoto & Yasuhiro Ishida., *Nat Commun.* 2020, **11**, 2311.
- 1-9) Elisha Krieg, Maartje M. C. Bastings, Pol Besenius, and Boris Rybtchinski. *Chem. Rev.* 2016, **116**, 2414-2477.
- 1-10) Jessica A. Lehrman, Honggang Cui, Wei-Wen Tsai, Tyson J. Moyerb and Samuel I. Stupp. *Chem. Commun.* 2021, **48**, 9711-9713.
- 1-11) Jiang, H.; Guler, M. O.; Stupp, S. I., *Soft Matter*, 2007, **3**, 454-462.
- 1-12) Ardoñ a, H. A. M.; Tovar, J. D. *Chem. Sci.* 2015, **6**, 1474-1484.
- 1-13) Santanu Panja and Dave J. Adams. *Chem. Soc. Rev.*, 2021. **50**. 5165-5200.
- 1-14) Pengyao Xing, Xiaoxiao Chu, Mingfang Ma, Shangyang Li and Aiyao Hao. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014,**16**, 8346-8359.
- 1-15) F. Xie, L. Qin and M. Liu., *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 930–933.
- 1-16) Z. Yang, G. Liang, L. Wang and B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3038–3043.

第 2 章

自己修復材料への応用を指向した
超分子ゲル化剤の開発と自己修復特性の制御

2-1. 序論

自己修復能を持つ材料は、損傷が自然に修復することから、自動車をコーティングする塗料やスマートフォンの液晶保護フィルムなどに既に利用されている。自己修復材料が実社会において大いに活用されるためには、さらなる利用範囲の拡張が重要であり、現在盛んに研究がなされている。近年では、社会的にも強く要望されている持続的社会的の実現のために、建造物材料を始めとしたあらゆる素材の長寿命化やメンテナンスフリー化を達成するために必要な自己修復能に関する技術革新が求められている。このような流れの中で、非共有結合的な分子間相互作用が可逆的に再形成可能であることから、化学的アプローチによる自己修復性の材料を開発する上で、分子間相互作用の適切な制御による自己修復能の発現とその制御は非常に重要な研究課題となっている。よって、分子間相互作用の制御によって機能発現を達成することを目指す超分子化学は自己修復材料の開発に貢献する研究領域と言える。化学的アプローチによる自己修復材料の開発については、これまでに高分子ゲルを基盤とした研究例が多く、成果を収めている。例えば、ポリロタキサンの可逆的な架橋を利用した例²⁻¹⁾やイオン液体を溶媒とした自己修復ゲル系の開発²⁻²⁾など様々な分子間相互作用様式を利用した系の開発が進められている (Figure 2-1)。これは、高分子材料が本質的に実用に値する物理的強度を持つため、実用的な自己修復材料の開発のために、都合の良い材料である事が要因と考えられる。

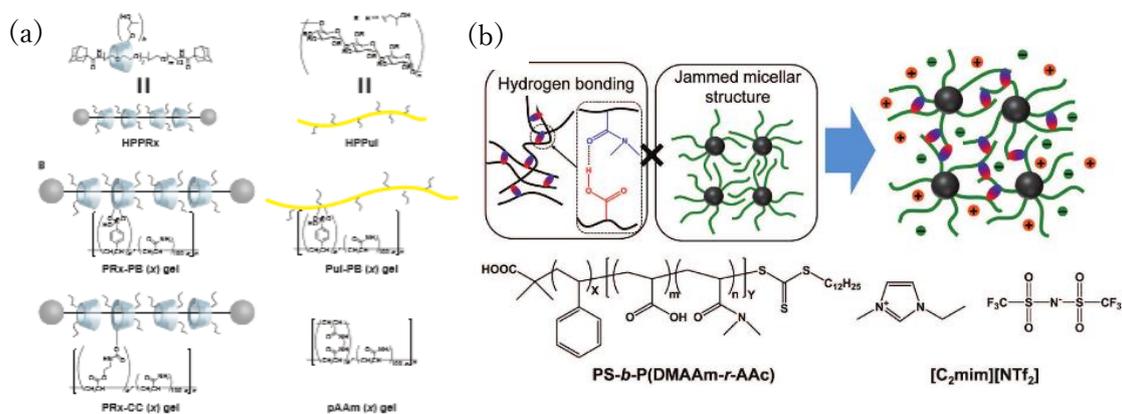


Figure 2-1. 自己修復ゲル系の例。(a)ポリロタキサンによる可逆的な架橋。(b)イオン液体を溶媒とした自己修復系。

一方、小分子が非共有結合的に集合することで形成した分子集合体は、基本的に脆弱であることが多く、分子集合体を基盤とする自己修復材料の開発は、高分子材料に比べて十分には進展していない。それでも、小分子が形成するゲル系を対象とした自己修復ゲル・チキソトロピックゲルの開発として、当研究室も含めた多くの研究者が注力している²⁻³⁾。

超分子ゲル系による自己修復ゲルの一例として、Falconeらは構造内にフェロセン-トリプトファンを有する分子 (FC-Trp, Figure 2-2a)を用いてジクロロメタンをゲル化させ、そ

のゲルが自己修復能を有することを明らかにした(Figure 2-2b)。得られたゲルの構造をX線回折や IR スペクトルから評価したところ、トリプトファンのインドール環の N-H が分子間及び分子-溶媒間の水素結合に大きく関わっていることが明らかとなったが(Figure 2-2c)、これが自己修復能を示す直接的な要因かどうかは議論されていない²⁻⁴⁾。

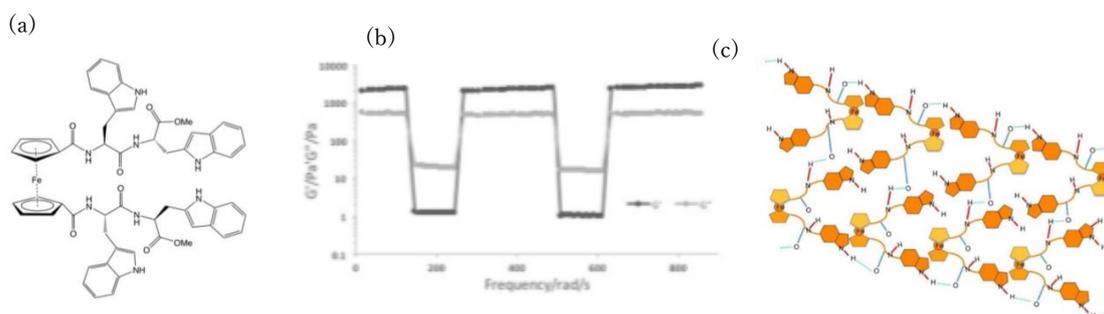


Figure 2-2. (a) **Fc-Trp** の分子構造。(b) 動的粘弾測定による **Fc-Trp** ゲルが示す自己修復過程の追跡結果。(c) **Fc-Trp** がゲル中で形成する分子配列の模式図。

最近では、小分子と金属イオンとの相互作用によって架橋構造を作るメタロヒドロゲルが優秀な自己修復能を有することを報告する論文も多い。例えば Banerjee らのチロシンを基盤とした小分子と Ni^{2+} イオンの系²⁻⁵⁾や、Chen らのグアノシン(**G**)とイソグアノシン(**isoG**)の小分子と K^{+} イオンの系²⁻⁶⁾の自己修復ゲルが報告されている。

以上の例で示されるように、自己修復能をもつ超分子ゲル系の研究は近年でも盛んに進められている。しかしながら、ゲルを形成する小分子の構造と自己修復能獲得の相関関係は十分には明らかにされておらず、小分子が形成するゲル系による自己修復ゲルの発見は偶然に依るところが多い。そういった背景があるため、分子集合体における自己修復能発現の学理が確立していない現在において、その先にある自己修復能の制御に関する戦略は、ほぼ未開拓の研究領域であるといえる。

そこで、本章では、 π 共役系を中心骨格とし、その両末端にジペプチド配列を導入した一連の超分子ゲル化剤候補分子を系統的に設計・合成し、それらのゲル形成能、自己修復能の発現と分子構造との相関を調査することで、超分子ヒドロゲルを利用した自己修復特性の発現と制御を目指した。

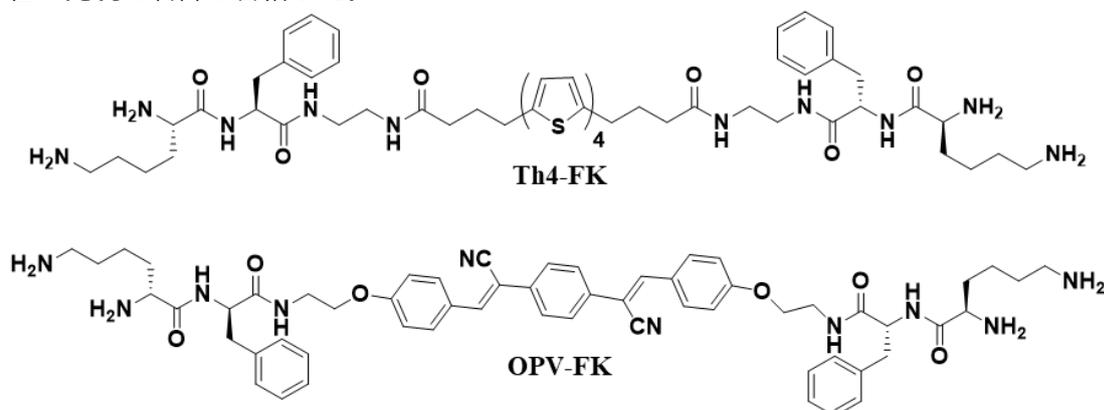


Figure 2-3. 本研究で用いるヒドロゲル化剤候補分子の構造。
(Th4-FK, OPV-FKのみ示す)

この目的のために、 π 共役系骨格の両末端にジペプチド構造を導入した双頭型両親媒性分子を基本的な分子設計として採用した (Figure 2-3)。中心骨格となる π 共役系にはテトラチオフェン(Th4)とシアノ基導入オリゴフェニレンビニレン(OPV)を採用した。

Th4 骨格は非会合状態では、強い発光を示し、会合状態では蛍光波長のレッドシフトを伴って消光するという特性がある。また第1章でも示したように Th4 骨格同士の π - π スタッキングは、小分子が次元方向に規則的に会合し繊維状会合体を形成するために有効な構造である。当研究室ではこれまでに、Th4 骨格にクラウンエーテルを修飾した有機小分子 (Th4-crown) が形成する超分子ゲルを用いて、 K^+ 添加による超分子ゲル繊維の解離に起因したゾル化とそれに伴う蛍光の劇的な発現に成功した²⁻⁷⁾。また、Th4-crown は、キラルなジアンモニウム型ゲストが添加されると、自己修復能を発現することも明らかにされている²⁻⁸⁾。

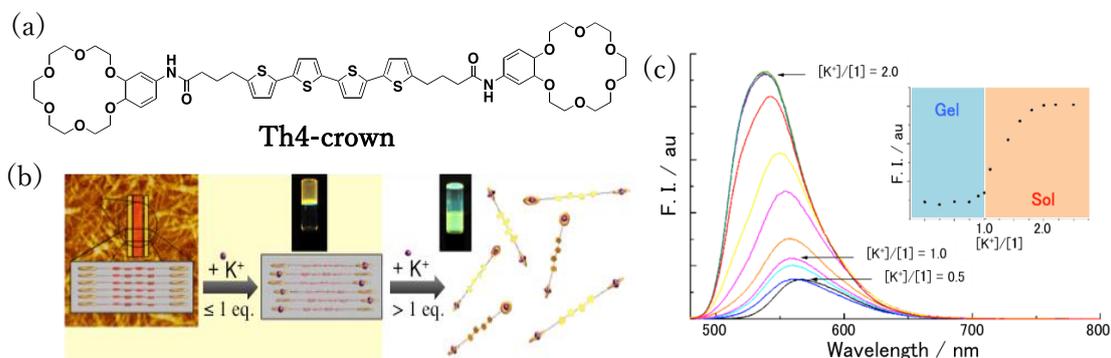
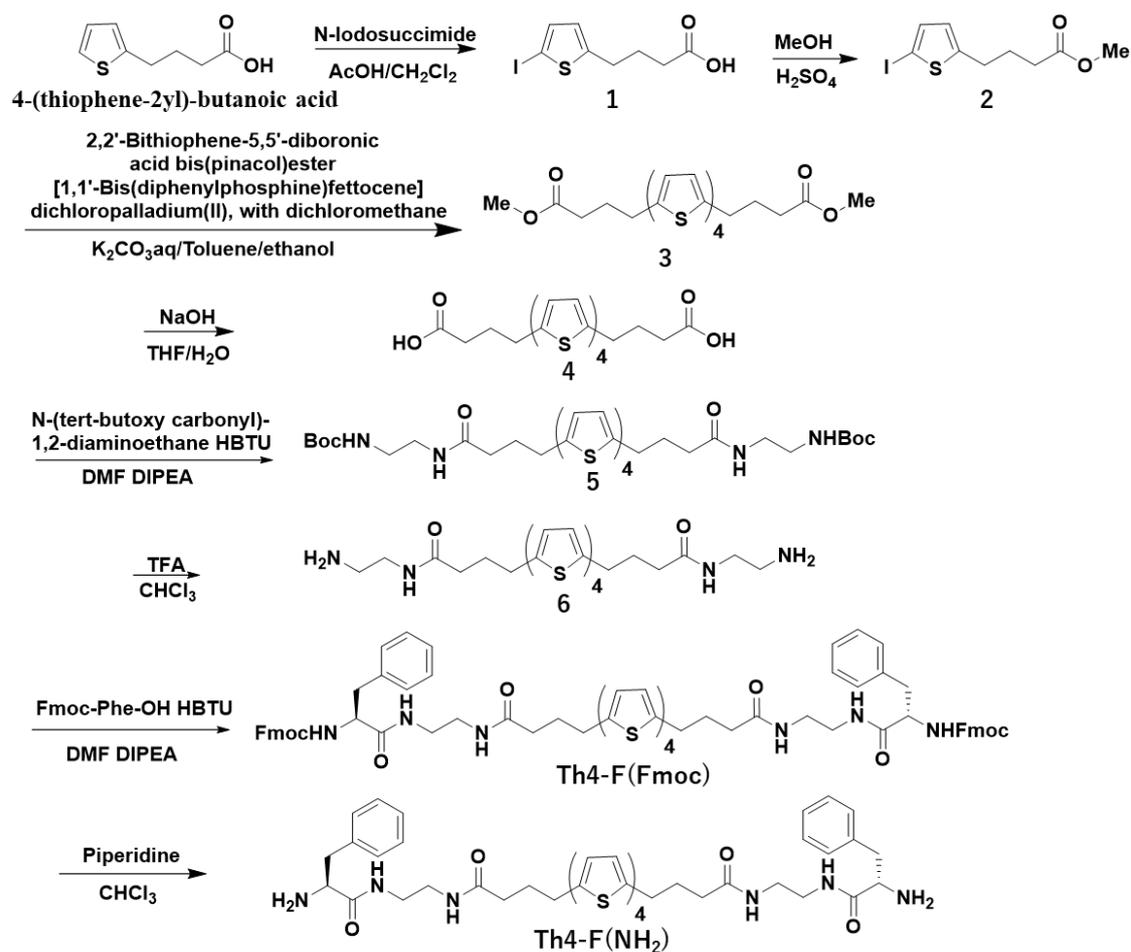


Figure 2-4. Th4-crown の構造。(b)Th4-crown の K^+ 応答を利用した Th4-crown ゲルの相転移。(c) Th4-crown の相転移に伴う蛍光スペクトル変化。

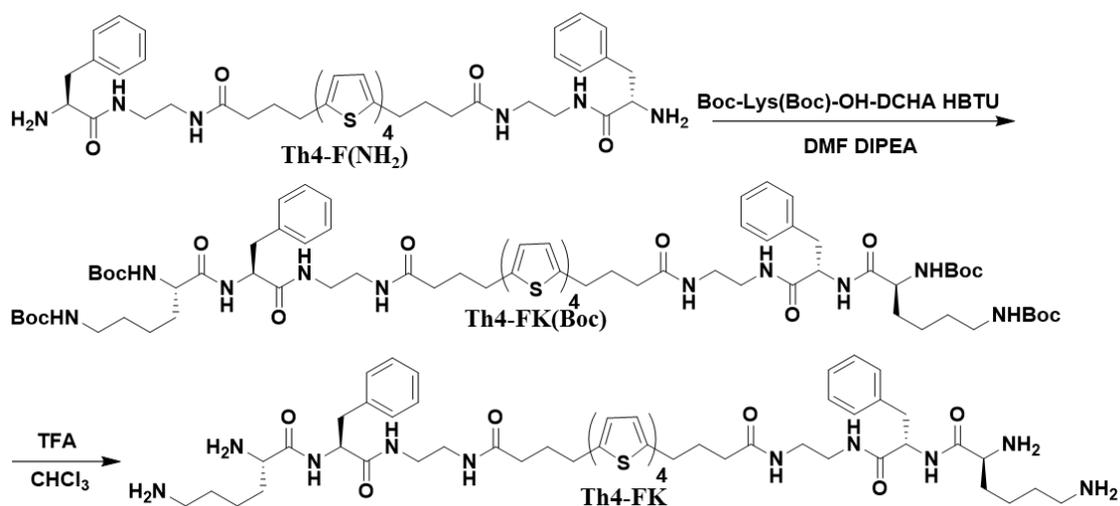
一方、OPV 骨格は平面性が高い π 共役系分子であり、強力な π - π 相互作用による一次元的な会合を誘起できる構造として期待できる。さらに、第 1 章で紹介したように、特徴的な性質として AIE 特性を有する。この分子骨格は、解離した状態では蛍光をほとんど示さず、会合状態で強い蛍光を示す。このため、Th4 とは逆の光化学的特性を発現すると期待される。

ペプチド鎖は Fmoc 法や Boc 法として知られるように、保護アミノ酸同士のアミノ基とカルボキシル基との縮合反応による連結と脱保護による反応点の露出の繰り返しによって、効率的に合成する手法が確立されている。また主鎖のアミド結合は水素結合形成点として、分子の一次元的な会合を誘起するために有効な構造である。さらに側鎖にはそれぞれのアミノ酸残基に由来する置換基があり、疎水性相互作用の形成点や水素結合形成点、塩橋（静電的相互作用）などの様々な分子間相互作用点を導入することができる。このため、様々な性質の超分子ゲル化剤を系統的に合成していくことが可能である。特に側鎖の親水性に関しては、Kyte-Doolittle の疎水性指標や Hoop-Woods 指標の形で既に数値化されているため^{2-9), 2-10)}、ゲル形成能や自己修復特性と分子構造との相関について、これら指標と照らし合わせて評価することができる。

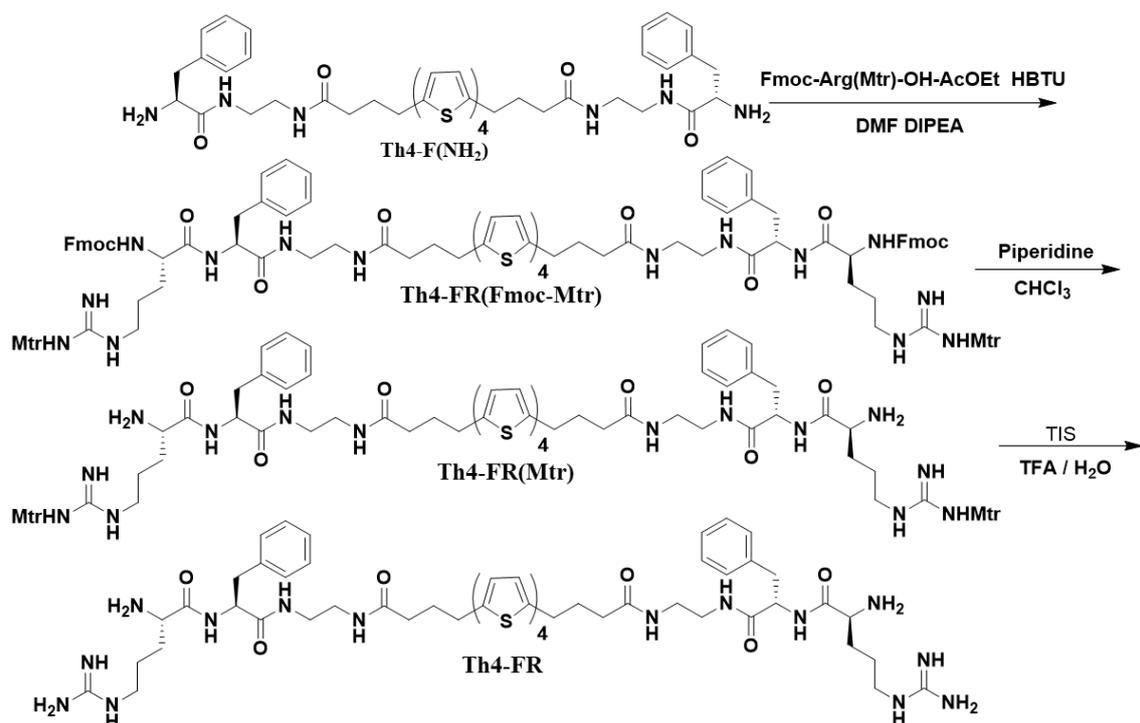
本研究では、ジペプチド配列の 1 残基目に、既報²⁻¹¹⁾でヒドロゲル化能の向上に寄与すると報告されているフェニルアラニンを導入し、2 残基目に種々のアミノ酸を導入することで、一連の Th4 型双頭型分子を合成した。これらの分子の全体合成スキームを Scheme 1~10 に示し、各段階の実験操作と結果については、章末の「2-6. 合成項」に記す。最終化合物の前駆体に当たる、フェニルアラニン導入 π 共役系分子 (Th4-F(NH₂), OPV-F(NH₂)) を合成し、2 残基目のアミノ酸の種類を変更することで、一連のゲル化剤候補分子を合成した。



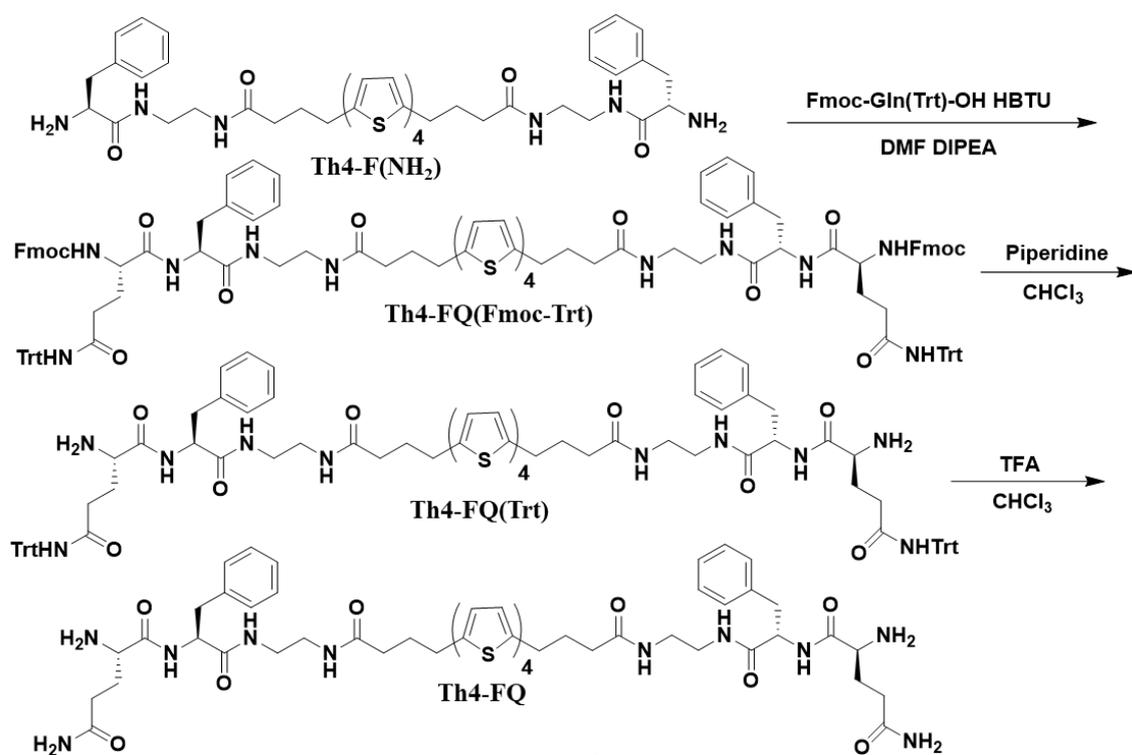
Scheme 1. Th4-F(NH₂)の合成スキーム。



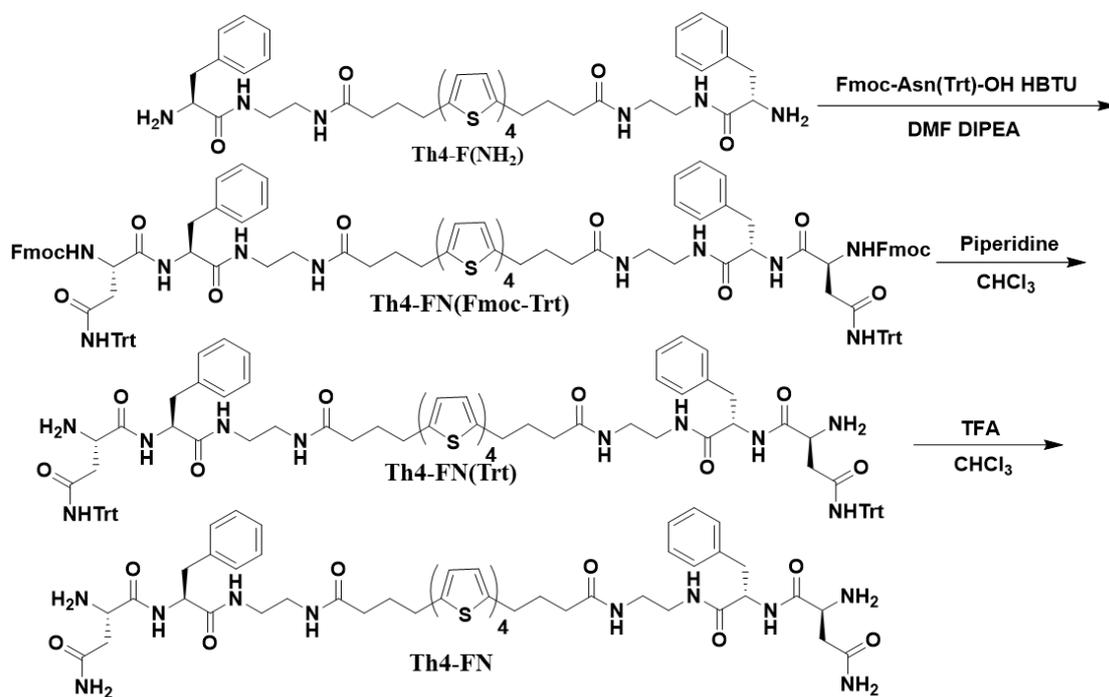
Scheme 2. Th4-FKの合成スキーム。



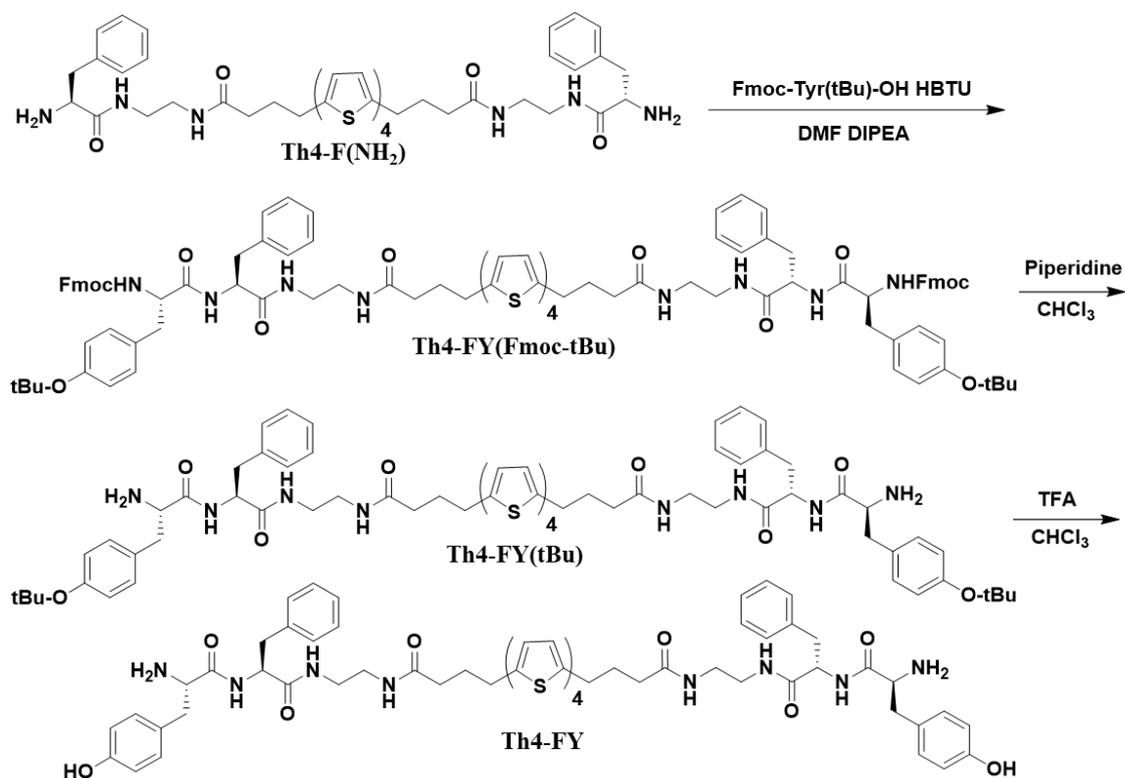
Scheme 3. Th4-FR の合成スキーム。



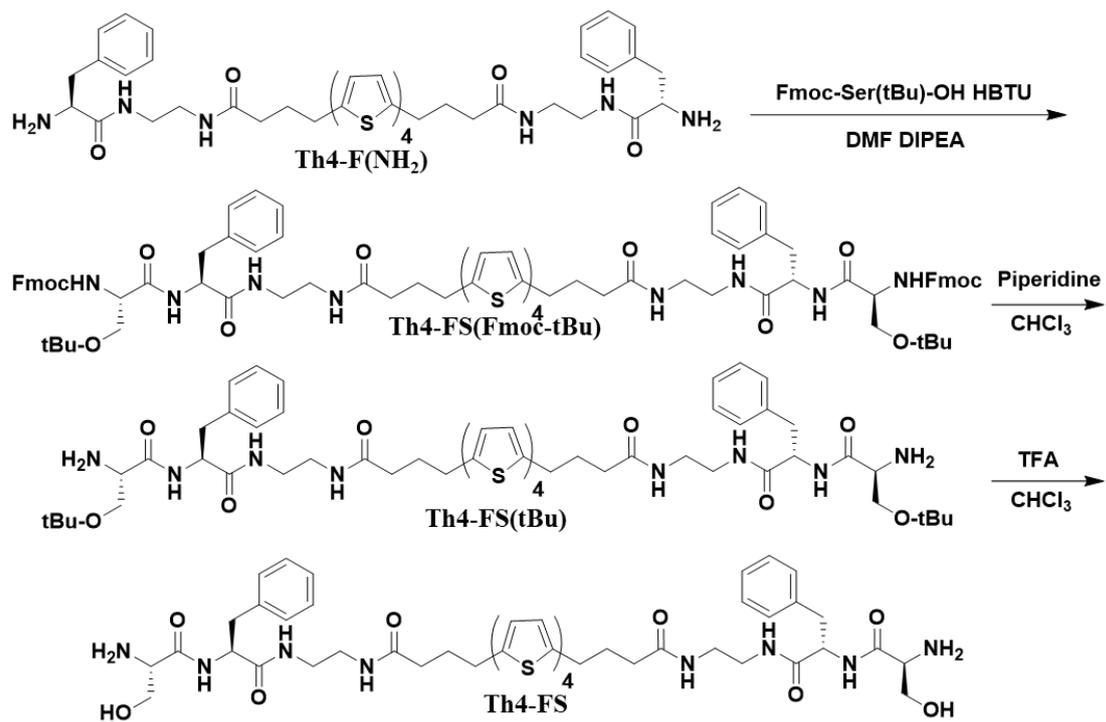
Scheme 4. Th4-FQ の合成スキーム。



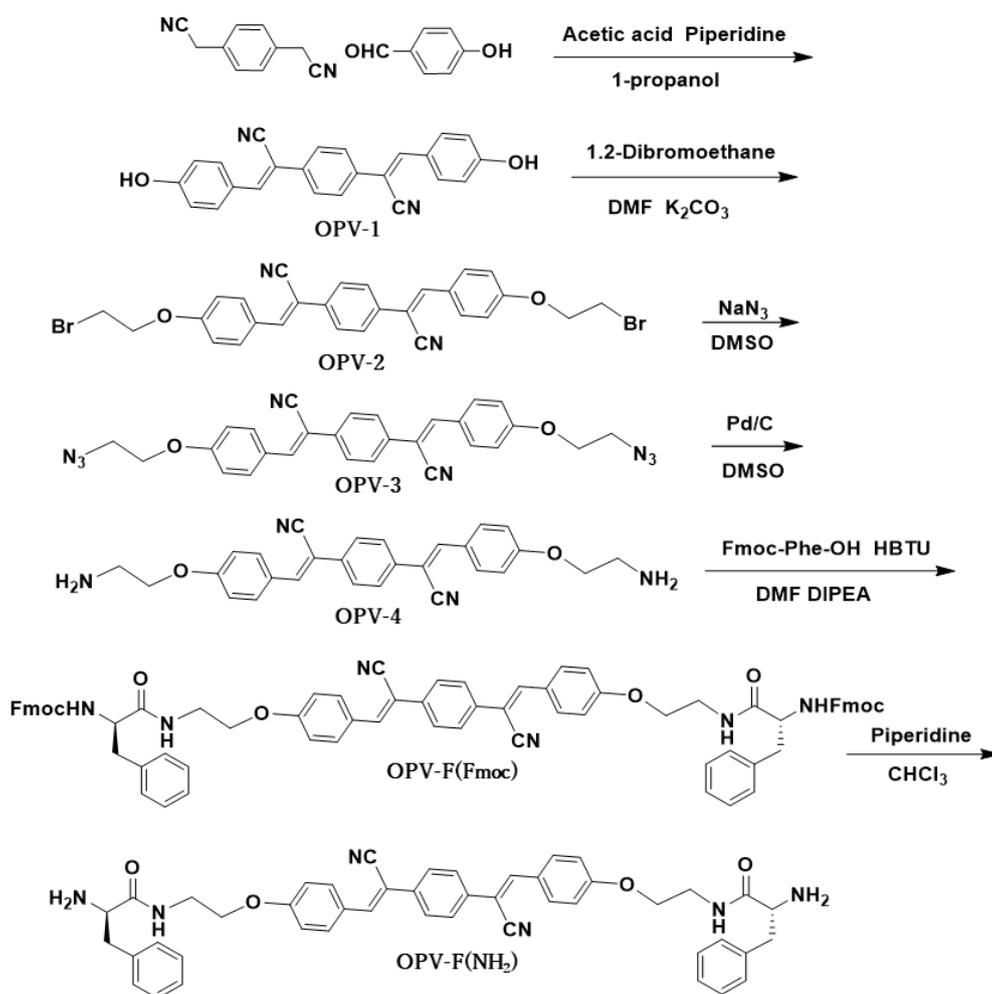
Scheme 5. Th4-FN の合成スキーム。



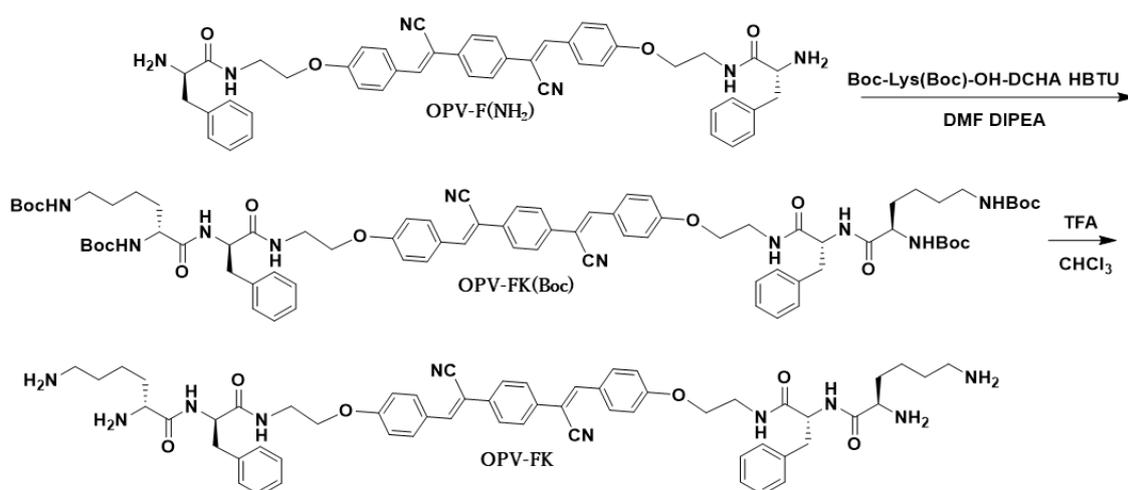
Scheme 6. Th4-FY の合成スキーム。



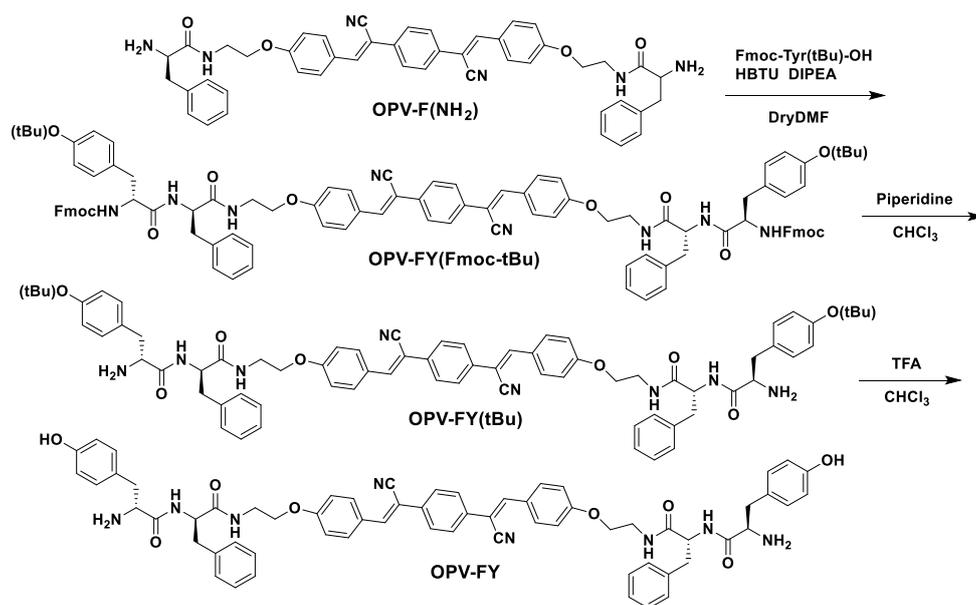
Scheme 7. Th4-FS の合成スキーム。



Scheme 8. OPV-F(NH₂)の合成スキーム。



Scheme 9. OPV-FKの合成スキーム。



Scheme 10. OPV-FY の合成スキーム。

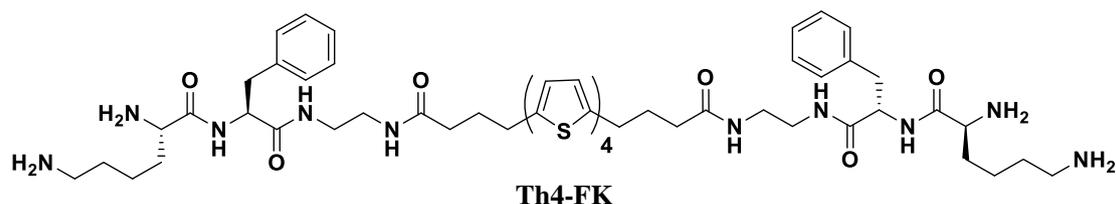
2-2. Th4 型超分子ゲル化剤候補分子のゲル化試験

Th4 型化合物 Th4-FK、Th4-FR、Th4-FQ、Th4-FN、Th4-FS、Th4-FY について、ゲル化実験を行った。いずれも構造の両末端にカチオン性の置換基を複数有する構造になっている。そのため、pH を変化させていくことで、構造内に存在する置換基の pKa に基づいたプロトン化、脱プロトン化を誘導することができ、それに伴って化合物の荷電状態と水溶性を調節することができる。このことから、適切な pH 条件に調整することで、ヒドロゲルが形成されると期待できる。具体的な実験操作を以下に示す。

Th4 型化合物 2 mg を逆浸透水 200 μ L に分散させた。そこで溶解しなかったサンプルは 1 M 塩酸を用いて pH 2 前後にして化合物を溶解させた。その後、1 M と 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を徐々に上げつつ混合溶液の状態を確認し、ヒドロゲルの形成を評価した。サンプル混合物を含むバイアル管を反転倒立させても、サンプルがバイアル管上部にとどまり、流落することがないものをゲルと判定した（倒立法）。

以下に、各分子のゲル化実験結果を分子毎に示す。

2-2-1. Th4-FK のゲル化実験



Th4-FK について pH 変化に伴う溶液の状態変化を検討した(Figure 2-5)。pH 3 から pH 9 までは完全に溶解していたが、pH 9.5~pH 10 にかけて透明なゲルを形成した。さらに pH を上昇させたところ pH 11 以上の高 pH 条件では、分子の凝集がさらに促進され、沈殿が生じた。この pH 変化に伴う **Th4-FK** 溶液の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、pH 4.6 から pH 7.2 にかけてスペクトルの急激な短波長シフトが観測され、pH 7.2 から pH 9.7 にかけてわずかに短波長シフトした(Figure 2-6)。この吸収帯の短波長シフトは **Th4** 骨格が H 会合体を形成したことを示すスペクトルの変化であることが報告されており²⁻¹²⁾、**Th4-FK** ゲルの形成には **Th4** 骨格の H 会合体形成に伴う π スタッキングが駆動力として作用していることが示された。

pH 9.6 の条件で形成した **Th4-FK** ヒドロゲルを凍結乾燥することで、キセロゲルとして回収した。得られたキセロゲルの SEM 観察を行った結果(Figure 2-7)、繊維状の会合体がネットワークを形成していることが確認できた。繊維の直径は $1 \mu\text{m}$ 以上であり、**Th4-FK** からなる繊維が束なって 1 本の繊維状構造体を形成後、それが絡み合うことでゲルを形成したことが示唆された。

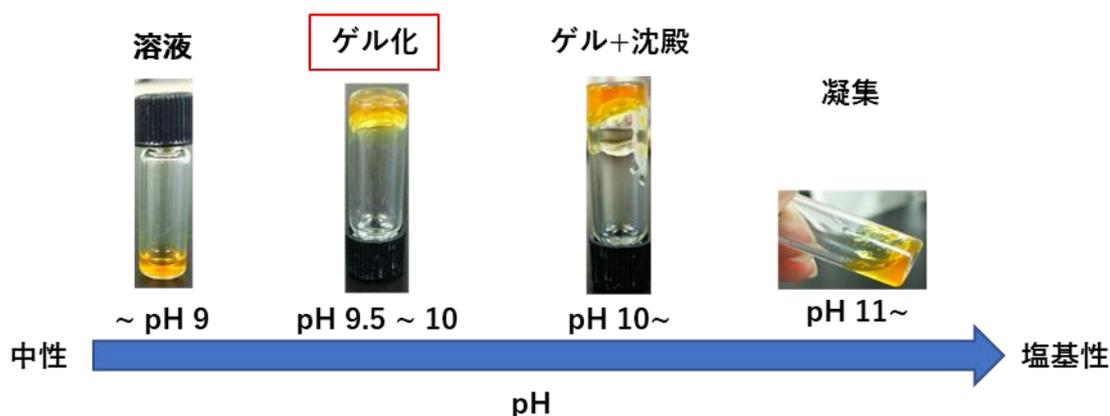


Figure 2-5. pH 変化に伴う **Th4-FK** 水溶液の状態変化。
[**Th4-FK**] = 8.8 mM (1.0 wt%) .

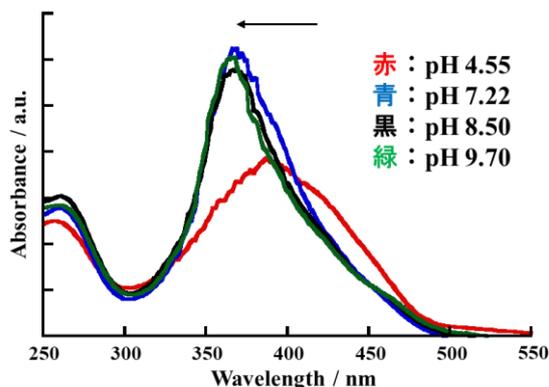


Figure 2-6. pH 変化に伴う Th4-FK 溶液が示す紫外可視吸収スペクトル変化。
[Th4-FK] = 8.8 mM (1.0 wt%) .

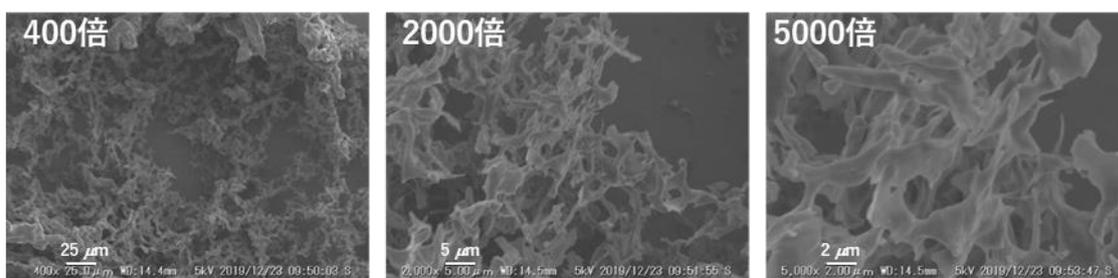
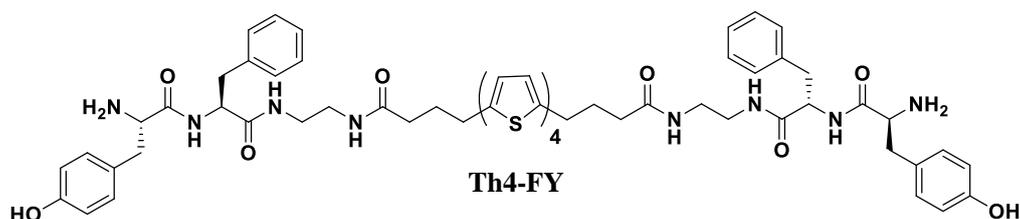


Figure 2-7. Th4-FK が pH 9.6 で形成したヒドロゲルのキセロゲルの SEM 観察像。
[Th4-FK] = 8.8 mM (1.0 wt%) .

2-2-2. Th4-FY のゲル化実験



Th4-FY について pH 変化に伴う溶液の状態変化を検討した(Figure 2-8)。pH 2 ~ 4 の条件では完全に溶解していたが、pH 4 ~ 5 の条件では常温では懸濁し、加熱することで溶解したものの、放冷すると懸濁液に戻った。この時、粘度の上昇は確認できなかった。pH 5 以上の条件では加熱しても懸濁状態が維持されており、さらに中性条件よりも高 pH 条件では、Th4-FY は完全に沈殿し、水溶液部分には Th4-FY 由来の着色が全く見られなかった。このような条件では、加熱・放冷の操作を行っても、ゲル化するには至らず、沈殿が形成した。この沈殿は密度が低く、綿状に近いようなものだった。SEM 観察の結果(Figure 2-9)、

凝集体が繋がって一次的に伸びていったような構造体を確認できたことから **Th4-FY** を繊維状に会合させることはできたが、**Th4-FY** の親水性が足りず、ヒドロゲルを形成するために必要な三次元ネットワークを構築することができなかったと考えられる。**Th4-FK** がアミノ基を4つ有するのに対して、**Th4-FY** はアミノ基を2つとフェノール水酸基を2つ有する化合物であるため、**Th4-FK** と比べると水溶性に劣る分子と言える。その結果、ゲル形成に必要な三次元的ネットワーク形成ではなく、より強い凝集に伴う沈殿の形成に終わったものと考えられる。

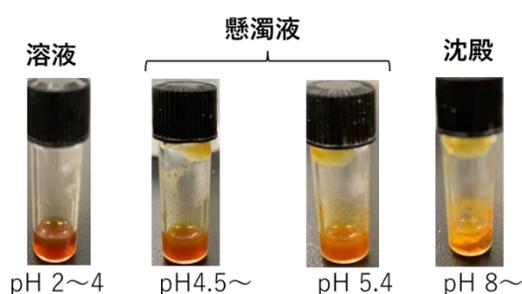


Figure 2-8. pH 変化に伴う **Th4-FY** 水溶液の状態変化。

[**Th4-FY**] = 8.3 mM, (1.0 wt%) .

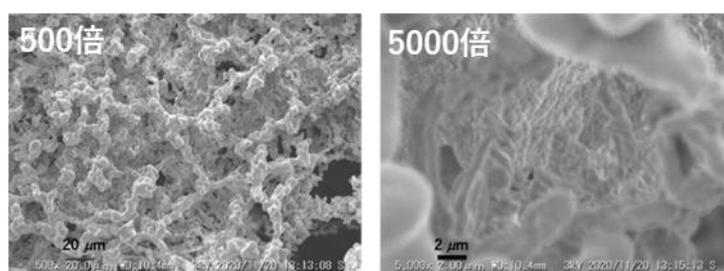
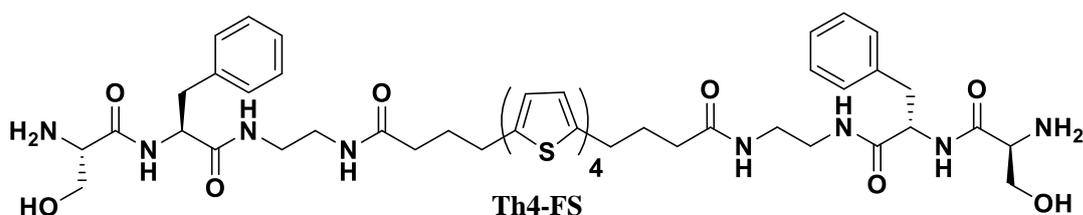


Figure 2-9. **Th4-FY** が pH 8 で形成した会合体の SEM 観察像。

[**Th4-FY**] = 8.3 mM (1.0%) .

2-2-3. **Th4-FS** のゲル化実験



Th4-FS について pH 変化に伴う溶液の状態変化を検討した(Figure 2-10)。**Th4-FS** は **Th4-FY** とほとんど同様の pH 領域で溶解、懸濁、沈殿の状態になり、ゲル化するには至ら

なかった。**Th4-FS** も pH を上昇させていく過程で粘性の上昇は確認できなかった。pH 8 の条件で形成した沈殿の見目は綿状であった。この沈殿について SEM 観察を行った結果 (Figure 2-11)、部分的に凝集体が一次元的に伸びている構造体が確認できたものの、ほとんどが強く凝集した構造体であった。**Th4-FY** と同様、**Th4-FS** の親水性が足りず、ヒドロゲルを形成するために必要な三次元ネットワークを構築することができず、沈殿を形成したと考えられる。

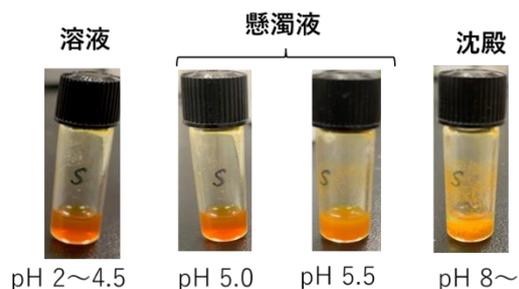


Figure 2-10. pH 変化に伴う **Th4-FS** 水溶液の状態変化。

[**Th4-FS**] = 9.5 mM (1.0 wt%) .

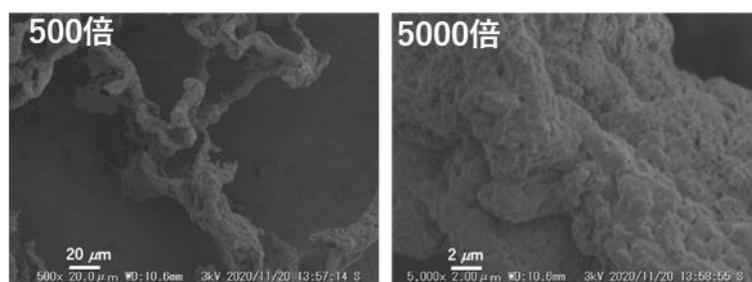
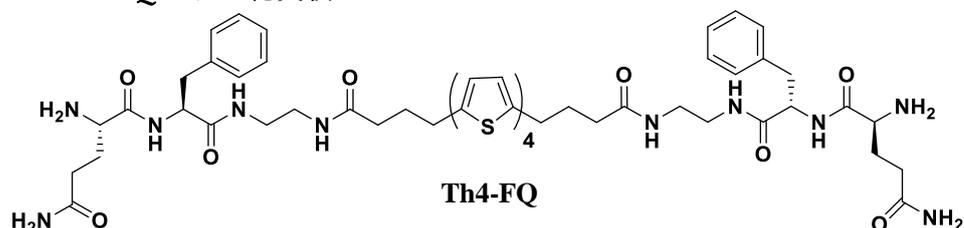


Figure 2-11. **Th4-FS** が pH 8 で形成した会合体の SEM 観察像。

[**Th4-FS**] = 9.5 mM (1.0 wt%) .

2-2-4. **Th4-FQ** のゲル化実験



Th4-FQ について pH 変化に伴う溶液の状態変化を検討した (Figure 2-12)。**Th4-FQ** は pH 1.9 ~ 4 の条件で完全に溶解した。ここから pH を徐々に上昇させていくと、pH 4.8 付近で粘性が上昇し、懸濁液を形成した。さらに高い pH 条件では、**Th4-FQ** は完全に沈殿し、水溶液部分には **Th4-FQ** 由来の着色が全く見られなかった。この沈殿は加熱しても溶解しなかった。pH 4.8 の条件で得られた懸濁液の SEM 観察を行った結果 (Figure 2-13)、全体的

に凝集した構造体が確認できた。凝集体の表面を観察してもはっきりとした繊維は確認できなかった。さらに凝集が進んで得られる沈殿は粒子に近い形をしていることから、側鎖のアミド基は水素結合の形成に強く寄与するものの、分子の親水性を向上させるには不十分な置換基であったため、**Th4-FQ** が分子間で強力に会合し強く凝集したと考えられる。

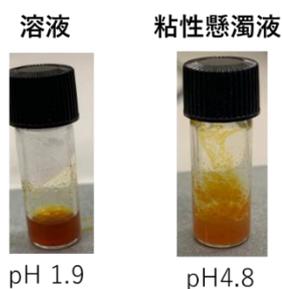


Figure 2-12. pH 変化に伴う **Th4-FQ** 水溶液の状態変化。

[**Th4-FQ**] = 8.8 mM (1.0 wt%) .

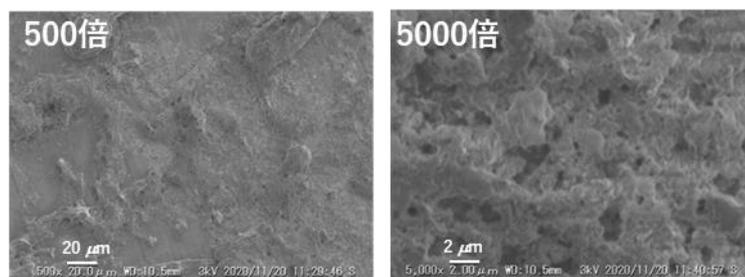
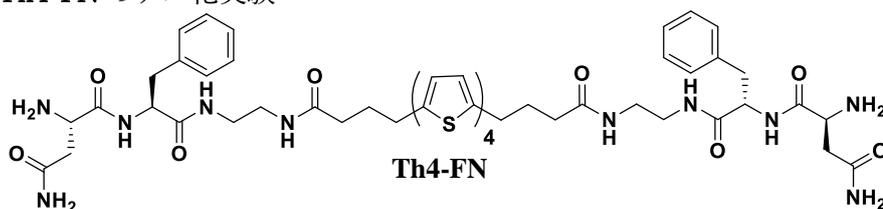


Figure 2-13. **Th4-FQ** が pH 4.8 で形成した会合体の SEM 観察像。

[**Th4-FQ**] = 8.8 mM (1.0 wt%) .

2-2-5. **Th4-FN** のゲル化実験



Th4-FN について pH 変化に伴う溶液の状態変化を検討した(Figure 2-14)。**Th4-FN** は pH 3.0~5 付近の条件で完全に溶解した。ここから pH を徐々に上昇させていくと、pH 5.8 付近で懸濁液を形成した。さらに高い pH 条件では **Th4-FN** は徐々に沈殿し、加熱しても溶解しなかった。pH 5.8 の条件で得られた懸濁液の SEM 観察を行った結果(Figure 2-15)、全体的に凝集体が確認できた。この凝集体の表面を観察するとより微細な構造体が集まって凝集体を形成していることが確認できた。**Th4-FN** も **Th4-FQ** と同様にアミド基を有した化合物であるため、水溶性の不足と分子間の水素結合の形成などの要因で、ヒドロゲルを

形成するには至らなかったと考えられる。

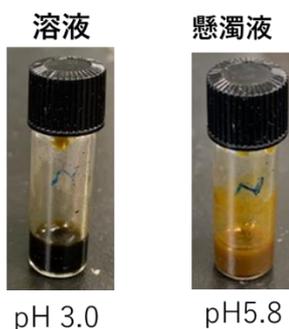


Figure 2-14. pH 変化に伴う Th4-FN 水溶液の状態変化。

[Th4-FN] = 9.0 mM (1.0 wt%) .

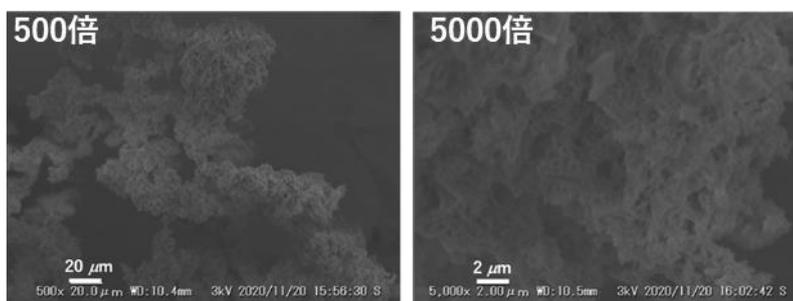
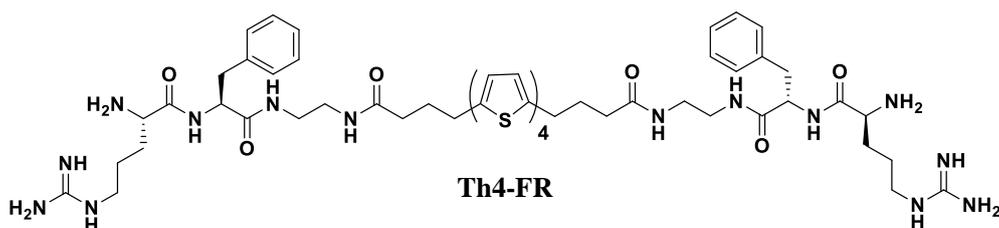


Figure 2-15. Th4-FN が pH 5.8 で形成した会合体の SEM 観察像。

[Th4-FN] = 9.0 mM (1.0 wt%) .

2-2-6. Th4-FR のゲル化実験



Th4-FR について pH 変化に伴う溶液の状態変化を検討した(Figure 2-16)。Th4-FR は pH 1.6~12 までの条件で完全に溶解した。ここから pH を徐々に上昇させていくと、pH 12 以上の条件では懸濁液を形成し、pH 13 の条件で強く凝集した粒子状の沈殿を形成した。この pH 条件では Th4-FR は完全には沈殿せず、水溶液部分に Th4-FR 由来の着色が残っていた。この沈殿は加熱しても溶解しなかった。pH 13 の条件で得られた沈殿の SEM 観察を行った結果(Figure 2-17)、部分的にシート状に近い構造体が見られた。Th4-FR が有するグアニジノ基の pKa が 12.48、主鎖のアミノ基の pKa が 9.04 であると報告されていることから¹³⁾、pH 12 以下の条件では主鎖のアミノ基が脱プロトン化していても、側鎖のグアニジノ基

がカチオン化して電荷を有していることで **Th4-FR** は親水性を保っており溶液状態を維持したと考えられる。しかし、pH 13 を境にグアニジノ基が脱プロトン化し始めることで静電反発が解消され、**Th4-FR** の急激な会合が進行したことが考えられ、これが pH 12~13 へ条件が変化する過程で強く凝集した沈殿が生じた原因であると考えられる。

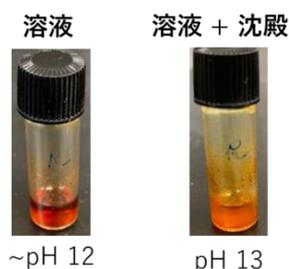


Figure 2-16. pH 変化に伴う **Th4-FR** 水溶液の状態変化。

[**Th4-FR**] = 8.4 mM (1.0 wt%) .

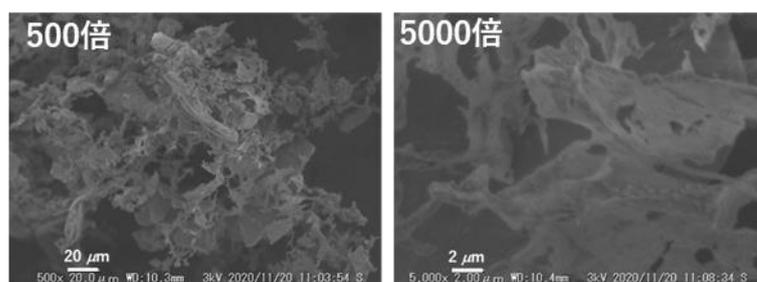


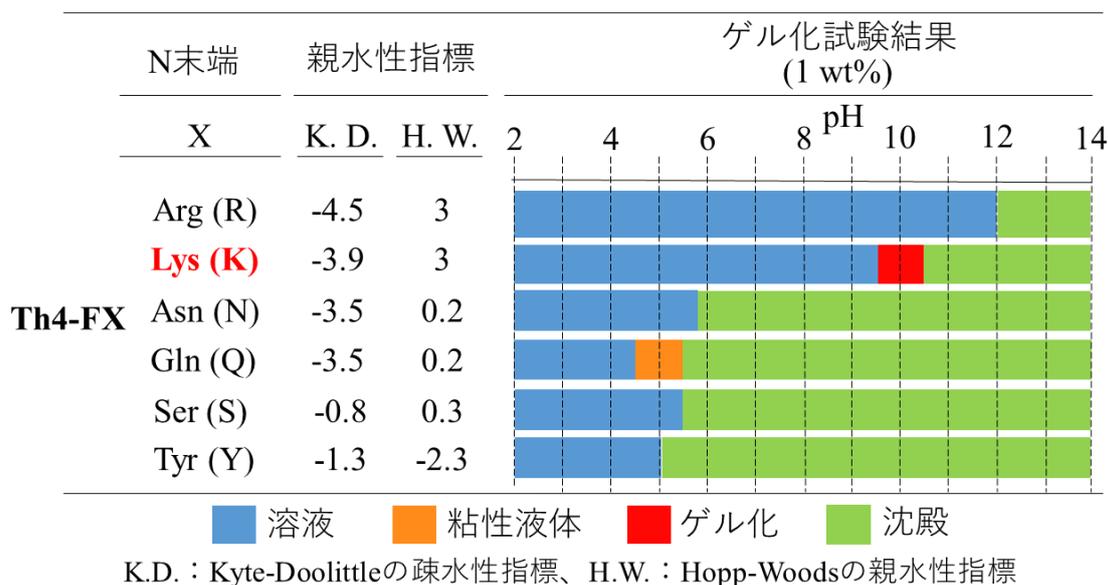
Figure 2-17. **Th4-FR** が pH 13 で形成した会合体の SEM 観察像。

[**Th4-FR**] = 8.4 mM (1.0 wt%) .

2-2-7. **Th4** 型超分子ゲル化剤候補分子のゲル化試験結果に関する考察

Th4 型化合物のゲル化試験の結果を Table 2-1 にまとめた²⁻¹⁴⁾。本実験で検討した分子のうち、ヒドロゲル化能を示したのは、**Th4-FK** のみであり、ゲルを形成できる条件は pH 9.5~10 の限られた pH 領域であることが確認された。**Th4-FK** が有するリジン残基は主鎖のアミノ基の pKa が 8.95、側鎖のアミノ基の pKa は 10.53 であることから、pKa の範囲に大きな差はないことが分かる。**Th4-FK** は主鎖と側鎖が示す pKa の中間に当たる pH 領域で主鎖と側鎖のアミノ基が脱プロトン化される過程で、適度に親水性と疎水性のバランスがとれた状態となり、ヒドロゲルを形成したと考えられる。

Table 2-1. Th4 型化合物のゲル化実験結果。



Th4-FKと同様にテトラカチオン型であり、Kyte-Doolittleの疎水性指標やHopp-Woodsの親水性指標でもTh4-FKと大きな差はないTh4-FRは、実験したpH領域ではほぼ同様の状態変化を示したが、ヒドロゲルを形成するには至らなかった。Th4-FRが有するグアニジノ基のpKaが12.48、主鎖のアミノ基のpKaが9.04であると報告されていることから、Th4-FKと比べて主鎖と側鎖のpKaの差が大きいことが分かる。pH 12以下の条件では溶液状態であったことから、側鎖のグアニジノ基がカチオン化してグアニウムカチオンの状態であることで一定の親水性を保っており溶解していたと考えられる。しかし、pH 13を境にグアニウムカチオンはグアニジノ基に戻るため、水溶性と分子間の静電反発を著しく失うとともに、優秀な水素結合置換基であるグアニジノ基の出現によってTh4-FRの凝集力が著しく向上したと考えられる。

Th4-FQ、Th4-FN、は主鎖にアミノ基、側鎖にはアミド基を有しているジカチオン型の分子であり、QとNはKyte-Doolittleの疎水性指標やHopp-Woodsの親水性指標をもとにすると、KやRより親水性が低いと評価されているため、これら化合物は、Th4-FKやTh4-FRより水溶性が低いと予想される。Th4-FQとTh4-FNはpH 2～4付近の強酸性条件下では末端に存在するアンモニウムカチオンの効果によりある程度の水溶性を確保するものの、これらの脱プロトン化による電荷の消失が進行することで水溶性がさらに低下したと考えられる。それに加えて、アミド基は分子間の水素結合形成点として優秀な構造であることから、分子の凝集を促進してしまい、最終的に強く凝集した会合体を形成したと考えられる。これらのことから、側鎖上のアミド基は、親水性の向上には貢献できず、さらに分子間

の水素結合の形成を積極的に促進するため、**Th4** 骨格に対してヒドロゲル化能を付与する構造としては相応しくないと考えられる。

Th4-FY、**Th4-FS** は主鎖にアミノ基、側鎖にはフェノール性水酸基もしくは水酸基を有しているジカチオン型の分子であり、**Y** と **S** は Kyte-Doolittle の疎水性指標や Hopp-Woods の親水性指標をもとにすると、本研究で検討した **Th4** 型化合物の中で最も親水性が低い一群である。実験結果からも明らかなように、これらの分子はヒドロゲル化剤を構築するためには不適切な構造を持つと示唆された。

これらのゲル化試験の結果から、**Th4** 骨格のような疎水性の強い π 共役系骨格を有するユニットにヒドロゲル化能を付与するためには、末端には電荷を有するような親水性の高いアミノ酸残基を導入することが有効である傾向が見られた。その中でもテトラカチオン型であれば、**Th4-FK** のように分子上に存在する塩基性置換基の pKa が近く、pH の変化に伴って分子が有する電荷の状態を制御しやすい構造が特に有効であると考えられる。一方、ジカチオン型では **Th4** 骨格にヒドロゲル化能を付与することができなかったものの、**Th4-FY** が一次元会合体を形成した。この結果は、側鎖に電荷は有しないものの側鎖同士の分子間相互作用が適切な強さである側鎖を導入することで、ヒドロゲルを形成する可能性があることを示唆している。

以上のように、本実験で検討した分子設計では、分子のヒドロゲル化能をペプチド鎖上のアミノ酸残基の親水性・疎水性パラメータからある程度予想することが可能であることが明らかとなった。一方で、親水性・疎水性パラメータでは同等の値を示すアミノ酸であっても、その置換基の pH 特性および分子間相互作用形成能はそれぞれ異なる。よって、これらの置換基の特性を十分に理解して、適切なペプチド配列を提案することで、本実験の戦略に基づいた合理的な超分子ヒドロゲル化剤の開発が可能になると考えられる。

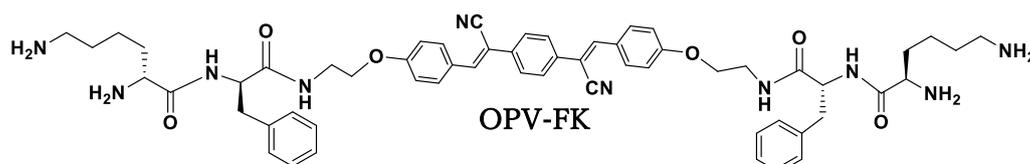
2-3. OPV 型化合物のゲル化試験

Th4 型化合物のゲル化試験から得られた知見が、様々な π 共役系骨格に適用可能できれば、新たな特性を持つ超分子ヒドロゲル化剤の設計に大きく貢献すると期待される。そこで、**OPV** 型化合物を採用して、**Th4** 型化合物のゲル化試験から得られた知見に基づく、論理的なゲル化剤設計を計画した。**OPV** 骨格に導入するジペプチド構造は、**Th4** 骨格にヒドロゲル化能を付与した **FK** 配列と **Th4** 骨格では一次元会合体を形成した **FY** 配列を採用した。また、第 1 章や 2-1 項で示したように **OPV** 骨格は AIE 特性を有するため、ヒドロゲルの形成過程において蛍光スペクトルを測定することで、ゲル化剤の会合状態をより詳細に検討できることを期待した。具体的な実験操作を以下に示す。

OPV 型化合物 2 mg を逆浸透水 200 μ L に分散させた。そこで溶解しなかったサンプルは 1 M 塩酸を用いて pH 2 前後にして化合物を溶解させた。その後、1 M と 0.1 M 水酸化ナト

リウム水溶液を用いて pH を徐々に上げつつ混合溶液の状態を確認し、ヒドロゲルの形成を倒立法により評価した。

2-3-1. OPV-FK のゲル化実験



OPV-FK について pH 変化に伴う溶液の状態変化を検討した(Figure 2-18)。OPV-FK は pH 3 ~ 9 の条件で溶液だった。pH を徐々に上昇させていくと、pH 9 以上の条件では少し粘性が生じ、pH 9.7 でわずかに濁ったヒドロゲルを形成した。pH 9.7 の条件下で OPV-FK 水溶液の蛍光スペクトルを測定したところ、時間経過に伴い蛍光強度が徐々に上昇し、目視でヒドロゲルの形成が確認できた 15 分後以降は蛍光強度の上昇は頭打ちした(Figure 2-19a, b)。OPV 骨格は第 1 章でも示したように AIE 特性を有しており、ヒドロゲルの形成に伴い OPV 骨格の蛍光が強力になったことから、OPV-FK のヒドロゲル形成には OPV 骨格の π - π スタッキングが駆動力として作用していることが示された。pH 9.7 の条件で形成した OPV-FK ヒドロゲルを凍結乾燥によってキセロゲルとして回収した。得られたキセロゲルの SEM 観察を行った結果(Figure 2-20)、OPV-FK は繊維状会合体を形成し、三次元ネットワーク構造を構築していることが確認できた。繊維の直径は $5 \mu\text{m}$ 以上であり、OPV-FK 会合体からなる繊維が束なってより太い繊維状構造体を形成し、それらが絡み合うことでゲルを形成したことが示唆された。以上のように、フェニルアラニンーリジンという同じジペプチド配列を導入することで、想定通り OPV 骨格にヒドロゲル化能を付与することに成功した。

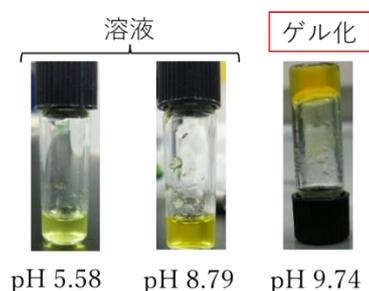


Figure 2-18. pH 変化に伴う OPV-FK 水溶液の状態変化。
[OPV-FK] = 10 mM (1.0 wt%) .

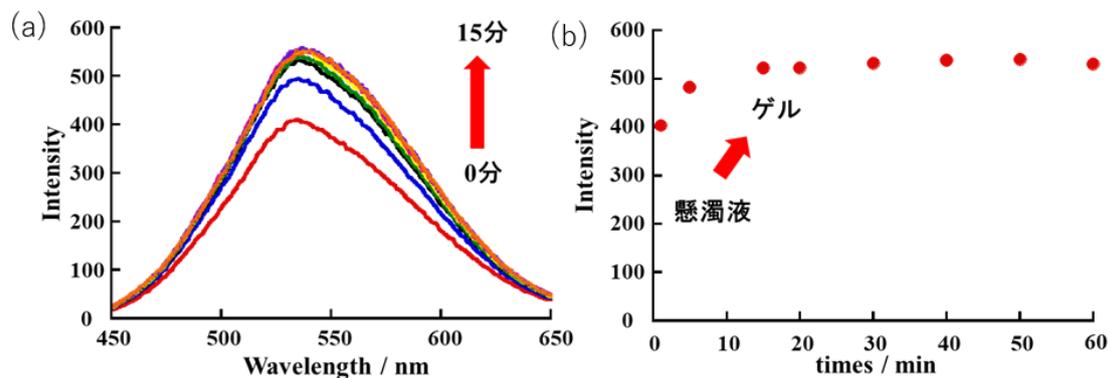


Figure 2-19. (a) OPV-FK のゲル形成過程における蛍光スペクトルの時間変化。(b) 時間経過に伴う蛍光強度のプロット($\lambda = 530 \text{ nm}$)。[OPV-FK] = 10 mM (1.0 wt%) , pH 9.7, $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ 。

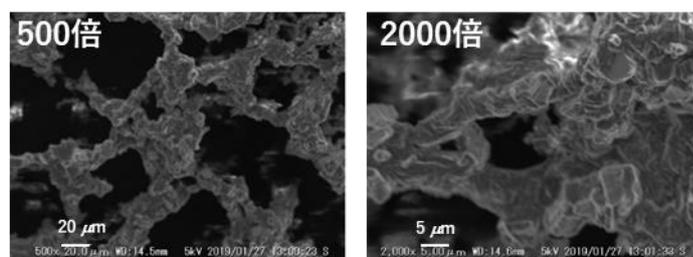
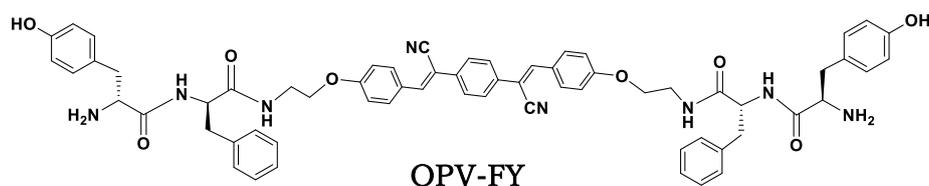


Figure 2-20. OPV-FK が pH 9.7 で形成したヒドロゲルのキセロゲルの SEM 観察像。[OPV-FK] = 10 mM (1.0 wt%) .

2-3-2. OPV-FY のゲル化実験



OPV-FY について pH 変化に伴う溶液の状態変化を検討した(Figure 2-21)。OPV-FY は pH 1.6 の条件で加熱すると溶液となり、室温で放冷すると僅かに懸濁した。この懸濁液を 60 分程度放置すると、かなり脆いヒドロゲルが形成した。その後、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を添加し pH を徐々に上昇させて、加熱・放冷を繰り返して、ヒドロゲルの形成を確認していくと、pH 3.93 までは脆くもゲルを形成していた。しかしそれ以上 pH が高い条件では懸濁が強くなり加熱しても溶解は確認できず、放冷してもヒドロゲルを形成しなかった。pH 6 以上の条件になると、OPV-FY は完全に沈殿し、水溶液部分には OPV-FY 由来の着色は全く見られなかった。pH 3.9 の条件下で OPV-FY 水溶液の蛍光スペクトルを測定し

たところ、時間経過に伴い蛍光強度が徐々に上昇し、ヒドロゲルを形成した 80 分後以降は蛍光強度の上昇は頭打ちした(Figure 2-22a, b)。OPV-FK と同様にヒドロゲルの形成に伴い OPV 骨格の蛍光が強力になったことから、OPV-FY のヒドロゲル形成には OPV 骨格の π - π スタッキングが駆動力として作用していることが示された。

pH 3.9 の条件で形成した OPV-FY ヒドロゲルを凍結乾燥によってキセロゲルとして回収した。得られたキセロゲルの SEM 観察の結果(Figure 2-23)、フィルム状に近い繊維状会合体がネットワークを形成していることが確認できた。このように、OPV-FY は pH 2~4 の条件でゲルを形成するが、同じジペプチド配列を持つ Th4-FY はこの pH 条件下では完全に溶解することを確認している (2-2-2 項)。以上の結果から、本研究で用いた双頭型両親媒性分子にヒドロゲル化能を付与する中心骨格として、Th4 骨格より OPV 骨格が優位であることが明らかとなった。

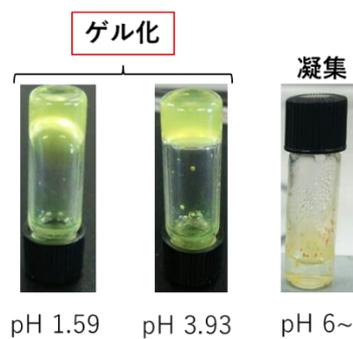


Figure 2-21. pH 変化に伴う OPV-FY 水溶液の状態変化。

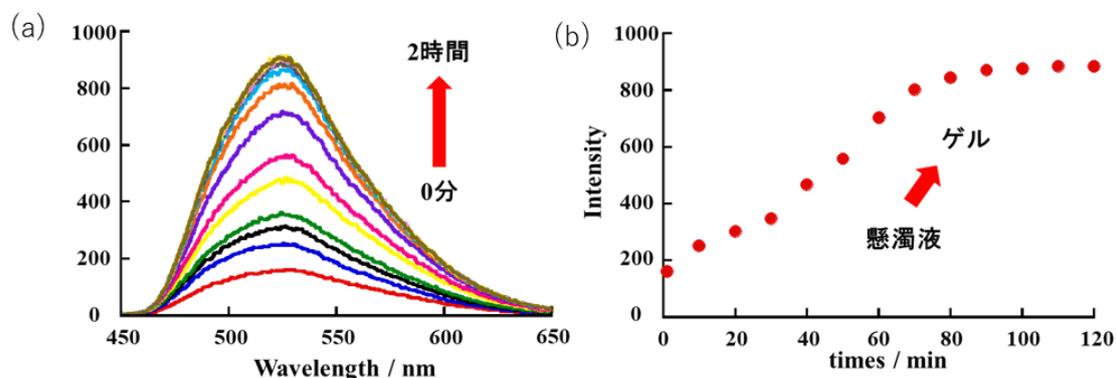


Figure 2-22. (a) OPV-FY のゲル形成過程における蛍光スペクトルの時間変化。(b) 時間経過に伴う蛍光強度変化($\lambda = 530$ nm)。[OPV-FY] = 9.3 mM (1.0 wt%) , pH 3.9, $\lambda_{ex} = 320$ nm。

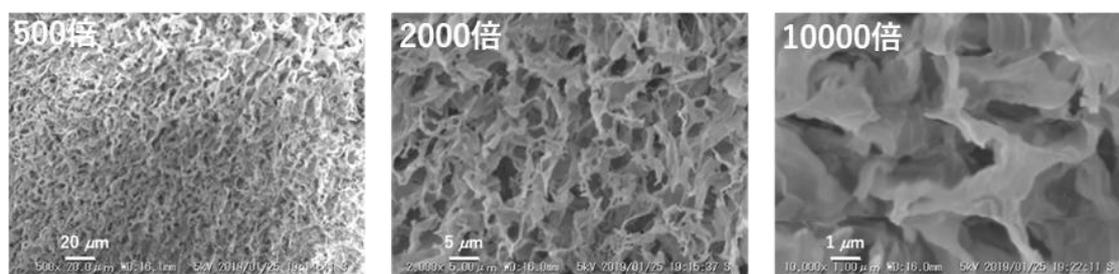


Figure 2-23. OPV-FY が pH 3.9 で形成したヒドロゲルのキセロゲルの SEM 観察像。
[OPV-FY] = 9.3 mM (1.0 wt%) .

OPV-FK と OPV-FY は両方ともヒドロゲルを形成することが確認された。このことから、Th4 型でのヒドロゲル化試験の結果から得られた知見は、OPV 骨格に対しても有効に活用できることが示された。OPV-FK と Th4-FK は同じ pH 条件(pH 9.5~)でヒドロゲルを形成したことから、フェニルアラニン-リジンというジペプチド配列は 2 残基という最も短く合成が容易なペプチドユニットであるにも関わらず、 π 共役系骨格のような疎水性が高く会合力が強い分子骨格に対してヒドロゲル化能を付与する優位な配列であることが明らかとなった。OPV-FK、OPV-FY および Th4-FK、Th4-FY が示したゲル形成能の違いから、以下の 3 つの結論を導き出すことができた。

- 1) フェニルアラニン-チロシン、フェニルアラニン-リジンいずれの配列も、水中における π 共役系骨格の一次元会合体形成に寄与する。
- 2) フェニルアラニン-リジンはフェニルアラニン-チロシンと比べて、ヒドロゲル形成能を付与する効果が高い。
- 3) OPV 骨格は Th4 骨格に比べて、ヒドロゲル形成能を持つ双頭型両親媒性分子を設計する上でより優位な骨格である。

2-4. Th4 型および OPV 型超分子ヒドロゲルの物理特性の評価と自己修復能の発現・制御

ここまでのゲル化試験の結果、Th4-FK、OPV-FK および OPV-FY がヒドロゲルを形成することが確認された。続いてこれらのゲルの物理特性、および自己修復能を評価し、さらに共通のペプチド配列を持つ Th4-FK、OPV-FK の混合による自己修復能の制御について検討を行った。

2-4-1. Th4-FK ゲルの動的粘弾性の評価

Th4-FK ゲルの物理的特性と内部構造との相関に関する知見を得るために、動的粘弾性測定を、以下の手順に従って行った。

10 mg の Th4-FK を 1 mL の逆浸透水に添加し、超音波照射により攪拌した。その後 1 M NaOH 水溶液と 0.1 M NaOH 水溶液を用いて pH 9.6 まで変化させてゲルを調製した。こ

のゲルをドライヤーで加熱することでゾル状態にし、そこから 200~300 μL を素早くレオメーターのステージ上に移した後、直ちにサンプルギャップ 1.0 mm、10 rad/s の条件でひずみ掃引測定を行うことで、ゲルのひずみ耐性を評価した(Figure 2-24a)。この結果を参考に、ゲルが崩壊しないギリギリのひずみ量である 0.5% の条件に固定して、周波数 1 Hz、昇温速度 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の条件で貯蔵弾性率 (G')、損失弾性率 (G'') の温度依存性を測定した(Figure 2-24b)。

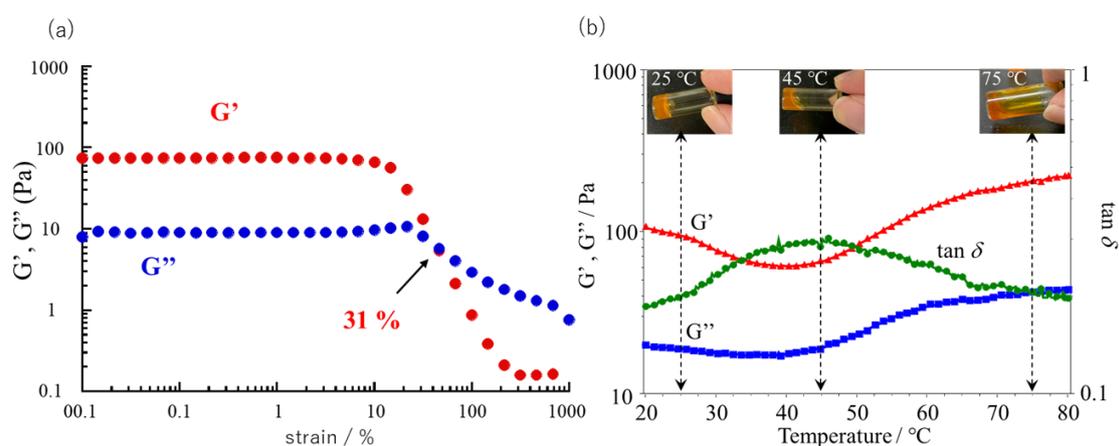


Figure 2-24. (a)Th4-FK ゲルのひずみ依存性。(b) Th4-FK ゲルの温度依存性。
[Th4-FK] = 8.8 mM, 1.0 wt%.

貯蔵弾性率(G')は、物体に対して働く外力とひずみにより生じたエネルギーのうち物体の内部に貯蔵される成分であり、物質の弾性(固体)的な性質を示す。そのため、本系ではゲルとしての寄与度に関する指標となる。一方、損失弾性率(G'')は物体の外部へ拡散する成分であり、物質の粘性(液体)的な性質を示すため、本実験では粘性液体としての寄与度に関する指標となる。つまり、 $G' > G''$ の場合、その系はゲルであることを示し、 $G' < G''$ である場合、一見ゲル状に見えたとしても粘性液体であることを示す。 $\tan \delta$ は G' と G'' の比(G''/G')を表しているの、 $\tan \delta < 1$ の時はゲル状態、 $\tan \delta > 1$ の時はゾル状態であることを示す。

Th4-FK のひずみ依存性を測定したところ、ひずみをほとんどかけていない初期の状態では G' が約 80 Pa、 G'' が約 8 Pa であることから、Th4-FK が比較的強度が低いゲルであることが示された。ひずみの値を大きくしていくとひずみ値が 4%(回転角 0.09 $^{\circ}$ に相当するひずみ)付近から G' の値が減少し始め、ひずみ値が 31%(0.71 $^{\circ}$)付近になったときに G' と G'' の大小が反転し、ゾル状態へと相転移したことが確認された(Figure 2-24a)。

Th4-FK ゲルの温度依存性について評価した。動的粘弾性測定結果(Figure 2-24b)から、25~45 $^{\circ}\text{C}$ の温度領域での温度上昇では、 G' と G'' の値がいずれも減少しゲルの強度が低下していることが示された。ここで、 $G' > G''$ の状態が維持されているものの、 $\tan \delta$ の値が上昇し

たことから、このゲルの内部構造として溶液状態の寄与度が高まっていることが明らかとなった。見た目の評価でも、この温度領域ではわずかに流動性の上昇が確認されており、これに相関する結果である。

一方、45°C以上の昇温過程では、一転して G' と G'' の値が上昇し、 $\tan\delta$ の値が減少した。このことから、50°C以上の温度で加熱することで**Th4-FK**ゲルが徐々に強固になっていくことが示唆された。見た目の評価では、**Th4-FK**は熱応答的に収縮する性質が確認されているので、この動的粘弾性測定の結果は、熱収縮過程におけるゲルの外部構造変化を反映したものと考えられる。

2-4-2. OPV-FK ゲルの動的粘弾性の評価

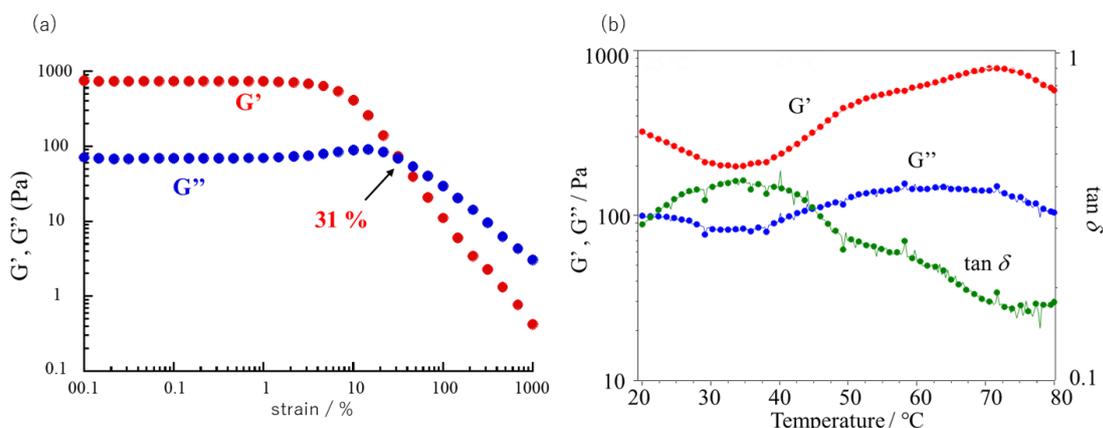


Figure 2-25. (a)OPV-FK ゲルのひずみ依存性。(b) OPV-FK ゲルの温度依存性。
[OPV-FK] = 10 mM, (1.0 wt%) .

OPV-FK ゲルについても、**Th4-FK** と同じ手順 (2-4-1 項) で動的粘弾性測定を行った。OPV-FK ゲルのひずみ依存性測定結果(Figure 2-25a)より、ひずみをほとんどかけていない初期の状態では G' が約 700 Pa、 G'' が約 70Pa であることから、**Th4-FK**ゲルより強度が高いゲルであることが示された。ひずみの値を大きくしていくとひずみ値が 0.2%(0.046°)付近から G' の値が減少し始め、**Th4-FK**ゲルと同様にひずみ値が 31%(0.71°)付近になったときに G' と G'' の大小が反転し、ゾル状態へと相転移したことが確認された。

OPV-FK ゲルの温度依存性について評価した。見た目の変化では、25°Cでは安定したゲルを形成しているものの、温度を徐々に上昇させていくと 40°Cになるとゲル状態ではあるものの、物理的な強度が僅かに弱くなることが確認されている。25°C~35°Cにかけての動的粘弾性測定結果(Figure 2-25b)から、 G' と G'' の値のいずれもが減少しゲルの強度が低下していることが示された。ここで、 $\tan\delta$ の値が上昇したことから、このゲルの内部構造として溶液状態の寄与度が高まっていることが明らかとなった。

一方、40°C以上の昇温過程では、一転して G' と G'' の値が上昇し、 $\tan\delta$ の値が減少した。このことから、50°C以上の温度で加熱することで**OPV-FK**ゲルが徐々に強固になっていく

ことが示唆された。

これらの結果から、**OPV-FK** ゲルの方が物理的な強度が高いという違いはあるものの、**Th4-FK** ゲルと **OPV-FK** ゲルは類似点の多い性質であることが示唆された。

2-4-3. 単独ヒドロゲルの自己修復能調査

Th4-FK、**OPV-FK** および **OPV-FY** のヒドロゲルを物理的に破碎し、それぞれのヒドロゲルが単独で示す自己修復特性について、以下の実験操作に従って評価した。

バイアル瓶に **Th4-FK**、**OPV-FK** または **OPV-FY** の水溶液(1.0 wt%)をそれぞれ調製し、pH 条件に調整することで各サンプルをヒドロゲル化させた。これらのゲルを激しく振盪することで強い衝撃を加えてヒドロゲルが粘性を示さなくなるまで破碎した。その後、各ゾルを静置し、一定時間後に倒立法により、ヒドロゲルの再形成を確認した。

OPV-FY ゲルは物理粉碎後に懸濁液を形成したが、静置後も状態変化は見られず、自己修復能は発現しなかった。それに対し、共通のジペプチド配列 **FK** を有する **Th4-FK** と **OPV-FK** は、時間経過に伴い粘性が上昇していき、最終的には破碎前と変わらない強度を持つヒドロゲルを再形成した。興味深いことに、これらの目視で確認された自己修復時間は **OPV-FK** ゲルが 20 分であったのに対し、**Th4-FK** ゲルが 2 時間と大きな差を示した。

以上の結果は、ジペプチド配列 **FK** はヒドロゲル形成能の付与にも貢献するだけでなく、自己修復能の発現に重要な配列であることを示している。また、自己修復能を示す超分子ゲル化剤の分子構造として、**OPV** 骨格の優位性が明らかとなった。

2-4-4. **Th4-FK/OPV-FK** 複合ゲルによる自己修復特性の制御

同じジペプチド配列を有する **Th4-FK** と **OPV-FK** は、ほぼ同様の pH 条件でヒドロゲルを形成するが、自己修復能が大きく異なることが示された。ここでこの 2 分子の構造的相関性とそれぞれのゲルに対する動的粘弾性の類似性に注目し、これらのゲル化剤を混合した複合ゲルを調製することで、自己修復能を制御できるのではないかと着想した。まず、以下に具体的な実験手順に従って、状態変化の評価を目視によって行った。

Th4-FK と **OPV-FK** の逆浸透水溶液(1.0 wt%)をそれぞれ調製し、それぞれの水溶液の混合比率を連続的に変えながら、全量が 200 μL になるように混合し、**Th4-FK** に対する **OPV-FK** の含有量が異なる **Th4-FK/OPV-FK** 溶液を作製した。得られたサンプルに 1 M 水酸化ナトリウム水溶液と 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH を 9.6 付近に調整することで **Th4-FK/OPV-FK** 複合ゲルを調製した。これらのゲルを激しく浸透することで強い衝撃を加えてヒドロゲルが粘性を示さなくなるまで破碎した。その後、各ゾルを静置し、一定時間後に倒立法により、ヒドロゲルの再形成を確認した。また **OPV-FK** 含有量が 0%~10%の複合ゲルについては、凍結乾燥によって得たキセロゲルの SEM 観察を行った。

Table 2-2 に各複合ゲルの調製条件と見た目の自己修復時間をまとめ、Figure 2-26 に **OPV-FK** 含有率と自己修復時間の関係を示すプロットを示す。

Table 2-2. Th4-FK/OPV-FK 複合ゲル(1.0 wt%)の実験条件と自己修復時間。

	Th4-FK aq.	OPV-FK aq.	濃度	pH	OPV-FK 含有率	修復時間
1	200 μL	0 μL	1.0 wt%	9.71	0%	120 min
2	194 μL	6 μL	1.0 wt%	9.58	3%	120 min
3	190 μL	10 μL	1.0 wt%	9.68	5%	120 min
4	186 μL	14 μL	1.0 wt%	9.55	7%	90 min
5	180 μL	20 μL	1.0 wt%	9.65	10%	20 min
6	160 μL	40 μL	1.0 wt%	9.62	20%	20 min
7	100 μL	100 μL	1.0 wt%	9.58	50%	20 min
8	0 μL	200 μL	1.0 wt%	9.64	100%	20 min

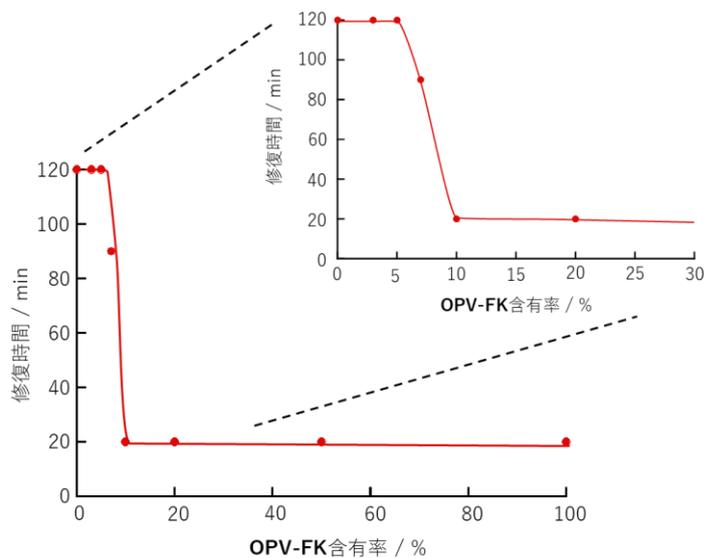


Figure 2-26. Th4-FK/OPV-FK 複合ゲルの自己修復時間と OPV-FK 含有率の関係。
Th4-FK/OPV-FK ゲル : 1.0 wt%。

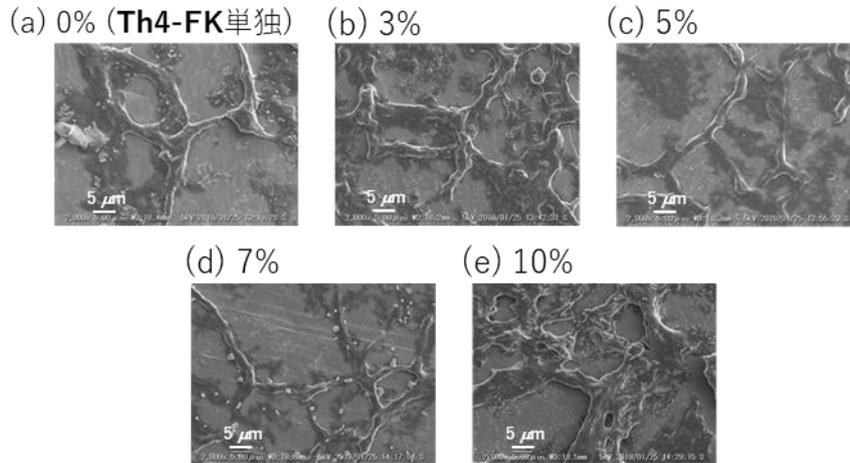


Figure 2-27. 各 OPV-FK 含有率に調製された Th4-FK/OPV-FK 複合ゲルのキセロゲルの SEM 観察像。 Th4-FK/OPV-FK ゲル：1.0 wt%。

Table 2-2 に示すように Th4-FK/OPV-FK 複合ゲルはいずれの OPV-FK 含有量であっても自己修復能を持つヒドロゲルの形成が確認された。興味深いことに、OPV-FK 含有量が 7% から修復速度が急速に加速し、OPV-FK 含有量が 10% になると OPV-FK 単独に匹敵する自己修復速度を示した (Figure 2-26)。この結果から、Th4-FK/OPV-FK 複合ゲルの自己修復特性は少数成分である OPV-FK が支配的に制御していることが示唆された。急激に自己修復速度が変化した OPV-FK 含有率 0% ~ 10% のサンプルの SEM 観察を行ったところ、すべてのサンプルで直径 $1\ \mu\text{m}$ 以上の繊維状構造体が観察され (Figure 2-27)、形態学的には明確な差は見られなかった。

この Th4-FK/OPV-FK 複合ゲルの自己修復特性について、動的粘弾測定により詳細に検討した。実験手順を以下に示す。

16 mg の Th4-FK を含む水溶液 1.6 mL に、4 mg の OPV-FK を含む水溶液 0.4 mL を加え、超音波照射により攪拌した。その後 1 M NaOH 水溶液と 0.1 M NaOH 水溶液を用いて pH 9.71 まで変化させてゲルを調製した。このゲルをドライヤーで加熱することでゾル状態にし、それを 1 mL のテルモシリンジで $500\ \mu\text{L}$ 取り、その状態のまま静置することでテルモシリンジ中でゲルを調製した。レオメーターのステージ上にテルモシリンジからゲル $400\ \mu\text{L}$ をゆっくりと押し出したのち、直ぐにサンプルギャップ 0.5 mm、ひずみ 0.1% の条件下で、 G' 、 G'' の経時変化を 20 分間測定した。その後、step-strain 法により、各ゲルが示す自己修復過程を調査した。ひずみ値は静置過程を 0.01%、ゲル破碎過程を 1000% にそれぞれ設定し、周波数 1 Hz の条件で測定した。

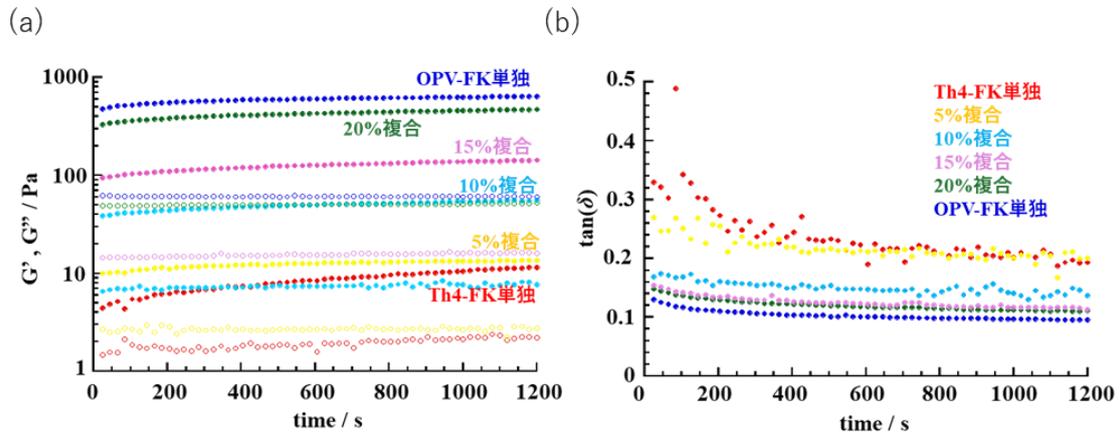


Figure 2-28. 各ヒドロゲルのひずみ 0.1%での経時変化。(a) G' の変化。(b) $\tan\delta$ の変化。[Th4-FK/OPV-FK] = 1.0 wt%。

20 分間の G' と G'' の経時変化(Figure 2-28)を調査したところ、ステージ上にゲルを乗せてから 20 分後には変化がほぼ頭打ちとなり、 $G' > G''$ となっているため、いずれのサンプルもゲル状態であることが確認された(Figure 2-28a)。 $\tan\delta$ の値より、ヒドロゲルの内部状態は **OPV-FK** 含量が多いほど、ゲルとしての物性の貢献度が高いことが示され、**OPV-FK** が 5%含まれている複合ゲルは **Th4-FK** ゲルとほぼ同等の状態であることが示唆された(Figure 2-28b)。さらにゲルの形成過程に着目すると、**Th4-FK** はなだらかにゲルが熟成されていくのに対し、**OPV-FK** は初期からほぼ熟成したゲル状態を形成していることがわかり、**OPV-FK** が 10%含まれるだけで、**OPV-FK** 単独とほぼ同様の形成過程を示すことが確認された。この結果は、複合ゲルの目視での自己修復特性の評価で示した **OPV-FK** が 10%含まれるだけで自己修復速度が急激に加速したという結果(Figure 2-26)と高い相関性があると考えられる。

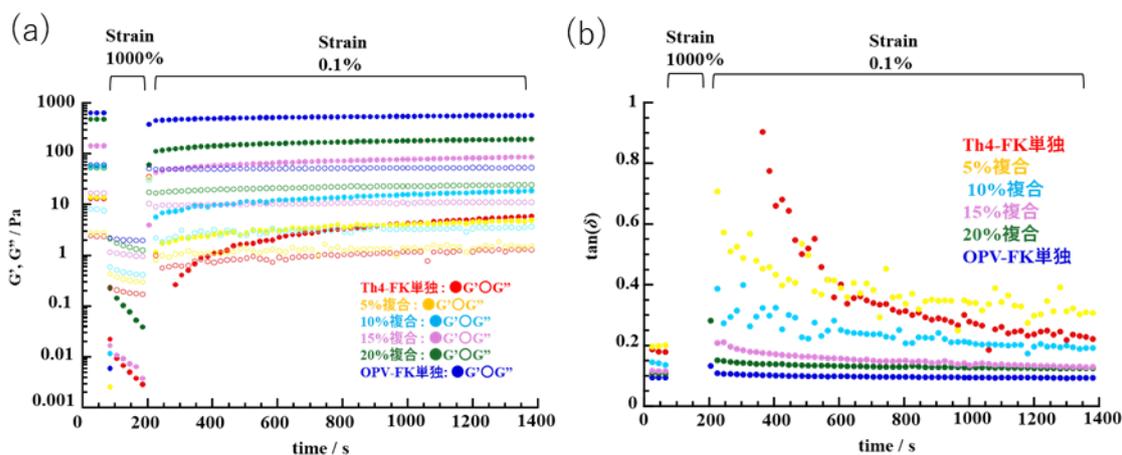


Figure 2-29. Step-strain 法による各ヒドロゲルの自己修復過程。(a) G' と G'' の変化。(b) $\tan\delta$ の変化。[Th4-FK/OPV-FK] = 1.0 wt%。

Step-strain 法により、各ヒドロゲルの状態の変化を調査したところ、いずれのヒドロゲルも一度破碎され、その後自己修復している過程が確認された(Figure 2-29a)。修復過程の $\tan\delta$ に注目すると OPV-FK 含量が少ない複合ゲルほど $\tan\delta$ の値が徐々に減少していく過程が確認できた。OPV-FK 含量が 15% 以上になると、修復過程に入った直後に、破碎前のゲルに匹敵する $\tan\delta$ の値にまで回復し、これらゲルの状態は破碎後速やかに修復され、その後徐々に物理強度が上昇していく過程が確認された(Figure 2-29b)。以上の動的粘弾性測定結果からも、Th4-FK/OPV-FK 複合ゲルの自己修復特性は少数成分である OPV-FK が支配的に制御していることが示された。

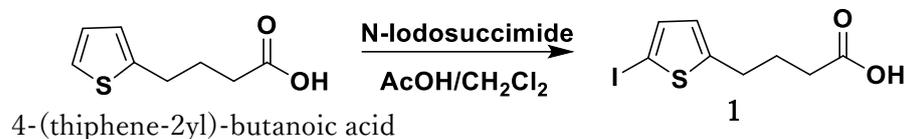
2-5. 結論

中心骨格に Th4 骨格もしくは、OPV 骨格を持ち、その両末端に種々のペプチドを導入した一連の双頭型分子を合成し、それらのヒドロゲル形成能や自己修復特性を比較・検討した。その結果、Th4-FK がヒドロゲルを形成したことから、Th4 骨格のような疎水性の強い π 共役系骨格を有するユニットにヒドロゲル化能を付与するためには、末端に電荷を有するような親水性の高いアミノ酸残基を導入することが有効である傾向が見られた。Th4 型化合物で得られた知見をもとに OPV 型分子である OPV-FK と OPV-FY を合成し、ヒドロゲル化能を調査したところ、想定通りこれら 2 分子はヒドロゲルを形成した。さらに OPV-FY は自己修復能を示さないヒドロゲルを形成するのに対し、共通のジペプチド構造を有する Th4-FK と OPV-FK は、いずれも自己修復能を持つヒドロゲルを形成した。これらの自己修復時間は OPV-FK ゲルが 20 分、Th4-FK ゲルが 2 時間と大きな差を示すことから、ジペプチド配列 FK は自己修復能の発現に重要であり、OPV 骨格が自己修復特性を有する超分

子ゲル化剤の構造として優位であることが明らかとなった。**OPV-FK** と **Th4-FK** が類似の構造を持つため、これら 2 つを混合した複合ゲルの自己修復性について評価した。興味深いことに **OPV-FK** が数%含まれるだけで、ゲルの自己修復時間が著しく短縮されることが明らかになった。このことから、類似の分子構造を持ち、異なる自己修復能を持つ分子を混合することで、自己修復能を調節出来ることが確認された。このように、分子構造の相同性を元に、異なる自己修復能を示す分子を混合することで、その自己修復能が単純な足し合わせではなく、より精密に制御できることが示された。この成果は、状況によって必要とされる自己修復能を、分子設計と分子の混合という手順から精密に実現するための有益な知見であると言える。

2-6. 合成項

2-6-1. 化合物 1 の合成



Scheme 11. 化合物 1 の合成スキーム。

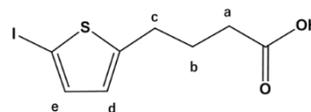
Table 2-6-1. 化合物 1 の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
4-(thiophene-2yl) butanoic acid	170.04	6.48 g	38 mmol	1.0 eq.
<i>N</i> -Iodosuccinimide	224.98	9.46 g	42 mmol	1.1 eq.
酢酸	60.05	90 mL		
乾燥ジクロロメタン	84.93	90 mL		

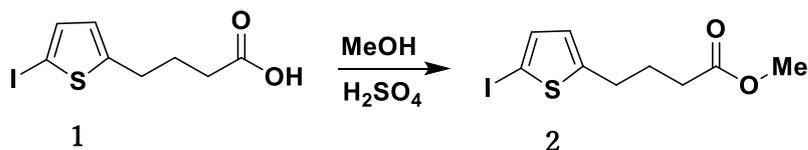
500 mL 三口フラスコに *N*-Iodosuccinimide (9.46 g, 42 mmol, 1.1 eq.) を加え、アルゴン置換し、そこに乾燥ジクロロメタン (90 mL)、4-(thiophene-2yl)-butanoic acid (6.48 g, 38 mmol, 1.0 eq.) を溶解させた酢酸 (90 mL) を加え、再度アルゴン置換し、室温で攪拌した。反応開始から 19 時間後原料の消失を TLC(展開溶媒：酢酸エチル/ヘキサン=3/7、検出：UV) で確認し、反応を終了した。得られた反応溶液に Na₂SO₃ 水溶液を加え 1 回分液操作を行い、有機相を回収した。得られた有機相にトルエンを加えて減圧留去を行い、酢酸の匂いがなくなるまで共沸した。得られた赤色液体をクロロホルムに溶解させ、1 M NaOH 水溶液を加え、2 回分液操作を行った。得られた水相に 6 M 塩酸を加えて、目的物を沈殿として生じさせ、クロロホルムを加えて分液操作によって有機相へ抽出した。得られた有機相を硫酸ナトリウムで脱水し、吸引濾過することで硫酸ナトリウムを濾別、得られた濾液を減圧留去、真空乾燥し、橙色固体を得た。収量：9.01 g 収率：74%。

Table 2-6-2. 化合物 1 の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃ , TMS r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.97	t (7.3)	3.9	4 H	b
2.39	t (7.3)	4.3	4 H	c
2.87	t (7.3)	4.2	4 H	a
6.49	d (3.7)	2.0*	2 H	d
7.04	d (3.7)	2.0	2 H	e



2-6-2. 化合物 2 の合成



Scheme 12. 化合物 2 の合成スキーム。

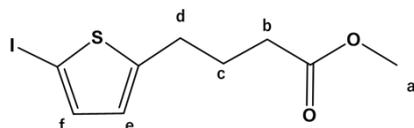
Table 2-6-3. 化合物 2 の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
1	295.94	9.01 g	30 mmol	1.0 eq.
乾燥メタノール	32.04	60 mL		
硫酸	98.08	150 μ L		

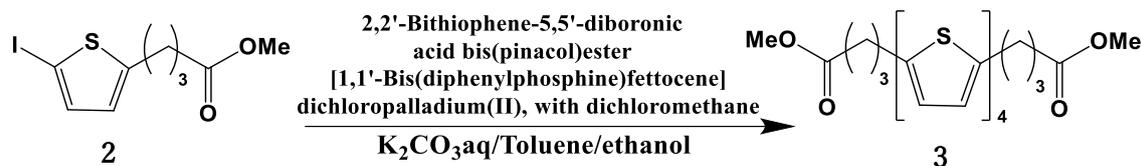
500 mL 三口フラスコに化合物 1 (9.01 g, 30 mmol, 1.0 eq.)を加え、アルゴン置換を行い、メタノール (60 mL)と H₂SO₄(150 μ L)を加え、再度アルゴン置換し、加熱還流した。2 時間後に TLC(展開溶媒：酢酸エチル/ヘキサン = 7/3、検出：UV)で原料の消失を確認し、Na₂CO₃を加えて反応溶液を中和し、減圧留去し、得られた褐色液体にクロロホルムを加えて溶解させ、1 M NaHCO₃水溶液を加えて 1 回分液操作による洗浄を行い、得られた有機相に硫酸ナトリウムを加えて脱水、吸引濾過することで硫酸ナトリウムを濾別して、得られた濾液を減圧留去、真空乾燥して褐色液体を得た。その後シリカゲルクロマトグラフィ(展開溶媒：酢酸エチル/ヘキサン=7/3)で精製し、淡黄色液体を得た。収量 7.70 g 収率 82%。

Table 2-6-4. 化合物 2 の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.82	m	2.4	2 H	c
2.34	t (7.3)	2.2	2 H	d
2.85	t (7.5)	2.2	2 H	b
3.67	s	3.2	3 H	a
6.49	d (3.2)	1.00*	1 H	e
7.04	d (3.7)	1.00	1 H	f



2-6-3. 化合物 3 の合成



Scheme 13. 化合物 3 の合成スキーム。

Table 2-6-5. 化合物 3 の合成条件。

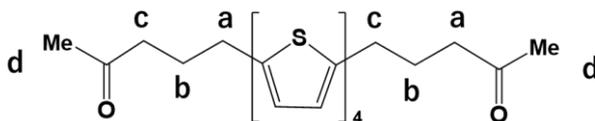
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
2	310.95	2.22 g	7.1 mmol	2.9 eq.
bithiophene bispinacol ester	418.19	990 mg	2.4 mmol	1.0 eq.
pd(dppf)DCM	752.5	301 mg	0.4 mmol	0.17 eq.
K ₂ CO ₃	138.21	2.76 g	20 mmol	8.3 eq.
Toluene	92.14	120 mL		
Ethanol	46.07	30 mL		
H ₂ O	18.01	30 mL		

500 mL 三口フラスコに化合物 2 (2.22 g, 7.1 mmol, 2.9 eq.)を加え、アルゴン置換を行った。その後トルエン (120 mL)、エタノール (30 mL)、K₂CO₃ (2.76 g, 20 mmol, 8.3 eq.)を溶解させた超純水を凍結脱気してフラスコに加え、再度アルゴン置換を行い、Bithiophene bispinacol ester (990 mg, 2.4 mmol, 1.0 eq.)、Pd(dppf)Cl₂ DCM (301 mg, 0.4 mmol, 0.17 eq.)を加えアルゴン置換を行い、室温で攪拌した。反応開始から 1 時間後に原料の消失を TLC(クロロホルム、検出: UV、ヨウ素)で確認でき、さらに 1 時間後に TLC で変化が見られなかったため、反応を停止した。反応溶液から水相を取り除き、沈殿を濾別した。得られたろ液に MgSO₄を加えて脱水し、MgSO₄を濾別し、ろ液を減圧留去、真空乾燥後、カラムクロマトグラフィ(クロロホルム)で精製した。得られた褐色固体を少量の DMF で洗浄することで褐色固体を得た。収量 815 mg 収率 43%。

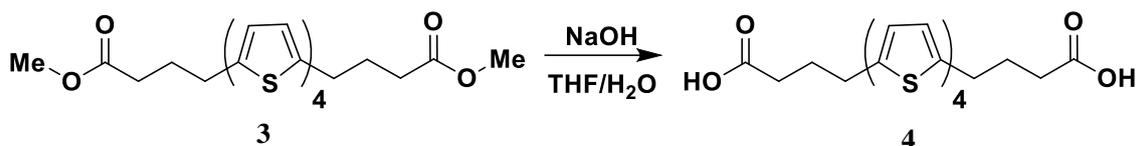
Table 2-6-6. 化合物 3 の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, CDCl ₃ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.83	t (7.3)	4.25	4 H	b
2.28	t (7.5)	4.22	4 h	a
2.80	t (7.3)	3.96	4 H	c
3.69	s	6.22	6 H	d

6.82	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.00-6.99	m	3.83	4 H	
7.04	d (4.1)	1.79	2 H	



2-6-4. 化合物 4 の合成



Scheme 14. 化合物 4 の合成スキーム。

Table 2-6-7. 化合物 4 の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
14-3a	530.73	2.49 g	4.7 mmol	1 eq.
KOH	56.11	1.0 g	18 mmol	
THF	72.11	200 mL		
H ₂ O	18.01	75 mL		

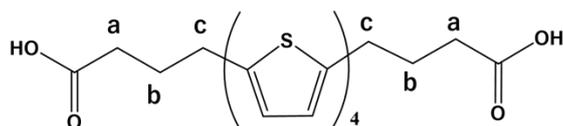
500 mL 三口フラスコに化合物 3 (1.42 g, 2.7 mmol, 1.0 eq.) と THF 200 mL を加え溶解させ、KOH 1.0 g を溶解させた超純水 75 mL (0.2 M KOH 水溶液) を加え、2 相系で反応を行った。反応開始から 25 時間後に TLC(展開溶媒 クロロホルム、検出: UV、ヨウ素) で原料である化合物 3 の消失とテトラチオフェン由来の褐色が THF 相から水相に移っていることを確認して、反応を終了した。反応溶液を減圧留去することで THF を取り除き、得られた溶液に 6 M 塩酸を加えて目的物である化合物 4 を沈殿させ、吸引濾過で濾別し、超純水を上からかけて洗浄し、真空乾燥して黄色の固体を得た。収量 2.49 g 収率 105 %。

※ 固体が一部塊状になり、内側が湿っていたことが確認できている。

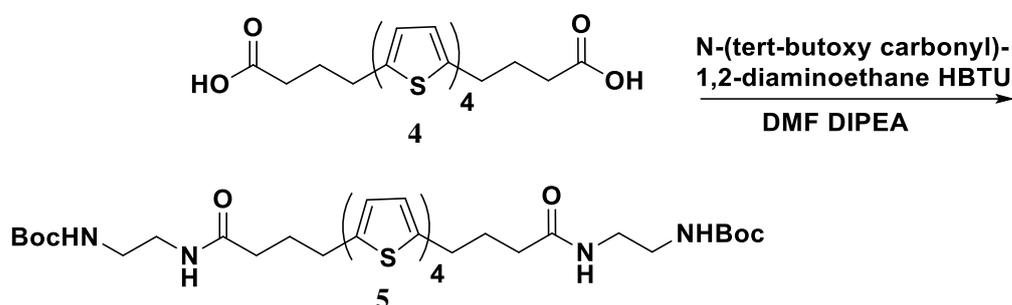
Table 2-6-8. 化合物 4 の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.85	t (7.5)	4.4	4 H	b
2.29	t (7.3)	4.4	4 H	a
2.81	t (7.5)	4.3	4 H	c

6.83	d (3.2)	2.0*	2 H	thiophene
7.15	d (3.7)	2.0	2 H	
7.19	d (3.7)	2.0	2 H	
7.26	d (3.7)	2.0	2 H	



2-6-5. 化合物 5 の合成



Scheme 15. 化合物 5 の合成スキーム。

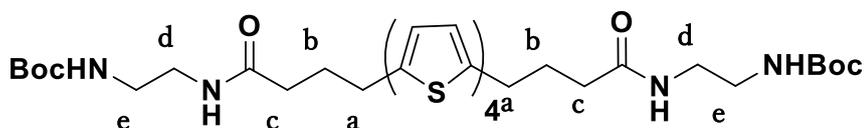
Table 2-6-9. 化合物 5 の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
4	502.73	2.49 g	5.0 mmol	1.0 eq.
N-Boc-1,2-diaminoethane	160.21	2.0 g	12.5 mmol	1.0 eq.
HBTU	379.25	4.7 g	12.5 mmol	1.0 eq.
DIPEA	129.24	10 mL	50 mmol	3.0 eq.
DMF	73.09	100 mL		

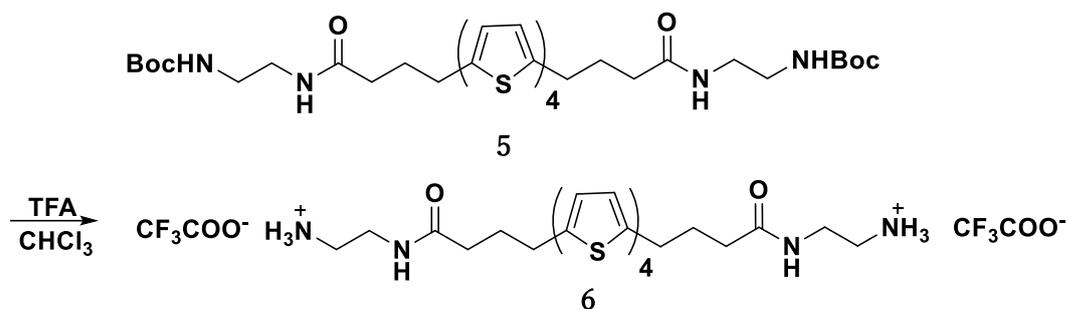
100 mL三口フラスコに化合物 4 (2.49 g, 5 mmol, 1.0 eq.)、*N*-Boc-1,2-diaminoethane (2.0 g, 12.5 mmol, 2.5 eq.)、HBTU (4.7 g, 12.5 mmol, 2.5 eq.)を乾燥 DMF (100 mL)に加え攪拌した。そこに DIPEA (10 mL, 50 mmol, 10 eq.)を加え、室温で攪拌した。反応開始直後は褐色の溶液だったが、3 時間後には黄色沈殿が生じていた。5 時間後 TLC (展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1、検出：UV、ヨウ素)で原料の消失を確認し、反応を終了した。反応溶液に 1 M NaHCO₃水溶液を加え、黄色沈殿を生じさせ、吸引濾過した。濾別した黄色沈殿をイオン交換水で洗浄し、真空乾燥し黄色固体を得た。収量 2.51 g, 収率 63 %。

Table 2-6-10. 化合物 5 の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.40	s	18.40	18 H	boc
1.85-1.93	m	4.14	4 H	a
2.17	t (7.3)	3.96	4 H	b
2.81	t (7.5)	4.24	4 H	c
3.00-3.02	m	2.43	4 H	d
3.13-3.25	m	3.90	4 H	e
6.39	s	1.69	2 H	NH
6.82	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.14-7.19	m	4.00	4 H	
7.26	d (3.7)	1.79	2 H	
7.54	s	1.98	2 H	NH



2-6-6. 化合物 6 の合成



Scheme 16. 化合物 6 の合成スキーム。

Table 2-6-11. 化合物 6 の合成条件。

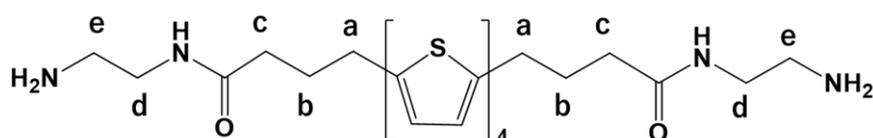
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
5	786.26	2.51 g	3.2 mmol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸	114.02	15 mL		
クロロホルム	119.40	100 mL		

50 mL 三口フラスコに化合物 5 (2.51 g, 3.2 mmol, 1.0 eq.)、クロロホルム (100 mL)、ト

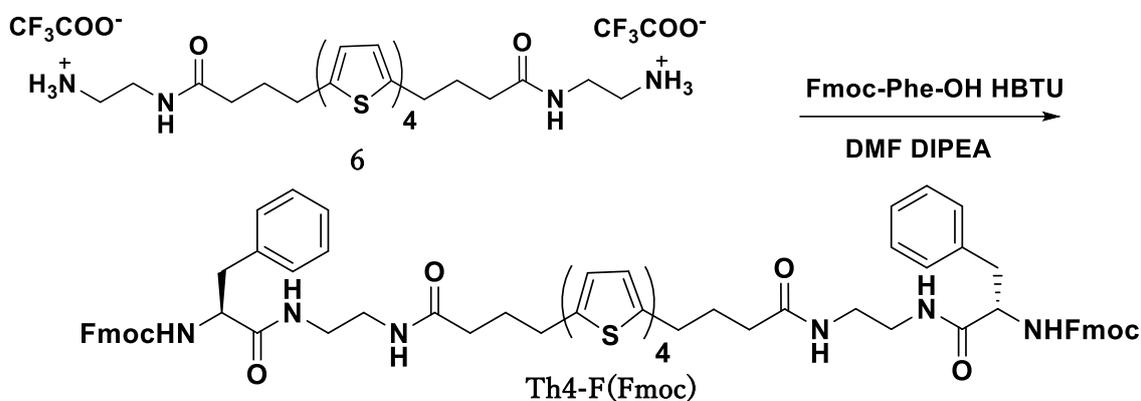
リフルオロ酢酸 (15 mL)を加え、室温で攪拌した。反応溶液は暗緑色であった。反応開始から 4 時間後、原料の消失を TLC(展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1、検出：UV、ヨウ素)で確認し、反応を終了した。反応溶液にトルエンを加え、減圧留去し、再度トルエンを加えトリフルオロ酢酸を取り除くまで減圧留去を繰り返し、真空乾燥後、黄色固体を得た。収量 2.07 g, 収率 80%。

Table 2-6-12. 化合物 6 の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (270 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.82-1.90	m	4.74	4 H	a
2.18	t (7.3)	4.16	4 H	b
2.80	t (7.3)	5.27	4 H	c
2.84-2.86	m	4.21	4 H	d
3.24-3.31	m	5.56	4 H	e
6.82	d (3.5)	2.00*	2 H	thiophene
7.14-7.19	m	4.38	4 H	
7.26	d (3.7)	2.02	2 H	
7.54	s	5.43	6 H	NH
7.99	t (5.5)	2.10	2 H	NH



2-6-7. Th4-F(Fmoc)の合成



Scheme 17. Th4-F(Fmoc)の合成スキーム。

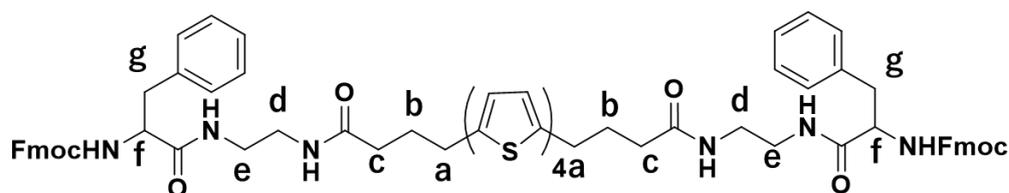
Table 2-6-13. Th4-F(Fmoc)の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
6	744.01	859 mg	1.07 mmol	1.0 eq.
Fmoc-Phe-OH	387.44	1.55 g	2.67 mmol	2.5 eq.
HBTU	379.25	1.52 g	2.67 mmol	2.5 eq.
DIPEA	129.24	1.6 g	10.7 mmol	4.7 eq.
DMF	73.09	30 mL		

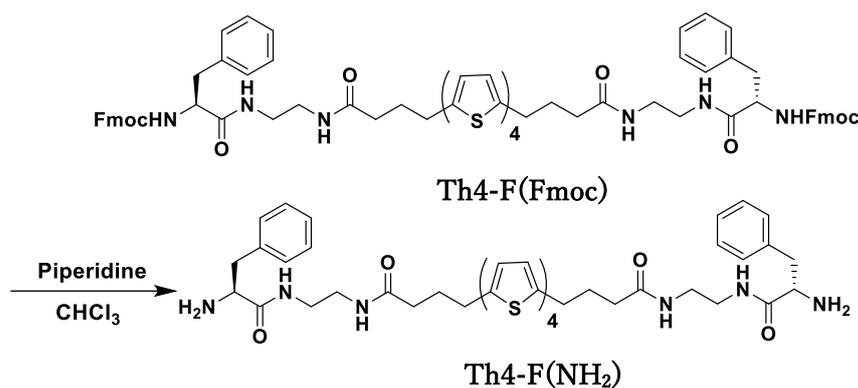
100 mL 三口フラスコに化合物 **6** (859 mg, 1.07 mmol, 1.0 eq.)、Fmoc-Phe-OH (1.03 g, 2.67 mmol, 2.5 eq.)、HBTU (1.01 g, 2.67 mmol, 2.5 eq.)を乾燥 DMF (30 mL)に加え攪拌した。そこに DIPEA (1.5 g, 10.7 mmol, 10 eq.)を加え、室温で攪拌した。1 時間後に TLC (展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1、検出：UV、ヨウ素)で原料である化合物 **6** の消失を確認し、反応を終了した。反応溶液に 1 M NaHCO₃ 水溶液を加え、褐色沈殿を生じさせ、吸引濾過した。濾別した褐色沈殿をイオン交換水で洗浄し、真空乾燥し褐色固体を得た。収量 1.31 g, 収率 92%。

Table 2-6-14. Th4-F(Fmoc)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, DMSO, TMS r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.84	t (7.1)	4.56	4 H	a
2.13	t (7.3)	3.34	4 H	b
2.82-2.73	m	5.56	6 H	c, g
3.09-3.02	m	9.72	6 H	d, g
4.17-4.15	m	9.01	8 H	h
6.80	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.11	d (3.7)	2.43	2 H	thiophene
7.14	d (3.7)	3.22	2 H	thiophene
7.34-7.16	m	21.32	16 H	thiophene, phenyl, fmoc
7.38-7.45	m	5.70	4 H	fmoc
7.61-7.69	m	5.79	4 H	fmoc
7.78	s	2.14	2 H	NH
7.88-7.82	m	7.15	6 H	NH, fmoc
8.05	s	1.53	2 H	NH



2-6-8. Th4-F(NH₂)の合成



Scheme 18. Th4-F(NH₂)の合成スキーム。

Table 2-6-15. Th4-F(NH₂)の合成。

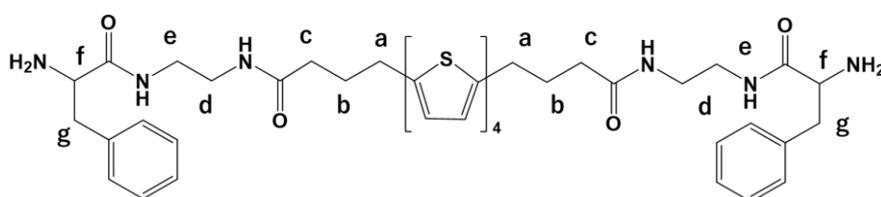
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-F(Fmoc)	1324.43	2.32 g	1.8 mmol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	20 mL		
クロロホルム	119.40	100 mL		

三口フラスコに **Th4-F(Fmoc)** (2.32 g, 1.8. mmol, 1.0 eq.)、クロロホルム (100 mL)、ピペリジン (20 mL)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 24 時間後に原料である **Th4-F(Fmoc)**の消失を TLC(展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1)で確認した。反応開始時は黄色の懸濁液だったが、反応終了時には橙色の溶液となっていた。反応溶液にトルエンを加えて、3回減圧留去することでピペリジンを取り除いた。得られた残渣を酢酸エチルとクロロホルムで洗浄し、得られた沈殿を吸引濾過でろ取することで黄色固体を得た。収量 1.32 g, 84%。

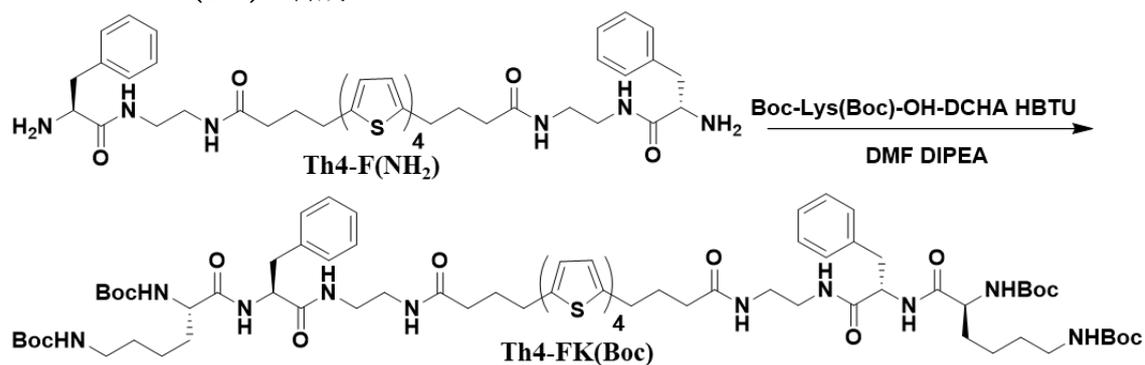
Table 2-6-16. Th4-F(NH₂)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.78-1.89	m	4.12	4 H	b
2.12	t (7.4)	3.97	4 H	a

2.78	t (7.6)	4.66	4 H	c
3.11-3.01	m	14.70	10 H	d, e, g
3.89	s	2.11	2 H	f
6.82	d (3.4)	2.00*	2 H	thiophene
7.15-7.34	m	16.70	16 H	thiophene, phenyl
7.79-7.83	m	5.43	6 H	NH
8.14	s	2.10	2 H	NH
8.45-8.37	m	2.06	2 H	NH



2-6-9. Th4-FK(Boc)の合成



Scheme 19. Th4-FK(Boc)の合成スキーム。

Table 2-6-17. Th4-FK(Boc)の合成条件。

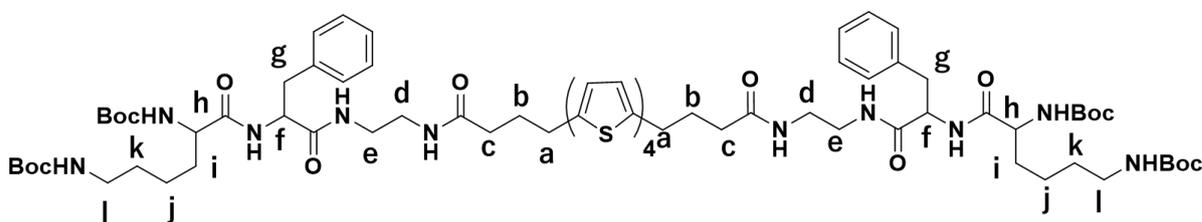
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-F(NH ₂)	881.20	600 mg	0.64 mmol	1.0 eq.
Boc-Lys(Boc)-OH · DCHA	527.73	750 mg	1.50 mmol	2.3 eq.
HBTU	379.25	586 mg	1.50 mmol	2.3 eq.
DIPEA	129.24	500 μ L	3.21 mmol	5.0eq.
DMF	73.09	40 mL		

200 mL 三口フラスコに Th4-F(NH₂) (600 mg, 0.64 mmol, 1.0 eq.)、Boc-Lys(Boc)-OH ·

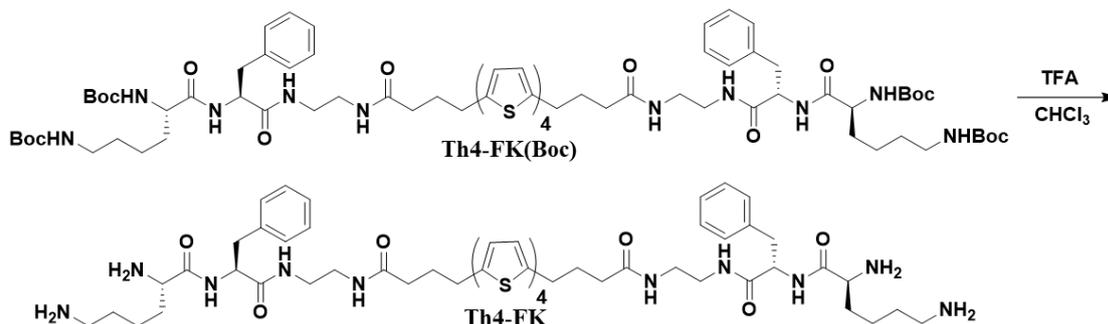
DCHA (750 mg, 1.5 mmol, 2.3 eq.), HBTU (568 mg, 1.5 mmol, 2.3 eq.)と乾燥 DMF (40 mL)を加え攪拌した。そこに DIPEA (500 μ L, 3.21 mmol, 5.0 eq.)を加え、室温で攪拌した。反応開始 5 分後、TLC (展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1、検出：UV、ヨウ素)で原料の消失を確認し、反応を終了した。反応終了後 DMF を減圧留去により取り除き、そこに 1 M NaHCO₃水溶液を加え、攪拌し、黄色沈殿を洗浄した。その後、吸引濾過後、濾取した黄色沈殿をイオン交換水で洗浄し、真空乾燥し黄色固体を得た。収量 959 mg 収率 92 %。

Table 2-6-18. Th4-FK(Boc)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.40	m	61.52	56 H	boc, i, j
1.78-1.89	m	4.12	4 H	a
2.12	t (7.5)	3.97	4 H	b
2.83-2.76	m	10.94	12 H	c, g, k
3.32-2.93	m	9.34	12 H	d, e, l
3.78	s	1.74	2 H	f
4.44	s	2.12	2 H	h
6.73	s	1.96	2 H	NH
6.82	s	2.00	2 H	NH
6.86	d (3.7)	1.62	2 H	thiophene
7.15-7.34	m	16.70	16 H	thiophene, phenyl
7.79-7.83	m	5.43	6 H	NH
8.14	s	2.10	2 H	NH



2-6-10. Th4-FK の合成



Scheme 20. Th4-FK の合成スキーム。

Table 2-6-19. Th4-FK(Boc) の合成条件。

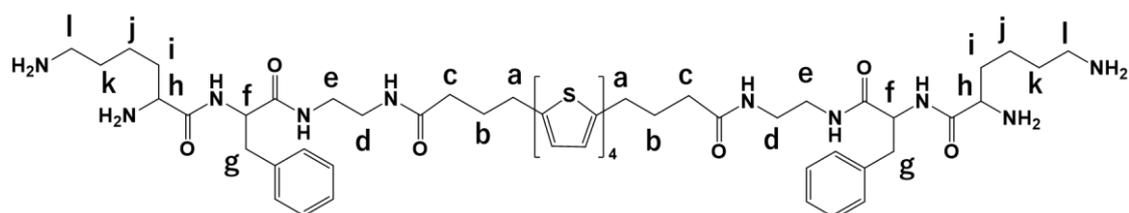
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FK(Boc)	1538.69	650 mg	0.42 mmol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸	85.15	20 mL		.
クロロホルム	119.40	100 mL		

50 mL 三口フラスコに **Th4-FK(Boc)** (650 mg, 0.6 mmol, 1.0 eq.)、トリフルオロ酢酸 (2 mL)、 CH_2Cl_2 (20 mL) を加え、室温で攪拌した。反応溶液は暗緑色であった。反応開始から 2 時間後原料の消失を TLC (展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1、検出：UV、ヨウ素) で確認し、反応を終了した。反応溶液にトルエンを加え、減圧留去し、再度トルエンを加えトリフルオロ酢酸が取り除かれるまで減圧留去を繰り返し、黄色固体を得た。収量 443 mg 収率 101%。

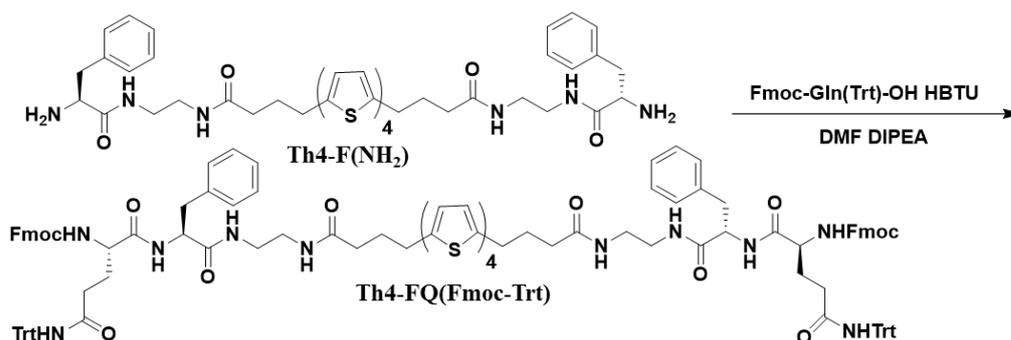
Table 2-6-20. Th4-FK の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (270 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.51	t (7.5)	4.84	4 H	j
1.68-1.76	m	4.49	4 H	i
1.84	t (7.2)	4.12	4 H	a
2.14	t (7.3)	3.97	4 H	b
2.72-2.84	m	12.18	12 H	c, g, k
3.01-3.97	m	8.93	8 H	d, e, l
3.78	s	1.86	2 H	f
4.44	s	2.14	2 H	h
6.86	d (3.6)	2.00*	2 H	thiophene

7.14-7.30	m	17.96	16 H	thiophene, phenyl
7.71	s	6.15	4 H	NH
7.81	s	2.91	2 H	NH
8.05	s	4.48	4 H	NH
8.14	s	2.10	2 H	NH
8.63	d (5.5)	1.96	2 H	NH



2-6-11. Th4-FQ(Fmoc-Trt)の合成



Scheme 21. Th4-FQ(Fmoc-Trt)の合成スキーム。

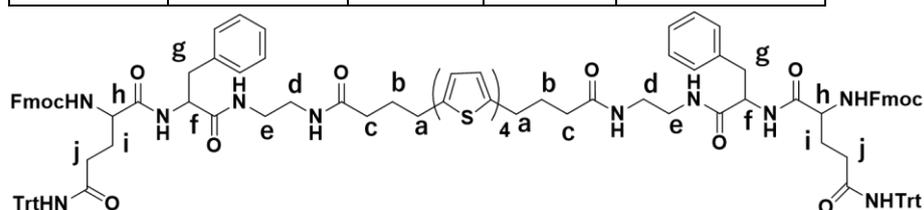
Table 2-6-21. Th4-FQ(Fmoc-Trt)の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-F(NH ₂)	744.01	100 mg	0.11 mmol	1.0 eq.
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610.72	168 mg	0.28 mmol	2.5 eq.
HBTU	379.25	104 mg	0.28 mmol	2.5 eq.
DIPEA	129.24	200 μ L	1.5 mmol	14 eq.
DMF	73.09	15 mL		

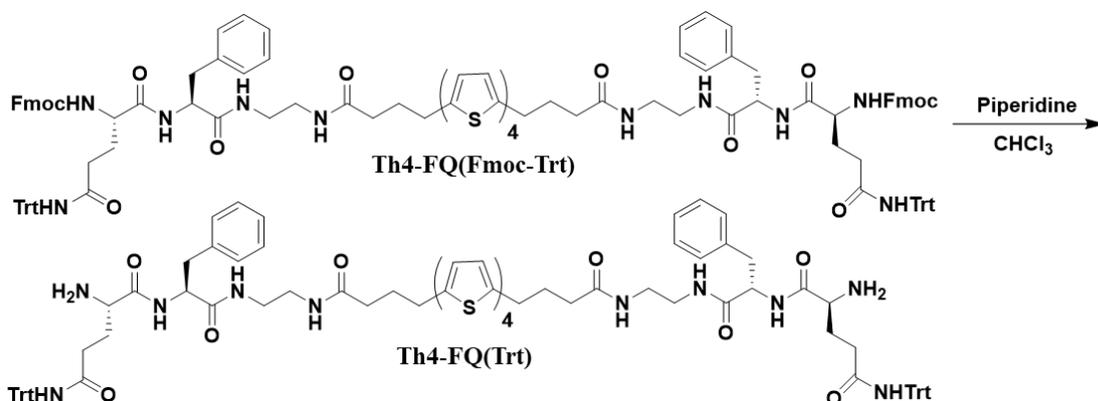
100 mL三口フラスコに **Th4-F(NH₂)** (100 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq.)、Fmoc-Gln(Trt)-OH (168 mg, 0.28 mmol, 2.5 eq.)、HBTU (104 mg, 0.28 mmol, 2.5 eq.)を乾燥 DMF (15 mL) に加え攪拌した。そこに DIPEA (200 μ L, 1.5 mmol, 14 eq.)を加え、室温で攪拌した。2時間後 TLC (クロロホルム：メタノール=10：1、検出：UV、ヨウ素)で原料の消失を確認し、反応を終了した。反応溶液に 1 M NaHCO₃水溶液を加え、褐色沈殿を生じさせ、吸引濾過した。濾別した褐色沈殿をイオン交換水で念入りに洗浄し、真空乾燥し褐色固体を得た。収量 183 mg 収率 88%。

Table 2-6-22. Th4-FQ(Fmoc-Trt)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.63	s	4.26	4 H	i
1.51-1.43	t (7.5)	4.06	4 H	a
2.21	t (7.3)	3.48	4 H	b
2.22-2.21	m	5.66	4 H	j
2.81-2.75	m	5.63	6 H	c, g
3.07-2.97	m	7.64	6 H	d, g
3.94	s	1.91	2 H	f
4.28-4.23	m	4.35	6 H	fmoc
4.43	s	1.39	2 H	h
6.79	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.39-7.12	m	53.64	50 H	thiophene, trt, phenyl, fmoc
7.43-7.39	m	5.33	4 H	fmoc
7.71-7.69	m	4.81	4 H	fmoc
7.88-7.86	m	4.96	4 H	fmoc
7.93-8.02	m	1.86	2 H	NH
8.47-8.52	m	1.85	2 H	NH



2-6-12. Th4-FQ(Trt)の合成



Scheme 22. Th4-FQ(Trt)の合成スキーム。

Table 2-6-23. Th4-FQ(Trt)の合成条件。

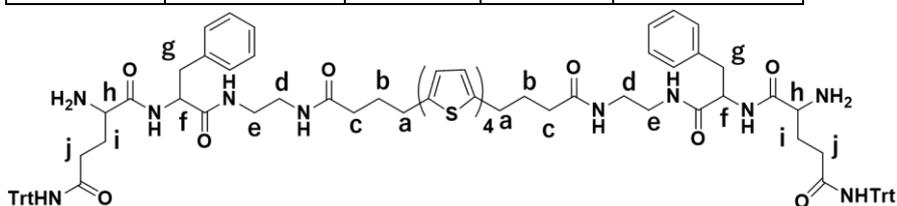
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FQ(Fmoc-Trt)	2066.59	183 mg	0.089 mmol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	5 mL		
クロロホルム	119.40	30 mL		

三口フラスコに **Th4-FQ(Fmoc-Trt)** (183 mg, 0.089 mmol, 1.0 eq.)、クロロホルム (30 mL)、ピペリジン (5 mL)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 22 時間後に原料である **Th4-FQ(Fmoc-Trt)**の消失を確認した。反応開始時は黄色の懸濁液だったが、反応終了時には橙色の溶液となっていた。反応溶液にトルエンを加えて、3回減圧留去することでピペリジンを取り除いた。得られた残渣に酢酸エチル、ヘキサンを加えて洗浄し、得られた沈殿を吸引濾過で濾別することで黄色固体を得た。得られた黄色固体をシリカゲルクロマトグラフィ(展開溶媒：クロロホルム/メタノール=5/1)により精製し、褐色固体を得た。収量 121 mg、収率 85%。

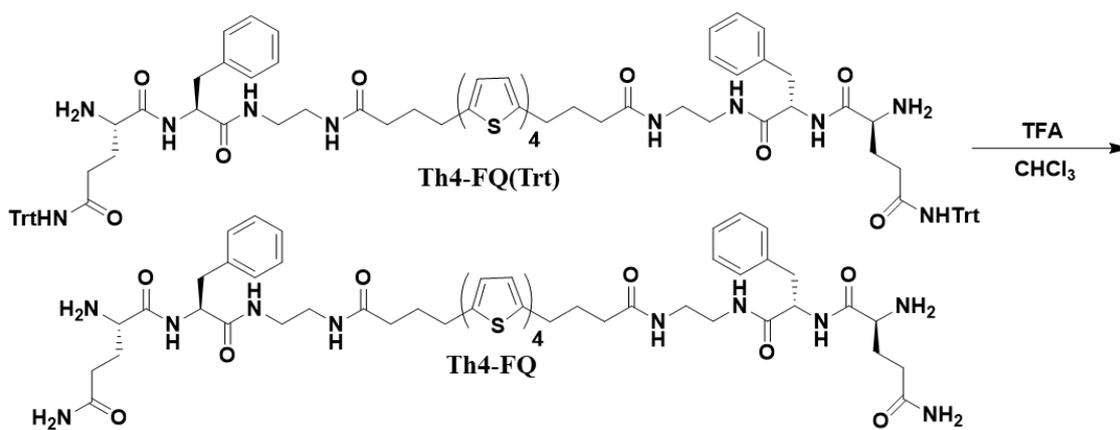
Table 2-6-24. Th4-FQ(Trt)の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.64	s	3.71	4 H	i
1.83	t (7.1)	4.24	4 H	a
2.12	t (7.3)	3.72	4 H	b
2.33	t (1.8)	3.78	4 H	j

2.82-2.75	m	6.34	6 H	c, g
3.09-3.02	m	9.65	10 H	d, e, g
4.66	m	1.89	2 H	h
6.80	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.26-7.12	m	48.25	46 H	thiophene, phenyl, trt
7.77	s	1.61	2 H	NH
8.08	s	1.68	2 H	NH
8.58	s	1.70	2 H	NH



2-6-13. Th4-FQ の合成



Scheme 23. Th4-FQ の合成スキーム。

Table 2-6-25. Th4-FQ の合成条件。

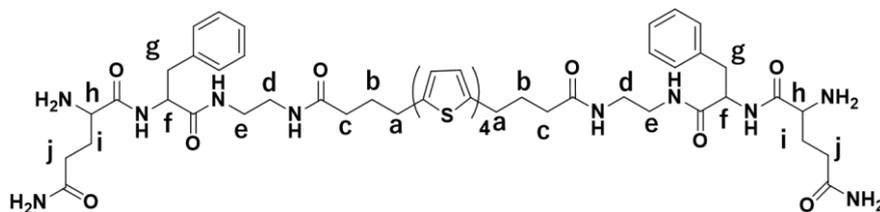
試薬	分子量	使用量	物質量	当量
Th4-FQ(Trt)	1622.10	121 mg	75 μ mol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸	114.02	4 mL		
クロロホルム	119.40	35 mL		

500 mL ナスフラスコに **Th4-FQ(Trt)** (121 mg, 75 μ mol, 1.0 eq.)、クロロホルム (35 mL)、トリフルオロ酢酸 (4 mL)を加え、室温で攪拌した。反応溶液は暗緑色であった。反応開始から 2 時間後に原料の消失を TLC(クロロホルム：メタノール=10：1、検出：UV、ヨウ素)で確認し、反応を終了した。反応溶液にトルエンを加え、減圧留去し、再度トルエンを加えトリフルオロ酢酸を取り除くまで減圧留去を繰り返した。得られた残渣に酢酸エチルを加え、超音波照射を行い、懸濁液にした。得られた懸濁液を吸引濾過することで固体を回収し、真空乾燥後、暗緑色固体を得た。粗収量 70 mg 粗収率 85 %

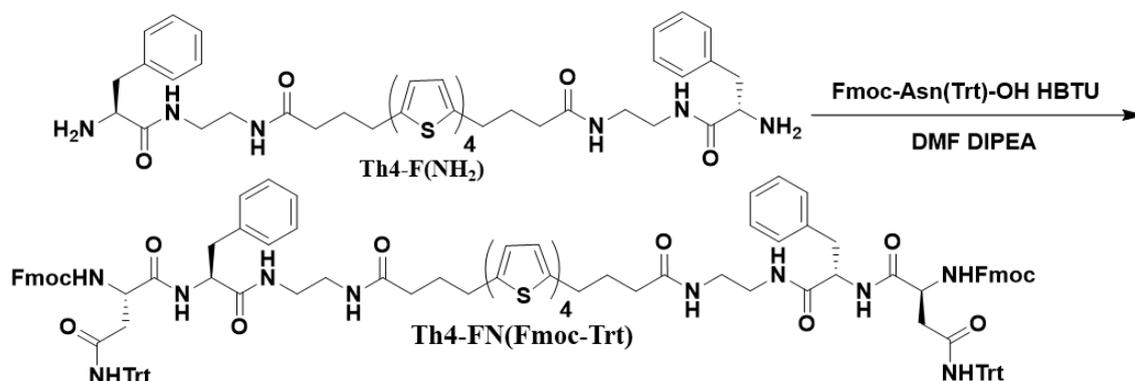
本来であれば固体の色は褐色から橙色のはずであり、 ^1H NMR 測定結果からは大きな不純物は見えなかったが、GPC による精製を行ない、褐色の固体を得た。収量 22 mg 収率 26%

Table 2-6-26. Th4-FQ の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (400 MHz DMSO TMS <i>r.t.</i> 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.81-1.85	m	7.95	8 H	a, i
2.01	t (7.3)	3.72	4 H	b
2.12	t (1.8)	3.78	4 H	j
2.75-2.88	m	6.34	6 H	c, g
3.02-3.10	m	9.65	10 H	d, e, g
3.92-3.96	m	0.87	2 H	f
4.66	m	1.89	2 H	h
6.80	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.26-7.12	m	19.38	16 H	thiophene, phenyl
7.78-7.97	m	2.03	2 H	NH
8.05-8.08	m	2.17	2 H	NH



2-6-14. Th4-FN(Fmoc-Trt)の合成



Scheme 24. Th4-FN(Fmoc-Trt)の合成スキーム。

Table 2-6-27. Th4-FN(Fmoc-Trt)の合成条件。

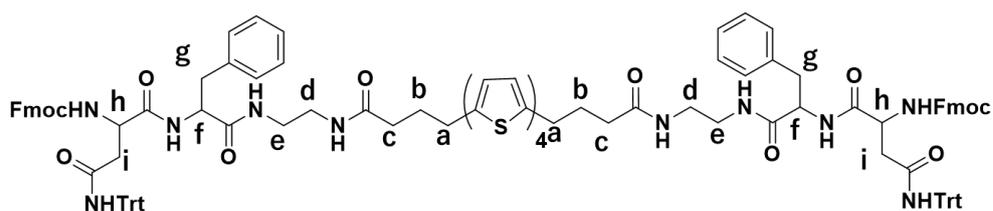
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-F(NH ₂)	744.01	100 mg	0.11 mmol	1.0 eq.
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596.69	164 mg	0.28 mmol	2.5 eq.
HBTU	379.25	104 mg	0.28 mmol	2.5 eq.
DIPEA	129.24	200 μ L	1.5 mmol	14 eq.
DMF	73.09	15 mL		

100 mL 三口フラスコに Th4-F(NH₂) (100 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq.)、Fmoc-Asn(Trt)-OH (164 mg, 0.28 mmol, 2.5 eq.)、HBTU (104 mg, 0.28 mmol, 2.5 eq.)を乾燥 DMF (15 mL)に加え攪拌した。そこに DIPEA (200 μ L, 1.5 mmol, 14 eq.)を加え、室温で攪拌した。2時間後 TLC (展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1、検出：UV、ヨウ素)で原料の消失を確認し、反応を終了した。反応溶液に 1 M NaHCO₃水溶液を加え、褐色沈殿を生じさせ、吸引濾過した。濾取した褐色沈殿をイオン交換水で念入りに洗浄し、真空乾燥し褐色固体を得た。収量 177 mg 収率 79%。

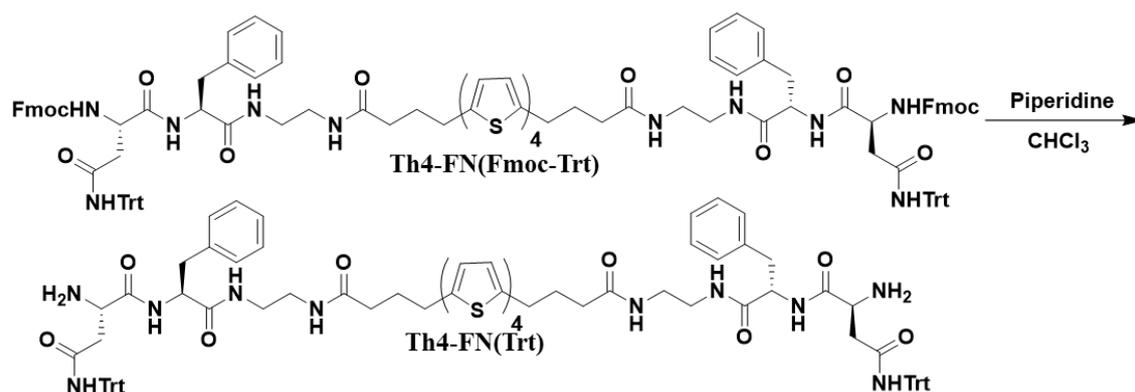
Table 2-6-28. Th4-FN(Fmoc-Trt)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.83	t (7.5)	4.43	4 H	a
2.10	t (7.3)	3.81	4 H	b

2.61-2.60	m	3.54	4 H	i
2.83-2.74	m	5.68	6 H	c, g
3.01-2.97	m	9.62	10 H	d, e, g
4.34-4.23	m	8.36	2 H	h, fmoc
6.80	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.26-7.12	m	51.62	50 H	thiophene, trt, phenyl, fmoc
7.41-7.39	m	4.35	4 H	fmoc
7.62-7.60	m	2.42	2 H	NH
7.72-7.70	m	3.62	4 H	fmoc
7.88-7.86	m	5.06	4 H	fmoc
7.94	s	1.60	2 H	NH
8.58	s	1.59	2 H	NH



2-6-15. Th4-FN(Trt)の合成



Scheme 25. Th4-FN(Trt)の合成スキーム。

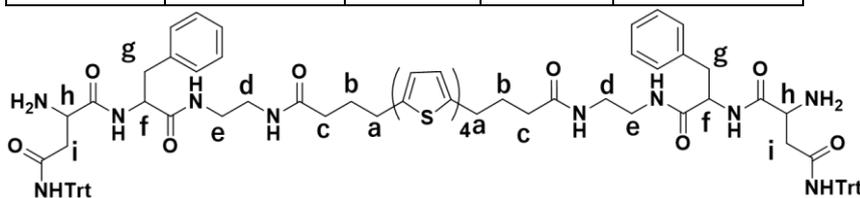
Table 2-6-29. Th4-FN(Trt)の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FN(Fmoc-Trt)	2036.54	177 mg	0.087 mmol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	6 mL		
クロロホルム	119.40	30 mL		

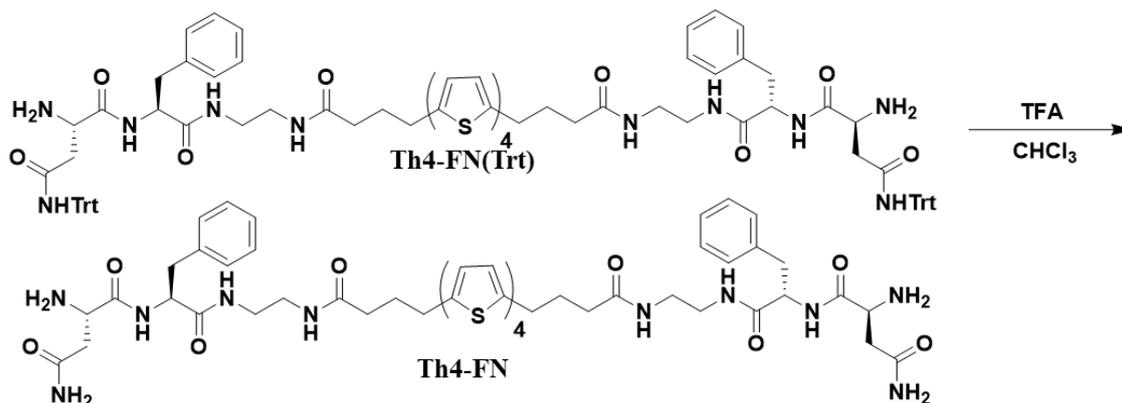
三口フラスコに Th4-FN(Fmoc-Trt) (183 mg, 0.089 mmol, 1.0 eq.)、クロロホルム (30 mL)、ピペリジン (6 mL)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 6 時間後に原料である Th4-FN(Fmoc-Trt)の消失を確認した。反応開始時は黄色の懸濁液だったが、反応終了時には橙色の溶液となっていた。反応溶液にトルエンを加えて、3回減圧留去することでピペリジンを取り除いた。得られた残渣に酢酸エチル、ヘキサンを加えて洗浄し、得られた沈殿を吸引濾過で濾別することで黄色固体を得た。得られた黄色固体をシリカゲルクロマトグラフィ(展開溶媒:クロロホルム/メタノール = 5/1)により精製した。収量 99 mg, 収率 71%。

Table 2-6-30. Th4-FN(Trt)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.83	t (7.1)	4.20	4 H	a
2.12	t (7.3)	3.43	4 H	b
2.63-2.59	m	4.60	4 H	i
2.82-2.75	m	5.21	6 H	c, g
3.09-3.02	m	8.88	10 H	d, e, g
4.66	m	2.80	2 H	h
6.80	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.26-7.12	m	45.17	46 H	thiophene, phenyl, trt
7.77	s	1.90	2 H	NH
8.08	s	1.81	2 H	NH
8.58	s	1.14	2 H	NH



2-6-16. Th4-FN の合成



Scheme 26. Th4-FN の合成スキーム。

Table 2-6-31. Th4-FN の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FN(Trt)	1594.05	99 mg	62 μ mol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸	114.02	4 mL		
クロロホルム	119.40	35 mL		

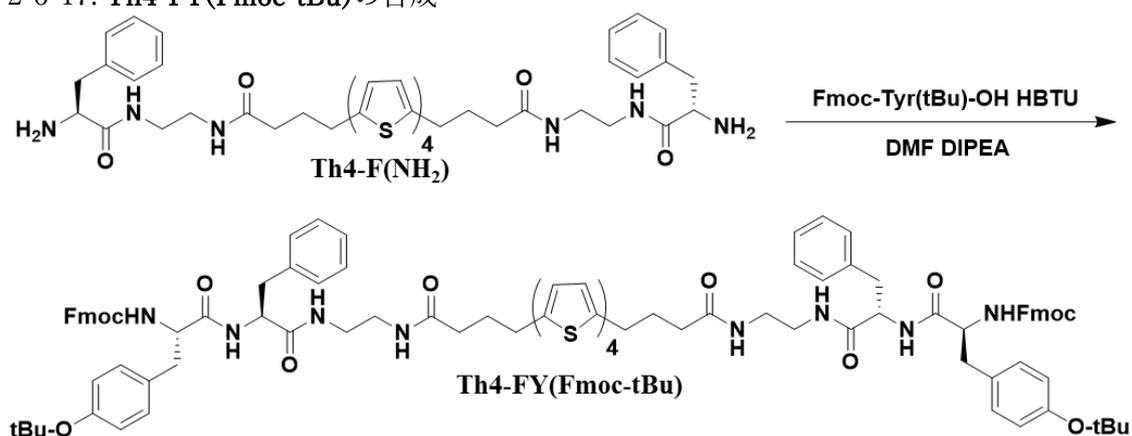
300 mL ナスフラスコに **Th4-FN(Trt)** (99 mg, 62 μ mol, 1.0 eq.)、クロロホルム (35 mL)、トリフルオロ酢酸 (4 mL)を加え、室温で攪拌した。反応溶液は暗緑色であった。反応開始から 4 時間後に原料の消失を TLC(展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1、検出：UV、ヨウ素)で確認し、反応を終了した。反応溶液にトルエンを加え、減圧留去し、再度トルエンを加えトリフルオロ酢酸を取り除くまで減圧留去を繰り返した。得られた残渣に酢酸エチルを加え、超音波照射を行い、懸濁液にした。得られた懸濁液を吸引濾過することで固体を回収し、真空乾燥後、暗緑色固体を得た(粗収量 73 mg 粗収率 106%)。この緑色は反応中にトリフルオロ酢酸が含まれたことによる色の変化であったため、再度、クロロホルム/メタノール混合溶媒に溶解させ、そこにトルエンを加え減圧留去を繰り返すことで、暗褐色固体を得た。収量 56 mg, 収率 81%。

Table 2-6-32. Th4-FN の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, TMS r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.83	t (7.1)	3.65	4 H	a
2.12	t (7.3)	3.65	4 H	b
2.82-2.75	m	6.42	6 H	c g
3.09-3.02	m	11.43	10 H	d, e, g

3.99	br s	1.87	2 H	f
4.66	br s	1.97	2 H	h
6.80	br s	1.13	2 H	thiophene
7.26-7.12	m	16.00	16 H	thiophene, phenyl
7.66	s	1.81	2 H	NH
7.77	s	2.10	2 H	NH
7.97	s	4.72	4 H	NH
8.11	s	1.14	2 H	NH
8.63	s	1.78	2 H	NH

2-6-17. Th4-FY(Fmoc-tBu)の合成



Scheme 27. Th4-FY(Fmoc-tBu)の合成スキーム。

Table 2-6-33. Th4-FY(Fmoc-tBu)の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-F(NH ₂)	880.29	70 mg	0.075 mmol	1.0 eq.
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	610.70	86 mg	0.188 mmol	2.5 eq.
HBTU	379.25	71 mg	0.188 mmol	2.5 eq.
DIPEA	129.24	1 mL		
DMF	73.09	40 mL		

三口フラスコに HBTU (71 mg, 0.188 mmol, 2.5 eq.)、Fmoc-Tyr(tBu)-OH (86 mg, 0.188 mmol, 2.5 eq.)、DMF (40 mL)、DIPEA (1 mL)、**Th4-F(NH₂)** (70 mg, 0.075 mmol, 1.0 eq.) を加え、室温で攪拌した。反応開始から 2 時間後に TLC で原料である **Th4-F(NH₂)** の消失

を確認した。反応溶液にイオン交換水を加え、沈殿を生じさせ、吸引濾過することで沈殿を濾別した。得られた沈殿を真空乾燥し、橙色固体を得た。収量 111 mg, 収率 79%。

Table 2-6-34. Th4-FY(Fmoc-tBu)の¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.18	m	15.04	18 H	tBu
1.84	t (7.2)	4.00*	4 H	a
2.13	m	4.45	4 H	b
2.83-2.77	m	9.58	8 H	c, g
3.02-2.94	m	11.63	8 H	d, e, i
4.29	m	5.98	6 H	fmoc, f
4.41	s	1.59	2 H	h
6.80-6.75	m	5.42	4 H	thiophene, tyr
7.13-7.20	m	42.90	46 H	thiophene phenyl, tyr
7.22	s	4.38	4 H	fmoc
7.29	s	4.03	4 H	fmoc
7.39	s	1.41	2 H	NH
7.85	s	4.06	4 H	fmoc
7.98	s	1.97	2 H	NH
8.07	s	1.04	2 H	NH

2-6-18. Th4-FY(tBu)の合成

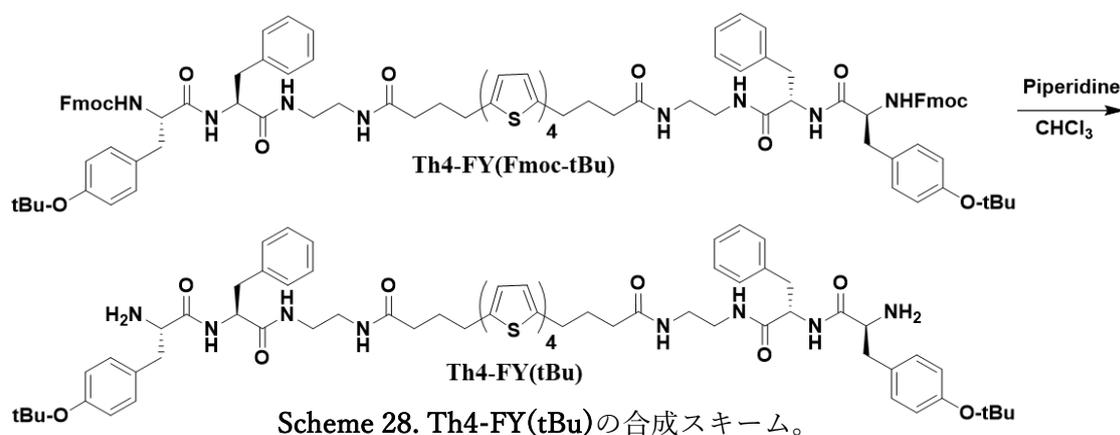


Table 2-6-35. Th4-FY(tBu)の合成条件。

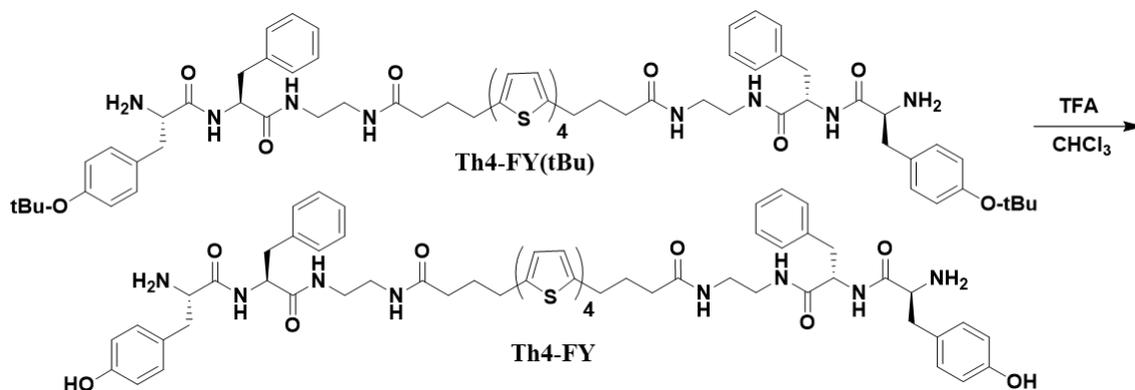
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FY(Fmoc-tBu)	1762.68	111 mg	0.06 mmol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	4 mL		
クロロホルム	119.40	30 mL		

三口フラスコに Th4-FY(Fmoc-tBu) (111 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.)、クロロホルム (30 mL)、ピペリジン (4 mL)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 2 時間後に原料である Th4-FY(Fmoc-tBu)の消失を確認した。反応開始時は黄色の懸濁液だったが、反応終了時には橙色の溶液となっていた。反応溶液にトルエンを加えて、3 回減圧留去することでピペリジンを取り除いた。得られた残渣にトルエンを加えて洗浄し、得られた沈殿を吸引濾過で濾別することで黄色固体を得た。収量 86 mg, 103 %。

Table 2-6-36. Th4-FY(tBu)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.18	s	14.96	18 H	tBu
1.84	t (7.2)	4.00*	4 H	a
2.13	t (7.3)	4.45	4 H	b
2.83-2.77	m	6.78	8 H	c, g
3.02-2.94	m	16.36	12 H	d, e, i
4.29	s	2.51	6 H	f
4.41	s	2.39	2 H	h
6.80-6.75	m	5.53	4 H	thiophene, tyr
7.05-7.03	m	3.21	4 H	tyr
7.13-7.20	m	16.86	16 H	thiophene, phenyl
7.78	s	2.51	2 H	NH
7.98	s	1.96	2 H	NH

2-6-19. Th4-FY の合成



Scheme 29. Th4-FY の合成スキーム。

Table 2-6-37. Th4-FY の合成条件。

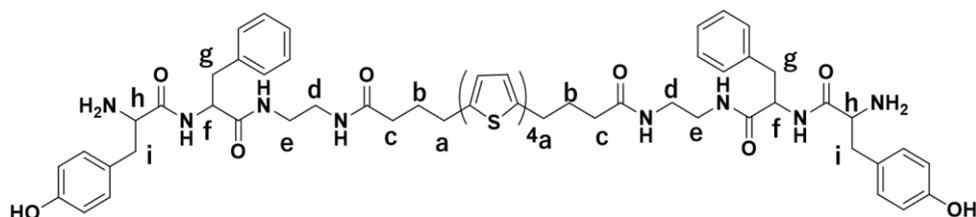
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FY(tBu)	1319.77	105 mg	0.08 mmol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸	114.02	4 mL		
クロロホルム	119.40	30 mL		

200 mL ナスフラスコに **Th4-FY(tBu)** 82 mg (0.08 mmol, 1.0 eq.) とクロロホルム (30 mL) を加え懸濁させ、そこにトリフルオロ酢酸 (4 mL) を加えて室温で攪拌した。反応開始から 4 時間後に原料である **Th4-FS(tBu)** の消失とともに **Th4-FS** の生成を確認して反応を終了した。得られた反応液にトルエンを加えて減圧留去を行い、トリフルオロ酢酸のにおいがなくなるまで繰り返し減圧留去を行った。得られた残渣を真空乾燥し褐色の固体を得た。収量 80 mg, 収率 83%。

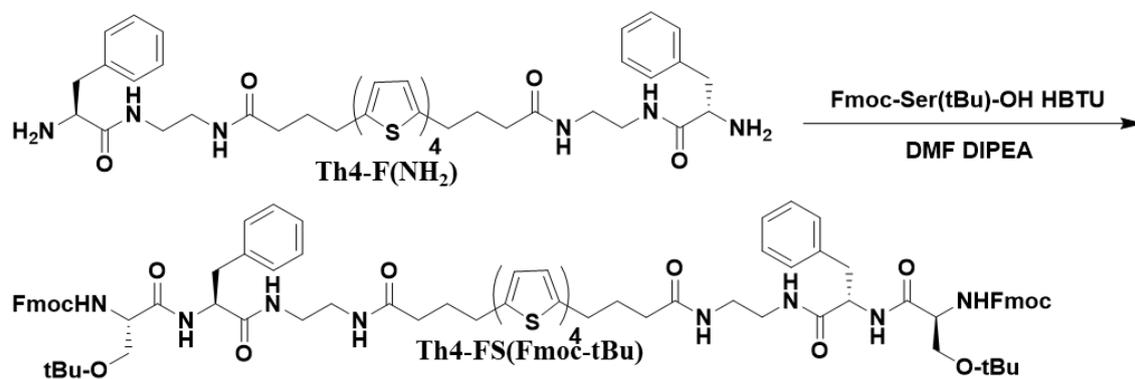
MALDI-TOF MS m/z 1229.41, calc for $C_{64}H_{70}N_8O_8S_4Na$ $[M+Na^+]$, found 1229.748

Table 2-6-38. Th4-FY の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.84	t (7.2)	4.00*	4 H	a
2.11-2.15	t (7.3)	4.45	4 H	b
2.67-2.72	m	6.78	8 H	c, g
2.86-2.99	m	16.36	12 H	d, e, i
3.89	s	2.51	6 H	f
4.46	s	2.39	2 H	h
6.67	d (8.2)	4	4 H	
6.81	s	2	2 H	thiophene
7.02	d (7.8)	3.21	4 H	tyr
7.13-7.27	m	16.86	16 H	thiophene, phenyl
7.80	s	2.51	2 H	NH
7.98	s	1.96	2 H	NH
8.72	s		2 H	OH



2-6-20. Th4-FS(Fmoc-tBu)の合成



Scheme 30. Th4-FS(Fmoc-tBu)の合成スキーム。

Table 2-6-39. Th4-FS(Fmoc-tBu)の合成条件。

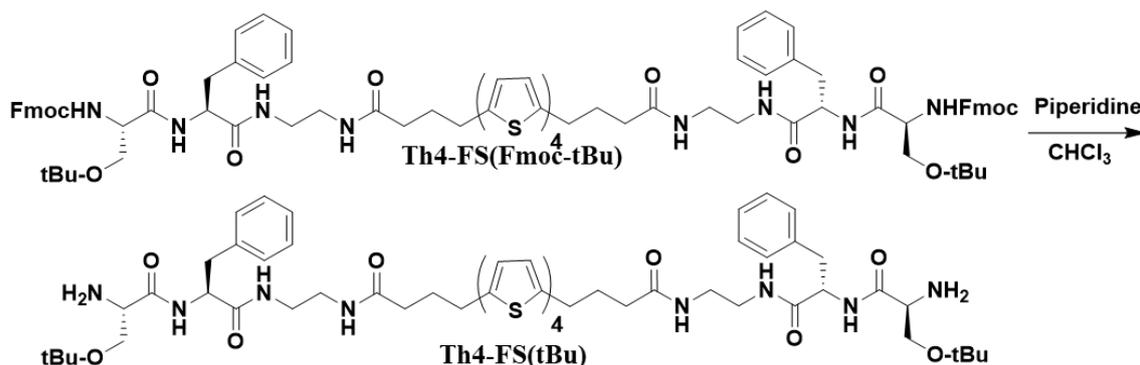
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-F(NH ₂)	880.29	70 mg	0.075 mmol	1.0 eq.
Fmoc-Ser(tbu)-OH	383.45	72 mg	0.188 mmol	2.5 eq.
HBTU	379.25	71 mg	0.188 mmol	2.5 eq.
DIPEA	129.24	0.5 mL		
DMF	73.09	30 mL		

三口フラスコに HBTU (71 mg, 0.188 mmol, 2.5 eq.)、Fmoc-Ser(tBu)-OH (72 mg, 0.188 mmol, 2.5 eq.)、DMF (30 mL)、DIPEA (0.5 mL)、Th4-F(NH₂) (70 mg, 0.075 mmol, 1.0 eq.)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 30 分後に TLC で原料である Th4-F(NH₂)の消失を確認した。反応溶液にイオン交換水を加え、沈殿を生じさせ、吸引濾過することで沈殿を濾別した。得られた沈殿を真空乾燥し、橙色固体を得た。収量 102 mg 収率 80%

Table 2-6-40. Th4-FS(Fmoc-tBu)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.08	s	14.72	18 H	tBu
1.84	t (7.2)	3.96	4 H	a
2.08	t (6.9)	4.18	4 H	b
2.83-2.73	m	6.45	8 H	c, g
3.02-2.89	m	10.68	8 H	d, e
3.37-3.36	m	4.02	4 H	i
3.94	s	1.68	2 H	f
4.22-4.35	m	4.38	4 H	fmoc
4.41	s	1.59	2 H	h
6.82-6.67	m	2.00*	2 H	thiophene
7.15-7.34	m	12.64	16 H	thiophene, phenyl
7.41	s	11.78	8 H	fmoc
7.70	s		2 H	NH
7.88	s	4.50	6 H	fmoc, NH

2-6-21. Th4-FS(tBu)の合成



Scheme 31. Th4-FS(tBu)の合成スキーム。

Table 2-6-41. Th4-FS(tBu)の合成条件。

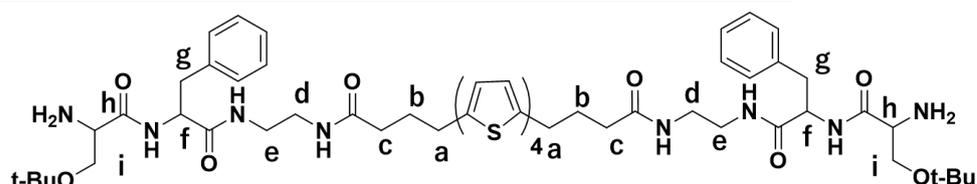
試薬	分子量	使用量	物質量	当量
Th4-FS(Fmoc-tBu)	1610.62	102 mg	0.06 mmol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	4 mL		
クロロホルム	119.40	30 mL		

三口フラスコに Th4-FS(Fmoc-tBu) (102 mg, 0.06 mmol, 1.0 eq.)、クロロホルム (30 mL)、ピペリジン (4 mL)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 2 時間後に原料である Th4-F(NH₂)の消失を確認した。反応開始時は黄色の懸濁液だったが、反応終了時には橙色の溶液となっていた。反応溶液にトルエンを加えて、3 回減圧留去することでピペリジンを取り除いた。得られた残渣にトルエンを加えて洗浄し、得られた沈殿を吸引濾過で濾別することで黄色固体を得た。収量 58 mg, 収率 83%。

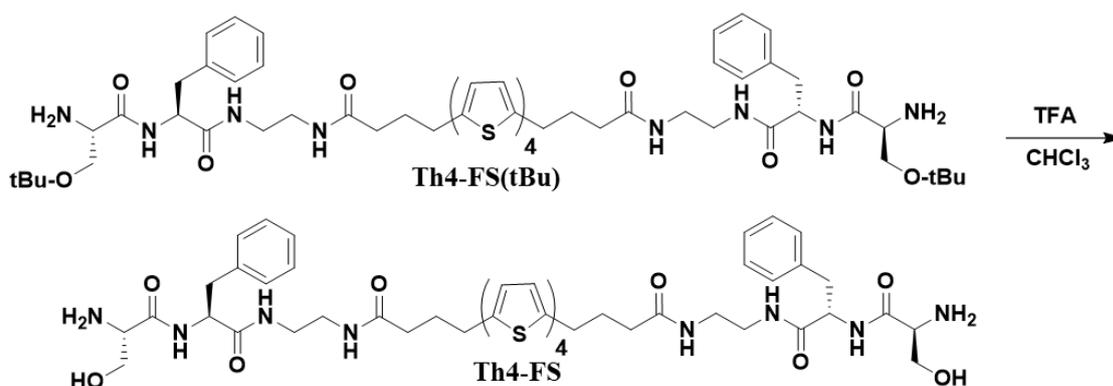
Table 2-6-42. Th4-FS(tBu)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.08	s	14.72	18 H	tBu
1.84	t (7.2)	5.01	4 H	a
2.08	t (6.9)	3.33	4 H	b
2.83-2.73	m	6.42	8 H	c, g
3.04-2.93	m	15.12	12 H	d, e, i
4.41	s	2.04	2 H	h
6.81	m	2.00*	2 H	thiophene

7.13-7.25	m	17.56	16 H	thiophene, phenyl
7.79	s	2.07	2 H	NH
8.02	s	1.75	2 H	NH
8.21	s	0.96	2 H	NH



2-6-22. Th4-FS の合成



Scheme 32. Th4-FS の合成スキーム。

Table 2-6-43. Th4-FS の合成条件。

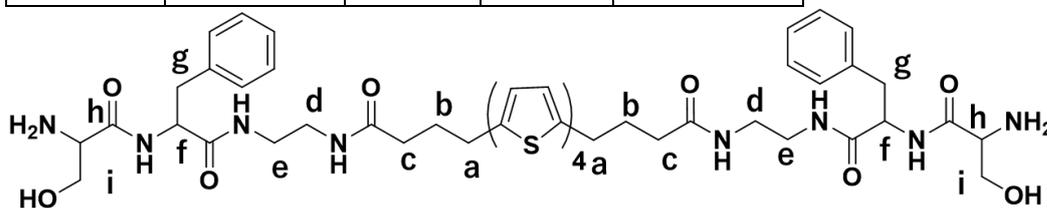
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FS(tBu)	1166.48	96 mg	0.08 mmol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸	114.02	4 mL		
クロロホルム	119.40	30 mL		

200 mL ナスフラスコに **Th4-FS(tBu)** (96 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq.) とクロロホルム (30 mL) を加え懸濁させ、そこにトリフルオロ酢酸 (4 mL) を加えて室温で攪拌した。反応開始から 4 時間後に原料である **Th4-FS(tBu)** の消失とともに **Th4-FS** の生成を確認して反応を終了した。得られた反応液にトルエンを加えて減圧留去を行い、トリフルオロ酢酸のにおいがなくなるまで繰り返し減圧留去を行った。得られた残渣を真空乾燥し褐色の固体を得た。収量 62 mg, 収率 72%。

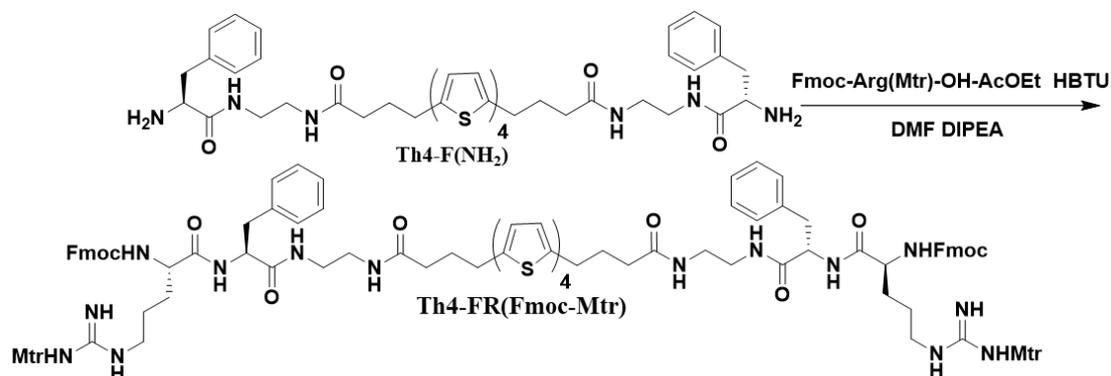
MALDI-TOF MS m/z 1094.32, calc. for $C_{52}H_{62}N_8O_8S_4K$ $[M+K^+]$, found 1095.472

Table 2-6-44. Th4-FS の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.85	m		4 H	a
2.12	t (7.8)		4 H	b
2.72-2.77	m		8 H	c, g
2.93-3.17	m		12 H	d, e, i
3.74	br s		2 H	f
4.48	br s		2 H	h
6.82	s	2.00*	2 H	thiophene
7.18-7.25	m	18.99	16 H	phenyl, thiophene
7.80	br s	1.97	2 H	NH
8.01	br s	1.47	2 H	NH
8.12	br s	1.39	2 H	NH
8.51	br s	1.93	2 H	OH



2-6-23. Th4-FR(Fmoc-Mtr)の合成



Scheme 33. Th4-FR(Fmoc-Mtr)の合成スキーム。

Table 2-6-45. Th4-FR(Fmoc-Mtr)の合成条件。

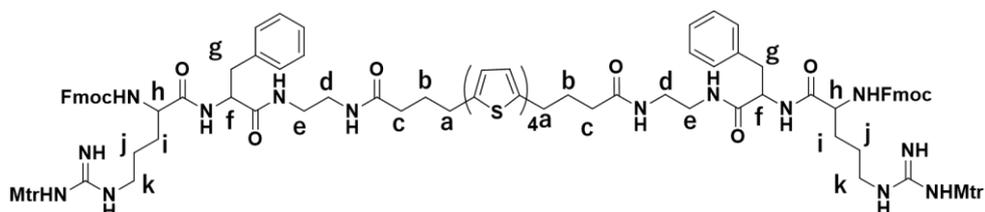
試薬	分子量	使用量	物質量	当量
Th4-F(NH ₂)	744.01	100 mg	0.11 mmol	1.0 eq.
Fmoc-Arg(Mtr)-OH · AcOEt	696.83	195 mg	0.28 mmol	2.5 eq.
HBTU	379.25	104 mg	0.28 mmol	2.5 eq.
DIPEA	129.24	200 μ L	1.5 mmol	14 eq.
DMF	73.09	15 mL		

100 mL 三口フラスコに Th4-F(NH₂) (100 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq.)、Fmoc-Arg(Mtr)-OH (195 mg, 0.28 mmol, 2.5 eq.)、HBTU (104 mg, 0.28 mmol, 2.5 eq.)を乾燥 DMF (15 mL)に加え攪拌した。そこに DIPEA (200 μ L, 1.5 mmol, 14 eq.)を加え、室温で攪拌した。2時間後 TLC (展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 10/1、検出：UV、ヨウ素)で原料の消失を確認し、反応を終了した。反応溶液に 1 M NaHCO₃水溶液を加え、褐色沈殿を生じさせ、吸引濾過した。濾別した褐色沈殿をイオン交換水で念入りに洗浄し、真空乾燥し褐色固体を得た。収量 183 mg, 収率 89%。

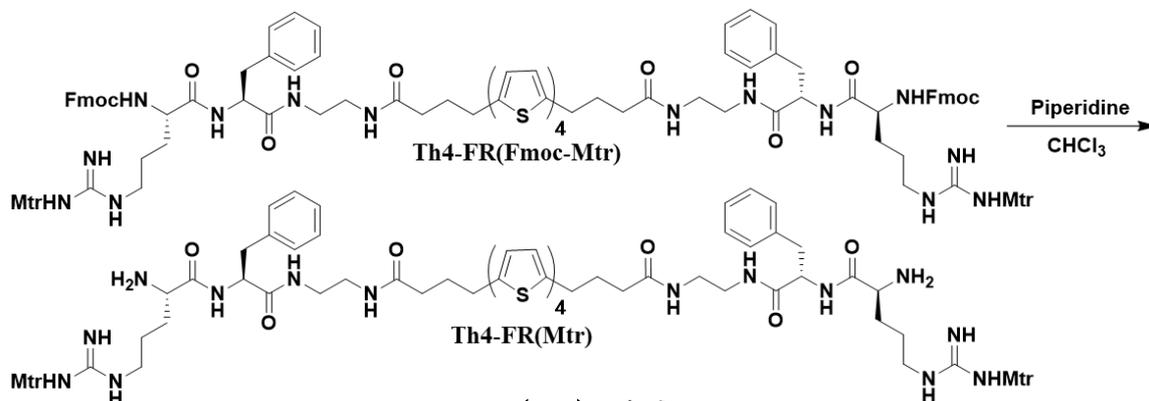
Table 2-6-46. Th4-FR(Fmoc-Mtr)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.30	s	4.69	4 H	j
1.43-1.51	m	4.40	4 H	i
1.83	t (7.3)	4.30	4 H	a
2.03	s	5.88	6 H	mtr
2.12	t (7.5)	3.87	4 H	b
2.60	s	5.30	6 H	mtr
2.75-2.77	m	5.12	6 H	c, g
2.98-3.03	m	9.36	10 H	k, d, g
3.77	s	6.36	6 H	mtr
3.92	s	1.81	2 H	f
4.23-4.27	m	4.37	6 H	fmoc
4.42	s	1.54	2 H	h
6.55	s	1.99	2 H	mtr

6.82	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.14-7.24	m	14.58	16 H	thiophene, phenyl
7.26-7.28	m	2.34	2 H	NH
7.30-7.32	m	3.93	4 H	fmoc
7.38-7.40	m	4.01	4 H	fmoc
7.44-7.52	m	1.34	2 H	NH
7.69-7.72	m	4.66	4 H	fmoc
7.84-7.86	m	4.44	4 H	fmoc
7.92-7.95	m	3.21	4 H	NH



2-6-24. Th4-FR(Trt)の合成



Scheme 34. Th4-FR(Mtr)の合成スキーム。

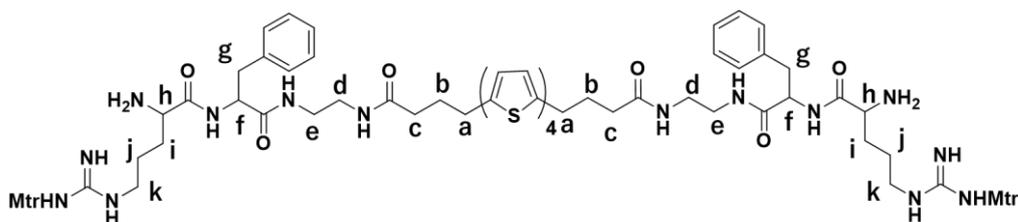
Table 2-6-47. Th4-FR(Mtr)の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FR(Fmoc-Mtr)	2062.59	183 mg	0.089 mmol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	5 mL		
クロロホルム	119.40	30 mL		

三口フラスコに **Th4-FR(Fmoc-Mtr)** (183 mg, 0.089 mmol, 1.0 eq.)、クロロホルム (30 mL)、ピペリジン (5 mL)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 24 時間後に原料である **Th4-FR(Fmoc-Mtr)**の消失を確認した。反応開始時は黄色の懸濁液だったが、反応終了時には橙色の溶液となっていた。反応溶液にトルエンを加えて、3回減圧留去することでピペリジンを取り除いた。得られた残渣に酢酸エチルとヘキサンを加えて洗浄し、得られた沈殿を吸引濾過で濾別することで黄色固体を得た。収量 125 mg, 収率 87%。

Table 2-6-48. Th4-FR(Mtr)の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.41	br s	3.45	4 H	j
1.55-1.65	br s	6.91	4 H	i
1.84	t (7.3)	3.89	4 H	a
2.06	s	5.90	6 H	mtr
2.13	t (7.5)	3.87	4 H	b
2.53	s	5.30	6 H	mtr
2.60	s	5.94	6 H	mtr
2.75-2.86	m	5.12	6 H	c, g
2.99-3.04	m	9.36	10 H	k, d, g
3.62	s	1.38	2 H	h
3.78	s	6.20	6 H	mtr
4.46	s	1.81	2 H	f
6.67	s	1.92	2 H	mtr
6.81	d (3.7)	2.00*	2 H	thiophene
7.16-7.21	m	16.51	16 H	thiophene, phenyl
7.78	s	1.91	2 H	NH
8.12	s	1.75	2 H	NH
8.54	s	1.26	2 H	NH



2-6-25. Th4-FR の合成

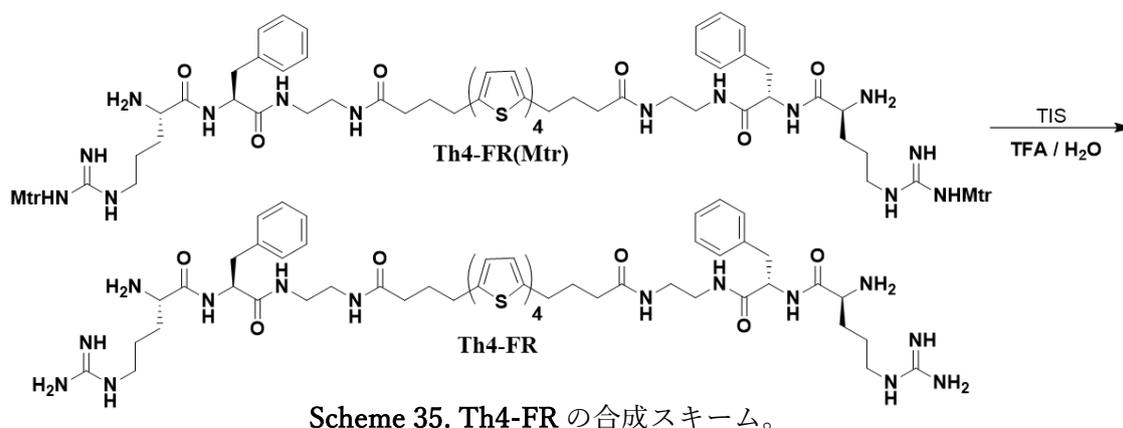


Table 2-6-49. Th4-FR の合成条件。

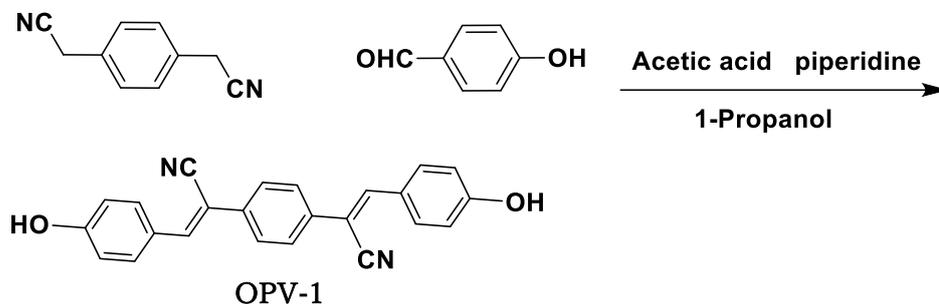
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
Th4-FR(Mtr)	1616.60	125 mg	77 μ mol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸 (TFA)	114.02	28.5 mL		
トリエソプロピルシラン (TIS)	158.36	0.75 mL		
H ₂ O	18.015	0.75 mL		

200 mL ナスフラスコに **Th4-FR(Mtr)**(125 mg, 77 μ mol, 1.0 eq.)とトリフルオロ酢酸 (TFA) 28.5 mL・水 28.5 mL・トリエソプロピルシラン(TIS) 0.75 mL の混合溶液(TFA : 水 : TIS = 95 : 2.5 : 2.5)を加え、深青色溶液を得た。**Th4** 骨格を有する化合物は酸性溶液中では、暗緑色溶液を与えることが多いが、今回は水や TIS の影響で深青色になったと思われる。反応開始から 6 時間後に TLC 上で **Th4** 骨格由来のスポットが 2 つ確認できたため、反応を継続し、24 時間後に **Th4** 骨格由来のスポットが 1 つになっていることを確認し、反応を終了した。得られた反応溶液にトルエンを加え減圧留去、この操作を 3 回行うことで TFA を取り除いた。得られた残渣にメタノールを加えて溶解させ、酢酸エチルを添加することで懸濁させた。懸濁液を吸引濾過することで、褐色固体をろ取り、その固体をメタノール・DMF を用いて懸濁させることで回収し、減圧留去、真空乾燥することで褐色固体を得た。収量 33 mg, 収率 42%。

Table 2-6-50. Th4-FR の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆ /CF ₃ COOD = 7/2, TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.41	br s	4.00*	4 H	j
1.55-1.65	br s	3.53	4 H	a
1.84	br s	3.23	4 H	i
2.13	br s	3.64	4 H	b
2.75-2.86	m	4.17	4 H	c
2.99-3.04	m	17.13	16 H	d, e, g, k
3.62	s	2.33	2 H	h
4.46	s	2.11	2 H	f
6.81	d (3.7)	1.20	2 H	thiophene
7.16-7.21	m	14.46	16 H	thiophene, phenyl

2-6-26. OPV-1 の合成



Scheme 36. OPV-1 の合成スキーム。

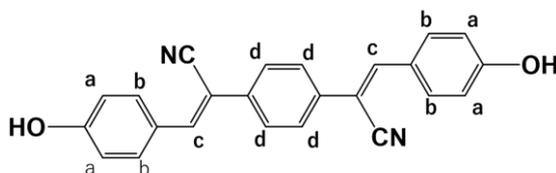
Table 2-6-51. OPV-1 の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
4-Hydroxybenzaldehyde	156.18	10 g	8.2 mmol	2.5 eq.
1,4-phenylenediacetonitrile	122.12	5 g	3.3 mmol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	5 mL		
酢酸	60.05	4 mL		
1-プロパノール	60.1	90 mL		

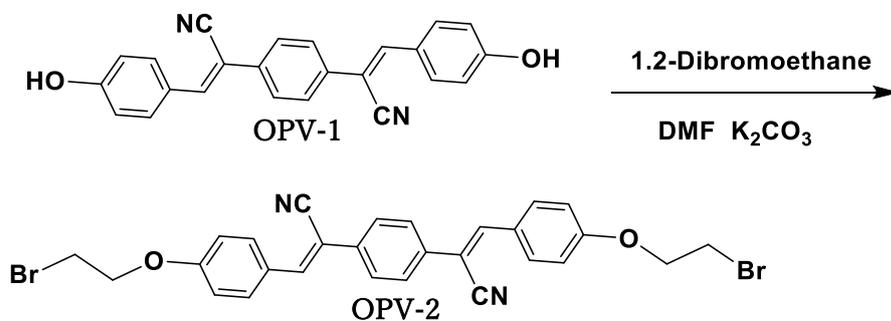
300 mL 三口フラスコに 4-Hydroxybenzaldehyde (10 g, 8.2 mmol, 2.5 eq.)、1,4-phenylenediacetonitrile (5 g, 3.3 mmol, 1.0 eq.)、1-プロパノール (90 mL)、酢酸 (4 mL)を加え、白色の懸濁液を得た。その後アルゴン置換を行い、80°Cに加熱した。温度が上昇するにつれて懸濁が薄くなり、そこにピペリジン (5 mL)をゆっくり加えると淡黄色の懸濁液になった。反応開始(ピペリジンを加えて)から数分後に淡黄色の溶液になり、3 時間後には OPV-1 の生成に伴い、黄色の懸濁液となった。反応開始から 24 時間後に TLC(クロロホルム：メタノール=10：1 検出：UV、ヨウ素)で原料である 1,4-phenylenediacetonitrile の減少を確認し、反応を終了した。反応終了後、懸濁液を室温で放冷した後、吸引濾過により沈殿を濾取し、メタノールで洗浄後、真空乾燥を行い、淡黄色固体を得た。収量 5.35 g, 収率 46%。

Table 2-6-52. OPV-1 の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (270 MHz, DMSO- d_6 , TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
6.91	d (7.8)	4.7	4 H	a
7.82	s	4.0	4 H	b
7.88	d (9.1)	4.6	4 H	d
7.98	s	2.00*	2 H	c



2-6-27. OPV-2 の合成



Scheme 37. OPV-2 の合成スキーム。

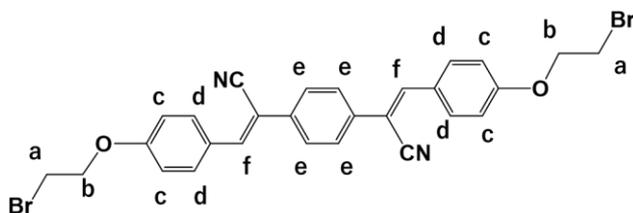
Table 2-6-53. OPV-2 の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-1	364.13	5.35 g	15 mmol	1.0 eq.
K ₂ CO ₃	138.20	6.25 g	45 mmol	3.0 eq.
1,2-Dibromoethane	187.86	56 g	0.3 mol	20 eq.
乾燥 DMF	73.09	100 mL		

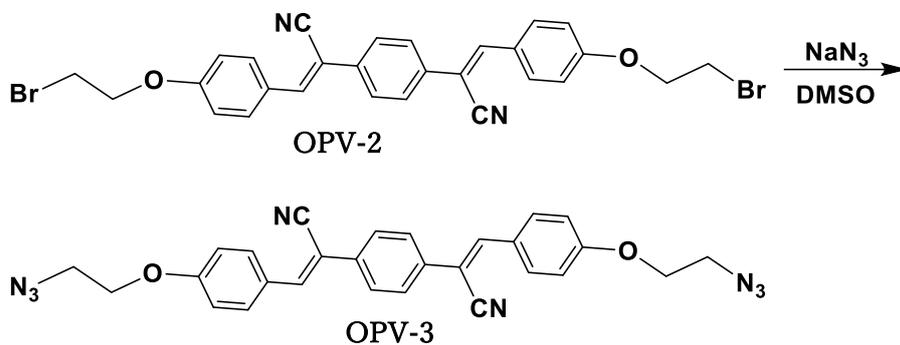
300 mL 三口フラスコ内で OPV-1 (5.35 g, 15 mmol, 1.0 eq.) と DMF (100 mL) を加え、90°C に加熱し、黄色の懸濁液を得た。そこに K₂CO₃ (6.25 g, 45 mmol, 3.0 eq.) を加えると赤色の懸濁液となり、更に 1,2-Dibromoethane (56 g, 0.3 mol, 20 eq.) を加え、18 時間加熱攪拌した。18 時間後に TLC (展開溶媒：クロロホルム、検出：UV) で原料である OPV-1 の消失を確認した。反応溶液を室温になるまで冷却した後、メタノール (100 mL) を加え、沈殿を生じさせた。得られた懸濁液を遠心分離した後、沈殿を回収し、DMF/メタノール = 1/1 の溶液を加えて再度懸濁させ、遠心分離することで洗浄した。得られた沈殿に対して、水を加え再度懸濁させ、遠心分離することで洗浄した。水での洗浄は 3 回行った。得られた沈殿を真空乾燥することで黄色固体を得た。収量 5.61 g 収率 65%。

Table 2-6-54. OPV-2 の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
3.85	t (5.5)	3.8	4 H	b
4.43	t (5.5)	4.0	4 H	a
7.16	d (9.1)	4.0	4 H	c
7.86	s	4.7	4 H	e
7.98	d (9.1)	4.4	4 H	d
8.07	s	2.0*	2 H	f



2-6-28. OPV-3 の合成



Scheme 38. OPV-3 の合成スキーム。

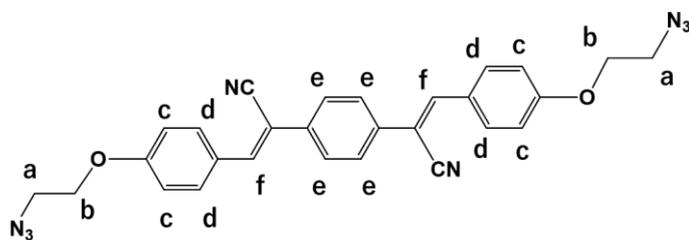
Table 2-6-55. OPV-3 の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-2	378.30	5.81 g	11.2 mmol	1.0 eq.
NaN ₃	65.03	3.64 g	56 mmol	5 eq.
DMSO	78.13	200 mL		

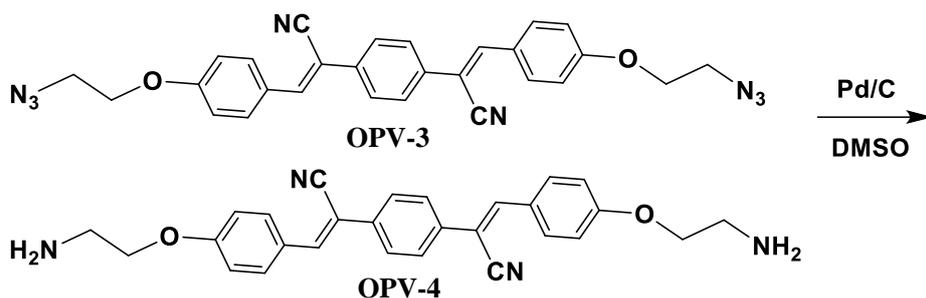
300 mL 三口フラスコに OPV-2 (5.81 g, 11.2 mmol, 1.0 eq.) と DMSO (200 mL) を加え、80°C で加熱攪拌して黄色の懸濁液を得た。そこに NaN₃ (3.64 g, 56 mmol, 5 eq.) を加えると、すぐに橙色の懸濁液となった。反応開始 5 時間後に TLC (展開溶媒：クロロホルム、検出方法：UV) で原料(OPV-2)の消失を確認し、反応を終了した。反応溶液を室温まで冷ました後に水(200 mL)を加えて沈殿を生じさせた。吸引濾過により生じた沈殿を濾別した。その後、得られた沈殿を水で念入りに洗浄し NaN₃ を取り除き、真空乾燥することで黄色固体を得た。収量 4.12 g, 収率 73%。

Table 2-6-56. OPV-3 の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
3.71	t (4.7)	3.7	4 H	b
4.29	t (5.0)	3.7	4 H	a
7.16	d (9.1)	4.4	4 H	c
7.87	s	4.5	4 H	e
8.00	d (9.1)	5.3	4 H	d
8.09	s	2.0*	2 H	f



2-6-29. OPV-4 の合成



Scheme 39. OPV-4 の合成スキーム。

Table 2-6-57. OPV-4 の合成条件。

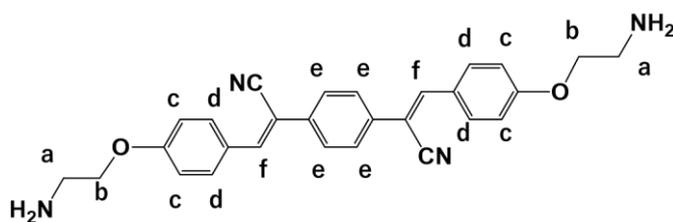
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-3	502.19	1.0 g	2.0 mmol	1.0 eq.
Pd/C				
DMF	73.09	40 mL		
酢酸エチル		20 mL		
メタノール		20 mL		

500 mL 三口フラスコに OPV-3 (1.0 g, 2.0 mmol, 1.0 eq.) と酢酸エチルとメタノールを 20 mL ずつ加え、黄色の懸濁液を得た。この懸濁液の上澄みにほとんど色がついていなかったため、DMF を 40 mL 加え、超音波照射(バス型)を行うと上澄みにも色がある懸濁液を得た。その懸濁液に対し、アルゴン置換を 3 回行った後、Pd/C をマイクロスパーテル山盛り 1 杯加え、再度アルゴン置換した。更に H₂ 置換を行い、室温で攪拌した。反応開始から 1.5 時間後に沈殿が減少し、懸濁液が橙色になっていることを確認し、更に 18 時間後に TLC(展開溶媒：クロロホルム、検出：UV ニンヒドリン)で原料の OPV-3 の消失を確認した。反応混合物を減圧留去し、得られた残渣に DMF を加え、化合物をできる限り溶解させた。この懸濁液を吸引濾過することで Pd/C を取り除き、得られた濾液(橙色溶液)を減圧留去し、橙色固体を得た。ここに酢酸エチルを加えて懸濁させ、再度吸引濾過を行った。この時得られた濾液は橙色、固体は黄色だった。その後、この黄色固体を真空乾燥し、回収した。収量 406

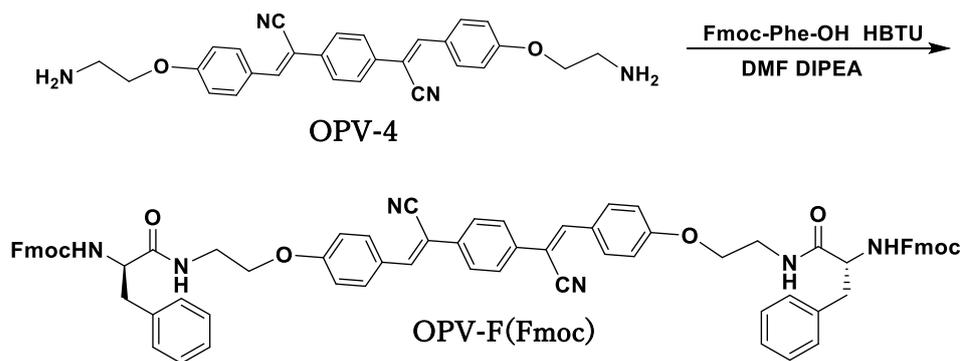
mg, 収率 45%。

Table 2-6-58. OPV-4 の ^1H NMR 測定結果。

^1H NMR (270 MHz, DMSO- d_6 , TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
2.85	t (4.7)	4.12	4 H	b
3.96	t (4.7)	3.60	4 H	a
7.06-7.09	m	6.29	4 H	c, NH
7.80	s	3.75	4 H	e
7.91-7.94	m	5.79	4 H	d, NH
8.01	s	2.00*	2 H	f



2-6-30. OPV-F(Fmoc)の合成



Scheme 40. OPV-F(Fmoc)の合成スキーム。

Table 2-6-59. OPV-F(Fmoc)の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-4	450.54	500 mg	1.11 mmol	1.0 eq.
Fmoc-Phe-OH	387.49	1.01 g	2.61 mmol	2.4 eq.
HBTU	379.25	1.01 g	2.66 mmol	2.4 eq.
DIPEA	129.24	1.5 g	11.6 mmol	11 eq.
DMF	73.09	60 mL		

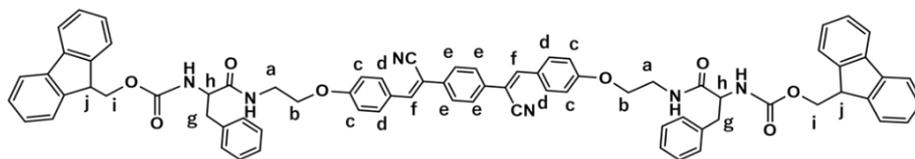
実験操作

300 mL 三口フラスコに Fmoc-Phe-OH (5.4 g, 14 mmol, 2.5 eq.)、HBTU (5.31 g, 14 mmol, 2.5 eq.)、DIPEA (10 mL, 57 mmol, 10 eq.)、DMF (100 mL)、**OPV-4** (2.55 g, 5.7 mmol, 1.0 eq.)を加え、得られた溶液を室温で攪拌した。反応開始から5分後に TLC (展開溶媒：クロロホルム/メタノール=10/1、検出：UV、ニンヒドリン)で原料である **OPV-4** の消失を確認した。反応溶液を減圧留去することで DMF を取り除いた後、HBTU と Fmoc-Phe-OH を取り除くために、得られた残渣に 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて黄色沈殿を細かく懸濁させ、洗浄した。その懸濁液を吸引濾過することで黄色沈殿を濾別し、さらに水をかけて洗浄した。得られた黄色固体を酢酸エチル-クロロホルム混合溶媒に懸濁させ、再度吸引濾過を行った。沈殿として得られた黄色固体を真空乾燥した。収量 314 mg, 収率 24%。

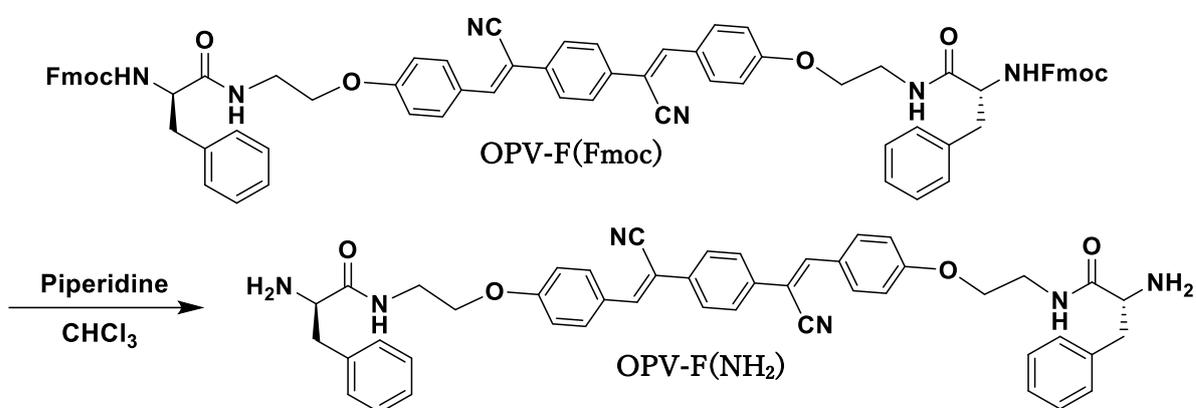
Table 2-6-60. OPV-F(Fmoc)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
2.88-2.94	m	2.4	2 H	a
3.41-3.56	m	13.2	2 H	g
4.00-4.09	m	3.8	4 H	b
4.09-4.21	m	2.1	2 H	i
4.21-4.34	m	4.0	2 H	h
7.10-7.35	m	27.2	18 H	c, phenyl, fmoc
7.35-7.46	m	8.2	4 H	fmoc
7.58-7.68	m	7.7	4 H	fmoc
7.84	s	7.9	4 H	fmoc
7.90	s	4.1	4 H	e

7.96	t (7.6)	4.9	4 H	d
8.05	s	2.0*	2 H	f
8.26-8.34	m	1.6	4 H	NH



2-6-31. OPV-F(NH₂)の合成



Scheme 41. OPV-F(NH₂)の合成スキーム。

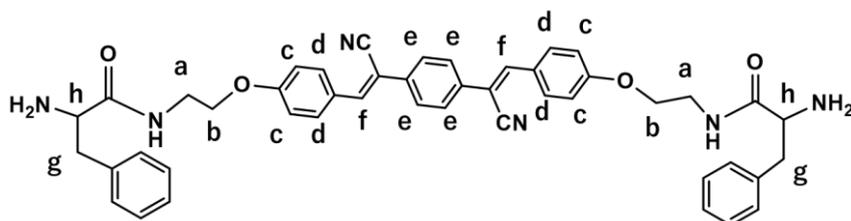
Table 2-6-61. OPV-F(NH₂)の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-F(Fmoc)	1189.38	200 mg	0.17 mmol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	4 mL		
クロロホルム	119.40	20 mL		

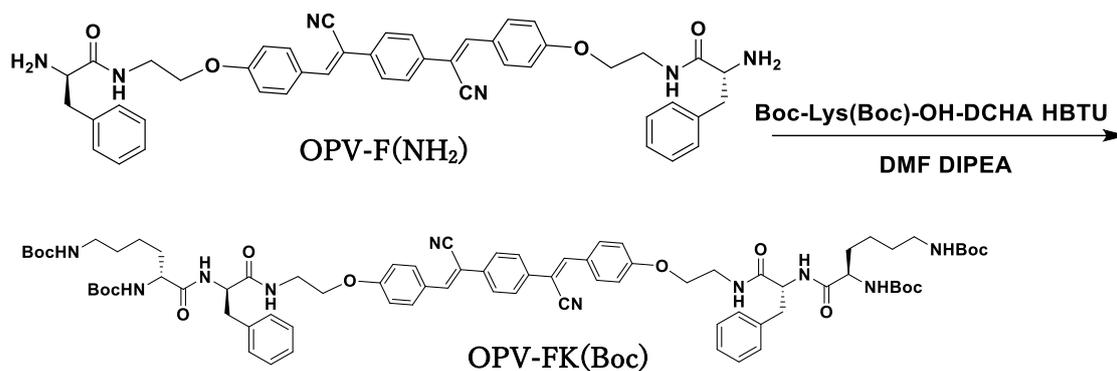
三口フラスコに OPV-F(Fmoc) (314 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.)、クロロホルム (20 mL)、ピペリジン (4 mL, 39.5 mmol, 232 eq.) を加え、室温で攪拌した。反応開始から 2 時間後に原料である OPV-4 の消失を確認した。反応開始時は黄色の懸濁液だったが、反応終了時には橙色の溶液となっていた。反応溶液にトルエンを加えて、3 回減圧留去することでピペリジンを取り除いた。得られた残渣にトルエンを加えて洗浄し、得られた沈殿を吸引濾過で濾取することで黄色固体を得た。収量 177 mg, 収率 90%。

Table 2-6-62. OPV-F(NH₂)の¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
2.64	m	2.4	2 H	g
3.43	m	7.9	4 H	a
4.01-4.08	m	4.1	4 H	b
7.11	d (8.7)	4.7	4 H	c
7.14-7.24	m	10.6	10 H	phenyl
7.84	s	5.0	4 H	e
7.96	d (9.1)	4.7	4 H	d
8.06	s	2.00*	2 H	f
8.09	s	1.9	4 H	NH



2-6-32. OPV-FK(Boc)の合成



Scheme 42. OPV-FK(Boc)の合成スキーム。

Table 2-6-63. OPV-FK(Boc)の合成条件。

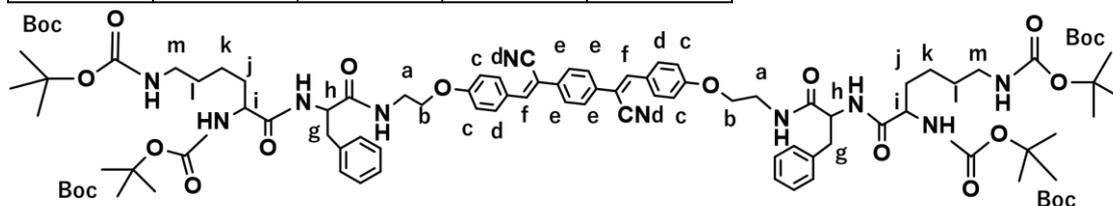
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-F(NH ₂)	744.90	177 mg	0.12 mmol	1.0 eq.
Boc-Lys(Boc)-OH · DCHA	527.73	190mg	0.30 mmol	2.4 eq.

HBTU	379.25	137 mg	0.30 mmol	2.4 eq.
DIPEA	129.24	1 mL		18.5 eq.
DMF	73.09	10 mL		

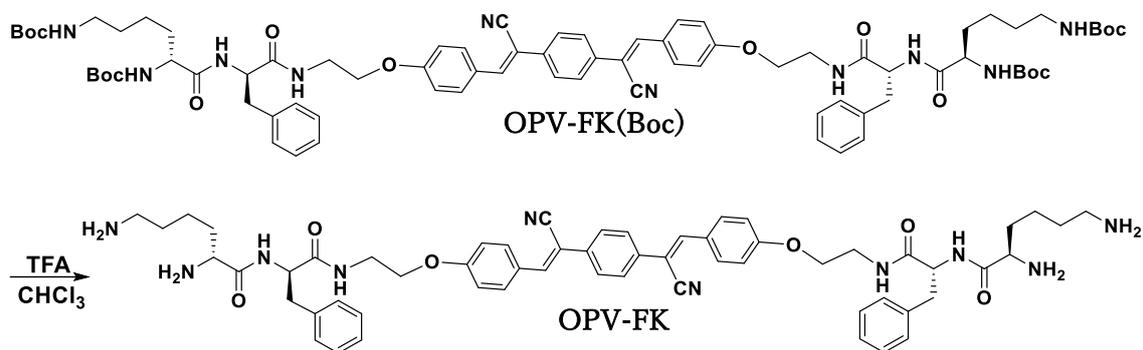
三口フラスコに HBTU (137 mg, 0.3 mmol, 2.5 eq.)、Boc-Lys(Boc)-OH · DCHA (190 mg, 0.3 mmol, 2.5 eq.)、DMF (10 mL)、DIPEA (1 mL)、OPV-F(NH₂) (177 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq.)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 30 分後に TLC で原料である OPV-F(NH₂)の消失を確認した。反応溶液にイオン交換水を加え、沈殿を生じさせ、吸引濾過することで沈殿を濾別した。その後沈殿をヘキサンで洗浄した後、再度吸引濾過し、沈殿を濾取した。得られた沈殿を真空乾燥し、橙色固体を得た。得られた橙色固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 5/1)により精製し、黄色固体を得た。収量 198 mg, 収率 60 %。

Table 2-6-64. OPV-FK(Boc)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, CDCl ₃ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.25	m	56.27	36 H	boc
1.63-1.81	m	14.83	12 H	j, k, l
3.00-3.30	m	9.33	8 H	a, m
3.35-3.82	m	2.67	4 H	g
3.82-4.14	m	3.29	4 H	b
4.55-4.81	m	6.01	4 H	h, i
6.48	br s	2.13	2 H	NH
6.76	br s	2.66	2 H	NH
7.14-7.17	m	5.35	4 H	c
7.18-7.24	m	12.54	10 H	phenyl
7.53	s	2.00*	2 H	d
7.73	s	3.28	4 H	e
7.91	d (8.6)	3.64	4 H	f



2-6-33. OPV-FK の合成



Scheme 43. OPV-FK の合成スキーム。

Table 2-6-65. OPV-FK の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質量	当量
OPV-FK(Boc)	1401.71	198 mg	32 μ mol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸	114.02	2 mL	27 mmol	
クロロホルム	119.40	20 mL		

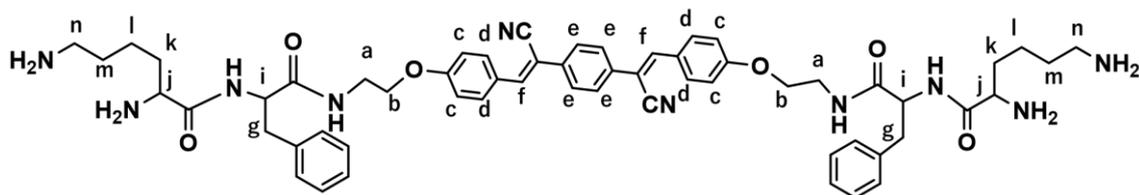
200 mL ナスフラスコに OPV-FK(Boc) (198 mg, 32 μ mol, 1.0 eq.)、クロロホルム (20 mL)、トリフルオロ酢酸 (2mL)を加えて攪拌した。反応開始から 1 時間後に原料である OPV-FK(Boc)の消失を TLC(展開溶媒 クロロホルム：メタノール 検出 UV ニンヒドリン)で確認し、反応を終了した。反応溶液にトルエンを加え、減圧留去を繰り返し、トリフルオロ酢酸を取り除けたことを確認したあと、真空乾燥を行い、黄色の固体を得た。¹H NMR 測定の結果 Boc 基が残っていることを示すシグナルが確認できたため、再度、トリフルオロ酢酸による脱保護を行った。

200 mL ナスフラスコに前反応の残渣に、クロロホルム、トリフルオロ酢酸を加えて攪拌した。反応開始から 24 時間後に反応を終了した。反応溶液にトルエンを加え、減圧留去を繰り返し、トリフルオロ酢酸を取り除けたことを確認したあと、真空乾燥を行い、黄色の固体を得た。収量 196 mg, 収率 99%。

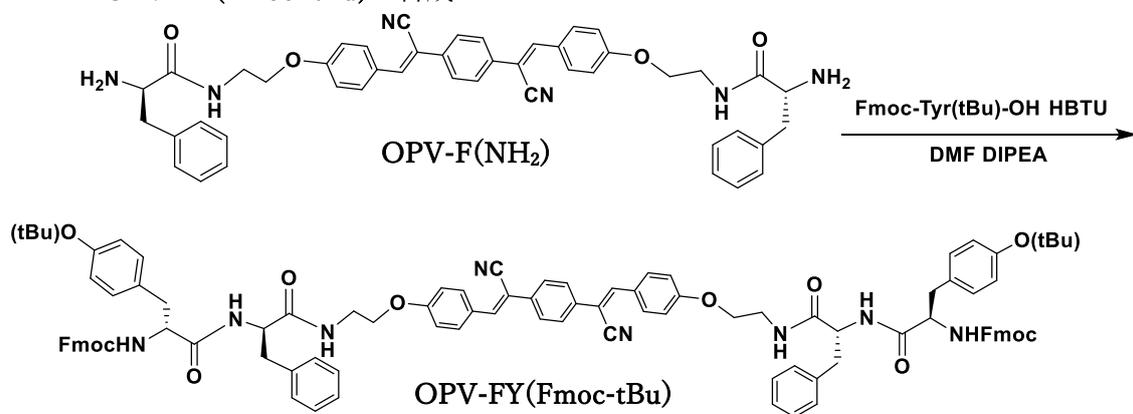
Table 2-6-66. OPV-FK の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO, TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.40-1.58	m	6.36	4H	l
1.61-1.78	m	6.02	4 H	k
1.83-1.94	m	5.20	4 H	n

2.91-2.99	m	5.91	4 H	m
2.99-3.08	m	4.06	4 H	a
3.58-3.74	m	3.49	4 H	g
3.77-3.97	m	3.75	4 H	b
3.97-4.08	m	4.02	2 H	j
4.59-4.68	m	2.08	2 H	i
7.02	d (8.9)	3.95	4 H	c
7.07-7.29	m	13.17	14 H	phenyl, NH
7.83	s	3.04	4 H	d
7.84-7.89	m	2.00	2 H	f
7.98	d (8.9)	4.37	4 H	e



2-6-34. OPV-FY(Fmoc-tBu)の合成



Scheme 44. OPV-FY(Fmoc-tBu)の合成スキーム。

Table 2-6-67. OPV-FY(Fmoc-tBu)の合成条件。

試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-F(NH ₂)	744.90	50 mg	0.067 mmol	1.0 eq.
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459.53	190mg	0.141 mmol	2.4 eq.
HBTU	379.25	52 mg	0.141 mmol	2.4 eq.
DIPEA	129.24	1 mL		18.5 eq.

DMF	73.09	10 mL		
-----	-------	-------	--	--

三口フラスコに HBTU (52 mg, 0.141 mmol, 2.1 eq.)、Fmoc-Tyr(tBu)-OH (71 mg, 0.141 mmol, 2.1 eq.)、DIPEA (130 mg)、乾燥 DMF (10 mL)、OPV-F(NH₂) (50 mg)を加え、室温で攪拌した。反応開始から 1 時間後に原料である OPV-F(NH₂)の消失を TLC(展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 15/1 検出：UV、ニンヒドリン)により確認した。反応溶液に酢酸エチルを加え希釈し、得られた溶液に水を加えて分液操作による洗浄を行った。分液操作中に沈殿が生じたため、吸引ろ過により濾取したことで黄色固体を得た。¹H NMR 測定の結果、この固体は目的物の OPV-FY(Fmoc-tBu)であることが確認された(収量 42 mg)。

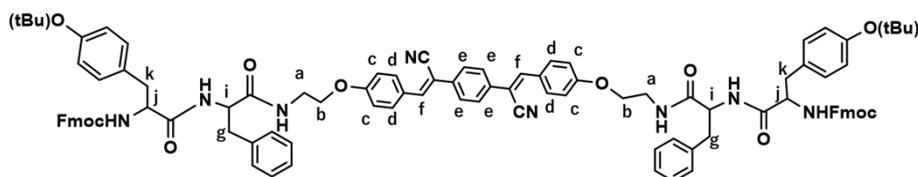
溶解していた成分は分液操作による洗浄を行い、回収した有機相に硫酸ナトリウムを加え脱水し、硫酸ナトリウムを吸引濾過により濾別し、得られた濾液を減圧留去、真空乾燥することで黄色固体を得た。この黄色固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製を行い、黄色固体を得た(34 mg)。合計 収量 76 mg, 収率 71%。

MALDI TOF MS (dithranol): m/z calc. for C₁₀₀H₉₈N₈O₁₂:1650.94 [M+Na]⁺; found 1650,294, m/z calc. for C₁₀₀H₉₈N₈O₁₂ 1667.05 [M+K]⁺; found 1666.250.

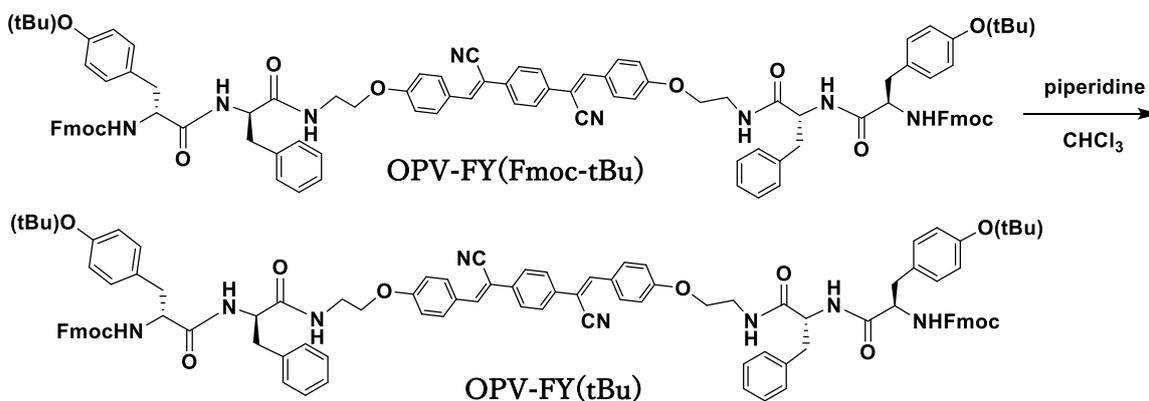
Table 2-6-68. OPV-FY(Fmoc-tBu)の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.05-1.31	m	25.08	18 H	tBu
2.79-2.87	m	3.47	4 H	k
2.93-3.04	m	2.59	4 H	a
3.95-4.28	m	11.86	10 H	b, j
4.48-4.62	m	1.05	2 H	i
6.77	d (8.9)	3.53	4 H	tyr
7.05-7.16	m	12.78	14 H	c, phenyl
7.16-7.24	m	8.21	8 H	tyr, fmoc
7.27-7.35	m	4.47	4 H	fmoc
7.35-7.45	m	4.59	4 H	fmoc
7.52-7.58	m	1.99	2 H	NH
7.60-7.67	m	3.81	4 H	fmoc
7.86	s	6.42	4 H	e
7.95	s	5	4 H	d

8.03-8.15	m	2.00*	2 H	f
8.26-8.33	m	1.68	2 H	NH



2-6-35. OPV-FY(tBu)の合成



Scheme 45. OPV-FY(tBu)の合成スキーム。

Table 2-6-69. OPV-FY(tBu)の合成条件。

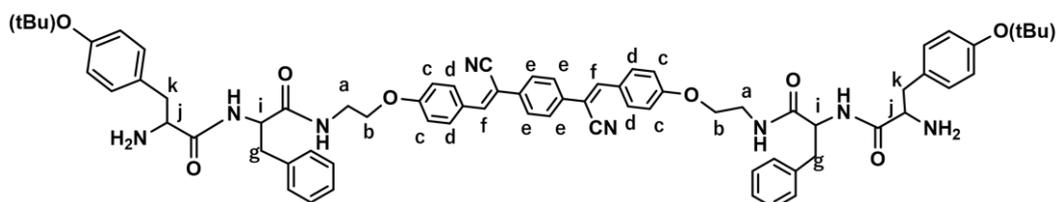
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-FY(Fmoc-tBu)	1401.71	40mg	25 μ mol	1.0 eq.
ピペリジン	85.15	2 mL		
クロロホルム	119.40	20 mL		

200 mL ナスフラスコに OPV-FY(Fmoc-tBu) (40 mg, 25 μ mol, 1.0 eq.)、クロロホルム (20 mL)、ピペリジン (2 mL)を加え室温で攪拌した。反応開始時は淡黄色の懸濁液だったが、反応開始から3時間後に黄色の溶液となり、原料である OPV-FY(Fmoc-tBu)の消失を TLC(展開溶媒：クロロホルム/メタノール = 15/1 検出方法：UV)により確認した。反応溶液にトルエンを加え、減圧留去を繰り返し、ピペリジンを取り除いた。得られた残渣にヘキサンを加えて洗浄後、吸引濾過により沈殿を濾取し、真空乾燥することで黄色固体を得た。収量 23 mg, 収率 80%。

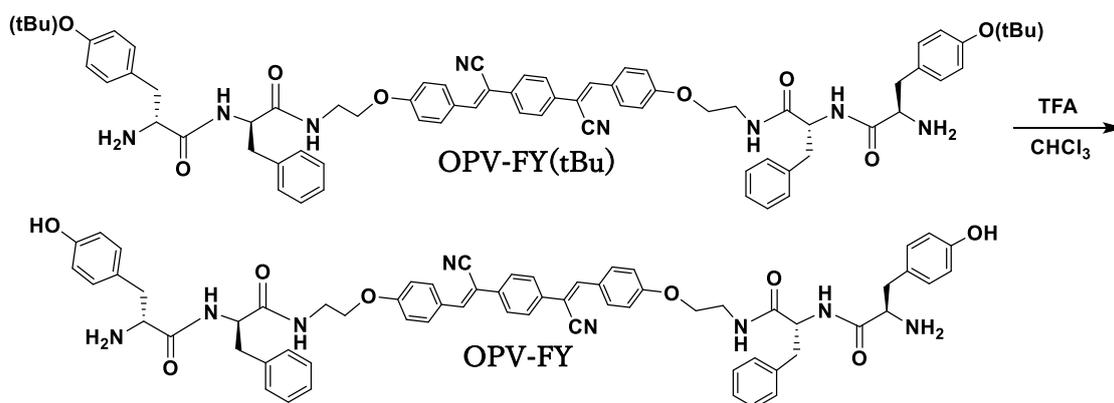
MALDI TOF MS (dithranol): m/z calcd for C₇₂H₇₈N₈O₈: 1183.46 [M]⁺; found, 1183.575.

Table 2-6-70. OPV-FY(tBu)の¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ/ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
1.24	s	32.18	18 H	tBu
2.82-3.03	m	10.19	8 H	a, k
3.97-4.09	m	5.01	6 H	b, j
4.50-4.65	m	2.25	2 H	i
6.81-6.90	m	7.71	8 H	tyr, NH
7.03-7.26	m	26.73	18 H	c, phenyl, tyr
7.86	s	3.75	4 H	e
7.96-8.05	m	3.23	4 H	f
8.05-8.13	m	2.00*	2 H	d
8.25-8.46	m	4.84	4 H	NH



2-6-36. OPV-FY の合成



Scheme 46. OPV-FY の合成スキーム。

Table 2-6-71. OPV-FY の合成条件。

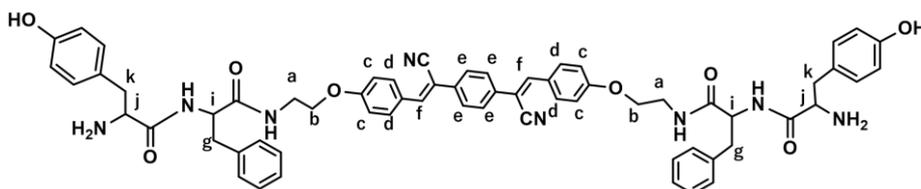
試薬	分子量	使用量	物質質量	当量
OPV-FY(tBu)	1183.46	27 mg	23 μ mol	1.0 eq.
トリフルオロ酢酸	114.02	1 mL		
クロロホルム	119.40	10 mL		

200 mL ナスフラスコに **OPV-FY(tBu)** (27 mg, 23 μ mol, 1.0 eq.)、クロロホルム (10 mL)、トリフルオロ酢酸 (1 mL) を加え、室温で攪拌した。反応開始から 1 時間後に原料の消失を TLC(展開溶媒：メタノール, 検出 UV) で確認し、その後、念のため更に 1 時間室温で攪拌した。その後、反応溶液にトルエンを加え、減圧留去を繰り返し、トリフルオロ酢酸を除去し、真空乾燥後、黄色の固体を得た。収量 23 mg, 収率 96%。

MALDI TOF MS (dithranol): m/z calc. for $C_{64}H_{62}N_8O_8$ 1071.25 [M]⁺; found, 1071.481

Table 2-6-72. OPV-FY の ¹H NMR 測定結果。

¹ H NMR (270 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, r.t., 積算 32)				
δ /ppm	分裂(J/Hz)	積分比	理論比	帰属
2.78-3.16	m	17.01	8 H	a, k
3.49-3.72	m	7.81	4 H	g
3.87-4.09	m	11.61	6 H	b, j
4.58-4.68	m	2.83	2 H	i
6.68-6.79	m	7.93	8 H	tyr, NH
6.96-7.27	m	25.95	18 H	c, phenyl, tyr
7.80-7.85	m	5.19	6 H	e, f
7.91-7.99	m	4.91	4 H	d
8.22-8.45	m	3.18	4 H	NH



2-7. 参考文献

- 2-1) Masaki Nakahata, Shoko Mori, Yoshinori Takashima, Hiroyasu Yamaguchi, Akira Harada, *Chem.*, 2016,**1**, 766-775.
- 2-2) Ryota Tamate, Kei Hashimoto, Tatsuhiko Horii, Manabu Hirasawa, Xiang Li, Mitsuhiro Shibayama, and Masayoshi Watanabe, *Adv. Mater.* 2018, **30**, 1802792.
- 2-3) Xudong Yu, Liming Chen, Mingming Zhanga and Tao Yi. *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 5346-5371.
- 2-4) Natashya Falcone, Shibaji Basak, BinDong, JebrielSyed, Annaleizle Ferranco, Alan Lough, Zhe She and Heinz-Bernhard Kraatz, *ChemPlusChem*, 2017, **82**,1282–1289.
- 2-5) F. Tang, H. Feng, Y. Du et al., *Chemistry - An Asian Journal*, 2018, **13**, 1962–1971.
- 2-6) Shibaji Basak, Jayanta Nanda and Arindam Banerjee, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 2356-2359.
- 2-7) Adam A. Sobczuk, Shun-ichi Tamaru and Seiji Shinkai. *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 3093–3095.
- 2-8) Adam A. Sobczuk, Youichi Tsuchiya, Tomohiro Shiraki, Shun-ichi Tamaru, and Seiji Shinkai. *Chem. Eur. J.*, 2012,**18**, 2832 – 2838.
- 2-9) Kyte J, Doolittle RF. *J. Mol Biol.*, 1982, **157**, 105–132.
- 2-10) Hopp TP, Woods KR. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1981, **78**, 3824–3828.
- 2-11) R. D. Mahapatra, J. Dey, and R. G. Weiss, *Langmuir*, 2017, **33**, 12989-12999.
- 2-12) Wathsala Liyanage, Herdeline Ann M. Ardoña, Hai-Quan Mao and John D. Tovar. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*,751-759.
- 2-13) D.R.Lide, *Handbook of Chemistry and Physics, 72nd Edition*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.
- 2-14) Naofumi Kuroda, Yukie Tounoue, Kouichiro Noguchi, Yutaro Shimasaki, Hitoshi Inokawa, Masayoshi Takano, Seiji Shinkai, Shun-ichi Tamaru, *Polym J.*, 2020, **52**, 939–946.

3 章

超分子ヒドロゲルのゲスト応答的なゾル-ゲル
相転移を利用したアニオン性多糖類の識別

3-1. 序論

グリコサミノグリカン類とは、グルコサミンやガラクトサミンとウロン酸の繰り返し構造からなる多糖類の総称であり、ヒアルロン酸(HA)やコンドロイチン硫酸(CS)、ヘパリン(Hep)などが分類される。この中でもヘパリンは、ウロン酸(L-イズロン酸またはD-グルクロン糖)とD-グルコサミンの2糖の単位の繰り返し構造に、2糖あたり平均2-3個のスルホ基を有する構造からなる硫酸化グリコサミノグリカンである。ヘパリンは、アンチトロンビンIIIと特異的に結合することにより、第IIa因子や第Xa因子などの血液凝固因子を阻害し、血液凝固防止作用を示す。そのため、血液透析などの体外循環装置使用時の血液凝固防止剤として世界中で汎用されるなど、臨床上きわめて重要な医薬品であり、第15改正日本薬局方に収載されている³⁻¹⁾。

2007年12月アメリカにおいて、Baxter社製のヘパリンナトリウム製剤の静脈内急速大量投与を受けた患者に、血圧低下や頻脈等を伴うアレルギー反応が頻発し、80名以上の死亡例が報告された。これまでHep関連製剤に関して、血小板減少症などの副作用が知られていたが、そのとき発生した副作用はこれまでの例とは明らかに異なっていた。さらにドイツでも同様の症例が確認され、国際的な問題へと発展した。2008年3月に米国食品医薬品局(FDA)は有事事象が多発したロットにHep様物質が混入していることを発表し、のちに2次元NMRなどを用いる構造解析により、このHep様物質は過硫酸化コンドロイチン硫酸(OSCS)であることが明らかになった³⁻²⁾。

コンドロイチン硫酸(CS)は2糖単位にスルホ基が1-3個結合しているものであり、混入したOSCSはCS中のヒドロキシ基が全て硫酸化され、2糖単位にスルホ基が4個結合した構造をしている。現状このOSCSの検出方法は、¹H NMRもしくはキャピラリー電気泳動法である³⁻¹⁾。¹H NMRはヘパリン中のN-アセチルグルコサミンのN-アセチル基と、OSCS中のN-アセチルグルコサミンのN-アセチル基のケミカルシフトが異なることを利用した方法である。キャピラリー電気泳動法はHepとOSCSのスルホ基の結合数の違いを利用する分離分析する方法である。このキャピラリー電気泳動法は、ルーチン分析に適した分析法であるものの、OSCS検出の特異性や検出感度にやや、問題を残しているといわれている。そのため、より精度が高くかつ簡便にHep中のOSCSを検出する方法は、今なお検討されている。

これまでに報告されている超分子ゲルを用いた検出への応用の研究例として、Gotoらは、酵素反応と超分子ゲルを組み合わせることでがん細胞を検出できる系を開発した³⁻³⁾。この

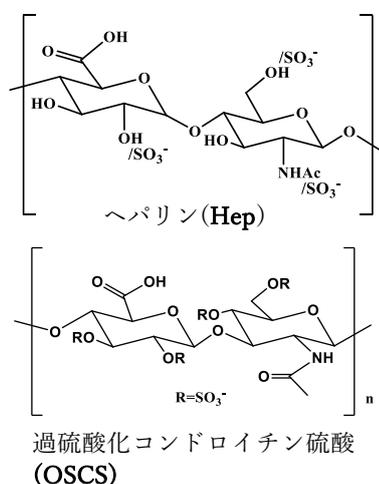


Figure 3-1. Hep と OSCS の構造。

系での小分子は超分子ゲル化を阻害する構造を導入しており、がん細胞から分泌される **MMP-7** と呼ばれる酵素の反応によってゲル化を阻害する構造を切断されるような構造になっている。そのため、ガン細胞がなく **MMP-7** が分泌されていない健康な系内では溶液状態であるが、がん細胞があると **MMP-7** の酵素反応によってゲル化剤が系内へ放出されてゲルを形成することでガン細胞の検出が可能だと報告されている (Figure 3-2)。このような超分子ゲルの形成に伴うゾル-ゲル相転移を用いることで、ゲスト分子への応答前後で劇的に系の状態を変化させることができるため、超分子ゲルを利用した検出系の構築への研究は活発に行われている。

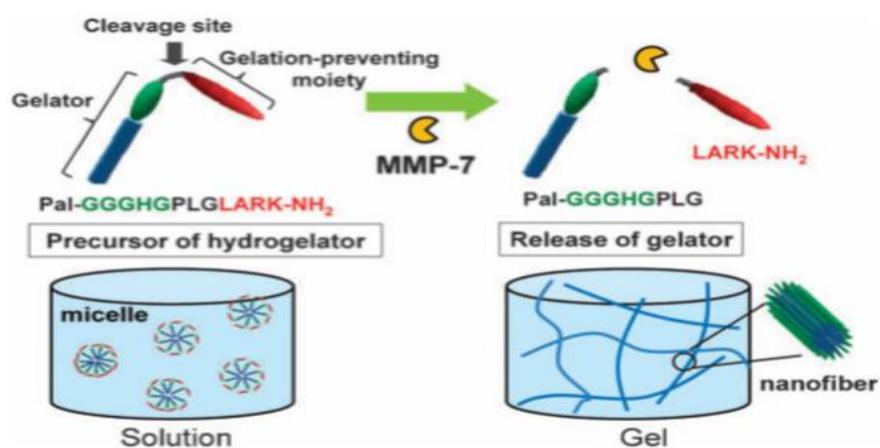
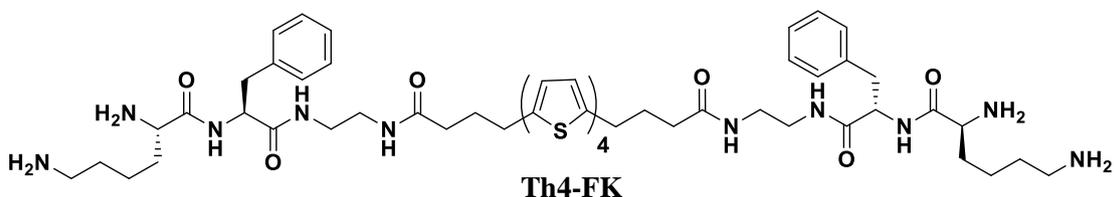


Figure 3-2. 酵素反応をトリガーとする超分子ゲルの形成によるガン細胞検出系の模式図。



前章において、中心骨格に **Th4** 骨格を有し、両末端にフェニルアラニン-リジンのペプチド鎖を有する **Th4-FK** が塩基性条件下でヒドロゲルを形成したことを報告した (Figure 3-3)。 **Th4-FK** は末端にカチオン性側鎖を有し、かつゲル化能を有することから、アニオン性の多糖類を添加することでヒドロゲルへの相転移を引き起こすことが期待できる。本章では、それを応用したアニオン性多糖類の識別・検出系の構築を目指した。

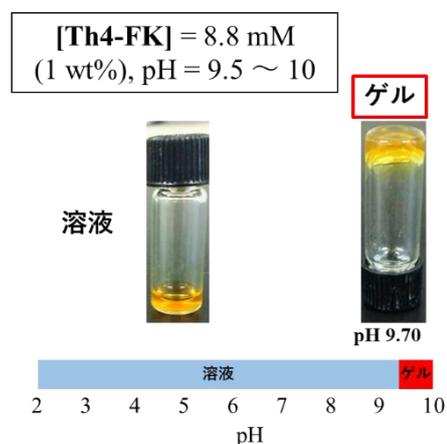


Figure 3-3. **Th4-FK** の pH 応答的なヒドロゲルの形成。

3-2. Th4-FK の pH 応答性の評価

Th4-FK が pH に応答してヒドロゲルを形成することが確認できており、酸性から塩基性に pH が変化してヒドロゲルを形成した結果、Th4-FK が繊維状構造体を形成することが確認できていた。しかしその過程でどのように Th4-FK が会合するかが不明確であった。アニオン性多糖の添加に伴う相転移を誘発するために Th4-FK のヒドロゲルへの相転移の詳細を調査する必要がある。そこでまずは以下の実験操作に従って Th4-FK 水溶液の pH 応答性を評価した。

Th4-FK 1 mg を逆浸透水 40 mL に溶解させ、Th4-FK 水溶液(22 μ M)を調製した。得られた水溶液を分注し、各水溶液に対して塩酸と NaOH 水溶液を加えて pH を調製し、得られたサンプルの CD スペクトルを測定した。その後、各 pH の Th4-FK 水溶液を凍結乾燥することで得られたサンプルの SEM 観察を行った。

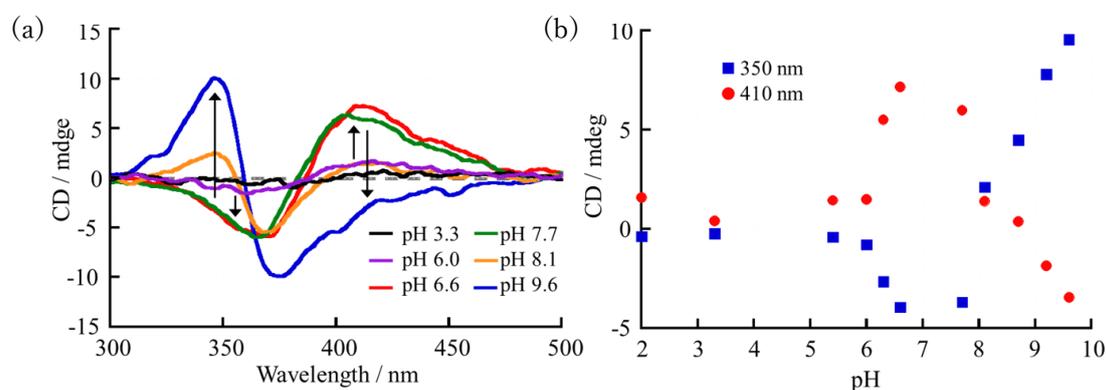


Figure 3-4. (a) pH 変化に伴う Th4-FK 水溶液の CD スペクトル変化。(b) 各 pH での 350 nm と 410 nm の CD シグナル強度のプロット。セル長=1 cm, 室温。

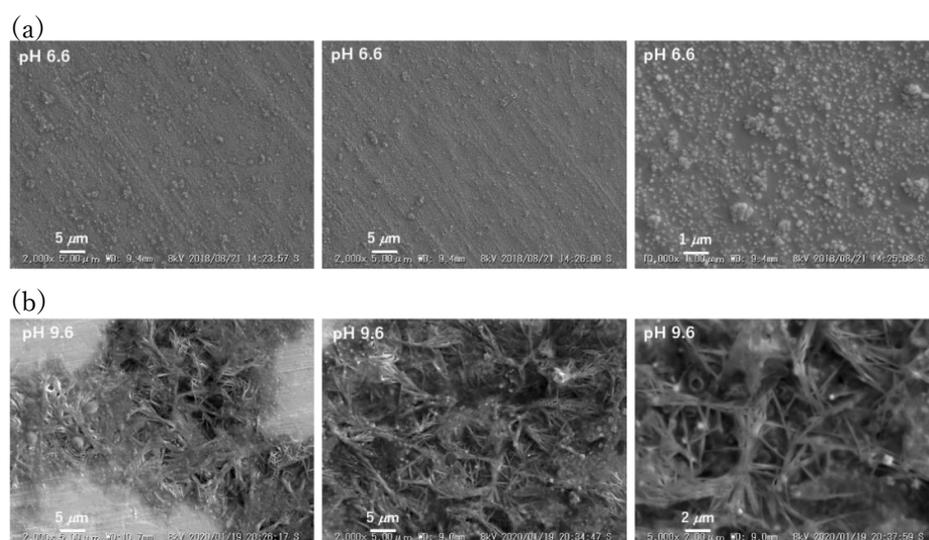


Figure 3-5. 各 pH 条件での Th4-FK 会合体の SEM 観察像。(a) pH 6.6, (b) pH 9.6, [Th4-FK]=22 μ M.

pH 6 以下の酸性条件では、有意な CD シグナルを示すことはなかったが、pH 6.6 ~ 8 の中性付近の pH 条件では 370 nm 付近に負の吸収帯、410 nm 付近に正の吸収帯を持つ負のコットン効果が確認できた。これに対して、pH 8 ~ 10 付近までの pH 条件では、350 nm に正の吸収帯、370 nm に負の吸収帯を持つ正のコットン効果が確認された。このことから **Th4-FK** は pH 6 ~ 8 と pH 8 ~ 10 では、異なる会合形態を採ることが示唆された。そこで特徴的な CD スペクトルを示した pH 6.6 と pH 9.6 の条件でそれぞれ調製した会合体について、SEM 観察を行った (Figure 3-5)。その結果、**Th4-FK** は 22 μM という希薄な濃度条件では、pH 6.6 で顆粒状の構造体を形成し、pH 9.6 では繊維状構造体を形成することが確認された。これらの結果から、CD スペクトルから推定された **Th4-FK** の pH 応答的な会合状態変化は、顆粒状から繊維状への相転移であることが明らかとなった。

リジン側鎖のアミノ基の pK_a は 8.95、10.53 と報告されている²⁻¹³⁾。このことから、**Th4-FK** 上に 4 つあるアミノ基は、中性付近で塩基性側へと pH が変化することによって、アンモニウムカチオンからの脱プロトン化による劇的なカチオン電荷の減少が発現すると考えられる。これによって、中性付近で形成していた顆粒状構造体が繊維状構造体へ相転移したと考えられる (Figure 3-6)。この考察は、あくまで希薄な溶液状態でのものであるが、この相転移が発現する pH 領域と、**Th4-FK** がヒドロゲルを形成する pH 領域 (pH 9.5 ~ 10) とに一定の相関関係があることから、**Th4-FK** のヒドロゲルを形成過程も、同様に考察可能であると結論づけた。

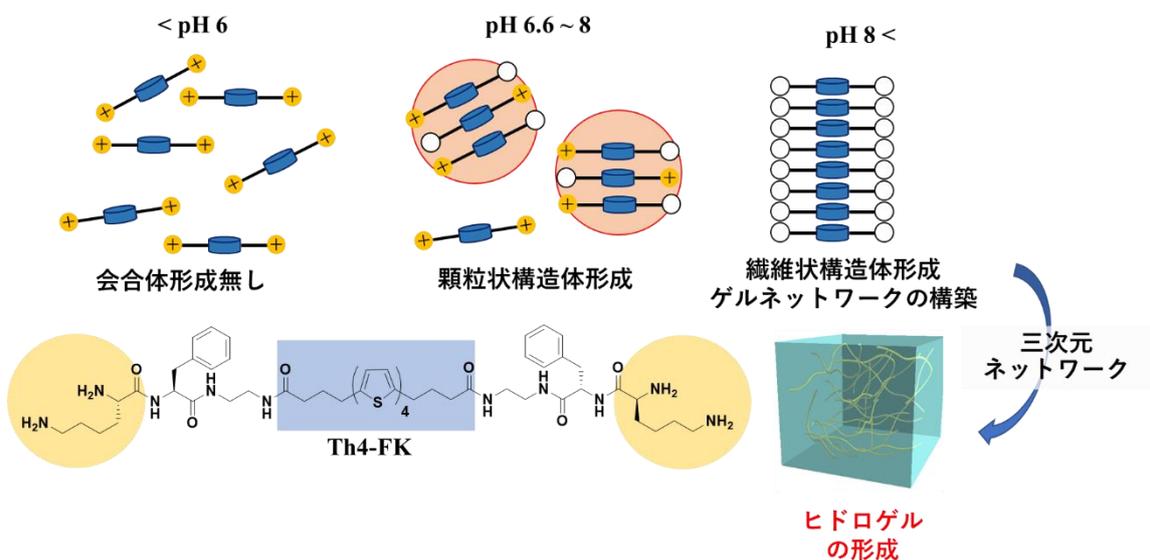


Figure 3-6. **Th4-FK** の pH 応答的な会合状態変化とヒドロゲル形成に関する模式図。

上記で示した刺激応答的な **Th4-FK** のヒドロゲル形成の過程を利用して、アニオン性多糖の検出について検討した。**Th4-FK** がカチオン性を保持しつつ顆粒状構造体を形成する pH 6.6 の条件でアニオン性多糖を添加することで、アニオン性多糖との静電相互作用を駆動力とした錯形成が進行すると考えられる。これによって **Th4-FK** 間の静電反発は軽減されるとともに、**Th4-FK** が多糖鎖に沿って集積されることで、繊維状構造体を形成すると期待される。さらにアニオン性多糖は **Th4-FK** の繊維状会合体を架橋する役割を担うことも期待されるため、**Th4-FK**/多糖の繊維状会合体同士が絡み合うことで三次元ネットワークを構築し、ヒドロゲルが形成すると期待される (Figure 3-7)。

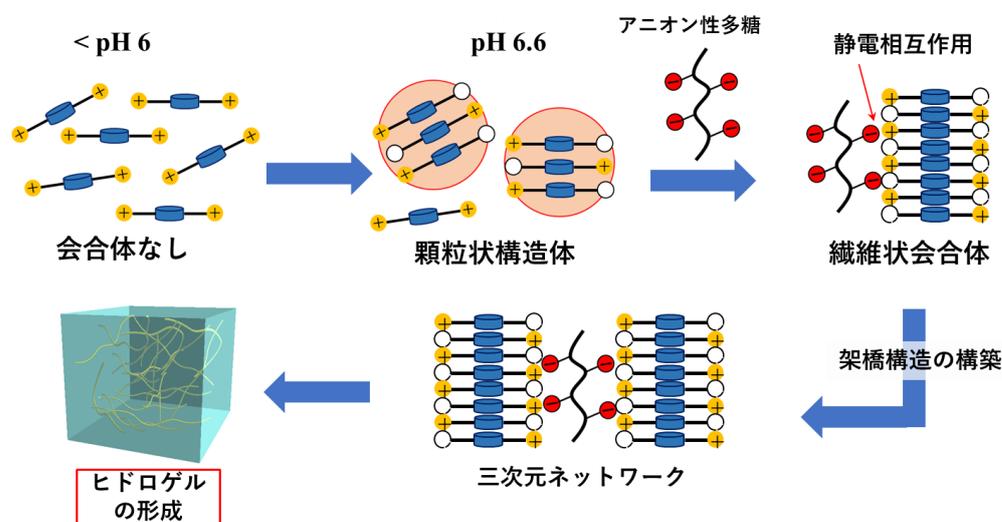


Figure 3-7. アニオン性多糖類の添加に伴う **Th4-FK** のゲスト応答的なゲル形成に関する作業仮説。

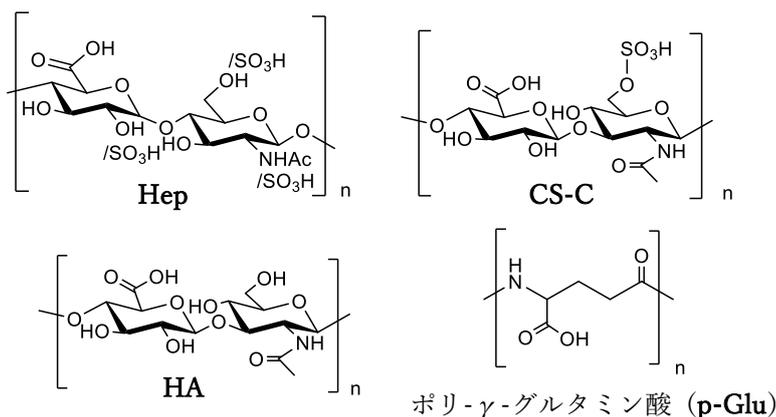


Figure 3-8. アニオン性多糖類の構造。

3-3. アニオン性高分子添加に伴う **Th4-FK** の応答性の評価

Figure 3-8 に示した 3 種類のアニオン性多糖 (**Hep**, **CS-C**, **HA**) とポリ- γ -グルタミン酸

(p-Glu) に対する Th4-FK の応答性を評価した。Hep は 2 糖の繰り返し構造にカルボキシ基が 1 つとスルホ基が 2~3 個含まれており、CS-C はカルボキシ基が 1 つとスルホ基が 1 つ含まれている硫酸化したグリコサミノグリカン類である。一方、HA はスルホ基を持たないグリコサミノグリカンであり、p-Glu はカルボキシ基のみを有する人工高分子である。このようなアニオン性置換基の種類や個数の違いが、Th4-FK のゲスト応答性にどのような影響を及ぼすか検討した。Th4-FK 会合状態の変化について詳細な検討を行うために、まず以下の実験操作に従って希薄な溶液条件での CD スペクトル測定を行った。

Th4-FK 1 mg を逆浸透水 40 mL に溶解させ、Th4-FK 水溶液(22 μ M)を調製した。得られた水溶液を塩酸と NaOH 水溶液により pH 6.6 に調整した。別途、5 mM (モノマーユニット濃度) の各アニオン性高分子水溶液を調製し、塩酸と NaOH 水溶液により pH 6.6 に調整した。これらの水溶液を用いて、Th4-FK 水溶液に各種アニオン性高分子水溶液を添加していき、その過程の CD スペクトルを測定した。

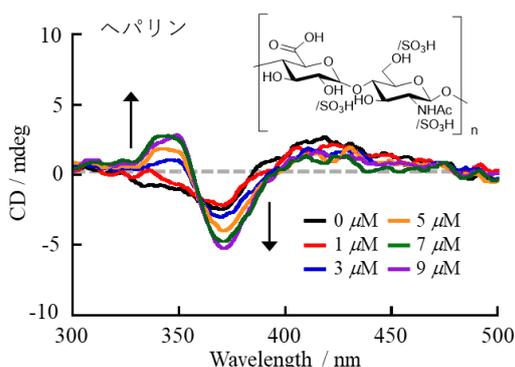


Figure 3-9. Hep 添加に伴う Th4-FK 水溶液の CD スペクトル変化。[Th4-FK]=22 μ M, pH 6.6. セル長=1 cm, 室温。

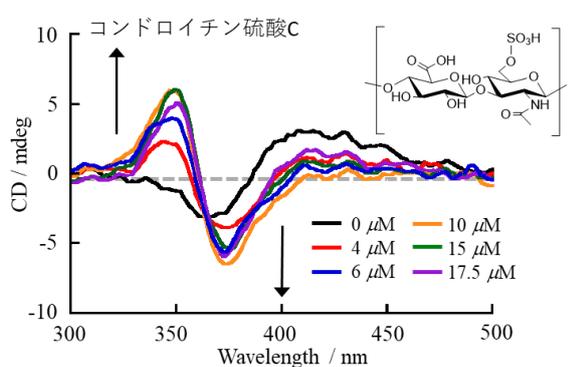


Figure 3-10. CS-C 添加に伴う Th4-FK 水溶液の CD スペクトル変化。[Th4-FK]=22 μ M, pH 6.6. セル長=1 cm, 室温。

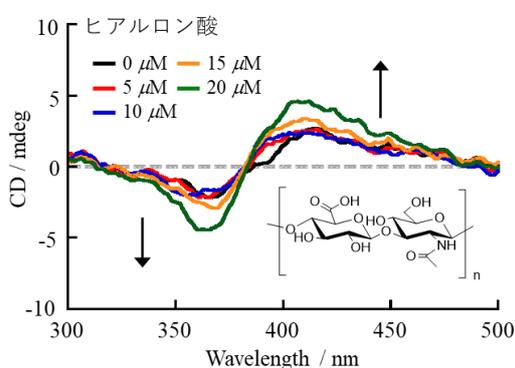


Figure 3-11. HA 添加に伴う Th4-FK 水溶液の CD スペクトル変化。[Th4-FK]=22 μ M, pH 6.6. セル長=1 cm, 室温。

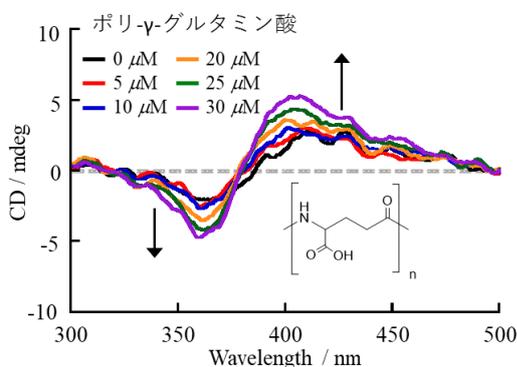


Figure 3-12. p-Glu 添加に伴う Th4-FK 水溶液の CD スペクトル変化。[Th4-FK]=22 μ M, pH 6.6. セル長=1 cm, 室温。

硫酸化アニオン性多糖である **Hep** と **CS-C** を添加した場合、顆粒状構造体から繊維状構造体へと相転移していることを示す CD スペクトル変化が確認された(Figure 3-9, 3-10)。一方で **HA** と **p-Glu** を添加した場合は、顆粒状構造体を形成していることを示す CD シグナルの波形を維持したまま、CD 強度が上昇した(Figure 3-11, 3-12)。このことから、この条件では、スルホ基を構造内に有するグリコサミノグリカン類を添加することで **Th4-FK** の繊維状構造体の形成を促進させることができることが示された。この結果から、**Th4-FK** の相転移を利用することで、アニオン性高分子の中から硫酸化アニオン性多糖類を識別することができることが示唆された。

さらに興味深いことに、**Th4-FK** が顆粒状構造体を形成していない pH 6.0 の条件で **CS-C** を添加しても、顆粒状構造体の形成を示す CD シグナルしか得られず、繊維状構造体の形成を示す CD シグナルは得られなかった(Figure 3-13, 3-14)。以上の結果から、**Th4-FK** にアニオン性多糖類を添加して繊維状会合体を形成させるには、アニオン性多糖の種類だけでなく、pH も重要な要素であることが明らかとなった。

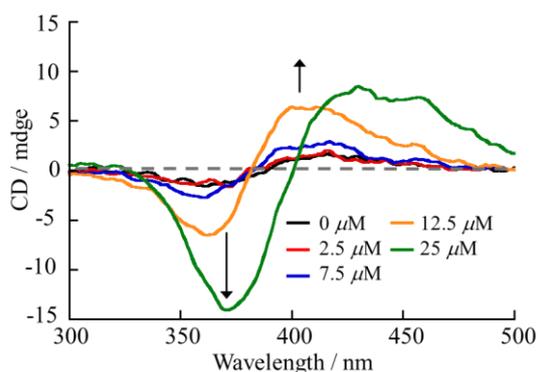


Figure 3-13. CS-C 添加に伴う **Th4-FK** 水溶液の CD スペクトル変化。
[**Th4-FK**]=22 μ M, pH 6.0,
セル長=1 cm, 室温。

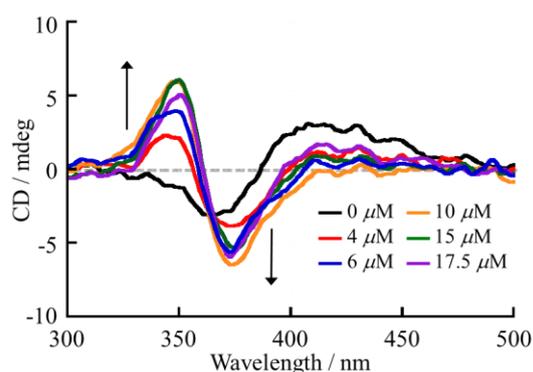


Figure 3-14. CS-C 添加に伴う **Th4-FK** 水溶液の CD スペクトル変化。
[**Th4-FK**]=22 μ M, pH 6.6
セル長=1 cm, 室温。

3-4. アニオン性高分子添加に伴う **Th4-FK** のゲスト応答的なゲル化試験

上記で得られた結果をもとに、pH 6.6 かつ **Th4-FK** がヒドロゲルを形成する高濃度条件 ($[\text{Th4-FK}] = 17.6 \text{ mM}$) においてアニオン性高分子の添加に伴うゲスト応答型ヒドロゲル形成について、以下の実験操作に従って検討した。

Th4-FK 20 mg を逆浸透水 1 mL に溶解させ、**Th4-FK** 水溶液 (17.6 mM) を調製した。得られた水溶液を塩酸と NaOH 水溶液により pH 6.6 に調整した。別途、200 mM (モノマー濃度) の各アニオン性高分子水溶液を調製し、塩酸と NaOH 水溶液により pH 6.6 に調整した。これらの水溶液を用いて、**Th4-FK** 水溶液に各種アニオン性高分子水溶液を添加していき、その過程の CD スペクトルを測定した。さらにゲル形成については倒立法により判定し、それぞれの凍結乾燥サンプルについて SEM 観察を行った。

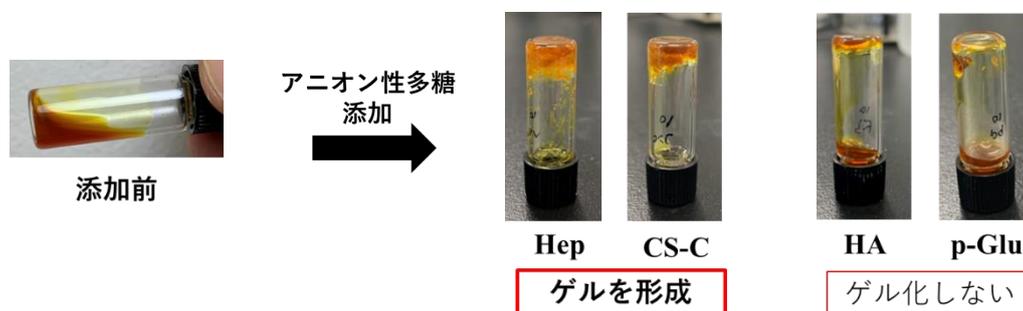


Figure 3-15. アニオン性高分子添加に伴う **Th4-FK** のゲル化実験の結果。
 $[\text{Th4-FK}] = 17.6 \text{ mM}$, pH 6.6, $[\text{Polymer (monomer unit)}] = 10 \text{ mM}$.

Th4-FK は、2 wt% の条件では完全に溶解して水溶液となった。そこに各種アニオン性高分子を添加した。その結果、スルホ基を有する **Hep** と **CS-C** をモノマー濃度で 10 mM 添加したサンプルでは、バイアル瓶の底の方からゲル化が進行し、1 時間程度経過後には取り込まれきれなかった水が僅かに残ったものの、全体的にはやや濁ったゲルを形成した。一方で **HA** や **p-Glu** を添加したサンプルは、どれだけ静置しても水溶液に変化は確認されず、ゲスト濃度を 20 mM に上昇させてもヒドロゲルは形成しなかった (Figure 3-15)。よって、**Th4-FK** はスルホ基が導入されたグリコサミノグリカンを選択的に認識してヒドロゲルを形成し、スルホ基を有しないその他のアニオン性高分子との構造的な違いをゲル形成の可否によって識別することが可能であることが明らかとなった。

ゲスト高分子不在下で得られる **Th4-FK** 水溶液の CD スペクトル (Figure 3-16a 黒線) は、希薄な水溶液系 ($[\text{Th4-FK}] = 22 \mu\text{M}$) で観測された繊維状会合体、顆粒状会合体のそれぞれが示した CD スペクトル (Figure 3-16b) のいずれとも異なる波形を示した。この水溶液に含まれる **Th4-FK** の会合体に対する SEM 観察の結果 (Figure 3-17)、数 100 nm 程度の太さを持つ繊維状構造体が観察された。pH 6.6 という条件は、希薄溶液系では顆粒状の会合体を形成する条件であることを本章 3-2 項で議論した。よって、より高濃度の条件で

は、**Th4-FK** はさらなる会合体の成長が進行し、繊維状会合体を形成するが、なおヒドロゲルを形成することはない、見た目上は水溶液となると考えられる。

CS-C や **Hep** を添加することで得られたヒドロゲルが示す CD スペクトルを Figure 3-16a にそれぞれ、赤、青の線で示した。これらのスペクトルの波形は、本章 3-2 項で議論した希薄溶液系で形成した繊維状会合体のスペクトル (Figure 3-16b 赤線) と酷似していることがわかる。これらのサンプルに対する SEM 観察の結果、ゲスト不在下条件で **Th4-FK** が形成した繊維状会合体 (Figure 3-17) に比べて、より発達した繊維・膜状の会合体の形成が確認された。このことから、本実験の作業仮説の通り、スルホ基を有するアニオン性多糖は、**Th4-FK** の繊維状会合体と錯形成することで架橋点として働き、ヒドロゲルの形成に寄与したと考えられる。一方、**HA** や **p-Glu** 共存下で得られる **Th4-FK** 水溶液が示す CD スペクトル (Figure 3-16b それぞれ、橙、緑線) は、**CS-C** や **Hep** を添加して形成したヒドロゲルの CD スペクトルとゲスト不在下

の **Th4-FK** 水溶液が示すスペクトルの中間を意味する波形を示した。SEM 観察の結果 (Figure 3-17)、これらの水溶液中で形成している会合体は、ゲスト不在下条件で **Th4-FK** が形成する繊維状会合体とほぼ同様の形態を持つことが確認された。以上の結果から、**HA** や **p-Glu** はアニオン性高分子であることから、**CS-C** や **Hep** と同様に **Th4-FK** の繊維状会合体形成を促進する効果があるものの、その効果は **CS-C** や **Hep** と比べて非常に弱く、結果的にヒドロゲルを形成するような会合体の形成を誘導することはできない、と結論付けられる。

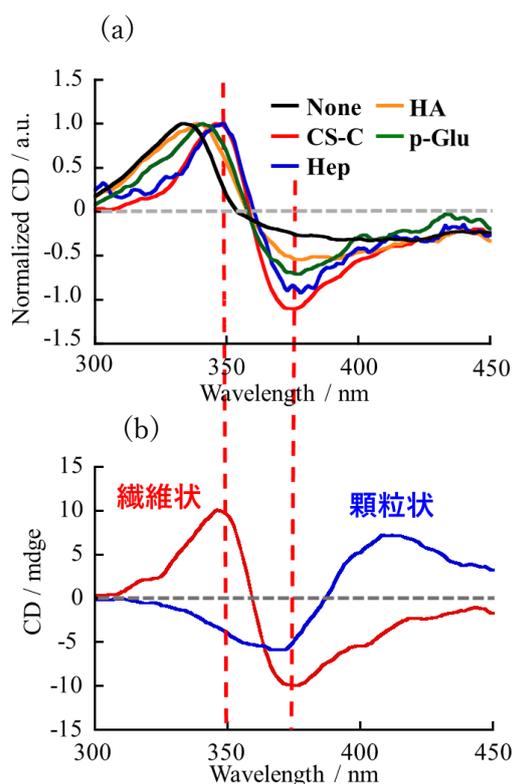


Figure 3-16. (a)各種アニオン性多糖添加に伴うゲル化実験後の CD スペクトル。[**Th4-FK**]=17.6 mM, pH 6.6, [Polymer(monomer unit)]=10 mM. (b)希薄水溶液系で観測された繊維状会合体と顆粒状構造体の形成を示す CD スペクトル。[**Th4-FK**]=22 μ M, セル長=1 cm, 室温。

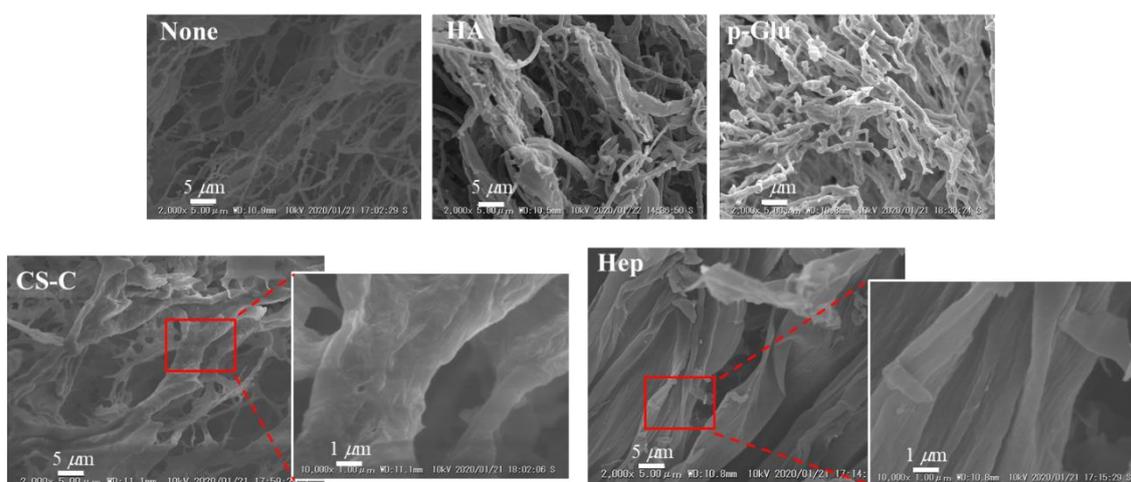


Figure 3-17. 各種アニオン性高分子存在・不在下で形成する **Th4-FK** の会合体の SEM 観察像。[**Th4-FK**]=17.6 mM, pH 6.6, [Polymer (monomer unit)]= 10 mM.

3-5. 結論

Th4-FK は pH 変化による分子上の荷電状態の変化に起因して、顆粒状から繊維状の構造体へと相転移し、この繊維状構造体が三次元的なネットワークを構築することでヒドロゲルが形成することが明らかとなった。同様の相転移はアニオン性高分子の添加によっても誘起することが可能であり、硫酸化アニオン性多糖類であるヘパリン(**Hep**)やコンドロイチン硫酸 C(**CS-C**)の添加によるゲスト選択的なヒドロゲル形成を誘導することに成功した。一方、ヒアルロン酸(**HA**)などの硫酸アニオンを持たない高分子を添加しても **Th4-FK** はヒドロゲルを形成しなかった。

以上の結果から、**Th4-FK** のヒドロゲル形成能を利用することで、硫酸化アニオン性多糖を選択的に識別するヒドロゲル系の構築に成功した²⁻¹⁴。この系は pH とアニオン性多糖類の種類という 2 つの条件が両方満たされた場合のみ駆動する and ゲート型の識別系であることから、高い選択性を発現する検出系構築のための有用な知見となると考えられる。

3-6. 参考文献

- 3-1) Naotaka Kakoi, Mitsuhiro Kinoshita, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa, Kazuaki Kakehi. *Yakugaku Zasshi*, 2009, **129**, 1255-1264.
- 3-2) Osamu Doi. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 2017, **48**, 778-779.
- 3-3) Daisuke Koda, Tatsuo Maruyama, Nami Minakuchi, Kazunori Nakashima and Masahiro Goto. *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 979-981.
- 2-13) D.R.Lide, *Handbook of Chemistry and Physics, 72nd Edition*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.
- 2-14) Naofumi Kuroda, Yukie Tounoue, Kouichiro Noguchi, Yutaro Shimasaki, Hitoshi Inokawa, Masayoshi Takano, Seiji Shinkai, Shun-ichi Tamaru, *Polym J.*, 2020, **52**, 939-946.

4 章

π 共役系骨格を有する両親媒性分子の錯形成に
伴うグリコサミノグリカンの識別

4-1. 序論

発光や色調変化を利用した検出系は、比較的安価に用意できる機器を用いて簡便な手法で検出を可能にする。特に、蛍光などの発光の変化は鋭敏な検出系構築を実現する検出手法であるため、様々な蛍光検出系が実用化されており、新たな原理に基づく発光・色調変化を利用した検出系の構築は精力的に進められている。

新海らは、AIE 特性を有する小分子 **OPV-G2**(Figure 4-1a)を用いてアニオン性多糖類に対する分子認識能を評価している。アニオン性多糖類添加に伴う **OPV-G2** 溶液の蛍光スペクトル強度の変化から、高分子上の電荷が少ないヒアルロン酸(**HA**)、コンドロイチン硫酸(**CS**)、ヘパリン(**Hep**)の順に応答が強くなった(Figure 4-1b)。電荷が多い順に応答が強くなるのが一般的であるとされているが、**OPV** 型の化合物の自己会合形態が複数あることから、このような結果が得られたと報告している⁴⁻¹⁾。

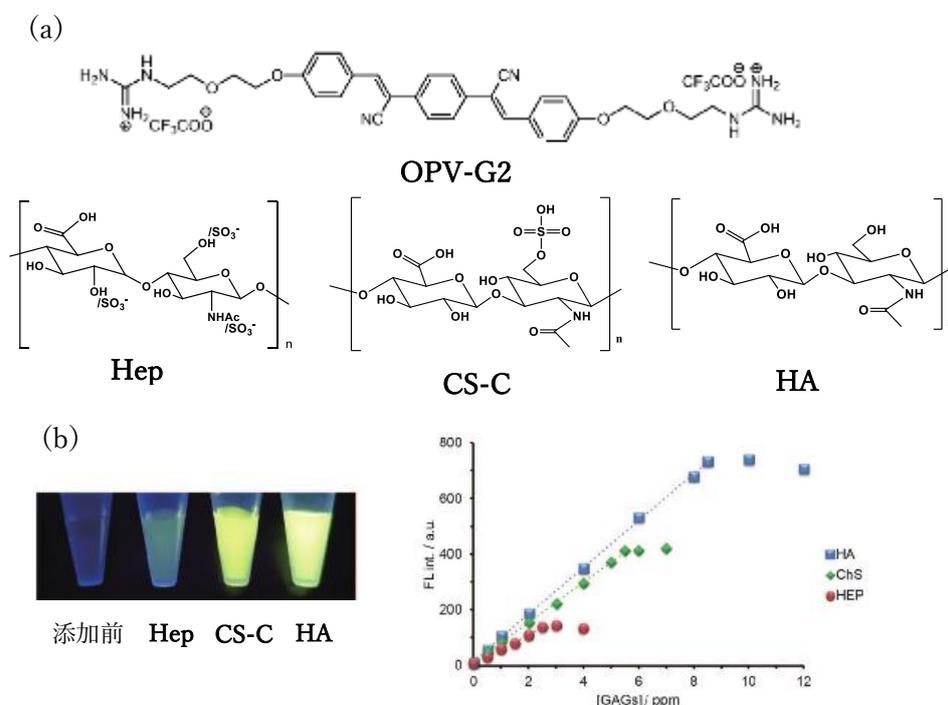


Figure 4-1. AIE 特性を利用したグリコサミノグリカン類の識別。(a) **OPV-G2**、**Hep**、**CS-C**、**HA** の構造。(b) グリコサミノグリカン添加に伴う蛍光強度変化。

前章では、**Th4-FK** のゲスト誘導的なゾルーゲル相転移を利用してスルホ基の有無によって硫酸化アニオン性多糖類を選択的に識別できる系の構築に成功した (Figure 4-2)。この成果をもとに、新たな課題として、硫酸化アニオン性多糖類識別を蛍光または色調変化によって実現す



Figure 4-2. 硫酸化アニオン性多糖類の選択的な識別。

る検出系の構築について検討した。検出系の構築において、標的分子との応答に伴う劇的な光化学的特性の変化を利用することは有効な戦略であるとして、溶液系での劇的な色調変化などを伴う検出系が報告されている⁴⁻²⁾。さらに溶液系という希薄な条件で応答性を評価することで、標的分子がより低濃度での条件でも検出できるようになると期待される。

先行研究として、希薄溶液系の条件で **Th4-FK** とヌクレオチド類を始めとしたアニオン性分子との錯形成に伴う **Th4-FK** 水溶液の蛍光強度の減少に基づいた応答性の評価を行った。その結果、分子上のアニオン電荷数が多いほど、より低濃度の条件で蛍光強度が減少していくことが確認されたものの、分子同士の識別精度を確保できるほどの大きな差を見出すことはできなかった。この結果から、水溶液の蛍光強度の減少での評価では、置換基の数に依存した識別・検出系の構築は困難であることが示唆された。さらに 4 つのカチオン性置換基が全てアミノ基である **Th4-FK** がアニオン性分子の添加に伴い、緩やかにアニオン性分子と錯形成を行い、徐々に会合を進行したことも原因であると考えられる。この結果を受けて、水溶液系での検出系の構築には、水溶液中でより劇的に溶解性が変化する分子の開発が必要であると示唆されていた。一方、第 2 章で、**Th4-FR** は **Th4-FK** と同様にテトラカチオン型の分子であるが、主鎖のアミノ基と側鎖のグアニジノ基の pKa の差が大きく、pH 13 を境に水溶性が劇的に低下することを報告した。さらにグアニジノ基はスルホ基やカルボキシル基などに対する効率的な水素結合形成点を有しており、アニオン性分子と強力に相互作用することが知られていることから⁴⁻³⁾、**Th4-FK** より鋭敏にアニオン性分子と錯形成することが期待される。

そこで本章では、**Th4-FR** を中心に、双頭型テトラチオフェン界面活性剤 (**Th4**) 類の水溶液にアニオン性多糖類の溶液検出系としての有用性を評価した。本研究では、特にゲスト添加していくことで **Th4-FR** の会合に伴う **Th4-FR** 水溶液の蛍光強度の減少と、そこから過剰にアニオン性多糖類を添加することによる **Th4-FR** の再解離に伴う蛍光強度の増加という二段階の蛍光強度の変化をとりうる系の構築を計画した。この蛍光強度が変わる二つの濃度領域でのスペクトル変化をアニオン性多糖ごとに比較することで、より精度の高い検出系の構築が可能であると考えられる。そのデモンストレーションとして、医療製剤の検査において重要性が高いヘパリン製剤中の混入過硫酸化コンドロイチン検出を念頭において、ヘパリン (**Hep**) と過硫酸化コンドロイチン (**OSCS**) の混合比の計測系の構築を行った。

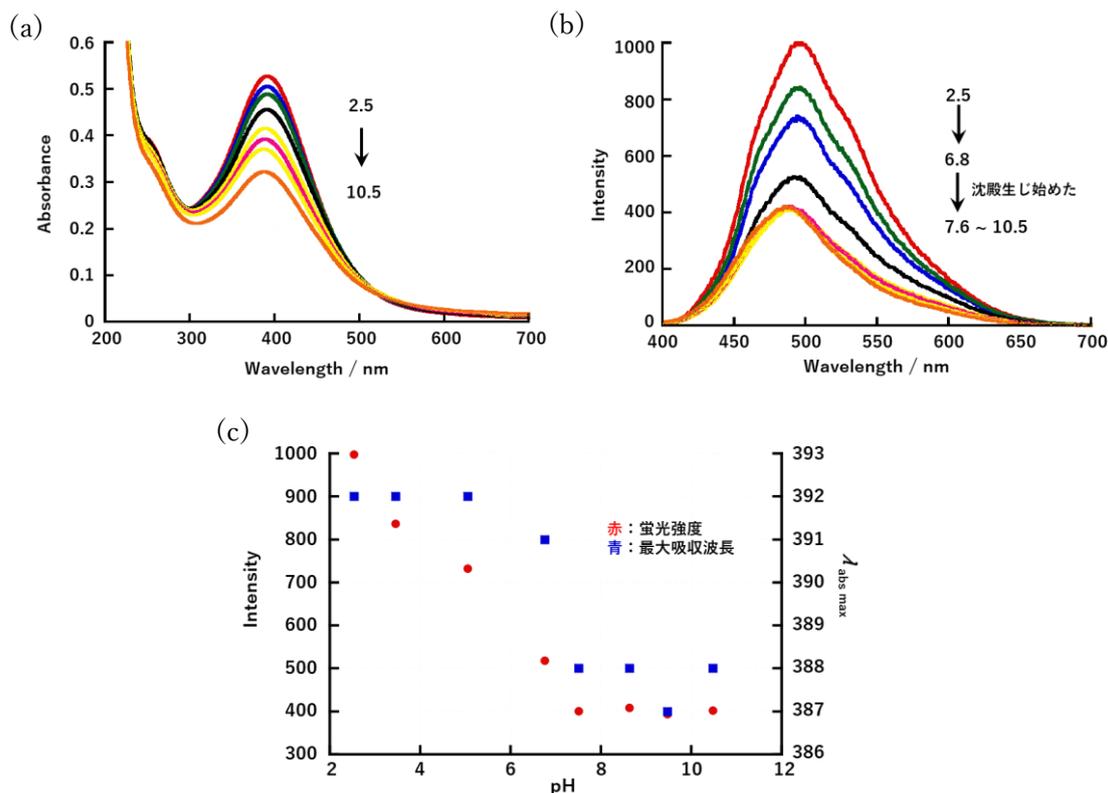
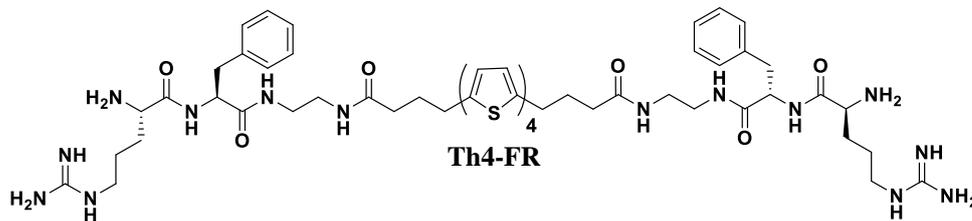


Figure 4-4. pH 変化に伴う **Th4-FR** の各種スペクトル測定結果。(a) 紫外可視吸収スペクトル変化。(b) 蛍光スペクトル変化。(c) pH 変化に伴う蛍光強度(赤)と最大吸収波長(青)の変化。[**Th4-FR**] = 53 μ M.

Th4-FR は酸性条件では、最大吸収波長が 390 nm 以上であることから、単分子的に溶解していることが確認された。一方、pH が中性から徐々に弱塩基性の領域に移行するに従って急激に会合体が形成し沈殿が生じ、pH 8 よりも高 pH 側ではスペクトルの変化を示さなかった。以上のように、**Th4-FR** は酸性領域では安定に溶解しているものの、末端の解離性置換基のプロトン化状態の変化に敏感に応答して、急激な会合の進行と沈殿形成が起こる劇的な変化を示すことが確認された。

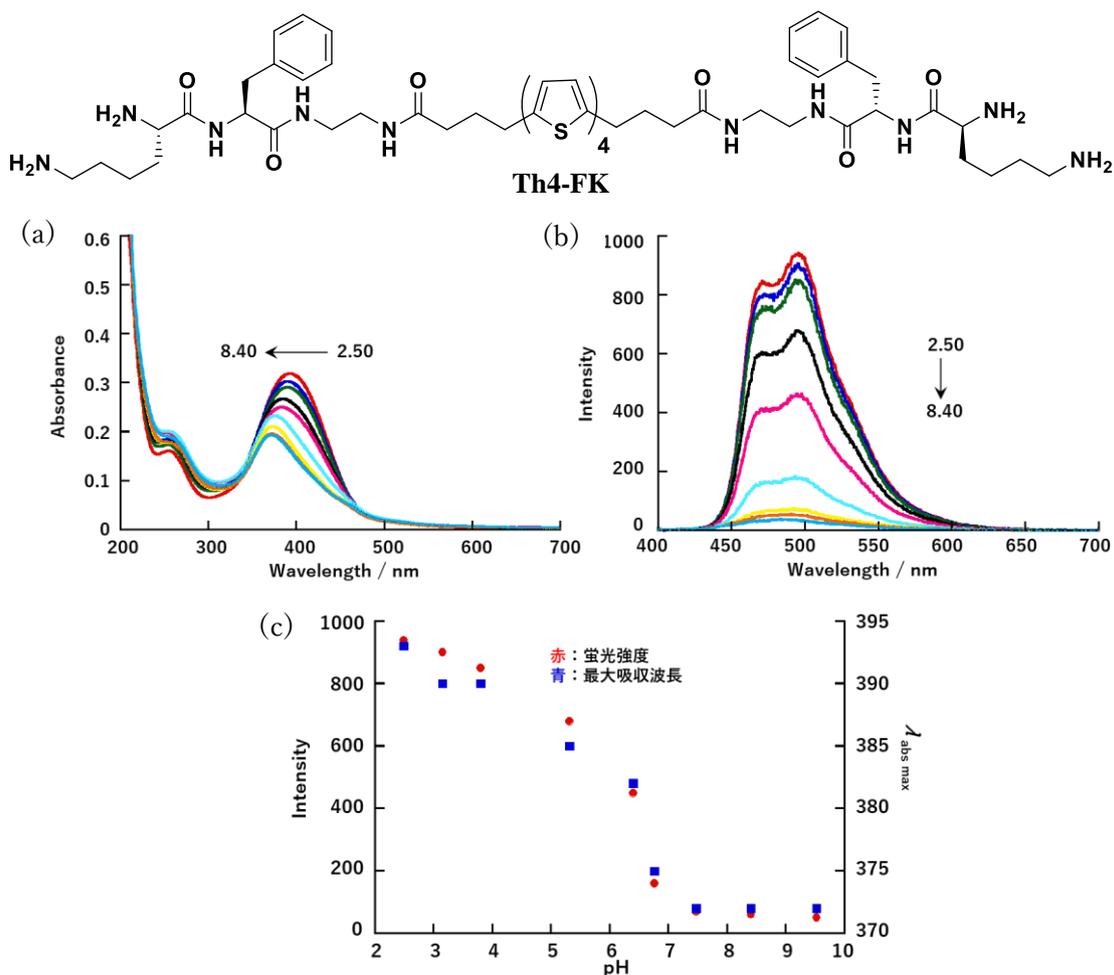


Figure 4-5. pH 変化に伴う Th4-FK の各種スペクトル測定結果。(a) 紫外可視吸収スペクトル変化。(b) 蛍光スペクトル変化。(c) pH 変化に伴う蛍光強度(赤)と最大吸収波長(青)の変化。[Th4-FK] = 16 μM 。

Th4-FK は pH を強酸性条件で溶解している時点では、最大吸収波長が 390 nm 以上であることから化合物が単分子的に溶解していることが示された。一方、弱酸性から中性へ pH が変化していく過程で連続的に短波長シフトが確認されていることから、pH 変化に伴って徐々に会合が進行し、弱塩基性条件では最大吸収波長と蛍光強度の変化はほとんど生じなくなった。実験した pH 領域では沈殿が生じることはなかった。

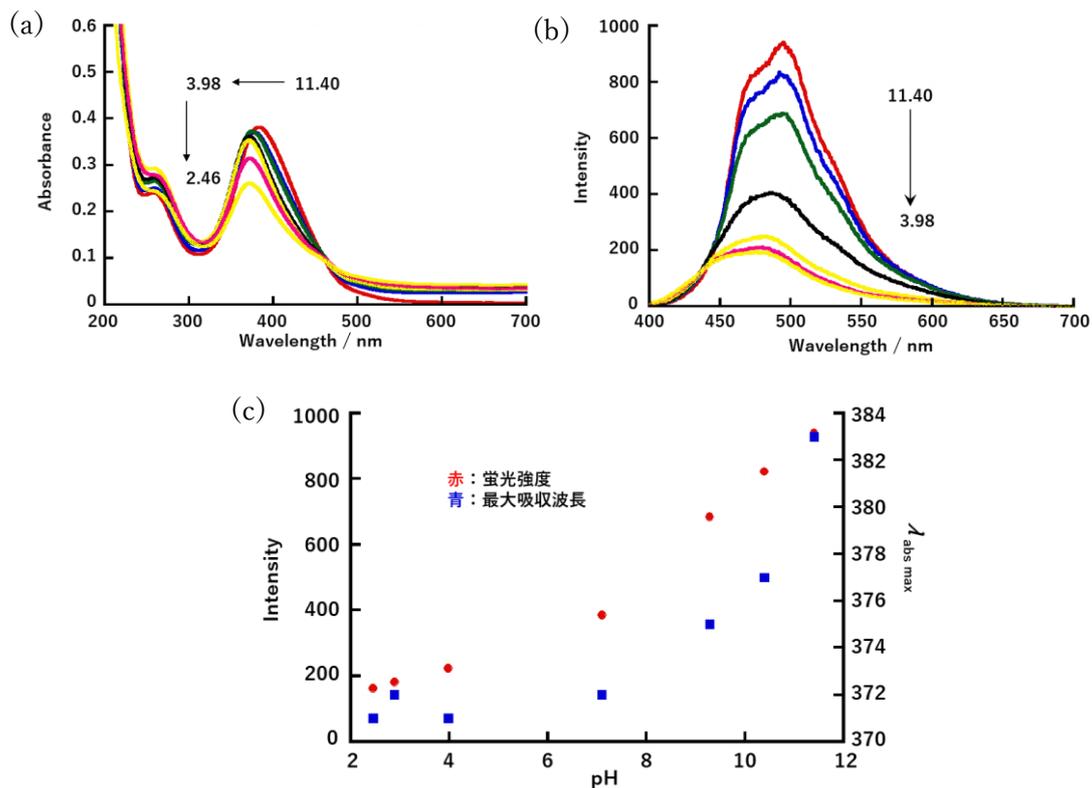
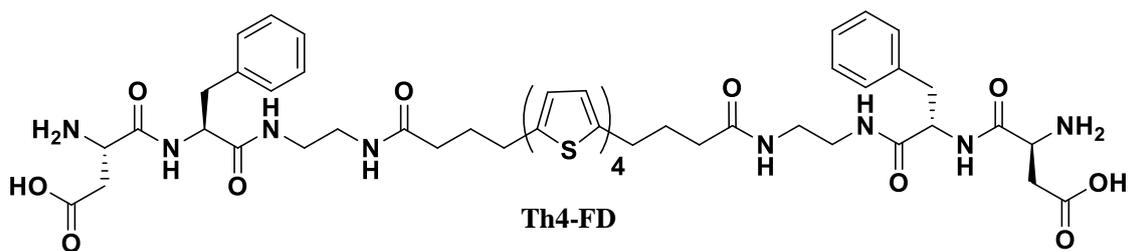


Figure 4-6. pH 変化に伴う Th4-FD の各種スペクトル測定結果。(a) 紫外可視吸収スペクトル変化。(b) 蛍光スペクトル変化。(c) pH 変化に伴う蛍光強度(赤)と最大吸収波長(青)の変化。

両末端が双性イオン型の **Th4-FD** は、塩基性条件では溶解しているものの、その最大吸収波長が 382 nm 前後であり、単分子的に溶解していないことが示唆された。また、pH の低下に伴って連続的に会合が進行し、中性～酸性条件では水溶性を示さず、沈殿を形成した。

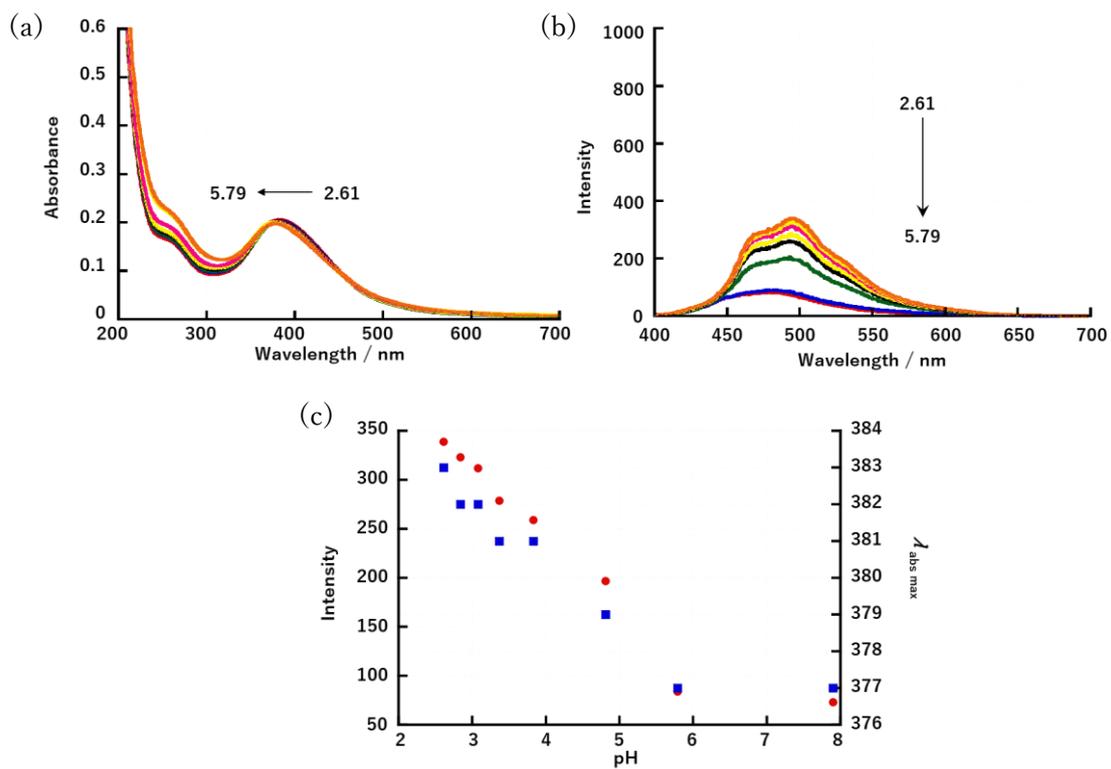
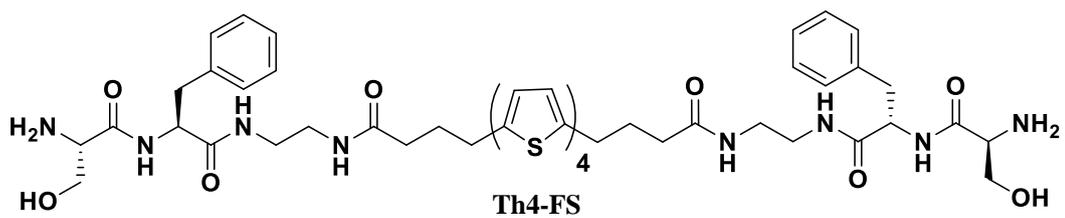


Figure 4-7. pH 変化に伴う **Th4-FS** の各種スペクトル測定結果。(a) 紫外可視吸収スペクトル変化。(b) 蛍光スペクトル変化。(c) pH 変化に伴う蛍光強度(赤)と最大吸収波長(青)の変化。[**Th4-FS**] = 50 μM 。

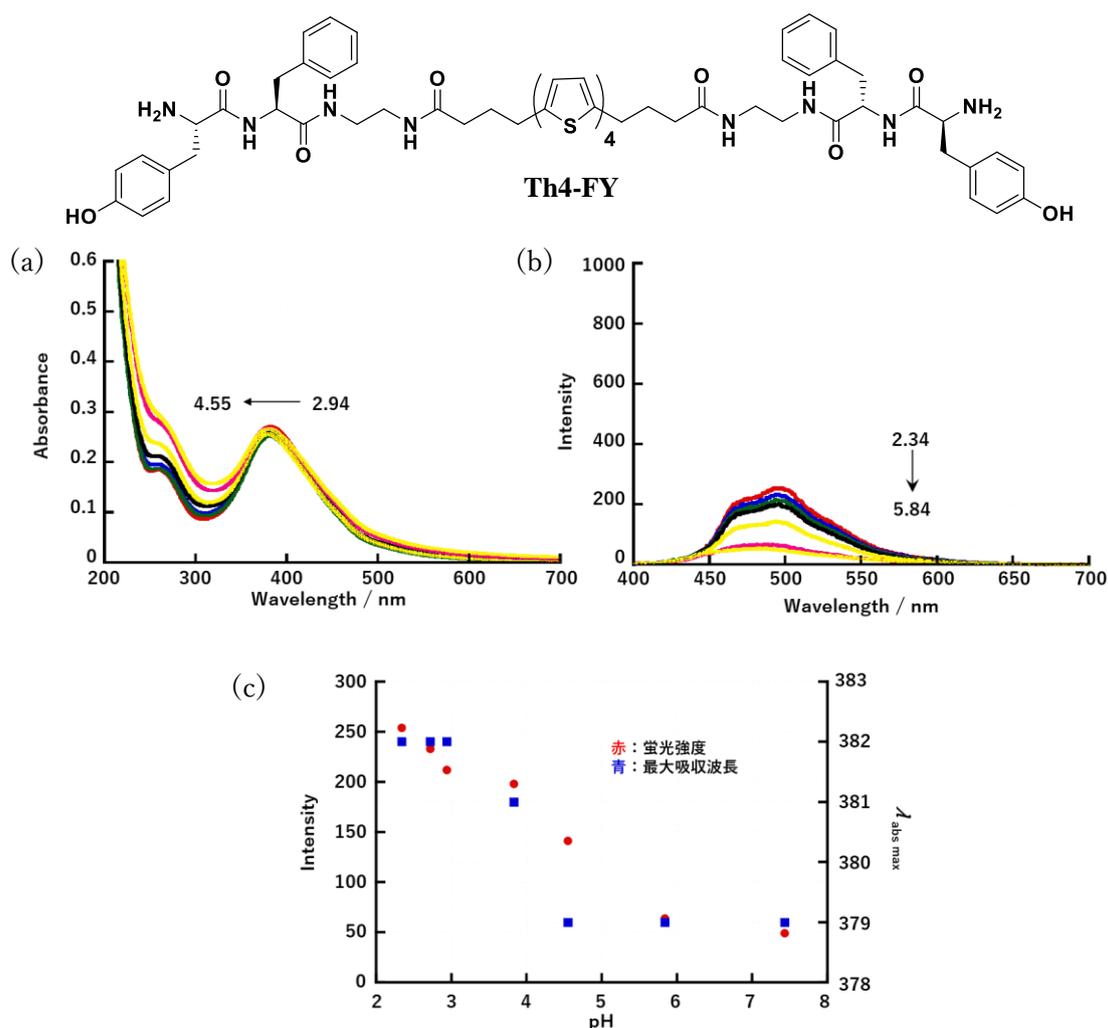


Figure 4-8. pH 変化に伴う Th4-FY の各種スペクトル測定結果。(a) 紫外可視吸収スペクトル変化。(b) 蛍光スペクトル変化。(c) pH 変化に伴う蛍光強度(赤)と最大吸収波長(青)の変化。[Th4-FY] = 40 μ M。

水酸基を側鎖に持つ Th4-FS と Th4-FY は、酸性条件で溶解していたものの、最大吸収波長が 382 nm 前後であり、単分子的に溶解していないことが示唆された。さらに pH の上昇に伴って、弱酸性条件でも会合が進行したことが確認された。

以上の結果から、Th4 類の中で Th4-FR は pH<6 の水に対してかなり高い溶解性を示すが、中性条件付近で Th4-FR が有するカチオン電荷の減少に伴って、急激に会合が進行するという最も特徴的な会合特性を有していることが確認された。このことから、Th4-FR はほかの Th4 類と比較して Th4 骨格が示す解離・会合に伴う蛍光・色調変化という光化学的特性の活用に適していると考えられる。

4-3. Th4-FR 水溶液にアニオン性多糖類を添加することによるスペクトル変化を利用する系の構築

前項で得られた知見をもとに、Th4-FR のアニオン性多糖類との錯形成による Th4-FR の会合状態変化と Th4-FR 水溶液の分光学的特性変化について検討を行なった。特により高精度な識別の可能性を探索することを目的に、Th4-FR とアニオン性多糖との混合比の変化に伴う Th4-FR および Th4-FR/多糖錯体の会合状態・水溶性の変化を分光学的に調査した。Th4-FR の会合状態がアニオン性多糖の濃度上昇に伴って、解離状態から会合状態に変化し、さらに過剰量のアニオン性多糖の添加によって Th4-FR の再解離を実現できれば、蛍光強度などの分光学的特性を二段階的に変化させることが可能となると考えられる (Figure 4-8)。これによって、特徴的に分光学的特性が変化する二つの濃度領域での結果を比較することで、より高精度に標的分子を識別できると期待される。

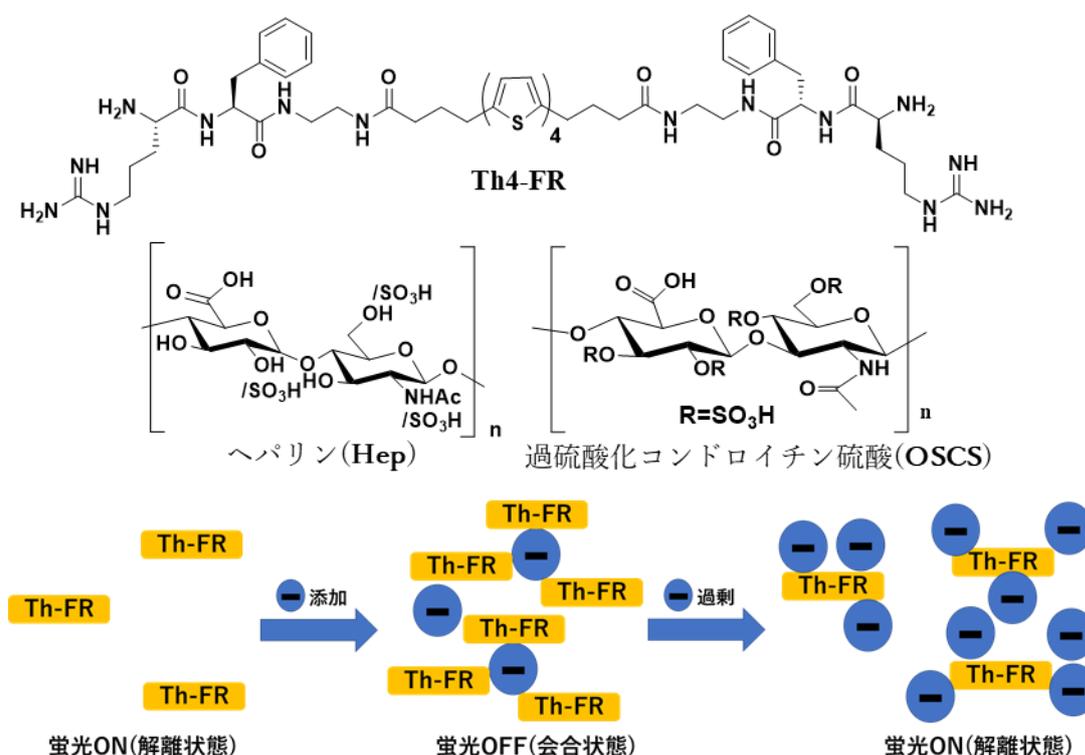


Figure 4-9. アニオン性高分子水溶液添加に伴う Th4-FR の会合状態の変化を利用したグリコサミノグリカン識別の作業仮説。

まずは Th4-FR とグリコサミノグリカンの錯形成に伴う各種スペクトル変化を、Hep をゲスト分子として以下の実験操作に従って調査した。

Th4-FR 1 mg を逆浸透水 40 mL に懸濁させた後、塩酸を用いて pH を 2.3 にし、溶液を得た ($[\text{Th4-FR}] = 21 \mu\text{M}$)。また Hep を逆浸透水に溶解させ、5 mM の Hep ストック溶液を調製した。その後、Th4-FR 水溶液に Hep 水溶液を添加していく過程で蛍光スペクトル測定と紫外可視吸収スペクトル測定を行い、Hep に対する応答性を評価した (Figure 4-10)。

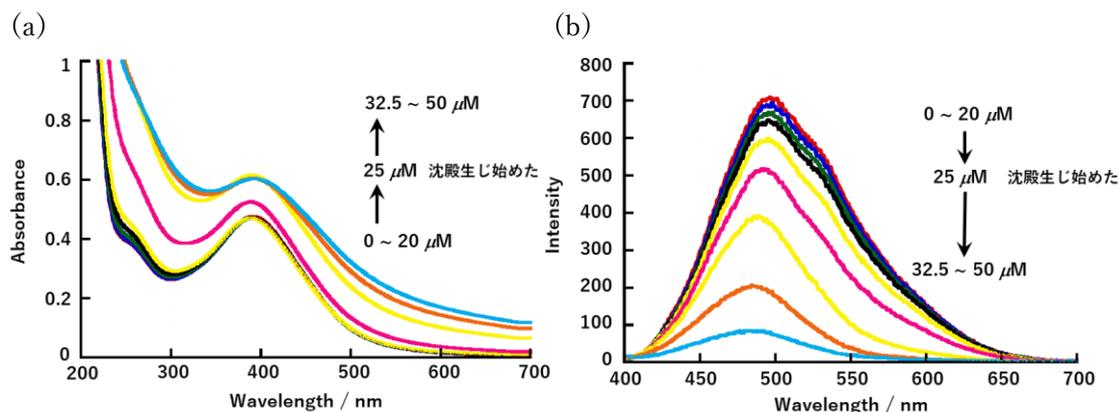


Figure 4-10. Hep 添加に伴う Th4-FR 水溶液の各種スペクトル変化。(a)紫外可視吸収スペクトル変化。(b)蛍光スペクトル変化。 $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$, ex slit : 3.5 nm, em slit : 3.5 nm. セル長 1 cm。 [Th4-FR]=21 μM , pH 2.3.

Hep 濃度変化に伴う Th4-FR 水溶液の蛍光強度変化を Figure 4-11 に示した。Hep が低濃度の条件ではあまり蛍光強度が減少しなかったが、Hep 濃度が 20 μM 程度に達すると沈殿が生じ始め、消光が加速した。紫外可視吸収スペクトルでは沈殿が生じ始めた濃度領域で、ベースラインの上昇と最大吸収波長の短波長シフトが観測された。この挙動は pH 変化に伴って Th4-FR が発現する挙動と同様のものであることから、Hep との静電的相互作用の形成に伴う遊離電荷の減少によって、Th4-FR 間の静電反発が抑制されることで会合が急激に促進したと考えられる。蛍光強度の減少は Hep 濃度が 50 μM 程度に達すると飽和に達したが、さらに 1.2 mM までを Hep 添加しても、十分な蛍光の回復は確認されなかった。Th4-FR の 10 倍濃度程度の Hep を加えた溶液を 60°C 程度で加熱後、放冷したサンプルの蛍光スペクトルを測定したがサンプル混合物の状態変化は誘導されず、蛍光の回復は確認されなかった。

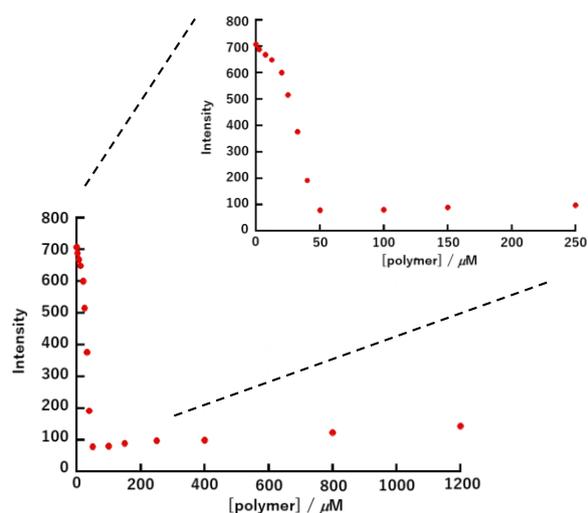


Figure 4-11. Hep 水溶液添加に伴う Th4-FR 水溶液の蛍光強度プロット ($\lambda = 495 \text{ nm}$)。 [Th4-FR]=21 μM , pH 2.3, [Hep] = 0 ~ 1200 μM .

4-4. Hep 水溶液への Th4-FR 水溶液添加に伴うアニオン性多糖類の識別系の構築

前項のように Th4-FR はアニオン性多糖との錯形成により、一旦沈殿が生じるまで会合を進行させてしまうと、再度溶解させることは困難であることが確認された。そこで錯形成実験手順の変更し、ある一定濃度のアニオン性多糖水溶液に Th4-FR を徐々に添加することとした (Figure 4-12)。本手法では、初期段階では Th4-FR の濃度上昇に伴って吸光度が上昇していくが、ある濃度領域まで Th4-FR が添加されると、錯形成に伴う急激な凝集が進行し、Th4-FR が沈殿すると考えられる。この状態からさらに Th4-FR を添加すると、溶液中にはすでにアニオン性多糖が存在しないことから、Th4-FR の濃度が単純に上昇し、吸光度も上昇すると考えられる。このような変化が進行する濃度領域は、Th4-FR とアニオン性多糖との親和性の違い、特にアニオン性多糖上のアニオン電荷の数の違いに依存すると考えられるので、本来硫酸化度が高すぎるために、静電相互作用を利用した識別が困難な Hep と OSCS とをより正確に識別できると期待される。

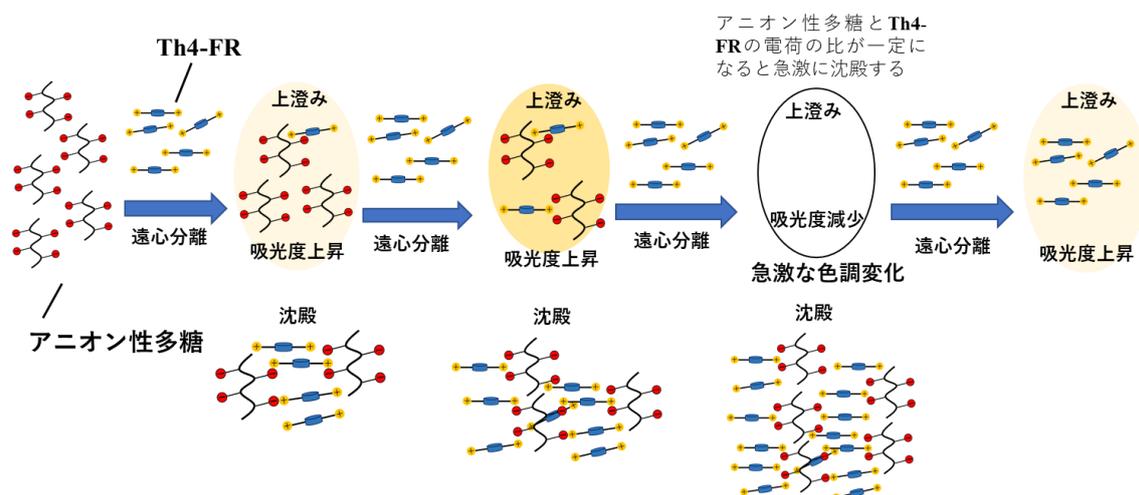


Figure 4-12. アニオン性高分子との錯形成に伴う Th4-FR の会合状態の変化を利用したグリコサミノグリカン識別の作業仮説。

4-4-1. 実験条件の検討

まずは Th4-FR とグリコサミノグリカンの応答性に対する pH の変化が及ぼす影響を検討するために、pH 2.5、pH 7.5、pH 9.5 の条件で Hep との錯形成実験を、以下の手順に従って行った。

Th4-FR 2 mg を超純水 780 μ L に懸濁させ、1 M 塩酸を約 20 μ L 加えて溶解させた後、1 M アンモニア水を用いて pH を調整した。Hep 23 mg を超純水 8 mL に溶解させ、5 mM Hep ストック溶液を調製し、そのストック溶液を希釈し、各濃度の Hep 水溶液 3 mL を調製した。その後、1 M 塩酸と 1 M アンモニア水を用いて pH 調整を行い、各 pH 条件の Hep 水溶液 3 mL に所定量の Th4-FR 水溶液を添加した。Th4-FR 水溶液添加後の混合溶

液から遠心分離操作(12000 rpm, 15分)によって上澄みを回収し、その紫外可視吸収スペクトルを測定した。この上澄み液に所定量の **Th4-FR** 水溶液を添加し、遠心分離後に得られる上澄みの紫外可視吸収スペクトルを測定するという操作を繰り返すことで、**Th4-FR** の濃度変化に伴う **Th4-FR** 水溶液のスペクトル変化を測定した。

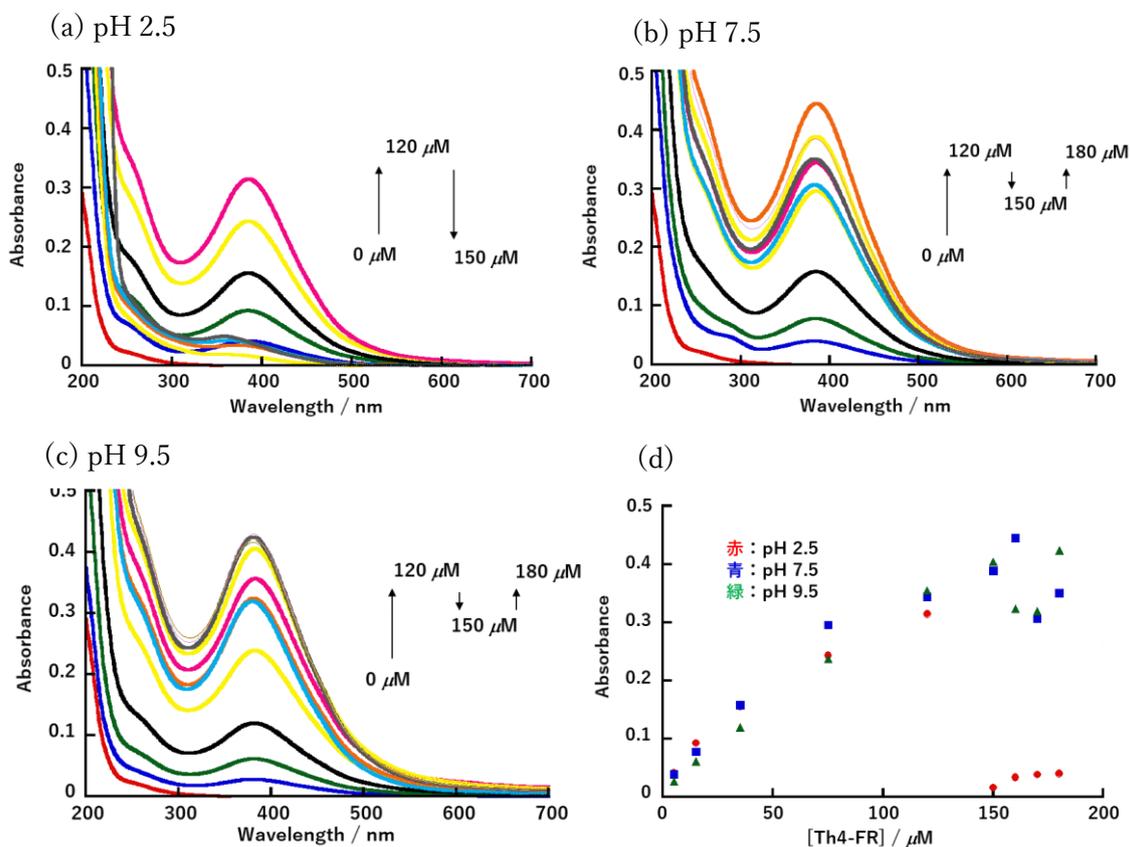


Figure 4-13. pH の違いによる **Th4-FR** とヘパリンの応答性の変化に伴う **Th4-FR** 水溶液の UV-vis 吸収スペクトル測定結果 [Hep] = 167 μM, a) pH 2.5, b) pH 7.5, c) pH 9.5, d) λ_{abs}=385 nm における吸光度プロット。

Figure 4-13 に示すように、pH 2.5 の条件では、[Hep] = 167 μM に対して [Th4-FR] = 150 μM 程度の濃度領域で急激に沈殿量が増え、遠心分離後の上澄みの吸光度が劇的に減少した。一方、pH 7.5, 9.5 の条件では、同様の濃度領域でわずかな吸光度の減少が見られたが、それ以降は **Th4-FR** の添加に伴い、上澄みの吸光度が上昇していった。この結果より、本系の実験操作は酸性条件で行うことが適していることが確認できた。

また酸性条件でのみ、この実験操作が成立した理由を考察するために、各 pH で **Th4-FR** の添加量を変えた条件での **Th4-FR**/Hep 錯体の SEM 観察を行った。

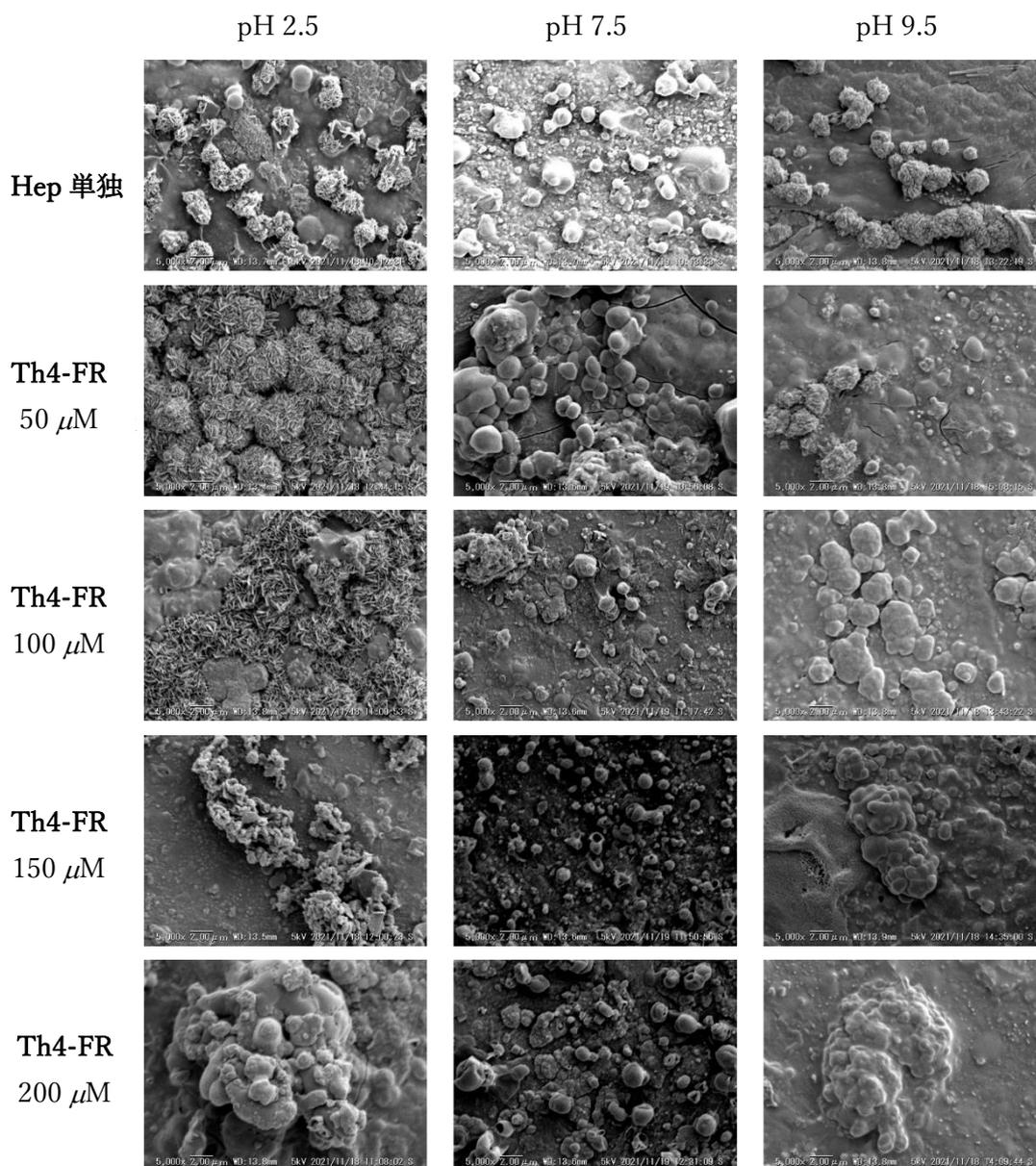


Figure 4-14 各 pH・Th4-FR 濃度条件における Th4-FR/Hep 錯体の SEM 観察像。
[Hep]=167 μM.

それぞれの条件での結果を比べると、Hep の初期の構造が pH によって異なり、その違いから始まる会合状態の変化の有無が SEM 観察から確認された。酸性条件では Hep 単独から微細な構造が見られており、応答性を示した濃度領域では急激に凝集が進行したような構造体の変化が見られた。中性と塩基性条件では Hep 単独でも微細な構造は見られず、Th4-FR を添加してもほとんどの条件で粒子状の構造体を示していた。この SEM 観察結果の違いは、酸性条件だけで Th4-FR と Hep が応答性を示したことと関連性があると思われる。Th4-FR は強酸性条件では単分散的に溶解しており、中性条件以降で会合が進行していることから、酸性条件で Hep と効率的に錯形成をしやすいと思われることと、酸性条件で

の **Hep** のカルボキシ基のプロトン化により **Th4-FR/Hep** 錯体の水溶性の減少が原因であると考えられる。中性よりも高 pH 領域では **Th4-FR** が会合した状態で水溶液中に存在することが吸収スペクトル測定の結果(Figure 4-4)から確認できており、その状態からではアニオン性多糖類と効率的に錯形成できないことが推察され、急激な吸光度の減少と伴う錯形成が起きなかったと考えられる。

続いてあらかじめ溶解させておく **Hep** の濃度について検討を行なった。実用性を考える上では、より少量のサンプルで検出に足るスペクトル変化が得られる条件がより好ましいと言える。

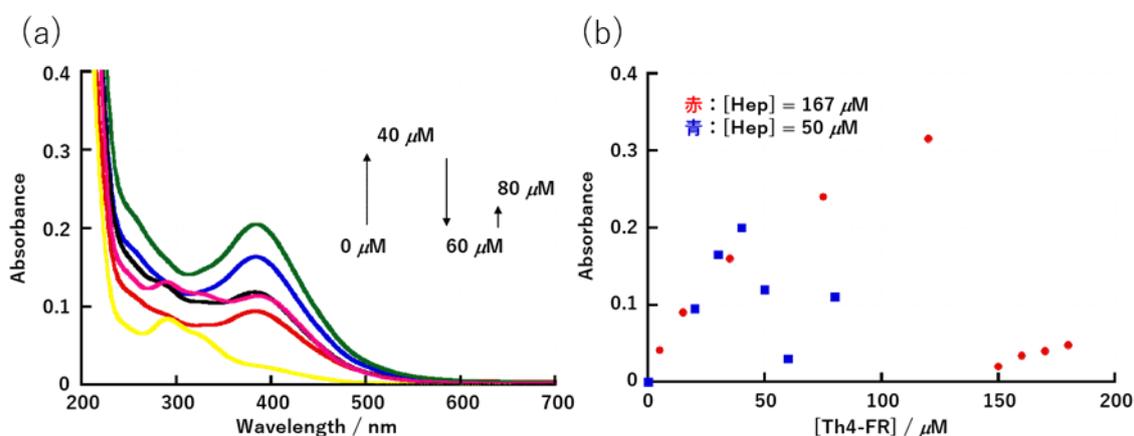


Figure 4-15. ヘパリン水溶液への **Th4-FR** 添加に伴う UV-vis スペクトル変化のヘパリン濃度依存性。a) UV-vis スペクトル変化, b) $\lambda_{\text{abs}} = 385 \text{ nm}$ における吸光度プロット。pH 2.5。

Figure 4-15 より、**Hep** 濃度は $50 \mu\text{M}$ で十分なスペクトル変化が得られることが確認された。これらの結果から pH 2.5、 $[\text{Hep}] = 50 \mu\text{M}$ が本研究の作業仮説に最も適した条件であることが明らかとなった。ここで、 $[\text{Hep}] = 50 \mu\text{M}$ は重量濃度に変換すると $29 \mu\text{g/mL}$ に当たる。実際の検出系ではモル濃度での検討は実用的でなく、むしろ重量濃度での比較を行うことがより实际的と言える。

4-4-2. **Th4-FR** を用いたアニオン性多糖類の識別

前項の知見をもとに、アニオン性多糖の濃度を $29 \mu\text{g/mL}$ に設定して、各種アニオン性多糖をゲストとした検出実験を、以下の手順に従って実施した。

Th4-FR 2 mg を超純水 $780 \mu\text{L}$ に懸濁させ、1 M 塩酸を約 $20 \mu\text{L}$ 加えて溶解させた後、1 M アンモニア水を用いて pH 2.5 に調整した。アニオン性多糖はいずれも 2.9 mg/mL ストック溶液を調製し、そのストック溶液を希釈することで、 $29 \mu\text{g/mL}$ 多糖水溶液 3 mL を調製した。得られた多糖類の水溶液を 1 M 塩酸を用いて pH 2.5 に調整し、各アニオン性多糖水溶液 3 mL に所定量の **Th4-FR** 水溶液を添加した。**Th4-FR** 水溶液添加後の混合部溶液から遠心分離操作(12000 rpm, 15 分)によって上澄みを回収し、その紫外可視吸収スペク

トルを測定した。この上澄み液に所定量の **Th4-FR** 水溶液を添加し、遠心分離後に得られる上澄みの紫外可視吸収スペクトルを測定するという操作を繰り返すことで、**Th4-FR** の濃度変化に伴う **Th4-FR** 水溶液のスペクトル変化を測定した。

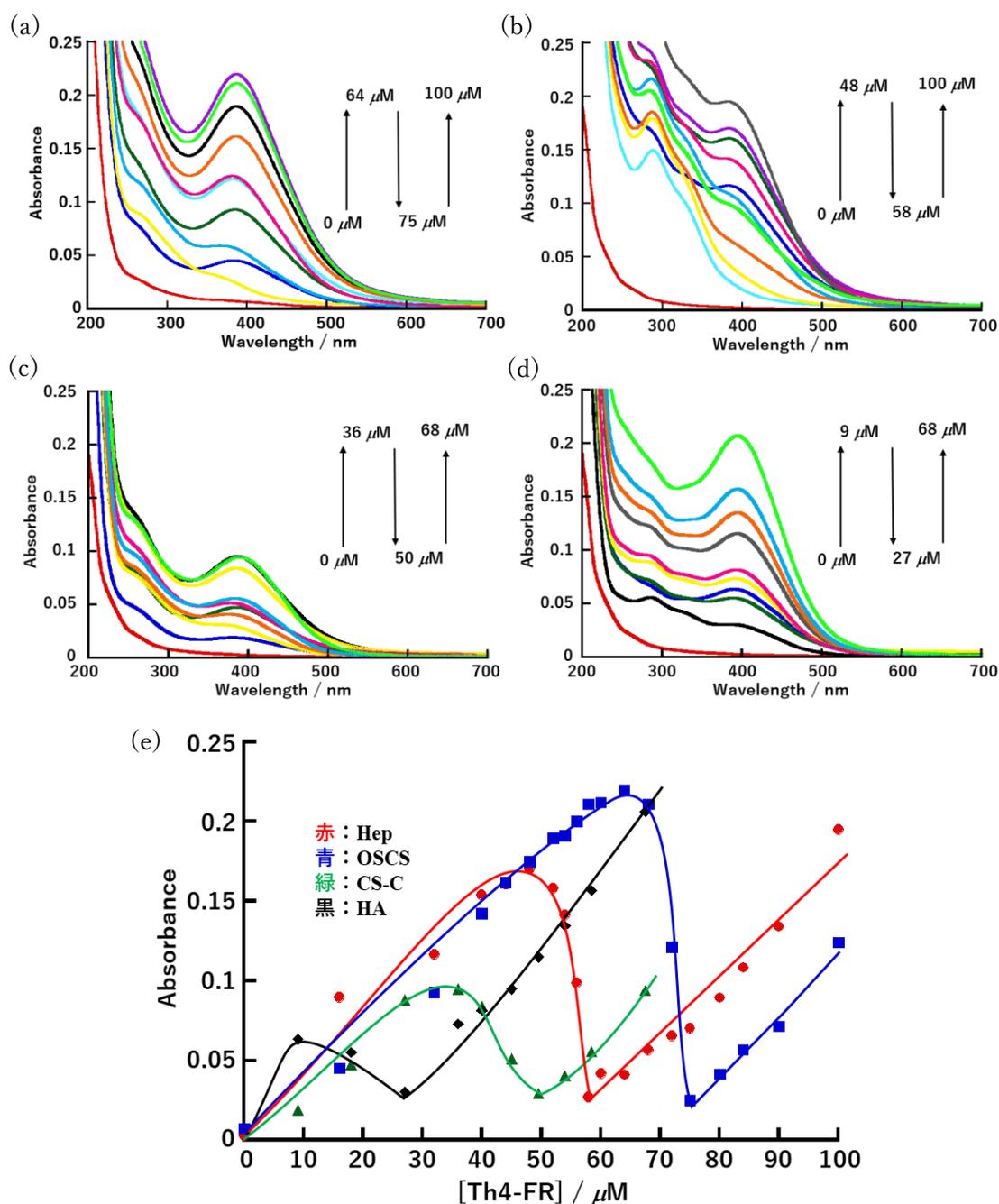


Figure 4-16. 各種多糖溶液への **Th4-FR** 水溶液添加・遠心分離後の上澄み液の紫外可視吸収スペクトル変化。(a) OSCS. (b) Hep. (c) CS-C. (d) HA. (e) $\lambda_{\text{abs}} = 385 \text{ nm}$ における吸光度変化と **Th4-FR** 濃度依存性。pH 2.5, 多糖濃度 (モノマーユニット): $29 \mu\text{g/mL}$.

Figure 4-16a~16d に各アニオン性多糖類に対するスペクトル変化を、Figure 4-16e に 385 nm における吸光度の **Th4-FR** 濃度依存性を示す。Figure 4-16e から、それぞれ異なる濃度領域で沈澱形成に伴う上澄みの吸光度の減少が進行することが確認された。その序列に注目すると、**OSCS>Hep>CS-C>HA** となっており、これはアニオン性多糖上のアニオン電荷の数の序列と一致していることがわかる。よって、本系は想定通り、アニオン性多糖上のアニオン電荷の数に基づいてアニオン性多糖を識別可能であることが確認された。また、**OSCS** と **Hep** 間で比較すると、 $[\text{Th4-FR}]=58 \mu\text{M}$ の条件では、**OSCS** では十分な吸光度があるのに対して、**Hep** ではほぼ吸収帯が消失している。一方、 $[\text{Th4-FR}]=75 \mu\text{M}$ の条件では逆に、**Hep** では観測可能な吸光度があるのに対して、**Hep** ではほぼ吸収帯が消失していることがわかる。このように、特徴的な差が観測される二つの濃度領域での吸光度を比較することで、本来識別に困難が伴う **OSCS** と **Hep** との間で明確な実験結果の差異に基づいてより精度良く識別可能であることが示唆された。

4-5. 96 穴プレートによる簡易的なアニオン性多糖類の検出系の構築

Figure 4-16e が示すように $[\text{Th4-FR}]=58 \mu\text{M}$ 条件時の **Hep** 溶液の吸光度はほぼ 0 であるのに対して、**OSCS** 溶液では十分な吸光度が保持されていることが明らかとなった。この大きな差に注目し、より簡便な実験操作でヘパリンと過硫酸化コンドロイチン硫酸の混合比の計測を可能にする検出系の構築を計画した。検査の高効率化を意識して、本実験では、96 穴プレートを用いてプレートリーダーによる測定を採用することとした。96 穴プレートは生物系の分野や検出系の分野で、同条件での実験のしやすさや、データの比較のしやすさを理由によく用いられている。本系でも 96 穴プレートを用いることで、短時間に多くの検体の検査が可能となるとともに、同一サンプルの検査数を多量に確保することができるため、その検査精度の向上が達成される。

4-5-1. **Th4-FR** の濃度条件の最適化

まず $[\text{Th4-FR}]=58 \mu\text{M}$ 付近の濃度領域で **OSCS** 濃度が異なる **Hep** 水溶液に対して応答性の評価を行い、**Th4-FR** の濃度条件の最適化を行なった。以下に具体的な実験操作を示す。

逆浸透水を塩酸で pH 2.5 に調製し、それを用いて $200 \mu\text{M}$ **Th4-FR** 水溶液 (溶液①) と $290 \mu\text{g/mL}$ の **Hep** 水溶液、**OSCS** 水溶液をそれぞれ調製した。これらの **Hep** 水溶液と **OSCS** 水溶液を所定の比率で混合することで、異なる **OSCS** 含量の **Hep** 水溶液 (溶液②) を調製した。96 穴プレートのウェル内に溶液②を $20 \mu\text{L}$ ずつ加え、ここに pH 2.5 の水と溶液①を所定の **Th4-FR** 濃度になるように添加することで、**OSCS** と **Hep** の総濃度が $29 \mu\text{g/mL}$ 、 $[\text{Th4-FR}] = 58, 60, 63 \mu\text{M}$ 、全量 $200 \mu\text{L}$ の検査溶液とした。室温にて 1 時間静置した後、遠心分離操作 ($2,500 \text{ rpm}$, 2 分) を行い、上層から $100 \mu\text{L}$ 取り、隣のウェルに移すことで上清成分と沈澱成分とに分けた。プレートリーダーを用いて全てのウェルの吸光度を測定したのち、沈澱成分のウェルが示す吸光度と上清成分が示す吸光度の比を算出し、

この値を OSCS の含有率に対してプロットした。

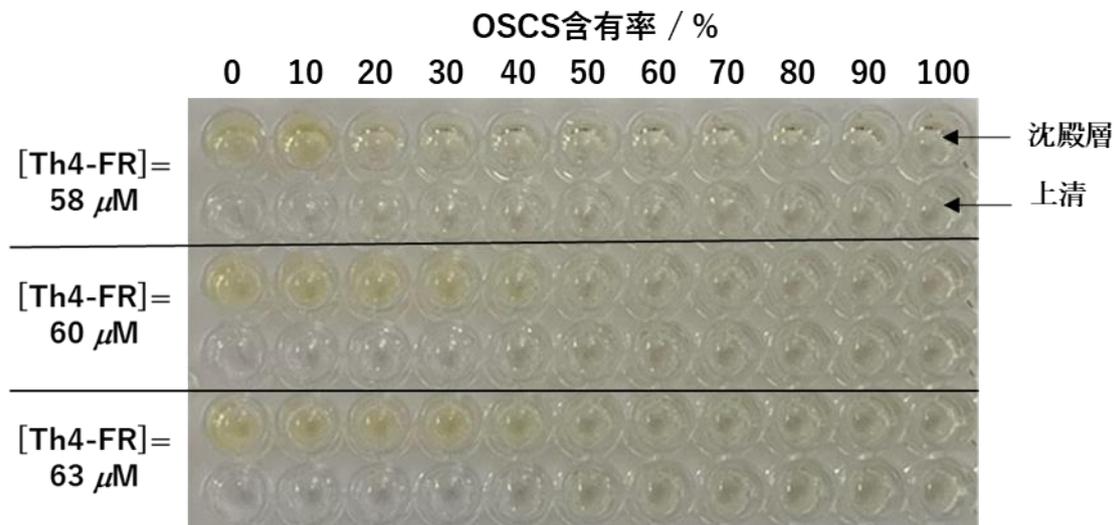


Figure 4-17. 遠心分離後の 96 穴プレート上の様子 pH 2.5, [polymer]= 29 µg/mL.

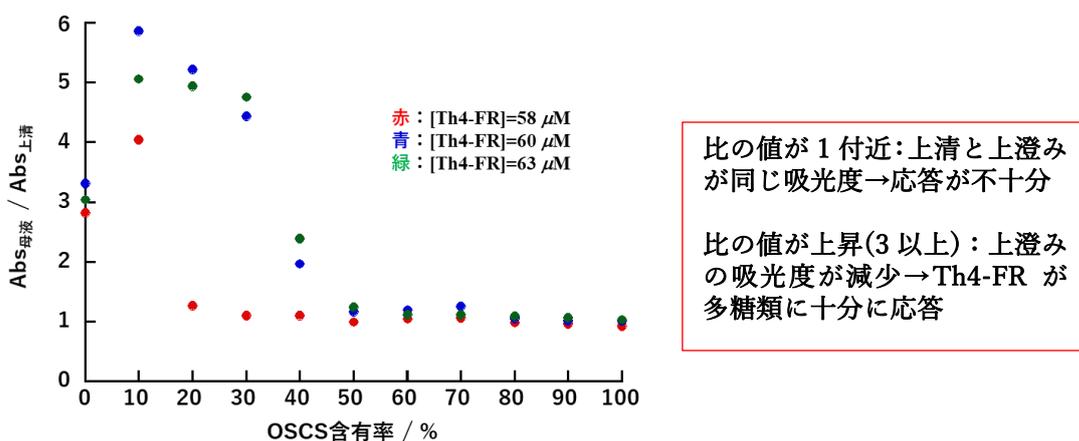


Figure 4-18. 各 Th4-FR 濃度条件での遠心分離後の OSCS 含有 Hep 水溶液の沈殿層/上清の吸光度比のプロット。λ_{abs} = 385 nm, pH 2.5, 多糖濃度: 29 µg/mL.

4-5-2. Hep に混入する OSCS の簡易検査系の構築

Figure 4-18 に示す結果から、Th4-FR の濃度は 58 µM において、OSCS 含量が 20%未満の低含量領域でも含量の違いを識別できる可能性が示された。

そこで [Th4-FR]=58 µM に固定し、OSCS 含量が 0~40%の間で変化させながら、12 サンプル調製し、4-5-1 項と同様の実験手順で検討を行った。

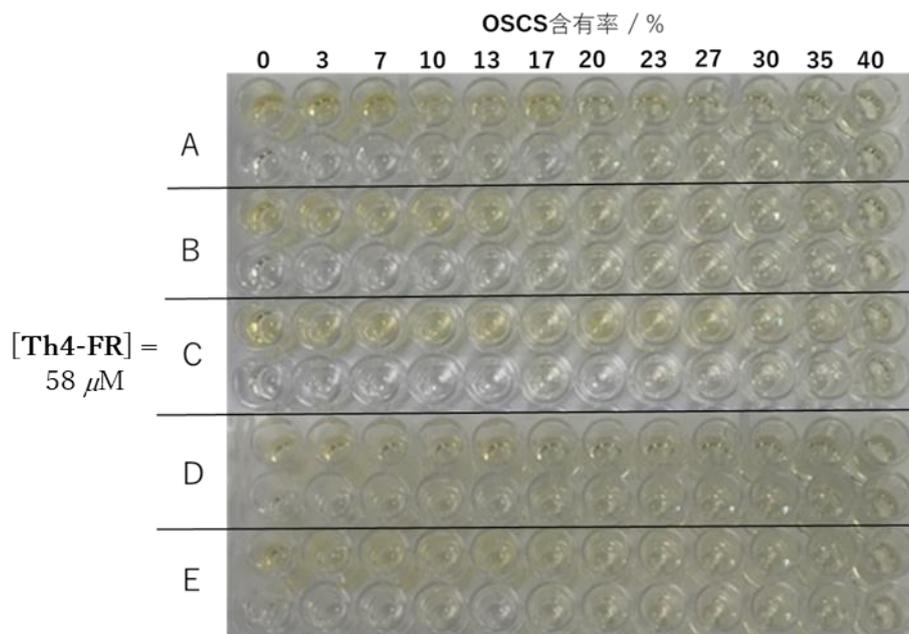


Figure 4-19. OSCS 含有 Hep 水溶液への Th4-FR 添加・遠心分離後の様子(A~E はすべて同じ条件)。 $[\text{Th4-FR}] = 58 \mu\text{M}$, pH 2.5, 多糖濃度: $29 \mu\text{g/mL}$.

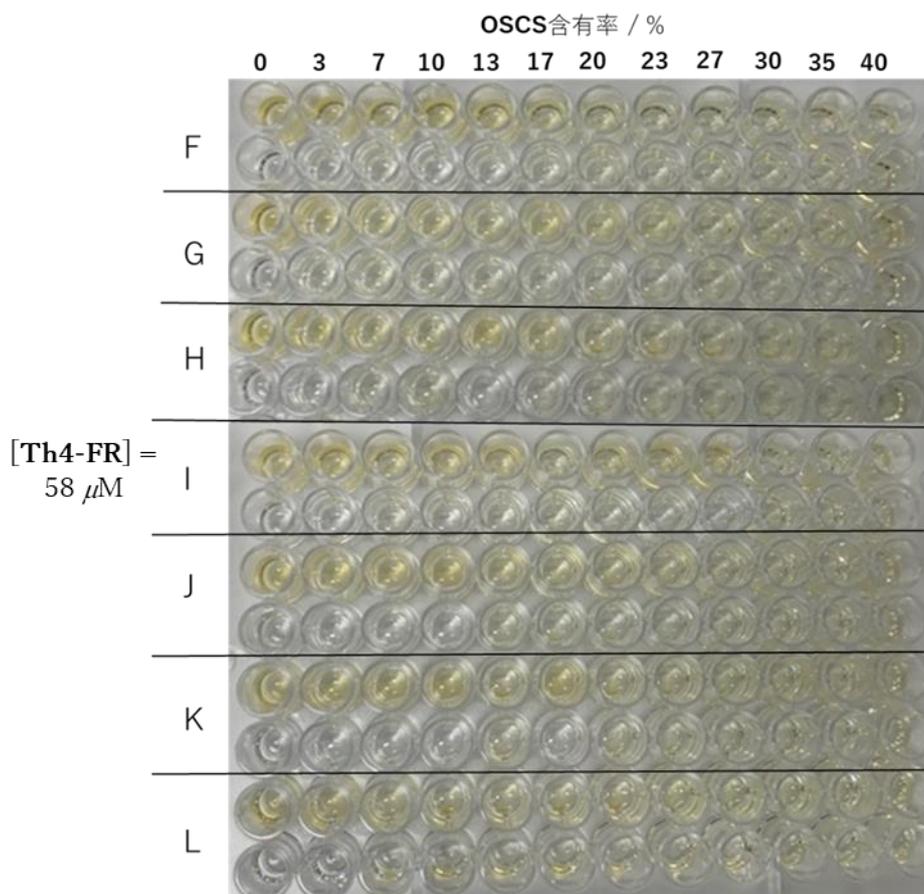


Figure 4-20. OSCS 含有 Hep 水溶液への Th4-FR 添加・遠心分離後の様子(F~L はすべて同じ条件)。 $[\text{Th4-FR}] = 58 \mu\text{M}$, pH 2.5, 多糖濃度: $29 \mu\text{g/mL}$.

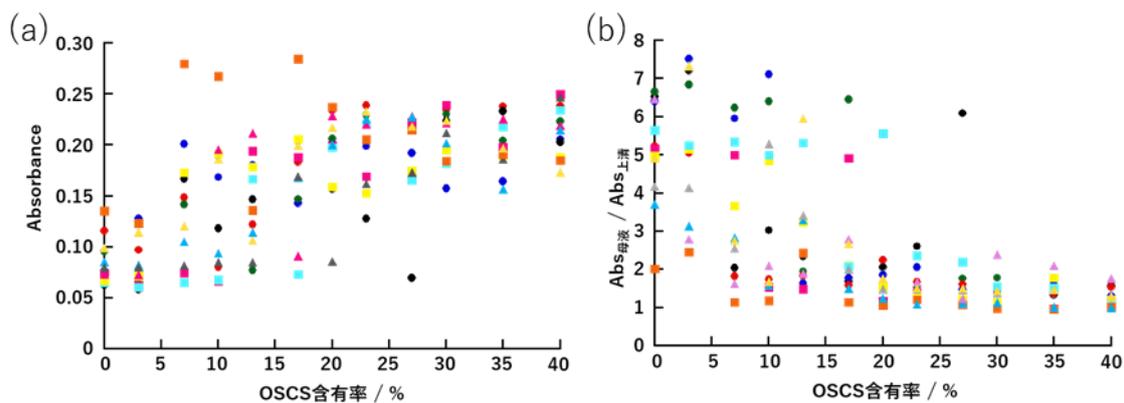


Figure 4-21. (a) OSCS 含有 Hep 水溶液への Th4-FR 添加・遠心分離後の 上清の吸光度プロット。(b) 沈殿層/上清の吸光度比のプロット。 $\lambda_{\text{abs}} = 385 \text{ nm}$, $\text{pH } 2.5$, $[\text{Th4-FR}] = 58 \mu\text{M}$, 多糖濃度: $29 \mu\text{g/mL}$.

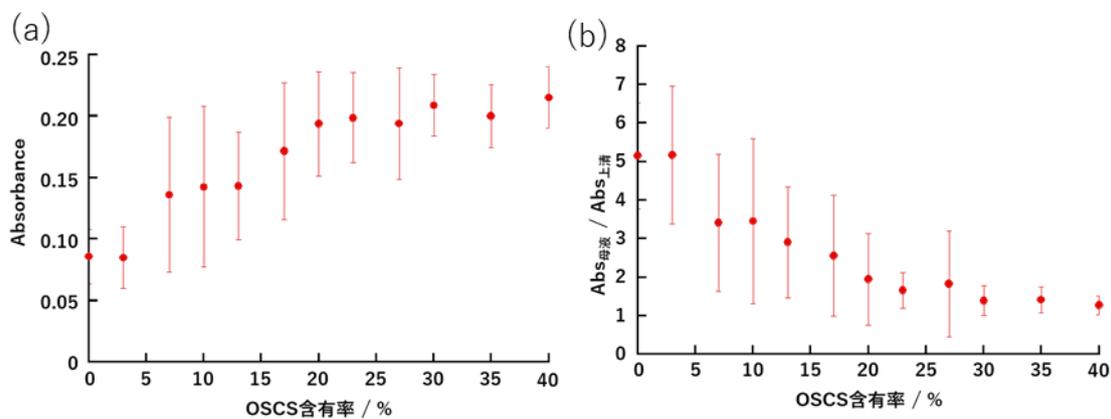


Figure 4-22. Figure 4-21 を統計処理した標準偏差のプロット (a) Figure 4-21a の標準偏差プロット。(b) Figure 4-22b の標準偏差プロット。 $\lambda_{\text{abs}} = 385 \text{ nm}$, $\text{pH } 2.5$, $[\text{Th4-FR}] = 58 \mu\text{M}$, 多糖濃度: $29 \mu\text{g/mL}$.

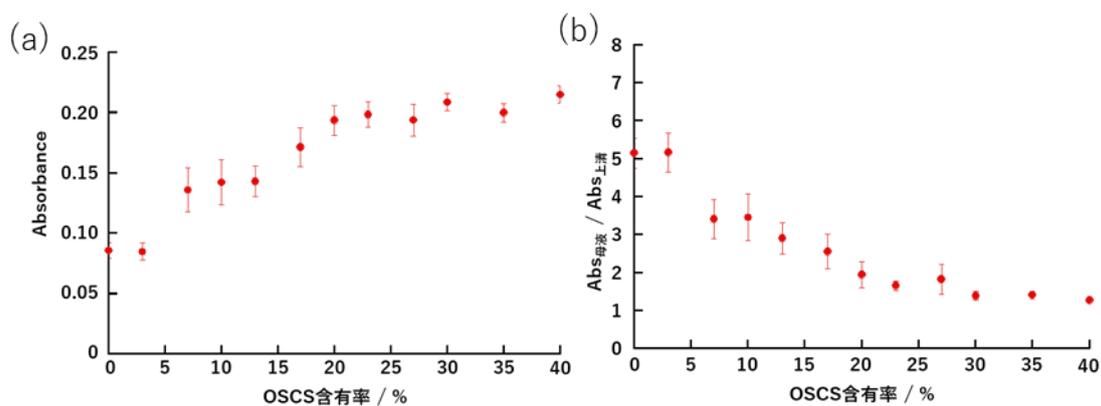


Figure 4-23. Figure 4-21 を統計処理した標準誤差のプロット (a) Figure 4-21a の標準誤差プロット。(b) Figure 4-22b の標準誤差プロット。 $\lambda_{\text{abs}} = 385 \text{ nm}$, $\text{pH } 2.5$, $[\text{Th4-FR}] = 58 \mu\text{M}$, 多糖濃度: $29 \mu\text{g/mL}$.

Figure 4-21 に検査数 12 で実施した実験結果を示す。ここで (a) は上清の吸光度をプロットしたグラフであり、(b) は上清の吸光度と沈澱層の吸光度の比をプロットしたものである。これらを統計処理した標準偏差のプロットを Figure 4-22 に、標準誤差のプロットを Figure 4-23 にそれぞれ示す。Figure 4-22a より、上清の吸光度が **OSCS** 含量が 20%未満の領域で連続的に上昇することが確認された。このことから 20%未満の **OSCS** 混入 **Hep** の **OSCS** 含有濃度を決定することができることが示された。さらに Figure 4-22 b より、上清の吸光度と沈澱層の吸光度の比を取ることで、**OSCS** 含量の変化に伴う、測定値の変化をより大きくすることが可能となった。これは、検出精度の向上につながる有益な知見である。

Figure 4-21, 4-22 より、本手法によって得られる実験データはばらつきが多く、大きな誤差が含まれることがわかる。一方で、Figure 4-23 より、各実験データの平均値を取ると、そのばらつきは小さいことがわかる。このことは、試行数を十分量確保することで、**OSCS** 含量を精度良く決定できることを示している。プレートリーダーを活用することによる簡便さと効率の良さを加味すると、本検出系は、簡易型検出としては、実用化を十分視野に入れることができると期待される。

4-6. 結論

Th4-FR とアニオン性多糖類の錯形成に伴う溶解性の変化を利用した検出系の構築を行った。4-4 項に示した作業仮説に基づき、pH 2.2 の条件下で各種アニオン性多糖水溶液に **Th4-FR** を添加すると、それぞれ異なる濃度領域で沈澱形成に伴う上澄みの吸光度の減少が進行することが確認された。その変化の序列はアニオン性多糖上のアニオン電荷の数と一致したことから、アニオン性多糖上のアニオン電荷の数に基づいてアニオン性多糖を識別可能であることが確認された。更に $[\text{Th4-FR}] = 58 \mu\text{M}$ 条件時の **Hep** と **OSCS** の応答性の大きな差に注目し、**Hep/OSCS** 混合系に対する応答性の評価を行った。96 穴プレート上で **Th4-FR**・**Hep/OSCS** 水溶液を調製後に遠心分離を行い、得られた沈澱層と上清の 2 つウェルの吸光度をプレートリーダー測定後、沈澱層と上清の吸光度の比 ($\text{Abs}_{\text{沈澱層}}/\text{Abs}_{\text{上清}}$) を算出後プロットしたところ、比の値が **OSCS** 含量が 20%未満の領域で連続的に上昇することが確認された。このことから 20%未満の **OSCS** 混入 **Hep** の **OSCS** 含有濃度を決定することができることが示された。プレートリーダーを活用することによる簡便さと効率の良さを加味すると、本検出系は、簡易型検出としては、実用化を十分視野に入れることができると期待される。

4-7. 参考文献

- 4-1) Takao Noguchi, Bappaditya Roy, Daisuke Yoshihara, Junji Sakamoto, Tatsuhiro Yamamoto, and Seiji Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 5708–5712.
- 4-2) Teresa L. Mako, Joan M. Racicot, and Mindy Levine. *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 322-477.
- 4-3) Shiro Futaki. *MEDCHEM NEWS* 2014, **1**, 20-24.

5 章

蛍光性高分子/蛍光分子の錯形成を利用した アニオン性多糖類の識別

5-1. 序論

ポリチオフェンは、チオフェン骨格を繰り返し単位とした長い共役系を有する導電性高分子であり、会合状態の違いによって様々な光化学的特性を示す。

米村らは、ナノワイヤー化した **P3HT**(Figure 5-2a)と未処理の **P3HT**(Figure 5-2b)から形成される 2 種類の電極に対する酸素存在下での照射により、陰極光電流を得たことを確認し、この光電流の強度がナノワイヤー化した方が未処理の **P3HT** の 2 倍ほどだったことを報告した⁵⁻¹⁾。これは **P3HT** がナノワイヤー化する際にチオフェン環の π - π スタッキングが効率的に形成された(Figure 5-2c)ことが原因であるとしている。

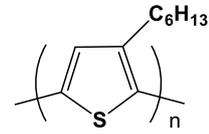


Figure 5-1. **P3HT** の構造

P3HT 溶液の紫外可視吸収スペクトルでは、最大吸収波長が 460 nm 近辺であることに對し、**P3HT** がナノワイヤー化することで 460 nm の吸収帯が減少し、520 nm、550 nm、600 nm に肩のあるスペクトルが得られた(Figure 5-3)。これらの 500~600 nm に観測される特徴的な吸収帯は、規則的に集積したポリチオフェンの組織体に由来すると考えられる。

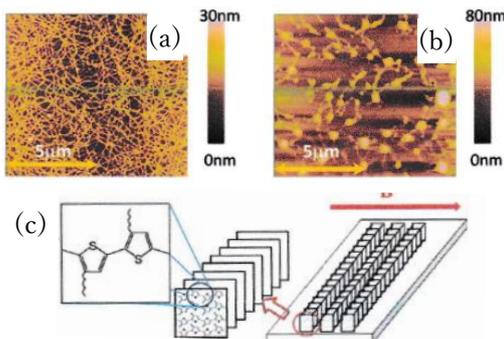


Figure 5-2. (a)ナノワイヤー状態の **P3HT** の AFM 観察像。(b) **P3HT** 分散状態の AFM 観察像。(c)ナノワイヤー形成時の **P3HT** の会合状態の模式図。

Scharsich らは **P3HT** の分子量とポリチオフェンが規則的に配列した構造と紫外可視吸収スペクトルの相関関係について報告している⁵⁻²⁾。分子量を揃えた **P3HT** を用いてその集積状態と分子量との関係を調査したところ、分子量が大きい **P3HT** ほど、会合が進行した際に 0-0、0-1 遷移の吸収帯が見られやすく、これは規則的に配列したポリチオフェンの面の長さに依存している可能性を報告している(Figure 5-4)。

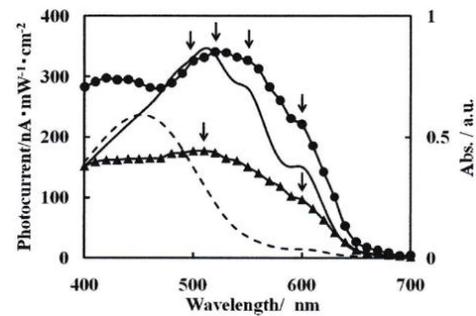


Figure 5-3. **P3HT** の吸収スペクトル。
● : **P3HT** ナノワイヤー, 破線 : **P3HT** 溶液状態。

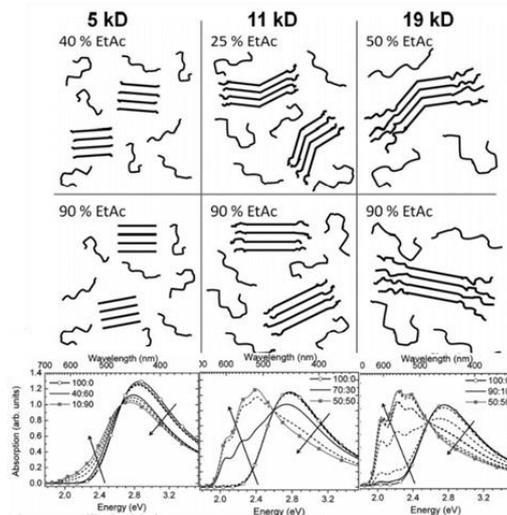


Figure 5-4. 分子量が異なる **P3HT** の会合状態の模式図と紫外可視吸収スペクトル変化。

Yashima らは、貧溶媒存在下もしくは、金属イオン存在下で会合する **poly-1** を設計し、それぞれの条件下での **poly-1** の会合状態について報告した⁵⁻³⁾。貧溶媒もしくは金属イオンのどちらかが存在する条件では、ポリチオフェンが規則的に配列したことを示す 500 nm から 600 nm の領域に現れる吸収帯を確認し、両方が存在する条件では、500 nm から 600 nm の吸収帯が減少し、 $\lambda = 700$ nm 以上の近赤外領域の吸収帯が上昇することを示した(Figure 5-5b, 5-5c)。

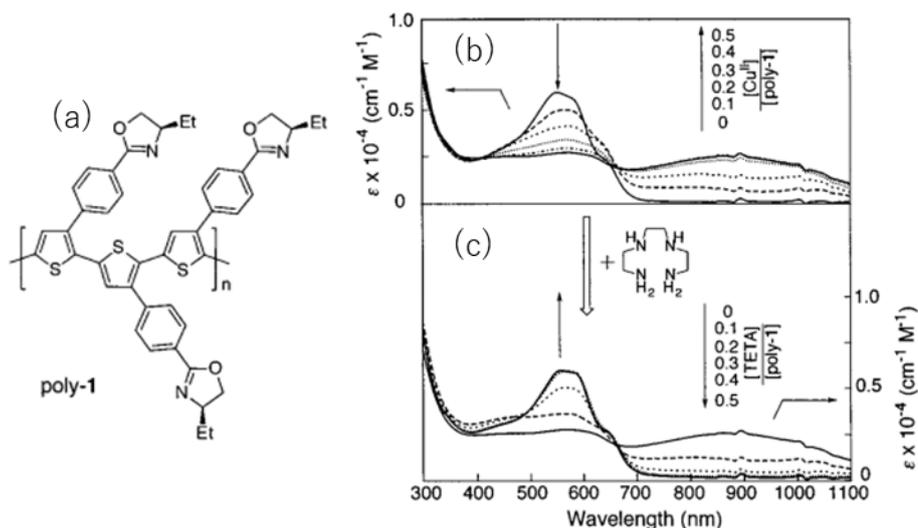


Figure 5-5. (a) **poly-1** の構造。(b) 貧溶媒存在下での **Poly-1** の銅イオンとの錯形成に伴う紫外可視吸収スペクトル変化。(c) 脱銅イオンに伴う錯体の解消時の紫外可視吸収スペクトルの変化。

X線回折より、ポリチオフェン会合体の 22.9 Å (1,0,0) と 7.4 Å (3,0,0) の回折パターンの僅かなシフトが生じ(Figure 5-6)、これは銅イオンのカウンターイオンに当たるトリフルオロメタンスルホナート (TfO⁻) がポリチオフェン鎖の間に並んでいることが原因であると報告している。その結果、規則的に配列したポリチオフェン環をより秩序だてて整列させることになり、吸収帯が変化していると考えられる。

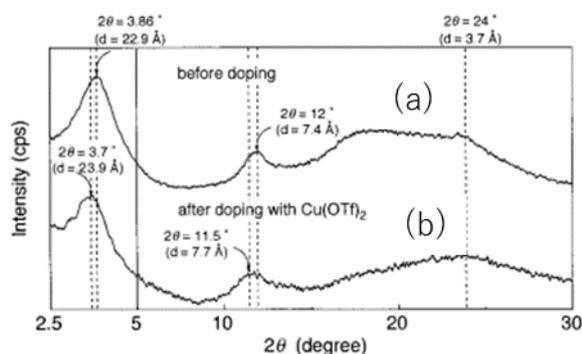


Figure 5-6. 貧溶媒存在下での **poly-1** の X線回折測定結果。(a) 銅イオン添加前。(b) 銅イオン添加後。

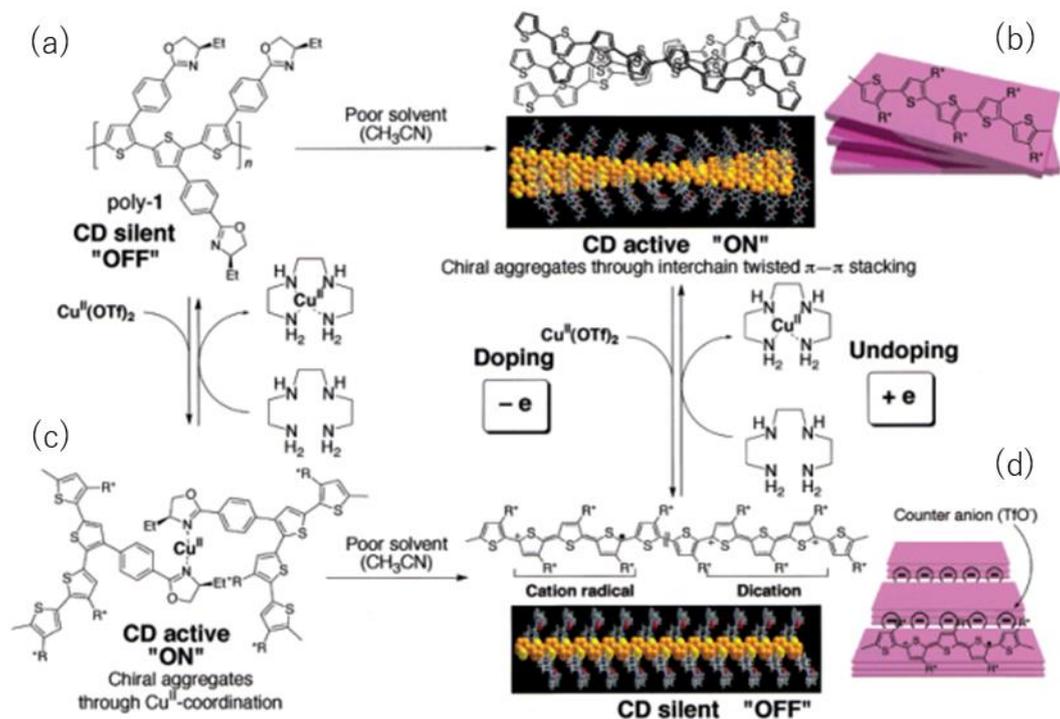


Figure 5-7. 貧溶媒存在下、銅イオンの有無による **poly-1** の会合体形成時の模式図。(a) 貧溶媒、銅イオン非存在下条件。(b) 貧溶媒存在下での **poly-1** の会合状態の模式図。(c)銅イオン存在下での **poly-1** の会合状態の模式図。(d)貧溶媒、銅イオン存在下での **poly-1** の会合状態の模式図。

Figure 5-5 で示した 500 nm から 600 nm の吸収帯が減少し、 $\lambda = 700$ nm 以上の近赤外領域の吸収帯が上昇する紫外可視吸収スペクトル変化は、 $\text{Cu}^{\text{II}}\text{OTf}$ の添加によりポリチオフェン環が酸化された状態になることで、より平面性の高く効率的な π スタッキングが可能になったキノイド型の会合体の形成(Figure 5-7d)によるものであると報告されている。

このように、ポリチオフェン誘導体は、そのコンフォメーションや集合形態の変化に基づいて、光化学的特性を様々に変化させることができるため、検出系の構築において有望な材料であると言える。

そこで本研究では、カチオン性ポリチオフェン誘導体である **PT-1** を用いた、多様な多糖識別系の構築を計画した。これまでの研究において、水溶性ポリチオフェンである **PT-1** がらせん性多糖類と疎水性相互作用とらせん構造の相同性に基づいて共らせん型の錯体を形成し、特有の CD スペクトルを発現することを見出している。さらに、**PT-1** と 1-ピレンスルホン酸(**1-PyS**)が錯形成した際に、**PT-1** が規則的な配列を形成することで吸収帯が長波長領域(550 nm ~ 600 nm)へ大幅に変化することを見出している(Figure 5-8)。上記で述べたようにこの領域の吸収帯は、ポリチオフェンの規則的な集積体に帰属できることから、**1-PyS** の添加により **PT-1** が規則的な集積体を形成したと考えられる。



Figure 5-8. 1-PyS 添加時の PT-1 溶液の劇的な色調変化。

以上の結果から、**PT-1** は多糖類との錯形成によって誘導されるコンフォメーションおよび集合形態の変化によって、多糖類の多様な識別が実現できると着想した。すなわち、**PT-1** 単独ではらせん構造などのコンフォメーション変化を誘導できる多糖類の選択的検出が可能であり、一方、**PT-1/1-PyS** 錯体を利用することで、この錯体の形成・解離に伴う **PT-1** の集合形態の変化を誘導できる多糖類を大きな色調変化として選択的に検出できると期待される。このような考えのもと、本研究では **PT-1** と各種多糖類(Figure 5-9)との錯形成を検討するとともに、**PT-1/1-PyS** 錯体を利用した多糖類の検出について検討した。

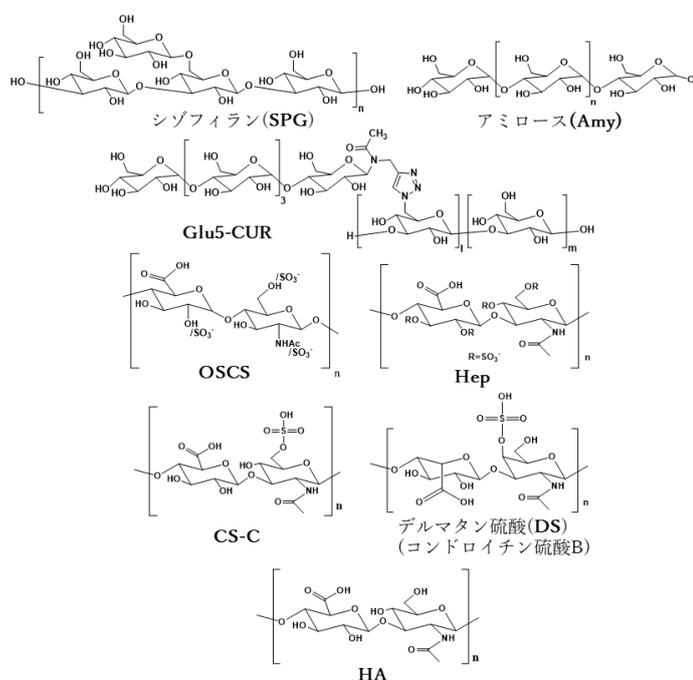


Figure 5-9. 各種多糖類の構造。

5-2. PT-1 単独による多糖類の応答性の評価

5-2-1. 天然由来らせん性多糖類との錯形成の評価

すでに PT-1 が β -1,3 グルカン類であるシゾフィラン (SPG) と共らせん性の錯体を形成して、特有の CD スペクトルを与えることが報告されている。そこで、らせん構造を形成している多糖類として、カードラン (β -1,3 グルカン) の側鎖に水溶性ユニットとしてマルトペンタオースを導入した Glu5-CUR、 α -1,4-グルカン類であるアミロース (Amy)、およびらせん構造を形成しない多糖類としてヘパリン (Hep) とヒアルロン酸 (HA) を用いて、PT-1 との錯形成過程を CD スペクトルにより検討した。具体的な実験操作は以下の通りである。

らせん性の多糖については、らせん構造を解離するために、Glu-5-CUR およびアミロース (31 mM: グルコースユニット濃度) の DMSO 溶液を調製し、この溶液 100 μ L と 100 μ L の PT-1 (4 mM: モノマーユニット濃度) 水溶液を混合したのち、2.8 mL の水で希釈して全量を 3.0 mL とすることで錯形成を行い、得られた溶液の CD スペクトルを測定した。Hep および HA については、5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7.2) を調製し、PT-1 を溶解させ、PT-1 溶液 ([PT-1] = 130 μ M) を調製した。この PT-1 溶液に 5 mM (繰り返しユニット濃度) の多糖水溶液を 130 μ M になるように添加し、得られた溶液の CD スペクトルを測定した。

Figure 5-10 に各種多糖添加時に観測された PT-1 水溶液の CD スペクトルを示す。PT-1 が Glu-5-CUR と錯形成し、SPG/PT-1 錯体と同様に 500 nm 付近に負の分裂型の CD スペクトルを与えることが明らかとなった。Glu-5-CUR と SPG はいずれも β -1,3 グルカン構造を主鎖に持つことから、本実験で観測された CD シグナルは β -1,3 グルカンが持つらせん構造を反映したものと考

えられる。一方、アミロースとの錯形成では、330 nm 付近に正の分裂型の CD スペクトルが観測された。また、らせん構造を持たない Hep および HA 存在下では、意味のある CD シグナルは観測されなかった。以上の結果より、錯形成に伴う PT-1 のコンフォメーション変化を CD スペクトルにより検出することが可能であり、らせん構造を形成する多糖類を選択的に検出可能であることが確認された。また、その波形の違いから、らせん性多糖の種類も区別することが可能であることが示された。

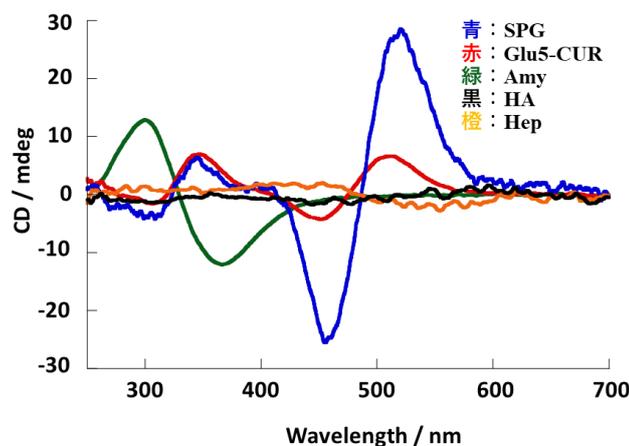


Figure 5-10. 各種多糖との錯形成に伴う PT-1 水溶液の CD スペクトル変化。[PT-1] = 130 μ M.

5-2-2. アニオン多糖類との錯形成の評価

前項において、CD スペクトルを活用することで **PT-1** によるらせん性多糖の検出の可能性を示すことができたが、**PT-1** のコンフォメーション変化を利用した検出系では、**Hep** や **HA** のような非らせん系の多糖類の検出が難しいことが示された。そこで、**PT-1/1-PyS** 錯体を利用したアニオン多糖類の検出について検討を行った。

本研究における作業仮説を Figure 5-11 に示す。**PT-1** は、チオフェンモノマーユニットごとに一つの四級アンモニウムカチオン部位を持つポリカチオンである。一方、**1-PyS** はスルホ基を一つ持つピレン誘導体である。よって、**PT-1** は多数の **1-PyS** と静電的に錯形成することで、主鎖である共役高分子の構造がより直線的なコンフォメーションに誘導されつつ規則的に集積し、紫色を呈したと考えられる。ここで、**1-PyS** と競合するアニオン性のゲストが添加されると **PT-1/1-PyS** 錯体からの **1-PyS** の引き剥がしが進行し、これに伴って **PT-1** のコンフォメーションの直線性の低下が誘導されることで、**PT-1** が溶解状態で示す橙色の色調へと変化すると考えられる。ここで、**1-PyS** と競合するゲストがポリアニオン型の高分子である場合、**PT-1** との錯形成が **1-PyS** に比べてエントロピー的に有利であるため、**PT-1/1-PyS** 錯体からの **1-PyS** の引き剥がしをより速やかに進行させることができると期待される。また、このような機構に基づくことから、本研究で標的とするアニオン性多糖の構造とアニオン性置換基の種類、数、導入位置などの影響を受けて、アニオン性多糖類を識別・分類できると期待される。

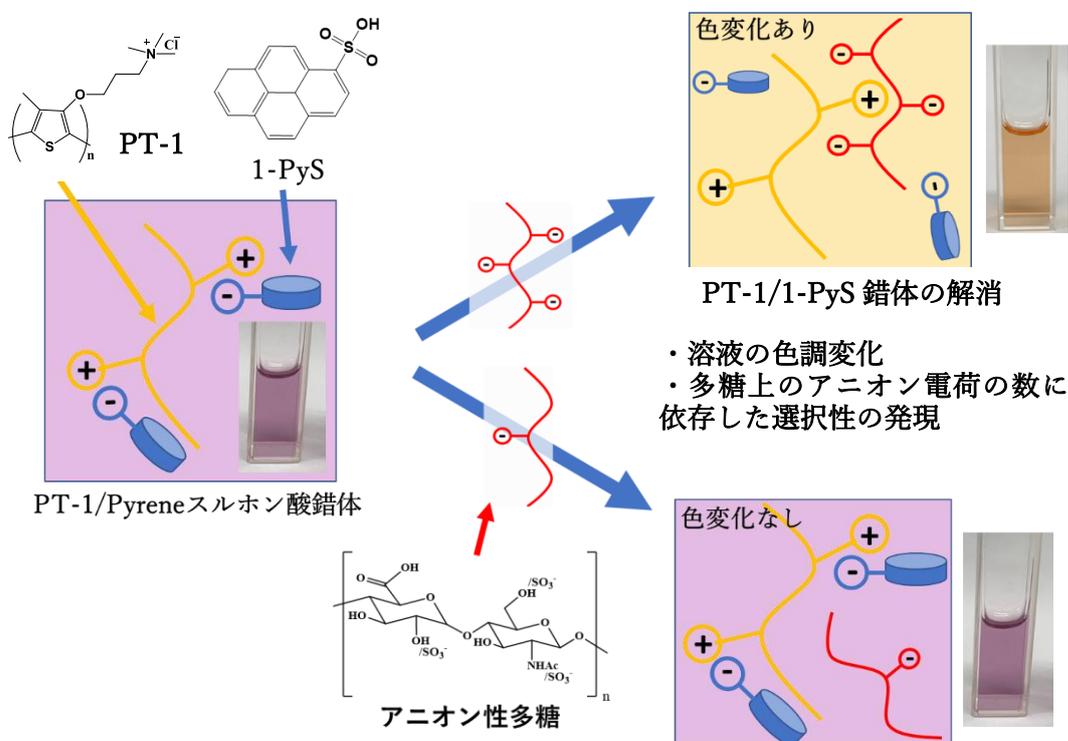


Figure 5-11. **PT-1/1-PyS** 錯体を用いたアニオン性多糖検出の作業仮説。

本作業仮説に基づいて、大きな色調変化を誘導するためには、**PT-1** とアニオン性多糖類との錯体が、**PT-1/1-PyS** 錯体とは大きく異なる色調を示すことが重要である。また、錯形成過程およびアニオン性多糖間の識別について詳細に理解するためには、まず、**1-PyS** 不在条件で、**PT-1** とアニオン性多糖類との錯形成過程について知見を得る必要がある。

そこで、まず **PT-1** と各種アニオン性多糖類との錯形成について、以下の実験操作に従って紫外可視吸収スペクトルと目視によって評価した。

PT-1(1 mg)を 5 mM Tris-HCl 水溶液(30 mL)に溶解させ、**PT-1** 溶液(130 μM)を調製した。この **PT-1** 溶液に各種アニオン性多糖水溶液を添加していき、その過程を紫外可視吸収スペクトル測定により追跡した。

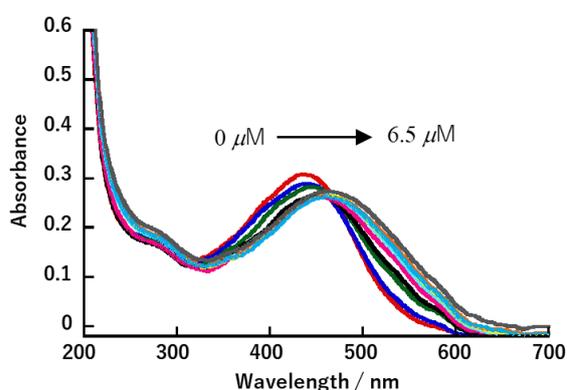


Figure 5-12. OSCS 添加に伴う **PT-1** 水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。
5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), $[\text{PT-1}] = 130 \mu\text{M}$.

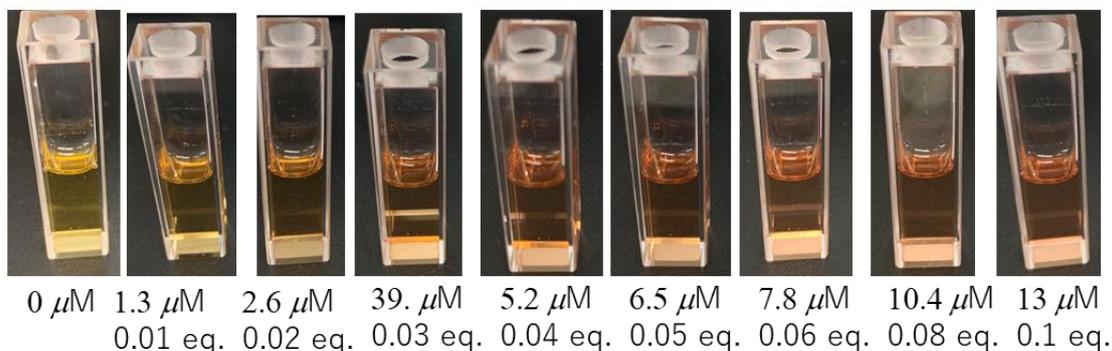


Figure 5-13. OSCS 添加に伴う **PT-1** 水溶液の色調変化。
5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), $[\text{PT-1}] = 130 \mu\text{M}$.

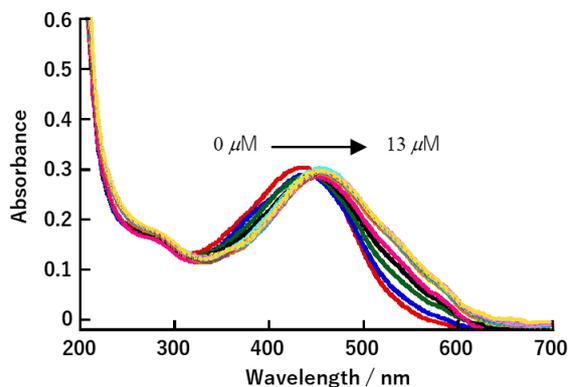


Figure 5-14 Hep 添加に伴う PT-1 水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。
5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1]= 130 μM .

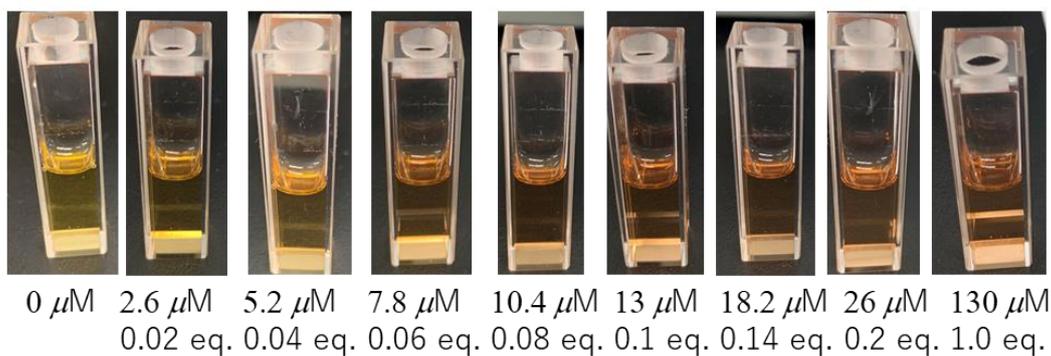


Figure 5-15. Hep 添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。
5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1]= 130 μM .

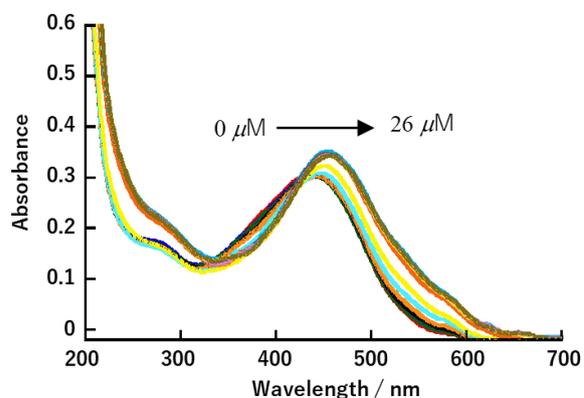


Figure 5-16. CS-C 添加に伴う PT-1 水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。
5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1]= 130 μM .

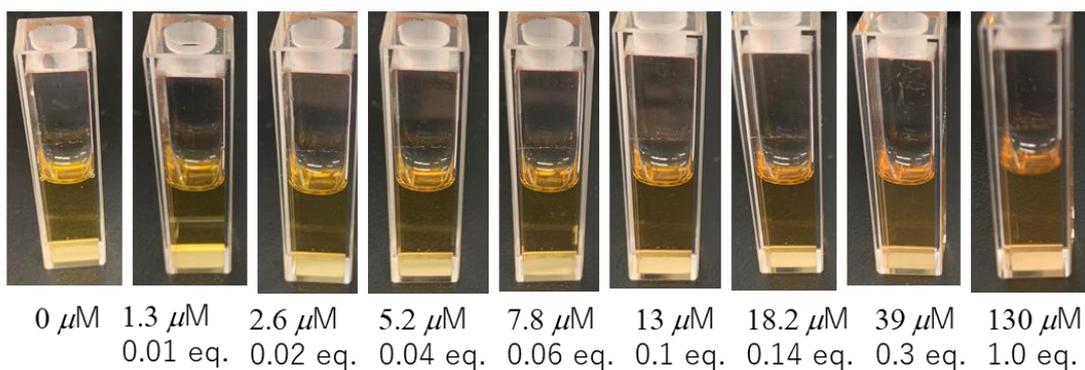


Figure 5-17. CS-C 添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。
 5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1]= 130 μM .

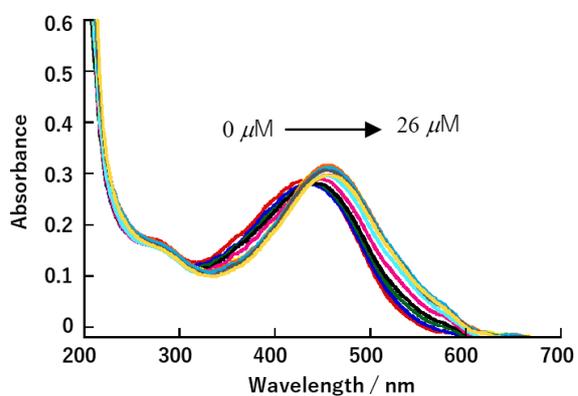


Figure 5-18. DS 添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。
 5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1]= 130 μM .

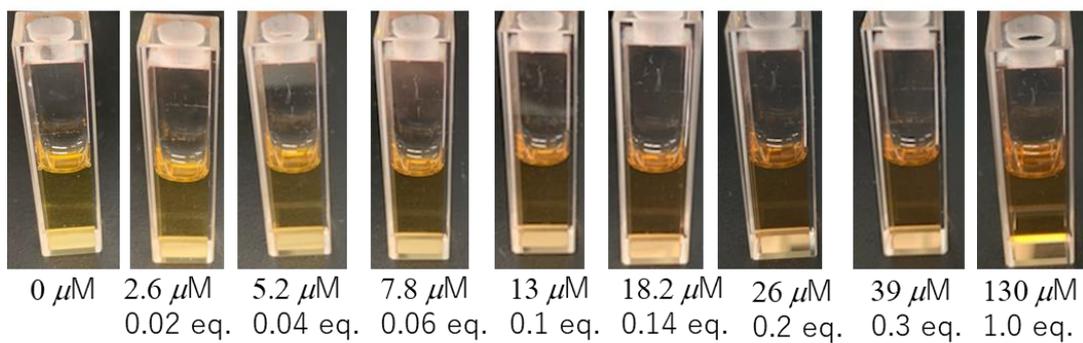


Figure 5-19. DS 添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。
 5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1]= 130 μM .

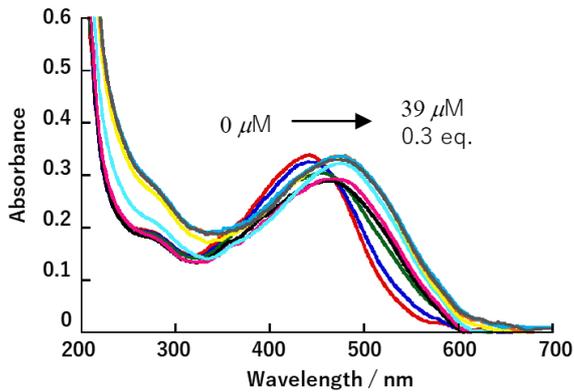


Figure 5-20. HA 添加に伴う PT-1 水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。
5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1] = 130 μM .

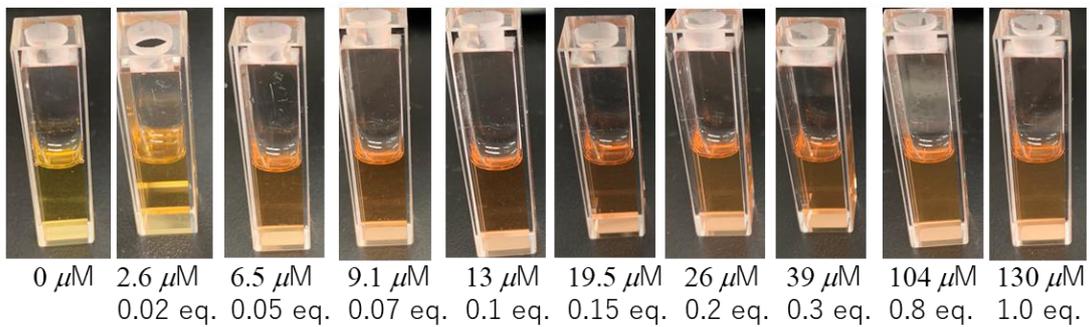


Figure 5-21. HA 添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。
5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1] = 130 μM .

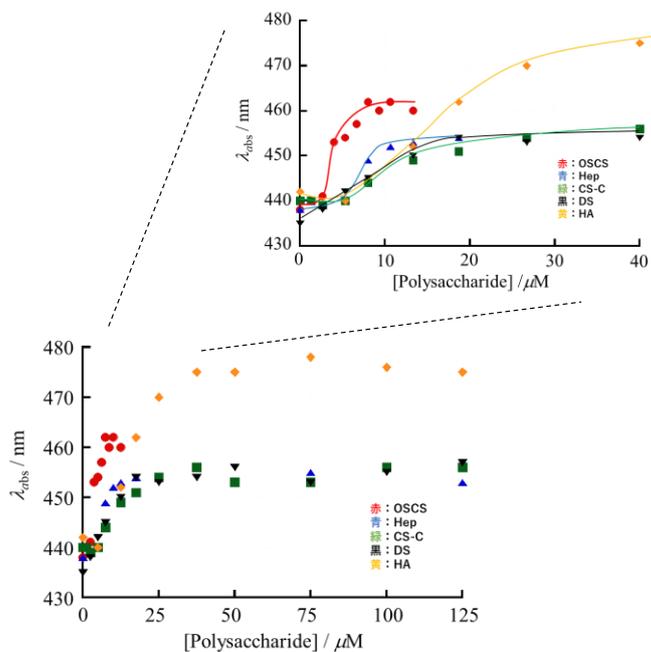


Figure 5-22. アニオン性多糖添加に伴う PT-1 水溶液の最大吸収波長の変化。
5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1] = 130 μM .

pH 7.2 の **PT-1** 溶液 ($[\text{PT-1}] = 130 \mu\text{M}$) にアニオン性多糖類を添加すると、アニオン性多糖類の種類によらず黄色から橙色への僅かな色調変化が誘導されることが明らかとなった (Figure 5-13, 5-15, 5-17, 5-19, 5-21)。紫外可視吸収スペクトルでは、アニオン性多糖との錯形成に伴って、**PT-1** の吸収帯が長波長シフトした。このスペクトル変化は、多糖の種類によって若干ながら異なっていたことから、多糖の構造の違いが、**PT-1** の多糖錯体中でのコンフォメーションに影響を及ぼすことが確認された。また、このスペクトル変化は繰り返し単位上のアニオン性置換基数が多い多糖であるほど、より低濃度領域で飽和することが確認された (Figure 5-22)。このことから、**PT-1** はアニオン性多糖をアニオン性置換基数を元に識別できる可能性が示された。また、**PT-1**/多糖錯体の色調が、**PT-1**/1-PyS 錯体のものと大きく異なることから、**PT-1** のみでのアニオン性多糖類の識別は困難であるが、**1-PyS** を添加することで、明瞭な色調変化に基づく多糖識別が可能であることが確認された。

5-3. pH 7.2 での **PT-1**/1-PyS の錯形成

PT-1/1-PyS の錯形成過程と錯体の状態に関する知見を得るために、**PT-1** 水溶液に **1-PyS** 水溶液を添加した際の紫外可視吸収スペクトルの変化および色調変化を、以下の実験操作に従って確認した。

PT-1 (1 mg) を 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (30 mL) に溶解させ、**PT-1** 溶液 ($130 \mu\text{M}$) を調製した。得られた **PT-1** 溶液もしくは Tris-HCl 緩衝液に **1-PyS** を添加していき、その過程を紫外可視吸収スペクトル測定により追跡し、吸光度を確認した。

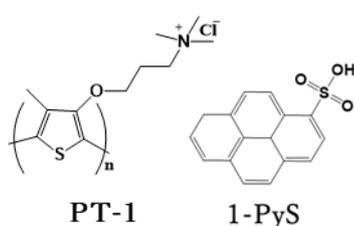


Figure 5-23. **PT-1** と **1-PyS** の構造。
5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2),
 $[\text{PT-1}] = 130 \mu\text{M}$.

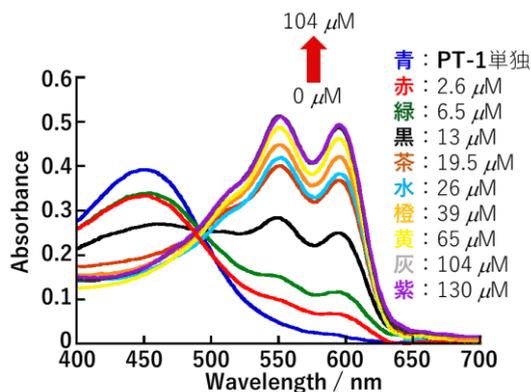


Figure 5-24. **PT-1**/1-PyS 錯体の紫外可視吸収スペクトル変化。5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2), $[\text{PT-1}] = 130 \mu\text{M}$.

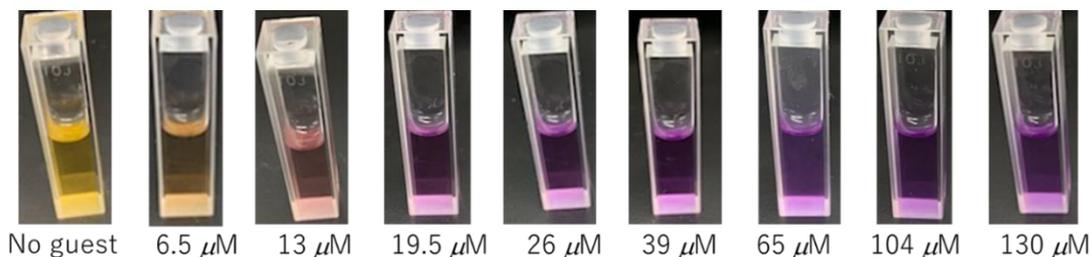


Figure 5-25. 1-PyS 添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。

5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.2), [PT-1] = 130 μM .

PT-1 水溶液に対し、1-PyS 水溶液を添加したところ、遊離 PT-1 そのものに帰属される 440 nm 付近の吸収帯が減少し、コンフォメーションの直線性が向上した PT-1 の集積体に帰属される 550 nm~600 nm の吸収帯が出現・上昇した。この変化は[1-PyS] = 19.5 μM まで顕著に進行することが明らかとなり (Figure 5-24)、これに伴って見た目の色調変化も [1-PyS] = 19.5 μM 程度の条件で十分に進行することが確認された(Figure 5-25)。以上の結果から、PT-1/1-PyS 錯体を用いた多糖識別実験では、[1-PyS] = 19.5 μM の条件を採用することとした。

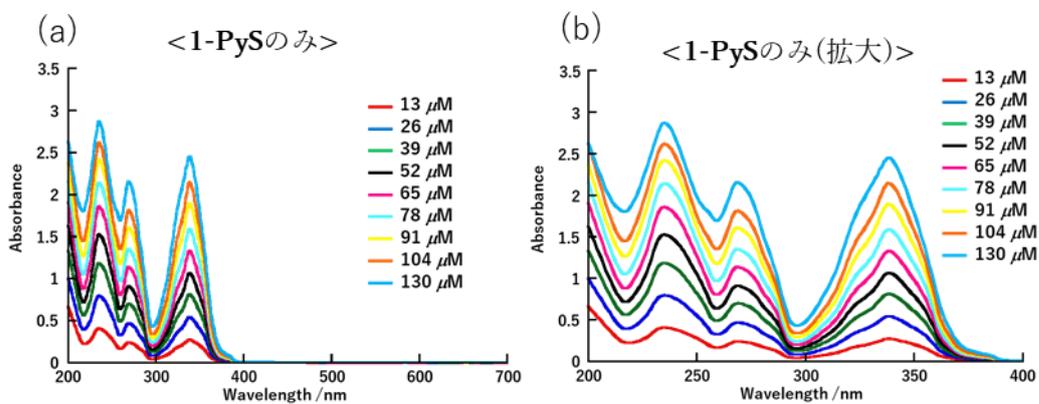


Figure 5-26. 各濃度の 1-PyS 水溶液の紫外可視吸収スペクトル。(a) $\lambda = 200 \text{ nm} \sim 700 \text{ nm}$ 。(b) $\lambda = 200 \text{ nm} \sim 400 \text{ nm}$ 。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液, pH 7.2。

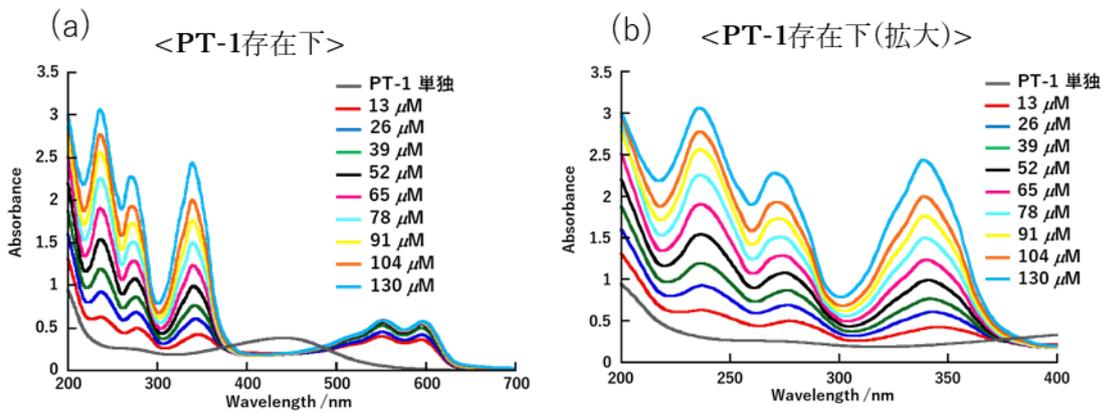


Figure 5-27. PT-1 存在下での各濃度の 1-PyS 水溶液の紫外可視吸収スペクトル。(a) $\lambda=200\text{ nm}\sim 700\text{ nm}$ 。(b) $\lambda=400\text{ nm}\sim 700\text{ nm}$ 。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM 。

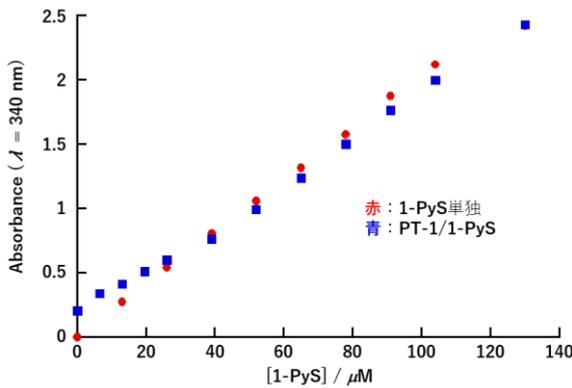


Figure 5-28. 1-PyS 添加に伴う $\lambda=340\text{ nm}$ の吸光度プロット。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM 。

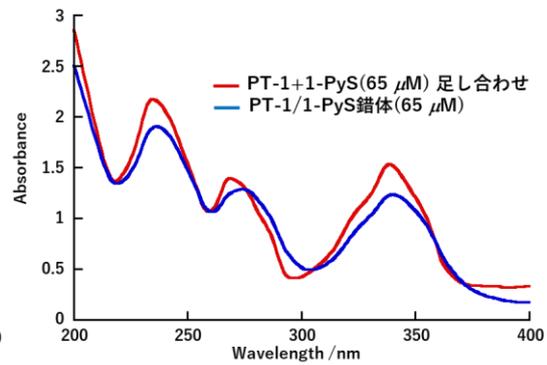


Figure 5-29. PT-1/1-PyS 錯体が示す紫外可視吸収スペクトル (青線) と、PT-1、1-PyS それぞれのスペクトルの足し合わせ (赤線) の比較。

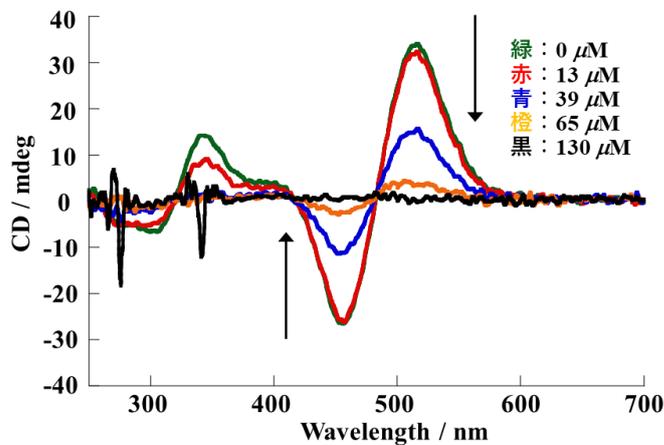


Figure 5-30. 1-PyS 添加に伴う SPG/PT-1 錯体水溶液の CD スペクトル変化。pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [SPG]=900 μM

この錯形成過程における **1-PyS** の状態変化について検討するために、400 nm 以下の吸収帯に注目すると、Figure 5-28 に示すように、**1-PyS** 単独と比べて、**PT-1** が存在することで吸光度の上昇が鈍く、特に溶液全体の色調変化が激しい 0~40 μM の領域では吸光度の上昇が鈍いことが確認できた。このことから、**PT-1** と **1-PyS** が錯形成することで **1-PyS** の吸光度が本来得られる吸光度より低くなっていることが示唆された。

Figure 5-29 に示すように、**PT-1** と **1-PyS** の足し合わせであるスペクトルと **PT-1/1-PyS** 錯体の紫外可視吸収スペクトルを比較すると、**PT-1/1-PyS** 錯体(青線)では、それぞれの吸収帯が僅かに長波長シフトしており、240 nm 付近の吸収帯と 340 nm 付近の吸収帯の吸光度が足し合わせ(赤線)より低くなっていることが確認された。また、蛍光スペクトルによる検討から、ピレノのエキシマーの形成は全く確認されなかった。続いて、**SPG/PT-1** 錯体を含む水溶液中に **1-PyS** を添加したところ、**SPG/PT-1** 錯体に由来する CD スペクトルが、**1-PyS** 濃度の上昇に伴って減少し、消失することが確認された (Figure 5-30)。この過程では、**PT-1/1-PyS** 錯体の形成を示す、水溶液の紫色への変化が目視で確認されたことから、静電相互作用を駆動力とする **PT-1/1-PyS** 錯体の形成は、疎水性相互作用を駆動力とする **SPG/PT-1** 錯体の形成よりも優位であることが示された。すなわち **PT-1/1-PyS** 錯体を用いた検出系においては、アニオン性の多糖類がより優位であることが示唆された。

5-4. pH 7.2 での **PT-1/1-PyS** 錯体からの **1-PyS** とアニオン性多糖の交換に与える温度の効果

Figure 5-11 で示した作業仮説を達成するためには、**1-PyS** とアニオン性多糖との効果的な交換が起こる必要がある。このためには、**PT-1** と **1-PyS** の錯体形成の平衡を適度の調節しておく必要がある。そこでまず、**PT-1/1-PyS** 錯体の熱安定性を以下の実験操作に従って評価することとした。

PT-1(1 mg)を 5 mM Tris-HCl 水溶液(30 mL)に溶解させ、**PT-1** 溶液(130 μM)を調製した。そこに **1-PyS** 水溶液を添加し、**PT-1/1-PyS** 溶液($[\text{PT-1}] = 130 \mu\text{M}$, $[\text{1-PyS}] = 19.5 \mu\text{M}$)を作製した。得られた **PT-1/1-PyS** 溶液を光路長 1 cm の石英セルに加え、セルを加熱しながら紫外可視吸収スペクトル測定を行った。

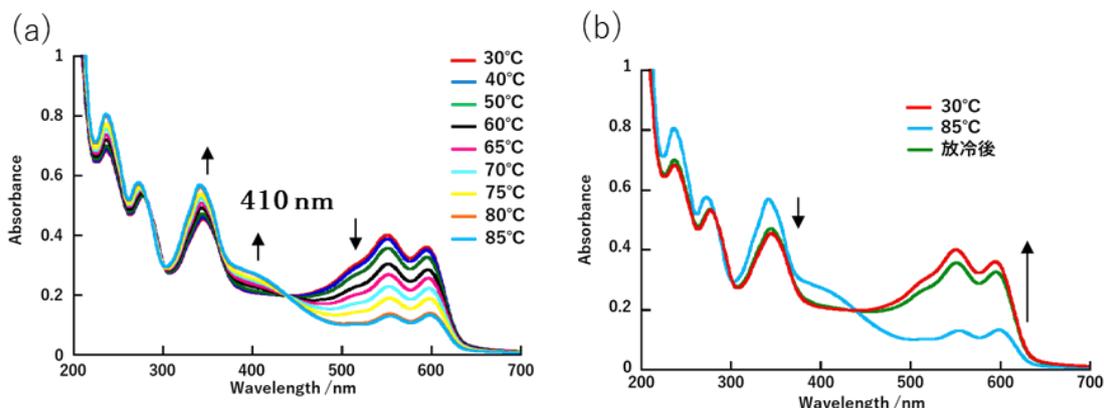


Figure 5-31. 温度変化に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。(a) 昇温過程。(b) 放冷過程。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μ M, [1-PyS]=19.5 μ M.

Figure 5-31a に示すように、温度上昇に伴って、500~600 nm の吸収帯が減少し、410 nm 付近と 1-PyS の吸収帯が上昇した。80°C以降ではこれ以上のスペクトル変化が見られなかったことから、温度による解離平衡が 80°C程度で十分に解離側に移動することが明らかとなった。放冷後は、加熱前と同等のスペクトルが得られたことから(Figure 5-30b)、温度調節による PT-1/1-PyS 錯体の平衡状態を制御することができることが確認された。

5-5. pH 7.2 で PT-1/1-PyS 錯体を示すアニオン性多糖に対する応答挙動

5-4 項の結果を参考に、PT-1/1-PyS 錯体水溶液への各種アニオン性多糖の添加に伴う紫外可視吸収スペクトル変化を追跡した。まず本実験を加熱操作なしに、室温条件下で試みた。

5-5-1. 室温での Hep 添加に伴うスペクトルの変化

PT-1(1 mg)を 5 mM Tris-HCl 水溶液(30 mL)に溶解させ、PT-1 溶液(130 μ M)を調製した。そこに 1-PyS 水溶液を添加し、PT-1/1-PyS 溶液([PT-1] = 130 μ M, [1-PyS] = 19.5 μ M)を作製した。得られた PT-1/1-PyS 溶液を光路長 1 cm 石英セルに加え、そこに Hep 水溶液を添加し、紫外可視吸収スペクトル測定を行った。

Figure 5-32 に示すように、PT-1/1-PyS 錯体水溶液に対して Hep を添加しても、大きな色調の変化が期待されるようなスペクトル変化は見られなかった。室温では、PT-1/1-PyS 錯体が安定であり、1-PyS と Hep の交換が十分には進行しないことが明らかとなった。

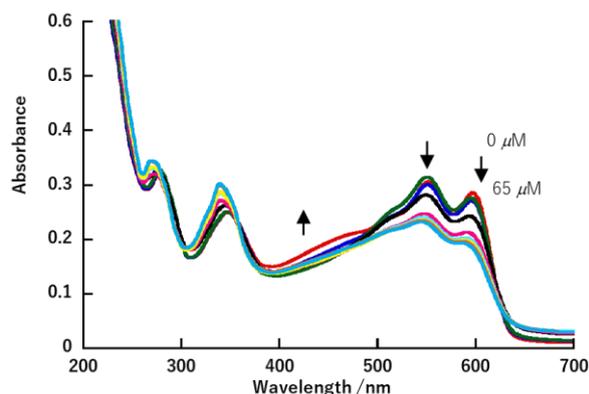


Figure 5-32. Hep 添加に伴う PT-1/1-PyS 錯体の紫外可視吸収スペクトル変化。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μ M, [1-PyS]=19.5 μ M.

5-5-2. 加熱条件でのアニオン性多糖添加に伴うスペクトル変化

5-4、5-5-1 の結果を受けて、1-PyS とアニオン性多糖の交換に対する、温度とアニオン性多糖の濃度の効果を評価した。さらに多糖上の置換基の効果を評価するために、CS-C と HA におけるスペクトル変化を比較した。実験操作を以下に示す。

PT-1(1 mg)を 5 mM Tris-HCl 水溶液(30 mL)に溶解させ、PT-1 溶液(130 μ M)を調製した。そこに 1-PyS 水溶液を添加し、PT-1/1-PyS 溶液([PT-1] = 130 μ M, [1-PyS] = 19.5 μ M)を作製した。得られた PT-1/1-PyS 溶液を光路長 1 cm 石英セルに加え、そこにアニオン性多糖水溶液を添加し、セルを加熱しながら各温度での紫外可視吸収スペクトル測定を行った。

まず、[CS-C]<20 μ M の条件で測定したスペクトルについての結果と考察を以下に示す。

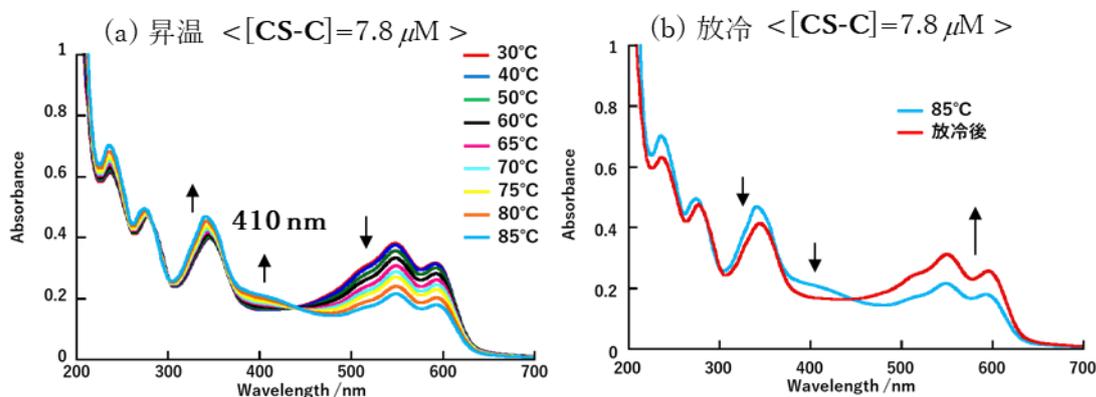


Figure 5-33. 7.8 μ M の CS-C 共存下での温度変化に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。(a) 昇温過程。(b) 放冷過程。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μ M, [1-PyS]=19.5 μ M.

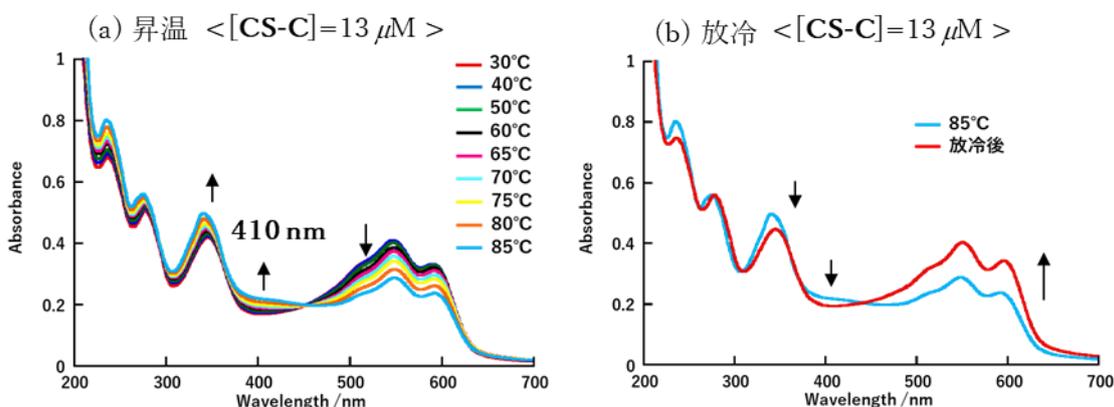


Figure 5-34. 13 μM の CS-C 共存下での温度変化に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。(a) 昇温過程。(b) 放冷過程。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=19.5 μM .

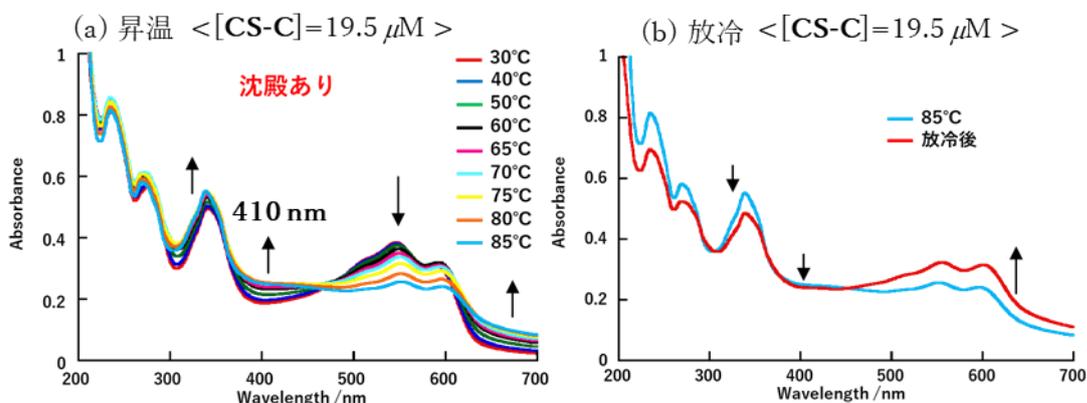


Figure 5-35. 19.5 μM の CS-C 共存下での温度変化に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。(a) 昇温過程。(b) 放冷過程。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=19.5 μM .

[CS-C]=7.8 μM と 13 μM の条件ではゲスト不在下と同じように十分なスペクトル変化は得られなかった (Figure 5-33, 5-34)。[CS-C]=19.5 μM の条件でも加熱に伴って同様のスペクトル変化 (Figure 5-35) が確認されたものの、沈殿の形成が確認された。この条件では、PT-1/1-PyS/CS-C の三元的な会合体が予想され、この錯体の溶解性が低いことが原因として考えられる。

続いて [CS-C]>20 μM の条件で測定したスペクトル変化についての結果と考察を以下に示す。

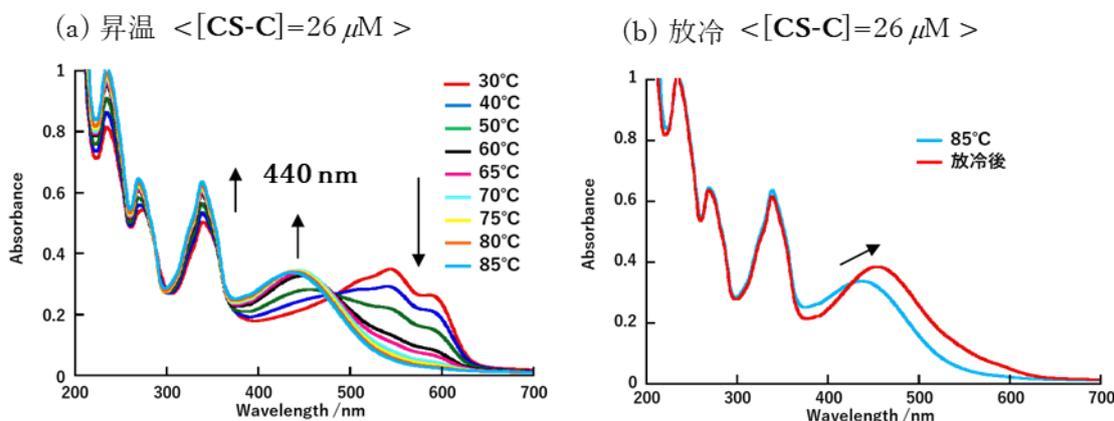


Figure 5-36. 26 μM の CS-C 共存下での温度変化に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。(a) 昇温過程。(b) 放冷過程。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=19.5 μM 。

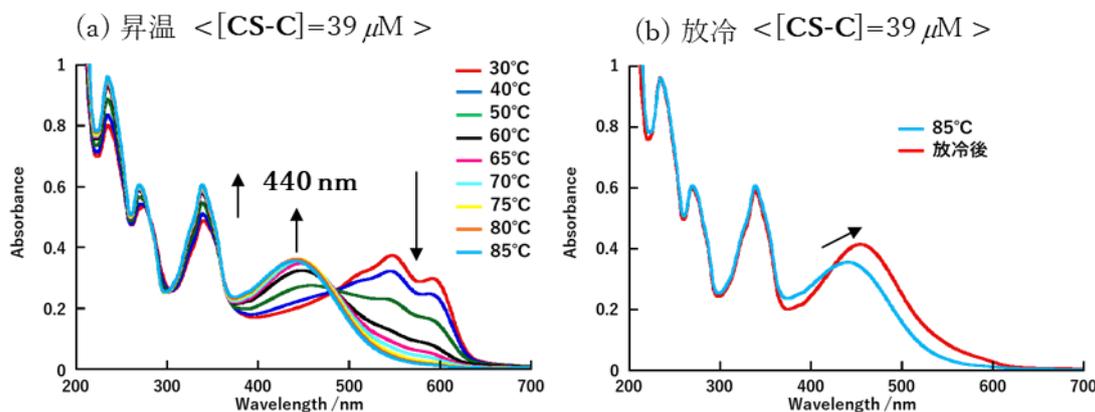


Figure 5-37. 39 μM の CS-C 共存下での温度変化に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。(a) 昇温過程。(b) 放冷過程。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=19.5 μM 。

[CS-C]=26 μM よりも高濃度の条件では、50°C~60°Cにかけて急激に 500~600 nm の吸収帯が減少し、440 nm 付近及び 370 nm 以下の 1-PyS に帰属される各吸収帯の上昇が確認された (Figure 5-36a, 5-37a)。同様の変化はさらなる温度上昇に伴って進行し、80°C 付近ではほぼ完全に PT-1/1-PyS 錯体の解消が確認できた。85°C から 30°C まで冷却過程では、1-PyS に由来する吸収帯は変化しないのに対し、PT-1 に由来する $\lambda_{\text{max}}=440$ nm 付近の吸収帯は 460 nm へシフトした (Figure 5-36b, 5-37b)。このようなスペクトル変化は 1-PyS 不在下で PT-1 と CS-C が錯形成した際に見られるスペクトル変化 (Figure 5-16) と同様であることから、[CS-C]=26 μM よりも高濃度の条件では、高温条件において 1-PyS と CS-C の交換が効率よく進行していることが確認された。

以上を踏まえて、同様の実験を HA をゲストとして検討した。

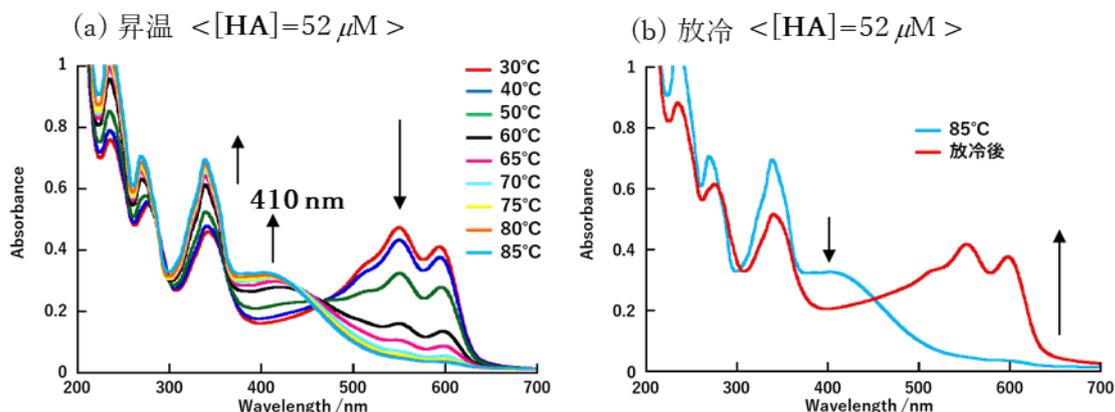


Figure 5-38. 52 μM の HA 共存下での温度変化に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。(a) 昇温過程。(b) 放冷過程。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=19.5 μM 。

[HA] = 52 μM の条件では、50 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ にかけて急激に 500~600 nm の吸収帯が減少し、410 nm 付近及び 1-PyS に帰属される 370 nm 以下の各吸収帯の上昇が確認された (Figure 5-38a)。放冷後は、500~600 nm の吸収帯が上昇し、1-PyS の吸収帯が減少したことから、放冷によって PT-1/1-PyS 錯体の再形成が進行したことが確認された (Figure 5-38b)。このことから HA は多糖骨格上に 2 糖ユニットにつき、わずか 1 つのカルボキシル基を持つため、PT-1 に対する親和性が低いと考えられる。その結果、低温条件では PT-1/1-PyS 錯体の形成が優先したと考えられる。

5-6. pH 7.2 での PT-1/1-PyS 錯体によるアニオン性多糖類の識別

前項の結果から、PT-1/1-PyS 錯体から 1-PyS とアニオン性多糖の交換を引き起こすためには、80 $^{\circ}\text{C}$ 以上の温度で加熱する必要があることが確認された。この知見をもとに、他のアニオン性多糖に対する紫外可視吸収スペクトルと目視での色調変化について以下の実験操作に従って評価した。

PT-1 (1 mg) を 5 mM Tris-HCl 水溶液 (30 mL) に溶解させ、PT-1 溶液 (130 μM) を調製した。そこに 1-PyS 水溶液を添加し、PT-1/1-PyS 溶液 ([PT-1] = 130 μM , [1-PyS] = 19.5 μM) を作製した。得られた PT-1/1-PyS 溶液を光路長 1 cm 石英セルに分注し、そこに各種アニオン性多糖水溶液を添加し、セルを 85 $^{\circ}\text{C}$ で加熱し放冷後の紫外可視吸収スペクトル測定を行った。

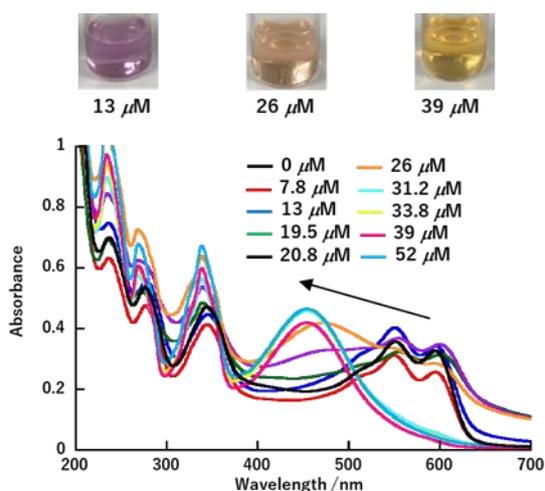


Figure 5-39. CS-C 添加に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μ M, [1-PyS]=19.5 μ M.

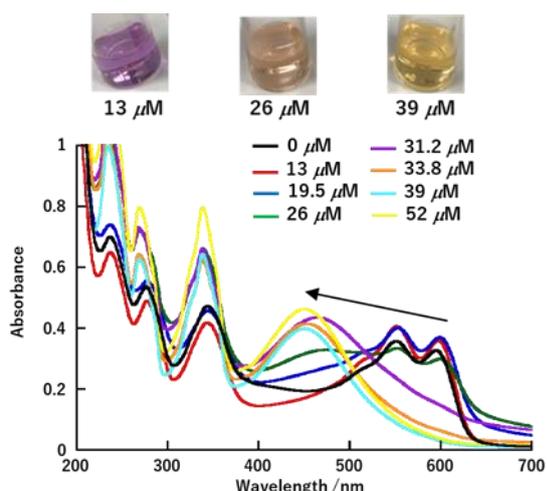


Figure 5-40. DS 添加に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μ M, [1-PyS]=19.5 μ M.

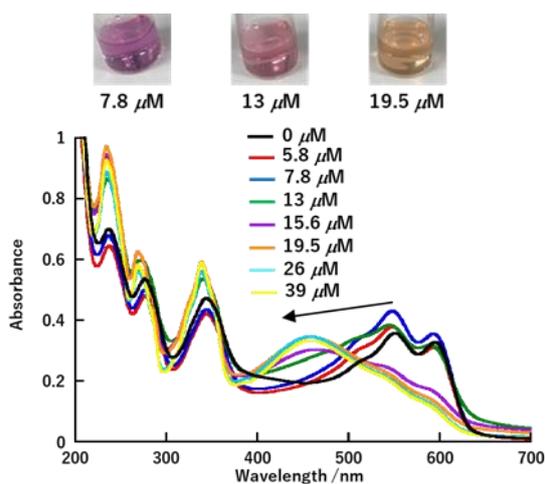


Figure 5-41. Hep 添加に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μ M, [1-PyS]=19.5 μ M.

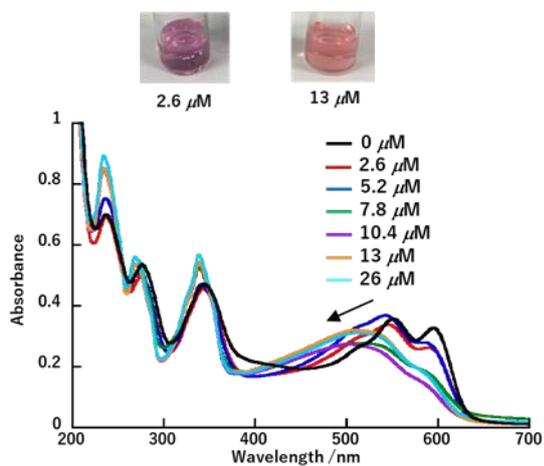


Figure 5-42. OSCS 添加に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μ M, [1-PyS]=19.5 μ M.

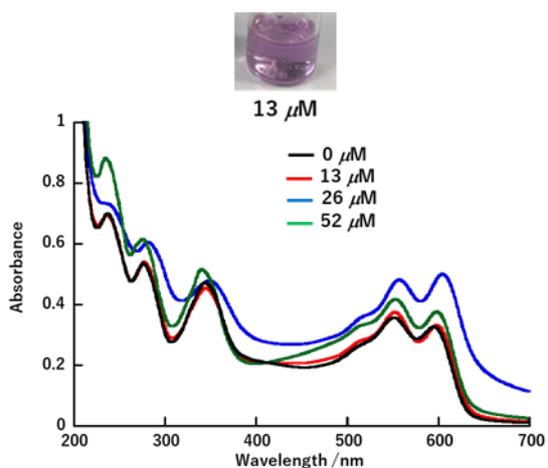


Figure 5-43. HA 添加に伴う PT-1/1-PyS 錯体水溶液の紫外可視吸収スペクトル変化 (放冷後), 5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=19.5 μM .

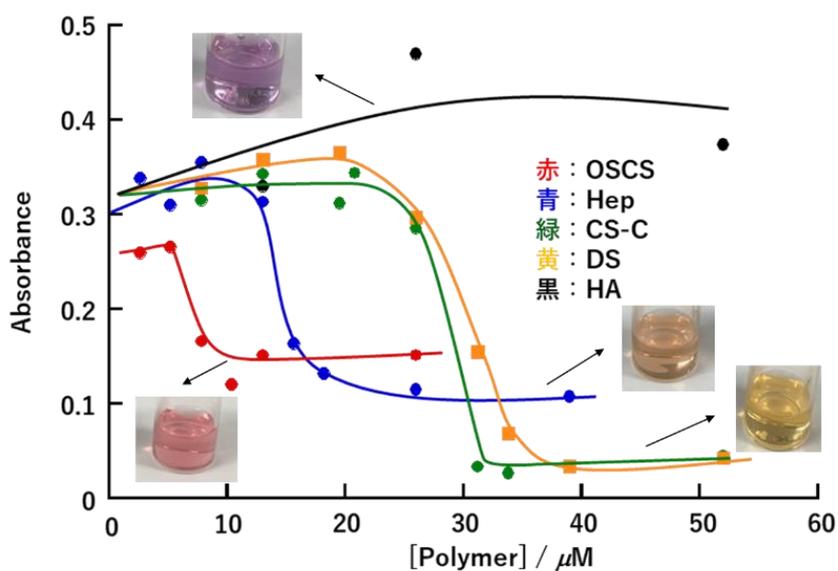


Figure 5-44. アニオン性多糖添加に伴う $\lambda = 595 \text{ nm}$ の吸光度プロット (横軸: モル濃度)。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=19.5 μM .

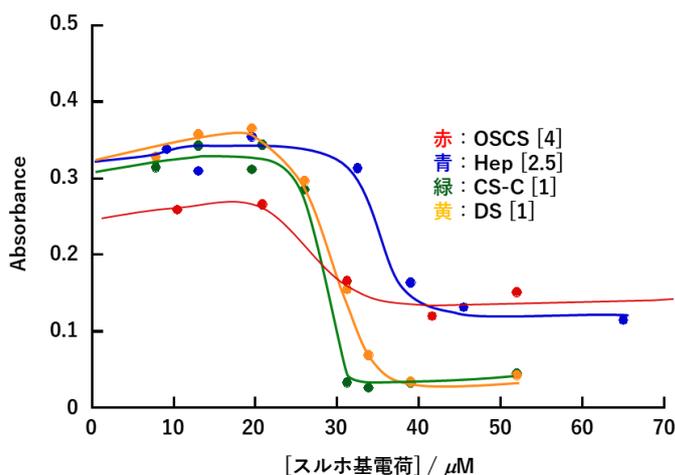


Figure 5-45. アニオン性多糖添加に伴う $\lambda=595\text{ nm}$ の吸光度プロット (横軸：電荷濃度)。5 mM Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=19.5 μM .

2 糖ユニットにつき 1 つのスルホ基を有している **CS-C** と **DS** 存在下では、大きなスペクトルの変化が確認され、それに伴う紫色から黄色への顕著な色調変化が確認された (Figure 5-39, 5-40)。2 糖ユニットにつき 2.5 個のスルホ基を有している **Hep** 存在下では **CS-C** や **DS** のように比べると僅かに変化が小さかったものの、十分なスペクトル変化が確認され、このスペクトル変化に伴い、色調は紫色から橙色へと変化した (Figure 5-41)。それに対して 2 糖ユニットにつき 4 個のスルホ基を有している **OSCS** 存在下では、スペクトル変化を示したものの、**CS-C**、**DS** や **Hep** と比べるとスペクトル変化は小さく、それに伴って色調変化も小さくなった (Figure 5-42)。これは **PT-1** とアニオン性多糖が錯形成した際に、アニオン性多糖の構造に依存して **PT-1** の構造に違いが生じることが原因であると考えられる。一方で、アニオン性多糖添加に伴う $\lambda_{\text{max}}=595\text{ nm}$ の吸光度の変化をプロットすると、**OSCS**、**Hep**、**CS-C**・**DS** の順に薄い濃度領域からスペクトル変化が生じていることが明らかとなった (Figure 5-44)。横軸をスルホ基の濃度としてプロットすると (Figure 5-45)、いずれのアニオン性多糖でもほぼ同じスルホ基の濃度領域においてスペクトル変化が生じていることが分かる。また、構造内にスルホ基を有しない **HA** ではほとんどスペクトル・色調変化が確認されなかった (Figure 5-43)。以上のことから、**PT-1** とアニオン性多糖の錯形成においては、スルホ基が主導的に関与していると考えられる。

5-7. pH 7.2 での **PT-1/1-PyS** を用いたアニオン性多糖に対する応答性の評価に関するまとめ

pH 7.2 で **PT-1/1-PyS** 錯体を用いたアニオン性多糖に対する検出を検討した結果、本系は、2 糖ユニットに存在するスルホ基の数が少ないアニオン性多糖ほど大きなスペクトル変化と色調変化を示し、2 糖ユニットに存在するスルホ基の数が多きほど、低濃度で応答性を示すことが明らかとなった。この系を利用することで応答濃度と色調変化の大きさからア

ニオン性多糖の識別が可能であることが示された。

5-8. PT-1/PyS 系のアニオン性多糖に対する応答性に及ぼす pH の効果

前項までの結果から、pH 7.2 で PT-1/1-PyS 錯体における 1-PyS とアニオン性多糖の交換を利用することで、アニオン性多糖の識別系の構築に成功している。この識別は PT-1 とアニオン性多糖の親和性の高さを駆動力にしていることが明らかとなっている。一方で、アニオン性多糖はカルボキシル基を有しているため、pH を変化させることで PT-1 との親和性を調節することができ、pH 7.2 の条件で得られた応答性とは異なった応答性を示すことが期待できる。そこで、一般的なカルボキシル基の pKa は約 4.7、ヒアルロン酸のカルボキシル基の pKa は 3 であると報告されているため⁵⁻⁴⁾、カルボキシル基がアニオンとしての機能を果たさないと予想される pH 2 付近で実験を行うことを計画した。

5-8-1. pH 2.2 での PT-1 単独のアニオン性多糖類への応答性の評価

1-PyS 非存在下で PT-1 水溶液にアニオン性多糖類を添加し、その紫外可視吸収スペクトルと色調の変化について、以下の実験操作に従って調査した。

PT-1(1 mg)を逆浸透水(30 mL)に溶解させ、PT-1 水溶液(130 μM)を調製した。得られた PT-1 水溶液に 1 M 塩酸を添加することで pH 2.2 に調整した。得られた PT-1 水溶液を分注し、そこにアニオン性多糖水溶液を添加し、色調変化を確認した。

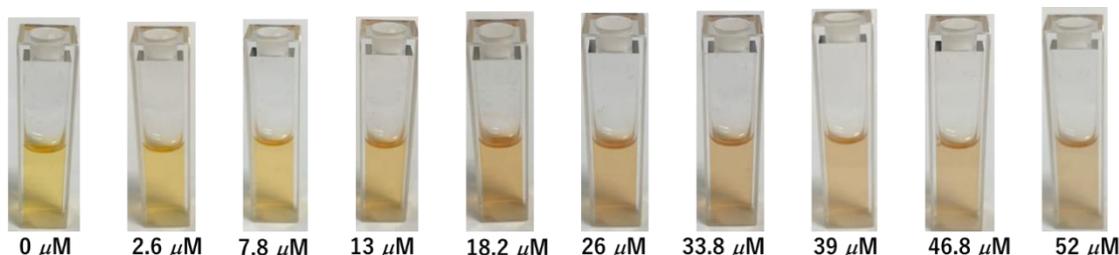


Figure 5-46. Hep 水溶液添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。pH 2.2, [PT-1]=130 μM .

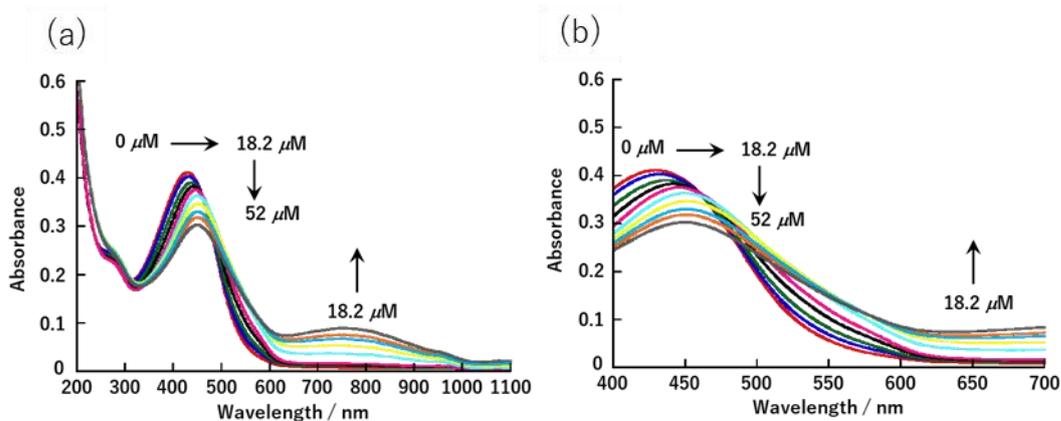


Figure 5-47. Hep 水溶液添加に伴う PT-1 水溶液の紫外可視スペクトル変化。a) pH 2.2, $\lambda=200 \text{ nm} \sim 1100 \text{ nm}$, b) pH 2.2, $\lambda=400 \text{ nm} \sim 700 \text{ nm}$, [PT-1]=130 μM , [1-PyS]=91 μM , pH 2.2.

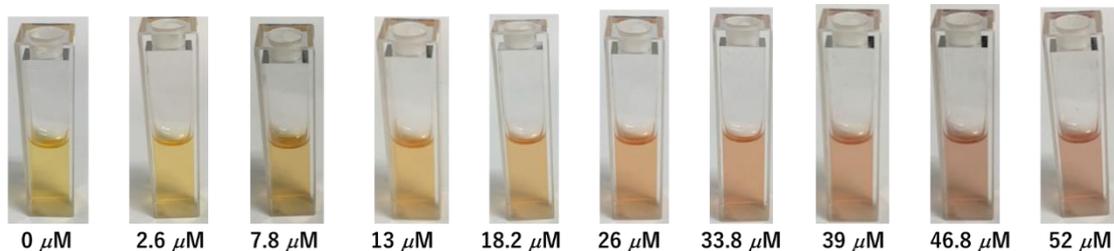


Figure 5-48. CS-C 水溶液添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。
pH 2.2, [PT-1]=130 μM .

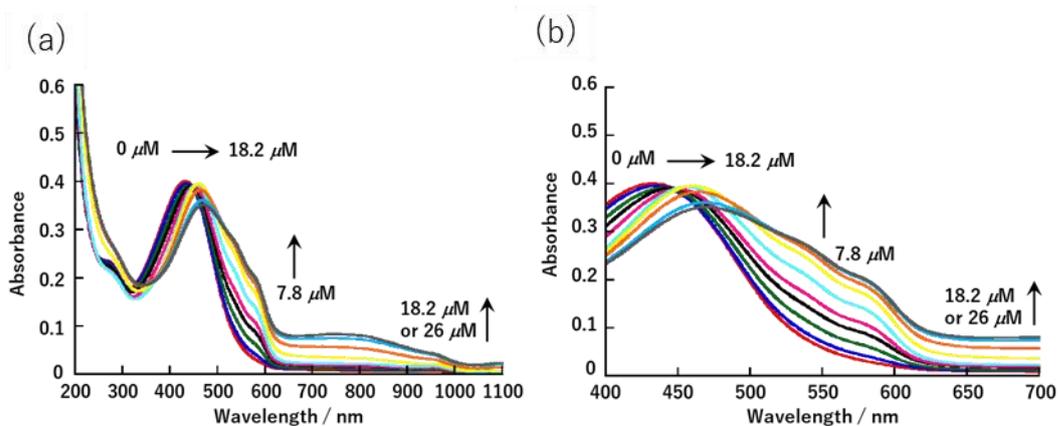


Figure 5-49. CS-C 水溶液添加に伴う PT-1 水溶液の紫外可視スペクトル変化。
a) pH 2.2, $\lambda=200 \text{ nm} \sim 1100 \text{ nm}$, b) pH 2.2, $\lambda=400 \text{ nm} \sim 700 \text{ nm}$,
[PT-1]=130 μM , [1-PyS]=91 μM , pH 2.2.

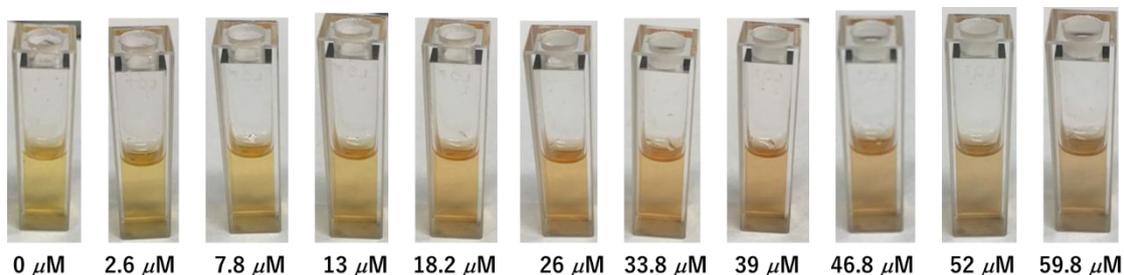


Figure 5-50. DS 水溶液添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。
pH 2.2, [PT-1]=130 μM .

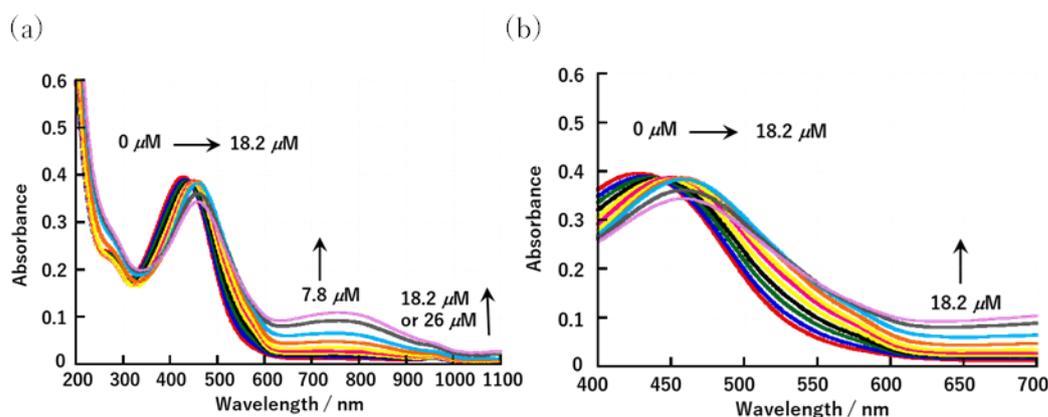


Figure 5-51. DS 水溶液添加に伴う PT-1 水溶液の紫外可視スペクトル変化。
 a) pH 2.2, $\lambda=200\text{ nm} \sim 1100\text{ nm}$, b) pH 2.2, $\lambda=400\text{ nm} \sim 700\text{ nm}$,
 $[\text{PT-1}]=130\ \mu\text{M}$, $[\text{1-PyS}]=91\ \mu\text{M}$, pH 2.2.

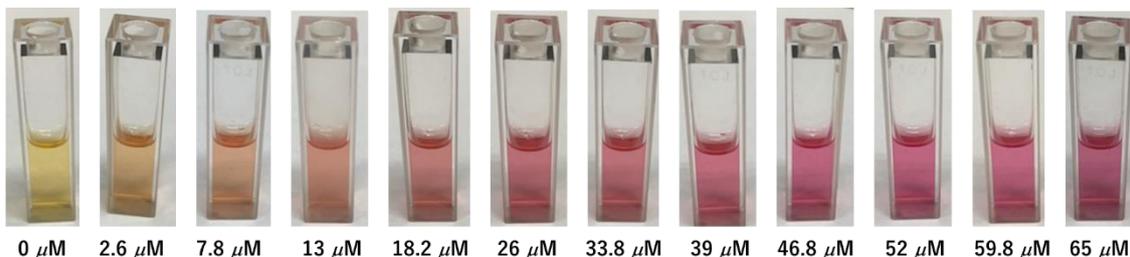


Figure 5-52. HA 水溶液添加に伴う PT-1 水溶液の色調変化。
 pH 2.2, $[\text{PT-1}]=130\ \mu\text{M}$.

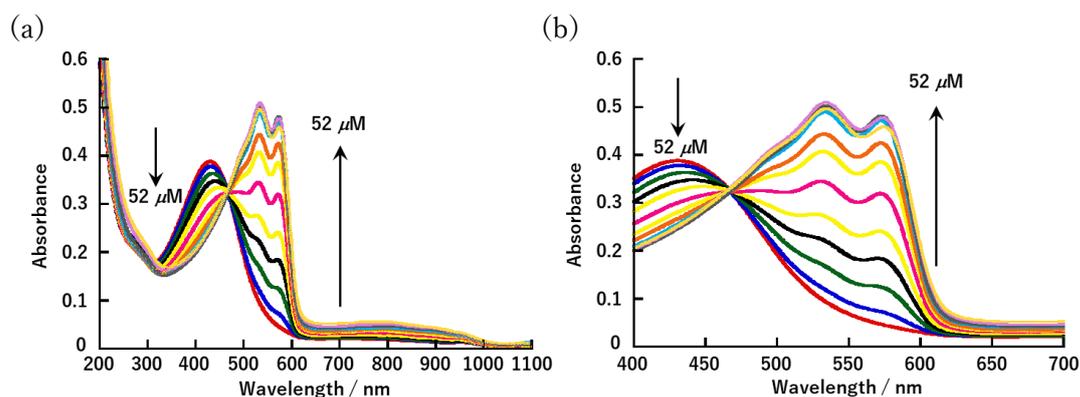


Figure 5-53. HA 水溶液添加に伴う PT-1 水溶液の紫外可視スペクトル変化。
 a) pH 2.2, $\lambda=200\text{ nm} \sim 1100\text{ nm}$, b) pH 2.2, $\lambda=400\text{ nm} \sim 700\text{ nm}$,
 $[\text{PT-1}]=130\ \mu\text{M}$, $[\text{1-PyS}]=91\ \mu\text{M}$, pH 2.2.

まず、すべてのアニオン性多糖添加実験に共通する結果について考察する。Figure 5-47, 49, 51, 53 に示されるように、アニオン性多糖添加に伴って、PT-1 由来の $\lambda_{\text{max}}=430\text{ nm}$ 付近の吸収帯が 450 nm へ長波長シフトと $\lambda_{\text{max}}=750\text{ nm}$ 付近の吸収帯が生じた。これは、PT-

1 とアニオン性多糖が錯形成することで、遊離 **PT-1** が減少し、**PT-1** のキノイド型の会合体の形成が進行したことを示している。よって、pH 2.2 という強酸性の条件では、**PT-1** はアニオン性多糖によってキノイド型会合体へと再編成されるという、中性条件ではみられない自己組織化過程が進行することが確認された。

一方、 $\lambda_{\max}=550\text{ nm}\sim 600\text{ nm}$ の吸収帯の変化は、多糖の種類に応じて異なることが明らかとなった。すなわち、二糖ユニット単位に 2.5 個のスルホ基を持つ **Hep** 添加時には、この領域に吸収帯がほとんど観測されない (Figure 5-47) のに対して、分子骨格上にスルホ基を持たない **HA** 添加時には顕著な吸収帯の増強が確認された (Figure 5-53)。この波長領域に見られる吸収帯は、ポリチオフェンの主鎖のコンフォメーションの直線化と規則的な積層構造の形成に帰属されるため、pH 2.2 という強酸性の条件で **HA** によって、**Hep** とは異なる集積構造に誘導されたことを示している。また、この変化は pH 7.2 の条件下で **PT-1/1-PyS** 錯体の形成時に見られたスペクトル変化と同様のものであり、このスペクトル変化に伴って水溶液の色調は黄色から紫色へと劇的に変化した。**CS-C** 添加時に観測されたスペクトル変化は、**Hep**、**HA** で観測されたものの丁度中間に当たるものであり、 $\lambda_{\max}=550\text{ nm}\sim 600\text{ nm}$ の吸収帯の中程度の増強が確認された (Figure 5-49)。**CS-C** は二糖ユニット単位に 1 個のスルホ基を持つことから、構造的にも **Hep** と **HA** の中間に当たる。このことが、多糖添加に伴うスペクトル変化にも反映されたと考えられる。同様に二糖ユニット単位に 1 個のスルホ基を持つ **DS** 添加時にみられたスペクトル変化は、**Hep**、**CS-C** で観測されたものの中間であると判断できる (Figure 5-51)。このことから、**PT-1/多糖** 錯体中の **PT-1** の集合形態は、多糖上のスルホ基の数に大きく影響を受けるものの、置換基の導入位置を始めとした多糖の構造の違いにも影響を受けていると考えられる。

以上のように pH 7.2 の条件では、**PT-1** とアニオン性多糖との錯形成に伴う紫外可視吸収スペクトル変化は乏しかったのに対して、pH 2.2 ではアニオン性多糖構造の違いに応じた顕著なスペクトル変化を示した。また、pH 7.2 の条件で **PT-1/1-PyS** 錯体を用いたアニオン性多糖の識別実験では、その色調変化においてスルホ基の数が多い多糖に対して選択性を示したのに対して、pH 2.2 ではその序列が逆転するという興味深い知見が得られた。よって、**PT-1** を用いたアニオン性多糖の識別は、その条件を変えることで、実験者の要求に応じた形で運用できる汎用性を示すことができた。

5-9. 結論

pH 7.2 の条件では、**PT-1/1-PyS** 錯体を用いることで、2 糖ユニットに存在するスルホ基の数が少ないアニオン性多糖ほど大きなスペクトル変化と色調変化を示し、2 糖ユニットに存在するスルホ基の数が多いほど、低濃度で応答性を示すことが明らかとなった。このことから応答性を示す濃度条件と色調変化の大きさの 2 つの観点からアニオン性多糖を識別す

ることができることが示された。一方で、pH 2.2 の条件で、**PT-1** とアニオン性多糖との錯形成に伴う紫外可視吸収スペクトルを測定すると、アニオン性多糖構造の違いに応じた顕著なスペクトル変化を示した。また、pH 7.2 の条件で **PT-1/1-PyS** 錯体を用いたアニオン性多糖の識別実験では、その色調変化においてスルホ基の数が多い多糖に対して選択性を示したのに対して、pH 2.2 ではその序列が逆転するという興味深い知見が得られた。よって、**PT-1** を用いたアニオン性多糖の識別は、その条件を変えることで、実験者の要求に応じた形で運用できる汎用性を示すことができた。

5-10. 参考文献

- 5-1) Hiroaki Yonemura et.al. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 2011, **538**, 171-174.
- 5-2) Christina Scharsich, Ruth H. Lohwasser, Michael Sommer, Udom Asawapirom, Ullrich Scherf, Mukundan Thelakkat, Dieter Neher, Anna Köhler. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2012, **50**, 442-453.
- 5-3) Hidetoshi Goto and Eiji Yashima., *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**, 27, 7943-7949.
- 5-4) Lubomír Lapčík, Lubomír Lapčík, Stefaan De Smedt, Joseph Demeester, and Peter Chabreček. *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 2663-2684.

6 章

結言

本論文では、 π 共役系骨格を有した有機分子が形成する超分子の機能化について議論してきた。2~4章では、 π 共役系骨格に種々のアミノ酸配列を導入した双頭型両親媒性分子を基本的な分子設計として採用し、 π 共役系骨格に導入したペプチド配列の違いによる分子間相互作用の差によって生じる両親媒性分子の性質の相違点に関する知見を蓄積した。その知見をもとに、ヒドロゲルの自己修復特性の制御やアニオン性多糖類に対する検出系の構築について検討することができたことから、同一の分子設計に基づく有機小分子から形成される超分子であるにもかかわらず、多岐にわたる応用例の拡張について示すことができた。3章と4章で得られたカチオン性置換基を有する π 共役系分子とアニオン性多糖の錯形成に関する知見をもとに、5章ではカチオン性ポリチオフェンを用いたアニオン性多糖類の識別についても検討した。3章~5章の結果から、ヒドロゲルの相転移、プレートリーダーを使用する簡易型検出、劇的な色調変化という異なった出力方法でアニオン性多糖の検出・識別系の構築について提案することができた。

2章では超分子ヒドロゲルを利用した自己修復特性の発現と制御を目指した。中心骨格にテトラチオフェン(**Th4**)もしくはシアノ基導入オリゴフェニレンビニレン(**OPV**)を持ち、その両末端に種々のジペプチド構造を導入した一連の両親媒性小分子を合成し、それらのヒドロゲル形成能や自己修復特性を比較・検討した。その結果、**Th4-FK**、**OPV-FK**及び**OPV-FY**がヒドロゲルを形成し、**Th4-FR**、**Th4-FD**、**Th4-FQ**、**Th4-FS**、**Th4-FY**及び**Th4-FF**はヒドロゲルを形成しなかった。このゲル化実験の結果から、疎水性アミノ酸残基であるフェニルアラニンと親水性置換基からなる2残基のペプチド鎖が、強力な疎水性の中心骨格に対してヒドロゲル化能を付与しやすい傾向があることを見出した。さらに一度形成したヒドロゲルに衝撃を加えたところ**OPV-FY**は自己修復能を示さないヒドロゲルを形成するのに対し、共通のジペプチド構造を有する**Th4-FK**と**OPV-FK**は、いずれも自己修復能を持つヒドロゲルを形成することが確認された。これらの自己修復時間は**OPV-FK**ゲルが20分、**Th4-FK**ゲルが2時間と大きな差を示すことから、1)ジペプチド**FK**は自己修復能の発現に重要であり、2)自己修復能を示す超分子ゲル化剤の分子構造として、**OPV**骨格を中心骨格に導入することの優位性が明らかとなった。**OPV-FK**と**Th4-FK**が類似の構造を持ち、ほぼ同様の条件でヒドロゲルを形成することから、これら2つを混合した複合ゲルの自己修復性について評価した。興味深いことに**OPV-FK**が数%含まれるだけで、ゲルの自己修復時間が著しく短縮されることが明らかになった。このことから、類似の分子構造を持ち、異なる自己修復能を持つ分子を混合することで、自己修復能を調整出来ることが示唆された。

3章ではヒドロゲル化能を示した**Th4-FK**を用い、ゲスト応答的なゾル-ゲル相転移を利用した系の構築しアニオン性多糖類の識別を目指した。まず**Th4-FK**のヒドロゲル形成について詳しく調査するために**Th4-FK**稀薄溶液のpH応答性をCDスペクトルとSEM観察によって評価した。それらの結果から**Th4-FK**はpH応答的に顆粒状から繊維状の構造体

へと相転移し、この繊維状構造体が三次元ネットワークを構築してヒドロゲルを形成することが示唆された。この相転移を利用して、**Th4-FK** のヒドロゲル形成によるアニオン性多糖類の識別が可能ではないかと考えた。**Th4-FK** が顆粒状構造体を形成する pH 6.6 の条件下でアニオン性多糖類を添加することによって、アニオン性多糖が静電相互作用を利用して **Th4-FK** と錯形成しつつ架橋点として働くことでゲスト誘導的にヒドロゲルを形成することを期待した。そこで **Th4-FK** 稀薄溶液にアニオン性多糖水溶液を添加し、それに伴う CD スペクトルの変化を確認した。硫酸化アニオン性多糖類であるヘパリン(**Hep**)やコンドロイチン硫酸 C(**CS-C**)を添加した時は **Th4-FK** が顆粒状構造体から繊維状構造体へ相転移したことを示す CD シグナルの変化が確認された。一方でヒアルロン酸(**HA**)などの硫酸アニオンを持たない高分子を添加しても **Th4-FK** が顆粒状構造体を形成したままであることを示す CD シグナルを確認できた。このような興味深い結果をもとに、**Th4-FK** がヒドロゲルを形成する濃度条件($[\text{Th4-FK}] = 2 \text{ wt}\%$)でのゲスト誘導的なゲル化実験を行ったところ、**Hep** と **CS-C** を添加した時のみ **Th4-FK** はヒドロゲルを形成し、**HA** などを添加してもヒドロゲルは形成しなかった。以上の結果から、**Th4-FK** のヒドロゲル形成能を利用することで、硫酸化アニオン性多糖を選択的に識別するヒドロゲル系の構築に成功した。本系は pH とアニオン性多糖類の種類という 2 つの条件が満たされて駆動する and ゲート型の識別系であり、高い選択性を実現できたと考えている。その後、このゲル化実験結果の詳細を調査するために SEM 測定と CD スペクトル測定を行った。アニオン性多糖を添加していない **Th4-FK** は 2 wt% の条件では、稀薄溶液条件で得られた CD シグナルとは異なった波形を示しており、SEM 観察では細い繊維状の構造体が観察された。**CS-C** や **Hep** を添加してヒドロゲルを形成したサンプルは、稀薄溶液条件で繊維状会合体を形成した際に得られた CD シグナルと酷似した CD シグナルを示しており、SEM 観察では繊維状構造体が束なってフィルム状になった構造が観察された。一方 **HA** などを添加しヒドロゲルを形成しなかったサンプルはゲスト分子を加えていない状態と似た CD スペクトル測定結果と SEM 観察結果を得た。これらの結果から、**Th4-FK** が硫酸アニオンを有するアニオン性多糖類との錯形成によって繊維状かつ架橋された構造に相転移したことで本系が成立したと考えられる。

4 章では両親媒性分子とアニオン性多糖の錯形成を利用することで、スルホ基の個数によって識別できる系の構築を目指した。アニオン性多糖類への応答と酸性条件での系の構築を視野に入れ、2 章で開発した **Th4** 型の化合物の中でも比較的親水性の高い化合物群の pH 応答性を UV-vis 吸収スペクトルによって評価した。テトラカチオン型である **Th4-FR** と **Th4-FK** は酸性条件で溶解していることが確認でき、それぞれの水溶液が示す吸収帯の最大吸収波長から **Th4-FR** は pH 5 まで単分子的に溶解していることが確認できたのに対し、**Th4-FK** は弱酸性条件下で徐々に H 会合体を形成していることを確認できた。一方で双性型の **Th4-FD** やジカチオン型の **Th4-FS** は酸性条件での溶解性を確保できなかった。以上の結果から本系で用いるホスト分子として **Th4-FR** を採用した。そして **Th4-FR** 水溶液をアニオン性多糖類水溶液に添加し遠心分離操作を行うと、**Th4-FR** はアニオン性多糖と水溶

液中で静電相互作用を利用して会合しながらも、水溶液中に溶解していることが上澄み液の UV-vis 吸収スペクトル測定より確認できた。さらにアニオン性多糖水溶液中に **Th4-FR** 水溶液を追加していくと、上澄みの吸光度が徐々に増加した。しかし水溶液中のアニオン性多糖類の量は一定であるため、**Th4-FR** 水溶液を添加していき、系中の **Th4-FR** が一定の濃度に達した途端に、上澄みに溶解していた化学種も一気に静電相互作用によって会合することになり、系全体が沈殿し、上澄みの吸光度が急激に減少した。同様の操作を電荷の数が異なるアニオン性多糖を用いて実験すると、想定通りアニオン電荷が少ない **HA**、**CS-C**、**Hep**、**OSCS** の順に、吸光度が大幅に減少した。この結果から、系中に存在する **Th4-FR** の濃度によって硫酸化アニオン性多糖のスルホ基の数に依存した識別が可能な系の構築に成功した。更に $[\text{Th4-FR}] = 58 \mu\text{M}$ 条件時の **Hep** と **OSCS** の応答性に大きな差があることに注目し、**OSCS** の混合比率が異なる **OSCS/Hep** 水溶液に対する応答性の評価を行った。96 穴プレート上で **Th4-FR**・**Hep/OSCS** 水溶液を調製後に遠心分離を行い、得られた母液から上清を別のウェルに移した。これら 2 つウェルの吸光度を測定後、母液と上清の吸光度の比 ($\text{Abs}_{\text{沈殿層}}/\text{Abs}_{\text{上清}}$) を算出後プロットしたところ、**OSCS** 含有率が 3% から 20% までの水溶液の吸光度比が **Hep** や **OSCS** 単独時とは異なる値をとることが確認された。この結果は、96 穴プレートを用いた簡便な実験操作でありながら、低濃度領域での **Hep** 水溶液中の **OSCS** の検出が可能であることを示唆するものであり、実用化を十分視野に入れることができるほどの成果である。

5 章では蛍光性高分子と蛍光分子の錯形成を利用した系を利用したアニオン性多糖類の識別を目指した。当研究室では、アンモニウムカチオンを有するポリチオフェン **PT-1** 水溶液に 1-ピレンスルホン酸 (**1-PyS**) 水溶液を加え、錯形成させることで、黄色から紫色への劇的な色調変化を示すことを発見した。この現象は **PT-1** と **1-PyS** 間の静電相互作用が駆動力として錯体が形成された際に、**PT-1** がより規則的に π スタッキングした構造体が構築されたことに由来すると考えられている。この **PT-1/1-PyS** 錯体形成後にアニオン性多糖を添加することで、**1-PyS** からアニオン性多糖類が **PT-1** を奪い取る形で **PT-1/1-PyS** 錯体が解消することによって色調が紫色から変化することを期待した。更にその色調変化がアニオン性多糖の電荷の数などに起因して異なった濃度条件で引き起こされることで識別できることを期待した。pH 7.2 の条件で **PT-1/1-PyS** 錯体水溶液に硫酸化アニオン性多糖類を添加すると、**PT-1/1-PyS** 錯体の解消に伴い、水溶液の色調が変化した。スルホ基の数が多ほど低濃度領域で色調変化が始まり、**OSCS**、**Hep**、**CS-C** とデルマタン硫酸 (**DS**) の順で応答した。この応答に伴い **OSCS** では赤色、**Hep** では橙色、**CS-C** と **DS** では黄色へと色調変化した。これらの結果から、スルホ基の多いアニオン性多糖類から順に応答しやすくなるものの色調変化の度合いは小さくなっていくことが分かった。一方で硫酸アニオンを持たない **HA** を添加しても水溶液の色調は変化せず紫色のままだった。以上の結果から応答性を示す濃度と色調変化の大きさという 2 つの観点から硫酸化アニオン性多糖のスルホ基の数に依存した識別が可能な系の構築に成功した。一方で、pH 2.2 の条件で、**PT-1** とアニオ

ン性多糖との錯形成に伴う紫外可視吸収スペクトルを測定すると、アニオン性多糖構造の違いに応じた顕著なスペクトル変化を示した。pH 7.2 の条件で **PT-1/1-PyS** 錯体を用いたアニオン性多糖の識別実験では、その色調変化においてスルホ基の数が多い多糖に対して選択性を示したのに対して、pH 2.2 ではその序列が逆転するという興味深い知見が得られた。よって、**PT-1** を用いたアニオン性多糖の識別は、その条件を変えることで、実験者の要求に応じた形で運用できる汎用性を示すことができた。

本論文で示した成果は、分子間相互作用を複数組み合わせた超分子材料の挙動の精密な制御に関する有用な知見であり、自己修復材料や分子センサー開発のさらなる発展に貢献できるものであると確信している。この成果が、実社会への実装が期待されているソフトマテリアル開発の基盤として、有効に活用されていくものと期待している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究内容のみでなく、研究に取り組む姿勢や日常生活に至るまで様々なことをご教授頂き、長きにわたり厳しくも温かみのあるご指導ご鞭撻を賜りました崇城大学大学院工学研究科 田丸俊一 教授に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

また本研究の遂行にあたりまして動的粘弾性測定、プレートリーダーの使用に関して便宜を図っていただきました薬学部 庵原大輔 准教授、研究に関する助言を賜りました、崇城大学・新海征治 名誉教授、崇城大学・米村弘明 教授並びに崇城大学工学部ナノサイエンス学科の教員の皆様に厚く御礼申し上げます。

同じ研究分野であり様々な協力を頂いた共同研究者の修士課程1年 枝元祐貴 氏、4年生 福本詩音 氏にも心より感謝の意を表します。
同じ研究室で、先輩方ならびに在学中の学生諸君と共に、切磋琢磨し合いながら研究が行えたことを嬉しく思っています。

最後に、長い学生生活を支援してくれた両親および家族に深く感謝いたします。

令和4年2月
著者 黒田 尚史