

平成18年度 応用化学セミナー  
学生発表会 要旨集  
(第102回応用化学セミナー)

平成18年12月4日(月)

愛媛大学工学部5号館

リフレッシュコーナー(3, 5, 7階)

主催：愛媛大学大学院理工学研究科

物質生命工学専攻 応用化学コース

# 平成 18 年度 応用化学セミナー学生発表会

平成 18 年 12 月 4 日 (月) 17:30~18:50

於：工学部 5 号館リフレッシュコーナー (3, 5, 7F)

## 発表時間

17:30~18:10 奇数の発表番号

18:10~18:50 偶数の発表番号

- 1. フラーレンの電子状態 I –アルカリ金属ドープフルラーレンの光電子スペクトル**  
(物性物理化学) 日野照純
- 2. フラーレンの電子状態 II –金属内包フルラーレンの電子状態と分子構造**  
(物性物理化学) 日野照純
- 3. プロトン伝導性高分子グラフト基板の作製と高耐水性湿度センサへの応用**  
(工業物理化学) 小倉真吾
- 4. ジアミノ化合物を導入した共重合ポリマーによるトルエン蒸気検知**  
(工業物理化学) 景本宗良
- 5. 超分岐ポリマーを表面に固定有した水晶振動子を用いた NO<sub>2</sub> ガス検知**  
(工業物理化学) 小谷頼利
- 6. 超分岐ポリマーグラフト磁気ビーズの作製とその応用**  
(工業物理化学) 小林伸輔
- 7. 高次融合型テトラチアフルバレン類の合成**  
(構造有機化学) ○柴山 聡、岡田佐栄子
- 8. シアノ基で置換された新規テトラチアフルバレン類の合成と性質**  
(構造有機化学) ○高島 毅、石丸幸広、森田俊行
- 9. セレン原子を含む新規テトラチアペンタレン系ドナーの合成**  
(構造有機化学) ○棚橋徹彦、石津謙一
- 10. ベンゼン環を挿入した拡張型テトラチアフルバレン系ドナーの合成と性質**  
(構造有機化学) 山本佳代子
- 11. オリゴチオフェンを挿入した融合型テトラチアフルバレン系ドナーの合成と性質**  
(構造有機化学) 河野 裕
- 12. セレノメチル基で置換されたテトラチアペンタレン系導体の構造と伝導性**  
(構造有機化学) ○保田三沙貴、御崎洋二

13. **N-ベンゾイルグリシン結晶の光学活性**  
(機能有機化学) ○大塚将成、谷口智哉、小島秀子
14. **イソプロピルベンゾフェノン系キラル塩結晶の光環化と表面形態変化**  
(機能有機化学) ○井手 佑弥・小島 秀子
15. **イソプロピルベンゾフェノン誘導体結晶のジアステレオ特異的光環化**  
(機能有機化学) ○深野道太郎・山崎真吾・小島秀子
16. **N-フタロイルアミノ酸とアクリジンの複合結晶の光縮合反応におけるキラリティーメモリー**  
(機能有機化学) ○谷口 明広・碓本 奨・小島 秀子
17. **アキラルなクマリン誘導体から生成したキラルゲルの光二量化**  
(機能有機化学) ○守時 達也・柳瀬 郁人・小島 秀子
18. **マイクロ波照射による迅速芳香族アルキル化**  
(機能有機化学) ○吉岡慎市・中矢英允・小島秀子
19. **生理活性イノシトールリン脂質の簡便な合成法の開発**  
(反応有機化学) 三宅慶行
20. **インシュリン作用に関与するイノシトールグリカンの全合成**  
(反応有機化学) 植村 剛
21. **Lys の特性を活かした有機合成反応の開発**  
(反応有機化学) 落合美智子
22. **環状共役リンイリド化合物の合成と構造解析**  
(反応有機化学) 森田絵美
23. **多核錯体触媒を目指した多官能性リン配位子の合成**  
(反応有機化学) 山崎俊和
24. **ポリエチレングリコールメタクリレート鎖とポリアミノ酸誘導体鎖を有するヘテロ星型ポリマーの合成**  
(高分子化学) ○山下洵史、(愛媛大院理工・VBL) 伊藤大道、井原栄治、井上賢三
25. **ポリグルタミン酸エステルのヘリックス-コイル転移における鎖末端の効果**  
(高分子化学) ○畑中隆志、(愛媛大院理工・VBL) 伊藤大道、井原栄治、井上賢三
26. **ポリスチレンゲルにおける架橋点間分子量の制御**  
(高分子化学) ○鄙山鉄博、(愛媛大院理工・VBL) 伊藤大道、井原栄治、井上賢三
27. **環状ジアゾカルボニル化合物の重合**  
(高分子化学) ○平連利光、(愛媛大院理工・VBL) 伊藤大道、井原栄治、井上賢三
28. **2-ノルボルネン-2-カルボン酸メチルの合成とアルキルアクリレートとのラジカル共重合**  
(高分子化学) ○本城慎吾、(愛媛大院理工・VBL) 伊藤大道、井原栄治、井上賢三

**29. 温度環境による tRNA 修飾酵素生産量の変動**

(応用生物化学) 岩下知香子

**30. tRNA グアニントランスグリコシラーゼによる DNA の塩基の交換**

(応用生物化学) 車田光謙

**31. 超好熱菌由来 tRNA (m7G46) methyltransferase は、コアドメインのみでメチル基転移活性を持つ**

(応用生物化学) 富川千恵

**32. tRNA (m1G37) methyltransferase (TrmD)の機能解析**

(応用生物化学) 豊岡 峻

**33. ホウケイ酸塩ガラスの固体 NMR と FT-IR による構造解析**

(分離分析化学) 赤木裕幸

**34. Fe 置換イモゴライト触媒による過酸化水素を用いた芳香族炭化水素の酸化反応**

(分離分析化学) 高田 裕

**35. ジルコニア担持金属硫酸塩による酸性発現**

(分離分析化学) 篠原 亮

**36. Ge 置換型イモゴライトの合成とキャラクタリゼーション**

(分離分析化学) 平尾好宏

**37. 酸化物基板上へのプロトン導電性電解質膜の作製**

(材料物性化学) ○浅本麻紀子、山浦弘之、八尋秀典

**38. 有機金属錯体より調製したペロブスカイト型酸化物の物性と触媒活性との関連**

(材料物性化学) ○岩本侑士、山浦弘之、八尋秀典

**39. 銅系触媒の劣化機構の検討-金属銅表面積と CO シフト活性の関係-**

(材料物性化学) ○佐伯和彦、山浦弘之、八尋秀典

**40. 一酸化炭素シフト用銅アルミナ触媒の銅の状態解明**

(材料物性化学) ○山本哲也、山浦弘之、八尋秀典

**41. 担癌マウスにおける Span80 ベシクルの血管壁透過現象**

(生体環境機能工学) ○重川庸介<sup>1</sup>、宮崎龍彦<sup>2</sup>、増田晴造<sup>3</sup>、秋山浩一<sup>3</sup>、菅原卓也<sup>4</sup>、藤原 隆<sup>3</sup>、能勢真人<sup>2</sup>、加藤敬一<sup>1</sup>

(1) 愛媛大院・理工、(2)愛媛大・医、(3)愛媛大・総研支援、(4)愛媛大・農

**42. 癌特異標的攻撃機能を有する新規レクチン ESA 固定化ベシクルの創製と機能  
-ヒト大腸癌治療の実用化を目指して-**

(生体環境機能工学) ○福田祐介<sup>1</sup>、菅原卓也<sup>2</sup>、藤原隆<sup>3</sup>、増田晴造<sup>3</sup>、秋山浩一<sup>3</sup>、立石憲彦<sup>4</sup>、鈴木洋司<sup>4</sup>、宮崎龍彦<sup>4</sup>、川久保明宏<sup>5</sup>、加藤敬一<sup>1</sup>

(1) 愛媛大院・理工、(2) 愛媛大・農、(3) 愛媛大・総研支援、(4) 愛媛大・医、(5) ヤマキ(株)

**43. 非イオン性界面活性剤 Span80 ベシクルの構造とその特性**

(生体環境機能工学) ○石原竹比虎<sup>1</sup>、Peter Walde<sup>2</sup>、小稲則夫<sup>1</sup>、市川創作<sup>3</sup>、辻井哲也<sup>4</sup>、長濱亮<sup>1</sup>、黒岩崇<sup>3</sup>、首藤政親<sup>5</sup>、加藤敬一<sup>1</sup>

(1)愛媛大院・理工、(2)ETH、(3)筑波大院・生環、(4)PerkinElmer Japan、(5) 愛媛大・総研支援

#### 44. ヒト大腸癌の初期治療に利用する抗癌剤内包 Span80 ベシクルのマウス投与効果

(生体環境機能工学) ○山本潤一<sup>1</sup>、菅原卓也<sup>2</sup>、秋山浩一<sup>3</sup>、増田晴造<sup>3</sup>、宮崎龍彦<sup>4</sup>、川久保明宏<sup>5</sup>、青儀健二郎<sup>6</sup>、加藤敬一<sup>1</sup>

(1)愛媛大院・理工、(2)愛媛大・農、(3)愛媛大・総研支援、(4)愛媛大・医、(5)ヤマキ(株)、(6)四国がんセンター

#### 45. ヒト脳腫瘍治療をめざしたイムノベシクルの利用とその機能

(生体環境機能工学) ○住吉一輝<sup>1</sup>、菅原卓也<sup>2</sup>、秋山浩一<sup>3</sup>、増田晴造<sup>3</sup>、宮崎龍彦<sup>4</sup>、藤原隆<sup>3</sup>、青儀健二郎<sup>5</sup>、加藤敬一<sup>1</sup>

(1)愛媛大院・理工、(2)愛媛大・農、(3)愛媛大・総研支援、(4)愛媛大・医、(5)四国がんセンター

#### 46. 新規 NADPH oxidase:Nox1 の活性化機構の解明

(分子生命化学) ○楠野 太郎、吉成 光市、西本 行男、田村 実

#### 47. p40<sup>phox</sup> :食細胞 NADPH oxidase の新しい活性化因子として

(分子生命化学) ○塩崎 猪一郎、水木 一洋、佐々木 孝幸、田村 実

#### 48. ヒト NADPH oxidase 成分の無細胞タンパク質合成の試み

(分子生命化学) ○水木 一洋、木綱 崇之、阿部 正人、堀 弘幸、田村 実

#### 49. ヒト O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成酵素の活性化因子:結晶化と構造解析をめざして

(分子生命化学) ○國廣 幸雄、倉岡 光成、小野 泰子、月原 富武、田村 実

#### 50. 超音波照射を利用した凍結濃縮分離に与える溶質の拡散係数の影響

(化学工学) ○伊藤洋晃、川崎健二、松田 晃

#### 51. 吸収冷凍機の性能向上に関する研究

(化学工学) ○末広亮二、川崎健二、松田 晃

#### 52. 微生物を用いた排水処理における膜ろ過特性の検討

(化学工学) ○須之内慧、川崎健二、松田 晃

#### 53. 排水処理に用いる流動多孔質担体の開発

(化学工学) ○戸賀瀬竜一、川崎健二、松田 晃

#### 54. 種々のスラリーの束縛水量測定とその比較

(化学工学) ○松本一法、川崎健二、松田 晃

#### 55. コムギ無細胞タンパク質ライブラリーを用いた疾患特異的抗体の網羅的動態解析

(無細胞遠藤研) 松岡和弘

#### 56. 網羅的リン酸化基質タンパク質探索を目指したコムギ無細胞合成系によるヒト及びマウスプロテインカイネースライブラリーの構築

(無細胞遠藤研) 京嶋沙和

#### 57. 自己免疫疾患における免疫関連タンパク質を認識する自己抗体の解析

(無細胞遠藤研) 中尾典彦

**58. 翻訳開始反応阻害剤を用いたコムギ胚芽 ribosome display 法の試み**

(無細胞高井研) 桶田雅志

**59. コムギ胚芽由来再構成無細胞タンパク質合成系に向けて**

(無細胞高井研) 杉原祥平

**60. コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系における大腸菌バリン tRNA の活性**

(無細胞高井研) 藤井敬司

**61. モノクローナル抗体を用いた熱帯熱マラリア原虫メロゾイト先端部小器官の新規分子の同定**

(無細胞坪井研) 伊藤大輔

**62. モノクローナル抗体を用いたマラリア発病阻止ワクチン候補抗原の探索**

(無細胞坪井研) 横内ゆき

**63. マラリア原虫完全長 cDNA のハイスループットスクリーニング**

(無細胞坪井研) 坂本寛和

**64. コムギ胚芽由来の新奇コバルト結合タンパク質の解析**

(無細胞戸澤研) 渋谷謙介

**65. 無細胞タンパク質合成技術を利用した植物膜輸送タンパク質の機能解析**

(無細胞戸澤研) 宮田拓治

# フラーレンの電子状態 I

## - アルカリ金属ドープフラーレンの光電子スペクトル -

物性物理化学研究室

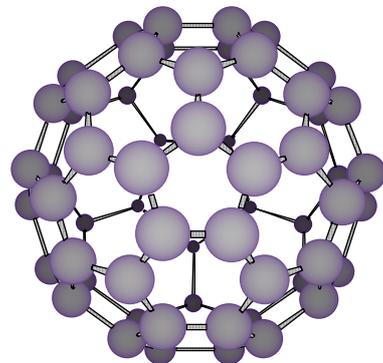
日野 照純

1985年にKroto<sup>1)</sup>らによってC<sub>60</sub>の存在が指摘されたが、炭素のレーザー加熱法でしかC<sub>60</sub>は合成できなかったため、C<sub>60</sub>の研究はほとんどなされなかった、しかし、1990年Krätschmer<sup>2)</sup>によりフラーレンの大量合成法が発見されてmg以上のC<sub>60</sub>を初めてする種々のフラーレンが合成できるようになりフラーレンの研究は爆発的に進んだ。C<sub>60</sub>自体は電気伝導性の乏しい絶縁体であるが、これにアルカリ金属をドープすることにより伝導度は飛躍的に上昇し、K<sub>3</sub>C<sub>60</sub>では金属的な伝導性を示すばかりでなく、超伝導性も示すなど物性的にも興味を持たれるものであった。

本来絶縁体であるC<sub>60</sub>がアルカリ金属をドープすることにより金属的な伝導性を示すということは、C<sub>60</sub>の伝導帯に電子が充たされることによってフェルミ準位（電子を見いだす確率が1/2になる準位であるが、ここでは電子が入っている一番上の準位と見なしても良い）がシフトしたことに関連している。電子状態の測定を行えば、この電子が伝導帯に充たされていく様子が観測できる。

本発表では、電子状態を測定する有力な手段である光電子分光を、フラーレンにアルカリ金属をドープして錯形成をさせたときの変化に適用し、実際に電子状態がどのような変化をするかについて報告する。

- 1) H. Kroto *et al.*, Nature, 318, 162 (1985).
- 2) W. Krätschmer *et al.*, *ibid.* 347, 354 (1990).
- 3) R. C. Haddon *et al.*, *ibid.* 350, 321 (1991).
- 4) A. F. Hebard *et al.*, *ibid.* 350, 600 (1991).



# フラーレンの電子状態 II

## - 金属内包フラーレンの電子状態と分子構造 -

物性物理化学研究室

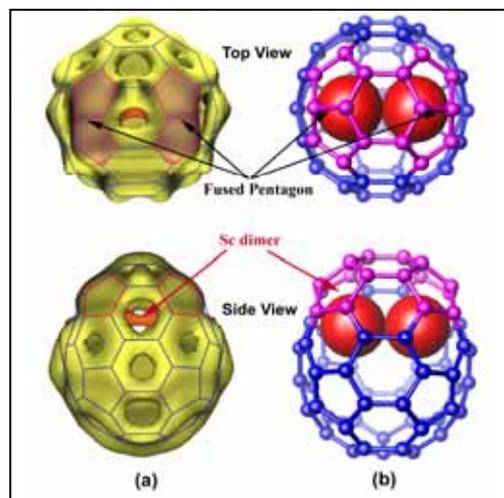
日野 照純

1991年にSmalley<sup>1)</sup>らによってフラーレンケージの内部に金属が取り込まれたフラーレンの存在が指摘され、M@C<sub>n</sub>という表示方法が提案された。ここで、Mは内包された金属種を、またC<sub>n</sub>は炭素数がn個であるフラーレンケージを意味する。この内包フラーレンは、内包された原子の周辺にさらに他の原子群が取り囲むというさながらスーパーアトムともいうべきものであるため、広く注目を集めた。特にフラーレンケージ内に取り込まれた原子が金属である場合には、金属から電子移動が起こるばかりでなく、この電子移動により空のフラーレンではエネルギー的に不安定と考えられている構造をしているフラーレンも安定に存在できるため、特異的な形をしたフラーレンの形成も見られる(図)。

金属内包フラーレンの光電子スペクトルには、空のフラーレンの空軌道に金属原子から移動した電子に起因する構造も観測することができる。フラーレンのケージ構造が異なる構造異性体の中に同じ原子を内包させた場合、得られる光電子スペクトルは全く異なるものとなる。一方、同じケージ構造の中に異なる金属原子を内包させても、電子状態に大きな違いは存在しない。また、同じフラーレンケージ構造の中に、金属原子(M)が2個内包された場合と(MC)<sub>2</sub>が内包された場合には、電子状態が微妙に変化する。

本発表では、一連の金属内包フラーレンの光電子スペクトルについて報告し、現在問題となっている点を指摘する。

1) Y. Chai et al., J. Phys. Chem. **95**, 7564 (1991)



# プロトン伝導性高分子グラフト基板の作製と高耐水性湿度センサへの応用 (工業物理化学) 小倉 真吾・松口 正信

## ( ) 緒言

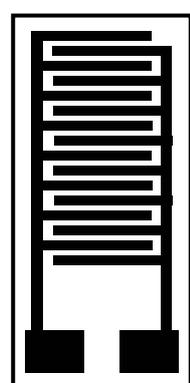
ビルや工場等の空調では、室温付近における 40~70%RH 程度の中間的な相対湿度の制御が求められる。この目的のために、これまでに多くのタイプの湿度センサが開発、使用されてきた。一方で、電気・電子、化学、製薬、医療、食品、農業などの多様な産業分野において、湿度は製品等の品質に影響を与える重要な因子として注目されており、そのような分野における高確度・高耐久性の湿度センサの需要が増加している。これらの市場では、広範囲の温度・湿度領域において長期安定的に使用できるセンサが必要とされ、湿度センサに対する要求は次第に過酷なものになってきている。

現在使用されている電気抵抗型湿度センサの検知材料には、親水性でイオン伝導性の高分子が使用されており、高分子が雰囲気中の水蒸気を収着脱離することによって生ずるイオン伝導度の変化を検知原理としている。そのため、結露を起こすような高湿度雰囲気中での使用においては、高分子が大量の水蒸気を収着するため、その高分子の溶解に伴う検知膜の変形や滴下が起こり、その結果、センサの出力値がドリフトし、最終的には使用不能になってしまう。従って、このような高湿度雰囲気中でも長期間安定に使用できる耐水性に優れた湿度センサの開発が望まれている。

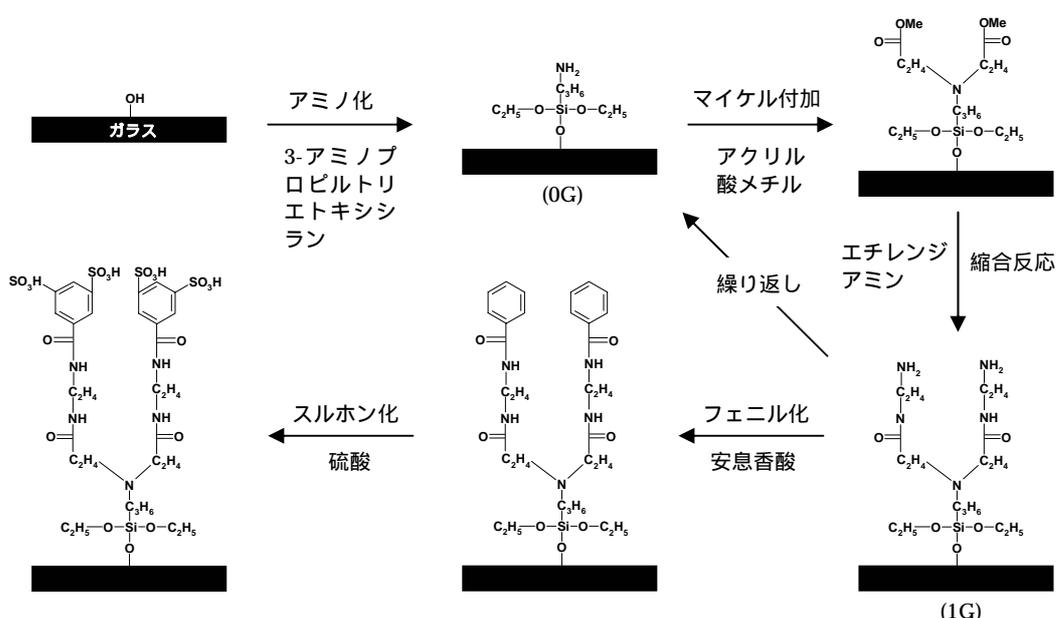
電気抵抗型の湿度センサは、一般に Fig.1 に示すようなアルミナやガラスの基板上一対の櫛型電極を配置した構造をしている。本研究では、プロトン伝導性の高分子をセンサ基板上に直接グラフト反応させることによって、高湿度雰囲気中でも溶出ししないセンサ素子の作製を試みている。また、表面の親水基の濃度を高めるために、 dendrimer 合成法を利用することを試みている。これにより、最終的には、水洗いも可能な程の高耐水性と耐久性を持った湿度センサを作製することを目標としている。

## ( ) 実験と考察

現在検討を行っているガラス基板表面へのプロトン伝導性高分子のグラフト反応について、Scheme 1 を用いて説明する。まず、水酸化ナトリウムを用いて基板表面の加水分解を行い、水酸基を反応の開始核として基板表面に導入する。次に、この水酸基と 3-アミノプロピルトリエトキシシランを反応させることで、基板表面へアミノ基を導入する。これを超分岐ポリマーの 0 世代(0G)とする。このアミノ基へのアクリル酸メチルのマイケル付加反応と、それに続くエチレンジアミンとの縮合反応を行うことで末端アミノ基の濃度は理論的に 2 倍となる。これを超分岐ポリマーの 1 世代(1G)とする。これらの反応を繰り返すことによって、ガラス基板表面から超分岐ポリアミドアミンを成長させることができる。最後に、末端アミノ基と安息香酸を縮合反応させることで末端にフェニル基を導入し、硫酸溶液を用いてスルホン化することで、高密度にスルホン基を有する超分岐ポリマーをガラス基板上へ固定化できると考えている。現在は、各反応での反応条件について、IR や蛍光分光測定などを用いて最適化を行っているところである。また、今後、超分岐ポリマーの世代とプロトン伝導性との関係についても明らかにしていくとともに、耐水性湿度センサとしての特性についても調べていく予定である。



< Fig.1 櫛型金電極を有するガラス基板 >



< Scheme 1 ガラス基板上へのプロトン伝導性高分子のグラフト化 >

# ジアミノ化合物を導入した共重合ポリマーによるトルエン蒸気検知

(工業物理化学) 景本宗良、松口正信

## 1. 緒言

揮発性有機化合物(VOC)は、大気中で気体として存在する有機化合物の総称である。VOCは大気汚染の直接的原因である浮遊粒子状物質や光化学オキシダントなどの発生に起因する物質とされ、一刻も早い排出量の削減が求められている。それに伴いVOCモニタリングに対する必要性も高まっている。本研究では、検知原理として膜に収着した蒸気の質量変化を利用する、水晶振動子マイクロバランス法(QCM法)を用いたトルエン蒸気センサについて検討を行った。

## 2. 実験方法

まず、スチレン(St)またはメタクリル酸メチル(MMA)とクロロメチルスチレン(CMSt)からなる様々な組成のコポリマー{P(St-co-CMSt)、P(MMA-co-CMSt)}を作製した。次に、それぞれのコポリマーにN,N-ジメチル-1,3-プロパンジアミン(DMPDA)を導入した。これらの共重合ポリマーを、水晶振動子(銀電極、4MHz)上にスピンコートし、熱処理したものを測定素子とした。この測定素子を540ppmのトルエン蒸気にさらした際の共振周波数変化を測定した。

## 3. 結果・考察

まず、それぞれの検知膜の応答特性をFig.1に示す。DMPDAの導入の有無による効果を比較すると、DMPDAを導入することで応答時間、回復性、 $f$ は向上した。さらに共重合体のモノマーをStからMMAにかえることでさらなる応答特性の改善が見られた。また、DMPDAを導入した様々な組成のP(St-co-CMSt)膜とP(MMA-co-CMSt)膜を作製し、 $f_{60}$ の膜厚依存性を調べた。ここで $f_{60}$ は、60分間540ppmのトルエン蒸気にセンサを暴露させたときの周波数変化量と定義する。結果をFig.2に示す。P(St-co-CMSt)を用いた検知膜では、膜厚に比例して $f_{60}$ は大きくはなっているが、その傾きは小さく、またStとCMStの組成の違いによる膜厚依存性もほとんど見られない。したがってP(St-co-CMSt)では、コポリマーの組成を変化させてもこれ以上のセンサ感度の増加は期待できない。一方、P(MMA-co-CMSt)を用いた検知膜では大きな組成依存性が見られ、CMStの組成の大きなものほど $f_{60}$ の膜厚依存性が大きくなった。その結果、一定の膜厚においてはCMStの組成が大きなものほど大きな $f_{60}$ が得られた。これはCMStの増加によりDMPDAが多く導入できたことと関係しており、トルエン蒸気収着にはDMPDAが大きな役割を担っていることがわかった。

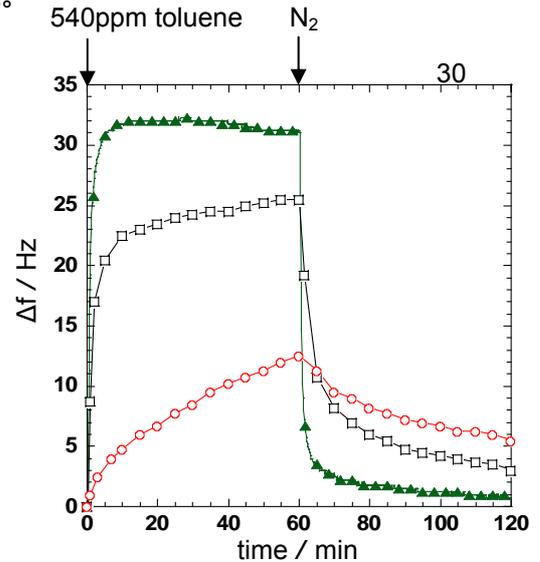


Fig.1 DMPDAの有無によるコポリマーの応答特性

)MMA : CMSt=74 : 26,  
)St : CMSt=80 : 20,  
)St : CMSt=80 : 20 without DMPDA.

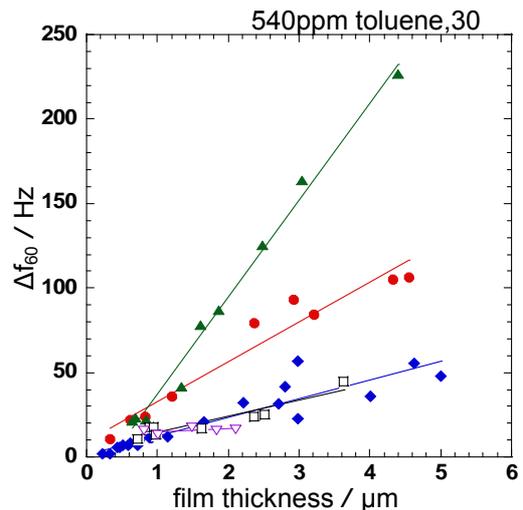


Fig.2 DMPDAを導入した様々な組成のコポリマーに対する $\Delta f_{60}$ の膜厚依存性

) MMA : CMSt=4 : 96,  
) MMA : CMSt=55 : 45,  
) MMA : CMSt=74 : 26,  
) St : CMSt=80 : 20,  
) St : CMSt=46 : 54.

# 超分岐ポリマーを表面に固定した水晶振動子を用いたNO<sub>2</sub>ガス検知

(工業物理化学) 小谷頼利・松口正信

[緒言] 我々の健康や地球環境に対し多大な被害をもたらす様々な化学物質に対し、厳しい排出規制が行われている。本研究ではNO<sub>2</sub>ガスを簡易に且つ正確にモニタリングするためのセンサの開発を行っている。従来の薄膜を用いた検知膜の場合、官能基とガス分子との相互作用以外に高分子の高次構造や膜厚なども特性に影響してくるため結果の解析が複雑になる。そこで、検知膜として超分岐ポリマーを固定した水晶振動子を用いてNO<sub>2</sub>の吸着特性の検討を行った。超分岐ポリマーを利用することで、表面にある官能基とガス分子との直接反応が利用できるため、官能基とNO<sub>2</sub>ガス分子との相互作用の解析を行うことができる。これによって、NO<sub>2</sub>ガス吸着サイトとして利用する官能基の最適化を行うことができる。一方、応用の面からは、センサの応答時間の短縮、回復性の向上など、重要な結果が得られると期待される。今回ポリアミドアミン(PAMAM)超分岐ポリマーを2つの方法で水晶振動子上に固定してNO<sub>2</sub>ガス吸着特性の検討を行った結果について報告する。

[実験] 2種類の表面修飾した水晶振動子を作製した。1つは、世代の異なる市販のPAMAM dendrimerを水晶振動子上に固定したもの。もう1つは dendrimer 合成法を利用して超分岐PAMAMを水晶振動子上で成長させたものである。これらの振動子を30で一定に制御したチャンバー内にセットし、50ppmNO<sub>2</sub>を導入した際の共振周波数変化を測定した。

[結果と考察] 今回、NO<sub>2</sub>吸着脱離特性の測定に関し、水晶振動子マイクロバランス(QCM)法を用いて行った。

QCM法を用いることで、水晶振動子上の高分子膜へのガス吸着によるわずかな質量変化を、共振周波数変化としてとらえることができる。まず、市販の dendrimer で修飾した水晶振動子のNO<sub>2</sub>応答の結果をFig1に示す。Dendrimerが1世代成長するごとに、NO<sub>2</sub>の吸着サイトである末端アミノ基の量が2倍になる。Dendrimerを用いた場合、アミノ基はほぼ表面に露出しているため、表面反応により迅速な吸着が起こることを期待したがそうはならなかった。また、アミノ基の多い高世代の方に行くにつれ共振周波数変化量が大きくなると予想したが、実際にはほとんど差が得られなかった。これは世代が大きくなるにつれて dendrimer の直径も大きくなるため、表面に固定化できる dendrimer の数が減ってしまったためと考えられる。次に超分岐PAMAMで修飾した水晶振動子のNO<sub>2</sub>応答の結果をFig2に示す。超分岐ポリマーで修飾したものの方が0世代よりは共振周波数変化は増加しているようにも見えるが、バラツキが大きく世代の違いによるはっきりとした傾向は見られない。この理由は上に述べた dendrimer を固定した場合と同じかもしれないが、さらに反応条件を最適化していく必要もあると思われる。また回復性に関してはどちらの場合も見られず、末端のアミノ基とNO<sub>2</sub>ガス分子が強い酸塩基反応をしていると考えられる。以前の試験でアミド基を有する高分子を用いると回復性を示すことが分かっているので、現在末端をアミド基に変えて検討を行っているところである。

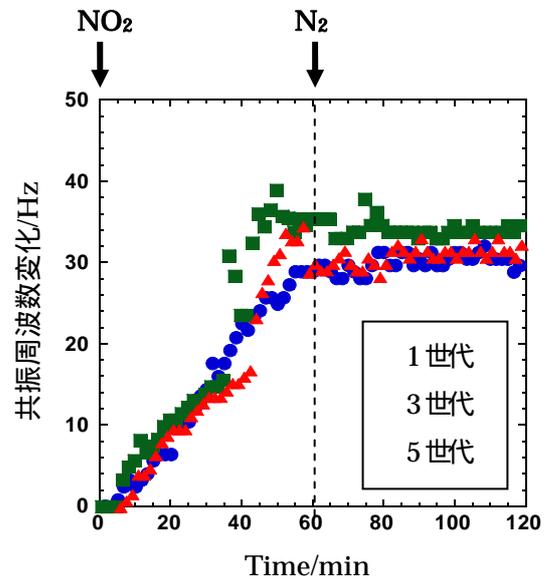


Fig1 市販の dendrimer で修飾した水晶振動子の30における50ppmNO<sub>2</sub>に対する応答

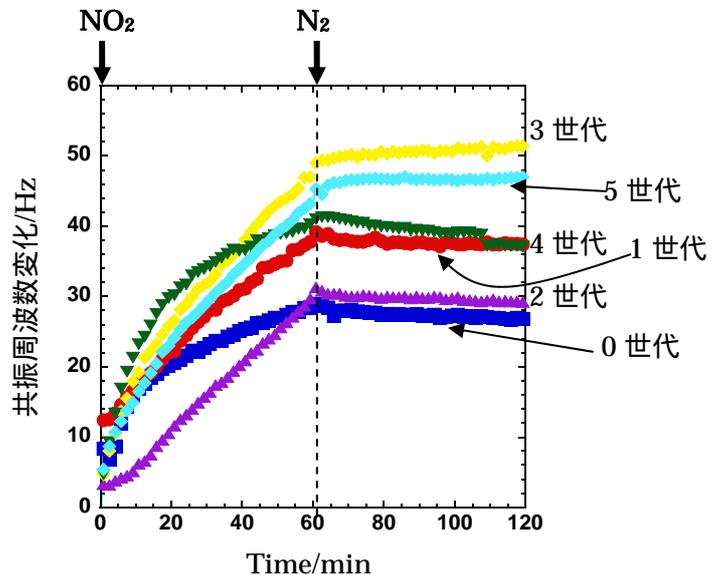


Fig2 超分岐PAMAMで修飾した水晶振動子の30における50ppmNO<sub>2</sub>に対する応答

# 超分岐ポリマーグラフト磁気ビーズの作製とその応用

(工業物理化学) 小林伸輔・松口正信

[緒言] 様々な基質表面上にいかに機能分子を組織的に修飾させることができるか、が近年のナノテクノロジーの課題の一つである。また、微粒子は比表面積の大きさに由来した様々な利点を持っており、その高機能化が大きな関心を持たれている材料である。本研究では、微粒子の中でも取り扱いの容易な磁気ビーズを基質として利用し、その表面にいかに高密度に機能分子を固定し、応用につなげることができるかの検討を行っている。今回は dendrimer 合成の方法を利用して磁気ビーズ表面上に超分岐ポリアミドアミン(PAMAM)をグラフトさせ、その末端に MALDI-TOFMS のマトリックス分子として利用される  $\gamma$ -CHCA を高密度に固定化するための反応条件について検討を行った。結果について報告する。

[実験] 磁気ビーズは、直径が  $2.8 \mu\text{m} \pm 0.2$ 、密度約  $1.6 \text{ g/cm}^3$  の市販のものを使用した。このビーズは、中心が酸化鉄( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )を含む架橋ポリスチレンからなり、外側はグリシジルエーテルで覆われ、表面には第一級アミノ基が導入されている。まず、この磁気ビーズ表面上にアクリル酸メチルを付加させた。この反応によって、1つのアミノ基あたりに2分子のアクリル酸メチルが付加される。すなわち、 $-\text{NH}_2$ のそれぞれのHが $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ となる。続いて無水エチレンジアミンとの縮合反応を行った。これによって脱メタノール化が起こり、末端は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ となり、この時点で末端アミノ基の量は2倍となる。この状態を超分岐ポリマーの第1世代(1G)と呼び、以上の手順を繰り返すことによって磁気ビーズ表面上に超分岐PAMAMを成長させた。また、アクリル酸メチルを付加させた後の各世代の磁気ビーズ末端の $\text{COOCH}_3$ 基を室温で $\text{NaOH}$ aqで加水分解させ、そして生じた末端 $\text{COOH}$ 基に  $\gamma$ -シアノ-4-ヒドロキシシナピン酸( $\gamma$ -CHCA)を縮合反応により固定した。以上の反応を様々な条件下で行い、より高密度に超分岐ポリマーが成長し、 $\gamma$ -CHCAが固定化される条件の最適化を行った。

[結果と考察] 磁気ビーズ表面に成長した超分岐 PAMAM を定量する目的で、末端にある第一級アミノ基と、蛍光指示薬であるフルオレスカミンを水溶液中で混合し反応させた。フルオレスカミンは、第一級アミノ基と反応することで、475 ~ 490nm に蛍光を発する。Fig.1 は得られた蛍光スペクトル強度と超分岐 PAMAM の世代との関係の一例を示したものである。グラフを見ると、世代が増すにつれて蛍光強度が増えており、超分岐ポリマーが成長して表面の第一級アミノ基量が増えていることが確かめられた。水温 50 で 24h 攪拌する条件で、定量(1ml)の

ビーズと混合する反応物質 (アクリル酸メチルと無水エチレンジアミン)の量を変えて超分岐ポリマーの成長を調べたところ、反応物の量を 20ml とした場合でも、超分岐ポリマーの成長は見られたが、その成長度は実験ごとにばらばらで、再現性のある結果を得ることが難しかった。そこで反応物の量を 40ml に変えて行ったところ、Fig.1 のように超分岐ポリマーが再現性良く成長し、かつ蛍光強度も 20ml の場合より大きくなった。このことから、ビーズに対する反応物の量を多くすることで未反応の末端基を減らす効果があったのではないかと考えられる。

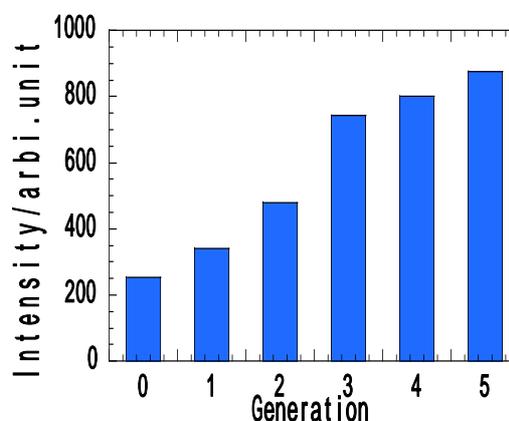


Fig.1 超分岐PAMAMの世代と蛍光スペクトル強度の関係

# 高次融合型テトラチアフルバレン類の合成

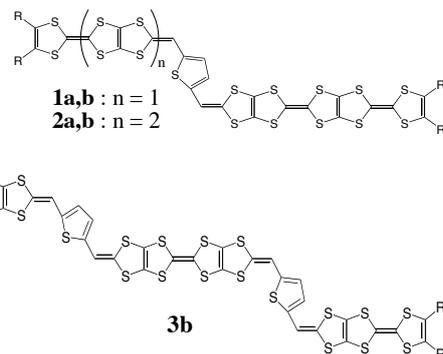
(構造有機化学分野) ○柴山 聡・岡田 佐栄子

〔序〕有機超伝導体のドナー分子を開発するにあたって、これまで様々な指針が示されてきた。最初の有機分子性金属を与えるドナーとして知られるテトラチアフルバレン(TTF)は、金属的な伝導性や超伝導性を示すラジカルカチオン塩を与えることで知られ、三分子以上の TTF 分子が融合した高次 TTP 類縁体には、多段階酸化還元系や分子ナノワイヤーのプロトタイプとしての興味が持たれている。

以前当研究室では、TTF の二つの 1,3-ジチオール環の

間にチオフェン環を導入した拡張型 TTF をユニットとした TTF オリゴマーの合成が検討されたが、幾可異性体が混在して

分離が困難という欠点があった。そこで今回我々は、分子内にチオフェン環を一つまたは二つだけ挿入することによって幾何異性体の存在を減らした融合型 TTF の四量体(1)および五量体(2), (3)の合成を行い、その性質について調べたので報告する。

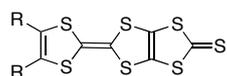


**1a,b**: n = 1  
**2a,b**: n = 2  
**3b**

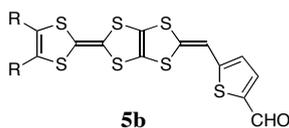
**a**, R = S(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>

**b**, R = SCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

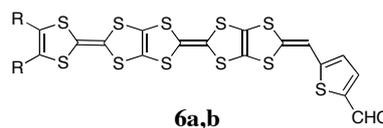
〔結果と考察〕**1a** の合成は、**4a** と **6a** をトルエン中で P(OMe)<sub>3</sub> を用いてクロスカップリング反応させることにより得られた(収率: 60%)。一方、**1b** は **5b** と **7b** を THF 中、LDA 存在下 -70°C で Wittig-Horner 反応させることで得られた(収率: 75%)。同様にして **2a,b** は、**6a,b** と **7a,b** を、**3b** は **5b** と **8** を THF 中、LDA 存在下 -70 °C で Wittig-Horner 反応させることで得られた(収率: **2a**, 40% ; **2b**, 58% ; **3b**, 45%)。1-3 の酸化還元電位を CV 法を用いて測定したところ、次のような結果が得られた ; **1b** : -0.03(1e), 0.05(1e), 0.22(1e), 0.40(3e), 0.84 V(2e) [V vs. Fc/Fc<sup>+</sup>, in PhCN-CS<sub>2</sub>(1:1, v/v)]、**2b** : -0.06(2e), 0.13(2e), 0.42(4e), 0.84 V(2e)、**3b** : -0.05(2e), 0.01(2e), 0.24(2e), 0.32(1e), 0.44(2e), 0.61 V(1e)。これらの酸化還元過程の詳細については当日報告する。



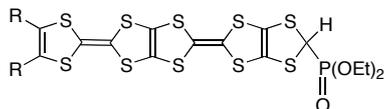
**4a**



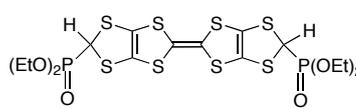
**5b**



**6a,b**



**7a,b**

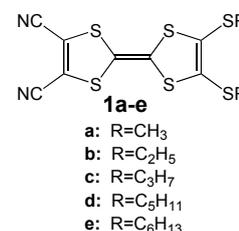


**8**

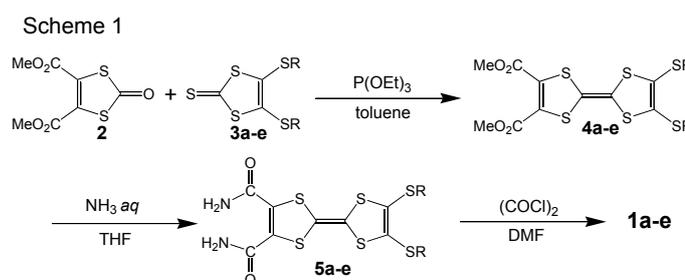
# シアノ基で置換された新規テトラチアフルバレン類の合成と性質

(構造有機化学分野)○高島毅・石丸幸弘・森田俊行

**[緒言]** テトラチアフルバレン (TTF) 誘導体は分子性導体の伝導成分分子や有機電解トランジスター (OFET) の活性層材料として興味を持たれている。我々は、新規 OFET 材料として、適度な HOMO-LUMO ギャップを持つ分子系に着目し、理論計算による分子設計を行ってきた<sup>1)</sup>。本研究では、理論的な分子設計から導かれた分子系として、シアノ基で置換された新規 TTF 誘導体(**1a-e**)を合成し、それらの性質を検討した。



**[結果と考察]** **1a-e** の合成は Scheme 1 に従って行った。メトキシカルボニル基を有する 1,3-ジチオール-2-オン(**2**)とアルキルチオ基で置換された 1,3-ジチオール-2-チオン(**3a-e**)をトリエチルポスファイトでクロスカップリングさせることにより対応する TTF 誘導体(**4a-e**)とした後、



THF 中でアンモニア水を反応させることによりアミド置換 TTF(**5a-e**)を得た。最後に **5a-e** を DMF 中、塩化オキサリルで脱水させることで目的物である **1a-e** を 58-84% の収率で得た。

**1a-e** の酸化還元電位を測定したところ、いずれも二段階の可逆な酸化還元波を示した。**1e** の第一酸化還元電位( $E_1 = 0.39$  V vs. Fc/Fc<sup>+</sup> in PhCN)は強い電子吸引性置換基であるシアノ基の影響のため、シアノ基をを持たないビス(メチルチオ)-TTF の  $E_1$  値(0.01 V)よりも 0.4 V 近く高電位側へシフトしていることが明らかとなった。

**1e** の X 線結晶構造解析の結果は、アルキル鎖は TTF 面に対してほぼ直立し、head-to-tail 型で積層している。分子長軸方向から見るとこの分子は有機導体において  $\beta$ ”型と呼ばれている分子配列をとることがわかった。今回得られたジシアノ置換 TTF 誘導体の FET 特性については現在検討中であり、当日報告する予定である。

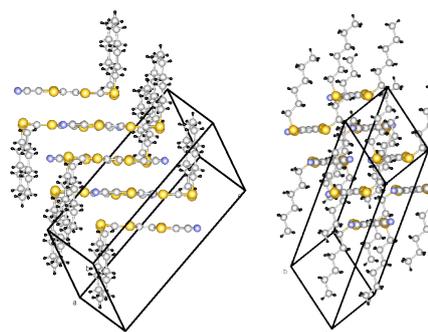


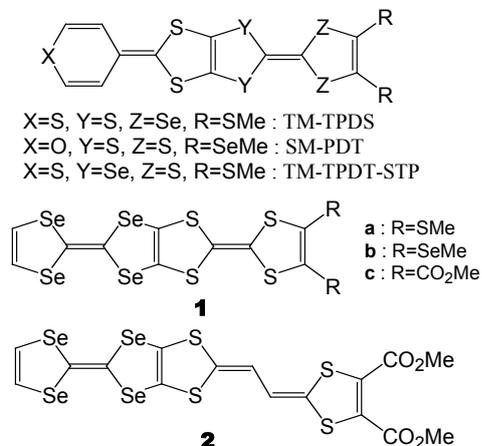
Fig. 1. Crystal structure of **1e**.

1) 笹野他, 第 64 回応用物理学会学術講演会 講演予稿集, 1p・S-1

# セレン原子を含む新規テトラチアペンタレン系ドナーの合成

(構造有機化学分野) ○棚橋徹彦・石津謙一

【序】 これまでに当研究室では、二分子の TTF が融合した TTP 系ドナーを合成し、その CT 錯体及びラジカルカチオン塩の構造と物性について検討を行い、多くの伝導性錯体が二次元的な分子配列をとり低温まで金属的な伝導性を示す事を明らかにしている。更に伝導性錯体におけるバンド巾増大を目指し、ジセレンテトラチアフルバレン (STF) と TTF が融合した TTP ドナーや、TTP の末端のジチオール環をピラン環に置換した PDT-TTP 系導体の合成を行ってきた。また、TTP 骨格中にセレン原子を導入することにより、ラジカルカチオン塩での分子間相互作用の増大し、高い伝導性や、様々な結晶構造が期待される。今回、TSF と TTF が融合したドナー**1**、**2** の合成を行い、その電気化学的性質について検討したので報告する。



【結果と考察】 **1a-1c** は **3a** と **4** をそれぞれトルエン中で P(OMe)<sub>3</sub> を用いてクロスカップリング反応させることにより、**1a** が 63%、**1b** が 36%、**1c** が 13% の収率で得られた。**2** は **3b** と **5** を同じようにクロスカップリング反応により 30% の収率で得られた。

次に合成した **1** の電気化学的性質をベンズニトリル中、サイクリックボルタメトリーにより検討した。CV の結果を Fig. 1 に示す。4 対の酸化還元波をが観測された。酸化電位を Table に示した。比較のために TTP 誘導体である BTM-TTP の結果も示した。第一酸化電位(E<sub>1</sub>)は **1** と BTM-TTP 両者共同値(0.05V)を示したが、E<sub>2</sub> 値は、**1** の方が 0.05V 高電位側にシフトしている、この結果は、カチオンラジカル状態における陽電荷は主に TTF 側に分布するが、ジカチオン状態において陽電荷が TSF 側にかなり分布していることを示唆している。

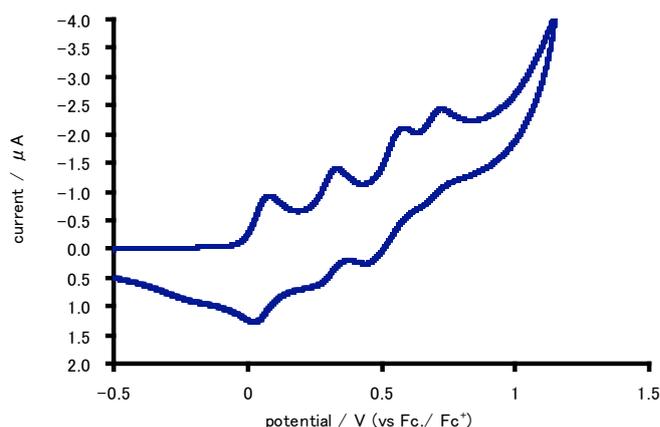
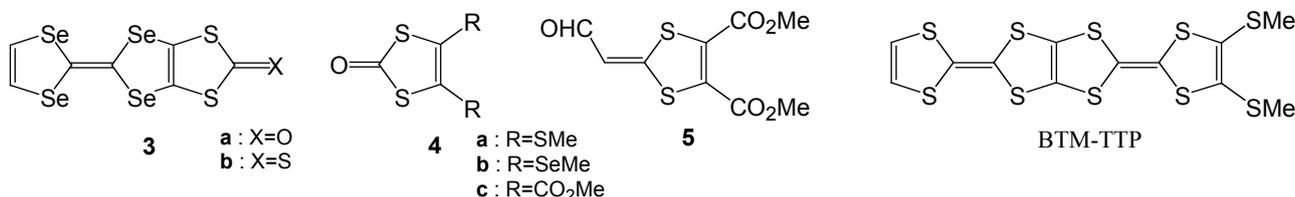


Fig. 1 Cyclic Voltammogram of **1**

Table. Redox potentials of **1** in benzonitrile (V vs. Fc / Fc<sup>+</sup>)

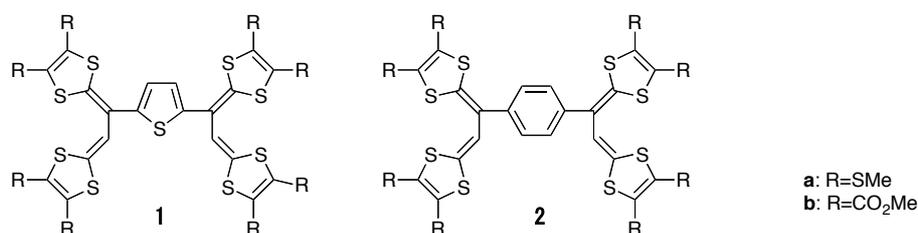
Donor	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>
<b>1</b>	0.05	0.31	0.54	0.68
BTM-TTP	0.05	0.26	0.57	0.72



# ベンゼン環を挿入した拡張型テトラチアフルバレン系ドナーの合成と性質

(構造有機化学分野) 山本佳代子

〔序〕 1, 3-ジチオール環を有する交差共役系は、直線的な $\pi$ 電子系と異なり、複雑な電子系を有するために、酸化還元過程を明らかにする事は興味を持たれる。これまでに当研究室では、**1**のような TTF 交差共役系ドナーの合成を行ってきた。今回我々は、**2a,b**の新規交差共役型ドナーの合成を行ったので報告する。



## 〔結果と報告〕

合成は下記の Scheme に従って行われた。**3a,b**を DMF 中  $\text{POCl}_3$  と氷冷下で反応させると、**4a,b** が収率 68%、80% で得られた。**4a,b** を Toluene 中  $\text{P}(\text{OEt})_3$  の存在下で  $110^\circ\text{C}$  でクロスカップリング反応させると **2a,b** が収率 76%、55% で得られた。

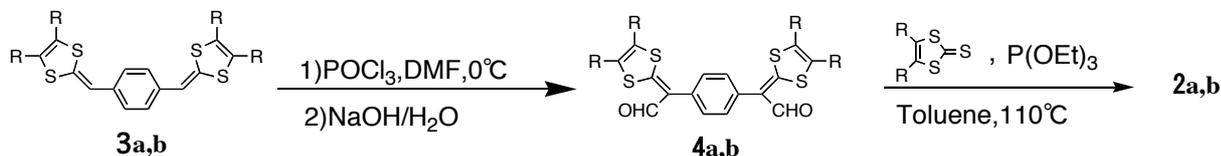
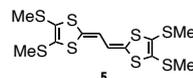
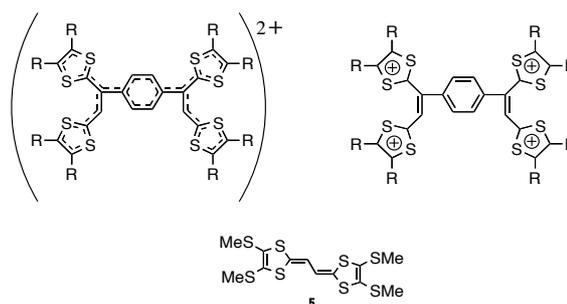


Table1. Redox Potentials of **2a,b** and Their Related Donors(vs.Fc/Fc<sup>+</sup>,Pt electrode,0.1M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> in Benzonitrile)

Donor	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>
<b>2a</b>	-0.07	0.00	0.15(2e)	
<b>2b</b>	0.28	0.35	0.54(2e)	
<b>1a</b>	-0.05	0.00	0.20(2e)	
<b>1b</b>	0.23	0.33	0.53(2e)	
<b>3b</b>	0.18	0.38		
<b>5</b>	-0.06	0.10		

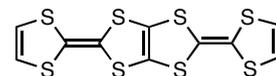
**2**の酸化還元電位を CV 法により測定したところ、**2**は**1**と同様の二段階の一電子酸化還元過程と一段階の二電子酸化還元過程が観測された。したがって、ジカチオンでは、2つの陽電荷は**1**と同様分子全体に非局在していてテトラカチオンでは陽電荷が**5**のユニット中に局在していると考えられる。



# オリゴチオフェンを挿入した 融合型テトラチアフルバレン系ドナーの合成と性質

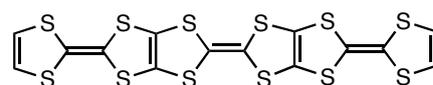
(構造有機化学研究室) 河野 裕

(序) 二分子の **TTF** が融合した **TTP** を更に一次元に拡張した高次 **TTP** 分子系には、1) 多段階酸化還元系、2) 有機分子性金属のドナー成分、3) 分子ナノワイヤーのプロトタイプとしての興味を持たれる。これまで当研究室では種々の高次 **TTP** 分子系ドナーを合成してきた。その中には、三分子の **TTF** が融合した **TTPY**

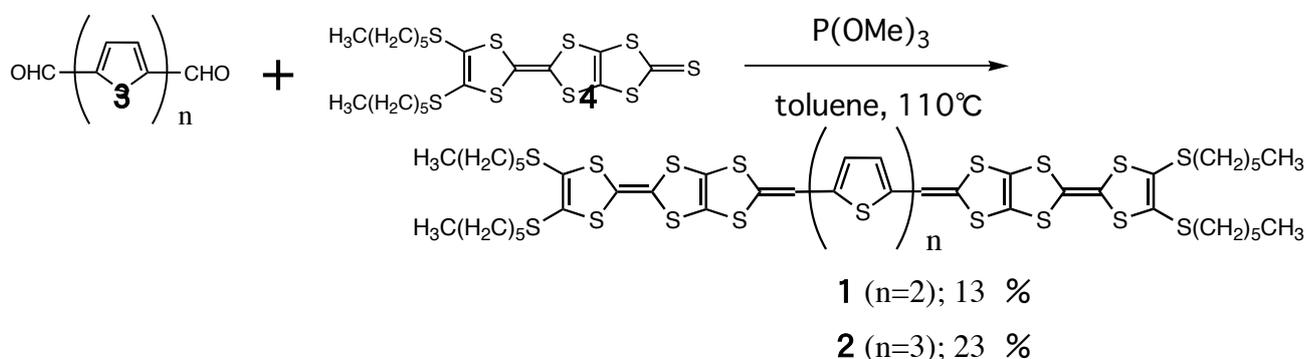


**TTP**

誘導体にチオフェン環やフラン環を挿入し、共役系を拡張させた拡張型ドナーがあり、それらの構造と酸化還元系としての性質について調べてきた。今回、私は **TTPY** 誘導体にオリゴチオフェンを挿入することによって共役系を拡張させた融合型テトラチアフルバレン系ドナー化合物 **1** と **2** の合成を行い、それらの性質を調べたので報告する。



**TTPY**



(結果) 化合物 **3** と **4** をトルエン中亜リン酸トリメチル存在下 110°Cで反応すると **1** が 13%、**2** が 23%の収率で得られた。**1** と **2** の酸化還元電位を CV 法により測定し、いずれも 3 対の 2 電子移動過程が観測された。また、**1** と **2** について分子軌道計算を行い、**1** に比べ **2** の方が HOMO と HOMO-1 のエネルギー差が減少することがわかった。**1** と **2** の酸化還元過程の詳細については当日報告する予定である。

Table.1 Redox Potentials of **1** and **2**

Donor	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>
<b>1</b>	-0.01 (2e)		0.38 (2e)		0.50 (2e)	
<b>2</b>	-0.04 (2e)		0.27 (2e)		0.39 (2e)	

Measured in PhCN-CS<sub>2</sub>(1:1, v/v) containing 0.05M Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub>

# セレノメチル基で置換されたテトラチアペンタレン系導体の構造と伝導性

(構造有機化学分野) 保田三沙貴・御崎洋二

[緒言] 当研究室では、二分子のテトラチアフルバレン(TTF)が融合した BDT-TTP 系ドナーを用いた分子性導体の多くが対イオンのサイズや形状に関係なく二次元的な  $\beta$  配列をとるといった強い自己凝集能を有し、その結果、大部分の塩が低温まで金属的挙動を示すことを明らかにしている。最近では、BDT-TTP にメチルチオ基を導入した BTM-TTP が自己凝集能を示さず、均一に積層した  $\beta$  型配列を有する金属及び  $\theta$  型分子配列を有する半導体を与えることを見出している。今回、メチルチオ基を導入した BSM-TTP 塩について検討したところ、二種の  $\text{PF}_6$  塩の単結晶が得られたのでそれらの構造と物性について検討したので報告する。

[結果と考察] クロロベンゼン中、 $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  を支持電解質として用いて電解酸化を行うことにより二種の結晶  $(\text{BSM-TTP})_2\text{PF}_6$  ならびに  $(\text{BSM-TTP})_4(\text{PF}_6)_3(\text{PhCl})_2$  を得た。両者の X 線構造解析を行ったところ、 $(\text{BSM-TTP})_2\text{PF}_6$  は BTM-TTP 塩と同様  $\theta$  型分子配列を有することが明らかとなった(Fig. 1)。一方、 $(\text{BSM-TTP})_4(\text{PF}_6)_3(\text{PhCl})_2$  ではドナー分子は、四量化したドナーカラムが分子長軸方向に沿って二次元的な分子配列を形成するといった、通常の二次元導体では見られないような結晶構造を有していることが見出された(Fig. 2)。これらの塩の電気伝導度測定を四端子法により行ったところ、 $(\text{BSM-TTP})_2\text{PF}_6$  は  $1.2 \text{ S cm}^{-1}$  の伝導性を有し、室温から半導体的挙動を示した ( $E_a = 0.088 \text{ eV}$ )。一方、 $(\text{BSM-TTP})_4(\text{PF}_6)_3(\text{PhCl})_2$  塩は室温において、 $25 \text{ S cm}^{-1}$  の伝導性を示し、金属的な温度依存性を示した後、 $170 \text{ K}$  で絶縁化した。

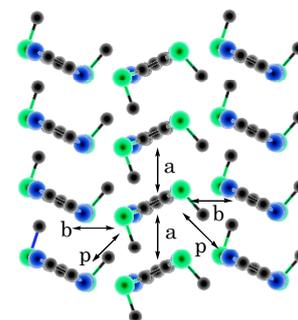
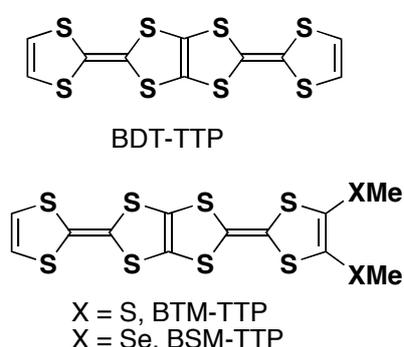


Figure 1. Donor sheet structure of  $(\text{BSM-TTP})_2\text{PF}_6$ .

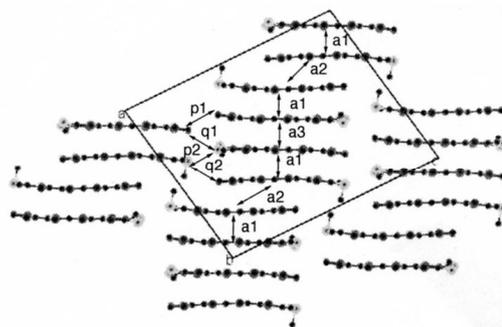


Figure 2. Donor sheet structure of  $(\text{BSM-TTP})_4(\text{PF}_6)_3(\text{PhCl})_2$ .

# N-ベンゾイルグリシン結晶の光学活性

(愛媛大院理工 機能有機化学・リガク X 線研究所) 大塚将成・谷口智哉・小島秀子・城 始勇

[緒言] アキラルな N-ベンゾイルグリシンから生成するキラルな結晶の旋光能を HAUP 法により測定し、結晶構造との関係を考察した。

[実験と結果] この結晶は空間群  $P2_12_12_1$  に属しているが、今回、 $-180^\circ$  での X 線結晶解析を行い、得られた Flack の定数 0.0(1) から、測定した結晶の絶対配置が P 体であることを確定した。この P 体結晶は a 軸方向に、カルボン酸部位での水素結合により、右回りの 2 回らせん構造を形成している (Fig.1)。また b 軸方向では、アミド部位での水素結合により、同じく右回りの 2 回らせん構造を形成している (Fig.2)。

まず、メタノール溶液を室温でゆっくり蒸発させることにより、数 mm サイズの単結晶を作製した。次に、各面の測定試料の両面を光学面に研磨した。厚さは  $200\ \mu\text{m} \sim 400\ \mu\text{m}$  とした。精密旋光能測定装置 (HAUP) により、消光位の温度依存性の測定を、He-Ne レーザーの  $632.8\text{nm}$  の波長、 $303\text{K} \sim 313\text{K}$  の範囲で行い、比旋光能 (厚さ  $1\text{mm}$  当たりの旋光度) 及び複屈折を算出した。その結果、Fig. 3 に示すように、P 体 (100) 面、すなわち右巻きらせん軸 (a 軸) 方向の旋光能は  $-126\ \text{deg/mm}$ 、M 体 (100) 面、左巻きらせん軸方向の旋光能は  $+124\ \text{deg/mm}$  となった。また、P 体 (010) 面の旋光能は  $-104\ \text{deg/mm}$ 、M 体 (010) 面の旋光能は  $+110\ \text{deg/mm}$  となった。らせんを形成していない (001) 面では、P 体の旋光能は  $+19\ \text{deg/mm}$ 、M 体の旋光能は  $-15\ \text{deg/mm}$  と値が小さかった。以上の結果、旋光能の符号は、右回りのらせんは負、左回りのらせんは正であること、また、らせん構造により大きな旋光能が誘起されることがわかった。

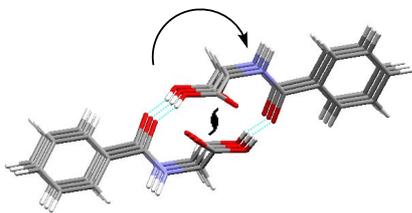


Fig.1 P 体 (100) 面の 2 回らせん構造

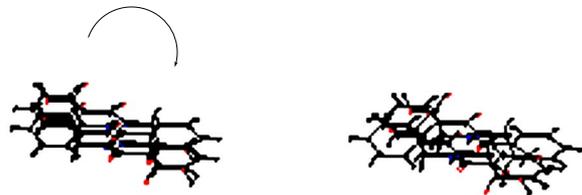


Fig.2 P 体 (010) 面の 2 回らせん構造のステレオ図

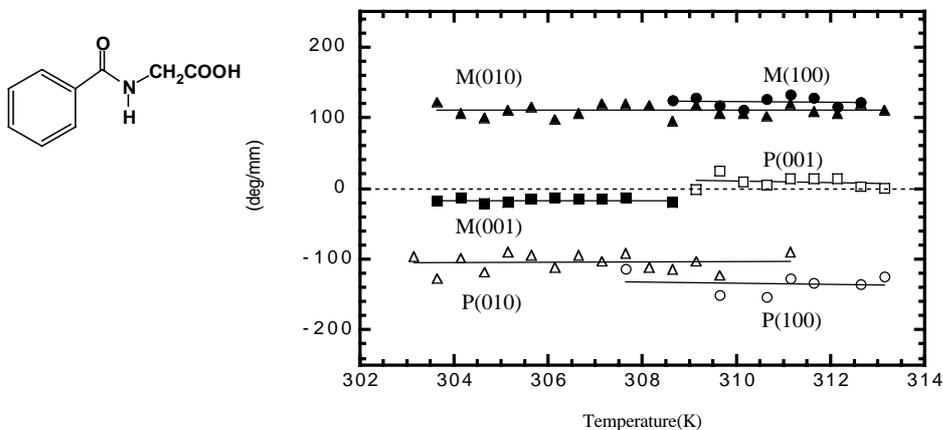


Fig.3 N-ベンゾイルグリシン結晶の旋光能

# イソプロピルベンゾフェノン系キラル塩結晶の光環化と表面形態変化

(愛媛大院理工 機能有機化学) 井手佑弥・小島秀子

[緒言] 先に、エナンチオ特異的光環化を起こすジイソプロピルベンゾフェノン誘導体と(*S*)-フェニルエチルアミンの塩結晶は、単結晶-単結晶反応であるにもかかわらず、反応の途中では結晶の表面にナノレベルの形態変化が起こることを報告している。

[実験と結果] 今回、同類の 2,4,6-トリイソプロピル-4'-カルボキシベンゾフェノンと(*S*)-フェニルエチルアミンとの塩結晶について検討した。結晶中で二分子間の塩結合により右回りの 2 回らせん構造が形成されている(Fig. 1)。この結晶の光照射はエナンチオ選択的光環化を起こす。マイクロメータサイズの微結晶を作製し、光環化に伴う微結晶の形態変化を原子間力顕微鏡を用いて観察した。微結晶の表面は、バルク結晶の外形から(001)面と考えられる(Fig. 2)。反応率は IR 測定を用い、光環化に伴うカルボニル基由来のピークの減少より求めた。その結果、結晶の形態が変化することなく光環化が起こることがわかった(Fig. 3)。

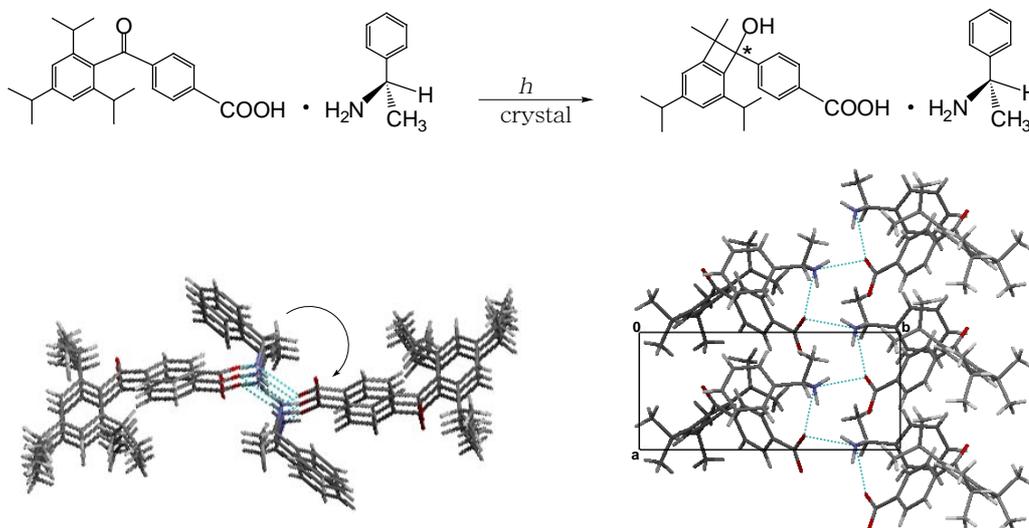


Figure 1. (100)面の 2 回らせん構造

Figure 2. (001)面の分子配列

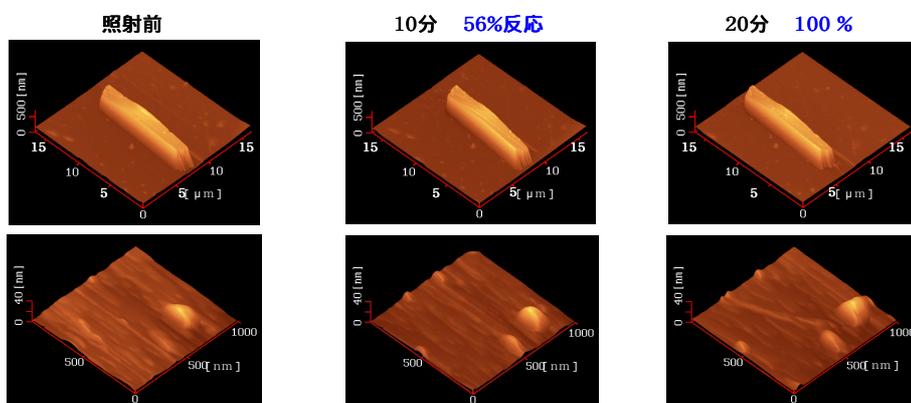


Figure 3. 光照射に伴う微結晶(001)面の形態変化 . 上 ; 全体, 下 ; 表面

# イソプロピルベンゾフェノン誘導体結晶のジアステレオ特異的光環化

(愛媛大院理工 機能有機化学) 深野道太郎・山崎真吾・小島秀子

[緒言] 有機結晶の光反応に伴う結晶構造変化と結晶形態変化との関連性について検討した。

[実験と結果] (*S*)-フェニルエチルアミンを導入したイソプロピルベンゾフェノン誘導体(*S*)-1 の結晶に光照射すると、ジアステレオ特異的光環化を起こし、生成物として(*R,S*)-2 のベンズヒドロール体のみを与えた(Scheme1)。一方、溶液中での反応はジアステレオ選択性が低く、(*S,S*)-2 と(*R,S*)-2 の混合物を 53:47 の割合で与えた(6% de)。結晶反応で(*R,S*)-2 のみが生成するのは、出発物の(*S*)-1 と生成物の(*R,S*)-2 は結晶中で同様の 2 回らせんと水素結合を形成するなど、分子配列がよく似ており、反応過程において小さい分子の動きしか必要としないためと考えられる(Fig. 1)。それに対して、(*S,S*)-2 は結晶中で 4 回らせんを形成し、水素結合形態も出発物の(*S*)-1 の結晶とは異なるため大きな分子の動きが必要となり、結晶中では(*S,S*)-2 は全く生成しないと考えられる。また、バルク結晶に光照射すると結晶が割れてしまうが(Fig. 2)、マイクロメータサイズの微結晶についての反応を、IR 測定と顕微鏡観察により追跡した結果、もとの形と透明性を完全に保ったまま、見かけ上何の変化もなく反応が完了することがわかった(Fig. 3)。このため、生成物(*R,S*)-2 の再結晶前と後の粉末 X 線回折を測定したところ、回折パターンは異なっており、再結晶により結晶構造が変わることがわかった。

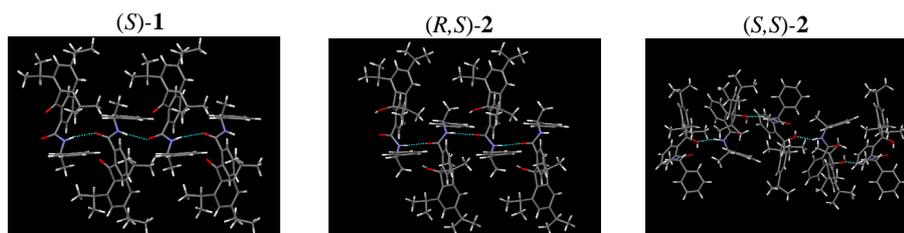
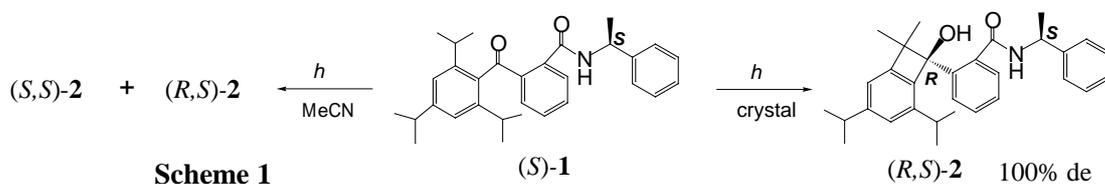


Figure 1. 出発物(*S*)-1 と生成物(*R,S*)-2, (*S,S*)-2 の結晶構造

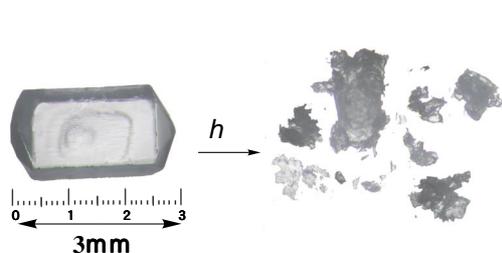


Figure 2. バルク結晶の光照射

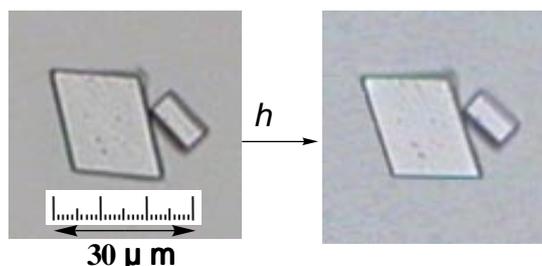


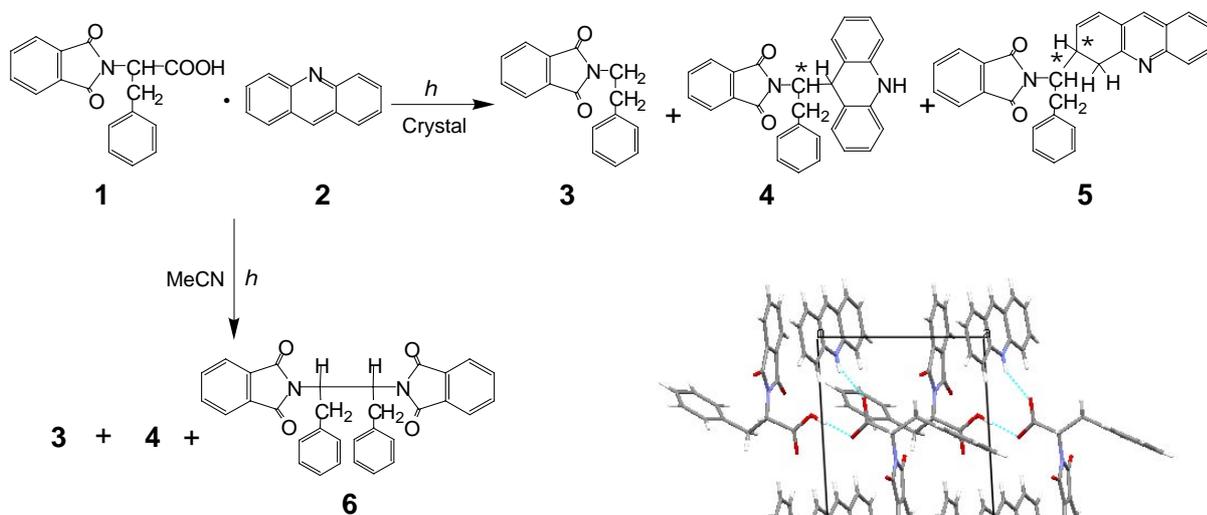
Figure 3. 微結晶の光照射

# N-フタロイルアミノ酸とアクリジンの複合結晶の光縮合反応におけるキラリティーメモリー

(愛媛大院理工 機能有機化学) 谷口明広・碓本 奨・小島秀子

[緒言] N-フタロイルアミノ酸とアクリジンのキラル複合結晶の光脱炭酸縮合について検討した。

[実験と結果] N-フタロイル-L-フェニルアラニン **1** とアクリジン **2** の 2 : 1 複合結晶をメタノール溶液からの再結晶により作製した(mp 171-173 °C)。次に、粉末結晶をアルゴン中で高圧水銀ランプを用い光照射した。その結果、生成物として、脱炭酸体 **3**、および 2 種類の脱炭酸縮合体 **4** と **5** が得られた(Scheme 1)。一方、アセトニトリル中での光反応による生成物は、脱炭酸体 **3** とその 2 量体 **6**、および脱炭酸縮合体 **4** であり、結晶反応とは生成物選択性が異なっていた。縮合体 **4** の旋光度を測定したところ、結晶反応の方が値は大きいものの、溶液反応についても一定の値が得られた。このことから、**1** の脱炭酸したラジカルが、結晶中では勿論、溶液中においても、もとの S(L) 配置をある程度保持した状態でアクリジンとカップリングすることがわかった。また **5** は結晶反応でのみ生成する縮合体であり、ジアステレオマ - の混合物であるが、これについても旋光性が確認された。現在、反応の詳細と結晶構造(Fig.1)との関連性を解析中である。



Scheme 1

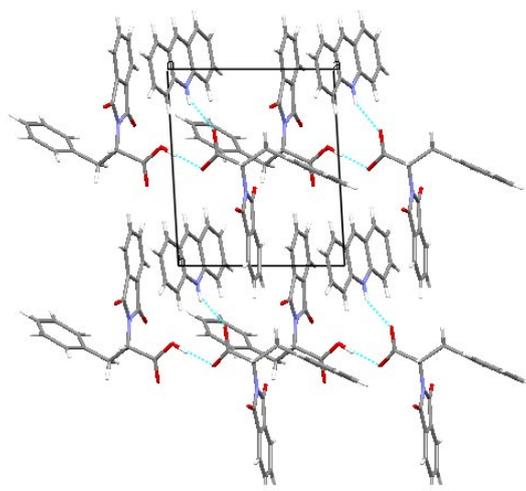


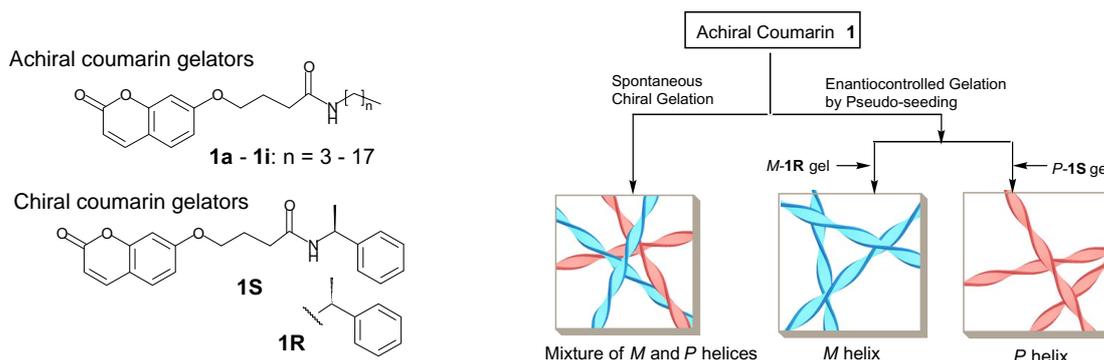
Figure 1. Crystal structure of 2:1 cocystal **1**

# アキラルなクマリン誘導体から生成したキラルゲルの光二量化

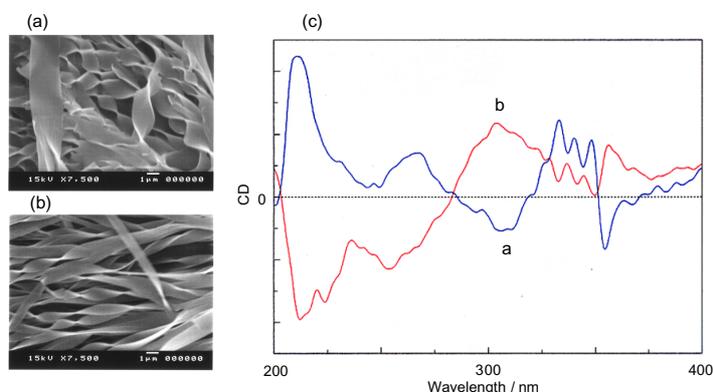
(愛媛大院理工 機能有機化学) 守時 達也・柳瀬 郁人・小島 秀子

【緒言】アキラルなクマリン誘導体から生成したらせん状のキラルなゲルのヘリシティ制御を、擬似種ゲル法により行ない、光二量化を検討した。

【結果・考察】アルキルアミド結合を有するアキラルなクマリン誘導体 **1a-1i** は、アルキル鎖の長さにかかわらずシクロヘキサン中ではらせん状のキラルなゲルを形成したが、常に右巻きらせんと左巻きらせんが混在していた。一方、(*S*)-フェニルエチルアキド基を有するキラルなクマリン成分 **1R** は左巻き、逆の **1S** は右巻きの一方のみのゲルを形成した。このため、**1R** または **1S** のゲルを擬似的な種ゲルとして、アキラルなクマリン溶液に少量(5%)加えてゲル化させることにより、ヘリシティ制御を試みた(Fig. 1)。その結果、**1R** を種ゲルとした場合は左巻きゲル、**1S** を種ゲルとした場合は右巻きゲルのみ生成することが SEM 観察により確認され、CD スペクトルでも両者は区別でき、ヘリシティ制御に成功した(Fig. 2)。また、粉末 X 線回折の測定により、種ゲルを共存させてエナンチオ制御したゲルと、種ゲルなしで作製したゲルの一次構造は同じであることがわかった。次に、クマリンゲル **1i** ( $n = 17$ ) の光照射を行なったところ、立体選択的な二量化を起こし、アキラルな化合物である *syn*-head-head dimer のみ生成し、不斉反応は達成されなかった。反応の詳細は当日報告する。



**Figure 1.** Schematic illustration of the helicity control of achiral coumarins in gelation by pseudo-seeding.



**Figure 2.** SEM images of the helical gels of achiral coumarin **1i** ( $n = 17$ ) in cyclohexane; (a) left-handed helix obtained by seeding **1R** gels, and (b) right-handed helix obtained by seeding **1S** gels, and (c) the CD spectra of the gels corresponding to (a) and (b).

【文献】H. Yu, H. Mizufune, K. Uenaka, T. Moritoki, and H. Koshima, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8932-8938.

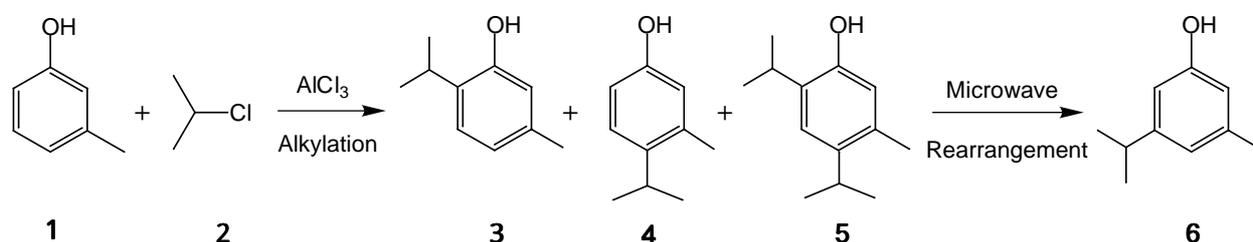
# マイクロ波照射による *m*-クレゾールの迅速アルキル化

(愛媛大院理工 機能有機化学・日立プラントテクノロジー)

吉岡 慎市・中矢 英允・末松孝章・小島 秀子

【緒言】 近年、マイクロ波の化学合成への応用研究が進んでいる。マイクロ波のもつエネルギーは非常に小さいので、紫外・可視光のように分子を直接励起して反応を起こすことはできないが、反応速度を飛躍的に速くする効果がある。今回、*m*-クレゾール(1)と塩化イソプロピル(2)を塩化アルミニウム触媒を用いて Friedel-Crafts アルキル化を試みた結果、マイクロ波照射によりイソプロピル基の転移が速やかに進行し、3-isopropyl-5-methylphenol(6)が高選択的、高効率で生成することがわかった。

【結果と考察】 1 と 2 と塩化アルミニウムの 1 : 2 : 1 混合物は、室温での Friedel-Crafts アルキル化反応により、イソプロピル基がオルト位に置換された 2-isopropyl-5-methylphenol (Thymol, 3) とパラ位置置換体 4-isopropyl-5-methylphenol (Biosol, 4)、およびオルト位とパラ位の二置換体 2,4-diisopropyl-5-methylphenol (5) の混合物を与えた (Scheme 1)。引き続いてこれらオルト、パラ置換体混合物にマイクロ波を照射すると、3、4、5 のいずれのイソプロピル基もメタ位へと速やかに転移が起き、本来の Friedel-Crafts アルキル化では生成し難い 3-isopropyl-5-methylphenol (6) へと収束することが明らかとなった (図 1)。発表会では、マイクロ波照射の最適条件、通常加熱との比較について詳細に報告する。



Scheme 1

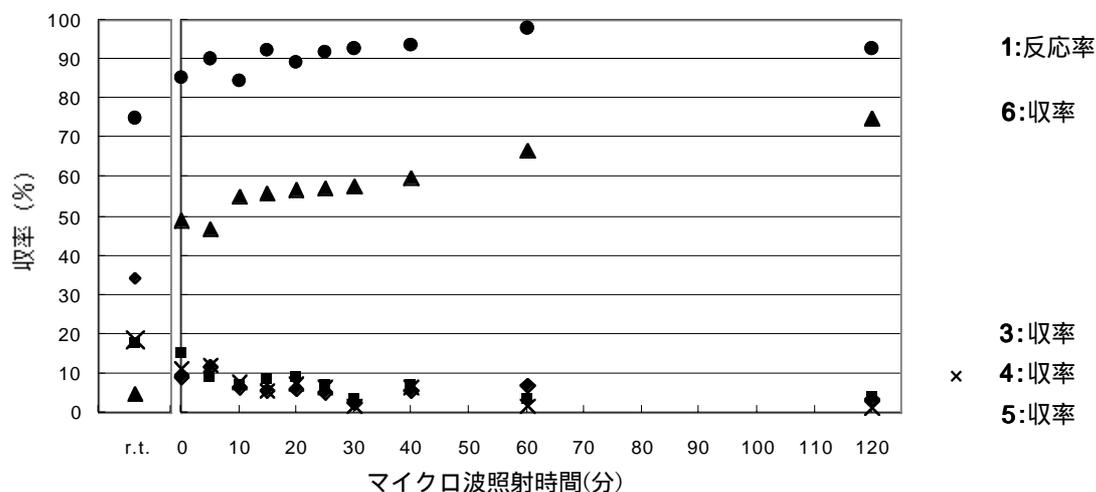


図 1 マイクロ波照射時間と反応生成物の関係

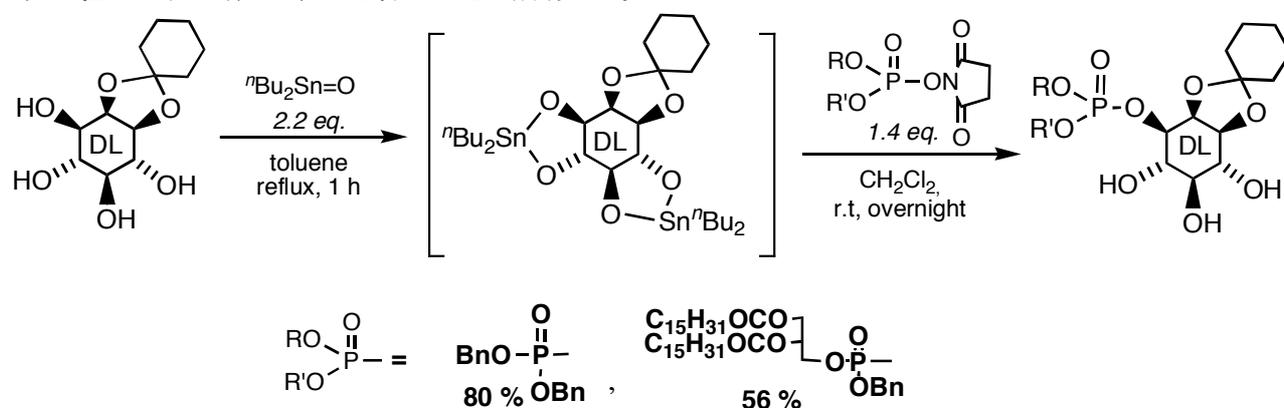
## 生理活性イノシトールリン脂質の簡便な合成法の開発

(反応有機化学) 三宅 慶行

イノシトールリン脂質類 (PtdIns)は、細胞内の情報伝達系の担い手として様々な場面で重要な役割を演じていることが明らかにされてきた。その機能の詳細を明らかにしたり、医薬への展開が近年の重要な研究課題となっている。

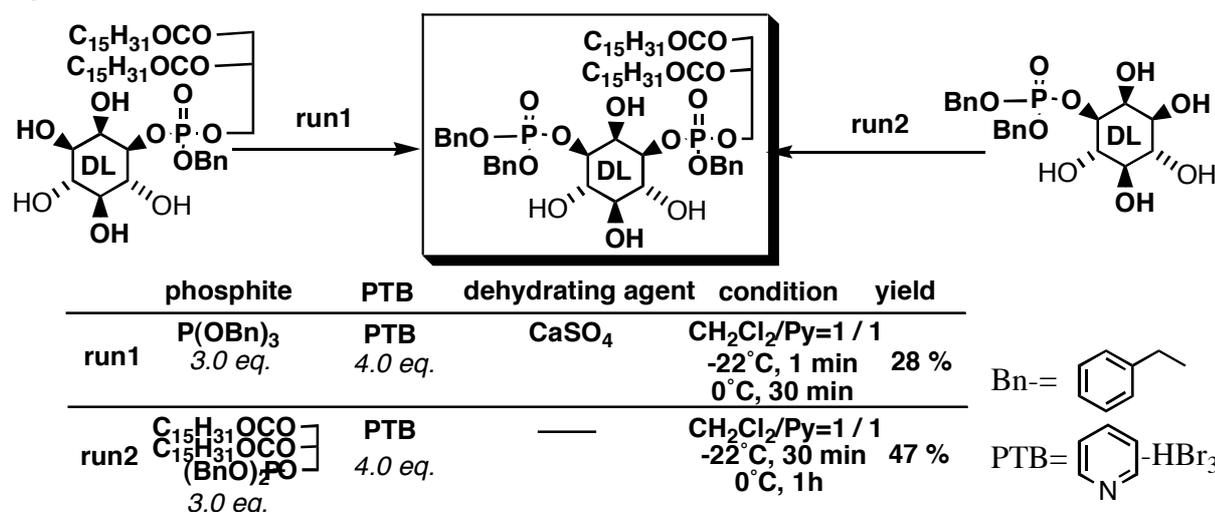
有機合成での供給を考えた場合、小胞輸送等の重要な生理機能の担い手であるPI(3)Pなどのイノシトールリン脂質の従来の合成法は、いくつかの保護基を導入するため、工程数がかかるという難点があった。本研究では、選択的反応を駆使して下記のように保護基を最小限にしたイノシトールに選択的リン酸化を行い、PI(3)Pなどのイノシトールリン脂質の効率的かつ実用的な合成法の確立を目的し、上手く行けば既知報に比べて工程数が半減するのではないかと考えた。

そこでまず始めにスズを用いてのリン酸化を試みた。下式に従ってスズオキシドと反応させ、環状のスズ誘導体を形成させて、リン酸化剤であるリン酸スクシンイミドエステルと反応させてみた。その結果、選択的に1位モノリン酸エステルを得ることに成功した。



次に得られた1位モノリン酸エステルの脱ケタル化を行い、それぞれの生成物を当研究室で開発されたPTBを使用してのリン酸化法で反応を行った。その結果、温度を制御してやることにより、phosphonium ionを経由してrun 1、run 2 から3位にそれぞれリン酸基を導入することに成功した。

結果、スズ誘導体を経由して行う選択的リン酸化、PTBとphosphiteを使用しての選択的リン酸化の二つの反応を用いることにより簡便に(DL)1-O-benzylpalmitoylglycerolphosphoryl-3-O-dibenzylphosphoryl-myoinositolを合成できた。

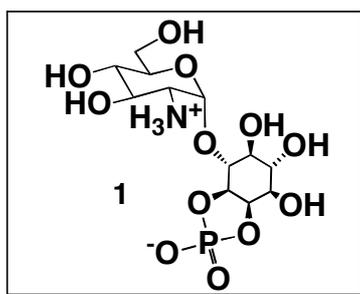


このことから、イノシトールのD体、L体いずれからもPI(3)Pが合成可能ではないかと考えられる。今後、光学活性体であるD-1-O-benzylpalmitoylglycerolphosphoryl-3-O-dibenzylphosphoryl-myoinositolを合成し、水添を行い、PI(3)Pの合成を完成させる。

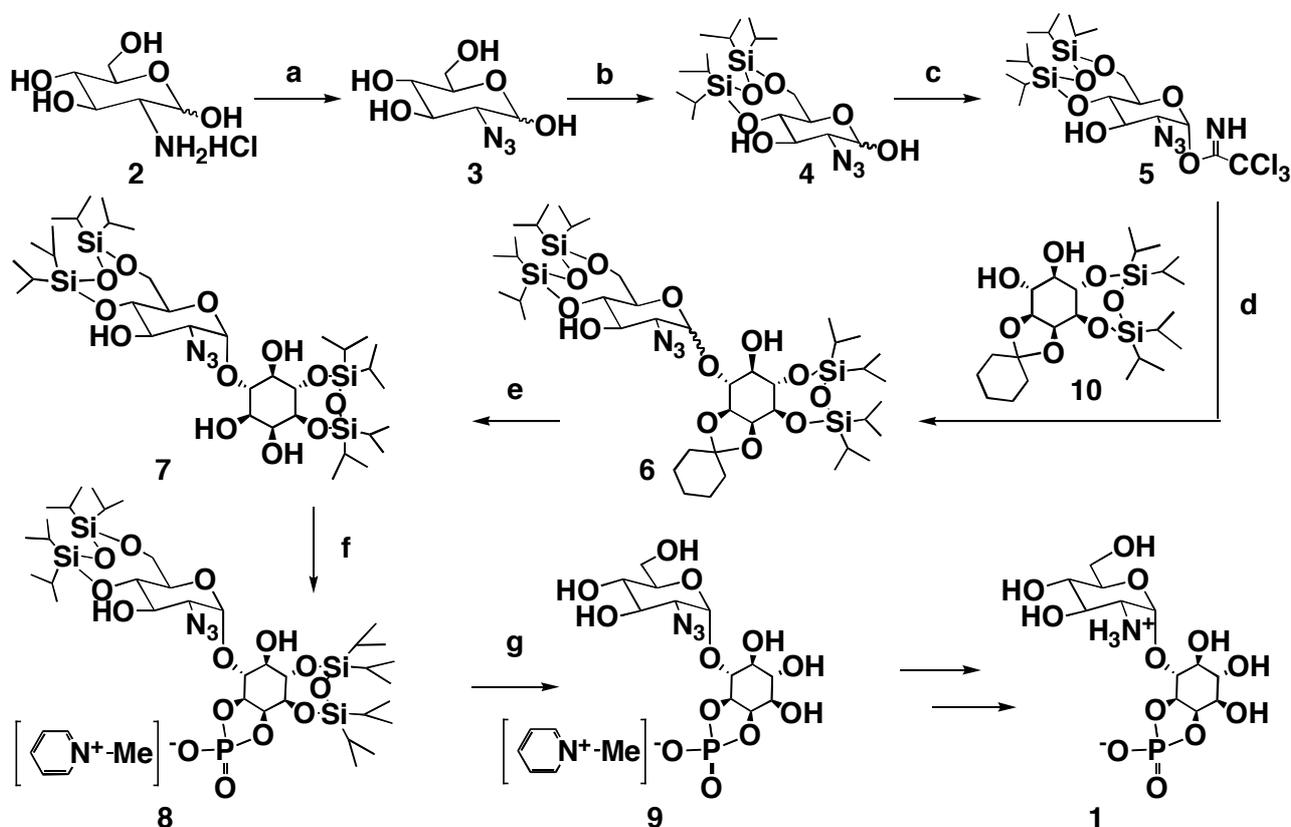
# インシュリン作用に関与するイノシトールグリカンの全合成

(反応有機) 植村 剛

糖質は近年その生理学的意義および疾病との関わりから注目されている。こうした背景から有機化学の分野でも糖質合成に関する研究が活発に展開されている。その中でイノシトールグリカン類はインシュリン作用に関与していることが示唆されている。そこで有機合成の立場からインシュリン作用の詳細の解明や糖尿病の治療薬の開発を目指すこととし本研究ではその作用に関わると考えられる **1** 及び周辺誘導体の合成を目的とした。

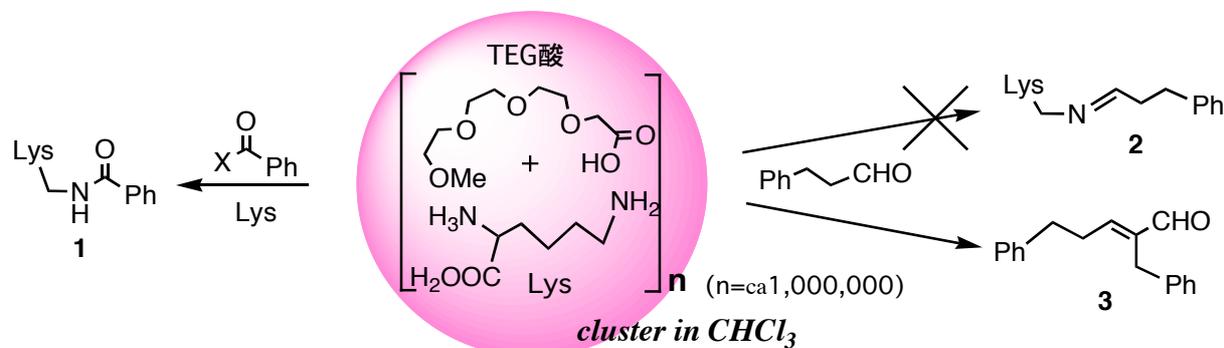


D-グルコサミン **2** を出発原料に化合物 **3** ~ **6** を経由して5段階で化合物 **7** を得た。そこから1, 2位をリン酸化することで5員環リン化合物 **8** を得た。次にSi置換基を除去し化合物 **9** を7段階収率2%で得た。今後水素添加反応による脱保護の検討をし、イオン交換を行うことで目的物であるイノシトールグリカン **1** の合成を完成させる。



a: NaOEt, MeOH, r.t., 10 min, then CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, DMAP, MeOH, r.t., 48h    b: TIPDSCl<sub>2</sub>, Py, 0°C, 3h, 52% (a, b 2steps)  
 c: Cl<sub>3</sub>CCN, NaH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 10 min, r.t., 3h, 78%    d: Inositol **10**, Me<sub>3</sub>SiOTf, MS4A, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -23°C, 1 h, 75%  
 e: CF<sub>3</sub>COOH, MeOH, 0°C, 2h, r.t., 2h, 25%    f: MeOP(O)Cl<sub>2</sub>, Py, Py, r.t., 3h, 83%    g: TBAF, CH<sub>3</sub>COOH, r.t., 8h, 24%

塩基性アミノ酸は通常有機溶媒に不溶であるが当モル量のポリオキサカルボン酸 (TEG 酸) を加えるとクロロホルムに可溶化しクラスターを形成すること、さらに、過剰の塩基性アミノ酸を取り込み乳化状態となることを当研究室で見いだしている。そこで、このキラルでもあるクラスターを反応場として利用した有機合成反応の開発を本研究の目的とする。この研究の一環として、クラスターに過剰の Lys を加えてアシル化を行うと、側鎖アミノ基のみ選択的アシル化され **1** が得られることを既に見いだしている。



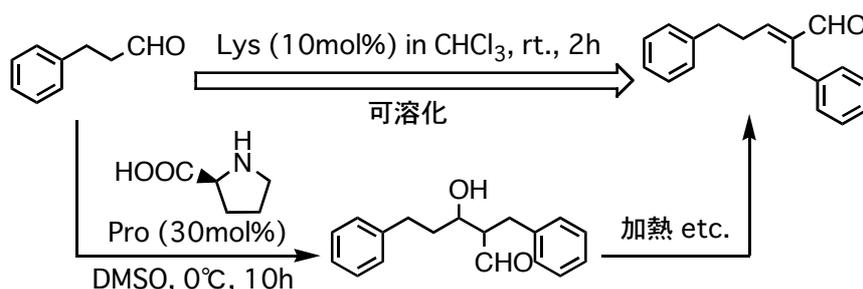
クロロホルム中の Lys/TEG 酸クラスターに 3-フェニルプロパナルを作用させ、Lys の末端アミノ基のイミノ基への変換を試みた。しかし、予期に反して **2** は全く得られず”アルドール脱水体” **3** が生成することが分かった。通常アルドール反応で脱水体を得るには加熱が必要とされているが、この系では室温という温和な条件下でも脱水体が容易に得られ、収率も高いことから有機合成反応として有用なものになると考えられる。そこで種々検討をした結果、クロロホルム中 10 mol% Lys のみで同様に反応が進行することが分かった。また、基質を 1-ヘキサナルに変えても同様に反応が進行する結果が得られている。Lys に替えて単純な 1 級アミンとしてベンジルアミンを使うと全く反応が進行しないことも分かり、Lys のもつ構造的特徴が反応の進行に反映していることが示唆された。そのため、同様の構造をもつ Orn や 2,4-DA で比較をしたところ、後者では反応が進行しなかった。これらの現象を注意深く観察すると、有機溶媒に溶けない Lys や Orn がクロロホルムに溶けていくことがわかった。一方、2,4-DA は可溶化しないことから、反応が進行しなかったと結論できる。

Catalyst	mol%	Yield, %
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ (n=4 (Lys))	10	85
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ (n=3 (Orn))	10	82
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ (n=2 (2,4-DA))	10	-
Lys/TEG酸	10/10	77
PhCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	10	-
PhCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> /AcOH	10/10	-

1-ヘキサナル脱水体 **4**  
89%

この反応の進行には触媒の可溶化が不可欠で、可溶化には炭素数が一定量以上必要であることがわかる。これらの結果から、今回のアルドール反応は Lys の特性により進行するものと考えられ、Lys で特異的に起きる現象についてさらに検討を重ねていこうと考えている。

なお、同じアミノ酸でも Pro を触媒にすると、アルドール体が得られ脱水体が生成しないことが報告されており、Lys との大きな違いにも興味もたれる。

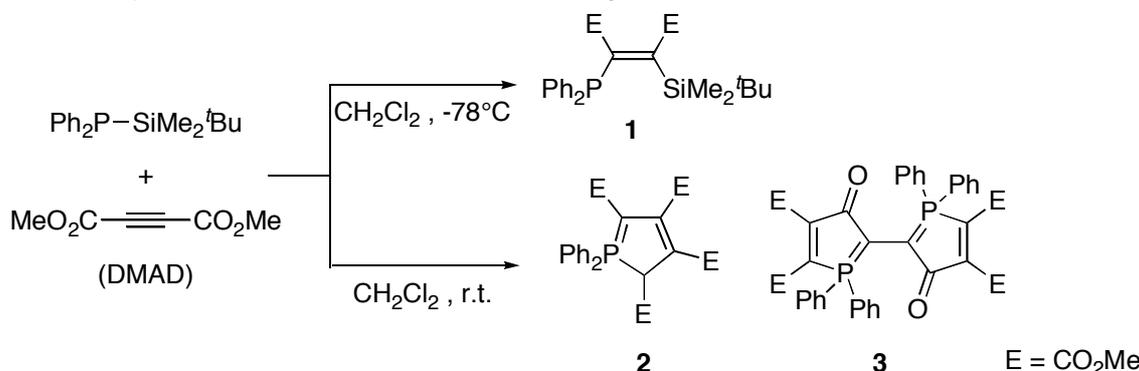


## 環状共役リンイリド化合物の合成と構造解析

(反応有機化学) 森田絵美

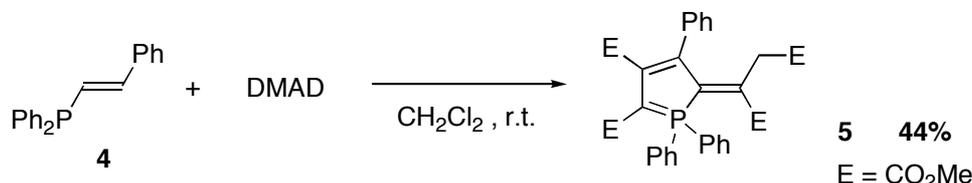
共役ヘテロ環を有する化合物は、その光特性や電子特性に由来する様々な機能発現が期待される化合物であり、窒素、酸素、硫黄、セレン等をヘテロ原子として含むヘテロ環化合物について広く研究されている。しかしながら、リン原子を含む共役ヘテロ環については3価リンを含むホスホール類がいくつか報告されているものの、5価リンイリドを含む共役ヘテロ環についてはあまり知られておらず、その性質に興味を持たれる。

当研究室では既に、低温でのシリルホスフィンへのアルキンの付加反応により、1:1付加体 **1** が得られることを報告している。また、室温ではシリルホスフィンへアルキンの多重付加が起こり、5価リンイリドを含む環状共役化合物である2*H*-ホスホール誘導体 **2** やホスファインジゴ誘導体 **3** が得られること、及びそれらの誘導体が可視領域に吸収を有し、赤〜緑に着色していることを報告している。



今回、より広く共役した化合物の合成を目的として、ホスフィン源にスチリル部を有するジフェニルスチリルホスファン **4** を用いて、アセチレンジカルボン酸ジメチル (DMAD) との反応を行なったところ、新規な青色の化合物 **5** が得られたので、その構造解析を行なった。

質量分析により、化合物 **5** は **4** と DMAD が 1 : 2 で反応したものであることがわかった。また<sup>1</sup>H-NMRからは、DMAD由来と考えられる4種のメチルエステルと、それとは別に1つのメチレン部分が存在することが確認できたが、炭素及びリンからなる骨格構造を決定するには至らなかった。また、<sup>13</sup>C-NMR及びHMBCスペクトルに関しても、決定的な情報は得られなかった。最終的に、酢酸エチル-ヘキサン系からの再結晶により良質な単結晶が得られたのでX線構造解析により **5** の構造を決定した。



上式に示すように、**5** は *exo*メチレン構造を有する5価リン原子を含む五員環構造であることがわかった。このうち、五員環、*exo*メチレン部、及び2つのエステルのカルボニル基が同一平面上にあって、共役しており、結合距離から、5位のエステルは部分的にエノラート構造になっていることがわかった。一方、期待に反し3位のフェニル基は、この平面にほぼ直交しており共役系に関与していなかった。この共役に由来する可視吸収 ( $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 7.2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) により、化合物 **5** は青色を呈することがわかった。

今後は詳細な反応機構の解明、及び類似化合物等の新規リン含有共役系化合物の合成と物性に関する検討を行なっていく予定である。

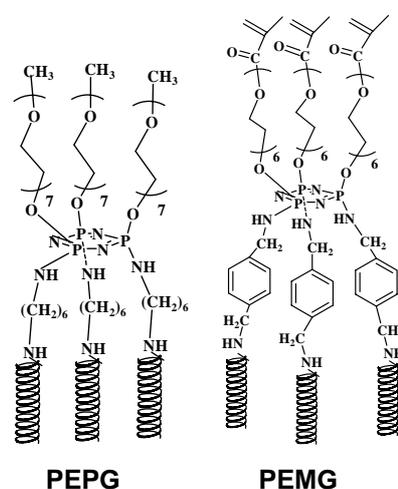


# ポリエチレングリコールメタクリレート鎖とポリグルタミン酸誘導体鎖を有するヘテロ星形ポリマーの合成

愛媛大院理工 山下洵史 愛媛大院理工・VBL 伊藤大道・井原栄治・井上賢三

【緒言】これまでにホスファゼンを核としアルキル鎖とポリグルタミン酸を有する両親媒性ポリマーを合成し、そのポリマーの二次構造の集合挙動について報告してきた。本研究では、ポリエチレングリコール(PEG)とヘキサメチレンジアミン(HMDA)またはポリエチレングリコールメタクリレート(PEGMA)とキシリレンジアミン(KDA)を3本ずつ導入した開始剤(EPA or PEMK)を用いて、Scheme 1に示すポリグルタミン酸誘導体を持つ星形ブロックポリマー(PEPG or PEMG)を合成し、得られたポリマーの二次構造の集合挙動、及びマクロマー(PEMG)の重合等について報告する。

【実験・結果・考察】開始剤は以下のように合成した。平面構造を持つホスファゼン環の一方の側(上側)の3個のP-Clを-68 でPEGMAナトリウム塩[Na(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CO-C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>]で置換し、その後下側にBocにより片側のアミンを保護したキシリレンジアミンモノBoc(KDA-monoBoc)を室温で導入した。その後脱保護を行い、末端をアミンにした開始剤(PEMK)を合成した。PEGとHMDAも同様に行い、開始剤(PEPA)を合成した。これらを用いてγ-ベンジル-L-グルタミン-N-カルボキシ無水物(BLG-NCA)の開環重合を行った。[BLG-NCA]/[PEPA]=60で重合を行ったところM<sub>n</sub>=17000、M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>=1.03の分子量分布の狭いポリマーが得られた。重合結果をTable 1と2に示す。これらのポリマーについてCD、FT-IR測定を行ったところ、CD測定より208nm、222nmに負のピークを示したことから、またFigure 1に示すFT-IR測定より1650cm<sup>-1</sup>にアミド(NHの偏角)のピーク、1540cm<sup>-1</sup>にアミド(COの伸縮)のピークが見られたことからα-ヘリックス構造をとっていることがわかった。開始剤合成と得られたポリマーの集合挙動と二次構造、及びマクロマー重合について報告する。



Scheme 1. Polymer of PEPG and PEMG

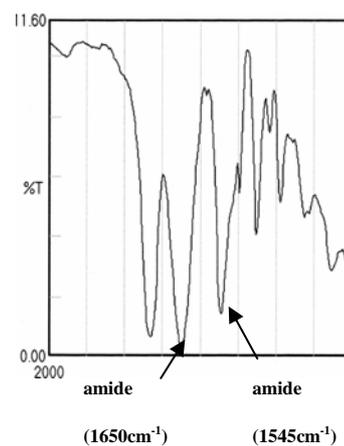


Figure 1. IR spectra of PEPG

Table 1. Synthesis of PEPG

run	[I]	[M]/[I]	conv. (%)	M <sub>n</sub> ×10 <sup>-4</sup> (NMR)	M <sub>n</sub> ×10 <sup>-4</sup> (GPC)	[M]/[I] (DP <sub>NMR</sub> ) <sup>a)</sup>	[M]/[I] (DP <sub>GPC</sub> )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	Polymer
1		45	74	1.06	1.15	43(14)	48(16)	1.04	PEPG1
2	3EPA	60	70	1.48	1.53	63(21)	63(21)	1.05	PEPG2
3		90	78	2.00	1.42 <sup>b)</sup>	87(29)	60(20)	1.10	PEPG3
4		45	70	1.27	2.28	51(17)	96(32)	1.08	PEPG4
5	7EPA	60	70	1.73	2.92	72(24)	126(42)	1.03	PEPG5
6		90	86	2.71	3.96	117(39)	174(58)	1.07	PEPG6

a) Number of γ-benzyl-L-glutamate residues per polymer chain.

b) Bimodal.

Table 2. Synthesis of PEMG

run	[I]	conv. (%)	M <sub>n</sub> ×10 <sup>-4</sup> (NMR)	M <sub>n</sub> ×10 <sup>-4</sup> (GPC)	[M]/[I] (DP <sub>NMR</sub> ) <sup>a)</sup>	[M]/[I] (DP <sub>GPC</sub> )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	-helix content (%)	Polymer
1	PEMK	69	1.48	0.87	66(22)	37(12)	1.16	78	PEMG

## ポリグルタミン酸エステルのヘリックス - コイル転移における鎖末端の効果

愛媛大院理工 畑中隆志 愛媛大院理工・VBL 伊藤大道・井原栄治・井上賢三

【緒言】ポリグルタミン酸エステルである Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) (PBLG)は溶媒組成の変化に伴って、ヘリックス - コイル転移が起こることが知られている。本研究では、PBLG の C 末端もしくは N 末端に重クロロホルム(CDCI<sub>3</sub>)中で PBLG よりも運動性の高いポリスチレン(PS)を導入したブロック共重合体を合成

し、CDCl<sub>3</sub> 中、Trifluoroacetic Acid(TFA)の添加量の変化に伴うヘリックス - コイル転移における鎖末端の効果について検討した。

【実験】 ATRP で Br 末端 PS を合成し、Gabriel法を用いて、末端を NH<sub>2</sub> 化し、これ

を開始剤として L-Glutamic Acid と Benzylalcohol からなる BLG-NCA の開環重合によって PS-*b*-PBLG を重合した。また、*t*-BuNH<sub>2</sub>を開始剤とした BLG-NCA の開環重合によって PBLG を重合し、N 末端に 2-Bromoisobutyrylbromide を導入したのち、これを開始剤として用いて ATRP により PBLG-*b*-PS を合成した。これらのポリマーのヘリックス - コイル転移挙動について、PBLG の主鎖の C <sup>$\alpha$</sup> H と NH の <sup>1</sup>H NMR スペクトルから検討した。

【結果と考察】 PS-*b*-PBLG、PBLG-*b*-PS が得られたことを <sup>1</sup>H NMR と GPC で確認した。また、CDCl<sub>3</sub> 中、TFA の添加量の変化によるヘリックス - コイル転移挙動について検討したところ、PBLG<sub>55</sub> は TFA 添加量が 8 vol % で転移が始まっており、10 vol % で転移が完了した。

PBLG<sub>55</sub>-*b*-PS<sub>160</sub> は転移に必要な TFA 濃度が低かった。PS<sub>110</sub>-*b*-PBLG<sub>59</sub> は 2 vol % で既に転移が始まっており、穏やかな転移挙動を示し、10 vol % で転移が完了した。このように、C 末端に PS を導入した PS-*b*-PBLG は N 末端に PS を導入した PBLG-*b*-PS 及び PBLG ホモポリマーに比べ低い TFA 濃度で転移が始まることがわかった。また、PBLG、PBLG-*b*-PS、PS-*b*-PBLG の helix-coil 転移における PS や PBLG の分子量依存性についても検討を行った。PBLG の分子量が小さい程低い TFA 濃度で転移が起こることが分かった。また、PBLG の分子量を固定し、PS の分子量依存性について検討を行ったところ、PS-*b*-PBLG のみ PS の分子量の大きなものがより多くのランダムコイルを示した。以上のことから C 末端と N 末端でらせんの安定性が異なることが分かった。

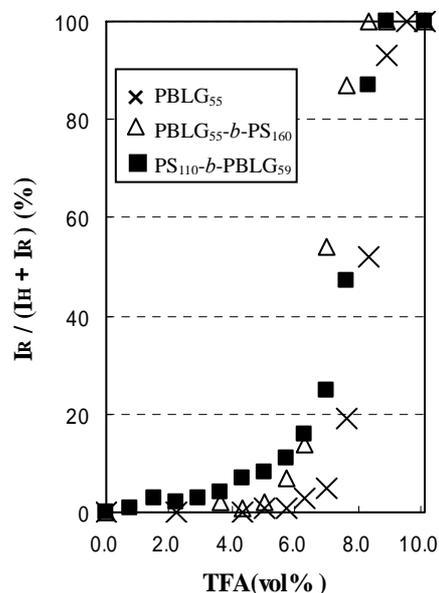
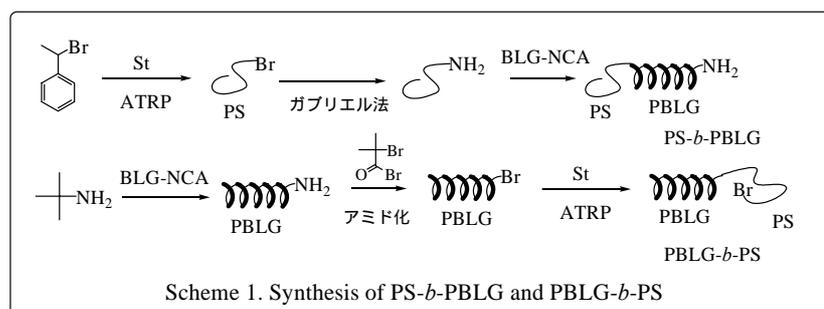


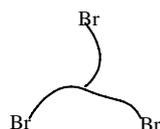
Fig 1. Ratio of random coil with addition of TFA determined from C <sup>$\alpha$</sup> H proton signals

## ポリスチレンゲルにおける架橋点間分子量の制御

愛媛大院理工 ○鄙山 鉄博 愛媛大院理工・VBL 伊藤 大道・井原 栄治・井上 賢三

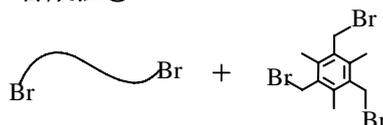
【緒言】ゲルが応用されている分野は様々だが、その網目構造が不均一であるため力学的強度が低い。その克服方法として、ATRPによって重合した高分子同士のカップリング反応を応用し、高分子ゲルの精密合成を試みた。ATRPで高分子を重合しているため架橋点間分子量が明確で、架橋点からの腕数も明確なゲルの合成が期待できる。

### 合成法①



Gelation ?

### 合成法②



Gelation ?

Scheme 1, Synthesis of Polystyrene Gels

【実験】まず、ATRPで得た末端がBr基のポリスチレン(PS-Br)を用い、Atom Transfer Radical Coupling (ATRC)の手法でカップリング反応が起こりやすい条件を検討した。

ついで、TBM-TMBとDBPXをATRPの開始剤として、2本もしくは3本腕のPS (PS-Br<sub>2</sub>, PS-Br<sub>3</sub>)をそれぞれ合成し、これに先のATRCの結果を適用することによって、実際にゲル化させることを試みた。

【結果・考察】PS-BrのATRCにおけるカップリングの進行度を、高分子量側へシフトしたGPCのピーク (Figure 1)の積分比から決定した結果、PS-Brの 10 当量のCuBrとCuを加えること 64%のカップリングを確認した。これをPS-Br<sub>3</sub>に応用し、Scheme 1 に示す方法 (合成①) でゲルを合成することに成功した。一方、両末端がBr基のPS (PS-Br<sub>2</sub>)とTBM-TMBのATRC (合成②) ではゲル化は起こらなかった。これはScheme 1 の反応と比べて素反応が多いためと、架橋点が不均一に存在しているためと考えられる。得られたゲルをアセトンで洗浄したところ、ゲルの表面側に多くのCuBrが残留していた。IRで測定した結果は、外側・内側ともに元になったPSと比較して違いがみられなかったが、反応条件の検討から、反応中の熱伝導に原因があることが示唆された。また、他の合成法によるゲル化、および架橋点間分子量の違いによる膨潤度の差をもとにゲルの構造について検討を行った。

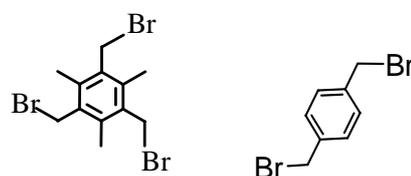


Figure 1, 1,3,5-Tris (bromomethyl)-2,4,6-trimethylbenzene (TBM-TMB) and  $\alpha, \alpha'$ -Dibromo-p-xylene (DBPX)

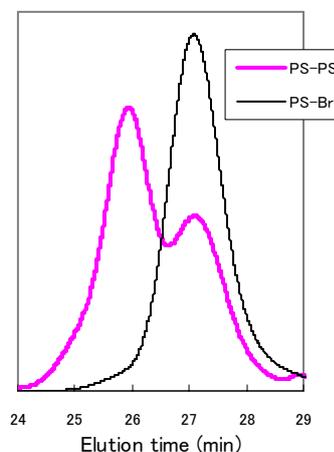


Figure 2, GPC traces of PS-Br and the coupled PS-Br (PS-PS)

Table 1, The results of synthesis

	$M_c$	ゲル化
合成法①	4000	○
	6000	○
合成法②	4000	×
	6000	×

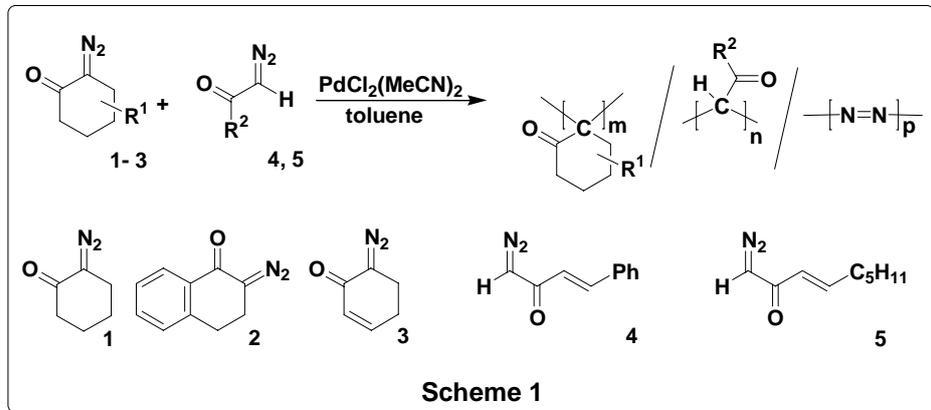
## 環状ジアゾカルボニル化合物の重合

(愛媛大工) ○平連 利光

(愛媛大工・VBL) 伊藤 大道・井原 栄治・井上 賢三

### 【 緒 言 】

PdCl<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub> を開始剤として用いた様々な環状ジアゾカルボニル化合物の重合を行い、環状構造中の炭素によって主鎖が形成された新規ポリ(置換メチレン)の合成について検討



を行った。また、これらの環状モノマーと非環状ジアゾケトンの共重合についても報告する。

【実験操作】 1 当量のPdCl<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>をトルエンに懸濁させ 100 当量のモノマーを加え、80°Cで 14 時間反応させた。得られたポリマーは全て分取GPCにより精製した。

### 【結果と考察】モノマー

1、2 の単独重合を行った結果、重合は進行せずポリマーを得ることはできなかった。そこで非環状ジアゾケトンとの共重合を試みた (Scheme 1)。モノマー 1 と 1-ジアゾ-4-フェニル-3-ブテン-2-オン 4 との共重合では仕込み比にある程度対応した組成比を持つ共重合体が得られ、仕込み比が[1] :

Table 1. Polymerization of cyclic diazocarbonyl compounds

run	monomer (M1)	monomer (M2)	[M1] : [M2]	yield (%)	<i>M<sub>n</sub></i>	<i>M<sub>w</sub></i> / <i>M<sub>n</sub></i>	組成比 M1 : M2 ( <sup>1</sup> H-NMR)
1	1	4	1 : 1	52.7	700	1.51	1 : 1.5
2	1	4	1 : 3	33.6	1410	1.30	1 : 4.4
3	2	5	1 : 1	34.0	1200	1.45	1 : 2.8
4	2	5	1 : 3	38.0	1920	1.54	1 : 5.5
5	3	—	—	36.4	1110	1.88	—
6	—	—	1 : 0.5	39.4	1470	1.61	1 : 0.8
7	3	5	1 : 1	26.3	1960	1.61	1 : 1.3
8	—	—	1 : 2	35.9	2410	1.55	1 : 1.9

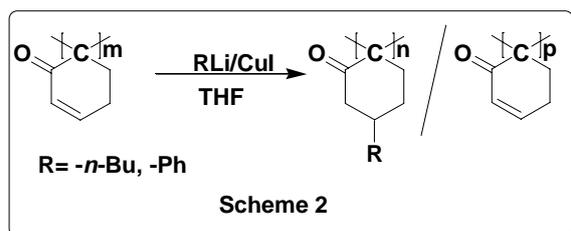
solvent=toluene(15ml); polymerization period=14h; temp.=80°C; initiator(I)=PdCl<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub> [M1+M2]/[I]=100. *M<sub>n</sub>* and *M<sub>w</sub>*/*M<sub>n</sub>* were obtained by GPC calibration using standard PMMAs in THF.

[4]=1 : 3 の重合では

*M<sub>n</sub>*=1410 の共重合体が収率=33.6%で得られた (run 2)。また、モノマー 2 と 1-ジアゾ-3-ノネン-2-オン 5 の共重合においても同様の傾向が見られ、仕込み比が[2] : [5]=1 : 3 のとき *M<sub>n</sub>*=1920 の共重合体が収率=38.0%で得られた (run 4)。

以前の研究から α, β 不飽和型のモノマーがポリ(置換メチレン)の合成においてより有効であることが分かっているため、モノマー 3 を新たに合成しその重合を行った。単独重合ではモノマー 1、2 とは異なり、*M<sub>n</sub>*=1110 のポリマーが収率=36.4%で得られた (run 5)。また、モノマー 3 と 5 の共重合を様々な仕込み比で行ったところ、組成比がほぼ仕込み比に対応する共重合体が得られ、仕込み比が[3] : [5]=1 : 2 のとき、*M<sub>n</sub>*=2410 の共重合体が収率=35.9%で得られた (run 8)。

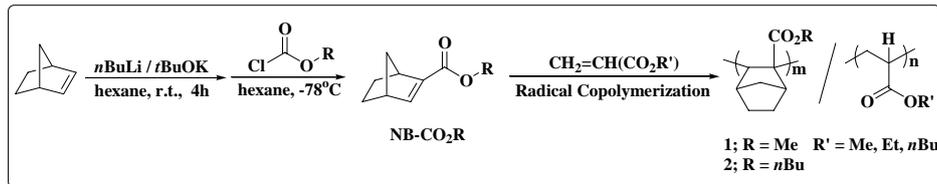
さらに、ポリ 3 のシクロヘキセノン環への各種求核剤の Michael 付加反応による置換基の導入について検討を行った。求核剤として n-BuLi や PhLi を用いた反応で主鎖のシクロヘキセノンユニットに対して 22~50%の割合で置換基が導入されたポリマーが得られた。



## 2-ノルボルネン-2-カルボン酸アルキルの合成とアルキルアクリレートとのラジカル共重合

愛媛大工<sup>1)</sup>・VBL<sup>2)</sup> ○本城慎吾<sup>1)</sup>・伊藤大道<sup>1)2)</sup>・井原栄治<sup>1)2)</sup>・井上賢三<sup>1)2)</sup>、三菱レイヨン中研 野殿光史

【緒言】一般に、ノルボルネン骨格をビニル重合でポリマーの主鎖中に導入することによって、得られるポリマーの物性の向上が期待できる。しかし、現在までノルボルネンのビニル炭素にエステル基を結合させたモノマーの重合は、我々の知る限りでは報告されていない。そこで、今回我々は 2-ノルボルネン-2-カルボン酸アルキル(NB-CO<sub>2</sub>R)の合成法を確立し、アクリレート類とのラジカル共重合を試みた。



【実験】モノマー合成：1; ヘキサン中、ノルボルネンに対して *n*-ブチルリチウム(1.10 eq.)、*t*-ブトキシカリウム(1.20 eq.)、クロロ炭酸メチル(1.30 eq.)を加えて反応させることにより、合成した(収率 45%)。2; 1 と同様の条件でクロロギ酸 *n*-ブチルを用いて反応させることにより、合成した(収率 33%)。重合条件：トルエン中、85°Cでラジカル開始剤 VAZO を用いて重合を行った。

【結果と考察】NB-CO<sub>2</sub>Rの単独重合は進行しなかったため、アクリレート類との共重合を試みた。NB-CO<sub>2</sub>Meはメタクリル酸メチルと共重合しなかったが、アクリル酸エチル(EA)、アクリル酸*n*-ブチル(*n*BA)、アクリル酸メチル(MA)とは共重合した(Table 1)。

Table 1. Radical Copolymerization of Alkyl 2-Norbornene-2-carboxylate with Alkyl Acrylate<sup>a</sup>

run	NB-CO <sub>2</sub> R (M1)	Alkyl Acrylate (M2)	feed ratio [M1]:[M2]	solvent	yield (%)	<i>M<sub>n</sub></i>	<i>M<sub>w</sub></i> / <i>M<sub>n</sub></i>	composition mol% of M1
1	1	EA	1:1	toluene	28.5	2080	1.68	24.4
2	1	EA	1:1	bulk	31.1	6000	1.82	34.5
3	1	EA	1:2	toluene	44.7	3290	1.87	15.5
4	1	EA	1:2	bulk	40.8	18680	2.09	24.4
5	1	EA	1:3	toluene	48.3	7160	1.65	11.0
6	1	EA	1:3	bulk	67.1	33290	2.45	19.4
7	1	EA	2:1	toluene	12.7	1220	1.52	37.0
8	2	EA	1:3	toluene	40.7	5260	1.82	14.7
9	2	MA	1:3	toluene	23.7	4470	1.64	13.4
10	2	<i>n</i> BA	1:3	toluene	51.4	4350	1.93	11.7

<sup>a</sup> Initiator = VAZO; ([M1]+[M2]/[VAZO]) = 200; solvent = 5 mL; polymerization period = 13.5 h; polymerization temperature = 85 °C. <sup>b</sup> *M<sub>n</sub>* and *M<sub>w</sub>*/*M<sub>n</sub>* were obtained by GPC calibration using standard PMMAs in THF solution.

NB-CO<sub>2</sub>Meの仕込み比が増すにつれて分子量は低下したが、コポリマー中のNB-CO<sub>2</sub>Meの含有率は増大した。<sup>1</sup>H NMRスペクトルから溶媒への連鎖移動が起きていることが判明したので、バルク重合を試みた。同じ仕込み比で比較すると、バルク重合の方が分子量、NB-CO<sub>2</sub>Meの含有率共に増加した。

NB-CO<sub>2</sub>*n*Buを用いて共重合を試みてもそれぞれのアクリレートに対して、共重合体が得られた。

NB-CO<sub>2</sub>R, アルキルアクリレート, *N*-Phenylmaleimideを用いた三元共重合も進行し、仕込み比に対応した組成比のポリマーが得られた(Table 2)。

Table 2. Ternary Radical Copolymerization of Alkyl 2-Norbornene-2-carboxylate, Alkyl Acrylate, and *N*-Phenylmaleimide in Toluene<sup>a</sup>

run	(M1)	(M2)	(M3)	feed ratio [M1]:[M2]:[M3]	yield (%)	<i>M<sub>n</sub></i>	<i>M<sub>w</sub></i> / <i>M<sub>n</sub></i>	composition [M1]:[M2]:[M3]
1	1	EA	<i>N</i> -Phenylmaleimide	1:3:4	71.0	5920	1.76	1.0:1.8:2.0
2	1	EA	<i>N</i> -Phenylmaleimide	1:1:2	30.6	4100	1.61	1.0:1.0:1.4
3	2	MA	<i>N</i> -Phenylmaleimide	1:3:4	73.5	5280	1.73	1.0:2.3:2.2
4	2	MA	<i>N</i> -Phenylmaleimide	1:1:2	54.1	3170	1.85	1.0:1.3:1.8

<sup>a</sup> Initiator = VAZO; ([M1]+[M2]+[M3]/[VAZO]) = 200; toluene = 5 mL; polymerization period = 13.5 h; polymerization temperature = 85°C. <sup>b</sup> *M<sub>n</sub>* and *M<sub>w</sub>*/*M<sub>n</sub>* were obtained by GPC calibration using standard PMMAs in THF solution.

## 温度環境による tRNA 修飾酵素生産量の変動

応用生物化学 岩下 知香子

細胞内で生じた tRNA 前駆体は、転写後プロセッシングを経て成熟 tRNA になる。その中で、特定部位が修飾を受ける過程があり、作用する修飾酵素には、TrmH、TruB、TrmI、TrmFO などが存在する。塩基やリボースのメチル化や、シュードウリジン化は RNA の立体構造の安定化に寄与することが言われており、生命活動を維持するにあたって重要である。本研究室で研究が進んでいる TrmH は tRNA の 18 位の G のリボースをメチル化 (Gm18) する酵素であり、このときメチル基供与体として S-adenosyl-L-methionine が使われる。本酵素は結晶化され構造解析がなされたが、TrmH による修飾の機能は未だ不明である。

これらの RNA 修飾酵素は、細胞内でどのぐらいの量が生産され、細胞の成育フェーズや RNA 転写量、生育環境に応じて、どのように変化するのだろうか。これを調べることで、修飾酵素の必要量や、成育フェーズの意義、修飾機能の解明の手がかりになる。我々は、研究室で培養可能となった高度好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* HB8 を調査対象として用い、修飾酵素生産量の変化を Western Blotting や活性測定により追跡している。あらゆる修飾酵素について調べていく計画であり、現在、tRNA(Gm18)methyltransferase (TrmH) に関しての分析が進んだので報告する。

*Thermus thermophilus* HB8 は生育温度が 50~80°C であるため、このうち 52、67、77°C での温度条件化で培養し、成育フェーズの異なる箇所で 50 ml culture 分をサンプルとして分取した。Western Blotting では TrmH に特異的なウサギ血清由来のポリクローナル抗体と、蛍光標識された二次抗体を用いて TrmH のバンドを検出し、量を調べた。その結果、67°C culture の菌体由来の TrmH は総タンパク質の約 5000 分の 1 であることがわかった。また、酵母の tRNA 混合物を基質として <sup>14</sup>C で標識された S-adenosyl-L-methionine からのメチル基転移を測定した。これにより 77、67°C culture のサンプルで log phase において徐々に活性が下がってくる結果が得られた。この結果から log phase で TrmH 量が減っている、あるいは TrmH 以外の他のタンパク質が大量につくられていることが考えられる。TrmH を調べる上で *T.thernophilus* HB8 の TrmH 遺伝子の破壊株の培養も行なった。79、70、50°C で得られた生育曲線では、50°C の場合において、野生株との違いが見られた。このことから、TrmH による作用は低温下でより大きな影響を及ぼすと思われる。

## tRNA グアニン トランス グリコシラーゼによる DNA の塩基の交換

応用生物化学 車田光謙

[緒言] RNA 中には基本となる四種の塩基(A,U,G,C)の他に、様々な修飾塩基が存在する。tRNA 上には数多くの修飾塩基が存在し、tRNA の立体構造の安定化や翻訳時におけるコードン認識等に作用している。修飾塩基は、tRNA 上の塩基配列や立体構造を認識して作用する生合成酵素によって導入される。7-デアザグアニン骨格を持つ修飾塩基として、tRNA のアンチコードン文字目に存在するキューイン(Q)がある。このキューインは、tRNA 上で塩基の交換反応によって導入される。この交換反応を触媒する酵素が tRNA グアニン トランス グリコシラーゼ(TGT)である。

近年、Garciaらにより報告された触媒メカニズムによると、TGT は RNA のリボースの 2'位を認識していない。すなわち、DNA にも作用する潜在活性を持っているのではないかと考えられた。もし、TGT が DNA の塩基の交換反応を触媒しうる場合、TGT が tRNA 遺伝子自身に作用し、その分子進化に影響を与えてきた可能性が考えられる。そこで本研究では、TGT が DNA に対して作用するかどうかを調べることを目的とした。

[実験方法]超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* TGT-pET30a を大腸菌内で発現した。

上記発現系は大腸菌にとってきわめて負荷の大きな発現系であり、イソプロピル-1-チオ-β-ガラクトシド(IPTG)による誘導で溶菌が起こった。そこで添加する IPTG 量の最適化をはかった。その後、DE52 及び CM-Toyopearl カラムクロマトグラフィにより、TGT の精製を行った。その精製した TGT を用いて様々な tRNA 及び tDNA (*Aquifex aeolicus* tRNA<sup>Asp</sup> の配列をもつ DNA およびその改変体、全ての U を T に変えたものや G34 を I、A、C に変えたものなど)の塩基が <sup>14</sup>C-グアニンに置き換わるかどうかを検証した。

[結果と考察]大腸菌内の発現系に対して、IPTG を最終濃度 40 μM になるように加えると、溶菌することなく細胞を遠心操作で回収することができた。

リコンビナント TGT は電気泳動上でシングルバンドになるまで精製することができた。

様々な tRNA において U33G34U35 配列をもつ tRNA で <sup>14</sup>C-グアニンによる交換反応が確認できた。

また tDNA においては全ての tDNA で <sup>14</sup>C-グアニンによる交換反応が確認できた。これらの tDNA には、A34 や C34 を持つ tDNA も含まれる。この事実は、34 位以外の位置でも塩基の交換が起こっている可能性を示唆している。今後は、どこの塩基が交換されているかを検証したい。

超好熱菌由来 tRNA (m<sup>7</sup>G46) methyltransferase は、  
コアドメインのみでメチル基転移活性を持つ

応用生物化学 富川千恵

極限環境下に生育する生物の生体内システムの研究は、生物や化学分子の進化、生命現象を理解する上で、非常に重要な位置にある。超好熱菌 *Aquifex aeolicus* は、90℃という超高温環境下でも生育可能な真正細菌であり、上記のような理由から、本菌の研究は必須であると考えている。

tRNA 修飾ヌクレオシドは、転写・翻訳効率の安定化や、tRNA の L 字型構造の維持など、重要な役割を担っていることが知られている。これまで、100 種以上の修飾ヌクレオシドが同定され、これらを合成する様々な修飾酵素が見つかっている。修飾ヌクレオシドの一つ、m<sup>7</sup>G は、全ての RNA 分子種に存在している。例えば、Cap 構造の m<sup>7</sup>G は、mRNA の安定化、mRNA のリボソームへの結合促進といった機能を担っており、生体内における RNA 修飾の重要性を明示している。

また、tRNA 中の m<sup>7</sup>G46 の修飾は、真正細菌、古細菌、真核生物に共通して見られる普遍的な修飾ヌクレオシドで、S-adenosyl-L-methionine (SAM) をメチル基供与体とし、tRNA (m<sup>7</sup>G46) methyltransferase [TrmB] によりメチル基転移がなされる。m<sup>7</sup>G46 は、C13,G22 と三塩基対合を形成しており、この修飾は、tRNA の三次元立体構造の安定化に不可欠であることが分かっている。近年、この tRNA メチル化酵素の遺伝子は、大腸菌、酵母、好熱菌、ヒトから相次いで同定され、結晶構造解析もなされた。しかしながら、詳細な触媒メカニズムの解明や、基質認識機構への構造生物学的アプローチは、未だなされていない。そこで、我々は、*Aquifex aeolicus* の TrmB と、その他の真正細菌の TrmB のアミノ酸配列の情報をもとに、保存アミノ酸の含まれていない C 末部分を欠いたドメイン部分を作成した。すると、ドメイン部分のみでも、G46 をメチル化することを確認することができた。

## tRNA (m<sup>1</sup>G37) methyltransferase (TrmD)の機能解析

応用生物化学分野 豊岡 峻

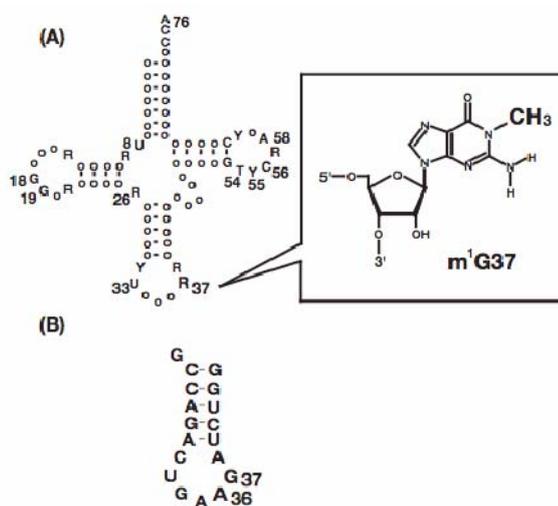
### <緒言>

近年のゲノムプロジェクトの進展により、ゲノムの配列情報から研究対象となる遺伝子のターゲットを絞ることが容易となった。そこで我々は、進化の観点から非常に興味深い生命体として、真正細菌の中で、最も初期に分岐したと考えられている超好熱菌 *Aquifex aeolicus* に着目し、その tRNA 修飾酵素の未知の機能を解明している。

tRNA の 37 位のグアニン (G37) は tRNA (m<sup>1</sup>G37) methyltransferase (TrmD)によりメチル化され、1-メチルグアニン(m<sup>1</sup>G37)へと修飾される (図 A)。本酵素の基質認識機構は、従来、大腸菌由来 TrmD についてよく研究されており、G36G37 配列が必須認識部位であった。さらに、A36G37 配列へのメチル基転移活性を持つ TrmD は真核生物と古細菌だけに存在すると考えられてきた。ところが、機能解析の結果、*Aquifex aeolicus* 由来 TrmD は、G36G37 配列のみならず A36G37 配列の G37 をもメチル化することがわかった。今回の研究成果は、本菌が真正細菌に属するにも関わらず、真核生物・古細菌型の酵素を保持することを証明するものである。現在、我々は、高温環境下で TrmD が機能するための必要な因子を模索しており、その途中経過と合わせて報告する。

### <実験方法および結果と考察>

まず、本酵素の基質特異性を網羅的に探究するために、16 種類の tRNA 転写産物を作成し、メチル化アッセイおよび反応速度分析を行った。次に、その中から酵母 tRNA<sup>Phe</sup> を選択し、修飾ヌクレオチドおよび修飾部位を質量分析によって確認した。さらに、新規の基質選択性を探るために、9 種類のミュータント tRNA を作成し、メチル化アッセイおよび反応速度分析を行った。驚くべきことに、図 B のようなアンチコドン・ステムのみの tRNA においてメチル基転移活性が得られた。この結果から、TrmD は tRNA の三次元構造に関わりなく、とくにアンチコドン・ステムの構造を認識しているのではないかということが示唆された。



(A) tRNA N1-methyl Guanine 37

(B) 酵母 tRNA<sup>Phe</sup>のアンチコドン・ステムの構造

# ホウケイ酸塩ガラスの固体 NMR と FT-IR による構造解析

(分離分析研究室) ○赤木 裕幸・山下 浩・前川 尚

**【緒言】** 本研究室ではこれまで単一のアルカリ、アルカリ土類金属酸化物を含む系について、ガラス中に  $\text{SiO}_2$ 、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{B}_2\text{O}_3$  という網目形成酸化物が共存するときのアルカリ、アルカリ土類金属酸化物との反応の優先順位について調べ、まず  $\text{Al}_2\text{O}_3$  と優先的に反応し、その後は、電気陰性度の低いものほど  $\text{B}_2\text{O}_3$  と反応し、電気陰性度の高いものほど  $\text{SiO}_2$  と反応するという結果を得た。電気陰性度が低く  $\text{B}_2\text{O}_3$  との反応性が高いと思われるアルカリ金属酸化物( $\text{Na}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{O}$ )と電気陰性度が大きく  $\text{SiO}_2$  との反応性が高いと思われる二価金属酸化物( $\text{MgO}$ 、 $\text{CaO}$ 、 $\text{SrO}$ 、 $\text{BaO}$ 、 $\text{PbO}$ 、 $\text{ZnO}$ )を含むホウケイ酸塩ガラスについて組成を変化させたとき、その構造がどのように変化するかを、 $^{11}\text{B}$  MAS-NMR 測定を行うことでガラス中のホウ素原子の 3 配位  $\text{B}(\text{Q}_3)$  と 4 配位  $\text{B}(\text{Q}_4)$  の割合を調べアルカリ金属酸化物、二価金属酸化物の反応性を比較検討した。さらに FT-IR 測定においても同様の傾向が見られるかを調べた。

**【実験方法】**  $r\text{Na}_2\text{O}$  or  $r\text{K}_2\text{O}$ - $(0.139-r)\text{MO}$ - $0.188\text{B}_2\text{O}_3$ - $0.673\text{SiO}_2$  系ガラス( $\text{M}=\text{Mg}$ 、 $\text{Ca}$ 、 $\text{Sr}$ 、 $\text{Ba}$ 、 $\text{Pb}$ 、 $\text{Zn}$ )( $r=0.139$ 、 $0.119$ 、 $0.099$ 、 $0.079$ 、 $0.059$ )を作成するため、それぞれの試料を所定の組成となるように調製し、アセトンを加えながら乳鉢で混合、均一化しアセトンを蒸発させた後、白金るつぼを用いて電気炉中で約  $1200^\circ\text{C}$  で熔融後急冷しガラスを作成した。作成したガラスはガラス粉碎器を用いて粉碎し、粉末化したものを  $^{11}\text{B}$  MAS-NMR 及び FT-IR 測定に供した。

**【結果と考察】** Fig.1 は  $r\text{Na}_2\text{O}$ - $(0.139-r)\text{MgO}$ - $0.188\text{B}_2\text{O}_3$ - $0.673\text{SiO}_2$  ガラスの  $^{11}\text{B}$  MAS-NMR 測定の結果を示している。-2ppm 付近にあるピークが 4 配位ホウ素  $\text{B}(\text{Q}_4)$  のピークを示し、その両脇の  $\pm 10\text{ppm}$  付近に広がっているブロードなピークが 3 配位ホウ素  $\text{B}(\text{Q}_3)$  のピークを示している。Fig.2 は NMR の結果から  $r$  の変化量に対する  $\text{B}(\text{Q}_3)$  の割合(%)を示したグラフである。なおグラフ内の数字は金属の電気陰性度を示している。Fig.1 と Fig.2 より  $r$  の減少つまり二価金属酸化物の増加とともに  $\text{B}(\text{Q}_3)$  が増加していることがわかる。ホウ素の配位変化に使われていない二価金属酸化物はケイ素の非架橋酸素形成に使われていると考えることができる。さらに Fig.2 より  $r$  が一定のとき二価金属酸化物の電気陰性度が高い方が  $\text{B}(\text{Q}_3)$  の割合が多いことがわかる。つまり電気陰性度が高い二価金属酸化物ほど、ホウ素の配位変化よりケイ素の非架橋酸素形成に使われると考えることができる。これらのことから電気陰性度が大きいものほど  $\text{SiO}_2$  と優先的に反応し、電気陰性度が小さいものほど  $\text{B}_2\text{O}_3$  と優先的に反応するという傾向に一致したと言える。

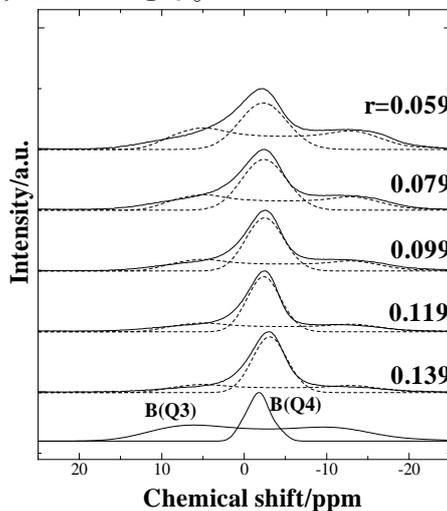


Fig.1  $^{11}\text{B}$  MAS-NMR spectra of  $r\text{Na}_2\text{O}$ - $(0.139-r)\text{MgO}$ - $0.188\text{B}_2\text{O}_3$ - $0.673\text{SiO}_2$

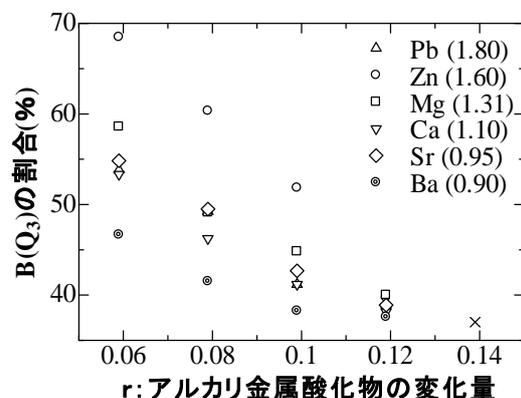


Fig.2  $r\text{Na}_2\text{O}$ - $(0.139-r)\text{MO}$ - $0.188\text{B}_2\text{O}_3$ - $0.673\text{SiO}_2$  ガラスの  $r$  の変化量に対する  $\text{B}(\text{Q}_3)$  の割合

# Fe 置換イモゴライト触媒による過酸化水素を用いた芳香族炭化水素の酸化反応

(分離分析講座) ○高田 裕・大川 政志・前川 尚・山口 力

Alの一部をFeに置換したイモゴライト( $\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )を用いて  $\text{H}_2\text{O}_2$  によるベンゼンの酸化反応を行った。PhOHのみが収率10%で生成することが分かった。さらに、 $\text{H}_2\text{O}_2$  によって PhCH<sub>3</sub>からは PhCHO とクレゾールを、PhOHからはヒドロキノンとカテコールを生成させる能力があることが分かった。

イモゴライト・ベンゼン・ $\text{H}_2\text{O}_2$

## 1. 緒言

イモゴライト( $\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )は Fig. 1 に示すような外径が2nm、内径が1nmのチューブ構造を有する<sup>1)</sup>。ゼオライトと同様に形状選択性触媒としての応用が期待されるが触媒としての研究例は少ない<sup>2)</sup>。我々はイモゴライトがアルケンのエポキシ化反応の触媒となることを見出し<sup>3)</sup>、さらにAlの一部をFeに置換した酸化作用の高いFe置換イモゴライト(IF)を合成してきた<sup>4)</sup>。近年  $\text{Fe}^{3+}/\text{Al}_2\text{O}_3$  が  $\text{C}_6\text{H}_6$  から PhOH を直接酸化する触媒として報告されている<sup>5)</sup>。そこで本研究ではIFを用いて  $\text{H}_2\text{O}_2$  による  $\text{C}_6\text{H}_6$  の酸化反応を行った。さらに官能基を持つ芳香族炭化水素の酸化反応を行い、Fe置換イモゴライト触媒の性質を検討した。

## 2. 実験

IFは0.1Mの  $\text{Na}_4\text{SiO}_4$  水溶液100mlと  $\text{AlCl}_3$  と  $\text{FeCl}_3$  の0.15Mの混合塩化物溶液100mlから合成した。出発溶液を混合攪拌し、0.1MのNaOHをpH5.5まで滴下して白濁溶液を得た。脱塩のために遠心分離を行い、前駆体と上澄み液に分けた。前駆体を脱イオン水に分散し希塩酸を加えた後、100°C、40h静置した。透析後100°Cで乾燥しIFを得た。またIFのSiをGeに置換した試料(GIF)を  $\text{GeO}_2$  を溶解したNaOH水溶液を  $\text{Na}_4\text{SiO}_4$  水溶液の代わりに用いて合成した。Feの含有量を出発塩化物溶液中の原子比  $\text{Fe}/(\text{Al}+\text{Fe})=x$  で表し、試料は  $x$  IF や  $x$  GIF と表記した。リアクタントとして  $\text{C}_6\text{H}_6$ 、PhCH<sub>3</sub>、PhCHO、PhOH、PhClを各2.0mmol使用し酸化反応を行った。 $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液(30%)を11.5mmol、溶媒として  $\text{CH}_3\text{CN}$  を10ml、触媒を0.1g使用した。反応は60°C、6h行い、生成物の定性・定量にはGC-MSを用いた。

## 3. 結果と考察

$\text{C}_6\text{H}_6$  酸化反応では無触媒では反応は進行せず、IFを用いるとPhOHのみが生成した。Fig. 2に各触媒におけるPhOH収率を示した。IFのFe含有量が増加するとPhOHの収率が増加した。 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{FeOOH}$  や前駆体を触媒とした場合には酸化反応は進行しなかった。さらに、0.05IF触媒下で酸化剤に *tert*-Butyl

hydroperoxideを用いても反応は起こらなかった。以上の結果から、イモゴライト構造と  $\text{H}_2\text{O}_2$  が  $\text{C}_6\text{H}_6$  を酸化させるのに必要であることが分かった。Ge置換型の0.05GIFを用いるとIFよりもPhOH収率が向上した。検討した全ての触媒でGC-MSではPhOH以外の生成物は検出されず、0.10GIFで最も高い収率を得た。

0.05IFを用いて官能基を持つ芳香族炭化水素の酸化反応を行った。PhOHからはカテコールとヒドロキノン、PhClからはクロロフェノールが生成し、これらのリアクタントでもベンゼン環の酸化が起こることが分かった。PhCH<sub>3</sub>からはPhCHOとクレゾール、PhCHOからは安息香酸、ヒドロキシベンズアルデヒドが生成することより、炭化水素の官能基はベンゼン環よりも酸化されやすいことが分かった。

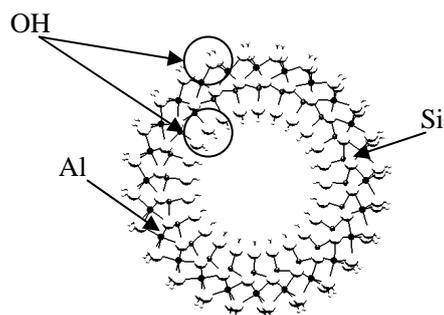


Fig. 1 イモゴライトの構造断面図

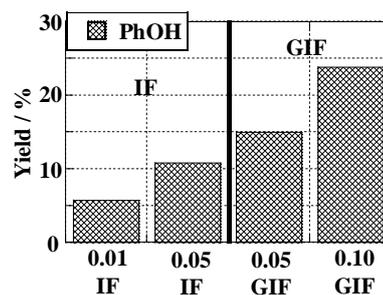


Fig. 2  $\text{C}_6\text{H}_6$  酸化反応の触媒依存性

- 1) D. P. G. Cradwick et al., Nature Phys. Sci., 240, 187 (1972).
- 2) S.Imamura et al., Ind. Eng. Chem. Res., 32, 600 (1993).
- 3) 大川ら, 粘土科学, 45, 184 (2006).
- 4) M.Ookawa et al., Clay Sci., 12, Suppl. 2, 280 (2006).
- 5) H.H.Monfared and Z.Amouei, J. Mol. Catal. A: Chem., 217, 161 (2004).

# ジルコニア担持金属硫酸塩による酸性発現

(分離分析講座) ○篠原 亮<sup>しのはら りょう</sup>・大川 政志<sup>おおかわ まさし</sup>・前川 尚<sup>まえかわ たかし</sup>・山口 力<sup>やまぐち つとむ</sup>

## 1. 諸言

硫酸処理  $ZrO_2$  は超強酸性を示すことが知られており、その酸性発現の要因は Fig.1 に示す二重結合性 S-O 結合を有する sulfato 種の存在によるとされている<sup>1)</sup>。一方本研究室では金属硫酸塩を担持した  $ZrO_2$  が酸性を発現することを見出したので、本研究では  $ZrO_2$  担持金属硫酸塩の表面種構造や酸性発現のメカニズムを探ることを目的として、IR による  $ZrO_2$  担持  $NiSO_4$  の構造解析及び  $NH_3$  吸脱着による表面種の挙動について検討した。

## 2. 実験

試料は  $NiSO_4$  を湿式混練法にて水和ジルコニアに担持させ、 $100^\circ C$ 、18h 乾燥後、 $500^\circ C$ 、3h 焼成して調製した。担持量は硫酸塩イオンを水和ジルコニア表面積  $1nm^2$  あたり X 個(X=0.1, 1, 10)とし、試料を X-NiSZ と表記する。IR 測定は、パイレックス製真空赤外セル(窓材:  $CaF_2$ )を用いて室温で行った。IR 測定の前処理として、さらに  $500^\circ C$  焼成した self-supporting wafer 状の試料をセル中で所定温度で 30min 排気を行った。 $NH_3$  吸着には、 $400^\circ C$  排気試料を用いた。室温で  $NH_3$  を吸着した後、所定の温度で 30min 排気し、室温で IR の測定を行った。

## 3. 結果と考察

Fig.2(a)に 1-NiSZ の IR の測定結果を示した。室温排気後に  $1355cm^{-1}$  と  $1287cm^{-1}$  に観測されたピークは共に  $200^\circ C$  排気後には高波数側へシフトし、より高波数側に観測されたピークの強度は相対的に増加した。排気温度の上昇に伴い、低波数側のピークは消失し、高波数側のピークはさらに高波数側へシフトし  $400^\circ C$  では  $1392cm^{-1}$  に観測された。

一般に硫酸処理  $ZrO_2$  に存在する sulfato 種(Fig.1)に由来する吸収ピークは  $1400\sim 1000cm^{-1}$  に観測され、水和状態から脱水すると高波数シフトすることが知られている。 $400^\circ C$  排気試料で観測されたこのピークは、ピーク位置や排気温度依存性から  $ZrO_2$  表面に二座配位した sulfato 種に由来すると同定される。

$400^\circ C$  排気の 10-NiSZ には、 $1377cm^{-1}$  にわずかにピークが観測されたが、より低波数側では強い吸収のためスペクトルの詳細な検討は行えなかった。

0.1-NiSZ(Fig.2(b))の場合、1-NiSZ とは異なり室温

排気試料では主に  $1334cm^{-1}$  にピークが観測された。排気温度の上昇に伴い、このピークは高波数側へシフトし  $400^\circ C$  排気では  $1369cm^{-1}$  となった。

$3600cm^{-1}$  以上の領域において  $400^\circ C$  排気した 1-NiSZ では  $3659cm^{-1}$  に、0.1-NiSZ では  $3775cm^{-1}$  と  $3659cm^{-1}$  に吸収ピークが観測された。 $ZrO_2$  では表面 OH 基に由来する 2 本の吸収ピークがこの領域に検出されるが、1-NiSZ では OH 基と硫酸イオンとのイオン交換が起こり、高波数側の OH 基が消失したと考えられる。一方、0.1-NiSZ では硫酸イオンの吸収と OH 伸縮振動が同時に観察されることから、OH 基の硫酸イオンによる置換は部分的であることがわかる。

$400^\circ C$  排気した 0.1-NiSZ に  $NH_3$  を吸着させると  $1369cm^{-1}$  のピークは  $50cm^{-1}$  程度低波数側へシフトした。排気温度を上昇させるとピーク位置は高波数側へシフトし、 $300^\circ C$  排気では吸着前と概ね同じピーク位置に吸収が現れた。アンモニアの吸脱着に伴い sulfato 種のピークがシフトすることから、この表面 sulfato 種は酸性発現と関連があることがわかる。

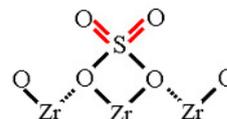


Fig.1 加熱排気後の硫酸処理  $ZrO_2$  表面の sulfato 種

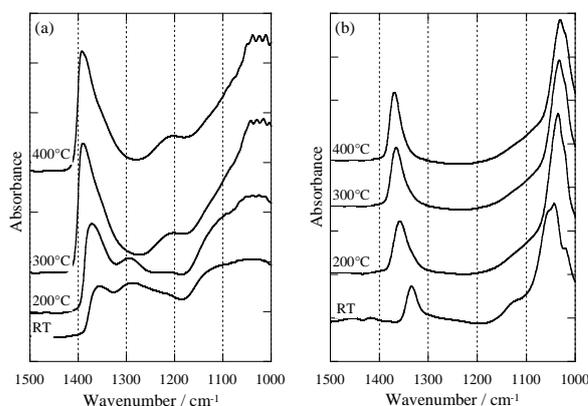


Fig.2 加熱排気に伴う (a) 1-NiSZ (b) 0.1-NiSZ の IR スペクトルの変化

1) T. Yamaguchi, Applied Catal., 63, 1(1990)

# Ge 置換型イモゴライトの合成とキャラクタリゼーション

分離分析化学分野○平尾 好宏・高田 裕・大川 政志・山下 浩・前川 尚

【緒言】イモゴライト (IM) は火山噴出物に由来する外径約 2nm、内径約 1nm のアルミノケイ酸塩ナノチューブである。その構造断面図を Fig.1 に示す。従来 IM はケイ酸イオンの重合を避けるため、約 2 mM 以下の低濃度のモノケイ酸溶液から合成されてきた。一方 Si を Ge に置換した Ge 置換型イモゴライト (G-IM) は 1.4 mM  $\text{GeCl}_4$  の低濃度溶液から合成されている。<sup>1)</sup> 近年大量合成を目的として高濃度溶液からの IM の合成法が報告された<sup>2)</sup> が G-IM の高濃度溶液からの合成は報告されていない。そこで本研究では Ge 源に  $\text{GeO}_2$  を用いた高濃度溶液からの G-IM の新規合成法について検討を行った。

【実験】出発溶液に 0.1M の  $\text{GeO}_2$  を溶解した NaOH 水溶液と 0.15M の  $\text{AlCl}_3$  水溶液をそれぞれ 100ml 用いた。混合攪拌後 NaOH 水溶液を pH5.5 まで加え、遠心分離によって脱塩した前駆体を得た。その前駆体を希塩酸に分散し 100°C、48h 熟成を行った。熟成溶液を  $\text{NH}_3$  で凝集させ遠心分離後得られたゲルを乾燥し生成物を得た。AFM、TEM、XRD、FT-IR、NMR、DTA により生成物の評価を行った。

【結果と考察】生成物の XRD パターン、IR スペクトル、DTA の結果は既報<sup>1)</sup> の結果と概ね一致した。熟成溶液の乾燥試料の AFM 写真 (Fig.2) には円柱状の物質が観測された。G-IM の TEM<sup>1)</sup> による形態と同様にこれらの物質は IM より太く短かった。さらに TEM (Fig.3) からチューブの断面と考えられる状態も観測された。以上の結果より、既報と同様の G-IM が  $\text{GeO}_2$  を用いた高濃度溶液から合成出来ることが分かった。

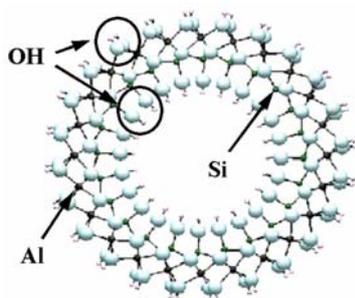


Fig.1 Cross section of the structure of IM tube

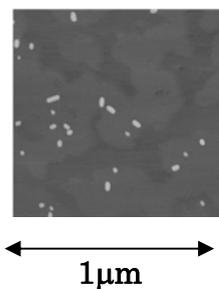


Fig.2 AFM image

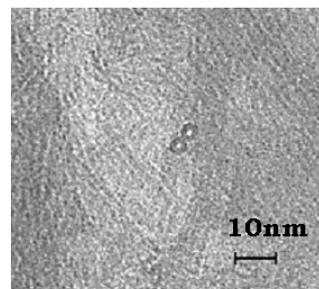


Fig.3 TEM image

【謝辞】AFM の測定に関して産業技術総合研究所の犬飼恵一博士、宮本早苗氏に感謝いたします。

## 【参考文献】

- 1) S.Wada and K.Wada, Clays Clay Miner.,30,123-128,1982
- 2) 鈴木正哉, 大橋文彦, 犬飼恵一, 前田雅喜, 渡村信治, 粘土科学, 40, 1-14, 2000

# 酸化物基板上へのプロトン導電性電解質の作製

(材料物性) ○浅本麻紀子, 山浦弘之, 八尋秀典

## Fabrication of the proton-conducting electrolyte film on oxide substrates

M. Asamoto, H. Yamaura, H. Yahiro (Ehime Univ.)

### 1. 目的

我々は以前, プロトン導電体 ( $\text{SrCe}_{0.95}\text{Yb}_{0.05}\text{O}_{3-\alpha}$ ) を利用したSOFCでPtより $\text{La}_{0.7}\text{Sr}_{0.3}\text{FeO}_{3-\alpha}$  (以後, LSF) が低いカソード過電圧を示すこと[1], LSF電極は $\text{BaCe}_{0.8}\text{Y}_{0.2}\text{O}_{3-\alpha}$  (以後, BCY) プロトン導電体でも有効であること[2]を報告した. 本研究ではLSF酸化物基板上へのBCY電解質膜の成膜条件について検討した.

### 2. 実験

固相反応によって調製したLSF粉末をディスク状(直径10 mm, 厚さ1 mm)に成型し, 1300-1400 °Cで熱処理することで酸化物基板を作製した. BCY膜は, イソプロパノールなどの溶媒中に分散させたBCY粉末を基板上にスピンのコーティングして, 1200-1300 °Cで熱処理することにより得た. 得られた膜のキャラクタリゼーションはXRD, SEMで行い, 膜の導電率は交流二端子法により測定した.

### 3. 結果と考察

LSF基板上にスピンのコーティング→熱処理(1300 °C)の操作を繰り返すことによりBCY膜を作製した. 繰り返し回数とともに膜厚はほぼ直線的に増加した(1.7  $\mu\text{m}$  (3回), 4.8  $\mu\text{m}$  (7回)). 図1に湿潤空气中, 600-800 °CでのBCY膜の導電率を示す. 繰り返し3回膜, 7回膜のいずれもBCYバルク試料と比較して導電率は大きく低下した. また, 活性化エネルギーも繰り返し回数とともに増加した(45.3  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (3回), 57.3  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (7回)). これらの結果と未同定であるがBCYに帰属されないXRDピークが出現したことを考え合わせると, 高温熱処理の繰り返しにより基板と膜の界面に新たな化合物が形成したと推定される. 次に熱処理温度を1200 °Cまで低下させて同様な方法でBCY膜を作製した. 新たな化合物の生成はXRDでは認められなかったものの, BCY粉末や多くのピンホールが存在し, 緻密な膜は得ることができなかった.

そこで, 1200 °C以下の低温熱処理温度で緻密なBCY膜を作製する方法について検討した. 粒子サイズを揃えたBCY粉末を原料にスピンのコーティング→熱処理繰り返しを行ったところ, 1200 °C熱処理で基板と膜が反応することなく, 緻密な膜が作製できた. また, 分散剤の種類についても検討したところ, イソプロパノールよりも粘性の高いエチレングリコールの方が1200 °Cの熱処理で緻密な膜が作製できることがわかった(図2).

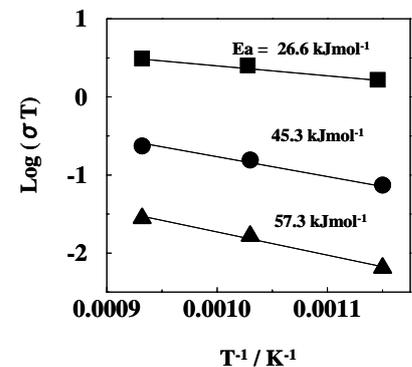


図1 BCY膜(●, 繰り返し3回; ▲, 繰り返し7回)およびBCYバルク(■)の導電率のアレニウスプロット.

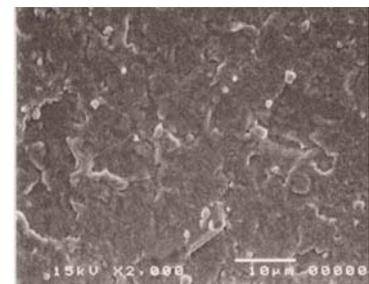


図2 分散剤としてエチレングリコールを用いて作製したBCY膜のSEM写真(表面).

[1] H. Yamaura, T. Ikuta, H. Yahiro, G. Okada, *Solid State Ionics*, 176 (2004) 269.

[2] M. Asamoto, H. Shirai, H. Yamaura, H. Yahiro, *J. Euro. Ceram. Soc.*, submitted.

# 有機金属錯体より調製したペロブスカイト型酸化物の物性と触媒活性との関連

(材料物性化学) ○岩本 侑士・山浦 弘之・八尋 秀典

有機金属錯体の焼成プロセスを変化させてペロブスカイト型酸化物 $\text{SmCoO}_3$ を調製した。XRD測定から熱分解温度 600℃でペロブスカイト型酸化物 $\text{SmCoO}_3$ に帰属可能なピークが出現した。CO酸化活性は 600℃付近の熱分解温度で最大となる山型の序列を示した。

ペロブスカイト・有機金属錯体・CO酸化

## 1. 緒言

有機金属錯体の熱分解により、1000℃以下の低い焼成温度で、蒸発乾固法に比べて、均質な部分金属イオン置換ペロブスカイト型酸化物が調製できることを報告した[1]。本研究では、焼成プロセスの検討を行い、得られたペロブスカイト型酸化物触媒の物性と触媒活性との関連について検討した。

## 2. 実験

既報[2]の方法より $\text{Sm}[\text{Co}(\text{CN})_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ を調製し、得られた錯体を空气中 500-1000℃で1時間焼成を行った。得られた酸化物触媒のキャラクタリゼーションはXRD, DRIFT-IR, BET, TG-DTA測定より行った。

CO酸化反応は、触媒 0.5 g, 流量  $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  (CO 1vol%,  $\text{O}_2$  20vol%, He バランス) の条件で行い、分析にはTCDガスクロマトグラフを用い、活性はCO転化率により評価した。

## 3. 結果と考察

図1には、調製した原料錯体 $\text{Sm}[\text{Co}(\text{CN})_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ を 500-1000℃で、熱分解して得られた試料のXRD測定結果を示す。500℃では原料錯体のピークは消失し、30°付近にブロードなピークのみが認められた。ブロードなパターンを示す試料の電子線回折像にはペロブスカイト型酸化物由来の明瞭なスポットが生じており 500℃付近から既にペロブスカイト微粒子が形成され始めていると考えられる[3]。600℃でブロードなピークは減少し、同時にペロブスカイト型酸化物 $\text{SmCoO}_3$ に帰属可能なピークが出現した。 $\text{SmCoO}_3$ の回折ピーク幅が熱分解温度の上昇とともに狭くなっていることから、結晶子の成長が 700℃以上の熱分解温度で進行していることがわかった。

これらの熱分解で得られた試料について、CO酸化活性を調べた(図2)。すべての試料においてCOは量論的に酸化されていることを確認した。500℃熱

分解試料では 100℃以下から CO 酸化活性を示し、170℃付近で転化率は 100%に達した。熱分解温度が 600℃の試料では、活性は低温側にシフトし、本研究で検討した触媒の中で最も高い活性を示した。さらに、熱分解温度を 700℃にすると活性は 500℃の試料より低下し、それ以上の温度でさらに減少した。このように、600℃で CO 酸化活性が最大となった理由は、熱分解温度が上昇することによりペロブスカイトの結晶性が増加し、活性が向上する効果とそれとは相反的に粒子成長により表面積が低下して活性が低下する効果のためであると考えられる。

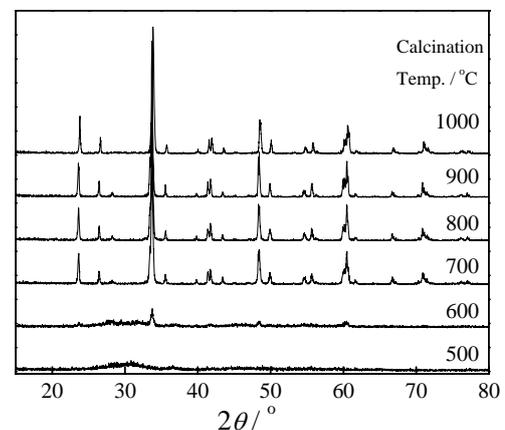


図1.  $\text{Sm}[\text{Co}(\text{CN})_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ を各温度で熱分解した試料のXRD結果

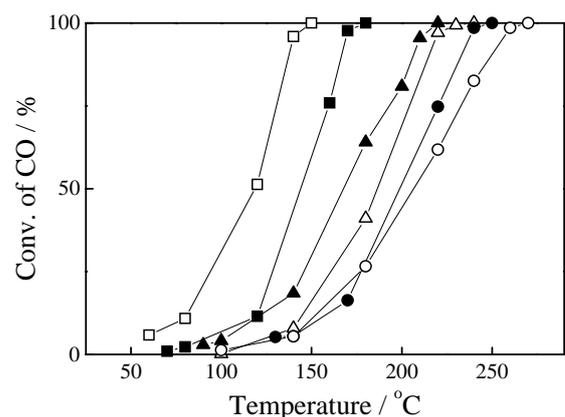


図2. 各熱分解温度で調製した試料のCO酸化反応  
■ : 500℃, □ : 600℃, ▲ : 700℃,  
○ : 800℃, △ : 900℃, ● : 1000℃

[1]岩本ら, 第97回触媒討論会討論会A 予稿集, (2006) p. 8.

[2]Y. Sadaoka et al., *J. Alloys Comp.*, 240 (1996) 51.

[3]山浦ら, 第98回触媒討論会, B 講演 1A04 (2006).

# 銅系触媒の劣化機構の検討

## - 金属銅表面積と CO シフト活性の関係 -

(材料物性化学) ○佐伯 さいき 和彦 かずひこ・山浦 やまうら 弘之 ひろゆき・八尋 やひろ 秀典 ひでのり

銅担持量が異なるアルミナ担持銅触媒の金属銅表面積をN<sub>2</sub>Oパルス法により測定し、COシフト活性との関連について検討した。高温での反応ガスの流通では金属銅表面積はほとんど変化しないが、H<sub>2</sub>O中で昇降温処理すると金属銅は不可逆的に酸化されることがわかった。

COシフト・金属銅・アルミナ・劣化

### 1. 緒言

我々は以前、アルミナ担持銅触媒がCOシフト反応に活性を示すことを報告した[1]。しかしながら、銅系触媒は昇降温を繰り返すことで劣化していくことが報告されている[2]。本研究では、アルミナ担持銅触媒を用いて、反応前後あるいは昇降温中の金属銅表面積を追跡し、各段階での触媒の劣化について検討した。

### 2. 実験

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(JRC-AL08)上にCu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>・3H<sub>2</sub>O(CuO担持量, 5-30 wt%)を含浸させ、800 °Cで8 h焼成することで触媒を得た。以後、得られた触媒をCu(x) (xはCuOの担持量)で略記する。COシフト反応は20% H<sub>2</sub>/He中、250 °C, 2 h還元処理した触媒を用いて、CO(5.4%)+H<sub>2</sub>O(21.6%)+H<sub>2</sub>(57%)+He(16%)流通下で行った(GHSV=6000h<sup>-1</sup>)。また、昇降温はCOシフト反応→50 °Cまで冷却(H<sub>2</sub>O(21.6%))→所定の温度まで昇温(H<sub>2</sub>O(21.6%))→COシフト反応の順に行った。金属銅の表面積はN<sub>2</sub>O(10%)パルス測定により求めた(100 °C)。触媒のキャラクタリゼーションとしてXRD, TPR, BET測定を行った。

### 3. 結果と考察

図1に銅担持量が異なる触媒の水素還元前後のXRD結果を示す。Cu(15)は水素還元前後でγアルミナ由来の回折ピーク以外にCuO, Cuに帰属されるピークは認められず、銅は高分散状態でアルミナ上に存在していると考えられる[1]。一方、Cu(30)で水素還元前CuO, 還元後Cuのピークが存在したことおよびスピネル型CuAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>のピークがシャープになったことから、担持量の増加により銅の凝集が進行したと考えられる。このことは、Cu(30)のTPR測定で分散した銅(158 °C)と銅クラスター(187 °C)に帰属される2つの還元ピークが認められたこと[3]や、BET表面積が低下した(Cu(15)=104 m<sup>2</sup>/g; Cu(30)=73 m<sup>2</sup>/g)ことから支持される。

図2に銅担持量の異なる触媒のCO転化率(200 °C)と金属銅表面積を示す。CO転化率は銅担持量15wt%まで増加し、それ以上では一定となった。

250 °C水素還元後の金属銅表面積の担持量依存性も同様な傾向を示したことから、本反応の活性点は金属銅であると推定できる。また、200 °C反応ガス流通、1 h後の金属銅表面積は水素還元後の金属銅表面積と概ね一致した。すなわち、200 °C反応ガス流通下では活性点はほとんど変化しない。これに対し、昇降温を行うことでCO転化率は低下した(図2)。また、金属銅表面積も同様に低下した。従って、50 °CでH<sub>2</sub>Oのみを流通させると、銅の不可逆的な酸化が進行することがわかった。

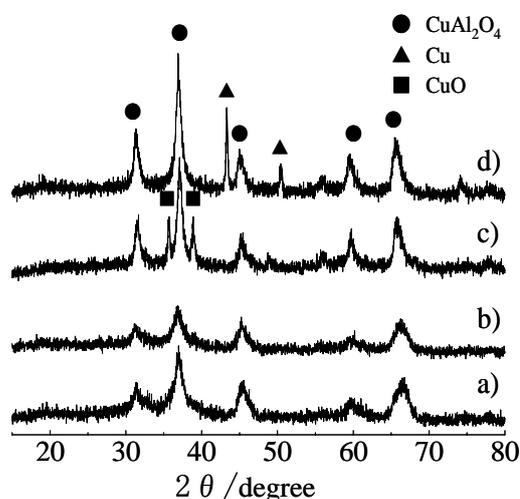


図1. (a, b)Cu(15)および(c, d)Cu(30)の250 °C水素還元前後のXRD. (a, c)還元前, (b, d)還元後.

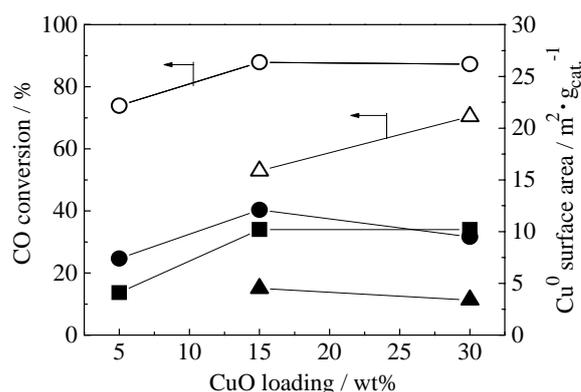


図2. (○, △)CO転化率および(●, ■, ▲)金属銅表面積の銅担持量依存性. (○, ●)250 °C水素還元後, (●)200 °C, 1 h反応ガス流通後, (▲)H<sub>2</sub>O中昇降温1回後, (△)昇降温3回繰り返した後.

[1] H. Yahiro et al., *Catal. Commun.* **7** (2006) 228.

[2] Y. Sato et al., *Catal. Commun.* **7** (2006) 91.

[3] W. P. Dow et al., *J. Catal.* **160** (1996) 155.

# 一酸化炭素シフト用銅アルミナ触媒の銅の状態解明

(材料物性化学)○山本哲也・山浦弘之・八尋秀典

## 1. 緒言

一酸化炭素シフト反応( $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ )は水素製造触媒プロセスには必要な反応である。これまでに、Cu-ZnO系酸化物触媒が本反応に活性を示すことが報告されている[1]。これに対し、我々はアルミナ担持銅 ( $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 触媒の活性について検討してきた[2]。本研究では、 $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 触媒上の銅の状態をXRD, TPR,  $\text{N}_2\text{O}$ パルス法などにより評価し、活性との関係について検討した。

## 2. 実験

$\text{Al}_2\text{O}_3$ (JRC-ALO8)上に所定量の $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ を含浸後、773-1173 Kで8時間焼成して $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 触媒を得た。以後、触媒はCu(担持量)/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ [焼成温度]で略記する。反応前に前処理として20% $\text{H}_2/\text{He}$ 中、523 K, 2 hで触媒を還元した。反応は固定床流通式反応装置を用い、 $\text{CO}(5.4\%) + \text{H}_2\text{O}(21.6\%) + \text{H}_2(57\%) + \text{CO}_2(16\%)$ , GHSV=5000-6000  $\text{h}^{-1}$ の条件で行った。金属銅の表面積は $\text{N}_2\text{O}$ パルス測定から求めた(373 K)。その他の触媒のキャラクタリゼーションとしてXRD, TPR, BET測定を行った。

## 3. 結果と考察

触媒の還元挙動を調べるために、TPR測定を行った。TPR測定において、低温側(473-523K)にCuOの還元由来のピークと高温側(623-673K)にスピネル型 $\text{CuAl}_2\text{O}_4$ の還元由来のピークが観察された。表1に各触媒のTPR測定によって得られたCuOと $\text{CuAl}_2\text{O}_4$ の存在割合をまとめた。焼成温度773 KではCuOが主である、焼成温度の増加とともにCuOは減少して、 $\text{CuAl}_2\text{O}_4$ が生成した。1073 Kで焼成した触媒では、CuOに帰属されるXRDパターンが認められないことから、この触媒ではCuOが触媒上に高分散していると推定できる。一方、1173 Kで焼成した触媒では、 $\alpha$ -アルミナに帰属可能なXRDパターンが認められ、1173 Kでアルミナ担体が $\gamma \rightarrow \alpha$ 相に変化することがわかった。BET表面積の大幅な低下はこの相変化によるものであると考えられる。

担持量が異なる $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 触媒(1073 K焼成)のTPR測定結果を比較した(表1)。Cu担持量の増加に伴い、 $\text{CuAl}_2\text{O}_4$ の割合が増加することがわかった。また、Cu担持量30wt%の触媒では、 $\text{CuAl}_2\text{O}_4$ のXRDパターンが確認されるとともに、CuOのXRDパターンの各ピークは先鋭化し

た。このことから、担持量の増加により銅の凝集も進行したと考えられる。

図1に本研究で用いた種々の触媒について $\text{N}_2\text{O}$ パルス測定から求めた金属銅表面積と473 KのCOシフト活性との関係を示す。CO転化率は金属銅表面積の増加とともにほぼ直線的に増加することがわかった。この結果から、本触媒の活性点は金属銅であると推定される。

表1 各触媒のBET表面積とTPR測定より見積ったCuO,  $\text{CuAl}_2\text{O}_4$ の割合

触媒	BET 表面積 ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )	TPR より求めた割合	
		CuO	$\text{CuAl}_2\text{O}_4$
Cu(15)/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ [773]	163	100	0
Cu(15)/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ [973]	137	92	8
Cu(15)/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ [1073]	115	70	30
Cu(15)/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ [1173]	18	19	81
Cu(5)/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ [1073]	137	100	0
Cu(30)/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ [1073]	73	43	57

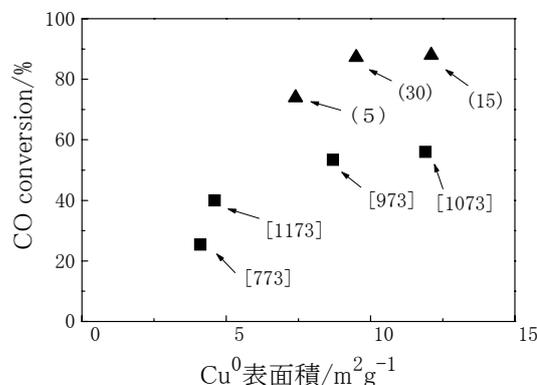


図1 CO転化率(測定温度473K)と $\text{Cu}^0$ 表面積との関係  
▲(担持量 / wt%) ■[焼成温度 / K]

謝辞

本研究は(独)新エネルギー産業技術総合開発機構(NEDO)の援助により行われた。

[1]Y.Tanaka et al., *Appl. Catal. A*, 238(2003) 11.

[2]H.Yahiro et al., *Catal. Commun.* 7(2006) 228.

# 担癌マウスにおける Span80 ベシクルの血管透過現象

(生体環境機能工学) 重川 庸介<sup>a</sup>・宮崎 龍彦<sup>b</sup>・増田 晴造<sup>c</sup>・秋山 浩一<sup>c</sup>  
菅原 卓也<sup>d</sup>・藤原 隆<sup>c</sup>・能勢 真人<sup>b</sup>・加藤 敬一

<sup>a</sup>愛媛大院理工,<sup>b</sup>愛媛大医,<sup>c</sup>愛媛大総科研支援,<sup>d</sup>愛媛大農

## 1. 緒言

筆者らは、がん治療のための DDS への利用を目指して、非イオン性界面活性剤 Sorbitan Monooleate (Span80) を主成分とする界面活性剤ベシクル(Spanベシクル)の研究を行ってきた。これまでの研究で、がん細胞(特に大腸がん細胞)に対してアポトーシス誘導機能をもった海藻由来レクチン ESA を固定化したベシクルが、マウスに移植した大腸がん腫瘍の増殖を抑制させることを明らかにした。ESA 固定化ベシクルが投与されてから抗腫瘍効果を発現するには、血管内から腫瘍組織へ移動する必要がある。これは、ドラッグキャリアとしてベシクルを応用するという点において最も重要である。本研究では *in vitro* で、その透過に関するベシクルのサイズの影響を検討した。さらに、マウスを使った *in vivo* 実験で、ベシクルの血管壁透過による癌組織への蓄積を検討した。

## 2. 実験方法

**2.1 生体投与用のベシクル調製:** ベシクルの主成分として、Span80 264mg とレシチン 24mg とコレステロール 12mg を用いた。ベシクルは蛍光試薬である 5,6-carboxyfluorescein (CF) を内包させた CF 内包ベシクル(CF-V)、または、FITC を内包させた ESA 固定化 PEG 修飾ベシクル(FITC-EPV)を二段階乳化法により調製した。調製されたベシクルは、Extruder (0.1  $\mu$ m PC 膜)で処理するか、または遠心処理(50000rpm, 10min)を二回繰り返した。これにより得られるベシクルの平均粒径は、それぞれ 100nm、500nm 程度であった。

**2.2 粒径変化によるベシクルと親和性と血管透過性への影響:** 平均粒径 100nm、500nm の CF-V を、血管内皮細胞 HUVEC に 1 時間インキュベートした。その後、HUVEC を回収して、ベシクルと血管内皮細胞との親和性はフローサイトメトリー(FACS)により評価した。透過性は血管壁モデル(図 1 [B])を使用し、透過されるベシクルに内包された CF の蛍光量により評価した。

**2.3 ESA 固定化 PEG 修飾ベシクルを用いた動物実験:** 動物実験モデル用のベシクルとして、FITC 内包した ESA 固定化 PEG 修飾ベシクルを用いた。このベシクルを、大腸がん細胞 Colon26 担がんマウス(Balb/CByj)に投与した。投与 3.5、6、24 時間後に、マウスの腫瘍を切除し、切片を作成した。この切片を Propidium iodide (PI) で細胞核を染色し、FITC と PI の蛍光により蛍光顕微鏡観察を行なった。

## 3. 結果と考察

**3.1 フローサイトメトリーによるベシクルと血管内皮細胞との親和性の評価:** 二つの粒径(100nm と 500nm)でベシクルと血管内皮細胞の相互作用を評価した。100nm の CF-V は、Control、CF-V 500nm に比べて高い蛍光量が確認された。ゆえに、小粒径のベシクルは、血管内皮細胞に取り込まれることが示唆された。

**3.2 血管壁モデルにおけるベシクルの粒径と透過性:** 平均粒径 100nm と 500nm のベシクルの血管壁モデルにおける透過性を図 1 に示した。結果として、より小粒径のベシクルが、高い透過性を持つことが明らかとなった。これは血管内皮細胞間の間隙を、より小さい粒径をもつベシクルが透過しやすいことを示唆している。

**3.3 生体内におけるベシクルの血管壁透過と腫瘍細胞への取り込み:** FITC 内包 ESA 固定化 PEG 修飾ベシクル投与後のマウス腫瘍切片において、血管付近の腫瘍細胞で FITC の蛍光が観察された(詳細は発表時に譲る)。

これらの結果より、Span ベシクルの血管壁透過現象は、粒径により変化し、*in vivo* において、そのベシクルが血管壁を透過し腫瘍へ到達していることが明らかとなった。

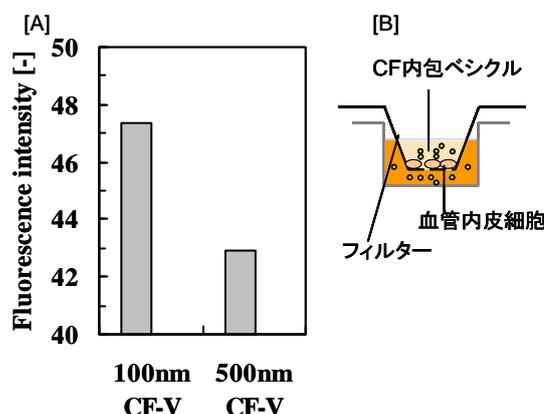


図 1 ベシクルの血管壁透過性 [A] と血管壁モデル[B]

### 参考文献

- 1) T. Sugahara et. al., *Cytotechnology*, **36**, 93-99, (2002)
- 2) K.Kato et al *Animal Cell Technology: Animal Cell Technology, Products from Cells, Cells as Products*, Kluwer Academic Publishers, 433-435(1999)

\*Keiichi Kato Dept of Applied Chem, Ehime Univ, Bunkyo chou 3, Matsuyama, Ehime, 790-8577 TEL and FAX: 089(927)9928  
E-mail: [kato@eng.ehime-u.ac.jp](mailto:kato@eng.ehime-u.ac.jp)

# 癌特異標的攻撃機能を有する新規なレクチン ESA 固定化ベシクルの創製と機能 -ヒト大腸癌治療の実用化を目指して-

(生体環境機能工学) ○福田祐介<sup>a</sup>、菅原卓也<sup>b</sup>、藤原隆<sup>c</sup>、増田晴造<sup>c</sup>、秋山浩一<sup>c</sup>、立石憲彦<sup>d</sup>、

鈴木洋司<sup>d</sup>、宮崎龍彦<sup>d</sup>、川久保明宏<sup>e</sup>、加藤敬一<sup>a</sup>

(<sup>a</sup>愛媛大院・理工、<sup>b</sup>愛媛大・農、<sup>c</sup>愛媛大・総研支援、<sup>d</sup>愛媛大・医、<sup>e</sup>ヤマキ(株))

## 1. 緒言

筆者らはこれまでの研究で、海藻由来の新規レクチン ESA が癌細胞の異常糖鎖構造を認識して特異的に結合し、アポトーシスによる癌細胞死を誘導することを明らかにしてきた。一方、非イオン性界面活性剤 Span80 を主成分とするベシクルにこの ESA を固定化した、いわゆる ESA ベシクルの調製に成功した。ヒト大腸癌細胞 Colo201 を皮下注射して育種した担癌ヌードマウスに、上記の ESA ベシクル、あるいはその ESA ベシクル中に抗癌剤を内包させたベシクルを血中投与する動物実験を行い、これらのベシクルの DDS における腫瘍増殖抑制効果を明らかにしてきた。

本研究ではヒト大腸癌治療の臨床応用を視野に入れて、これらのベシクル投与による腫瘍増殖抑制効果と免疫システムとの関わりを調べるため、免疫機能を有するマウスを用いた。このマウスに、マウス大腸癌細胞株 Colon26 を移植して育種した担癌マウスに対する上記の ESA ベシクルの腫瘍増殖抑制効果を検討した。

## 2. 実験・方法

**2.1 ESA, ESAベシクルの制癌効果 (in vitro) :** マウス大腸癌細胞 Colon26 に対して、①PBS (Control)、②ESA、③Spanベシクルを添加し、トリパンブルーによって死細胞を染色し、細胞の生存率を測定した。またCaspase-3 活性の測定・DNAラダー検出・蛍光顕微鏡観察等により、細胞死の検討を行なった。**2.2 ESAベシクルの制癌効果 (in vivo) :** Colon26 担癌BALB/cマウスを育種した後、尾静脈より①PBS (Control)、②ESA、③PV (PEG修飾ベシクル)、④EPV (ESAをPVに固定化)、⑤EEPV (ESAをEPV内に内包) を3日ごとに計15日間投与して腫瘍体積・体重を測定した。マウス匹数は基本的に6-10匹とした。**2.3 抗癌剤の内包効果 (in vivo) :** 上記2.2の場合と同様に尾静脈より①PBS (Control)、②TXT (市販の抗癌剤タキソテール)、③EPV、④ETPV (EPVにTXTを内包) を3日ごとに計15日間投与して腫瘍体積・体重を測定した。またマウスの腫瘍を回収し、TUNEL法により皮下腫瘍中での細胞死の検討を行なった。

## 3. 結果と考察

**3.1 フリーESA, ESAベシクルのColon26細胞に対する制癌効果 (in vitro) :** ESAは0.1mg/mlの時48時間で約80%、Spanベシクルは濁度2.0の時48時間で約90%細胞の増殖を阻害していることがわかった。また阻害されたColon26細胞はアポトーシ

ス死が誘導される事が明らかになった。**3.2 ESAベシクルの担癌マウスに対する制癌効果 (in vivo) :** PV、EPV、EEPV、ESAの順に抗腫瘍効果が増し、ESA投与群の腫瘍体積増加はコントロール群に対して顕著に抑制された。また投与開始6日目以降、腫瘍体積増殖抑制効果には有意差が認められた。**3.3 抗癌剤内包ESAベシクルの制癌効果 (in vivo) :** 図1にEPV、TXT、ETPVの投与による腫瘍体積変化を示した。それらのサンプル投与の順に腫瘍増殖抑制効果が増大し、ETPV投与群の腫瘍体積増加はほぼ完全に抑制された。なお、コントロール群とETPV投与群では、投与開始9日目以降、腫瘍体積に有意差が認められた。さらに、ESAベシクルを投与された担癌マウスの腫瘍切片をTUNEL法により観察した結果、ベシクルが腫瘍部に到達し、その腫瘍でアポトーシスが誘導されていることが明らかになった。

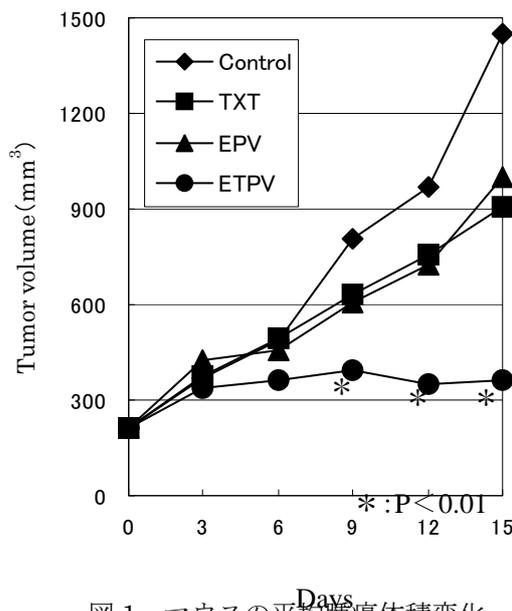


図1 マウスの平均腫瘍体積変化

### 【参考文献】

- 1) Keiichi Kato, Yousuke Omokawa, Koichi Akiyama, Takuya Sugahara, Akihiro Kawakubo and Toshiaki Saeki : Anti-cancer effect to colon cancer in either *in vitro* or *in vivo* using lipid vesicle combined with alga lecithin ESA, *Proc. of the 10<sup>th</sup> Asian Pacific Confederation of Chem. Eng. (APCCChE), J-STAGE, Vol.2004, pp500 (2004)*
- 2) Keiichi Kato, Takuya Sugahara, Koichi Akiyama, Yousuke Omokawa, Norihiko Tateishi and Motomich Sato : New Preparation of the Surface-Modified Lipid Vesicle Targeting to a Cancer Cell and the Vesicle Function, *Proc. of the First International Congress on Biop-Nanointerface (ICBN), 201 (2003)*

\* Keiichi kato Dept of Applied Chem, Ehime Univ, Bunkyo chou  
3, Matsuyama, Ehime, 790-0826, TEL and FAX: 089(927)9928 E-mail  
kato@eng.ehime-u.ac.jp

# 非イオン性界面活性剤 Span80 ベシクルの構造とその特性

(生体環境機能工学) 石原竹比虎<sup>a</sup>・加藤敬一<sup>a,\*</sup>・Peter Walde<sup>b</sup>・小稻則夫<sup>a</sup>

市川創作<sup>c</sup>・辻井哲也<sup>d</sup>・長濱亮<sup>a</sup>・黒岩崇<sup>c</sup>

<sup>a</sup>愛媛大工, <sup>b</sup>ETH, <sup>c</sup>筑波大院生環, <sup>d</sup>パーキンエルマー・ジャパン

## 1. 緒言

筆者らは、非イオン性界面活性剤 Span80 を主成分とした Span80 ベシクルの、ドラッグキャリアーへの利用を目指した DDS(Drug Delivery System)研究を行ってきた。これまでの研究で、市販の Span80 は 1~4 本アルキル鎖を有するエステル分子異性体の混合物からなること、また、その Span80 から二段階乳化法により調製した Span80 ベシクルは、均一系 Span80 の組成と大きく異なり、2 本アルキル鎖を有するジエステル分子が主成分となることを、これまでの研究で明らかにしてきた。本研究では、市販の Span80 から各エステル成分をカラムにより分取し、その分取成分によるベシクル再構成を試みた。さらに、従来 DDS でよく使用される天然リン脂質リポソームと、この Span80 ベシクルとの特性を比較して、ベシクルの安定性・電顕写真・相転移温度などを評価した。

## 2. 実験方法

**2.1 Span80 ベシクル調製法**：Tween80 水溶液を分散剤とした二段階乳化法で調製し、内水には純水を用いた。また、生成率測定用には Brilliant Blue FCF と 5(6)-Carboxyfluorescein を、粒径安定性測定用には PBS と生理食塩水を内包させた。

**2.2 天然リン脂質リポソームの調製**：天然リン脂質の POPC、DOPC、DPPC を用いて、凍結融解法と逆相蒸発法によりリポソームを調製した。

**2.3 ベシクル粒径制御法**：Extruder法で粒径 100nm 付近のベシクルを、ミリポアメンブラン濾過法で粒径 1 $\mu$ m 付近のベシクルを分画した。

**2.4 ベシクル組成比測定**：前処理したベシクルから得られた HPLC チャートのピーク面積と、各エステルの吸光感度ファクターを用いて算出した。

**2.5 Span80 成分の分取**：15 $\times$ 500mm カラム (Develosil LopODS 90g, 70%IPA) を用いて分取し、HPLC で確認を行い、溶媒を除去した。

**2.6 ベシクル再構成**：ベシクル調製の出発原料として、(1)オープンカラムで分取した 1~4 本アルキル鎖の 4 種のエステル異性体を、所定のモル混合比 (Mono=30.4%, Di=49.8%, Tri=13.4%, Tetra=6.4% (平均粒径 150nm のベシクルで得られた組成比)) で混合した場合、及び (2) 2 本鎖エステルのみで調製した場合で調製した。調製法は超音波攪拌法と二段階乳化法の二種類による。

**2.7 ベシクルの各特性の測定**：粒径の測定には動的光散乱法 (DLS: DLS-6000EW, 大塚電子) を用い、また、相転移温度の測定には示差走査熱量測定 (DSC: Pyris1, PerkinElmer) を用いた。さらに、ベシクルを電子顕微鏡で観察した。

## 3. 結果と考察

**3.1 Span80 ベシクルの粒径と組成**：**3.3.1 粒径制御**；二段階乳化法により調製したベシクル (ノーマルベシクル (NV), 平均粒径 260 $\pm$ 62nm) を、孔径 0.1 $\mu$ m の Extruder法により、平均粒径 161 $\pm$ 12nm の小粒径ベシクル (SV) を得た。また、Freeze fracture method によるベシクルの TEM 写真の撮影を行い、粒径が約 50~400nm の多数のベシクル形成を確認した (図 1)。さらに、孔径 5 $\mu$ m のミリポアメンブラン濾過によって、平均粒径 1.18 $\pm$ 0.56 $\mu$ m の大粒径ベシクル (GV) を得た。

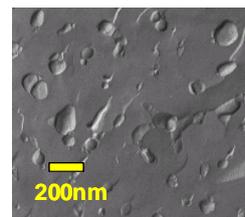


図 1. Span80 ベシクルの TEM 写真; Freeze fracture method

**3.3.2 粒径と組成**；表 1 に市販の均一系 Span80、及び上記の粒径の異なるベシクルのエステル異性体のモル組成を示した。表に示すように、その組成は粒径によって変化した。これは、Span80 ベシクル膜構造のエステル組成が、ベシクルの粒径により決定し、熱力学的最密充填によるエステル分子配列で安定化した膜構造をとるためと考えられる。

**3.2 分取エステル異性体によるベシクル再構成**：実験方法 2.5 で述べた方法で調製されたベシクルは、その生成率から、超音波攪拌法と二段階乳化法いずれの調製法に於いてもベシクルの再構成を確認した。また、2 本鎖によるベシクルの粒径が大きくなる (約 300~500nm) 傾向を示した。

**3.3 ベシクルと天然リン脂質リポソームの特性比較**：**3.3.1 粒径安定性**；粒径変化に基づく安定性を検討した結果、42 $^{\circ}$ C 下で静置した Span80 ベシクルの粒径が増大し、膜融合を起こしていることが示唆された。**3.3.2 相転移温度**；Span80 ベシクルの相転移温度は、詳細な測定により -40 $^{\circ}$ C 付近に観察され、これは一般的なリポソーム (POPC, DOPC, DPPC) の相転移温度よりも非常に低い値で、ベシクルの高い流動性を説明するものと言える。

表 1. ベシクル粒径によるエステル異性体の組成変化

サンプル	平均粒径[nm]	エステル組成比[%]			
		Mono-	Di-	Tri-	Tetra-
Span80(n=5)	—	11.4 $\pm$ 1.3	62.6 $\pm$ 0.8	17.5 $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 0.4
SV(n=4)	161 $\pm$ 12	2.0 $\pm$ 0.6	53.7 $\pm$ 1.1	26.7 $\pm$ 0.8	17.6 $\pm$ 0.7
NV(n=8)	260 $\pm$ 62	8 $\pm$ 4.6	61.5 $\pm$ 2.7	22.1 $\pm$ 3.0	8.4 $\pm$ 4.4
GV(n=2)	1177 $\pm$ 565	49.3 $\pm$ 11.5	33.2 $\pm$ 9.7	12.2 $\pm$ 3.7	5.4 $\pm$ 1.9

### 【参考文献】

1) Kato, K., Walde, P., Koine, N., Imai, Y., Akiyama, K. and Sugahara, T., Preparation and characterization of non-ionic vesicles containing Span 80 or Span 85, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 27(8), (2006), in press

\*Keiichi Kato Dept of Applied Chem, Ehime Univ, Bunkyo cho 3, Matsuyama, Ehime, 790-8577 TEL and FAX: 089(927)9928 E-mail: kato@eng.ehime-u.ac.jp

# ヒト大腸癌の初期治療に利用する抗癌剤内包 Span80 ベシクルのマウス投与効果

(生体環境機能工学) 山本潤一<sup>a</sup>・菅原卓也<sup>b</sup>・秋山浩一<sup>c</sup>・増田晴造<sup>c</sup>・宮崎龍彦<sup>d</sup>・  
川久保明宏<sup>e</sup>・青儀健二郎<sup>f</sup>・加藤敬一<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>愛媛大工,<sup>b</sup>愛媛大農,<sup>c</sup>愛媛大総研支援,<sup>d</sup>愛媛大医,<sup>e</sup>ヤマキ(株),<sup>f</sup>四国がんセンター

## 1. 緒言

海藻由来の新規なレクチンESAは大腸癌細胞表面の異常糖鎖構造に対する特異認識物質であり、さらにその癌細胞のアポトーシスを誘引することを、これまでの我々の研究で明らかにしてきた。<sup>1)</sup> このESAを、Span80を主成分とするベシクルに固定化し、更にそのベシクル内部にもESAや抗癌剤であるタキソテール(TXT)を内包させ、癌細胞標的ドラッグキャリアーとして利用した。<sup>2)</sup> 癌治療において早期治療が重要であることは周知のとおりである。そこで、本研究では癌初期治療を視野に入れて、マウス大腸癌細胞 Colon26 を移植した担癌マウスの腫瘍の発現が未だ目視では確認出来ないような癌細胞移植直後において上記のベシクルを担癌マウスに投与して、制癌効果を検討した。また、その投与時に発現するESA特異抗体の量と影響についても検討を加えた。

## 2. 実験方法

**2.1 マウス投与ベシクルの調製**：今回主に使用したベシクルは、ESA固定化タキソテール内包PEG脂質修飾ベシクル(ETPV)で、調製は二段階乳化法で行い、Extruder法によりベシクル粒径を均一化した。このベシクルを動的光散乱法(DLS-6000EW)により測定した(p. d. 7. 584 × 10<sup>-2</sup>)。その結果、ベシクル粒径は 100 ± 10nm となった(25°C・3回測定)。投与ベシクルの濃度(個数基準)は、約 1.86 × 10<sup>9</sup> 個/μl (vesicle suspension: vesi.) であり、ESA濃度は 2.0mg/ml・vesiで、タキソテール濃度を 400 μg/ml・vesiに調整した。

**2.2 動物実験でのESA特異抗体量の測定**：上記のベシクルを担癌マウスの尾静脈より投与して動物実験を行った。その投与実験において発現するESA特異抗体の量を、PBS投与群をcontrolとして、ELISA法により、波長 415nm で測定した。

**2.3 動物実験**：マウス匹数は1群7~10匹とした。初期癌治療モデルとして、BALB/cByJJc1マウスを Colon26 移植(細胞濃度 5 × 10<sup>6</sup> cells/ml)後すぐに、尾静脈より3種のサンプル(1) ControlとしてのPBS緩衝液(2) FreeのTXT(3) ETPV(ESA濃度:2.0mg/ml、TXT濃度:400 μg/ml)を3日ごとに計27日間投与して、癌細胞に対する腫瘍形成阻害効果を評価した。また、ベシクルの粒径制御をした場合(100 ± 10nm)としない場合(300nm ± 50nm)の制癌効果の検討も行った。

## 3 結果と考察

**3.1 ESA特異抗体量の測定**：今回使用したETPVはレク

チンESAが含まれているため、そのESAに対する特異抗体が産生されてしまうと考えた。ELISA法による測定の結果、ETPVの単回投与(投与後3日)ではPBS投与群と比べて1.4倍の吸光度が観測された。また、投与2回目(投与後6日)以降は吸光度差が約2倍になった。これは、生体内でESAに対する特異抗体が産生された事を示す。ESAに対する抗体は産生されてはいるが、下記に述べるように、制癌効果は低下しなかった。この事については今後更に検討したい。

## 3.2 ベシクル投与による初期癌治療実験の評価

投与開始から27日経過する間の担癌マウスの腫瘍体積変化の結果を図1に示す。(1)この図から、ETPVが腫瘍部に届き、抗癌作用を発現していることが示唆される。(2)更に、抗癌剤の副作用による体重減少も、約40%軽減できた(結果省略)。これは抗癌剤をベシクルに内包した効果であることが示唆される。このようにESA固定化・TXT内包ベシクル(ETPV)を、初期癌の段階で投与しても、腫瘍形成を阻害することができた。(初期段階での癌治療効果の評価の詳細は発表時に譲る。)また、副作用の軽減も示唆された。以上よりESA固定化TXT内包ベシクルのDDSとしての有効性と、免疫系での効果を確認できた。

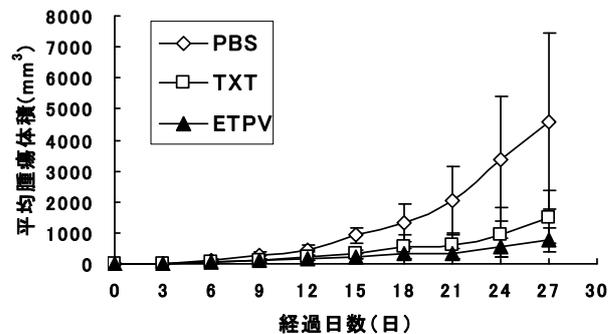


図1. 各サンプルを投与したマウス群の平均腫瘍体積変化

### 【参考文献】

- 1) T.Sugahara, K.Kato et al., "The Cytotoxic effect of Eucheuma serra agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles", Cytotechnology, 36, 93-99 (2002)
- 2) Keiichi Kato, Yousuke Omokawa, Koichi Akiyama, Takuya Sugahara, Akihiro Kawakubo and Toshiki Saeki: Anti-cancer effect to colon cancer in either vitro or vivo using lipid vesicle combined with alga lectin ESA, Proc. of the 10th Asian Pacific Confederatio of Chem. Eng. (APCCHE), J-STAGE, Vol. 2004, No. SPACE pp.500- (2004)

\* Keiichi Kato Dept. of Applied Chem. Univ., Bunkyo chou 3, Matsuyama, 790-8577 TEL&FAX 089-927-9928 E-mail kato@eng.ehime-u.ac.jp

# ヒト脳腫瘍治療をめざしたイムノベシクルの利用とその機能

(生体環境機能工学) 住吉一輝<sup>a</sup>・菅原卓也<sup>b</sup>・秋山浩一<sup>c</sup>・増田晴造<sup>c</sup>・宮崎龍彦<sup>d</sup>・藤原隆<sup>e</sup>  
青儀健二郎<sup>f</sup>・加藤敬一<sup>a</sup>

<sup>a</sup>愛媛大工,<sup>b</sup>愛媛大農,<sup>c</sup>愛媛大総研支援,<sup>d</sup>愛媛大医,<sup>e</sup>四国がんセンター

## 1. 諸言

ヒト脳腫瘍細胞は、特有の抗原である EGFR を有する。これに対する抗 EGFR 抗体をベシクル表面に固定化し、内部には抗癌剤タキソテールを内包したヒト脳腫瘍細胞標的機能を有する抗癌剤内包イムノベシクル (ITV) を調製した。<sup>1,2</sup> また、EGFR 抗原を有するマウス細胞 ERM5-1 細胞 (モデル脳腫瘍細胞) を皮下注射して担癌マウスを育種した。その担癌マウスに腫瘍の発現が目視では確認出来ないような初期段階において、上記の抗癌剤内包イムノベシクルとマウスに投与し、その制癌効果を検討した。また、血管壁の膜透過性変化に伴うベシクル効果についても検討を加えた。

## 2. 実験方法

**2.1 イムノベシクル調製:**ベシクルの内包物として抗癌剤タキソテール (TXT) を用いた。抗EGFR抗体をミサイル装置としてベシクル表面に固定化させた。一次乳化時に内包するTXTの濃度は10.0mg/ml、抗体濃度は0.692 μg/mlで調整後のベシクル懸濁液に加えた。**2.2 抗体固定化量の測定:**イムノベシクル上の抗体はELISA法で測定した。

**2.3 ProteinAの濃度の測定:**ベシクル溶液中の微量のProteinAは、トリクロロ酢酸を用いて沈殿させ、Lowry法により定量した。**2.4 イムノベシクルの標的性:**フローサイトメトリー (FACSCalibur™ BECTON DICKINSON 社) によりERM5-1 細胞への標的性を測定した。**2.5 イムノベシクルの制癌効果:** (1) マウスはBALB/c-nuヌードマウスを用いた (n=6) (2) 投与サンプルには、コントロールとしてPBS、抗癌剤タキソテールTXT、TXT内包イムノベシクル (ITV) を用いた。 (3) 上記マウスにERM5-1 細胞を皮下注射 (投与細胞個数:  $3 \times 10^6$  cells) して担癌マウスを育種した。 (4) 各種サンプルは3日ごとにマウスに尾静投与 (投与サンプル0.2ml、TXT濃度200 μg/ml) し、体重・腫瘍体積経日変化を測定。投与は癌細胞移植後、7日後に開始した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 抗体固定化量の測定

ベシクルを調整する段階で仕込む ProteinA の濃度が1.0~5.0mg/ml 範囲では、 $0.143 \sim 0.556 \times 10^{-3}$  個/vesicle-particle の値を得た。

### 3.3 イムノベシクルの制癌効果 (in vivo)

サンプル投与に関する、マウスの腫瘍体積の経日変化を図1に示した。投与後約30日経過後から、free-TXTよりITVで制癌効果が観測され始めた。これは、以下に記したような理由が推測される。すなわち、(1) 腫瘍の増殖に伴い、血管壁に細孔が形成され、ベシクルの血管壁透過性が上昇し、(2) より効率的にベシクルが腫瘍部に送達され、(3) ベシクルにミサイル装置として付加している抗EGFR抗体の腫瘍標的、および内包している抗癌剤TXTによる制癌活性が機能した効果であろう。詳細は発表時に譲る。

### 3.4 イムノベシクルの性能向上

イムノベシクルに固定化するProteinAの仕込み濃度を、1.0mg/ml、2.5mg/ml、5.0mg/mlと増加させるとミサイル装置としての抗EGFR抗体の固定化量も3.60ng、4.71ng、14.01ngと上昇した。また、固定化した抗体が多くなるほど、イムノベシクルのERM5-1 細胞への標的機能が上昇することを、フローサイト測定によりin vitroで確認した (結果省略)。したがって、抗体の固定化量を増やしたイムノベシクルを用いると、in vivoでのこの制癌効果は増加することが予測される。その動物実験を今後行う予定である。

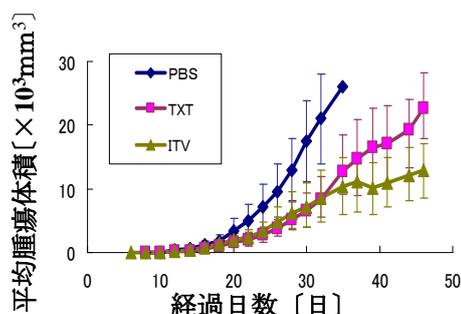


図1.各サンプルを投与したマウス群の平均腫瘍体積変化

[参考文献]

- 1) Keiichi Kato et al.: Specific targeting at ERM5-1 cell as a model human-brain tumor cell and the anti-tumor effect by using immunovesicle, Proc. of the 10th Asian Pacific Confederation of Chem. Eng. (APCChE), J-STAGE, Vol.2004, No.SPACep.501-(2004)
- 2) 水岡、加藤ら: 「ヒト脳腫瘍治療に用いるイムノベシクルの創製とその担癌マウスの体内動態」、L109 化学工学会 第8回学生発表会 (広島大会)

※Keiichi Kato Dept. of Applied Chem. Univ., Bunkyo chou 3, Matuyama, 790-8577 TEL&FAX089-927-9928  
E-mail kato@eng.ehime-u.ac.jp

# 超音波照射を利用した凍結濃縮分離に与える溶質の拡散係数の影響

(化学工学) ○伊藤洋晃・川崎健二・松田 晃

## 1. 緒言

溶液状態の水が凍結する際には、理想的には水に含まれている成分を排除して純粋な水だけが凍結する。そのため、液中の成分は未凍結部に濃縮され、凍結部は純粋な氷となる。この原理を利用したのが本研究の主題である凍結濃縮分離法である。この方法は、加熱濃縮分離法に比べてエネルギー的に有利であるばかりでなく、低温で操作され、しかも気液界面を少なくできるため、溶質の変質、揮発芳香成分の散逸を極めて低いレベルに抑え、成分の変化を少なくすることができる。

溶液を凍結する際、凍結速度が速いと凍結界面に鋭い凹凸状の氷晶が生じ、不純物が氷晶の隙間に入ったまま凍結が進行するのでほとんど濃縮分離されない。しかし、凍結界面付近を激しく乱してやると凍結界面は滑らかなまま成長し、溶質が液全体に拡散され、凍結界面付近の濃度を比較的強く保つことが出来る。したがって、凍結界面は溶質を取り込み難くなり、濃縮分離しやすくなる。

本研究では、攪拌方法として超音波照射を採用している。本法では、超音波を照射するとき振動子を液に浸すだけで簡単に凍結界面付近の液を激しく攪拌でき、振動子の形状が比較的単純であるため洗浄も簡単に行うことができる。本報では、分子量と拡散係数のどちらが濃縮分離効率に影響しているかを調べた結果を報告する。

## 2. 実験試料

分子量と拡散係数が異なる NaCl, KCl, KI の 0°C, 0.05mol/L 溶液を使用した。分子量と拡散係数を Table1 に示す。NaCl は拡散係数、分子量共に最も小さく、KCl と KI は拡散係数がほぼ等しいが、分子量は KI が KCl のほぼ2倍である。

## 3. 実験方法

実験装置図を Fig.1 に示す。ステンレス製凍結管(高さ 325mm、内径 55mm、側壁厚さ 3mm)に試料を 500mL(高さ 210mm)入れて超音波(20kHz)を照射しながら凍結管を冷媒中(-16.5°C)に降下し、80mm/h の速度で凍結した。所定時間後に冷媒から取り出した試料は凍結部と未凍結部に分離し、それぞれの濃度と体積を測定した。凍結部は 6~8 分割して測定し、高さ方向の濃度分布も調べた。

## 4. 結果

溶質による濃縮分離効率の違いを調べた結果を Fig.2 に示す(記号は Table1 に記載)。凍結距離は凍結管の底

を 0 として上方向に取った値である。濃度比とは凍結部の濃度(C)と原液の濃度(C<sub>0</sub>)の比であり、小さいほど純粋な氷ができていることを示す。未照射では成分によらず濃度比はほぼ1を示し、ほとんど濃縮分離されていないが、超音波を照射すると 0.3 以下となり、濃縮分離することができた。このとき、KCl と KI の濃度比はほぼ等しいが、NaCl は少し大きくなり、Table1 に示したように拡散係数が大きい溶質の方が濃縮分離効率は良くなること、また分子量の大きさに関わらず拡散係数が等しいと濃縮分離効率も等しくなることがわかった。

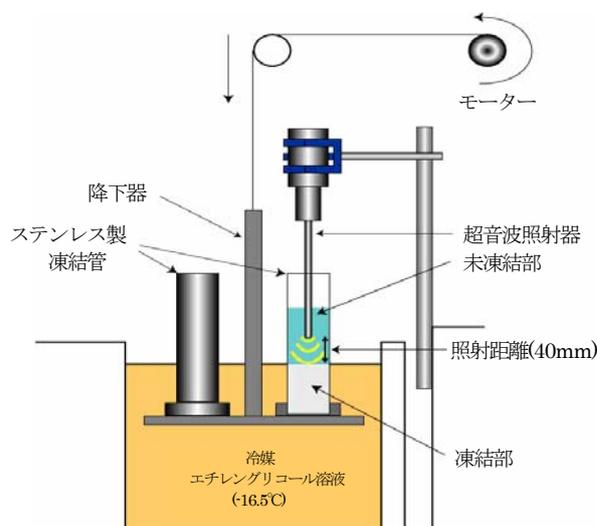


Fig.1 実験装置図

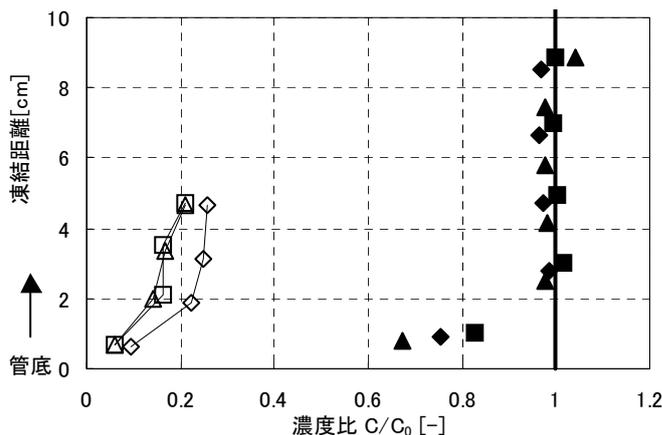


Fig.2 溶質成分による濃度比の違い

Table1 各成分の分子量と拡散係数

溶質	NaCl	KCl	KI
照射	◇	△	□
未照射	◆	▲	■
分子量	58.44	74.55	166.01
拡散係数 × 10 <sup>10</sup> [m <sup>2</sup> /s]	6.29	7.79	7.90

# 吸収冷凍機の性能向上に関する研究

(化学工学) ○末広亮二・川崎健二・松田晃

**1.緒言** 現在、広く普及している圧縮冷凍機にはオゾン層の破壊、また夏の昼間の電力消費量増大という問題がある。そのため熱を駆動源とするLiBr水溶液を用いる吸収冷凍機の製造が増加している。ここでFig.1に吸収冷凍機の仕組みを示す。低圧の蒸発器で水が周囲の熱を奪って水蒸気になり、吸収器でLiBr水溶液に吸収される。そのLiBr水溶液は再生器に送られ熱を加えて濃縮された後、再び吸収器に送られる。再生器で発生した水蒸気は凝縮器で液化し、蒸発器に戻る。このようなサイクルによって蒸発器で冷熱を得ることができる。本研究では水・LiBr系の吸収冷凍機の性能向上を目的として、平滑銅板よりなる垂直平板式装置および銅管よりなる水平管式装置を再生器または吸収器に用いた実験を行い、LiBr水溶液に界面活性剤(1-Octanol)を添加したときの性能に及ぼす影響について調べた。

**2.実験** 実験装置をFig.2に示す。減圧した垂直平板・水平管装置内でLiBr水溶液を循環させ、再生器で濃縮したLiBr水溶液を吸収器に送り、再生器で発生した水蒸気を吸収させる循環式で実験する。実験は再生器/吸収器に流す加熱水/冷却水の温度を47/21℃、53/27℃、59/33℃に設定し、LiBr水溶液に添加する1-Octanol濃度を0、500、1000、5000ppmで行う。

**3.結果および考察** Fig.3に垂直平板式装置および水平管式装置を再生器または吸収器としたときの界面活性剤濃度の影響を示す。縦軸に界面活性剤を添加したときの熱伝達係数 $h_L$ と無添加の $h_L$ の比、 $h_L/h_L(0\text{ppm})$  (Oppm)、をとり、横軸に界面活性剤濃度をとる。垂直平板式装置は再生器よりも吸収器として用いた方が値が大きくなり、1000ppmまでに急激に増加する。吸収では実験時の観察から再生よりも界面活性剤添加により液膜が激しく乱れて $h_L$ の増加率が高くなったと考えられる。水平管式装置は垂直平板式装置ほどの違いはない。これは10本の水平管が縦に並べられているため、水平管上の液の流れが十分に乱されないまま次の管に流下するためと考えられる。

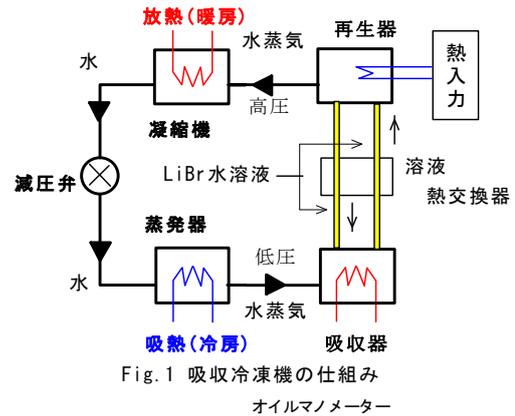


Fig.1 吸収冷凍機の仕組み  
オイルマンメーター

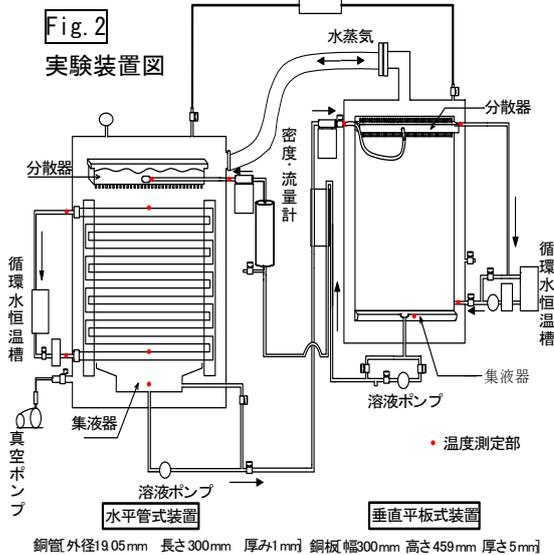


Table.1 実験条件

加熱水温度[℃] / 冷却水温度[℃]	47 / 21	53 / 27	59 / 33
再生器	○	△	□
吸収器	●	▲	■

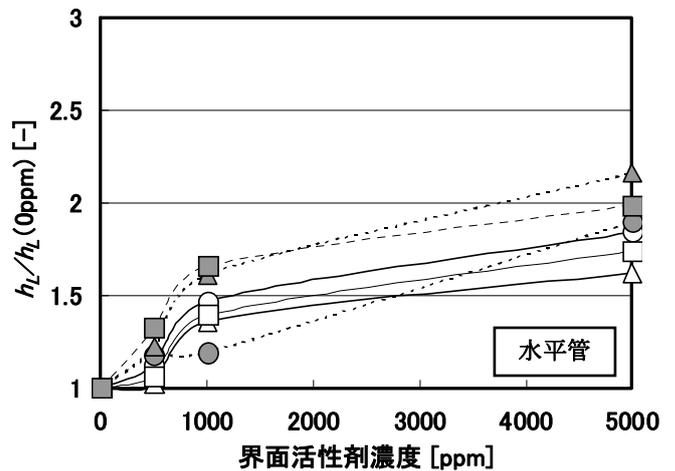
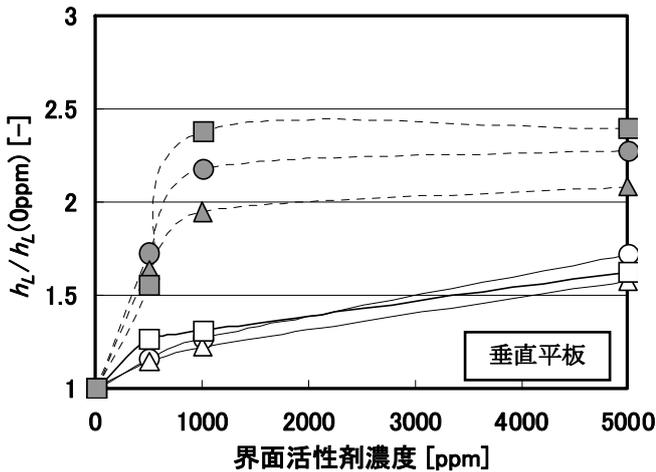


Fig.3 流下液膜熱伝達係数 $h_L$ に及ぼす界面活性剤濃度の影響



# 微生物を用いた排水処理における膜ろ過特性の検討 ～初期汚泥濃度の影響～

(化学工学) ○須之内慧・川崎健二・松田晃

**1. 緒言** 排水処理法として広く用いられている活性汚泥法は、懸濁固形物の沈降分離、有機物の微生物（活性汚泥）による分解除去、活性汚泥の重力沈降分離からなる。これに対し浸漬型膜分離活性汚泥法は、生物反応槽に分離膜を直接浸漬するため沈殿槽が不要となり、装置のコンパクト化が可能となる。又、安定して清澄な処理水を得ることができるため、活性汚泥法に代わる処理法として期待されている。しかし、処理の経過とともに膜が目詰まりしてしまい、水透過流束が低下する問題がある。

本研究では、浸漬型膜分離活性汚泥法の家庭用合併浄化槽としての開発研究として、長期の安定運転に及ぼす初期汚泥濃度の影響について検討する。各汚泥濃度での膜の各ろ過抵抗に基づいて考察を行った。

**2. 実験** 装置図をFig.1に示す。膜分離反応槽は有効容量20LのPVC樹脂製円筒槽で、等量のグルコースとペプトンを基質とする合成排水を連続的に投入して行った。ポリエチレン製精密濾過中空糸膜モジュール（公称孔径 $0.1\mu\text{m}$ 、膜面積 $0.4\text{m}^2$ ）を反応槽に浸漬し、吸引ろ過によって処理水を得た。水透過流束（以下、水フラックス）を $20\text{L}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ に設定し、槽底部のディフューザーより、曝気した。

膜の水フラックス測定試験は、膜分離反応槽から取り出した汚泥が付着した膜モジュールと、水洗浄によって付着汚泥を剥離した膜モジュールで行った。膜モジュールの全濾過抵抗（ $R_t$ ）は、新膜の抵抗（ $R_m$ ）と膜目詰まり抵抗（ $R_{cl}$ ）と膜表面の付着汚泥（ケーキ）の抵抗（ $R_c$ ）の和で表される。

**3. 実験結果および考察** Fig.2に吸引圧の経日変化を示す。膜ろ過の吸引圧は $30\text{kPa}$ 程度に抑えるべきといわれている。RUN1の吸引圧は経過1～63日目まで不安定で高い値を示した。この間、槽内には泡立ちが見られ、上澄み液TOCの値も非常に高く、処理水量が所定量に達しない日もあった。これは初期F/M比が高く有機物の分解が十分に行われなかったと考えられる。RUN2も同様である。RUN3の吸引圧は160日経過しても $30\text{kPa}$ 以下と低い値で推移している。初期F/M比が適切で有機物の分解が安定していると考えられる。RUN4も233日間 $30\text{kPa}$ 以下である。RUN5は初期MLSSが高くMLSSが $15000\text{mg}/\text{L}$ を超えるため経過83日目に $30\text{kPa}$ をこえている。

Fig.3にRUN1,3の各濾過抵抗の経日変化を示す。RUN1は短い経過日数から膜目詰まり抵抗  $R_{cl}$  が高く、付着汚泥抵抗  $R_c$  も低くない。RUN3は長期間  $R_{cl}$ 、 $R_c$  共に低い値を維持していることから、初期MLSSが  $3000\text{mg}/\text{L}$  程度で安定運転ができると考えられる。

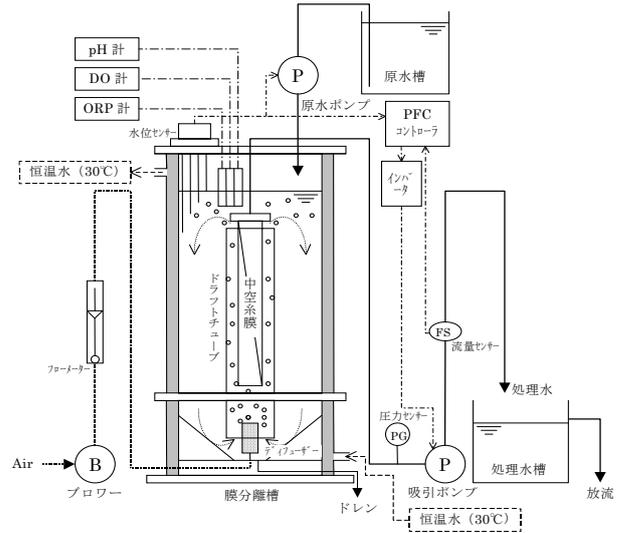


Fig.1 実験装置図

Table1 実験条件

RUN	1	2	3	4	5
初期MLSS [mg/L]	1350	2100	3150	4900	9300
初期F/M比	0.303	0.205	0.146	0.092	0.054
BOD容積負荷[kg/m <sup>3</sup> ·d]	0.5				
KEY	●	▲	○	△	■

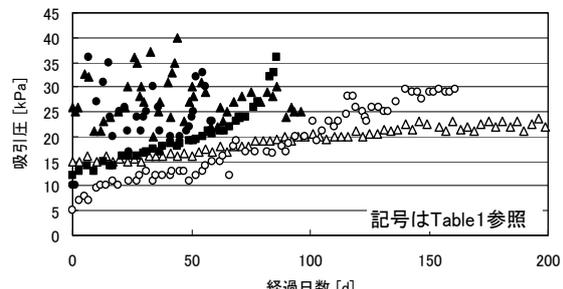


Fig.2 吸引圧の経日変化

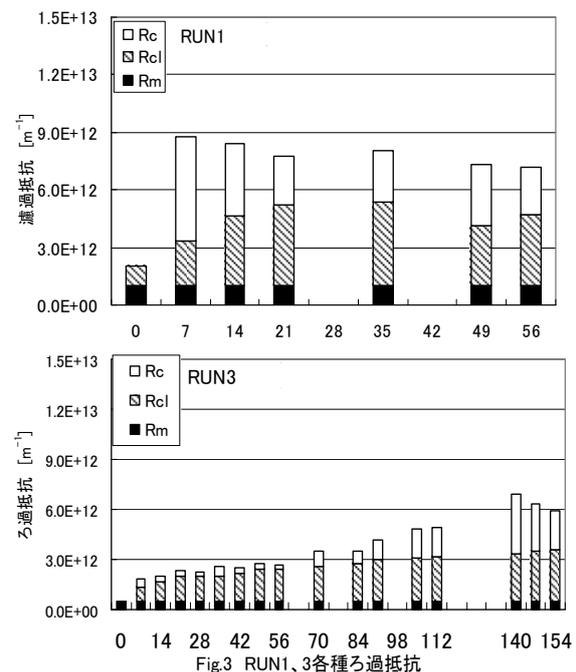


Fig.3 RUN1, 3各種ろ過抵抗

# 排水処理に用いる流動性多孔質担体の開発

(化学工学) ○戸賀瀬竜一 川崎健二 松田 晃

## 緒言

現在、我が国では一般的な排水処理方式として活性汚泥法が用いられており、そのフロー図を Fig.1-(a) に示す。活性汚泥法は、最初沈殿池で流入排水中の比較的粒径の大きい懸濁固形物を除き、曝気槽で微生物（活性汚泥）により排水中有機物の分解を行い、その後、最終沈殿池で活性汚泥と処理水を重力沈降分離する処理法である。その変法の一つとして、曝気槽に微生物を高密度に付着できる担体を投入する担体添加法があり、Fig.1-(b)に示す。微生物が担体に付着してスクリーンで分離できるため最終沈殿池が不要であり、曝気槽中に高濃度の微生物が長時間滞在して、効率よく有機物を分解させることができるメリットがある。微生物を付着させる担体は微生物との親和性に優れており、比重が適当(水とほぼ同じ)で微生物の付着により流動性が失われないことが必要である。担体としての材質・寸法・形状等の最適値はまだ不明であるため、本研究では様々な担体を用いて微生物付着量や BOD 除去率を測定することにより、排水処理に有効な担体を調査・開発する。

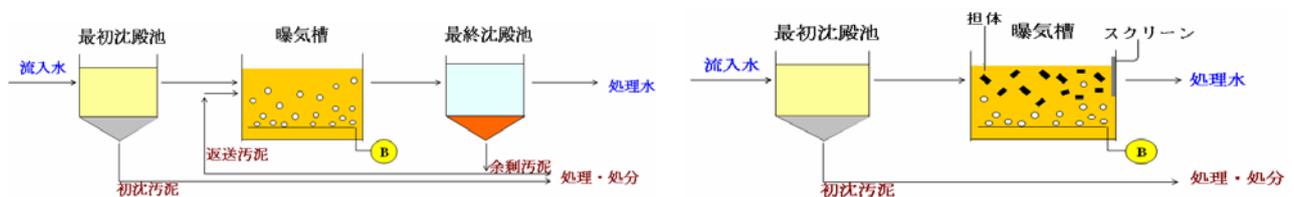


Fig.1 (a) 標準活性汚泥法

(b) 担体添加法

## 実験方法

実験装置の概要を Fig.2-(a) に示す。体積 12L の角が切った直方体の曝気槽にグルコース-ペプトンを基質として等量含む人工排水(BOD 濃度 200mg/L)を 1.25L/h の流量で供給する。従って HRT(水力学的滞留時間)は 9.6 h であり、BOD 体積負荷は 0.5kg-BOD/m<sup>3</sup>・d となる。曝気槽の下端から風量 6.4L/min で曝気しているため酸素は十分供給でき、また、Fig.2-(b)に示すように活性汚泥と担体をうまく混合攪拌できる。種々の担体を入れた 4 系列と比較のための担体を入れない場合の 1 系列について実験を行い、流入排水中の有機物の処理特性と曝気槽中の懸濁固形物濃度、担体への微生物の付着量等を調べる。使用担体の一例を Table1 に示す。

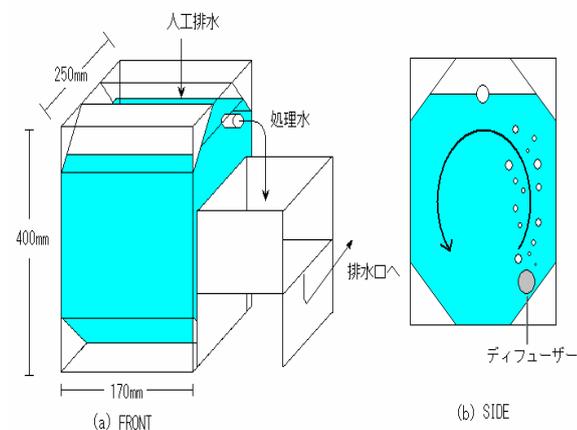


Fig.2 実験装置

Table1 使用担体の一例

名称	材質	比表面積 (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> )
多孔性 パイプ状 担体	ポリプロピレン	1000
ネット担体	ポリプロピレン	330

# 種々のスラリーの束縛水量測定とその比較

(化学工学) ○松本 一法 川崎 健二 松田 晃

**1. 緒言** スラリーには機械的な手段では除去する事の困難な束縛水が大量に含まれている。スラリー中の水は Fig.1 のような模式図で表され、自由水と間隙水は機械的操作により比較的簡単に取り除けるが、内部保留水・表面附着水・毛管結合水は取り除くのが困難でありこれらが束縛水である。束縛水は固液分離後の含水率に大きい影響を与えるためスラリーの性状として重要な値であり、遠心沈降法で測定することができる。

最終沈殿地で固液分離するかわりに曝気槽に膜を浸漬させ吸引濾過して処理水を得る浸漬型膜分離活性汚泥法は、沈殿槽が不要で装置のコンパクト化が期待できる。また、懸濁固形物が膜によって完全に阻止されるので安定して清澄な処理水を得ることができるため、有望な排水処理法である。そこでこの浸漬型膜分離活性汚泥法および下水処理場から採取した余剰汚泥の束縛水量を遠心沈降法により測定して汚泥の各種性状との関連等を調べた。

## 2. 理論

スラリーを底の平たいスピッツ管に入れ(高さ  $H_0$ ) 様々な回転数  $N$  で遠心沈降した場合、平衡状態の沈積層(高さ  $H_N$ ) は固形物と水(自由水+束縛水) から構成されている。 $N$  を増加して遠心圧力を増加すると沈積層から自由水が除かれて  $H_N$  が減少していく。 $1/N$  vs.  $H_N/H_0$  をプロットすると、 $N \rightarrow \infty$  すなわち  $1/N \rightarrow 0$  の時に、沈積層は束縛水と固形物だけで構成されていると考えられる。この時の平衡界面高さ  $H_\infty$  から束縛水の体積比率  $\Phi_v$  は次式で求められる。

$$\Phi_v = \frac{\text{束縛水体積}}{\text{乾燥固形物体積}} = \frac{\rho_k - \rho_w}{\rho_b - \rho_w} \frac{H_\infty}{H_0} - 1$$

ただし、 $\rho_k$ ,  $\rho_w$ ,  $\rho_b$  は乾燥固形物, 水 およびスラリーの密度である。

## 3. 実験

BOD 容積負荷:  $0.5 \text{ kg/m}^3 \text{ d}$ , 汚泥滞留時間(SRT):  $200 \text{ d}$  で運転している浸漬型膜分離活性汚泥装置から得た余剰汚泥を『膜分離汚泥』, 松山市下水道中央浄化センターから採取した返送汚泥を『下水汚泥』として実験に用いた。参考として単一微生物群であるパン酵母(オリエンタル酵母(株)製)についても実験した。各汚泥の性状は Table1 に示してある。実験は直径  $40 \text{ mm}$ , 高さ  $90 \text{ mm}$  のスピッツ管に2種類の初期高さ  $H_0$  ( $50 \text{ mm}$ ,  $70 \text{ mm}$ ) まで試料を入れ、所定の回転数  $N$  ( $1300 \text{ rpm} \sim 4000 \text{ rpm}$ ) で遠心沈降し、平衡界面高さ  $H_\infty$  を求めた。

## 4. 結果及び考察

遠心沈降実験の結果を  $1/N$  vs.  $(H_N/H_0)/Ct$  として示したのが Fig.2 である。実験点は各実験共ほぼ直線上にあった。これらの値から求めた束縛水の体積比率  $\Phi_v$  の値を Table 1 に示した。膜分離汚泥は SRT が  $200$  日と長いが下水汚泥は約  $3$  日と短く、構成微生物の平均寿命が膜分離汚泥の方が長いので  $\Phi_v$  が小さくなっていると考えられる。また、パン酵母は回転楕円体の形状であり活性汚泥のようなフロック形成機能が弱いため、 $\Phi_v$  が  $4.0$  とかなり小さくなったと推測される。

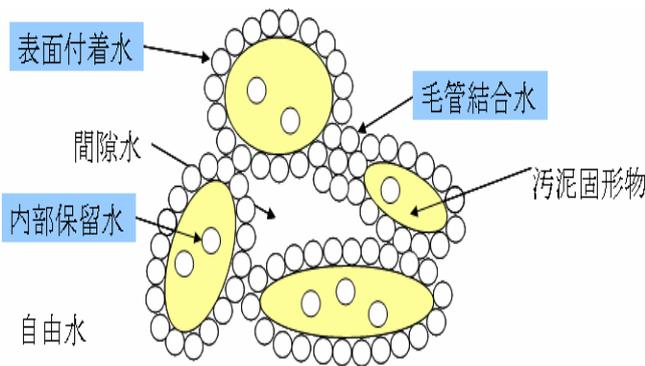


Fig.1 活性汚泥フロックの模式図

Table1 各汚泥の性状と束縛水の体積比率  $\Phi_v$

	スラリー濃度 [ $\text{kg/m}^3$ ]	TOC [ $\text{mg/L}$ ]	$\alpha_{av}$ [ $\text{m/kg}$ ]	束縛水の 体積比率 $\Phi_v$ [-]
膜分離汚泥	15.48	5.2	$3.20 \text{ E}+12$	7.8
下水汚泥	7.70	92.7	$5.45 \text{ E}+12$	9.0
パン酵母	49.38	783.3	$7.95 \text{ E}+10$	4.0

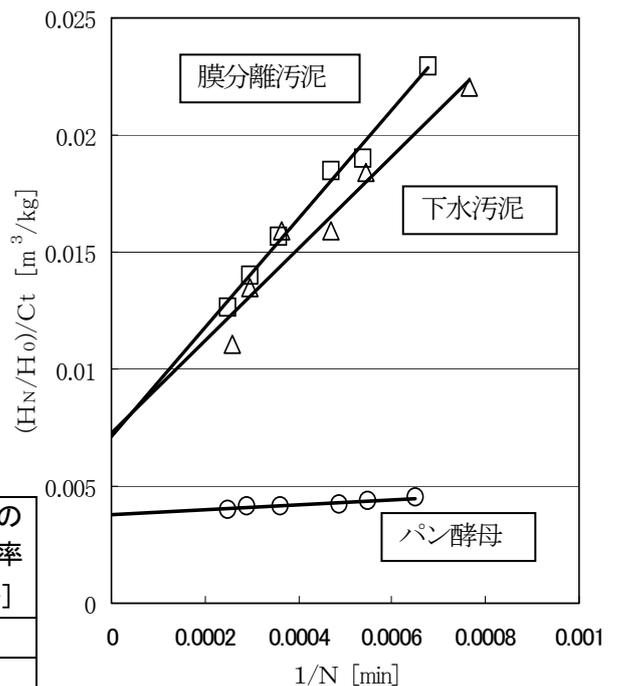


Fig.2  $1/N$  vs.  $(H_N/H_0)/Ct$

## コムギ無細胞タンパク質ライブラリーを用いた疾患特異的抗体の網羅的動態解析 無細胞生命科学工学研究センター 遠藤研究室 松岡 和弘

現在、ヒトやマウス、および様々な病原体のゲノムシーケンスデータや、ゲノム上にコードされている遺伝子の完全長 cDNA が入手可能な時代となった。そこで、これらを疾患の診断や治療法の開発に最大限活用する、ポストゲノム研究が求められている。その一つのアプローチとして、ゲノムワイドなタンパク質ライブラリーを作成して、発病時における生体内タンパク質の動態変化に伴う診断、および病原体に対するワクチン候補に必要な疾患関連タンパク質の探索に活用することは、非常に有効な方法であると思われる。しかし、大腸菌などの生細胞を用いて、数百、数千種類のタンパク質を発現させることは、機械化できないため現実的には難しく、また宿主の生理機能に影響を及ぼすタンパク質の発現が困難であることなどから、解析に十分量の網羅的なタンパク質の発現・調製は不可能であるといえる。一方で、本研究室で開発された生細胞を使わない自由に高品質タンパク質を合成可能なコムギ無細胞タンパク質合成系は、機械化も完了しており、数千種類のタンパク質発現においても何ら問題はない。また PCR 法による転写・翻訳鋳型構築時に、ビオチンライゲース認識部位を付加しておけば、目的タンパク質のみをビオチン化することができ、ビオチン化したタンパク質ライブラリーと、ハイスループットな検出系である AlphaScreen と組み合わせることにより、抗原抗体反応などのタンパク質相互作用を、高感度かつ高速に検出できることが期待される。そこで本研究は、熱帯熱マラリアワクチン候補タンパク質の探索および、自己免疫疾患に関与する自己抗体の探索を行うことを目的として、熱帯熱マラリア原虫と疾患関連遺伝子座上のビオチン化タンパク質ライブラリーを作成し、感染や疾患後における患者血清の経時変化を調べることにより、疾患に関与する自己抗体の動態変化を同定および解析を行った。

熱帯熱マラリア原虫、またはマウス cDNA を鋳型に、転写・翻訳・ビオチン化に必要な配列を” split primer” PCR により付加した転写鋳型を作成した。その後、転写鋳型を *in vitro* 転写後、ビオチン化を行いながら、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、それぞれ熱帯熱マラリア原虫タンパク質 76 種と疾患関連遺伝子座上のタンパク質 120 種類のビオチン化タンパク質ライブラリーを作成した。その後、熱帯熱マラリア患者血清、または自己免疫疾患モデルマウスの血清を混合し、AlphaScreen によって未精製のビオチン化タンパク質と血清中の抗体間の特異的な抗原抗体反応を検出した。その結果、熱帯熱マラリア原虫タンパク質においては、既知ワクチン候補タンパク質 1 種を含む 9 種類について抗原抗体反応を検出することができた。また、疾患関連遺伝子座のマウスタンパク質のうち、既知自己抗体 2 種を含む 16 種について抗原抗体反応を検出することができた。これらはワクチン候補もしくは自己免疫疾患関連タンパク質の可能性を示唆するものである。以上のことから、ビオチン化タンパク質ライブラリーを基盤に、迅速かつ簡便な検出系を用いることにより、疾患における特異的抗体のゲノムワイドスクリーニングが可能となった。今後は、リウマチなど患者数が多い自己免疫疾患を中心に、本手法を活用して、診断などに有効な疾患特異的抗体のスクリーニングを進める。

網羅的リン酸化基質タンパク質探索を目指したコムギ無細胞合成系による  
ヒト及びマウスプロテインカイネースライブラリーの構築  
無細胞生命科学工学研究センター 遠藤研究室 京嶋 沙和

**【緒言】** 分化・増殖・プログラム死などの多種多様な細胞機構の多くは、細胞内情報伝達機構により制御されている。細胞内情報伝達の主要制御機構は、タンパク質の活性を制御する分子スイッチとして機能するリン酸化修飾反応と考えられ、それらはプロテインカイネース(PK)により触媒される。このようなPKを中心とした多数のタンパク質からなるリン酸化ネットワークの解明が制御機構の理解には必須であると考えられているが、まだごく一部のPKのネットワークが明らかとなっているのみである。また、これらのリン酸化ネットワークの一部の異変が、細胞の癌化に関与していることが報告されており、生命現象の根幹をなすのみでなく創薬ターゲットとしても重要な分子である。しかし、大腸菌などの生細胞を用いる従来のタンパク質合成法では発現や品質、スループットに限界があると共に、真核生物と原核生物のフォールディング機構の違いにより活性を保持したPKを得ることは困難だった。また、リン酸化検出においても、従来法ではスループットに限界があったため、リン酸化ネットワーク解析をハイスループットに行うことはできなかった。そこで本研究では、我々の研究室で開発されたハイスループットタンパク質合成が可能なコムギ無細胞タンパク質合成系により、PKの調製を試みた。コムギ無細胞タンパク質合成法は従来法と異なり宿主の生存にとらわれないため、より多くの種類のPKを合成できるとともに、真核型の翻訳系を用いるため、活性を保持したPKを得られる事が期待される。また、リン酸化検出においてはハイスループット検出が期待されるエネルギー転移アッセイ系を用い、ヒト及びマウスPKライブラリーとハイスループットリン酸化ネットワーク検出法の構築を行った。

**【方法】** 独自にクローン化したヒトPK 214種類と、理化学研究所のマウス完全長cDNAライブラリーFANTOMより、マウスPK 292種類を選抜した。このうちヒトとマウスのオーソログPKは127種類含まれており、これら合計379種類のPKについてコムギ無細胞系によるタンパク質合成をおこなった。そして、合成されたPKの活性確認とハイスループットリン酸化検出法の構築を行うため、エネルギー転移アッセイ系による自己リン酸化活性の検出と、さらにその比較対象として、ヒトPKとそのオーソログマウスPK合計254サンプルについて、ラジオアイソトープ(RI)を用いるアッセイ法により、自己リン酸化活性の検出をおこなった。

**【結果】** コムギ無細胞タンパク質合成系を基盤としたヒトおよびマウスPKのライブラリー構築によって、ゲノムワイドなPKのハイスループット合成に成功した。また、RIを用いた実験から、これらのヒトとマウスPKの約73%において自己リン酸化活性が検出され、そのうち18種類について、ヒトとマウスのオーソログPK間における自己リン酸化活性に違いがあった。さらに、エネルギー転移アッセイにより、約40%のヒトとマウスPKの自己リン酸化活性の検出ができ、コムギ無細胞系を用いたハイスループットリン酸化ネットワーク解析法として応用が可能であるとわかった。今後は、今回の実験で高い自己リン酸化活性のえられたPKを用いて、癌関連PKカスケードの探索をおこなう。

## 自己免疫疾患における免疫関連タンパク質を認識する自己抗体の解析

無細胞生命科学工学研究センター 遠藤研究室 中尾 典彦

高等生物がもつ抗原抗体反応を中心とした免疫機構は、自己と非自己を厳密に識別することにより、細菌やウイルス、真菌、寄生虫などからの感染を未然に防いでいる。この自己と非自己の識別のバランスが崩れると、リウマチなどの自己免疫疾患が引き起こされると考えられている。そのため、自分自身が作るタンパク質（自己抗原）が、自分自身によって作られる抗体（自己抗体）によって認識され、自己免疫疾患の主要な分子機構として提案されている。従って、自己免疫疾患に置いて、非自己と見なされた自己抗原を同定することは、診断や治療に向けた最初の一步となる、必要不可欠な情報である。これまでに非常に多くの自己免疫疾患が報告されているが、その多くで自己抗原が同定されていないのが現状である。一般的に、患者組織から抽出したタンパク質を用いて、その中から患者血清内に含まれる抗体と相互作用するタンパク質を同定する方法が用いられてきた。しかし、発現量が低いタンパク質を抽出することがほぼ不可能である点や、組織内の細胞には細胞膜や核、ミトコンドリア、小胞体など様々な細胞小器官が存在しており、抽出法は各画分により異なるため、抽出されるタンパク質は概ね数百種類程度と限定的となる。ヒトでは、ゲノム上の遺伝子から考えると、2万数千種類以上のタンパク質が自己抗原の対象とする必要があるため、従来の方法で同定できる自己抗原は、ほんのごく一部であるといわざるを得ない。多種類ある自己免疫疾患を調べていくためにも、ゲノムワイドに自己抗原を同定する新たな手法が求められている。また、自己免疫疾患の多くは、多因子が関与した疾患であることが知られており、例え原因は良く似ていても、個々の患者においては様々な自己抗体が発現している可能性が示唆されている。抗体の生産および血中への発現は、B細胞やT細胞などで起こる免疫応答機構により制御されている事から、免疫に関与するタンパク質が種々の自己免疫疾患に深く関与している可能が考えられる。そこで本研究では、ハイスループットなタンパク質発現が可能なコムギ無細胞系を用いた、免疫関連タンパク質をターゲットとしたゲノムワイドな自己抗原同定法の構築を目指した。

本研究では、免疫におけるシグナルネットワークで主要な機能を担っているCD抗原やインターロイキン、インターフェロンに着目した。そして、これらを含む406種類の免疫関連タンパク質をコムギ無細胞系を用いて合成し、自己免疫疾患モデルマウス血清や、自己免疫疾患患者血清、あるいは、自己免疫疾患においては健常とされる血清と混合した。最後に、AlphaScreenを用い、抗原抗体反応の検出を行った。

自己免疫疾患モデルマウスであるMRL血清や、ヒトリウマチ疾患患者の血清において測定した結果、それぞれ約150種類と、約30種類のタンパク質で高いシグナルが得られ、これらは自己抗原の可能性が示唆された。MRL血清で、ヒトの血清より多くのタンパク質で高い値が得られたことは、リウマチや抗グロブリン血症など、いくつかの自己免疫疾患を併発しているMRLマウスの特徴と考えられる。また、ヒト患者血清では、検体により高いシグナルを得られたタンパク質が異なった。これは、個々の患者における多因子の自己抗体の発現と関係していると考えられる。今後は、さらに免疫関連タンパク質を170種類ほど加え、より網羅的な解析と得られた自己抗原候補の詳細な解析を行う。

# 翻訳開始反応阻害剤を用いたコムギ胚芽 Ribosome display 法の試み

物質生命工学応用科学コース（無細胞センター高井研） 桶田 雅志

## 【緒言】

近年の遺伝子操作技術の進歩により、機能性分子の創成に進化分子工学と呼ばれる手法が広く行われている。これは自然淘汰の進化のサイクルを人工的に再現することにより、変異を導入した分子を、目的の機能を持つ分子へと試験管内で進化させるというもので、新しい機能性分子の出現を予感させるものである。この手法において無細胞技術を用いることにより、タンパク質などの生体分子を、生命がその歴史の中で進まなかった方向へと進化させることが原理的に可能となる。この進化分子工学的手法によるタンパク質のスクリーニング法の一つとして、リボソームディスプレイ法がある。これは目的の機能を持つタンパク質を、タンパク質合成反応中間体である mRNA-リボソーム-タンパク質複合体の単位で選択し、回収して得られた mRNA を RT-PCR 法によって再増幅させる、という手法である。この特定の性質により選択-再増幅というサイクルを繰り返し行うことで、目的の機能を持つ分子へと試験管内で進化させることができる。

しかしこの方法には人工的にランダムなアミノ酸配列を作成しようとする途中に終止コドンが現れてしまい、長いアミノ酸配列を作成することが困難である、という問題がある。一方、翻訳開始反応阻害剤として知られる ATA(Aurintricarboxylic Acid)は RNase 活性も阻害するために、リボソームディスプレイ法における翻訳反応の停止に適していると考えられる。また翻訳伸長反応は阻害しないために、この翻訳開始反応阻害剤を用いてスクリーニングを行うことで終止コドンを含まない配列が回収できるのではないかと考えた。

## 【実験と結果】

まず GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)の終止コドンを除き、後ろにランダム配列をつなげたライブラリーを作成した。これをコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて翻訳し、ATA を加えて反応を止めた。これをグルタチオンセファロースに通し、結合したリボソーム-mRNA-タンパク質複合体を回収した。複合体から回収した mRNA の塩基配列を解析した。一方 GST の後ろに終止コドンを含む配列と含まない配列にそれぞれ異なる制限酵素サイトを導入し、これらを混ぜ合わせて同様のスクリーニングを試み、制限酵素による配列の確認を行った。その結果両方の実験で、スクリーニングによる終止コドンの減少が確認できた。

# コムギ胚芽由来再構成無細胞タンパク質合成系に向けて

愛媛大学応用化学科（無細胞センター高井研） 杉原 祥平

## 緒言

生物の中には、DNA の遺伝情報を RNA に写し（転写）、そして RNA からタンパク質に変換する（翻訳）一連の過程がある。これは細胞内において機能を持つ分子を作るという点で、最も基本的で重要な過程の一つである。現在愛媛大学では、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、この中の翻訳の過程について試験管内（*in vitro*）で行うことが可能になっている。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は、タンパク質を合成する目的においては非常に有効な系であるが、翻訳の仕組みを理解する目的に対しては、関わる因子がすべて把握できていないことなどから不向きな系となっている。ここで、この問題を解決し、翻訳についての研究を可能にするためには系の再構成という作業が必要になる。再構成とは、系に含まれる一つ一つの因子をいったん分けて、必要と思われる因子を再び混ぜて反応を進行させることである。このような再構成系を作ることによって、翻訳に必要な不可欠な物質が何かを知ることができ、さらに翻訳の各段階についての詳細な研究を行うことができる。

現在、原核生物の代表である大腸菌を使った無細胞系において、再構成の系が確立しているが、真核生物における再構成系は部分的にしか確立されていない。そこで、本研究室では、コムギ胚芽を材料として、真核生物型タンパク質合成の再構成を目的としている。そのために、ウイルス由来の IRES と呼ばれる RNA 領域に着目した。

翻訳反応は大きく分けて開始、伸長、終結に分けられる。この中で、最も複雑で再構成の障害となりそうなのは、多数のタンパク質因子が関与している開始反応である。今回着目した IRES は、これらの因子の一部を必要とせずに反応を行なうことができるとされている。本研究ではこの IRES を用いて開始反応の難しさを回避することで、再構成に向けた系を作ろうとしている。

## 実験

4つのプライマーを用いた PCR により IRES (上の文章参照) を合成した。次に IRES の後ろにタンパク質をコードした領域(ORF)をつなげ、通常のコムギの系で翻訳を行おうとしている。翻訳を確認できれば、系からリボソームや他の翻訳因子を少しずつ取り除き再び加えることを繰り返して、完成された再構成系に近づけていくことを検討している。

## コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系における大腸菌バリン tRNA の活性

無細胞生命科学工学研究センター（高井研） 藤井 敬司

### <緒言>

生物には大きく分けて真核生物と原核生物が存在する。真核細胞と原核細胞とは共通の祖先を持つはずであり、多くの共通機能をもつが、それらを担う分子の構造や性質は様々な点で異なる。mRNA 上のコドンを実アミノアシル tRNA がリボソーム上で認識しアミノ酸が重合するというタンパク質合成の基本的なメカニズムは共通であるが、リボソームの構造はかなり異なるし、tRNA の転写後修飾も異なっている。tRNA のアンチコドン 1 字目は転写後修飾を受けていることが多いが、これによりコドン 3 字目との対応規則（wobble 則）が制御されると考えられている。この wobble 則も、真核細胞と原核細胞の間で異なることが知られている。

原核生物である大腸菌のバリン tRNA はアンチコドン 1 字目に原核細胞特有のウリジン 5-オキシ酢酸 (cmo<sup>5</sup>U) という修飾ヌクレオシドを持つ。U から cmo<sup>5</sup>U への修飾は通常のワトソン-クリック塩基対以外の塩基対合を可能にする。これは、修飾が、アンチコドンの立体構造特性を制御することによると信じられている。一方で、真核細胞では、同様の立体構造特性を持つ修飾ウリジンは知られていないし、アンチコドン 1 字目に見つかっているどの U 誘導体もコドン 3 字目の A としか対合しない。

もし、本当に、cmo<sup>5</sup>U 修飾の効果が立体構造特性の制御のみによるのであれば、真核細胞のタンパク質合成系においても、同様の効果があるはずである。本研究においては、この点について、無細胞タンパク質合成系を用いて調べることにした。

### <実験>

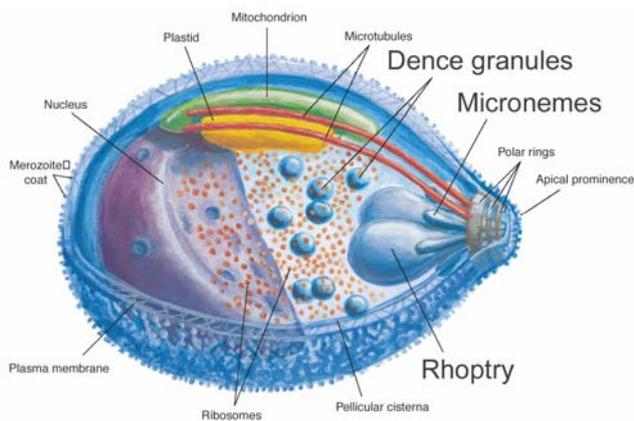
まず、真核型無細胞タンパク質合成系で、添加したアミノアシル tRNA のコドン特異性に応じてタンパク質が合成される実験系を構築する必要がある。そのために、まず、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系中に Val-AMS (tRNA のバリル化を競合的に阻害する) を加えて、コムギ胚芽由来のバリン tRNA が翻訳に寄与しないようにすることを目指した。これまでに、Val-AMS の添加により翻訳がほぼ完全に阻害できることが確認できた。

次の段階として、人工的に合成したアミノアシル-tRNA (3 種類) を上記の系に加えることによるコドン特異的な翻訳阻害解除が可能か確認することを計画している。もしこれが可能なら、バリル化した大腸菌バリン tRNA を加えて翻訳が進むかどうかを観察することにより、cmo<sup>5</sup>U 修飾が真核生物翻訳系においてどのような作用を持つか調べる。

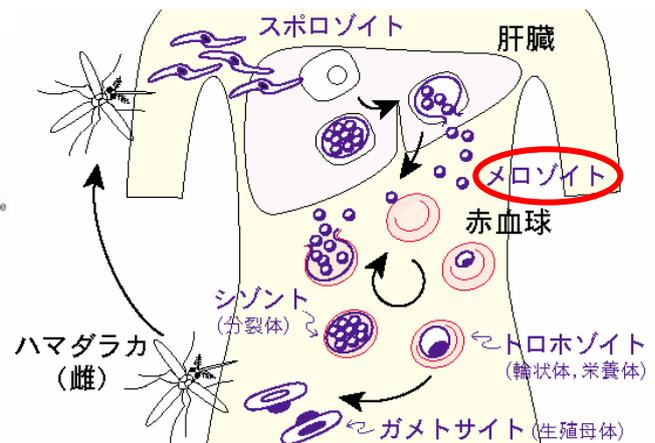
## モノクローナル抗体を用いた熱帯熱マalaria原虫メロゾイト先端部小器官の新規分子の同定

無細胞生命科学工学研究センター プロテオーム・医薬部門 伊藤大輔

【緒言】マalariaはハマダラカによって媒介されるマalaria原虫が赤血球に寄生することで引き起こされる感染症であり、熱帯地域を中心に全世界で年間推定3～5億人が罹患しており、150万人～270万人が死亡している。1960年代からWHOが中心となって撲滅対策に取り組んできたが、殺虫剤抵抗性ハマダラカや治療薬耐性マalaria原虫の出現によってその制圧が困難となっているため、現在ワクチン開発が期待されている。そのためには、原虫が赤血球へ侵入する際の分子メカニズムの解明が重要と考えられている。マalaria原虫は赤血球侵入の際、メロゾイト(侵入型)といわれる特有の形態に変化する。マalaria原虫メロゾイトには Rhoptry、Microneme、Dense granule といった先端部小器官が存在する。しかし、これらの先端部小器官はメロゾイトが赤血球へ侵入すると消失してしまう。このことから先端部小器官には赤血球侵入に必須の分子(タンパク質)が存在すると考えられている。現在、いくつかの先端部小器官分子の存在が既に確認されているが、その全貌は明らかとなっていない。また、大部分の既知の先端部小器官分子の機能はよくわかっていない。本研究では、マalaria原虫メロゾイトの先端部小器官に存在する分子の赤血球侵入における役割を明らかにする第一段階として、モノクローナル抗体(mAb)を用いて熱帯熱マalaria原虫メロゾイト先端部小器官に存在する新規分子の同定を試みる。



マalaria原虫メロゾイト



マalaria原虫の生活環

【実験方法】熱帯熱マalaria原虫の抗原(メロゾイトに富む原虫抗原)をマウスに免疫し、そのリンパ球を用いてハイブリドーマ細胞を作製する。この中から熱帯熱マalaria原虫の抗原と反応する抗体を産生するものを酵素結合免疫測定法(ELISA)によって選択し、さらに間接蛍光抗体法(IFA)を用いて熱帯熱マalaria原虫メロゾイト先端部小器官を特異的に染色するmAbを産生するハイブリドーマ細胞を選択する。そのmAbと反応する抗原を、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法でゲノムワイドに合成した熱帯熱マalaria原虫組換えタンパク質の中から、ハイスループット抗原抗体反応アッセイシステム(AlphaScreen)を用いてスクリーニングし、熱帯熱マalaria原虫メロゾイト先端部小器官に存在する新規分子を同定する。

【結果】熱帯熱マalaria原虫の抗原と反応するmAbを産生する164種類のハイブリドーマ細胞の作製に成功した。そのうち IFA によって熱帯熱マalaria原虫メロゾイト先端部小器官を特異的に染色するmAbを産生するハイブリドーマ細胞をこれまでに12種類選択した。

モノクローナル抗体を用いたマラリア発病阻止ワクチン候補抗原の探索  
無細胞生命科学工学研究センター プロテオーム・医薬部門 横内ゆき

[緒言]

マラリアは、熱帯・亜熱帯地域に広く分布し、世界 100 ヶ国余りの国々で流行し、全世界で 1 年間に 3～5 億人の患者、150～270 万人の死者があると報告されている重篤な感染症である。さらに、治療薬に耐性のあるマラリア原虫が大きな問題となっているが、感染を防ぐワクチンのような予防接種はない。

マラリア原虫がヒト体内で赤血球に侵入して赤血球内で約 40 時間かけて発育・増殖すると、10～30 個体の新しい原虫(メロゾイト)が形成される。このメロゾイトは、感染赤血球を破壊して血中に出現し、また新しい赤血球に侵入し発育する。これを繰り返すことで、マラリア原虫はヒト体内で発育増殖をすすめ、ヒトに発熱などマラリア症状を引き起こし、重症化すれば死に至る。これらの過程でマラリア原虫は特異的な原虫タンパク質を分泌しており、それらは赤血球への侵入や、感染赤血球の血管内壁への接着など感染の成立に重要な働きをしている。これらの原虫タンパク質の働きを阻止するワクチンが出来れば、マラリア原虫に感染しても発病を阻止することが可能となる。本研究では、このワクチンの標的となる抗原の探索を目的としている。

[方法]

まず、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトのタンパク質をマウスに免疫し、多種類のモノクローナル抗体を作製する。酵素結合免疫測定法(ELISA)を用いて、得られたモノクローナル抗体の中から原虫抗原を認識する抗体を選択する。次にこれらの抗体をそれぞれ、熱帯熱マラリア原虫の培養液中に添加して約 40 時間培養し(Growth Inhibition Assay)、原虫の発育増殖を抑制するモノクローナル抗体を選択する。原虫の発育増殖を抑制する抗体の認識する抗原を、以下の方法で同定する。1) AlphaScreen 法を用いた原虫組換えタンパク質からの同定、2) 抗体を用いて原虫のタンパク質から免疫沈降を行い、抗原タンパク質を単離した後、質量分析法を用いて同定。

[結果]

これまでの Growth Inhibition Assay は時間と多大な労力を必要とするものであったため、先ず、多検体が同時に処理可能な新しい Growth Inhibition Assay を確立した。次に、作製したモノクローナル抗体のうち、メロゾイトのタンパク質と特異的に結合していると考えられる 64 種類の抗体を用いて Growth Inhibition Assay を行い、増殖抑制活性の認められる 14 種類の抗体を同定した。

今後、これらの原虫増殖抑制抗体を用いて、上記手法により抗原の探索を進めていく予定である。

# 熱帯熱マラリア原虫完全長 cDNA ライブラリーの

## ハイスループットスクリーニング

無細胞生命科学工学研究センター プロテオーム・医薬部門 坂本寛和

### <緒言>

現代世界最大の感染症であるマラリアは、寄生性の単細胞真核生物であるマラリア原虫 (*Plasmodium* 属)が、ヒト吸血性のハマダラ蚊 (*Anopheles* 属)により媒介されて赤血球に侵入、発病する。ワクチン接種は理想的な感染症対策であり、実際に天然痘やポリオ(小児まひ)は克服された。しかしこれまでのマラリアワクチン開発は、少数の抗原(タンパク質)分子に基づいており、効果の高いワクチン候補抗原は未だ同定されていない。これに対してゲノムワイドなスクリーニングにより新規ワクチン候補抗原を探索するという全く新しいアプローチを可能としたのが、推定遺伝子数およそ 5400 種を含む熱帯熱マラリア原虫ゲノム情報の公開である(2002 年)。もっとも同アプローチの実行には、ハイスループットな<sup>1</sup> 組換えタンパク質の合成、<sup>2</sup> 免疫スクリーニングという技術的要件があり、熱帯熱マラリア原虫については1の鍵となる合成鑄型(=塩基配列)の調製、タンパク質合成のいずれも既存の手法に問題がある。前者はハイスループット化に有効な遺伝子特異的プライマーによる PCR 法ではコドン読み枠のズレが頻発すること、後者についてはスループットの低さと元来合成不可能な分子が多いこと(大腸菌生細胞で成功率 20%未満)であり、いずれもゲノム解読生物種中最高の AT 残基比率(エキソンで 76%、タンパク質コード領域で 70%以上)が主な原因と考えられている。タンパク質合成はコムギ胚芽無細胞系により大幅な改善を達成できたが(成功率約 80%)、その鑄型となる塩基配列をコドン改変を伴う人工合成により調製することは現実的ではない。そこで、PCR を用いずに完全長 cDNA を含むライブラリーを構築し、これからタンパク質合成鑄型を得ることで正確さとスループットの両立を試みた。同時に2の免疫スクリーニングについても少量の試料で迅速にタンパク質相互作用を解析する手法を抗原抗体反応の検出に応用することを検討した。以上の組み合わせによってゲノムワイドな新規マラリアワクチン候補抗原の探索を目的とした一連のハイスループットスクリーニング系の確立を試みた。

### <実験方法>

熱帯熱マラリア原虫 cDNA を PCR を利用せず(=塩基配列の正確さを確保)にクローニングして、ライブラリーを構築する。このライブラリーから完全長 cDNA を含むと予測されるクローンを選択する。得られた1444種のクローンから split PCR(=ハイスループットの追求)により転写鑄型を調製する。さらに転写反応により mRNA を合成する。それらを鑄型としてコムギ胚芽無細胞系により組換えタンパク質を合成すると同時に、合成産物をビオチン修飾する。合成反応の成否を、これらビオチン化体を蛍光アビジンでアフィニティ検出することにより確認する。合成が確認された組換えタンパク質(抗原)をマラリア感染者血清(抗体)試料を用いて免疫スクリーニングする。このスクリーニングについても、合成確認と同じビオチン化体を用いて、AlphaScreen™ 法によるハイスループット化を試みる。

### <結果>

1444 種の cDNA クローンから split PCR を用いて調製した転写鑄型より、1133 種の mRNA が合成された。これらのうち、初めのトライアルとして 133 種の組換えタンパク質合成を行ったところ、97 種の合成を蛍光アビジンにより確認した。今後、1133 種全ての合成産物についてタンパク質の合成を確認し、AlphaScreen™ 法により新規マラリアワクチン候補抗原の探索を行う予定である。

## 「コムギ胚芽由来の新奇コバルト結合タンパク質の解析」

無細胞生命科学工学研究センター 進化工学部門

渋谷謙介

### 要旨

我々の研究室では小麦胚芽無細胞系で合成した His タグ融合タンパク質をコバルトカラムで精製する際に、目的のタンパク質以外に特異的に結合する 2 つの小麦胚芽抽出液内在性タンパク質を見出した。これらの未知タンパク質は分子量が約 48、43kDa で、ユニークな性質を有していた。本研究では、アミノ酸シーケンサーなどを使ってタンパク質の同定を進め、その機能を解析することを目的とした。

まず、これら 2 つのタンパク質がコバルトカラム以外の他の His タグ精製用のカラムにも結合するか否か検証した。結果、これらのタンパク質がコバルトカラムだけでなくニッケルカラムにも特異的に結合することがわかり、His タグに類似した金属イオン結合特性を有することを確認できた。一方、グアニジン塩酸でタンパク質を変性させたところコバルトカラムへの吸着性が消失し、高次構造が金属イオン結合に重要であることを示唆する結果となった。

これらのタンパク質はともに 40kDa 以上の分子量を示すにもかかわらず、分子量 3 万カットの限外ろ過膜を通過するという非常に不思議な性質を持っている。この性質に buffer 中のどの成分が影響しているのか調べてみると、界面活性剤 Triton が膜透過性に寄与することがわかった。よってこのタンパク質は界面活性剤による何らかの構造機能変化が原因で限外濾過膜を透過するものと予想したが、限外濾過膜通過後のタンパク質も依然として金属イオン結合性を保持していた。更にこのタンパク質をゲル濾過で分画したところ 190kDa 付近にメジャーなピークが検出された。さらに SDS-PAGE によりピークの部分を解析したところ 48、43kDa の 2 つタンパク質が検出された。これらの結果より、この金属結合タンパク質は、可逆的に解離／集合を繰り返すことができる比較的安定な  $\alpha_2\beta_2$  のヘテロテトラマーを形成しているのではないのかという仮説を立てた。

これらのタンパク質を同定するため、末端アミノ酸配列分析を行ったが、両者ともに N 末端がブロックされていたため、プロテアーゼで分解してアミノ酸シーケンサーにかける方法をとった。これまでに V8 プロテアーゼ及びリシルエンドプロテアーゼを用いて 48kDa のタンパク質の 3 つの短断片について配列を決定した。得られたアミノ酸配列を基にして遺伝子データを検索したが、近縁種であるイネには相同するタンパク質遺伝子が全く見出されず、コムギに特異的な新奇タンパク質である可能性が高いと考えられる。さらに、我々は 48kDa と 43kDa の各タンパク質に共通なアミノ酸配列が存在することも確認しており、これら 2 つのタンパク質は単一の遺伝子由来のものである可能性も高いものと考えている。現在、他の分析法による解析も平行して進めている。

## 「無細胞タンパク質合成技術を利用した植物膜輸送タンパク質の機能解析」

無細胞生命科学工学研究センター 進化工学部門

宮田 拓治

(緒言) 植物は、我々哺乳類に無い代謝経路を持ち、糖類、脂肪酸、アミノ酸などの一次代謝物とともに、様々な二次代謝産物を生産する。我々の研究室では特に有用生理活性物質の前駆体となる芳香族アミノ酸の合成経路に着目し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた芳香族アミノ酸合成関連酵素群の機能解析を行っている。現在までに、個々の代謝系の鍵となる酵素を改変することで有用な物質を生産する高機能な植物の創出を目指してきたが、機能解析が困難な膜輸送タンパク質の利用を目指し、本研究を開始した。植物の芳香族アミノ酸は葉緑体に存在するシキミ酸経路を介して合成され、その出発物質の1つがホスホエノールピルビン酸 (PEP) である。細胞質で合成される PEP は、葉緑体の膜に局在するホスホエノールピルビン酸／リン酸輸送体(phosphoenolpylvate/phosphate translocator,PPT)により葉緑体ストロマ内に取り込まれ、カルビン回路の中間産物であるエリトロース 4-リン酸とともにシキミ酸経路の前駆体となる。すなわち、葉緑体への PEP 流量が代謝フローを規定する可能性が大きいという仮説が立つ。今回、我々はイネにおいて核にコードされた3種の PPT ホモログを見いだし、その機能解析を行った。

(結果) 3種の PPT ホモログ遺伝子を鋳型にしてコムギ無細胞系によりタンパク質を合成し、機能解析を行った。まずノーザンブロットによりイネの根と葉、両方において PPT1,2 の発現を確認した。また <sup>35</sup>S ラベルした PPT タンパク質および単離したエンドウ葉緑体を用いた葉緑体移行試験により、PPT ホモログは3種とも葉緑体に局在することを確認した。この移行実験により推定した N 末端シグナルペプチド領域を除いた成熟型タンパク質を合成したところ、これら成熟型 PPT タンパク質はいずれも不溶化しており、機能解析には使用できなかった。PPT は 6 回膜貫通領域を有する膜タンパク質であるため、通常の間条件下では大部分が不溶化し活性を失うと考えられる。従って、合成系に界面活性剤を添加することにより可溶化効率の改善を試みた。数種の界面活性剤についてスクリーニングを行ったところ、合成活性にほとんど影響を与えることなく、PPT タンパク質を可溶化した状態で調製可能な界面活性剤を見出すことに成功した。続いて、ミシガン州立大学の Weber 研究室において、可溶化合成した PPT タンパク質と半人工膜リポソームを用いたプロテオリポソーム再構成実験を行い、活性を検出することに成功した。現在、この新規技術の汎用性を確認するために様々な膜蛋白質の合成試験を進めているとともに、PPT については、確立した活性測定系を用いて基質特異性等の詳細をさらに明らかにするために実験を進めている。