

## 研究助成報告書（中間・終了）

No.1

整理番号	2019-J-027	報告者氏名	檜垣勇次
------	------------	-------	------

研究課題名：環境応答性構造反転を実現する非対称高分子ベシクルの創製

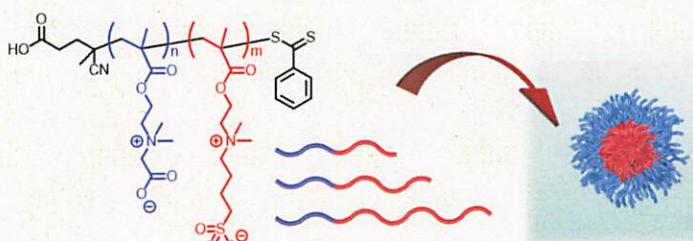
&lt;代表研究者&gt; 機関名：大分大学理学部 職名：准教授 氏名：檜垣勇次

<共同研究者> 機関名：大分大学工学研究科 職名：大学院生 氏名：清水 茜  
 機関名： 職名： 氏名：  
 機関名： 職名： 氏名：  
 機関名： 職名： 氏名：

## &lt;研究内容・成果等の要約&gt;

ブロック共重合体の集積により構築される高分子ミセル／ベシクルは、高分子量鎖状分子の集合体であるため低分子量両親媒性分子である界面活性剤や脂質と比較して、会合体の構造安定性が高く、分子量の制御や分子鎖の部分的な修飾によって、会合体の形態と環境応答性の設計が容易である。しかしながら、環境に応じて内層と外層の構造反転が誘導される非対称ベシクルについては未だ報告されていない。双性イオン高分子は、双性イオン構造、分子量、溶液の高分子濃度に応じて特異的な自己集合特性を示ため、環境応答性構造反転を発現する非対称高分子ベシクルの構成成分として期待される。本研究では、ポリ(カルボキシベタインメタクリレート)(PCB)鎖とポリ(スルホベタインメタクリレート)(PSB)鎖で構成される両双性イオンブロック共重合体(PCB-*b*-PSB)の合成と、水溶液中における環境応答性会合体形態変化の解明を目的とした(**Figure 1**)。

純水中において、重合度比  $PCB/PSB = 43/166$  の PCB-*b*-PSB は粒径分布の狭い球状ミセルを自発的に形成した。一方、重合度比  $PCB/PSB = 43/40, 43/100$  の PCB-*b*-PSB は安定な会合体を形成することなく孤立鎖となった。NaCl 水溶液中において、重合度比  $PCB/PSB = 43/166$  の PCB-*b*-PSB は NaCl 濃度増大により会合体形態が不安定化して粗大化し、単一分子鎖が解離した。すなわち、PCB-*b*-PSB は親水性の高い双性イオン高分子鎖のみからなるブロック共重合体であるにもかかわらず、ブロック共重合体を構成する分子鎖の分子量と PCB/PSB 組成比に応じて水溶液中で多様な会合体を形成する新たな会合性高分子であることが示された。



**Figure 1.** Schematic representation of zwitterionic PCB-*b*-PSB diblock copolymer aggregates.

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

1. Author: Akane Shimizu, Yuji Higaki

Title: Salt Concentration Dependent Transformation of Zwitterionic Block Copolymer Aggregates in Aqueous Solution

Conference: 2019 Pusan-Gyeongnam/Kyushu-Seibu Joint Symposium on High Polymers(19th) and Fibers(17th)

Venue: Pusan National University, Korea (2019.10.18), Poster

2. 発表者：檜垣勇次, 清水 茜

発表題目：双性イオンプロック共重合体会合体吸着膜の秩序構造

学会：第29回 日本MRS年次大会

会場／日時／形式：横浜市開港記念会館 (2019.11.29), 口頭

3. 発表者：清水 茜, 檜垣勇次

発表題目：双性イオン型ジプロックポリマー会合体の塩濃度依存性形態変化

学会：第69回 高分子年次大会

会場／日時／形式：オンライン (2020.5.27), ポスター

4. 発表者：清水 茜, 檜垣勇次

発表題目：双性イオン型ジプロック共重合体の塩濃度依存性会合形態変化

学会：第10回 CSJ 化学フェスタ

会場／日時／形式：オンライン (2020.10.22), ポスター

5. 発表者：清水 茜, 高橋将也, 檜垣勇次

発表題目：双性イオンプロック共重合体のイオン特異的相互作用による会合形態変化

学会：第30回 日本MRS年次大会

会場／日時／形式：オンライン (2020.12.09), ポスター

<研究の目的、経過、結果、考察(5000字程度、中間報告は2000字程度)>

### 【緒言】

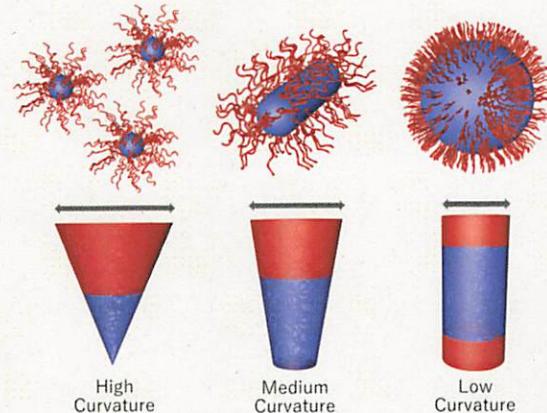
両親媒性分子の媒質中における自発的な集積により形成されるミセル状分子集合体や中空球状分子集合体であるベシクルは、薬物や美容有効成分の輸送や徐放、微小反応場など、物質科学分野や医療分野における実用化の可能性から多大な注目を集めている。ベシクル内部に薬剤を直接内包した薬物内包ベシクル、ベシクルに酵素を内包した生体内反応性ベシクル、腫瘍への集積を促進するターゲッティング機能を付与したベシクルキャリア等、数多くの機能性ベシクルが提案されている。しかしながら、脂質分子で構成されたベシクルは、構造安定性が低い上に、膜透過性が高く、選択的物質輸送が困難である。さらに、細胞膜では内葉と外葉を構成する脂質の組成が非対称であるため膜貫通タンパク質の配向が制御されており選択的物質輸送が実現されるのに対し、脂質分子の自己集合により形成される人工ベシクルは対称構造であるため、膜構成物質の配向制御や、内層と外層の独立した膜機能の制御に課題がある[1]。

ブロック共重合体の集積により構築される高分子ミセル／ベシクルは、高分子量鎖状分子の集合体であるため低分子量両親媒性分子である界面活性剤や脂質と比較して、会合体の構造安定性が高く、分子量の制御や分子鎖の部分的な修飾によって、会合体の形態と環境応答性の設計が容易である

(Figure 1) [1-4]。ブロック共重合体を構成する分子鎖の体積分子設計を設計することで、内層と外層の構成成分が異なる非対称ベシクルの自発的形成が達成されており、その分子鎖の多様性からブロック共重合体ベシクルは大いに注目を集めている。しかしながら、環境に応じて内層と外層の構造反転が誘導される非対称ベシクルについては未だ報告されていない。

正電荷と負電荷が炭化水素鎖で連結された双性イオンを側鎖に有する双性イオン高分子は、電荷と水との強い相互作用により極めて親水性が高いにもかかわらず、実効電荷が中性であるため生体高分子を含む荷電粒子との相互作用が弱く、生体適合性に優れる親水性高分子として注目されている[5-7]。双性イオン高分子は、双性イオン構造、分子量、溶液の高分子濃度に応じて特異的な自己集合特性を示す。ポリカルボキシベタイン(PCB)は水中で高度に水和して溶解する。一方、ポリスルホベタイン(PSB)は水溶液中でスルホベタイン基同士の相互作用により凝集する。このスルホベタイン凝集体はイオンとの相互作用により相互作用が遮蔽されるため、電解質水溶液中では分子鎖が解離する[7]。したがって、双性イオン高分子鎖の水中における凝集状態は環境に応じて変化するため、環境応答性構造反転を発現する非対称高分子ベシクルの構築に利用できる。

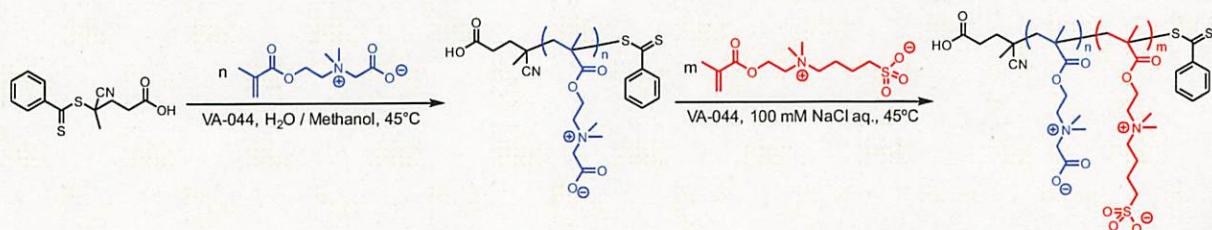
本研究では、双性イオン高分子ブロック共重合体の環境応答性凝集特性を利用することで、高度な構造安定性と、選択的物質透過／放出性、環境応答性を示す新規非対称高分子ベシクルの創生と環境応答性形態変化の実態解明を研究目的とした。



**Figure 1.** Various self-assembled structures produced by block copolymers. The structure is determined depending on the relative volume of the components.

## 【実験】

可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により、PCB 高分子連鎖移動剤 (PCB Macro-CTA) を合成し、PCB Macro-CTA より PSB 鎖を RAFT 重合によって鎖延長することで PCB-*b*-PSB を合成した (**Scheme 1**)。反応溶液を透析精製した後、溶液をメタノールに滴下し、沈殿物を遠心分離により回収した。動的光散乱 (DLS) 測定は、Zetasizer Nano ZS (Malvern) にて、He-Ne レーザー(波長 633 nm) を用い、測定温度 25°C、測定角度 173°で行った。PCB-*b*-PSB の純水中および NaCl 水溶液 (10 mM, 100 mM, 1000 mM) 中における流体力学的半径 ( $R_h$ ) を、散乱光強度の自己相関関数から計測した緩和時間より算出した剛体球の拡散係数より Stokes-Einstein 式に基づき求めた。



**Scheme 1.** Synthesis of PCB-*b*-PSB by RAFT polymerization

## 【結果・考察】

合成した PCB Macro-CTA と PCB-*b*-PSB の GPC 測定により計測した数平均分子量 ( $M_{n, GPC}$ ) と分子量分布 ( $M_w/M_{n, GPC}$ )、<sup>1</sup>H-NMR 測定により計測した PSB 鎖の重合度に基づき算出した数平均分子量 ( $M_{n, NMR}$ )、PCB 鎖と PSB 鎖の重合度から算出したブロック共重合体の重合度比を **Table 1** に示す。PCB Macro-CTA の分子量分布は十分に狭く、高度に分子量制御された高分子鎖が得られた。PCB Macro-CTA を RAFT 重合で鎖延長して PSB 鎖の分子量を制御することで PCB/PSB 組成比の異なる PCB-*b*-PSB ブロック共重合体を系統的に合成した。PCB-*b*-PSB の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルには、PCB の四級アンモニウムカチオンメチル基 (3.35 ppm) と PSB の四級アンモニウムカチオンメチル基 (3.24 ppm) のシグナルがそれぞれ観測され、積分比より PSB 鎖の重合度を算出して PCB-*b*-PSB の数平均分子量を算出した ( $M_{n, NMR}$ )。 $M_{n, GPC}$  と  $M_{n, NMR}$  がよく対応しており、GPC 測定で計測された分子量、分子量分布は十分に正確であると考えられる。

**Table 1.** Molecular weight, molecular weight distribution, and composition of PCB Macro-CTA and PCB-*b*-PSB copolymers

Sample	$M_{n, GPC}^a$	$M_w/M_{n, GPC}^a$	$M_{n, NMR}^b$	PCB/PSB <sub>GPC</sub>	PCB/PSB <sub>NMR</sub>
PCB <sub>43</sub>	9,500	1.11	—	—	—
PCB <sub>43</sub> - <i>b</i> -PSB <sub>40</sub>	21,100	1.11	21,200	1/0.92	1/0.93
PCB <sub>43</sub> - <i>b</i> -PSB <sub>100</sub>	32,100	1.10	38,800	1/1.8	1/2.33
PCB <sub>43</sub> - <i>b</i> -PSB <sub>166</sub>	55,800	1.08	58,200	1/3.67	1/3.86

<sup>a</sup>Determined by GPC measurement; <sup>b</sup>Determined by integration of the signals assigned to the PCB and PSB chains.

PCB<sub>43</sub>-*b*-PSB<sub>166</sub> は純水中で  $R_h = 40.5 \text{ nm}$  の粒径分布の狭い均質な会合体を形成した (**Figure 2 (c)**)。PCB、PSB はともに親水性であるが、PSB は純水中で側鎖のスルホベタイン基同士が分子間相互作用により凝集する。したがって、純水中で形成された会合体は PSB 鎖がコア、PCB がシェルのコアシェル型会合体であると考えられる。透過型電子顕微鏡による相補的な解析が必要であるが、ブロック共重合体が形成する高分子ベシクルは、 $R_h > 100 \text{ nm}$  となることが多いため、計測されている会合体はミセル状会合体であると解釈している。

一方、PSB 組成比の低い  $\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{40}$  と  $\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{100}$  は、会合体由来のシグナルと単分子鎖由来のシグナルがそれぞれ観測された (Figure 2(a), (b))。PSB の重合度が低下すると、分子鎖間で相互作用するスルホベタイン基の数が減少するため、会合駆動力が低下する。したがって、孤立分子鎖に相当する  $R_h \approx 4 \text{ nm}$  の散乱体が発生していると推測する。また、PCB と PSB の重合度が同等である  $\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{40}$  では、ブロック共重合体の分子量が小さいにもかかわらず、会合体の  $R_h$  が大きくなつた (Table 2)。PCB 鎖と PSB 鎖の体積比が均等になるとブロック共重合体凝集体の界面曲率が低下して二分子膜状の会合体を形成する。すなわち、ミセル状会合体からベシクル状会合体への構造転移を起こしていると考えられる。

$\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{166}$ ,  $\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{100}$  は純水中でミセル状会合体を形成していたが、塩濃度の増加に伴い、分子鎖が会合体から脱離した (Figure 2(b), (c))。PSB 側鎖の分子間相互作用が水溶液中のイオンにより阻害されるためであると考えられる。一方、 $\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{40}$  は会合形態の変化がみられなかつた (Figure 2(a))。二分子膜状会合体は球状会合体と比較して分子鎖の狭雑によるエントロピー損失が小さいことに加え、PSB 分子鎖の分子量が低いためイオンによる会合阻害の影響が低かつたと考えられる。

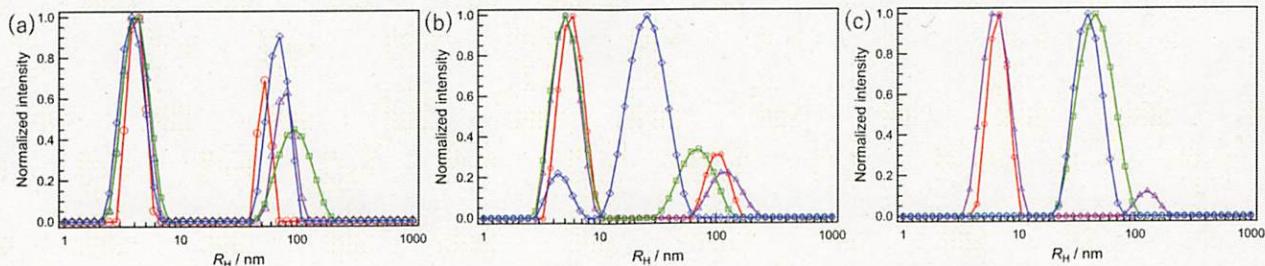


Figure 2. Hydrodynamic radius of gyration of (a)  $\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{40}$ , (b)  $\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{100}$ , (c)  $\text{PCB}_{43}\text{-}b\text{-PSB}_{166}$  in pure water (blue rhombus), 10 mM NaCl aq. (green square), 100 mM NaCl aq. (purple triangle), 1.0 M NaCl aq. (red circle).

### 【結論】

PCB-*b*-PSB 両双性イオンブロック共重合体は、ブロック共重合体の分子量と PCB/PSB 組成比に応じて水溶液中で多様な会合体を形成することが明らかとなつた。両双性イオンブロック共重合体は、双性イオン高分子鎖における水溶性の非対称性と環境応答性を利用した新たな会合性高分子として位置づけられる。今後、会合体構造の全貌の解明と医用分子システムへの応用を目指して研究を継続する。

### 参考文献

- Peyret, A.; Zhao, H.; Lecommandoux, S., *Langmuir* **2018**, *34*, 3376-3385.
- Cabral, H.; Miyata, K.; Osada, K.; Kataoka, K., *Chem. Rev.* **2018**, *118* (14), 6844-6892.
- Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J., *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 267-277.
- Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 113-131.
- Stefan Paschke, K. L., *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 129-151.
- Shao, Q.; Jiang, S., *Adv. Mater.* **2014**, *27* (1), 15-26.
- Higaki, Y.; Kobayashi, M.; Takahara, A., *Langmuir* **2020**, *36*, 9015-9024.