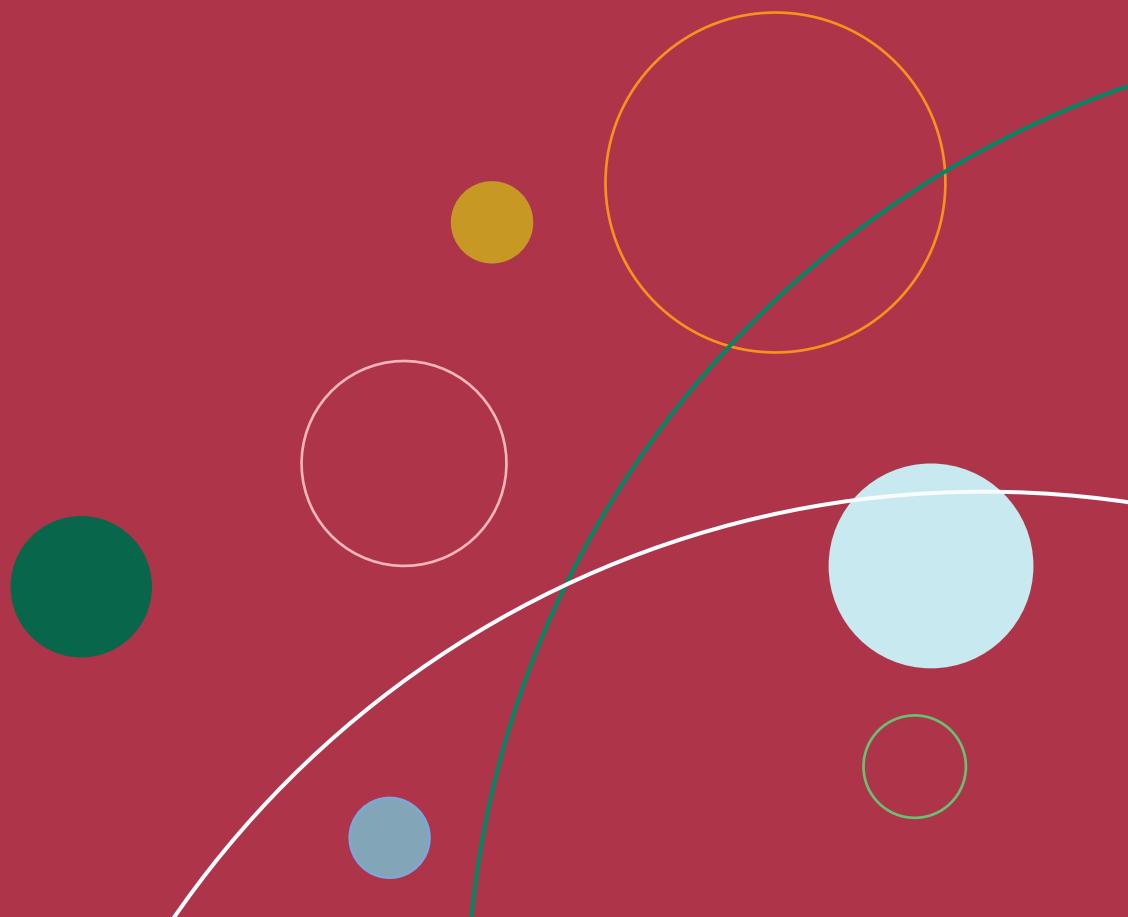


# 京都大学化学研究所 共同利用・共同研究拠点

化学関連分野の深化・連携を基軸とする  
先端・学際研究拠点  
平成25年度 成果報告書



京都大学化学研究所  
共同利用・共同研究拠点

化学関連分野の深化・連携を基軸とする  
先端・学際研究拠点

平成 25 年度成果報告書



## まえがき

京都大学化学研究所は、平成22年度から「化学関連分野の深化・連携を基軸とする先端・学際研究拠点」としての共同利用・共同研究拠点の活動を行ってきました。本拠点では、化学関連コミュニティの研究者の皆様からの要請を踏まえつつ、化学研究所の研究分野の広がりと深さ、そしてこれまでの様々な連携実績を活かして先端・学際的共同利用・共同研究を推進するとともに、国内外の研究機関の相互協力を担保するハブ環境の提供も目指しています。特に、同コミュニティの研究者の皆様と化学研究所の教員が手を携えて、応募していただいた分野選択型、課題提案型、施設・機器利用型、連携・融合促進型等の多彩な共同研究を展開するとともに、各種の国際会議、シンポジウム、研究会等を主催・共催することにより、多様でグローバルな化学研究を展開し、次代の化学関連分野を担う広い視野を持った若手研究者の輩出も図っています。また、所外、学外の有識者と化学研究所の教員を委員とする共同研究委員会および運営評議会を核として、共同研究課題の公募・採択などの拠点運営を円滑に遂行しています。

拠点活動4年目の平成25年度には、化学研究所教員が一丸となって対応させていただき、76件の共同利用・共同研究を採択・遂行し、5件の国際シンポジウムと4件の研究会・講演会を主／共催致しました。特に、年度末に開催した「スマートマテリアルの科学と技術」に関する国際シンポジウム ICRIS'14 では、材料化学、生物化学、有機化学の分野を中心として本拠点の成果も含む最先端の研究結果が発表され、最新の知見を共有するとともに活発な討論を通じて次のテーマも浮き彫りになり、今後に向けて、異分野間の連携促進という本拠点ひいては化学研究所の方針を再確認することになりました。以上の幅広い成果に加えて、年度前半に実施された文部科学省の拠点中間評価でS評価を受けたことも踏まえ、これからも引き続き本拠点の活動の充実・発展に努める所存です。皆様にはこれまで以上にご支援・ご協力を賜りますよう、よろしくお願ひ申しあげます。

本報告書は、平成25年度の本拠点における研究成果をとりまとめたものです。本報告書をご一読いただき、本拠点が今後目指すべき方向やその活動に係る改善・推進方法などについてお気づきの点がございましたら、忌憚のないご意見・ご提案をお寄せいただければ幸甚に存じます。

化学研究所  
所長 佐藤 直樹



# 平成25年度共同利用・共同研究報告書目次

## 1. 共同研究成果報告

### 分野選択型共同研究

#### ビーム科学分野

2013-1.	レーザー加速陽子を用いたリチウム電池の診断	光産業創成大学院大学	加藤 義章	1
2013-2.	X線構造解析によるレゾルシノールヒドロキシラーゼの反応機構研究	関西大学化学生命工学部	老川 典夫	3
2013-3.	I LC推進に向けた将来加速器技術開発 高エネルギー加速器研究機構 加速器研究施設	高エネルギー加速器研究機構 加速器研究施設	早野 仁司	5
2013-4.	中性子基礎物理実験のためのデバイス開発	名古屋大学理学研究科	北口 雅暁	7

#### 元素科学分野

2013-5.	蛍光性有機ケイ素化合物の開発と発光機構の解明	金沢大学理工研究域	前多 肇	9
2013-6.	ビナフチルセレノリン酸系を基軸とするキラル分子識別法・合成法の開発	岐阜大学工学部	村井 利昭	11
2013-7.	カルコゲン多重結合の高い求ジエン性を機軸とする新規複素環化合物の合成	金沢大学理工研究域	千木 昌人	13
2013-8.	ペロブスカイト $\text{BiNiO}_3$ をベースとした負の熱膨張を持つ材料の開発	東京工業大学応用セラミックス研究所	東 正樹	15
2013-9.	新規ドナーポリマーと新規フラーレン誘導体から構成されるバルクヘテロ接合有機太陽電池	大阪大学産業科学研究所	家 裕隆	17
2013-10.	シリル摂動効果を付与した低配位ホスフィンを利用する新規鉄触媒の開発	東京工業大学大学院理工学研究科	伊藤 繁和	19
2013-11.	四鉄上に配位したエチニルカチオンのルイス酸としての反応性	弘前大学大学院理工学研究科	岡崎 雅明	21
2013-12.	分子認識によるフラーレン配列構造の構築	広島大学大学院理学研究科	灰野 岳晴	23
2013-13.	環状 $\pi$ 共役分子の合成と物性	自然科学研究機構・分子科学研究所	鈴木 敏康	25

2013-14.	IV族半導体ナノ構造におけるスピンドイナミクスの研究	東京大学大学院総合文化研究科	深津 晋	27
2013-15.	シリコンフォトニック結晶の光ダイナミクスについての研究	大阪府立大学 21世紀科学研究機構	高橋 和	29
2013-16.	鉄触媒カップリング反応による糖アセチレン化合物の効率合成と刺激応答性発光機能の探索	岡山理科大学工学部	折田 明浩	31
2013-17.	溶液エックス線分光法を用いる鉄触媒炭素-炭素結合生成反応の反応機構解析	九州大学先導物質化学研究所	永島 英夫	33
2013-18.	ルテニウム錯体結合アミノ酸・ペプチド触媒の開発と木質バイオマス精密酸化分解反応への応用	京都大学生存圏研究所	渡辺 隆司	35
バイオ情報学分野				
2013-19.	パーソナライズド医療のための生物データの同時クラスタ解析法の開発	岐阜大学	志賀 元紀	37
2013-20.	ゲノム配列における頻出類似領域の発見	北海道大学	中村 篤祥	39
2013-21.	複雑二部ネットワークの解析と制御	東邦大学理学部情報科学科	ホセ ナチュエル	41
2013-22.	確率的手法に基づくタンパク質相互作用ネットワーク解析	九州大学マス・フォア・インダストリ研究所	丸山 修	43
2013-23.	ゲノム、メタゲノムの機能評価システムの開発とその応用	海洋研究開発機構	高見 英人	45
2013-24.	ヒト腸内細菌叢代謝経路データベースの構築	東京工業大学	山田 拓司	47
物質合成分野				
2013-25.	カルバゾロファンを有するポリマートーの合成、構造とその電子物性	大阪教育大学	谷 敬太	49
2013-26.	濃厚ポリマーブラシ付与ファイバーと細胞との相互作用に関する研究	物質・材料研究機構	吉川 千晶	51
2013-27.	精密重合法を用いたキチンナノファイバーポリマーブラシの合成と自己組織化アプローチによる階層構造を持った新規ソフトマテリアルの開発	鳥取大学工学研究科	伊福 伸介	53

2013-28.	新たな三次元構造拡張π電子系骨格を基盤とする 電子材料の創製	岡山大学大学院自然科学研究科	菅 誠治	55
2013-29.	海洋天然物アリロニンAの作用機構解明	筑波大学数理物質系大学院数理物質科学研究科	木越 英夫	57
2013-30.	機能性金属ナノ粒子を用いた新規光音響造影剤の合成	防衛医科大学校医用工学講座	石原 美弥	59
2013-31.	新規自己分解型ペプチドリンカーの開発	東京薬科大学薬学部	林 良雄	61
2013-32.	新規エンドソーム脱出ペプチドの開発	京都薬科大学薬学部 小暮 健太朗		63

### 現象解析分野

2013-33.	A型高分子絡み合い系の力学および誘電緩和過程に対する 束縛解放機構の寄与	大阪大学大学院理学研究科	浦川 理	65
2013-34.	F1モータータンパク質の機能発現における水の役割	横浜市立大学大学院生命医科学研究科	池口 満徳	67
2013-35.	フッ素化リン脂質および脂肪酸の単分子膜の構造解析	群馬大学大学院理工学研究科	園山 正史	69
2013-36.	立体制御したアクリルアミド系高分子薄膜の水分子 およびタンパク質収着の解析	広島大学大学院理学研究科	勝本 之晶	71
2013-37.	分子設計して調製したアントシアニン誘導体を用いる 高効率でカラフルな色素増感太陽電池の創製	名古屋大学大学院情報科学研究科	吉田 久美	73
2013-38.	日本海における生体活性微量元素の鉛直断面観測	近畿大学理工学部	中口 譲	75
2013-39.	新規多座配位子を用いた液液抽出系における金属 イオンの抽出挙動の調査	京都教育大学理学科	向井 浩	77
2013-40.	有機結晶中の分子間ハロゲン原子・カルコゲン原子 接触の研究	産業技術総合研究所ナノシステム研究部門	都築 誠二	79
2013-41.	ポリ尿素の結晶成長プロセスの解明	山形大学大学院理工学研究科	松葉 豪	81
2013-42.	ポリ乳酸／ナノファイバコンポジットの結晶化機構 に関する研究	群馬大学大学院理工学研究科	河井 貴彦	83

### 課題提案型共同研究

2013-43.	シスチン/グルタミン酸アンチポーターxCT および $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の阻害 による新規抗酸化ストレス応答誘導物質の開発	山形大学農学部	佐藤 英世	85
----------	---	---------	-------	----

2013-44.	電荷秩序状態を示すペロブスカイト酸化物における 焦電性の探索	東京大学物性研究所	高橋 竜太	87
2013-45.	新規オタマジャクシ型高分子の絡み合い緩和	名古屋大学	高野 敦志	89
2013-46.	マイクロ波伝導度法を駆使したマテリアルデザイン に基づく有機光電変換材料の開発	大阪大学大学院工学研究科	佐伯 昭紀	91
2013-47.	不斉4置換炭素含有複素環化合物ライブラリーの 構築と生理活性物質の検索	千葉大学大学院薬学研究院	石橋 正巳	93
2013-48.	多架橋型オリゴナフタレン類の合成と機能	京都府立大学大学院生命環境科学研究科	倉持 幸司	95
2013-49.	植物表皮細胞の分化における制御機構の研究	広島大学	富永 るみ	97
2013-50.	サイトカイニンに応答した転写因子 ARR1 の動態の 研究	理化学研究所環境資源科学研究中心 Jong-Myong Kim		99
2013-51.	合成細胞接着分子を利用した移植細胞延命化による 損傷治癒の促進	京都大学大学院薬学研究科	西川 元也	101
2013-52.	直接的アリール化反応を用いる効率的な $\pi$ 共役系 高分子合成法の開発	筑波大学大学院数理物質科学研究科	神原 貴樹	103
2013-53.	原子層制御蒸着法で作製したホイスラー合金 Co <sub>2</sub> MnSn を強磁性電極とする磁気トンネル接合素子による トンネル磁気抵抗効果と局所磁性に関する研究	名古屋工業大学	田中 雅章	105
2013-54.	フェリ磁性スピネル超薄膜の逆位相境界の制御	北海道大学工学研究院	長浜 太郎	107
2013-55.	1 nm 凹凸周期構造を利用したナノ粒子の規則配列化 と新奇光電子物性発現	東京工業大学	尾上 順	109
2013-56.	真空中四光波混合の検知へ向けた測定手法の開発	広島大学大学院理学研究科	本間 謙輔	111
2013-57.	高輝度テラヘルツ波放射による非線形相互作用物理 の探索 (Intense THz emission for nonlinear interaction physics)	大阪大学	長島 健	113
2013-58.	広帯域誘電分光と他の観測手法による生体水構造の 相補的解析	東海大学理学部	八木原 晋	115
2013-59.	キラルアミン化合物の酵素的生産法の開発	立命館大学生命科学部	三原 久明	117

2013-60.	細菌の金属代謝に関するタンパク質の同定と機能解析	近畿大学農学部	倉田 淳志	119
2013-61.	細胞内への薬物取り込みを制御可能な人工受容体-リガンドシステムの構築	大阪府立大学	中瀬 生彦	121
2013-62.	酸化物ガラスシンチレーターの開発	九州工業大学若手研究者フロンティア研究アカデミー	柳田 健之	123
2013-63.	固体NMRを用いたセシウムの土壤への吸着の解明	福島県農業総合センター	小野 勇治	125
2013-64.	ミューオン g-2/EDM 精密測定に関する開発研究 高エネルギー加速器研究機構素粒子原子核研究所		三部 勉	127
<b>施設・機器利用型共同研究</b>				
2013-65.	有機典型元素保護金属ナノ粒子の合成と構造解明	近畿大学理工学部	藤原 尚	129
2013-66.	色調可変有機セレノニウム塩の合成と構造 北里大学理学部（現立教大学理学部）		箕浦 真生	131
2013-67.	小員環骨格を有する高周期典型元素化合物の実験的電子密度分布解析 理化学研究所創発物性科学研究センター		橋爪 大輔	133
2013-68.	新規含リン芳香族化合物の合成と物性の解明 福岡大学理学部		長洞 記嘉	135
2013-69.	ヘテロ元素を骨格に含む新しい芳香族化合物の物理化学的性質の解明 埼玉大学大学院理工学研究科		斎藤 雅一	137
2013-70.	多核NMRによる交互共重合型無機系オリゴマー分子の解析および分子形態制御手法の開発 大阪府立大学大学院工学研究科		高橋 雅英	139
2013-71.	太陽電池用ポリマーの構造と機能 北海道大学大学院工学研究院		佐藤 敏文	141
2013-72.	パルスインジェクション法を用いてグラファイト表面に吸着させた超分子メタロポリマーのAFMによる観察 大阪大学大学院理学研究科構造熱科学研究センター		高城 大輔	143
2013-73.	Si中のヘリウムバブルのナノ電子分光学的研究 島根大学総合理工学研究科		宮本 光貴	145
2013-74.	ソフトテンプレート法による金属ナノリングの作製 東京理科大学工学部		河合 武司	147
<b>連携・融合促進型共同研究</b>				
2013-75.	「ペロブスカイト研究会」の開催 高輝度光科学研究センター	水牧 仁一朗		149
2013-76.	東アジア圏の若手レオロジストのための第9回ワークショップ 九州大学先導物質科学研究所	高橋 良彰		153

## 2. 國際會議、シンポジウム・研究会報告

### 国際会議

• 高分子結晶化国際会議 IDMPC2013	161
• 13 <sup>th</sup> Annual International Workshop on Bioinformatics and Systems Biology (IBSB 2013)	163
• 2013 International Workshop on Machine Learning and Applications to Biology (MLAB)	165
• HUPO Initiative Assembly in Kyoto (Uji)	167
• 京都大学化学研究所 国際シンポジウム 2014 (ICRIS'14)	169

### シンポジウム・研究会

• KUBIC-NII Joint Seminar on Bioinformatics	174
• 高分子物理学セミナー2013	176
• グリーントライボ・ネットワーク 夏の学校 2013	177
• ペロブスカイト構造物質研究会	179

## 3. 成果発表論文

183

(平成 26 年 4 月までに刊行された論文で平成 22、23、24 年度の成果報告書に掲載されていないもの)

紙数の都合により、\*を付けた論文のみについて、別刷りを本報告書に記載する。

\*Development of a novel nanoparticle by dual modification with the pluripotential cell-penetrating peptide PepFect6 for cellular uptake, endosomal escape, and decondensation of an siRNA core complex, *Biopolymers (Peptide Science)*, 100, 698-704(2013).

\*Infrared spectroscopic study of stereo-controlled poly(*N*-isopropylacrylamide) with an extended chain conformation induced by adsorption on a gold surface, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 9411-9418(2013).

\*VMAT2 identified as a regulator of late-stage  $\beta$ -cell differentiation, *Nat. Chem. Biol.*, 10, 141-148 (2014).

Curvature Engineering: Positive Membrane Curvature Induced by Epsin N-Terminal Peptide Boosts Internalization of Octaarginine, *ACS Chem. Biol.*, 8, 1894-1899 (2013).

Syntheses and Structures of an "Alumole" and Its Dianion, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 10031-10034 (2013).

Investigation of the Carboxylate Position during the Acylation Reaction Catalyzed by Biaryl DMAP Derivatives with an Internal Carboxylate, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 6445-6449 (2013).

Collagen-like Cell-penetrating Peptides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 5497-5500 (2013).

Synthesis of a Dialumene-Benzene Adduct and Its Reactivity as a Synthetic Equivalent of a Dialumene, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 10818-10821 (2013).

Syntheses and Structures of Terminal Arylalumylene Complexes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press, DOI: 10.1002/anie.201310559.

Molecular interplays involved in the cellular uptake of octaarginine on cell surfaces and the importance of syndecan-4 cytoplasmic V domain for the activation of protein kinase C $\alpha$ , *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014 Mar 12. pii: S0006-291X(14)00449-5.

Flux Balance Impact Degree: a New Definition of Impact Degree to Properly Treat Reversible Reactions in Metabolic Networks, *Bioinformatics*, 29, 2178-2185 (2013).

Supervised de novo Reconstruction of Metabolic Pathways from Metabolome-scale Compound Sets, *Bioinformatics*, 29, 135-144 (2013).

Prediction of Heterotrimeric Protein Complexes by Two-phase Learning Using Neighboring Kernels, *BMC Bioinformatics*, 15, Suppl 2, [6:1-6:6] (2014).

A New Family of Multiple-Bond Compounds between Heavier Group 14 Elements, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 86, 1005-1021 (2013).

1,2-Bis(ferrocenyl)dipnictenes: Bimetallic Systems with a Pn=Pn Heavy  $\pi$ -Spacer (Pn: P, Sb, and Bi), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 86, 1132-1143 (2013).

A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells, *Cell Reports*, in press.

Carboxylated SiO<sub>2</sub>-Coated  $\alpha$ -Fe Nanoparticles: Towards a Versatile Platform for Biomedical Applications, *Chem. Commun.*, 49, 2563-2565 (2013).

Synthesis and Photovoltaic Properties of Bulky Acceptor Materials Based on the Dimerization of Fullerene C<sub>60</sub> for Efficient Polymer Solar Cells, *Chem. Commun.*, 49, 3670-3672 (2013).

Physical properties of mononuclear organoeuropium sandwich complexes ligated by cyclooctatetraene and bis(trimethylsilyl)cyclooctatetraene, *Chem. Phys. Lett.*, 595-596, 144-150 (2014).

1,2-Bis(ferrocenyl)-Substituted Distibene and Dibismuthene: Sb=Sb and Bi=Bi Units as  $\pi$  Spacers between Two Ferrocenyl Units, *Chem. Asian J.*, 8, 690-693 (2013).

Size- and Orientation-Selective Encapsulation of C<sub>70</sub> by Cycloparaphenylenes, *Chem. Eur. J.*, 19, 14061-14068 (2013).

Synthesis and self-assembly of NCN-pincer Pd-complex-bound norvalines, *Chem. Eur. J.*, 19, 12356 - 12375 (2013).

Synthesis and Structure of a 1-Phospha-2-boraacenaphthene Derivative and Its Chalcogenation Reactions, *Chem. Eur. J.*, 20, 3752-3758 (2014).

Unique Synthetic Approach toward a Phosphaalkene: Synthesis of a Selenium-substituted Phosphaalkene with Bulky Substituents, *Chem. Lett.*, 43, 95-96 (2014).

Fast Algorithms for Finding a Minimum Repetition Representation of Strings and Trees, *Discrete Applied Mathematics*, 161, 1556-1575 (2013).

Cesium Transfer from Granule Conglomerate, Asphalt, and Concrete Using Water-Containing Nanosized Air Bubbles, *ECS Trans.*, 50, 1-6(2013).

Secretion of miraculin through the function of a signal peptide conserved in the Kunitz-type soybean trypsin inhibitor family, *FEBS Lett.*, 587, 1767-1772 (2013).

Origin of attraction in chalcogen-nitrogen interaction of 1,2,5-chalcogenadiazole dimers, *J. Phys. Chem. B*, 117, 6849–6855 (2013).

Low Band-gap Donor–acceptor Copolymers Based on Dioxocyclopenta[c]thiophene Derivatives as Acceptor Units: Synthesis, Properties, and Photovoltaic Performances, *J. Mater. Chem. A*, 1, 15000-15009 (2013).

Dynamic Amphiphile Libraries to Screen for the “Fragrant” Delivery of siRNA into HeLa Cells and Human Primary Fibroblasts, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 9295-9298 (2013).

Site-Selective Doping Effect in  $\text{AMn}_3\text{V}_4\text{O}_{12}$  ( $\text{A} = \text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{La}^{3+}$ ), *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 6056-6060 (2013).

Small-Molecule-Induced Clustering of Heparan Sulfate Promotes Cell Adhesion, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 11032-11039 (2013).

Asymmetric Induction via Short-Lived Chiral Enolates with Chiral C-O Axis, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 7102-7105 (2013).

Cyclochiral Conformational Motif Constructed Using a Robust Hydrogen Bonding Network, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 13644-13647 (2013).

Asymmetric  $\alpha$ -Arylation of Amino Acid Derivatives by Clayden Rearrangement of Ester Enolates via Memory of Chirality, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 13294-13297 (2013).

Inhibition of Microtubule Assembly by A Complex of Actin and Antitumor Macrolide Aplyronine A, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 18089-18095 (2013).

Reversible Generation of a Carbon-Centered Radical from Alkyl Iodide Using Organic Salts and Their Application as Organic Catalysts in Living Radical Polymerization, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 11131-11139 (2013).

Facile N-H Bond Cleavage of Ammonia by an Iridium Complex Bearing a Non-innocent PNP-Pincer Type Phosphalkene Ligand, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 11791-11794 (2013).

Iron-Catalyzed Aromatic Amination for Nonsymmetrical Triarylamine Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 20262-20265 (2012).

Planar Chiral Tetrasubstituted [2.2]Paracyclophane: Optical Resolution and Functionalization, *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 335-3353 (2014).

Measurement of the Femtosecond Optical Absorption of Dielectric Relaxation of Monodisperse Linear Polyisoprene: Contribution of Constraint Release, *Macromolecules*, 46, 6067-6080 (2013).

Dewetting Process of Deuterated Polystyrene and Poly(vinyl methyl ether) Blend Thin Films via Phase Separation, *Macromolecules*, 46, 4540-4547 (2013).

Precursor of Shish-Kebab above the Melting Temperature by Microbeam X-ray Scattering, *Macromolecules*, 46, 3031-3036 (2013).

Uniaxial Extensional Behavior of  $(\text{SIS})_p$ -Type Multiblock Copolymer Systems: Structural Origin of High Extensibility, *Macromolecules*, 46, 2681-2695 (2013).

Component Relaxation Times in Entangled Binary Blends of Linear Chains: Reptation/CLF along Partially or Fully Dilated Tube, *Macromolecules*, 46, 9296-9312 (2013).

A Highly Efficient Catalytic System for Polycondensation of 2,7-Dibromo-9,9-dioctylfluorene and 1,2,4,5-Tetrafluorobenzene via Direct Arylation, *Macromolecules*, 46, 370-374 (2013).

A Highly Efficient Catalyst for the Synthesis of Alternating Copolymers with Thieno[3,4-c]pyrrole-4,6-dione Units via Direct Arylation Polymerization, *Macromolecules*, 47, 626-631 (2014).

\*Synthesis and Physical Properties of a Ball-Like Three-Dimensional  $\pi$ -Conjugated Molecule, *Nat. Commun.*, 4, 3694 (2013).

X-Ray Observation of a Helium Atom and Placing a Nitrogen Atom inside He@C<sub>60</sub> and He@C<sub>70</sub>, *Nat. Commun.*, 4, 1554 (2013).

KEGG OC: A Large-scale Automatic Construction of Taxonomy-based Ortholog Clusters, *Nucleic Acids Res.*, 41, D353-D357 (2013).

Paramagnet enhanced nuclear spin relaxation in H<sub>2</sub>O@Open-C<sub>60</sub> and H<sub>2</sub>@Open-C<sub>60</sub>, *Organic Letters*, 15, 4746 - 4749 (2013).

Expansion of orifices of open C<sub>60</sub> derivatives and formation of an open C<sub>59</sub>S derivative by reaction with sulfur, *Organic Letters*, 15, 2750 - 2753 (2013).

Assessment of Fullerene Derivatives as Rolling Journals in a Finite Carbon Nanotube Bearing, *Organic Letters*, 15, 3199-3201 (2013).

Asymmetric intermolecular conjugate addition of amino acid derivatives via memory of chirality: Total synthesis of manzacidin A, *Organic Letters*, 15, 864 - 867 (2013).

Biomimetic Synthesis of Zeylanone and Zeylanone Epoxide by Dimerization of 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, *Organic Letters*, 15, 1556-1559 (2013).

Synthesis of a Rhodium Carbonyl Phosphaalkenyl-Phosphido Complex: A Phosphorus Congener of Schiff Base Type N,N'-Chelating Monoanionic Ligands, *Organometallics*, 33, 1341-1344 (2014).

\*Measurement of transient photoabsorption and photocurrent of BiFeO<sub>3</sub> thin films: Evidence for long-lived trapped photocarriers, *Phys. Rev. B*, 89, 035133/1-035133/5 (2014).

Divergence-Free Transport of Laser-Produced Fast Electrons Along a Meter-Long Wire Target, *Phys. Rev. Lett.*, 110, [155001-1]-[155001-4] (2013).

The Ca<sup>2+</sup>-binding protein PCaP2 located on the plasma membrane is Involved in root hair development as a possible signal transducer, *Plant J.*, 74, 690-700 (2013).

Prediction of Heterodimeric Protein Complexes from Weighted Protein-Protein Interaction Networks Using Novel Features and Kernel Functions, *PLoS ONE*, 8, [e65265:1-e65265:7] (2013).

Variational Bayes Co-clustering with Auxiliary Information, *Proceedings of the 4th MultiClust Workshop on Multiple Clusterings, Multi-view Data, and Multi-source Knowledge-driven Clustering*, Article No. 5 (2013).

Removal of radioactive Cs from nonwoven cloth with less waste solution using aqueous sodium metasilicate, *J. Soc. Remed. Radioact. Contam. Environ.*, 1, 191-195 (2013).

Structural Controllability of Unidirectional Bipartite Networks, *Scientific Reports*, 3, [1647:1-1647:8] (2013).

Synthesis of Hexa(furan-2-yl)benzenes and Their pi-Extended Derivatives. *J. Org. Chem.*, 78, 2763-2768 (2013).

Synthesis and Characterization of Binary-Complex Models of Ureas and 1,3-Dicarbonyl Compounds: Deeper Insights into Reaction Mechanisms Using Snap-Shot Structural Analysis, *J. Org. Chem.*, 79, 1805-1817 (2014).

Liquid-Phase Synthesis of Multidecker Organoeuropium Sandwich Complexes and Their Physical Properties, *J. Phys. Chem. C*, 118, 5896-5907 (2014).

Removal of radioactive Cs from gravel conglomerate using water containing air bubbles, *Water Sci. Tech.*, 67, 996 – 999 (2013).

#### 4. 參考資料

4-1. 拠点中間評価結果	221
4-2. 平成 25 年度公募要領	222
4-3. 平成 25 年度採択課題一覧	229

# 1. 共同研究成果報告



## レーザー加速陽子を用いたリチウム電池の診断

加藤義章、三間国興、藤田和久（光産業創成大学院大学）

### 目的

高強度レーザー利用の新分野開拓を目指し、イオンビーム材料分析技術開発に取り組んでいる。具体的には、次世代リチウムイオン電池(LIBs)の開発に資するため、LIBs電極内のリチウムイオン分布のイオンビームによる測定法の開発を進める。本課題は、日本(JST) - スペイン(MICINN)研究交流事業(H23-26)の支援を得て、光産創大、京大(人間環境科学 内本嘉晴教授、化研 阪部周二教授)、原子力機構高崎研、筑波大学、豊田中研、トヨタ自動車 電池開発部、スペインマドリッド工科大間の共同研究を実施しているものである。静電加速器陽子ビーム(原子力機構高崎量子応用研究所TIARA)を用いたLIBs電極断面内のリチウムイオン分布の測定に成功しており、この成果を基盤として、研究・開発現場で使用できる小型イオンビーム分析装置の開発を目指す事になった。化研の超高強度レーザー装置T6を使用し、レーザー加速高エネルギーイオンによるLIBs電極内のリチウムイオン分布計測技術を開発する事が本共同研究の目的である。

### 実験方法

T6 レーザーを用いて高エネルギー陽子ビーム生成(1.0 MeV以上の高指向性プロトンビームの高効率生成と収束)を行ない、LIBsサンプルにレーザー生成陽子ビームに照射し、イオンビーム分析技術(Ion Beam Analysis: IBA), すなわち、核反応分析:NRA、粒子誘起ガンマ線分析:PIGEなどをLIBs電極の診断に活用できる事を明らかにする。

化研 T6 レーザーは、超高出力・高コントラストを有する世界最先端のレーザーであり、高エネルギーイオン生成に極めて適している。今迄は静電加速器生成連続イオン源を用いていたが、本研究ではレーザー生成パルスイオン源に適した分析技術を開発する。本研究に必要なイオンビーム発生とサンプル照射のための真空容器や計測装置等の実験機器は、阪部研究室の支援を得て上記日西研究交流事業及びトヨタ自動車電池研究部との共同研究により光産創大で製作し、化研に設置する。実験は光産創大のメンバー(加藤、三間、藤田他)が化研に滞在し、阪部研の協力により実施する。

### 研究成果

阪部研究室の井上助教、中島大学院生の協力を得て、イオンビーム生成、LIBsサンプル照射のための真空容器、レーザー照射装置を作成設置し、陽子ビームの発生実験を行なった。第1図は真空容器内のレーザービーム軸外し放物面鏡までの経路を示したものである。この配置では、右上方に回転円盤ターゲット設置し、レーザー生成イオンビームを右側面に設置した計測器やサンプルに導く。

予備実験では陽子ビームのエネルギー分布と角度分布を計測し、ビームの特性評価を行った。その結果を第2図に示す。このときのレーザー照射条件は、照射強度  $3 \times 10^{19} \text{ W/cm}^2$ 、パルス幅 40fs、パルスエネルギー 0.45J、集光径  $5 \times 3 \mu\text{m}^2$  であった。陽子ビームのエネルギーは 0.5MeV から 2MeV 超まで指数関数的に分布しており、0.5MeV 以上のビーム粒子数は、 $3 \times 10^8$  であった。

図2赤色のプロットより、ビームの角度広がりは、アルミディスクをコートした厚さ  $10 \mu\text{m}$  のプラスチックターゲットの場合、半値半幅 0.25 Rad. ( $15^\circ$ ) であった。一方、単純なプラスチック平板では、角度分布の揺らぎが大きく、半値全幅は 0.33Rad. であった。

### 結果の検討と今後の予定

TIARA の線形静電加速実験では、電流 100pA、約 20 分照射であり照射粒子数は  $8 \times 10^{11}$

であった。従って、レーザー陽子ビームで同じ条件を実現するには、少なくとも 3000 ショット／サンプルが必要である。これは 5Hz で 5 分の照射となる。実際には、照射領域が  $1 \text{ mm}^2$  のサンプルが標準であり、有効な陽子ビームは  $1 / 10$  程度以下と予想されるので、パルス当たり有効な陽子ビーム数を 10 倍にする必要がある。例えば、プラズチックの厚さを  $1 / 10$  にするとか、繰り返しを高くするとかの工夫が今後必要となる。また、IBA のための計測（アルファ粒子計測、中性子計測、ガンマ線計測）のためのシステムの整備が必要である。照射システムの設計にはイオンビームの発生、伝搬のシミュレーションが有効であり、大阪大学の研究生に依頼してイオンビーム伝搬のシミュレーションを開始している。とくに、外部磁場をかけた場合のイオンビームの収束を確認しつつ有る。

### 成果報告

- 1) K. Mima, et al., EPJ Web of Conference 59 (2013), 19001
- 2) Y. Nakashima, et al., 「高強度短パルスレーザーと薄膜との相互作用による陽子線発生」第34回レーザー学会年次大会、C220pIII10, 2014
- 3) Y. Kato, et al, “Toward in-situ observation of Li-ion distribution in Li-ion batteries”, TNT Conference Japan2014, 1.28-31, 2014

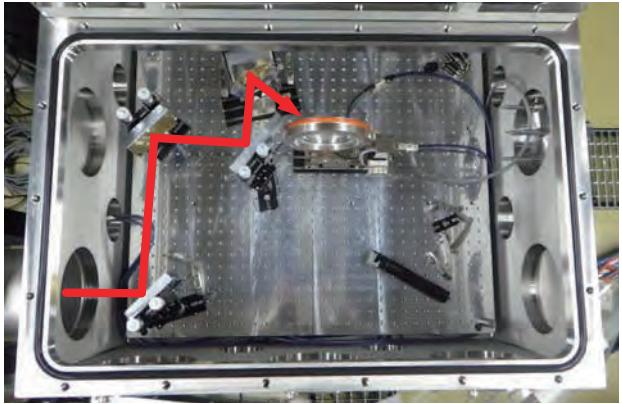


図1 レーザー照射真空容器

解析結果: 陽子線分布

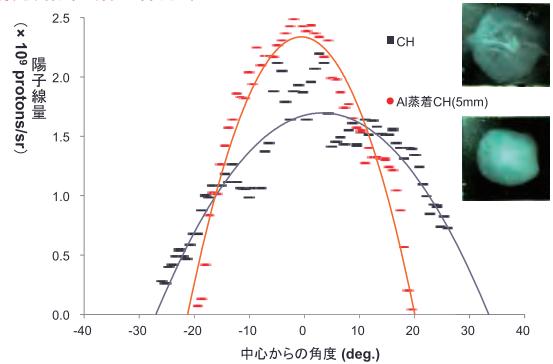


図2 陽子ビーム角度分布

## X 線構造解析によるレゾルシノールヒドロキシラーゼの 反応機構研究

老川 典夫・関西大学化学生命工学部

**【研究目的】** 代謝は生物の生存に必須の生体内化学反応で、その過程で酵素が反応に関与する。代謝の代表ともいえる物質代謝は大きく異化と同化に区分され、異化では高分子などの比較的大きい有機分子が酵素で分解されて低分子化することで生存に必要なエネルギーが生産される。微生物の生体内で行われる脂肪酸化合物や芳香族化合物の代謝において多くの酵素が働いている。ここで働く酵素の機能および反応機構を正確に理解するには、同一微生物の酵素群を対象としてその立体構造を決定し、構造一活性相関について構造生物学的に研究するのが正当法である。そこで、本研究課題では、根粒菌 *Rhizobium* のレゾルシノール代謝に関する酵素群 (GraA～GraD) のうちモノオキシゲナーゼ (GraA) とフラビンリダクターゼ (GraD) の二成分共存で機能してレゾルシノールをヒドロキシキノールに変換するレゾルシノールヒドロキシラーゼを対象として、それらおよび基質や補酵素との複合体の立体構造をX線解析により原子レベルで決定し、それらに基づいて機能発現機構の解明を研究目的として研究を行った。この研究を京都大学化学研究所の畠研究室との共同研究として進めるこことで、研究の一層の発展を期した。

本年度は、レゾルシノール代謝の初段階であるレゾルシノールからヒドロキシキノールへの反応を触媒するレゾルシノールヒドロキシラーゼの構成成分であるフラビンリダクターゼ (GraD) の機能発現機構解明を昨年度から継続し、より精密な解析を行った。GraD は GraA の酵素反応で生成される酸化型フラビンを還元することで GraA の酵素反応に利用可能な還元型フラビンを生成している。本酵素はアミノ酸残基数 179、質量 19,400 Da のサブユニット 2 個からなる二量体タンパク質である。本酵素は、補酵素 NADH が酵素に結合して先に酵素に結合している補酵素 FMN あるいは FAD を還元し、還元された補酵素フラビンが NAD の解離後に酵素に結合した基質 FMN あるいは FAD を還元して GraA に供給する、いわゆるピンポンバイバイ機構で機能していると考えられている。反応過程で補酵素フラビンは酵素に結合したままである。GraD の立体構造の解明は、TC-FDM (Two-component diffusible flavin monooxygenase) ファミリーにおける還元型フラビンの授受機構の解明に重要なだけでなく、このファミリー酵素の利用に関する研究にも寄与すると期待される。

**【実験方法】** GraD の大腸菌での大量発現および精製は確立された方法で行った。また、GraD の結晶構造解析は昨年度に確立した方法で行った。結晶化は少量の FAD を共存させた PEG2000 を沈殿剤溶液に用いた蒸気拡散法により 20 °C で行った。約 2 週

間で GraD–FAD 複合体結晶として X 線解析に供することのできる結晶を得た。また、得られた結晶を用いて浸漬法で GraD–FAD–NADH 三成分複合体結晶を調製した。つくばにある PFにおいて温度 100K で X 線回折強度データを収集し、GraD–FAD 複合体および GraD–FAD–NADH 複合体の X 線回折強度データを収集した。分子置換法により構造解析を進めた。まず GraD–FAD 複合体の結晶構造を決定し、得られた GraD–FAD 複合体の構造を用いて GraD–FAD–NADH 複合体の結晶構造を決定した。GraD–FAD 複合体および GraD–FAD–NADH 複合体について、 $1.8\text{\AA}$  分解能でそれぞれ  $R = 0.157$  ( $R_{\text{free}} = 0.191$ ) および  $R = 0.180$  ( $R_{\text{free}} = 0.212$ ) の構造を得た。得られた GraD–FAD 複合体および GraD–FAD–NADH 複合体の構造について、コンピュータグラフィックスを用いてリボンモデルや CPK モデルとして表示することにより、全体構造および補酵素 FAD や NADH<sub>2</sub> と基質 FAD の結合サイト周辺の構造を詳細に比較検討した。

**【結果と考察】** GraD は結晶中で二量体を形成しており、両サブユニット (A 鎖, B 鎖) には各 1 分子の FAD が結合していた。各サブユニットは、Greek-key topology で  $\beta$ -鎖が並んだ FMN-binding split  $\beta$ -barrel fold を  $\alpha$ -ヘリックスが蓋をする FMN 結合ドメインと末端領域の一部を含む付加ドメインで構成されている。A 鎖では N 末端 14 残基が FAD に外側から覆い被さるように相互作用していたが、B 鎖ではこの領域は明瞭な構造をとっておらず、FAD のイソアロキサジン環は溶媒に暴露していた。また、GraD–FAD–NADH 複合体では、B 鎖に結合した FAD 付近に NAD<sup>+</sup>の結合が確認された。そこで、各リガンドとタンパク質との相互作用と結合様式を明らかにするため GraD–FAD 複合体と GraD–FAD–NADH 複合体の構造を詳細に検討した結果、以下の事が解った。

補酵素 FAD は、イソアロキサジン環をフェニルアラニン 6 との環間相互作用で、疎水性部位を疎水性相互作用で、親水性部位を水素結合で、リン酸部を静電相互作用でタンパク質に認識され、結合している。NADH のニコチニアミドのアミド基はヒスチジン 143 と相互作用しており、リン酸基はアルギニン 21 によって認識されている。また、アデニン部分は、別のサブユニットのセリン 54 からメチオニン 57 の四残基により認識されている。このように両サブユニットが一方の NADH 認識に関与していることから、GraD はその機能を発現するために二量体構造をとっていると考えられる。

NADH による FAD の還元反応では、NADH のニコチニアミドの 4 位の炭素原子に結合した水素が FAD のイソアロキサジン環の 5 位の窒素に渡される。複合体構造は、二つの環同士がちょうど向かい合うように配置されて、NADH から FAD へのヒドリドの移動が可能な距離に位置していることを示している。

**【成果報告】** GraD に関する成果は、2013 年 3 月 25 日に日本農芸化学会 2013 年度年会 (仙台) において、また 2013 年 9 月 26 日に第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (雲仙) において口頭発表した。

# I L C 推進に向けた将来加速器技術開発

早野仁司・高エネルギー加速器研究機構 加速器研究施設

最近各種ニュースで取り上げられたヒッグス粒子とみられる新粒子の発見を受けて、高エネルギー物理の次期計画として国際的に研究されてきた I L C (International Linear Collider) 計画はいよいよ実現間近の様相である。I L C は昨年 T D R (Technical Design Report) を完成させ、その技術成熟度を増している。これまで、化学研究所のもつ加速器技術と新規アイデア、地元メーカとのつながりを有機的に連携させ、KEKとの協力のもと ILC 超伝導空腔開発に取り組み大きな成果を上げてきた。更にその連携を強固にし発展させるため、いくつかのテーマに関して共同研究として進めるのが合理的である。今後の超伝導空腔開発として、高電界性能の向上と更なる歩留まり改善、製造コスト削減の研究を推し進め、超伝導加速技術を完成の域に到達させる事を目的とする。

今年度計画していた開発項目は以下の 4 件である。

- (1) EBW 量産化技術
- (2) Tmap, Xmap
- (3) X-ray ラジオグラフィー
- (4) Klystron PM

(1) 超伝導空腔の製造時に時間短縮と作業員縮小の量産化技術を開発し、製造コスト削減に資するため、電子ビーム溶接機内に多数ワークを自動的に交換するローダーを開発し、メーカーにて試作を行った。これにより多数ワークを一度にセットでき、真空引きの時間が短縮できる。図 1 は 9 連空腔を構成するローダーの試作機である。各ダンベルは別途製作しておく必要があるが、このための四個装荷できるローダーも試作した（図 2 参照）。

(2) 超伝導空腔の高電界性能測定時に取り付ける温度センサーマッピング装置および x 線センサーマッピング装置は空腔に何らかの欠陥やコンタミの有無の情報を提供する。空腔はクライオスタット内で液体ヘリウムに浸けられるのでセンサーからの



図 1 9 連用ローダー

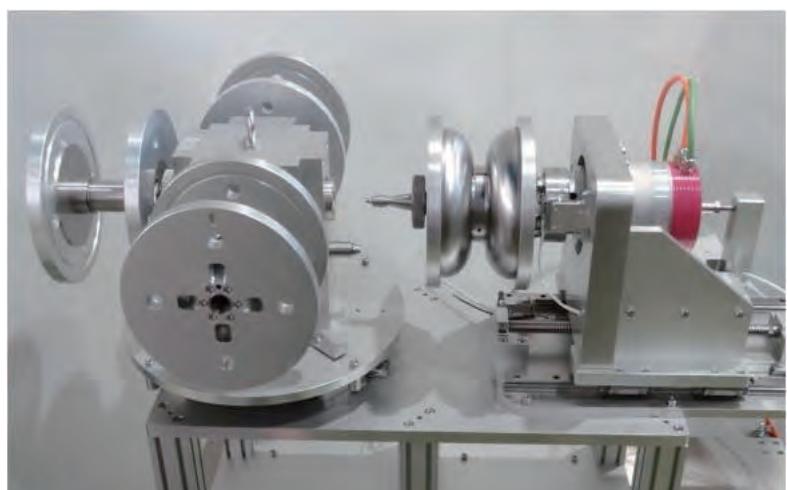


図 2 4 装版ダンベルローダー

信号線は最小にしながらも計測点は最大化したい。そのため、フレキシブル基盤上に多数のセンサーを配置しマルチプレクサーにて計測を行う装置を開発、メーカーにて試作を行い、3月には実際の超伝導空腔試験の現場で試験を行う予定である（図3参照）。

(3) ラジオグラフィーは透視すべき素材が比較的原子番号の大きいニオブでかつ厚さが約3 mmも有るため、一般に工業分野で対象になる鉄などと較べて透過率が低い（図4参照）。図3 マッピング検出器の超伝導空腔表面への装着テスト

率を上げることは出来るが、観測目標としているのがサブミリのボイドであるため、上げすぎるとコントラストが出なくなるきらいが有る。このため、ニオブの1つ下の原子番号を持つジルコニアムを用い、K吸収端直下の特性X線でどこまで見えるかのテストを行うべく装置の準備を行った。現在装置の長時間安定度に難があるため改良を重ねているところである。

(4) ILCに使用するクライストロンのビーム集束を電磁石から永久磁石に変更できると、コスト削減と電力削減になり、信頼性も向上する。設計にはクライストロンの構造や、必要な磁場分布の情報が必要なため、クライストロンメーカーとの守秘義務契約の締結が必要であるが、メーカー側の手続きが進まないため、今年度は構想を練るに留まった。

RF electromagnetic field and vortex penetration in multilayered superconductors, T. Kubo, Y. Iwashita and T. Saeki, 16th International Conference on RF Superconductivity, SRF2013, Paris, France, 22-27 September (Young Scientists Best Poster Award 受賞)

Anisotropic Ferrite Magnet Focusing System for Klystrons, Y. Fuwa, Y. Iwashita, H. Ikeda, R. Kitahara, Y. Nasu, H. Tongu, T. Matsumoto, S. Michizono, S. Fukuda, IPAC2013, Shanghai, China, p.2756-8, (2013)

RF Field-Attenuation Formulae for the Multilayer Coating Model, T. Kubo, T. Saeki, Y. Iwashita, IPAC2013, Shanghai, China, p.2343-5, (2013)

Update on Detection and Study of Welding Porosity in Niobium EBW, Y. Iwashita, Y. Fuwa, M. Hashida, S. Sakabe, S. Tokita, H. Tongu, K. Otani, H. Hayano, K. Watanabe, Y. Yamamoto, ECFA LC2013, May 2013, DESY 口頭発表

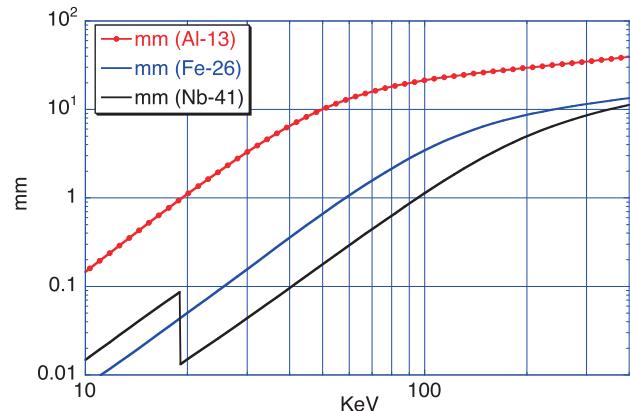
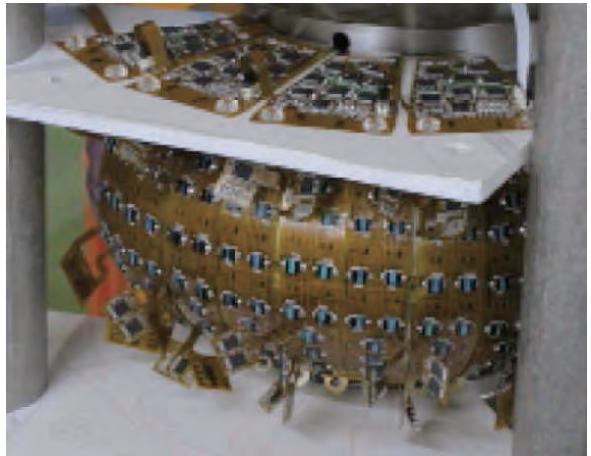


図4 X線の Al, Fe, Zr に於ける減衰長

重ねているところである。

図3 マッピング検出器の超伝導空腔表面への装着テスト

## 中性子基礎物理実験のためのデバイス開発

北口雅曉・名古屋大学・理学研究科

### 研究目的

中性子は素粒子・基礎物理研究にとって良いプローブである。例えば中性子の電気双極子能率(EDM)は時間反転対称性の破れに感度がある。極めて低エネルギーの中性子(UCN)は物質容器に蓄積することが出来、電気双極子能率と電磁場との相互作用を高精度で調べることができる。一方中性子は電気的に中性であるためビーム制御が難しい。この研究では特に中性子の磁気双極子能率と電磁場との相互作用を用いた高精度の軌道制御やエネルギー制御技術を開発し、基礎物理実験への実用化を目指す。

### 実験

UCNを用いたEDM測定では、実験位置でのUCN空間密度が精度向上のために重要である。UCNパルスを時間空間的に収束させる。中性子を磁場中でスピント反转させUCNの運動エネルギーを制御する。エネルギー変化は印加する高周波磁場の周波数に比例するので、速度に広がりを持ったUCNが通過する間に周波数を変化させて装置への到着時刻を制御できる。利用できるUCN量は高周波磁場の周波数幅と強度に依存する。我々はすでにプロトタイプ装置を用いてこの原理(UCN Rebuncher)を実証していたが[1]、周波数幅・強度ともに十分ではなく、収束による密度向上も1.4倍程度にとどまっていた。

今回、Rebuncher実用化に向けた開発を行った。よりパワーロスが少なく可変範囲の大きいコンデンサを作成し、従来14MHzから28MHzの範囲であった周波数幅を、7MHzから35MHzまでに拡大した(図1)。電力源を1kWから3kWに増強し、中性子スピント反转率100%に必要な磁場強度(2mT)が得られるようになった。これらはJ-PARCでのEDM実験計画[2]の要求性能を満たしている。2014年6月にJ-PARCでテスト実験を行う予定である。

J-PARC物質生命科学実験施設(MLF)の中性子基礎物理ビームラインBL05 NOPに、我々はドップラーシフターによるUCN発生装置を設置している[3]。J-PARCから供給される冷中性子を回転鏡による反射によってUCNに減速させる。ドップラーシフターへ中性子を輸送する光学系を整備した(図2,3)。UCNの発生数は3倍になると見積もられる。J-PARCの加速器出力の向上も含めると、約50cpsのUCNが得られると期待でき、上述のRebuncherテスト実験が可能となる。



図1:開発したRF共振回路

一方、<sup>3</sup>He ガスを使った比例計数管である UCN 検出器は経年劣化によって検出効率が低下していたため、ガスの詰め替えを行った。また部品の劣化と思われる純粋な回路上のノイズが大きかったため、基板ごと作り直した。ドップラーシフターからの振動によるマイクロフォニックノイズの影響を避けるため、通常の電荷積分型ではなくハイパスフィルターを付加し、信号よりも低い周波数帯のノイズの除去を図った。中性子検出動作は理研小型中性子源にてテストした。2 月中にドップラーシフターによる UCN を用いたテストを行う予定である。

UCN を用いた EDM 測定では実験領域での環境磁場の高精度測定が必要である。水銀原子のラーモア歳差回転をレーザーでプローブするシステムの開発を開始した。1.5mW のレーザーで水銀の共鳴線 254nm を観測できている。現在水銀原子を封入したセルを準備しており、今後緩和時間の測定やコーティングの中性子に与える影響の研究などを進める計画である。

今年度は J-PARC が運転されず中性子を用いた実験がほとんど行えなかつたが、Rebuncher など中性子制御デバイスの性能向上のための開発を行い、装置性能を確認した。J-PARC 運転再開後のテスト実験に向けて、ビームラインや検出器など周辺装置の準備を行った。



図 2: ドップラーシフター上流光学系

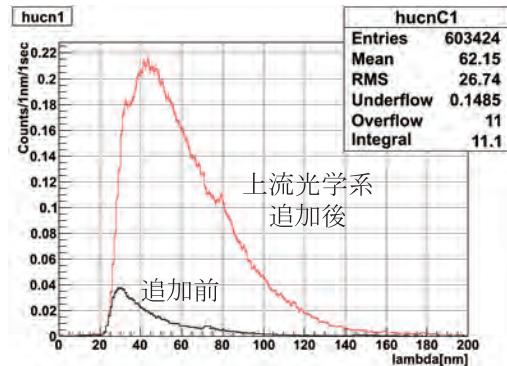


図 3: ドップラーシフターへ入射する  
冷中性子の波長分布。

## 参考文献

- [1] Y. Arimoto, et., al., Phys. Rev. A 86, 023843 (2012).
- [2] [http://j-parc.jp/jhf-np/pac\\_1001/pdf/KEK\\_J-PARC-PAC2009-11.pdf](http://j-parc.jp/jhf-np/pac_1001/pdf/KEK_J-PARC-PAC2009-11.pdf)
- [3] Y. Arimoto, et., al., Prog. Theor. Exp. Phys. (2012) 02B007.

## 成果報告

Rebunching Ultracold Neutrons by Magnetic Deceleration for the Neutron EDM Experiment at J-PARC, S. Imajo, Y. Iwashita, et.al, IPAC2013, Shanghai, China, p. 1187–9, (2013).

「J-PARC での EDM 測定を目指した UCN リバンチャーの改良」今城想平、日本物理学会年次大会、高知大、2013 年 9 月。

## 蛍光性有機ケイ素化合物の開発と発光機構の解明

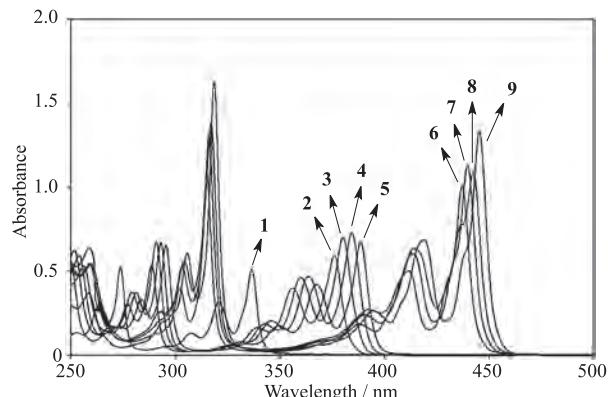
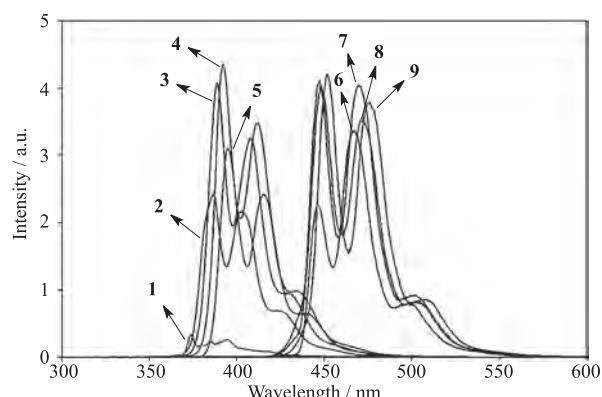
前多 肇・金沢大学理工研究域

芳香族炭化水素にケイ素官能基を導入すると、蛍光強度が増大する現象がしばしば報告されている。我々の研究グループでは以前、ナフタレン、ピレン、ペリレンなどの芳香族炭化水素類にトリメチルシリル基またはトリメチルシリルエチニル基を導入することにより、蛍光強度が著しく増大する現象を見出した<sup>1</sup>。本研究では、ケイ素上の置換基が吸収・蛍光特性に及ぼす効果について検討し、発光機構を解明する手がかりとする目的とした<sup>2</sup>。

テトラシリルピレン **2-5** およびテトラキス(シリルエチニル)ピレン **6-9** は、ピレンの臭素化、リチオ化と続くクロロシラン類との反応、菌頭反応を用いて合成した(Scheme 1)。

ピレン(**1**)と合成した **2-9** の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、

**1** に比べて **2-9** の極大吸収波長は長波長側にシフトし、モル吸光係数は増大した(Figure 1, Table 1)。ケイ素上のフェニル基の数が多いほど、長波長シフトの度合いは大きかった。また、**1-9** の  $10^{-5}$  M ジクロロメタン溶液の蛍光スペクトルを空気飽和条件下で測定したところ、**2-9** の蛍光強度は **1** に比べて著しく大きいことが分かった(Figure 2)。凍結脱気した  $10^{-5}$  M シクロヘキサン溶液を用いて蛍光量子収率( $\Phi_f$ )を測定したところ、**1** ( $\Phi_f = 0.32$ )に比べて **2** ( $\Phi_f = 0.56$ ), **3** ( $\Phi_f = 0.63$ ), **4** ( $\Phi_f = 0.70$ ), **5** ( $\Phi_f = 0.62$ )の蛍光量子収率は大きく、**6-9** ( $\Phi_f = 0.77 \sim 1$ )ではさらに大きな値を示した。ジクロロメタンを溶媒として飽和濃度で **1-9** の蛍光スペクトルを測定した結果、**6** ( $\lambda_{em} = 559$  nm), **7** ( $\lambda_{em} = 554$  nm), **8** ( $\lambda_{em} = 557$  nm)からは顕著なエキシマー発光が観測されたのに対し、**2-5** および **9** からはエキシマー発光は観測されなかった。これは、かさ高いケイ素官能基を有する場合、発光性のエキシマーの形成が立体障害により阻害されることを示している。

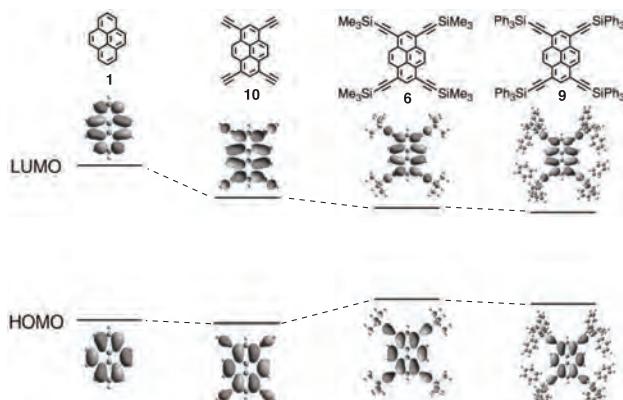
Figure 1. UV-Vis absorption spectra of **1-9** ( $1 \times 10^{-5}$  M in aerated  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).Figure 2. Fluorescence spectra of **1-9** ( $1 \times 10^{-5}$  M in aerated  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

**Table 1.** Physical properties of compounds **1-9**.

Compound	Absorption <sup>a</sup>		Fluorescence		Calculation <sup>d</sup>				<sup>29</sup> Si NMR <sup>e</sup> $\delta$ (ppm)	
	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\log \varepsilon$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{a}}$ (monomer) (nm)	$\Phi_f^{\text{b}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{c}}$ (excimer) (nm)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	energy gap (eV)		
pyrene ( <b>1</b> )	337	4.69	370	0.32 <sup>f</sup>	472	-5.459	-1.532	3.928	—	—
<b>2</b>	376	4.78	386	0.56 <sup>g</sup>	nd <sup>h</sup>	-5.326	-1.709	3.617	0.422	-6.6
<b>3</b>	380	4.85	389	0.63	nd <sup>h</sup>	-5.370	-1.760	3.610	0.463	-6.6
<b>4</b>	384	4.86	392	0.70	nd <sup>h</sup>	-5.407	-1.808	3.599	0.475	-9.3
<b>5</b>	389	4.83	395	0.62	nd <sup>h</sup>	-5.372	-1.779	3.594	0.476	-13.5
<b>6</b>	437	5.00	442	0.99 <sup>i</sup>	559	-5.244	-2.366	2.878	0.527	-17.4
<b>7</b>	440	5.05	446	0.9~1	554	-5.393	-2.459	2.934	0.549	-21.1
<b>8</b>	442	5.03	448	0.91	557	-5.360	-2.439	2.921	0.550	-25.1
<b>9</b>	445	5.12	452	0.77	nd <sup>h</sup>	-5.351	-2.434	2.917	0.560	-28.5

a)  $1 \times 10^{-5}$  M in aerated  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . b) Fluorescence quantum yield, degassed by freeze-pump-thaw method,  $1 \times 10^{-5}$  M in cyclohexane. c)  $1 \times 10^{-2}$  M in aerated  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . d) Calculated by B3LYP/3-21G. e) 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ . f) Data from Berlman, I. B. *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2nd ed., Academic Press, New York and London, 1971, p 383. g) Data from Maeda, H. et al. *Res. Chem. Intermed.* **2009**, 35, 939. h) Not detected. i) Data from Maeda, H. et al. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 824.

B3LYP/3-21Gによる計算を行った結果、**2-5**のケイ素官能基はペリ位の水素との立体反発が生じていることが分かった。特に化合物**5**では、重なり形(eclipsed)でSi-C1-C10-Hの二面角が12°となり、ねじれ形(staggered)に比べて16 kJ/mol不安定であった。また、ケイ素官能基およびエチニル基の導入により、HOMO-LUMO間のエネルギー差が縮まることが分かった(Figure 3)。エチニル基は電子求引基として働き、ピレンのLUMOのエネルギーが下がり、電子的に陽性な元素であるケイ素の導入により、HOMOのエネルギーが上がった。**2-9**上のケイ素官能基(SiR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>R<sup>3</sup>)は官能基全体として正電荷をもち、その正電荷の密度はフェニル基の数が増えるにつれて増大した。<sup>29</sup>Si NMRの化学シフト値はすべてMe<sub>4</sub>Siに比べて高磁場側に現れ、その高磁場シフトの度合いもフェニル基の数が増えるに従って増大した。以上の結果、ケイ素上のフェニル基の数が増えると $\sigma(\text{C-Si})-\pi^*$ 相互作用により $\pi$ 共役が拡張し、隣接する $\pi$ 電子によりケイ素が遮蔽される効果があるものと推定した。



**Figure 3.** Calculated HOMO and LUMO of pyrene and its derivatives.

(1) (a) Maeda, H.; Maeda, T.; Mizuno, K. *Molecules* **2012**, *17*, 5108. (b) Yamaji, M.; Maeda, H.; Nanai, Y.; Mizuno, K. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *536*, 72. (c) Yamaji, M.; Maeda, H.; Minamida, K.; Maeda, T.; Asai, K.; Konishi, G.; Mizuno, K. *Res. Chem. Intermed.* **2013**, *39*, 321.

(2) (a) 前多 肇, 鈴木 翼, 庄司智一, 千木昌人, 第60回有機金属化学討論会(2013年9月13-15日, 学習院大学), P3C-32. (b) Maeda, H.; Suzuki, T.; Shoji, T.; Segi, M. The 14th International Symposium Organized by Institute for Chemical Research, Kyoto University (ICRIS'14) "The Science and Technology of Smart Materials" (March 10-12, 2014), poster presentation.

# ビナフチルセレノリン酸系を基軸とするキラル分子識別法・合成法の開発

村井利昭・岐阜大工学部

ラジカル反応は、中性条件下空気中でも高い効率で進行するため、幅広く応用できる反応の一つである。そのため炭素ラジカルや様々なヘテロ原子ラジカルを用いた合成反応も広く開発されてきた。その中、リン原子中心ラジカルも同様で、三価あるいは五価のリン化合物からのリンラジカルの発生と不飽和化合物への付加を経由するリン—炭素結合形成反応が報告されている。ただしリン原子上さらには、それに組込まれた置換基がキラリティーを有するラジカルの反応例は少ない。しかも報告されている例では、ジアステレオ選択性を発現できていない。一方でリン—炭素を有する光学活性化合物の中には、高い生理活性を示す誘導体や、新しい遷移金属錯体触媒への配位子として利用できるものも多い。その様な背景の中、近年われわれは、ビナフチル基を有するリン酸誘導体の硫黄・セレン同族体に関する研究を行ってきた。そこでここでは、その誘導体を鍵化合物とするラジカル反応の開発を行った。

まず始めに、ビナフチルリン酸塩化物およびその硫黄・セレン同族体 **1** の  $\alpha$ -メチルスチレン(**4a**)への付加反応を、スズヒドリド(**3**)と AIBN 存在下、トルエン中で行った(テーブル 1)。リン酸塩化物 **1a** やチオリン酸塩化物 **1b** の **4a**への付加反応の効率は低く(Entries 1 and 2)、69 時間後でも目的生成物 **5** は 50%以下であった。一方、セレノリン酸塩化物 **1c**との反応は高い効率で進行し、対応する化合物 **5ca**を収率 76%で与えた。ただし反応で副生するスズ由来の化合物との分離が困難であった。そこで、リン原子上に PhSe 基を組込んだ化合物 **2**からのラジカルの発生と付加も行った。いずれも反応時間は大幅に短縮されたが、リン原子上が O, S, Se による生成物の収率の傾向は化合物 **1**と同様で、**2c**の反応が目的生成物を最も高い効率で与え、しかも高い純度で単離することもできた。

次に様々な置換基を有するアルケンへの **2c**の付加反応を行った(テーブル 2)。電子豊富なアルケンへの付加は高い効率を示したが、電子不足アルケンであるアクリル酸エチルへの付加反応では、対応する生成物は収率 24%でしか得ることができなかつた。

Table 1 Comparison of the reactivities of phosphoric acid derivatives and their isologues<sup>a</sup>

Entry	X	E	1, 2	time (h)	5	Yield (%)
1 <sup>b</sup>	Cl	O	<b>1a</b>	69	<b>5aa</b>	15 <sup>c,d</sup>
2 <sup>b</sup>		S	<b>1b</b>	69	<b>5ba</b>	40 <sup>c</sup>
3 <sup>b</sup>		Se	<b>1c</b>	21	<b>5ca</b>	76 <sup>c</sup>
4	SePh	O	<b>2a</b>	3	<b>5aa</b>	47
5		S	<b>2b</b>	3	<b>5ba</b>	38
6		Se	<b>2c</b>	3	<b>5ca</b>	78

<sup>a</sup> Reaction conditions: Bu<sub>3</sub>SnH (1.5 equiv), AIBN (0.125 equiv) at 80 °C for 3 h. <sup>b</sup> Xylene as a solvent and Bu<sub>3</sub>SnH (1.2 equiv) were used at reflux temperature. <sup>c</sup> The products were contaminated with a small amount of compounds that contained a Bu<sub>3</sub>Sn group. <sup>d</sup> Yields were determined by <sup>31</sup>P NMR of crude mixtures.

**Table 2** Addition of phosphorodiselenoic acid ester **2c** to alkenes<sup>a</sup>

Alkene	Product	Yield (%) <sup>b,c</sup>	Alkene	Product	Yield (%) <sup>b,c</sup>	Alkene	Product	Yield (%) <sup>b,c</sup>
		78 (50:50)			82			24
		55			51 (56:44)			46 (50:50) (43:57)
		61 (38:62)			62 <sup>c</sup> (54:46)			58 <sup>d</sup> (24:68:3:5)

<sup>a</sup> Reaction conditions: Bu<sub>3</sub>SnH (1.5 equiv), AIBN (0.125 equiv) at 80 °C for 3 h ( $n = 0$ ). <sup>b</sup> Isolated yields. <sup>c</sup> Ratios of diastereomers determined by <sup>31</sup>P NMR spectra of crude mixtures are shown in parentheses. <sup>d</sup> AIBN (0.125 equiv) was further added after 1 hour ( $n = 2$ ).

末端アルケン、内部アルケン、環状アルケンいずれの反応も同程度の効率で進行したもの、反応のジアステレオ選択性は低かった。たとえば **4i** への付加では目的生成物 **5ci** を四つのジアステレオマー混合物として与えた。

**Table 3** Radical addition of 3,3'-substituted phosphoroselenoic acid esters **2** with alkenes<sup>a</sup>

Alkene	Product	Yield (%) <sup>b,c</sup>	Alkene	Product	Yield (%) <sup>b,c</sup>	Alkene	Product	Yield (%) <sup>b,c</sup>
		72 (82:18)			51 (4:96)			57 (16:84)

<sup>a</sup> Reaction conditions: Bu<sub>3</sub>SnH (1.5 equiv), AIBN (0.125 equiv) at 80 °C for 7 h. AIBN (0.125 equiv) was further added after 1 and 4 hours. <sup>b</sup> Isolated yields. <sup>c</sup> Ratios of diastereomers determined by <sup>31</sup>P NMR spectra of crude mixtures are shown in parentheses.

そこでビナフチル基の 3,3'位にフェニル基を組込み同様のラジカル反応を行った(テーブル 3)。その結果、環状アルケンへの付加反応は、反応効率が低下することもなく、ジアステレオ選択性も格段に向上した。たとえば **4i** への付加では、二つのジアステレオマーを収率 57%、4: 96 の比で与えた。

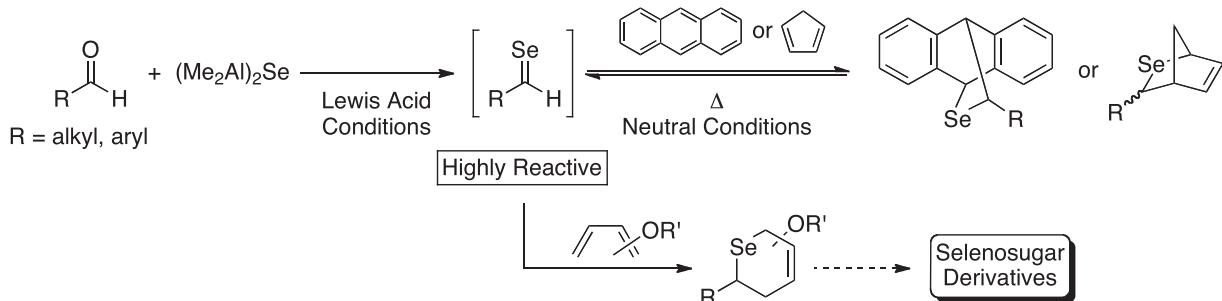
1) Murai, T.; Maekawa, Y.; Maruyama, T. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 9576.

## カルコゲン多重結合の高い求ジエン性を機軸とする 新規複素環化合物の合成

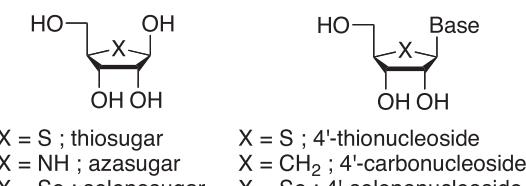
千木昌人・金沢大学理工研究域

### 【目的】

セレンやテルルなどのカルコゲン元素は非金属性と金属性の両面を合わせ持つユニークな元素であり、近年の典型元素化学の重要性と相まって活発に研究が行われるようになってきた。我々はこれまで、アルミニウム原子の酸素原子に対する大きな親和性に着目し、高周期カルコゲン元素と炭素原子との二重結合の効率的な構築法を確立し、カルボニル基から一段階で対応するカルコゲノカルボニル基に変換できるカルコゲン化試薬ビス(ジメチルアルミニウム)カルコゲニド( $(Me_2Al)_2E$ , E=S, Se, Te)を開発した。本研究では、得られた高活性な炭素-カルコゲン二重結合の高いジエノフィル性を利用し、セレノアルデヒド類を中心に、側鎖に酸素官能基を有する共役ジエン類との環化付加反応等を経てさらなる分子変換により、新規な複素環化合物、特にセレノ糖やセレノヌクレオシド関連化合物などの機能性化合物の合成を検討した。

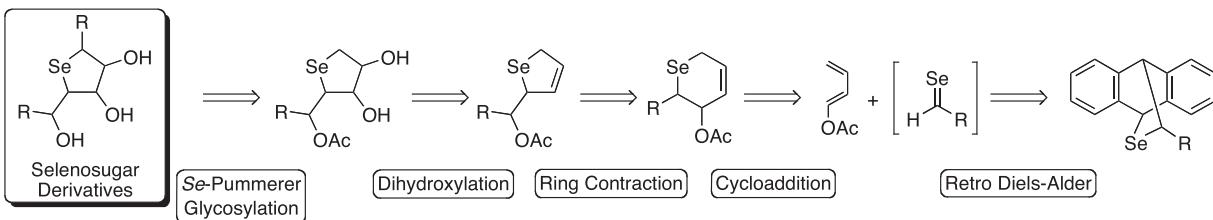


糖類やヌクレオシドの環内酸素を他のヘテロ原子に置き換えた擬似糖類（右図）は高い生理活性を示すことが期待され、これまでに窒素、硫黄、リンなどの擬似糖類が数多く合成されているが、同様な活性が期待されるセレノ糖類は合成の困難さのためほとんど報告例がない。なかでも、2位に核酸塩基の置換したセレノヌクレオシド類の合成に関しては、数例が報告されているにすぎないが、いずれも糖類を出発原料に用い、それらの開環とセレノアニオンを用いた閉環を経る多段階合成である。

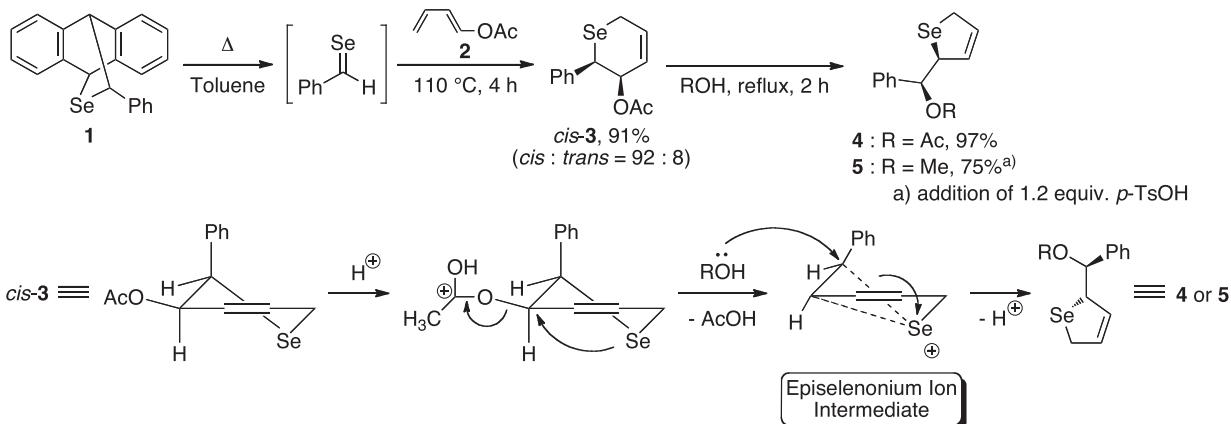


### 【実験・結果・考察】

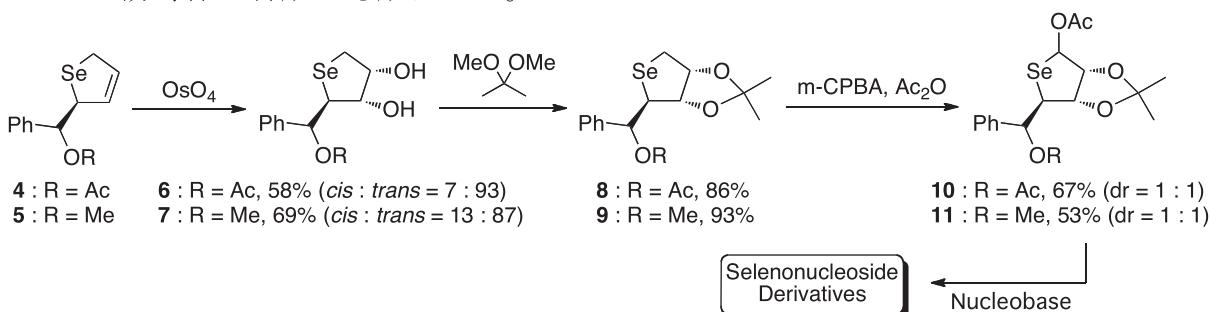
5員環セレノ糖関連化合物を合成ターゲットとし、以下に示す逆合成解析を行った。セレノアルデヒドとアセトキシブタジエンとの環化付加反応と、続く立体特異的環縮小反応を利用して5員環基本骨格を形成する。環内二重結合部位のジヒドロキシリ化により酸素官能基を導入し、最後に2位炭素への置換基導入を行う分子変換を計画した。



セレノベンズアルデヒドとアントラセンとの[4+2]環化付加体 **1** の熱的な逆 Diels-Alder 反応により、系中で再生されたセレノベンズアルデヒドと *trans*-1-アセトキシ-1,3-ブタジエン **2** との環化付加反応は位置及び立体選択性的に進行し、Ph 基と AcO 基が隣接する環化付加体 **3** をシス体優先で与えた。引き続き、主生成物の *cis*-**3** を酸性条件下、酢酸あるいはメタノールの還流温度で攪拌すると、立体特異的な環縮小反応が進行し、5員環の2,5-ジヒドロセレノフェン誘導体 **4, 5** を高収率で与えた。この環縮小反応は以下に示す反応機構で進行するものと考えられる。まず、酸性条件下 AcO 基のカルボニル酸素がプロトン化され酢酸分子として脱離する際に、Se 原子の隣接基関与により橋かけしたエピセレノニウムイオン中間体を形成する。このカチオン中間体のベンジル位へ溶媒分子が求核攻撃することで、環縮小した5員環化合物を与える。また、minor 生成物の *trans*-**3** からは立体配置が異なる対応した5員環化合物が生成することが確認され、この環縮小反応が立体特異的であることが明らかになった。



**4, 5** の環内二重結合部位を四酸化オスミウムで酸化した結果、*trans*-**6, 7** を優先的に与えた。次に、1,2-ジオールのアセトニド保護（**8, 9**）の後、無水酢酸を用い Se-Pummerer 転位による Se 原子の  $\alpha$  位への AcO 基の選択性的な導入を試みたが、その立体選択性はほとんど見られなかつたが、AcO 基の導入により 5 員環セレノ糖誘導体 **10, 11** の合成に成功した。さらに、核酸塩基を用い、**10, 11** から非天然型セレノヌクレオシド誘導体の合成にも成功した。



## ペロブスカイト $\text{BiNiO}_3$ をベースとした負の熱膨張を持つ材料の開発

岡研吾、東 正樹・東京工業大学応用セラミックス研究所

### 目的

近年の高精度化した光通信機器や半導体などの生産現場では、熱膨張による位置ずれが致命的である。現状、この問題を解決するため高度空調が行われているが、使用される莫大なエネルギーが大きな問題となっている。そこで正の熱膨張の問題を補償するために、温度が上がれば体積が収縮する負の熱膨張を示す物質が注目を集めている。我々は過去の研究で、ペロブスカイト  $\text{BiNiO}_3$  をベースとした系が巨大熱膨張を示す事を報告した[1]。母物質で  $\text{BiNiO}_3$  は常圧で  $\text{Bi}^{3+}_{0.5}\text{Bi}^{5+}_{0.5}\text{Ni}^{2+}\text{O}_3$  という特異な価数状態をとる[2]。高圧下では Bi の電荷不均化が解けると同時に Bi と Ni の間で電荷移動が起こり、 $\text{Bi}^{3+}\text{Ni}^{3+}\text{O}_3$  という価数状態に変化する[3]。この際、Ni の価数増大に伴い、大きな体積収縮が観測される。Bi の一部を 3 値しかとらない La で置換し、 $(\text{Bi/La})^{3+}\text{Ni}^{3+}\text{O}_3$  の価数状態を安定化すると、温度誘起の電荷移動相転移が起こる[4,5]。歪みゲージを用いた熱膨張率の測定では、実際に  $\text{Bi}_{0.95}\text{La}_{0.05}\text{NiO}_3$  が電荷移動相転移に伴い 320 K から 380 K の温度範囲で -82 ppm/K という従来材料の 3 倍もの巨大な負の熱膨張が観測される。このような相転移現象に由来する負の熱膨張現象は、組成によってチューニングできると期待される。そこで本研究では、La 以外のランタノイドイオン(Nd, Eu, Dy) で置換した系を合成し、負の熱膨張現象の組成依存性を詳細に調べた。

### 実験方法

試料原料には、目的の組成に金属比を合わせて  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Nd}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Eu}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Dy}_2\text{O}_3$ , Ni 粉末を混合し、硝酸に溶かした後、蒸発乾固させた沈殿を 750°C で熱処理したものを使用した。得られた原料に酸化剤を加え金カプセルに封入、6GPa, 1000°C の条件で 30 分間熱処理することにより目的の試料を得た。 $\text{Bi}_{1-x}\text{Ln}_x\text{NiO}_3$  ( $\text{Ln}$ : ランタノイド) の組成で  $x = 0.05, 0.075, 0.10$  の試料を合成した。京都大学化学研究所島川研究室の RINT-2000 中低温オプションを使用し、得られた試料の粉末 X 線回折パターン温度変化を測定した。得られた回折パターンをリートベルト解析することにより、電荷移動相転移に格子体積変化を評価した。

### 実験結果および考察

図 1 に示す様に、粉末 X 線回折実験より Bi を La, Nd, Eu, Dy で置換した全ての試料において、電荷移動相転移に伴う低温相の三斜晶構造から高温相の斜方晶構造への変

化を確認した。また回折パターンのリートベルト解析を行った結果、図2の通り、相分率の重みをつけた平均格子体積の温度変化で体積の収縮を確認した。熱膨張係数を表1にまとめる。La, Ndで置換した試料は置換量が増えるにつれ負の熱膨張の大きさが小さくなつたが、Eu, Dyで置換した試料は $x = 0.10$ まで巨大負の熱膨張を保持した。熱膨張の開始温度および線熱膨張係数を表1にまとめる。

以上の研究成果より、ペロブスカイト  $\text{BiNiO}_3$  をベースとした系の負の熱膨張現象は組成によりチューニング可能であることを明らかにした。

## 成果報告

本研究の成果は、K. Oka *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **103**, 061909 (2013)として出版された。

- [1] M. Azuma, *et al.*, *Nat. Commun.* **2** (2011) 347.
- [2] S. Ishiwata *et al.*, *J. Mater. Chem.*, **12** (2002) 3733.
- [3] M. Azuma *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **129** (2007) 14433.
- [4] S. Ishiwata *et al.*, *Phys. Rev. B*, **72** (2005) 045104.
- [5] K. Oka *et al.*, *Phys. Rev. B* **88**, 014112 (2013).

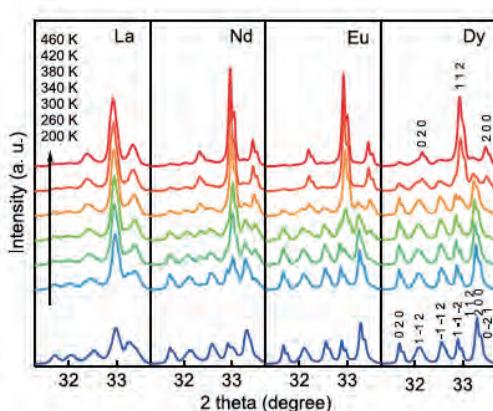


図1  $\text{Bi}_{1-x}\text{Ln}_x\text{NiO}_3$  ( $\text{Ln} = \text{La}, \text{Nd}, \text{Eu}, \text{Dy}$ )の粉末XRDパターンの温度変化

$\text{Ln}$	$x$ in $\text{Bi}_{1-x}\text{Ln}_x\text{NiO}_3$	$T$ (K)	$\alpha_L$ (ppm/K)
La	0.05	330 → 380	-70.7(2)
	0.075	220 → 280	-35.7(1)
	0.10	210 → 300	-5.2(1)
Nd	0.05	380 → 410	-134.4(2)
	0.075	280 → 330	-41.2(1)
	0.10	200 → 250	-29.7(1)
Eu	0.05	420 → 440	-69.6(3)
	0.075	330 → 390	-41.3(1)
	0.10	250 → 310	-43.9(3)
Dy	0.05	440 → 470	-104.3(6)
	0.075	410 → 460	-42.9(1)
	0.10	330 → 380	-67.5(2)

表1  $\text{Bi}_{1-x}\text{Ln}_x\text{NiO}_3$  ( $\text{Ln} = \text{La}, \text{Nd}, \text{Eu}, \text{Dy}$ )の線熱膨張係数

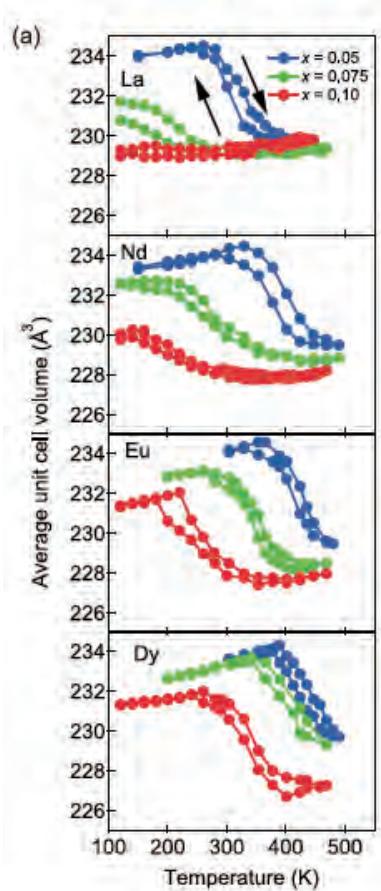


図2  $\text{Bi}_{1-x}\text{Ln}_x\text{NiO}_3$  ( $\text{Ln} = \text{La}, \text{Nd}, \text{Eu}, \text{Dy}$ )の単位格子体積の温度変化

## 新規ドナーポリマーと新規フラーレン誘導体から構成される バルクヘテロ接合有機太陽電池

家 裕隆・大阪大学産業科学研究所

**研究背景と目的**：現状の太陽電池の活性層には、シリコンに代表される無機半導体材料が用いられている。これに対して、次世代の太陽電池として、有機半導体材料を活性層に利用した有機薄膜型太陽電池が有望視されている。有機化合物でデバイスを作製することができれば、フレキシブル基板上に軽量かつ安価な材料で太陽電池を組むことが可能となる。また、現状の無機半導体材料では困難な太陽電池の曲面設置や大面積での利用が可能となることから、化石エネルギーの代替としての利用が期待されている。さらに、有機材料を用いた太陽電池は、有機化合物が本来持つ多様性を反映して、分子の様々な構造制御が可能であることから、従来の無機系太陽電池の性能を凌駕する可能性も秘めている。

有機薄膜型太陽電池の活性層を構成するためには p 型半導体材料と n 型半導体材料の両方が必要不可欠である。現状ではこれら 2 種類の材料を混合させて電荷分離層を薄膜内で効果的に形成させる観点から、バルクヘテロ接合の利用が盛んに行われている。有機薄膜型太陽電池の典型的な p 型半導体材料として、これまでポリ(3-ヘキシリチオフェン) (P3HT) が用いられてきた。しかし、最近では P3HT に代わる新たな p 型半導体材料の開発が望まれており、この点から主鎖にアクセプターユニットを導入したドナーアクセプター (D-A) 型ポリマーが注目されている。これは、アクセプターユニットの導入で HOMO-LUMO エネルギーギャップが狭くなることに起因して、分子内の電荷移動吸収による長波長光吸収が可能となること、および、HOMO レベルの低下に起因して開放端電圧の向上が期待できること、等の効果で、光電変換効率の向上が可能になるためである。このような背景の下、本研究では京都大学化学研究所の構造有機化学研究領域で開発した n 型半導体材料(フラーレン誘導体)との組合せにより、高効率な太陽電池作製を試みることを目的としている。この目的実現に向けて、新規アクセプターポリマーを設計・開発し、基礎物性の評価を行った。さらに、この D-A 型ポリマーの太陽電池材料としての特性を明らかとするため、市販の n 型半導体材料と組みあわせた素子を作製し、その特性評価を行った。

**実験方法**：本研究では我々が見いだした新規なアクセプターポリマー部位  $C_h$ ,  $C_{hy}$  と、ドナー部位としてジチエノシロールを組み合わせた共重合体  $DTS-C_h$ ,  $DTS-C_{hy}$ ,  $DTS-T-C_h$ ,  $DTS-T-C_{hy}$  の開発を行った(図 1)。

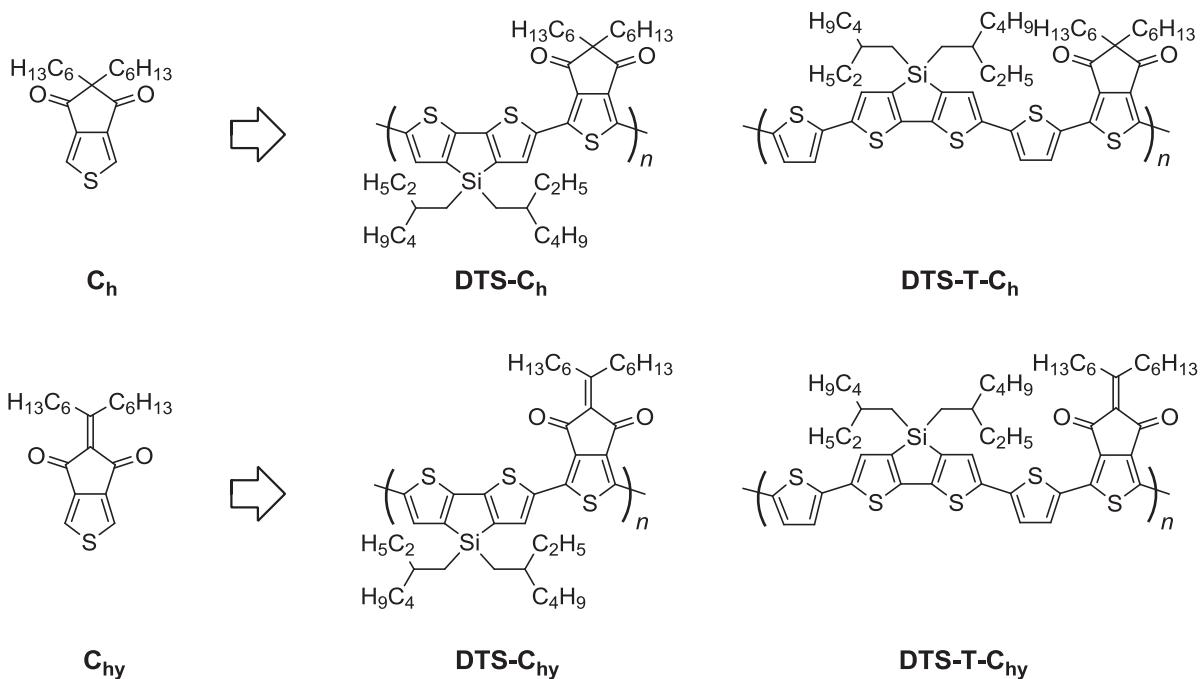


図 1 本研究で開発したポリマーの化学構造

**実験結果と考察：**ポリマーの合成は **C<sub>h</sub>, C<sub>hy</sub>** ユニットのジブロモ体とジチエノシロールのビスマスチル体との Stille カップリング反応で行った。一部のポリマーにおいて分子間の凝集が大きいことに起因して通常の測定条件で数平均分子量を見積もることができなかった。そこで化学研究所村田研究室の機器を用いて、140 度の高温条件で測定を行なった。その結果、分析 GPC 測定から数平均分子量は **DTS-C<sub>h</sub>**: 8.3, **DTS-C<sub>hy</sub>**: 6.3, **DTS-T-C<sub>h</sub>**: 11.7, **DTS-T-C<sub>hy</sub>**: 7.9 kg/mol と見積もられた。ポリマーの基礎物性と正孔移動度測定から、有機薄膜型太陽電池材料

としての機能が有望視された。そこで、これらのポリマーと典型的な n 型フーラーエン材料の PC<sub>61</sub>BM, PC<sub>71</sub>BM を組み合わせて素子の最適化検討を行なった。その結果、**DTS-T-C<sub>h</sub>/PC<sub>71</sub>BM** の組み合わせにおいて、5.17% の高い光電変換効率 (PCE) が得られた (図 2)。この結果を基に、今後、構造有機化学研究領域で開発した n 型半導体材料と組み合わせた素子作製へと展開を行っていく予定である。

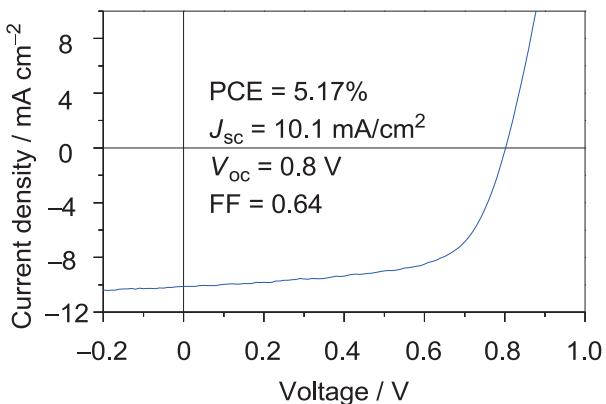


図 2 本研究で開発したポリマーの太陽電池特性

成果報告 : J. Huang, Y. Ie, M. Karakawa, Y. Aso, *J. Mater. Chem. A* 1 (2013) 15000-15009.

## シリル摂動効果を付与した低配位ホスフィンを利用する 新規鉄触媒の開発

伊藤 繁和・東京工業大学大学院理工学研究科

### 研究目的

3価リンと  $sp^2$ 炭素が二重結合を形成しているホスファアルケンは、P=C分子骨格の低いLUMO準位に由来する強いパイ受容性を示す。これは通常用いられる3価3配位のホスフィンには見られない特徴であり、錯体配位子として用いると中心金属のルイス酸性が高まっている<sup>1)</sup>。このP=C二重結合の炭素上にシリル基を導入すると、シリル基が電子供与性置換基として作用するため、分子骨格のLUMO準位が更に低下し、より強いルイス酸性を示す触媒機能が発現すると考えられる。しかし、これまでにシリル基を導入したホスファアルケン誘導体は幾つか合成されているものの、その配位化学および触媒機能に関する知見は限られている。また、ホスファアルケン構造に関連する典型元素置換基を導入した場合の特性変化についても、系統的な検討例は非常に少ない。

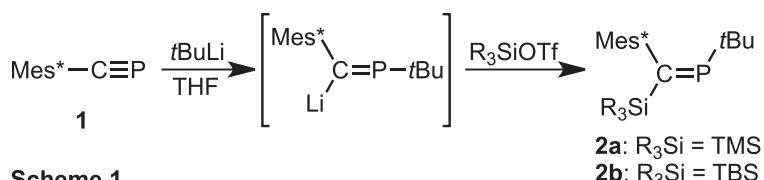
本研究では、ホスファアルケン骨格の炭素原子上にシリル基を導入した誘導体を利用する新規かつ実用的な触媒の創成を目的として、配位子骨格の合成とその構造特性を検討した。また、シリル基に関して、フッ素原子を導入したホスファアルケン誘導体にも検討することとした。また、主に鉄を中心金属とする遷移金属錯体に誘導し、その触媒活性を明らかにすることを目的とした。

### 実験方法

かさ高いMes\* (=2,4,6-トリ-*t*-ブチルフェニル) 基を速度論的安定化基として用いてP=C三重結合化合物(ホスファアルキン)1を合成した。この1にアルキルリチウムを作用して生成したホスファビニルアニオンをシリルトリフラートで処理して  $sp^2$ 炭素上にシリル基およびMes\*基を導入した2を合成した。化合物2の構造解析結果から、その特徴を3と比較することによってP=C構造に及ぶシリル効果を解析した。次に、1の配位化学について基本的な知見を得るべく、塩化金錯体3に誘導し、その触媒活性を1,6-エンインの環化異性化反応をベンチマークとして評価し、また金錯体3の構造に関する解析を行った。これを踏まえ、3を用いて鉄錯体の合成を、鉄カルボニル試薬を用いて検討した。一方、2と比較対象として、フッ素を炭素上に導入したホスファアルケンを立体選択的に合成し、その特性について検討した。

## 実験結果

確立したスキーム<sup>2)</sup>によって合成した1に1当量の*t*-ブチルリチウムとシリルトリフラーとの反応により、対応するホスファアルケン2を合成単離した。トリメチルシリル体2aについてはX線結晶構造解析を行い、立体化学を確定している(Scheme 1)<sup>3)</sup>。2aのDFT計算を行ったところ、LUMOにあたる軌道(Figure 1)のエネルギーはMes\*P=CH<sub>2</sub>のそれと比べて有意に低くなっていることが確認され、シリル基がP=C分子骨格に効果的に電子摂動を与えていることが明らかとなった。



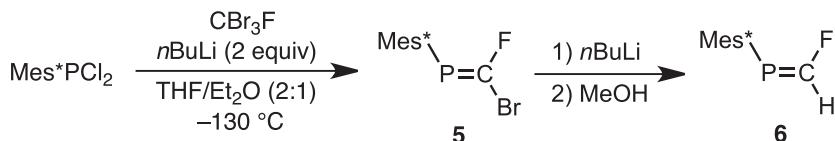
Scheme 1



Figure 1

次に2aを用いて塩化金錯体3aに誘導し、助触媒を加えない条件でエンイン基質4の環化異性化がほぼ定量的に進行することを確認し、これまでに見出しているホスファアルケン-塩化金錯体とほぼ同様の性質を示すことを見出した。その一方で、3aは室温下でゆっくりと別の構造に異性化する様子がNMRによって観測されたため、現在、この異性体構造についてX線構造解析による解析を試みている。さらに2aについて鉄との錯形成に関する知見を得るために、鉄カルボニル試薬Fe<sub>2</sub>(CO)<sub>9</sub>との反応を検討したところ、NMRにおいてシグナルの変化が観測され、鉄への配位が起きていることが示唆された。生成物の構造解析を現在進めており、さらに2が鉄に配位した錯体の触媒活性について今後検討する予定である。

一方、sp<sup>2</sup>炭素上にフッ素を導入したホスファアルケンについて検討することとし、トリブロモフルオロメタンを用いて5を立体選択的に合成した(Scheme 2)<sup>4)</sup>。5の臭素を水素に置き換えた誘導体6についてDFT計算を行ったところ、フッ素原子の電子対がP=Cペイ軌道と相互作用しているために、Mes\*P=CH<sub>2</sub>と比べるとLUMO(Figure 2)の準位が上昇していることがわかった。



Scheme 2

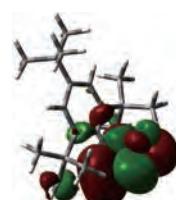


Figure 2

## 文献

- 1) F. Ozawa, M. Yoshifuji, *Dalton Trans.* **2006**, 4987.
- 2) H. Sugiyama, S. Ito, M. Yoshifuji, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3802.
- 3) S. Ito, T. T. T. Ngo, K. Mikami, *Chem. Asian J.* **2013**, 8, 1976.
- 4) S. Ito, T. Nakagawa, K. Mikami, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 9221.

## 四鉄上に配位したエチニルカチオンのルイス酸としての反応性

岡崎雅明・弘前大学大学院理工学研究科

### 1. 背景と目的

$3^+$  配位の陽イオン性炭素種であるカルベニウムイオンは、炭素中心にエネルギー準位の低い空の  $p$  軌道を有することから高いルイス酸性が期待できる。アセチレンからヒドリドを引き抜いたエチニルカチオンは形式的には  $sp$  混成をとり、優れた脱離基を置換基として導入しても発生させることは困難である。本研究では、この未踏化学種を四鉄上に担持させることで準安定化し、そのルイス酸として性質を調べた。その結果、広く有機塩基として用いられる三級アミンの炭素－水素結合活性化およびジアルキルエーテルにおける炭素－酸素結合活性化に成功したので、以下に報告する。

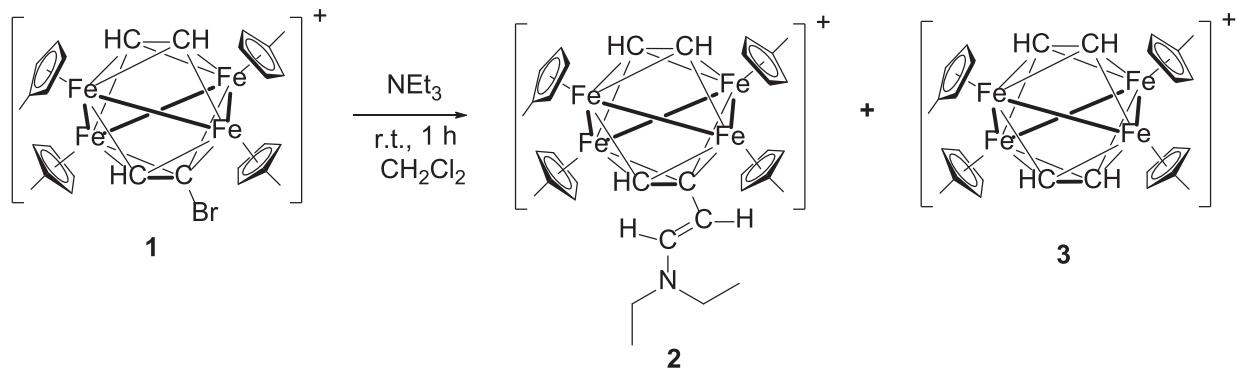
### 2. 実験方法

合成実験は、シカペントを通すことで乾燥した窒素またはアルゴン雰囲気下、一般的なシュレンクテクニックにより行った。特に空気に不安定な化合物については、不活性ガス循環精製装置が付いたグローブボックスを用いて取り扱った。溶媒類は市販の無水溶媒を使用し、必要に応じて再蒸留して用いた。新規化合物のキャラクタリゼーションは、各種分光学的データ、元素分析値および単結晶 X 線構造解析の結果に基づき行った。元素分析および質量分析は京都大学化学研究所の機器を用いて行った。

### 3. 結果と考察

四鉄担持エチニルカチオンの合成等価体として、プロモアセチレン配位クラスター $\mathbf{1}$ を用いた。 $\mathbf{1}$ とトリエチルアミンのジクロロメタン溶液を室温で攪拌した。1 時間後、揮発成分を留去し、残渣を再結晶法により精製したところ、三箇所の炭素－水素結合が切断された $\mathbf{2}$ が收率 26%で得られた。また、同じ残渣から $\mathbf{3}$ が收率 49%で単離された。また、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにより反応を追跡したところ、反応はほぼ定量的であり、 $\mathbf{2}$ および $\mathbf{3}$ の生成收率はそれぞれ 50%であることがわかった。 $\text{N}^i\text{Pr}_2\text{Et}$ を用いることで $\mathbf{2}$ の類縁体の単結晶を作成し、単結晶 X 線構造解析により、構造を明らかにした。

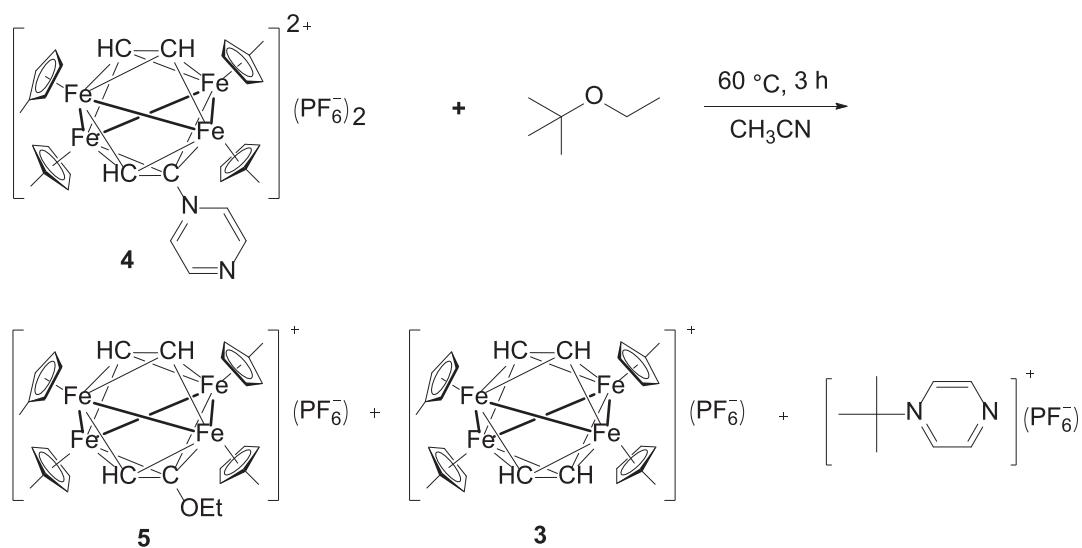
Scheme 1



四鉄担持エチニルカチオンの合成等価体として、ピラジンの配位により安定化されたエチニルカチオン配位クラスター $\mathbf{4}$ を用いて、ジアルキルエーテルの炭素–酸素結合切断に成功した。 $\mathbf{4}$  のアセトニトリル溶液に *tert*-ブチルエチルエーテルを加えて、この溶液を  $60^{\circ}\text{C}$  で 3 時間攪拌した。反応溶液から揮発成分を留去し、残渣の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定したところ、 $\mathbf{5}$  の生成が確認された。 $\mathbf{3}$  の生成も確認されたが、これは系中に微量に含まれる水との反応によるものと考えられる。解離した *tert*-ブチル基はピラジニウムイオンとして捕捉されていることが明らかとなった。混合物をアセトニトリル溶液とした後、酸化剤として  $[\text{Cp}_2\text{Fe}](\text{PF}_6)_2$  を添加し、単離操作を行うことで、 $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{Me})_4\text{Fe}_4(\text{HCCH})(\mu_3\text{-CH})(\mu_3\text{-COEt})](\text{PF}_6)_2$  が収率 40% で得られた。

硫黄類縁体ジアルキルスルフィドの硫黄–炭素結合の活性化についても、Scheme 2 と同条件下で成功した。

## Scheme 2



三級アミン、ジアルキルエーテルおよびジアルキルスルフィドの活性化は、各基質がエチニルカチオンに配位することで開始すると理解でき、これらの実験結果は四鉄に担持されたエチニルカチオンが高いリイス酸性を示すことを示唆するものといえる。

## 4. 成果報告

### 論文

$\text{C}(\text{sp}^3)\text{-N}(\text{sp})$  Bond Cleavage of Isocyanides at a Cationic [CCH] Subunit in a Bisdisphenoidal Eight-Atom Tetrairon-Tetracarbon Cluster Wataru Taniwaki and Masaaki Okazaki, *Chem. Lett.*

2013, 42, 807-809.

### 学会

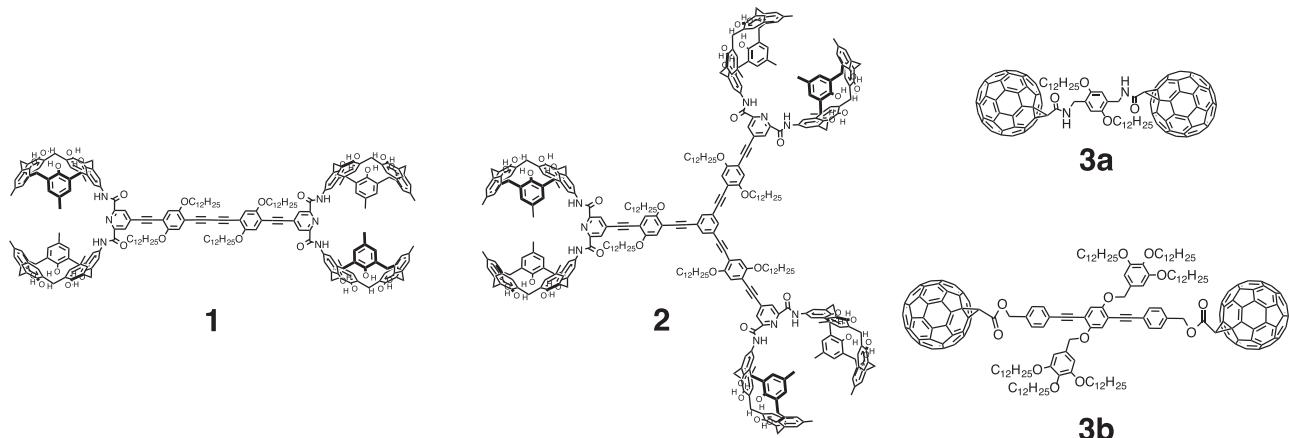
Carbon-oxygen bond activation of dialkyl ether by a cationic [CCH] subunit on the tetrairon core, Masakazu Nishiya and Masaaki Okazaki, 4th Asian Conference on Coordination Chemistry (ACCC4), November 4-7, 2013, Jeju, Korea.

## 分子認識によるフラーレン配列構造の構築

灰野 岳晴・広島大学大学院 理学研究科

## 目的

カリックス[5]アレーンはフェノールの2,6位がメチレン基を介して5つ環状に繋がった分子である。研究代表者の灰野は、カリックス[5]アレーンを二つ繋いだビスカリックス[5]アレーンがC<sub>60</sub>を強く包接することを明らかにしている。また、ビスカリックス[5]アレーン部位を二つもつテトラキスカリックス[5]アレーン**1**とフラーレン部位を二つもつダンベル型フラーレン**3a**は1:1の逐次会合によって一次元の超分子フラーレンポリマーを形成することを明らかにしている。本研究では、溶液中および固体状態で、この超分子ポリマー構造に由来する物性を明らかにすることを目的に、新たに溶解度の高いダンベル型フラーレン**3b**を合成した。より高濃度の溶液を調整することで、溶液中で、より重合度の高いポリマーを形成すると考えられるため、溶液物性について詳細な知見が得られると期待される。また、ポリマーの一次元鎖を二次元に拡張する目的で、分岐型のホスト分子**2**を合成した。ホスト分子の分岐構造がポリマーの成長に与える影響にも興味が持たれる。



**Figure 1.** Molecular structure of host molecules **1** and **2**, and guest molecules **3a** and **3b**.

## 実験方法

共同研究者である化学研究所の山子は、X線散乱によって、固体状態の物質や構造情報を評価する方法を確立している。一方、研究代表者の灰野は、カリックス[5]アレーン誘導体とフラーレン誘導体の有効な合成法を確立していることから、適切に役割分担を行ながら研究を行った。

## 実験結果と考察

始めに、溶液中の会合体形成を調べるために蛍光スペクトル測定およびNMRスペクトル測定を行った。**1**および**2**は共役芳香族部位に由来する発光を示す。また、一般的にフラーレンはアクセプターとして知られているため、**1**および**2**が**3b**を包接

することで、蛍光が消光すると考えられる。**1** および **2** の溶液に **3b** を滴下していくと、蛍光の消光が観測された。また、カリックス[5]アレーンは環反転しており、その速度が NMR のタイムスケール近傍であることから、二つの架橋メチレンプロトンの NMR シグナルはブロードに現れる。しかし、**1** および **2** の溶液に **3b** を加えると、もともとブロードに現れていたカリックス[5]アレーン部位の架橋メチレンプロトンが二つに分離した。このことは、カリックス[5]アレーンがフラーレンを包接することで環反転のエネルギー障壁が大きくなり、環反転の速度が NMR のタイムスケールよりも遅くなつたためであると考えられる。以上の結果から **1** および **2** のビスカリックス[5]アレーン部位は **3b** のフラーレン部位を抱接し、多量体を形成することがわかつた。

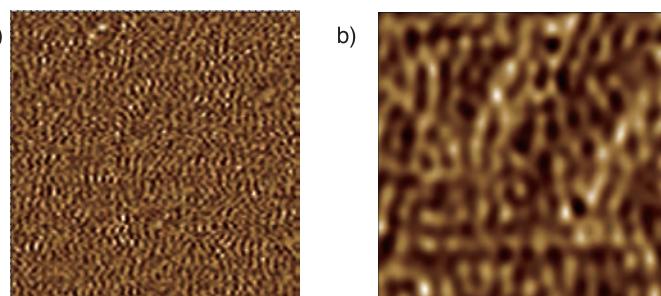
次に、溶液中でのこれらの会合体の大きさを調べるために DOSY 測定から拡散係数を見積もつた。単量体と会合体の拡散係数を比較することで、濃度約  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  の時 **1** と **3b** の混合物および **2** と **3b** の混合物は 100 分子前後が重合していることがわかつた。

さらに、固体状態での超分子ポリマーの形態を調べるために広角 X 線回折 (WAXD) および原子間力顯微鏡 (AFM) 測定をおこなつた。WAXD 測定の結果、**1**, **2**, **3b** はいずれも単独で異なるメゾ相を構築していることがわかつた。また、**1** と **3b** の混合物および **2** と **3b** の混合物は **1**, **2**, **3b** 単独の場合と異なる位置にピークが現れており、**1**, **2**, **3b** 単独の散乱パターンの単純な足し合わせとも異なつてゐることがわかつた。従つて、**1** および **2** が **3b** と分子レベルで会合したことで新たな構造のメゾ相を形成していることがわかつた。また、基盤上に **1** と **3b** の混合溶液および **2** と **3b** の混合溶液より調整した薄膜の AFM 測定を行つた。その結果、**1** と **3b** の混合物は超分子ポリマーが高度に配列した相分離構造形成していた。この組織は平均  $5 \text{ nm}$  間隔で並んでおり、これは **3b** のアルキル基の長さとよい一致を示す。すなわち、基盤の上でポリマーの主鎖一本一本が配列した組織であることがわかつた。**2** と **3b** の混合物は多数の空孔を有する組織が観測された。この空孔の大きさは平均  $16 \text{ nm}$  であり、**2** と **3b** が六分子ずつで形成する大環状構造の直径とよい一致を示す。従つて、**2** と **3b** は基盤の上で二次元に広がりをもつた網目構造を形成することがわかつた。

これらの結果は、非共有結合によって形成される主鎖型フラーレンポリマーの溶液物性について詳細に検討した初めての例であり、フラーレンポリマーの応用の可能性を探る上で重要な知見となるものと期待している。

## 成果報告

Size- and Orientation-Selective Encapsulation of C70 by Cycloparaphenylenes, T. Iwamoto, Y. Watanabe, H. Takaya, T. Haino, N. Yasuda, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **19**, 14061-14068 (2013).



**Figure 2.** The AFM images of cast-films of (a) a 1:1 mixture of **1** and **3b** and (b) a 2:3 mixture of **2** and **3b** prepared from their toluene solution on mica.

## 環状 $\pi$ 共役分子の合成と物性

鈴木 敏泰・自然科学研究機構・分子科学研究所

### 目的

歪んだ骨格を持つ環状 $\pi$ 共役分子は、新しい有機半導体の基本骨格となることが期待される。特に、分子の軌道順位などの重要な物性を、環の歪みにより微細に調整できる可能性があることから大変興味深い。本研究では、環状 $\pi$ 共役分子であるシクロパラフェニレンにヘテロ元素置換基を導入することで、環の歪みとともにヘテロ元素の効果によって、電荷移動材料の特性を変化させる可能性について検討する。また、材料の実際の物性は、分子構造とともに固体状態のバルク構造の制御も重要である。ヘテロ原子置換基導入により発生する双極子は、分子間 $\pi-\pi$ 相互作用を実現するのに有効な方法である。シクロパラフェニレンにヘテロ元素置換基を導入することにより分子間相互作用をコントロールし、有機半導体として機能するような固体構造を可能としたい。

### 実験方法

共同研究者である化学研究所の山子は、シクロパラフェニレンの有効な合成法を確立している。分子科学研究所の鈴木・阪元は、ヘテロ置換シクロパラフェニレンの設計および合成を担当する。生成物を化研・山子の協力の元に、GPC装置による精製およびX線装置による構造解析を行った。

### 実験結果

#### テトラシクロカルバゾールの合成

カルバゾール誘導体は、ホール輸送性および光導電性の点で興味深い。今回、テトラシクロ(2,7-カルバゾール)の9-メチル体(4CMCZ)およびフェニル体(4CPCZ)の合成を完了した。まず、2,7ジブロモカルバゾール誘導体のn-BuLiによるリチオ化と、それに続く塩化トリメチルスズとのトランスメタル化によって2,7ビス(トリメチルスタニル)カルバゾール誘導体を合成した。これらの有機スズ化合物に2当量のPt(nbd)Cl<sub>2</sub>を作用させて白金二量錯体を得た。この白金二量錯体と有機スズ化合物を1,2ジクロロエタン中、混合することにより白金四角錯体を得た。生成した白金錯体にdppfを加えて配位子交換を

行った。その後、臭素を用いた還元的脱離反応を行った結果、4CMCZ を 4 段階収率 10%、4CPCZ を 10%で得た。

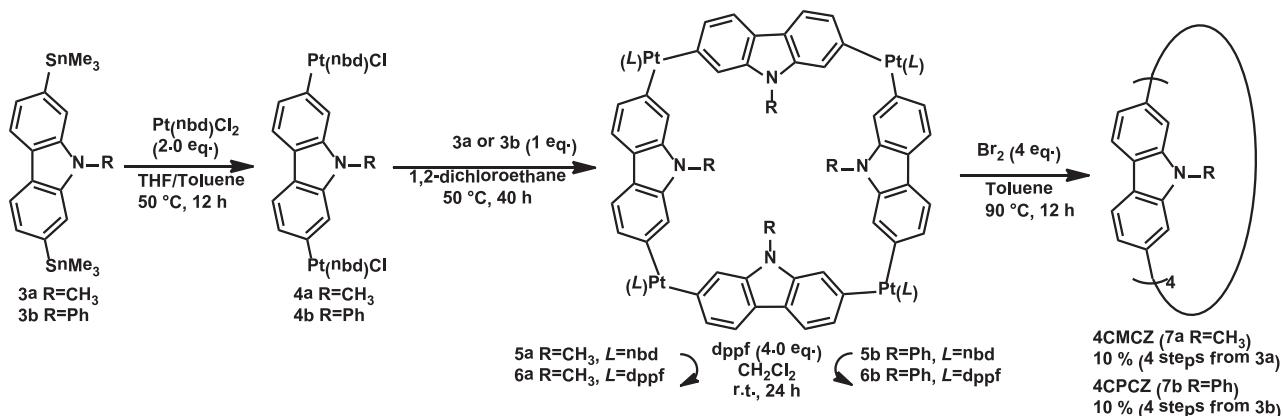


図 1. テトラシクロ (2, 7-カルバゾール) の 9-メチル体およびフェニル体の合成

## 考察

現在、テトラシクロ (2, 7-カルバゾール) の単結晶 X 線構造解析を検討している。分子間での  $\pi - \pi$  相互作用が観察されれば、有機トランジスタを作製し、p 型半導体としての可能性を探っていきたい。

## 成果報告

- (1) E. Kayahara, T. Iwamoto, T. Suzuki, S. Yamago, Selective Synthesis of [6]-, [8]-, and [10]Cycloparaphenylenes. *Chem. Lett.* **42**, 621–623 (2013).
- (2) E. Kayahara, T. Iwamoto, H. Takaya, T. Suzuki, M. Fujitsuka, T. Majima, N. Yasuda, N. Matsuyama, S. Seki, S. Yamago, Synthesis and Physical Properties of a Ball-Like Three-Dimensional  $\pi$ -Conjugated Molecule. *Nature Commun.* **4**, 2694 (2013).

## IV族半導体ナノ構造におけるスピンドイナミクスの研究

深津晋・東京大学大学院総合文化研究科

### 【研究背景と目的】

エレクトロニクスの基盤材料であるシリコンに光やスピノンなど新しい機能を付加する試みが進められる中で、光とスピノン機能の同時制御を達成可能な、円偏光によるスピノン注入・検出が試みられるようになっている。研究代表者は、これまでIV族半導体(Si、Ge)およびそのナノ構造体における円偏光励起によるスピノン注入について研究を進めてきた[1]。円偏光励起では、光のスピノン角運動量が半導体中の電子の軌道角運動量に移行する結果、スピノン偏極が生成される。一方、スピノン偏極した電子がホールと再結合する逆過程では円偏光が放出される。本研究では、この円偏光を用いた生成・検出を用いることで、IV族半導体中における新しい光・スピノン機能の探索をおこなった[Fig. 1(a)]。特に、ナノ構造体の導入による格子歪制御や量子閉じ込め効果を通じてバルク材料では不可能なスピノン軌道相互作用制御など新しいアプローチに取り組んだ。

### 【実験方法】

円偏光によるスピノン注入・検出の素過程は、エネルギーギャップなど電子構造に依存する。そこでナノ構造体を用いることで、エネルギーギャップやスピノン-軌道相互作用によるエネルギー分裂を制御するとともに、円偏光励起エネルギーを系統的に変えた実験からメカニズムの理解を目指した。近赤外波長可変光源を用いた円偏光発光測定の実験は、化学研究所において太野垣准教授、金光教授の協力のもとで進めた。

試料には、Ge薄膜とSiGe混晶薄膜を交互に積層したGe多重量子井戸試料を用いた[Fig.1(a)]。間接遷移型半導体であるGeは、Fig.1(b)のようなバンド構造を示し、価電子帯の最低エネルギー状態がL点( $\mathbf{k} = [1/2, 1/2, 1/2]$ )に現れる[Fig.1(b)]。双極子許容な光学遷移によって電子ホール対は $\Gamma$ 点付近に形成されるが、 $\Gamma$ 点に生成された電子はすぐに $\Gamma$ 点のホールと再結合(発光)することに加えて、電子-格子相互作用によってL点に散乱される。このL点の電子はフォノンの助けを借りて $\Gamma$ 点のホールと再結合(間接遷移発光)するため、円偏光計測を通じてL点を占有する電子のスピノン偏極に関する情報を引き出すことができる。

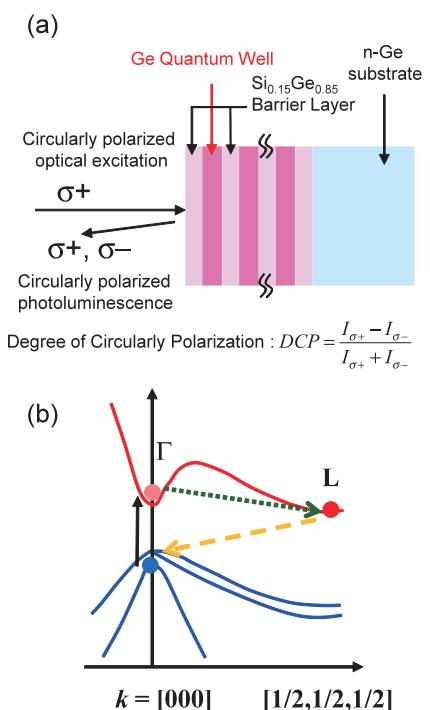


Figure 1. Schematic illustrations of (a) optical orientation and (b) band structure of crystalline Ge.

## 【実験結果】

Figure 2(a)は、井戸幅が16nmの量子井戸試料を右回り円偏光で励起した際の円偏光発光スペクトルである。1400nm付近には直接端( $\Gamma$ 点)由来の再結合発光が、1600nm以下には間接端(L点)の電子由來の発光が見える。直接端の発光では、1100nmの励起光波長では右円偏光発光が左円偏光発光に対してより強く現れる[Fig. 2(a)下]。一方、より短波長励起の条件では、左偏光がより強く現れることができた。円偏光度(DCP)[Fig. 1(a)中に定義式]は、Fig. 2(b)のように、ある閾値波長よりも短波長側では負の円偏光度を、一方、長波長側では正の円偏光度を示すことが分かった。

また、より薄い量子井戸構造を用いることで、円偏光度の正負が入れ換わる閾値波長が系統的に短波長側にずれることができた。円偏光度は、バンドギャップの大きさとスピン軌道相互作用の大きさに依存するから、この結果は、量子閉じ込め効果と格子歪の影響でエネルギーギャップが増大し、スピン軌道相互作用によるエネルギー分裂が増大したためと考えられる。

一方、間接遷移発光[図2(a)垂直下向き矢印]の円偏光度に着目すると、波長1100nmの励起条件では微弱な正の円偏光度を示すものの、直接端発光で見られたような明瞭なエネルギー依存性は得られなかった。

## 【考察】

$\Gamma$ 点における光スピン注入・検出は、エネルギーギャップなどの電子構造と励起光エネルギーに依存して正・負のスピン偏極を生成できることがわかった。一方、間接端(L点)の電子に関しては、直接端からのフォノン散乱を介在して生成されるメカニズムとは異なる、新しいスピン偏極注入の可能性が考えられる。特に $\Gamma$ 点のエネルギーギャップよりも低エネルギーの光励起ではこの効果が増強することが予想され、最近の理論研究で予測されている間接光学遷移(光励起・発光)におけるスピン偏極電子生成の可能性についても今後、検討を進める。また、時間分解測定によるスピンダイナミクスの解析なども進め、研究を継続・発展させる予定である。

## 【参考文献】

- [1] Y. Yasutake, S. Hayashi, H. Yaguchi, and S. Fukatsu, *Appl. Phys. Lett.* **102**, 242104 (2013).

## 【成果報告】

本研究成果は、論文投稿準備中である。

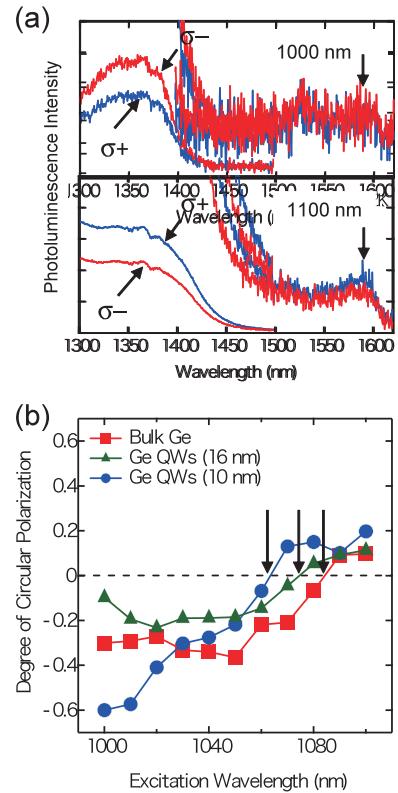


Figure 2. (a) Circularly-polarized photoluminescence under excitation at 1000-nm (upper) and 1100-nm (lower). (b) DCP values of direct gap recombination under excitation at different excitation wavelengths.

## シリコンフォトニック結晶の光ダイナミクスについての研究

高橋 和・大阪府立大学 21世紀科学研究機構

### 目的

間接遷移型半導体であるシリコンは、ナノ構造体とすることで発光効率や光取り出し効率が劇的に向上することが広く知られており、シリコン発光素子の実現を目指して長年研究が行われてきた。近年、フォトニック結晶ナノ共振器においても発光強度の増強が報告され、興味深いことに、その増強の一部は、共振器量子電磁力学で説明されるパーセル効果の寄与によることが示唆されてきた。もしパーセル効果がシリコンでも発現するならば、シリコン発光素子研究に新たな展開がもたらされるだけでなく、間接遷移型半導体の特徴である電子正孔液滴状態（EHL）のダイナミクスを制御可能と期待される。そのため、基礎物理の面からも非常に興味深い対象である。しかし、これまでのところ、シリコンナノ共振器におけるパーセル効果を証明することには、どのグループも成功していない。研究者は、最高品質のシリコンナノ共振器を作製可能であり、その特長を生かした応用デバイス研究を推進するために、ナノ共振器におけるキャリアダイナミクスの解明に大きな関心を持ってきた。これまで、金光教授、井原助教とともに近赤外域の低温顕微発光分光測定を用いて、EHLの存在を確認し、その時空間ダイナミクスの解明を進めてきた。本研究では、シリコンナノ共振器におけるパーセル効果の有無、発光強度増強の原因となるキャリア状態の特定、EHLの寿命変化などについて、新たに高感度時間領域測定を用いて調べた。

### 実験方法

図1(a)が本研究で用いたサンプル構造である。厚み 190 nm のシリコン薄板に直径 190 nm の空気孔を 50 μm 四方にわたり周期的に配列しており、空気孔を 3 つ埋めた L3 型ナノ共振器が中央に作製してある。空気孔の格子定数を 320nm から 350nm まで 1 nm 間隔で細かく変化させた試料を同一基板に作製して、共振モードの周波数がシリコンの EHL や励起子発光ピークに共鳴するように工夫してある。図1(b)が顕微発光分光測定系を示しており、励起光は 405nm の連続発振/ピコ秒半導体パルスレーザーを用いて、CW の分光測定と時間分解分光測定の両方を行った。空間分解能は 5 μm 以下であり、ナノ共振器部分とフォトニック結晶だけの部分を切り分けて測定可能である。また安定なクライオス

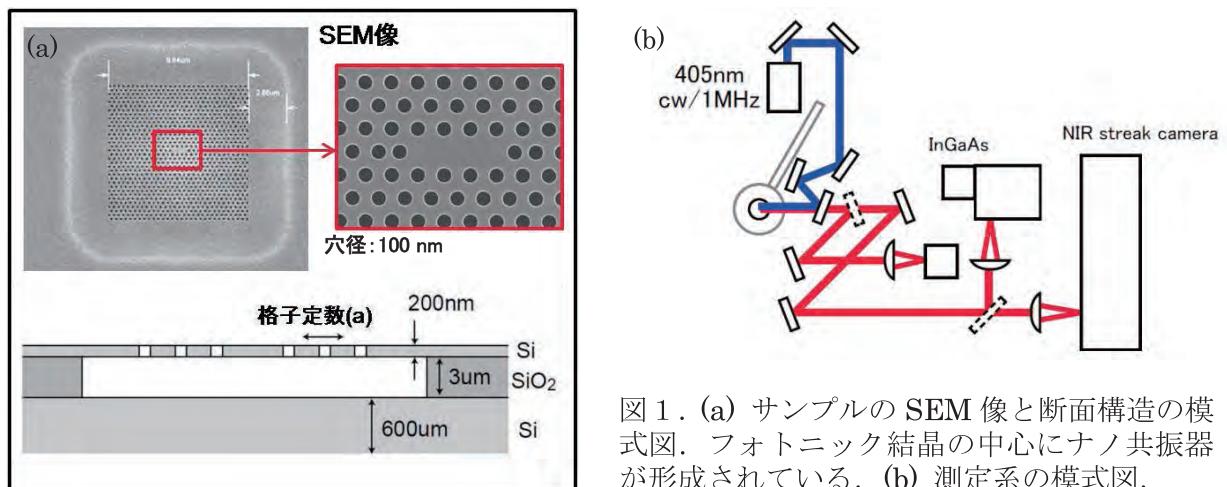


図1. (a) サンプルの SEM 像と断面構造の模式図。フォトニック結晶の中心にナノ共振器が形成されている。(b) 測定系の模式図。

タットを使用することで、近赤外域の微弱な発光信号を長時間露光測定できるようにしてある。さらに近赤外ストリークカメラを用いることにより、時間領域と波長領域の分光を一括で測定できるようにした。この工夫により、ナノ共振器の発光ダイナミクスを広い波長エネルギーで直接測定可能となった。

## 実験結果

図1(a)に示したサンプル構造のうち、ナノ共振器がある領域とフォトニック結晶のみの領域からの時間分解発光分光スペクトルを比較した。ナノ共振器がある領域からは、共振モードに起因するシャープで強い発光ピークと高密度電子正孔状態を起源とするブロードな発光ピークが確認された。一方、フォトニック結晶のみのデータでは、ブロードな発光ピークだけが観測された。ナノ共振器を含むデータからブロードな発光信号を差し引くことで、共振モードピークの時間変化だけを抽出できた。その結果、単調な指数的減少が観測され、共振モードの発光寿命が 1.2 ns と非常に速いことが分かった。一方、ブロードな発光ピークの寿命は 3.2 ns であった。先行研究では、複数の発光起源からの信号が混ざってしまうため、共振モードの発光寿命を特定することが困難であったが、今回、高品質試料とストリークカメラを用いた測定により発光寿命を正確に求めることに成功した。続いて、観測された速い発光寿命がパーセル効果によるものなのかを特定するために、微細加工を施していないシリコン基板からの発光時間変化を調べた。ここでもブロードな発光ピークのみが確認され、その発光寿命は 10 ns であった。これらの測定結果より、フォトニック結晶における輻射再結合レートと非輻射再結合レートを特定することができ、共振モード発光では、パーセル効果による輻射再結合レートの増大が、最少でも 6 倍という大きさで発現していることを特定できた。また、ブロードな発光ピークのスペクトルの時間変化から、発光の起源となるキャリア状態は、電子正孔プラズマから EHL に変化していくが、速い発光寿命のためにバルクシリコンに形成される EHL とは異なる寿命を持つことが分かった。

## まとめ

シリコンナノ共振器におけるパーセル効果の発現を、輻射再結合レートの増大として初めて直接観測した。これは、間接遷移型半導体の高密度励起状態の研究において、新たな展開を期待させる結果である。今回用いた共振モードの  $Q$  値は 1000 程度であるが、それでも顕著な発光増強が起こっており、今後、より  $Q$  値の高い共振モードによる測定や EHL の転移温度付近での挙動を調べることで、さらなる発光増強が期待される。将来的には、シリコンナノ共振器を用いた光機能材料の開発を目指していく。

## 成果

「Enhanced Radiative Recombination Rate of Electron-Hole Liquids Emission in Silicon Photonic Crystal Cavities」

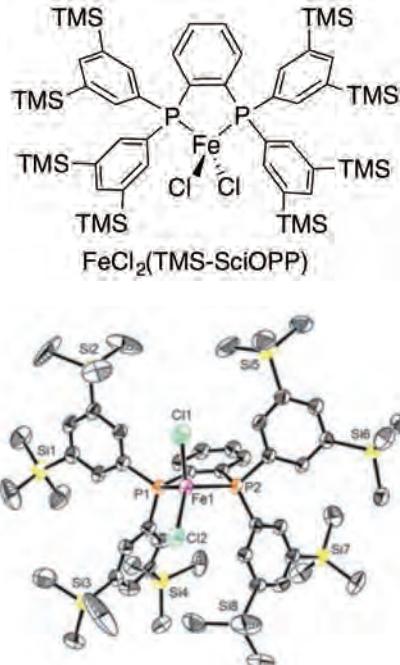
T. Ihara, Y. Takahashi, S. Noda, and Y. Kanemitsu, 投稿準備中

## 鉄触媒カップリング反応による糖アセチレン化合物の効率合成と 刺激応答性発光機能の探索

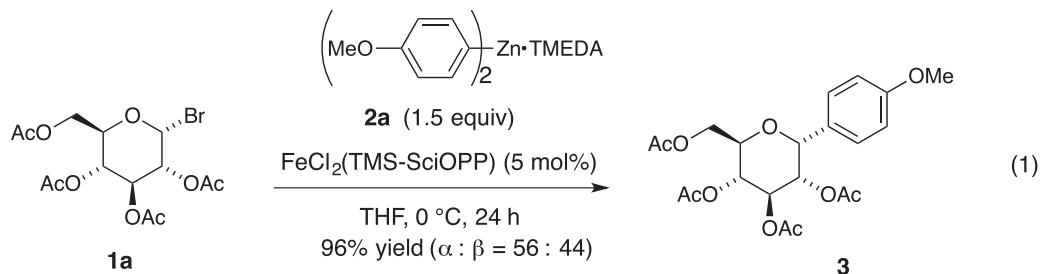
折田 明浩・岡山理科大学工学部

**【はじめに】**種々の糖—発光分子複合体は、タンパク質や酵素のバイオイメージングツールとして興味が持たれる化合物であり、これまでに発光部位としてシロール類や発光性金属錯体を有する糖デンドリマーなどが報告されている。本課題研究では、鉄を触媒とするハロゲン化糖と官能基化芳香族金属反応剤との選択的クロスカップリング反応を用い、発光部位としてフェニレンエチニレンを有する糖—発光分子複合体の合成を行い、その発光機能を探査することを目指す。近年、鉄触媒は、ハロアルカンを求電子剤とするクロスカップリング反応において極めて高い活性を示すことが明らかになってきたが、多様な官能基を有する複雑な生理活性物質および機能性分子の合成への応用例は少ない。鉄触媒カップリング反応による、実用的なC-アリルグリコシド合成手法、ならびにその保護・脱保護手法の開発も本研究課題の目標である。

**【結果と考察】**これまでに、触媒として中村らが新規に開発した $\text{FeCl}_2$ (TMS-SciOPP) (Figure 1)を用いてアニシリル Grignard 反応剤から調製したアリール亜鉛反応剤とアセチル保護ブロモグルコースとの鉄触媒クロスカップリング反応を行ったところ、対応するC-グリコシド3が定量的に得られることを見出した(式1)。



**Figure 1.** Structures of  $\text{FeCl}_2$ (TMS-SciOPP). Selected bond length ( $\text{\AA}$ ): Fe1–Cl1, 2.209(11); Fe1–Cl2, 2.219(9); Fe1–P1, 2.429(8); Fe1–P2, 2.437(9). Selected bond angles (deg): Cl1–Fe1–Cl2, 125.2(4); Cl1–Fe1–P1, 109.2(4); Cl2–Fe1–P2, 115.5(4); P1–Fe1–P2, 82.5(3).

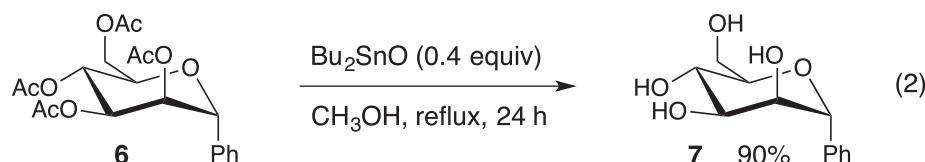


ところが、生成物のアノマーライド立体選択性は56:44とほぼ1:1に留まり、立体選択性の向上に向けて検討を進めた。種々のハロゲン化糖の反応性を比較したところ、これまでコバルトやニッケル触媒では用いることが出来なかった塩化糖を用いた場合も、

アノマー位のアリール化が高収率で進行することが明らかとなった。更に興味深いことに、ブロモ糖では、アノマー位の選択性は 6:4 程度だったのに対し、クロロリボフラノース **1b**、クロロリボピラノース **1c**、いずれの基質に於いても、アリール化反応は高立体選択性的に進行し、 $\beta$  体のみが生成物として得られてきた。Table 1 には **1b** を基質としたアノマー位アリール化の結果をまとめた。芳香族亜鉛反応剤が電子求引基、電子供与基のいずれを有する場合でも、反応は効率良く進行し望みの C-アリール

ヌクレオチド類縁体を良好な収率で与えた。インドリル基のような含窒素芳香環の導入も可能である。Table 2 には **1c** を基質とした反応の結果を示した。リボース基質 **1b** と比較して **1c** では全般的に収率が向上している。これは、原料塩化物が反応条件で比較的安定であることが原因である。芳香族亜鉛反応剤の反応性については、Table 1 に示す反応と同様に、電子求引性、電子供与性様々な官能基を有する芳香族置換基の導入が効率的に行えることが明らかとなった。

最後に得られた C-アリールグリコシドのアセチル基の脱保護について検討を行った。酸あるいは塩基条件下での脱アセチル化はさほど綺麗に進行しなかったものの、我々の開発した有機スズ酸化物を触媒として用いる中性条件での脱保護はほぼ定量的に進行し、対応する無保護の C-アリールグリコシドが得られることが明らかとなった。



【研究成果】 上記結果を現在投稿準備中である。

**Table 1.** C-Aryl Glycosides from **1b**

<b>1b</b>		$\text{FeCl}_2(\text{TMS-SciOPP})$ (5 mol %) $\text{Ar}_2\text{Zn}(\text{tmeda}) \cdot 2\text{MgBrCl}$ (1.7 equiv)	THF, 0 °C	<b>4</b> ( $\beta$ -only)	
entry	Ar	yield (%)	entry	Ar	yield (%)
1	Ph ( <b>4a</b> )	81	6	3-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>4f</b> )	78
2	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>4b</b> )	86	7	2-naphthyl ( <b>4g</b> )	73
3	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>4c</b> )	76	8	4-(3-butenyl)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>4h</b> )	71
4	4,4'-biphenyl ( <b>4d</b> )	80	9	5-N-Me-indolyl ( <b>4i</b> )	64
5	4-Me <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>4e</b> )	75			

**Table 2.** C-Aryl Glycosides from **1c**

<b>1c</b>		$\text{FeCl}_2(\text{TMS-SciOPP})$ (5 mol %) $\text{Ar}_2\text{Zn}(\text{tmeda}) \cdot 2\text{MgBrCl}$ (1.7 equiv)	THF, rt	<b>5</b> ( $\beta$ -only)	
entry	Ar	yield (%)	entry	Ar	yield (%)
1	Ph ( <b>5a</b> )	86	7	2-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>5g</b> )	65
2	4-MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>5b</b> )	84	8	2-naphthyl ( <b>5h</b> )	74
3	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>5c</b> )	83	9	9-phenanthryl ( <b>5i</b> )	78
4	4,4'-biphenyl ( <b>5d</b> )	80	10	4-(3-butenyl)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>5j</b> )	82
5	4-Me <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>5e</b> )	85	11	5-N-Me-indolyl ( <b>5k</b> )	90
6	2-tolyl ( <b>5f</b> )	76	12	2-pyridyl ( <b>5l</b> )	68

## 溶液エックス線分光法を用いる鉄触媒炭素—炭素結合生成反応の反応機構解析

永島英夫・九州大学先導物質化学研究所

【目的】クロスカップリング反応は液晶や有機EL材料、医農薬品の合成に幅広く利用されている工業化学プロセスにおける要となる基盤化学技術の一つである。従来法では、パラジウムやニッケルが触媒として用いられてきたが、これらの金属種は地殻埋蔵量が少ないレアメタルであり、かつ地域遍在性が高いため、安定的な供給が担保できない。また、環境負荷および生体毒性の高さから、製品段階における高い金属残渣基準をクリアしなければならない。これらの問題点を解決することを目的として、我々の研究グループでは地殻埋蔵量が遷移金属の中でも高く、生体毒性の低い普遍金属元素である鉄を触媒として用いる種々の有機合成反応の開発に取り組んでおり、京大化研中村研との共同研究において、クロスカップリング反応の開発と反応機構の解析に取り組んできた。京大化研グループではこの共同研究の成果を基盤に、実用鉄触媒の原料となる新規なフェニレン架橋ビスホスフィン配位子 (SciOPP) を開発し、発製品化に成功している<sup>[1]</sup>。図 1 に示すような SciOPP 配位子を有するクロスカップリング触媒  $\text{FeCl}_2(\text{SciOPP})$  1 が従来のパラジウム触媒では困難なハロゲン化アルキルを用いた種々のクロスカップリング反応に対して効率の良い触媒として機能することをこれまでに報告してきたが<sup>[2-4]</sup>、その反応機構は未だ明らかにはなっていない。本研究では、鉄触媒クロスカップリングの反応機構の解明を目的として、放射光 X 線吸収分光法 (XAFS: X-ray Absorption Fine Structure) を用いた反応溶液中の鉄触媒中間体の構造解析に取り組んだ。

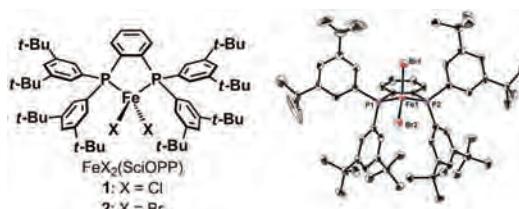


図 1. 鉄クロスカップリング触媒の分子構造と  $\text{FeBr}_2(\text{SciOPP})$  2 の結晶構造

【実験と結果】鉄錯体 2 と有機マグネシウム反応剤の混合溶液、およびこれらの混合溶液とハロゲン化アルキルの混合溶液を Ar 雰囲気下で調製し、PTFE 窓材を有する専用のガラス製セルに封入することで測定サンプルを作製した。調製したサンプルに対し BL14B2 ビームラインにおいて、イオンチェンバーを用いた透過法によって Fe K-edge (7.1 keV) の XAFS 測定を行った。鉄錯体 2 と 1 当量あるいは 2 当量の臭化メシチルマグネシウムとの反応により、図 2 に示す XANES スペクトルを得た。基準試料である 0 価の鉄ホイル、+III 価の塩化鉄、および+II 価の鉄錯体 2 と比較することで、いずれの反応中間体も鉄+II 価を保持していることが確認された。鉄錯体 2 と 1 当量の臭化メシチルマグネシウムとの反応で得られる反応溶液では、7109 eV に  $1s \rightarrow 3d$  遷移に帰属される pre-edge ピークが観測されることから、前駆体からの正四面体構造を保持した中間体が生成していると考えられる。また、鉄錯体 2 と 2 当量の臭化メシチルマグネシウムとの反応で得られる反応溶

液では、7109 eV に  $1s \rightarrow 3d$  遷移と思われる pre-edge ピークが観測されるだけでなく、7113 eV 付近に pre-edge ピークと思われる肩ピークが観測された。このピークは、平面四角形構造の Ni 錫体等においてしばしば観測される  $1s \rightarrow 4p_z$  遷移に由来するものと考えている。別途合成・単離した  $\text{FeBrMes}(\text{SciOPP})$  **3** および  $\text{FeMes}_2(\text{SciOPP})$  **4** の BN ペレット、THF 溶液の Fe k-edge の XANES スペクトルがこれらの反応溶液の XANES スペクトルと一致したことから、反応系中にハロアリール鉄中間体 **3** およびジアリール鉄中間体 **4** が生成していることが強く示唆された。さらに、単結晶 X 線構造解析により得られた鉄中間体 **3** および **4** の座標を用いて、当量反応溶液の EXAFS スペクトルの FEFF フィッティングを行った結果、ハロアリール鉄中間体 **3** およびジアリール鉄中間体 **4** の溶液中の構造は単結晶構造解析で得られた構造と良い一致を示す事が明らかとなった。

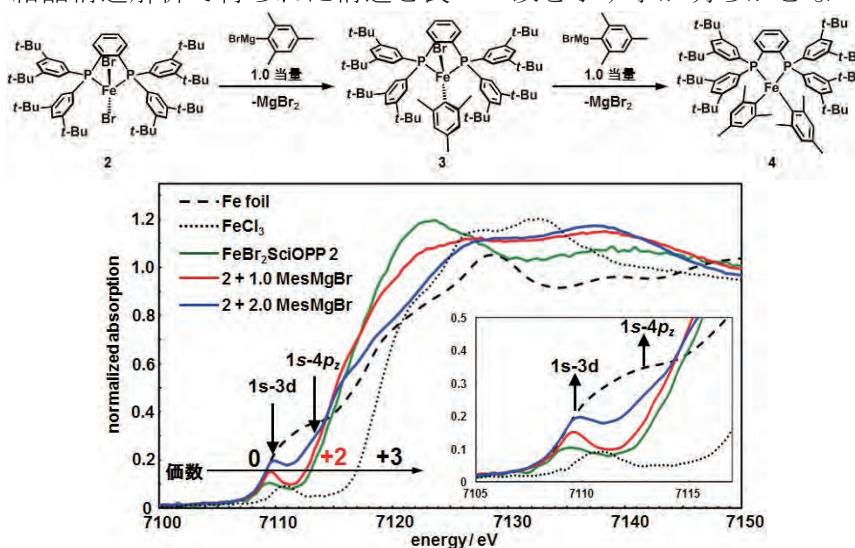


図 2.  $\text{FeBr}_2(\text{SciOPP})$  **2** と MesMgBr との量論反応 THF 溶液の XANES スペクトル

【まとめ】嵩高い置換基を有するビスホスフィン SciOPP を配位子とした鉄錫体  $\text{FeX}_2(\text{SciOPP})$  (**1**: X = Cl, **2**: X = Br)を触媒前駆体とする KTC-クロスカップリング反応における触媒活性種の溶液構造解析を目的として各種反応溶液の XAFS 測定を行い、触媒中間体と考えられる  $\text{FeBrMes}(\text{SciOPP})$  **3** および  $\text{FeMes}_2(\text{SciOPP})$  **4** の同定、結晶構造解析および溶液中構造の決定に成功した。

### 【参考論文】

- [1] Hatakeyama, T.; Fujiwara, Y.-I.; Okada, Y.; Itoh, T.; Hashimoto, T.; Kawamura, S.; Ogata, K.; Takaya, H.; Nakamura, M. *Chem. Lett.* **2011**, 40, 1030.
- [2] Hashimoto, T.; Hatakeyama, T.; Nakamura, M. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 1168.
- [3] Hatakeyama, T.; Okada, Y.; Yoshimoto, Y.; Nakamura, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 10973.
- [4] Hatakeyama, T.; Hashimoto, T.; Kondo, Y.; Fujiwara, Y.; Seike, H.; Takaya, H.; Tamada, Y.; Ono, T.; Nakamura, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10674.

### 【学会発表】

- [1] Takaya, H.; Nakajima, S.; Gower, N. J.; Imayoshi, R.; Tamenori, Y.; Nakagawa, N.; Isozaki, K.; Adak, L.; Hashimoto, T.; Hatakeyama, T.; Honma, T.; Takagaki, M.; Sunada, Y.; Nagashima, H.; Nakamura, M. *60th Symposium on Organometallic Chemistry, Japan*, O1-03, September 12, 2013.
- [2] Takaya, H.; Nakajima, S.; Gower, N. J.; Imayoshi, R.; Tamenori, Y.; Nakagawa, N.; Isozaki, K.; Adak, L.; Hashimoto, T.; Hatakeyama, T.; Honma, T.; Takagaki, M.; Sunada, Y.; Nagashima, H.; Nakamura, M. *Japan-Canada Joint International Symposium on Transition Metal Catalysts and Synthetic Processes for the Next Generation (The 93th CSJ Annual Meeting's Special Symposium)*, Shiga, March 23, 2013.

## ルテニウム錯体結合アミノ酸・ペプチド触媒の開発と 木質バイオマス精密酸化分解反応への応用

渡辺隆司・京都大学生存圏研究所

**(目的)** 炭素は地殻含有量が 0.6%の希少元素資源であり、元素戦略的な観点から化石資源に依存した有機化学工業を脱却し、再生可能なバイオマスを化学資源とした有用化合物生産の為の技術体系の確立が急務となっている。本研究では木質リグニンを炭素資源として有用化学物質を生産する「バイオリファイナリー」技術の開発を目的として、フェニルプロパノイド由來の不定形高分子であるリグニンの触媒的かつ選択性的分解法の開発を目的とした研究を行う。特に、リグニンの分子骨格中に豊富に含まれる芳香環を選択的に抽出し、それらを付加価値の高い芳香族性有機化合物原料として利用可能な形で高効率・高選択性に供給することができる新しい分子変換技術の確立を目指す。リグニン類は多様な官能基を有する不定形高分子であり、従前の単核錯体触媒をもちいる触媒技術では選択性的分解は難しい。本提案課題では、生存圏渡辺研究室で調製されたリグニン類を基質として、化研中村研グループで開発された多機能型のメタル化ペプチド触媒を用いた精密分解反応による有用芳香族分子生産プロセスの開発を目的とした研究を行った。特に、本研究では自然界でリグニンを分解する酵素が、リグニンとの多点相互作用に基づく複合的・協同的な触媒作用によって選択性的かつ高効率なリグニン分解を行っていることに着目し、リグニンとその部分構造に対して認識能を有するアミノ酸・ペプチド部位を有する新規な金属触媒の開発に着手した。現在までに、化学研究所の中村・高谷・磯崎らの研究グループは、高い酸化活性を示すルテニウム錯体触媒が結合したアミノ酸・ペプチドの開発に成功している。我々はこの触媒系が上述の様なリグニン親和性を示す酸化触媒となると考え、リグニン精密分解反応のための共同研究を行った。

**(結果と考察)** リグニンはフェニルプロパノイドがランダムに重合した巨大生体高分子であり、化学的に一定の組成や構造を持たない不定型物質である。そのため低分子量で構造の確定した分子を扱う場合と異なり、反応手法の選択、生成物の分析、反応機構の推定という研究過程において解決すべき課題が存在する。我々はリグニンや木粉を直接酸化して小分子へと還元し、多数の生成物の分布から反応条件の最適化と反応機構の解明を行うトップダウン型研究と、リグニンの構成単位であるフェニルプロパノイド類やベンジルアルコール類、メトキシベンゼン類等の酸化分解に関するボトムアップ型の研究を並行推進することによって、包括的かつ系統的な研究を行うこととした。具体的には、1) 優れた酸化触媒活性を有する Ru(pydc)(terpy)錯体が結合したノルバリン Boc-L-[Ru]Nva-OMe **1** およびこれらから誘導される Ru 結合型ノルバリンペプチドを合成し、これらを用いて 2) リグニンの構成単位であるベンジルアルコール類およびメトキシベンゼン類の酸化変換に関する基礎研究を行った。さらに、3) これら触媒を用いて、木粉およびボールミル処理したリグニンの酸化分解について検討を行った。これらの

成果の概要について以下に示す。

これまでの共同研究において、酸化触媒となる Ru(pydc)(terpy)が結合した Ru 結合型ノルバリンの合成を行い、これらがベンジルアルコールおよび二級アルカノールの過酸化水素酸化反応に有効であることが明らかになっている（図 1）。本反応の反応機構研究のために SPring-8 (BL01B1)において、反応溶液の *in situ* XAFS の測定を行ったところ、Ru(III)=O 種の生成を示す、XANES スペクトルを得た。これらは基質や反応条件の検討から推定される、Ru(III)=O への一電子移動を鍵とする酸化反応機構の存在を支持する結果である。

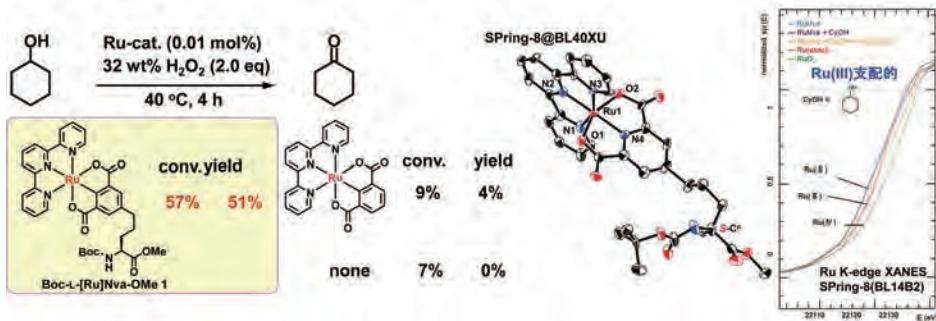
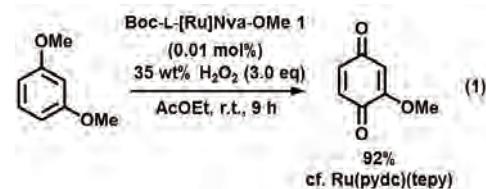


図 1. Ru 結合型ノルバリン触媒によるアルコール類の過酸化水素反応

上記の Ru(III)=O への電子移動の機構は電子リッチな芳香族化合物の酸化変換の鍵過程として知られているが、リグニンは元来メトキシベンゼンやフェノキシ構造を豊富に含む電子豊富な芳香族化合物のポリマーである。そこで、我々は触媒 1 を用いたメトキシベンゼン類の酸化反応について詳細な検討を行った。その結果、式 1 に示すように、0.01 mol% のごく少量の触媒 1 と 3 当量の過酸化水素の存在下にリグニン中の芳香族コアとして重要なジメトキシベンゼンが効率良く酸化され、対応するキノン類を与えることが明らかとなった。この結果は、Ru 触媒 1 がリグニン骨格中の大部分を占めるベンジルアルコール部位、メトキシベンゼンコアの双方の酸化に対して高効率な触媒となることを示している。そこで、我々は実際にボールミル処理リグニンと木粉の酸化を試みたところ、重量比に対して 0.5% 程度であるが、選択的に 2-メトキシキノンが得られることが明らかとなり、常温常圧の温和な条件における過酸化水素酸化でリグニンから有用有機化合物が得られることを見出した。



（まとめ）Ru 結合型ノルバリン Boc-[Ru]Nva-OMe 1 がアルコール類およびメトキシベンゼン類の過酸化水素酸化に高い触媒活性を示すことを明らかにした。また、この新規触媒を用いたボールミル処理リグニンおよび木粉の酸化分解が進行することを見出した。

#### （成果報告）

学会発表「ルテニウムピニンサーア型錯体結合型ノルバリン触媒を用いる電子豊富な芳香族化合物の過酸化水素酸化反応」（京大化研、元素科学国際研究センター・京大生存研・JST-CREST）◦ 吉田亮太・磯崎勝弘・横井友哉・竹中健朗・吉岡康一・渡邊隆司・高谷 光・中村正治、第 60 回有機金属化学討論会 P1B-21 2013 年東京

## パーソナライズド医療のための生物データ の同時クラスタ解析法の開発

志賀元紀・岐阜大学

### 研究背景・目的

ゲノム配列やタンパク質構造や代謝産物など分子レベルの生物情報を網羅的かつ高速に計測できるようになってきたために、個々の患者の状態に基づき治療方針を決定するパーソナライズド医療の可能性が高まっている。その実現のためには、患者の共通グループを発見するのみではなく、ゲノムなどの分子レベルでの計測パターンの共通構造を発見することも重要であり、したがって、両方のグループ構造を同時に検出するデータ解析法（同時クラスタ解析）が望まれる。ところで、観測される生物情報は生物ゆらぎによる雑音成分が多く含まれるために、本研究では、多様な既知補助情報を利用することにより、同時クラスタ解析の効率性の向上を目的としている。

### 研究方法・結果

本研究では、以下の2つの手法を開発した。各手法の概要を以下に述べる。

#### （1）補助情報を用いる非負値行列分解法

様々な状態の患者（細胞）に対して、マイクロアレイの遺伝子発現量解析する場合、遺伝子発現量は2次元配列（データ行列）にまとめられる。本研究では、データ行列の行方向および列方向の両方に対して、低ランク構造を同定する方法（行列因子化）の研究に取り組んだ。行列因子化により同定される低ランク構造は、行方向ノード（マイクロアレイ標本）および列方向ノード（遺伝子）のクラスタと密接に関係するため、同時クラスタ解析に寄与できる。本研究では、各方向のノードの既知の候補グループ情報を利用できる手法を開発した。ここでいうグループとは、既知の遺伝子グループ（例えば、代謝パスウェイのカテゴリなど）であり、既知グループ補助情報を用いることで行列因子化の頑健性および性能の向上に寄与できる。本研究では、低ランク構造の同定問題を、データ行列の近似誤差および構造ノルム罰則項からなるコスト関数を最小化する問題として定義した。この構造ノルム罰則項は、既知グループ情報を、学習後の低ランク構造に反映するためのものである。この最適化問題を直接解くことは計算コストの観点から困難であるので、双対問題に変換する工夫をして、高速な最適化アルゴリズムを導出した。乱数を用いて生成した擬似データおよび実データを用いた数値実験を網羅的に行い、本研究で開発した手法の有効性を検証した。本研究の成果をWorkshop MLAB2013[1]で発表し、また、データマイニングの学術雑誌[2]に投稿している。

## (2) 補助ネットワーク情報を用いる同時クラスタ解析

従来のクラスタ解析（グループ構造の発見法）は、1方向ノードのみのものであり、高次元データや欠損値のあるデータに対して十分な性能を示さない。この問題を解決するため、行列で表される観測データに対して、行方向と列方向の両方向の同時クラスタ解析（共クラスタリング）が盛んに研究されている。我々は、行ノードと列ノードのそれぞれに対して、補助ネットワーク情報を仮定し、これらのネットワーク情報を用いる同時クラスタ解析法を開発した。本研究では、補助ネットワーク構造および計測データを確率的な事象としてモデル化し、変分ベイズ学習によってクラスタリングする方法を提案した。遺伝子発現量データに対する数値実験によって、提案法は、クラスタ構造の事後確率（確信度）を推定できるため頑健であり、また、補助情報の使用によってより有効な方法であることを確認できた。本研究の成果を MultiClust Workshop 2013[3]において発表した。

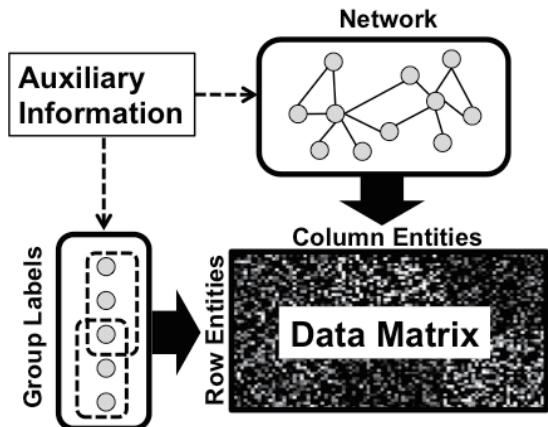


図1：問題設定（補助情報と計測データ）

## 今後の課題

本研究の結果より、計測データ解析において外部補助情報を加えることの有効性が示された。しかしながら、2つの提案法の実行において局所最適化問題を解く必要があるため、計算の実行速度が問題となる。今後の課題は、モデルおよび補助情報の導入方法の工夫による最適化アルゴリズムの高速化である。

## 成果報告（論文、学会発表など）

本共同研究の成果は以下の通りである。

1. Motoki Shiga and Hiroshi Mamitsuka, “Nonnegative Matrix Factorization with Auxiliary Information,” *2013 Sapporo Workshop on Machine Learning and Applications to Biology*, Sapporo, Japan, August 5–6 2013.
2. Motoki Shiga and Hiroshi Mamitsuka, “Nonnegative Matrix Factorization with Auxiliary Information on Overlapping Groups,” submitted.
3. Motoki Shiga and Hiroshi Mamitsuka, “Variational Bayes Co-clustering with Auxiliary Information,” *Proc. of the 4th MultiClust Workshop on Multiple Clusterings, Multi-view Data, and Multi-source Knowledge-driven Clustering*, 1–4, Chicago, Illinois, USA, August 2013.

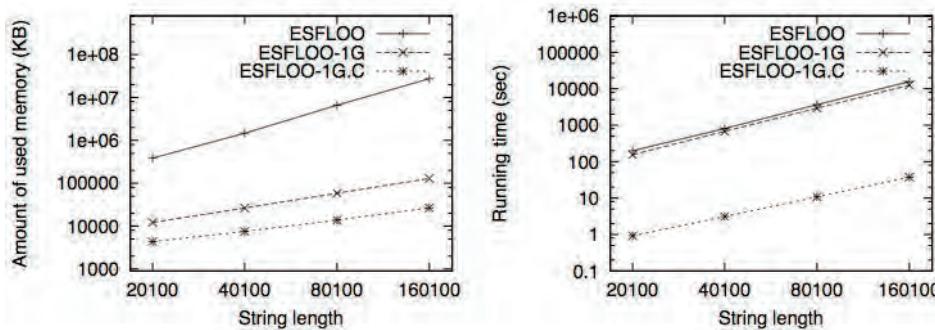
## ゲノム配列における頻出類似領域の発見

中村 篤祥・北海道大学

**[研究目的]** ゲノム配列に散在する類似領域の特定は、ゲノムの構造や進化の仕組み等を理解する上で重要である。本研究では、境界を特定でき、類似領域の推定に適用可能な頻出文字列マイニングの高速な手法を開発し、それを適用することにより実際のゲノムの散在類似構造において新たな知見を得ることを目的とする。本年度は、(1)省メモリ・高速化を目的に提案したアルゴリズムの実際の効果、および、(2)ヒトゲノムに対する既知の散在繰り返し領域の抽出能力、の2つを実験により検証することを行った。

**[提案方式]** 散在して繰り返し現れる類似部分文字列を、近似部分文字列パターンの出現領域とみなし、頻出パターンを列挙するアルゴリズム ESFL00 を用いる。類似領域の境界の曖昧さのために生ずる同じ領域の重複カウントを避け、局所最適な出現のみをパターンの出現として扱うのが ESFL00 の特徴である。類似度計算のために行うアライメントのギャップの数の合計を  $k$  個に制限した問題を解く省メモリ化アルゴリズム ESFL00- $kG$ 、さらに出現候補領域付近のアライメントスコアのみ計算することにより高速化を図った ESFL00- $kG.C$  を用いることにより、ヒトゲノムのような巨大シーケンスも扱える。

### [省メモリ・高速化の効果]



ギャップの数を1つに限った ESFL00-1G と ESFL00-1G.C のメモリ削減効果について実験をおこなった。

4種類の文字からなる長さ(約)20100, 40100, 80100, 160100 の文字列100本ずつ、以下の方法で発生させ実験に使用した。ランダムな文字列の101, 301, 501, … 文字目から長さ100文字のパターンを埋め込み、201文字目からの各文字に0.1の確率で編集操作(等確率で挿入・削除・置換)を加えた。左上図は、100本の文字列に対する平均メモリ使用量を示している。回帰分析により求めた実験的空間計算量は ESFL00 が  $0.00048n^{2.07}$  に対し、ESFL00-1G は  $0.15n^{1.14}$ 、ESFL00-1G.C は  $0.71n^{0.877}$  であり、 $n$  のオーダーが1次下がるという理論的な分析と一致する結果が得られた。また、ESFL00-1G.C の高速化の効果を調べるために、同じ文字列を用いて計算時間も計測した。右上図に結果を示す。ESFL00-1G は ESFL00 とあまり変わらないのに対し、ESFL00-1G.C

では大幅に計算時間を削減できていることがわかる。実際、回帰分析による実験的時間計算量は、ESFL00 は  $(1.7e-7)n^{2.11}$  であるのに対し、ESFL00-1G.C は  $(1.9e-8)n^{1.79}$  となつており、 $n$  の次数が約 0.3 下がるという結果となった。

#### [ヒトゲノムの既知の散在繰り返し領域抽出能力]

ヒトゲノムの染色体 21 のシーケンスに対して ESFL00-kG.C を適用し、散在繰り返し配列を 100 本求め、それらの出現領域として抽出された領域が、既知の繰り返し配列の出現領域のどれだけをカバーしているかチェックした。ヒトゲノム染色体 21 は長さ約 4700 万(未確定領域を除くと約 3510 万)の配列であり、ESFL00 をこれに適用すると、実験的時間計算量によれば 1 年以上かかると見積もられるため、現実的に適用不可能である。一致していたら 1、そうでなければ -4 というスコア関数を用いて、 $k=0, 1, 2$  に対して ESFL00-1G.C 実行し、長さが 100 以上、頻度が 30 以上のパターンを抽出した。その中から 0.5-closed パターンを抽出し、それらを編集距離により類似グラフ化し、正規化スペクトラルクラスタリングを用いて 100 のクラスタに分け、各々のクラスタの中心に最も近い抽出パターンを求めた。抽出されたパターンの出現と判断された領域を、既存ツール RepeatMasker により抽出された領域 (=Repbase Update (20130422 版) に登録されている繰り返しパターンを用いて NCBI/RMBLAST v. 2.2.27+ により抽出さ

algorithm	RepeatMasker all		RepeatMasker Alu	
	covered, covering	same ends	covered, covering	same ends
exact	71.4%, 1.1%	294, 195, 1	42.4%, 3.2%	172, 97, 1
ESFL00-0G.C	100.0%, 6.9%	162, 165, 1	96.4%, 33.1%	162, 165, 1
ESFL00-1G.C	100.0%, 9.7%	208, 184, 0	100.0%, 48.8%	208, 184, 0
ESFL00-2G.C	100.0%, 9.8%	362, 366, 6	94.1%, 46.4%	360, 363, 6

れた領域)と比べ、どのくらい抽出できているか調べた。左図にその結果を示す。

‘covered’ は RepeatMasker の抽出領域に含まれた割合で、‘covering’ は RepeatMasker の抽出領域全体に対しカバーした割合を示す。‘same ends’ は、領域の(左端、右端、両端)が一致した数を表す。また、‘RepeatMasker all’ は登録されているすべての繰り返しパターン用いた場合、‘RepeatMasker Alu’ は Alu 配列のみパターンとして用いた場合である。ESFL00-kG.C により抽出された領域はすべて既知の繰り返し配列により抽出される領域であり、既知の Alu 配列の抽出領域の約半分をカバーしていることがわかる。RepeatMasker はパターンの発見を行うツールではなく、登録されているパターンの出現領域と推測される領域を抽出するツールであることを考慮すると、この結果は ESFL00-kG.C がパターン配列を与えずにパターン抽出まで行う方式として、長さ 400 程度までの散在繰り返し配列に対しては有効であることを示した結果と言える。

#### [成果報告]

A. Nakamura, I. Takigawa, H. Tosaka, M. Kudo and H. Mamitsuka: Mining Approximate Patterns with Frequent Locally Optimal Occurrences, submitted to Discrete Applied Mathematics.

## 複雑二部ネットワークの解析と制御

ホセ ナチュエル・東邦大学理学部情報科学科

### 研究目的

遺伝子制御ネットワーク、代謝ネットワーク、タンパク質相互作用ネットワークなどの生体ネットワークの多くはランダムネットワークとは異なり、次数分布のべき乗則（スケールフリー性）という性質を持つと報告されている。これらの中で代謝ネットワークは頂点が化合物と化学反応の2種類に分割され、辺はこの2種類の頂点間にのみ存在する、すなわち、二部グラフ構造を持つという特徴がある。また、薬剤-疾患ネットワーク、薬剤-タンパク質ネットワークなども二部グラフ構造を持つ。これまで、代表研究者と共同研究者らは二部グラフ構造を持つネットワークを生成する数理モデルや二部グラフ構造を射影したネットワークにおける次数分布などについて共同で研究を行ってきた。また、近年重要性が増している複雑ネットワークの制御についても共同研究を行い、グラフ理論における支配集合を用いたモデル化とその理論解析などの成果を得てきた。本研究ではこれらの研究を発展させ、二部グラフ構造を持つネットワークの性質や制御について、特に、ネットワーク全体を制御するのに必要な頂点数について数理解析、シミュレーション解析、データベース解析を行う。

### 検討内容

まず、グラフ理論でよく知られた最小支配集合 (minimum dominating set, MDS) の概念を二部グラフ構造を持つネットワークに対応するように変更した。次に、二部ネットワークの両側の頂点集合を  $X, Y$  とする時、 $X$  の中から制御頂点を選択し、 $Y$  の頂点を全て制御するという問題設定を定義した。そして、これらの定義のもとで MDS を制御頂点として選択すれば、各頂点から出る辺を独立に制御できるという仮定のもとで、 $Y$  に属する頂点全てを制御できる、すなはち、「MDS を制御頂点として選べば線形モデルのもとでネットワークが可制御となる」ことを理論的に示した。

この結果に基づき、頂点の次数分布がべき乗則に従う二部ネットワーク、すなはち、スケールフリー構造を持つ二部ネットワークにおける MDS のサイズの理論解析を行った。さらに、この結果をコンピュータシミュレーションにより確認するとともに、薬剤-標的ネットワークなどのデータについてもデータベース解析を行った。

なお、研究代表者は数理モデル構築・解析、シミュレーション解析、データベース解析などを担当し、共同研究者は数理モデル構築・解析、シミュレーション解析の一部などを担当した。

## 結果

理論解析の結果、スケールフリーネットワークにおけるべき指数 $\gamma$ が 2 より大きい場合は MDS サイズが Y の頂点数の線形のオーダーとなるが、2 より小さい場合は線形オーダーより小さくなることが判明した。さらに、実際の多くのネットワークに現れる次数カットオフの影響を取り込むように理論的結果を拡張した。コンピューターシミュレーション解析の結果、これらと定性的に一致する傾向を確認することができた。Facebook Forum、薬剤-標的ネットワーク、転写制御ネットワークなど 10 種類の実際のネットワークを用いて MDS サイズを解析したところ、多くの場合、MDS は全体の数 10%という小さなサイズとなり、実際のネットワークにおいても、比較的少ない頂点数を制御することにより（前述の仮定のもとで）二部グラフ構造を持つネットワーク全体を制御できることがわかった。

## 今後の課題

本共同研究により、これまでに我々が得ていた通常のネットワークの MDS に基づく制御に関する結果を二部グラフ構造を持つネットワークに拡張することに成功した。さらに、次数カットオフの影響の理論およびシミュレーションによる解析という新たな結果を得ることができた。ただし、本研究では代謝ネットワークのように二種類の頂点が交互に現れる二部グラフには対応できていないため、そのようなネットワークに対する MDS の解析や制御手法の開発が今後の課題となっている。また、当初予定していた副作用などを考慮したネットワークの解析や制御については研究が十分に進展しなかつたため、やはり今後の課題となっている。

## 発表論文

- [1] J. C. Nacher and T. Akutsu, Structural controllability of unidirectional bipartite networks, *Scientific Reports*, 3, 1647, 2013.
- [2] J.C. Nacher and T. Akutsu, Analysis on critical nodes in controlling complex networks using dominating sets, Proc. 2013 Int. Conf. Signal-Image Technology & Internet-Based Systems (SITIS 2013)), 649–654, 2013.

## 確率的手法に基づくタンパク質相互作用ネットワーク解析

丸山修・九州大学マス・フォア・インダストリ研究所

### 研究目的

タンパク質分子の相互作用を解析し、さらに予測することは生命システムの理解のために重要である。研究代表者は近年、ランダムウォークに基づく確率的手法により相互作用ネットワークから効率的にクラスターを抽出して、タンパク質複合体を予測する手法を開発し、この手法が既存手法と比較し優れた予測率を持つことを示してきた。一方、共同研究者らは、ドメインに基づくタンパク質進化の確率モデルを構築し、さらに、タンパク質相互作用ネットワークとタンパク質ドメイン情報から整数計画法を用いて複合体を予測する方法を開発した。本研究では、この二つの研究を融合することにより、より精緻にタンパク質複合体を予測する方法を開発する。特に、タンパク質相互作用ネットワークにおける辺の重み情報やタンパク質のドメイン組成の情報を有効に活用した方法を開発する。タンパク質は複合体を形成することにより機能を発現するものも多いので、高精度の予測手法が開発できれば細胞内における各タンパク質の果たす役割の解明に役立つことが期待できる。

### 検討内容

これまでの共同研究における議論により、多数のタンパクからなる複合体の予測については数多くの研究があるものの少数のタンパク質からなる複合体予測については現状では十分になされていないことが判明した。そこで昨年度から、2個のタンパク質からなる複合体をタンパク質相互作用ネットワークなどの情報から予測するという問題に取り組んできた。そのためにタンパク質相互作用ネットワークの辺の重みをもとに計算される5種類の特徴量を定義し、また、タンパク質のドメイン組成に基づく2種類の特徴量を定義した。さらに、タンパク質のドメイン組成に基づくカーネル関数（類似性の指標となる関数）を新たに定義した。そして、これらの特徴量やカーネル関数をサポートベクターマシン（機械学習手法の一つ）と組み合わせた学習・予測方式を開発し、本年度の共同研究により予測法を完成させた。

さらに、本年度は3個のタンパク質からなる複合体を予測する方式の開発も試みた。そのために、上述と類似の特徴量とカーネル関数を用いるとともに、新たに予測を二段階に分けて行う方法を開発した。一段階目の予測は上述と類似の手法を用いるが、二段階目では同一のタンパク質が複数の複合体に含まれることをできるだけ避けるために、複合体の対象となるタンパク質と（タンパク質相互作用ネットワークにおいて）その近傍のタンパク質に対する一段階目の出力結果を用いて予測を行う。さらに二段

階目の予測においてはこれまで用いてきたサポートベクターマシン以外にも関連ベクターマシンの利用も試みた。

なお、予測手法の詳細設計や計算機実験を研究代表者と共同研究者のみで行うのは困難であるため、化学研究所数理生物情報研究領域の林田守広助教および大学院博士課程学生の阮佩穎氏の多大な協力のもとに研究を進めた。

## 結果

研究代表者が CYC2008 や WI-PHI などのデータベースから抽出・整理したデータを用いて、開発した手法の計算機実験による評価を行った。その結果、2 個のタンパク質からなる複合体予測においては 7 個の特徴量すべてを用いる場合に最も高い予測精度が得られ、かつ、それが既存手法よりも高い予測精度となっていることが判明した。3 個のタンパク質からなる複合体予測においては 1 段階の予測よりも 2 段階の予測を行う方がより高い精度が得られ、かつ、2 段目の予測においては関連ベクターマシンよりもサポートベクターマシンを用いる方がより高い精度が得られることが判明した。さらに、この結果は既存のランダムウォークに基づく方法よりも高い予測精度となっていた。

## 今後の課題

本共同研究を開始してから成果がまとまるまでに時間がかかったが、あせらずにじっくりと研究を行うことにより、2 個のタンパク質からなる複合体予測、および、3 個のタンパク質からなる複合体予測のそれぞれについて、最高レベルの予測精度を持つ手法を開発し論文として成果をまとめることができた。

今後の課題として 4 個以上のタンパク質からなる複合体の予測があげられる。ただし、既知の複合体データが少なくなるため、これまでのような学習に基づく予測法が有効に適用できない可能性もある。また、4 個、5 個、6 個と個別に手法を開発するのではなく、個数を与えれば自動的に学習と予測を行う手法を開発する必要がある。困難な課題ではあるが、本共同研究で得られた知見をもとに新たな技術やアイデアを取り入れることにより有用な成果が得られるものと期待している。

## 発表論文

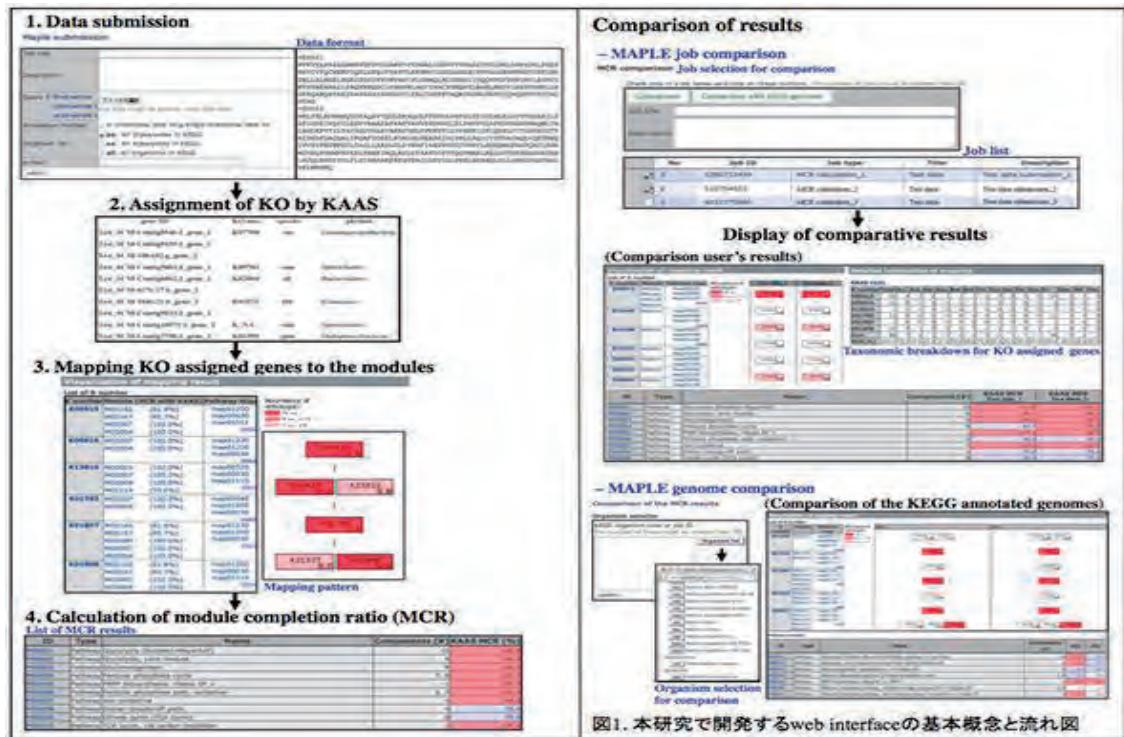
- [1] P. Ruan, M. Hayashida, O. Maruyama and T. Akutsu, Prediction of heterodimeric protein complexes from weighted protein-protein interaction networks using novel features and kernel functions, PLoS ONE, 8, e65265, 2013.
- [2] P. Ruan, M. Hayashida, O. Maruyama and T. Akutsu, Prediction of heterotrimeric protein complexes by two-phase learning using neighboring kernels, BMC Bioinformatics, 15, Suppl 2, S6, 2014.

## ゲノム、メタゲノムの機能評価システムの開発とその応用

高見英人・海洋研究開発機構

**目的:**これまでのメタゲノム解析では、環境中の微生物コミュニティが有する機能まで踏み込んだ議論があまりないのが現状である。また、ゲノム解析が安価で容易になった個別生物についても同様で、生物が持つ機能的ポテンシャルをゲノムから読み解く方法や生理・代謝機能単位でゲノム間の比較解析ができるシステムがほとんどないため、生物が有する網羅的機能ポテンシャルを把握しきれていない。そこで昨年は微生物コミュニティが有する潜在的機能ポテンシャルを代謝反応や輸送、情報伝達を担う複合体単位で詳細に評価する方法論の開発を目的として、“ゲノム、メタゲノムに潜む潜在的機能ポテンシャルの評価方法の開発”という萌芽的研究課題を申請し、KEGG の中心メンバーの一人である五斗准教授との共同研究を実施した。研究成果を首尾よくゲノム生物学の専門誌である BMC Genomics に掲載することができたので、25 年度はこの方法論を幅広くゲノム、メタゲノム研究に活用すべく自動解析システムの開発とともに、このシステムを用いたメタゲノム解析を目的とした。

**方法:**ゲノム、メタゲノムの機能評価システムの自動化には大きく 3 つの要因がある。1. データの投入から計算結果を表示するまでの web インターフェースの開発、2. モジュール充足率の計算結果とモジュールへのマッピングパターンの分かり易い可視化方法の開発、3. ゲノム



やメタゲノム間での結果の比較表示システムの開発である。まず、24 年度に開発した方法の手作業による部分を極力自動化することから始め、図 1 に示したフレームで web インターフェースを通じた解析を可能にするシステム開発を行った。

**結果と考察:**図 1 に示したように、1.ゲノム・メタゲノム配列（アミノ酸配列）を投入すると、投入された配列に対し、2. KAAS によって KEGG Ontology (KO)が割り振られ、KO が割り振られた配列を3. KEGG 機能モジュールへマッピング、その結果をもとに4. 各モジュールの充足率を計算するまでの過程を自動化した(図 1)。また、複数のゲノム・メタゲノムの結果の比較やゲノム・メタゲノムと KEGG でアノテーションされたゲノム間の比較解析を表示するシステムも開発した。このシステムは化学研究所のゲノムネットサーバにインストールして 12 月末から運用を開始したが(<http://www.genome.jp/tools/maple/>)、現状の計算資源環境で遺伝子数が約 1,800 の *H. influenzae* の全アミノ酸配列を投入すると約 2.5 時間で、10 万本のメタゲノム配列を投入すると約 6 日間で結果が表示される。すでに複数の研究者が本システムを活用してゲノム解析を行っているが、今後利用者が増大し計算資源が不足した場合には、割当 CPU の増加などの対策が必要となってくる。また、本システムに用いるゲノムデータやモジュールの更新を半年に一度行う予定にしているが、更新にともなう作業も自動化する必要がある。モジュールの更新にはまだ手作業が必要なため、今後この点も自動化することが必要となる。実際、このシステムを用いて、海洋堆積物中のメタゲノム解析を行ったところ、海底下 100m までの堆積物中には還元型アセチル CoA や還元型 TCA サイクル等による CO<sub>2</sub> 固定能が存在することが分ってきた。今後は更に詳細な解析を進める予定である。

## 成果報告:

(著書、査読あり)

1. **H. Takami**, (2014) New Method for comparative functional genomics and metagenomics using KEGG MODULES. *Encyclopedia of Metagenomics* (Nelson K. ed.) Springer, Tokyo Dordrecht, Heidelberg, London, New York, in press

(学会発表)

1. **高見英人** (平成 25 年 11 月) ゲノムから見えるアーキアの存在と機能、日本微生物生態学会年会 シンポジウム招待講演 (鹿児島大学)
2. **高見英人**、豊田敦、高木善弘、**荒井涉**、谷口丈晃、西真郎、坪内泰志、河合幹彦、藤山秋佐夫、稻垣史生 (平成 25 年 11 月) 海洋堆積物中に優先する Candidate division JS1は潜在的ホモアセトジェン、日本微生物生態学会年会 (鹿児島大学)
3. **荒井涉**、谷口丈晃、高木善弘、河合幹彦、稻垣史生、**高見英人** (平成 25 年 11 月) KEGG 機能モジュールを用いた海洋堆積中の菌叢解析と代謝機能評価、日本微生物生態学会年会 (鹿児島大学)
4. **高見英人**、谷口丈晃、**荒井涉**、守屋勇樹、**五斗進** (平成 25 年 12 月) ゲノム・メタゲノムに潜む代謝機能ポテンシャル評価システム、日本分子生物学会年会 (神戸)
5. **H. Takami**, T. Taniguchi, S. Moriya, T. Kuwahara, M. Kanehisa, **S. Goto** (2013) Evaluation of potential functionome harbored in genome and metagenome. *FEBS Journal* **280**, 541 (FEBS 2013, St. Petersburg, abstract)

## ヒト腸内細菌叢代謝経路データベースの構築

山田拓司・東京工業大学・講師  
奥田修二郎・新潟大学・准教授

### 目的：

本共同研究の目的はヒト腸内環境の代謝反応経路データベースの構築である。京都大学化学研究所の五斗進准教授を共同研究者として、本年度はデータベース基盤の構築と遺伝子予測パイプラインの構築を行った。

ヒト腸内には多種多様な微生物が共生している。近年になりヒト糞便から直接 DNA を抽出し、その配列を決定するメタゲノム解析と呼ばれる手法が開発され、ヒト腸内環境中の新規微生物やその遺伝子配列が明らかになってきた。しかしながら、腸内細菌の遺伝子機能に関してはその多くが未解明である上に、既知の事実に関してもデータ化が十分になされていない。そこで、本共同研究では①文献情報からの既知の反応経路情報の抽出、さらに②公共メタゲノムデータからの酵素反応系予測法の開発、を軸としてヒト腸内環境に特化した代謝機能データベースと遺伝子機能アノテーションパイプラインの構築を目指す。

### 方法：

これまでに報告されている論文及び代謝反応経路データベース KEGG の情報を基に、腸内細菌叢による代謝経路を網羅的に収集してデータベース化を行った。さらに、遺伝子が未知の反応経路に対して既知の反応パターンを用いた遺伝子予測手法の開発を行った。

### 結果：

菌叢代謝経路を 168 編の文献から網羅的に抽出することで、279 の代謝反応、176 の化合物、110 の反応経路モジュールを新規に抽出し、KEGG データベースなどの既存のデータベースに蓄積されている反応経路情報を加え、2690 の代謝反応、2597 の化合物、327 の反応モジュールを格納した enteroPATHWAY データベースを構築した。さらに、これらの経路を可視化したツールを作成、既存のメタゲノムデータをマップすることを可能にした。

表：構築したデータベースの内訳。今回新たに腸内細菌により代謝される化合物 (compounds)、酵素反応 (reactions)、及び連続した反応経路 (modules) を抽出した。

	Enteropathway		KEGG	Total
	Gene known	Gene unknown		
Reactions	39	240	2411	2690
Modules	21	89	217	327
Compounds	176		2421	2597

考察：

本年度の共同研究により、目的としたデータベース開発及び遺伝子予測パイプラインの構築を行うことを達成した。現在データベースは内部利用のみが可能となっており、今後は web ツールとしてデータベースの拡張を行う予定である。

本データベースはメタゲノムデータを基盤としている。現時点で公開されているメタゲノムデータをマッピングすることにより、今回新たに定義した腸内代謝機能の詳細な役割を解明していきたい。

学会発表：

ヒト腸内細菌叢代謝経路データベース 第18回腸内細菌学会年会 2014年6月11日（予定）

## カルバゾロファンを有するポリマートの合成、構造とその電子物性

谷 敬太・大阪教育大学

**【研究目的】**カルバゾール発色団は、そのポリマートであるポリ(*N*-ビニルカルバゾール)(PVK)が光電導性を有していることから、機能性材料として注目を浴びてきた。カルバゾール発色団は、PVK 中においてエキシマーを生成することが知られており、我々はそのモデル化合物としてカルバゾロファンが最適であること、また、カルバゾロファンのドナー性は対応するモノマートよりも高いことを見出した。

一方、PVK 中のホール移動の問題点として、カルバゾールのダイマー部位は対応するモノマートよりも安定なカチオンラジカル二量体を生成するため、ホール移動のトラップサイトとして作用することが指摘されてきた。

以上のことから、カルバゾロファンを単量体とするポリマーが合成できれば、ホールトラップサイトが存在せず、かつ、低電圧の印加でもホールが移動できる優れたホール輸送剤が開発できると予想した。この研究目的を達成するため、京大化研辻井教授・榎原助教との共同研究により、カルバゾール誘導体のポリマート化ならびにそれらの物性を検討した。

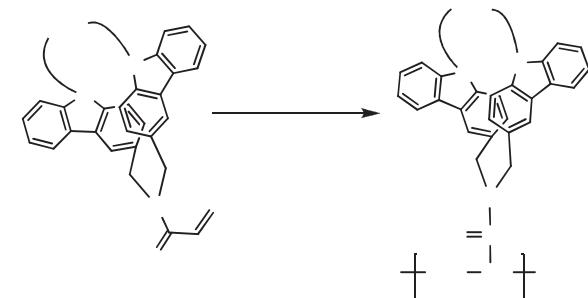
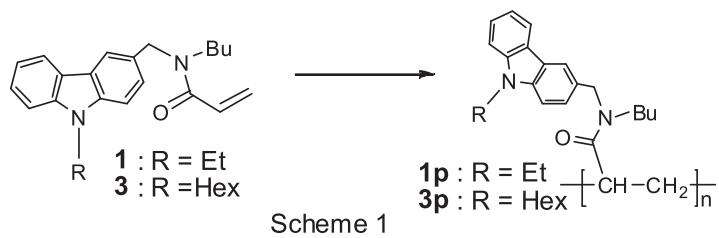
### 【実験方法・結果と考察】

昨年度、カルバゾール部位を一つ有するアクリルアミド誘導体**1**のラジカル重合を行い、数平均分子量( $M_n$ ) 約 5000、重量平均分子量( $M_w$ ) 約 9000 のオリゴマー

**1p** が生成することを報告した。

この結果を受けて今年度は、まず、アクリルアミドを有するカルバゾロファン誘導体**2**のラジカル重合を行った。条件検討の結果、Scheme 2 に示した条件で  $M_n$  が約 1200、 $M_w$  が約 1800 のオリゴマー**2p**

が生成することがわかった。しかしながら、分子量が数千程度にとどまった理由として、1) 原料の単量体の溶解度が低いこと、2) 重合する二重結合に対してカルバゾール部位の立体障害が大きい、の二つが考えられた。これらのうち、1) の要因を改善するために、**1**のカルバゾール環の *N*位の置換基をエチル基からヘキシル基にした**3**のラジカル重合を行った。**3**の溶解度は期待通り向上したので 40 重量% アニソ-



ル溶液が調製でき、1モル%のAIBN存在下、60°Cで20時間加熱することにより、 $M_n$ が約22000、 $M_w$ が約50000のポリマー**3p**を合成することができた。次に、カルバゾール環の構造により近いカルバゾール部位を二つ有するアクリルアミド誘導体**6**のラジカル重合を行った。**6**の合成経路をScheme 3に示した。カルバゾール環のN位のアルキル基の効果を調べるため、**6a**(R=Et)と**6b**(R=Hex)の2種類を合成した。

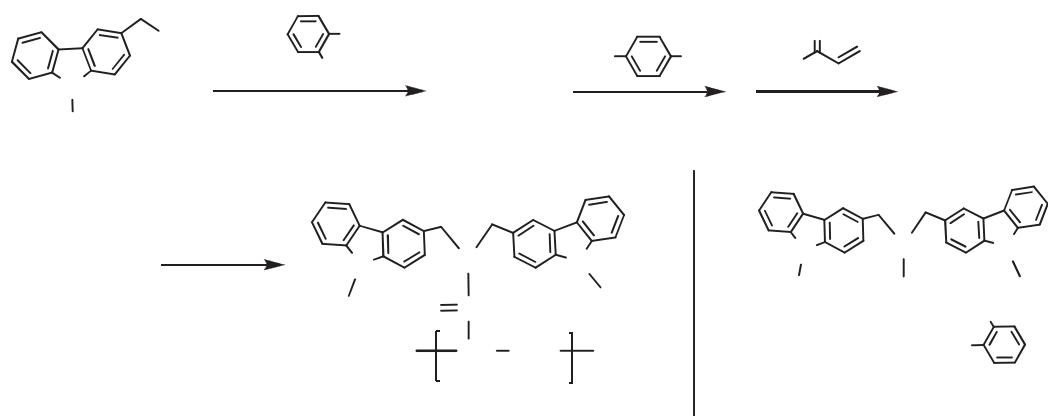


表1のEntry1,2から、N位のアルキル鎖が長くなり、溶解度が上昇すると共に $Mn$ が大きくなることが分かった。Entry3から、開始剤をVR-110からAIBNに変えて温和な条件でポリマー化すると、 $Mn$ が約7600、 $Mw$ が約12100のより高分子量のポリマーが得られた。次に、PVK, **3p**, **7b**のイオン化ポテンシャルを測定した結果、それぞれ5.72 eV, 5.74 eV, 5.58eVであったことから、**7b**のドナー性が最も強いことがわかつた。今後、得られたポリマーのホール移動度を測定する予定である。

表1. **6a** と **6b** のラジカル重合

Entry	単量体	単量体濃度	開始剤	開始剤濃度	時間	$M_n$	$M_w$	$M_w/M_n$	転化率
1	<b>6a</b>	10%	VR-110	1%	48 h	1600	2000	1.23	64%
2	<b>6b</b>	40%	VR-110	1%	15 h	3200	4700	1.45	79%
3	<b>6b</b>	40%	AIBN	1%	18 h	7600	12100	1.59	39%

以上、今年度の共同研究により、カルバゾールーアクリルアミド連結系のポリマー化に関して、有意義な知見が数多く得られた。

### 【成果報告：学会発表】

- [1] 大神、坂田、堀、久保塁、谷、武村、榎原、辻井、第24回基礎有機化学討論会、2P122
- [2] 坂田、加藤、大神、谷、榎原、辻井、第62回高分子討論会、1Pa013
- [3] K. Tani, H. Kato, K. Hori, K. Kubono, H. Takemura, K. Sakakibara, Y. Tsujii, ISNA-15, PSB-128
- [4] 坂田、大神、堀、谷、榎原、辻井、第94回日本化学会春季年会, 1PC-077
- [5] 大神、坂田、堀、谷、榎原、辻井、第94回日本化学会春季年会, 1PC-078

## 濃厚ポリマーブラシ付与ファイバーと細胞との相互作用に関する研究

吉川千晶・物質・材料研究機構

### 緒言

最近、私たちのグループでは濃厚ポリマーブラシを付与した電界紡糸ファイバーを短纖維化する技術（図1）を開発するとともに、短纖維（直径 $1\mu\text{m}$ 、纖維長 $\sim 150\mu\text{m}$ ）が細胞と自発的に凝集塊を形成することを見出している[1,2]。また、数百マイクロから成る短纖維/細胞凝集塊において細胞が均一に生存することから、この濃厚ブラシ付与短纖維は新しい細胞足場材料としての展開が期待される。

細胞接着は一般的に材料表面に吸着したタンパク層を介して起こるため、細胞培養用の培地に含まれる血清タンパクが濃厚ブラシ層に吸着し、細胞接着すなわち凝集塊の形成を引き起こしたと考えられる。そこで本申請請課では濃厚ブラシに吸着するタンパクの種類を液体クロマトグラフィー質量分析装置(LC-MSMS)により同定することを企図した。また、電界紡糸ファイバーより小さな直径を有するセルロースナノファイバー(CNF)（直径 $\sim 20\text{nm}$ ）を用いて細胞との培養を行い、纖維の構造（直径や纖維長）が細胞凝集塊の形成に与える影響についても検討した。

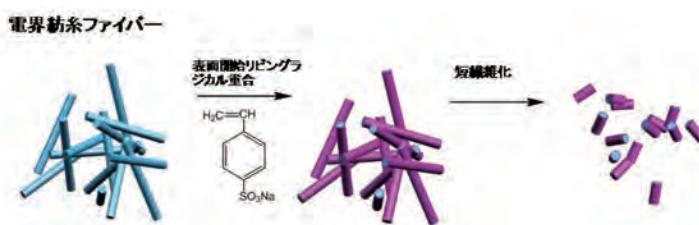


図1. 濃厚ブラシ付与短纖維の合成スキーム

### 実験

1. 表面開始原子移動ラジカル重合(SI-ATRP) : ATRP の開始基を有するシリカ微粒子(SiP)（直径 $130\text{nm}$ ）またはセルロースナノファイバー(CNF)を含む styrene sodium sulfonate (SSNa), フリー開始剤,  $\text{Cu}(\text{I})\text{Br}$ ,  $\text{Cu}(\text{II})\text{Br}_2$ , 2,2'-bipyridine の $1/3\text{ v/v\%}$ メタノール/水の溶液を Ar 雰囲気下、30 度で 3 時間加熱した。重合後フリーポリマーの  $M_n$ ,  $M_w/M_n$  を GPC 測定により決定した。 $M_n$ 、グラフト量、および表面積からグラフト密度は約 $0.22\text{ chains/nm}^2$ （表面占有率 $\leq 30\%$ ）と算出され、濃厚ポリマーブラシであることを確認した。

2. タンパク吸着: 濃厚 PSSNa ブラシを付与した SiP(500mg)をウシ胎児血清(FBS) 50mlに入れ、37°C で 1 時間静かに攪拌した。その後、PSSNa 付与 SiP に吸着したタンパクを 5wt%の SDS 水溶液により回収し、脱塩・トリプシン処理後 LC-MSMS 測定を行った。
3. 細胞培養: マウス L929 ( $3.0 \times 10^4$  個/ $\text{cm}^2$ ) と CNF (0.2wt%) を二日間インキュベータ内で培養した。

### 結果と考察

図2にLC-MSMSの結果を示す。同定されたタンパクは種類に応じて7つに分類した。濃厚PSSNa ブラシ表面に吸着したタンパク数は29個であり、未処理の SiP 表面 (124個)

に比べて非常に少ないことがわかった。興味深いことに、細胞接着性の糖タンパクやアクチン/アクチン結合に関わるタンパクなどは濃厚 PSSNa ブラシ表面では検出されなかつたが、検出された 29 個のうち 14 個のタンパクは未処理 SiP では検出されなかつた。シリコン基板にグラフトした濃厚 PSSNa ブラシ表面ではシリコン基板表面と同様に細胞が接着することを確認しており、吸着タンパクの特異性が短纖維/細胞凝集塊の形成に影響を与えている可能性がある。現在、ポリマー種を変え、短纖維形成と吸着タンパク種の相関について検討している。

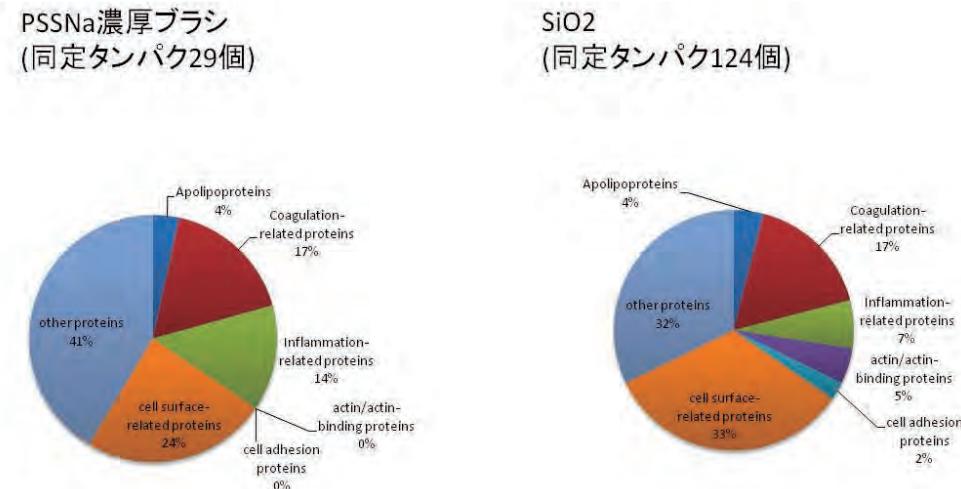


図 2. LC-MSMS による吸着タンパク質の検出総数とタンパクの種類

次に、纖維長が数百 nm のセルロースナノファイバー (CNF) と細胞を 2 日間共培養した。しかし、図 3a に示すように細胞凝集は見られなかつた。そこで、電界紡糸短纖維と同程度の纖維長 (数百 μm) を有する CNF を用いて細胞培養を行つたところ、凝集塊の形成が若干認められた (図 3b 矢印)。この結果は纖維長が細胞との凝集塊形成に影響を与えることを示唆する。一方、

PSSNa ブラシを付与した電界紡糸短纖維に比べると凝集塊の数や大きさが小さい。これは CNF と PSSNa ブラシ表面に吸着するタンパク (総数または種類) が異なるためだと考えられる。そこで SI-ATRP により CNF 表面に PSSNa をグラフトし ( $M_n = 11900$ , PDI = 1.3)、L929 との共培養を試みた。現在、培養および凝集塊の評価方法を検討中であり、結果については今後、学会等で報告する予定である。

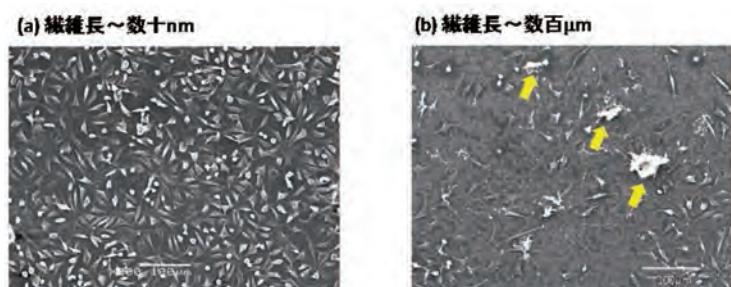


図 3. 細胞培養後 2 日の CNF の SEM 写真。細胞数：6 万個/cm<sup>2</sup>。

## 参考文献

- [1] C. Yoshikawa et al., *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 12(1), 015003-1 (2011).
- [2] 小林尚俊、吉川千晶 特願 2011-102759.

# 精密重合法を用いたキチンナノファイバーポリマーブラシの合成と自己組織化アプローチによる階層構造を持った新規ソフトマテリアルの開発

伊福伸介・鳥取大学工学研究科

## 【緒言】

当研究室ではカニやエビの殻およびキノコから纖維幅 10nm のキチンナノファイバー（キチン NF）を単離する技術を開発している<sup>1)</sup>。このキチン NF は優れた物性と多様な生体機能をもつ。よって、これまで未利用であったキチンが今後様々な用途で利用されると期待している。用途拡大においてキチン NF の表面修飾が有効な手段であろう。表面に機能性官能基を導入することによって目的の機能を付与することができる。

表面を修飾する方法として原子移動ラジカル重合（ATRP）が挙げられる。すなわち、遷移金属錯体と有機ハライドをラジカル開始剤として用いるリビング重合であり、ATRP により得られるポリマーブラシ様はグラフト側鎖の分子の種類や重合度、密度に応じて様々な機能を発現することができる。また通常のラジカル重合とは異なり、連鎖移動や停止反応が起こりにくいため分子量分布の狭いポリマーが得られる。

そこで本研究では、ATRP 法を適用した新規なキチン NF 誘導体の調製を目的とした。グラフトするビニルモノマーとして、温度に応じて親水性から疎水性へと変化する温度応答性高分子である *N*-イソプロピルアクリルアミド（NIPAAm）を選択した。

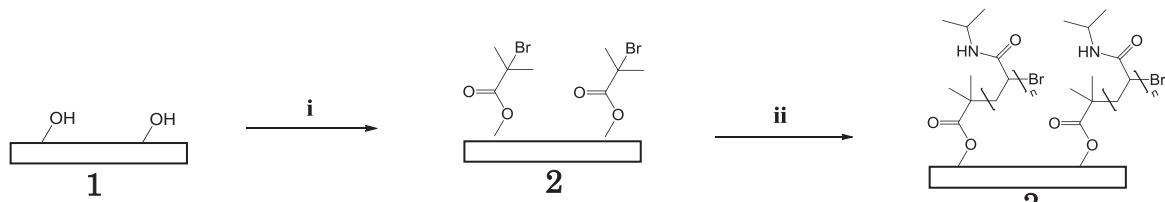
## 【実験方法】

### (1) キチン NF シートへの ATRP 開始剤の導入

Scheme 1.に調製方法を示す。まず市販のキチン粉末に酢酸水溶液を加え解纖することで 2wt%キチン NF 懸濁液を調製した。これをシート状に形成したものに、THF, DMAP, TEA, 2-bromoisobutyryl bromide を加え 24 時間、室温で反応させ開始剤を導入したキチン NF シート(2)を得た<sup>2)</sup>。

### (2) 原子移動ラジカル重合

得られたシート(2)を用い、NIPAAm と原子移動ラジカル重合を行った。なお触媒として CuBr、配位子として 1,1,4,7,10,10-hexamethyltriethylenetetramine (HMTETA)、銅錯体濃度を間接的に制御するためのフリー開始剤として ethyl 2-bromoisobutyrate、溶媒に DMF/H<sub>2</sub>O を用いた<sup>3)</sup>。得られたグラフト化キチン NF シート(3)について、その化学構造、結晶構造、形状、熱分解挙動、温度応答性について評価した。



**Scheme 1.** Preparation of polyNIPAAm chitin nanofiber sheet.

Reagents and conditions: (i) THF, triethylamine, 2-bromoisobutyryl bromide, r.t., 24 h; (ii) NIPAAm, CuBr, HMTETA, ethyl 2-bromoisobutyrate, DMF/H<sub>2</sub>O, 60 °C, 48-96 h.

## 【実験結果と考察】

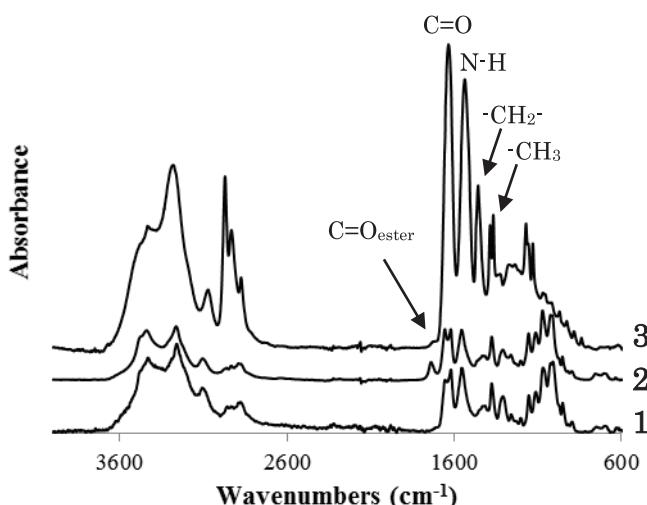
### (1) キチン NF シートへの ATRP 開始剤の導入

得られたシートのプロモイソブチリル基の置換度は反応試薬の量を変えることにより 0.2~0.6 まで制御できた。XRD の結果より、重合開始剤の置換度が高くなるに伴いキチンの相対的な結晶構造が低下した。すなわち、NF の表面から内部に反応が進行したと考えられる。よって、キチン NF の表面を修飾するためには、相対結晶化度が低下しない、開始剤の置換度が 0.2 のシートを ATRP に使用するのが好ましい。

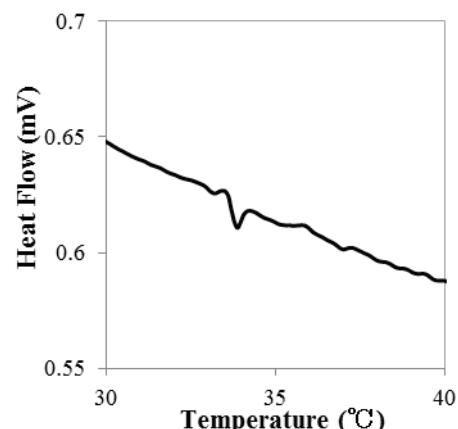
### (2) 原子移動ラジカル重合

原子移動ラジカル重合において、プロモイソブチリル基の置換度、また反応時間によって重合度を制御できることが見出された。FT-IR スペクトルより NIPAAm に由来するアミド、メチレン基、メチル基のピークが現れ、重合の進行が確認できた (Fig. 1.)。また DSC の結果より NIPAAm の重合度が低い (DP=2) シートにおいても 34°C 付近で温度相転移を確認できた (Fig. 2.)。これは ATRP によってキチン NF の表面に高密度にグラフトされた NIPAAm がポリマーのように振る舞うためだと考えられる。また、NIPAAm 側鎖の伸長に伴って、熱分解温度が向上した。これは、polyNIPAAm がアモルファスであるためキチン NF への熱伝導が低下するためと考えている。

様々な重合度のシートに冷水と温水をそれぞれ滴下し接触角を測定した。冷水に対してはシート表面が親水性になり、一方で温水に対しては撥水性を示した。また、重合度 60 のサンプルにおいて冷水および温水に対するシートの含水率はそれぞれ 225% および 67% であった。すなわち、NIPAAm の導入によりキチン NF シートに温度応答性機能を付与することができた。



**Fig. 1.** FT-IR spectra of 1-3. DP of 3 is 60.



**Fig. 2.** DSC analysis of 3 with DP<sub>NIPAAm</sub> of 2.

## 【参考文献】

- 1) S. Ifuku, M. Yoshioka *et al.*, *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 1584-1588.
- 2) Anna Carlmark *et al.*, Malmström, *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 1740-1745.
- 3) S. Ifuku *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2013**, *52*, 14-19.

## 新たな三次元構造拡張 $\pi$ 電子系骨格を基盤とする電子材料の創製

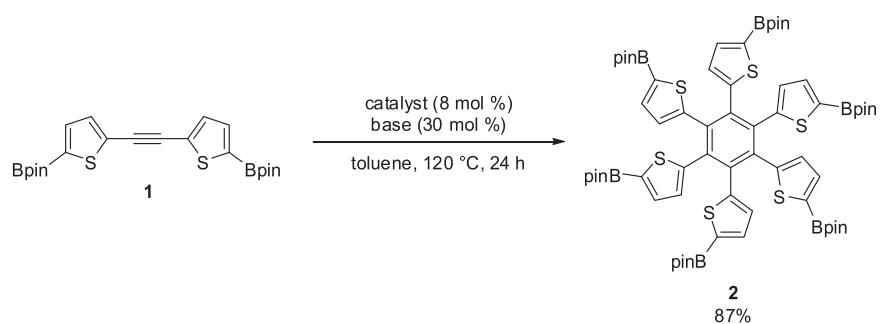
菅 誠治（岡山大学大学院自然科学研究科）

### 目的

近年、ヘテロ原子を主鎖に含む高分子の合成と物性に注目が集まり、半導体材料などの新規機能性材料への応用が盛んに研究されている。これまでに報告されたこれらの $\pi$ 電子系高分子の大半の一次構造は直線構造である。それに対し、最近スターバースト型拡張 $\pi$ 電子系に代表される三次元的な分子構造を有する分子群が、その空間的な特殊性から示す特異な性質により注目を集め始めてきている。すでに、種々のスターバースト型分子が報告されているが、その大半はヘテロ元素を含まないヘキサフェニルベンゼン・ヘキサアルキルベンゼンを主骨格とするものである。ヘテロ元素を共役系内に含んだスターバースト型拡張 $\pi$ 電子系分子の報告は合成的な困難さゆえに非常に少なかった。前年度までに著者らは、これまでに合成報告の全くなかった含酸素スターバースト型拡張 $\pi$ 電子系分子であるヘキサフリルベンゼンとその $\pi$ 拡張誘導体を含む新規三次元構造分子群を世界で初めて合成することに成功すると共にその光学特性を明らかとした。本年度は、ヘテロ芳香環としてチオフェンを六つ導入し三次元的に高度に $\pi$ 拡張したヘキサチエニルベンゼン及びヘキサキス（ビチエニル）ベンゼン誘導体を合成し、その光学的・電気化学的特性を明らかにすることでこれら誘導体の機能性材料への応用をめざすことを目的として研究を行った。

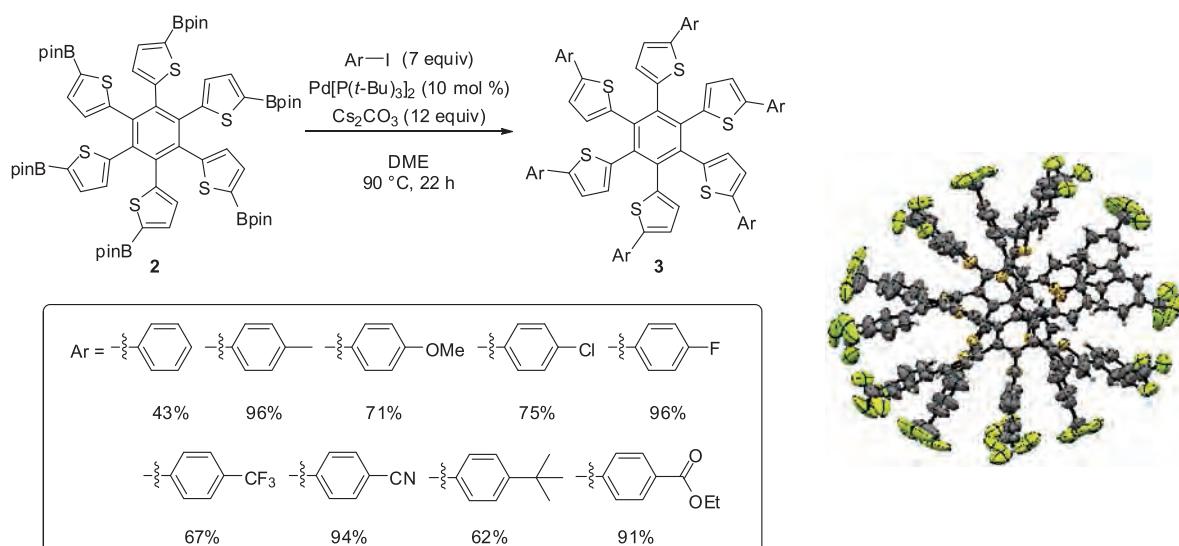
### 結果及び考察

まず、ホウ酸エステル (Bpin) 基を両末端に導入した二 Bpin 置換ジ(2-チエニル)アセチレン (**1**) の環化三量化反応による六 Bpin 置換ヘキサチエニルベンゼン (**2**) の合成をおこなった。六 Bpin 置換ヘキサフリルベンゼンの合成時と同様、一般的によく用いられる  $\text{Co}_2(\text{CO})_8$  触媒では複雑な混合物を与えたが、我々の開発した  $\text{RhCl}_3/i\text{-Pr}_2\text{NEt}$  触媒系を用いることで収率よく六 Bpin 置換ヘキサチエニルベンゼンが得られた。**2** は種々のヨウ化アリールとの鈴木一宮浦カップリングにより対応する $\pi$ 拡張ヘキサフリルベンゼン誘導体 **3** へと変換できた (Scheme 2)。これらの誘導体の光学的・電気化学的特性を精査し、 $\Phi_F = 0.1$  程度ではあるものの固体蛍光を示すことが分かった。



Scheme 1.  $\text{RhCl}_3/i\text{-Pr}_2\text{NEt}$ -Catalyzed Cyclotrimerization of **1**

また、*p*-トリフルオロメチルフェニル基を導入した誘導体については結晶構造解析に成功しており、その結晶構造がヘキサフリルベンゼンの類縁体とは大きく異なり、全てのチオフェン環が同じ方向を向いたお椀型の構造をとり、しかもそれが二つ組み合わさった二枚貝状のパッキング構造をとることが明らかとなった。本結果は、三次元型拡張 $\pi$ 電子系分子がその構成要素であるヘテロ芳香環によって固体物性を著しく変化させる可能性があることを示唆している。

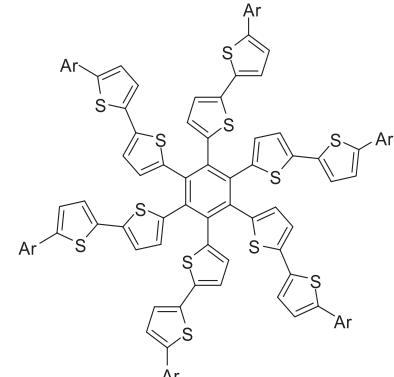


Scheme 2. Synthesis of  $\pi$ -Extended Hexathienylbenzenes

同手法を応用することで、右図に示す、さらに $\pi$ 拡張したヘキサキス（ビチエニル）ベンゼン誘導体の合成にも成功すると共に、その光学的特性・電気化学的基礎物性を精査した。その結果、UV吸収・FL波長が $\pi$ 共役系の拡張により長波長シフトすると共に吸光係数も増大しており、 $\pi$ 共役系の拡張の効果が現れていた。

## 結言

多様な置換基を有するヘキサチエニルベンゼン及びヘキサキス（ビチエニル）ベンゼン誘導体の汎用的な合成法を確立し、その結晶構造と光学的基本特性を明らかとした。一連の新規構造の物性及びその三次元的挙動の端緒を明らかとしたことは科学的に意義深いと考えられる。今後様々なヘテロ芳香環を主骨格とするスターバースト型分子を合成し、その性質を明らかとともに機能性材料へと応用していきたい。



## 成果報告

- (1) Mitsudo, K.; Kamimoto, N.; Murakami, H.; Mandai, H.; Wakamiya, A.; Murata, Y.; Suga, S. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9562–9569.
- (2) Mitsudo, K.; Harada, J.; Tanaka, Y.; Mandai, H.; Nishioka, C.; Tanaka, H.; Wakamiya, A.; Murata, Y.; Suga, S. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2763–2768.

## 海洋天然物アブリロニンAの作用機構解明

木越 英夫・筑波大学・数理物質系・大学院数理物質科学研究科

### 1. 緒言

アブリロニン A (ApA) は非常に強力な細胞毒性 ( $IC_{50}$  0.01 nM、HeLa S3 cell) と抗腫瘍活性 (P388 白血病モデルマウスの延命率 545%、0.08 mg/kg/day) を有する海洋産マクロリドである (Yamada, K. et al. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 27.)。また ApA は細胞骨格タンパク質である F-アクチンを分解し、モノマーのアクチンと 1:1 の複合体を形成する (図 1)。しかし ApA が細胞毒性を示す濃度は、細胞のアクチン骨格に実際に影響するよりも 1,000 倍以上低い。そのため ApA の強力な抗腫瘍活性はアクチンとの相互作用のみでは説明できず、異なる作用メカニズムの存在が考えられていた。1994 年に ApA の全合成が達成されて以来、構造活性相関研究やアクチンとの複合体の X 線結晶構造解析などが行われてきた。これらの知見より ApA はその側鎖部 (C24-C34 位) でアクチンと結合するが、細胞毒性にはマクロラクトン上の置換基が重要であることがわかった。興味深いことに、アクチンとの複合体において細胞毒性に重要な 7 位トリメチルセリン基は溶媒側に突出している。従ってこれらのマクロラクトン上の置換基と相互作用する第二の標的分子が存在すると予想してきた。そこで本研究では、ApA をリガンドとした分子プローブを設計・合成し、それらを用いて第二の標的分子を同定し、相互作用を解析することで作用機序の解明を目指した。

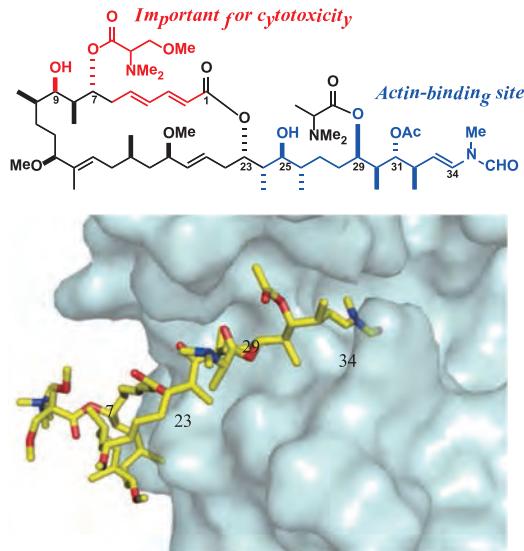


図 1.

アブリロニン A の構造およびアクチンとの複合体の X 線結晶構造解析

### 2. 細胞抽出液からの ApA 標的タンパク質の精製

ApA をリガンドとしたビオチンプローブを合成し、HeLa S3 細胞の抽出液から標的タンパク質を精製したところ、アクチン以外に新たに Arp2,3 (actin related proteins 2,3)を見出した (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9871)。しかし光親和性ビオチンプローブ **1** を用いた相互作用解析により、Arp2,3 はこの場合も精製されるが、プローブ **1** と共有結合を形成しないことがわかった。従って Arp2,3 はアクチンを介して間接的に ApA と相互作用すると考えられた (*J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20314.)。

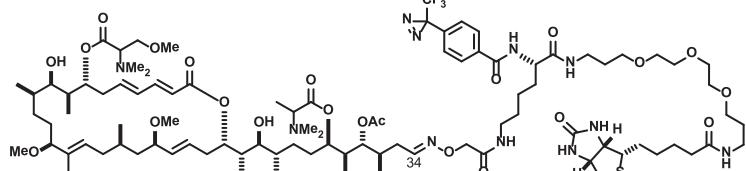


図 2. 光親和性ビオチンプローブ **1**

### 3. 生細胞中での標識化による ApA 標的タンパク質の精製

さらに細胞抽出液からの精製を検討したが、目的の標的タンパク質の精製には至らなかった。この原因として標的タンパク質が不安定で、細胞から抽出する過程で変性している可能性が考えられた。そこで光親和性ビオチンプローブ **1** を生細胞に投与し、細胞内で光標識実験を行うことで、プローブと共に結合したタンパク質の精製を試みた。標識されたタンパク質を

細胞から抽出し、アビジン樹脂によって精製したところ、アクチン以外にプローブ**1**と共有結合した新たなタンパク質を得ることに成功した。酵素消化とMS解析、およびイムノプロット法により、このタンパク質をチューブリンと同定した (*J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18089)。

#### 4. 精製チューブリンを用いた相互作用解析

チューブリンの精製品を用いた *in vitro* 相互作用解析を行った。興味深いことに、光親和性プローブ**1**はアクチンの存在下でのみチューブリンと共有結合を形成した。従ってApAはアクチンとの1:1複合体の状態でチューブリンに作用すると考えられる。チューブリンは重合することで細胞骨格の一つである微小管を形成する。そこで *in vitro* チューブリン重合活性試験に対する化合物の影響を調べたところ、ApAはアクチン共存下でのみチューブリンの重合を阻害した。さらにゲルろ過 HPLC 分析により、チューブリンの $\alpha/\beta$ -ヘテロダイマーとアクチンとApAが1:1:1で三元複合体を形成することを証明できた(*J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18089)。

#### 5. 細胞観察

続いてApAをHeLa S3細胞に投与し、免疫蛍光染色や細胞周期解析によって、一般的な微小管阻害薬であるビンプラスチント作用機序を比較した。ApAは0.1 nMという低濃度で紡錘体の多核化などM期細胞の形態異常を引き起こし、細胞周期をG2/M期で停止させた。さらに1 nMでは10 nMのビンプラスチント作用機序と同様に微小管の機能を完全に阻害し、アポトーシスを誘導した。一方でアクチン骨格にはこれらの濃度で異常はみられなかった。従ってApAはF-アクチンと平衡にあるモノマーアクチンと1:1複合体を形成し、微小管ダイナミクスを阻害することで有糸分裂を阻害し、顕著な細胞増殖阻害作用を示すと考えられる。

#### 6. 結語

本研究では光親和性ビオチンプローブを用いてApAの新規標的タンパク質であるチューブリンの同定に成功した。さらにApAがアクチン—チューブリン間のタンパク質間相互作用(protein–protein interaction, PPI)を生み出し、顕著な生物活性を発現することを明らかにした。ApAの微小管に対する作用やがん細胞に対する増殖抑制活性を示す濃度は、従来の微小管阻害剤と比べても低い。これはPPIが一般に多くの相互作用点を有し、結合した生体分子の大きな構造変化を伴うなどそのダイナミクスに大きく影響するためではないかと考えている。有機小分子—アクチン複合体がチューブリンに直接作用するというPPIはこれまで例がなく、ApAの作用メカニズムは新規性が高いと考えられる。また細胞骨格を形成するアクチンやチューブリンのダイナミクスは、それぞれ多くの内在性タンパク質により制御されている。一部にはアクチンとチューブリンの両方に影響を及ぼす関連タンパク質も報告されており、ApA—アクチン複合体はこのような生体高分子を模倣していることも考えられる。

ApAのように、標的生体分子と三元複合体を形成して活性を発現する化合物として、免疫抑制剤FK506が挙げられる。FK506はFKBPと複合体を形成し、カルシニューリンに作用する(Schreiber, S. L. et al. *Nature* **1989**, *341*, 758.)。一方で、FK506の構造類縁体であるラパマイシンは、FKBPおよびmTORと三元複合体を形成し、FK506とは異なるメカニズムで免疫抑制活性や抗腫瘍活性を示す(Schreiber, S. L. et al. *Nature* **1994**, *369*, 756.)。従ってアクチンに結合する化合物の中にも、ApAとは全く異なるメカニズムで第二の生体分子に作用するものが存在すると期待される。今後ApAを始めとするアクチンに作用する化合物を研究ツールとして活用することで、生物学的に重要な新たなPPIの発見やメカニズム解析が進展すると期待される。

## 機能性金属ナノ粒子を用いた新規光音響造影剤の合成

石原美弥・防衛医科大学校医用工学講座

【研究目的】光音響造影剤の創製として、機能性金属ナノ粒子を *in vivo* で可視化する光音響イメージング技術の確立を目的とした。光音響分光法 (PAS) の原理に基づき生体内分子の無輻射過程を画像化する光音響画像は、既にヘモグロビンを観察対象とした微細な血管網の 3 次元画像化（分解能 < 200  $\mu\text{m}$ , 深度 > 2 cm）が可能となつており脳機能画像の描出に成功しているが、がんや生活習慣病などの診断には至っておらず医療機器としては未だない。すなわち、がんや生活習慣病診断用の光音響造影剤の開発が急務である。我々は光吸収特性や表面修飾などの観点から金ナノ粒子を利用した造影剤の高い有用性に着目している。そこで本研究では化学研究所の寺西教授により精密に設計・合成された金属ナノ粒子の形状や粒径を最適化して光音響信号の増強効果を図り、がん細胞による金属ナノ粒子の高集積化で発現する特徴的な光音響特性の変化を活用することで、がん診断を可能にする光音響画像の実現を目指している。

今年度は、(1)種々の形状と粒径の金ナノ粒子水溶液を対象にした光音響信号測定と(2)表面電荷を変化させた金ナノ粒子の細胞への取り込み性能の評価を中心に検討した。

【実験方法】本研究では波長可変ナノ秒パルスレーザーを励起光源、P(VDF-TrFE) 圧電フィルムをセンサ材料とし、励起光の導光用石英ガラスファイバと同軸に配置したリング状の音響センサを用いて光音響信号を測定した。測定項目は励起波長と照射パルス数を変化させた光音響信号強度とした。(1)として、レーザー照射前後での消光スペクトル測定、電子顕微鏡観察で金ナノ粒子水溶液を評価した。(2)では A549 細胞（ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞）を用い、(1)と同様に消光スペクトル測定、電子顕微鏡観察に加えて、光学顕微鏡観察、及び、細胞毒性試験を実施した。

【実験結果】(1) 金ナノ粒子水溶液を対象にした測定結果では本研究で検討した粒径 10–50 nm の範囲では粒径が大きい方が光音響信号発生効率が高かった。形状によって光音響信号発生効率に違いがあり、さらに照射パルス数の増加に伴う光音響信号強度変化の様子が異なった。設定した実験条件ではロッドや球に比べて多面体の方が光音響信号増強効果が高く、レーザー照射による変形が見られなかった。また、レーザー光照射に起因した金ナノ粒子の凝集が観察されたが、レーザー光の強度や照射パルス

数、金ナノ粒子の形状、保護配位子、濃度によって異なる傾向が見られた。

(2) A549 細胞に取り込ませた金ナノ粒子を対象にした測定結果では取り込み量は接触時間で大きく異なり、表面電荷に関わらず接触時間が長いほど細胞取り込み量は大きくなつた。接触時間 6 時間後のポリ-L-リジン保護金ナノ粒子（カチオン性）とクエン酸保護金ナノ粒子（アニオン性）の細胞内の様子を TEM(Transmission electron microscopy)像で示した（図 1）。いずれもリソソームに局在しているが、カチオン性金ナノ粒子の方がアニオン性金ナノ粒子よりも多く細胞に取り込まれており、カチオン性金ナノ粒子は細胞内で分散しているが、アニオン性金ナノ粒子は凝集している。細胞毒性試験では、本研究で設定した実験条件で金ナノ粒子の取り込みによる生細胞数の減少は見られなかつた。すなわち、実験結果に細胞毒性による影響はないと判断された。

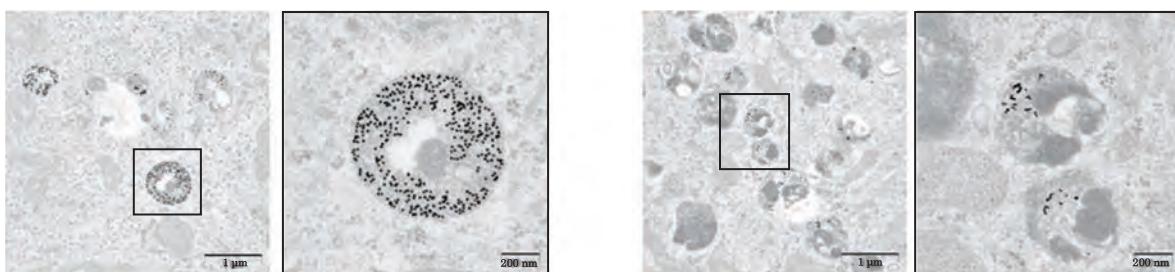


図 1 細胞に取り込まれた金ナノ粒子の様子。左、ポリ-L-リジン保護金ナノ粒子（カチオン性）；右、クエン酸保護金ナノ粒子（アニオン性）

【考察】光音響信号は吸収体でレーザー光が熱に変換され、熱弾性過程により音響波が放出される。すなわち一般的に光音響信号強度はレーザー光強度と吸光度で決まる。これに対して金ナノ粒子を対象にした本研究ではプラズモン増強効果による光音響信号が観察された。さらに細胞が金ナノ粒子をエンドサイトーシス過程で取り込む点、取り込み量や分散／凝集の様子が表面電荷特性によって異なる点など、光音響造影剤の設計指針に資するデータが収集出来た。

次年度以降も引き続き、培養細胞や小動物を用いて機能性金属ナノ粒子の光音響造影剤としての有効性と安全性を確認していく。

### 【成果報告】

1. M. Ishihara, et al., “The effect of surface charge of plasmonic gold nanoparticles on photoacoustic signal”, SPIE Photonics West Biomedical Optics, BiOS 2014, San Francisco, California, USA, (2014).
2. M. Ishihara, et al., “Photoacoustic signal enhancement by localized surface plasmon of gold nanoparticles”, Proceedings of the International Conference Nanomaterials: Applications and Properties. 2(4), p.04NABM12-1-04NABM12-3 (2013).
3. M. Ishihara, et al., “Characterization of photoacoustic signal of plasmonic gold nanoparticles”, CLEO-PR & OECC/PS 2013, Kyoto, Japan (2013).

## 新規自己分解型ペプチドリンカーの開発

林 良雄・東京薬科大学薬学部

近年、塩基性の細胞透過性ペプチド (cell-penetrating peptide, CPP) を用いた薬物や生理活性物質の細胞内への送達法が開発された。京都大学化学研究所の二木は、代表的な膜透過ペプチドである HIV-1 由来 Tat ペプチドやオリゴアルギニンの膜透過機序の解明において数々の研究成果を挙げてきた。CPP と薬物のコンジュゲーションにより、細胞膜透過性の低い薬物が効率的に細胞内に送達されることが示されてきているが、CPP を用いた細胞内送達は、一般に細胞選択性は少なく、どの細胞においても効果的に見られると考えられてきた。一方では、体内的患部細胞に選択的に薬物を送達することにより、薬効の向上のみならず、用量の低減による副作用の抑制や治療費の軽減などが期待されるため、CPP を用いた薬物の送達において、患部組織への送達効率を高めることが重要である。二木らは、最近、尾静脈注射された D 型アルギニンの 8 量体 (r8) が、高い腫瘍集積性を示すを見いだしたことは、この観点から非常に意義深い。一方、研究代表者の林はチューブリン重合阻害薬 plinabulin (1) とその新規誘導体 KPU-300 (2)を開発しており、特に plinabulin は米国において肺癌適用に関する第二相臨床試験中であり、r8 を用いた腫瘍への送達により、その薬効の更なる向上が期待される。一方、CPP とのコンジュゲーションにより、細胞内への薬物の送達効率は一般に高まるが、CPP との結合により、薬物の効果が低下する場合も予期される。従って、細胞内に至った後に、薬物と CPP とをつなぐリンカーが開裂し、薬物が CPP から遊離する設計ができれば、CPP を用いた送達の適用範囲が広がることが期待される。

本研究では、r8 と plinabulin とのコンジュゲートの腫瘍細胞への送達を可能とする新規自己分解型ペプチドリンカーを開発することを目的とした。具体的な合成に当たっては、(1) 図 1 に示すように plinabulin のジケトビペラジンをラクチム体にプロドラッグ変換、ならびに (2) 林により以前に開発された固相反応を利用したアルギニンペプチド (3) との簡易ジスルフィド形成法 (特願 2013-209166) の併用により行うことを計画した。(2) のジスルフィド結合は細胞内の還元的環境において容易に開裂されることが知られており、(1) の変換と組み合わされることで細胞内での効果的な plinabulin の放出が期待できる。

この合成計画の妥当性を検証するために、r8 の代わりに通常の L 型のアルギニンの 8 量体 R8 (図 1 では(Arg)<sub>8</sub> と記載) と plinabulin のコンジュゲート (3) の合成を行った。すなわち、クリック反応を利用して、ラクチム体の plinabulin にスルフィドを導入し、これに前述

のジスルフィド形成法を用いることにより、ワンポットで効率的に目的のコンジュゲート(3)を得ることができた。

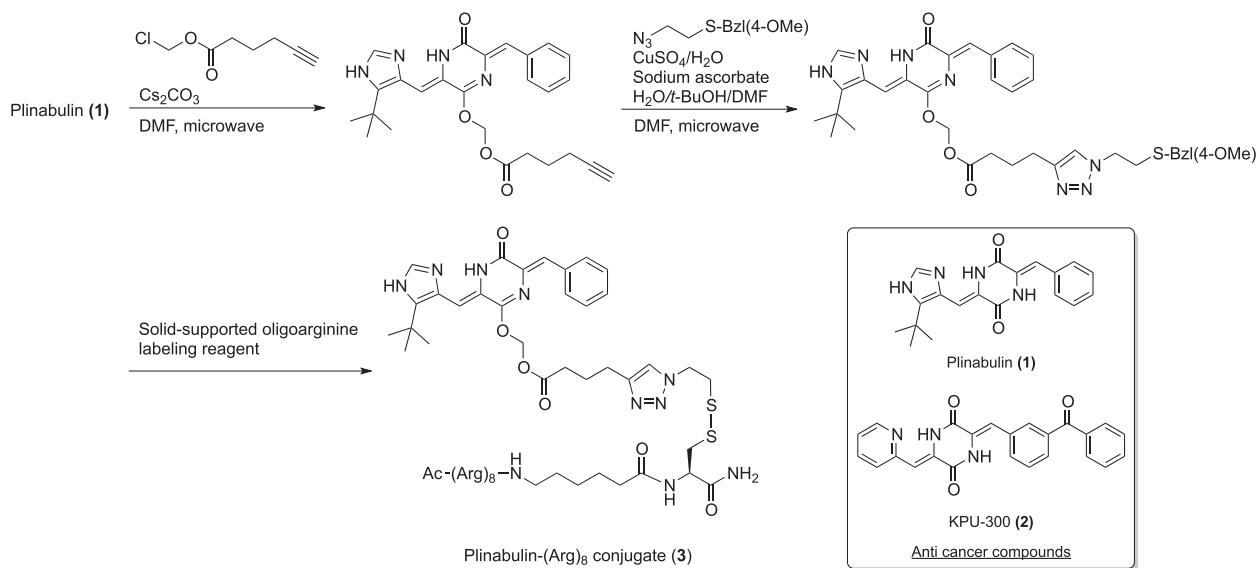


図1. Plinabulin-(Arg)<sub>8</sub>コンジュゲートの調製

一方では、(1)のプロドラッグが、培養上清中で親化合物 plinabulin に戻り、抗癌活性を発揮することも確認することができた。今後、r8 を用いて同様の合成を行うとともに、培養細胞実験あるいは動物実験により本設計の有用性を確認したい。

## 引用文献

- [1] Nakase, I., Konishi, Y., Ueda, M., Saji, H., Futaki S. *J. Control. Release*, **159**, 181-188 (2012)
- [2] Yamazaki, Y., Sumikura, M., Hidaka, K., Yasui, H., Kiso, Y., Yakushiji, F., Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 3169-3174 (2010)
- [3] Yamazaki, Y., Tanaka, K., Nicholson, B., Deyanat-Yazdi, G., Potts, B., Yoshida, T., Oda, A., Kitagawa, T., Orikasa, S., Kiso, Y., Yasui, H., Akamatsu, M., Chinen, T., Usui, T., Shinozaki, Y., Yakushiji, F., Miller, B. R., Neuteboom, S., Palladino, M., Kanoh, K., Lloyd, G. K., Hayashi, Y. *J. Med. Chem.*, **55**, 1056-1071 (2012)
- [4] JP 2013-209166, Hayashi, Y., Kajiyama, A., Taguchi, A., Fukumoto, K.

## 新規エンドソーム脱出ペプチドの開発

小暮健太朗・京都薬科大学薬学部（薬品物理化学分野）

近年、低分子干渉 RNA(siRNA)、アプタマーなどを含む核酸医薬品の臨床開発が進められているが、大きな問題となっているのはこれらの細胞内への送達である。この際、細胞の生理的飲食作用であるエンドサイトーシス系により、これらの医薬品が細胞内に取り込まれた後の、エンドソームから細胞質への移行効率をあげることが非常に重要になってくる。細胞内に移行したエンドソームの内部の pH が低下することを利用して、細胞外の中性環境では膜傷害性を発揮せず、pH が 5 程度になると膜傷害性を発揮し、エンドソーム膜を傷害する所謂「pH 感受性エンドソーム脱出ペプチド」や同様の効果を持つ高分子がこれまでに種々開発されてきたが、その効率は十分ではなかった<sup>1,2</sup>。一方、スウェーデン・ストックホルム大学の Ulo Langel 教授らは、Pepfect6 (PF6)と呼ばれるペプチド誘導体を報告している<sup>3</sup>。今回、我々はこのペプチドの pH 依存的なエンドソーム脱出能に着目し、PF6 の細胞内への siRNA 送達への有用性の検討を行った。すなわち、図 1 に示すように、(1) PF6 あるいは二木らにより優れた膜透過性が確認されているオクタアルギニン(R8)と siRNA の複合体を形成させた後、(2) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) と cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) (9:2) からなる単層リポソーム(ナノ粒子：NP)内に複合体を封入し、(3)さらに、SUV 表面を PF6 もしくは R8 で修飾を行い、(4)ルシフェラーゼ定量発現細胞におけるルシフェラーゼ活性の抑制を指標に細胞内送達効率の評価を行った<sup>4</sup>。

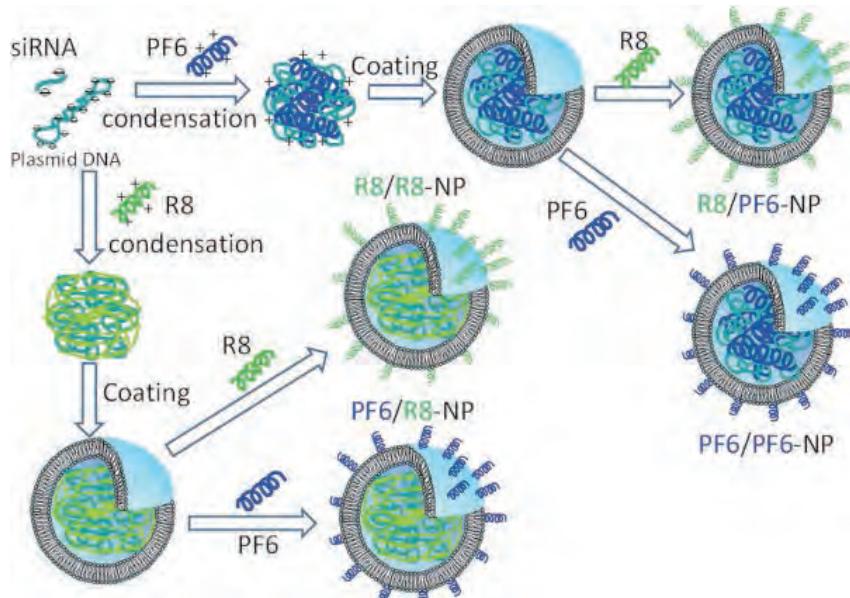


図 1. PF6 修飾ナノ粒子の調製：たとえば R8/PF6-NP は PF6 と siRNA の複合体を包含する単層リポソーム(NP)を R8 で修飾したものと示す。

まず、PF6 と siRNA の複合体形成に関して検討したところ、ペプチドの正電荷/siRNA の負電荷=2~3.5 の付近で直径 100 nm 程度の複合体が形成されることが分かった。さらに、小暮らが以前に開発した方法<sup>2</sup>を用いて、ペプチド-siRNA 複合体を内包する NP を調製し、表面のペプチド修飾を行ったところ、直径 250 nm 程度の修飾 NP が得られることが分かった。ゼータ電位を測定したところ、表面が正に帶電した NP が得られたことが確認された。

次に、血清非含有培地中、細胞と SUV を 3 時間処理後、血清含有培地に置き換え、更に 21 時間インキュベートした後の活性を測定したところ、PF6 と siRNA を包含する SUV (PF6-NP) 表面を PF6 で修飾する組合せ(PF6/PF6-NP)が最も効果的にルシフェラーゼ遺伝子の発現を抑制できることが分かった(図 2)。さらに上記の方法を用いて、ローダミンで蛍光ラベルした siRNA の細胞内への導入を行い、この細胞内分布を確認したところ、PF6/PF6-NP の場合は、細胞全体に siRNA のシグナルが観察されたのに対し、R8/R8-NP の場合は主に核にシグナルが観察され、PF6/PF6-NP が RNA 干渉作用発現の場である細胞質に効果的に分布することがその活性の高さにつながったことが示唆された<sup>4</sup>。溶解性や細胞毒性に対して今後検討する余地はあるものの、以上の結果は、PF6 が新しいタイプのエンドソーム脱出ペプチドとして基本的要件を備えていることを示すものである。

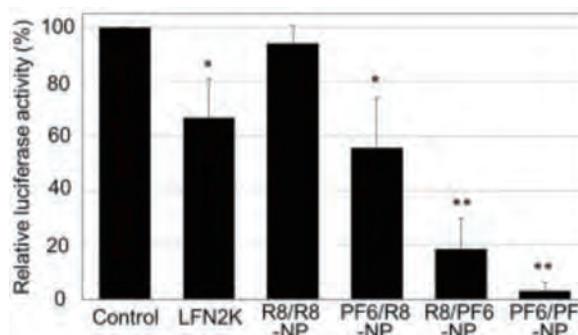


図 2. PF6 修飾 NP の RNA 干渉活性

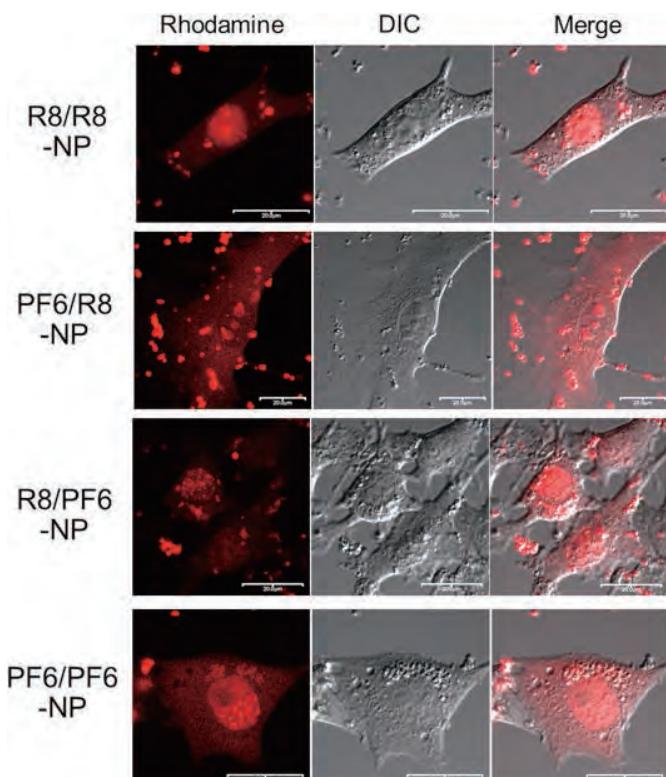


図 3. PF6 修飾 NP による蛍光修飾 RNA の細胞内導入と局在

## 引用文献

- I. Nakase et al., Acc. Chem. Res. 2012, 45, 1132–1139.
- K. Kogure et al., Adv. Drug. Deliv. Rev. 2008, 60, 559–571.
- S. E. Andaloussi, et al., Nucleic Acids Res. 2011, 39, 3972–3987.
- A. Mitsueda et al., Biopolymers. 2013, 100, 698–704.

## A 型高分子絡み合い系の力学および誘電緩和過程に対する束縛解放機構の寄与

浦川理・大阪大学大学院理学研究科

**1. 緒言** 高分子濃厚系の絡み合いの本質は、高分子鎖同士が横切れないために必然的に発生するトポロジー的拘束にある。このトポロジー的拘束を管状の拘束として表現する管モデルでは、管軸に沿った鎖の運動機構（直鎖の場合は reptation 機構）と管自体の運動機構（束縛解放機構; Constraint Release）の競合によって、緩和時間と緩和モード分布が決定される。特に、直鎖単分散系では、鎖の緩和部分が溶媒と等価となって絡み合いを希釈すると考える完全管膨張 (full Dynamic Tube Dilation) の描像が成立し、時刻  $t$  における管の残存割合  $\varphi'(t)$  と規格化粘弾性緩和関数  $\mu(t)$  が

$$\mu(t) = \{\varphi'(t)\}^{1+d}, \quad d \approx 1.3 \text{ (管膨張指数)} \quad (1)$$

という関係をみたすと考えられてきた。実際、主鎖骨格に平行な A 型双極子をもつシス-ポリイソブレン (PI) について、末端間揺らぎを反映する誘電緩和データの解析から  $\varphi'(t)$  を実験的に求め、 $\varphi'(t)$  を  $\mu(t)$  データと比較した研究から、直鎖単分散系では、式 (1) が良く成立することが見出されている<sup>1)</sup>。しかし、式 (1) は  $\varphi'(t)$  と  $\mu(t)$  の関係だけを規定するもので、実際の緩和が完全に膨張した管に沿った reptation によって起こっているのかどうかについては、一切情報を与えない。本研究では、ブレンド中の希薄なプローブ鎖の緩和に着目し、この問題を検討した。

**2. 結果と考察** 分子量  $M_2 = 110$  万の直鎖 PI マトリクス中に分子量  $M_1 = 2.1$  万～17.9 万の直鎖 PI プローブを 10 または 20 vol% ブレンドした系に対して、40°C にて誘電緩和測定と粘弾性測定を行なった。図 1 は、系のデータを解析することで得たブレンド中のプローブの損失剛性率  $G_{1,b}''$  と誘電損失  $\varepsilon_{1,b}''$  を比較した結果を示す<sup>2)</sup>。試料コード番号は  $M_1$  を表す。 $M_1 = 2.1$  万、4.3 万では  $G_{1,b}''$  と  $\varepsilon_{1,b}''$  の角周波数 ( $\omega$ ) 依存性が非常に良く一致している。この一致は、プローブ鎖に対する束縛解放が完全に抑制されている（プローブより非常に長いマトリクスの運動は、プローブの運動

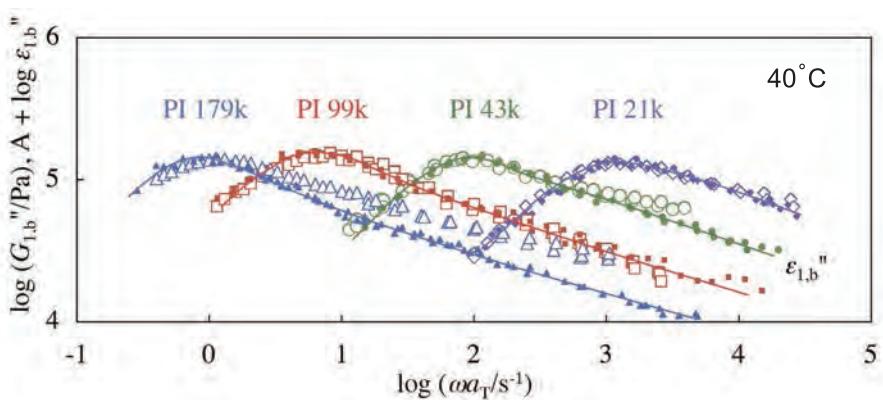


図 1 ブレンド中のプローブの損失剛性率  $G_{1,b}''$  (プロット) と誘電損失  $\varepsilon_{1,b}''$  (実線) の比較。

よりはるかに遅い)ことを示す。 $M_1 = 9.9$  万では、 $G_{1,b}''$  と  $\varepsilon_{1,b}''$  の  $\omega$  依存性に小さな差が現れ、マトリクス運動がプローブの緩和に影響を与え始めている。さらに、 $M_1 = 17.9$  万では、 $G_{1,b}''$  と  $\varepsilon_{1,b}''$  の  $\omega$  依存性に明瞭な差が現れ、マトリクス運動がプローブの緩和に大きく寄与していることがわかる。一般に、マトリクス運動の影響が発現する場合、 $G_{1,b}''$  は  $\varepsilon_{1,b}''$  より速く緩和することが結論されているが<sup>1)</sup>、図1のデータはこの結論を支持する。

図2は、図1のデータから求めたプローブの誘電緩和時間  $\tau_{1,b}^{[e]}$  (パネル a), 粘弾性緩和時間  $\tau_{1,b}^{[G]}$  (パネル b) を単分散系中のプローブ緩和時間  $\tau_{1,m}^{[e]}$ ,  $\tau_{1,m}^{[G]}$  で規格化し、プローブ鎖1本あたりの絡み合い数  $M_1/M_e$  に対して両対数プロットした結果を示す(○)。前述のように、单分散系では式(1)が成立するが、 $t = \tau_{1,m}^{[G]}$ (終端緩和域)における管径  $a(t)$  は、束縛解放/管膨張の効果により、 $t = 0$ での管径  $a(0)$  に比べて約70%大きくなっている( $a(\tau_{1,m}^{[G]}) \approx 1.7 a(0)$ )ことが知られている<sup>2)</sup>。緩和時間は  $a^{-3}$  に比例するので、もし单分散系中で完全に膨張した管に沿った reptation が起こっているのであれば、束縛解放が完全に抑制されたブレンド系中の  $\tau_{1,b}^{[e]}$  は、单分散系中の  $\tau_{1,m}^{[e]}$  に比べて、 $\{a(\tau_{1,m}^{[G]})/a(0)\}^3 \approx 5$  倍だけ長くなるはずである。しかし、図2のデータは  $\tau_{1,b}^{[e]} / \tau_{1,m}^{[e]} < 2$  であることを示す。従って、单分散系中の直鎖は、完全に膨張した管に沿って reptation している訳ではないことが結論される。後述のように、この結論と式(1)が成立するという実験事実は、矛盾しない。

reptation の最遅固有モードが束縛解放の最遅固有モードとのみカップルすると仮定すれば、それぞれのモードの特性時間  $\tau_{\text{rep}}$ ,  $\tau_{\text{CR}}$  を用いて、ブレンド中と单分散系中のプローブの緩和時間比が  $\tau_{1,b} / \tau_{1,m} = 1 + \tau_{\text{rep}} / \tau_{\text{CR}}$  と表される。図2中の点線は  $\tau_{\text{rep}}$ ,  $\tau_{\text{CR}}$  データから計算された緩和時間比を示す。実際の緩和時間比(○)は計算値よりはるかに大きい。すなわち、reptation の最遅固有モードは、束縛解放の高次モードも含めた全固有モードとカップルしていることが結論される。この結論から、单分散系中の直鎖は部分的に膨張した管に沿って reptation しているが、この部分的膨張管は管径方向に完全膨張管の中で揺らいでいるという分子描像が推論される。完全膨張管中の揺らぎは式(1)が成立することを保証する。また、緩和時間比は、部分的膨張管の管径  $a_p$  を用いて  $\tau_{1,b}^{[e]} / \tau_{1,m}^{[e]} = \tau_{1,b}^{[e]} / 2 \tau_{1,m}^{[e]} = \{a_p/a(0)\}^3$  と表される。 $\tau_{\text{CR}}$  データから  $a_p$  を推定し、この比を計算した結果を図2に実線で示す。データは計算値と良く一致し、上記の分子描像の妥当性が示唆される。

文献 1) Watanabe, H. *Polym. J.* **2009**, *41*, 929. 2) Y. Matsumiya, K. Kumazawa, M. Nagao, O. Urakawa, and H. Watanabe. *Macromolecules* **2013**, *46*, 6067.

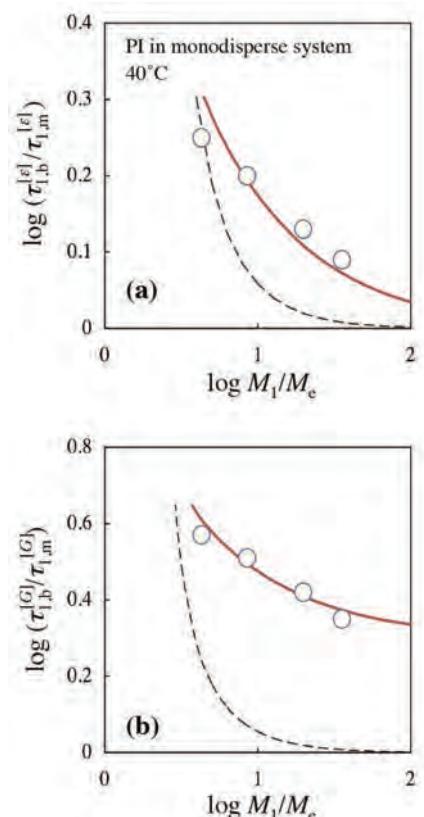


図2 ブレンド中のプローブの誘電緩和時間と粘弾性緩和時間。

## F<sub>1</sub> モータータンパク質の機能発現における水の役割

池口 満徳・横浜市立大学大学院生命医科学研究科

F<sub>1</sub> モータータンパク質は、ATP（アデノシン 3 リン酸）の合成と加水分解を司る重要な生体物質である。その機能を発揮する最小単位であるβサブユニットさえ数百残基からなる巨大系であり、これまでに、大規模高並列分子動力学シミュレーションによって、構造ゆらぎの相關解析などが行われてきたが、水をも含めた自由エネルギー論の定量的展開は困難な状況にある。先行研究では、モデル計算や、部分的に原子レベルで取り扱ったエネルギー論の議論がされているが、溶媒中におけるタンパク質の揺らぎまで全原子で取り扱った例はない。本共同研究では、水和効果の定量的解析を行うために、分子動力学シミュレーションをエネルギー表示溶液理論と組み合わせ、F<sub>1</sub> タンパク質における ATP 反応と構造変化のカップリングに及ぼす水和の効果を、自由エネルギーのレベルで解析する。

F<sub>1</sub> タンパク質 (F<sub>1</sub>) は、いくつかのサブユニットから形成される。ATP 加水分解の触媒活性を担うβサブユニット (466 残基、7121 原子) のみに注目し、自由エネルギー解析を行った。ATP 加水分解過程において、βサブユニットは、3 つの化学プロセス (ATP 結合、加水分解、生成物解離) に伴う構造変化を起こす事が知られており、本研究では、ATP 結合過程に注目した。それらの構造変化は F<sub>1</sub> 内、つまりサブユニットの複合体内で起こる過程であるが、βサブユニット単体での解析は複合体の影響を理解する際に必要不可欠な、第一ステップとなる。

ATP 結合前 ( $\beta E$ ) と ATP が 1 分子結合した ( $\beta TP$ -ATP) 構造は、F<sub>1</sub> の結晶構造 (PDB code: 2JDI) を用いた平衡ゆらぎ中の分子動力学シミュレーションより、30 ns のスナップショットから用意した。それぞれのβサブユニットを純水中 (TIP3P) へ、水の密度が 1 g/cm<sup>3</sup> となるように入れた。βサブユニットの ATP 結合過程には、βサブユニットの構造変化 (open から closed) と、 $\beta TP$  への ATP 結合の 2 つの過程が含まれる。その 2 つの過程を分離し、それぞれについて、水和効果を解析する為に、ATP 単体及び、 $\beta TP$  単体の系を用意した。本研究で扱う ATP にはマグネシウムイオンが 1 原子結合している。 $\beta E + ATP$  と  $\beta TP + ATP$  系から βサブユニットの構造変化、 $\beta TP + ATP$  と  $\beta TP$ -ATP 系から ATP 結合に伴うエネルギー収支を解析した。

$\beta E$ 、 $\beta TP$ -ATP、及び ATP 系を純水中でゆらがせ、平衡ゆらぎ中における代表的な構造をサンプリングした。本計算で行ったすべての分子動力学シミュレーションは、研究代表者の開発したパッケージプログラム MARBLE で行った。ユニットセルのサイズは 240×150×150 Å<sup>3</sup>、水の個数は 179820 である。全系のサイズは、約 60 万原子系となる。分子力場は、CHARMM22/CMAP (βサブユニットおよび水)、CHARMM27 (ATP) を用いた。アンサンブルは NVT、温度は 300 K、Lennard-Jones 相互作用は switching range

が 10–12 Å の switching function で計算し、静電相互作用は particle mech Ewald 法で計算した。5 ns の平衡化後、50 ns のシミュレーションから 1 ns ごとにスナップショットを抜き出し、それぞれの系において 50 個の構造を用意した。50 ns シミュレーションにおける、結晶構造からの平均二乗偏差は、2-3 Å であった。 $\beta$ TP 単体の構造は、50 個の $\beta$ TP-ATP 構造から ATP 部分のみを取り除いて用意した。ATP を取り除いた後、 $\beta$ TP 構造を固定した状態で、水のみの平衡化を 1 ns 行った。

水和効果のエネルギー論を展開するために、構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーから、タンパク質の分子内とタンパク質–水間の分子間エネルギーの収支を解析した。全原子モデルを用いた場合でも、構造エネルギーは容易に計算できるが、溶媒和自由エネルギーの計算は、従来法では、事実上不可能である。そこで、化学研究所内対応共同研究者が開発したエネルギー表示溶液理論を用いた自由エネルギー計算を行った。

約 60 万原子からなる $\beta$ サブユニットの水溶液においても、分子動力学シミュレーションをエネルギー表示溶液理論と組み合わせ手法によって、全原子モデルを用いた溶媒和自由エネルギーの計算が可能であることが分った。平衡揺らぎ中における $\beta$ E,  $\beta$ TP, 及び $\beta$ TP-ATP 系において、構造エネルギーと溶媒和自由エネルギー間に補償関係が成立していた。各 $\beta$ サブユニットにおける、構造エネルギーの変化幅は約 400 kcal/mol に及び、その真空中では起こりえない大きな揺らぎは、溶媒との補償関係によって引き起こされていた。また、構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーの補償関係は、本研究の計算手法の妥当性を示すものである。

$\beta$ E + ATP と $\beta$ TP + ATP 系のエネルギー収支から $\beta$ サブユニットの構造変化に伴う水和の役割を明らかにした。溶媒和自由エネルギーの変化が負となる事から、水は $\beta$ サブユニットの open 構造から closed 構造への変化を促進する駆動因子の役割があることがわかった。一方で、構造エネルギーは不安定になる事がわかった。構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーの和値の変化は、正であり、ATP が結合していない状態で、 $\beta$ E から $\beta$ TP への変化は自発的に起こらないことを示す。 $\beta$ サブユニット単体のMDシミュレーションにおける構造ゆらぎの解析では、 $\beta$ E 構造が $\beta$ TP 構造より安定になると示唆されており、本結果と矛盾しない。すなわち、ATP の誘起無しでも、ATP を「迎え入れる」構造を取ることは無いということを明らかにした。

次に、 $\beta$ TP + ATP と $\beta$ TP-ATP 系のエネルギー収支から ATP 結合に伴う水和の役割を解析した。溶媒和自由エネルギーの変化は約 220 kcal/mol となり、水は ATP 結合の阻害因子として働く事がわかった。構造エネルギーの変化は、約 230 kcal/mol の安定化を示し、その安定化の大部分は $\beta$ サブユニットと ATP の間の結合エネルギーが占めていた。その、結合エネルギーから生じる大きな安定化は、水和の不安定化でゆるやかなものとなり、 $\beta$ TP + ATP から $\beta$ TP-ATP 系への変化に伴う、構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーの和値の変化は 20 kcal/mol 程度の安定化となる。

## フッ素化リン脂質および脂肪酸の単分子膜の構造解析

園山正史・群馬大院理工

### 【目的】

バイオ材料は、その表面・界面が生体や生体分子と接触して相互作用することから、材料のバルク的な性質よりも、表面・界面を理解することの方が重要である。界面を、界面活性剤の合成によって制御することは、材料の安定性に加えて生体への安全性を高める意味でも重要である。両親媒性化合物は界面活性剤として基本的な化合物で、とりわけフッ素化炭素を疎水部とする両親媒性化合物は界面での際立った物性により注目され、super surfactant と呼ばれる。化合物としての高い安定性に加え、耐熱性・耐薬品性という点では炭化水素よりもはるかに優れており、また、フッ素の導入により、生理活性物質の活性度合いを制御できることをも明らかとなり、フッ素化脂質およびリン脂質の界面の構造と物性を明らかにすることが必要な段階にある。そこで私たちは、パーカルオロアルキル鎖長の異なるミリスチン酸アナログ分子群およびリン脂質 Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) のアナログ分子群（図 1）を系統的に新たに合成し、パーカルオロアルキル基がフッ素化脂肪酸およびリン脂質の界面の構造と物性に及ぼす影響を調べた。

### 【実験方法】

ミリスチン酸アナログ分子群  $\text{FnH}(13-n)$  ( $\text{F}(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_{13-n}\text{COOH}$ ,  $n=2, 4, 6, 8$ ) の合成は、パーカルオロアルキルアイオダイドの  $\omega$ -不飽和アルカノールへのラジカル付加反応に始まる合成法を用いて行った。DMPC アナログ分子群 diFnH(14-n)-PC ( $n=2, 4, 6, 8$ ) は、前述の方法で合成したフッ素化ミリスチン酸を、Glycerol phosphatidylcholine に DCC-DMAP エステル化させることによって合成した。DMPC アナログ分子からなる脂質二分子膜の示差走査熱量測定は、これらのリン脂質をミリ Q 水に懸濁した試料（濃度 100 mM）に対して、SEIKO DSC6100 を用いて行った。昇温速度は 1 K/min とした。フッ素化ミリスチン酸単分子膜の表面圧-面積( $\pi$ -A) 曲線は、KSV Instruments 社製 KSV minitrough を用いて測定した。さらに、単分子膜を金板上 LB 法で写し取り、Nicolet Magna760 を用いて赤外反射吸収スペクトルを測定し、単分子膜の配向を調べた。



図. DMPC (左) および DMPC アナログ分子 diF4H10-PC (右) の化学構造

## 【実験結果・考察】

フッ素化ミリスチン酸、フッ素化 DMPC の全合成における収率はそれぞれ約 50%, 25-40%であった。<sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F NMR および MALDI-TOF MS スペクトルから、得られた全ての化合物の純度は十分に高いことが示された。

フッ素化 DMPC 懸濁液の示差走査熱量測定を行った結果, diF2H12-PC では吸熱ピークが 6.9 °C に観測され, 24 °C にゲル-液晶相転移を示す DMPC に比べて、顕著に低下が見られた diF4H10-PC の 5.4 °C とほぼ同じであった。ところが、Rf 鎖長が F4 より長い diF6H8-PC においては、吸熱ピークが 18.1 °C に大きく上昇し、さらに Rf 鎖長を F8 に伸ばすと 65.0 °C にまで劇的に上昇した。これらのことから、Rf 鎖長が F6 以下では、DMPC に比較して、脂質二分子膜のパッキングの乱れが大きくなるが、F8 になるとフルオロアルキル鎖間の相互作用が強くなるためにより密な膜構造を形成すると考えられる。

フッ素化ミリスチン酸 F4H9, F6H7, F8H5 をそれぞれクロロホルム溶液としたのち、純水上に単分子膜として展開し、表面圧-面積(π-A)曲線を測定した。F8H5 のみが明確で長い固体膜領域を示し、その他は液体膨張膜のような変化を示し、F8H5 が安定な単分子膜を作るかのように見えた。しかし、圧縮-拡張測定を繰り返した結果、F8H5 は膜面積が減少し続けた。一方、F4H9 の繰り返し圧縮-拡張測定は、きわめて高い再現性を示し、とくに膜拡張時も圧縮時と同じトレースをなぞった。膜分子展開直後から表面圧の上昇がみられたことも考慮して、F4H5 の Rf 末端は凝集力が弱く、かつ親水基として働き、いわば両末端が親水基の両親媒性化合物となって水面上に横たわったまま、分子が屈伸して圧力緩和する可能性を示唆した。

単分子膜を金板上 LB 法で写し取り、赤外 RA 法で解析した結果、F4H9 は膜面上に横たわって配向することが実証できた。逆に、F8H5 は強い Rf 基間相互作用を反映して膜面に対して立ち上がった配向を示した。これらのことから、Rf 基は F8 程度以上の長さのとき、凝集がきっかけで疎水性が顕著となることが示唆された。

## 【成果報告】

- 森田康平、高橋浩、網井秀樹、園山正史、高木俊之、金森敏幸、長谷川健、パーフルオロアルキル鎖長の異なる DMPC アナログ分子の合成と膜物性の解析、日本化学会第 94 回年会、名古屋、2014 年 3 月 29 日
- 長谷川健、下赤卓史、森田康平、園山正史、高木俊之、金森敏幸、パーフルオロアルキル鎖が示す親水性と双極子相互作用の界面化学および赤外分光法による検討日本化学会第 94 回年会、名古屋、2014 年 3 月 29 日

# 立体制御したアクリルアミド系高分子薄膜の水分子およびタンパク質吸着の解析

勝本之晶・広島大学大学院理学研究科

## 【はじめに】

合成高分子を用いた生体適合性材料にとって、合成高分子とタンパク質の相互作用を分子レベルで調べることは重要な知見を与える。これまで、様々な組み合わせで合成高分子膜に対するタンパク質の吸着量が調べられ、合成高分子の親水性とタンパク質の膜吸着量には一定の相関があることがわかっている[1]。本研究では、アクリルアミド系高分子の立体規則性を系統的に制御し、合成高分子の一次構造の変化が高分子への水の吸着量や吸着様式にどのような影響を与えるかを調べた[2]。また一次構造が高分子の固体表面への吸着に与える影響についても検討した[3]。

**【方法】** 使用した試料のサンプル名と立体規則性を Table 1 に示す。気相中における薄膜への水分子吸着の測定は以下のように行った。立体規則性の異なる poly(*N*-ethylacrylamide) (PNEAm), poly(*N,N*-diethylacrylamide) (PNdEAm)をそれぞれアセトン、水に溶かした。サンプル溶液を CaF<sub>2</sub> 基板および水晶振動子 (9 MHz) に滴下し、乾燥させることで薄膜を成形した。真空チャンバー内に CaF<sub>2</sub> 基板と振動子を設置し、溶媒の蒸気圧を徐々に上げながら、溶媒分子が薄膜に吸着する様子を赤外分光法および QCM 測定を用いて観察した。

**【結果と考察】** Fig. 1 に、PNEA(E-m47, E-m78) 薄膜の真空状態 (Dry) および各蒸気圧下における Amide I (C=O 伸縮) バンドを示す。Dry の Amide I 伸縮バンドは複数の成分で構成されており、これは水素結合状態の異なる Amide I 基が複数種存在していることを示している。Dry における E-m47 と E-m78 のスペクトルには大きな違いがないが、蒸気圧の上昇とともに E-m78 の方が E-m47 よりも低波数側のバンドの相対強度が大きくなった。このことから、立体規則性がアミド基と水分子の水素結合様式に影響を及ぼすことが示唆された。

Table 1. Characterization of polymer samples

Sample	m %	M <sub>n</sub> / g mol <sup>-1</sup>	M <sub>w</sub> / M <sub>n</sub>	T <sub>c</sub> / °C
PNEAm				
E-m47	47	2.4 × 10 <sup>4</sup>	2.6	78
E-m78	78	1.4 × 10 <sup>4</sup>	1.6	70
PNdEAm				
D-m55	55	3.1 × 10 <sup>4</sup>	3.3	32
D-m90	90	3.6 × 10 <sup>4</sup>	2.4	40

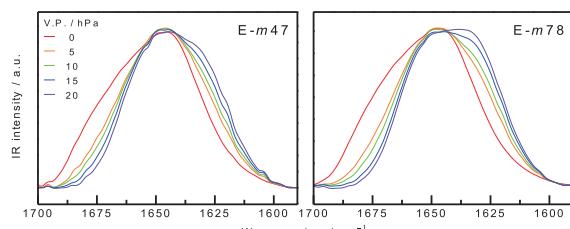


Fig. 1. Amide I envelope of E-m47 and E-m78 spin-coated films at each water-vapor pressure.

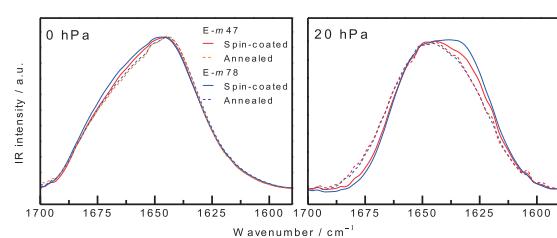


Fig. 2. C=O stretch vibration band of E-m47 and E-m78 after annealing the films.

Fig. 2 は、アニーリング後に測定した PNEA の Amide I バンドの水蒸気圧依存性を示している。この図から明らかなようにアニーリングを行うと、水吸着による Amide I バンドの変化が極めて小さくなつた。

Fig. 3 には PNEA 薄膜に対する D<sub>2</sub>O 収着量の蒸気圧依存性を示している。

どの蒸気圧においても、水吸着量は E-m78 の方が E-m47 よりも多かった。これは、立体規則性が薄膜の水分子の吸着量にも影響を及ぼしていることを示している。また、ガラス転移点以上でアニーリングを行つた後に D<sub>2</sub>O 収着量を測定すると、アニーリング前に比べて E-m78 と E-m47 のどちらも D<sub>2</sub>O 収着量が減少し、さらに立体規則性による差が見られなくなつた。これは、アニーリングによって側鎖間の水素結合がより促進されたためだと考えられる。特に meso 配置では、分子内水素結合が強いことが過去の研究からわかつてゐるため、E-m78 の方がアニーリングの効果が大きかったと推測される。赤外

スペクトル測定の結果や、アニーリングによる収着量の減少から、PNEA 薄膜の水分子吸着サイトは、分子内水素結合をしていないアミド基であると考えられる。

Fig. 4 には、PNdEA 薄膜に対する D<sub>2</sub>O 収着量の蒸気圧依存性を示している。PNdEA ではメソ比の高いもののほうが水吸着量が多い点を除けば、PNEA と同様の結果が得られた。

### 【参考文献】

[1] J. Kim, W. Qian, Z. Y. Al-Saigh, *Surface Science* **605**, 419 (2011).

### 【発表論文】

- [2] A. Tsuchiiizu, T. Hasegawa, and Y. Katsumoto, “Water sorption on a thin film of stereocontrolled poly(*N*-ethylacrylamide) and poly(*N,N*-diethylacrylamide)” *MATEC Web of Conferences* 4, 03001(2013).
- [3] T. Shimoaka, K. Rikiyama, Y. Katsumoto, and T. Hasegawa, “Infrared spectroscopic study of stereo-controlled poly(*N*-isopropylacrylamide) with an extended chain conformation induced by adsorption on a gold surface” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 9411-9418(2013)

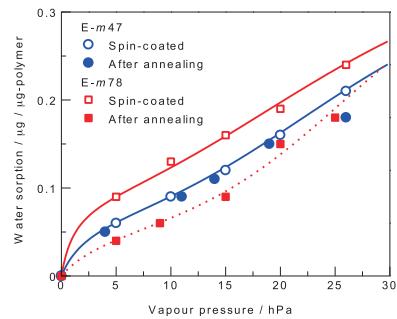


Fig. 3. Water sorption of PNEAm films. The line was drawn as guides for the eyes.

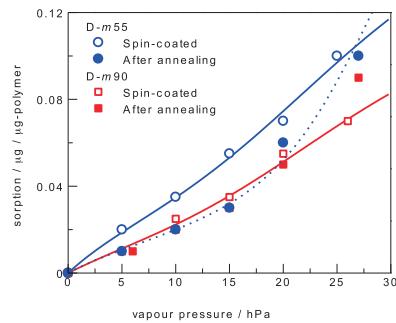


Fig. 4. Water sorption of PNdEAm films. The line was drawn as guides for the eyes.

## 分子設計して調製したアントシアニン誘導体を用いる 高効率でカラフルな色素増感太陽電池の創製

吉田久美・名古屋大学大学院情報科学研究科

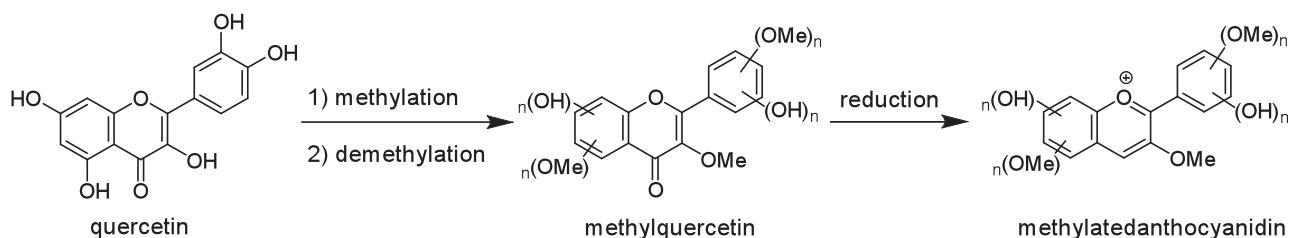
### 目的

色素増感太陽電池（DSC）はシリコン系太陽電池と比較すると、低コストで生産でき、低照度での発電が可能であることに優位性がある。さらにはカラフルで、軽量かつ柔軟性に富んだ形状のセルが可能である。変換効率および耐久性において、シリコン系太陽電池より劣る部分があるが、補完的な役割を持ち、持続可能エネルギーの一端として期待される。現在、10%以上の高い変換効率を記録する色素は、ルテニウム錯体色素がほとんどであるが、これらの色素は一般的にモル吸光係数が小さく色も黄色～褐色系である。意匠性の観点からは、より多彩な色素が求められている。申請者らが長年研究対象としてきた植物色素アントシアニンは、吸収波長が広く赤から紫～青色までの多彩な発色が可能である。しかも、モル吸光係数が大きい上、レアメタルを含まない。従って、DSCへの応用を考えた場合、非常に魅力的な色素と言える。

しかし、現状では天然アントシアニンを用いたDSCの変換効率の報告例は1%以下で、しかもそのほとんどが、単純な構造の色素や天然から抽出された不純物を含む色素である。従って、アントシアニンの構造とDSCの性能に関する知見は少ない。そこで本研究では、申請者らが保有する多種の天然アントシアニン類、および、分子設計して合成したアントシアニジン類を用いてDSCを作成し、その性能評価を行った。

### 方法および結果

#### 1) メチル化アントシアニジンの化学合成



スキーム 1: メチル化アントシアニジンの合成経路

市販のケルセチンを完全メチル化して、ペンタメチル体を得た。これを、選択的脱メチル化反応により脱メチル化し、種々のメチル化ケルセチン類（テトラ、トリ、ジ、モノメチル体）を合成した。さらに、これらのメチル化ケルセチン類を、我々が開拓した金属還元-空気酸化法、または、水素化金属による還元法で対応するメチル化アントシア

ニジンへと変換した。いずれも、収率よく、数百 mg～数 g のスケールでの合成を達成した。

## 2) DSC の作成と性能評価

導電性のガラス基板 (15 mm×20 mm×1.8 mmt) に粒径の異なる 4 種類の酸化チタンペーストを 4 mm 角、膜厚約 10 μm となるよう塗布し、500 °Cで焼成した後、四塩化チタン処理を行った。この基板を 0.5 mM の色素に浸漬して色素を吸着させた後、太陽電池セルを組み立て、ヨウ素電解液を注入した。分光計器社製 OTENTO-SUNIII ソーラシミュレータを用いて AM 1.5 G (100 mW/cm<sup>2</sup>) を照射し、電流・電圧測定を行った。さらに、分光計器社 SMO-250 型 ハイパーモノライトシステムを用いて量子効率測定を行った。

天然色素である、各種アントシアニジン 3-グルコシドを用いてセルを作成したところ、B 環上の置換様式によりセルの色が異なることがわかった。デルフィニジンおよびペチュニジン 3-グルコシドは青紫～青色となる一方、マルビジンおよびシアニジン 3-グルコシドは、紫色を呈した。変換効率は 0.3～0.6%程度といずれも低かった。

合成したメチル化ケルセチン類は、黄色から橙色を呈し、変換効率は 0.1～0.8%であった。メチル化シアニジン類は、赤色から紫色を呈し、変換効率はケルセチン類より低い 0.1～0.3%程度であった。いずれも *t*-ブチルピリジンを入れない場合に変換効率が 2 ないし 8 倍程度高くなることが明らかになった。量子効率測定からこれらの化合物は長波長の光を十分に利用できていないことがわかった。

## 考察

合成した化合物は、平面性が高いため、分子会合により効率が低下していることが推測された。さらに、これらの分子の HOMO-LUMO 準位を光電子分光法と計算から見積もった結果、いずれも LUMO が酸化チタンの伝導体準位よりも低く、また HOMO 準位も低いことが明らかになった。今後、これらを考慮した分子設計により、効率向上をはかりたい。

## 成果報告

- 1) Kimura, Y., Oyama, K., Kondo, T., Uchida, S., Wakamiya, A., Yoshida, K.: Synthesis of 3-*O*-Methylflavones and Anthocyanidins, and their Application for Dye-sensitized Solar Cells. Institute for Chemical Research International Symposium 2014 (Uji, Japan) March 10-12, 2014.
- 2) 木村友紀、尾山公一、近藤忠雄、内田聰、若宮淳志、吉田久美、3-*O*-メチル化フラボン類とアントシアニジン類の合成および色素増感太陽電池への応用、日本化学会第 94 回春季年会（名古屋）3.27-30, 2014.

## 日本海における生体活性微量元素の鉛直断面観測

中口 讓・近畿大学理工学部

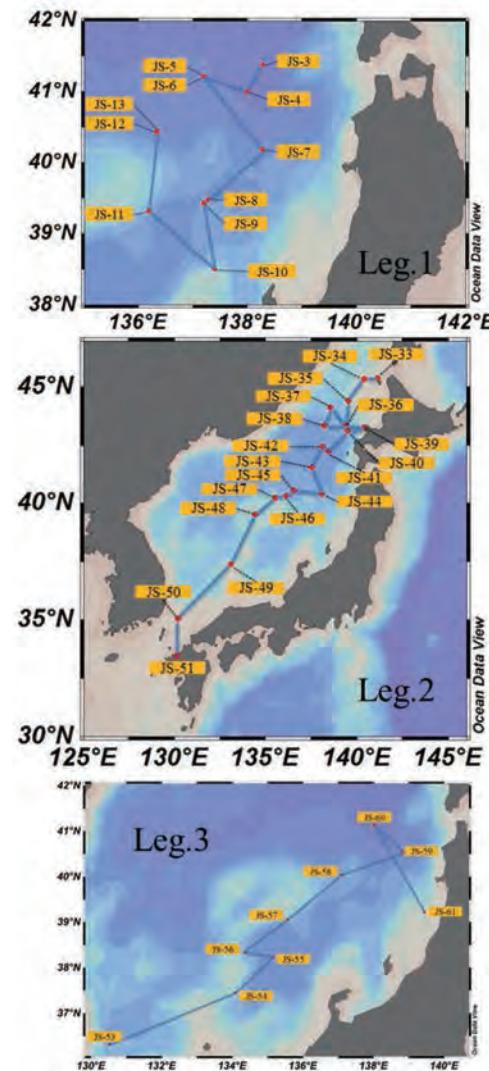
＜目的＞申請研究においては日本海における生体活性微量金属(Bioactive Trace Metal:BATM)の分析結果から溶存態生体活性微量金属の鉛直断面図を作成することができた。本年度は全可溶態の分析ならびに、日本海洋上で採取した大気エアロゾル中のBATMの分析を行い、粒子サイズ( $<2.5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $>2.5\text{ }\mu\text{m}$ )の濃度分布を調査し、大気を経由した日本海へのBATMのフラックスを見積もることとした。

＜実験方法＞大気エアロゾル試料は海洋研究開発機構白鳳丸の KH-10-2 次研究航海（2010 年 6 月 12 日～7 月 22 日）にて白鳳丸ブリッジ上に設置したエアーサンプラー（紀本電子工業製 AS-9）に PTFE フィルター（ADVANTEC 社製 PF040）をセットし、12 時間毎にフィルターを交換し連続捕集を行った。船前方からの大気を捕集するため、ウインドセレクターを用いて後方からの流入をカットした。捕集後のフィルターはシャーレに密封し冷蔵保存して研究室に持ち帰った。

フィルター試料はセラミック製ハサミを用いて粗大粒子画分 (Coarse:>2.5 μm) と微小粒子画分 (Fine:<2.5 μm) にカットした。イオン成分の分析はカットしたフィルターをビーカーに移し、純水を加え、超音波照射を 15 分間行い、0.45 μm の DISMIC フィルター (ADVANTEC 社製) にてろ過を行い、イオンクロマトグラフィー (DIONEX 社製 ICS-1500) にて行った。BATM (Al, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb) の分析は、カットしたフィルターをテフロン製分解容器に移し、超高純度硝酸、超高純度過塩素酸、フッ化水素酸を加え電子レンジ内で加熱分解し、放冷後フッ化水素酸を揮発させた後、定溶し ICPMS (島津製作所製 ICPM8500) にて行った。試料採取点を Fig. 1, 2 に示した。

## ＜結果および考察＞

## 洋上大気中の BATM 粒径別の濃度分布



**Fig.1 Track chart of KH-10-02 cruise**

大気エアロゾルの粒径サイズは  $2.5 \mu\text{m}$  を境として、粒子径が  $2.5 \mu\text{m}$  より大きな粒子は海塩、土壤など自然起源で、しかも発生源から直接排出される 1 次粒子が多く存在し、それに対し  $2.5 \mu\text{m}$  より小さな粒子は発生源からはガス状物質として供給され、大気中で化学反応により粒子となった 2 次粒子が多いと言われている。またその起源は人為起源が多いと言われている。Fe の分析結果を Fig. 2 に示したが、洋上エアロゾル中で Fe は大粒子よりも小粒子画分に多く存在することがわかった。洋上エアロゾル中の BATM 濃度および非海塩性硫酸イオン、硝酸イオンの平均値を Table 1 に示したが、Al, Cr, Mn, Fe, Zn, Cd, Pb 非海塩性硫酸イオン、硝酸イオンは小粒子画分に多く存在することがわかった。

#### 日本海への生体活性微量元素の乾性沈着量

大気を経由した BATM の日本海への乾性沈着量を見積もった。大気を経由した乾性沈着 Flux は次式のように定義されている。

$F = VdCa$  ( $Vd$ : 乾性沈着速度、 $Ca$ : 大気中濃度)  
 $Vd$  は微小粒子 ( $< 2.5 \mu\text{m}$ ) では  $0.1 \text{ cm s}^{-1}$  (Duce et al. 1991) 粗大粒子では ( $> 2.5 \mu\text{m}$ ) では  $2 \text{ cm s}^{-1}$  (Yeatman, 2001) と見積もられている。今回の観測結果をもとに日本海への BATM の乾性沈着量を見積もった。結果を Table 2 に示した。

#### ＜成果報告＞

Kawaguchi, S. et al (2013) Post-drilling changes in fluid discharge pattern, mineral deposition, and fluid chemistry in the Iheya North hydrothermal field, Okinawa Trough, Geochemistry Geophysics Geosystems, 14, 4774–4790

武田光市、木村圭、坂本敦史、西内明、竹内誠、中口譲(2013)日本周辺洋上大気中の化学成分分析 2、日本分析化学会第 62 年会、講演要旨集 Y1130

中口譲、藤原司、前田孝平、武田光市、佐野到 (2013) 東大阪市で捕集された黄砂エアロゾルの化学成分分析、日本分析化学会第 62 年会、講演要旨集 P3108

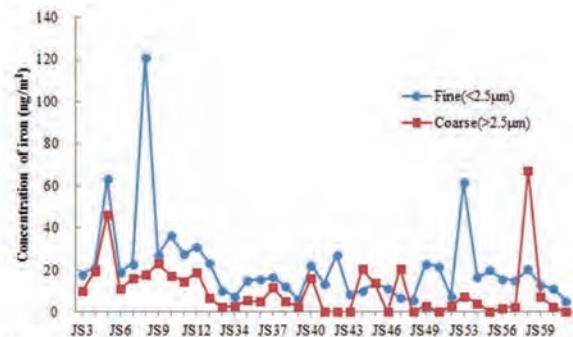


Fig.2 Horizontal distribution of iron in the atmospheric aerosols over the Japan Sea

Table 1 Average concentrations of elements and major anion over the Sea of Japan(JS3-JS61)

	Concentration (unit: ng/m³)(n=39)		
	Fine(<2.5μm)	Coarse(>2.5μm)	Total
Al	77.5	36.4	114
Cr	23.2	0.00	23.2
Mn	1.83	0.79	2.63
Fe	21.6	9.82	31.4
Co	0.00	0.00	0.00
Ni	0.41	1.15	1.56
Cu	0.03	6.52	6.54
Zn	6.91	1.18	8.09
Cd	0.03	0.00	0.03
Pb	0.12	0.09	0.21
Nss-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	56.1	29.5	85.5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	39.5	19.5	59.0

Table 2 Dry deposition flux of trace metal calculated for fine and coarse fractions of aerosols over The Japan Sea(JS3-JS61)

	Flux (mg m <sup>-2</sup> yr <sup>-1</sup> )(n=39)		
	Fine(<2.5μm)	Coarse(>2.5μm)	Total
Al	2.45	22.9	25.4
Cr	0.73	0.00	0.73
Mn	0.06	0.50	0.56
Fe	0.68	6.20	6.88
Co	0.00	0.00	0.00
Ni	0.01	0.72	0.74
Cu	0.00	4.11	4.11
Zn	0.22	0.74	0.96
Cd	0.00	0.00	0.00
Pb	0.00	0.06	0.06

## 新規多座配位子を用いた液液抽出系における 金属イオンの抽出挙動の調査

向井 浩・京都教育大学 理学科

### 目的

$\beta$ -ジケトンの一種であるアセチルアセトン（AA）は、二座配位子として疎水性のキレート錯体を生成するため、金属イオンの液液抽出におけるキレート試薬として用いられている。アセチルアセトン誘導体の内、 $\beta$  位にフェニル基を有するベンゾイルアセトン（BA）やジベンゾイルメタン（DBM）は、置換基の疎水性効果により抽出能を向上させることが知られている。一方、 $\alpha$  位にフェニル基を有する誘導体については、抽出挙動への置換基効果が期待されるにも関わらず、殆ど調べられていなかつた。本研究では、新規多座配位子として、 $\alpha$  位にフェニル基を有するフェニルアセチルアセトン（PhAA）とフェニルベンゾイルアセトン（PhBA）に着目し、これらの配位子を用いて 2 価金属イオンの液液抽出挙動を調べた。

本研究のこれまでの結果から、PhAA と PhBA は、 $\alpha$  位のフェニル基の立体効果により配位原子間距離が抑制される特徴を有すること、銅（II）イオン  $Cu^{2+}$  に対する分離性能を向上させる機能を有することが見出された。本年度は、これらの配位子による分離性能向上の要因を、各種の平衡定数に基づいて定量的に調べることを目的とした。PhAA と PhBA を AA、BA、及び、DBM と比較することで、 $\alpha$  位の置換基が、抽出挙動、特に分離性能に及ぼす影響を、配位原子間距離とも関連づけて考察した。

### 実験方法

液液抽出 金属イオン ( $M^{2+}$ )  $2.0 \times 10^{-5}$  M、pH 緩衝剤 ( $CH_3COONa$ 、MES、MOPS、TAPS、または、CAPS) 0.01 M、 $NaClO_4$  0.1 M となるように調製した水溶液を、AA 誘導体を  $1.0 \times 10^{-2}$  M または  $1.0 \times 10^{-1}$  M 含むクロロホルム溶液と、等体積 (8 mL) で、25°C、1 時間振とうし、 $M^{2+}$  を正抽出した。振とう後の有機相 6 mL を、等体積の 0.1 M-HCl と 30 分間振とうし、逆抽出した。抽出平衡（正抽出）での水相の pH を測定した後、原子吸光光度法により、水相と逆抽出塩酸相の金属濃度をそれぞれ求め、その比から分配比 D を算出した。

分子軌道法計算 Gaussian 社製量子化学計算ソフトウェア Gaussian 09W を用いて、B3LYP/6-31G (d, p) を基底関数とした密度汎関数法により、配位子の安定構造を求めた。二座配位子の配位原子間距離は、酸解離したエノール形の  $\beta$ -ジケトン骨格を平面上に固定して求めた。

## 実験結果

一塩基酸型配位子 (HL) である AA、PhAA、及び、PhBA の水—クロロホルム間の分配挙動を調べ、酸解離指数  $pK_a$  として、8.86 (AA)、8.50 (PhAA)、8.72 (PhBA) を、分配定数  $\log P_{HL}$  として、1.41 (AA)、4.09 (PhAA)、4.64 (PhBA) を得た。

AA、PhAA、及び、PhBA をキレート試薬 (二座配位子) として用いて、 $\text{Cu}^{2+}$  の抽出挙動を調べ、AA 誘導体 (HL) が抽出錯体  $\text{ML}_2$  を生成することに基づいて、抽出定数を実験結果から算出した。抽出定数  $\log K_{ex}$  として、-3.29 (AA)、-5.15 (PhAA)、-6.75 (PhBA) を得た。配位子の酸解離定数と分配定数、及び、抽出定数から、 $\text{Cu}^{2+}$  の錯体  $\text{ML}_2$  の錯生成定数  $\beta_2$  と分配定数  $P_{ML2}$  の積である二相間安定度定数  $\log (P_{ML2} \beta_2)$  を算出し、17.25 (AA)、20.03 (PhAA)、19.97 (PhBA) を得た。

配位原子間距離  $d(\text{O}-\text{O}^-)$  を分子軌道法計算により求め、310 pm (AA)、304 pm (BA)、298 pm (DBM) に対し、 $\alpha$  位置換では、285 pm (PhAA) と 275 pm (PhBA) を得た。

## 考察

$\alpha$  位と  $\beta$  位のフェニル基の置換基効果を比較した。それぞれの平衡定数を対応する AA の平衡定数で除して、置換基による変化を AA に対する比率で表した。その結果を Fig. 1 に示す。配位子の  $K_a$  と  $P_{HL}$  では、 $\alpha$  位 (PhAA、PhBA) と  $\beta$  位 (BA、DBM) で大差はない。しかし、 $\text{Cu}^{2+}$  の  $K_{ex}$  と  $P_{ML2} \beta_2$ において、 $\beta$  位置換に比べ、 $\alpha$  位置換で大きな減少が見られた。このことから、 $P_{ML2} \beta_2$  の減少に起因して  $K_{ex}$  が減少したと考えられる。疎水的なフェニル基の導入により錯体の分配定数  $P_{ML2}$  の増大が期待されるにも関わらず、逆に  $P_{ML2} \beta_2$  が減少したことから、錯生成定数  $\beta_2$  の減少がその理由と考えられる。 $d(\text{O}-\text{O}^-)$  は、PhAA が AA の 91.9%、BA が 88.7% に減少しており、二座配位子のバイトサイズの減少が、錯体の安定度を低下させたと考えられる。 $\text{Cu}^{2+}$  よりも大きなイオン半径を持つ他の金属イオンに対しては、錯体の安定度はより大きく低下すると予想される。これにより、 $\text{Cu}^{2+}$  の分離性能が向上したと考えられる。

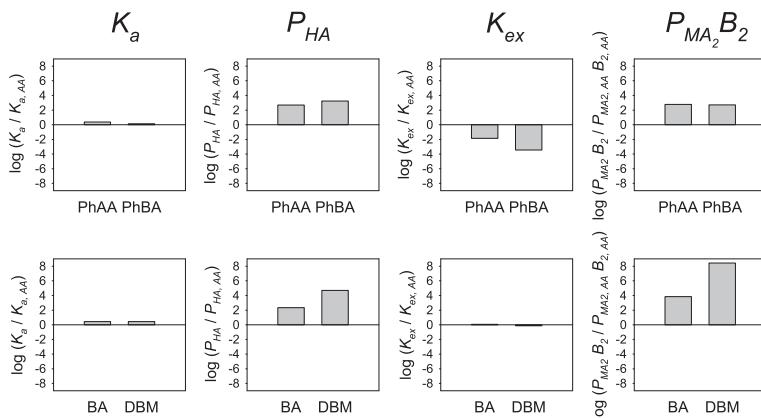


Fig. 1 Comparison of the equilibrium constants of the AA derivatives on the basis of those of AA.

## 成果報告

1. H. Mukai *et al*, "Investigation of extraction behaviors of metal ions in a liquid-liquid extraction system using novel bidentate ligands", poster presentation in ICRIS '14, 2014.

## 有機結晶中の分子間ハロゲン原子・カルコゲン原子接触の研究

都築誠二・産業技術総合研究所ナノシステム研究部門

[目的] カルコゲン原子の非結合相互作用は有機固体中の分子充填や諸物性、生体分子の分子認識に重要な寄与をなす相互作用の一つであると言われている。しかし、カルコゲンの非結合相互作用の詳細（相互作用の強さ、距離依存性、引力の原因、方向性）は未だに明確でなく、混乱した状況も認められる。本研究では、有機固体中の分子の配列制御に関するカルコゲンの役割の解明を目指し、化学研究所佐藤研究室との共同研究としてオリゴチエアノアセンの非結合相互作用の解析を行った。オリゴチエアノアセン等の含硫黄芳香族分子の結晶ではしばしば近距離の  $S \cdots S$  接触が見られる。このため、 $S \cdots S$  接触に伴う軌道間の相互作用による引力が結晶中の分子配列に寄与するとの考えもあるが、相互作用の詳細は明らかではない。そこで *ab initio* 分子軌道法によるテトラチエアノアセン結晶中の分子間相互作用の解析を行った。特に、引力の原因を明らかにするため、静電力、分散力、軌道間の各相互作用の寄与の解析も行ったのでその結果を報告する。

[計算方法] 分子軌道法計算には Gaussian 09 プログラムを用い、MP2/cc-pVTZ レベルで分子間相互作用エネルギー ( $E_{\text{total}}$ ) を計算した。基底関数重ね合わせ誤差 (BSSE) は counterpoise 法で補正した。静電エネルギー ( $E_{\text{es}}$ ) はモノマーの電子状態から計算した各原子上の多極子 (distributed multipole) の相互作用として計算した [1]。誘電分極による引力の寄与である誘起エネルギー ( $E_{\text{ind}}$ ) は distributed multipole の作る電場と原子の分

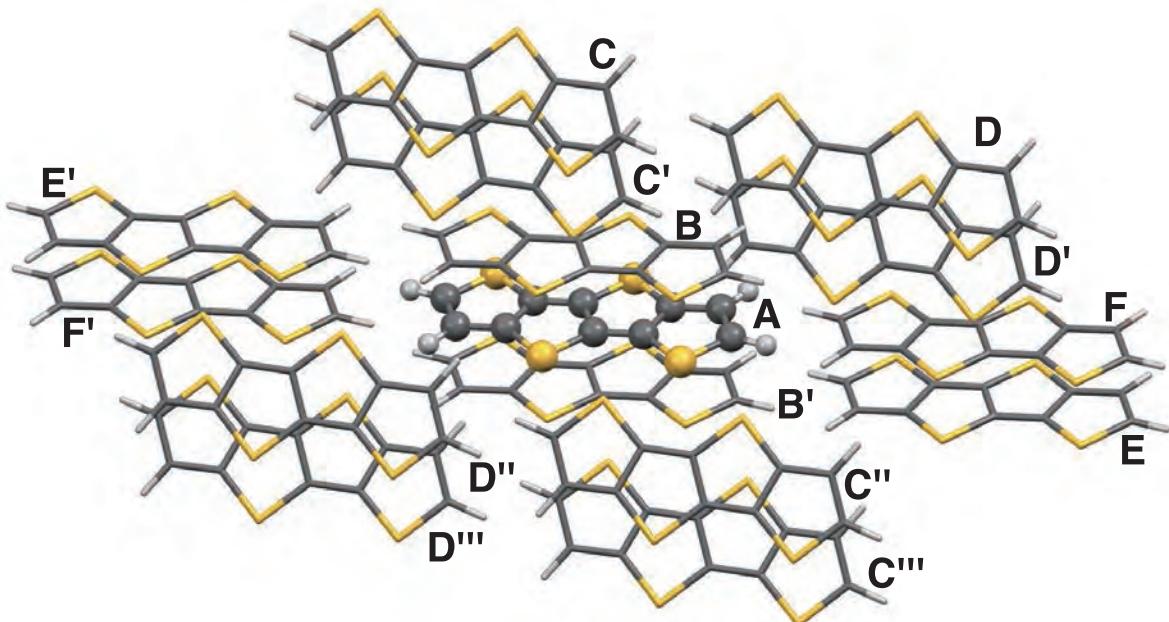


Fig. 1. Crystal structure of tetrathienoacene

極率から計算した[2]。HF 法で計算される相互作用エネルギー ( $E_{\text{HF}}$ ) は大部分が静電力、誘起力と軌道間の相互作用なので、軌道間の相互作用の寄与 ( $E_{\text{short}}$ ) は  $E_{\text{short}} = E_{\text{HF}} - E_{\text{es}} - E_{\text{ind}}$  として計算した。

また、MP2 法で計算した分子間相互作用エネルギー ( $E_{\text{MP2}}$ ) と  $E_{\text{HF}}$  の差から分子間相互作用への電子相関の寄与 ( $E_{\text{corr}}$ ) を計算した。 $E_{\text{corr}}$  は大部分が分散力である。

[結果と考察] テトラチエアノアセンの結晶構造を図 1 に示す。テトラチエアノアセン分子 (A) は 4.0 Å 以下の原子間距離で図に示す 14 個の分子と接触している。結晶の対称性のため隣接分子との相互作用で非等価なものは表 1 に示す 5 種類である。相互作用が最も強いのは平行で重なっている B との相互作用である。相互作用エネルギーは -16.6 kcal mol<sup>-1</sup> と計算され、非常に強い引力が働いている。S···S の接触がある C との相互作用は B に比べるとかなり弱く、相互作用エネルギーは -5.3 kcal mol<sup>-1</sup> と計算された。他の分子 (C,D,E) との相互作用はさらに弱い。相互作用エネルギーの内訳を表 1 に示す。静電力、誘起力の引力への寄与は小さい。一方、 $E_{\text{corr}}$  の引力への寄与は極めて大きく、引力の大部分が分散力であることが分かる。また、軌道間の相互作用は S···S 接触を持つ B との相互作用も含め、全体では常に斥力となっており、引力としては働いていない。これらの結果は、軌道間の相互作用による引力ではなく、分散力を主とする他の相互作用が、含硫黄芳香族分子の結晶中の分子配列に重要な役割を果たしていることを示唆する。

#### 〔文献〕

- [1] A. J. Stone and M. Alderton, *Mol. Phys.*, **1985**, 56, 1047.
- [2] A. J. Stone, *Mol. Phys.*, **1985**, 56, 1065.

#### 〔成果報告〕

- (1) Seiji Tsuzuki and Naoki Sato, “Origin of Attraction in Chalcogen-Nitrogen Interactions of 1,2,5-Chalcogenadiazole Dimers”, *J. Phys. Chem. B*, **2013**, 117, 6849-6855.
- (2) 都築誠二、折田秀夫、佐藤直樹、「*ab initio* 分子軌道法によるオリゴチエアノアセンの分子間相互作用の解析：S···S 接触による軌道間相互作用の寄与について」、第 22 回有機結晶シンポジウム、2013 年 11 月 1 日、北海道大学札幌キャンパス。
- (3) 都築誠二、佐藤直樹、「含カルコゲン芳香族分子の分子間相互作用：*ab initio* 分子軌道法による S, Se, Te の相互作用の比較」第 94 日本化学会春季年会、2014 年 3 月 28 日（予定）、名古屋大学東山キャンパス。

Table 1. Interaction energy between tetrathienoacene molecules (in kcal mol<sup>-1</sup>).

	$E_{\text{total}}$	$E_{\text{es}}$	$E_{\text{ind}}$	$E_{\text{short}}$	$E_{\text{corr}}$
A-B	-16.56	1.18	-0.34	7.30	-24.70
A-C	-5.25	-0.37	-0.12	4.02	-8.77
A-D	-3.71	-0.59	-0.16	2.09	-5.04
A-E	-1.61	-0.32	-0.10	1.81	-3.01
A-F	-0.95	0.14	-0.05	0.46	-1.50

## ポリ尿素の結晶成長プロセスの解明

松葉 豪・山形大学 大学院理工学研究科

### 緒言

ポリ尿素は二酸化炭素と天然材料から合成可能で、高い耐熱性を持つポリ尿素については、石油由来のエンプラの代替品として非常に有望でありながら、その結晶構造、特性など基本的な物性が未だ明らかにされておらず、利用が進んでいない。そこで、本研究では、これまで我々が得た結晶構造に関する知見を利用して、実際の成形加工時に近い温度変化時の結晶構造の変化に着目し、本実験を行った。特に、化学研究所共同利用の一環として、化研、金谷研究室で開発された高速温度ジャンプ法を用いた小角・広角同時 X 線散乱法による測定を行った。

### 実験

試料はユニチカ（株）からご提供いただいたバイオマス由来のポリ尿素を用いた。（PUA10）。装置については、結晶構造解析は茨城県つくば市にある高エネルギー加速器研究機構、物質構造研究所のフォトンファクトリー、BL6A に高速温度ジャンプセルを取り付けて実験を行った。高速温度ジャンプセル（図 1）は京都大学化学研究所の西田准教授が開発したものを利用した。実際に取り付けた様子を図 1 に示す。カメラ距離は広角が 7.5 cm、小角が 220.5 cm、X 線の波長は 0.15nm である。

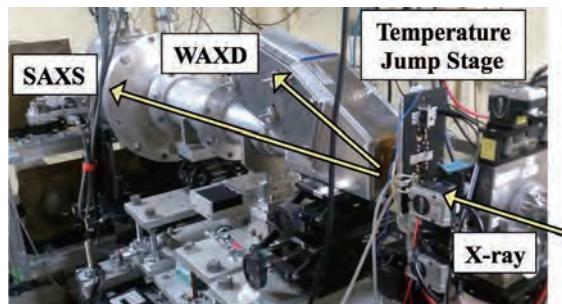


図 1 溫度ジャンプセルを取り付けた様子

### 結果

図 2 に溶融状態もしくはガラス状態から、種々の温度に温度ジャンプさせて十分な時間（20 分以上）経過した試料の広角 X 線散乱像を示すすべての温度条件で高温相である  $\delta$  相もしくはアモルファスハローのみが観測されており、低温相である  $\alpha$  相は観測されていない。これらのこととは、 $\alpha$  相作製のためにはかならず高温相である  $\delta$  相を通る必要があるということを示唆している。

これらのこととを確認するため、さらにクエンチ後の成長プロセスに着目して測定を行った。図 3 に溶融状態から 140 °C に温度ジャンプさせたときの、 $q$  が 9~19 nm<sup>-1</sup> の領域を拡大した広角 X 線散乱プロファイルの時間発展を示す。赤はアモルファスハローであり、青が結晶のプロファイルである。これらのプロファイルの時間発展を表すには結晶ピークとアモルファスハローのみではフィッティングできない。そこで、ナイロンなどの

比較的固い高分子で観測されているメゾ相を仮定した。メゾ相を考慮することでこれらの散乱曲線を精度よくフィッティングすることが出来た。さらに、広い温度領域での結晶相、メゾ相およびアモルファス相の分率の時間変化を図4に示す。180°Cまでのすべての条件でメゾ相の存在が示唆された。このメゾ相については、結晶成長以前に成長が始まっていることがわかる。一方、120°C以上の温度条件では、メゾ相の分率は増加も減少もしていないことがわかる。すなわち、メゾ相が「固定された架橋点」として振る舞い結晶成長を加速しているというモデルを示すことが出来た。

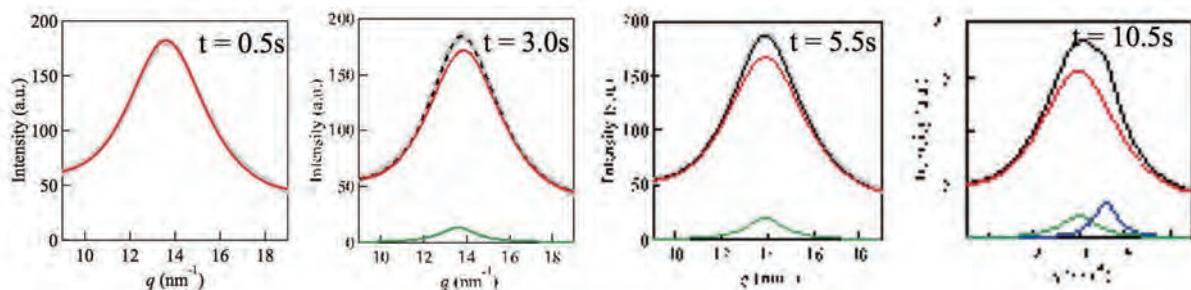


図2 溶融状態から140°Cに温度ジャンプさせたときの広角X線散乱プロファイルの時間発展。赤：アモルファス、青：結晶、緑：メゾ相

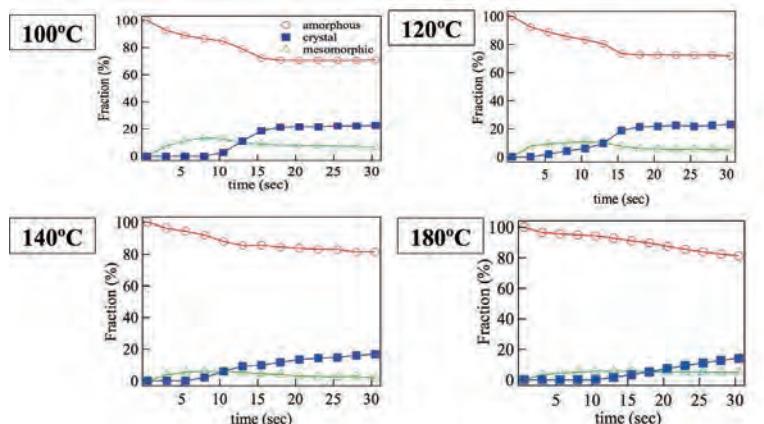


図3 広角X線散乱プロファイル解析から得られた各成分（結晶、アモルファス、メゾ相）の変化

## まとめ

ポリ尿素の成形加工に近い条件での結晶成長プロセスにおいてメゾ相が大きな役割を果たしていることを示した。現在、メゾ相の役割をさらに明らかにするべく小角X線散乱測定、高速DSC測定、粘弾性測定を行う予定である。

## 学会発表

本研究は以下の学会にて発表を行った。

1. 繊維学会年次大会 (2013.6) @東京 ポスター発表
2. IDPMC2013 (2013.7) @京都 ポスター発表 (英語) :
3. ATC-12(2013.10)@上海 ポスター発表 (英語)

## ポリ乳酸/ナノファイバコンポジットの結晶化機構に関する研究

河井 貴彦 (群馬大学 理工学研究院)

### <緒言>

高分子への温度や圧力の因加により、高分子鎖は規則的に配列し、結晶化する。フィラーや核剤などが存在する場合は、その表面自由エネルギーもしくは結晶間エピタキシーにより、固体添加剤表面で核形成が優先的に起こり、結晶化速度が向上することが知られている。

一方、高分子薄膜では基板表面との物理的、化学的相互作用により、界面にて高分子鎖が束縛され、分子鎖の運動性が著しく低下することが、近年のX線、中性子散乱の結果から明らかになりつつある。結晶化に関する研究はあまり多くないものの<sup>1</sup>、界面における分子鎖の束縛効果は結晶化を著しく阻害することは明白であろう。高分子複合材料においても、フィラー(粒子、纖維)界面において、同様の束縛効果が存在することは明らかであり、複合材料中の高分子マトリクスの結晶化はフィラー界面の影響を大きく受けるものと考えられる。またこの影響はフィラー比表面積が著しく増大するナノサイズのフィラーを用いた際に特に大きな問題となり、また界面における束縛効果に加え、ナノサイズのフィラー間に高分子鎖が“閉じ込められる”ことによる束縛効果も発現する。

このような固体表面における、高分子の核形成促進効果と分子鎖束縛効果の詳細については、ナノコンポジット設計の際に非常に重要なものの、広範囲な濃度に亘って詳細に検討した報告はほとんどない。本研究ではマトリクス、フィラーとともに生分解性を有し、グリーンコンポジットとして今後の期待が大きい、ポリ乳酸/セルロースナノファイバーを用いて、ポリ乳酸の結晶化に及ぼすセルロースナノファイバー添加効果について詳細な検討を行った。研究では熱測定、各種顕微鏡観察、赤外分光法、X線散乱法などの多角的な手法を用い、様々な空間スケールで結晶化現象を捉えることにより、ナノコンポジットにおける高分子の結晶化を明らかにすることを目的とした。

### <実験>

試料はマトリクスピリマーとしてポリ乳酸(PLLA)(レイシア H-100,  $M_w=176,000 \text{ g/mol}$ )、フィラーとしてセルロースナノファイバー(CeNF)(日産化学工業(株)提供、平均纖維径 15 nm)を用いた。CeNF 添加量は 0 から 10 wt% である。試料を 190°C で 2 分間溶融した後、80 ~ 135°C の範囲で等温結晶化を行った。等温結晶化挙動は示差走査熱量計(DSC, Perkin Elmer 製 DSC-7)、フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR, JASCO 製 FT-IR4200)を用いて検討した。FT-IR 測定は MCT 検出器を用い、分解能は 2 cm<sup>-1</sup>、積算回数 32 回で行った。

### <結果および考察>

DSC を用いて 130°C で等温結晶化を行い、得られた DSC 曲線の発熱ピーク時間の逆数を結晶化速度( $V_{DSC}$ )として、CeNF 濃度に対してプロットした(Fig. 1)。CeNF 1% 以下では結晶化速度が濃度に対して著しく増加しており、CeNF による PLLA の結晶化促進効果が確認された。一方で、1% 以上の高濃度域では速度が減少に転じ、10% ではほぼ 0% と同様の結晶化速度にまで低下している。このような結晶化速度の特異的 CeNF 濃度依存性は、低濃度域の CeNF 表面における PLLA の核形成促進効果、また高濃度域において CeNF が近接することによる、PLLA 分子鎖の束縛効果が現れているものとして説明することができる。以下、FT-IR を用いたコンフォメーション解析より、特異な濃度依存性の本質を明らかにする。

PLLA の IR スペクトルにおいて、 $921\text{ cm}^{-1}$  に見られる PLLA の C-C 伸縮振動と C-H 変角振動に由来するカップリングバンドは、PLLA 結晶中の安定コンフォメーションである 10/3 ヘリックス構造に帰属されることが知られている(ヘリックスバンド)。一方  $1749\text{ cm}^{-1}$  に見られるバンドは C=O 伸縮振動に由来し、同じく結晶バンドとして理解されているが、カルボニル基の分子間相互作用に起因し、分子鎖の結晶格子内へのパッキングにより強度上昇を示すという報告がなされている(パッキングバンド)。 $135^\circ\text{C}$  で等温結晶化した際の上記 2 つのバンドの面積変化を規格化して Fig. 2 に示す。CeNF 未添加 PLLA ではヘリックスバンド、パッキングバンドは結晶化時間とともに強度の上昇を示しており、その時間発展に違いはない、すなわちヘリックス形成と結晶内へのパッキングは同一の時間スケールで進行することを示している。

一方で CeNF 10% 試料では、両バンドの時間発展に著しい差が見られる。ヘリックスバンドの強度上昇は 0% より短時間側にシフトしているのに対して、パッキングバンドの上昇は 0% より鈍化している。この興味深い結果は、束縛下での結晶化ではコンフォメーション形成と結晶格子内へのパッキングが異なる時間スケールで進行することを示している。Fig. 3 に CeNF 濃度に対するそれぞれのバンドの半結晶化時間の逆数( $V_{IR}$ )をプロットした。ヘリックスバンドの  $V$  は濃度の増加とともに上昇する、すなわちヘリックス構造形成は CeNF 界面の増加により促進されるのに対し、パッキングバンドは 1% で極大を示し、より高濃度域では鈍化するという傾向が観察される。興味深いくことに DSC より求められた結晶化速度(Fig. 1)はパッキングバンドと同じ傾向を示した。高濃度域における結晶化の鈍化はナノファイバーによるマトリクスピリマーの束縛効果により説明される。一方で高濃度域におけるヘリックスバンドの結晶化誘導期における急激な増加は、CeNF 表面における優先的なヘリックス形成を示唆しており、この二つの相反する効果がナノファイバー添加 PLLA の結晶化における特異な濃度依存性をもたらすものと考えている。

以上の研究成果は京都大学化学研究所 金谷利治教授との共同実験および議論によって得られたものであり、ナノコンポジットにおける、空間的に束縛された環境下での高分子結晶化のダイナミクスを初めて明らかにできた点で非常に意義深い。

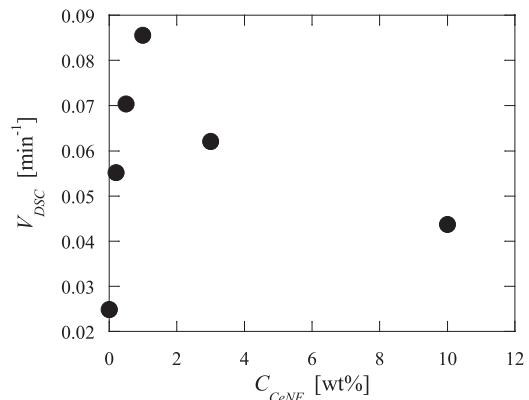


Fig. 1 Plots of crystallization rate,  $V_{DSC}$ , of PLLA against the CeNF concentration.

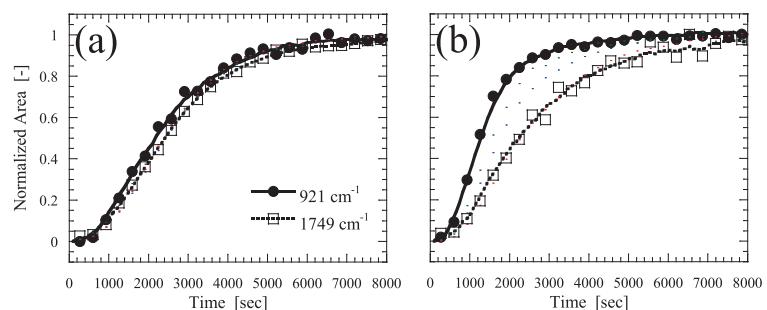


Fig. 2 Changes in normalized area of helix ( $921\text{ cm}^{-1}$ ) and packing ( $1749\text{ cm}^{-1}$ ) band during isothermal crystallization of PLLA(a) and PLLA/CeNF10%(b).

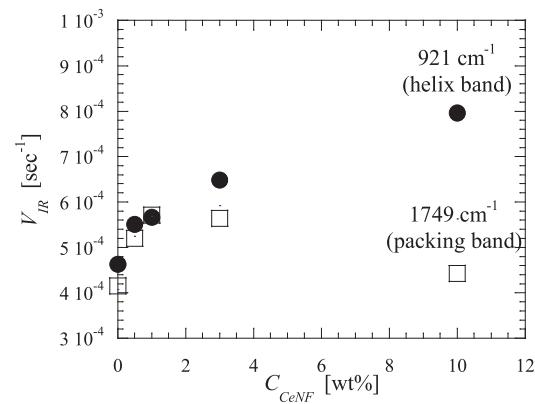


Fig. 3 The inverse half time of helix and packing formation during isothermal crystallization plotted against the CeNF concentration.

## シスチン/グルタミン酸アンチポーターxCT および $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の阻害による新規抗酸化ストレス応答誘導物質の開発

佐藤英世・山形大学農学部

生体内の主要な抗酸化物質であるグルタチオンの生合成に必要なシスティンを供給する2種類のタンパク質、シスチン/グルタミン酸アンチポーター xCT および $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の機能を阻害すると、細胞へのシスティン供給が遮断されるため、細胞内グルタチオンレベルが低下し、軽い酸化ストレス負荷状態となり、細胞の抗酸化ストレス応答が引き出されることにつながると考えられる。また、xCT の阻害剤は、それ自体が新しい作用機序を持った抗がん剤につながる可能性が高い。このような細胞へのシスティン供給を遮断しグルタチオンレベルを低下させるという観点からは、xCT の阻害と GGT の阻害とを協奏的に行う作用を持つ物質の開発が重要になる。そこで、本研究では、xCT および GGT の阻害剤を探索し、グルタチオンレベルが低下することによって生じる細胞の抗酸化ストレス応答を誘導する新規化合物を開発することを目指した。

これまでの研究で、申請者および化研受け入れ教員である平竹潤教授らは、GGT 阻害剤として開発された化合物 GGsTop™（平竹教授により特許取得済）とその誘導体が、xCT を介するシスチンの取り込みに対しても弱い阻害活性を持つことを明らかにした。この先行研究の成果を踏まえ、GGT および xCT 阻害剤の候補化合物を合成し、それらの阻害効果の検証を行った。xCT が基質として、生理的 pH 下でおよそ 20%の存在比で存在する 3 個のシスチンを認識することから、このイオン型のシスチンのアナログに焦点を当て、まず、平竹教授により 10 種類の化合物が阻害剤候補として設計、合成された（図 1）。合成された化合物の GGT 阻害活性を見たところ、化合物 1a に極めて強力な GGT 阻害活性が認められた。次に、xCT を安定高発現しているマウス胚性線維芽細胞を用いてシスチン取り込み活性に対する影響を調べた（図 2）。その結果、合成した化合物のうち 7 つの化合物に有意なシスチン取り込み阻害効果が見られ、その中で特に化合物 2b によって、シスチン取り込み活性が強く阻害されることが示された。その阻害効果は濃度依存的であり、また、xCT の基質であるグルタミン酸と同程度の阻害効果を示したことなどから、化合物 2b は、シスチン取り込みを競合的に阻害する化合物であることが推定された。また、関節リュウマチや炎症性腸疾患の治療薬として使用され、xCT の阻害剤としても知られている sulfasalazine と化合物 2b とは、よく似た構造であることもわかった。一方、最近、Hras や Kras などの発がん ras を有する腫瘍細胞に選択的に作用する抗がん剤候補として見出された erastin が、xCT を介するシスチン取

り込みを阻害することが報告された。申請者らは、erastinによるシスチン取り込み阻害の特性を調べたところ、erastinは、sulfasalazineやこれまでに報告された他のxCT阻害剤より低濃度でシスチンの取り込み活性を阻害することが示された。また、その阻害効果は、一部不可逆的に生じていることが示唆された。以上、本研究により、GGTやxCTを阻害する化合物の構造と阻害効果との関連性の一端が明らかとなった。今後、本研究の結果を踏まえ、これらの化合物の構造機能相関を詳細に検討することで、より効果的なGGTおよびxCT阻害剤の開発が期待できると考えられる。

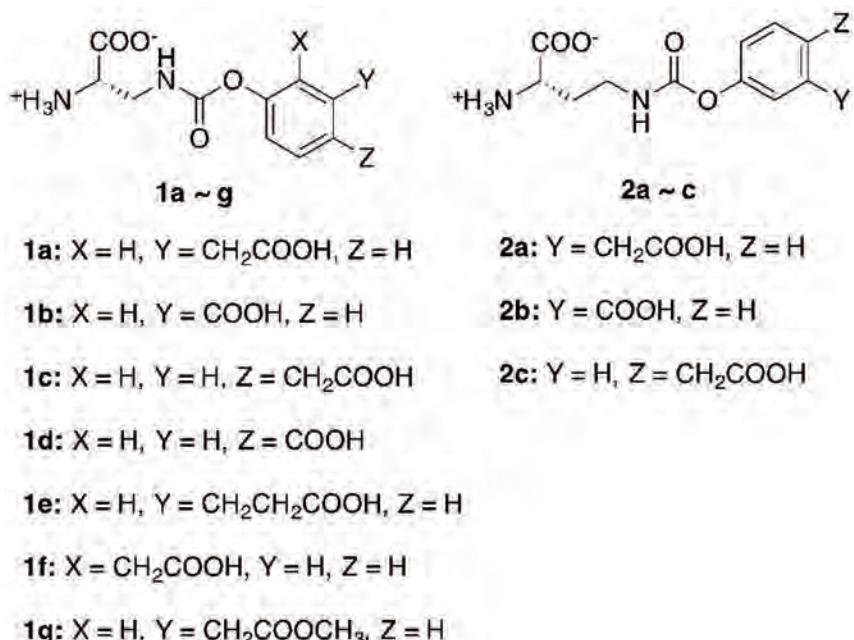


図1 合成化合物の構造

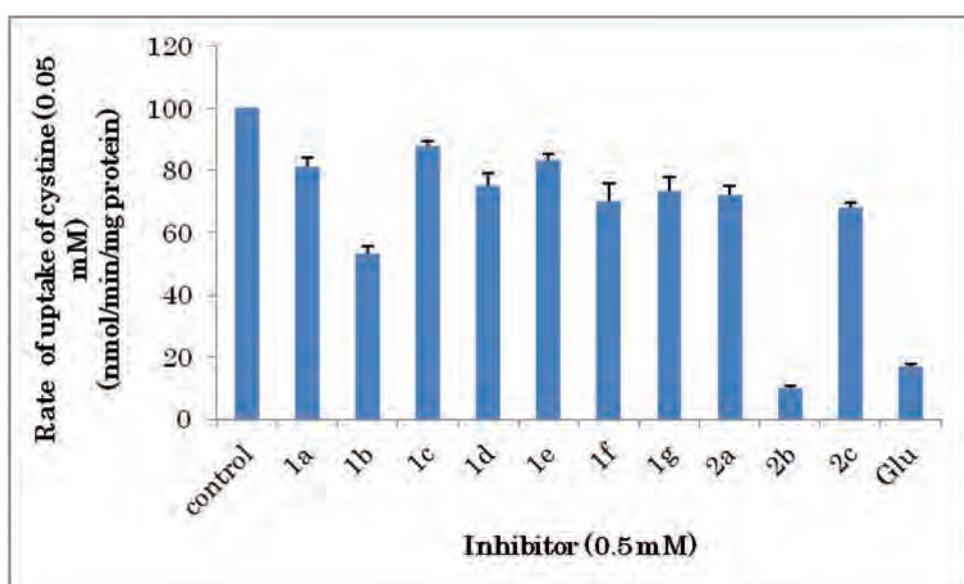


図2 シスチン取り込みに対する合成化合物の阻害効果

## 電荷秩序状態を示すペロブスカイト酸化物における焦電性の探索

高橋竜太・東京大学物性研究所

### 目的

本研究では「電荷秩序状態を示す遷移金属酸化物における焦電性の探索」を目的とした。電荷秩序状態は、遷移金属酸化物に特徴的な現象の一つであり、電子-スピニ-格子が強い相互作用を示す結果発現するものと考えられている。つまり、電荷整列状態では単に電子が整列するだけでなく、格子変位や磁気秩序が付随する。このことは電荷秩序状態が電場、磁場や温度と言った外場に対して新奇な応答を示す可能性を示唆している。そこで本研究では電荷整列状態に対して焦電性を評価することにより電荷整列状態における新奇な外場応答の探索を行った。

本研究では電荷整列状態を有するペロブスカイト酸化物である  $\text{La}_{1/3}\text{Sr}_{2/3}\text{FeO}_3$  (LSFO) に着目した。バルク試料においては約 190K において電荷不均化 ( $3\text{Fe}^{11/3+} \rightarrow 2\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{5+}$ ) が発生し、単位格子の [111] 方向に  $\text{Fe}^{3+}$  と  $\text{Fe}^{5+}$  が 2:1 の割合で規則配列した電荷整列状態を形成することが知られている。またこの電荷整列状態の形成には LSFO 中の酸素欠損量に非常に敏感であることから、LSFO の酸素量変化に対する輸送特性及び焦電性に焦点を当て、焦電性の評価を行った。

### 実験方法

試料にはパルスレーザー堆積法によって (001) の面方位を有する  $\text{SrTiO}_3$  (STO) 基板上にエピタキシャル成長させた薄膜を用いた。膜厚は 20nm とした。製膜中に生成した薄膜中の酸素欠損を消失させるため、成膜後に 200°C でオゾン酸化を施した。また薄膜中に生じた酸素欠損の効果を検出する為に、オゾン酸化した試料を空气中 200°で 60 分間アニールして、酸素欠損を薄膜中に導入した。作製した薄膜の構造評価には 4 軸 X 線回折装置を用いた。電気抵抗の温度依存性は櫛形電極を用いて 2 端子法によって測定した。また焦電流の温度依存性を Chynoweth 法によって測定した。赤外線の半導体レーザーを薄膜サンプルにパルス照射し、温度が変調した時に発生する電流をロックイン検波しながら検出した。

### 実験結果及び考察

図 1 には作製した薄膜から得られた 2θ-θ 回折パターンを示す。オゾン酸化直後の薄膜及び大気中アニールを施した薄膜試料とともに、LSFO(00L) 反射のみを観測し、薄膜中の

酸素量に依存せずエピタキシャル成長していることを確認した。オゾン酸化直後の試料に比べ、大気中アニールを施した薄膜試料では LSF0(002)反射がより低角側に現れているのが分かる。また STO(204)反射近傍の逆格子マッピングから、どちらの薄膜試料においても、薄膜層の面内の格子定数は基板のそれと一致していることを確認した。このことは、STO 基板上の LSF0 薄膜の酸素量変化は面間格子定数の変化を及ぼし、酸素量が減少するほど、面間格子定数が伸張することを意味している。

図 2 にはこれらの薄膜試料から得られた電気抵抗の温度依存性を示す。オゾン酸化した試料では、190Kにおいて電荷不均化に伴う金属絶縁体転移が明瞭に観測できた。その一方で大気中のアニールによって酸素欠損を導入した試料においては、金属絶縁体転移は消滅し、温度降下に対して電気抵抗が増加するという絶縁体的な振舞いが観測された。これは酸素欠損の導入によって電荷整列状態の形成が抑制されたことを示すものである。

酸素欠損に依存して電荷整列が形成される薄膜試料と形成されない試料に対して焦電電流の温度依存性を評価したところ、電荷整列の形成が抑制された酸素欠損を有する薄膜試料において焦電流を観測した。この結果は期待していた電荷整列における焦電性の発現とは異なるものであるが、酸素欠損ペロブスカイト酸化物が示す新しい機能性として非常に興味深い結果である。今後は観測された焦電性の起源を探究する為に、さらに詳細な測定を実施する予定である。

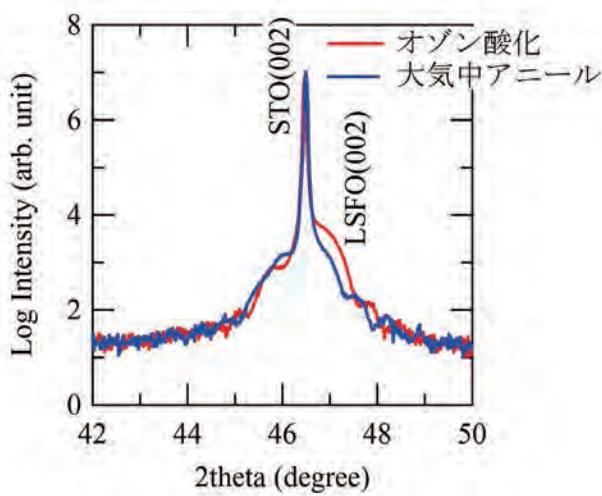


図 1: オゾン酸化処理した  
LSFO 薄膜(赤線)と大気中でア  
ニールを施した LSFO 薄膜(青  
線)から得られた X 線 2θ-θ回折  
パターン

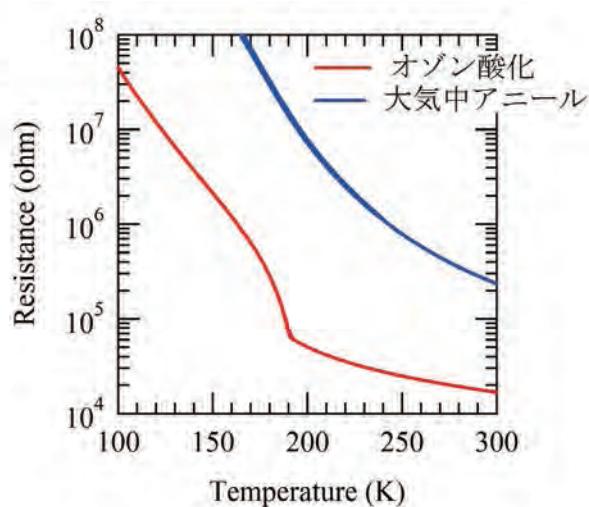


図 2: オゾン酸化処理した  
LSFO 薄膜(赤線)と大気中でア  
ニールを施した LSFO 薄膜(青  
線)の電気抵抗の温度依存性

## 新規オタマジャクシ型高分子の絡み合い緩和

高野敦志・名古屋大学大学院工学研究科

**【目的】**高分子の粘弾性はその一次構造に強く支配されることが知られている。中でも「末端」を持たない環状高分子は、明確なゴム状平坦領域を示さず分子間の絡み合いで非常に起こりにくいこと、また、環状鎖中に線状鎖を添加していくと少量の添加でもゴム状平坦領域が出現し、ある添加量以上では線状鎖単体よりも緩和が遅くなることが報告されている。このような研究成果をもとに、私たちは環状鎖と線状鎖が1点で連結した「おたまじやくし型高分子」の精密合成を試み、その粘弾性について検討を進めている。本研究では、環状鎖と線状鎖の分子量が等しい試料の調製に加えて、線状鎖部分の分子量の異なる一連のおたまじやくし型高分子試料の系統的調製を行った。さらに、その動的粘弾性測定を行うことで、おたまじやくし型高分子の絡み合い運動様式を検討した。

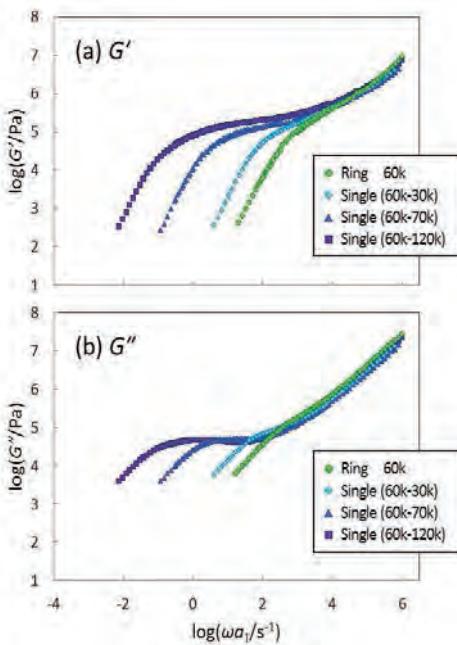
**【実験】**おたまじやくし型高分子試料はまず分子鎖状に1,1-ジフェニルエチレン型ビニル基を有する環状ポリスチレン(Ring PS)を高純度に合成し、さらにこの反応性環状ポリスチレンに対してリビング線状ポリスチレン(Linear PS)をカップリングさせることにより合成した。得られた試料のキャラクタリゼーションは、光散乱(LS)、SEC、ならびに臨界条件液体クロマトグラフィー(LCCC)を用いて行った。動的粘弾性測定にはARES-G2(TA Instruments)を用いた。コーン・プレート型ジオメトリー(直径8mm)を用い、N<sub>2</sub>雰囲気下、測定温度120–200°C、歪み5%の線形領域で周波数分散測定を行った。参照温度( $T_{ref}$ )は170°Cとした。

**【結果と考察】**高純度環状PS( $M_w = 57.2k$ )に、分子量が半分、同程度、2倍の線状PS( $M_w = 26.3k, 66.0k, 116k$ )をそれぞれ連結し、一連のおたまじやくし型PS試料を調製した。LCCC分析の結果、いずれの試料とも99%以上の高い試料純度を有することが確認された。Table 1にこれらの試料の分子特性を示す。Figure 1に一連のおたまじやくし型PS試料の動的貯蔵弾性率( $G'$ )と動的損失弾性率( $G''$ )のマスターカーブを示す。いずれの試料も、粘弾性測定後に分子鎖切断が生じていないことをLCCC測定により確認した。さらにTable 2には、各試料のマスターカーブから算出したゼロずり粘度( $\eta_0$ )と定常回復コンプライアンス( $J_e$ )をまとめた。Figure 1より、おたまじやくし型PSの $G'$ と $G''$ は低周波数側でどちらも線状PSよりも緩やかな減少を示すことが

Table 1. Molecular characteristics of tadpole-shaped polystyrene samples

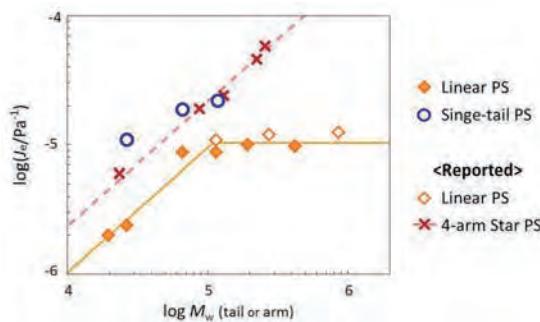
Sample	$M_w, total^a$ ( $\times 10^3$ )	$M_w,tail^a$ ( $\times 10^3$ )	$M_w/M_n^b$	Purity (%) <sup>c</sup>
Ring 60k	57.2	-	1.02	99.9
Tadpole (60k-30k)	82.7	26.3	1.02	99.3
Tadpole (60k-70k)	123	66.0	1.01	99.6
Tadpole (60k-120k)	175	116	1.02	99.1

Measured by (a) SEC-MALS, (b) SEC and (c) HPLC



**Figure 1.** Master curves of (a)  $G'$  and (b)  $G''$  for a series of tadpole-shaped polystyrene samples at  $T_{\text{ref}} = 170^{\circ}\text{C}$ .

PS の  $\eta_0 - M_w$  曲線上に乗ることが確認された。つまり、おたまじやくし型高分子の運動様式が星型高分子の挙動 (= Retraction) と類似していることが強く示唆された。一方、Figure 3 のおたまじやくし型 PS の  $J_e$  は、星型 PS と異なる分子量依存性を示した。これは、おたまじやくし型高分子の構造中に存在する環構造のためだと考えられる。すなわち、 $\eta_0$  に関して環状鎖の寄与は極めて小さい ( $\eta_{0,\text{Ring}} = 390 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ) のに対し、 $J_e$  に関しては環状鎖の寄与が大きい ( $J_{e,\text{Ring}} = 0.77 \times 10^{-5} \text{ Pa}^{-1}$ ) ためだと考えられる。この  $J_e$  の不一致がおたまじやくし型高分子の運動様式に与える影響に関しては、検討中である。



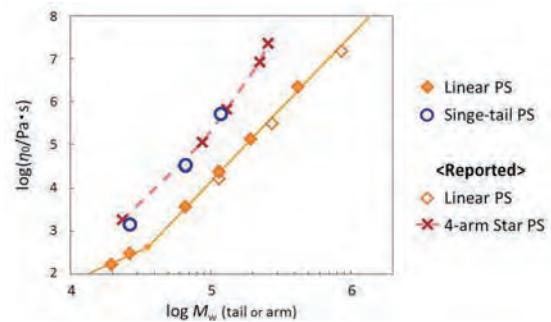
**Figure 2.** Zero-shear viscosity vs tail (or arm)  $M_w$  for linear PSs (◆, ◇), tadpole-shaped PSs (○) and 4-arm star-shaped PSs (×) at  $T_{\text{ref}} = 170^{\circ}\text{C}$ .

**Table 2.** Viscoelastic parameters for tadpole-shaped polystyrenes at  $T_{\text{ref}} = 170^{\circ}\text{C}$

Sample	$\eta_0 (\times 10^5/\text{Pa}\cdot\text{s})$	$J_e (\times 10^{-5}/\text{Pa}^{-1})$
Ring 60k	0.0039	0.77
Tadpole (60k-30k)	0.014	1.10
Tadpole (60k-70k)	0.34	1.88
Tadpole (60k-120k)	5.2	2.19

~確認された。この挙動は、おたまじやくし型高分子と同じく分子構造中に分岐点を 1 点有する星型高分子の挙動と類似している。そこで、おたまじやくし型 PS の  $\eta_0$  と  $J_e$  の分子量依存性を線状 PS、ならびに 4 分岐星型 PS[5] と比較した。Figure 2 と 3 には、線状 PS、おたまじやくし型 PS、4 分岐星型 PS の  $\eta_0$  と  $J_e$  を、横軸にしつぽあるいは星型鎖の腕 1 本の分子量をとってプロットした結果を示した。

Figure 2 より、おたまじやくし型 PS の  $\eta_0$  は星型



**Figure 3.** Steady-state recoverable compliance vs tail (or arm)  $M_w$  for linear PSs (◆, ◇), tadpole-shaped PSs (○) and 4-arm star-shaped PSs (×) at  $T_{\text{ref}} = 170^{\circ}\text{C}$ .

本研究の成果は以下の論文、ならびに学会発表にて報告した。

- [1] Doi, Y. et al. *Macromolecules* 46, 1075 (2013)
- [2] 土肥ら, 日本レオロジー学会第 40 年会講演予稿集, 5-6 (2013)
- [3] 土肥ら, 第 61 回レオロジー討論会講演要旨集, 186-187 (2013)

# マイクロ波伝導度法を駆使したマテリアルデザインに基づく 有機光電変換材料の開発

佐伯昭紀・大阪大学大学院工学研究科

## 1. はじめに

フレキシブルかつ軽量な有機薄膜太陽電池（OPV）は、太陽電池の低コスト化と用途開拓に向けて世界中で活発に研究が行われている。バルクヘテロジャンクション（BHJ）型OPVは、p型高分子とn型半導体であるフラーレン誘導体（例えばPCBM）からなるナノスケール相分離をpn接合として利用し、プロセスの簡略化に加えて電荷分離と輸送の両面で優れた構造である。高効率材料の開発には分子の設計と合成、統一して個々の材料に応じた作製プロセス（溶媒・pn混合比・デバイス構造）の最適化が必要だが、有機材料は多種多様な化学構造を持つ反面、その電気物性は材料自身の特性だけでなく、集合形態や不純物などの多くの内部・外部要因によって激しく増減する。したがって、設計・合成 $\leftrightarrow$ デバイス評価をいかに効率的に行うかは、高性能太陽電池の開発において非常に重要である。

## 2. デバイス評価法を基にした新規材料開発

本研究では新たに開発した、太陽電池評価に特化した時間分解マイクロ波伝導度（Time-resolved microwave conductivity: TRMC）法を実際の材料開発へ利用することを試みた<sup>1,2)</sup>。数多くのアセプター基の中でベンゾビスチアゾール（BBTz）は、ベンゼン環を電子吸引性のチアゾール基で両側から縮環した構造であるため、通常はアセプターとして認識されている。しかし、BBTzはアセプターの中でも比較的、最高占有分子軌道（HOMO）が高いため、筆者ら BBTzを弱ドナーとみなし、強アセプターと組み合わせることで高い開放電圧（ $V_{oc}$ ）を持つp型材料の開発を試みた（図1a）<sup>3)</sup>。

アセプターとして代表的なチエノビロジオン（TPD）とベンゾチアジアゾール（BT）を選び、まずは合成上の簡便さからランダム共重合体を合成した（PBBTz-ran-TPDおよびPBBTz-ran-BT、図1a）。吸収極大波長は520 nm程度（図1b）であったが、HOMOは-5.7 eVとかなり深くなり、BBTzを弱ドナーとして利用した効果が確認できた。なお、高分子フィルムのHOMOの測定には、京大化研・村田靖次郎先生、若宮淳志先生の協力を仰いだ。PCBMとの混合膜のTRMC評価を行い、最大の光過渡伝導度を与えるpn混合比で比較すると、図2a)に示すようにPBBTz-ran-BTの方がPBBTz-ran-TPDより2倍大きい伝導度と長い寿命を与えた。そこで太陽電池デバイスを評価したところ、後者はPCE = 0.90%となったが、前者は溶解性・表面粗さの問題でダイオード特性が得られなかった。しかし、PBBTz-ran-BTの方が高い

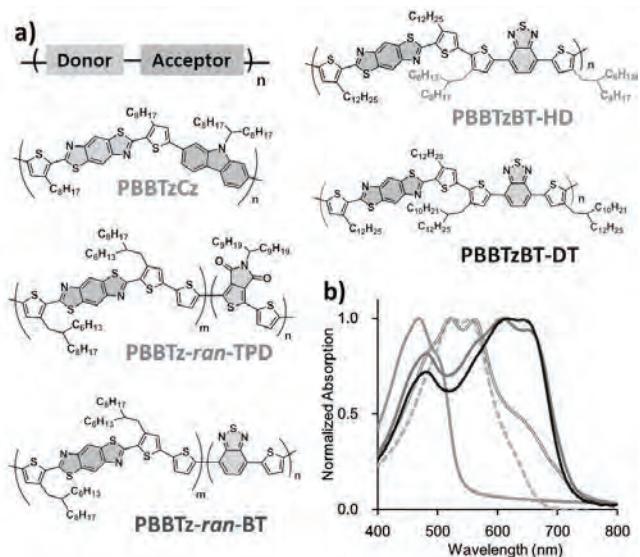


図 1 a) 新規に設計・合成した高分子構造。b) 薄膜の光吸收スペクトル。

TRMC 信号と長い電荷寿命を与えていたため、TPD よりも BT の方が BBTz との組合せにおいて優れた性能が期待できると判断した。

そこで、図 1a)に示す交互共重合体：PBBTzBT-HD を合成した。HD は側鎖の分岐アルキル鎖 (*n*-hexyldecyl) を表している。pn 比を最適化した TRMC 信号はランダム共重合体よりも大きく増加し、変換効率の向上が期待できた（図 2a）。TRMC による最適化後、実際にデバイスを作製すると 3.20%まで向上した（図 2b）。

次に、分岐アルキル鎖をより長くした PBBTzBT-OT (*n*-octyltetradecyl) を合成した。PBBTzBT-HD と比べて重量平均分子量は約 3 倍増加し、過渡伝導度信号も 2 倍増加した。しかし、変換効率は 2.37%となり、PBBTzBT-HD よりも低下する結果となった。図 2b)の *J-V* 曲線を見ると、開放電圧付近で S 字カーブが生じて形状因子 (FF) が低下し、短絡電流密度 ( $J_{sc}$ ) も大きく減少している。S 字カーブは不純物による電荷再結合の増加やバッファ一層との界面抵抗などが原因と考えられている。

PBBTzBT-OT の HOMO がやや深くなっていること (-5.7 eV)、TRMC では最も高い光伝導度を示すことを踏まえると、バッファ一層に用いた PEDOT:PSS の仕事関数 (約 -5.1 eV) との差が大きいため、オーミック接合していないことが変換効率低下の原因と推測された。

そこで、仕事関数の深い  $\text{MoO}_3$  (-5.4 eV) を陽極バッファ一層、陰極バッファ一層を  $\text{TiO}_x$  とする逆デバイスを作製して評価したところ、変換効率は 3.84%に向上した<sup>3)</sup>。さらに  $\text{TiO}_x$  の代わりに  $\text{ZnO}$ 、金電極の代わりに銀電極を用い、PCBM に変えて可視光の吸収が大きい  $\text{PC}_{71}\text{BM}$  を n 型材料として用いることで、6.53% ( $J_{sc} = 12.09 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $V_{oc} = 0.80 \text{ V}$ , FF = 0.67) まで向上させることに成功した（図 2b）<sup>4)</sup>。この値は現在のところ BBTz を有する高分子の中で最も高い変換効率である。最終的に得られた太陽電池効率と TRMC 過渡伝導度強度はよい相関を示しており、分子骨格の選択、側鎖のチューニング、そしてデバイスの作り込みの段階において TRMC は非常に有用な評価法であることが分かる。特に、少量での評価と難溶性の材料での評価が可能であること、また、不純物に影響を受けないという点は、材料設計・合成の現場で有効な指標を与える。

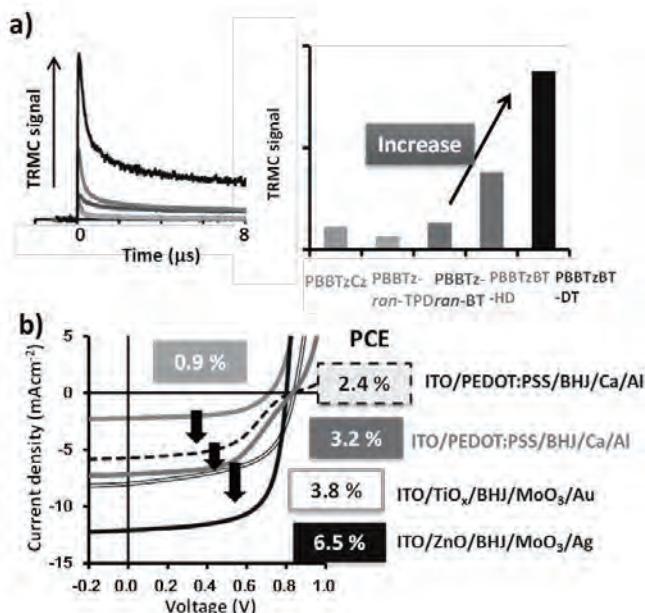


図 2 a)TRMC による評価 b) 太陽電池デバイス評価。PCE の横にデバイス構造を表示。

- 1) A. Saeki, S. Yoshikawa, M. Tsuji, Y. Koizumi, M. Ide, C. Vijayakumar, S. Seki, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 19035 (2012).
- 2) 佐伯昭紀, 高分子論文集, **70**, (2013) 370.
- 3) M. Tsuji, A. Saeki, Y. Koizumi, N. Matsuyama, C. Vijayakumar, S. Seki, *Adv. Funct. Mater.*, **24**, 28 (2014).
- 4) A. Saeki, M. Tsuji, S. Yoshikawa, A. Gopal, S. Seki, *J. Mater. Chem. A* (2014) DOI:10.1039/C3TA14109H

## 不斉4置換炭素含有複素環化合物ライブラリーの構築と 生理活性物質の検索

石橋正己・千葉大学大学院薬学研究院

### 【目的】

我々は天然有機化合物を基盤とし、有用な生物活性物質の探索・創製を行っている。活性天然物には部分構造として芳香環や含窒素複素環が多く見られる事から、空間的多様性を付加する不斎4置換炭素と含窒素複素環の融合は、新たな活性物質探索に有用と期待される。本研究では、当研究室で見いだした天然物の骨格を基盤とした、不斎4置換炭素を持つ含窒素複素環化合物を含む天然物誘導体ライブラリーを構築し、生物活性を有する新規有機化合物の探索を行う事を目的とする。

### 【方法・結果】

TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) シグナルはがん細胞表面に発現しているデスレセプター (Death Receptor 5; DR5) と結合しがん細胞選択的にアポトーシスを引き起こすことから、近年がん治療の標的として注目されている (Fig. 1A)。しかしながら TRAIL 耐性がん細胞の存在が問題となつており、これらの TRAIL への感受性を高め TRAIL 耐性克服を促す低分子化合物の開発が重要である。当研究室にて変形菌 *Fuligo candida* より単離された新規天然物 Fuligocandin A (1), B (2) のうち 2 は、Fig. 2 に示すように、正常な末梢血单核球には毒性を示さず、患者由来の TRAIL 耐性成人 T 細胞白血病細胞/リンパ腫細胞 (adult T cell leukemia · lymphoma; ATLL 細胞) に対して TRAIL 耐性克服作用を示すを見いだしている。また 2 は TRAIL 耐性ヒト胃がん細胞株 (human gastric adenocarcinoma cells; AGS 細胞) にも活性を示す。近年、我々は Fuligocandin A (1), B (2) の全合成を達成し、高い光学純度にてこれらの誘導体を合成する改良合成法も確立した。川端らの開発した反応を用いて不斎4置換炭素を有する誘導体を含むミニライブラリーを構築した。その中で最も強い TRAIL 耐性克服作用を示した 5'-I Fuligocandin B (3)において放射性ヨウ素 <sup>125</sup>I でラベル化した誘導体を合成し *in vivo* 実験にてマウス体内動態を検討したところ、肝臓で代謝され胆汁排泄されることが明らかとなった。さらに TRAIL 耐性 AGS 細胞を腹部に移植したヌードマウスを用い 5'-<sup>125</sup>I Fuligocandin B (3\*) 体内動態を調べた

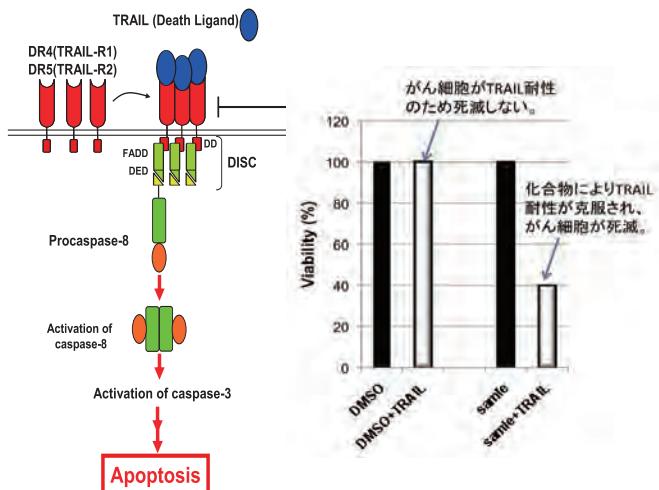


Fig 1. TRAIL 経路と TRAIL 耐性克服作用

Fig. 1A illustrates the TRAIL signaling pathway. TRAIL (Death Ligand) binds to DR4 (TRAIL-R1) and DR5 (TRAIL-R2) on the cell surface. This triggers a cascade involving FADD, DED, and DISC, leading to the activation of Procaspase-8 and then caspase-3, which results in Apoptosis.

Fig. 1B is a bar graph showing cell viability (%) for different treatments. The y-axis ranges from 0 to 120. The legend indicates: DMSO (100%), DMSO+TRAIL (~100%), Sanie (100%), and Sanie+TRAIL (~40%). An arrow points to the Sanie+TRAIL bar with the text 'がん細胞がTRAIL耐性のため死滅しない' (Cancer cells do not die because they are TRAIL-resistant). Another arrow points to the Sanie+TRAIL bar with the text '化合物によりTRAIL耐性が克服され、がん細胞が死滅' (The compound overcomes TRAIL resistance and causes cancer cell death).

ところ、がん組織での減少率は3時間後では6%であり、多くの臓器と比較して減少率が小さく、がん組織における滞留性の可能性を見出した(Fig. 3)。体内動態解析の結果を受け、がんへの集積性を向上させる分子とのハイブリッド化を構想し、設計を行った。アミンを末端に持つリンカーを種々の検討を経て5'-Br Fuligocandin Bの7位に導入し、エチレングリコール鎖を伸長した誘導体の合成を行った。得られた化合物についてTRAIL耐性克服作用の活性評価を行ったところ、7位から伸びる側鎖は直鎖状のものが適していることが判明した。続いてL-アルギニンメチルエステルをモデル基質として縮合の条件検討を行った。現在、京都大学化学研究所二木史郎先生より御供与頂いたオリゴペプチドを用いてがんに集積するD-アルギニンペプチドハイブリッドFuligocandin Bの合成を検討しており、担がんマウスにおけるTRAIL併用投与時のがん殺傷効果を検討する。

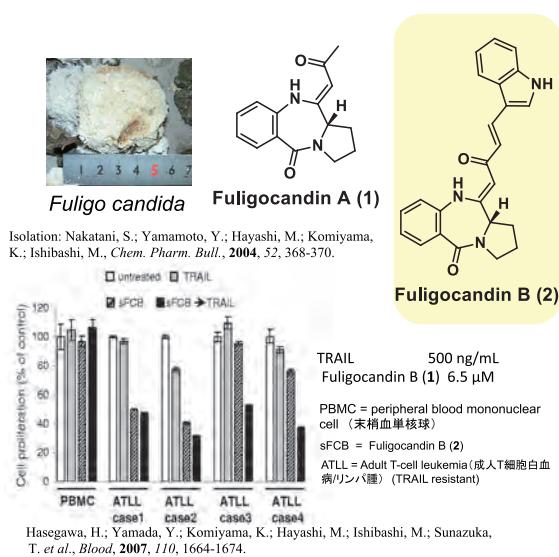


Fig. 2 Fuligocandin A (1), B (2)と TRAIL 耐性克服作用

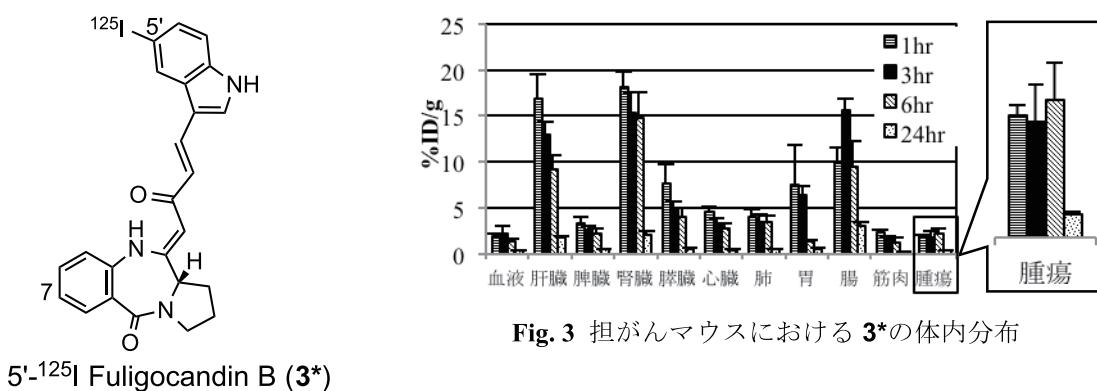


Fig. 3 担がんマウスにおける3\*の体内分布

## 【成果】

学会発表 (1) M. Arai, K. Komatsuzaki, H. Hanaoka, Y. Arano, and M. Ishibashi, "Synthesis and evaluation of <sup>125</sup>I Fuligocandin B derivatives targeting TRAIL resistant cancer cells", 3<sup>rd</sup> Junior International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia; November 22-25, 2013, Chiba, (The best poster presentation award 受賞); (2) 荒井緑, 小松崎一裕, 花岡宏史, 荒野泰, 石橋正己, "TRAIL 耐性がん細胞を標的とした <sup>125</sup>I 標識 Fuligocandin B 誘導体合成と活性評価", 第39回反応と合成の進歩シンポジウム(2013)福岡; (3) 荒井緑, 小松崎一裕, 花岡宏史, 荒野泰, 石橋正己, "TRAIL 耐性がん細胞を標的とした <sup>125</sup>I 標識 Fuligocandin B 誘導体合成と活性評価", 日本薬学会第133年会(2013)横浜.

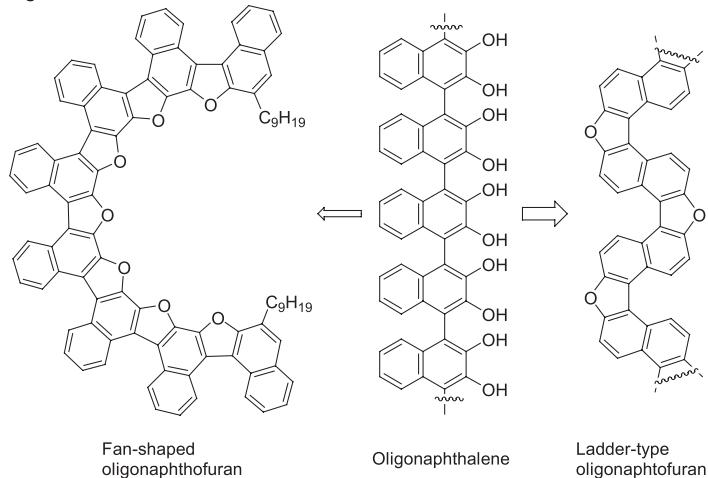
# 多架橋型オリゴナフタレン類の合成と機能

倉持 幸司・京都府立大学大学院生命環境科学研究科

## 【背景】

我々は 1,4-位連結オリゴナフタレン類の合成研究および機能化に取り組んでいる。最近はナフタレン環の連結軸を五員環（フラン環）に組み込んだ、扇状オリゴナフトフラン類を系統的に合成し、最大で 8 ユニットのナフタレン環が連結したオリゴナフトフラン類の構築を達成している。かかる背景の下、我々は縮環様式が異なるラダー型のオリゴナフトフラン類のボトムアップ型精密合成に取り組んだ（Figure 1）。本化合物も扇状ナフトフランと同様に、ペリ位の水素同士の立体反発で、 $\pi$  面は平面構造をとることが出来ない、三次元  $\pi$  系化合物である。

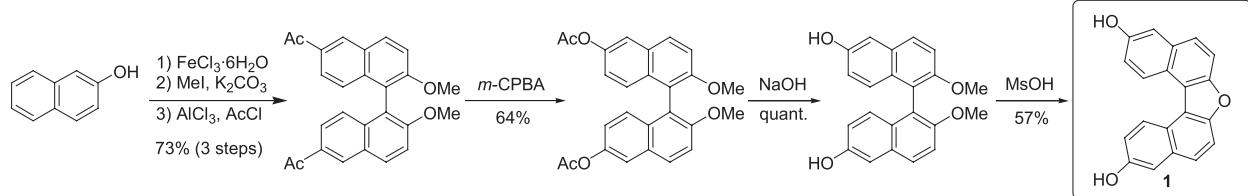
Figure 1.



## 【結果と考察】

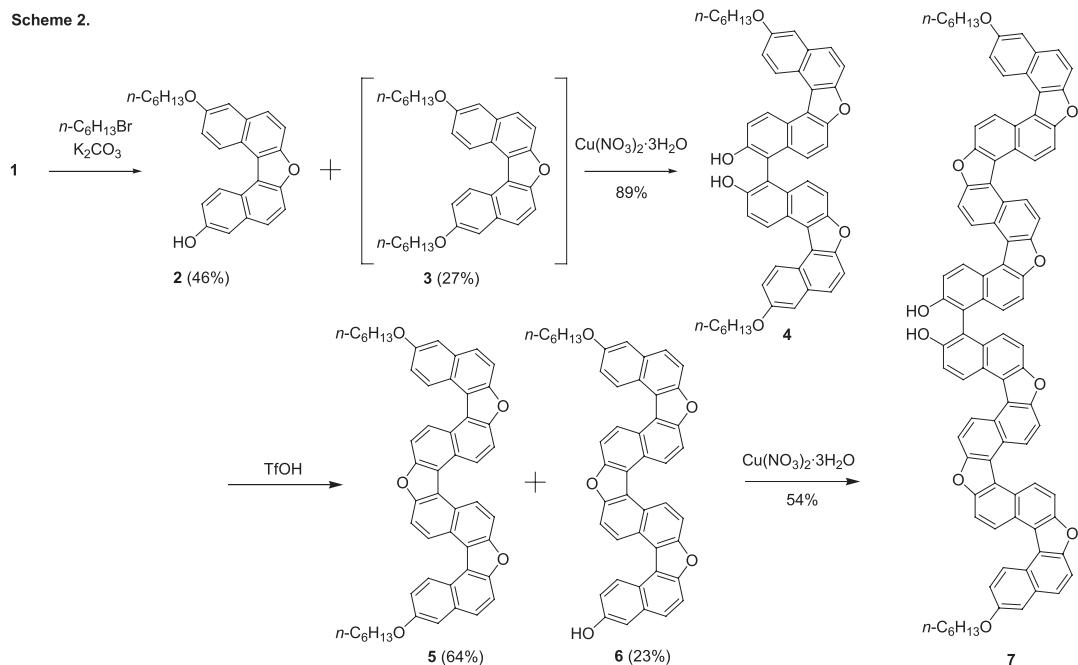
ラダー型オリゴナフトフランを合成するに際して、適切なシントンとして化合物 **1** を選択した。化合物 **1** はナフトールから Scheme 1 に示す経路で合成した。これまでのオリゴナフタレン/オリゴナフトフランの研究では、化合物の低溶解性が問題となることが多い、今回のラダー型の化合物では化合物 **1** 由来の二ヶ所の水酸基を、一方は二量化反応の足場として、他方は溶解性を付与する足場として利用しようと考えた。

Scheme 1.



鍵化合物 **1** からは、Scheme 2 に示す経路にて、高次のナフトフラン類の合成を進めた。すなわち、**1** の片方の水酸基に長鎖アルキル基を導入し、**2** へと導いた。次いで硝酸銅を用いた酸化的二量化により、化合物 **4** へと高収率で変換した。中央のフラン環の構築は、クロロベンゼン中、トリフルオロメタンスルホン酸で処理する事で行った。この際、目的の化合物 **5**（収率 62%）以外に、一方の可溶性基が外れた化合物 **6**（収率 23%）も得られた。最後に化合物 **6** を酸化的二量化に付し、4+4 型の化合物 **7** を収率 54% で得た。化合物 **7** の中央でのフラン環構築には現時点では成功しておらず、条件を精査している段階である（Scheme 2）。

Scheme 2.



次に化合物 **3, 4, 5, 7** を用いて、UV-vis スペクトルおよび蛍光スペクトル、蛍光量子収率を求めた (Figures 2 and 3)。

Figure 2. UV-vis spectra

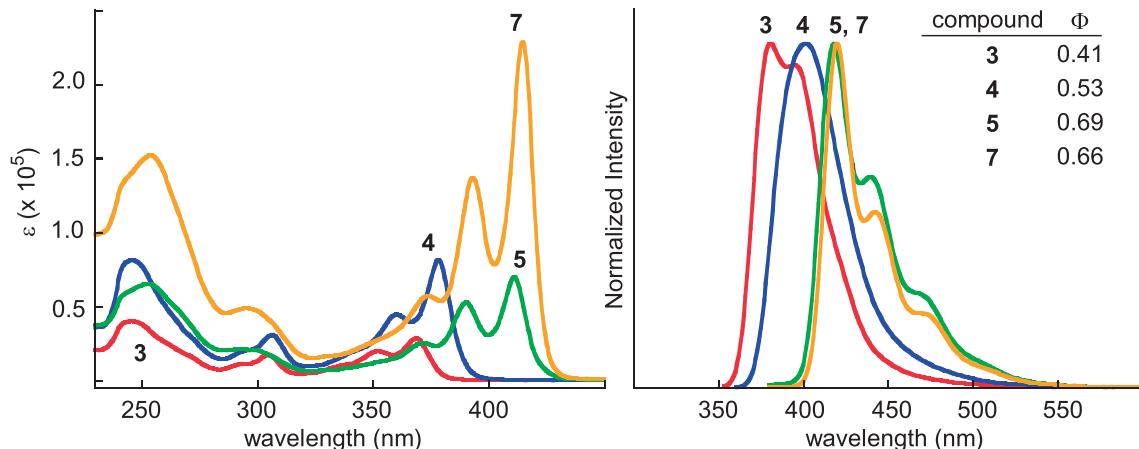
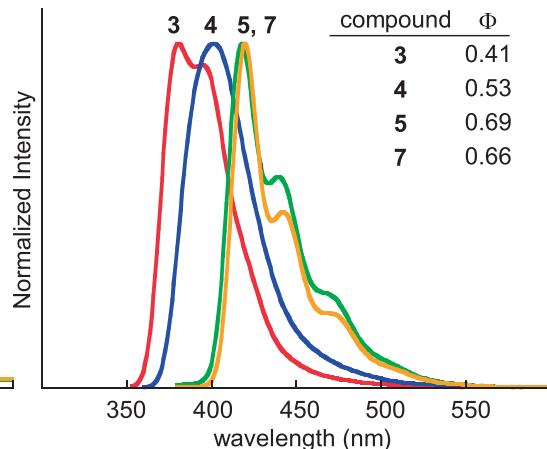
Figure 2. Conditions; chloroform,  $1.0 \times 10^{-5}$  M (**3, 4, and 5**),  $1.0 \times 10^{-6}$  M (**7**), temp = 25°C.Figure 3. Conditions; chloroform,  $1.0 \times 10^{-6}$  M, temp = 25°C, **3** ( $\lambda_{\text{ex}} = 339$  nm), **4** ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm), **5** and **7** ( $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm),

Figure 3. FL spectra



化合物 **3** とその二量体 **4** を比較すると吸収スペクトル、蛍光スペクトルとともに長波長シフトが認められた。一方、化合物 **5** と二量体 **7** では吸収スペクトルでは強度が約二倍となり、蛍光スペクトルにおいては、長波長シフトはほとんど観察されず、化合物の直交性を反映した結果となった。蛍光量子収率は 40~70%程度であり、中程度から高い量子収率を示した。

今後の展開として、現在合成を検討中の化合物 **7** からのフラン環構築を達成し、これら一連の化合物の物性評価を行い、これまでに合成してきた化合物群との比較を行いたい。

**【成果報告】** (1) 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 口頭発表 2013/3/28. (2) 第 7 回有機 π 電子系シンポジウム (群馬) ポスター発表 2013/12/13. (3) Nakanishi, K.; Sasamori, T.; Kuramochi, K.; Tokitoh, N.; Kawabata, T.; Tsubaki, K. *J. Org. Chem.* accepted.

## 植物表皮細胞の分化における制御機構の研究

富永 るみ・広島大学

### [目的]

シロイヌナズナの根毛細胞やトライコームなどの表皮細胞は、観察の容易さやそれに関する突然変異体の多さから細胞分化および細胞形態形成の研究対象として集中的に用いられてきた。その結果、表皮細胞の分化パターンや細胞極性の形成などが様々な遺伝子機能に基づき厳密に制御されていることが明らかとなっている。一方、個々の遺伝子機能がどの様に相互作用し、全体の制御機構として働くのかを理解するには、遺伝子転写制御ネットワークを中心とした、より詳細な分子生物学的な解析が必要である。本申請研究では、遺伝子発現調節の主役となる転写因子が細胞形態形成に関わる様々な遺伝子群の発現をどのように制御するのかを明らかにすることにより、植物表皮細胞における分化制御機構および形態形成制御機構を解明することを試みる。

### [研究計画]

平成 25 年 10 月より宮崎大学から広島大学へ異動後も、平成 24 年度に引き続きシロイヌナズナの根表皮および葉表皮の細胞分化パターン形成に関わる転写因子群の遺伝学的な相互作用解析を行う（研究代表者：富永るみ）。その結果をもとに、それら転写因子が細胞形態形成に関わる遺伝子群の発現をどのように制御しているのかを、逆遺伝学的手法を用いて解析する（共同研究者：青山卓史）。作製された形質転換シロイヌナズナ株、およびそれらと変異体との掛け合わせ株を適宜双方の大学で観察することにより遺伝学的解析を進める（研究代表者：富永るみ、共同研究者：青山卓史）。この間研究者がお互いに双方の大学に赴き、それぞれの研究の進展状況を確認し、研究の方向性に関して議論を行う。

### [実験方法]

我々は、シロイヌナズナの根毛形成を正に制御する *CAPRICE (CPO)* 遺伝子と、4つのファミリー遺伝子 (*TRY, ETC1, ETC2, CPL3*) の機能についてこれまで解析を進めてきた。*CPC* ファミリー遺伝子は、R3 タイプの MYB 転写因子をコードしており、根毛およびトライコーム形成制御において協調的に働いている。これまでの研究により、ファミリー遺伝子の翻訳産物が、分解速度が早いもの (*TRY, ETC2*) とそうでないもの (*CPC, ETC1, CPL3*) に分類されることを明らかにした。*TRY* と *ETC2* は、他の 3 つの *CPC* ファミリータンパク質には見られない長い C 末端配列を持っており、これらの配列がタンパク質分解に関与しているのではないかとの予想の下、*TRY* 及び *ETC2* に特異的な C 末端の部分を取り除いたコンストラクト (*CPC::TRYΔC* および *CPC::ETC2ΔC*) と、*CPC* や *ETC1* に、*TRY* の長い C 末端モチーフを付加したコンストラクト (*CPC::CPC:C* および *CPC::ETC1:C*) を作製し、シロイヌナズナに形質転換した。

## [実験結果]

シロイヌナズナ形質転換体の表現型を解析した結果、CPC::TRY $\Delta$ C 形質転換体の根毛数は、野生型や CPC::TRY 形質転換体に比べて顕著に増加していることが分かり、CPC::TRY $\Delta$ C では、TRY のタンパク質分解が起こっていないことを示唆するデータを得た(図 1)。現在他のコンストラクトの形質転換体についても順次解析を進めている。また、TRY 及び ETC2 タンパク質の根での早い分解が、ユビキチン化を経由したプロテアソームによる分解であるかどうかを明らかにするために、プロテアソーム阻害剤である MG132, MG115 を加えた培地で CPC::TRY:GFP または CPC::ETC2:GFP 形質転換体を育てる実験も試みている。これまでのところ、阻害剤による融合タンパク質の分解の抑制は観察されていない。現在、さらに条件を変えた実験を行っている。

## [考察]

表皮細胞分化制御機構の解明を目指し、シロイヌナズナの R3 タイプの MYB 転写因子をコードする CPC 遺伝子ファミリーを中心とした解析を進めている。

CPC ファミリータンパク質の分解速度に違いがあるのは、TRY 及び ETC2 の C 末端配列に分解促進機能があるためだと考え、C 末端改変 DNA コンストラクトを作製、シロイヌナズナへ形質転換した。その結果、TRY の C 末端を除くと、根毛数の増加がみられ、TRY タンパク質分解の阻害が示された。一方、ETC1 に TRY の C 末端を付加しても、根毛形成促進機能は阻害されなかった。このとき、アミノ酸付加によるタンパク質の構造が重要であるので、2つの遺伝子間にリンカーパー配列を付ける実験を検討している。同時に、タンパク質の安定性

等を、他の形質転換  
体表現型との比較、  
GFP の蛍光局在の観  
察、ウエスタンブ  
ロッティングなどに  
より確認したいと考  
える。

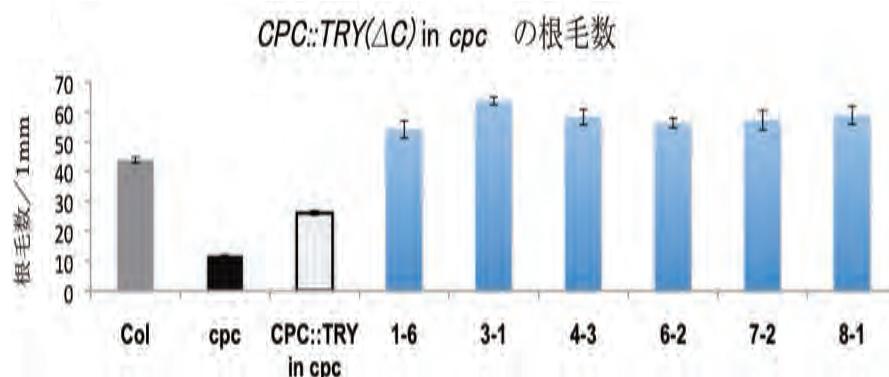


図 1、形質転換体の根毛数

CPC::TRY $\Delta$ C in cpc 形質転換体の根毛数は、野生型や cpc、CPC::TRY 形質転換体に比べて顕著に増加している。

## [発表論文等]

Kusano, H., Tominaga, R., Wada, T., Kato, M., and Aoyama, T. Phosphoinositide signaling in root hair tip growth. in "Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape" (ed., Fukuda, H.: Wiley) (in press)

## サイトカイニンに応答した転写因子 ARR1 の動態の研究

Jong-Myong Kim・理化学研究所環境資源科学研究センター

### [目的]

近年のゲノム DNA 研究における技術基盤の急速な発展により、真核生物の染色体における全遺伝子の発現状態を網羅的に解析することが可能になっている。モデル植物シロイスナズナにおいても様々な組織や生育条件を用いた遺伝子発現の網羅的な解析が進んでいる。このように、現象としての遺伝子発現の動態は詳細に明らかにされつつあるが、その制御の分子機構に関しては依然として個別遺伝子の解析が主流であり、染色体全体の遺伝子発現制御を包括的に解析した例は少ない。本申請研究では、主要な植物ホルモンであるサイトカイニンによるシグナル伝達の下流で転写調節を司る転写因子 ARR1 に焦点を当て、その染色体上の動態を染色体免疫沈降法（Chromosome Immuno-Precipitation: ChIP）により明らかにすることで、植物ホルモンシグナルによる染色体グローバルな発現制御の分子機構を明らかにする。

植物細胞の増殖・分化に深く関わるサイトカイニンは、植物固体や諸器官の形態や機能を制御する要素として必須である。また、様々な環境シグナルへの応答や環境ストレスに対する防御においても重要な働きをする。本研究では、高等植物の発生・器官分化および環境応答の研究分野におけるサイトカイニンシグナルの役割に関する知見を得、農作物など有用植物の開発につなげることも目的としている。

### [実験方法]

京都大学化学研究所において、ChIP 解析に用いる ARR1-YFP を発現する形質転換シロイスナズナを作成するとともに、それを用いて ARR1 のサイトカイニンシグナル応答時の植物細胞における分子動態の解析を行なった。理化学研究所において、作成された形質転換シロイスナズナを用いてサイトカイニンシグナル応答時における ARR1-YFP の ChIP 解析および遺伝子発現解析を行なった。その結果をもとに、代表的なサイトカイニン応答遺伝子と ARR1-YFP タンパク質の間の相互作用、およびそれら遺伝子の転写活性化状態を解析し、DNA マイクロアレーや次世代シーケンサーを用いた染色体グローバルな ARR1 の分子動態解明へとつなげるための基盤とした。

### [結果と考察]

ARR1-YFP を本来の ARR1 と同様に発現させるため、*ARR1* 遺伝子ゲノム DNA に YFP コード配列および myc タグ配列をつないだ融合遺伝子 *ARR1g-YFPmyc* を作製し、機能欠損型突然変異体 *arr1-1* に導入した。それら形質転換シロイスナズナの複数の株の中から、

*arr1-1* の表現型を相補し、ARR1-YFP 融合タンパク質を内在性 ARR1 と同様のパターンで安定的に発現する形質転換体株を選抜した。

そのシロイヌナズナ株を用い、抗 YFP 抗体による ChIP 解析を行った。その結果、ARR1-YFP が ARR1 標的遺伝子である *ARR6* 遺伝子のプロモーター領域に結合することを確認した。また、この結合は植物体へのサイトカイニン処理により強められることが明らかとなった。これにより、ARR1 の DNA 結合がサイトカイニンシグナルに応答することが初めて示された。また、ARR1-YFP はこれまでに知られている典型的なサイトカイニン応答遺伝子以外にも、アクチン遺伝子など、一般的に活性の高い細胞において発現される遺伝子の上流領域にも結合することが明らかとなった。このことは、ARR1 は植物染色体 DNA 上で予想以上に広範な領域に結合し、多くの遺伝子の転写制御に対して直接影響を与えるという可能性が示された。

[関連成果発表]

Kim J.M.

“Epigenetically regulated acetic acid biosynthesis confers plant drought tolerance”

Institute for Chemical Research International Symposium 2014,

March 10-12, 2014, Uji, JAPAN

## 合成細胞接着分子を利用した移植細胞延命化による損傷治癒の促進

西川 元也・京都大学大学院 薬学研究科

### 【目的】

近年の目覚ましい細胞培養・分化誘導技術の発展により、人工多能性幹細胞（iPS細胞）が樹立されるなど、細胞治療に向けた環境が整備されつつある。これと並行して、体外から細胞を投与することにより疾患を治療する「細胞治療」が次世代的な治療法として期待されている。しかしながら、治療を目的に移植された細胞の大半は、免疫細胞による攻撃を受ける、あるいは生着できずに足場依存的アポトーシスを起こして死滅することが明らかになっており、このことが細胞治療の効果を妨げている原因であると考えられる。皮膚創傷は、複数の細胞が創傷部位近傍に移行して増殖することや破壊された細胞外基質（extracellular matrix, ECM）の除去と新たなECMの再構成が、段階を踏んで順序良く繰り返されることで治癒する。創傷部位では、様々な成長因子やECMを放出する線維芽細胞や骨髄由来細胞が組織修復に重要な役割を果たすと考えられている。従って、自然治癒が遅い重篤な創傷や褥瘡に対しては、これら細胞を投与する治療法が効果的であることが報告されている。そこで本研究では、化学研究所 上杉志成教授らが開発した細胞間接着を促進する合成低分子化合物adhesamine誘導体を利用して、細胞間相互作用を制御することにより、移植細胞の生存を向上できるかを試みた。さらに、移植細胞の生存を向上することにより、創傷治癒の促進を目的とした細胞の治療効果の増強を試みた。

### 【実験方法】

試薬：Adhesamineおよびアルギニンーグリシンーアスパラギン酸（RGD）ペプチドをadhesamineに2分子結合したRGD2-adhesamineは京都大学化学研究所 上杉志成教授より分与していただいた。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

細胞：マウス線維芽細胞株 NIH3T3 およびマウス大動脈血管内皮細胞株 MAEC を用いた。定法に従い、ルシフェラーゼを安定に発現する NIH3T3/Luc 株を樹立した。

実験動物：ICRマウスおよび糖尿病 db/db マウス、その正常同腹子である db/m マウスを用いた。動物実験は、所属研究科の動物実験委員会の承認を得て行った。

骨髄由来細胞の単離：マウス大腿骨および脛骨から骨髄細胞を採取した。混入する赤血球を溶解後、遠心することで得られた細胞を骨髄由来細胞（BMDC）として用いた。

血管内皮細胞への細胞接着の評価：種々の濃度の adhesamine、RGD2-adhesamine を添加した NIH3T3/Luc または BMDC を単層培養した MAEC 細胞に添加し、24 時間後に接着した細胞数を評価した。

創傷モデルマウスへの細胞移植：麻酔下、除毛したマウス背部に、生検パンチを用いて背部両側に直径 8 mm の全層欠損皮膚創傷を作製した。Adhesamine あるいは RGD2-adhesamine を添加した BMDC を  $5 \times 10^5$  個/shot となるように調製し、創傷の上下 2か所に皮内注射した。経時的に創傷サイズを計測することで治療効果を評価した。

### 【実験結果】

Adhesamine 誘導体の細胞間接着に対する効果：未処置の NIH3T3/Luc 細胞と比較して、adhesamine または RGD2-adhesamine を添加した NIH3T3/Luc 細胞は、MAEC 細胞に高い細胞接着を示した。このとき、RGD2-adhesamine のほうがより低い濃度で同等の結果が得られることが示された。NIH3T3/Luc 細胞に代えて BMDC を用いた場合にも同様の結果が得られた。

マウス創傷部位に皮内注射した NIH3T3/Luc 細胞の生存率に及ぼす adhesamine 誘導体の影響：皮内注射された RGD2-adhesamine を添加した NIH3T3/Luc 細胞は、未処置の NIH3T3/Luc 細胞、または adhesamine 添加 NIH3T3/Luc 細胞よりも有意に高い生存率を示した。また、NIH3T3/Luc 細胞のマウス皮内での生存率は、RGD2-adhesamine の濃度に依存して高くなかった。

BMDC を利用したマウス創傷の治癒：BMDC を投与した群では、未処置群と比較して、マウスの創傷が小さくなる傾向が見られた。Adhesamine または RGD2-adhesamine を添加した BMDC 投与群では、BMDC 細胞投与群よりもさらにマウスの創傷が小さくなった。2型糖尿病モデル db/db マウスで同様の検討を行ったところ、正常マウスと比較して創傷治癒の大幅な遅延が認められた。このマウスにおいても、RGD2-adhesamine を添加した BMDC 投与により、最も高い創傷治癒促進効果が得られた。

### 【考察】

Adhesamine は、細胞表面に存在するヘパラン硫酸に選択的に結合することで生理的な接着を示す合成化合物である。RGD ペプチドは、インテグリンに高い親和性を有するフィブロネクチンの最小単位であり、RGD2-adhesamine は adhesamine の細胞接着効果を増強することを目的に開発された化合物である。RGD2-adhesamine 添加細胞でより高い細胞接着が認められたことから、ヘパラン硫酸に加えてインテグリンを介することで細胞接着が促進することが示唆された。マウスを用いた検討においても、投与部位における残存細胞数が adhesamine 誘導体の添加により増大したことから、adhesamine 誘導体はマウス体内における細胞接着を促進し、結果的に細胞の生存率を上昇したものと推察される。BMDC は創傷治癒促進効果を有することが報告されており、adhesamine 誘導体により生存期間が延長したことで、創傷治癒が加速されたものと考えられる。

### 【成果報告】

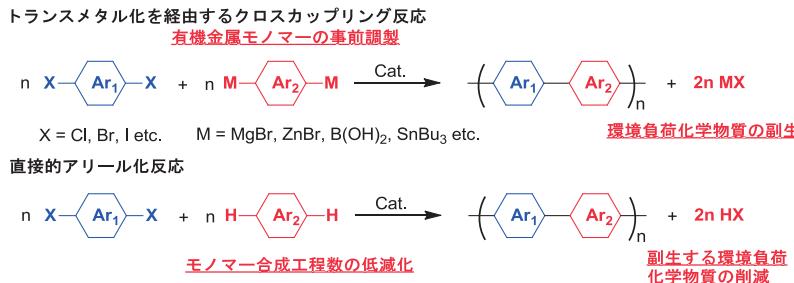
Takemoto N, et al. Small-Molecule-Induced Clustering of Heparan Sulfate Promotes Cell Adhesion. J. Am. Chem. Soc., 135: 11032-11039 (2013).

## 直接的アリール化反応を用いる効率的な $\pi$ 共役系高分子合成法の開発

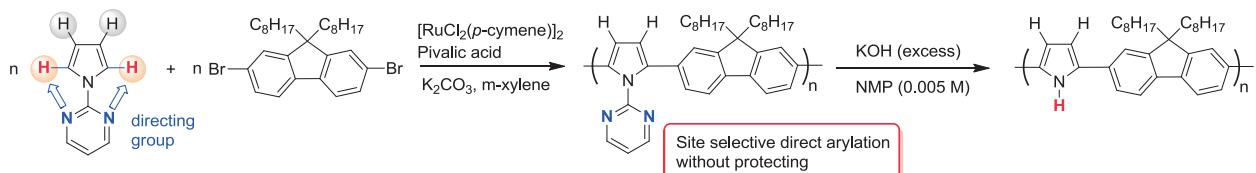
神原貴樹・筑波大学大学院数理物質科学研究科

**目的：**  $\pi$ 共役高分子は高分子半導体として機能することから、近年、有機EL素子や有機薄膜太陽電池などの光電子デバイスへの応用が期待され、国内外で広範な研究が進められている。一般に、それらの多くはジハロゲン化芳香族化合物と有機金属芳香族化合物をモノマーとして用い、トランスメタル化反応を経由するクロスカップリング反応によって合成されている。一方、近年、C-H結合を活性化して直接官能基とする反応が省資源・環境調和の観点から合成化学において大きな研究分野となっている。我々は、芳香族化合物のC-H結合を直接官能基化してカップリング反応を進行させる直接的アリール化反応(Direct arylation)に注目して $\pi$ 共役高分子を効率よく合成する手法の開発に取り組んでいる。この合成法では、モノマーとなる有機金属試薬の事前調製を必要としないことから、合成過程における原子効率の向上や環境負荷化学物質の削減、安全衛生面への配慮などの点で優位性を持ち、大きな可能性を秘めている。

本研究では、この直接的アリール化反応に注目し、高効率な触媒設計について多くの研究実績をあげている京大化研の小澤文幸教授との共同研究により、実用性に優れた $\pi$ 共役高分子を効率よく合成する手法を開発することを目的とした。



**結果と考察：** 昨年度までの研究では、種々の芳香族モノマーの重合を検討し、この重合の適用性の拡張に努めた。しかし、芳香族モノマーは一般にC-H結合が多数存在し、直接的アリール化反応ではそれらがいずれも反応点となりうることから、望まない分岐構造や架橋構造の生成が懸念される。そこで、指向性メタル化基(directing metalation group: DMG)を組み込んだ芳香族モノマーを利用することにより、特定位置のC-H結合で効率よく反応が進行する重縮合(site selective polycondensation)について検討した。1-位にDMGを導入したピロール誘導体では、オルトメタル化反応を経由して $\alpha$ 位での直接的アリール化反応が効率よく進行する。この反応を重縮合に適



用して最適化することで $\beta$ 位での副反応を抑制し、結合位置が高度に制御された $\pi$ 共役高分子を得た。さらに重合後にDMGの脱離反応を行い、立体障害の緩和による主鎖の共役長の伸長を確認した。

Table 1 Results of polycondensation, elemental analysis, and ICP-AES of the polymers

Polymer	Bond formation	Heating method	$M_n^a$	Br (%) <sup>b</sup>	P (ppm) <sup>c</sup>	Pd (ppm) <sup>c</sup>
<b>H-PEDOTF</b>	Direct arylation	Microwave heating	147 000	0	nd <sup>c</sup>	1590
<b>L-PEDOTF</b>	Direct arylation	Conduction heating	47 500	0.34	nd <sup>c</sup>	2300
<b>S-PEDOTF</b>	Suzuki coupling	Conduction heating	17 100	0.08	470	4390

<sup>a</sup> Estimated by GPC calibrated on polystyrene standards <sup>b</sup> Residual amount of Br in the polymers from elemental analysis <sup>c</sup> Residual amount of the elements from the ICP-AES measurements <sup>d</sup> Not detected

一方、 $\pi$ 共役高分子を有機デバイスに実装する際、ポリマー中に残存する不純物が高分子半導体の欠陥となることが問題視されている。そこで、重合時にマイクロ波照射加熱を利用して反応の効率化を図った。その結果、30分という短時間でこれまでより高分子量のポリマーが得られることがわかった。さらに、簡便な精製操作で高い純度の高分子が得られることを元素分析や微量分析から確認した(表1)。次に、得られたポリマーを有機薄膜太陽電池に実装してデバイス特性を比較した。その結果、同じ化学構造のポリマーでも、高分子量で高純度なポリマーでは高い光電変換効率を示した(図1)。これらの結果から、直接的アリール化反応の特長を充分に活かすことで、この重合法が有機光電子デバイス素材の実用的な製造プロセスに繋がる重要な要素技術となることを明らかにした。

## 研究成果：

Wei Lu, Junpei Kuwabara, and Takaki Kanbara, "Synthesis of

$\pi$ -Conjugated Polymer Consisting of Pyrrole and Fluorene Units by Ru-Catalyzed Site-Selective Direct Arylation Polycondensation", *Macromol. Rapid Commun.*, **34**, 1151-1156 (2013).

Seong Jib Choi, Junpei Kuwabara, and Takaki Kanbara, "Microwave-Assisted Polycondensation via Direct Arylation of 3,4-Ethylenedioxythiophene with 9,9-Dioctyl-2,7-dibromofluorene", *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **1**, 878-883 (2013).

Junpei Kuwabara, Takeshi Yasuda, Seong Jib Choi, Wei Lu, Koutarou Yamazaki, Shigehiro Kagaya, Liyuan Han, and Takaki Kanbara, "Direct Arylation Polycondensation: A Promising Method for the Synthesis of Highly Pure, High-Molecular-Weight Conjugated Polymers Needed for Improving the Performance of Organic Photovoltaics", *Adv. Funct. Mater.*, DOI: 10.1002/adfm.201302851, (2014).

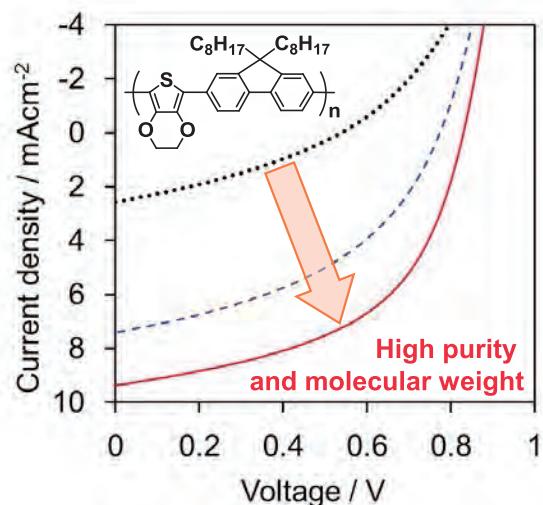


図1 合成したポリマーを実装した有機薄膜太陽電池の特性評価：分子量・純度が向上するに従って、変換効率も向上。

原子層制御蒸着法で作製したホイスラー合金  $\text{Co}_2\text{MnSn}$  を  
強磁性電極とする磁気トンネル接合素子による  
トンネル磁気抵抗効果と局所磁性に関する研究

田中雅章・名古屋工業大学

### 目的

本共同研究は、高いスピノン分極率を有する Co 基ホイスラー合金を強磁性電極層に用いた磁気トンネル接合(MTJ)素子の界面磁性や局所磁性とトンネル磁気抵抗(TMR)効果との関係を明らかにして、高い TMR 比を有する Co 基ホイスラー合金型の MTJ 素子の作製法を確立することを目的としている。これまで  $\text{Co}_2\text{MnSn}$  よりもマイノリティースピノンのバンドギャップが大きいとされる  $\text{Co}_2\text{FeGe}$  を用いて MTJ 素子を作製し、その TMR 効果を調べた。 $\text{Co}_2\text{FeGe}$  を用いた MTJ 素子では、他のホイスラー合金系の MTJ 素子と同様に温度上昇とともに TMR 効果が大きく劣化することがわかった。そこで本年度は Co 基ホイスラー合金の MTJ 素子の TMR 効果で見られる悪い温度依存性と、 $\text{MgO}$  バリア層に接するホイスラー合金界面における磁気状態の関係を調べた。本研究では Fe 同位体中の  $^{57}\text{Fe}$  のみが測定対象となるメスバウアーフィルタ光法を利用した。

### 実験方法

Co を 1 原子層、Fe を半原子層、Ge を半原子層と交互に成膜する原子層交互蒸着法を用いて  $\text{MgO}(001)$  基板上に基板温度 300°C で  $\text{Co}_2\text{FeGe}$  薄膜を作製した。参照用試料として  $^{57}\text{Fe}$  が膜全体に存在する試料を作製した。 $^{57}\text{Fe}$  メスバウアーフィルタ光法で  $\text{MgO}$  との界面の局所磁性のみが評価できる試料として、 $\text{MgO}$  と接する  $\text{Co}_2\text{FeGe}$  層の半原子層の Fe 原子のみに  $^{57}\text{Fe}$  を、残りの Fe 原子には  $^{56}\text{Fe}$  を用いた界面評価試料を作製した。それぞれの試料について室温で  $^{57}\text{Fe}$  原子核に対する内部転換電子メスバウアーフィルタ光法による評価を行った。

### 実験結果・考察

Fig. 1 に、(a)層内部の磁性を見るための参照用の  $\text{Co}_2\text{FeGe}$  単層膜と(b)界面測定用の  $\text{Co}_2\text{FeGe}/\text{MgO}$  積層膜の室温における  $^{57}\text{Fe}$  メスバウアースペクトルを、Fig. 2 にメスバウアースペクトルから解析を行った  $^{57}\text{Fe}$  周辺の内部磁場の分布を示す。メスバウアーフィルタ測定の結果から  $\text{MgO}$  との界面では Fe 原子には酸化等の状態変化はなく、参照用試料の  $\text{Co}_2\text{FeGe}$  全体の磁気特性と比較して大きな内部磁場の低下はない。Co 基ホイス

ラ一合金を用いたMTJ素子では界面は室温まで磁化の大きな強磁性状態を保っていることから、顕著な温度依存性は界面の磁性の大きな温度依存性を反映したものではないことが示唆される。

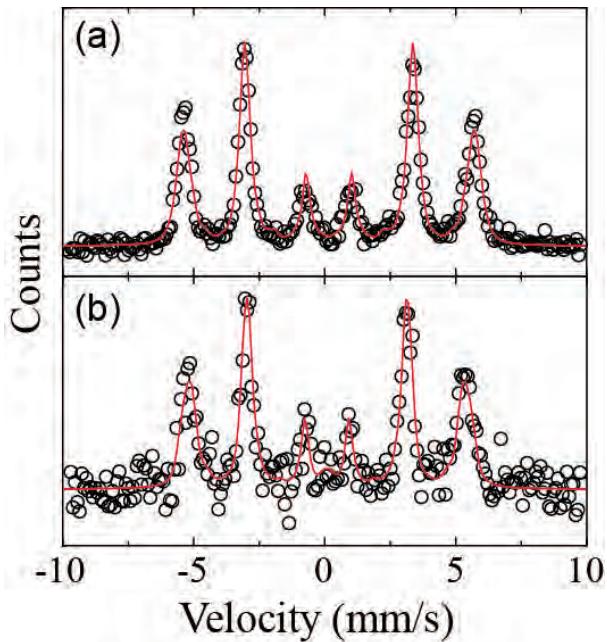


Fig. 1 Mössbauer spectra of (a) a  $\text{Co}_2\text{FeGe}$  single film and (b) a  $\text{Co}_2\text{FeGe}/\text{MgO}$  layered structure at room temperature.

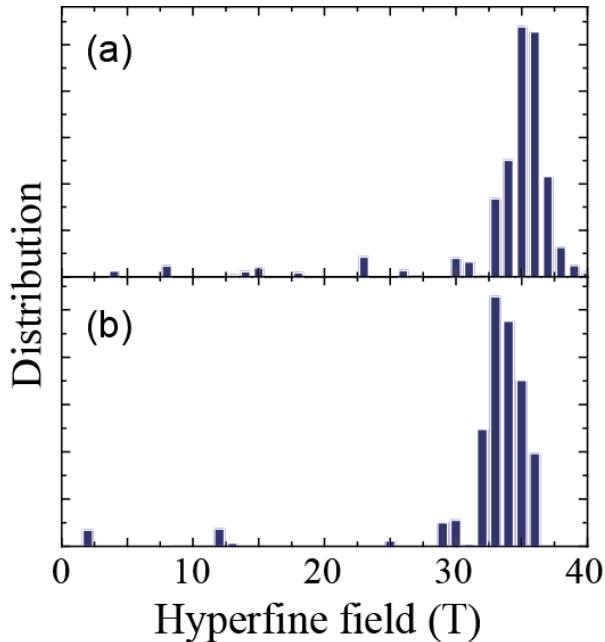


Fig. 2 Hyperfine distributions of (a) a  $\text{Co}_2\text{FeGe}$  single film and (b) a  $\text{Co}_2\text{FeGe}/\text{MgO}$  layered structure at room temperature.

## 成果報告

### <学会発表>

- ◆ M. A. Tanaka, A. Murata, D. Maezaki, T. Ishii, K. Mibu, R. Hiramatsu, T. Ono, “Local magnetism and tunnel magnetoresistance of  $\text{Co}_2\text{FeGe}$  Heusler alloy films prepared by atomically controlled alternate deposition”, The IEEE 8th International Symposium on Metallic Multilayers, Kyoto, Japan, 2013年5月22日
- ◆ 中川浩次, 奈木南, 田中雅章, 平松亮, 小野輝男, 壬生攻 「垂直磁気異方性を持つ $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ 薄膜を用いたトンネル型スピンドルフィルター素子の作製と評価」 日本物理学会2013年秋季大会, 徳島大学, 2013年9月25日
- ◆ 前崎大輔, 大久保篤伺, 村田敦, 石井友章, 田中雅章, 平松亮, 小野輝男, 壬生攻 「原子層制御交互蒸着法で作製した $\text{Co}_2\text{FeGe}$ ホイスラー合金薄膜の界面磁性とトンネル磁気抵抗効果の評価」 日本物理学会2013年秋季大会, 徳島大学, 2013年9月25日

## フェリ磁性スピネル超薄膜の逆位相境界の制御

長浜太郎・北海道大学工学研究院

### 目的

マグнетタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) をはじめとするスピネルフェライトはフェリ磁性体であり、約 800K という高い磁気転移点を持つ材料である。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  は室温で金属的な電気伝導を示し、100%のスピノン偏極率を持つハーフメタル特性を示すと期待されている。また、 $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  や  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  はフェリ磁性絶縁体であり、スピノン偏極トンネリングを示すスピノンフィルター材料であることが示されている。このようにスピネルフェライトは多様な磁気的・電気的性質を示し、有望なスピントロニクス材料として期待されている。一方、デバイス的な観点からは大きな磁気抵抗効果や高い磁界感度などが求められる。これらの視点からみると、現在報告されているスピネルフェライトを用いたデバイスは、いまだいくつかの問題点を抱えている。例えば、スピネル薄膜を超薄膜化すると磁界感度が大きく低下し、磁気的に飽和するためには大きな磁界が必要となる。また、磁気抵抗効果は磁気構造を反映するため、金属系のような大きな磁気抵抗効果を観測するに至っていない。本研究の目的は、高品質スピネルフェライト超薄膜を作製し、作製条件の最適化による磁気特性の大幅な改善を目指すことである。

### 実験方法

スピネルフェライトは、格子定数が約 0.84nm で MgO 基板へのエピタキシャル成長に適している。そこで、MgO(100), MgO(110) 基板を用い、スピネルフェライトのエピタキシャル成長を行った。また (111) 方向に関しては  $\text{Al}_2\text{O}_3-\text{c}$  面基板を用いて成長を行った。作製したのは  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoCr}_2\text{O}_4$  超薄膜またはその多層膜である。成膜は反応性分子線エピタキシー法、基板温度は 300~600°C、また必要に応じて熱処理を行った。酸化物製膜中に酸素分子ガス、あるいは酸素ラジカルを  $4 \times 10^{-4}$  Pa 導入し、反応性蒸着とした。構造評価として、エピタキシャル成長の様子を高速反射電子線回折 (RHEED) により確認し、表面形状を AFM にて観察した。さらに TEM による断面観察も行った。また、磁気特性は振動試料型磁束計 (VSM) および磁気光学カーポロードにて評価し、磁気抵抗効果は PPMS を用いた。

### 実験結果・考察

RHEED などから、全てのスピネル膜がエピタキシャル成長していることが確認され、製膜後熱処理により一部の膜では結晶性・表面平坦性の改善が見られた。また、多層化しても RHEED 観察からはスピネル構造を示すストライクパターンが得られ、良好なエピタキシャル成長が観察された。図 1 に MgO(110)/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (60nm)/ $\text{CoCr}_2\text{O}_4$ (3nm)/Fe(10nm)

断面の高分解能 TEM 写真を示す。下部の  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  が非常にきれいなエピタキシャル成長していることがわかる。また、 $\text{CoCr}_2\text{O}_4$  との界面も原子層レベルで平坦であり、そのエピタキシャル成長は回折像から確認された。 $\text{CoCr}_2\text{O}_4$  層についてはランダムスピネル構造になっている可能性がある。

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  は室温で金属伝導性を示す。そこで、エピタキシャル  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  膜に関して磁気伝導特性の評価を行い、磁化過程との関係や逆位相境界との関連について調べた。用いた膜は  $\text{Fe}_3\text{O}_4(100)$  膜と  $\text{Fe}_3\text{O}_4(111)$  膜である。図 2 に室温での磁気抵抗 (MagnetoResistance:MR) 曲線を示す。測定温度は室温、外部磁界は膜面に垂直方向に印加した。測定は京大化研小野教授グループの協力で行った。全体的には磁界中で抵抗が減少する負の MR が得られたが、弱磁界領域では大きな結晶方位依存性が観測された。 $\text{Fe}_3\text{O}_4(100)$  膜で 1 T 程度までは磁界中で抵抗が増大し、比較的鋭いピーク構造を示した後で抵抗減少に転じている。一方 (111) 膜では抵抗値は磁界に対して単調減少した。また MR 比は 5 T 印加時に 1 % 強と比較的小さい値であった。磁性体薄膜では、磁性体中の磁気モーメントと電流方向の相対的な配置に依存する磁気抵抗効果 (異方性磁気抵抗効果) が観測されるが、(100) 薄膜の磁気抵抗曲線に見られる挙動は  $\text{Fe}_3\text{O}_4(100)$  の磁化過程と関連しているように見える。このような結晶方位依存性が何に起因するのか詳細はまだわかつていない。スピネル中の構造欠陥である逆位相境界が原因となっている可能性があるが、現在研究を進めている。

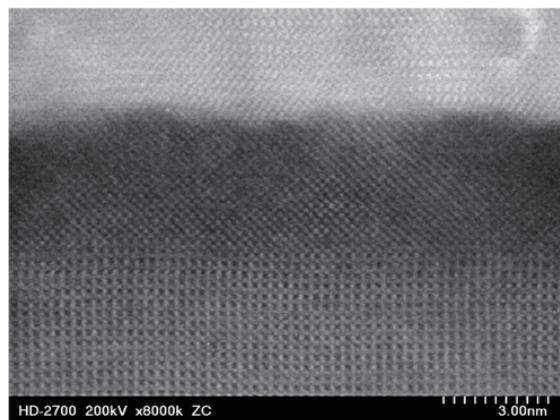


図 1  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CoCr}_2\text{O}_4/\text{Fe}$  の高解像度断面 TEM 像

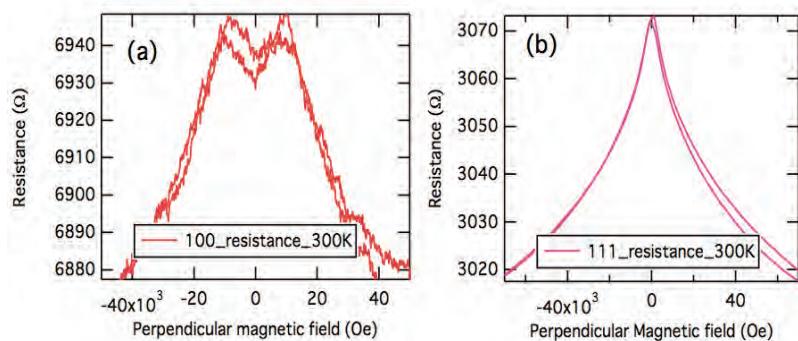


図 2  $\text{Fe}_3\text{O}_4(60\text{nm})$  の磁気抵抗曲線。(a) $\text{Fe}_3\text{O}_4(100)$ , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4(111)$

## 成果報告

本研究の一部は第 37 回日本磁気学会学術講演会 5aC2「 $\text{CoCr}_2\text{O}_4$  スピネルを用いたトンネル磁気抵抗素子の作製」および国際学会 MMM2013 GU-09 “Magnetic properties of epitaxial  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  with various crystal orientations” で発表された。

# 1 nm 凹凸周期構造を利用したナノ粒子の規則配列化 と新奇光電子物性発現

尾上 順・東京工業大学

## 【目的】

申請者は、これまでフラー・レン、ナノチューブ、グラフェンとは幾何学的に異なり、負のガウス曲率をもつ1次元凹凸周期構造の金属ナノカーボン（エキゾチックナノカーボン）を創成し、最近電子物性に対する幾何曲率効果を理論予測し光電子分光により実証した。

本申請では、1 nm の凹凸周期構造に沿った分極を利用して、ナノ粒子を規則配列させたハイブリッド構造を創製し、環境・エネルギー分野への応用を目的に光電子物性を調べることを目的に、今年度は基板上に作製した1次元凹凸周期エキゾチックナノカーボン薄膜の光応答特性を調べた。

## 【実験方法】

四探針測定装置とゲートバルブを介して繋がっている超高真空（UHV）蒸着装置（到達真空度： $10^{-7}$  Pa）で、Kセルを用いて  $C_{60}$ （純度： $> 99.98\%$ ）を 673K で加熱蒸発させ、室温のガラス基板（22.8 mm × 12.8 mm）上に 100 分間堆積させ、膜厚 1000 nm の  $C_{60}$  薄膜を作製した後、同じチャンバー内で約 220 時間電子線照射（加速電圧：3.00 kV、エミッション電流：1.5 mA）を照射し、1次元  $C_{60}$  ポリマー膜を作製した。マグネットフィードスルーを用いて、ポリマー膜を UHV 四探針測定装置（到達真空度： $10^{-6}$  Pa）に入れ、1次元  $C_{60}$  ポリマー膜の暗状態および明状態（40 mW/cm<sup>2</sup>）での抵抗率を測定した（探針間距離：125 μm）。光源には、太陽光シミュレーター（分光計器 OTENTO-SUN III）を用いた。測定場所ごとに明・暗状態を 10 回繰り返し、その抵抗値を測定した。光照射による基板温度変化は、± 0.5 K であり、探針の熱膨張（± 0.2 μm）による測定値への影響は無視できる。

## 【結果と考察】

*In situ* での1次元  $C_{60}$  ポリマー膜の抵抗の光応答特性を図 1 に示す。縦軸は明状態と暗状態で測定した膜のシート抵抗値の比を、横軸は測定点でのシート抵抗値を、それぞれ表す。図 1 に示すように、薄膜の場所に関わらず、どの場所においても光照射すると膜の抵抗値が減少する結果が得られた。また、シート抵抗が低くなるにしたがって、光照射による抵抗の減少も大きくなることがわかる。最大平均 35% 減少した。

光照射によって抵抗が減少した理由として、1次元ポリマー間での電子移動によるキャリア（電子と正孔）発生によることが考えられる。シート抵抗が低い領域では、発生したキャリアが比較的スムーズに探針まで移動するため光応答特性が大きいのに対して、シート抵

抗の高い領域では、発生したキャリアが探針まで届く前に再結合して消滅する確率が高くなるため光応答性が小さい。

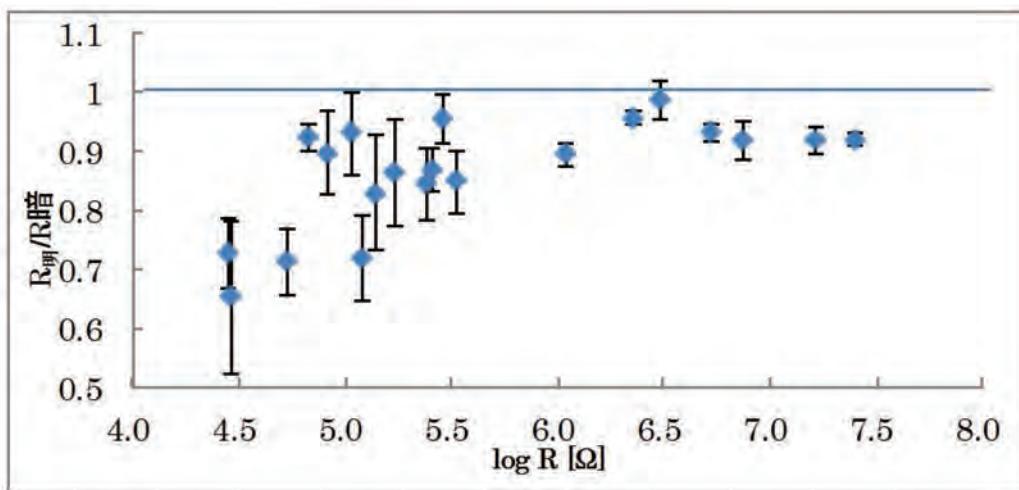


図 1. *In situ* 1 次元 C<sub>60</sub> ポリマー膜の抵抗の光応答

光励起キャリア発生を間接的に確かめる目的で、大気暴露による酸素に対する光応答性を調べた。酸素はとくに電子捕獲能に優れており、キャリアのクエンチャーとして働く。図 2 に 1 時間大気暴露した後、UHV 四探針測定装置で測定した光応答特性を示す。

抵抗の低い領域では、酸素による電子捕獲が大きく影響していることがわかる。高い領域では、酸素による電子捕獲よりも膜抵抗が律速であるため、大気暴露の影響はほとんどない。

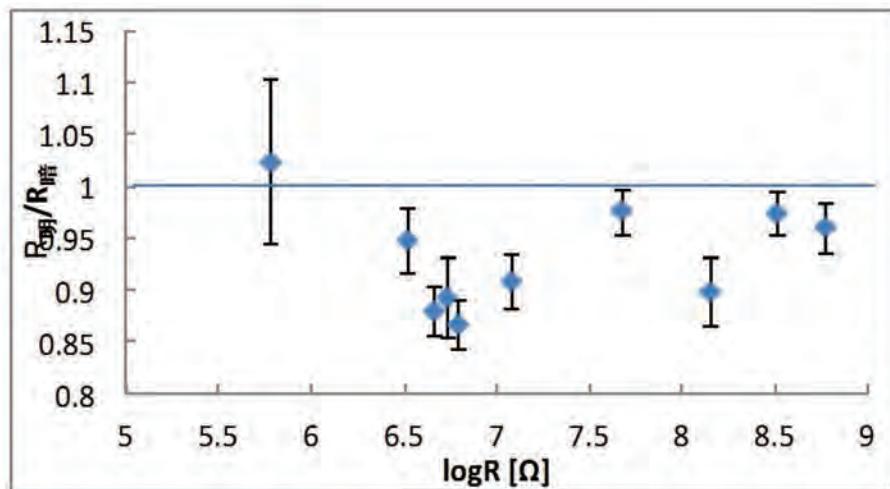


図 2 大気暴露した 1 次元 C<sub>60</sub> ポリマー膜の抵抗の光応答

今後、ポリマー膜の光応答性の波長依存性を調べる予定である。

## 真空中四光波混合の検知へ向けた測定手法の開発

氏名・所属 本間謙輔・広島大学大学院理学研究科

### 背景と目的

物質とは、概念的に背後の真空から分離される何かである。しかし、量子的な効果を考慮すると、真空中自体もまたかも豊かな物質的様相を示すと期待される。そのような真空の量子的側面を、真空を伝播する電磁場に起る非線形現象と捉えることは原理的には可能である。物質は高次の感受率をもち、光と顕著な非線形相互作用を示す。代表的な現象は4光波混合である。本研究は、真空を対象にこの現象をとらえる事を最終目標に、測定手法の基盤を築くことを目指す。真空が持ち得る非線形効果の観測が可能になると、軽い暗黒物質や暗黒エネルギーといった宇宙論的課題が、実験室でも議論し得る。この場合、物質中の原子の励起の役割を、軽い質量の未知場の共鳴状態が担うことになる。しかし、これら真空の量子的効果は極めて微弱であり、それを検証するには、極めて高強度のレーザー場が必要不可欠となる。さらに、地上で人工的に作り出せる真空状態には、必ず残余原子が含まれ、それらを介した混合過程もレーザー強度増大に伴い顕著となってくる。したがって、極少数原子の光混合過程を定量的に理解し、それらを抑制した上で初めて、真空の非線形効果の議論が可能となる。本研究では、高強度レーザー場を真空中で集光する際に生成される、残余ガスからの微弱な四光波混合による高調波を検知し得るシステムを開発し、それらを最大限抑制する手法を開拓することを目的とする。本格的に宇宙論的課題に達する感度を得るためにには、さらに高強度のレーザー場が必須となることが予測される。Ti:Saベースの10PWクラスのレーザーシステムが欧州連合国内に完成予定であることを背景として、Ti:Saベースのレーザー場で行う本研究は、その世界初のパイロット実験と位置付けられる。ここで開発される四光波混合の測定系および残余原子からのバックグラウンドの抑制手法の開拓は、この意味で大きな意義を有する。

### 方法

レーザーのコヒーレント光は、同一運動量に縮退した状態の、異なった個数状態の線形結合として理解される。単一波長のレーザー光を集光すると、軽い未知場の生成かつ自発崩壊の確率は入射レーザー光強度の2乗に比例する。これは、コヒーレント状態から2光子を消滅させる際の自由度に起因する。一方、生成された未知場が2光子へ崩壊する際、別の運動量状態にあるコヒーレント光が背景に存在すると、その運動量状態へ崩壊が誘導される。この場合、崩壊確率がその誘導場の強度に比例することになる。そこで、生成用に $1\omega$ のレーザー光を用意し、崩壊用に $u\omega$ の背景レーザー場を用意しておくと、エネルギー・運動量の保存則から $1\omega + 1\omega \rightarrow \text{共鳴} \rightarrow u\omega + (2-u)\omega$ という反応を介して、崩壊時に一方の光子は $(2-u)\omega$ というエネルギーを満たすことになる。つまり、あらかじめ2波長のレーザーを混在させておくことにより、真空中でパラメトリックに新たな光波を生成すること（真空中四光波混合）が可能になる。この場合、生成場と崩壊誘導場の強度を同程度とすると、未知場の生成かつ崩壊の確率は、それらレーザー強度の3乗に比例することになる。共同研究者らが運営するTi:Saレーザーシステムでは、 $\omega$ として $800 \pm 50\text{nm}$ を使用し、 $u\omega$ としてTi:Sa用の增幅用光源からの $1064\text{nm}$ を用いる。この場合、物理信号となる $(2-u)\omega$ の波長域は、 $640\text{nm}$ を中心として $580\sim709\text{ nm}$ となる。

25年度は、24年度中に構築した信号光分離・検知システムを用いて、以下に概説するように原子起因の四光波生成量を低強度のレーザーを用いて定量化することを課題と位置付けた。

### 実験実施と結果

25年度中に、総合して10週間程度の実験を実施した。その結果、生成用レーザー(0.1mJ/160fs @ 800nm)と誘導用レーザー(10mJ/10ns @ 1064nm)を大気中で混合し、原子起因の四光波混合の信号光子を非相互作用光から分離後、単一光子感度で波長と偏光状態を指定しながら検出することに成功した。同時に、信号光量の真空容器内圧力依存性を実測することにより、圧力に依存しない光学素子起因の信号光と残余ガス起因の信号光を、分離・同定することにも成功した。これらの実測データに基づき、これまでに基礎データが揃っていない生成・誘導レーザーの直線偏光が互いに直交している場合の原子起因3次分極係数の決定が、我々の構築したシステムで可能となる展望が得られた。

### 成果報告

#### 機関誌寄稿 :

本間謙輔、長谷部孝、久米一輝、阪部周二、橋田昌樹、

高エネルギーニュース Vol.32 No.3 2013/10.11.12

#### 国内学会発表 :

「真空量子光学 - 軽い暗黒物質/暗黒エネルギー源候補の地上探索へ向けて -」

本間謙輔、長谷部孝、久米一輝、大谷一人、時田茂樹、橋田昌樹、阪部周二、

日本物理学会第68回年次大会、誠25年3月28日

「真空中四光波混合測定手法」

長谷部孝、本間謙輔、久米一輝、大谷一人、時田茂樹、橋田昌樹、阪部周二、

日本物理学会第68回年次大会、誠25年3月28日

「真空中四光波混合測定の試み」

久米一輝、本間謙輔、長谷部孝、大谷一人、時田茂樹、橋田昌樹、阪部周二、

日本物理学会第68回年次大会、誠25年3月28日

「真空中四光波混合による sub-eV 中性ボゾンの共鳴探索」

#### 国際会議発表 :

**Low energy stimulated photon-photon collider toward laboratory search for dark fields,**

K. Homma, From Fundamental Physics to Societal Applications at the Embassy of France-Tokyo -Japan (2013.11.19)

**Prospect to search for sub-eV dark fields with high-intensity and high-energy lasers,**

K. Homma, 3<sup>rd</sup> IZEST meeting – Livermore –USA (2013.07.17)

**Prospect to search for sub-eV dark fields with high-intensity and high-energy lasers,**

K. Homma, 22th International Laser Physics Workshop (2013.07.15)

**Required Laser System toward Laboratory Search for Low-mass Dark Matter and Dark Energy Candidates,**

K. Homma, ICAN Conference, CERN Geveva Switzerland (2013.06.27)

# Intense THz emission for nonlinear interaction physics

Takeshi Nagashima (*Institute of Laser Engineering, Osaka University*)

## 1. Introduction

To explore the potential of future intense THz sources for nonlinear science in solid materials, THz radiation from plasmas produced by intense femtosecond laser pulses has been studied. Especially gas plasmas are featured by convenience and replenishment [1][2]. A number of artificial schemes such as electric field biasing of the plasma and frequency-mixing methods have been employed to enhance the energy of THz radiation from gas plasmas. By using a frequency-mixing scheme, THz pulses with energy up to 570 nJ at frequencies below 5.5 THz has been reported [3]. Furthermore, Rodriguez, *et al.* [4] have shown that, at laser energies higher than 4  $\mu$ J, stronger THz radiation is generated from argon gas than from air, neon, krypton, and xenon. Our preliminary study indicates that argon clusters are more suitable for generating strong THz radiation than gases because of higher absorption [5]. Additionally, the angular distribution of THz emission from cluster plasma has been measured and reported in [6]. The radially polarized THz radiation with conical angular distribution in forward and backward directions has been observed, accompanying by elliptically polarized THz radiation in forward on the laser direction. In this study clusters are irradiated with intense laser with various pulse durations in the laser propagation direction. We have found that THz power is enhanced by optimizing laser pulse duration.

## 2. Experiments

In the experiments, a T<sup>6</sup> laser system (Ti:sapphire chirped-pulse amplification system) operating with a central wavelength of 810 nm and pulse energy of 10 mJ is used. The laser pulse duration is controlled by changing the distance between a pair of gratings of the compressor. The laser pulses are focused by a spherical lens with a focal length of 200 mm onto argon clusters in a spot with diameter of 10  $\mu$ m (Fig.1). Argon clusters are generated in the center of a vacuum chamber by injecting argon gas with a backing pressure of 7 MPa. The chamber diameter and wall thickness are 100 mm and 5 mm, respectively. To measure angular distribution of THz emission, the chamber is made of fused silica glass with refractive index of 1.95 and transparency of 90 % at 0.5 THz. THz emission from argon cluster plasma is collected and collimated by a polyethylene lens with a focal length of 70 mm and directly image-relayed on the input window of a liquid helium-cooled InSb bolometer. A polystyrene foam and a thin black polypropylene filter are installed in front of the bolometer window, to exclude the laser pulses and unwanted lights emitted or scattered from the plasma. To measure the horizontally and vertically polarized components, a wire grid with an extinction ratio of  $\sim 10^5$  at 0.5 THz is used. The angular distribution of THz waves is measured by rotating the detection setup about the center of the glass chamber.

## 3. Results and discussion

In the laser propagation direction (solid angle of  $8.7 \times 10^{-4}$  sr), the emitted THz energy is measured with various laser pulse durations. Incident laser pulse duration is varied from 37 fs to 1000 fs by changing the distance between the compressor gratings. THz power for various laser durations are shown in Figure 2. The plus and minus signs on the horizontal axis show pulse durations with positive

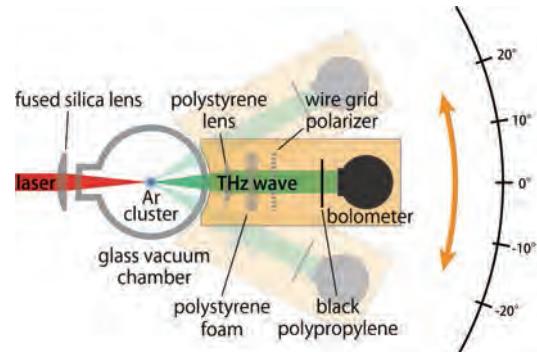


Fig. 1. Schematic diagram of experimental setup for (a)THz detection with a bolometer.

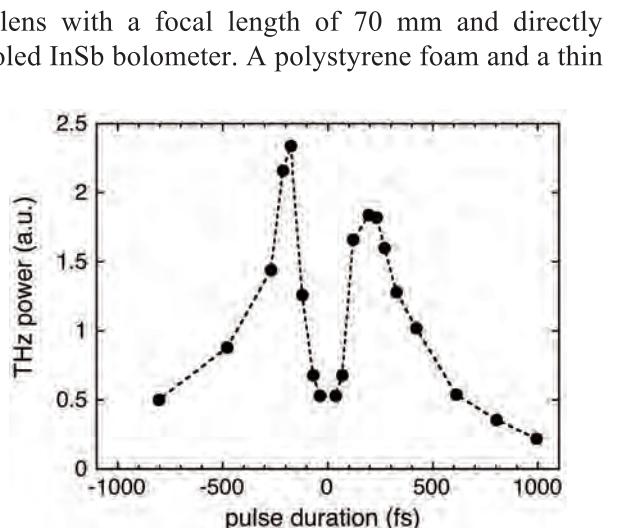


Fig. 2. THz energy for various excitation pulse durations (laser energy, 10 mJ; backing pressure, 7 MPa). The plus and minus on the abscissas axis means pulse duration with positive and negative chirp, respectively.

and negative chirp, respectively. In this experiment, backing pressure is 7 MPa. By a measurement of cluster size at 7 MPa, a radius of cluster is estimated to be  $\sim 10$  nm, which corresponds to a number of  $\sim 10^4$  atoms from the Hagena parameter. In Figure 2, the power of emitted THz radiation is maximum when the pulse duration is 180 fs (-180 fs). As pulse duration is shortened to 37 fs, the THz power drastically decreases to 1/5 of the maximum. The experimental results suggest that the power of THz pulse generating from cluster plasmas can be enhanced by optimizing laser pulse duration. Furthermore, there seemed to be little difference between positive and negative chirp. Figure 3 shows absorption fraction of Ar cluster depends on laser pulse duration. The experimental conditions are same as those for Figure 2. The absorption fraction is estimated by the energy ratio of the incident laser to the transmitted laser through Ar cluster at the backing pressure of 7MPa. The absorption fraction is highest at the pulse duration of  $\sim 500$  fs ( -500 fs). This consists in previous study by Zweiback *et al.* [7]. It shows there is an optimal pulse duration to maximize laser absorption for a given noble-gas cluster size.

The pulse duration is optimized by the resonance condition of expanded atomic-cluster plasma ( $n_e/n_{cr}=3$ ), where  $n_e$  is electron density and  $n_{cr}$  is critical density for 810 nm laser. As long as seeing the property that the THz radiation at  $\pm 30^\circ$  with respect to the laser propagation direction in the laser propagation direction has radial polarization, the mechanism of THz emission can be attributed to electric quadrupole schemes. In this mechanism, it is expected that THz intensity is proportional to square of incident laser intensity. However, the experimental results do not show such laser intensity dependence. The THz power is enhanced 5 times when pulse duration is changed from 37 fs to 180 fs. We need more studies to investigate the mechanism of THz generation from cluster plasma.

## References

- [1] F. Jahangiri, M. Hashida, S. Tokita, T. Nagashima *et al*, Appl. Phys. Lett. **99**, 161505(2011).
- [2] F. Jahangiri, M. Hashida, S. Tokita, T. Nagashima *et al*, Appl. Phys. Express **5**, 026201 (2012).
- [3] T. J. Wang *et al*, Phys. Rev. A **83**, 053801 (2011).
- [4] G. Rodriguez *et al*, Opt. Exp. **18**, 15130 (2010)
- [5] T. Nagashima *et al*, Opt. Exp. **17**, 8807 (2009).
- [6] F. Jahangiri, M. Hashida, T. Nagashima, *et al* Appl. Phys. Lett. **99**, 261503 (2011).
- [7] Zweiback.*et al*, Phys. RevA **59**, R3166 (1999).

## Publications and presentations

- [s1] “Enhancing the energy of terahertz radiation from plasma produced by intense femtosecond laser pulses”, F. Jahangiri, M. Hashida, S. Tokita, T. Nagashima, M. Hangyo, and S. Sakabe, Appl. Phys. Lett. **102**, 191106 (2013).
- [s2] ” Energy Enhancement of THz Emission from Intense-Laser Cluster Plasmas by Optimizing Laser Pulse Duration”, K.Mori, M. Hashida, T. Nagashima, S. Tokita, M. Hangyo, and S. Sakabe, The 2nd Advanced Lasers and Photon Sources (ALPS’13), Apr. 23 - Apr. 25, 2013, Yokohama, Japan.
- [s3] 「高強度レーザー生成クラスタークラスターから放射 THz 波のレーザーパルス幅依存」森一晃, 橋田昌樹, 長島 健, 井上峻介, 時田茂樹, 萩行正憲, 阪部周二、2013 年 9 月 16-20 日、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、同志社大学京田辺キャンパス、京田辺市
- [s4] 「高強度レーザー・クラスター相互作用によるテラヘルツ波放射のレーザーパルス幅依存」森一晃, 橋田昌樹, 長島 健, 井上峻介, 時田茂樹, 萩行正憲, 阪部周二、2013 年 9 月 25-28 日、日本物理学会 2013 年秋季大会、徳島大学常三島キャンパス、徳島市
- [s5] 「高強度レーザー生成クラスタークラスターから THz 波発生」森一晃, 橋田昌樹, 長島 健, 井上峻介, 時田茂樹, 萩行正憲, 阪部周二、2014 年 1 月 20-22 日、第 34 回レーザー学会学術講演会、北九州国際会議場、小倉市
- [s6] 「高強度パルスレーザー生成クラスタークラスターからテラヘルツ放射」橋田昌樹, 森 一晃, 長島 健, 井上峻介, 時田茂樹, 阪部周二 2014 年 1 月 28 日、第 11 回赤外線放射応用関連学会年会、東京工科大学蒲田キャンパス、東京

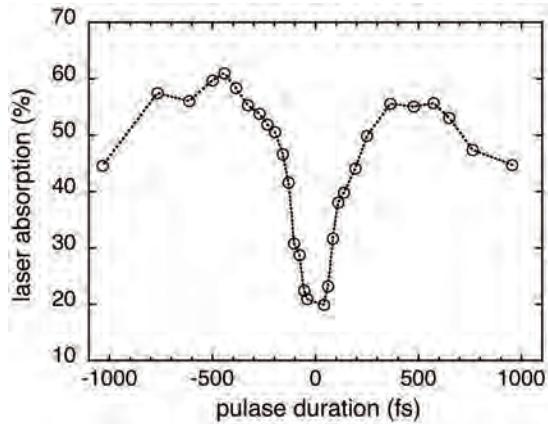


Fig. 3. Laser absorption for various pulse durations (laser energy, 10 mJ; backing pressure, 7 MPa). The plus and minus on the abscissas axis means pulse duration with positive and negative chirp, respectively.

## 広帯域誘電分光と他の観測手法による生体水構造の相補的解析

八木原 晋・東海大学理学部

**【目的】** 生体中の水と生体分子との相互作用に基づく生体水構造は、ps・THz 域での分子レベルから ms・kHz 域での細胞レベル、さらに ks・mHz 域での大規模イオン挙動まで、幅広い時空間域の中で特徴づけられる多様な階層構造的ダイナミクスを伴って実現されている。これらの多様な広帯域ダイナミクスを水構造の概念で統一的に観測し解析するには困難が伴う。誘電分光技術は、100 年におよぶ長い歴史を経た現在でも、なお新たな測定機器や解析手法の開発に様々な工夫がなされている。

本研究では、広帯域誘電分光 (BDS) 技術の開発に長く携わってきた二研究室 (京大・化研、東海大・理) がそれぞれの特徴を生かした生体水構造の相補的解析を行い、広帯域ダイナミクスによる生体・複雑系の分子機構解析がどう用いられるべきか考える。被測定物として想定される、生体組織、細胞、リポソーム、タンパク質分散系などの生体・複雑系のうち、まず細胞培養とその低周波域誘電分光測定を行い、リポソーム系の結果の BDS 測定結果と比較した。細胞にはこれまであつかった実績があるイヌ腎尿細管 (MDCK) 細胞を選んだ。リポソームも同様にあつかった実績のある 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) を用いた。

**【実験方法】** MDCK 細胞を培養し、図 1 のオリジナルの試料容器下部の平行平板電極間に PBS バッファーに懸濁した試料を遠心 (5000rpm) して細胞を挿入した。またリポソーム試料として、いくつかの濃度で純水 (MiliQ 水) に懸濁し、エクストルーダ (細孔径 : 40nm) にかけて DPPC 懸濁液を調製した。得られた懸濁液の調製直後と 1 日経過後の試料、およびさらに調製後 60°C で 30 分熱処理した試料について誘電測定を行った。

細胞の誘電測定には Impedance Analyzer (IA: HP4294A + HP16092A spring clip fixture, Yokogawa Hewlett Packard, 京大・化研) を用いて 21°C、リポソームでは IA と Time Domain Reflectometry (TDR: HP54120B + HP54124A four channel test set, 東海大・理) にそれぞれオリジナルな同軸円筒型と開放端同軸電極を用いて 25°C～50°C で測定を行った。

**【実験結果】** 図 2 に測定試料調製後 (1day) と翌日 (2day)、および 60°C にて 30 分熱処理を行った後 (heat treated) の誘電率および電気伝導率の周波数依存性を示す。いずれの試料でも 1M-10MHz 域と 1k-10kHz 域に大きな変化が観測されており、その挙動からイオンのダイナミクスに特徴的な緩和が生じていることがわかる。

細胞懸濁後 1、2 日目の試料は同様な緩和過程を示したが、高周波数領域の誘電率は 2 日目に大きかった。熱処理試料は 1M-10MHz 域緩和過程が減少した。



図 1. 細胞計測用の  
オリジナル電極

【考察】これまでの浅見ら(京大化研)による豊富な実験結果から、1M-10MHz域の緩和は細胞の界面分極に起因する過程、1k-10kHz域の緩和は電極分極による過程である。電極分極は電極形状、周囲のスペーサの配置、試料部の構造や導電率などに依存することから、この電極で細胞懸濁液に適切な計測系が得られたことがわかる。

懸濁後2日目の試料で高周波域の誘電率が大きいのは、界面分極が低周波シフトしたか、高周波側の誘電率が大きくなつたためである。界面分極が反映するイオンのふるまいは膜構造に強く依存している。図3に示した測定試料調製直後とその後の熱処理後の細胞懸濁液の位相差顕微鏡写真では、細胞膜が熱処理によって大きな損傷を受け、イオンの界面近傍での分布が変化し分極が小さくなっていることがわかる。一方八木原ら(東海大理)は純水中に懸濁した導電率の小さなDPPC Liposomeでは、3MHz域のDPPC膜構造の強誘電的ふるまいや、水系に共通な10GHz域のバルクな水の挙動、100MHz域の生体分子と相互作用している水やイオンの協同的挙動、さらに磁場勾配核磁気共鳴によるms域の制限拡散などを見出した。

これらの結果から、細胞の水構造とそのはたらきを十分に明らかにするためには広帯域ダイナミクスの詳細な解析が必要であり、BDSに他の相補的手法(核磁気共鳴、分子動力学的シミュレーション、有限要素法による電磁場解析など)を組み合わせた、ユニヴァーサルな広帯域ダイナミクス解析は今後の重要な解析ツールとなるだろう。

#### 【成果報告(論文、学会発表等)】

- Yagihara S (2014) Dynamics of water, biomaterials, and skins by means of dielectric relaxation spectroscopy. In: Dobashi T, Kita R (Ed.) Nano/Micro Science and Technology in Biorheology, Springer, 編集中.
- 八木原晋(2013)水構造の誘電分光と広帯域ダイナミクス. 第19回日本学術振興会産学協力研究委員会「水の先進理工学」第183委員会研究会, 2013年12月, 下呂.

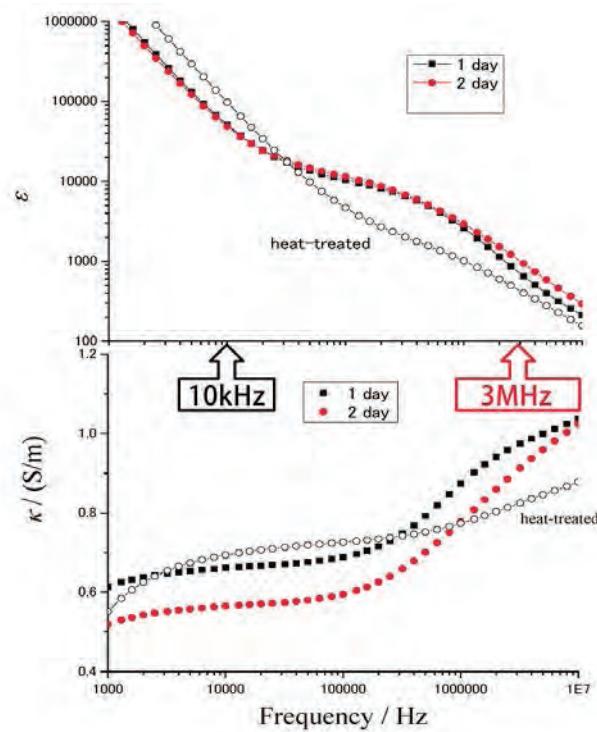


図2. 21°CにおけるMDCK細胞懸濁液の誘電率と電気伝導度の周波数依存性

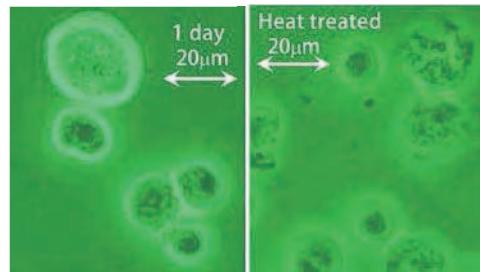


図3. (左)測定初日と(右)30分60°Cで熱処理後のMDCK細胞懸濁液の位相差顕微鏡写真

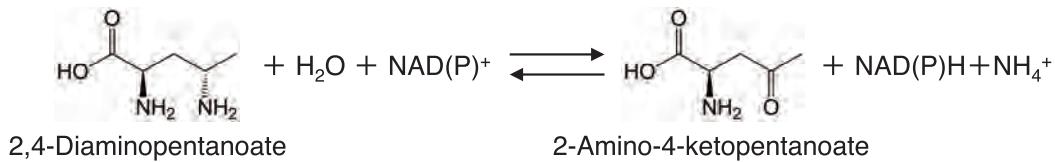
## キラルアミン化合物の酵素的生産法の開発

三原 久明・立命館大学 生命科学部

#### 【背景·目的】

キラルアミン化合物はキラル医薬中間体として需要のある重要な有機化合物である。現在は主に化学合成で生産されているが、基質特異的・部位特異的・立体選択的に簡便な手法でキラルアミン化合物を生産するための生体触媒の開発が強く望まれている。本研究では、キラルアミンを合成する微生物酵素を開発し、効率の良いキラルアミン合成系を確立することを目的とする。カルボニル基をアミノ基に変換する反応を触媒するデヒドロゲナーゼを主な研究対象とする。 $\alpha$ -ケト酸の $\alpha$ -カルボニル基に作用するデヒドロゲナーゼについては多数の報告例があるので、本研究では $\alpha$ -カルボニル基以外のカルボニル基に作用する酵素を重点的に研究する。*Fervidobacterium nodosum* などが生産する 2,4-ジアミノペンタン酸デヒドロゲナーゼ (2,4-DAPDH) について、 $\gamma$  位のカルボニル基に作用することが示されているので、本酵素の基質特異性の検討や、本酵素を用いたキラルアミン生産系の開発に取り組む。そのほか、新しいキラルアミン生産用酵素を探索する。

2,4-DAPDH は、一部の嫌気性細菌がもつ D-オルニチン代謝系の酵素であり、NAD(P)<sup>+</sup> 依存的に 2,4-ジアミノペントン酸 (2,4-DAP) の  $\gamma$  位のアミノ基を酸化的に脱アミノ化して 2-アミノ-4-オキソペントン酸に変換する反応を触媒する (図 1)。これまでに *Clostridium* 属細菌にその存在が示され、また、メタゲノムにコードされる 2,4-DAPDH の一次構造が明らかにされているが、触媒特性の詳細、特に活性調節機構や、立体構造は明らかにされてこなかった。本酵素は AKP の  $\gamma$  位の還元的アミノ化反応も触媒すると推定され、医薬中間体などとして重要なキラルアミン化合物の酵素合成にも有用であると期待された。そこで、種々の酵素学的解析や産業利用に適した耐熱性 2,4-DAPDH を探索し、好熱性嫌気性細菌 *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 に本酵素を見いだすとともに、その触媒特性と構造特性を解析した。



### 図 1. 2,4-DAPDH が触媒する反応

【方法・結果・考察】

*F. nodosum* Rt17-B1 のゲノム配列中に酸化的な D-オルニチン代謝系に関与している

ると推定される遺伝子クラスターを見いだした。このクラスターに含まれる Fnod\_1646 遺伝子は、D-オルニチンの 2,4-DAP への変換反応を触媒するオルニチンアミノムターゼホモログ遺伝子の近傍にあり、その遺伝子産物は NAD(P)<sup>+</sup> 結合タンパク質に特徴的な GXGXXG 配列を有していたことから、2,4-DAPDH をコードしているものと考えられた。本遺伝子をクローニングし、その遺伝子産物の触媒能を調べた結果、2,4-DAP 依存的に NAD(P)<sup>+</sup> を還元する反応を触媒したことから、本遺伝子が 2,4-DAPDH をコードしていることが明らかになった。本酵素は至適温度を 85 °C にもつ耐熱性酵素であった。本酵素の酵素化学的諸性質を調べたところ、基質 2,4-DAP による不拮抗阻害を受けることが見いだされ、2,4-DAP に対する  $K_m$  値、 $K_i$  値はそれぞれ 0.2 mM、0.9 mM であった（図 2）。また、本酵素は D-オルニチンによっても不拮抗阻害 ( $K_i = 0.1 \text{ mM}$ ) を受けることが示された。これらの結果から、2,4-DAPDH は酸化的な D-オルニチン代謝の上流部でこの代謝経路を制御することが示唆された。さらに、本酵素の活性に影響を及ぼす化合物を探索した結果、種々のアミノ酸が本酵素の 2,4-DAP に対する活性を阻害することが明らかとなり、また、これらのアミノ酸の L-体と D-体を比較すると D-体の方が強い阻害効果を示すことが見いだされた。特に強い阻害効果が見られた D-Trp、D-Phe、D-His、D-Leu の阻害様式を調べたところ、いずれも非拮抗阻害であることが示され、それぞれの  $K_i$  値は、0.03 mM、0.2 mM、0.9 mM、1.2 mM であった。一方、本酵素は、2,5-ジアミノヘキサン酸 (2,5-DAH) の δ 位のアミノ基にも作用する基質特異性の広い酵素であることが明らかになった。2,5-DAH を基質とした場合、基質阻害は見られず、 $K_m$  値は 2 mM であった（図 2）。さらに、2,4-DAPDH の還元的アミノ化反応における触媒特性を調べた結果、基質として α-アミノ基と α-カルボキシル基を持たない 2-ブタノン、2-ペントノン、2-ヘキサノン、アセトフェノンを用いた場合、それぞれからブタン-2-アミン、ペントン-2-アミン、ヘキサン-2-アミン、1-フェニルエチルアミンが生成した。以上の結果から、2,4-DAPDH を種々のアミン化合物の合成に利用できる可能性が示された。

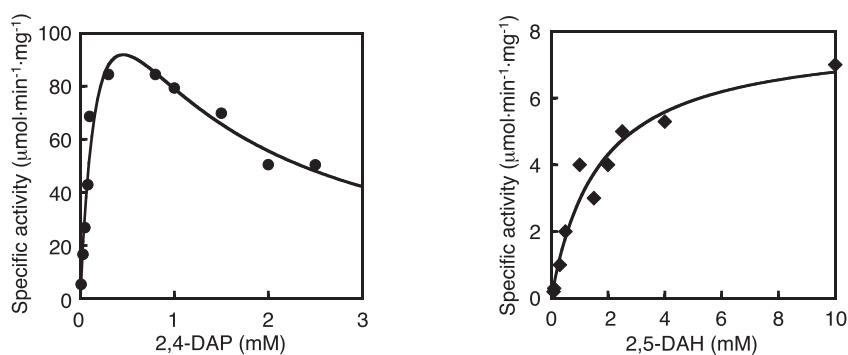


図 2. 2,4-DAPDH の反応初速度の基質濃度依存性

## 細菌の金属代謝に関するタンパク質の同定と機能解析

倉田 淳志・近畿大学 農学部

### 【背景・目的】

嫌気環境に生息する微生物の中には、鉄、マンガン、クロム、ウランなど種々の金属化合物を電子受容体として呼吸するものがある。これらの微生物は、それぞれ特定の金属化合物を還元することで溶解度を変化させ、水溶性金属化合物の沈殿や、固体金属化合物の溶解を可能にするため、環境中からの有害金属の除去や希少金属の回収に有用であると期待されている。しかし、個々の金属化合物への電子伝達機構の詳細は不明であり、また、常温・常圧以外の特殊環境において活発な金属代謝を行う微生物に関する研究はほとんど行われていないのが現状である。本研究では、特殊環境下で優れた金属代謝能をもつ微生物を対象とし、その金属代謝機構の詳細を明らかにするとともに、環境浄化と有用資源確保に資する微生物の開発を目指す。特に、0°C付近の低温環境に生息し、多様な金属代謝能をもつ *Shewanella livingstonensis* Ac10 および新たに種々の特殊環境から分離する金属代謝細菌を主な研究対象とし、これらの金属代謝能の解析、種々の金属化合物の細胞内への取り込みに関するタンパク質の分析、個々の金属化合物への電子伝達に関するタンパク質の同定と構造・機能解析、特定金属の除去・回収に有用な微生物の開発を行う。今年度は、*S. livingstonensis* Ac10において、三価鉄存在下で誘導生産されるリン酸選択性的チャネルタンパク質のホモログ(PhoE) の機能解析を重点的に行った。

### 【方法・結果・考察】

*S. livingstonensis* Ac10 を、クエン酸鉄もしくはフマル酸を含有する合成培地で培養し、ショ糖密度勾配遠心法を用いて内膜タンパク質と外膜タンパク質を分離した。各画分を二次元電気泳動に供し、三価鉄を含むクエン酸鉄の存在下で誘導的に生産量が増加するタンパク質群を同定した。クエン酸鉄依存的に生産量が増加する膜タンパク質群のうち、PhoE は、*Escherichia coli* や *Pseudomonas* 属細菌などのグラム陰性細菌の外膜に存在するリン酸選択性的チャネルのホモログであった。PhoE は正電荷を有するアミノ酸が局在する親水的な筒状構造を形成すると考えられているが、金属代謝との関連は報告されていない。

PhoE の遺伝子破壊株 ( $\Delta phoE$ ) を作製するとともに、 $\Delta phoE$  にプロモーター領域と *phoE* 遺伝子を含む相補用プラスミド (pNatPhoE) を導入した相補株を作製した。野生株、 $\Delta phoE$ 、および相補株を、クエン酸鉄、フマル酸のいずれかを電子受容体として含む合成培地で培養し、PhoE の有無が生育速度におよぼす影響を解析した。フマル酸含

有培地では  $\Delta phoE$  は野生株と同様に生育するのに対して、クエン酸鉄含有培地では生育速度が著しく低下し、さらに  $Fe^{3+}$  の還元能が低下することがわかった。pNatPhoE を導入した相補株は、クエン酸鉄含有培地で正常に生育した。コバルトアセチルアセトナート含有培地でも  $\Delta phoE$  の生育速度の低下とコバルト還元能の低下が見られ、pNatPhoE を導入した相補株では、本培地で正常に生育した。一方、不溶性の酸化鉄(Ⅲ)では PhoE の有無による生育と還元能の差はみられなかった。以上の結果から、可溶性三価鉄、三価コバルトの還元において、PhoE が生理的に重要な役割を担うこと、また、不溶性の金属化合物の還元には関与しないことが示唆された。本菌の異化的金属還元において、負の電荷をもつ媒介物質と結合した可溶性の金属錯体が外膜タンパク質である PhoE を介してペリプラズム空間に取り込まれ、最終電子受容体として利用される可能性や、電子受容体の還元に必要な何らかの因子が PhoE を介して細胞外に分泌される可能性が考えられた。

*Shewanella oneidensis* MR-1 では、内膜ペリプラズム側に存在する CymA が鉄還元能をもつことが示されており、CymA を *E. coli* に導入すると *E. coli* が異化的鉄還元能をもつようになる。*E. coli* の場合、外膜を壊したプロトプラストにすると、インタクトな細胞の場合よりも著しく鉄還元能が向上するが、この結果は、外膜が電子受容体の拡散障壁になっていること、および *E. coli* では CymA から細胞外最終電子受容体への電子伝達系が無いことによるものと考察される。*Shewanella* 属細菌においてインタクトな細胞でも高い鉄還元能が見られる理由は、外膜に存在する MtrC や OmcA を介して、細胞外最終電子受容体への電子伝達が可能であると考えることで説明できるが、これとは別に、可溶性電子受容体については PhoE が関与する取り込み系があつて、それによってペリプラズム空間に取り込まれた電子受容体が CymA で還元される可能性も考えられる。一方、上述のように PhoE が何らかの因子を細胞外に分泌し、それが MtrC や OmcA と共同して最終電子受容体の還元に関与する可能性もあり、これらの可能性について、今後、検討を加える必要があると考えられる。

## 細胞内への薬物取り込みを制御可能な 人工受容体-リガンドシステムの構築

中瀬生彦・大阪府立大学

### <研究目的>

細胞内への薬物送達において、細胞応答を利用した送達制御は生物学的な観点からも興味深く、その応答機序を基盤にした送達システムの開発は重要であると考えられる。これまで、研究代表者の中瀬と共同研究者の京都大学化学研究所 生体機能設計化学 二木史朗教授は、膜透過性アルギニンペプチドの細胞内移行機序の解明と、薬物送達への応用研究を続けてきた。細胞内へ高効率に移行する HIV-1 Tat (48-60) ペプチドやオリゴアルギニンといった膜透過性アルギニンペプチドは、様々な生理活性分子の送達キャリアとして現在広く利用されている [1]。アルギニンペプチドの移行機序に関しては、プロテオグリカンを介した細胞膜集積及び、それに伴うマクロピノサイトーシスの誘導が重要な移行経路の一つであることが示されているが、その詳細な過程は明らかにされていない。本研究では、二木教授との共同研究において、プロテオグリカンの一種である syndecan-4 (Syn-4) を介した細胞内へのペプチド取り込み機序を明らかにするとともに、Syn-4 からのシグナル伝達を担う PKC $\alpha$  の関与についての検討を行う。更に、Syn-4 を介したこれらの移行機序に関する知見を基盤とした、細胞内への薬物取り込みを制御可能な人工受容体-リガンドシステムの構築に繋げることを目的とする。

### <実験方法>

Syn-4 を遺伝子工学で強制発現させたヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞において、蛍光標識 (Alexa488) したアルギニンペプチドの細胞内移行における Syn-4 発現の影響について、共焦点顕微鏡を用いた細胞内局在の確認及び、FACS を用いた細胞内移行量の検討を行った。ペプチドの細胞内取り込み時におけるサイトゾルでの Syn-4 と PKC $\alpha$  の相互作用は、ペプチド細胞刺激後に細胞溶解液を用いた Syn-4 抗体による免疫沈降と、Western blot 法により検出した。また、サイトゾルで PKC $\alpha$  との結合とその活性化に寄与する V ドメインを欠失させた Syn-4 (Syn-4 $\Delta$ V) に関しても、遺伝子工学で強制発現させた HeLa 細胞を用いて同様に評価を行った。マクロピノサイトーシス誘導については、その指標となるデキストラン (70 kDa) の蛍光 (FITC) 標識体を用いた細胞内取り込みについて検討した。

### <結果と考察>

Syn-4 を細胞膜に強制発現することで、代表的な膜透過性アルギニンペプチドの一つであるオクタアルギニン(R8)の細胞内移行量が顕著に上昇することが明らかとなった。この

R8 の細胞内移行において、Syn-4 が細胞膜でクラスター化を誘導されることも観察された。Syn-4 強制発現細胞において、マクロピノサイトーシスのマーカーであるデキストランの細胞内移行量が、R8 ペプチド処理によって有意に増加することが示され、Syn-4 を介した R8 ペプチドによるマクロピノサイトーシスの効率的誘導が明らかとなった。R8 ペプチドと比較して、細胞内移行性が著しく低いテトラアルギニン (R4) の場合は、Syn-4 強制発現細胞においても、ペプチドの移行量が増加せず、また Syn-4 のクラスター化もほとんど観察されなかった。これらの結果より、アルギニンペプチドのマクロピノサイトーシス誘導及び、細胞内取り込みには、Syn-4 のクラスター化が重要であることが示唆された。一方で Syn-4ΔV 発現細胞では、R8 の細胞内移行量の上昇はほとんど見られなかつたことから、R8 ペプチドによってクラスター化誘導された Syn-4 への PKC $\alpha$  の結合が、ペプチドの細胞内取り込みに大きく寄与していることが初めて示された。また、Syn-4 抗体を用いた免疫沈降及び、Western blot 実験では、細胞への R8 ペプチド刺激によって、細胞内で PKC $\alpha$  が Syn-4 に結合することが確認された。さらに、C1 及び C2 ドメインを欠失した Syn-4 を強制発現した細胞において、R8 ペプチドの細胞内移行には影響を与えないことも明らかとなり、Syn-4 V ドメインがペプチドの細胞内移行に大きく寄与することが示された。

次に、これらの知見を基盤にした人工的な薬物取り込み制御システムの構築に向け、ヘリックス相互作用認識を利用した Syn-4 のクラスター化誘導と細胞内取り込み上昇に関する研究に現在取り組んでいる。既に、我々は EGF (epidermal growth factor) 受容体 (EGFR) をモデル受容体とした、人工受容体-リガンドシステムの構築に成功している。この研究では、EGFR の細胞外ドメインを切り取り、その部分にヘリックス構造を有する E3 配列 [2, 3] を組み込んだ人工受容体 (E3-EGFR) を設計し、遺伝子工学的に細胞膜に発現させた。この受容体に対して、E3 配列と特異的にコイルドコイル二量体を形成する K4 ペプチド [2, 3] を利用し、10Å 前後のリンカーを用いて 2 分子の K4 ペプチドを連結した人工リガンドによる受容体の二量体化形成及び、受容体活性化の制御に成功している [4]。

本研究においても、同様な手法で Syn-4 に遺伝子工学的に人工ヘリックス配列を融合した E3-Syn-4 を細胞膜に発現させ、そのクラスター化を K4 ペプチド連結体で制御することを試みた。上記と同様にデキストラン蛍光標識体を用いた細胞取り込みに関する検討を行った結果、E3-Syn-4 強制発現細胞において、K4 ペプチド (4 分子) 連結体の刺激によって有意にデキストランの細胞内取り込み上昇が認められた。今後、更なる制御性の高い細胞内薬物取り込みシステムの設計と構築が必要であるが、本手法が新しい細胞内への薬物取り込み制御技術として発展することが強く期待できる。

#### <参考文献>

- [1] Nakase, I. et al. (2012) *Acc. Chem. Res.* **45**, 1132–1139. [2] Litowski, J.R., Hodges, R.S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37272–37279. [3] Lindhout, D.A. et al. (2004) *Biopolymers* **75**, 367–375. [4] Nakase, I. et al. (2012) *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 7464–7467.

## 酸化物ガラスシンチレーターの開発

柳田健之・九州工業大学 若手研究者フロンティア研究アカデミー

### 【目的】

現在、放射線誘起蛍光材料は、レアアースを主成分とするホストマトリックスが主として経験則によって利用されており、元素戦略的な観点から、新規材料開発に対する期待は大きい。一方、酸化物ガラスは、透明性と高い成型加工性（賦形性）を併せ持つ材料であり、近年では、光に対して能動的に作用するフォトニクス材料としての応用が盛んに検討されている。しかし、放射線誘起蛍光材料への応用に際しては、実際に製品化に至った酸化物ガラス（Liガラス、Saint-Gobain）においても、その発光特性は十分ではなく、更なる高感度検出部材が望まれている。本課題は、酸化物ガラスを用いた発光部材の研究に関する業績を挙げている京都大学化学研究所の正井博和助教と協力し、酸化物ガラスを用いた新規放射線検出部材の創製および、その評価をおこなった。

### 【実験方法】

共同研究者が京大化研において溶融急冷法により作製した  $\text{SnO-ZnO-P}_2\text{O}_5$  (SZP) ガラスの発光特性評価を、研究代表者が九工大において行った。

### 【実験結果及び考察】

#### ① $\text{Sn}^{2+}$ - $\text{Ce}^{3+}$ 共添加ガラスの Photoluminescence(PL) および Radioluminescence(RL) 特性

我々は、以前に SZP ガラスにおける  $\text{Sn}^{2+}$  中心の RL 特性を報告している[1]。 $\text{Ce}^{3+}$  は  $\text{Sn}^{2+}$  と同様、許容遷移に基づく高い発光効率を示す発光中心である。このような許容遷移過程を有する中心は通常、単独で蛍光体に添加されるが、共添加された例はこれまでに報告がなく励起光依存性の観点から興味深い。母ガラス組成は、以前の報告[2]で高い内部量子収率を示した組成とし、これに  $\text{CeO}_2$  を外モルで添加した。得られた  $x\text{CeSZP}$  ( $x$ : 添加量) ガラスは透明であり、光学吸収端が  $\text{Ce}^{3+}$  で構成されることが明らかになった。PL スペクトルでは、低エネルギー励起によって  $\text{Ce}^{3+}$  発光が、高エネルギー励起により  $\text{Sn}^{2+}$  発光が主として観察された。一方、RL スペクトルでは、発光はほぼ Ce 濃度に依存せず一定であり、RL 過程において、発光が  $\text{Sn}^{2+}$  中心から主として生じていることが確認された。図 1 は異なる励起光を用いた発光スペクトルであり、X 線励起 RL スペクトルは PL の高エネルギー励起スペクトル（主として  $\text{Sn}^{2+}$  発光）に類似している。本ガラス系においては、X 線励起によって  $\text{Ce}^{3+}$  中心へ

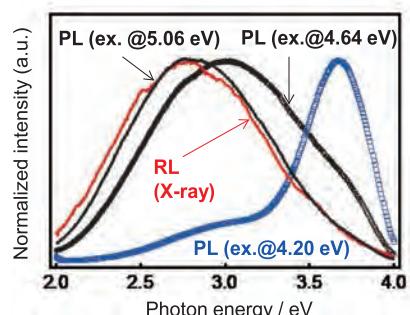


Fig. 1 Emission spectra of the 0.05CeSZP glass with different excitation energies.

のエネルギー輸送過程が効率的に生じていないことが確認された。

## ②Sn<sup>2+</sup>-RE 共添加ガラスの PL 特性評価

一方、多くの3価希土類カチオンは禁制遷移を有するため、概して発光効率が低い。そこで、Sn<sup>2+</sup>をエネルギーードナー、RE<sup>3+</sup>をエネルギーアクセプターとした共添加系(SZP-RE)ガラスにおいて、PL特性を評価した。図2にCe, Tb, Dyを添加したSZPガラスのPLスペクトル(4.88 eV励起)を示す。Ce添加ガラスではPL測定およびPL発光減衰測定より、Sn<sup>2+</sup>とCe<sup>3+</sup>中心間にエネルギー輸送過程が生じていないことが判った。一方、SZP-DyではDy<sup>3+</sup>由来の2つの発光ピーク(2.16 eV ( $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$ )、2.58 eV ( $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{15/2}$ ))が見られ、Sn<sup>2+</sup>と共に添加することで発光強度の増加および励起スペクトルのブロード化が観察された。またSZP-TbについてもTb由来の鋭い発光の励起波長がSn<sup>2+</sup>との共添加によりレッドシフトした。これらの結果はSn<sup>2+</sup>から希土類イオンへのエネルギー移動過程の存在を示している。

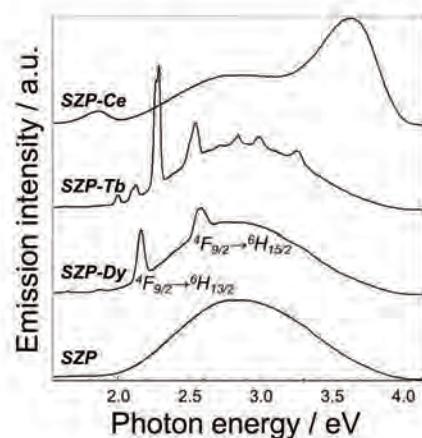


Fig. 2 PL spectra of SZP-Ln glasses(Ln = Ce, Tb, Dy) together with that of SZP glass. The excitation energy is 4.88 eV.

上記は、主として京都大学大学院生 日野祐輔氏の実験成果であり、ここに謝意を表する。

## 参考文献

- [1] H. Masai, T. Yanagida, et al., *Appl. Phys. Lett.*, **101**, 191906 (2012).
- [2] H. Masai, et al., *Appl. Phys. Express.*, **3**, 082102 (2010).

## 【成果報告】

### ◆査読付き論文

1. H. Masai, Y. Hino, T. Yanagida, Y. Fujimoto, K. Fukuda, T. Yoko, *J. Appl. Phys.*, **114**, 083502 (2013).
2. H. Masai, Y. Hino, T. Yanagida, Y. Fujimoto, T. Yoko, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, <http://dx.doi.org/10.1246/bcsj.20130281> (2014).
3. H. Masai, T. Tanimoto, S. Okumura, K. Teramura, S. Matsumoto, T. Yanagida, Y. Tokuda, T. Yoko, *J. Mater. Chem. C.*, DOI: 10.1039/C3TC32259A (2014).

### ◆国際学会発表

1. Fluorescence properties and radiation response of Ce<sup>3+</sup>-doped CaO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> glasses, Y. Fujimoto, T. Yanagida, Y. Futami, H. Masai., 2013 JSAP-MRS Joint Symposia, Kyotanabe., Japan, (2013/9/16-20).
2. Study of Rare-Earth Free Sn<sup>2+</sup> Doped Glass Scintillator, T. Yanagida, H. Masai, Y. Fujimoto, M. Koshimizu, IEEE NSS MIC 2013, Seoul, Korea (2013/10/ 27-11/2).
3. OSL Properties in X-ray irradiated xSnO-(25-x)SrO-75B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Glass, T. Ohno, R. Nakagawa, Y. Miyamoto, Y. takei, K. Hirasawa, H. Masai, T. Yanagida, Y. Fujimoto, T. Kurobori, T. Yamamoto, H. Nanto, The 9th International Workshop on Ionizing Radiation Monitoring, Oarai, Japan, (2013/11/30-12/1).

### ◆国内学会発表

1. ns<sup>2</sup>発光中心を有する酸化物ガラスの発光特性、正井博和、奥村駿、柳田健之、藤本裕、山田泰裕、金光義彦、徳田陽明、横尾俊信、セラミックス協会第26回秋季シンポジウム、2013/9/4-6 他 2件

## 固体NMRを用いたセシウムの土壤への吸着の解明

小野勇治・福島県農業総合センター

### 緒言

福島原発災害により、放射性セシウムが東日本に降下した。放射性セシウムの半減期は長く、原発事故に伴う人類への健康被害の主要素であり、また、作物の育つ土壤への影響も無視できない。土壤浄化については、現在進められているが、実質的には表面の物理的な剥ぎ取りであり、本質的な解決策が必要である。また、福島県は米の生産量が多いため、セシウムを吸収しない稻作技術の考案も急務となっている。

我々は、京都大学化学研究所の徳田陽明博士らと連携し、微細気泡を含む水が環境修復に有効であることを見出してきた。浄化効率の向上のためには、環境中に固定化されるセシウムの吸着メカニズム・浄化メカニズムについての探求が必須であるが、現在のところは定性的な理解に留まっており、今後の研究が必須である。土壤へのセシウム吸着は、セシウムとカリウムのイオン交換によるとされるが、イオン交換によって吸着したセシウムサイトは定まっておらず、X線回折による評価は容易ではない。本研究では、不定形物質に適用可能な固体NMR法を用いることによって、セシウムの粘土鉱物・樹木等への吸着動態の解明を行うことを最終目的とする。環境中のセシウム含有量は極微量であるため、イオン交換の重要な系として、無機ガラスを選択し、セシウムの局所構造解析が可能であることを明らかにした。

また、放射性セシウムの高効率な浄化方法についても検討したので、本報告では浄化技術に関する報告を行う。

### 目的

現在、放射性セシウムの除去は物理的な剥ぎ取りによって行われているが、洗浄物によつては適切でないことも多く（衣類や樹木等）、洗浄方法の多角化が必要である。また、廃棄物の減容化も大きな課題となっている。そこで本研究では、ケイ酸ナトリウム水溶液に微細気泡を混入させた洗浄液に着目し、洗浄効率ならびに廃液の減容化に関する検討を行つた。

### 実験方法

メタケイ酸ナトリウム九水和物を濾過水（オルガノ社製のG-20Bにより製造）に溶解し、0.47 mol/kg の溶液を調製した。協和エンジニアリング社製のマイクロバブル発生装置（1ml当たり2万個以上のマイクロバブル発生装置）を用いて微細気泡を溶液中に混入させ、超音波照射（40kHz、シャープ社製の超音波発振機UT-1204U、超音波振動子UI-12R3）により気泡を圧壊処理し、洗浄剤（SMC）を調製した。また、比較のためSMCを10倍(10wt%)および100倍希釈(1wt%)したもの、および蒸留水を用いた。

原発事故に伴うフォールアウト以降、屋外で保管されていたポリプロピレン製の不織布を洗浄物とした。不織布を洗浄水 100cc 中に 20 時間浸漬した。また、複数回洗浄の場合には、6 時間ずつの浸漬とした。浸漬の後、不織布を 40 時間 40°C 乾燥させ、十分に水分がなくなったものを洗浄後のサンプルとした。また、洗浄後の洗浄液に、塩酸を加えて中和し、沈殿を行った。沈殿と上澄み液を分離し、それぞれの放射線強度をゲルマニウム半導体検出器 (EG&G ORTEC 社, GMX-18200-S) を用いて測定した。

## 結果と考察

Fig. 1 に洗浄後の不織布の除去率 (洗浄後/洗浄前) を示す。これより、1~100 wt % の SMC 中に静置するだけで放射性セシウムが、それぞれ 45~78 % 程度除去できることがわかった。また、100 倍希釈した洗浄液 (1 wt%) を用いて複数回洗浄を行うことにより、セシウムを 64 % 程度除去できることもわかった。さらに、塩酸によって SMC を中和して生成した沈殿中に放射性セシウムが捕捉される (約 95%) こともわかった (Table 1)。これは、溶液の沈殿に伴って、含まれていた放射性セシウムが共沈したと考えることができる。以上より、洗浄物からのセシウム分離や、廃液の減容化・再利用できる可能性が高いといえる。

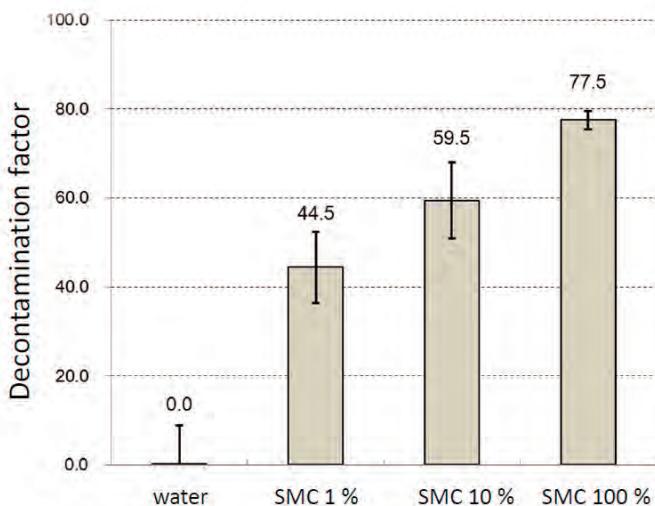


Figure 1 Decontamination factor for water SMC 1 %, 10 %, 100 %.

Table 1. Residual  $^{133}\text{Cs}$  ion concentration after aqueous sodium metasilicate and SMC neutralization with concentrated HCl (0.36 g, 3.6 g, and 36 g) determined by potassium ion conversion.

amount of conc. HCl	concentration of Cs ion	
	aqueous sodium metasilicate	SMC
0.36 g	7.2 ppm	0.4 ppm
3.6 g	7.5 ppm	0.4 ppm
36 g	4.4 ppm	0.0 ppm

## まとめ

微細気泡を含むメタケイ酸ナトリウム水溶液を用いることによって、不織布からのセシウム除去、分離や、廃液の減容化が可能であることを見出した。今後、セシウム構造解析から得られた知見と組み合わせて、高効率な除染や土壤の解析などを行っていく。

## 成果報告

Ueda, Y., Tokuda, Y., Goto H., Kobayashi, T., Ono, Y., J. Soc. Remed. Radioact. Contam. Environ. Vol1. No.3, 2013,

Ueda, Y., Tokuda Y., Goto H., Kobayashi T., and Ono Y., ECS transactions, vol. 58, in press

## ミューオン g-2/EDM 精密測定に関する開発研究

三部 勉・高エネルギー加速器研究機構・素粒子原子核研究所

## 研究目的：

ミューオンの異常磁気能率、いわゆる g-2 は、CERN で 10 ppm 程度まで測定され、その後 BNL で、0.54 ppm まで精度を測定された。その結果は標準模型から誤差の 3 倍以上の違いが顕在化している。標準模型はほぼ全ての素粒子反応現象を説明する堅牢な枠組みである為に、このズレは、新しい物理過程の存在を示唆する可能性がある。また、電気双極子モーメント(EDM)についても重要な制限がついている。ミューオン g-2 および EDM の精密測定に関する R&D を共同研究で行う。

現在の計画にはミューオンの加速器が必要であり、また高い安定性を有する崩壊陽電子検出器が必要である。この検出器には低電圧大電流で稼働する検出器回路が有り、これへの効率的な給電を行うために比較的高い電圧で送電し、オンボード近傍で DCDC コンバータを使って降圧し給電する必要がある。検出器内には磁場が存在するため、従来型の磁性体を使った DCDC コンバータでは磁性体が飽和し、使用が困難である。そこで、磁場中でも稼働するコンデンサのみで降圧の出来るチャージポンプ式の DCDC コンバータの開発研究を行った。これは直列で充電した複数のコンデンサーを並列に切り替えて給電に供するもので、この段数により降圧比が決まる（図 1 参照）。少電流用の IC は流通しているが、大電流かつ多段のものは見当たらぬ。

試作した 10 V から 2.5 V へ降圧するための 4 段の実験回路（図 2 参照）は出力 1

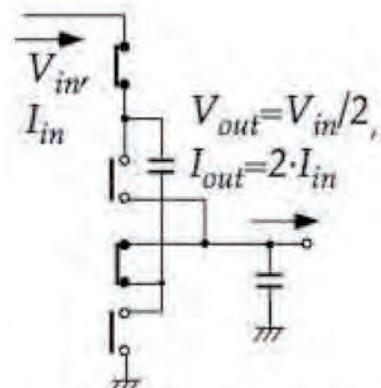


図 1 チャージポンプ原理図。  
2 組の SW を交互に切り替える。

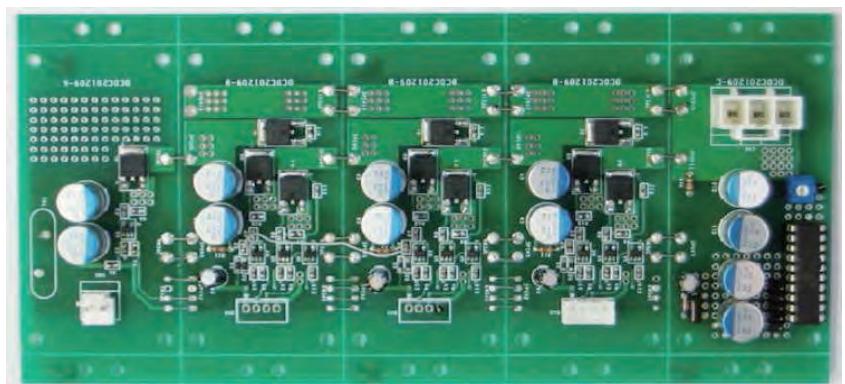


図 2 1/4 降圧型チャージポンプ試作回路基板

0 A 時に変換効率が 90 % を超え、電流を下げるに更に効率が上がる。低電流側で損失が下がることから、SW 素子の抵抗や基板上の配線の抵抗の低減により効率改善の余地はある。この基板および、インダクターを空芯トロイダルコアと交換した通常のチョッパー型 IC のメーカーが供給している評価基板 (1.5V 出力) の動作確認を 1.6T

磁場中で行った。磁場発生にはKEK低温センターのMRI用超伝導磁石を用いた(図3参照)。結果はチャージポンプ型が2.5V出力で90%強、1.5V出力で89%強、1.5Vの空芯バックコンバータ型が89%前後となった。チャージポンプ型は試作機、バックコンバータ型がメーカーで最適化しているはずの評価基板である事を考えるとチャージポンプ型は開発研究を続ければ更に高効率化が見込める。バックコンバータ型でも既に90%程度の効率を達成しているが、さらなる高効率が必要な場合には有力な選択肢とである。

ミュオンの加速については実験を行う予定のh-lineでの表面ミュオンビーム(エネルギー約4MeV)の位相空間分布を解析した。図4では $50\pi\mu$

mradのエミッタанс内(図中赤色の楕円)に収まるミュオン数は16000個程度ぐらいある事が判った。これを直接加速することが出来れば実験装置がより簡略化できるが、まだ充分な情報が得られていないため、詳細について今

後更なる研究が必要である。図4 表面ミュオンビームの位相空間分布

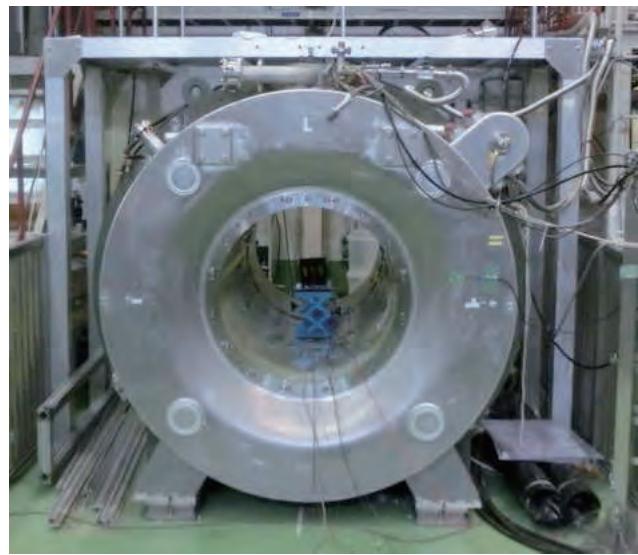
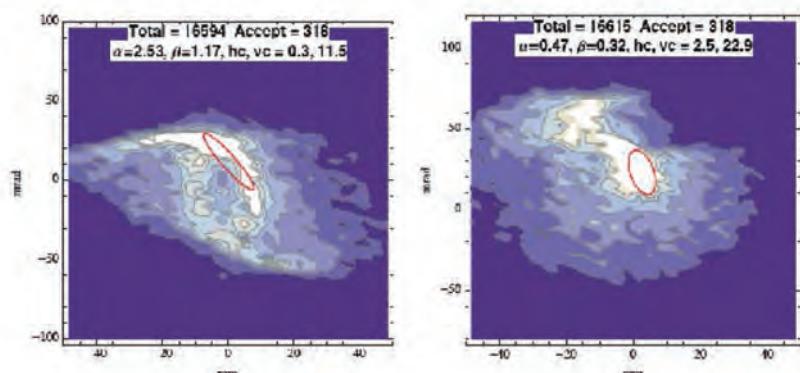


図3 MRI用超伝導磁石



## 論文、学会報告

“A DC to DC converter R&D for g-2/EDM experiment”, Woodo Lee, et al., Poster, Korea Physical Society 2013 fall meeting, Oct 31, 2013

## 有機典型元素保護金属ナノ粒子の合成と構造解明

藤原 尚, 仲程 司・近畿大学理工学部

**【序】** 金属ナノ粒子とは金属原子が数個から数百個集まった微粒子であり、量子サイズ効果などにより、バルクの状態とは異なる性質を示し、そのサイズにより性質が劇的に変化することが知られている。また、有機分子で金属ナノ粒子界面を保護・安定化することで凝集を防ぎ、粒子径分布幅をコントロールすることが可能である。さらに、保護基である有機分子に機能性官能基を導入することにより金属ナノ粒子界面の機能化も可能となる。我々は金属ナノ粒子の機能化に関する研究を行っており、光学活性な 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) を保護基とするパラジウムナノ粒子 (BINAP-Pd NPs) を初めて合成し、単核金属錯体を用いた触媒反応との差異について明確にした。しかしながら、このように高い触媒能を有する BINAP-Pd NPs を用いた触媒反応であっても、さらなる反応条件検討の余地は残されている。特に反応場が触媒反応に与える影響は無視できないものであり、反応場を新しく構築することで革新的な反応性の向上も期待できると考えられる。そこで我々は、新規反応場として超臨界二酸化炭素に着目した。超臨界二酸化炭素は二酸化炭素の超臨界流体である。超臨界流体とは、臨界点以上の温度・圧力領域にある物質の存在状態の一つであり、液体の有する溶解性と気体の有する高い拡散性を併せ持ち、様々な反応の反応場となる。さらに、臨界点付近における溶質分子間の分子会合現象に由來した反応速度向上、エナンチオ選択性の向上などが期待できる。また、超臨界二酸化炭素は、臨界温度と臨界圧力が他の物質と比べて低いだけでなく低毒性であり、環境調和型の溶媒として注目を集めている。しかし、二酸化炭素は無極性物質であり、超臨界二酸化炭素に対する極性物質の溶解性は極めて低いという課題がある。その解決策として、二酸化炭素との親和性が高いパーフルオロアルキル基を有するリガンドで保護したパラジウムナノ粒子 (**S**-4,4'-C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>-BINAP-Pd NPs) を合成した。

**【結果・考察】** キラルホスフィンリガンドを保護基とするパラジウムナノ粒子は、キラルホスフィンリガンド存在下、パラジウムイオンを還元することにより合成した。その一例として、ジクロロメタン溶液のキラルホスフィンリガンド存在下、パラジウムイオンを NaBH<sub>4</sub> で還元することにより、キラルホスフィンリガンド保護パラジウムナノ粒子を合成した。合成したパラジウムナノ粒子の粒子径を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察したところ、約 2 nm と、粒子径は小さく、また分散性に優れていることが分かった。合成したパラジウムナノ粒子の構成元素を調べる目的で、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を行ったところ、炭素、酸素、リンおよびパラジウムの含有を確認した。また UV-vis スペクトル測定を行ったところ、粒子径が非常に小さいため金属の表面プラズモン共鳴に基づく吸収がほとんど見られなかった。さらに、CD スペクトル測定では、コットン効果が観測され、パラジウムナノ粒子においてはナノ粒子にしか見られない特徴的なコットン効果

をはっきりと確認することができ、これによりパラジウムナノ粒子界面にキラリティーが付与されていることを明らかにした。

合成した パラジウムナノ粒子の不斉触媒能について検討する目的で、炭素－炭素結合形成反応の1つである不斉鈴木－宮浦クロスカップリング反応に着目した。一般に、鈴木－宮浦クロスカップリング反応は、アリールボロン酸とハロゲン化アリールを塩基存在下、パラジウム錯体等を触媒として用い、加熱条件下で反応が行われている。また、金属ナノクラスターを触媒に用いた鈴木－宮浦クロスカップリング反応に関する研究が報告されているが、保護基にポリビニルピロリドン等のポリマーを用いて、加熱条件下で反応が行われている。さらに、鈴木－宮浦クロスカップリング反応を用いた、軸不斉ビアリール化合物の合成に関する研究も行われているが、反応収率や不斉収率等の向上が難しく、多くの課題が残されている。しかしながら、合成したキラルパラジウムナノ粒子を不斉鈴木－宮浦クロスカップリング反応の触媒として用いた結果、超臨界二酸化炭素中、温和な条件で不斉カップリング反応が進行し、カップリング生成物を高収率かつ高選択的に得ることができた。

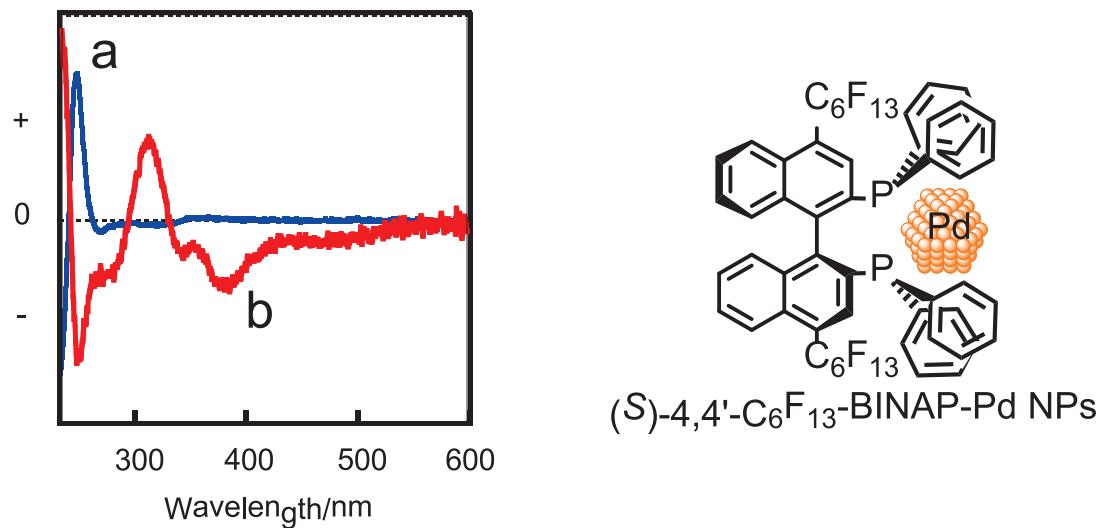


Fig. 1 CD spectra of (a) (S)-4,4'-C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>-BINAP and (b) (S)-4,4'-C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>-BINAP-Pd NPs

本研究を行うにあたり、実験・測定でご指導いただきました京都大学化学研究所・物質創製化学研究系 有機元素化学研究領域の时任宣博先生および笹森貴裕先生に厚く御礼申し上げます。

## 色調可変有機セレノニウム塩の合成と構造

箕浦 真生・北里大学理学部（現立教大学理学部）

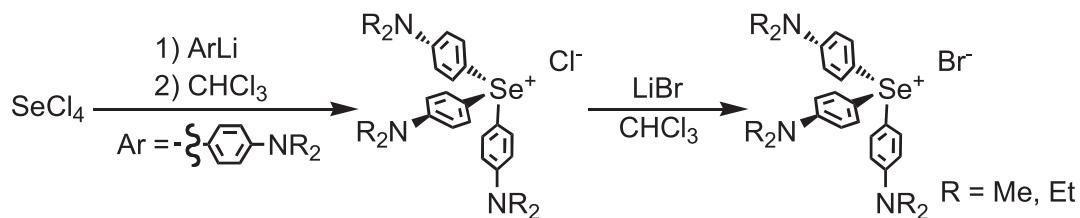
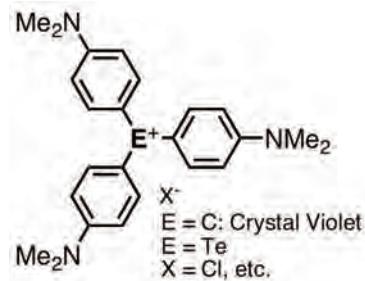
【序】カチオン性トリアリールメタン系化合物は Crystal Violetなどの有機色素として古くから知られている。トリアリールメチルカチオンの中心元素の炭素を高周期典型元素で置き換えたものは、14族元素では高反応性であり、他の元素においても不安定または無色であるのが一般的である。また16族元素オニウム塩は安定ではあるものの一般に無色または淡黄色であることが知られている。

一方で、我々はこれまでに、炭素配位子のみからなる超原子価有機テルル化合物に着目し、中性のヘキサフェニルテルル( $\text{Ph}_6\text{Te}$ )、中心テルル上に5つの芳香族置換基を有する超原子価オニウム種  $\text{Ph}_5\text{Te}^+$ 、およびアニオン種  $\text{Ph}_5\text{Te}^-$ について研究を行ってきた。また一般に不安定とされている電子供与性置換基を芳香族環上に有する中性のテトラアリールテルル化合物についても合成単離を行いそれらの性質を明らかにしてきた。

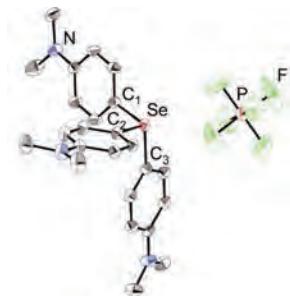
これらの研究の過程で、4-アミノフェニル系置換基をテルル上に導入したトリアリールテルロニウム塩が、カウンターアニオンを選ぶことで、緑色から青色を呈することを見いだし、昨年度の京都大学化学研究所機器利用型研究においてその結晶構造を明らかにすることが出来た。

本申請課題では、高周期同族体であるセレノニウム塩を合成単離し性質の解明を行うことで 16 族元素オニウム種の呈色要因を見いだすことを目的とした。

【結果・考察】トリアリールセレノニウム塩[ $(p\text{-R}_2\text{N-C}_6\text{H}_4)_3\text{SeCl}$ , R=Me,Et]の合成は、対応するテルル同族体合成時に開発した方法に倣い、四塩化セレンに4等量の対応するアリールリチウム試剤を-78 °Cで反応させ、クロロホルムにて反応停止することで行った。この反応は系中で生成した高反応性であるテトラアリールセレンのクロロホルムによる加溶媒分解過程を含み、合成段階で酸の使用や発生を回避できるため、置換基上のアンモニウム塩の生成を防ぐことが出来る。単離したセレノニウムの塩化物塩から臭化物塩へアニオン交換を行い、いずれも黄色の固体として単離した。



トリアリールセレノニウム臭化物塩  $\text{Ar}_3\text{SeBr}$  をヘキサフルオロリン酸リチウムを用いて  $\text{Ar}_3\text{SePF}_6$  へと対アニオン交換した。 $\text{PF}_6^-$  体への交換は  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{77}\text{Se}$  の値が  $\text{Br}$  体の時と比べてほとんど変化していなかったことに加えて、新たに  $^{19}\text{F}$ 、 $^{31}\text{P}$  に  $\text{PF}_6^-$  由来のピークが観測され、単結晶X線結晶置構造解析により構造を確定した。また、今回得られた  $\text{PF}_6^-$  体の固体の色は黄色であった。



	M.F	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{F}_6\text{N}_3\text{PSe} \cdot \text{C}_6\text{H}_6$	$E = \text{Se}$	$E = \text{Te}$
	M.W	584.47	$E-\text{C}_1(\text{\AA}) : 1.919(3)$	2.095(3)
Crystal system		<i>triclinic</i>	$\text{C}_2 : 1.919(3)$	2.097(3)
Space group		$P\bar{1}$	$\text{C}_3 : 1.922(3)$	2.098(3)
Z		2	$\text{C}_1-\text{E}-\text{C}_2(\text{°}) : 101(1)$	96.8(1)
R / R w		0.0579 / 0.166	$\text{C}_2-\text{E}-\text{C}_3 : 101(1)$	96.1(1)
			$\text{C}_1-\text{E}-\text{C}_3 : 102(1)$	97.9(1)

得られたセレノニウム塩の固体中の構造は、セレン原子と対アニオンのフッ素原子との強い相互作用は認められず、テルロニウム塩との比較では中心原子の違いを反映した結果であった。単離したトリアリールテルロニウムの  $\text{BPh}_4^-$ 、 $\text{BF}_4^-$ 、 $\text{PF}_6^-$ 、 $\text{OTf}^-$  塩がそれぞれ青色から緑色を呈することに対し、セレノニウム塩ではいずれの対アニオンの場合でも淡黄色程度の呈色であった。また紫外可視吸収スペクトルでも、テルロニウム塩では 600 nm 付近にいずれも吸収を有しており、固体および溶液中共に強い呈色を示していることに対し、セレノニウム塩では呈色しておらず全く異なる結果を得た。

このことは、第5周期テルルから第4周期セレン原子となることで、カチオン性の局在化の寄与の増加や LUMO 準位の上昇などが考えられるが、今後 16 族元素オニウム種の呈色要因を理論的にも検討する必要がある。

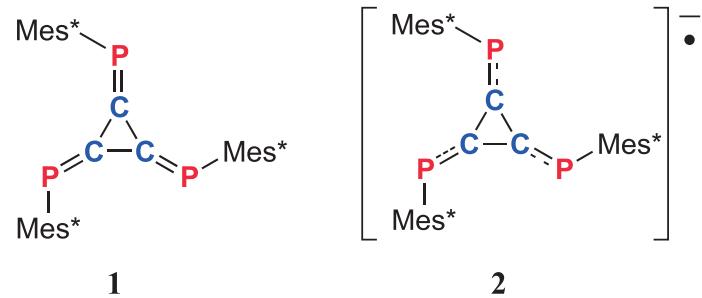
本研究を行うにあたり、京都大学化学研究所・物質創製化学研究系有機元素化学研究領域の时任宣博先生、笹森貴裕先生に実験・測定の便宜を図って頂きました。深く感謝致します

## 小員環骨格を有する高周期典型元素化合物の実験的電子密度分布解析

橋爪 大輔・独立行政法人理化学研究所 創発物性科学研究センター

[目的] 含高周期典型元素化合物は第二周期元素のみからなる化合物に比べ、その結合状態が複雑である。特に小員環化合物は結合の歪みも伴うので、結合状態の理解が困難である。そこで本研究では、化研側共同研究者である時任教授グループが合成する高周期典型元素化合物、特に小員環化合物の結合状態を、高精度な単結晶 X 線結晶回折データから実験的にあるがままの電子密度分布を、結合の本質である価電子も含め観測し、これをもとに結合状態を明らかにする。

シクロプロパン骨格を有する  
トリホスファ[3]ラジアレン、**1**、は、  
計算化学からは  $C_3$  対称構造をと  
ることが予測されている。一方、  
結晶構造解析からは、 $C_3$  対称から  
大きく歪んだ構造が得られてい  
る<sup>1</sup>。さらに、**1**を一電子還元した



アニオンラジカル種、**2**についても、計算化学-結晶構造で同様な対称性の違いが見られる。そこでこのような構造の歪みが分子の安定化にどのように寄与しているのか明らかにするために、中性種**1**、およびアニオンラジカル種**2**の実験的電子密度分布解析を行った。

[実験方法] (サンプリング) 本研究では、構造解析を目的とした通常の構造解析に比べ、高精度・高分解能なデータが必要である。そのためには、測定に供する結晶を単結晶状態が崩壊することなく、実験室から回折装置上に移動しなければならない。空气中で**1**は安定であるが、**2**は瞬時に分解する。そこで、**2**のサンプリングはグローブボックス内で行った。結晶は乾燥したパラフィンを用いてガラスキャピラリーに接着し、試料ビンに密封して、回折装置が設置してある部屋に移動し、その後速やかに回折計上にマウントし、100 K の窒素ガス気流下においていた。

(測定と解析) 測定は共焦点ミラーで集光および单色化した、Mo  $K\alpha$ 線を用いた。測定は  $2\theta < 120^\circ$ まで行った。解析は通常の構造解析を行った後、 $d < 0.83 \text{ \AA}$  のデータを用いて高角解析を行い、原子位置を精密に決定した。次にここで決定し原子座標と温度因子を用いて、多極子展開法による電子密度分布解析を行った。

[実験結果と考察] **1** および **2** の最終的な *R* 因子はそれぞれ、0.0213, 0.0235 であった。Fig. 1 にシクロプロパン骨格面における static model map (温度因子の効果を除外した deformation Fourier map) を示す。C-P 結合軸上および、三員環を形成する C-C 結合の外側に高い電子密度が見られた。Fig. 2 に各結合の bond path (BP), bond critical point (BCP) を示す。**1**, **2** いずれも C-C 結合のほぼ直線に近い BP が観測された。C-BCP-C の角度は **1** では  $177.1^\circ$ (av.), **2** では  $177.4^\circ$ (av.) であった。計算化学的手法から得られた値は **1**, **2** それぞれ、 $170.99$ ,  $171.16^\circ$  であり、結晶中の方が C-BCP-C が直線的であることが分かった。これは結晶中の構造の方が、結合を形成する軌道の重なりが直線的であることを示している。したがって、分子構造が  $C_3$  対称から歪むことによって、三員環形成の歪みが緩和されていると考えられる。

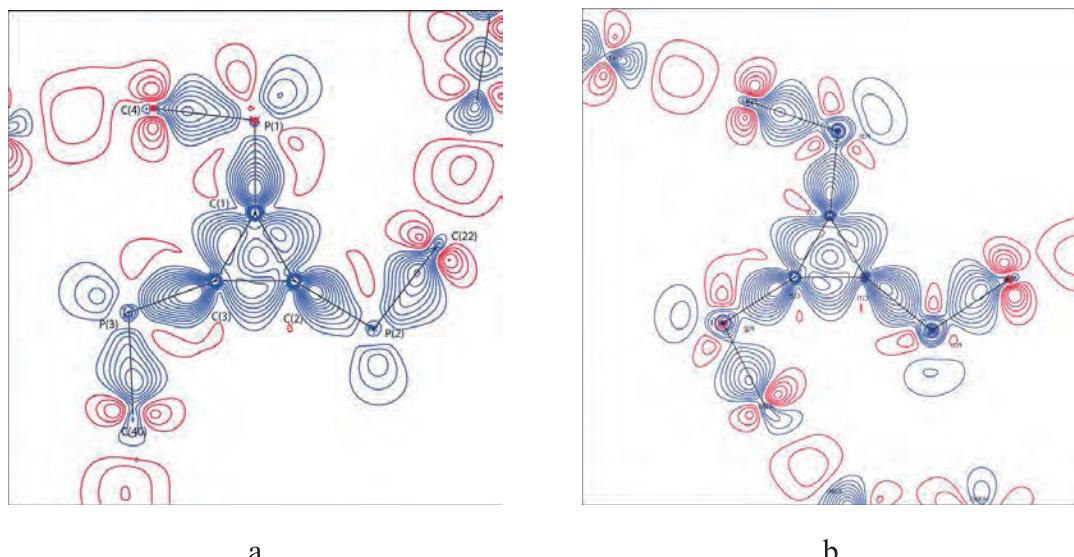


Fig. 1 シクロプロパン骨格面 (a: **1**, b: **2**) の static model map。等高線の間隔は  $0.05 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ 。

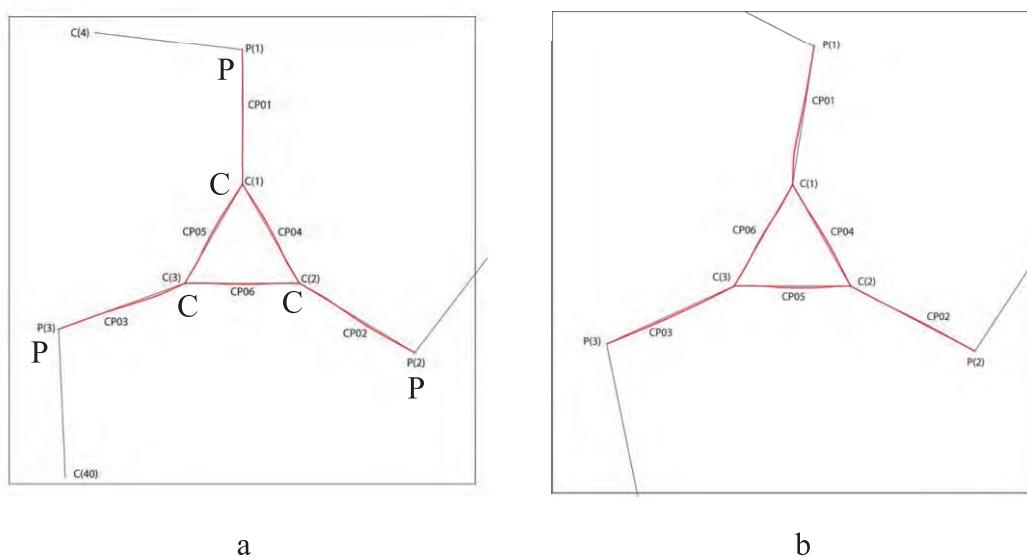


Fig. 2 シクロプロパン骨格内の C-C と C=P 結合の BP および BCP (a: **1**, b: **2**)。

(1) H. Miyake, T. Sasamori, N. Tokitoh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3458.

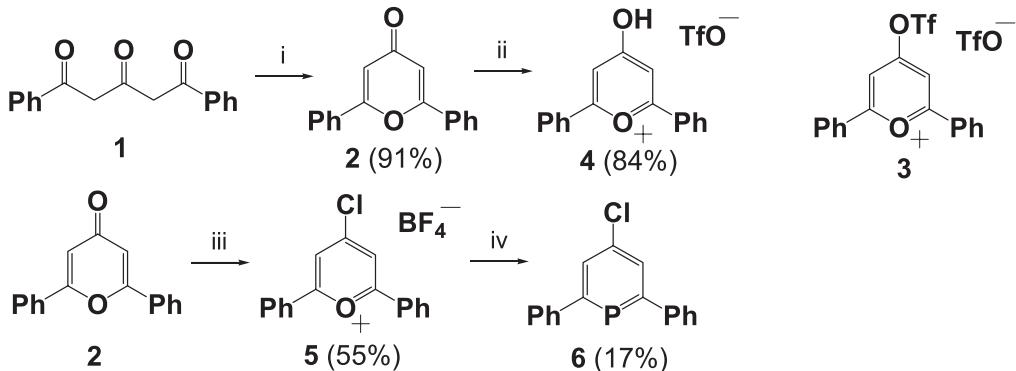
## 新規含リン芳香族化合物の合成と物性の解明

長洞記嘉・福岡大学理学部

含窒素芳香族化合物であるピリジンは有機塩基や遷移金属の有用な配位子として用いられ、有機合成化学の分野などで広く研究されている。一方、窒素原子と同族のリン原子を含む多環式芳香族化合物の報告例は非常に少なく、それらの構造や性質は明らかになっていない。リン原子を含む多環式芳香族化合物の理論的な考察によると、非共有電子対の配位能が高いこと、最低非占有分子軌道レベルが低く良い電子受容体であること、さらにバンドギャップが小さく有機導電性材料の候補となり得ることが報告されており、非常に興味深い性質を有している化合物である。本研究課題ではリン原子を含む多環式芳香族化合物の系統的合成法の開拓とそれらの性質の解明を目的とした。

## スルホン酸エステルおよび塩素置換基を有するホスフィニンの合成検討

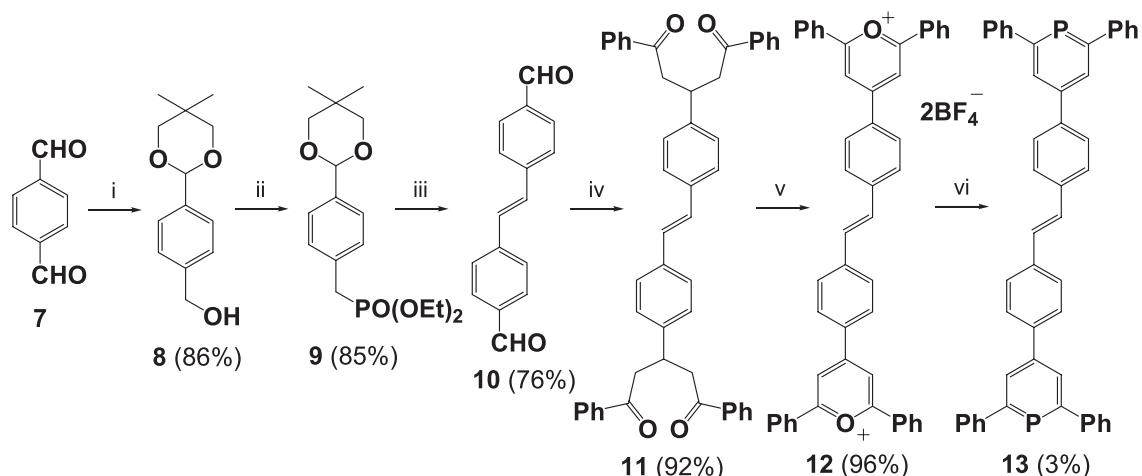
トリオン **1** を濃硫酸で脱水縮合することで収率良くピラノン **2** が得られた。化合物 **2** にトリフルオロメタンスルホン酸無水物を作用させたところ、トリフルオロメタンスルホニル (TfO) 基を有する化合物 **3** ではなく、水酸基をもつピリリウム塩 **4** が黄色粉末として収率 84%で得られ、TfO 基の脱離能が高いことが明らかになった。化合物 **4** の構造は各種 NMR および X 線結晶構造解析で明らかにした。次に、ピラノン **2** に塩化ホスホリルを作用させ、引き続きほうフッ化水素酸を反応させたところ、塩素置換基を有するピリリウム塩 **5** が収率 55%で得られた。得られたピリリウム塩 **5** にトリス(トリメチルシリル)ホスフィンを作用させたところ、<sup>31</sup>P NMR でリン原子を含む芳香族化合物に特徴的な低磁場領域である+184.2 ppm にシグナルが観測され、塩素置換基を有するホスフィニンを合成することに成功した。



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (i) conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rt, 10 min; (ii) Tf<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1.5 h; (iii) (a) POCl<sub>3</sub>, rt, 1 h, (b) HBF<sub>4</sub><sup>-</sup>, rt, 2.5 h, (iv) P(SiMe<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, rt, 3 h.

## ビホスフィニン誘導体の合成

テレフタルアルデヒド<sup>7</sup>を出発物質とし、アセタール保護および還元によりアルコール<sup>8</sup>を合成した。臭素化後、亜リン酸トリエチルを作用させ化合物<sup>9</sup>を得た。Horner Emmons 反応を行い、酸による脱保護を行うことで化合物<sup>10</sup>を合成した。化合物<sup>10</sup>のアルドール縮合、引き続きマイケル付加反応でテオラオン<sup>11</sup>を経て、ビピリリウム塩<sup>12</sup>を合成した。最後に、トリス(トリメチルシリル)ホスフィンを反応させ、新規ビホスフィニン<sup>13</sup>を黄色固体として単離収率3%で得た。



**Scheme 2.** Reagents: (i) (a) dimethylpropanediol, TsOH, toluene, (b) LiAlH<sub>4</sub>, THF; (ii) (a) CBr<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, (b) P(OEt)<sub>3</sub>; (iii) (a) terephthalaldehyde monodiethylacetal, t-BuOK, (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (iv) (a) acetophenone, Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, toluene, (b) acetophenone, NaNH<sub>2</sub>, toluene; (v) HBF<sub>4</sub>, Ph<sub>3</sub>COH; (vi) P(SiMe<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, benzene.

## 学会発表

1. 芳香環で連結した二量体ホスフィニンの合成と吸収、発光および電気化学的特性の解明、第50回化学関連支部合同九州大会、長洞記嘉・小川環樹・塩路幸生・大熊健太郎、2013年7月、北九州市

2. 新規なモノおよびビスホスフィニン類の合成、長洞記嘉・西嶋修平・小川環樹・徳丸裕士・塩路幸生・大熊健太郎、第40回有機典型元素化学討論会、2013年12月、東大阪市

## 論文発表

1. The First Formation of (1Z)-1-Alkylidene-1*H*-isobenzofuranium Amides and 1*H*-Inden-1-ones: Acid-Promoted 5-*exo* Cyclization and Hydration/Aldol Condensation Reactions of *o*-Ethynylbenzophenones, N. Nagahora, T. Wasano, K. Nozaki, T. Ogawa, S. Nishijima, D. Motomatsu, K. Shioji, K. Okuma, *Eur. J. Org. Chem.*, **2014**, 1423–1430.

## ヘテロ元素を骨格に含む新しい芳香族化合物の物理化学的性質の解明

斎藤 雅一・埼玉大学大学院理工学研究科

### <序論>

報告者が合成に成功しているジリチオスタンノール **1-2** はスズを炭素 $\pi$ 電子系骨格に含む初めてのアニオン性芳香族化合物であるので<sup>(1)</sup>、フェロセンに代表される遷移金属錯体の配位子として用いられているシクロペンタジエニルアニオンとの対比で大変興味深い化合物である。特にシクロペンタジエニルアニオンとは異なり、ジリチオスタンノールはジアニオン等価体であるので、その $\pi$ 面の両面で錯形成することができる。しかし、そのような中性錯体の合成は、シクロペンタジエニルアニオンの系はもとより、どの高周期 14 族元素を骨格に含むアニオン性芳香族化合物を用いても達成されていなかった。そこで本研究では、ジリチオスタンノールの $\pi$ 面の上下で配位した錯体を合成し、その酸化・還元挙動を調べ、ジリチオスタンノールがシクロペンタジエニルアニオンと比べて電子供与性が高い配位子として機能するかどうかを解明することを目的とした。

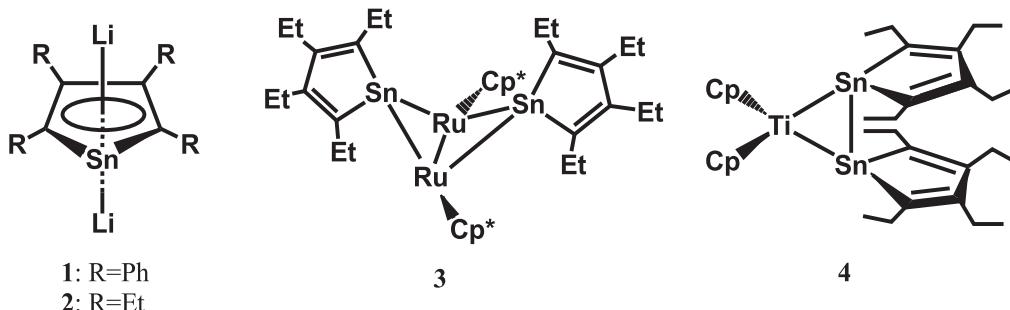
### <結果と考察>

#### 1. ジリチオテトラフェニルスタンノール **1** と各種遷移金属試薬との反応

まず最初に、スタンノール環炭素上の置換基がフェニル基のジリチオスタンノール **1** と各種遷移金属試薬との反応を検討したが、いずれの反応も複雑で、生成物の同定には至らなかった。

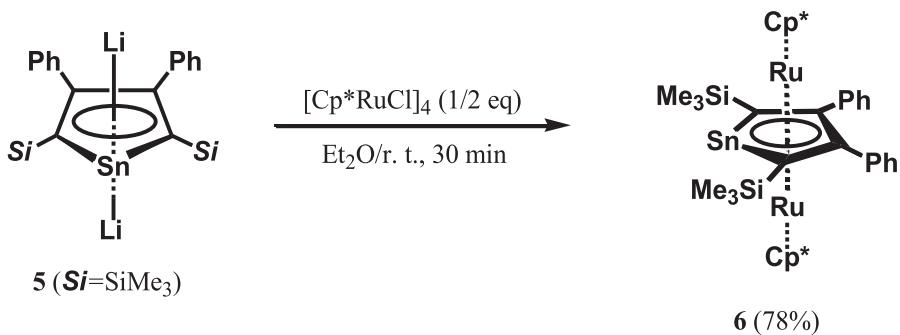
#### 2. テトラエチルジリチオスタンノール **2** と各種遷移金属試薬との反応

次にテトラエチルジリチオスタンノール **2** と  $[Cp^*RuCl]_4$  及び  $Cp_2TiCl_2$  との反応を検討したところ、いずれの場合もスタンノール環は $\pi$ 配位せず、予想外の化合物 **3** 及び **4** がそれぞれ得られた。化合物 **3**において、異常に短いルテニウムールテニウム結合が見つかり、その根源は三員環の歪みに由来するバナナ結合と三員環に非局在化した $\sigma$ 軌道であることを明らかにした。また、化合物 **4**の構造を調べたところ、これまでのオレフィン錯体やメタラシクロプロパンとは異なる、三員環内に非局在化した $\sigma$ 軌道による芳香族性が発現していることを明らかにした。



### 3. シリル基を有するジリチオスタンノール **5** の合成とルテニウム試薬との反応

スタンノール環炭素上の置換基がフェニル基及びエチル基の場合にはスタンノール環が $\pi$ 配位した錯体が得られなかつたので、次に $\alpha$ 炭素上の置換基をトリメチルシリル基に置き換えたジリチオスタンノール **5** を新規に合成し、これと $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ との反応を検討したところ、中性としては初めてのトリプルデッカー錯体の例となる重いルテノセン **6** を合成・単離することに成功した。



そこで、得られたトリプルデッカー錯体 **6** のサイクリックボルタンメトリーを測定したところ、その酸化電位はフェロセンに対して-0.43 Vと、フェロセンよりも酸化されやすいことがわかつた。ルテノセンはフェロセンよりも酸化されにくく、電子供与性置換基であるメチル基を有するデカメチルルテノセンでさえもフェロセンよりも酸化されにくいことから<sup>(2)</sup>、スタンノール配位子はこの一般則を変えてしまうほど強力な電子供与性配位子としてはたらいていることがわかつた。

#### 参考文献

- (1) (a) M. Saito, R. Haga, M. Yoshioka, K. Ishimura and S. Nagase, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 6553-6556 (2005); (b) M. Saito, T. Kuwabara, C. Kambayashi, M. Yoshioka, K. Ishimura and S. Nagase, *Chem. Lett.*, **39**, 700-701 (2010).
- (2) M. D. Todd, Y. Dong and J. T. Hupp, *Inorg. Chem.*, **30**, 4687-4690 (1991).

#### 成果発表

- (1) "Unexpected Formation of  $\text{Ru}_2\text{Sn}_2$  Bicyclic Four-membered Ring Complexes with Butterfly and Inverse Sandwich Structures", T. Kuwabara, M. Saito, J. D. Guo and S. Nagase, *Inorg. Chem.*, **52**, 3585-3587 (2013).
- (2) "Diversity of the Structures in a Distannene Complex and its Reduction to Generate Six-membered  $\text{Ti}_2\text{Sn}_4$  Ring Complex", T. Kuwabara, J. D. Guo, S. Nagase and M. Saito, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **53**, 434-438 (2014).
- (3) "Synthesis, Structures and Electronic Property of the First  $\mu\text{-}\eta^5\text{:}\eta^5$ -Stannacyclopentadienyl Dianion Transition-metal Complexes", T. Kuwabara, J. D. Guo, S. Nagase, T. Sasamori, N. Tokitoh, M. Saito, in preparation.

## 多核 NMR による交互共重合型無機系オリゴマー分子の解析 および分子形態制御手法の開発

高橋雅英・大阪府立大学大学院工学研究科

### 【目的】

サブ nm～数十 nm の構造（中距離構造）は、「伝導」や「 спинの相関」をはじめとする多様な物性に影響を及ぼすため、極めて重要な構造サイズ領域である。しかしながら、無機非晶質材料においては精密な中距離構造制御が困難であるため、加工成型性は高いものの物性制御の自由度が低いことが問題となってきた。ここで申請者らは、「ヘテロな金属－オキソ結合を有する交互共重合体の液相合成反応」を拡張することで、中距離構造が制御された無機系オリゴマー分子の作製および非晶質固体材料のビルディングアップが可能であると考えた。本申請研究では、ケイリン酸塩系オリゴマー分子に着目し、各種合成条件と形成される化学種（中距離構造）との相関を、NMR を用いた局所構造解析により明らかにする。

### 【実験方法】

1) リン酸/ジメチルジクロロシラン系： リン酸 ( $\geq 99.999\%$ ) とジメチルジクロロシランを、窒素雰囲気下、 $1:x$  のモル比 ( $x = 0.5, 3$ ) で混合した。30 分攪拌後、ジメチルジクロロシランの蒸発を防ぐために合成容器を密栓した。その後、同温度で 2 時間保持し試料を得た。合成した試料はグローブボックスにて保管した。また、リン酸およびジメチルジクロロシランの各々を THF に希釈 (10 wt%) し混合することで、THF 共存下においても試料を作製した。NMR チューブ(OPTIMA 製 NES-600, 5mm)に試料を原液のまま充填した。構造評価には  $^{31}\text{P}$  NMR 測定および  $^{29}\text{Si}$  NMR 測定を用いた。2) リン酸/ジフェニルジクロロシラン系： リン酸 ( $\geq 99.999\%$ ) とジフェニルジクロロシラン ( $\geq 97.00\%$ ) を、窒素雰囲気下、1:3 のモル比で混合した。100 °C に 3 時間かけて昇温し、同温度で 3 時間保持した後、室温に徐冷して試料を得た。リン酸/ジメチルジクロロシラン系と同様に、 $^{31}\text{P}$  NMR 測定および  $^{29}\text{Si}$  NMR 測定により得られた分子の構造を解析した。得られた分子の化学式は P-S-P のように略記する。ここで、P はリン酸、S は有機シランを示す。

### 【実験結果と考察】

ケイリン酸オリゴマー分子の作製には、酸塩基反応による出発原料同士の直接反応を利用した無溶媒直接縮合法[1-3]を利用した。反応温度および出発原料組成を制御することで、直鎖および分岐型の形状を有するオリゴマー分子の選択的な合成を試みた。

Fig. 1 にリン酸/ジメチルジクロロシラン系において作製した試料に対する $^{31}\text{P}$ および $^{29}\text{Si}$ NMR測定結果を示す。 $x = 0.5$ 組成における $^{29}\text{Si}$ NMR結果より、D<sup>1</sup>種の割合が94%を占めることが明らかになった。また、 $^{31}\text{P}$ NMR結果より、得られた試料は Q<sup>3</sup>種を含まない分子であることが分かった。 $^{29}\text{Si}$ NMR、 $^{31}\text{P}$ NMR両測定において、ヘテロな金属オキソ結合に由来するシグナルが観測されなかったことと併せて考えると、反応生成物は、SP型オリゴマー : [SP]<sub>1</sub>S型オリゴマー = 82 : 18 で構成される混合試料である。同様にして、 $x = 3$ 組成で作製した試料は、[SP]<sub>1</sub>S型オリゴマー : [SP]<sub>2</sub>S型オリゴマー = 87 : 13 で構成されることが明らかになった。また、THF溶媒共存下、 $x = 0.5$ 組成で試料を合成した場合、[PS]<sub>1</sub>P型オリゴマー分子を35~45%で含む試料が得られた。以上のことより、SP結合形成を逐次的に進行させ、かつ、反応の進行に伴う分子量の多分散化を抑制することで、種々の分子構造を有する直鎖型オリゴマー分子が合成可能であると言える。

分岐型ケイリン酸オリゴマー分子の合成はリン酸/ジフェニルジクロロシラン系でおこなった。電子吸引的なフェニル基により修飾されたジフェニルジクロロシランは反応性が高いため、Q<sup>3</sup>種のリン原子を含む分岐型オリゴマー分子を形成することが期待される。しかしながら、種々の実験条件を検討したにもかかわらず、PS系環状分子もしくは分岐型高分子が形成し、目的とするオリゴマー分子の合成には至らなかつた。これは、Q<sup>2</sup>種リン酸分子の求核性が低く反応に関与しないためであると考えられる（リン酸の酸解離定数はプロトンの脱離ごとに  $\text{pK}_1 = 2.15$ ,  $\text{pK}_2 = 7.1$ ,  $\text{pK}_3 = 12.4$  と減少する）。これを加味して、ジフェニルジクロロシランをシランAに変更し同様の反応をおこなつところ、分岐型オリゴマー分子の合成に成功した。得られた分岐型オリゴマーをビルディングブロックとして作製したバルク非晶質材料は、中距離構造が精密に制御されているため極めて高い耐加水分解性を有する。今後、種々のオリゴマー分子から成る非晶質材料を合成するとともに、構造-物性相関を得ることを目指す。

【参考文献】 1) H. Niida, M. Takahashi, T. Uchino and T. Yoko, *J. Mater. Res.*, 18, 1081 (2003); 2) H. Niida, M. Takahashi, T. Uchino and T. Yoko, *Phys. Chem. Glasses*, 43C, 416 (2001); 3) H. Niida, M. Takahashi, T. Uchinoband T. Yoko, *J. Non-Cryst. Solids*, 306, 292 (2002)

【論文・学会発表等】 1) 高橋雅英, "酸化物オリゴマー分子の設計と機能創出", 分子ナノテクノロジー第174委員会 第44回研究会、2) 吉井雄飛、徳留靖明、高橋雅英、"酸塩基反応を用いたケイリン酸塩系オリゴマー分子設計", 日本セラミックス協会第25回秋季シンポジウム

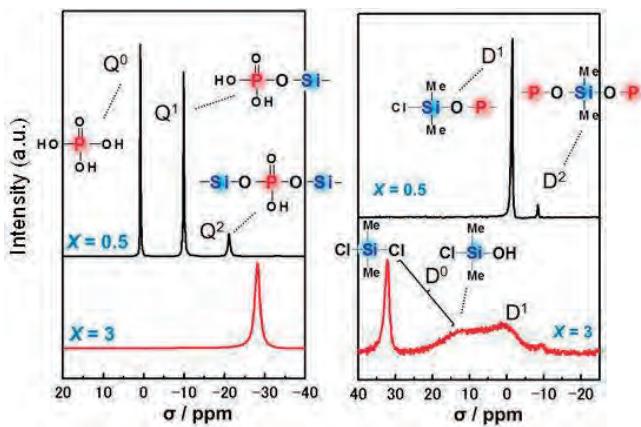


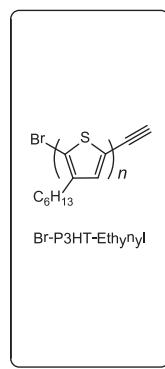
Fig.1  $^{31}\text{P}$  (left) and  $^{29}\text{Si}$  (right) NMR spectra of phosphosilicate oligomers prepared at  $x = 0.5$  and 3.

# 太陽電池用ポリマーの構造と機能

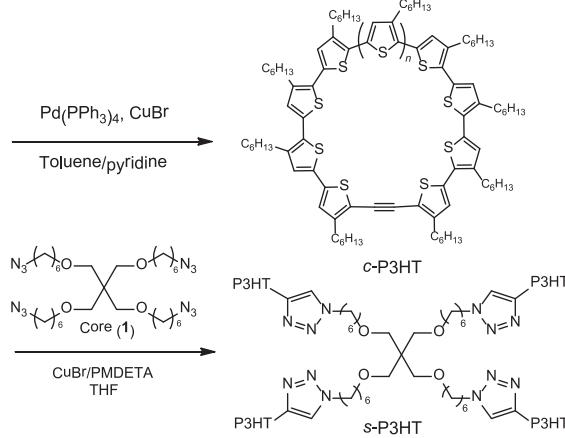
佐藤敏文・北海道大学 大学院工学研究院

## [目的]

高分子のモルフォロジーは、その高分子の発現する特性と密接に相関していると考えられる。そのため、特性を理解する上で、高分子の凝集構造を明らかにすることは極めて重要であるが、そのような基礎科学は未開拓の部分が多い。本研究では、これまで応募者が確立してきた精密重合法を活用し、有機太陽電池に用いられてきたポリ(3-ヘキシルチオフェン) (P3HT) の環状および星型高分子を合成する。また、核磁気共鳴(NMR) 法と融合させることにより、その凝集構造を明らかにし、その基礎科学の構築、すなわち、材料一構造相関解明を目指す。本年度は環状及び星形構造を有する高分子の精密合成を行った (Scheme)。



**Scheme.** Synthesis of *c*-P3HT and *s*-P3HT



## [実験方法]

### 環状 P3HT (*c*-P3HT) の合成

三つ口フラスコに乾燥トルエン (300 mL) とピリジン (100 mL) を加えてアルゴンで 30 分間脱気した後、臭化銅 (11.9 mg, 82.7  $\mu\text{mol}$ ) 及び  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (95.6 mg, 82.7  $\mu\text{mol}$ ) を加え、80 °C に加熱した。系内にアルゴンを用いて脱気した **Br-P3HT-Ethynyl** (35.0 mg,  $M_{n,\text{NMR}} = 4,200$ , 8.27  $\mu\text{mol}$ ) のトルエン溶液 (11.2 mL) を  $0.3 \text{ mL h}^{-1}$  の速さで滴下し、滴下終了後、続けて 24 時間攪拌した。その後、活性アルミナを用いたスカッドカラムに通すことにより金属残渣を除去し、溶媒を減圧留去した。残渣を THF に溶解させ、氷冷したメタノールへの再沈殿により紫色固体を得た (収量: 30.2 mg, 収率: 86.3%)。

### 星形 P3HT (*s*-P3HT) の合成

アルゴン雰囲気下、シュレンク管に **Br-P3HT-Ethynyl** (60.0 mg,  $M_{n,\text{NMR}} = 5,600$ , 10.7  $\mu\text{mol}$ ) と **1** (1.55 mg, 2.44  $\mu\text{mol}$ )、臭化銅 (I) ( $\text{CuBr}$ ) (1.05 mg, 7.31  $\mu\text{mol}$ )を入れ、乾燥 THF (6.0 mL) と *N,N,N',N'',N'''*-ペンタメチルジエチレントリアミン (PMDETA) (2.53 mg, 14.6  $\mu\text{mol}$ ) に溶解させた。室温で 72 時間攪拌した後、シリカゲルを用いたフラッシュカラムに通すことにより触媒残渣を除去し、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により精製し

て紫色固体を得た(収量: 18.6 mg, 収率: 31.0%)。

## [結果と考察]

### **c-P3HT** の合成

生成物の構造解析を目的として MALDI-TOF MS 測定を行った結果、166 Da 間隔のピークが観測された(Figure 1)。この数値は P3HT のモノマーユニットの分子質量に一致する。さらに、2349.42 Da に観測されたピークは **c-P3HT** の 14 量体の理論分子質量(2349.15 Da)と良い一致を示した。この結果から、分子内環化反応は定量的に進行したことが示唆された。次に、ポリマーの物性解析を目的として粘度測定を行った結果、THF 溶液中における **c-P3HT** の固有粘度( $8.8 \text{ mL g}^{-1}$ )は **Br-P3HT-Ethynyl** の固有粘度( $13.4 \text{ mL g}^{-1}$ )よりも低下した。この結果は同一分子量の直鎖状ポリマーの粘度に比べ、環状ポリマーの粘度が減少する既知事実と一致した。以上の結果より、**c-P3HT** の精密合成を達成した。

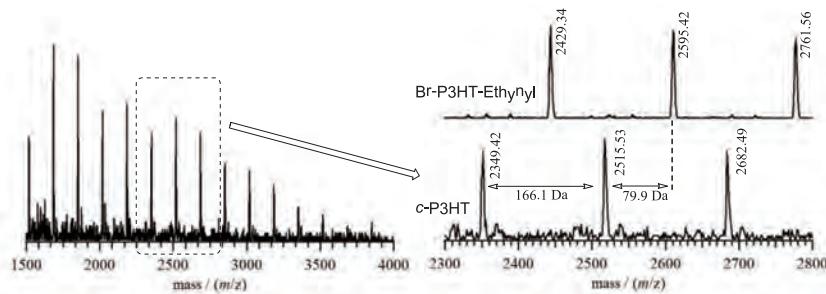


Figure 1. MALDI-TOF MS analyses of **c-P3HT** and **Br-P3HT-Ethynyl**.

### **s-P3HT** の合成

生成物に対して  $^1\text{H}$  NMR 測定を行ったところ、末端のエチニル基に由来するシグナルが消失し、コア(1)に由来するシグナルが代わりに観測された。また、 $^1\text{H}$  NMR から求められた数平均分子量( $M_{n,\text{NMR}} = 23,100$ )は原料である **Br-P3HT-Ethynyl** の数平均分子量から算出した理論分子量( $M_{n,\text{calcd.}} = 23,000$ )と良い一致を示した。さらに、SEC 測定を行った結果、生成物のピークは原料である **Br-P3HT-Ethynyl** よりも高分子量側に検出された(Figure 2)。以上の結果より、**s-P3HT** の精密合成を達成した。

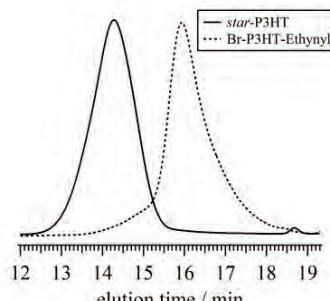


Figure 2. SEC traces of **star-P3HT** and **Br-P3HT-Ethynyl**.

## [成果報告]

2013 年 8 月、2013 年度北海道高分子若手研究会、「末端エチニル化ポリ(3-ヘキシリルチオフェン)の精密合成」、優秀ポスター賞受賞

2014 年 1 月、化学系協会北海道支部 2014 年冬季研究発表会、「大環状ポリ(3-ヘキシリルチオフェン)の精密合成」

## パルスインジェクション法を用いてグラファイト表面に吸着させた超分子メタロポリマーのAFMによる観察

高城大輔・大阪大学大学院理学研究科構造熱科学研究センター

### 目的

真空中にセットした基板に目的分子を含む溶液のナノサイズの粒径をもつミストをパルスバルブの開口により吹き付け、その吸着相を得る方法をパルスインジェクション法と呼ぶ。この方法よれば、高分子などのように、加熱分解により真空蒸着法ではその吸着層を得ることが不可能な材料を基板上に吸着させることができる。さらに、そのパルス数（開口回数）により、吸着層の被覆率をサブモノレイヤーの精度で制御することが可能である。本研究では、このパルスインジェクション法を用いて、甲南大学の檀上博史准教授が開発したツインボウル型接合素子により連結された超分子メタロポリマー（Fig. 1）を基板上に配線する（吸着させる）ことを目的とした。この超分子は、溶液中で球状錯体 $2^{3+}$ をゲスト分子としてツインボウル型分子 $1^{3-}$ により包接することで自発的に得られる（Fig. 2）。その特徴は、 $1^{3-}$ および $2^{3+}$ の濃度を調整または混合する金属カチオン種を選択することで、鎖長を制御することができる。したがって、あらかじめ、これらの溶液の条件を調整することで、パルスインジェクション法によりこの超分子を分解させることなく、基板上にその鎖長を制御して吸着させると期待される。

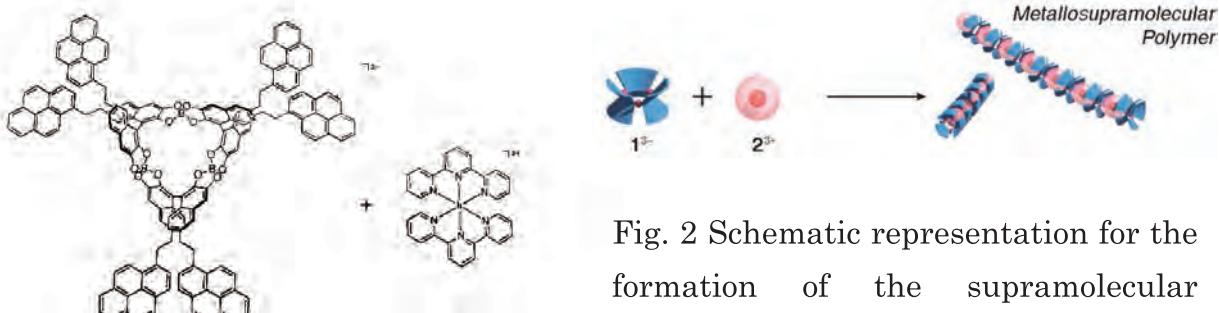


Fig. 1 Chemical structures of the twin bowl ·  $1^{3-}$  and guest molecule  $[Ir(tpy)_2]^{3+}$  ( $tpy = 2,2':6',2''$ -terpyridine) ·  $2^{3+}$ .

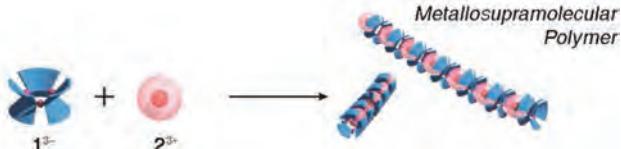


Fig. 2 Schematic representation for the formation of the supramolecular polymer chain composed of the twin bowl ·  $1^{3-}$  and guest molecule  $[Ir(tpy)_2]^{3+} \cdot 2^{3+}$ .

### 実験方法

ここでは、以下のような手順で上述の超分子メタロポリマーをグラファイト（HOPG）基板に吸着させた。ガラスノズルのキャビラリー内に供給された超分子ポリマーのクロロホルム溶液（0.23 mg/mL）を窒素ガスにより加圧し（350 kPa）、ガラスチャンバー内にこれを噴射することで、そのミスト（直径数百 nm）を形成させた。つづいて、ガラスチャンバーと真空チャンバー（ $2.7 \times 10^{-3}$  Pa）の間に設けたパルスバルブを2000回開閉させ（duration time 2 ms, delay time 500 ms）、ガラスチャンバー内で発生させたミストをパルスバルブから 13 cm 離して真空チャンバー内にセットした HOPG (0001) 表面に吹き付けた（Fig. 3）。このサンプルを大気中に取り出し、AFM 観察を行った。

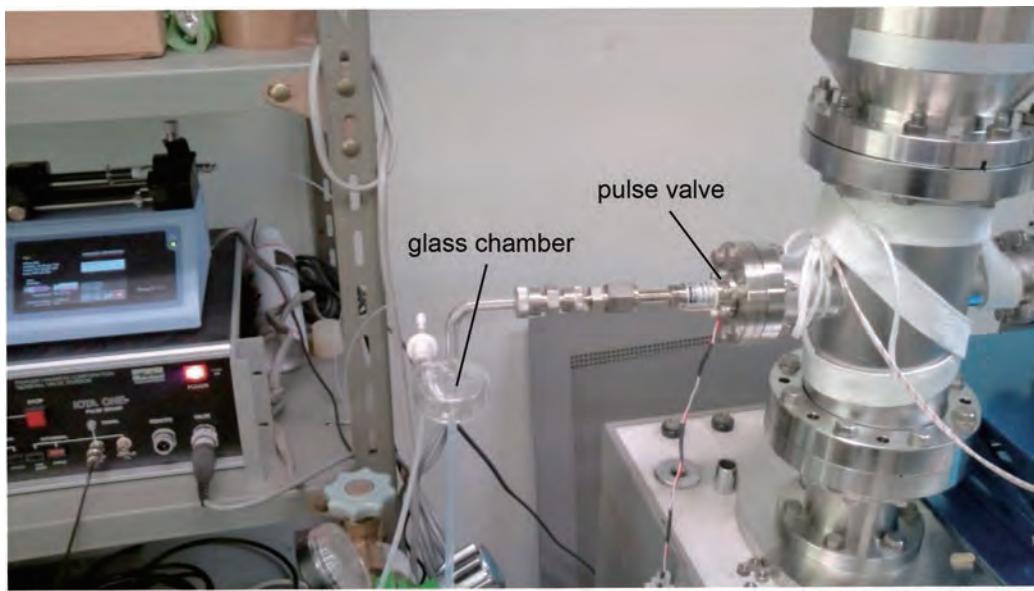


Fig. 3 Photo of the equipment for the pulse injection.

### 実験結果および考察

得られた AFM 像から、超分子ポリマーが、HOPG(0001)表面上に 2 次元的な束を形成し、明るいドメインとなって現れることが分かる (Fig. 4)。また、伸長した超分子が、基板表面に対して同一の配向をもってドメインを形成した結果、黒い線で示した数 nm 間隔のストライプ模様がその内部に観察されている。さらに、HOPG(0001)表面のステップエッジにおいて優先的に核生成が起こるため、黒い矢頭で示したようなステップエッジに沿ってドメインが形成されていることが分かる。このことから、あらかじめパターニングした基板表面上に、超分子メタロポリマーをパルスインジェクション法により吸着させることで、高度に配向と位置が制御された配線の形成が可能となることが期待される。今後は、パルスインジェクション法により得た基板上のこのような超分子メタロポリマーの鎖長の濃度依存性や化学的添加による構造変化の評価を AFM 観察により行う予定である。

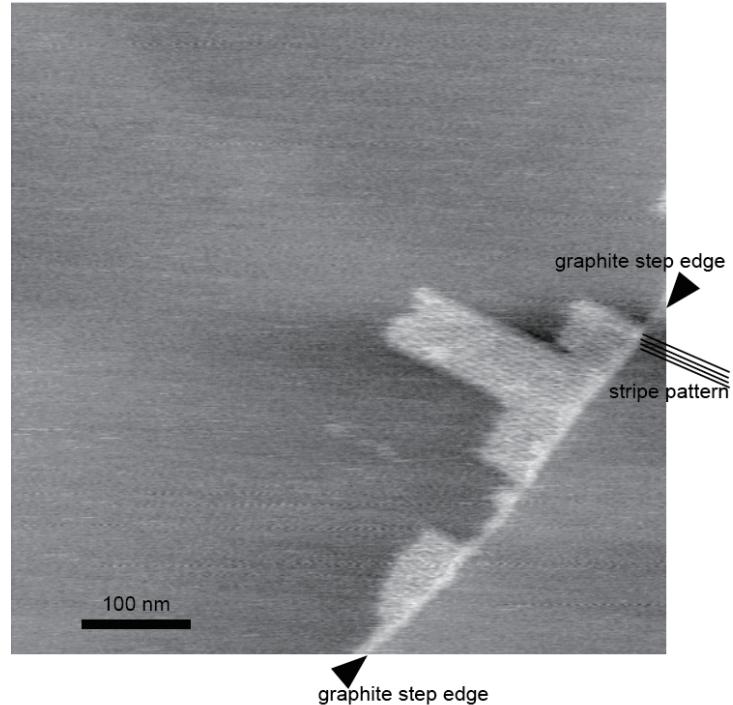


Fig. 4 AFM image of the supramolecular chains composed of the twin bowl ·  $1^{3+}$  and guest molecule  $[\text{Ir}(\text{tpy})_2]^{3+} \cdot 2^{3+}$  at the step edges (black arrowheads) of HOPG surface obtained by applying the 2000 pulses. The extended supramolecular chains arise as bright lines (indicated by black lines) in the 2D domain (bundle).

## Si 中のヘリウムバブルのナノ電子分光学的研究

宮本光貴・島根大学総合理工学研究科

**目的：**高密度化する半導体デバイス用 Si は、一層の高純度化や欠陥の少ない微細加工技術の開発が求められている。ヘリウム照射はこのような半導体微細加工技術として有力な選択肢であるが、同時に照射によって形成されたバブルを微量金属不純物のゲッターリングサイトとして有効利用できることが示され、Si 中のヘリウムバブルの形成・移動挙動、ヘリウムと照射欠陥との相互作用やその制御等に注目が集まっている。我々はこれまで、FZ-Si 試料について、ヘリウムイオン照射実験を行い、損傷の形成発達過程や照射ヘリウムガスの熱放出特性について電子顕微鏡観察や四重極質量分析装置を用いて調べてきた。しかし、バブル中のヘリウムの捕獲存在状態、その温度依存などについてはほとんど調べられた例が無い。そこで、本研究では高精度のナノ電子分光測定により、バブル中のヘリウムの捕獲状態についての知見を得ることを目的とする。

**実験方法：**試料は、TDY 社製の FZ(011)Si 単結晶で、ディスク状（直径 3 mm、厚さ 0.2 mm）に超音波カッターで切断した後、ディンプリング加工、化学研磨を行った。電子顕微鏡内で、この試料に 5 keV のヘリウムイオンを照射した。照射温度は 300 – 673 K、照射強度は、 $1 \times 10^{17} \text{ ions/m}^2 \text{ s}$ 、照射量は、 $5.5 \times 10^{20} – 1 \times 10^{21} \text{ ions/m}^2$  であった。照射済み試料を化研の STEM-EELS 装置（JEOL9980-TKP-1）により電子エネルギー損失分光の測定を行った。EELS のエネルギー分解能は 0.5 eV 程度である。

**結果と考察：**ヘリウム照射した Si からのヘリウムの熱的離脱特性を調べるために、四重極質量分析を用いて放出ガスの測定を行った。図 1 は、473 K で  $1 \times 10^{21} \text{ He}^+/\text{m}^2$  の照射を行った後、6 K/min の一定速度で昇温したときのヘリウムガスの放出速度と温度の関係を示した図である。これから 600 – 1200 K にかけてヘリウムの放出があり、放出ピークの形状から 3 つのサブピークが重なったものだと推察できる。これらのサブピークは、それぞれ対応した照射欠陥からの熱的離脱によるものと考えられ、欠陥種を同定する必要がある。

バブルでのヘリウムの捕獲存在状態を調べるために 673 K で  $5 \times 10^{20} \text{ He}^+/\text{m}^2$  の照射を行った Si 試料の STEM-EELS 測定

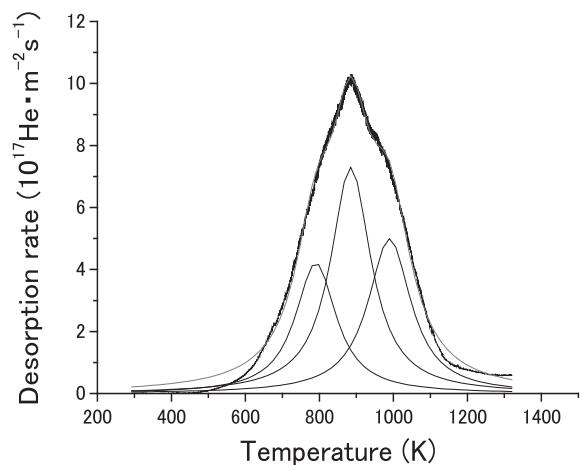


図 1

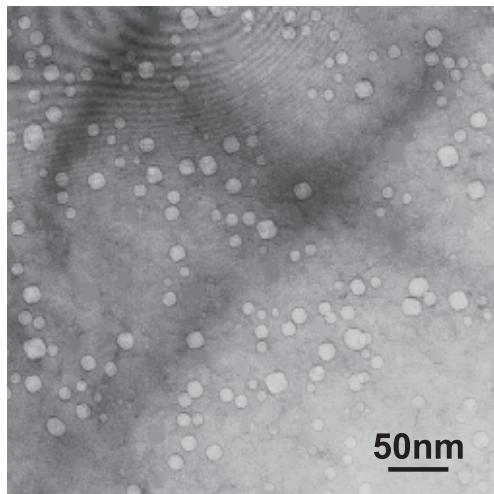


図 2

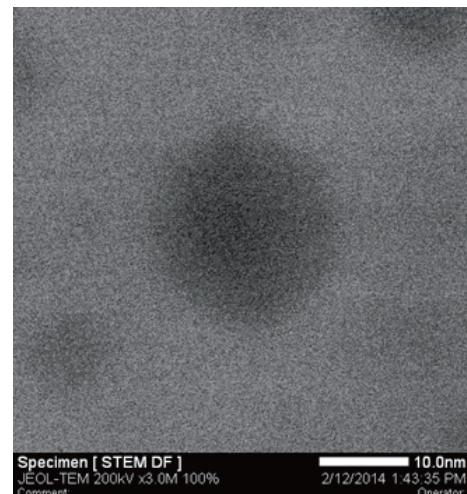


図 3

を行った。図 2 は、通常の TEM 明視野像である。直径 5–20 nm 程度のバブルが多数見られる。大きいバブルではファセットを持つものも見られる。図 3 は、STEM-EELS 電子顕微鏡で撮影されたバブルの高角度散乱円環暗視野 (HAADF) 像である。試料厚は約 8.5 nm、バブルの直径は 20 nm である。このバブルの中心部から得られた EELS スペクトルと Si のマトリックス部分から得られた EELS スペクトルを重ねて図 4 に示す。16 eV 付近と 32 eV 付近に Si からのピークが見られるが、バブル中心部からのスペクトルでは 22 eV 付近に He 荷電子励起によると思われる損失ピークが明瞭に見られる。また、12 eV 付近には、表面プラズモン励起によると思われるエネルギー損失も見られる。Si 中に形成されたバブル中の He が検出されたのは、初めての例だと思われる。

今後は、図 1 の結果と対応させて試料を焼鈍し、バブルからのヘリウムの消失温度を決定することにより、ヘリウムの固溶や拡散についての新たな知見が得られることが期待できる。また、He スペクトルのバブルサイズ依存性等にも興味が持たれる。

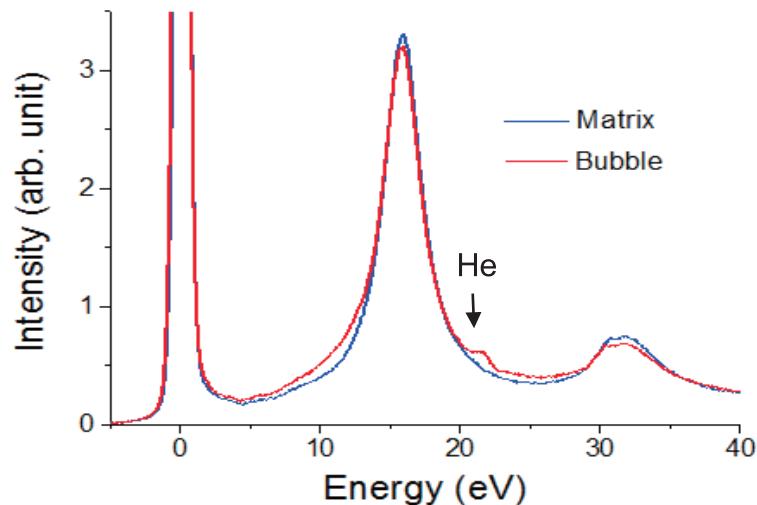


図 4

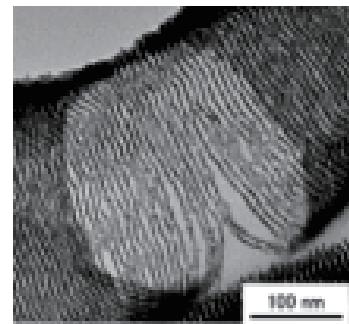
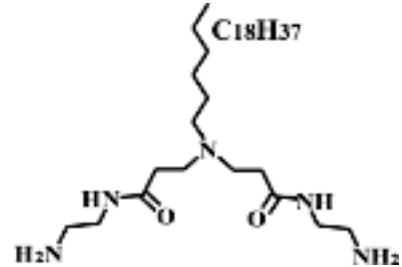
## ソフトテンプレート法による金属ナノリングの作製

河合武司・東京理科大学工学部

[目的] ナノサイズの物質は、原子や分子、バルクの状態と異なる性質を示すことから、現在、盛んに研究が行われている。ナノ素材の中でも金属・半導体ナノワイヤーは微細加工技術の進歩が著しい電子デバイス分野においてたいへん興味深い材料である。これらのナノワイヤー作製法としては、電子線リソグラフィー、SPM 法などの高額な装置や高度な技術を要するドライプロセスがいくつか報告されているが、現状では数十 nm オーダーの太さが限界である。一方、ウェットプロセスによるワイヤー合成も金については数多く報告されているが、幅が数十 nm と太いものや折れ曲がったものが多かったが、我々は金の(111)面が選択的に成長した幅 2 nm の直線状 Au ナノワイヤーの作製に成功した。ナノワイヤーの次のチャレンジングな課題は形態・形状などの二次構造制御である。ごく最近、我々は長鎖アミドアミン誘導体(C18AA; 右図)の分子集合体を鋳型に用いると、太さが 3 nm 以下の Pd ナノリングが容易に作製できることを見出した。さらに、条件によっては Pd ナノコイルも生成することがわかった。ナノリングの作製法としては直線状ナノワイヤーの両端を繋げる方法も考えられるが、現実的にはほとんど不可能である。また、これまでに太さ数 nm のナノリングの報告は全くないことから、ナノワイヤーの分野のさらなる発展には、ナノリングが直接合成できる本方法を展開・確立させることが重要である。そこで本研究では、金属の中でも特に触媒活性が高い白金族元素である Pd ナノリングの構造・生成機構の解明およびその触媒能について検討した。

[実験方法] Pd ナノリングの作製は、C18AA 水溶液に基質である  $K_2PdCl_4$  を溶解させた後、少量のトルエンを加え、還元剤として  $NaBH_4$  を添加し 1 日静置して行った。その触媒活性の評価は、作製した試料溶液を p-Nitrophenol と  $NaBH_4$  水溶液の混合水溶液中に添加して行った。

[結果および考察] C18AA の分子集合体に及ぼす C18AA の濃度、トルエンの可溶量、有機溶媒の種類および塩化パラジウム酸カリウムの濃度（電解質の効果）などの影響を調べ、Pd ナノリング作製の最適条件を調べたところ、 $[K_2PdCl_4]=7.5\mu mol$ ,  $[C18AA]/[K_2PdCl_4]=2$ ,  $[NaBH_4]/[K_2PdCl_4]=10$  およびトルエンの添加量が 7  $\mu L$  の条件下で、右図の TEM 像に示すような Pd ナノリングの集合体の作製に成功した。さらに、トルエンの添加量によって球状ナノ粒子や分岐状ナノワイヤーなどの構造体が作製でき、



数種類の構造体を容易に作り分けることができた。トルエンなどの油を可溶化させた C18AA は水溶液中で芋虫状の剛直な分子集合体を形成することが TEM 観察からわかった。さらに、ナノリングの生成機構を検討するために、倉田教授の支援で生成途中の TEM 観察を行ったところ、下図のように塩化パラジウム酸カリウムを添加した後に還元剤を加えると、C18AA の鋳型上にまずパラジウムナノ粒子が生成し、それが成長・融合してナノリングが生成することが判明した。また高分解

TEM 観察（倉田教授の支援）から、ナノリングの成長方向には  $0.227\text{ nm}$  間隔のフリンジと多数の粒界が観測された。 $0.227\text{ nm}$  は Pd の(111)面と一致することから、C18AA が(111)面以外の結晶面、例えば(100)面や(110)面に選択的に吸着することによってナノリングが成長することがわかった。

得られたナノリングの耐環境安定性を評価したところ、高い耐溶媒性、耐熱性、耐酸性・塩基性を有し、非常に安定したナノ構造体であることも分かった。そこで Pd ナノリングを用いた p-Nitrophenol の水素化反応に対する触媒能を調べた結果、比表面積がナノリングよりも大きいナノ粒子に比べ、4 倍の高活性を示した。Pd の (111) 面より (100) 面の方が触媒活性が高い事実を考えると、この高活性はナノリングが (111) 方向に成長し、リング表面の多くが (100) 面であるためと思われる。さらに、最近格子欠陥である結晶粒界が高い触媒活性サイトとなることが報告されている。したがって、本研究の Pd ナノリングに観測された多数の結晶粒界も高触媒活性の発現に寄与しているものと考えられる。

以上のように、倉田教授による TEM 観察支援により、ナノリングの生成機構および高触媒活性の理由を解明することができた。

### [成果報告書]

- (1) Thermal sensitive viscosity transition of elongated micelles induced by breaking intermolecular hydrogen bonding of amide groups. Clara Morita, Yoshiro Imura, Tetsuya Ogawa, Hiroki Kurata and Takeshi Kawai, *Langmuir*, Vol. 29, No. 18, 5450-5456 (2013).
- (2) 長鎖アミドアミン誘導体の分子集合体を鋳型に用いた Pd ナノリングの作製  
第3回 CSJ 化学フェスタ 2013, 渡辺沙也香・遠藤洋史・河合武司 (優秀ポスター賞受賞)

## 「ペロブスカイト研究会」の開催

水牧仁一朗・公益財団法人高輝度光科学研究センター

### 目的

本共同利用研究では放射光を駆使して遷移金属酸化物の結晶構造や電子状態を解明する国際共同研究を進めてきた。今年は特に最近話題となっている「ペロブスカイト構造物質」と放射光による局所構造解析に注目し、有機・無機の研究者が一堂に会してミニワークショップを開催した。

### 概要

ペロブスカイト構造は、巨大磁気抵抗、強誘電性や高温超伝導など非常に興味深い物性を示す舞台として知られている。その特性を活かし、誘電体や磁性体、電池材料などに広く用いられ、機能性材料として幅広く研究されてきた。ごく最近、有機分子を含んだペロブスカイト型構造材料が太陽電池として大きな注目を集めている。

そこで、今回は「ペロブスカイト構造物質」だけをキーワードに、無機合成、有機合成の両面から取り組んでいる研究の基礎と最近の進展を紹介する目的で本研究会を開催することにした。また無機・有機合成により作成された化合物の電子状態を評価する手段として放射光 X 線分光が挙げられるが、これまでに行ってきたペロブスカイト酸化物に対する研究結果を紹介することも目的とする。合成と評価を専門とする研究者が一堂に会することにより新しい共同研究が生まれることも期待して 2014 年 1 月 29 日に京都大学宇治キャンパス総合研究棟 CB215/217 室にて本研究会を実施した。

### 内容

本研究会は下記のプログラムに従って行われた。はじめに、島川教授よりペロブスカイト構造についてのイントロダクションが有った。ペロブスカイト構造は遷移金属元素(TM)と酸素(O)からなる  $TMO_6$  という八面体ユニットを基本単位としており、その基本単位の繋がり方により様々な構造を取り得ること、その構造や TM の価数を制御することにより、非常に多彩な物性を作り出すことができるこことを示された。次に水牧研究員により、X 線分光測定により、ペロブスカイト酸化物に含まれる TM 元素全てについて価数が簡便な方法により決定できることが示され、X 線分光法の有用性を訴える講演であった。最終公演では、若宮准教授から有機分子を含んだペロブスカイト型太陽電池材料についての最近の進展について講演があった。新規太陽電池材料としてペロブスカイト型化合物が有用で有り、合成条件を最適化することにより変換効

率が10%を超えることを明らかにした。

また研究会の様子を伝えるべく、写真を末尾に示す。ペロブスカイトという一つのキーワードのみで研究会を開催したが、ペロブスカイトの奥深さを感じた研究会となつた。

プログラム 1月29日

13:00-13:05 はじめに（島川 祐一）

13:05-13:45 島川 祐一（京都大学化学研究所 無機先端機能化学）

「ペロブスカイト構造酸化物の基礎と物質開発」

13:45-14:30 水牧 仁一朗（SPring-8）

「X線分光で観たペロブスカイト酸化物」

14:30-15:15 若宮 淳史（京都大学化学研究所 構造有機化学）

「ペロブスカイト型太陽電池の研究最前線～新規材料に求められる物性～」

15:15-16:00

[フリーディスカッション]







## 東アジア圏の若手レオロジストのための第9回ワークショップ

高橋 良彰・九州大学先導物質科学研究所

### 【目的】

本経費は、東アジア圏内の各国の研究者と連携し、物質科学およびレオロジ一分野の若手研究者や大学院生の研究活動のさらなる活性化や融合を目的とした、国際交流を促進する活動に充てられた。表記ワークショップは、若手研究者に自由な雰囲気の下での研究発表と議論などを通じて、将来の共同研究の基盤となる交流・連携を深める場を提供するものであり、今後のさらなる連携強化へ寄与する使命を帯びている。したがって、日本から多くの若手研究者・大学院生の参加が望まれ、化学研究所の渡辺宏教授らとともに、可能な限り多数の日本からの参加を奨励する支援活動を行なった。

### 【研究集会の開催場所・日程】

表記のワークショップは、Kyung Hyun Ahn 韓国ソウル大学教授を実行委員長として、同大学の Ayoung Lee 博士研究員を中心とした現地若手実行委員の運営により、韓国ソウル大学 Hoam Faculty House にて、2014年2月6日-2月7日に開催された。

### 【研究集会の開催趣旨】

このワークショップの開催趣旨は、近い将来に東アジア圏における物質科学およびレオロジ一分野の中核を担う若手研究者や大学院生の国際交流・連携を深め、研究の活性化を図ることである。また、研究発表と議論の場を提供し、各研究グループ間の共同研究等の活動をさらに発展させるための人的交流の場を提供することにある。

### 【研究集会の経緯】

このワークショップは、第1回のソウル(2006年2月)を皮切りに、第2回は京都(2007年1月)、第3回は上海(2008年1月)、第4回は Nakhon Ratchasima (2009年1月)、第5回は釜山(2010年1月)、第6回は山形(2011年1月)、第7回は北京(2012年2月)、第8回はプーケット(2013年1-2月)にて開催してきた。

### 【研究集会の形式】

このワークショップ開催の趣旨に鑑み、聴衆が分散して参加者相互の交流を低下させないために、これまでのワークショップでは参加者全員が常に同じ会場に居るよう口頭発表とポスター発表を1会場で行なってきた。今回のワークショップでは、ポスター発表は行なわれず、発表者(大学院生)全員が5分間の口頭のショートプレゼンテーションを行なうようにプログラムされた。短い発表時間内にいかにうまくまと

めるかが問われた企画だったが、ほぼ全員が、内容が良く伝わる発表を行なっていた。発表件数は 67 件と例年より若干増加した。

さらに今回の新企画として学生のチームプレーが実施された。これは学生たちが自らテーマを設定して現地の文化に触れるとともに、その結果を短時間でまとめて発表するもので、文化交流に留まらず、学生の企画・実行・プレゼンテーション能力の向上におおいに役立つ企画であった。またこの経験は、若手研究者たちが将来共同研究を行なうに当たっても良い経験となつたと思われる。

### 【研究発表の内容】

Complex fluid, Fluid dynamics, Nanocomposites and polymer melt, Biorheology, Industrial application の 5 セッションに大別して行なわれた。

高分子材料をはじめとするソフトマターのレオロジーの理論・シミュレーション・実験、そして新しい測定方法の開発に関する研究、化学工学的な観点からの流動制御・計測といった基礎研究や、ポリマーブレンドやブロック共重合体、ナノコンポジット、粒子分散系などの複雑な系の階層構造の解析とレオロジーを含めた様々な物性の関係の研究も多く、物質科学的な広がりを見せてている。さらに細胞のレオロジー的考察やバイオベース材料、医療・香粧用機能材料などをターゲットにした材料開発に関する研究発表、さらに乾燥過程に関する研究などもあり、これまでのワークショップに比べ発表内容が一段と広がってきた。

### 【参加者】

今回の参加者は 112 名であった。国別の所属機関数は韓国が 12 (参加者 65 名)、日本が 7 (参加者 32 名)、中国が 2 (参加者 13 名)、タイが 2 (参加者 2 名) であった。各大学とも国際化が進み、さらに一連のワークショップを通じた学生の短期留学や共同研究による発表もあり、単純な大学別、あるいは国別の発表や人数把握は困難である。西アジア、南アジア出身の学生が増加傾向にあるように感じられた。

参加者中、主な教員は以下の人々であった。

Natthida Rakkapao タイ王国 Prince of Songkla 大学 講師

Youngdon Kwon 韓国 SungKyunKwan 大学 教授

Kwang Soo Cho 韓国 Kyungpook 大学 准教授

Wei Yu 中国 上海交通大学 教授

Kang Sun 中国 上海交通大学 教授

Jiasong He 中国 中国科学院化学研究所 教授

櫻井 伸一 京都工芸繊維大学 教授

井上 正志 大阪大学 教授

杉本 昌隆 山形大学 准教授

岡本 茂 名古屋工業大学 准教授  
増渕雄一 京都大学化学研究所 准教授  
松宮由実 京都大学化学研究所 助教

【プログラム】

添付の通り。

【会議の写真】



ソウル大学 Hoam Faculty House (会場)



実行委員



参加者の集合写真



口頭発表の様子



学生たちのチームプレーの報告打ち合わせ

## — Program schedule —

The 9<sup>th</sup> International Workshop for East Asian Young Rheologists (IWEAYR-9)

2/6(THU.)		2/7(FRI.)	
09:00~09:30		Registration	
09:30~10:00	Introduction	09:30~10:00	Industrial application 2
10:00~10:30	Complex fluids 1	10:00~10:30	Complex fluids 3
10:30~11:00	Fluid dynamics 1	10:30~11:00	Fluid dynamics 2
Break time		Break time	
11:30~12:00	Nanocomposites and Polymer melt 1	11:30~12:00	Nanocomposites and Polymer melt 2
12:00~12:30	Complex fluids 2	12:00~12:35	Complex fluids 4
Lunch		Lunch	
14:00~14:30	Bio rheology	14:00~16:00	TEAM CONTEST
14:30~15:00	Industrial application 1	16:00~16:30	Break time
15:00~	TEAM PLAY	16:30~17:00	Awards ceremony
		17:30~	Dinner

### 2/6(THU.)

10:00~10:30 Complex fluids 1	
1	Effects of blended amorphous rice flour on rheological properties of rice dough <b>Seigo Marukami</b> (Yamagata University, Japan)
2	Viscoelastic Properties of Ring Polystyrenes with High Purity <b>Yuya Doi</b> (Nagoya University, Japan)
3	Rheological interpretation of the metal-ligand complexes in aqueous and non-aqueous solvents <b>Hashmi Saud</b> (Chonbuk National University, Korea)
4	Xanthan gum coated carbonyl iron microsphere based magnetorheological fluid and its polishing application <b>Seung Hyuk Kwon</b> (Inha University, Korea)
5	Viscoelastic Behavior of Cubic Phase <b>Naoto Oba</b> (Osaka University, Japan)
6	Rheological behavior of polymers filled with nanoparticles <b>Jun Wang</b> (Shanghai Jiao Tong University, China)

10:30~11:00 Fluid dynamics 1	
1	Fast drying dynamics of bimodal particulate suspensions using MS-DWS: Effect of drying temperature <b>Gwi Jeong Oh</b> (Korea University, Korea)
2	Dynamics of highly elastic fluids in 4:1 micro-contraction flow <b>Daewoong Lee</b> (Seoul National University, Korea)
3	Numerical simulation of 3D 4:1 contraction flow of weakly aggregating particulate suspensions <b>Sungup Choi</b> (Seoul National University, Korea)
4	Multiscale simulation of Melt-spinning process: Relation between macroscopic flow and microscopic deformation <b>Kazuhiro Takase</b> (Kyoto University, Japan)
5	Effect of particle addition on the filament breakup of Newtonian fluids <b>Joo Yong Moon</b> (Seoul National University, Korea)
6	Particle tracking microrheology of drying process <b>Hye Kyung Lee</b> (Seoul National University, Korea)

11:30~12:00 Nanocomposites and Polymer melt 1	
1	Dynamics of Linear/Cyclic Poly(ethylene oxide) Blended Melts: A Monte Carlo Simulation <b>Jittima Chaodamrongksakul</b> (Vongchavalitkul University, Thailand)
2	Supra Molecular Interaction Induced Controlled Diffusion Mechanism of Hybrid Hydrogel Systems of Zwitterions and CNT <b>Francis O. Obiweleuzor</b> (Chonbuk National University, Korea)
3	Fabrication of Graphene Oxide Composites and Their Electro-responsive Characteristics <b>Wen Ling Zhang</b> (Inha University, Korea)
4	Dynamics of polybutene/organoclay suspensions under combined shear flow and electric field <b>Hyun Geun Ock</b> (Seoul National University, Korea)
5	Effects of surface grafting on rheological properties of GO/PNIPAM composites <b>Amin GhavamiNejad</b> (Chonbuk National University, Korea)
6	Single Diamond in Equilibrium State Formed in Diblock Copolymer Solution <b>Itsuki Saito</b> (Nagoya Institute of Technology, Japan)

12:00~12:30 Complex fluid 2	
1	Dynamic Viscoelastic and Birefringence Behavior of Polymerized Ionic Liquids (PILs) <b>Atsushi Matsumoto</b> (Osaka University, Japan)
2	Chain Properties and Hindered Moisture Diffusion in Polymer Hydrogel Based on Obstruction-Scaling Model <b>Yoona Yang</b> (KIST, Korea)
3	Nonlinear rheological behavior of PVA/Silica suspension with Cu-Nanowire under the Large Amplitude Oscillatory shear (LAOS) flow <b>Seunghak Lee</b> (Pusan National University, Korea)
4	A rigid experimental method for estimating plateau modulus <b>Kazuki Kumazawa</b> (Kyoto University, Japan)
5	Domain Spacing Control by Two Immiscible Selective Solvents <b>Remi Miyamachi</b> (Nagoya Institute of Technology, Japan)
6	Viscoelasticity of Aqueous Glycosaminoglycan Solutions <b>Ding Kang</b> (Shanghai Jiao Tong University, China)

14:00~14:30 Bio rheology	
1	Modeling of cell rheology <b>Takeshi Konishi</b> (Kyoto University, Japan)
2	Dynamics of DNA hydrogel <b>Yohji Kawasaki</b> (Kyoto University, Japan)
3	Viscoelasticity of Silk Fibroin Fiber Reinforced Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Biocomposite and Its Application as Bone Repair Material <b>Shengjian Qian</b> (Shanghai Jiao Tong University, China)
4	Novel Method for Producing Amorphous Cellulose and Rheology of Polypropylene/Amorphous Cellulose Composite <b>Ryoichiro Shimura</b> (Yamagata University, Japan)
5	Analysis of Viscoelastic Behavior of Lecithin Reverse Wormlike Micellar System with Reo-Optical Measurements <b>Momoko Furuta</b> (Osaka University, Japan)
6	The Rheological Properties of Heat-Induced Globular Protein Gel of Bovine Serum Albumin <b>Yuna Oh</b> (Pusan National University, Korea)

14:30~15:00 Industrial application 1	
1	Effect of ink viscosity on the cone jet formation in EHD printing <b>Milim Yu</b> (Seoul National University, Korea)
2	Screen Printing Performance and Rheological Properties of Solar Cell Pastes: A Review <b>Hyunjong Lee</b> (Seoul National University, Korea)
3	Aqueous Synthesis of Doped Quantum Dots and Its Bio-Imaging Application <b>Bingxia Zhao</b> (Shanghai Jiao Tong University, China)
4	Effect of viscosity ratio in dual-layer slot coating <b>Ho Suk Ji</b> (Korea University, Korea)
5	Mechanism of Latex Migration in Battery Slurries during Drying Process <b>Sanghyuk Lim</b> (Seoul National University, Korea)
6	Analysis of viscoplastic flow in slot coating <b>Jaeki Lee</b> (Sungkyunkwan University, Korea)

## 2/7(FRI.)

9:30~10:00 Industrial application 2	
1	Simple Method of Evaluating Polymer Melt Density with Experiment using the Melt Indexer <b>Seok-Jun Kang</b> (HannamUniversity, Korea)
2	Computational study on flow dynamics in stripe slot coating <b>Won-Gi Ahn</b> (Korea University, Korea)
3	Deposition of ZnO nanoparticles in electrohydrodynamic jet printing <b>Kibyeok Son</b> (Seoul National University, Korea)
4	Brownian dynamics simulation of colloidal fouling on the patterned membrane surface <b>Seon Yeop Jung</b> ( Seoul National University, Korea)
5	Study on helical instability in film blowing process <b>Ilyoung Kwon</b> (Korea University, Korea)
6	Effect of Screw Geometry on theGeometrical Correction factor for the screw type rheometer <b>Bo-Kyung Kim</b> (Hannam University, Korea)

10:00~10:30 Complex fluids 3	
1	Antimicrobial Activity and Properties of Edible Chitosan Based Films Incorporated with Difference Types of Essential Oils Extracted from Thai <b>Nattida Rakkapao</b> (Prince of Songkla University, Thailand)
2	Rheological behavior of coating liquids composed of binary colloidal particles <b>Jooyoung Lee</b> (Seoul National University, Korea)
3	Rheology of non-Brownian particle suspensions: A Lattice Boltzmann study <b>Young Ki Lee</b> (Seoul National University, Korea)

4	Effect of particles size on viscosity of nanofluids containing ZnO nanoparticles suspended in poly(vinyl alcohol) aqueous solution <b>Tongsai Jamnongkan</b> (Yamagata University, Japan)
5	Simulation of hard sphere suspensions under oscillatory shear flow using potential free-method <b>Chan Hyung Park</b> (Seoul National University, Korea)
6	Synthesis of protoporphyrin loaded upconverting nanoparticles for photodynamic therapy <b>Dexin Chen</b> (Shanghai Jiao Tong University, China)

10:30~11:00 Fluid dynamics 2	
1	Structural change of colloidal gels under oscillatory shear flow <b>Jun Dong Park</b> (Seoul National University, Korea)
2	Self-consistent particle simulation with time-dependent momentum balance equation <b>Jae Hyun Yoo</b> (Seoul National University, Korea)
3	Dynamics of Liquid Droplet using Smoothed Particle Hydrodynamics <b>Masafumi Kitagawa</b> (Kyoto University, Japan)
4	One dimensional model of viscoplastic flow inside coating die manifold <b>Sungwan Yoon</b> (Sungkyunkwan University, Korea)
5	The Effect of Film Thickness on the Depth-wise Chain Orientation of Rigid Shaped Polyimide <b>Byoung Wook Jo</b> (Seoul National University, Korea)
6	Effect of the viscoelasticity of PEO solutions on vortex dynamics and pressure drop <b>Youngseok Kim</b> (Seoul National University, Korea)

11:30~12:00 Nanocomposites and Polymer melt 2	
1	Enhanced Electrical Conductivity of Polystyrene Nanocomposites by the Inclusion of Silver Nanowires <b>Hyo Yeol Na</b> (The University of Suwon, Korea)
2	Effects of filler type and concentration on viscoelastic behavior of PP/PS blends <b>Reza Salehiyan</b> (Pusan National University, Korea)
3	Rheology of SIS Triblock Copolymer Systems: Effect of Tg of S domains <b>Ryoma Egami</b> (Kyoto University, Japan)
4	Effect of Organoclay as a Compatibilizer on the Dynamics of Polypropylene / Ionomer blends <b>Doohyun Kim</b> (Seoul National University, Korea)
5	Comparative Study of Carbon-Based Nanofillers on Electrical and Rheological Properties of Polystyrene Nanocomposites via Latex Technology <b>Hyo Yeol Yeom</b> (The University of Suwon, Korea)
6	Probe Rheology in Miscible Blends: Dynamics of Probe PI in PVE Matrix <b>Zhi-Chao Yan</b> (Chinese Academy of Sciences, China)

12:00~12:35 Complex fluids 4	
1	Viscoelastic Properties of Tadpole-shaped Polystyrenes with High Purity <b>Yuya Doi</b> (Nagoya University, Japan)
2	Control of Orientation of Cylindrical Microdomains via Directional Coalescence of Non-equilibrium Spherical Microdomains of SEBS Triblock Copolymer <b>Shogo Tomita</b> (Kyoto Institute of Technology, Japan)
3	Thermal and Rheological Properties of Poly(vinyl alcohol-co-vinyl acetate) with Different Sequence Distribution <b>Shun Tasaka</b> (Osaka University, Japan)
4	Electrolytic non-Newtonian Fluids in a Curved Microchannel with Charged Wall <b>Kyu Yoon</b> (Korea University, Korea)
5	Dynamics of Guest Molecules in Syndiotactic Polystyrene Co-crystals : Effect of Molecular Size <b>Hideo Kobayashi</b> (Osaka University, Japan)
6	Determination of Dynamic Moduli from Creep Compliance <b>Min Kyung Kim</b> (Kyungpook National University, Korea)
7	Dielectric Segmental Relaxation of Flexible Polymers <b>Omi Kaiga</b> (Osaka University, Japan)

TEAM CONTEST	
14:00~14:30	Team 1, Team 2, Team 3
14:30~15:00	Team 4, Team 5, Team 6
15:00~15:30	Team 7, Team 8, Team 9
15:30~16:00	Team 10, Team 11, Team 12
16:00~16:30	break
16:30~17:00	Award Ceremony



## 2. 国際会議、シンポジウム・研究会報告



# 高分子結晶化国際会議 IDMPC2013 報告書

高分子結晶化国際会議（IDMPC2013）を2013年6月30日（日）～7月4日（木）にコープイン京都（京都市中京区）において開催した。会議開催にあたり、高分子結晶化国際会議組織委員会、高分子結晶化国際会議現地実行委員会、アドバイザリーボードを立ち上げ、京都大学化学研究所、公益社団法人 高分子学会、纖維工業技術振興会、フロンティアソフトマター開発専用ビームライン产学連合体（FSBL）との共催のもと会議を運営した。

高分子結晶化の問題は学問的にも、産業的にも重要であり、数多くの会議が開催されている。本会議は、この分野の世界的一人者の G. Strobl 博士が、形式的な議論ではなく、実質的・本質的な議論を行なおうと 1999 年からドイツ Waldau で定期的に開催したのに端を発し、多くの日本人も招待講演者として呼ばれた。その後、高分子結晶化で世界を牽引する日本で科研費（特定領域）を基盤として 2002 年に三島で、また 2007 年にも同様の会議を開催した。最近では進境著しい中国で 2009 年（上海）、2011 年（北京）に開催された。北京において、高分子結晶化研究の新たな方向性を議論し、国際的共同研究を進めるため、本会議の日本開催が決定された。

本会議ではトピックスとして、I. 高分子結晶化の基礎研究と II. 産業利用を目指した応用研究の両面を取り上げた。世界 7カ国より、86人の参加者があったが、うち海外から 34 人、学生が 15 人であった。4 日間の会議の間に 26 件の招待講演と 35 件のポスター発表がなされ、Discussion Meeting の名の通り、活発な議論がなされた。ポスター発表に対しては、学生とポスドクの方を対象にポスター賞が選出され、バンケットの席上で表彰を行った。この会議では、参加者の親睦とサイエンスの議論を深めるために、参加者全員が毎日夕食とともにする習慣があるが、本会議においても会議前日のレセプション、初日、2 日目のレストランでのディナー、そして 3 日目のバンケットを開催し、参加者のディスカッションをより深いものにした。また、3 日目には自由時間を設け、嵐山散策、伏見の酒蔵訪問、サイクリングなど思い思いの自由時間を楽しみ、リフレッシュの後またサイエンスの議論を深め、盛会のうちに閉会した。

（報告者：金谷 利治・複合基盤化学研究系 高分子物質科学研究領域 教授）

International  
Discussion  
Meeting on  
Polymer  
Crystallization  
2013

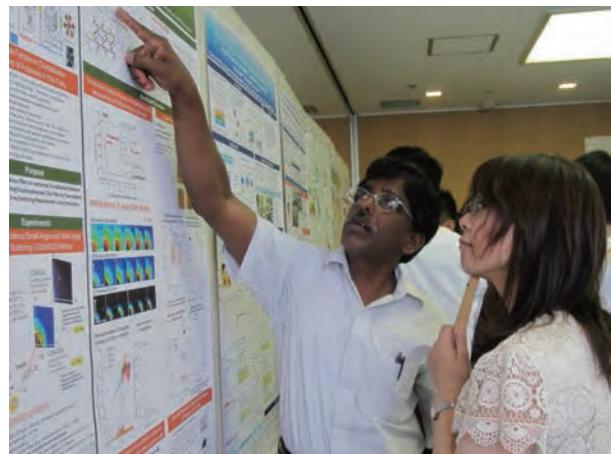
**IDMPC2013**  
June 30th - July 4th, 2013  
**COOP INN KYOTO, KYOTO, JAPAN**



集合写真



会場の様子



ポスターセッション

**13th Annual International Workshop on Bioinformatics and Systems Biology (IBSB 2013)**

の開催

バイオインフォマティクスとシステムズバイオロジーに関する国際ワークショップが、2013年7月30日～8月4日の4日間に渡り、京都大学宇治キャンパスにおいて開催された。本ワークショップの開催経緯と成果の概要を以下に述べる。

附属バイオインフォマティクスセンターは、日本学術振興会若手研究者インターナショナルトレーニングプログラム（通称 ITP）に採択され、その活動の一環として、海外パートナー機関（米国ボストンおよび独ベルリン）と共に若手研究者を対象としたワークショップ IBSB を毎年持ち回りで開催している。より具体的には、米国ボストン大学バイオインフォマティクスプログラム、ベルリン・システムズバイオロジーグループが共同で2002年より IBSB を開催しており、化学研究所附属バイオインフォマティクスセンターは2003年より参加している。IBSB の目的は、通常の大規模な国際会議と同様のセッティングの下で、若手研究者に国際会議を通じた研究交流を学習・実践する上で最適の場を提供することである。すなわち、交流の場を多く与えることにより、口頭発表およびポスター発表での議論を深め、国際交流による研究推進能力の向上を幅広く研鑽することが目的である。そのため、口頭発表やポスター発表のみならず招待講演、レセプション、バンケット、エクスカージョン等が用意され、若手研究者の研鑽の良い機会を与えている。以下のホームページ (<http://www.bic.kyoto-u.ac.jp/itp/workshop/IBSB2013/index.html>) に今回のワークショップの詳細が記載されている。今回の開催場所は京都大学宇治キャンパス内のホール及び隣接する施設等を使用した。今回の IBSB は、80名に参加者が登り、33件の口頭発表、61件のポスター発表が行われ、これまで通り、あるいはそれを上回る規模のワークショップとなった。特に、今回のワークショップでは、日本学術振興会 ITP の支援により、世界で活躍する准教授・教授レベルの研究者を7名（6名が ITP 負担）招待講演者として招聘し、若手研究者の研究意欲を刺激した。6名の招待講演者の所属研究機関は、米国（Carnegie Mellon University、Institute for Systems Biology）2名、英国（Imperial College London、European Bioinformatics Institute）2名、フィンランド（Aalto University）1名、シンガポール（National University of Singapore）1名であり、いずれも、地域的に世界の各領域を代表し、非常に活発に研究活動を行っている研究者である。参加者は、口頭およびポスター発表での議論等はもちろん、エクスカージョン等の企画においても若手研究者同士、積極的に交流・貢献した。本交流のパートナー機関の相補性から、参加者は日頃受けられない研究発表に触れる機会となり、研究推進に関して様々な点において啓発され、また今後のパートナー機関の研究室滞在する上での参考に大いになった。

（報告者：馬見塚 拓・附属バイオインフォマティクスセンター 生命知識工学研究領域 教授）

# IBSB 2013



## 13<sup>th</sup> Annual International Workshop on Bioinformatics and Systems Biology

<http://www.bic.kyoto-u.ac.jp/itp/workshop/IBSB2013>



July 31 – August 2, 2013, Uji Obaku Plaza, Uji Campus, Kyoto University

The 13th Annual International Workshop on Bioinformatics and Systems Biology is part of a collaboration involving several leading research institutes in the world: Bioinformatics Program, Boston University in US, Research Training Group "Computational Systems Biology" in Germany, Human Genome Center, The University of Tokyo in Japan, and International Research and Training Program on Bioinformatics and Systems Biology, Bioinformatics Center, Kyoto University. This student-focused event has been held since 2001 to provide graduate students and junior researchers with opportunities to present and discuss their research objectives, approaches and results in the emerging field of genomics, systems biology and bioinformatics.

Supported by JSPS-International Training Program (ITP)



***2013 International Workshop on  
Machine Learning and Applications to Biology (MLAB)***  
の開催

機械学習の生命科学応用に関する国際シンポジウムが、2013年8月5日～6日の二日間に渡り、北海道大学創成研究機構において開催された。本シンポジウムの開催経緯と成果の概要を以下に述べる。

機械学習あるいはデータマイニングは1980年代に登場した比較的新しい、しかし計算機科学の最大分野であり、与えられたデータから規則や仮説を自動的かつ効率的に抽出することにより、様々な応用領域における計算機の自動化に貢献することを特徴としている。また、データマイニングとは、よりビジネス応用に頻用されるが、機械学習とほぼ同義語として計算機科学では用いられている。機械学習およびデータマイニングは、ロボティクス、音声、言語等を中心としたIT領域での応用が分野発足当時より非常に盛んであるが、ここ20年ほどの間に、生命科学データへの応用も盛んに行われるようになってきた。この背景には、ヒトゲノム計画等の国家レベルでのプロジェクトの進展、さらにハイスクールプラット呼ぶれる、大量の生体分子の状況を一度に観察・解析できる実験技術の進展で、人手で解析することは到底不可能な大量のデータが蓄積されつつあり、これらのデータから規則や仮説を自動的に抽出することが待たれている現状がある。特に、ここ10年ほどは、他の応用領域と同様、生命科学データの構造や特徴と密接に結びついた独自の機械学習手法が構築されるようになってきており、生命科学データへの応用を主眼とした機械学習技術の研究開発が、一つの研究分野として確立しつつある。化学研究所バイオインフォマティクスセンター生命知識工学領域（領域代表者：馬見塚）は、このような新しい分野の中核的な研究室の一つである。同領域の助教であった瀧川一学博士が平成24年1月に北海道大学に赴任したことを契機に、北海道大学創成研究機構と京都大学化学研究所の協力により、この新しい分野を俯瞰するようなシンポジウムを、瀧川博士と馬見塚が昨年2012年に開催した。

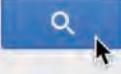
今年、2013年には、昨年のシンポジウムを国際シンポジウムとしてスケールアップし開催した。生命科学データへの応用を主眼とした機械学習技術の構築とその実際の応用に関する研究を行っている、著名な海外招待講演者2名を含む計16名の講演者を迎える、参加者は昨年から増加し約70名に達した。講演および質疑応答において、概観から詳細まで様々な議論の下、近年のバイオインフォマティクスにおける機械学習技術の展開を肌で感じ研究交流を行う絶好の機会となった。これにより、この新しい分野を俯瞰する機会を得ると同時に、中身の濃い研究交流を行うという本シンポジウムの目的を十分に果たしたと考えている。また、予想以上に多くの参加者があり、この分野への多方面からの高い注目をあらためて実感した。

(報告者：馬見塚 拓・附属バイオインフォマティクスセンター 生命知識工学研究領域 教授)

August 5 - 6, 2013  
Creative Research Institution, Hokkaido University

Register NOW. It's open to all for no charge.  
All researchers and students who are interested  
in the talks below are welcome.

mlab sapporo 2013



<http://www.cris.hokudai.ac.jp/takigawa/mlab2013/>

— 16 inspiring talks —

**Samuel Kaski**

(Aalto University, Finland)

Learning from Multi-Modal Data: Integration, Fusion, and Data  
Translation

**Masashi Sugiyama**

(Tokyo Institute of Technology, Japan)

Change Detection in Multi-Dimensional Time Series: From  
Distributional Change to Structural Change

**Motoki Shiga**

(Toyohashi University of Technology, Japan)

Non-negative Matrix Factorization with Auxiliary Information

**Canh Hao Nguyen**

(Kyoto University, Japan)

Discriminative Graph Embedding for Label Propagation

**Koji Tsuda**

(AIST, Japan)

Mining Combinatorial Regulations

**Ian Johnston**

(Boston University, USA)

Spatially Weighting Genes in Variable Selection for GWAS

**David duVerle**

(AIST, Japan)

A Regularisation Path-Following Approach for Discovering  
Interactions in High-Dimensional Survival Data

**Ichigaku Takigawa**

(Hokkaido University, Japan)

Identifying Paired Substructures Significantly Shared among  
Interacting Structure Pairs

**Ziv Bar-Joseph**

(Carnegie Mellon University, USA)

Algorithm in Nature

**Jean-Philippe Vert**

(Mines ParisTech, France)

Fast Lasso-based Isoform Prediction from RNA-Seq Data as a  
Flow Problem

**Martin Frith**

(AIST, Japan)

Adapting Classic Alignment Techniques to Modern High-  
Throughput DNA

**Yayoi Natsume**

(JST PRESTO, Japan)

Detection of Time-Differences in Histone Modification

**Shin-ichi Minato**

(Hokkaido University/JST ERATO, Japan)

Recent Research Activities on BDD/ZDD-Based Discrete Structure  
Manipulation

**Satoshi Morinaga**

(NEC, Japan)

Factorized Asymptotic Bayesian Inference for Sequential/  
Hierarchical Latent Variable Models

**Toby Dylan Hocking**

(Tokyo Institute of Technology, Japan)

Learning to Compare Graph Layouts

**Masayuki Karasuyama**

(Kyoto University, Japan)

Latent Factor based Subnetwork Feature Selection

## ***HUPO Initiative Assembly in Kyoto (Uji)***

の開催

ヒトプロテオーム解析に関する国際ワークショップが、2013年9月19日に、京都大学宇治キャンパスにおいて開催された。本ワークショップの開催経緯と成果の概要を以下に述べる。

HUPO はヒトプロテオームに関する非常に大きな国際学会であり、学会の詳細は以下のホームページに記載されている (<http://www.hupo.org/>)。今年、2013年に、HUPO の世界大会(HUPO 2013、詳細が記載されているホームページは <http://www.hupo.org/2013/>)の横浜での開催に合わせて、ポストカンファレンスワークショップとして、HUPO Initiative Assembly in Kyoto が開催された。会議の詳細は、以下のホームページに記載されている：  
<http://www.kidney-niigata.org/kyoto/>。この会議には、HUPO の主要なメンバーが集まり、特に、HUPO では染色体毎等、細分化しプロテオーム解析を進めているが、本会議では各グループのリーダーが参加し、グループ毎にリーダーがショートトークを行った。各リーダーのトークでは、自分のグループの達成度合や問題点を披露し、参加者から質問やコメントを受けることにより、グループ毎に、時にはグループ間で研究の方向性を修正し合うという、トップダウンな場を提供する会議となった。特に、本会議では参加者がリーダーレベルの成熟した研究者に限られたこともあり、プロテオームの研究領域を代表する少人数の研究者による非常に中身の濃い議論が展開され、世界のヒトプロテオーム研究の進捗に大きく貢献する会議となった。



(報告者：馬見塚 拓・附属バイオインフォマティクスセンター 生命知識工学研究領域 教授)

## ■ Program

† [Back to Index](#)

### 9:00 Opening and Messages from HUPO/HPP ( $\leq 15$ min presentation and discussion)

Chair: Naoyuki Taniguchi (tentative)

- ▶ HUPO, Pierre Legrain (France)
- ▶ HPP, Gilbert S Omenn (USA)
- ▶ C-HPP, William Hancock (USA)
- ▶ B/D-HPP, Jennifer Van Eyk (USA)
- ▶ KBpC, Lydie Lane (Switzerland)
- ▶ MSpC, Bruno Domon (Luxembourg)
- ▶ ABpC, Jochen Schwenk (Sweden)

### 10:30-10:45 Coffee Break

### 10:45 Pre-existing Initiatives Session ( $\leq 15$ min presentation and discussion)

Chairs: Pierre Legrain & Tadashi Yamamoto (tentative)

- ▶ HPPP, Mark Baker (Australia)
- ▶ HAI, Jochen Schwenk (Sweden)
- ▶ PSI, Henning Hermjakob (UK)
- ▶ HLPP, Pumin Zhang (USA)
- ▶ HBPP, Young Mok Park (Korea) and Lea T. Grinberg (Brazil)
- ▶ HGPI, Hisashi Narimatsu (Japan)
- ▶ HCVI, Peipei Ping (USA)
- ▶ HKUPP, Yutaka Yoshida (Japan)
- ▶ iMOP, Emøke Bendixen (Denmark)

### 13:00-14:00 Lunch

Introduction of Institute for Chemical Research: Hiroshi Mamitsuka (tentative)

### 14:00 New B/D-HPP Initiatives Session 1 ( $\leq 15$ min presentation and discussion)

Chairs: Gil Omenn & Bill Hancock (tentative)

- ▶ Eyeome, Richard Semba (USA)
- ▶ Network, Amos Bairoch (Switzerland)
- ▶ Epigenetics, Edyta Marcon (Canada)
- ▶ Cancer, Hui Zhang (USA)
- ▶ Chromosome 1, Ping Xu (China)
- ▶ Chromosome 2, Lydie Lane (Switzerland)
- ▶ Chromosome 5, Péter Horváthovics (Netherlands)

### 15:30-15:45 Coffee Break

### 15:45 New B/D-HPP Initiatives Session 2 ( $\leq 15$ min presentation and discussion)

- ▶ Chromosome 6, Christopher M Overall (Canada)
- ▶ Chromosome 7, Mark Becker (Australia)
- ▶ Chromosome 14, French consortium (France)
- ▶ Chromosome 18, Alexander Archakov (Russia)
- ▶ Chromosome X, Tadashi Yamamoto (Japan)
- ▶ Chromosome Y, Ghasem Hosseini Salekdeh (Iran)

### 17:00 Closing

Senior Scientific Advisory Board (SSAB), Catherine E. Costello (USA)

京都大学化学研究所 国際シンポジウム 2014 (ICRIS'14)  
「スマートマテリアルの科学と技術」  
"The Science and Technology of Smart Materials"  
を開催（平成 26 年 3 月 10~12 日）

## 1. 開催状況

- ①日程： 平成 26 年 3 月 10 日（月） – 12 日（水）
- ②場所： 京都大学宇治キャンパス おうばくプラザ
- ③主催： 京都大学化学研究所
- ④共催： 京都大学エネルギー理工学研究所、京都大学生存圏研究所、  
京都大学化学研究所 共同利用・共同研究拠点
- ⑤内容： 特別講演 1 件、基調講演 4 件、招待講演 17 件、ポスター発表 91 件
- ⑥参加者： 381 名（所内 207 名）
- ⑦開催経費： 京都大学全学経費、化学研究所共通経費／共同利用・共同研究拠点経費

## 2. 概要

化学研究所国際シンポジウム (Institute for Chemical Research International Symposium, ICRIS) は、当研究所の創立 70 周年（1996 年）を機会に立案され、以降、化学の様々な先進的研究分野をターゲットに比較的小規模の国際会議として実施されてきた。今回は、若手研究者の国際交流促進と新分野開拓の二つの視点で、本学の全学経費による支援を受け、また、エネルギー理工学研究所、生存圏研究所、化学研究所共同利用・共同研究拠点の共催にて、3 日間にわたり京都大学宇治キャンパス・おうばくプラザで開催された。「スマートマテリアル」に関して、Bio-inspired Systems, Green Innovation, Advanced Analysis and Design の三つを主要トピックスとして掲げて、ノーベル化学賞受賞者の鈴木章先生の特別講演、各トピックスを総括する 4 件の基調講演、国内外からの 17 件の招待講演に加えて、91 件のポスター発表が行われた。所内 207 名を含めて、総勢 381 名の参加者を得て、化学をキーワードに、生物、材料、精密解析を包含し、当該テーマに関する、質的にも高度な議論が展開されるなど、有意義なシンポジウムとなった。また、1 日のポスター発表とこれに続くワインパーティ、2 日目のバンケットは、参加者相互の親睦を深めるよい機会ともなった。バンケットでは、山本正宇治市長、江崎信芳京都大学理事、Andrew Woolley トロント大学教授、鈴木章北海道大学名誉教授の挨拶があり、今後の更なる交流に対する化学研究所への期待も述べられた。

学術分野の先進性に伴い、研究者コミュニティが企画する国際シンポジウムのテーマはますます先鋭化している。一方、本シンポジウムは、学際融合を目指して、幅の広い、「化研らしい」研究交



流となった。何よりも、予想を大幅に上回る多数の参加者を得たことは、この分野への関心の高さと連携研究の重要性を如実に感じられる機会となった。本シンポジウムを成功に導いた要因の一つに、これまで化学研究所が共同利用・共同研究拠点として行ってきた共同研究の実績が挙げられる。一般発表としてはポスター発表を募集し、主題関連の共同研究参画者にも周知を図った結果、50件あまりの申込みがあり、視点を替えれば拠点の革新機能材料創製に関わる共同研究成果報告会ともみなしうる大きな盛り上がりを見せた。

(報告者：辻井 敬亘・材料機能化学研究系 高分子材料設計化学研究領域 教授)

### 3. プログラム

Monday 10<sup>th</sup> March 2014

12:00	Registration
13:00	<b>Opening Remarks</b> Naoki Sato, ICR
<i>Session Chair: Shiroh Futaki, ICR</i>	
13:10	<b>Key-note lecture 1</b> Andrew Woolley, University of Toronto Azobenzene Photoswitches for Biomolecules
13:50	<b>Invited 1</b> Hiroshi Yabu, Tohoku University Nano-structured Composite Particles Prepared by Self-Organization and Biomimetic Molecular Technology
14:20	<b>Invited 2</b> Akifumi Sugiyama, RISH, Kyoto University Plant Specialized Metabolites in the Rhizosphere and Their Roles in Sustainable Agriculture
14:50	Coffee Break
ICR PR Session (Invited lectures and poster short talks from ICR, Kyoto University)	
<i>Session Chair: Hiroshi Watanabe, ICR</i>	
15:10	<b>Invited 3</b> Masatoshi Tosaka Kinetics of Crystallization and Stress Relaxation in Strained Natural Rubber Network
15:35	<b>Invited 4</b> Masaki Hashida Nano-ablation of Metals and Self-organization of Periodic Grating Structures by Femtosecond Laser Pulses
16:00	<b>Invited 5</b> Atsushi Wakamiya Molecular Design for Organic Electronics Materials: Fine Tuning of the Electronic Structure
16:25	<b>Poster Short Talks</b>
1 Tomohiro Ago	6 Yumi Matsumiya
2 Tatsuya Fukushima	7 Koji Nishida
3 Ryohei Ishige	8 Masanori Sakamoto
4 Katsuhiro Isozaki	9 Takafumi Shimoaka
5 Hirokazu Masai	10 Masayuki Wakioka
16:55	<b>An Overview of Joint Usage/Research Center (JURC), ICR</b> Hiroshi Watanabe
17:00	Poster Session (Wine party)

Tuesday 11<sup>th</sup> March 2014

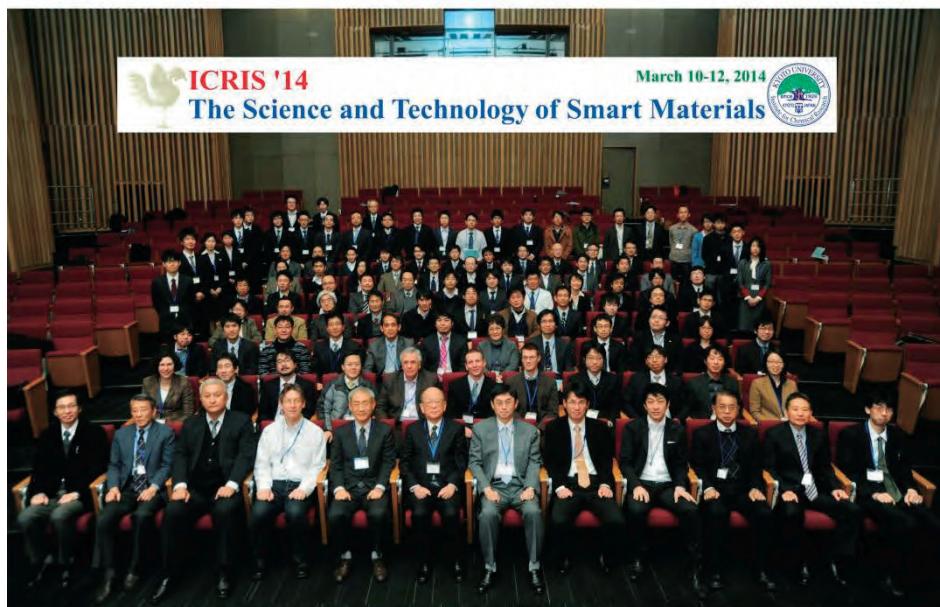
<i>Session Chair: Fumiaki Ozawa, ICR</i>	
09:00	<b>Key-note lecture 2</b> <b>Munetaka Akita</b> , Tokyo Institute of Technology Photoredox Catalysis: An Easy and Green Access to Radical Chemistry
09:40	<b>Invited 6 Stephan Irle</b> , Nagoya University Molecular Dynamics in Computational Materials Sciences: From the Study of Nanostructure Formation to the Design of Fluorescent Dye Molecules
10:10	<b>Invited 7 Zhang-Jie Shi</b> , Peking University Direct Transformation of Unreactive Chemical Bonds
10:40	Coffee Break
<i>Session Chair: Hironori Kaji, ICR</i>	
11:00	<b>Key-note lecture 3 Michel Cloitre</b> , ESPCI Paris Tech Microscopic Design of Glassy Materials using Soft Colloids
11:40	<b>Invited 8 Wai-Yeung Wong</b> , Hong Kong Baptist University Metallated and Metal-Free Molecular Dyes for Light/Electrical Energy Conversion
12:10	Group Photo Session
12:20	Lunch
<i>Session Chair: Masaharu Nakamura, ICR</i>	
13:20	<b>Special lecture</b> <b>Akira Suzuki</b> , 2010 Nobel Prize Laureate in Chemistry, Hokkaido University Reactions of Organoboranes: An Easy Way for Carbon-Carbon Bonding
14:10	Short Break
<i>Session Chair: Tatsuo Kurihara, ICR</i>	
14:20	<b>Invited 9 Ming-Jung Wu</b> , National Sun Yat-sen University Transition Metal-Catalyzed Cyclization Reactions of Enediynes to Carbazoles, Dibenzothiophenes and Dibenzopyranones
14:50	<b>Invited 10 Evelyne van Ruymbeke</b> , Université Catholique de Louvain Dynamics of Metallo - Supramolecular Entangled Polymer Melts
15:20	<b>Invited 11 Shoji Takeuchi</b> , The University of Tokyo Artificial lipid Bilayers for Biosensing Applications
15:50	Coffee Break
<i>Session Chair: Takeo Kawabata, ICR</i>	
16:10	<b>Invited 12 Takamasa Sakai</b> , The University of Tokyo Correlation between Physical Properties and Structure of Polymer Gels with Controlled Network Structure
16:40	<b>Invited 13 Insung S. Choi</b> , KAIST Artificial Spores: Cytoprotective Nanoencapsulation of Individual Living Cells
17:10	<b>Invited 14 Jun-ichiro Yamaguchi</b> , Nagoya University New Cross-coupling Reactions through Nickel Catalysis
18:00	Banquet

Wednesday 12<sup>th</sup> March 2014

Session Chair: Shigeru Yamago, ICR	
09:00	<b>Key-note lecture 4</b> <b>Yasuhiro Uozumi</b> , Institute for Molecular Science Amphiphilic Polymeric Reaction Environment: Reaction Driving Based on the “Umbrella Effect”
09:40	<b>Invited 15</b> <b>Antoine Debuigne</b> , University of Liege Precision Design, Solution Behavior and Application of Stimuli-responsive N-vinylamides Containing Copolymers
10:10	<b>Invited 16</b> <b>Shun Nakano</b> , IAE, Kyoto University Construction of Tailor-made Receptors and Sensors from RNA-peptide Complex
10:40	Coffee Break
Session Chair: Motonari Uesugi, ICR	
11:00	<b>Invited 17</b> <b>Dal-Hee Min</b> , Seoul National University Graphene-based Nanobiosensors for Nucleic Acid (DNA/RNA) Detection
11:30	<b>Invited 18</b> <b>Kazushi Kinbara</b> , Tohoku University Development of PEG-Based Amphiphilic Molecules for Biological and Biomimetic Applications
12:00	<b>Closing Remarks</b> <b>Yoshinobu Tsujii</b> , ICR
12:10	Close of Symposium

13:30~14:30 Open Lab (Futaki, Nakamura, Ozawa, Tsujii, Uesugi, Watanabe Labs)

#### 4. 会議の様子



集合写真（招待講演者を中心に）



Opening Remarks,  
Prof Sato



Assoc Prof Ohno



Prof Watanabe



Prof Andrew Woodlley



Poster Session



Prof Akira Suzuki



Closing Remarks, Prof Tsujii



Banquet



Mayor of Uji  
Tadashi Yamamoto



Executive Director  
Nobuyoshi Esaki

## KUBIC-NII Joint Seminar on Bioinformatics の開催

### 開催の経緯：

化学研究所（以下、化研と略）は、平成 22 年度より、「化学関連分野の深化・連携を基軸とする先端・学際研究拠点」としての共同利用・共同研究拠点の活動を開始している。その附属センターであるバイオインフォマティクスセンター（KUBIC）ではバイオインフォマティクス研究に関する情報交換や交流を促進するため、国内外の研究者と国際ワークショップや研究会を開催してきた。このセミナーはこの活動の一環として化研が国立情報学研究所と共に開催した研究会である。

KUBIC の阿久津は以前より国立情報学研究所の井上教授と交流を持ち、研究会や国際ワークショップなどを通じ情報交換を行ってきた。井上教授の研究グループは人工知能や論理プログラミングにおいて国際的に非常に高いレベルの研究を行っているが、そのバイオインフォマティクスへの応用についても精力的に研究を進めている。そこでお互いに研究成果を報告しあい、また、議論を行うことにより、それぞれの研究の発展にフィードバックすることができると考え、KUBIC-NII Joint Seminar on Bioinformatics という名称の研究会を、平成 22 年、平成 23 年、平成 24 に引き続き、化研と国立情報学研究所の共催で平成 25 年 4 月 19 日に化研にて開催した。

### 内容：

会議のテーマはバイオインフォマティクスであるが、特に論理プログラミングやアルゴリズムを主要な方法論とするバイオインフォマティクス研究が中心テーマとなっている。参加者は国立情報学研究所の井上教授の研究グループと関連研究者、および、KUBIC の数理生物情報研究領域の教員、学生、関連研究者であるが、外国人研究者による発表も 8 件含まれるため、研究会はすべて英語を用いて行った。参加者は発表者 14 名および数理生物情報研究領域の学生など 5 名程度であった。発表者のうち 3 名はフランス、1 名はアメリカ、1 名はイスラエルからの研究者であり、また、他の発表者や参加学生にも外国籍の研究者や留学生が多く、小規模ながらも国際色豊かなものとなった。

発表内容は、論理プログラミング、各種推論手法、生体ネットワーク情報を用いたに創薬、制約充足可能性問題の効率的計算法、二分決定グラフを用いた学習、マルチエージェントシステム、進化系統樹およびグラフ構造の比較アルゴリズム、生体システムの制御、タンパク質-RNA 結合予測、配列比較の統計的基礎、多目的最適化などに多岐に渡るものであった。ただし、これらの中には一見違うように見えても関連の深いものがある。特に生体システムの離散モデルであるブーリアンネットワーク（BN）は論理プログラミングと関係が深く、例えば、制約充足可能性問題や二分決定グラフの効率的計算法は BN の定常状態計算に利用することができ、論理プログラミングにおける推論手法である Answer Set Programming やモデル検査などは BN の解析や制御

に応用できる可能性がある。また、細胞内ネットワークを論理システムとして理解することもでき、その解析に人工知能における手法を適用できる可能性がある。一方、BNに関する研究成果は論理プログラミングの研究にも影響を与えつつある。

このように井上教授のグループは主に論理プログラミングの立場から研究を行い、数理生物情報研究領域は生物情報ネットワークの立場から研究を行っているが、それらの数理的基盤や情報解析技術には共通する要素が多いことが再認識され、今後の研究を進めるにあたり相互に有用な情報を得ることができた。その結果、小規模ながらも多岐にわたるトピックを含みつつ密接な議論がかわされた充実した研究会となった。なお、研究会の後は懇親会を開催し、なごやかな雰囲気の中で懇親を深めることができた。

(報告者 化学研究所・教授・阿久津 達也)

### Program

April. 19,  
2013

9:30-10:00	<i>Opening</i>	
10:00-10:20	<i>A Dominating Set Approach to Controllability of Scale-free Networks</i>	Tatsuya Akutsu
10:20-10:50	<i>Drug discovery and the need for new post-ligation downstream network analysis algorithms incorporating contextualization</i>	J.B. Brown
11:00-11:30	<i>Nested canalyzing SAT-formulae and their satisfaction</i>	Avraham Melkman
(20 minutes Break)		
11:20-11:40	<i>Learning from Interpretation Transition and its Applications to Boolean Networks and Cellular Automata</i>	Katsumi Inoue, Tony Ribeiro, Chiaki Sakama
11:40-12:00	<i>Learning from Interpretation Transition Using an Efficient OBDD-Like Structure</i>	Tony Ribeiro, Katsumi Inoue, Chiaki Sakama
(90 minutes Break)		
13:30-14:00	<i>Inference in Biological Regulatory Networks: From Discrete Parameters to Timing Information</i>	Morgan Magnin, Maxime Folschette, Katsumi Inoue, Loic Pauleve, Olivier Roux, Olivier Roux, Gilles Bernot, Jean-Paul Comet, Adrien Richard
14:00-14:20	<i>Computing the Rooted Triplet Distance between Galled Trees by Counting Triangles</i>	Jesper Jansson
14:20-14:40	<i>Probability theory on the monoid of strings and its application to molecular ecology</i>	Hitoshi Koyano
(20 minutes Break)		
15:00-15:20	<i>Predicting protein-RNA residue-base contacts using two-dimensional conditional random field with the lasso</i>	Morihiro Hayashida
15:20-15:40	<i>Translating the Systems Biology Graphical Notation to Logic</i>	Adrien Rougny, Christine Froidevaux, Katsumi Inoue, Yoshitaka Yamamoto
15:40-16:00	<i>On the complexity of the maximum common subgraph problem for partial k-trees of bounded degree</i>	Takeyuki Tamura
(20 minutes Break)		
16:20-16:40	<i>CTL and ASP for Model-Checking of Biological Boolean Networks</i>	Alexandre Rocca, Morgan Magnin, Katsumi Inoue
16:40-17:00	<i>Asynchronously Updated Elementary Cellular Automata with Random Perturbations</i>	Earl Bellinger, Hei Chan, Katsumi Inoue
17:00-17:20	<i>A Study for Multi-Objective Distributed Constraint Optimization</i>	Tenda Okimoto and Katsumi Inoue

## 高分子物理学セミナー2013 の開催

高分子物理学の分野で世界の研究を主導している Dimitris Vlassopoulos 教授 (IESL-FORTH and Department of Materials Science and Technology, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece) と Ralph Colby 教授 (Department of Materials Science and Engineering and Chemical Engineering, Pennsylvania State University, University Park, PA, USA) が、日本レオロジー学会 40 周年記念にあわせて来日された。この機会を捉えて、両教授の最先端の研究成果についてのセミナーを、化学研究所「化学関連分野の深化・連携を基軸とする先端・学際研究拠点」主催の標記セミナーとして開催した。その内容を以下にまとめる。

セミナーは、2013 年 5 月 14 日（火）に、化学研究所 5 階会議室 (N-531C) において開催された。化学研究所内の教員、大学院生に加えて学外の教員、大学院生も多数セミナーに参加し、全部で 35 名の聴衆が集まった。

Vlassopoulos 教授は、環状高分子のメルトレオロジーとソフトコロイド系についての最新の成果について講演された。特に、現在の絡み合い鎖に対する管モデルでは高分子鎖端が緩和の起点となるが、鎖端を持たない環状鎖ではループ状の部分鎖がアメーバのように運動して緩和が起こっている可能性について、問題提起と活発な質疑応答が行われた。

Colby 教授は、電解質基を持つ高分子イオノマーのイオン電導機構とレオロジーに関する最近の知見について講演された。電解質基間の相互作用がイオン電導性を支配するだけではなく、特徴的なレオロジー的緩和も与えるため、電導性とレオロジーに強い相関が発現するという点について、相関の定式化やイオンの易動度などについての活発な質疑応答が行われた。

Vlassopoulos 教授と Colby 教授は、お互いに仲の良い友人であり、形式張らない気さくな先生である。お二人とも化学研究所の *at home* な雰囲気が大いに気に入られたらしく、次の機会にも来所したいとのお言葉で、セミナーは盛会裡に終了した。

(報告者：渡辺 宏・複合基盤化学研究系 分子レオロジー研究領域 教授)



Vlassopoulos 教授の講演



Colby 教授の講演

# 「グリーントライボ・ネットワーク 夏の学校 2013」の開催

## 1. 概要

文部科学省 GENE 事業先進環境材料分野「グリーントライボ・イノベーション・ネットワーク」では、若手人材育成と最新成果報告を兼ねて、年1回の本プログラムを実施している。今年度は、関西地区での開催にあたり、共同利用・共同研究拠点の共催のもと、摩擦・潤滑の科学・技術に関する特別講義、基礎講義ならびに応用講義、さらには当該ネットワークの各研究グループからの最新成果のポスター発表が行われた。講師に、当該プロジェクトのメンバーのみならず民間企業の方々も迎え、実用例と合わせた最新ナノテクノロジーの観点から、低摩擦研究に関する材料と機械という、より広い視野に基づく有意義な議論が活発に行われた。産業界を含めて、108名という多数の参加者があり、環境・エネルギー問題の解決を見据えた次世代技術として、潤滑制御の重要性の認識が実感された。

## 2. 開催状況

- ①日 程 平成25年8月26日（月）・27日（火）
- ②場 所 京都大学宇治キャンパス きはだホール、他
- ③開催責任者 栗原和枝（東北大学・教授）
- ④主催：文部科学省 GENE 事業「グリーントライボ・イノベーション・ネットワーク」  
共催：京都大学化学研究所 共同利用・共同研究拠点、公益社団法人 日本化学会、  
一般社団法人 日本トライボロジー学会、一般社団法人 日本ゴム協会
- ⑤参加者数 108名
- ⑥プログラム

### 8月26日（月）@きはだホール

- 13:00～ 開講の挨拶 栗原和枝／東北大学
- 13:10～ 特別講義：「摩擦・摩耗」 岩井善郎／福井大学
- 14:10～ 基礎講義1：「表面力測定：基礎と展開、摩擦研究への応用」  
栗原和枝／東北大学
- 15:10～ 基礎講義2：「ポリマーブラシの基礎と応用：高度潤滑を目指して」  
辻井敬亘／京都大学
- 16:00～ 応用講義1：「転がり軸受の高効率化とトライボロジー」

松山博樹／(株) ジェイテクト

16:50～ 応用講義2：「圧延のトライボロジー」

中西裕信／(株) 神戸製鋼所

18:00～ 技術交流会（ポスター発表 兼懇親会）

8月27日（火）@共同研究棟 大セミナー室

9:00～ 基礎講義3：「レオロジーの基礎：トライボロジー現象を中心に」

中野健／横浜国立大学

9:50～ 基礎講義4：「イオン液体：その特徴と実用化」

佐藤貴哉／鶴岡工業高等専門学校

10:50～ 応用講義3：「潤滑グリース」

小宮広志／日本グリース（株）

11:40～ 閉講の挨拶

13:00～ 京大化研・辻井研究室見学会

(報告者：辻井 敬亘・材料機能化学研究系 高分子材料設計化学研究領域 教授)



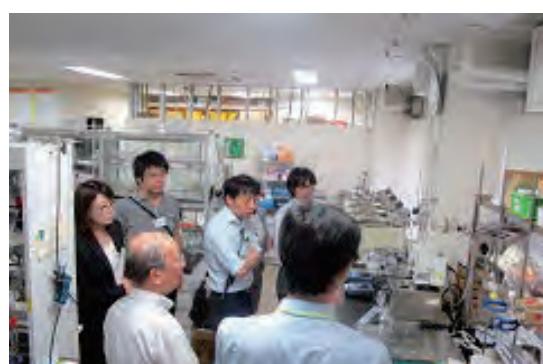
開講の挨拶／栗原和枝先生



会場の様子



技術交流会



ラボツアー

## ペロブスカイト構造物質研究会の開催

### 目的

これまで、放射光を駆使して遷移金属酸化物の結晶構造や電子状態を解明する国際共同研究を進めてきた。今年は特に最近話題となっている「ペロブスカイト構造物質」と放射光による局所構造解析に注目し、有機・無機の研究者が一堂に会してミニワークショップを開催した。

### 概要

ペロブスカイト構造は、巨大磁気抵抗、強誘電性や高温超伝導など非常に興味深い物性を示す舞台として知られている。その特性を活かし、誘電体や磁性体、電池材料などに広く用いられ、機能性材料として幅広く研究してきた。ごく最近、有機分子を含んだペロブスカイト型構造材料が太陽電池として大きな注目を集めている。

そこで、今回は「ペロブスカイト構造物質」だけをキーワードに、無機合成、有機合成の両面から取り組んでいる研究の基礎と最近の進展を紹介する目的で本研究会を開催することにした。また無機・有機合成により作成された化合物の電子状態を評価する手段として放射光 X 線分光が挙げられるが、これまでに行ってきたペロブスカイト酸化物に対する研究結果を紹介することも目的とする。合成と評価を専門とする研究者が一堂に会することにより新しい共同研究が生まれることも期待して 2014 年 1 月 29 日に京都大学宇治キャンパス総合研究棟 CB215/217 室にて本研究会を実施した。

### 内容

本研究会は下記のプログラムに従って行われた。はじめに、島川教授よりペロブスカイト構造についてのイントロダクションが有った。ペロブスカイト構造は遷移金属元素(TM)と酸素(O)からなる  $TMO_6$  という八面体ユニットを基本単位としており、その基本単位の繋がり方により様々な構造を取り得ること、その構造や TM の価数を制御することにより、非常に多彩な物性を作り出すことができるこことを示された。次に水牧研究員により、X 線分光測定により、ペロブスカイト酸化物に含まれる TM 元素全てについて価数が簡便な方法により決定できることが示され、X 線分光法の有用性を訴える講演であった。最終公演では、若宮准教授から有機分子を含んだペロブスカイト型太陽電池材料についての最近の進展について講演があった。新規太陽電池材料としてペロブスカイト型化合物が有用で有り、合成条件を最適化することにより変換効率が 10%を超えることを明らかにした。

また研究会の様子を伝えるべく、写真を末尾に示す。ペロブスカイトという一つのキーワードのみで研究会を開催したが、ペロブスカイトの奥深さを感じた研究会となつた。

プログラム 1月 29日

13:00-13:05 はじめに (島川 祐一)

13:05-13:45 島川 祐一 (京都大学化学研究所 無機先端機能化学)

「ペロブスカイト構造酸化物の基礎と物質開発」

13:45-14:30 水牧 仁一朗 (SPring-8)

「X線分光で観たペロブスカイト酸化物」

14:30-15:15 若宮 淳史 (京都大学化学研究所 構造有機化学)

「ペロブスカイト型太陽電池の研究最前線～新規材料に求められる物性～」

15:15-16:00

[フリーディスカッション]

(報告者: 島川 祐一・元素科学国際研究センター無機先端機能化学研究領域 教授)







### **3. 成果発表論文**

紙数の都合により、目次に記載した論文の一部についてのみ、別刷りを次頁以降に掲載する。



# Development of a Novel Nanoparticle by Dual Modification With the Pluripotential Cell-Penetrating Peptide PepFect6 for Cellular Uptake, Endosomal Escape, and Decondensation of an siRNA Core Complex

Asako Mitsueda,<sup>1</sup> Yuri Shimatani,<sup>1</sup> Masahiro Ito,<sup>1</sup> Takashi Ohgita,<sup>1</sup> Asako Yamada,<sup>1</sup> Susumu Hama,<sup>1</sup> Astrid Gräslund,<sup>2</sup> Staffan Lindberg,<sup>3</sup> Ülo Langel,<sup>3</sup> Hideyoshi Harashima,<sup>4</sup> Ikuhiko Nakase,<sup>5</sup> Shiroh Futaki,<sup>5</sup> Kentaro Kogure<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, Kyoto 607-8414, Japan

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, Stockholm University, 10691 Stockholm, Sweden

<sup>3</sup>Department of Neurochemistry, Stockholm University, 10692 Stockholm, Sweden

<sup>4</sup>Laboratory for Molecular Design of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita 12, Nishi 6, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan

<sup>5</sup>Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

Received 3 February 2013; revised 27 April 2013; accepted 4 June 2013

Published online 26 July 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22310

## ABSTRACT:

Development of novel devices for effective nucleotide release from nanoparticles is required to improve the functionality of nonviral delivery systems, because decondensation of nucleotide/polycation complexes is considered as a key step for cytoplasmic delivery of nucleotides. Previously, PepFect6 (PF6) comprised chloroquine analog moieties and a stearylated cell-penetrating peptide to facilitate endosomal escape and cellular uptake, respectively, was developed as a device for efficient siRNA delivery. As PF6 contains bulky chloroquine analog moieties, the polyplexes are expected to be loose structure, which facilitates decondensation. In the present study, siRNA

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: Kentaro Kogure, PhD, Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto, 607-8414, Japan; e-mail: kogure@mb.kyoto-phu.ac.jp

Contract grant sponsor: Swedish Research Council, the Swedish Foundation for Strategic Research and VINNOVA

Contract grant number: MDB09-0015

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Japan Science, Technology Agency (JST) and VINNOVA; Collaborative Research; Program of Institute for Chemical Research; Kyoto University

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

was electrostatically condensed by PF6, and the PF6/siRNA complexes were coated with lipid membranes. The surface of the nanoparticles encapsulating the PF6/siRNA core (PF6-NP) was modified with PF6 for endosomal escape (PF6/PF6-NP). The RNAi effect of PF6/PF6-NP was compared with those of stearylated cell-penetrating peptide octaarginine (R8)-modified PF6-NP, R8-modified nanoparticles encapsulating the R8/siRNA core (R8-NP) and PF6-modified R8-NP. Nanoparticles encapsulating the PF6 polyplex, especially PF6/PF6-NP, showed a significant knockdown effect on luciferase activity of B16-F1 cells stably expressing luciferase. siRNA was widely distributed within the cytoplasm after transfection of the nanoparticles encapsulating the PF6 polyplex, while siRNA encapsulated in the R8-presenting nanoparticles was localized within the nuclei. Thus, the siRNA distribution was dependent on the manner of peptide-modification. In conclusion, we have successfully developed PF6/PF6-NP exhibiting a potent RNAi effect resulting from high cellular uptake, efficient endosomal escape and decondensation of the polyplexes based on the

*multifunctional cell penetrating peptide PF6. PF6 is therefore a useful pluripotential device for siRNA delivery.* © 2013 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers (Pept Sci)* 100: 698–704, 2013.

**Keywords:** cell-penetrating peptide; siRNA delivery; decondensation

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of the preprint by emailing the *Biopolymers* editorial office at [biopolymers@wiley.com](mailto:biopolymers@wiley.com)

## INTRODUCTION

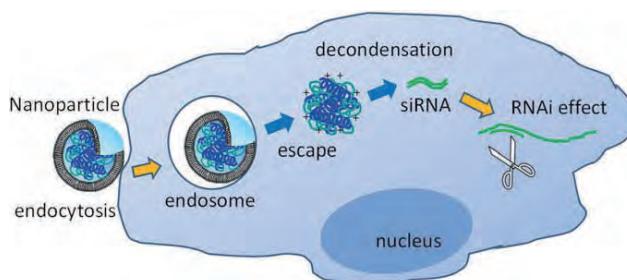
In the process of siRNA delivery into the cytoplasm by non-viral polyplexes and lipoplexes, there are several key steps regulating the activity of the siRNA. In particular, the functionality of siRNA is affected by cellular uptake, endosomal escape and nucleotide release from complexes (Figure 1).

To improve the delivery efficiency of siRNA, various devices have been developed.<sup>1</sup> A variety of devices for cellular uptake, such as the transferrin ligand<sup>2,3</sup> and cell-penetrating peptides,<sup>4,5</sup> have been reported. In particular, the modification of a nanoparticle surface with the cell-penetrating peptide octaarginine is known to increase cellular uptake by inducing the cellular entry mechanism macropinocytosis.<sup>6–8</sup> With regard to endosomal escape, the pH-sensitive fusogenic peptide GALA was applied to enhance escape from the endosome via

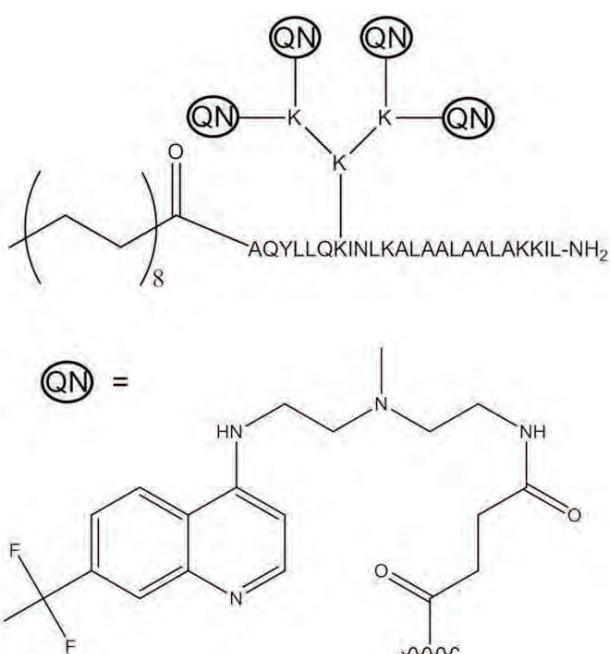
membrane fusion.<sup>9,10</sup> Various histidine-rich peptides have also been reported to function as devices for endosomal disruption via the proton sponge effect.<sup>1</sup> As the decondensation process is difficult to control, only a few devices that consider decondensation have previously been reported. For example, a biocleavable polyrotaxane having a necklace-like structure and consisting of many cationic alpha-cyclodextrins and a disulfide-introduced poly(ethylene glycol) was developed as a supramolecular dissociative condenser, and the polyplexes comprised of polyrotaxane/plasmid DNA were easily decondensed under reductive conditions.<sup>11–13</sup>

However, use of as few components as possible would be better for the preparation of nanoparticles, because the packaging of various kinds of devices into one nanoparticle is troublesome and difficult for practical applications. Therefore, a novel device exhibiting pluripotency for cellular entry, endosomal escape and decondensation, is required for the development of an efficient siRNA delivery system.

Previously, PepFect6 (PF6) consisting of chloroquine analogue (QN) moieties, a stearyl moiety and a positively charged cell-penetrating peptide has been developed as a device for the efficient delivery of siRNA as shown in Figure 2.<sup>14,15</sup> Three QN moieties play a role in endosomal escape via the proton sponge effect, while the positively charged cell-penetrating peptide



**FIGURE 1** Schematic image of each step for siRNA delivery into the cytoplasm using a non-viral delivery system. Nanoparticles have to overcome several steps for delivery of siRNA into the cytoplasm. Nanoparticles bind to the surface of cells, enter into the cells via endocytosis, and escape from the endosome. This is followed by polyplex decondensation to allow for siRNA release and exhibition of the RNAi effect.



**FIGURE 2** Chemical structure of PepFect6 (PF6). PF6 consists of a cell-penetrating peptide, a stearyl moiety and three chloroquine analog moieties. QN in the structure indicates the chloroquine analog moiety.

enhances cellular entry.<sup>14</sup> Moreover, since the QN moieties are bulky structures (Figure 2), we expected that the condensed state of the polyplex comprised of PF6 with siRNA should be looser than that of the polyplex condensed with general linear polycations, such as poly-L-lysine and linear polyethyleneimine. Based on the expected loose structure of the PF6 polyplex, decondensation of the PF6 polyplex should occur easily. Thus, we considered that PF6 would prove to be a useful device for the facilitation of the polyplex decondensation process. Therefore, PF6 should function as a pluripotential device for cellular uptake, endosomal escape, and decondensation.

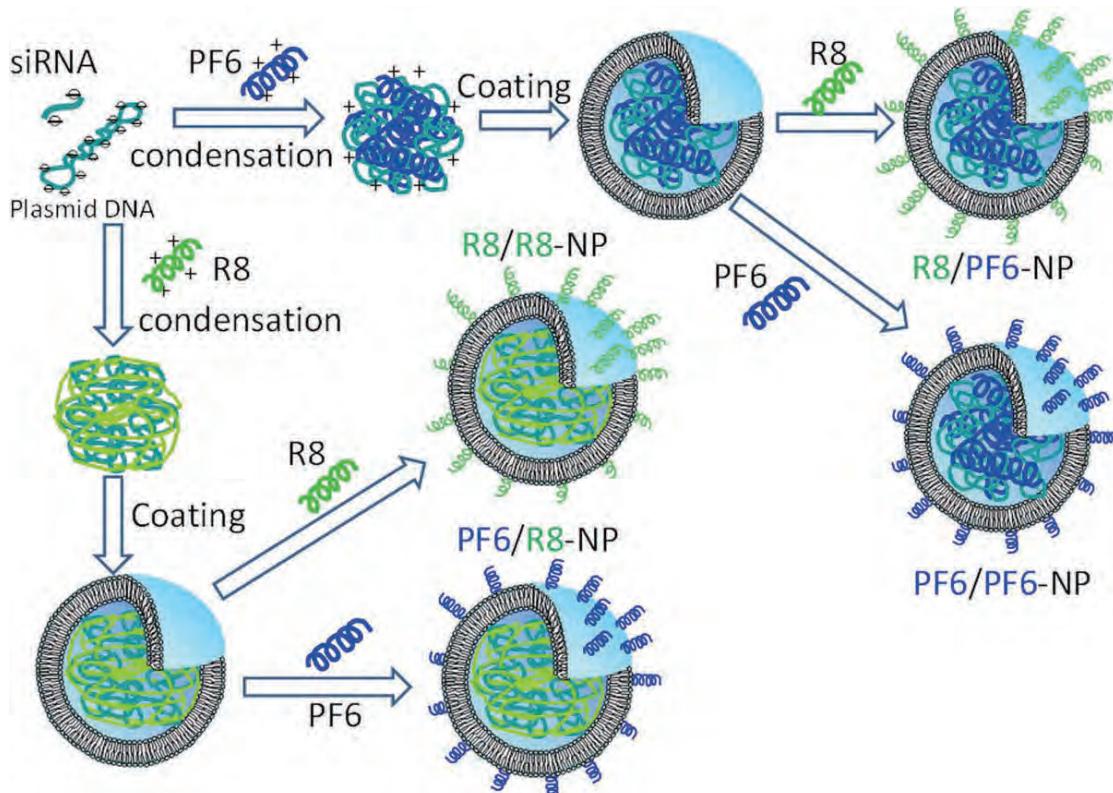
In the present study, we attempted construction of the PF6 polyplex encapsulating siRNA with plasmid DNA for formation of stable nanoparticles (PF6-NP), in addition to coating the polyplex with lipids to avoid decondensation before cellular entry. The surface of the lipid-coated nanoparticle was subsequently modified with PF6 (Figure 3), i.e., the nanoparticles contain PF6 on the surface to allow for cellular entry and endosomal escape, as well as in the core polyplex particles to

allow for the facilitation of decondensation after endosomal escape. The RNAi effect of the PF6-modified lipid nanoparticles (NP) encapsulating the PF6 polyplex (PF6/PF6-NP) was compared with those of three other nanoparticles shown in Figure 3, namely the cell penetrating peptide stearylated octaarginine (R8)-modified NP encapsulating the PF6 polyplex (R8/PF6-NP), R8-modified NP encapsulating the polyplex condensed with R8 (R8/R8-NP) and PF6-modified NP encapsulating the R8 polyplex (RF/RF-NP), on luciferase stably expressing cells. In addition, the intracellular distribution of those particles was also evaluated. Based on the results obtained from these experiments, the pluripotential ability of PF6 was discussed.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials and Cell Line

The 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) was purchased from AVANTI Polar Lipids (Alabaster, AL). Cholestryll



**FIGURE 3** Schematic flow of the construction of various nanoparticles. siRNA and plasmid DNA were electrostatically condensed with PF6 or stearyl-octaarginine (R8) for the preparation of positively charged core particles. Next, the positively charged core particles were coated with negatively charged lipid membranes via the fusion of small unilamellar vesicles. After lipid-coating, the surfaces of the thus-obtained nanoparticles were modified with either PF6 or R8. Finally, four types of nanoparticles were obtained, namely PF6/PF6-NP, PF6/R8-NP, R8/PF6-NP, and R8/R8-NP.

hemisuccinate (5-Cholesten-3 $\beta$ -ol 3-hemisuccinate; CHEMS) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Lipofectamine 2000 was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). B16-F1 cells, a mouse melanoma cell line, were obtained from DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan). Anti-luciferase siRNA (21-mer, 5'-GCGCUGCUUGG UGCCAACCTT-3', 5'-GGGUUGGCACCAGCAGCGCTT-3') was synthesized by KURABO (Osaka, Japan) and Invitrogen (Carlsbad, CA), respectively. Plasmid DNA encoding green fluorescent protein (GFP) was prepared using an Endfree Plasmid Mega Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). PF6 and stearyl-octaarginine (R8) were synthesized by us as described in previous reports.<sup>6,14</sup>

### Preparation of Nanoparticles Encapsulating siRNA

siRNA-encapsulated nanoparticles were prepared in accordance with previous reports.<sup>16</sup> Anti-luciferase siRNA with or without plasmid DNA (weight ratio 1:2) were condensed with either PF6 or stearyl-R8 at a nitrogen:phosphate (N/P) ratio of 3.0. Small unilamellar vesicles (SUV) consisting of DOPE and CHEMS (9:2) were prepared, and 72  $\mu$ L of a 0.55 mM SUV suspension was added to 36  $\mu$ L of the condensed siRNA/plasmid DNA suspension (1.2  $\mu$ g nucleotide/mL). The mixture was incubated for 10 min at room temperature to induce lipid-coating due to fusion of SUV on the surface of the polyplex particles. After the lipid-coating, the PF6 or R8 solution (final concentration was 5 mol% of lipid) was added to the nanoparticle suspension and incubated for 30 min at room temperature to allow for modification of the surface of nanoparticles. The final lipid concentration of the nanoparticles was 0.37 mM. The particle size and surface potential of the nanovesicles dispersed in PBS (-) were measured by dynamic light scattering and laser Doppler electrophoresis, respectively, with a Zetasizer Nano (Malvern).

### Observation of Nanoparticles by Atomic-Force Microscopy

Atomic-force micrographs were obtained using a Nanoscope<sup>TM</sup> IIIa atomic force microscope operating in tapping mode (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). A 20- $\mu$ L droplet of the nanoparticle suspension was deposited onto freshly cleaved mica and subsequently air dried for 30 min. Atomic force micrographs were collected by laser scanning the sample under tapping mode in air.

### Measurement of Luciferase Activity and Protein Content of the Cells After Transfection

B16-F1 cells stably expressing luciferase (B16-F1-luc) were prepared according to the general protocol of neomycin selection. B16-F1-luc cells were seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well in 24 wells. After incubation for 24 h, the cells were treated with either siRNA-encapsulated nanoparticles or Lipofectamine 2000 (0.27  $\mu$ g siRNA/well), which was prepared according to the instruction manual, in serum-free DMEM (500  $\mu$ L/well) for 3 h, followed by the addition of DMEM containing 10% FBS (1 mL/well), and additional incubation for 21 h. To examine the luciferase activity, the transfected cells were lysed with Reporter Lysis Buffer (Promega) according to the manufacturer's instructions. The cell lysates were reacted with the luciferase substrate (Promega), and relative light units (RLU) were measured using a luminometer (Luminescencer-PSN, ATTO). The total protein concentration was determined using a BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific). Luciferase activity is reported as RLU/mg protein.

### Observation of Intracellular Distribution of siRNA After Transfection of Nanoparticles

B16-F1 cells were cultured on 0.002% poly-L-lysine (PLL)-coated glass bottom dishes at a density of  $1 \times 10^5$  cells/dish for 24 h in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS). After washing with PBS (-), cells were treated with nanoparticles encapsulating rhodamine-labeled siRNA for 3 h in serum-free DMEM. A series of images were obtained using a confocal laser scanning microscope (CLSM) (LSM510META, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with an oil-immersion objective lens (Plan-Apochromat 63/NA1.4).

### Statistical Analysis

Statistical significance was determined using one-way ANOVA. A *P* value < 0.05 was considered to be significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Construction of Nanoparticles Encapsulating the PF6/siRNA Polyplex

First, construction of the PF6 polyplex with siRNA was examined. To determine the optimum nitrogen/phosphate (N/P) ratio of PF6/siRNA, siRNA of varying amounts was mixed with PF6 for condensation to form the positively charged PF6 polyplex, which is suitable for lipid-coating. The diameters of the PF6/siRNA polyplex (N/P ratios 2.0–3.5) were around 100 nm, as measured by dynamic light scattering, while a very big structure (over 500 nm) was observed using AFM (Supporting Information Figure 1). It was suggested that the condensation state was very loose due to the presence of the bulky QN moieties of PF6 (Figure 2). However, the zeta-potential, which indicates the surface charge of the particle, could not be measured precisely by the laser Doppler method. It is likely that the polyplex might be decondensed by electrophoresis because of its loose structure. To obtain information about the surface charge, the PF6/siRNA polyplex was subjected to a hemagglutination assay. At an N/P ratio of 3.0, blood erythrocytes were agglutinated by the addition of the PF6/siRNA polyplex (data not shown), indicating that the surface of the polyplex was positively charged. Although we attempted lipid-coating of the PF6/siRNA polyplex via addition of negatively charged SUVs, coating was not successful. It is likely that the SUVs disrupt the PF6/siRNA polyplex structure via electrostatic interactions.

Previously, Huang's group reported that stable polyplexes of siRNA could be prepared via interfusion of bovine thymus DNA.<sup>17</sup> Thus, in this study, we attempted to prepare a more stable PF6 polyplex encapsulating siRNA via interfusion of plasmid DNA. The optimum weight ratio of the siRNA/plasmid DNA was 1:2. As a result, the diameter and zeta-potential of the polyplex were ca. 110 nm and 4 mV, respectively (Table I). Next, lipid-coating of the polyplex was carried out. The

**Table I** Average Diameters and Zeta-Potentials of the Nanoparticles Constructed in this Study

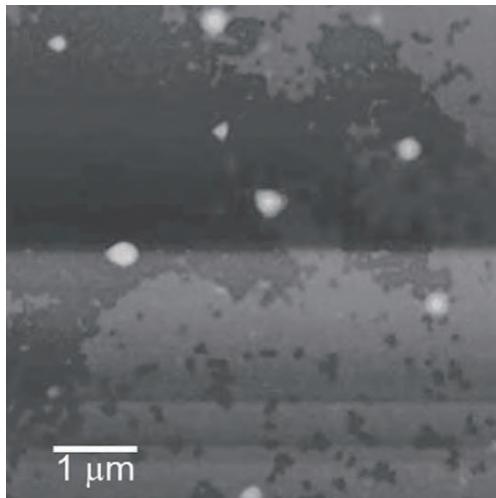
Nanoparticles	Diameter ± SD (nm)	Zeta-Potential ± SD (mV)	Poly-Dispersity Index
PF6 polyplex	113.6 ± 18.4	3.5 ± 8.0	0.477 ± 0.217
R8 polyplex	162.4 ± 100.8	4.3 ± 5.6	0.321 ± 0.053
R8/R8-NP	244.1 ± 81.5	16.9 ± 23.0	0.684 ± 0.283
PF6/R8-NP	328.8 ± 193.3	14.0 ± 19.7	0.461 ± 0.183
R8/PF6-NP	259.9 ± 88.5	17.1 ± 18.5	0.268 ± 0.095
PF6/PF6-NP	258.9 ± 126.7	15.4 ± 16.6	0.253 ± 0.094

The polyplexes were prepared by condensation of siRNA and plasmid DNA with PF6 or R8. The diameters and zeta-potentials of the nanoparticles were measured by dynamic light scattering and the laser Doppler method. Data shown are the means with SD from multiple measurements ( $n > 4$ ).

thus-obtained nanoparticles were modified with PF6, and the diameter and zeta-potential were  $\sim 250$  nm and 15 mV, respectively. The spherical structure of the PF6-modified nanoparticles encapsulating the PF6/siRNA-plasmidDNA polyplex (PF6/PF6-NP) was confirmed by AFM (Figure 4). From these results, we concluded that preparation of the nanoparticles encapsulating the PF6 polyplex was successful. Similarly, the cell penetrating peptide stearylated octaarginine (R8)-modified NP encapsulating PF6 polyplex (R8/PF6-NP), R8-modified NP encapsulating polyplex condensed with R8 (R8/R8-NP) and PF6-modified NP encapsulating R8 polyplex (RF/RF-NP) were also prepared. The diameters and zeta-potentials were  $\sim 250$ –300 nm and 15 mV, respectively (Table I).

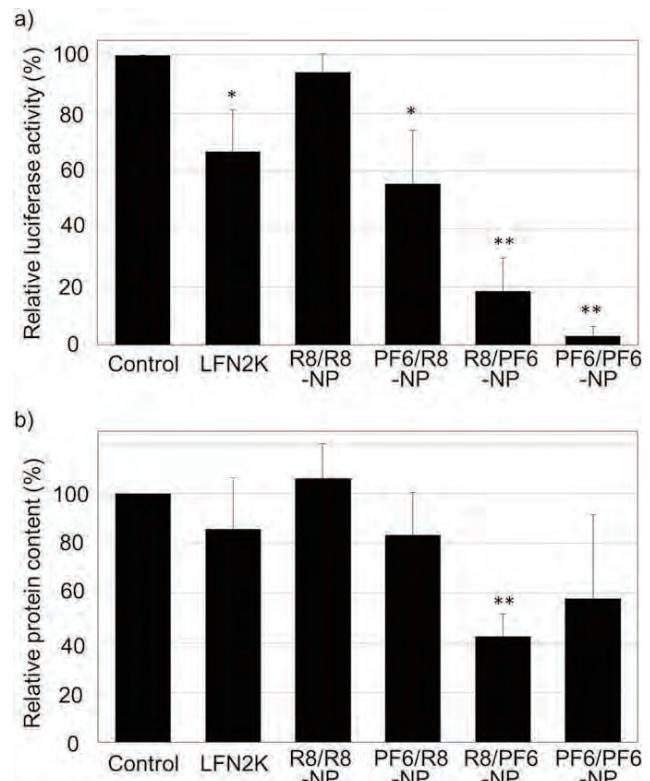
### RNAi effect of the Nanoparticles

To evaluate the functionality of PF6/PF6-NP, we compared the RNAi effect of the PF6/PF6-NP encapsulating anti-luciferase siRNA on luciferase activity of B16F1 cells stably expressing

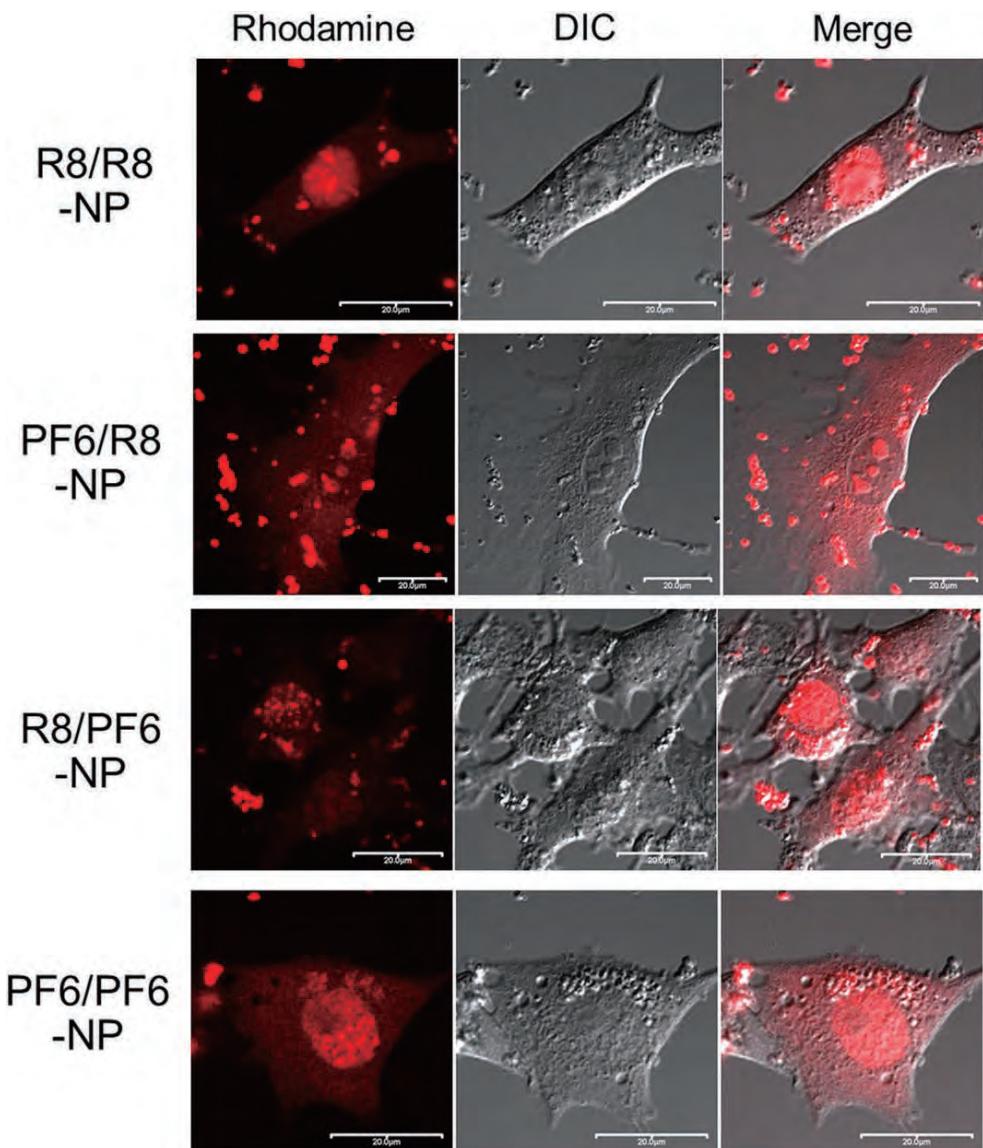


**FIGURE 4** AFM image of PF6/PF6-NP. A suspension of PF6/PF6-NP was deposited onto a mica surface, and air-dried for AFM observation. The white bar shown in the AFM image indicates 1  $\mu$ m.

luciferase to those of R8/R8-NP, R8/PF6-NP, and PF6/R8-NP. As the luciferase activity of the B16F1 cells stably expressing luciferase was very high, the commercially available transfection reagent Lipofectamine 2000 (LFN2K) reduced luciferase activity by only 35% (Figure 5a) in this experiment. Likewise,



**FIGURE 5** Effect of various nanoparticles on the luciferase activity of B16-F1 cells stably expressing luciferase and protein content. Nanoparticles encapsulating anti-luciferase siRNA were transfected to B16-F1 cells expressing luciferase. After 48 h, (a) luciferase activity and (b) protein content of the cells were measured. Luciferase activity and protein content are represented as relative percentage values averaged from the data obtained by three different experiments. Lipofectamine 2000 (LFN2K) was used as a positive control of RNAi effect.



**FIGURE 6** Intracellular distribution of siRNA after transfection of nanoparticles. Nanoparticles encapsulating rhodamine-labeled siRNA were transfected to B16-F1 cells. After 3 h, the cells were washed with PBS, and then observed using a confocal laser scanning microscope. DIC: differential interference contrast. The white bar shown in the images indicates 20  $\mu$ m.

PF6/R8-NP showed a 40% inhibition of luciferase activity, while R8/R8-NP, which has been previously reported to exhibit a potent RNAi effect, did not inhibit luciferase activity under these experimental conditions. As reported recently, the RNAi activity of R8/R8-NP was improved by introducing the pH-sensitive fusogenic peptide GALA to improve endosomal escape.<sup>16</sup> Therefore, it was suggested that endosomal escape was the cause of the low RNAi efficiencies of R8/R8-NP, which have no device allowing for endosomal escape on the surface of the nanoparticles in this study. Thus, the higher RNAi effect

of PF6/R8-NP compared to R8/R8-NP is due to surface modification with PF6 possessing endosomal escape capabilities. On the other hand, nanoparticles encapsulating the PF6 polyplex, especially PF6/PF6-NP, showed a potent knockdown effect on luciferase activity, i.e., the RNAi effects of R8/PF6-NP and PF6/PF6-NP were 80 and 95%, respectively (Figure 5a). Therefore, it is suggested that the combination of PF6-modification on the surface of the nanoparticle and the PF6 polyplex is the best formulation for high functionality to deliver siRNA into the cytoplasm. Under these experimental conditions, R8/PF6-NP

exhibited cytotoxic effects, which were evaluated using the cellular protein content. PF6/PF6-NP had a tendency to be cytotoxic. However, the decrease in protein content was not statistically significant.

### Intracellular Distribution of siRNA After Transfection of Nanoparticles

To elucidate the reason for the differing RNAi effects depending on the manner of peptide-modification, the intracellular distribution of siRNA labeled with rhodamine after transfection of the nanoparticles was observed by confocal laser scanning microscopy. As shown in Figure 6, all four types of nanoparticles were efficiently internalized into the cells, indicating that the cell-penetrating peptide presenting on the surface of the nanoparticles should contribute to cellular uptake. In the case of R8/R8-NP-treated cells, siRNA localized within the nuclei (Figure 6). Similarly, siRNA localized within the nuclei of the cells transfected with R8/PF6-NP. Based on these results, it is suggested that R8-modification of the surface of the nanoparticle is suitable for the efficient delivery of cargo into the nucleus. Thus, R8-modified nanoparticles might be useful for gene delivery. On the other hand, siRNA was distributed within the cytoplasm of the cells treated with PF6/R8-NP. Similarly, in the case of PF6/PF6-NP, siRNA was observed not only in the nuclei, but also in the cytoplasm. PF6-modification on the surface of the nanoparticle is suggested to be useful for delivery into the cytoplasm, since endosomal escape of the nanoparticles should be enhanced via the proton sponge effect due to the QN moiety of PF6. Therefore, it is suggested that the delivery destination could be controlled by the manner of peptide-modification on the surface of nanoparticles.

However, the RNAi effect of PF6/PF6-NP was very potent compared to PF6/R8-NP, while the cytoplasmic distributions of siRNA were similar in both nanoparticles. Likewise, R8/PF6-NP, which localized within the nuclei, similar to R8/R8-NP, showed a higher knockdown effect than R8/R8-NP. Based on these results, it is suggested that the PF6 polyplex core is responsible for the potent RNAi effect, regardless of surface modification having an influence on intracellular trafficking of nanoparticles. This high functionality of nanoparticles encapsulating the PF6 polyplex is likely due to the higher release efficacy of siRNA from the PF6 polyplex compared to the R8 polyplex. As previously reported, stearylated octaarginine (R8) can form a stable polyplex due to tight condensation.<sup>18</sup> On the other hand, PF6 makes a loose polyplex as a result of the bulky QN moieties, as mentioned above. Therefore, it is suggested that the more potent RNAi effect of PF6/PF6-NP is due to the high cellular uptake by the cell-penetrating peptide, QN

moiety-dependent efficient endosomal escape and facilitation of polyplex decondensation.

In conclusion, we have successfully developed a novel nanoparticle via dual modification of the particle surface with a cell-penetrating peptide PF6 and a core polyplex for cellular uptake, endosomal escape and decondensation of the siRNA complex. Therefore, PF6 is useful as a pluripotential device for siRNA delivery.

### REFERENCES

1. Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J. J.; Jaffrè, P. A. *Br J Pharmacol* 2009, 157, 166–178.
2. Sasaki, K.; Kogure, K.; Chaki, S.; Nakamura, Y.; Moriguchi, R.; Hamada, H.; Danev, R.; Nagayama, K.; Futaki, S.; Harashima, H. *Anal Bioanal Chem* 2008, 391, 2717–2727.
3. Maruyama, K. *Adv Drug Deliv Rev* 2011, 63, 161–169.
4. Regberg, J.; Eriksson, J. N.; Langel, Ü. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013, 5, 509–516.
5. Nakase, I.; Akita, H.; Kogure, K.; Gräslund, A.; Langel, Ü.; Harashima, H.; Futaki, S. *Acc Chem Res* 2012, 45, 1132–1139.
6. Nakase, I.; Tadokoro, A.; Kawabata, N.; Takeuchi, T.; Katoh, H.; Hiramoto, K.; Negishi, M.; Nomizu, M.; Sugiura, Y.; Futaki, S. *Biochemistry* 2007, 46, 492–501.
7. Kogure, K.; Akita, H.; Yamada, Y.; Harashima, H. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60, 559–571.
8. Khalil, I. A.; Kogure, K.; Futaki, S.; Harashima, H. *Int J Pharm* 2008, 354, 39–48.
9. Kakudo, T.; Chaki, S.; Futaki, S.; Nakase, I.; Akaji, K.; Kawakami, T.; Maruyama, K.; Kamiya, H.; Harashima, H. *Biochemistry* 2004, 43, 5618–5628.
10. Nakase, I.; Kogure, K.; Harashima, H.; Futaki, S. *Methods Mol Biol* 2011, 683, 525–533.
11. Ooya, T.; Choi, H. S.; Yamashita, A.; Yui, N.; Sugaya, Y.; Kano, A.; Maruyama, A.; Akita, H.; Ito, R.; Kogure, K.; Harashima, H. *J Am Chem Soc* 2006, 128, 3852–3853.
12. Yamashita, A.; Yui, N.; Ooya, T.; Kano, A.; Maruyama, A.; Akita, H.; Kogure, K.; Harashima, H. *Nat Protoc* 2006, 1, 2861–2869.
13. Yamada, Y.; Nomura, T.; Harashima, H.; Yamashita, A.; Katoono, R.; Yui, N. *Biol Pharm Bull* 2010, 33, 1218–1222.
14. Andaloussi, S. E.; Lehto, T.; Mäger, I.; Rosenthal-Aizman, K.; Oprea, I. I.; Simonson, O. E.; Sork, H.; Ezzat, K.; Copolovici, D. M.; Kurrikoff, K.; Viola, J. R.; Zaghloul, E. M.; Sillard, R.; Johansson, H. J.; Said Hassane, F.; Guterstam, P.; Suhorutšenko, J.; Moreno, P. M.; Oskolkov, N.; Häldin, J.; Tedebar, U.; Metspalu, A.; Lebleu, B.; Lehtiö, J.; Smith, C. I.; Langel, U. *Nucleic Acids Res* 2011, 39, 3972–3987.
15. Dash-Wagh, S.; Jacob, S.; Lindberg, S.; Fridberger, A.; Langel, U.; Ulfendahl, M. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012, 1, e61.
16. Akita, H.; Kogure, K.; Moriguchi, R.; Nakamura, Y.; Higashi, T.; Nakamura, T.; Serada, S.; Fujimoto, M.; Naka, T.; Futaki, S.; Harashima, H. *J Control Release* 2010, 143, 311–317.
17. Li, S. D.; Chono, S.; Huang, L. *Mol Ther* 2008, 16, 942–946.
18. Khalil, I. A.; Futaki, S.; Niwa, M.; Baba, Y.; Kaji, N.; Kamiya, H.; Harashima, H. *Gene Ther* 2004, 11, 636–644.

# Infrared spectroscopic study of stereo-controlled poly(*N*-isopropylacrylamide) with an extended chain conformation induced by adsorption on a gold surface

Takafumi Shimoaka · Kazuaki Rikiyama ·  
Yukiteru Katsumoto · Takeshi Hasegawa

Received: 4 July 2013 / Revised: 5 September 2013 / Accepted: 24 September 2013 / Published online: 15 October 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNiPAM) compounds with various diad tacticities were prepared, and the molecular interaction properties in a thin film deposited on a gold surface were analyzed using infrared spectroscopy. The intramolecular and intermolecular interactions were found to depend on the tacticity, and only atactic (diad ratio 46 %) PNiPAM exhibits poor molecular interaction even in the bulk sample. On the other hand, the same series of compounds dissolved in an acetone solution were spread on a gold surface to form a thin film. In the dissolution process, the polymer molecules are relaxed via solvation, and they are bound to the gold surface by a molecular interaction to form a submonolayer thin film. In the thin film, the molecular interaction with the gold surface via the N–H group was monitored in the infrared spectra only for a nearly isotactic ( $m=90$ ) PNiPAM by an apparent shift of the N–H stretching vibration band. This shift was confirmed by changing the degree of hydrophilicity of the gold surface: a larger shift is found on a gold surface with stronger hydrophilicity. As a result, the conformation of a nearly isotactic molecule is found to be extended by the interaction with the gold surface, which works to immobilize the molecule.

**Keywords** Tacticity · Poly(*N*-isopropylacrylamide) · Solution · Fluffy solid · Thin film · Gold surface · Infrared spectroscopy

---

T. Shimoaka · T. Hasegawa (✉)  
Laboratory of Solution and Interface Chemistry, Division of Environmental Chemistry, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasho Uji, Kyoto 611-0011, Japan  
e-mail: htakeshi@scl.kyoto-u.ac.jp

K. Rikiyama · Y. Katsumoto  
Graduate School of Science, Hiroshima University,  
1-3-1 Kagami-yama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

## Introduction

Extension of a macromolecule is one of the useful approaches to understand the intrinsic chemical properties. When a polymeric compound is in bulk, the molecule cannot prevent intermolecular and intramolecular interactions from forming a higher-order structure represented by a helix and a sheet. To understand the role of the compound in biodevices, the higher-order structure and the assembly structure should both be revealed.

To understand the chemical mechanism of the structural transition of a macromolecule, on the other hand, the molecular conformation and orientation of each chemical group should be revealed, which can be done by extending the molecule. The simplest means for molecular extension is dissolving the compound in a solvent. In the dissolving process, the associated, folded, or entangled molecules come apart, and they are further relaxed by solvation. In solution, however, the analysis of the molecular conformation and orientation is difficult because of the quick molecular mobility.

To overcome this issue, a technique for immobilizing the relaxed molecules on a solid surface is useful. The adsorbed molecules on the surface are ready for analysis using spectroscopy. Since the amount of adsorbed molecules is more or less than the monolayer level, a high-sensitivity spectroscopic technique is necessary. For this purpose, a gold surface is appropriate. When an adsorbate is on a gold surface, and the sample is irradiated with infrared (IR) radiation, highly sensitive IR reflection-absorption (RA) spectra can be easily obtained [1]. Since the surface hydrophilicity of gold can be controlled [1], the chemical adsorption of a polymeric material on gold can also be changed, through which the immobilization of the extended molecule is possible.

The correlation between the chemical structure and the macroscopic functions of a polymeric compound is often discussed in terms of the hierarchical structure [2]. For the

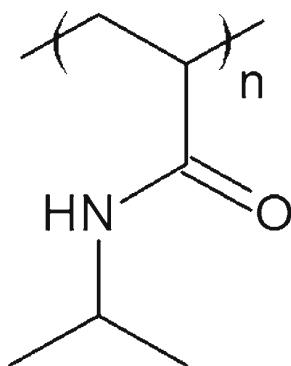
characterization of a synthetic polymer, much attention is focused on the higher-order structures using a physical parameter such as the gyration radius in solution, since it is believed that the higher-order structure is directly correlated with the macroscopic functions. On the other hand, the characterization of the primary structure of a synthetic polymer also attracts attention, and is especially important for the development of a biomimetic material using a synthetic polymer having a tuned primary structure.

For a vinyl polymer that is extensively used as a functionalized material, characterization of the primary structure is difficult because of the configuration of the side chains [3]. When the polymer chain has a structure containing a repeated unit (Fig. 1), each unit has two degrees of freedom for the side chain direction. The “structural order” determined by the molecular configurations of the primarily repeated units is called “tacticity” or “stereoregularity” [2]. To evaluate the configuration of the polymer chain, the concept of the diad tacticity is introduced [4, 5]. When the backbone has an *all-trans* conformation, and the adjacent repeating units are oriented in the same direction to the polymer backbone, then the configuration is called a *meso* diad. When the diad consists of units oriented in opposite directions, the configuration is called a *racemo* diad. The numbers of *meso* diads and *racemo* diads in a molecule,  $n_{\text{meso}}$  and  $n_{\text{racemo}}$ , which can be evaluated by using NMR spectra, are conveniently used to define a useful parameter, diad tacticity,  $D$ :

$$D \equiv \frac{n_{\text{meso}}}{n_{\text{racemo}} + n_{\text{meso}}} \times 100\% \quad (1)$$

In this study, we focus on poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNiPAM) [6], which is one of the most popular stimuli-responsive polymers and consists of the unit structure presented in Fig. 1, and investigate the relationship between the chemical structure and the conformation for both bulk and adsorbed molecules on a gold surface. PNiPAM is often used as a raw material for building a drug delivery system because

**Fig. 1** Chemical unit structure of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNiPAM)



the polymer can store and release small molecules in response to an external thermal condition [7]. Since the side chain of PNiPAM has an amide group, which induces a relatively strong interaction between the side chains, the diad tacticity is known to significantly influence the thermoresponsiveness of PNiPAM in both aqueous and organic solutions [8–10]. Since the change of the macroscopic property is correlated with the conformational change of the polymer chains induced by the variation of tacticity, the thermoresponsiveness should be discussed by considering not only the solvation of side chains, but also the intramolecular interactions depending on the tacticity. In fact, the solvation of a dimer model compound of PNiPAM was found to be strongly correlated with the intramolecular interactions as a function of the stereoregularity [11].

When the polymer molecules form a thin film on a surface, the interaction between the polymer molecule and the surface will play another important role to determine the film structure and properties, and the arrangement of the side chain should correlate with the surface interaction [12]. In fact, cast films of PNiPAM were found to exhibit the solvation imprint effect after evaporation of the solvent, which supported the study of solvation in solution.

In this study, tacticity-controlled PNiPAM compounds (m-46, m72, m-82, and m-90) were synthesized with a diad ratio ranging from 46 to 90 %, and a solid bulk sample of PNiPAM and a thin film deposited on a gold surface are analyzed and compared. The hydrophilic property of the gold surface was also controlled, and was efficiently used to determine the intrinsic molecular interaction properties of PNiPAM depending on the tacticity. In a thin film of a high- $m$  PNiPAM deposited on gold, a specific conformational change immobilizing the molecule was found by IR spectroscopy.

## Experimental

PNiPAM compounds with various diad ratios ranging from 46 to 90 % were synthesized using established techniques. PNiPAM samples were prepared by a stereospecific living radical polymerization using a reversible addition–fragmentation chain transfer agent and a Lewis acid [13]. 1-Phenylethyl phenyldithioacetate was used as the reversible addition–fragmentation chain transfer agent, and was synthesized according to the literature [14]. *N*-Isopropylacrylamide (NiPAM) and  $\alpha$ ,  $\alpha$ -azobisisobutyronitrile, the monomer and initiator, respectively, were recrystallized from a benzene/hexane solution. The polymer solution was subjected to dialysis to yield the final product as a fluffy white solid, from which impurities were removed. The number-average molecular weight ( $M_n$ ) and the polydispersity ( $M_w/M_n$ ) of the samples were determined by size-exclusion chromatography using an Intelligent high-performance liquid chromatography system (JASCO,

Tokyo, Japan) equipped with a Shodex (Tokyo, Japan) SB-807 HQ guard column, two linear poly(hydroxymethacrylate) bead columns (Shodex SB-802.5 HQ and SB-806 M), and a JASCO RI-2031 differential refractive-index detector. The eluent was *N,N*-dimethylformamide (10 mM LiBr) at 60 °C with a flow rate of 0.35 mL min<sup>-1</sup>. The size-exclusion chromatogram was calibrated by using standard polystyrene samples. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded with a JEOL (Tokyo, Japan) JNM-LAMBDA spectrometer (500 MHz). The diad ratio was determined by measuring the methylene proton peak areas using dimethyl-*d*<sub>6</sub> sulfoxide at 145 °C [13]. The parameters for the sample preparation are summarized in Table 1. The number in the sample ID corresponds to *D* defined by Eq. 1.

Acetone was chosen as the solvent for dissolving the compounds, since it was used in a previous thin-film study [12]. Guaranteed reagent acetone was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), and was used without further purification. The dissolution property was dependent on the tacticity, and m-90 was the most difficult to dissolve. After some trials, a concentration of 0.2 wt% was chosen for all the solutions, and with this m-90 could be easily dissolved in acetone.

The water was obtained from a Millipore (Molsheim, France) Elix UV-3 pure-water generator and a Yamato (Tokyo, Japan) Autopure WT100U water purifier, which produces water comparable to Milli-Q water. The water exhibited an electric resistivity higher than 18.2 MΩ cm and a surface tension of 72.5 mN m<sup>-1</sup> (25 °C), which guaranteed that the water was contamination-free.

Gold-evaporated glass slides were purchased from Geomatec (Yokohama, Japan), and consisted of a gold layer with a thickness of 300 nm, a chromium stabilization layer of 50 nm, and a glass substrate. The gold-evaporated glass was cleaned in a conventional manner: successive sonication in pure water, ethanol, acetone, and dichloroethane for about 1 min each. All solvents were guaranteed reagents. This

**Table 1** Characterization of stereo-controlled poly(*N*-isopropylacrylamide) compounds

Sample ID	<i>D</i>	<i>M</i> <sub>n</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	<i>M</i> <sub>w</sub> / <i>M</i> <sub>n</sub>	Y(OTf) <sub>3</sub> <sup>c</sup> (M)
m-46 <sup>a</sup>	46	3.6 × 10 <sup>4</sup>	1.20	—
m-72 <sup>a</sup>	72	2.5 × 10 <sup>4</sup>	1.40	0.040
m-82 <sup>a</sup>	82	3.4 × 10 <sup>4</sup>	1.28	0.075
m-90 <sup>b</sup>	90	3.1 × 10 <sup>4</sup>	1.44	0.20

*N*-Isopropylacrylamide (2.23 M),  $\alpha,\alpha$ -azobisisobutyronitrile (0.8 mM), and 1-phenylethyl phenyldithioacetate (8.94 mM) in a methanol/toluene (1:1 by volume) mixture

<sup>a</sup> Polymerization at 60 °C

<sup>b</sup> Polymerization under UV irradiation at room temperature

<sup>c</sup> Metal trifluoromethanesulfonate

substrate surface cleaned by the sonication is named “hydrophobic” [15] in this article.

The hydrophobic gold substrate was further cleaned using a BioForce Nanosciences (Ames, IA, USA) UV/ozone Procleaner™ Plus ozone cleaner to have an ideally hydrophilic surface [15]. The UV irradiation time was about 10 min under ambient air conditions. This surface of the substrate is named “hydrophilic” throughout this article. The surface properties of the two different surfaces were checked by placing a water droplet on the surface. The water spread quickly over the hydrophilic gold surface, whereas it stayed as a hemisphere on the hydrophobic surface. The cleanliness of both surfaces was confirmed by measurements of IR spectra.

All the IR spectra were measured by a Thermo Fisher Scientific (Madison, WI, USA) Nicolet 6700 Fourier transform IR spectrometer. The inside of the spectrometer was air-purged by continuously flowing dry air generated by an Air-Tech (Yokohama, Japan) AT-35H dried-air generator; the air was passed through a molecular-sieve tower after the generator. A liquid-nitrogen-cooled Hg–Cd–Te detector with a modulation frequency of 60 kHz was used.

IR RA measurements [16–18] of a thin film deposited on a gold surface were performed on a Harrick (Pleasantville, NY, USA) VR1-NIC variable-angle reflection accessory. The p-polarized IR ray for the RA measurements was obtained by using a Harrick PWG-U1R wire-grid polarizer. The angle of incidence was 75° from the surface normal. The number of accumulations was 2,000. The RA measurements were repeated three times to confirm the reproducibility: three thin films were prepared for each compound, and were all subjected to the RA measurements. Since the band positions were precisely reproduced for each sample, only representative spectra are plotted in Figs. 4, 7 and 8.

IR attenuated total reflection (ATR) [17] spectra of the bulk samples were measured using a Spectra-Tech Foundation Performer single-reflection ATR accessory provided by Thermo Fischer Scientific equipped with an ATR prism made of germanium. The number of accumulations was 2,000. The measured spectra were transformed into the absorptance,  $\alpha = 4\pi k/\lambda$  (where *k* and  $\lambda$  are the imaginary parts of the complex refractive index and the wavelength, respectively), which was obtained by the Kramers–Kronig relations [19]. After this treatment, the  $\alpha$  spectra become comparable to the spectra of a bulk sample measured by the conventional transmission technique; otherwise, the raw ATR spectra often have peaks distorted by the influence of the real part of the complex refractive index, which induces an inappropriate reading of the peak position [17].

The bulk samples for the IR ATR measurements were dried, in advance, in a drying oven above 60 °C for more than 3 days. The adsorbed excess water on the surface of the solid was thus removed. Therefore, the water absorption band in the

ATR spectra is from the molecular water strongly preserved in the sample.

For preparation of the thin film, a compound was dissolved in acetone, and a gold-evaporated glass slide (substrate) was dipped in the solution. The substrate was withdrawn from the solution to the air at a constant speed of  $5 \text{ mm min}^{-1}$ , and a thin film of molecular adsorbates was formed on the gold surface by the interaction between the gold surface and the solvated compound.

Atomic force microscopy (AFM) images were acquired with a Seiko Instruments (Chiba, Japan) NanoNavi IIIs probe station equipped with a probing microscope unit (Nanocute), and the probe unit was put on an antivibration stage. The dynamic (tapping) mode was used for the AFM scanning. The cantilever was made of a crystalline silicon tip, and its force constant was  $20 \text{ N m}^{-1}$ .

## Results and discussion

### Analysis of bulk compounds with different degrees of tacticity

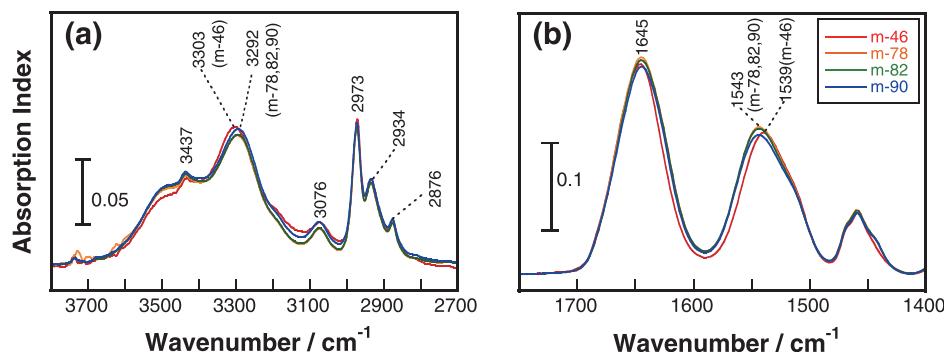
Figure 2 presents IR spectra of bulk samples of m-46, m-78, m-82, and m-90. Irrespective of the tacticity, most of the bands stay at the same positions, except for the bands related to the amide modes. For example, the  $\text{CH}_3$  asymmetric stretching, the  $\text{CH}_2$  antisymmetric stretching, and the  $\text{CH}_3$  symmetric stretching vibration bands keep their positions at 2,973, 2,934, and  $2,876 \text{ cm}^{-1}$ , respectively, irrespective of the tacticity (Fig. 2a) [20, 21]. The hydrogen-bonding free N–H group [12] also appears at a fixed position of  $3,437 \text{ cm}^{-1}$ . On the other hand, the “hydrogen-bonded” N–H stretching vibration [ $\nu(\text{NH})$ ] mode exhibits interesting behavior. It stays at  $3,292 \text{ cm}^{-1}$  for a high degree of tacticity (m-78, m-82, and m-90), whereas it is shifted to a higher wavenumber of  $3,303 \text{ cm}^{-1}$  when D decreases to m-46. Since this band is known to appear at a low wavenumber when the N–H group is hydrogen-bonded [12, 21], the higher shift suggests that the

N–H group in m-46 has imperfect hydrogen bonding. To confirm the band shift, the amide group region should also be investigated.

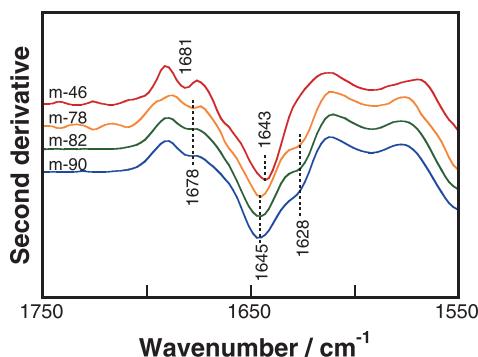
For this purpose, in the amide band region ( $1,450$ – $1,750 \text{ cm}^{-1}$  in Fig. 2b), the amide II band at approximately  $1,540 \text{ cm}^{-1}$  is useful. This mode comprises the N–H angular deformation [ $\delta(\text{NH})$ ] and C–N stretching vibrations, and  $\delta(\text{NH})$  plays a major role [21], which is expected to confirm the discussion of the  $\nu(\text{NH})$  mode. In fact, as expected, only m-46 yields the band at  $1,539 \text{ cm}^{-1}$ , whereas the other compounds yield the band at a common position of  $1,543 \text{ cm}^{-1}$ . In this manner, the bulk sample of m-46 has proved to have a different character at the N–H group.

Since the counterpart of the hydrogen bonding of the N–H group is the C=O group, the amide I band [10, 11] can be used as a double check. The amide I band, which mainly reflects the C=O stretching vibration mode, has a strong peak at  $1,645 \text{ cm}^{-1}$  for all the compounds. On closer inspection, however, the right side of the band is apparently shifted only for m-46, which suggests that a component involved in the band decreases in intensity. To make the component more visible, the second-derivative spectra are presented in Fig. 3. As expected, a band component at  $1,628 \text{ cm}^{-1}$  is missing only for m-46. The origin of the band at  $1,628 \text{ cm}^{-1}$  has already been established, and the band works as a good marker of a cooperative hydrogen bonding that is often found in a helix structure [10, 11]. The high-tacticity compounds (m-78, m-82, and m-90) should involve a helix structure, and in fact the band component is apparently recognized. On the other hand, m-46 lacks the component, which indicates that m-46 has a negligible amount of the helix even in the bulk sample. Since m-46 is generally expected to exhibit an atactic character, the intermolecular and intramolecular interactions may be weaker than in an isotactic ( $D=100$ ) or a syndiotactic ( $D=0$ ) compound. The disappearance of the band at  $1,628 \text{ cm}^{-1}$  readily supports this expectation even in a bulk sample.

Also of interest is the broad shoulder band at about  $3,500 \text{ cm}^{-1}$  in Fig. 2a, which corresponds to the O–H stretching



**Fig. 2** Absorption ( $\alpha$ ) spectra of solid samples of m-46, m-78, m-82, and m-90. The spectra were obtained by converting infrared attenuated total reflection spectra using the Kramers–Kronig relations



**Fig. 3** The second-derivative spectra of the spectra in Fig. 2

vibration band of water involved in the dried polymer (see “Experimental”). This suggests that molecular water is kept by a strong interaction with the amide groups.

In this manner, at the moment, only m-46 is an exceptional compound in terms of the intermolecular or intramolecular interaction, and the other compounds exhibit no apparent difference. This may be because the high molecular density in a solid induces hydrogen bonding among amide groups. What would happen if the molecular density were made much lower? In the next section, the intrinsic molecular interaction properties are discussed.

#### Molecular interaction with a hydrophobic and hydrophilic gold surface

Dip-coated films of the stereo-regulated PNiPAM compounds were subjected to IR RA spectroscopy. The results for a normally prepared gold surface cleaned by solvent sonication are described first. As stated in “Experimental,” this surface is called “hydrophobic” through this article.

#### On the hydrophobic gold surface

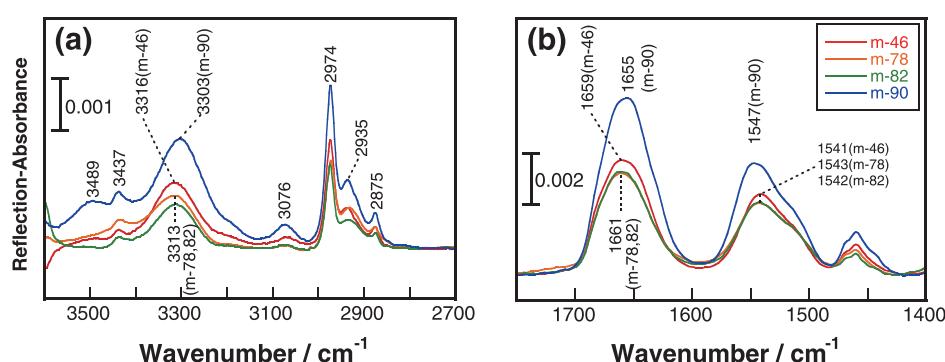
Figure 4 presents IR RA spectra of the dip-coated film prepared on the hydrophobic gold surface. The  $\nu(\text{NH})$  mode

appears in the range from 3,313 to 3,316  $\text{cm}^{-1}$  for m-82, m-78, and m-46, whereas it is largely shifted to 3,303  $\text{cm}^{-1}$  for m-90. In the discussion of bulk samples, m-46 is an exception, but in the case of “thin films” of PNiPAM on gold, m-90 is the exception. When we refer to Fig. 2a, the strongly hydrogen bonded N–H group yields the  $\nu(\text{NH})$  band at 3,292  $\text{cm}^{-1}$ . If the polymer molecules in the acetone solution still involve a helix structure, which is transferred onto the gold surface, the hydrogen bonding should be kept on the surface and the band positions would be the same as those for the solid samples. The different band positions, therefore, indicate that the polymer is disentangled through the solvation in acetone, and the relaxed polymer molecules are attached to the gold surface. The intermolecular interaction in the solution would be negligible. This explains the higher wavenumber position (3,303–3,316  $\text{cm}^{-1}$ ) in the thin film than in solid (3,292–3,303  $\text{cm}^{-1}$ ).

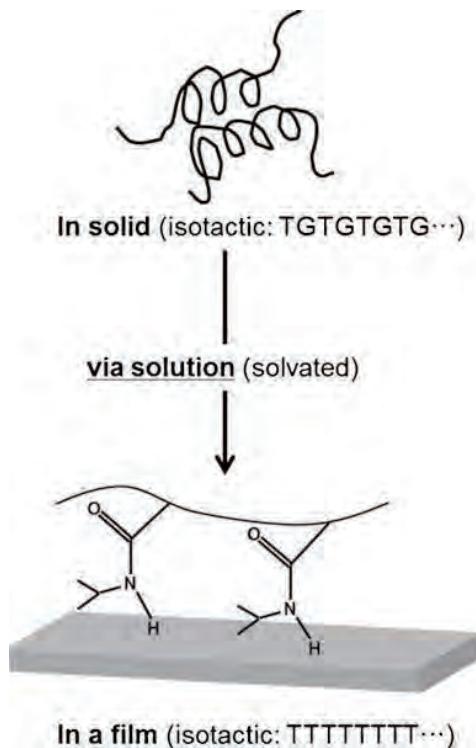
This discussion is true for the amide I band in Fig. 4b. For m-82, m-78, and m-46, the band is located at approximately 1,660  $\text{cm}^{-1}$ , which is significantly higher than in solid (1,645  $\text{cm}^{-1}$ ). The amide I band is known to appear at a higher wavenumber when the hydrogen bonding is weak. The discussion of the  $\nu(\text{NH})$  band is thus readily supported by that of the amide I band, which concludes that the PNiPAM compounds have no helix structure in the dip-coated film.

On the other hand, the band shift found only for m-90 is interesting. Since m-90 is also considered to be relaxed in dilute acetone solution (0.2 wt%), the shift may arise from the interaction with the gold substrate. In other words, only m-90 has a specifically strong interaction with the gold surface (3,303  $\text{cm}^{-1}$ ). One of the important properties of m-90 should be attributed to the isotactic-like structure.

From previous work [11] on the NiPAM dimer, even for the *meso* configuration the *trans-gauche* (TG) conformation needs to be considered. For example, pentane ( $\text{C}_5\text{H}_{12}$ ) has several conformers owing to the rotation about the second and third C–C bonds, and the all-*trans* conformer (*trans-trans*, TT) is stabler than the other conformers (TG and gauche-gauche). For the *meso*-type NiPAM dimer, the TG conformer in the main chain is stabler than the TT conformer because of



**Fig. 4** Infrared reflection-absorbance (RA) spectra of dip-coated films of m-46, m-78, m-82 and m-90 on a hydrophobic gold surface



**Fig. 5** Conformational change of PNiPAM. *T* trans, *G* gauche

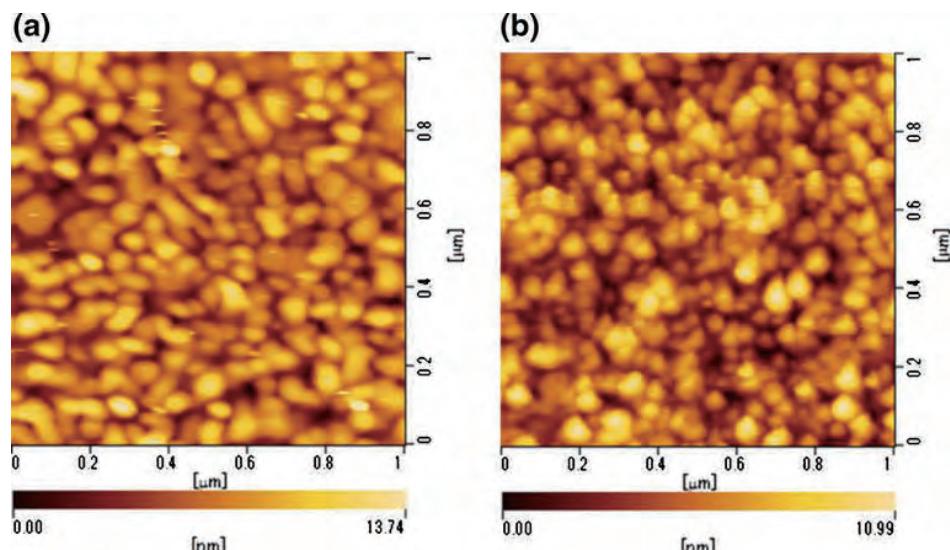
the steric hindrance and the intramolecular C=O $\cdots$ H–N hydrogen bond [11]. In other words, a helical structure of PNiPAM with a high *D* is related to the sequence of the TG conformation (TGTGTG...). If the side chains of PNiPAM with a isotactic configuration are stabilized by a strong interaction between the amide groups and the gold surface, however, the main chain of the isotactic parts is expected to prefer

the all-*trans* (TTTTTT) conformation, so the ordered amide groups preferably interact with the gold surface. In this manner, m-90 should change its conformation from TGTGTG $\cdots$  to TTTTTT $\cdots$  as illustrated in Fig. 5.

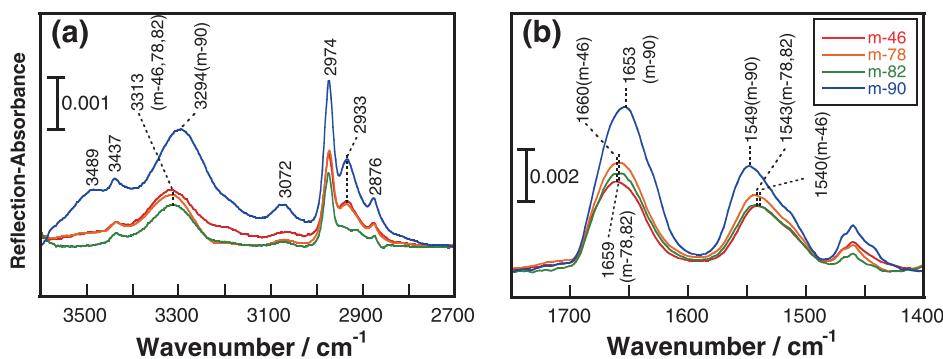
The reader may consider, however, that the m-90-specific band shift could arise from an imperfect relaxation in acetone because the helix structure of m-90 is tight in the solid. This doubt was resolved by an additional study on the hydrophilic gold surface, which will be discussed in the next section.

Further interesting behavior is found for the O–H stretching vibration band at 3,489 cm $^{-1}$ . This water-related band is found in the bulk samples as discussed for Fig. 2. In the RA spectra of dip-coated films, however, the band appears apparently only for m-90, whereas it is largely depressed for the other compounds. The disappearance of the water band (m-82, m-72, m-46) indicates that the PNiPAM molecules associated with water are relaxed in acetone and release the water. Although m-90 is also considered to be relaxed in dilute acetone solution, the isotactic structure has an important effect on the gold surface: the side chains are closely aligned nearly parallel to each other. In this situation, the amide groups work as anchors to receive water molecules from the ambient air, which explains the O–H band. Therefore, m-90 is once again confirmed to exhibit an isotactic-like character in a thin film as expected.

The surface selection rule of RA spectroscopy [17, 18] does not work here. In general, the gold surface is treated as very flat, for which the boundary condition of the electromagnetic field yields the surface selection rule. When the surface was analyzed in detail using AFM, however, the surface was found to consist of particle aggregates as shown in Fig. 6. The average diameter of a particle is about 50 nm, which is comparable to the length of a PNiPAM molecule. Although the



**Fig. 6** Atomic force microscopy images of **a** a bare gold surface and **b** a gold surface on which m-90 molecules are attached



**Fig. 7** Infrared RA spectra of dip-coated films of m-46, m-78, m-82, and m-90 on a hydrophilic gold surface

molecular adsorption is clearly recognized in the IR spectra, it is not visible in the AFM images. Therefore, there is no film on the substrate, but instead submonolayer adsorption occurs on “each” gold particle. With this situation, the boundary condition cannot be applied to the flat surface. The IR RA spectra thus resemble the spectra of unoriented molecules. The bottom line is that the adsorbed polymer chains cannot be recognized as being oriented molecules in the IR RA spectra.

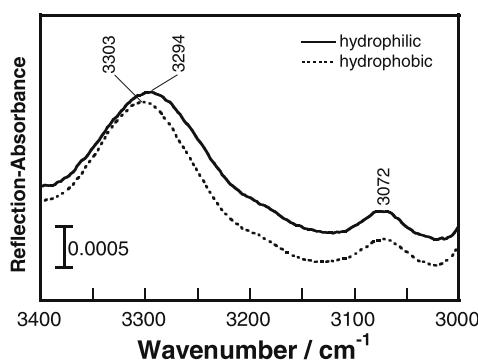
#### On the hydrophilic gold surface

A similar study was performed on the hydrophilic gold surface. A similar trend is seen in Fig. 7. For example, the water band at  $3,489\text{ cm}^{-1}$  is apparent only for m-90, whereas it is depressed for the other compounds with lower tacticity.

The most interesting result is obtained for the  $\nu(\text{NH})$  band of m-90 at  $3,294\text{ cm}^{-1}$ ; whereas the other compounds yield the mode at  $3,313\text{ cm}^{-1}$ , which is the same as for the hydrophobic gold surface. For a better comparison, in Fig. 8 this result is overlaid on the previous result for the hydrophobic gold surface. The surface effect is significant on the  $\nu(\text{NH})$  band. If the imperfect relaxation of m-90 in acetone solution is the major reason that the band position shifts, the band position is determined in solution, and is independent of the surface

property. The two RA spectra in Fig. 8 apparently indicate that the adsorbed thin film of m-90 largely depends on the surface hydrophilicity.

When the amide band region is investigated by referring to Figs. 4 and 7, the relative band intensity of the amide I band to the amide II band is almost identical to that for the hydrophobic and hydrophilic surfaces, which means that the molecular orientations in the adsorbed films are the same. In other words, the band intensity simply indicates the number of molecules on the gold surfaces when considering the surface selection rule. To analyze the number of adsorbed molecules, the amide A band [21] (overtone of the amide II band) is chosen, since this band is isolated. The amide A bands of the two samples at  $3,072\text{ cm}^{-1}$  in Fig. 8 have almost the same intensity, which indicates that the numbers of molecules adsorbed on the two different gold surfaces are nearly the same. This further means that the band shift simply arises from the difference of the interactive forces between the molecule and the gold surface. The hydrogen atom of the N–H group is positively charged because of the electronegativity, whereas the oxygen atom of the C=O group is negatively charged. Therefore, the N–H group will preferably interact with the electron-enriched gold surface, in particular for the hydrophilic (electron-rich) surface. This model readily explains the band shift.



**Fig. 8** Comparison of the infrared RA spectra of thin films of m-90 deposited on hydrophobic and hydrophilic gold surfaces

#### Conclusion

This study has revealed that stereo-controlled compounds of PNiPAM exhibit different characters in bulk and thin-film samples: the atactic-like polymer m-46 has exceptionally weak intramolecular and intermolecular interactions in bulk, whereas the isotactic-like compound m-90 exhibits an exceptionally strong interaction with the gold surface via the N–H group. In a bulk sample, the molecules interact greatly through both intramolecular and intermolecular interactions. Regardless, only the atactic-like polymer exhibits weak interaction, which was experimentally proved by the disappearance of the

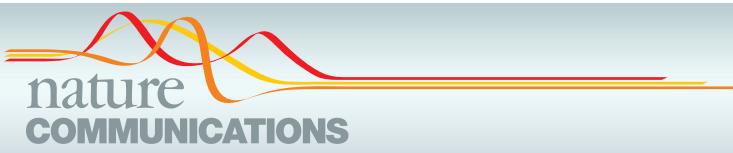
band component related to the cooperative hydrogen bonding involved in the amide I band.

On the other hand, thin films of the compounds were fabricated by the dip-coating technique, and revealed that the molecular interaction and orientation in the dip-coated film are both influenced largely by the surface property of the substrate. The influence was revealed by using two different gold surfaces, and the band shifts were systematically understood. Although the degree of tacticity of m-78 and m-82 is greater than that of m-46, the isotactic-like character is not recognized through the analysis using IR RA spectroscopy. In this manner, for an experiment on an isotactic polymer of PNiPAM, m-90 or a compound with a higher diad ratio is necessary.

**Acknowledgments** This work was financially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (no. 23350031) from the Japan Society for the Promotion of Science, and Priority Areas (no. 23106710) from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture, and Technology, Japan. This work was supported by the Collaborative Research Program of the Institute for Chemical Research, Kyoto University (grant 2012-38).

## References

- Shimoaka T, Itoh Y, Hasegawa T (2012) *J Phys Chem C* 116: 17142–17148
- Baer E, Hiltner A, Keith HD (1987) *Science* 235:1015–1022
- Natta G, Pino P, Corrandini P, Danusso F, Mantica E, Mazzanti G, Moraglio G (1955) *J Am Chem Soc* 77:1708–1710
- Patel S, Lavasanifar KA, Choi P (2010) *Biomaterials* 31:345–357
- Matsuzaki K, Uryu T, Asakura T (1996) NMR spectroscopy and stereoregularity of polymers. Japan Scientific Societies Press, Tokyo
- Schild HG (1992) *Prog Polym Sci* 17:163–249
- Yan H, Tsujii K (2005) *Colloids Surf B: Biointerfaces* 46:142–146
- Li C, Alam MM, Bolisetty S, Adamcik J, Mezzenga R (2011) *Chem Commun* 47:2913–2915
- Katsumoto Y, Kubosaki N (2008) *Macromolecules* 41:5955–5956
- Koyama M, Hirano T, Ohno K, Katsumoto Y (2008) *J Phys Chem B* 112:10854–10860
- Katsumoto Y, Kubosaki N, Miyata T (2010) *J Phys Chem B* 114: 13312–13318
- Hasegawa T, Tatsuta S, Katsumoto Y (2010) *Anal Bioanal Chem* 397:2203–2209
- Ray B, Isobe Y, Marioka K, Habae S, Okamoto Y, Kamigaito M, Sawamoto M (2003) *Macromolecules* 36:543–545
- Quinn JF, Rizzato E, Davis TP (2001) *Chem Commun* 1044–1045
- Schrader ME (1984) *J Colloid Interface Sci* 100:372–380
- Umemura J (2002) In: Chalmers JM, Griffiths PR (eds) *Handbook of vibrational spectroscopy*, vol 2. Chichester, Wiley
- Tolstoy VP, Chernyshova IV, Skryshevsky VA (2003) *Handbook of infrared spectroscopy of ultrathin films*. Wiley, Chichester
- Greenler RG (1966) *J Chem Phys* 44:310–315
- Plaskett JS, Schatz PN (1963) *J Chem Phys* 38:612–617
- Maeda Y, Higuchi T, Ikeda I (2000) *Langmuir* 16:7503–7509
- Bellamy LJ (1975) *The infrared spectra of complex molecules*, vol 1, 3rd edn. Chapman and Hall, London



## ARTICLE

Received 8 Jul 2013 | Accepted 1 Oct 2013 | Published 29 Oct 2013

DOI: 10.1038/ncomms3694

# Synthesis and physical properties of a ball-like three-dimensional $\pi$ -conjugated molecule

Eiichi Kayahara<sup>1,2</sup>, Takahiro Iwamoto<sup>1</sup>, Hikaru Takaya<sup>1</sup>, Toshiyasu Suzuki<sup>2,3</sup>, Mamoru Fujitsuka<sup>2,4</sup>, Tetsuro Majima<sup>2,4</sup>, Nobuhiro Yasuda<sup>5</sup>, Naoto Matsuyama<sup>6</sup>, Shu Seki<sup>6</sup> & Shigeru Yamago<sup>1,2</sup>

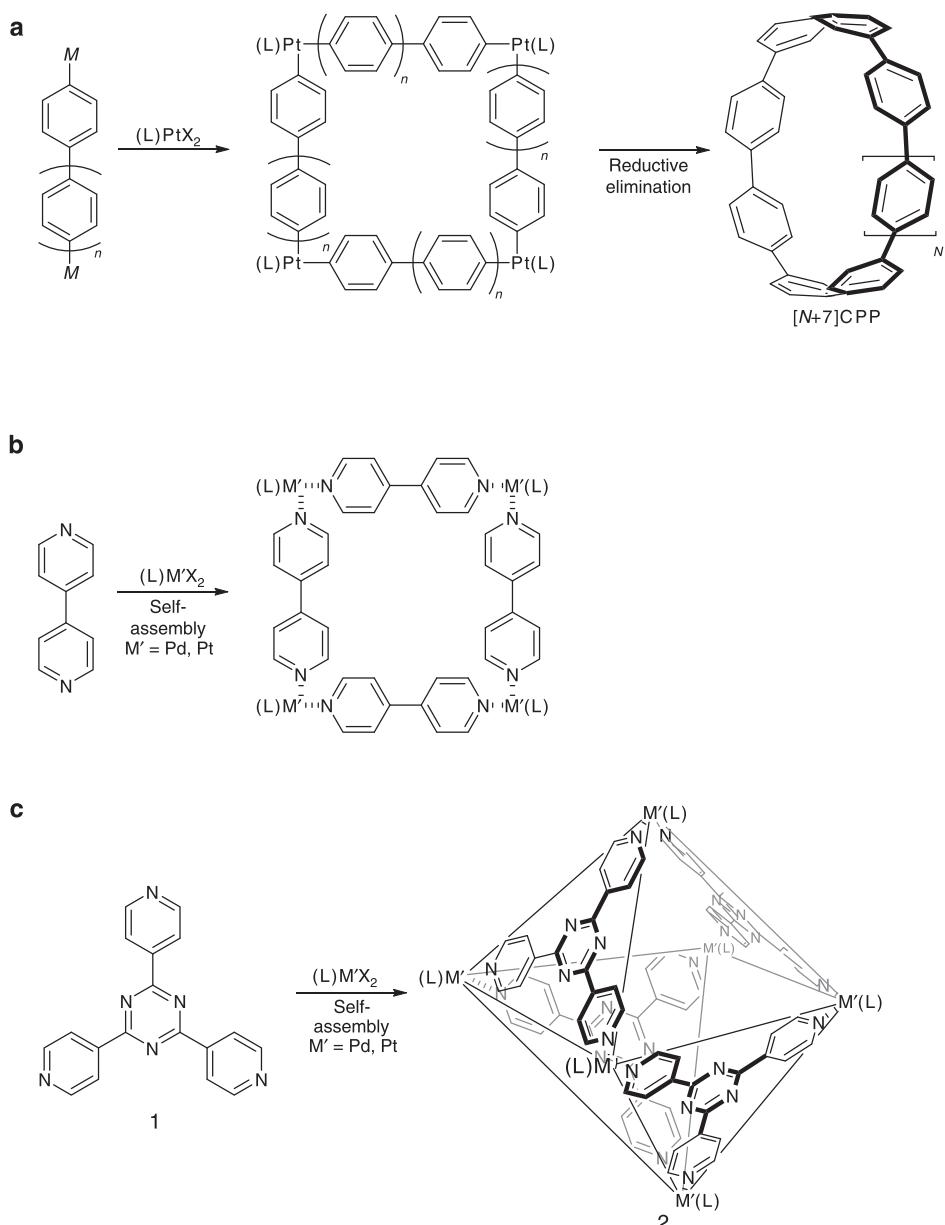
Curved  $\pi$ -conjugated molecules with closed and three-dimensional (3D) structures, such as fullerenes and carbon nanotubes, have been the subject of intensive research due to their potential applications in molecular electronics. However, basic molecular skeletons of 3D molecules are limited because of the lack of a rational and selective synthetic method by organic synthesis. Here we report the synthesis of a 3D  $\pi$ -conjugated molecule based on the platinum-mediated assembly of four molecules of a stannylated trisubstituted benzene derivative forming a hexanuclear platinum complex with an octahedral shape, from which reductive elimination of platinum gave the target molecule. As many supramolecular transition metal-ligand complexes with 3D cages and polyhedral structures have been synthesized by self-assembly of ligands and metals, the current assembly/reductive elimination strategy could provide a variety of new 3D  $\pi$ -conjugated molecules with different structures and topologies, which are challenging to obtain using conventional synthetic methods.

<sup>1</sup> Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji 611-0011, Japan. <sup>2</sup> CREST, Japan Science and Technology Agency, Tokyo 102-0076, Japan. <sup>3</sup> Institute for Molecular Science, National Institute of Natural Sciences, Myodaiji, Okazaki 444-8787, Japan. <sup>4</sup> The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan. <sup>5</sup> Research and Utilization Division, Japan Synchrotron Radiation Research Institute, Hyogo 679-5198, Japan. <sup>6</sup> Department of Applied Chemistry, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.Y. (email: yamago@scl.kyoto-u.ac.jp).

**A**fter the discovery of fullerenes<sup>1</sup> and carbon nanotubes (CNTs)<sup>2</sup>, curved  $\pi$ -conjugated molecules with closed and three-dimensional (3D) structures have been the subject of intensive research. This is not only for their structural beauty but also their many potential applications in molecular electronics<sup>3,4</sup>. For example, C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> derivatives have been used as charge transport materials in organic photovoltaics<sup>5,6</sup>, and CNTs have demonstrated promise as nanowires or active components in electronic devices such as the field-effect transistor<sup>7</sup>. However, despite these developments, basic molecular skeletons of 3D molecules are limited. This is due to the lack of a rational synthetic method, with fullerenes and CNTs being prepared by physical methods such as laser vaporization or arc discharge of carbon and combustion of aromatic hydrocarbons. A solitary exception is the rational synthesis of C<sub>60</sub> by Scott *et al.*<sup>8</sup>, which was based on a flash vacuum pyrolysis

technique. However, the application of this strategy to other 3D molecules has been hampered owing to the low generality, long synthetic steps, harsh reaction conditions and poor overall yields. Therefore, development of a general, bottom-up synthetic route to 3D  $\pi$ -conjugated molecules by organic synthesis is not only a significant challenge but also a pivotal contribution to materials science.

Recently, two-dimensional (2D) hoop-shaped  $\pi$ -conjugated molecules, in particular cycloparaphenylanes (CPPs), the simplest structural unit of armchair CNTs, have captured significant interest<sup>9</sup>, and three groups including our own have developed new synthetic methods for producing them<sup>10–17</sup>. Our method relies on the formation of a square-shaped tetranuclear aryl platinum complex by the transmetalation of arylmetal species and a platinum dihalide (Fig. 1a)<sup>12,18–20</sup>. The process of the complex formation can be regarded as a covalent bonding



**Figure 1 | Cycloparaphenylene and supramolecular transition metal-ligand complexes. (a)** Synthetic route of cycloparaphenylene (CPPs). **(b)** Self-assembly of metal-ligand interaction forming square metal complex. **(c)** Octahedral metal complex. M, metal; L, ligand.

version of the self-assembly of structurally related coordination complexes of palladium and platinum macrocycles with, for example 4,4'-bipyridyl, in supramolecular chemistry (Fig. 1b)<sup>21–23</sup>. Once the covalently bonded complex has been formed, reductive elimination of platinum affords the CPPs.

As many supramolecular transition metal-ligand complexes with 3D cages and polyhedral structures have been previously reported<sup>24–27</sup>, it was envisioned that these complexes would be suitable precursors for 3D molecules. For example, Fujita<sup>24</sup> reported that trispyridyl ligand **1** and palladium(II) selectively and quantitatively formed octahedral, hexapalladium cage **2** by self-assembly involving a ligand–metal interaction. If a structurally related cage consisting solely of covalent bonds was to form, such a molecule would be a possible precursor of a 3D  $\pi$ -conjugated molecule.

Here we report the synthesis of a 3D, spherical  $\pi$ -conjugated molecule, in which  $sp^2$ -carbons of 1,3,5-trisubstituted and 1,4-disubstituted benzenes are covalently bonded forming a ball-like molecule. The synthesis involves the assembly of four molecules of tristannylated 1,3,5-benzene derivative and six platinum(II) species through 12-fold stannane–platinum transmetallation forming a hexanuclear platinum complex with octahedral shape, from which 6-fold reductive elimination of platinum gave the target molecule. The structure of the molecule is unambiguously determined by the single-crystal X-ray analysis. In addition, the optical and electrochemical properties and charge mobility of the molecule are reported.

## Results

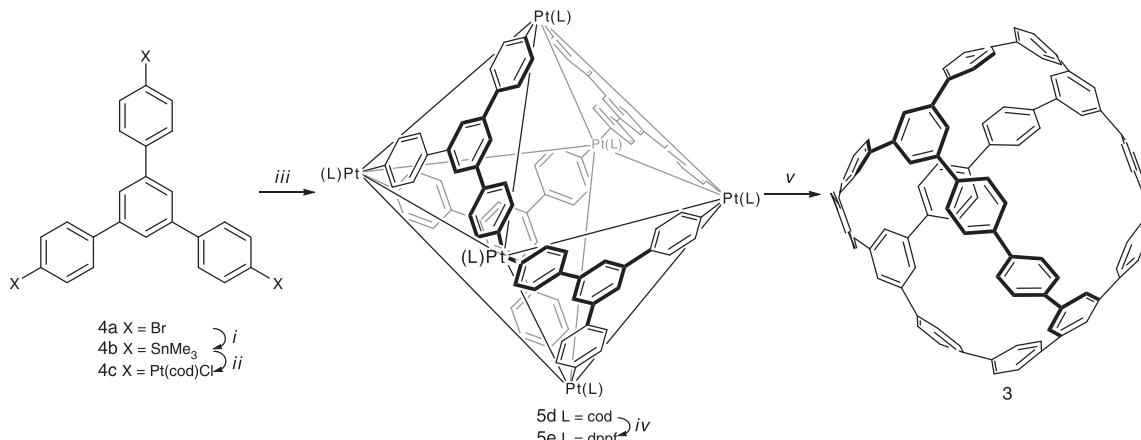
**Synthesis of 3D molecule **3**.** The synthesis of 3D molecule **3** starting from commercially available tribromide **4a** is summarized in Fig. 2. Transmetallation of the bromide in **4a** by BuLi, followed by the addition of trimethylstannyl chloride, gave **4b**, which was treated with 3 equiv. of Pt(cod)Cl<sub>2</sub> (cod = 1,5-cyclooctadiene) in 1,2-dichloroethane at 50 °C for 20 h, affording trisplatinated **4c** in 75% yield (two steps). Subsequently, **4c** was treated with an equimolar amount of **4b** in 1,2-dichloroethane (1 mM) at 50 °C for 30 h. The white precipitate that was formed was collected by filtration and washed with 1,2-dichloroethane and toluene to afford **5d** in 81% yield. The structure of **5d** was characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopies. The formation of **5d** is most likely to involve reversible C–Pt bond formation<sup>18</sup>,

but the detail studies were hampered due to the low solubility of **5d**. Treatment of **5d** with bis(diphenylphosphino)ferrocene (dppf, 6 equiv.) gave **5e**. After removal of cod and unreacted dppf, treatment of the reaction mixture with XeF<sub>2</sub> (6 equiv.) in toluene at 90 °C for 20 h gave **3** (refs 20,28), which was isolated by silica gel chromatography in 21% yield as a pale yellow solid. Using triphenylphosphine (6 equiv.) instead of XeF<sub>2</sub> also gave **3**, but in 19% yield. The use of bromine, however, which was employed in the synthesis of CPPs<sup>12,18</sup>, did not give the desired cyclic product at all. **3** was found to be soluble in many common solvents, including toluene, THF, CHCl<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

The use of Pt complex was essential to obtain the octahedral complex. The use of Pd complex such as Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> instead of the Pt complex resulted in a complex mixture because bis-aryl Pd complexes readily undergo reductive elimination and do not have sufficient lifetime to form the octahedral complex.

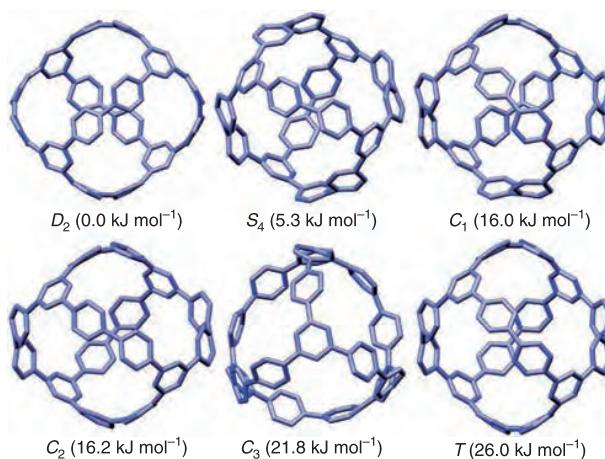
The reductive elimination process was monitored by the <sup>19</sup>F and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy (Supplementary Figs S1 and S2). When XeF<sub>2</sub> (6 equiv.) was added to **5e** in toluene-d<sub>8</sub>, the reaction mixture immediately turned orange. The <sup>19</sup>F NMR spectrum of the solution showed a singlet peak at –271.3 p.p.m., suggesting the formation of single species. In the <sup>31</sup>P NMR spectrum, the singlet peak of **5e** at 20.3 p.p.m. with a characteristic <sup>195</sup>Pt satellite (<sup>1</sup>J<sub>PPt</sub> = 1,784.3 Hz) completely disappeared and a new singlet peak at –2.9 p.p.m. with the satellite (<sup>1</sup>J<sub>PPt</sub> = 1,018.0 Hz) appeared. The large upfield shift and smaller <sup>1</sup>J<sub>PPt</sub> coupling constant of the product as compared with **5e** suggested the formation of the corresponding (bis-aryl)Pt(IV)F<sub>2</sub> complex by the oxidation of **5e** by XeF<sub>2</sub> (refs 28–30).

After heating at 90 °C for 3 h, the <sup>19</sup>F NMR analysis indicated the complete disappearance of the signal at –271.3 p.p.m. and the appearance of a new singlet peak at –233.1 p.p.m. corresponding to Pt(dppf)F<sub>2</sub> together with several peaks from –290 to –236 p.p.m. The spectrum became simpler after 9 h of heating, and only the signal of Pt(dppf)F<sub>2</sub> was observed after 18 h. The same trend was observed in the <sup>31</sup>P NMR spectrum. The signal at –2.9 p.p.m. almost disappeared after 3 h with the formation of several new signals, and only a signal corresponding to Pt(dppf)F<sub>2</sub> was observed at 9.5 p.p.m. with the satellite (<sup>1</sup>J<sub>PPt</sub> = 3,542.3 Hz) after 18 h of heating. These observations suggest that the reductive elimination from the initially formed (bis-aryl)Pt(IV)F<sub>2</sub> to **3** did not proceed at the same time but rather in a stepwise manner.



**Figure 2 | Synthesis of **3**.** Reagents and conditions: (i) (1) BuLi (4.5 equiv.), THF, –78 °C, 1 h. (2) Me<sub>3</sub>SnCl (4.5 equiv.), –78 °C to room temperature, 6 h, 91%. (ii) Pt(cod)Cl<sub>2</sub> (3.0 equiv.), 1,2-dichloroethane, 50 °C, 20 h, 82%. (iii) **4b** (1.0 equiv.), 1,2-dichloroethane, 50 °C, 30 h, 81%. (iv) dppf (6.0 equiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 19 h, 86%. (v) XeF<sub>2</sub> (6.0 equiv.), toluene, 90 °C, 20 h, 21%, or PPh<sub>3</sub> (6.0 equiv.), toluene, 90 °C, 20 h, 19%. cod, 1,5-cyclooctadiene; dppf, bis(diphenylphosphino)ferrocene.

**Characterization of 3.** The product was first characterized in solution by NMR spectroscopy (Supplementary Figs S3 and S4). In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C, 3 showed one singlet and two doublets in the aromatic region (7.41, 7.54 and 7.59 p.p.m.), which is consistent with the highly symmetrical structure of 3. This was also confirmed by the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, which showed six signals (125.5, 127.4, 128.3, 138.6, 139.5 and 141.9 p.p.m.). In the MALDI-TOF mass spectrum, a molecular ion peak was observed at  $m/z = 1,212.4612$ , with an isotopic distribution pattern identical to the theoretical pattern (Supplementary Fig. S5). The Raman spectrum of 3 in THF at room temperature shows a similar spectral pattern to that of CPP<sup>31</sup>, but with approximately double the number of peaks present (Supplementary Fig. S6). In addition to the peak derived from the paraphenylene unit, 3 showed the characteristic bands at 1,586, 1,329 and 1,231  $\text{cm}^{-1}$  due to intra-ring C–C stretch, inter-ring C–C stretch and in-plane C–H bend, respectively, derived from the 1,3,5-trisubstituted benzene unit.

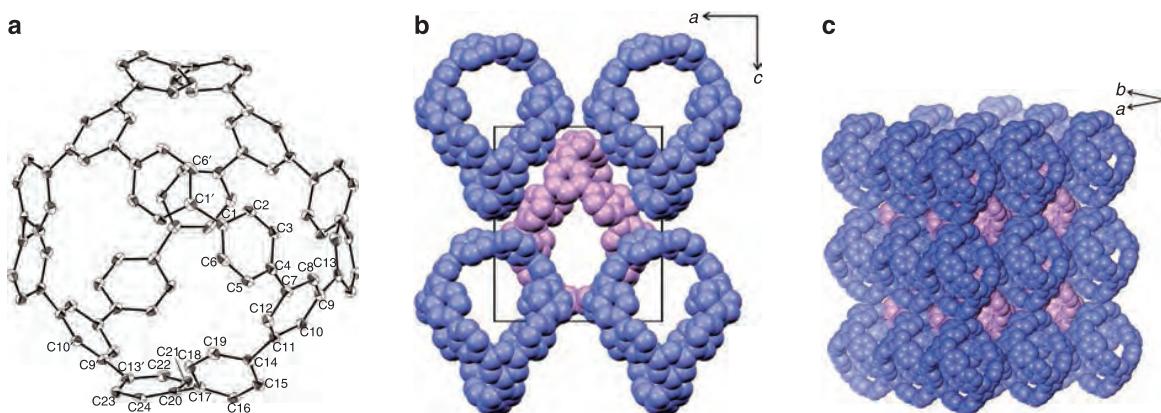


**Figure 3 | Calculated structural isomers of 3.** All molecular geometries were obtained by geometry optimization with DFT calculation at the B3LYP/6-31G\* level. The energy values ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) beneath each isomer are the relative energy with respect to the lowest-lying isomer calculated at the corresponding level of DFT calculation. Blue represents carbon atoms. Hydrogen atoms are omitted for clarity.

3D-structural information for 3 was first obtained by the density functional theory (DFT) calculations at the B3LYP/6-31G\* level of theory. Six energy-minimized isomers with  $D_2$ ,  $S_4$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  and  $T$  symmetries were calculated (Fig. 3), among which the  $D_2$  symmetric isomer was the most thermodynamically stable, followed by the  $S_4$  symmetric isomer by 5.3  $\text{kJ mol}^{-1}$ . The other isomers were found to be very high in energy ( $>16.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) compared with the  $D_2$  isomer, suggesting that the contributions of these isomers to the ground state structure were negligible. As all isomers are rotational isomers with respect to the biphenyl units, the conversion among the isomers should occur spontaneously within the time frame of the NMR measurement. Indeed, the isomerization could not be frozen, even at low temperature, which was evident from the observation that  $^1\text{H}$  NMR signals of 3 did not split, even at –80 °C.

The strain energy of the  $D_2$  isomer was calculated to be 501  $\text{kJ mol}^{-1}$  using a hypothetical homodesmotic reaction (Supplementary Fig. S7). The strain energy of 3 is higher than that of [6]CPP (407  $\text{kJ mol}^{-1}$ ), which is the smallest CPP that has been synthesized to date<sup>20,32</sup>, and even [5]CPP (491  $\text{kJ mol}^{-1}$ )<sup>18,33</sup>. In contrast, precursor 5 does not exhibit significant strain because the bond angle of *cis*-substituted platinum would be close to its ideal angle of 90°, although detailed structural analysis has so far proved unsuccessful. These results strongly suggest that the use of reductive elimination is an excellent strategy for synthesizing highly strained molecules.

**X-ray crystallographic analysis of 3.** The structure of 3 was unambiguously determined by X-ray crystallographic analysis performed on a single crystal of 3 that was grown by vapor diffusion of *n*-hexane into a solution of 3 in  $\text{CHCl}_3$  (Supplementary Data 1). The crystal belongs to the tetragonal crystal system with a space group of  $P\bar{4}2_1c$ . As shown in the ORTEP drawing in Fig. 4a, 3 clearly exhibited a ball-shaped structure, with the inner void space occupied by highly disordered *n*-hexane molecules. The structure of 3 was found not to be a highly symmetrical circular shape but an elliptic form, the breadth of which was shown to be elongated along the  $c$  axis (15.28(3) Å) rather than the  $a$ - and  $b$  axes (12.54(9) Å), as estimated from the distance between the diagonal ipso carbon atoms. The conformation of 3 in the crystal did not have  $D_2$  symmetry, which was calculated to be the most stable conformer, but instead possessed a pseudo  $S_4$  symmetry, which was induced by the elongation of the  $c$  axis, as



**Figure 4 | Crystal structure of 3.** (a) ORTEP drawing of 3, showing the atom-numbering scheme. Asterisks indicate atoms generated by the symmetry operation. Thermal ellipsoids are shown at 50% probability. Hydrogen atoms and solvent atoms are omitted for clarity. Crystal data: tetragonal,  $P\bar{4}2_1c$  (#114);  $a = 16.0885(6)$  Å,  $b = 16.0885(6)$  Å,  $c = 18.6558(8)$  Å,  $V = 4828.9(3)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$ ,  $R_{\text{all}} = 0.0665$ ,  $wR_2 = 0.1682$ , GOF = 1.068. (b) Crystal packing of 3. View down  $b$  axis. (c) Space filling model in extended area. Carbon atoms are shown as blue or purple and layer structure (one layer in blue and another layers in purple) are presented in the figure. For clarity, hydrogen atoms and solvent molecules are omitted.

mentioned above. The bond lengths and bond angles of the crystal of **3** were in good agreement with those of the calculated  $S_4$  structure, but the dihedral angle with respect to the two benzene units was slightly different. This apparent contradiction between the gas phase and crystalline structures is likely to be due to the effects of crystal packing forces and/or inclusion of solvent molecules.

Selected structural parameters of **3** obtained from the X-ray analysis and the theoretical calculations are summarized in Supplementary Table S1. The bond lengths of the C<sub>ipso</sub>-C<sub>ipso</sub> bonds, namely C1-C1\*, C4-C7, C9-C13, C11-C14 and C17-C20 were in the range of 1.46(4)-1.49(0) Å, the values of which are typical C<sub>ipso</sub>-C<sub>ipso</sub> bond lengths observed between two phenyl groups. The C-C bonds of the benzene rings were in the range of 1.37(7)-1.39(6) Å, and no significant bond alternation was observed. These results indicate that, despite extremely high strain of **3**, the benzenoid form was preserved in all of the benzene rings. This observation is in sharp contrast to the hexagons of fullerenes and small CPPs, where the benzenoid character is reduced owing to the presence of strain. The ipso carbon atoms were slightly pyramidalized, as indicated by the sum of three bond angles around them being <360° (357.4(2)-358.9(2)°). The bend angles as defined by the angle consisting of three ipso carbon atoms<sup>33</sup>, namely C1\*-C1-C4, C1-C4-C7, C4-C7-C10, C12-C9-C13, C8-C11-C14, C11-C14-C17, C14-C17-C20, C17-C20-C13\* and C20-C13\*-C9\* were 155.4(5)°, 158.1(1)°, 161.7(7)°, 161.7(7), 164.6(2)°, 161.3(1)°, 163.1(3)°, 163.4(7)° and 160.4(0)°, respectively. These observations suggest that the strain is more localized at the ipso carbons of the paraphenylenne unit.

The molecular arrangement of **3** in the crystal was found to be a body-centered quasi-cubic structure ( $a=b\neq c$ ), where each molecule of **3** in the unit cell center had eight nearest upside-down neighbors on the vertices of the unit cell, as shown in Fig. 4b and c. Interestingly, there is no  $\pi$ - $\pi$  stacking contact of benzene units between adjacent molecules of **3**. Instead, weak offset C-H/ $\pi$  interactions were observed between the central molecule and the vertex molecules, in which the C-H bonds lay perpendicular to the C atom of benzene, rather than pointing towards the center of the benzene rings (Supplementary Fig. S8)<sup>34</sup>. The observed C-H... $\pi$  bond distances (3.5-3.6 Å) were slightly longer than the sum of the van der Waals radius of sp<sup>2</sup> C (3.40 Å). This type of C-H... $\pi$  interaction is observed in crystalline pentacene and is responsible for the large charge mobility in pentacene-based organic transistors<sup>35</sup>. Therefore, **3** might also serve as a new charge transport material in molecular electronics. Indeed, the flash-photolysis time-resolved microwave conductivity measurements<sup>36</sup> on the solid film of **3** with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane gives a clear signature of photo-induced charge separation and the subsequent delocalization of positive charges on **3**, revealing its moderate hole mobility of  $3.0 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Supplementary Fig. S9).

**Physical properties of **3**.** The ultraviolet-vis spectrum of **3** in chloroform at room temperature shows an absorption maximum at 317 nm, with an absorption coefficient  $\epsilon = 29,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Supplementary Fig. S10). The time-dependent DFT calculations for the  $D_2$  and  $S_4$  isomers indicated that this absorption mainly consisted of four transitions for the  $D_2$  isomer and three transitions for the  $S_4$  isomer, but that the HOMO → LUMO transition was symmetry-forbidden for both isomers (Supplementary Table S2). In the fluorescence spectra, a blue fluorescence was observed with  $\lambda_{\text{em}} = 426 \text{ nm}$  in THF. The Stokes shift was significantly high, probably due to large structural relaxation from the Franck-Condon state<sup>37</sup>. The fluorescence quantum yield ( $\Phi_F$ ) was

determined to be 0.44, using 9,10-dicyanoanthracene as a standard. The fluorescence decay of **3** followed first-order kinetics with a lifetime ( $\tau = 2.1 \text{ ns}$ ), as measured by the single-photon counting method. The radiation decay rate constant ( $k_r$ ) was determined to be  $2.1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  from the equation  $k_r = \Phi_F/\tau$ .

The electrochemical properties of **3** were studied using differential pulse voltammetry (DPV) in a 0.1 M solution of Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> in 1,1,2,2-tetrachloroethane as a supporting electrolyte (Supplementary Fig. S11). A single oxidation peak was observed, with an oxidation potential of +1.06 V versus ferrocene/ferrocenium couple (Fc/Fc<sup>+</sup>); however, no reduction was observed under the given solvent window.

## Discussion

A ball-like 3D  $\pi$ -conjugated molecule **3** was successfully synthesized and characterized. The key steps of the synthesis are the platinum-mediated assembly of  $\pi$ -units by transmetalation and subsequent reductive elimination of the platinum. The assembly process by which the hexanuclear platinum complex **5** was formed mimics the self-assembly of metal and ligands that form structurally related cage-like coordination complexes (Fig. 1c). Furthermore, despite the high strain of **3**, reductive elimination of platinum from **5** proceeded with reasonable yield. As many metal-organic frameworks with 3D structures are already known and can easily be prepared, the assembly/reductive elimination strategy described here would provide a variety of new 3D  $\pi$ -conjugated molecules with different structures and topologies, which are challenging to obtain using conventional synthetic methods. In view of the diverse range of possible functions of  $\pi$ -conjugated molecules, the current method has the potential to open up a new era of 3D  $\pi$ -conjugated molecules. Interestingly, as the structure of **3** is topologically identical to a Reuleaux triangle, the extension of this synthetic strategy should make it possible to synthesize molecules with Klein's quartic curve structure<sup>38</sup>, a 3D version of a Möbius strip<sup>39</sup>.

While this work was ongoing, Matsui *et al.*<sup>40</sup> reported on the synthesis of a  $\pi$ -conjugated 3D molecule that possessed a simpler bicyclic structure than **3**, which is tricyclic, using a modification of the strategy they developed for CPP synthesis. However, the synthesis required long reaction steps and the final product was only obtained in a low overall yield. Furthermore, it is likely that extension of the method to the synthesis of a structurally diverse array of 3D molecules would be challenging.

## Methods

**General.** All reaction conditions dealing with air- and moisture-sensitive compounds were carried out in a dry reaction vessel under a nitrogen atmosphere. <sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz) spectra were measured for a CDCl<sub>3</sub> or (CDCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub> solution of a sample and are reported in p.p.m. ( $\delta$ ) from internal tetramethylsilane or residual solvent peak. <sup>19</sup>F NMR spectra were measured at 376 MHz and are reported in  $\delta$  from external C<sub>6</sub>F<sub>6</sub> (-162.9 p.p.m.), which was separately calibrated from CCl<sub>3</sub>F (0.0 p.p.m.). <sup>31</sup>P NMR spectra were measured at 162 MHz and are reported from external 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aqueous solution. Infra-red spectrum (absorption) was reported in cm<sup>-1</sup>. Electrospray ionization time-of-flight mass spectrum (ESI-TOF MS) was recorded under the positive mode with samples dissolved in a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/isopropanol solution. Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF MS) was obtained on a spectrometer under the positive reflection mode with 20 kV acceleration voltage. Samples were prepared by mixing a 1:1 ratio of sample (1 mg ml<sup>-1</sup>) and dithranol (1 mg ml<sup>-1</sup>) solutions in THF. Ultraviolet-vis and fluorescence spectra were measured in CHCl<sub>3</sub> and THF at room temperature, respectively. DPV was performed with a Pt electrode of a sample solution (1 mM) in 0.1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> solution of 1,1,2,2-tetrachloroethane at room temperature under a nitrogen atmosphere. The scan rate with 20 mV s<sup>-1</sup> was employed. After the measurement, ferrocene was added to the mixture and the potential was calibrated with respect to the Fc/Fc<sup>+</sup>.

**Materials.** Unless otherwise noted, commercially available materials were used without purification. Dichloromethane was distilled successively from P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and stored over molecular sieves. Toluene was distilled from CaH<sub>2</sub> and

stored over molecular sieves. Pt(cod)Cl<sub>2</sub> (ref. 41), dppf (ref. 42), 1,3,5-tris(*p*-bromophenyl)benzene **4a** (ref. 43) are commercially available and were easily synthesized as reported. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra are provided for all new compounds (see Supplementary Figs S12–S17).

**Synthesis of 4b.** To a solution of **4a** (5.43 g, 10 mmol) in THF (75 ml) BuLi (32 ml, 1.41 M in hexane, 45 mmol) was slowly added by using a syringe at -78 °C. After stirring for 1 h at this temperature, a solution of trimethylstannyl chloride (8.96 g, 45 mmol) in THF (10 ml) was slowly added through a cannula at -78 °C and the resulting mixture was slowly warmed to room temperature over 3 h. After stirring for 3 h at this temperature, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution and was extracted with ethyl acetate. The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to give a crude mixture. The residue was purified by passing neutral alumina with hexane as an eluent to give the title compound (7.22 g, 91%) as a white solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 0.34 (s, 27H, J<sub>Sn-H</sub> = 54.0 Hz, SnMe<sub>3</sub>), 7.62 (d, J = 7.6 Hz, 6H, -ArH), 7.66 (d, J = 7.2 Hz, 6H, -ArH), 7.77 (s, 3H, -ArH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) -9.50 (J<sub>Sn-C</sub> = 341.5 Hz), 125.18, 126.92, 136.35, 141.04, 141.50, 142.36; HRMS (FAB) *m/z*: calcd for C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>Sn<sub>3</sub> (M)<sup>+</sup>, 798.0352; found 798.0285; IR (KBr) 798, 990, 1,265, 1,420, 1,465, 1,571, 2,900, 3,002; mp 191.0–193.5 °C.

**Synthesis of 4c.** Pt(cod)Cl<sub>2</sub> (2.24 g, 6.0 mmol) and **4b** (1.59 g, 2.0 mmol) were dissolved in 1,2-dichloroethane (1,200 ml) and the mixture was heated at 50 °C for 20 h under a nitrogen atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was washed with toluene to give a crude mixture. The residue was purified by passing over a short neutral alumina plug with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as an eluent to give the title compound (2.16 g, 82%) as a white solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 2.15–2.84 (m, 24H, cod), 4.65 (s, J<sub>Pt-C</sub> = 68.5 Hz, 6H, cod), 5.81 (s, 6H, cod), 7.27–7.36 (m, 3H, -ArH), 7.36–7.49 (m, 6H, -ArH), 7.61–7.76 (m, 6H, -ArH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) 27.91, 32.13, 87.44 (J<sub>C,Pt</sub> = 201.3), 115.70, 124.30, 124.66, 127.11, 127.23, 128.71, 134.21, 137.28, 141.39, 141.84, 142.21, 143.43; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: calcd for C<sub>48</sub>H<sub>55</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>1</sub>Pt<sub>3</sub> (M-NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 1,337.2320; found 1,337.2402; IR (KBr) 772, 890, 986, 1,215, 1,460, 1,536, 2,221, 2,765, 2,980.

**Synthesis of 5d.** The solution of **4b** (0.40 g, 0.5 mmol) and **4c** (0.66 g, 0.5 mmol) in 1,2-dichloroethane (1,500 ml) was heated at 50 °C for 30 h under a nitrogen atmosphere, forming a white precipitate. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was washed with 1,2-dichloroethane/toluene (1/1) to give the title compound (0.61 g, 81%) as a white solid. <sup>1</sup>H NMR (C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>, 400 MHz) 2.17–2.65 (brs, 48H, cod), 4.84–5.27 (brs, 24H, cod), 7.18–7.23 (m, 24H, -ArH), 7.24–7.32 (m, 36H, -ArH); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>, 100 MHz) 30.48, 104.03, 126.83, 128.82, 130.05, 134.37, 135.55, 156.22; IR (KBr) 789, 988, 1,020, 1,088, 1,465, 1,568, 2,360, 2,868, 2,996.

**Synthesis of 3.** A suspension of **5d** (0.30 g, 0.1 mmol) and dppf (0.33 g, 0.6 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 ml) was stirred at room temperature for 19 h under a nitrogen atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was washed with ethyl acetate to give **5e** (0.49 g, 86%) as an orange solid. The suspension of **5e** (0.49 g, 0.086 mmol) and XeF<sub>2</sub> (87.4 mg, 0.52 mmol) in toluene (86 ml) was heated at 90 °C for 20 h under a nitrogen atmosphere. The resulting suspension was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude mixture. The residue was purified by silica gel chromatography (hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 4/1 to 1/1) to give **3** (21.9 mg, 21%) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 7.41 (d, 24H, J = 8.0 Hz, -ArH), 7.54 (s, 12H, -ArH), 7.59 (d, 24H, J = 8.0 Hz, -ArH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) 125.45, 127.36, 128.26, 138.55, 139.52, 141.89; HRMS (MALDI-TOF) *m/z*: calcd for C<sub>96</sub>H<sub>60</sub> [M]<sup>+</sup>, 1,212.4612; found 1,212.4690.

**Alternative synthesis of 3.** A suspension of **5d** (30.3 mg, 10 µmol) and dppf (33.3 g, 60 µmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) was stirred at room temperature for 19 h under a nitrogen atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was washed with ethyl acetate to give **5e** (48.0 mg, 84%) as an orange solid. The suspension of **5e** (48.0 mg, 8.4 µmol) and PPh<sub>3</sub> (26.4 mg, 101 µmol) in toluene (8.4 ml) was heated at 90 °C for 20 h under a nitrogen atmosphere. The resulting suspension was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude mixture. The residue was purified by silica gel chromatography (hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 4/1 to 1/1) to give **3** (1.9 mg, 19%) as a pale yellow solid.

**NMR monitoring of the reductive elimination of 5e.** To a solution of **5e** (6.4 mg, 1.12 µmol) in toluene-d<sub>8</sub> (0.5 ml) in a NMR tube XeF<sub>2</sub> (67 µl, 0.1 M in toluene-d<sub>8</sub>, 6.72 µmol) was added at room temperature. The <sup>19</sup>F and <sup>31</sup>P NMR analyses showed the quantitative conversion from **5e** (<sup>31</sup>P NMR: 20.3 p.p.m., <sup>1</sup>J<sub>P,P</sub> = 1,784.3 Hz) to the Pt(IV) difluoride complex (<sup>19</sup>F NMR: -271.3 p.p.m., <sup>31</sup>P NMR: -2.9 p.p.m., <sup>1</sup>J<sub>P,P</sub> = 1,018.0 Hz). The NMR tube was sealed and was heated at 90 °C. The progress of the reaction was monitored by <sup>19</sup>F and <sup>31</sup>P NMR

spectrometry after 3, 9 and 18 h. The disappearance of **5e** and the formation of several species were observed at 3 and 9 h and the reaction eventually gave Pt(dppf)F<sub>2</sub> (<sup>19</sup>F NMR: 233.1 p.p.m., <sup>31</sup>P NMR: 9.5 p.p.m., <sup>1</sup>J<sub>P,P</sub> = 3542.3 Hz) as an exclusive product.

**Computational study.** DFT calculations were carried out by using the Gaussian 09 program package<sup>44</sup>. The DFT method with the B3LYP hybrid functional<sup>45,46</sup> and the 6-31G(d) basis set<sup>47</sup> was employed. Geometry optimizations were performed under the constraint of D<sub>2</sub>, S<sub>4</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> or T symmetries. Normal coordinate analysis at the same level of theory was performed, and the number of imaginary frequencies was 0 for all structures. See Supplementary Figs S18 and S19 and Supplementary Tables S3 and S4.

**X-ray crystallography.** Single-crystal X-ray diffraction experiments were carried out with a large cylindrical imaging plate camera<sup>48</sup> at SPring-8 beam line BL02B1 (Hyogo, Japan). Crystal data are summarized in Supplementary Table S5. The structures were solved by the direct methods with SIR2004 (ref. 49) and refined by the full-matrix least-squares techniques against F<sub>2</sub> (SHELXL-97)<sup>50</sup>. The intensities were corrected for Lorentz and polarization effects. The non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atoms were placed using AFIX instructions. All calculations were performed by using Crystal Structure 4.0 or Yadokari-XG 2011.

**Charge carrier mobility in 3.** Charge carrier mobility in **3** was measured by the flash-photolysis time-resolved microwave (FP-TRMC) technique<sup>36,51</sup>. **3** (5 mg, 2.5 wt%) and 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (5 mg, 2.5 wt%) were added to 200 mg of toluene solution including 5 wt% of poly(methyl methacrylate). The mixture was heated at 80 °C, casted onto a quartz substrate and dried at room temperature. The nanosecond laser pulses from an Nd: YAG laser (third harmonic generation, THG (355 nm) from Spectra Physics, INDI-HG, FWHM 4 ns) was used as excitation source. The excitation density was 4.6 × 10<sup>15</sup> photons cm<sup>-2</sup>. The resonant frequency and the microwave power were set at ~9.1 GHz and 3 mW, respectively. The TRMC signal from a diode was recorded on a digital oscilloscope (Tektronix, TDS 3032B). The transient photoconductivity ( $\Delta\sigma$ ) of the samples is related to the reflected microwave power ( $\Delta P_r/P_r$ ) and sum of the mobilities of charge carriers via:

$$\langle \Delta\sigma \rangle = \frac{1}{A} \frac{\Delta P_r}{P_r} \quad (1)$$

$$\langle \Delta\sigma \rangle = e \Phi N \sum \mu \quad (2)$$

where  $A$ ,  $e$ ,  $\Phi$ ,  $N$  and  $\sum \mu$  are the sensitivity factor, elementary charge of electron, photo carrier generation yield (quantum efficiency), the number of absorbed photons per unit volume, and sum of mobilities for negative and positive carriers, respectively. The value of  $\Phi$  was determined by transient absorption spectroscopy measurement. Details of the experimental setup are described elsewhere<sup>36</sup>.

Time-dependent absorption spectral changes were monitored by Hamamatsu C7700 streak camera via a Hamamatsu C5094 spectrometer upon direct excitation of the identical solid-state films used for TRMC measurements using a third harmonic generation ( $\lambda = 355$  nm, 50 mJ pulse<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>) from the Nd: YAG laser. To correct a 2D time-wavelength correlation data of the transient absorption, the streak scope images were averaged over 2,500 images via a high-speed camera (Hamamatsu C4742-95).

## References

- Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F. & Smalley, R. E. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. *Nature* **318**, 162–163 (1985).
- Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 56–58 (1991).
- Guldii, D. M. & Martin, N. (eds) *Carbon Nanotubes and Related Structures* (Wiley-VCH, 2010).
- Akasaka, T., Wudl, F. & Nagase, S. (eds) *Chemistry of Nanocarbons* (John Wiley & Sons, 2010).
- Brabec, C. J. Organic photovoltaics: technology and market. *Solar Energy Mater. Solar Cells* **83**, 273–292 (2004).
- Brabec, C. J. et al. Polymer-fullerene bulk-heterojunction solar cells. *Adv. Mater.* **22**, 3839–3856 (2010).
- Collins, P. G. & Avouris, P. Nanotubes for electronics. *Sci. Am.* **283**, 62–69 (2000).
- Scott, L. T. et al. A rational chemical synthesis of C<sub>60</sub>. *Science* **295**, 1500–1503 (2002).
- Tahara, K. & Tobe, Y. Molecular loops and belts. *Chem. Rev.* **106**, 5274–5290 (2006).
- Jasti, R., Bhattacharjee, J., Neaton, J. B. & Bertozzi, C. R. Synthesis, characterization, and theory of [9]-, [12]-, and [18]cycloparaphenylenes: carbon nanohoop structures. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 17646–17647 (2008).
- Takaba, H., Omachi, H., Yamamoto, Y., Bouffard, J. & Itami, K. Selective synthesis of [12]cycloparaphenylenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 6112–6116 (2009).

12. Yamago, S., Watanabe, Y. & Iwamoto, T. Synthesis of [8]cycloparaphenylenes from a square-shaped tetranuclear platinum complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 757–759 (2010).
13. Jasti, R. & Bertozzi, C. R. Progress and challenges for the bottom-up synthesis of carbon nanotubes with discrete chirality. *Chem. Phys. Lett.* **494**, 1–7 (2010).
14. Sisto, T. J. & Jasti, R. Overcoming molecular strain: synthesis of [7]cycloparaphenylenes. *Synlett.* **23**, 483–489 (2012).
15. Hirst, E. S. & Jasti, R. Bending benzene: syntheses of [n]cycloparaphenylenes. *J. Org. Chem.* **77**, 10473–10478 (2012).
16. Itami, K. Toward controlled synthesis of carbonnanotubes and graphenes. *Pure Appl. Chem.* **84**, 907–916 (2012).
17. Omachi, H., Segawa, Y. & Itami, K. Synthesis of cycloparaphenylenes and related carbon nanorings: a step toward the controlled synthesis of carbon nanotubes. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1378–1389 (2012).
18. Iwamoto, T., Watanabe, Y., Sakamoto, Y., Suzuki, T. & Yamago, S. Selective and random syntheses of [n]cycloparaphenylenes ( $n = 8\text{--}13$ ) and size dependence of their electronic properties. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8354–8361 (2011).
19. Kayahara, E., Sakamoto, Y., Suzuki, T. & Yamago, S. Selective synthesis and crystal structure of [10]cycloparaphenylenes. *Org. Lett.* **14**, 3284–3287 (2012).
20. Kayahara, E., Iwamoto, T., Suzuki, T. & Yamago, S. Selective synthesis of [6]–[8]–, and [10]cycloparaphenylenes. *Chem. Lett.* **42**, 621–623 (2013).
21. Fujita, M., Yazaki, J. & Ogura, K. Preparation of a macrocyclic polynuclear complex, [(en)Pd(4,4'-bpy)]<sub>4</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>8</sub> (en = ethylenediamine, bpy = bipyridine), which recognizes an organic molecule in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5645–5647 (1990).
22. Fujita, M., Yazaki, J. & Ogura, K. Spectroscopic observation of self-assembly of a macrocyclic tetranuclear complex composed of Pt<sup>2+</sup> and 4,4'-bipyridine. *Chem. Lett.* **20**, 1031–1032 (1991).
23. Stang, P. J. & Cao, D. H. Transition metal based cationic molecular boxes. Self-assembly of macrocyclic platinum(II) and palladium(II) tetranuclear complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4981–4982 (1994).
24. Fujita, M. *et al.* Self-assembly of ten molecules into nanometre-sized organic host frameworks. *Nature* **378**, 469–471 (1995).
25. Fujita, M. Metal-directed self-assembly of two- and three-dimensional synthetic receptors. *Chem. Soc. Rev.* **27**, 417–425 (1998).
26. Fujita, M., Tominaga, M., Hori, A. & Therrien, B. Coordination assemblies from Pd(II)-cornered square complex. *Acc. Chem. Res.* **38**, 369–378 (2005).
27. Seidel, S. R. & Stang, P. J. High-symmetry coordination cages via self-assembly. *Acc. Chem. Res.* **35**, 972–983 (2002).
28. Yahav, A., Goldberg, I. & Vigalok, A. Synthesis of the elusive (R<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>MF<sub>2</sub> (M = Pd, Pt) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13634–13635 (2003).
29. Yahav, A., Goldberg, I. & Vigalok, A. Disfluoro complexes of platinum(II) and -IV with monodentate phosphine ligands: an exceptional stability of d<sup>6</sup> octahedral organometallic fluorides. *Inorg. Chem.* **44**, 1547–1553 (2005).
30. Yahav-Levi, A., Goldberg, I., Vigalok, A. & Vedernikov, A. N. Competitive aryl-iodide vs. aryl-aryl reductive elimination reactions In Pt(IV) complexes: experimental and theoretical studies. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 724–731 (2008).
31. Fujitsuka, M., Iwamoto, T., Kayahara, E., Yamago, S. & Majima, T. Enhancement of the quinoidal character for smaller [n]cycloparaphenylenes probed by Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Chem.* **14**, 1570–1572 (2013).
32. Xia, J. & Jasti, R. Synthesis, characterization, and crystal structure of [6]cycloparaphenylenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **124**, 2524–2526 (2012).
33. Bachrach, S. M. & Stück, D. DFT study of cycloparaphenylenes and heteroatom-substituted nano hoops. *J. Org. Chem.* **75**, 6595–6604 (2010).
34. Nishio, M., Hirota, M. & Umezawa, Y. *The CH/π Interaction: Evidence, Nature, and Consequences* 91–285 (Pergamon Press, 1998).
35. Valeev, E. F., Coropceanu, V., da Silva Filho, D. A., Salman, S. & Brédas, J.-L. Effect of electronic polarization on charge-transport parameters in molecular organic semiconductors. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9882–9886 (2006).
36. Saeki, A., Seki, S., Sunagawa, T., Ushida, K. & Tagawa, S. Charge-carrier dynamics in polythiophene films studied by in-situ measurement of flash-photolysis time-resolved microwave conductivity (FP-TRMC) and transient optical spectroscopy (TOS). *Philos. Mag.* **86**, 1261–1276 (2006).
37. Fujitsuka, M., Cho, D. W., Iwamoto, T., Yamago, S. & Majima, T. Size-dependent fluorescence properties of [n]cycloparaphenylenes ( $n = 8\text{--}13$ ), hoop-shaped π-conjugated molecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 14585–14588 (2012).
38. Moon, F. C. *The Machines of Leonardo Da Vinci and Franz Reuleaux: Kinematics of Machines from the Renaissance to MACHINES OF LEONARDO DA VINCI (History of Mechanism and Machine Science)* (Springer-Verlag GmbH, 2007).
39. Ajami, D., Oeckler, O., Simon, A. & Herges, R. Synthesis of a Möbius aromatic hydrocarbon. *Nature* **426**, 819–821 (2003).
40. Matsui, K., Segawa, Y., Namikawa, T., Kamada, K. & Itami, K. Synthesis and properties of all-benzene carbon nanocages: a junction unit of branched carbon nanotubes. *Chem. Sci.* **4**, 84–88 (2013).
41. Hill, G. S. *et al.* *Inorg. Synth.* 149–153 (John Wiley & Sons, Inc., 2007).
42. Cullen, W. R., Kim, T. J., Einstein, F. W. B. & Jones, T. Structure of the hydrogenation catalyst [(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Rh(NBD)]ClO<sub>4</sub>, PP = (η<sup>5</sup>-(Me<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>PC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe, and some comparative rate studies. *Organometallics* **2**, 714–719 (1983).
43. Zhao, Y. *et al.* PTSA-catalyzed green synthesis of 1,3,5-triarylbenzene under solvent-free conditions. *Green Chem.* **12**, 1370–1372 (2010).
44. Frisch, M. J. *et al.* *Gaussian 09, Revision A.02* (Gaussian Inc, 2009).
45. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648–5652 (1993).
46. Lee, C., Yang, W. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785–789 (1988).
47. Hehre, W. J., Radom, L., Schleyer, P. v. R. & Pople, J. A. *Ab initio Molecular Orbital Theory* (John Wiley, 1986).
48. Sugimoto, K. *et al.* Extremely high resolution single crystal diffractometry for orbital resolution using high energy synchrotron radiation at SPring-8. *AIP Conf. Proc.* **1234**, 887–890 (2010).
49. Burla, M. C. *et al.* SIR2004: an improved tool for crystal structure determination and refinement. *J. Appl. Cryst.* **38**, 381–388 (2005).
50. Sheldrick, G. M. (ed) *SHELXS97. Program for the Solution of Crystal Structures* (University of Göttingen, 1997).
51. Valeev, E. F., Coropceanu, V., da Silva Filho, D. A., Salman, S. & Brédas, J.-L. Effect of electronic polarization on charge-transport parameters in molecular organic semiconductors. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9882–9886 (2006).

## Acknowledgements

This work was partly supported by the CREST program of the Japan Science and Technology Agency (S.Y.) and by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) from the Japan Society for the Promotion of Science (E.K.). Single-crystal X-ray analysis was performed at BL02B1 of Spring-8 with the approval of Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI) (2012B1790). We thank Dr Kunihisa Sugimoto (JASRI) and Dr Katsumi Isozaki (Kyoto University) for their guidance and valuable discussions on the X-ray crystallographic analysis.

## Author contributions

S.Y. conceived, designed and directed the investigations and wrote the manuscript with revision provided from E.K. and H.T. The synthetic experiment was carried out by E.K. Single-crystal X-ray analysis was performed by E.K., T.I., and H.T. with helps from N.Y. Computational studies were performed by E.K. and T.S. Raman and fluorescence analyses were carried out by M.F. and T.M. Conductivity measurements were carried out by N.M. and S.S. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

## Additional information

**Accession codes:** The X-ray crystallographic coordinates for structures reported in this Article have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) under deposition numbers CCDC 924350. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Kayahara, E. *et al.* Synthesis and physical properties of a ball-like three-dimensional π-conjugated molecule. *Nat. Commun.* **4**:2694 (2013). doi: 10.1038/ncomms3694 (2013).

# VMAT2 identified as a regulator of late-stage $\beta$ -cell differentiation

Daisuke Sakano<sup>1</sup>, Nobuaki Shiraki<sup>1</sup>, Kazuhide Kikawa<sup>1,2</sup>, Taiji Yamazoe<sup>1</sup>, Masateru Kataoka<sup>1</sup>,  
Kahoko Umeda<sup>1</sup>, Kimi Araki<sup>3</sup>, Di Mao<sup>4</sup>, Shiro Matsumoto<sup>2</sup>, Naomi Nakagata<sup>5</sup>, Olov Andersson<sup>6,7</sup>,  
Didier Stainier<sup>6,8</sup>, Fumio Endo<sup>2</sup>, Kazuhiko Kume<sup>1,10</sup>, Motonari Uesugi<sup>4</sup> & Shoen Kume<sup>1,9\*</sup>

**Cell replacement therapy for diabetes mellitus requires cost-effective generation of high-quality, insulin-producing, pancreatic  $\beta$  cells from pluripotent stem cells. Development of this technique has been hampered by a lack of knowledge of the molecular mechanisms underlying  $\beta$ -cell differentiation. The present study identified reserpine and tetrabenazine (TBZ), both vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) inhibitors, as promoters of late-stage differentiation of *Pdx1*-positive pancreatic progenitor cells into *Neurog3* (referred to henceforth as *Ngn3*)-positive endocrine precursors. VMAT2-controlled monoamines, such as dopamine, histamine and serotonin, negatively regulated  $\beta$ -cell differentiation. Reserpine or TBZ acted additively with dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic AMP, a cell-permeable cAMP analog, to potentiate differentiation of embryonic stem (ES) cells into  $\beta$  cells that exhibited glucose-stimulated insulin secretion. When ES cell-derived  $\beta$  cells were transplanted into AKITA diabetic mice, the cells reversed hyperglycemia. Our protocol provides a basis for the understanding of  $\beta$ -cell differentiation and its application to a cost-effective production of functional  $\beta$  cells for cell therapy.**

Pancreatic cells arise from definitive endoderm and *Pdx1*-positive (*Pdx1*+) pancreatic progenitor cells<sup>1</sup>, which proliferate and give rise to all three pancreatic lineages: acini, ducts and endocrine islets<sup>2</sup>. Endocrine precursors are characterized by the transient expression of the basic helix-loop-helix transcription factor neurogenin 3 (*Ngn3*, also known as *Neurog3*)<sup>2</sup>. Previous studies showed that *Ngn3* specifically establishes the endocrine lineages and that loss of *Ngn3* precludes endocrine cell development<sup>2,3</sup>. Production of islet cells occurs through the concerted activation of a combination of transcription factors<sup>4</sup>. However, the coordination of cell fate decisions remains poorly understood.

The prevalence of diabetes mellitus in many populations is high, and development of cell replacement therapy through generation of  $\beta$  cells from ES cells is a research priority. Recent studies have shown that mouse or human ES cells can be induced to recapitulate embryonic development of the pancreas<sup>5</sup>. Studies on ES cell differentiation into endodermal or pancreatic cell lineages have shown that stimulation with activin, FGF or retinoic acid, in addition to inhibition of hedgehog signaling by KAAD-cyclopamine, promotes the differentiation into endoderm or pancreatic fates<sup>6,7</sup>. New signal pathways that promote ES cell differentiation into endodermal<sup>8</sup> or pancreatic<sup>9</sup> lineages have been discovered through large-scale screening of cell-permeable, bioactive small molecules. However, it is still difficult to derive mature  $\beta$  cells that secrete insulin in a glucose-dependent manner. A better understanding is needed of the underlying molecular mechanisms that control the late stages of  $\beta$ -cell development, in which *Pdx1*+ pancreatic progenitor cells develop into *Ngn3*+ endocrine progenitor

cells and insulin-positive (Ins+)  $\beta$  cells and then further differentiate into mature  $\beta$  cells capable of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS).

Here, we identified reserpine and TBZ as potent promoters of pancreatic progenitor cell differentiation into functional  $\beta$  cells. This study highlights the use of chemical compound libraries for the identification of new developmental pathways that control progenitor cell differentiation into mature  $\beta$  cells.

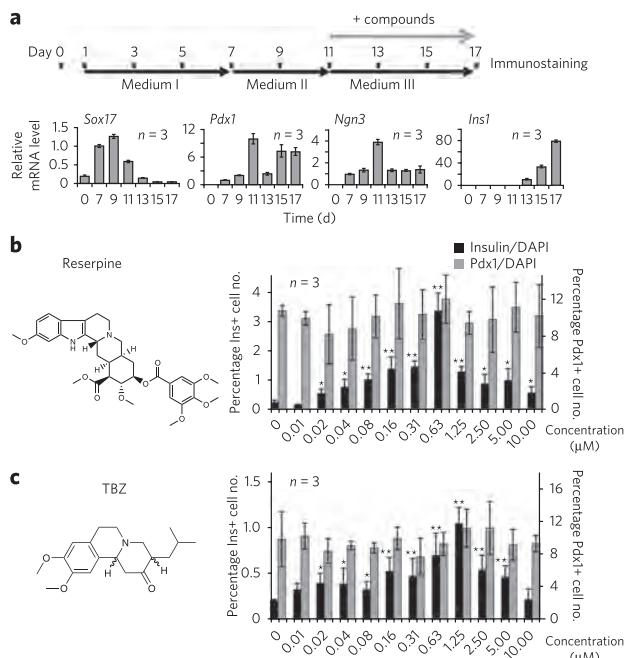
## RESULTS

### Reserpine and TBZ increase Ins+ cells

The present study used large-scale screening of chemical compounds with an ES cell line, SK7, that expresses GFP under the *Pdx1* promoter<sup>10,11</sup>. The *Pdx1*-GFP ES cell line is useful because the expression of *Pdx1* is biphasic (Fig. 1a), which enabled the detection of early-stage *Pdx1*+ pancreatic progenitors and late-stage *Pdx1*+ Ins+  $\beta$  cells. We optimized the culture to promote modest basal differentiation with high reproducibility, so that the markers *Sox17*, *Pdx1*, *Ngn3* and *Ins1* were sequentially expressed (Fig. 1a).

To screen for compounds that potentiate the differentiation of ES cell-derived *Pdx1*+ pancreatic progenitor cells into insulin-expressing cells, we tested a library of 1,120 biologically active compounds arrayed as single compounds in DMSO on cultures, starting on day 11 after confirming the appearance of *Pdx1*-GFP+ cells and conducting the assay on day 17 (Fig. 1a). Candidate compounds that increased both *Ins1* expression and the number of Ins+ cells relative to vehicle (1% DMSO) were selected as primary hits. The coefficient of variation of this screen was  $0.36 \pm 0.0447$  ( $\pm$  s.d.), which was difficult to minimize further owing to the long assay

<sup>1</sup>Department of Stem Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Kumamoto, Japan. <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan. <sup>3</sup>Laboratory of Developmental Genetics, Institute of Resource Development and Analysis, Kumamoto University, Kumamoto, Japan. <sup>4</sup>Institute for Chemical Research and Institute for Integrated Cell-Material Sciences, (WPI-iCeMS), Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>5</sup>Division of Reproductive Engineering, Center for Animal Resources and Development, Kumamoto University, Kumamoto, Japan. <sup>6</sup>Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. <sup>7</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, University of California-San Francisco, San Francisco, California, USA. <sup>8</sup>Department of Developmental Genetics, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany. <sup>9</sup>Program for Leading Graduate Schools, Health Life Science Interdisciplinary and Global Oriented (HIGO) Program, Kumamoto University, Kumamoto, Japan. <sup>10</sup>Present address: Department of Neuropharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan. \*e-mail: skume@kumamoto-u.ac.jp



**Figure 1 | Reserpine identified as a chemical that enhanced ES cell differentiation into pancreatic  $\beta$  cells.** Using a high-throughput screening system, a chemical library was screened, and reserpine was identified as a hit chemical. (a) A high-throughput screening system for chemicals that enhance differentiation into  $\beta$  cells. Transcript expressions of *Sox17*, *Pdx1*, *Ngn3* and *Ins1* are expressed as fold change relative to control on day 7. (b,c) Reserpine (b) and TBZ (c) (chemical structure shown at left) increased the number of  $\beta$  cells relative to the total number of DAPI-stained cells (black bars) without affecting *Pdx1*<sup>+</sup> cells (light gray bars). In a-c, data shown are mean  $\pm$  s.d. ( $n = 3$ ); significant differences between treatment and control at \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  are shown (two-tailed paired Student's *t*-test).

period. To overcome this, we investigated dose dependencies of the hit chemicals as a secondary screen. Of our hit compounds, the indole alkaloid antipsychotic and antihypertensive drug reserpine demonstrated the strongest effect. Reserpine increased the proportion of  $\text{Ins}^+$  cells in a concentration-dependent manner without altering the *Pdx1*-GFP<sup>+</sup> cell ratio (Fig. 1b). Reserpine is known to deplete monoamines from secretory vesicles by blocking uptake into monoamine secretary granules, mediated by VMAT proteins<sup>12–15</sup>. Because human pancreatic  $\beta$  cells express the isoform VMAT2 (refs. 16–19), we also tested another VMAT2 inhibitor, TBZ, which also increased the amount of insulin-expressing cells in a dose-dependent manner (Fig. 1c). The half-maximal effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) values of reserpine and TBZ were 0.19  $\mu\text{M}$  and 0.22  $\mu\text{M}$ , respectively. The concentrations that led to 50% cell death ( $\text{TD}_{50}$ ) were 1.56  $\mu\text{M}$  reserpine and 5.98  $\mu\text{M}$  TBZ. In a separate experiment, we treated cells with 0.63  $\mu\text{M}$  reserpine or 1.25  $\mu\text{M}$  TBZ (Supplementary Results, Supplementary Fig. 1). We confirmed the increases in the percentage of  $\text{Ins}^+$  cells out of the total cell numbers versus the untreated cells and in the relative *Ins1* mRNA levels (by real-time PCR) (Supplementary Fig. 1). These results suggested that VMAT2 is the candidate target molecule of reserpine and TBZ, which has a pivotal role in the differentiation of ES cells into  $\text{Ins}^+$  cells.

### VMAT2 inhibited differentiation into $\text{Ins}^+$ cells

To identify the role of VMAT2 in differentiation of ES cells into pancreatic  $\beta$  cells, we performed a knockdown of VMAT2. We established two VMAT2-knockdown SK7 cell lines, VMAT2KD1

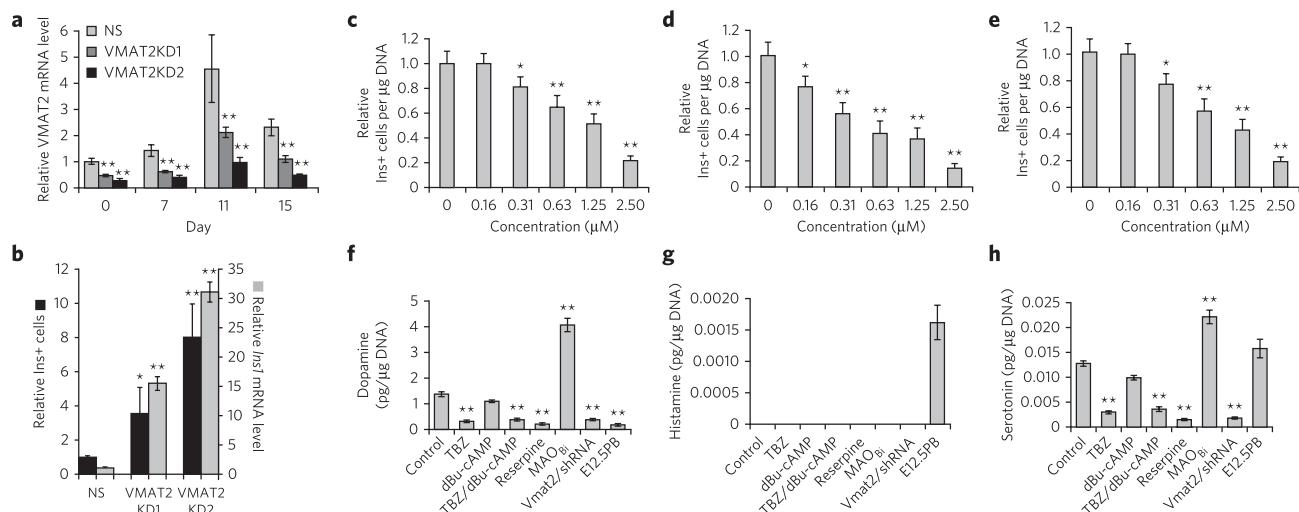
and VMAT2KD2, using lentiviral short hairpin RNA (shRNA) (Fig. 2a). VMAT2KD2 exhibited lower *Slc18a2* (henceforth referred to as *Vmat2*) expression than VMAT2KD1 (Fig. 2a) and showed greater increases in the number of  $\beta$  cells and level of *Ins1* transcription (Fig. 2b). These results indicated that reserpine- or TBZ-mediated VMAT2 inhibition led to an enhancement of differentiation into  $\text{Ins}^+$  cells. Therefore, VMAT2-mediated monoamine storage functions as a negative regulator of differentiation into  $\text{Ins}^+$  cells. Pancreatic islets have an isozyme of the monoamine-catabolizing enzyme, monoamine oxidase B ( $\text{MAO}_B$ )<sup>20</sup>. We then tested the effects of application of pargyline, an  $\text{MAO}_B$  inhibitor ( $\text{MAO}_{B\text{i}}$ ), to stabilize the monoamines and increase intracellular monoamines. Indeed, application of pargyline had an inhibitory effect on the number of  $\beta$  cells and the level of *Ins1* expression, and reserpine counteracted the inhibitory effect of  $\text{MAO}_{B\text{i}}$  (Supplementary Fig. 2). Moreover, the number and expression level of *Pdx1*-GFP<sup>+</sup> cells was unaffected (Supplementary Fig. 2), similarly to treatment with reserpine and TBZ (Fig. 1b,c).

Monoamines such as dopamine, histamine and serotonin are known to be the substrates for VMAT2. We tested the effect of these monoamines by exogenous application and found that incubation with dopamine, histamine or serotonin from days 11–17 suppressed  $\beta$ -cell differentiation, with  $\text{EC}_{50}$  values of 1.25  $\mu\text{M}$  (dopamine), 0.5  $\mu\text{M}$  (histamine) and 0.92  $\mu\text{M}$  (serotonin) (Fig. 2c–e). We determined the monoamine contents in the ES cell-derived cells on day 17 (Fig. 2f–h and Supplementary Fig. 3a,b). The dopamine content (approximately 1.3  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  DNA) was approximately 100-fold higher compared to the other monoamines, whereas histamine was undetectable. Inhibition of VMAT2 with TBZ or reserpine and knockdown of *Vmat2* with shRNA significantly decreased ( $P < 0.005$ ) monoamine contents, whereas treatment with pargyline increased it ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2f,h and Supplementary Fig. 3). The enzyme that synthesizes dopamine, tyrosine hydroxylase (Th), was expressed in the ES cells during differentiation at a level comparable to that in the embryonic pancreatic bud. By contrast, the histamine-synthesizing enzyme histidine decarboxylase (Hdc) and the serotonin-synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase 1 (Tph1) were expressed at approximately 0.066-fold lower levels compared to those in the embryonic pancreas (Supplementary Fig. 4a–c). The monoamine receptors dopamine D2 (Drd2), histamine H1 (Hrh1), histamine H2 (Hrh2) and serotonin 1A (Htr1a) were expressed in day 11 and day 13 differentiated cells (Supplementary Fig. 4d–f). Upon addition of chemical compounds that inhibit the synthesizing enzymes for dopamine ( $\alpha$ -methyl-tyrosine ( $\alpha$ -MT) and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)), histamine ( $\alpha$ -fluoromethylhistidine ( $\alpha$ -FMH)) or serotonin (5-hydroxy tryptophan (5HTP) and carbidopa), we observed increases in  $\text{Ins}^+$  cell numbers (Supplementary Fig. 4g–i).

Taken together, VMAT2-controlled monoamine release exerted inhibitory effects on the differentiation of pancreatic progenitor cells into  $\text{Ins}^+$  cells. Reserpine and TBZ inhibit the uptake of monoamines into vesicular stores, which led to depletion of monoamines and potentiation of  $\text{Ins}^+$  cell differentiation.

### TBZ increased differentiation into $\text{Ngn3}^+$ cells

We then examined the effects of TBZ on marker expression in ES cell-derived cells by real-time PCR. We used TBZ instead of reserpine owing to its lower cytotoxicity; the results are expressed as fold changes compared to control treatments without chemicals at day 13. Treatment with TBZ resulted in a marked increase of *Ngn3*, *Nkx6-1* and *Ins1* transcripts on day 15 and day 17 (Fig. 3a). The real-time PCR results suggested that TBZ increases differentiation of ES cell-derived cells into  $\text{Ngn3}^+$  endocrine progenitors. To follow the transient increase of  $\text{Ngn3}^+$  endocrine precursors in living cells, we developed an NGP9 ES cell line from a transgenic mouse line bearing the *Ngn3*-promoter-driven eGFP transgene<sup>21</sup>.

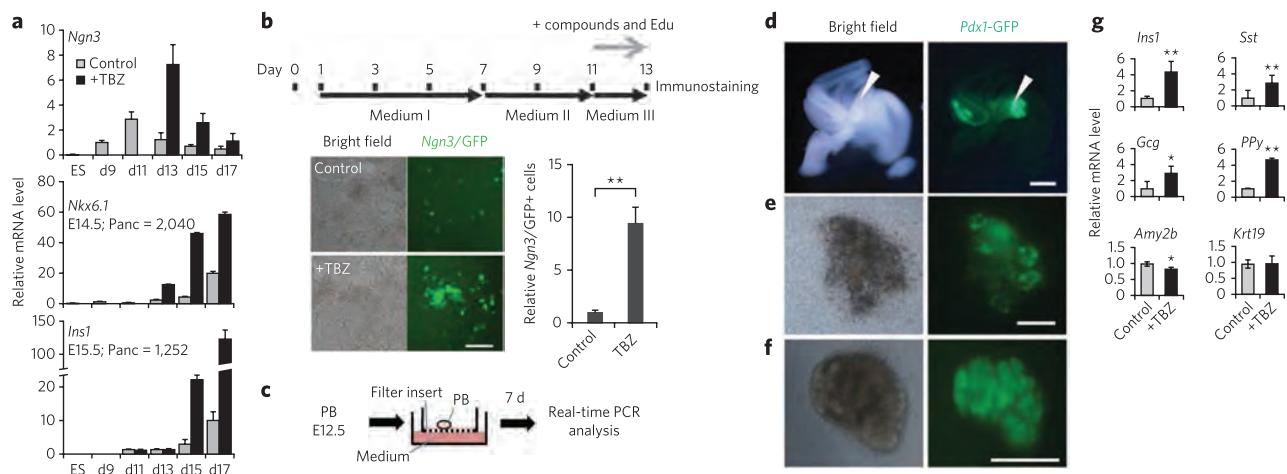


**Figure 2 | VMAT2- and monoamine-dependent suppression of pancreatic β-cell differentiation.** The effects of VMAT2- and monoamine-mediated inhibition on ES cell differentiation into Ins<sup>+</sup> cells were tested, and monoamine cellular contents were determined. (a) Time-dependent expression of VMAT2 in VMAT2KD1 (dark gray), VMAT2KD2 (black) and control nonsilencing (NS; light gray) ES cell lines. (b) VMAT2KD1 and VMAT2KD2 ES cell lines yielded more Ins<sup>+</sup> cells and *Insl1* transcripts than control NS ES cells. (c–e) Addition of monoamines, dopamine (c), histamine (d) or serotonin (e) suppressed differentiation of ES cells into Ins<sup>+</sup> cells in a dose-dependent manner. (f–h) Cellular contents of dopamine (f), histamine (g) or serotonin (h) when added with VMAT2 inhibitors or MAO<sub>Bi</sub> treatment with both TBZ and dBu-cAMP. Control, no chemical treatment; MAO<sub>Bi</sub>: 1 μM pargyline; Res: 0.63 μM reserpine; MAO<sub>Bi</sub> + Res: 1 μM pargyline + 0.63 μM reserpine. For a–h, data shown are mean ± s.d. ( $n = 3$ ); significant differences between treatment and no chemical treatment at \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  are shown (two-tailed paired Student's *t*-test). In a and b, black bars indicate Ins<sup>+</sup> or *Pdx1*-GFP+ relative cell numbers, and gray bars indicate *Insl1* or *Pdx1* transcript expression relative to that in cells with no chemical treatment.

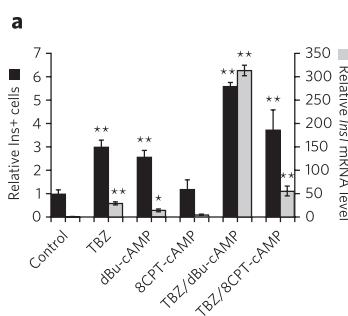
We treated the NGP9 cells with TBZ from day 11 to 13 and then performed the assay on day 13 (Fig. 3b). TBZ increased *Ngn3*-GFP+ cell numbers (Fig. 3b). These results indicate that VMAT2 signaling negatively controls differentiation into *Ngn3*-GFP+ endocrine precursors. We observed 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation in *Ngn3*- cells but not in *Ngn3*+ cells, and TBZ addition did not increase EdU+ *Ngn3*+ cells, indicating that the increase in *Ngn3*+ cells was due to increased differentiation

into *Ngn3*+ cells but not proliferation of *Ngn3*+ cells (Fig. 3b and Supplementary Fig. 5a). The *Ngn3*+ cells expressed Nkx2.2 and Nkx6.1 in their nuclei (Supplementary Fig. 5b).

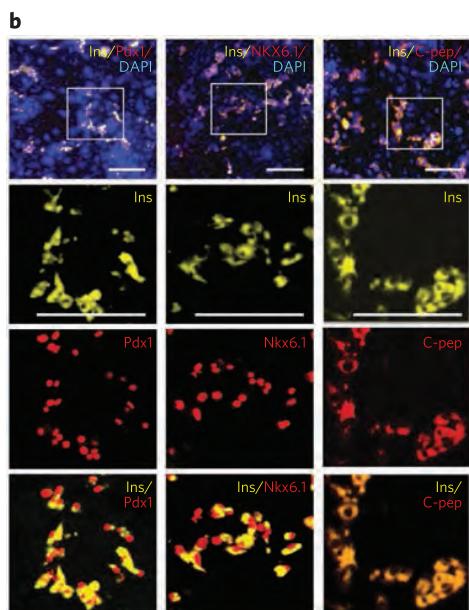
We then examined whether this mechanism existed during normal embryonic development using an *in vitro* pancreas bud culture system. Upon addition of TBZ, we observed increased differentiation into insulin-, glucagon-, somatostatin- or pancreas polypeptide-expressing endocrine cells in the *Pdx1*-GFP+



**Figure 3 | VMAT2 inhibition increased differentiation into *Ngn3*-GFP+ cells.** TBZ increased differentiation into *Ngn3*-GFP+ cells without increasing proliferation. (a) *Ngn3*, *Nkx6.1* and *Ins1* expression assayed on differentiation days (d) 13, 15 and 17, with or without (w/o) TBZ, expressed as fold change relative to control on day 13. Gray bars, no chemical (vehicle) samples; black bars, TBZ-treated samples. For all graphs, ( $n = 3$ ). (b) A schematic drawing of the experimental design is shown. ES cell cultures were added with TBZ from day 11 to day 13 and assayed on day 13. Transmission or fluorescence images (left) and quantitative representations (right) of *Ngn3*-GFP+ cells without TBZ on day 13 are shown. (c) Schematic drawing of the experimental design. Pancreatic rudiments (PB, pancreatic bud) dissected from *Pdx1*-GFP mice at E12.5 were used for ex vivo culture for 7 d on filter inserts. (d–f) Transmission (left) and fluorescence (right) micrographs of explants before (d) and after culturing without TBZ (e; control DMSO) or with TBZ (f). (g) Semiquantitative real-time PCR was used to assay the expression of *Gcg*, *Sst*, *PPY*, *Amy2b* or *Krt19* after 7-d culture. Data shown are mean ± s.d. ( $n = 3$ ), expressed as relative cell number compared to control. Scale bars, 200 μm. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  (two-tailed paired Student's *t*-test).

**Figure 4 | TBZ and dBu-cAMP**

**additively potentiated differentiation into  $\beta$  cells.** TBZ acted with dBu-cAMP, additively increased Ins<sup>+</sup> cell number and synergistically increased *Ins1* mRNA. (a) Additive effects of TBZ and dBu-cAMP on Ins<sup>+</sup> cell number and synergistic effects on *Ins1* mRNA were examined. The results are expressed as fold change relative to control vehicle treatment (DMSO). By contrast, treatment with 8CPT-cAMP, a cAMP analog that specifically activates Epac2, showed no effects. Data shown are mean  $\pm$  s.d. ( $n = 3$ ), expressed as relative cell number compared to control (no chemical treatment). On the y axis, 1 = 0.3% Ins<sup>+</sup> cells. (b) Total ES cell cultures were assayed by immunohistochemistry. Ins staining (yellow) completely overlapped with staining (red) of Pdx1, Nkx6.1 and C-peptide for *in vitro* differentiated ES cells treated on days 11–17 with TBZ and dBu-cAMP. Blue shows DAPI staining. Scale bars, 100  $\mu$ m. Lower panels are enlarged pictures of the boxes in the top panels. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  (two-tailed paired Student's *t*-test).



pancreatic bud explant culture (Fig. 3c–g). We observed a slight decrease in *Amy2b*-expressing exocrine cells but no effects on *Krt19*-expressing duct cells. These results therefore suggested that VMAT2-mediated inhibition of the progress from Pdx1<sup>+</sup> pancreatic progenitors to Ngn3<sup>+</sup> endocrine progenitors exists in both normal pancreatic endocrine development (Fig. 3c–g) and ES cell differentiation (Fig. 3b).

#### The combinatory effects of TBZ and dBu-cAMP addition

Dopamine, histamine and serotonin are considered to function through binding to their receptors. All dopamine, histamine and serotonin receptors are G protein-coupled receptors<sup>22</sup>. In our screen, dibutyryl adenosine 3',5'-cAMP (dBu-CAMP), a cell-permeable cAMP analog, was identified as a compound to promote  $\beta$ -cell differentiation. We examined the effects of dBu-cAMP and its synergy with TBZ. TBZ or dBu-cAMP alone increased the number of Ins<sup>+</sup> cells or the amount of *Ins1* transcript, respectively. Simultaneous addition of TBZ and dBu-cAMP caused an approximately 300-fold increase in *Ins1* transcript, which is approximately 30-fold or 15-fold the effect of single addition of TBZ or dBu-CAMP, respectively (Fig. 4a).

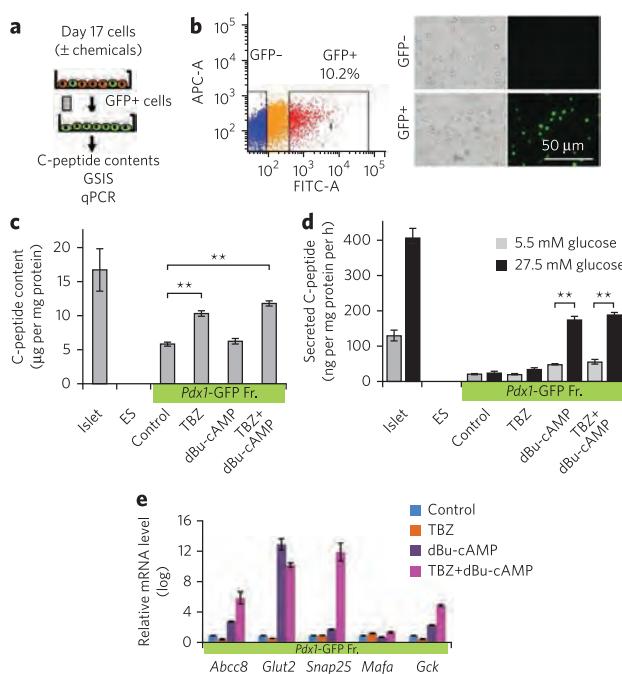
In the adult islets, cAMP is known to regulate the potentiation of insulin secretion by a protein kinase A (PKA)-dependent mechanism and a PKA-independent mechanism that involves the cAMP-binding protein Epac2 (ref. 23). As dBu-cAMP activates both pathways<sup>24,25</sup>, we then tested a cell-permeable analog, 8CPT-cAMP, that specifically activates Epac2 but not PKA<sup>26</sup>. Ins<sup>+</sup> cell number or *Ins1* gene expression did not increase with application of 8CPT-cAMP, and neither showed an additive effect after treatment with 8CPT-cAMP and TBZ. The results suggested that the potentiation of  $\beta$ -cell differentiation by the dBu-cAMP signaling pathway is not mediated through activation of Epac2 but possibly through PKA (Fig. 4a).

We then analyzed the differentiated ES cell-derived  $\beta$  cells generated by TBZ and dBu-cAMP treatment by immunocytochemistry. The Ins<sup>+</sup> cells expressed Pdx1 and Nkx6.1, which are mature  $\beta$  cell markers. Almost all of the Pdx1<sup>+</sup> cells were Ins<sup>+</sup>. Almost all Ins<sup>+</sup> staining overlapped with C-peptide<sup>+</sup> staining (Fig. 4b). Ins<sup>+</sup> cells expressed Nkx2.2, Nkx6.1 and MafA (Supplementary Fig. 6a). We also observed *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA)-pancreatic duct cells but not amylase<sup>+</sup> exocrine cells in the ES cell culture (Supplementary Fig. 6b). There were no qualitative differences in the expression of the above markers among cells treated with both TBZ and dBu-cAMP or each alone (Supplementary Fig. 6a,b). We examined whether the Ins<sup>+</sup> cells also expressed other endocrine hormones. Although some Ins-single-positive cells, which do not express other endocrine hormones, exist (approximately 10%) in the culture, over 90% of the Ins<sup>+</sup> cells were polyhormonal cells, in which glucagon, somatostatin and/or pancreatic polypeptide were also expressed with insulin (Supplementary Fig. 6).

As almost all of the Pdx1<sup>+</sup> cells derived from ES cells treated with TBZ or dBu-cAMP expressed insulin at the late stage (day 17), which corresponded to the second phase of Pdx1 expression, where Ins is also coexpressed (Fig. 1a), we purified ES cell-derived *Pdx1*-GFP<sup>+</sup> cells by flow cytometry (Fig. 5a,b) to analyze the  $\beta$  cells with respect to insulin content, GSIS and mRNA expression (Fig. 5c–e). *Pdx1*-GFP<sup>+</sup>  $\beta$  cells comprised 10.2% of the total cells recovered (Fig. 5b). TBZ alone increased C-peptide content to 10  $\mu$ g per mg, which is approximately 60% of that in adult islets (Fig. 5c). However, TBZ did not promote differentiation into cells capable of GSIS (Fig. 5d). Isolated *Pdx1*-GFP<sup>+</sup> cells treated with dBu-cAMP alone increased GSIS to 170 ng per mg protein per h, which is 42% of that in mature islets (Fig. 5d). However, in contrast to TBZ, dBu-cAMP did not increase C-peptide content on a per-protein level (Fig. 5d).

The recovery of C-peptide contents from total ES cell-derived cells treated with TBZ, dBu-cAMP or both compounds is summarized in Supplementary Figure 7a. ES cell-derived  $\beta$  cells with a C-peptide content equivalent of approximately 100 islets could be obtained from one 96-well plate. The C-peptide contents increased by approximately 5.7-fold or 2.7-fold through treatment with TBZ or dBu-cAMP alone, respectively, and to 8.1-fold through treatment with both compounds (on a per  $\mu$ g DNA basis). This result is consistent with the above result that TBZ and dBu-cAMP additively increased Ins<sup>+</sup> cell number.

We also examined the time-dependent effects of the chemicals on GSIS. TBZ alone did not alter GSIS, but dBu-cAMP alone potentiated ES differentiation into Ins<sup>+</sup> cells, showing the ability for GSIS from day 15 (Supplementary Fig. 7b). To further confirm that the effect of dBu-cAMP occurs through potentiation of differentiation into Ins<sup>+</sup> cells, we treated ES cells with dBu-cAMP in different time windows, that is, from day 11 to day 15 or from day 11 to day 17, and then assayed for GSIS on day 17. Treatment with dBu-cAMP for a longer period (day 11 to day 17) significantly ( $P < 0.01$ ) enhanced GSIS compared to those treated from day 11 to day 15 (Supplementary Fig. 8). Treatment with dBu-cAMP during the secretion assay significantly ( $P < 0.01$ ) increased GSIS. Therefore, dBu-cAMP treatment potentiated differentiation into matured  $\beta$  cells and enhanced GSIS ability. The results

**Figure 5 | Characterization of the purified ES cell-derived Ins+ and**

**Pdx-GFP+ cells.** TBZ and dBu-cAMP additively potentiated differentiation and maturation of ES cells into  $\beta$  cells with GSIS ability. (a–e) Differentiated  $\beta$  cells were purified by flow cytometry. Experimental procedures (a) and flow cytometry results (b) are shown. Cells were tested for their C-peptide contents (c), GSIS (d) and quantitative PCR (qPCR) (e). In b, *Pdx1*-GFP+ cells (10.2% of total cells) were purified by flow cytometry on the basis of GFP intensity. Scale bar, 50  $\mu$ m. In c and d, treatment with TBZ alone increased C-peptide content, and treatment with dBu-cAMP alone evoked GSIS, as measured by C-peptide contents or secreted C-peptide with significant differences (two-tailed paired Student's t-test)  $**P < 0.01$ . (e) Quantitative PCR was performed to quantify the expression of *Abcc8*, *Glut2*, *Snap25*, *Mafa* and *Gck*. In c–e, GFP+ cells from differentiated ES cells were used, to which DMSO (no chemical treatment), TBZ or dBu-cAMP or both (TBZ + dBu-cAMP) were added. In c,  $n = 4$ , and in d and e,  $n = 3$ .

showing that dBu-cAMP potentiated GSIS suggested that the enhancement of differentiation may be mediated by insulin. The effect of insulin was then examined by manipulating the insulin concentration in medium III (Fig. 1a), which contained 10  $\mu$ M insulin in all of the experiments reported so far. Insulin potentiated the differentiation at 16 nM, and its effect declined with increasing insulin concentrations (Supplementary Fig. 9). Therefore, TBZ plus dBu-cAMP enhanced insulin secretion at low levels, which in turn accelerated the expression of *Ins1* and further drove  $\beta$ -cell differentiation.

Real-time PCR analyses revealed that dBu-cAMP administration alone increased the expression of genes implicated in GSIS: *Abcc8*, which encodes the regulatory sulfonylurea receptor SUR of the ATP-sensitive potassium channel, and the glucose transporter-encoding genes *Slc2a2* (also known as *Glut2*) and *Gck* (Fig. 5e). Double treatment with TBZ and dBu-cAMP upregulated expression of *Abcc8* and *Gck* by  $\sim 1 \times 10^5$ -fold and upregulated expression of *Glut2* and *Snap25*, which encodes a component involved in the regulation of vesicular release, by  $\sim 1 \times 10^{10}$ -fold compared to expression in the control (Fig. 5e).

Taken together, these results indicated that TBZ treatment increased insulin content and dBu-cAMP increased GSIS of the ES cell-derived cells. Simultaneous treatment with TBZ and dBu-cAMP

enabled the ES cell-derived  $\beta$  cells to produce Ins and secrete Ins *in vitro* in a glucose-sensitive manner at levels comparable to that of adult islets.

### The transplanted cells reversed hyperglycemia in mice

To examine their *in vivo* function, we transplanted ES cell-derived  $\beta$  cells into AKITA mice with immunodeficiency (*Rag1*<sup>−/−</sup> *Ins2*<sup>Akita/+</sup>)<sup>27</sup>. The AKITA mouse is a model that inherits diabetes in a dominant manner owing to a missense mutation in *Ins2*. Consistent with our previous report<sup>28</sup>, all male heterogeneous AKITA mice gradually developed hyperglycemia after they reached 6 weeks of age (Supplementary Fig. 10a). We harvested  $4 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  ES cell-derived cells (treated with both TBZ and dBu-cAMP) on day 17 and grafted the cells under the kidney capsule in each experimental mouse. The experimental mice showed a reversal of hyperglycemia for more than 6 weeks, with larger grafts showing increasing effects (Supplementary Fig. 10a), whereas no change in blood glucose was observed in control untransplanted AKITA mice.

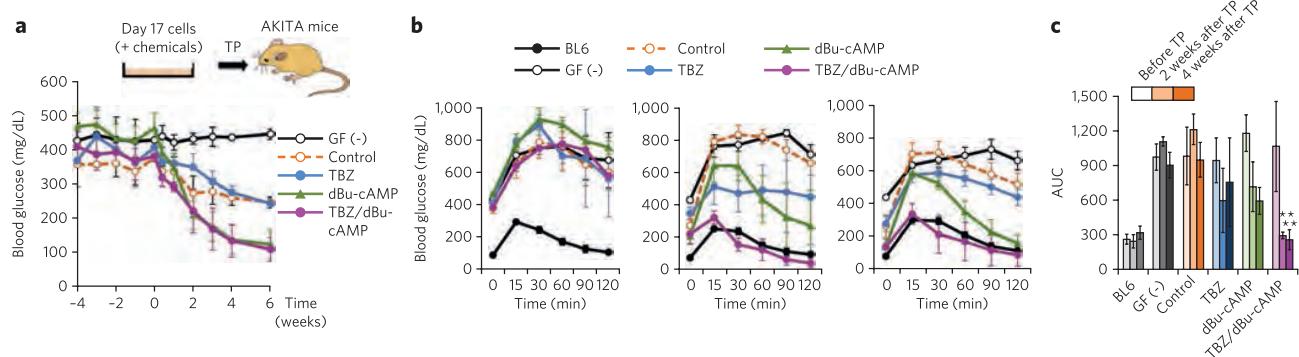
We then transplanted  $1 \times 10^7$  ES cell-derived cells, which were treated with no chemical, TBZ or dBu-cAMP alone or with both TBZ and dBu-cAMP, into the kidney capsule of the AKITA mice. Mice engrafted with cells that were not treated with growth factors served as negative controls. Mice transplanted with cells treated with TBZ plus dBu-cAMP or dBu-cAMP alone partially recovered from hyperglycemia and showed lowered fasting blood glucose as early as 2 weeks after engraftment (Fig. 6a). Mice engrafted with cells treated with both TBZ and dBu-cAMP completely recovered from glucose intolerance, whereas those engrafted with cells treated with dBu-cAMP alone did not (Fig. 6a–c). In both cases, the engrafted mice showed even higher levels of plasma C-peptide compared to that in the control wild-type BL6 mice (Supplementary Fig. 10b). The AKITA mice are reported to be insulin resistant<sup>29</sup>. The above results might reflect the insulin resistance of the recipient AKITA mice. In contrast, mice engrafted with cells treated with TBZ alone responded to glucose administration and increased plasma C-peptide levels more rapidly compared to those engrafted with control cells (no chemical treatment) (Supplementary Fig. 10b), which agreed with their partial reversal of glucose tolerance (Fig. 6b) and fasting blood glucose (Fig. 6a).

Grafts without noticeable tumor formation were recovered from the experimental mice and were found to express insulin (Supplementary Fig. 10c). No insulin-positive cells coexpressed glucagon, pancreas polypeptide or somatostatin. We confirmed that the  $\beta$ -cell mass in the recipient AKITA pancreas did not increase after transplantation, showing an altered allocation of glucagon+ cells at the center of the islets, in contrast to their peripheral localization in the control wild-type mice (Supplementary Fig. 10d). Taken together, we concluded that the reversal of hyperglycemia and restoration of glucose tolerance was due to the transplanted ES cell-derived cells.

These results demonstrate that treatment of both TBZ and dBu-cAMP potentiated differentiation of ES cells into cells, with a high level of C-peptide contents and GSIS ability, and transplantation of these cells reversed hyperglycemia in AKITA diabetic mice.

### DISCUSSION

Although the function of VMAT2 in the pancreas is largely unknown, VMAT2 is known to take up monoamines such as dopamine, histamine and serotonin into secretory granules of neurons and exert both autocrine and paracrine functions in the nervous system. VMAT2 is described to be expressed in human  $\beta$  cells. However, there has been some controversy in the literature about its presence in  $\beta$  cells of rodents<sup>30</sup>. Here, the target cells of the VMAT2 inhibitors are differentiating pancreatic progenitor cells. We revealed a new role of VMAT2 and monoamine-dependent suppression of differentiation from the pancreatic progenitor cells.



Dopamine, histamine and serotonin are synthesized and stored in the endocrine pancreas during pregnancy<sup>31</sup> and in adult  $\beta$  cells<sup>19</sup>. In the adult, there are several lines of evidence supporting that dopamine and histamine negatively regulate insulin content, glucose tolerance<sup>32-34</sup> and GSIS<sup>35-37</sup>. In contrast, serotonin is reported to drive  $\beta$ -cell replication and regulate glucose tolerance in pregnant mice. However, the role of monoamines during embryonic development remains largely unknown.

Among the monoamines, dopamine is produced at a highest level in ES cell-derived cells and during embryonic stages. Consistent with this, dopamine synthesizing enzyme (encoded by *Th*), was expressed in the ES-derived cells at a level comparable to that in the embryonic pancreas. In spite of the differences in their cellular contents, inhibition of all three synthesizing enzymes showed similar effects to enhance  $\beta$ -cell differentiation, indicating that all of these monoamines take part in this process. It was puzzling that application of these monoamines dose-dependently suppressed  $\beta$  cell differentiation with similar EC<sub>50</sub> values, although their EC<sub>50</sub> against their specific receptors are very different<sup>38-40</sup>. We hypothesize that this is due to the fact that monoamine is taken up into the storage vesicles and their subsequent release is required for their action and that other components co-released from the vesicle might be required to convey their function<sup>41</sup>.

Our results indicated that monoamines controlled by VMAT2 serve as a brake for differentiation of Pdx1+ pancreatic progenitors into Ngn3+ endocrine precursors and subsequently into Ins+ cells. Once this brake is released, the Pdx1+ cells are induced to differentiate into Ngn3+ cells, which quickly turn into Ins+ cells. TBZ acted during a short time window to increase Ngn3+ cells, suggesting that this brake functions transiently. However, whether there are specific roles for each of the monoamines remains an open question.

In the adult  $\beta$  cells, GLP1 and GIP are well known to activate Gα<sub>s</sub>-coupled receptors and potentiate GSIS by activating cAMP signaling and modulating K<sub>ATP</sub> channel activity. It is reported that cAMP signaling induces glucose responsiveness through both PKA and Epac2 dependent pathway<sup>23</sup>. PKA is reported to modulate VMAT2 by regulating its trafficking<sup>42</sup>. It is possible that cAMP activates  $\beta$ -cell differentiation through modulating VMAT2.

It remains unknown whether GLP1, GIP or other unknown ligands function to promote the maturation of  $\beta$  cells to initiate GSIS during embryonic development. This would agree with the observation that pancreas-specific Gα<sub>s</sub>-deficient mice demonstrated reduced  $\beta$ -cell mass and defects in glucose response<sup>43</sup>.

Most of the ES cell-derived insulin+ cells were polyhormonal cells, coexpressing other endocrine hormones. Maturation rapidly occurred *in vivo*. They rapidly turned into insulin-single positive cells after they were grafted under kidney capsules. Intrapenitonal glucose trellant test (IPGTT) results revealed that cells doubly treated with TBZ and dBu-cAMP matured into cells capable of GSIS and restored glucose tolerance as early as 2 weeks after engraftment. Cells treated with TBZ alone or with no chemicals also matured *in vivo* and became potent for GSIS within 2 weeks. In mouse pancreatic development, Ins+ glucagon+ cells appear early in 'first transition', and they do not contribute to the generation of mature  $\beta$  cells<sup>44</sup>. These cells do not express mature endocrine markers<sup>45</sup>. By contrast, Ins+ glucagon+ transitional cells exist transiently during the conversion of  $\alpha$  cells into  $\beta$  cells<sup>46,47</sup>. The polyhormonal cells observed in the present study expressed mature endocrine markers. Therefore, the ES cell-derived polyhormonal cells here might have characteristics close to the transitional cells that appear during cell fate conversion rather than those that exist during early mouse embryonic development. Although the exact mechanism of how ES cells mature under *in vivo* environment remains unknown, it is reported that dynamic chromatin remodeling occurs in human ES cells after they are engrafted *in vivo*<sup>48</sup>. Previous studies have shown that human ES cell-derived insulin-expressing cells, which are polyhormonal, differentiate into  $\alpha$  cells, instead of  $\beta$  cells, after transplantation<sup>49</sup>. The discrepancies might be due to the differences in the underlying mechanism between the mouse and human ES cells or due to the differences between the culture protocols. However, it is technically difficult for us to perform further long-term analyses, such as transplantation or re-culture of the mouse ES cell-derived Pdx1/GFP+ cells, owing to a significant ( $P < 0.01$ ) loss of cell viability after sorting at this late stage of differentiation. Taken together, although we cannot completely rule out other possibilities, our results suggested that the transplanted insulin-expressing cells reversed hyperglycemia in AKITA mice.

The graft experiments showed that transplanting  $4 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  ES cell-derived cells, with their C-peptide contents equivalent to 40 or 100 islets, respectively, is enough to reverse hyperglycemia in AKITA diabetic mice. This is lower than the previously reported observation that it is necessary to transplant 150–200 islets to reverse hyperglycemia<sup>50</sup>. Our results suggested that these ES cell-derived cells rapidly underwent further differentiation *in vivo* and increased their C-peptide contents or GSIS ability so that a lower number of ES cell-derived cells was enough for the reversal of hyperglycemia.

The ES cell-derived cells showed no signs of tumor formation. This might due to the high differentiation efficiency into the definitive endoderm. Moreover, the long differentiation period might also result in a low population of undifferentiated cells remaining in culture.

In conclusion, results of the present study demonstrated a previously unknown function of VMAT2 in controlling differentiation into pancreatic endocrine precursors. VMAT2 inhibition and dBu-cAMP addition synergized and further increased *Ins1* transcripts and are sufficient to promote differentiation of ES cells into functional  $\beta$  cells capable of reversing hyperglycemia in diabetic mice. Future studies would be required to analyze the role of VMAT2 during human induced pluripotent stem cell cell differentiation to apply this protocol for future cell replacement therapy.

Received 15 December 2012; accepted 15 October 2013;  
published online 15 December 2013

## METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

## References

- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. & Edlund, H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**, 606–609 (1994).
- Gu, G., Dubauskaite, J. & Melton, D.A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**, 2447–2457 (2002).
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. & Guillemot, F. *neurogenin3* is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1607–1611 (2000).
- Puri, S. & Hebrok, M. Cellular plasticity within the pancreas—lessons learned from development. *Dev. Cell* **18**, 342–356 (2010).
- D'Amour, K.A. *et al.* Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1534–1541 (2005).
- Skoudy, A. *et al.* Transforming growth factor (TGF) $\beta$ , fibroblast growth factor (FGF) and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells. *Biochem. J.* **379**, 749–756 (2004).
- D'Amour, K.A. *et al.* Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1392–1401 (2006).
- Borowiak, M. *et al.* Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **4**, 348–358 (2009).
- Chen, S. *et al.* A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 258–265 (2009).
- Shiraki, N. *et al.* Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem Cells* **26**, 874–885 (2008).
- Higuchi, Y. *et al.* Synthesized basement membranes direct the differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic lineages. *J. Cell Sci.* **123**, 2733–2742 (2010).
- Wang, Y.M. *et al.* Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron* **19**, 1285–1296 (1997).
- Pothos, E.N. *et al.* Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *J. Neurosci.* **20**, 7297–7306 (2000).
- Vergo, S., Johansen, J.L., Leist, M. & Lotharius, J. Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels. *Brain Res.* **1185**, 18–32 (2007).
- Eiden, L.E. & Weihe, E. VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Ann. NY Acad. Sci.* **1216**, 86–98 (2011).
- Erickson, J.D., Schafer, M.K., Bonner, T.I., Eiden, L.E. & Weihe, E. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5166–5171 (1996).
- Anlauf, M. *et al.* Expression of the two isoforms of the vesicular monoamine transporter (VMAT1 and VMAT2) in the endocrine pancreas and pancreatic endocrine tumors. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 1027–1040 (2003).
- Simpson, N.R. *et al.* Visualizing pancreatic  $\beta$ -cell mass with [<sup>11</sup>C]DTBZ. *Nucl. Med. Biol.* **33**, 855–864 (2006).
- Saisho, Y. *et al.* Relationship between pancreatic vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and insulin expression in human pancreas. *J. Mol. Histol.* **39**, 543–551 (2008).
- Grimsby, J., Chen, K., Wang, L.J., Lan, N.C. & Shih, J.C. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3637–3641 (1991).
- Gu, G. *et al.* Global expression analysis of gene regulatory pathways during endocrine pancreatic development. *Development* **131**, 165–179 (2004).
- Kroese, W.K., Sheffler, D.J. & Roth, B.L. G-protein-coupled receptors at a glance. *J. Cell Sci.* **116**, 4867–4869 (2003).
- Seino, S., Shibasaki, T. & Minami, K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J. Clin. Invest.* **121**, 2118–2125 (2011).
- Lo, K.W., Kan, H.M., Ashe, K.M. & Laurencin, C.T. The small molecule PKA-specific cyclic AMP analogue as an inducer of osteoblast-like cells differentiation and mineralization. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, 40–48 (2012).
- Mei, F.C. *et al.* Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 11497–11504 (2002).
- Kelley, G.G. *et al.* Glucose-dependent potentiation of mouse islet insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *Islets* **1**, 260–265 (2009).
- Wang, J. *et al.* A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction in the *Mody* mouse. *J. Clin. Invest.* **103**, 27–37 (1999).
- Mochida, T. *et al.* Time-dependent changes in the plasma amino acid concentration in diabetes mellitus. *Mol. Genet. Metab.* **103**, 406–409 (2011).
- Hong, E.G. *et al.* Nonobese, insulin-deficient *Ins2Akita* mice develop type 2 diabetes phenotypes including insulin resistance and cardiac remodeling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E1687–E1696 (2007).
- Schäfer, M.K. *et al.* Species-specific vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) expression in mammalian pancreatic  $\beta$  cells: implications for optimising radioligand-based human  $\beta$  cell mass (BCM) imaging in animal models. *Diabetologia* **56**, 1047–1056 (2013).
- Harris, P.E. *et al.* VMAT2 gene expression and function as it applies to imaging  $\beta$ -cell mass. *J. Mol. Med.* **86**, 5–16 (2008).
- Fülöp, A.K. *et al.* Hyperleptinemia, visceral adiposity, and decreased glucose tolerance in mice with a targeted disruption of the histidine decarboxylase gene. *Endocrinology* **144**, 4306–4314 (2003).
- Buchanan, T.A. & Xiang, A.H. Gestational diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **115**, 485–491 (2005).
- Kim, H. *et al.* Serotonin regulates pancreatic  $\beta$  cell mass during pregnancy. *Nat. Med.* **16**, 804–808 (2010).
- Rubí, B. *et al.* Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic  $\beta$  cells and mediate inhibition of insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **280**, 36824–36832 (2005).
- Ericson, L.E., Hakanson, R. & Lundquist, I. Accumulation of dopamine in mouse pancreatic B-cells following injection of l-DOPA. Localization to secretory granules and inhibition of insulin secretion. *Diabetologia* **13**, 117–124 (1977).
- Zern, R.T., Bird, J.L. & Feldman, J.M. Effect of increased pancreatic islet norepinephrine, dopamine and serotonin concentration on insulin secretion in the golden hamster. *Diabetologia* **18**, 341–346 (1980).
- Seeman, P. *et al.* The dopaminergic stabilizer ASP2314/ACR16 selectively interacts with D2<sup>HIGH</sup> receptors. *Synapse* **63**, 930–934 (2009).
- Braden, M.R., Parrish, J.C., Naylor, J.C. & Nichols, D.E. Molecular interaction of serotonin 5-HT2A receptor residues Phe339<sup>(6,51)</sup> and Phe340<sup>(6,52)</sup> with superpotent N-benzyl phenethylamine agonists. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1956–1964 (2006).
- Peakman, M.C. & Hill, S.J. Endogenous expression of histamine H1 receptors functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in C6 glioma cells: regulation by cyclic AMP. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 1554–1560 (1994).
- El Mestikawy, S., Wallen-Mackenzie, A., Fortin, G.M., Descarries, L. & Trudeau, L.E. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 204–216 (2011).
- Yao, J., Erickson, J.D. & Hersh, L.B. Protein kinase A affects trafficking of the vesicular monoamine transporters in PC12 cells. *Traffic* **5**, 1006–1016 (2004).
- Xie, T., Chen, M. & Weinstein, L.S. Pancreas-specific Gs<sub>a</sub> deficiency has divergent effects on pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cell proliferation. *J. Endocrinol.* **206**, 261–269 (2010).

44. Herrera, P.L. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* **127**, 2317–2322 (2000).
45. Murtaugh, L.C. Pancreas and  $\beta$ -cell development: from the actual to the possible. *Development* **134**, 427–438 (2007).
46. Collombat, P. *et al.* The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently  $\beta$  cells. *Cell* **138**, 449–462 (2009).
47. Thorel, F. *et al.* Conversion of adult pancreatic  $\alpha$ -cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss. *Nature* **464**, 1149–1154 (2010).
48. Xie, R. *et al.* Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 224–237 (2013).
49. Kelly, O.G. *et al.* Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 750–756 (2011).
50. Yasunami, Y. *et al.* V $\alpha$ 14 NK T cell-triggered IFN- $\gamma$  production by Gr-1+CD11b+ cells mediates early graft loss of syngeneic transplanted islets. *J. Exp. Med.* **202**, 913–918 (2005).

### Acknowledgments

We thank members of the Gene Technology Center and Center for Animal Resources and Development at Kumamoto University for technical assistance. This work was supported by the Funding Program for Next Generation World-Leading Researchers (to S.K. (no. LS099) and M.U.); the Japan Society for the Promotion of Science,

the Realization of Regenerative Medicine (to S.K. and M.U.); the Program for Leading Graduate Schools 'HIGO' (awarded to S.K.); Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan (no. 21390280 to S.K. and no. 22790653 to D. Sakano); and the Collaborative Research Program of Institute for Chemical Research, Kyoto University (grant no. 2010-44). The iCeMS is supported by World Premier International Research Center Initiative, MEXT, Japan.

### Author contributions

D. Sakano performed chemical screening, cellular and biochemical analyses; D. Sakano, N.S. and K.U. established the ES cell differentiation system; D. Sakano, K. Kikawa, M.K. and T.Y. performed transplantation assays; K.A. established the ES cell line; S.M., F.E. and N.N. helped maintain AKITA mice; D.M. and M.U. provided and analyzed the chemical library; O.A. and D. Stainier provided chemicals; K. Kume and S.K. provided technical advices; S.K. designed the experiments and wrote the paper. All of the authors discussed the results and commented on the manuscript.

### Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

### Additional information

Supplementary information and chemical compound information is available in the [online version of the paper](#). Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Correspondence and requests for materials should be addressed to S. Kume.

## ONLINE METHODS

**Ethics statement.** This animal work is approved by the Institutional Review Board for Animal Care and Use of Kumamoto University. All animal procedures were conducted according to Kumamoto University guideline.

**ES cell lines.** The SK7 ES cell line<sup>10</sup> was established from a transgenic mouse line bearing the *Pdx1*-GFP gene. NGP9 ES cells were established by culturing blastocysts obtained from transgenic mice heterozygous for the *Ngn3*-GFP gene<sup>21</sup>. SK7 and NGP9 cells were maintained on MEF feeder cells in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with leukemia inhibitory factor (LIF), 10% FBS, nonessential amino acids (NEAA), L-glutamine (L-Gln), penicillin and streptomycin (PS) and β-mercaptoethanol (β-ME)<sup>10</sup>.

**Differentiation of ES cells into pancreatic β cells.** For differentiation studies, ES cells were plated at 5,000 cells per well, in Corning 96-well plates with Ultra-Web Synthetic Polyamine Surface (no. 3873XX1, Corning Coster, Cambridge, MS). The cells were cultured for 7 d in Medium I: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: Invitrogen, Glasgow, UK) containing 4,500 mg/L glucose and supplemented with 100 μM nonessential amino acids (NEAA), 2 mM L-glutamine (L-Gln; Nacalai tesque, Japan), 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 50 units/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin (PS; Nacalai tesque), 100 μM β-mercaptoethanol (β-ME; Sigma-Aldrich), ITS (10 μg/mL insulin (Sigma-Aldrich), 5.5 μg/mL transferrin (Sigma-Aldrich) and 6.7 pg/mL selenium (Sigma-Aldrich)), 0.25% Albmax (Invitrogen), 10 ng/ml recombinant human Activin-A (R&D Systems, Minneapolis, MN) and 5 ng/mL recombinant human bFGF (Peprotech). On days 7–11, the cells were cultured in Medium II: RPMI 1640 medium (Invitrogen) containing 2,000 mg/L glucose (Sigma, St. Louis, MO), 1 μM retinoic acid (Sigma-Aldrich), 50 ng/mL human recombinant fibroblast growth factor-10 (human recombinant FGF10, Peprotech, Rocky Hill, NJ), 2% B-27 Supplement (Invitrogen) and 0.25 μM of the Shh signaling antagonist 3-keto-N-(aminoethyl)-aminocaproyl-dihydrocinnamoyl cyclopamine (KAAD-cyclopamin, Calbiochem, San Diego, CA). Finally, on days 11–17, cells were cultured in Medium III: DMEM containing 1,000 mg/L glucose supplemented with NEAA, L-Gln, PS, β-ME, ITS, 0.25% Albmax (Invitrogen), 10 nM glucagon-like peptide 1 (GLP-1, Sigma-Aldrich) and 10 mM nicotinamide (NA, Sigma-Aldrich). The medium was replaced every 2 d.

**Screening of small molecules and quantitative analysis of imaging.** Small molecules from the bioactive, pharmacologically defined Prestwick Chemical Library were screened for pro-differentiation factors. Compounds were dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich) and added at 1:100 on day 11, with changes on days 13 and 15. Cells were assayed by immunostaining with mouse anti-insulin (Sigma-Aldrich; I2018; 1:1,000) on day 17. Fluorescent images were quantified by counting pixel numbers representing the number of positive cells, using a ImageXpress Micro scanning system and MetaXpress cellular image analysis software (Molecular Devices, Japan). Data were normalized as fold change relative to DMSO controls. Hit compounds were defined as causing a twofold or higher increase in insulin-positive β cells. Candidate compounds were tested for dose dependency and reproducibility. The screening information is summarized in Supplementary Table 1.

**Chemicals.** Reserpine was purchased from Calbiochem Novabiochem Novagen, TBZ was purchased from Tocris Bioscience, and dibutyryl-cAMP (dBu-cAMP) was purchased from BIOMOL International.

Pargyline was purchased from Cayman Chemicals. The compounds were dissolved in DMSO (final concentration = 1.0%) and added on days 11, 13 and 15. After initial screening, the following concentrations were used: 0.63 μM reserpine, 1.25 μM TBZ, 0.1 μM dopamine (LKT Labs, Inc.), 0.6 μM dBu-cAMP, 1.0 μM pargyline, 1.3 μM α-methyltyrosine (α-MT, Sigma-Aldrich), 0.6 μM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Toronto Research Chemicals Inc.), 1.3 μM α-fluoromethyl-histidine (α-FMH, Toronto Research Chemicals Inc.), 1.3 μM 5-hydroxy tryptophan (5HTP, Sigma-Aldrich) and 0.6 μM carbachol (Sigma-Aldrich), unless otherwise specified.

**Chemical characterization.** To confirm the purity of reserpine, TBZ and dBu-cAMP, we checked their HPLC, LC-MS (ESI), and <sup>1</sup>H-NMR profiles. The results showed that the reagents we used had high purity (>90%) (Supplementary Figs. 11–13). HPLC analysis was performed with a Shimadzu LC-2010C

equipped with reversed-phase HPLC column (GL science, Inertsil ODS-3, 4.6 × 150 mm, flow rate 1.0 mL/min, 0.1% TFA CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 10–100%). Mass spectra (ESI) were recorded on a Shimadzu LCMS-2010. <sup>1</sup>H-NMR spectra were collected on a JEOL JNM-ECP (300 MHz).

**Immunocytochemistry.** For immunocytochemistry, ES cells were fixed with 4% paraformaldehyde and processed after 13 days in culture (Fig. 3 and Supplementary Fig. 5), 17 d in culture (Figs. 1, 2 and 4 and Supplementary Fig. 6) or 6 weeks after transplantation (Supplementary Fig. 10). For examination of target protein expression in single cells, ES cell-derived differentiated cells were dissociated with 0.25% trypsin (Invitrogen), replated for 30 min and then fixed and processed for immunocytochemistry. The following antibodies were used: rabbit anti-MafA (Abcam; ab17976; 1/100), rabbit anti-C-peptide (Cell Signaling; 4593, 1/100), guinea pig anti-insulin (Dako; A0564; 1/1,000), rabbit anti-pancreatic polypeptide (Dako; A619; 1/100), mouse anti-Nkx2.2 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa; 74.5A5; 1/100), mouse anti-Nkx6.1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa; F64A6B4; 1/100), rabbit anti-GFP (MBL International Corp; 598; 1/1,000), goat anti-Pdx1 (R&D systems; AF2419, 1/100), goat anti-amylase (Santa Cruz Biotechnology; sc-12821; 1/100), goat anti-somatostatin (Santa Cruz Biotechnology; sc-7819; 1/100), mouse anti-glucagon (Sigma-Aldrich; G2654; 1/1,000), biotin-conjugated *D. biflorus* agglutinin (DBA) lectin (Sigma-Aldrich; L6533; 1/500) and mouse anti-insulin (Sigma-Aldrich; I2018; 1/1,000) antibodies were used. Secondary antibodies used were Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (A11029; 1/1,000), Alexa 568-conjugated goat anti-guinea pig IgG (A11075; 1/1,000), Alexa 568-conjugated goat anti-mouse IgG (A11031; 1/1,000), Alexa 568-conjugated goat anti-rabbit IgG (A11036; 1/1,000), Alexa 568-conjugated anti-streptavidine antibody (S11223; 1/1,000), or Alexa 633-conjugated donkey anti-goat IgG (A21082; 1/1,000), Alexa 633-conjugated goat anti-mouse IgG (A21053; 1/1,000), Alexa 633-conjugated goat anti-rabbit IgG (A21072; 1/1,000) (all from Invitrogen). Cells were counterstained with DAPI (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

**Gene silencing.** In the VMAT2-knockdown assays, cells were transfected with Expression Arrest nonsilencing, control shRNA (Open Biosystems, no. RHS4080), VMAT2 shRNA (Open Biosystems, no. RMM3981-97058457 and no. RMM3981-97058458). The lentiviral vectors were constructed as previously described<sup>11</sup>. SK7 cells were infected with viral supernatants. After 24 h of incubation, the virus-containing medium was replaced with fresh ES maintenance medium. After 24 h of incubation, infected cells were selected using 1.5 μg/mL puromycin (Sigma-Aldrich). The surviving cells were harvested, and clones were selected to establish knockdown and control cell lines.

**Measurement of intracellular monoamine levels.** Cells were treated with chemicals before harvest (days 11–17). Cells were lysed with lysis buffer containing 0.1% Triton X-100 (Nakarai Tesque, Japan) in 0.1 M PBS (pH7.2, Sigma-Aldrich) with protease inhibitor cocktail. Lysates were assayed for dopamine, histamine, serotonin, adrenaline or noradrenaline with each monoamine-specific ELISA kit (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co.; KG Nordhorn Germany).

**EdU incorporation.** Cells were treated with culture medium containing 20 μM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for 48 h before harvest (days 17–19), processed using the Click-iT EdU Alexa Fluor 594 Imaging Kit (Invitrogen) and stained with DAPI and anti-GFP antibodies, rabbit anti-GFP (no. 598; 1:1,000; MBL International Corp., Woburn, MA) and detected with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen; A-11008; 1:1,000).

**Pancreas bud *in vitro* culture.** Pancreas buds were dissected from E12.5 embryos of a transgenic mouse line bearing the *Pdx1*-green fluorescent protein (GFP) gene. The tissue was placed onto 12-well Corning Transwell cell culture inserts (Corning Coster, Cambridge, MS). The bottom of the inserts were touched with medium containing M199 with NEAA, L-Gln, PS, β-ME and 10% FBS (FBS, Hyclone).

**Flow cytometry.** Cells were collected and suspended in 1 × HANKS with 1% FBS. A FACS Aria II flow cytometry cell sorter (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) was used to purify GFP-positive cells by sorting them against the fluorescence profiles of differentiating cells prepared from wild-type mice. Dead cells were identified using propidium iodide (Sigma-Aldrich).

**Quantitative real-time PCR.** RNA was extracted from ES cells, mouse tissue or transplanted grafts using the RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany) and then treated with DNase I (Qiagen).

Complementary DNA was synthesized from 1 µg of total RNA using Revertra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo).

For real-time PCR analysis, the mRNA expression was quantified with SyberGreen on an ABI 7500 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). The level of expression of each gene was normalized with that of the β-actin-expressing gene *Actb*. The PCR conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 15 s, annealing and extension at 60 °C for 60 s for up to 40 cycles. Each measurement was normalized to *Actb* (mouse) expression for each sample by subtracting the average *Actb* (mouse) expression.  $C_t$  values (threshold cycle) from the average  $C_{t_0}$  resulting in  $C_t$ . Target mRNA levels are expressed as arbitrary units. All of the primers for real-time PCR are listed in Supplementary Table 2.

**Measurement of glucose-stimulated C-peptide secretion and cellular or plasma C-peptide level by enzyme-linked immunosorbent assay.** Differentiating ES cells were preincubated for 0.5 h in low glucose (5.5 mM) DMEM with minimal essential medium and 1% FBS. Cells were washed twice with phosphate-buffered saline then incubated for 2 h in low-glucose (5.5 mM)

or high-glucose (27.5 mM) DMEM with 1% FBS. The culture medium was collected, and cells were lysed with a lysis buffer of 0.1% Triton X-100 in PBS with added protease inhibitor cocktail. Insulin secretion into the culture medium and insulin content of the cell lysates were measured using a mouse C-peptide ELISA kit (Shibayagi Co. Ltd., Japan).

**IPGTT.** Mice fasted for 16–18 h were used. Body weights were measured. Blood glucose levels were measured before (0 min) or at 15 min, 30 min, 60 min, 90 min and 120 min after intraperitoneal administration of 25% Glucose (Sigma-Aldrich) solution at 2 g per kg body weight. Serum C-peptide concentrations were measured as described above.

**Cell transplantation into AKITA mice.** Differentiated cells were dissociated with 0.25% trypsin, resuspended in DMEM with 10% FBS and injected under the kidney capsules of AKITA mice (*C57BL/6J-Rag1<sup>-/-</sup>Ins2<sup>AKITA/+</sup>*; male)<sup>27</sup> with a 24G catheter (NIPRO, Japan). The AKITA mice were at least 6 weeks old. Six weeks after transplantation, the tissue was removed and analyzed for insulin expression, content and secretion, as described above.

**Statistical tests.** Data were analyzed by two-tailed *t*-test. Data are presented as mean ± s.d.

## Measurement of transient photoabsorption and photocurrent of BiFeO<sub>3</sub> thin films: Evidence for long-lived trapped photocarriers

Yasuhiro Yamada,<sup>1</sup> Toru Nakamura,<sup>1</sup> Shintaro Yasui,<sup>2</sup> Hiroshi Funakubo,<sup>2</sup> and Yoshihiko Kanemitsu<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

<sup>2</sup>Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Midori-ku, Yokohama, 226-8502, Japan

(Received 29 October 2013; revised manuscript received 2 January 2014; published 21 January 2014)

We have studied the optical response and dynamical behavior of photocarriers in BiFeO<sub>3</sub> thin films by means of transient absorption (TA) and photocurrent (PC) measurements. PC and absorption spectroscopy indicate that BiFeO<sub>3</sub> thin films have an indirect band gap energy of ~2.4 eV. The TA and PC decay dynamics have fast (~1 ns) and slow (~100 ns) components that are attributed to the localization of free carriers to shallow trap states and the recombination of trapped carriers, respectively. The long decay time of the PC is caused by the thermal activation of trapped carriers into the conduction band. Long-lived trapped photocarriers can be linked to the ferroelectricity and give rise to unique photoinduced phenomena in BiFeO<sub>3</sub>.

DOI: 10.1103/PhysRevB.89.035133

PACS number(s): 78.47.jb, 77.55.fp, 78.47.db, 78.66.-w

### I. INTRODUCTION

Transition-metal oxides have fascinating multifunctional properties that can be employed for a range of new device concepts, and the large remnant polarization, high Curie temperature, and strong multiferroic coupling of BiFeO<sub>3</sub> makes this oxide one of the most promising device materials [1–4]. Bulk BiFeO<sub>3</sub> crystals take a rhombohedrally distorted perovskite structure at room temperature, and the quasitetragonal phase in BiFeO<sub>3</sub> thin films, which are usually deposited on SrTiO<sub>3</sub> or DyScO<sub>3</sub> substrates, is stabilized by the compressive strain induced by the lattice mismatch with the substrate [5]. Extensive studies of the dielectric properties of BiFeO<sub>3</sub> and related heterostructures have been performed [6,7], and it has been reported that the tetragonal phase of BiFeO<sub>3</sub> results in an enhancement of the spontaneous polarization [8,9].

The unique optical properties of BiFeO<sub>3</sub> have also recently come under scrutiny; bulk BiFeO<sub>3</sub> crystals exhibit a large photoinduced size expansion along the polarization direction [10,11], and a nonthermal, ultrafast piezoelectric response induced by above-band-gap photoexcitation has also been observed in time-resolved x-ray diffraction measurements [12]. These results imply that the photoexcited carriers (photocarriers) are strongly linked to the ferroelectric properties of BiFeO<sub>3</sub>. In addition, it has been reported that BiFeO<sub>3</sub> thin films on DyScO<sub>3</sub> display an above-band-gap photovoltage that is generated along the net polarization direction [13,14]. Photocarriers would thus appear to be driven by the ferroelectric depolarization field, which is the origin of the large photovoltaic effect. It has also been suggested that the photovoltaic properties of BiFeO<sub>3</sub> are completely different from those of conventional photoconversion systems based on the built-in field of pn and Schottky junctions. The unique photoinduced phenomena observed in BiFeO<sub>3</sub> may suggest new directions for ferroelectrics science and assist in the development of innovative ferroelectrics-based devices, including light-controlled elastic actuators and light-energy converters. However, the fundamental optical properties and photocarrier recombination processes of BiFeO<sub>3</sub>

that determine the exact optical response are still unclear. A study of the dynamical behavior of the photocarriers is thus essential for understanding the unique photoinduced effects in BiFeO<sub>3</sub>.

In this work, we report on the relaxation and recombination dynamics of photocarriers of BiFeO<sub>3</sub> thin films investigated using a combination of transient absorption (TA) and time-resolved photocurrent (PC) measurements. The band gap energy was determined on the basis of the PC excitation spectrum to be approximately 2.4 eV, and the TA spectrum has a strong photoabsorption peak at around 2.3 eV, which we attribute to the optical transition of photoexcited electrons to the higher conduction band. The TA dynamics show two exponential decay components under weak photoexcitation, and we assign the fast component to the localization of free photocarriers and the slow decay component to the relaxation of photocarriers in the shallow trap states. These results are consistent with both the very fast decay of the PC signals, which mainly reflect the population of free photocarriers, and the thermal activation of the trapped carriers that gives rise to a long PC lifetime. Here, we discuss the photocarrier relaxation and recombination processes and their impact on the photoinduced phenomena in BiFeO<sub>3</sub>.

### II. SAMPLE AND EXPERIMENTAL SETUP

BiFeO<sub>3</sub> epitaxial thin films were fabricated by chemical vapor deposition [15]. Because the structural and ferroelectric properties of BiFeO<sub>3</sub> thin films are dependent on the quality and crystal structure of the substrate, we fabricated thin films on two different substrates (SrTiO<sub>3</sub> and DyScO<sub>3</sub>). The film thicknesses were 260 nm and 50 nm for the SrTiO<sub>3</sub>- and DyScO<sub>3</sub>-substrate samples, respectively. We measured the TA dynamics using femtosecond white-light pump-probe spectroscopy; pump and probe pulses with a delay time  $\Delta t$  were focused onto the sample surface, and the variation in the probe-pulse intensity induced by the pump excitation was detected as a function of  $\Delta t$ . The white-light probe pulses were generated by focusing a 1.2-eV laser pulse onto a sapphire plate. The pump energy was fixed at 3.1 eV. A wavelength-tunable femtosecond laser system based on a Yb:KGW

\*Corresponding author: kanemitu@scl.kyoto-u.ac.jp

(potassium gadolinium tungstate) regenerative amplified laser with a pulse duration of 300 fs was used as the light source. Transient absorption measurements in the microsecond region were also performed using a 2.3-eV continuous wave (cw) laser as the probe beam. For the PC measurements, two parallel rectangular Al electrodes were evaporated onto the sample surface, and femtosecond laser pulses (3.1 eV) were focused onto the gap between the electrodes [16]. The transient PC was recorded by an oscilloscope and a current–voltage converter. The time resolution of the PC measurement was about 6 ns.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

The band gap energy of  $\text{BiFeO}_3$  has previously been reported to lie within a range of 2.4 to 2.8 eV, but optical absorption in the shallow trap states formed by defects and impurities smears the optical absorption edge that corresponds to the band gap energy, which makes it difficult to determine the exact band gap energy [17–20]. It has also been pointed out that the optical absorption peak due to a  $d-d$  transition appears in the near band-edge absorption spectrum of  $\text{BiFeO}_3$  [19,20]. The optical absorption and PC spectra of  $\text{BiFeO}_3$  thin films on the  $\text{SrTiO}_3$  (BFO/STO) and  $\text{DyScO}_3$  (BFO/DSO) substrates are shown in Fig. 1. The optical absorption spectrum of BFO/STO shows a significant increase above 2.4 eV, which is

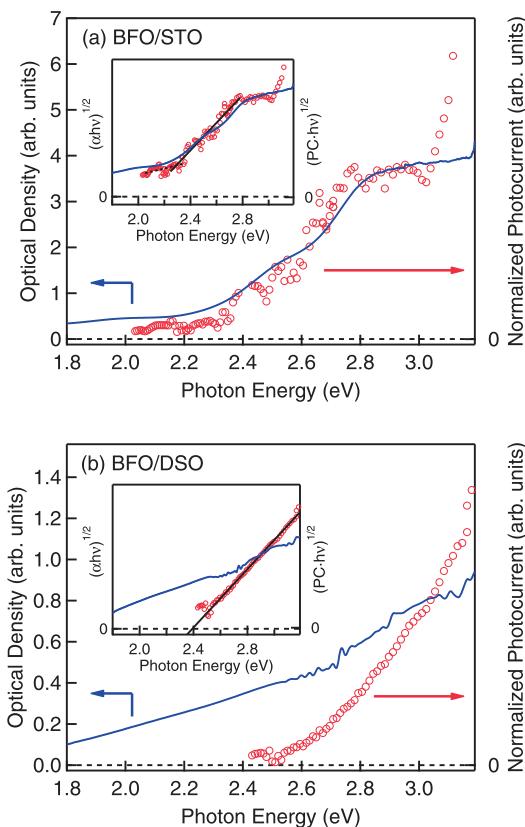


FIG. 1. (Color online) Optical absorption and PC excitation spectra of (a)  $\text{BiFeO}_3/\text{SrTiO}_3$  and (b)  $\text{BiFeO}_3/\text{DyScO}_3$ . The insets show Tauc plots of the optical absorption and PC. The dashed lines are a guide for the eye.

consistent with reported values of the band gap energy [20,21] and also has a long tail on the low-energy side. The BFO/DSO, however, shows no clear absorption edge around 2.4 eV, and the optical absorption below the band gap energy suggests that there is a high density of below band gap states introduced by defects due to the lattice mismatch. The onsets of the PC spectra (Fig. 1) of BFO/STO and BFO/DSO are approximately 2.3 and 2.4 eV, respectively. As the PC reflects the optical absorption that contributes to the PC generated by band-to-band photoexcitation, it is therefore less affected by the optical absorption of deep defect or impurity states. In other words, the PC is more sensitive to band-edge optical transitions. Tauc plots of the PC (insets in Fig. 1) reveal a linear variation in the PC of both BFO/STO and BFO/DSO, which is evidence of an indirect transition [22,23]. This assignment is consistent with our experimental results that show that almost no photoluminescence is observed from  $\text{BiFeO}_3$  thin films even at low temperatures (data not shown) because most direct-gap semiconductors exhibit efficient light emission. The indirect gap and the band gap energy are also consistent with theoretical band calculations [21,24]. In an indirect-gap semiconductor, optical absorption involves wavenumber-conserving phonons, and we estimate  $(E_g - E_{ph})$  to be 2.4 eV, where  $E_g$  and  $E_{ph}$  are the band gap energy and the phonon energy, respectively. As the phonon energy is typically much smaller than the band gap energy, we conclude that the band gap energy of the  $\text{BiFeO}_3$  thin film is approximately 2.4 eV at 300 K.

Note that the large difference in the optical absorption and PC spectra of BFO/STO and BFO/DSO arises from the differences in the quality of the substrate rather than interface strain due to the lattice mismatch. The below-band-edge optical properties are generally sensitive to defects and impurities; therefore, we consider the defect (impurity) density to be strongly dependent on the substrate. However, the band gap energy, which is dependent on the crystal structure, is relatively unaffected by the substrate. This result is consistent with the results of a previous report [25].

Femtosecond TA measurements were performed with an excitation photon energy (3.1 eV) that was higher than the band gap energy, and Fig. 2 shows the change in the optical density ( $\Delta OD$ ) spectra of BFO/STO and BFO/DSO for different delay times. In both samples, we observed a photoabsorption peak at around 2.3 eV. The absence of photobleaching, which generally appears near the band gap energy of direct-gap semiconductors under strong photoexcitation conditions, is consistent with our assignment that  $\text{BiFeO}_3$  is an indirect-gap semiconductor. The 2.3-eV photoabsorption peak appears just after photoexcitation, suggesting that photocarriers in the band state (not localized carriers) are responsible for the absorption because there are no localized carriers just after the excitation. We consider that the 2.3-eV peak corresponds to the optical transition of electrons in the lowest conduction band to higher energy levels; a higher band composed mainly of the Bi 6p state has been theoretically predicted [26]. With an increase in the delay time, the 2.3-eV peak shows a blueshift owing to the crossover of two TA bands. For BFO/STO, these two TA bands peak at 2.27 and 2.41 eV [as shown by the dashed curves in Fig. 2(a)], and we attribute these peaks to optical transitions from the near band-edge (shallow) state and the lowest energy conduction band to a higher conduction band,

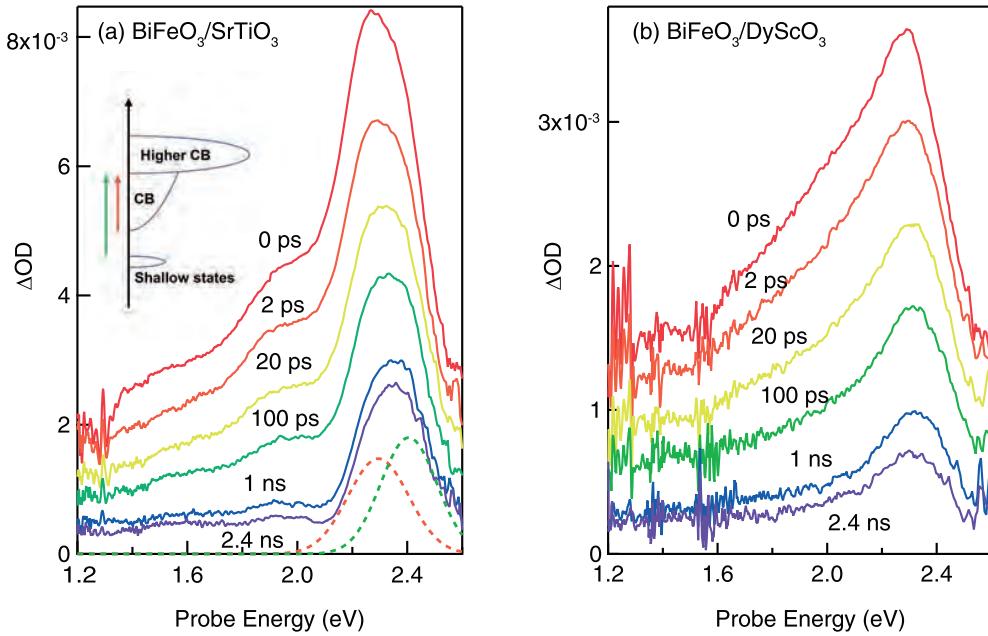


FIG. 2. (Color online) TA spectra of (a)  $\text{BiFeO}_3/\text{SrTiO}_3$  and (b)  $\text{BiFeO}_3/\text{DyScO}_3$  for different delay times. Dashed curves represent the two Gaussian functions that compose the 2.3-eV TA band. The inset illustrates the energy levels of  $\text{BiFeO}_3$ .

respectively, as indicated by the arrows in the inset. The TA band crossover indicates that photocarriers in the band state relax to the shallow trap state.

The TA dynamics are shown in Fig. 3 for a probe energy of 2.3 eV (photoabsorption peak energy) and different excitation densities; the TA intensities were normalized at 200 ps. The TA decay profiles in the nanosecond time range, obtained from the cw-probe TA measurements, are shown in the inset. The TA intensity at 2.3 eV corresponds to the carrier density at the band state and shallow trap state. Between 0 and 200 ps, the TA decay profiles are dependent on the excitation density; a very fast decay component appears with an increase in the excitation density. This excitation-density-dependent decay component can be associated with Auger recombination involving three carriers under strong photoexcitation conditions [27,28].

Under weak photoexcitation fluence, the TA dynamics consist of fast and slow components. The lifetime of the fast component is about 1 ns in both samples, as determined by a single-exponential fitting over the range 0.2–2 ns. However, the slow component has a nonexponential decay profile. We obtained average slow lifetimes of 130 ns for BFO/STO and 160 ns for BFO/DSO by fitting a double exponential over the range 10–800 ns. Additional decay components with a longer decay time also exist, and these can be attributed to relaxation in the deeper states. Note that these very slow decay components are sensitive to the probe energy and focal position of the laser. We attribute the fast and slow decay components to the localization of free photocarriers and the relaxation of photocarriers in the shallow trap, respectively, as shown schematically in Fig. 4(a); according to our model, photoexcited electrons rapidly relax into shallow trap states ( $\sim 1$  ns) and reach thermal equilibrium, which is consistent with the nanosecond timescale of the TA crossover. These

trapped carriers have a longer lifetime ( $\sim 130$ –160 ns), and thermal activation of carriers in the shallow trap induces transitions to the conduction band that are reflected by the slow decay component.

To confirm our photocarrier recombination model described in Fig. 4(a), we examined the PC decay profiles of BFO/STO under different bias voltages [Fig. 4(b)]. It should be noted that we were careful in focusing the excitation laser onto the gap between the electrodes to avoid illuminating and heating the electrodes, which would induce a pyroelectric current independent of the bias voltage. The observed PC was very weak because of the large gap width needed to reduce the pyroelectric current. The PC increases linearly with the bias voltage, meaning that an ohmic contact is formed at the interface of the  $\text{BiFeO}_3$  sample and electrodes. The PC decay profiles are almost independent of the bias voltage. Two decay components can be observed in the PC profiles: a very fast decay component that decays within  $\sim 6$  ns (equivalent to the time resolution of the measurements) and a slow decay component with an estimated decay time of 200 ns (determined from a single-exponential fitting). The BFO/DSO sample showed similar PC decay dynamics, and the decay times were similar to those estimated from the TA results.

The logarithm of the time-integrated PC intensity as a function of inverse temperature [Fig. 4(b) inset] reveals a linear relationship that indicates the existence of a thermally activated process from the shallow trap state to the conduction band, which supports the recombination model proposed in Fig. 4(a). We found that the activation energies ( $E_a$ ) of BFO/STO and BFO/DSO were 120 and 80 meV, respectively, based on an Arrhenius plot of the PC intensity; an activation energy of about 100 meV corresponds to the energy difference between the band state and shallow trap state, as well as being consistent with the energy shift of the photoabsorption peak (around

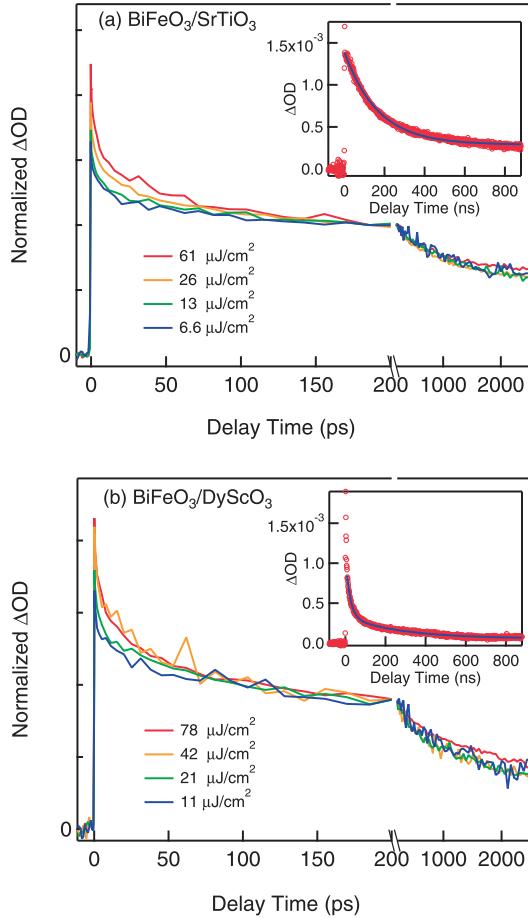


FIG. 3. (Color online) Normalized TA decay profiles of (a)  $\text{BiFeO}_3/\text{SrTiO}_3$  and (b)  $\text{BiFeO}_3/\text{DyScO}_3$  for different excitation densities. The inset shows the TA decay profiles in the submicrosecond time region and the calculated double-exponential function (blue curve).

100 meV) shown in Fig. 2. These results provide further support for our photocarrier recombination model. Note that the substrate-dependent activation energy can be attributed to the below band gap state, which is also dependent on the substrate, as shown in the PC and absorption spectra (see Fig. 1).

Our results indicate that the free photocarriers are captured in the shallow trap state within 1 ns. However, at room temperature, carriers in the shallow trap state have a long lifetime (130 and 160 ns for BFO/STO and BFO/DSO, respectively), and thermally activated free carriers have an effectively longer lifetime. Owing to these long-lived carriers, a high carrier density is achieved when the carriers are continuously photogenerated. This long carrier lifetime is linked to the ferroelectricity of  $\text{BiFeO}_3$ ; photogenerated electrons and holes will be spatially separated due to the depolarized field in ferroelectric  $\text{BiFeO}_3$ , which reduces the photocarrier recombination rates, and more effective charge separation would be expected at ferroelectric domain walls because of the large associated electric field. Our research suggests that extremely long-lived carriers in the trap states play an important role in the photoinduced phenomena such as the size expansion and large photovoltage mentioned in Refs. 10–14. Photocarriers driven by ferroelectricity would appear to be responsible for the unique photoresponses in ferroelectric semiconductors.

#### IV. CONCLUSION

We have studied the near-band-edge optical properties and dynamical behavior of photocarriers in  $\text{BiFeO}_3$  thin films on  $\text{SrTiO}_3$  and  $\text{DyScO}_3$  substrates by means of transient TA and PC measurements. We did not observe any significant difference in the optical responses of the two  $\text{BiFeO}_3$  thin films, and we found that the TA decay profiles have two components. The fast and slow decay components were attributed to the relaxation of free photocarriers and the recombination of photocarriers in the shallow traps, respectively. These results are consistent with the PC decay dynamics, which are more sensitive to the mobile carrier population. The fast localization

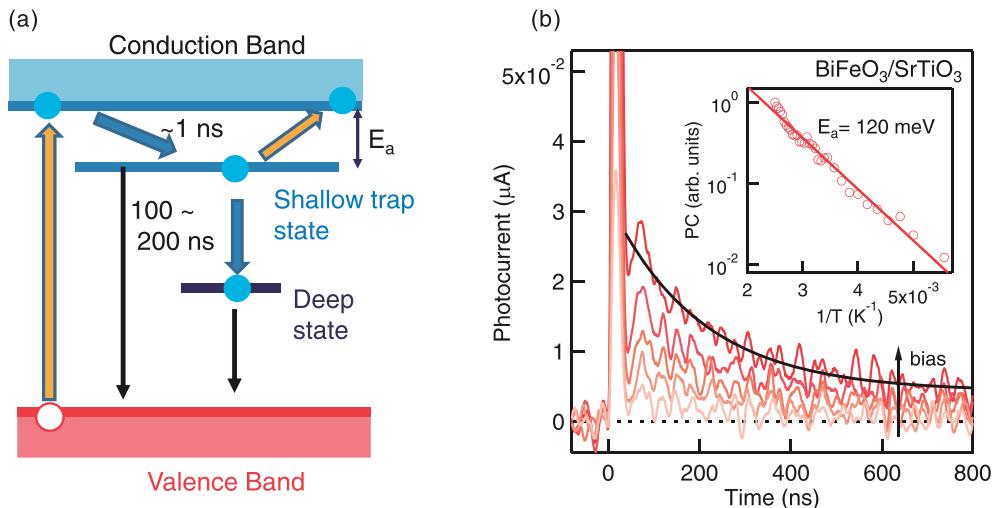


FIG. 4. (Color online) (a) Schematic of the photocarrier relaxation and recombination processes in  $\text{BiFeO}_3$ . (b) PC dynamics of  $\text{BiFeO}_3/\text{SrTiO}_3$  at different bias voltages (2, 4, 6, 8, and 10 V). The inset shows the time-integrated PC as a function of inverse temperature.

of free photocarriers is related to the very small PC observed in the photovoltaic measurements. While free photocarriers are rapidly trapped within 1 ns, trapped carriers are thermally activated and have an effectively long lifetime. We believe that our results provide a deep insight into the photoinduced phenomena in BiFeO<sub>3</sub>.

## ACKNOWLEDGMENTS

Part of this work was supported by The Sumitomo Electric Industries Group CSR Foundation, KAKENHI (No. 24740202 and No. 25247052), the Collaborative Research Program of Institute for Chemical Research, Kyoto University (No. 2011-6 and No. 2012-7), and JST-CREST.

- 
- [1] As a review, G. Catalan and J. F. Scott, *Adv. Mater.* **21**, 2463 (2009).
  - [2] D. Lebeugle, D. Colson, A. Forget, and M. Viret, *Appl. Phys. Lett.* **91**, 022907 (2007).
  - [3] Y.-H. Chu, L. W. Martin, M. B. Holcomb, M. Gajek, S.-J. Han, Q. He, N. Balke, C.-H. Yang, D. Lee, W. Hu, Q. Zhan, P.-L. Yang, A. Fraile-Rodríguez, A. Scholl, S. X. Wang, and R. Ramesh, *Nat. Mater.* **7**, 478 (2008).
  - [4] N. Balke, S. Choudhury, S. Jesse, M. Huijben, Y. H. Chu, A. P. Baddorf, L. Q. Chen, R. Ramesh, and S. V. Kalinin, *Nat. Nanotechnol.* **4**, 868 (2009).
  - [5] R. J. Zeches, M. D. Rossell, J. X. Zhang, A. J. Hatt, Q. He, C.-H. Yang, A. Kumar, C. H. Wang, A. Melville, C. Adamo, G. Sheng, Y.-H. Chu, J. F. Ihlefeld, R. Erni, C. Ederer, V. Gopalan, L. Q. Chen, D. G. Schlom, N. A. Spaldin, L. W. Martin, and R. Ramesh, *Science* **326**, 977 (2009).
  - [6] Y. P. Wang, L. Zhou, M. F. Zhang, X. Y. Chen, J.-M. Liu, and Z. G. Liu, *Appl. Phys. Lett.* **84**, 1731 (2004).
  - [7] M. J. Calderón, S. Liang, R. Yu, J. Salafranca, S. Dong, S. Yunoki, L. Brey, A. Moreo, and E. Dagotto, *Phys. Rev. B*, **84**, 024422 (2011).
  - [8] J. X. Zhang, Q. He, M. Trassin, W. Luo, D. Yi, M. D. Rossell, P. Yu, L. You, C. H. Wang, C. Y. Kuo, J. T. Heron, Z. Hu, R. J. Zeches, H. J. Lin, A. Tanaka, C. T. Chen, L. H. Tjeng, Y.-H. Chu, and R. Ramesh, *Phys. Rev. Lett.* **107**, 147602 (2011).
  - [9] J. Wang, J. B. Neaton, H. Zheng, V. Nagarajan, S. B. Ogale, B. Liu, D. Viehland, V. Vaithyanathan, D. G. Schlom, U. V. Waghmare, N. A. Spaldin, K. M. Rabe, M. Wuttig, and R. Ramesh, *Science* **299**, 1719 (2003).
  - [10] B. Kundys, M. Viret, D. Colson, and D. O. Kundys, *Nat. Mater.* **9**, 803 (2010).
  - [11] B. Kundys, M. Viret, C. Meny, V. Da Costa, D. Colson, and B. Doudin, *Phys. Rev. B* **85**, 092301 (2012).
  - [12] H. Wen, P. Chen, M. P. Cosgriff, D. A. Walko, J. H. Lee, C. Adamo, R. D. Schaller, J. F. Ihlefeld, E. M. Dufresne, D. G. Schlom, P. G. Evans, J. W. Freeland, and Y. Li, *Phys. Rev. Lett.* **110**, 037601 (2013).
  - [13] S. Y. Yang, J. Seidel, S. J. Byrnes, P. Shafer, C.-H. Yang, M. D. Rossell, P. Yu, Y.-H. Chu, J. F. Scott, J. W. Ager, III, L. W. Martin, and R. Ramesh, *Nat. Nanotechnol.* **5**, 143 (2010).
  - [14] J. Seidel, D. Fu, S.-Y. Yang, E. Alarcón-Lladó, J. Wu, R. Ramesh, and J. W. Ager, III, *Phys. Rev. Lett.* **107**, 126805 (2011).
  - [15] R. Ueno, S. Okamura, H. Funakubo, and K. Saito, *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**, L1231 (2005).
  - [16] Y. Yamada and Y. Kanemitsu, *Appl. Phys. Lett.* **101**, 133907 (2012).
  - [17] S. J. Clark and J. Robertson, *Appl. Phys. Lett.* **90**, 132903 (2007).
  - [18] L. Bi, A. R. Taussig, H.-S. Kim, L. Wang, G. F. Dionne, D. Bono, K. Persson, G. Ceder, and C. A. Ross, *Phys. Rev. B* **78**, 104106 (2008).
  - [19] P. Chen, N. J. Podraza, X. S. Xu, A. Melville, E. Vlahos, V. Gopalan, R. Ramesh, D. G. Schlom, and J. L. Musfeldt, *Appl. Phys. Lett.* **96**, 131907 (2010).
  - [20] B. Ramachandran, A. Dixit, R. Naik, G. Lawes, and M. S. Ramachandra Rao, *Phys. Rev. B* **82**, 012102 (2010).
  - [21] J. B. Neaton, C. Ederer, U. V. Waghmare, N. A. Spaldin, and K. M. Rabe, *Phys. Rev. B* **71**, 014113 (2005).
  - [22] P. Y. Yu and M. Cardona, *Fundamentals of Semiconductors*, 3rd ed. (Springer, Berlin, 2005).
  - [23] Y. Yamada and Y. Kanemitsu, *Phys. Rev. B* **82**, 121103(R) (2010).
  - [24] R. V. Pisarev, A. S. Moskvin, A. M. Kalashnikova, and T. Rasing, *Phys. Rev. B* **79**, 235128 (2009).
  - [25] H. L. Liu, M. K. Lin, Y. R. Cai, C. K. Tung, and Y. H. Chu, *Appl. Phys. Lett.* **103**, 181907 (2013).
  - [26] O. Diéguez, O. E. González-Vázquez, J. C. Wojdeł, and J. Íñiguez, *Phys. Rev. B* **83**, 094105 (2011).
  - [27] P. T. Landsberg, *Recombination in Semiconductors* (Cambridge University Press, Cambridge, 1991).
  - [28] Y. Yamada, H. Yasuda, T. Tayagaki, and Y. Kanemitsu, *Phys. Rev. Lett.* **102**, 247401 (2009).



## 4. 參考資料



## 拠点中間評価結果

大学名	京都大学
研究施設名	化学研究所
拠点の名称	化学関連分野の深化・連携を基軸とする先端・学際研究拠点
認定期間	平成22 年度～平成27 年度

### 1. 拠点の目的・概要

本拠点は、母体である化学研究所の研究分野の広さと深さや連携実績を活かし、国内の化学関連分野の研究者との共同研究に、内外の研究機関の連携を維持拡張するハブ環境の提供も含め、化学関連分野の深化・連携や学際分野の開拓の推進を目的とする。併せて若手研究者の育成も図る。そのため、客員教員、機関研究員、技術系職員、事務職員を配した共同研究ステーションを基盤とし、運営評議会、協議員会、共同研究委員会を設けて共同利用・共同研究を効率よく展開する。（共同利用・共同研究の形態は、化学分野の「共同研究型」を第一とするが、大型設備も有しており、データベースによる研究資料も提供する。）

### 2. 総合評価

#### (評価区分)

S：拠点としての活動が活発に行われており、共同利用・共同研究を通じて特筆すべき成果や効果が見られ、関連コミュニティへの貢献が多大であると判断される。

#### (評価コメント)

共同利用・共同研究拠点として海外の多くの研究機関との共同研究を行い、インパクトファクターの高い雑誌への論文掲載など、十分な研究実績を上げており、技術職員や事務職員の適切な配置、設備の充実など、支援体制の充実を図ってコミュニティへの積極的な貢献に努めている点が高く評価できる。

今後、大型プロジェクトの発案等、中核的な拠点としての先導的な役割を一層果たすことが期待される。

京都大学化学研究所  
化学関連分野の深化・連携を基軸とする先端・学際研究拠点  
平成25年度共同利用・共同研究公募要領

京都大学化学研究所は、「化学に関する特殊事項の学理及び応用の研究を掌る」ために、化学を中心とする分野で基礎研究に重点を置いた先駆的・先端的研究に邁進してまいりました。平成22年度からは、「化学関連分野の深化・連携を基軸とする先端・学際研究拠点」として国内外の共同利用・共同研究をこれまで以上に押し進め、それを新たな糧としてより多様でグローバルな化学研究の展開を図っています。

つきましては、化学が関わる分野でご活躍の皆様のご意見・ご要望を尊重しつつ、世界の化学の基礎・応用研究を皆様とともに一層推進することを念頭に置き、平成25年度の共同利用・共同研究の公募をさせて頂きたく存じます。

この公募に当たっては、分野選択型（計画研究型）、課題提案型、連携・融合促進型および施設・機器利用型の四つに分けて研究課題を募集いたします。これらの課題の実施に際しては当研究所の専任教員または客員教員との共同研究を基調としますが、いずれの課題でも後述の共通設備・機器・資料等のご利用が可能です。この点も是非ご勘案いただき、本公募要領の詳細について十分ご確認の上、期日（平成25年2月1日）までにご申請下さるようお願ひいたします。

## 1. 研究期間

1年間（平成25年4月1日から平成26年3月31日まで）。ただし、研究内容によっては、次年度への継続申請にも配慮いたします。予め継続申請が必要と思われる場合には、その旨を理由とともに申請書にご記載下さい。

## 2. 研究課題分類

下記のような分類（型）ごとに研究課題を募集いたします。いずれの課題についても、分類ないし分野の担当者もしくは当研究所で対応する共同研究者にご一報の上、ご申請下さい。また、研究経費に関しては、次頁の表をご覧下さい。

### 2-1. 分野選択型（計画研究型）研究課題

分野選択型（計画研究型）研究課題は、あらかじめ設定された分野に関して化学研究所内の研究者と共に遂行する課題です。平成25年度は下記の5分野について課題を公募いたします。5分野を合わせて、萌芽的な課題と発展的な課題をそれぞれ14件程度、採択の予定です。

ビーム科学分野（担当者：畠 安雄； hata@scl.kyoto-u.ac.jp）

基本テーマ：先進量子ビームの応用とその複合も含む新たな分析手法の創出

趣旨：レーザー、X線、電子線、イオンビームなどの量子ビームを高度に制御し、先端的研究手段として確立すると共にこれらを複合的に用いて、単一の手法では検出不能な超高速化学過程や極微細領域での物理化学的变化などの詳細を明らかにすることを目指します。また、超短パルス等のより高度な量子ビームの開発・制御技術の確立とこれを用いた新たな分析手法の創出も目指します。

元素科学分野（担当者：中村 正治； masaharu@scl.kyoto-u.ac.jp）

基本テーマ：元素科学に基づく物質創製・機能探索

趣旨：元素（特に遷移元素）の特性を見直し、それに基づいて、高い機能を有する新物質の創製を推進します。さらに、物質の機能が構成元素の特性を反映して発現することに着目し、この発現機構を理解して、望みの機能を得るために要する新物質創製の方法論の確立を目指します。

バイオ情報学分野（担当者：馬見塚 拓； mami@kuicr.kyoto-u.ac.jp）

基本テーマ：バイオ情報を含む複合情報の融合解析

趣旨：ゲノムやメタゲノムに代表される最新バイオ情報に立脚して、バイオ情報がいかに生体内化学現象に関わっているかを明らかにし、生命システムについての化学的理解の深化を図ります。さらに、その成果を応用して、ゲノム創薬やパーソナライズド医療などへの展開も目指します。

物質合成分野（担当者：辻井 敬亘；tsujii@scl.kyoto-u.ac.jp）

基本テーマ：複合機能材料の戦略的創製

趣旨：異種材料のハイブリッド化・複合化ならびにナノサイズ化に重点を置き、新規な機能をもつ新世代材料の創製を目指すとともに、生体の認識、応答、反応などの諸機能を担う例えは生体膜等も複合機能材料と捉え、機能物質と生命現象の化学的相関の解明も目指します。

現象解析分野（担当者：金谷 利治；kanaya@scl.kyoto-u.ac.jp）

基本テーマ：複合測定に基づく物質解析

趣旨：化学を基盤とする多種の分光学的手法・解析的手法を複合的に駆使して、天然および人工物質の構造・性質を分子レベルから巨視的レベルまで階層的に理解・記述することを目指し、一方、その結果を還元することによって新たな物質科学の枠組みを構築する取組みも目指します。

## 2-2. 課題提案型研究課題（担当者：島川 祐一；shimak@scl.kyoto-u.ac.jp）

課題提案型研究課題は、前項1で設定した一つの分野に留まらない分野、あるいはそれ以外の分野について、化学関連分野の研究者から自由にご提案いただく課題です。萌芽的な課題と発展的な課題を、それぞれ14件程度、採択の予定です。新分野の開拓につながるような課題を特に歓迎いたします。なお、緊急性・重要性が極めて高いと判断した課題については、前記の応募期日にかかわらず、直ちに採択することもあります。

## 2-3. 連携・融合促進型研究課題（担当者：渡辺 宏；hiroshi@scl.kyoto-u.ac.jp）

連携・融合促進型研究課題は、化学関連分野における国内外の研究連携の強化を主目的とする共同研究課題です。国外も念頭に置く場合は、化学研究所の部局間国際学術交流締結先（<http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/kokusai.html> 参照）との共同研究を開始する場を求めていただくことも可能です。また、この目的に沿った研究集会の開催も本課題として応募いただけます。4件程度を採択する予定です。

## 2-4. 施設・機器利用型研究課題（担当者：阪部 周二；sakabe@laser.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

施設・機器利用型研究課題は、後述（項目6）の共通設備・機器・資料等の利用を主とする共同研究課題です。10件程度を採択する予定です。

平成25年度共同利用・共同研究経費概算値

	経費上限／件 <sup>*</sup> （千円）
分野選択型萌芽的研究	600
分野選択型発展的研究	1,200
課題提案型萌芽的研究	600
課題提案型発展的研究	1,200
連携・融合促進型研究	600
施設・機器利用型研究	600

\*表中の金額は目安です。予算の状況に応じた減額もありますことをご了解下さい。

経費内での備品費、消耗品費、旅費の配分は、申請者と化学研究所の共同研究者が協議して決定下さい。特に、旅費については、地域性を勘案してご決定下さい。

## 3. 共同研究応募方法

### 3-1. 申請資格

国公私立大学、国公私立研究機関、独立行政法人等の専任研究者、または、これに準ずる者。

### 3-2. 申請書記入要領

申請に当たっては、該当する募集分類・分野の担当者もしくは当研究所で対応する共同研究者と、事前に研究課題、研究内容、研究経費に関して、必ずご協議下さい。対応する共同研究者は、当研究所の専任教員（[http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/kaken\\_person.html](http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/kaken_person.html)）または平成25年度客員教員（本公募要領末尾の7項の表）からお選び下さい。また、対応する共同研究者をお決めになれない場合は、各分類・分野の担当者に、まず、ご相談ください。上記の表の経費上限は目安です。特に、経費内での備品費、消耗品

費、旅費の配分については、当研究所で対応する共同研究者と十分にご協議の上で申請下さい。特に、旅費については、地域性を勘案してご申請下さい。

申請は、本要領に添付の平成25年度京都大学化学研究所分野選択型共同利用・共同研究申請書（様式1）、平成25年度京都大学化学研究所課題提案型共同利用・共同研究申請書（様式2）、平成25年度京都大学化学研究所連携・融合促進型共同利用・共同研究申請書（様式3）、平成25年度京都大学化学研究所施設・機器利用型共同利用・共同研究申請書（様式4）に必要事項を記入し、下記の要領で、化学研究所共同研究推進室にご提出下さい。

#### ＜記入上の注意事項＞

1. ※を付した事項は当研究所で記入します。
2. 当研究所で対応する共同研究者は必ずご記入下さい。
3. 申請者（研究代表者）と共同研究者の役割分担を明記して下さい。事前に共同研究者の承諾を得ていただくことが必要です。

### 3-3. 提出期限および提出先

応募に当たっては、前記の申請書にご記入の上、平成25年2月1日（金）までに、下記宛に電子メール添付書類（Word書類）としてお送り下さい。

書類提出先および問い合わせ先

京都大学化学研究所共同研究推進室 共同利用・共同研究係

E-mail: icr-hub@scl.kyoto-u.ac.jp, 電話: (0774) 38-3134

### 4. 課題選考と採択通知

応募課題の採否は、当研究所の共同研究委員会で審査し、運営評議会の承認を経て決定されます。審査に際しては、共同研究の申請内容だけでなく、予算枠や、共通設備・機器・資料の使用時間等も考慮いたします。採否の結果（内定）については、平成25年3月に当研究所の所長から研究代表者に通知いたします。

### 5. 研究の実施および研究成果報告

#### 5-1. 研究経費等

研究代表者と当研究所で対応する共同研究者には、予算の範囲内で、研究経費（備品費および消耗品費）と旅費が支給されます。また、研究協力者にも予算の範囲内で旅費が支給されます。共同研究の実施に当たっては、まず対応する共同研究者にご連絡下さい。なお、当研究所には、共同研究者のための宿泊施設はありません。

研究協力者について、学生の場合は原則として大学院生といたします。なお、傷害保険等に加入していることが必要です。

#### 5-2. 研究成果報告

採択された研究課題については、研究成果報告書を次に記す作成要領に従って記載・提出していただきます。その報告書は、まとめて当研究所の共同利用・共同研究報告書集として公開させていただく予定です。また、その内容を研究成果報告会でご報告いただくことがあります。なお、報告会についての詳細は、採択課題の研究代表者に後日お知らせいたします。

#### 5-3. 研究成果報告書の作成要領

分野選択型研究、課題提案型研究、施設・機器利用型研究については2頁、連携・融合促進型研究については4頁の報告書を（様式5）を用いて作成下さい。A4版の用紙には1頁あたり2,000字程度が記載できます。図表などカラーを用いて構いませんが、報告書集刊行の際はモノクロ印刷になることもありますので、その点をお含み置き下さい。

1頁の1行目の中央に研究課題名、3行目に右詰めで研究代表者の氏名と所属、5行目から本文を記載して下さい。なお、当研究所で対応した共同研究者は報告書の共著者とはせず、必要に応じて本文中に明記して下さい。

#### 5-4. 報告書の内容

形式は自由ですが、例えば、実験的研究では、目的、実験方法、実験結果、考察、成果報告（論文、学会発表等）をお書き下さい。なお、連携・融合促進型研究で研究集会を開催した場合には、研究集会のプログラム、参加者名簿（所属機関・部局・職名を明記）、および、作成された場合は要旨集またはプロシードィングスを添付して下さい。

#### 5-4. 報告書の提出

提出締切日は、平成26年2月末日とします。電子ファイル（PDFファイル）を、下記へ電子メール添付書類としてお送り下さい。なお、添付ファイル名は「課題番号+代表者名（姓）」として下さい。

報告書提出先

京都大学化学研究所共同研究推進室 共同利用・共同研究係

E-mail: icr-hub@scl.kyoto-u.ac.jp, 電話: (0774) 38-3134

#### 5-5. 研究成果の公開

学術論文などによる研究成果の公開に際しては、京都大学化学研究所の共同利用・共同研究として行われたことを明記して下さい。英文での謝辞例を次に示します。

謝辞例: This work was supported by the Collaborative Research Program of Institute for Chemical Research, Kyoto University (grant # XXXX).

日本語での謝辞は、この英文表記に準ずるものとして下さい。

## 6. 共通設備・機器・資料の概要 ([http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/kaken\\_kyodo\\_instr.html](http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/kaken_kyodo_instr.html))

機器（施設）名	管理研究領域 (担当教員)	特徴・性能・仕様等	掲載 WEB ページ
生命化学情報解析用 スーパーコンピューター システム	生命知識工学 (馬見塚 拓)	KEGG データベースを中心としたゲノムネットサービス ( <a href="http://www.genome.jp/">http://www.genome.jp/</a> ) に一部が提供されているスーパーコンピューターシステムを内部利用することができる。分子生物学・化学・創薬科学関連のデータベースと様々な応用ソフトウェアが整備された SGI UV1000 (総 CPU コア数 3,072) を中心としたシステムである。	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/</a>
高機能電子顕微鏡群	複合ナノ解析化学 (倉田 博基)	透過型電子顕微鏡と走査型透過電子顕微鏡群、加速電圧 120-200 kV。原子分解能観察や電子エネルギー損失分光法による状態分析、エネルギー・フィルタ像観察、液体窒素温度や液体ヘリウム温度での観察が可能。集束イオンビーム加工装置、クライオミクロトーム、イオンミリング装置などの試料作成支援装置群も利用可。	<a href="http://eels.kuicr.kyoto-u.ac.jp:8080/Root/Souchi/">http://eels.kuicr.kyoto-u.ac.jp:8080/Root/Souchi/</a>
多目的超高磁場 NMR	分子材料化学 (梶 弘典)	800MHz NMR、溶液および固体測定が可能。5mm φ 1H/109Ag~31P 多核種プローブ、5mm φ 1H/13C, 15N トリプルインバースプローブ、10mm φ 1H/109Ag~31P 多核種プローブ、3重共鳴 CP/MAS プローブ、高速回転型 CP/MAS プローブが利用可能。温度可変可能	<a href="http://molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp/">http://molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp/</a>
ナノスケール動的構造評価 X 線システム	高分子制御合成 (山子 茂)	多層膜ミラーにより集光された高輝度 X 線を試料に照射し、得られる回折/散乱強度を半導体二次元検出器 (PILATUS) で迅速にデジタルデータ化。さらに付属のソフトウェアにより構造評価を行うシステム。透過と反射の両測定法に対応。加熱冷却、引張、せん断の様々なアタッチメントを備えている。	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~kayahara/">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~kayahara/</a>
生物用 X 線回折装置	構造分子生物科学 (畠 安雄)	モノクロメータ集光系および全反射ミラー集光系と IP 型二次元検出器を有する二台の装置で構成されるタンパク質単結晶 X 線回折装置で結晶の質や格子定数などによって使い分けることが出来る。いずれも窒素吹付け低温装置を有しているので、100K での極低温回折実験が可能である。	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~hata/index.html">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~hata/index.html</a>
電子線形加速器 (休止中)	粒子ビーム科学 (野田 章)	最高電流 100mA、パルス幅 40ns~100ns、繰り返し最大 20Hz の 60~100 MeV の電子ビームが供給可能。T2K のニュートリノ実験の検出器の較正等に使用されている。	<a href="http://wwwal.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/index.htmlx">http://wwwal.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/index.htmlx</a>
電子蓄積リング KSR (休止中)	粒子ビーム科学 (野田 章)	電子線形加速器の出力ビーム (60~100 MeV) を入射・蓄積し、共鳴を用いた遅い取り出しにより、ビームのデューティー ファクター (単位時間中にビームが供給される時間の割合) を数十パーセントにまで増大させたビームが供給可能。また、このビームを 300 MeV に加速し、放射光の放出も可能。リング内に内部標的を設置し、この標的と電子ビームの散乱によりこの標的の解析を行うことも可能である。リング中に設置したイオントラップに捕獲された原子核の構造を周回電子ビームとの散乱の解析により実施した実績を有する。	<a href="http://wwwal.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/index.htmlx">http://wwwal.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/index.htmlx</a>
イオン蓄積・冷却リング S-LSR (休止中)	粒子ビーム科学 (野田 章)	陽子線形加速器からの 7 MeV 陽子ビームを電子ビーム冷却し、早い取出しによりリング外に取り出して、最短で 3.5 ns の幅のビームの供給が可能。また、電子ビーム冷却、レーザー冷却 (24Mg+イオンに限定される) により、低温 (数ケルビン) に冷却したビームと物質との相互作用の研究が可能となる。	<a href="http://wwwal.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/index.htmlx">http://wwwal.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/index.htmlx</a>
超高強度極短パルス レーザー装置 (T6-レーザー)	レーザー物質科学 (阪部 周二)	パルス幅 100fs、波長 800nm、エネルギー<1J、繰り返し単発~10Hz のパルス光を発することができる。集光照射系 (真空中) も有しております。各種物質への照射実験が可能。また、レーザー装置を構成している、短パルスマード同期発振器や励起用 Q スイッチ Nd:YAG レーザーを独立に利用することも可能。	<a href="http://laser.kuicr.kyoto-u.ac.jp/facility1.html">http://laser.kuicr.kyoto-u.ac.jp/facility1.html</a>
レーザー照射可能 透過形電子顕微鏡	レーザー物質科学 (阪部 周二)	短パルスレーザー光を電子顕微鏡内の試料に照射することができる。レーザーの性能はパルス幅 100fs、波長 800nm、エネルギー<1mJ、繰り返し単発~10Hz。電子顕微鏡は日本電子製 100kV 透過型電子顕微鏡。	<a href="http://laser.kuicr.kyoto-u.ac.jp/facility2.html">http://laser.kuicr.kyoto-u.ac.jp/facility2.html</a>
極微小結晶用 X 線単結晶構造解析装置 VariMax	有機元素化学 (時任 宣博)	X 線単結晶構造解析装置は、単結晶に X 線を照射し、その解説データを集積・解析することにより、結晶中の原子配置・分子構造を決定するための装置である。本装置は、通常では弱い反射データしか得られないような極微小の単結晶サンプルに対し、特殊な X 線反射装置を用いることによりデータ集積可能としたものであり、極微小な単結晶しか得られない化合物に対しても十分な解析データが得られる装置である。	<a href="http://boc.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/inst.html">http://boc.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/inst.html</a>
単結晶 X 線回折装置	構造有機化学 (村田 靖次郎)	主に有機化合物・有機金属化合物の構造決定に使用する。CCD 検出器を備えており、測定時間は約 6~24 時間。-173°C の低温あるいは室温で測定を行う。装置は、Bruker 社 SMART APEX。	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~kouzou/carbon/main.html">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~kouzou/carbon/main.html</a>
単結晶 X 線回折装置	典型元素機能化学 (中村 正治)	強力な Mo 線源 (50mV, 100mA) と大口径の CCD 検出器 (72mm) を有する単結晶 X 線回折装置。付属の回折・構造解析ソフト CrystalClear および CrystaIStructure により 0.1~0.3mm 角の単結晶から分子構造を決定することができる。(Rigaku 社製 AFC10R + Satrun)	<a href="http://es.kuicr.kyoto-u.ac.jp/top.html">http://es.kuicr.kyoto-u.ac.jp/top.html</a>

MCD 磁気円二色性測定装置	有機元素化学 (时任 宣博)	MCD とは、磁場中で CD スペクトルを測定する手法である。従来の方法では見えない、もしくは見えにくい電子遷移スペクトルの測定や、遷移の帰属、環状π共役システムの研究などに用いられる。MCD スペクトルは、波長および波数に対してモル減水係数の差、または磁場中でのモル橋円率をプロットしたものである。	<a href="http://boc.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/inst.html">http://boc.kuicr.kyoto-u.ac.jp/www/inst.html</a>
マトリックス支援 レーザー脱離イオン化 飛行時間形質量分析計	生体機能設計化学 (二木 史朗)	ブルカーダルトンニクス社 microflex Reflectron 蛋白質などの生体高分子の他、合成高分子や有機化合物などの質量を高分解能で容易に測定できる。数万ダルトン以上の化合物の質量測定も可能。NMR などによる構造決定が困難な高分子の構造確認に威力を発揮する。（*本品の使用にあたりましては、化学系研究施設有効活用ネットワークの使用規則・料金が適用されます。）	<a href="http://chem-eqnet.ims.ac.jp/index.html">http://chem-eqnet.ims.ac.jp/index.html</a>
超電導磁石型フーリエ 変換質量分析装置	典型元素機能化学 (中村 正治)	7.2T の超電導イオンサイクロトロン検出器によって 100amol レベルの感度で質量範囲 100~10,000 (m/z)までの超精密質量分析（100 万 FWHM）が可能な質量分析計。イオン化方法は大気圧 MALDI および ESI イオン化に対応、CID, ECD, ETD 法による MSMSMS 分析が行える。	<a href="http://es.kuicr.kyoto-u.ac.jp/">http://es.kuicr.kyoto-u.ac.jp/</a>
二重収束型 高分解能 ICP 質量分析計	水圈環境解析化学 (宗林 由樹)	Finnigan ELEMENT2, Thermo Fisher 世界でもっとも高感度かつ高精度な微量元素分析システム。目的元素をアルゴンプラズマでイオン化、二重収束型質量分析計（分解能 300~10,000）で妨害イオンと分離し、測定する。70 種以上の元素について、ppq ( $10^{-15}$ ) レベルまでの多元素同時定量が可能である。	<a href="http://inter3.kuicr.kyoto-u.ac.jp/scope_J.html">http://inter3.kuicr.kyoto-u.ac.jp/scope_J.html</a>
四重極型 ICP 質量分析計	水圈環境解析化学 (宗林 由樹)	ELAN DRC II, Perkin Elmer ダイナミックリアクションセル (DRC) を持つ四重極型 ICP-MS。DRC はイオンレンズと四重極質量分離部の間に設置されている。イオンレンズを通過したイオンのうち、分子イオンは反応ガス (NH <sub>3</sub> ) と低振幅高周波四重極により除去される。一方、目的原子イオンは、反応ガスによる影響を受けずに四重極質量分離部に入り、質量対電荷比 (m/z) で分離され、検出部に到達する。そのため、分子イオン干渉を受ける Fe, Ca などの検出限界が劇的に低くなる。約 70 種の元素について、ppt ( $10^{-12}$ ) レベルまでの多元素同時定量が可能。	<a href="http://inter3.kuicr.kyoto-u.ac.jp/instruments/instruments_J.html">http://inter3.kuicr.kyoto-u.ac.jp/instruments/instruments_J.html</a>
ICP 発光分光分析計	水圈環境解析化学 (宗林 由樹)	Optima 2000 DV, Perkin Elmer 溶液試料を高温のアルゴンプラズマ中に噴霧し、目的元素を中性の原子やイオンとし、さらに励起する。励起された原子やイオンは、低いエネルギー準位に戻るときに発光する。その波長から元素を同定し、その強度から元素の含有量を求める。本装置は半導体検出器で発光線スペクトル全体を観測できる。ppb ( $10^{-9}$ ) レベルまでの濃度において、多元素同時定量を高精度で行うことができる。	<a href="http://inter3.kuicr.kyoto-u.ac.jp/instruments/instruments_J.html">http://inter3.kuicr.kyoto-u.ac.jp/instruments/instruments_J.html</a>
汎用溶液 NMR	分子材料化学 (梶 弘典)	600MHz NMR, 5mm φ 1H/109Ag~31P-19F 多核種プローブ, 1.7mm φ 1H/13C, 15N トリプルインバースプローブが利用可能。温度可変可能。	<a href="http://molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp/">http://molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp/</a>
汎用多岐固体 NMR	分子材料化学 (梶 弘典)	400MHz NMR, 4mm 径 CP/MAS プローブ, 7.5mm 径 CP/MAS プローブ, 配向プローブが利用可能。温度可変可能。パルス幅は、4 μs あるいはそれ以下。	<a href="http://molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp/">http://molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp/</a>
二重収束質量分析装置 MStation JMS-700	精密有機合成化学 (川端 猛夫)	イオン光学系が、磁場・電場から構成される逆配置二重収束型質量分析計で、イオン化法として、FAB および EI を用いることができる。最大分解能は 60,000 (10%谷) で、高分解能測定により組成式も明らかにできる。最大加速時に質量範囲として 2,400 ダルトンまで測定可能。イオン源および各種パラメーターのオートチューニング機能を搭載している。	<a href="http://fos.kuicr.kyoto-u.ac.jp/">http://fos.kuicr.kyoto-u.ac.jp/</a>
遺伝子導入装置 Biolistic Particle Delivery System, Model PDS-1000/He	生体分子情報 (青山 卓史)	ヘリウムガスの圧力により金やタンゲステンの微小粒子を加速し、それら粒子上にコートされた DNA を細胞内に導入する。植物組織、動物培養細胞、植物培養細胞などを標的とすることができる。	<a href="http://molbio.kuicr.kyoto-u.ac.jp/mbl/index.html">http://molbio.kuicr.kyoto-u.ac.jp/mbl/index.html</a>
トリプル四重極 LC/MS/MS システム (Applied Biosystems API 3000 LC/MS/MS シス テム))	分子微生物科学 (栗原 達夫)	マスレンジ : m/z 30~3000. タンパク質など高分子化合物の質量分析、各種化合物の定量分析、タンデム四重極によるフラグメントイオン解析などに適している。 MS/MS 解析では、プロダクトイオンスキャンのほか、ブレーカーサーイオンスキャン、ニュートラルロススキャンが可能。HPLC と接続しており、LC/MS, LC/MS/MS も可能。ノーマルイオンスプレーのほか、ターボイオンスプレーの使用が可能。	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~mmsicr/mmstojp/Research.html">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~mmsicr/mmstojp/Research.html</a>
精密有機構造解析 システム 角度分解紫外・X線 光電子分光装置 (有機固体用)	分子集合解析 (佐藤 直樹)	有機固体を主な対象として、超高真空中でその価電子構造や内殻電子準位を、それぞれ真空紫外線 (He 共鳴線), X 線 (Mg α K 線) を光源とし電場偏向型電子エネルギー分析器を備えた光電子分光法により観測する装置。試料調製室で真空蒸着した薄膜のその場測定や、紫外光電子分光法についてはエネルギー分析器を動かしての角度分解測定も可能。	<a href="http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/labos/is2/scope_J.html">http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/labos/is2/scope_J.html</a>
温度可変粉末 X 線回折装 置	精密無機合成化学 (寺西利治)	粉末試料、微量試料、大型バルク試料、薄膜材料まで、多種多様な試料・結晶状態にて高感度 XRD 分析。同定、定量、配向、ストレス、微小部、温度可変、高分解測定まであらゆるアプリケーション	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~teranisi/apparatus.html">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~teranisi/apparatus.html</a>

		ンに対応。	
超高温高分解能 磁気共鳴装置	分子環境解析化学 (松林 伸幸)	エネルギー・環境問題に重要な有機化合物の超臨界水による有用物質化・無毒化反応を、分子レベルで直接観察するために開発された 500 MHz 機. 400°Cまでの構造・ダイナミクス・反応の研究が可能となっている。日本電子株式会社製 ECA500W.	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~yoeki/">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~yoeki/</a>
液体用磁気共鳴装置	分子環境解析化学 (松林 伸幸)	<sup>1</sup> H核から <sup>14</sup> N核までに世界最高感度で対応し、多種の特殊測定を行うことができる 600 MHz 機. 生体模倣膜などのナノスケール構造体の拡散ダイナミクス測定が可能である。日本電子株式会社製 ECA600.	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~yoeki/">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~yoeki/</a>
高分解能 2 結晶 蛍光 X 線分析装置	構造分子生物科学 (伊藤嘉昭)	高分解能 2 結晶蛍光 X 線分光法は、測定は通常の蛍光 X 線分析法と何ら変わらないが、XPS とほぼ同等の分析を行うことができる。分光系が 2 結晶分光器という通常の蛍光 X 線分析では用いられないタイプではあるが、超高真空系や高真空系などは不用である。蛍光 X 線分光法を用いると絶縁体や溶液試料でも容易に非破壊測定を行うことが可能であるので、汎用状態分析装置である。仕様：負荷 3 kW, W と Rh のターゲット、絶縁体、溶液試料などの状態分析可。真空、大気圧での測定可、分析エネルギー：Na~U まで	<a href="http://www.spring8.or.jp/ext/ja/iuss/htm/text/06file/safety_security_anal_eval-1/ito_kyoto.pdf">http://www.spring8.or.jp/ext/ja/iuss/htm/text/06file/safety_security_anal_eval-1/ito_kyoto.pdf</a>
電子スピン共鳴 (ESR) +レーザーフラッシュ フォトリシス装置	高分子材料 設計化学 (辻井敬亘)	ナノ秒パルス YAG レーザー (波長 1064 nm, 532 nm, 355 nm, 出力 450mJ/pulse(1064 nm), パルス幅 20 nsec, 繰返し周期<10 Hz) + ナノ秒パルスエキシマーレーザー (波長 308 nm, 出力 200 mJ/pulse, パルス幅 20 nsec, 繰返し周期<100Hz) + 電子スピン共鳴 (ESR) (Bruker 社製 E500, X バンド, 温調 100~700K, 時間分解測定可) + 分光測光装置 (浜松ホトニクス製 PMA-50/BT-CCD システム 感度波長範囲 200~1100 nm, 時間分解測定可) の組み合わせが可能。それぞれ独立に使用することも可能。	<a href="http://www.cpm.kuicr.kyoto-u.ac.jp/">http://www.cpm.kuicr.kyoto-u.ac.jp/</a>
電子ビーム露光装置	ナノスピントロニクス (小野 輝男)	電子ビーム露光装置を使うことにより、レジストを塗布した試料に電子ビームで描画することで、ナノメータースケールのパターンングができる。	<a href="http://www.cpm.kuicr.kyoto-u.ac.jp/">http://www.cpm.kuicr.kyoto-u.ac.jp/</a>
高圧合成装置	無機先端機能化学 (島川 祐一)	5 万気圧、2000°C以上まで到達可能な大型高圧発生装置 (試料容積約 1cc) . 他に 15 万気圧まで到達可能な装置 (試料容積約 0.04cc) もあり、極限条件での新規物質開拓を行っている。	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~shimakgr/index.html">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~shimakgr/index.html</a>
レーザー蒸着装置	無機先端機能化学 (島川 祐一)	KrF エキシマーレーザー ( $\lambda$ :248nm) をパルス状に照射することにより原料を蒸発させ薄膜を作製する。薄膜の成長中に反射高速電子回折 (RHEED) を観察することで単位格子レベルでの成長制御が可能。	<a href="http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~shimakgr/index.html">http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~shimakgr/index.html</a>

## 7. 平成 25 年度化学研究所客員教員

客員教授 氏名 (本務先)	客員准教授 氏名 (本務先)
福住 俊一 (大阪大学大学院工学研究科)	遊佐 真一 (兵庫県立大学大学院工学研究科)
橋本 俊一 (北海道大学大学院薬学研究科)	西岡 純 (北海道大学低温科学研究所)
永島 英夫 (九州大学先導物質化学研究所)	八井 崇 (東京大学大学院工学系)
今西 誠之 (三重大学大学院工学研究科)	渋谷 哲朗 (東京大学医科学研究所)



## 化学研究所共同利用・共同研究拠点 H25 年度採択研究課題（応募98件中、76件採択）

課題番号	研究代表者 氏名	研究代表者所属	共同研究者 氏名	研究の型 分野*	選択 分野*	課題名
2013- 1	加藤 義章	光産業創成大学院大学		阪部 周二	1	レーザー加速器を用いたリチウム電池の診断
2013- 2	老川 典夫	関西大学 化学生命工学部	畠 安雄	分野選択型	1	X線構造解析によるレゾルシーノールヒドロキシラーゼの反応機構研究
2013- 3	早野 仁司	高エネルギー加速器研究機構 加速器研究施設	岩下 芳久	分野選択型	1	ILC推進に向けた将来加速器技術開発
2013- 4	北口 雅哉	名古屋大学 理学研究科	岩下 芳久	分野選択型	1	中性子基礎物理実験のためのデバイス開発
2013- 5	前多 雄一	金沢大学 工学研究域	年光 昭夫	分野選択型	2	蛍光性有機ケイ素化合物の開発と発光機構の解明
2013- 6	村井 利昭	岐阜大学 工学部	年光 昭夫	分野選択型	2	ビナフチルセレーリン酸系を基盤とするキラル分子識別法・合成法の開発
2013- 7	千木 昌人	金沢大学 工程工学研究域	年光 昭夫	分野選択型	2	カルコゲン多量結合の高いジョンソン性を機構とする新規複素環化物の合成
2013- 8	東 正樹	東京工業大学 応用セラミックス研究所	島川祐一	分野選択型	2	ペロブスカイト BiNbO <sub>3</sub> をベースとした負の熱膨張を持つ材料の開発
2013- 9	家裕造	大阪大学 産業科学研究所	村田 靖次郎	分野選択型	2	新規ドナー半導体と新規フーラン誘導体から構成されるバレイヘテロ接合有機太陽電池
2013- 10	伊藤 繁和	東京工業大学 大学院 工学研究科	小澤 文幸	分野選択型	2	シリル基導引物質を付与した底配位ホスフィンを利用した新規鉄触媒の開発
2013- 11	岡崎 雄明	弘前大学 大学院 工程工学研究科	小澤 文幸	分野選択型	2	四鍶上に配位したエチニルカルボチオノのルイス酸としての反応性
2013- 12	灰野 岳晴	広島大学 大学院 工学研究科	山子 茂	分野選択型	2	分子認識によるフーラン配位構造の構築
2013- 13	鈴木 敏泰	自然科学研究機構 分子科学研究所	山子 茂	分野選択型	2	環境 II 半導分子の合成と物性
2013- 14	深津 晋	東京大学 大学院 総合文化研究科	太野恒健	分野選択型	2	IV族半導体ナノ構造におけるスピンドライナミクスの研究
2013- 15	高橋 和	大阪府立大学 21世紀科学研究機構	金光 義彦	分野選択型	2	シリコンフォトニック結晶の光ダイナミクスについての研究
2013- 16	折田 明浩	岡山理科大学 工学部 ハイオ応用化学科	中村 正治	鉄触媒カッティング反応による糖アセチル化物の効率化と別歯応答性蛍光機能の探索	2	鉄触媒カッティング反応による糖アセチル化物の効率化と別歯応答性蛍光機能の探索
2013- 17	永島 英夫	九州大学 先導物質化学研究所	中村 正治	分野選択型	2	溶渡エックス線分光法を用いる鉄触媒炭素—炭素結合生成反応の反応機構解析
2013- 18	渡辺 隆司	京都大学生存圈研究所	中村 正治	分野選択型	2	ルテニウム錯体結合アミノ酸およびペプチドの合成と木質由来バイオマス類の酸化分解への応用
2013- 19	志賀元記	豊橋技術科学大学 大学院 工学研究科	馬見冢 石拓	分野選択型	3	ペソナルライズド医療のための生物データの同時クラスタ解析法の開発
2013- 20	中村 駿洋	北海道大学 大学院 情報科学研究	馬見塗 拓	分野選択型	3	ゲノム配列における頻出類似領域の検出
2013- 21	ホセナチャエル	東邦大学 理学部	阿久津 達也	複数二部ネットワークの解析と制御	3	複数二部ネットワークの解析と制御
2013- 22	丸山 勲	九州大学 マス・ファインダストリ研究所	阿久津 達也	分野選択型	3	確率的手法に基づくタンパク質相互作用ネットワーク解析
2013- 23	高見 英人	海洋研究開発機構 海洋・極限環境生物学研究部門	五斗 進	分野選択型	3	ゲノム、メタゲノムの機能評価システムの開発とその応用
2013- 24	山田 拓司	東京工業大学 生命理工学研究科	五斗 進	分野選択型	3	ヒト腸内細菌叢代謝経路データベースの構築
2013- 25	谷 敏太	大阪教育大学 教育学部	辻井 敬亘	分野選択型	4	カレバソロファンを有するボリマー体の合成、構造とその電子物性
2013- 26	吉川 千晶	物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクtonikス研究拠点	辻井 敬亘	分野選択型	4	濃厚ボリマープラシ付与ファイバーと細胞との相互作用に関する研究
2013- 27	伊福 伸介	鳥取大学 大学院 工学研究科	辻井 敬亘	分野選択型	4	精密重合法を用いたチチナノノファイバーフラッシュの合成とその電子物性
2013- 28	菅誠治	岡山大学 大学院 自然科学研究科	村田 靖次郎	分野選択型	4	新たな三次元構造計画 TT 電子系骨格を基盤とする電子材料の創製
2013- 29	木越 英夫	筑波大学 数理物質系大学院 数理物質科学研究科	上杉 志成	分野選択型	4	海洋天然物アブリニンAの作用機構解明
2013- 30	石原 美玲	防衛医科大学校 医用工学講座	寺西 利治	分野選択型	4	機能性金属ナノ粒子を用いた新規光音響造影剤の合成
2013- 31	林 良雄	東京薬科大学 薬学部	二木 史朗	分野選択型	4	新規自己分解型ペプチドリソースの開発
2013- 32	小暮 健太朗	京都薬科大学 薬学部	二木 史朗	分野選択型	4	新規エンドソーム脱出ペプチドの開発
2013- 33	瀬川 理	大阪大学 大学院 生命ナノシステム科学研究科	松宮 由実	分野選択型	5	A型高分子絡み合い系の力学および構造解明
2013- 34	池口 清志	横浜市立大学 大学院 生命ナノシステム科学研究科	松林 伸幸	分野選択型	5	F1モーターナノバク質の機能発現における水の役割
2013- 35	園山 正史	群馬大学 大学院 工学研究科	長谷川 健	分野選択型	5	ツケ素リソソム質および脂肪酸の单分子膜の構造解析
2013- 36	勝本 之晶	広島大学 大学院 生命ナノシステム科学研究科	長谷川 健	分野選択型	5	立体制御したアクリラミド系高分子導管の分子およびタンパク質吸着の解析
2013- 37	吉田 久美	名古屋大学 大学院 情報科学研究科	村田 靖次郎	分野選択型	5	分子設計して開発したアントシアニン誘導体を用いる高効率カラフルな色素増感太陽電池の創製
2013- 38	中口 譲	近畿大学 工学部	宗林 由樹	分野選択型	5	日本海における生体活性微量元素金属の粒直断面図の作成

2013- 39	向井 浩	京都教育大学 教育学部 産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門	宗林 由樹	分野選択型	5	新規多座配位子を用いた液体抽出系における金属イオンの抽出挙動の調査
-2013- 40	都築 誠二	佐藤 直樹	佐藤 直樹	分野選択型	5	新規多座配位子を用いた液体抽出系における金属イオンの抽出挙動の調査
-2013- 41	松葉 豪	山形大学大学院 工学研究科	金谷 利治	分野選択型	5	有機化合物中の分子間・ハロゲン原子・カルコゲン原子接触の研究
-2013- 42	河井 寛彦	群馬大学大学院 工学研究科	金谷 利治	分野選択型	5	ポリ尿素の結晶成長プロセスの解説
-2013- 43	佐藤 英世	山形大学医学部	平竹 潤	課題提案型	5	ポリ乳酸／ナノファイバーコンポジットの結晶構造に関する研究
-2013- 44	高橋 達太	東京大学生物研究室	菅 大介	課題提案型	5	シスチン／グルタミン酸アントボーターエンzyme-GGTの阻害による新規抗酸化ストレス応答誘導物質の開発
-2013- 45	高野 敦志	名古屋大学大学院 工学研究科	渡辺 泰	課題提案型	5	電荷秩序状態を示すペロスカイト鉄化合物における焦電性的探索
-2013- 46	佐伯 昭記	大阪大学大学院 工学研究科	岩宮 淳志	課題提案型	5	新規オマツヤクシ型高分子の絡み合い緩和
-2013- 47	石橋 正己	千葉大学薬学研究院	川端 猛夫	課題提案型	5	マイクロ波伝導法を駆使したマテリアルデザインに基づく有機光電変換材料の開発
-2013- 48	倉持 幸司	京都府立大学大学院 生命環境科学研究科	川端 猛夫	課題提案型	5	不斉4置換炭素含有複素環化合物ライフラリーの構築と生理活性物質の検索
-2013- 49	富永 さみ	宮崎大学IR推進機構	青山 卓史	課題提案型	5	植物表皮細胞の分化における制御機構の研究
-2013- 50	Jong-Myong Kim	理化学研究所 植物科学研究中心	青山 卓史	課題提案型	5	サイトカininによる細胞治癒の促進
-2013- 51	西川 元也	京都大学大学院 畜学研究科	上杉 志成	課題提案型	5	合致細胞接着分子を利用した多能細胞命运化による新規分子合成法の開発
-2013- 52	神原 黃樹	筑波大学大学院 数理物質科学研究中心	小澤 文幸	課題提案型	5	直接的アーチル反応を用いる効率的な共役系高分子合成法の開発
-2013- 53	田中 雄章	名古屋工業大学 電気電子工学科	小野 錦男	課題提案型	5	原子層制御蒸着法で作製したハイドロゲン化金(Co <sub>2</sub> MnSn)を強磁性電子遷移とする磁気トンネル接合素子によるトネル磁気抵抗効果と局所磁性に関する研究
-2013- 54	長浜 大郎	北海道大学工学研究院 物質化学部門	小野 錦男	課題提案型	5	フェリ磁性スビネル超薄膜の優位相協会の制御
-2013- 55	尾上 順	東京工業大学 原子炉工学研究所	寺西 利治	課題提案型	5	1 nm凹凸周期構造を利用したナノ粒子の規則配列化と新奇光電子物性発現
-2013- 56	本間 謙輔	広島大学大学院 理学研究科	阪部 周二	課題提案型	5	真空内光波混合の検知へ向けた測定手法の開発
-2013- 57	長島 健	大阪大学 レーザー工学ギャラリーアーク研究センター	橋田 昌樹	課題提案型	5	高輝度テラヘルツ波放射による非線形相互作用物理の探索
-2013- 58	八木原 晋	東海大学 理学部	浅見 耕司	課題提案型	5	広帯域誘電分光と他の観測手法による生体水構造の相補的解析
-2013- 59	三原 久明	立命館大学 生命科学部	栗原 達夫	課題提案型	5	キララミニカル化合物の酵素的生産法の開発
-2013- 60	倉田 淳志	近畿大学 レーザー工学ギャラリーアーク研究センター	栗原 達夫	課題提案型	5	細菌の金属代謝に關するタンパク質の同定と機能解析
-2013- 61	中瀬 生彦	大阪府立大学 ナノ科学・材料研究センター	二木 史朗	課題提案型	5	細胞内への薬物取り込みを制御可能な人工受容体・リガンドシステムの構築
-2013- 62	柳田 健之	九州工業大学 若手研究者フロンティア研究アカデミー	正井 博和	課題提案型	5	酸化物ガラスシンチレーターの開発
-2013- 63	小野 真治	福島県農業総合センター 作物園芸部脂脳作科	巖田 陽明	課題提案型	5	固体NMRを用いたセシウムの土壌への吸着の解明
-2013- 64	三部 鮎	近畿大学 レーザー加速度器研究機 極電子原子核研究所	岩下 耕久	課題提案型	5	蛋白質の構造と機能の合成と構造解析
-2013- 65	藤原 尚	北里大学 理学部	时任 宣博	施設・機器利用型	5	有機古典元素保謹金属ナノ粒子の合成と構造解析
-2013- 66	箕浦 真生	近畿大学 生命科学部	时任 宣博	施設・機器利用型	5	色調可変有機セレノニウム塩の合成と構造
-2013- 67	橋爪 大輔	理化研究所 物質評価チーム	时任 宣博	施設・機器利用型	5	ミュー・オ・ン・0-2EDDM 緩密測定に關する開発研究
-2013- 68	長洞 記嘉	福岡大学 理学部	笹森 貴裕	施設・機器利用型	5	小鼠環骨格を有する高周期典型元素化合物の合成と物性の解明
-2013- 69	斎藤 雄一	埼玉大学 工学研究科	时任 宣博	施設・機器利用型	5	新規リソウ番族化合物の合成と物性の解明
-2013- 70	高橋 雅英	大阪府立大学大学院 工学研究科	桝 弘典	施設・機器利用型	5	ヘテロ元素を骨格に含む新しい芳香族化合物の物理化学的性質の解明
-2013- 71	佐藤 敏文	北海道大学大学院 工学研究院	桝 弘典	施設・機器利用型	5	多核NMRによる交互共重合型無機系オリゴマー分子の解折および分子形制御手法の開発
-2013- 72	高城 大輔	大阪大学大学院 理学研究科	倉田 博基	施設・機器利用型	5	太陽電池用シリコンの構造と機能
-2013- 73	宮本 光貴	島根大学 総合理工学部	倉田 博基	施設・機器利用型	5	ハレスインジェクション法を用いてグラファイト表面に吸着させた超分子メタロボリマーのAFMによる観察
-2013- 74	河合 武司	東京理科大学 工学部	倉田 博基	施設・機器利用型	5	Si中のヘリウム・バルブのナノ電子分光学的研究
-2013- 75	水牧 仁一郎	高麗度光科学研究センター 利用研究促進部門	島川 祐一	連携・融合促進型	5	放射光線を用いた遷移金属触物の電子状態と局所構造
-2013- 76	高橋 良彰	九州大学 先導物質化研究室	渡辺 泰	連携・融合促進型	5	東アジア圏の若手レオロジストのための第9回ワークショウ

選択分野: 1. ビーム科学分野、2. 元素科学分野、3. ハイオ情報学分野、4. 物質合成分野、5. 現象解析分野



