微生物生産ポリマー材料のフォトンアップコンバージョン機能化技術の開発

学校法人片柳学園東京工科大学　工学部*
入谷　康平

共同研究者
学校法人片柳学園東京工科大学　応用生物学部
後藤　早希

1．はじめに

自然エネルギーのうち太陽光を利用する技術は、太陽光発電や光触媒による水素ガスの生成などすでに多方面で研究開発が進んでいる。しかし利用できる波長領域には限界があり、エネルギーの低い長波長光の多くが無駄になっていることが課題である。この解決方法として、低エネルギー光を高エネルギー光に変換するフォトンアップコンバージョン (UC) 機能がある[1]。これを利用することで、太陽光に含まれるより広い波長領域をエネルギー資源として有効利用できると期待されている。また近年では、フレキシブル太陽光パネルなどの柔軟な有機薄膜材料が求められている。そのため、軽量でフレキシブルなフィルム材料に UC 機能を与え、フィルムを通すことで、エネルギー利用できる波長領域を拡大する材料を創出できれば非常に有意義である。このような材料を作製するためには、ポリマー材料中に UC 機能をもつ部位を精密に配置する技術が必要である。しかし、UC 機能性分子の物理的混合では、分子の凝集により発光効率が低下すること、ポリマー分子に化学結合により導入する場合は、モノマーの分子構造が複雑化し反応経路が多段階になることなどの課題が挙げられる(図 1a)。そのため、効率的に機能性材料を創出することは困難である。

一方、材料創出の観点では、石油由来ポリマーの代替として、糖や油を原料としてオールバ

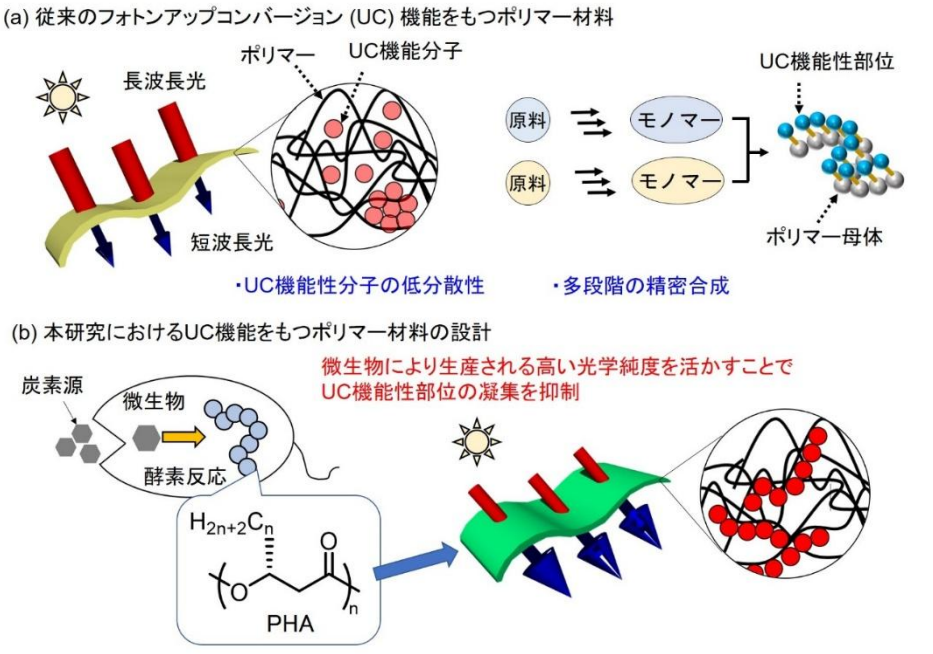

図1. (a) 従来のフォトンアップコンバージョン材料の課題点、(b) 本研究の概略。微生物内の酵素反応により得られるPHAを利用した高効率フォトンアップコンバージョン材料の創出。

イオプロセスでの生産が 2000 年代に確立されているポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) が知られている [2]。PHA は、異なる様々なアルキル鎖長のモノマーユニットをもつポリマーの総称であり、モノマーユニットの化学構造とその組成比が異なる 150 種類以上の PHA が報告されている。さらには母体に官能基を付与した PHA の合成例も報告され、物性のさらなる多様化が期待されている [3,4]。

本研究では、微生物の酵素重合により生産される PHA を主体として、その特異的な構造に基づく機能性分子の精密配置を実現し、UC 機能をもつフレキシブル材料の創出を志向した基盤技術の開発を本研究の目的とする (図 1b)。これは、エネルギーおよび材料創出の両面から脱石油化を志向した、バイオマス材料の新たな応用展開として画期的な研究である。

2. 研究の方針と分子設計

本研究では、三重項-三重項消滅 (TTA) 機構に基づくフォトンアップコンバージョンを利用する (図 2)[5,6]。ドナー分子は低エネルギー光照射により一重項励起された後、項間交差によって三重項励起状態となる。その後、ドナー分子とアクセプター分子間の三重項-三重項エネルギー移動 (TTET) によりアクセプターが三重項励起状態となり、続いて、隣接するアクセプター間でのTTETが起こる。この過程において三重項励起状態にある2つのアクセプター分子同士が衝突すると、エネルギーを得た片方の分子が一重項励起状態になり、蛍光を発する。このとき発する光は、最初にドナーが吸収した光よりも高エネルギーとなり、結果として、低エネルギー光を高エネルギー光に変換することができる。

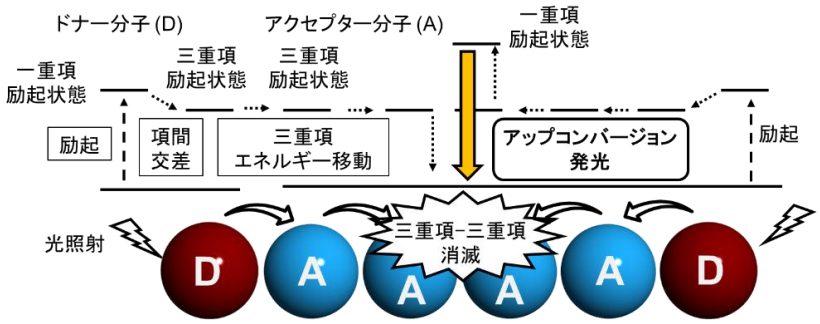

図2. 三重項-三重項消滅機構に基づくフォトンアップコンバージョン機能における
エネルギー移動の概略。

効率的なエネルギー移動のために、ポリマー主鎖にアクセプター部位を化学結合により導入する必要がある。そのため、微生物体内の重合酵素により*R*体の反応選択性を示す光学純度が極めて高いPHAが利用できると考えた。この方法では、遺伝子組換え操作をすることなく、炭素源であるカルボン酸の化学構造や生産菌、温度などの培養条件などを最適化することで、種々の反応性部位をもつオーダーメイドのPHAを合成できるメリットがある (図3)。

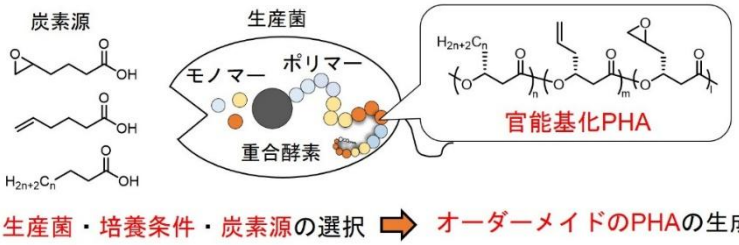

図3. 様々な脂肪族を炭素源とした生産菌内での酵素反応によるPHAの合成。

PHAにフォトンアップコンバージョン機能を付与するために、アクセプターとしてアントラセン誘導体を含むメタクリルモノマー4を合成し(図4a)、続いてラジカル開始剤存在下においてビニル基をもつPHA-vinylと反応することで、アントラセン誘導体をもつPHA-antを合成する計画とした (図4b)。また、ドナー分子は図4cに示すテトラエチレン白金ポルフィリンPt-Porを用いる。ポリマーとドナー分子を混合し、フィルム化した後に、分光器によりアップコンバージョン機能を評価することとした。

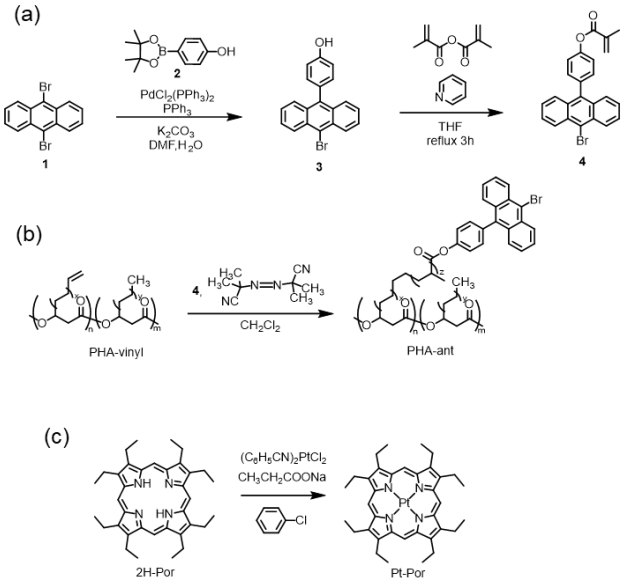

図4. アントラセンを含むメタクリル酸モノマー4 (a), アントラセン部位を含むPHA-ant (b), およびドナー分子Pt-Por (c)の合成経路。

3. ビニル基含有 PHA の合成

PHA-vinyl を生産するため、PHA 生産菌の *Pseudomonas putida* KT2440 を利用した。炭素源としてオクタン酸ナトリウム（2 g/L）を培養開始時に培地に添加した。さらに、ウンデシレン酸を添加しない条件と、培養開始後 0 時間または 24 時間後に 7.5 mmol/L のウンデシレン酸を添加する条件を設定し、72 時間の培養を行った。培養後、集菌して凍結乾燥し、メタノリシス化による前処理を行ったのち、GC/MS 分析により、生産された PHA のモノマー組成を確認した。その結果、オクタン酸ナトリウムのみの場合では、3-ヒドロキシオクタン酸および 3-ヒドロキシデカン酸からなる PHA を生産した（図 5a)。一方、オクタン酸ナトリウムとウンデシレン酸を添加した条件において、中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸由来のピークに加えて、保持時間 16 分付近と 20 分付近にピークが確認された（図 5b)。クロロホルム中で微生物細胞から PHA を抽出し、上澄み液をメタノール中に滴下し、再沈殿により PHA を回収した。回収した PHA の ^{1}H-NMR 測定を行った結果、ウンデシレン酸を添加した場合、得られたポリマーにおいて、5.8 ppm 付近と 4.9 ppm 付近に、積分比が 1 : 2 となるシグナルが観測された (図 6)。これらはビニル基のプロトン由来のシグナルであると考えられるため、PHA-vinyl が得られたことが示唆された。側鎖が付加した炭素とビニル基のプロトンの積分比は、1 : 0.39 であっ

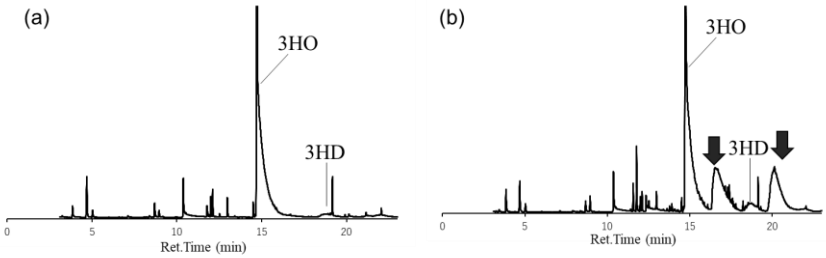

図5. オクタン酸ナトリウムのみ（a）およびオクタン酸ナトリウムとウンデセン酸（b）を炭素源として生産されたPHAのクロマトグラム。

たことから、ビニル基の導入率は 39%であることが分かった。さらに、ウンデシレン酸を 24 時間後に添加した場合、ビニル基の導入率は 58%となり、培養中に添加しすると官能基導入率が向上することを見出した。

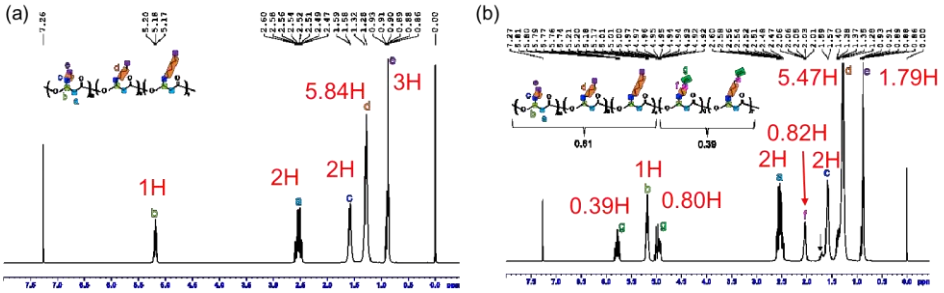

図6. オクタン酸ナトリウムのみ(a)およびオクタン酸ナトリウムとウンデセン酸(b)を炭素源として生産されたPHAの^{1}H NMRスペクトル($CDCl_3$, 298 K)。

4. アクセプターおよびドナー分子の合成

アントラセン部位を含むアクセプターユニットの合成を行った。まず、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロリド、炭酸カリウム存在下における鈴木宮浦カップリング反応により、原料の化合物 **1** にボロン酸エステル **2** を作用することで、化合物 **3** を収率 27%で得た。図 7 に化合物 **3** の ^{1}H NMR を示す。芳香族領域に、6 種類のシグナルが観測された。それぞれの積分比はすべて 2 であったことから、これらのシグナルはアントラセン部位およびフェニレン基に付加したプロトンに相当すると考えられる。また、5 ppm に芳香族領域のシグナルに対して積分比 1 となるシングレットのシグナルが観測された。これはフェノール部位のヒドロキシ基のプロトンに相当すると考えられる。さらに、CH_2Cl_2 溶媒中における化合物 **3** の吸収スペクトルを測定したところ、330 nm から 420 nm 付近にアントラセン特有の吸収が観測された(図 8)。続いて、ピリジン存在下で**3**にメタクリル酸無水物を作用するこ

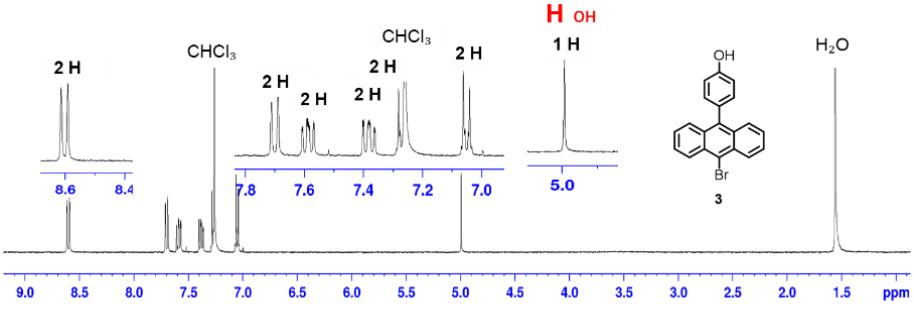

図7. アントラセン誘導体3の^{1}H NMRスペクトル($CDCl_3$, 298 K)。

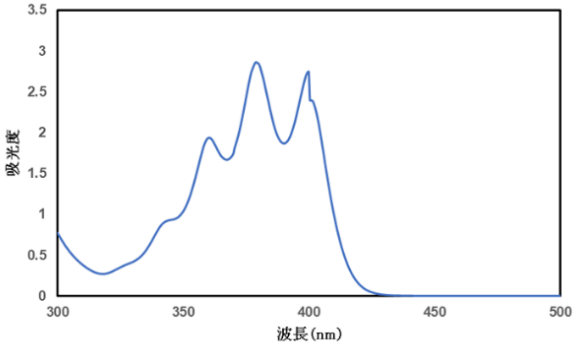

図8. 化合物3の紫外可視吸収スペクトル(CH_2Cl_2, 1.9×10^{-4} M)。

とにより、アントラセン部位を含むメタクリルモノマー**4**を収率43%で合成した。化合物**3**と^{1}H NMRを比較すると（図9)、アントラセンに付加したフェニレン基のプロトンのシグナルがシフトし、また、メタクリル部位のビニル基およびメチル基に相当するシグナルがそれぞれ2H（1H＋1H）および3Hで観測され、メタクリルモノマーが得られたことが示唆された。

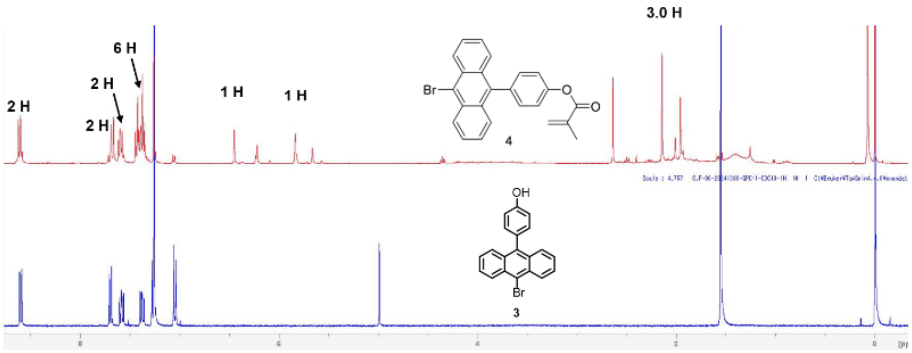

図9. 化合物3と4の ^{1}H NMRスペクトル（$CDCl_3$, 298 K）の比較。

次にアクセプター分子の合成を行った。オクタエチルポルフィリン2H-Porに、プロピオン酸ナトリウム存在下、クロロベンゼン中においてビス(ベンゾニトリル)白金(II)ジクロリドを作用させることで、オクタエチル白金ポルフィリンPt-Porを収率74%で合成した。得られたPt-Porの紫外可視、蛍光（励起波長 382 nm)、および励起（検出波長 644 nm）スペクトルを図 10 に示す。吸収スペクトルでは、382 nmと536 nmに極大をもつ、ソーレ―帯とQ帯に相当するピークがそれぞれ観測された。励起スペクトルは、吸収スペクトルと同様のものが得られた。また、蛍光スペクトルでは644 nmに極大をもつピークが観測された。

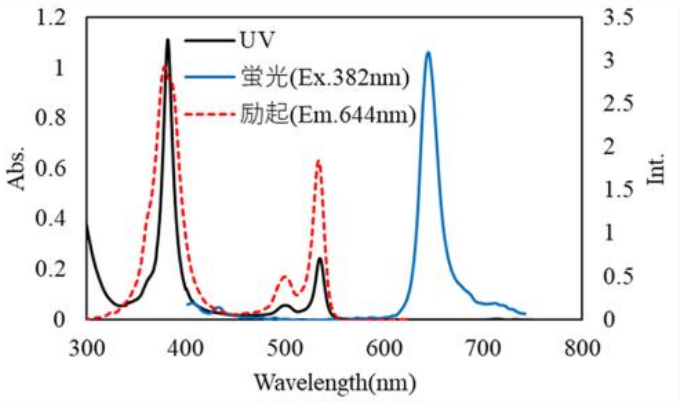

図10. Pt-Porの紫外可視吸収、発光、および励起スペクトル(トルエン, 1.4×10^{-5} M)。

5. ポリマーの官能基化および光学特性評価

ラジカル重合開始剤として、2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)を添加し、PHA-vinyl に化合物 4 を重合し、PHA-ant を黄色いゴム状の物質を得た。ポリマー中のアントラセン部位に対して 0.73 mol%の Pt-Por をクロロホルムに溶解し、その溶液に PHA-ant を添加した。溶媒を減圧留去することにより Pt-Por を混合した PHA-ant（PHA-ant/Pt-Por）を得た。

PHA-ant/Pt-Por をホットプレス機により、150 ºC、15 MPa で加熱圧縮した。紫外可視吸収スペクトル測定により、380 nm 付近にアントラセン由来の吸収が、また 530 nm 付近に白金ポルフィリン由来の吸収が観測された。また蛍光スペクトル測定により、励起光を 380 nm とすると

460 nm 付近にアントラセン由来の発光が観測され、530 nm で励起すると 610 nm 付近に白金ポルフィリン由来の発光が観測された。これらを踏まえて、アップコンバージョン発光の測定を行った（図 11）。図 11 の赤色点線は、PHA-ant/Pt-Por 混合物を 380 nm で励起した蛍光スペクトルで、450 nm から 490 nm 付近で幅広いピークが観測された。これはアントラセン部位の通常の発光に相当する蛍光である。それに対して、PHA-ant/Pt-Por 混合物を 530 nm で励起した場合においても同様に 450 nm から 490 nm 付近に発光が観測された（赤色実線）。白金ポルフィリンを添加していない PHA-ant のみの場合では、380 nm で励起した際にアントラセンに由来する通常の発光は観測されたものの（青色点線）、530 nm で励起した場合では、青色実線の通り発光はまったく検出されなかった。以上より、PHA-ant/Pt-Por 混合物を 530 nm で励起した場合に観測された発光は、アントラセン/白金ポルフィリン誘導体のアップコンバージョン機能に起因することが示唆された。

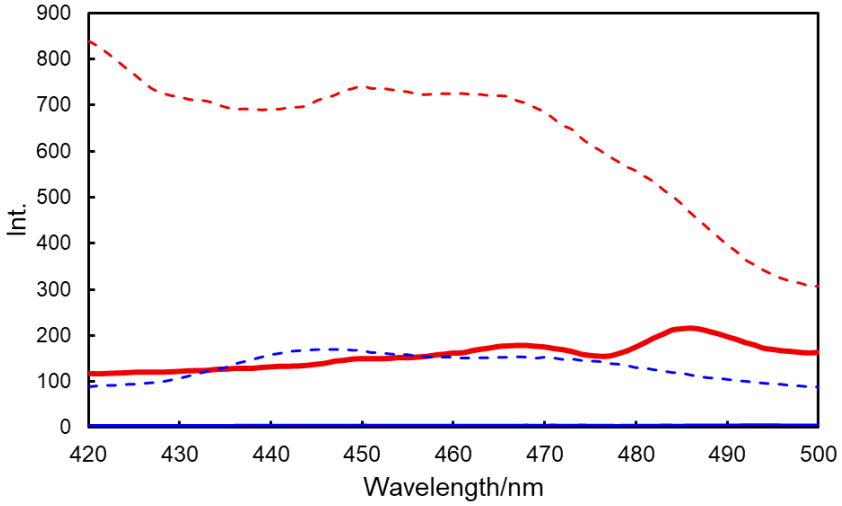

図11. PHA-ant/Pt-Por混合物を530 nmで励起した蛍光スペクトル（赤実線）、PHA-ant/Pt-Por混合物を380 nmで励起した蛍光スペクトル（赤点線）、PHA-antを530 nmで励起した蛍光スペクトル（青実線）、およびPHA-antを380 nmで励起した蛍光スペクトル（青点線）。

6. まとめ

本研究では、微生物が生産するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）の光機能化を目的として、PHA の官能基化および光機能性部位を導入した PHA の光学特性評価を行った。まず微生物によるビニル基含有 PHA 生産において、ビニル基ユニットの炭素源としてウンデシレン酸を添加する時間により、官能基導入率を制御できることを見出した。さらに、得られたビニル基含有 PHA に、アントラセン部位を化学的に導入し、そのポリマーに白金ポルフィリン誘導体を混合すると、フォトンアップコンバージョンが観測されたことを明らかにした。本研究を通じて PHA の光機能化が実現可能であることを示した。この研究は、導入する官能基を変えるだけで、PHA に対して様々な高付加価値化の実現可能性を見出したものであり、環境にやさしい高機能材料開発の足がかりとなる。

謝辞

本研究は（公益財団法人）天野工業技術研究所、2024 年研究助成を受けて実施されました。

参考文献

1) Jankus, V.; Snedden, E. W.; Bright, D. W.; Whittle, V. L.; Williams, J. A. G.; Monkman, A. "Energy Upconversion via Triplet Fusion in Super Yellow PPV Films Doped with PalladiumTetraphenyltetrabenzoporphyrin: a Comprehensive Investigation of Exciton Dynamics", *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 384–393.

2) Matsusaki, H.; Abe, H.; Doi, Y. "Biosynthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by Recombinant Strains of *Pseudomonas* sp. 61-3" *Biomacromol.*, **2000**, *1*, 17–22.

3) Bear, M. M.; Leboucher-Durand, M. A.; Langlois, V.; Lenz, R. W.; Goodwin, S.; Guérin, P. "Bacterial poly-3-hydroxyalkenoates with epoxy groups in the side chains", *React. Funct. Polym.* 1997, 34, 65–77.

4) Yu, L.-P.; Yan, X.; Zhang, X.; Chen, X.-B.; Wu, Q.; Jiang, X.-R.; Chen, G.-Q. "Biosynthesis of functional polyhydroxyalkanoates by engineered *Halomonas bluephagenesis*", *Metabolic Eng.* **2020**, *59*, 119–130.

5) Kouno, H.; Ogawa, T.; Amemori, S.; Mahato, P.; Yanai, N.; Kimizuka, N. "Triplet energy migration-based photon upconversion by amphiphilic molecular assemblies in aerated water", *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5224–5229.

6) Qu, Z.; Duan, P.; Zhou, J.; Wang, Y.; Liu, M. "Photon upconversion in organic nanoparticles and subsequent amplification by plasmonic silver nanowires", *Nanoscale*, **2018**, *10*, 985–991.