

# 超高効率海水淡水化を志向したフッ素化ナノチューブの固相合成法開拓

佐藤 浩平

関西学院大学理学部化学科

## 概要

2015年の国連サミットで採択された『持続可能な開発目標(SDGs)』の一つに、安全な水の確保に向けた技術開発が取り上げられた。これは、近年の発展途上国における人口の爆発的増加と、経済発展に伴う生活様式の劇的な変化により、飲用水の需要が世界規模で急激に高まっているためである。現在では、地球上のおよそ40億もの人々が深刻な飲用水不足に直面しているとされ、この状況は今後さらに悪化すると予想されている。この問題を解決するべく、海水を精製して飲用水に変える技術(海水淡水化技術)が盛んに研究されているが、現在の海水淡水化効率は、世界的な飲用水不足問題を解決するには到底及ばず、水を選択的かつ高速でろ過するための革新的技術の開発が強く望まれている。

これに対して本研究者は、フライパン表面のポリテトラフルオロエチレンと呼ばれる、フッ素原子を多く含んだ高分子化合物が極めて高い撥水性を示す様子から着想を得て、内壁がフッ素原子で密に覆われた人工チャネルである『フッ素化ナノチューブ』を開発することができれば、水がその内部を滑るように高速で透過するのではないかと考えた。そして、内部がフッ素原子で密に覆われた大環状フッ素化ナノリングの一次元状自己集合化によって得られるフッ素化ナノチューブが、天然の水チャネルタンパク質であるアクアポリンの実に4500倍にも上る水透過能を示し、一方で塩を全く通さないという、驚愕の性質を明らかにした。

一方で、その合成単離収率はわずか0.0055%という、目も当てられない数字であったために、フッ素化ナノチューブの大量生産は現時点では非現実的であると言わざるを得ない。そこで本研究では、フッ素化ナノチューブの高効率合成を目指すべく、ペプチド固相合成法に基づいた合成手法を新たに開拓した。

ペプチド固相合成法によるフッ素化ナノチューブの構築を実現するために、本研究者は天然の両親媒性らせん状ペプチドの構造に着目し、そのアミノ酸残基のいくつかをフッ素原子を含んだ人工アミノ酸で置き換えることとした。そして、Fmoc基で保護された各種アミノ酸を原料とし、固相担体上における脱保護とカップリング反応を繰り返すことで目的の分子を合成することに成功した。合計47の工程を経た最終的な単離収率は2%であり、これは従来法の実に364倍の値であった。

## 1. 研究目的

2015年の国連サミットで採択された『持続可能な開発目標(SDGs)』の一つに、安全な水の確保に向けた技術開発が取り上げられた。これは、近年の発展途上国における人口の爆発的増加と、経済発展に伴う生活様式の劇的な変化により、飲用水の需要が世界規模で急激に高まっているためである。現在では、地球上のおよそ40億もの人々が深刻な飲用水不足に直面しているとされ、この

状況は今後さらに悪化すると予想されている<sup>(1)</sup>。この問題を解決するべく、海水を精製して飲用水に変える技術(海水淡水化技術)が盛んに研究されている。歴史的には、海水を蒸留(加熱して水を蒸発させた後、再度冷却)して飲用水を得る方式が主流であったが、エネルギー効率が悪いという致命的な問題を抱えていた。そこで近年では、芳香族ポリアミドや酢酸セルロースからなる細かい網目状の膜に対して、海水を押し込むことで水を選択的にろ過

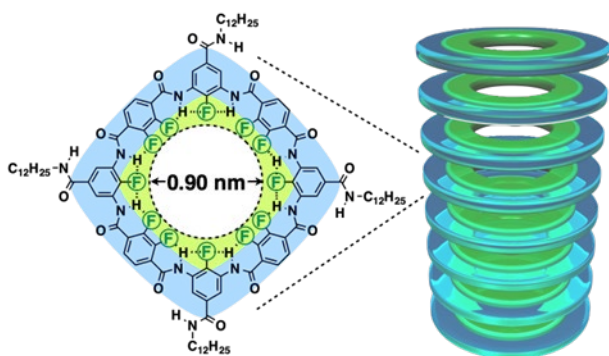
する『逆浸透膜方式』が、海水淡水化プラントで多く採用されるようになった<sup>(2)</sup>。しかし、現在の海水淡水化効率は、世界的な飲用水不足問題を解決するには到底及ばず、水を選択的かつ高速でろ過するための革新的技術の開発が強く望まれている。

一方で我々の体内に目を向けてみると、アクアポリンと呼ばれるタンパク質が、このような水の精製をいとも容易く実現していることが見て取れる。アクアポリンは、直径 0.3 nm 程度の細孔を有するチャネルタンパク質であり、細胞膜を介した水透過を担っている。特筆すべきことに、アクアポリンは毎秒  $10^9$  個にも及ぶ水分子の高速透過を実現する一方で、塩などの不純物は全く通さない<sup>(3)</sup>。そのため、アクアポリンは腎臓の上皮細胞などの表面に豊富に存在しており、体内の老廃物を『濾す』ことで、生命の維持に欠かせない役割を果たしている。このようなアクアポリンの優れた機能に触発され、アクアポリンの構造を模倣した様々な人工チャネルが開発されてきた<sup>(4)</sup>。しかし現在に至るまで、アクアポリンの性能を大きく超えるような人工チャネルの開発には至っていない。

これに対して本研究者は、アクアポリンの性能をも上回る、革新的人工チャネルの開発に挑んでいる。そこで注目したのが、我々の日常生活に馴染み深い、フライパンの性質である。フライパンの表面は、ポリテトラフルオロエチレンと呼ばれる、フッ素原子を多く含んだ高分子化合物によって覆われており、極めて高い撥水性を示すことが知られている。そこで、フライパンの表面と同様に、内壁がフッ素原子で密に覆われた人工チャネルである『フッ素化ナノチューブ』を開発することができれば、水がその内部を滑るように高速で透過するのではないかと考えた。そして現在までに、生体膜の内部で自発的に集合化する種々の人工チャネルを開発してきた<sup>(5, 6)</sup>。中でも特に、**Fig. 1** に示す大環状フッ素化ナノリングは、一次元状に自己集合することでフッ素化ナノチューブを形成する<sup>(7)</sup>。そして、得られたナノチューブを生体膜に埋め込み、ストップフロー装置を用いた蛍光測定により水透過速度を計測したところ、その速度は上述のアクアポリンの実に 4500 倍にも上り、一方で塩を全く通さないという、驚愕の性質が明らかとなった。分子動力学法によるシミュレーションの結果、フッ素化ナノチューブの内壁表面では水分子間に働く水素結合が切断されるために、水分子の塊

(クラスター)がチューブ内部で崩壊する様子が示唆された。その結果、チューブ内壁表面と水分子との間の摩擦が劇的に低減され、超高速水透過が実現したと考えられる。また、密度汎関数理論計算の結果、フッ素原子の導入に伴ってチューブ内壁が負に帯電していることが明らかとなった。これが塩化物イオン(Cl<sup>-</sup>)に対してバリアのように作用することで、超高速水透過を実現しつつも塩を通さないという性質が発現したと考えられる。

このように、フッ素化ナノチューブは世界を救う超高速海水淡水化技術へと展開できる可能性を秘めた、極めて魅力的な次世代材料である。一方で大環状フッ素化ナノリングは、3,5-ジアミノ-4-フルオロベンズアミド誘導体と2,3-ジフルオロテレフタル酸の2種類のモノマーユニットをペンタフルオロフェニルジフェニルホスフィナート(FDPP)を用いて縮合させることで得られるが、その単離収率はわずか 0.0055%という、目も当てられない数字であった。この反応によって得られた生成物を核磁気共鳴スペクトル測定およびサイズ排除クロマトグラフィーによって分析したところ、大環状フッ素化ナノリングとは基本構造が酷似している一方で、その分子量がナノリングを大幅に上回っている副生成物の存在が示唆された。このことから、従来の合成法ではナノリング以外にも様々な繰り返し単位数からなるオリゴマーが大量に生成していることが考えられる。また、生成したナノリングを副生成物であるオリゴマーから分離する操作にも困難が付き纏っており、実際には *N,N*-ジメチルホルムアミドを移動相として用いるサイズ排除クロマトグラフィーを約 20 周リサイクルさせて実施することでようやく単離が実現した。以上、これらの合成上の問題が大きな障害として立ちはだかっているため、フッ素化ナノチューブの大量生産は現時点では非現実的であると言わざるを得ない。そこで本研究では、フッ素化ナノチューブの高効率合成を目指すべく、ペプチド固相合成法に基づいた合成手法を新たに開拓した。

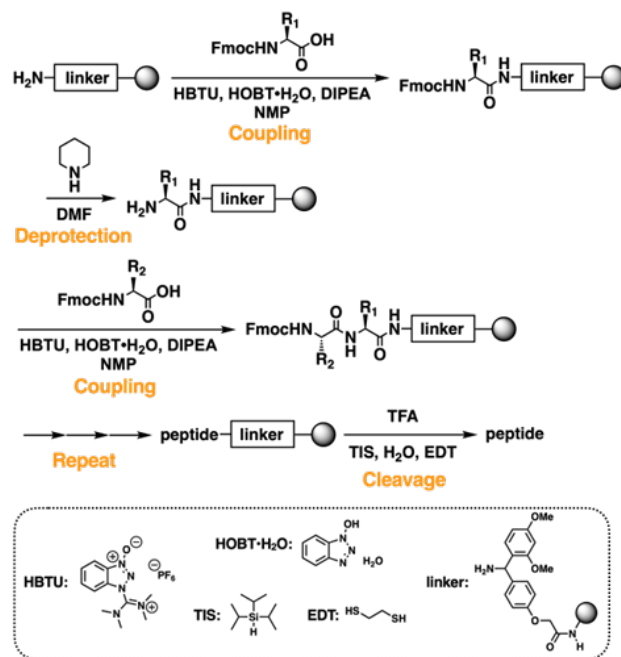


**Fig. 1** Chemical structure of a fluorinated nanoring and its one-dimensional assembly to form fluorinated nanotube.

## 2. 研究方法

### 2.1 ペプチド固相合成法

1963年に Merrifield が開発したペプチド固相合成法は、複雑なペプチド配列を精密かつ簡便に合成できる有用な手法として世界中で用いられてきた<sup>(8)</sup>。現在では、穏和な条件下での脱保護が可能である 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 基で保護されたアミノ酸を原料とするペプチド固相合成 (Fmoc 固相合成) が主流となっている<sup>(9)</sup>。樹脂表面に担持されたアミノ酸に対して、Fmoc 保護アミノ酸、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1*H*-ベンゾトリアゾリウム 3-オキシドヘキサフルオロホスファート (HBTU) などの縮合剤、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) などの塩基を加えることでペプチド鎖の伸長反応を極めて高収率 (99%以上) で行うことが可能となる。溶媒による洗浄後、ピペリジン処理により Fmoc 基が脱保護され、末端アミノ基が露出する。以上のサイクルを繰り返して、最後に酸処理を施すことで、側鎖の官能基が脱保護された目的のペプチドを得ることができる (**Fig. 2**)。合成したペプチドはジエチルエーテルを用いた再沈殿を行ったのち、シルカゲル担体にオクタデシルシリル (ODS) 基が化学結合した充填剤を用いた逆相クロマトグラフィーによって単離する。



**Fig. 2** Overview of the Fmoc solid-phase peptide synthesis performed in this study.

### 2.2 分子設計

天然には細胞膜の内部で自発的に集合し、細孔を形成するらせん状のペプチドが数多く存在する<sup>(10)</sup>。これらのペプチドは多くの場合、疎水性部位 (有機化合物との親和性が高い領域) と親水性部位 (水との親和性が高い領域) を併せ持った、「両親媒性」と呼ばれる構造的特徴を有する。そこで最近では、このようなペプチドの構造を体系化することで、細孔を形成することが可能な人工ペプチドを戦略的に設計する試み (*de novo* 設計) が盛んになされるようになった<sup>(11)</sup>。なお、これらのペプチドはいずれも先述の固相合成法によって極めて高収率で得ることができる。そこで本研究者は、これまでに報告されてきた細孔形成能を有する天然および人工ペプチドの構造を基盤に、細孔の内壁を形成する部位に配置されたアミノ酸をフッ素化したアミノ酸で置き換えることで、ペプチド固相合成法に基づいた高効率合成が可能なフッ素化ナノチューブを構築することができるのではないかと考えた。具体的には、Woolfson らによって 2021 年に報告された 30 程度のアミノ酸残基からなるらせん状ペプチドに加えて<sup>(11)</sup>、アフリカツメガエルの皮膚から単離された天然らせん状ペプチドである Magainin II の構造をもとに<sup>(12)</sup>、これらのアミノ酸の一部をフッ素化アミノ酸で置換した新規フッ素化ペプチドを設計した。

### 3. 研究結果

#### 3.1 新規フッ素化イソロイシンの合成

先述の Woolfson らによって報告されたペプチドは細孔を形成する際に複数のイソロイシン残基を内部に配向させることがすでに明らかとなっている<sup>(11)</sup>。そこで、イソロイシンの側鎖に多数のフッ素原子が導入された新規フッ素化イソロイシンを新たに合成することを試みた。まずはその前駆体として、(E)-5,5,5-トリフルオロ-2-ペンテン酸を合成するべく、塩化銅(I)の存在下メタノール溶媒中で Togni 試薬 II を用いたアリルトリフルオロメチル化を行った<sup>(13)</sup>。反応終了後、核磁気共鳴スペクトル(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F NMR)測定を行った結果、期待通りに(E)-5,5,5-トリフルオロ-2-ペンテン酸エステルが生成していることが明らかとなった。続いて、得られたエステルの加水分解を行うとともに、その酸塩化物と(S)-4-ベンジル-2-オキサゾリジノンとの反応を目指したものの<sup>(14)</sup>、期待していた目的物を得ることはできなかった。生成物を各種 NMR 測定によって解析したところ、トリフルオロメチル基の周辺で脱離反応が進行していることを示唆する結果が得られた。これはフッ素原子の導入に伴い分子が不安定化したことを意味している。

#### 3.2 ペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドの合成

先述の通り、新規フッ素化イソロイシンの合成とそれを用いた人工らせん状ペプチドの合成を実現するためには、フッ素原子の導入に伴う分子の不安定化に関する問題を解決する必要があり、それには相応の時間が必要であると考えられた。そこで代替案として、Woolfson らによって報告されたペプチドと同様の細孔形成能を有することが知られている、天然のらせん状ペプチドである Magainin II の構造に着目し、そのアミノ酸を市販のフッ素化アミノ酸によって置き換えることを考案した。Magainin II にはフェニルアラニン残基が複数含まれていることから、ここではその芳香環に 5 つのフッ素原子が導入されたペンタフルオロフェニルアラニンを導入することとした。

はじめに、ポリエチレングリコールの末端アミノ基(反応点:0.1 mmol)が Fmoc 基によって保護された Rink amide-PEG 樹脂を *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)によって一晩膨潤させた。続いて、膨潤した樹脂を、ピペリジンを 20%(v/v) 含む DMF 溶液で 10 分間処理したのち、DMF で洗浄した。この操作を 2 回ほど繰り返すことで、樹脂上

の Fmoc 基の脱保護を行った。なお、固相担体上の化学反応は一般的な薄層クロマトグラフィーによる反応追跡法を適用できないため、反応済みの樹脂を少量取り出し、ニンヒドリン反応による末端アミノ基の検出を行うことで確認した。続いて、アミノ基が Fmoc 基で保護され、側鎖のヒドロキシ基が *tert*-ブチル基によって保護されたアミノ酸を、縮合剤である HBTU とラセミ化防止剤である 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT), 塩基である DIPEA の存在下 *N*-メチル-2-ピロリドン(NMP)溶媒中で反応させることで、アミド結合の形成を試みた。反応開始から 2 時間後に反応溶液を洗い流し、さらに樹脂を DMF で 3 回ほど洗浄したのちにニンヒドリン反応を行ったところ、末端アミノ基は検出されなかった。このことから、セリン残基とのアミド結合形成反応が定量的に進行していることが示唆された。続いて、ピペリジン溶液を用いた Fmoc 基の脱保護を行ったのち、同様の反応条件を用いることでトリチル基保護されたアスパラギンとのカップリングを行った。以降、脱保護と各種保護アミノ酸を用いたカップリングを繰り返すことで、メチオニン、イソロイシン、およびグルタミン酸をカップリングさせた。

この時点で、当初の期待通りにアミノ酸が連結されていることを確認するべく、ペプチド鎖の質量分析を行った。まず、少量の樹脂をエッペンチューブへと移したのち、トリフルオロ酢酸を加えて 30 分ほど放置した。この反応により、樹脂上に担持されていたペプチドが溶液中へと移動するとともに、側鎖の保護基も全て脱保護される。次に、窒素ガスを吹き付けることでトリフルオロ酢酸を蒸発させ、そこにメタノールを加えることで、生成したペプチドを含んだメタノール溶液を作成した。この溶液をエレクトロスプレー法でイオン化した飛行時間型質量分析計(ESI-TOF Mass)によって解析したところ、固相上で反応させたアミノ酸 5 残基からなるペプチドと良い一致を示す分子イオンピークが観測されたことから、いずれの脱保護反応およびカップリング反応ともに良好に進行していたことが確認された。

続いて、脱保護とカップリングをさらに繰り返すことで、グリシン、バリンをカップリングさせた。これらのアミノ酸とのカップリングは問題なく進行したが、続くペンタフルオロフェニルアラニンとのカップリングの際に、反応の進行が不完全であることがニンヒドリン反応による末端アミノ基の検

出から示唆された。そこで、2 時間のカップリング反応後、樹脂を DMF で 3 回ほど洗浄したのちに再度同じ反応条件でカップリング反応を試みたものの、末端アミノ基は依然として検出されたままであった。これはペンタフルオロフェニルアラニンの芳香環にフッ素原子が導入されたことにより、立体的に嵩高くなったために反応点が露出しづらくなったことや、ペンタフルオロフェニルアラニン自体の疎水性が高いために樹脂上のペプチドが凝集し、反応点が露出しづらくなったことなどの理由から、カップリング反応が進行しづらくなったものと考えられる。そこで、HBTU よりも反応性が高いとされる<sup>(15)</sup>、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム 3-オキシドヘキサフルオロホスファート(HATU)を縮合剤として用いて再度ペンタフルオロフェニルアラニンのカップリング反応を行ったところ、ニンヒドリン反応で末端アミノ基の消失が確認されたことから、HATU の使用によって反応が良好に進行したことが示唆された。

続いて、アラニンとリシンのカップリングを行ったところ、今度はリシンの段階でカップリング反応の進行が芳しくない様子が観察されたため、ペンタフルオロフェニルアラニンと同様に HATU を縮合剤として用いることで問題を解決した。この時点でアミノ酸残基数が 10 に達したため、先述と同様の方法により樹脂からペプチドを切断し、その質量分析を行った。ESI-TOF Mass 測定の結果、目的の分子イオンピークが主に検出されたものの、一方でペンタフルオロフェニルアラニンやリシン残基が欠けたペプチドに由来する分子イオンピークもわずかながら検出された。これは、先述の通りこれらのアミノ酸をカップリングする際の反応効率の低さに起因しており、同時にニンヒドリン反応による簡易的な反応追跡法ではその精度に限界があることを示している。しかしながら、分子イオンピークの強度がそこまで高くなかったことと、逆相クロマトグラフィーによる精製(後述)によってこれらのペプチドを分離できることを期待して、このまま合成を続行することとした。

以降、グリシン、ペンタフルオロフェニルアラニン、リシン、リシン、アラニン、セリン、ヒスチジン、ロイシン、ペンタフルオロフェニルアラニン、リシン、グリシン、イソロイシン、グリシンの順にカップリング反応を行っていった。全てのアミノ酸のカップリングを終えたのち、アミノ基末端の Fmoc 基を脱保護し、合成したペプチドを樹脂上から切断する反応

を行った。具体的には、トリフルオロ酢酸・トリイソプロピルシラン・エタンジチオール・H<sub>2</sub>O を 94 : 2.5 : 2.5 : 1 (v/v) で混合した溶液を樹脂に加え、2 時間ほど室温で反応させたのち、得られた溶液に対してあらかじめ -20°C で冷却しておいたジエチルエーテルを勢いよく加えることで、樹脂上から切断したペプチドを白色の固体として沈殿させた。この固体をろ過操作によって回収し、ジエチルエーテルで 3 回ほど洗浄することで未精製のペプチドを得た。このペプチドの質量分析を ESI-TOF Mass 測定によって行ったところ、目的のペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドに由来する分子イオンピークが観察された一方で、アミノ酸が数個欠けたペプチドに相当する分子イオンピークも多数観察された。先述のペンタフルオロフェニルアラニン・リシンが欠けたペプチドのほか、アラニン残基が欠けたペプチドに相当する分子イオンピークも同様に観察された。いずれにせよ、精製操作が必要であることが明らかとなった。

### 3.3 ペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドの精製

未精製のペプチドを、トリフルオロ酢酸を 0.1% 含んだ H<sub>2</sub>O・アセトニトリルを 95 : 5 (v/v) で混合した溶液へと溶解させたのち、ODS 基が化学結合したシリカゲルを充填剤に用いた逆相カラムへと導入し、クロマトグラフィーによる精製操作を行った。この際、用いる溶出液はトリフルオロ酢酸を 0.1% 含んだ H<sub>2</sub>O・アセトニトリルを 95 : 5 から 35 : 65 の体積比へと徐々に変化させ、溶出するペプチドは 220 nm の波長における吸光度をもとに検出した。その結果、10 本以上のピークが得られたことから各ピークに相当するペプチドの同定を試みた。しかし、各フラクションを分取して ESI-TOF Mass 測定を行ったものの、十分な強度の分子イオンピークが検出されなかった。そのため、代替策としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOF Mass) による質量分析を試みることにした。用いるマトリックス剤としては  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、ジスラノール、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、テトラシアノキノジメタンを、カチオン化剤としてはヨウ化ナトリウム、トリフルオロ酢酸銀を検討した。その結果、マトリックス剤として  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、カチオン化剤としてヨウ化ナトリウムを用いた際に良好な強度の分子イオンピークを検出できることを明らかにした。この測定条件に基づき、目

的のペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドに由来する分子イオンピークのみが検出されたフラクションのみを纏め、凍結乾燥によって溶媒を除去した。得られた粉末を再度溶解させたのち、高速液体クロマトグラフィーによる分析を行ったところ 1 本の化合物ピークのみが観測された。また、MALDI-TOF Mass による高分解能質量分析を行ったところ、理論値と  $0.003 m/z$  以内という極めて小さい誤差範囲内の分子イオンピークが観察された。以上の結果から、目的のペプチドの単離に成功したと考えられる。合計 47 の合成工程を経て、最終的な単離収率は 2%であった。

なお、高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った際にペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドとフッ素原子を含まないらせん状ペプチドの溶出時間を同一分析条件下で比較したところ、フッ素原子の導入に伴って溶出時間が有意に長くなる様子が観察された。これは、フッ素原子の導入によってペプチドの疎水性が向上したことで、シリカゲル上のオクタデシル鎖との相互作用がより強固になったことを示唆している。後述の通り、今回合成に成功したペプチドは今後脂質二重層へと導入し、その機能を評価していくことになるが、この結果はフッ素化に伴ってより効率的にフッ素化ナノチャネルを膜の内部へと局在化させることが可能であることを示唆しており、今後の機能開拓において非常に期待の持てる結果であると言える。

#### 4. 考察

本研究の先行研究である、大環状フッ素化ナノリングの合成における単離収率がわずか 0.0055%であったことを踏まえると、本研究で合成に成功したペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドの単離収率は実に 364 倍も向上している。これは劇的な改善と言っても差し支えない値であろう。一方で、先述の通りペンタフルオロフェニルアラニン・リシン・アラニンのカップリング工程における反応効率に依然として課題が見られたことから、さらなる収率の改善が見込めると考えられる。具体的には、高い反応性とアミノ基との副反応(グアニジル化)を抑えることが可能な性質を併せ持つ、ホスホニウム系脱水縮合剤であるヘキサフルオロリン酸(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウム(PyBOP)や<sup>(16)</sup>、(7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウ

ムヘキサフルオロリン酸塩(PyAOP)を用いる手法が考えられる<sup>(17)</sup>。このほか、固相担体上で凝集したペプチドを解離させる手法としてマイクロ波の照射が有効とされていることから、その利用も合わせて検討すべきであると考えられる<sup>(18)</sup>。

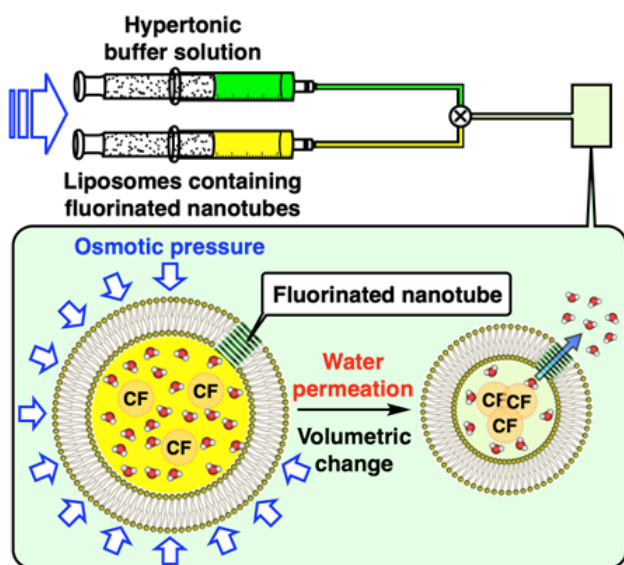
#### 5. 今後の課題

今後は合成したペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドの細孔形成能を検証していく。まずは既報に従って<sup>(11)</sup>、円二色性スペクトル測定によるペプチドの二次構造解析を行うほか、1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエンを用いた蛍光スペクトル測定によって、水溶液中でチューブ状の構造体が形成されていることを確認する。また、単結晶X線構造解析によるナノチューブ構造の直接観察も試みる予定である。

その後、得られたフッ素化ナノチューブの水透過能を評価する。本研究自身も過去に確立した手法に基づき<sup>(7)</sup>、まずはリン脂質の一種である 1,2-ジヘキサデカノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)を含んだクロロホルム溶液を調製する。この溶液を褐色フラスコに導入したのち、窒素ガスを吹き付けながらフラスコを回転させることで、フラスコの内部に DPPC の薄膜を形成させる。この薄膜を減圧下で乾燥させたのち、2-[4-(2-ヒドロキエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)と塩化ナトリウムに加えてカルボキシフルオレセインと呼ばれる蛍光色素を含んだ緩衝液を加えて 1 時間ほど水和させる。こうして得られた DPPC の分散液を、液体窒素による凍結と融解を繰り返すことで単層の脂質リポソームへと導く。続いて、100 nm の細孔を有するテフロン性薄膜を 20 回ほど通過させることで、直径が 100 nm に揃った DPPC の単層脂質リポソームを調製するとともに、透析操作によって脂質リポソーム外部に存在するカルボキシフルオレセインを全て取り除く。こうして得られた脂質リポソームに対して、すでに合成したペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドを添加することで脂質二重層の内部にフッ素化ナノチューブを自発的に形成させる。続いてこの脂質リポソーム分散液を、ストップフロー装置を用いて高塩濃度バッファー溶液と瞬時に混合させる。すると、この混合によって生じた浸透圧により、脂質リポソーム内部の水がリポソーム外部へと排出され、リポソームの体積収縮が起こる。この際、脂質リポソーム内部のカルボキシフルオレセイン

の濃度消光が起こるため、脂質リポソームの体積収縮に伴う蛍光強度の変化をミリ秒単位で追跡することで、フッ素化ナノチューブの内部が水が透過する速度を算出することができる( Fig. 3)。以上の実験を、フッ素原子を含まないペプチドにおいても実施することで、フッ素化に伴う水透過速度への影響を検証していく予定である。

なお、将来的にフッ素化ナノチューブを海水淡水化へと応用していくためには、その脱塩能を評価することも極めて重要である。ここでは、本研究者が過去に実施した経験を有する、脂質二重層を介した電流測定によってイオン透過能を検証する<sup>(19, 20)</sup>。具体的には、任意の塩を溶解させた HEPES 緩衝液中、*n*-デカンに溶解させた DPPC を直径 100  $\mu\text{m}$  程度のプラスチック製ポアに塗布し、DPPC からなる単層膜を形成させる。続いて、ペンタフルオロフェニルアラニン含有らせん状ペプチドの水溶液を少量ずつ添加することで、単層膜にペプチドが自発的に挿入され、フッ素化ナノチューブが形成されるのを促す。この際に、膜の両側から 100 mV 程度の電圧を印加するとともに、得られる電流値を記録することで、フッ素化ナノチューブの膜間イオン透過能を検証する。以上の実験を、種々の塩を用いて実施するとともに、先述の膜間水透過実験で得られた水透過速度と比較することで、最終的にフッ素化ナノチューブが有する脱塩能を評価していく予定である。



**Fig. 3** Schematic illustration of the stopped-flow measurements for water permeation study.

## 6. 文献

1. Mekonnen, M. M.; Hoekstra, A. Y. Four billion people facing severe water scarcity. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1500323.
2. Lee, K. P.; Arnot, T. C.; Mattia, D. A review of reverse osmosis membrane materials for desalination—Development to date and future potential. *J. Membr. Sci.* **2011**, *370*, 1–22.
3. Agre, P. Aquaporin Water Channels (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4278–4290.
4. Tunuguntla, R. H.; Henley, R. Y.; Yao, Y.-C.; Pham, T. A.; Wanunu, M.; Noy, A. Enhanced water permeability and tunable ion selectivity in subnanometer carbon nanotube porins. *Science* **2017**, *357*, 792–796.
5. Sasaki, R.; Sato, K.; Tabata, K. V.; Noji, H.; Kinbara, K. Synthetic Ion Channel Formed by Multiblock Amphiphile with Anisotropic Dual-Stimuli-Responsiveness. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 1348–1355.
6. Sato, K.; Sasaki, R.; Matsuda, R.; Nakagawa, M.; Ekimoto, T.; Yamane, T.; Ikeguchi, M.; Tabata, K. V.; Noji, H.; Kinbara, K. Supramolecular Mechanosensitive Potassium Channel Formed by Fluorinated Amphiphilic Cyclophane. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 11802–11809.
7. Itoh, Y.; Chen, S.; Hirahara, R.; Konda, T.; Aoki, T.; Ueda, T.; Shimada, I.; Cannon, J. J.; Shao, C.; Shiomi, J.; Tabata, K. V.; Noji, H.; Sato, K.; Aida, T. Ultrafast water permeation through nanochannels with a densely fluorinated interior surface. *Science* **2022**, *376*, 738–743.
8. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
9. Sheppard, R. The fluorenylmethoxycarbonyl group in solid phase synthesis. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 545–552.
10. Baltutis, V.; O’Leary, P. D.; Martin, L. L. Self-Assembly of Linear, Natural Antimicrobial Peptides: An Evolutionary Perspective. *ChemPlusChem* **2022**, *87*, e202200240.
11. Scott, A. J.; Niitsu, A.; Kratochvil, H. T.; Lang, E. J. M.; Sengel, J. T.; Dawson, W. M.; Mahendran, K. R.; Mravic, M.; Thomson, A. R.; Brady, R. L.; Liu, L.; Mulholland,

- A. J.; Bayley, H.; DeGrado, W. F.; Wallace, M. I.; Woolfson, D. N. Constructing ion channels from water-soluble  $\alpha$ -helical barrels. *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 643–650.
12. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *14*, 5449–5453.
13. Wang, X.; Ye, Y.; Zhang, S.; Feng, J.; Xu, Y.; Zhang, Y.; Wang, J. Copper-Catalyzed C(sp<sup>3</sup>)C(sp<sup>3</sup>) Bond Formation Using a Hypervalent Iodine Reagent: An Efficient Allylic Trifluoromethylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16410–16413.
14. Erdbrink, H.; Peuser, I.; Gerling, U. I. M.; Lentz, D.; Kokschi, B.; Czekelius, C. Conjugate hydrotrifluoromethylation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated acyl-oxazolidinones: synthesis of chiral fluorinated amino acids. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8583–8586.
15. Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441–445.
16. Shimamura, H.; Breazzano, S. P.; Garfinkle, J.; Kimball, F. S.; Trzuppek, J. D.; Boger, D. L. Total Synthesis of Complestatin: Development of a Pd(0)-Mediated Indole Annulation for Macrocyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7776–7783.
17. Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853–4856.
18. Pedersen, S. L.; Tofteng, A. P.; Malika, L.; Jensen, K. J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1826–1844.
19. Muraoka, T.; Noguchi, D.; Kasai, R. S.; Sato, K.; Sasaki, R.; Tabata, K. V.; Ekimoto, T.; Ikeguchi, M.; Kamagata, K.; Hoshino, N.; Noji, H.; Akutagawa, T.; Ichimura, K.; Kinbara, K. A synthetic ion channel with anisotropic ligand response. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2924.
20. Mori, M.; Sato, K.; Ekimoto, T.; Okumura, S.; Ikeguchi, M.; Tabata, K. V.; Noji, H.; Kinbara, K. Imidazolium-based Multiblock Amphiphile as Transmembrane Anion Transporter. *Chem. Asian J.* **2021**, *16*, 147–157.



# Efficient Synthesis of Fluorinated Nanochannels for Water Desalination Technology

Kohei Sato

Kwansei Gakuin University

## Summary

One of the Sustainable Development Goals (SDGs) adopted at the UN Summit in 2015 was the development of technologies to obtain safe water. This is due to the explosive population growth in developing countries in recent years and the dramatic changes in lifestyles associated with economic development, which have led to a rapid increase in the demand for drinkable water on a global scale. It is estimated that about 4 billion people on the planet are currently facing serious drinking water shortages, and this situation is expected to worsen in the future. However, the current desalination efficiency is far from sufficient to solve the global shortage of drinkable water, and the development of an innovative technology for selective and rapid water filtration is strongly desired.

We were inspired by the high-water repellency of polytetrafluoroethylene, a fluorinated polymer, and developed "fluorinated nanotubes," whose inner walls are densely covered with fluorine atoms to filter water at an extremely high speed. The fluorinated nanotubes, formed by one-dimensional assembly of macrocyclic fluorinated nanorings, exhibited a water permeability that is 4500 times higher than that of aquaporins, natural water channel proteins. However, the synthetic yield of the fluorinated nanorings was only about 0.0055%, which is too low for mass production at this time. In this study, we developed a new synthetic method based on peptide solid-phase synthesis for highly efficient synthesis of fluorinated nanotubes.

We focused on the structure of natural amphiphilic helical peptides and replaced some of their amino acid residues with artificial amino acids containing fluorine atoms. We succeeded in synthesizing the desired molecule by repeating the deprotection and coupling reactions on a solid-phase support using various amino acids protected with Fmoc groups. The final isolated yield after 47 steps was 2%, which was 364 times higher than that of the conventional method.