

マイクロデバイスを用いた金属錯体含有蛋白質の  
合成及び結晶化に関する研究

Synthesis and crystallization of metal  
complex-containing proteins using micro devices

2018 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
ナノ理工学専攻 マイクロシステム研究

田中 大器

Daiki TANAKA

## 1章 序論

1.1	近年の金属錯体含有蛋白質の利用の応用に関する動向.....	1
1.2	金属錯体含有蛋白質合成における課題.....	2
1.3	マイクロ化学合成デバイスの適用による従来法の問題点の解決の試み.....	5
1.4	化学反応におけるマイクロ化学合成デバイスの利点.....	6
1.5	本研究の概要.....	8

## 2章 金属錯体の合成

2.1	サレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合.....	10
2.1.1	試薬および分析装置.....	12
2.1.2	従来法によるサレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成.....	13
2.1.3	マイクロ化学合成デバイスによるサレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成.....	15
2.1.4	マイクロ化学合成デバイスを用いたサレン型 Mn(II), Co(II)錯体合成実験 における結果および考察.....	19
2.1.5	まとめ.....	28
2.2	アゾ Mn(II)錯体の合成.....	29
2.2.1	試薬および分析装置.....	30
2.2.2	従来法によるアゾ Mn(II)錯体の合成.....	30
2.2.3	マイクロ化学合成デバイスによるアゾ Mn(II)錯体の合成.....	33
2.2.4	マイクロ化学合成デバイスを用いたアゾ Mn(II), Co(II)錯体合成実験にお ける結果および考察.....	36
2.2.5	まとめ.....	46
2.3	配位子への臭素(Br)付加合成.....	47
2.3.1	試薬および分析装置.....	47
2.3.2	従来法による Br 付加合成.....	48
2.3.3	マイクロ化学合成デバイスを用いた Br 付加合成.....	50
2.3.4	マイクロ化学合成デバイスを用いた Br 付加合成実験における結果.....	52
2.3.5	考察.....	52

2.3.6	まとめ.....	57
2.3.7	今後の課題.....	57
3	章 金属錯体含有蛋白質の結晶化および単離	
3.1	金属錯体含有蛋白質の結晶化に対する課題.....	59
3.2	マイクロ流体デバイスを用いた蛋白質の結晶化における課題.....	59
3.3	二重凹型ピラーアレイによる微小ドロップレットの担持と金属錯体含有蛋白質結晶化への応用.....	63
3.4	二重凹型ピラーアレイの作製プロセス.....	65
3.5	二重凹型ピラーアレイによる金属錯体含有蛋白質の結晶化.....	68
3.6	二重凹型ピラーアレイにおける金属錯体含有蛋白質の結晶化実験における結果および考察.....	70
3.7	まとめ.....	72
3.8	今後の課題.....	72
4	章 結言.....	74
4.1	本論文の結論.....	74
4.2	今後の展望.....	74
4.2.1	マイクロデバイスによる化学物質の合成技術.....	74
4.4.2	マイクロデバイスによる化学物質の結晶化技術.....	75
	謝辞.....	76

## 1章 序論

### 1.1 近年の金属錯体含有蛋白質の利用の応用に関する動向

金属錯体含有蛋白質とは、蛋白質に金属錯体を内包させたものである。図 1.1 は蛋白質の一種であるリゾチームに対して金属錯体を内包した場合のドッキングシミュレーション結果であり大きな分子量を持つタンパク質分子の一部と金属錯体が立体的に結合している様子を示している。この様な金属錯体含有蛋白質は電気化学や生化学等、様々な分野での応用が期待されている。Nogala・Wittstock らは、金属錯体とラッカーゼから成る金属錯体含有蛋白質の酸化還元能を利用して生物学的に安全なバイオ化学燃料電池を実現することを目指しており<sup>1</sup>、金属錯体である $(\text{FeCN})_6$  をラッカーゼに内包させ燃料電池の電極に応用する事により、従来の電極と比較して電子の授受が効率的に行われるようになり、エネルギー損失の小さい燃料電池の作製が可能となる事を示した。Das・Faniらは金属錯体含有蛋白質が結核菌株に対して抗マイコバクテリア活性を示すことを発見し、創薬への応用を進めている。金属錯体含有蛋白質は健康細胞に対して毒性が低いことから、より安全性の高い抗結核薬が可能となると推察される<sup>2</sup>。Limらは<sup>3</sup>アゾ金属錯体を蛋白質にドッキングさせる技術に応用して細胞マーカーへの応用を進めており、自己蛍光の低いミトコンドリアグルタチオンをモニタリングする目的で近赤外蛍光を有するアゾ金属錯体を用いている。以上のように各分野への応用が盛んに検討されているが、これらの金属錯体含有蛋白質を合成および単離するには種々の課題が存在する。次節以降で、現状の課題について詳述する。

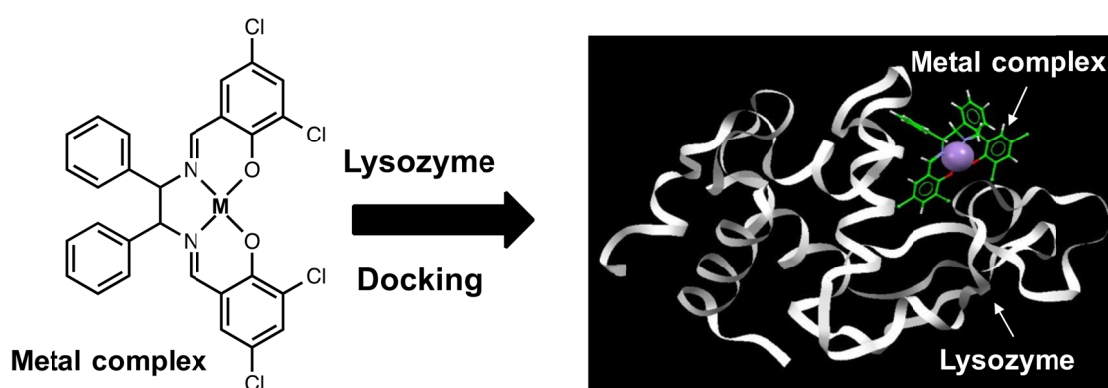


図 1.1 サレン型金属錯体とリゾチームのドッキング



## 1.2 金属錯体含有蛋白質合成における課題

金属錯体含有蛋白質の化学合成は通常以下のように行われる。出発化合物から配位子を合成し、その後、配位子に各種金属を配位させて金属錯体とする。合成した金属錯体をリゾチームやアルブミンといった様々な蛋白質にドッキングさせ、結晶化や単離することにより金属錯体含有蛋白質が合成される。現在、この金属錯体含有蛋白質の合成、結晶化および単離を行うにはビーカーやサンプルチューブを使用するのが一般的であるが、以下の問題点に対する解決方法の確立が求められている。

### (1) 金属錯体合成工程での厳密な温度管理、雰囲気制御の必要性

常温でビーカーを用いてジアゾ化反応を行うと発生する反応熱に起因する副生成物が発生する。その為、従来法でジアゾ化反応を行う際は氷冷下での合成が必須となる。サレン型金属錯体の合成では、反応効率を上げるために、高温(例えば 40 °C)での加熱が必要である。また、中心金属の酸化を防止するために、窒素雰囲気中での合成操作が要求される。さらに、配位子の合成では、臭素等毒性試薬を使用する場合があります、ドラフトやグローブボックス内での合成操作が必須となる(図 1.2)。

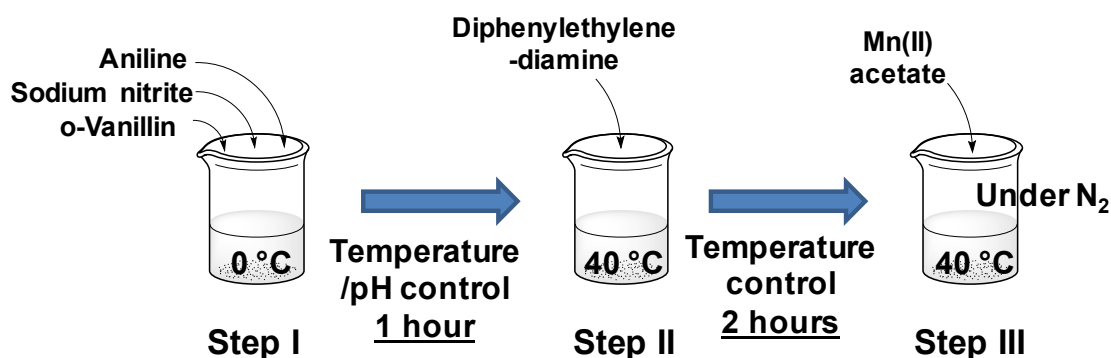


図 1.2 従来法によるアゾ金属錯体の合成例

(2) 厳密な pH 制御の必要性

アゾ金属錯体の合成過程で必要となるジアゾ化反応の合成では、pH 制御を行う必要があるが、現状ではその際に使用される強酸および強塩基を起因とする副生成物が避けられない(図 1.3)。

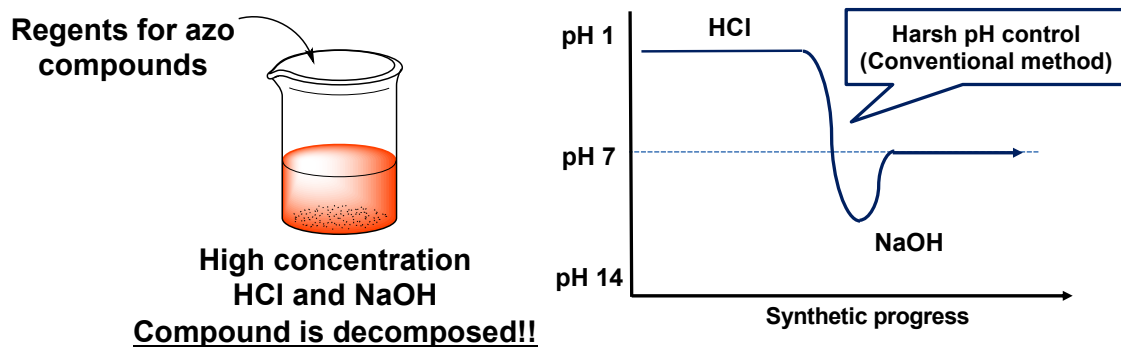


図 1.3 アゾ化合物の合成の際の強酸・強塩基を用いた pH 制御

(3) 金属錯体含有蛋白質の良質な結晶を得る工程の確立が必要

金属錯体含有蛋白質の結晶化では、一般的にサンプルチューブが用いられるが、この方法で結晶化を行うと、サンプルチューブ内で沈殿剤、蛋白質溶液および金属錯体溶液の濃度勾配が発生し、良質で大きな金属錯体含有蛋白質の結晶を再現よく得ることが困難である。

図 1.4 は、サンプルチューブを用いた場合の結晶化の一例である。蛋白質溶液等の濃度勾配により、得られた結晶が数十マイクロンと小さく、各種分析やその後の応用が困難である。さらに、金属錯体含有蛋白質結晶は壊れやすいため、ハンドリングが容易な結晶化法の確立も必要である。

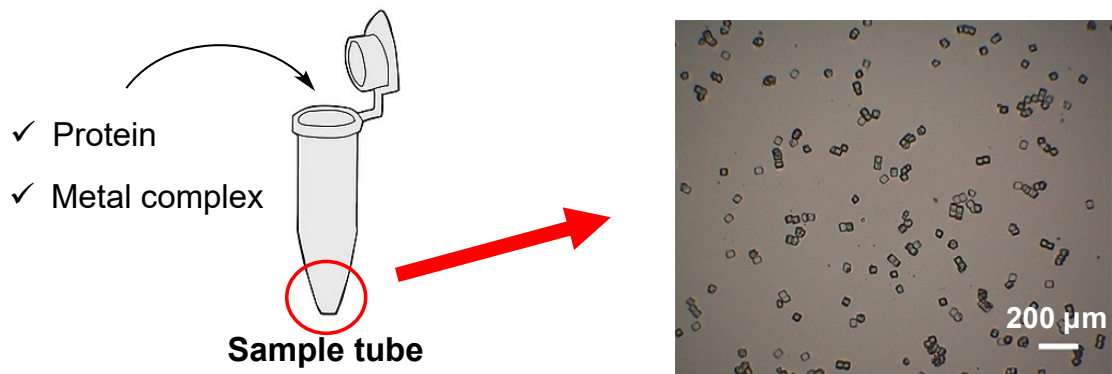


図 1.4 従来法による蛋白質の結晶化

以上指摘した問題点は、従来のビーカーワークに代わる簡便で制御が容易な新合成法の必要性を示している。

### 1.3 マイクロ化学合成デバイスの適用による従来法の問題点の解決の試み

本研究では、以上の問題点を解決するために、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術により作製した「マイクロ化学合成デバイス」を化学反応および結晶化へ応用を目指した。

マイクロ化学合成デバイスを用いた化学合成は、これまでに北森らの研究チームにより、基礎的な有機化学合成における検討がなされている。例えば有機ホスフィンとアルデヒドからWittig反応がマイクロ化学合成デバイス内でも効率的に進行することが確認されており、収率が10%ほど高くなることも明らかにされている<sup>4</sup>。この研究はWittig反応がマイクロ化学合成デバイスでも可能であることを示した点で意義がある。また、Lumleyらはマイクロ化学合成デバイスを用いて $\alpha$ -terpineneとcitronellolの光化学的酸化反応を行い、その結果を従来法と比較している<sup>5</sup>。Priestや北森らは2-hydroxy-5-nonyl-acetophenoneを用いた水溶液からのCu<sup>2+</sup>イオンの微量溶媒抽出を報告している<sup>6</sup>。P. Wattsらはマイクロ化学合成デバイスを用いてペプチド合成を行い、ペプチド合成を従来法で行うと収率が50%程だが、マイクロ化学合成デバイスを用いることにより、90%以上の収率で目的化合物が得られることを報告している<sup>7</sup>。

上記のようにマイクロ化学合成デバイスを用いた基礎的な有機化学反応に関しては検討されてきたが、本研究で目的とする金属錯体含有蛋白質の合成で必須である温度制御やpH制御を伴った化学合成に関しては過去に検討は行われていない。本研究では、これらのマイクロ化学合成デバイスによる化学合成例を基礎として、これまで実現が困難とされてきた温和な化学合成条件下での金属錯体含有蛋白質の合成、結晶化および単離の試みとその結果について述べる。その前提として、次節において「化学反応におけるマイクロ化学合成デバイスの利点」を具体的に論述する。

## 1.4 化学反応におけるマイクロ化学合成デバイスの利点

マイクロ化学合成デバイスを用いた化学合成には以下の利点がある<sup>8</sup>。

### (1) 界面反応の効率化

反応場をマイクロ化することにより、単位容積あたりの表面積が格段に増大する。例えば、化学反応  $A+B\rightarrow C$  では、反応が界面のみで起こるため反応効率が上昇する。また、マイクロ化学合成デバイス内に分離壁を設けることにより目的化合物(C)のみを効率的に分離・抽出することが可能となる(図 1.5)。

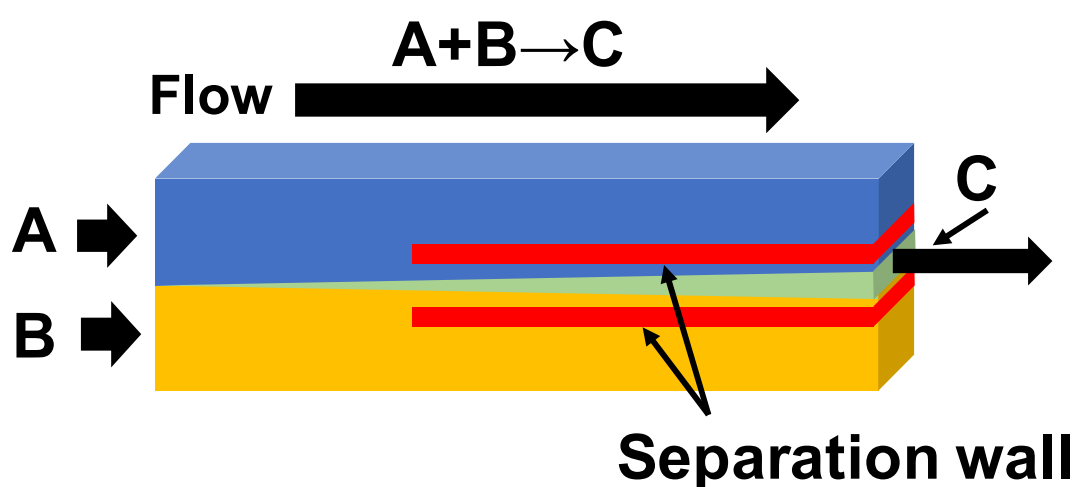


図 1.5 マイクロデバイス内の A-B 界面における化学反応と分離壁による目的化合物 C の分離・抽出

### (2) 混合の効率化

化学反応では化学種の効率的な混合が鍵となる。化学種の混合し易さは最終的には分子拡散の度合に依存する。分子拡散による混合では、混合時間は拡散距離の 2 乗に比例する。

$$t \propto d^2 / D$$

$t$ :混合時間、 $d$ :拡散距離、 $D$ :拡散係数

マイクロ化学合成デバイス内での化学反応は界面におけるマイクロスケールでの拡散により進行する。これを従来法(ビーカー)と比較した場合、マイクロ化学合成デバイ

ス内では拡散距離が  $1/5000 \sim 1/10000$  程度短くなる為、拡散時間が大幅に短縮される(図 1.6)。これにより化学種を効率的に混合、拡散することができ、化学合成の際の反応温度の低温化が可能となる。

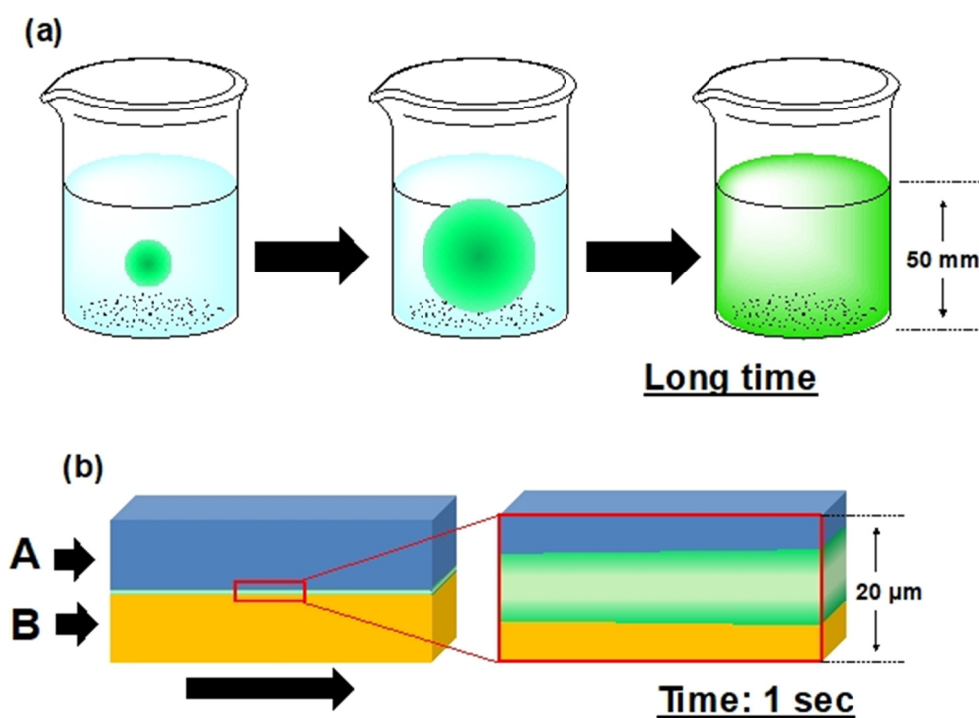


図 1.6 化学種の拡散の様子 (a) 従来法 (b) マイクロデバイス

### (3) 温度制御の高効率化

マイクロ化学合成デバイス内での反応場は、単位容積あたりの表面積が大きいいため熱交換効率が非常に高い。よってジアゾ化反応等の反応熱による暴走や爆発の危険を防ぐことができ、従来法では冷却が必須の化学合成系に対して、マイクロ化学合成デバイスでは冷却が不要となる(図 1.7)。

$$q = -kAdt/dx$$

q:熱伝達量、k:熱伝導率、A:面積、(dx / dt):温度勾配

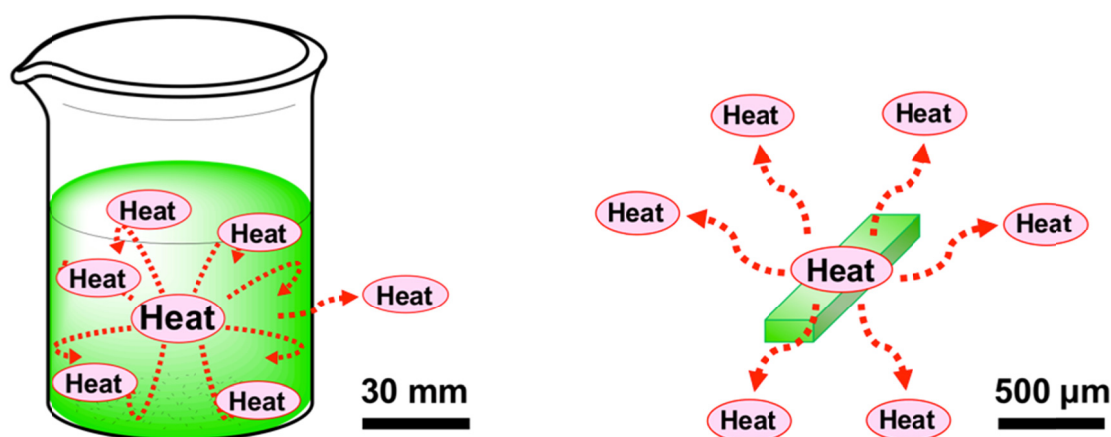


図 1.7 従来法とマイクロデバイスの熱発散の違い

### 1.5 本研究の概要

本研究では、1.4節に記したマイクロ化学合成デバイスによる化学反応の利点を応用することにより、従来では困難とされてきた金属錯体含有蛋白質の合成、結晶化および単離を試みた結果について論述し、考察を行うとともに、将来展望についても述べている。本研究で得られた成果は化学合成の新しい手法となりうる汎用性がある。次章以降で具体的な研究成果について述べる。

## 参考文献

1. W. Nogala, K. Szot, M. Burchardt, F. Roelfs, J. Rogalski, M. Opalloa and G. Wittstock, *Analyst*, 2010, 135, pp.2051–2058.
2. K. Das, S. Nandi, S. Mondal, T. Askun, Z. Canturk, P. Celikboyun, C. Massera, E. Garribba, A. Datta, C. Sinha and T. Akitsu, *New J. Chem.*, 2014, 39, pp.1101–1114.
3. S. Y. Lim, K. H. Hong, D. I. Kim, H. Kwon and H. J. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 7018–7025.
4. H. Hisato, T. Sato, M. Tokeshi, A. Hibara, T. Kitamori, *Chem. Commun.*, 2001, pp.2662
5. E. K. Lumley, C. E. Dyer, N. Pamme and R. W. Boyle, *Org. Lett.*, 2012, 14/22, pp.5724–5727.
6. C. Priest, J. Zhou, R. Sedev, J. Ralston, A. Aota, K. Mawatari and T. Kitamori, *Int. J. Miner. Process.*, 2011, 98, pp.168–173.
7. P. Watts, C. Wiles, S. J. Haswell, E. P. –Villar, *Chem. Commun.*, 2001, 990
8. 北森武彦, 庄子習一, 馬場嘉信, 藤田博之, “マイクロ化学チップの技術と応用”, 2004, pp.47-48



## 2 章 金属錯体の合成

金属錯体含有蛋白質は、①配位子の合成 ②金属錯体の合成 ③金属錯体含有蛋白質の結晶化および単離の各工程を経て合成、単離されるが、本章では①配位子の合成および②金属錯体の合成について、マイクロ化学合成デバイスを用いた場合と従来法とを比較するために行った実験を比較し考察を加える。

配位子の合成では金属錯体の基本骨格であるサレン型の配位子の合成実験を行った。さらに配位子にアゾ基(R-N=N-R)やブロモ基(R-Br)を付加させる合成実験も行った。これらの官能基に機能性分子を付加することで金属錯体含有蛋白質に光応答性等の機能性を持たせることができる。

### 2.1 サレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成

サレン型金属錯体とは、図 2.1-(a)に示す構造をした化合物の一種で、2 分子のサリチルアルデヒドと 1 分子のエチレンジアミンとが脱水縮合した化合物である。配位子は様々な金属に対してキレート性の配位座として作用する。本研究では、このサレン型金属錯体を目的化合物として設定し、マイクロ化学合成デバイスによる効率的な合成法の構築を試みた。

サレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成は、図 2.1-(b)のように二段階の合成操作に分けられる。サレン型 Mn(II), Co(II)錯体を従来法で合成するには厳密な加熱温度管理が必要である。さらに中心金属に使われる Mn(II)と Co(II)の酸化を防止するために窒素雰囲気下での合成操作が必須となる<sup>1</sup>。

本研究ではこれらの煩雑な化学合成操作が要求される化学合成系に対してマイクロ化学合成デバイスを応用することにより、常温、空気中での合成を可能とする全く新しい合成手法の構築を目指した。

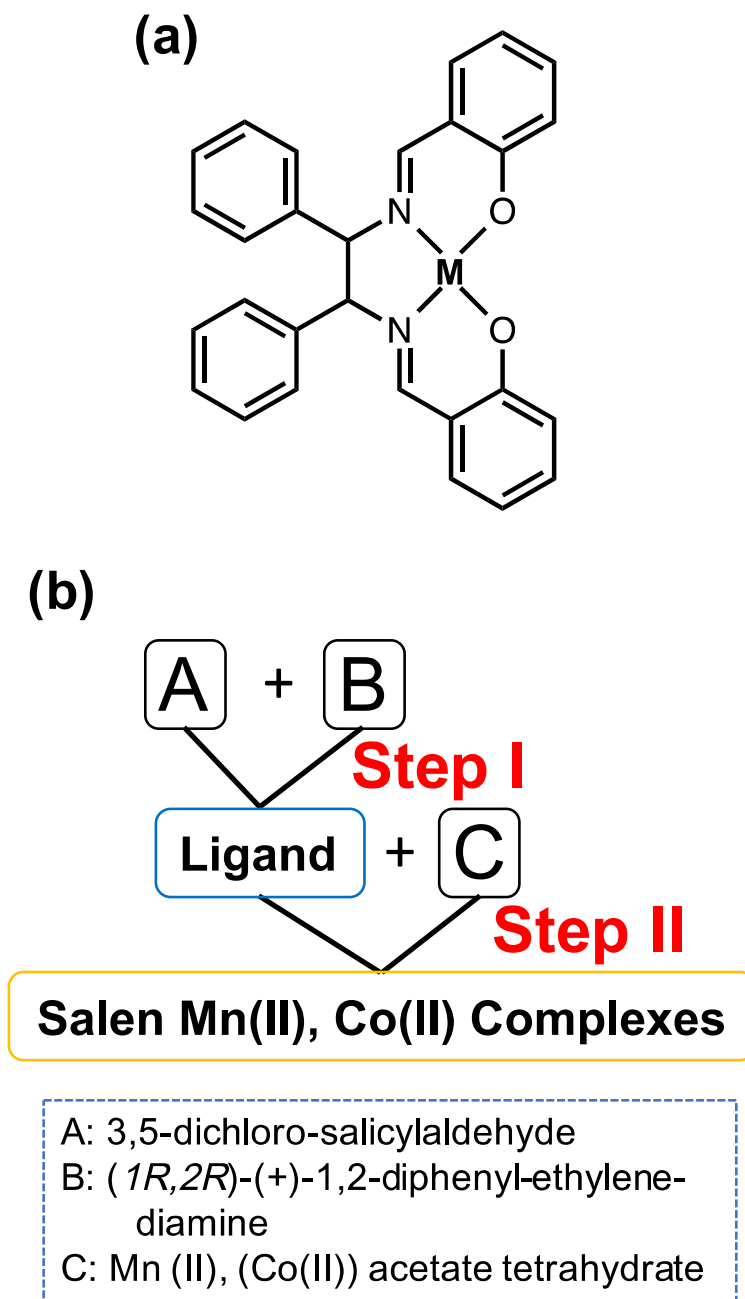


図 2.1 サレン型金属錯体の合成概要 (a)サレン型金属錯体の化学構造 (b)サレン型金属錯体の合成工程

### 2.1.1 試薬および分析装置

市販されている試薬を、精製せずにそのまま使用した。また、合成した化合物は、紫外可視分光法 (UV-vis; U-3900, Hitachi)、質量分析 (TOF-MS; JMS-T100LC, JEOL)、赤外分光法 (IR; FT / IR-6200, JASCO)、走査型電子顕微鏡 (SEM; SU8240, Hitachi) およびエネルギー分散型 X 線分析 (EDX; Genesis-AP2, EDAX) により同定した。

なお、サレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成について、従来法の合成条件とマイクロ化学合成デバイスによる合成条件を表 2.1 にまとめて示す。

表 2.1 サレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成条件

	従来法	マイクロ化学合成デバイス
合成温度	40 °C	室温 (23°C)
流量	-	3 $\mu$ L/min
攪拌時間	4.5 h	-
合成雰囲気	N <sub>2</sub> gas	Air
合成場の容積	50 cm <sup>3</sup>	0.002 cm <sup>3</sup>
配位子の同定法 (step I)	IR	
錯体の同定法 (step II)	SEM, EDX, UV-vis, MS	

## 2.1.2 従来法によるサレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成

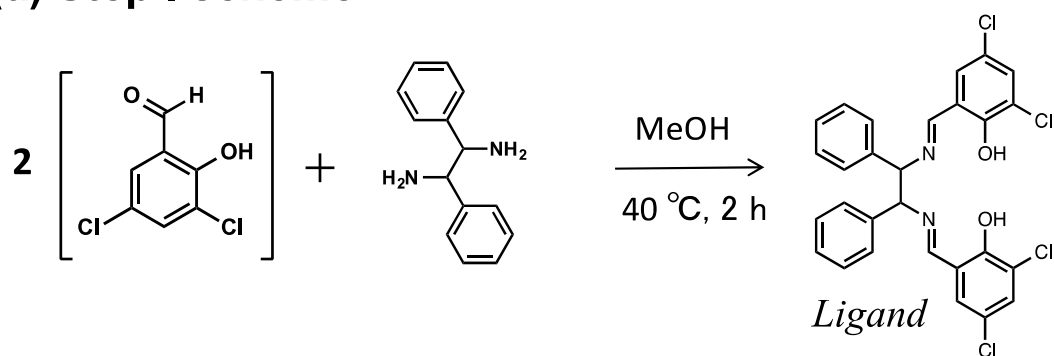
### 2.1.2.1 配位子の合成 (Step I)

3,5-Dichlorosalicylaldehyde (2 mmol) と (*1R,2R*)-(+)-1,2-diphenyl-ethylenediamine (1 mmol) をメタノール 50 mL に溶解し 40 °C、2 時間攪拌することにより溶液が黄色を呈し、配位子が合成された。生成物については IR (KBr 法:  $1620\text{ cm}^{-1}$  (C=N)) により化合物の同定を行った。(図 2.2-(a))

### 2.1.2.2 サレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成 (Step II)

2.1.2.1 で合成した配位子溶液に Mn(II) (Co(II)) acetate tetrahydrate (1 mmol) を溶解し 40 °C、2 時間攪拌することにより茶褐色を呈した化合物が析出し、濾過により金属錯体を得た。また、合成中は Mn(II) および Co(II) の酸化防止のため窒素雰囲気下で合成を行った。化合物については SEM, EDX, UV-vis および TOF-MS により観察、同定分析を行った。(図 2.2-(b))

### (a) Step I scheme



### (b) Step II scheme

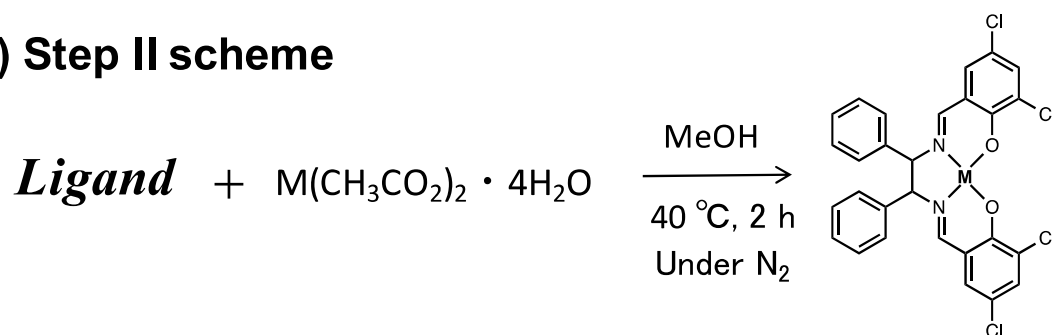


図 2.2 サレン型金属錯体の合成スキーム (a)配位子の合成 (b)Mn(II), Co(II)錯体の合成スキーム

## 2.1.3 マイクロ化学合成デバイスによるサレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成

### 2.1.3.1 マイクロ化学合成デバイスの作製

化学合成に用いるマイクロ化学合成デバイスをソフトMEMS技術により作製した<sup>2,3</sup>。作製プロセスは概略下記の通りである(図 2.3)。なお、本研究では溶媒にメタノールを使用するため、デバイスの材質はメタノールに対して膨潤することがほとんどないPDMS (poly-dimethyl siloxane, SILPOT 184, Dow Corning Toray)とした。

- ① Si 基板を純水にて洗浄。
- ② ネガティブ型フォトリソグレイ(SU-8 3050, Kayaku MicroChem)をスピンドットコート。
- ③ UV 露光装置(MA/BA6, SUSS MicroTec)によりパターン露光。
- ④ SU-8 developer により現像。
- ⑤ 未硬化の PDMS を鋳型に流し込み真空ポンプにより脱気後 75 °C のホットプレートで硬化。
- ⑥ 硬化後鋳型から取り出し O<sub>2</sub> プラズマによりガラスと接合。

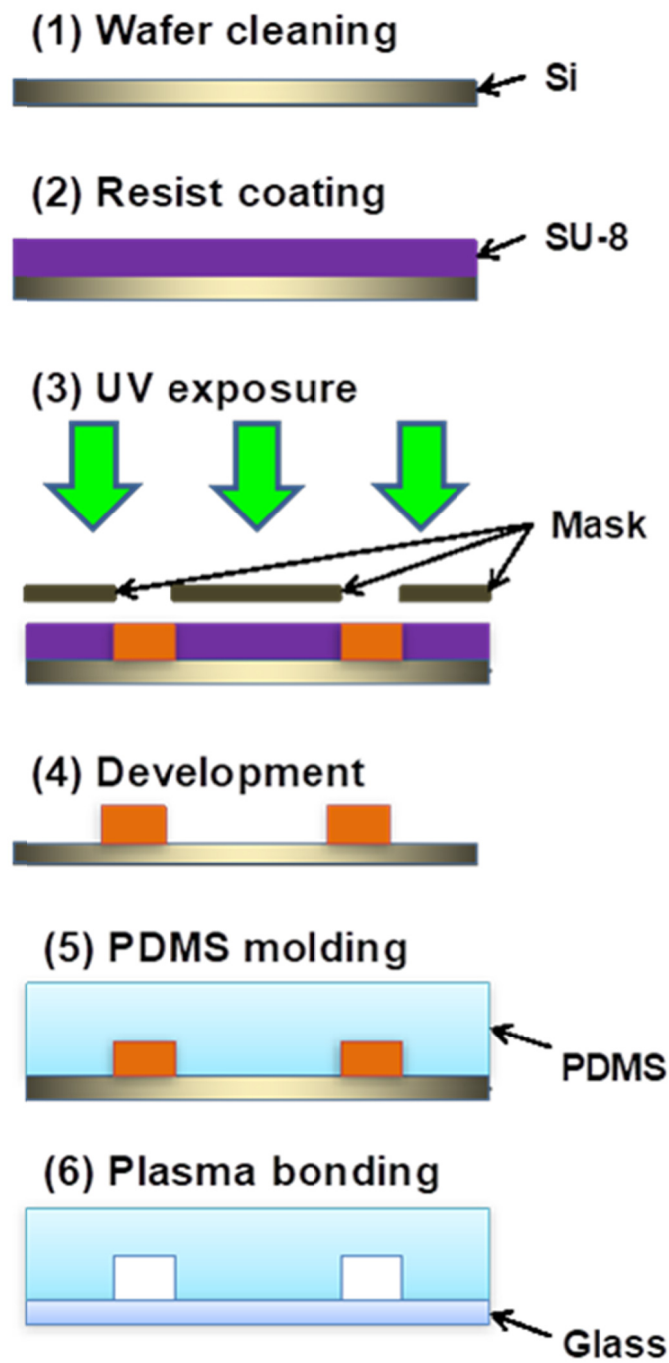


図 2.3 ソフト MEMS 技術によるマイクロ化学合成デバイスの作製方法

### 2.1.3.2 デバイスデザイン

マイクロ化学合成デバイスのデザインは二種類の試薬を界面で反応させるように Y 字型を採用した<sup>4</sup>(図 2.4)。デバイスの流路幅を決定するための予備実験を行った。流路幅 100, 300, 500  $\mu\text{m}$  のもので流体実験を行ったところ 500  $\mu\text{m}$  以下の流路幅では生成物が詰まる問題が発生したため、流路幅を生成物が詰まることがなかった 1000  $\mu\text{m}$  に設定した。

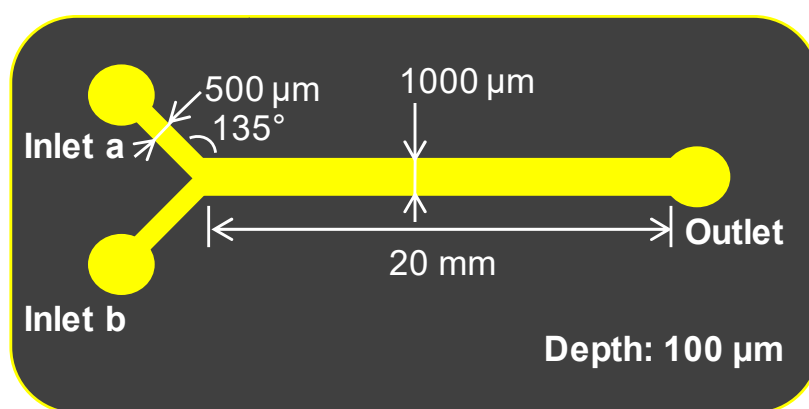


図 2.4 Y 字型マイクロデバイスのデザインおよび寸法

### 2.1.3.3 流体実験

シリンジポンプ (KDS-100, KD Scientific) を使用して、試薬および溶液をシリンジ (1750CX, Hamilton) によって導入した。シリンジとマイクロ化学合成デバイスは ETFE (エチレンテトラヒドロエチレン) チューブで接続した。

サレン型 Mn(II), Co(II) 錯体の合成工程は Step I と Step II の二段階合成のため、図 2.5 に示すように Y 字型マイクロ化学合成デバイスを 2 本結合して合成に用いた。



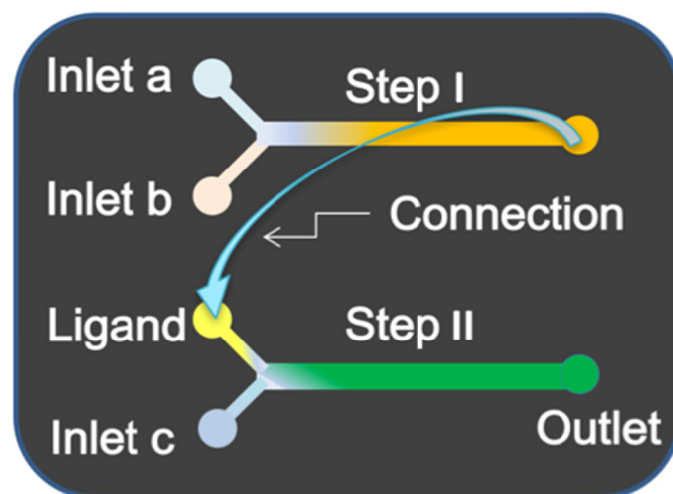


図 2.5 2本のY字型マイクロ化学合成デバイスを用いたサレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成

#### 2.1.3.4 配位子の合成 (Step I)

3,5-dichlorosalicyl-aldehydeと(*1R,2R*)-(+)-1,2-diphenylethylenediamineを従来法と同様にメタノール中に溶かした。なお、各試薬は従来法と同濃度となるように調整された。1本目のY字型マイクロ化学合成デバイスのインレット a から 3,5-dichlorosalicyl-aldehyde (2 mmol, reagent A)を導入し、インレット b から(*1R,2R*)-(+)-1,2-diphenylethylenediamine (1 mmol, reagent B)を導入して1本目のY字型マイクロ化学合成デバイスで配位子を合成した。1本目で合成された配位子は2本目のY字型マイクロ化学合成デバイスにフッ素樹脂チューブを用いて結合し、Step IIの合成へと繋げた。この配位子の合成実験は室温(23 °C)、大気下で行った。なお、シリンジポンプの流量は 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  で流体実験を実施した。合成した生成物は IR (KBr 法: 1620  $\text{cm}^{-1}$  (C=N))により同定された。

#### 2.1.3.5 サレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成 (Step II)

Mn(II) (Co(II)) acetate tetrahydrate を従来法と同様にメタノール中に溶解した。なお、各試薬は従来法と同濃度となるように調整された。2本目のY字型マイクロ化学合成デバイスにおいてインレット c から Mn(II) (Co(II)) acetate tetrahydrate (1 mmol, reagent C)を導入しサレン型 Mn(II)錯体の合成を行っ

た。この時の合成条件は流量: 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  で室温(23  $^{\circ}\text{C}$ )である。合成した生成物は SEM, EDX, UV-vis および TOF-MS により観察、同定された。

#### 2.1.4 マイクロ化学合成デバイスを用いたサレン型 Mn(II), Co(II)錯体合成実験における結果および考察

流体実験の様子を光学顕微鏡で観察した。2本目の Y 字型マイクロ化学合成デバイスの界面に着目すると、配位子溶液と酢酸金属溶液が触れると同時に錯形成が開始された(図 2.6)。

最終生成物(Step II 生成物)を IR により測定したところ、従来法、マイクロ化学合成デバイス法ともに C=N に由来する 1622 および 1598  $\text{cm}^{-1}$  のピークを確認した(図 2.7, 2.8)。この結果は、化合物中に C=N 結合が含まれていることを示している。

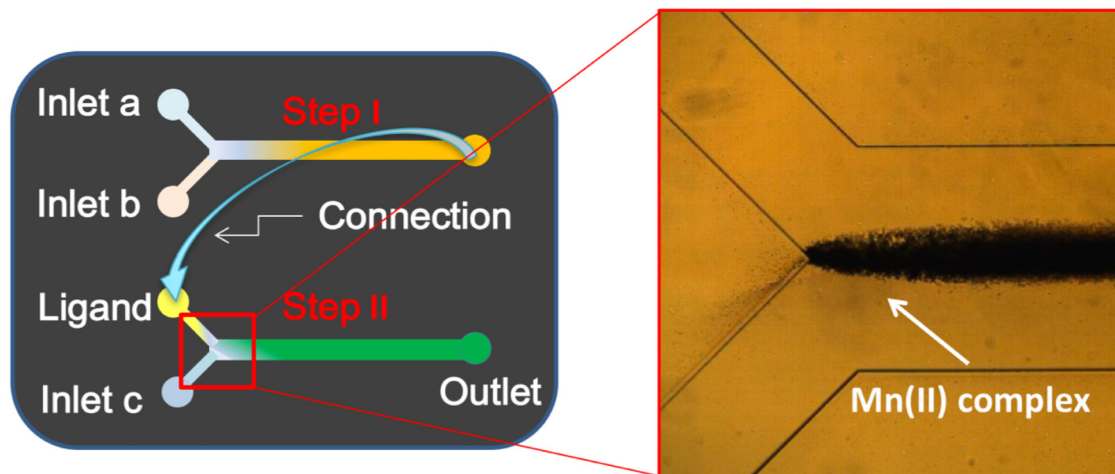
SEM 観察および EDX 元素分析の結果を図 2.9, 2.10 に示す。SEM 観察では各金属錯体の結晶状態を観察した。Mn(II)錯体では微粒子状の結晶が確認され、Co(II)錯体では針状の結晶が確認された。これら結晶の形状に関しては従来法、マイクロ化学合成デバイス法ともに大きな違いは見られなかった。EDX 元素分析で化合物内の含有金属を調べたところ、生成物内に Mn および Co が含まれていることが示された。Pt のピークは帯電防止膜(5 nm)に由来するものであり、Cl のピークは化合物中の置換基に由来するものである。

UV-vis 測定は従来法、マイクロ化学合成デバイス双方の生成物について微小セル(3  $\mu\text{L}$ )を用いて測定を行い電荷移動遷移(d-d および CT 遷移)のピークの有無を調べた。d-d 遷移と CT 遷移は、配位子と中心金属間で見られるピークで、このピークを確認することにより金属錯体の合成が確認できる。これらのピークを確認すると、従来法およびマイクロ化学合成デバイス法で d-d および CT 遷移のピークが確認でき、配位子に中心金属が付加していることが示された。これらは目的の Mn(II), Co(II)錯体が合成されていることを示している(図 2.11, 2.12)。

TOF-MS による分析では、目的化合物の分子量である Mn(II) (MW: 611.0) および Co(II) 錯体 (MW: 615) の位置にピークが確認され、従来法、マイクロ化学合成デバイス法ともにサレン型 Mn(II), Co(II)錯体が合成できていることが示された(図 2.13, 2.14)。 $[\text{m}/\text{z}]$ : 640 付近のピークは測定の際に Cl 等ハロゲン元素が化合物に付加したことによるものと考えられる。

これらの結果は、マイクロ化学合成デバイスを用いてサレン型 Mn(II), Co(II)錯体が合成されていることを示している。従来法でサレン型 Mn(II), Co(II)錯体を合成する場合では、合成工程中での Mn および Co の酸化を防止するために窒素雰囲気中での合成操作が必須であった。しかし、マイクロ化学合成デバイスでは元々閉じられた系での合成のため、窒素雰囲気中にマイクロ化学合成デバイスを封入する必要がなくなった。さらに、従来法では4時間(配位子合成:2時間、錯体合成:2時間)の合成時間が必要な反応に対して、マイクロ化学合成デバイスでは1秒以下で目的錯体が合成された。

ZhangとCloudらは、PDMSには酸素を透過させる性質があり、試薬が酸化する可能性がある<sup>5</sup>と報告しているが、本実験では酸化は観察されなかった。反応時間の早さとマイクロ化学合成デバイス内の動的な中での化学合成のため、酸素の影響が極端に抑えられたと考えられる。



**Inlet a:** 3,5-dichloro-salicylaldehyde  
**Inlet b:** (1*R*,2*R*)-(+)-1,2-diphenylethylenediamine  
**Inlet c:** Mn (II) acetate tetrahydrate

図 2.6 マイクロ化学合成デバイスによるサレン型 Mn(II)錯体の合成

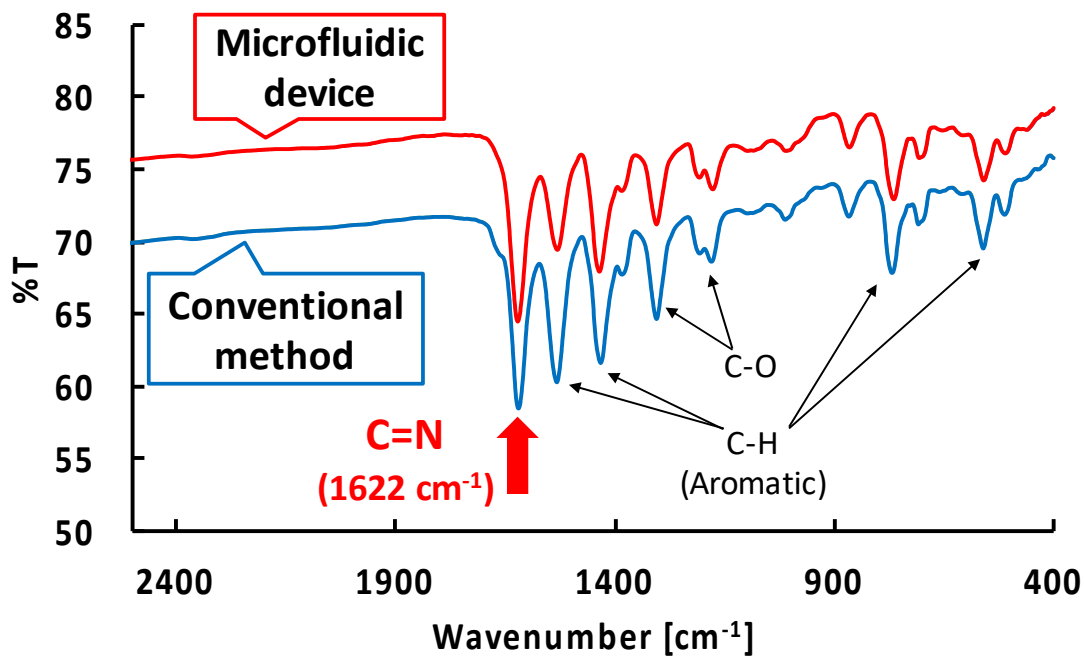


図 2.7 サレン型 Mn(II)錯体の IR 測定の結果

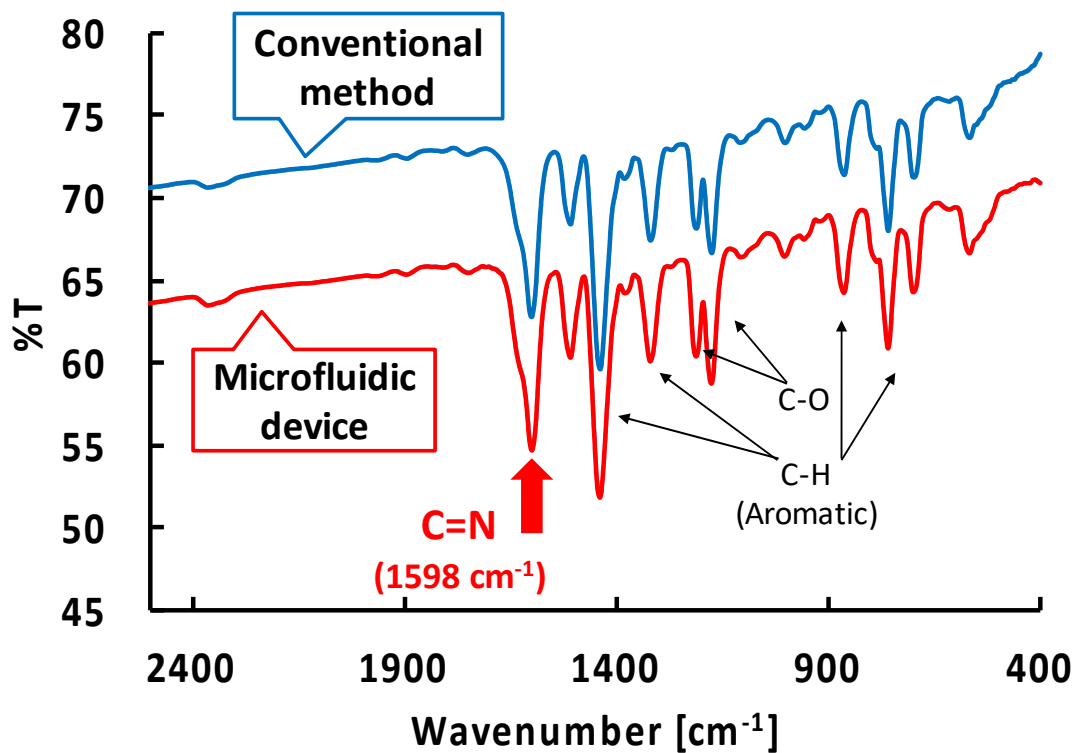
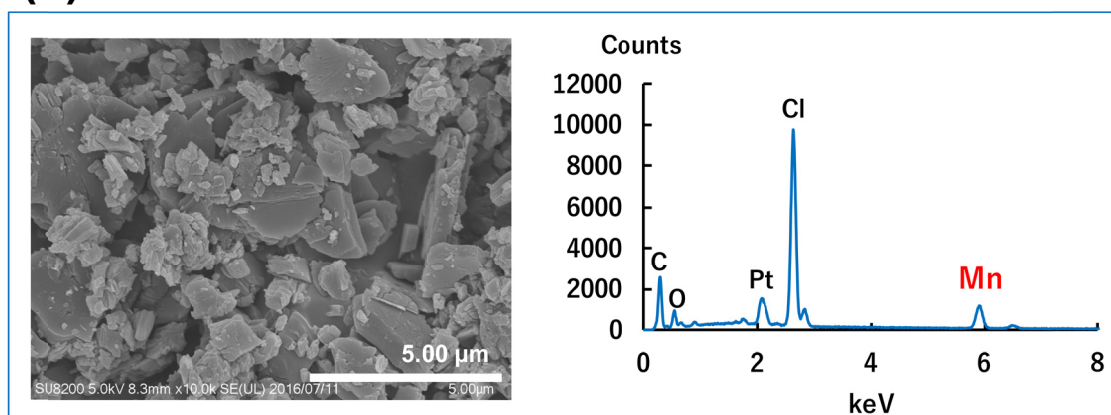


図 2.8 サレン型 Co(II)錯体の IR 測定の結果

## (a) Conventional method



## (b) Microfluidic device

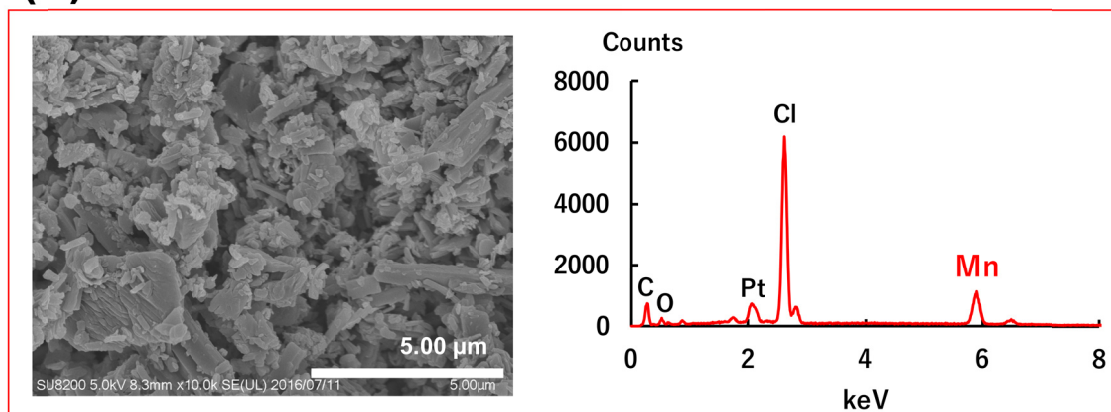
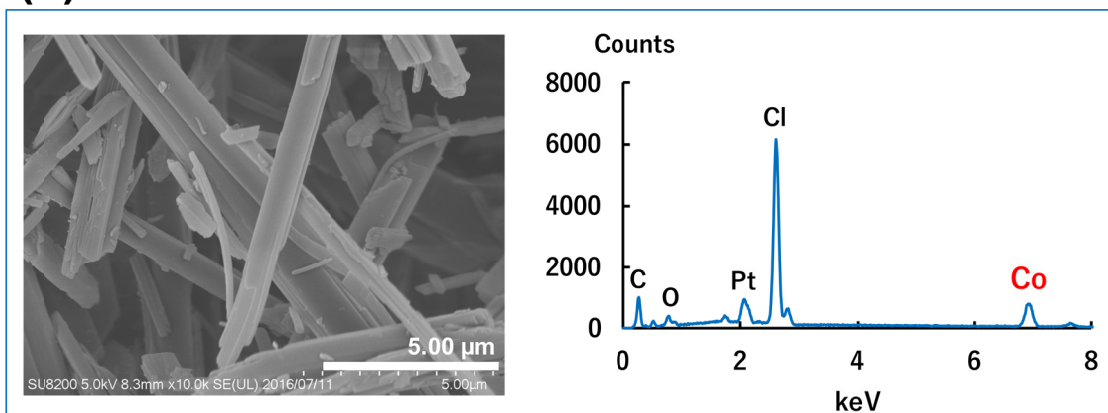


図 2.9 サレン型 Mn(II)錯体結晶(SEM 像)及び EDX 分析の結果 (a)従来法 (b) マイクロ化学合成デバイス法

### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

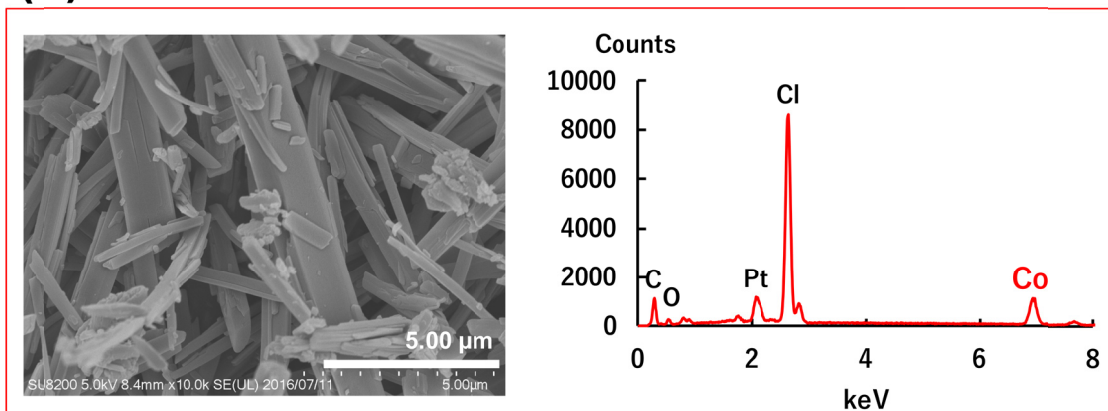


図 2.10 サレン型 Co(II)錯体結晶(SEM 像)及び EDX の結果 (a)従来法 (b) マイクロ化学合成デバイス法

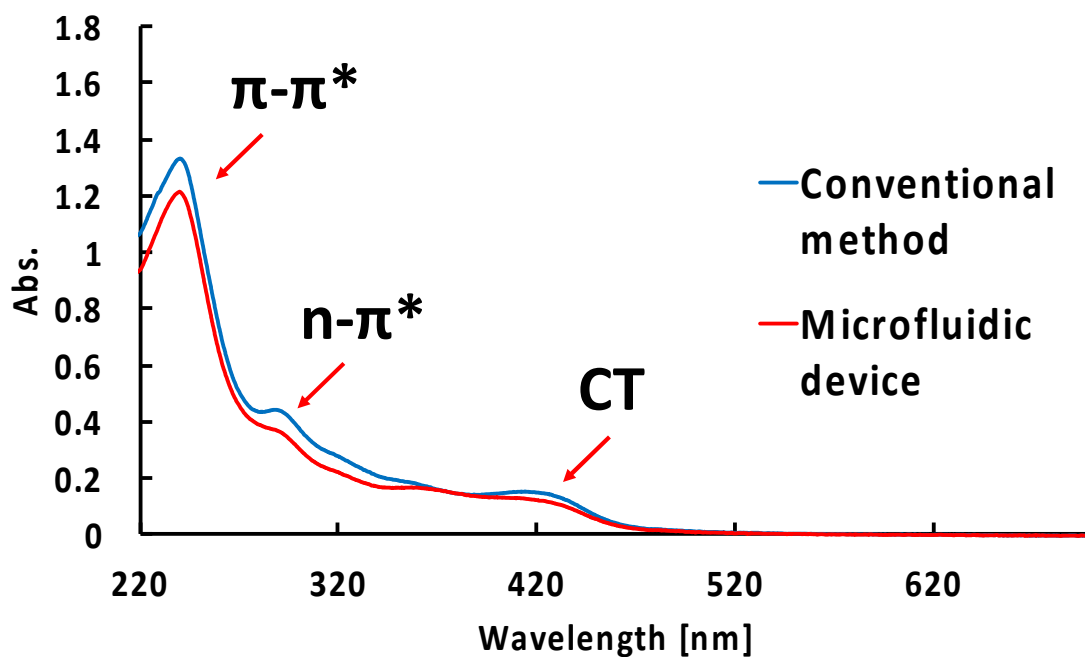


図 2.11 サレン型 Mn(II)錯体の UV-vis スペクトル測定の結果

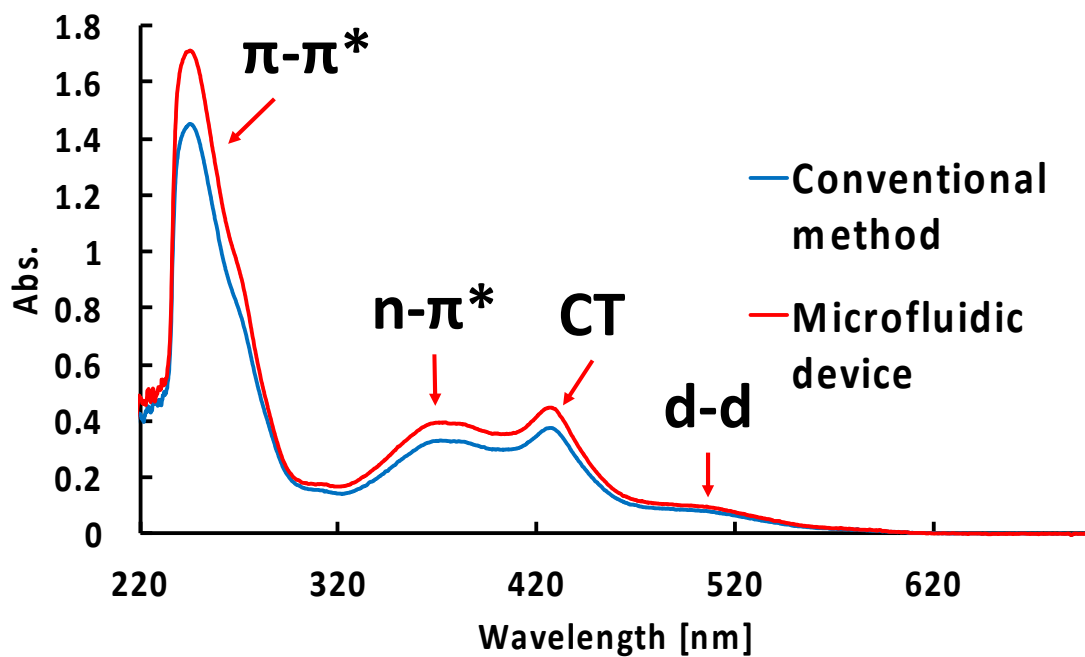
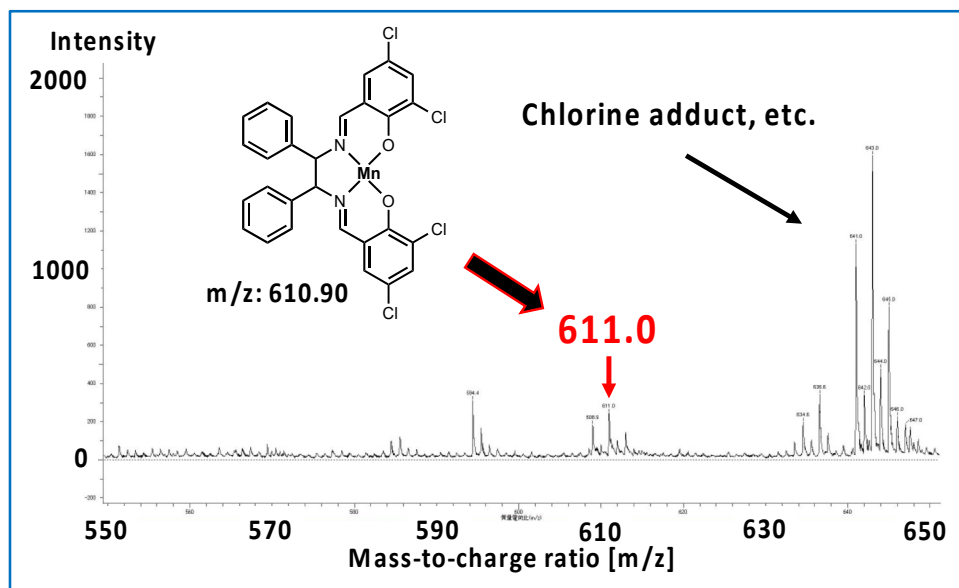


図 2.12 サレン型 Co(II)錯体の UV-vis スペクトル測定の結果



### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

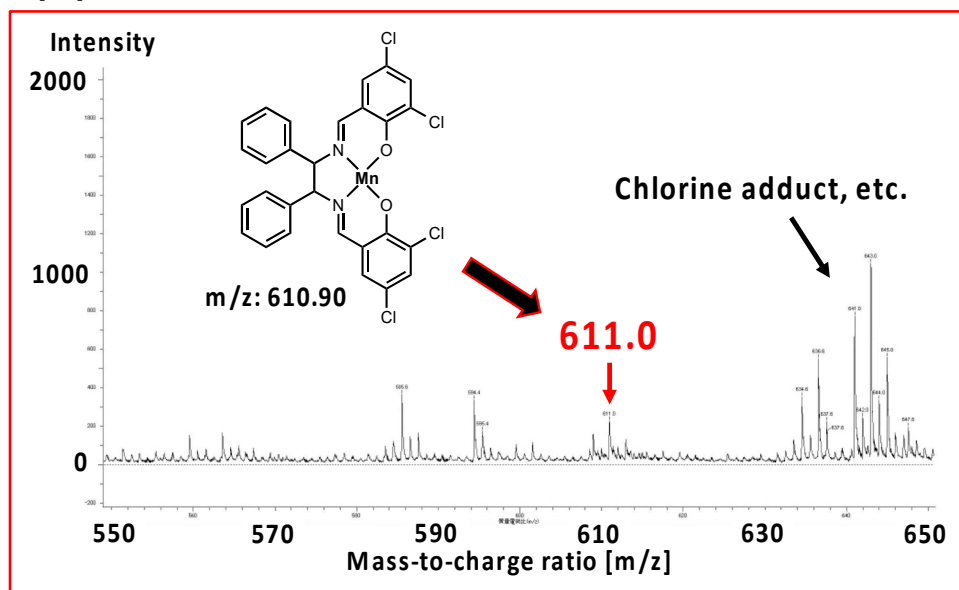
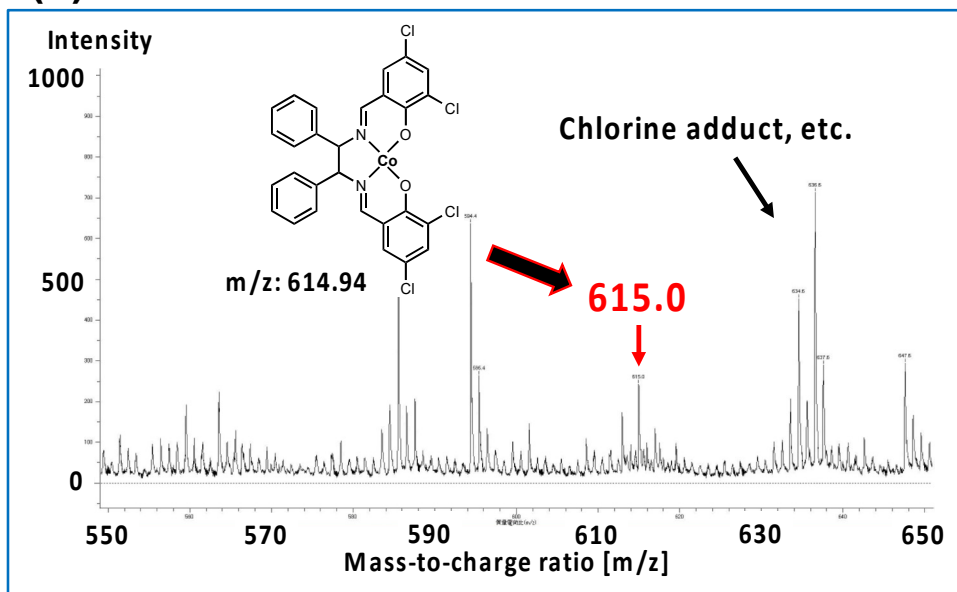


図 2.13 サレン型 Mn(II)錯体の MS による分析結果 (a)従来法 (b) マイクロ化学合成  
デバイス法

### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

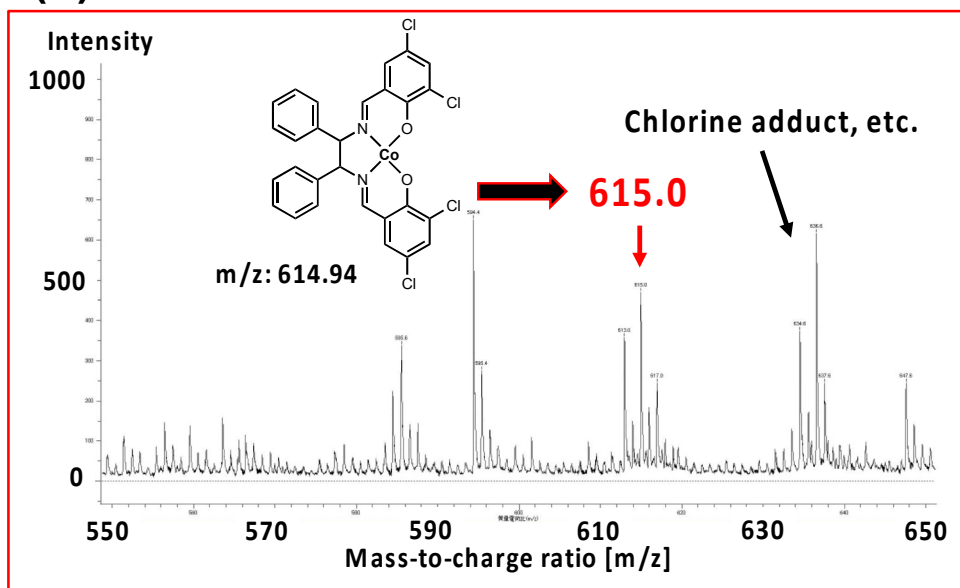


図 2.14 サレン型 Co(II)錯体の MS による分析結果 (a)従来法 (b) マイクロ化学合成  
デバイス法

### 2.1.5 まとめ

マイクロ化学合成デバイスを用いたサレン型 Mn(II), Co(II)錯体の化学合成では配位子溶液と酢酸金属溶液が触れた瞬間に錯形成が開始され、1 秒以下でサレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成が可能であった(表 2.2)。さらに従来法では厳密な温度管理やグローブボックス中での合成等、煩雑な合成工程が必須であったが、マイクロ化学合成デバイスを応用することにより室温、大気下で合成が可能となり、簡便な方法でサレン型 Mn(II), Co(II)錯体の合成が可能となった。

表 2.2 従来法とマイクロ化学合成デバイスによる化学合成条件の違い

	従来法	マイクロ化学合成デバイス
合成温度	40 °C	室温 (23°C)
反応時間	4 hr.	1 sec.
合成雰囲気	N <sub>2</sub>	Air

## 2.2 アゾ Mn(II)錯体の合成

アゾ Mn(II)錯体とは構造中に橙色色素のアゾ基(R-N=N-R)をもつ金属錯体で、紫外の光に対して光異性化を示す特性がある(図 2.15)。このようなアゾ基を金属錯体に付与することにより光により分子配向が制御可能となり、高効率な太陽光パネルや燃料電池の電極への応用が期待されている。しかし、現在、このアゾ Mn(II)錯体を合成するには、強酸、強塩基を用いたジアゾ化反応が必須であり、強酸、強塩基に由来する副生成物が避けられない。そこで本研究では酸、塩基の濃度を低く設定し、マイクロ化学合成デバイスを用いることで、より温和な条件下でのアゾ化合物の合成を試みた(図 2.16)。

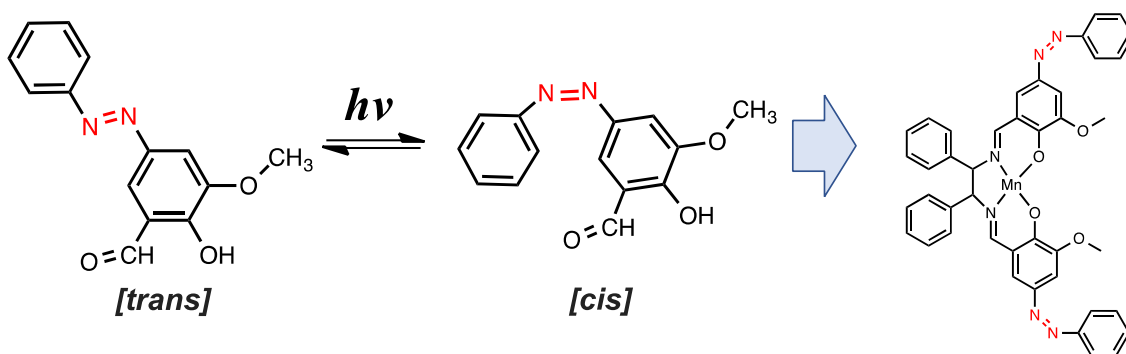


図 2.15 光応答性を示すアゾ Mn(II)錯体

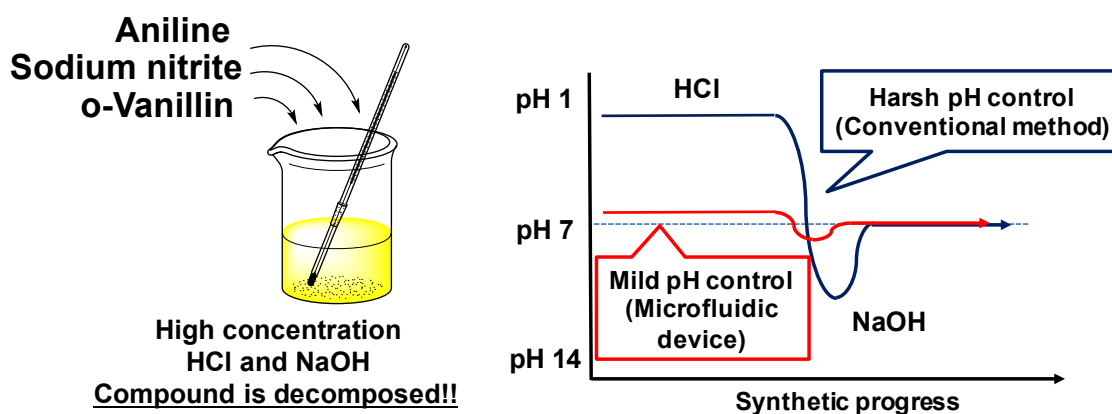


図 2.16 従来法とマイクロ化学合成デバイスを用いたアゾ化合物合成における pH 条件の比較

### 2.2.1 試薬および分析装置

市販されている試薬を、精製せずにそのまま使用した。合成された各化合物は、赤外分光法 (IR; FT / IR-6200、JASCO)、紫外可視分光法 (UV-vis; U-3900、Hitachi)、質量分析法 (FAB-MS; JMS-BU25、JEOL (TOF-MS; JMS-T100LC、JEOL)、プロトン NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ; ECX500、JEOL) および X 線回折 (XRD; RINTUltima3、Rigaku) により同定された。

### 2.2.2 従来法によるアゾ Mn(II)錯体の合成

アゾ Mn(II)錯体は 3 つのステップで合成される。Step I でアゾ化合物の合成、Step II でアゾシッフ塩基配位子の合成、そして Step III でアゾ配位子に Mn(II)を配位させる合成反応である<sup>6</sup>(図 2.17、2.18)。

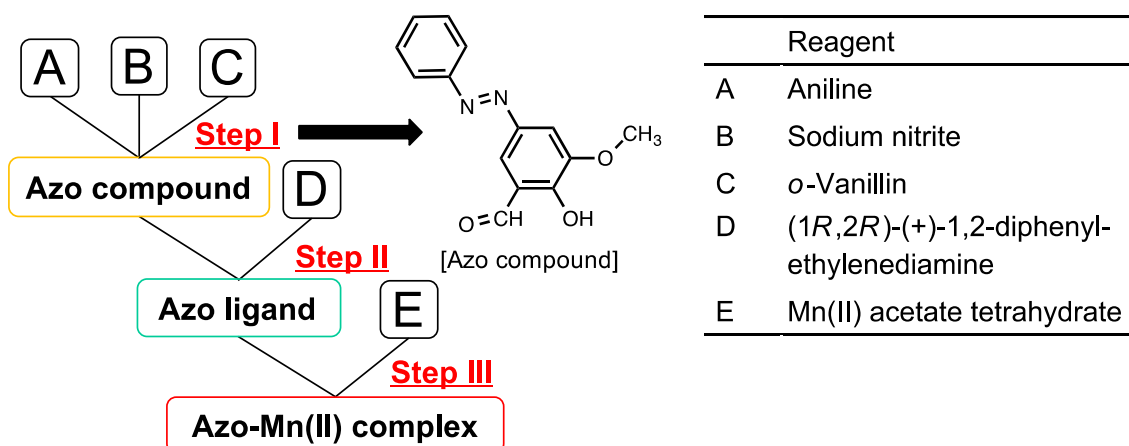


図 2.17 3 ステップで構成されるアゾ Mn(II)錯体合成

**Step I, Azo compound**

Analysis method

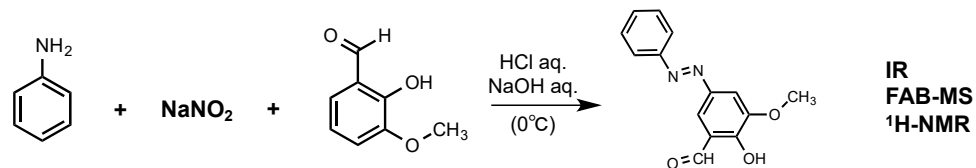
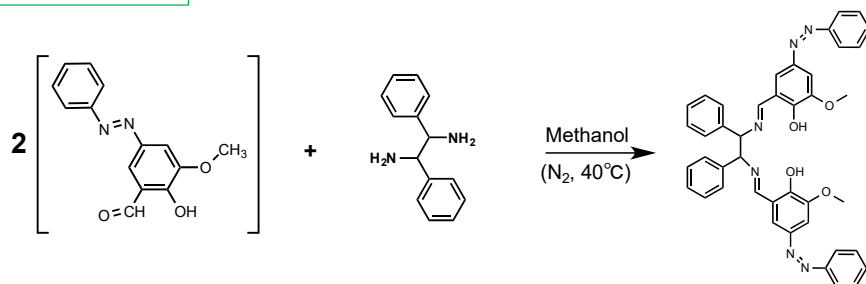
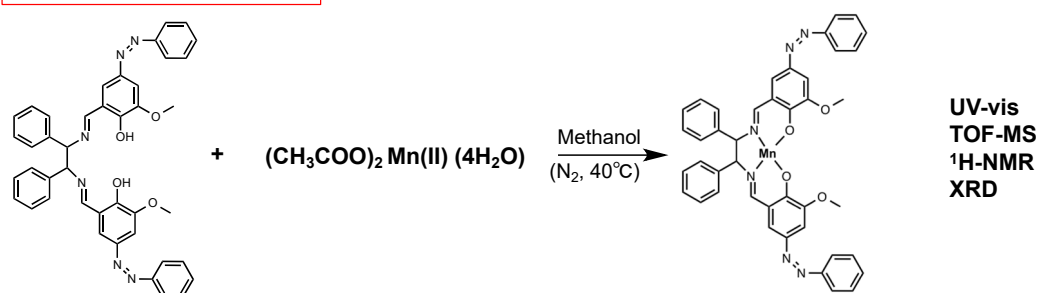
**Step II, Azo ligand****Step III, Azo-Mn(II) complex**

図 2.18 アゾ Mn(II)錯体の合成スキーム

### 2.2.2.1 従来法によるアゾ化合物の合成 (Step I)

アゾ化合物は以下の工程により合成した。

- ① 希塩酸 30 mL (5.62 mol/L)に Aniline (10 mmol)を滴下して混合。
- ② 純水 30 mL に Sodium nitrite (10 mmol)を溶解。
- ③ ②の水溶液を①の溶液に滴下混合。
- ④ 30 分攪拌することでジアゾニウム化合物を合成。
- ⑤ ④溶液に o-Vanillin を加える。
- ⑥ ⑤の溶液に水酸化ナトリウム水溶液(5.62 mol/L)を徐々に加えて pH 7 に調整。
- ⑦ 30 分攪拌することでオレンジ色を呈したアゾ化合物を合成。
- ⑧ 濾過によりアゾ化合物を抽出。

なお、このアゾ化合物の合成は発熱反応であるため、全ての工程を氷冷下で行った。合成した化合物については IR、FAB-MS、および  $^1\text{H-NMR}$  により同定した。

### 2.2.2.2 従来法によるアゾ配位子の合成 (Step II)

メタノール 50 mL に 2.2.2.1 で合成したアゾ化合物(2 mmol)を溶解する。この溶液に (*1R,2R*)-(+)-1,2-diphenylethylenediamine (1 mmol)を加え 40°C、2 時間攪拌をすることによりアゾ配位子を合成した。

### 2.2.2.3 従来法によるアゾ Mn(II)錯体の合成 (Step III)

2.2.2.2 で合成したアゾ配位子の溶液中(50 mL)に Mn(II) acetate tetrahydrate (1 mmol)を加え 40°C、2 時間攪拌することにより赤褐色の粉末状のアゾ Mn(II)錯体を合成した。その後、濾過により目的生成物を得た。なお、アゾ Mn(II)錯体の合成操作は Mn(II)の酸化防止のため窒素雰囲気下で行った。合成した化合物は UV-vis、TOF-MS、 $^1\text{H-NMR}$  および XRD により同定した。

### 2.2.3 マイクロ化学合成デバイスによるアゾ Mn(II)錯体の合成

本実験で使用したマイクロ化学合成デバイスは2.1節と同様にソフトMEMS技術により作製した。

#### 2.2.3.1 デバイスデザイン

本実験は、二種類のデバイスデザインを採用し合成実験を行った。一種類目のデザインは、アゾ化合物の合成 (Step I) およびアゾ配位子 (Step II) の合成で使用したもので2.1節の際に用いた Y 字型のマイクロ化学合成デバイスである。二種類目のデザインは、アゾ Mn(II)錯体 (Step III) の工程で使用したもので最終生成物が液体状で生成するため界面付近で合成された目的生成物のみを取り出すために流路内に分離壁を設けたデバイスデザインとした(図 2.19)。

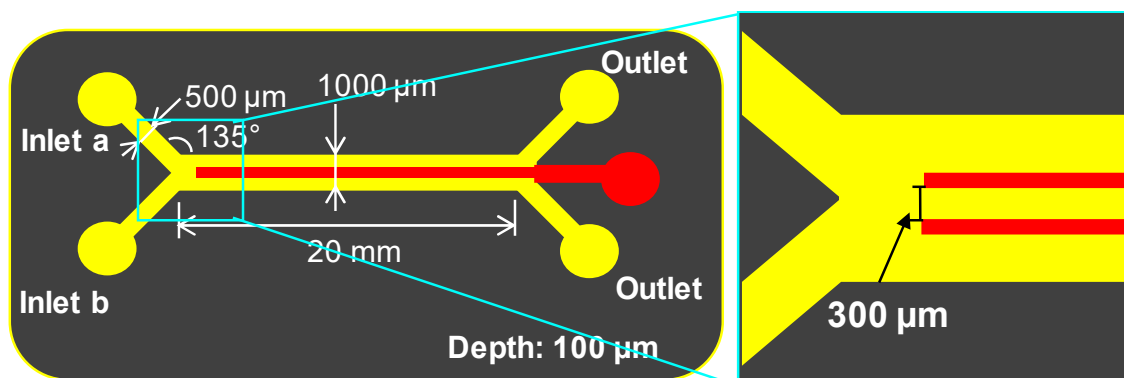


図 2.19 分離壁を設けたマイクロ化学合成デバイス

#### 2.2.3.2 予備実験

アゾ化合物の合成 (Step I) について、マイクロ化学合成デバイスで合成実験を行うにあたり pH 調整試薬としての HCl と NaOH の適切な濃度を決定するための予備実験を行った。HCl と NaOH の濃度は 1/1 (5.62 mol/L)、1/2 (2.81 mol/L)、1/5 (1.12 mol/L)、1/10 (0.56 mol/L)、1/15 (0.37 mol/L)、1/20 (0.28 mol/L) に設定した。アゾ化合物は本来オレンジ色を呈した化合物であるが、中和反応に失敗をすると黒色の油状物質が生成しアゾ化合物は合成されない。予備実験では黒色の副生成物が生成しない HCl の濃度を確かめた。

予備実験の結果を表 2.3 に示す。5.62, 2.81, 1.12 mol/L の濃度では、黒色の油状副



生成物が生成し合成失敗となった。0.56 および 0.37 mol/L の濃度による合成では、オレンジ色を呈したアゾ化合物が得られた。さらに、0.28 mol/L より低い HCl の濃度では、アニリンが水溶液中に溶解しなくなり合成実験の続行が不可能であった。この予備実験の結果から、温和な pH 条件下での合成の実現を目的とするため HCl の濃度 1/15 (0.37 mol/L) でアゾ化合物の合成実験を行うことにした。

表 2.3 予備実験における各濃度に対する合成結果

HCl の濃度	合成結果
5.62 mol/L	失敗
2.81 mol/L	失敗
1.12 mol/L	失敗
0.56 mol/L	成功
0.37 mol/L	成功
0.28 mol/L	試薬が不溶

#### 2.2.3.3 マイクロ化学合成デバイスによるアゾ化合物の合成 (Step I)

この合成実験では Y 字型マイクロ化学合成デバイスを使用した。アゾ化合物の合成で使用した試薬は従来法と同様で、Aniline、Sodium nitrite および o-Vanillin を用いた。なお、試薬は従来法と同濃度に調整された。Aniline を HCl 水溶液(0.37 mol/L)に溶解し、o-バニリンを NaOH 水溶液(0.37mol/L)に溶解した。1 本目の Y 字型マイクロ化学合成デバイスのインレットから Aniline と Sodium nitrite を導入し合成を行い、アウトレットから 2 本目の Y 字型マイクロ化学合成デバイスのインレットに接続、もう一方のインレットから o-Vanillin (250 mmol /L)を導入した。シリンジポンプの流量は、2  $\mu$ L/min で流体実験を実施した。合成したアゾ化合物を濾過、洗浄し、IR、FAB-MS および  $^1$ H-NMR により同定分析を行った(表 2.3)。

#### 2.2.3.4 マイクロ化学合成デバイスによるアゾ配位子の合成 (Step II)

アゾ配位子(Step II)の合成実験は、Y 字型のマイクロ化学合成デバイスを使用した。アゾ配位子を、アゾ化合物 (40 mmol/L) および(*IR,2R*)-(+)-1,2-diphenylethylene-diamine (20 mmol/L)から合成した。シリンジポンプの流量は 2  $\mu$ L/min である(表 2.3)。

### 2.2.3.5 マイクロ化学合成デバイスによるアゾ Mn(II)錯体の合成 (Step III)

アゾ Mn(II)錯体を 2.2.3.4 で合成したアゾ配位子と Mn(II) acetate tetrahydrate (20 mmol/L)から合成した。この合成ステップでは最終生成物が液体のため X 字型で流路内に隔壁を設けたマイクロ化学合成デバイスを使用した。この合成工程では 1 本目の Y 字型マイクロ化学合成デバイス(2.2.3.4)のアウトレットから 2 本目の X 字型のマイクロ化学合成デバイスにフッ素樹脂チューブを繋ぎ入れ、他方のインレットから Mn(II) acetate を導入した(図 2.20)。シリンジポンプの流量は 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  で流体実験を行った。合成後の化合物の溶媒を蒸発させることにより最終目的生成物を得た。生成物は、UV-vis、TOF-MS、 $^1\text{H-NMR}$  および XRD により同定した(表 2.4)。

表 2.4 アゾ Mn(II)錯体の各合成条件

	従来法	マイクロ化学合成デバイス
pH 制御に使用する試薬の濃度 (step I), HCl and NaOH	5.62 mol/L	0.37 mol/L
試薬の濃度 1 (step I), アゾ化合物	250 mmol/L	250 mmol/L
試薬の濃度 2(steps II and III) アゾ Mn(II)錯体	20, 40 mmol/L	20, 40 mmol/L
合成温度 1 (step I), アゾ化合物	0-5 °C	23 °C
合成温度 2 (steps II and III) アゾ Mn(II)錯体	40 °C	23 °C
流量	-	2 and 4 $\mu\text{L}/\text{min}$
合成時間 (step I) アゾ化合物	1 h	1 s
合成時間 (steps II and III) アゾ Mn(II)錯体	4 h	1 s
合成雰囲気	N <sub>2</sub>	Air
合成場の容積	50 cm <sup>3</sup>	0.002 cm <sup>3</sup>
同定方法 1 (step I), アゾ化合物	IR, FAB-MS and $^1\text{H-NMR}$	
同定方法 2 (step III), アゾ Mn(II)錯体	UV-vis, TOF-MS, $^1\text{H-NMR}$ and XRD	

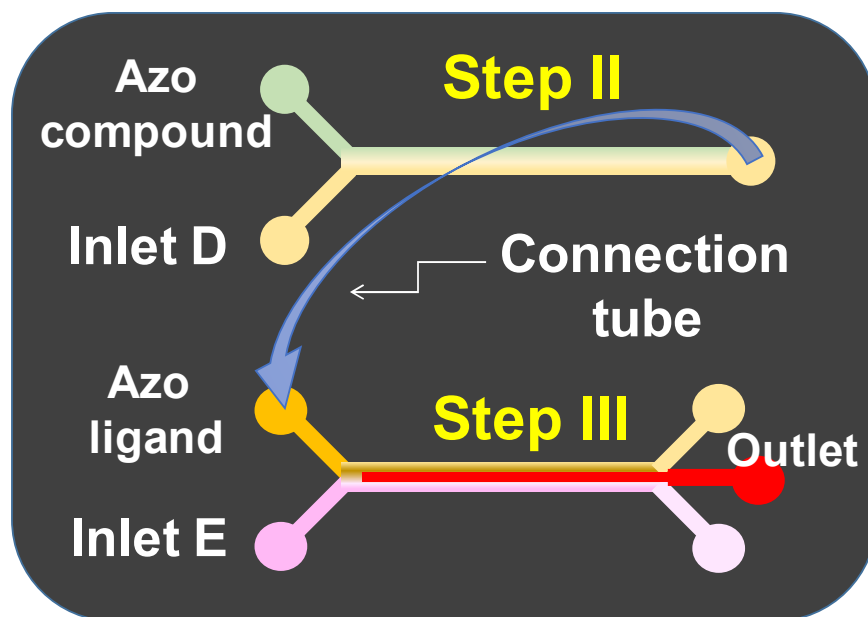


図 2.20 マイクロ化学合成デバイスを用いたアゾ Mn(II)錯体の合成工程

## 2.2.4 マイクロ化学合成デバイスを用いたアゾ Mn(II), Co(II)錯体合成実験における結果および考察

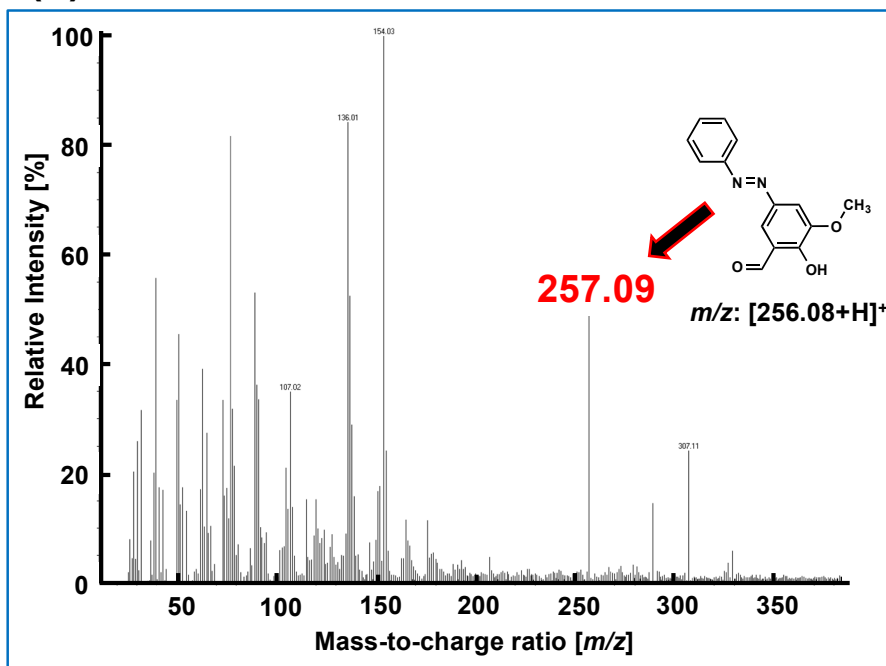
### 2.2.4.1 アゾ化合物(Step I)の合成結果

従来法とマイクロ化学合成デバイス法で合成した生成物の FAB-MS による分析結果を図 2.21 に示す。質量電荷比 ( $m/z: [256.08+H]^+$ ) 由来のピークから目的化合物の合成が示された。また、 $^1\text{H-NMR}$  による分析結果では、双方の生成物ともスペクトルは一致していた(図 2.22)。さらに、IR による測定結果では  $\text{N}=\text{N}$  (KBr 法:  $1590\text{ cm}^{-1}$ ) に対応するピークが確認された(図 2.23)。これらの分析データは、従来型およびマイクロ化学合成デバイス法の双方においてアゾ化合物を合成可能なことを示している。さらに、マイクロ化学合成デバイスにおいて穏やかな pH 制御下でアゾ化合物を合成できることを示している。アゾ化合物の合成では図 2.24 に示す通り、 $\text{H}^+$  が起因となり反応が進行するため、合成過程において希塩酸は必須となる。マイクロ化学合成デバイスを用いたアゾ化合物の合成では、マイクロ化学合成デバイスの界面による化学種の効率的な拡散に起因し、希塩酸に含まれる  $\text{H}^+$  が効率的に流路内に拡散する。このため、塩酸の濃度を従来法と比較して 1/15 まで下げることに成功したと考えられる。

さらに、ジアゾ化反応は発熱反応のため従来法では氷冷下での合成が必須であっ

たが、マイクロ化学合成デバイスを用いた合成反応では室温(23 °C)での合成が可能であった。マイクロ化学合成デバイスでは、反応場の単位容積あたりの表面積が格段に大きくなる。これにより熱交換効率が高くなり、発熱を伴うアゾ化合物の合成でも冷却温度制御が不要となったと考えられる。

### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

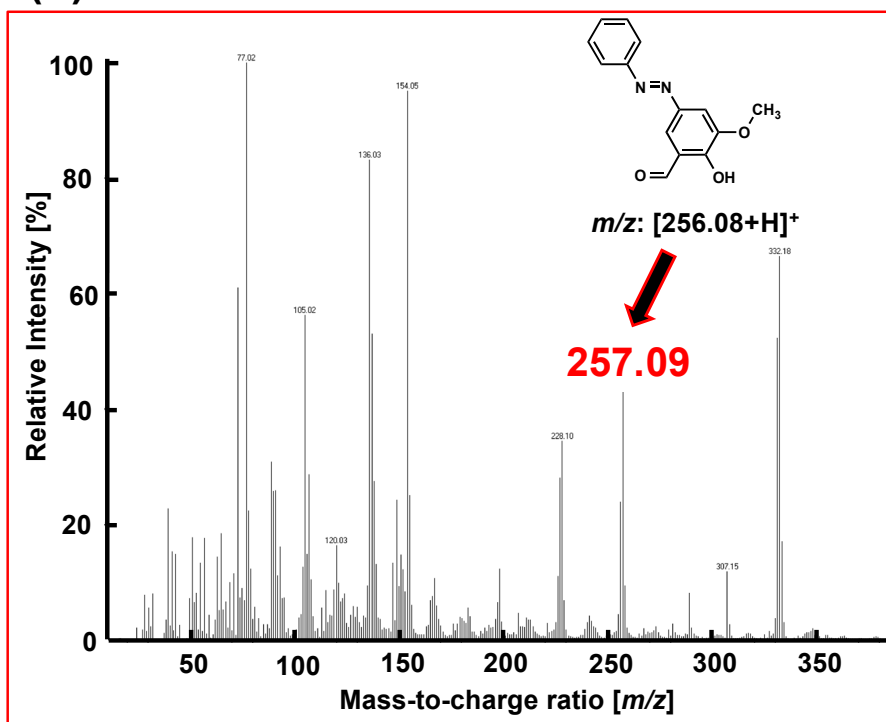
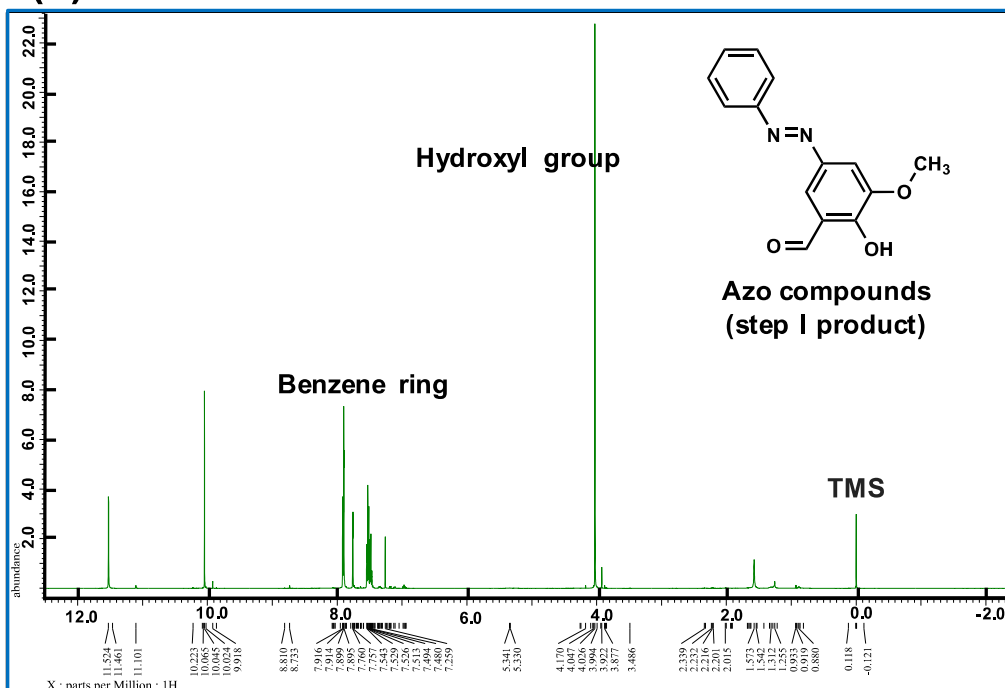


図 2.21 アゾ化合物の FAB-MS の結果  
(a)従来法 (b) マイクロ化学合成デバイス

### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

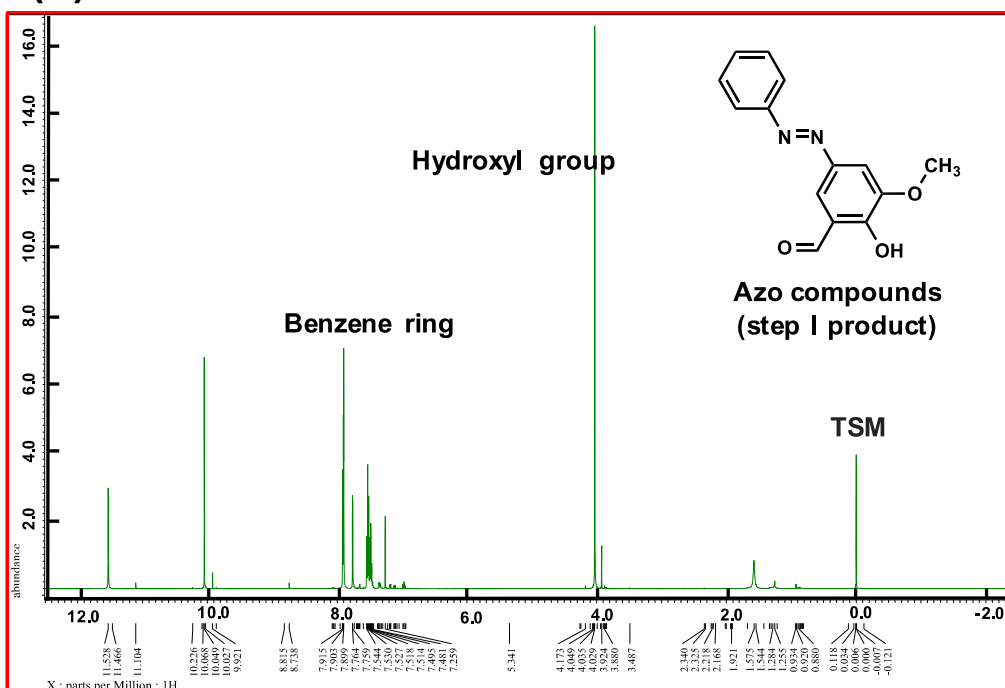


図 2.22 従来法、マイクロ化学合成デバイス法によるアゾ化合物の  $^1\text{H-NMR}$  の結果  
(a)従来法 (b) マイクロ化学合成デバイス

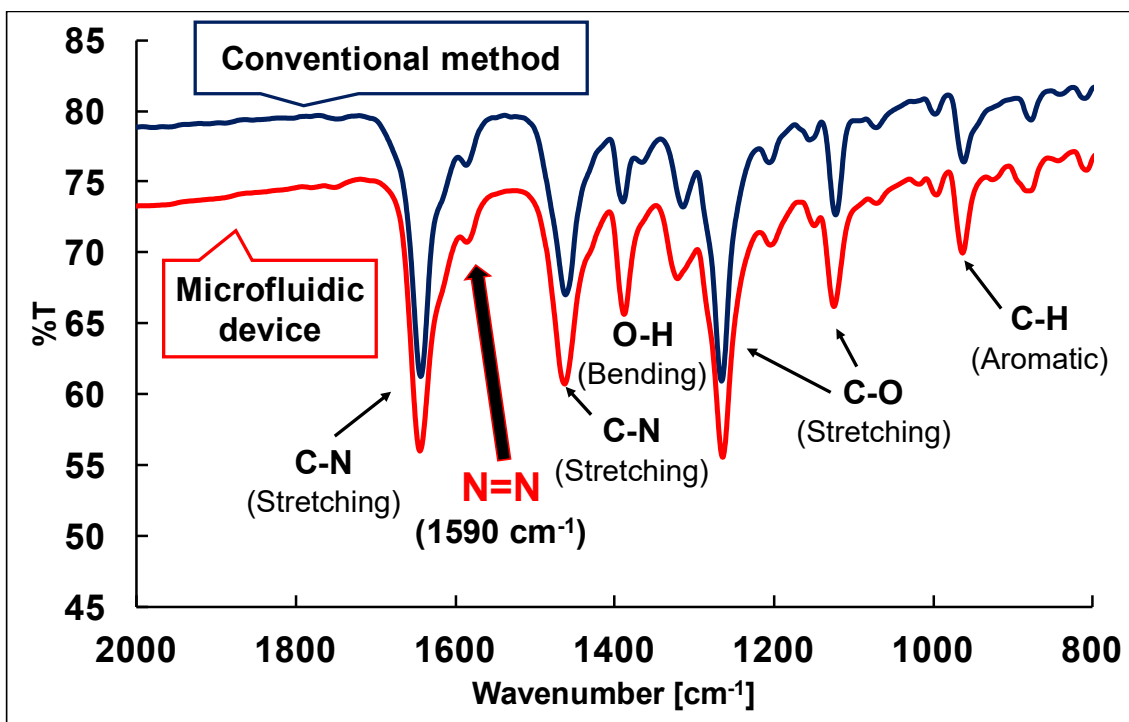


図 2.23 従来法、マイクロ化学合成デバイス法によるアゾ化合物の IR による分析結果

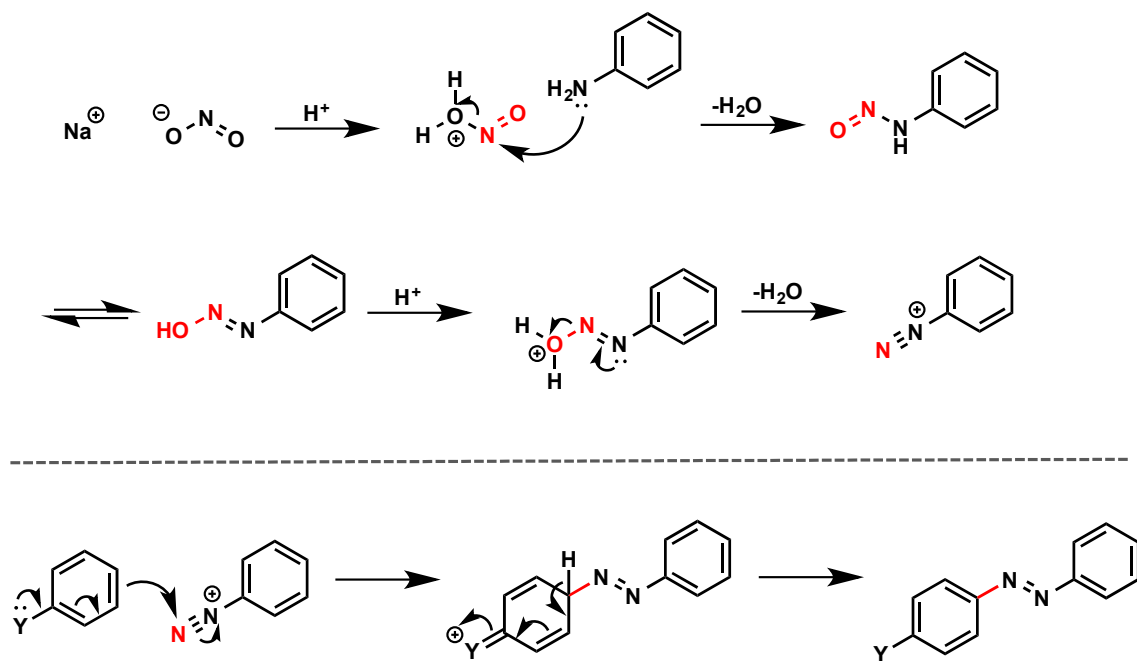


図 2.24 アゾ化合物の合成スキーム



#### 2.2.4.2 アゾ Mn(II)錯体(Step II, Step III)の合成結果

UV-vis スペクトル(図 2.25)で  $\pi\text{-}\pi^*$ ,  $n\text{-}\pi^*$  および CT 遷移が確認されたことは、従来法、マイクロ化学合成デバイス法双方でアゾ Mn(II)錯体が合成されたことを示している。また、TOF-MS による分析では、アゾ Mn(II)錯体 ( $m/z$ : 741.2; 図 2.26) のピークが確認された。なお、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルのピークの位置は一致している(図 2.27)。これらの結果は、アゾ Mn(II)錯体がマイクロ化学合成デバイスにより合成されたことを示すものである。また、本実験では、XRD による結晶構造解析を試みたが、従来法、マイクロ化学合成デバイス法双方とも良質な錯体結晶を得ることができず測定不良となった。この点については、ヘキサンや酢酸エチルを用いて再結晶を行う等の工夫の必要があると考えられる。

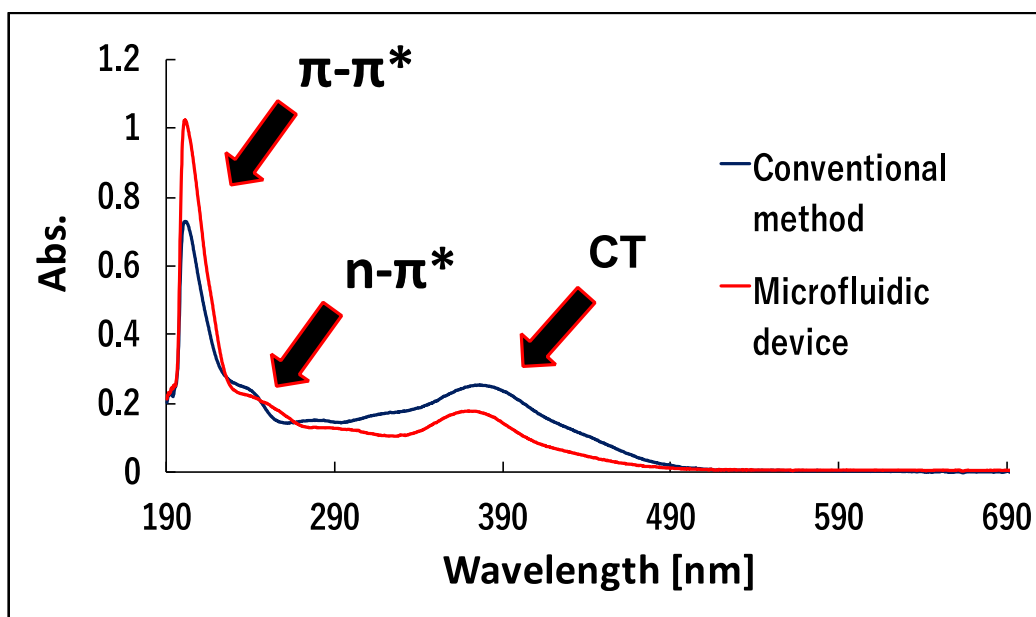
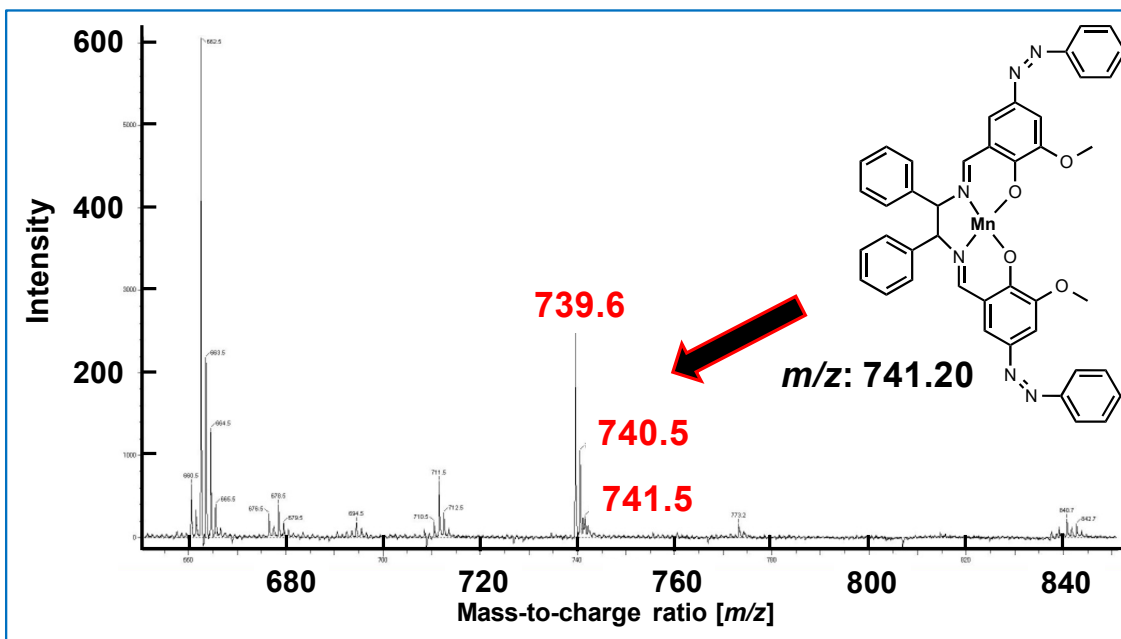


図 2.25 アゾ Mn(II)錯体の UV-vis の測定結果

### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

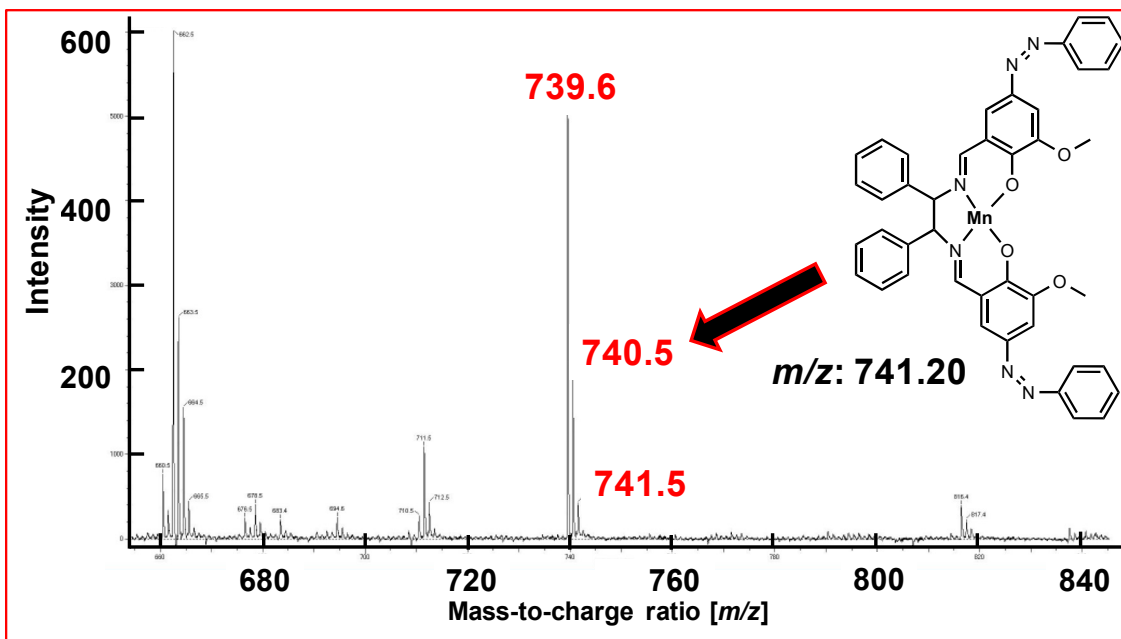
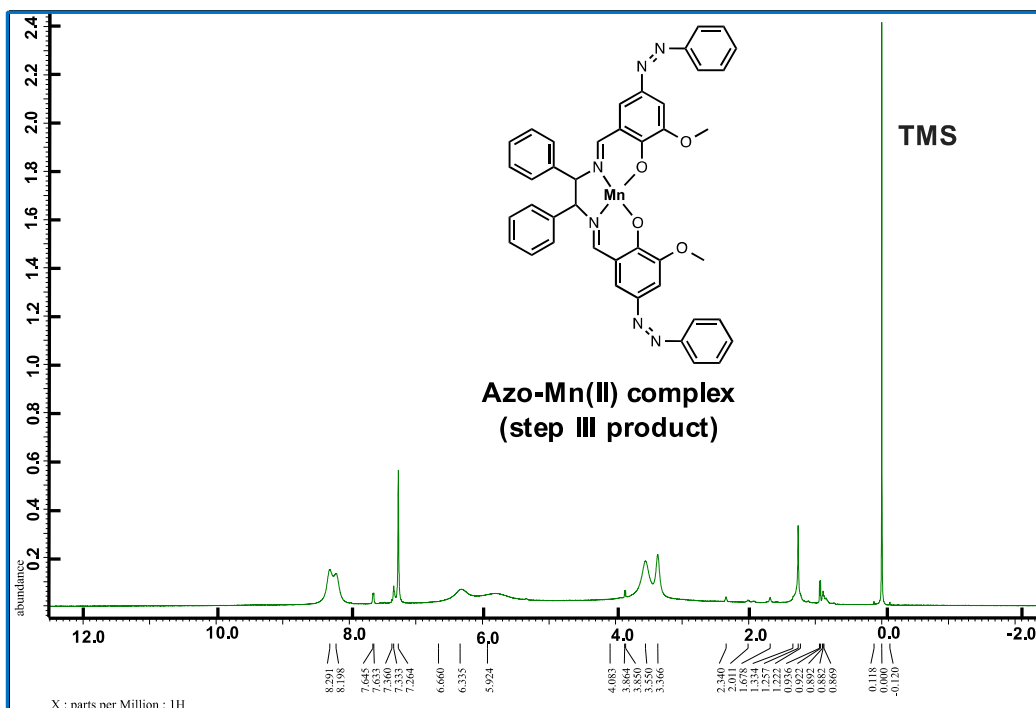


図 2.26 アゾ Mn(II)錯体の TOF-MS による分析結果 (a)従来法 (b) マイクロ化学 合成デバイス

### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

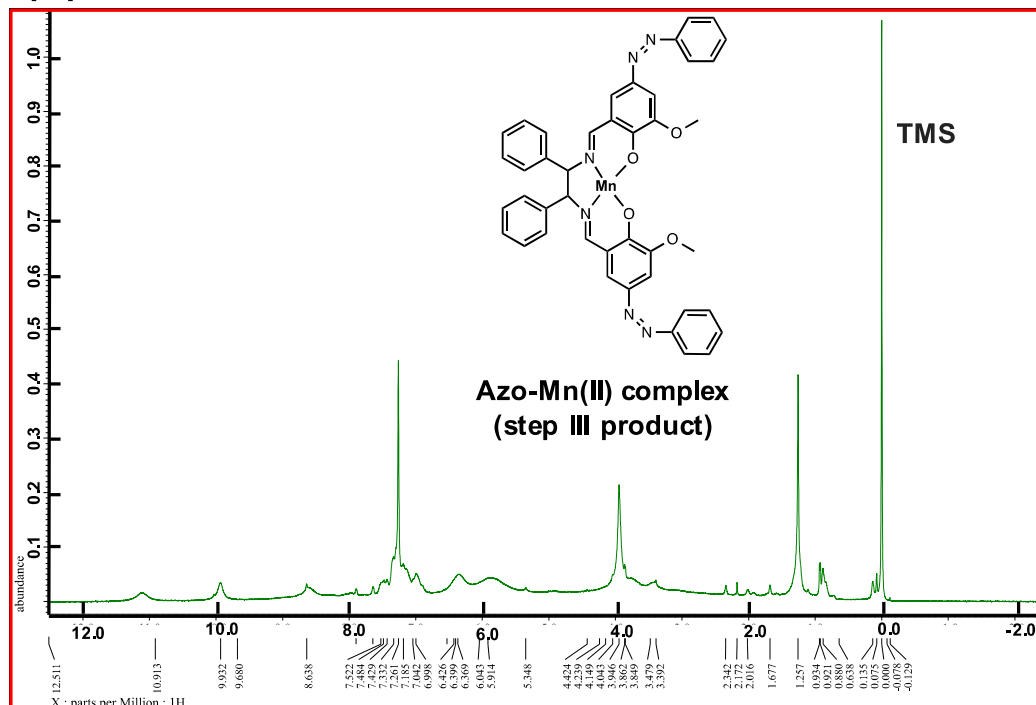


図 2.27 アゾ Mn(II)錯体の <sup>1</sup>H-NMR の結果 (a)従来法 (b)マイクロ化学合成デバイス

## 2.2.5 まとめ

マイクロ化学合成デバイスを用いたアゾ化合物の合成(Step I)では従来法と比較してpH制御に使用する試薬(HCl, NaOH)の濃度を1/15に低減することに成功した。さらに従来法では氷冷下での合成操作が必須であった系に対して室温(23°C)での合成が可能となった。

アゾ Mn(II)錯体の合成では、これまで加温(40 °C)および窒素雰囲気下での合成が必須であった化学合成スキームに対して、室温(23 °C)、大気中での合成が可能となった。さらに4時間必要であった化学反応時間が1秒以下に短縮されることも確認した。これらの結果から、従来では不可能とされてきた、より温和な pH 条件下、環境でアゾ Mn(II)錯体の合成に関して全く新しい合成手法が構築されたと結論できる(表 2.5)。

表 2.5 従来法とマイクロ化学合成デバイスによる化学合成条件の違い

	従来法	マイクロ化学合成デバイス
pH 制御に使用する試薬の濃度 (step I), HCl and NaOH	5.62 mol/L	0.37 mol/L
合成温度1 (step I), アゾ化合物	0–5 °C	23 °C
合成温度1 (step III), アゾ金属錯体	40 °C	23 °C
合成時間1 (step I), アゾ化合物	1 hr.	1 sec.
合成時間2 (step I), アゾ金属錯体	4 hr.	1 sec.
合成雰囲気	N <sub>2</sub>	Air

### 2.3 配位子への臭素(Br)付加合成

Br 基を付加した金属錯体は長波長側の光を吸収する性質を有し、色素増感太陽電池の吸光帯域拡張に応用が可能である等、幅広い分野への応用が期待されている。

Br 付加合成の工程は臭素(Br)が猛毒、腐食性であることから、合成操作はドラフト内で行うことが必須となる。さらにナフタレンに Br 基を付加させる合成スキームは化学反応性が低く反応速度が遅いといった課題があった。そこで本研究ではマイクロ化学合成デバイスの“閉じられた系での合成”と“反応性の高さ”の利点を生かすことにより、安全で高効率な Br 付加合成工程の構築を目指した。

マイクロ化学合成デバイスを利用した Br 付加合成については Cygan らにより報告されている<sup>7</sup>。この研究では有機溶液からなるマイクロドロップレット内で Br 付加反応を行い、目的化合物を合成しているが、Br に対して耐薬品性の低い PDMS 製のデバイスを使用しているため Br が起因となるデバイスの腐食の影響を避けられていない。また、目的化合物の単離に対して人の手を介して抽出操作を行っているため、“安全で高効率な合成”という点では依然課題が残された。

本研究ではマイクロ化学合成デバイスの材質として Br に対して耐薬品性の高いガラスとシリコンを用いた。さらに 2.1 および 2.2 で実績のある Y 字型マイクロ化学合成デバイスを応用することにより、再現性が良い安全な新しい Br 付加合成スキームの構築を目指した。

#### 2.3.1 試薬および分析装置

市販されている試薬を、精製せずにそのまま使用した。合成された各化合物は、赤外分光法 (IR; FT / IR-6200, JASCO)、質量分析法 (FAB-MS; JMS-BU25, JEOL)、走査型電子顕微鏡 (SEM; SU8240, Hitachi) およびエネルギー分散型 X 線分析 (EDX; Genesis-AP2, EDAX) を用いて同定した。

### 2.3.2 従来法による Br 付加合成

合成スキームおよび概要を図 2.28, 2.29 に示す。なお、Br 付加合成は以下の工程で行った<sup>8</sup>。

- ① クロロホルム 10 mL に Br (0.15 mol/L, 10 mL) を溶解した。
- ② クロロホルム 20 mL に Hydroxy-2-naphthaldehyde (0.050 mol /L, 20 mL) を溶解した。
- ③ ②の溶液を①の溶液に 30 分かけて滴下混合した。
- ④ ③の溶液を室温 (23 °C) で 4 時間攪拌した。
- ⑤ 攪拌後、濾過により目的化合物 (4-Bromo-1-hydroxy-2-naphth-aldehyde) を抽出した。

合成した生成物を SEM, EDX, IR および FAB-MS を用いて同定した。

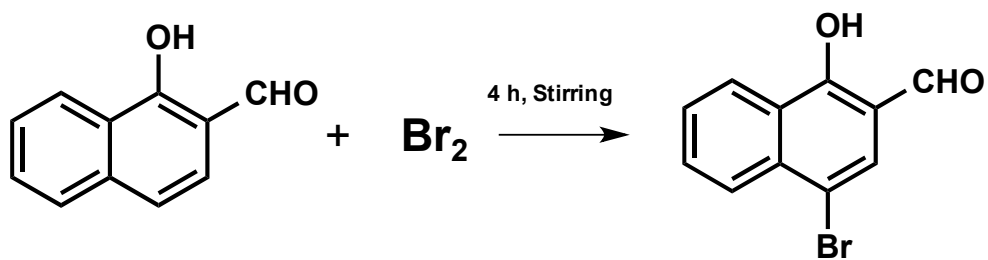


図 2.28 Br 付加合成の反応スキーム

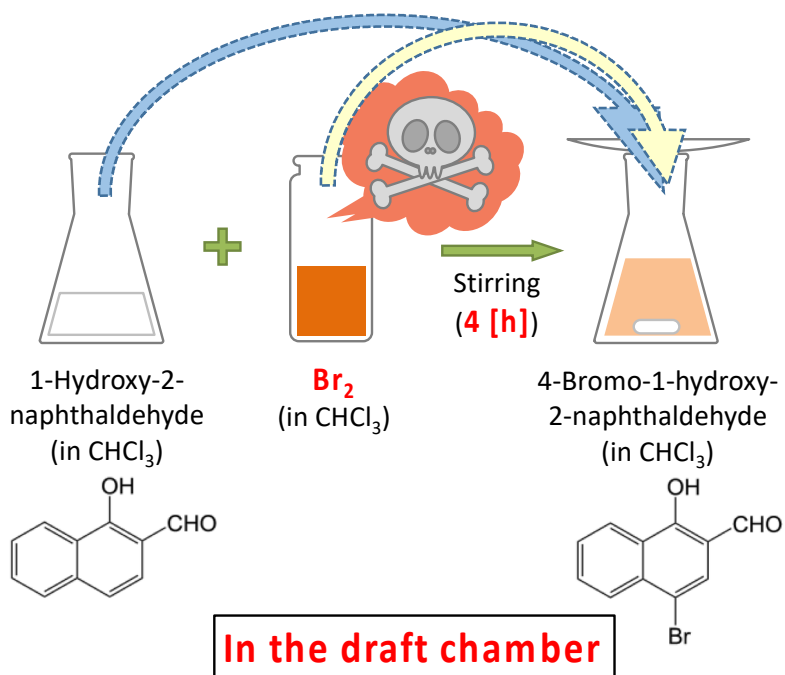


図 2.29 従来の Br 付加実験のスキームとその課題



### 2.3.3 マイクロ化学合成デバイスを用いた Br 付加合成

本実験で使用したデバイスデザインを図 2.30 に示した Y 字型のマイクロ化学合成デバイスを採用した。2つのインレットからクロロホルムに溶かした 1-Hydroxy-2-naphthaldehyde と Br をそれぞれ導入し、界面反応により目的化合物を合成するスキームとなっている。

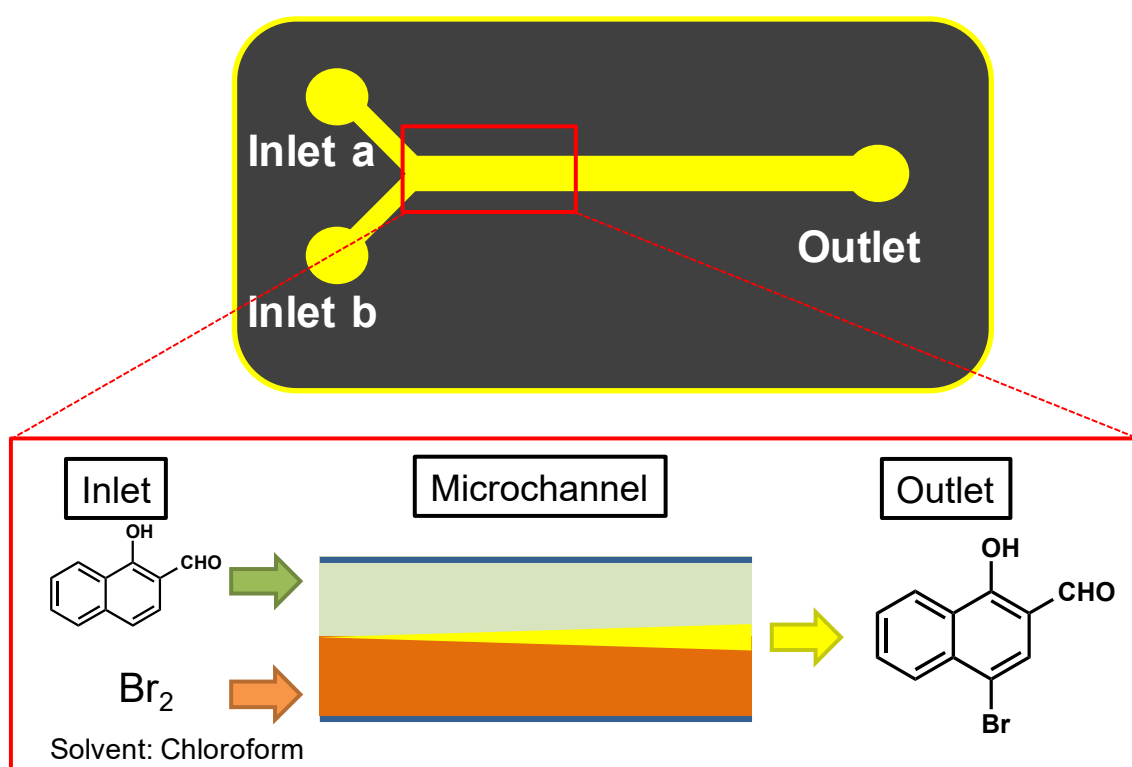


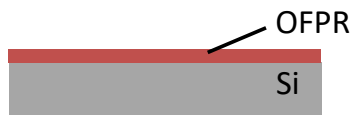
図 2.30 Y 字型マイクロ化学合成デバイスを用いた Br 付加操作

#### 2.3.3.1 マイクロ化学合成デバイスの作製

本実験で使用したマイクロ化学合成デバイスの材質には耐薬品性の観点からガラスとシリコンを用いた。作製プロセスを図 2.31 に示す。

シリコン基板の上にポジ型フォトリソレジストである OFPR (東京応化工業株式会社) をスピコート後 UV 露光装置によりデバイスデザインのパターンを描画した。その後、このパターンをマスクとして DEEP-RIE (RIE-400iPB, SAMCO)を用いてドライエッチングを施しマイクロ化学合成デバイスを作製した。最後に陽極接合によりガラス基板とシリコンデバイスと接合した。

1. OFPR spin coating



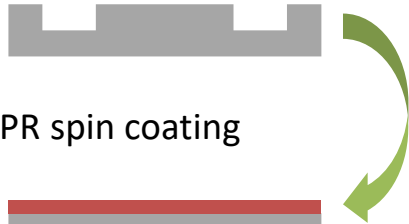
2. UV exposure/ Develop/ Rinse



3. Etching (Deep-RIE)



4. Resist removing



5. OFPR spin coating



6. UV exposure/ Develop/ Rinse



7. Etching (Deep-RIE)



8. Resist removing



9. Anodic bonding

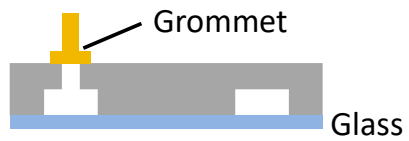


図 2.31 シリコン, ガラス製のマイクロ化学合成デバイスの作製プロセス

### 2.3.3.2 マイクロ化学合成デバイスを用いた Br 付加合成実験

Y 字型マイクロ化学合成デバイスの 2 つのインレットからクロロホルムに溶かした 1-Hydroxy-2-naphthaldehyde (0.050 mol/L, 20 mL) と Br (0.15 mol/L, 10 mL) をそれぞれ導入した。また、この時の流量は 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした。合成された生成物については SEM, EDX, IR, FAB-MS を用いて同定分析を行った。

### 2.3.4 マイクロ化学合成デバイスを用いた Br 付加合成実験における結果

従来法、マイクロ化学合成デバイスの双方で合成された生成物を図 2.32 に示す。これらの生成物を SEM, EDX, IR, FAB-MS により同定分析した。

SEM による観察では双方の生成物ともに針状の結晶が認められた(図 2.33)。これら結晶の形状に関しては従来法、マイクロ化学合成デバイス法ともに大きな違いは見られなかった。続いて EDX 元素分析では、Br のピークを確認し化合物に Br が含まれていることを確認した。

IR による分析では(KBr ( $\text{cm}^{-1}$ )): 542  $\text{cm}^{-1}$  付近に C-Br 結合のピークが検出された<sup>9</sup>。これにより従来法、マイクロ化学合成デバイス法とも化合物構造中に C-Br 結合が含まれていることを確認した(図 2.34)。

次に FAB-MS による分析では目的化合物である 4-Bromo-1-hydroxy-2-naphthaldehyde (m/z: 252.03) とみられるピークを確認し目的化合物が合成できていることを確認した<sup>10</sup>(図 2.35)。

### 2.3.5 考察

合成時間は、従来法が 4 時間であったのに対してマイクロ化学合成デバイスによる合成では、3 秒以下で合成が完了した。これはマイクロ化学合成デバイスでの化学合成の特徴である界面での化学種の素早い拡散により効率的に化学反応が進行したためと考えられる。さらにマイクロ化学合成デバイスは閉じられた系での合成工程のため、これまでドラフト内での合成操作が必須であった Br 付加反応をドラフト外で合成が可能なスキームの構築に成功した。

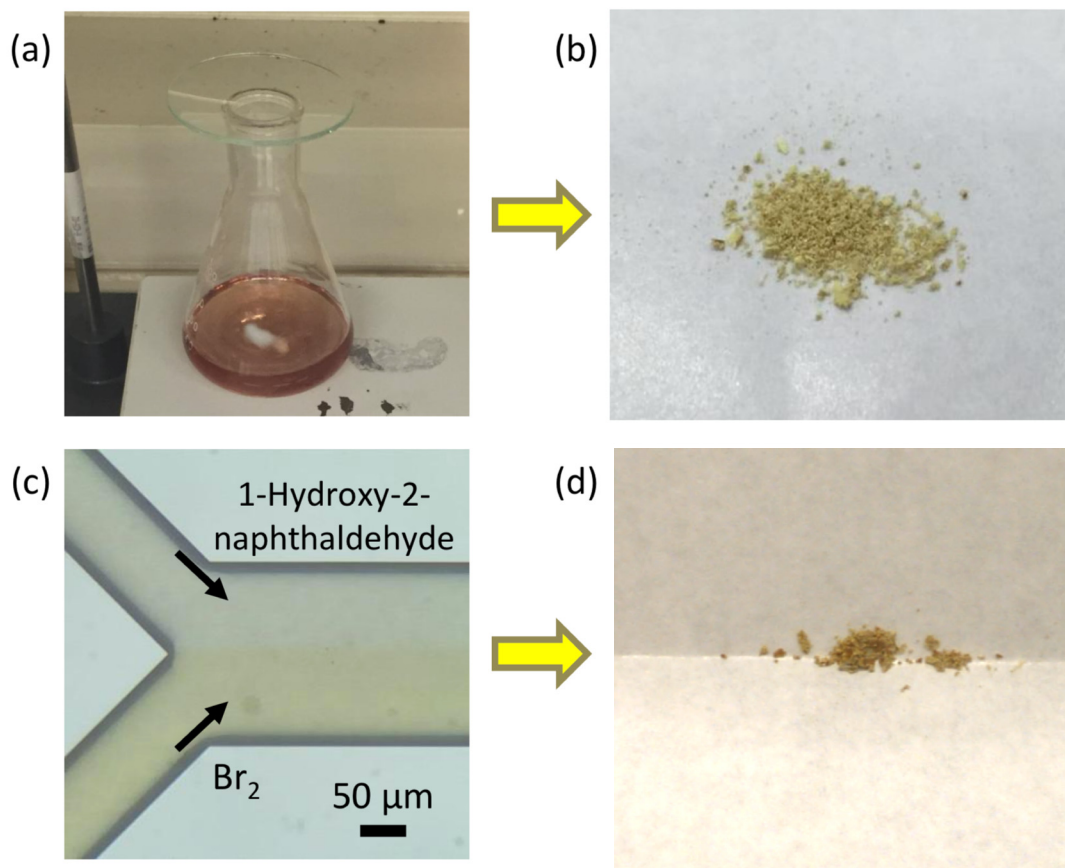
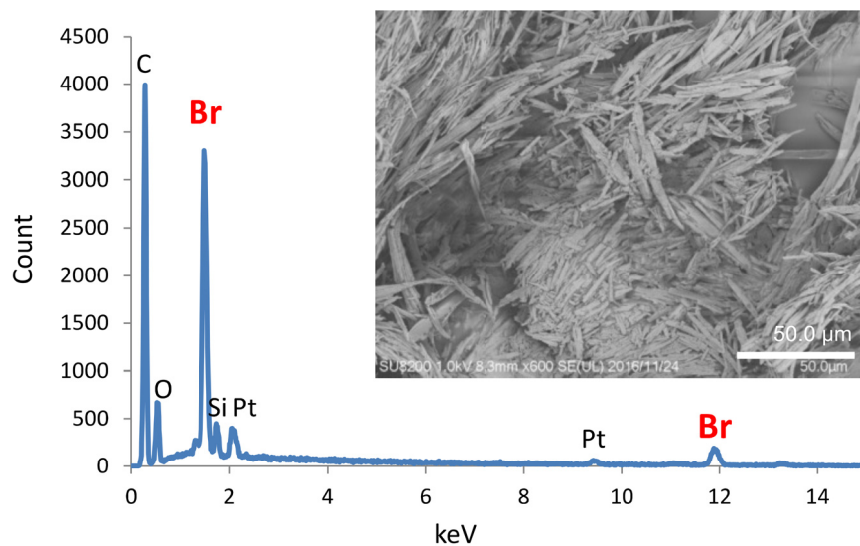


図 2.32 従来法およびマイクロ化学合成デバイス法による合成物の比較

(a)従来法による合成 (b)従来法によるサンプル

(c)マイクロ化学合成デバイスによる合成 (d)マイクロ化学合成デバイスによるサンプル

### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

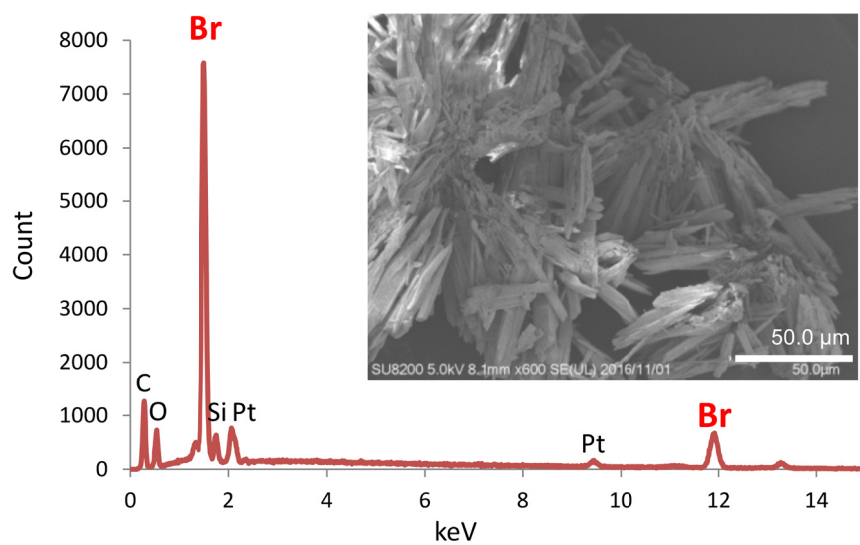


図 2.33 生成物の SEM による観察および EDX 元素分析結果 (a)従来法 (b) マイクロ化学合成デバイス

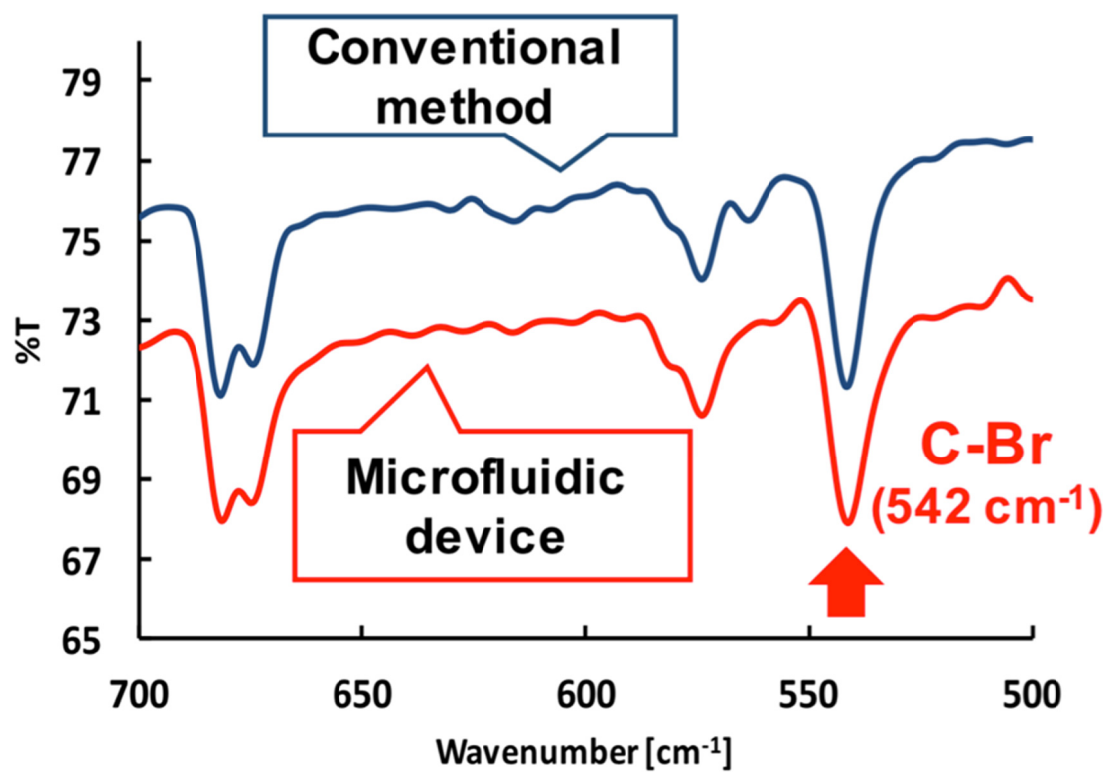
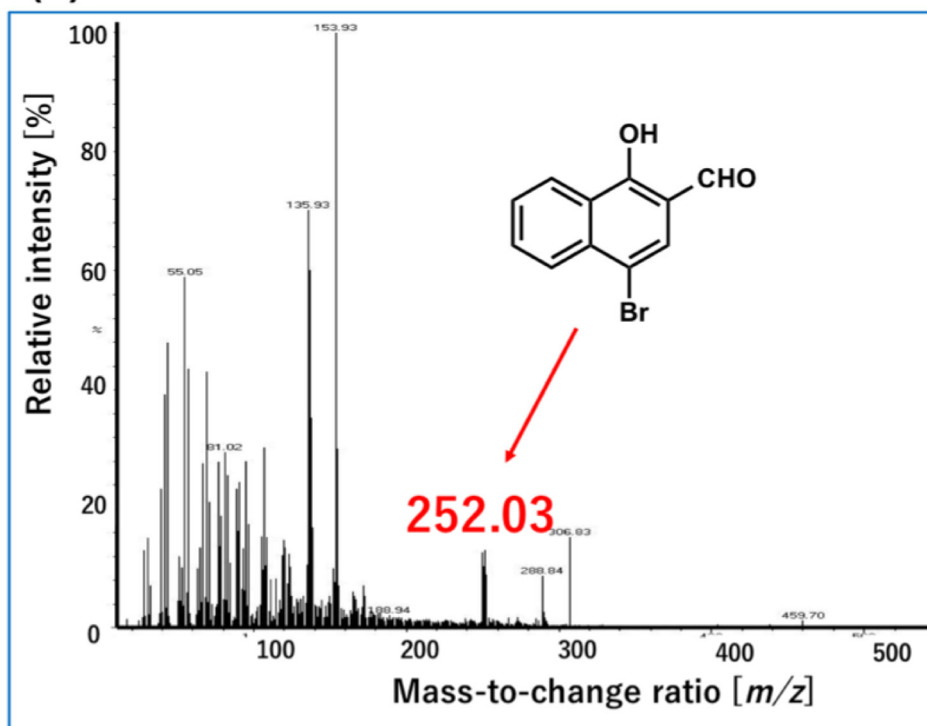


図 2.34 Br 付加合成の IR 分析結果

### (a) Conventional method



### (b) Microfluidic device

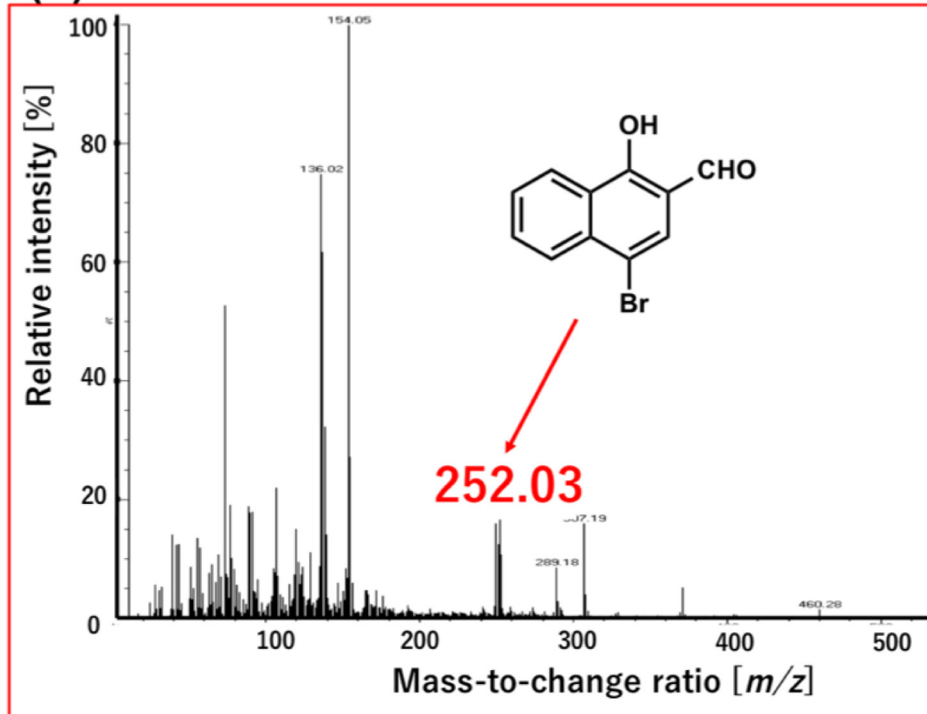


図 2.35 Br 付加合成の MS による分析 (a)従来法 (b)マイクロ化学合成デバイス

### 2.3.6 まとめ

本研究では、これまでドラフト内での合成操作が必須であった Br 付加合成反応に対して、マイクロ化学合成デバイスを応用することにより、大気下で安全に合成できる手法を新たに構築した。(表 2.6) さらにこの時の化学反応時間は従来法と比較して 1/5000 程度と大幅な短縮に成功した。

表 2.6 従来法とマイクロ化学合成デバイスによる化学合成条件の違い

	従来法	マイクロ化学合成デバイス
試薬の濃度	0.05, 0.15 mol/L	0.05, 0.15 mol/L
合成温度	23 °C	23 °C
合成時間	4 hr.	3 sec.
排気装置	ドラフト中	大気下

### 2.3.7 今後の課題

本研究で行った Br 付加実験は、1-Hydroxy-2-naphthaldehyde に対して Br 基 1 つの付加であったが、次のステップとしてマイクロ化学合成デバイスを用いて Br 基 2 つの付加を試みていく(図 2.36)。2 つ目の Br は非常に反応速度が遅く、従来法では、鉄触媒および長時間の熱攪拌が必須となる。さらに収率も 5%以下と非常に難しい化学合成である。本研究を基盤として、マイクロ化学合成デバイスを用いてさらに困難な Br 付加合成実験にチャレンジしていく。

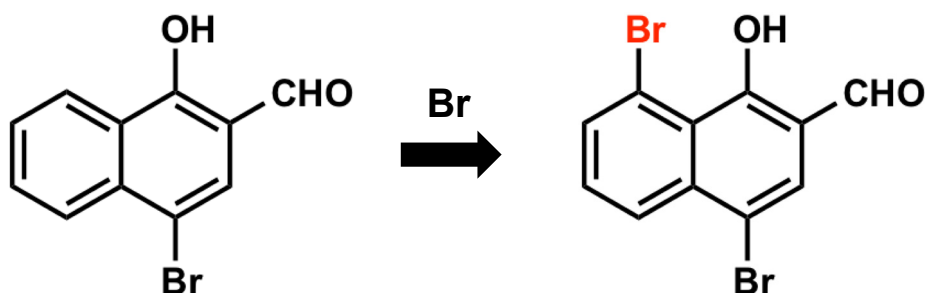


図 2.36 2 つ目の Br 付加合成



## 参考文献

- 1 T. Akitsu and R. Tanaka, *Current Physical Chemistry*, 2011, **1**, pp.82-89
- 2 M. Kanai, S. Ikeda, J. Tanaka, J. S. Go, H. Nakanishi and S. Shoji, *Sens. Actuators, A*, 2004, 111, pp.32–36.
- 3 K. S. Elvira, X. C i Solvas, R. C. R. Wootton and A. J. deMello, *NATURE CHEMISTRY*, 2013, Vol.5, pp.905-915
- 4 北森武彦・庄子習一・馬場嘉信・藤田博之:「マイクロ化学チップの技術と応用」, 2004, pp.101-110
- 5 H. Zhang and A. Cloud, *Global Advances in Materials and Process Engineering, Coatings and Sealants Section*, November, 2006
- 6 Y. Einaga, R. Mikami, T. Akitsu and G. Li, *Thin Solid Films*, 2005, 493, 230–236.
- 7 Z. T. Cygan, J. T. Cabral, K. L. Beers, and E.J. Amis, *Langmuir*, 2005, Vol. 21, pp.3629-3634
- 8 Y. Wang, M. Wang, Y. Wang, Y. Chen, and L. Sun, *Synthetic Communications*, 2011, Vol.41, pp.1381-1393
- 9 R. M. Silverstein, G. C. Bassler and T. C. Morrill, 1974, pp.144
- 10 梅澤喜夫・澤田嗣郎・寺部茂:「先端の分析法 ー理工学からナノ・バイオまでー」, 2004, pp.123

### 3 章 金属錯体含有蛋白質の結晶化および単離

#### 3.1 金属錯体含有蛋白質の結晶化に対する課題

金属錯体含有蛋白質は、様々な分野での応用が期待されている。例えば、生化学分野ではシッフ型金属錯体を蛋白質に付加することにより得られる新しい抗がん剤や腫瘍マーカーの開発が期待されている<sup>1</sup>。さらに、電気化学分野では蛋白質に金属錯体を内包させることにより、燃料電池の電極における電子の授受の効率化に応用できることが期待されている<sup>2</sup>。これらの金属錯体含有蛋白質の構造や特性を評価するには、その金属錯体含有蛋白質の結晶化および単離技術が必要不可欠である。従来法の結晶成長法ではサンプルチューブを用いる。しかし、この方法では、サンプルチューブ内で生じる蛋白質溶液や沈殿化剤の濃度勾配により良質で大きな蛋白質結晶を得ることが困難である。良質で大きな結晶を安定して簡便に成長させる方法は現在までに確立されていない。

蛋白質の結晶化技術に関しては、例えば、微小重力空間である宇宙ステーションでの研究が行われている<sup>3</sup>。微小重力中で蛋白質結晶を成長させると蛋白質溶液や沈殿化剤の濃度勾配が緩やかになり、通常法の結晶成長よりも良質で大きな結晶が得られる。しかしながら、費用が膨大になることや、1 サイクルに掛かる時間が数ヶ月単位と長いことから、これは様々な種類の金属錯体含有蛋白質の結晶化に応用できる現実的な方法とはなりえない。本研究では、微小ドロプレットを用いて結晶化を試みる。微小ドロプレット中では、液体自身の表面張力が支配的で重力の影響が小さくなり、擬似的に宇宙ステーションのような“微小重力空間”を作り出すことが可能となる。本研究では、このようなスケール効果を利用して、これまでに実現できなかった金属錯体含有蛋白質の新しい結晶化および単離の方法の構築を目指した。

#### 3.2 マイクロ流体デバイスを用いた蛋白質の結晶化における課題

従来法では、サンプルチューブ内の試薬の濃度勾配に起因し、良質な結晶を成長させることは困難であったが、微小体積中では濃度勾配が無視できるほど小さいので、マイクロ流体デバイスを用いて作製した微小ドロプレット中で蛋白質を結晶成長させる方法が注目されている<sup>4</sup>。微小ドロプレット中で結晶を成長させるもう一つのメリットは、体積が小さいがために、蛋白質溶液や沈殿化剤が成長中の結晶核に集中しやすく、効率的な結晶成長も期待できることである<sup>5</sup>。これらの観点から、著者はまず、マイクロ流体デバイスを用いて作製した微小ドロプレット中での蛋白質の結晶化実験を

行った(図 3.1, 3.2)。マイクロ流体デバイスを用いた結晶化は、微小ドロップレット中で結晶を速やかに成長できたにもかかわらず、マイクロ流体デバイス内から取り出すことができなかった。原因は、蛋白質結晶は流路壁に固着しやすく結晶化後に流体を強い力で流し込む必要がある。しかし、蛋白質結晶は非常に壊れやすく流体で押し出すことが困難であった。そこで、本研究では撥水性デバイス上での結晶化法を提案する。具体的には撥水性基板表面上に蛋白質溶液および金属錯体溶液を滴下し微小ドロップレット作製する。その後、このドロップレット中で結晶を成長させ、生成した蛋白質結晶を壊すことなくピペットによる容易な取り出しを行う結晶生成工程である(図 3.3)。また、この結晶化法は微小ドロップレットをカバーで覆う事により結晶化剤の蒸発を容易に制御できる利点もある。結晶化の際の容易なハンドリングは、目的結晶の分析やその後の応用へ不可欠な要素技術である。

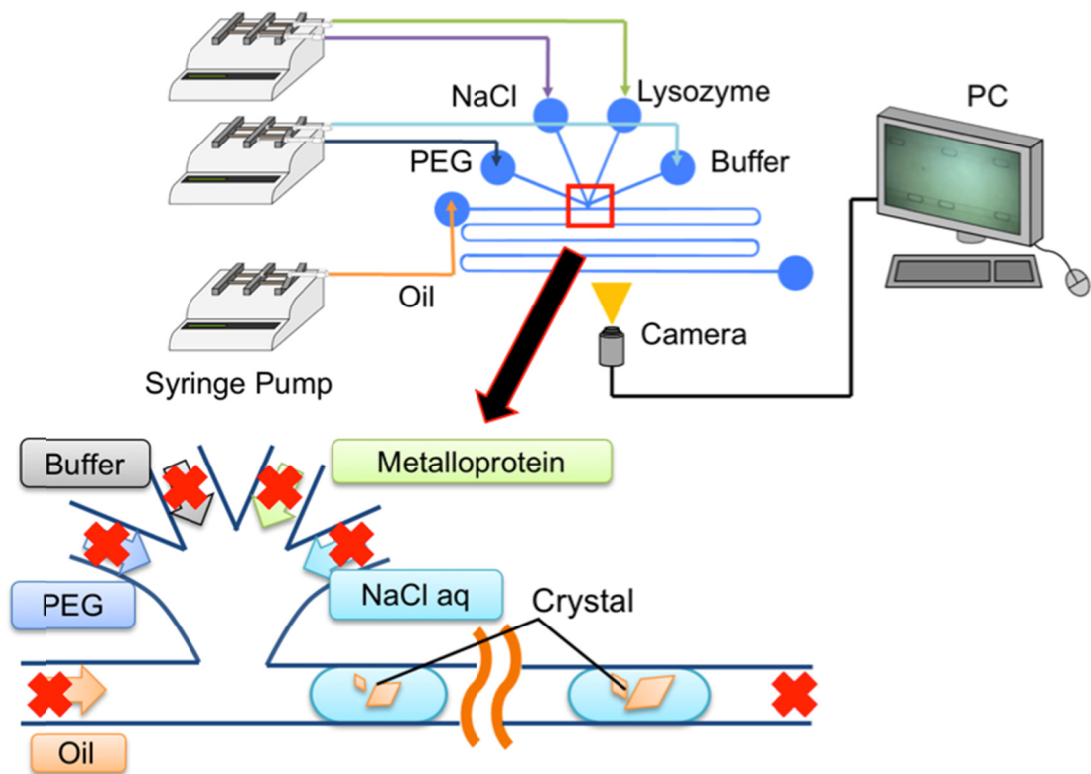


図 3.1 マイクロ流体デバイスを用いた微小ドロプレット中の結晶化

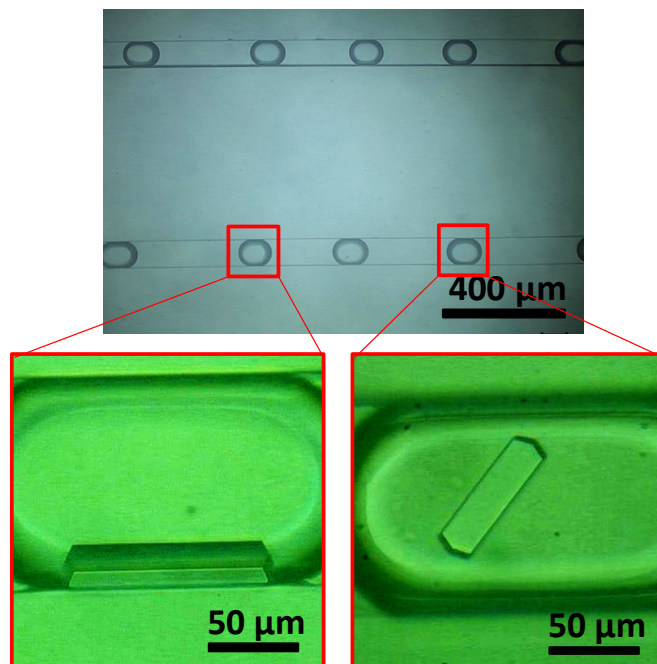


図 3.2 光学顕微鏡によるリゾチーム結晶の観察

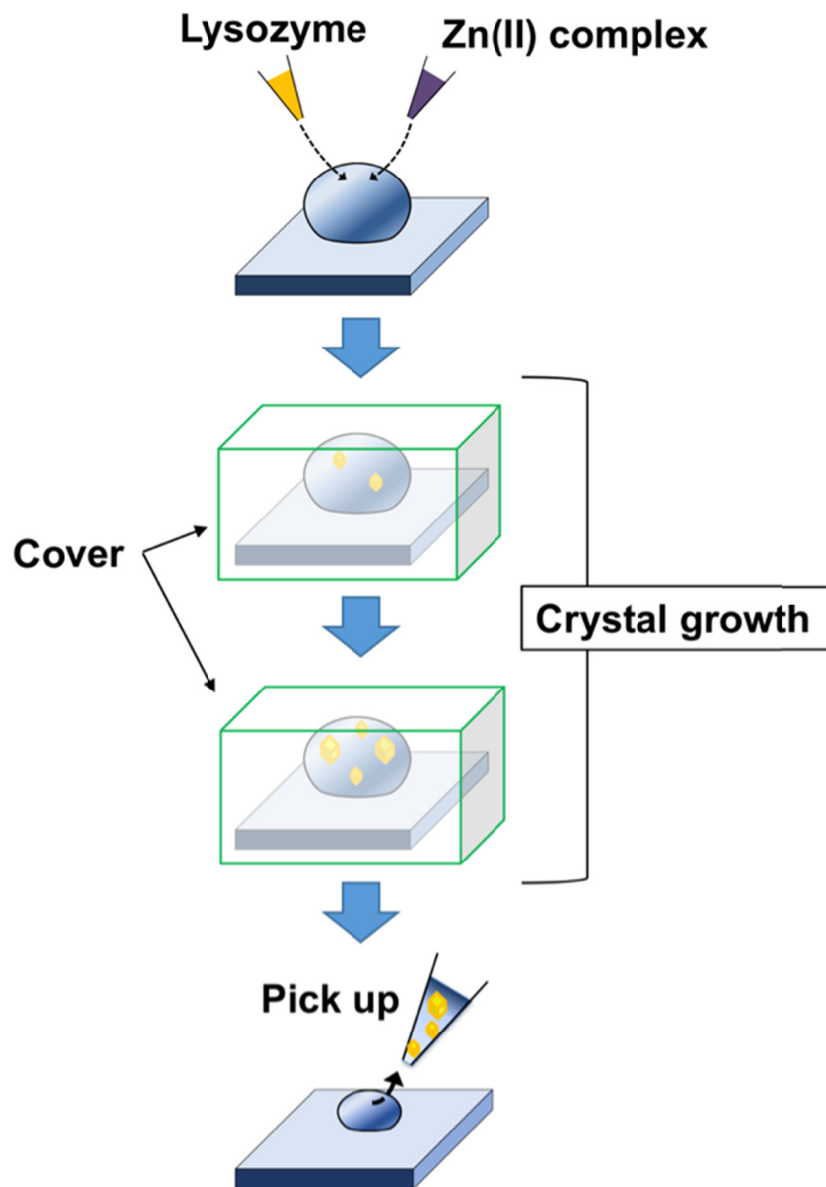


図 3.3 撥水デバイス上による金属錯体含有蛋白質の結晶化の概要  
 (図は Zn(II)錯体を用いた例)

### 3.3 二重凹型ピラーアレイによる微小ドロップレットの担持と金属錯体含有蛋白質結晶化への応用

本研究に用いる撥水基板について、それ自身が撥水能力を有する素材としては PDMS やテフロン等がある。しかし、PDMS やテフロンは水に対しては高い撥水性を示すが、アルコール等の有機溶剤に対しては撥水能を発揮できない欠点をもつ。本実験では、結晶化の際に Zn(II)錯体を溶解する目的でメタノールを使用するため、PDMS やテフロンを用いることができない。そこで、本研究では二重凹型ピラーアレイを用いた結晶化法を提案する。二重凹型ピラーアレイとは、図 3.4 に示すように傘型のピラーを基板の上に配列形成したものであり、この上に液体を滴下すると液体自身の表面張力により基板底面が液体に接することなく撥水性を維持するものである。図 3.5 は、PDMS と二重凹型ピラーアレイの水およびメタノールに対する撥水性の比較である。二重凹型ピラーアレイは、その原理上、表面構造により撥水能を発揮するため、メタノール等様々な溶液に対して撥水性を示す。本研究では結晶化の際にメタノールが使用されるため最適な表面構造であると考えられる。

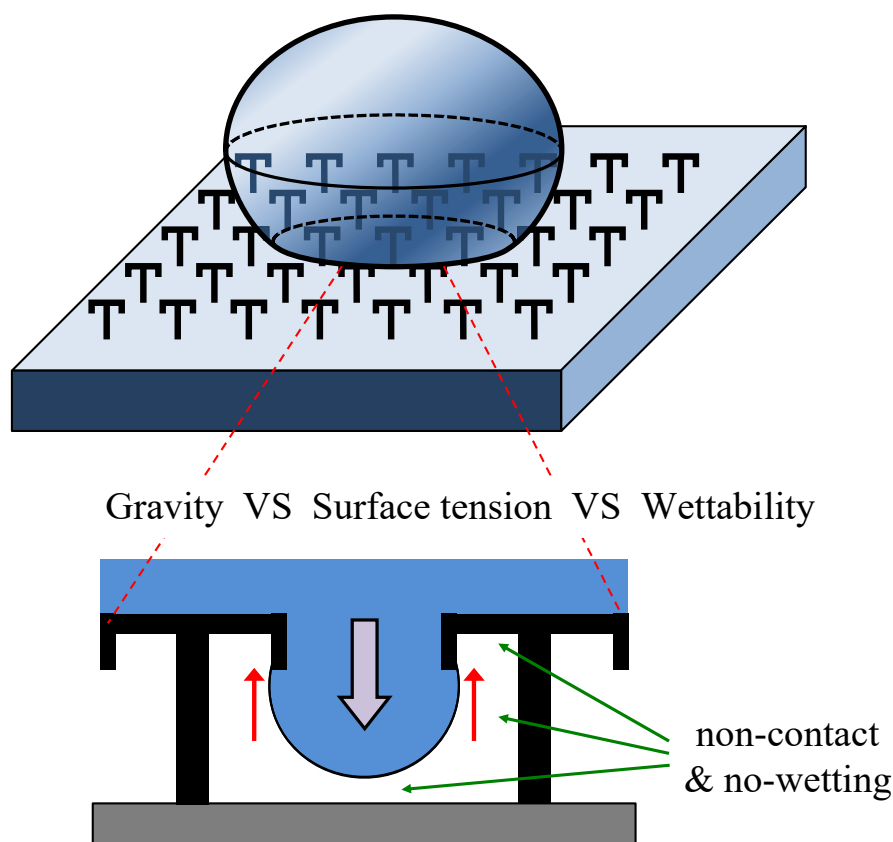


図 3.4 二重凹型ピラーアレイの撥水原理


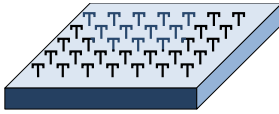
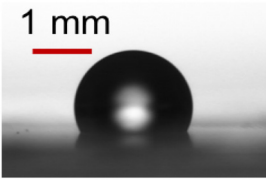
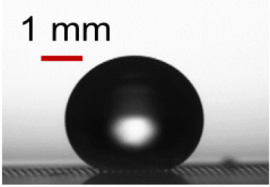

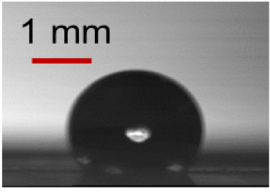
	 <b>PDMS film</b>	 <b>Pillar array</b>
Solvent	PDMS film (untreated)	Fabricated surface (O <sub>2</sub> -plasma-treated)
Water (Surface tension: 72.8 mJ/m <sup>2</sup> )	 <b>114.6°</b>	 <b>139.9°</b>
Methanol (Surface tension: 22.5 mJ/m <sup>2</sup> )	 <b>44.2°</b>	 <b>138.7°</b>

図 3.5 PDMS フィルムと二重凹型ピラーアレイの水およびメタノールに対する撥水性の比較

### 3.4 二重凹型ピラーアレイの作製プロセス

金属錯体含有蛋白質の結晶化実験に使用した二重凹型ピラーアレイは 2 章で記した実験でも使用実績のある SU-8 および PDMS を用いてソフト MEMS 技術により作製した。作製手順は図 3.6 に示す通りである。

- ① Si 基板の上に犠牲層を塗布。
- ② SU-8 を三段階に分けて露光と塗布を行い最後に現像。  
(凹型の部分の寸法は 55  $\mu\text{m}$ )
- ③ 硬化させた PDMS 上に硬化前の PDMS を塗布し SU-8 ピラーアレイ基板を押し付け接着。
- ④ 犠牲層を溶解。

完成した二重凹型ピラーアレイの SEM 像を図 3.7 に示す。



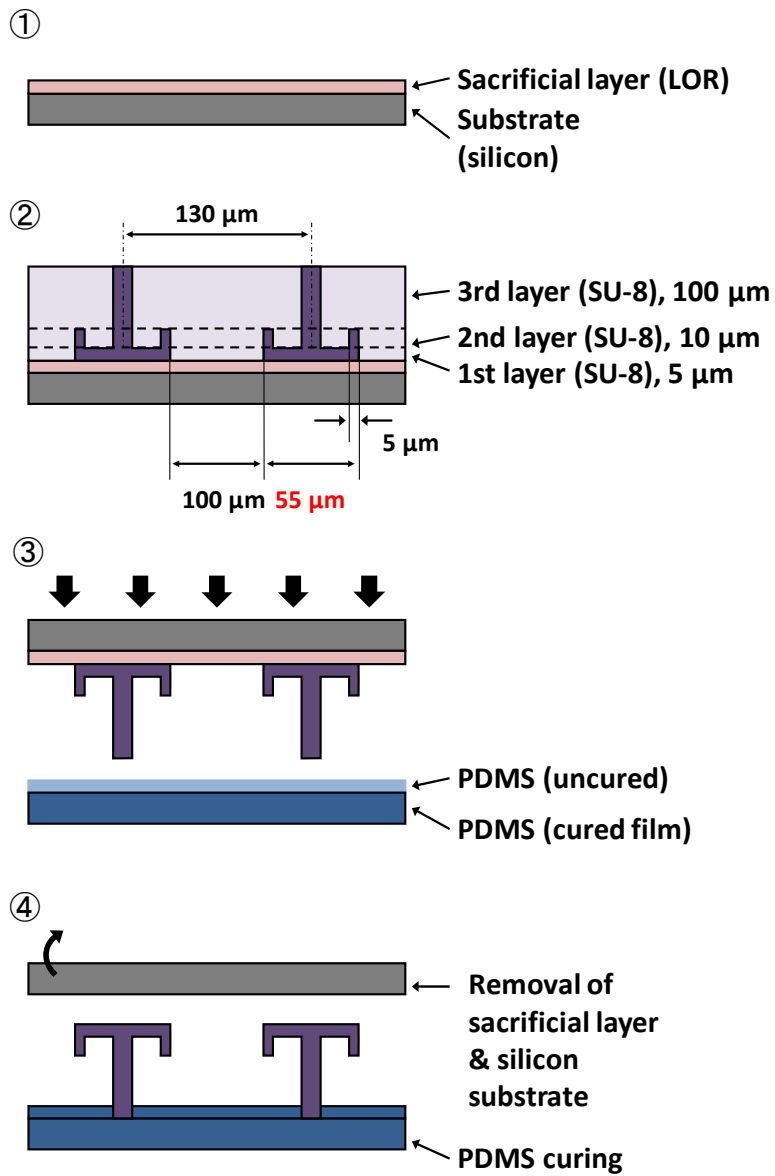


図 3.6 二重凹型ピラーアレイ作製手順

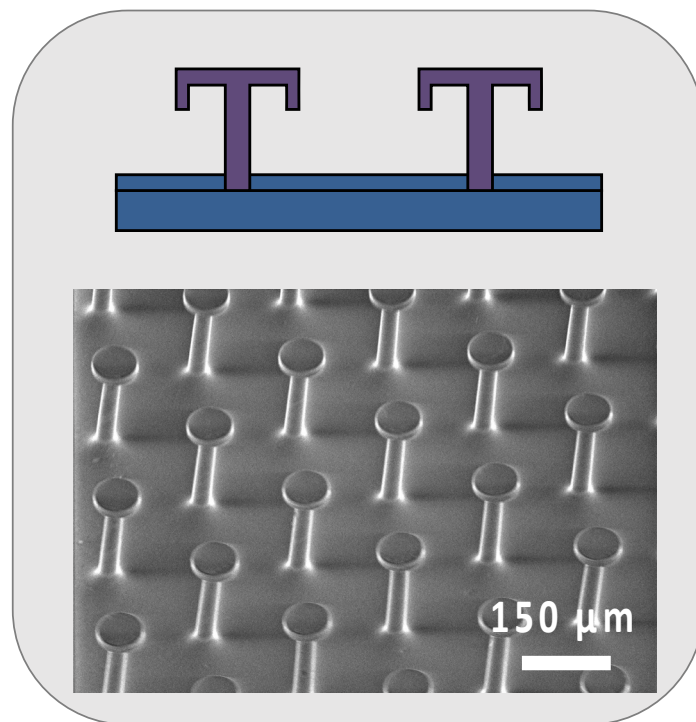


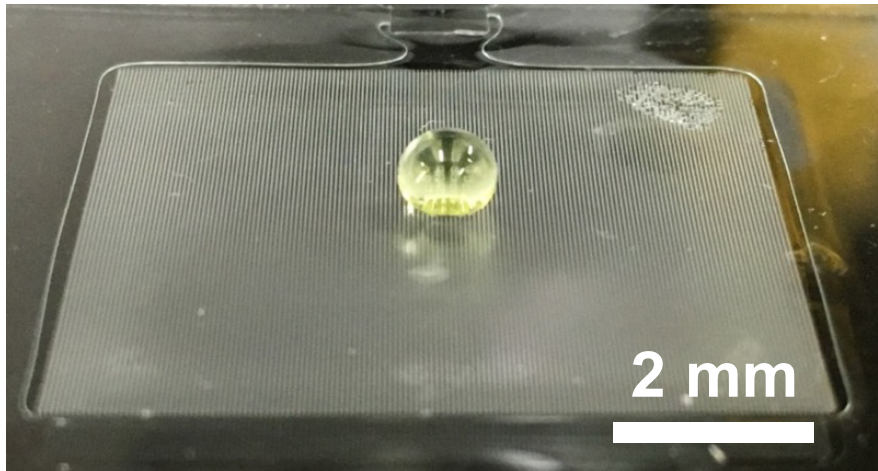
図 3.7 二重凹型ピラーアレイの SEM 像

### 3.5 二重凹型ピラーアレイによる金属錯体含有蛋白質の結晶化

金属錯体含有蛋白質の結晶化実験は図 3.8-(a)に示す通り、卵白由来リゾチーム溶液と Zn(II)錯体溶液を二重凹型ピラーアレイ上に滴下したのちに大気中にて放置し結晶を成長させた。本実験で使用した Zn(II)錯体は、水に対して溶けやすい図 3.8-(b)の構造をしたものを使用した。結晶化実験で用いた溶液は Zn(II)錯体水溶液(8 mmol/L)とリゾチーム水溶液(10 mmol/L)の二種類である。Zn(II)錯体水溶液については溶解度を上げるため 30%程度メタノールを加えている。

この水溶液をピペットにより二重凹型ピラーアレイデバイス上に滴下混合し微小ドロップレットを作製した。その後、大気下、室温(23 °C)で結晶化実験を行った。(図 3.9)滴下直後から 120 分までの間で放置し、光学顕微鏡を用いて随時観察を行って結晶生成の有無および成長の様子を確認した。さらに生成した金属錯体含有蛋白質の結晶は、純水を用いて表面付着不純物を洗浄、乾燥処理後に EDX を用いて元素分析を行い、結晶に内包されている金属の有無を確認した。

(a)



(b)

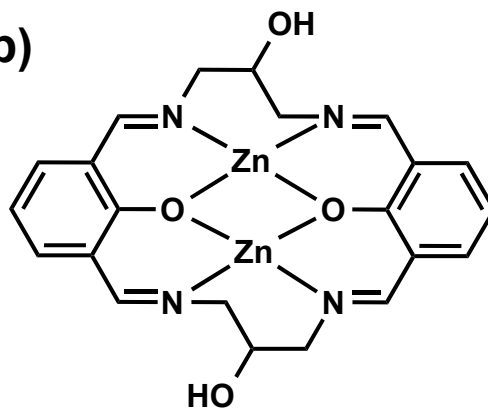


図 3.8 二重凹型ピラーアレイ上の Zn(II)錯体含有蛋白質の結晶化 (a)結晶化実験の様子 (b)Zn(II)錯体の構造

### 3.6 二重凹型ピラーアレイにおける金属錯体含有蛋白質の結晶化実験における結果および考察

二重凹型ピラーアレイ上に Zn(II)錯体水溶液とリゾチーム水溶液を滴下混合し微小ドロプレットを作製した。この状態で大気下、室温(23 °C)で放置後 90 分を経過した辺りから金属錯体含有蛋白質の結晶が生成することを確認した(図 3.9)。

この微小ドロプレットを用いた結晶化は開かれた系で実行されているため光学顕微鏡によりリアルタイムでの観察が可能という利点がある。さらに金属錯体含有蛋白質結晶は二重凹型ピラーアレイ上で成長するため、壊れやすい蛋白質結晶を破壊することなくピペットにより容易に取り出すことが可能となり、測定、分析作業を迅速に実施することが可能となった。

二重凹型ピラーアレイ上に担持した微小ドロプレット中で成長した金属錯体含有蛋白質の結晶の元素分析を EDX により行った。結果は図 3.10 示す通り、8.5 keV 辺りに Zn のピークを確認した。この分析によりリゾチーム内に Zn(II)錯体が含有されていることが示された。

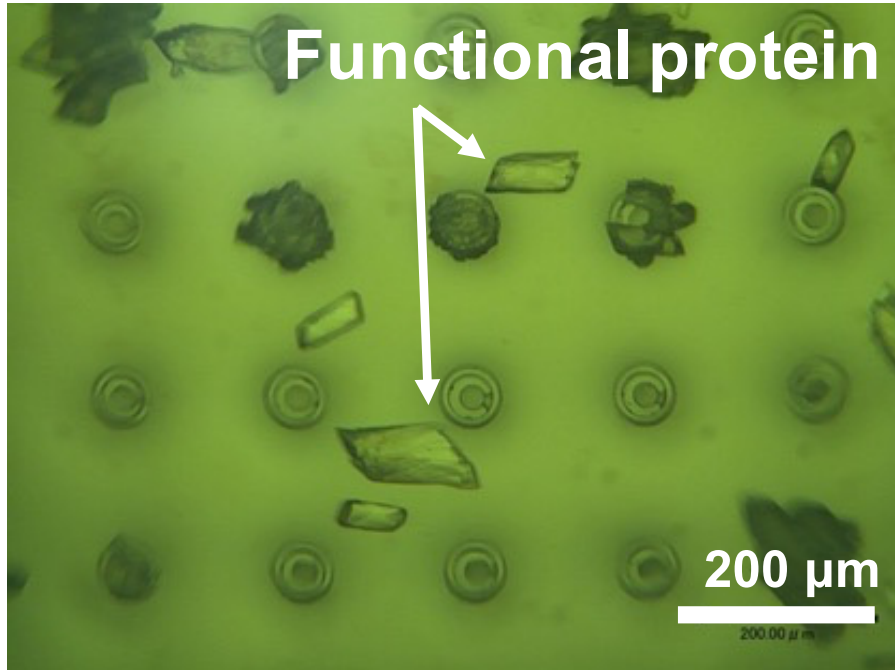


図 3.9 微小ドロップレット中で成長した Zn(II)錯体含有蛋白質結晶

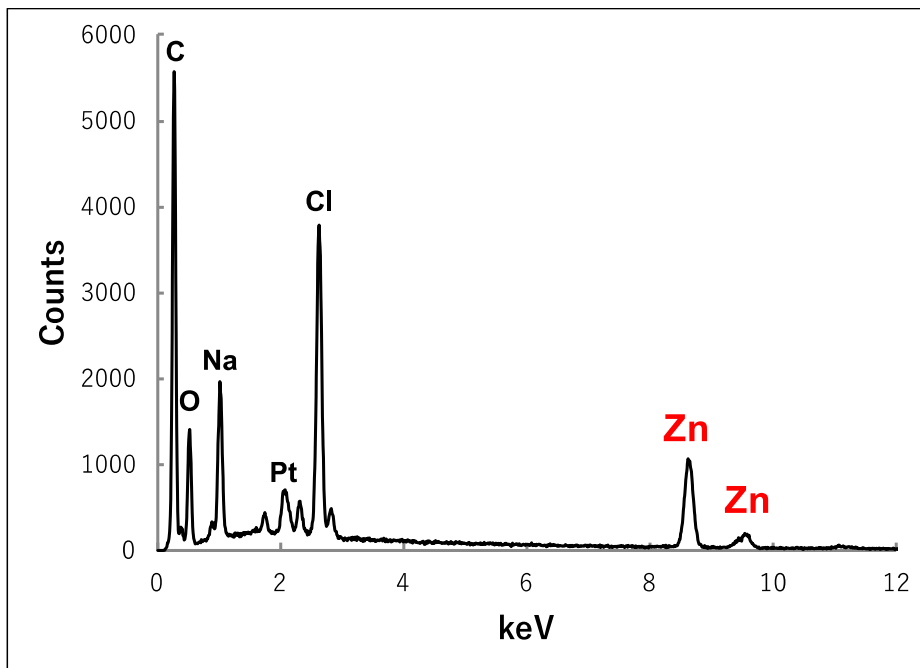


図 3.10 EDX による蛋白質結晶の含有元素分析結果

### 3.7 まとめ

二重凹型ピラーアレイデバイス上に作製した微小ドロップレット中で金属錯体含有蛋白質の結晶を生成することに成功した。これまで行われてきたマイクロ流体デバイスによる微小ドロップレット法ではデバイス内から取り出すことが困難であったが、二重凹型ピラーアレイデバイスでは目的結晶を容易に取り出すことが可能となり、全く新しい金属錯体含有蛋白質の結晶化法の構築に成功した。

### 3.8 今後の課題

二重凹型ピラーアレイデバイスを用いて生成した金属錯体含有蛋白質の結晶の大きさは 100  $\mu\text{m}$  程度で、マイクロ流体デバイスを用いた微小ドロップレットで生成した結晶と比較してまだ小さく、蛋白質溶液や沈殿剤の濃度、結晶化温度等の条件変えて実験を行う必要がある。また、金属錯体含有蛋白質の結晶構造を調べるために X 線結晶構造解析により分析する事が必須であり、今後結晶の大型化が成功した時点で実施する予定である。

## 参考文献

1. N. Fani, A.K. Bordbar and Y. Ghaye, *Spectrochimica Acta Part A*, Vol. 103, 2013, pp.11–17
2. Xiao Yu Yang, Ge Tian, Nan Jiang and Bao Lian Su, *Energy Environ. Sci*, Vol. 5, 2012, pp.5540–5563
3. Y. Sakamoto, Y. Suzuki, I. Iizuka, C. Tateoka, S. Roppongi, M. Fujimoto, K. Inaka, H. Tanaka, M. Yamada, K. Ohta, H. Gouda, T. Nonaka, W. Ogasawara and N. Tanaka, *Scientific Reports*, 2015, 11151, pp.1–16.
4. Bo Zheng, L. Spencer Roach and Rustem F. Ismagilov, *J. AM. CHEM. SOC.*, Vol 125, 2003, pp.11170-11171
5. Carl L. Hansen, Scott Classen, James M. Berger and Stephen R. Quake, *J. AM. CHEM. SOC.*, Vol 128, 2006, pp.3142-3143
6. 中西完貴, 簗城森幸, 尹棟鉉, 関口哲志, 庄子習一, *電気学会論文誌 E*, No. 6, Vol. 138, 2017



## 4 章 結言

### 4.1 本論文の結論

本論文において著者は、従来法では合成困難な金属錯体および金属錯体含有蛋白質の合成、結晶化および単離に対してマイクロデバイスを応用することにより簡便で再現性の良い合成手法を構築した。錯体化学合成にマイクロデバイスを用いることにより、温度制御や雰囲気制御が不要となることを示した。また、pH 制御では、調整試薬の濃度を 1/15 に下げること成功した。さらに、金属錯体含有蛋白質の結晶化では、撥水デバイス上で結晶化を行うことにより、雰囲気制御、観察および取り出しが容易な全く新しい結晶化法を構築した。

### 4.2 今後の展望

一般的な化学合成の分野において、希少かつ難反応材料を利用した効率の良い合成技術、および分離・結晶化が難しい高分子物質の結晶化技術は極めて重要な技術である。本研究で構築したマイクロデバイスによる金属錯体含有蛋白質の合成、結晶化および単離の方法は、様々な化学合成や薬理・医療に応用が可能と考えられる。

#### 4.2.1 マイクロデバイスによる化学物質の合成技術

本研究で構築された化学合成技術は、化学プラントに適応可能な「収量」を求める化学反応への応用には向かない。半導体集積回路と同じ技術を使用しているので集積化による収量の増大が可能だという意見もあるが、著者は現実的ではないと考えている。シーズの面から考えれば、触媒や薬理向け試薬等、「量よりも質を求める」分野への展開が妥当だと考えている。また、具体的反応条件を考えた場合、今まで高温高压下(オートクレーブ等)、超低温下(氷冷下、液体窒素下等)、無重力下等、非常に極端な反応条件を要求した化学反応を、より温和な条件へと導ける技術であり、そのような条件で現状行われている化学合成にすべて適応可能だと考えている。さらに、温和な条件で反応可能だということは、特殊技術を必要としないということであり、化学合成の汎用化にも寄与可能だと考えている。

例えば、従来法で 1,3-diamino-2-propanol と 2,6-diformylphenol からなる配位子合成は、7 時間の還流により合成される非常に反応速度の遅い反応である。このような合成は、マイクロ化学合成デバイスを用いることにより反応速度が早くなり効率的な合成が期待できる。さらに、マイクロ化学合成デバイスは微小スケールでの合成のため、従来法と比較して大幅に試薬の使用量を削減できる。この長所は、例えば Ru 錯体等の高

額試薬が用いられる合成に対しても、複数回の合成実験が可能となる。また、有害ガスの発生量も従来法と比較して大幅に削減でき安全な合成実験が期待できる。

#### 4.4.2 マイクロデバイスによる化学物質の結晶化技術

二重凹型ピラーアレイを用いた金属錯体含有蛋白質の結晶化では、ピラーアレイが様々な溶液に対して撥水性を示すことから、非水溶性で有機溶媒に溶解しやすい化合物と水溶性の蛋白質とのドッキングおよび結晶化に対して有用性が高いと考えられる。例えば、本研究でも取り扱ったアゾ基を含む化合物は、非常に水に溶けづらい性質を有している。このような化合物と蛋白質をドッキングするには、メタノールやヘキサン等有機溶媒の使用が必須となる。ピラーアレイは、溶液の種類に関係なく撥水性を示すため、水溶性の蛋白質と非水溶性の化合物とのドッキングおよび結晶化に対して最適だと考えられる。さらに、近年は宇宙ステーション内の微小重力環境で結晶化実験が行われているが、本研究で使用したマイクロドロップレットでも擬似的な微小重力環境が再現できることから、様々な蛋白質の結晶化に応用が可能だと考えられる。

一般的に有機化学の分野において色素・顔料・高機能試薬等の多環系の合成物質は結晶化が困難であり、従来は長い時間をかけて微結晶を濾過で取り出すのが一般的であった。本研究で構築された結晶化技術を使えば極めて容易に従来に比較してより大きな結晶を入手することが可能となり、特に薬理分野での新規薬剤合成に大いに寄与可能であると考えられる。

本研究の更なる汎用化を今後の課題として、著者は筆を一旦置くことにする。

## 謝辞

本論文は多くの方に大変ご尽力頂き研究内容を論文にすることができました。  
本研究と論文執筆にご支援頂きました全ての皆さまへ心から深く感謝いたします。

初めに、指導教員でもあり、多くのご支援とご尽力、そしてご指導を賜りました早稲田大学先進理工学研究科ナノ理工学専攻 庄子習一教授に心より感謝申し上げます。2013年に東京理科大学秋津研究室からの外部研究生として研究室に受け入れて下さり、学部四年次から現在に至るまでご指導を頂きました。特に、先生からご教授頂いた「一つの事象を違う視点から見てみる」という考え方は、研究を進める上で非常に重要な教えであると感じております。

本研究の審査過程におきまして、多くのご指導とご指摘を賜りました早稲田大学先進理工学研究科ナノ理工学専攻 川原田洋教授、谷井孝至教授、東京理科大学理学部第二部化学科 秋津貴城教授に心より感謝申し上げます。

川原田先生には、博士課程入学以前から学会発表の練習等をご指導頂きました。また、審査過程時においても研究の詳細についてご説明し、分析手法の議論をさせて頂き非常に貴重な経験となりました。本当にありがとうございました。

谷井先生には、本論文の審査過程時に一文、一文にわたる先生からの貴重なご指導は、論文執筆時の基礎となりました。大変感謝申し上げます。

秋津先生には、東京理科大学卒業研究時からご指導を頂き、特にマイクロ化学合成デバイスを用いた錯体合成の論理的な考察に対して深く議論させて頂き、“純粋化学”の視点からマイクロスケールの化学合成への解釈に繋がりました。本当にありがとうございました。

博士課程入学以前から多岐にわたる多くのご支援とご指導を頂いたナノ・ライフ創新研究機構の関口哲志教授に大変感謝申し上げます。先生には本論文や公聴会での発表資料の細部に至るまでご指導を頂き、今後の研究活動の基礎となりました。本当にありがとうございました。

ナノ・ライフ創新研究機構の水野潤教授には、マイクロスケールの化学反応に対する物理学的視点からのご指摘を頂き、本研究の学術的解釈へのヒントを与えて頂きました。心より感謝申し上げます。

庄子研究室の皆さまから多大なご支援を頂きました。時には私のようなものを頼って頂き、私自身勉強になることもございました。皆さまと一緒に研究を進めることができた体験は大変貴重な経験となりました。感謝申し上げます。

錦織玲子秘書には、私が研究室に顔を出すといつもお声掛け頂き、忙しい日々の中大変心が温まりました。本当にありがとうございました。

ナノ・ライフ創新研究機構の皆さまからは、大変手厚いご支援を頂きました。著者は、2010年からナノ・ライフ創新研究機構(旧ナノ理工学研究機構)にて勤務しており、博士課程入学以前からサポートを頂いておりました。特に尾島浩幸事務長には研究遂行上の理由によるわがままを色々と聞いて頂きました。本当にありがとうございました。

本研究は、主に早稲田大学ナノテクノロジー研究所を利用して行いました。いつでも実験が行える非常に恵まれた環境で研究を遂行することができました。施設運営に関わる全ての先生方、スタッフに深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

最後に私事ではありますが、博士課程入学当初からご支援、応援して頂いた両親に最大限の感謝の気持ちを表します。本当にありがとうございました。

これまでの大学生活では様々な方々に出会い、研究に対するご指導を頂きました。ここに名前をあげさせて頂けなかった皆さまにも感謝しております。皆さま、本当にありがとうございました。

## 研究業績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 (査読有)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ○<b>D. Tanaka</b>, S. Sawai, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji, “Synthesis of azo Mn(II) complex with mild pH control using microfluidic device”, RSC Advances (2017), Vol. 7, pp. 39576–39582, DOI: 10.1039/c7ra06089k</li> <li>2. ○<b>D. Tanaka</b>, W. Kawakubo, E. Tsuda, Y. Mitsumoto, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji, “Microfluidic synthesis of chiral salen Mn(II) and Co(II) complexes containing lysozyme”, RSC Advances (2016), Vol. 6, pp. 81862–81868, DOI: 10.1039/c6ra09975k</li> <li>3. ○<b>D. Tanaka</b>, Y. Murakoshi, E. Tsuda, Y. Mitsumoto, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji, “High efficient synthesis of manganese(ii), cobalt(ii) complexes containing lysozyme using reaction area separated micro fluidic device”, 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2015), Anchorage, USA, 2015.06.21-25, pp.243-246, DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2015.7180907, (Oral)</li> <li>4. D. H. Yoon, <b>D. Tanaka</b>, T. Sekiguchi and S. Shoji, “Mechanical Reinforcement of Low-Concentration Alginate Fibers by Micro uidic Embedding of Multiple Cores”, Macromol. Mater. Eng. (2018), DOI: 10.1002/mame.201700516</li> <li>5. D. H. Yoon, Z. Xie, <b>D. Tanaka</b>, T. Sekiguchi and S. Shoji, "A high-resolution passive droplet-phase sample sorter using multi-stage droplet transfer", RSC Advances, (2017), Vol. 7, pp. 36750–36754, DOI: 10.1039/c7ra05556k</li> <li>6. Y. Kamata, T. Sekiguchi, T. Nakajima, T. Sasaki, D. H. Yoon, <b>D. Tanaka</b> and S. Shoji, "Analysis of vinylidene fluoride–trifluoroethylene copolymer film for nonpolarized energy harvester", Japanese Journal of Applied Physics (2017), Vol. 56, pp. 0703011–073013</li> <li>7. D. H. Yoon, K. Kobayashi, <b>D. Tanaka</b>, T. Sekiguchi and S. Shoji, “Simple microfluidic formation of highly heterogeneous microfibers using a combination of sheath units”, Lab on a Chip, (2017), Vol. 17, pp. 1481–1486, DOI: 10.1039/C7LC00157F</li> <li>8. D. H. Yoon, <b>D. Tanaka</b>, T. Sekiguchi and S. Shoji, “Microfluidic Stamping on Sheath Flow”, small (2016), Vol. 12, pp. 3224–3228, DOI: 10.1002/sml.201600552</li> <li>9. D. H. Yoon, A. Jamshaid, J. Ito, A. Nakahara, <b>D. Tanaka</b>, T. Akitsu, T. Sekiguchi and S. Shoji, “Active microdroplet merging by hydrodynamic flow control using a pneumatic actuator-assisted pillar structure”, Lab on a Chip (2014), Vol. 14, pp. 3050-3055, DOI: 10.1039/c4lc00378k</li> </ol>
国際学会 (査読有)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ○<b>D. Tanaka</b>, W. Kawakubo, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji, "Crystallization of Zinc(II) complex containing lysozyme by super water repellent doubly reentrant structure pillar array device", The 3rd Conference on MicroFluidic Handling Systems (MFHS 2017), 2017.10.04-06, Enschede, Nederland, (Oral)</li> <li>2. ○<b>D. Tanaka</b>, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji and T. Akitsu, “High yield micro Fluidic synthesis of metal complex containing proteins”, The 6th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2014), Singapore, pp.39-40, (Oral)</li> </ol>

## 研究業績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
国内学会 (査読有)	3. W. Kawakubo, <b>D. Tanaka</b> , D. H. Yoon, T. Sekiguchi, K. Takahashi, T. Akitsu and S. Shoji, "Extremely Efficient and non-hazardous bromo group addition reaction using simple microfluidic devices", The 3rd Conference on MicroFluidic Handling Systems (MFHS2017), 2017.10.04-06, Enschede, Nederland, (Poster)
	4. R. Isshiki, H. Fujitani, <b>D. Tanaka</b> , T. Sekiguchi and S. Tuneda, "Growth heterogeneity in pure cultures of nitrifiers", Fifth International Conference on Nitrification and Related Processes (ICoN5), 2017.07.23-27, Vienna, Austria, pp.10, (Poster)
	5. Y. Nozaki, T. Kanai, A. Matsuo, <b>D. Tanaka</b> , I. Yuito, T. Takeuchi, T. Sekiguchi and S. Shoji, "Fabrication process of fluidic devices for producing fine droplets using a focused ion beam system", Proceedings of the 16th International Conference on Nanotechnology Sendai, Japan, 2016.8.22-25, Sendai, Japan, pp.795-798, (Oral)
	6. D. H. Yoon, L. Ariyoshi, <b>D. Tanaka</b> , T. Sekiguchi and S. Shoji, "All-round micro sheath flow formation to realize complex cross sections by simply stacked PDMs structures", The 29st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2016), 2016.01.24-28, China, pp.141-144, (Poster)
	1. <b>田中 大器</b> , 川久保 渉, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 秋津 貴城, 庄子 習一, "超撥水製二重凹型ピラーアレイデバイスによる Zn(II)錯体含有リゾチームの結晶化", 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017年10月31日(火)~11月2日(木), 広島国際会議場, (ポスター)
	2. 川久保 渉, <b>田中 大器</b> , 尹 棟鉉, 関口 哲志, 高橋 啓太, 秋津 貴城, 庄子 習一, "マイクロ流体デバイスによる高効率かつ安全なプロモ基付加操作", 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017年10月31日(火)~11月2日(木), 広島国際会議場, (ポスター)
	3. 一色 理乃, 藤谷 拓嗣, <b>田中 大器</b> , 関口 哲志, 常田 聡, "硝化菌単一菌株集団でみられる形態と増殖能の不均一性", 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017年8月29日(火)~8月31日, 東北大学川内北キャンパス 講義棟, (ポスター)
	4. 一色 理乃, 藤谷 拓嗣, <b>田中 大器</b> , 関口 哲志, 常田 聡, "なぜ、難培養性微生物の増殖は不均一なのか?—シングルセル観察から見たクローナル集団の実態—", 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19日(日)~21日(火), 仙台国際センター, (ポスター)
	5. 山本 尚輝, 一色 理乃, 河合 祐人, <b>田中 大器</b> , 関口 哲志, 松本 慎也, 常田 聡, "好気呼吸と発酵のバランスが崩れると persister が形成される", 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19日(日)~21日(火), 仙台国際センター, (ポスター)

## 研究業績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>6. 一色 理乃, 藤谷 拓嗣, <b>田中 大器</b>, 関口 哲志, 常田 聡, "クローナルな硝化菌集団における細胞増殖活性の不均一性の評価と機構解明", 日本微生物生態学会第 31 回横須賀大会, 2016 年 10 月 22 日(土)~25 日(火), 横須賀市文化会館, (ポスター)</p> <p>7. 山本 尚輝, 一色 理乃, 河合 祐人, <b>田中 大器</b>, 関口 哲志, 松本 慎也, 常田 聡, "ldhA の確率的な発現による persister 形成と制御", 日本微生物生態学会第 31 回横須賀大会, 2016 年 10 月 22 日(土)~25 日(火), 横須賀市文化会館, (ポスター)</p> <p>8. 一色理乃, 河合祐人, <b>田中大器</b>, 関口哲志, 松本慎也, 常田聡, “細菌集団中の確率的な ldhA 発現による休止細菌形成”, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 日(水)~25 日(金), 大阪国際交流センター, (ポスター)</p> <p>9. <b>田中大器</b>・村越弓莉・津田恵梨香・光本雄哉・尹棟鉉・関口哲志・庄子習一・秋津貴城, “マイクロ流体デバイスを用いたキラルサレン型 Mn(II), Co(II)錯体含有リゾチームの高効率合成”, 日本化学会 第95 春季年会 (2015), 2015 年 3 月 26 日(木)~29 日(日)日本大学 理工学部船橋キャンパス/薬学部, (口頭発表)</p> <p>10. <b>田中大器</b>・尹棟鉉・関口哲志・庄子習一・秋津貴城, “マイクロ流体デバイスを用いた金属錯体含有蛋白質の合成”, 日本化学会第 94 春季年会 (2014), 2014 年 3 月 27 日(木)~30 日(日), 名古屋大学 東山キャンパス, (口頭発表)</p>
招待講演	<p>1. 関口哲志, 尹棟鉉, <b>田中大器</b>, 庄子習一, “MEMSによるマイクロ流体コントロール” (独)日本学術振興会 先端ナノデバイス・材料テクノロジー第151委員会 (2015), 2015 年12月17日, 早稲田大学西早稲田キャンパス</p>
その他	<p>1. S. Sawai, <b>D. Tanaka</b>, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu, S. Shoji, “Fabrication of the Microfluidic Device for Chemical Reaction”, 4 大学ナノ・マイクロファブリケーションコンソーシアム・シンポジウム (2017), 川崎, 2017年3月13日, (ポスター)</p> <p>2. <b>D. Tanaka</b>, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu and S. Shoji. " Fabrication of the Microfluidic Device for Chemical Reaction ", マイクロ・ナノテクノロジーに関する日仏ワークショップ (2017), 京都大学, 2016年11月8日, (ポスター)</p>