

# βキチンメタノール錯体の構造

萌芽的研究課題研究報告書

課題番号 2010A1595 BL40B2

東京大学農学生命科学研究科 博士2年 澤田 大輔

共同実験者 蘇暁博、磯部則之、小川悠、木村聡、和田昌久

## 1 諸言

キチンはセルロースに次いで生産量の多い天然多糖であり、バイオマスとして注目されている（図1）。セルロースは様々な用途で用いられてきたため、研究は進んでおりその天然の構造のみならず各種錯体の結晶構造についても詳しく研究がなされてきている。一方キチンでは未だ用途が限られていることもあり、結晶構造に関する研究は多くはなされていない。キチンには主に二つの結晶多形が存在し、 $\alpha$ キチンと $\beta$ キチンと呼ばれている。 $\alpha$ キチンは結晶形としては主要なものであり、節足動物、甲殻類の外骨格や腱などに存在しており、逆平行鎖構造をとるとされている。 $\beta$ キチンは結晶形としてはイカの腱、珪藻の棘条、ハオリムシの棲管など限られているが、特に珪藻は海洋における主要な炭素循環の担い手でありバイオマスとしての存在量は非常に多い<sup>1,2</sup>。その結晶構造は1本鎖の単斜晶で非対称単位はアセチルグルコサミン1個であり平行鎖構造をとる。近年シンクロトン放射光を用いた原子分解能での構造が報告された<sup>3</sup>。

$\beta$ キチン結晶はac面に疎水性相互作用と水素結合により分子鎖シートを形成し、b軸方向では炭素原子につく水素原子と、酸素原子の間の弱い水素結合のみによって安定化がなされている。b軸方向のインタラクションが弱いため、極性低分子では単純に溶液に浸漬するだけで結晶性を保ったままb軸方向に広がる錯体を形成することができる。また直接錯体を形成できないものでも、溶液を順次置換することにより大きい分子の挿入が可能であることがわかっている。これまでに各種アミン、アルコール、DMSOや反応性の酸無水物などが挿入可能であることが報告されており、その応用性は注目されている<sup>4,6</sup>。しかし詳細な結晶構造が報告されているのは無水 $\beta$ キチンのみであり、錯体形成挙動や置換挙動などは十分に



図1 キチンの1次構造

議論されてきていない。 $\beta$ キチンのアルコール錯体はn-ブタノールまでは溶液への単純な浸漬により得られるとされており、それ以上のアルコールについては6N塩酸浸漬後アルコールに浸漬することにより得られると報告されている<sup>7,8</sup>。メタノール錯体のシンクロトン放射光X線回折測定を行うことで、メタノール錯体の構造解析を目指した。

## 2 実験

### 試料

サツマハオリムシ (*Lamellibrachia satuma*) を鹿児島湾沖深海 100m で Hyper-Dolphin (JAMSTEC, Japan)を用いて採取した。棲管を 1 N 水酸化ナトリウム溶液に室温で 1 晩浸漬し、0.1M 酢酸バッファー中 0.3%次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理し精製を行った。この処理を十分回行って、精製試料を得た。精製試料を 1cm x 2mm x 200 $\mu$ m 程度に切り出し、両端をクリップではさみおもりをつけながら乾燥させることにより配向試料を得た。この際繊維をねじることにより、繊維の面配向を避けた。配向試料を 1mm 径のガラスキャピラリー中に隙間なく詰め込み、水、エタノール、メタノールと順に置換することによりメタノール錯体を得、キャピラリーを閉じて測定まで置いた。

### シンクロトロン放射光 X 線回折測定

シンクロトロン放射光 X 線回折測定を SPring-8, BL40B2 にて行った (Hyogo, Japan)。キャピラリーを試料台に貼り付け、波長 0.7 Å のシンクロトロン放射光を 120 秒繊維軸方向に垂直に照射した。繊維回折図はフラットイメージングプレート (RIGAKU R-AXIS IV++) で読み取った。カメラ長、ビームセンターはシリコンパウダーを用いて補正した。ピーク位置は R-axis display(RIGAKU)を用いて測定し、各面間隔を指数付けした後、最小二乗法により精密化を行った。



図 2  $\beta$ キチンメタノール錯体の繊維回折図

## 固体 CP/MAS<sup>13</sup>C NMR 測定

$\beta$ キチンメタノール錯体を十分なメタノール存在下で <sup>13</sup>C 固体 NMR 測定を行った。CMX 300 spectrometer (Chemagnetics)を用い、周波数は 75.6MHz であった。7.5mm の酸化ジルコニウム回転子中の試料をマジック角の固体プローブ中 3.5-4.5kHz で回転させた。スペクトルは交差分極時間 1 ms、60 KHz CW プロトンデカップリングで、4.8 または 5.0 ms の <sup>1</sup>H NMR 90° パルス長を用いて室温で得た。リサイクル時間は 3 秒を用いた。アダマンタンを標準試料とした。試料は乾燥を避けるため、テフロンキャップを用いて封をした。

## 3 解析

### 単位格子パラメータの決定

メタノール錯体の繊維回折図を図 2 に示す。無水 $\beta$ キチン、水和 $\beta$ キチンなどと同様に<sup>3,9</sup>、奇数時の(0 0 1)の回折が非常に微弱であるため、繊維軸に  $P2_1$  の対称性を持つとした。本来  $P2_1$  の対称性を持つ場合 001 003 の回折は現れないが、002 に対する強度が 1% 以下であり、結晶表面の影響などにより現れているとみなし、これらのピークは続く解析では無視した。明確に帰属可能な 42 個の回折点を用いて単位格子パラメータの計算を行った。メタノール錯体は単斜晶 1 本鎖、非対称単位 1 個の単位格子が報告されており<sup>7</sup>、またその他の報告されている $\beta$ キチン錯体もほぼ同様の晶系で指数付けされており、それによる指数付けを試みたが、回折点の位置が 1 本鎖の指数付けよりも低角側に現れた。そのため **b** 軸方向に単的に 2 倍した単位格子パラメータを算出し、最小二乗法による精密化を行ったところ非常に精度の高い結果が得られた。得られた単位格子パラメータは  $a = 4.673 \text{ \AA}$   $b = 26.235 \text{ \AA}$   $c = 10.343 \text{ \AA}$   $\gamma = 92.19^\circ$  となった。

## 4 結果と考察

既往の報告では $\beta$ キチンメタノール錯体は溶液に浸漬することにより得られるとされていた<sup>7</sup>。本実験で用いたサツマハオリムシでは、無水 $\beta$ キチンをメタノール錯体に浸漬した場合錯体化は完全には進行しなかった。 $\beta$ キチン DMSO 錯体などでは水和 $\beta$ キチンを経由することで得られるため<sup>6</sup>、水和物を介した錯体化も試みたが若干量水和由来と考えられる回折が残った。一方 $\beta$ キチンエタノール錯体は水和物を經由して得ることができたため、エタノール錯体経由での調製を試み $\beta$ キチンメタノール錯体を得ることができた。既往の報告では酸分解した $\beta$ キチンを用いており、繊維長や繊維幅などの影響により錯体製法に違いが出たと考えられる。またエタノール錯体がメタノール錯体よりも容易に得られたのは、エタノール錯体が一般的な $\beta$ キチン錯体とは異なる結晶形をとっているためであろう。

既往の報告と異なり、メタノール錯体は 1 本鎖単斜晶では指数付けできず、2 本鎖単斜晶での指数付けとなった。**b** 軸方向に 2 倍の単位格子となっていることから、メタノールが導入されたことにより **b** 軸方向の対称性が崩れたと考えられる。

<sup>13</sup>C 固体 NMR 測定の結果を図 3 に示す。無水 $\beta$ キチンのシグナルは既に報告されており、

それをもとに帰属を行った<sup>9,10</sup>。C2、C=O のピークがダブルレットで観測されるのは、既報の通り 4 極子の <sup>14</sup>N につく二つの炭素原子による <sup>13</sup>C-<sup>14</sup>N の双極子相互作用を除去できないためである。βキチンメタノール錯体では C3、C4 がダブルレットとして観測され、C3、C4 周りでのコンフォメーションが二つあることを示唆しており、2 本鎖の単位格子を取るということに合致したものである。また C6 にもショルダーのピークが現れており、ヒドロキシメチル基にもディスオーダーがあることが示唆された。

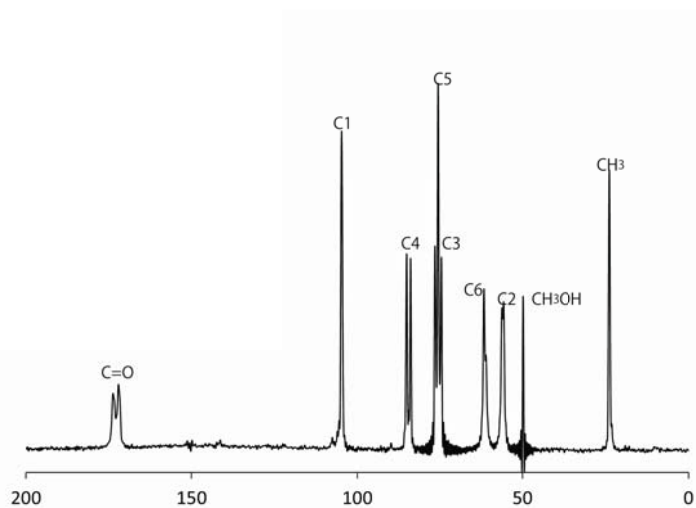


図3 βキチンメタノール錯体の固体 CP/MAS<sup>13</sup>C NMR スペクトル  
(炭素番号は図1に示した)

- 1 Rudall, K. M.; *Advanced in Insect Physiology*, **1963**, 1, 257-313.
- 2 Blackwell, J. *Biopolymers*. **1969**, 7, 281-298.
- 3 Nishiyama, Y.; Noishiki, Y.; Wada, M. *Macromolecules*. **2011**, 44, 950-957.
- 4 Noishiki, Y.; Nishiyama, Y.; Wada, M.; Okada, S.; Kuga, S. *Biomacromolecules*. **2003**, 4, 944-949.
- 5 Noishiki, Y.; Kuga, S.; Wada, M.; Hori, K.; Nishiyama, Y. *Macromolecules*. **2004**, 37, 6839-6842.
- 6 Yoshifuji, A.; Noishiki, Y.; Wada, M.; Heux, L.; Kuga, S.; *Biomacromolecules*. **2006**, 7, 2878-2881.
- 7 Saito, Y.; Okano, T.; Putaux, J.-L.; Gaill, F.; Chanzy, H. In *Advances in Chitin Science II*; Domard, E. A., Roberts, G., Varum, K., Eds.; J.C. André© Pub, 1998; Chapter Crystallosoolvates of beta chitin and alcohols, pp 507-512.
- 8 Saito, Y.; Okano, T.; Gaill, F.; Chanzy, H.; Putaux, J.-L. *International Journal of*

*Biological Macromolecules*. **2000**, 28, 81-88.

9 Kobayashi, K.; Kimura, S.; Togawa, E.; Wada, M.; *Carbohydrate Polymers*. **2010**, 79, 882-889.

10 Tanner, S. F.; Chanzy, H.; Vincendon, M.; Roux, J. C.; Gail, F. *Macromolecules*. **1990**, 23, 3576-3583.