

東京大学学術機関リポジトリ

<http://repository.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/>

論文題目 (Title of Thesis)

キチンとキトサンの結晶転移過程およびキトサンの固体構造解析

氏 名 (Name)

内藤 フィリップ 邦夫

追加情報 (Additional information) :

この論文の一部は以下のように出版されています。

(3 章部分)

X-ray Crystal Structure of Anhydrous Chitosan at Atomic Resolution
Philip-Kunio Naito, Yu Ogawa, Daisuke Sawada, Yoshiharu Nishiyama,
Tadahisa Iwata, Masahisa Wada
Biopolymers, 105 (7), 361-368 (2016)
DOI: 10.1002/bip.22818.

博士論文

キチンとキトサンの結晶転移過程および

キトサンの固体構造解析

内藤 フィリップ邦夫

目次

1. 序論	1
1.1. 多糖類とその利用	1
1.2. キチン・キトサン	1
1.3. キチン・キトサンの利用	3
1.4. 多糖類の構造	4
1.5. キチン・キトサンの結晶構造	5
1.6. キトサンの複合体結晶	8
1.7. 本研究の目的	11
2. キチンからアルカリ-キチン、およびアルカリ-キトサンから水和型キトサンへの結晶転移	12
2.1. 緒言	12
2.2. 実験	13
2.2.1. 試料	13
2.2.2. 回折実験	14
2.2.3. 透過型電子顕微鏡観察	14
2.3. 結果と考察	15
2.3.1. 電子顕微鏡による形態変化の観察	15
2.3.2. アルカリ-キチン複合体	17
2.3.3. キチンの脱アセチル化過程	20
2.3.4. アルカリ-キトサン複合体	21
2.4. 結言	26

3. キトサンの結晶構造解析	27
3.1. 緒言	27
3.2. 実験	28
3.2.1. 試料	28
3.2.2. 固体 CP/MAS ¹³ C NMR 測定	28
3.2.3. シンクロトロン放射光回折	28
3.3.4. X 線結晶構造解析	29
3.3. 結果と考察	35
3.3.1. 水和型キトサンの結晶構造	35
3.3.2. 無水型キトサンの結晶構造	39
3.4. 結言	47
4. 水和型キトサンおよびキトサン-カルボン酸複合体から無水型キトサンへの転移	48
4.1. 緒言	48
4.2. 実験	49
4.2.1. 試料	49
4.2.2. 回折実験	50
4.3. 結果と考察	50
4.3.1. 水和型キトサンから無水キトサンへの転移	50
4.3.2. キトサン/モノカルボン酸複合体の構造	52
4.3.3. キトサン/モノカルボン酸複合体から無水型キトサンへの転移	56
4.4. 結言	57
5. 再結晶化させたキトサンの構造	58
5.1. 緒言	58

5.2. 実験	59
5.2.1. 試料	59
5.2.2. 電子顕微鏡観察	60
5.2.3. 回折実験	61
5.3. 結果と考察	61
5.4. 結言	66
総括	67
引用文献	69
謝辞	79
発表論文	80
APPENDIX	81

1. 序論

1.1. 多糖類とその利用

多糖類は自然界で最も多く生産されている高分子であり、多糖類は構造多糖類と貯蔵多糖類に大別される。構造多糖類の代表例として植物の細胞壁の主成分であるセルロース、節足動物の外骨格、真菌類の細胞壁などの主成分であるキチンがあり、生物の構造を支持する機能を果たしている。貯蔵多糖類は生物がエネルギー源を蓄え適宜取り出す機能を果たし、デンプン、イヌリンといったものが代表例としてあげられる。人類は古くから多糖類を素材として利用してきた。特にセルロースは、樹木の細胞壁として広く大量に存在しており、木材そのものの建築部材、家具などの材料としての利用、さらに精製、加工を施すことにより紙、繊維素材としての利用がなされてきた。現在、エネルギー源、素材原料として用いられている石油はいずれ枯渇すると予想されており、石油以外のエネルギー源、素材原料を模索する必要性から再生産可能な生物資源、いわゆるバイオマスとして多糖類が注目されている。その中でも、食料生産と競合しない構造多糖の利用技術を発展させていくことが重要であると考えられる。これまで、古くから利用・研究されてきたセルロースの他に、集積・精製加工に手間がかかることからほとんど利用がされてこなかったキチン、およびその誘導体のキトサンの利用技術を発展させていくことが望まれる。

1.2. キチン・キトサン

1800年代前半にキノコ、および昆虫の角皮（クチクラ）の希アルカリ加熱処理抽出物中に同様の不溶性物質が発見され、キチン（chitin）と命名された。その後、キチンを濃アルカリ中で加熱することにより、有機酸に可溶となることを見出され、Hoppe-Seylerによりキトサン（chitosan）と命名された。キチンの一次構造は poly- β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine で表される。キトサンはキチンのアセトアミド基の脱アセチル化によって得られ、キチンやセルロースと比較して2位の炭素の官能基だけが異なる構造となっている (Figure 1-1)。しかしながら、二つは明瞭に定義、区別されている訳ではなく、多くの場合、部分的に脱アセチル化（あるいは、アセチル化）されたコポリマーとして存在し、利用されている。生物より抽出したキチンのアセチル基は数%程度脱離している。一般的に脱アセチル化度が50%程度以上で酸可溶となったものがキトサンと呼ばれ、商業的には50-85%程度のものが

キトサンとして利用されている。キチンは菌界、植物界において、カビ、キノコ等の真菌類および下等な藻類の細胞壁の構成成分として存在し、構造的な強度を維持する役割を果たしている。動物界にも広く分布し、特にエビ、カニ、昆虫などの節足動物のクチクラ層の構成成分として無機塩やタンパク質と複合体を形成している。一方、天然キトサンは接合菌類の細胞壁にのみ見出されている (Bartnicki-Garcia, 1968)。このキトサンはキチンの生合成と脱アセチル化酵素による反応がほぼ同時に起こることによって合成されている (Araki & Ito, 1975)。

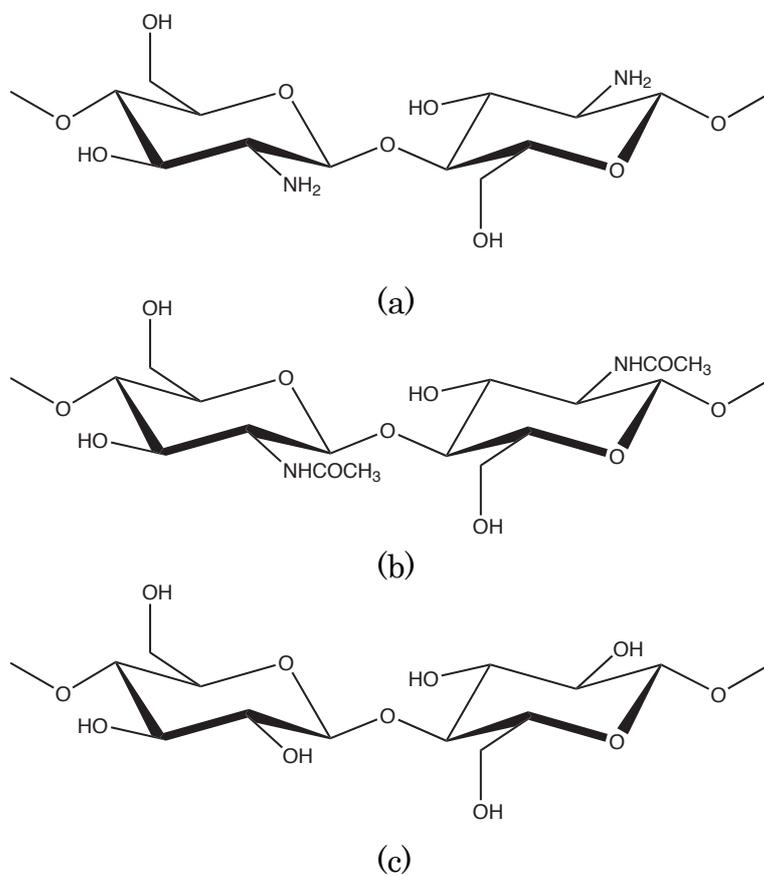


Figure 1-1 Primary structures of (a) chitosan, (b) chitin, and (c) cellulose.

1.3. キチン・キトサンの利用

一次構造の類似したセルロースやキチンが難溶性である一方で、アミノ基を有するカチオン性高分子であるキトサンは様々な有機酸、無機酸溶液に容易に溶解する。従って、溶解・再生によるビーズ、繊維、フィルム、不織布といった様々な形態加工や、溶媒中での反応による誘導体化に関して幅広い選択が可能である。またキトサンは、生理活性、生体適合性、細胞接着性等の性質を有することが知られている。こうした特性を持つことから、キトサンはこれから詳しく述べるように抗菌材料、医用材料、医薬品、化粧品、食品添加剤、農薬などの分野でのこれからの利用が見込まれるバイオマス資源である。

化学修飾を施した例としては、TEMPO 触媒酸化によるキチンのナノフィブリル化や微結晶化 (Fan et al., 2007; Fan et al., 2009)、誘導体化による水溶性や熱可塑性などの機能性付与がある。代表的な水溶性キトサン誘導体としてカルボキシメチルキトサンがある (Kumar, 2000)。また、種々の無水カルボン酸により *N*-または *O*-アシル化することにより熱可塑性を付与することが可能である (Kumar, 2000)。他にも、硫酸化 (Gamzazade et al., 1997; Je et al., 2005; Zhang et al., 2003) の報告がある。

キトサンおよびその分解物は細菌、植物病原真菌類の増殖抑制効果とともに植物の発芽・成長促進効果を持つことが知られており (El Hadrami et al., 2010; Kulikov et al., 2006; Rabea et al., 2003)、用途として種子コーティング剤 (Guan et al., 2009)、子葉散布剤 (Khan et al., 2002) 等の検討がなされており、天然由来の農薬としての応用が期待される。こうした効果は植物が外敵の昆虫や病原菌の細胞壁の構成成分であるキチン・キトサンを認識することによる免疫活性化によって引き起こされると考えられているが、詳しいメカニズムについては明らかになっておらず、今後の研究が期待される。

その抗菌性、生体適合性、生分解性、生理活性を生かした医薬・医療分野での活発な応用研究および実用化がなされている。キチンおよびキトサンには創傷治癒効果が認められており (Alsarra, 2009; Niekraszewicz et al., 2007)、商品化の例としてベスキチン (Unitika, Japan)、キトパック (Eisai Co., Japan)、Chitodine (IMS, Italy) などがある。また、止血効果も見出されており (Kucharska et al., 2011a,b; Struszczyk & Struszczyk 2007; Muzarelli 2009)、商品化の例として HemCon、ChitoFlex (絆創膏および止血剤、HemCon Medical Technologies, USA)、Syvatek (止血パッチ、Marine Polymer Technologies, USA)、Tromboguard (止血剤、TRICOMED SA, Poland) などがある。

医療分野における先端的な研究の例としては、神経再生を目的とした結晶性キチンチューブの作製 (Yamaguchi et al., 2003a,b; Muzarelli 2009; Crompton et al., 2007)、骨再生 (Ratajska et al., 2008; Niekraszewicz et al., 2009)、細胞足場材料 (Tchemtchoua et al., 2011)、遺伝子デリバリー (Hagiwara et al., 2012) などがあり、更なる研究の発展と今後の実用化が期待される。

食品添加剤分野ではキトサンの経口摂取によってコレステロールの吸収の抑制が認められ (Gallaher et al., 2000)、応用例として特定保健用食品素材の関与成分として認可されたキトサミン (日本化薬フードテクノ) がある。また、ヒアルロン酸に類似した保湿効果、および老化抑制効果があるとの報告があり、いくつかの化粧品分野での応用がなされている (Morganti et al., 2013)。

1.4. 多糖類の構造

セルロースやキチン、またキトサンのような多糖類は分子鎖が規則的に配列した分子結晶状態として存在しており、それらの構造は疎水的相互作用と水素結合によって安定化されている。結晶構造からは、結晶中での分子間相互作用の有り様を理解することができ、高分子材料としての情報の最も基礎的なものの一つを得ることができる。多糖類の研究において、高分子としての物性を議論する上でも (Ogawa et al., 2011)、誘導体化の際における反応性や酵素分解性といったアクセシビリティを議論する上でも (Igarashi et al., 2007; Oka et al., 2013) 結晶構造に関する知見は必要不可欠である。これまでのところ、セルロース結晶多形であるセルロース I α 、I β 、II、III $_1$ 、またいくつかのキチン結晶多形について、X線、および中性子線繊維回折法に基づく結晶構造解析が行われており、水素結合様式を含む詳細な結晶構造が報告されている (Langan et al., 1999; Langan et al., 2001; Nishiyama et al., 2001; Nishiyama et al., 2002; Nishiyama et al., 2011; Sawada et al., 2012; Wada et al., 2004)。

これらの多糖結晶構造解析の報告では、高輝度の X 線源であるシンクロトロン放射光 X 線によって X 線回折強度データを取得しており、従来型の実験室 X 線源を用いた場合と比較して、非常に高分解能の強度データによる精度の高い解析が行われている。加えてこれらの解析においては、中性子線繊維回折法による水素原子位置、および水素結合様式の直接的な決定を行っており、この点が従来の多糖結晶構造解析と最も大きく異なる点である。

1.5. キチン・キトサンの結晶構造

前述した通り、キチンはカニ、エビなど甲殻類、および昆虫の外骨格やイカの中骨などから脱タンパク処理、脱カルシウム処理を経て抽出される。そうして得られたキチンは結晶性のマイクロフィブリルとして得られ、2種類の結晶構造が知られている。 α -キチン (Figure 1-2) は自然界で最も広く見られる構造で甲殻類、昆虫の外骨格、微細藻類などに見られ、隣接する分子鎖同士の極性（還元末端の向き）が異なる逆平行鎖の結晶構造をとる

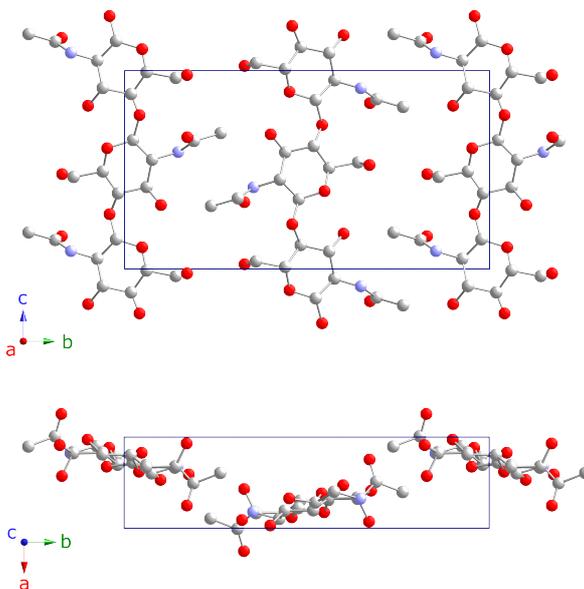


FIGURE 1-2 Crystal structure of α -chitin proposed by Sikorski et al. (2009).

(Sikorski et al., 2009)。 β -キチン (Figure 1-3) はイカの中骨、珪藻、ハオリムシの棲管などの一部の生物で見られ、平行鎖の結晶構造をとる。天然状態では水和型結晶として得られ (Sawada et al., 2012)、乾燥により無水型結晶に転移する (Kobayashi et al., 2010; Nishiyama et al., 2011)。

これらのキチンマイクロフィブリルの形態、結晶性は由来する生物種、部位によって異なり、高結晶性かつ高配向性を実現可能な試料が結晶構造解析のモデル試料として用いられる。 β -キチンは疎水性スタックした分子鎖シート間に種々の分子を取り込んだ複合体結晶を作ることが可能であるが α -キチンはそのような性質は示さない (Sawada et al., 2013)。

また、 β -キチンマイクロフィブリルはアルカリ膨潤および濃塩酸処理後に水洗により再生させると α -キチンの結晶構造に転移し、分散したフィブリル状の形態は崩壊もしくは膨潤し、凝集状構造へと変化する (Noishiki et al., 2003; Saito et al., 1997)。この過程は不可逆であり、平行鎖構造をとる天然セルロース (セルロース I) のアルカリ膨潤

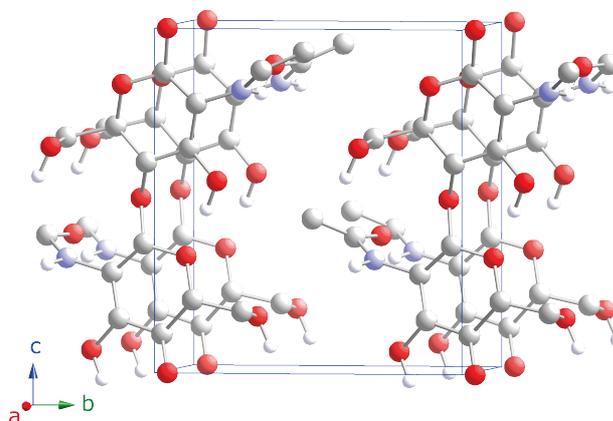
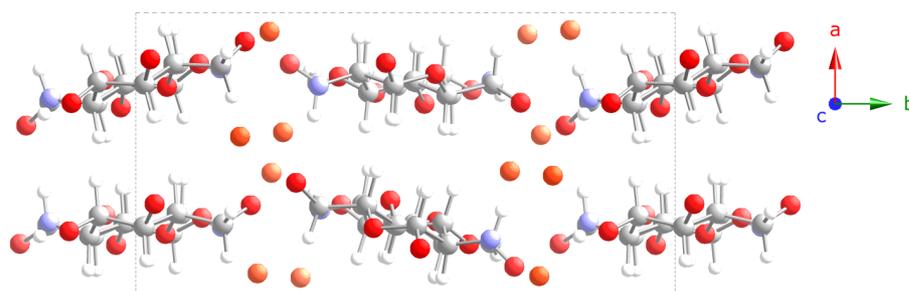


FIGURE 1-3 Crystal structure of anhydrous β -chitin proposed by Nishiyama et al. (2011).

による逆平行鎖構造（セルロースⅡ）への変化過程と類似しているが、セルロースの場合で報告されているようなアルカリ複合体構造（Okano et al., 1985）や水和型結晶（Nishimura & Sarko, 1991）といった中間体構造はこれまでのところ報告されていない。

キチンの脱アセチル化によって得られたキトサンも同様に結晶状態として得られ、キチンやセルロースの場合と同様に、その結晶構造は X 線結晶構造解析の対象とされてきた。熱重量測定、および X 線構造解析の結果からキトサン結晶には結晶中に水分子を包接した水和型結晶と、水分子を含まない無水型結晶が存在することが明らかとなっている。この水和型キトサン結晶の繊維 X 線回折図は初め、Clark & Smith (1937) によって報告された。その後、Okuyama ら (1997) は熱重量分析、および繊維 X 線回折の手法に基づく構造解析により、水和型キトサンの結晶構造モデルを報告している (Figure 1-4)。それによると水和型キトサンの単位格子は斜方晶系、空間群は $P2_12_12_1$ であり、この単位格子中には 4 本の

(a)



(b)

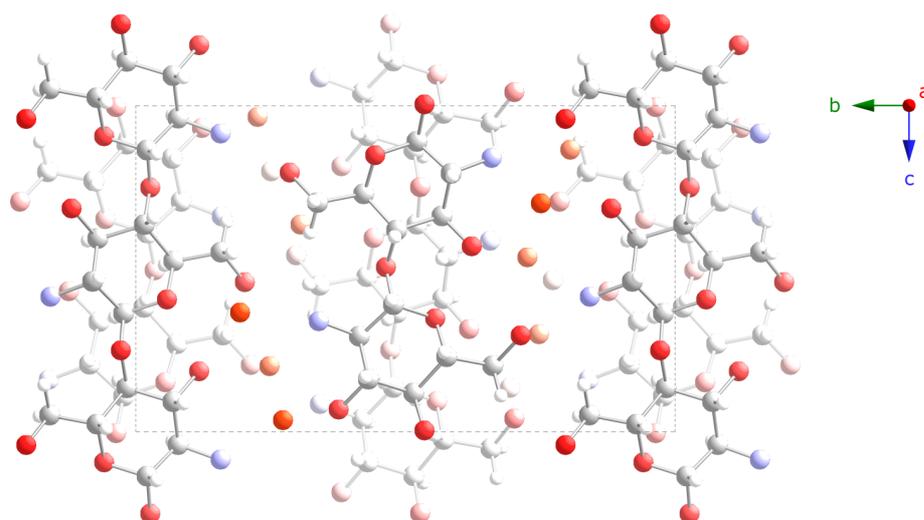


FIGURE 1-4 Crystal structure of hydrated chitosan (Okuyama et al., 1997) projected along the (a) *c*-axis and the (a) *a*-axis.

分子鎖が含まれている。逆平行鎖構造を形成しており、またグルコサミン残基一つあたり一つの水分子を含むと報告された。これが現在までのところ報告されている唯一の水和型キトサンの結晶構造モデルであるが、この構造中には水分子の配置について曖昧さが残っている。

水和型キトサンを熱水処理すると結晶中の水和水は脱離し、結晶中に水分子を含まない無水型キトサン結晶が得られる (Ogawa et al., 1984)。また重合度数十程度の低分子量のキトサン分子を再結晶化することで得られるラメラ結晶は、熱水処理によって得られるものと同様の無水型キトサンの結晶形を有することが分かっている (Carins et al., 1990)。無水型キトサンの結晶構造については、X線繊維回折と微小部電子線回折法により、いくつかの結晶構造モデルが報告されている (Yui et al., 1994; Okuyama et al., 1999; Mazeau et al., 1994)。いずれのモデルにおいても、無水型キトサンの単位格子は斜方晶系で、空間群は $P2_12_12_1$ であり、単位格子中では二本の分子鎖が逆平行に配列している。提案されている結晶構造モデルの最も大きな違いは、分子間結合によって形成される分子シートが、 ac 面に沿って配置するか (Yui et al., 1994)、 bc 面に沿って配置するかという点であり (Mazeau et al., 1994; Okuyama et al., 1999)、無水型キトサンの構造としてはこの点に曖昧さが残っている (Figure 1-5)。また、X線構造解析に基づく水素結合様式の予測が行われているが、この点についても詳細な検討はなされていない。

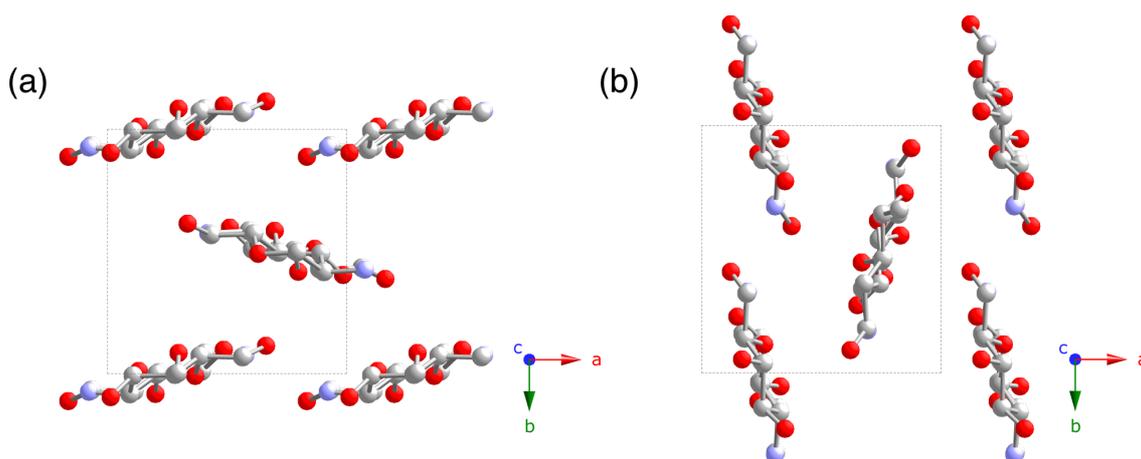


FIGURE 1-5 Crystal structure of anhydrous chitosan proposed by (a) Okuyama et al. (1997) and (b) Yui et al. (1994) projected along the c -axis.

以上に述べた結晶構造解析は高結晶性試料を得ることを目的として繰り返しアルカリ処理を行い、完全に脱アセチル化したキトサンを用いて行われている。しかしながら、前述の通り一般的に利用されているのは部分的に脱アセチル化（アセチル化）されたキチン、あるいはキトサンである。そのようなキチン・キトサンがどのような構造をとるかについて、キトサンを無水酢酸により順次 *N*-アセチル化することによって結晶構造の変化を調べた例がある（戸倉、田村 2009）。これによるとアセチル化度が 44.2%までの試料はキトサン結晶の X 線回折パターンを示すが、52.2%を境に明確にキチン結晶の X 線回折パターンに変化する。つまり、中間体構造や混晶は存在せず、アセチル化度によって結晶部分がキトサン結晶由来かキチン結晶由来かがはっきりと変化する。また、脱アセチル化の処理方法によってもキトサンは異なる性質を示す。均一系で柔和な条件（25°C）で脱アセチル度 50%まで脱アセチル化したキトサンは水溶性を示すが、不均一系で処理した同じ脱アセチル化度を持つキトサンはこのような性質は示さない（Sannan et al., 1976）。これは均一系ではランダムに脱アセチル化が起こる一方で、不均一系では非晶部分、マイクロフィブリルの表面部分から脱アセチル化度がブロック状に進むからであると考えられる（Kurita et al., 1977）。このことから、一般的に不均一系で調製されている脱アセチル化度 50–85%のキトサン試料は主としてブロック状のキトサンからなり、結晶部分は水和型キトサンの構造をとると考えられる。

1.6. キトサンの複合体結晶

水和型キトサンは適切な条件下で酸溶液、金属塩水溶液に浸漬することにより種々の酸、金属イオンを結晶中に取り込んだ複合体結晶を作ることが知られている（Cairns et al., 1992; Demarger-Andre & Domard, 1994; Kawada et al., 1999; Ogawa & Inukai, 1987; Ogawa et al., 1993; Yamamoto et al., 1997）。こうした複合体の構造は、X 線回折と固体 ^{13}C NMR により二つのタイプに分けられている（Ogawa et al., 1987; Saito et al., 1987）。Type I 複合体は種々の金属イオンや、HBr、HI、 HNO_3 を結晶中に包接することで得られる水分子を含まない繊維方向に 2 回らせんの対称性を有する構造である。一方、Type II 複合体は HCl、 H_2SO_4 や、酢酸などのモノカルボン酸を包接して形成される、結晶中に水分子を含む、繊維軸方向に 8 回らせんの対称性を有する構造である（Figure 1-6）。興味深いことに、同一の酸でも濃度や温度条件によって Type I 複合体と Type II 複合体のどちらもとりの場合がある（Table 1-1）。

いずれの場合でも、より柔和な条件では Type II 構造をとり、高温、高濃度などの激しい条件では Type I 構造をとる。

Type I 複合体の結晶はそれぞれ異なる X 線回折パターンを示す一方、Type II 複合体の結晶の X 線回折パターンは類似しており、Type I 複合体ではゲスト分子とキトサン分子が明確な相互作用による結晶構造が形成されているが、Type II 複合体ではゲスト分子と水分子はキトサン分子鎖間にランダムに存在しており、キトサン分子鎖の構造のみが X 線回折パターンに反映されているものと考えられる。以上のことから、水を含んだ緩やかでランダムな相互作用による複合体構造は 8 回らせん構造をとり、水分子を含まないゲスト分子とキトサン分子鎖間の明確な相互作用によって、より対称性の高い 2 回らせんの結晶構造をとるのではないかと考えられる。

これらの複合体のゲスト分子である種々の酸は、それ単独ではキトサンにとっての良溶媒である。溶媒と高分子が混ざりあって溶液が形成されるためには、まず溶媒分子が高分子間に侵入して複合体化し、膨潤したゲルが形成される。次いでゲルが溶解し、真の溶液が形成される。キトサンの場合、酸の複合体化までは進行するが、その後の混合自由エネ

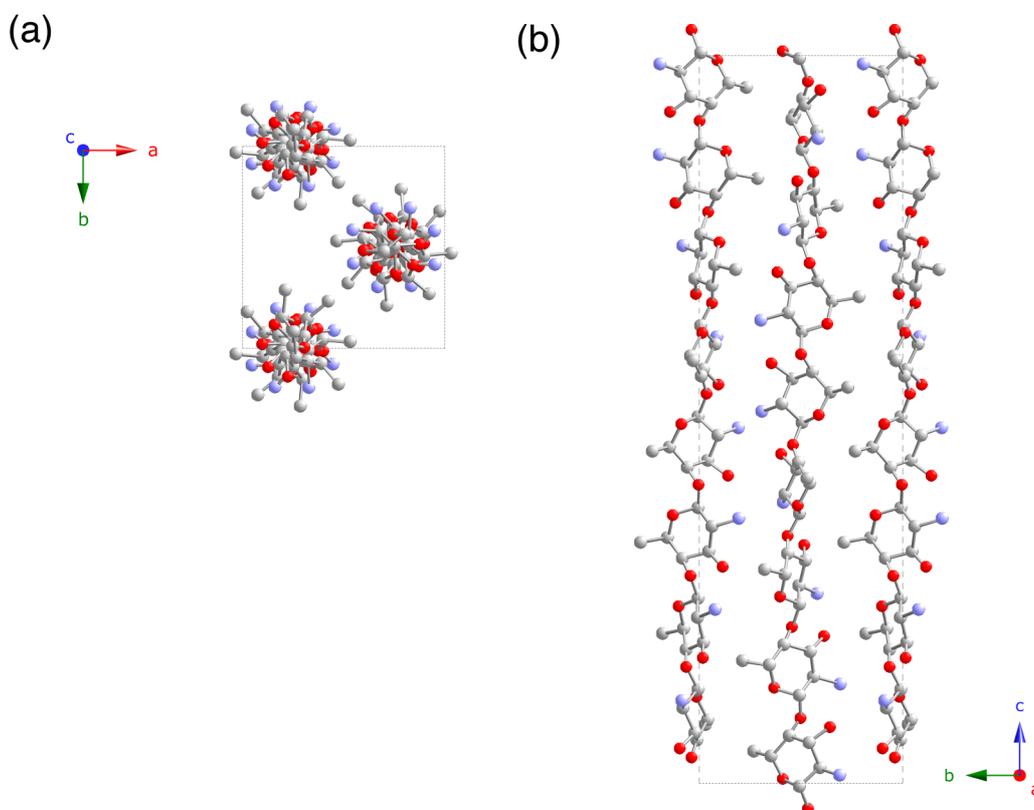


FIGURE 1-6 Plausible packing model of chitosan/acetate complex.

ルギー (free energy of mixing) ΔG が負にならないために、ゲル形成および溶解が進まずに結晶性の複合体が得られる場合が存在するのであろう。この傾向は酸水溶液に 2-プロパノール等の溶媒を混合することによりさらに強めることができる。これらの複合体結晶の構造を明らかにし、ゲスト分子とキトサン分子との間の相互作用を明らかにすることは、キトサンの各種溶媒への溶解状態や溶解機構についても知見を与えると考えられ、非常に興味深い。

Type I 複合体の結晶構造については、HI 複合体についてシンクロトロン放射光を用いた X 線構造解析により、詳細な報告がなされている (Lertworasirikul et al., 2004)。それによるとキトサン/HI 複合体結晶の単位格子は単斜晶で空間群は $P2_1$ であり、グルコサミン残基一つあたり一つの Br が単位格子中に存在し、この I が N、O6 との間で相互作用を持つことによって安定化した構造をとっている。Type II 複合体の結晶構造については、Carins らが、分子鎖が 8/5 らせんを形成していると報告している (Carins et al., 1992)。一方、Okuyama ら (2000) は 8/5 らせんのモデルは X 線回折データと一致せず、繊維軸方向の繰り返しはグルコサミン 4 残基を一単位とした 2 回らせんであると報告している。このような構造解析に向けた取り組みはなされているが、Type II 複合体の結晶構造についての詳細な報告はなされていない。

Table 1-1 Typical chitosan acid complexes

Helical structure		Guest molecule
Type I	2-fold	HNO ₃ (high concentration), HBr, HI (high temperature), HClO ₄ , L- or D-lactic acid (high temperature)
Type II	8-fold	HNO ₃ (low concentration), H ₂ SO ₄ , HCl, HF, L- or D-lactic acid (low temperature)

キトサンの良溶媒として知られる酢酸をはじめとしたモノカルボン酸とキトサンが形成する複合体結晶は Type II 複合体に分類される。これまでのところ、ギ酸と酢酸複合体について X 線繊維回折図が報告されており、単位格子はいずれも斜方晶系で、空間群は $P2_12_12_1$ である。X 線構造解析に基づく結晶構造モデルは、これまでのところ報告されていない。モノカルボン酸複合体は他の複合体結晶と異なり、高湿度条件下で結晶中の水分子と酸が脱離して無水型キトサンへと転移することが知られている。これはモノカルボン酸複合体に

においてのみ認められる現象であり、この挙動を解析することはキトサンとモノカルボン酸間の相互作用を明らかにすることにつながるであろう。

1.7. 本研究の目的

以上で述べたように、キトサンはセルロースやキチン同様、繊維結晶として存在する。そして、複数の結晶系をとることが知られている。固体構造は物性と密接な関係にあるため、構造そのものの情報、および構造がどのような条件でどのように転移するかは材料としての基礎的知見として重要である。そこで、本研究ではキチンからキトサンへの変換プロセスにおける結晶転移過程（第二章）、キトサン多結晶の詳細な X 線結晶構造解析（第三章）、キトサンの結晶多形間の転移、具体的には水和型キトサンおよびキトサン-カルボン酸複合体から無水型キトサンへの転移（第四章）、さらに、再結晶化させたキトサンの構造（第五章）に関して研究を行った。

2. キチンからアルカリ-キチン、およびアルカリ-キトサンから水和型キトサンへの結晶転移

2.1. 緒言

アルカリによる膨潤を経由して起こる多糖の結晶変態としてセルロースのマーセル化処理（セルロース I→セルロース II）が良く知られている。これは工業的に重要なプロセスとして、また結晶中のセルロース分子鎖が平行鎖構造からアルカリ膨潤による中間体を経て逆平行鎖に転移するという学術的に興味深い現象として長い間、研究され議論されてきた（Kolpak et al., 1978; Nishimura et al., 1987; Nishimura et al., 1991a; Nishimura et al., 1991b; Okano et al., 1984; Okano et al., 1985）。この現象とキチンからキトサンへの変換はアルカリ膨潤を経たプロセスであるという点で共通している。キチンをアルカリ水溶液に浸漬するとキチン分子鎖内にアルカリ分子を取り込んだキチン-アルカリ複合体が得られる（Li et al., 1999）。この複合体をアルカリ水溶液中で保持すれば脱アセチル化が進行し、アルカリ-キトサン複合体が得られると考えられ、水洗を経ると水和型キトサンが得られる（Figure 2-1）。キチンおよびキトサンは通常、繊維状結晶として存在するが、これまでこの複合体は非晶

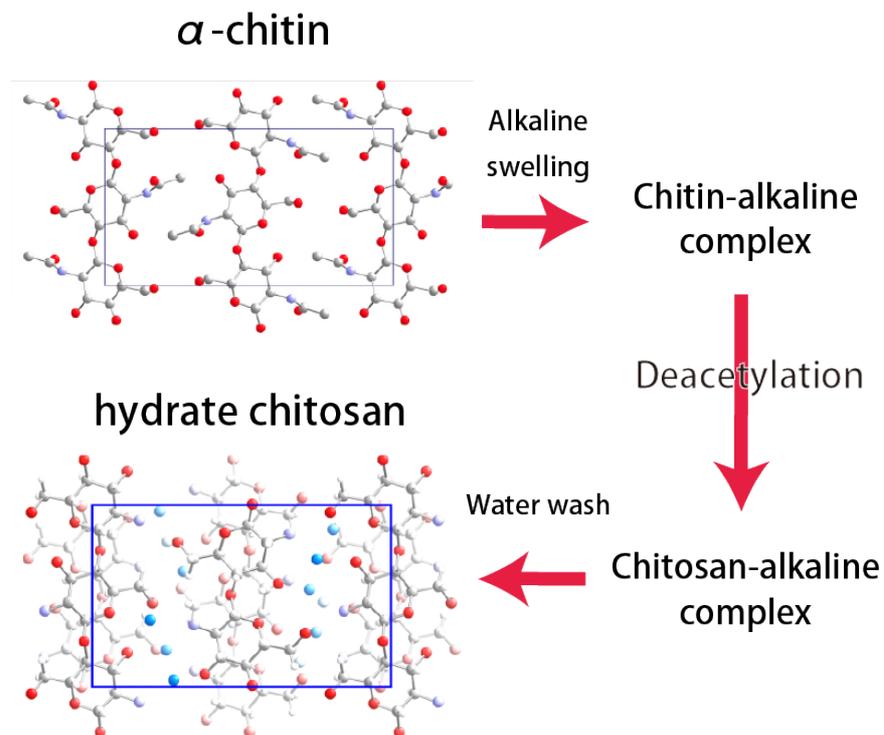


FIGURE 2-1 Schematic representation of the crystal conversion of chitin from hydrated chitosan.

であると報告されてきた (Jooyeoun & Yanyun, 2014; Li, Revol, & Marchessault, 1999)。キトサンを得るためには 30–60 % の NaOH または KOH 水溶液を用いて、60–140 °C で反応を行う。低分子量化を防ぐためには NaBH₄ もしくはチオフェノールの添加が有効である。完全に脱アセチル化させたキトサンを得るためには 100°C 以上の条件で数時間、数回の処理が必要である。

キチン源の集積からキチンの精製、脱アセチル化処理を経たキトサンの生産プロセスを効率化、低コスト化していくことが望まれる。そのためには、キチンのアルカリ処理過程において分子がどう振舞っているか、構造、形態がどういった変化、転移過程を経ているかを知ることが重要である。この脱アセチル化の過程で、キチンおよびキトサンの構造がアルカリとどのように相互作用しているかはこれらのバイオマスのプロセッシングにおける重要な知見であるが、これまで詳しい報告はなされていない。そこで、本実験ではこれらの複合体の変換過程のうち、①キチンのアルカリ膨潤による結晶転移、②脱アセチル化されたアルカリ膨潤キトサンの水洗による水和型キトサンへの結晶転移の二つの結晶転移過程に注目し、シンクロトロン放射光を用いた繊維 X 線回折実験を行った。

2.2. 実験

2.2.1. 試料

α -キチン試料としてズワイガニ (*Chionoecetes opilio*) の脚部の腱、ハプト藻 *Pheocystis globosa* の棘条を用いた。ズワイガニの腱の精製は Sikorski ら (2009) の方法に従った。30 分程度水中で煮沸したズワイガニから取り除いた腱を 1 M NaOH に一昼夜浸漬した。NaClO₂ による漂白処理後、再び 1 M KOH に一昼夜浸漬することで、脱タンパクおよび漂白を行った。得られたキチン精製物は 0.1 % アジ化ナトリウム水溶液中に防腐保存し、X 線回折実験用の試料として用いた。

アルカリ *P. globosa* (NIES-1396、国立環境研究所) を Ogawa ら (2010) の方法によって培養した。Modified MIR 培地中 (Epply et al., 1967)、20°C、12 時間周期の明暗サイクル下で 1 ヶ月間通気培養を行った。培養液を遠心分離し、得られた固形分を、前述のズワイガニの腱と同様の手順で精製した。得られたキチン精製物の懸濁液を凍結乾燥し、形態観察用のキチン試料として用いた。

C. opilio 由来のキチン試料を触媒量の NaBH₄ を加えた 50 % NaOH 中で 120°C、2 時間、3

回処理した試料を水洗せずにアルカリ液中に浸漬したままのものをアルカリ-キトサン、水洗したものを水和型キトサン試料として X 線回折実験に用いた。 *P. globosa* 由来のキチン試料を同様の条件で 33 % および 50 % NaOH でアルカリ処理、水洗したものを形態観察用試料として用いた。

2.2.2. 回折実験

放射光施設 SPring-8 (Hyogo, Japan) のビームライン BL40B2 にて繊維 X 線回折実験を行った。波長は $\lambda = 1.000 \text{ \AA}$ とした。180 s 露光し、平板イメージングプレート上に記録した。カメラ長は 150 mm 程度に設定し、ビームセンター位置と共に CeO_2 結晶 ($d_{111} = 0.312 \text{ nm}$) を標準試料として較正した。 *C. opilio* 由来のキチン試料を 33%、35%、39%、50% 濃度の水酸化ナトリウム水溶液にそれぞれ 2 分、5 分、10 分、20 分、30 分、60 分間浸漬し、余分な液を拭き取った後にフィルムで挟んで固定し、湿潤状態で X 線回折実験に供した。アルカリ-キトサン試料は 50%、45%、35%、30%、22%、16.5%、10%、9%、7%、0% 濃度の水酸化ナトリウム水溶液に順次、1 時間ずつ浸漬して平衡状態とし、それぞれの試料についてフィルムで挟んで固定し、湿潤状態で X 線回折実験に供した。得られた回折図の解析は RAXIS ソフト (Rigaku) を用いて行った。

2.2.3. 透過型電子顕微鏡観察

本研究では、回折コントラスト法ならびにネガティブ染色法による観察を行った。4 nm 厚のカーボン蒸着膜を被覆したマイクログリッドをソフトプラズマエッチング装置 (SEDE-GE, Meiwafoysis Co.) で親水化し、試料の水分散液を滴下し、気乾した。ネガティブ染色は 0.5% 酢酸ウラン水溶液をグリッドへ滴下、余分な液をろ紙で吸い取って気乾させることで行った。観察には透過型電子顕微鏡 (JEM-2000EX, JEOL) を使用し、加速電圧 200 kV、CCD カメラ (Keen View, Olympus Soft Imaging Solution) で画像を記録した。

2.3. 結果と考察

2.3.1. 電子顕微鏡による形態変化の観察

Figure 2-2 に *P. globosa* 由来の α -キチン試料の濃アルカリ処理前後の電子顕微鏡観察像を示す。未処理物は典型的な *P. globosa* 由来の α -キチンの特徴である剛直で幅が均一なマイクロフィブリルが均一に分散していることが分かる (Ogawa et al., 2010)。33% NaOH で処理して水洗を行った試料は、この形態的特徴の変化は一切見られなかった。これは Fan ら (2010) が甲殻類の殻由来の α -キチンを用いた 33%濃度以下のアルカリ処理では表面のみが脱アセチル化され、結晶サイズに変化がないことを報告したが、この条件では *P. globosa* 由来の試料も同様に内部までの脱アセチル化は起こらず、形態的な変化も起こらないということが確認できた。一方で、50% NaOH 処理および水洗を行った試料は形態的特徴に大きな変化が見られており、以前の剛直なフィブリル構造が、ねじれ、湾曲するように変化していた。また、フィブリル同士が解合して、束上の構造になっている箇所も観察された。これは、アルカリ膨潤、高温でのアルカリ処理を経てマイクロフィブリル構造が大きく変化していることを示している。 β -キチンのアルカリによる α -キチンへの結晶転移で見られたような完全なフィブリル構造の崩壊と再凝集 (Noishiki et al., 2003) は見られず、フィブリル形状の幅と長さは概ね保たれていた。このことは β -キチンから α -キチンへの転移過程では並行鎖 \rightarrow 逆並行鎖への転移が起こる一方で、 α -キチンからアルカリ膨潤を経たキトサンへの変換過程では逆並行鎖 \rightarrow 逆並行鎖への転移のみが起こることを示唆している。

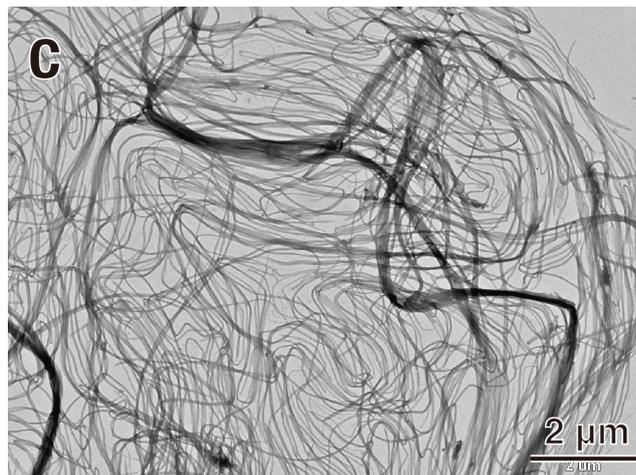
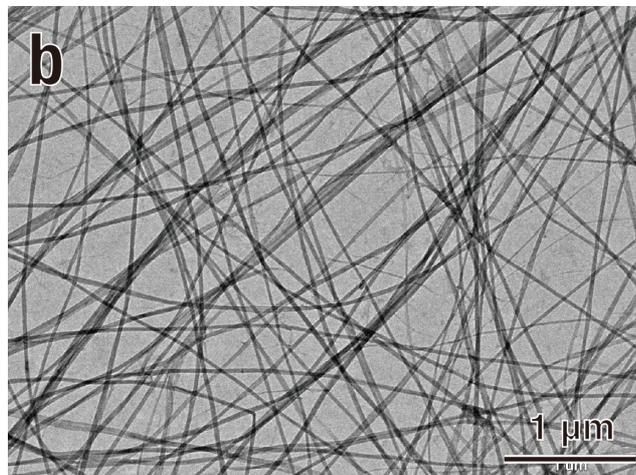
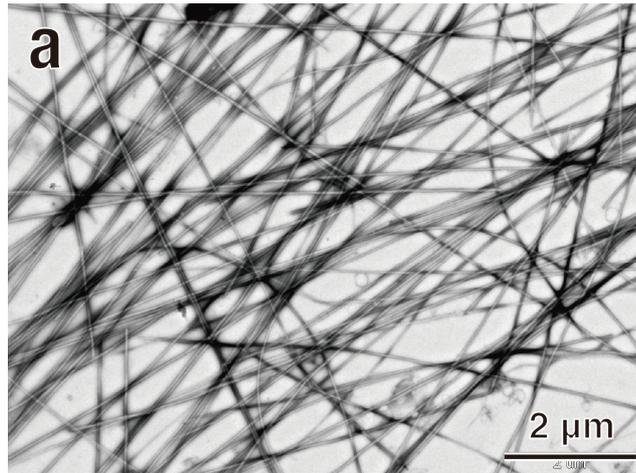


FIGURE 2-2 TEM images of α -chitin, extracted from *P. globosa* treated at different alkali concentration. (a) initial sample (negative stained). Sample treated at 33% (b) and 50 % (c) NaOH, 120°C, for 3 h, 3 times respectively (diffraction contrast).

2.3.2. アルカリ-キチン複合体

Figure 2-3 に *C. opilio* 由来の α -キチン、および同試料を 39% NaOH に 5 分間浸漬した繊維 X 線回折図を示す。二つの回折パターンは明確に異なっており、Figure 2-3b はキチンがアルカリを取り込んだアルカリ複合体結晶（以下、アルカリ-キチン複合体）由来の回折であると考えられる。キチンはキチン分子鎖がアルカリによって膨潤し、複合体を形成して脱アセチル化が進むと考えられており、このキチンのアルカリ膨潤体はこれまで非晶であると報告されてきたが (Jooyeoun & Yanyun, 2014; Li, Revol, & Marchessault, 1999)、アルカリ-キチン複合体結晶が存在することが明らかになった。アルカリ-キチン複合体の回折図には子午線の三層線上 ($d = 0.502$ nm) に強い回折が現れており、繊維軸方向に 3 回らせんの繰り返し周期を持つと考えられる。同様の 3 回らせん構造を持つ多糖結晶として、銅-アルカリ-セルロース複合体が知られており、単位格子が六方晶形をとると報告されている (Ogawa et al., 2013)。アルカリ-キチン複合体の回折パターンは銅-アルカリ-セルロース複合体の回折図に似通っており、類似した単位格子を取ることが示唆される。回折図から、独立な 16 個の回折点の面間隔を測定し、単位格子モデルの精密化を試みた。得られた面間隔データは銅-アルカリ-セルロース複合体の単位格子を基に、六方晶の単位格子で c 軸長および a 軸長を 1.5 nm としたモデルで指数付けを行うことができた。最小二乗法による精密化により単位格子パラメータ、 $a = 15.01(5)$ Å、 $c = 15.11(6)$ Å を得た。測定した面間隔 (d_{obs}) と単位格子モデルから計算された面間隔 (d_{calc}) の比較を Table 2-1 に示す。Figure 2-4 に 33%、35%、39%、50% NaOH に各時間浸漬した状態で測定した *C. opilio* 由来の α -キチンの X 線回折プロファイルを示す。どの条件でも α -キチン由来の回折ピークは時間と共に減少し、徐々に別の回折プロファイルを示す構造、つまりアルカリ-キチン複合体への転移が進行している。特に、39%から 50%条件下では数分以内で完全に転移が進んでいることが分かる。

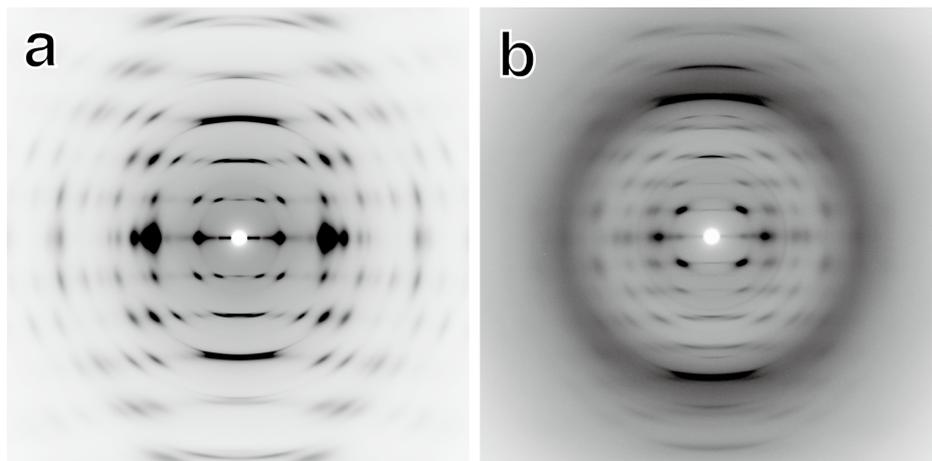


FIGURE 2-3 Typical X-ray diffraction pattern of α -chitin (a), and alkali-chitin (α -chitin treated at 50% NaOH) (b).

Table 2-1 Observed and calculated d -spacings of Na-chitin

h	k	l	d_{obs}	d_{calc}	$ d_{\text{obs}} - d_{\text{calc}} $
1	1	0	7.578	7.532	0.046
2	1	0	4.829	4.924	0.095
3	0	0	4.322	4.335	0.013
2	1	1	4.659	4.682	0.023
3	1	1	3.481	3.512	0.032
1	0	2	6.487	6.529	0.042
1	1	2	5.412	5.332	0.080
2	0	2	4.925	4.927	0.001
2	1	2	4.118	4.124	0.007
0	0	3	5.023	5.033	0.010
1	0	3	4.740	4.693	0.047
1	1	3	4.173	4.185	0.012
2	1	3	3.499	3.520	0.021
0	0	4	3.757	3.775	0.018
1	0	4	3.625	3.625	0.000
1	1	4	3.383	3.374	0.008

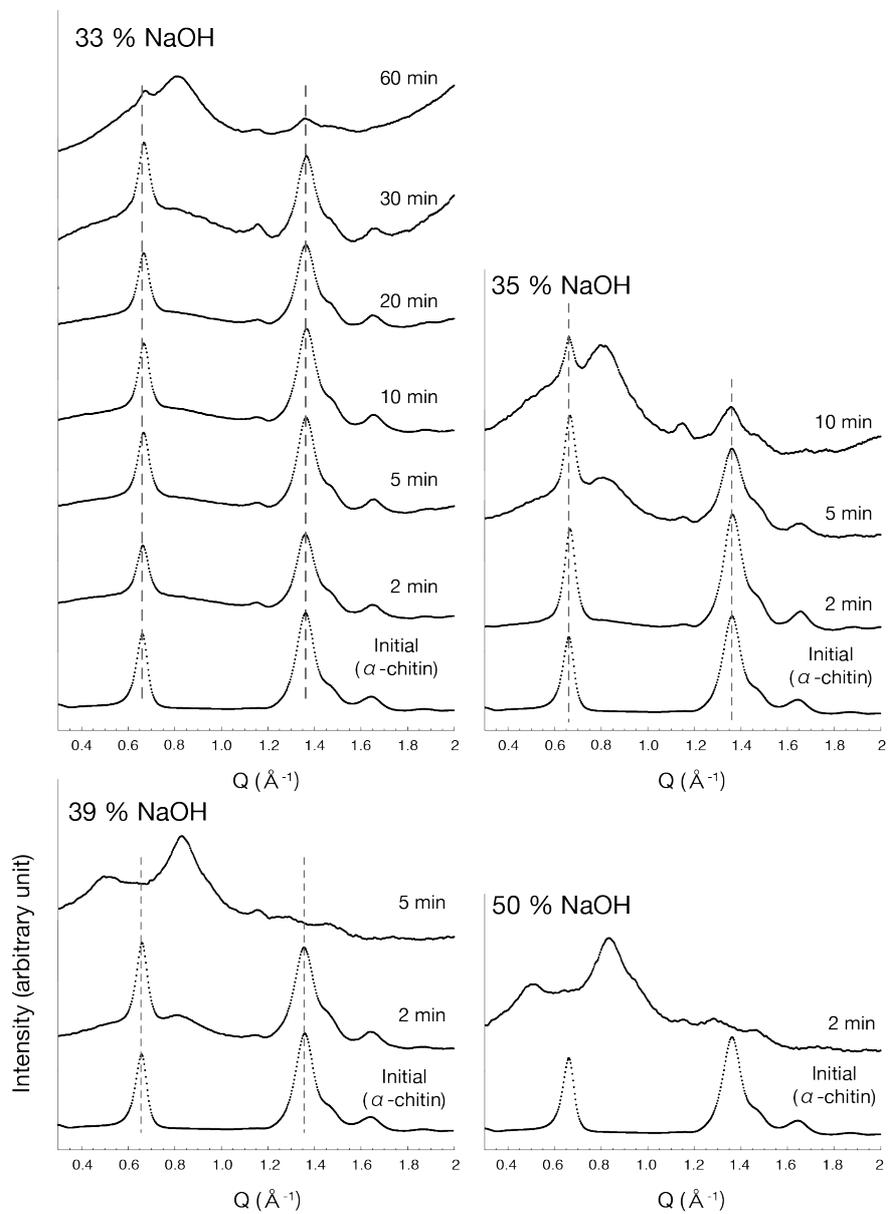


FIGURE 2-4 Equatorial profile of the fiber X-ray diffraction pattern of α -chitin treated at 33%, 35%, 39%, and 50% NaOH at various times.

2.3.3. キチンの脱アセチル化過程

以上のようにキチンはアルカリ膨潤によって、分子鎖間にアルカリが取り込まれたアルカリ-キチン複合体を形成することが分かった。アルカリによるキチンの脱アセチル化過程ではアルカリ複合体が形成された状態で脱アセチル化が進行し、キトサンへと変換されると考えられる。キチンの脱アセチル化過程については不均一系の反応ではブロック状に脱アセチル化が進行する一方で、均一系反応ではランダムに脱アセチル化が進行すると報告されている (Kurita et al., 1977)。本研究の結果から、不均一反応においても、アルカリ-キチン複合体が形成されることでアルカリはキチン結晶の内部にまで浸透しているが、溶解状態での均一反応とは異なる反応挙動を示すことが分かっている。ここで提起される疑問はアルカリ複合体結晶内で脱アセチル化は起こるのかということである。これまでのキチンの脱アセチル化反応過程に関する報告 (Kurita et al., 1977; Chang et al 1997; Methacanon et al., 2003) では、不均一系において、キチン試料はキチン結晶状態を保った状態で反応が進行しているという仮定のもとに考察が行われているようである。Chang ら (1997) はキチンの不均一系での脱アセチル化反応は高次反応、もしくは拡散律速反応をそれぞれ単独で用いても説明できないとしているが、アルカリ複合体結晶内部でも脱アセチル化が進行するのであれば、反応の複雑性が説明できる。いずれにせよ、複合体結晶の内部では反応は起りにくいと考えられ、非晶部およびアルカリ複合体表面の反応性が高い場所で反応が進んでいくことでブロック状にキトサンへの変換が進むと予想される。

構造の変化を含めて、どのような反応過程を経て脱アセチル化が進行していくかは *in situ* での回折実験を行うことで多くの情報が得られると考えられたが、高温で高濃度のアルカリを用いるという実験上の制約から本研究では実現に至らなかった。そこで、続く実験として完全脱アセチル化を行ったキトサン試料を用いてアルカリ膨潤キトサンから水和型キトサンへの結晶構造の変化を調べることにした。

2.3.4. アルカリ-キトサン複合体

Figure 2-5 に *C. opilio* 腱由来の α -キチンの濃アルカリ処理による脱アセチル化で得られたアルカリ-キトサン試料を段階的に濃度の薄い水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、1時間ずつ平衡化した試料の X 線回折プロファイルを示す。また、Figure 2-6 に 50 %、30 %、10 %、9 % NaOH 条件下、湿潤状態での繊維回折図を示す。50% NaOH の回折 (Figure 2-6a) は第一層線の面間隔 5 Å 付近に強い回折が観察される等、アルカリ-キチン複合体に類似した回折パターンを示しており、脱アセチル化が進行してキトサン化した試料についてもキチンの場合と同様に複合体結晶が存在するということが分かった。この回折パターンはキチン-アルカリ複合体に比べて分解能と結晶性が低い。これは数回の高温での処理を経ているためであると考えられる。また、このことからアルカリ-キトサンは低結晶性のアルカリ複合体として存在し、水洗によってアルカリが放出されて分子鎖の再配置が行われる結果、水和型キトサン結晶となることが分かった。また、数回の処理を経て得られたサンプルであることからアルカリ-キトサン複合体と水和型キトサン複合体の間には可逆性があることも分かる。アルカリ-キトサン複合体結晶は、浸漬しているアルカリ濃度を段階的に低下させていくと 9 % NaOH 以下の濃度で完全に水和型キトサンに転移していた (Figure 2-5)。この転移過程において、22 %、16.5 %、10 % の回折プロファイルは未知の構造由来の回折ピーク (点線で示す) を示した。これは、アルカリ-キトサンとも水和型キトサンともまったく異なる回折パターンであり、アルカリ-キトサンから水和型キトサンの転移過程にはこれまでに報告されていない中間体構造が存在することが分かった。この構造は 30 % でかすかに表れ始め、22 % から 10 % にかけて回折ピークがシャープになり、10 % でもっとも結晶性が高かった (Figure 2-6c)。

以下、50 % NaOH におけるアルカリ-キトサンの構造をアルカリ-キトサン I (Na-chitosan I)、

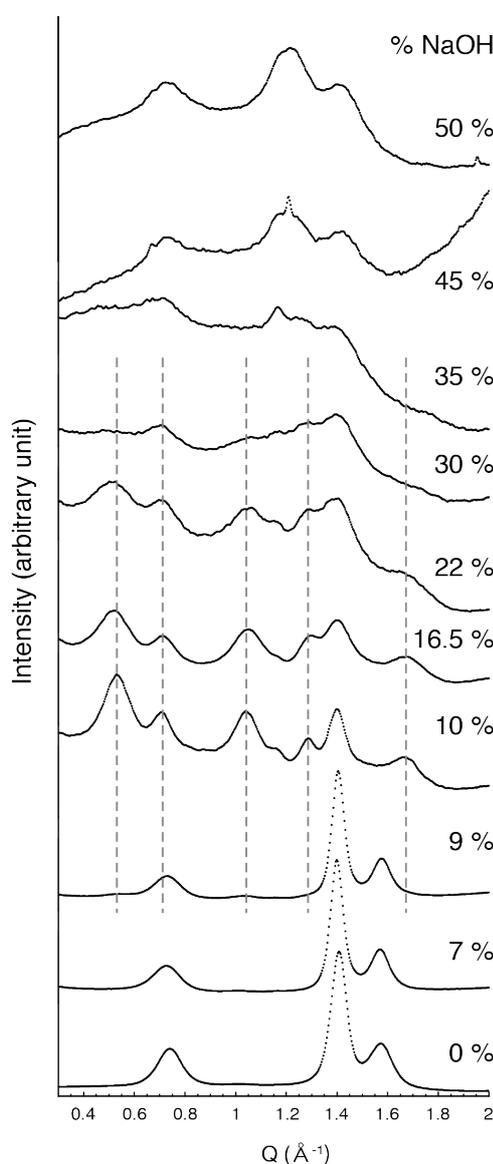


FIGURE 2-5 Equatorial X-ray diffraction profile of Na-chitosan subsequently treated with various concentration of alkali.

22%–10%における構造をアルカリ-キトサンⅡ (Na-chitosan Ⅱ) と呼ぶ。

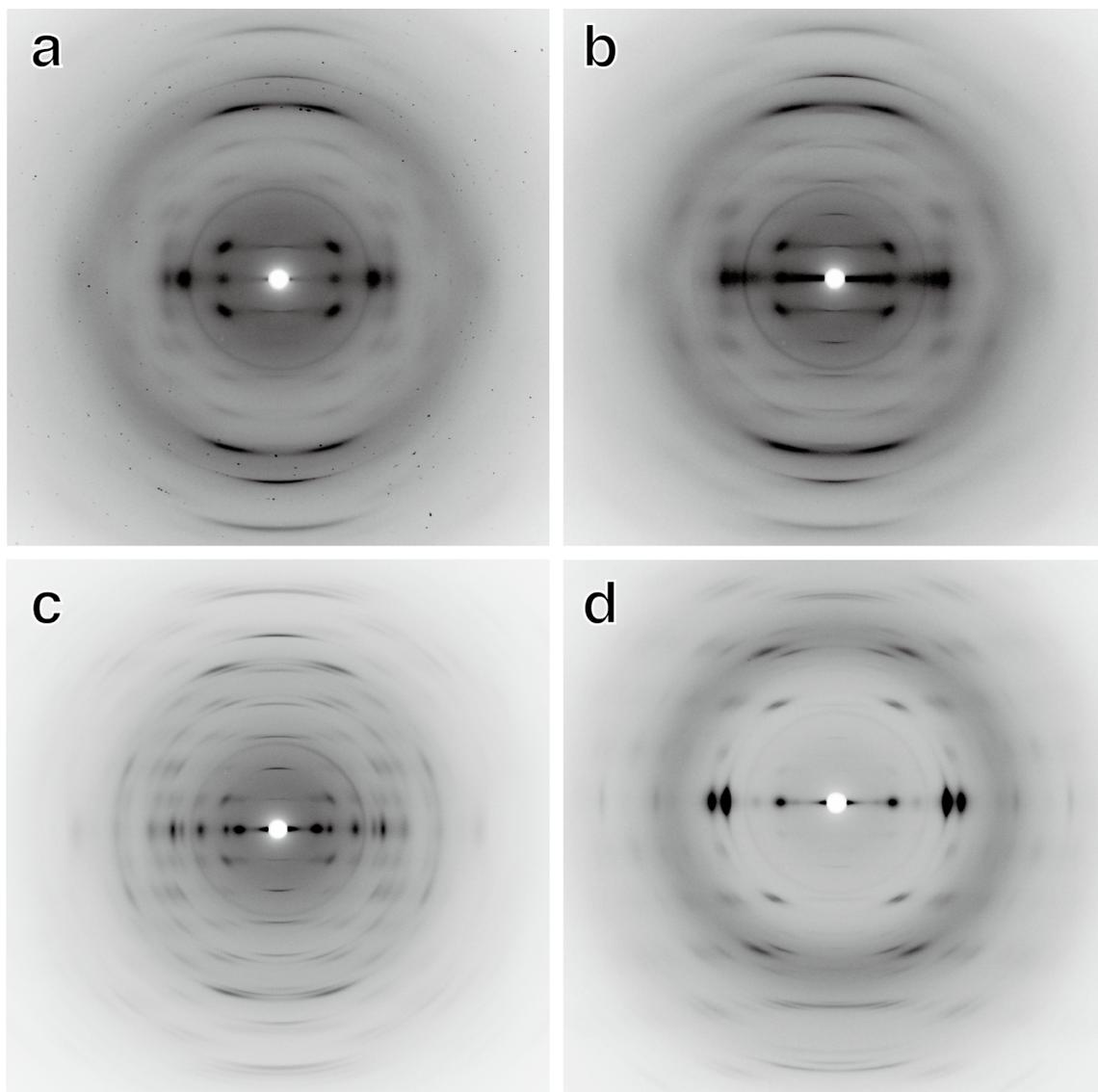


FIGURE 2-6 Fiber X-ray diffraction patterns of Na-chitosan subsequently treated with various concentration of alkali. (a) 5% NaOH, (b) 30% NaOH, (c) 10% NaOH, and (d) 9% NaOH.

アルカリ-キトサン I の繊維回折図は子午線上の 006 に強い回折が観察された。この回折の面間隔は 0.254 nm であり、アルカリ-キチン複合体同様、繊維方向に 3 回らせんの繰り返し周期を持つことが分かった。アルカリ-キチン複合体と異なり、003 に強い回折が観察されず、006 に観察されるのは単位格子中の分子鎖にグルコサミン残基 1/2 個分の繊維方向への stagger が存在するからであると考えられる。アルカリ-キトサン I の繊維回折図の 11 個の独立した回折の面間隔を測定し、単位格子モデルの精密化を試みた。得られた面間隔データは六方晶の単位格子を用いて指数付けを行うことができ、単位格子を精密化することができた [$a = 10.26(4) \text{ \AA}$, $c = 15.4(1) \text{ \AA}$]。Table 2-2 に測定した面間隔 (d_{obs}) と単位格子モデルから計算された面間隔 (d_{calc}) の比較を示す。続いて、アルカリ-キトサン II も同様に単位格子の決定を試みところ、これまでの複合体で共通していた六方晶の単位格子は一致せず、斜方晶の単位格子によって回折を指数付け、精密化することができた [$a = 12.03(7) \text{ \AA}$, $b = 14.4(2) \text{ \AA}$, $c = 15.1(1) \text{ \AA}$]。しかしながら、この単位格子モデルでは概ね測定結果と合致するが 030、222、322 など一部に一致の良くない回折が見られており (Table 2-3)、単斜晶などの可能性を検討する必要がある。

Table 2-2 Observed and calculated d -spacings of Na-chitosan I

h	k	l	d_{obs}	d_{calc}	$ d_{\text{obs}} - d_{\text{calc}} $
0	1	0	8.789	8.885	0.096
1	1	0	5.226	5.130	0.096
2	0	0	4.459	4.443	0.016
1	0	1	7.742	7.692	0.050
2	0	1	4.341	4.268	0.073
1	1	2	4.248	4.266	0.019
2	0	2	3.852	3.846	0.006
1	0	3	4.442	4.437	0.004
1	0	4	3.519	3.526	0.007
1	0	5	2.889	2.904	0.015
0	0	6	2.539	2.561	0.022

Table 2-3 Observed and calculated d -spacings of Na-chitosan II

h	k	l	d_{obs}	d_{calc}	$ d_{\text{obs}}-d_{\text{calc}} $
1	0	0	12.150	12.026	0.124
1	1	0	9.101	9.237	0.136
2	0	0	6.080	6.013	0.067
0	3	0	4.949	4.808	0.141
2	2	0	4.530	4.618	0.089
3	1	0	3.807	3.862	0.056
1	1	1	7.834	7.874	0.041
0	0	2	7.580	7.531	0.049
0	3	2	4.099	4.052	0.046
2	2	2	3.838	3.937	0.100
3	2	2	3.012	3.177	0.165
1	0	3	4.528	4.633	0.105
0	2	3	4.130	4.121	0.009
0	3	3	3.533	3.473	0.060
0	0	4	3.773	3.766	0.007
1	0	4	3.563	3.594	0.031
0	2	4	3.393	3.338	0.055
0	3	4	3.000	2.965	0.036
0	0	5	3.042	3.013	0.029
0	1	5	2.916	2.949	0.033
1	1	5	2.844	2.864	0.021
0	0	6	2.540	2.510	0.030

今回得られた複合体結晶はいずれも繊維軸方向に3回らせんの繰り返し周期を持っている。同様の3回らせん構造を持つ多糖結晶の例としてコンドロイチン4硫酸ナトリウム (Winter et al., 1978) がある。六方晶の単位格子 ($a = 14.52 \text{ \AA}$ 、 $c = 28.32 \text{ \AA}$ 、空間群 $P3_221$) 中に繊維方向に3回らせんの繰り返し周期を持った2本の分子鎖が逆平行にパッキングされており、非対称単位中に2糖単位一つと二つのNaカチオンが5つの水と水和して存在している。 α -キチン結晶および水和型キトサンは逆平行鎖構造であり (Sikorski, et al., 2009; Okuyama et al., 1999)、アルカリを取り込んだ構造であるアルカリ-キチン、およびアルカリ-キトサンも逆平行鎖構造をとると考えられる。六方晶の単位格子で空間群が $P3_221$ 、もしくは $P3_121$ であれば逆平行鎖構造をとることが可能である。アルカリ-キチン複合体の単位格子中に2本の分子鎖が存在し、GlcNAc 残基あたり NaOH が一つ存在すると仮定すると計算される密度は 0.82 g/cm^3 となる。これは低すぎる値となり、アルカリ-キチン複合体の単位格子中には複数の NaOH およびまたは複数の水分子を含んだ構造をとっていると考えられる。一方、アルカリ-キトサン I、およびアルカリ-キトサン II の単位格子中に2本の分子鎖が存在し、グルコサミン残基あたり NaOH が一つ存在すると仮定すると計算される密度はそれぞれ 1.43 g/cm^3 、 1.53 g/cm^3 となり、キチンとキトサンでは包接するアルカリ、水分子の数に差があると考えられる。

以上のことから、キチンからキトサンへの変換プロセスの過程には複数の構造変化が起きていることが分かった。まず、キチンのアルカリ膨潤によってキチンの結晶構造は2回らせん構造からアルカリを結晶中に取り込んだ3回らせん構造へと変化する。そして、アルカリ-キトサン複合体結晶の脱アセチル化がブロック状に進行して得られたアルカリ-キトサンも同様の3回らせん構造をとる。50% NaOH で膨潤したアルカリ-キトサン (アルカリ-キトサン I) に対し、段階的に浸漬しているアルカリ濃度を低下させていくと 22-10% NaOH で異なる構造 (アルカリ-キトサン II) へと転移する。これらはいずれも3回らせんの構造をとっており、9%以下の濃度では2回らせん構造をとる水和型キトサンに転移する。

2.4. 結言

本研究ではキチンからキトサンの変換過程における結晶性のアルカリ複合体の存在を明らかにし、その構造について解析した。アルカリ-キチン複合体結晶は繊維軸方向に3回らせん、アルカリ-キトサン複合体結晶は繊維軸方向に2回らせんの構造をとることが分かった。またアルカリ-キトサンの水洗によるアルカリの放出過程による水和型キトサンへの転移過程でこれまでに知られていなかった中間体構造の存在を明らかにした。これらの構造を詳細に解析していくことで、キチンからキトサンへの変換機構に関する情報を与え、材料プロセッシングの効率化に寄与することが期待できる。さらにキトサンの新たな中間体はキトサンの新規構造として新たなキトサン利用につながることを期待できる。

3. キトサンの結晶構造解析

3.1. 緒言

これまでに述べた通り、キトサンは分子鎖が規則的に配列した結晶状態として存在しており、キチンやセルロースの場合と同様に、その結晶構造は X 線結晶構造解析の対象とされてきた。それらの研究の結果、キトサン結晶には結晶中に水分子を包接した水和型結晶と、水分子を含まない無水型結晶が存在することが明らかとなっている。前章で述べたように、キチンを濃アルカリ処理によって脱アセチル化して得られたキトサンは、水洗処理を経て水和型結晶として得られる。この水和型キトサンの結晶構造モデルは単位格子は斜方晶系の単位格子 [$a = 8.95(4) \text{ \AA}$, $b = 16.97(6) \text{ \AA}$, $c = 10.34(4) \text{ \AA}$ 、空間群 $P2_12_12_1$] をとり、この単位格子中には 4 本の分子鎖が逆平行にパッキングされており、非対称単位はグルコサミン残基二つである (Figure 1-2)。また、グルコサミン残基一つあたり一つの水分子が確率的に分布したモデルとなっている (Okuama et al., 1997)。

水和型キトサンの熱水処理によって得られる無水型キトサンの結晶構造については、X 線繊維回折と微小部電子線回折法により、いくつかの結晶構造モデルが報告されており (Yui et al., 1994; Okuyama et al., 1999; Mazeau et al., 1994)、いずれのモデルにおいても、無水型キトサンの単位格子は斜方晶系で、空間群は $P2_12_12_1$ であり、単位格子中に二本の分子鎖が逆平行にパッキングされている。これらの構造の間には、分子間水素結合によって形成される分子鎖シートが、 ac 面に沿って配置するか (Yui et al., 1994)、 bc 面に沿って配置する (Okuyama et al., 1999; Mazeau et al., 1994) という点で曖昧さが残っている (Figure 1-3)。2000 年代以降、セルロース、キチンの結晶多形の構造の再検討が高分解能 X 線回折、および中性子線回折データに新しい手法を適用することによって行われてきた (Langan et al., 1999; Langan et al., 2001; Nishiyama et al., 2001; Nishiyama et al., 2002; Nishiyama et al., 2011; Sawada et al., 2012; Wada et al., 2004)。いずれも、自由度の高い原子をフーリエ差分図で直接決定する手法や、経験に基づく分子コンフォメーションの制限を用いない解析を行うなど信頼性の高い構造モデルの提案に成功している。そこで、本研究では水和型キトサン、および無水型キトサンにこれらの手法を適用し、シンクロトロン放射光 X 線回折によって得られた高分解能データを用いた原子分解能での結晶構造の再検討を行った。

3.2. 実験

3.2.1. 試料

2.2.1.同様、精製したズワイガニ (*Chionoecetes opillio*) の腱をキチン試料として用い、触媒量の NaBH_4 を加えた 50 % $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$ 中で 120°C 、2 時間処理した後、水洗するという操作を 3 回繰り返して完全に脱アセチル化し、水和型キトサン結晶を得た。水和型キトサンをジグに固定して繊維方向の配向を維持しながら風乾した。この試料を 240°C 、0.1 N NaOH 水溶液中で約 20 分間熱水処理することにより無水型キトサンを得た。この際、試料を 2 枚のガラスプレートの間に固定し、配向を維持した。得られた水和型キトサンおよび無水型キトサンを固体 CP/MAS ^{13}C NMR 測定、およびシンクロトロン放射光による繊維 X 線回折実験に供した。

3.2.3. 固体 CP/MAS ^{13}C NMR 測定

各キトサン試料の固体 CP/MAS ^{13}C NMR 測定は JNM-ECA 500 II スペクトロメーター (JEOL) を用いた。試料を直径 4 mm のジルコニア試料管に入れて密閉した。125MHz、11.74 T の磁場の下、マジック角回転数 15 kHz、接触時間、積算回数は 10000 回とした。アダマントンを標準試料として用いた。

3.2.2. シンクロトロン放射光回折

高輝度放射光施設 SPring-8 のビームライン BL40B2 にておいて回折実験を行った。測定は室温条件下で行い、ゴニオメータにマウントした試料に対して、波長 1.0 \AA のシンクロトロン放射光 X 線を繊維軸に垂直に照射した。露光時間は 120 s とした。回折図の記録は平板イメージングプレート (R-AXIS V, Rigaku) を用い、読み取りは 4000×4000 ピクセル、ピクセルサイズ $100 \mu\text{m}$ で行った。

回折図からの強度抽出は Nishiyama ら (2011) の方法に従って行った。試料が X 線を回折する際に反射面と偏光成分との角度によって回折強度が変化することによる測定された回折強度の偏りを次の式で表される偏光因子を用いて補正した。

$$P = (1 + \cos^2 2\theta)/2 - A(\cos 2\rho \sin^2 2\theta)/2$$

ここで θ は反射角、 ρ は偏光角度、 A は定数であり本実験では 0.83 を用いた。回折図からダイレクトビーム位置を原点として方位角 1° 、放射方向に 1 ピクセルごと、つまりおよそ

2000 要素に分割し 361 列（方位角 1°刻み）×2000 要素（放射方向長 Å⁻¹）の極座標に変換した。バックグラウンドの減算を行った後、結晶サイズと結晶の乱れ、各結晶の繊維方向についての配向の乱れ、ビームサイズによる広がりやを考慮し、各回折点が方位方向にガウス関数で表される広がりを持つものと近似して、強度とそれについての標準偏差を計算した。それぞれの指数での回折に対応する強度データは“crude intensity list”としてフーリエ図作製用に用い、同一層線上にある近接した強度は分配の誤差を避けるため、高分解能粉末回折で用いられる手法にならって一つの強度にまとめ“regrouped intensity list”として構造精密化用に用いた。

3.3.3. X 線結晶構造解析

Figure 3-1a に水和型キトサンの X 線繊維回折図を示す。回折図中で明確に独立な回折点として観測できる 26 個の回折点の面間隔を R-Axis ソフトウェア (Rigaku) を用いて測定した。これらの回折点について想定される単位格子モデルに基づいて指数付けを行い、最小二乗法アルゴリズムを用いて格子定数の精密化を行った。後述するように、この回折図をもとに水和型キトサンの単位格子モデルについていくつかの検討を行ったが単位格子の決定にまで至らなかった。

無水型キトサンの繊維回折図を Figure 3-1b に示す。赤道と子午線の奇数次の回折（0 0 1 と 0 0 3 に観察されるが他の回折に比べ非常に微弱であることから結晶表面の乱れからくるものと判断した）が観測されないことから、消滅則により、空間群は $P2_12_12_1$ と決定した。明確に帰属できる独立した 45 個の回折点の面間隔を測定し、斜方晶の単位格子をもとに指数付けを行い、最小二乗法により単位格子定数を精密化した。得られた単位格子パラメータは $a = 8.129(7)$ Å、 $b = 8.347(6)$ Å、 $c = 10.311(7)$ Å となった。無水型キトサンの測定した面間隔 (d_{obs}) と単位格子モデルから計算された面間隔 (d_{calc}) の比較を Table 3-1 に示す。

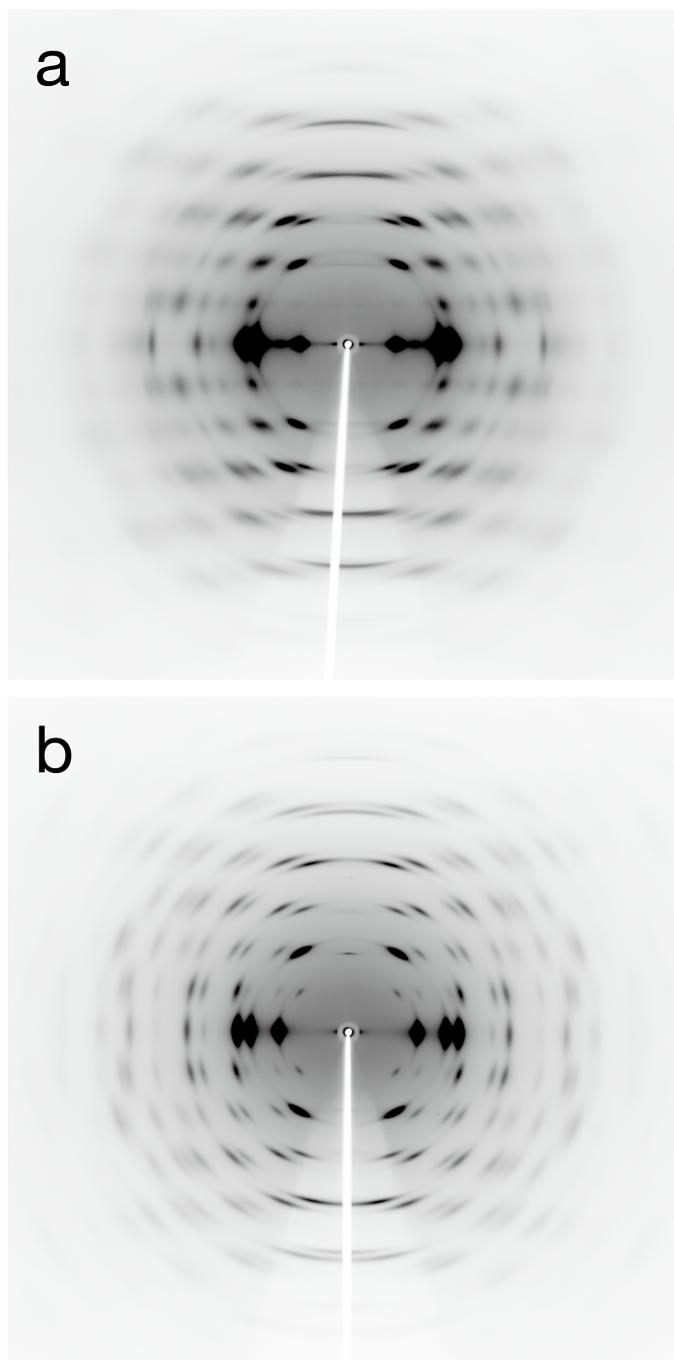


Figure 3-1 Synchrotron X-ray fiber diffraction diagram of hydrated chitosan (a), and anhydrous chitosan (b).

Table 3-1 Observed and calculated d -spacings of anhydrous chitosan

h	k	l	d_{obs}	d_{calc}	$ d_{\text{obs}}-d_{\text{calc}} $
1	1	0	5.825	5.824	0.001
0	2	0	4.178	4.174	0.004
1	2	0	3.715	3.713	0.002
2	2	0	2.916	2.912	0.004
1	3	0	2.643	2.632	0.010
3	2	0	2.266	2.273	0.007
4	0	0	2.033	2.032	0.000
2	4	0	1.841	1.856	0.015
0	1	1	6.476	6.488	0.012
1	1	1	5.067	5.071	0.004
2	0	1	3.772	3.781	0.009
1	2	1	3.496	3.493	0.003
2	2	1	2.807	2.802	0.004
3	0	1	2.615	2.621	0.006
3	2	1	2.226	2.219	0.006
4	0	1	1.989	1.994	0.005
4	1	1	1.944	1.939	0.005
0	0	2	5.147	5.155	0.008
0	1	2	4.377	4.386	0.010
1	1	2	3.866	3.860	0.006
2	0	2	3.188	3.192	0.003
2	1	2	2.985	2.981	0.003
2	2	2	2.540	2.535	0.004
2	3	2	2.092	2.097	0.006
4	1	2	1.847	1.844	0.003
1	0	3	3.179	3.166	0.013
1	1	3	2.969	2.960	0.009

2	0	3	2.621	2.624	0.004
2	1	3	2.507	2.504	0.004
2	2	3	2.221	2.222	0.001
3	0	3	2.132	2.128	0.004
3	1	3	2.069	2.062	0.007
2	3	3	1.914	1.909	0.005
0	1	4	2.467	2.463	0.004
1	1	4	2.359	2.357	0.002
0	2	4	2.191	2.193	0.003
2	1	4	2.115	2.106	0.009
2	2	4	1.930	1.930	0.000
1	3	4	1.848	1.842	0.006
2	3	4	1.714	1.714	0.000
0	4	4	1.623	1.622	0.001
1	1	5	1.945	1.944	0.001
0	2	5	1.848	1.849	0.001
1	2	5	1.806	1.803	0.004
1	3	5	1.624	1.623	0.001

構造解析は構造計算の最小二乗法のソフトである、SHELX-97 (Sheldrik, 1997) を繊維回折に適用する手法を用いて行った (Langan et al., 2001)。無水型キトサンの構造は単位格子のサイズと空間群が $P2_12_12_1$ であることから、単位格子中には二本の分子鎖が含まれ、隣接する分子鎖が互いに異なる向きに配置した逆平行鎖構造をとり、非対称単位はグルコサミン残基一つである。分子鎖の配置として Yui ら (1994) が提案した分子鎖シートが bc 面にそって配置する構造と Mazeau ら (1994)、Okuyama ら (1999) らが提案した ac 面にそって配置する 2 つのモデルを初期座標として 1.5 Å までの回折を用いて計算を行い、測定された構造因子とモデルから計算された構造因子の一致を示す信頼度因子 $R1$ 、式 (1) の比較によ

$$R1 = \frac{\sum ||F_o(hkl)| - |F_c(hkl)||}{\sum |F_o(hkl)|} \quad (1)$$

ってモデルの妥当性を評価した。 $R1$ 値 ($F_o > 4\sigma(F_o)$) は前者のモデルで $R1=0.5817$ 、後者のモデルで $R1=0.3387$ となった。分子鎖シートが ac 面にそって配置するモデルを初期座標として採用した。続いて、自由度の高い $O6$ 一級水酸基の原子座標を計算から外したモデルからフーリエ差分図を作成することで、ヒドロキシメチル基のコンフォメーションの決定

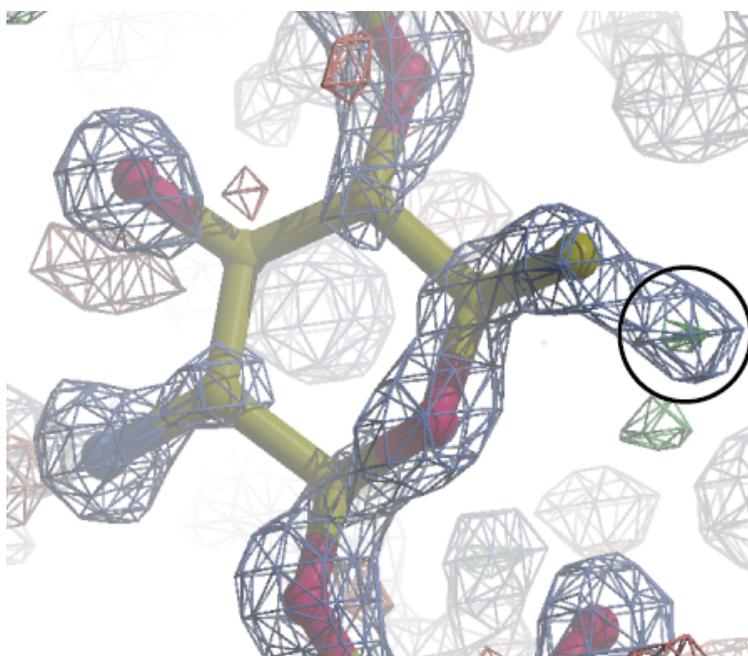


FIGURE 3-2 Section through the $2mF_o-F_c$ (σ) map (showing positive density in blue mesh) and the F_o-F_c omit map (showing positive and negative density in green and red mesh, respectively) of anhydrous chitosan calculated with the $O6$ atom omitted. The positive density indicated by the circle can be associated with the omitted $O6$.

を行った。原子座標リストから O6 原子を取り除き、1.3 Å 以上の回折を用いて、構造計算を行った。得られた結果から、 $2Fo-Fc$ (実際の電子密度に近い形が現れる) および $Fo-Fc$ (取り除いた原子の電子密度が現れる) の逆フーリエ変換によりフーリエ差分図を作成した。図の作成および出力に、*Coot* (Emsley & Cowtan, 2010)、および *Raster 3D* (Merrit & Bacon, 1997) ソフトウェアを用いた。差分図中に O6 に帰属できる位置に $2Fo-Fc$ の電子密度、および $Fo-Fc$ のポジティブピークが観察できる (Figure 3-2)。この位置はヒドロキシメチル基のコンフォメーションが *gt* となる位置であると決定できた。

引き続き、同じ層線上の面間隔の差が 0.01 Å 以内の近傍の回折をまとめた "regrouped intensity list" を作成し重なりあった複合ピークを処理できる HKLF 6 オプションを用いて分解能 1.17 Å までの回折を用いて計算を行った。これにより、 $R1 = 0.16$ を得た。続いて、水素原子を幾何学的に予想される位置に挿入する HFIX オプションで炭素原子上の水素原子を挿入した等方性温度因子パラメータの導入を行ったところ $R1 = 0.15$ を得た。結合長と結合角の制限を外し、結合した原子の温度因子の方向を近似させる RIGU オプションを用いて異方性温度因子を導入した結果、 $R1 = 0.118$ となった。しかしながら、C2-N2、O5-C1 の値が標準的な値に比べおよそ 10% 大きい結果となった。そこで、この二つの原子間について距離の制限 (DFIX) と角度の制限 (DANG) を再導入し、最終構造とした。最終的な結果は 155 個の回折を用いた分解能 1.17 Å の解析を行い、 $F_o > 4\sigma(F_o)$ である 101 の回折点について $R1 = 0.129$ 、155 すべての回折について $R1 = 0.170$ となった。結晶構造の各種情報を含んだ cif (crystallographic information file) ファイルを Appendix に添付する。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 水和型キトサンの結晶構造

Fig. 3-3 は、水和型キトサンの繊維回折図上に、精密化した単位格子 (斜方晶、四本鎖、空間群 $P2_12_12_1$) から計算される回折位置をプロットしたものであるが、矢印で示されたように著しく一致しない回折が見られている。さらに空間群 $P2_12_12_1$ の 2 本鎖の斜方晶、空間群 $P2_1$ の 2 本鎖の単斜晶、空間群 $P2_1$ の 4 本鎖の単斜晶の単位格子についても精密化を行ったが、いずれの場合も回折図中には指数付けができないか、面間隔の計算値と実測値の一致が非常に良くない回折があった。このうち斜方晶、四本鎖、空間群 $P2_12_12_1$ の単位格子モデル [$a = 8.95(2)$ Å, $b = 17.07(2)$ Å, $c = 10.35(3)$ Å] と単斜晶、4 本鎖、空間群 $P2_1$ の単位格子モ

デル[$a = 8.97(2) \text{ \AA}$, $b = 17.13(3) \text{ \AA}$, $c = 10.34(2) \text{ \AA}$, $\gamma = 92.3(2)^\circ$]から計算された面間隔と測定した面間隔との比較をそれぞれ Table 3-2、Table 3-3 に示す。Figure 3-4 に水和型キトサンの固体 ^{13}C NMR スペクトルを示す。5つの主要なピークが観察されており、C4 および C6 の共鳴線に開裂が見られた。C4 の高磁場の共鳴は非晶由来のピークと考えられ (Mori et al., 2012)、水和型キトサンにはある程度の非晶成分を含むことが分かった。また、C6 の二つの共鳴から O6 が僅かに異なる *gt* のコンフォメーションを取っていると考えられ、水和型キトサンには少なくとも二つの非対称単位 (結晶中で同じ環境に置かれたグルコサミン残基) が含まれることが分かる。

以上より、水和型キトサンの単位格子は、既報の単位格子には一致せず、また 2、4 本鎖の斜方晶、単斜晶によっては精密化できないことが分かった。固体 ^{13}C NMR スペクトルの結果から、非対称単位は二つ存在し、非晶構造を含むことが分かった。従って、水和型キトサン結晶の構造については以下の 3 つの可能性がある。つまり、①4 本鎖より大きな単斜晶、斜方晶の単位格子、②対称性の低い三斜晶、③複数の結晶形を含んだ構造、という可能性である。いずれの場合についても、従来の報告に比べて構造モデルは複雑化することが予想される。

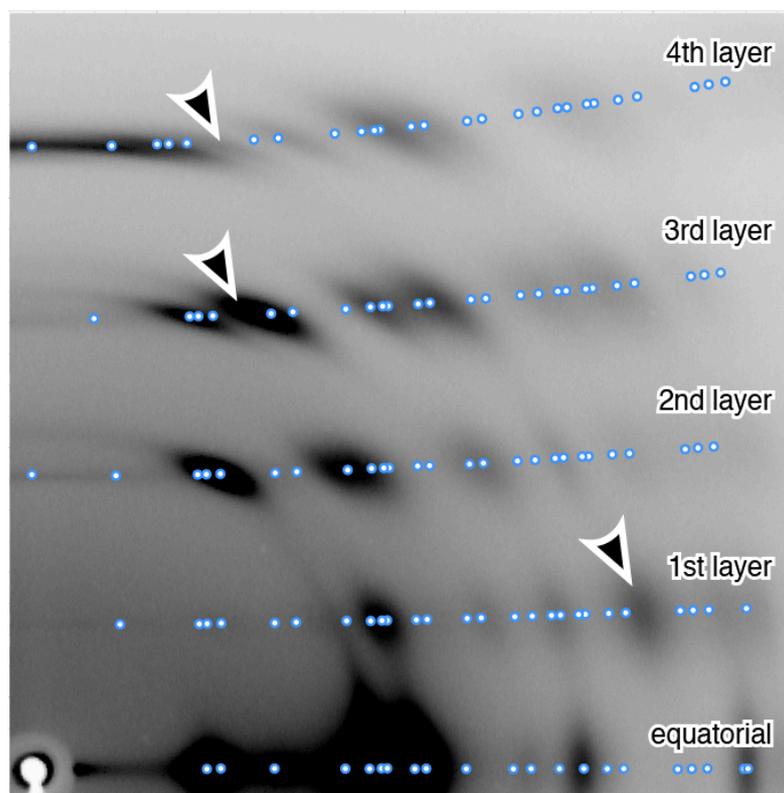


FIGURE 3-3 Synchrotron X-ray fiber diffraction diagram of hydrated chitosan. Position of the reflection calculated from the refined structure are also shown. Head arrows indicate the diffraction spots that the observed and the calculated d -spacing did not agree. (from Naito et al., 2015)

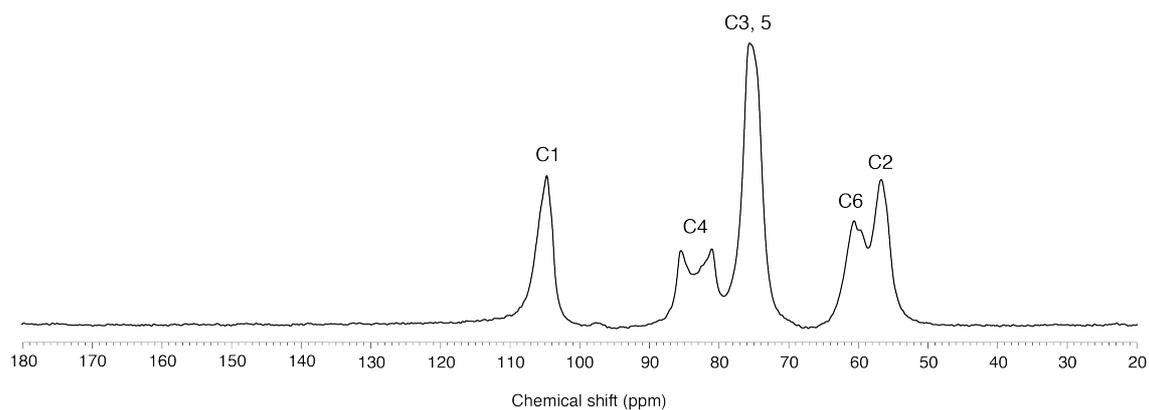


FIGURE 3-4 Solid-state ^{13}C NMR spectra of hydrated chitosan.

Table 3-3 Observed and calculated d -spacings from the orthorhombic unit cell model [$a = 8.95(2)$ Å, $b = 17.07(2)$ Å, $c = 10.35(3)$ Å] of hydrated chitosan

h	k	l	d_{obs}	d_{calc}	$ d_{\text{obs}} - d_{\text{calc}} $
0	2	0	8.558	8.539	0.019
2	0	0	4.475	4.475	0.000
2	2	0	3.996	3.963	0.033
0	6	0	2.838	2.846	0.009
3	5	0	2.242	2.247	0.005
0	5	1	3.205	3.243	0.038
3	0	1	2.845	2.866	0.021
4	1	1	2.179	2.169	0.009
1	1	2	4.343	4.333	0.010
2	3	2	2.880	2.909	0.029
3	0	2	2.572	2.585	0.012
3	3	2	2.358	2.353	0.005
1	0	3	3.216	3.219	0.003
1	1	3	3.172	3.163	0.008
2	1	3	2.712	2.698	0.014
1	4	3	2.553	2.570	0.018
2	4	3	2.290	2.301	0.012
3	2	3	2.161	2.182	0.021
1	0	4	2.513	2.486	0.027
0	3	4	2.349	2.356	0.007
0	4	4	2.204	2.213	0.009
1	4	4	2.143	2.148	0.006
3	1	4	1.940	1.942	0.002
1	3	5	1.905	1.901	0.003
2	3	5	1.794	1.784	0.009
3	0	5	1.698	1.701	0.003

Table 3-3 Observed and calculated d -spacings from the monoclinic unit cell model [$a = 8.97(2)$ Å, $b = 17.13(3)$ Å, $c = 10.34(2)$ Å, $\gamma = 92.3(2)^\circ$] of hydrated chitosan

h	k	l	d_{obs}	d_{calc}	$ d_{\text{obs}} - d_{\text{calc}} $
0	2	0	8.558	8.560	0.002
1	2	0	6.091	6.073	0.018
2	0	0	4.475	4.482	0.007
0	6	0	2.838	2.853	0.016
4	0	0	2.242	2.241	0.001
-2	1	1	4.053	4.032	0.020
-3	1	1	2.845	2.849	0.004
3	3	1	2.502	2.527	0.025
-3	5	1	2.266	2.242	0.024
-4	1	1	2.179	2.183	0.005
-1	1	2	4.343	4.355	0.012
-1	3	2	3.575	3.558	0.017
1	3	2	3.476	3.491	0.015
2	3	2	2.880	2.875	0.005
-3	1	2	2.572	2.571	0.001
-3	3	2	2.358	2.387	0.029
1	0	3	3.216	3.218	0.002
-1	1	3	3.172	3.171	0.001
-2	1	3	2.712	2.709	0.003
1	4	3	2.553	2.555	0.002
2	4	3	2.290	2.279	0.011
3	2	3	2.161	2.168	0.007
1	0	4	2.513	2.485	0.028
0	3	4	2.349	2.355	0.006
0	4	4	2.204	2.213	0.009
1	4	4	2.143	2.139	0.004
-3	1	4	1.940	1.948	0.008
-1	3	5	1.905	1.906	0.001
-2	3	5	1.794	1.793	0.001
3	0	5	1.698	1.701	0.003

3.3.2. 無水型キトサンの結晶構造

Structure

Figure 3-6 に無水型キトサンの結晶構造を示す。無水型キトサンの単位格子中には 2 本の分子鎖が逆平行にパッキングされており、非対称単位はグルコサミン残基ひとつである。分子鎖は ac 面にそって配列する構造を取る。Yui らのモデルと Okuyama らのモデルは分子鎖の配置が ac 面にそって配置するか bc 面にそって配置するかで異プロパノールになっている。これは、単位格子の a 軸長と b 軸長が 3–4% しか異なっておらず、低分解能のデータでは $(h\ k\ l)$ の回折と $(k\ h\ l)$ の回折が重なった回折として処理されており、分子鎖の配置を解析することが可能でなかったからであると考えられ、本研究で得られた高分解能データでは、これらの回折は回折図全体に渡って良く分離できている。最も強い回折の一つは $2\ 1\ 0$ ではなく、 $1\ 2\ 0$ に観察され、 $2\ 0\ 0$ ではなく $0\ 2\ 0$ の位置に強いピークが観察される (Figure 3-5)。

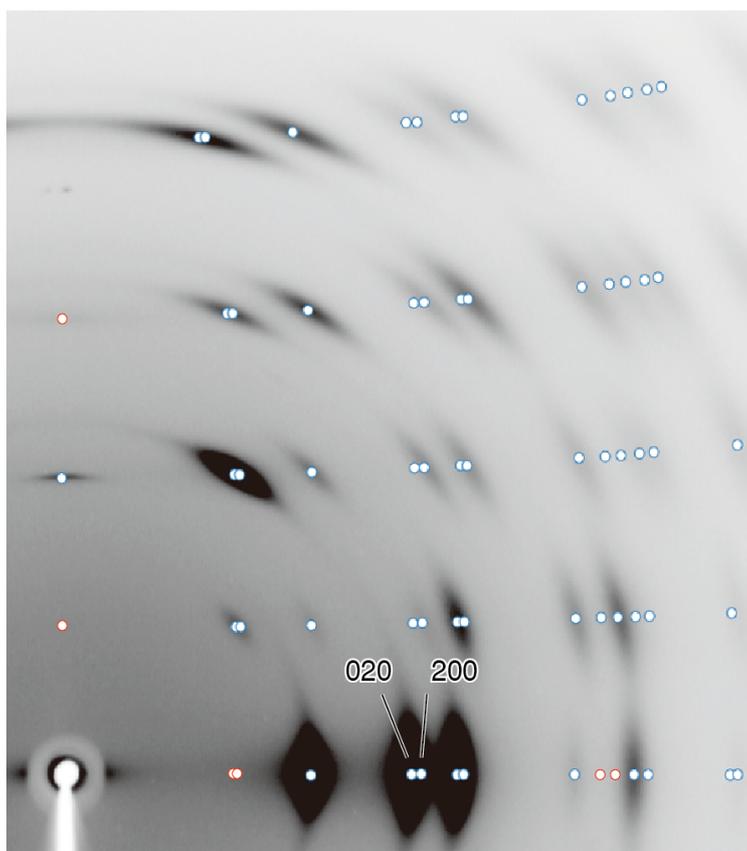


FIGURE 3-5 Fiber diffraction diagram of anhydrous chitosan. The blue dots denote to the positions of the calculated diffraction spots from the unit cell. The red dots are the positions of the diffraction spots that are extinct in the $P2_12_12_1$ symmetry.

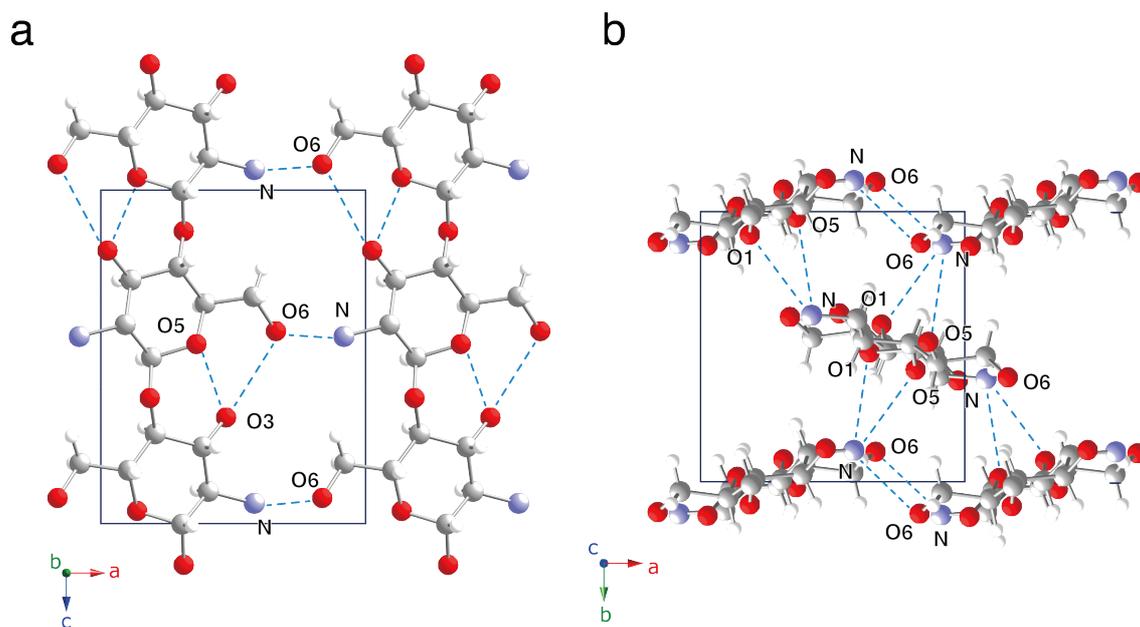


FIGURE 3-6 Crystal structure of anhydrous chitosan. (a) *ac*-projection, (b) *ab*-projection. The carbon, nitrogen, and oxygen atoms are represented in gray, blue, and red, respectively. Hydrogen bonds are indicated with blue dots.

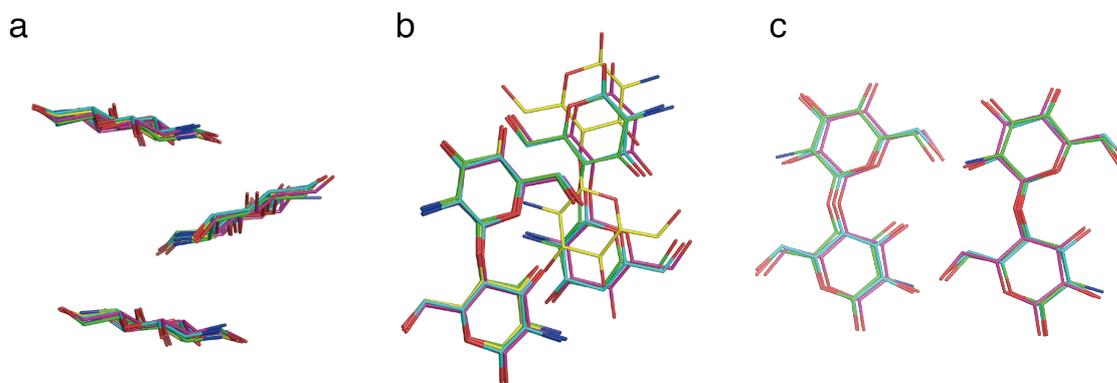


FIGURE 3-7 Superimposition of crystal structure models of anhydrous chitosan (green, this study: blue, Okuyama et al.: magenta, Yui et al.: yellow, Mazeau et al.) in (a) *ab* projection and (b) *ac* projection. (c) Comparison between sheet structures of chitosan (green), cellulose II (origin layer, blue), and cellulose III₁ (magenta). The Cartesian coordinates of cellulose II corner chains and cellulose III₁ were converted as $(1.202+x, -y, 2-z)$ and $(10-cx-sy, sx-cy, z+1.36)$, respectively, where $c = \cos(\gamma = 105^\circ)$ and $s = \sin\gamma$. (from Naito et al., 2016)

Conformational parameters

主要なコンフォメーションに関わるパラメータを Table 3-2 に示す。 τ 、 ϕ と ψ はグリコシド結合のコンフォメーションを表すが、これについては他の多糖結晶構造と大きな差はなかった。ピラノース環の理想的なコンフォメーションからの変位を表す Cremer & Pople のパッカリングパラメータ θ (Cremer & Pople, 1975) は 6° となり、セルロース II origin chain (Langan et al., 2001) , セルロース III₁ (Wada et al., 2004) と近い値となり、歪みの少ないピラノース環を持っていた。ヒドロキシメチル基のコンフォメーション χ (O5-C5-C6-O6) ($^\circ$) は Okuyama ら (1999) の 49° 、Mazeau ら (1994) の 48° に比べ、理想の *gt* (60°) に近い値 (58°) をとっていた。固体 CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを Figure 3-8 に示す。5つのシングルピークが観察されたことから、無水型キトサンの単位格子中には非対称単位が一つ存在するという X 線構造解析の結果と一致する。ピークの帰属は Saito ら (1987) の報告をもとに行った。C1 位のピークには 104–108 ppm にショルダーが見られる。これは結晶転移せずに残った水和型キトサンによるものである可能性がある。C6 位の化学シフトはヒドロキシメチル基のコンフォメーション (χ , χ') と相関があることが知られている (Horii et al., 1983)。*gt* のコンフォメーションと C6 の 62.7 ppm の共鳴は Horii ら (1983) の報告した相関関係と概ね一致している。全体的に、固体 ^{13}C NMR スペクトルデータは X 線構造から得られる結果と良く一致している。

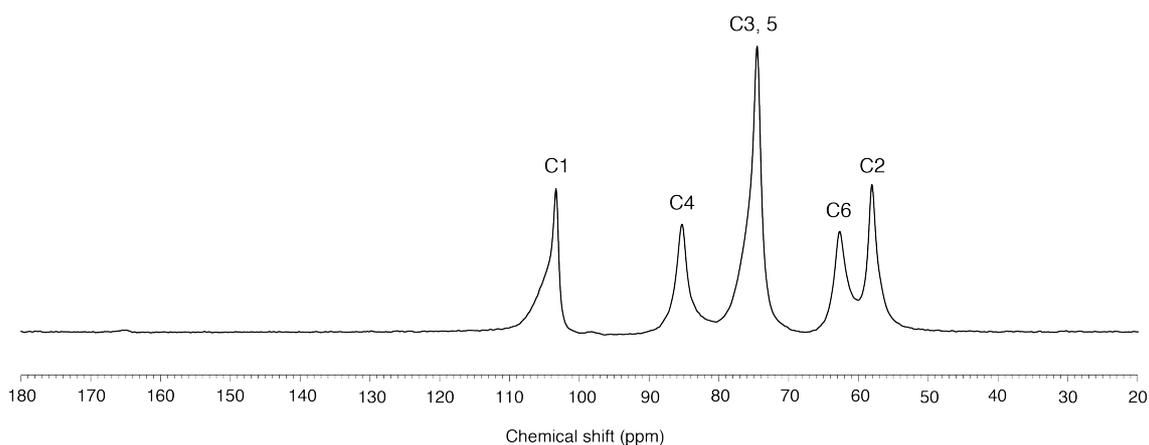


FIGURE 3-8 Solid-state ^{13}C NMR spectra of anhydrous chitosan.

Hydrogen bonding

可能性のある水素結合（ドナー-アクセプター間距離 3.4 Å 以下）のリストを Table 3-3 に示す。O6 の *gt* コンフォメーションは O3 と O5 への二股の水素結合を可能にする。これらの水素結合は、同様に *gt* を持つ cellulose III₁ と cellulose II (Langan et al., 2001; Wada et al., 2004) で中性子線回折によって直接確認されている。Mazeau ら (1994) は N-H...O6 の水素結合様式を提案している。しかしながら、アミンはドナーとしては弱く、アクセプターとなる傾向が強いことが報告されている (Nelson, Fraser, & Klemperer, 1987; Wada et al., 2011)。さらに、本研究の構造では O6 がドナーとなる方が幾何学的に有利である。以上のことから O6-H...N の水素結合が存在する可能性が高い。この場合 N-H...O5 もしくは N-H...O1 の分子間水素結合のドナーとなる可能性がある。それぞれのドナー-アクセプター間の距離は 3.23 Å と 3.20 Å である。過去の報告ではこれらの距離は > 3.5 Å であり、水素結合を考慮することは難しかった。O6-H...N 水素結合における N の共有電子対の位置から N-H のコンフォメーション予想できる。それによると、N-H...O5 と N-H...O1 は同時に存在することができ、∠N-H...O1 と ∠N-H...O5 の角度はおよそ 140° である。

次に、古典的な N-H...O、O-H...O 水素結合に対し、C-H と O との間に存在する弱い相互作用である弱い水素結合について述べる。C-H...O 水素結合は 1930 年代にはじめて提案されてから、度々活発な論争が行われ、提案と否定を繰り返しながら 1990 年代以降の量子化学計算法の進歩により、広く存在することが明らかになってきた相互作用である。C-H...O 水素結合の結合エネルギーは 2-10 kJ で、O-H...O、O-H...N などの 10-40 kJ に比べ小さいため弱い水素結合と呼ばれ、多くの有機・無機化合物、タンパク質、リン脂質、高分子化合物などにおいてその存在が確認されている。タンパク質 DNA-複合体、酵素-基質複合体等多くの複合体に C-H...O が存在しており、生体内で強い水素結合と弱い水素結合を使い分けることで複合体の解離速度を調製し、機能を果たしている可能性が分かってきた (Wahl et al., 1996; Mandel-Gurfreund et al., 1998)。X 線構造中の炭素原子上の水素の位置は幾何的に予測することが可能である。C-H による弱い水素結合と水素同士ショートコンタクトによる反発を Table 3-3 にリストする。Figure 3-9 に C-H との距離が 3.4 Å 以下、C-H...A の角度が 120° 以上のものを原子間距離と C-H...A の角度でプロットしたものを示す。酸素原子と窒素原子は水素結合のアクセプターになりうる一方、水素原子同士の接近は、原子間反発に作用する。C-H...O、および C-H...N は同様の距離では C-H...H よりも直線性が

高い傾向がある。C-H...O の角度と距離には相関が見られ、ドナー-アクセプター間距離が近い程、直線性が高い。C1-H と C4-H は O6 に、C3-H は O3 に向かっている。そして、C6-H の一つは隣接する逆平行鎖の O1 に向かい、そして残る一つは同じ分子鎖に向かっている。これにより、すべての C-H は弱い水素結合に関与しているということが分かった。

これらの結果をまとめると、主要な水素結合として O3-H...O5/O6 の二股分子内水素結合が一つ存在し、分子間水素結合には *ac* 面にそって分子鎖シートを形成する強い水素結合 (O6-H...N) と 分子鎖シート間の間に C-H...O や N-H...O といった弱い水素結合が存在していると考えられる (Figure 3-6)。

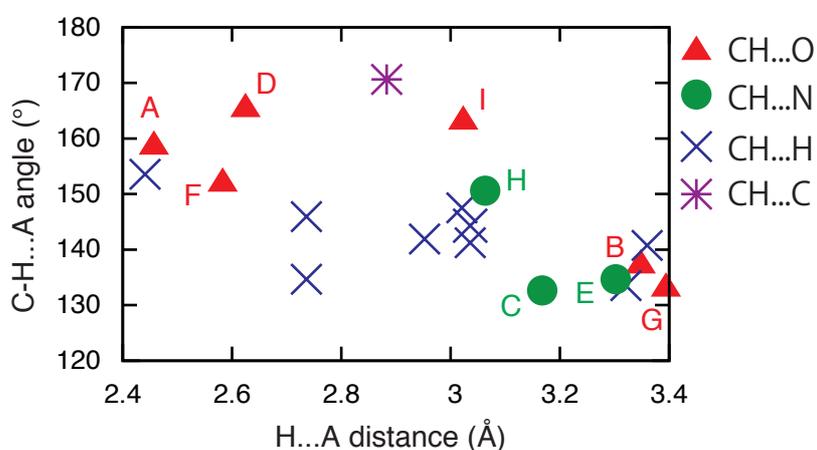


Figure 3-9. Distance-angle distribution of weak hydrogen bonds and short contacts. Labels of data points correspond to those in table 2. (from Naito et al., 2016)

以上はドナー-アクセプター間距離に基づく予想である。水素原子に対して十分な感度を持つ中性子線回折データを用いた構造解析によって、自由度の高い O 原子と N 原子に結合する水素原子の座標を決定し、完全な水素結合様式を明らかにすることができるであろう。

Table 3-2 The major conformational parameters of anhydrous chitosan and other polysaccharide crystals (from Naito et al., 2016)

	τ	ϕ	ψ	χ	χ'	θ
<i>Anhydrous chitosan</i>						
This structure	114	-94	-149	58	180	6.0
Okuyama et al. (1999)	117	-96	-145	49	170	3.5
Mazeau et al. (1994)	118	-93	-149	48	173	6.9
<i>Other polysaccharides</i>						
α -chitin	114	-80	-167	47/-44*	168/77*	16.4
anhydrous β -chitin ^a	117	-89	-152	-65	58	10.0
cellulose I α <i>up</i> ^b	116	-99	-140	166	-74	6.9
cellulose I α <i>down</i> ^b	116	-98	-138	167	-75	9.4
cellulose I β <i>origin</i> ^c	115	-99	-142	170	-70	10.2
cellulose I β <i>center</i> ^c	116	-89	-147	158	-83	6.7
cellulose II <i>origin</i> ^d	115	-97	-144	72	-165	5.0
cellulose II <i>center</i> ^d	116	-94	-151	58	-175	10.2
Cellulose III ₁ ^e	116	-92	-152	44	163	10.5

Glycosidic bond angle τ (C1-O4-C4) and the glycosidic torsion angles ϕ (O5-C1-O1-C4) and ψ (C1-O1-C4-C5) describe the relative orientation of adjacent glucosyl residues in the same chain. The conformation of the primary hydroxyl group is defined by two torsion angles; χ (O5-C5-C6-O6) and χ' (C4-C5-C6-O6). θ is the Cremer & Pople puckering parameter. *Disordered structure. a: Nishiyama et al. (2011). b: Nishiyama et al. (2003). c: Nishiyama et al. (2002). d: Langan et al. (2001). e: Wada et al. (2004).

Table 3-3 The geometry of the potential hydrogen bonds of anhydrous chitosan

Donor	Acceptor	Do...A (Å)	D...A (Å)	Do-D...A (°)	A residue	
Strong HB						
Intramolecular						
O3	O5	2.719	-	-	1/2-x, -y, -1/2+z	
O3	O6	3.091	-	-	1/2-x, -y, -1/2+z	
O3	O1	2.979	-	-	x, y, z	
O6	O3	3.091	-	-	1/2-x, -y, 1/2+z	
Intermolecular						
O6	N	2.854	-	-	1+x, y, z	
O3	O6	3.471	-	-	1-x, -1/2+y, 1/2-z	
O6	O3	3.471	-	-	1-x, 1/2+y, 1/2-z	
Weak HB						
Intermolecular						
N	O6	2.854	-	-	-1+x, y, z	
N	O1	3.171	-	-	-1/2+x, 1/2-y, 1-z	
N	O5	3.21	-	-	-1/2+x, 1/2-y, 1-z	
C1H	O6	3.375	2.448	158.3	-1/2+x, -1/2-y, 1-z	A ¹
C1H	O3	4.129	3.348	137	-x, 1/2-y, 1-z	B
C2H	N	3.894	3.168	132.7	1/2+x, 1/2-y, 1-z	C
C3H	O3	3.574	2.621	165.1	-x, -1/2+y, 1/2-z	D
C3H	N	4.051	3.302	134.7	-x, -1/2+y, 1/2-z	E
C4H	O6	3.471	2.582	151.7	1-x, 1/2+y, 1/2-z	F
C5H	O6	4.116	3.394	132.8	-1/2+x, -1/2-y, 1-z	G
C6HA	N	3.938	3.064	150.6	1+x, y, z	H
C6HB	O1	3.961	3.023	162.9	1/2+x, 1/2-y, 1-z	I

Do: Donor, A: Acceptor, 1: Labels in figure 5.

Table 3-4 Comparison with previous analyses

	This study	Okuyama et al.	Mazeau et al.
Method	Synchrotron X-ray diffraction	Lab source X-ray diffraction	Electron diffraction
Sample	Annealed crab tendon chitosan	Via acetic acid of crab tendon chitosan	Recrystallized chitosan (DP = 35)
Unit cell parameters			
<i>a</i> (Å)	8.129	8.26	8.07
<i>b</i> (Å)	8.347	8.5	8.44
<i>c</i> (Å)	10.311	10.43	10.34
No. of diffraction spots	146	41	23
R factor	0.147	0.15	0.133
Intramolecular H-bond			
O3–H...O5	2.73	2.75	2.6
O3–H...O6	3.08	3.23	3.2
Intermolecular H-bond			
O6...N	2.87	2.72	2.6
N...O5	3.23	3.67	3.5

3.4. 結言

水和型キトサンはこれまでの報告よりも複雑な結晶構造をとる可能性がある。シンクロトロン放射光を用いた高分解能データを用いた結晶構造解析により、無水型キトサンの結晶構造を 1.17 Å の分解能で精密化することができ、これまで曖昧だった分子鎖の配置について結論づけることができた。無水型キトサンの O6-H...N 水素結合によって形成される分子鎖シート構造はセルロースⅡ、セルロースⅢ₁と似通っていたが、分子鎖シート同士の相互作用の違いにより、シート同士の位置関係が異なる構造をとっていることを明らかにした。

4. 水和型キトサンおよびキトサン-カルボン酸複合体から 無水型キトサンへの転移

4.1. 緒言

多くの多糖は、その両親媒性から水和し、水との複合体を形成する。デンプン、 β -1,3-グルカン、 β -1,3-キシラン、 β -1,4-キシラン、 β -キチンは天然で水和結晶として存在する (Atkins et al., 1969; Buleon et al., 1998; Chuah et al., 1983; Nieduszynski et al., 1972; Sawada et al., 2012)。セルロースの水和結晶はアルカリ膨潤、水洗の過程を経るかヒドラジン複合体を経由することで得られる (Lee et al., 1981; Nishimura et al., 1991)。これらの水和結晶中の水分子と多糖分子の間には水素結合による相互作用が存在していると考えられており、 β -キチンについてはそれが中性子線回折により直接示されている (Sawada et al., 2012)。多糖類の水和は物性、形態に影響を与え、生体内での機能に関係していると考えられる (Jane et al., 1994; Srichuwong., 2005)。また、素材としての機能やエネルギー原料としてのプロセスビリティがどのように変化するかを知ることは重要である (Wada et al., 2010)。これらの水和結晶の安定性および無水型結晶への転移挙動は X 線回折を用いて報告されてきた (Kobayashi et al., 2010a; Kobayashi et al., 2010b; Kobayashi et al., 2011a; Kobayashi et al., 2011b)。

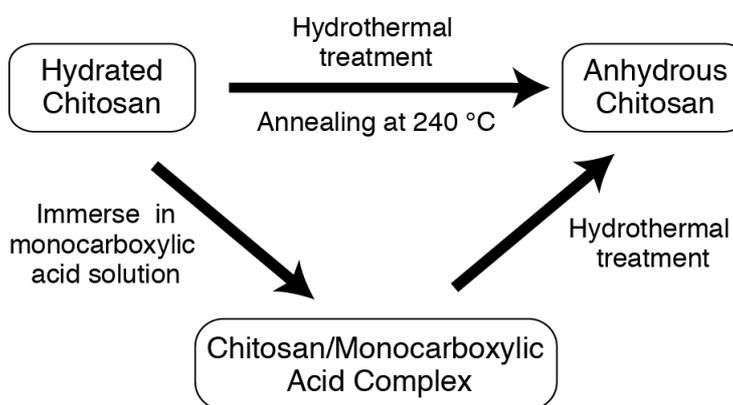


FIGURE 4-1 Conversion of crystalline polymorphs of chitosan. (from Naito et al., 2015)

これらの水和結晶は一般的に高湿度化では安定であるが、室温で、およそ湿度 50%以下で水分子を放出し、無水型結晶に転移する。天然水和多糖では水和および水分子の放出は可逆であるが、セルロースでは不可逆である。

キトサンにも水和型と無水型が存在するが、室温、低湿度条件下で水分子の放出は起こらないことが他の水和多糖に比べて特徴的である。無水型キトサンを得る方法として、水和型キトサンの熱水中での加熱とキトサン/モノカルボン酸複合体を経由する 2 種類の方法が知られている (Figure 4-1)。これらの転移は水和型セルロースの転移と同様、不可逆プロセスである。この水和型キトサンの安定性は他の多糖に比べ特異的であり、水分子とキトサン分子鎖間に強い相互作用が存在すると考えられる。この性質はキトサンを材料として注目した場合にも重要になると考えられるが、水和型キトサンの安定性について詳しく調べた報告はなされてこなかった。そこで、本研究では水和型キトサンから無水型キトサンへの転移を熱水処理、およびモノカルボン酸複合体を経由する 2 種類の方法について X 線回折を用いて調べた。

4.2. 実験

4.2.1. 試料

水和型キトサンは前述通り、ズワイガニの腱由来の試料を用いた。水和型キトサンを 4 M モノカルボン酸水溶液とイソプロパノール混合液 (1/3, v/v) に 3 時間浸漬することでキトサン/モノカルボン酸複合体を得た (Okuyama et al., 2000)。得られた複合体を室温化で風乾した後、80°C、相対湿度 100%下に 1 時間静置した。得られた各試料は繊維方向に張力を加えて配向を維持しながら風乾した。水和型キトサンを各条件で熱水処理に供した。0.1 N NaOH 中で 160°C、180°C、200°C、240°C の各温度で 20 分~24 時間の各時間処理した。処理後、水洗し繊維方向に張力を加えながら風乾した。キトサン-ギ酸複合体およびキトサン-酢酸複合体は相対湿度 100%条件下で 20°C、40°C、60°C、80°C で 1 時間静置した後、室温下で冷却した。

4.2.2. 回折実験

大型放射光施設 SPring-8 (兵庫県)、ビームライン BL40B2 にてキトサン-ギ酸複合体およびキトサン-酢酸複合体のシンクロトロン放射光繊維回折実験を 3.2.2 同様に行った。その他の試料の繊維 X 線回折実験を Rotaflex RU-200BH (リガク) を用いて行った。ニッケルフィルターで単色化した $\text{CuK}\alpha$ 線 ($\lambda = 0.15418 \text{ nm}$ 、100 mA、50 kV) を繊維方向に垂直に照射し、回折をイメージングプレート (FUJIX BAS300UR、富士フイルム) 上に記録した。得られた回折パターンは R-Axis ソフトウェア (リガク) を用いて解析した。Wada ら (1997) の方法を用いてピークフィッティングを行い、Scherrer の式を用いて結晶サイズの算出を行った。

4.3. 結果と考察

4.3.1. 水和型キトサンから無水キトサンへの転移

Figure 4-2 に各温度、各時間で熱水処理した水和型キトサンの赤道方向の X 線回折プロファイルを示す。赤道方向には水和型キトサン由来の 3 個のピーク (a, b, c) および、無水型キトサン由来の 3 個のピーク (1 1 0、0 2 0、1 2 0) が存在する。処理温度と処理時間の上昇に伴って、水和型キトサン由来のピークは減少し、無水型キトサン由来のピークが増加している。160°C、180°C では試料が崩壊してしまい、転移が完全に無水型キトサンに転移

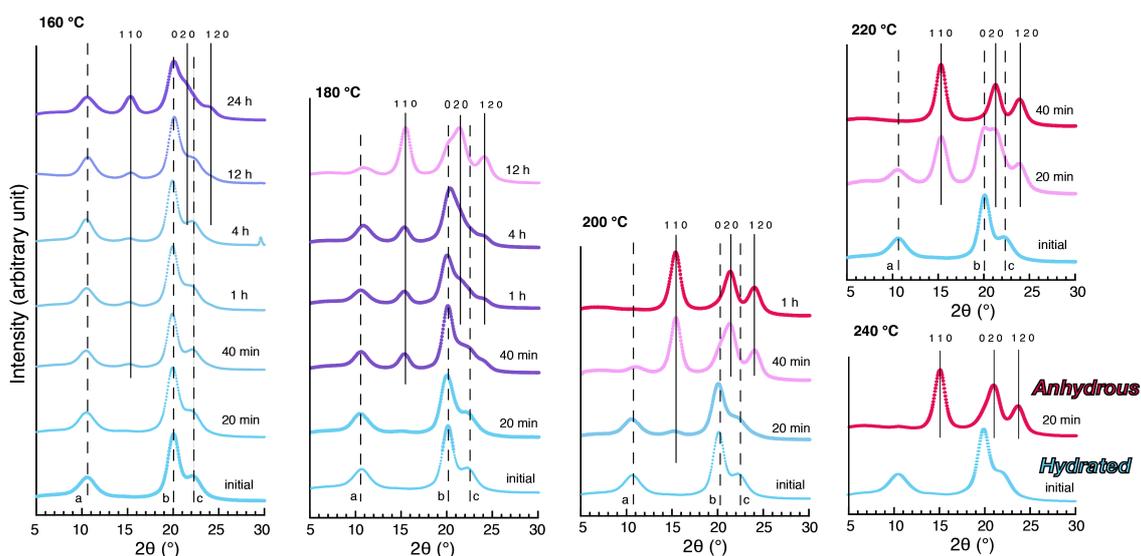


FIGURE 4-2 X-ray diffraction profiles of chitosan before and after the annealing treatment at various temperatures. Peaks a, b, and c indicated with broken lines belong to the hydrate form. Peaks of 1 1 0, 0 2 0, 1 2 0 of anhydrous chitosan are indicated with solid lines. (from Naito et al., 2015)

することはなかった。200°C 以上で転移は比較的急速に進み、1 時間以内で完全に無水型キトサンに転移した。水和セルロースと β -キチンは 80°C から 100°C で完全に無水型構造に転移する (Kobayashi et al., 2010a; Kobayashi et al., 2011a; Kobayashi et al., 2011b)。一方で、水和型キトサンは 140°C 以下ではほぼ無水型への転移は進行せず、高い安定性を示した。熱処理による多糖類の結晶構造転移はセルロース、キチンなどで見られている。セルロース $I\alpha$ からセルロース $I\beta$ への不可逆な結晶転移は 200°C 以上の熱水処理で起こる (Yamamoto et al., 1989)。また、セルロース III_1 からセルロース $I\beta$ への転移も同様の条件で起こる (Wada, 2001)。加えて、セルロース、キチンの重水素化は 180°C から 200°C の温度域で急速に進むことが知られている (Horikawa et al., 2008; Ogawa et al., 2012)。これらの温度域では水素結合の不安定化が引き起こされることで構造の再配置が引き起こされると考えられる (Watanabe et al., 2007)。水和型キトサンもこの温度域で無水型キトサンへの転移が急速に進んだことは同様に水素結合の不安定化による水和水の放出と無水型構造への転移が起こったと考えられる。

4.3.2. キトサン/モノカルボン酸複合体の構造

Figure 4-3 にキトサン-ギ酸複合体およびキトサン-酢酸複合体の X 線繊維回折図を示す。両繊維図は非常に似通っており、非常に大きな繊維周期を有していることがわかる。キトサン-酢酸複合体の繊維 X 線回折図から測定した明確に独立した 21 個の回折点について面間隔を測定した。水和型キトサンの場合と同様に、それらの回折点について斜方晶の単位格子をもとに指数付けを行い、最小二乗法により単位格子の決定を行った。精密化の結果、単位格子は斜方晶であり、格子定数は $a = 11.08(2) \text{ \AA}$, $b = 11.13(1) \text{ \AA}$, $c = 40.17(2) \text{ \AA}$ であった。回折図中では $h00$, $0k0$, $00l$ と指数付けできる回折点では奇数次の回折は観測されなかったため、空間群は $P2_12_12_1$ であると決定した。また子午線の回折については、さらに 002 , 006 , 0010 が未観測であり、 008 の回折点が強く観測された他、 004 , 0012 の回折が弱い強度ながらも観測されている。この結果は、Okuyama らの報告の通り (Okuyama et al., 2000)、繊維軸方向に

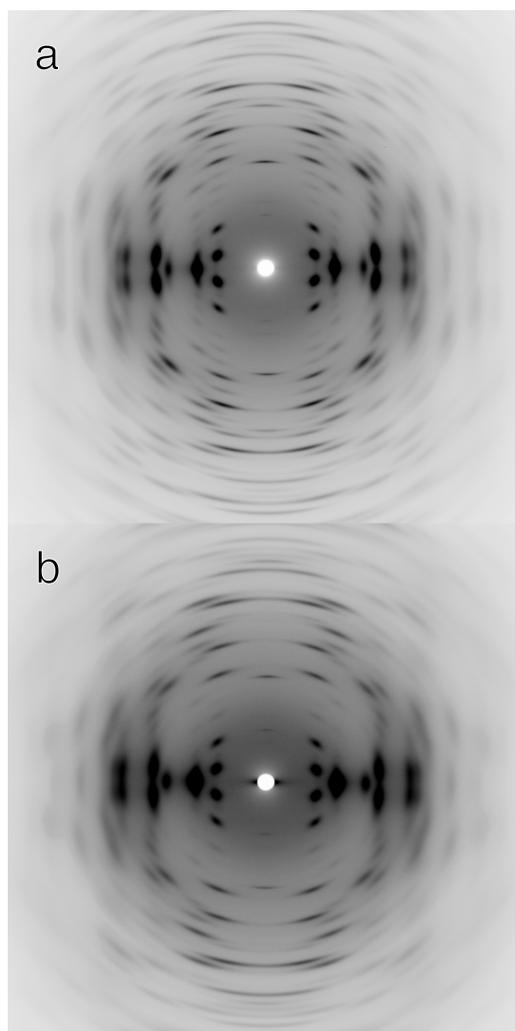


FIGURE 4-3 Synchrotron X-ray fiber diffraction diagrams of: (a) chitosan/acetic acid complex, and (b) chitosan/formic acid complex. (from Naito et al., 2015)

グルコサミン残基 4 つを繰り返す単位とした、 2_1 らせん軸を有することを示唆している。同様に、ギ酸複合体の繊維回折図から測定した 21 個の回折点の面間隔を測定し、単位格子を精密化した。その結果、単位格子は斜方晶、格子定数は $a = 10.75(3) \text{ \AA}$, $b = 10.82(2) \text{ \AA}$, $c = 40.41(8) \text{ \AA}$ 、空間群は $P2_12_12_1$ であると決定した。子午線の回折については、 008 が高強度で観測される点は酢酸複合体の場合と同様であるが、 0012 が未観測である点、 004 の他に非常に弱い 003 , 005 が観測されている点など異なった部分が存在する。 003 , 005 の回折強度は 008 の強度の 1%程度であるから、繊維軸方向について基本的には $P2_1$ の対称性

を有していると考えられるが、酢酸複合体に比べると、結晶中の対称性が低く、やや乱れを含んだ 2_1 らせん軸を有している可能性がある。

以上より、キトサン/モノカルボン酸複合体の構造は、斜方晶系の単位格子で、空間群は $P2_12_12_1$ であることが分かった。これより、分子鎖はもとのキトサン水和物と同様に逆平行に配列しているおり、格子体積を考えると、いずれの結晶についても単位格子には2本の分子鎖が含まれるであろう。また、酢酸複合体の単位格子体積はギ酸複合体に比べると5%程度大きいですが、これはゲスト分子である酢酸分子の体積が、ギ酸分子に対して大きいためであると考えられる。Table 4-1、Table 4-2に、それぞれの回折点の指数と、測定された面間隔(d_{obs})、精密化された単位格子から計算された面間隔(d_{calc})、およびそれらの差($d_{\text{obs}} - d_{\text{calc}}$)を示す。

Table 4-1 Observed and calculated d -spacing of chitosan/AcOH complex

h	k	l	d_{obs}	d_{calc}	$ d_{\text{obs}}-d_{\text{calc}} $
1	1	0	7.844	7.856	0.013
0	2	0	5.543	5.568	0.025
1	3	0	3.537	3.520	0.017
0	1	1	10.746	10.731	0.016
2	1	1	4.931	4.925	0.006
2	2	1	3.922	3.909	0.013
0	3	1	3.714	3.696	0.018
0	1	3	8.547	8.562	0.015
1	2	4	4.444	4.458	0.015
0	3	4	3.478	3.482	0.004
1	2	5	4.217	4.230	0.013
0	3	5	3.372	3.370	0.003
0	1	6	5.726	5.738	0.012
1	1	6	5.103	5.096	0.007
0	1	7	5.101	5.101	0.001
0	2	7	4.004	3.996	0.007
1	2	7	3.769	3.759	0.010
0	0	8	5.031	5.022	0.009
0	1	8	4.573	4.578	0.005
1	2	8	3.542	3.534	0.007
0	1	9	4.151	4.143	0.007

Table 4-2 Observed and calculated d -spacing of chitosan/formic acid complex

h	k	l	d_{obs}	d_{calc}	$ d_{\text{obs}}-d_{\text{calc}} $
1	1	0	7.599	7.628	0.030
0	2	0	5.445	5.411	0.034
2	3	0	3.013	2.996	0.017
0	1	1	10.410	10.454	0.045
2	1	1	4.799	4.781	0.017
2	2	1	3.798	3.797	0.001
0	3	1	3.632	3.593	0.039
0	1	3	8.443	8.439	0.004
1	2	4	4.360	4.361	0.001
3	0	4	3.380	3.379	0.001
1	2	5	4.140	4.149	0.009
0	3	5	3.310	3.295	0.015
1	0	6	5.702	5.711	0.009
1	1	6	5.071	5.051	0.020
0	2	7	3.947	3.950	0.002
1	2	7	3.714	3.707	0.007
0	0	8	5.049	5.056	0.007
0	1	8	4.572	4.580	0.008
1	1	9	3.876	3.872	0.004
1	0	10	3.769	3.786	0.017
1	1	10	3.574	3.573	0.000

4.3.3. キトサン/モノカルボン酸複合体から無水型キトサンへの転移

キトサン-酢酸複合体を相対湿度 100%、所定の温度で 1 時間静置した試料の X 線回折図の赤道方向のプロファイルを Figure 4-4 に示す。回折プロファイル中には酢酸複合体由来のピークが 3 つ（小角側から 110、020）、無水型キトサンについては 3 つのピーク（小角側から 110、020、120）がそれぞれ観測された。こちらの転移の場合でも、処理温度の上昇に伴って、酢酸複合体から無水型キトサンへの結晶転移が起きたことを示している。20°C では、回折プロファイルの変化は見られず、複合体は安定であった。40°C では無水型のピーク自体は観察されないが、酢酸複合体由来のピークの幅が増大し、結晶性の有意な低下が見られた。60°C 以上では、無水型キトサン由来のピークが見られるようになり、80°C では、酢酸複合体由来のピークは観測されず、完全に無水型キトサンに転移した。処理温度を上昇させることで、回折ピークのシフトは観察されなかった。

キトサン-ギ酸複合体を相対湿度 100%、所定の温度で 1 時間静置した試料の X 線回折図の赤道方向のプロファイルを Figure 4-4 に示す。ギ酸複合体の場合では、酢酸複合体とは異なり、無水型キトサンへの転移は観察されなかった。40°C、60°C、80°C の条件下で、ギ酸複合体由来のピークの幅の増大が認められ、結晶性は低下していた。

以上に示した通り、キトサン-酢酸複合体は 60°C 以上の相対湿度 100% の雰囲気下で無水型に転移するが、キトサン-ギ酸複合体では無水型キトサンへ転移することはなかった。両複合体は X 線回折図から同様の 8 回らせん構造をとっていることが分かるが、炭素鎖が一つ長いだけで安定性は大きく異なっており、劇的な結晶転移を引き起こすことは興味深い。

水和型-無水型間転移、および酢酸複合体-無水型間転移は、どちらも完全に無水型キトサンに転移する機構であることがわかったが、その転移機構には異なる点が存在することが分かった。前者の場合では、キトサン分子鎖と結晶内の水分子は強固な水素結合を形成していると考えられ、無水型への転移は水素結合の不安定化を引き起こす 200°C 以上の条件での処理が必要であったが、後者では比較的マイルドな条件下で転移が引き起こされる。酢酸とアミノ基の相互作用による複合体化によって引き起こされる水和型キトサンの 2 回らせん構造から 8 回らせんへのコンフォメーションの変化は不安定さを持っており、高湿度条件が駆動力となってゲスト分子の放出を引き起こし、最も安定な構造である無水型結晶へ変態するのであろう。

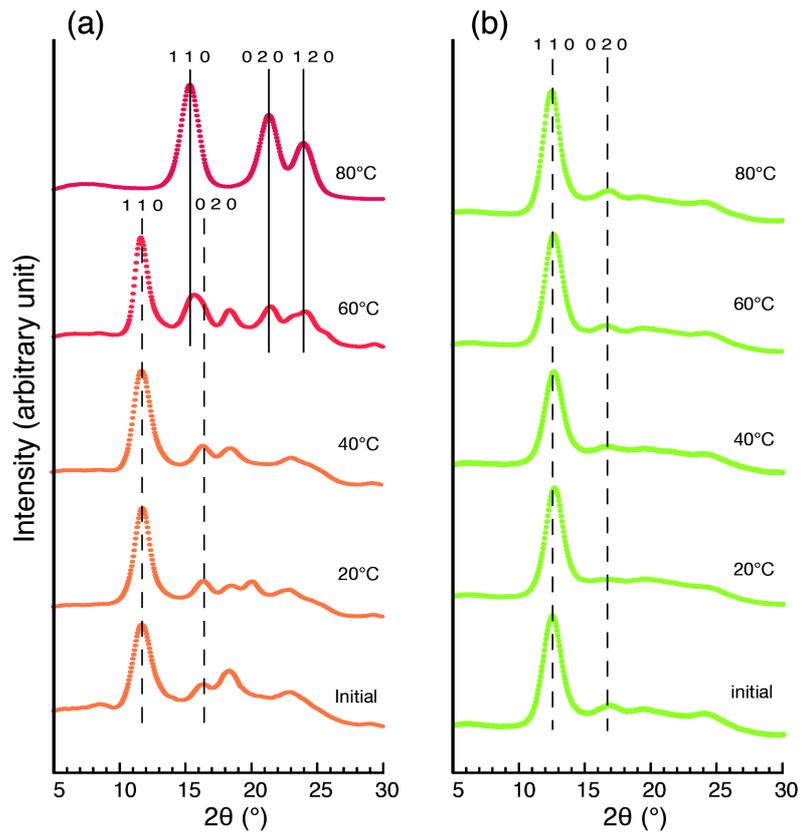


Figure 4-4 X-ray diffraction profiles of (a) chitosan/acetic acid complex and (b) chitosan/formic acid complex before and after stored at RH 100% at various temperatures. (from Naito et al., 2015)

4.4. 結言

水和型キトサンのX線回折実験により、水和型キトサンは200°C以上の熱処理で完全に無水型キトサンに転移するという多糖類水和結晶の中で特異的な安定性を明らかにした。さらに、2種類のキトサン-カルボン酸複合体の高相対湿度下での転移について、ゲスト分子による転移挙動の違いを明らかにした。

5. 再結晶化させたキトサンの構造

5.1. 緒言

多糖類は分子量の制御や、溶解・再生の方法を工夫することによって様々な形態や結晶構造をとる。多くの場合、溶解・再生を経た試料の結晶性は低い、分子量および再生温度によって単結晶が得られる場合がある。天然で得られる試料の結晶性が低く構造解析が困難な場合でも、高結晶性の単結晶を得ることができればより多くの情報を得ることが出来る。また、これまでに知られていなかった構造が発見されることもある。新たな構造は新たな物性、性質を持つので素材応用の観点から興味深い。多糖類から得られる単結晶は数十 nm から数 μm オーダーである。その構造を調べる手段としては、X 線回折、電子顕微鏡観察、電子線回折が用いられる。例えば、平行鎖構造を取る天然セルロースは溶解・再生によって、逆平行鎖構造であるセルロース II をとることが知られている。部分アセチル化した低分子量セルロースの再結晶化によりセルロース II、セルロース IV の単結晶の作製が報告されている (Buléon et al., 1982; Brittiger & Husemann., 1972) が平行鎖構造を持つセルロース I の単結晶の作製はなされていない。セロデキストラノスホスホリラーゼを用いたセルロースの *in vitro* 合成実験で厚さ 4.5 nm の高結晶性のセルロース II のラメラ結晶が合成されることが報告されている (Hraishi et al., 2009)。これは知られている中で最も大きなセルロース単結晶である。また、Imai ら (2014) は大腸菌にセルロース合成遺伝子を導入して合成させたセルロースのマイクロフィブリルがこれまでに知られていない結晶構造をとることを報告している。キチンは低分子量キチン (重合度 35) の LiSCN 希薄水溶液から 240°C で再結晶化を行うことで、長さ数 μm 、幅 10–20 nm の針状結晶が得られる (Persson et al., 1992)。低分子化したアミロースからは針状の結晶 (Buléon, et al., 1984)、球晶結晶 (Ring et al., 1987) が調製できることが知られている。キトサンに関しては低分子量キトサン (DP = 35) を高温で再結晶化させることにより、無水型キトサンの構造をとるラメラ単結晶が調製できることが報告されている (Carins et al., 1990) が水和型キトサンの単結晶の作製はなされていない。

いずれにおいても、高結晶性の単結晶を得るためには低分子量の多糖を調製する必要があることが共通点として挙げられる。これは、多糖類が合成高分子の場合と異なり、分子鎖のフォールディングによる結晶化が起らず、分子鎖は伸びきって結晶化しており、分子

量が大きくなる程、完全に伸びきった分子鎖での結晶化が困難になるためであると考えられている (Buléon et al., 1982)。こうした単結晶の生成条件、構造を調べることは素材そのものの基礎的情報として重要である。

キトサンの溶解・再生によるフィルムや繊維への材料プロセッシングにおいてはキトサン分子鎖の自己組織化が起こる。これはその条件によって異なる形態、構造をとる。構造、形態は物性に大きな影響を与えるため、キトサンが溶解・再生によってどのような形態・構造をとるかは材料として応用していく上で重要な知見である。そこで本研究では、低分子化したキトサンを試料として再結晶化させたキトサンの温度および分子量による結晶構造、形態の違いについて調べた。

5.2. 実験

5.2.1. 試料

キトサン 10 (分子量 60000 程度、脱アセチル化度 85%程度、和光純薬) をキトサン試料として用いた。Domard ら (1982) の方法に従って完全脱アセチル化を行った。5%酢酸水溶液にキトサンを溶解させ凍結乾燥した試料を水に溶かし 4%とした。これに、80 ml の DMSO を加えるとゲル状となった。得られたゲルを激しく攪拌しながら 50% NaOH 水溶液 2 ml を少量ずつ滴下し、100°C で 1 時間処理して脱アセチル化を行った。得られた沈殿をガラスフィルターで濾過し、水、メタノールの順にそれぞれ数回ずつ洗浄した。この操作を 2 回繰り返して、完全脱アセチル化キトサン試料を得た。脱アセチル化度は $^1\text{H NMR}$ により確認し、H1 と *N*-アセチルグルコサミン残基中のメチル基の強度比から算出した脱アセチル化度は 99%であった (Figure 5-1)。

完全脱アセチル化キトサンを塩酸加水分解による低分子化により、DP がそれぞれ 20、50、100 の低分子キトサンを得た。

得られた低分子量キトサンを用いて再結晶化を行った。塩酸凍結乾燥低分子化キトサン 15 mg を脱イオン水 50 ml に溶かし、濃度 0.3%のキトサン水溶液を調製した。目的の再結晶化温度にしたキトサン水溶液に 0.15%アンモニア水溶液を 10 ml 加え、最終キトサン濃度を 0.25%とした。アンモニア水溶液を加えると直ぐに溶液は白濁し、沈殿が得られた。この際、100°C と 125°C の条件ではアンモニア水溶液をガラス製アンプルに封入し、メディウム瓶でキトサン水溶液と共に加熱し、目的の再結晶化温度に達した後に瓶を良く振ってアンプ

ルを割って混合し、再結晶化を行った。アンモニア水添加後、1時間静置して得られた沈殿を、0.5 μm のメンブレンフィルターで吸引濾過し、水、メタノールの順に数回ずつ洗浄した。得られた沈殿はアンモニア水溶液に分散し、凍結乾燥した。この再結晶化操作を DP = 20、50、100 のキトサンを用いて 125°C で行った。さらに、DP = 50 のキトサンについて 0°C、25°C、50°C、75°C、100°C、125°C で再結晶化を行った。

5.2.2. 電子顕微鏡観察

本研究では回折コントラスト法、および白金コーティングによるシャドーウィング法により電子顕微鏡観察を行った。カーボン蒸着膜を被覆した電子顕微鏡観察用グリッド上へメタノールに分散させた再結晶化キトサンを滴下し、気乾した。グリッドを凍結切断レプリカ作製装置 (JFD 9010, JEOL) を使用し 30°もしくは 45°の角度で白金を真空蒸着することでシャドーウィングを行った。観察は透過型電子顕微鏡 (JEM-2000EX, JEOL) を使用し、加速電圧 200 kV、CCD カメラ (Keen View, Olympus Soft Imaging Solution, Germany) で画像を記録した。電子線回折は微小部電子線回折法により、行った。20 μm 径の集束レンズ絞りを挿入して、直径 100 nm 程度の電子線プローブを得て、視野の探索と撮影を行った。回折パターンはイメージングプレート (FDR-UR-V、フジフィルム) に記録し、読み取り装置は FDL-5000 (フジフィルム) により画像ファイルとして取り込んだ。

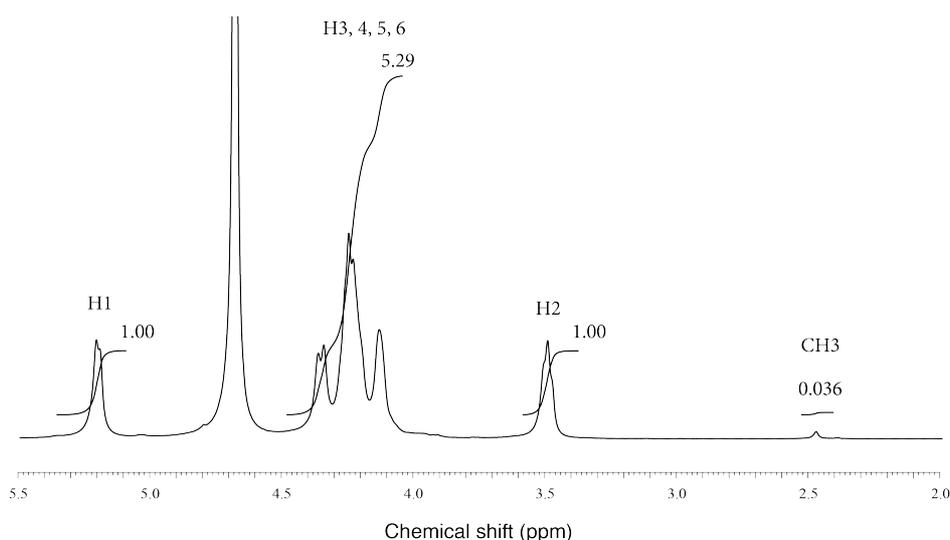


FIGURE 5-1 ^1H NMR spectrum of fully deacetylated chitosan.

5.2.3. 回折実験

SPring-8（兵庫県）のビームライン BL02B2 にてシンクロトロン放射光による粉末回折実験を行った。2 θ 軸にカメラ半径 278 mm の湾曲型カメラを搭載した大型デバイ-シェラーカメラを用いて行った。凍結乾燥試料をキャピラリーに封入してクロスゴニオに固定し、回転させながら露光することで試料の粒度分布による回折 X 線強度のばらつきを均一化した。200×400 mm の IP 上にスリット幅 10 mm で露光し回折を記録した。IP の読み取りは読取装置 BAS2500（フジフィルム）を用いて分解能 50×50 μm 角（1 画素あたり 0.01°）で行った。得られた回折データを自作のプログラムで 1 次元の粉末回折データにした。

5.3. 結果と考察

Figure 5-1 に異なる結晶化温度で再結晶化させたキトサン（DP = 50）の電子顕微鏡像を示す。また、Fig. 5-2 に同試料の粉末 X 線回折プロファイルを示す。電子顕微鏡像からは 125°C の条件下でのみラメラが形成されていた。ラメラは幅 0.5–1 μm であり、シャドーウィングの影から厚さおよそ 300 nm のものが得られていた。100°C 以下ではラメラは形成されず、粒状の凝集体構造が同様に得られていた。形態は似通っているものの、粉末 X 線回折プロファイルは異なる傾向を示し、75°C、および 100°C の再結晶化物は完全な無水型キトサンのプロファイルを示していた。25°C、および 50°C の再結晶化物は水和型および無水型構造が混合したプロファイルを示していた。そして 0°C ではどちらにも帰属できない未知のプロファイルを示していた。以上から、25–100°C の範囲下で再結晶化させたキトサンは形態に変化はほぼ無いものの、結晶構造の組成にかなりの差があることが分かった。水和型キトサンと無水型キトサンは知られている限りでも金属塩・酸との複合体形成能の有無で大きく異なる性質を示しており、キトサンの溶解・再生条件によって異なる結晶構造を持ったキトサンを作製し機能制御を図る際に重要な知見であろう。

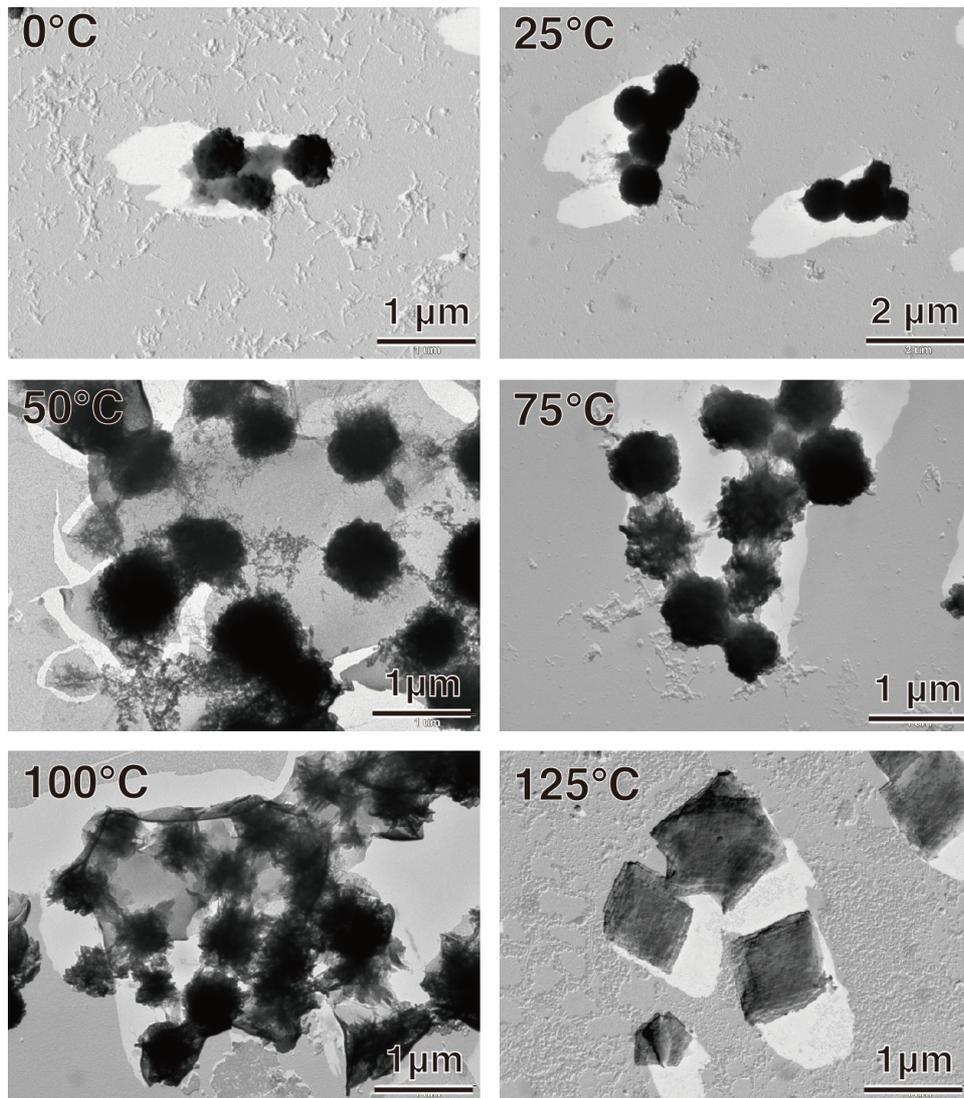


FIGURE 5-2 TEM images (shadowed, Pt, 45°) of of low DP (= 50) chitosan recrystallized at various temperatures.

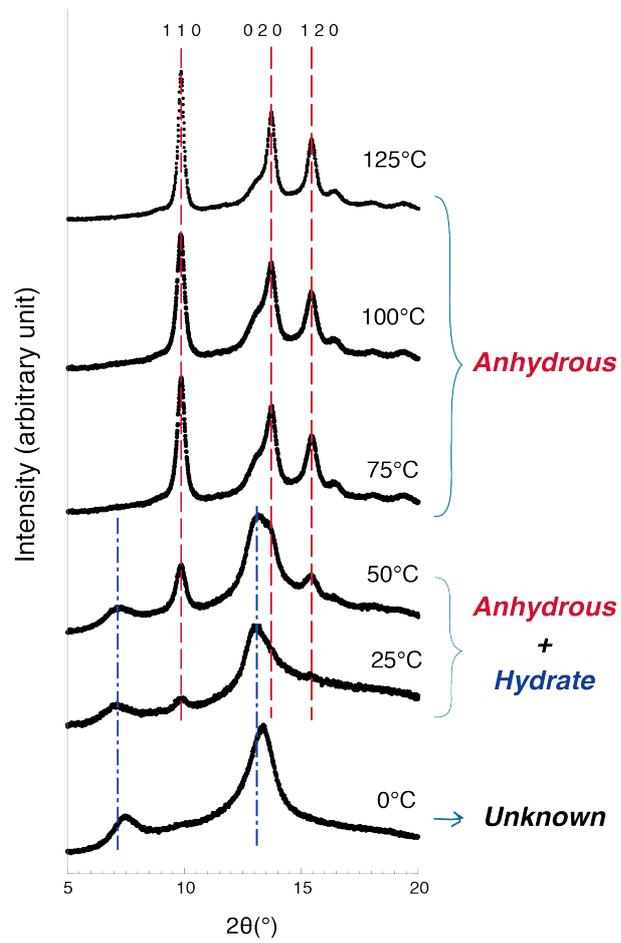


FIGURE 5-3 Powder X-ray diffraction profile of low DP (= 50) chitosan recrystallized at various temperatures.

Figure 5-3 に異なる分子量 (DP = 20、DP = 50、DP = 100) で 125°C で再結晶化させたキトサンの電子顕微鏡像を示す。DP = 20 の再結晶化試料は非常に薄いラメラが生成しており、その厚さがおよそ 20 nm であることから一本のキトサン分子鎖が伸びきって配列したラメラからなると考えられる。一方で、DP = 50 の再結晶キトサンは 300 nm と比較的厚いラメラが観察された。これは、ラメラがいくつも積層した構造で、階段状の分子鎖の配列、ラメラから分子鎖の飛びなしなどが生じ、そこから更に結晶化が進むことで複合した厚いラメラとなっていると考えられる。Figure 5-4 に DP = 50、125°C で再結晶化させた単結晶の微小部電子線回折図を示す。この回折パターンは Cartier ら (1990) が報告した DP = 35、125°C で再結晶化させたキトサン単結晶の電子線回折パターンと一致しており、*c* 軸 (繊維軸) は紙面方向に垂直であった。ラメラ結晶内の *a* 軸と *b* 軸方向は一致しており、積層様式には異方性があることが分かる。DP = 100 の再結晶化キトサンは明確なラメラ構造は取らず、板状ではあるが不定形の構造を取っていた。

各分子量での再結晶化試料の X 線回折プロファイルはいずれも典型的な無水型キトサンの回折パターンを示していた (Figure 5-5)。それぞれの X 線回折プロファイルをピーク分離し、110 の回折をもとに Sherrer の式を用いて結晶サイズを算出したところ DP = 20 では 11.5 nm、DP = 50 では 9.1 nm、DP = 100 では 5.7 nm となり分子量が大きい程、結晶サイズは低い結果となった。キトサン分子鎖も他の多糖類同様、分子鎖のフォールディングによる結晶成長は起こらず、分子量の増大に伴ってラメラの積層構造、分子鎖の絡み合い、乱れが生じて非晶部が増大し、結晶性が低下するということが分かった。この事実から読み取れることは結晶化温度によって結晶構造は決まるが、分子量によって形態が異なるということである。より高分子量のキトサンでも同様の傾向が見られるかどうかについての知見を得ていくことが今後の課題であろう。

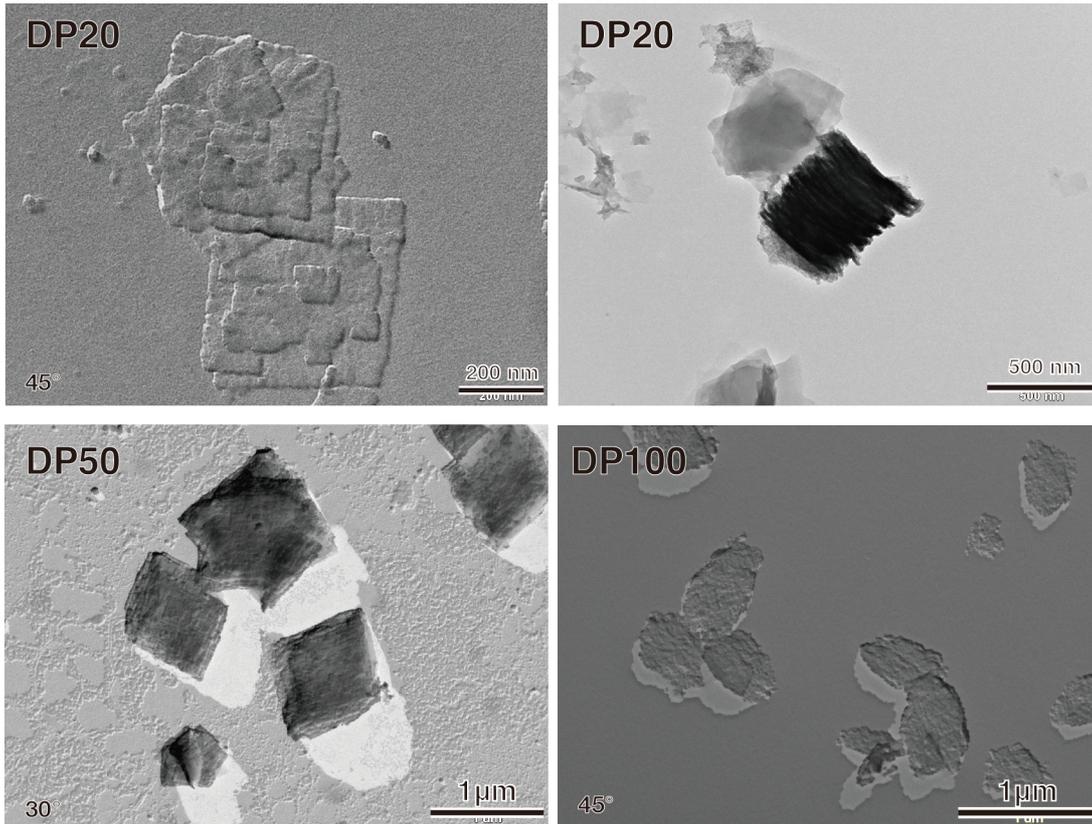


FIGURE 5-3 TEM images (shadowed, Pt, 45° and 30°) of of law DP (20, 50, 100) chitosan recrystallized at 125°.

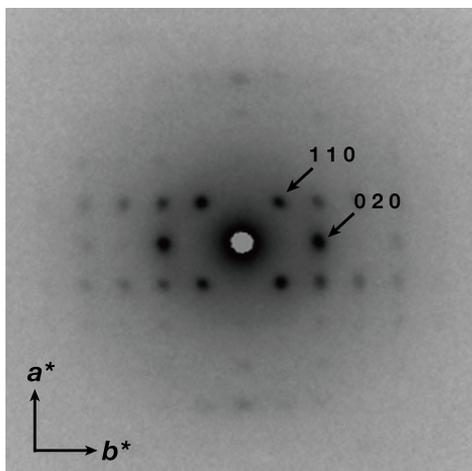


FIGURE 5-4 Electron microdiffraction diagram obtained from the single crystal of law DP (= 50) chitosan recrystallized at 125°C.

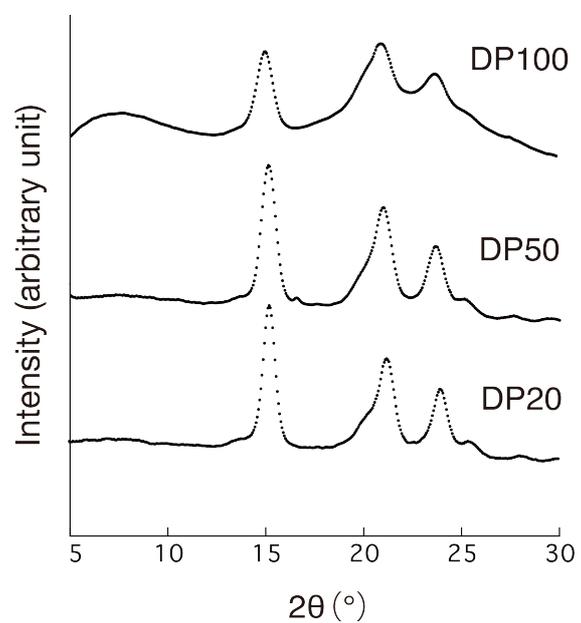


FIGURE 5-5 X-ray diffraction profile of law DP (20, 50, 100) chitosan recrystallized at 125°C.

5.3. 結言

低分子化したキトサンの再結晶化物について、分子量および再結晶化温度による形態、構造の違いについて調べた。125°C以上の結晶化温度で低分子量キトサンはラメラ状の無水型キトサン結晶をとるが、より低い温度でも形態は異なるものの無水型キトサンの構造をとることが分かった。さらに、再結晶化により水和型キトサンおよび無水型キトサンの混合物が得られる条件も存在した。分子量によってラメラ状結晶が得られる限界は $DP = 50$ であった。

総括

本研究では、キチンからキトサンへの結晶転移過程およびキトサンの固体構造について X 線回折を主な手法として解析を行った。その結果を以下に述べる。

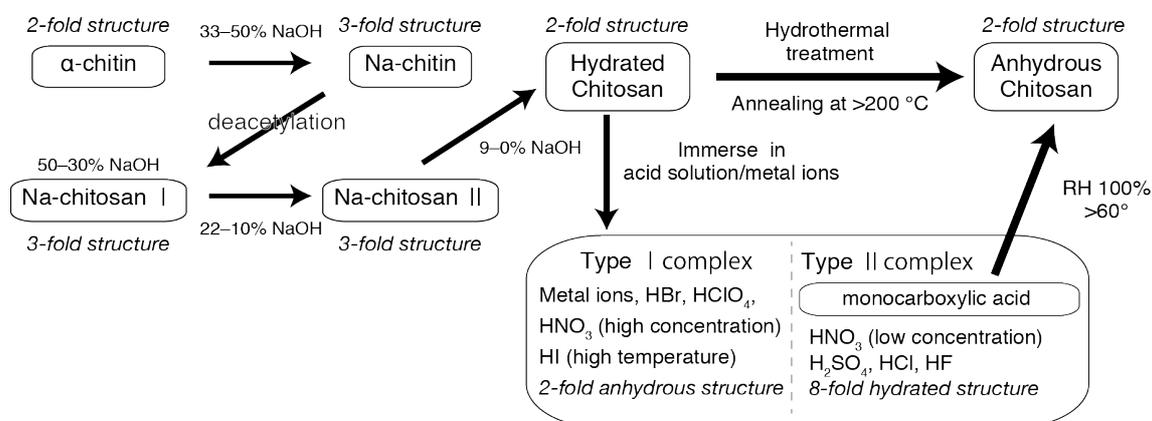
1. ブワイガニ (*C. opilio*) の腱由来の α -chitin を用いて、繊維 X 線回折実験からキチンからキトサンの変換過程における構造の変化について明らかにした。アルカリ-キチンはアルカリ膨潤によって 2 回らせんから 3 回らせんの構造に変化し、アルカリ-キトサンの水洗によるアルカリの放出過程ではアルカリ-キトサンは 3 回らせんから中間体構造を経て 2 回らせんの水和型キトサンへと変化することが分かった。(第二章)

2. 水和型キトサンと無水型キトサンの 2 種類の結晶構造についてシンクロトロン放射光を用いた X 線回折データを用いて、構造の再検討を行った。無水型キトサンについて、高分解能 X 線回折データにより、これまで曖昧さが残っていたシート構造の配置について決定づけることができた。また、経験に基づく分子構造の制限を極力排した高精度な解析を行うことができ、様々な分子間相互作用に関する知見を得ることができた。(第三章)

3. 水和型キトサンおよびキトサン-カルボン酸複合体の無水型キトサンへの転移過程について X 線回折実験を用いて調べた。様々な条件で熱水処理した水和型キトサンの X 線回折実験により、水和型キトサンは 200°C 以上の熱処理で完全に無水型キトサンに転移するという多糖類水和結晶の中で特異的な安定性を明らかにした。さらに、2 種類のキトサン-カルボン酸複合体の高相対湿度下での転移について、ゲスト分子による転移挙動の違いを明らかにした。(第四章)

4. 低分子化したキトサンの再結晶化物について、分子量および再結晶化温度による形態、構造の違いについて調べた。125°C 以上の結晶化温度で低分子化キトサンはラメラ状の無水型キトサン結晶をとるが、より低い温度でも形態は異なるものの無水型キトサンの構造をとることが分かった。さらに、再結晶化により水和型キトサンおよび無水型キトサンの混合物が得られる条件も存在した。分子量によってラメラ状結晶が得られる限界は DP = 50

であった。(第五章)



SCHEME 1 The crystal transitions of chitin and chitosan that were focused in this study are shown in arrows.

以上のように、本研究ではまず、キチンからキトサンの変換プロセスにおける新たな構造についての成果を得ることができた。この成果は今後期待されるキトサンの応用において、反応機構の解明など効率的な変換プロセスの研究開発にとって重要な知見となるであろう。X線構造解析によって明らかとなったキトサンの高精度な結晶構造はキトサンそのものの材料としての基礎的情報として有用となる。結晶多形間の転移についてもX線回折による知見を得ることが出来た。これはキトサンの再結晶化に関する研究結果と合わせて溶解・再生といったキトサンの形態制御プロセスによってキトサンがどのような構造をとりうるか、またその構造の安定性はどのようなものであるかについて重要な知見となるであろう。キトサンの構造についてさらなる理解を深めていくことでその材料としての応用にさらなる基礎をあたえるであろう。

引用文献

- Alsarra I. A. (2009). Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules* 45, 16-21.
- Araki Y. & Ito E. (1975). A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. *European Journal of Biochemistry* 55, 71-78.
- Atkins E., Parker K., & Preston R. (1969). The Helical Structure of the β -1, 3-Linked Xylan in Some Siphonous Green Algae. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 173, 209-221.
- Bartnicki-Garcia S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Reviews in Microbiology* 22, 87-108.
- Buléon A., Colonna P., Planchot V., & Ball S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.
- Cairns P., Miles M. J., Morris V. J., Ridout M. J., Brownsey G. J., & Winter W. T. (1992). X-ray fibre diffraction studies of chitosan and chitosan gels. *Carbohydrate Research* 235, 23-28.
- Cartier N., Domard A., & Chanzy H. (1990). Single crystals of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 12, 289-294.
- Chang K. L. B., Tsai G., Lee J., & Fu W. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research* 303, 327-332.
- Chen P., Ogawa Y., Nishiyama Y., Bergenstr hle-Wohlert M., & Mazeau K. Alternative hydrogen bond models of cellulose II and III based on molecular force-fields and density functional theory. (2015). *Cellulose* 22, 1485-1493.
- Chuah C. T., Sarko A., Deslandes Y., & Marchessault R. H. (1983). Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. Part 14. Triple-helical crystalline structure of curdlan and paramylon hydrates. *Macromolecules* 16, 1375-1382.

- Cremer D. t. & Pople J. (1975). General definition of ring puckering coordinates. *Journal of the American Chemical Society* 97, 1354-1358.
- Crompton K., Goud J., Bellamkonda R., Gengenbach T., Finkelstein D., Horne M., & Forsythe J. (2007). Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials* 28, 441-449.
- Demarger-Andre S. & Domard A. (1994). Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state. *Carbohydrate Polymers* 23, 211-219.
- Domard A. & Rinaudo M. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 5, 49-52.
- Dutta P., Tripathi S., Mehrotra G., & Dutta J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* 114, 1173-1182.
- El Hadrami A., Adam L. R., El Hadrami I., & Daayf F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs* 8, 968-987.
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., & Cowtan K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66, 486-501.
- Fan Y., Saito T., & Isogai A. (2010). Individual chitin nano-whiskers prepared from partially deacetylated α -chitin by fibril surface cationization. *Carbohydrate Polymers* 79, 1046-1051.
- Fan Y., Saito T., & Isogai A. (2009). TEMPO-mediated oxidation of β -chitin to prepare individual nanofibrils. *Carbohydrate Polymers* 77, 832-838.
- Fan Y., Saito T., & Isogai A. (2007). Chitin nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of α -chitin. *Biomacromolecules* 9, 192-198.
- Gagne N. & Simpson B. (1993). Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnology* 7, 253-263.
- Gallaher C. M., Munion J., Hesslink R., Jr, Wise J., & Gallaher D. D. (2000). Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *The Journal of Nutrition* 130, 2753-2759.

Gamzazade A., Sklyar A., Nasibov S., Sushkov I., Shashkov A., & Knirel Y. (1997). Structural features of sulfated chitosans. *Carbohydrate Polymers* 34, 113-116.

Ghosh A. & Bansal M. (1999). CH.. O hydrogen bonds in minor groove of A-tracts in DNA double helices. *Journal of Molecular Biology* 294, 1149-1158.

Guan Y., Hu J., Wang X., & Shao C. (2009). Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University Science B* 10, 427-433.

Hagiwara K., Nakata M., Koyama Y., & Sato T. (2012). The effects of coating pDNA/chitosan complexes with chondroitin sulfate on physicochemical characteristics and cell transfection. *Biomaterials* 33, 7251-7260.

Horii F., Hirai A., & Kitamaru R. (1987). CP/MAS carbon-13 NMR spectra of the crystalline components of native celluloses. *Macromolecules* 20, 2117-2120.

Horii F., Hirai A., & Kitamaru R. (1983). Solid-state ¹³C-NMR study of conformations of oligosaccharides and cellulose. *Polymer Bulletin* 10, 357-361.

Horikawa Y. & Sugiyama J. (2008). Accessibility and size of Valonia cellulose microfibril studied by combined deuteration/rehydrogenation and FTIR technique. *Cellulose* 15, 419-424.

Igarashi K., Wada M., & Samejima M. (2007). Activation of crystalline cellulose to cellulose III_B results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase. *Febs Journal* 274, 1785-1792.

Jane J., Kasemsuwan T., Leas S., Zobel H., & Robyt J. F. (1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch-stärke* 46, 121-129.

Je J., Park P., & Kim S. (2005). Prolyl endopeptidase inhibitory activity of chitosan sulfates with different degree of deacetylation. *Carbohydrate Polymers* 60, 553-556.

Jung J. & Zhao Y. (2014). Alkali-or acid-induced changes in structure, moisture absorption ability and deacetylating reaction of β -chitin extracted from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens. *Food Chemistry* 152, 355-362.

- Kawada J., Abe Y., Yui T., Okuyama K., & Ogawa K. (1999). Crystalline transformation of chitosan from hydrated to anhydrous polymorph via chitosan monocarboxylic acid salts.
- Kobayashi K., Kimura S., Togawa E., & Wada M. (2011). Crystal transition from cellulose II hydrate to cellulose II. *Carbohydrate Polymers* 86, 975-981.
- Kobayashi K., Kimura S., Togawa E., & Wada M. (2011). Crystal transition from Na-cellulose IV to cellulose II monitored using synchrotron X-ray diffraction. *Carbohydrate Polymers* 83, 483-488.
- Kobayashi K., Kimura S., Togawa E., & Wada M. (2010). Crystal transition between hydrate and anhydrous β -chitin monitored by synchrotron X-ray fiber diffraction. *Carbohydrate Polymers* 79, 882-889.
- Kobayashi K., Kimura S., Togawa E., Wada M., & Kuga S. (2010). Crystal transition of paramylon with dehydration and hydration. *Carbohydrate Polymers* 80, 491-497.
- Kolpak F. J., Weih M., & Blackwell J. (1978). Mercerization of cellulose: 1. Determination of the structure of mercerized cotton. *Polymer* 19, 123-131.
- Kulikov S., Chirkov S., Il'ina A., Lopatin S., & Varlamov V. (2006). Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42, 200-203.
- Kumar M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 46, 1-27.
- Kurita K., Sannan T., & Iwakura Y. (1977). Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses. *Die Makromolekulare Chemie* 178, 3197-3202.
- Langan P., Nishiyama Y., & Chanzy H. (1999). A revised structure and hydrogen-bonding system in cellulose II from a neutron fiber diffraction analysis. *Journal of the American Chemical Society* 121, 9940-9946.
- Langan P., Nishiyama Y., & Chanzy H. (2001). X-ray structure of mercerized cellulose II at 1 Å resolution. *Biomacromolecules* 2, 410-416.
- Lee D. M. & Blackwell J. (1981). Structure of cellulose II hydrate. *Biopolymers* 20, 2165-2179.

- Lertworasirikul A., Yokoyama S., Noguchi K., Ogawa K., & Okuyama K. (2004). Molecular and crystal structures of chitosan/HI type I salt determined by X-ray fiber diffraction. *Carbohydrate Research* 339, 825-833.
- Li, J., Revol, J., & Marchessault, R. (1999). Alkali induced polymorphic changes of chitin. *Biopolymers - Utilizing Nature's, Advanced, Materials; Acs Symp. Ser. 723*, 88-96.
- Madhally S. V. & Matthew H. W. (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 20, 1133-1142.
- Mandel-Gutfreund Y., Margalit H., Jernigan R. L., & Zhurkin V. B. (1998). A role for CH... O interactions in protein-DNA recognition. *Journal of Molecular Biology* 277, 1129-1140.
- Mazeau K., Winter W. T., & Chanzy H. (1994). Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data. *Macromolecules* 27, 7606-7612.
- Merritt E. A. & Bacon D. J. (1997). Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods in Enzymology* 277, 505-524.
- Methacanon P., Prasitsilp M., Pothsree T., & Pattaraarchachai J. (2003). Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers* 52, 119-123.
- Morganti P., Muzzarelli R. A., & Muzzarelli C. (2006). Multifunctional use of innovative chitin nanofibrils for skin care. *J Appl Cosmetol* 24, 105-114.
- Morganti P., Palombo M., Fabrizi G., Guarneri F., Slovacchia F., Cardillo A., Del Ciotto P., Carezzi F., & Morganti G. (2013). New insights on anti-aging activity of chitin nanofibril-hyaluronan block copolymers entrapping active ingredients: In vitro and in vivo study. *J Appl Cosmetol* 32, 1-29.
- Mori T., Chikayama E., Tsuboi Y., Ishida N., Shisa N., Noritake Y., Moriya S., & Kikuchi J. (2012). Exploring the conformational space of amorphous cellulose using NMR chemical shifts. *Carbohydrate Polymers* 90, 1197-1203.
- Muzzarelli R., Baldassarre V., Conti F., Ferrara P., Biagini G., Gazzanelli G., & Vasi V. (1988). Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials* 9, 247-252.

- Muzzarelli R. A. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 76, 167-182.
- Naito P., Ogawa Y., Kimura S., Iwata T., & Wada M. (2015). Crystal transition from hydrated chitosan and chitosan/monocarboxylic acid complex to anhydrous chitosan investigated by X-ray diffraction. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* .
- Nelson D. D., Jr, Fraser G. T., & Klemperer W. (1987). Does ammonia hydrogen bond? *Science (New York, N.Y.)* 238, 1670-1674.
- Nieduszynski I. & Marchessault R. (1972). Structure of β , D (1 \rightarrow 4')-xylan hydrate. *Biopolymers* 11, 1335-1344.
- Niekraszewicz A., Kucharska M., Wisniewska-Wrona M., Cienchanska D., Ratajska M., & Haberko K. (2009). Surgical biocomposites with chitosan. *Prog.Chem.Appl.Chitin Deriv* 14, 167-178.
- Niekraszewicz A., Lebioda J., Kucharska M., & Wesolowska E. (2007). Research into developing antibacterial dressing materials. *Fibres and Textiles in Eastern Europe* 15, 101.
- Nishimura H., Okano T., & Sarko A. (1991). Mercerization of cellulose. 5. Crystal and molecular structure of Na-cellulose I. *Macromolecules* 24, 759-770.
- Nishimura H. & Sarko A. (1991). Mercerization of cellulose. 6. Crystal and molecular structure of Na-cellulose IV. *Macromolecules* 24, 771-778.
- Nishimura H. & Sarko A. (1987). Mercerization of cellulose. IV. Mechanism of mercerization and crystallite sizes. *Journal of Applied Polymer Science* 33, 867-874.
- Nishiyama Y., Langan P., & Chanzy H. (2002). Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society* 124, 9074-9082.
- Nishiyama Y., Noishiki Y., & Wada M. (2011). X-ray structure of anhydrous β -chitin at 1 Å resolution. *Macromolecules* 44, 950-957.
- Ogawa K., Hirano S., Miyanishi T., Yui T., & Watanabe T. (1984). A new polymorph of chitosan. *Macromolecules* 17, 973-975.

- Ogawa K. & Inukai S. (1987). X-Ray diffraction study of sulfuric, nitric, and halogen acid salts of chitosan. *Carbohydrate Research* 160, 425-433.
- Ogawa K., Oka K., & Yui T. (1993). X-ray study of chitosan-transition metal complexes. *Chemistry of Materials* 5, 726-728.
- Ogawa Y., Hidaka H., Kimura S., Kim U., Kuga S., & Wada M. (2014). Formation and stability of cellulose-copper-NaOH crystalline complex. *Cellulose* 21, 999-1006.
- Ogawa Y., Hori R., Kim U., & Wada M. (2011). Elastic modulus in the crystalline region and the thermal expansion coefficients of α -chitin determined using synchrotron radiated X-ray diffraction. *Carbohydrate Polymers* 83, 1213-1217.
- Ogawa Y., Kimura S., Saito Y., & Wada M. (2012). Infrared study on deuteration of highly-crystalline chitin. *Carbohydrate Polymers* 90, 650-657.
- Ogawa Y., Kimura S., Wada M., & Kuga S. (2010). Crystal analysis and high-resolution imaging of microfibrillar α -chitin from *Phaeocystis*. *Journal of Structural Biology* 171, 111-116.
- Oka D., Kobayashi K., Isobe N., Ogawa Y., Yokoyama T., Kimura S., Kim U., Tokuyasu K., & Wada M. (2013). Enzymatic hydrolysis of wood with alkaline treatment. *Journal of Wood Science* 59, 484-488.
- Okano T. & Sarko A. (1985). Mercerization of cellulose. II. Alkali-cellulose intermediates and a possible mercerization mechanism. *Journal of Applied Polymer Science* 30, 325-332.
- Okano T. & Sarko A. (1984). Mercerization of cellulose. I. X-ray diffraction evidence for intermediate structures. *Journal of Applied Polymer Science* 29, 4175-4182.
- Okuyama K., Noguchi K., Kanenari M., Egawa T., Osawa K., & Ogawa K. (2000). Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers* 41, 237-247.
- Okuyama K., Noguchi K., Hanafusa Y., Osawa K., & Ogawa K. (1999). Structural study of anhydrous tendon chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex. *International Journal of Biological Macromolecules* 26, 285-293.
- Okuyama K., Noguchi K., Miyazawa T., Yui T., & Ogawa K. (1997). Molecular and crystal structure of hydrated chitosan. *Macromolecules* 30, 5849-5855.

- Pérez S. & Bertoft E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch-stärke* 62, 389-420.
- Persson J., Domard A., & Chanzy H. (1992). Single crystals of α -chitin. *International Journal of Biological Macromolecules* 14, 221-224.
- Rabea E. I., Badawy M. E., Stevens C. V., Smaghe G., & Steurbaut W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4, 1457-1465.
- Saito H., Tabeta R., & Ogawa K. (1987). High-resolution solid-state carbon-13 NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent carbon-13 chemical shifts. *Macromolecules* 20, 2424-2430.
- Saito Y., Putaux J., Okano T., Gaill F., & Chanzy H. (1997). Structural aspects of the swelling of β chitin in HCl and its conversion into α chitin. *Macromolecules* 30, 3867-3873.
- Sannan T., Kurita K., & Iwakura Y. (1976). Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. *Die Makromolekulare Chemie* 177, 3589-3600.
- Sawada D., Kimura S., Nishiyama Y., Langan P., & Wada M. (2013). The crystal structure of mono-ethylenediamine β -chitin from synchrotron X-ray fiber diffraction. *Carbohydrate Polymers* 92, 1737-1742.
- Sawada D., Nishiyama Y., Langan P., Forsyth V. T., Kimura S., & Wada M. (2012). Water in crystalline fibers of dihydrate β -chitin results in unexpected absence of intramolecular hydrogen bonding. *PLoS One* 7, e39376.
- Sikorski P., Hori R., & Wada M. (2009). Revisit of α -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. *Biomacromolecules* 10, 1100-1105.
- Srichuwong S., Sunarti T. C., Mishima T., Isono N., & Hisamatsu M. (2005). Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. *Carbohydrate Polymers* 60, 529-538.
- Tanner S. F., Chanzy H., Vincendon M., Roux J. C., & Gaill F. (1990). High-resolution solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance study of chitin. *Macromolecules* 23, 3576-3583.

- Tchemtchoua V. T., Atanasova G., Aqil A., Filée P., Garbacki N., Vanhooetghem O., Deroanne C., Noël A., Jérôme C., & Nusgens B. (2011). Development of a chitosan nanofibrillar scaffold for skin repair and regeneration. *Biomacromolecules* 12, 3194-3204.
- Wada M. (2001). In situ observation of the crystalline transformation from cellulose III to I β . *Macromolecules* 34, 3271-3275.
- Wada M., Chanzy H., Nishiyama Y., & Langan P. (2004). Cellulose III crystal structure and hydrogen bonding by synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Macromolecules* 37, 8548-8555.
- Wada M., Ike M., & Tokuyasu K. (2010). Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. *Polymer Degradation and Stability* 95, 543-548.
- Wada M., Kwon G. J., & Nishiyama Y. (2008). Structure and thermal behavior of a cellulose I-ethylenediamine complex. *Biomacromolecules* 9, 2898-2904.
- Wada M., Nishiyama Y., Bellesia G., Forsyth T., Gnanakaran S., & Langan P. (2011). Neutron crystallographic and molecular dynamics studies of the structure of ammonia-cellulose I: rearrangement of hydrogen bonding during the treatment of cellulose with ammonia. *Cellulose* 18, 191-206.
- Wada M., Okano T., & Sugiyama J. (1997). Synchrotron-radiated X-ray and neutron diffraction study of native cellulose. *Cellulose* 4, 221-232.
- Watanabe A., Morita S., & Ozaki Y. (2007). Temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose I α studied by infrared spectroscopy in combination with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy: comparison with cellulose I β . *Biomacromolecules* 8, 2969-2975.
- Wu F., Tseng R., & Juang R. (2001). Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan. *Water Research* 35, 613-618.
- Yamaguchi I., Itoh S., Suzuki M., Osaka A., & Tanaka J. (2003). The chitosan prepared from crab tendons: II. The chitosan/apatite composites and their application to nerve regeneration. *Biomaterials* 24, 3285-3292.

- Yamamoto A., Kawada J., Yui T., & OGAWA K. (1997). Conformational behavior of chitosan in the acetate salt: an X-ray study. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61, 1230-1232.
- Yamamoto H. & Horii F. (1993). CPMAS carbon-13 NMR analysis of the crystal transformation induced for Valonia cellulose by annealing at high temperatures. *Macromolecules* 26, 1313-1317.
- Yamamoto H., Horii F., & Odani H. (1989). Structural changes of native cellulose crystals induced by annealing in aqueous alkaline and acidic solutions at high temperatures. *Macromolecules* 22, 4130-4132.
- Yui T., Imada K., Okuyama K., Obata Y., Suzuki K., & Ogawa K. (1994). Molecular and crystal structure of the anhydrous form of chitosan. *Macromolecules* 27, 7601-7605.
- Zhang C., Ping Q., Zhang H., & Shen J. (2003). Preparation of N-alkyl-O-sulfate chitosan derivatives and micellar solubilization of taxol. *Carbohydrate Polymers* 54, 137-141.
- Zhao F., Repo E., Yin D., & Sillanpää M. E. (2013). Adsorption of Cd (II) and Pb (II) by a novel EGTA-modified chitosan material: Kinetics and isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science* 409, 174-182.

謝辞

はじめに、本研究を遂行するにあたり、学部から博士課程の前半まで指導教員としてご指導いただいた和田昌久先生（京都大学）、博士課程の後半から指導教員としてご指導いただきました岩田忠久先生に御礼申し上げます。京都大学の木村聡先生には、透過型電子顕微鏡の手法をはじめとした様々な実験方法について大変丁寧なご指導を頂戴いたしました。御礼申し上げます。

フランス植物高分子研究所（Cermav）の西山義春先生には、X線構造解析についてご指導頂きました。ありがとうございました。SPring-8のビームラインBL40B2の太田昇博士には、放射光X線回折実験に際してご協力頂きました。アメリカオークリッジ国立研究所の澤田大輔博士には、X線繊維回折法の実験と解析方法をご指導いただきました。Cermavの小川悠博士、京都大学の小林加代子博士には実験手法、解析手法、論文執筆に至るまで丁寧な指導、御助言、ご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。

また、ここに至るまでに支え励ましてくださった両親、友人に感謝いたします。

第二章におけるシンクロトロン放射光実験はSPring-8の萌芽的研究支援制度の支援のもとに遂行いたしました。

発表論文

Philip-Kunio Naito, Yu Ogawa, Satoshi Kimura, Tadahisa Iwata, & Masahisa Wada. (2015). Crystal transition from hydrated chitosan and chitosan/monocarboxylic acid complex to anhydrous chitosan investigated by X-ray diffraction. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 53, 1065-1068.

Philip-Kunio Naito, Yu Ogawa, Daisuke Sawada, Yoshiharu Nishiyama, Tadahisa Iwata, & Masahisa Wada. X-ray Crystal structure Analysis of Anhydrous Chitosan at Atomic Resolution. *Biopolymers* (accepted)

APPENDIX

Appendix 1. CIF (crystallographic information file) of anhydrous chitosan by X-ray diffraction.

```

data_final4          4.2.6.8 and 6.1.1.4'
                    'N' 'N'  0.0311  0.0180
_audit_creation_method 'International Tables Vol C Tables
'SHELXL-2014/7'      4.2.6.8 and 6.1.1.4'
_shelx_SHELXL_version_number 'H' 'H'  0.0000  0.0000
'2014/7'             'International Tables Vol C Tables
_chemical_name_systematic      ?      4.2.6.8 and 6.1.1.4'
_chemical_name_common      chitosan      space_group_crystal_system
_chemical_melting_point      ?      orthorhombic
_chemical_formula_moiety      ?      _space_group_IT_number      19
_chemical_formula_sum      _space_group_name_H-M_alt 'P 21 21 21'
'C6 H6 N O4'               _space_group_name_Hall      'P 2ac 2ab'
_chemical_formula_weight
156.12                    _shelx_space_group_comment
                            ;
loop_                      The symmetry employed for this shelxl
_atom_type_symbol          refinement is uniquely defined
_atom_type_description      by the following loop, which should
_atom_type_scatter_dispersion_real      always be used as a source of
_atom_type_scatter_dispersion_imag      symmetry information in preference to
_atom_type_scatter_source      the above space-group names.
'C' 'C'  0.0181  0.0091      They are only intended as comments.
'International Tables Vol C Tables
4.2.6.8 and 6.1.1.4'      loop_
'O' 'O'  0.0492  0.0322      _space_group_symop_operation_xyz
'International Tables Vol C Tables      'x, y, z'

```

'x+1/2, -y+1/2, -z'		_exptl_crystal_F_000	324
'-x+1/2, -y, z+1/2'		_exptl_transmission_factor_min	?
'-x, y+1/2, -z+1/2'		_exptl_transmission_factor_max	?
		_exptl_crystal_size_max	?
_cell_length_a		_exptl_crystal_size_mid	?
8.129(7)		_exptl_crystal_size_min	?
_cell_length_b		_exptl_absorpt_coefficient_mu	
8.347(6)		1.105	
_cell_length_c		_shelx_estimated_absorpt_T_min	?
10.311(7)		_shelx_estimated_absorpt_T_max	?
_cell_angle_alpha	90	_exptl_absorpt_correction_type	?
_cell_angle_beta	90	_exptl_absorpt_correction_T_min	?
_cell_angle_gamma	90	_exptl_absorpt_correction_T_max	?
_cell_volume		_exptl_absorpt_process_details	?
699.6(9)		_exptl_absorpt_special_details	?
_cell_formula_units_Z	4	_diffrn_ambient_temperature	
_cell_measurement_temperature		293(2)	
293(2)		_diffrn_radiation_wavelength	
_cell_measurement_reflns_used	?	1.000	
_cell_measurement_theta_min	?	_diffrn_radiation_type	?
_cell_measurement_theta_max	?	_diffrn_source	?
		_diffrn_measurement_device_type	?
_exptl_crystal_description	?	_diffrn_measurement_method	?
_exptl_crystal_colour	?	_diffrn_detector_area_resol_mean	?
_exptl_crystal_density_meas	?	_diffrn_reflns_number	154
_exptl_crystal_density_method	?	_diffrn_reflns_av_unetI/netI	
_exptl_crystal_density_diffrn		0.0673	
1.482		_diffrn_reflns_av_R_equivalents	?

_diffnrn_reflms_limit_h_min	0	_reflms_Friedel_coverage
_diffnrn_reflms_limit_h_max	6	0.000
_diffnrn_reflms_limit_k_min	0	_reflms_Friedel_fraction_max
_diffnrn_reflms_limit_k_max	7	0.000
_diffnrn_reflms_limit_l_min	0	_reflms_Friedel_fraction_full
_diffnrn_reflms_limit_l_max	8	0.000
_diffnrn_reflms_theta_min		
4.420		_reflms_special_details
_diffnrn_reflms_theta_max		;
25.293		_reflms_Friedel_fraction is defined as
_diffnrn_reflms_theta_full		the number of unique
25.293		Friedel pairs measured divided by the
_diffnrn_measured_fraction_theta_max		number that would be
0.976		possible theoretically, ignoring
_diffnrn_measured_fraction_theta_full		centric projections and
0.976		systematic absences.
_diffnrn_reflms_Laue_measured_fraction_		;
max 0.976		
_diffnrn_reflms_Laue_measured_fraction_		_computing_data_collection ?
full 0.976		_computing_cell_refinement ?
_diffnrn_reflms_point_group_measured_fr		_computing_data_reduction ?
action_max 0.619		_computing_structure_solution ?
_diffnrn_reflms_point_group_measured_fr		_computing_structure_refinement
action_full 0.619		'SHELXL-2014/7 (Sheldrick, 2014)'
_reflms_number_total	154	_computing_molecular_graphics ?
_reflms_number_gt	100	_computing_publication_material ?
_reflms_threshold_expression	'I >	_refine_special_details
2¥s(I)'		;

		_refine_ls_number_parameters	102
Refined as a 2-component perfect twin.		_refine_ls_number_restraints	103
;		_refine_ls_R_factor_all	
		0.1692	
_refine_ls_structure_factor_coef	Fsqd	_refine_ls_R_factor_gt	
_refine_ls_matrix_type	full	0.1276	
_refine_ls_weighting_scheme	calc	_refine_ls_wR_factor_ref	
_refine_ls_weighting_details		0.3132	
'w=1/[$\sigma^2(F_o^2)+(0.2000P)^2$]	where	_refine_ls_wR_factor_gt	
P=($F_o^2+2F_c^2$)/3'		0.2884	
_atom_sites_solution_primary	?	_refine_ls_goodness_of_fit_ref	
_atom_sites_solution_secondary	?	1.936	
_atom_sites_solution_hydrogens	geom	_refine_ls_restrained_S_all	
_refine_ls_hydrogen_treatment		1.192	
constr		_refine_ls_shift/su_max	
_refine_ls_extinction_method	none	0.000	
_refine_ls_extinction_coef	.	_refine_ls_shift/su_mean	
_refine_ls_abs_structure_details		0.000	
;		loop_	
No quotients, so Flack parameter		_atom_site_label	
determined by classical intensity fit		_atom_site_type_symbol	
;		_atom_site_fract_x	
		_atom_site_fract_y	
_refine_ls_abs_structure_Flack		_atom_site_fract_z	
-5(6)		_atom_site_U_iso_or_equiv	
_chemical_absolute_configuration	?	_atom_site_adp_type	
_refine_ls_number_reflns	154	_atom_site_occupancy	

_atom_site_site_symmetry_order	C6_1001 C 0.576(3) -0.043(6) 0.318(3)
_atom_site_calc_flag	0.131(16) Uani 1 1 d D U . . .
_atom_site_refinement_flags_posn	H6A_1001 H 0.6040 -0.0962 0.2372 0.157
_atom_site_refinement_flags_adp	Uiso 1 1 calc R U . . .
_atom_site_refinement_flags_occupancy	H6B_1001 H 0.6071 0.0689 0.3108 0.157
_atom_site_disorder_assembly	Uiso 1 1 calc R U . . .
_atom_site_disorder_group	01_1001 O 0.185(3) 0.086(3) 0.6244(19)
	0.112(10) Uani 1 1 d D U . . .
C1_1001 C 0.191(3) 0.009(4) 0.504(2)	03_1001 O 0.031(3) 0.128(4) 0.182(2)
0.098(10) Uani 1 1 d D U . . .	0.114(11) Uani 1 1 d D U . . .
H1_1001 H 0.1554 -0.1025 0.5105 0.118	05_1001 O 0.360(2) 0.020(3) 0.4634(19)
Uiso 1 1 calc R U . . .	0.104(9) Uani 1 1 d D U . . .
C2_1001 C 0.088(3) 0.100(4) 0.404(2)	06_1001 O 0.660(3) -0.116(4) 0.423(3)
0.088(10) Uani 1 1 d D U . . .	0.113(10) Uani 1 1 d D U . . .
H2_1001 H 0.1338 0.2086 0.4005 0.106	Uiso 1 1 calc R U . . .
Uiso 1 1 calc R U . . .	N2_1001 N -0.085(3) 0.118(6) 0.441(3)
C3_1001 C 0.116(3) 0.027(4) 0.269(2)	0.108(11) Uani 1 1 d D U . . .
0.099(10) Uani 1 1 d D U . . .	loop_
H3_1001 H 0.0682 -0.0803 0.2657 0.119	_atom_site_aniso_label
Uiso 1 1 calc R U . . .	_atom_site_aniso_U_11
C4_1001 C 0.296(3) 0.018(4) 0.233(2)	_atom_site_aniso_U_22
0.097(11) Uani 1 1 d D U . . .	_atom_site_aniso_U_33
H4_1001 H 0.3390 0.1246 0.2134 0.116	_atom_site_aniso_U_23
Uiso 1 1 calc R U . . .	_atom_site_aniso_U_13
C5_1001 C 0.394(3) -0.057(4) 0.342(2)	_atom_site_aniso_U_12
0.110(12) Uani 1 1 d D U . . .	
H5_1001 H 0.3646 -0.1701 0.3494 0.132	C1_1001 0.082(12) 0.13(3) 0.081(12)
Uiso 1 1 calc R U . . .	0.019(12) 0.014(9) -0.003(14)

C2_1001 0.073(11) 0.11(2) 0.081(10)
 0.016(11) 0.003(8) -0.014(13)
 C3_1001 0.080(13) 0.13(3) 0.085(12)
 0.021(12) 0.009(9) -0.003(15)
 C4_1001 0.084(12) 0.12(3) 0.086(12)
 0.018(12) 0.004(9) 0.002(16)
 C5_1001 0.090(12) 0.17(3) 0.067(14)
 0.023(14) 0.011(10) 0.014(14)
 C6_1001 0.088(12) 0.22(4) 0.086(17)
 0.033(19) 0.008(11) 0.023(16)
 O1_1001 0.087(13) 0.16(3) 0.084(11)
 0.007(12) 0.007(11) 0.024(17)
 O3_1001 0.099(16) 0.16(3) 0.083(12)
 0.008(12) -0.008(10) 0.023(19)
 O5_1001 0.072(9) 0.16(2) 0.083(11)
 0.008(11) 0.005(9) 0.003(12)
 O6_1001 0.101(14) 0.15(2) 0.090(15)
 0.009(18) -0.008(13) 0.010(16)
 N2_1001 0.075(11) 0.15(3) 0.101(17)
 0.020(17) 0.015(11) -0.001(16)

_geom_special_details

;

All esds (except the esd in the dihedral
 angle between two l.s. planes)
 are estimated using the full covariance
 matrix. The cell esds are taken

into account individually in the
 estimation of esds in distances, angles
 and torsion angles; correlations
 between esds in cell parameters are only
 used when they are defined by crystal
 symmetry. An approximate (isotropic)
 treatment of cell esds is used for
 estimating esds involving l.s. planes.

;

loop_

_geom_bond_atom_site_label_1

_geom_bond_atom_site_label_2

_geom_bond_distance

_geom_bond_site_symmetry_2

_geom_bond_publ_flag

C1_1001 O1_1001 1.397(17) . ?

C1_1001 O5_1001 1.444(17) . ?

C1_1001 C2_1001 1.524(17) . ?

C2_1001 N2_1001 1.467(17) . ?

C2_1001 C3_1001 1.538(17) . ?

C3_1001 O3_1001 1.413(16) . ?

C3_1001 C4_1001 1.510(17) . ?

C4_1001 O1_1001 1.425(17) 3_554 ?

C4_1001 C5_1001 1.508(16) . ?

C5_1001 O5_1001 1.429(17) . ?

C5_1001 C6_1001 1.505(17) . ?

C6_1001 O6_1001 1.418(17) . ?

01_1001 C4_1001 1.425(17) 3 ?				
	loop_			
loop_		_geom_torsion_atom_site_label_1		
_geom_angle_atom_site_label_1		_geom_torsion_atom_site_label_2		
_geom_angle_atom_site_label_2		_geom_torsion_atom_site_label_3		
_geom_angle_atom_site_label_3		_geom_torsion_atom_site_label_4		
_geom_angle		_geom_torsion		
_geom_angle_site_symmetry_1		_geom_torsion_site_symmetry_1		
_geom_angle_site_symmetry_3		_geom_torsion_site_symmetry_2		
_geom_angle_publ_flag		_geom_torsion_site_symmetry_3		
01_1001 C1_1001 05_1001 105.1(19) . . ?		_geom_torsion_site_symmetry_4		
01_1001 C1_1001 C2_1001 111(2) . . ?		_geom_torsion_publ_flag		
05_1001 C1_1001 C2_1001 107.2(18) . . ?				
C1_1001 C2_1001 N2_1001 114(2) . . ?	01_1001	C1_1001	C2_1001	N2_1001
C1_1001 C2_1001 C3_1001 109.7(17) . . ?	-58(4)	?	
N2_1001 C2_1001 C3_1001 115(3) . . ?	05_1001	C1_1001	C2_1001	N2_1001
03_1001 C3_1001 C4_1001 111(2) . . ?	-172(3)	?	
03_1001 C3_1001 C2_1001 105.6(19) . . ?	01_1001	C1_1001	C2_1001	C3_1001
C4_1001 C3_1001 C2_1001 112.4(18) . . ?	172(2)	?	
01_1001 C4_1001 C3_1001 109(2) 3_554 . ?	05_1001	C1_1001	C2_1001	C3_1001
01_1001 C4_1001 C5_1001 106(2) 3_554 . ?	58(3)	?	
C3_1001 C4_1001 C5_1001 110.7(16) . . ?	C1_1001	C2_1001	C3_1001	03_1001
05_1001 C5_1001 C6_1001 107(2) . . ?	-174(2)	?	
05_1001 C5_1001 C4_1001 111.5(19) . . ?	N2_1001	C2_1001	C3_1001	03_1001
C6_1001 C5_1001 C4_1001 111.1(19) . . ?	57(4)	?	
06_1001 C6_1001 C5_1001 108.4(19) . . ?	C1_1001	C2_1001	C3_1001	C4_1001
C4_1001 01_1001 C1_1001 115(2) 3 . ?	-53(3)	?	
C5_1001 05_1001 C1_1001 113.9(18) . . ?	N2_1001	C2_1001	C3_1001	C4_1001

178(4) ?	61(3) ?
03_1001 C3_1001 C4_1001 01_1001	01_1001 C1_1001 05_1001 C5_1001
-77(3) . . . 3_554 ?	178(2) ?
C2_1001 C3_1001 C4_1001 01_1001	C2_1001 C1_1001 05_1001 C5_1001
165(2) . . . 3_554 ?	-64(3) ?
03_1001 C3_1001 C4_1001 C5_1001	
167(3) ?	_refine_diff_density_max 0.144
C2_1001 C3_1001 C4_1001 C5_1001	_refine_diff_density_min -0.181
49(3) ?	_refine_diff_density_rm
01_1001 C4_1001 C5_1001 05_1001 -169(3)	
3_554 . . . ?	
C3_1001 C4_1001 C5_1001 05_1001	
-51(3) ?	
01_1001 C4_1001 C5_1001 C6_1001 71(4)	
3_554 . . . ?	
C3_1001 C4_1001 C5_1001 C6_1001	
-171(3) ?	
05_1001 C5_1001 C6_1001 06_1001	
58(4) ?	
C4_1001 C5_1001 C6_1001 06_1001	
-179(3) ?	
05_1001 C1_1001 01_1001 C4_1001	
-93(3) . . . 3 ?	
C2_1001 C1_1001 01_1001 C4_1001	
151(2) . . . 3 ?	
C6_1001 C5_1001 05_1001 C1_1001	
-177(3) ?	
C4_1001 C5_1001 05_1001 C1_1001	

