

高分解能 X 線回折及び中性子線回折による
 β キチン結晶の構造解析

澤田 大輔

高分解能 X 線回折及び中性子線回折によるβキチン結晶の構造解析

1 繊維結晶構造解析とキチン結晶構造

1-1	繊維結晶構造解析	1
1-2	キチン	
1-3	キチンの結晶構造	
1-4	キチンの結晶性錯体	
1-5	本研究の目的	

2 βキチン無水物の中性子線解析による水素結合様式の決定

2-1	緒言	14
2-2	実験	
2-2-1	試料調製	
2-2-2	中性子線回折実験	
2-2-3	構造解析	
2-3	考察	
2-4	結論	

3 βキチン二水和物の高分解能 X 線及び中性子線解析による 固体構造解析並びに水素結合様式の決定

3-1	緒言	26
3-2	X 線回折実験	
3-2-1	試料調製	
3-2-2	測定・強度抽出	
3-2-3	構造解析	
3-3	中性子線回折実験	
3-3-1	試料調製及び測定	
3-3-2	測定・強度抽出	
3-3-3	構造解析	
3-4	考察	
3-5	結論	

4	総括	55
---	----	----

References	56
------------	----

謝辞

APPENDIX	63
----------	----

1 繊維結晶構造解析とキチン結晶構造

1-1 繊維結晶構造解析

結晶は分子や原子が規則性を持って 3 次元に配列したものである。その繰り返しの単位になるのが単位格子であり、その中に対称操作による分割のできない非対称単位を含む。結晶構造を解析する手法として FT-IR や固体 ^{13}C NMR によるスペクトル解析も重要であるが、原子位置を直接的に決定できるという点で X 線、中性子線、電子線による回折解析は重要な情報を得ることができる。

X 線回折や中性子線回折により得られる情報は、面間隔(d_{hkl})と強度(I)である。繊維回折を含め単位格子の決定法はほぼ確立されている。当研究室では面間隔 d_{obs} の中で明確に分離できるものを R-AXIS display ソフト (Rigaku) を用いて測定し、回折点の消滅則から想定した対称性を用いて回折点を指数付けし、単位格子パラメータを算出する。パラメータは測定データ(d_{obs})と計算データ(d_{cal})を用いて最小二乗法による精密化を行い、最終的な単位格子パラメータの決定を行う。

回折強度(I)は測定結晶構造因子 F_o の振幅の 2 乗($I = |F_o|^2$)として計算される。回折強度は入射 X 線の弾性散乱 X 線が強めあう位置に観測され、その際の回折強度は X 線の回折角 2θ と主に電子数に比例する原子散乱因子により決定される。各($h\ k\ l$)での結晶構造因子は以下の式のように表される¹。

$$F(h\ k\ l) = \sum_j f_j \exp\{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)\}$$

ここで(x_j, y_j, z_j)は各原子(j)の座標であり、 f_j はそれぞれの原子(j)の原子散乱因子であり、静止した原子の原子散乱因子 f_0 と原子の温度因子 B により以下の式で表される。

$$f = f_0 e^{-M} \quad M = B \left(\frac{\sin\theta}{\lambda} \right)^2$$

そこで単位格子中の原子の座標を導入し、適切な温度因子を与え電子密度のモデルを作成することで、ある回折点に対する強度($|F_c|$:計算結晶構造因子)を見積もることが可能にな

る。構造解析ではこの測定値(I_{Fo})と計算値(I_{Fc})の差を、モデルへの原子の導入や構造精密化により最小化していく。

繊維回折では、結晶サイズ、繊維方向の配向性、面配向等によるピークの重なりから、測定強度(I_{Fo})の評価が非常に難しく、適切なモデルが組めたとしても構造解析の精度を上げることが難しい。

繊維回折の中で、セルロースやキチン等の解析手法は X 線と中性子線についてそれぞれ確立されつつある。測定サンプルについては、結晶サイズが大きい高結晶性の繊維試料が望ましく、回折がスポットとして観測されない繊維回折では繊維垂直方向の配向性が一定以上求められる。それぞれの結晶で天然に高結晶性のものがいくつか存在しており、セルロースではホヤ(*Halocynthia roretzi*)や微細藻類(*Glaucozystis nostochinearum*)、シオグサ(*Chladophora wrightiana*)など、キチンでは珪藻(*Thalassiosira fluviatilis*, *Thalassiosira weissflogii*)の棘条やハオリムシ(*Oligobrachia ivanovi*, *ZenkTavichkau longissima*, *Lamellibrachia satsuma*)の棲管、ズワイガニ(*Chionoecetes opilio*)の腱、ハプト藻(*Phaeocystis globosa*)の棘条などを試料として解析が行われてきた。配向性の改良のためには、加水分解した試料溶液をガラス管中高速で回転させて配向フィルムを得る手法²、PVA 溶液中に試料を分散させホウ酸ナトリウムによりゲル化させ延伸する手法、フィブリノーゲン溶液をトロンビンによりゲル化させ延伸させる手法³、高配向性の試料を更に延伸する手法⁴などが報告されている。こうして得られた試料は、SPring-8(Harima, Japan)、ESRF(Grenoble, France)などのシンクロトロン放射光による X 線回折や、ILL(Grenoble, France)、JRR-3(Tokai, Japan)、J-PARC(Tokai, Japan)などの中性子線回折に供する。

繊維回折解析の手法では、単結晶の様に原子位置を直接的に決定していくことは難しいため、回折から想定されるモデルを組み、そのモデルと回折データの一致を比較することによりリーズナブルなモデルを提案してきた。1978 年 Smith と Arnott によって繊維回折解析の強力な手法として LALS (linked-atom least-square) が発表された⁵。この手法では、結合長や結合角は既知であるとして固定し、主に結合の二面角をパラメータとして計算を行

う。それにより、パラメータ数を従来の方法より大幅に減らすことができるため、実験室レベルの X 線でも精度の高い構造を提示することが可能になった。LALS を用いて構造が提示されている例は多糖高分子でも多く、現在でも X 線源が限られている場合や、錯体等複雑な構造を取る場合などに用いられる⁶⁻⁸。

一方で温度因子まで含めた精密な構造解析を行うためには、高分解能のデータを用いて、全ての原子のパラメータを計算する構造解析を行う必要がある。近年のセルロースやキチンの最終構造の提示のための手法は、概ね Langan ら⁹の手法とそれを発展させた手法¹⁰⁻¹²が用いられている。これらの手法は近年 Nishiyama らにより考察し直されている¹³。構造計算には直接法の最小二乗計算ソフトである SHELX-97¹⁴を用いる。フーリエ差分図作成のため、標準的なデータセットである HKLF 4 を用いて、重なり合った回折を均等に割り振ったピークリストを用いて計算を行う。一方構造精密化のためには、高分解能粉末 X 線回折の複合ピークが処理できるデータセットである HKLF 6 を用いて、重なり合った回折をまとめて計算を行う。回折をまとめて処理することにより、繊維回折特有のピークの重なりによる配分の誤差を避けることができる。

初期モデルの構築はこれまでの手法と同様、単位格子パラメータから回折データによく一致する座標モデルを用意する。多糖高分子の中で自由度が高い原子はヒドロキシメチル基の酸素原子や、アセトアミド基といった側鎖であり、その位置を正確に把握することは重要である。そこで主鎖の原子のみ計算座標に導入し、自由度の高い原子を計算座標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、原子を視覚的に直接的に確認することにより確実な原子導入が可能になる。電子密度と構造因子はフーリエ変換の関係にあるため、Fo-Fc（計算されていない電子密度が正のピークとして現れる）や 2Fo-Fc（実際の電子密度に近い形で現れる）といった差分の逆フーリエ変換により原子（電子密度ピーク）を探す手法である。この際原子位置の確認に用いられるデータは高分解能である必要はなく、1.5Å~2.0Å 程度までの回折データでピークを確認できる場合が多い。この手法により大まかに決定された全ての原子を、計算の誤差になりやすい近接した回折をまとめたうえで、高分解能までの全データを用いた構造精密化を行うことでより精密な座標の提示が可能となる。また従来の方法では困難であった温度因子を含めた精密化を行うことが可能に

なり、原子振動に対する情報を得ることが可能になった。近年の解析では強度抽出の方法を含めた強度の取り扱いの改善により、異方性温度因子を用いて結合長、結合角や温度因子に対する制限を大幅に減らすことが可能になった。そこで理想的な結合長に近づける制限を外すことで、実際の結晶で起こりうる原子の変位を反映した構造解析を行うことが可能になってきている。

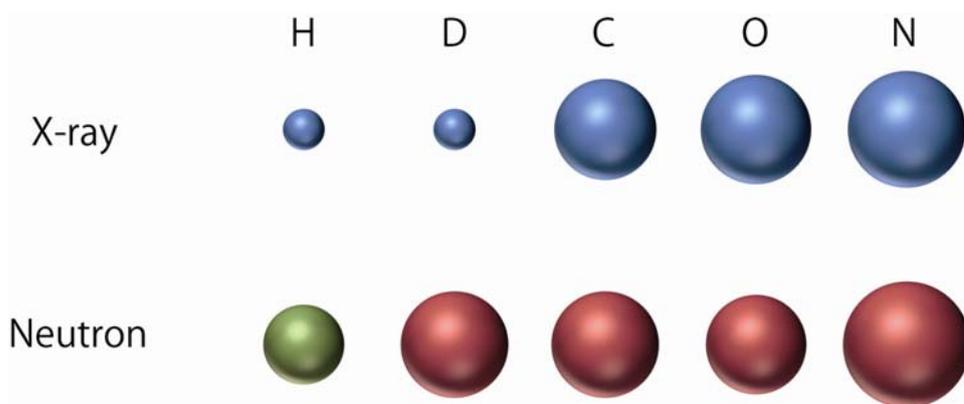


Figure 1-1. The model of scattering power by X-ray and Neutron, showing negative scattering length of neutron in green and positive in red.

前述の様に、X線構造解析は繊維回折でも極めて高精度になってきた。とはいえ電子数にほぼ比例する散乱因子を考慮すると、水素位置をフーリエ差分図から決定することは非常に難しい。水素位置は結晶構造に多大に影響を与える水素結合様式と直接的に関与するため、その正確な位置決定は重要である。そこで散乱長が原子核に由来する中性子線回折により、水素位置を可視化し構造決定を行うことが求められる。Figure 1-1に糖構成原子における主な原子のX線散乱因子の比と中性子線の干渉性散乱長の比を示す。中性子線回折についても、X線とほぼ同様の手法で行うことが可能である^{10-12,15-17}。とはいえ繊維結晶の場合、中性子線の強度の弱さから全原子をパラメータとして構造解析することは難しい。そのため非水素原子についてはX線構造で固定した解析が行われることが一般的である。中性子散乱長は水素については他原子と同程度の大きさの負の値を持ち、重水素の場合は正の値を持つ。それぞれのみで解析を行うことも可能であるが、水酸基や錯体分子を重水素置換サンプルが用意できる場合、フーリエ差分図の作成の際 $F_d - F_h$ を振幅とするとより

明確に水素位置を確認できる。このようにして、X線と中性子線を複合させた手法により、水素原子まで含めた全座標を高い精度で明らかにしていくことが繊維回折でも可能になった。

精密化された結晶構造を解析することで、分子間に働く相互作用を明らかにすることができ、結晶の機械的特性や様々な反応性に関する知見を得ることができる。実際に用いられる材料中で必ずしも分子が結晶として存在しているわけではないが、結晶中の相互作用は材料の分子間相互作用を知るための基礎的情報となりうる。結晶中の相互作用には、水素結合を含む静電的相互作用、ロンドン分散力を含む Van der waals 相互作用、 π - π 相互作用（スタッキング相互作用）、疎水性相互作用がある。これらの相互作用の強さを一般的に比較した場合、水素結合は極めて強い相互作用である。また水素結合は生態中に存在することの多い水分子との相互作用に大きく関わるため、生物学的にも非常に重要であり¹⁸、相互作用の中心として研究が行われてきた¹⁹。水素結合は1939年 Pauling の著作の中で構造化学にとって重要であるとされ²⁰、それ以来広い研究分野で注目されるようになった。Pauling による原子の電気陰性度の差による水素結合形成の理論は、現在の理論の基礎となっている。酸素や窒素などの電気陰性度の大きい原子と結合した水素は、孤立電子対と非共有結合性であるが極めて強い結合を示す。一方で近年の量子化学計算の手法の発展に伴い、Hobza と Šponer は DNA の塩基スタッキング相互作用エネルギーの研究の中で、水素結合による安定化とスタッキング相互作用はともに重要であることを述べている²¹。

セルロースにおいても、水素結合や疎水性相互作用が結晶とその物性に及ぼす効果について研究がなされてきた。近年セルロースの結晶多形やその錯体についての水素結合様式を含む結晶構造は中性子線と高分解能 X 線を用いて直接的に決定されてきており^{9-12,15-17,22-24}、その結晶構造の情報はセルロース系のバイオマスを高効率でバイオ燃料へと変換する際の指針ともなっている^{25,26}。例えば、セルロース III₁はセルロース I β に比べて約5倍の速度で酵素分解され、またそれらのセルロース III₁の疎水面の距離の長さや密度の低さから説明がされている²⁵。一方で二つの結晶形の水素結合を比較すると、セルロース III になることにより分子内水素結合は減少し、分子間水素結合は増加し、個々の水素結合の幾何

的な強さは強くなる。水素結合様式は当然セルロース結晶の安定性に影響を与えるものであり²⁷、個々の結晶に由来する特性に対して、全ての分子間相互作用を含めた結晶情報を網羅的に把握する必要があると言える。

1-2 キチン

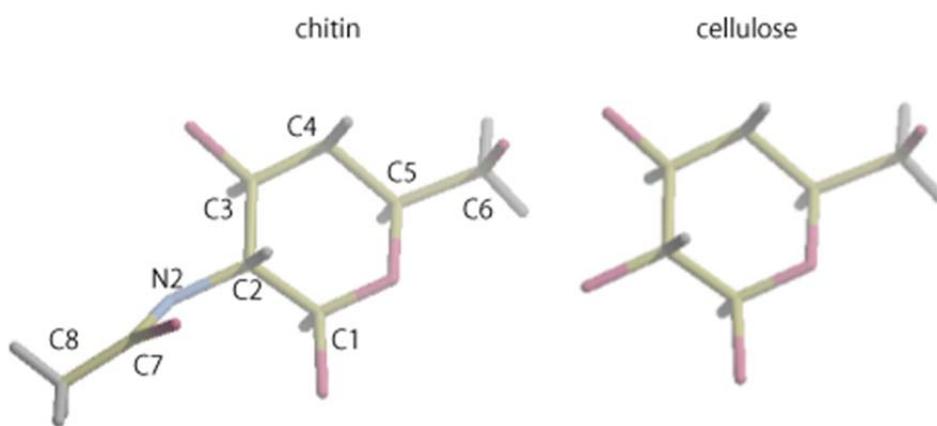


Figure 1-2. The monomeric residue of chitin and cellulose. The atoms are shown with yellow (carbon), red (oxygen) and blue (nitrogen). The atomic numbers shown with chitin are used consistently in this thesis.

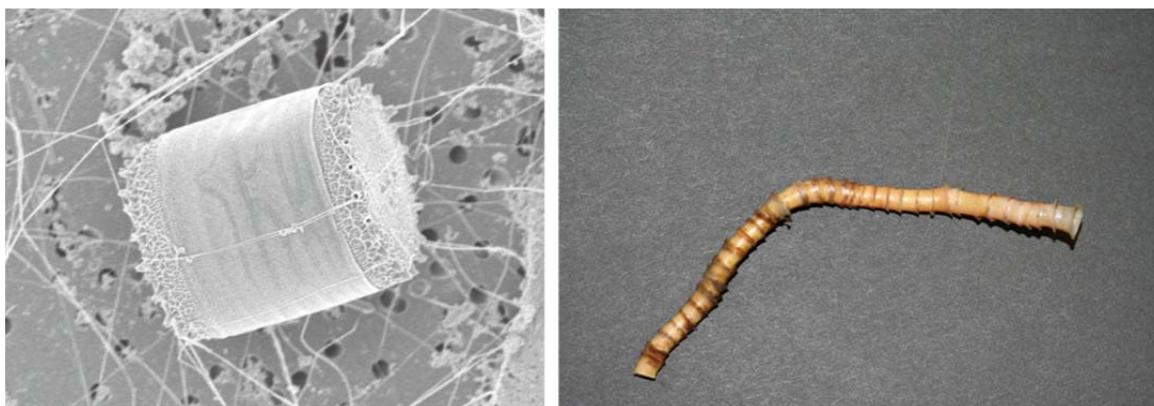


Figure 1-3. Diatom (*Thalassiosira weissflogii*) and tubeworm (*Lamellibrachia satsuma*).

キチンはセルロースと並び地球上で多量に生産されるバイオマスであり環境的観点からも注目されている。セルロースは主に構造多糖として植物界で生産され、衣料品や紙など

として汎用的に用いられてきており、それに伴い基礎的研究も進んでいる。一方で、キチンは動物界で生産されるものが多く、近年その生体親和性や体内で代謝されることから医療用材料として主に研究が行われているが、基礎的研究に関して残す所は多い。Figure 1-2. に示すように、キチンは N-アセチル-D-グルコサミンが β ,1-4 結合した直鎖上の多糖であり、セルロースの C2 位の水酸基をアセトアミド基に置換した化学構造になっている (図の GlcNac 残基中の原子名は本論文中共通)。キチンには少なくとも二つの結晶多形が知られており、逆平行鎖構造と言われる α キチンと平行鎖構造の β キチンと名付けられている。 α キチンは甲殻類の外骨格や、昆虫のクチクラ中などに存在し、結晶形としてメジャーである。一方 β キチンは珪藻の棘条、ハオリムシの棲管やイカの腱など、数種の水生物によって生産される (Figure 1-3.)。しかし主に海洋での生産量は多く、 β キチンは海洋における炭素循環の主要な担い手の一つと言える。また珪藻では高収率の培養法が確立されている。

1-3 キチンの結晶構造

キチンの存在自体は 1800 年代初頭には確認されていたが、結晶構造が提示されたのは 1900 年に入ってからである。結晶形としてメジャーであり、配向性など構造解析に適した試料が得られやすい α キチンが、キチンの結晶構造として最初に提示された。Gonell、Meyer と Pankow、Lotmar と Picken はロブスターの腱を用いて、キチンの結晶構造を提示した²⁸⁻³⁰。

1957 年になって Carlstrom は、 α キチンの現在のモデルに近い詳細な構造を提示した³¹。ロブスター (*Homarus americanus*) の腱から撮影した回折図から、斜方晶で $P2_12_12_1$ の対称性を持ち、これまでの単位格子から a 軸方向を小さく取った、 $a = 4.76 \text{ \AA}$, $b = 18.85 \text{ \AA}$, c (fiber axis) = 10.28 \AA の単位格子パラメータを算出した。この構造では単位格子内に二つのキトビオース単位を含み、それらは逆平行に配列している。Carlstrom は 1962 年にも α キチンの骨格構造に関する報告³²をし、 c 軸方向の繰り返し単位長から Dweltz が提示した主鎖の糖残基が直線的に並んだ構造³³を否定した。

1978 年 Minke と Blackwell は同様にロブスターの腱を用いて X 線回折による構造決定を行った。回折強度による構造精密化の結果、それまでとほぼ同様に逆平行鎖で斜方晶

$P2_12_12_1$ 、 $a = 4.74 \text{ \AA}$, $b = 18.86 \text{ \AA}$, c (fiber axis) = 10.32 \AA の単位格子パラメータを持ち、単位格子 ab 面の中央と角に分子鎖を持つとした。加えて、O6 のコンフォメーションが gt (O6 の位置が O5 に対して *gauche*、C4 に対して *trans*) と tg が 50 : 50 になるモデルで、全ての水酸基が水素結合を持つ妥当な構造が提示された。

2009 年に Sikorski らにより、結晶性が良く高配向性試料であるズワイガニ (*Chionoecetes*) の腱を用いて、シンクロトロン放射光による高分解能の X 線回折データから構造解析が行われた³⁴。単位格子パラメータや結晶の基本情報はこれまでの解析とほぼ変わらず、 $a = 4.749 \text{ \AA}$, $b = 18.89 \text{ \AA}$, $c = 10.33 \text{ \AA}$ (300 K 測定) と報告している。この構造でも O6 を二つの位置に分けたモデルであるが、Minke と Blackwell のモデルと異なり gg と gt がほぼ 60 : 40 となるモデルを採用しており、フーリエ差分図と、信頼度因子の有意な減少により確認されている。またセルロース系の結晶構造の中で tg のコンフォメーションを取る構造は非常に少ないことから妥当な結果であると言える。この構造が現在の晶系と繊維構造解析法で決定できる構造としては、最有力な構造であろう。

一方 2010 年、Ogawa らは高結晶性試料であるハプト藻 (*Phaeocystis globosa*) の棘条を配向させた試料のシンクロトロン放射光回折図を報告しており、その回折点の中にこれまでの結晶形では説明できないものが存在することを明らかにしている³⁵。逆平行鎖での生合成の説明が難しい現状と合わせて、 α キチンに関しては未だ現在のモデルで確定できるとは言えない現状となっている。

β キチンが最初に α キチンと区分されたのは、Lotmar と Picken によるイカ (*Loligo*) の腱の X 線回折研究によるものである³⁰。Dweltz は同様のサンプルを用いて単斜晶の $P2_1$ の指数付けを行い、単位格子パラメータがほぼ $\gamma = 90^\circ$, $a = 4.7 \text{ \AA}$, $b = 10.5 \text{ \AA}$, $c = 10.3 \text{ \AA}$ と報告し、構造決定も試みている³⁶。この構造は、乾燥させたイカの腱を用いているものの一水和物の単位格子として報告されている。また α キチンの場合と同様、主鎖の直線性に問題が残る。

その後の研究は *chitan* と呼ばれてきた珪藻の棘条³⁷やハオリムシの棲管³⁸から精製した高結晶性 β キチンを用いて、構造研究の精度が飛躍的に上昇した。Blackwell はイカの腱 (*Loligo vulgaris*) に加えて、珪藻の棘条 (*Thalassiosira fluviatilis*)、ハオリムシの棲管

(*Oligobrachia ivanovi*, *ZenkTavichkau longissima*) を用いて様々な調製条件での単位格子の再調査、及び構造決定を行った³。この中で無水βキチンの単位格子パラメータを $a = 4.85 \text{ \AA}$, $b = 9.26 \text{ \AA}$, $c = 10.38 \text{ \AA}$, $\gamma = 97.5^\circ$ と報告している。

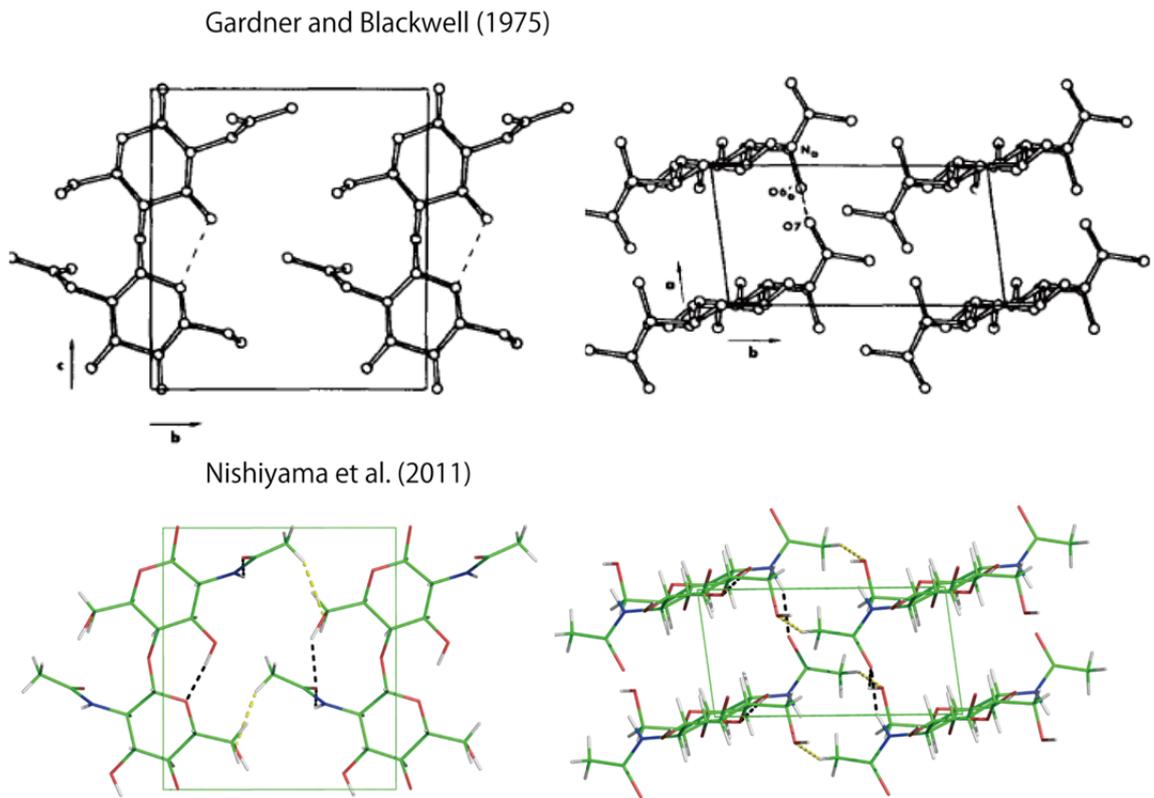


Figure 1-4. The crystal structure model of anhydrous β -chitin in the view of ab projection (left) and fiber direction (right) proposed by Gardner and Blackwell (up)³⁹ and Nishiyama et al. (down)⁴⁰.

この単位格子を元に Gardner と Blackwell は高結晶性のハオリムシ (*Oligobrachia ivanovi*) の β キチン結晶を用いて回折図を撮影した。回折データは実験室レベル X 線に制限されているものの、強度の最小二乗法による構造精密化を行い妥当な構造を提示した³⁹。提示された構造から、O3-H...O5 の分子内水素結合と、O6-H...O7、N2-H...O7 の分子間水素結合

が示され、*b* 軸方向に水素結合を持たないことが、 β キチンの錯体形成による結晶膨潤の理由として説明された。一本平行鎖の非対称単位が GlcNac 一つであるシンプルな構造であることもあり、このモデルが近年まで β キチンの妥当なモデルとして用いられてきた (Figure 1-4.)。

X 線回折実験による構造解析だけでなく、無水 β キチンの構造研究は継続的に行われてきた。Tanner らは、イカの腱、珪藻の棘条、ハオリムシの棲管を用いて、 β キチンの高分解能 ^{13}C 固体 NMR データを報告している⁴¹。カルボニルと C2 以外の炭素原子はシャープな 1 本のピークとして現れ、既存の構造を支持する結果となっている。カルボニルと C2 がダブルレットとして現れるのはアセトアミド基の ^{14}N の電気 4 極子モーメントによる説明がなされている。

2003 年 Imai らは珪藻の棘条、ハオリムシの棲管を用いて還元末端をラベルする手法を用いキチン生合成での分子の方向性について発表している⁴²。生合成の際は還元末端から押し出されるように分子鎖は成長し、“parallel-up”の構造になることが明らかにされた。

2007 年 Yui らは、Gardner と Blackwell の構造と立体科学的基準から、 β キチンの結晶構造パラメータの網羅的研究を行った⁸。gg に位置するヒドロキシメチル基や、“parallel-up”の還元末端向きなど、Gardner と Blackwell の結果を再確認する結果であった。同時にその構造の分子動学的検討を行い、O3-H...O5、N2-H...O7 が強い水素結合により分子を安定化しているのに対し、O6-H...O7 の分子間水素結合はやや不安定であることが示唆された。

また 2011 年 Ogawa らは珪藻 (*Thalassiosira weissflogii*) の棘条とハオリムシの棲管 (*Lamellibrachia satsuma*) を用いて、高分解能電子顕微鏡観察による β キチンの形状観察で、同じ結晶形であっても生物種によってマイクロフィブリルの形状が異なっていることを示した⁴³。

このように様々な手法で β キチンの構造情報が明らかにされてきたが、2011 年珪藻 (*Thalassiosira weissflogii*) の高結晶性 β キチンを試料とし、シンクロトロン放射光を用いた結晶構造解析が行われ、より精密化された原子座標が発表された⁴⁰ (Figure 1-4.)。この構造解析では、フーリエ差分図を利用することにより、自由度の高い 1 級水酸基とアセトアミド基の全ての原子を直接的に電子密度として確認することで、原子座標の導入を進め

ている。最終的に提示された構造は、異方性温度因子を用いて数個の結合長への制限のみで解析が行われており、炭素・酸素・窒素原子の座標は代替の構造を考えにくい、精度の高い構造が提示された。このモデルでも、*b* 軸方向への強い水素結合は確認されなかったが、C8-H...O6 の弱い水素結合による若干の安定化は図られていることが示唆された。

1-4 キチンの結晶性錯体

前述のように無水βキチン結晶は、*ac* 面に O3-H...O5 の分子内水素結合と O6-H...O7、N2-H...O7 の分子間水素結合、及び疎水性相互作用による分子鎖シートを形成し、*b* 軸方向には C8-H...O6 間の弱い水素結合が一つ存在するのみの構造を取っている。そのため極性溶液に浸漬させると、この相互作用の小さいシート間に分子を取り込むことにより層間化合物を形成する (Figure 1-5.)。

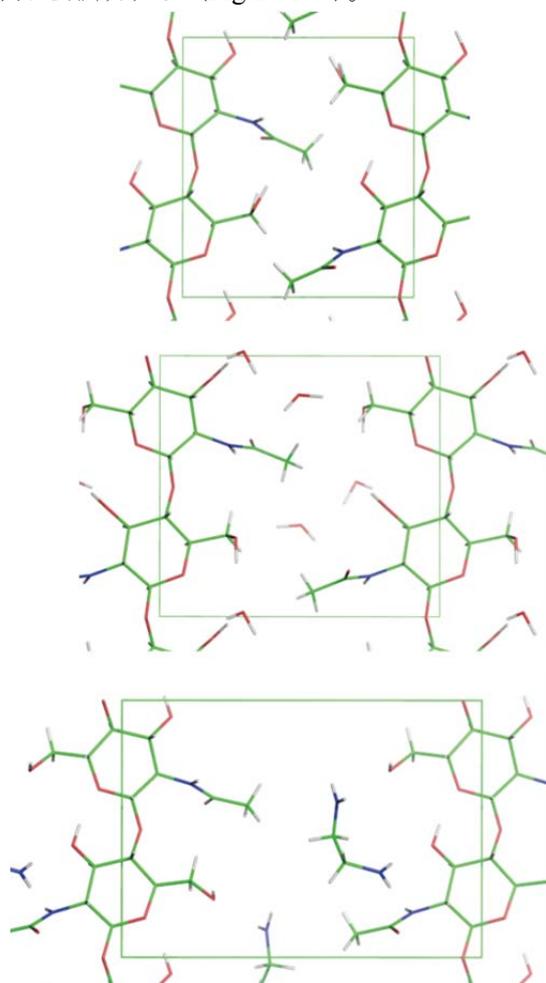


Figure 1-5. The model of β-chitin complexes. Distance of *b*-axis direction expands by the guest molecules.

錯体形成可能な分子としては水、アルコール、アミン等が報告されており、単純な浸漬で完全な錯体が得られる分子や、部分的に錯体が形成される分子、錯体が形成されない分子も存在する⁴⁴⁻⁴⁷。単純な浸漬で錯体が形成されない分子でも、低分子の錯体を作製した後に順次置換していくことにより、錯体化が可能な分子も報告されている。このように錯体形成挙動について、分子のサイズや極性といった因子による導入の可否についての網羅的研究は行われてきた。しかし錯体形成の際の結晶構造の変化については、原子座標を精密化することで最も情報が得られる。例えば自由度の高いヒドロキシメチル基の O6 が、錯体分子によって変化するのかなどは非常に興味深く、また結晶の反応性等にも大きく関与してくると思われる。これらの錯体形成挙動を利用し、酸無水物を取り込んだ後にエステル化する研究も行われている⁴⁸。

最も重要であり、近年まで継続して研究が行われている錯体は水和物であろう。Blackwell は様々な試料や調製条件における β キチンの結晶について報告している³。精製した β キチンに限れば、水和物として二種類の構造があり一水和物と二水和物と名付けられている。単位格子体積からの単純な分子計算では、それぞれグルコサミン残基あたり 1 個の水と 2 個の水を含むとされている。詳細な構造は現在まで明らかにされていないが、温度条件等による転移機構や水和物形成が瞬時に行われるなどの報告がされてきた^{49,50}。

2010年 Kobayashi らは湿度調整条件下での β キチンの結晶変態を詳しくモニタリングした⁴。二水和物から相対湿度を下げて行く場合 30%まで二水和物は安定であり、そこから一水和物を経て無水物へと変化する。一方、無水物から相対湿度を上げていく場合 80%から一水和物へと変化するが、100%相対湿度まで上げても二水和物へとは変化せず、水に浸漬させることのみによって二水和物へと戻すことができる。類似の結晶性水和物であるセルロース水和物の脱水挙動^{51,52}と異なるこの強いヒステリシスと、無水物及びそれぞれの水和物の構造との関係は非常に興味深い。

1-5 本研究の目的

前述のように β キチンは様々な興味深い特性を持つ結晶であり、無水 β キチンの X 線構造はほぼ確実なものとなっている。しかしこれらの特性は水素結合様式と密接に関わっていると考えられるため、X 線構造解析による推定ではなく直接的に水素結合様式を確定させることが重要である。そのためセルロースで行われてきた繊維中性子線回折法をキチン結晶に適用し、無水 β キチンの水素結合様式の直接的な決定を目指した。

またその結晶錯体形成能から、水系での β キチンは二水和物になっていると考えられる。生合成や分解、また多くの工業的プロセスは水系環境下で行われるため、二水和物の構造はこれらの錯体の中でも特に重要である。高分解能 X 線により β キチン二水和物の構造決定を行った。さらに中性子線により水素位置の決定を行うことで、二水和物の水素結合様式を明らかにした。この無水物と二水和物の水素原子を含む構造から、 β キチン及びその錯体での水素結合の役割を明らかにすることを目指した。

β キチンの錯体は様々な溶媒を容易に取り込むことから、その溶媒とキチン骨格の相互作用は比較的表面や溶液系と近い状態になっていることが想定される。部分的でもキチン骨格と類似した構造を持つ多糖はセルロースを含め多く存在しているが、水和物を含む錯体で十分な構造解析に足る結晶が得られることは少ない。 β キチンの各種錯体結晶構造を解析することにより、そのような多糖と溶媒との各種相互作用を予測することが可能になる。近年分子動力学による物性の確認や予測が活発に行われているが、その際相互作用のエネルギーは非常に重要になる。 β キチンの各種錯体の構造解析と分子動力学の融合により多糖の利用に有用な情報が多く得られることを期待している。今回その検討も含め水和物の構造とセルロースでの分子動力学による表面推定構造などとの比較を行った。

最後に糖由来の材料は様々な利用されているが、詳細に解析されている糖系の構造、特に β ,1-4 結合を持つ構造は非常に少ない現状である。詳細な構造はそれのみでも様々な知見を与えるものであるが、類似した構造を高レベルの解析で比較することにより得られる情報は非常に大きくなる。 β キチンの構造は、その観点からも連続的に明らかにされていくべき構造であると言える。

2 β キチン無水物の中性子線解析による水素結合様式の決定

2-1 諸言

1975年 Gardner と Blackwell は X 線回折による β キチン無水物の固体構造解析を行い、ほぼ妥当なモデルを提案した³⁹。この構造解析では 61 個の子午線を除いた回折点を用いて精密化が行われ、窒素原子の座標に問題を残すものの構造としての大きな矛盾点は存在せず、彼らの提示した構造は近年まで β キチン無水物の構造モデルとして用いられてきた。2011年 Nishiyama らはシンクロトロン放射光による高分解能 X 線を用いた原子分解能での構造解析を行い、窒素原子の座標を訂正すると共に非水素原子の座標に関して大きな変化を取りえない精度の高い構造が提示された⁴⁰。1 Å までの全ての回折を用いた構造解析が可能であったため、異方性温度因子を用いて数個の結合長に対する制限のみで妥当なモデルの構築がなされた。しかし繊維回折の場合この様に精度の高い解析であっても、水素原子の電子数と測定強度の誤差のためフーリエ差分法による可視化及び原子位置の精密化は難しい。キチンは水素結合に関わる官能基として、水酸基に加えアセトアミド基を有しているため、その構造と物性を考える際に水素位置と水素結合様式はより重要になる。特に β キチンは X 線構造解析からの推定により *b* 軸方向に水素結合を持たないことから、結晶性の錯体を形成すると考えられており、正確に水素位置を精密化し水素結合の情報を得ることはその特性解明に重要である。繊維回折での水素位置決定のための手法として中性子線回折法がセルロース等で用いられてきており、解析法もほぼ確立されてきた^{10-12,15-17}。水素は非干渉性散乱が強くバックグラウンド強度を上昇させるため、解析の可否は別としても置換可能な水素を全て重水素化することが望ましい。この手法を発展させ β キチン無水物の水素位置を中性子線フーリエ差分図により直接的に決定し、同時に水素結合様式の決定を行った。

2-2 実験

2-2-1 試料調製

サツマハオリムシ(*Lamellibrachia satuma*)を鹿児島湾深海水深 100 m にて、hyperdolphin(JAMSTEC, JAPAN)を用いて採取した。50~100 nm 幅の結晶サイズを持つ高結晶性 β キチンとタンパク質の複合体からなる棲管を 1N 水酸化ナトリウム処理、及び亜塩素酸処理により精製し、白色の繊維結晶からなる膜を得た。これを 1 mm x 200 μ m x 1 cm 程度の短冊状に切り出し、延伸させながら乾燥させることにより更に高配向性の試料を作製した。それらを 1 mm 径のキャピラリーに隙間なく詰め、160°C で 1 時間オートクレーブ処理することにより、窒素と酸素の水素を重水素化した試料を得た。繊維約 200 本を詰めた 10 本のキャピラリーを約 4 mm x 10 mm x 10 mm になるようにまとめ、中性子測定実験に供した。

2-2-2 中性子線回折実験

Data collection

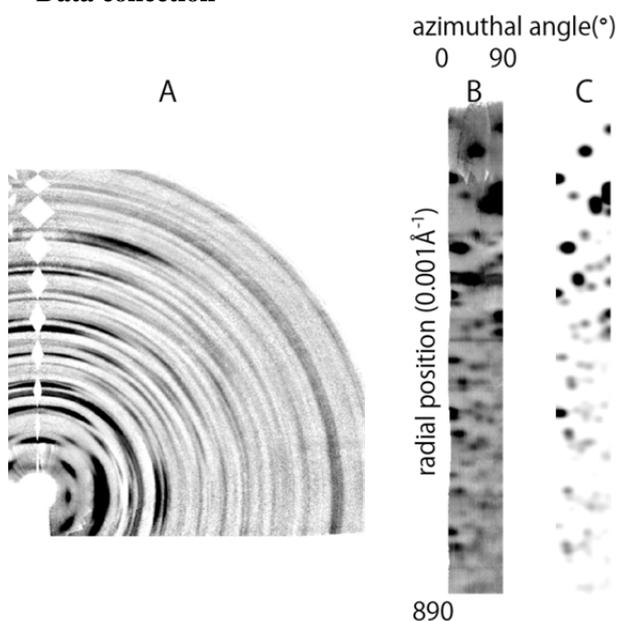


Figure 2-1. Neutron diffraction data after remapping into (A) cylindrically averaged reciprocal space with the meridional and equatorial axes vertical and horizontal respectively (B) polar coordinates with the radial distance in vertical and azimuthal angular coordinates horizontal respectively (C) The fitted intensity distribution. The meridian in A corresponds to 0° in B and equator in A corresponds to the 90° in B. Peaks were observed to the ninth layer line.

Institute Laue-Langevin(Grenoble France)の D19 ラインにて、マルチワイヤー式の検出器を備えた 4 方向回転回折計にて中性子線回折実験を行った。検出器は円筒形状で、256(vertically) x 640(horizontally)のデータ列を出力し、赤道方向の角分解能は 0.19° である。繊維回折データの D19 での計測は、Langan らの手法を用いて行った^{53,54}。D19 は広範囲の合成高分子や天然高分子の研究に用いられてきたラインである⁵⁵⁻⁶²。室温下で 1.4558 \AA の中性子線を 24 時間照射し回折データを得た。Figure 2-1A.に得られたデータを円筒形に平均化して逆空間に再展開した回折図を示す。それぞれの試料位置で記録したデータを D19 のプログラムの DCD19 を用いて空間的な歪みを補正した。検出器の位置による応答変動は、それぞれの位置でのデータフレームを、バナジウム棒の等方性の非干渉性散乱のデータフレームを用いて割ることにより補正した。炭素に付く水素など試料中に残る水素による非干渉性散乱は、回折された中性子線を減衰させ、バックグラウンド散乱の上昇を導く。散乱の減衰の影響はそれぞれの中性子線が通る経路によって異なるため、その評価と吸収補正には試料の形状の正確な把握が必要である。繊維回折実験では繊維結晶を充填したキャピラリーを用いるため、正確な試料の状態を完全に定義することは難しく、回折された中性子線が実際に通る経路は不明であるため、標準的な吸収補正計算を行うことはできない。本研究では、バックグラウンドの非干渉性散乱を高レベルに見積もり、吸収補正を行うとバックグラウンドは平滑になるという作業仮説を用いて補正を行った。それぞれのデータフレームを、二次元スプライン関数によって概算したバックグラウンドで割り、最尤法によってピークとノイズを決定した。

得られたデータを、Figure 2-1B.に示すように 91 列 (方位角 1° 刻み) x 890 要素 (放射方向長 \AA^{-1}) の極座標へと変換した。それぞれの回折の強度プロファイルは方位角方向の c 軸の配向関数と、放射方向のガウス関数に従う拡がりから計算を行った。その強度を測定データに合致するように、線形最小二乗法を扱うことのできるソフトウェアパッケージ LAPACK 中の分割統治法の特異値分解により解を与える DGELSD プログラムを用いて、線形最小二乗法の最小ノルム解として与えた。このようにして、シリンダー状に平均化した逆空間における、互いに近接したいくつかの回折による強度スポットを、寄与する回折強度へと一様に分配した。得られたミラー指数に対応する強度データは 'crude intensity list'

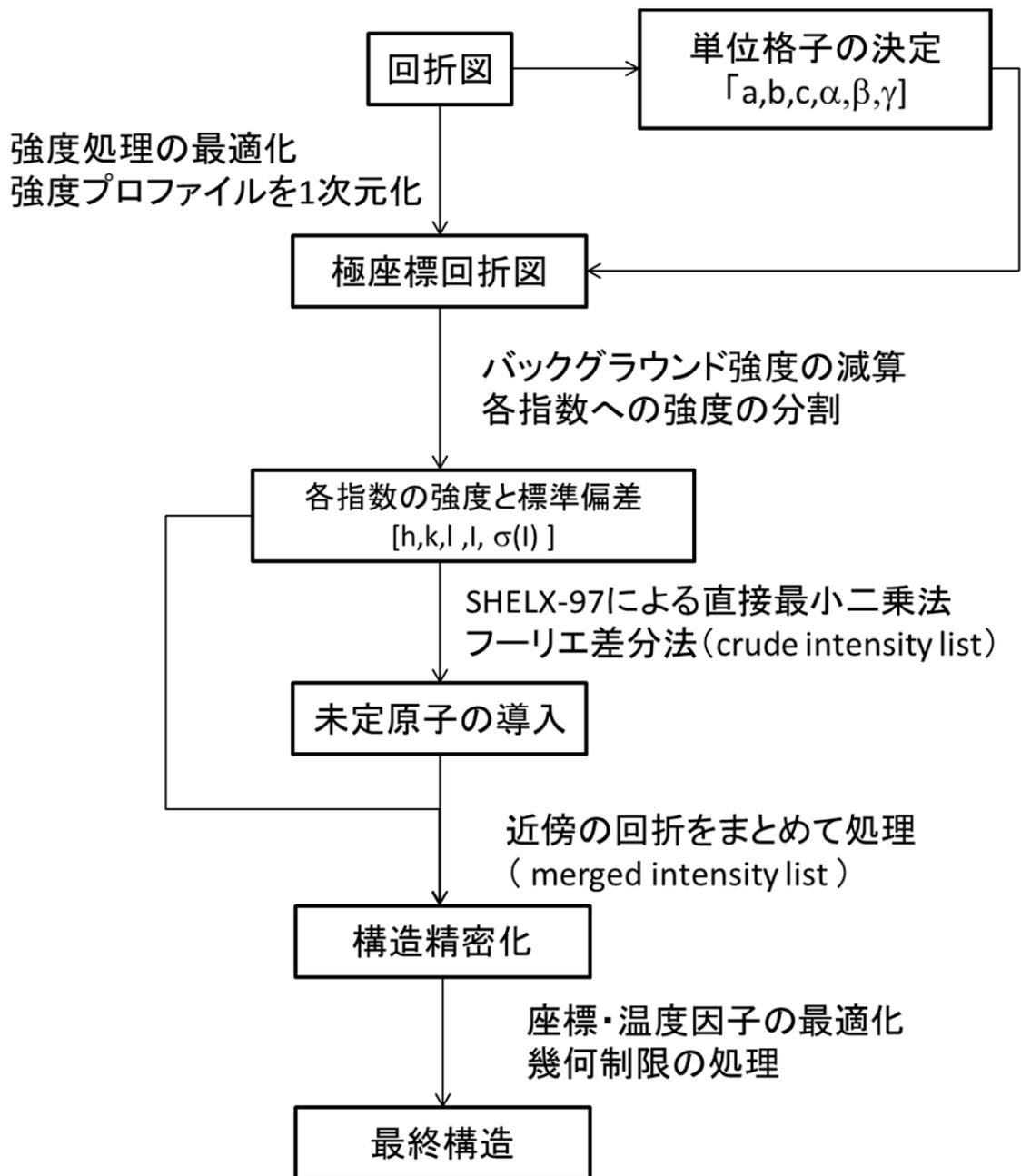


Figure 2-2. The scheme of peak fitting and structure analysis of fiber diffraction.

としてフーリエ差分図作製用に用い、また同層線状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構造精密化用に用いた。強度抽出から構造解析への流れを Figure 2-2. に示す。

2-2-3 構造解析

構造解析は構造計算の最小二乗法のソフトである、SHELX-97¹⁴ を繊維回折に適用する手法⁹を用いて行った。キチン骨格の位相モデルには、今年発表されたβキチン無水物の X 線構造を用いた⁴⁰。重水素化した酸素原子、窒素原子に付く水素原子を構造モデルから外し、それ以外の原子の座標及び温度因子は X 線モデルで固定し、測定の構造因子と計算の構造因子を調節するスケール因子をパラメータとした。フーリエ変換図中に重水素原子を可視化するため、回折データとして”crude intensity list”(HKLF 4)を用いて、1.35 Å までの強度の標準偏差に対して十分な強度を持つ $F_o > 4\sigma(F_o)$ の 109 個の回折を用いて計算を行った。

これまでのセルロース中性子解析では、回折の強度が強く重なりが少ない子午線近傍の回折を中心に用いてフーリエ差分図の作成を行ってきた^{10-12,15}。そのためフーリエ差分図は全体の密度を反映させるよりも重水素位置の発見を目指しており、繊維方向へ広がった図が得られる。今回強度の取り扱いに改善を加えたため、より骨格全体を反映することを期待し全体の測定強度を用いたフーリエ差分図の作製を試みたが失敗した。キチンは自由度の大きいアセトアミド基を持つため、X 線位相を用いた初期計算強度と中性子回折データから得られる測定強度の誤差が大きくなることも一つの原因であろう。この際測定強度が過小に評価されている傾向がスケール因子（測定強度と計算強度を調節する因子）に見られたため、非常に微弱な測定強度を持つ指数の回折（測定強度が 10 以下）を計算から除外した。これにより計算に用いる回折の数は 88 個まで減少し、フーリエ差分図中に重水素原子を可視化することができ、また全体の骨格密度をある程度反映することができた。

*Cool*⁶³ 及び *Raster3D*⁶⁴ を用いて作成したフーリエ差分図を Figure 2-3. に示す。フーリエ変換の振幅として $F_o - F_c$ を用いた図と、 $2mF_o - F_c$ (m は評価指数)を用いた σ_A 図を示している。これらの図中重水素として妥当な位置に、O6、N2 に対してピークが一つずつ確認され、O3 の重水素に対応するピークは二つ確認された。確認されたピーク位置に対して DO3、DO6、DN2 の座標を構造計算に順次導入した。この際 O-D と N-D の結合長は 0.98 Å に C-

O-D の結合角は 110° を中心に、SHELX の DFIX 及び DANG オプションを用いて制限をかけた。また DN2 の位置は N2,C2,C7 と同一平面に来るように FLAT オプションを用いて制限をかけた。座標を導入するごとにフーリエ図作成を行い、座標の妥当性の確認も行った。O3 周りの二つの座標に関して Figure 2-3dA の座標の場合、O3 から O5 への分子内水素結合を取れるため先に導入した。しかし最終的に計算したフーリエ差分図 (Figure 2-3d.) でも B の位置に属するピークは確認された。

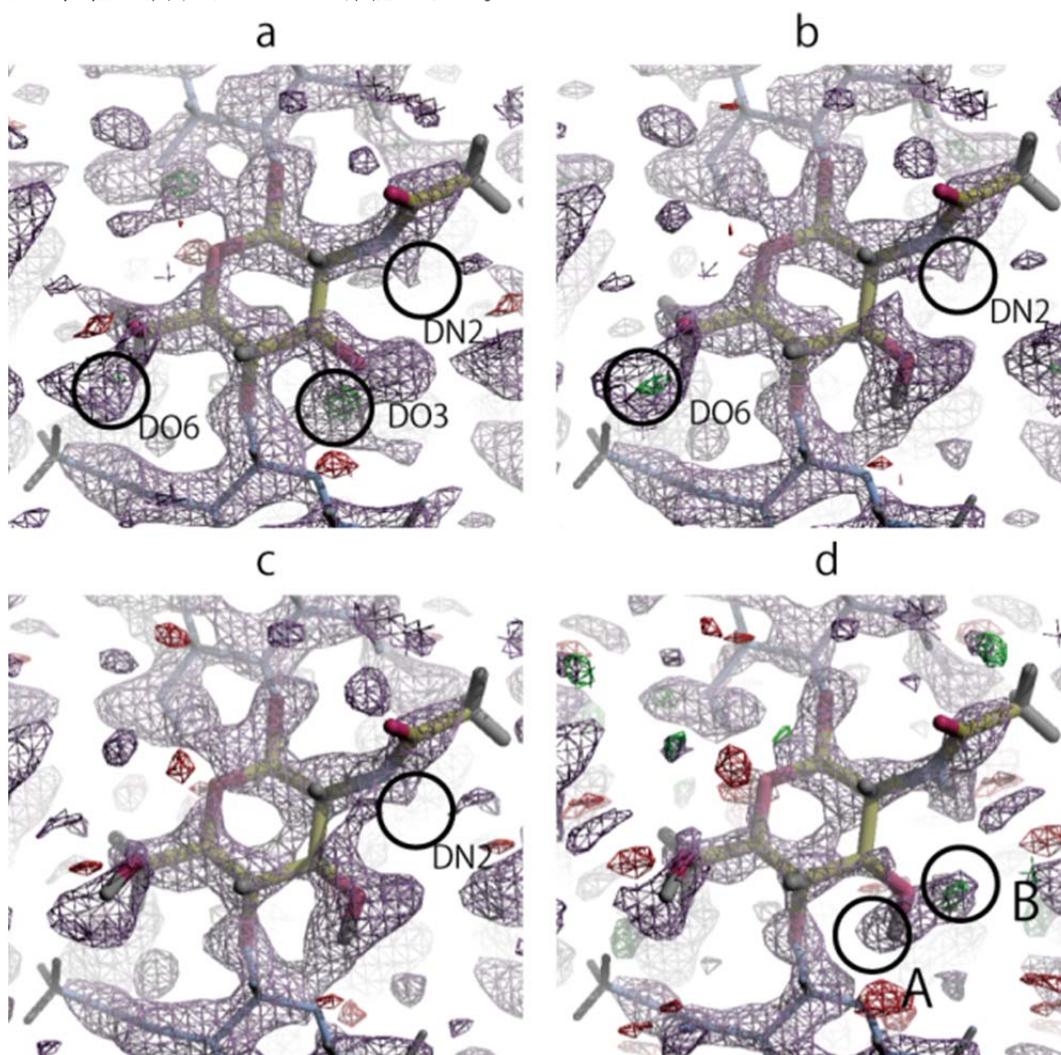


Figure 2-3. Sections through the σ_A map (blue wire) and the Fo-Fc omit map of anhydrous β -chitin with no deuterium added (a) and then with DO3 (b), DO6 (c), and DN2 (d) added. Green shows positive intensity and red shows negative intensity in the Fo-Fc omit map. A density peak still exists after adding all deuterium atoms at the position labeled B in (d).

こうして取りうる座標を 4 個 (O3:2, O6:1, N2:1) に限定した後、”regrouped intensity list” の 1.5 Å までの 63 個の回折を用いて、構造精密化を行った。まず O3 に対して二つあるピークを用いて、それぞれの位置に占有率 1 で座標導入した構造と、二つの位置の合計占有率が 1 になるように計算した構造の比較を行った。構造は次式に示す信頼度因子 R1 にて評価した。

$$R1 = \frac{\sum (|Fo| - |Fc|)}{\sum |Fo|} \quad : \quad Fo > 4\sigma$$

それぞれの信頼度因子は $R1(A) = 0.253$, $R1(B) = 0.282$, $R1(A-B) = 0.262$ となり、A のみの構造が計算のパラメータ数に対して最も信頼度が高い結果となった。A を用いた構造は”crude intensity list”の構造からやや変化しており、構造の確認のため重水素原子を外して、一つずつ導入した際の信頼度因子の減少を確認した。重水素を含まない構造の信頼度因子、及び DN2, DO3, DO6 を順次導入した信頼度因子は $R1_{(no)} = 0.300$, $R1_{(DN2)} = 0.289$, $R1_{(DN2,DO3)} = 0.264$, $R1_{(all)} = 0.253$ となり、重水素の導入により測定構造との誤差が有為に減少していることが確認された。

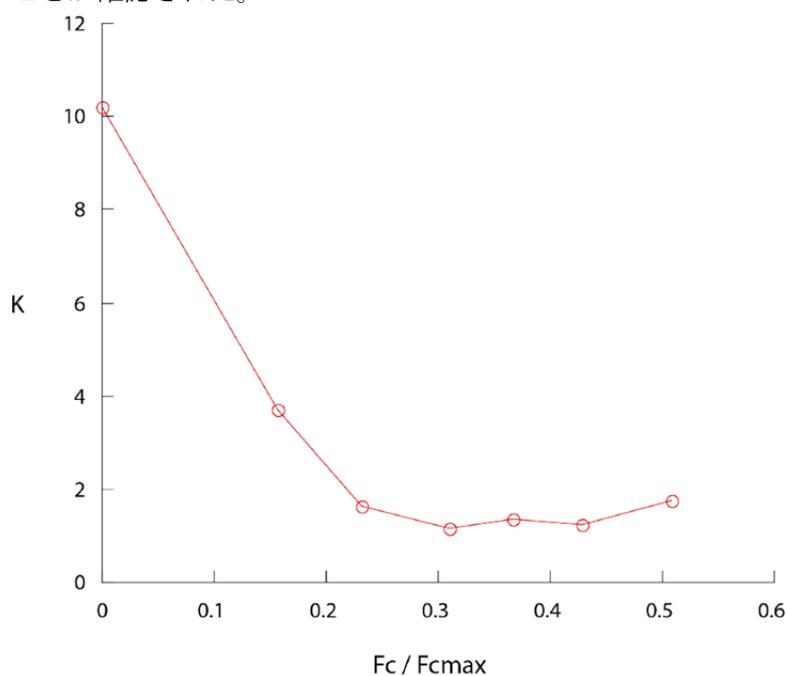


Figure 2-4. K, the mean of Fo^2 over the mean of Fc^2 calculated for reflections grouped in relative structure factor $Fc / Fcmax$.

この構造から分解能が 1.11 Å までの 110 個の回折点を用いて、個別の等方性温度因子をパラメータに加えて構造計算を行った所、構造はほぼ変わらず信頼度因子が $R1 = 0.323$ となった。最後に Langan らの手法⁹にならって、バックグラウンドに対する相対構造因子(F_c/F_{cmax})が 0.2 よりも小さい回折(Figure 2-4.)を計算から除外したところ、DO6 の位置がやや変化し信頼度因子は $R1 = 0.256$ となった。この構造をβキチン無水物の最終構造として提示する(Figure 2-4.)。

2-3 考察

Hydrogen bond

Table 2-1. Hydrogen bonding geometry.

Donor	Acceptor	D...A distance(Å)	Do...A distance(Å)	Do-D...A angle(°)	acceptor residue
N2D	O7	1.94	2.73	139	1+x,y,z
O3D	O5	1.77	2.73	171	-x,-y,-1/2+z
O3D	O1	2.47	2.95	110	-x,-y,-1/2+z
O6D	O7	2.09	2.99	149	-1-x,-y,-1/2+z
C8HA	O3	2.52	3.32	141	-1-x,-1-y, -1/2+z
C8HB	O6	2.48	3.36	153	x, -1+y, z
C2H	O7	2.39	2.87	109	
C4H	O6	2.43	2.82	103	

中性子繊維回折により直接的に決定した水素結合様式を Table 2-1 と Figure 2-5a に示す。この水素結合様式はこれまでの高分解能X線構造解析⁴⁰で推定されたものとはほぼ一致している。水素結合様式は O3-D...O5 の分子内水素結合、O6-D...O7、N2-D...O7 の a 軸方向分子間水素結合からなり、全ての水素結合は孤立した水素結合である。単純に水素結合の結合長と結合角の公式から算出すると O3-D...O1 の分子内水素結合も存在し得るが、O1 の孤立電子対の位置を考えると O3-D...O5 に付随的な非常に弱い水素結合である。セルロース I_Bやセルロース III_I、メチルセロビオシドなどに見られるような連続的水素結合¹⁰はβキチン無水物には存在しない。βキチン無水物でアクセプターとなるのは、カルボニルの酸素である O7 と環中の酸素である O5 であるためである。3 章で詳しく考察するが、連続的水素結合は孤立的水素結合に対して結晶の安定化に大きく寄与するとされる。二つの分子間

水素結合は疎水性相互作用で結びついた *a* 軸方向の構造を安定化している。Blackwell の構造の時から述べられてきたように *b* 軸方向の強い水素結合は存在せず、C8-H...O6 と C8-H...O3 間の弱い水素結合のみがシート間を補助する力として働いている。単純な浸漬による錯体形成の原因は、この水素結合様式であると確定できる。

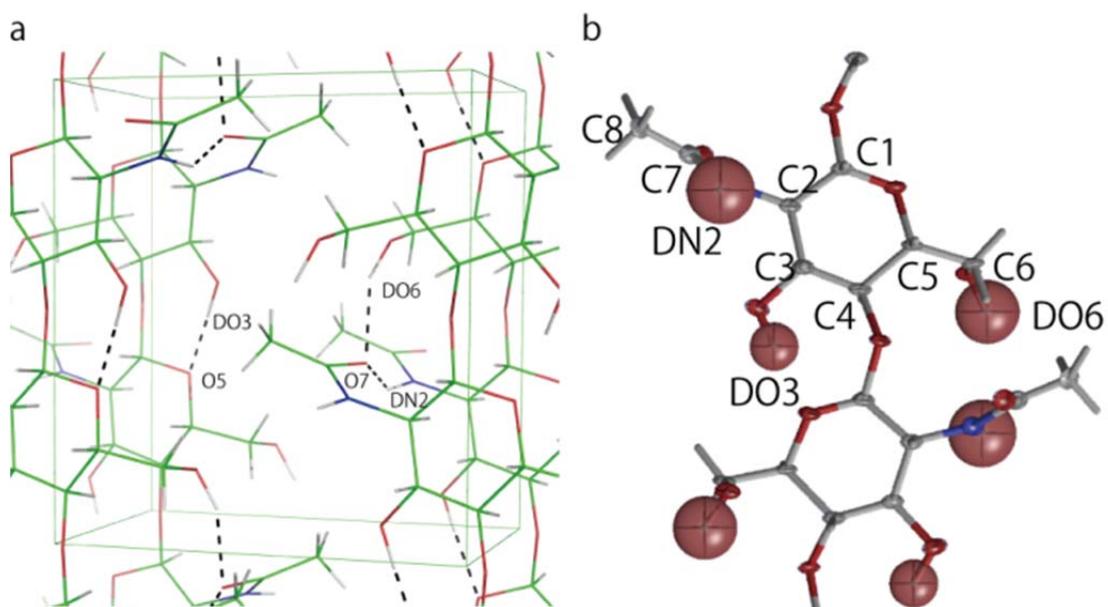


Figure 2-5. Final hydrogen bonding model of anhydrous β -chitin (a) and isotropic temperature factors of deuterium atoms (b). The geometry of hydrogen bond is listed in table 2-1.

Intensity re-distribution

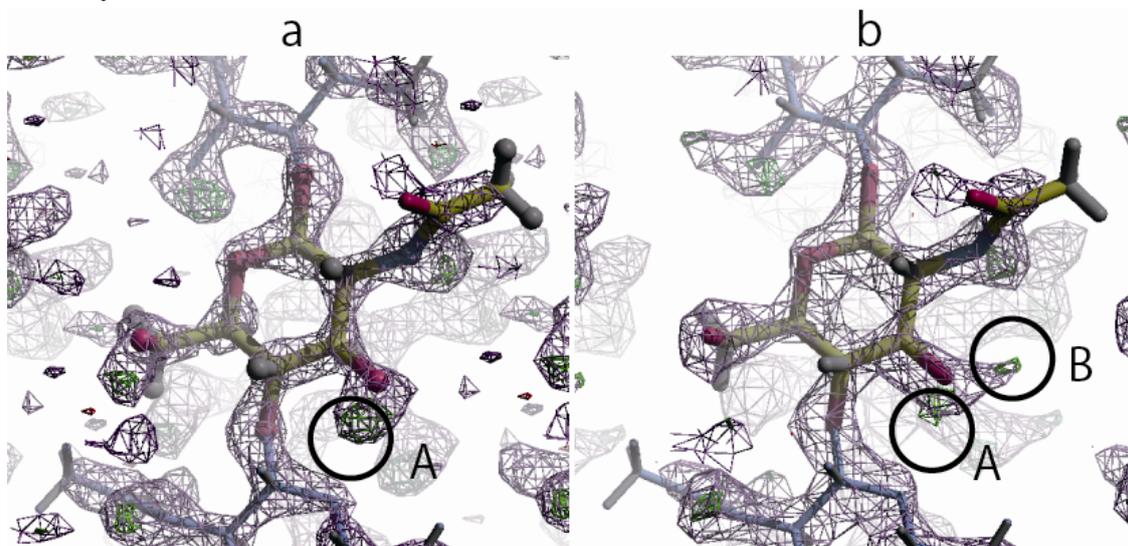


Figure 2-6. Section through the σ_A map (purple wire) and the Fo-Fc omit map after re-distributing the intensity of close reflections proportional to calculated intensities of the final model (a) and alternative model (b).

フーリエ差分図中の O3 周りに二つのピークが出現した理由は、複数のピークが合わさった強度を回折の寄与に応じて分配する際の偏りにあると想定される。その確認及び最終構造の確認のため、最終構造の計算構造因子を用いて重なり合った回折の測定強度の再分配を試みた。結晶サイズからの回折の重なりを考慮し、繊維垂直方向 0.07 Å の距離での、強度の合成及び再分配を行った。Figure 2-6.に結果のフーリエ差分図を示す。DO3 を最終構造である A の位置で再分配を行うと、B の位置に属するピークは消失し、また他の重水素のピーク位置も明確に確認された。一方 B の位置で再分配を行った所、A の位置にピークを確認することができ、また DO6 のピークが確認されないことを代表に全体的なフーリエ差分図の精度も下がる。これらの結果より、現れていた余分なピークは強度の分配誤差の影響であると結論付けることができた。一般的な中性子繊維回折の精度では、強度の取り扱い次第ではこのような事象が起こりうる可能性は否定できない。今回のβキチンでは一方の位置は水素結合が無くなる場所にあったが、フーリエ差分図により 2 パターンの水素結合様式が想定される場合であっても、慎重な解析が必要とされる。

強度の再分配がフーリエ変換図の作成に有効であることがわかったため、X線構造の非重水素原子の計算強度のみを用いて再分配を行うことを試みたが、X線構造を過大に評価してしまうため、重水素位置の可視化には有効ではなかった。

Thermal displacement parameters

Figure 2-5b に示す精密化された等方性温度因子は、炭素、酸素、窒素原子に比べて非常に大きい値を示した。その値が標準よりも大きく見積もられることは、強度評価の手法に一因がある可能性がある。特に測定した座標から極座標への変換の際、高角の回折で顕著になる本来の回折位置からの若干のずれは、最小二乗計算で回折強度を見積もる時に強度を過小評価させる傾向があるため、その強度は正確性にかける傾向がある。この高角の回折データの正確な評価は繊維回折の強度の取り扱いの現在進行中の課題であるが、この不正確性が全体的に大きな温度因子の要因の一つと考えられる。一方で重水素の温度因子の比を見た場合、DO3 の温度因子が非常に小さい値を示すのは O3-D...O5 が最も直線的で最も短い、強い水素結合であることによる安定性から説明できる。N2-D...O7、O6-D...O7 の水素結合はそれに対するとやや弱いため、大きく見積もられているのであろう。特に O6D はその回転の自由度も合わせて最も不安定であると想定される。O7 は二つのドナーから水素結合を供与されているため、それぞれの水素結合を強める位置に C2N2 周りの回転により移動することにより、水素結合の安定性を下げる可能性も示唆される。この不安定性が DN2 と DO6 の温度因子の大きさの一つの要因となりうる。

2-4 結論

β キチン無水物の水素結合様式を中性子線回折法を用いることにより、フーリエ差分図を用いて視覚化した上で直接的に決定した。主な水素結合は O3-H...O5 の強い分子内水素結合と、O6-H...O7、N2-H...O7 のやや弱い二つの分子間水素結合である。加えて O3-H...O1 の水素結合も計算上は存在する。セルロース結晶多形で見られることのある連続的水素結合様式は存在せず、水素結合を止めるアクセプターであるエーテル及びカルボニル酸素による、孤立した水素結合様式となった。*b* 軸方向の強い水素結合は存在せず二つの弱い水素結合のみであり、結晶性錯体が形成される要因として証明された。

最後にこの研究はキチンにおける初めての中性子線繊維回折解析である。中性子線解析が、キチンにおけるその他の結晶形や結晶錯体でも水素結合様式を決定するための強力な手法であることを示すことができた。

3 β キチン二水和物の高分解能 X 線及び中性子線解析による固体構造解析並びに水素結合様式の決定

3-1 緒言

2章で証明されたように、 β キチンは b 軸方向には強い水素結合を持たず、 ac 面にアセトアミド基による N2-H...O7、水酸基による O6-H...O7 の分子間水素結合と疎水性相互作用により形成されたシート構造が堆積した構造を取る。そのため相互作用の弱いシート間に水、アルコール、アミン等の極性低分子を取り込み結晶性の錯体を形成する⁴⁴⁻⁴⁶。Blackwell は β キチンの構造として、その調製法から数種類の構造を提示している³。精製された β キチンに限れば、明確に確認されている水和構造として、二つの結晶形がある。単位格子パラメータは、繊維方向が約 10.4 Å で、向かい合うピラノース環方向が約 4.8 Å、単斜晶の鈍角が約 97°でほぼ同じであり、現在の単位格子の取り方で b 軸方向の値が約 10 Å, 11 Å と異なっている。単位格子体積から単純に計算したモデルでは、それぞれ一水和物、二水和物とされている。Kobayashi らは相対湿度のコントロールによる β キチンの結晶転移を詳しくモニタリングしている⁴。 β キチンはセルロース水和物の脱水^{51,52}やパラミロンの脱水、吸水⁶⁵の連続的な転移と異なり、急激で段階的な転移機構を示す。 β キチン二水和物は室温で相対湿度約 30%までは安定であるが、無水物や一水和物から二水和物にするためには水に浸漬させることが必要である。一方、一水和物は非常に狭い領域でしか存在せず、二水和物を相対湿度 30%以下の領域で乾燥させた場合や、無水物を相対湿度 80%以上に調湿した場合に得られる。また Saito らは DSC と X 線を用いて β キチンの水中での挙動の調査を行い⁴⁹、熱変化により一水和、二水和、無水の状態を取ることを示している。

生合成や分解、また多くの工業的なプロセスは水系で行われるため、水和物の詳細な構造を明らかにすることは重要なことである。しかし、水和物の構造は実験室レベルの X 線データですら提示されていない。近年高輝度の X 線と、高結晶性、高配向性の試料を用い

て自由度の高い官能基や錯体分子を直接位置決定する手法が繊維結晶でも確立されつつある。これらの手法を用いて β キチン二水和物の構造を明らかにした。

また 2 章と同様に水素結合様式を確定するため、中性子線回折法を用いて水素位置を直接的に決定した。

3-2 X線回折実験

3-2-1 試料調製

2-2-1 と同様に精製し切り出した試料を、100%湿度蒸気中で延伸配向させ測定試料とした。

3-2-2 測定・強度抽出

Data collection

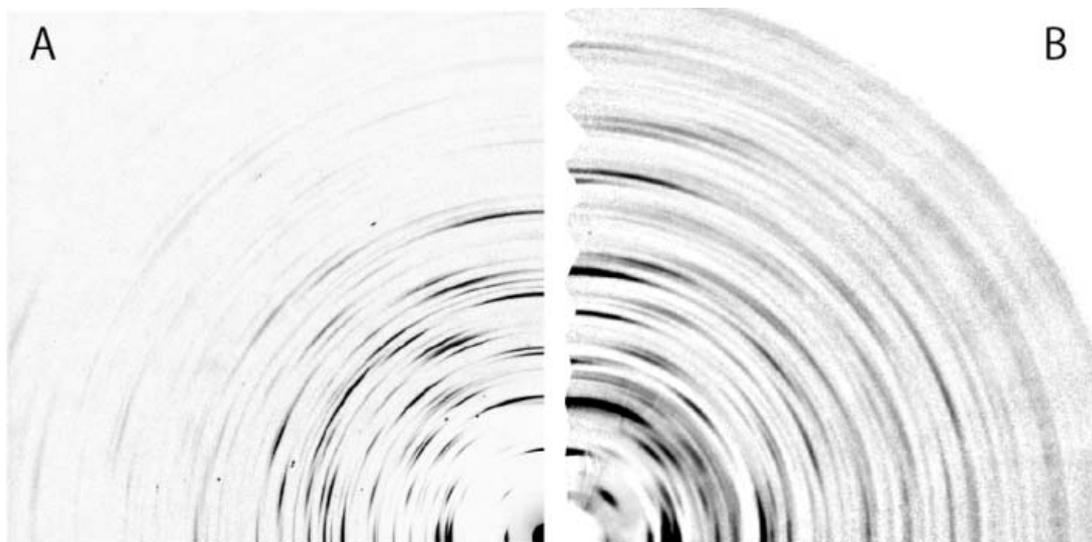


Figure 3-1. X-ray (A) and neutron (B) Fiber diffraction data. The fiber direction (meridian) is vertical and the equator is horizontal. Background scattering was subtracted using a rolling-ball algorithm for the purpose of improved visual presentation.

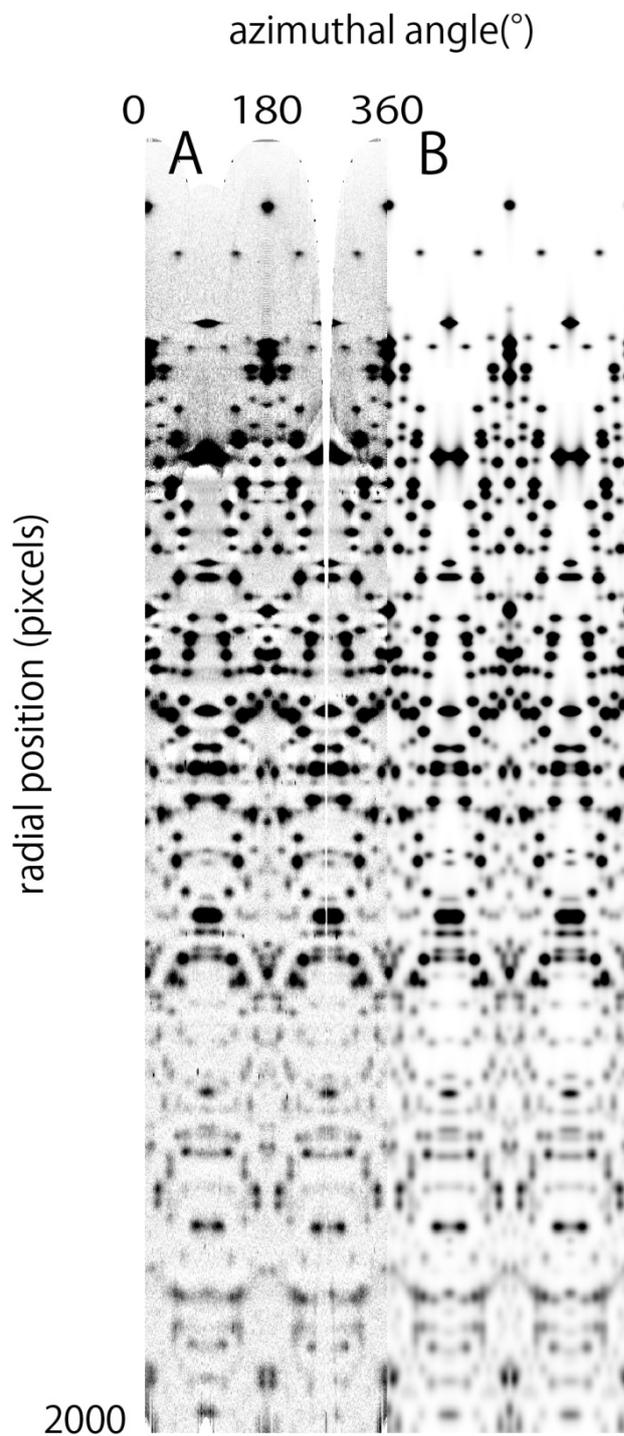


Figure 3-2. X-ray fiber diffraction diagrams transformed into Polar coordinates. A: observed B: fitted.

The origin of azimuthal angle corresponds to horizontal left of fiber pattern in figure 3-1.

調製した試料を SPring-8 (Harima, Japan)、BL38B1 にてシンクロトロン放射光回折実験に供した。試料をコの字型のジグに固定し、ゴニオメーターに取り付け、100%湿度蒸気を humidity generator (Shinyei SRG-1R) を用いて 1 L/min で吹き付けながら波長 1.0 Å のシンクロトロン放射光を繊維方向に対して 180 秒照射した。回折図の記録は平板イメージングプレート (R-Axis V, Rigaku) で行い、170 mm に設定した試料とイメージングプレート間のカメラ長はシリコンパウダーを標準試料として補正した³⁴。Figure 3-1A に測定した X 線回折図を示す。子午線の奇数次の回折 (特に 003) が確認できるものの、その強度は偶数次の子午線の回折に対して非常に微弱である (002 に対して 1%以下) ことから繊維方向 $P2_1$ の対称性をつとした。明確に帰属可能な 37 個の独立した回折点の面間隔を R-AXIS の Display (Rigaku) を用いて測定し、単斜晶で指数付けを行った。単位格子パラメータは最小二乗法により精密化した。面間隔の測定値、及び計算値を Table 3-1. に示す。得られた単位格子パラメータは $a = 4.814 \text{ \AA} (2)$, $b = 11.167 \text{ \AA} (8)$, $c = 10.423 \text{ \AA} (10)$, $\gamma = 96.45^\circ (1)$ となった。偏光補正、バックグラウンド減算、ピークフィットは Nishiyama らの手法に従って行った⁴⁰。

シンクロトロン放射光は線形に偏光しており、入射光に対する散乱角 θ と偏光軸からの放射角 ρ の関数である偏光因子 P は次式によって表される。

$$P = \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} - A \frac{\cos 2\rho \sin^2 2\theta}{2}$$

ここで線形の偏光係数 A は本研究の測定条件では 0.83 であり、ピクセル強度を位置 (θ , ρ) に対して補正することにより、楕円形の対称性を持つバックグラウンドの強度を円形の対称性を持つように全体の強度を補正した。得られた回折図を 360 (方位角 1°刻み) x 2000 (ピクセルサイズ、100 μm) の要素を持つ極座標へと変換した (Figure 3-2A.)。通常の繊維回折図からでは各回折について二次元強度プロファイル ($I(r, \theta)$) を計算しなければならないが、極座標系にすることで 1 次元強度プロファイル ($I(r), I(\theta)$) の計算にすることができるという利点がある。バックグラウンド強度は 50 ピクセルごとの格子点ごとに二次元スプライン関数 (B-spline function) を用いてそれぞれの放射軸に対して評価を行い減算した。得ら

Table 3-1. D-spacing for unit cell determination

h	k	l	Dobs	dcal	dobs - dcal
0	1	0	11.047	11.050	-0.004
1	0	0	4.771	4.788	-0.017
-1	1	0	4.577	4.587	-0.011
1	1	0	4.223	4.222	0.001
-1	2	0	3.852	3.841	0.011
1	2	0	3.446	3.431	0.015
-1	3	0	3.093	3.094	-0.001
0	5	0	2.220	2.210	0.009
0	1	1	7.561	7.582	-0.021
1	0	1	4.343	4.351	-0.008
-1	1	1	4.211	4.199	0.012
1	1	1	3.916	3.913	0.002
-1	2	1	3.609	3.604	0.006
1	2	1	3.268	3.259	0.009
-1	3	1	2.969	2.966	0.003
0	0	2	5.217	5.211	0.006
0	1	2	4.702	4.713	-0.011
0	2	2	3.788	3.791	-0.003
1	0	2	3.519	3.526	-0.007
-1	1	2	3.447	3.443	0.004
-1	2	2	3.098	3.092	0.006
0	3	2	3.017	3.008	0.009
1	2	2	2.874	2.866	0.008
0	1	3	3.317	3.314	0.002
0	2	3	2.944	2.941	0.002
-1	1	3	2.773	2.770	0.003
1	1	3	2.688	2.683	0.005
0	3	3	2.535	2.527	0.007
-1	3	3	2.312	2.311	0.001
-1	4	3	2.040	2.040	0.000
0	0	4	2.607	2.606	0.001
0	1	4	2.537	2.536	0.001
0	2	4	2.360	2.357	0.003
1	0	4	2.291	2.289	0.002
1	1	4	2.221	2.217	0.004
-1	2	4	2.163	2.156	0.007
1	2	4	2.082	2.075	0.007
-1	3	4	1.996	1.993	0.002

れた強度データに合致するように、単位格子から決定される回折点の位置と、方位方向のガウス関数に従う回折点の拡がりや放射軸の配向関数から強度計算を行った。方位方向のガウス関数に従う拡がりや、子午線の回折の方位方向の拡がりやに従うように計算した。回折点の方位方向の強度の拡がりや逆空間でのそれぞれの位置での強度に寄与する回折群の数値積分により計算することができる。それぞれの回折の放射方向ピーク幅(w)はピーク位置に従い次式により算出した。

$$w = w_0 + w_c(d^*, \sigma) / \cos^2 2\theta \cos \theta$$

$$w_c = w_m + w_{eq} \sin \sigma + cd^{*2}$$

ここで w_0 はビームサイズによる拡がりやに対応し、 w_c は結晶サイズと結晶の乱れによる拡がりやに対応する。また w_c は子午線方向のピークの拡がりやに対応する w_m 、赤道方向のピークの拡がりやに対応する w_{eq} 、及び逆空間座標位置 d^{*2} により定義される。繊維方向の結晶サイズは巨大であることから、 w_{eq} には繊維軸と格子位置間の角度 σ の正弦関数を乗している。また c は結晶の乱れに対するパラメータである。これらの関数から、 $360^\circ \times 150$ (pixel) のブロックごとに強度計算を行った。その際、ブロックの末端に位置する回折は近傍の計算外の回折から影響を受けるため除外し、ブロックの内部のみでの計算を行った。このようにして計算された強度での回折図が Figure 3-2B であり、Figure 3-2A の回折図とよく一致していることがわかる。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使い、近傍の回折点をまとめた強度データを”regrouped intensity list”として構造精密化用に用いた。

3-2-3 構造解析

X 線構造解析は構造計算の最小二乗法のソフトである SHELX-97¹⁴ を繊維回折に適用する Langan らの手法⁹に従って行った。今年発表された無水 β キチンの構造⁴⁰を位相モデルとして利用した。結合長、結合角は β -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine dimer trihydrate の平均値

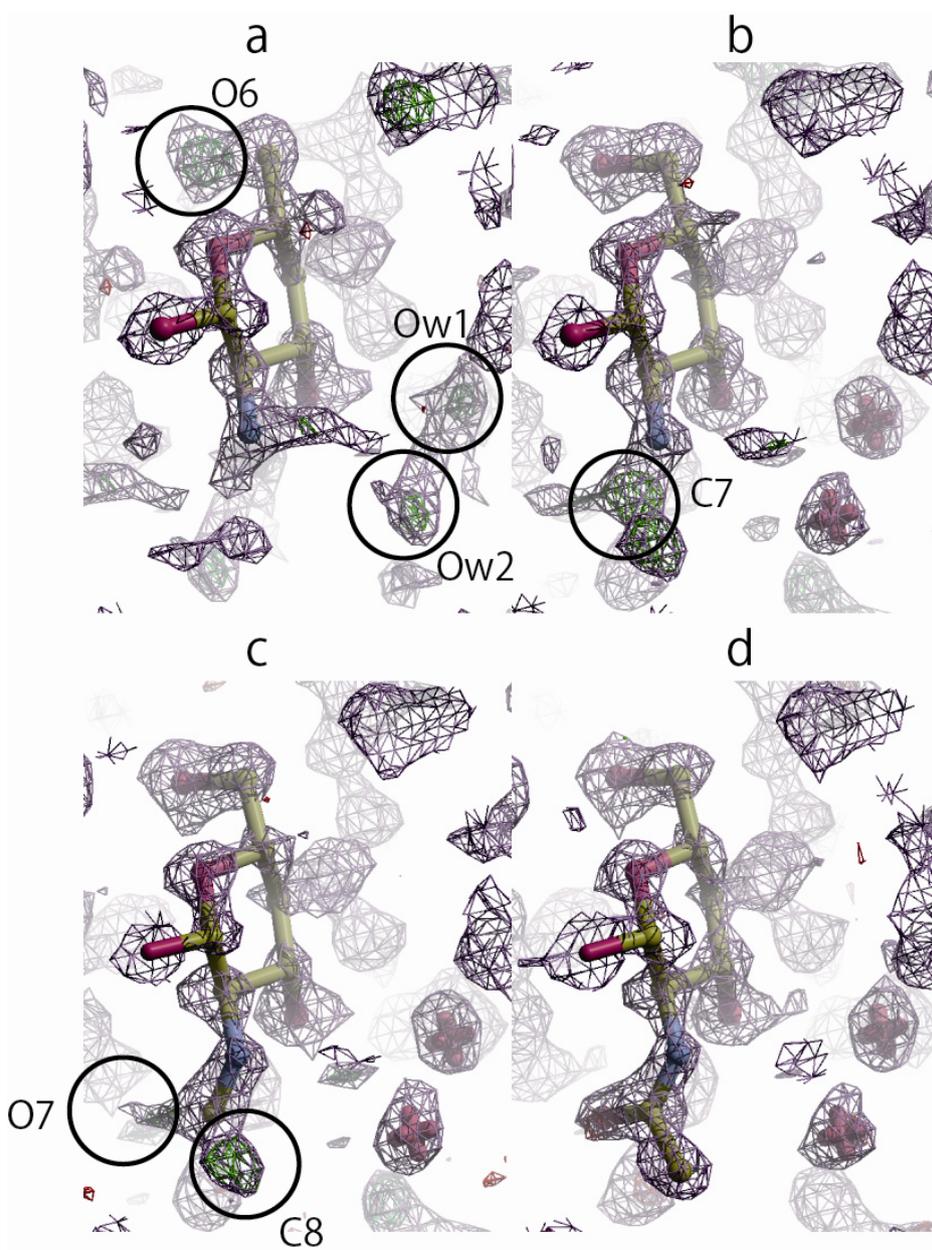


Figure 3-3. Section through the X-ray σ_A map (showing positive density in blue) and the X-ray Fo-Fc omit map (showing positive and negative density in green and red, respectively). (a) Calculated using only the rigid backbone (omitting O6, C7, C8 and O7) as phasing model. Density indicated by circles can be associated with the hydroxymethyl oxygen O6 and two water molecules Ow1 and Ow2. (b) Calculated after introduction of O6 and the water oxygen atoms. Density indicated by circles can be associated with acetamide C7. (c) Calculated after further addition of C7. Density indicated by circles can be associated with C8, and O7. (d) Calculated with the complete molecular model (excluding hydrogen).

を用いて、SHELX の DANG、DFIX オプションを用いて制限した。初めに構造モデルから自由度の高いヒドロキシメチル基の O6 とアセトアミド基の C7、C8、O7 を除き、1.2 Å までの回折を含む”crude intensity list”で構造計算を行った（それぞれの原子番号は Figure 3-12. に示す）。この際子午線の回折強度は強いが、繊維軸に対する配向度による誤差が大きく精密化計算を阻害する要因になるため計算から除外した。構造計算は 163 個の $I > 4\sigma$ の回折点を用い、スケール因子パラメータ、単一の等方性原子変位パラメータと座標をパラメータ（32 個）として 28 個の制限をかけて行った。French と Howley⁶⁶ の定義に従い、単一格子内での還元末端向きによりパラレルアップのモデルとパラレルダウンのモデルをそれぞれ用いた（パラレルアップ：単一格子中 O5 の z 座標が C5 の z 座標より大きい、パラレルダウン：同小さい）。計算構造の信頼性は、測定構造因子（ F_o ）と計算構造因子（ F_c ）から次式に示す信頼度因子 R1 により評価した。

$$R1 = \frac{\sum (|F_o| - |F_c|)}{\sum |F_o|} \quad : \quad F_o > 4\sigma$$

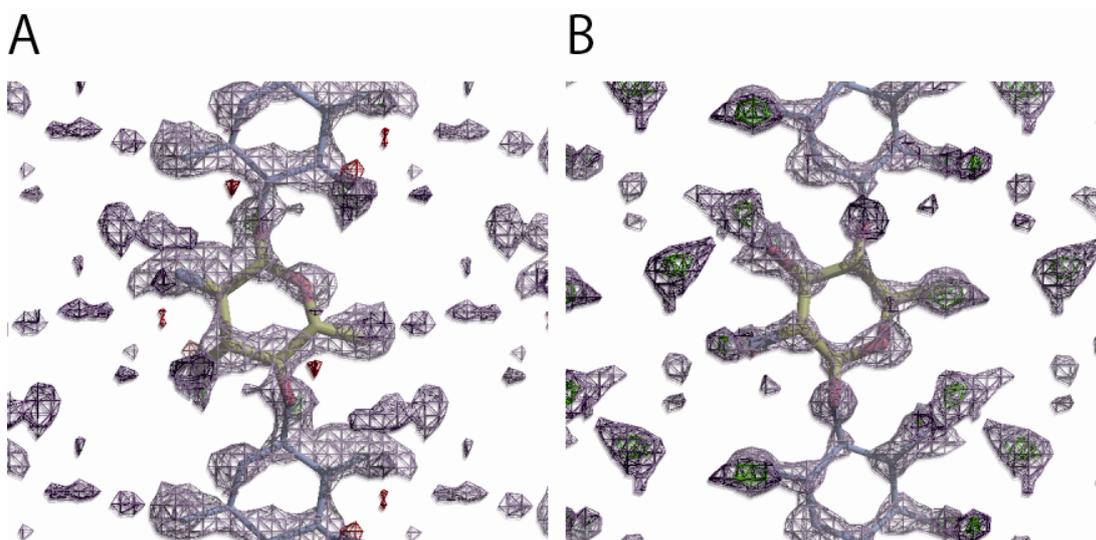


Figure 3-4. Section through the X-ray σ_A map (showing positive density in blue) and the X-ray F_o - F_c omit map (showing positive and negative density in green and red, respectively) seen along ab projection. “Parallel-up” model (A) shows the ambiguity σ_A map and “Parallel-down” model (B) shows the clear σ_A map and positive density in F_o - F_c omit map.

パラレルダウンの座標を用いた精密化では構造の信頼度因子は、 $R1 = 0.4272$ となった。計算された構造因子と、測定した構造因子からのフーリエ差分図の可視化は *Cool*⁶³ と *Raster3D*⁶⁴ を用いて行った。Figure3-3 に Fo-Fc を振幅として用いた (Fo-Fc) 図と、 $2mFo-Fc$ を振幅として用いた (σ_A) 図を示す。パラレルダウンのモデルでは初期計算から二つの水と O6 の酸素原子が (Fo-Fc) 図に明確に確認され、アセトアミド基の C7、C8、O7 も (σ_A) 図に示唆された。一方パラレルアップのモデルでは信頼度因子が $R1 = 0.5279$ と高く、フーリエ差分図に原子を確認することはできなかつたためパラレルダウンのモデルを採用した (Figure 3-4.)。

こうして確認されたフーリエピーク位置に原子を順次導入した。その際原子の導入と同時に結合長と結合角への制限を同時に加えた。信頼度因子の向上は O6 の導入により $R1 = 0.4159$ 、二つの水原子 Ow1・Ow2 の導入により、 $R1 = 0.3359$ 、C7 の導入により $R1 = 0.3097$ となった。C8H₃ (電子数：9) と O7 (電子数：8) はほぼ電子数が等しくなるため、アセトアミド基の一般的な構造と同様に、O7 をアミンの水素に対してトランスの位置に来るように導入し、 $R1 = 0.2647$ となった。またフーリエ差分図 (σ_A) は原子の導入ごとに、より分子鎖の電子密度を正確に反映していくことがわかる。最終的に提示したフーリエ差分図 (Figure 3-3d) では、(Fo-Fc) 図に存在する正のピークは非常に微弱になった。こうして信頼度因子と、フーリエ差分図から導入した原子座標の妥当性が確認された。

詳細な構造精密化は”regrouped intensity list”を用い、1.2 Å までの 97 個の回折点を用いて行い、 $R1 = 0.1153$ となった。測定した回折点は 1.11 Å まで存在したが、分解能を上げた場合でも、結合長や温度因子等高分解能データが影響を与える因子に対する向上効果が見られず、データ数の増加に対する有為な信頼度因子の変化が見られなかつたためこの分解能を選択した。本研究で用いた繊維は極微量であったため、特に強度の低下する高角の回折点でバックグラウンドに対する評価が十分にできなかつたことが原因であると考えられる。SHELX の HFIX オプションを用いて、自由度の少ない炭素原子と窒素原子に付く水素原子を理想的な位置に導入し、 $R1 = 0.1102$ となった。更に等方性温度因子を各原子個別に取り、SIMU オプションで近傍の原子と温度因子を近似させた解析で $R1 = 0.0983$ となった。最後に温度因子に原子振動方向を示す楕円形に近似した異方性温度因子を導入し、SIMU オプ

ションに加えて結合した原子の結合方向の温度因子を近似させる DELU オプションにより制限をかけた解析を行い、 $R1 = 0.0781$ となった。この構造を X 線構造モデルの最終構造として提示する。

3-3 中性子線回折実験

3-3-1 試料調製

2-2-1 と同様に調製した試料を重水中に浸漬させ、キャピラリー中に封入して試料とした。

3-3-2 測定・強度抽出

測定及び強度データの処理は 2-2-2 と同様に行った。測定した中性子線回折データは Figure3-1B に示す。

3-3-3 構造解析

X 線構造モデルを位相モデルとし、初期モデルとして重水素化した窒素原子に付く水素原子と水酸基の水素原子を座標から除いた。その他の原子の座標及び温度因子は X 線構造で固定し、初期パラメータは全体のスケール因子のみを計算した。1.5 Å 分解能で $I > 4\sigma$ の 100 個の回折点を用いて、フーリエ差分図を X 線と同様に作成した。2 章と同様に測定強度が 0 である回折点、及びバックグラウンドに対して相対的な強度の小さい回折は、全体のスケール因子の調整に対する誤差が大きくなるため除外した。この操作により回折点の数は 84 個まで減少し、信頼度因子は $R1 = 0.3446$ となった。Figure 3-5. に中性子回折での σ_A 図と Fo-Fc 図を示す。図中に、N2、O3、Ow1 に対応する重水素の中性子のピークが存在し、O6 に対しては重水素位置として妥当な二つのピークが確認された (Figure 3-5a, AB)。

ここで O6 の重水素位置をどちらに置いた場合でも、水素結合様式を想定できる位置であったため、初期モデルとして O6 の位置により二つのモデルを作成した。精密化計算の際、水酸基の結合長 (O-D)、結合角 (C-O-D) は、それぞれ (0.98 Å, 110°)、水の結合長 (O-D)、結合角 (D-O-D) は (0.97 Å, 106°)⁶⁷ に、SHELX の DANG,DFIX オプションを用いて制限をかけた。DN2 のピーク位置はややアセトアミド平面から外れて存在していたが、

導入原子の位置が確定できないこの段階では、FLAT オプションを用いて平面に制限して構造計算を行った。

まず O6 の重水素位置を A に、DO3、DN2 と同時に導入して精密化計算を行ったところ、信頼度因子は $R1 = 0.3144$ となった。更にこの時同時にフーリエ差分図を合成し直したところ、Ow2 周りにはほぼ水の角度を持つ二つのピークと Ow1 の周りに 1 つのピークが現れた。Ow1 のピーク分布はブロードに広がっていたため、まず Ow2 の周りの二つの座標を導入したところ信頼度因子は $R1 = 0.3024$ となり、同時に Ow1 周りのピークが二つに分離した。すべての原子を導入したところ信頼度因子は $R1 = 0.2713$ となり、この座標群をモデル A として詳細な解析を進めるモデルとした。

次に O6 の重水素位置を B の位置に置き、A と同様に 3 つの原子を導入したところ、 $R1 = 0.3188$ となった。B のモデルの場合二つの水回りのピーク位置はこの段階で明確に確認できたため、これらの 4 つの座標を導入したところ $R1 = 0.2754$ となり、これをモデル B1 として解析モデルの一つとした。B1 では Ow2 は O6 と O3 への水素結合ドナーとして存在している。しかし、B の場合最終的なフーリエ差分図に Ow1 方向に Ow2 の近傍に位置する弱いピークが残存していたため、Ow2 がドナーとして Ow1 と O3 のアクセプターに向かう形に座標を導入したものをモデル B2 ($R1_{B2} = 0.2730$) とし、Ow1 と O6 のアクセプターに向かう形に座標を導入したものをモデル B3 ($R1_{B3} = 0.2723$) として、これらも同時に解析モデルに加えた。繊維中性子線解析のデータ精度を考慮すると、この段階での信頼度因子は誤差範囲に含まれている可能性があるため、これらのモデルは全て詳細な構造解析のモデルとして用いた。

それぞれのモデルを”regrouped intensity list”の 1.5 Å までの回折を用いて、構造計算を行った所、 $R1_A = 0.2899$ 、 $R1_{B1} = 0.2855$ 、 $R1_{B2} = 0.2913$ 、 $R1_{B3} = 0.2863$ となった。ここでアセトアミド基を平面に制限していた FLAT オプションを除いたところ、信頼度因子は全て 0.3 以上の値を示した。そのためアセトアミド基と DN2 が平面に存在している構造が妥当であるとし、解析は FLAT オプションを用いて進めた。

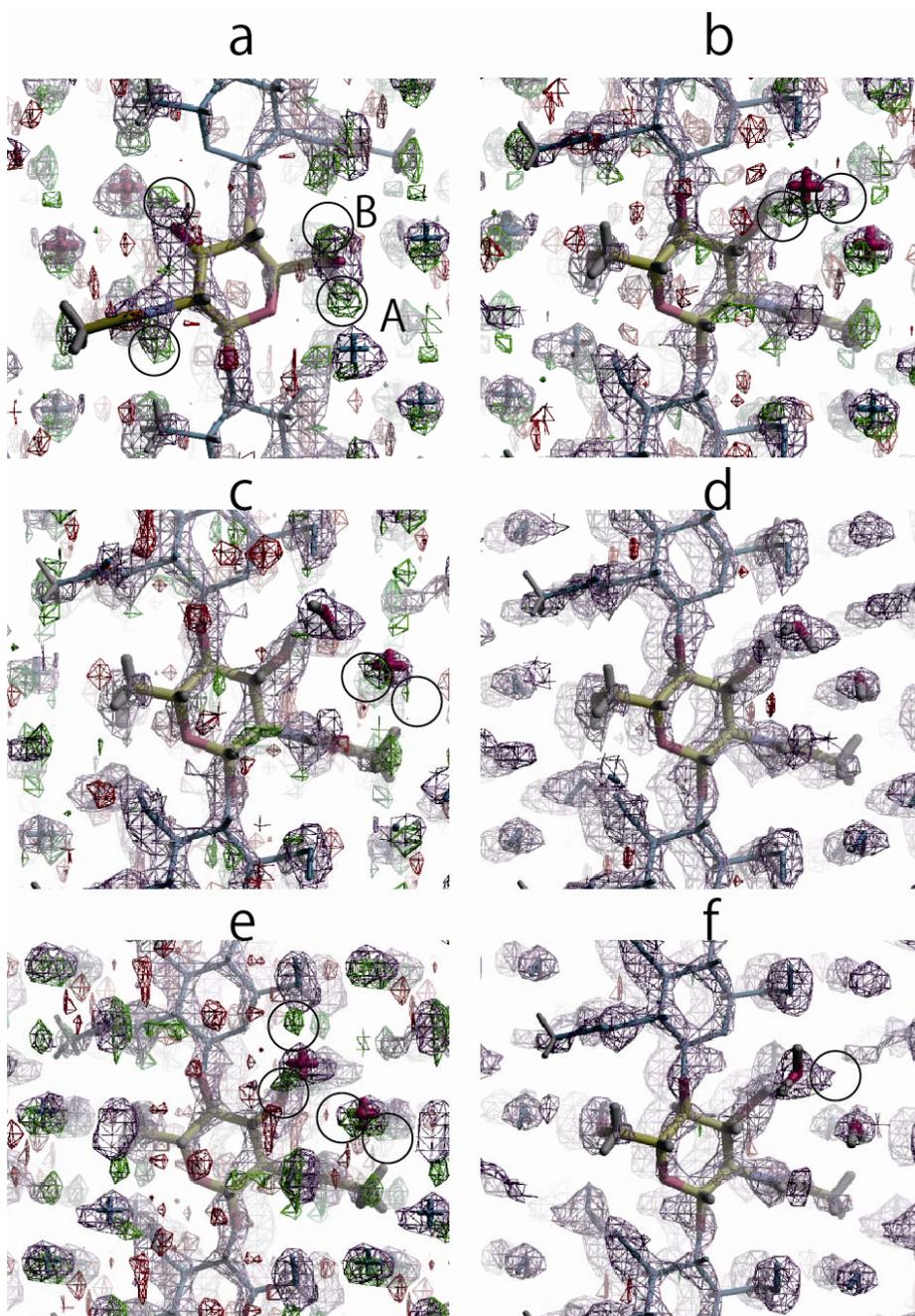


Figure 3-5. Section through the neutron σ_A map (showing positive density in blue) and the Fo-Fc omit map (showing positive and negative density in green and red, respectively) after (a) removing all deuterium atoms (b) adding DO3, DN2 and DO6 at position A (c) further adding the deuterium atoms attached to Ow2 (d) further adding the deuterium atoms attached to Ow1 (e) adding DO3, DN2 and DO6 at position B (f) further adding the deuterium atoms attached Ow1 and Ow2. In (f) small residual peaks can still be seen near Ow2.

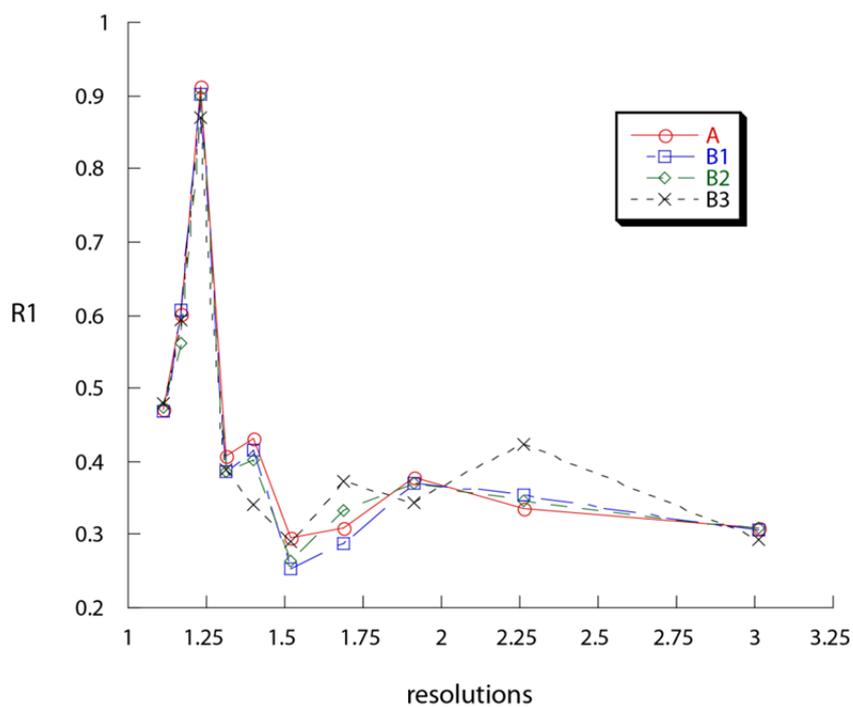


Figure 3-6. R1 value for reflections grouped in the resolution shell.

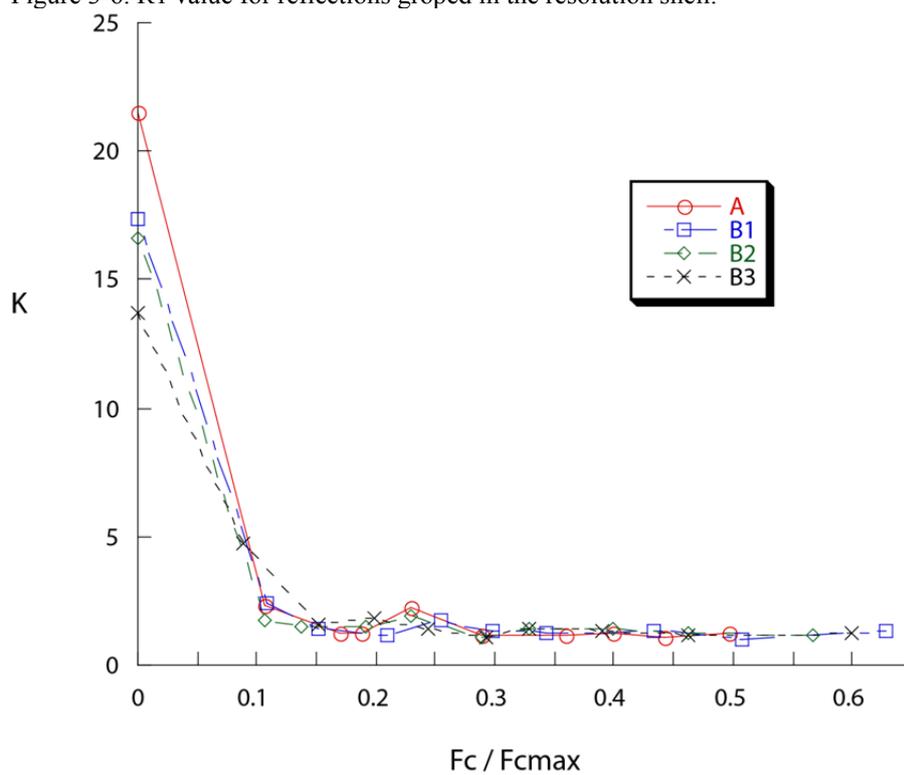


Figure 3-7. K, the mean of F_o2 over the mean of F_c2 calculated for reflections grouped in relative structure factor F_c / F_{cmax} .

1.00 Å までの 138 個の回折を用いて構造計算を行った所、 $R_{1A} = 0.3324$ 、 $R_{1B1} = 0.3346$ 、 $R_{1B2} = 0.3295$ 、 $R_{1B3} = 0.3241$ となった。この際 R_1 の値を分解能別に比較したところ、Figure 3-6.に示すように、1.11 Å から 1.32 Å の間で他の域に比べて非常に大きくなっていてため 1.32Å までの分解能で解析を進めた。それにより回折点の数は 103 個まで減少し、この構造計算での信頼度因子は $R_{1A} = 0.3023$ 、 $R_{1B1} = 0.2998$ 、 $R_{1B2} = 0.3038$ 、 $R_{1B3} = 0.3037$ となった。ここで Langan らの手法⁹に従って、バックグラウンドに対する評価が十分にできていないと想定される、バックグラウンドに対する相対強度が小さい回折 ($F_c / F_{cmax} < 0.15$) の回折を計算から除外した (Figure 3-7.)。この操作によりデータは 94 個の回折まで減少し、それぞれの信頼度因子は、 $R_{1A} = 0.2621$ 、 $R_{1B1}=0.2654$ 、 $R_{1B2} = 0.2658$ 、 $R_{1B3} = 0.2617$ となった。この際、モデル B3 の重水素原子位置は、他のモデルに対して大きくずれた位置となった。

これらのモデルの重水素原子にそれぞれ個別の等方性温度因子を導入し、SHELX の SIMU オプションを用いて制限をかけつつ構造計算を行った所、 $R_{1A} = 0.2591$ 、 $R_{1B1} = 0.2578$ 、 $R_{1B2} = 0.2641$ 、 $R_{1B3} = 0.2604$ となった。この解析条件はこれまでのセルロース結晶多形の構造計算^{10-12,15} とほぼ同条件であるものの、信頼度因子の値は総じて相対的に本研究の物が大きい結果となった。これは結晶の配向性や、水和物であることからバックグラウンドの評価が難しいことなどが要因であろう。加えて電子密度位置を見る X 線回折に対して、中性子線回折では座標位置は核位置によるため、その座標は本質的にやや異なる。そのため構造計算のレベルでは、セルロースに存在しない自由度の高い官能基であるアセトアミド基と水を持つため、その影響はセルロースより大きいと考えられる。ここで、X 線構造解析で利用していた、結合長、結合角の制限を再導入し中性子回折により全ての原子座標をパラメータとして構造計算することを試みた。この際、非重水素原子の異方性温度因子パラメータを中性子解析のレベルで自由にすることは解析の精度から現実的ではない。そのため異方性温度因子の全てのパラメータの比は一定に固定し、これに比率のパラメータを 1 つ加えて解析を行った。この構造計算で主にアセトアミド基とヒドロキシメチル基、また水の位置がやや変化し、構造の信頼度因子は $R_{1A} = 0.2229$ 、 $R_{1B1} = 0.2191$ 、 $R_{1B2} = 0.2419$ 、 $R_{1B3} = 0.2314$ となった。信頼度因子で比較すると、モデル B1 が最も小さいもの

の、Ow2 の座標位置が他のモデルに比べ O6 より非常に大きく移動した。その結果重水素原子と O6 間の距離は 1.236 Å と非常に短くなっており、ファンデルワールス半径から妥当な値ではなく、モデル B1 は構造モデルから外した。モデル B2 と B3 は、幾何学的に排除される異常は観測されなかったが、モデル A に比べて想定される水素結合が減少しており、また Ow1 の一つの重水素は水素結合を持たない形に計算された。一般的に水和物の結晶構造解析で、信頼に値する精度を持つと言われる構造ではフリーの水酸基を持つ構造は、特殊な構造数種しか報告されていない¹⁸。また水素結合を持たない、モデルは熱力学的に不安定である。これらのことからモデル B2、B3 も構造モデルから除外し、モデル A を構造モデルとして採用した。

モデル A は安定した水素結合様式を示したものの、特に Ow1 の周りの水素結合様式が理想的な角度、距離からやや外れていた。そこで Ow1 ドナーと O6 アクセプター、Ow2 ドナーと Ow1 アクセプターの間で、幾何学的に理想的な水素結合となるように結合距離の制限をかけたところ、信頼度因子は $R1 = 0.2250$ となった。信頼度がほぼ同じであったため、理想化したモデルをβキチン二水和物の最終構造として提示する (Figure 3-9.)。

3-4 考察

General crystal information

本研究で精密化された、単位格子パラメータは、 $a = 4.814 \text{ \AA}$, $b = 11.167 \text{ \AA}$, $c = 10.423 \text{ \AA}$, $\gamma = 96.45^\circ$ となり、Blackwell の単位格子 ($a = 4.8 \text{ \AA}$, $b = 11.1 \text{ \AA}$, $c = 10.4 \text{ \AA}$, $\gamma = 97^\circ$)³ や Kobayashi らの単位格子 ($a = 4.80 \text{ \AA}$, $b = 11.15 \text{ \AA}$, $c = 10.44 \text{ \AA}$, $\gamma = 96.39^\circ$)⁴ の値とほぼ同じであった。GlcNac あたり二つの水をフーリエ差分図中に明確に確認することができ、それらの単位格子内での占有率に自由度を与えた場合でもほぼ 1 に計算された。無水βキチンからの単位格子の膨張と水の自由体積からの想定や、重量分析に基づく単位格子中の水の数⁴ を構造解析により明示的に示すことができた。パラレルアップで解析されてきた無水βキチンに対して、βキチン二水和物はパラレルダウンの構造となった。

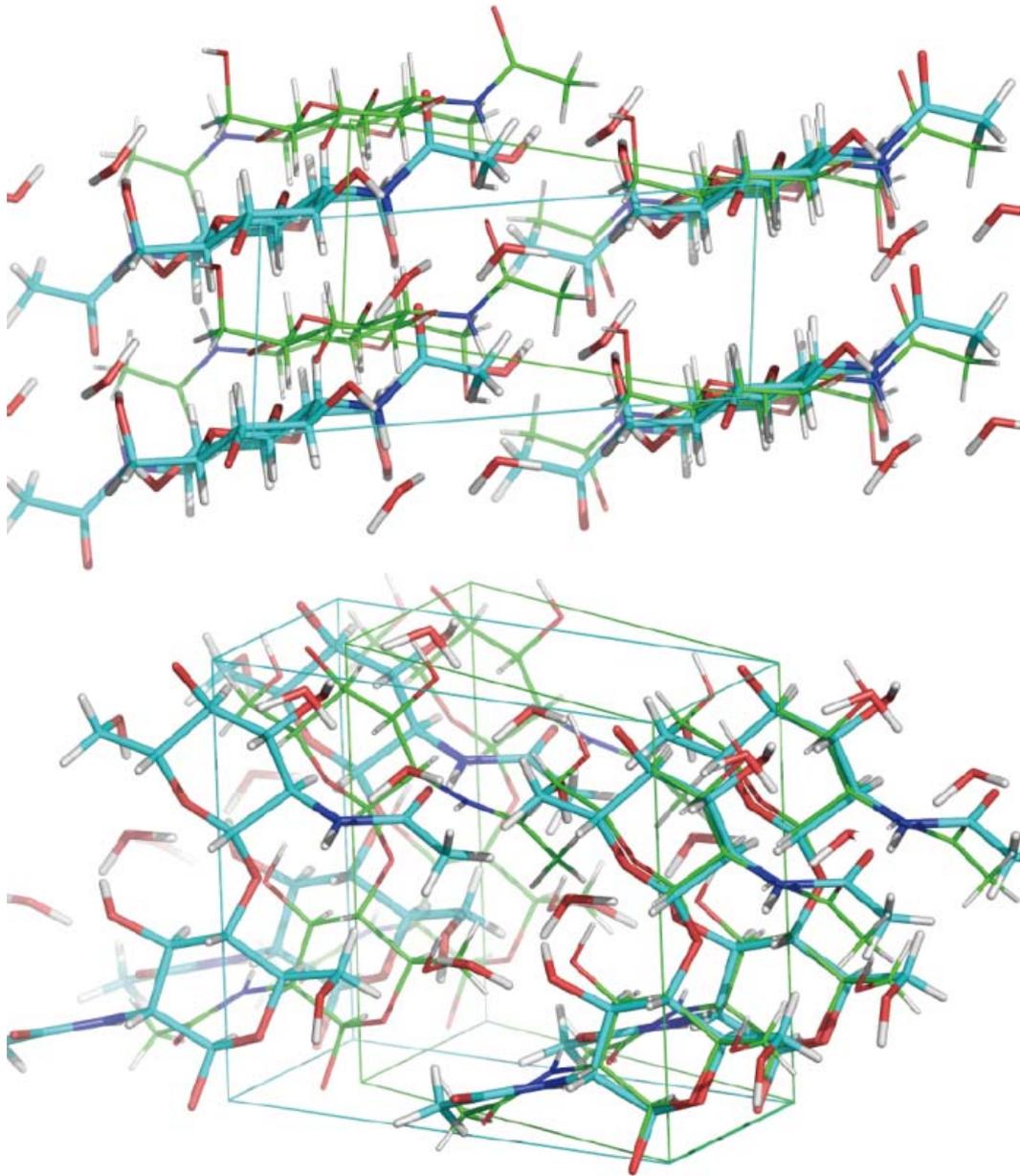


Figure 3-8. Superposition of dihydrate β -chitin (cyan backbone and cell) and anhydrous structure (green backbone and cell).

無水構造と水和構造の転移は、疎水性相互作用とアセトアミド基の水素結合により安定化されたシートの膨潤に伴って起こるが、この際還元末端を揃えた単位格子を取ると、Figure 3-8.に示すようにシート間の角度は約 14° の変異が起こっている。すなわち、単位格子の γ 角（単斜晶の鈍角）は無水と水和でほぼ同じになっているが、その類似性はパッキングシート間の類似性を意味せずやや異なっていると言える。

β キチン二水和物と無水 β キチンは GlcNac2 個を単位格子内に含有しており、その単位格子体積はそれぞれ 556.8 \AA^3 、 459.4 \AA^3 である⁴⁰。無水 β キチンとバルクの水から 2 つの GlcNac と 4 つの水の体積を計算すると、 579 \AA^3 となり、約 4%実験値より大きい値となる。つまり水分子とそれに伴う水和結晶は、ロンドン分散力による密度の増加に伴いエンタルピー的に安定であることが示唆される。

Hydrogen bond and conformational parameters

最終構造の水素結合様式を Figure 3-9. と Table 3-2. に示す。水素結合はソフトウェア PLATON の定義に従い次の 3 つの条件の元に提示した。

- ・ドナーとアクセプターとの間の距離がそれぞれのファンデルワールス半径に 0.5 \AA 足したものよりも短い。
- ・重水素原子とアクセプターとの間の距離がそれぞれのファンデルワールス半径から 0.12 \AA を引いたものよりも短い。
- ・O-D...O の角度が 100° よりも大きい。

無水構造の水素結合と比較すると、水素結合が保たれているのはアセトアミド基間に存在する N2-D...O7 のシート間を保持する分子間水素結合のみである。これまでに β キチンでは錯体形成の際に *ac* 面の水素結合がどの程度保たれるかは不明であったが、水和物の場合アセトアミド基間以外の水素結合は消失した。ほとんどのセルロースの結晶多形や無水 β キチンで存在し、グリコシド結合や繊維方向の環間を安定化している O3-H...O5 の分子内水素結合は存在せず、O3 の水素は Ow2 との水素結合を形成する。水和物の O3-O5 間の距離は 2.90 \AA となっておりセルロース結晶やセルロースの錯体結晶に比べてやや長い値を示す。特に錯体であるセルロース I エチレンジアミン錯体⁶⁸や、二股の水素結合様式を持つセルロース III_I (2.87 \AA)¹² に比べても長くなっている。それに伴い単位格子の繊維軸方向長も長くなっている (cellulose I α : 10.4, Cellulose I β : 10.380, Cellulose III_I: 10.310, cellulose EDA_I: 10.368, anhydrous β -chitin: 10.390, β -chitin dihydrate: 10.423) ことは、水素結合の消失を示唆するデータであろう。

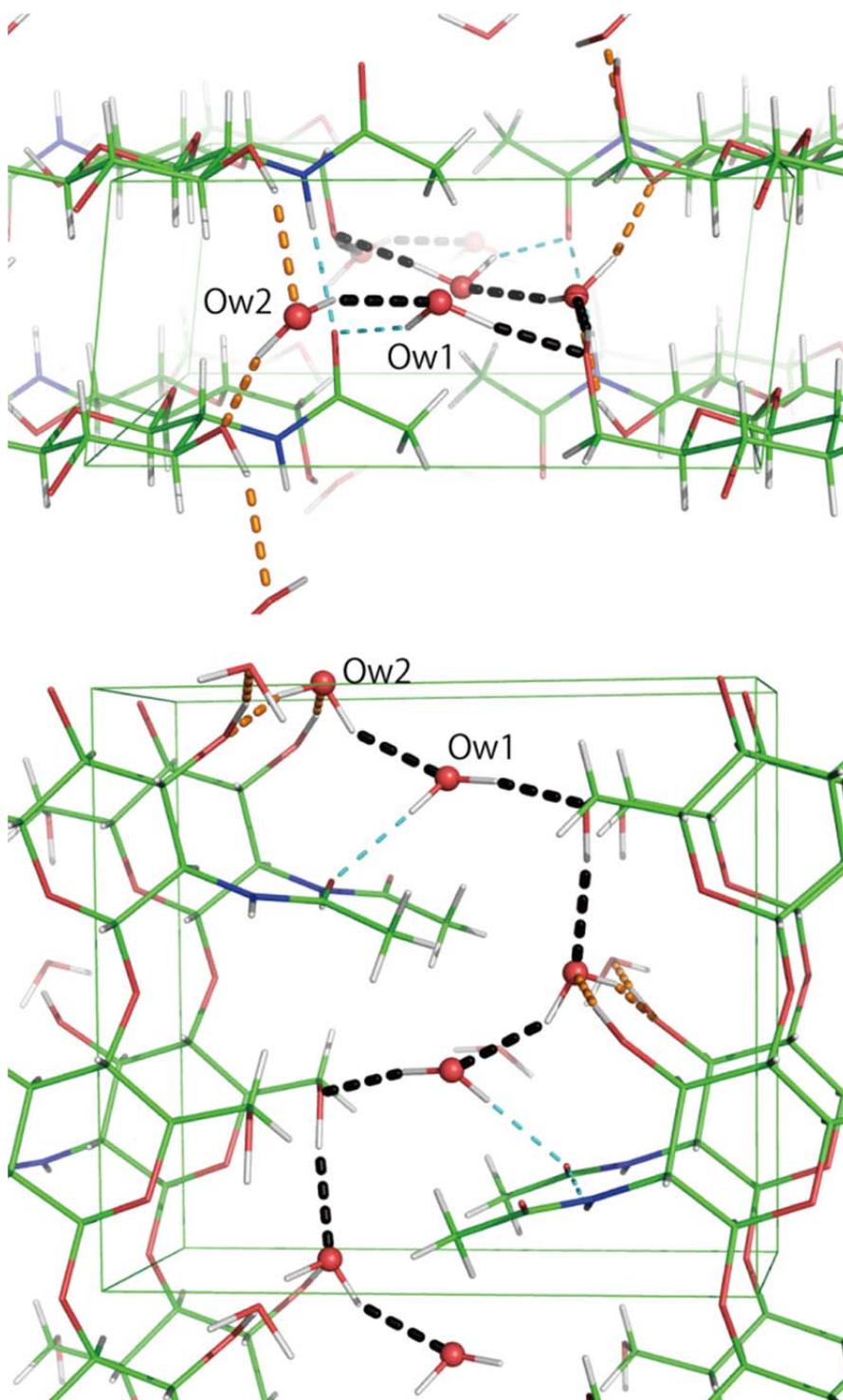


Figure 3-9. Final structure model and hydrogen bond networks of dihydrate β -chitin seen along the chain direction and ab projection.

Table 3-2. Hydrogen bonding geometry.

Donor	Acceptor	D...A distance(Å)	Do...A distance(Å)	Do-D...A angle(°)	D...A-D(°)	acceptor residue
N2	O7	1.96(10)	2.87 (9)	150 (7)	-	x+1,y,z
O3	Ow2	2.21(17)	3.12 (16)	153 (9)	70(Ow1), 120(O3)	x,y,z
O6	Ow2	2.00 (13)	2.98 (11)	176 (11)	137(Ow1), 117(O3)	-x,-y,-1/2+z
Ow1	O7	1.93 (14)	2.85 (13)	159 (14)	-	x+1,y,z
Ow1	O6	1.79 (11)	2.75 (11)	167 (15)	102(Ow2)	x+1,y+1,z
Ow2	O3	1.68 (16)	2.62 (16)	166 (15)	96(Ow2)	x+1,y,z
Ow2	Ow1	1.96 (15)	2.87 (15)	156 (13)	144(O6), 76(7)	x,y,z
C2	O7	2.39	2.78(9)	103	-	x,y,z
C6	O1	2.51	2.88(6)	102	-	-x,-y,1/2+z
C8	Ow1	2.53	3.42 (12)	154	99(O6), 83(O7)	x,y,z

D: deuterium Do: donor A: acceptor

O3-H...O5 の分子内水素結合が無い可能性が示唆されているのは、セルロースでは繊維方向 3 回螺旋になるような特殊な構造である⁶⁹。French と Johnson は信頼性のおけるピラノース系の単分子での構造におけるコンフォメーションパラメータ (τ , ψ) とグリコシド結合についてまとめている⁷⁰。これらの構造は全ての水素位置が直接的にフーリエ差分図から決定されているわけではないが、 $\psi < -130^\circ$ の構造で O3 に水酸基を持つものは全て O3-O5 間に水素結合を持つことが示唆されている。一方 $\psi > -130^\circ$ の構造では環間のねじれにより O3-O5 間の距離が離れることにより分子内水素結合を持たないものが存在する。GlcNac 系の単分子の報告されている構造は非常に少ないが、Mo と Jensen により報告された β -(1-4) linked α -N,N'-diacetylchitobiose (ACHITM10)⁷¹ や Mo により報告された β -(1-4) linked β -N,N'-diacetylchitobiose trihydrate (BCHITT10)⁷² などがある。ACHITM10 では O3-H...O5 の水素結合は存在しないが、 $\psi = -106^\circ$ でありグリコシド結合周りのコンフォメーションから説明できる。BCHITT10 では O3-H...O5 間に水素結合は存在するが、O3 の近傍に位置する O6 との水素結合と二股となって存在しており、O3-H...O5 の水素結合は幾何学的

にやや弱い結合である。 β キチン二水和物の構造では $\psi = -147^\circ$, $\tau = 117^\circ$ であり一般的なセルロース結晶多形や無水 β キチン結晶の構造とほぼ同じであり、グリコシド結合周りの構造からこの水素結合の有無を議論することは難しい。

これまでに明らかにされてきたセルロース結晶多形や無水 β キチン、BCHITT10 の構造と比較した際の β キチン二水和物の大きな相違点は、O3 の近傍に水分子が存在することである。BCHITT10 の場合での O6 の位置の近傍に水分子が存在しており、錯体としての水分子の大きな自由度から O3 と水との間の水素結合が O3 と O5 との間の水素結合よりも優先される可能性が示唆される。

O3-H...O5 の分子内水素結合の消失は、水素結合自体の特徴からも説明することができる。水を含む構造での水素結合強度の統計を取った場合、水分子はアクセプターとして強い水素結合を作る傾向を示し、それに対してエーテル (C-O-C) や水酸基は弱い傾向を示す。O3 の水酸基が O5 ではなく錯体の分子と優先的に水素結合を作るとすると、これまでに報告されたグリコシド結合周りの水素結合様式に新たな見解を加えることができる。初めに、水系溶液でのセルロースオリゴマーの分子動力学によるシミュレーションで O3 が O5 ではなく水との水素結合を優先するという結果を支持する²⁷一つの構造データである。またキチンやセルロースの水系での繊維結晶表面では、O3 の水酸基は O5 ではなく水と水素結合している可能性を示唆し、実際にセルロースの分子動力学シミュレーションではそのようにふるまうという結果が報告されている²⁶。一方でアルカリ溶液でのセルロースの溶解と O3-H...O5 の水素結合の欠如の関連性は報告⁷³されているほど重要ではない可能性も示唆する。Kamide らは、アルカリ溶液でのセルロースの溶解にとって、O3-O5 の水素結合を壊す前処理が特に重要であると述べている⁷³。しかし本研究の結果から見ると、O3 の近傍に水分子が存在する場合、特にキチン骨格ではこの分子内水素結合が優先されていることはないと言える。

またこの結果から、アミン類といった他の溶媒分子との錯体形成した場合、O3 の水酸基は O5 ではなくその分子との水素結合を形成する可能性を示唆する。実際にセルロースとアンモニアの錯体の場合、O3 の水酸基は O5 との単一の水素結合を形成せずアンモニア分

子との水素結合を形成する場合がある¹⁷。

O3-H...O5の水素結合の消失はO3がより自由度の高い溶媒分子のドナーとして優先されることが一番の要因であると想定しているが、更にもう一つの要因も考えられる。JefferyとSaengerは多数の炭水化物の結晶構造中の水素結合様式とその強さについてまとめている¹⁸。結晶サイズでつながる水素結合(InfBond)と単一の水素結合(IsoBond)を比較した場合、InfBondの方が統計的に強くなる傾向を示し、そのことは水素結合の協調作用(cooperative effect)により説明がなされる。O3-DがドナーとしてO5に向かう場合IsoBondになる一方で、水分子に向かう場合は(O3→Ow2→O3')とInfBondを形成することができる。またbc面にも同様に(O6→Ow2→Ow1→O6')の順にInfbondでの水素結合が存在する。このような連続的な水素結合は、キトビオース水和物単結晶⁷²やGlcNAcβNAc一水和物単結晶⁷⁴に見られる。セルロースの場合でもセルロースIやセルロースIII_IでのO2-H...O6、O6-H...O2に見られる。またA-amylose⁷⁵でもその酸素位置からInfBondが示唆されており、多くの繊維結晶でも観測されている。WadaらやChundawatらは、セルロースIII_IでのInfBondによる水素結合の協調作用の結晶の安定性に与える重要性について、結晶構造解析や分子シミュレーションの中で述べている^{12,76}。X線回折データのみでO3-Ow2間の距離(3.12 Å)とO3-O5間の距離(2.90 Å)のみの情報を単純に比較した場合、O3-O5間に水素結合が存在する方が妥当であり、中性子回折により水素位置及び水素結合様式を直接的に決定することが重要であることを示す結果となった。

O3-O5間の水素結合は長い間、β₁(1-4)-glycanの繊維方向への内的な剛性を与える水素結合であると考えられてきた。無水βキチン、βキチン二水和物での弾性率の変化を比較することで、分子内水素結合の影響や繊維の機械的特性の影響を見る上で非常に興味深い結果を与えると思われる。例えば、Tashiroらによる理論計算ではこの水素結合が主鎖方向の軸変形の際グリコシド結合周りの回転を遅らせると想定されており、それゆえ分子鎖への剛直性を与えるものとしているが⁷⁷、それに対する直接的な実験結果が得られると期待される。

Table 3-3. Conformational parameters of anhydrous β -chitin and dihydrate from the X-ray model.

	τ	ω	ω'	ϕ	ψ	χ	χ'	ζ	ζ'	θ
This structure	115(2)	-54(3)	67(3)	-95(2)	-147(2)	127(2)	-109(2)	-1(2)	180(2)	6.6
Anhydride	117	-65	58	-89	-152	95	-136	16	-170	10

τ : glycosidic bond angle, torsion angles ω : O5C5C6O6, ω' : C4C5C6O6, ϕ : O5C1O1C4', ψ : C1O1C4'C5', χ : C1C2N2C7, χ' : C3C2N2C7, ζ : C2N2C7O7, ζ' : C2N2C7C8, θ : Ring puckering parameter

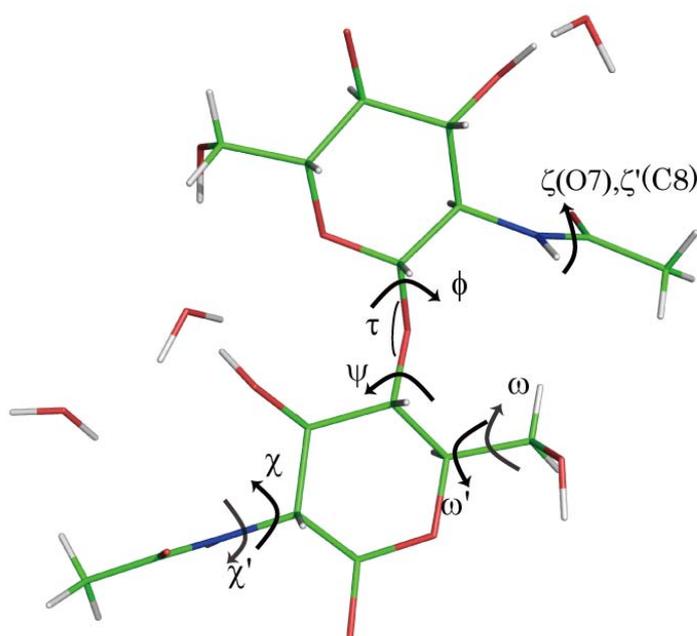


Figure 3-10. Definition of torsion angles and glycosidic angle.

無水物のO6-O7で存在する分子間水素結合は、結合距離、結合角から比較的弱い水素結合であるため、水の挿入によりアセトアミド基と1級水酸基の少しの回転により消失することは、合理的な結果である。C4-C5-C6-O6(ω')のねじれ角は67°となっており (Table 3-3、Figure 3-10.)、無水物のものとほぼ同じggの位置をとる。理想的な60°からのずれは、Ow2との水素結合によるものであろう。Ow2の孤立電子対はほぼ直線的にO6を向いており、それに伴う水素結合がほぼ直線的であるためO6のずれを起こすのであろう。Ow1からの水素結合はO6のコンフォメーションには影響を与えにくい方向となっている。最近の α -glucoseと β -glucoseのNMRの研究では、水系ではgtをメジャーなコンフォメーションとして

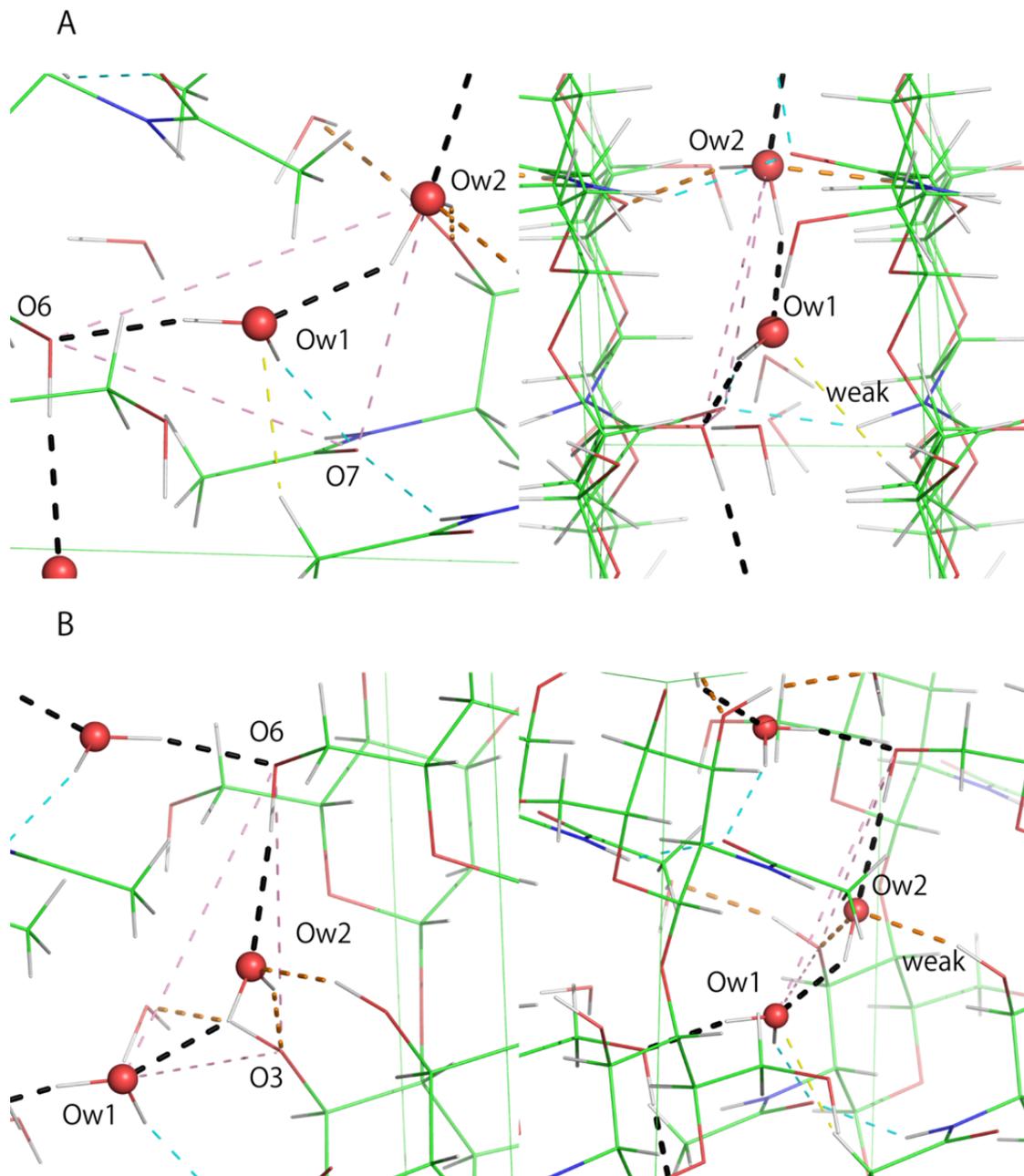


Figure 3-11. The hydrogen bonding arrangement around water molecules Ow1 (A) and Ow2 (B). Water molecules almost lie in the plane presented by pink dash. The weaker hydrogen bond is shown in the right side.

いる⁷⁸。グルコース系結晶では、*gt*となる構造が非常に多いことはこの研究結果と一致している⁷⁰。O6は位置的にはアセトアミド基とは遠いものの、GlcNac系の構造の多くや今回の構造は*gg*のコンフォメーションを取るようであり、その影響が伺える。

アセトアミド基は C2-N2 を軸に約 30°回転した構造になっている。これは O6-D...O7 の水素結合の消失と、Ow1-D...O7 の水素結合の生成に良く一致した結果になっている。また水の存在により自由度が上がったアセトアミド基の H(C2)-C2-N2-DN2-C7 は、ほぼ同一平面内に存在するストレスの無い構造になっている。本研究のモデルは、アセトアミド平面が平面になるように制限をかけているため、アセトアミド基のねじれ角は、0°(ζ)、180°(ζ')となっている。中性子線回折のデータのみで他の水素位置を排除することはできなかったが、こうしたコンフォメーションの妥当性や水素結合エネルギー状態の推測により、提案した水素結合様式が最も妥当であると言える。

水素結合様式全体を見た場合、水和物の水素結合様式は N2-D...O7 以外の全ての水素結合に水が関与している。水を中心とした水素結合様式を Figure 3-11.に示す。二つの水はそれぞれ、3 つのやや強めの水素結合と 1 つのやや弱い水素結合を形成している。それに伴い、Ow2 を中心に見た場合、O6(-x, -y, 0.5+z)、Ow2、O3、Ow1 はほぼ同一平面内に存在し、Ow2 は Ow1 と O3 のドナーとなり、O6 のアクセプターとなる。これに加え前述したように、O3 のアクセプターともなる。Ow1 を中心に見ても、Ow2、Ow1、O7、O6 (1+x, 1+y, z) はほぼ同一平面内に存在し、Ow2 は O6 と O7 のドナーとなり、Ow2 のアクセプターとなる。これに加え、C8H からの弱い水素結合のアクセプターでもある。水を含む結晶の信頼できる構造を調査すると、弱い水素結合を含めて二つのドナー、二つのアクセプターを持つ構造は最も頻出する構造であり、一般的な状態になっていると言える。

水素とアクセプターの距離は、1.89 Å から 2.16 Å の間に位置しており、無水βキチンの構造や、低分子の類似物質に比べてやや長い。この水素結合距離は、どちらかというところ、その他の水和物結晶構造中の水の平均値⁷⁹に近い。二つのドナー二つのアクセプターを持つ水の最も一般的な結晶構造であり、全ての水分子が 1.74 Å の結合長とほぼ 180°の結合角で強固な正四面体状に結びついた Ice Ih⁸⁰に比べると、水回りの水素結合はかなり弱いものになる。一番の要因は、共にアクセプターとしての一つの水素結合が弱い水素結合になって

いることであろう。一方 GlcNAc β NAc 一水和物単結晶⁷⁴等の低分子では、より Ice Ih の構造に近い安定な構造を取っている。N-H...O=C の水素結合も無水物に比べて、距離が長くやや歪んだ形になっている。水素結合の数と比重の高い分子鎖へのパッキングが、個々の水素結合様式の弱さを補っているようである。

Cremer と Pople の定義⁸¹によるピラノース環のコンフォメーションを表す指標であるパッカリングパラメータ θ は、約 6.6°となった。これはほぼ理想的な 4C_1 のコンフォメーションと言える。しかし、結合角の制限はパッカリングパラメータに大きな影響を与える。結合角の制限である DANG オプションを全て除いた場合 θ は11.5°となり、逆に無水物に DANG オプションを与えた場合 θ は5.7°となる。セルロースの結晶多形と、セルロース I-EDA 錯体やセルロース I-ammonia 錯体を比較した際、錯体の方が大きい傾向を示すことから、無水物の方がやや理想的な構造を取っていると想定できる。いずれにしるどちらも理想的 4C_1 のイス型コンフォメーションの範囲に含まれていると言える。

Atomic thermal displacement parameters

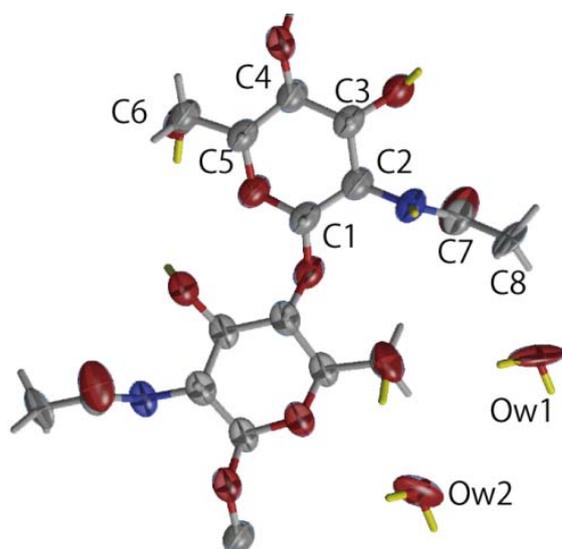


Figure 3-12. The model of anisotropic temperature factors of dihydrate β -chitin (ORTEP plot) at 50% probability level. Ow1 shows the thin and flat shape indicating the oscillation along *b*-axis.

Figure 3-12.にβキチン二水和物の X 線構造解析からの非等方性温度因子を楕円形に近似した ORTEP 図を示す。全体に原子は *a* 軸方向への振動を示したが、アセトアミド基や 1 級水酸基では繊維方向への振動も示唆する。特にアセトアミド基ではアセトアミド平面が C2-N2 を軸として回転することができるため、繊維軸方向の温度因子が大きく示されるのであろう。水の温度因子はキチン骨格よりも大きい値を示し、振動性が高いことが示唆される。特に Ow1 の水の酸素原子は *b* 軸方向へと細長い形を取っており、Ow2 と比較しても原子の変異が大きいと言える。

3-5 結論

β キチン二水和物の水素原子を含む全原子の原子分解能での結晶構造を決定した。想定とは異なり、結晶性 β -1,4 グリカンに存在することが一般的な O3-H...O5 の分子内水素結合は存在しなかった。この要因としては次に上げるようないくつかの要因が想定される。

- ・水分子は、水酸基やエーテルよりも強い水素結合のアクセプターとして働く。
- ・O3 がドナーとして優先して結合するのは、O5 よりも自由度の高い錯体分子である水である。
- ・水分子を経由して水素結合を形成することで、*a* 軸方向に結晶サイズでつながる水素結合のネットワークを形成することができる。

O3-O5 間の距離は 2.90 Å と O3-Ow2 間の距離 3.12 Å よりも短い。中性子線データから直接的に決定するのではなく、X 線データのみから水素結合様式を想定した場合、その距離から考えると O3-O5 間の水素結合を主な水素結合とするという結論を出さざるを得ない。この結果は中性子線回折を用いて直接的に水素位置を決定することの重要性を示している。O3-H...O5 のグリコシド結合に沿う水素結合は、 β -1,4 グリカン鎖に内的な剛性を与える重要な水素結合であると想定されてきた。 β キチン二水和物と無水 β キチンの弾性率の測定を行うことで、 β -1,4 グリカン繊維におけるこの水素結合の機械的特性に与える影響を直接的に確認できると考えられ、様々な研究に知見を与えうる。

また水和物への構造転移を見た場合、錯体が形成する際に分子鎖シートの水素結合は必ずしも保たれない。N2-H...O7 の水素結合は疎水性相互作用と共に保たれると想定されるが、その他の水素結合は錯体分子により詳細な検討が必要とされる。1 級水酸基の O6 は本研究の二つの構造では *gg* のコンフォメーションに保たれており GlcNac 系の構造と類似していたが、水素結合による若干の転移が確認された。錯体分子とその水素結合次第では異なるコンフォメーションを取る可能性もあると言える。

4 総括

- 1 中性子線回折を用いたフーリエ差分法により、 β キチン無水物の水素位置を直接的に決定した。それに伴い、O3-H...O5 の分子内水素結合、O6-H...O7、N2-H...O7 の分子間水素結合を確定することができた。同時にキチンにおいても、中性子線回折法が水素位置を決定する強力な手法であることを示した。また、繊維回折における問題点の一つである、繊維垂直方向の回折の重なりによる、解析の誤差を最終構造の計算強度により再分配することにより、最終構造の確認に用いる手法を提案できた。
- 2 X線回折を用いたフーリエ差分法により、 β キチン二水和物の自由度の高いヒドロキシメチル基及びアセトアミド基の各原子、また二つの水分子の位置を直接的に高精度に決定した。また、それらの全原子を導入し、強度を用いた構造精密化により無水物からの構造変化を確認することができた。ヒドロキシメチル基はほぼ理想的な *gg* のコンフォメーションであった。
- 3 中性子線回折を用いたフーリエ差分法により、 β キチン二水和物の水素位置を決定した。繊維回折の水和物にて、中性子回折により水素位置を決定した例は少ないが、一定以上の測定精度があれば X線と同様に構造決定が可能なことを示した。それに伴い、ほぼ全ての水素結合が水を介して存在した。水回りの水素結合様式は結晶中に存在する水において最も存在の多い二つのドナー・アクセプターを持つ水素結合になることが証明できた。この際多くの β 1,4 グリカンに存在し、グリコシド結合周りの安定性に大きく寄与していると考えられていた O3-H...O5 の分子内水素結合は存在しなかった。

今回 X 線解析と中性子線解析の複合による全座標構造解析をキチンに適用した。重水素原子を見ることは、キチン骨格においても有効であり水和物では重水のものも確認することができた。錯体分子であっても十分な精度があれば完全構造解析が可能であることがわかった。中性子線解析はその強度の弱さから精度を高めることが難しいが、重なり合った回折を適切に評価することにより一定の向上が見られるということは、解析の難しかったこれまでの繊維結晶でもある程度の向上が見られる可能性が示唆される。

キチン無水物の水素位置を含む構造は、X 線解析による推定とほぼ同様の構造であった。ほぼ理想的な O3-O5 の分子内水素結合は β ,1-4 結合を持つ 2 回螺旋の多糖の一般的な構造である。水素結合による繊維方向の剛直性と、向かい合う環方向の疎水性相互作用及び補助する分子間水素結合による安定した分子鎖シートが β キチンの安定性を保たせていると言えよう。一方で分子鎖シート間には水酸基による水素結合が存在していないため、その他の多糖に対してシート間の相互作用は弱い。このことは β キチンの特徴である、単純な浸漬のみによる様々なゲスト分子との錯体形成の要因であると共に、 α キチンに対して種々の反応性が高い要因であろう。

前述した無水物の特徴から、 β キチンの錯体形成ではキチン骨格の構造は無水物と大きく変化せずシート間を拡げる錯体形成挙動が想定されてきた。特に水和物は最も速やかに完全に形成される錯体である。しかし今回の結果では、キチン骨格自体の構造が変化し、特にその水素結合様式は大きく変化した。結晶内部でもゲスト分子のサイズや親和性といった要因により影響を受け、構造が変化するということになる。水による水素結合様式の変化は、水系における β キチンの化学反応性の高さとある程度のある関係を持つと言えよう。逆に言えば溶媒系の適切な選択は β キチンにおいては非常に重要になることが示唆される。一方で結晶の安定化自体には特に重要な分子内水素結合よりも、疎水性相互作用や密度に伴うファンデルワールス力による安定化が優先されているのであろう。

本研究において非常に重要な結果の一つに、セルロース表面やオリゴマーでの分子動力学による推定と β キチン結晶内部における状態が非常に良く一致している点が挙げられる。すなわち β キチンの結晶錯体は種々の溶媒系におけるキチン骨格と溶媒分子の相互作用を

見る上で非常に適したモデル結晶である可能性が示唆される。またそれと同時に種々の錯体系、溶媒系における力学試験、反応性の違いを見ることにより、様々な物性の違いに与える骨格の影響を見ることができると想定される。キチン結晶自体の工業的利用価値は未だ大きいとは言えない現状にあるが、利用価値の高いセルロースやキトサンなどでの表面や溶解系での状態を想定することができる可能性が示唆される。 β キチンは、セルロースの溶剤系である水系や DMSO 系、またセルロースを結晶変態させる EDA 系など様々な分子との錯体形成を可能としており、その多くは構造解析が可能な結晶が得られる。水和物の構造解析を始めとしたこれらの結晶構造解析と MD シミュレーションの融合は、推定の難しかった表面や溶液中での溶媒分子との相互作用を知る上で、非常に重要な結果が得られることを期待している。

References

- (1) 化学薬学のための X線解析入門 平山 令明著 丸善株式会社 [2006]
- (2) Yoshiharu, N.; Shigenori, K.; Masahisa, W.; Takeshi, O. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6395-6397.
- (3) Blackwell, J. *Biopolymers* **1969**, *7*, 281-298.
- (4) Kobayashi, K.; Kimura, S.; Togawa, E.; Wada, M. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *79*, 882-889.
- (5) Smith, P. J. C.; Arnott, S. *Acta Crystallographica Section A* **1978**, *34*, 3-11.
- (6) Okuyama, K.; Noguchi, K.; Hanafusa, Y.; Osawa, K.; Ogawa, K. *International Journal of Biological Macromolecules* **1999**, *26*, 285-293.
- (7) Lertworasirikul, A.; Tsue, S.-ichiro; Noguchi, K.; Okuyama, K.; Ogawa, K. *Carbohydrate Research* **2003**, *338*, 1229-1233.
- (8) Yui, T.; Taki, N.; Sugiyama, J.; Hayashi, S. *International Journal of Biological Macromolecules* **2007**, *40*, 336-344.
- (9) Langan, P.; Nishiyama, Y.; Chanzy, H. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 410-416.
- (10) Nishiyama, Y.; Langan, P.; Chanzy, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9074-9082.
- (11) Nishiyama, Y.; Sugiyama, J.; Chanzy, H.; Langan, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14300-14306.
- (12) Wada, M.; Chanzy, H.; Nishiyama, Y.; Langan, P. *Macromolecules* **2004**, *37*, 8548-8555.
- (13) Nishiyama, Y.; Langan, P.; Wada, M.; Forsyth, V. T. *Acta Crystallographica Section D* **2010**, *66*, 1172-1177.
- (14) Sheldrick, G. M., SHELX-97, a program for the refinement of Single-Crystal Diffr.
- (15) Langan, P.; Nishiyama, Y.; Chanzy, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9940-9946.
- (16) Nishiyama, Y.; Johnson, G. P.; French, A. D.; Forsyth, V. T.; Langan, P. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3133-3140.
- (17) Wada, M.; Nishiyama, Y.; Bellesia, G.; Forsyth, T.; Gnanakaran, S.; Langan, P. *Cellulose*

- 2011**, *18*, 191-206.
- (18) Jeffrey, G. A.; Saenger, W. *Hydrogen bonding in biological structures*; Springer-Verlag, 1994.
- (19) Müller-Dethlefs, K.; Hobza, P. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 143-168.
- (20) Pauling, L. *The nature of the chemical bond*; Cornell University Press, 1940.
- (21) Hobza, P.; Šponer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11802-11808.
- (22) Wada, M.; Nishiyama, Y.; Langan, P. *Macromolecules* **2006**, *39*, 2947-2952.
- (23) Wada, M.; Heux, L.; Nishiyama, Y.; Langan, P. *Biomacromolecules* **2008**, *10*, 302-309.
- (24) Wada, M.; Heux, L.; Nishiyama, Y.; Langan, P. *Cellulose* **2009**, *16*, 943-957.
- (25) Igarashi, K.; Wada, M.; Samejima, M. *FEBS Journal* **2007**, *274*, 1785-1792.
- (26) Chundawat, S. P. S.; Bellesia, G.; Uppugundla, N.; da Costa Sousa, L.; Gao, D.; Cheh, A. M.; Agarwal, U. P.; Bianchetti, C. M.; Phillips, G. N.; Langan, P.; Balan, V.; Gnanakaran, S.; Dale, B. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11163-11174.
- (27) Shen, T.; Langan, P.; French, A. D.; Johnson, G. P.; Gnanakaran, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14786-14794.
- (28) Gonell, H. W. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1926**, *152*, 18-30.
- (29) Meyer, K. H. & Pankow, G. W. (1935). *Helv. Chim. Acta*, *18*, 589-598.
- (30) Lotmar, W.; Picken, L. E. R. *Experientia* **1950**, *6*, 58-59.
- (31) Carlström, D. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **1957**, *3*, 669 -683.
- (32) Diego, C. *Biochimica et Biophysica Acta* **1962**, *59*, 361-364.
- (33) N.E., D. *Biochimica et Biophysica Acta* **1960**, *44*, 416-435.
- (34) Sikorski, P.; Hori, R.; Wada, M. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1100-1105.
- (35) Ogawa, Y.; Kimura, S.; Wada, M.; Kuga, S. *Journal of Structural Biology* **2010**, *171*, 111-116.
- (36) N.E., Dweltz. *Biochimica et Biophysica Acta* **1961**, *51*, 283-294.
- (37) Blackwell, J.; Parker, K. D.; Rudall, K. M. *Journal of Molecular Biology* **1967**, *28*, 383-385.
- (38) Blackwell, J.; Parker, K. D.; Rudall, K. M. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **1965**, *45*, 659-661.
- (39) Gardner, K. H.; Blackwell, J. *Biopolymers* **1975**, *14*, 1581-1595.

- (40) Nishiyama, Y.; Noishiki, Y.; Wada, M. *Macromolecules* **2011**, *44*, 950-957.
- (41) Tanner, S. F.; Chanzy, H.; Vincendon, M.; Roux, J. C.; Gaill, F. *Macromolecules* **1990**, *23*, 3576-3583.
- (42) Imai, T.; Watanabe, T.; Yui, T.; Sugiyama, J. *Biochem J* **2003**, *374*, 755-760.
- (43) Ogawa, Y.; Kimura, S.; Wada, M. *Journal of Structural Biology* **2011**, *176*, 83-90.
- (44) Noishiki, Y.; Kuga, S.; Wada, M.; Hori, K.; Nishiyama, Y. *Macromolecules* **2004**, *37*, 6839-6842.
- (45) Saito, Y.; Okano, T.; Putaux, J.-L.; Gaill, F.; Chanzy, H. In *Advances in Chitin Science II*; Domard, E. A., Roberts, G., Varum, K., Eds.; J.C. André© Pub, 1998; Chapter Crystallosoolvates of beta chitin and alcohols, pp 507-512.
- (46) Saito, Y.; Okano, T.; Gaill, F.; Chanzy, H.; Putaux, J.-L. *International Journal of Biological Macromolecules* **2000**, *28*, 81-88.
- (47) Noishiki, Y.; Nishiyama, Y.; Wada, M.; Okada, S.; Kuga, S. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 944-949.
- (48) Yoshifuji, A.; Noishiki, Y.; Wada, M.; Heux, L.; Kuga, S. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2878-2881.
- (49) Saito, Y.; Kumagai, H.; Wada, M.; Kuga, S. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 407-410.
- (50) R ssle, M.; Flot, D.; Engel, J.; Burghammer, M.; Riekel, C.; Chanzy, H. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 981-986.
- (51) Kobayashi, K.; Kimura, S.; Togawa, E.; Wada, M. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *86*, 975-981.
- (52) Kobayashi, K.; Kimura, S.; Togawa, E.; Wada, M. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83*, 483-488.
- (53) Langan, P.; Denny, R. C.; Mahendrasingam, A.; Mason, S. A.; Jaber, A. *Journal of Applied Crystallography* **1996**, *29*, 383-389.
- (54) Shotton, M. W.; Pope, L. H.; Forsyth, V. T.; Denny, R. C.; Archer, J.; Langan, P.; Ye, H.; Boote, C. *Journal of Applied Crystallography* **1998**, *31*, 758-766.
- (55) Forsyth, V. T.; Mahendrasingam, A.; Pigram, W. J.; Greenall, R. J.; Bellamy, K.; Fuller, W.;

- Mason, S. A. *International Journal of Biological Macromolecules* **1989**, *11*, 236-240.
- (56) Mahendrasingan, A.; Al-Hayalee, Y.; Forsyth, V. T.; Langan, P.; Fuller, W.; Oldman, R. J.; Blundell, D. J.; Mason, S. *Physica B: Condensed Matter* **1992**, *180-181, Part 1*, 528-530.
- (57) Langan, P.; Forsyth, V. T.; Mahendrasingam, A.; Pigram, W. J.; Mason, S. A.; Fuller, W. J. *Biomol. Struct. Dyn.* **1992**, *10*, 489-503.
- (58) Shotton, M. W.; Pope, L. H.; Forsyth, T.; Langan, P.; Denny, R. C.; Giesen, U.; Dauvergne, M.-T.; Fuller, W. *Biophysical Chemistry* **1997**, *69*, 85-96.
- (59) Fuller, W.; Forsyth, T.; Mahendrasingam, A. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **2004**, *359*, 1237 -1248.
- (60) Gardner, K. H.; English, A. D.; Forsyth, V. T. *Macromolecules* **2004**, *37*, 9654-9656.
- (61) Tiggelaar, S. M.; Mossou, E.; Callow, P.; Callow, S.; Teixeira, S. C. M.; Mitchell, E. P.; Mitraki, A.; Forsyth, V. T. *Acta Crystallographica Section F* **2011**, *67*, 332-335.
- (62) Haupt, M.; Blakeley, M. P.; Teixeira, S. C. M.; Mason, S. A.; Mitchell, E. P.; Cooper, J. B.; Forsyth, V. T. *Acta Crystallographica Section F* **2011**, *67*, 1428-1431.
- (63) Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallographica Section D* **2004**, *60*, 2126-2132.
- (64) Merritt, E. A.; Bacon, D. J. *Macromolecular Crystallography Part B*; Academic Press, 1997; Vol. Volume 277, p. 505-524.
- (65) Kobayashi, K.; Kimura, S.; Togawa, E.; Wada, M.; Kuga, S. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *80*, 491-497.
- (66) French, A. D.; Howley, P. D.; Computer models of cellulose. Schuerch, C., Ed; Wiley, New-York, 1989;; Cellulose and wood, chemistry and technology p164.
- (67) Ichikawa, K.; Kameda, Y.; Yamaguchi, T.; Wakita, H.; Misawa, M. *Molecular Physics* **1991**, *73*, 79-86.
- (68) Wada, M.; Heux, L.; Nishiyama, Y.; Langan, P. *Cellulose* **2009**, *16*, 943-957.
- (69) Porro, F.; Bédué, O.; Chanzy, H.; Heux, L. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2586-2593.
- (70) French, A. D.; Johnson, G. P. *Cellulose* **2004**, *11*, 5-22.
- (71) Mo, F.; Jensen, L. H. *Acta Crystallographica Section B* **1978**, *34*, 1562-1569.

- (72) Mo, F. *Acta Chemica Scandinavica A* **1979**, 33, 207-218.
- (73) Kamide, K.; Okajima, K.; Kowsaka, K.; Matsui, T. *Polymer Journal* **1985**, 17, 701-706.
- (74) Cioci, G.; Srivastava, A.; Loganathan, D.; Mason, S. A.; Pérez, S.; Imberty, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10042-10045.
- (75) Popov, D.; Buléon, A.; Burghammer, M.; Chanzy, H.; Montesanti, N.; Putaux, J.-L.; Potocki-Véronèse, G.; Riekel, C. *Macromolecules* **2009**, 42, 1167-1174.
- (76) Parthasarathi, R.; Bellesia, G.; Chundawat, S. P. S.; Dale, B. E.; Langan, P.; Gnanakaran, S. *J. Phys. Chem. A* **2011**.
- (77) Tashiro, K.; Kobayashi, M. *Polymer* **1991**, 32, 1516-1526.
- (78) Thibaudeau, C.; Stenutz, R.; Hertz, B.; Klepach, T.; Zhao, S.; Wu, Q.; Carmichael, I.; Serianni, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15668-15685.
- (79) Ferraris, G.; Franchini-Angela, M. *Acta Crystallographica Section B* **1972**, 28, 3572-3583.
- (80) Kuhs, W. F.; Lehmann, M. S. *J. Phys. Chem.* **1983**, 87, 4312-4313.
- (81) Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1354-1358.

謝辞

学部学生時代から適切な御助言を頂き、また博士2年次からは指導教官として適切な研究計画から研究発表までの正確性の大切さを懇切丁寧にご指導いただきました和田昌久准教授に厚く御礼申し上げます。実験手法から学生生活に至るまで広くご指導いただきました木村聡先生には非常に感謝致しております。また博士1年次までの指導教官であり、卓越した発想力から様々な研究テーマを頂き研究の幅を広げて頂きました空閑重則前教授に御礼申し上げます。

本博士論文の研究遂行に当たりまして、X線、中性子線の基本的な構造解析の手法から考察までご指導頂きました CERMAV/CNRS の西山義春博士には非常にお世話になりました。ありがとうございました。同様に X線構造解析の手法の御指導や論文執筆に際して広く有用な意見を頂きました Oak Ridge National Laboratory の Paul Langan 博士には非常に感謝しております。中性子線回折の測定の際にお世話になりました ILL の D19 チーム、特に論文作成に御助力頂きました Keele 大学の V. Trevor Forsyth 博士に御礼申し上げます。本研究遂行にあたり特別研究員 DC1 として採択頂き、ご援助頂いた日本学術振興会様に厚く御礼申し上げます。

研究室の皆様には、日々様々なことを学ばせて頂きましたこと感謝いたしております。最後に本研究の遂行にあたり、家族や友人の皆様のご協力のおかげで最後まで仕上げる事ができたと思っております。ありがとうございました。

発表論文

- (1) “Direct Determination of Hydrogen Bonding Arrangement in Anhydrous β -chitin by Neutron Fiber Diffraction ” *Biomacromolecules* **2012**, 13, 288-291.
Sawada, D., Nishiyama, Y., Langan, P., Forsyth, V.T., Kimura, S., Wada, M.
- (2) “Water in crystalline fibers of dihydrate β -chitin results in absence of intramolecular hydrogen bond” (on submitting)
Sawada, D., Nishiyama, Y., Langan, P., Forsyth, V.T., Kimura, S., Wada, M.

APPENDIX 1. Cif file of anhydrous β -chitin by neutron diffraction.

```

# start Validation Reply Form

_vrf_CELL003_manhyd
;
PROBLEM: _cell_measurement_reflms_used is
missing
RESPONSE: Using the X-ray cell.
;
_vrf_CELL004_manhyd
;
PROBLEM: _cell_measurement_theta_min is missing
RESPONSE: Using the X-ray cell.
;
_vrf_CELL005_manhyd
;
PROBLEM: _cell_measurement_theta_max is missing
RESPONSE: Using the X-ray cell.
;
_vrf_DIFF003_manhyd
;
PROBLEM: _diffrn_measurement_device_type is
missing
RESPONSE: D19.
;
_vrf_REFLT03_manhyd
;
PROBLEM: Reflection count < 85% complete (theta
max?)
RESPONSE: This is due to the limited radius of
Ewald sphere of X-ray and overlap
of diffraction peak in the cylindrically
averated reciprocal space of fiber
diffraction
;
;
_vrf_RFACG01_manhyd
;
PROBLEM: The value of the R factor is > 0.20
RESPONSE: This is not unusual for neutron fiber
diffraction.
;
;
_vrf_RFACR01_manhyd
;
PROBLEM: The value of the weighted R factor is >
0.45
RESPONSE: This is not unusual for neutron fiber
diffraction.
;
;
_vrf_THETM01_manhyd
;
PROBLEM: The value of sine(theta_max)/wavelength
is less than 0.550
RESPONSE: Due to the fiber symmetry, the higher
resolution intensities are
difficult to obtain.
;
;
_vrf_PLAT022_manhyd
;
PROBLEM: Ratio Unique / Expected Reflections
(too) Low .. 0.382
RESPONSE: Overlap due to teh cylindrical
averaging in reciprocal space
characteristic of fiber diffraction.
;
;
_vrf_PLAT023_manhyd
;
PROBLEM: Resolution (too) Low [sin(theta)/Lambda
< 0.6].. 40.89 Deg.
RESPONSE: The higher angle diffractions are too
overlaped to be exploited.
;
;
_vrf_PLAT029_manhyd
;
;
PROBLEM: _diffrn_measured_fraction_theta_full
Low ..... 0.381
RESPONSE: Same as above.
;
;
_vrf_PLAT073_manhyd
;
;
PROBLEM: H-atoms ref, but _hydrogen_treatment
reported as constr
RESPONSE: Hydrogen positions are fixed.
;
;
_vrf_PLAT082_manhyd
;
;
PROBLEM: High R1
Value .....
0.26
RESPONSE: This is not unusual for neutron fiber
diffraction.
;
;
_vrf_PLAT084_manhyd
;
;
PROBLEM: High wR2
Value .....
0.62
RESPONSE: This is not unusual for neutron fiber
diffraction.
;
;
# end Validation Reply Form

#Added by pubICIF (金 11 25 13:50:56 2011)

_audit_update_record
;
2011-11-25 # Formatted by pubICIF
;
;
_audit_creation_method SHELXL-97
_chemical_name_systematic
?
_chemical_name_common ?
_chemical_melting_point ?
_chemical_formula_moiety ?
_chemical_formula_sum
'C8 H10 D3 N O5'

```

_chemical_formula_weight	206.14		
loop_			
_atom_type_symbol			_diffrn_ambient_temperature 293(2)
_atom_type_description			_diffrn_radiation_wavelength 1.45540
_atom_type_scatter_dispersion_real			_diffrn_radiation_type 'neutron'
_atom_type_scatter_dispersion_imag			_diffrn_radiation_source 'neutron'
_atom_type_scatter_source			_diffrn_radiation_monochromator graphite
'C' 'C' 0.0000 0.0000			_diffrn_measurement_device_type ?
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'			_diffrn_measurement_method ?
'H' 'H' 0.0000 0.0000			_diffrn_detector_area_resol_mean ?
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'			_diffrn_standards_number ?
'N' 'N' 0.0000 0.0000			_diffrn_standards_interval_count ?
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'			_diffrn_standards_interval_time ?
'O' 'O' 0.0000 0.0000			_diffrn_standards_decay_% ?
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'			_diffrn_reflns_number 145
'D' 'D' 0.0000 0.0000			_diffrn_reflns_av_R_equivalents 0.0000
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4'			_diffrn_reflns_av_signal/netI 0.1205
_symmetry_cell_setting monoclinic			_diffrn_reflns_limit_h_min 0
_symmetry_space_group_name_H-M 'P 1 1 21'			_diffrn_reflns_limit_h_max 4
loop_			_diffrn_reflns_limit_k_min -8
_symmetry_equiv_pos_as_xyz			_diffrn_reflns_limit_k_max 8
'x, y, z'			_diffrn_reflns_limit_l_min 0
'-x, -y, z+1/2'			_diffrn_reflns_limit_l_max 9
_cell_length_a 4.8190(10)			_diffrn_reflns_theta_min 6.08
_cell_length_b 9.239(2)			_diffrn_reflns_theta_max 40.89
_cell_length_c 10.384(2)			_reflns_number_total 145
_cell_angle_alpha 90.00			_reflns_number_gt 93
_cell_angle_beta 90.00			_reflns_threshold_expression >2sigma(I)
_cell_angle_gamma 97.16(5)			
_cell_volume 458.72(16)			
_cell_formula_units_Z 2			
_cell_measurement_temperature 293(2)			
_cell_measurement_reflns_used ?			
_cell_measurement_theta_min ?			
_cell_measurement_theta_max ?			
_exptl_crystal_description 'uniaxially oriented fibers'			
_exptl_crystal_colour 'white'			
_exptl_crystal_size_max 0.01			
_exptl_crystal_size_mid 0.01			
_exptl_crystal_size_min 0.004			
_exptl_crystal_density_meas ?			
_exptl_crystal_density_diffrn 1.492			
_exptl_crystal_density_method 'not measured'			
_exptl_crystal_F_000 148			
_exptl_absorpt_coefficient_mu 0.352			
_exptl_absorpt_correction_type none			
_exptl_absorpt_correction_T_min ?			
_exptl_absorpt_correction_T_max ?			
_exptl_absorpt_process_details ?			
_exptl_special_details ?			
			_computing_data_collection ?
			_computing_cell_refinement ?
			_computing_data_reduction ?
			_computing_structure_solution 'SHELXS-97 (Sheldrick, 1990)'
			_computing_structure_refinement 'SHELXL-97 (Sheldrick, 1997)'
			_computing_molecular_graphics ?
			_computing_publication_material ?
			_refine_special_details
			;
			Refinement of F ² against ALL reflections. The weighted R-factor wR and goodness of fit S are based on F ² , conventional R-factors R are based on F, with F set to zero for negative F ² . The threshold expression of F ² > 2sigma(F ²) is used only for calculating R-factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on F ² are statistically about twice as large as those based on F, and R-factors based on ALL data will be even larger.
			;
			_refine_ls_structure_factor_coef Fsqd
			_refine_ls_matrix_type full
			_refine_ls_weighting_scheme calc
			_refine_ls_weighting_details
			'calc w=1/[sigma ² (Fo ²)+(0.2000P) ² +0.0000P] where P=(Fo ² +2Fc ²)/3'
			_atom_sites_solution_primary direct
			_atom_sites_solution_secondary difmap

```

_atom_sites_solution_hydrogens    geom
_refine_ls_hydrogen_treatment    constr
_refine_ls_extinction_method      none
_refine_ls_extinction_coef       ?
_refine_ls_abs_structure_details
'Flack H D (1983), Acta Cryst. A39, 876-881'
_refine_ls_abs_structure_Flack    10(10)
_refine_ls_number_reflns         145
_refine_ls_number_parameters     13
_refine_ls_number_restraints     26
_refine_ls_R_factor_all          0.4685
_refine_ls_R_factor_gt          0.2566
_refine_ls_wR_factor_ref         0.6239
_refine_ls_wR_factor_gt         0.5303
_refine_ls_goodness_of_fit_ref   2.800
_refine_ls_restrained_S_all     3.596
_refine_ls_shift/su_max         0.000
_refine_ls_shift/su_mean        0.000

loop_
  _atom_site_label
  _atom_site_type_symbol
  _atom_site_fract_x
  _atom_site_fract_y
  _atom_site_fract_z
  _atom_site_U_iso_or_equiv
  _atom_site_adp_type
  _atom_site_occupancy
  _atom_site_symmetry_multiplicity
  _atom_site_calc_flag
  _atom_site_refinement_flags
  _atom_site_disorder_assembly
  _atom_site_disorder_group
C1_1 C -0.0422 -0.0364 0.3726 0.062 Uani 1 1 d
D . . .
H1_1 H 0.1569 -0.0469 0.3807 0.074 Uiso 1 1
d . . .
C2_1 C -0.1522 -0.1562 0.2884 0.063 Uani 1 1 d
D . . .
H2_1 H -0.3503 -0.1426 0.2825 0.076 Uiso 1 1
d . . .
C3_1 C -0.0519 -0.1236 0.1530 0.064 Uani 1 1 d
D . . .
H3_1 H 0.1447 -0.1407 0.1561 0.076 Uiso 1 1
d . . .
C4_1 C -0.0355 0.0329 0.1118 0.068 Uani 1 1 d
D . . .
H4_1 H -0.2222 0.0565 0.0893 0.081 Uiso 1 1
d . . .
C5_1 C 0.0946 0.1377 0.2135 0.062 Uani 1 1 d
D . . .
H5_1 H 0.2923 0.1242 0.2221 0.074 Uiso 1 1
d . . .
C6_1 C 0.0779 0.2927 0.1805 0.065 Uani 1 1 d
D . . .
H6A_1 H 0.1536 0.3557 0.2501 0.078 Uiso 1 1
d . . .
H6B_1 H 0.1845 0.3194 0.1030 0.078 Uiso 1 1
d . . .
C7_1 C -0.3844 -0.3908 0.3871 0.073 Uani 1 1 d
D . . .
C8_1 C -0.3298 -0.5329 0.4432 0.073 Uani 1 1 d
D . . .

```

```

H8A_1 H -0.4704 -0.5638 0.5063 0.109 Uiso 1 1
d . . .
H8B_1 H -0.1489 -0.5218 0.4834 0.109 Uiso 1 1
d . . .
H8C_1 H -0.3347 -0.6047 0.3762 0.109 Uiso 1 1
d . . .
N2_1 N -0.1670 -0.3057 0.3272 0.070 Uani 1 1 d
D . . .
O1_1 O -0.1522 -0.0617 0.5034 0.062 Uani 1 1 d
D . . .
O3_1 O -0.1678 -0.2244 0.0605 0.072 Uani 1 1 d
D . . .
O5_1 O -0.0444 0.1005 0.3368 0.065 Uani 1 1 d
D . . .
O6_1 O -0.2086 0.3076 0.1609 0.076 Uani 1 1 d
D . . .
O7_1 O -0.6273 -0.3414 0.3860 0.078 Uani 1 1 d
D . . .
DN2_1 D 0.000(7) -0.348(6) 0.313(4) 0.22(19)
Uiso 1 1 d D . .
D03_1 D -0.11(3) -0.184(12) -0.023(3) 0.07(6)
Uiso 1 1 d D . .
D06_1 D -0.210(19) 0.35(3) 0.073(11) 0.15(12)
Uiso 1 1 d D . .

loop_
  _atom_site_aniso_label
  _atom_site_aniso_U_11
  _atom_site_aniso_U_22
  _atom_site_aniso_U_33
  _atom_site_aniso_U_23
  _atom_site_aniso_U_13
  _atom_site_aniso_U_12
C1_1 0.080 0.076 0.025 0.002 0.004 -0.007
C2_1 0.072 0.081 0.032 0.001 -0.004 -0.008
C3_1 0.076 0.082 0.030 -0.006 -0.003 -0.003
C4_1 0.087 0.085 0.026 0.000 -0.004 -0.008
C5_1 0.085 0.079 0.017 0.000 0.006 -0.004
C6_1 0.092 0.081 0.017 0.008 0.000 -0.010
C7_1 0.076 0.081 0.053 -0.004 -0.007 -0.022
C8_1 0.064 0.074 0.069 -0.003 -0.021 -0.037
N2_1 0.077 0.079 0.049 0.001 -0.004 -0.015
O1_1 0.075 0.078 0.027 0.008 0.003 -0.021
O3_1 0.078 0.093 0.041 -0.016 0.005 -0.013
O5_1 0.087 0.078 0.023 0.008 0.008 -0.010
O6_1 0.096 0.094 0.037 0.005 0.012 0.010
O7_1 0.071 0.091 0.064 0.005 -0.013 -0.025

_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_1 O5_1 1.3199 . . ?
C1_1 C2_1 1.4572 . . ?
C1_1 O1_1 1.4660 . . ?
C1_1 H1_1 0.9800 . . ?
C2_1 N2_1 1.4316 . . ?
C2_1 C3_1 1.5059 . . ?
C2_1 H2_1 0.9800 . . ?
C3_1 O3_1 1.4039 . . ?
C3_1 C4_1 1.5003 . . ?
C3_1 H3_1 0.9800 . . ?
C4_1 O1_1 1.4483 2_554 ?
C4_1 C5_1 1.5140 . . ?
C4_1 H4_1 0.9800 . . ?
C5_1 O5_1 1.4657 . . ?
C5_1 C6_1 1.4846 . . ?
C5_1 H5_1 0.9800 . . ?
C6_1 O6_1 1.4195 . . ?
C6_1 H6A_1 0.9700 . . ?
C6_1 H6B_1 0.9700 . . ?
C7_1 O7_1 1.3082 . . ?
C7_1 N2_1 1.3768 . . ?
C7_1 C8_1 1.4902 . . ?
C8_1 H8A_1 0.9600 . . ?
C8_1 H8B_1 0.9600 . . ?
C8_1 H8C_1 0.9600 . . ?
N2_1 DN2_1 0.95(2) . . ?
O1_1 C4_1 1.4483 2 ?
O3_1 D03_1 0.98(3) . . ?
O6_1 D06_1 0.98(3) . . ?

loop_
  _geom_angle_atom_site_label_1
  _geom_angle_atom_site_label_2
  _geom_angle_atom_site_label_3
  _geom_angle
  _geom_angle_site_symmetry_1
  _geom_angle_site_symmetry_3
  _geom_angle_publ_flag
O5_1 C1_1 C2_1 120.9 . . ?
O5_1 C1_1 O1_1 111.6 . . ?
C2_1 C1_1 O1_1 110.1 . . ?
O5_1 C1_1 H1_1 104.1 . . ?
C2_1 C1_1 H1_1 104.1 . . ?
O1_1 C1_1 H1_1 104.1 . . ?
N2_1 C2_1 C1_1 122.2 . . ?
N2_1 C2_1 C3_1 115.6 . . ?

C1_1 C2_1 C3_1 109.3 . . ?
N2_1 C2_1 H2_1 102.0 . . ?
C1_1 C2_1 H2_1 102.1 . . ?
C3_1 C2_1 H2_1 102.1 . . ?
O3_1 C3_1 C4_1 114.4 . . ?
O3_1 C3_1 C2_1 114.5 . . ?
C4_1 C3_1 C2_1 115.8 . . ?
O3_1 C3_1 H3_1 103.2 . . ?
C4_1 C3_1 H3_1 103.2 . . ?
C2_1 C3_1 H3_1 103.2 . . ?
O1_1 C4_1 C3_1 110.8 2_554 . . ?
O1_1 C4_1 C5_1 103.0 2_554 . . ?
C3_1 C4_1 C5_1 112.7 . . ?
O1_1 C4_1 H4_1 110.1 2_554 . . ?
C3_1 C4_1 H4_1 110.1 . . ?
C5_1 C4_1 H4_1 110.1 . . ?
O5_1 C5_1 C6_1 110.4 . . ?
O5_1 C5_1 C4_1 108.6 . . ?
C6_1 C5_1 C4_1 112.8 . . ?
O5_1 C5_1 H5_1 108.3 . . ?
C6_1 C5_1 H5_1 108.3 . . ?
C4_1 C5_1 H5_1 108.3 . . ?
O6_1 C6_1 C5_1 107.3 . . ?
O6_1 C6_1 H6A_1 110.3 . . ?
C5_1 C6_1 H6A_1 110.3 . . ?
O6_1 C6_1 H6B_1 110.3 . . ?
C5_1 C6_1 H6B_1 110.3 . . ?
H6A_1 C6_1 H6B_1 108.5 . . ?
O7_1 C7_1 N2_1 116.6 . . ?
O7_1 C7_1 C8_1 125.1 . . ?
N2_1 C7_1 C8_1 118.3 . . ?
C7_1 C8_1 H8A_1 109.5 . . ?
C7_1 C8_1 H8B_1 109.5 . . ?
H8A_1 C8_1 H8B_1 109.5 . . ?
C7_1 C8_1 H8C_1 109.5 . . ?
H8A_1 C8_1 H8C_1 109.5 . . ?
H8B_1 C8_1 H8C_1 109.5 . . ?
DN2_1 N2_1 C7_1 117(4) . . ?
DN2_1 N2_1 C2_1 114(4) . . ?
C7_1 N2_1 C2_1 128.4 . . ?
C4_1 O1_1 C1_1 119.1 2 . . ?
D03_1 O3_1 C3_1 106(4) . . ?
C1_1 O5_1 C5_1 114.4 . . ?
D06_1 O6_1 C6_1 103(4) . . ?

_diffrn_measured_fraction_theta_max 0.381
_diffrn_reflns_theta_full 40.89
_diffrn_measured_fraction_theta_full 0.381
_refine_diff_density_max 0.926
_refine_diff_density_min -0.799
_refine_diff_density_rms 0.274

```

APPENDIX 2. Cif file of dihydrate β -chitin.

```

# start Validation Reply Form
_vrf_CELL003_manhyd
;
PROBLEM: _cell_measurement_reflns_used is
missing
RESPONSE: Using the X-ray cell.
;
_vrf_CELL004_manhyd
;
PROBLEM: _cell_measurement_theta_min is missing
RESPONSE: Using the X-ray cell.
;
_vrf_CELL005_manhyd
;
PROBLEM: _cell_measurement_theta_max is missing
RESPONSE: Using the X-ray cell.
;
_vrf_DIFF003_manhyd
;
PROBLEM: _diffrn_measurement_device_type is
missing
RESPONSE: D19
;
_vrf_RFACG01_manhyd
;
PROBLEM: The value of the R factor is > 0.20
RESPONSE: This is not unusual for neutron fiber
diffraction.
;
_vrf_RFACR01_manhyd
;
PROBLEM: The value of the weighted R factor is >
0.45
RESPONSE: This is not unusual for neutron fiber
diffraction.
;
_vrf_THETM01_manhyd
;
PROBLEM: The value of sine(theta_max)/wavelength
is less than 0.550
RESPONSE: Due to the fiber symmetry, the higher
resolution intensities
are difficult to obtain.
;
_vrf_PLAT023_manhyd
;
PROBLEM: Resolution (too) Low [sin(theta)/Lambda
< 0.6].. 19.15 Deg.
RESPONSE: The higher angle diffractions are too
overlapped to be exploited.
;
_vrf_PLAT029_manhyd
;
PROBLEM: _diffrn_measured_fraction_theta_full
Low ..... 0.383
RESPONSE: Same as above
;
_vrf_PLAT073_manhyd
;
PROBLEM: H-atoms ref, but _hydrogen_treatment
reported as constr
RESPONSE: Hydrgen positions are fixed.
;
_vrf_PLAT082_manhyd
;
PROBLEM: High R1
Value .....
0.26
RESPONSE: This is not unusual for neutron fiber
diffraction.
;
_vrf_PLAT084_manhyd
;
PROBLEM: High wR2
Value .....
0.62
RESPONSE: This is not unusual for neutron fiber
diffraction.
;
# end Validation Reply Form

#Added by publCIF (金 9 30 10:40:58 2011)

_audit_creation_method SHELXL-97
_chemical_name_systematic ?
_chemical_name_common 'chitin'
_chemical_melting_point ?
_chemical_formula_moiety ?
_chemical_formula_sum 'C8 H10 D3 N O5'
_chemical_formula_weight 206.14

loop_
_atom_type_symbol
_atom_type_description
_atom_type_scatter_dispersion_real
_atom_type_scatter_dispersion_imag
_atom_type_scatter_source
'C' 'C' 0.0000 0.0000
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and
6.1.1.4'
'H' 'H' 0.0000 0.0000
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and
6.1.1.4'
'N' 'N' 0.0000 0.0000
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and
6.1.1.4'
'O' 'O' 0.0000 0.0000
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and
6.1.1.4'
'D' 'D' 0.0000 0.0000
'International Tables Vol C Tables 4.2.6.8 and
6.1.1.4'

_symmetry_cell_setting 'monoclinic'
_symmetry_space_group_name_H-M 'P 1 1 21'

```

loop_		_reflns_threshold_expression	>2sigma(I)
_symmetry_equiv_pos_as_xyz		_computing_data_collection	?
'x, y, z'		_computing_cell_refinement	?
'-x, -y, z+1/2'		_computing_data_reduction	?
		_computing_structure_solution	'SHELXS-97
_cell_length_a	4.8190(10)	(Sheldrick, 1990)'	
_cell_length_b	9.239(2)	_computing_structure_refinement	'SHELXL-97
_cell_length_c	10.384(2)	(Sheldrick, 1997)'	
_cell_angle_alpha	90.00	_computing_molecular_graphics	?
_cell_angle_beta	90.00	_computing_publication_material	?
_cell_angle_gamma	97.16(5)		
_cell_volume	458.72(16)	_refine_special_details	
_cell_formula_units_Z	2	;	
_cell_measurement_temperature	293(2)	Refinement of F^2 against ALL reflections.	
_cell_measurement_reflns_used	?	The weighted R-factor wR and	
_cell_measurement_theta_min	?	goodness of fit S are based on F^2 ,	
_cell_measurement_theta_max	?	conventional R-factors R are based	
		on F , with F set to zero for negative F^2 . The	
_exptl_crystal_description	'uniaxially	threshold expression of	
oriented fibers'		$F^2 > 2\sigma(F^2)$ is used only for	
_exptl_crystal_colour	'white'	calculating R-factors(gt) etc. and is	
_exptl_crystal_size_max	0.01	not relevant to the choice of reflections for	
_exptl_crystal_size_mid	0.01	refinement. R-factors based	
_exptl_crystal_size_min	0.004	on F^2 are statistically about twice as large	
_exptl_crystal_density_meas	?	as those based on F , and R-	
_exptl_crystal_density_diffn	1.782	factors based on ALL data will be even larger.	
_exptl_crystal_density_method	'not measured'	;	
_exptl_crystal_F_000	225		
_exptl_absorpt_coefficient_mu	0.355	_refine_ls_structure_factor_coef	Fsqd
_exptl_absorpt_correction_type	none	_refine_ls_matrix_type	full
_exptl_absorpt_correction_T_min	?	_refine_ls_weighting_scheme	calc
_exptl_absorpt_correction_T_max	?	_refine_ls_weighting_details	
_exptl_absorpt_process_details	?	'calc $w=1/[\sigma^2(F_o^2)+(0.2000P)^2+0.0000P]$	
		where $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ '	
_exptl_special_details		_atom_sites_solution_primary	direct
?		_atom_sites_solution_secondary	difmap
		_atom_sites_solution_hydrogens	geom
_diffn_ambient_temperature	293(2)	_refine_ls_hydrogen_treatment	constr
_diffn_radiation_wavelength	1.45580	_refine_ls_extinction_method	none
_diffn_radiation_type	'neutron'	_refine_ls_extinction_coef	?
_diffn_radiation_source	'neutron'	_refine_ls_abs_structure_details	
_diffn_radiation_monochromator	graphite	'Flack H D (1983), Acta Cryst. A39, 876-881'	
_diffn_measurement_device_type	?	_refine_ls_abs_structure_Flack	-10(10)
_diffn_measurement_method	?	_refine_ls_number_reflns	146
_diffn_detector_area_resol_mean	?	_refine_ls_number_parameters	14
_diffn_standards_number	?	_refine_ls_number_restraints	11
_diffn_standards_interval_count	?	_refine_ls_R_factor_all	0.4711
_diffn_standards_interval_time	?	_refine_ls_R_factor_gt	0.2591
_diffn_standards_decay_%	?	_refine_ls_wR_factor_ref	0.6214
_diffn_reflns_number	146	_refine_ls_wR_factor_gt	0.5310
_diffn_reflns_av_R_equivalents	0.0000	_refine_ls_goodness_of_fit_ref	2.779
_diffn_reflns_av_sigmaI/netI	0.1212	_refine_ls_restrained_S_all	3.000
_diffn_reflns_limit_h_min	0	_refine_ls_shift/su_max	0.000
_diffn_reflns_limit_h_max	4	_refine_ls_shift/su_mean	0.000
_diffn_reflns_limit_k_min	-8		
_diffn_reflns_limit_k_max	8	loop_	
_diffn_reflns_limit_l_min	0	_atom_site_label	
_diffn_reflns_limit_l_max	9	_atom_site_type_symbol	
_diffn_reflns_theta_min	3.04	_atom_site_fract_x	
_diffn_reflns_theta_max	19.15	_atom_site_fract_y	
_reflns_number_total	146	_atom_site_fract_z	
_reflns_number_gt	93	_atom_site_U_iso_or_equiv	

```

_atom_site_adp_type
_atom_site_occupancy
_atom_site_symmetry_multiplicity
_atom_site_calc_flag
_atom_site_refinement_flags
_atom_site_disorder_assembly
_atom_site_disorder_group
C1_1 C -0.0359 -0.0382 0.3731 0.064 Uani 1 1
d . . .
H1_1 H 0.1636 -0.0476 0.3817 0.076 Uiso 1 1
d . . .
C2_1 C -0.1456 -0.1557 0.2865 0.062 Uani 1 1 d
D . . .
H2_1 H -0.3432 -0.1408 0.2819 0.075 Uiso 1 1
d . . .
C3_1 C -0.0555 -0.1223 0.1547 0.064 Uani 1 1 d
D . . .
H3_1 H 0.1403 -0.1407 0.1580 0.077 Uiso 1 1
d . . .
C4_1 C -0.0282 0.0212 0.1125 0.066 Uani 1 1
d . . .
H4_1 H -0.2158 0.0437 0.0903 0.079 Uiso 1 1
d . . .
C5_1 C 0.0960 0.1372 0.2140 0.060 Uani 1 1
d . . .
H5_1 H 0.2947 0.1272 0.2246 0.072 Uiso 1 1
d . . .
C6_1 C 0.0733 0.2946 0.1810 0.065 Uani 1 1 d
D . . .
H6A_1 H 0.1458 0.3576 0.2511 0.078 Uiso 1 1
d . . .
H6B_1 H 0.1813 0.3227 0.1042 0.078 Uiso 1 1
d . . .
C7_1 C -0.3763 -0.3962 0.3879 0.071 Uani 1 1 d
D . . .
C8_1 C -0.3323 -0.5289 0.4408 0.073 Uani 1 1 d
D . . .
H8A_1 H -0.4727 -0.5569 0.5047 0.109 Uiso 1 1
d . . .
H8B_1 H -0.1507 -0.5202 0.4801 0.109 Uiso 1 1
d . . .
H8C_1 H -0.3431 -0.6015 0.3743 0.109 Uiso 1 1
d . . .
N2_1 N -0.1672 -0.3058 0.3272 0.073 Uani 1 1 d
D . . .
O1_1 O -0.1514 -0.0626 0.5035 0.063 Uani 1 1
d . . .
O3_1 O -0.1661 -0.2246 0.0613 0.075 Uani 1 1 d
D . . .
O5_1 O -0.0448 0.0982 0.3373 0.064 Uani 1 1
d . . .
O6_1 O -0.2128 0.3087 0.1598 0.074 Uani 1 1 d
D . . .
O7_1 O -0.6245 -0.3428 0.3865 0.078 Uani 1 1 d
D . . .
DN2_1 D 0.004(6) -0.346(5) 0.313(3) 0.21(15)
Uiso 1 1 d D . . .
DO3_1 D -0.10(3) -0.183(10) -0.022(3) 0.08(5)
Uiso 1 1 d D . . .
DO6_1 D -0.211(15) 0.35(2) 0.074(10) 0.14(9)
Uiso 1 1 d D . . .

loop_

```

```

_atom_site_aniso_label
_atom_site_aniso_U_11
_atom_site_aniso_U_22
_atom_site_aniso_U_33
_atom_site_aniso_U_23
_atom_site_aniso_U_13
_atom_site_aniso_U_12
C1_1 0.081 0.077 0.028 0.002 0.007 -0.007
C2_1 0.073 0.077 0.033 -0.001 -0.005 -0.005
C3_1 0.079 0.077 0.033 -0.003 -0.006 -0.004
C4_1 0.085 0.083 0.026 0.000 -0.005 -0.009
C5_1 0.084 0.075 0.018 -0.002 0.004 -0.002
C6_1 0.093 0.080 0.019 0.007 0.001 -0.005
C7_1 0.072 0.080 0.053 -0.005 -0.008 -0.026
C8_1 0.066 0.070 0.069 -0.007 -0.020 -0.042
N2_1 0.081 0.080 0.048 0.003 -0.003 -0.021
O1_1 0.082 0.077 0.022 0.005 0.008 -0.018
O3_1 0.081 0.093 0.044 -0.017 0.006 -0.015
O5_1 0.087 0.077 0.025 0.005 0.007 -0.005
O6_1 0.096 0.091 0.036 0.003 0.011 0.009
O7_1 0.073 0.087 0.063 0.005 -0.011 -0.029

_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_1 O5_1 1.3201 . ?
C1_1 C2_1 1.4570 . ?
C1_1 O1_1 1.4702 . ?
C1_1 H1_1 0.9800 . ?
C2_1 N2_1 1.4417 . ?
C2_1 C3_1 1.4570 . ?
C2_1 H2_1 0.9800 . ?
C3_1 C4_1 1.3871 . ?
C3_1 O3_1 1.4114 . ?
C3_1 H3_1 0.9800 . ?
C4_1 O1_1 1.4478 2.554 ?
C4_1 C5_1 1.5675 . ?
C4_1 H4_1 0.9800 . ?
C5_1 O5_1 1.4723 . ?
C5_1 C6_1 1.5109 . ?
C5_1 H5_1 0.9800 . ?
C6_1 O6_1 1.4183 . ?
C6_1 H6A_1 0.9700 . ?
C6_1 H6B_1 0.9700 . ?

```

```

C7_1 O7_1 1.3496 . ?
C7_1 N2_1 1.3783 . ?
C7_1 C8_1 1.3829 . ?
C8_1 H8A_1 0.9600 . ?
C8_1 H8B_1 0.9600 . ?
C8_1 H8C_1 0.9600 . ?
N2_1 DN2_1 0.96(2) . ?
O1_1 C4_1 1.4478 2 ?
O3_1 D03_1 0.98(2) . ?
O6_1 D06_1 0.98(2) . ?

loop_
  _geom_angle_atom_site_label_1
  _geom_angle_atom_site_label_2
  _geom_angle_atom_site_label_3
  _geom_angle
  _geom_angle_site_symmetry_1
  _geom_angle_site_symmetry_3
  _geom_angle_publ_flag
O5_1 C1_1 C2_1 119.0 . . ?
O5_1 C1_1 O1_1 110.4 . . ?
C2_1 C1_1 O1_1 111.0 . . ?
O5_1 C1_1 H1_1 105.0 . . ?
C2_1 C1_1 H1_1 105.0 . . ?
O1_1 C1_1 H1_1 105.0 . . ?
N2_1 C2_1 C1_1 120.8 . . ?
N2_1 C2_1 C3_1 117.6 . . ?
C1_1 C2_1 C3_1 110.6 . . ?
N2_1 C2_1 H2_1 101.2 . . ?
C1_1 C2_1 H2_1 101.2 . . ?
C3_1 C2_1 H2_1 101.2 . . ?
C4_1 C3_1 O3_1 114.0 . . ?
C4_1 C3_1 C2_1 119.3 . . ?
O3_1 C3_1 C2_1 115.2 . . ?
C4_1 C3_1 H3_1 101.5 . . ?
O3_1 C3_1 H3_1 101.5 . . ?
C2_1 C3_1 H3_1 101.5 . . ?
C3_1 C4_1 O1_1 118.8 . 2_554 ?
C3_1 C4_1 C5_1 115.1 . . ?
O1_1 C4_1 C5_1 100.4 2_554 . ?

C3_1 C4_1 H4_1 107.3 . . ?
O1_1 C4_1 H4_1 107.3 2_554 . ?
C5_1 C4_1 H4_1 107.3 . . ?
O5_1 C5_1 C6_1 110.3 . . ?
O5_1 C5_1 C4_1 107.0 . . ?
C6_1 C5_1 C4_1 116.0 . . ?
O5_1 C5_1 H5_1 107.8 . . ?
C6_1 C5_1 H5_1 107.8 . . ?
C4_1 C5_1 H5_1 107.8 . . ?
O6_1 C6_1 C5_1 108.1 . . ?
O6_1 C6_1 H6A_1 110.1 . . ?
C5_1 C6_1 H6A_1 110.1 . . ?
O6_1 C6_1 H6B_1 110.1 . . ?
C5_1 C6_1 H6B_1 110.1 . . ?
H6A_1 C6_1 H6B_1 108.4 . . ?
O7_1 C7_1 N2_1 112.8 . . ?
O7_1 C7_1 C8_1 124.7 . . ?
N2_1 C7_1 C8_1 122.5 . . ?
C7_1 C8_1 H8A_1 109.5 . . ?
C7_1 C8_1 H8B_1 109.5 . . ?
H8A_1 C8_1 H8B_1 109.5 . . ?
C7_1 C8_1 H8C_1 109.5 . . ?
H8A_1 C8_1 H8C_1 109.5 . . ?
H8B_1 C8_1 H8C_1 109.5 . . ?
DN2_1 N2_1 C7_1 116(3) . . ?
DN2_1 N2_1 C2_1 111(3) . . ?
C7_1 N2_1 C2_1 132.6 . . ?
C4_1 O1_1 C1_1 118.5 2 . ?
D03_1 O3_1 C3_1 106(4) . . ?
C1_1 O5_1 C5_1 114.2 . . ?
D06_1 O6_1 C6_1 103(4) . . ?

_diffrn_measured_fraction_theta_max 0.383
_diffrn_reflns_theta_full 19.15
_diffrn_measured_fraction_theta_full 0.383
_refine_diff_density_max 0.928
_refine_diff_density_min -0.757
_refine_diff_density_rms 0.270

```