

博士論文

論文題目 キチン結晶多形の構造と物性の実験的解析と理論計算

氏名 小川 悠



## 目次

1. 序論	1
1.1. 構造多糖類	1
1.2. キチン	2
1.3. キチンの固体構造	3
1.3.1. $\alpha$ -キチンの結晶構造	3
1.3.2. $\beta$ -キチンの結晶構造	5
1.3.3. 高次の凝集構造	7
1.4. キチンの物性	9
1.5. 本研究の目的	10
2. $\alpha$ -キチン結晶構造の再検討	11
2.1. 緒言	11
2.2. 実験	13
2.2.1. 試料調製	13
2.2.2. 回折実験	14
2.2.3. 固体 CP/MAS $^{13}\text{C}$ NMR 測定	14
2.3. 結果と考察	15
2.3.1. X線回折	15
2.3.2. 中性子線回折	17
2.3.3. 固体 $^{13}\text{C}$ NMR	18
2.3.4. 天然 $\alpha$ -キチンの構造についての一考察	20
2.4. 結言	21
3. $\beta$ -キチンの理論計算	23
3.1. 緒言	23
3.2. 方法	23
3.2.1. 量子化学計算	23
3.2.2. 分子動力学計算	25
3.3. 結果と考察	26
3.3.1. 量子化学計算	26
3.3.2. 分子動力学計算	30
3.4. 結言	33
4. キチンマイクロフィブリルの高分解能電子顕微鏡観察	34
4.1. 緒言	34
4.2. 実験	35
4.2.1. 試料調製	35
4.2.2. 電子顕微鏡観察	36

4.3.	結果と考察	37
4.3.1.	<i>P. globosa</i> 由来 $\alpha$ -キチンマイクロフィブリル	37
4.3.2.	<i>T. weissflogii</i> 由来 $\beta$ -キチンマイクロフィブリル	40
4.3.3.	<i>L. satsuma</i> 由来 $\beta$ -キチンマイクロフィブリル	43
4.3.4.	キチンマイクロフィブリルの断面形状における多様性	46
4.3.5.	キチンマイクロフィブリルの結晶化機構	46
4.4.	結言	48
<b>5.</b>	<b>ハオリムシ棲管中のキチンの高次凝集構造</b>	<b>49</b>
5.1.	緒言	49
5.2.	実験	50
5.2.1.	試料調製	50
5.2.2.	X線回折実験	50
5.2.3.	電子顕微鏡観察	51
5.3.	結果と考察	51
5.3.1.	分子鎖極性	51
5.3.2.	面配向	52
5.3.3.	棲管内での配向様式の変動	54
5.3.4.	キチンマイクロフィブリルの生合成と分泌様式	56
5.4.	結言	57
<b>6.</b>	<b>キチン結晶の重水素化挙動</b>	<b>58</b>
6.1.	緒言	58
6.2.	実験	59
6.2.1.	試料調製	59
6.2.2.	X線回折実験	59
6.2.3.	重水素化実験	59
6.2.4.	フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 測定	60
6.3.	結果と考察	60
6.3.1.	X線回折	60
6.3.2.	$\alpha$ -キチンの重水素化挙動	61
6.3.3.	$\beta$ -キチンの重水素化挙動	64
6.4.	結言	66
<b>7.</b>	<b><math>\alpha</math>-キチンの物性解析</b>	<b>68</b>
7.1.	緒言	68
7.2.	実験	69
7.2.1.	試料調製	69
7.2.2.	弾性変形挙動解析	69
7.2.3.	熱膨張挙動解析	71
7.3.	結果と考察	71

7.3.1.	弾性変形挙動	71
7.3.2.	熱膨張挙動	75
7.4.	結言	76
<b>8.</b>	<b><math>\beta</math>-キチンの物性解析</b>	<b>77</b>
8.1.	緒言	77
8.2.	弾性変形挙動	77
8.2.1.	方法	78
8.2.1.1.	X線回折実験	78
8.2.1.2.	第一原理計算	78
8.2.2.	結果と考察	78
8.2.2.1.	X線回折実験	78
8.2.2.2.	量子化学計算	81
8.3.	熱膨張挙動	84
8.3.1.	方法	85
8.3.1.1.	X線回折実験	85
8.3.1.2.	第一原理計算とLöwdinの密度解析	85
8.3.1.3.	分子力場修正	86
8.3.1.4.	分子動力学計算	87
8.3.2.	結果と考察	89
8.4.	結言	95
<b>9.</b>	<b>結論</b>	<b>97</b>
	引用文献	100
	謝辞	113
	発表論文リスト	114

# 1. 序論

## 1.1. 構造多糖類

およそあらゆる生物は、その生態に適した形態を形成、維持するために体内外に剛直な構造体、いわゆる骨格を有する。脊椎動物の場合では、リン酸カルシウム等から成る骨組織を中心とした内骨格を有するが、動物界最大の分類群である節足動物門ではキチン質の外骨格、高等植物や藻類、真菌類では細胞壁というように、脊椎動物門以外の生物は多糖類を含む骨格構造を有する場合が多い。これらの構造体の主成分である多糖は構造多糖類と呼ばれ、アミロースやグリコーゲンのような貯蔵多糖とは区別される。その中でもセルロースやキチンといった結晶性多糖類は骨格構造に求められる生物体を支持し保護する機能を担うため、強度や熱安定性などの面で優れた機械的特性を有する。また、生体内における構造多糖は単独で強度を発現するのではなく、多くの場合にタンパク質やその他の生体高分子、また無機塩と高度に複合化することで、巨視的な骨格組織として機能を発現している。

構造多糖類は、その優れた特性のために古くから材料としての利用がなされてきた。特にセルロースは、樹木細胞壁の主成分として蓄積量が非常に豊富で、また容易に入手することが可能であるため利用可能性が極めて高い資源であり、樹木そのものは建材として、また精製、加工の工程を経ることで紙、繊維として広く利用されている。材料としての利用が盛んになされていく中で、物性発現機構の解明、また新たな用途の探索などを目的に、セルロースの構造や物性についての基礎的研究、またその物性の改質についての研究が行われてきた。そのようなセルロースについての研究によって、セルロースの構造と物性について以下のような知見が得られている。まず X 線回折実験により、天然のセルロースが空間的周期を持って分子が配列した分子結晶であること、その結晶中では高分子量の伸びきり分子鎖が疎水的相互作用と水素結合によって安定化されていることが明らかとなった (Gardner & Blackwell, 1974; Meyer & Mark, 1928; Meyer & Misch, 1937; Nishiykawa & Ono, 1913; Nishiyama et al., 2002, 2003)。さらにその結晶には分子鎖の配列様式の違いによって、天然に二種類の結晶形が存在すること (Atalla & Vanderhart, 1984; Sugiyama et al., 1991)、また化学的、あるいは熱力学的処理によってその結晶構造が別のいくつかの安定な結晶構造に転移しうることが示された (Kolpak & Blackwell, 1976; Langan et al., 1999; Sarko & Muggli, 1974; Stipanovic & Sarko, 1976; Wada et al., 2004)。この天然セルロースの分子結晶は微視的にはマイクロフィブリルと呼ばれる、太さ数~数十 nm、長さ数  $\mu\text{m}$  程度の繊維として存在しており、マイクロフィブリル中での分子鎖の充填様式、あるいはより高次のマイクロフィブリル同士、またキシランなどのヘミセルロースのような他の基質との凝集状態も報告がなされている (Hayashi et al., 1987; Helbert et al., 1998a, b; Matthews et al, 2006; Preston

et al., 1948; Sugiyama et al., 1985, 1986; Whitney et al., 1999)。また、これらのセルロース結晶多形の機械的強度を始めとした種々の物性が、X線回折を中心とした実験的解析と、理論計算手法の双方を用いて報告されている (Bergenstrahle et al., 2007; Dri et al., 2013; Hori & Wada, 2006; Iwamoto et al., 2009; Mazeau, 2011; Mazeau & Heux, 2003; Nishino et al., 1995; Sakurada et al., 1962; Tanaka & Iwata, 2006; Wada, 2002; Wada et al., 2010; Wohler et al., 2012)。

これに対して、キチンや  $\beta$ -1,3 グルカンといったその他の構造多糖では、資源の存在量や入手の困難さなどの問題からセルロースほどには産業的利用はなされておらず、構造や物性についての知見の蓄積はセルロースに比べると不足している。

## 1.2. キチン

キチンはセルロースに次いで豊富に存在する構造多糖である。キチンは 19 世紀初頭に西洋キノコのアルカリ不溶成分として初めて見出され、その後 1823 年にフランスの Odier によって昆虫の外皮から抽出され chitine と命名された (後に Children によって chitin と英訳される) (Khoushab, 2010)。この物質は、菌類の細胞壁、昆虫類の外皮をはじめとした節足動物の外骨格、貝殻の殻皮、植物プランクトンの棘条の構成成分として地球上に広く分布している。セルロースと同様、再生産可能な生物資源、バイオマスの一つであり、その年間の再生産量は  $5.1 \times 10^6$  トン程度と見積もられているが、大部分が陸上植物中に存在しているセルロースに対して、海洋性生物による生産が中心的なキチンについては生産量の正確な把握は困難である (Shahidi et al., 1999)。含窒素有機物である点、また海洋生物によって盛んに生産、代謝される点から、深海も含む海洋生態系の物質循環において極めて重要な役割を果たすものと考えられる (Khoushab, 2010)。一方で、産業的利用に目を向けると、資源の確保が比較的難しいため利用量は限定的であるが、食品残渣として得られるカニ殻、エビ殻を主な供給源として、キチンそのもの、あるいはその誘導体であるキトサンが食品添加物や医用材料、あるいは抗菌材料として用いられている (Rinaudo, 2006)。

化学的には、キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ -1,4 グリコシド結合によって重合した直鎖状の高分子であり (図 1-1a)、これは D-グルコースが  $\beta$ -1,4 グリコシド結合したセルロースの一次構造と非常に類似している (図 1-1b)。生体内ではキチンのアセトアミド基は部分的に脱アセチル化している場合が多く、高度に脱アセチル化されたものはキチンと区別してキトサンと呼ばれる (図 1-1c)。他の天然高分子と同様に、生物学的起源の違いによってこの化学構造には多様性があることが知られている。たとえば、重合度は甲殻類では  $3.0 \times 10^3$  程度と見積もられるが、知られている中で最も高重合度のハオリムシ由来のキチンは少なくとも  $1.0 \times 10^4$  の重合度である (Kauss et al., 1989; Ogawa, Unpublished data)。脱アセチル化度について

でもその多様性は大きく、菌類では 80%程度と高いが、海洋性植物プランクトンの棘条、ハオリムシ棲管や毛顎動物の顎毛に由来するキチンでは脱アセチル化はほぼ起こっていないと考えられている (Heux et al., 2000)。

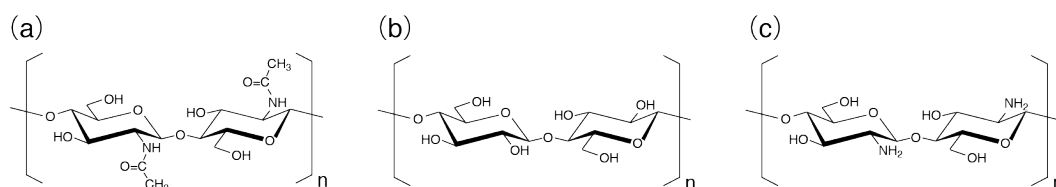


Fig. 1-1 Chemical structures of (a) chitin, (b) cellulose, and (c) chitosan.

### 1.3. キチンの固体構造

同じ  $\beta$ -1,4 グリコシド結合で形成された直鎖状多糖であるセルロースのように、キチンも天然に分子鎖が空間的規則性を持って配列した結晶状態で産出されることが知られている。より高次の凝集状態もセルロースと似通っており、マイクロフィブリルと呼ばれる繊維状結晶がタンパク質や多糖と複合化されることで、真菌類の細胞壁や節足動物のクチクラ層を形成している。

キチン結晶の固体構造解析については、昆虫や甲殻類の外皮（クチクラ層）を用いた X 線回折実験の報告は 1920 年代からあるが (Gonell, 1926; Meyer & Pankow, 1935)、1950 年に Lotmer と Picken によってイカの腱が昆虫や甲殻類由来のキチンと異なる回折パターンを与えることが報告され、天然に結晶多形が存在することが明らかとなった (Lotmer & Picken, 1950)。珪藻の棘条由来の試料が chitan と呼ばれるなど一時的に用語の不統一が見られたが、現在ではキチンの結晶多形は X 線回折パターンを元に Rudall によって整理されたように呼称されている (McLacklan et al., 1965; Rudall 1963)。すなわち、真菌類の細胞壁、節足動物の外皮等から得られるキチン結晶を  $\alpha$ -キチン、イカの腱、珪藻の棘条、ハオリムシの棲管、また貝の殻皮等から得られるものを  $\beta$ -キチンと区別する。Rudall らによって第三の結晶形である  $\gamma$ -キチンがイカや一部の昆虫の囲食膜や甲虫の繭中に存在することが示され、結晶構造についての予測も行なわれたが、現在までのところそれに続く詳細な構造解析の報告はなく、その存在は疑問視されている (Rudall, 1963; Jang et al., 2004)。

#### 1.3.1. $\alpha$ -キチンの結晶構造

節足動物のクチクラ層や真菌類の細胞壁で見出される主要な結晶形である  $\alpha$ -キチンの結晶構造解析は、Gonell (1926) や Meyer と Pankow (1937) によって 1920 年代から行なわれおり、この時点で比較的現在に近い形の分子モデルが提案されていた。より近代的な構造解析は



1957年に Carlström によって行なわれた (Carlström, 1957)。ロブスターの腱を用いた X 線繊維回折実験を行い、その強度データに基づく詳細な構造解析を行い、分子構造を提案した。Carlström の結晶構造モデルは、斜方晶系の単位格子に還元末端の向きの異なる分子鎖が二本充填された構造 (逆平行鎖構造) であり、空間群は  $P2_12_12_1$  であった。この構造モデルの特徴は現在広く認められているモデルのものと一致している。その後、Minke と Blackwell (1978) はロブスターの腱を用いて、再度  $\alpha$ -キチンの X 線回折による構造解析を行なった。単位格子や主鎖の基本的な配列様式は Carlström の構造と概ね一致していたが、一級水酸基の配座が、Carlström の構造では *gt* (O6 の

配座が O5 に対して *gauche* 位、C4 に対して *trans* 位) の一通りであったが、このモデルでは *gg* (O5 と C4 に対して共に *gauche*) と *gt* が 50:50 の確率で統計的に配置されている。これにより、この構造中では全ての水酸基が水素結合に関与することになるため、Carlström の構造モデルと赤外分光法の結果との齟齬を解消する信頼性の高いモデルであると言えた。

2009年には、Sikorski ら (2009) が高輝度のシンクロトロン放射光 X 線を線源として、ズワイガニの腱を試料として用いた X 線構造解析を行なった。このモデルにおいても単位格子や分子鎖の配列様式は Carlström のモデルとほぼ同一である。一級水酸基には統計的に配座を振り分けたモデルが採用されているが、強度データから得られる構造因子の差フーリエ合成によって直接的に一級水酸基の配座を決定した点で、モデルとしての信頼性がより高い。このモデルが現在までに報告されたものの中では最有力の  $\alpha$ -キチンの構造モデルである (図 1-2)。この構造中では、結晶の *a* 軸方向にグルコピラノース環が疎水的相互作用によって堆積した分子シート構造を有しており、分子シート内、またシート構造同士が水素結合で安定化されている。

しかしながらこの構造モデルについても、分光学的な知見と不一致が見られるなど依然として問題がある。 $\alpha$ -キチンの赤外分光スペクトルにおいては、C=O 伸縮振動 (amide I) は doublet として観測され、2通りの振動様式が存在することが示唆されている (Pearson et al., 1960)。しかし Sikorski の構造モデル中で許容される C=O 伸縮振動は一種類であることが予測される。ま

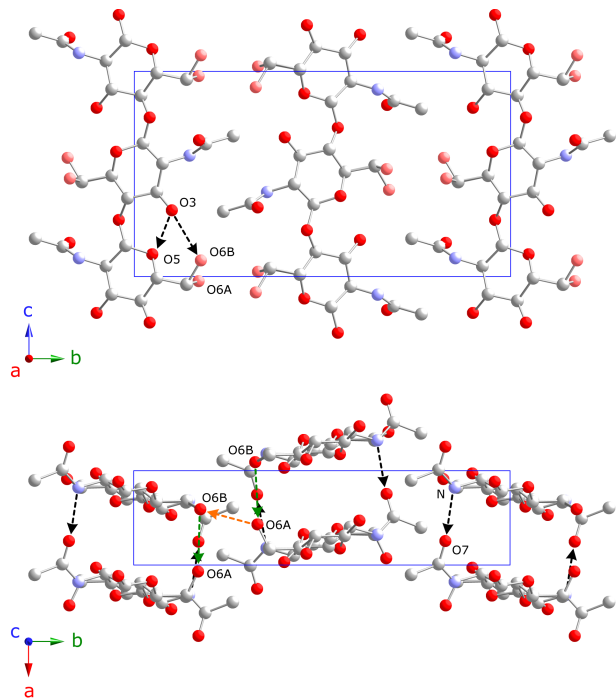


Fig. 1-2 Crystal structure of  $\alpha$ -chitin proposed by Sikorski et al. (2009)

たカニの腱を用いた  $\alpha$ -キチンの固体  $^{13}\text{C}$  核磁気共鳴 (NMR) スペクトルでは、各炭素に帰属されるピーク数は一つであるもののピーク形状が左右非対称であり、結晶の対称性がより低い可能性を示唆している (Tanner et al., 1992; Kameda et al., 2005)。加えて、逆平行鎖構造の繊維結晶を生合成する機構についてもこれまでのところ説明はなされていない。キチン合成酵素としては非還元末端で分子鎖伸長反応を行なうものしか知られておらず、逆平行鎖構造の結晶をセルロースのように連続的な重合-結晶化の過程で産出することは不可能である。 $\alpha$ -キチンマイクロフィブリルが一定の形状的均一性を有することを考えると、セルロース合成酵素複合体のような分子鎖重合と結晶化を同時に制御する合成装置の関与が予想されるが、産出された高分子量の分子鎖がただちには凝集、不溶化せず、その後合成装置に再度取り込まれて結晶化する、という機構は想像し難い。真菌類のキチン生合成については、キチン合成酵素を含む Chitosome と呼ばれる細胞膜結合性の小胞によって  $\alpha$ -キチンが生合成される仕組みが見出されているが、マイクロフィブリルの形状が制御されえない機構であるため、形状的均一性を有する節足動物などの  $\alpha$ -キチンの生合成様式とは異なるものと考えられる (Ruiz-Herrera et al., 1974; Bracker et al., 1976; Siemieniowicz et al., 2007)。以上に示した分光学的知見との齟齬と、生合成機構に関する疑問から、 $\alpha$ -キチンの結晶構造モデルには再検討の必要があると言える。

$\alpha$ -キチンは天然に産出される以外にも、低分子量のキチン分子の再結晶化や、 $\beta$ -キチンの高濃度アルカリ処理によっても得ることが出来る (Helbert et al., 1998c; Persson et al., 1992; Noishiki et al., 2003; Sakamoto et al., 2000)。もう一つの結晶形である  $\beta$ -キチンに比べて化学的に安定であると考えられており、後述する  $\beta$ -キチンのような高い結晶性錯体形成能は有さないが、ヒドラジンや低分子量のアルキルジアミンと錯体結晶を形成する (Noishiki et al., 2005)。

### 1.3.2. $\beta$ -キチンの結晶構造

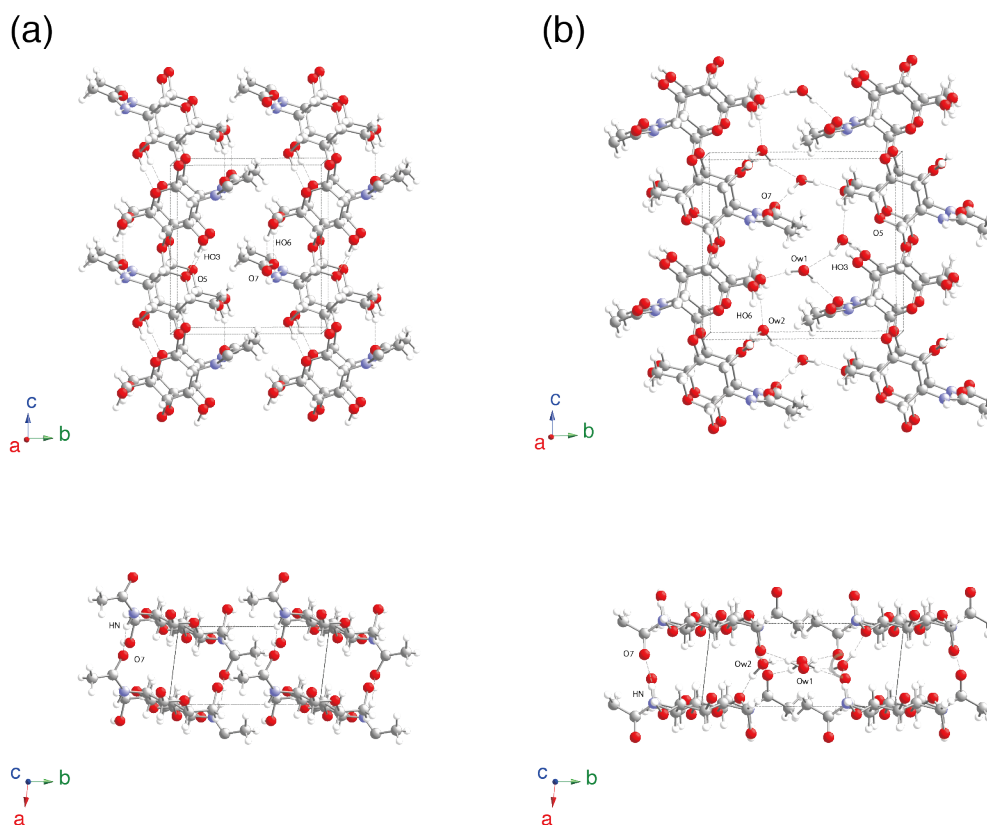
$\beta$ -キチンは前述の通り、Lotmer と Picken (1950) により見出された。イカの腱を用いて Dweltz ら (1968) によって X 線構造解析が行なわれていたが、Blackwell らのグループは珪藻由来、あるいはハオリムシ由来の高結晶性  $\beta$ -キチンを用いることで解析精度を向上させた。Dweltz らの報告の中で  $\beta$ -キチンの結晶格子中に水分子が含まれることがすでに示唆されていたが、Blackwell は試料の乾燥、湿潤などの調製条件によって繊維回折図形の赤道の回折が不連続な値をとることを見出し、格子中に全く水分子を含まない無水型結晶と水を含む水和型結晶が存在することを示した (Blackwell, 1969)。また同時に、結晶格子中に含有する水分子の量によって少なくとも二種類の水和型結晶が存在することが報告された。その後、Gardner と Blackwell はハオリムシ棲管由来の試料から得た無水型  $\beta$ -キチンの X 線回折強度データを元に、構造精密化を行なった (Gardner & Blackwell, 1975)。これによると無水型  $\beta$ -キチンの単位格子は分子鎖を一本

含んだ単斜晶系で、分子鎖の還元末端の向きは結晶内では揃っている（平行鎖構造）。またこの結晶はセルロース結晶多形のように空間群は  $P2_1$  に属しており、結晶の繊維軸方向にのみ二回らせんの対称性を有している。

この構造モデルは近年まで妥当性の高く有力なモデルとされてきたが、最近になって Nishiyama ら (2011) は、一連のセルロース結晶多形の精密構造解析において Langan と Nishiyama によって開発された構造解析手法を用いることで、構造モデルの信頼性を飛躍的に向上させた (Langan et al., 1999; Nishiyama et al., 2002, 2003)。具体的には高結晶性試料と高輝度 X 線と中性子線を用いた高分解能の強度データの取得と、バックグラウンド強度の適切な評価によって、精度の高い回折強度情報を用いること、そしてその強度情報に基づいて直接法による構造解析を行なうことがこの解析手法の要点である。Nishiyama ら (2011) の無水  $\beta$ -キチンの報告においては、差フーリエ合成によって自由度の高い側鎖構造の全ての原子位置の直接決定を行なった。特にこの研究で用いられた珪藻由来の  $\beta$ -キチンは、Nishiyama らの一連の研究で用いられた高結晶性セルロースと比しても結晶サイズが大きく、極めて高精度の強度データを収集することが出来たために、タンパク単結晶構造解析に比肩する信頼性の高い解析が行なわれた。これに続いて Sawada ら (2012a) は高結晶性試料を用いた中性子線回折実験を行い、Nishiyama らの骨格構造を元に X 線構造解析によっては直接決定できない水素位置を決定した。(Fig. 1-3a) この構造モデルにおいては、 $\alpha$ -キチンと同様にグルコピラノース環が堆積した分子シートが  $a$  軸方向に形成されているが、水酸基やアセトアミド基の水素が関与する強い水素結合は  $b$  軸方向には存在せず、炭素結合性の水素がドナーの弱い水素結合のみが存在することが示された。

また Sawada ら (2012b) はその後、 $\beta$ -キチンの湿潤状態の結晶形である二水和型  $\beta$ -キチンの X 線、および中性子回折による構造精密化を行なった (Fig. 1-6)。Nishiyama らの構造解析の場合と同様に、この解析においても差フーリエ合成によって側鎖の全原子位置と水分子の位置を直接決定しており、詳細な水素結合様式も明らかとなった。この構造中では、無水型の分子シート構造はほぼ維持されており、分子シート間に GlcNAc1 残基につき 2 つの水分子が配列した構造となっている。ほぼ全ての水素結合が水分子を介してネットワークを形成しており、 $\beta$ -1,4 結合した多糖の構造安定化に寄与していると考えられる O5 と HO3 の間の水素結合が、この結晶構造には存在しないことが明らかとなった。 $\beta$ -キチンは、低分子の極性溶媒分子と錯体結晶を形成する (Noishiki et al., 2003, 2004; Saito et al., 1998)。セルロースや  $\alpha$ -キチンも極性の高いアルキルアミンと結晶性錯体を形成するが、 $\beta$ -キチンの場合は、水分子や一級アルコールといった溶媒分子とも錯体化が容易に進行する。また、低分子量の溶媒分子との錯体結晶を、相溶性のあるより高分子量の溶媒分子に順次溶媒置換していくことで、炭素数 10 までの長鎖のアルコール分子や芳香族化合物、カルボン酸とも錯体化することが可能である (Saito et al., 1998)。Saito

らによる一連の X 線繊維回折実験の結果から、 $\beta$ -キチンの結晶性錯体中では、分子シート構造は概ね維持され、溶媒分子は分子シート間に規則的に配置していることが示された。Sawada ら (2013) は、エチレンジアミン錯体の X 線構造解析を行なうことで、シート構造間での溶媒分子の配列とキチン分子との相互作用を明らかにした。このような錯体形成能は、構造的に安定な分子シート間に強い水素結合がない無水  $\beta$ -キチンの結晶構造に起因していると考えられる。



**Fig. 1-3** Crystal structures of (a) anhydrous  $\beta$ -chitin proposed by Nishiyama et al. (2011) and (b) dihydrate  $\beta$ -chitin proposed by Sawada et al. (2012)

### 1.3.3. 高次の凝集構造

このように天然に結晶多形が存在するキチンであるが、その天然での産出状態は結晶形によらず繊維状結晶、つまりマイクロフィブリルである。キチンマイクロフィブリルの形状は、セルロースマイクロフィブリルと類似しており、幅はおよそ 2 nm から 50 nm 程度、長さは数から数十  $\mu\text{m}$  程度である。断面形状は、天然セルロースの場合と同様に生物的起源によって大きく異なっている。例えば、カニのクチクラ層中のキチンは、一辺 2 nm 程度の正方形断面を有するが (Atkins, 1985; Giraud-Guille, 1984; Giraud-Guille et al., 1990; Neville et al., 1976)、ガラパゴス大ハ

オリムシの棲管中のキチンは、長辺 30~50 nm 程度の矩形断面を有している (Gaill et al., 1992; Shillito et al., 1997)。セルロースが、透過型電子顕微鏡や原子間力顕微鏡観察、あるいは理論計算によって表面を含むマイクロフィブリル構造の解析が盛んに行なわれているのに対して、キチンについてはそのような試みは少なく、いくつかの高分解能観察像が報告されているもののマイクロフィブリル内での分子鎖充填様式は明らかになっていない (Gaill et al., 1992; Revol, 1988; Revol & Chanzy, 1986; Revol et al., 1989)。

一方で、生体組織中でのキチンマイクロフィブリルの存在様式についての研究は盛んに行なわれている。珪藻やハプト藻の棘条、黄金色藻の被甲などでは例外的にほぼ単離したマイクロフィブリルとして産出されるが (Herth et al., 1977a, b; Chretiennot-Dinet et al., 1997)、それ以外のほとんどの場合でキチンはタンパク質やその他の多糖と共存状態で産出される。例えば昆虫のクチクラ層やハオリムシの棲管はキチンとコラーゲンのようなタンパク質によって形成されており、カニなどの甲殻類の外骨格においては、類似のキチン-タンパク質複合構造に炭酸カルシウムが沈着することによって機械的強度が高められている (Raabe et al., 2006; Rudall et al., 1973; Vincent, 2002; Vincent and Wegst., 2004)。一方、真菌類の細胞壁ではキチンは  $\beta$ -1,3 グルカンなどの多糖類や糖タンパクと高度に複合化している (Kapteyn et al., 1999)。この細胞壁中では、キチンをはじめとした各構成成分は共有結合していると考えられており、この点においてクチクラ層中のキチンや植物細胞壁中のセルロースの存在様式とは異なる。また具体的な存在比は、クチクラ層などのキチン-タンパク質複合体の系では、重量比でキチンとタンパクがおよそ 1:1 から 1:3 程度の割合で含まれているが、菌類の細胞壁では乾燥重量で数%程度しか含まないと考えられている (Vincent and Wegst, 2004; Kapteyn et al., 1999)。

組織構造中におけるキチンマイクロフィブリルの存在状態に関する研究は、セルロースや他の多糖類と同様に、電子顕微鏡観察や X 線散乱実験などの解析手法によって行なわれている (Neville 1993; Rudall, 1963; Rudall & Kenchinton, 1973)。X 線回折による解析では、甲虫の繭や、ハチの産卵管、イカの腱などには巨視的なキチン結晶の配向があることが示された (Rudall, 1963)。このようなキチン-タンパク質複合体では、頻繁にキチンの回折と同時にタンパク質由来の周期が回折図中に観測される。特にハチの産卵管から得た X 線回折図には、キチン結晶と配向の一致した繊維状の構造タンパク質の周期が広角領域に、またタンパク質と複合化したマイクロフィブリルの配列周期が小角領域にそれぞれ観測されており、キチンとタンパク質の高度に複合化された様子が直接的に観察された (Blackwell & Weih, 1980)。この研究と関連して、組織中でのタンパク質とキチン結晶との相互作用についてのタンパク構造と分子モデリングによる予測がなされている (Hamodrakas et al., 2002; Iconomidou et al., 2005; Neville 1993; Vincent 2004)。それらの研究では、クチクラ層中でキチンと相互作用があると考えられる  $\beta$  シート構造を有す

るタンパク質分子の周期の3倍周期と、キチン繊維周期の2倍の周期の一致から、キチンの一級水酸基とアセトアミド基とタンパク質間の水素結合が主要な相互作用であると指摘されている。また、キチン-タンパク質複合体では、タンパク質との相互作用によってキチンの結晶構造に変化が見られる場合がある。例えば、ハエの幼生のクチクラ層やイカの腱などでは、タンパク質の除去処理の前後で繊維周期や繊維軸方向の結晶の対称性に有意な差異が見られる。これは、タンパク質との密接な複合化によって組織中では一定の応力がキチン結晶にかかっているためであろう。

昆虫や甲殻類のクチクラ層では、植物細胞壁中でのセルロースのような古典的なX線回折法によって観測できるような巨視的な結晶の配向はない。しかしながら、カニの外骨格の組織切片についての電子顕微鏡観察によって、このクチクラ層が配向の揃ったマイクロフィブリルとタンパク質マトリックスで構成される層が積層されることで形成されていること、その層ごとが回転して組み合わせられた、いわゆる合板状の構造体であることが明らかとなった (Bouligand, 1972; Giraud-Guille, 1984)。昆虫のクチクラ層の微視的構造も、これに類似することが知られている。さらに、同様の合板様構造は *Riftia* 属、*Tevnia* 属のハオリムシ棲管中でも観察されている (Gaill et al., 1992; Shillito et al., 1997)。

このように、マイクロフィブリルの構造や生体内での存在様式といったキチンの高次の凝集構造は、部分的にはあるが明らかにされつつある。このような高次の凝集構造の理解は、骨格構造の物性発現機構を解明する上で不可欠なばかりでなく、キチンやその組織の生成過程を理解する上でも重要な知見となりうる。

#### 1.4. キチンの物性

キチンを構造成分として含む組織や材料の物性理解を行なうために最も重要な点は、その系の物性発現の基本となるキチンの結晶物性を理解することである。しかしながらキチンの結晶物性についての研究は、セルロースの結晶多形に比べると報告が非常に少ない。最も基本的な力学物性である結晶の弾性変形挙動については、甲殻類  $\alpha$ -キチンについてのX線回折実験による測定が一件 (Nishino et al., 1999) と、また珪藻の  $\beta$ -キチンの結晶弾性率について走査型プローブ顕微鏡を用いた解析が一件行なわれているのみである (Xu et al., 1994)。これらの報告は、繊維軸方向についての結晶弾性率のみを報告したものであり、弾性変形挙動に限っても軸力に対する弾性体の変形傾向を表す Poisson 比が報告されていない。このようにキチンの外力に対する応答挙動についての情報は限定的である。熱物性についてはいくつかの報告例があり、熱膨張率を始め、熱分解挙動や熱示差分析による吸放熱挙動の解析などが行なわれている (Jang et al., 2004; Saito et al., 2002; Wada & Saito, 2001)。

一方で、キチン質である昆虫の外皮の力学特性評価は盛んに行なわれてきた。これは昆虫のクチクラ層が飛行の妨げにならないように非常に軽量で、かつ生物体を保護するために強靱な性質を有することから、理想的な天然の複合材料であるとして注目されたためである (Raabe et al., 2006; Vincent and Wegst., 2004)。クチクラ層の弾性率はその生物学的起源に強く依存することが知られており、小さいものでは脚部の関節部分の 1 kPa 程度であり、大きいものではバッタの腹部クチクラ層で 20 GPa 程度までの高い弾性率を発揮する。また破壊歪みは 1~5% に達するなど、靱性と剛性を兼ね備えていることが知られている。クチクラ層のこのような力学物性の多様性は、キチンやタンパク質、水分などの構成成分比の違いと、キチンの配向性、組織形状など各階層での高度な設計によって行なわれており、人工材料を設計する際の生物模倣の対象となりうる。しかしながら、その物性発現の根幹をなすキチンをはじめとした構成成分の外力への応答挙動が明らかとなっていないため、このような複合体の物性発現機構のより詳細な解明には至っていない。

## 1.5. 本研究の目的

これまで示した通り、キチンの固体構造については X 線回折を中心とした解析が行なわれており、その結晶構造と高次の組織構造についての知見は蓄積されつつある。しかしながら、両者を結びつける中間的なスケールの構造、すなわちマイクロフィブリル構造についての情報は乏しく、キチン質の固体構造の全体像に理解するには至っていない。また結晶構造解析についても、主要な結晶形である  $\alpha$ -キチンの結晶構造には依然として問題点があり、最近詳細な構造が明らかとなった  $\beta$ -キチンについても、セルロースや他の結晶性材料で行なわれているような、理論計算法による動的構造についての知見などが不足している。またキチンの基礎的な結晶物性についての情報は十分に蓄積されておらず、物性そのものや構造-物性間の相関関係を理解するためにはより広範な物性値を得ることが必要であろう。そこで本研究では、キチンの固体構造と物性、また両者の関係を理解することを目的とした。具体的には、第二章から第五章では、分子スケールから巨視的な組織構造に至るまでの各階層での固体構造解析を行ない、第六章から第八章では、キチンの両結晶多形の化学的、また熱的、力学的物性について調べた。特に詳細な構造が既知である  $\beta$ -キチンについては、実験的手法に加えて、微視的な動的挙動をより詳細に理解することを目的に理論計算法による解析を行なった。

## 2. $\alpha$ -キチン結晶構造の再検討

### 2.1. 緒言

$\alpha$ -キチンは、昆虫や甲殻類などの節足動物の外皮や、真菌類の細胞壁に存在するキチンの主要な結晶形である。セルロースの結晶構造解析の場合と同様に、 $\alpha$ -キチンの結晶構造解析は、X線や電子線を用いた回折実験と赤外分光法や固体NMR法などの分光学的手法によって行われてきた (Carlström, 1957; Minke & Blackwell 1978; Focher et al., Kameda 2005; 1992; Pearson et al., 1960)。X線構造解析の結果としては、カニの腱由来の  $\alpha$ -キチンを試料として解析した Sikorski らのモデルが現状では最も有力である (図 2-1) (Sikorski et al., 2009)。この構造モデルでは、結晶の属する空間群は  $P2_12_12_1$  であり、単位格子は斜方晶系で  $a = 4.74 \text{ \AA}$ 、 $b = 18.86 \text{ \AA}$ 、 $c = 10.34 \text{ \AA}$  の格子定数を有している。従って、一つの単位格子中には、繰り返し単位である 2 つの GlcNAc 残基から成る分子鎖が 2 本分、つまり 4 つの GlcNAc 残基が含まれる。空間群が  $P2_12_12_1$  であることから、回転、並進などの対称操作による分割ができない最小の単位である非対称単位は GlcNAc 一残基分で構成される。また、対称性から明らかであるが、単位格子中に含まれる 2 本の分子鎖の還元末端の向きは互いに異なる (逆平行鎖構造)。Sikorski らのモデルにおいては、

グルコピラノース環の疎水面の垂直方向に分子鎖が堆積することで形成された分子シート構造が存在しており、この結晶はこのシート構造同士が分子間力と水素結合によって安定化した構造体であると見ることが出来る (Fig. 2-1)。1 つの分子シート構造に含まれる分子鎖の極性は全て揃っているが、隣接シート中の分子鎖の極性は異なっている。6 位の一級水酸基の配座は、*gg* と *gt* のコンフォメーション (O6A と O6B) が室温ではおよそ 60:40 の割合で分配された構造である。またこの構造モデル中では、O3-H...O5/O6 間の分子内水素結合と、N-H...O7 間と O6B-H...O6A 間の分子シート構造内の分子間水素結合、O6A-H...O6B 間のシート間の分子間水素結合が各官能基の幾何学的配置により予

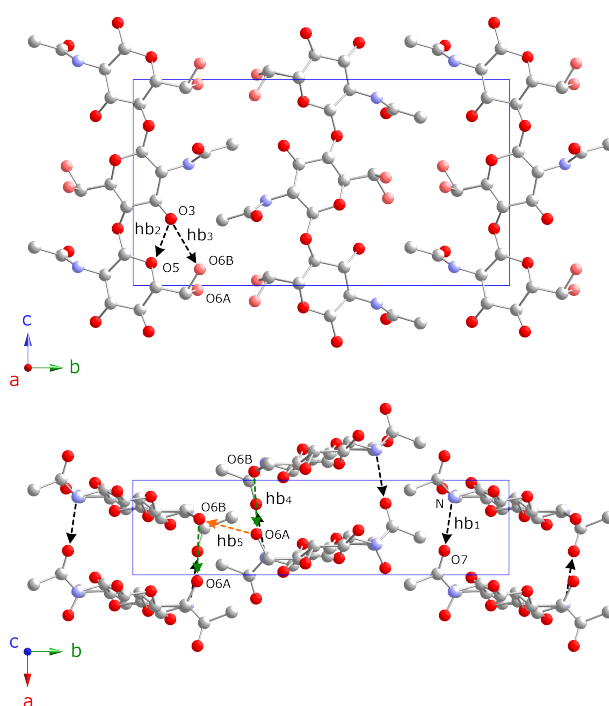


Figure 2-1 Crystal structure and hydrogen bonding pattern of  $\alpha$ -chitin proposed by Sikorski et al. (2009)



想されている。

キチンの固体構造解析に関する研究としては、回折実験以外にも赤外分光法と核磁気共鳴法によるアプローチがある。赤外分光法によっては、固体試料中での分子の振動様式についての知見が得られる (Focher et al., 1992; Marchessault et al., 1960; Pearsson et al., 1960)。 $\alpha$ -キチンの赤外分光スペクトル中では、C7=O7 二重結合の伸縮振動を主とする共鳴振動に対応する吸収である amide I が doublet として観測される。これは C7=O7 間の伸縮振動のパターンが 2 通りあること、すなわち O7 の存在状態が二種類あることを示唆するものであるが、Sikorski らの X 線構造解析の結果では O7 がアクセプターとなる水素結合は一通りであり、この赤外分光の結果に一致しない。Sikorski らによってドナー-アクセプター間の距離が非常に遠い水素結合の存在が示唆されているが、これは一般的な水素結合距離の基準を大きく逸脱している。最近の平面波基底を用いた量子化学計算による  $\alpha$ -キチンの水素結合に関する研究では、複数の一級水酸基の配座の組み合わせについての計算を試行することで、O7 がアクセプターとなる水素結合様式が 2 通りあることを示している (Petrov et al., 2013)。これは一級水酸基の配座によって赤外分光の結果と構造モデルとの齟齬を解消する可能性を示すものではあるが、この DFT 計算の結果得られた  $a$  軸長は実験値から 10%程度大きく見積もられており、この研究で見出された水素結合である O6-H...O7 が  $a$  軸にほぼ平行に配向していることを考えると、実際の結晶構造を適切に再現しているかという点に疑問が残る。また、甲殻類由来の  $\alpha$ -キチンの固体  $^{13}\text{C}$  NMR の結果も現行の X 線構造モデルの結果と一致しないことが示されている。非対称単位が 1 つの GlcNAc 残基から構成される現行モデルの場合、各炭素原子に対応する核磁気共鳴ピークは 1 本ずつになるはずであるが、実験的に得られる NMR スペクトル中の C7 のピークは 2 本に分離していることが確認されている (Kameda et al., 2005)。また、Tanner ら (1990) が指摘しているように、環構造中の炭素原子についてもピーク形状が左右非対称であり、重なり合った複数のピークを観測している可能性が高い。これらの結果は、 $\alpha$ -キチンの結晶中に少なくとも 2 つ以上の不等価な GlcNAc 残基が存在することを示すものであるが、解析に用いられている甲殻類由来の  $\alpha$ -キチンの結晶サイズは十分に大きくなく、結果として分解能が十分に高くないため詳細な解析は行なわれていない。

以上の点から  $\alpha$ -キチンの結晶構造は再度検証する必要があると言える。 $\alpha$ -キチンのより詳細な結晶構造解析を行なうにあたっての問題点は、前述の通り解析用試料の結晶サイズである。これまで信頼性のある詳細な構造が報告された構造多糖類の結晶、すなわちセルロース結晶多形や  $\beta$ -キチンの系では、試料の結晶サイズはほとんどの場合各方位に 10 nm 以上あり、繊維結晶としては高結晶性で大結晶サイズの試料が用いられてきた (Nishiyama et al., 2002, 2003, 2011; Sawada et al., 2012a, b)。一方で、 $\alpha$ -キチンの X 線回折実験に用いられてきた試料は甲殻類

の腱由来のものであり、その結晶サイズはおよそ 2~3 nm である。回折の広がりには結晶サイズに反比例するから、層線上の回折同士の間隔が問題となる繊維回折の手法では結晶サイズが解析精度にもたらす影響は非常に大きい。高結晶性の  $\alpha$ -キチンとしては、毛顎動物の顎毛とハプト藻の棘条が知られている。前者の試料は主に電子回折実験に用いられている (Atkins et al., 1979; Saito et al., 1995)。Saito らの研究によってこの顎毛が極めて高結晶性の  $\alpha$ -キチンであることが示され、現行モデルの単位格子と空間対称性を支持する結果が得られたが、結晶の高い完全性に由来する二重回折 (double reflection) が発生することから、電子線回折の手法によるそれ以上の詳細な解析は行なわれていない。また顎毛の巨視的に湾曲した形状のために、結晶は強い面配向を有しており、従来通りの X 線繊維回折実験を行なうことは困難である (Saito et al., 1995)。後者の単細胞藻類ハプト藻 *Phaeocystis* 属が体外に生産する棘条は、分散性の良い高結晶性の  $\alpha$ -キチンマイクロフィブリルであることが Chretiennot-Dinet ら (1997) によって示されているが、その後これを用いた構造解析はなされていない。そこで本研究では、この *Phaeocystis* の生産する棘条由来の  $\alpha$ -キチンを用いて、 $\alpha$ -キチンの結晶構造について結晶構造解析を行なった。

## 2.2 実験

### 2.2.1. 試料調製

ハプト藻 *Phaeocystis globosa* (NIES-1396 株、国立環境研究所) を mIMR 培地中 (Eppley 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。培養物を遠心分離により回収し、得られた固形分を、1 N KOH (室温、16 h)、0.05 N HCl (50°C、2 h)、0.3% NaClO (pH4.0、80°C、3 h)、1% HF (室温、2 h) による処理を連続して 2 回繰り返して行うことで培養物中に含まれるキチンを精製した。各処理の後には水洗を行い、最終的に得られたキチンの精製物は使用まで水懸濁液として保存した。

X 線繊維回折実験のために、Blackwell の方法 (1969) に従ってタンパク質ゲルを用いて、この *P. globosa* 由来のキチンの繊維軸についての一軸配向試料を調製した。具体的には、1 mg/mL のキチンの水懸濁液を同量の 1% フィブリノーゲン水溶液と混合し、それに牛血清由来の濃トロンビン水溶液を滴下し、12 時間程度静置することによってキチン-タンパク質の複合ゲルを得た。これを短冊上に切り出し、乾燥させながら元の長さの 5 倍程度まで延伸することによって繊維状の配向試料を得た。

本研究では対照用試料として、甲殻類由来のキチンとリン酸加水分解によって得た低分子量の再生キチン結晶を用いた。甲殻類由来のキチンとしてはズワイガニ (*Chionoecetes opilio*) の腱由来のものを用いた。*C. opilio* を 20 分間沸騰水中で処理した後、脚部の腱を取り出し、これを 1 N KOH (室温、16 h)、3% NaClO (pH4.0、80°C、3 h) による処理を 2 回繰り返すことで

精製した。腱中では長手方向にキチン結晶の繊維軸が配向しているため、繊維回折実験に腱としての形状を保ったまま供した。また、NMR 測定、および粉末 X 線回折実験にはヒスコトロンによって解繊した試料を供した。

再生キチン試料は、甲殻類の殻由来のキチン（和光純薬）を Hasegawa ら（1993）の方法でリン酸加水分解することで調製した。キチン試料を 83 % $\text{H}_3\text{PO}_4$  中に強く攪拌することで分散させ、その後室温にて二日間静置した。反応液を大過剰の水で一度再生させた後、上清をエタノールで再度再生させることにより、低分子量のキチンを得た。

### 2.2.2. 回折実験

X 線粉末回折実験には、回転対陰極型 X 線発生装置（RU-200BH、リガク）を用いた（Cu  $\text{K}\alpha$  線、 $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ）。凍結乾燥した粉末状のキチン試料を 1 mm 径のガラスキャピラリーに封入し、X 線回折測定に供した。回折図の撮影は真空カメラを用いて行い、回折図の記録はイメージングプレート（FDR-UR-V、富士フィルム）上に行なった。回折図の読み取り、および解析はリガク社製の RAXIS ソフトウェアによって行なった。

シンクロトロン放射光 X 線繊維回折測定は、放射光施設 SPring-8（播磨、日本）の BL38B1 において行なった。波長 1.000  $\text{\AA}$  の放射光 X 線を一軸配向試料の繊維軸に垂直に照射した。回折図は平板イメージングプレート上に露光時間 120 s で記録した。解析は RAXIS ソフトウェア（リガク）上で行なった。

中性子回折実験は、Institute Laue Langevin（ILL, Grenoble, France）のビームライン D19 において行なった。*C. opilio* の腱由来の  $\alpha$ -キチン試料を 0.1 N NaOD 重水溶液中での熱水処理（200°C、300 min）によって重水素化したものと、未処理の試料をそれぞれ 4 方向回転式の回折計上に設置し、波長 1.4558  $\text{\AA}$  の熱中性子線を照射した。測定は室温条件で行い、中性子線を各試料につきおよそ 24 時間程度照射した。回折強度の記録はマルチワイヤー式の検出器によって行なった。

### 2.2.3. 固体 CP/MAS $^{13}\text{C}$ NMR 測定

各  $\alpha$ -キチン試料は、4 mm 径の BL 型酸化ジルコニウムの試料管に入れ密閉した。測定は室温で 100 MHz の磁場の下、Avance 核磁気共鳴分光計（Bruker, Germany）により行い、魔法角回転（Magic angle spinning: MAS）速度 12 kHz、クロスポーラリゼーション（CP）のために 2.5  $\mu\text{s}$  の 90°位相の異なる 80 kHz の  $^1\text{H}$  パルス波を照射した。掃引幅は 50 kHz とし、反復時間は 4 s、積算回数は 20000 回とした。 $^{13}\text{C}$  の化学シフト値はグリシンのカルボニル炭素の 176.03 ppm を標準として補正した。

## 2.3. 結果と考察

### 2.3.1. X線回折

図 2-2 に  $\alpha$ -キチン試料の X 線回折プロファイルを示す。いずれの回折パターンもこれまでに報告されている  $\alpha$ -キチンの回折プロファイルと一致しているが、回折点の広がりやピーク分離の結果として得られた 0 2 0 の回折の広がりや Scherrer 式から、結晶サイズを算出したところ、*P. globosa* 由来、*C. opilio* 由来、リン酸加水分解物のそれぞれの  $\alpha$ -キチンの結晶サイズは、10.2 nm、5.7 nm、7.2 nm となり、結晶サイズは *P. globosa* > リン酸加水分解物 > *C. opilio* の順に大きかった。Scherrer 式による結晶サイズの見積もりは、粒子形状や線源の違いによって必ずしも正確性は高くないが (Zhang et al., 2003)、*Phaeocystis* の棘条由来の  $\alpha$ -キチン結晶は、従来用いられてきた甲殻類由来の  $\alpha$ -キチンに比して 2 倍程度の結晶サイズを有する高結晶性のものであることが明らかとなった。

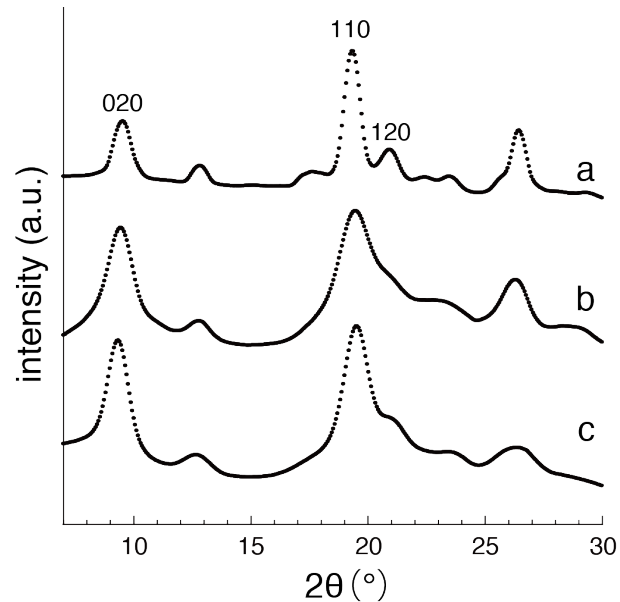


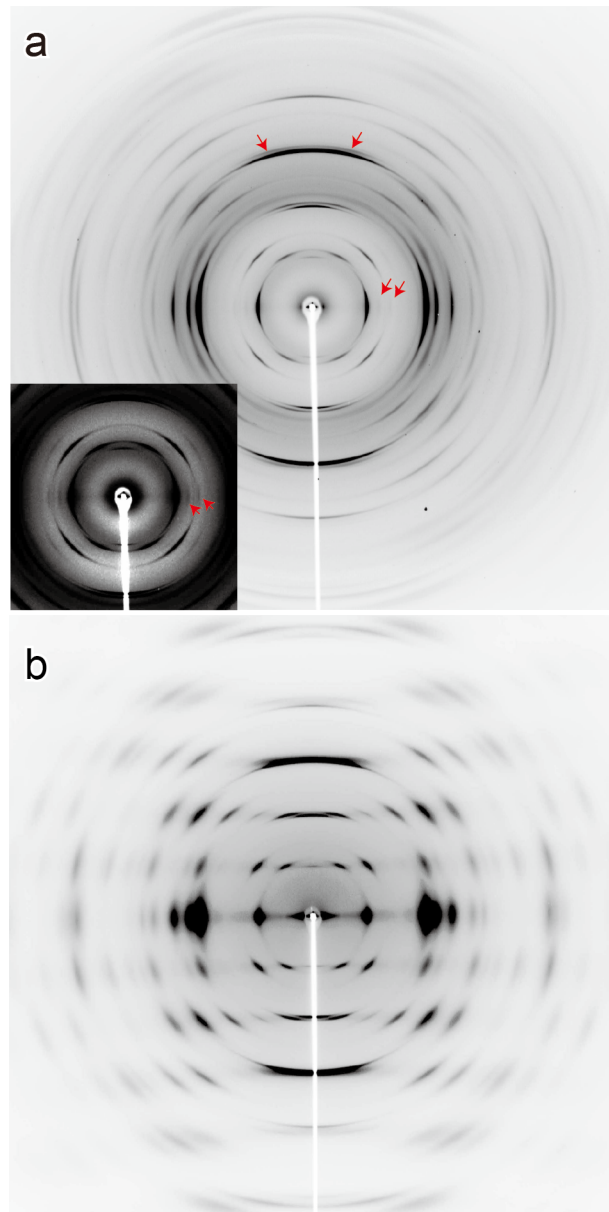
Figure 2-2 X-ray diffraction profiles of  $\alpha$ -chitin from (a) *P. globosa*, (b) *C. opilio*, and (c) low-molecular weight  $\alpha$ -chitin obtained by phospholysis.

図 2-3 には *Phaeocystis* 由来の  $\alpha$ -キチンの繊維回折図を示す。前述した通り、各回折点の放射方向への広がりが狭く、高結晶性であることが分かる。この回折図中の分解能 1.5 Å までの 40 の回折強度の強い回折点、全て Sikorski らの提案する二本鎖の斜方晶の単位格子に従って指数付けを行なうことが可能である。しかしながら、図 2-3a の第三層線上や図 2-3b の赤道上に矢印で示すように、Sikorski らの二本鎖斜方晶の単位格子からは予想されない位置に微弱な回折点が観測された。これらの回折点の面間隔を測定し、単位格子の再精密化を試みた。この結果、二本の分子鎖を含む体積の単位格子の系では、対称性の低い晶系であっても精度の良い単位格子の精密化が行なえないことが明らかとなり、より大きな単位格子と低い対称性を想定する必要性が示された。

一方で、カニの腱由来や離散加水分解物の  $\alpha$ -キチン結晶の X 線回折図からは、このような斜方晶系に合致しない回折点を観測することは出来なかった。これは特に甲殻類由来のキチ

ンについては結晶サイズが小さく、放射方向についての回折の広がりが大きいため生じる回折同士の間隔により、これらの回折点が観測できないためであると考えられる（図 2-3）。加えてこれらの回折点の強度は微弱であり、完全性が高く結晶サイズの大きい結晶でなければ観測に十分な回折強度が得られない可能性があり、この発見は高結晶性の *P. globosa* 由来の  $\alpha$ -キチンを用いることで、初めて可能になったと言える。

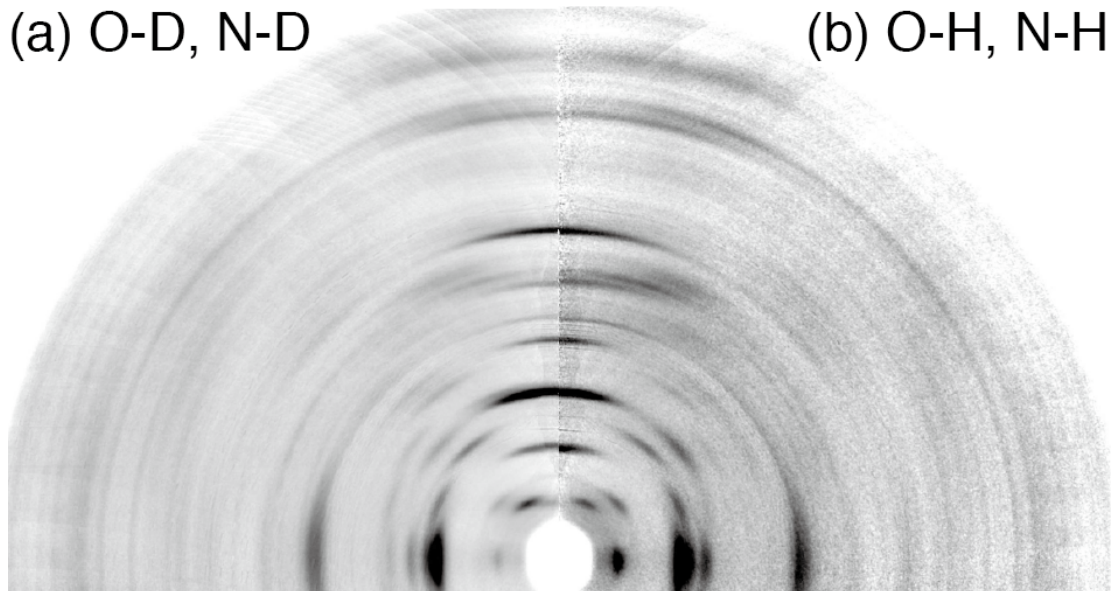
**Figure 2-3** (a) X-ray diffraction diagram of  $\alpha$ -chitin from *P. globosa*. Arrow indicates extra reflections unexpected from the current orthorhombic unit cell. (Inset) Small angle region of the diagram with enhanced contrast. (b) X-ray diffraction pattern of crustacean  $\alpha$ -chitin from tendon of *C. opilio*.



### 2.3.2. 中性子線回折

電子と相互作用を起こす X 線と異なり、中性子線は原子核と相互作用することによって散乱現象を引き起こす。X 線の原子散乱因子は原子中の電子数、つまり原子番号に比例するが、中性子線の場合は、X 線の散乱因子に相当する散乱長は原子に固有であり、たとえば同一の結晶から得られる X 線と中性子の回折情報、あるいは同じ結晶中の原子をその同位体に置換したものでは中性子線回折の強度情報はそれぞれ異なる (Langan et al., 1999; Nishiyama et al., 2002, 2003)。この特性を利用して結晶構造解析においては、X 線回折によっては位置を決定できない水素原子を、中性子線に対しては散乱能の強い重水素に置換した試料の中性子線回折測定を行うことで決定する手法が用いられている。セルロース結晶多形や  $\beta$ -キチンについてもその手法を用いて水素元素位置の決定が行われているが、 $\alpha$ -キチンについては中性子線回折実験についての報告はこれまでのところ行われていない。そこで、本研究では  $\alpha$ -キチンの中性子線回折を行なうことによって、結晶構造についての新たな知見を得ることを試みた。中性子散乱長は水素 (H:  $-0.37$ ) と重水素 (D:  $0.67$ ) で大きく異なっており、構造中の水素を重水素に置換することで、回折図に大きなコントラストの差を生み出すことができる。そこでキチンの結晶内重水素化物についての回折測定を行なった。

図 2-4 に *C. opilio* の腱由来の中性子繊維回折図を示す。およそ  $1.0 \text{ \AA}$  までの回折点を観測可能であり、未処理物においても重水素化物においても第八層線にいたるまで十分な数の回折点を観測することが出来ている。両回折図の間では、特に子午線と赤道上の回折が異なってお

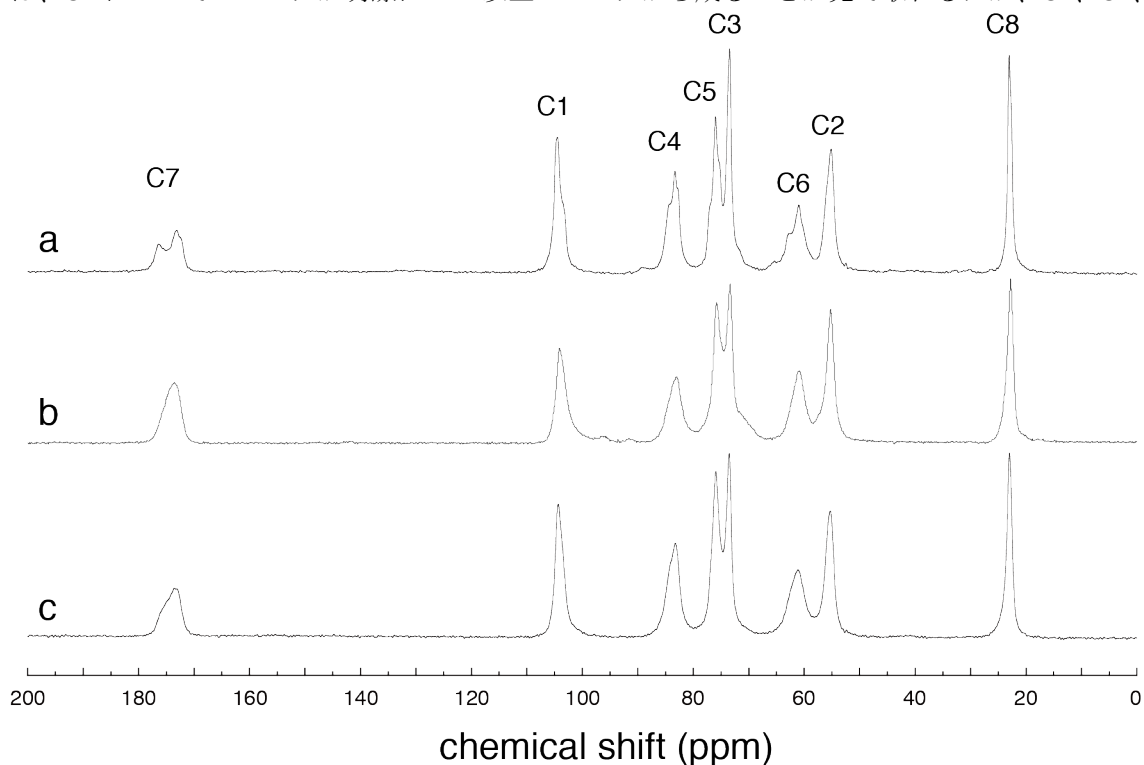


**Figure 2-4.** Neutron fiber diffraction patterns for (a) deuterated and (b) initial (hydrogenated)  $\alpha$ -chitin from tendons of snow crab *C. opilio*. Considerable discrepancies are found on the meridians and equators.

り、重水素化物においては001の回折点を明瞭に観測することが出来るが、未処理物では001の回折点はX線回折図の場合と同様観測することは出来ない。また重水素化物の回折図中では002、004の回折点は、未処理物に比べると非常に弱い。子午線上の回折についてのこのような特徴は、繊維軸方向に2回らせんの対称性が存在しないことを示唆している。この結果はX線回折の結果とは矛盾しない。また赤道上の020の回折強度は未処理物に比べると極めて微弱であり、また110と120の強度比も両者の間では異なる。従って分子シートに垂直な方向についての対称性や詳細な構造についても検討の余地があるものと考えられる。いずれにしても、重水素化物についての中性子線回折の結果は、 $\alpha$ -キチン結晶の真の構造は従来の結晶構造モデルに対して、より対称性が低く複雑な構造であることを強く示唆している。

### 2.3.3. 固体 $^{13}\text{C}$ NMR

図2-5に各 $\alpha$ -キチン試料の固体CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルを示す。いずれのスペクトルもこれまでに甲殻類の $\alpha$ -キチンを用いて測定された固体 $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルのパターンと概形は一致している。しかしながら *P. globosa* 由来の $\alpha$ -キチン結晶のスペクトル(図2-5a)では、C7についてのピークが明瞭に2つ以上のピークから成ることが見て取れるほか、C1、C4、



**Figure 2-5.** Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of (a)  $\alpha$ -chitin from *P. globosa*, (b) low-molecular weight chitin from phosphrysis, and (c)  $\alpha$ -chitin from *C. opilio*. Assignments of carbon atoms are indicated upon the peaks.

C6 の各炭素について複数の共鳴線を観測することが可能である。*C. opilio* 由来のスペクトル (図 2-5b) では、Tanner らが指摘する通り各炭素に対応する共鳴線が左右対称な形状をしており、*P. globosa* 由来の試料の共鳴線の形状に類似性が見られるが、結晶性のために十分に分解能が高くなく、いくつかのピークから成るかは不明瞭である。

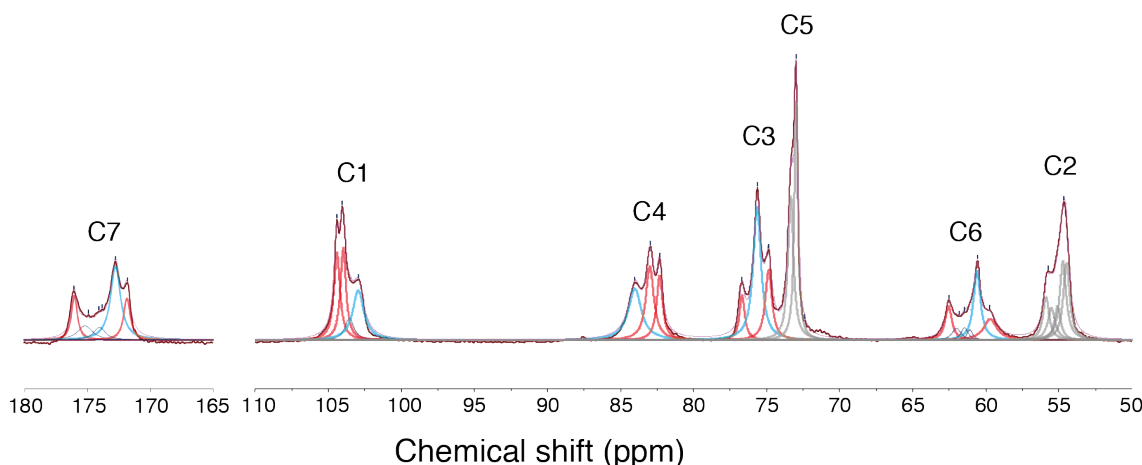
一方で、リン酸加水分解物由来の低分子量  $\alpha$ -キチン結晶のスペクトル (図 2-5c) は他の二つの試料の場合とは異なる特徴を示した。2つの天然物由来の  $\alpha$ -キチンにおいて最も分離が顕著な C7 についての共鳴線は、この低分子量  $\alpha$ -キチン試料については単一のピークとして観測されている。また、それ以外の各炭素についてもピーク形状の非対称性は見られず、全ての炭素原子について一本ずつの共鳴線のみが観測された。従って、低分子量  $\alpha$ -キチンの非対称単位には GlcNAc 一残基のみが含まれており、現行の構造モデルに一致していた。低分子量のキチン分子鎖から成る  $\alpha$ -キチン結晶の詳細な構造解析の報告例はこれまでないが、Sikorski ら (2009) のモデルによく一致した空間群  $P2_12_12_1$ 、二本鎖斜方晶の単位格子を有する逆平行鎖構造の結晶であることが予想される。

*P. globosa* 由来の  $\alpha$ -キチン結晶の NMR スペクトルのピーク分離結果を図 2-6 と表 2-1 に示す。C8 の共鳴線は単一のピークとして観測されたため、図中には示さなかった。図に示すように各共鳴線は複数の Lorentz 関数に分離することが出来る (表 2-1)。特に C7、C1、C4、C3、C6 の共鳴線は積分値とピーク幅のほぼ等しい 1 対の鋭いピーク (A) と、やや幅の広い一つのピーク (B) の計 3 つのピークに分離することが出来る。このことは、 $\alpha$ -キチン結晶中には少なくとも 3 つ以上の不等価な GlcNAc 残基が含まれることを示している。またピーク分離によって得られた Lorentz ピークの積分値の各炭素原子間での一致から、天然の  $\alpha$ -キチンが天然セルロースと同様に複数の結晶形の混晶である可能性がある。より詳細な解析には、 $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  の二次元相関スペクトルの測定が必要であろう。また、C6 の化学シフト値から、一級水酸基の配座についての情報が得られるが、C6 の化学シフトはそれぞれ 62.54 ppm、61.82 ppm、59.75 ppm であり、*gg*、*gt*、*tg* のいずれのコンフォメーションも  $\alpha$ -キチンの結晶中には存在することが示唆されている。このような特徴を有する  $\beta$ -1,4 結合した結晶多糖の報告はなく、天然の  $\alpha$ -キチン結晶が極めて複雑な結晶構造を有していることを示している。

Table 2-1. Chemical shifts of  $\alpha$ -chitin from *P. globosa* evaluated by peak fitting calculation.

Chemical Shifts (ppm)													
C7		C1		C4		C3		C5		C6		C2	C8
176.09	A	104.40	A	84.01	B	76.69	A	73.00		62.54	A	55.74	22.89
172.79	B	104.03	A	82.96	A	75.63	B	72.39		60.57	B	54.66	
171.84	A	102.94	B	82.32	A	74.86	A			59.75	A		





**Figure 2-6.** Solid-State  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of  $\alpha$ -chitin from *P. globosa* with the peaks obtained by peak fitting. Red and blue peaks are corresponding to assignment of A and B in Table 2-1.

#### 2.3.4. 天然 $\alpha$ -キチンの構造についての一考察

これまで示したように、*P. globosa* 由来の高結晶性試料を固体構造解析に用いることで、X線回折と固体 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルから天然の $\alpha$ -キチン結晶は現在提案されている Sikorski らのモデルより複雑な構造であることが示された。本研究においては詳細な結晶構造を提示するには至らなかったが、本項では得られたデータから現状での $\alpha$ -キチンの構造の予測と今後の展望について述べる。

固体 $^{13}\text{C}$  NMR の結果は、すくなくとも天然の $\alpha$ -キチンの結晶中に不等価な GlcNAc が 3 つ以上存在することを示している。前述の通りこの知見からは、一つの単一な結晶構造中、すなわち一つの単位格子中に 3 つ以上の不等価な GlcNAc が含まれる可能性と、天然の $\alpha$ -キチンが 2 つ以上の異なる結晶形の混晶である可能性の二通りの構造モデルを考えることが出来る。

$\alpha$ -キチンの真の結晶構造が前者であるとする、*P. globosa* 由来の試料についての繊維 X 線回折図中に新たに認められたものを含む全ての回折点は、一つの単位格子に基づいて指数付けが可能であることになる。実際に、現行の単位格子の  $a$  軸長を 3 倍にすることで、回折図中に認められる全ての回折点を指数付けすることが可能である ( $a = 14.2 \text{ \AA}$ ,  $b = 18.9 \text{ \AA}$ ,  $c = 10.3 \text{ \AA}$ ,  $\gamma = 90^\circ$ )。この場合、単位格子には 6 本の分子鎖、12 の GlcNAc 残基が含まれることになり、天然の多糖結晶の単位格子としては非常に大きい。第 3 章で示す通り、*P. globosa* 由来の $\alpha$ -キチンにも分子シート構造が認められており、現行の Sikorski らの構造モデルと真の構造とはある程度の類似性があると推測される (Sikorski et al., 2009)。この拡大された単位格子中においても、やはり  $a$  軸方向に分子シート構造が形成され、そのシート構造が  $b$  軸方向に堆積しているであ

ろう。その場合、含まれる分子鎖の本数と分子の形状からこの新しい斜方晶の単位格子中には対称性はないと考えるのが妥当であり（例えば繊維軸方向に  $2_1$  の対称性を想定することは困難である）、このことはより天然の  $\alpha$ -キチン結晶の対称性がより低いことを示す中性子線回折の結果と矛盾しない。

しかしながら、この単位格子をもとに結晶構造の決定を試みるには問題がある。一般に  $N$  原子系の自由度は  $3N$  であり、またこの系では対称性が  $P2_12_12_1$  から  $P1$  になったことによって飛躍的に空間的な自由度が増加することになる。また、タンパク質単結晶の場合とは異なり、結晶サイズが高々数十 nm の繊維試料では強度の見積もり精度に限度があり、回折実験の強度データのみに基づいてこのような大きな系の解析を行うことには限界がある。従って、この単位格子に基づいて解析を行う場合には、分子動力学法をはじめとした理論計算による構造の予測が不可欠になる。

もう一方の可能性、すなわち天然の  $\alpha$ -キチンが天然セルロースの場合のような混晶であることを想定する場合、まずより詳細な固体 NMR 解析による解析が必要になる。現在得られている一次元の NMR スペクトルでは、各炭素に対応するピーク間での積分強度比の一致から A 型と B 型の多形を想定している。セルロースの場合では、試料の起源によって  $I\alpha$  と  $I\beta$  の存在比に差異が見られ、また両者の  $^{13}\text{C}$  NMR の化学シフト値に大きな差があったために二つの結晶系の存在を明瞭に示すことが出来た (Atalla and Van del Hart, 1984)。しかし  $\alpha$ -キチンのスペクトル中で見られた A ピークと B ピークの化学シフト値の差は非常に小さく、*P. globosa* 由来の試料のような高結晶性のものでなければ判別は困難であった。したがって、*P. globosa* 由来の  $\alpha$ -キチンを用いたより詳細な解析によって多形の存在を示すことが望ましい。具体的には、INADEQUATE 法による  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  の結合を観測することで、A ピークと B ピークとの相関を確認できれば、結晶中の非対称単位の存在状態についてより多くの情報が得られる。INADEQUATE 法の測定のためには試料中の天然には 1% しか存在しない  $^{13}\text{C}$  の存在量を高めることが必要である。現在、この測定のための *P. globosa* 由来の  $\alpha$ -キチンの同位体標識実験を行っており、INADEQUATE 法の測定によって、天然  $\alpha$ -キチンの構造についてのより詳細な情報が得られることが期待される。

## 2.4. 結言

単細胞藻類 *P. globosa* 由来の  $\alpha$ -キチンを用いて、 $\alpha$ -キチンの結晶構造解析を再度行った。*P. globosa* 由来の  $\alpha$ -キチンは従来構造解析用に用いられてきた甲殻類由来の  $\alpha$ -キチンに比べて 2 倍以上の結晶サイズを有する高結晶性の試料であった。この試料の繊維 X 線回折図中には、現状の単位格子に一致しない微弱な回折点が観測され、また固体  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは、現状構

造モデルで想定される1つより多くの非対称な炭素原子が結晶中に存在することを示していた。また、甲殻類 $\alpha$ -キチンを用いた中性子線回折実験によって、天然の $\alpha$ -キチンの結晶の対称性が低いことが示された。以上のことから、天然の $\alpha$ -キチンの結晶構造としては、空間群  $P1$  に属する、より多くの分子鎖を含む大きな単位格子を持つ系か、天然セルロースのような混晶の系の2通りが考えられる。より詳細な固体 NMR 測定に基づく解析と理論計算を組み合わせた構造解析を行うことで、天然 $\alpha$ -キチンの複雑な構造を解明することが出来ると期待される。

一方で、対照用試料として用いた溶解・再生の過程を経た $\alpha$ -キチンでは、結晶の非対称単位は GlcNAc 残基1つ分であり、従来は同一のものと考えられてきた天然物とは異なる構造を有することが明らかとなった。

## 3. $\beta$ -キチンの理論計算

### 3.1. 緒言

$\beta$ -キチンはイカや貝、珪藻、ハオリムシをはじめとした水生生物を中心に生合成されるキチンの結晶多形の一つである。前章で示したように  $\alpha$ -キチンの結晶構造が再検討を必要としているのに対して、 $\beta$ -キチンについては詳細な結晶構造が信頼性の高い解析によって明らかにされている。Nishiyama らの研究グループは、無水型と二水和型  $\beta$ -キチンの結晶構造を X 線、および中性子線回折による解析によって原子分解能で明らかにした (Nishiyama et al., 2011; Sawada et al., 2012a, b) (図 3-1)。中性子線回折を用いたことによって酸素、および窒素に結合した水素原子の原子位置を直接決定することが出来ており、その幾何学的配置に基づいて詳細な水素結合様式を報告している。水素結合は結晶構造を特徴づける主要な原子間相互作用の一つであり、構造の安定性や物性を解釈する上で極めて重要な情報である。加えて、 $\beta$ -キチンは低分子の極性溶媒分子を結晶中に取り込んで錯体結晶を形成するが、ゲスト分子とキチン分子との主要な相互作用は水素結合であることが予想されるため、結晶中での水素結合様式を理解することは錯体形成挙動やその物性を解釈する上で重要な知見となろう (Saito et al., 1998)。回折実験によって得られる原子位置の情報は統計的な分布として与えられるものであり、その構造中での平均的な位置を示すものである。実際には室温域では分子は熱振動しており、したがってたとえ固体中であっても原子位置は一定ではない。このような動的挙動を解析するためには分子動力学法をはじめとした理論計算法を本章においては、いくつかの理論計算手法を用いて、 $\beta$ -キチンのエネルギー的な安定構造と動的挙動を明らかにすることにより、 $\beta$ -キチン結晶中での原子間相互作用をより詳細に理解することを試みた。実験的に得られた構造と水素結合様式と理論計算の結果を比較し、評価を行なった。

### 3.2. 方法

#### 3.2.1. 量子化学計算

量子化学計算 (あるいは、第一原理計算) は、電子数と軌道の対称性のみを入力として、非経験的に系の電子状態を計算する手法である。このモデリング手法は電子状態の全てを計算するため、原子間相互作用を正確に予測することが可能であるが、全ての電子軌道を計算するための計算コストは高いために、扱える原子数には限りがあり、また動的挙動の計算を行なうことは困難である。本研究では、エネルギー最適化構造を計算するために、擬ポテンシャルと平面波基底を用いた密度汎関数法 (Density Functional Theory method: DFT method) による計算を行なった。以下にこの計算方法の概要を示す。

密度汎関数理論とは、Hohenberg と Kohn によって示された、あらゆる物理量を電子密度

の汎関数として表すことが可能であるとする理論である (Hohenberg & Kohn, 1964)。この理論のもとに、Kohn と Sham が電子密度の関数として波動関数を導入することによる一電子方程式についての解法を示したことで、複数の電子から成る系 ( $N$  電子系) への応用が可能となった (Kohn & Sham, 1965)。具体的には、実際の相互作用の存在する  $N$  電子系の電子密度を、相互作用のない粒子とそれに対する仮想的な外部ポテンシャルを指定することによって表すものである。つまり、従来のアプローチでは電子密度  $\rho$  のみによるエネルギーについての複雑な表式が必要であったものを、Kohn–Sham の定理によって  $N$  個の一電子についてのシュレディンガー方程式を解くだけで系全体の電子密度を与えることができることを意味している。

Kohn–Sham の定理においては、 $N$  電子系の電子密度は  $N$  個の波動関数 (Kohn–Sham 波動関数) により、

$$\rho(r) = \sum_i^N |\phi_i(r)|^2$$

と表せる。この時、一電子についてのシュレディンガー方程式は、Kohn–Sham 波動関数と軌道エネルギー、および外部ポテンシャル (Kohn–Sham ポテンシャル) によって、

$$\left( -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + v_{eff}(r) \right) \phi_i(r) = \varepsilon_i \phi_i(r)$$

で与えられる。系の全エネルギー量  $E$  は電子密度の汎関数として、

$$E[\rho] = T_s[\rho] + \int dr v_{ext}(r)\rho(r) + V_H[\rho] + E_{xc}[\rho]$$

で表される。右辺第一項は運動エネルギー、第二項は核–電子間相互作用、第三項はクーロンエネルギー、第四項はそれ以外のエネルギーを表す交換相関エネルギーである。この時、Kohn–Sham ポテンシャルは次式で与えられる。

$$v_{eff}(r) = v_{ext}(r) + e^2 \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)}$$

右辺の第三項は、交換相関ポテンシャルであり、van der Waals 相互作用をはじめとした Kohn–Sham 理論において唯一、厳密な表式がなされていないものであり、複数の研究グループにより様々な近似法が提案されている。本研究においては、局所密度近似を密度勾配によって補正した一般化勾配近似 (GGA: Generalized Gradient Approximation) のうち、Perdew ら (1998) によって提案された PBE (Perdew–Burke–Ernzerhof) GGA を用いた。

結晶についてのバンド計算を行う上で一つの問題となるのは境界条件であるが、Bloch の定理では周期境界条件満たすポテンシャルの場合には、波動関数は並進操作に対して不変な形、すなわち Bloch 型の関数であることが示されている (Bloch, 1929)。これは波動関数が平面波型

であることを意味しており、従って平面波を波動関数の基底として用いることで結晶についての Kohn–Sham 方程式を解くことが可能である。

量子化学計算には、平面波基底を用いた DFT 計算のソフトウェアパッケージである *Quantum ESPRESSO* を用いた (Gianozzi et al., 2009)。外殻の価電子のみを軌道計算に含めた擬ポテンシャル法を適用して、エネルギー計算、および構造最適化計算を行った。相関汎関数には Perdew らによって提案された PBE GGA を使い、エネルギー計算には van der Waals 相互作用の寄与を含めるため、Grimme の方法により London 分散力の影響を考慮した (DFT-D2 method) (Grimme et al., 2006)。基底関数の最大エネルギーは、解析を通じて 70 Ry とした。構造最適化計算は、構造中で働く全ての力が  $1.0 \times 10^{-3}$  Ry/Å 以下になることを条件に行なった。初期構造には、Nishiyama ら (2011) と Sawada ら (2012a) が提案した無水型  $\beta$ -キチンと、Sawada ら (2012b) が提案した二水和型  $\beta$ -キチンの結晶構造をそれぞれ用いた。

### 3.2.2. 分子動力学計算

古典分子動力学計算は、いくつかの原子間の相互作用を表すポテンシャル関数の存在する場 (分子力場) において、系を構成する各粒子について古典力学の運動方程式を解くことで、粒子の位置と速度を算出する分子モデリングの一手法である。量子化学計算とは異なり、分子力場のポテンシャル関数は経験的、半経験的に得られたものであり、計算を通じて不変である。分子動力学計算は実際の原子間相互作用の近似関数の集合である分子力場を用いているため、量子化学計算に比べると系の物理現象の再現精度に問題があるが、各電子のシュレディンガー方程式を解くために莫大な計算コストを必要とする DFT 計算よりコストが低く、大規模な系の動的挙動の解析を行なうことが可能である。本研究では、室温域での  $\beta$ -キチンの平衡構造についての解析を行なうため、分子動力学計算を行なった。

分子動力学計算には GROMACS ソフトウェアを用いた (Hess et al., 2008)。分子力場には、第 8 章で無水  $\beta$ -キチンの熱膨張挙動の再現をする上で用いた修正 GROMOS 56A<sub>CARB</sub> 力場 (第 8 章、図 8-2c を参照) を使い (Chen et al., In preparation; Hansen & Hunenberger, 2011)、NPT (一定粒子数、定圧・定温) と NVE (一定粒子数、定積、定エネルギー) のアンサンブル (統計集団) について計算を行なった。運動方程式の解を得るための数値積分は効率性に優れる Leap-frog 法により行い、時間ステップは NPT 計算には 1 fs、NVE 計算には 0.5 fs を用いた。原子間に働く短距離のクーロン相互作用と非結合性の Lennard–Jones 相互作用の範囲径は 0.9 nm とし、それ以上遠い原子同士のこれらの相互作用は無視した。0.9 nm 以上の遠距離の分散力の補正はエネルギーと圧力について行い、遠距離のクーロン相互作用の補正は、遠距離の計算に適した逆空間での計算を用いた Ewald 法 (Ewald summation) に従った (Essmann et al., 1995)。NPT 計算においては、圧力の補正は Berendsen アルゴリズムによって行い、温度の補正は velocity rescaling

アルゴリズムを用いた (Berendsen et al., 1984; Bussi et al., 2007)。H-O 間、H-N 間の共有結合の結合長にのみ、LINCS アルゴリズムによる制限をかけた (Hess et al., 1997)。NVE 計算では圧力、温度についての補正、結合長についての制限は用いなかった。分子動力学計算の計算フレームは 1 ps ごとに出力した。

分子モデルには、Nishiyama らと Sawada らが X 線と中性子線回折実験による構造解析によって明らかにした無水型  $\beta$ -キチンと二水和型  $\beta$ -キチンの結晶構造を用いた。本研究では、表面の効果を無視して理想結晶の物性を再現するために、x、y、z の全方向 (x は a 軸に z は c 軸に平行とした) に周期境界条件を用いた無限結晶 (infinite crystal) の系を採用した。無水  $\beta$ -キチンの非対称単位である GlcNAc 残基を複製することで、8 残基の分子鎖が 32 本 ( $xxy = 8 \times 4$ ) 含まれる、およそ 4 nm $\times$ 4 nm $\times$ 4 nm の対称性 P1 のスーパーセルを構築した。各分子鎖の末端は周期境界条件によって作り出される隣のスーパーセルの分子像に共有結合させることで無限長の分子鎖から成る結晶についての計算を行なった。

この分子モデルについて、まず最急降下法 (steepest-decent method) と共益勾配法 (conjugate gradient method) によるエネルギー最適化計算を行なった。最適化条件は、系中の原子間に働く力の全てが 1 kJ/mol/Å 以下となることとした。構築した構造モデルについて、300 K での 5 ns の NPT 計算を行なった。各方位の変形しやすさを表す圧縮率は  $1.0 \times 10^{-5}$  bar $^{-1}$  (x 方向)、 $1.0 \times 10^{-5}$  bar $^{-1}$  (y 方向)、 $1.0 \times 10^{-7}$  bar $^{-1}$  bar $^{-1}$  (z 方向)、 $1.0 \times 10^{-5}$  bar $^{-1}$  (xz 対角線方向)、 $1.0 \times 10^{-5}$  bar $^{-1}$  (yz 対角線方向)、 $1.0 \times 10^{-5}$  bar $^{-1}$  (xy 対角線方向) とした。この NPT シミュレーションの平衡構造を初期構造として、その後 7.5 ns の NVE 計算を行なった。平衡構造と分子軌跡の描画には、VMD ソフトウェアと gridcount を用いた (Bechstein & Sansom, 2003; Humphrey et al., 1996)。

### 3.3. 結果と考察

#### 3.3.1. 量子化学計算

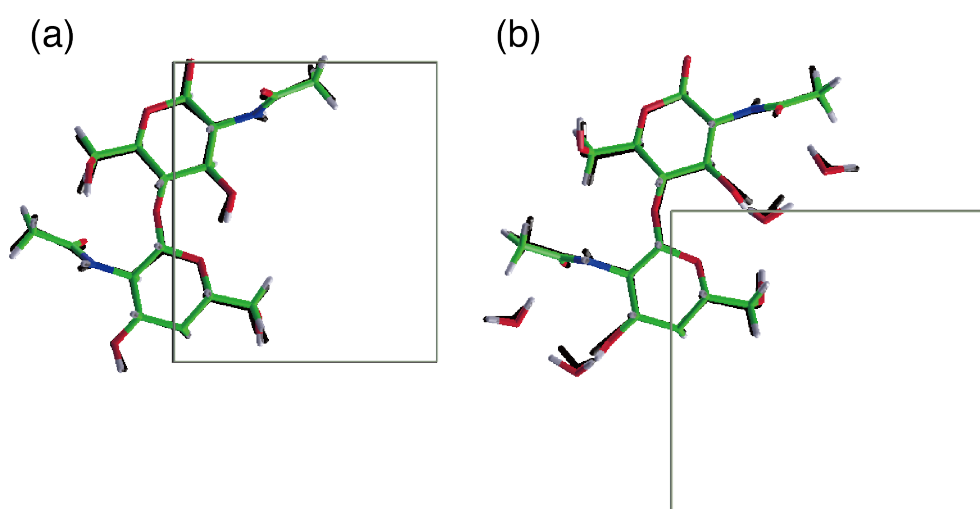
表 3-1 に無水型と二水和型  $\beta$ -キチンの回折実験に基づく報告値と、本研究での理論計算により得られた単位格子定数を示す。平面波基底を用いた周期境界条件下での DFT 計算の構造最適化によって得られた単位格子定数は、いずれの結晶形についても実験値とよい一致が見られたが、各方位について軸長と単斜晶角に変化が見られた。無水型  $\beta$ -キチンでは、a 軸に最も減少率が大きく 3.5%、b 軸と c 軸にそれぞれ 1.3%と 0.6%減少した。 $\alpha$  と  $\beta$  は 90°でほぼ一定であり単斜晶系を維持しており、 $\gamma$  は 1.4°増加した。また、二水和型  $\beta$ -キチンについても a 軸に 4.3%と最も大きな減少率を示し、b 軸と c 軸の減少率はそれぞれ 2.4%、0.2%であった。二水和型結晶も最適化後についても単斜晶系を維持しており、 $\gamma$  のみ 2.3°増加した。このようにいずれの結晶方位についても収縮が見られたが、これは DFT 計算による最適化構造が温度の効果を含

まない 0 K での最安定構造であり、結晶が熱膨張することを考えると室温域で測定された実験値に対して結晶が収縮しているのは妥当である。また、構造最適化による格子の収縮には異方性があるが、*ab* 面内での収縮に比べて *c* 軸の収縮は非常に小さい。これは *c* 軸方向が分子鎖方向で共有結合が存在しているために、熱膨張の効果が小さいことが原因であろう。

図 3-1 に DFT 計算による最適化計算前後の分子構造の重ね合わせを示す。無水型  $\beta$ -キチンでは、側鎖のコンフォメーションに微小な変化が認められたが、全体としては実験的に得られた結晶構造と非常によく一致が見られた。二水和型  $\beta$ -キチンについてもキチン分子のコンフォメーションは実験値と非常によく一致していたが、ゲスト分子である水分子の酸素原子位置は元の実験的に観測された位置に維持されていたものの、水素原子の配置が比較的大きく変化した。この変化は温度の効果であると考えられ、特に運動性の高いと考えられる水分子の水素原子では、300 K での平均位置と 0 K に相当する最安定構造中での位置とが、他の原子に比して大きく異なることを示している。

**Table 3-1** Unit-cell parameters of anhydrous and dihydrate  $\beta$ -chitin calculated from X-ray diffraction and DFT-D2 calculations and Molecular dynamics simulations.

	Anhydrous			Dihydrate		
	Experimental* <sup>1</sup>	DFT	MD (300 K)	Experimental* <sup>2</sup>	DFT	MD (300 K)
a (Å)	4.820	4.649	4.702	4.814	4.604	4.729
b (Å)	9.247	9.125	9.491	11.167	10.895	11.166
c (Å)	10.390	10.331	10.367	10.423	10.425	10.527
$\gamma$ (°)	97.21	96.28	98.60	96.45	95.28	98.78



**Figure 3-1** DFT-optimized molecular structures of (a) anhydrous and (b) dihydrate  $\beta$ -chitin. Experimental structure was laid down as dark shadows.

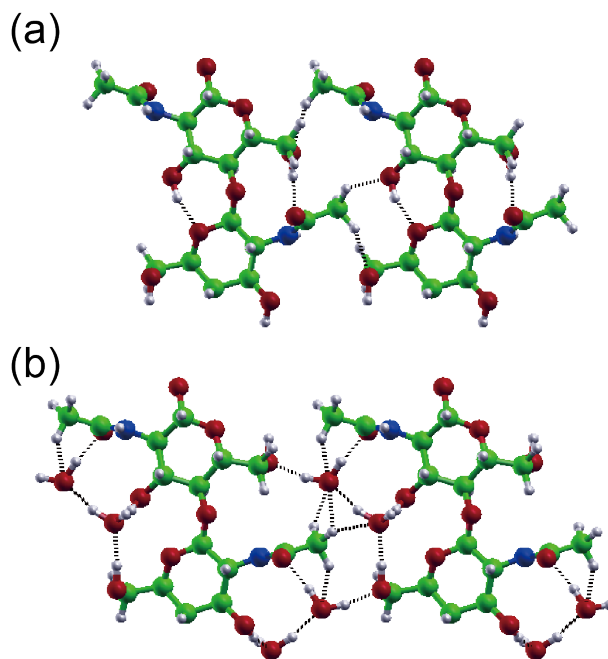


図 3-2a に DFT による構造最適化前後での無水  $\beta$ -キチンの水素結合様式を、表 3-1 に結合間距離と結合角を示す。Sawada らの無水  $\beta$ -キチンの構造中では分子内の O3-H...O5 間、分子シート内の O6-H...O7 間、N-H...O7 間の分子間水素結合が存在する。シート間には酸素や窒素に結合する水素がドナーとなる強い水素結合は存在せず、C8-H...O6 と C8-H...O3 の弱い水素結合が存在すると提案されている。最適化計算後の構造中でもこの水素結合様式が維持された。実験的に提案された構造は、解析時に結合長と結合角に経験的に得られた制限値をかけて精密化を行なうため、真の構造から乖離する可能性があるが、量子計算による最適化によっても

構造がよく維持されたことは、この構造がエネルギー的に非常に安定で立体化学的な不利のない信頼性の高い構造であるということを示している。一方で、構造最適化によっては水素結合の結合長、結合角に変化が見られ、特に Sawada らの構造中で結合角が水素結合の形成に不利であった N-H...O7 間の水素結合が安定化するように構造が最適化されていた。一方で O3-H...O5 間の水素結合は安定な水素結合を形成することが可能な条件にはあるが、実験構造に比べると結合強度は弱まっている。N-H...O7 間の水素結合は分子シート構造の安定化に寄与していると考えられるから、分子シート構造のエネルギー的な安定性が結晶構造全体としてのエネルギー的な最適化に強く影響を与えているものと考えられる。

**Table 3-2** Hydrogen bonding lengths and angles of anhydrous  $\beta$ -chitin before and after DFT-optimization.

Donor	Acceptor	Experimental		DFT-D2	
		Distance (Å)	Do-D...A Angle (°)	Distance (Å)	Do-D...A Angle (°)
HO3	O5	1.768	171.16	1.774	160.45
HO6	O7	2.093	149.18	1.755	168.15
HN	O7	1.944	138.97	1.754	149.57
HC8	O6	2.480	153.37	2.226	148.30
HC8_2	O3	2.517	141.13	2.371	138.92



**Figure 3-2** Hydrogen bonding pattern of (a) anhydrous and (b) dihydrate  $\beta$ -chitin after DFT optimization.

次に二水和型  $\beta$ -キチンの DFT による最適化計算前後での水素結合様式と結合長、結合角を図 3-2b と表 3-3 にそれぞれ示す。Sawada らによる二水和型  $\beta$ -キチンの実験構造中では N-H...O7 間の水素結合以外は全て水分子を介した水素結合を有することが報告されている。Sawada らの構造を初期構造とした最適化計算によっても新たなキチン分子内、分子間での水素結合は見出されず、元の水素結合様式をほぼ維持していたが、側鎖のアセトアミドの微小なコンフォメーションの変化と水分子の回転によって変化が見られた。無水型の場合と同様に N-H...O7 間の水素結合が最適化構造中では、実験構造に比して有意に安定している。これは無水型の場合と同様に、アセトアミド基のコンフォメーションの変化に伴うもので、構造全体としてシート構造がより安定化することがエネルギー的に望ましいためであろう。また、水分子を介したものについても、全ての強い水素結合がより強く結合するように結合長が小さく、結合角が  $180^\circ$  に近くなっている。これはキチンの分子のコンフォメーション変化よりも、水分子の回転に伴う配位位置の変化によるものと考えられる。水分子とキチン分子との主要な相互作用は水素結合であり、構造中での配位様式は水素結合の安定性に大きく依存するものであると考えられる。従って静的な最適化構造中ではより理想的な水素結合を形成するような水分子の配置になったものと考えられる。実験構造中水分子の位置が理想的な水素位置から異なるのは、実験構造は室温域での回折実験に基づいて提案されているため温度の効果によるものである。

**Table 3-3** Hydrogen bonding lengths and angles of dihydrate  $\beta$ -chitin before and after DFT-optimization.

Donor	Acceptor	Experimental		DFT-D2	
		Distance (Å)	Do-D...A Angle (°)	Distance (Å)	Do-D...A Angle (°)
HO3	Ow1	2.190	151.22	1.714	167.15
HO6	Ow1	2.084	175.68	1.773	175.98
HN	O7	1.963	144.99	1.691	163.16
HOw1	O3	1.683	162.70	1.797	168.47
HOw1	Ow2	1.963	158.01	1.679	165.90
HOw2	O7	1.954	157.44	1.740	171.00
HOw2	O6	1.798	161.69	1.742	168.59
HC8	Ow2	2.528	151.94	2.388	141.73
HC8_2	Ow2	2.676	151.11	2.480	155.68
HC8_3	Ow2	-	-	2.525	136.04
HC8_3	Ow1	-	-	2.577	160.81

### 3.3.2. 分子動力学計算

表 3-1 には、無水型と二水和型  $\beta$ -キチンの、NPT 計算による 300 K での平衡構造の格子定数を示した。本研究で用いた分子力場は、Lennard-Jones パラメータの修正と部分電荷を DFT 計算に基づいて再分配した修正 GROMOS 56A<sub>carbo</sub> 力場である。300 K における各格子定数は、実験値とよい一致を示しており、いずれの結晶形についても定数の差異は 2% 程度以内に収まっている。これは、同じ結晶性多糖であるセルロース結晶多形の分子動力学計算の結果と比較しても、この計算の再現精度が高いと言える (Dri et al., 2013; Mazeau & Heux, 2003; Chen et al., 2011)。

無水型  $\beta$ -キチンの各コンフォメーションの実験値と NVE 計算による平均値の比較を表 3-4 に示す。各コンフォメーションについての値が示す通り、NVE 計算によって算出された分子の骨格構造は Nishiyama らによって提案された実験構造を非常によく再現している。運動性の高い一級水酸基の配座についても実験値とよい一致が見られた。

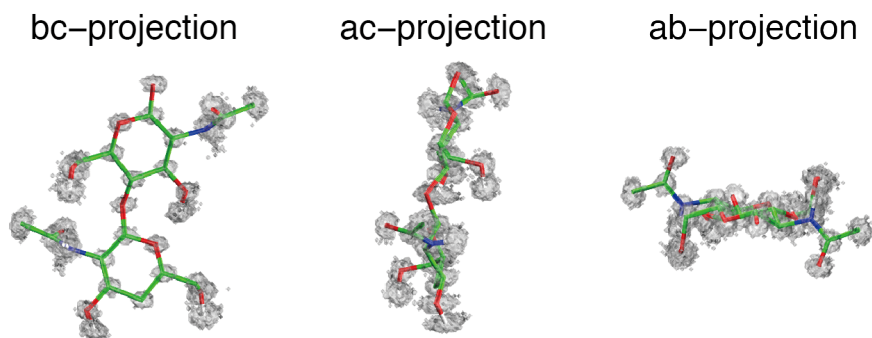
**Table 3-4** Conformational parameters of anhydrous and dihydrate  $\beta$ -chitin from experimental X-ray structure and equilibrium structure of NVE-simulation at 300 K.

		$\tau(^{\circ})$	$\omega(^{\circ})$	$\phi(^{\circ})$	$\psi(^{\circ})$
Anhydrous	Experimental	117	-65	-89	-152
	MD	115.314	-64.96	-87.677	-147.216
Dihydrate	Experimental	115	-54	-95	-147
	MD	117.075	-47.697	-86.634	-153.281

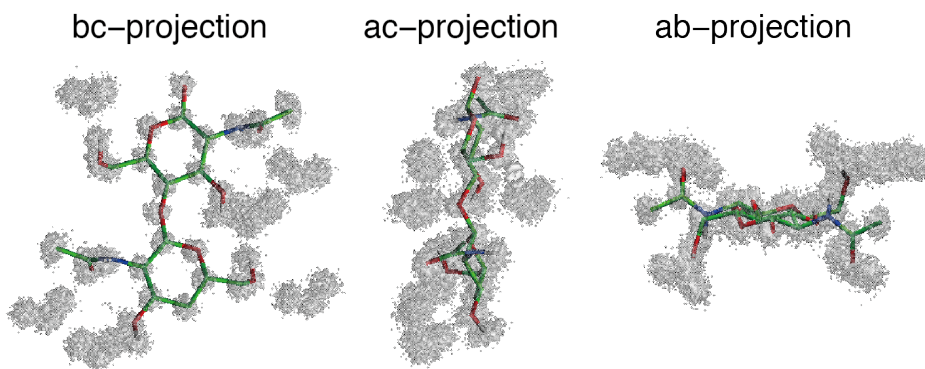
$\tau$ : glycosidic bond angle, C4-O1-C1;  $\omega$  O5-C5-C6-O6;  $\phi$  O5-C1-O1-C4;  $\psi$  C1-O1-C4-C5

図 3-4 に NVE 計算による無水型  $\beta$ -キチンの平衡構造を示す。図中の灰色の各点は 10 ps ごとに記録した全原子の原子座標を示すものである。平行構造は実験構造に一致しているが、シミュレーションの軌跡である灰色のプロットが示すように、平衡構造を中心として一定の範囲内で振動している。炭素、酸素、窒素の分子の骨格構造の振動様式は、Nishiyama らが X 線構造解析によって提示している異方性温度因子の形状とよく一致しており、分子の結合方向である分子鎖方向への振動が小さくそれに直交方向に振動が大きい楕円球状の振動をしていた。また、環構造中の原子に比べると自由度の高い側鎖上の原子の方が振動が大きいという点でも一致が見られた。Sawada らの中性子線回折についても解析から水素原子についての温度因子が報告されているが、中性子線回折の精度の問題から温度因子の異方性についての記述はない。水素原子は他の原子に比べると振動が大きいことが見て取れるが、中性子線回折の結果に比べると振動が酸素や炭素に比べて極端に大きいということはない。これは Sawada らが指摘している通り、中性子線回折の広角領域での強度の見積りの精度に問題があるためであろう。全

ての水素が一定以上の振幅を持って振動しているものの、実験構造中の水素結合を形成する距離と角度をアクセプター原子に対して維持していた（表 3-2）。従って、300 K においては無水型  $\beta$ -キチン中の全ての水素結合は安定的に存在していることが分かった。セルロース I $\beta$  などでは、複数の水素結合パターンが存在しており、セルロース II 型についても同様のことが示唆されているから、このような安定的な水素結合は多糖結晶には比較的稀であると言える（Chen et al., 2013）。



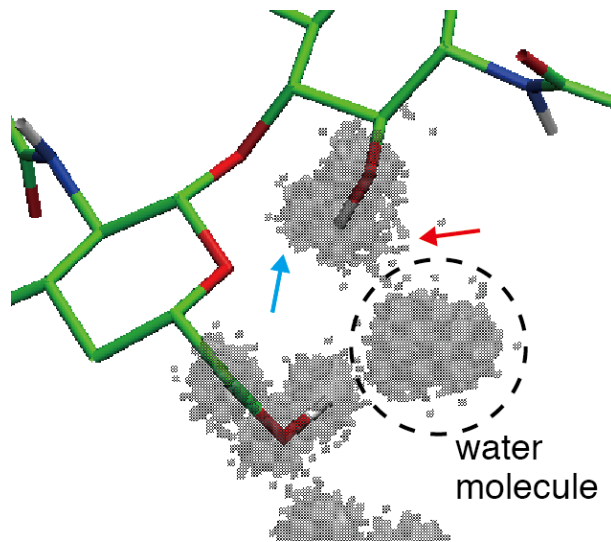
**Figure 3-3** Equilibrium molecular structure of anhydrous  $\beta$ -chitin calculated by NVE simulation. The gray points indicate the molecular trajectory outputted from NVE simulation at every 10 ps.



**Figure 3-4** Equilibrium molecular structure of dihydrate  $\beta$ -chitin calculated by NVE simulation. The gray points indicate the molecular trajectory outputted from NVE simulation at every 10 ps.

二水和型  $\beta$ -キチンの主要な分子コンフォメーションの報告されている実験値と本研究で NVE 計算により算出された計算値を表 3-4 に示す。無水型  $\beta$ -キチンの場合に比べると各パラメータの実験構造からの相違が見られるが、一級水酸基の配座以外については、10%未満の差異であり、概ね骨格構造は実験構造を再現していることが分かる。一級水酸基のコンフォメーション

ヨンは実測値からは外れているが、*gg* の配座は維持している。一級水酸基は運動性が高く配位する水分子とも直接的に相互作用を有しているため、水分子の部分電荷の分配など力場パラメータの変化の影響を強く受けるものと考えられる。図 3-4 に NVE 計算による二水和型  $\beta$ -キチンの平衡構造を示す。図中の灰色の各点は、図 3-3 と同様、10 ps ごとに記録した全原子の原子座標を示すものである。水分子については水素原子の運動性が高かったことから、分子振動の軌跡のみを示した。無水型結晶に比べると振動が大きいものの、やはり骨格構造については、楕円球状の振動様式を有していることが分かる。温度がどちらの系でも 300 K で同一であるにも拘らず無水型結晶に比して特に側鎖で分子振動が大きいのは、分子シート間の水分子の存在によって分子の運動の自由度が増加しているためであろう。この影響は特に側鎖で大きいものと考えられる。前述の通り、二水和型結晶中での水分子の関与しない水素結合は N-H...O7 のみであるが、HN の振動は比較的小さく、この結合は安定している。一方で水分子の振動はキチン分子に比べて大きいため、キチン分子上の水素がドナーで水分子の酸素がアクセプターになる水素結合はより動的な挙動を示しうる。図 3-5 には、骨格構造と水素結合に関与する O3、HO3、O6、HO6、および水分子の NVE 計算による軌跡を示した。図に示す通り、HO6 は Ow2 に対してよく配向しており、この水素結合が安定であることが予想される。一方で、HO3 については矢印で示すとおり、2通りの配向が存在することが見て取れる。赤矢印で示す位置は、実験構造中に見られる Ow2 と水素結合を形成する位置であるが、もう一方の青矢印で示す位置は分子内の O5 に対して配向している。この NVE 計算全体についての HO3 の平均位置はいずれの水素結合も結びうる中間的な座標であった。O5 と水素結合を結ぶ位置に水素原子が配向する場合、平均の水素結合距離は 2.70 Å、結合角は 161.9°であり、Ow2 をアクセプターとする場合（結合長 2.80 Å、結合角 169.1°）と同程度の強さの水素結合を形成することが可能であり、幾何学的には不利ではない。一方、水分子は分子振動が大きいために水素結合の距離が変動するものの、水分子の回転のような水素の配置自体が大きく変動する挙動はこの温度域では見られないため、水分子がドナーとなる水素結合については安定に結合が形成されていた。



**Fig. 3-5** Molecular trajectory around the HO3 and HO6 in dihydrate  $\beta$ -chitin from NVE simulation. Red and blue arrows indicate the density of HO3 positions which can donate the hydrogen bond to Ow2 and O5, respectively.

分子動力学計算の結果は、300 K の条件下では無水型  $\beta$ -キチン内の水素結合は安定的であるが、二水和型  $\beta$ -キチンについては水分子の運動性のために結合様式に動的な変動が見られ、また実験構造中では見られなかった O3-H...O5 の水素結合の存在が示唆された。この水素結合については、原子の幾何学的な配置からは水素結合の存在を予測することが出来るが、中性子線回折の結果から水分子をアクセプターとする水素結合のみが存在することが Sawada らによって示されている。分子動力学計算によって水素結合を予測する場合には、力場パラメータの違いによって水素結合の形成しやすさは変化しうるため、本研究で得られた結果よりも現実の O3-H...O5 間の水素結合の形成頻度は低い可能性がある。しかしながら本研究によって水分子の熱振動による平均位置からの移動が見られ、その結果、水素結合の部分的な組み替えが起こりうることが示された。

#### 3.4. 結言

回折実験により詳細な構造が明らかとなっている  $\beta$ -キチンの無水型と二水和型の結晶について、より詳細な分子間相互作用とその動的挙動を明らかにすることを目的に理論計算による解析を行った。量子化学計算によるエネルギー最適化構造は、実験的に明らかにされた構造とよく一致しており、実験的に提案された構造が極めて信頼性の高い構造であることが確かめられた。分子動力学計算による解析によっては、無水型  $\beta$ -キチン結晶中の水素結合が室温域でも安定であるのに対して、二水和型  $\beta$ -キチン中では水分子の熱振動によって、複数の水素結合様式が存在するより動的な構造体であることが示唆された。

## 4. キチンマイクロフィブリルの高分解能電子顕微鏡観察

### 4.1. 緒言

キチンは、セルロースの場合と同様に、天然に繊維幅が数～数十ナノメートルの結晶性繊維、マイクロフィブリルとして生産される。形態学的な観点ではマイクロフィブリルはセルロースやキチンの最小単位であり、この構造を理解することは天然の存在状態を明らかにする上で極めて重要である。加えて近年のナノ材料も含めて、これらの資源の材料利用はこのマイクロフィブリルの形態を維持して行なわれる場合が多いため、マイクロフィブリル中での分子鎖充填様式や表面構造を解析することは応用面を鑑みても重要性が高い。特にキチンについては、序論でも示した通りマイクロフィブリル構造についての情報が不足していることから、本章では高結晶性キチンマイクロフィブリルの構造の解明を高分解能電子顕微鏡観察により試みた。

マイクロフィブリル構造についての研究は、セルロースの分野に先行事例が多い。マイクロフィブリル構造やそれより高次の凝集構造に関する研究は、顕微鏡法を中心に X 線小角散乱や赤外分光法などの手法により行なわれてきた。1930 年代に電子顕微鏡が開発されて間もなく、緑藻の細胞壁を中心にセルロース系試料の微細構造観察が始められるが、1948 年に Preston らは、*Valonia* の細胞壁の電子顕微鏡観察によって、細胞壁成分の最小の構成単位としてマイクロフィブリルの存在を報告した (Preston et al., 1948)。それに続いて Green らや Preston らの研究グループによって *Valonia* 属や車軸藻、その他の緑藻の細胞壁の観察が行なわれることで、生物的由来によってマイクロフィブリルの形状に差異があることが示唆された (Green & Chapman, 1955; Preston, 1974)。より詳細な観察は Manley (1971) による陰染色法や, Revol や Chanzy らの研究グループによる回折コントラスト法や暗視野観察法によって行なわれてきたが (Revol 1982; Bourret et al., 1972; Roche & Chanzy, 1981)、セルロースは軽元素からなる分子結晶であるために電子線感受性が高く、分子レベルの超微細構造を保持したまま電子顕微鏡による観察を行なうことは困難であった。1985 年に Sugiyama らはセルロースの電子損傷性を定量的に評価し、撮影法の工夫によって電子線損傷を抑えることで天然セルロースの結晶格子を直接観察することに成功した (Sugiyama et al., 1985)。この手法と超薄切片法を組み合わせることで、Sugiyama らのグループは種々の高結晶性セルロースマイクロフィブリルの繊維横断面中での分子鎖充填様式を明らかにした (Sugiyama et al. 1987; Helbert et al., 1998a, b; Imai et al., 2003a)。これらの観察はセルロースマイクロフィブリルが横断面方向には途切れのない単結晶様であることや、生物的由来によって分子鎖充填様式が大きく異なることを明らかにしたことばかりでなく、繊維表面に露出する結晶面の予測を可能にした点でも重要性が高い。これと関係して、Hanley らや Baker らによって走査型プローブ顕微鏡によるマイクロフィブリル表面の繰り返し周期の直接観察が行なわれている

(Hanley et al., 1992, 1997; Baker et al., 1997, 2000)。また分子動力学法をはじめとした理論計算法によってマイクロフィブリル構造やその表面物性を解析する方法も継続して行なわれている (Matthew et al., 2006; Mazeau & Rivet, 2008; Yui et al., 2006; Wohlerl & Berglund, 2011)。

一方でキチンについては、昆虫のクチクラ層やイカの各組織中のマイクロフィブリル構造や (Rudall 1963; Giraud-Guille et al., 1990, )、また中心珪藻の棘条由来の  $\beta$ -キチンマイクロフィブリルについての陰染色による詳細な観察結果が報告されている (McLacklan et al., 1966; Herth et al., )。またハオリムシ棲管由来の  $\beta$ -キチン (Gaill et al., 1992) や毛顎動物の顎毛由来の  $\alpha$ -キチン (Saito et al., 1995) など、いくつかの高結晶性キチンマイクロフィブリルについては、格子像観察を含む詳細な電子顕微鏡観察が行なわれている (Revol, 1989; Revol & Chanzy, 1986; Revol et al., 1988)。しかしながら、セルロースの場合と異なり、その横断面についての高分解能観察は行なわれておらず、キチンマイクロフィブリル中での分子鎖充填様式に関する情報は乏しい。このような情報の欠如のために、結晶構造が既知で詳細な解析に適した高結晶性のマイクロフィブリルが得られるにも拘らず、高分解能の走査型プローブ顕微鏡観察や、理論計算による形態学的な解析はほとんど行なわれていないと考えられる。そこで本研究では、いくつかの高結晶性キチンマイクロフィブリルについて透過型電子顕微鏡による高分解能観察を試みた。得られた格子像から分子鎖配列様式の推定を行い、結晶多形や生物的由来の異なるマイクロフィブリル間での比較を行なった。

第二章において天然の  $\alpha$ -キチンの構造に再検討の必要性があることを示しているが、本章においては便宜上、従来の Sikorski ら (2009) の構造モデルを採用して微細構造についての解釈を行なっている。

## 4.2. 実験

### 4.2.1. 試料調製

キチンはセルロースと同様に電子損傷性の物質であるから、高分解能観察のためには結晶サイズが大きく結晶の完全性の高い試料が望ましい。そこで本研究では、ハプト藻 *Phaeocystis globosa* 由来の  $\alpha$ -キチンマイクロフィブリルと、中心珪藻 *Thalassiosira weissflogii* 由来、およびサツマハオリムシ *Lamellibrachia satsuma* の  $\beta$ -キチンマイクロフィブリルを用いた。

*P. globosa* (NIES-1396 株、国立環境研究所) は前述の通り培養し、この培養物を回収、精製することで、 $\alpha$ -キチンマイクロフィブリルを得た。精製されたキチン試料は、使用まで水懸濁液として保存した。

*T. weissflogii* (CCMP 1051 株、CCMP) を L1 培地中、20°C、12 h-12 h の明暗サイクル下で 1 ヶ月間通気培養を行った。培養物を家庭用ミキサーにより処理し、およそ 2000 g で遠心分離



を行うことで細胞質、珪酸塩よりなる殻を沈殿物として分離し、上清に残った棘条をおよそ 18000 g の遠心分離により回収した。この沈殿に対して 1 N KOH (室温、16 h)、0.3% NaClO (pH4.0、80°C、3 h) 処理を 2 回繰り返すことにより精製した。各処理の後には水洗を行い、最終的に得られた精製物は使用まで水懸濁液の状態で保存した。

サツマハオリムシ *L. satsuma* は、鹿児島湾の水深約 100 m の海底で遠隔操作型の潜水艦 Hyper-Dolphin により採集された。棲管内に存在する生物体を水洗により除去した後、使用まで水中に保存した。

断面についての観察のためにこれらのマイクロフィブリルの繊維軸についての一軸配向試料を調製した。*P. globosa* と *T. weissflogii* 由来の試料については前述したフィブリノーゲンゲルによる配向法 (Blackwell, 1969) によって配向試料を調製した。*L. satsuma* の棲管内では管の長軸に平行にマイクロフィブリルが配向しているため、風乾した棲管をそのまま配向試料とした。

各配向試料は十分に風乾した後、酸化プロピレンに浸漬することで脱水して、エポキシ樹脂 (Epok 812、応研商事) に包埋した。これをウルトラミクロトーム (Ultracut UCT, Leica, Germany) とダイヤモンドナイフ (Ultra 45°, DiATOME, Switzerland) を用いて薄切し、およそ 50 nm 厚の切片を得た。薄切時の逃げ角は 6°であった。切片はおよそ 4 nm 厚のカーボン蒸着膜を被覆したマイクログリッド (応研商事) 上にすくいとり、観察中の試料の浮動を避けるため、真空蒸着装置により 2 nm 厚程度のカーボン膜を試料上に蒸着した。

またこれとは別に、*L. satsuma* の未精製の棲管を 1%OsO<sub>4</sub> 水溶液によって固定した試料をエタノールシリーズと酸化プロピレンにより脱水し、同様にエポキシ系樹脂に包埋した。100 nm 厚の切片に薄切後、2%酢酸ウラン水溶液と Leynolds の試薬によってタンパク質を染色し、測定に供した。

#### 4.2.2. 電子顕微鏡観察

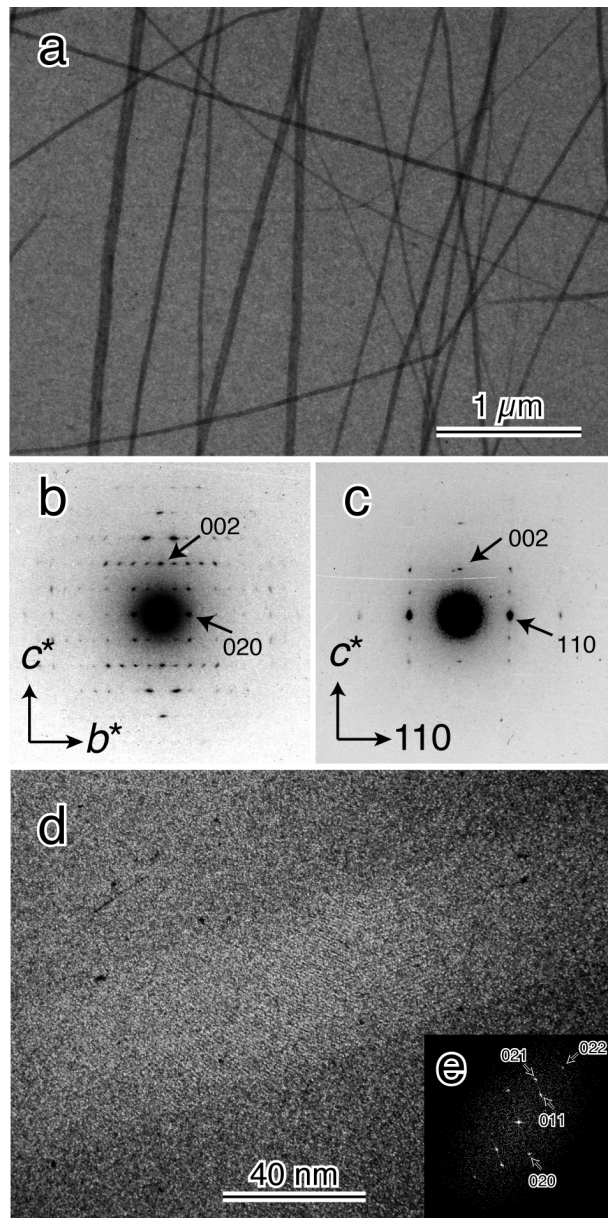
本研究では、超薄切片試料による繊維横断面についての観察と、カーボン被覆した銅グリッド上にマイクロフィブリルの水分散液を滴下、乾燥した試料を用いた繊維方向についての観察の両者を行なった。電子顕微鏡観察には CCD カメラ (Keen View, Olympus Soft Imaging Solution, Germany) を搭載した JEM-2000EXII (日本電子) を用い、観察は全て 200 kV の加速電圧の条件で行なった。回折コントラスト法による観察時には 10 μm 径の、高分解能観察時には 40 μm 径の対物絞りを使用した。電子線損傷を抑えるために最小照射装置 (Minimum Dose System, MDS, 日本電子) を用い、観察像は三菱製の MEM フィルム、および KODAK 社製の SO-163 フィルムに露光時間 1-2 s で記録した。電子線回折実験は微小部電子線回折法により行なった。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、これによる視野の探索

と撮影を行なった。回折パターンはイメージングプレート（FDR-UR-V、富士フィルム）上に記録し、読み取り装置 FDL-5000（富士フィルム）によりコンピュータに取り込み、解析を行なった。電子線回折図中の回折点の面間隔の補正は、真空蒸着装置によってグリッド上に蒸着した金結晶の 111 の回折点の面間隔を用いて行なった。

### 4.3. 結果と考察

#### 4.3.1. *P. globosa* 由来の $\alpha$ -キチンマイクロフィブリル

図 2-1a に *P. globosa* の棘条由来の  $\alpha$ -キチンマイクロフィブリルの回折コントラスト像を示す。回折コントラスト法では、一定以上の散乱角を有する散乱波を対物絞りによって結像に用いる情報から排除しているため、電子散乱性の高い結晶領域は黒いコントラストによって観測される（Revol et al., 1982）。マイクロフィブリルの形状は片末端に向かって先細りになっており、最も太い部分での平均繊維径は  $39.8 \pm 8.8$  nm であった。光学顕微鏡観察によって見積もられた平均繊維長は  $17.9 \mu\text{m}$  であった。小胞内で生産されるこのマイクロフィブリルの生合成様式のために、繊維長の均一性は高かった。図 2-1b および c にマイクロフィブリルから得られた微小部電子線回折図を示す。この回折パターンは、Cretiennot-Dinet ら（1997）の報告した *Phaeocystis* の棘条から得た電子線回折パターンに一致しており、回折点は全て Minke と Blackwell ら（1978）、また

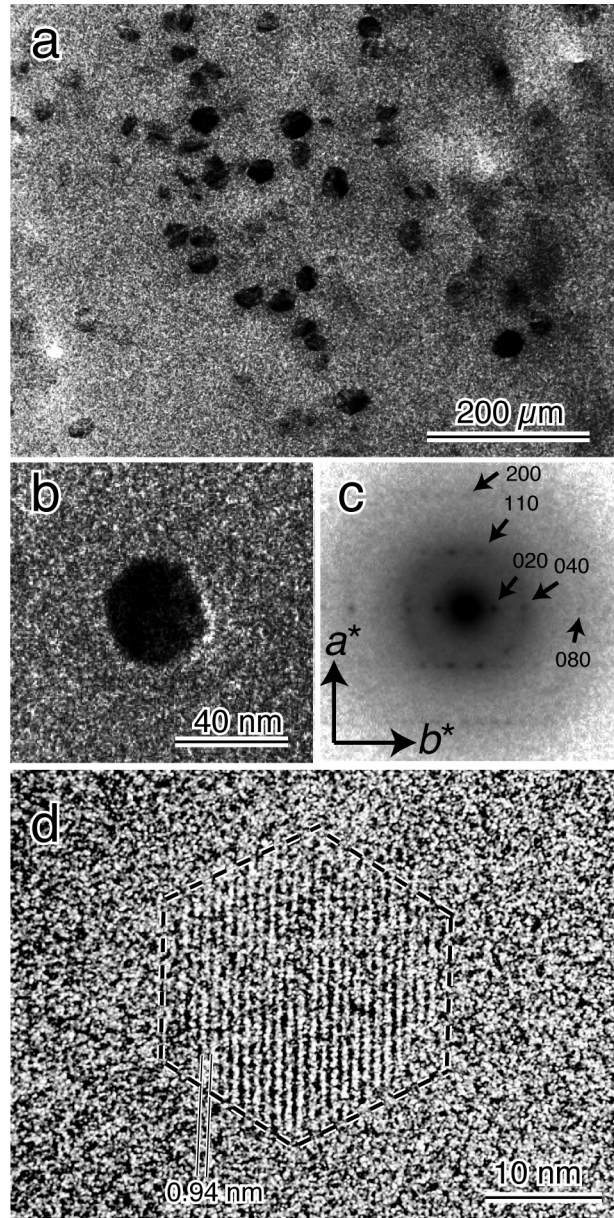


**Figure 4-1** (a) Bright field diffraction contrast images of chitin microfibrils from *P. globosa*, and electron microdiffraction diagrams obtained from the microfibrils, of (b)  $b^*c^*$  and (c)  $110c^*$  projection. (d) Lattice image of chitin microfibril from *P. globosa* and (e) its power spectrum obtained by FFT transformation of the whole image.

は Sikorski ら (2009) の構造モデルに合うように指数付けすることが出来る。第二章に示した繊維回折図中での二本鎖の単位格子に一致しない回折点が観測されないのは、その格子面が Bragg 反射の条件を満たしていないこと、回折強度が弱いこと、あるいは特に電子損傷性が高いことなどのいくつかの理由が考えられる。

図 2-1d には、繊維方向についての高分解能観察像を示す。繊維軸に平行に (0 2 0)面 ( $d=0.94$  nm)、(0 1 1)面 ( $d=0.91$  nm)、(0 1 2)面 ( $d=0.70$  nm) に由来する格子縞が明瞭に観察された。格子縞は繊維方向について連続的に 100 nm 程度の領域について観測された。この観察像をフーリエ変換することにより得られた二次元パワースペクトルを示す。このスペクトル中でも結晶は  $P2_12_12_1$  の対称性を維持しているように観測された。2つの象限でのみパワースポットが観測されるのは、キチンマイクロフィブリルが繊維方向についてねじれており、そのために Bragg 反射の条件を満たさなくなる結晶格子が存在するためであろう。

図 4-2a に、*P. globosa* 由来のマイクロフィブリルの横断面についての回折コントラスト像を示す。繊維方向についての観察と同様に、マイクロフィブリルは黒いコントラストによって観測される。マイクロフィブリルごとにコントラストに差異があるのは、観察面に対する繊維軸の傾きによって  $a^*b^*$ 面内の格子点が Bragg 反射の条件からずれる場合があるためである (Revol et al., 1982)。キチン結晶では赤道上の回折の回折強度が強いから、観察面について繊維軸が直交するマイクロフィブリルが最も

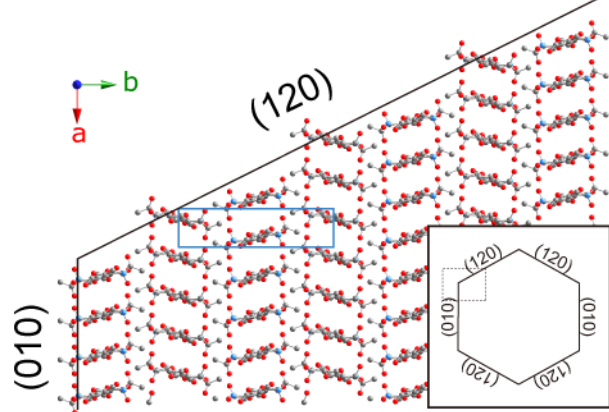


**Figure 4-2** (a) Bright field diffraction contrast image of cross sections of chitin microfibrils from *P. globosa*. (b) Typical hexagonal cross section. (c) Electron microdiffraction diagrams obtained from the cross section of microfibril. (d) Lattice image of cross section of chitin microfibril from *P. globosa*.

強いコントラストを与える。図 2-2b に示すようにマイクロフィブリルの横断面形状は、概ね正六角形状であったが、より大きなマイクロフィブリルでは六角形が変形したような五角形状に観測されるものもあった。全体としてはバロニアセルロースやホヤセルロースのように断面形状の均一性は高かった (Helbert et al., 1998a; Sugiyama et al., 1985; Revol, 1982)。

マイクロフィブリルの横断面から得られた微小部電子線回折像を図 4-2c に示す。回折図は低分子キチンの再結晶化により得られた  $\alpha$ -キチンのラメラ結晶の回折パターンによく一致しており (Perrson et al., 1992; Helbert et al., 1998c)、また Minke と Blackwell、Sikorski らのモデルとも合致している。ここでも第二章で観測された二本鎖の斜方晶の単位格子に合致しない回折点は観測されなかったが、これはそれらの回折点の回折強度が微弱であるためであろう。

図 4-2d にマイクロフィブリル横断面についての高分解能観察像を示す。(0 2 0)面に相当する格子縞が六角形状の横断面全域に観測された。格子縞は横断面全体で途切れなく観測されており、従って横断面中では  $\alpha$ -キチンの結晶が、結晶としてはそれ以上分割の出来ない一つの結晶であることが明らかとなった。格子縞は六角形の 2 辺に平行に配置しており、残りの辺とはおよそ  $117^\circ$  の角度で接していた。これを元に構築した分子鎖の充填モデルを図 4-3 に示す。格子縞に平行なマイクロフィブリル表面は(0 1 0)面に平行であり、残りの 4 辺は (1 2 0) 面に平行である。(0 1 0)面と(1 2 0)面の成す角は  $116.7^\circ$  であるから、これは高分解能観察像によく一致している。

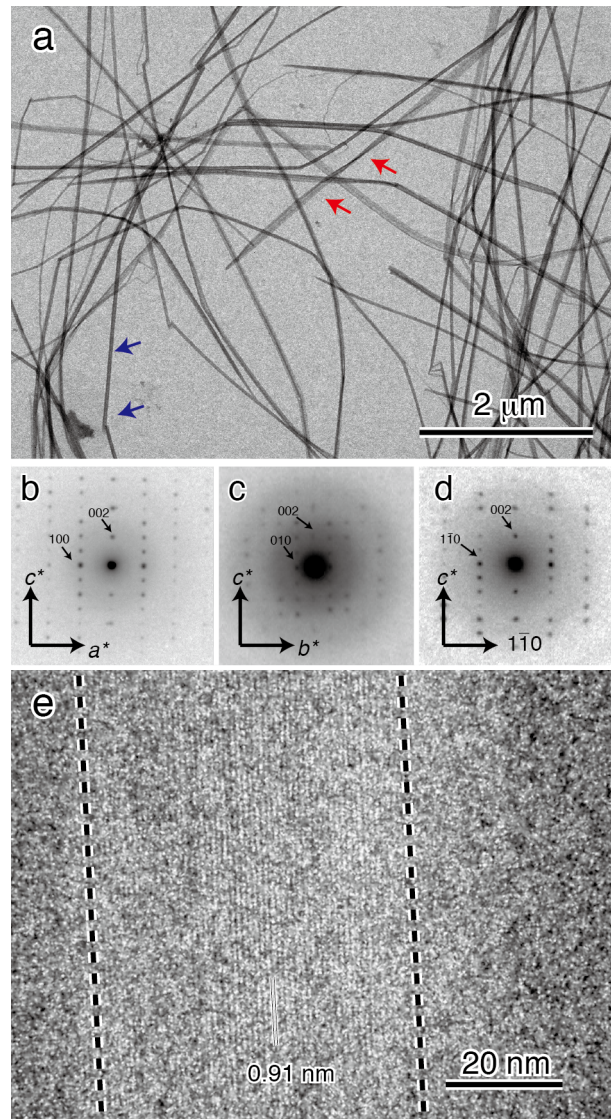


**Figure 4-3** Schematic representation of cross section of  $\alpha$ -chitin microfibril from *P. globosa*. Vertical side is parallel to (0 1 0) plane and diagonal side is parallel to (1 2 0) plane.

#### 4.3.2. *T. weissflogii* 由来の $\beta$ -キチンマイクロフィブリル

図 4-4a に *T. weissflogii* の棘条由来の  $\beta$ -キチンマイクロフィブリルの回折コントラスト像を示す。このマイクロフィブリルでも末端に向かって繊維径が細くなっている様が観察されたが (Imai et al., 2003b)、*P. globosa* のマイクロフィブリルに比べると先細りになる傾向は小さい。平均繊維径は、 $29.8 \pm 8.8$  nm であり、繊維長は不定長であった。マイクロフィブリルには、図中に青い矢印で示すような比較的細く強いコントラストで観察されるものと、赤い矢印で示した繊維径が太くりボン状の繊維として観察されるものの 2 通りが存在した。図 4-4b、c、および d に一本のマイクロフィブリルから得られた微小部電子線回折像を示す。回折パターンはいずれも報告されている無水  $\beta$ -キチンの回折図に一致しており、全ての回折点は Nishiyama ら (2011) によって提案された単位格子に従って帰属することが可能であり、水和型結晶の形跡は見られなかった。従って、この観察条件下では全ての  $\beta$ -キチン結晶は無水型として存在しているものと考えられる。

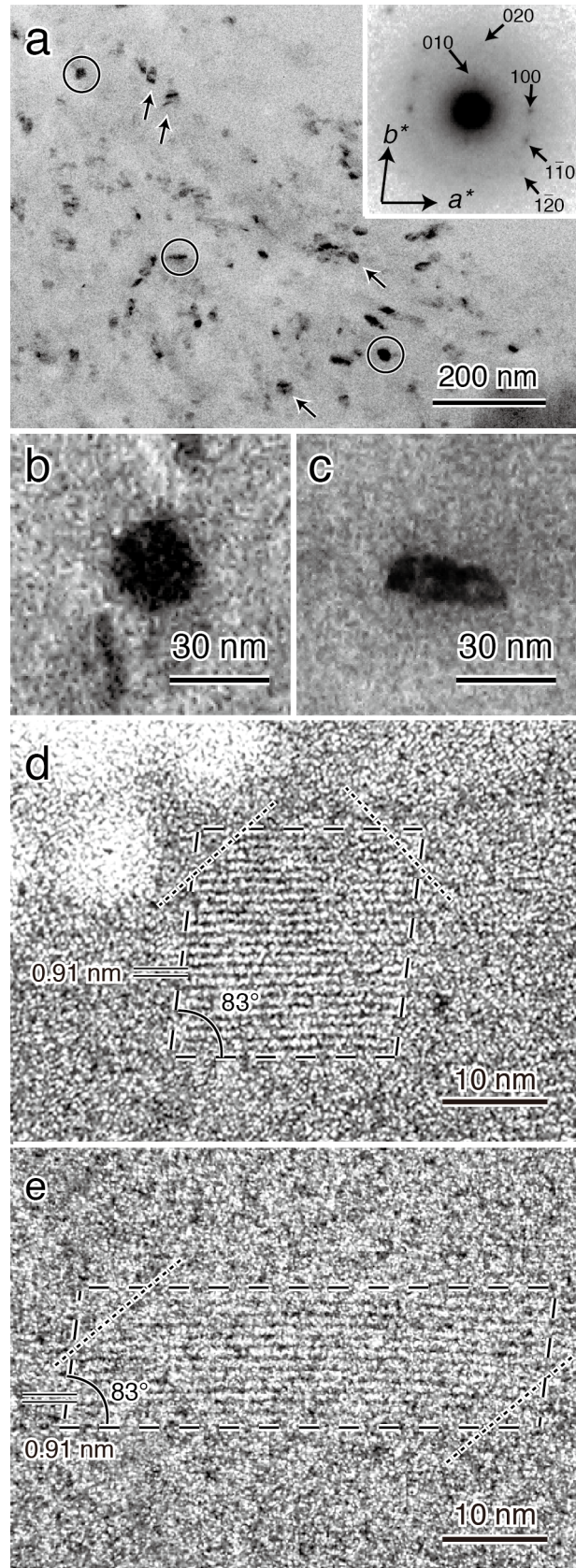
図 4-4e に繊維方向についての高分解能観察像を示す。繊維軸に平行に無水  $\beta$ -キチンの(0 1 0)面に相当する格子縞 ( $d = 0.91$  nm) が観測された。繊維幅方向全体に渡って 30 nm 程度、繊維軸方向に 300 nm 以上の領域でこの格子縞は観測された。このように繊維軸方向についての連続性は高く、また(0 1 0)面の格子縞がこのような領域で連続的に観測されたことから、セルロースマイクロフィブリルとは異なって、 $\beta$ -キチンマイクロフィブリルに周期的なねじれ構造が存在しない可能性がある (Henley et al., 1997; Matthews et al., 2006)。これはキ



**Figure 4-4** (a) Bright field diffraction contrast images of chitin microfibrils from *T. weissflogii*. Red and blue arrows indicate the ribbon-like and thinner solid microfibrils, respectively. Electron microdiffraction diagrams obtained from single microfibril: (b)  $a^*c^*$ , (c)  $b^*c^*$  and (d)  $110c^*$  projection. (e) Lattice image of chitin microfibril from *T. weissflogii* with (0 1 0) lattice plane of anhydrous  $\beta$ -chitin crystal..

チン結晶の構造を考えると、分子シート構造中では極めて密にグルコピラノース環の疎水面が堆積しており、無水型 $\beta$ -キチン結晶ではこれを安定化するようにO6-H...O7とN-H...O7の水素結合が存在している。従ってこの長細い分子シート構造は極めて安定で剛直であると考えられ、このシートが変形するねじれのようなマイクロフィブリルの変形は起こりづらいのであろう。

図4-5aにマイクロフィブリル横断面についての回折コントラスト像を示す。マイクロフィブリルの形状は、長形状であるが、図4-4bに示すようなほぼ正方形に観察されるものと、図4-4cのような細長い長形状に観察されるものがあった。短辺と長辺の比は1:1から、1:6程度までのものが観察された。これは、図4-4a中に観察された細いものとリボン状のマイクロフィブリルに対応するものであろう。



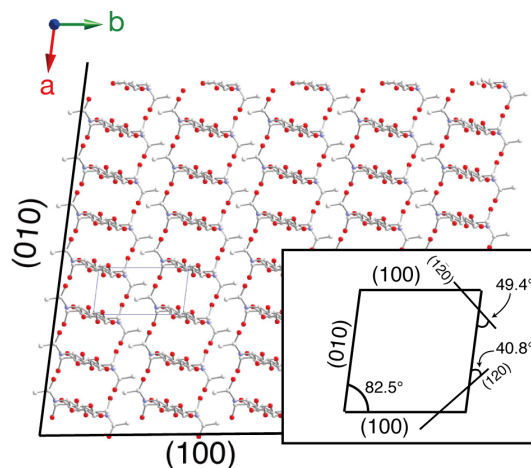
**Figure 4-5** (a) Bright field diffraction contrast image of cross sections of chitin microfibrils from *T. weissflogii*. Circles indicate the typical cross sections, and arrows point the cracked cross sections. Inset: Electron diffraction diagram of anhydrous  $\beta$ -chitin obtained from single cross section. Typical square- (b) and ribbon-type (c) cross section. (d) Lattice image of cross section of chitin microfibril from *T. weissflogii*. (d) square type (e) ribbon type.

また図 4-5a 中に矢印で示した通り、横断面の一辺に平行な亀裂によってマイクロフィブリルが割れている様が頻繁に観察された。この原因としては薄切時の剪断力によって生じた可能性と、乾燥-湿潤による無水型-二水和型結晶間の転移によって結晶に応力が掛かったことによる可能性の2通りが考えられる。乾燥-湿潤のサイクルを繰り返し行なうことで結晶性が低下することが Kobayashi ら (2010) によって報告されていることから、後者についての可能性が高いが、この事象をより詳細に観測するためには乾燥-湿潤サイクルを複数回繰り返した試料の電子顕微鏡観察と X 線回折を組み合わせることが必要であろう。

図 4-5b にはマイクロフィブリル一本の横断面から得られた電子線回折像を示す。各回折点は図中に示すように Nishiyama らの単位格子に従って指数付けできた。一本のマイクロフィブリルから電子線回折を取得することによって、結晶の逆格子を直接的に観察することが出来た。面間隔が大きいにも拘らず 1 1 0 の回折点が未観測であるが、これは Nishiyama らの報告にあるようにこの回折の強度が小さいためであろう (Nishiyama et al., 2011)。

図 4-5d と 5e にマイクロフィブリル横断面についての高分解能観察像を示す。(0 1 0)面に相当する格子縞が正方形状と、長方形状の横断面全域に観測された。両者ともに格子縞は横断面全体に途切れなく観測されており、いずれの横断面形状の場合であっても横断面中では結晶としてはそれ以上分割の出来ない一つの結晶であることが明らかとなった。格子縞は四角形の2辺に平行に配置しており、残りの辺とはおよそ 83°の角度で接していた。また非常に頻繁にマイクロフィブリルの角が欠けているように観察される場合があった。マイクロフィブリルの辺に対しておよそ 40°から 50°の角度を持って欠けている場合が多かったが、これが生合成の過程で生じたものであるのか、精製や乾燥、湿潤の試料調製過程で生じたものであるのかは不明である。

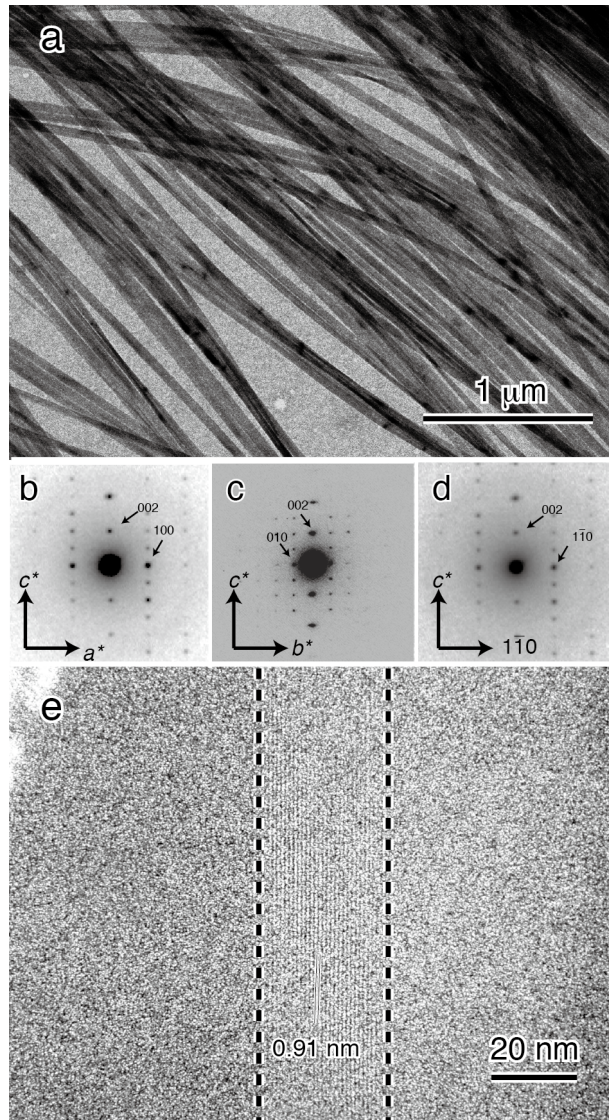
これらの観察を元に構築した分子鎖の充填モデルを図 2-5f に示す。格子縞に平行なマイクロフィブリル表面は(0 1 0)面に平行であり、こちらがリボン上の横断面の場合は長辺に対応する。残りの2辺は (1 0 0) 面に平行であった。(0 1 0)面と(1 0 0)面の成す角は 82.7°であるから、観察結果によく一致している。角の欠損部分については、仮にある結晶面に平行に欠けが生じているとすれば、(1 2 0)、あるいは (1  $\bar{2}$  0) 面に対して平行であると予測される。



**Figure 4-6** Schematic representation of cross section of  $\alpha$ -chitin microfibril from *T. weissflogii*. Vertical side is parallel to (0 1 0) plane and horizontal side is parallel to (1 0 0) plane.

#### 4.3.3. *L. satsuma* 由来の $\beta$ -キチンマイクロフィブリル

図 4-7a に *L. satsuma* の棲管由来の  $\beta$ -キチンマイクロフィブリルの回折コントラスト像を示す。このマイクロフィブリルは *P. globosa* および *T. weissflogii* 由来のマイクロフィブリルとは異なり、天然にタンパク質と棲管として組織化しており、マイクロフィブリル同士の凝集性が高い。マイクロフィブリルの平均繊維径は、 $52.4 \pm 13.7$  nm であり、繊維長は計測出来なかった。図 4-7b、c、および d に一本のマイクロフィブリルから得られた微小部電子線回折像を示す。*L. satsuma* の場合でも回折パターンは報告されている無水  $\beta$ -キチンの回折図に一致しており、全ての回折点は Nishiyama ら (2011) によって提案された単位格子に従って帰属することが出来た。図 4-7e に繊維方向についての高分解能観察像を示す。繊維軸に平行に無水  $\beta$ -キチンの(0 1 0)面に相当する格子縞 ( $d = 0.91$  nm) が観測された。繊維幅方向全体に渡って 30 nm 程度、繊維軸方向に 300 nm 以上の領域でこの格子縞は観測された。このような長軸方向に広い範囲に渡って格子縞が観測される傾向は *T. weissflogii* の場合と同様であり、マイクロフィブリルに周期的なねじれ構造がないことが示唆された。



**Figure 4-7** (a) Bright field diffraction contrast images of chitin microfibrils from *L. satsuma*. Red and blue arrows indicate the ribbon-like and thinner solid microfibrils, respectively. Electron microdiffraction diagrams obtained from single microfibril: (b)  $a^*c^*$ , (c)  $b^*c^*$  and (d)  $1\bar{1}0c^*$  projection. (e) Lattice image of chitin microfibril from *L. satsuma* with (0 1 0) lattice plane of anhydrous  $\beta$ -chitin crystal..



図4-8aには棲管の横断面の染色像を示す。四酸化オスミウムとクエン酸鉛によって染色したことから、マトリックス成分であるタンパク質が黒いコントラストで、染色されないキチンマイクロフィブリルの断面は白色に観察されている。棲管中ではキチンが高密度に配列しており、その単位面積あたりの存在量はおよそ  $200 \text{ 本}/\mu\text{m}^2$  であった。これまでに観察されている *Tevnia* や *Riftia* の棲管とは異なり、明確な層構造は観察されず、従って合板様の層同士の凝集構造は認められなかった (Gaill et al., 1992; Shillito et al., 1997)。観察面に対して斜めに配向しているように観察されるマイクロフィブリルは観察されず、長軸に対して全てのマイクロフィブリルが配向している様が見て取れる。また、キチンマイクロフィブリルの断面形状は、染色像であるためマトリックス部分との境界は曖昧であるものの平行四辺形状に観察された。

**Figure 4-8** (a) Bright field image of a stained cross-section of a tube from *L. satsuma*. The  $\beta$ -chitin microfibrils appear as white dots embedded in stained protein matrix. (b) Diffraction contrast image of a cross-section of the same tube. The microfibrils are visualized as black areas. Cracks in the microfibrils are indicated by black arrows. (c) Typical shape of a cross-section of the microfibrils of *L. satsuma*. (d) Electron diffraction diagram corresponding to the circled area in (b). The pattern, obtained from a few tens of microfibrils, shows the orientation in the lateral plane of a  $\beta$ -chitin crystal. (e) Lattice image of a cross-sectioned  $\beta$ -chitin microfibril showing the lattice fringe corresponding to the (010) plane ( $d = 0.91 \text{ nm}$ ) of anhydrous  $\beta$ -chitin.

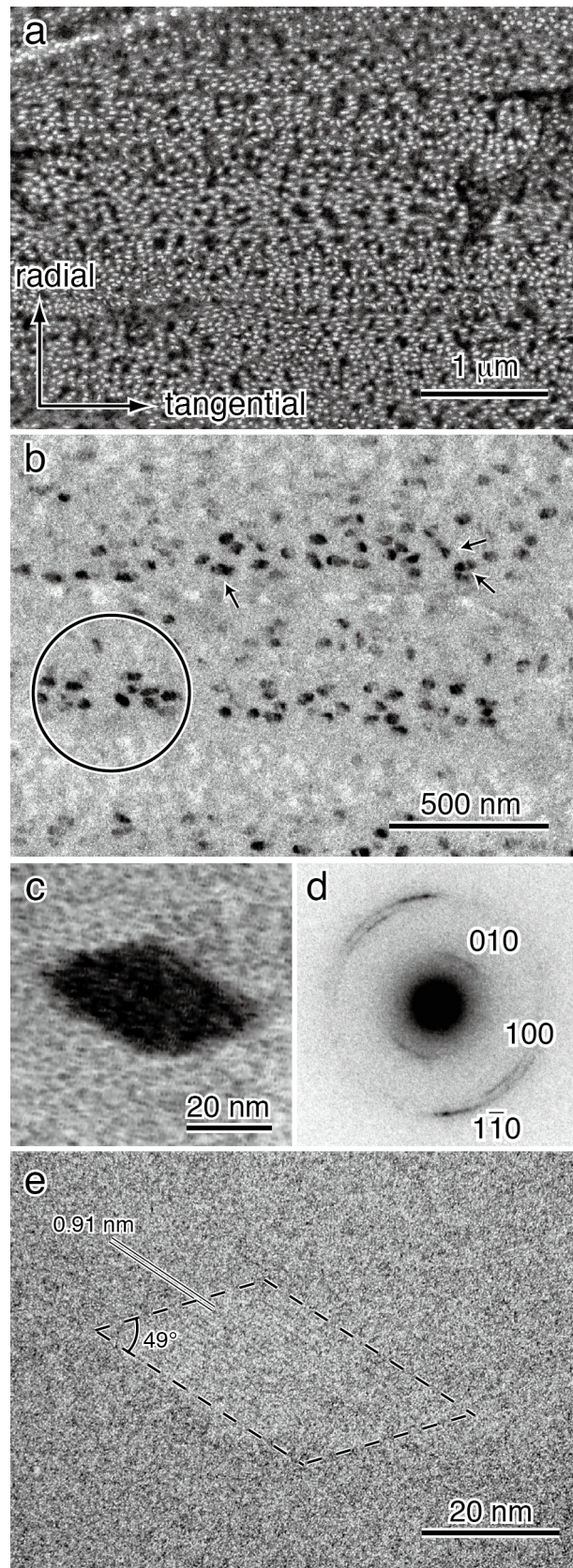
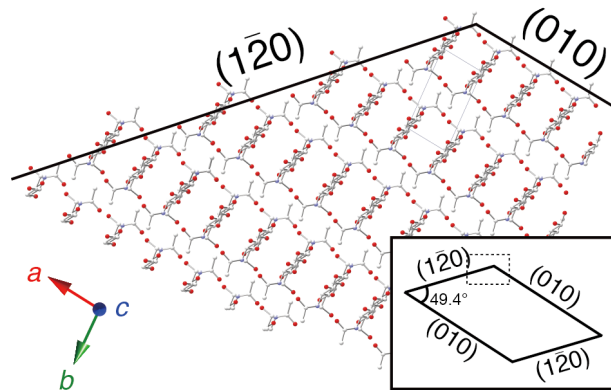


図 4-8b には、棲管横断面についての回折コントラスト像を示す。マイクロフィブリルの形状は、平行四辺形状であるが、矩形状のものから菱形に近いものまで、形状には多様性があった。短辺と長辺の比は 1:1 から、1:2 程度までのものが観察された。図 4-8a に比べると観察されるマイクロフィブリルの数が少ないが、これは回折コントラスト法によって強いコントラストを得るには、厳密に観察面に対してマイクロフィブリルが垂直に配向している必要があるためである (Revol, 1982)。図 4-8a 中に矢印で示すように、*T. weissflogii* のマイクロフィブリルの場合と同様にマイクロフィブリル断面の割れが観測された。図 4-8d には図 4-8b 中の円で囲われたような 500 nm 径の範囲から得られた電子線回折像である。*Tevnia* や *Riftia* の棲管と同様に、*L. satsuma* の棲管断面中には  $\beta$ -キチン結晶の *ab* 面内での面配向が存在していた (Gaill et al., 1992a; Shillito et al., 1997)。配向様式の詳細は次章にて扱う。

図 4-8e にはマイクロフィブリル横断面についての高分解能観察像を示す。(0 1 0)面に相当する格子縞 ( $d = 0.91$  nm) が平行四辺形状の横断面全域に観測された。両者ともに格子縞は横断面全体に途切れなく観測されており、横断面中では結晶としてはそれ以上分割の出来ない一つの結晶であった。格子縞は四辺形の 2 辺に平行に配置しており、残りの辺とはおよそ  $50^\circ \sim 70^\circ$  までの角度で接していた。

これを元に構築した分子鎖の充填モデルを図 4-9 に示す。格子縞に平行なマイクロフィブリル表面は(0 1 0)面に平行であり、残りの 2 辺は  $(1 \bar{1} 0)$  面あるいは  $(1 \bar{2} 0)$ 面に平行であった。(0 1 0)面と  $(1 \bar{1} 0)$ 面とがなす角は  $68.4^\circ$ 、(0 1 0)面と  $(1 \bar{2} 0)$ 面の成す角は  $49.4^\circ$ であるから、観察結果と一致している。



**Figure 4-9** Schematic representation of cross section of  $\alpha$ -chitin microfibril from *L. satsuma*. Two sides are parallel to (0 1 0) plane and other two sides is parallel to  $(1 \bar{2} 0)$  plane or  $(1 \bar{1} 0)$  plane.

#### 4.3.4. キチンマイクロフィブリルの断面形状における多様性

これまでに示したように、 $\beta$ -キチンマイクロフィブリルとして二つの生物種から得られた試料を用いて観察を行った結果、特に断面形状について、*T. weissflogii* と *L. satsuma* との間には有意な差を観察することができた。

前者のキチンでは正方形に近い平行四辺形状か、その形状から角が欠損した多角形状の断面であった。表面は (1 0 0) 面と (0 1 0) 面に平行であった。また、断面の形状の均一性は比較的低かった。*L. satsuma* の場合では、断面の形状は平行四辺形状であり、明確に長辺と短辺の差異があった。表面は (0 1 0) 面と (1  $\bar{1}$  0) (1  $\bar{2}$  0) 面に平行であった。このように形状には明確な差異があり、また分子鎖の配列様式の違いから、表面に露出していると考えられる結晶面も異なっている。このことから *T. weissflogii* と *L. satsuma* のキチンとは異なった表面物性を示すと考えられる。露出している結晶面が違いはすなわち露出している官能基の違いであるため、表面の親水性の差異等が生じていると考えることができる (Mazeau & Rivet, 2008)。この差異は、キチンの結晶表面を認識して酵素の活性にも影響を与えるものと予測することができる。また、表面物性の違いは、材料利用を考えた際にも影響を与えると考えられ、マイクロフィブリルを繊維強化材として複合材料化する際のマトリックスとの界面接着性などに差異が見られると予測される。また、*L. satsuma* と同じ有鬚動物である *Tevnia* や *Riftia* 由来の  $\beta$ -キチンマイクロフィブリルについても断面形状の観察が行われている (Gaill et al., 1992; Shillito et al., 1997)。*Tevnia* キチンも *L. satsuma* キチンと同様に高結晶性であるが、断面形状は矩形である。*Tevnia* キチンマイクロフィブリルの断面については高分解能観察が行われていないため、分子鎖配列様式は不明であるが、セルロース生合成の場合と同様に近傍の属であっても断面形状と分子鎖充填様式には違いがあると考えられる (Helbert et al., 1998a, b)。これは生物種ごとにキチンの生合成装置の形状やその中の酵素の配列などに差異があるためであろう (Tsekos, 1999)。

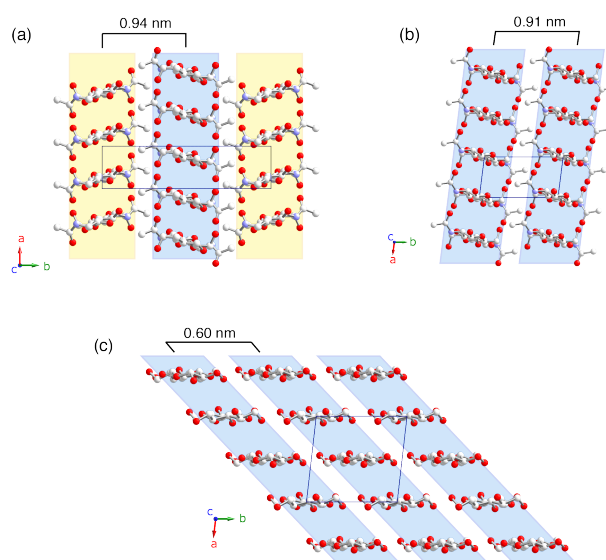
#### 4.3.5. キチンマイクロフィブリルの結晶化機構

一方で、生産する生物種や結晶形が異なっても (0 1 0) 面がマイクロフィブリルの一表面に平行である、という特徴は本研究で観察した全てのキチンマイクロフィブリルに共通であった。キチン結晶においては図 4-10 に示すように、両結晶多形に共通して (0 1 0) 面に平行に、グルコピラノース環が疎水的に堆積した分子シートが存在しており、この分子シート構造は多形間で非常に類似性が高い。また、この疎水的相互作用による分子シートは  $\beta$ -キチンの水和-無水の結晶転移においても構造的に維持されていると予想されているから、天然の存在状態である二水和結晶の状態の  $\beta$ -キチンマイクロフィブリル中でも分子シートは無水型と同様な状態で存在していると考えられる。(0 1 0) 面は  $\beta$ -シート構造を有するタンパク質分子と組織化する上で重要

であると考えられているから (Neville 1993; Vincent 2004)、この特徴は、単に今回観察した高結晶性のキチンマイクロフィブリルばかりでなく、甲殻類や昆虫のキチンマイクロフィブリルにも共通するものであると考えられる。

天然セルロースには  $I\alpha$  と  $I\beta$  の結晶多形が存在しているが、 $I\alpha$  が量的に多い藻類由来のセルロースマイクロフィブリルにおいても、ほぼ  $I\beta$  からのみなるホヤセルロースのマイクロフィブリルにおいても、断面形状の差異と無関係に 0.6 nm 周期の  $(1 \bar{1} 0)$  面がある表面に必ず平行になるように分子鎖が配列している。セルロースの I 型結晶においては、 $(1 \bar{1} 0)$  面に平行にグルコピラノース環の疎水的凝集力によって形成された分子シートが存在している(図 4-10c)。このような状況から、セルロースの生合成での結晶化機構は、二段階的に進行していると考えられている。まず、第一段階で、疎水的凝集力による分子シートの形成が行われ、次段階としてそれらの分子シート同士がさらに疎水的な相互作用により凝集し、一本のセルロースマイクロフィブリルを構築するというものである。この結果は、計算科学によって自由エネルギー的に妥当性がある機構であるということが示されている (Cousins and Brown, 1995)。

セルロースの分子シートとキチン結晶における分子シートは類似性の高いものであり、マイクロフィブリル中における存在状態についてもよく似ていることから、この二段階的な結晶化機構はキチンマイクロフィブリルの生合成にも適用できるものと考えられる。つまり、 $(0 1 0)$  面に平行な分子シート構造がまず形成され、これらが一本のキチンマイクロフィブリルとして再度凝集する、ということである。この機構は、 $\alpha$  型と  $\beta$  型の結晶形に共通であると考えられる。二段階的な結晶化機構は両結晶形に共通であると予測されることから、 $\alpha$ -キチンの生合成機構は、これまで予想されていたより  $\beta$ -キチンのそれと共通する部分を多く含んでいる可能性が高い。結晶化機構の第一段階で形成されると考えられる分子シート内の分子鎖の極性は結晶形によらず揃っており、 $\alpha$ -キチンの場合では極性の異なるシートが交互にならんでマイクロフィブリルを形成している。もし、分子鎖伸長方向



**Figure 4-10.** Models of hydrophobic molecular sheets in a-chitin crystal (a), anhydrous b-chitin crystal (b) and cellulose Ib crystal. The sheets are displayed as tinted planes. This sheet aligns parallel to  $(010)$  plane in a- and b-chitin and to  $(110)$  plane in cellulose Ib. In the a-chitin crystal the sheets contains only the molecular chains with the same direction of c-axes, but the direction are different between each adjacent sheet as shown by difference in color of the sheets

の異なる二つの合成酵素が存在するとすれば、それらが合成装置内に交互に配列することで、逆平行鎖構造を有する  $\alpha$ -キチンマイクロフィブリルを、セルロースや  $\beta$ -キチンマイクロフィブリルの場合と同じような一方向的な機構で生合成することが可能である。

#### 4.4. 結言

結晶形と起源の異なる高結晶性キチンマイクロフィブリルについて、高分解能電子顕微鏡観察と電子線回折実験を行なった。この観察によって、キチンマイクロフィブリルの断面形状を明らかにし、生産する生物種によって断面形状に差異があることが示された。また、マイクロフィブリル横断面についての高分解能観察によって得られた格子像から、マイクロフィブリル中の分子シートの充填様式を明らかにし、表面に露出する結晶面の予測を行った。今回観察を行ったキチンマイクロフィブリルについては、試料の結晶形、起源によらず分子シートは必ず横断面の長辺に平行に配列していた。このことから、キチンマイクロフィブリルの結晶化は、分子シートの形成と、それらのシートの堆積という二段階の過程を経ていることが予想された。

## 5. ハオリムシ棲管中のキチンの高次凝集構造

### 5.1. 緒言

前章ではキチンマイクロフィブリル構造の理解のために高分解能電子顕微鏡観察を行なったが、実際のキチン質の骨格組織中ではこのマイクロフィブリルがタンパク質などの他の基質と複合化している。キチンやキチン質に含まれる構造タンパク質などは室温条件下で水に不溶であるから、その組織構造は生合成・分泌様式に強く影響を受ける。従ってそのような組織構造を理解することは、生物によるキチン質の生産様式を明らかにする上で非常に重要である。加えて、昆虫のクチクラ層やイカの腱のようなキチン質は、剛性と可撓性を兼ね備えた理想的な複合材料であるため、生物模倣による材料創製を行なう上でもこのようなキチン質の組織構造を精査することには意義がある。本章では、微視的な結晶構造と組織構造、さらに生合成様式の関係性について、ハオリムシ棲管を試料として解析を行なった。

ハオリムシは、シボグリヌム科 (Siboglinidae) に属する軟体動物である。海底の熱水噴出孔などの近傍に生息するベントス (底生生物) の一種であり、体内に共生させた硫黄酸化細菌が噴出孔からの硫化水素等を変換して得た有機物を栄養源とする、この生物に特有の生態を有する (Bright & Lallier, 2010)。この生態のために、ハオリムシは噴出孔付近に体を固定して硫化水素を摂取する必要があり、さらにその状態で外敵から身を守る必要があるため、体外にチューブ、あるいは棲管と呼ばれる剛直な管状構造体を構築して生物体を保護している。この棲管は高結晶性の  $\beta$ -キチンマイクロフィブリルとタンパク質からなる複合体であり、Gaill らのグループの電子顕微鏡観察を中心とした研究によって、*Tevnia* 属や *Riftia* 属の棲管の組織構造が報告されている (Gaill et al., 1992a, b; Shillito et al., 1995, 1997)。キチン結晶についての電子線回折と組織切片の観察から、この棲管中では数千本のキチンマイクロフィブリルとタンパク質から成る厚さ数  $\mu\text{m}$  程度の薄層が堆積することで構成された構造体であることが示された。層構造中では強い面配向が観察され、電子線回折の結果からこの層構造中では全ての分子鎖の極性が揃っていることが示された。しかしこの薄層同士は互いに向きを変えて、合板のような堆積様式を有しているために、組織全体としてはキチン分子の極性の一致などは見られないことが報告されている。一方で、前章で示した通り、*Lamellibrachia* 属の棲管中では明確な層構造が存在せず、合板様の構造体が存在していないことが観察されており、近傍の属のハオリムシの棲管であっても組織構造に差異が存在することが明らかとなっている。

キチンやセルロースの生合成は、分子鎖伸長が一方に限定された方向性を有する反応であるために、組織構造中での分子鎖の極性は分泌様式に直接的に関与する (DeAngelis, 1999; Imai et al., 2003b; Koyama et al., 1997)。生合成様式と組織構造の関係性を明らかにするために、

電子線回折によって分子鎖極性を明らかにする試みはハオリムシ棲管以外の系、たとえば酢酸菌のセルロースや珪藻  $\beta$ -キチンについても行なわれており、いくつかの重要な知見を与えている (Koyama et al., 1997; Imai et al., 2003b; Lai-Kee-Him et al., 2002)。しかしながら電子線回折実験によって得られる情報は微視的なものに制限される。より巨視的な解析を行なうことで、生物体の動きとキチンの生合成様式、組織構造についての関係性についての理解が得られるものと期待される。本章ではハオリムシの一種であるサツマハオリムシ (*Lamellibrachia satsuma*) の棲管の組織構造解析を X 線回折によって行い、その構造と、合成様式について検討した。

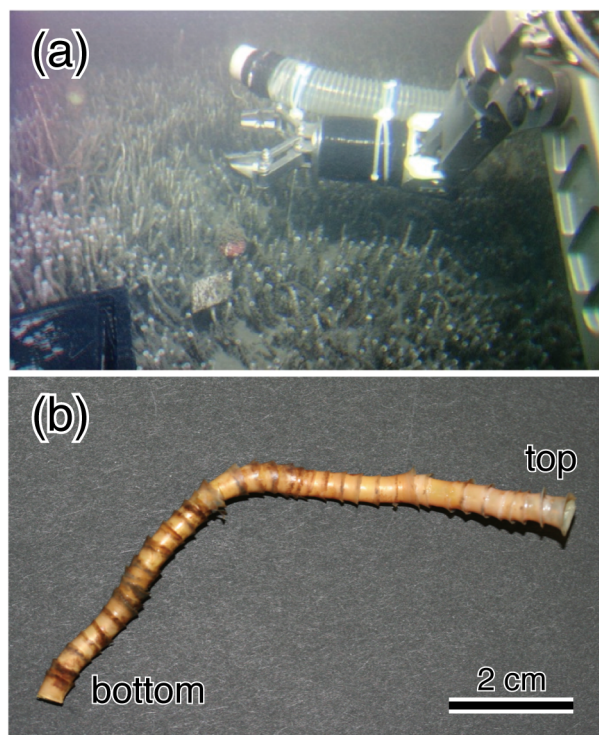
## 5.2. 実験

### 5.2.1. 試料調製

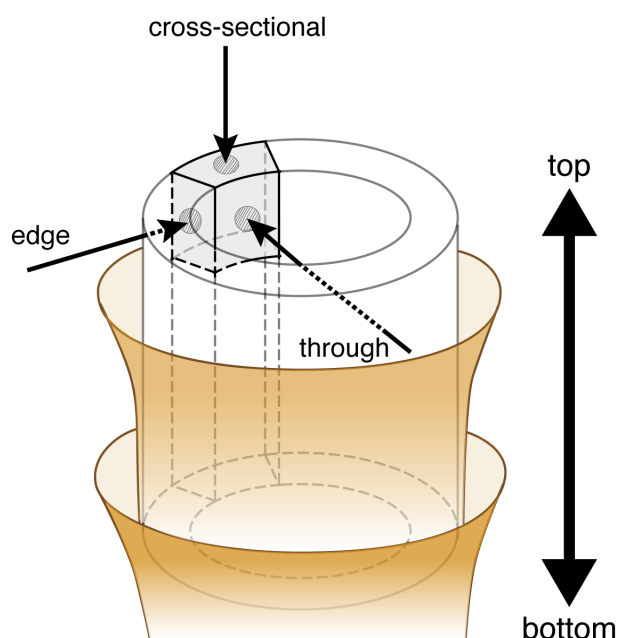
サツマハオリムシ (*L. satsuma*) は前章に示した通り、鹿児島湾の海底約 100 m の領域から採取した。水洗により棲管から生物体を除去した後、この棲管を風乾した。棲管は図 5-1 に示す通り、円錐様の構成要素が積み重なることによって構成されている。

### 5.2.2. X 線回折実験

X 線回折実験は、回転対陰極型 X 線発生装置 (RU-200BH、リガク) を X 線源として行なった。風乾した棲管を 2 mm (高さ)  $\times$  1 mm (幅)  $\times$  1 mm (厚さ) 程度



**Figure 5-1.** Appearance of tubeworm *Lamellibrachia Satsuma* (a) in the 100 m depth of Kagoshima Bay. (b) Harvest tube.



**Figure 5-2.** Experimental layout of X-ray diffraction of tube of *L. satsuma*.

の大きさの小片に切り出したものを試料とした。図 5-2 に示すように試料に対して、横断面 (Cross section)、透視面 (Through)、端視面 (Edge) のそれぞれに垂直に入射するように、三方向から X 線を照射して、回折図をイメージングプレート上に記録した。

### 5.2.3. 電子顕微鏡観察

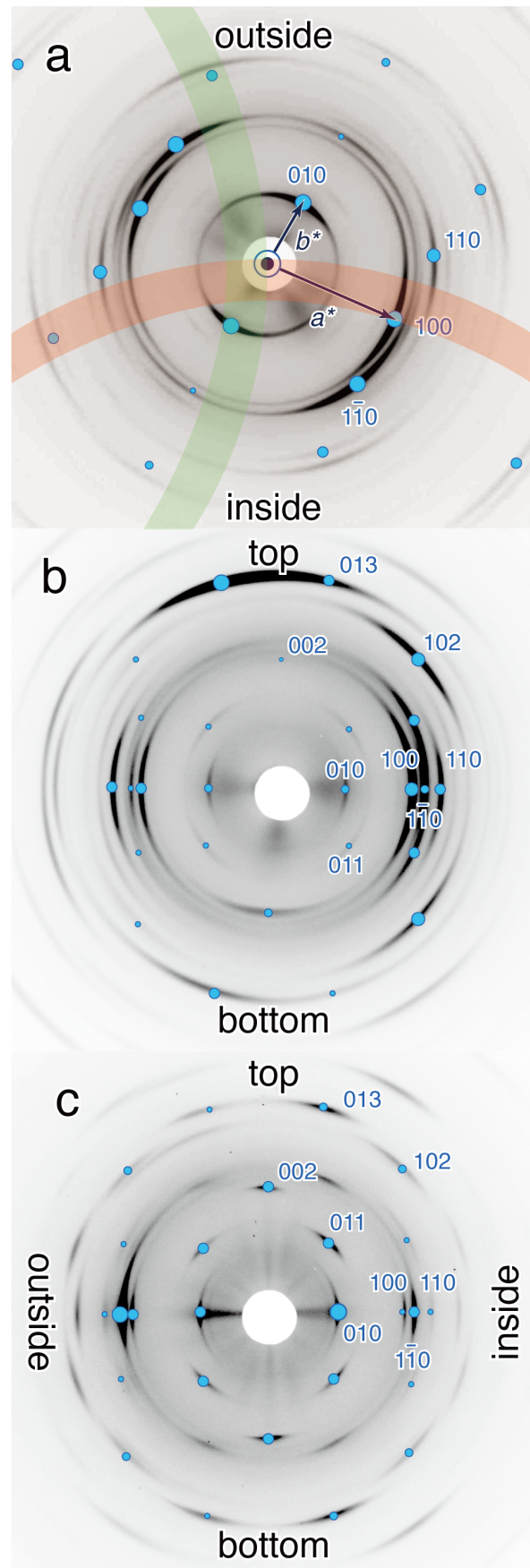
電子顕微鏡観察の方法は棲管の断面についての観察を、超薄切片法と回折コントラスト法によって行なった。詳細は 4.2.2 および 4.2.3 に示す通りである。

## 5.3. 結果と考察

### 5.3.1. 分子鎖極性

図 5-3 に、棲管に対して横断面 (図 5-3a)、透視面 (図 5-3b)、端視面 (図 5-3c) の各方位から X 線を照射した際に得られた X 線回折図を示す。この試料は棲管の中央部分のバルク部分から小片として切り出したものを用いている。

**Figure 5-3.** X-ray diffraction diagram of the tube irradiated from the directions shown in Figure 2. (a) Cross-sectional view, (b) through view, and (c) edge view. In (a), equatorial reciprocal points are shown as circular dots. The  $c^*$ -axis is upward from the paper plane, and the direction normal to (1 1 0) plane corresponds to the tangential direction of the tube. The red and green broad lines denotes surfaces of the Ewald spheres when the incident X-ray is in through and edge directions, respectively.





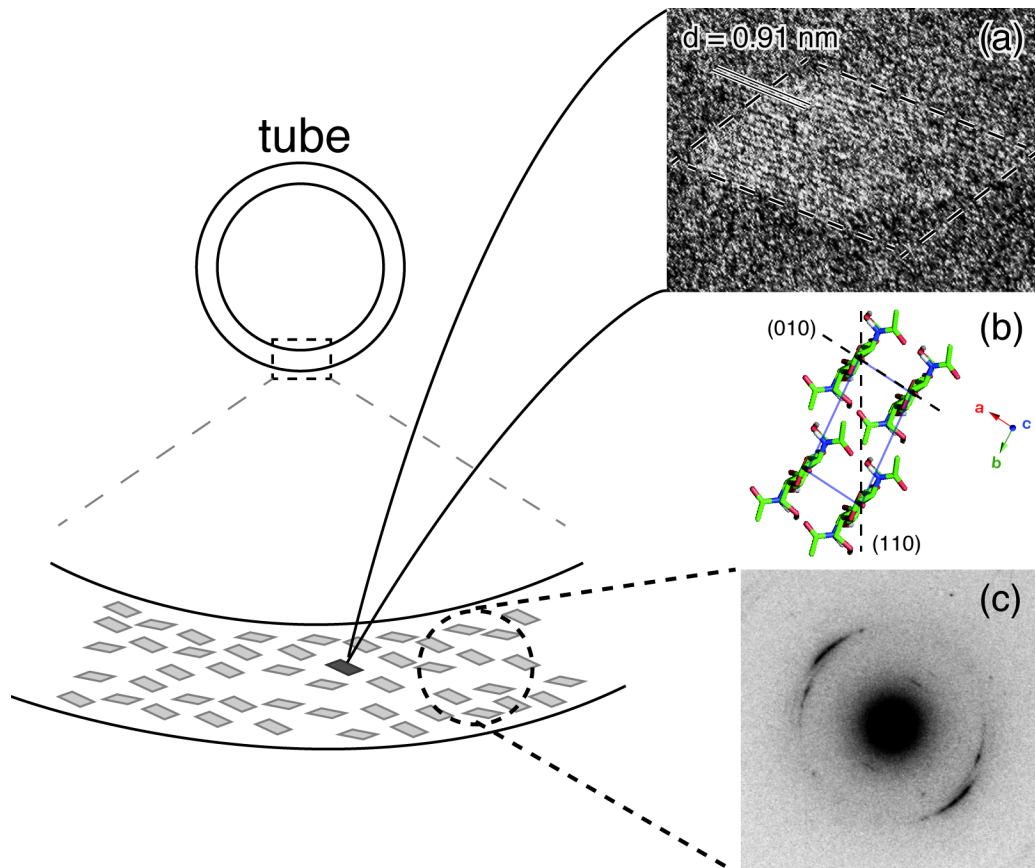
横断面についての回折図中では、 $0kl$ のミラー指数を有する回折点のみが観察されている。これは結晶の  $c$  軸が棲管の長軸に平行に配列しているためである。回折図は結晶が  $ab$  面内に明確な配向を有していることを示しており、この回折パターンは前章で示したような無水  $\beta$ -キチンの  $a^*b^*$ 面の投影によく一致しており、この棲管中では無水  $\beta$ -キチンの(1 1 0)面が棲管壁に垂直に配向している。逆空間でのベクトル表示は右手系で表されるから、棲管中のキチン結晶の  $c$  軸は全て紙面に上向きに配列している。Nishiyama ら (2011) の構造モデルにおいては、還元末端の向きと  $c$  軸の向きとは一致しているから、従って棲管中の全てのマイクロフィブリルの極性は揃っており、還元末端は棲管組織の上部を向いていることになる。

### 5.3.2. 面配向

透視面 (図 5-3b) と端視面 (図 5-3c) の回折図は、報告されている無水  $\beta$ -キチンの繊維回折図に外形は一致しているが、各回折点が象限ごとに回折強度は大きく異なっており、これは横断面中でも観測されたように試料中の結晶が三次元的に強く配向していることを示している。透視面においては、 $100$ の回折点では右半球のものが左半球に比べて5倍強い強度を有するが、一方で $1\bar{1}0$ と $110$ の回折点の半球ごとの強度差はほぼない。回折強度の差異は赤道上だけではなく、 $102$ や $013$ など高次の層線上に観測された。また子午線上の $002$ の回折強度が非常に弱く、これは棲管壁中に小さいながらも軸方向についての配向の乱れが存在していることを示している。また端視面の回折図 (図 5-3c) においては、 $1\bar{1}0$ の左右半球での強度差が特に顕著であり、左側の回折が右側の回折の6倍の強度を有している。また、こちらの場合では、 $010$ の回折強度にも左右で3倍程度の差異が存在している。これらの面配向様式は、横断面での回折図中の結晶の配向様式によく一致している。つまり、図 5-3a 中に示すように、透視面に垂直に  $X$  線を透過した場合には赤色で示した線上の、端視面に垂直に透過した場合には緑色の線上にある逆格子点が Bragg 反射の条件を満たすことになるため、左右半球で強度に明確な差異が存在している。

この *L. satsuma* の棲管中で観測されたキチンの面配向様式は、*Tevnia* 属のハオリムシの棲管中でのキチンの配向様式とは異なる。*Tevnia* 属の棲管は、前述の通り、キチンマイクロフィブリルとタンパク質マトリックスから成る層構造が合板状に堆積することで形成されており、*L. satsuma* の棲管と異なり巨視的に観測できる繊維軸の配向はない。しかしながら電子線回折によって層構造中ではキチン結晶が  $ab$  面内に配向しており、 $b^*$ 軸が棲管壁面に対して垂直に配向していることが明らかとなっている (Gaill et al., 1992a)。これは(1 1 0)面が壁面に垂直に配向している *L. satsuma* の配向様式とは異なっており、両者の間では結晶は繊維軸についておよそ  $60^\circ$ 回転している。*L. satsuma* のマイクロフィブリル中での分子鎖配列様式は、前章において高分解能電

子顕微鏡観察によって示しているが、平行四辺形状の断面の長辺が(0 1 0)に平行であり、単辺は(1  $\bar{1}$  0)、あるいは(1  $\bar{2}$  0)面に平行である。従って棲管中のマイクロフィブリルは図 5-4 に示すように斜めに配列しており、長い対角線が壁面におよそ平行になるように配列していることになる。一方で *Tevnia* 属の棲管中のキチンマイクロフィブリルはむしろ矩形状であり、矩形断面の長辺が壁面に平行に配列しているように観測されている。ハオリムシ棲管中のキチンの面配向様式には、マイクロフィブリルの形状が強く影響を与えているのであろう。



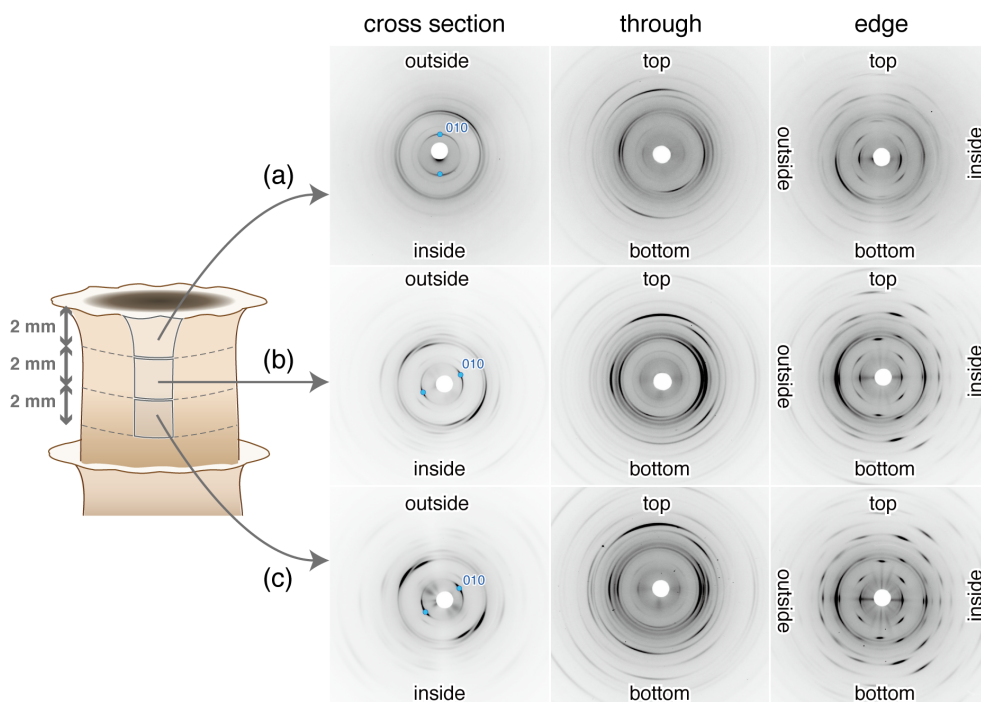
**Figure 5-4** Schematic representation of the organization of chitin microfibrils in the cross sectional tube of *L. satsuma*. The longer diagonals of the cross section of the microfibrils are arranged parallel to the tangential direction of the cross sectional tube. (a) Lattice image of cross sectional chitin microfibril from *L. satsuma*. The lattice fringes of 0.91 nm are observed as being parallel to the longer side of the cross section. (b) The molecular arrangement in the tube, where (1 1 0) plane lies perpendicular to the tube surface. (c) Electron microdiffraction pattern obtained from the cross section of tube of *L. satsuma* with an electron probe of 200-nm diameter. This pattern shows the microscopic orientation of chitin crystal, which is coincident with the X-ray diffraction data shown in Fig. 5-3.

### 5.3.3. 棲管内での配向様式の変動

次に、図 5-5 に示すように、棲管から取り出した円錐様の構成要素より、上部から 2 mm ごとに小片を切り出し、それぞれの試料について前述と同様に X 線回折実験によってキチンの配向様式を調べた。上端から 2 mm と 4 mm の試料においては、図 5-2 で示したバルク試料と同様の配向様式を示したが、上端の試料中のキチン結晶の配向はバルク試料やその他 2 つの試料とは異なっていた。この上端の試料中ではキチン結晶は  $b^*$ 軸が壁面に垂直に配向するように配列していた。この配列様式は前述の *Tevnia* 属の棲管中のキチンの配向様式に類似している (Gaill et al., 1992a)。

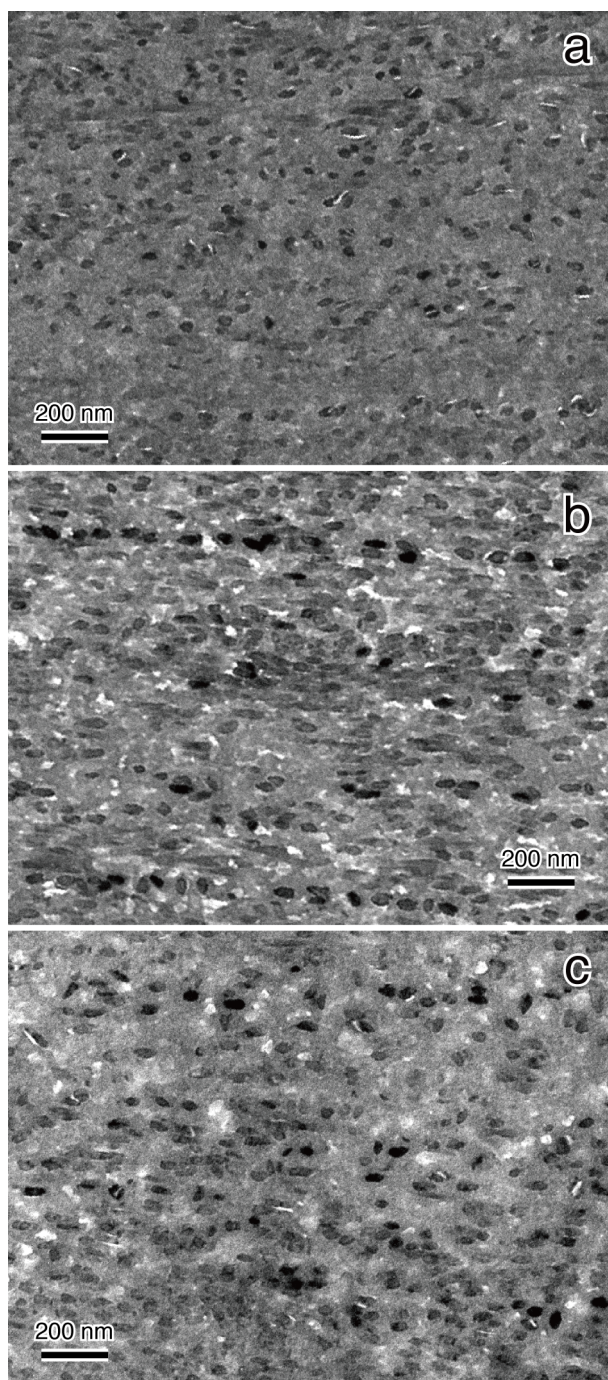
同じ棲管試料の断面についての回折コントラスト法による電子顕微鏡観察像を示す。上端の試料中では、明確にマイクロフィブリルの繊維径が小さく、また断面形状は境界の不明瞭な不定形状か、矩形状に観察された。このような傾向は他の二つの試料では観測されず、前章でのバルク試料の観察結果と同じく、断面形状は平行四辺形状であった。

このように、*L. satsuma* の棲管中でのキチンマイクロフィブリルには、棲管の高さによって形状や配列に明確な差異が存在している。この原因については、キチンマイクロフィブリルの生合成様式と関連づけて次項で考察を行なう。



**Figure 5-5** X-ray diffraction diagrams obtained from (a) top, (b) middle, and (c) bottom parts of the tube with the incident X-ray beams from three different directions as shown in Fig. 5-2.

**Figure 5-6** Transmission electron micrographs of the cross section of the tube of *L. satsuma*. Each micrograph was obtained from (a) top, (b) middle, and (c) bottom parts of the tube corresponding to the specimens seen in Figure 5-5.



#### 5.3.4. キチンマイクロフィブリルの生合成と分泌様式

ハオリムシによるキチンの生合成様式については、Gaill らのグループによっていくつかの報告があり、ハオリムシの生物体の表面に配列したカップ状のキチン合成装置の存在が知られている (Gaill et al., 1992b; Shillito et al., 1996)。この合成装置は分泌細胞上に固定されており、この点で植物細胞の細胞膜上を移動しながらセルロースを生産するセルロース合成酵素複合体とは異なっている。そのため、マイクロフィブリルの配列は生物体自体の移動によって制御されていると考えられる。またキチンやセルロースを含む多糖類の合成酵素による分子鎖伸長反応については、現在までのところ非還元末端への付加反応しか知られておらず (Koyama et al., 1997; Imai et al., 2003b; Lai-Kee-Him et al., 2002)、ハオリムシのキチン合成酵素による分子鎖伸長反応も同様の機構を有するであろう。この棲管中ではキチンマイクロフィブリルの還元末端が全て上向きであることを考えると、マイクロフィブリルは下向きの一方向的な分泌によって生合成されており、その分泌は *L. satsuma* の生物体が縦走筋の収縮によって棲管内部に後退する運動と連動していると考えられる (Bright et al., 2002; Bright & Lallier, 2010)。キチンマイクロフィブリルが棲管長軸方向について高度に配向するためには、生物体の後退運動の速度がキチンマイクロフィブリルを伸びきった状態に保つ程度には速い必要があるのと同時に合成装置から脱離しない程度には低速でなければならず、キチンの生合成速度と生物体の移動速度の間には優れた一致が見られると考えられる。

棲管を構成する円錐状の構造体は、一度の後退運動によって形成されるのではなく、複数回の分泌の繰り返しによって形成されていると考えられる。合成装置中のキチン合成酵素は、キチン分泌の各サイクルを円錐状の構成要素の上端部から開始すると考えられる。キチン合成酵素は上端部付近で再活性化、あるいは新たに生産されることが考えられるから、上端部でのキチンマイクロフィブリル分泌時には十分な活性化された合成酵素が存在せず、そのために上端部でのキチンマイクロフィブリルの繊維径は小さく、マイクロフィブリルの形状も不定形なのであろう。このような生合成様式に由来すると考えられる先細りのマイクロフィブリルは他のキチン生合成の系、たとえば前章で示した *Phaeocystis* の  $\alpha$ -キチンや珪藻の  $\beta$ -キチンでも観察されている (Imai et al., 2003b)。

また、*Tevnia* 属と *Lamellibrachia* 属の間のマイクロフィブリルの形状と面配向様式の違いについては、いくつかの原因が考えられる。両者の間でキチン合成酵素の配列など、キチン合成装置の構造が異なっていることがキチンマイクロフィブリルの形状に影響を与えていることがまず予想される (Tsekos, 1999)。また、*Tevnia* の棲管は層状構造が合板状に堆積しており一軸に強く配向しているわけではないため、*Lamellibrachia* の場合に比べると、分泌時に結晶の繊維軸方向にかかる引っ張り力が弱いことが予想される。分泌時の引っ張り力が弱い状況は、断面が

矩形状に観察される *Lamellibrachia* の棲管の上端部でも同様であろうから、このことがマイクロフィブリルの形状と面配向に影響を与えている可能性がある。このようにマイクロフィブリルの形状を決定する要因は、これまでに考えられていたように生合成装置自体の形状や、その中での酵素の配列様式ばかりでなく、分泌時の物理化学的な環境も含まれることが予想される。

#### 5.4. 結言

サツマハオリムシ (*L. satsuma*) 棲管中でのキチンマイクロフィブリルの凝集様式を X 線回折と電子顕微鏡観察により調べた。棲管中では  $\beta$ -キチン結晶は三次元的に配向しており、全てのキチン分子の還元末端が棲管の上端に向くように配向していることが明らかとなった。 $\beta$  1,4 結合を持つ多糖の分子鎖伸長反応が非還元末端で起こり、またハオリムシのキチン生合成装置が表皮に固定されていることから、キチンマイクロフィブリルの合成、分泌がハオリムシの下向きの運動と連動して起こることが示された。また、キチンマイクロフィブリルの断面形状や面配向には、棲管中での存在位置によって差異があることが分かり、これは生合成時の合成酵素の配列様式や、マイクロフィブリルに掛かる張力などの違いによるものであると予想された。

## 6. キチン結晶多形の重水素化挙動

### 6.1. 緒言

不溶性基質を含む不均一系の化学反応では、系中に存在する分子、あるいは官能基の全てが反応に関与するのではなく、溶媒や他の基質と相互作用を持つことができるもののみが活性を持ちうるため、一般的に均一系に比べると反応効率は小さい。各種溶媒に不溶性を示すセルロースやキチンの場合、化学修飾や酵素反応のほぼ全てが不均一系で進行するため、他の基質による官能基への接触可能性、いわゆるアクセシビリティを評価することは反応の効率評価や速度論的解釈をする上で重要である。

セルロースやキチンなどの結晶性多糖類のアクセシビリティを評価する方法としては、重水による水酸基上での水素-重水素置換挙動を観測することが最も一般的で有力な手法である。水素結合のドナーとなる水酸基やアミノ基上の水素原子は、重水分子上の重水素と可逆的に交換反応を起こすため、この置換を赤外分光や中性子小角散乱などによって検出することでアクセシビリティを定量的に評価することが可能である。セルロースの重水素化とアクセシビリティの評価に関する先行研究は報告が多い (Frilette et al., 1948; Mann & Marrinan, 1956; Marrinan & Mann, 1956)。Marrinan と Mann の実験によって室温での単純な重水中浸漬によっては、セルロースの結晶中の分子はアクセシビリティを有さず、表面や非晶領域の分子中の水素のみが重水素化されることが示された (Marrinan & Mann, 1956a)。これと中性子小角散乱の手法を組み合わせることで、Fischer らや Nishiyama らは再生セルロースや植物繊維中の周期的に結晶が乱れた領域の存在を示した (Fischer et al., 1978; Nishiyama et al., 2003)。Wada らや Nishiyama らによって、熱水処理によって天然セルロース結晶中の水酸基上の水素も重水素化が可能であることが明らかとなり、この結晶内重水素化を利用して中性子線回折による天然セルロースの結晶構造解析が行なわれた (Wada et al., 1997; Nishiyama et al., 1999, 2002, 2003, 2008)。

一方でキチンの重水素化についての報告はセルロースに比べると少ない。一つは甲殻類由来の  $\alpha$ -キチンの室温での重水蒸気への暴露試験であり、これによつては  $\alpha$ -キチン結晶内部での部分重水素化が観測された (Pearson et al., 1960)。もう一方は、 $\beta$ -キチンの結晶性性錯体形成挙動の解析の中で、室温条件で重水と重メタノール、重塩酸中に試料を浸漬させることで重水素化を行なった報告である (Saito et al., 2000, 2007)。ここでも部分的な結晶内重水素化が見られたが、錯体結晶を形成することで重水素化溶媒分子がキチン分子に接触しやすくなっているにも拘らず、重水素置換度は低かった。このようにキチンの重水素化挙動、またアクセシビリティについての解析は断片的であり、十分な知見の蓄積はない。そこで本章ではキチン結晶多形の重水素化挙動を系統的に解析した。両結晶多形ともに天然セルロースの場合と同様の熱水処

理で完全な結晶内重水素化が可能であり、これを踏まえて結晶内重水素化の温度依存性についても検討した。

## 6.2. 実験

### 6.2.1. 試料調製

ハプト藻 *P. globosa* (NIES-1396 株、国立環境研究所) を前述の通り培養し、回収、精製することで、 $\alpha$ -キチンマイクロフィブリルを得た。精製されたキチン試料は、使用まで水懸濁液として保存した。サツマハオリムシ *L. satsuma* の棲管についても同様に精製処理を行い、 $\beta$ -キチンマイクロフィブリルを得た。精製された棲管はしろうまで水中に保存した。

### 6.2.2. X 線回折実験

X 線回折実験は回転対陰極型の X 線発生装置を用いた粉末 X 線回折計 (RINT2000、リガク) を用いて行なった。測定は、管電圧 38 kV、管電流 50 mA の条件で発生させた X 線を用いて反射法により行なった。 $\alpha$ -キチン試料は、凍結乾燥物を測定に供した。 $\beta$ -キチン試料については、Kobayashi らの方法に従って、凍結乾燥物を五酸化二リンのデシケータ中で一昼夜乾燥した試料、この乾燥試料を相対湿度 100% の水蒸気中で一昼夜調湿した試料、湿潤試料を KCl 飽和水溶液を用いた相対湿度 85% (25 °C) のデシケータ中で一昼夜調湿した試料の三種類について測定を行なった。後者二つの測定時には、乾燥を防ぐため、湿度発生装置 (SRG-1R、神栄テクノロジー) を用いて測定室内を相対湿度 100% (25 °C) の雰囲気とした。

### 6.2.3. 重水素化実験

キチンの重水素化は重水蒸気への暴露と、液体重水中での熱水処理の両手法によって行なった。軽水中に保存していたキチン試料を PTFE シート上で風乾することで製膜し、この膜状試料を相対湿度 100% (25 °C) の重水蒸気に所定の時間 (1 h、24 h) 静置した。これを真空乾燥機中、室温条件で乾燥させた。これとは別に、凍結乾燥したキチン試料を 0.1 N NaOD 重水溶液中に浸漬し、耐圧容器中で所定の温度 (25 °C~260 °C) で 1 時間処理した。これを重水によって洗浄、室温条件の真空乾燥機中、PTFE フィルム上で乾燥させることにより製膜した。各処理によって得られた薄膜試料は、赤外分光測定を行なうまで五酸化二リンのデシケータ中に保存した。また、脱アセチル化などの化学的組成の変化を調べるために、重水素化処理前後の試料を元素分析測定 (PE 2400、Perkin Elmer、U.S.A.) に供したが、化学組成の変化は認められなかった。



### 6.2.4. フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 測定

前項で調製した薄膜試料を FT-IR 測定に供した。Nicolet Magna 860 赤外分光計 (Madison, U.S.A.) を用い、測定は透過モード、分解能  $4\text{ cm}^{-1}$ 、積算回数 64 回、室温、乾燥窒素雰囲気の中で行ない、データ解析は OMNIC ソフトウェアにより行なった。スペクトルは  $2900\text{ cm}^{-1}$  の C-H 伸縮振動の吸収を内部標準として規格化し、各官能基上の軽水素 (HO3、HO6、HN) の重水素置換度  $R_D$  を、次式により算出した。

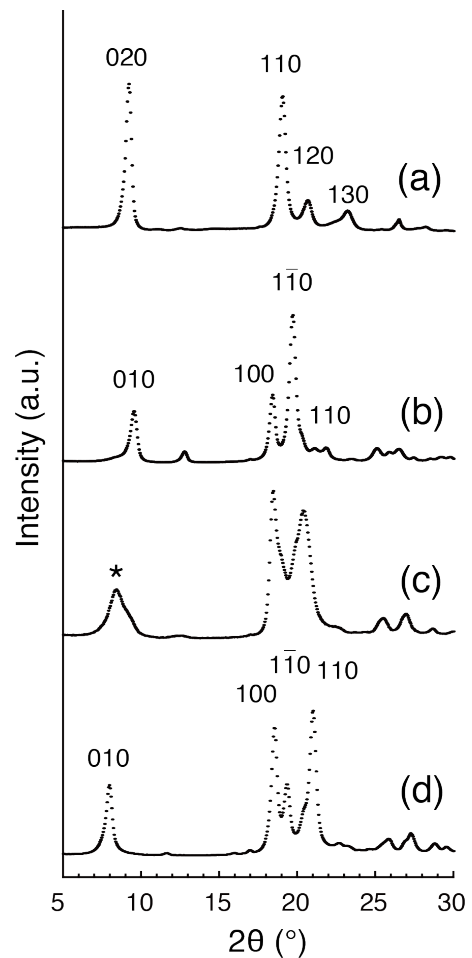
$$R_D = \frac{\alpha A_D}{\alpha A_D + A_H}, \quad (1)$$

ここで、 $A_D$  は O-D、N-D の伸縮振動の吸収強度、 $A_H$  は O-H、N-H の伸縮振動の吸収強度である。 $\alpha$  は O-D (N-D) と O-H (N-H) の伸縮振動のモル吸光係数の比で表される吸光強度の補正係数であり、O-D/O-H については 1.11 (Mann&Marrinan, 1956)、N-D/N-H については 1.41 を用いている (Shin et al., 2001)。

## 6.3. 結果と考察

### 6.3.1. X 線回折

図 6-1a と 1b に  $\alpha$ -キチンと  $\beta$ -キチンの乾燥試料の X 線回折プロファイルを示す。回折パターンは報告されている  $\alpha$ -キチンと、無水  $\beta$ -キチンのパターンによく一致している。分子シートの周期である考えられている  $020$  ( $\alpha$ -キチン) と  $010$  の回折点の広がりから Scherrer 式により算出した結晶サイズは  $\alpha$ -キチンで  $18.2\text{ nm}$ 、 $\beta$ -キチンで  $19.0\text{ nm}$  であり、両結晶多形について、同程度の結晶性と結晶サイズを有する試料を調製することが出来た。従って、以下に示す重水素化挙動の結晶多形間での違いは、分子の凝集構造によるアクセシビリティの差異を反映しているものであると言



**Figure 6-1** X-ray diffraction spectra of (a)  $\alpha$ -chitin from *P. globosa*, (b) anhydrous, (c) monohydrated, and (d) dihydrate  $\beta$ -chitin from *L. satsuma*. The indices are shown upon each diffraction pattern. The asterisk (\*) denotes the characteristic reflection of monohydrated  $\beta$ -chitin with  $d$  spacing =  $10.4\text{ \AA}$ .

える。

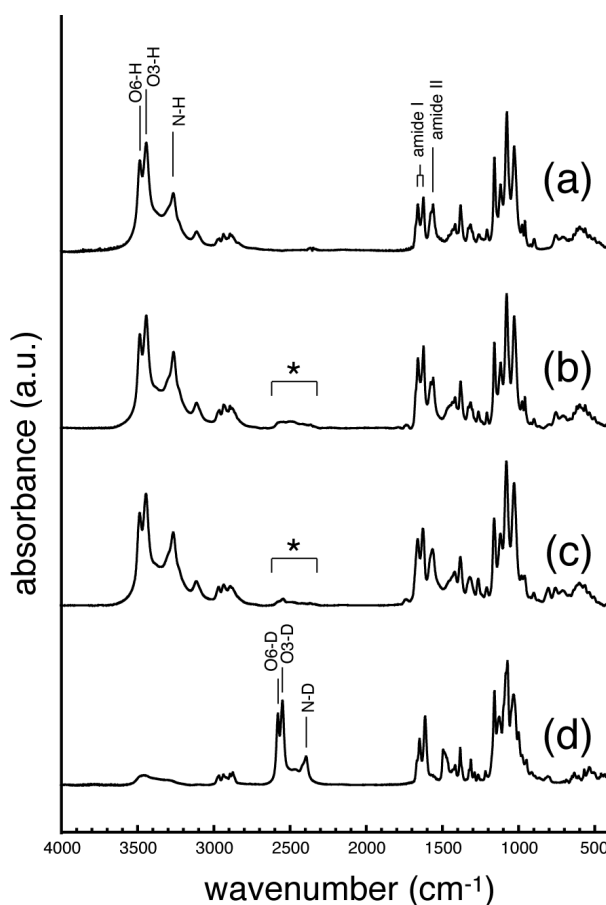
図 6-1c と 1d には、乾燥した  $\beta$ -キチンを水蒸気に暴露した試料と、湿潤した  $\beta$ -キチン試料についての X 線回折プロファイルを示す。両回折プロファイルは、報告されている一水和型と二水和型の回折プロファイルに一致しており (Kobayashi et al., 2010)、この条件で  $\beta$ -キチン結晶が結晶内に水分子を取り込むことが確認された。同様の条件で  $\alpha$ -キチンについても X 線回折実験を行なったが、回折パターンに変化は見られなかった。

### 6.3.2. $\alpha$ -キチンの重水素化挙動

図 6-2 に重水素化処理前後の  $\alpha$ -キチンの FT-IR スペクトルを示す。

未処理試料のスペクトル (図 6-2a) は、これまでに報告されている  $\alpha$ -キチンのスペクトルに概ね一致している。カニなどの甲殻類由来の  $\alpha$ -キチン試料に比べると本研究で用いた  $\alpha$ -キチン試料は高結晶性であるから各吸収の分離がよく、甲殻類キチンのスペクトル中では分離されていない O3-H ( $3441\text{ cm}^{-1}$ ) と O6-H ( $3482\text{ cm}^{-1}$ ) の伸縮振動の吸収が 2 本の独立したピークとして観測することが出来ている。また図中に示した通り、 $3260\text{ cm}^{-1}$  の吸収は N-H 伸縮振動に、 $1655\text{ cm}^{-1}$  と  $1661\text{ cm}^{-1}$  の二重吸収は amide I (C=O 伸縮振動)、 $1550\text{ cm}^{-1}$  の吸収は amide II (N-H の変角振動および C-N の伸縮振動) にそれぞれ帰属することが出来る。

重水蒸気に室温で 1 時間暴露した試料のスペクトル (図 6-2b) は、未処理の試料とほぼ同様であったが、O-D と N-D の伸縮振動の領域である  $2300\text{ cm}^{-1}$  から  $2700\text{ cm}^{-1}$  の波数領域に微弱な吸収が見られた。結晶表面上の官能基上の水素が重水素されただけであるならば、ただちに軽水素に再置換されることが予想されるから、表



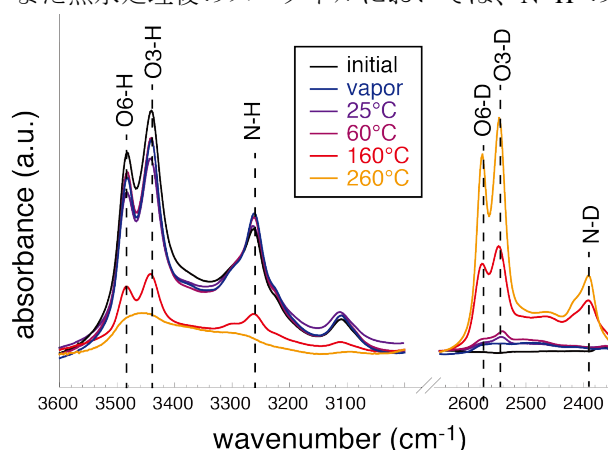
**Figure 6-2** FT-IR spectra of  $\alpha$ -chitin before and after deuteration. (a) Initial, non-treated  $\alpha$ -chitin (b)  $\alpha$ -Chitin after exposure to vaporous  $\text{D}_2\text{O}$  at  $25^\circ\text{C}$  for 1 h. The asterisk (\*) denotes the new band resulting from vaporous deuteration. (c)  $\alpha$ -chitin after annealed in liquid  $\text{D}_2\text{O}$  at  $260^\circ\text{C}$  for 1 h.

面付近の結晶内部の O-H と N-H の一部が重水素化されたものと考えられる。式(1)により算出した重水素置換度はいずれの官能基についても 0.05 以下であった。また 24 時間暴露を行なった試料についても測定を行なったが、スペクトルのパターンは変化せず、時間経過によってはそれ以上重水素化が進行しなかった。一方で、Pearson ら (1960) は単純な重水蒸気への室温暴露によって置換度が 0.5 に達すると報告している。Pearson らは試料として低結晶性の甲殻類由来の  $\alpha$ -キチンを用いており、また DCI による前処理によって部分的な低分子化や結晶構造の変化が起こったことでアクセシビリティが向上したために、本研究の置換値を大きく上回る値となったと考えられる。

25 °C で 1 時間、重水浸漬した試料のスペクトル (図 6-2c) は重水蒸気への暴露試料とほぼ同様の吸収パターンを示した。2300  $\text{cm}^{-1}$  から 2700  $\text{cm}^{-1}$  の波数領域の微小な吸収が観測され、結晶表面付近で結晶内重水素化がわずかに起こったことが示唆された。一方、260 °C の熱水処理物のスペクトル (図 4-2d) は未処理試料と大きく異なっている。O-H と N-H の鋭い結晶性の吸収はほぼ観測されず、O-H と N-H の伸縮振動の波数領域である 3100  $\text{cm}^{-1}$  から 3500  $\text{cm}^{-1}$  には表面の分子由来と考えられる散漫で微弱な吸収のみが観測された。一方で 2300  $\text{cm}^{-1}$  から 2700  $\text{cm}^{-1}$  の波数領域では新たな結晶性の吸収が観測された。これは O-H と N-H の伸縮振動が重水素化されたことで低波数域にシフトしたためである。2389  $\text{cm}^{-1}$  は N-D に、2542  $\text{cm}^{-1}$  と 2575  $\text{cm}^{-1}$  は O3-D と O6-D の伸縮振動にそれぞれ帰属される。式(1)により算出した重水素置換度はいずれの官能基についても 0.8 以上であった。測定条件下で即座に軽水素の再置換が起こる表面上の官能基の割合を考えると、ほぼ全ての結晶内の N-H と O-H が重水素化されたことになる。このように、重水中で熱水処理を行なうことによって、セルロースと同様に重水素化は  $\alpha$ -キチンの結晶内部にまで進行することが分かった。また熱水処理後のスペクトルにおいては、N-H の変角振動と C-N がカップリングした振動である amide II の振動が観測されていないが、これは N-H の変角振動の吸収波数が、重水素化によって低波数側にシフトし、指紋領域の吸収と重複したためであろう。

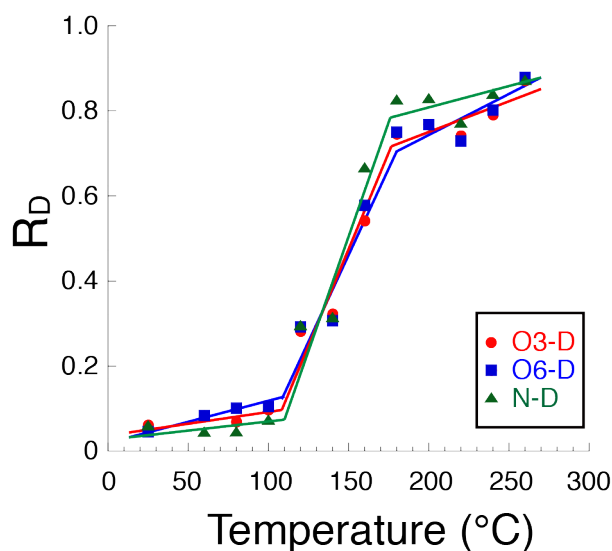
高温の熱水処理によって  $\alpha$ -キチンの結晶内重水素化がほぼ完全に進行することが確かめられたので、次に処理温度に

対する重水素化挙動について調べた。図 6-3 に各温度で 1 時間重水中において熱水処理した  $\alpha$ -キチンの IR スペクトルを示す。



**Fig. 6-3** O-H, N-H and O-D, N-D stretching region of FT-IR spectra of  $\alpha$ -chitin after deuteration at various temperatures. Assigned bands are indicated with dash lines.

処理温度の増加に伴って結晶性の吸収が O-H、N-H の伸縮振動領域において減少し、O-D、N-D の伸縮振動領域で増加していることが見て取れる。図 6-4 に、処理温度に対する重水置換度の変化を示した。いずれの官能基上でも処理温度の上昇に伴って置換が進行しているが、特に 110 °C から 180 °C の領域で急激な重水素化が進行し、200 °C 以上ではほぼ置換度が 0.8 で一定となっている。従って、110°C 以下では全ての官能基のアクセシビリティは低く、温度に対する増分も小さいが、110 °C から 180 °C の領域で結晶内部の官能基のアクセシビリティは急激に増加していき、200 °C 以上では  $\alpha$ -キチン結晶内部の全ての官能基がアクセシブルな状態であると言える。



**Figure 6-4** Changes in the  $R_D$  values of each functional groups of  $\alpha$ -chitin with temperature.

このような一定温度以上で急激に結晶内部の官能基のアクセシビリティが増加していくような挙動はセルロースの重水素化においても観測されている。Horikawa ら (2008) の報告では、天然セルロースの結晶内重水素化は 170 °C 以上の温度域において急激に進行している。これは Kokot らが二次元 FT-IR の実験に基づいて報告した通り、天然セルロースの水素結合様式が 150 °C 以上で不安定化することと関係していると考えられている (Kokot et al., 2002)。実際に昇温過程における天然セルロースの X 線回折や理論計算の研究でもそのような温度域では急激に単位格子の体積が増加し、水素結合様式が転移していく様が実験的にも理論計算によっても確認されているから (Bergenstrahle et al., 2007; Chen et al., 2011; Wada et al., 2002, 2010)、構造の不安定化と結晶内部でのアクセシビリティの増大は強く関係しているであろう。同様の水素結合や構造そのものの不安定化が  $\alpha$ -キチンにおいても高温域で起こっていると考えられる。天然セルロースに比べると低温から  $\alpha$ -キチンのアクセシビリティが増大するのは、結晶そのものの熱安定性の低さに起因しているであろう (Köll et al., Lin et al., 2009; Shafizadeh & Bradbury, 1979; Wanjun et al., 2005)。

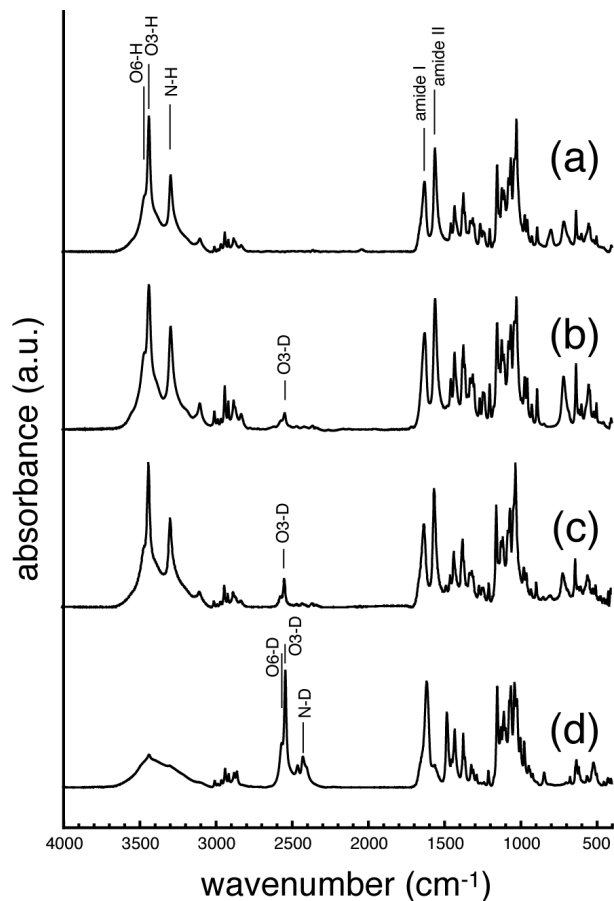
### 6.3.3. $\beta$ -キチンの重水素化挙動

図 6-5 に重水素化処理前後の  $\beta$ -キチンの FT-IR スペクトルを示す。

未処理試料のスペクトル (図 6-5a) は、これまでに報告されている無水  $\beta$ -キチンのスペクトルに一致している。3500  $\text{cm}^{-1}$  から 3200  $\text{cm}^{-1}$  の吸収はそれぞれ、O3-H (3438  $\text{cm}^{-1}$ ) と O6-H (3462  $\text{cm}^{-1}$ )、N-H (3292  $\text{cm}^{-1}$ ) に帰属される。 $\alpha$ -キチンの FT-IR スペクトルでは amide I は二重線で観測されたが、 $\beta$ -キチンの場合は、1627  $\text{cm}^{-1}$  の単一の吸収が amide I に、1557  $\text{cm}^{-1}$  の吸収が amide II に帰属される。

重水蒸気に室温で 1 時間暴露した試料のスペクトル (図 6-5b) は、未処理の試料とほぼ同様であったが、O-D と N-D の伸縮振動の領域である 2300  $\text{cm}^{-1}$  から 2700  $\text{cm}^{-1}$  の波数領域に微弱ながらも鋭い結晶性の吸収が見られた。この吸収は O3-D (2541  $\text{cm}^{-1}$ ) に帰属することができる。式(1)により算出した重水素置換度はいずれの官能基についても 0.1 であった。 $\alpha$ -キチンの場合と異なって重水蒸気への暴露によって鋭い吸収が見られるのは、相対湿度 100% の水蒸気中では  $\beta$ -キチンが結晶中に水分子を取り込み、一水和型の結晶を形成するためであろう。一水和型  $\beta$ -キチンの結晶構造は未解明であるが、結晶水とキチン分子の間で水素結合が形成されているはずであり、両者の間で水素原子の交換が起こっているために  $\alpha$ -キチンに比する結晶内の重水素化がより進んだのでであろう。また、重水蒸気に対して 24 時間暴露を行なった試料についても測定を行なったところ、スペクトルのパターンは 1 時間暴露のものとは変化がなかった。これはたとえ直接水素結合を形成していても室温域では分子間での水素原子の交換は極めて限定的であることを示している。

25  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間、重水浸漬した試料のスペクトル (図 6-5c) は重水蒸気への暴露試料とほぼ同様の吸収パターンを示し



**Figure 6-5** FT-IR spectra of  $\beta$ -chitin before and after deuteration. (a) Initial, non-treated  $\beta$ -chitin (b)  $\beta$ -Chitin after exposure to vaporous  $\text{D}_2\text{O}$  at 25 $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. (c)  $\beta$ -chitin after annealed in liquid  $\text{D}_2\text{O}$  at 160 $^{\circ}\text{C}$  for 1 h.

たが、O3-D と O6-D ( $2568\text{ cm}^{-1}$ ) の吸収が観測されており、より重水素化が進行したことが分かる。このスペクトルは Saito らによって報告されている重メタノール浸漬による部分重水素化試料のものと類似している (Saito et al., 2000)。重水に浸漬したことで二水和型  $\beta$ -キチン結晶を形成しており、結晶水との直接の相互作用によってより重水素化が進行したものと考えられるが、ここでも完全な結晶内重水素化の進行は認められなかった。また室温では重水素化は時間経過によってはこれ以上進行しなかった。また N-D 領域では結晶内の重水素化の進行がほぼ認められなかった。一方、 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ の熱水処理物のスペクトル (図 6-5d) では結晶内重水素化はより進行していた。O-H と N-H の鋭い結晶性の吸収はほぼ観測されず幅の広い散漫な吸収が観測された。これは表面の分子由来であると考えられるが、結晶性の吸収の残存もわずかに見られた。一方、O-D と N-D の伸縮振動領域では O3-D と O6-D の吸収強度が増大し、また  $2425\text{ cm}^{-1}$ に N-D の伸縮振動に由来する吸収が観測された。重水素置換度は官能基ごとにばらつきがあったが 0.8 程度の高い値であった。また  $\alpha$ -キチンの場合と同様に amide II の吸収が元の波数領域では未観測となった。

$\beta$ -キチンにおいても熱水処理によって結晶内重水素化が十分に進行することが明らかとなったので、次に  $\alpha$ -キチンの場合と同様に処理温度に対する重水素化の挙動の変化について調べた。

図 6-6 に各温度条件で重水中において 1 時間熱水処理した  $\alpha$ -キチンの IR スペクトルを示す。処理温度の増加に伴って結晶性の吸収が O-H、N-H の伸縮振動領域において減少し、O-D、N-D の伸縮振動領域で増加していることが見て取れる。

図 6-7 に、処理温度に対する重水素置換度の変化を示した。いずれの官能基上でも処理温度の上昇に伴って置換が進行

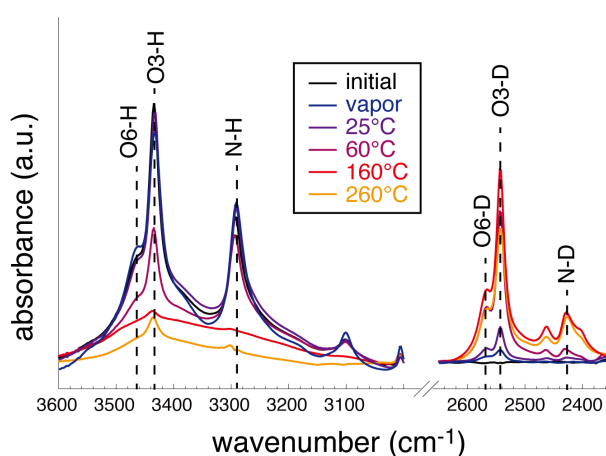


Figure 6-6 O-H, N-H and O-D, N-D stretching region of FT-IR spectra of  $\beta$ -chitin after deuteration at various temperatures. Assigned bands are indicated with dash lines.

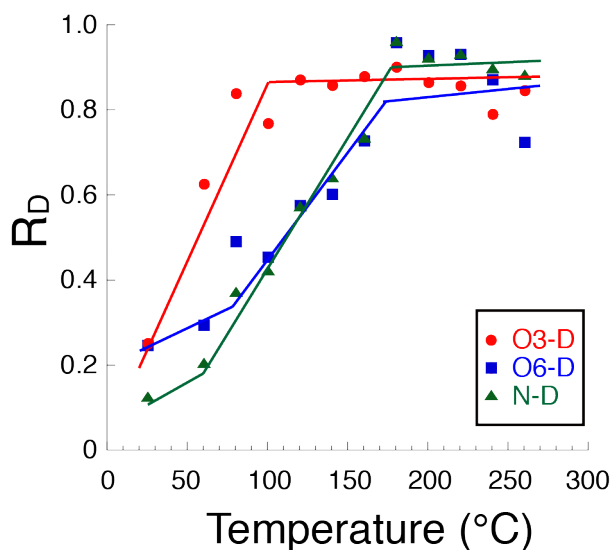
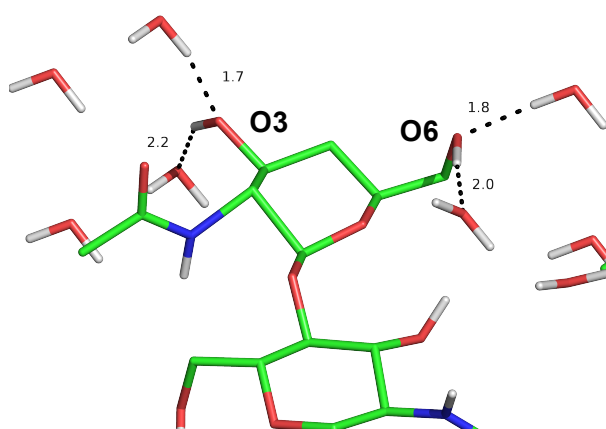


Figure 6-7 Changes in the  $R_D$  values of each functional groups of  $\beta$ -chitin with temperature.

しているが、 $\alpha$ -キチンの場合と異なって、官能基ごとに重水素化の進行には差異があることが分かる。O3-H は室温域からすでに高い結晶内でのアクセシビリティがあるが、O6-H、N-H では比較的高温で熱水処理を行なわないと重水素化の進行が遅い。 $\alpha$ -キチンやセルロースではいずれの官能基も処理温度に対して類似した重水素化挙動を示したから、このような官能基に特異的な重水素化挙動は $\beta$ -キチンに特有である。特に室温から 100 °C までの重水素化挙動の差異については、水中で形成している二水和型  $\beta$ -キチン結晶内での水素結合様式に原因がある。図 6-8 に示す通り、二水和  $\beta$ -キチンの結晶中では、O3 と O6 はアクセプターとして、結晶水の水素原子をドナーとして形成される水素結合が存在している。一方で、アセトアミド基側鎖中の N は結晶水とは直接的な相互作用を有していない。そのために、室温域では特に N-H の重水素化が遅いのであろう。HO3 と HO6 の重水素化挙動の差は水素結合の強さによるものと考えられる。キチン分子内の酸素がアクセプターとなる水素結合の強さが重水素との置換を起こす上で最も重要な要因になると考えられるが、O3 と結晶水間の水素結合はその結合角度と距離の観点から結晶中で最も強い結合であると言える。従って、室温域では O3-H の重水素化がより速く進行するのであろう。



**Figure 6-8** Crystal structure of dihydrate  $\beta$ -chitin crystal with hydrogen bonding pattern. Hydrogen bonding lengths are denoted near the bonds.

高温域に注目すると、 $\alpha$ -キチンに比べると重水素置換度にばらつきがある。また図 4-6 に示す通り、160 °C 処理後の O-D 伸縮振動の吸収強度が 260 °C に比べて高い。これについては、高温域において結晶の部分的な熱分解が起こっていることが原因として考えられる。また、Saito らの報告では二水和型  $\beta$ -キチンは 80 °C 以上では構造が不安定化していることが示唆されている (Saito et al., 2002)。高温の熱水中における  $\beta$ -キチンの構造は不明であるが、仮に別の構造への転移が起こっているとすると、その構造中では水分子との相互作用の様式が異なりうる。熱水中での  $\beta$ -キチンの結晶構造についてのより詳しい解析を行なうことで、重水素化挙動の不安定性についての解釈が可能になるであろう。

#### 6.4. 結言

キチン結晶多形のアクセシビリティの評価を、結晶内重水素化と FT-IR 測定により行な

った。 $\beta$ -キチン結晶の重水素化挙動には、官能基ごとに二水和型結晶の構造に由来すると考えられる差異があり、O3-H は室温付近で結晶内重水素化が進むのに対して、O6-H、N-H の結晶内重水素化の進行は 100 °C以上の高温域で急激に起こった。



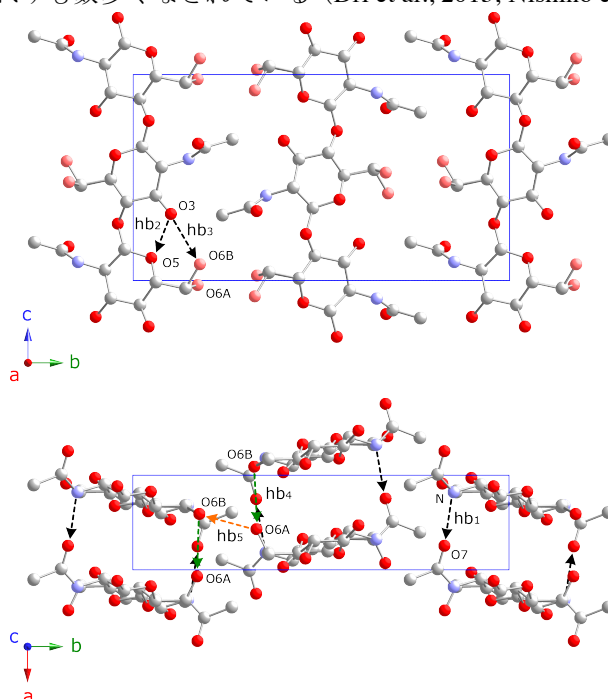
## 7. $\alpha$ -キチンの物性解析

### 7.1. 緒言

材料利用を行なうためには、その材料の物性を詳細に解析し、理解することが必要となる。これは工業用材料などでは詳細な物性理解に基づいて、適材適所の利用を行なうことが求められるためである。特にキチンやセルロースのような結晶性多糖は成形加工が困難で、また物性制御にも限界があるために天然の存在状態を活かして利用していく場合が多いため、その基礎物性を理解することは重要である。

序論にも示したが、セルロースは広範な用途で材料としての利用がなされており、材料開発と共にその物性解析は数多くの研究者により行なわれている。特に弾性率や強度など力学的性質に注目して研究が進められてきた。天然、あるいは再生セルロース繊維や植物細胞壁の巨視的な引っ張り強度や弾性率も報告されているが、材料物性としての最大値はセルロースの結晶物性に依存するため、むしろ結晶物性について多くの研究がなされている。セルロース結晶の弾性変形挙動は、X線回折実験を中心に原子間力顕微鏡などの走査型プローブ顕微鏡、ラマン分光などによる実験的解析を中心に解析がなされてきたが、同時に分子動力学法などをはじめとした理論計算による結晶弾性率算出の試みも数多くなされている (Dri et al., 2013; Nishino et al., 1995; Sakurada et al., 1962; Tanaka & Iwata, 2006; Wohler et al., 2012)。また、熱物性についても研究例は多く、こちらの場合には主に X線回折による熱膨張挙動の解析が主流である (Hori & Wada, 2005; Wada et al., 2002, 2010)。一方で、キチンについての結晶物性解析の研究例は非常に少ない。 $\alpha$ -キチンの引っ張り弾性率についての報告 (Nishino et al., 1999) と走査型プローブ顕微鏡を用いた  $\beta$ -キチンの曲げ弾性率の報告 (Xu et al., 1994)、またキチンの両結晶多形の結晶横断面 ( $ab$  面) 方向の熱膨張挙動についての報告があるのみである (Wada & Saito, 2001)。

本章ではまず主要な結晶形である  $\alpha$ -キチンの熱物性、および力学的物性につ



**Figure 7-1** Crystal structure and hydrogen bonding pattern of  $\alpha$ -chitin proposed by Sikorski et al. (2009)

いて X 線回折実験による解析を行なった。本研究においては、X 線源として高輝度のシンクロトロン放射光 X 線を用いることで、実験精度の向上を試みている。特に弾性変形挙動についての解析では応力緩和による実験精度の低下が問題となるため、高輝度の X 線源を用いることで測定時間を短縮する意義は大きい。また試料としては、結晶性では *Phaeocystis* 由来の  $\alpha$ -キチンには劣るが、天然の状態で繊維軸方向の配向性に優れる甲殻類の腱由来の  $\alpha$ -キチンを用いた。第二章で示した通り、 $\alpha$ -キチンの結晶構造はより対称性が低いことが予想されるが、構造と物性の関係性についての解釈のためには、便宜上 Sikorski ら (2009) の現行のモデルを採用することとした (図 7-1)。

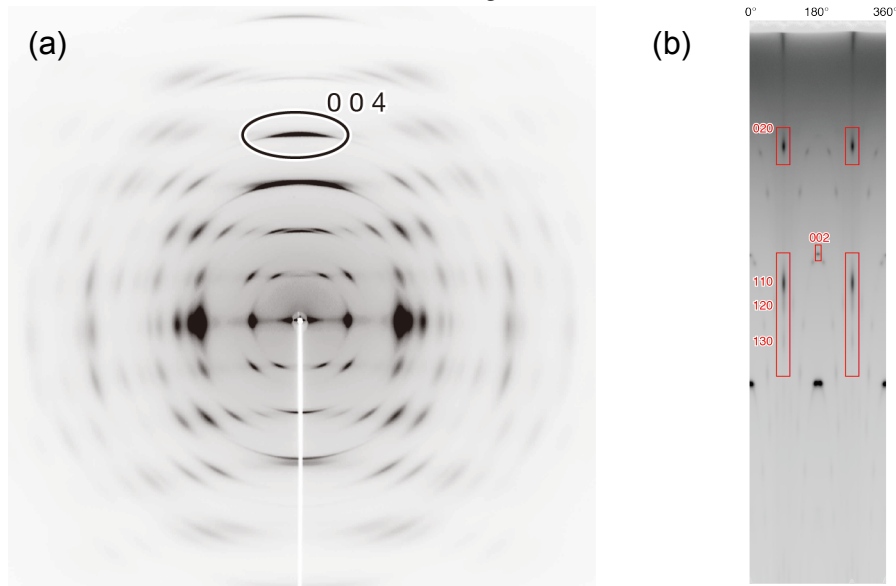
## 7.2. 実験

### 7.2.1. 試料調製

ズワイガニ (*C. opilio*) 由来の  $\alpha$ -キチン試料は、第一章に示す通りに採取、精製を行なった。精製したキチンは腱の形状を保った繊維状の試料であり、この繊維の長さを一定に保つように軸方向に両端を固定して風乾したものを測定用試料とした。

### 7.2.2. 弾性変形挙動解析

乾燥させた繊維状試料の両端を厚紙にエポキシ系接着剤で接着し、スパン 10 mm の引っ張り試料を作製した。これをロードセル (LVS-2KA、共和電業) とモータ式の引っ張り装置を備えたゴニオヘッドに取り付けた。測定は SPring-8 の BL40B2 にて行なった。波長 1 Å の放射



**Figure 7-2** (a) X-ray diffraction diagram of  $\alpha$ -chitin with tilting angle of  $11.1^\circ$  around the fiber axis. (b) Polar coordinate of diffraction pattern of  $\alpha$ -chitin with azimuthal coordinates in horizontal and radial distance in vertical, respectively. Red boxes indicate the fields used for the two-dimensional peak fitting calculation.

光 X 線を試料に 30 秒間照射し、回折パターンをイメージングプレート (R-Axis IV、リガク) 上に記録した。弾性率計測時には、100 gf から 100 gf 間隔で 1900 gf までの一定荷重を繊維軸方向にかけながら、子午線上の 004 の回折の変位を計測した。この時、004 の格子点が Bragg の反射条件を満たすように、X 線に対して試料の繊維軸を垂直から 11.1° 傾斜させて測定を行なった。また、ポアソン比の計測には、100 gf から 300 gf 間隔で 1900 gf までの繊維軸に対する荷重をかけながら X 線回折測定を行なった。この時 X 線は繊維軸に対して垂直に照射した。測定は 11 の試料について行なった。カメラ長の補正はシリコン粉末の  $d_{111}=0.31355$  nm の回折を用いて行なった。

弾性率測定の算出は、004 の変位と試料の断面積の計測に基づいて算出した応力から求めた。得られた二次元の回折パターンから子午線についての一次元の回折プロファイルを得て、004 の回折ピークについて、pseudo-Voigt 関数と最小二乗法アルゴリズムを用いてピーク分離を行い、004 の面間隔を算出した。100 gf 荷重時の面間隔を初期値として、ひずみ ( $\epsilon$ ) を以下の式で算出した。

$$\epsilon = \frac{\Delta d}{d_0}, \quad (1)$$

ここで、 $d_0$  は荷重 100 gf で測定した各回折点の面間隔 (初期値) であり、 $\Delta d$  は初期値と各荷重での面間隔の差である。

試料断面積の計測は、繊維断面についての切片を走査型電子顕微鏡により観察することで算出した。これとロードセルの表示から読み取った荷重値から応力  $\sigma_l$  を求め、以下の式で繊維軸方向についての結晶弾性率 ( $E_l$ ) を算出した。

$$E_l = \frac{\sigma_l}{\epsilon_l}, \quad (2)$$

ポアソン比の算出は、試料の結晶サイズが小さく赤道方向についての回折点の分離が悪かったことから、二次元の回折図中でのピーク分離を行なうことで算出した。Nishiyama ら (2011) の方法によって、平板の回折図を、図 6-1 に示すように極座標系の表示に変換した。020、110、120、130、002 の回折点の面間隔を算出するために図中に示すような領域について、二次元の pseudo-Voigt 関数と最小二乗法のアルゴリズムを用いてピーク分離を行なった。各回折図から算出したピーク位置から各回折の面間隔を求め、100 gf 荷重時の面間隔を初期値として赤道上の回折点のひずみと、002 の回折点のひずみの比からポアソン比 ( $\nu$ ) を次式より算出した。

$$\nu_l = -\frac{\epsilon_l}{\epsilon_l}, \quad (3)$$

ここで  $\epsilon_l$  は赤道の回折点の変位、 $\epsilon_l$  は子午線の 002 の回折点の変位である。

### 7.2.3. 熱膨張挙動解析

熱膨張挙動についての測定は SPring-8 の BL40B2 において行なった。乾燥させた繊維状試料をゴニオメータに取り付け、温度制御の出来る窒素ガス吹き付け装置を用いて、一定温度の窒素ガスを吹き付けることで試料温度を所定の温度（50、100、150、200、250 °C）に調節した。その上で繊維軸に対して垂直に波長 0.75 Å の X 線を 60 秒照射し、回折図をイメージングプレート上に記録した。カメラ長の補正はシリコン粉末の  $d_{111}=0.31355$  nm の回折を用いて行なった。

図 7-3 に示すように、記録した回折パターン中の分解能およそ 1.5 Å までの 28 個の回折点の面間隔を計測し、Sikorski ら（2009）の斜方晶の単位格子に従って指数付けを行い、単位格子定数を指数と面間隔についての最小二乗法計算によって精密化した。温度条件ごとの格子定数を算出し、次式によって線熱膨張係数（ $\alpha$ ）と、体積熱膨張係数（ $\beta$ ）を算出した。

$$\alpha = \frac{1}{l_{t=0}} \cdot \frac{\Delta l}{\Delta t} \quad (4)$$

$$\beta = \frac{1}{V_{t=0}} \cdot \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad (5)$$

ここで  $l$  は単位格子の各軸長、 $V$  は単位格子体積であり、 $\Delta l$ 、 $\Delta V$ 、および  $\Delta t$  はそれぞれ軸長の変化量、堆積変化量、温度変化である。

## 7.3. 結果と考察

### 7.3.1 弾性変形挙動

図 7-2a に、本研究で用いた  $\alpha$ -キチンの X 線回折図を示す。弾性率測定の実験条件と同様に、この回折図の撮影時には 004 の回折が Bragg の反射条件を満たすように入射 X 線に対して、繊維軸を垂直から 11.1° 傾斜させている。各回折点の方位角方向の広がり小さく、繊維軸についての良配向性が見て取れる。004 の回折についての方位角-強度プロファイルから算出した Herman の配向パラメータは 0.89 となり、これは結晶の繊維軸についての配向性に優れたセルロース試料として知られる靱皮繊維の配向パラメータとほぼ等しかった。繊維軸についての良

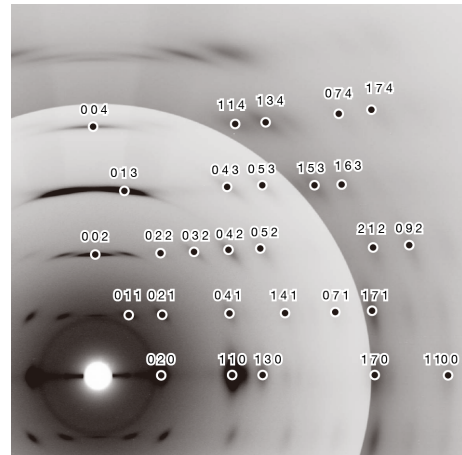
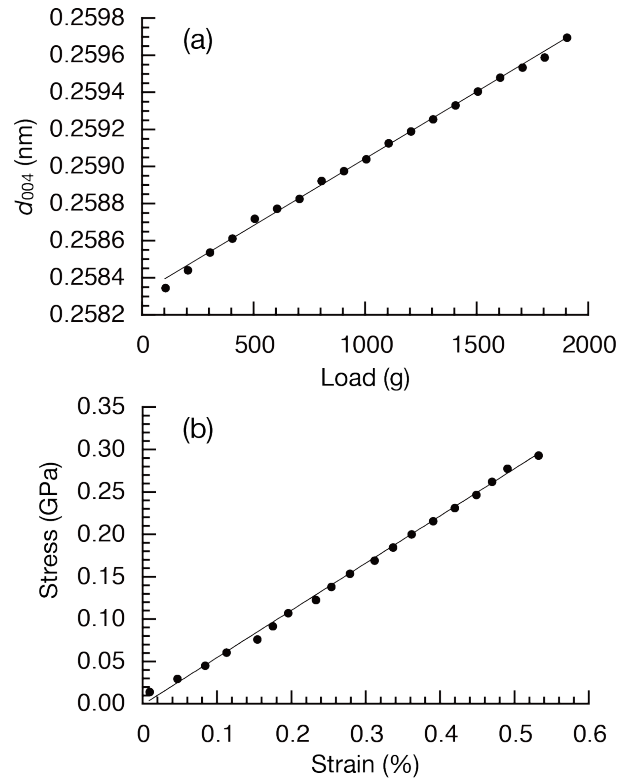


Figure 7-3 X-ray diffraction diagram of  $\alpha$ -chitin. The reflections used for cell parameter refinement are indicated with indices

配向性は、繊維軸方向に荷重した際の応力伝達の均一性を担保するため、この試料は結晶弾性率測定に適していると言える。

図 7-4a に荷重に対する 004 の回折点の面間隔変化を示す。004 の面間隔は荷重の増加に伴って線形に増加しており、この測定範囲において結晶が軸力に対して弾性変形していることが分かる。次にこれについての応力-ひずみ曲線を図 7-4b に示す。11 個の試料について、応力-ひずみ曲線は直線に近似することができた。式(4)に従って算出した  $\alpha$ -キチンの c 軸についての結晶弾性率は  $59.3 \pm 11.3$  GPa であった。この値は Nishino らによって報告されている 41 GPa という値に比べると、およそ 50%程度大きく見積もられている (Nishino et al., 1999)。これは、高強度の X 線源を用いて回折図の撮影時間を短縮したことによって、結晶中の応力緩和の効果を減じることが出来ていることが原因であり、本研究の測定ではより真の弾性率に近い値が得られたものと考えられる。加えて Nishino らの報告ではカニ殻由来の試料を用いている。試料の違いによって、結晶中の欠陥の存在や結晶同士の凝集様式が異なるため、弾性率の見積もりが大きくずれたものと考えられる。

この  $\alpha$ -キチンの c 軸方向の結晶弾性率は、天然セルロースの結晶形の一つであるセルロース I $\beta$  の c 軸方向の結晶弾性率に比べると有意に小さい。セルロース I $\beta$  の結晶弾性率は回折実験や理論計算など、いくつかの方法によって算出されており、その値は 110~140 GPa 程度と見積もられているが (Iwamoto et al., 2009; Nishino et al., 1995; Sakurada et al., 1962; Tanaka & Iwata, 2006; Wohlert et al., 2012)、本研究で算出された  $\alpha$ -キチンの結晶弾性率はその 60%以下の値を示している。セルロースやキチン結晶の c 軸方向は分子鎖の方向に一致しており、これらの伸びきり鎖構造の結晶においては軸力に対する抗力の大部分は主鎖の共有結合が負うことになる。分子鎖一本あたりの断面積は  $\alpha$ -キチンが  $44.9 \text{ \AA}^2$  に対してセルロース I $\beta$  は  $31.7 \text{ \AA}^2$  であり、 $\alpha$ -キチンが 40%程度大きい。キチンの側鎖は嵩高いアセトアミド基であるため分子鎖あたりの断面積

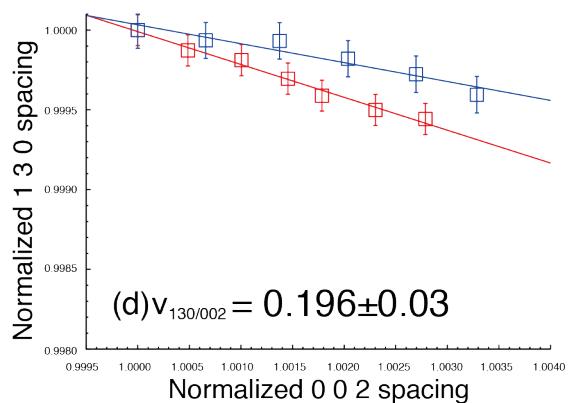
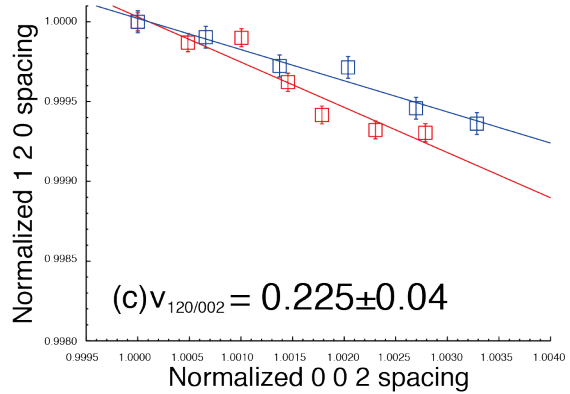
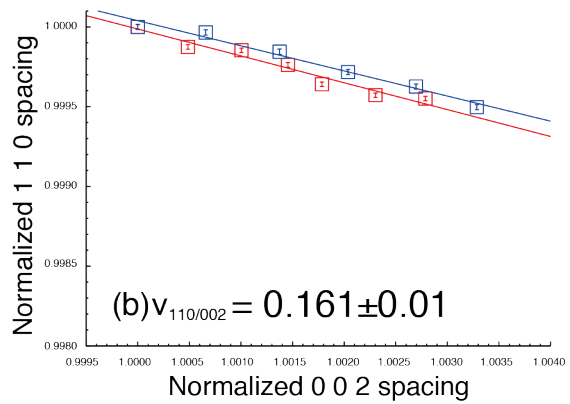
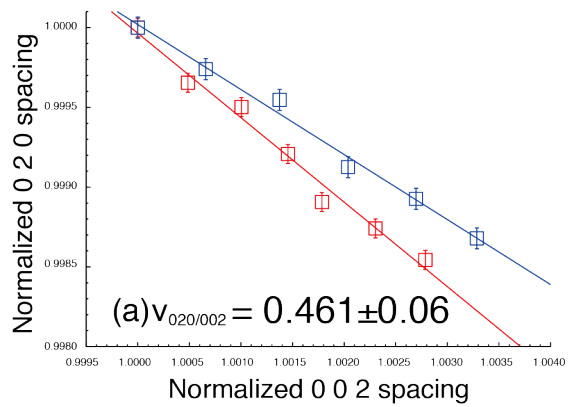


**Figure 7-4** (a) Load-Displacement relationship and (b) Stress-Strain curve of  $\alpha$ -chitin crystal under tensile load.

は大きく、そのために分子鎖を変形させるのに必要な単位面積あたりの軸力は小さくなる。また主鎖構造中では環構造はコンフォメーションの変化に対してエネルギーの増分が大きく極めて剛性が高く、実際の変形はグリコシド結合周りで起こっていることが予想される。結晶構造中でのグリコシド結合角は  $\alpha$ -キチンで  $113.96^\circ$ 、セルロース  $I\beta$  で  $115.05^\circ$  である。C-O-C 間の理想的な結合角は  $114^\circ$  程度であるから、 $\alpha$ -キチンの方が軸方向の引っ張り力に対して伸びやすい。このような構造的な差異が  $\alpha$ -キチンとセルロース  $I\beta$  の結晶弾性率の違いを生み出しているものと考えられる。

次に繊維軸方向についての荷重に対する直交方向での変形挙動について解析した。図 7-5 に子午線の 0 0 2 の回折の面間隔変化に対する赤道上の回折点の面間隔変化を示した。解析は図 7-2b に示す通り、0 2 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0 について行なっている。0 0 2 の面間隔の増加に対して、減少傾向を見て取ることが出来る。この面間隔変化について、最小二乗法によって線形近似を行ない、各結晶方位についての Poisson 比を算出した結果を図 7-5 中に示した。0 2 0 の方向に最も Poisson 比が大きく、1 1 0 の方向に最も Poisson 比が小さかった。これよ

**Figure 7-5** Changes in  $d$ -spacing of equatorial reflections as a function of displacement of meridional 0 0 2 reflection: (a) 0 2 0, (b) 1 1 0, (c) 1 2 0, (d) 1 3 0 reflections. Error bars indicate the standard deviations estimated for 2D peak fitting calculations. Red and Blue plots were obtained from different specimens.



り、Poisson 比は  $a$  軸側に小さく、 $b$  軸に大きいことが分かる。結晶の  $b$  軸方向は分子シートに直交する方向であり、シート間の水素結合は  $O6A-H...O6B$  のみであり、対して  $a$  軸方向は分子シート方向であるから疎水相互作用と二つの分子間水素結合が存在している。このような相互作用の存在によって  $a$  軸方向については収縮に対する斥力が  $b$  軸方向に比べて強くなると考えられる。

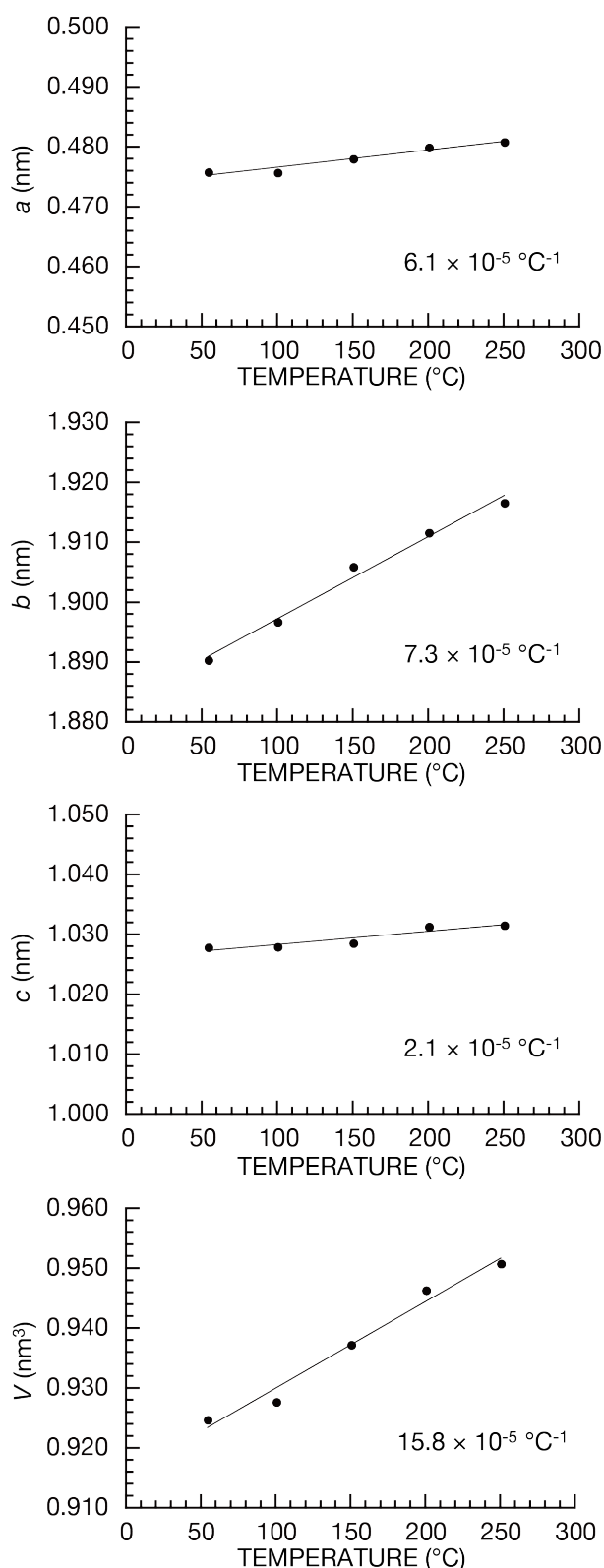
図 7-5 中には青と赤の 2 つの試料についての測定値を示しているが、青の系列が赤に比べて全体に繊維軸方向の変形に対する直交方向の変形が小さいことが分かる。どちらの系列についても 002 の変位に対して線形に減少しておりまたピークフィット計算による誤差は小さいことから測定誤差ではなく、青色の試料の変化量が実際に小さかったのであろう。Poisson 比は結晶に固有のものであり、断面積の算出に不確定さを含む結晶弾性率よりも精度の高い計測が可能である。従って、この有意な Poisson 比の差は結晶への外力の掛かり方の違いに起因するものであろう。例えば本測定では  $c$  軸への軸力のみを想定しているが、結晶の配向や試料の巨視的な形状によっては、他の応力成分が微小ながらかかることが予想される。繊維結晶に対する軸力とせん断力の両者が掛かった際の変形挙動についての報告例はないが、実際の材料利用を考えると、軸力のみがかかる場合はむしろ少なく、このような変形量を理解することの意味は大きい。剛性テンソルを算出することが出来ればその変形挙動の予測が可能であるが、実際の測定は困難であり、理論計算による見積もりが必要となろう。最近、Dri ら (2013) によってセルロース  $I\beta$  の剛性テンソルが量子化学計算により報告されている。この報告では繊維軸方向の弾性率が 200 GPa を超えていることから、実際よりも結晶の剛直性が過大に見積もられていることが予測されるが、量子化学計算による結晶の力学物性評価の可能性を示すものである。

### 7.3.2 熱膨張挙動

図 7-3 に 50 °C の条件で撮影した  $\alpha$ -キチンの X 線回折図を示す。図中に単位格子の精密化に用いた 28 個の回折点とその指数を表示した。単位格子の精密化計算は、まず  $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $\gamma$  の 4 つの格子定数をパラメータとしたが、本研究での測定範囲である 50 °C から 250 °C においては  $\gamma$  の値は 90° でほぼ一定であり、結晶は斜方晶系を維持していた。そこで改めて  $\gamma=90^\circ$  に固定して  $a$ 、 $b$ 、 $c$  のみをパラメータとして精密化計算を行い、格子定数を算出した。

図 7-6 に温度に対する格子定数と体積の変化を示す。いずれの結晶軸も温度の上昇に対して線形の増加傾向を示した。式(5)に従って各軸に対しての線熱膨張係数を算出したところ、 $\alpha_a=6.1\text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ 、 $\alpha_b=7.3\text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ 、 $\alpha_c=2.1\text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ 、また体積熱膨張係数は  $\beta=15.8\text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  になった。線熱膨張係数は、 $\alpha_b > \alpha_a > \alpha_c$  の順に大きいが、この異方性は、結晶構造と水素結合様式から説明することが可能である。結晶の  $ab$  面内においては、 $b$  軸に最も熱膨張係数が大きく、 $a$  軸方向に最も小さい。

Fig. 7-6 Changes in lattice parameters as a function of elevated temperature. All relationship between lattice parameters and temperature can be expressed as single linear lines as indicated.





$\alpha$ -キチンの  $b$  軸方向は分子シートに垂直な方向であり、分子シート間の安定化に寄与する水素結合は O6A-H...O6B のみである。一方、 $a$  軸方向は分子シート方向であるから環構造が分子間力によって堆積し、また二つの分子間水素結合によって構造が安定化されているために  $a$  軸方向には熱膨張しづらいため、熱膨張係数が最も小さいことは妥当である。

#### 7.4. 結言

$\alpha$ -キチンの弾性変形挙動と熱膨張挙動を X 線回折実験により調べた。弾性変形挙動の解析は、繊維軸方向についての一定の軸力下で繊維回折図を測定し、各回折点の面間隔変化から変形量を算出することで行なった。これより、繊維軸方向の結晶弾性率 ( $E_f=59.3$  GPa) と Poisson 比 ( $\nu_{020/002}=0.48$ ,  $\nu_{110/002}=0.14$ ,  $\nu_{120/002}=0.22$ ,  $\nu_{130/002}=0.21$ ) を報告した。結晶の熱膨張挙動についても同様に、一定温度条件下で測定した繊維回折図から変形量を産出し、各軸方向の線熱膨張係数と体積熱膨張係数 ( $\alpha_a=6.1$  °C<sup>-1</sup>,  $\alpha_b=7.3$  °C<sup>-1</sup>,  $\alpha_c=2.1$  °C<sup>-1</sup>,  $\beta=15.8$  °C<sup>-1</sup>) を報告した。

## 8. $\beta$ -キチンの物性解析

### 8.1. 緒言

前章では、 $\alpha$ -キチンの熱膨張挙動と繊維方向の弾性変形挙動について解析した結果を示したが、本章ではもう一つの結晶多形である  $\beta$ -キチンについて熱膨張挙動と弾性変形挙動の解析を行なった。より精密な構造解析を必要としている  $\alpha$ -キチンに対して、 $\beta$ -キチンの結晶構造は水素結合様式を含む結晶構造が、信頼性の高い解析によって明らかとなっているため、ここでは動的挙動を含む分子レベルでの解析を行い、構造と物性間の関係性について解明することを試みた。

### 8.2. 弾性変形挙動

弾性変形挙動は、材料の最も基礎的な力学的特性である。前章でも示した通り、セルロースやキチンの弾性変形挙動の解析は、主に繊維軸方向の弾性率を算出を中心に行なわれてきた。繊維軸方向の結晶弾性率は、繊維補強材としての材料利用を考えた時に重要であるが、弾性体の変形挙動の理解としては極めて断片的である。実際の材料利用を考えると、結晶に対して単純な軸力がかかる場合はむしろ稀であり、せん断弾性率を含む弾性定数テンソルを理解することは材料中での結晶の振る舞いを予測する上で非常に重要である。セルロースについては繊維軸方向の引張力に対する直交方向の変形挙動について、X線回折実験による報告があるもののその報告数は非常に少ない (Nakamura et al., 2004)。ナノメートル領域の微小な結晶サイズを有するこれらの結晶については、荷重方向の制御が不可欠なせん断変形についての実験を行うことは現実的には不可能であり、理論計算による予測が必要になろう。最近、Driら (2013) は量子化学計算によってセルロース I $\beta$  の弾性定数テンソルを報告した。量子化学計算は前述の通り、原子間相互作用を正確に見積もりことが出来るため、分子力学法等の従来法に比べると高精度の予測が可能であり、セルロースの弾性変形挙動の異方性を説明する上で非常に重要な知見を与えた。しかしながら結晶が実験的に予測されるより大きく剛直に見積もられており、正確な弾性定数の算出のためにはより詳細な検討が必要であると言える。本章においては、信頼性の高い弾性変形挙動の実験値を得ることを目的に、結晶サイズの大きい  $\beta$ -キチン結晶について X線回折実験により繊維軸方向の弾性率とそれに直交する結晶面についての Poisson 比を算出した。それに対して同様の変形挙動を量子化学計算により再現し、理論計算による弾性変形の見積もりの再現精度とこの手法の現状での課題について検討した。

## 8.2.1. 方法

### 8.2.1.1. X線回折実験

X線回折実験には、*L. satsuma* 由来の高結晶性  $\beta$ -キチン試料を用いた。第四章に示すように、*L. satsuma* の棲管を精製し、一軸配向試料を調製した。

X線回折実験は SPring-8 の BL40B2 において行なった。第7章の  $\alpha$ -キチンについての方法と同様の実験を行なった。室温条件で、300 gf 間隔で 100 gf から 1900 gf までの一定荷重を試料の繊維軸方向にかけながら、繊維軸に垂直に波長 1.0 Å の X線を 60 秒照射し、回折図をイメージングプレート上に記録した。得られた回折図から赤道と子午線の回折プロファイルを取得し、pseudo-Voigt 関数と最小二乗法アルゴリズムを用いてピーク分離を行い、面間隔を算出した。本研究で用いた  $\beta$ -キチン試料は高結晶性であり、赤道方向の回折点の分離もよかったことから、Poisson 比の算出時にも一次元のピーク分離によって面間隔を算出することが出来た。結晶弾性率の算出には 002 の回折点の、Poisson 比の算出には赤道上の 010、100、110、1 $\bar{1}$ 0 の回折点の面間隔変化を用い、第7章の方法に従って行なった。

### 8.2.1.2. 第一原理計算

第3章の方法と同様に無水型  $\beta$ -キチン結晶について平面波基底の密度汎関数理論計算により構造最適化計算を行なった。基底関数の平面波の最大エネルギーは 70 Ry とし、Brillouin 空間のサンプリングは  $x^*$ 、 $y^*$ 、 $z^*$  の各方位について 221 の  $k$  点により行なった。量子化学計算の結果として得られた電子軌道を用いて、Löwdin の密度解析 (Population analysis: PA) によって結晶中の各原子上の電荷を算出した (Löwdin, 1950, 1970)。弾性変形挙動の解析のためには、 $c$  軸長のみを任意の値に固定して最適化計算を行なった。最適化計算の条件は、 $c$  軸をパラメータとしない点以外は、上記と同様の方法によって行なった。全ての方位の変形を許容した差異の最適化計算の結果の  $c$  軸長を原点として、そこからの変位と最適化構造のポテンシャルエネルギーから弾性率を算出した。また最適化構造の  $a$ 、 $b$  軸長の変化から Poisson 比を算出した。

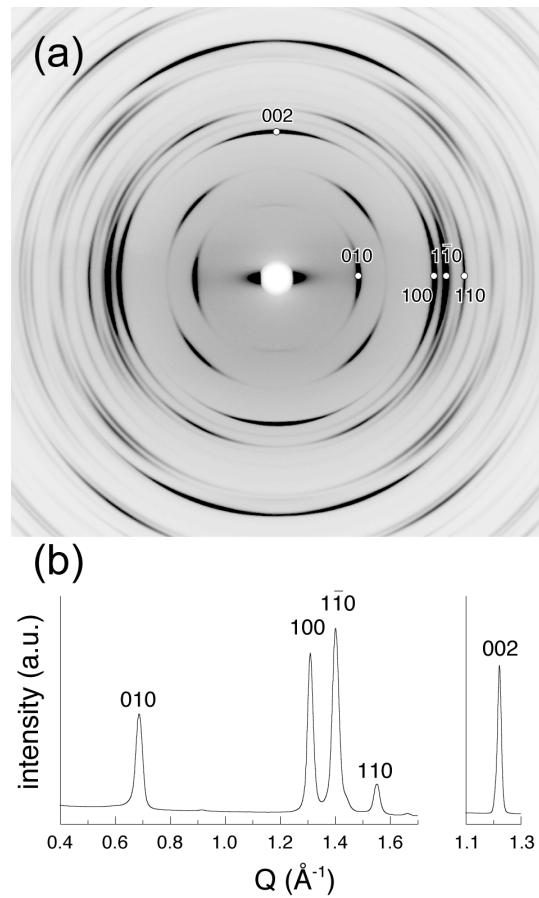
## 8.2.2. 結果と考察

### 8.2.2.1. X線回折

図 8-1 に X線回折図を示す。これまでに示した通り、高結晶性の無水型  $\beta$ -キチン結晶の回折パターンが得られた。結晶サイズが大きいため放射方向についての回折の広がりが小さく、甲殻類由来の  $\alpha$ -キチンに比べて赤道上の回折の分離が良かった。

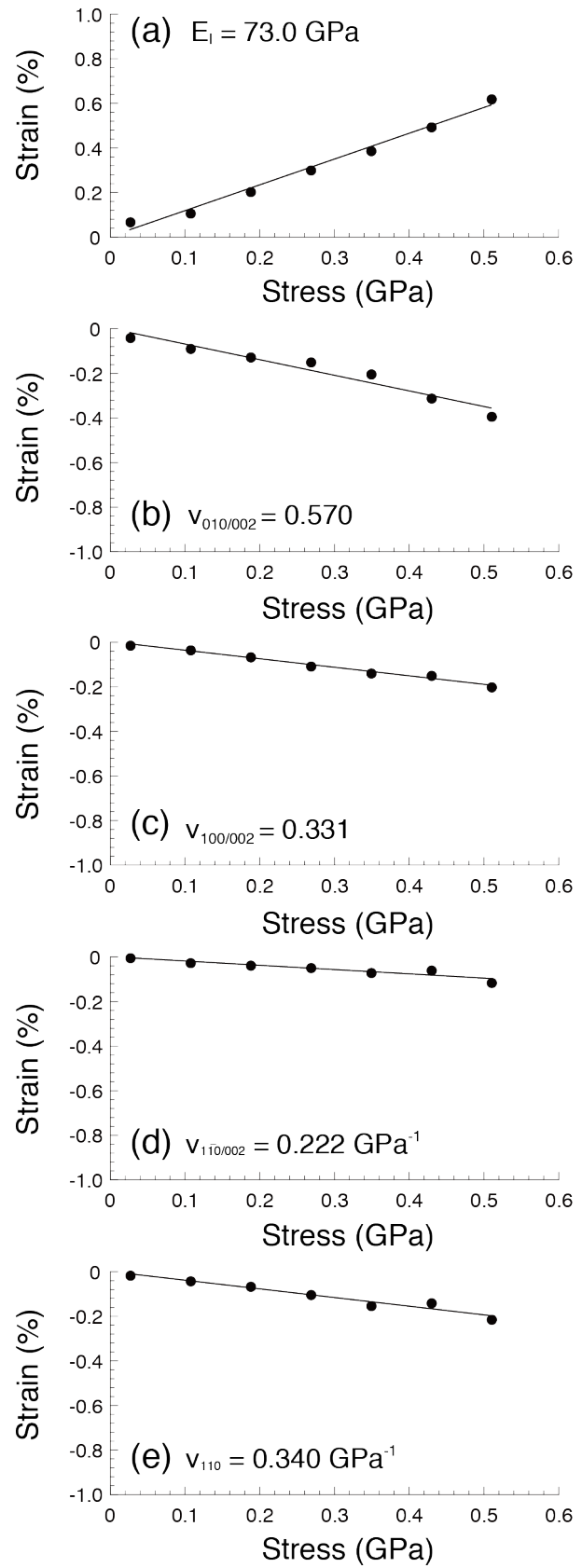
この回折図から得られた各結晶方位についての応力-ひずみ曲線を図 8-2 に示す。図中に、弾性率、および Poisson 比の値を示した。いずれの応力-ひずみの曲線も単一の直線によって表せることが出来ることから、この実験が弾性変形領域で行なわれたことが分かる。

図 8-2 中に示す通り、繊維軸方向の結晶弾性率は、 $73.0 \pm 17.5$  GPa であった。これは  $\alpha$ -キチンの結晶弾性率 (59.3 GPa) に比べて 20%程度大きい値であった。無水型  $\beta$ -キチンの分子鎖一本あたりの ab 面に置ける面積 ( $44.2 \text{ \AA}^2$ ) は  $\alpha$ -キチン ( $44.9 \text{ \AA}^2$ ) とほぼ等しかったが、無水型  $\beta$ -キチンのグリコシド結合角は  $117.2^\circ$  であり、 $\alpha$ -キチン ( $113.96^\circ$ ) に比べて分子鎖は伸びきっているため、より結晶弾性率は大きくなったものと考えられる。加えて、無水型  $\beta$ -キチンの繊維軸方向には O3-H...O5 と O6-H...O7 の強い水素結合が存在しており、それが繊維軸方向の構造安定性に強く寄与しているものと考えられる。一方で  $\alpha$ -キチンの繊維軸方向には O3-H...O5/O6 の水素結合が存在するのみである。



**Figure 8-1** (a) The X-ray fiber diffraction diagram of anhydrous  $\beta$ -chitin. The reflections marked by white circle with indices were used for the analyses. (b) The diffraction profiles of marked reflections in part (a). The indices are shown upon the corresponding peaks.

**Figure 8-2** Changes in the lattice strain of (a) [0 0 2], (b) [0 1 0], (c) [1 0 0], (d) [1  $\bar{1}$  0], and (e) [1 1 0] directions of anhydrous  $\beta$ -chitin as the function of the applied stress.



繊維軸直交方向の Poisson 比は  $b$  軸方向に最大で、 $a$  軸方向に最小となった。この結果は前章で示した  $\alpha$ -キチンと同様であった。しかしながら絶対値には差異が見られ、無水型  $\beta$ -キチンの方がより  $ab$  面内に異方性が大きいことが明らかとなった (図 8-3)。分子シート方向、すなわち  $a$  軸方向についての Poisson 比は概ね 0.2 程度であり、両結晶多形間で差異は見られなかった。これは分子シート構造の高い類似性によるものであろう。しかしながら  $b$  軸方向では、 $\alpha$ -キチンの Poisson 比が 0.46 であるのに対して、無水  $\beta$ -キチンでは 0.57 であり、24%大きかった。現行のモデルでは分子シート間には、 $\alpha$ -キチンには O6-H...O6 間の分子間水素結合が存在するが、無水型  $\beta$ -キチンにはシート間の水素結合は存在しない。分子間水素結合の有無が変形のしやすさに影響している可能性が高い。

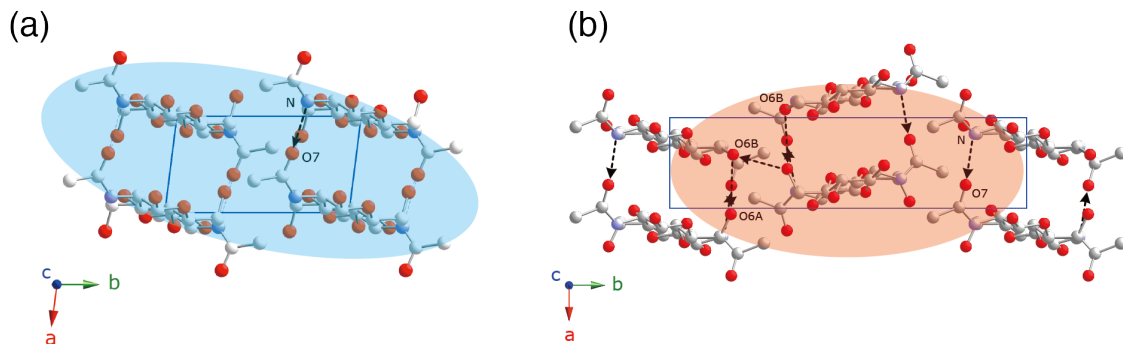


Fig. 8-3 Schematic representations of anisotropy of Poisson's ratio in lateral planes of (a) anhydrous  $\beta$ -chitin and (b)  $\alpha$ -chitin.

### 8.2.2.2. 量子化学計算

量子化学計算の結果として得られた、 $c$  軸方向の変位に対するポテンシャルエネルギーの変化を図 8-4 に示す。ニュートン方程式の通り、ポテンシャルエネルギーと変位には二次関数の関係がある。図に示す近似曲線から算出した結晶弾性率は 136 GPa であった。これは、実験値 (73.0 GPa) の二倍であった。Wohlert ら (2011) の報告のとおり、セルロース結晶の弾性率にも微小ながら温度依存性があり、DFT の最適化構造は 0 K の構造に対応すること、また平面波基

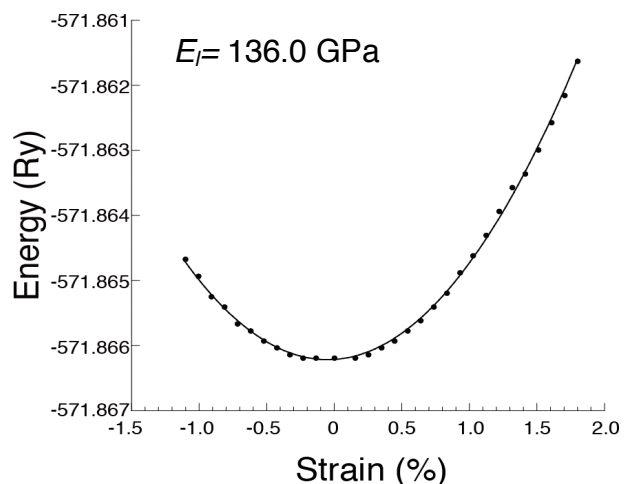


Fig. 8-4 Changes in DFT-optimized potential energy as a function of strain along  $c$ -axis of anhydrous  $\beta$ -chitin. The relationship between energy and strain can be expressed by a single quadratic curve.

底の DFT 計算が理想結晶について計算していることから、室温域での実測値よりも弾性率は大きく見積もられると予想されるが、2 倍の差は非常に大きくこの計算によっては無水型  $\beta$ -キチンは繊維方向に非常に剛直に見積もられていると言える。これは Dri ら (2013) の報告が示した傾向と一致している。

結晶弾性率は実験的には巨視的な試料断面積の計測に不確定さを含むため、セルロースやキチンのような微細な結晶の弾性率を正確に算出することは困難である。したがって、理論計算の計算値の妥当性を評価するためにはより信頼性の高い実測値を用いることが望ましい。一方で、Poisson 比は回折図の情報のみによって算出することが出来るから、曖昧さのないより信頼性の高い値であると言える。本研究では高結晶性試料を用いたことにより高精度で Poisson 比を算出することが出来たから、この値を弾性変形挙動の再現精度の評価に用いることとした。

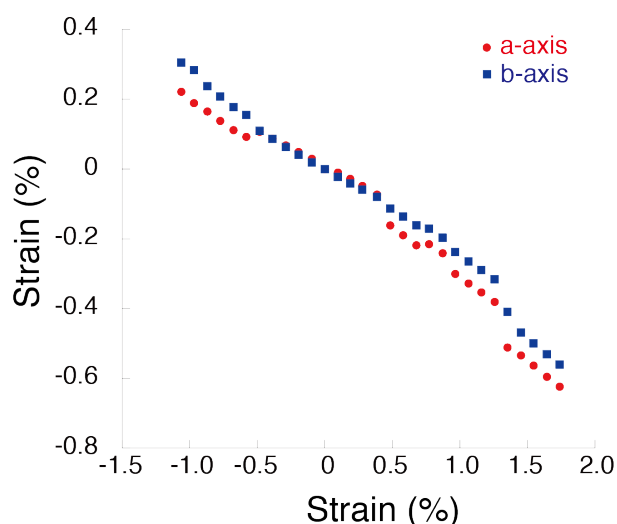


Fig. 8-5 Changes in strains along a- and b-axes as functions of strain along c-axis, obtained from DFT-D2 optimization calculation of anhydrous  $\beta$ -chitin.

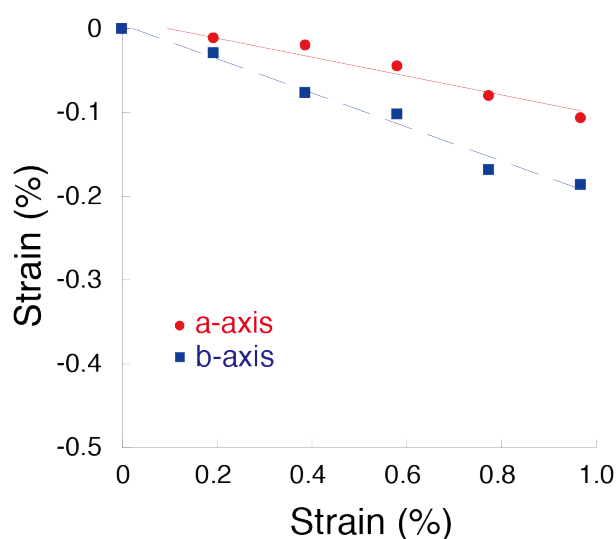
図 8-5 には、c 軸の変位に対する a 軸および b 軸の変位を示した。図に示すように、この一連の DFT 計算によっては図 8-3 に見られるような無水型  $\beta$ -キチンの  $ab$  面での Poisson 比の異方性を再現していないことが分かった。無水型  $\beta$ -キチンの  $b$  軸方向には強い水素結合は存在せず、相互作用としては弱い水素結合と分子間力が存在するのみである。強い相互作用がある場合にはその相互作用の見積もりは容易であり、 $c$  軸の変位に付随した変形を再現しやすいと考えられるため、分子間相互作用の少ないシート直交方向である  $b$  軸方向の変形の追従が実際よりも低いのは、相互作用の見積もりが十分でないためであろう。

実際に比べて変位が小さいということは構造全体の剛直性が過大に見積もられていることを意味しており、 $b$  軸方向の変形の過小評価が結晶弾性率の過大評価の原因であろう。また、 $c$  軸を固定した計算によって得られた最適化構造の近傍で  $b$  軸長を変化させてエネルギーを計算させたところ、ポテンシャルエネルギーが最小化されていないことが分かった。そこで計算精度を向上させるために、 $c$  軸長を固定した最適化計算後にさらに  $b$  軸長を変化させ、エネルギーが最小になる点を求め、そこから再度 Poisson 比を算出した。図 8-6 にその結果を示す。この計

算によつては、*b* 軸の Poisson 比が *a* 軸よりも大きくなっており、*ab* 面内の異方性を、図 8-5 の結果に比べればよく再現していると言える。またこの計算により得られた結晶弾性率は 105.2 GPa であり、実測値に比較的近い値が得られた。しかしながら、*a* 軸、*b* 軸方向の Poisson 比は 0.12 と 0.22 であり、実測値 (*a* 軸に 0.18、*b* 軸に 0.54) に比べると過小に見積もられている。この実験値からの乖離は基底平面波のエネルギー制限を増大させる、*k*-point を増やすといった計算精度の向上によって解決の可能性がある。また、本検討では単純に単位格子の軸長のみを変化させていたが、より現実に則するよう

に、分子間距離を近づけるように原子座標を操作することによって精度向上が可能であるかもしれない。

このように、量子化学計算によつては、一定の精度で弾性変形挙動を再現することが可能であるが、分子結晶系においては非結合方向への変形挙動の再現に問題が存在することが分かった。精度の高い変形挙動の予測のためには現状ではさらなる検討が必要であり、実測値との比較を行なうことで計算精度の向上を試みる必要がある。



**Fig. 8-6** Changes in strains along a- and b-axes as functions of strain along c-axis, obtained by re-optimization along b-axis after the calculation displayed in Fig. 8-13.



### 8.3. 熱膨張挙動

結晶性高分子は、石油資源由来、天然資源由来に拘らず、繊維補強材やその他の工業材料として非常に広範に用いられてきた。このような高分子材料は熱的、機械的物性に優れるが、これは結晶内部では分子同士が非常に高密度に凝集しているため、分子同士が強い相互作用によって安定化した構造となっているためである。結晶性高分子材料の物性解析は X 線や中性子などの回折実験をはじめとして種々の顕微鏡法や分光法によって実験的に解析が行なわれてきた。特に回折実験によって結晶格子の変形を精査する手法は外部の刺激への応答を見る上で有力な手法である。しかしながら実験的手法によっては、一般的に巨視的に平均化された情報が得られるため微視的な分子レベルでの応答を観測することは困難であり、分子構造と物性を関連づけて議論することを困難にしている。また材料創成を行なう場合には、試料調製から物性解析までを実験的に網羅することの物質的、時間的なコストが高いという難点がある。

物性解析のもう一つの手法としては、分子動力学法などをはじめとした理論計算法がある。理論計算法は扱う粒子の大きさによっていくつかの種類に分類することが出来るが、原子を構成要素としてその集合体の系を扱う分子シミュレーション、具体的には分子動力学法 (Molecular Dynamics: MD) や分子力学法 (Molecular Mechanics: MM) による計算が材料物性の解析のためには用いられてきた。このような分子シミュレーションでは計算機性能の限界から扱える粒子数に制約があり微視的な系のみが対象となるが、外部刺激に対する原子レベルでの応答を追跡することが出来るため、物性発現の機構について詳細な解析を行なうことが可能である。実際に MD 法によって種々の材料の機械的物性の解析が行なわれており、その他の分野では特に酵素学の分野で酵素の機能予測などの面で成果を上げている。

理論計算法はこのように非常に有力な解析手法であるが、計算条件によっては現実の現象から大きく乖離した計算結果をもたらす場合があり、実験系の解釈に用いる場合には注意を要する。系中の全ての原子の電子軌道を計算する量子化学計算 (第一原理計算) は、量子化学的効果までを考慮に入れて計算を行なうため原子間の相互作用をよく再現した非常に信頼性の高い計算方法である。しかし軌道計算は計算コストが非常に高く扱える粒子数は千個程度までと限定的で、また一定以上の時間スケールが必要な動的挙動の解析には適さない。一方、古典的な MD 法などでは系中の分子間に働く相互作用をいくつかのポテンシャル関数に近似し、そのアセンブリについて計算を行なうことで系の挙動を再現しているため計算コストが低く、扱える粒子数も数万以上で比較的長い時間についての計算が可能であることから、現状では物性解析のための動的挙動解析には MD 法を用いることが効率的である。ただしポテンシャルの近似精度によっては計算結果の実験値とのずれが大きくなる。特に凝集性の高く、かつ分子同士に共有結合の存在しない分子結晶系においては、種々の非結合性の相互作用が構造や物性発現

に大きく寄与するため、凝集性の低い酵素や結合性相互作用が支配的な無機物結晶などに比べると分子力場の計算結果に与える影響は大きい。従って高分子結晶材料の物性解析のための信頼性の高い理論計算を行なうためには、適切な条件下で計算を行なうことが不可欠である。

計算条件の最適化のためには、結晶構造中での相互作用の正確な見積もりに基づく分子力場の修正と、その修正条件下での計算結果が実際に現実の物理現象を再現しているのかという再現精度の評価の二点を行なう必要がある。相互作用の見積もりには量子化学計算を用いることが可能であるが、その場合には詳細な結晶構造が明らかにされていることが条件であり、また制限精度の評価のためには正確性の高い実験値を取得することが出来るモデル系が必要である。

序論でも述べた通り、 $\beta$ -キチンの結晶構造は極めて詳細に解析がなされており、水素原子の位置も含めて信頼性の高い構造モデルが提示されている。また、その構造解析に用いられた高結晶性試料の結晶サイズは 30 nm 以上と繊維結晶としては非常に大きく、構造の均一性も高いため、物性解析のためのモデル試料としての条件を満たしている。そこで本章においてはこの  $\beta$ -キチン結晶について正確性の高い観測が可能な物性発現、具体的には熱膨張挙をモデルケースとして分子結晶系の信頼性に足る分子力場の構築を試みた。同時にこの修正により得られた修正力場を用いて熱膨張挙動解析を行なった。

### 8.3.1. 方法

#### 8.3.1.1. X線回折実験

X線回折実験には、*L. satsuma* 由来の高結晶性  $\beta$ -キチン試料を用いた。第四章に示すように、*L. satsuma* の棲管を精製し、一軸配向試料を調製した。

X線回折実験は SPring-8 の BL40B2 において行なった。第 7 章の  $\alpha$ -キチンについての実験と同様に温度調節の可能は窒素ガス吹き付け装置によって、40 °C 間隔で 40 °C から 240 °C の試料温度を調節した。所定の温度条件ごとに波長 1.0 Å の X 線を繊維軸に垂直に 60 秒照射し、イメージングプレート上に回折図を記録した。記録した回折図から赤道、および子午線方向の回折プロファイルを取得し、pseudo-Voigt 関数と最小二乗法アルゴリズムを用いてピーク分離を行い、面間隔を算出した。単位格子の精密化では、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の全ての単位格子定数線熱膨張係数は第六章で示した方法によって算出した。

#### 8.3.1.2. 第一原理計算と Löwdin の密度解析

第 3 章の方法と同様に無水型  $\beta$ -キチン結晶について平面波基底の密度汎関数理論計算により構造最適化計算を行なった。基底関数の平面波の最大エネルギーは 70 Ry とし、Brillouin

空間のサンプリングは  $x^*$ 、 $y^*$ 、 $z^*$  の各方位について  $2 \times 2 \times 1$  の  $k$  点により行なった。量子化学計算の結果として得られた電子軌道を用いて、Löwdin の密度解析 (Population analysis: PA) によって結晶中の各原子上の電荷を算出した (Löwdin, 1950, 1970)。

### 8.3.1.3. 分子力場修正

序論で示した通り、本研究では単純な分子力場に基づく分子動力学計算を用いて分子結晶の動的挙動を再現することを試みた。分子力場としては糖の分子動力学計算用に開発された分子力場である GROMOS 56A<sub>CARBO</sub> (Hansen et al., 2011) を元にいくつかのパラメータを修正することとした。GROMOS 分子力場は図 8-7 に示すようにアルキル基の水素原子を炭素原子とまとめて一粒子として扱う United atom 分子力場である。また、次式で表されるように、結合長、結合角、結合の二面角 (Proper、Improper)、クーロン相互作用、分子間力に相当する Lennard-Jones ポテンシャルの 6 つのポテンシャル関数のみからなる単純な力場である。

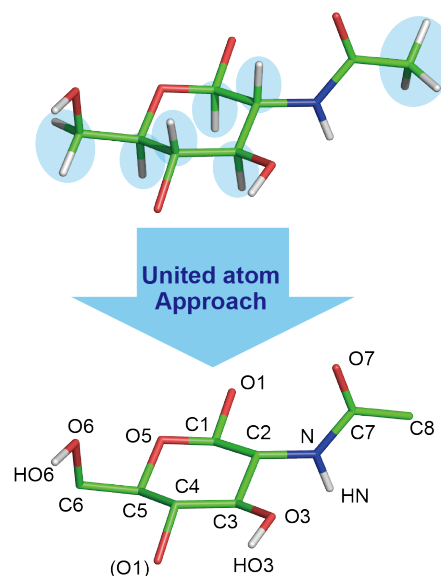
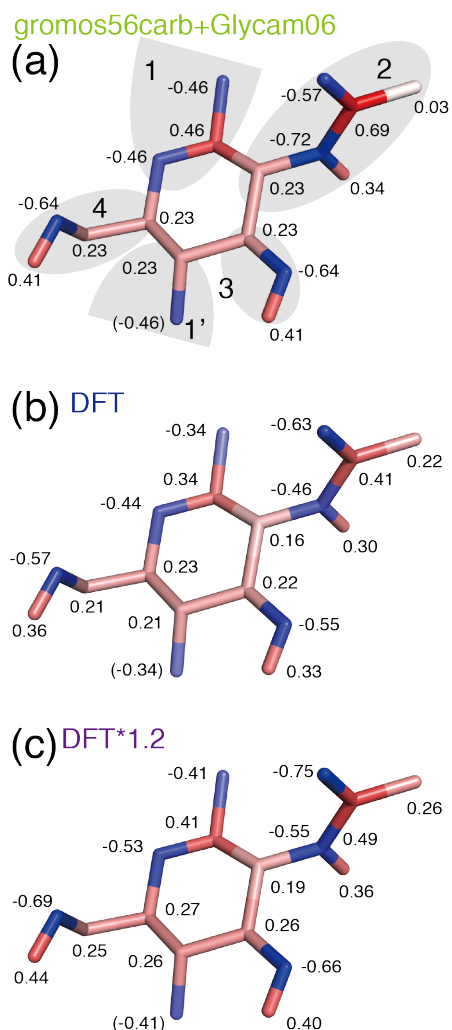


Figure 8-7 Concept of united atom approach and definition of atom labels.

$$U = U_{\leftrightarrow} + U_{\perp} + U_{\text{proper-dihedral}} + U_{\text{improper-dihedral}} + U_{\text{elec}} + U_{\text{LJ}}$$

Chen ら (Chen et al., *In Preparation*) の検討によって Lennard-Jones ポテンシャルの斥力項は、この力場においては過大に見積もられており、そこで CH3 と HO6 の斥力項を初期値から 70% に小さくした。また、クーロン相互作用は原子上の電子の局在を示す部分電荷によって表されるが、キチンの構成単位である GlcNAc 残基についての部分電荷情報はこの分子力場には存在しなかったため、以下に示す三通りの部分電荷セットを新たに構築した。すなわち①GROMOS 56A<sub>CARBO</sub> 分子力場と CHARM06 の合成電荷、②無水  $\beta$ -キチンの DFT 計算の結果を用いた Löwdin PA から算出した電荷セット、③②の Löwdin 電荷の絶対値を 1.2 倍した電荷セット、である。①の部分電荷セットは、GROMOS 56A<sub>CARBO</sub> 力場のグルコースのピラノース環構造とアセトアミド基以外の側鎖についての部分電荷の値と、GLYCAM 06 のアセトアミド基についての電荷値を組み合わせた。GROMOS 力場では幾何学的に近い原子群を電気的中性な一つのグループ (Charge group) として扱うことで、クーロン相互作用の距離についてのカットオフによるアーティファ

クトを避けるようにしている。そこで C2 を含むアセトアミド基全体を一つのチャージグループとなるように C2 に電荷を分配している (図 8-8a)。この部分電荷セットを用いた力場を以下、Native FF とする。②の電荷セットは第一原理計算の結果として得られた電子軌道について Löwdin の密度解析を行なうことで、各原子上に局在する電荷を算出した。算出された Löwdin 電荷と各原子の価電子数の差を部分電荷とし、これを各チャージグループが電気的中性を保つように、グループ中の電荷をパラメータとして GSL (GNU Scientific Library) の提供する多次元最小化アルゴリズムを用いて部分電荷を再分配した (図 8-8b)。この部分電荷セットを用いた力場を以下、DFT Charge とする。③の電荷は、クーロン相互作用を強めるために②の部分電荷の絶対値を 1.2 倍したものである (図 8-8c)。ここでスケールリングファクターを用いたのは、一般的に Löwdin 電荷が他の電荷、Mulliken 電荷や Natural PA の結果に対して小さく見積もられる傾向にあるためである (Becker et al., 2005)。この部分電荷セットを用いた力場を以下、DFT Charge\*1.2 とする。これら三つの部分電荷セットを用いて分子動力学計算を行なった。



**Figure 8-8** Partial charge sets used in molecular dynamics simulation. (a) Native force field, (b) DFT charge evaluated by Löwdin population analysis. (c) DFT charge multiplied by a scaling factor of 1.2. The atomic color is set to be more red as its partial charge becomes more positive, and to be bluer as it becomes more negative.

#### 8.3.1.4. 分子動力学計算

分子動力学計算は GROMACS ソフトウェア (version 4.5) を用いて行なった。分子力場には上記の修正 GROMOS 56A<sub>CARBO</sub> 分子力場を使用し、NPT (一定粒子数、定圧・定温) と NVE (一定粒子数、定積、定エネルギー) のアンサンブル (統計集団) について計算を行なった。分子動力学計算は、各粒子の運動方程式を数値積分することによって各粒子の位置と速度情報

を得て、系の動的挙動を解析する。本研究では、数値積分は効率性に優れる Leap-frog 法により行い、時間ステップは NPT 計算には 1 fs、NVE 計算には 0.5 fs を用いた。原子間に働く短距離のクーロン相互作用と非結合性の Lennard-Jones 相互作用の範囲径は 0.9 nm とし、それ以上遠い原子同士のこれらの相互作用は無視した。0.9 nm 以上の遠距離の分散力の補正はエネルギーと圧力について行い、遠距離のクーロン相互作用の補正は、遠距離の計算に適した逆空間での計算を用いた Ewald らの方法 (Ewald summation) に従った。NPT 計算においては、圧力の補正は Berendsen アルゴリズムによって行い、温度の補正は velocity rescaling アルゴリズムを用いた。H-O 間、H-N 間の共有結合の結合長にのみ、LINCS アルゴリズムによる制限をかけた。NVE 計算では圧力、温度についての補正、結合長についての制限は用いなかった。分子動力学計算の計算フレームは 1 ps ごとに出力した。

分子モデルには、Nishiyama らと Sawada らが X 線と中性子線回折実験による構造解析によって明らかにした無水  $\beta$ -キチンの結晶構造を用いた。本研究では、表面の効果を無視して、バルクの理想結晶の物性を再現するために系の x、y、z の全方向 (x は a 軸に z は c 軸に平行とした) に周期境界条件を用いた finite crystal の系を採用した。無水  $\beta$ -キチンの非対称単位である GlcNAc 残基を複製することで、8 残基の分子鎖が 32 本含まれる対称性  $P1$  のスーパーセルを構築した。各分子鎖の末端は周期境界条件によって作り出される隣のスーパーセルの分子像に共有結合させることで無限長の分子鎖から成る結晶についての計算を行なった。

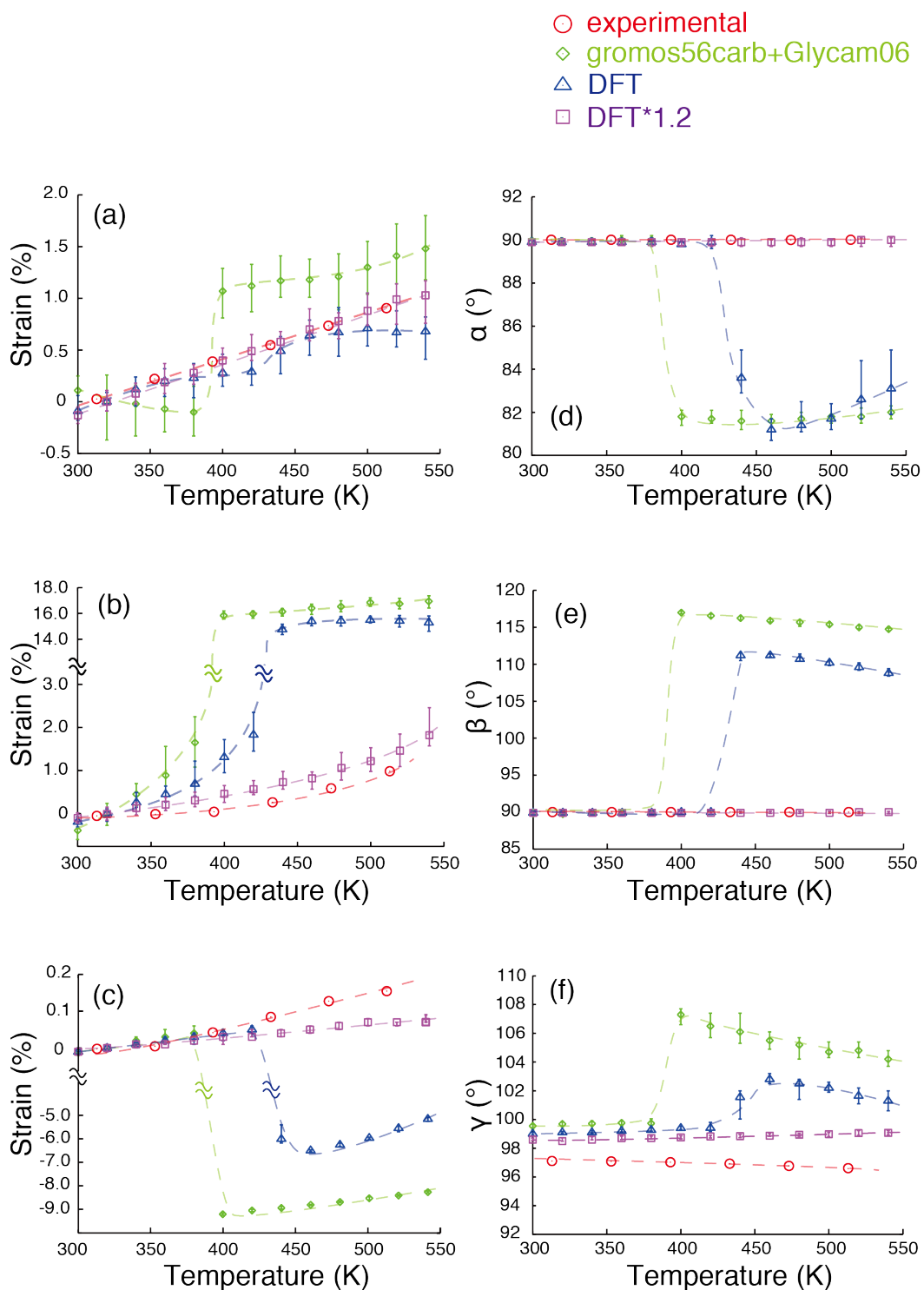
この分子モデルについて、まず最急降下法 (steepest-decent method) と共益勾配法 (conjugate gradient method) によるエネルギー最適化計算を行なった。最適化条件は、最適化計算のステップ間の最大のエネルギー変動が 1 kJ/mol/Å 以下となることとした。このようにしてエネルギー最適化した系について、まず室温域での構造を実験的に得られた結晶構造と比較して評価するため、300 K での 10 ns の NPT 計算を行なった。次に NPT 計算による系の昇温過程についての計算を行なった。100 K/ns の昇温速度で、200 ps 間の 20 K の温度上昇ステップと温度を 600 ps 一定に保つ平衡化ステップを繰り返しながら 300 K から 540 K まで昇温した。各方向の変形しやすさを表す圧縮率は  $1.0 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  (x 方向)、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  (y 方向)、 $1.0 \times 10^{-7} \text{ bar}^{-1} \text{ bar}^{-1}$  (z 方向)、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  (xz せん断方向)、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  (yz 方向)、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  (xy 方向) とした。次に 300 K、400 K、500 K での構造について精査するべく 5 ns の NVE 計算を行なった。

### 8.3.2. 結果と考察

図 8-9 に、X 線回折と、分子動力学計算によって算出された無水  $\beta$ -キチンの昇温過程における単位格子定数の変化を示す。

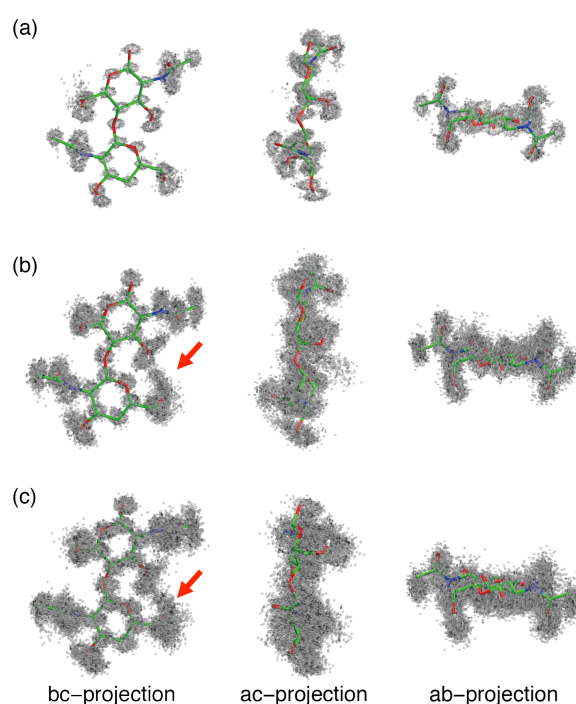
X 線回折実験により得られた回折図から、313 K から 513 K の各温度での 6 つの単位格子定数 ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) を算出した。図 8-9a, 9b に示す通り、 $\alpha$ ,  $\beta$  の値はこの温度域では 90°で一定であり、結晶が単斜晶系を維持していることが分かる。 $\gamma$  の値は、温度の上昇に伴って単調な減少傾向が見られたが、その変化量は 1%以下であった。一方で、各軸の長さは温度上昇に伴ってゆるやかな増加傾向を示し、また同時に明確な異方性を示した。結晶の  $a$  軸と  $c$  軸の温度上昇に対する膨張傾向は、線形に近似でき、その線熱膨張係数はそれぞれ、 $4.35 \times 10^{-5} \text{ K}^{-1}$ 、および  $8.37 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$  であった。一方で、 $b$  軸の膨張傾向はより強い温度依存性があり、400 K 付近を境に膨張傾向に差異が見られた。どちらの領域についても線形に近似することが出来、その低温域では  $8.52 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$  であり、高温域では  $9.43 \times 10^{-5} \text{ K}^{-1}$  であった。高温域においては、熱膨張係数は  $\alpha_b > \alpha_a > \alpha_c$  となり、前章に示したような  $\alpha$ -キチンの熱膨張の異方性と同様の傾向が見られたが、低温域においては、 $\alpha_a > \alpha_b > \alpha_c$  となり、温度によって各方位についての膨張しやすさは明確に異なっていた。この結果は Wada と Saito の結果に一致している (Wada & Saito, 2001)。

分子動力学計算によって計算された熱膨張挙動は、用いた分子力場によって挙動が大きく異なった。Native FF を用いた計算においては、前述した通り 300 K 付近では構造は X 線構造と大きく異なっておらず (図 8-10a)、温度の上昇に伴って単斜晶系の構造を維持しながら、軸長が徐々に増加していく。しかし、390 K 前後で  $a$  と  $\beta$  の値が 90°から大きく変化しており、単斜晶系の元の構造から三斜晶系の新たな構造に転移したことが見て取れる。各軸長も 390 K の転移点において大きく変化しており、特に  $b$  軸には 10%、 $c$  軸には 5%以上の大きな変位が見られた。このような熱膨張挙動は実測されないことから、この転移は非現実的な現象である。図 8-10b と 10c に示した 400 K と 500 K の平衡構造は、X 線構造からは大きく逸脱しており、また灰色の点で描画した各 MD フレームの原子位置の履歴が示すように、特に側鎖の振動は極めて大きく、分子のコンフォメーションは大きく変化していた。三斜晶系の新構造中では分子鎖の屈曲が起り、水素結合様式は後述するように大きく変化した。DFT charge を用いた計算によっても、400 K 前後までは不連続な増加傾向は見られなかったが、420 K 前後で大きな構造転移が観測された。これは、Native FF で見られた転移と同様に単斜晶系から三斜晶系への転移であった。各温度での平衡構造を図 8-11 に示す。300 K (図 8-11a)、400 K (図 8-11b) での平衡構造は実験構造に類似しており、この温度域では比較的構造が維持されていることが分かるが、転移後の 500 K では Native FF の場合と同様に分子が屈曲し、一級水酸基の配座と水素結合様式が大きく変化していた (図 8-11c)。



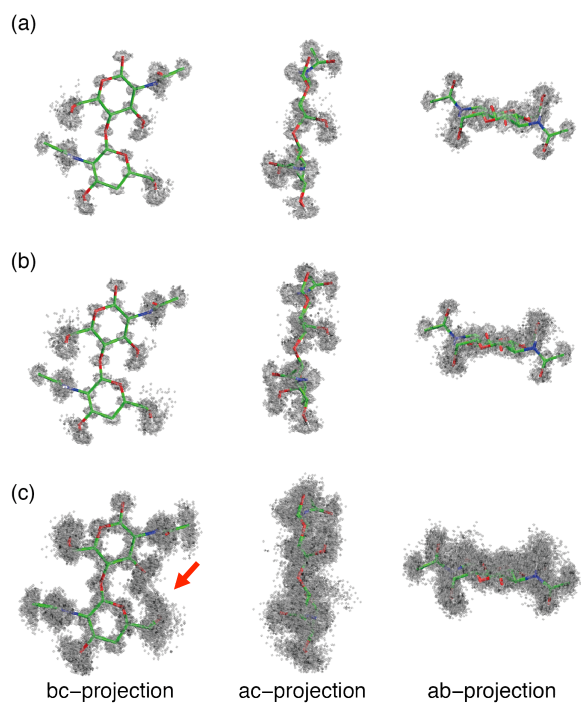
**Figure 8-9** Change in unit cell parameters of anhydrous  $\beta$ -chitin as a function of elevated temperature. (a) a-axis, (b) b-axis, (c) c-axis, (d)  $\alpha$ , (e)  $\beta$ , (f)  $\gamma$ .

一方で、DFT charge\*1.2 の計算によって再現された無水  $\beta$ -キチンの熱膨張挙動は、計算を行なった 300 K から 550 K の温度域において明確な構造の転移点は存在しておらず、単斜晶系の結晶構造を維持したまま熱膨張していた。特に  $a$  軸の増加挙動は実験値に極めて良い一致が見られており、また、 $b$  軸、 $c$  軸についても実験値と類似の温度依存性の熱膨張挙動を見せており、実験値からの差異は小さかった。また、各温度での平衡構造も徐々に分子振動は激しくなっているが、実験構造をほぼ維持していた (図 8-12)。このことから、DFT\*1.2 の力場を用いることによって、分子動力学により精度よく無水  $\beta$ -キチンの熱膨張挙動を再現できたと言える。

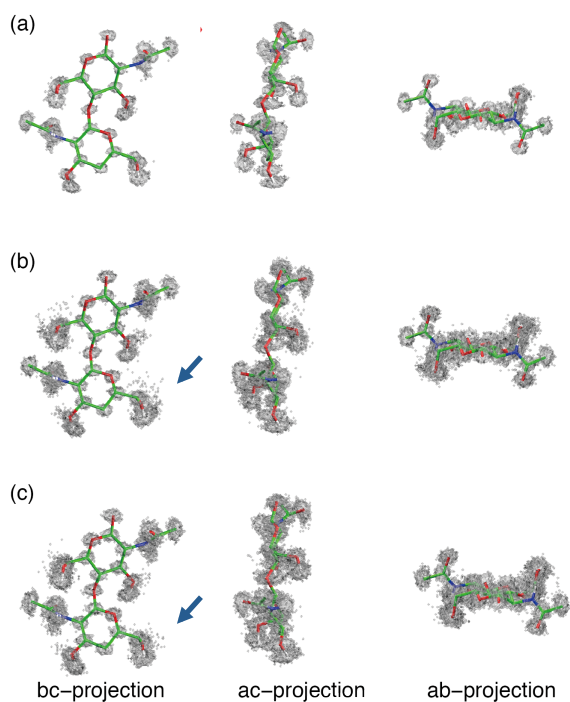


**Figure 8-10** Equilibrium molecular structure of anhydrous  $\beta$ -chitin calculated by NVE simulation with Native FF at (a) 300 K, (b) 400 K, (c) 500 K. Red arrows indicate the density of hydroxymethyl groups in *gt* conformation.





**Figure 8-11** Equilibrium molecular structure of anhydrous  $\beta$ -chitin calculated by NVE simulation with DFT charge at (a) 300 K, (b) 400 K, (c) 500 K. Red arrow indicates the density of hydroxymethyl groups in *gt* conformation.



**Figure 8-12** Equilibrium molecular structure of anhydrous  $\beta$ -chitin calculated by NVE simulation with DFT \*1.2 at (a) 300 K, (b) 400 K, (c) 500 K. Blue arrows indicate the rarer positions of HO6 changed from the normal structure.

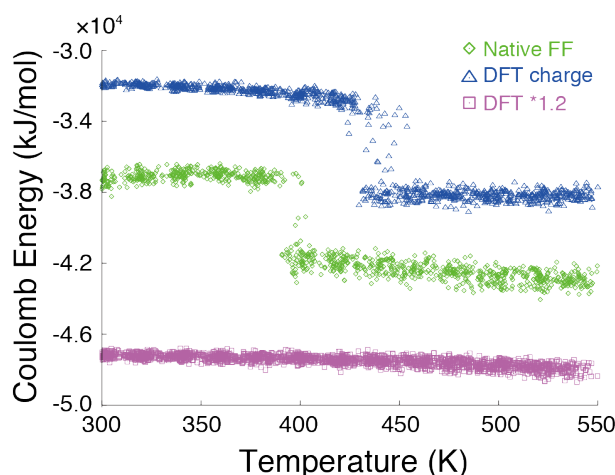
実験的に得られた熱膨張挙動の異方性は、DFT\*1.2 の分子力場を用いた計算によって示された図 8-12 に示す各温度での分子の振動様式から解釈することが可能である。まず *a* 軸方向については、温度の上昇に伴って、振動が増大しており一分子が *a* 軸方向に占める長さが増大していることが分かる。増大傾向も 300 K、400 K 間と 400 K、500 K 間でほぼ均一に増大しており、この方向の熱膨張が分子振動の単純な増大によるものであることが分かる。*c* 軸方向についてもほぼ同様の説明が可能である。この方向は分子結合方向であるから、原子ごとの振動の大きさが *a* 軸や *b* 軸に対してよりも分子の振動が小さいことが分かる。

一方で、*b* 軸方向の熱膨張挙動は *a* 軸や *c* 軸に比べると複雑である。この方向の熱膨張挙動は温度依存性が他の二方位に比べると高く、400 K 以下では *c* 軸並みに熱膨張係数が小さいが、400 K 以上ではおよそ室温付近の 2 倍程度の熱膨張係数を有している。分子の振動挙動は、*a* 軸のような温度上昇に伴う明確な振動の増大は認められないが、300 K と 400 K の間では環構造の原子の *b* 軸方向への振動が有意に増大している。さらに 400 K と 500 K の間では、一級水酸基のアセトアミド基の運動性の増大が見られる。一級水酸基については HO6 が O7 と水素結合を形成する位置から、図中に青矢印で示したような *b* 軸方向の隣接分子の O3 と水素結合を形成する位置に部分的に転移しており、この部分転移の増大が *b* 軸長の増大に寄与している。また、アセトアミド基の C8 の振動半径が有意に増加しており、*b* 軸方向に嵩高いアセトアミド基の運動性が上がることが熱膨張係数を増大させることの一因になっているものと考えられる。

以上のように、分子動力学計算を行い、分子振動様式を精査することによって、熱膨張挙動のより詳細な解釈が可能となった。

分子力場の修正によって熱膨張挙動を再現することが出来たが、部分電荷の修正が具体的にどのような影響を計算結果に与えたのか、検討した。

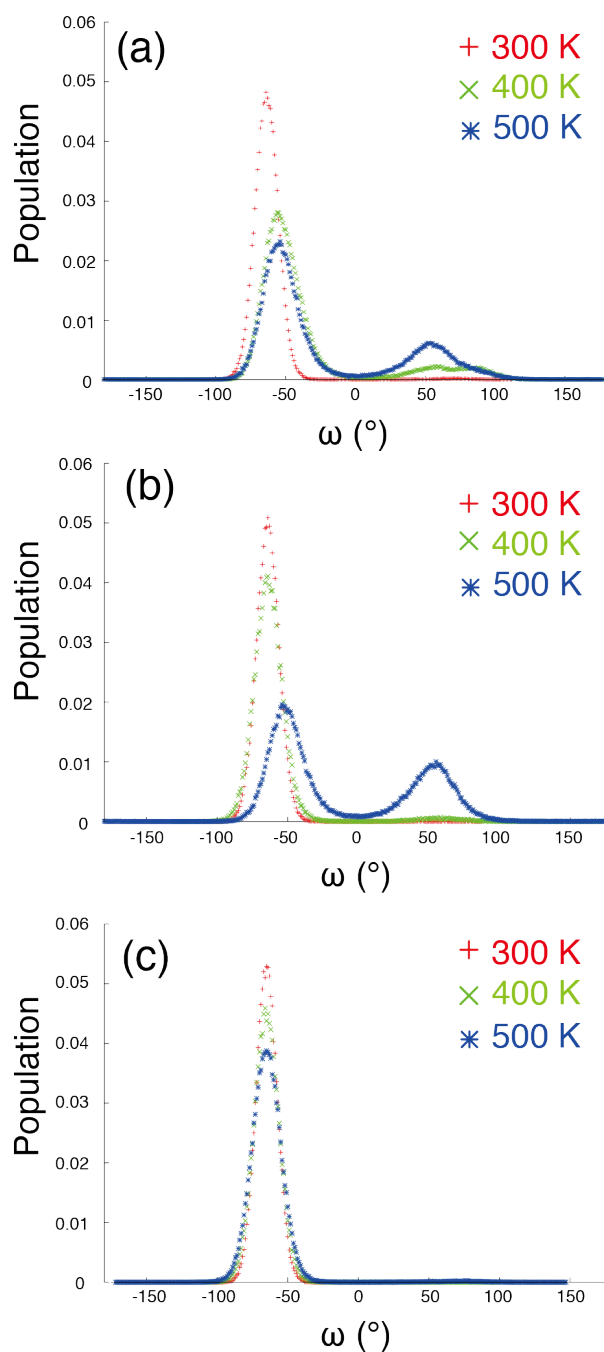
図 8-13 には NPT 計算によって算出した静電ポテンシャルエネルギーの温度に対する変化を示す。静電ポテンシャルはクーロン相互作用によって決定される量であるから、キチンのような多糖結晶系においては水素結合の強さや安定性に強



**Figure 8-13** Change in Coulomb potential energy of anhydrous  $\beta$ -chitin crystals calculated by NPT simulations with the three force fields with different partial charge sets. The simulated structure were energetically stabilized at transition points, 390 K for Native FF, and 420 K for DFT charge.

く影響を受ける。Native FF を用いた計算では、三斜晶への構造転移点である 390 K においてこのポテンシャルエネルギーが不連続に減少しており、三斜晶系への転移によって構造が静電的に強く安定化されたことが分かる。また DFT charge の場合であっても、同様に構造転移温度 (420 K) でエネルギーが不連続に大きく減少しており、同様の安定化が起こったものと考えられる。一方で、静電ポテンシャル以外のエネルギー、つまり結合長、結合角、二面角、LJ 相互作用の不連続な安定化はこの転移点では観測されなかった。

構造転移点で不連続に静電エネルギーの安定化が起こるということは、すなわち水素結合の再構成が起こったことが予想される。図 8-10、11 に示した通り、現実的でない三斜晶系への構造転移が起こると、一級水酸基の配座をはじめとした分子のコンフォメーションが大きく変化し、分子振動が非常に激しくなっていることが見て取れた。ここでは特に一級水酸基のコンフォメーションに注目した。図 8-14 に NVE 計算による各温度での平衡構造の一級水酸基の配座を示す。実験構造は *gg* ( $\omega = -60^\circ$ ) であるから、いずれの力場を用いた場合でも、300 K においては実験構造をよく再現していることが分かる。しかしながら、転移温度以降になると、部分的に一級水酸基が *gt* ( $\omega = 60^\circ$ ) の配座に転移していることが分かる。また、もとの *gg* のコンフォメーションが理想的な  $-60^\circ$  の位



**Figure 8-14** Angler distribution of the orientation of hydroxymethyl group of anhydrous  $\beta$ -chitin calculated by NVE simulation with (a) Native FF, (b) DFT charge, and (c) DFT \*1.2.  $\omega$  is dihedral angle of O5-C5-C6-O6.

置からずれ、かつ分布が広がっており、たとえ *gg* 位に配向する水酸基であっても元の構造からは変化していることが分かる。一方で、DFT \*1.2 の力場を用いた場合には、温度上昇に伴って分布がやや広がるものの一級水酸基の配座は *gg* に安定であった。

図 8-10 や 8-11 に示すように、分子の運動性が高まった結果として一級水酸基の一部が *gt* に変化すると、HO6 は分子間の O6-H...O7 ではなく、分子内の O3 と水素結合を形成するようになる。同時に HO3 の配向も反転して、分子内の O7 との間の水素結合を形成する。これは O3 近傍での立体障害によるものであろう。この場合、水素結合距離は元の結合様式に比べると非常に小さくより強い水素結合を結べるため、静電ポテンシャルの安定化が起こったのであろう。しかしながら、分子が  $P2_1$  の対称性を有する伸びきり鎖の構造を維持するために重要と考えられている O3-H...O5 の分子内水素結合と、分子シート構造の安定化に寄与している O6-H...O7 の分子間水素結合が消失したために、分子は大きく屈曲し、元の構造から大きく転移するのであろう。従って、高温域における構造安定化は、O3-H...O5 と O6-H...O7 の水素結合によって担保されているものと考えられる。図 8-8 に示した部分電荷セットでは O7 の電荷に最も大きな違いがあり、最も転移の温度の低い Native FF に比べると、実験結果をよく再現した DFT\*1.2 では O7 の電荷は 30%程度小さかった。この差異が O6-H...O7 の水素結合の安定度に差異をもたらし、結果として結晶構造全体の熱安定性の再現精度に違いをもたらしたのであろう。

以上に示したように、量子化学計算による部分電荷の再分配によって分子量子力学計算の精度を大きく向上させることが出来た。本研究で用いた量子化学計算は、平面波を基底関数として用いることで無限の理想結晶についての構造計算を行なっているため、そこから得られた結晶内での分子間相互作用についてもパラメータは結晶物性を再現する上では信頼性が高い。従って今回行なった分子力場の修正方法は、詳細な構造が明らかとなっている結晶系一般に有用であろう。

#### 8.4. 結言

無水型  $\beta$ -キチンの弾性変形挙動と熱膨張挙動を X 線回折測定、および理論計算により解析した。弾性変形挙動については、一定荷重下で X 線回折実験を行うことで、繊維図中での回折点の面間隔変化から繊維軸方向についての結晶弾性率 ( $E_1=73.0$  GPa) と各方位の Poisson 比を明らかにした ( $\nu_{010/002}=0.57$ ,  $\nu_{100/002}=0.33$ ,  $\nu_{110/002}=0.22$ ,  $\nu_{110/002}=0.34$ )。量子化学計算によっては一定の精度で結晶の弾性変形挙動を再現できることが分かったが、非結合方向の変形の正確な見積もりにはさらなる検討の余地があることが示された。熱膨張挙動については、量子化学計算により修正した分子力場を用いることで分子動力学によって、X 線回折実験により得られた結晶の熱膨張の異方性を精度よく再現することができた。分子動力学計算の結果として得られた

各温度における分子の振動様式から、熱膨張挙動の異方性を解釈することが出来た。

## 9. 結論

本研究では、キチンの固体構造と物性、また両者の関係性の理解を目的に、二つの結晶多形の結晶構造とさらに高次の凝集構造、そしてその物性についての解析を、実験的手法と理論計算を組み合わせることにより行なった。その結果、以下のような事柄が明らかとなった。

1. 単細胞藻類 *P. globosa* 由来の  $\alpha$ -キチンを用いて、 $\alpha$ -キチンの結晶構造解析を再度行なった。*P. globosa* 由来の  $\alpha$ -キチンは従来構造解析用に用いられてきた甲殻類由来の  $\alpha$ -キチンに比べて 2 倍以上の結晶サイズを有する高結晶性の試料であった。この試料の繊維 X 線回折図中には、現状の単位格子に一致しない微弱な回折点が観測され、また固体  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは、現状構造モデルで想定される 1 つより多くの非対称な炭素原子が結晶中に存在することを示していた。また、甲殻類  $\alpha$ -キチンを用いた中性子線回折実験によって、天然の  $\alpha$ -キチンの結晶の対称性が低いことが示された。以上のことから、天然の  $\alpha$ -キチンの結晶構造としては、空間群  $P1$  に属する、より多くの分子鎖を含む大きな単位格子を持つ系か、天然セルロースのような混晶の系の 2 通りが考えられる。(第二章)

2. 回折実験により詳細な構造が明らかとなっている  $\beta$ -キチンの無水型と二水和型の結晶について、より詳細な分子間相互作用とその動的挙動を明らかにすることを目的に理論計算による解析を行った。量子化学計算によるエネルギー最適化構造は、実験的に明らかにされた構造とよく一致しており、実験的に提案された構造が極めて信頼性の高い構造であることが確かめられた。分子動力学計算による解析によっては、無水型  $\beta$ -キチン結晶中の水素結合が室温域でも安定であるのに対して、二水和型  $\beta$ -キチン中では水分子の熱振動によって、複数の水素結合様式が存在するより動的な構造体であることが示唆された。(第三章)

3. 結晶形と起源の異なる高結晶性キチンマイクロフィブリルについて、高分解能電子顕微鏡観察と電子線回折実験を行なった。この観察によって、キチンマイクロフィブリルの断面形状を明らかにし、生産する生物種によって断面形状に差異があることが示された。また、マイクロフィブリル横断面についての高分解能観察によって得られた格子像から、マイクロフィブリル中の分子シートの充填様式を明らかにし、表面に露出する結晶面の予測を行った。今回観察を行ったキチンマイクロフィブリルについては、試料の結晶形、起源によらず分子シートは必ず横断面の長辺に平行に配列していた。このことから、キチンマイクロフィブリルの結晶化は、分子シートの形成と、それらのシートの堆積という二段階の過程を経ていることが予想された。(第

#### 四章)

4. サツマハオリムシ (*L. satsuma*) 棲管中でのキチンマイクロフィブリルの凝集様式を X 線回折と電子顕微鏡観察により調べた。棲管中では  $\beta$ -キチン結晶は三次元的に配向しており、全てのキチン分子の還元末端が棲管の上端に向くように配向していることが明らかとなった。 $\beta$  1,4 結合を持つ多糖の分子鎖伸長反応が非還元末端で起こり、またハオリムシのキチン生合成装置が表皮に固定されていることから、キチンマイクロフィブリルの合成、分泌がハオリムシの下向きの運動と連動して起こることが示された。また、キチンマイクロフィブリルの断面形状や面配向には、棲管中での存在位置によって差異があることが分かり、これは生合成時の合成酵素の配列様式や、マイクロフィブリルに掛かる張力などの違いによるものであると予想された。

#### (第五章)

5. キチン結晶多形のアクセシビリティの評価を、結晶内重水素化と FT-IR 測定により行なった。 $\beta$ -キチン結晶の重水素化挙動には、官能基ごとに二水和型結晶の構造に由来すると考えられる差異があり、O3-H は室温付近で結晶内重水素化が進むのに対して、O6-H、N-H の結晶内重水素化の進行は 100 °C 以上の高温域で急激に起こった。(第六章)

6.  $\alpha$ -キチンの弾性変形挙動と熱膨張挙動を X 線回折実験により調べた。弾性変形挙動の解析は、繊維軸方向についての一定の軸力下で繊維回折図を測定し、各回折点の面間隔変化から変形量を算出することで行なった。これより、繊維軸方向の結晶弾性率 ( $E_f=59.3$  GPa) と Poisson 比 ( $\nu_{020/002}=0.48$ ,  $\nu_{110/002}=0.14$ ,  $\nu_{120/002}=0.22$ ,  $\nu_{130/002}=0.21$ ) を報告した。結晶の熱膨張挙動についても同様に、一定温度条件下で測定した繊維回折図から変形量を産出し、各軸方向の線熱膨張係数と体積熱膨張係数 ( $\alpha_a=6.1$  °C<sup>-1</sup>,  $\alpha_b=7.3$  °C<sup>-1</sup>,  $\alpha_c=2.1$  °C<sup>-1</sup>,  $\beta=15.8$  °C<sup>-1</sup>) を報告した。(第七章)

7. 無水型  $\beta$ -キチンの弾性変形挙動と熱膨張挙動を X 線回折測定、および理論計算により解析した。弾性変形挙動については、一定荷重下で X 線回折実験を行うことで、繊維図中の回折点の面間隔変化から繊維軸方向についての結晶弾性率 ( $E_f=73.0$  GPa) と各方位の Poisson 比を明らかにした ( $\nu_{010/002}=0.57$ ,  $\nu_{100/002}=0.33$ ,  $\nu_{110/002}=0.22$ ,  $\nu_{110/002}=0.34$ )。量子化学計算によって一定の精度で結晶の弾性変形挙動を再現できることが分かったが、非結合方向の変形の正確な見積もりにはさらなる検討の余地があることが示された。熱膨張挙動については、量子化学計算により修正した分子力場を用いることで分子動力学によって、X 線回折実験により得られた結晶の熱膨張の異方性を精度よく再現することができた。分子動力学計算の結果として得られた各温度における分子の振動様式から、熱膨張挙動の異方性を解釈することが出来た。(第八章)

以上に示すように、本研究ではキチンの固体構造について、原子レベルから巨視的な構造に至るまでの各スケールでの解析を行なった。

$\alpha$ -キチン結晶については、天然の構造がより対称性の低いことを明らかにしたが、構造の完全解明のためにはより詳細な解析が必要であることが同時に示された。現状の構造では単位格子中に結晶学的に等価な4つのGlcNAc残基が含まれるが、天然の構造中では単位格子はより大きく、より多くの不等価な残基が含まれることになる。そのような複雑な構造を明らかにするためには、繊維回折に基づく解析には精度の限界があるため、固体NMRなどの実験的手法ばかりでなく、理論計算を組み合わせた解析が必要となろう。

マイクロフィブリルの構造解析によってキチンの結晶構造と巨視的な存在状態を関連づける中間的なスケールの構造の理解を進めることができた。本研究で観察した試料はいずれも高結晶性のものではあったが、ここで共通して見られた分子鎖の凝集様式の特徴は低結晶性のマイクロフィブリル中でも認められるものと予測される。存在量と利用可能性を考えると、材料利用のために重要となるのは低結晶性キチンであるから、この構造を明らかにすることは重要であり、本研究で得られ知見を元にマイクロフィブリル構造の解明が行なわれることが望まれる。

物性解析では、キチンの両結晶多形の基礎的な物性値を報告し、結晶構造との関連性を明らかにすることを試みた。分子レベルでの物性理解のためには、今日では理論計算は不可欠なものであり、本研究でも量子化学計算と分子動力学法による解析を行なった。その検討の結果、外的な刺激に対する分子の応答を明らかにすることが出来たものの、分子結晶系では理論計算による実験値の再現には計算条件の適切な修正が必要であることが明らかとなった。特に本研究で行なった量子化学計算を用いた分子力場の修正は、分子結晶全般に適用できるため有用性が高いと考えられる。この方法を適用することにより、セルロースなどの他の分子結晶系の理論計算の精度を向上させることが可能であろう。



## 引用文献

- Atalla RH, VandellHart DL (1984) Native cellulose: a composite of two crystalline forms. *Science* 223:283–285.
- Atkins E (1985) Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates. *J Biosci* 8:375–387.
- Atkins E, Dlugosz J, Foord S (1979) Electron diffraction and electron microscopy of crystalline  $\alpha$ -chitin from the grasping spines of the marine worm *Sagitta*. *Int J Biol Macromol.* 43:29–32.
- Baker A, Helbert W, Sugiyama J, Miles M (1997) High-Resolution Atomic Force Microscopy of Native *Valonia* Cellulose I Microcrystals. *J Struct Biol* 138:129–138.
- Baker A, Helbert W, Sugiyama J, Miles M (2000) New Insight into Cellulose Structure by Atomic Force Microscopy Shows the I  $\alpha$  Crystal Phase at Near-Atomic Resolution. *Biophys J* 79:1139–1145. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76367-3
- Beckstein O, Sansom MSP (2003) Liquid-vapor oscillations of water in hydrophobic nanopores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7063–8. doi: 10.1073/pnas.1136844100
- Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, et al. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81:3684. doi: 10.1063/1.448118
- Bergenstråhle M, Berglund L a, Mazeau K (2007) Thermal response in crystalline I $\beta$  cellulose: a molecular dynamics study. *J Phys Chem B* 111:9138–45. doi: 10.1021/jp072258i
- Blackwell J (1969) Structure of  $\beta$ -chitin or parallel chain systems of Poly- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-Glucosamine. *Biopolymers* 7:281–298.
- Blackwell J, Weih MA (1980) Structure of Chitin-Protein Complexes: Ovipositor of the Ichneumon Fly *Megurhyssa*. *J Mol Biol* 137:49–60.
- Bloch F (1929) über die Quantummechanik der Elektronen in Kristallgittern. *Zeitschrift für Phys* 52:555–600.
- Bouligand Y (1972) Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue Cell* 4:189–217.

- Bourret A, Chanzy H, Lazaro R (1972) Crystallite Features of Valonia cellulose by Electron Diffraction and Dark - Field Electron Microscopy. *Biopolymers* 11:893–898.
- Bracker C (1976) Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4570–4574.
- Bright M, Keckeis H, Fisher C (2000) An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the Riftia pachyptila symbiosis. *Mar Biol* 136:621–632.
- Bright M, Lallier H (2010) The biology of vestimentiferan tubeworms. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 48:213–266.
- Bussi G, Donadio D, Parrinello M (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126:014101. doi: 10.1063/1.2408420
- Carlström D (1957) The crystal structure of  $\alpha$ -chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine). *J Biophys Biochem Cytol* 3:669–683.
- Chen P, Nishiyama Y, Mazeau K (2011) Torsional entropy at the origin of the reversible temperature-induced phase transition of cellulose. *Macromolecules* 45:362–368.
- Chen P, Nishiyama Y, Putaux J, Mazeauj K (2013) Diversity of potential hydrogen bonds in cellulose I revealed by molecular dynamics simulation. *Cellulose*. doi: 10.1007/s10570-013-0053-x
- Chrétiennot-Dinet M, Giraud-Guille M, Vaultot D, et al. (1997) The chitinous nature of filaments ejected by *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J Phycol* 33:666–672.
- DeAngelis PL (1999) Molecular Directionality of Polysaccharide Polymerization by the Pasteurella multocida Hyaluronan Synthase. *J Biol Chem* 274:26557–26562. doi: 10.1074/jbc.274.37.26557
- Dri F, Jr LH, Moon R, Zavattieri P (2013) Anisotropy of the elastic properties of crystalline cellulose I $\beta$  from first principles density functional theory with Van der Waals interactions. *Cellulose*. doi: 10.1007/s10570-013-0071-8
- Dweltz N (1968) 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucan) fibers of the diatom *Thalassiosira fluviatilis*, Hustedt. III. The structure of chitan from X-ray diffraction and electron microscope. *Can J Bot*. 128:116–128.

- Dweltz NE, Colvin JR, McInnes AG (1968) Studies on chitan ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucan) fibers of the diatom *Thalassiosira fluviatilis*, Hustedt. III. The structure of chitan from x-ray diffraction and electron microscope observations. *Can J Chem* 46:1513–1521.
- Eppley RW, Holmes RW, Strickland J D H (1967) Sinking rates of marine phytoplankton measured with a Fluorometer. *J Exp Mar Bio Ecol* 1:191–208.
- Essmann U, Perera L, Berkowitz M (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys* 103:31–34.
- Fischer E, Herchenröder P, Manley RSJ, Stamm M (1978) Small-Angle Neutron Scattering of Selectively Deuterated Cellulose. *Macromolecules* 11:213–217.
- Focher B, Naggi A, Torri G, et al. (1992) Differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions—evidence from CP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Carbohydr Polym* 17:97–102.
- Frilette V, Hanle J, Mark H (1948) Rate of exchange of cellulose with heavy water. *J Am Chem Soc* 153:1107–1113.
- Gardner K, Blackwell J (1974) The Structure of Native Cellulose. *Biopolymers* 13:1975–2001.
- Gardner KH, Blackwell J (1975) Refinement of the Structure of  $\beta$ -chitin. *Biopolymers* 14:1581–1595.
- Giannozzi P, Baroni S, Bonini N, et al. (2009) QUANTUM ESPRESSO: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *J Phys Condens matter* 21:395502. doi: 10.1088/0953-8984/21/39/395502
- Giraud-Guille M (1984) Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle. *Tissue Cell* 16:75–92.
- GIRAUD-GUILLE MM, Chanzy H, Vuont R (1990) Chitin Crystals in Arthropod Cuticles Revealed by Diffraction Contrast Transmission Electron Microscopy. *J Struct Biol* 240:232–240.
- Gonell HW (1926) Röntgenographische Studien an Chitin. *Zeitschrift für Physiol Chemie* 152:18–30.

- Green P, Chapman G On the development and structure of the cell wall in *Nitella*. Am. J. Bot. 42: 685–693
- Grimme S (2006) Semiempirical GGA - type density functional constructed with a long - range dispersion correction. J Comput Chem 16:1787–1799. doi: 10.1002/jcc
- Hamodrakas SJ, Willis JH, Iconomidou V a (2002) A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins. Insect Biochem Mol Biol 32:1577–1583.
- Hampfrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics. J Mol Graph 14:33–38.
- Hanley S, Giasson J, Revol J, Gray D (1997) Atomic force microscopy and transmission electron microscopy of cellulose from *Micrasterias denticulata*; evidence for a chiral helical microfibril twist. Cellulose 4:209–220.
- Hanley S, Giasson J, Revol J, Gray D (1992) Atomic force microscopy of cellulose microfibrils: comparison with transmission electron microscopy. Polymer (Guildf) 33:4639–4642.
- Hansen H, Hünenberger P (2011) GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates accounting for the relative free energies of ring conformers, anomers, epimers, hydroxymethyl rotamers,. J Comput Chem 32:998–1031. doi: 10.1002/jcc
- Hasegawa M, Isogai A, Onabe F (1993) Preparation of Low-molecular weight cellulose using phosphoric acid. Carbohydr Polym 20:279–283.
- Hayashi T, Marsden MPF, Delmer DP (1987) Pea Xyloglucan and Cellulose. Plant Physiol 83:384–389.
- Helbert W, Nishiyama Y, Okano T, Sugiyama J (1998a) Molecular Imaging of *Halocynthia papillosa* Cellulose. J Struct Biol 50:42–50.
- Helbert W, Sugiyama J, Kimura S, Itoh T (1998b) High-resolution electron microscopy on ultrathin sections of cellulose microfibrils generated by glomerulocytes in *Polyzoa vesiculiphora*. Protoplasma 203:84–90.
- Helbert W, Sugiyama J (1998c) High-resolution electron microscopy on cellulose II and  $\alpha$ -chitin single crystals. Cellulose 5:113–122.

- Herth W, Kuppel A, Schnepf E (1977) CHITINOUS FIBRILS IN THE LORICA OF THE FLAGELLATE CHRYSOPHYTE POTERIOCHROMONAS *Stipitata* (Syn. *Ochromonas Malhamensis*). *J Cell Biol* 73:311–321.
- Herth W, Zugenmaier P (1977) Ultrastructure of the chitin fibrils of the centric diatom *Cyclotella cryptica*. *J Ultrastruct Res* 239:230–239.
- Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* 18:1463–1472.
- Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput* 4:435–447. doi: 10.1021/ct700301q
- Hohenberg P, Kohn W (1964) inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev.* 155: 864–871
- Hori R, Wada M (2006) The thermal expansion of cellulose II and III<sub>II</sub> crystals. *Cellulose* 13:281–290. doi: 10.1007/s10570-005-9038-8
- Horikawa Y, Sugiyama J (2008) Accessibility and size of Valonia cellulose microfibril studied by combined deuteration/rehydrogenation and FTIR technique. *Cellulose* 15:419–424. doi: 10.1007/s10570-007-9187-z
- Iconomidou VA, Willis JH, Hamodrakas SJ (2005) Unique features of the structural model of “hard” cuticle proteins: implications for chitin – protein interactions and cross-linking in cuticle. *Insect Biochem Mol Biol* 35:553–560. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.01.017
- Imai T, Putaux J, Sugiyama J (2003a) Geometric phase analysis of lattice images from algal cellulose microfibrils. *Polymer (Guildf)* 44:1871–1879.
- Imai T, Watanabe T, Yui T, Sugiyama J (2003b) The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. *Biochem J* 760:755–760.
- Iwamoto S, Kai W, Isogai A, Iwata T (2009) Elastic Modulus of Single Cellulose Microfibrils from Tunicate Measured by Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules* 10:2571–2576.

- Jang M, Kong B, Jeong Y, et al. (2004) Physicochemical characterization of  $\alpha$ -Chitin,  $\beta$ -Chitin, and  $\gamma$ -Chitin Separated from Natural Resources. *J Polym Sci Polym Chem* 42:3423–3432. doi: 10.1002/pola.20176
- Kameda T, Miyazawa M, Ono H, Yoshida M (2005) Hydrogen Bonding Structure and Stability of  $\alpha$ -Chitin Studied by  $^{13}\text{C}$  Solid-State NMR. *Macromol Biosci* 5:103–106. doi: 10.1002/mabi.200400142
- Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* 1426:373–83.
- Kauss H, W. J, Domand A (1989) The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* 178:385–392.
- Khoushab F, Yamabhai M (2010) Chitin Research Revisited. *Mar Drugs* 8:1988–2012. doi: 10.3390/md8071988
- Kim N, Herth W, Vuong R, Chanzy H (1996) The Cellulose System in the Cell Wall of *Micrasterias*. *J Struct Biol* 117:195–203.
- Kobayashi K, Kimura S, Togawa E, Wada M (2010) Crystal transition between hydrate and anhydrous  $\beta$ -chitin monitored by synchrotron X-ray fiber diffraction. *Carbohydr Polym* 79:882–889. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.10.020
- Kohn W, Sham L (1965) Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys. Rev.* 385: 1133–1138
- Kokot S, Czarnik-Matusewicz B, Ozaki Y (2002) Two-dimensional correlation spectroscopy and principal component analysis studies of temperature-dependent IR spectra of cotton-cellulose. *Biopolymers* 67:456–469. doi: 10.1002/bip.10163
- Kolpak FJ, Blackwell J (1976) Determination of the structure of cellulose II. *Macromolecules* 9:273–278.
- Koyama M, Helbert W, Imai T, et al. (1997) Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9091–9095.

- Lai-Kee-Him J, Chanzy H, Müller M, et al. (2002) In vitro versus in vivo cellulose microfibrils from plant primary wall synthases: structural differences. *J Biol Chem* 277:36931–9. doi: 10.1074/jbc.M203530200
- Langan P, Nishiyama Y, Chanzy H (1999) A revised structure and hydrogen-bonding system in cellulose II from a neutron fiber diffraction analysis. *J Am Chem Soc* 121:9940–9946.
- Lin Y, Cho J (2009) Kinetics and mechanism of cellulose pyrolysis. *J Phys Chem C* 113:20097–20107.
- Lotmar W, Picken L (1950) A new crystallographic modification of chitin and its distribution. *Experientia* 6:58–59.
- Manley RSJ (1971) Molecular morphology of cellulose. *J Polym Sci Part A - 2* 9:1025–1059.
- Marchessault R, Pearson F, Liang C (1960) Infrared spectra of crystalline polysaccharides VI. Effect of orientation of the tilting spectra of chitin films. *Biochim Biophys Acta* 43:499–507.
- Marrinan H, Mann J (1956) Infrared spectra of the crystalline modifications of cellulose. *J Polym Sci* 21:301–311.
- Matthews J, Skopec C, Mason P (2006) Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I $\beta$ . *Carbohydr Polym* 341:138–152. doi: 10.1016/j.carres.2005.09.028
- Mazeau K (2011) On the external morphology of native cellulose microfibrils. *Carbohydr Polym* 84:524–532. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.016
- Mazeau K, Heux L, Uni V (2003) Molecular Dynamics Simulations of Bulk Native Crystalline and Amorphous Structures of Cellulose. *J Phys Chem B* 107:2394–2403.
- Mazeau K, Rivet A (2008) Wetting the (110) and (100) surfaces of I $\beta$  cellulose studied by molecular dynamics. *Biomacromolecules* 9:1352–1354. doi: 10.1021/bm7013872
- McLachlan J, McInnes AG, Falk M (1965) Studies on the chitin (chitin:poly-N-Acetylglucosamine) fibers of the diatom *Thalassiosira fluvitilis* Hustedt: I. Production and isolation of chitin fibers. *Canadian J Bot* 43:707–712.
- Meyer KH, Mark H (1928) Über den Bau des krystallisierten Anteils der Cellulose. *Berichte der Dtsch Chem Gesleeschaft* 61:593–614.

- Meyer KH, Misch L (1937) Position des atomes dans le nouveau modele spatial de la cellulose. *Helv Chim Acta* 20:232–244.
- Meyer KH, Pankow GW (1936) Sur la constitution et la structure de la chitine. *Helv Chim Acta* 18:589–598.
- Miiinke RAM, Blackwell J (1978) The Structure of  $\alpha$ -Chitin. *J Mol Biol* 120:167–181.
- Neville AC, Parry DAD, Woodhead-Galloway J (1976) The Chitin Crystallite In Arthropod Cuticle. *J Cell Sci* 82:73–82.
- Nishino T, Matsui R, Nakamae K (1999) Elastic Modulus of the Crystalline Regions of Chitin and Chitosan. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 37:1191–1196.
- Nishino T, Takano K, Nakamae K (1995) Elastic Modulus of the Crystalline Regions of Cellulose Polymorphs. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 33:1647–1651.
- Nishiyama Y, Isogai A, Okano T (1999a) Intracrystalline deuteration of native cellulose. *Macromolecules* 32:2078–2081.
- Nishiyama Y, Johnson GP, French AD, et al. (2008) Neutron crystallography, molecular dynamics, and quantum mechanics studies of the nature of hydrogen bonding in cellulose I<sub>beta</sub>. *Biomacromolecules* 9:3133–40. doi: 10.1021/bm800726v
- Nishiyama Y, Langan P, Chanzy H (2002) Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J Am Chem Soc* 124:9074–9082.
- Nishiyama Y, Noishiki Y, Wada M (2011) X-ray Structure of Anhydrous  $\beta$ -Chitin at 1 Å Resolution. *Macromolecules* 44:950–957. doi: 10.1021/ma102240r
- Nishiyama Y, Okano T, Langan P, Chanzy H (1999b) High resolution neutron fibre diffraction data on hydrogenated and deuterated cellulose. *Int J Biol Macromol* 26:279–83.
- Nishiyama Y, Sugiyama J, Chanzy H, Langan P (2003) Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose I<sub>r</sub> from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J Am Chem Soc* 125:14300–14306.



- Noishiki Y, Kuga S, Wada M, et al. (2004) Guest Selectivity in Complexation of  $\beta$ -Chitin. *Macromolecules* 37:6839–6842.
- Noishiki Y, Nishiyama Y, Wada M, et al. (2003) Inclusion Complex of  $\beta$ -Chitin and Aliphatic Amines. *Biomacromolecules* 4:944–949.
- Noishiki Y, Nishiyama Y, Wada M, Kuga S (2005) Complexation of  $\alpha$ -chitin with aliphatic amines. *Biomacromolecules* 6:2362–2364.
- Pearson F (1960) Infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. Chitin. *J Polym Sci* 43:101–116.
- Perdew J, Burke K, Ernzerhof M (1996) Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys Rev Lett* 77:3865–3868.
- Persson JE, Domard A, Chanzy H (1992) Single crystals of  $\alpha$ -chitin. *Int J Biol Macromol* 14:221–224.
- Petrov M, Lymperakis L, Friák M, Neugebauer J (2013) Ab Initio Based Conformational study of the crystalline  $\alpha$ -chitin. *Biopolymers* 99:22–34. doi: 10.1002/bip.22131
- Preston R, Astbury W (1937) The Structure of the Wall of the Green Alga *Valonia ventricosa*. *Proc R Soc London* 122:76–97.
- Preston R, Nicolai E, Reed R, Millard A (1948) An electron microscope study of cellulose in the wall of *Valonia ventricosa*. *Nature* 162:665–667.
- Prestron R (1974) *Physical Biology of Plant cell walls*. Chapman and Hall, London
- Raabe D, Romano P, Sachs C, et al. (2006) Microstructure and crystallographic texture of the chitin – protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Mater Sci Eng A* 421:143–153. doi: 10.1016/j.msea.2005.09.115
- Revol J (1989) Lattice resolution in  $\alpha$ -chitin. *Int J Biol Macromol* 11:233–235.
- Revol J (1982) On the cross-sectional shape of cellulose crystallites in *valonia ventricosa*. *Carbohydr Polym* 2:123–134.
- Revol J, Chanzy H (1986) High-Resolution Electron Microscopy of  $\beta$ -Chitin Micro fibrils. *Biopolymers* 25:1599–1601.

- Revol J, Gardner KH, Chanzy H (1988)  $\beta$ -Chitin: Molecular Imaging at 0.35-nm Resolution. *Biopolymers* 27:345–350.
- Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci* 31:603–632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
- Roche E, Chanzy H (1981) Electron microscopy study of the transformation of cellulose I into cellulose III in *Valonia III* in *Valonia*. *Int J Biol Macromol* 3:201–206.
- Rudall K (1963) The chitin/protein complexes of insect cuticles. *Adv In Insect Phys* 1:256–310.
- Rudall K, Kenchington W (1973) The chitin system. *Biol Rev* 49:597–636.
- Ruiz-Herrera J, Bartnicki-Garcia S (1974) Synthesis of cell wall microfibrils in vitro by a “soluble” chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Science* 186:357–359.
- Saito Y, Iwata T (2012) Characterization of hydroxyl groups of highly crystalline  $\beta$ -chitin under static tension detected by FT-IR. *Carbohydr Polym* 87:2154–2159. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.10.044
- Saito Y, Okano T, Chanzy H, Sugiyama J (1995) Structural study of  $\alpha$  chitin from the grasping spines of the arrow worm (*Saggita* spp.). *J Struct Biol* 114:218–228.
- Saito Y, Kumagai H, Wada M, Kuga S (2002) Thermally reversible hydration of  $\beta$ -chitin. *Biomacromolecules* 3:5–8.
- Saito Y, Okano T, Putaux J-L, et al. (1998) Crystallosoolvates of  $\beta$ -chitin and alcohols. In: Domard EA, Roberts G, Vårum K (eds) *Adv. Chitin Sci. II*. Jacques André Publishers, Lyon, France, pp 507–512
- Saito Y, Tomotake Y, Shida S (2007) Formation of a Lamellar Compound by Reaction of Acrylic Acid Crystallosoolvated in Highly Crystalline  $\beta$ -Chitin. *Biomacromolecules* 8:1064–1068.
- Sakamoto J, Sugiyama J, Kimura S, Imai T (2000) Artificial Chitin Spherulites Composed of Single Crystalline Ribbons of  $\alpha$ -Chitin via Enzymatic Polymerization. *Macromolecules* 33:4155–4160.
- Sakurada I, Nukushina Y, Itoh T (1962) No Title. *J Polym Sci* 57:651–660.
- Sarko A, Muggli R (1974) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. III. *Valonia* cellulose and cellulose II. *Macromolecules* 7:486–494.

- Sawada D, Nishiyama Y, Langan P, et al. (2012a) Direct determination of the hydrogen bonding arrangement in anhydrous  $\beta$ -chitin by neutron fiber diffraction. *Biomacromolecules* 13:288–291. doi: 10.1021/bm201512t
- Sawada D, Nishiyama Y, Langan P, et al. (2012b) Water in crystalline fibers of dihydrate  $\beta$ -chitin results in unexpected absence of intramolecular hydrogen bonding. *PLoS One* 7:e39376. doi: 10.1371/journal.pone.0039376
- Sawada D, Kimura S, Nishiyama Y, et al. (2013) The crystal structure of mono-ethylenediamine  $\beta$ -chitin from synchrotron X-ray fiber diffraction. *Carbohydr Polym* 92:1737–1742. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.025
- Shafizadeh F, Bradbury A (1979) Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. *J Appl Polym Sci* 23:1431–1442.
- Shahidi F, Arachchi J, Jeon Y (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci Technol* 10:37–51.
- Shih A, Yeh S-H, Lee S-C, Yang TR (2001) Structural differences between deuterated and hydrogenated silicon nitride/oxy-nitride. *J Appl Phys* 89:5355–5361.
- Shillito B, Koster A, Walz J, Baumeister W (1996) Electron tomographic reconstruction of plastic-embedded organelles involved in the chitin secretion process. *Biol Cell* 88:5–13.
- Shillito B, Lechaire JP, Childress J (1997) Diffraction Contrast Imaging of Extracellular Matrix Components Using Zero-Loss Filtering. *J Struct Biol* 92:85–92.
- Shillito B, Lubbering B, Lechaire JP, et al. (1995) Chitin localization in the tube secretion system of a repressurized Deep-Sea tube worm. *J Struct Biol* 114:67–75.
- Siemienieicz K (2007) Elucidating the biosynthesis of chitin filaments and their configuration with specific proteins and electron microscopy. *Macromol Biosci* 7:40–47. doi: 10.1002/mabi.200600180
- Sikorski P, Hori R, Wada M (2009) Revisit of  $\alpha$ -Chitin Crystal Structure Using High Resolution X-ray Diffraction Data. *Biomacromolecules* 10:1100–1105.
- Stipanovic AJ, Sarko A (1976) Packing Analysis of Carbohydrates and Polysaccharides. 6. Molecular and Crystal Structure of Regenerated Cellulose II. *Macromolecules* 9:851–857.

- Sugiyama J, Harada H, Uyeda N (1985) Lattice images from ultrathin sections of cellulose microfibrils in the cell wall of *Valonia macrophysa* Kutz. *Planta* 166:161–168.
- Sugiyama J, Harada H, Saiki H (1987) Crystalline morphology of *Valonia macrophysa* cellulose III<sub>1</sub> revealed by direct lattice imaging. *Int J Biol Macromol* 9:122–130.
- Sugiyama J, Vuong R, Chanzy H (1991) Electron Diffraction Study on the Two Crystalline Phases Occurring in Native Cellulose from an Algal Cell Wall. *Macromolecules* 24:4168–4175.
- Tanaka F, Iwata T (2006) Estimation of the Elastic Modulus of Cellulose Crystal by Molecular Mechanics Simulation. *Cellulose* 13:509–517. doi: 10.1007/s10570-006-9068-x
- Tanner SF, Chanzy H, Vincendon M, et al. (1990) High-Resolution Solid-state Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study of Chitin. *Macromolecules* 23:3576–3583.
- Tsekos I (1999) THE SITES OF CELLULOSE SYNTHESIS IN ALGAE: DIVERSITY AND EVOLUTION OF CELLULOSE-SYNTHESIZING ENZYME COMPLEXES 1. *J Phycol* 655:635–655.
- Vincent J, Wegst U (2004) Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct Dev* 33:187–199. doi: 10.1016/j.asd.2004.05.006
- Wada M (2002) Lateral Thermal Expansion of Cellulose I $\beta$  and III<sub>1</sub>. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 40:1095–1102. doi: 10.1002/polb.10166
- Wada M, Saito Y (2001) Lateral Thermal Expansion of Chitin Crystals. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 39:168–174.
- Wada M, Okano T, SUGIYAMA J (1997) Synchrotron-radiated X-ray and neutron diffraction study of native cellulose. *Cellulose* 4:221–232.
- Wada M, Chanzy H, Nishiyama Y, Langan P (2004) Cellulose III<sub>1</sub> crystal structure and hydrogen bonding by synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Macromolecules* 37:8548–8555. doi: 10.1021/ma0485585
- Wada M, Hori R, Kim U-J, Sasaki S (2010) X-ray diffraction study on the thermal expansion behavior of cellulose I $\beta$  and its high-temperature phase. *Polym Degrad Stab* 95:1330–1334. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.034

- Wanjuan T, Cunxin W, Donghua C (2005) Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. *Polym Degrad Stab* 87:389–394. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.08.006
- Whitney SEC, Gothard MGE, Mitchell JT, Gidley MJ (1999) Roles of Cellulose and Xyloglucan in Determining the Mechanical Properties of Primary Plant Cell Walls. *Plant Physiol* 121:657–663.
- Wohlert J, Bergensträhle-Wohlert M, Berglund L a. (2012) Deformation of cellulose nanocrystals: entropy, internal energy and temperature dependence. *Cellulose* 19:1821–1836. doi: 10.1007/s10570-012-9774-5
- Yui T, Nishimura S, Akiba S, Hayashi S (2006) Swelling behavior of the cellulose I $\beta$  crystal models by molecular dynamics. *Carbohydr Res* 341:2521–30. doi: 10.1016/j.carres.2006.04.051
- Zhang Z, Zhou F, Lavernia E (2003) On the analysis of grain size in bulk nanocrystalline materials via X-ray diffraction. *Metall Mater Trans A* 34:1349–1355.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官としてご指導いただきました空閑重則名誉教授、和田昌久准教授に御礼申し上げます。木村聡先生には、透過型電子顕微鏡の観察方法をはじめとした実験手法について大変丁寧なご指導を頂戴いたしました。ありがとうございました。フランス植物高分子研究所 (Cermav) の西山義春博士には、学部 4 年次より様々な場面でご指導を頂きました。特に Cermav 研究所滞在中は中性子線回折実験や理論計算法といった実際的な研究手法についてばかりでなく、研究に対する姿勢など大変多くのことを学ばせて頂きました。厚く御礼申し上げます。Cermav 研究所の Karim Mazeau 博士には、Cermav 研究所派遣時に受入研究者として温かく研究グループに迎えて頂き、また滞在中は分子動力学計算の基礎についてご教授いただきました。ありがとうございました。

Cermav 研究所の Laurent Heux 博士には、固体 NMR 測定に際してご助力を賜りました。また同研究所の Jean-Luc Putaux 博士には電子線回折法とクライオ電子顕微鏡法についてのご指導をいただきました。御礼申し上げます。農学国際専攻の斎藤幸恵准教授には、赤外分光法の測定に際してご協力を頂き、またデータの解釈についてもご指導いただきました。京都大学生存圏研究所の杉山淳司教授、今井友也准教授には、同研究所において高分解能観察と電子回折実験についてのご指導を頂きました。御礼申し上げます。フランス・ラウエーランジュバン研究所 (ILL) の Trevor Forsyth 博士をはじめとした D19 チームには、同研究所での中性子線回折実験に際してご協力を賜りました。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いただきました。富士フィルム株式会社の堀律子博士には、繊維 X 線回折実験のデータ取得に際してご協力頂きました。ありがとうございました。

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についてご指導いただきました。Cermav 研究所の Pan Chen 博士には、分子動力学計算を行なう上で様々なアドバイスを頂戴しました。両博士には、研究面でご協力いただいたばかりでなく、日常生活においても大変世話になりました。御礼申し上げます。

末筆ではありますが、博士号取得までの長期に渡って様々な場面でご助力を頂いた両親、祖父母に感謝いたします。

本研究は、日本学術振興会の特別研究員制度の援助のもとで行なわれた (DC1、23-2362)。第八章のシンクロトロン放射光 X 線回折実験は、SPring-8 の萌芽的研究支援制度の支援のもとに行なわれた (2012A1549)。

## 発表論文リスト

1. Ogawa Y, Kimura S, Wada M, Kuga S (2010) Crystal analysis and high-resolution imaging of microfibrillar  $\alpha$ -chitin from *Phaeocystis*. *J Struct Biol* 171:111–116. doi: 10.1016/j.jsb.2010.03.010
2. Ogawa Y, Hori R, Kim U-J, Wada M (2011a) Elastic modulus in the crystalline region and the thermal expansion coefficients of  $\alpha$ -chitin determined using synchrotron radiated X-ray diffraction. *Carbohydr Polym* 83:1213–1217. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.09.025
3. Ogawa Y, Kimura S, Wada M (2011b) Electron diffraction and high-resolution imaging on highly-crystalline  $\beta$ -chitin microfibril. *J Struct Biol* 176:83–90. doi: 10.1016/j.jsb.2011.07.001
4. Ogawa Y, Kimura S, Saito Y, Wada M (2012) Infrared study on deuteration of highly-crystalline chitin. *Carbohydr Polym* 90:650–657. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.05.092
5. Ogawa Y, Hidaka H, Kimura S, et al. (2013a) Formation and stability of cellulose–copper–NaOH crystalline complex. *Cellulose*. doi: 10.1007/s10570-013-9977-4
6. Ogawa Y, Kobayashi K, Kimura S, et al. (2013b) X-ray texture analysis indicates downward spinning of chitin microfibrils in tubeworm tube. *J Struct Biol* 184:212–6. doi: 10.1016/j.jsb.2013.10.008
7. Ogawa Y, Noda K, Kimura S, Kitaoka M, Wada M, (2013c) Facile preparation of lamella crystal of (1 $\rightarrow$ 3)-  $\beta$ -glucan by using extraction of *Euglena*. *Int. J. Biol. Macromol.* *In Press*
8. Oka D, Kobayashi K, Isobe N, Ogawa Y, et al. (2013) Enzymatic hydrolysis of wood with alkaline treatment. *J Wood Sci*. doi: 10.1007/s10086-013-1359-x
9. Sawada D, Ogawa Y, Kimura S, et al. (2013) Solid–solvent molecular interactions observed in crystal structures of  $\beta$ -chitin complexes. *Cellulose*. doi: 10.1007/s10570-013-0077-2
10. Wu M, Sawada D, Ogawa Y, et al. (2013) Crystalline alignment of metal ions templated by  $\beta$ -chitin ester. *Cellulose*. doi: 10.1007/s10570-013-0064-7