博士論文

論文題目　　水和多糖の構造と湿度および
温度変化に伴う結晶転移

氏　　名　　小林　加代子

目次

1. 序論 3
1.1. 多様な天然多糖とその存在形態 3
1.2. 多糖の結晶多形と水和構造 3
1.3. 水和構造を取る各多糖の結晶多形と結晶構造 4
1.3.1. セルロース 5
1.3.2. アミロース 7
1.3.3. キチン 10
1.3.4. β-1,3-グルカン 11
1.3.5. β-1,3-キシラン 12
1.4. 本研究の目的 12

2. β キチンの水和・脱水による結晶転移 14
2.1. 緒言 14
2.2. 実験方法 14
2.3. 結果と考察 16
2.3.1. シンクロトロン放射光 X 線繊維回折 16
2.3.2. 固体 ^{13}C NMR スペクトル 17
2.3.3. 水和・無水構造間の結晶転移 18
2.4. 結論 22

3. β-1,3-グルカンおよびキシランの水和・脱水による結晶転移 24
3.1. 緒言 24
3.2. 実験方法 24
3.3. 結果と考察 27
3.3.1. シンクロトロン放射光 X 線回折 27
3.3.2. 固体 ^{13}C NMR スペクトル 29
3.3.3. 水和・無水構造間の結晶転移 30
3.3.4. 吸着等温線と水和構造における水分子の化学量論 33
3.4. 結論 34

4. 水和セルロースの脱水によるセルロース II への結晶転移 36
4.1. 緒言 36
4.2. 実験方法 36
4.3. 結果と考察 38
4.3.1. シンクロトロン放射光 X 線繊維回折 38
4.3.2. 固体 ^{13}C NMR スペクトル 40
4.3.3. 乾燥による水和セルロースからセルロース II への転移 42
4.3.4. 高温に対する水和セルロースの安定性 46
4.4. 結論 47

5. 低温領域における水和パラミロンの熱膨張挙動と結晶転移 49
5.1. 緒言 49
5.2. 実験方法 49
5.3. 結果と考察 50
5.3.1. 300 K と 100 K における水和パラミロンのシンクロトロン放射光 X 線粉末回折.....50
5.3.2. 300 K から 100 K における水和パラミロンの熱膨張挙動 51
5.3.3. 水和パラミロンの室温相と低温相間の転移 52
5.3.4. 低温相の固体 ^{13}C NMR スペクトル.....54
5.4. 結論 55

6. 低温領域における A 型および B 型アミロースの熱膨張挙動と結晶転移.....56
6.1. 緒言 56
6.2. 実験方法 56
6.3. 結果と考察 57
6.3.1. 300 K と 100 K におけるアミロースのシンクロトロン放射光 X 線粉末回折.....57
6.3.2. 低温領域における A 型アミロースの熱膨張挙動.....59
6.3.3. 低温領域における B 型アミロースの熱膨張挙動.....61
6.4. 結論 62

7. 総括 64

参考文献 66

謝辞 75

発表論文 76

1.　序論

1.1.　多様な天然多糖とその存在形態

多糖は複数の糖分子がグリコシド結合によって連なった化合物の総称であり、タンパク質や核酸と並ぶ代表的な天然高分子のひとつである。植物細胞壁の主成分であるセルロース、植物の貯蔵物質である澱粉などは一般的にもよく知られた多糖であるが、その他にも動物、藻類、菌類、バクテリアに至るまであらゆる生物が多糖を有していることが知られている[1]。多糖の構造は構成要素、結合様式、分岐構造等によって分類され、その組み合わせ次第で無数の種類の多糖が存在し得る。実際、自然界に存在する多糖も多種多様であり、セルロースのような一種類の単糖と結合の繰り返し単位から成る単純な構造を持つものもあれば、アミロペクチンのように多くの分岐を有するもの、更にはバクテリアの持つ多糖のように複数の構成糖成分や結合で構成された上、脂質やアミノ酸が結合した非常に複雑で特異な構造を持つものもある。

自然界における多糖の役割も、細胞壁の構成成分、エネルギーの貯蔵物質、バイオフィルム、生理活性物質など多岐にわたる。従ってそれに応じて、フィブリル状、顆粒状、ゲル状、もしくは複合体のマトリックスの一部、溶解状態といった様々な形態で存在している。なかでも構造を支持する役割を担うフィブリル状の多糖や、貯蔵物質として蓄えられる顆粒状の多糖は、結晶性の固体として自然界に存在する。セルロース、澱粉、キチンといった豊富に存在する多糖の大部分がこれに相当するため、自然界に存在する多糖の大半をこのような結晶性多糖が占めているといえる。

1.2.　多糖の結晶多形と水和構造

同じ化学組成を持つ同一の物質であっても異なる結晶形を形成する現象を、結晶多形という。結晶多形は金属結晶からタンパク質結晶に至るまであらゆる結晶性物質で見られるものであり、当然そのなかには多くの多糖結晶も含まれる。各多糖についての詳細は次項に記すが、例えばセルロース、澱粉、キチンなどの場合は自然界に存在する段階において、生物種によって異なる二種類の結晶形が存在する。そしてさらに化学処理を施したり、抽出したものを再結晶化させたりすることによって、自然界には存在しない結晶形へと転移する場合がある。またβ-1,4-キシランやデキストランのように自然界においては非晶性、もしくは非常に結晶性の低い物質として存在する多糖であっても、精製して再結晶化させることにより結晶性を示すようになるものもある。

このような多糖の持つ様々な結晶形のなかには、水分子を含んだ状態で結晶化している

ものが存在する。無機塩やタンパク質結晶など親水性を有する化合物において水和構造は頻繁に見られる構造であり、親水性基である水酸基を多数持つ多糖も例外ではない。セルロース[2,3]、アミロース[4-6]、キチン[7,8]、β-1,3-グルカン[9]、β-1,4-キシラン[10]、β-1,3-キシラン[11]、β-1,4-マンナン[12]、α-1,3-グルカン[13]、α-1,3-マンナン[14]、デキストラン[15]、ニゲラン[16]など、ほぼ全ての主要な天然多糖において水和構造の存在が報告されている。水中に棲息する生物はもちろんのこと、陸上においても生物の細胞の内部は水分で満たされているため、自然界に存在する多糖の多くは水と隣り合って存在していることになり、天然多糖に水和構造を取るものが多いことは至極当然であるといえる。

1.3. 水和構造を取る各多糖の結晶多形と結晶構造

前述のように10種類を超える多糖について水和構造を持つことが知られているが、ここでは本研究の対象としたセルロース、アミロース、キチン、β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランの5種類の多糖（**Fig. 1-1**）に的を絞り、水和構造を中心とした結晶多形とその結晶構造について記す。セルロース、アミロース、β-1,3-グルカンはいずれもグルコースのみで構成された多糖であるが結合様式はそれぞれ異なり、セルロースはβ-1,4結合、アミロースはα-1,4-結合、β-1,3-グルカンはβ-1,3結合によって連なっている（**Fig. 1-1a, b, d**）。キチンはセルロースと同様にβ-1,4結合で連なっているが、*N*-アセチルグルコサミンを構成要素としているため、セルロースではグルコース環のC2位の部分にヒドロキシル基が結合しているのに対し、キチンではアセトアミド基が結合した構造となっている（**Fig. 1-1a, c**）。また、β-1,3-キシランはβ-1,3-グルカンと同様にβ-1,3結合を有しているが、構成要素はキシロース残基であるため、β-1,3-グルカンではC6位に結合しているヒドロキシメチル基がβ-1,3-キシランには存在しない（**Fig. 1-1d, e**）。

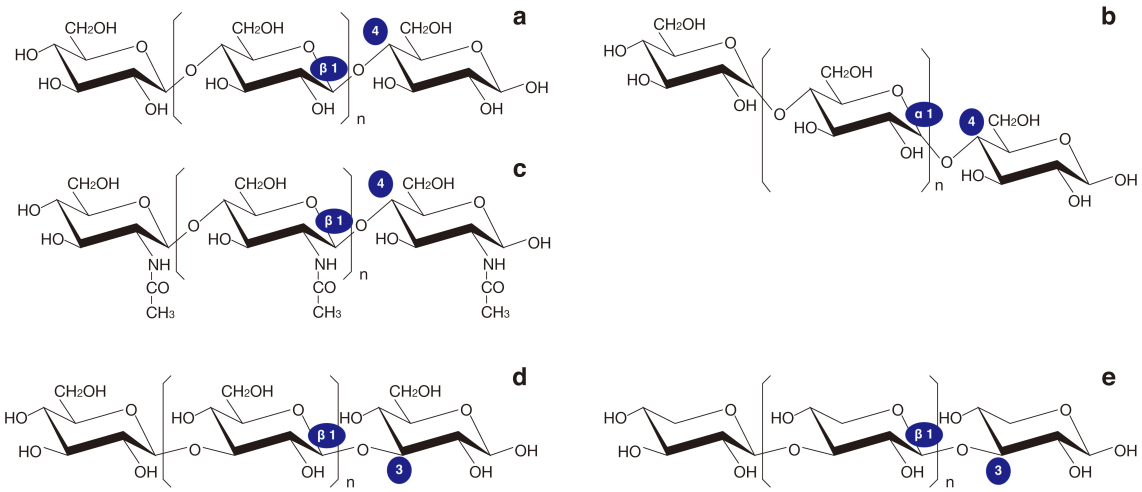

Fig. 1-1. Chemical structure of (a) cellulose, (b) amylose, (c) chitin, (d) β-1,3-glucan, and (e) β-1,3-xylan.

1.3.1. セルロース

植物や藻類において主要な細胞壁の支持体となっているセルロースは、結晶性のフィブリルとして自然界に存在している。このときセルロースが示す X 線の回折パターンはどの生物種においても同様であるため、1980 年代初頭まではセルロース I と呼ばれる一つの結晶形であると考えられていた。しかしながらその後、固体 ^{13}C NMR 法、FT-IR 法、電子線回折法によって天然セルロースはセルロース I_α、セルロース I_β と呼ばれる異なる二種類の結晶形から成ることが明らとなった [17-20]。セルロース I_α とセルロース I_β はどちらも全ての分子鎖が同じ方向を向いた平行鎖構造であり、横断面から見た構造は非常に類似している [21,22]。ただし、分子鎖に垂直な方向から見るとその配列様式が異なるため、単位格子は I_α（三斜晶：a = 6.717 Å, b = 5.962 Å, c = 10.400 Å, α = 118.08°, β = 114.80°, γ = 80.37°）、I_β（単斜晶：a = 7.784 Å, b = 8.201 Å, c = 10.380 Å, γ = 96.5°）と大きく異なる [21]。

セルロースの結晶形は二種類の天然セルロース以外にも、マーセル化や溶解・再生によって得られるセルロース II[23,24]、アンモニアやアミン処理で得られるセルロース III_I[25] などいくつか存在する。このうち、これまでに水和構造の存在が報告されているのはセルロース II に関連するもののみである（詳細は後述）。セルロース II の構造はセルロース I とは全く異なり、隣り合う分子鎖が異なる方向を向いた逆平行鎖構造のモデルが提案されている [23,24]。マーセル化によって得られたセルロース II の結晶構造モデルによると（**Fig. 1-2**）[24]、単斜晶の単位格子（a = 8.10 Å, b = 9.03 Å, c = 10.31 Å, γ = 117.10°）を持ち、単位格子の中心に位置した分子鎖（center 鎖）は還元末端が c 軸と逆方向、四隅に位置した分子鎖（corner 鎖）では還元末端が c 軸と同じ方向を向いている（**Fig. 1-2, left**）。*ab* 面を見ると、この center 鎖と corner 鎖は、[110]方向に疎水的な相互作用による分子鎖シートを形成しており、さらに分子鎖シート間には複数の水素結合が存在している（**Fig. 1-2, right**）。

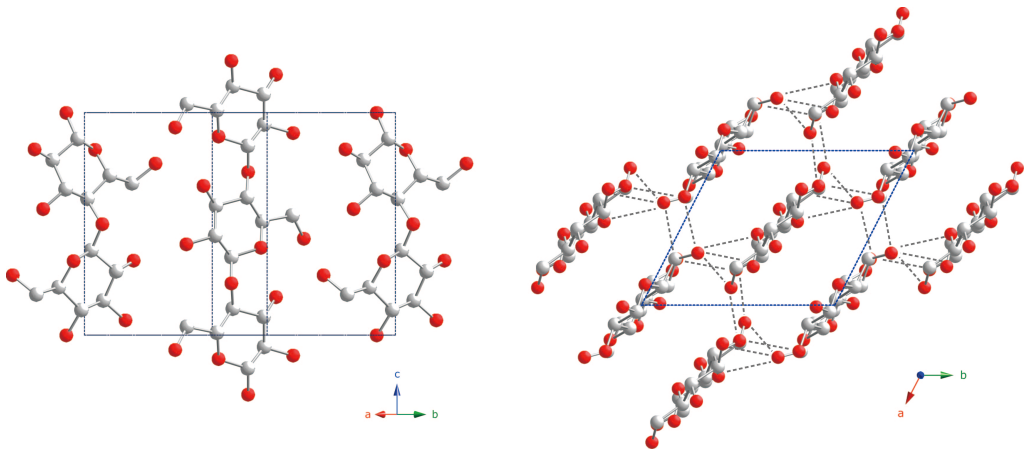

Fig. 1-2. Crystal structure of mercerized cellulose II proposed by Langan et al.[24].

セルロースに水和構造が存在することは、Sakurada と Hutino[26] によって初めて明らかにされた。現在では、2 つの異なる調製方法によってセルロースの水和構造が得られることがわかっている。1 つはアルカリセルロース IV と呼ばれるマーセル化の中間体であり [2]、もう 1 つはセルロース II 水和物と呼ばれ、セルロース II-ヒドラジン複合体を水洗して得られるものである [3]。

マーセル化とアルカリセルロース IV

マーセル化は、19 世紀にジョン・マーセルが発見したアルカリ溶液による天然セルロースの処理方法である [27]。マーセル化はセルロース繊維の光沢や機械的強度、染色性などを向上させるため、繊維工業において現在も用いられている。特定の濃度のアルカリ溶液を用いてマーセル化を行うと、天然セルロースの結晶形であるセルロース I_α と I_β は、アルカリセルロースと呼ばれるいくつかの中間体を介してセルロース II へと転移する [28]。

これらマーセル化の中間体については、X 線回折法 [2,29-34] や固体 ^{13}C NMR スペクトル法 [35-39] を用いて数多くの研究が行われてきた。現在、マーセル化の中間体については一般的に以下のように理解されている。まず、天然のラミーや綿などのセルロース繊維を 3–5 N NaOH 溶液に浸漬すると、アルカリ溶液がセルロース分子鎖間に侵入してアルカリセルロース I と呼ばれるアルカリイオン-水-セルロースの複合体が形成される。このアルカリセルロース I を十分な量の水で洗うと、結晶格子からアルカリイオンが取り除かれてアルカリセルロース IV と呼ばれる中間体に転移する。アルカリセルロース IV と名付けられているものの、実際には結晶格子中にアルカリイオンを含んではおらず、セルロース II の水和構造である。従って、乾燥によりアルカリセルロース IV がセルロース II へと転移し、これがマーセル化の最終過程となる。

Nishimura と Sarko[2] は、アルカリセルロース IV の結晶構造について X 線繊維回折法および立体化学的なモデリングの手法を用いて解析した。提案された結晶構造モデルは、空間群 $P2_1$、二本鎖単斜晶の単位格子（a = 9.57 Å, b = 8.72 Å, c = 10.35 Å, γ = 122.0°）に水分子と逆平行鎖のセルロース分子鎖が配列しているというものである（**Fig. 1-3**）。セルロース II の結晶構造に基づいて解析が行われているため、基本的にその構造はセルロース II と非常に類似したものとなっている

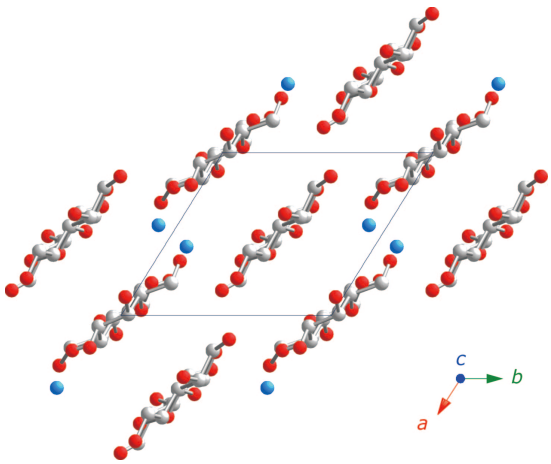

Fig. 1-3. Crystal structure of Na-cellulose IV proposed by Nishimura & Sarko[2].

が、単位格子の体積は水分子が占める体積分の影響でマーセル化セルロース II の単位格子[24]の体積に比べて約 9%大きい。また結晶格子中に含まれる水分子はグルコース 2 残基あたり 1 つであり、全ての水分子はセルロース分子鎖の corner 鎖間に規則正しく配列し、周囲のセルロース分子鎖と水素結合を形成している。

セルロース II 水和物

Lee と Blackwell[40]は、無水ヒドラジンにラミー由来のセルロースや再生セルロースを浸漬させて得られるセルロース-ヒドラジン複合体について研究を行い、セルロース II-ヒドラジン複合体を水洗してセルロース II に戻す際にその中間体としてセルロース II の水和構造（セルロース II 水和物）が得られることを報告した。その後、X 線回折法とセルロース II の構造を基にした立体化学的なモデリングにより結晶構造が解析されている[3]（**Fig. 1-4**）。得られた結晶構造モデルによると、単位格子は 2 本鎖の単斜晶（a = 9.02 Å, b = 9.63 Å, c = 10.34 Å, γ = 116.0°）、空間群 $P2_1$ であり、アルカリセルロース IV と同様にセルロース II の構造を基に解析が行われているために、セルロース II とほぼ同じような構造となっている。水分子は 1 グルコース残基あたり 1 分子が含まれているとされるが、これらは分子鎖シート間のどこに配置にしても解析の信頼度を示す信頼度因子が増加したために、分子鎖シート間にランダムに存在しているとされている。マーセル化セルロース II と比較したときの格子体積は、約 20%大きい。ただし、ここで報告されている単位格子はセルロース II やアルカリセルロース IV の単位格子の取り方とは異なっており（**Fig. 1-4**）、これらと同じように単位格子を取った場合には、単斜晶（a = 9.63 Å, b = 9.89 Å, c = 10.34 Å, γ = 125°）となる。

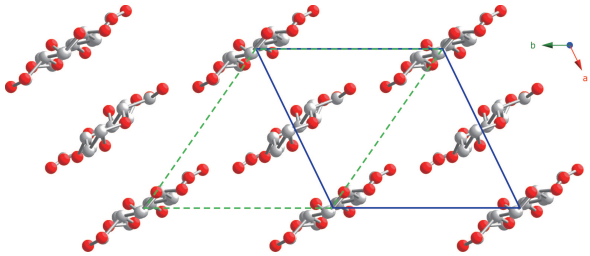

Fig. 1-4. Crystal structure of cellulose II hydrate proposed by Lee & Blackwell[3] with the original unit cell (solid line) and the unit cell chosen the same as cellulose II and Na-cellulose IV (dashed line).

1.3.2. アミロース

アミロースの結晶形は大きく分けて A 型、B 型、V 型に分類される。A 型および B 型結晶は天然の澱粉が有する結晶形であり、どちらも二重らせん構造である。さらに、A 型および B 型結晶はどちらも水和構造であり、水分子を失うと結晶性を保つことができない[41]。一方、V 型はアミロースが様々な化合物と複合体を形成して生じる結晶形の総称である。有名なヨウ素デンプン反応もこのアミロースが複合体を形成する一例であるが、アルコール類、脂質などアミロースと複合体を形成すると報告されているものはおよそ 80 種類にものぼる[42,43]。これら V 型結晶の中にも、DMSO やエタノールとの複合体を介して得られる

水和構造（V_h型）が存在する[6,44]。

澱粉粒の持つ結晶形：A 型結晶と B 型結晶

植物の貯蔵多糖である澱粉は主にアミロースとアミロペクチンという二種類の多糖から成る。アミロースとアミロペクチンはどちらも基本的にはα-1,4-グルカンであるが、アミロースは直鎖状、もしくは分岐があっても極僅かであるのに対し、アミロペクチンはα-1,6-結合を介した高度な分岐構造を持つ。澱粉の高次構造は非常に複雑であり、未だ完全に明らかになってはいないが、古くから様々な分析方法により研究が進められ、徐々にその構造が解き明かされている[45,46]。

澱粉粒は半結晶性の物質であり、非晶領域と結晶領域が存在する。さらに澱粉粒を観察すると growth ring と呼ばれる年輪状の構造が見られる。このような構造を説明するためのモデルとして、現在では **Fig. 1-5** のようなものが最も広く用いられている。このモデルによると澱粉の結晶性を与えているのはアミロペクチンの短鎖部分であり、隣り合う短鎖同士が二重らせんを形成し、さらに隣り合う二重らせん同士が凝集して結晶を形成している。そして、この結晶領域の結晶形が由来する植物によって異なり、トウモロコシや麦などイネ科の植物では A 型、イモ類など塊茎や根茎では B 型、マメ科の植物などでは A 型と B 型が混在（C 型とも呼ばれる）する。

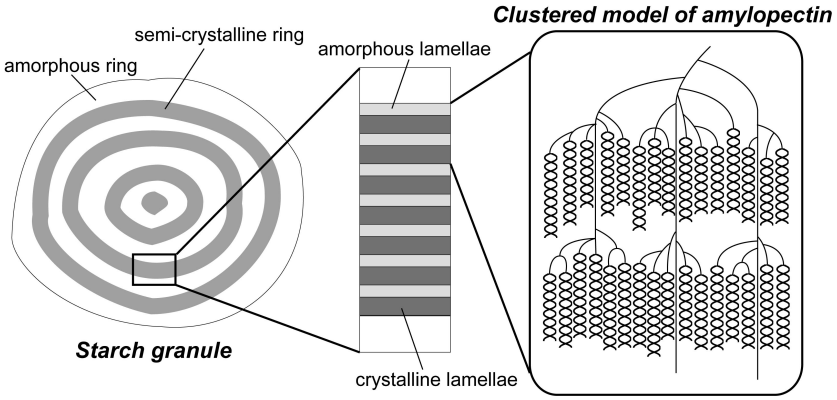

Fig. 1-5. Schematic model of starch granule[45].

A 型および B 型の結晶構造

以上のような構造を持つ澱粉は結晶性が低く、結晶構造の解析を行うのは難しい。そこで結晶構造を解析するために用いられて来たのがアミロース結晶である。天然の澱粉中では結晶の形成に関与していないと考えられているアミロースだが、再結晶化により A 型および B 型結晶を形成する。特にアセチル化によって得られるゲルを引っ張ることにより作成した配向試料[47]や、分子量の小さい短鎖アミロースから得られる単結晶[48]は構造解析において大きな威力を発揮してきた。

A 型結晶の構造は、1978 年に配向試料の X 線繊維回折図を用いた解析により初めてモデルが提案され [49]、その後は主に単結晶の電子線回折による構造の解析が行われてきた [50,51]。そして 2009 年には、X 線のマイクロビームを用いた単結晶の構造解析が行われ、その構造が完全に明らかにされた [4]（**Fig. 1-6**）。このモデルによると、単位格子は単斜晶（a = 20.8 Å, b = 11.5 Å, c = 10.6 Å, γ = 122°）、空間群 $B2$ であり、全ての分子鎖が同一の方向を向いた平行鎖構造で、6 グルコース残基で一周期の左巻き二重らせん構造となっている。この新しく提案されたモデルには、それまでに提案されていたモデル [50] と異なる点が幾つかあり、単位格子に対する分子鎖方向が逆であること（非還元末端側が c 軸方向を向く）、結晶中に含まれる水分子の数が 2 倍（グルコース 3 残基に対し水分子 2 個）であること、また二重らせんが正六角形状ではなく b 軸方向に少し押し潰したような形であることなどが明らかとなった。

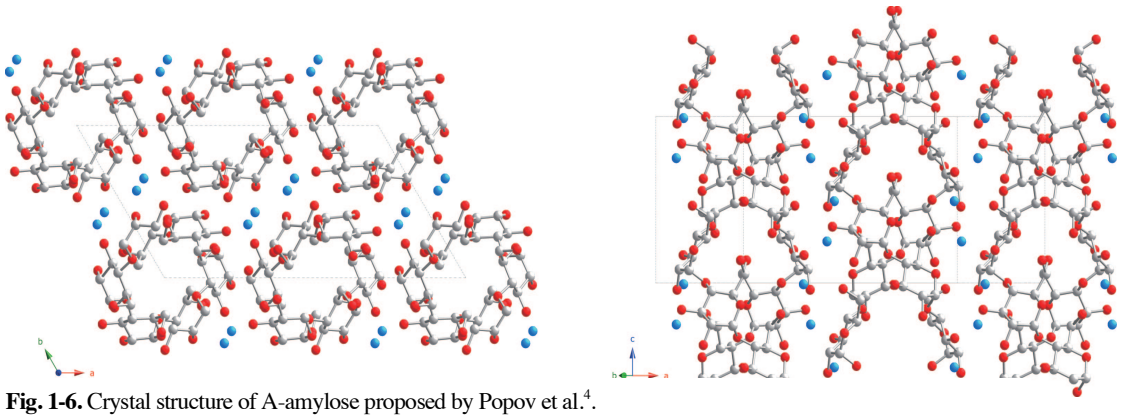

Fig. 1-6. Crystal structure of A-amylose proposed by Popov et al.[4].

一方、B 型結晶の構造は 1944 年に初めてモデルが提案され [52]、その後も主に配向試料を用いた X 線繊維回折測定により、幾つもの結晶構造モデルが提案されてきた [5,53-59]。2004 年に Takahashi らによって提案された最も新しいモデルも同様に配向試料の X 線繊維回折によ

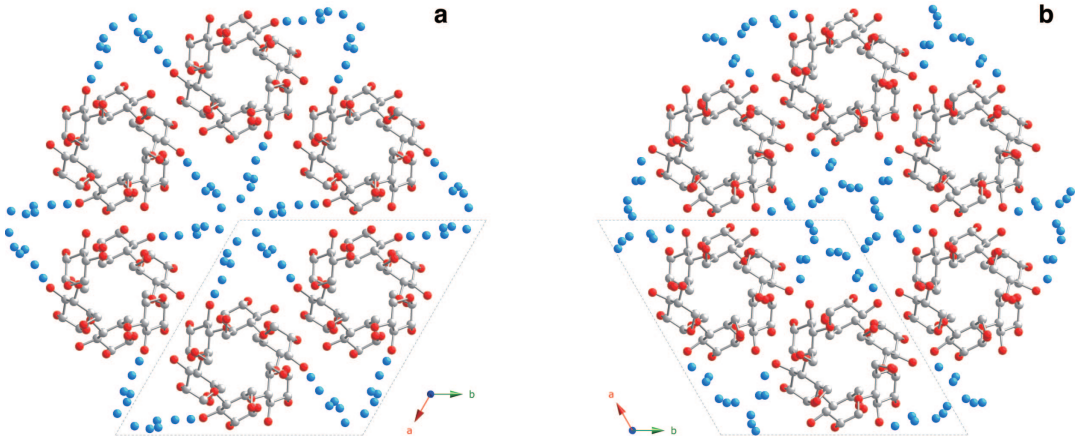

Fig. 1-7. Crystal structure of B-amylose proposed by (a) Takahashi et al.[5] and (b) Imberty & Perez[59].

り得られたもので、単位格子は六方晶（a = 18.52 Å, c = 10.57 Å）、空間群 $P6_1$-C_6^2、A 型と同様に平行鎖であり、6 グルコース残基で一周期の左巻き二重らせん構造であるとされている[5]（**Fig. 1-7a**）。結晶構造中に含まれる水分子の数は 1 グルコース残基あたり 3 つとされており、A 型結晶よりかなり多くの水分子が含まれていることになる。1988 年に Imberty と Perez によって提案されたモデル[59]（**Fig. 1-7b**）と比較すると、アミロース分子鎖の二重らせん構造についてはほぼ同じであるが、水分子の配置が両者では全く異なっている。またこの 2 つのモデルでは c 軸に対する還元末端の方向が逆であるが、六方晶であるために実際の構造には無関係である。

1.3.3. キチン

天然に存在するキチンは α キチン、β キチンと呼ばれる二種類の構造に分けられる[60,61]。α キチンは甲殻類や昆虫の殻などに豊富に存在するのに対し、β キチンはイカの腱，珪藻の棘条，ハオリムシの棲管など極一部の生物のみに存在する。

α キチンの結晶構造については無水構造のみが知られており、隣り合う分子鎖の向きが異なる逆平行鎖構造であるといわれている[62,63]。一方、β キチンの結晶構造には無水構造と 2 種類の水和構造があることが Blackwell によって報告された[55]。さらに、β キチンは水分子以外にも小さな分子（アルコール、アミン等）を取り込み、複合体を形成するという特殊な性質を持つことがわかっている[64-68]。

β キチンの結晶構造については、最近まで 1975 年に Gardner & Blackwell が提案した無水構造のモデルが報告されているのみであった[69]。しかしこの数年、無水構造および二水和構造について X 線回折および中性子線回折による構造解析が行われ、水素原子を含む全ての原子の位置が詳細に検討された結晶構造モデルが提案された[8,70,71]（**Fig. 1-8**）。無水構造のモデルによると、α キチンとは対照的に β キチンは平行鎖構造であり、単斜晶（a = 4.820 Å, b = 9.247 Å, c = 10.390 Å, γ = 97.21°）の単位格子を持つ[70]。そして ac 面に水素結合および疎水的相互作用によって分子鎖シートを形成しているが、この分子鎖シート間には水素結合が

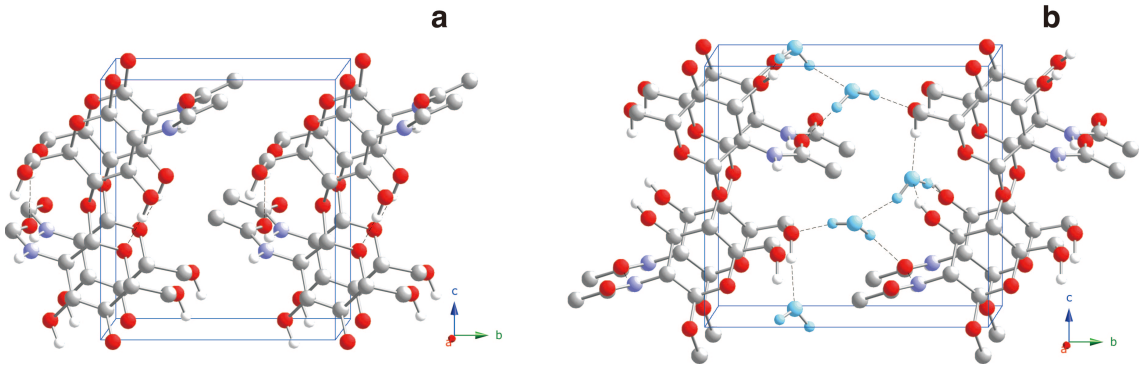

Fig. 1-8. Crystal structure of (a) anhydrous β-chitin[71] and (b) dihydrate β-chitin[8].

存在しない[71]（**Fig. 1-8a**）。このような構造的な特徴を有しているがゆえに、β キチンはこの分子鎖シート間に様々な化合物を取り込むことができると考えられている。実際、Sawada らの二水和構造のモデルにおいても分子鎖シート構造は無水構造とほぼ変わらない形で存在しており、単位格子は単斜晶（a = 4.814 Å, b = 11.167 Å, c = 10.423 Å, γ = 96.45°）と無水構造に比べて b 軸が大幅に長く、分子鎖シート間に *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）残基あたり 2 つの水分子が配列した構造となっている[8]（**Fig. 1-8b**）。ただし、水分子とキチン分子鎖、もしくは水分子同士が水素結合を形成しており、水素結合様式は無水構造とは大きく異なっている。

1.3.4. β-1,3-グルカン

β-1,3-グルカンは、菌類、バクテリア、藻類、植物などの非常に多くの生物種に存在する多糖である[72]。ただし、多くの生物が持つ“β-1,3-グルカン”はβ-1,6-結合を介した分岐を持っていたり、β-1,4-結合が含まれていたりするため、直鎖状で純粋なβ-1,3-グルカンを持つ生物は数少ない。その数少ない純粋なβ-1,3-グルカンのなかでも代表的なものが、*Alkaligenes* 属のバクテリアが菌体外に生産するカードラン[73]、ミドリムシの貯蔵多糖であるパラミロンである[74]。

天然のカードランとパラミロンは異なる結晶形を示す。天然のカードランは水和構造であるが、非常に低結晶性であるためにその詳しい構造については未だ定説がなく、7/1 三重らせんや 6/1 一重らせんといった複数のモデルが存在する[75-77]。しかしながら、カードランを水中でアニーリングする（密閉状態で約 140℃で処理する）と高結晶性の異なる結晶形へと変化し、その結晶形には水和構造と無水構造が存在する[78]。カードランとは対照的にパラミロンは非常に結晶性の高い物質であるが、パラミロンはこのアニーリングしたカードランと同様の結晶形を持つ[79]。

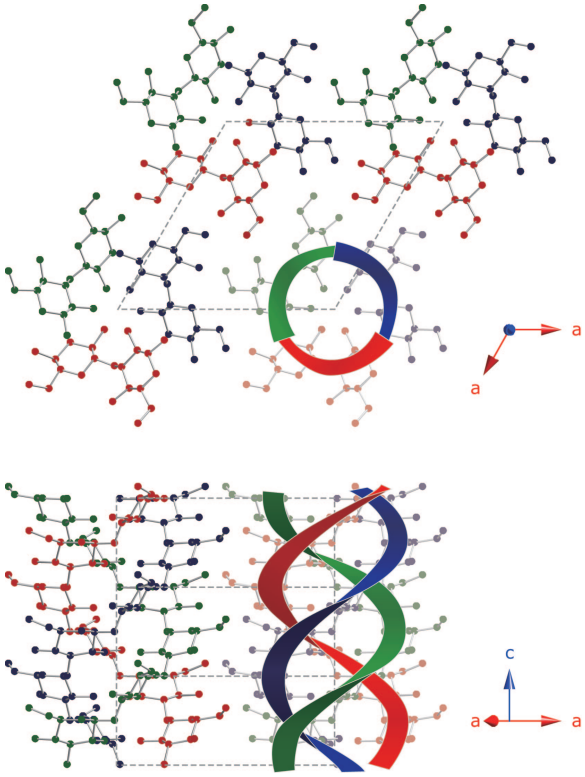

Fig. 1-9. Triple helical model of anhydrous β-1,3-glucan proposed by Deslandes et al[80].

アニーリングしたカードランおよびパラミロンが有する結晶形ついては、X 線回折と立体化学的なモデリングを組み合わ

せた解析により、無水構造・水和構造ともに三重らせんモデルが提案されている [9,80]。無水構造のモデルによると（**Fig. 1-9**）、右巻きの 6/1 三重らせんが六方晶の単位格子（a = 14.41 Å, c = 5.87 Å）中に c 軸方向をらせん軸として配列している。全ての分子鎖の向きが等しい平行鎖構造であり、空間群は $P6_3$ とされている [80]。一方、水和構造も無水構造と同様の三重らせんが六方晶の単位格子（a = 15.56 Å, c = 18.78 Å）に配列した構造である。ただし、1 グルコース残基あたり 2 つの水分子が三重らせん間に配列するために a 軸が無水構造よりも長くなっている。さらに、c 軸は無水構造の 3 倍に相当する三重らせんの一周期分、空間群は $P1$（ただし水分子を除くと $P3$ に近い）であると報告されており、無水構造と比較して対称性の低い構造となっている [9]。

1.3.5. β-1,3-キシラン

β-1,3-キシランは、一部の緑藻や紅藻に存在することが知られている [81]。特に、*Bryopsis* 属、*Caulerpa* 属、*Udotea* 属、*Penicillus* 属などイワヅタ目の緑藻には、細胞壁が主にフィブリル状のβ-1,3-キシランで構成されているものがある [82]。すなわちこのような緑藻において、β-1,3-キシランは植物におけるセルロースと同様の役割を担っている。

β-1,3-キシランの結晶構造は、このようなフィブリル状のβ-1,3-キシランのなかでも比較的高い結晶性を示し、さらに内壁では細胞壁の長軸方向にフィブリルが配向している *Penicillus dumetosus* を用いて研究が行われてきた [11,82-84]。1964 年に Frei と Preston は *Penicillus dumetosus* の内壁から得られた X 線繊維回折図を用いて、β-1,3-キシランには水和構造と無水構造が存在し、それぞれ六方晶の単位格子（水和 : a = 15.4 Å, c = 6.12 Å、無水 : a = 13.7 Å, c = 5.85 Å）を持つことを報告した [82]。その後、この X 線回折図を用いた更なる解析が行われ、立体化学的なモデリングや赤外分光法による解析の結果と合わせて、水和構造の結晶構造モデルが提案された [11,84]。このモデルによると、空間群は $P6_3$、平行鎖構造であり、キシラン分子鎖は右巻きの 6/1 三重らせんを形成して、その三重らせん間に 1 キシロース残基あたり 1 分子の水が配列している。Atkins らの論文に掲載された原子座標 [11] ではこの提案されているモデルを再現することができないため、ここではモデル図を示すことは省略するが、この三重らせんモデルはβ-1,3-グルカンの三重らせんモデルと非常に類似している（**Fig. 1-9**）。また、この Atkins らの三重らせんモデルは分子鎖のエネルギー計算による解析によって支持されているが [85]、 X 線回折図の再解析 [86] や量子力学計算による解析 [87] では、このモデルとは異なる水素結合様式が提案されている。

1.4. 本研究の目的

以上のように、様々な多糖が水和構造の形を取り得ることについては、これまでに多数の研究によって明らかにされてきた。固体構造とその物質が示す物性は密接な関係にある

ため、結晶性物質を扱う際にはその結晶構造を理解することが非常に重要である。特に水和構造を取ることが可能な結晶については、特殊な処理を行わずとも周囲の環境次第で大気中の水分を取り込んだり、あるいは水分子を放出したりするだけで構造が変化する可能性があり、十分に注意を払わなければならない点である。実際、薬学の分野では薬剤が水和物であるか無水物であるかにより、溶解性、溶解の速度、安定性等が変化してしまうとして、古くから水和構造とその性質についての研究が盛んに行われている[88, 89]。一方、豊富なバイオマス資源である多糖類は、その有効な利用に向けた応用研究が盛んに行われるようになっているが、水和構造の安定性、水和／無水構造間の転移機構について詳細な検討が行われた例は数少ない。

そこで本研究では、5 種類の水和多糖（キチン、β-1,3-グルカン、β-1,3-キシラン、セルロース、アミロース）について、相対湿度変化および温度変化に伴う結晶構造の変化を主に X 線回折測定を用いて観測することにより、結晶転移がどのような条件で、どのように進行するのかを明らかにすることを試みた。またこの 5 種類のいずれの水和多糖についても結晶構造モデルが提案されているが、解析が行われたのがかなり以前であったり、解析に用いられた試料の結晶性が不十分であったりと、モデルの信頼性が十分でないものが多い。従って本研究では、いずれの多糖についても非常に結晶性の高い試料を調製し、シンクロトロン放射光 X 線回折測定や固体 ^{13}C NMR 測定を行うことによってその結晶構造についても検討することにした。

2. βキチンの水和・脱水による結晶転移

2.1. 緒言

1.3.3.で述べたように、βキチンの二水和構造は 2012 年に Sawada らによって決定された[8]。しかし、1969 年に Blackwell がβキチンに水和構造が存在することを報告して以来[7]、長い間その構造は明らかにされてこなかった。その一因としては、一旦乾燥させた試料を再度湿潤させて用いるといった試料の調製段階、もしくは試料の測定時の条件に問題があったために、水和と無水あるいは一水和と二水和の構造が混在したデータが得られてしまったということが挙げられる。従って本研究では、高結晶性の β キチンを持つことで知られるハオリムシの一種、サツマハオリムシ（*Lamellibrachia satsuma*）の棲管を採取して未乾燥試料を調製することにより、天然の状態におけるβキチンはどのような結晶構造であるのか、もしくはこれを乾燥・再湿潤させた場合に結晶構造はどのように変化するのかを調べることにした。また本研究では相対湿度（RH）を調節しながら X 線回折測定を行うことにより、乾燥と湿潤による β キチンの結晶転移を詳細に観測することを試みた。

2.2. 実験方法

2.2.1. 試料調製

サツマハオリムシ（*Lamellibrachia satsuma*）を無人探査機「ハイパードルフィン」（JAMSTEC）によって鹿児島湾の水深約 100 m において採取した。採取したハオリムシの棲管は水洗して虫体を取り除き、長さ約 3 cm に切った後に Sugiyama らの方法[19]でタンパク質を除去した。精製した試料は、4℃で水中に保存した。

2.2.2. シンクロトロン放射光 X 線繊維回折測定

精製した棲管から薄膜を剥離し、薄膜の一方に重りを吊るして飽和蒸気圧下で引っ張ることによってキチンミクロフィブリルの配向を向上させた。厚さ約 200 μm の配向試料は水中で試料ホルダーに固定し､X 線回折実験に供する直前まで水中に保存したものを未乾燥試料、P_2O_5 のデシケータ中で保存したものを乾燥試料、乾燥試料をさらに K_2SO_4 の飽和塩水溶液を入れたデシケータ（RH = 98%）中に保存したものを再湿潤試料とした。

シンクロトロン X 線繊維回折測定は高輝度放射光施設 SPring-8 のビームライン BL38B1 で行った。配向試料をゴニオヘッドにマウントし、波長 1.0 Å のシンクロトロン放射光を入射した。測定時、未乾燥試料と再湿潤試料に対しては RH = 100%、乾燥試料に対しては RH = 0%に湿度発生機（Shinyei SRG-1R）によって調湿した空気を 1 L/min で吹き付けた。繊維回折図はイメージングプレート（R-Axis V, Rigaku）に記録し、試料と IP の距離は Si 粉末

の面間隔（d = 3.1355 Å）を用いて補正した。各回折のピーク位置は R-Axis display software（Rigaku）を用いて測定し、指数付けを行った後に最小二乗法によって単位格子を決定した。

2.2.3. 固体 CP/MAS ^{13}C NMR スペクトル測定

精製した棲管をホモジナイザーで解繊し、遠心分離によって沈殿物を回収した。これを固体 ^{13}C NMR 測定に供する直前まで水中に保存したものを未乾燥試料、P_2O_5 のデシケータ中で保存したものを乾燥試料、乾燥試料をさらに K_2SO_4 の飽和塩水溶液を入れたデシケータ（RH = 98%）中に保存したものを再湿潤試料とした。

固体高分解能 ^{13}C NMR 測定には Chemagnetics CMX 300 分光器（^{13}C の共鳴周波数は 75.6 MHz）を使用した。試料管にはジルコニア製の直径 7.5 mm 径を用い、速度 3.5–4.5 kHz でマジック角回転させた。観測には交差分極 (CP) 法を用い、^{1}H の 90°パルス幅は 4.8 または 5.0 ms とし、^{1}H-^{13}C 接触時間は 1.0 ms とした。信号を取り込む間隔は 3 s に設定した。化学シフト値の基準にはアダマンタンを用いた。なお、未乾燥試料、再湿潤試料の測定に関しては、測定中の乾燥を防止するため、テフロン製のキャップで試料管を密栓した。スペクトルは、非線形最小二乗法プログラムを用い、各ピークを Lorentz 関数に近似してピーク分離した。

2.2.4. シンクロトロン放射光 X 線回折測定による結晶転移の観測

X 線回折による水和・無水構造間の結晶転移は、上記と同様の設定で SPring-8 のビームライン BL38B1 において観測した。未乾燥試料を RH = 90%で測定した後、相対湿度を 10%ずつ減少させながら RH = 0%まで各相対湿度において測定を行った。相対湿度を変化させてから測定までは 15 分間おき、相対湿度を安定させた。RH = 0%まで乾燥させた試料は、続いて相対湿度を 10%ずつ上昇させながら 100%まで測定し、最後に水を数滴垂らしてから測定を行った。測定中の温度は約 23℃であった。

得られた繊維回折図から R-Axis display software（Rigaku）を用いて赤道および子午線方向の X 線回折プロファイルを得た。回折プロファイルは Wada らの方法 [90] によってピーク分離を行い、各回折ピークの位置を決定した。このピーク位置から求めた面間隔から最小二乗法により単位格子を求めた。

2.2.5. 水の吸着等温線測定

相対湿度が約 10 %間隔になるように 9 種類の調湿塩を選び、これらの飽和塩水溶液を入れたデシケータで試料を調湿することによって、乾燥過程および湿潤過程の重量変化を調べた。調湿塩は、Na_2SO_3 (RH = 95%), KCl (RH = 85 %), NaCl (RH = 76 %), $NaNO_2$ (RH = 66 %), $Ca(NO_3)_2$ (RH = 54 %), $Zn(NO_3)_2$ (RH = 42 %), $MgCl_2$ (RH = 33 %), CH_3COOK (RH = 21 %), LiCl (RH = 11 %) を用いた。RH = 0 % には P_2O_5 を入れたデシケータを用いた。測定は 23℃

の恒温室で行い、重量変化がなくなったときの重量を各湿度における試料の重量とした。

2.3. 結果と考察

2.3.1. シンクロトロン放射光 X 線繊維回折

未乾燥試料、乾燥試料、再湿潤試料はそれぞれ異なる 3 種類の X 線回折パターンを示した（**Fig. 2-1**）。まず未乾燥試料から得られた天然の水和構造の X 線繊維回折図を **Fig. 2-1a** に示す。各回折ピークは非常に鋭く、高解像度の回折図を得ることができた。全ての回折点は単斜晶の単位格子（a = 4.80 Å, b = 11.15 Å, c = 10.44 Å, γ = 96.39°）で指数付けされた。これは Sawada らが報告した二水和構造の値[8]とほぼ一致した。

二水和構造を乾燥させると、**Fig. 2-1b** に示す無水構造の X 線繊維回折図が得られた。この回折図から求めた無水構造の単位格子は、単斜晶（a = 4.82 Å, b = 9.20 Å, c = 10.38 Å, γ = 97.05°）であり、これまでに報告されている無水構造の単位格子[69,70]と一致した。また回折ピークは未乾燥試料には劣るものの非常に鋭く、高い結晶性を保っていた。

一方、乾燥試料を相対湿度 100%で再湿潤させた試料からは、**Fig. 2-1c** に示すような回折図が得られた。二水和構造と回折パターンは類似しているが（**Fig. 2-1a**）、各回折点の幅はやや広がり、広角側の回折点が不明瞭になった。これは、脱水／再水和する過程で結晶性や結晶サイズが低下したことを意味していると考えられる。赤道上の最も内側の回折点は d = 10.28 Å に現れた。この値は二水和構造の(010)面（d = 11.03 Å）と無水構造の(010)面（d = 9.14 Å）の中間であり、再湿潤構造が二水和構造よりも水和水の少ないもう一つの水和構造、おそらく一水和構造であることを示唆していた。子午線上の回折点については、00l の l が奇数の回折点は観測されず、002 の強度が強い一方で 004 が弱いことから、$P2_1$ の対称性を持ち繊維軸方向に分子鎖のずれがない（non-stagger）構造であることがわかった。これは、二水和構造および無水構造と同様である。しかし、二水和構造や無水構造と同様に回折点を一本鎖の単斜晶で指数付けすること

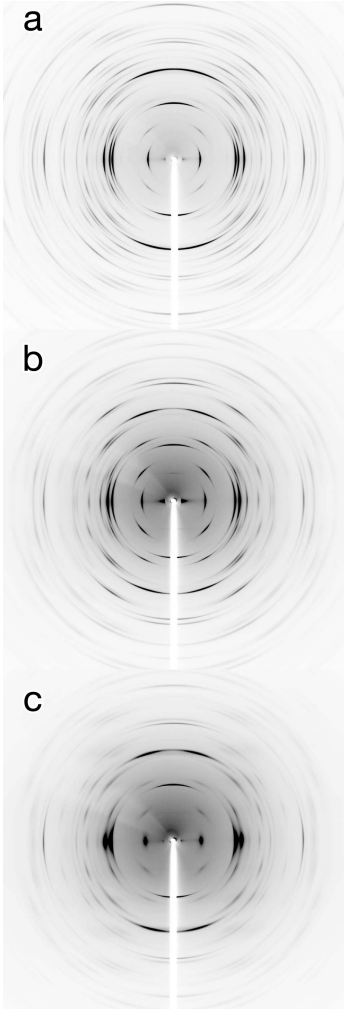

Fig. 2-1. Synchrotron X-ray fiber diffraction diagrams of (a) dihydrate, (b) anhydrous, and (c) monohydrate β-chitin obtained from never-dried, dried, and rehydrated samples, respectively.

はできず、単位格子を決定することはできなかった。

2.3.2. 固体 ^{13}C NMR スペクトル

シンクロトロン繊維 X 線回折で用いた天然の水和構造、無水構造、再湿潤構造に相当する試料の固体 ^{13}C NMR スペクトルをそれぞれ **Fig. 2-2** に示す。また、これらのスペクトルのピーク位置から求めた各炭素原子の化学シフトを **Table 2-1** に挙げる。二水和構造と無水構造のスペクトル（**Fig. 2-2a, b**）は、ピーク幅が非常に小さく、C2 とカルボニルの炭素由来の共鳴線以外は全て一本のピークとして観測された。C2 とカルボニルのピークが非対称に 2 本に割れるのは、アセトアミド基の ^{14}N 原子に直接結合しているために生じる ^{13}C–^{14}N の相互作用が原因であるといわれている[91]。従ってこれらの結果は、二水和構造と無水構造の結晶内で各炭素原子はすべて等価である、すなわち非対称単位は *N*-アセチルグルコサミン残基 1 つであることを示していた。さらに、二水和構造と無水構造の各炭素原子の化学シフトの差は最も大きいものでも 1.4 ppm であり、非常に僅かであった（**Table 2-1**）が、これは両構造の分子鎖のコンフォメーションは非常に似ていることを意味していると考えられる。以上の結果は、すべて X 線回折によって決定された二水和構造および無水構造のモデルと一致するものであった[8,70]。

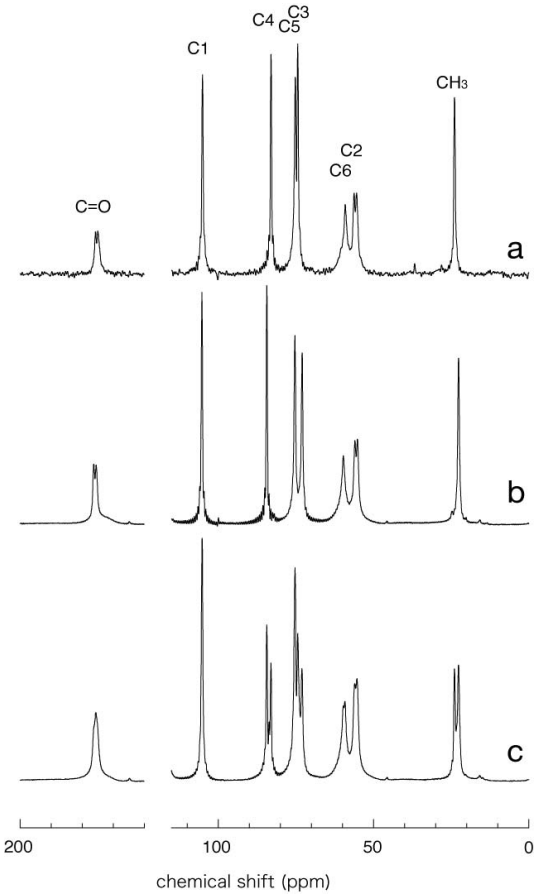

Fig. 2-2. Solid-state CP/MAS ^{13}C NMR spectra of β-chitin; samples (a)–(c) are the same as **Fig. 2-1**. The assignment of the carbon atoms is derived from Tanner et al.[91].

一方で、再湿潤構造のスペクトルを見ると C3、C4、C6、メチル基の炭素に由来する共鳴線も 2 本のピークに分離していた（**Fig. 2-2c**）。これは非対称単位に 2 つの *N*-アセチルグルコサミン残基が含まれることを示唆していた。また全ての炭素の化学シフトは天然の水和構造と無水構造の中間、またはこれらとほぼ同じ値であった（**Table 2-2**）。X 線繊維回折の結果と合わせて考えると、再湿潤構造は天然の水和構造と無水構造の中間的な構造にあたり、単位格子はおそらく 2 本の分子鎖を含む。そして、そのうちの 1 本は天然の水和構造、もう 1 本は無水構造に近いコンフォメーションを取っているのではないかと考えられる。

Table. 2-1. ^{13}C chemical shifts recorded from dihydrate, anhydrous, and monohydrate β-chitin.

sample	chemical shifts (ppm)							
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	CH_3	C=O
dihydrate	105.1	55.4	74.4	83.0	75.3	59.1	23.9	174.9
		56.3						175.8
anhydrous	105.3	55.2	73.0	84.4	75.4	59.8	22.6	175.5
		56.0						176.4
monohydrate	105.2	55.3	73.1	83.1	75.3	59.1	22.6	175.5
		56.2	74.3	84.4		59.6	23.9	176.4

3 つ全ての試料について、C6 の化学シフトは 59.1–59.8 ppm の範囲内であった（**Table 2-1**）。Horii ら [92] は C6 の化学シフトと第一級ヒドロキシル基の相関について報告しており、これによると天然の水和構造、無水構造および再湿潤構造のヒドロキシメチル基のコンフォメーションは全て *gg* であるということになる [93]。この結果も、X 線回折により提案されている二水和構造および無水構造のモデルと一致していた [8,70]。

2.3.3. 水和・無水構造間の結晶転移

相対湿度を変化させながらシンクロトロン X 線回折測定を行うことにより、β キチンの水和・無水構造間の結晶転移を観測した。未乾燥試料の乾燥過程における赤道方向および

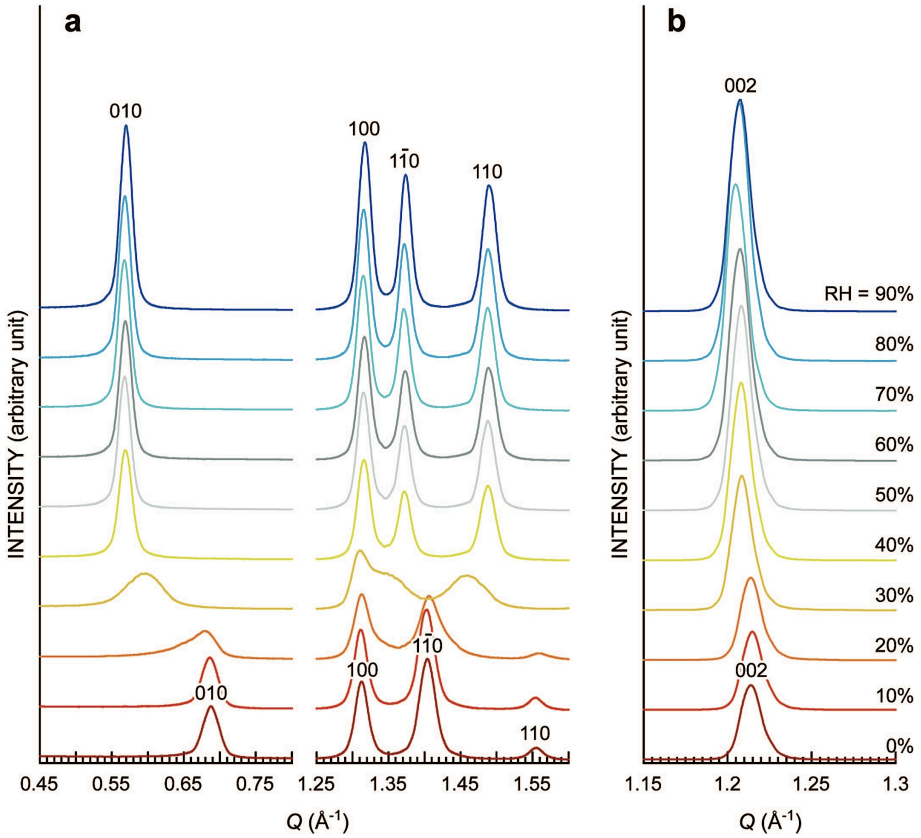

Fig. 2-3. Changes in (a) equatorial and (b) meridional X-ray diffraction profiles of the never-dried samples of β-chitin during the drying process. *Q* is the scattering vector (2π/*d*).

子午線方向の X 線回折プロファイルの変化を **Fig. 2-3** に示す。測定開始時の RH = 90%では二水和構造のパターンを示し、赤道方向には Q = 0.45–1.6 Å^{-1} の範囲に 4 つ、子午線方向には Q = 1.15–1.3 Å^{-1} の範囲に 1 つのピークが観測された。回折ピークの面間隔はそれぞれ d010 = 11.03 Å、d100 = 4.77 Å、d1$\bar{1}$0 = 4.57 Å、d110 = 4.22 Å、d002 = 5.20 Å であった。相対湿度を減少させていくと、RH = 40–50%まではピーク幅が広がりながらもピーク位置は変化せず、二水和構造のままであった。しかし RH = 30%前後に達すると 010 のピークが高 Q 側に、1$\bar{1}$0 と 110 のピークは低 Q 側にピーク幅を広げながらシフトした。このとき d010 = 10.56 Å であり、これは X 線繊維回折測定において再湿潤試料が示した一水和構造（**Fig. 2-1c**）の値とほぼ一致した。RH = 20%になるとピークは無水構造に対応する位置にシフトし、更に乾燥させるとピーク幅がより鋭くなって完全に無水構造に転移した。RH = 0%における各ピークの面間隔を計算すると d010 = 9.14 Å、d100 = 4.79 Å、d1$\bar{1}$0 = 4.48 Å、d110 = 4.04 Å であり、無水構造の単位格子から算出される値とほぼ同じになった。未乾燥試料の乾燥過程において、二水和構造は RH = 40%までは安定であったが、RH = 30%付近で中間体の一水和構造に転移した後に、RH = 20%で無水構造に転移することがわかった。

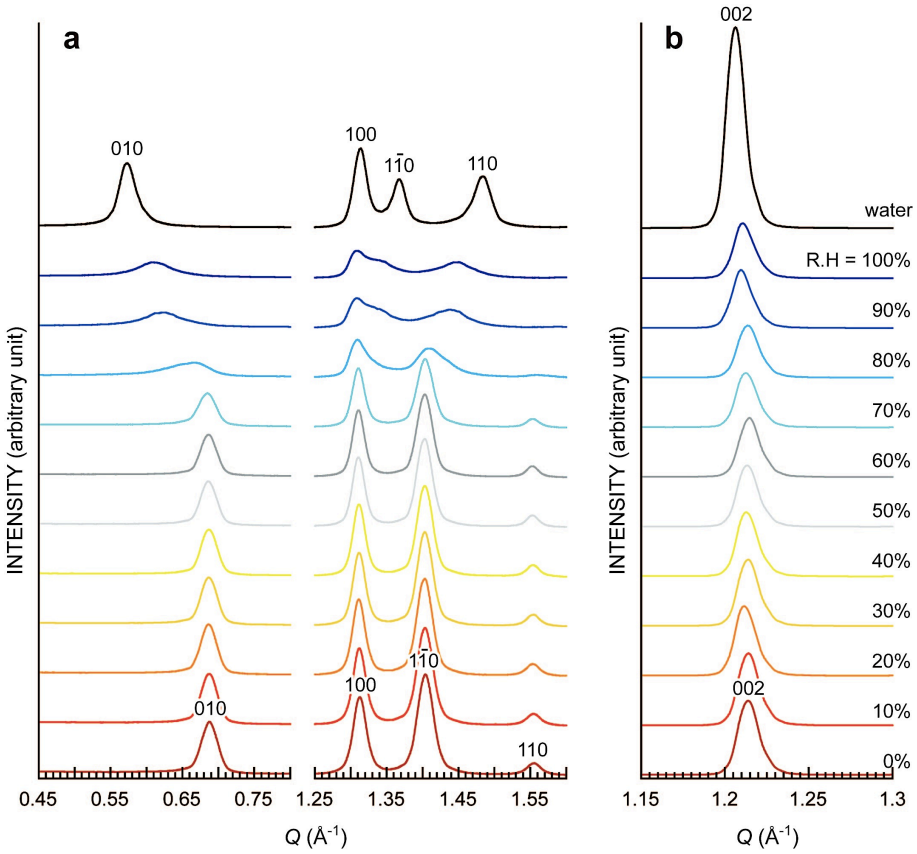

Fig. 2-4. Changes in (a) equatorial and (b) meridional X-ray diffraction profiles of the dried samples of β-chitin during the wetting process. Q is the scattering vector (2π/d).

このRH = 0%まで乾燥させた試料に対し、引き続き湿潤過程についても同様の測定を行った。湿潤過程における赤道方向および子午線方向のX線回折プロファイルの変化を **Fig. 2-4** に示す。相対湿度の増加に伴いピーク幅は僅かに広がったが、RH = 70%程度までは無水構造のピーク位置に変化はなかった。RH = 80%になるとピーク幅は急激に広くなり、 010のピークが少し低 Q 側にシフトした。相対湿度上昇に伴うピーク幅の広がりは、無水構造の結晶表面等に水分子が不規則に入り込むことにより結晶サイズが低下したためであると考えられる。RH = 80%を超えると相対湿度の上昇とともに010のピークは更にシフトして、RH = 100%では d010 = 10.28 Å となった。赤道方向のプロファイルのパターンは、乾燥過程のRH = 30%におけるものと同様であり、無水構造が一水和構造（**Fig. 2-1c**）に転移したことを示していた。

RH = 100%の測定後、試料に水を滴下して再びX線回折測定を行った（**Fig 2-4**, top）。ピーク幅は広いものの、プロファイルのパターンは測定開始時のプロファイル（**Fig. 2-3**, top）と同じになり、一水和構造が水の滴下によって直ちに二水和構造に転移したことがわかった。ピーク幅が広がったのは、乾燥および湿潤過程で結晶構造がいくらか壊れたり損傷し

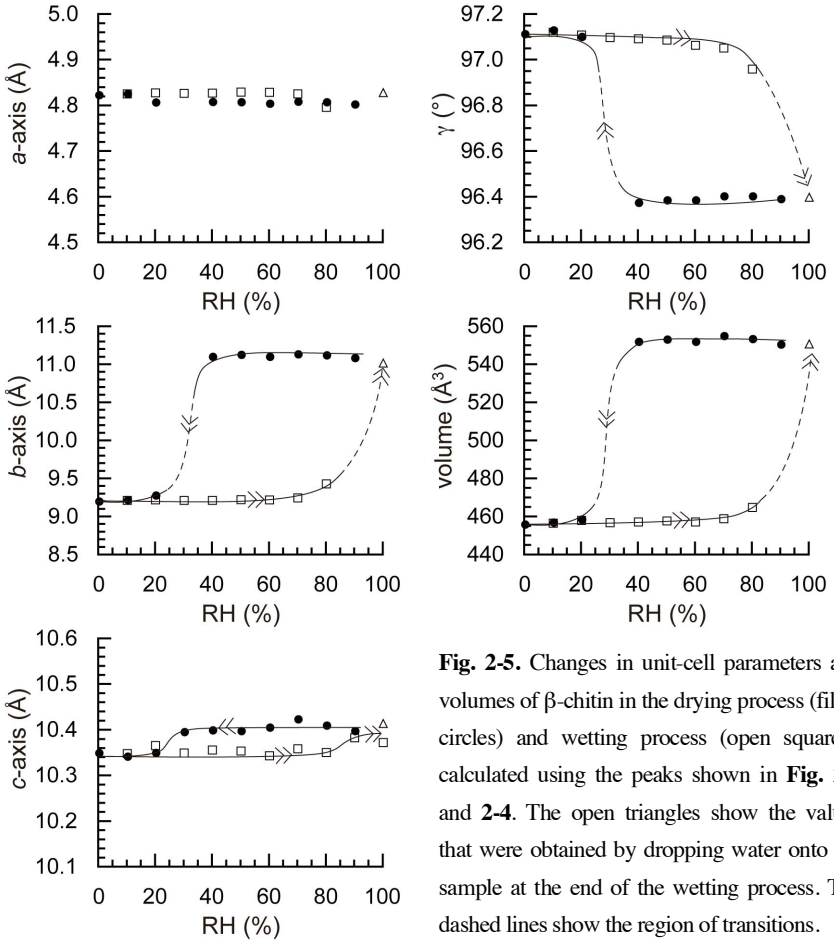

Fig. 2-5. Changes in unit-cell parameters and volumes of β-chitin in the drying process (filled circles) and wetting process (open squares), calculated using the peaks shown in **Fig. 2-3** and **2-4**. The open triangles show the values that were obtained by dropping water onto the sample at the end of the wetting process. The dashed lines show the region of transitions.

たりしたためであろう。乾燥試料の湿潤過程において、無水構造は RH = 70–80%まで安定であったが、RH = 90–100%では一水和構造を取り、二水和構造へは水の滴下によってようやく転移した。以上の乾燥過程および湿潤過程の結果をまとめると、二水和構造と無水構造間の転移は一水和構造を介して可逆的に起こり、大きなヒステリシスがあることがわかった。

Fig. 2-3 と **Fig. 2-4** のプロファイルより、各相対湿度における格子定数（*a* 軸、*b* 軸、*c* 軸、単斜角 γ ）と格子体積を計算した（**Fig. 2-5**）。測定中、*a* 軸の値はほぼ一定であった。一方、*b* 軸は乾燥過程と湿潤過程の転移点でそれぞれ減少／増加し、非常に大きな変化が見られた。*c* 軸も同じような変化を見せたが、その変化は *b* 軸と比較して僅かであった。単斜角も変化したが、その差は 1 °未満であった。これらの結果により、二水和構造と無水構造間の転移において、*b* 軸以外の格子パラメータも僅かではあるが、明確に変化を示すことが明らかになった。最近まで β キチンの結晶転移メカニズムについては、分子鎖シートがシートのほぼ垂直方向に平行移動することによってシート間の距離が変化し、シート間を水分子が出入りすると説明されてきた [94]。しかしながら Sawada らが提示した二水和構造のモデルはこのような単純なメカニズムのみでは転移が説明できないことを示しており [8,95]、これらの結果も二水和／無水構造間の転移においてはより複雑なプロセスが存在することを示唆していると考えられる。

乾燥過程および湿潤過程の重量変化を測定し、**Fig. 2-6** に示すような吸着等温線を得た。X 線回折による結晶構造変化のモニタリングの結果を考慮すると、乾燥過程において RH = 60–50%までの重量減少は結晶表面からの水の脱着であると考えられる。一方、これに続く RH = 50% から 20%の重量減少は主に水和構造から無水構造の転移に由来するものであろう。その減少量は RH = 0%における無水構造の約 18%であった。これは *N*-アセチルグルコサミン残基あたり 2 個の水分子に相当する量であり、二水和構造中に含まれるとされている水分子の数と一致した [8]。一方、水分子の吸着過程では、RH = 70–80%を超えてからの重量増加が約 12%であった。この増加分は *N*-アセチルグルコサミン残基あたりおよそ 1.5 個の水分子に相当する。しかし、この重量増加分には一水和構造中に含まれる水分子に加え、結晶表面へ吸着する水分

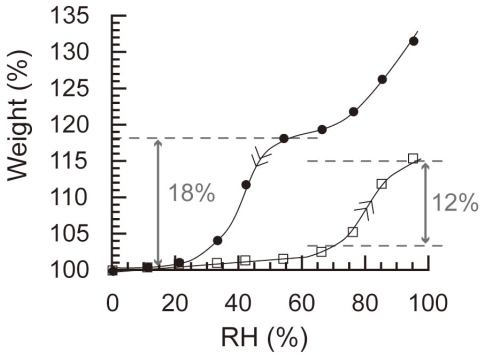

Fig. 2-6. Water desorption and adsorption isotherms of β-chitin starting from the never-dried sample. The filled circles and open squares show the values in the drying process and wetting process, respectively, as in **Fig. 2-5.**

子も含まれると考えられる。従って、ここまで二水和構造と無水構造の中間的な構造であるという特徴から、再湿潤試料が示した構造を“一水和構造”であると仮定してきたが、この重量変化の結果からも一水和構造に含まれる水分子は *N*-アセチルグルコサミン残基あたり 1 個であることが推測された。

今回の実験では、二水和構造と無水構造の中間体として一水和構造が乾燥と湿潤の両過程において観測された。しかし、これまでに行われた β キチンの結晶転移に関する研究では、一水和構造が単独では観測されてこなかった[94,96]。Rössle ら[96]は、乾燥させた試料に水分子を滴下した際の水和過程をモニタしたが、水が過剰に与えられるような条件下では無水構造から二水和構造への転移が迅速に起こるために一水和構造は観測されなかったと考えられる。Saito ら[94]は昇温による結晶転移を DSC および X 線回折で調べており、DSC 曲線では 2 つの吸熱ピークが見られているにもかかわらず、X 線回折測定では水和と無水が混合しているパターンしか得られていなかった。これは DSC 測定と X 線回折測定では試料の状態が厳密には異なっていたためであろう。一方で、我々は各相対湿度での平衡状態をモニタしたために転移の進行は遅く、一水和構造という中間体が明確に観察できたのだと考えられる。

2.4. 結論

サツマハオリムシの未乾燥試料、つまりサツマハオリムシが天然の状態において有していると考えられる結晶形は二水和構造であり、また非常に結晶性が高いことが明らかになった。これを乾燥させていくと、RH = 20〜30%で一水和構造を介して無水構造へと転移した。一方、無水構造を湿潤させていくと RH = 80%程度で一水和構造へと転移した。その後、100%まで相対湿度を上昇させても一水和構造を保っていたが、水に浸すと直ちに二水和構造へと戻った。従って、二水和／無水構造間の転移は可逆的にヒステリシスを伴って起こることが明らかになった。ただし、転移を経ることによって結晶性、結晶サイズは減少し、元には戻らなかった。

本研究で得られた X 線回折、固体 ^{13}C NMR、吸着等温線から見積もられる水分子の数といった結果には、提案されている無水構造および二水和構造のモデル[8,70,71]と矛盾する点はなかった。一方、この 2 つの構造間の転移過程で観測された一水和構造は、未だ構造が明らかになっていないだけでなく、1969 年に Blackwell[7]が発見してから現在に至るまでこの構造について報告された例はほとんどなかった。本研究でも結晶性が低いものしか観測できず、その構造を明らかにするには至らなかったが、結晶構造中に含まれる水分子の数は *N*-アセチルグルコサミン残基あたり 1 つ、分子鎖シート間の距離は二水和構造と無水構造の中間であり、二水和構造と無水構造にそれぞれ類似した 2 種類の分子鎖が含まれる構造

であることが示唆された。二水和構造と無水構造間の転移メカニズムは、二水和構造が明らかになったことにより従来考えられていたメカニズムよりも複雑であることがわかっている。今後一水和の結晶構造を明らかにしていくことが、この転移メカニズムを解き明かす鍵となるのではないかと考えられる。

3. β-1,3-グルカンおよびキシランの水和・脱水による結晶転移

3.1. 緒言

β-1,3-グルカンとβ-1,3-キシランは非常に類似した化学構造を持っており、その違いはC6位のヒドロキシメチル基の有無のみである（**Fig. 1-1d, e**）。従ってその結晶構造も類似しており、どちらも同じような三重らせん構造で、水和構造と無水構造を持つと言われている（1.3.4および1.3.5参照）。この三重らせん構造において両者の相違点であるC6位はらせんの外側に位置している（**Fig. 1-9**）。

β-1,3-グルカンは抗がん作用や免疫調節などの生理活性などを持つとして注目を集める多糖であり[97]、このような特性を示すのは三重らせん構造などβ-1,3-グルカンに特有の高次構造に由来しているのではないかとの報告が複数ある[98-100]。従ってβ-1,3-グルカンが生理活性等を発現するメカニズムを理解するためには、三重らせん構造やその構造がどのような特性を示すのかを理解することが極めて重要であると考えられる。

そこで本研究では、β-1,3-グルカンと、同様に三重らせん構造を持つβ-1,3-キシランについて研究を行うこととした。β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランの試料としてミドリムシの貯蔵多糖であるパラミロン、緑藻 *Penicillus dumetosus* の細胞壁とそれぞれ高結晶性であることが知られているものを用い[9,79,82,101,102]、湿潤試料と乾燥試料のシンクロトロンX線回折および固体 ^{13}C NMR測定によって水和構造および無水構造について調べた。また相対湿度を変化させながらX線回折測定を行うことにより、乾燥・湿潤によって起こる水和・無水構造間の結晶転移を観測することを試みた。

3.2. 実験方法

3.2.1. 試料調製

β-1,3-グルカン

Euglena gracilis E-6（IAMカルチャーコレクションより分譲）（**Fig. 3-1a**）をDifco Bactopepton 5 g, Difco Yeast extract 2 g, glucose 15 g, vitamin B_{12} 10 mgを水1 L中に含む培地で暗所、28℃において1週間培養した[103]。藻体は遠心分離（8,000 g, 5分）で回収し、rod typeの超音波で細胞を破砕した。その後、再び遠心分離で沈殿物を回収し、2 %SDSを溶解させた0.1 M Tris-HCl緩衝液（pH 6.8）中で約15分間煮沸処理した。この沈殿物を再び遠心分離で回収し、水洗を十分に繰り返して白色のパラミロンを得た[102]（**Fig. 3-1b**）。これを水に浸したまま、もしくはRH = 85%において保存したものを未乾燥試料、未乾燥試料を凍結乾燥した後にP_2O_5のデシケータ中で保存したものを乾燥試料とした。

β-1,3-キシラン

イワヅタ目の緑藻 *P. dumetosus* の乾燥試料は、H. Chanzy 博士（フランス植物高分子研究所）より提供して頂いた。0.1 N 塩酸で炭酸カルシウムを取り除いた後、細胞壁を 70%エタノール中において 70℃で 3 時間、熱水で 3 時間処理した。さらに 0.1 M 酢酸緩衝液で pH 4.5 に調整した 0.3%亜塩素酸ナトリウム溶液中において 70℃で 3 時間処理を行い、精製された細胞壁を得た（**Fig. 3-1c**）。固体 ^{13}C NMR 測定および重量測定で用いるため、精製した試料の一部はホモジナイザーで解繊した。これらを水に浸したまま保存したものを湿潤試料、未乾燥試料を凍結乾燥した後に P_2O_5 のデシケータ中で保存したものを乾燥試料とした。

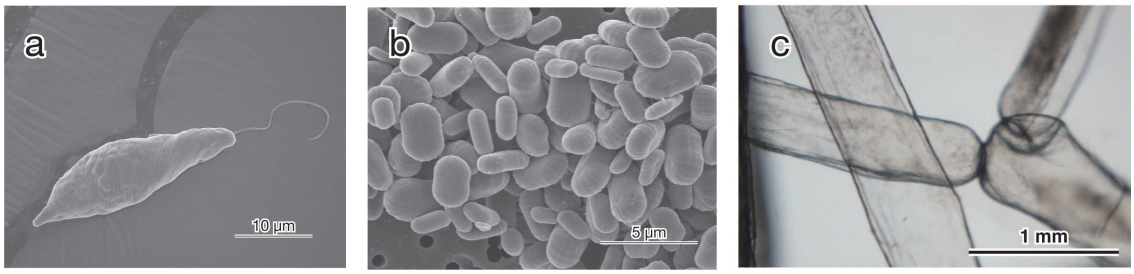

Fig. 3-1. SEM images of (a) *Euglena gracilis* and (b) paramylon, and (c) optical micrograph of the cell walls of *P. dumetosus*.

3.2.2. シンクロトロン放射光 X 線回折測定

β-1,3-グルカン

高輝度放射光施設 SPring-8 のビームライン BL38B1 において粉末 X 線回折測定を行った。キャピラリーに封入した試料を、ゴニオヘッドにマウントし、室温にて波長 1 Å のシンクロトロン放射光を入射した。粉末回折図はイメージングプレート（IP）に記録し（R-AXIS V, Rigaku）、試料と IP 間の距離は 170 mm とした。試料と IP 間の距離は Si 粉末の面間隔（d = 3.1355 Å）を用いて補正した。

X 線回折プロファイルは、非線形最小二乗法プログラムを用い、各回折ピークを pseudo-Voigt 関数に近似してピーク分離を行った [90]。

β-1,3-キシラン

高輝度放射光施設 SPring-8 のビームライン BL40B2 において X 線回折測定を行った。約 1 cm に切り出した細胞壁の精製試料を何枚か重ね合わせてゴニオヘッドに取り付け、波長 0.7 Å のシンクロトロン放射光を入射した。試料の湿潤状態もしくは乾燥状態を保つため、湿度発生装置（Shinyei SRG-1R）で RH = 100%, 0%に調整された空気をそれぞれ湿潤試料、乾燥試料に吹き付けながら室温にて測定を行った。回折図はイメージングプレート（IP）に記録し（R-AXIS V^{++}, Rigaku）、試料と IP 間の距離は Si 粉末の面間隔（d = 3.1355 Å）を用いて補正した。

X 線回折プロファイルは、非線形最小二乗法プログラムを用い、各回折ピークを pseudo-Voiigt 関数に近似してピーク分離を行った[90]。

3.2.3. 固体 CP/MAS ^{13}C NMR スペクトル測定

β-1,3-グルカン

固体高分解能 ^{13}C NMR 測定には Chemagnetics CMX 300 分光器（^{13}C の共鳴周波数は 75.6 MHz）を使用した。試料管にはジルコニア製の直径 4 mm 径を用い、速度 10 kHz でマジック角回転させた。観測には交差分極 (CP) 法を用い、^{1}H の 90°パルス幅は 2.5μs とし、^{1}H-^{13}C 接触時間は 2 ms とした。信号を取り込む間隔は 3 s に設定した。化学シフト値の基準にはアダマンタンを用いた。なお、未乾燥試料の測定に関しては、測定中の乾燥を防止するため、テフロン製のキャップで試料管を密栓した。

β-1,3-キシラン

固体高分解能 ^{13}C NMR 測定には Bruker 社製の Avance 分光計（^{13}C の共鳴周波数は 100 MHz）を使用した。試料はジルコニア製のローター（直径 4 mm 径）に封入し、速度 12 kHz でマジック角回転させた。観測には交差分極 (CP) 法を用い、^{1}H の 90°パルス幅は 2.5 μs とし、^{1}H-^{13}C 接触時間は 2 ms とした。信号を取り込む間隔は 4 s に設定した。化学シフト値はグリシンのカルボニル基（176.03 ppm）で補正した。

3.2.4. X 線回折測定による結晶転移の観測

β-1,3-グルカン

X 線ディフラクトメトリーは X 線発生装置、Rigaku RINT2000 により加速電圧 38 kV、電流 50 mA で発生し、モノクロメーターで単色化された Cu Kα線（λ = 1.5418 Å）を用いて行った。光学系スリットとしては、発散スリット (DS) : 0.5°、散乱スリット (SS) : 0.5°、受光スリット (RS) : 0.15 mm を使用した。測定条件は、走査範囲 : 2θ = 3-35°、ステップ間隔 : Δ2θ = 0.05°、積算時間 : 5 秒間とした。乾燥過程の測定においては、まずゴニオメーターの試料室を Mylar フィルムでシールし、そこへ湿度発生装置にて RH = 100%に調整した窒素ガスを流速 1 L/min で流した。次に、ガラス製の試料台に未乾燥試料を薄く均一に塗布して、試料室へ取り付けた。相対湿度 100 %の状態で一晩放置した後、X 線ディフラクトメトリー測定を行った。 1 時間の測定後、相対湿度を 90%に変更してその湿度で 1 時間保持し、再び X 線ディフラクトメトリー測定を行った。以後同様に、相対湿度を 10 %間隔で 0 %まで下げながら測定を繰り返した。湿潤過程の測定については、加圧して薄いディスク状に成形した乾燥試料を試料台に取り付け、相対湿度 0 %中に一晩置いた。そして、乾燥過程と同様の方法（その湿度にて 1 時間保持，その後 1 時間測定）で相対湿度を 10 %間隔で 100 %まで上げながら測定を行った。測定は室温（約 23℃）で行った。

β-1,3-キシラン

測定は SPring-8 のビームライン BL40B2 において 3.2.2.と同様の設定で行った。測定は上記のβ-1,3-グルカンと同様、まず乾燥過程を RH = 100%から 0%、続いて湿潤過程を RH = 0%から 100%の間でそれぞれ 10%毎に行った。測定は室温で行い、測定間隔は 10～20 分とした。

3.2.5. 水の吸着等温線測定

2.2.5 と同様にして行った。

3.3. 結果と考察

3.3.1. シンクロトロン放射光 X 線回折

パラミロンの未乾燥試料と乾燥試料、*P. dumetosus* の湿潤試料と乾燥試料のシンクロトロン放射光 X 線回折図を **Fig. 3-2** に示す。パラミロンの試料は顆粒状であるため、全ての方向に強度が均一な粉末回折像を示しているが（**Fig. 3-2a**, **b**）、*P. dumetosus* の試料では強度が均一ではなく一部が配向している様子が観察された（**Fig. 3-2c**, **d**）。*P. dumetosus* の細胞壁においては、外壁ではβ-1,3-キシランのフィブリルがランダムに配向しているが、内壁では長軸方向に配向していることが報告されており [82]、この結果と一致していた。

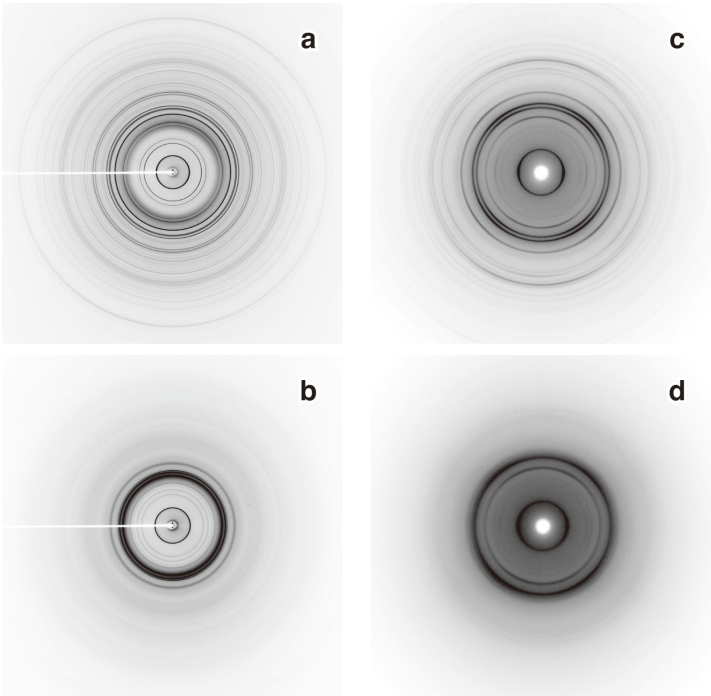

Fig. 3-2. Synchrotron X-ray diffraction patterns of (a) hydrated β-1,3-glucan, (b) anhydrous β-1,3-glucan, (c) hydrated β-1,3-xylan and (d) anhydrous β-1,3-xylan obtained from never-dried and dried samples of paramylon, and wet and dried samples of *P. dumetosus*, respectively.

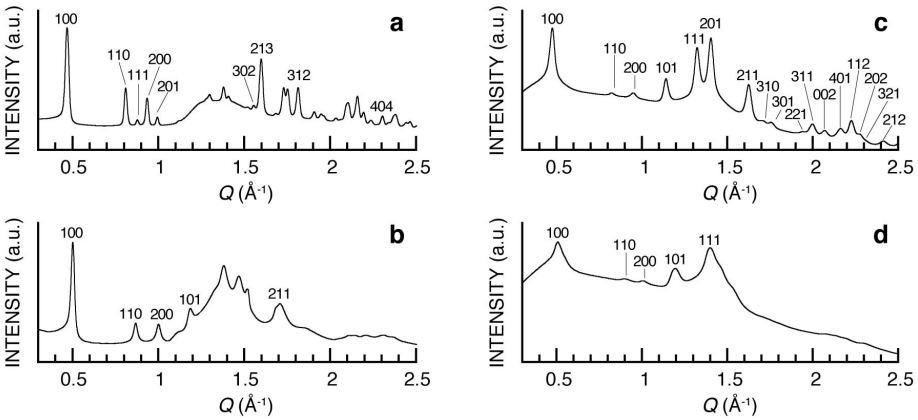

Fig. 3-3. Synchrotron X-ray diffraction profiles of (a) hydrated β-1,3-glucan, (b) anhydrous β-1,3-glucan, (c) hydrated β-1,3-xylan and (d) anhydrous β-1,3-xylan obtained from intensity integration of the patterns in **Fig. 3-2**.

Fig. 3-2 の回折図より得られたプロファイルを **Fig. 3-3** に示す。パラミロンの未乾燥試料では、高 Q 領域まで非常に鋭いピークが多く観察され、他の天然多糖では例を見ないほど高結晶性であることが明らかとなった（**Fig. 3-3a**）。観測されたピークは、β-1,3-グルカン水和構造の六方晶の単位格子[9]をもとに指数付けを行い、回折ピークが孤立して存在していると思われる 9 つのピーク（**Fig. 3-3a**）から単位格子を求めたところ、a = 15.574 (1) Å、c = 18.587 (10) Å であった。これは Chuah らが報告した単位格子[9]とほぼ一致した。試料を乾燥させると、水和構造のものとは異なるプロファイル（**Fig. 3-3b**）が得られ、乾燥によって無水構造に転移したことがわかった。ただし、高 Q 領域のピークがブロードであり、乾燥による無水構造への転移に伴って結晶性が低下することがわかった。乾燥試料のプロファイルについても、観測されたピークについて Deslandes らが報告した β-1,3-グルカン無水構造の六方晶の単位格子[80]をもとに指数付けを行った。そして、回折ピークが孤立して存在していると思われる 5 つのピーク（**Fig. 3-3b**）から単位格子を算出したところ、a = 14.543 (7) Å、c = 5.853 (9) Å であった。これも Deslandes らが報告した単位格子[80]とほぼ一致していた。

パラミロンの未乾燥試料には劣るものの、*P. dumetosus* の湿潤試料も高 Q 領域まで複数のピークが観測され、高い結晶性を示した（**Fig. 3-3c**）。観測された全てのピークは、β-1,3-キシラン水和構造の六方晶の単位格子[82]をもとに指数付けし、単位格子を算出した。得られた格子定数は、a = 15.34 (1) Å、c = 6.07 (10) Å であり、Frei と Preston が報告した値[82]とほぼ一致した。一方、乾燥試料のプロファイルでは幅の広いピークが数本観測されただけであり、パラミロンの場合と同様にして脱水により結晶性が大幅に低下したことがわかった（**Fig. 3-3d**）。これらのピークについても六方晶の単位格子で指数付けを行ったところ、a = 14.2 Å、c = 5.8 (10) Å と算出された。これらの値は、Frei と Preston が報告した β-1,3-キシラン無水構造の値[82]と比較すると a 軸の値が多少大きいが、c 軸の値はおおよそ一致した。

3.3.2. 固体 ^{13}C NMR スペクトル

パラミロンの未乾燥試料、乾燥試料および *P. dumetosus* の湿潤試料、乾燥試料の高分解能固体 ^{13}C NMR 測定を行い、それらのスペクトルを **Fig. 3-4** に示した。パラミロンの未乾燥試料、*P. dumetosus* の湿潤試料のスペクトルは（**Fig. 3-4a**, **c**）、これまでに報告されたパラミロンや *P. dumetosus* のスペクトル[104-106]とそれぞれ同様のパターンが観測されたが、これらよりも各炭素に由来する共鳴線が明瞭に分離していた。

パラミロンの未乾燥試料のスペクトル（**Fig. 3-4a**）では、C3 に由来する共鳴線が 5 つに分離していた。この結果は、非対称単位中にグルコース残基は 5 つ以上含まれることを示唆していた。Chuah ら[9]は、β-1,3-グルカンの水和構造は厳密には非対称単位がグルコース残基 18 個の空間群 *P*1 であるが、非対称単位がグルコース残基 6 個となる空間群 *P*3 に近いと報告していおり、本研究で得られた結果は一見この結果と一致するように思える。しかしながら、このモデルでは C6 位の水酸基以外は単位格子中の全ての残基が等しいとされており、C3、C4、C5 由来の共鳴線についても明確に複数のピークに分離している本研究の結果はこのモデルでは十分に説明できない。C6 位の水酸基以外の箇所についてもグルコース 6 残基分、あるいは 18 残基全てにおいてコンフォメーションや水素結合様式等が異なった非常に対称性の低い構造である可能性がある。

また *P. dumetosus* の湿潤試料のスペクトル（**Fig. 3-4c**）では、C4 を除く全ての炭素に由来

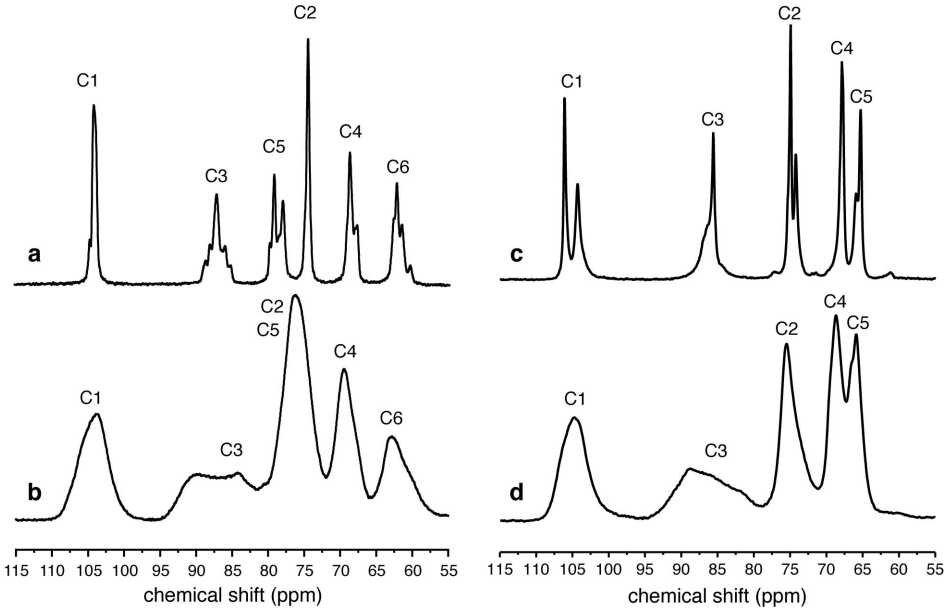

Fig. 3-4. Solid-state ^{13}C CP/MAS NMR spectra of: (a) hydrated β-1,3-glucan, (b) anhydrous β-1,3-glucan, (c) hydrated β-1,3-xylan and (d) anhydrous β-1,3-xylan obtained from never-dried and dried samples of paramylon, and wet and dried samples of *P. dumetosus*, respectively. The peaks of β-1,3-glucan and β-1,3-xylan are assigned according to Saito et al.[105] and Saito et al.[106], respectively.

する共鳴線が 2 本に分離しており、これら 2 本のピークは面積が等しかった。これは非対称単位中に 2 つのキシロース残基が含まれることを意味しているが、このことは非対称単位中に含まれるキシロース残基は 1 つであるとする Atkins らのモデル[11]とは矛盾していた。2 つのキシロース残基が非対称単位中に含まれるのならば、実際の構造はこのモデルよりも対称性が低く、空間群は *P*3 であるという可能性がある。もしくは、X 線回折測定ではこのモデルの単位格子と一致するという結果が得られたが、実際には 2 倍の大きさの単位格子を持ち、2 本の三重らせんが含まれているということもあり得るだろう。あるいは 2 つの異なる構造が結晶中に存在するという可能性も否定できない。しかしながら、いずれにしても本研究で得られたデータのみではその原因を断定することはできないため、β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランともに水和構造については提案されているモデルを見直す必要がある。

乾燥させると、パラミロン、*P. dumetosus* ともに全ての炭素に由来する共鳴線の幅が大きく広がった（**Fig. 3-4b**, **d**）。β-1,3-グルカンおよびβ-1,3-キシランの無水構造は水和構造と比較して、分子鎖のコンフォメーションが大きく乱れていると考えられる。このような水和構造から無水構造への転移に伴って固体 ^{13}C NMR のピークが広がるという現象は、澱粉やアミロースでも報告されている[107,108]。またこの結果は、脱水によって大幅に結晶性が低下するという前項（3.3.1）の X 線回折測定の結果とも一致した。乾燥による変化は各ピークのピーク幅だけでなく化学シフトにも現れており、脱水によりグルカンおよびキシラン分子鎖のコンフォメーションが変化していることを示していた。以上のような脱水に伴うピーク幅、化学シフトの変化は、β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランのどちらにおいても C3 に由来する共鳴線で特に顕著であった。

3.3.3. 水和・無水構造間の結晶転移

水和・無水構造間の転移過程を観測するため、湿度を段階的に変化させながらX線測定を行った。**Fig. 3-5** にパラミロンの未乾燥試料の乾燥過程と、それに続く湿潤過程における X 線回折プロファイルの変化を示した。未乾燥試料のプロファイルは（**Fig. 3-5a**, RH = 100%）、シンクロトロン放射光粉末X線回折プロファイル（**Fig. 3-3a**）と同じくβ-1,3-グルカンの水和構造のものであった。非常に鋭いピークがいくつも観察され、これらは乾燥に伴って徐々に広角側へシフトした。そして、RH = 30%になると水和構造と無水構造のプロファイルが重なり合ったものとなり、20%で完全に無水型へ転移した。一方、乾燥試料の湿潤過程では、RH = 0%において観察された無水構造のピークは相対湿度の上昇とともに低角側へシフトした。そして 70%になると無水構造のピークがブロードになり、80%でほぼ完全に水和構造へと転移した。しかしながら 100%に達しても（**Fig. 3-5b**, RH = 100%）ピーク幅は未乾燥試料（**Fig. 3-5a**, RH = 100%）のようには鋭くはならず、結晶性が低下したことがわかった。

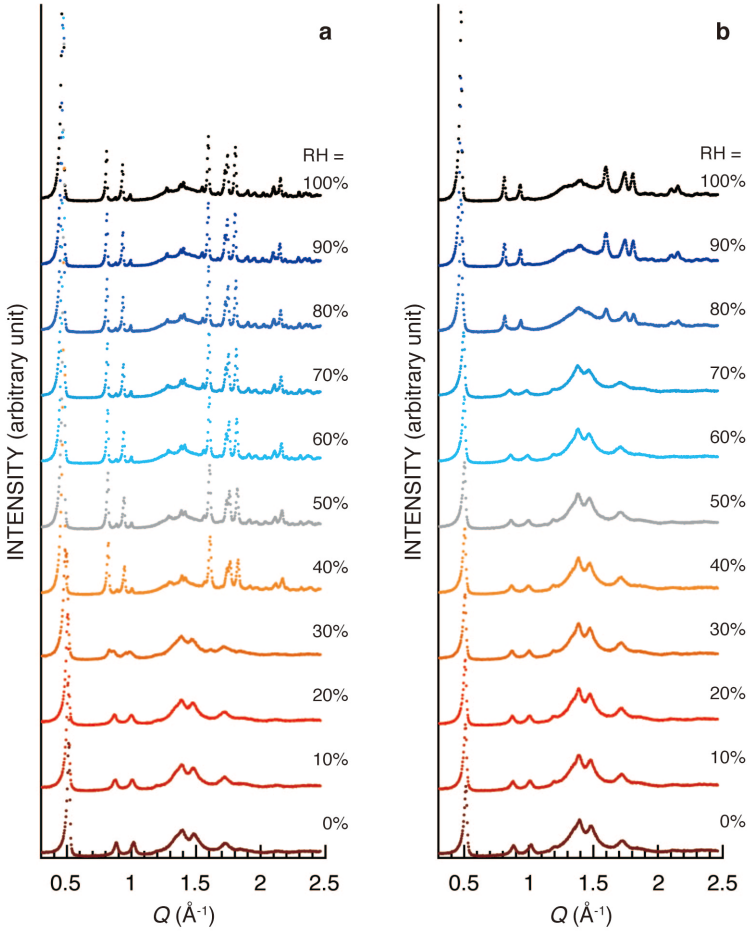

Fig. 3-5. Changes in X-ray diffraction profiles during (a) the drying of the never-dried paramylon (hydrated β-1,3-glucan) with a decrease in RH and (b) the subsequent wetting with an increase in RH. The term Q is the scattering vector ($2\pi/d$).

Fig. 3-6 には *P. dumetosus* の湿潤試料の乾燥過程と、それに続く湿潤過程における X 線回折プロファイルの変化を示した。乾燥過程のはじめは **Fig. 3-3c** と同様の β 1,3-キシラン水和構造のパターンを示しており（**Fig. 3-6a**, RH = 100%）、RH = 30%までは各ピークの強度が若干小さくなった以外に大きな変化は見られなかった。RH = 20%になると無水構造に由来するピークが現れ、0%では完全に無水構造に転移した。一方、湿潤過程では 70%までは無水構造のまま変化がなかったが、80%以上では徐々に水和構造由来のピークが増加し、100%ではほぼ完全に水和構造へと転移した。しかしながら、ピークの鋭さは元の水和構造（**Fig. 3-6a**, RH = 100%）と比較して大幅に失われており、結晶性は著しく低下していた（**Fig. 3-6b**, RH = 100%）。以上の結果から、β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランともに相対湿度の変化により水和・構造間の転移が可逆的に起こること、さらにその転移にはヒステリシスがあることが明らかになった。これらの結果は第 2 章の β キチンの場合と同様であった。

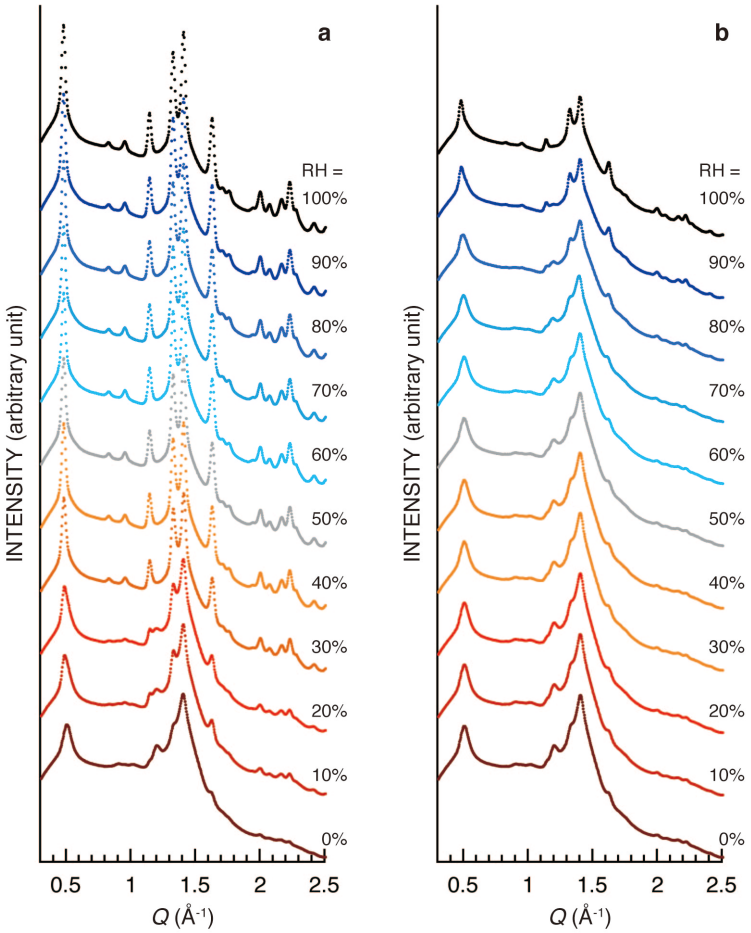

Fig. 3-6. Changes in synchrotron X-ray diffraction profiles during (a) the drying of the wet *P. dumetosus* samples (hydrated β-1,3-xylan) with a decrease in RH and (b) the subsequent wetting with an increase in RH. The term *Q* is the scattering vector (2π/*d*).

Fig. 3-5 と **3-6** の各プロファイルから単位格子を算出し、相対湿度に対する格子定数と格子体積をプロットした（**Fig. 3-7**）。ただし、β-1,3-グルカンについては転移点付近のプロファイルは結晶形の混在により一部ピーク分離が困難であったため、それらの点については算出していない。またβ-1,3-グルカンの無水構造およびβ-1,3-キシランの単位格子については、β-1,3-グルカンの水和構造の単位格子に相当するように、*c* 軸および格子体積は 3 倍にした値をプロットした。格子定数および体積は、β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランともに転移点でのみ大きな変化を示していた。さらに、*a* 軸においては転移点に達する前後でも緩やかに変化していた。この傾向はβ-1,3-キシランよりもβ-1,3-グルカンで、また水和構造よりも無水構造でより顕著であった。結晶表面に吸脱着する水分子が、三重らせん間の距離に多少の影響を及ぼすのだろうと考えられる。

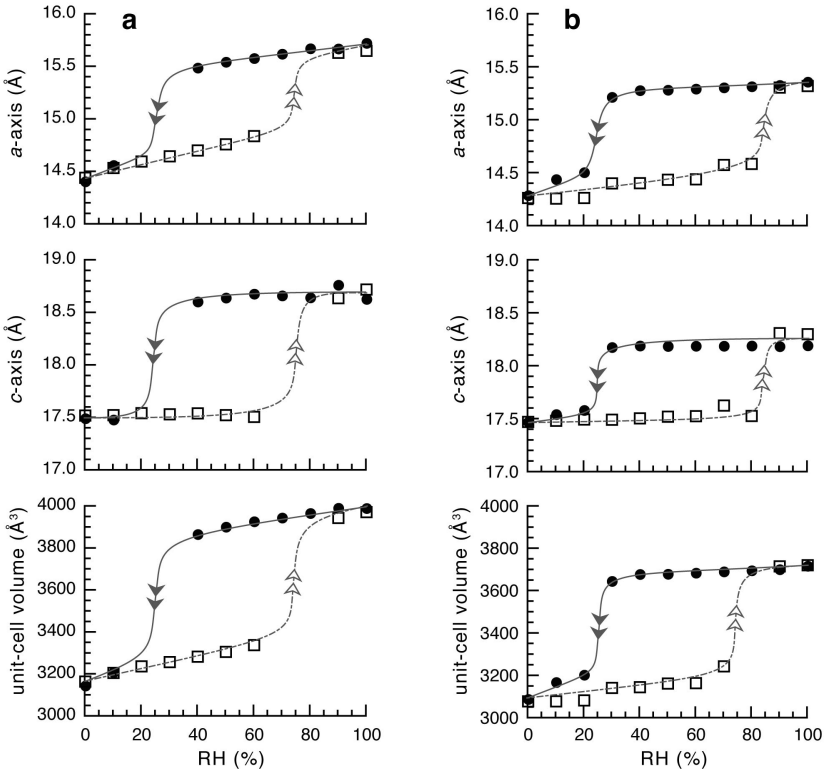

Fig. 3-7. Changes in unit-cell parameters of (a) β-1,3-glucan and (b) β-1,3-xylan calculated from each profile in **Fig. 3-5** and **3-6**, respectively. Key: filled circles = drying process; empty squares = wetting process.

3.3.4. 吸着等温線と水和構造における水分子の化学量論

重量測定により得られたパラミロンと *P. dumetosus* の吸着等温線を **Fig. 3-8** に示した。パラミロンの未乾燥試料を乾燥させていくと徐々に重量が減り、RH = 40%から RH = 30%で急激に減少した。その後は、再び緩やかに重量が減少した。吸湿過程では、RH = 60%までは緩やかに重量が増加し、RH = 70%で急激に増加していた。その後は再び緩やかに増加した（**Fig. 3-8a**）。一方、*P. dumetosus* の湿潤試料を乾燥させていくと、RH = 60%までは急激に減少した。その後 RH = 50%程度までは重量減少は僅かになったが、RH = 40%から 20%にかけて再び急激に減少した。吸湿過程では、RH = 60%から 80%にかけて急激な増加が見られた（**Fig. 3-8b**）。以上の重量が急激に増減している領域は、おおよそ前項の X 線回折測定で観測された転移点と一致していた。従って、この領域で生じた重量変化分（β-1,3-グルカンは 12%、β-1,3-キシランは 14%）は水和構造中の水和水に相当すると考えられる。これらの値は、1 グルコースもしくはキシロース残基あたりそれぞれ 1.1 個、1.0 個と算出された。

また **Fig. 3-6** に示した格子体積の変化からも、水和構造中に含まれる水分子の量を見積もった。β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランそれぞれ転移点における格子体積の変化はそれぞれ約 600 Å^3、480 Å^3 であり、水の密度を 1 g/cm^3 と仮定するとこれらの体積はそれぞれ水分子

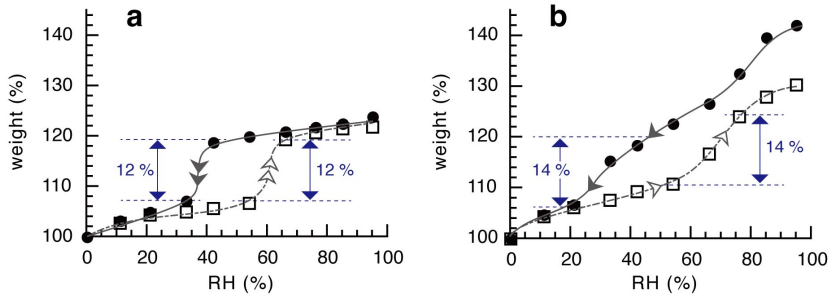

Fig. 3-8. Water-desorption/adsorption isotherms of (a) β-1,3-glucan of paramylon and (b) β-1,3-xylan from *P. dumetosus*. Key: filled circles = drying process; empty squares = wetting process.

20 個、16 個に相当していた。この単位格子中（β-1,3-グルカンの無水構造およびβ-1,3-キシランについては単位格子の 3 倍中）に含まれるグルコースもしくはキシロース残基は 18 個であるため、1 グルコースもしくはキシロース残基に換算すると、それぞれ 1.1 個、0.9 個となる。従って、重量変化、体積変化のどちらから見積もられる値も、β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランともに 1 個／1 グルコースもしくは 1 キシロース残基であることがわかった。β-1,3-キシランの水和構造については、この結果は Atkins らのモデル [11] と一致していた。一方、β-1,3-グルカンについては、Chuah らのモデル [9] とは少し異なっていた。Chuah らのモデル [9] では、結晶中に含まれる水分子は 1 グルコース残基あたり 2 個で、そのうち半数は三重らせんの 4 位と 5 位の酸素原子付近に規則的に分布し、もう半数はランダムに分布しているとされる。ただしこれは、X 線回折による構造解析では 1 グルコース残基あたり 1 個が最も適当であるとされたにもかかわらず、密度計算によってそれ以前に報告された値（1 グルコース残基あたり水分子 2 個）[78] との矛盾をなくすために、1 グルコース残基あたり 1 個分の水分子を付け加えたためである。従って本研究の結果と Chuah らの構造解析の結果は [9] 一致していることになり、水和構造中に含まれる水分子は 1 個／1 グルコース残基が正しいのではないかと考えられる。

3.4. 結論

β-1,3-グルカンおよびβ-1,3-キシランの結晶構造について、X 線回折により得られた単位格子は水和構造、無水構造ともにこれまでに報告されているもの [9,80,82] と同様に六方晶であり、その値もおおよそこれらに一致していた。また結晶転移の際に生じる格子体積および重量変化から見積もられる水和構造中に含まれる水分子の量も、これまでに報告されている結晶構造解析の結果 [9,11] と一致する値となった。しかしながら、固体 ^{13}C NMR の結果はβ-1,3-グルカン、β-1,3-キシランともにこれらの結晶構造モデルとは矛盾しており、特にβ-1,3-グルカンのスペクトルは非常に複雑であった。β-1,3-グルカン、β-1,3-キシランいずれ

についてもこれらのモデルはそれほど新しいものではなく、測定技術や解析手法は当時と比較して格段に進歩している。複雑な固体 ^{13}C NMR の結果を説明するためには、今後精度の高い解析を行い、新たなモデルを提案し直す必要があるだろう。

β-1,3-グルカンとβ-1,3-キシランは同じような転移挙動を示した。転移には明確な転移点があり、可逆的でヒステリシスが存在した。三重らせん間の距離は転移点以外の領域でも乾燥／湿潤に伴って僅かに減少／増加しており、結晶表面に吸着する水分子の影響を受けて三重らせん間の距離が変化していることが示唆された。また、結晶性は水和構造から無水構造への転移によって大幅に低下し、その後無水構造から水和構造へ戻っても転移前ほどの結晶性を取り戻すことはなかった。

4. 水和セルロースの脱水によるセルロース II への結晶転移

4.1. 緒言

2 種類の異なる方法で得られる水和セルロース、アルカリセルロース IV とセルロース II 水和物は、脱水するとセルロース II に転移する、すなわちセルロース II の水和構造であるという点において共通している。従って両水和構造をセルロース II の構造と比較すると、単位格子はセルロース II に比べ水分子の占める体積により拡大しているものの、基本的にはどちらもセルロース II と同様のコンフォメーション、堆積様式を有しているとされている。しかしながら、アルカリセルロース IV とセルロース II 水和物を比較してみると、単位格子の大きさや水分子の配列などいくつか異なる点が見られる [2,3]（1.3.1 参照）。

本研究では、ラミー繊維からアルカリセルロース IV およびセルロース II 水和物を調製し、この 2 種類の水和構造およびこれらを乾燥させて得られた無水構造についてシンクロトロン X 線繊維回折および固体 ^{13}C NMR スペクトルを用いてその構造を比較した。またアルカリセルロース IV もしくはセルロース II 水和物からセルロース II への転移過程を X 線回折によって観測し、転移のメカニズムや水和構造の安定性について詳しく調べることにした。

4.2. 実験方法

4.2.1. 試料調製

本研究に用いた試料は精製されたラミー（*Boehmeria nivea* Gaud.）繊維（帝国紡績株式会社）から調製した。ラミー繊維の束をステンレス製の引張り装置に揃えて固定し、3.5 N NaOH に浸漬させてアルカリセルロース I を調製した。また、アルカリセルロース IV およびセルロース II の調製には繰り返しマーセル化の手法を用いた [24,109]。アルカリセルロース IV の試料は水洗後そのまま水中に室温で保存し、セルロース II の試料はこれを風乾させることで得た。

得られたセルロース II を無水ヒドラジンに 2 日間、4℃で浸漬した後、十分に水洗してセルロース II 水和物を得た。セルロース II 水和物の試料は水中に保存し、一部は風乾により脱水させた（以下、これをセルロース II’とする）。以上の作業は試料を常に繊維方向に引っ張りながら行った。

4.2.2. シンクロトロン放射光 X 線繊維回折測定

シンクロトロン X 線繊維回折測定は高輝度放射光施設 SPring-8 のビームライン BL38B1 で行った。配向試料をゴニオヘッドにマウントし、波長 1.0 Å のシンクロトロン放射光を繊維に垂直に 120 秒間入射した。アルカリセルロース IV とセルロース II 水和物の試料測定時

には、湿度発生機（Shinyei SRG-1R）によってRH = 90%または100%に調湿した空気を1 L/minで吹き付けた。繊維回折図はイメージングプレート（R-Axis V, Rigaku）に記録し、試料とIPの距離はSi粉末の面間隔（d = 3.1355 Å）を用いて補正した。測定は室温で行った。

各回折のピーク位置はR-Axis display software（Rigaku）を用いて測定し、指数付けを行った後に最小二乗法によって単位格子を決定した。

4.2.3. 固体 CP/MAS ^{13}C NMR スペクトル測定

固体高分解能 ^{13}C NMR 測定には Chemagnetics CMX 300 分光器（^{13}C の共鳴周波数は 75.6 MHz）を使用した。試料管にはジルコニア製の直径 4.0 mm 径を用い、速度 5 kHz でマジック角回転させた。観測には交差分極 (CP) 法を用い、^{1}H の 90°パルス幅は 2.5 μs とし、^{1}H-^{13}C 接触時間は 1.0 ms とした。信号を取り込む間隔は 3 s に設定した。化学シフト値の基準にはアダマンタンを用いた。なお、アルカリセルロース IV およびセルロース II 水和物の測定の際には、測定中の乾燥を防止するためテフロン製のキャップで試料管を密栓した。スペクトルは、非線形最小二乗法プログラムを用い、各ピークを Lorentz 関数に近似してピーク分離した。

4.2.4. シンクロトロン放射光 X 線回折測定による結晶転移の観測

X 線回折によるアルカリセルロース IV の乾燥過程は，上記と同様の設定で SPring-8 のビームライン BL38B1 において観測した。アルカリセルロースの配向試料を、ゴニオヘッドにマウントし、湿度発生機（Shinyei SRG-1R）により相対湿度を調節した空気を 1 L/min で吹き付けた。測定は、相対湿度を 10%ずつ減少させながら RH = 100%から 0%まで各相対湿度において行った。RH = 0%まで乾燥させた試料は引き続き数滴の水を滴下して再湿潤させ、RH = 100%で再び測定を行った。相対湿度を変化させてから測定までは 10 分間おき，相対湿度を安定させた。

一方、X 線回折によるセルロース II 水和物の乾燥過程は SPring-8 のビームライン BL40B2 において観測した。測定方法は上記とほぼ同様であるが、波長は 0.7 Å、繊維回折図はイメージングプレート（R-Axis IV^{++}, Rigaku）に記録した。

得られた繊維回折図から R-Axis display software（Rigaku）を用いて赤道および子午線方向の X 線回折プロファイルを得た。回折プロファイルは Wada らの方法 [90] によってピーク分離を行い、各回折ピークの位置を決定した。

4.2.5. X 線ディフラクトメトリー測定による結晶転移の可逆性の検討

X 線ディフラクトメトリー測定は X 線発生装置、Rigaku RINT2000 を使用して行った。ゴニオメーターの試料室を Mylar フィルムで密閉し、ここに湿度調整機（Shinyei SRG-1R）で調湿された窒素ガスを流速 1 L/min で流し込んだ。まず、アルカリセルロース IV またはセ

ルロース II 水和物の繊維をゴニオメーターに取り付け、RH = 100%で測定を行った。続いて、相対湿度を 50%に変更して数時間置いてから測定を行った後に、相対湿度を 100%に戻して 1 時間経過後に再び測定を行った。測定には加速電圧 38 kV、電流 50 mA で発生し、モノクロメーターで単色化された Cu Kα線（λ = 1.5418 Å）を用い、光学系スリットとして散乱スリット（DS）= 0.5°、発散スリット（SS）= 0.5°、受光スリット（RS）= 0.15 mm を使用した。測定条件は、走査範囲：2θ = 5–30°、ステップ間隔：0.1°、積算時間：10 s とした。測定はすべて室温で行った。

4.2.6. 高温に対する安定性の検討

アルカリセルロース IV とセルロース II 水和物の試料を水に浸けたまま 40℃、60℃、80℃、100℃、120℃で 1 時間処理した。熱処理後は試料を室温まで冷まし、RH = 100%で X 線ディフラクトメトリー測定を行った。測定は全て上記と同じ条件で行った。

4.3. 結果と考察

4.3.1. シンクロトロン放射光 X 線繊維回折

ラミー繊維のシンクロトロン X 線繊維回折図は典型的なセルロース I のパターンを示した（**Fig. 4-1a**）。これを 3.5N NaOH で膨潤させると、ラミー繊維はアルカリセルロース I に転移した（**Fig. 4-1b**）。セルロース I と比較するとパターンは不鮮明であるが、これは結晶性の低さと余分なアルカリ溶液の散乱のためであると考えられる。ピークの強度は赤道上の 4.45 Å および 4.23 Å に現れた 2 つのピークを除き非常に弱かった。赤道上の最も内側のピークは 12.50 Å に現れており、アルカリ溶液によって結晶格子がかなり拡大していることを示していた。

アルカリセルロース I を水洗すると、結晶格子中のアルカリが取り除かれてアルカリセルロース IV へと転移した。RH = 90%で測定したアルカリセルロース IV の繊維回折図を **Fig. 4-1c** に示す。観測された回折点の面間隔を算出し、二本鎖単斜晶の単位格子[2]で指数付けを行った。その結果、格子定数は a = 9.21 Å, b = 9.87 Å, c = 10.35 Å, γ = 124.7°と算出された。Nishimura と Sarko が報告した値[2]よりも c 軸以外は大きい値となった。また子午線上の回折点 00l において、l が奇数の回折点が観測されないことから、空間群は $P2_1$ であることが示唆された。しかしながら、子午線近くの第三層線に見られる強い回折点は、この単斜晶の単位格子では指数付けすることができなかった。これに類似した回折点はセルロース III_{II} の繊維回折図においても観測されており、これはブラッグ反射によるものではなく散漫散乱であることが報告されている[110]。従って、今回アルカリセルロース IV の繊維回折図で見られた回折点も、同様のものである可能性が高いと考えられる。

アルカリセルロース IV を乾燥させるとセルロース II が得られた（**Fig. 4-1d**）。セルロー

スIIのX線繊維回折図はアルカリセルロースIVよりもピークが鋭く、更に多くのピークが観測されたことから、セルロースIIの試料の方がより結晶性が高いことがわかった。しかしアルカリセルロースIVとセルロースIIの2つのパターンは、全体的な特徴を見ると非常によく似ていた（**Fig. 4-1c, d**）。一番大きな違いは赤道上の最も内側の回折点、すなわち $1\bar{1}0$ と指数付けされる回折点の位置であり、セルロースIIでは $d1\bar{1}0 = 7.29$ Å に現れているのに対し、アルカリセルロースIVは $d1\bar{1}0 = 8.42$ Å であった。セルロースIIの全ての回折点（**Fig. 4-1d**）を二本鎖単斜晶の単位格子で指数付けしたところ、単位格子は $a = 8.10$ Å, $b = 9.08$ Å, $c = 10.36$ Å, $\gamma = 117.3°$ と算出された。これはLanganらが報告している値[24]とほぼ一致した。アルカリセルロースIVの回折図で見られた子午線近くの第三層線上の回折点はセルロースIIの回折図においても観測されたが、その強度は非常に小さかった。また、アルカリセルロ

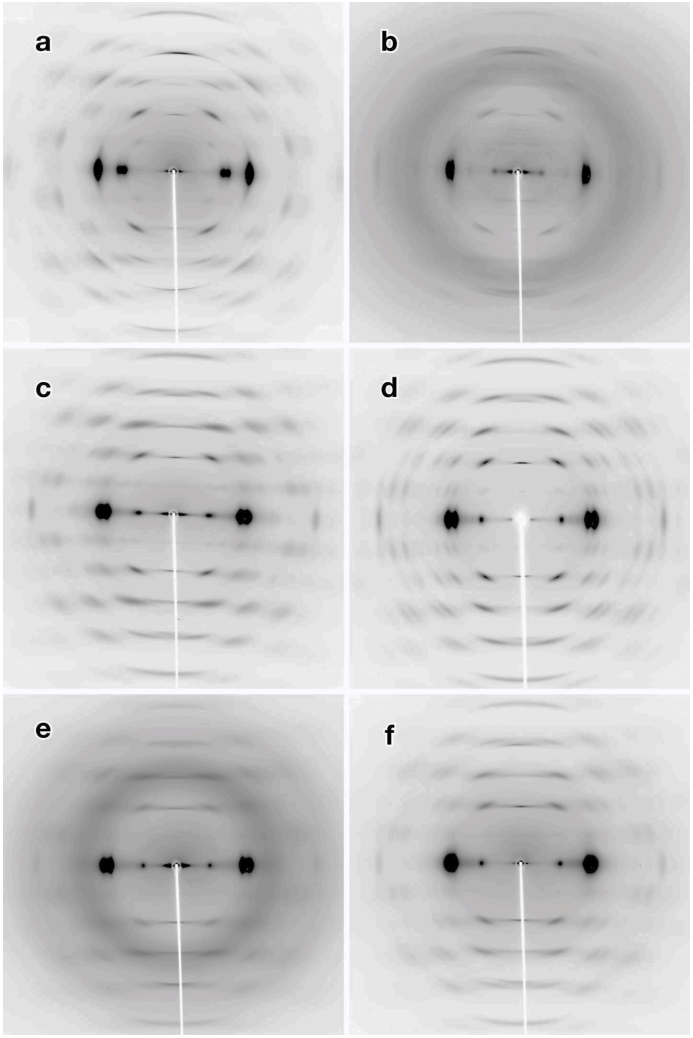

Fig. 4-1. Synchrotron X-ray fiber diffraction diagrams of (a) cellulose I, (b) Na-cellulose I, (c) Na-cellulose IV, (d) mercerized cellulose II, (e) cellulose II hydrate, and (f) cellulose II' (dried cellulose II hydrate) prepared from ramie fibers.

ース IV とセルロース II のパターンが類似していたことは、セルロース分子鎖のコンフォメーションや堆積様式に大きな差がないことを示していると考えられる。

セルロース II は無水ヒドラジンで膨潤させた後に水洗すると、セルロース II 水和物に転移した。RH = 100%において測定されたセルロース II 水和物の X 線回折図を **Fig. 4-1e** に示す。回折図は全体的に不明瞭であり、セルロース II 水和物の試料は結晶性が低いことがわかった。ただし赤道上に 3 つの強い回折点が観測されるなど、回折図の特徴はアルカリセルロース IV やセルロース II の回折図（**Fig. 4-1c, d**）と類似していた。いくつかの強い回折点から算出された単位格子は、単斜晶（a = 9.68 Å, b = 9.95 Å, c = 10.35 Å, γ = 125.8°）であった。回折点をアルカリセルロース IV やセルロース II と同様に指数付けしたため、単位格子の取り方が異なる Lee らの報告した単位格子の値 [3] とは一見異なるが、同様の単位格子の取り方をした場合の値と比較すると（1.3.1 参照）、今回得られた値はほぼ一致していた。一方、セルロース II 水和物を乾燥させて得られたセルロース II'の回折図を **Fig. 4-1f** に示した。マーセル化セルロース II（**Fig. 4-1d**）と同様のパターンを示しおり、脱水によりセルロース II へと戻ったことがわかった。しかしながら各回折点は不明瞭になっており、結晶性は大幅に低下していた。

2 種類の水和セルロースであるアルカリセルロース IV とセルロース II 水和物の X 線回折図を比較してみると、いくつか異なる特徴を示していることがわかった（**Fig. 4-1c, e**）。そのうちのひとつは、赤道上の最も内側に現れる $1\bar{1}0$ の回折ピークの位置であり、セルロース II 水和物の方がアルカリセルロース IV に比べてより内側に観測され、$d1\bar{1}0$ = 8.73 Å であった。格子体積で比較してみると、セルロース II 水和物とアルカリセルロース IV はセルロース II よりそれぞれ 19%、14%大きかった。この増加分は水和水によるものだと考えられるため、セルロース II 水和物はアルカリセルロース IV より多くの水分子を含んでいることになる。セルロース結晶中の水和水が液体の水と同じ密度で存在すると仮定すると、この格子体積の増加分はそれぞれ 1 グルコース残基あたり 1.1 個、0.8 個の水分子に相当しており、過去に提案されているそれぞれの結晶構造モデルとおおよそ一致した [2,3]。また、結晶性はセルロース II 水和物がアルカリセルロース IV よりもかなり低かった。多くの水分子を取り込むことで、結晶構造により乱れが生じるのではないかと考えられる。

4.3.2. 固体 ^{13}C NMR スペクトル

Fig. 4-2 にアルカリセルロース IV、セルロース II、セルロース II 水和物、セルロース II' の固体 ^{13}C NMR スペクトルを示す。アルカリセルロース IV とセルロース II では、C1、C4、C6 がダブレットになっており、これは典型的なアルカリセルロース IV とセルロース II のスペクトル [39,111] であった（**Fig. 4-2a**, **b**）。2 つのスペクトルを比較すると、各炭素原子に由

来するピーク位置はほぼ同じであり、セルロース分子鎖のコンフォメーションは非常に類似していることがわかった。しかし、アルカリセルロース IV のスペクトルでは 82–86 ppm や 62 ppm に現れる非晶領域に由来するピークがセルロース II に比べて大きかった。この結果は X 線回折の結果と矛盾しない。

一方、セルロース II 水和物に転移すると一見スペクトルはセルロース II から大きく変化しているようにみえる（**Fig. 4-2b**, **c**）。しかし、各ピークの化学シフトは C4 のダブレットなどの鋭いピークから明らかであるようにほとんど変化していない。この 2 つのスペクトルの主な違いは、82–86ppm や 62ppm に現れる非晶に由来すると言われているピークがセルロース II 水和物のスペクトルではより大きく、鋭くなったことである。このような現象はアルカリセルロース IV の場合と同様であるが（**Fig. 4-2a**）、ピーク面積はアルカリセルロースの場合よりも更に大きかった。従って、セルロース II 水和物はその無水物であるセルロース II に類似したコンフォメーションを有し、結晶サイズはセルロース II に比べて低いという点ではアルカリセルロース IV と同様であるが、結晶サイズはアルカリセルロース IV よりも更に小さいことがわかった。

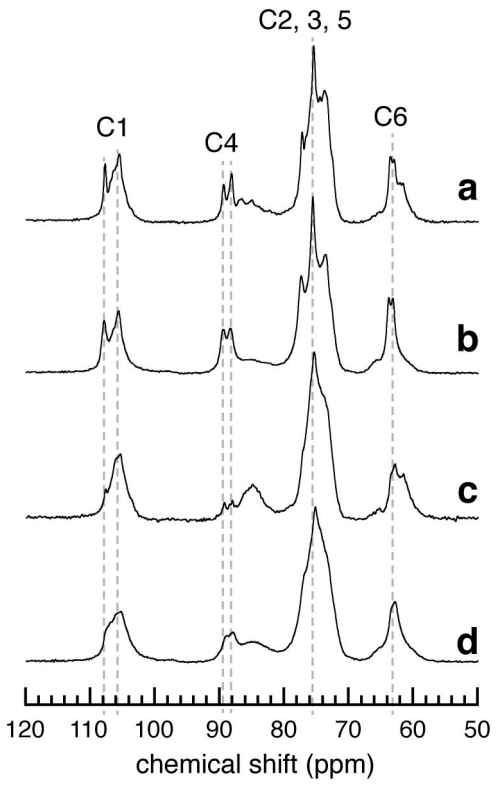

Fig. 4-2. Solid-state CP/MAS ^{13}C NMR spectra of (a) Na-cellulose IV, (b) mercerized cellulose II, (c) cellulose II hydrate, and (d) cellulose II' (dried cellulose II hydrate).

セルロース II'のスペクトルは各炭素のピーク幅が広くなったこと、結晶表面に由来するピーク面積が大きくなったこと以外は、マーセル化セルロース II とほぼ同じであった（**Fig. 4-2b**, **d**）。X 線回折測定の結果とも合わせると、セルロース II 水和物はアルカリセルロース IV より多くの水分子を取り込んで結晶格子を拡大させるため、セルロース II 水和物の乾燥によって得られるセルロース II'はマーセル化セルロース II と比べて結晶性が低く、より乱れた構造になるのだと考えられる。

アルカリセルロース IV の C6 に由来するピークの化学シフトは 63.0 および 63.6 ppm、セルロース II の C6 に由来するピークの化学シフトは 63.2 および 63.9 ppm であった。これら全ての化学シフトは、ヒドロキシメチル基の *gt* コンフォメーションに相当するとされる範

囲に含まれていた[92]。この結果はアルカリセルロース IV とマーセル化セルロースの X 線回折による構造解析の結果と一致していた[2,24]。またセルロース II 水和物の化学シフトもセルロース II からほとんど変化しないため、セルロース II 水和物の C6 ピークも *gt* コンフォメーションを示す範囲に含まれているといえる。しかし、これは Lee らが提案したセルロース II 水和物のモデル[3]とは矛盾していた。

4.3.3. 乾燥による水和セルロースからセルロース II への転移

相対湿度を 100%から 0%まで減少させながら、アルカリセルロース IV とセルロース II 水和物の X 線回折測定を行った。得られた赤道方向と子午線方向の X 線回折プロファイル変化を **Fig. 4-3** に示す。水和セルロースとセルロース II に共通する赤道上の回折ピーク $1\bar{1}0$、110、020 が $Q = 0.5–2.0$ Å^{-1}、子午線上の回折ピーク 002 が $Q = 1.0–1.5$ Å^{-1} に観測された。測定開始時、すなわち RH = 100%において、プロファイルはそれぞれ明確なアルカリセルロース IV、セルロース II 水和物のパターンであり、$1\bar{1}0$ のピーク位置はアルカリセルロース

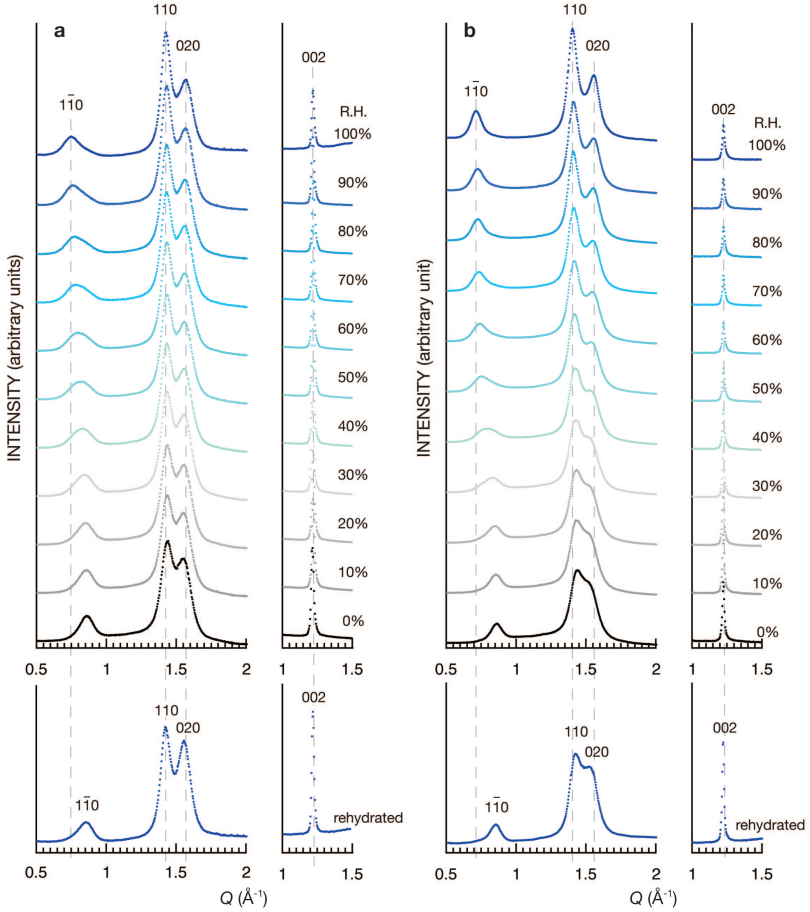

Fig. 4-3. Changes in the equatorial and meridional synchrotron X-ray fiber diffraction profiles during the drying and subsequent wetting of (a) Na-cellulose IV and (b) cellulose II hydrate. The term *Q* denotes the scattering vector ($2\pi/d$).

で $Q = 0.74$ Å^{-1}、セルロース II 水和物で $Q = 0.71$ Å^{-1} であった。相対湿度が減少していくと、この $1\bar{1}0$ のピークは徐々に高 Q 側にシフトしていき、更にピーク幅は広くなっていった。しかし、アルカリセルロース IV は RH = 50%、セルロース II 水和物は RH = 40%を下回ると、ピークは引き続き高 Q 側にシフトしたが、ピーク幅は鋭くなっていった。最終的に、RH = 0%では $1\bar{1}0$ のピークはアルカリセルロース IV で $Q = 0.86$ Å^{-1}、セルロース II 水和物では $Q = 0.85$ Å^{-1} となり、セルロース II に相当する値に達した。この乾燥過程全体を通して、110 および 020 のピークはそれぞれ少しずつ高 Q 側、低 Q 側にシフトした以外に変化はなかった。002 のピークも同様に、ピークは若干鋭くなったものの大きな変化は観測されなかった。

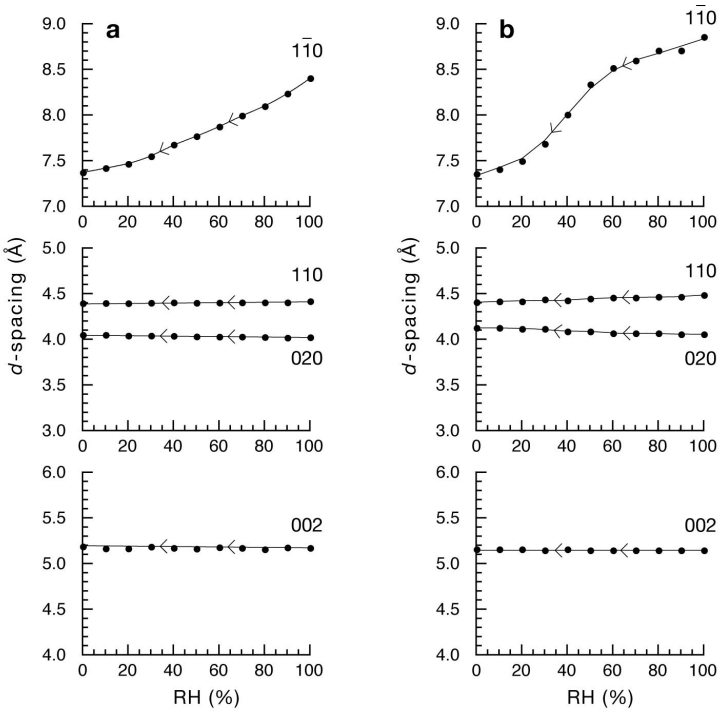

Fig. 4-4. Changes in the (1 $\bar{1}$ 0), (1 1 0), (0 2 0), and (0 0 2) plane *d*-spacing during the drying of (a) Na-cellulose IV and (b) cellulose II hydrate, calculated from the profiles shown in **Fig. 4-3a** and **4-3b**, respectively.

乾燥過程におけるプロファイル（**Fig. 4-3**）の全てのピーク位置から面間隔を算出し、**Fig. 4-4** に示した。アルカリセルロース IV の場合、$(1\bar{1}0)$面の面間隔（$d1\bar{1}0$）は乾燥過程を通して 8.45 Å から 7.33 Å へと徐々に減少した。同様にセルロース II 水和物の場合も、$d1\bar{1}0$ は 8.86 Å から 7.36 Å へと徐々に減少した。その他の面間隔、$d110$、$d020$、$d002$ は、アルカリセルロース IV ではそれぞれおよそ 4.4 Å、4.0 Å、5.2 Å でほぼ一定の値をとっていた。セルロース II 水和物でも $d110$ と $d020$ はほとんど一定であったが、$d110$ は 4.49 Å から 4.41 Å まで減少し、$d020$ は 4.06 Å から 4.13 Å に増加した。$d002$ は 5.15–5.16 Å でほぼ一定の値を保っていた。各面間隔は徐々に変化し続けるか一定の値を保っており、セルロース II 水和物

からセルロース II への転移には転移点がないことがわかった。

1.2.1 で述べたように、セルロース II は [110] 方向に疎水的に堆積した分子鎖シート構造を形成しており [24]、水和セルロースではこのシート間に水分子が存在するとされている [2,3]。そして、今回得られた乾燥過程におけるアルカリセルロース IV とセルロース II 水和物の $d1\bar{1}0$、$d110$、$d020$ から横断面の単位格子を算出し、[110] 方向が一致するように重ね合わせたものが **Fig. 4-5a** と **b** である。アルカリセルロース IV、セルロース II 水和物の場合とも、[110] 方向の対角線の長さは一定であるが、もう一方の対角線の頂点が *a* 軸方向に移動していくのがわかる。これらの結果から、水和セルロースが乾燥されると、疎水的な相互作用により堆積した分子鎖シートはその構造を保ちながら、水分子の放出によって隣り合うシートどうしが *a* 軸方向に近づいていき、セルロース II へと転移するというメカニズムが考察された（**Fig. 4-5c**）。

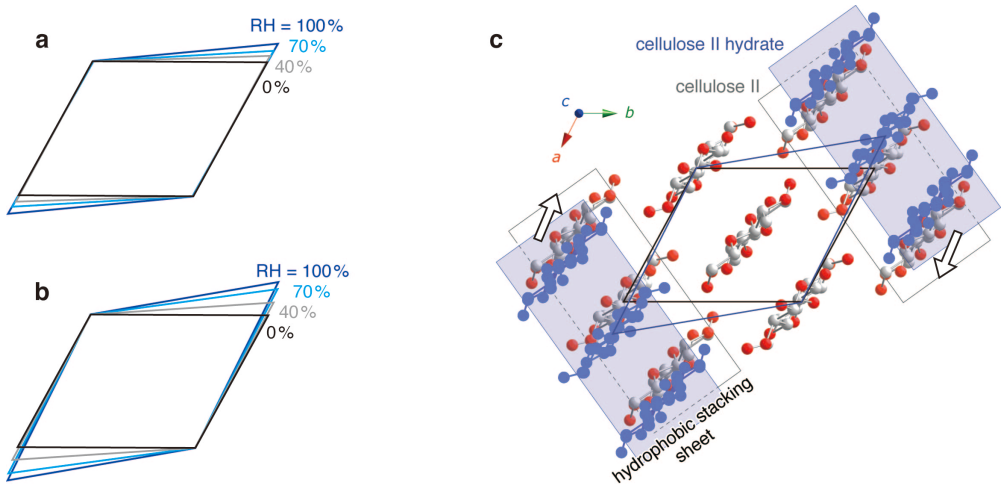

Fig. 4-5. Changes in cross-sectional unit cells during drying of (a) Na-cellulose IV and (b) cellulose II hydrate, and (c) the proposed transition mechanism from cellulose II hydrate to cellulose II based on (b). The cellulose chains of cellulose II and cellulose II hydrate form a sheet structure that forms stacks from the hydrophobic interaction of glucopyranose rings. When cellulose II hydrate is dried, the water molecules between the sheets are released, resulting in a narrowing of the distance between the sheets. The contraction direction is orientated along the *a*-axis, represented by the arrows in the figure.

乾燥過程に続いて、数滴の水を滴下して試料を再湿潤させた（**Fig. 4-3**, rehydrated）。ピーク位置は RH = 0%のときとほぼ同じであった。すなわち水和セルロースは一旦脱水してセルロース II になってしまうと、再湿潤させても構造に変化がないことが明らかとなった。ただし、プロファイルにはピークが若干鋭くなるなど僅かながら湿潤による変化が見られた。このような細かな変化が起きるのは、おそらく結晶表面に水が吸着することにより分子鎖の歪みが解消されるためであろう。さらに、セルロース II に完全に転移する前に再湿潤させた際には結晶構造にどのような変化が起きるのかについて検討した。水和セルロー

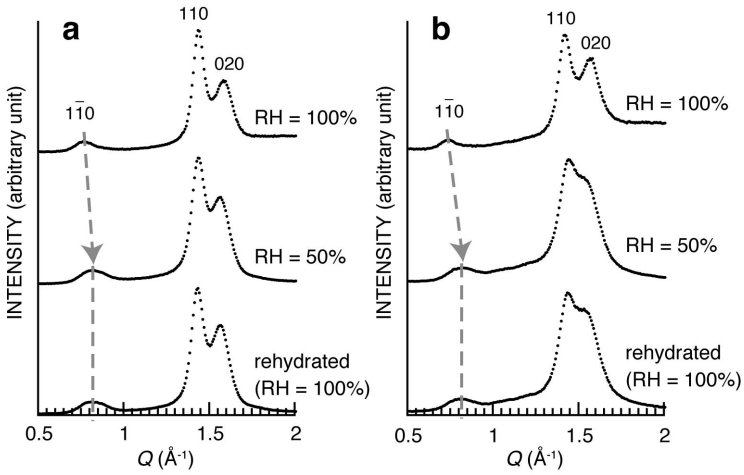

Fig. 4-6. Equatorial X-ray diffraction profiles of (a) Na-cellulose IV and (b) cellulose II hydrate at RH = 100%, dried at RH = 50% and subsequently rehydrated at RH = 100%. The term Q denotes the scattering vector ($2\pi/d$).

スを一旦 RH = 50%まで乾燥させ、これを RH = 100%で再湿潤させた（**Fig. 4-6**）。1$\bar{1}$0 のピークは相対湿度を 100%から 50%に下げると高 Q 側にシフトし、結晶格子内から水分子の一部が放出された。この状態から相対湿度を再び 100%に戻したが、ピーク位置は変化しなかった。これは水を滴下して再湿潤させた場合も同様であった（データは省略）。この結果より、水和セルロースが完全に乾燥する前に再湿潤させると転移の進行は中断されるが、元の状態に戻る方向には進まないということがわかった。結晶格子内に捕捉された水分子は RH = 100%または水中に保存されない限り、不可逆的に空気中へ放出されるのだということになる。

以上のような転移点がない、転移が不可逆といった転移の特性は、第 2 章や第 3 章で β キチンや β-1,3-グルカン／キシランが明確な転移点を伴って可逆的に転移したのと極めて対照的であった。これらの転移挙動の違いは、水分子とセルロース分子鎖間の相互作用の違い、もしくは結晶格子内における水分子の役割における違いによるものだと考えられる。すなわち、水和セルロースの結晶格子内に存在する水分子は、セルロース分子鎖との間に特定の相互作用を有しておらず、結晶構造の安定化に寄与していないのであろう。従って、これらの水分子はおそらく結晶格子中にランダムに存在していると考えられる。これはアルカリセルロース IV に関しては提案されている結晶構造モデル [2] と矛盾するが、セルロース II 水和物のモデルとは一致している [3]。また固体 ^{13}C NMR スペクトルで示唆された水和セルロースとセルロース II の分子鎖コンフォメーションの類似性は、セルロース分子鎖と水分子の相互作用が希薄であることを裏付けているといえる。さらに、今回得られた単位格子も含め、これまでに報告されているアルカリセルロース IV やセルロース II 水和物の単位格子 [2,3,26,32] にはいくらか差があるが、これは試料の調製方法や保存方法の違いによって結

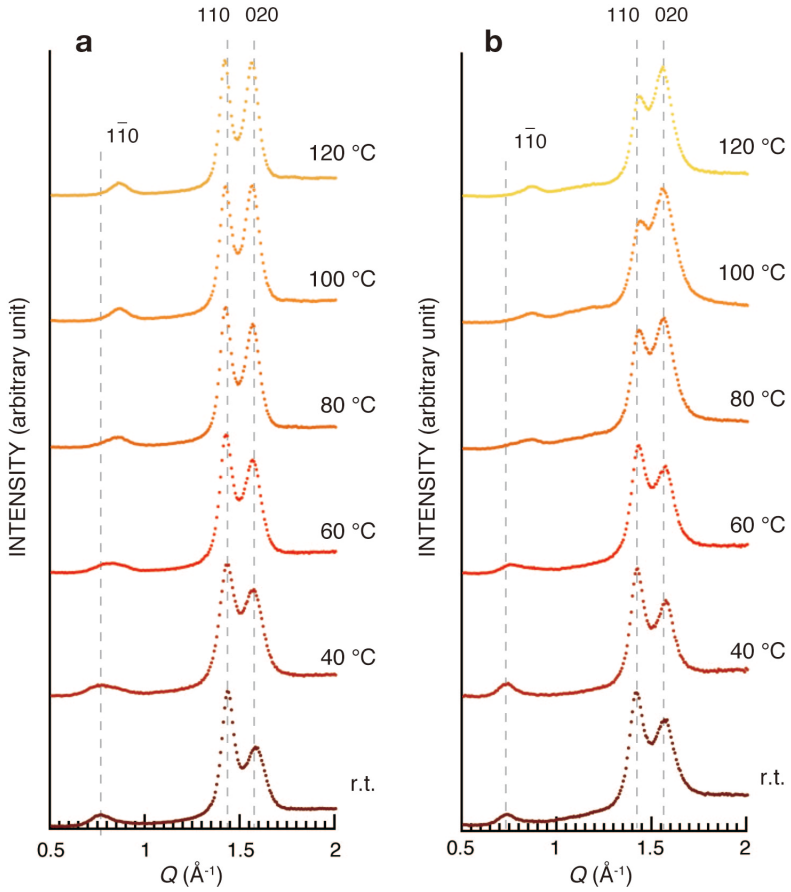

Fig. 4-7. Equatorial X-ray diffraction profiles of (a) Na-cellulose IV and (b) cellulose II hydrate after annealing in water for a period of 1 h at different temperatures. The term *Q* denotes the scattering vector (2π/*d*).

晶格子中の水分子の数が若干変化するためではないかと考えられる。

4.3.4. 高温に対する水和セルロースの安定性

アルカリセルロース IV およびセルロース II 水和物の試料を水に浸した状態で 1 時間熱処理し、RH = 100%で X 線回折測定を行った（**Fig. 4-7**）。室温と 40℃で処理した試料は、1$\bar{1}$0、110、020 の 3 つのピーク全てにおいて水和セルロースの標準的な位置に現れた。しかし、60℃で処理した試料は 1$\bar{1}$0 のピークが若干高 *Q* 側にシフトし、80℃を超えるとほぼセルロース II に相当する位置にまで達した。110 と 020 のピークはどの温度においてもほぼ同じ位置に現れたが、強度比には徐々に変化が見られた。これらのピークの面間隔を計算し、**Fig. 4-8** に示した。水和セルロースの乾燥過程と同様に、*d*1$\bar{1}$0 は温度上昇とともに徐々に減少し、一方で *d*110 と *d*020 はほぼ一定であった。従って、水和セルロースは乾燥と同様に加熱によってもセルロース II へと転移することがわかった。すなわち水和セルロースは、たとえ水中に保存されていても高温に対しては不安定であった。

水和セルロースの加熱によって得られたセルロース II は、乾燥によって得られるセルロ

ース II とは少し異なる特徴を示した。水和セルロースを乾燥させた際には、110 と 020 のピークが互いに近づく傾向が見られ、これはセルロース II 水和物で特に顕著であった（**Fig. 4-3**）。一方で、加熱処理ではこのような傾向は見られなかったが、一般的なセルロース II では 110 と 020 の強度比がほぼ等しいか、もしくは 110 の方が少し強いのに対し、セルロース II 水和物を 100℃以上で加熱処理して得られた試料では 020 が 110 の強度を上回っていた（**Fig. 4-7b**）。このような違いは、脱水によって生じる結晶構造中の歪みが脱水条件によって異なるためではないかと考えられる。

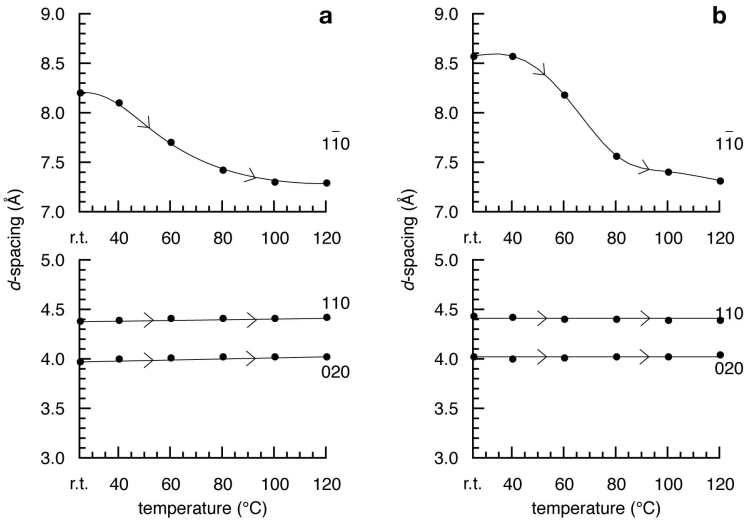

Fig. 4-8. Changes in the (1 $\bar{1}$ 0), (1 1 0), and (0 2 0) plane *d*-spacing on annealing (a) Na-cellulose IV and (b) cellulose II hydrate in water at various temperatures, calculated from the profiles shown in **Fig. 4-7**.

4.4. 結論

二種類の水和セルロース、アルカリセルロース IV およびセルロース II 水和物からセルロース II への転移は、乾燥もしくは水中において加熱することにより起こった。いずれの場合においても転移は不可逆であり、また転移点が存在せず徐々に転移が進行した。以上のような転移特性は、第 2 章や第 3 章のキチンやβ-1,3-グルカンおよびβ-1,3-キシランの場合とは全く異なっており、このことは水和セルロース中の水分子がランダムに存在することを示唆しているのではないかと考えらる。

またこのような脱水による転移がどのように進行するのかについて考察を行った。水和セルロース中に存在する水分子は疎水的な相互作用で堆積した分子鎖シート間に存在しているが、乾燥もしくは加熱が始まると分子鎖シート間から徐々に放出される。このとき、分子鎖シート同士が *a* 軸方向に向かって近づいていくが、シートの構造自体は保持されているということがわかった。

以上のような転移についてセルロースII水和物とアルカリセルロースIVは同様の挙動を示したが、結晶構造については異なる点が見られた。セルロース II 水和物はアルカリセルロース IV と比較してより多くの水を含んでおり、またより乱れた構造であった。ただし、アルカリセルロースIVは水分子の配列、セルロースII水和物はヒドロキシメチル基のコンフォメーションといった点について、これまでに提案されているモデルとはそれぞれ矛盾する結果が得られたため、両者の結晶構造については今後解析し直す必要があると考えられる。

水和セルロースは膨潤処理を介さなければ形成されず安定性にも乏しいため、これまであまり大きな注目を集めることはなかった。しかし最近では、天然のセルロースやセルロースII と比較して、水和セルロースの酵素糖化性は高いことが実証されている[112]。本研究で得られた水和セルロースの構造や安定性の結果を基に、このような水和セルロースの特性を活かした研究が更に発展していくことが期待される。

5. 低温領域における水和パラミロンの熱膨張挙動と結晶転移

5.1. 緒言

パラミロンは顆粒状の物質であるため（**Fig. 3-1b** 参照）、配向試料を調製できないという構造解析に用いるには決定的な欠点がある。しかしながら、第 3 章では培養したミドリムシから得られる未乾燥状態のパラミロンが、非常に高い結晶性を有していることがわかった。パラミロンが高結晶性であることはそれ以前から知られていたことであるが、第 3 章で明らかになったように乾燥／湿潤を繰り返すと結晶性が低下するため、未乾燥試料の結晶性はこれまで報告されたものにも増して高く、X 線ディフラクトメトリー測定で得られたプロファイル（**Fig. 3-5a**, RH = 100%）は解像度が約 1.5 Å、Scherrer 式で算出される結晶サイズは 40 nm を超えていた。そこで本研究では、この試料を用いてより高い解像度の回折データを得ることを目指し、シンクロトロン放射光を用いた粉末 X 線回折測定を行うこととした。

さらに本研究では室温付近から低温領域にかけて（300～100 K）測定を行い、この温度領域における熱膨張挙動についても検討した。熱膨張挙動と結晶構造とは密接な関係にあるため、熱膨張挙動について理解することは結晶構造自体の理解を深めることにつながる上、熱的な安定性への理解は応用研究の基礎としても欠かせない知見である。従ってセルロース [109,113-116]、アミロース [117]、キチン [118,119]、マンナン [120] といった主要な天然多糖については熱膨張挙動に関する研究が行われているが、これまでに β-1,3-グルカンについての報告はない。そしてこのような実験を行ったところ、低温領域で水和パラミロンは室温における構造とは異なる「低温相」として存在することがわかったので、本章ではこの新たに発見された構造についても報告する。

5.2. 実験方法

5.2.1. 試料調製

3.2.1 と同様の方法で *Euglena gracilis* NIES-48 を培養、精製し、パラミロン試料を得た。試料は水中もしくは RH = 85%で保存した。

5.2.2. シンクロトロン放射光 X 線粉末回折測定

シンクロトロン X 線粉末回折測定は高輝度放射光施設 SPring-8 のビームライン BL02B2 で行った。RH = 85%で保存したパラミロン試料をキャピラリーに封入し、大型デバイシェラーカメラに取り付けた。X 線の波長は CeO_2 を用いて補正したところ、0.99746 Å であった。回折データはイメージングプレートに記録し、測定温度は 100～300 K とした。温度は、

窒素ガス吹き付け型装置により制御した。

得られたプロファイルのピーク位置は、非線形最小二乗法プログラムを用いたピーク分離によって決定した。線熱膨張率（α）と体積熱膨張率（β）は以下の計算式より求めた。

$$\alpha = \frac{1}{l_{t=0}} \times \frac{\Delta l}{\Delta t}$$

$$\beta = \frac{1}{V_{t=0}} \times \frac{\Delta V}{\Delta t}$$

ただし、l は格子定数、V は格子体積、t は温度（K）とする。

5.2.3. 固体 CP/MAS ^{13}C NMR スペクトル測定

4.2.3.と同様の方法で行った。ただし、測定は 298 K と 245 K で行い、試料温度は $^{207}Pb(NO_3)_2$ で補正した。

5.3. 結果と考察

5.3.1. 300 K と 100 K における水和パラミロンのシンクロトロン放射光 X 線粉末回折

水和パラミロンのシンクロトロン X 線粉末回折測定を 300 K および 100 K で行い、得られたプロファイルを **Fig. 5-1** に示す。室温、すなわち 300 K 付近における X 線回折プロファイルは、第 3 章で得られた同様の試料の X 線回折プロファイル（**Fig. 3-2a**）よりも、更に解像度の高いものが得られた（**Fig. 5-1a**）。観測されたピークは極めて鋭く、高い Q 領域にまで渡って一本一本に分離したピークが観測された。さらに、Q = 0.82 Å^{-1} に観測されたピークのように、強度が小さいためにこれまでには観測されなかったピークも観測された。こ

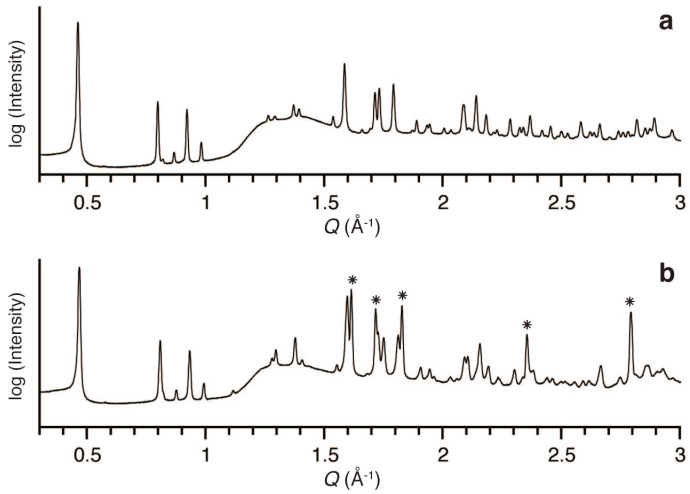

Fig. 5-1. Synchrotron X-ray diffraction profiles of hydrate paramylon obtained at (a) 300 K and (b) 100 K. The peaks indicated by an asterisk (*) are derived from ice crystals (ice Ih). The term Q is the scattering vector ($2\pi/d$).

のような新たに観測された回折も含め、全ての回折ピークはこれまでに報告されている六方晶の単位格子で指数付けすることができ、格子定数は a = 15.782 (2) Å, c = 18.580 (2) Å と算出された。これらの値は、第 3 章で求めた値や以前に報告された値 [9] とほぼ一致した。

100 K で得られたプロファイルは（**Fig. 5-1b**）、300 K で得られたものとほぼ同様のパターンであったが、いくつか異なる点が見られた。Q = 1.6 Å^{-1} 以上の領域に、300 K では観測されなかった強く鋭いピークが現れたが、これらは全て六方晶氷（Ice Ih）と呼ばれる氷の結晶に由来するピークであった [121]。また、特に Q = 1.0–1.5 Å^{-1} で顕著であったが強度比に変化が見られたほか、多くのピークは高 Q 領域側へと若干シフトしていた。さらに各ピークの幅は広くなり、解像度が低下していた。この結果は、100 K に冷却することによって水和パラミロンが有していた非常に高い結晶性が低下することを示していた。300 K のときと同様の六方晶の単位格子を仮定して指数付けし、単位格子を求めたところ、a = 15.586 (6) Å, c = 18.619 (7) Å と算出された。300 K における単位格子と比較すると、a 軸は 1.2%減少、一方で c 軸は 0.2%増加し、体積は 2.3%減少していた。

5.3.2. 300 K から 100 K における水和パラミロンの熱膨張挙動

水和パラミロンを 300 K から 100 K まで 25 K ずつ冷却させた際の変化をシンクロトロン粉末 X 線回折により観測した（**Fig. 5-2**）。各温度における格子定数と格子体積を算出した結果を **Fig. 5-3** に示す。

300 K から 100 K までの水和パラミロンの熱膨張挙動は 250 K を境に大きく異なっていた。300 K から 250 K までは回折プロファイルは **Fig. 5-1a** のような室温で観測されるパターンから **Fig. 5-1b** のような低温で観測されるパターンへと変化した（**Fig. 5-2**）。それと同時に、格子定数と格子体積にも著しい変化が見られ、a 軸と格子体積は大幅に減少し、c 軸は僅かに増加した（**Fig. 5-3**）。一方、250 K 以下の温度では、回折プロファイルのパターンは **Fig. 5-1b** と同様で大きな変化は見られなかった（**Fig. 5-2**）。 また格子定数と格子体積の変化も非常に小さく、直線的に減少した（**Fig. 5-3**）。従って、300 K から 100 K までの冷却による熱膨張挙動は連続的な挙動ではなく、250～300 K の間に相転移が起きていることが示唆された。つまり、これまでに水和パラミロンとして観測されてきた「室温相」に加え、「低温相」というもう一つの相が存在することが明らかになった。そして水和パラミロンは一旦低温相へと転移すると、少なくとも 100 K までは安定であった。このような温度変化によって引き起こされる相転移は、高温においてセルロース I_β でも起こることが報告されている [116]。

水和パラミロンの低温相において、熱膨張係数は $\alpha_a = 1.50 \times 10^{-5}$ K^{-1}、$\alpha_c = 0.33 \times 10^{-5}$ K^{-1}、$\beta = 3.08 \times 10^{-5}$ K^{-1}、と算出された（**Fig. 5-3**）。α_a は α_c の約 5 倍の値を示しており、三重らせん間の距離に対して三重らせんの周期は低温相の冷却過程においてそれほど収縮しないこ

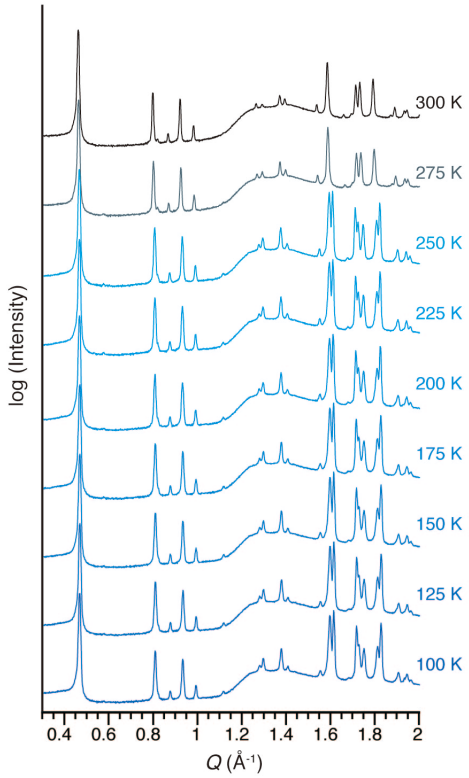

Fig. 5-2. Changes in synchrotron X-ray diffraction profile of hydrate paramylon on cooling from 300 to 100 K. The term Q is the scattering vector ($2\pi/d$).

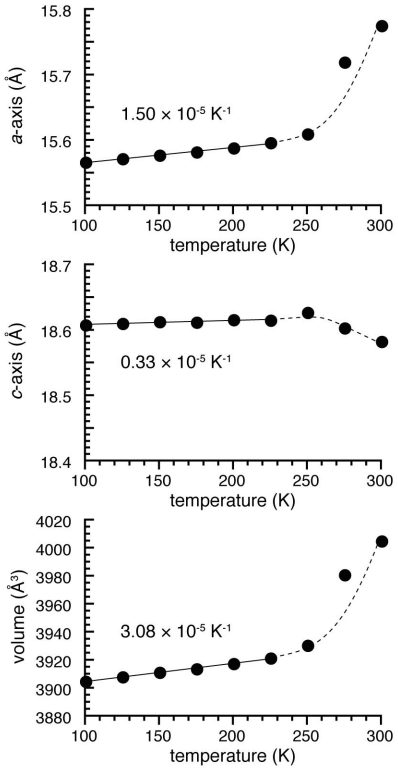

Fig. 5-3. Changes in the unit cell parameter and volume of hydrate paramylon on cooling from 300 to 100 K, calculated from the peaks shown in **Fig. 5-2**. The values of the thermal expansion coefficients are also given.

とがわかった。また熱膨張係数の絶対値はこれまでに報告されている他の多糖のものと大きく違わなかった[109,113,114,116-120]。しかしながら、分子鎖方向の熱膨張係数 α_c は、伸びきり鎖構造を持つセルロースやキチンの値と比較しても小さく、二重らせん構造を持つ A 型アミロースや B 型アミロースでは負の値を示すのに対して正の値であった。

5.3.3. 水和パラミロンの室温相と低温相間の転移

相転移が起きている温度領域について更に実験を行った。240～300 K 間での冷却過程とそれに続く加熱過程を 10 K 毎にシンクロトロン X 線粉末回折により観測した（**Fig. 5-4**）。算出した格子定数と格子体積の変化を **Fig. 5-5** に示す。

冷却過程では 270 K において室温相の回折パターン（**Fig. 5-1a**）から低温相に特有のパターン（**Fig. 5-1b**）へと一部変化し、260 K では完全に変化していた（**Fig. 5-4a**）。一方、加熱過程では 270～280 K において低温相の回折パターン（**Fig. 5-1b**）から室温相のパターン（**Fig. 5-1a**）へと戻った（**Fig. 5-4b**）。以上の結果から、室温相と低温相間の転移は可逆的であり、転移点が 270 K 付近に存在することがわかった。また相転移が起こると、格子定数と格子

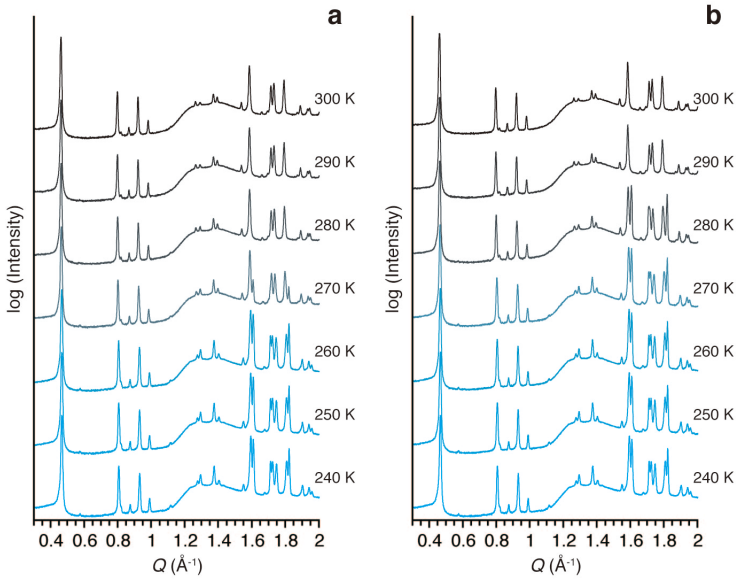

Fig. 5-4. Changes in the synchrotron X-ray diffraction profile of hydrate paramylon (a) on cooling from 300 to 240 K, and (b) on subsequent heating from 240 to 300 K. The term Q is the scattering vector ($2\pi/d$).

体積は急激に変化した（**Fig. 5-5**）。*a* 軸と格子体積は室温相から低温相への転移で減少、その逆の転移では増加した。一方、*c* 軸は室温相から低温相への転移で増加、その逆の転移では減少した。

興味深いことに、転移点は水の凝固点と非常に近い値を示し、従って相転移が起こるとほぼ同時に六方晶氷に由来するピークも出現／消失した。試料は余分な水分を取り除くために RH = 85%にて保存したものを用いているが、これらの六方晶氷に由来するピークは結晶表面に残存している少量の水が凍って生じたのではないかと考えられる。第 3 章では水和パラミロンの *a* 軸が相対湿度に依存して変化するという結果が得られており、結晶表面に吸着した水分子が結晶構造に影響を及ぼすことを示唆しているため、本研究で観測された相転移も吸着水の凝固／溶解に起因している可能性がある。しかしながら、加熱過程における 280 K のプロファイルでは氷のピークは残存しているにもかかわらず回折パターンは室温相に完全に変化しているため（**Fig. 5-4b**）、

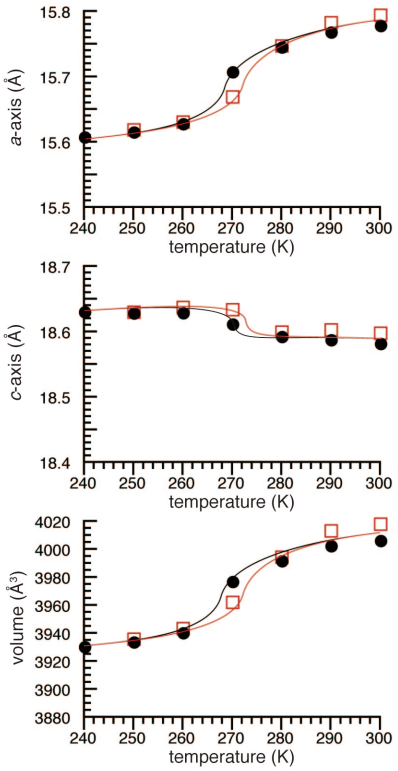

Fig. 5-5. Changes in the unit cell parameters and volume of hydrate paramylon on cooling from 300 to 240 K (filled circles) and subsequent heating from 240 to 300 K (open squares), calculated from the peaks shown in **Fig. 5-4**.

相転移の原因を吸着水であると断定することはできなかった。

5.3.4. 低温相の固体 ^{13}C NMR スペクトル

Fig. 5-6 にそれぞれ 298 K と 245 K で得られた室温相と低温相の固体 ^{13}C NMR スペクトルを示した。室温相のスペクトルは第 3 章で示したもの（**Fig. 3-3a**）や、これまでに報告されたもの[104,105] と同様の水和パラミロンに典型的なパターンが得られた（**Fig. 5-6a**）。ピークは非常に鋭く、C3、C4、C5 に由来する共鳴線は複数に分離しており、結晶構造中の対称性が低いことを示唆していた。低温相に転移すると、スペクトルはやはり複雑なパターンを示したが、ピーク幅がより広がったためにピークがどのように分離しているか判別するのは室温相よりも更に困難となった。X 線回折の結果においても低温相は室温相よりもピーク幅が広く結晶性が低下したことが示されており、固体 ^{13}C NMR スペクトルにおいてもピーク幅が広くなったのは低温相がより乱れた構造であることを示唆していると考えられる。ただし、固体 ^{13}C NMR においてはその結晶性に関係なく、分子の自由度が高いほどピークが鋭くなる場合もあるため、低温相においては表面の水分子が凍結したことも一因である可能性がある。いずれにせよ、以上のような理由から低温相についてはピークの正しい位置や強度を決定することはできなかったが、ピーク位置は特に C3、C4、C6 について明らかに変化しており、ピークの強度分布も C3、C6 で大幅に変化していた。

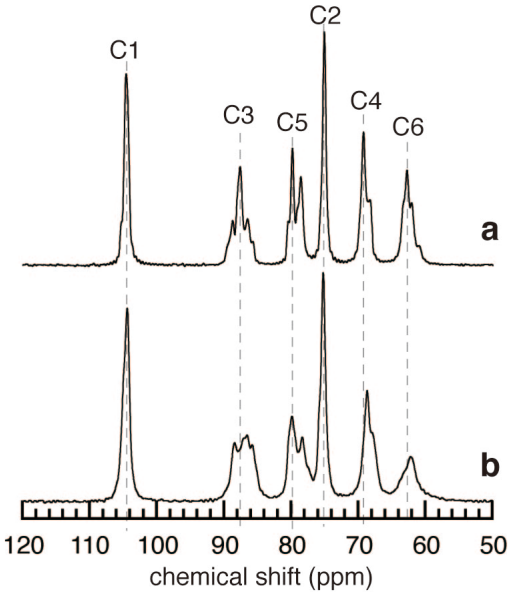

Fig. 5-6. Solid-state CP/MAS ^{13}C NMR spectra of hydrate paramylon: (a) RT phase obtained at 298 K, and (b) LT phase obtained at 245 K.

水和パラミロンの正確な結晶構造は明らかとなっていないため詳細な議論をすることはできないが、これらの結果は室温相と低温相の構造の違いについて幾つかの示唆を与えていた。まず、三重らせん構造において外側に位置している水酸基（C6）は三重らせん間の分子間水素結合、もしくは水分子を介した水素結合に深く関与していると考えられる[9,80]（**Fig. 1-9** 参照）。従って低温相に転移することによって C6 が大幅に変化していることは、水を介した水素結合様式が著しく変化したことを意味しており、その結果 *a* 軸の値に変化が生じたと考えられる。そのような変化と同時に、C3 に由来するピークが変化したことは

分子鎖のコンフォメーション自体にも変化が生じていることを示唆していた。この結果も、低温相への転移に伴って *c* 軸が僅かに変化したという X 線回折の結果を支持するものであった。

5.4. 結論

水和パラミロンには、これまでに室温付近で観測されていた「室温相」とは異なる「低温相」が存在していた。室温相と低温相間の転移は可逆的に 270 K 付近で起きた。低温相は室温相と比較して三重らせん間の距離が短く、一方で三重らせんの周期は僅かに長くなっていた。また低温相と室温相の X 線回折プロファイルのパターンには若干の違いが見られた。固体 ^{13}C NMR スペクトルにおいても低温相と室温相では異なるスペクトルが観測され、分子鎖のコンフォメーションや水素結合様式が変化していることを示唆していた。

しかしながら、*β*-1,3-グルカンの水和構造についてその結晶構造は完全に理解されておらず、この相転移についてもどのような変化が起こっているか詳細に議論することはできなかった。転移点が水の凝固点とほぼ等しいことは非常に興味深い結果であるが、これについても表面に吸着した水が氷晶を形成することと関係があるのか、もしくは結晶中に含まれる水和水自体が凝固点付近で何らかの変化を起こすためかといった判断はできない。低温側の熱膨張挙動についてはこれまでに行われた研究が数少ないため、水和構造のみならず様々な多糖結晶について研究を進めていくことで、低温相への転移機構を明らかにしたい。

6. 低温領域におけるA型およびB型アミロースの熱膨張挙動と結晶転移

6.1. 緒言

結晶構造を解明する上で最もよく利用されているX線回折測定や中性子回折測定などは、通常室温で行われる。しかしながら、水やその他の低分子を含む結晶の場合、電子顕微鏡を用いた測定を行う際には真空中でもこれらの分子を結晶構造中に保持するために、試料を凍結させ低温で観測を行うという手法が用いられる[6,50,122-125]。またA型アミロース結晶については単結晶を用いた結晶構造解析により結晶構造が明らかにされたが[4]、このような単結晶のX線回折も、通常は試料を凍結した状態で測定が行われる。このような低温において観測される構造は、通常室温において観測される構造と比較すると熱膨張により格子が収縮しているだろうということについては、当然これまでにも注意が払われていた。しかしながら、第5章において水和パラミロンは低温領域にいて相転移を起こし、このとき分子鎖のコンフォメーションや水素結合様式にも変化が生じていることが示唆された。このような構造の転移が起こることについてはこれまで報告がなく、従ってパラミロン以外の多糖についても低温において構造がどのように変化しているのかを理解することは極めて重要であると考えられる。そこで本研究では水和構造であるアミロースのA型およびB型結晶調製し、前章と同様にシンクロトロン放射光を用いたX線粉末回折測定を行うことにした。

6.2. 実験方法

6.2.1. 試料調製

スクロース 200 mM、スクロースホスホリラーゼ 200 mU/mL、マルトペンタオース 8 mM、グリコーゲンホスホリラーゼ 200 mU/mL、MOPS 緩衝液（pH 7.0）20 mM、DTT 1mM、EDTA 2mM を含む反応液を 37℃で 3 日間反応させた[126]。ここにエタノールを濃度が 30%になるように加えて反応を停止させたところ、白色沈殿が得られたのでこれを遠心分離により回収した。沈殿を凍結乾燥し、LiCl-DMAc に溶解させて GPC 測定を行ったところ、重合度は約 20 であった。

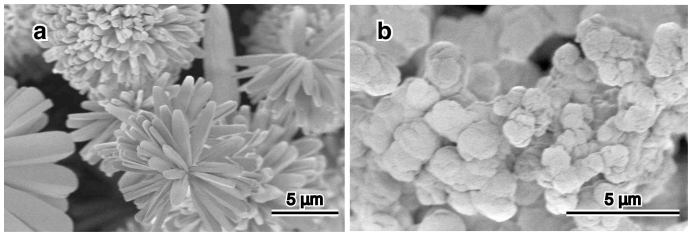

Fig. 6-1. SEM images of (a) A-amylose and (b) B-amylose crystals.

この合成アミロースを再結晶化させることにより、A 型および B 型アミロース結晶を調製した[127,128]。まず合成アミロースを 5 wt%で水に懸濁させ、120℃に加熱して溶解させた。120℃で 30～60 分置いた後、約 60℃まで徐々に冷却させ、ここに予め約 60℃に温めておいたアセトンを 50%になるように加えると白色沈殿が生じ、針状の A 型アミロース結晶が得られた（**Fig. 6-1a**）。一方、溶解させた後、そのまま徐々に室温まで冷却したところ、室温付近で白色沈殿が生じ、球状の B 型アミロース結晶が得られた（**Fig. 6-1b**）。

6.2.2. シンクロトロン放射光 X 線粉末回折測定

調製した A 型および B 型結晶は相対湿度 85%のデシケータ中に保存して余分な水分を除き、1 mm φ のキャピラリーに封入した。この試料について、シンクロトロン放射光 X 線粉末回折測定を九州シンクロトロン光研究センター（SAGA-LS）のビームライン BL15 にて行った。試料をデバイシェラーカメラに取り付け、試料の冷却装置を用いて 100～300 K の温度範囲で粉末回折測定を行った。温度は窒素ガス吹き付け型装置により制御した。波長は 1.8 Å、検出器にはイメージングプレート（IP）を用いた。波長および試料と IP 間の距離は Si 粉末を用いて補正した。

得られた回折プロファイルのピーク分離および熱膨張係数の算出は 5.2.2.と同様にして行った。

6.3. 結果と考察

6.3.1. 300 K と 100 K におけるアミロースのシンクロトロン放射光 X 線粉末回折

A 型アミロース結晶の 300 K および 100 K におけるシンクロトロン放射光 X 線粉末回折プロファイルを **Fig. 6-2** に示す。300 K において得られたプロファイル（**Fig. 6-2a**）は、こ

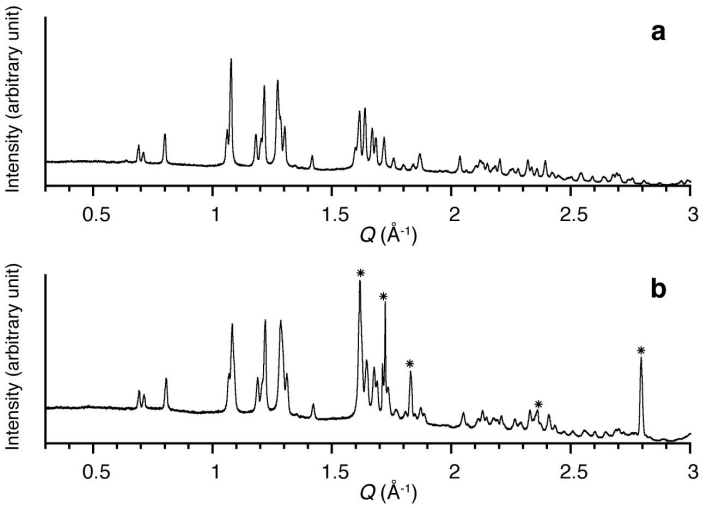

Fig. 6-2. Synchrotron X-ray powder diffraction profiles of A-amylose at (a) 300 K and (b) 100 K. The peaks indicated by an asterisk (*) are derived from ice crystals (ice Ih). The term Q is the scattering vector ($2\pi/d$).

れまでに報告されている A 型針状結晶から得られたもの[50,127]と同じようなパターンであった。しかし観測されたピークは非常に鋭いため、隣り合ったピークがよく分離していた。これらのピークについて既報の単斜晶の単位格子[4]を基に指数付けし、単位格子を求めたところ a = 21.031 (5) Å, b = 11.696 (3) Å, c = 10.660 (3) Å, γ = 122.42 (2) °と算出された。これらの値は Imberty らが報告した値[50]より若干小さいものの、おおよそ一致していた。一方、100 K において得られたプロファイル（**Fig. 6-2b**）は、氷に由来するピーク[121]が観測されたが、それ以外は 300 K におけるパターンと大きな違いはなかった。測定中、温度調節装置の窒素ガスの対流により、試料を封入しているキャピラリーの外側に室内の水蒸気が凍って付着してしまう様子が見られたため、観測された氷のピークはこれに由来するものであると考えられる。ただし、ピークは全体的に高 Q 側へとシフトし、さらにピーク幅は広くなっていた。そして 300 K と同様に単斜晶の単位格子で指数付けして格子定数を算出したところ、a = 20.937 (8) Å, b = 11.561 (5) Å, c = 10.621 (5) Å, γ = 122.32 (3) °となった。300 K の単位格子と比較すると全ての格子定数が減少しており、a 軸方向に 0.4%、b 軸方向に 1.2%、c 軸方向に 0.4%、体積は 1.9%収縮していた。またこれらの格子定数は、100 K における単結晶 X 線回折測定で得られたもの[4,129]と近い値であった。

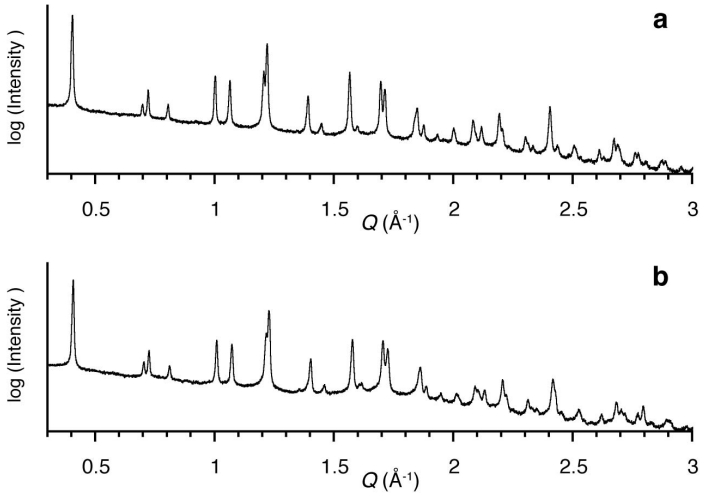

Fig. 6-3. Synchrotron X-ray powder diffraction profiles of B-amylose at (a) 300 K and (b) 100 K. The term Q is the scattering vector ($2\pi/d$)

B 型アミロース結晶の 300 K および 100 K におけるシンクロトロン放射光 X 線粉末回折プロファイルを **Fig. 6-3** に示す。300 K において得られたプロファイル（**Fig. 6-3a**）は、A 型結晶と同様、非常にピークが鋭く結晶性が高いことを示していた。観測されたピークは既報の六方晶の単位格子[5]を基に指数付けし、格子定数は a = 18.068 (3) Å, c = 10.541 (5) Å と求められた。Imberty らや Takahashi らが報告した値[5,59]と比較すると、a 軸の値が若干小さかった。一方、100 K において得られたプロファイル（**Fig. 6-3b**）は、A 型結晶の場合と

同様に、ピークの高 Q 側へのシフトとピーク幅の増加が観測されたが、それ以外には大きな変化がなかった。300 K と同様の六方晶の単位格子を仮定して指数付けし、単位格子を求めたところ a = 17.935 (4) Å, c = 10.492 (6) Å となった。A 型結晶の場合と同様に全ての格子定数が 300 K と比較して小さくなっており、a 軸方向に 0.7%、c 軸方向に 0.5%、体積は 1.9% 収縮していた。

A 型、B 型結晶ともに、100 K では 300 K と比較してピーク幅が大きくなる現象が見られた。これは第 5 章における水和パラミロンの場合でも同様であり、少なくともこの 3 種類の水和多糖では共通して冷却により結晶性が低下することがわかった。一方、水和パラミロンとは異なり、明らかな強度比の変化などはアミロース結晶においては観測されなかった。

6.3.2. 低温領域における A 型アミロースの熱膨張挙動

A 型アミロースの X 線回折測定を、100 K から 300 K の加熱過程および 300 K から 100 K の冷却過程について 25 K 毎に行い、得られた格子定数および格子体積の変化を **Fig. 6-4** に示す。100 K から徐々に温度を上昇させていくと、3 つの軸および格子体積は直線的に増加し、単斜晶角 γ はほぼ一定の値を保っていた。しかし 225 K を超えると、a 軸、b 軸、体積の増加がより急激になり、それまで一定の値を保っていた γ も温度上昇に伴って増加した。c 軸についてはそれほど顕著な変化は見られなかった。続いて 300 K から冷却させていくと、加熱過程とほぼ同じ変化が見られた。すなわち、225 K までは a 軸、b 軸、γ、体積が急激に減少していき、それ以下の温度領域では 3 つの軸および格子体積は直線的に減少し、γ には変化が見られなくなった。

続いて、変化の大きかった室温付近の温度領域（300～240 K）について更に詳しい変化を観測するため、10 K 毎に測定を行った（**Fig. 6-5**）。300 K から冷却させていくと、260 K まで a 軸と γ はほぼ一定の値を保ち、b 軸と体積は直線的に減少、c 軸は僅かながら直線的に増加した。260 K 以下になると、全ての a 軸、b 軸、体積は減少が急激になり、c 軸と γ も僅かながら減少していた。以上の結果から、A 型アミロースは約 260 K までは通常室温で観測されている構造、「室温相」を保っているが、更に冷却すると変化が急激な移行領域を経た後に「低温相」へと転移することがわかった。この室温相と低温相間の転移は可逆的であった。

低温相と室温相の熱膨張係数を算出し、それぞれ **Fig. 6-4** および **Fig. 6-5** 中に値を記した。室温相では b 軸方向の線熱膨張係数（α_b）は α_a の約 10 倍であり、ab 面内で異方性があることがわかった。Nishiyama ら [117] が報告した高温・高圧下における熱膨張の場合と値は異なるが、a 軸方向と b 軸方向では 10 倍近い異方性があることでは一致していた。また、α_c は

負の値であったことも、Nishiyama らの報告 [117] と一致した。一方、低温相では α_a は室温相より大きい値を示したのに対し、α_b は小さくなっていた。従って、低温相においても $\alpha_a < \alpha_b$ であったが、その差は約 2 倍と室温相と比較して非常に小さくなった。また、α_c は室温相と絶対値に大きな差はなかったが、低温相では正の値を示した。体積熱膨張率 β は室温相

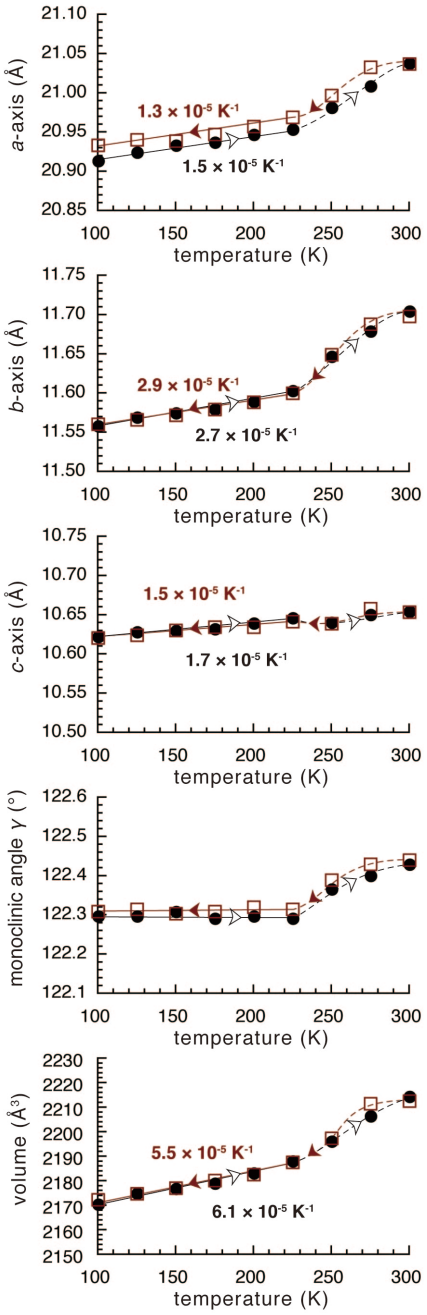

Fig. 6-4. Changes in the unit cell parameter and volume of A-amylose on heating (filled circles) and on subsequent cooling (open squares). The values of the thermal expansion coefficients are also given.

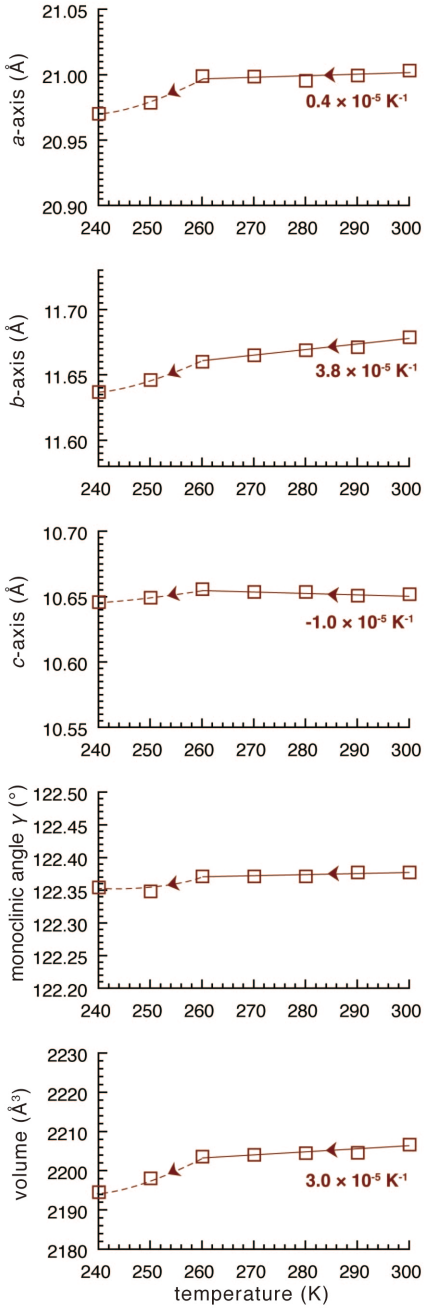

Fig. 6-5. Changes in the unit cell parameter and volume of A-amylose on cooling from 300 to 240 K. The values of the thermal expansion coefficients are also given.

よりも低温相の方が大きくなった。

6.3.3. 低温領域における B 型アミロースの熱膨張挙動

B 型アミロースの X 線回折測定についても A 型アミロースと同様に、100 K から 300 K の加熱過程および 300 K から 100 K の冷却過程について 25 K 毎に行った。得られた格子定数および格子体積の変化を **Fig. 6-6** に示す。100 K から加熱していくと *a* 軸、*c* 軸、体積のすべてが緩やかに増加した。しかし、200 K を超えると *a* 軸の増加率は徐々に大きくなり、275 K に達すると再び緩やかな増加に戻った。*c* 軸についても 200～275 K では少し変化が大きくなっているように見られた。続いて 300 K から 100 K まで冷却させていくと、全ての格子定数および体積は加熱過程とほぼ同じ軌跡を辿って元に戻った。

室温に近い領域についてどのような変化が起こっているのかを調べるため、さらに 240～300 K の温度範囲において 10 K 毎に測定を行った（**Fig. 6-7**）。その結果、270 K までは *a* 軸は直線的に減少、*c* 軸は僅かながら直線的に増加しているが、更に冷却していくと *a* 軸、*c* 軸ともに急激に減少し始めた。以上の結果から、通常室温で観測されている B 型アミロー

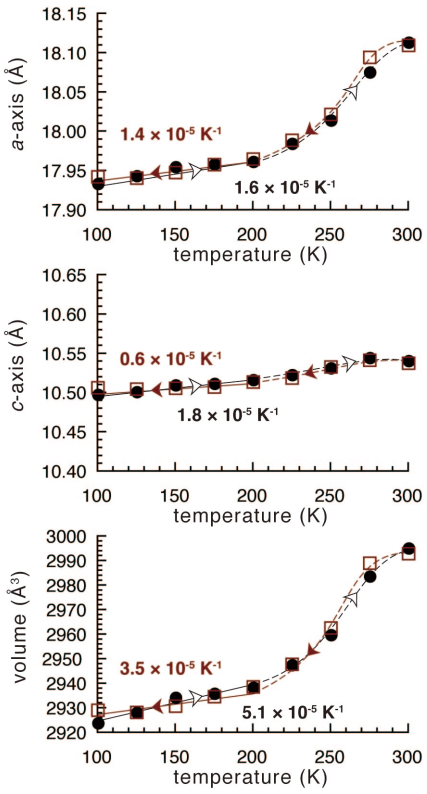

Fig. 6-6. Changes in the unit cell parameter and volume of B-type amylose on heating (filled circles) and on subsequent cooling (open squares). The values of the thermal expansion coefficients are also given.

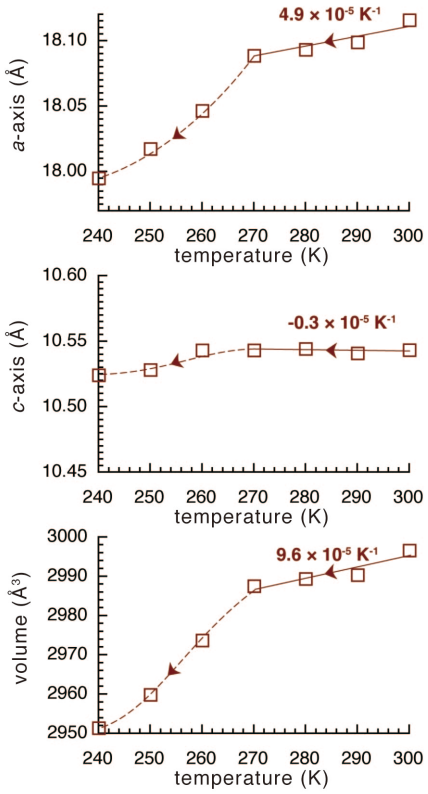

Fig. 6-7. Changes in the unit cell parameter and volume of B-type amylose on cooling from 300 to 240 K. The values of the thermal expansion coefficients are also given.

スの「室温相」は 270 K を下回ると構造が変化し、急激に変化する移行領域を経て「低温相」へと転移することが明らかとなった。またこの相転移は可逆的であった。

B 型アミロースの低温相と室温相の熱膨張係数を算出し、**Fig. 6-6** と **Fig. 6-7** 中にそれぞれ示した。α_a は室温相では低温相の約 3 倍となり、一方 α_c は室温相と低温相で絶対値にそれほど差はないが、低温相では正の値を示したのに対し、室温相では負の値を示した。α_c が負の値を示すことは、Nishiyama ら [117] が報告した高温・高圧下における熱膨張の結果と一致した。

B 型アミロースの熱膨張挙動は、A 型アミロースの場合と非常に類似していた。どちらも低温領域においては室温相とは異なる「低温相」へと可逆的に転移した。相転移は急には起こらず移行領域が存在し、この移行領域では全ての格子体積が低温相から室温相への転移で急激に増加した。転移点もおおよそ一致しており、室温相が移行領域へと変化するのが 260〜270 K、移行領域から低温相へと変化するのが 225 K 前後であった。

このような低温相が存在するという点、そして室温相が変化するのがおよそ 270 K という点においては第 5 章における水和パラミロンの場合と一致していた。ただし、水和パラミロンの場合はアミロースのような移行領域は観測されず、転移はより急激に起きているという点に関しては異なっていた。また 300 K と 100 K における格子体積の差も水和パラミロンは 2.3%であったのに対し、アミロースではどちらも 1.9%と小さく、さらに水和パラミロンではピークの強度比などに変化が見られたのに対し、アミロースではプロファイルのパターンには大きな変化が観測されなかった。しかしながら、アミロースにおいても水和パラミロンと同様に室温相と低温相では水素結合様式などが変化している可能性が高く、どのような違いが生じているかを理解するためには更に研究を進める必要があると考えられる。

6.4. 結論

アミロースの A 型、B 型結晶ともに、室温で観測される「室温相」とは異なる「低温相」が存在することが明らかとなった。室温相から低温相への転移は 270 K を下回るあたりから始まり、200 K までには完全に転移した。この転移は可逆的であった。低温相へ転移すると、全ての格子定数が減少することがわかった。

第 5 章の水和パラミロンのように、転移に際してプロファイルの強度比が変化する等の現象は観測されなかった。しかしながら本研究の結果は、水和パラミロンと同様にアミロースについても転移に伴って水素結合様式などが変化している可能性を示唆していると考えられる。A 型アミロースについては Popov らによって単結晶 X 線回折測定による解析がなされ [4]、その結晶構造モデルが確立されているが、室温においては異なる状態にあるので

あればもう一つ別のモデルを提案する必要があるだろう。また B 型結晶についても、本研究で得られた高結晶性の試料のデータを基に結晶構造モデルを検討し直し、室温相、低温相の 2 種類の構造について明らかにする必要があると思われる。

7.　　総括

本研究は、主要な多糖の水和構造が湿度変化や温度変化によってどのように変化するのか、またそのような変化が起こるメカニズムについて明らかにしたものである。

相対湿度変化によって引き起こされる脱水／水和に伴う転移は、β キチン、β -1,3-グルカンと β -1,3-キシラン、二種類の水和セルロース（アルカリセルロース IV とセルロース II 水和物）について実験を行った。β キチンには二水和、一水和の二種類の水和構造があり、乾燥と湿潤により二水和構造と無水構造間で一水和構造を介しながら可逆的に転移した。転移にはヒステリシスがあり、転移に伴って結晶性は低下した。β -1,3-グルカンと β -1,3-キシランも乾燥と湿潤により β キチンと全く同様の転移挙動を示した。ただし、β -1,3-グルカンと β -1,3-キシランの水和構造は一水和構造のみであるため、一水和構造と無水構造間で直接転移が起こったという点、また転移点の前後でも僅かながらに格子定数が変化したという点においては β キチンとは異なっていた。また、特に無水構造に転移した際の結晶性の低下の度合いは、β キチンと比較して非常に大きかった。一方、水和セルロースは全く異なる挙動を示した。水和セルロース中の水和水は乾燥により不可逆的に放出され、明確な転移点が存在せず徐々に転移が進行した。そして、このような転移は乾燥のみならず、水中においても加熱することによって進行した。このように水和多糖の種類によって転移の特性が大きく異なったことは、水和構造中における水分子の存在様式が異なるためであろうことが推測された。また水和セルロース以外の 3 種類の水和多糖が自然界においても水和構造の形で存在すると推測されるのに対し、膨潤処理を介して得られる水和セルロースは極めて対照的であり、このような観点から見ても水和セルロースの性質がそれ以外とは大きく異なったことは至極当然であると考えられる。

以上の結果から、水和セルロースを除く 3 種類の水和多糖は天然の状態で水和構造として存在するだけでなく、一旦乾燥させても高湿度条件下や水中では容易に水和構造に戻るということが明らかになった。従って、これらの多糖が実用的に用いられるとした際に水和構造の形を取っているという可能性は十分にあり、無水構造のみならず水和構造についての理解を深めることは非常に重要であるといえる。また天然の状態で水和構造として存在するということは、これらの水和多糖がどのように生合成され結晶化するのかを知るためにも、水和構造への理解は欠かせないことになる。しかしながら本研究で得られたデータには、これまでに提案されている水和多糖の結晶構造モデルと矛盾する点も幾つか見られており、本研究はこのような水和多糖のモデルを見直す必要性を多分に示唆していた。

一方で水和セルロースは意図的に水和構造を形成させなければならない上に、水和構造

を保つためには細心の注意を払わなければならないことが明らかとなった。セルロースは強固な結晶を形成し、機械的強度に優れていることが大きな特長であるが、それ故に溶解させたり分解させたりするのは難しいといった反面を持つ。しかしながら水和セルロースは酵素糖化性を向上させるという報告があり、セルロースを水和させることによってその性質を改善させることができる可能性が示唆されている。従って水和セルロースについても、水分子が結晶格子内に本当にランダムに存在しているのか、アルカリセルロース IV とセルロース II 水和物では構造にどのような違いがあるのか等、その構造について今後より明確にしていくことが重要であると考えられる。

温度変化による結晶構造の変化は、β-1,3-グルカンと二種類のアミロース（A 型および B 型結晶）について観測した。いずれも低温領域（100～300 K）について調べたが、3 種類全ての水和多糖について通常室温で観測されている「室温相」とは異なる「低温相」が存在することが明らかとなった。いずれの場合においてもこれらの相間の転移は可逆的であった。水和パラミロンでは、低温相に転移すると分子鎖のコンフォメーションや水素結合様式が変化していることがわかった。アミロースについては、水和パラミロンの場合と比較すると室温相と低温相の違いは小さいように見られたが、同様に水素結合様式等が変化している可能性は十分にあるだろう。

低温領域における熱膨張挙動が報告された多糖は本研究の 3 種類の多糖とセルロース[113]のみであるが、セルロース以外の 3 種類では同様の相転移が観測されたことになり、他の多糖においても低温相が存在する可能性が大いに示唆されたといえる。転移が水の凝固点に近い温度で起きていることから、このような現象が水分子を含んでいる故に起きるのか、もしくは多糖に幅広く起こる現象であるのか等を知るためには、今後他の多糖についても実験を行い、また更に具体的にどのような構造の変化が起きているのかを明らかにしなければならない。このような研究を進めることによって、これまでに知られていなかった多糖の挙動や構造が解明され、多糖の応用と開発に新たな可能性が広がることが期待される。

参考文献

(1) Aspinall, G. O. The Polysaccharicdes; Horecker, B.; Kaplan, N. O.; Marmur, J.; Scheraga, H. A., Eds.; Academic press, Inc., 1970.

(2) Nishimura, H.; Sarko, A. Mercerization of Cellulose. 6. Crystal and Molecular Structure of Na-Cellulose IV. *Macromolecules* **1991**, *24*, 771–778.

(3) Lee, D. M.; Blackwell, J. Structure of Cellulose II Hydrate. *Biopolymers* **1981**, *20*, 2165–2179.

(4) Popov, D.; Buléon, A.; Burghammer, M.; Chanzy, H.; Montesanti, N.; Putaux, J. L.; Potocki-Véronèse, G.; Riekel, C. Crystal Structure of A-Amylose: a Revisit from Synchrotron Microdiffraction Analysis of Single Crystals. *Macromolecules* **2009**, *42*, 1167–1174.

(5) Takahashi, Y.; Kumano, T.; Nishikawa, S. Crystal Structure of B-Amylose. *Macromolecules* **2004**, *37*, 6827–6832.

(6) Brisson, J.; Chanzy, H.; Winter, W. T. The Crystal and Molecular Structure of V_H Amylose by Electron Diffraction Analysis. *International Journal of Biological Macromolecules* **1991**, *13*, 31–39.

(7) Blackwell, J. Structure of β-Chitin or Parallel Chain Systems of Poly-β-(1→ 4)-*N*-Acetyl-D-Glucosamine. *Biopolymers* **1969**, *7*, 281–298.

(8) Sawada, D.; Nishiyama, Y.; Langan, P.; Forsyth, V. T.; Kimura, S.; Wada, M. Water in Crystalline Fibers of Dihydrate β-Chitin Results in Unexpected Absence of Intramolecular Hydrogen Bonding. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39376.

(9) Chuah, C. T.; Sarko, A.; Deslandes, Y.; Marchessault, R. H. Triple-Helical Crystalline Structure of Curdlan and Paramylon Hydrates. *Macromolecules* **1983**, *16*, 1375–1382.

(10) Nieduszynski, I. A.; Marchessault, R. H. Structure of β, D (1 → 4′)-Xylan Hydrate. *Biopolymers* **1972**, *11*, 1335–1344.

(11) Atkins, E. D. T.; Parker, K. D. The Helical Structure of a β-D-1,3-Xylan. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* **1969**, *28*, 69–81.

(12) Yui, T.; Ogawa, K.; Sarko, A. Molecular and Crystal Structure of Konjac Glucomannan in the Mannan II Polymorphic Form. *Carbohydrate Research* **1992**, *229*, 41–55.

(13) Jelsma, J.; Kreger, D. R. Polymorphism in Crystalline (1→3)-α-D-Glucan from Fungal Cell-Walls. *Carbohydrate Research* **1979**, *71*, 51–64.

(14) Yui, T.; Ogawa, K.; Sarko, A. Molecular and Crystal Structure of the Regenerated Form of (1 → 3)-α-D-Mannan. *Carbohydrate Research* **1992**, *229*, 57–74.

(15) Guizard, C.; Chanzy, H.; Sarko, A. The Molecular and Crystal Structure of Dextrans: a

Combined Electron and X-Ray Diffraction Study. *Journal of Molecular Biology* **1985**, *183*, 397–408.

(16) Taylor, K. J.; Chanzy, H.; Marchessault, R. H. Electron Diffraction for Hydrated Crystalline Biopolymers: Nigeran. *Journal of Molecular Biology* **1975**, *92*, 165–167.

(17) Atalla, R. H.; VanderHart, D. L. Native Cellulose: a Composite of Two Distinct Crystalline Forms. *Science* **1984**, *223*, 283–285.

(18) VanderHart, D. L.; Atalla, R. H. Studies of Microstructure in Native Celluloses Using Solid-State Carbon-13 NMR. *Macromolecules* **1984**.

(19) Sugiyama, J.; Persson, J.; Chanzy, H. Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymorphism of Native Celluloses. *Macromolecules* **1991**, *24*, 2461–2466.

(20) Sugiyama, J.; Vuong, R.; Chanzy, H. Electron Diffraction Study on the Two Crystalline Phases Occurring in Native Cellulose from an Algal Cell Wall. *Macromolecules* **1991**.

(21) Nishiyama, Y.; Sugiyama, J.; Chanzy, H.; Langan, P. Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose I_α from Synchrotron X-Ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14300–14306.

(22) Nishiyama, Y.; Langan, P.; Chanzy, H. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose Iβ from Synchrotron X-Ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9074–9082.

(23) Langan, P.; Nishiyama, Y.; Chanzy, H. A Revised Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose II from a Neutron Fiber Diffraction Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9940–9946.

(24) Langan, P.; Nishiyama, Y.; Chanzy, H. X-Ray Structure of Mercerized Cellulose II at 1 Å Resolution. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 410–416.

(25) Wada, M.; Chanzy, H.; Nishiyama, Y.; Langan, P. Cellulose III_I Crystal Structure and Hydrogen Bonding by Synchrotron X-Ray and Neutron Fiber Diffraction. *Macromolecules* **2004**, *37*, 8548–8555.

(26) Sakurada, I.; Hutino, K. Über Die Intramizellare Quellung Der Zellulose Durch Wasser. *Kolloid-Zeitschrift* **1936**, *77*, 346–351.

(27) Heines, S. V. John Mercer and Mercerization, 1844. *Journal of Chemical Education* **1944**, *21*, 430–433.

(28) Warwicker, J. O. Swelling. In *Cellulose and cellulose derivatives*; Ott, E.; Bikales, N. M.; Segal, L., Eds.; 1971.

(29) Hess, K.; Trogus, C. Information About Alkali Cellulose. *Zeitschrift fur Phisikalische Chemie-Abteilung B-Chemie der Elementarprozesse Aufbau der Materie* **1931**, *11*, 381–408.

(30) Sobue, H.; Kiessig, H.; Hess, K. The Cellulose-Sodium Hydroxide-Water System Subject

to the Temperature. *Zeitschrift fur Phisikalische Chemie-Abteilung B-Chemie der Elementarprozesse Aufbau der Materie* **1939**, *43*, 309–328.

(31) Whitaker, P. M.; Nieduszynski, I. A.; Atkins, E. D. T. Structural Aspects of Soda-Cellulose II. *Polymer* **1974**, *15*, 125–127.

(32) Okano, T.; Sarko, A. Mercerization of Cellulose. I. X-Ray Diffraction Evidence for Intermediate Structures. *J. Appl. Polym. Sci.* **1984**, *29*, 4175–4182.

(33) Okano, T.; Sarko, A. Mercerization of Cellulose. II. Alkali–Cellulose Intermediates and a Possible Mercerization Mechanism. *J. Appl. Polym. Sci.* **1985**, *30*, 325–332.

(34) Nishimura, H.; Okano, T.; Sarko, A. Mercerization of Cellulose. 5. Crystal and Molecular Structure of Na-Cellulose I. *Macromolecules* **1991**, *24*, 759–770.

(35) Kunze, J.; Ebert, A.; Schröter, B.; Frigge, K.; Philipp, B. ^{13}C- and ^{23}Na-NMR Investigations on Alkali Cellulose. *Polymer Bulletin* **1981**, *5*, 399–406.

(36) Kamide, K.; Kowsaka, K.; Okajima, K. Determination of Intramolecular Hydrogen Bonds and Selective Coordination of Sodium Cation in Alkalicellulose by CP/MASS ^{13}C Nmr. *Polym J* **1985**, *17*, 707–711.

(37) Yokota, H.; Sei, T.; Horii, F.; Kitamaru, R. ^{13}C CP/MAS NMR Study on Alkali Cellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, *41*, 783–791.

(38) Yamada, H.; Kowsaka, K.; Matsui, T.; Okajima, K.; Kamide, K. Nuclear Magnetic Study on the Dissolution of Natural and Regenerated Celluloses Into Aqueous Alkali Solution. *Cellulose chemistry and technology* **1992**, *26*, 141–150.

(39) Porro, F.; Bédué, O.; Chanzy, H.; Heux, L. Solid-State ^{13}C NMR Study of Na–Cellulose Complexes. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2586–2593.

(40) Lee, D. M.; Blackwell, J. Cellulose–Hydrazine Complexes. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1981**, *19*, 459–465.

(41) Guilbot, A.; Charbonnière, R.; Drapron, R. Sur La Contribution De l'Eau À L'Organisation Des Chaînes Macromoléculaires De L'Amidon. *Starch/Stärke* **1961**, *13*, 204–207.

(42) Tomasik, P.; Schilling, C. H. Complexes of Starch with Inorganic Guests. In *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*; Elsevier, 1998; Vol. 53, pp. 263–343.

(43) Tomasik, P.; Schilling, C. H. Complexes of Starch with Organic Guests. In *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*; Elsevier, 1998; Vol. 53, pp. 345–426.

(44) Rappenecker, G.; Zugenmaier, P. Detailed Refinement of the Crystal Structure of Vh-Amylose. *Carbohydrate Research* **1981**, *89*, 11–19.

(45) Pérez, S.; Bertoft, E. The Molecular Structures of Starch Components and Their Contribution to the Architecture of Starch Granules: a Comprehensive Review. *Starch/Stärke* **2010**, *62*, 389–420.

(46) Buléon, A.; Colonna, P.; Planchot, V.; Ball, S. Starch Granules: Structure and Biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **1998**, *23*, 85–112.

(47) Senti, F. R.; Witnauer, L. P. Oriented Filaments of Amylose and Alkali Amylose. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 2407–2408.

(48) Buléon, A.; Duprat, F.; Booy, F. P.; Chanzy, H. Single Crystals of Amylose with a Low Degree of Polymerization. *Carbohydrate Polymers* **1984**, *4*, 161–173.

(49) Wu, H.-C. H.; Sarko, A. The Double-Helical Molecular Structure of Crystalline A-Amylose. *Carbohydrate Research* **1978**, *61*, 27–40.

(50) Imberty, A.; Chanzy, H.; Pérez, S.; Buléon, A.; Tran, V. The Double-Helical Nature of the Crystalline Part of A-Starch. *Journal of Molecular Biology* **1988**, *201*, 365–378.

(51) Imberty, A.; Chanzy, H.; Pérez, S.; Buléon, A.; Tran, V. New Three-Dimensional Structure for A-Type Starch. *Macromolecules* **1987**, *20*, 2636–2638.

(52) Rundle, R. E.; Daasch, L.; French, D. The Structure of the "B" Modification of Starch from Film and Fiber Diffraction Diagrams. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 130–134.

(53) Kreger, D. R. The Configuration and Packing of the Chain Molecules of Native Starch as Derived from X-Ray Diffraction of Part of a Single Starch Grain. *Biochimica et Biophysica Acta* **1950**, *6*, 406–425.

(54) Spark, L. C. Some Notes on the Structure of B-Starch. *Biochimica et Biophysica Acta* **1952**, *8*, 101–103.

(55) Blackwell, J.; Sarko, A.; Marchessault, R. H. Chain Conformation in B-Amylose. *Journal of Molecular Biology* **1969**, *42*, 379–383.

(56) Kainuma, K.; French, D. Naegeli Amylodextrin and Its Relationship to Starch Granule Structure. II. Role of Water in Crystallization of B-Starch. *Biopolymers* **1972**, *11*, 2241–2250.

(57) Cleven, R.; Van den Berg, C.; Van Der Plas, L. Crystal Structure of Hydrated Potato Starch. *Starch/Stärke* **1978**, *30*, 223–228.

(58) Wu, H.-C. H.; Sarko, A. The Double-Helical Molecular Structure of Crystalline B-Amylose. *Carbohydrate Research* **1978**, *61*, 7–25.

(59) Imberty, A.; Pérez, S. A Revisit to the Three-Dimensional Structure of B-Type Starch. *Biopolymers* **1988**, *27*, 1205–1221.

(60) Blackwell, J. The Polysaccharides. In *Biopolymers*; Walton, A. G.; Blackwell, J., Eds.; Academic Press, 1973; p. 604.

(61) Rudall, K. M. The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles. In *Advances in Insect Physiology*; Advances in Insect Physiology; Elsevier, 1963; Vol. 1, pp. 257–313.

(62) Minke, R.; Blackwell, J. The Structure of α-Chitin. *Journal of Molecular Biology* **1978**, *120*, 167–181.

(63) Sikorski, P.; Hori, R.; Wada, M. Revisit of α-Chitin Crystal Structure Using High Resolution X-Ray Diffraction Data. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1100–1105.

(64) Noishiki, Y.; Kuga, S.; Wada, M.; Hori, K.; Nishiyama, Y. Guest Selectivity in Complexation of β-Chitin. *Macromolecules* **2004**, *37*, 6839–6842.

(65) Noishiki, Y.; Nishiyama, Y.; Wada, M.; Okada, S.; Kuga, S. Inclusion Complex of β-Chitin and Aliphatic Amines. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 944–949.

(66) Saito, Y.; Okano, T.; Putaux, J. L.; Gaill, F.; Chanzy, H. Crystallosolvates of β-Chitin and Alcohols. *Advances in Chitin Science II* **1998**, 507–512.

(67) Saito, Y.; Okano, T.; Gaill, F.; Chanzy, H.; Putaux, J.-L. Structural Data on the Intra-Crystalline Swelling of β-Chitin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2000**, *28*, 81–88.

(68) Sawada, D.; Kimura, S.; Nishiyama, Y.; Langan, P.; Wada, M. The Crystal Structure of Mono-Ethylenediamine β-Chitin from Synchrotron X-Ray Fiber Diffraction. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *92*, 1737–1742.

(69) Gardner, K. H.; Blackwell, J. Refinement of the Structure of β-Chitin. *Biopolymers* **1975**, *14*, 1581–1595.

(70) Nishiyama, Y.; Noishiki, Y.; Wada, M. X-Ray Structure of Anhydrous β-Chitin at 1 Å Resolution. *Macromolecules* **2011**, *44*, 950–957.

(71) Sawada, D.; Nishiyama, Y.; Langan, P.; Forsyth, V. T.; Kimura, S.; Wada, M. Direct Determination of the Hydrogen Bonding Arrangement in Anhydrous β-Chitin by Neutron Fiber Diffraction. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 288–291.

(72) Stone, B. A.; Clarke, A. E. Chemistry and Biology of 1,3-β-Glucans; Intl Specialized Book Service Inc, 1992.

(73) Harada, T.; Misaki, A.; Saito, H. Curdlan: a Bacterial Gel-Forming β-1, 3-Glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1968**, *124*, 292–298.

(74) Clarke, A. E.; Stone, B. A. Structure of the Paramylon from *Euglena Gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1960**, *44*, 161–163.

(75) Takeda, H.; Yasuoka, N.; Kasai, N.; Harada, T. X-Ray Structural Studies of (1→3)-β-D-Glucan (Curdlan). *Polym J* **1978**, *10*, 365–368.

(76) Stipanovic, A. J.; Giammatteo, P. J. Cp/Mas ^{13}C NMR Studies on Aqueous Polysaccharide Gels. In *Industrial polysaccharides, genetic engi- neering, structureproperty relations and applications*; Yalpani, M., Ed.; Elsevier, 1987; pp. 281–292.

(77) Okuyama, K.; Otsubo, A.; Fukuzawa, Y.; Ozawa, M.; Harada, T.; Kasai, N. Single-Helical Structure of Native Curdlan and Its Aggregation State. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1991**, *10*, 645–656.

(78) Marchessault, R. H.; Deslandes, Y.; Ogawa, K.; Sundararajan, P. R. X-Ray Diffraction

Data for β-(1→3)-D-Glucan. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 300–303.

(79) Marchessault, R. H.; Deslandes, Y. Fine Structure of (1→3)-β-D-Glucans: Curdlan and Paramylon. *Carbohydrate Research* **1979**, *75*, 231–242.

(80) Deslandes, Y.; Marchessault, R. H.; Sarko, A. Triple-Helical Structure of (1→3)-β-D-Glucan. *Macromolecules* **1980**, *13*, 1466–1471.

(81) Percival, E.; McDowell, R. H. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides; Academic Press, 1967.

(82) Frei, E.; Preston, R. D. Non-Cellulosic Structural Polysaccharides in Algal Cell Walls. I. Xylan in Siphoneous Green Algae. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **1964**, *160*, 293–313.

(83) Chanzy, H.; Guizard, C.; Vuong, R. Electron Diffraction on Frozen Hydrated Polysaccharides. *Journal of Microscopy* **1977**, *111*, 143–150.

(84) Atkins, E. D. T.; Parker, K. D.; Preston, R. D. The Helical Structure of the β-1,3-Linked Xylan in Some Siphoneous Green Algae. *Proc. R. Soc. Lond. B* **1969**, *173*, 209–221.

(85) Sathyanarayana, B. K.; Rao, V. S. R. Conformational Studies on β-D-(1→3)-Linked Xylan. *Carbohydrate Research* **1970**, *15*, 137–145.

(86) Veluraja, K.; Atkins, E. D. T. Helical Structure of *β*(1–3) Xylan and the Water Mediated Hydrogen Bonding Schemes. *Carbohydrate Polymers* **1987**, *7*, 133–141.

(87) Miyoshi, K.; Uezu, K.; Sakurai, K.; Shinkai, S. Inter-Chain and Arrayed Hydrogen Bonds in β-1,3-D-Xylan Triple Helix Predicted by Quantum Mechanics Calculation. *Carbohydrate Polymers* **2006**, *66*, 352–356.

(88) Byrn, S.; Pfeiffer, R.; Ganey, M.; Hoiberg, C.; Poochikian, G. Pharmaceutical Solids: a Strategic Approach to Regulatory Considerations. *Pharm Res* **1995**, *12*, 945–954.

(89) Khankari, R. K.; Grant, D. Pharmaceutical Hydrates. *Thermochimica Acta* **1995**, *248*, 61–79.

(90) Wada, M.; Okano, T.; Sugiyama, J. Synchrotron-Radiated X-Ray and Neutron Diffraction Study of Native Cellulose. *Cellulose* **1997**, *4*, 221–232.

(91) Tanner, S. F.; Chanzy, H.; Vincendon, M.; Roux, J. C.; Gaill, F. High-Resolution Solid-State Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study of Chitin. *Macromolecules* **1990**, *23*, 3576–3583.

(92) Horii, F.; Hirai, A.; Kitamaru, R. Solid-State 13C-NMR Study of Conformations of Oligosaccharides and Cellulose. *Polymer Bulletin* **1983**, *10*, 357–361.

(93) Sundaralingam, M. Some Aspects of Stereochemistry and Hydrogen Bonding of Carbohydrates Related to Polysaccharide Conformations. *Biopolymers* **1968**, *6*, 189–213.

(94) Saito, Y.; Kumagai, H.; Wada, M.; Kuga, S. Thermally Reversible Hydration of β-Chitin. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 407–410.

(95) Sawada, D.; Ogawa, Y.; Kimura, S.; Nishiyama, Y.; Langan, P.; Wada, M. Solid–Solvent Molecular Interactions Observed in Crystal Structures of β-Chitin Complexes. *Cellulose* **2013**, 1–8.

(96) Rössle, M.; Flot, D.; Engel, J.; Burghammer, M.; Riekel, C.; Chanzy, H. Fast Intracrystalline Hydration of β-Chitin Evealed by Combined Microdrop Generation and on-Line Synchrotron Radiation Microdiffraction. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 981–986.

(97) Ooi, V. E. C.; Liu, F. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. *Current medicinal chemistry* **2000**, *7*, 715–729.

(98) Ohno, N.; Miura, N. N.; Chiba, N.; Adachi, Y. Comparison of the Immunopharmacological Activities of Triple and Single-Helical Schizophyllan in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **1995**, *18*, 1242–1247.

(99) Yanaki, T.; Itoh, W.; Tabata, K. Correlation Between the Antitumor Activity of Schizophyllan and Its Triple Helix. *Agricultural and Biological Chemistry* **1986**, *19*, 608–612.

(100) Zhang, L.; Li, X.; Xu, X.; Zeng, F. Correlation Between Antitumor Activity, Molecular Weight, and Conformation of Lentinan. *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 1515–1521.

(101) Booy, F. P.; Chanzy, H.; Boudet, A. An Electron Diffraction Study of Paramylon Storage Granules from *Euglena Gracilis*. *Journal of Microscopy* **1981**, *121*, 133–140.

(102) Kiss, J. Z.; Roberts, E. M.; Brown, R. M., Jr; Triemer, R. E. X-Ray and Dissolution Studies of Paramylon Storage Granules from *Euglena*. *Protoplasma* **1988**, *146*, 150–156.

(103) Kitaoka, M.; Sasaki, T.; Taniguchi, H. Purification and Properties of Laminaribiose Phosphorylase (EC 2.4. 1.31) from *Euglena Gracilis* Z. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1993**, *304*, 508–514.

(104) Fyfe, C. A.; Stephenson, P. J.; Taylor, M. G.; Bluhm, T. L.; Deslandes, Y.; Marchessault, R. H. Hydration Effects in the ^{13}C CP/MAS NMR Spectra of Solid (1→3)-β-D-Glucans. *Macromolecules* **1984**, *17*, 501–502.

(105) Saito, H.; Yokoi, M.; Yoshioka, Y. Effect of Hydration on Conformational Change or Stabilization of (1→3)-β-D-Glucans of Various Chain Lengths in the Solid State as Studied by High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR Spectroscopy. *Macromolecules* **1989**, *22*, 3892–3898.

(106) Saito, H.; Yamada, J.; Yoshioka, Y.; Shibata, Y. Evidence of Three Distinct Conformations—Single Chain, Single Helix, and Triple Helix—of (1→ 3)-β-D-Xylan in the Solid and Intact Frond of Green Algae as Studied by ^{13}C-NMR Spectroscopy. *Biopolymers* **1991**, *31*, 933–940.

(107) Horii, F.; Hirai, A.; Kitamaru, R. CP/MAS Carbon-13 NMR Spectroscopy of Hydrated Amyloses Using a Magic-Angle Spinning Rotor with an O-Ring Seal. *Macromolecules* **1986**, *19*, 930–932.

(108) Marchessault, R. H.; Taylor, M. G.; Fyfe, C. A.; Veregin, R. P. Solid-State ^{13}C-C.P.-M.A.S. N.M.R. of Starches. *Carbohydrate Research* **1985**, *144*, C1–C5.

(109) Hori, R.; Wada, M. The Thermal Expansion of Cellulose II and III_{II} Crystals. *Cellulose* **2006**, *13*, 281–290.

(110) Wada, M.; Heux, L.; Nishiyama, Y.; Langan, P. X-Ray Crystallographic, Scanning Microprobe X-Ray Diffraction, and Cross-Polarized/Magic Angle Spinning ^{13}C NMR Studies of the Structure of Cellulose III_{II}. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 302–309.

(111) Kono, H.; Numata, Y.; Erata, T.; Takai, M. ^{13}C and ^{1}H Resonance Assignment of Mercerized Cellulose II by Two-Dimensional MAS NMR Spectroscopies. *Macromolecules* **2004**, *37*, 5310–5316.

(112) Wada, M.; Ike, M.; Tokuyasu, K. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose I is Greatly Accelerated via Its Conversion to the Cellulose II Hydrate Form. *Polymer Degradation and Stability* **2010**, *95*, 543–548.

(113) Hidaka, H.; Kim, U.-J.; Wada, M. Synchrotron X-Ray Fiber Diffraction Study on the Thermal Expansion Behavior of Cellulose Crystals in Tension Wood of Japanese Poplar in the Low-Temperature Region. *Holzforschung 64*, 167–171.

(114) Wada, M. Lateral Thermal Expansion of Cellulose I_{β} And III_{I} Polymorphs. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **2002**, *40*, 1095–1102.

(115) Wada, M.; Kwon, G. J.; Nishiyama, Y. Structure and Thermal Behavior of a Cellulose I–Ethylenediamine Complex. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2898–2904.

(116) Wada, M.; Hori, R.; Kim, U.-J.; Sasaki, S. X-Ray Diffraction Study on the Thermal Expansion Behavior of Cellulose Iβ and Its High-Temperature Phase. *Polymer Degradation and Stability* **2010**, *95*, 1330–1334.

(117) Nishiyama, Y.; Putaux, J.-L.; Montesanti, N.; Hazemann, J.-L.; Rochas, C. B→A Allomorphic Transition in Native Starch and Amylose Spherocrystals Monitored by in Situ Synchrotron X-Ray Diffraction. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 76–87.

(118) Wada, M.; Saito, Y. Lateral Thermal Expansion of Chitin Crystals. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **2001**, *39*, 168–174.

(119) Ogawa, Y.; Hori, R.; Kim, U. J.; Wada, M. Elastic Modulus in the Crystalline Region and the Thermal Expansion Coefficients of α-Chitin Determined Using Synchrotron Radiated X-Ray Diffraction. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83*, 1213–1217.

(120) Hori, R.; Sugiyama, J.; Wada, M. The Thermal Expansion of Mannan I Obtained from Ivory Nuts. *Carbohydrate Polymers* **2007**, *70*, 298–303.

(121) Rottger, K.; Endriss, A.; Ihringer, J.; Doyle, S. Lattice Constants and Thermal Expansion of H_2O and D_2O Ice I*H* Between 10 and 265 K. *Acta Crystallographica Section B* **1994**, *50*, 644–648.

(122) Putaux, J.-L.; Nishiyama, Y.; Mazeau, K.; Morin, M.; Cardoso, M. B.; Chanzy, H. Helical Conformation in Crystalline Inclusion Complexes of V-Amylose: a Historical Perspective. *Macromol. Symp.* **2011**, *303*, 1–9.

(123) Nishiyama, Y.; Mazeau, K.; Morin, M.; Cardoso, M. B.; Chanzy, H.; Putaux, J.-L. Molecular and Crystal Structure of 7-Fold V-Amylose Complexed with 2-Propanol. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8628–8636.

(124) Cardoso, M. B.; Putaux, J.-L.; Nishiyama, Y.; Helbert, W.; Hÿtch, M.; Silveira, N. P.; Chanzy, H. Single Crystals of V-Amylose Complexed with α-Naphthol. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1319–1326.

(125) Heux, L.; Hägglund, P.; Putaux, J. L.; Chanzy, H. Structural Aspects in Semicrystalline Samples of the Mannan II Family. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 324–332.

(126) Ohdan, K.; Fujii, K.; Yanase, M.; Takaha, T.; Kuriki, T. Enzymatic Synthesis of Amylose. *Biocatal Biotransformation* **2006**, *24*, 77–81.

(127) Montesanti, N.; Véronèse, G.; Buléon, A.; Escalier, P.-C.; Kitamura, S.; Putaux, J.-L. A-Type Crystals from Dilute Solutions of Short Amylose Chains. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3049–3058.

(128) Ring, S. G.; Miles, M. J.; Morris, V. J.; Turner, R.; Colonna, P. Spherulitic Crystallization of Short Chain Amylose. *International Journal of Biological Macromolecules* **1987**, *9*, 158–160.

(129) Popov, D.; Burghammer, M.; Buléon, A.; Montesanti, N.; Putaux, J. L.; Riekel, C. A-Amylose Single Crystals: Unit Cell Refinement from Synchrotron Radiation Microdiffraction Data. *Macromolecules* **2006**, *39*, 3704–3706.

謝辞

まず一番に、本研究の指導教員である和田昌久准教授に心から厚い御礼を申し上げます。研究室の入室時に私に本研究テーマを与えてくださり、それから 6 年間、実験の手法から研究の方針、論文の書き方に至るまで全てにわたって辛抱強く指導してくださいました。また同じく研究室に入室してから現在まで、木村聡先生には実験や研究生活全般において細かなところまで面倒を見ていただきました。そして学部生のときの指導教員であり、修士 1 年まで指導していただきました空閑重則名誉教授にはたくさんのご助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。

森林総合研究所の戸川英二氏、CERMAV の Laurent Heux 博士には固体 ^{13}C NMR 測定に協力して頂きました。お忙しい中、測定、解析、論文の作成まで積極的に協力してくださいましたことに、大変感謝しております。

また本学位論文の副査を引き受けてくださいました磯貝明教授、杉山淳司教授、岩田忠久教授、斉藤幸恵准教授に、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。その他にも、専攻の先生方、学会でお会いした先生方や研究者の皆様には、様々な局面でたくさんのご助力を賜りました。心より御礼申し上げます。

研究生活においては、研究室の皆様に大変お世話になりました。可愛がってくださった先輩の皆様、くだらない話に付き合ってくれた後輩の皆様、本当にありがとうございました。そして特に、同期の磯部紀之君、小川悠君には良くも悪くも多大なる影響を受けました。いずれにせよ、真面目な話からそうでもない話まで気さくに話せる存在がいたことは、非常に面白かったし大きな支えになりました。また研究室は違いますが、同じ専攻の同期である藤澤秀次君、中村彰彦君も学部のときからずっと一緒で、とても心強い存在でした。

本研究では、独立行政法人海洋研究開発機構（JAMSTEC）の無人探査機「ハイパードルフィン」によって採取されたサツマハオリムシ（*Lamellibrachia satsuma*）を使用しました。シンクロトロン X 線回折測定は、財団法人高輝度科学研究センターと佐賀県地域産業支援センターの支援により SPring-8 のビームライン BL38B1 および BL40B2、SAGA-LS のビームライン BL15 にて行いました。以上の研究機関および実験に協力して頂きました担当者の皆様に感謝の意を表します。また日本学術振興会の特別研究員（DC1）として特別研究員奨励費（23·2511）を頂き、研究費の支援をして頂きました。この場をお借りして感謝の意を表します。

最後に、大学生生活、研究生活を支えてくれた家族や友人たちにも心から感謝いたします。本当にありがとうございました。

発表論文

1. Kayoko Kobayashi, Satoshi Kimura, Eiji Togawa, Masahisa Wada
   "Crystal transition between hydrate and anhydrous β-chitin monitored by synchrotron X-ray fiber diffraction" *Carbohydrate Polymers*, 79, pp 882–889, 2010

2. Kayoko Kobayashi, Satoshi Kimura, Eiji Togawa, Masahisa Wada, Shigenori Kuga
   "Crystal transition of paramylon with dehydration and hydration" *Carbohydrate Polymers*, 80, pp 491–497, 2010

3. Kayoko Kobayashi, Satoshi Kimura, Eiji Togawa, Masahisa Wada
   "Crystal transition from Na-cellulose IV to cellulose II monitored using synchrotron X-ray diffraction" *Carbohydrate Polymers*, 83, pp 483–488, 2011

4. Kayoko Kobayashi, Satoshi Kimura, Eiji Togawa, Masahisa Wada
   "Crystal transition from cellulose II hydrate to cellulose II" *Carbohydrate Polymers*, 86, pp 975–981, 2011

5. Kayoko Kobayashi, Satoshi Kimura, Ung-Jin Kim, Ken Tokuyasu, Masahisa Wada
   "Enzymatic hydrolysis of cellulose hydrates" *Cellulose*, 19, pp 967–974, 2012

6. Kayoko Kobayashi, Satoshi Kimura, Eiji Togawa, Masahisa Wada
   "Thermal expansion behavior of hydrate paramylon in the low-temperature region" *Carbohydrate Polymers*, 91, pp 543–548, 2013

7. Kayoko Kobayashi, Satoshi Kimura, Laurent Heux, Masahisa Wada
   "Crystal transition between hydrate and anhydrous (1→3)-β-D-xylan from *Penicillus dumetosus*" *Carbohydrate Polymers*, 97, pp 105–110, 2013

8. Masahisa Wada, Kayoko Kobayashi, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Keiichi Noguchi
   "2-Acetamido-2-deoxy-3-*O*-*β*-D-galactopyranosyl-D-glucose dihydrate" *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports*, 65, pp o1781–o1782, 2009

9. Yu Ogawa, Kayoko Kobayashi, Satoshi Kimura, Yoshiharu Nishiyama, Masahisa Wada, Shigenori Kuga
   "X-ray texture analysis indicates downward spinning of chitin microfibrils in tubeworm tube" *Journal of Structural Biology,* 184, pp 212–216, 2013

10. Dai Oka, Kayoko Kobayashi, Noriyuki Isobe, Yu Ogawa, Tomoya Yokoyama, Satoshi Kimura, Ung-Jin Kim, Ken Tokuyasu, Masahisa Wada
"Enzymatic hydrolysis of wood with alkaline treatment" *Journal of Wood Science*, 59, pp 484-488, 2013

11. 小林加代子、木村聡、和田昌久
「βキチン水和・無水構造間の結晶転移」キチン・キトサン*研究 Chitin and Chitosan Research*, Vol. 17, pp 56–60, 2011

12. 小林加代子、和田昌久
「水和セルロースの結晶構造と脱水による結晶転移」*Cellulose Communications*, Vol. 18, pp 119–123, 2011