

学 位 論 文 題 名

Solid-State NMR Studies on the Crystal Structures of Cellulose and Cellulose Derivatives

(固体 NMR によるセルロース及びその誘導体の結晶構造に関する研究)

学位論文内容の要旨

天然セルロース(セルロース I)の構造解析は、セルロースの生合成機構やセルラーゼによるセルロース分解様式の解明などの目的で、繊維 X 線解析を中心に行われてきた。しかし、セルロース I は、 I_α と I_β の混合物であり、単結晶を得ることが困難であるため、隣接分子鎖の配列、構成残基のコンフォメーション、水素結合様式など必要な情報は得られていない。さらに、結晶性セルロース及び、その誘導体は複数の多形を持つために構造解析を困難にしている。CP/MAS ^{13}C NMR 法もまた、セルロース結晶構造解析に有効な分析手段として用いられてきたが、複雑な共鳴線の帰属がなされていないため、得られる情報は限られたものであった。

本論文は固体核磁気共鳴法を用いたセルロース及びその誘導体の結晶構造解析を主たる目的とし、位置選択的 ^{13}C ラベリング、固体二次元 NMR 法を用いて CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルの帰属とその解釈を詳細に行ったものである。その主要な成果は以下のとおりである。

(1) 位置選択的に ^{13}C ラベルしたグルコースまたはグリセロールを含む培地中で、酢酸菌 *Acetobacter xylinum* ATCC10245 を生育させることによって2、3、5位がそれぞれ選択的に ^{13}C ラベルされたバクテリアセルロース(以下 BC とする)を調製することに成功した。これら ^{13}C ラベル化 BC から I_α リッチ、 I_β リッチセルロースをそれぞれ調製し、差スペクトル法を用いて、セルロース I_α 、 I_β 成分のサブスペクトルを得た。これらサブスペクトルの各共鳴線強度と ^{13}C ラベル化率の比較から、天然セルロース I_α 、 I_β の CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを完全に帰属することに初めて成功した。この結果、セルロース I_α 、 I_β の各炭素原子は共鳴線強度の等しい二重線で表されることが明らかになり、それぞれの結晶格子中には二つの異なるコンフォメーションをもつグルコース残基が存在することを示した。(第二章)

(2) シオグサ(I_α リッチ)、ホヤ外皮(I_β リッチ)より抽出、精製して得られたセルロース試料の固体二次元 INADEQUATE 測定を行い、天然セルロースの ^{13}C - ^{13}C 相関信号を直接観測することに成功した。各二次元スペクトル上にはグルコース残基を構成する C1 から C6 までの相関が二組得られ、天然セルロースを構成する計 4 種類のサブスペクトルを完全に導出することができた。さらに高速 MAS と Lee-Goldberg ^1H デカップリングを併用した MAS- ν HMQC 実験を行い、4 種類のグルコース残基の各炭素原子と直接結合した ^1H 核の化学シフトを初めて明らかにした。これら固体二次元 NMR 測定の結果、セルロース I_α は、1 本の分子鎖から構成される三斜晶形の単位胞を持ち、コンフォメーションの異なるグルコース残基が分子鎖方向で交互に繰り返す構造を持つこと、セルロース I_β は、2 本の分子鎖から構成される単斜晶形の単位胞を持ち、同一の分子鎖に含まれるグルコース残基のコンフォメーションは全て等価であることを明らかにした。(第三章)

(3) 2、3、5位を選択的 ^{13}C ラベリングした BC をエチレンジアミンでそれぞれ処理し、セルロース III₁ に転移させた。これら試料の CP/MAS ^{13}C NMR 測定から、セルロース III₁ の各共鳴線を完全に帰属した。この結果、セルロース III₁ の各炭素原子はセルロース I とは異なり、全て一重線で表されるため、結晶を構成するグルコース残基は全て等価な構造を持つことを示した。さらにセルロース I から III₁ への転移は隣接分子鎖が繊維軸方向に対し、 $c/4$ ずれることにより引き起こるメカニズムを提案した。(第四章)

(4) 重合度2～6までのセロオリゴ糖を、ピリジン/無水酢酸系で完全アセチル化し、窒素雰囲気下で結晶化して三酢酸セルロース(以下 CTA とする)のオリゴマーを得た。これを CP/MAS ^{13}C NMR、及び粉末 X 線解析した結果、CTA オリゴマーの結晶構造は、隣接分子鎖が互いに平行であるとされる CTA(I)の結晶構造を等しいことを明らかにした。ピリジン/無水酢酸系でセルロースから得られる CTA は隣接分子鎖が逆平行であるとされる CTA(II)の結晶構造を持つことから、CTA(I)と CTA(II)の結晶構造の違いは隣接分子鎖が平行、逆平行で区別されるのではなく、構成するグルコース残基、アセチル基等のコンフォメーションの違いであることを示した。(第五章)

(5) 位置選択的に ^{13}C ラベリングした CTA(I)、(II)を調製し、それら試料の CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルにおける各共鳴線強度と、各位置の ^{13}C ラベル化率の比較から、CTA(I)と CTA(II) CP/MAS ^{13}C NMR を完全に帰属した。この結果、CTA(I)を構成する各炭素原子は全て一重線、CTA(II)は等価な二重線で表され、CTA(I)の単位胞を構成するグルコース残基は全て等価であり、CTA(II)は異なる構造を持つ二種類のグルコース残基が等しい割合で存在していることを明らかにした。(第六章)

(6) 1位から 6 位までの全ての炭素原子が3% ^{13}C ラベリングされた CTA(II)を調製し、固体二次元 INADEQUATE 測定を行った。その結果、CTA(II)を構成する異なる構造を持つ2種類のグルコース残基の存在を証明するとともに、サブスペクトルを導出することに成功した。さらに、CTA(I)と CTA(II)の MAS- ν HMQC スペクトルから、各炭素原子と直接結合した ^1H 原子核の化学シフトを帰属した。二次元スペクトルのメチル、グルコース領域の解析より、CTA(I)は 1 本の分子鎖から構成される単位胞を持ち、セルロース III₁ に類似した構造を示すことを、一方、CTA(II)は、2 本の分子鎖から構成される結晶構造を持つことを明らかにした。(第七章)

(7) 結晶性キチンに存在する 2 つの多形、 α 、 β キチンの構造を、二次元 INADEQUATE、MAS- ν HMQC 測定によって決定した。その結果、 α 、 β キチンそれぞれを構成する N -アセチルグルコサミン残基は全て等しいコンフォメーションを持つことが明らかになった。そこで α 、 β キチンの結晶構造の違いを明らかにするために、分子鎖内のアミド基 ^1H 原子とリング及びメチル炭素原子の核間距離を Dipolar HETCOR 測定によって見積もりを行った。その結果、 α 、 β キチンは従来考えられていた分子鎖配列の違いではなく、アセトアミド基のコンフォメーションの違いで区別されることを明らかにした。(第八章)

これを要するに、固体二次元 NMR と選択的 ^{13}C ラベリングによるセルロース及びその誘導体の共鳴線帰属方法を確立し、さらに ^{13}C 、 ^1H 化学シフトと共鳴線分裂の解釈、核間距離決定から天然セルロースとその誘導体の結晶構造を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 高 井 光 男 (大学院工学研究科)

副 査 助 教 授 出 村 誠

副 査 助 教 授 恵良田 知 樹 (大学院工学研究科)

学 位 論 文 題 名

Solid-State NMR Studies on the Crystal Structures of Cellulose and Cellulose Derivatives

(固体 NMR によるセルロース及びその誘導体の結晶構造に関する研究)

天然セルロース (セルロース I) は、 I_{α} と I_{β} の混合物であり、単結晶を得ることが困難であるため、隣接分子鎖の配列、構成残基のコンフォメーション、水素結合様式など必要な情報は得られていない。さらに、結晶性セルロース及び、その誘導体は複数の多形を持つために構造解析を困難にしている。本論文は固体核磁気共鳴法を用いたセルロース及びその誘導体の結晶構造解析を主たる目的とし、位置選択的 ^{13}C ラベリング、固体二次元 NMR 法を用いて CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルの帰属とその解釈を詳細に行ったものである。その成果は次の点に要約される。

(1) 位置選択的に ^{13}C ラベルしたグルコースまたはグリセロールから 2, 3, 5 位がそれぞれ選択的に ^{13}C ラベルされたバクテリアセルロース (以下 BC とする) を調製し、これら ^{13}C ラベル化 BC の固体 CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルの各共鳴線強度と ^{13}C ラベル化率の詳細な比較に基づき、天然セルロース I_{α} , I_{β} の固体 ^{13}C NMR スペクトルを完全に帰属することに初めて成功した。さらに、セルロース I_{α} , I_{β} はそれぞれ二つの異なるコンフォメーションをもつグルコース残基から構成されることを明らかにした。

(2) 固体二次元 INADEQUATE 実験の結果、天然セルロースの ^{13}C - ^{13}C 相関を直接観測することに成功すると共に、天然セルロースを構成する計 4 種類のサブスペクトルを導出した。さらに MAS-J-HMQC 実験から、4 種類のグルコース残基の各炭素原子と直接結合した ^1H 核の化学シフトを初めて明らかにした。この結果、セルロース I_{α} , I_{β} の分子鎖配列、構成グルコースのコンフォメーションの違いを明らかにした。

(3) 2, 3, 5 位を選択的 ^{13}C ラベリングした BC からセルロース III_I を調製し、

CP/MAS ^{13}C NMR 測定することによってセルロース III₁ の各共鳴線を完全に帰属した。セルロース III₁ を構成するグルコース残基は全て等価なコンフォメーションであることを明らかにした。さらにセルロース I から III₁ への転移における分子鎖形態変化の機構を初めて提案した。

(4) ピリジン/無水酢酸系で調製した三酢酸セルロース (以下 CTA とする) のオリゴマー (重合度 2-6) は、隣接分子鎖が互いに平行であるとされる CTA(I) の結晶構造であることを明らかにした。CTA の調製方法と結晶構造の関係から、CTA(I) と CTA(II) の結晶構造の違いは構成グルコース残基、アセチル基のコンフォメーションの違いであることを証明した。

(5) 位置選択的に ^{13}C ラベリングした CTA(I), (II) を調製し、それら試料の CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルにおける各共鳴線強度と、各位置の ^{13}C ラベル化率の詳細な比較によって、CTA(I) と CTA(II) CP/MAS ^{13}C NMR を完全に帰属した。この結果、CTA(I) の単位胞を構成するグルコース残基は全て等しいコンフォメーションであり、CTA(II) は異なる構造を持つ二種類のグルコース残基が等しい割合で存在していることを明らかにした。

(6) CTA(II) の固体二次元 INADEQUATE スペクトルによって、CTA(II) を構成する異なる 2 種類のグルコース残基のサブスペクトルを導出することに成功した。さらに、CTA(I) と CTA(II) の各炭素原子と直接結合した ^1H 原子核の化学シフトを帰属した。これら固体二次元 NMR 測定結果から、CTA(I) は 1 本の分子鎖から構成される単位胞を持つこと、CTA(II) は、2 本の分子鎖から構成される結晶構造を持つことを明らかにした。

(7) α , β キチンの結晶構造を、二次元 INADEQUATE, MAS-J-HMQC 測定によって決定した。その結果、 α , β キチンそれぞれを構成する *N*-アセチルグルコサミン残基は全て等しいコンフォメーションを持つことが明らかにした。分子鎖内のアミド基 ^1H 原子とリング及びメチル炭素原子の核間距離を Dipolar HETCOR 測定によって見積もりを行った結果、 α , β キチンは従来考えられていた分子鎖配列の違いではなく、アセトアミド基のコンフォメーションの違いで区別されることを証明した。

これを要するに、著者は固体二次元 NMR と選択的 ^{13}C ラベリングによるセルロース及びその誘導体の共鳴線帰属方法を確立した。さらに ^{13}C , ^1H 化学シフトと共鳴線分裂の解釈、核間距離決定から天然セルロースとその誘導体の結晶構造を明らかにしており、多糖類化学の進歩に寄与するところが大きい。よって著者は北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。