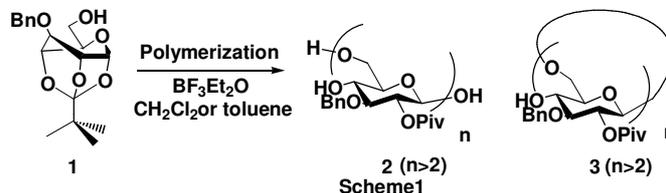


京大院農 ○吉田 彩子、上高原 浩、高野 俊幸、中坪 文明

【緒言】 鎖状β(1→6)グルカン(pustulan)は、植物、菌類、細菌などの細胞壁の構成成分のひとつであり、抗腫瘍活性などの免疫系に対し様々な効果を示すことが報告されている¹⁾。一方、環状β(1→6)グルカンは金属イオンなどのゲストを取り込み包接体を

形成するホスト化合物である²⁾。このような興味から、すでに鎖状および環状のβ(1→6)グルカンの化学合成が報告されているが、調製方法および収率などに改善の余地がある。そこで本研究では、グルコースオルトエステル誘導体



(1)の開環重合により、鎖状(2)および環状(3)β(1→6)グルカンの調製を試みた。

【方法】 3-O-benzyl-α-D-glucopyranose 1,2,4-orthopivalate (1)の重合反応を、Lewis酸触媒としてBF₃·Et₂Oを用い、ジクロロメタンあるいはトルエン中、種々の反応温度で試みた。得られた重合物およびそのアセチル化物の構造をGPC、MALDI-TOF-MS、およびNMRなどの分析により決定した。

【結果と考察】 化合物1の重合反応では(1→6)結合のほかに(1→4)結合形成の可能性も考えられる。¹³C NMRスペクトルにおいて、セルロース誘導体では60ppmに6位カーボンのピークが現れるのに対し、重合物は70~75ppmに6位カーボンピークが現れた。このことから、重合物(1→4)結合ではないことが判明した。また重合物がβ結合鎖であることは、重合物の¹³C NMRスペクトル、負の旋光度、および反応機構より強く示唆された。環状および鎖状構造は、MALDI-TOF-MSスペクトルより確認された(環状の化合物[M+Na]⁺=336n+23, 鎖状化合物[M+Na]⁺=336n+18+23)。なお、重合物が高い立体規則性をもつことは¹³C NMR分析から支持された。

Table 1 代表的な反応条件と結果を示す。反応条件によって重合物中の鎖状および環状構造の比率が制御されることが明らかになった。すなわち反応温度が低いほど、鎖状化合物の割合が増加した。また、反応溶媒としてジクロロメタンをトルエンにかえた場合も同様の傾向がみられた。重合度が大きくなるにつれて鎖状化合物の割合が増加したが、これは糖鎖が長くなるほどエントロピー的に環状構造の形成が不利になるためと思われる。

以上の分析結果より化合物1の開環重合により、鎖状および環状立体規則性β(1→6)グルカンが調製されたこと、また、条件を適切に選択することにより鎖状ならびに環状化合物の選択的合成が可能であることが見出された。

Table 1 重合条件と結果

Entry	SM/Solv. (mg/μl)	Temp. (°C)	Time(h)	Solvent	Yield (%)	DP _n ^a	低重合度部分の鎖状化合物の割合 ^b (%)			旋光度 [α] _D ²⁵
							DP=3	DP=4	DP=5	
1	100/1000	-60	24	CH ₂ Cl ₂	96.7	35.4	20.4	23.0	43.6	-6.0
2	100/1000	-30	24	CH ₂ Cl ₂	88.9	13.8	13.1	14.6	31.3	-26.0
3	100/1000	0	24	CH ₂ Cl ₂	93.1	4.71	7.6	7.0	8.0	-31.2
4	100/1000	-60	24	Toluene	94.6	15.8	52.3	83.6	85.1	-10.4
5	100/1000	-30	24	Toluene	93.9	21.0	22.2	49.4	56.5	-11.7

^aGPC分析(ポリスチレン標準)により求めた ^bMSスペクトルにおけるピーク面積より求めた

参考文献1) K. Shimura / *Carbohydr. Res.* 186, 267-273 (1989), 2) G. Bonas et al., *J. Biomol. Struct. Dynam.*, vol. 8, 4, 781-791 (1991), 3) G. Gattuso et al., *Chem. Rev.*, 98, 2929-2958 (1998)

京大院農 ○榊原圭太、上高原浩、高野俊幸、中坪文明

【緒言】 グルコースオルトエステル誘導体のカチオン開環重合により、セルロースが化学合成された¹⁾。しかし、分子量が制御できない点と、分子量が天然セルロースの重合度（およそ 200 以上）に達しない点などが残された課題である。この問題解決の手段として、テンプレート重合法の導入が考えられる。テンプレート重合法とは、鋳型（テンプレート）として、モノマーに対して親和性（イオン性、共有結合性、疎水性など）のある高分子を用いて行う重合法である。この方法により、重合速度や分子量の制御が期待される。そこで、本研究では、ラジカル重合能を持つメタクリロイル基をグルコースオルトエステル誘導体に導入し、まずラジカル重合によりテンプレートモノマーを調製し、次いで得られたテンプレートモノマーのカチオン重合により、高分子量セルロースの合成を試みた。

【方法】 本研究の合成経路を Scheme 1 に示す。常法²⁾により調製したオルトエステル誘導体 **1** の 6 位水酸基にメタクリロイル基を導入し、モノマー **2** を合成した。**2** のラジカル重合は α, α' -azobisisobutyronitrile (AIBN) を開始剤として、トルエン溶媒中、反応温度 60°C で行った。得られたテンプレートモノマー **3** のカチオン重合は $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ を開始剤として、クロロホルム溶媒中、反応温度 -30°C、48 時間行った。生成物の分子量は GPC（ポリスチレン標準）により、その構造は ^1H -及び ^{13}C -NMR スペクトル分析により決定した。

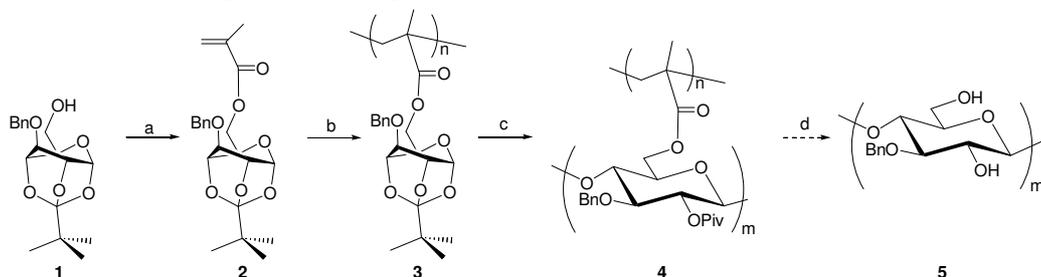
【結果と考察】 モノマー **2** のラジカル重合：重合条件を Table 1 に示す。モノマー初濃度 $[\text{M}]_0$ は全て 0.2M にした。モノマー / 開始剤仕込み比を 10 から 15 にすることで (Entry 1、2) 分子量が増加したが、Entry 3 ではゲル化した。生成物 **3b** の ^1H -NMR では、メタクリロイル基特有の 5.6ppm (m) と 6.2ppm (s) のピークが消失した。また、 ^{13}C -NMR では、123ppm のオルトエステル四級炭素由来のピークが存在していたことから、オルトエステル構造が保持されていることが判明した。

Table 1 Radical polymerizations of **2**

Entry	Product	$[\text{Monomer}]_0 / [\text{Initiator}]_0$	Time (h)	Yield (%)	$10^{-4} \overline{M}_n$ (GPC)	\overline{DP}_n (GPC)
1	3a	10	20	84	1.25	30.9
2	3b	15	20	85	1.78	44.0
3	3c	20	15	Gel	—	—

テンプレートモノマー **3** のカチオン重合：

テンプレートモノマー **3b** を上述の重合条件でカチオン開環重合し、生成物 **4b** を収率 96% で得た。GPC 分析により数平均分子量が 2.81×10^4 であり、重合度が約 69.4 だった。重合前後の分子量の変化から、一部で分子間架橋が生じたことが示唆された。**4b** の ^1H -NMR スペクトルでは、オルトエステル誘導体 C1 位プロトン由来の 5.7ppm のピークが消失し、 ^{13}C -NMR では、100.7ppm に C1 位由来のピークが確認された。これらの結果から、テンプレートモノマー **3b** のオルトエステル誘導体部分での重合が起こっている可能性が示唆された。現在、テンプレート部分との加水分解及び糖部分の分析を検討中である。



^aMethacryloyl chloride/ Et_3N / CH_2Cl_2 , 0°C, 2h, 89%, ^bAIBN/ toluene, 60°C,

^c $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ / CHCl_3 , ^d NaOCH_3 / 4:1 THF-MeOH

Scheme 1

The radical polymerization of the monomer and the cationic polymerization of the template monomer

参考文献 1) Nakatsubo, F.; Kamitakahara, H.; Hori, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1677.

2) Karakawa, M.; Nakatsubo, F. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 951.

はじめに セルロースを塩化リチウム-アミド系溶媒に溶解させる際には、前処理として、セルロースを水、アセトン、*N,N*-ジメチルアセトアミド(DMAc)に順次浸す溶媒置換処理を行う。この溶媒置換処理を行うことでセルロースの溶解は顕著に促進されるが、その理由を明らかにするために、溶媒置換処理がセルロースの構造や分子運動性に及ぼす影響について検討されてきた。その結果、溶媒置換の前後でセルロース固体構造におけるフラクタル性が変化することが小角 X 線散乱(SAXS)により明らかになっている。¹⁾

本研究では溶媒置換処理によるセルロースの固体構造の変化をより詳細に調べるために、サイズ排除クロマトグラフィーを用いてセルロースの細孔容積やサイズ分布の評価を行った。

試料と方法 試料として針葉樹溶解パルプ(DP)と Whatman®CF11 を用いた。これら水を、アセトン、一部はさらに DMAc で順次置換し、内径 6mm×長さ 250mm のカラムに詰めクロマトグラフ測定に供した。移動相に種々の有機溶媒(アセトン、2-ブタノン、トルエン、クロロホルム)を用い、溶質として種々の分子量の高分子(単分散ポリスチレンあるいはポリエチレングリコール)、あるいはフタル酸ジエチル、アセトンを個別に注入し、溶出体積を測定した。

結果 移動相と溶質の様々な組み合わせで測定したところ、2-ブタノンとポリスチレンの組み合わせで分子量の分別が可能であることがわかった。そこで以下の測定はこの組み合わせで行った。溶出体積には溶質分子量に対する依存性が見られたが、測定ごとにその値にはばらつきが生じた。これは試料のもつ不均一性やカラムに試料を充填する際の充填量のばらつきに起因すると考えられる。そこで、測定ごとの溶出体積の違いを補正し規格化を行うために、溶出体積から次式に示すキャパシティブクター k' への変換を行った。²⁾

$$k' = (V_e - V_m) / V_m$$

ここで V_e は溶出体積、 V_m は排除限界での溶出体積である。

Fig.1 に溶質分子量と k' の関係を示す。低分子量の領域ほど、DMAc で処理した DP のほうが

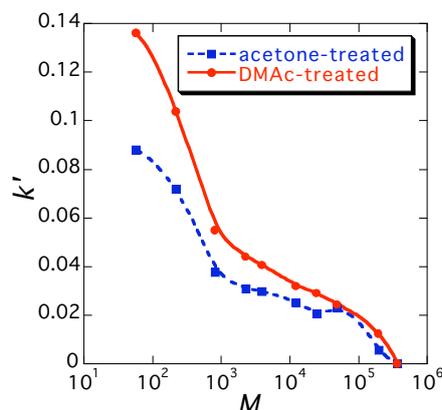


Fig.1 DPにおける溶質分子量と k' の関係

アセトンのみで処理した DP よりも k' が大きくなっている。これは DMAc 処理によって、より小さなサイズの細孔が増えることを示している。SAXS 測定から見出されたフラクタル性の変化とあわせて考えると、DMAc 処理により、セルロース固体内部の細孔が増えることで溶解が容易になると考えられる。なお発表では、溶質であるポリスチレンの流体力学的半径を粘度測定から算出する事で、溶質分子量から細孔サイズを求め、細孔サイズと容積の関係についてより定量的に議論を行う予定である。

引用文献

- 1) D. Ishii, D. Tatsumi, and T. Matsumoto, *Biomacromolecules*, **4**(5) 1238-1243(2003).
- 2) Y. Kiso et al, *J. High Resolution Chromatog. & Chromato. Commun.*, **9**, 763(1986).

京大院農 大野貴広、西尾嘉之

[緒言]

当グループでは、天然由来の物質が生体内で異種成分と複合化することにより多種多様な機能を発現していることにも留意し、糖質を中心として有機・無機の様々な素材との複合化研究を推進している。合成高分子とのブレンドによる複合化に関しては、セルロースアセテート(CA)またはセルロースブチレート(CB)とN-ビニルピロリドン-酢酸ビニル共重合体[P(VP-co-VAc)]とのブレンド系について、CAの熱的性質の改善、およびセルロースの側鎖長が相溶性に及ぼす影響について検討を行っており、分子間相互作用および混合系の相溶スケールについても多くの情報を得ている¹⁻³⁾。本研究では、医療、光学機器等様々な分野で利用されているメタクリル酸メチルを共重合体の一成分として用い、CAの機能性の付与を視野に置いてCA/ビニル共重合体ブレンドの相溶性を評価した。

[実験]

CAは、置換度(DS)が1.80-2.95の6種を使用した。ブレンド成分のビニルポリマーはポリメタクリル酸メチル(PMMA)、および共重合組成の異なる複数のN-ビニルピロリドン-メタクリル酸メチル共重合体[P(VP-co-MMA)]を用いた。CA/ビニルポリマーの均一混合溶液からキャスト法にてブレンドフィルムを調製し、それらについてDSC測定による熱分析、FT-IR測定および固体¹³C NMR測定を行い、CA/ビニルポリマーブレンドの相溶性並びに分子間相互作用について評価した。

[結果と考察]

DSC熱分析の結果、CA/PMMAブレンド系では、CAのDSに関わらず、ブレンド体为非相溶であることを示す両成分由来の二つのガラス転移点(T_g)が観測され、CAとPMMAは非相溶であることが判った。一方、共重合組成(VP/MMA)が50/50のP(VP-co-MMA)を用いたブレンド試料について T_g の組成依存性をFig. 1に示す。なお、DS=2.70と2.95のCAを用いた系では測定の熱履歴が他と異なる。この図よりDSがおよそ2.5以下のCAを用いたブレンドではブレンド体の T_g が両成分ポリマーの T_g の中間位置にただ一つ現れ、さらに組成に依存して系統的にシフトしていることからDS \leq 2.5のCAとVP/MMA=50/50のP(VP-co-MMA)とのブレンドは相溶系であることが分かる。他の共重合組成を持つP(VP-co-MMA)とCAとの相溶性は現在評価中である。

熱分析で良好な相溶性を示したCA(DS=1.80)/P(VP-co-MMA)(VP/MMA=50/50)ブレンド体について分子間相互作用を評価したところ、FT-IR測定からはCAの残存水酸基とP(VP-co-MMA)のVPユニット中のカルボニル基に由来する各バンドで水素結合の形成を示す低波数シフトが、固体¹³C NMR測定からも水素結合の形成を示唆するP(VP-co-MMA)のカルボニルピークの低磁場シフトがそれぞれ観測された。また固体¹³C NMR測定によりスピン-格子緩和時間(T_1^H)を測定したところ、両成分の緩和が均等に進行していたことから、拡散方程式に従いドメインサイズの定量化を行った。その結果、ブレンド体中で、CAとP(VP-co-MMA)の各成分はおよそ2.8nm以下のスケールで均一混合していることが示唆された。

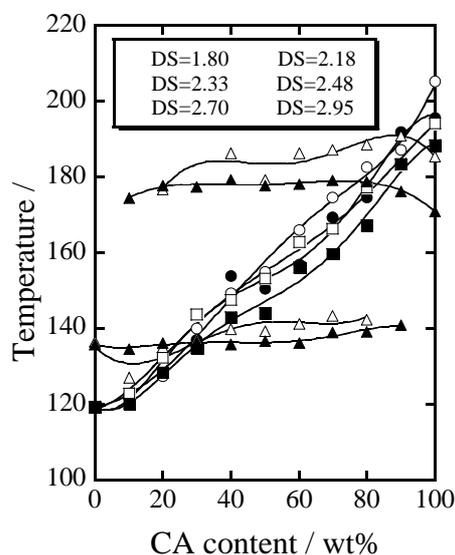


Figure 1 Composition dependence of T_g for six series of CA/P(VP-co-MMA) (VP/MMA=50/50) blends, with the acetyl DS of CA varying from 1.80 to 2.95.

1) Y. Miyashita, T. Suzuki, and Y. Nishio, *Cellulose*, **9**, 215 (2002).

2) T. Ohno, S. Yoshizawa, Y. Miyashita, and Y. Nishio, *Cellulose*, in submission.

3) 大野, 宮下, 西尾, *Polym. Preprints, Jpn.*, **53** (1), 2255 (2004).

東大院農 吉田 穰、磯貝 明

【緒言】 これまで、非水系セルロース溶剤を用いたセルロースとアルキルケテンダイマー(AKD)との均一的な β -ケトエステル化による、新規セルロース系ポリマーブラシ合成に関する研究を行ってきた。AKDとは中性紙製造工程においてサイズ処理の際に用いられる安全で汎用な物質で、2分子の脂肪酸から合成されるため1分子中に2本の長鎖アルキル基及び反応性の高い四員環を有する特徴的な試薬であり、すでに融点が室温以下で均一反応の容易なオレイン酸由来のAKD(OKD)の導入例については本研究者が報告している。本発表では、 β -ケトエステル化試薬として新たに側鎖長及び形状の異なる様々なAKDを選択することで、その反応における最適条件の変化、得られたセルロース誘導体の構造・物性の変化の解析の検討結果を報告する。

【実験】 非水系セルロース溶剤としては熱・化学安定性に優れ、反応媒体としての優位性も報告されているDMI/LiCl系を用い、これに微結晶セルロース粉末を加熱法によって溶解させ、1%セルロース溶液を調製した。調製されたセルロース溶液に対し、各種試薬及び塩基として1-メチルイミダゾールを添加した。試薬は C_{10} AKD、 C_{12} AKD、 C_{14} AKD、 C_{16} AKD、 C_{18} AKD、iso-AKDを用いた。得られた生成物はクロロホルム/プロパノール精製処理によって不純物を取り除き、サンプルとした。これらサンプルに対し、元素分析・FT-IR・NMR・SEC等の測定を行い置換度等の物性解析及び構造決定を行った。

【結果と考察】 反応は全て均一的に進行したが、系中でAKDが多量体化する副反応が確認された。副成するAKD多量体に関しては、精製処理によるサンプル中からの完全除去を確認した後に測定を行っている。この β -ケトエステル化反応における最適条件は、室温が融点以下のAKDに関しては試薬及び塩基をセルロースのグルコース残基(AGU)当り8~10倍モル添加し、室温で3時間程度攪拌するというものであった。一方、融点が室温以上のAKDに関しては100℃まで加熱することで、塩基を添加しなくても試薬をAGU当り8~10倍モル添加することで高置換度セルロース- β -ケトエステルが得られた。得られたセルロース- β -ケトエステル誘導体は、側鎖の最も短い C_{10} AKD導入体で置換度2.7程度、以下側鎖長が長くなるほど置換度は低くなる(C_{18} AKDで1.9程度)ことから、置換度と立体障害との相関関係が確認された。

高置換度セルロース- β -ケトエステル誘導体に関しては、クロロホルムやTHF等の有機溶剤に可溶性し、また、融点が室温以下であるため室温ではゴム状態を呈する一方、X線回折パターンから常温でも液晶状態を示す結果が得られている(図1)。また、このような高置換度セルロース- β -ケトエステルは、重クロロホルムに溶解させて ^{13}C -NMRスペクトルを定量モードで測定しても、セルロース由来の炭素のシグナルが検出されない、という特異的挙動を示した。この挙動については、以前に本研究者が報告した、OKD/セルロース- β -ケトエステルで確認されたもの(文献参照)と同様であり、この挙動の要因としては長鎖アルキル基を高密度に導入したことによって、溶液中においても、その置換基の分子運動の占有体積バランス及び置換基部分の運動による引張力と圧縮力の均衡からセルロース主鎖自身の剛直性が維持され、あたかも棒状固体として挙動する、というモデルによって説明される。本研究で得られた挙動は、このモデルを支持するものであり、新規セルロース系ポリマーブラシとしての新たな機能が期待される。

[引用文献]

Yutaka Yoshida and Akira Isogai “Preparation of polymer brush-type cellulose β -ketoesters using LiCl/1,3-dimethyl-2-imidazolidinone as a solvent” (投稿中)

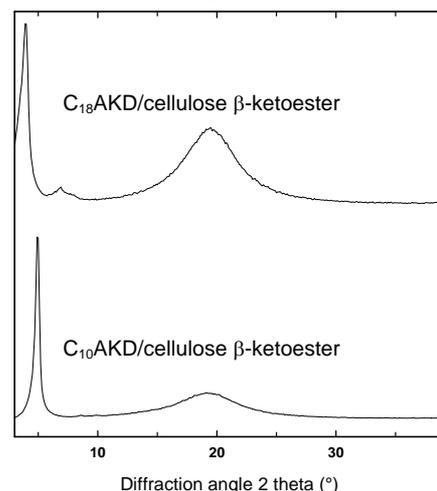


Fig.1 X-ray diffraction patterns of C_{10} AKD/ and C_{18} AKD/cellulose β -ketoesters.

SEC-MALS 法によるセルロースの分子特性解析

東大院農 柳澤 正弘、柴田 泉、磯貝 明

【緒言】 固相・液相における高分子鎖の形態（コンホメーション）はその高分子の物性・機能と密接な関連が有るので、その把握と制御は重要である。SEC-MALS 法(size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering detection)は高分子の分子量・分子量分布の測定法であると共に、溶媒中に分散している粒子の幾何学的な広がり（回転半径）の連続測定が可能なることから、溶液中での高分子鎖のコンホメーション、高分子の一次構造（分岐の有無等）およびある条件下で形成される分子間の会合・凝集構造等に関して情報を得ることができる。本検討では未修飾セルロースの安定な溶剤である塩化リチウム / 1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（LiCl/DMI）および塩化リチウム / N,N-ジメチルアセトアミド（LiCl/DMAc）を SEC-MALS 分析の移動相として用い、分子量、分子量分布および分子コンホメーションの観点からセルロースの分子特性解析を行った。

【実験】 生物的起源および機械的・化学的・酵素的履歴を異にする各種セルロース試料を溶媒置換処理（水、アセトン、DMAc に各 24h 順次浸漬した後真空乾燥）により活性化した後、8%の塩化リチウムを含む DMI または DMAc に室温で溶解させた。得られた溶液に DMI または DMAc を加えて希釈し試料濃度を 0.05-0.2% に調整した。希釈溶液は孔径 0.45 μ m の PTFE メンブランフィルターでろ過した後、SEC-MALS 分析に供した。測定条件は以下の通りである。検出: 接続順に UV-VIS (SPD-10A VP; 島津製作所)、MALS (DAWN-EOS; ワイアットテクノロジー)、DRI (RID-10A; 島津製作所)、カラム: KD-806M (Shodex)、カラム温度: 60、試料注入量: 100 μ L、流速: 0.5 mL/min、移動相: 1% LiCl/DMI または 8% LiCl/DMAc（孔径 0.1 μ m のメンブランフィルターでろ過した後使用）

【結果と考察】 図 1 に、様々な平均分子量を持つ各種セルロースについて、SEC-MALS 分析により得られた 8% LiCl/DMAc 中での回転半径と分子量との関係を示す。このプロットの傾きは溶液中での高分子鎖の形態の判定に利用されることが知られている。今回、回転半径が 30-40 nm（分子量では 20 万付近に相当）以上の領域ではこのプロットの傾きがほぼ一定であり、

$$\langle S^2 \rangle_z^{1/2} = 0.027 M_w^{0.57-0.59} \quad (\text{nm})$$

という関係式を得た。上式右辺の指数は 0.57-0.59 となっているが、この値は良溶媒中の直鎖ランダムコイル高分子について予想される値に相当する。よって、セルロース分子鎖はこの分子量領域ではコイル状の形態をとっているものと考えられる。一方、回転半径（分子量）がこれより小さい領域では、傾きが分子量に依存して連続的に変化している（分子量が小さいほど傾きが大きくなっている）。すなわち、分子鎖が短くなる程、セルロース分子鎖の形態は剛直な棒状に近づいているものと考えられる。同様の結果は 1% LiCl/DMI 中のセルロースおよびセルローストリカルバニレートについても得られ（図 2）、ここでも回転半径 30-40 nm 付近でプロットの傾きの分子量依存性が変化していることが確認された。これらの結果はセルロース分子鎖の形態が分子量の変化に伴い（剛直棒状）

（ランダムコイル）のように遷移することに対応していると考えられ、半屈曲性高分子としてのセルロース分子固有の性質を反映したデータとして興味深い。

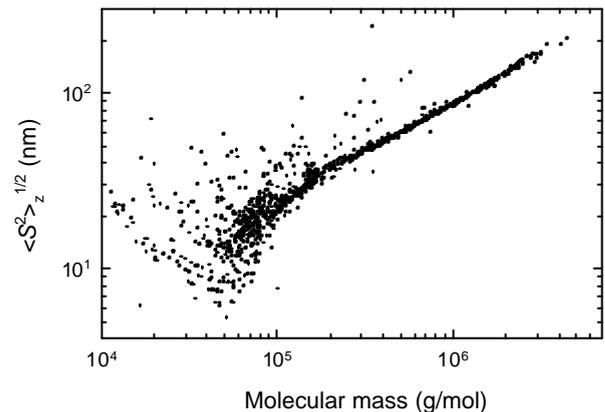


Fig. 1. Double logarithmic plots of $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ vs. M_w for cellulose in 8% LiCl/DMAc.

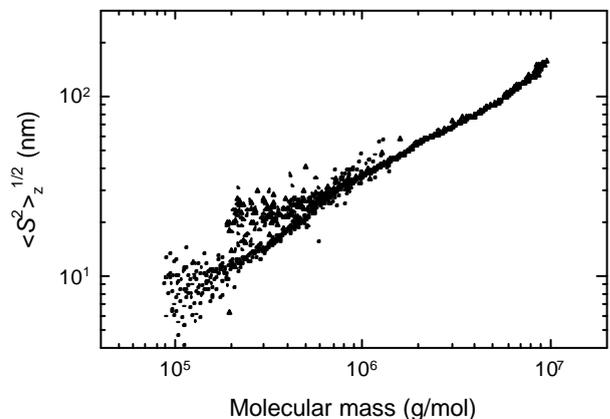


Fig. 2. Double logarithmic plots of $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ vs. M_w for cellulose tricarbaniates in 1% LiCl/DMI.

天然セルロースの TEMPO 触媒酸化 その 2 - 水可溶性および水不溶性成分の解析

東大院農 齋藤継之、柳澤正弘、磯貝 明

< 緒言 > TEMPO 触媒酸化は、多糖の C6 位 1 級アルコール性水酸基を高い選択性でカルボキシル基へと変換する。再生セルロースやマーセル化セルロースに TEMPO 触媒酸化を適用した場合、全ての C6 位が酸化された水溶性のポリグルクロン酸（セロウロン酸）が得られる。しかし、天然セルロースでは長時間酸化してもほとんどの C6 位水酸基が未反応のまま酸化物中に残り、水溶性のポリグルクロン酸は得られないと報告されてきた。

本実験では、天然セルロース試料に対してどのような機構で TEMPO 触媒酸化が進んでいるのかをより詳細に明らかにしていくことを目的とする。

< 実験 > 天然セルロース試料としてセルロース純度の高いリンターセルロースに TEMPO 触媒酸化を適用し、その酸化生成物をろ過により回収される水不溶性画分、ろ紙を通過する水可溶性および微小コロイド成分に分類し、カルボキシル基・アルデヒド基導入量（電導度滴定）、分子量（SEC-MALS）、結晶化度や結晶サイズ（X 線回折測定）等の観点から特性化を行った。

< 結果と考察 >

ろ過により回収される水不溶性画分の解析結果

ろ過により回収される繊維状の水不溶性画分には、TEMPO 触媒酸化によってカルボキシル基を最大約 0.7mmol/g（平均してグルコース残基約 8 つに 1 つの C6 位カルボキシル基）まで導入することができた。この値は元のリンターセルロースのカルボキシル基量の 35 倍以上もの値である。カルボキシル基以外にも、アルデヒド基を最大約 0.3mmol/g まで導入出来ることが判明した。この値は元のリンターセルロース中のアルデヒド基量の約 1000 倍にも及ぶ値であり、TEMPO 触媒酸化により極めて特異的な化学改質が可能になったと言える。この水不溶性画分として回収される割合は、酸化条件により変化するが通常 80%以上であった。

また、相当量のカルボキシル基が導入されるような酸化条件であっても、この繊維状水不溶性画分のセルロースの結晶化度と結晶サイズは元のリンターセルロースとほとんど変わらなかった。つまり、TEMPO 触媒酸化は結晶内部へ進むことはできず、酸化により導入されるカルボキシル基・アルデヒド基は結晶表面や非晶領域に集中するため酸化後のセルロースは水不溶性を維持しながらも、官能基を部分的に高密度で保有していることが明らかになった。

ろ紙を通過する水可溶性および微小コロイド状画分の解析結果

反応終了後のセルロース懸濁液をろ過した際に、ろ液中には様々な種類の酸化生成物が存在していることが判明した。これらはセルロース I の結晶構造をわずかに残している微粒子状コロイド成分と、多量のカルボキシル基が導入されることで水溶性化した分子分散成分とに分類できる。

微粒子としてろ液中に分散しているコロイド成分は、その粒子径にかなり広い分布（約 5 μm ~ 可視光波長以下）を有しており、この成分のカルボキシル基導入量は、ろ過により回収される繊維状成分と比べて、はるかに多量であった。つまり、約 0.8mmol/g 以上のカルボキシル基が導入された部位は、水可溶成分となるか、もしくは微粒子状コロイド成分として繊維から脱離し、ろ液部分に分散していることが明らかになった。

水溶化した分子分散成分は、セロウロン酸に近い化学構造を持った生成物だけではなく、酸化条件に従ってヘキサウロン酸として存在していることも判明した。また、セロウロン酸の分子量分布は高分子量側と低分子量側の 2 つのピークを持つという結果がこれまでに多数報告されてきたが、このうち高分子量側は実際には水可溶性の分子分散成分ではなく、このコロイド成分（< 0.45 μm ）が検出されていることが明らかになった。

トロロアオイ系粘質物の構成糖分析及び分子量分析

(東大院・農生命) 韓 允熙, 柳澤 正弘, 江前 敏晴, 磯貝 明, (森林総研) 石井 忠

1. はじめに

和紙を抄紙する場合は、長い繊維が絡まないように浮遊能力を高めるため、分散剤として様々な植物を使う。日本では粘質物としてトロロアオイ、ノリウツギが中心で、韓国ではトロロアオイ、ニレ(木の皮の部分を使用)が使われている。これら以外に昔から使われているのはビナンカズラ、タブ、ギンバイソウ、アオギリ、ヤマコウバジ、スミレ、マンジュシャゲ、ナミカズラ、ウワバミソウなどである。本研究では、現在最も一般的に使われている植物を中心として、この粘質物の糖組成や分子量に関する分析を行った。

2. 実験

まず各サンプルを常温で脱イオン水中に1日置いて粘質物を抽出した。次にそれらの水溶液をろ過し、濃縮して凍結乾燥を行った(ここまで処理したものを未処理とする)。さらに日本のトロロアオイ、韓国のトロロアオイ、ノリウツギについては60℃で3日間放置して粘度を低下させた。そのサンプルを遠心分離して、少量の不要部分を除去し、溶解部分を0.45 μmメンブレンフィルターでろ過した後、SEC-MALLS(size exclusion chromatography with a multi-angle laser light scattering detector)の分析に供した。溶離液として0.1Mの塩化ナトリウム水溶液を用いた。

構成糖分析には日本のトロロアオイ、韓国のトロロアオイ、ノリウツギ、ニレを用いた。これらのサンプルは未処理のもの、60℃で3日放置したものをそれぞれ遠心分離し、0.45 μmメンブレンでろ過したものを凍結乾燥して用いた。遠心分離して沈殿した部分も凍結乾燥して分析した。合計11種類の試料について、トリフルオロ酢酸加水分解-アルディールアセテート化と、塩酸メタノール加水分解-TMS化を行ない、GCで中性糖成分と酸性糖成分を分析した。

3. 結果及び考察

SEC-MALLSの結果によると、未処理のトロロアオイ粘質物は溶出容量と分子量の関係が通常のパターンにならず、分子分散状態でないことを示していた。すなわちトロロアオイは分子間で架橋あるいは凝集体を形成し、超高分子となって和紙製造の際に分散剤として機能していることが示された。一方、トロロアオイ系粘質物は60℃程度に加熱するとその分散能力が失われることが知られている。加熱した試料についてSEC-MALLS分析したところ、通常の高分子の分子量プロットが得られたことから、上記の結果が支持された。加熱処理した試料の結果から、日本のトロロアオイは分子量が $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 、韓国のトロロアオイは $1000 \sim 6 \times 10^4$ の幅広い分布を示していた。今回の実験で、日本と韓国のトロロアオイの分子量及び分子量分布の差が見出されたが、サンプリングの差なのか本質的な差なのかは現在検討中である。

これまでの文献ではトロロアオイはガラクトースとラムノースを主成分とされてきた。しかし、図に示すようにラムノース以外にも多くの中性糖が含まれていることが分かった。また、酸性糖についてもトロロアオイとノリウツギについてはガラクトース以外にもグルクロン酸の存在が確認された。一方、ニレには酸性糖は検出されなかった。日本のトロロアオイと韓国のトロロアオイは同じ科であるが、試料間の構成糖比率等の差異は顕著であり、採取された場所の影響及び分散機能の影響等について引き続き検討している。

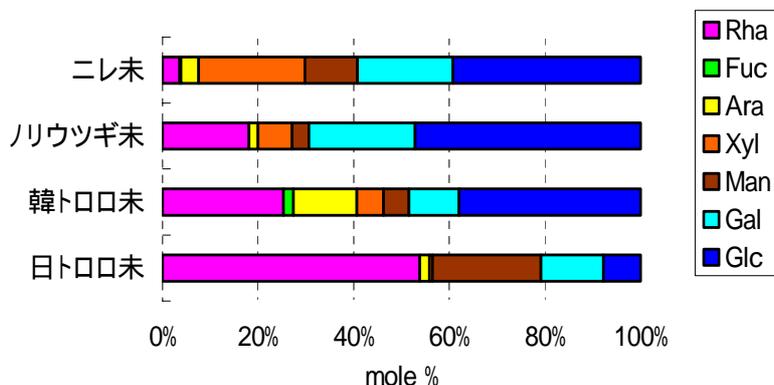


図 中性糖分析の結果

[緒言]

キチンはセルロースの2位の水酸基がアセチルアミド基に置換された構造の多糖で、セルロースについて自然界での存在量が多い。キチンの結晶多形の1つであるキチンは、アミド水素結合によりキチン分子鎖がシートをなし、そのシートが層状に重なった構造を持つ。このシート間には水素結合が存在しないため、容易に低分子溶媒をシート間に取り込むとされる。この取り込みにより、結晶のシート間隔に相当する d_{010} の長さが、取り込まれた溶媒分子のサイズに応じて増加する。キチンへの溶媒分子の取り込みは可逆的で、乾燥条件に置けば溶媒分子はシート間から抜け無水キチンに戻る。また、他の異なる溶媒でゲストを置換することもできる。しかし、アクリル酸をキチンに取り込ませ、熱によって反応させると、キチン分子鎖シートの間隔が広がった状態で、シートの規則性を保ったまま固定され、アクリル酸がキチン分子鎖シート間に存在する状態で安定し、新たな成層化合物を形成する。

本研究では、アクリル酸-キチン成層化合物の構造を明らかにするために、キチンシート間で反応したアクリル酸がキチンシートとどのような相互作用を持つのかを固体NMRにより明らかにするとともに、各種の溶媒に浸漬して溶媒の取り込み挙動をX線回折により検討した。

[実験]

Lamellibrachia sp. の棲管を精製して得た高結晶性キチンを試料として用いた。

試料をアクリル酸溶媒和させ、105℃で、9時間処理してアクリル酸-キチン成層化合物を得た。これを十分に水で洗浄、乾燥させて未反応のアクリル酸を除去した。

上記のアクリル酸-キチン成層化合物生成の反応過程を明らかにするために、アクリル酸とキチン分子鎖シートとの反応の前後で、固体NMRスペクトルを測定した。

アクリル酸-キチン成層化合物を室温で直鎖1価アルコール、アクリル酸などの各種溶媒に浸漬し、ガラスキャピラリに封入してX線回折に供した。

[結果と考察]

固体NMRスペクトルから、アクリル酸-キチン成層化合物において、キチン分子鎖シートとそれに取り込まれたアクリル酸との間で、エステル結合とカルボキシル基による水素結合を介した相互作用が生じていると推測された。これらの結合により、アクリル酸が安定にキチンシート間に保持されると推測される。安定したアクリル酸はキチンシート間隔を広げる役割を果たし、これによってシート間に他の溶媒を取り込む能力に変化を与えられられる。

取り込まれているアルコール、水・アクリル酸の炭素数に対して、キチン分子鎖シート間隔に相当する010面の面間隔をプロットしたグラフをFig. 1に示す。キチン分子鎖シート間に直鎖1価アルコールを包接した場合、キチンとアクリル酸-キチン成層化合物の両者において、増加したシート間隔に差異はなかった。これに対して、水やアクリル酸などの極性の高い溶媒を包接したとき、キチンとアクリル酸-キチン成層化合物では、シート間隔の増加量が異なった。これは、アクリル酸-キチン成層化合物ではキチン分子鎖シート間に存在するアクリル酸のカルボキシル基と、極性の高いゲスト溶媒分子が相互作用を持ち、キチン分子鎖シート間での溶媒の充填形状が異なってくるためではないかと推測される。

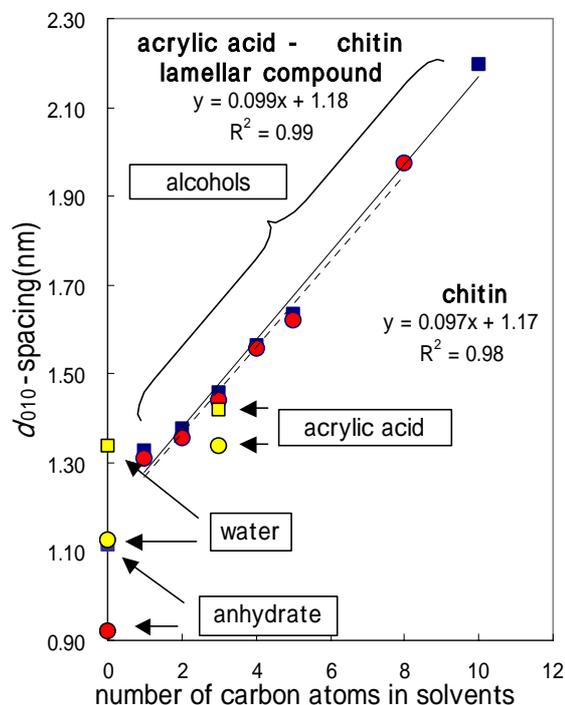


Fig. 1 各種溶媒取り込み時の(010)面間隔: キチン (○)アクリル酸-キチン成層化合物 (□)
(近似曲線はアルコール溶媒和物に対してのもの)

東大院農 堀律子、和田昌久

【緒言】セルロースは木材細胞壁の主要な構成要素であり、その性質を調べることは木材の物性を理解するうえで重要である。セルロース結晶の重要な物性の1つである熱膨張に関しては高結晶性のシオグサやホヤセルロースを用いた横断面方向の挙動に関する報告がある¹⁾。しかしながら木材のセルロースはシオグサやホヤセルロースに比べ格段に結晶サイズが小さく乱れが大きく、そのため異なる熱物性を示すことも考えられる。本研究では高配向性でセルロースに富み、木材セルロースの解析用試料としては理想的な材料であるドロノキ (*Populus maximowiczii*) の引張あて材を用い、繊維軸方向を含めた3次元方向の熱膨張挙動を観察した。

【試料と方法】ドロノキ板目面の 3(T)x1(R)x7(L)mm の小片を加熱繊維試料台 (Rigaku 社) に取り付け室温から 250 まで段階的に昇温させた。各段階で X 線発生装置 RINT2200 (Rigaku 社、電圧 38kV、電流 50mA) を用い CuK α 線 ($\lambda=0.15418\text{nm}$) を発生させ、検出器は位置敏感型比例計数管 (PSPC、Rigaku 社) を使い、赤道と子午線の X 線回折プロファイルを記録した。測定時間は 20 分とした。

【結果と考察】赤道では $\bar{1}10$ 、110、200 のピークがはっきりと観察された。昇温に伴う強度変化は見られなかったが、ピーク位置は低角側にシフトし、その傾向は 200 で特に顕著であった。子午線の回折プロファイルでは 004 が観測され、赤道同様に強度の低下は見られなかったがピークの明らかな低角側へのシフトも見られなかった。ピーク分離を行い面間隔の変化を算出すると、室温から 200 までの範囲で直線状に増加し、200 以上では急激に増加することから、この温度付近で木材セルロースの高温相への転移が見られると考えられる。その熱膨張係数は $d_{\bar{1}10}$ では $5.7 \times 10^{-5} \text{ }^{-1}$ 、 d_{110} では $6.6 \times 10^{-5} \text{ }^{-1}$ 、 d_{200} では $14.3 \times 10^{-5} \text{ }^{-1}$ であった。004 では室温から 250 の範囲で直線状に微弱ながら増加し、熱膨張係数は d_{004} で $0.6 \times 10^{-5} \text{ }^{-1}$ であった。

面間隔から算出した熱膨張係数は 200 までは分子間水素結合の存在しない a 軸で $14.3 \times 10^{-5} \text{ }^{-1}$ 、分子間水素結合の存在する b 軸で $-2.2 \times 10^{-5} \text{ }^{-1}$ 、 c 軸で $0.6 \times 10^{-5} \text{ }^{-1}$ であった。また monoclinic angle (γ) もわずかではあるが減少する傾向があった。これらのことから繊維軸方向にはほとんど熱膨張せず、横断面方向では熱膨張挙動に水素結合の有無によって引き起こされる異方性があることが示唆された。この横断面の結果は同じセルロース I β のホヤセルロースの傾向と一致する¹⁾。

1) Wada M. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 2002, 40, 1095

光学異方性を保持したキチンフィルムの 化学構造の温度依存性

(東大院農) ○山口寿 ThiThiNge 堀成人 竹村彰夫 小野拓邦

【緒言】キチンはセルロースに次いで豊富なバイオマス資源であるが、未だその応用範囲は限られ、さらなる研究が求められている。本研究ではキチンを用いた複合材料として光学異方性を保持したキチン/ポリアクリル酸(PAA)複合体フィルムを作成し、その温度依存的構造変化の解析を行った。

【実験】キチンを3N塩酸(104°C)で緩やかに加水分解した後、遠心分離と透析によって酸を取り除き、さらに超音波処理することによってキチンのコロイドサスペンションを得た。これにアクリル酸を加えて剪断応力を与え、UV重合することによって光学異方性のある一軸配向の複合体フィルムを作製した。キチン:アクリル酸:水の配合比の異なる複合体フィルムにおいて、それぞれ23°C~300°Cの範囲においてFT-IR測定を行った。さらにこのスペクトルを基に2D FT-IRによる解析も行った。

【結果と考察】・1D FT-IR…温度変化させたスペクトルはピーク強度が変化し、シフトも見られた。温度の上昇にともなって粒子内の水素結合のエネルギー変化および水素結合の切断がおり、180°Cを超えるあたりから分解が始まることが観測できた。Fig.1に23°C、160°C、および23°C(160°Cに上昇後)で測定された複合体フィルムのOH領域(3700~3000cm⁻¹)のスペクトルを示した。このように分解温度以下の温度範囲において水素結合はその温度に固有な状態をとり、化学構造に再現性があることが確かめられた。

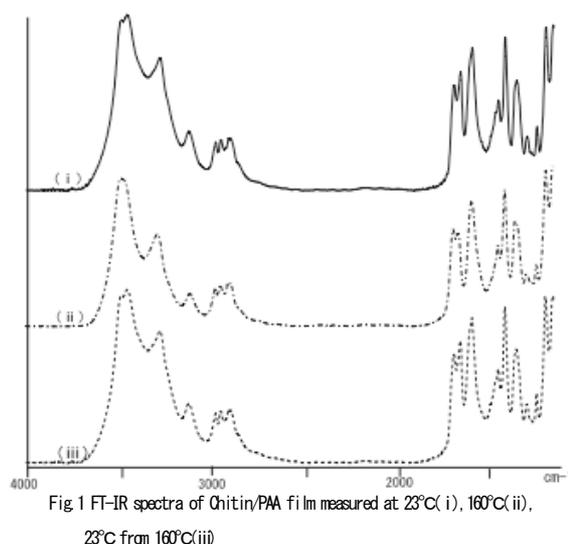


Fig.1 FT-IR spectra of Chitin/PAA film measured at 23°C (i), 160°C (ii), 23°C from 160°C (iii)

・2D FT-IR…Fig.2 および Fig.3 にはキチンフィルムの2D FT-IRの結果を示した。同時相関スペクトル

および異時相関スペクトルから、OHの領域は少なくとも5つのバンドに分けることができた。これらはそれぞれOH基の異なった水素結状態に由来するものであり、①フリーなOH、②アミドのC=Oと分子内水素結合したC₆OH、③グルコース環のO(5)と分子内水素結合したC₃OH、④隣接する鎖のC₆OHと分子間水素結合したC₆OH、⑤隣の鎖のC₆OHと分子間水素結合し、アミド基のC=Oとも分子内水素結合したC₆OHに帰属できた。また、異時相関スペクトルからそれらの水素結合の温度依存的な変化の順序も明らかになった。

まず温度の上昇に伴ってC₆OHどうしの分子間水素結合が切れ、その影響で分子内水素結合の強度が変化すると考えられる。複合体についても同様に解析した。

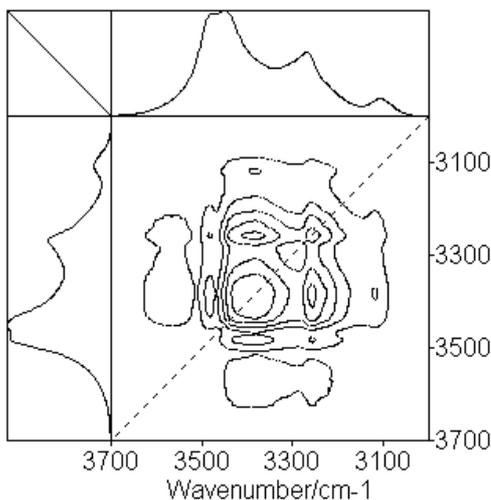


Fig.2 Synchronous spectrum of Chitin(40-120°C)

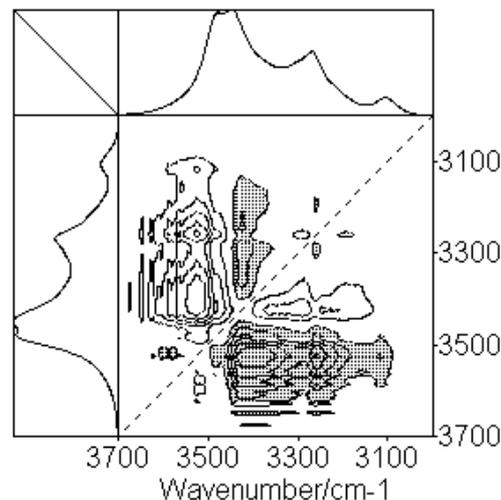


Fig.3 Asynchronous spectrum of Chitin(40-120°C)

1. はじめに

生分解性プラスチック原料のポリ乳酸は、主にデンプンを乳酸発酵して生産したものである。原理的には発酵原料をセルロースとすることも可能であるが、研究例はそう多くない。本研究は、セルロース分解菌と乳酸菌の共生培養系により、乳酸をセルロース系試料から得ることを目的に実施したものである。昨年度の本学会大会において、名和らは共生培養系として、環流式培養法を用いた結果を報告(T230830)しているが、この方法は複雑な操作を必要とすることが難点である。そこで、本実験では同一培養器中で簡便にセルロース分解菌と乳酸菌を培養する方法を検討した。

2. 実験方法

2.1 *Streptococcus bovis* JCM 5802 による乳酸発酵

種々のセルロース系試料や木材構成糖類等を炭素源としたときの乳酸生成量について検討した。基質濃度は1%とし、MRS培地を用い37℃で一週間静地培養した後、培養液中の乳酸濃度、グルコース濃度、pHを測定した。

2.2 セルロース分解菌のスクリーニング

基質としてスギ辺材から調製したホロセルロース及びリン酸膨潤セルロースを用い、種々の培養条件下に、本研究室保存菌株48種について、セルロースを分解しグルコースを蓄積する菌類のスクリーニングを行った。

2.3 セルロース分解菌と乳酸菌の共生培養系

セルロース分解菌(ヒイロタケ、*Trichoderma* sp)と乳酸菌の共生培養系による乳酸生成量について検討した。基質濃度は1%とし、MRS培地を用い37℃で1週間振とう培養した。培養に際してpH調製のために、炭酸カルシウムを1%培地に加えた。

3. 結果と考察

セルロース系基質に対して、乳酸菌 *S.bovis* を単独で培養した場合、図1に示す如く、セロビオースや各種単糖類から乳酸が生じた。また、効率は低くなるが、セロデキストリンからも乳酸が生じた。この結果は、乳酸菌 *S.bovis* が α -グルコシダーゼを分泌する事を示すものである。しかし、重合度や結晶化度が高くなると殆ど乳酸は生成しない。

次に、セルロース系基質からグルコースを蓄積する菌類のスクリーニングを行ったところ、扱い易くグルコース蓄積能の高い菌としてヒイロタケを選択した(図2)。

ヒイロタケの培養液に乳酸菌 *S.bovis* を接種培養しても、*S.bovis* は生育できない。そこで培地pH調製のために炭酸カルシウムを添加した後、接種・培養すると *S.bovis* は生育でき、培地中に乳酸を生成した。

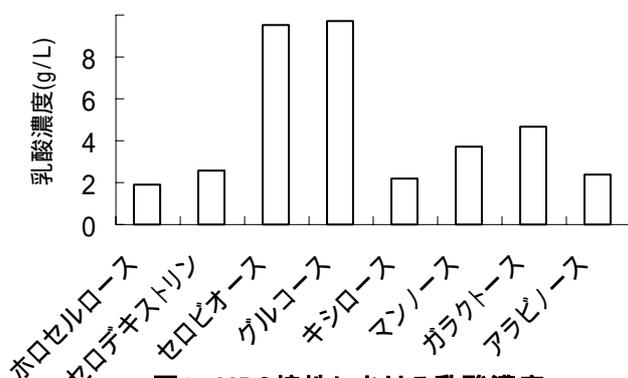


図1 MRS培地における乳酸濃度

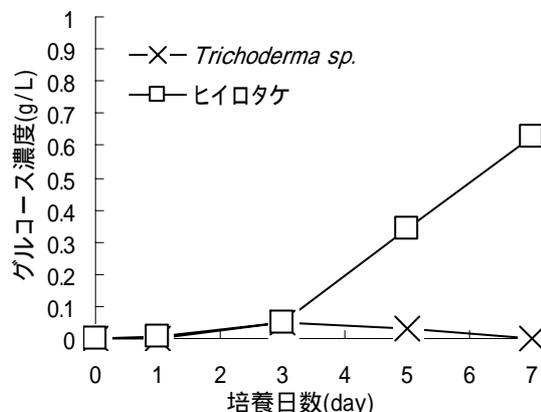


図2 ペプトン培地 37℃ 振とう培養
ホロセルロース グルコース濃度変化

Preparation and Ultrastructure of Microcrystalline Chitin/Hydroxyapatite Nanocomposite

○THI THI NGE, JUNJI SUGIYAMA

Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University

[Introduction] – A synthetic hydroxyapatite[HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] has long been widely used as bone substitutes because of its similar chemical structure to mineral component of human bone and it can form strong chemical bond to hard tissue. However, HA cannot be directly used as a load-bearing implant because of its poor mechanical property. Increasing research activities are thus being explored on incorporation of HA with organic polymeric substrates to generate high-performing and environmentally friendly biomaterials, designed to mimic the unique quality of bone in nature. In this study, we fabricate a bioactive apatitic nanocomposite by incorporation of calcium and phosphorous precursors with microcrystalline chitin suspensions. The primary goal is to explore the better understanding of the material structure and formation process at the nanometer scale.

[Experimental] – Microcrystalline β -chitin suspensions was prepared from deep-sea tube-worms (*Lamellibrachia satsuma*) by acid hydrolysis after deproteinization of the as received tubes. Appropriate amount of calcium chloride (CaCl_2) aqueous solution and phosphoric acid (H_3PO_4) (in order to obtain Ca/P molar ratio of 1.67) were then added to chitin suspensions while stirring. The pH (from pH6 to pH11) of the suspensions was adjusted by the dropwise addition of 1M NaOH followed by stirring for 30 min and aged at the respective reaction condition for 24 h at room temperature. The obtained suspensions were washed, centrifuged, and dried at 60°C . Several milliliters of the suspensions were kept before centrifugation for microscopic observation. The effect of processing parameters on the formation process and ultrastructure of the composite were investigated by transmission electron microscopy (TEM), and FT-IR. Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (SPS7800) was used for elemental analysis of Ca and P.

[Results] – The Ca and P molar ratio was found to be 1.41 to 1.48 without chitin and a small decrease with incorporation of chitin though the characteristic peaks of apatite crystal were observed in FT-IR. Two types of calcium/phosphate crystal (platelet and needle-like) were observed at lower pH (particularly at pH 6-7) and only needle-like crystals were observed at higher pH. The decrease in crystal size with increased pH of the processing suspensions was also observed. A cryo-TEM image, prepared by a vitreous ice embedding technique, revealed the *in situ* structural information in aqueous suspensions. There were some associated interactions between chitin microfibrils and apatite-like crystals (Fig.1(left)) although no apparent crystal growth on the chitin substrate was seen. We hypothesize that some positive surface charge (NH_3^+) as a result of acid hydrolysis and hydroxy groups of chitin have the potential to phosphate and calcium ions deposition on its surface in a loose fashion and then the increasing the degree of supersaturation in the vicinity of the chitin microfibrils. The TEM image in Fig.1(right) showed the crystal deposition on surface of the chitin microfibrils. The specimen was prepared by floating a carbon coated copper grid, with a pre-deposited chitin layer, on drops of calcium/phosphate solution for 2h followed by successive washing. Further optimization of processing condition is required in order to obtain pure and closet stoichiometric ratio of hydroxyapatite (Ca/P=1.67).

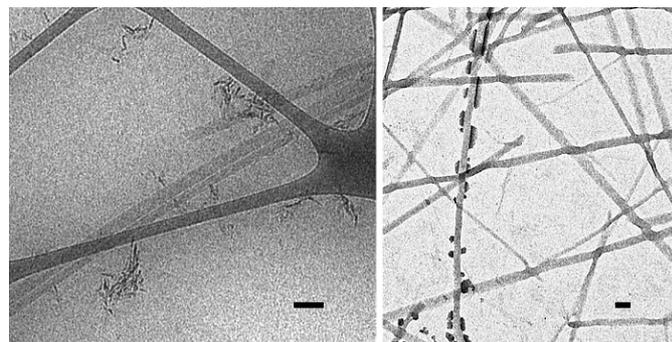


Figure 1. The cryo-TEM micrograph of associated interaction between chitin microfibrils and apatite-like nanocrystals *in situ* processing suspensions (left) and a conventional TEM image of nanocrystals deposition on surface of the chitin microfibrils (right) Scale bar 100 nm.

*We thank Dr. Kastunori Fujikura from Japan Marine Science and Technology Center for the gift of deep-sea tube-worms.

(東大院農生科) ○川合理恵、吉田誠、五十嵐圭日子、鮫島正浩

【緒言】

これまで担子菌による菌体外 β -グルカン代謝は、種々のセルラーゼによるセルロース分解に焦点が絞られてきた。一方で、担子菌の細胞壁は、非セルロース系である β -グルカンから主に構成されており、菌糸の形態維持や菌体外に分泌される酵素の局在性に関与していることが明らかとなっている。このため、細胞壁 β -グルカンは、様々な菌体外糖代謝において重要な役割を担っていることが考えられる。また、菌体の最外層を構成している β -グルカンは、 β -1,3/1,6-グルコシド結合を基本構造としているが、生長過程や外環境などによってその微細構造を変化させることが知られている。我々はこの β -グルカン代謝への関与が示唆される *Phanerochaete chrysosporium* 由来 β -グルコシダーゼ (BGL) の反応特性についてこれまで明らかにしてきた。そこで本研究においては、細胞壁 β -グルカン代謝に関わる他の糖質加水分解酵素をスクリーニングし、得られた酵素の機能解析を行うことを目的として実験を行った。

【実験】

ラミナリン (β -1,3/1,6-グルカン) を炭素源とする培地に担子菌 *P. chrysosporium* の胞子を接種して 3 日間振とう培養し、菌体および菌体外液を回収した。菌体外液を SDS-PAGE に供して得られたタンパク質 (分子量 36 kDa) の N 末端アミノ酸配列を決定し、*P. chrysosporium* のゲノムデータベースに対して検索を行った。また菌体から mRNA を抽出して合成した cDNA、およびゲノム情報に基づいて設計したプライマーを用いて PCR を行い、本遺伝子の cDNA 全長配列を決定した。更に、この遺伝子を酵母菌に導入して組換えタンパク質を生産させた。得られた組換えタンパク質はカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、ラミナリオリゴ糖 (重合度 2~7) やラミナリン、酵母由来グルカン、リケナンなどの β -グルカンに対する加水分解活性を解析した。

【結果と考察】

菌体外液から得られた分子量 36 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定し、*P. chrysosporium* のゲノムデータベースに対して検索を行ったところ、このタンパク質をコードすると考えられる遺伝子領域が一ヶ所見出された。この遺伝子をクローニングし得られた cDNA は 298 残基の成熟タンパク質をコードしており、その配列から糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 16 に属する酵素であることが推定された。更に、酵母菌 *Pichia pastoris* を宿主として組換えタンパク質の大量発現系を構築し、精製して得られた組換え体を SDS-PAGE に供した結果、野生型と同様の分子量を示した。また、ラミナリオリゴ糖 (重合度 2~7) を基質として組換え体の加水分解活性を解析した結果、三量体以上のオリゴ糖に対して活性を示し、最終産物はグルコースとラミナリビオースであった。この分解挙動を経時的に薄層クロマトグラフィー (TLC) 上で展開させて解析を行ったところ、反応初期には重合度の大きな分解産物が見られたことから、本酵素がエンド型糖質加水分解酵素であることが考えられた。更に、 β -1,6-グルコシド結合の分岐を持つラミナリン、酵母由来グルカンを作用させた結果、最終加水分解産物としてラミナリビオース、グルコース以外のオリゴ糖が検出された。 β -1,3/1,4-グルカンであるリケナンを基質として用いた場合においても、同様の結果が得られた。以上のことから、本酵素は β -1,3-グルコシド結合に対して基質特異性を示すエンド型糖質加水分解酵素のラミナリナーゼであり、他の β -グルコシド結合や分岐構造を厳格に認識している可能性が示唆された。

【摘要】

木材腐朽担子菌は菌体外に多くの酸化還元酵素を生産するが、そのほとんどはリグニン分解への関与が示唆されており、セルロース分解に関与するものとしてはセロビオース脱水素酵素 (CDH) のみが見いだされている。CDH は唯一の細胞外フラボヘムタンパク質であり、セロビオースの還元末端を酸化シラクトンを生じる反応を触媒する。CDH のヘムドメインは他のヘムタンパク質とは全く異なる特徴的な構造であることが知られており、またセロビオース脱水素ドメインであるフラビンドメインから電子を奪い、その電子をチトクロム *c* などの鉄を含む化合物へと渡す電子伝達を触媒することが明らかにされている。

演者らは、担子菌で初めてゲノム解析がなされた *Phanerochaete chrysosporium* のゲノムデータベース検索により、CDH のヘムドメインと高い相同性を示す領域を新たに一カ所見いだした。そこで本研究では、この遺伝子をクローニングし、さらに酵母菌を宿主として組換え体として生産させ、その機能を解析した。

【実験】

P. chrysosporium をセルロースを単一の炭素源とする培地で3日間培養し、その菌体から得た mRNA をもとに一本鎖 cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型にして、ゲノム情報に基づき設計したプライマーを用いて PCR を行い、目的とする遺伝子の cDNA 全長配列を決定した。さらにこの cDNA のうち、成熟タンパク質をコードする領域を酵母菌 *Pichia pastoris* に導入し、組換えタンパクを生産させた。得られた組換えタンパクを精製し、可視吸収スペクトル分析、共鳴ラマンスペクトル分析、酸化還元電位測定および種々の多糖に対する吸着能測定に供した。

【結果と考察】

クローニングにより得られた cDNA は 908 bp であり、258 アミノ酸残基の成熟タンパク質をコードしていた。また、オープンリーディングフレームの N 末端にシグナルペプチドが見られたことから、この遺伝子がコードするタンパク質は、菌体外に分泌されると予測された。さらに、成熟タンパク質の N 末端 188 残基は CDH のヘムドメインと高い相同性を示したが、興味深いことに、本遺伝子の C 末端にはフラビンドメインではなく、ファミリー 1 に属する糖結合モジュール (CBM) が存在していた。

本遺伝子がコードするタンパク質を、酵母発現系を用いて組換え体として発現させ、可視吸収およびラマンスペクトル分析に供した結果、本タンパク質は CDH のヘムドメインと同様に、低スピン 6 配位型チトクロム b_{562} であることが明らかとなった。また、このタンパク質の酸化還元電位を測定したところ、CDH のヘムドメインとほぼ同程度の電位値であった。これらの結果から、これら両チトクロムは非常に良く似たヘム周辺環境を有することが示唆された。さらに、本タンパク質の種々の多糖に対する吸着能を測定したところ、セルロースよりも菌体壁の構成成分であるキチンに高い吸着能を示し、また、この遺伝子はセルロースを単一の炭素源とする培地で発現していたことから、本研究で見いだされた遺伝子は、セルロース分解系において菌体壁に存在する新規のチトクロム b_{562} をコードしていると考えられた。

部位特異的変異を導入したセロピオース脱水素酵素における電子鎖反応の解析

(東大院農生科)○五十嵐圭日子、吉田 誠、鮫島正浩

(日医大一生化)西野武士

【緒言】微生物によるセルロースの分解は一般にセルラーゼによる加水分解反応を中心に議論されてきた。しかし、その一方で、多くのセルロース分解性糸状菌がセルロース分解時にセロピオース脱水素酵素 (CDH) を生産することが知られていることから、セルロース生分解過程においては CDH による酸化還元反応が重要な役割を担っていると考えられる。CDH はフラビンおよびヘムを補欠分子族として含む 2 つのドメインから構成されているフラボヘム蛋白質で、セロピオースやセロオリゴ糖の還元末端を酸化してラクトンを生産する反応を触媒する。その酸化反応に共役して CDH はキノン類似化合物や Fe(III) 含有化合物等の様々な電子受容体を利用することが知られているが、それら電子受容体への電子伝達機構としては、electron chain (電子鎖) 反応と electron sink (電子溜) 反応の二つの可能性が示唆されている。

そこで本研究では、野生型および部位特異的変異を導入した CDH における補欠分子族の酸化還元状態を三液混合ストップフロー分光光度計を用いて調べ、電子伝達機構を考察した。

【実験結果】メタノール資化性酵母によって生産された野生型および F166YCDH (白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来) を精製し実験に供した。セロピオースと CDH をあらかじめ迅速混合して CDH を還元した後、チトクローム *c* を迅速混合し CDH のヘムおよびチトクローム *c* の酸化還元状態を調べた。反応は 50mM 酢酸緩衝液 (pH4.0) 中、30°Cで行った。

【結果と考察】セロピオースによる CDH の還元と、還元された CDH によるチトクローム *c* の還元を三液混合法によって逐次的に行ったところ、セロピオースによって還元された CDH のヘムが酸化型へ変化すると同時にチトクローム *c* が還元された。また、部位特異的変異を導入した F166Y では、フラビンからヘムへの電子伝達速度は遅くなっていたが、ヘムからチトクローム *c* への電子伝達速度には影響がなかった。定常状態における F166Y によるチトクローム *c* の還元速度が、前定常状態におけるフラビンからヘムへの電子伝達速度と完全に一致していたことから、CDH の電子伝達機構は図に示したような電子鎖反応であることが示唆された。

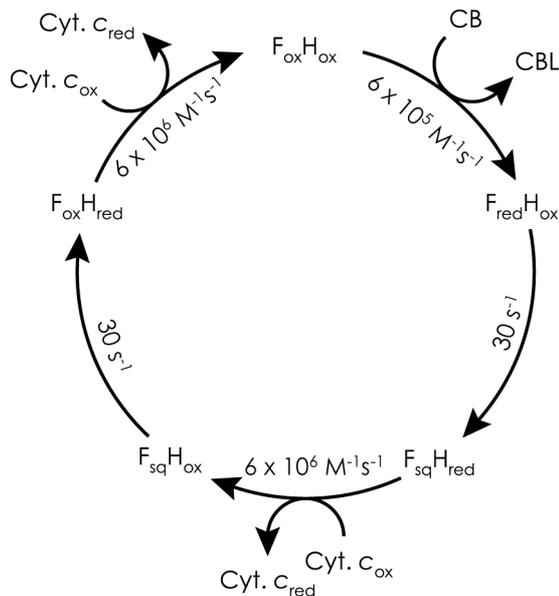


図 CDH における電子伝達スキーム

CB: セロピオース、CBL セロピオノラクトン、F: フラビン、

H: ヘム、ox: 酸化型、red: 還元型、sq: セミキノン型

(東大院農生科) ○齊藤修啓、五十嵐圭日子、鮫島正浩
(食総研) 金子 哲

【緒言】担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は木質細胞壁を栄養源として成長する木材腐朽菌の一種であり、菌体外に生産する様々な加水分解酵素や糖酸化還元酵素によってセルロースを分解することが知られている。演者らの研究室ではこれまで *P. chrysosporium* が生産するセルロース分解酵素に関する研究を手がけてきたが、その中でセルロース分解培養系にキシランを添加することで菌体成長が促進され、菌体外酵素の生産パターンが大きく変化することを発見し、昨年度本学会にて発表した*。そこで本研究では、セルロース培地にキシランおよびその構成糖を添加し、種々の菌体外酵素の生産ならびに菌体成長に与える影響を相互に比較検討することで、その原因を明らかにしていくことを試みた。

【実験】*P. chrysosporium* の胞子を 2.0% のセルロースを含む改変 Wood 培地またはそれにキシラン、キシロース、あるいはキシロオリゴ糖を 0.2% 添加した培地に接種し、37°C、150rpm の条件下で 5 日間振とう培養を行った。24 時間ごとにサンプリングを行い、10 分間静置後の菌体量を求めた。さらに、遠心分離して得られた培養液中のタンパク質濃度を Bradford 法で求め、セルロース分解に関与すると思われるエンドグルカナーゼ(EG)、セロビオヒドロラーゼ(CBH) およびセロビオース脱水素酵素(CDH) 活性を測定した。

【結果と考察】培養 1 日目におけるキシラン添加培養系における菌体量は、コントロールであるキシランを含まないセルロース培養系と比較して約 2 倍であり、菌体量は 5 日間の培養を通して高いレベルを保っていた。しかし、キシランの主鎖を構成しているキシロースおよびキシロオリゴ糖を添加した培養系では、キシランで見られたような成長の促進は観察されなかった(図)。さらに、キシラン添加培地ではコントロールの 2 倍近くのタンパク質が生産されているのに対して、キシロースおよびキシロオリゴ糖添加培地におけるタンパク質量はコントロールの 6-7 割程度であった。キシラン添加培養系における CDH 活性は、培養 2 日目には活性が急上昇してコントロールの 10 倍に達したのに対して、キシロースおよびキシロオリゴ糖を添加した培養系では、活性はコントロールよりも明らかに低かった(図)。CBH や EG の活性に関しても同様の傾向を示したが、CDH ほど明確ではなかった。今後キシランを部分加水分解して得られた断片を用いて同様の実験を行い、成長および酵素活性の増加の原因を探っていく予定である。

*住吉剛史、五十嵐圭日子、鮫島正浩、片山明、西野武士：

第 53 回日本木材学会大会研究発表要旨集 p347、2003

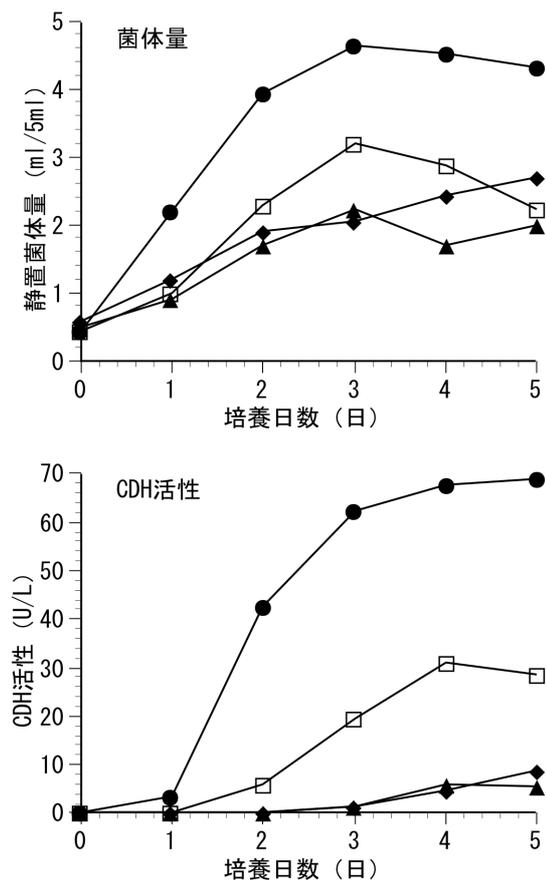


図 *P. chrysosporium* セルロース分解培養系における菌体量と CDH 活性の変化

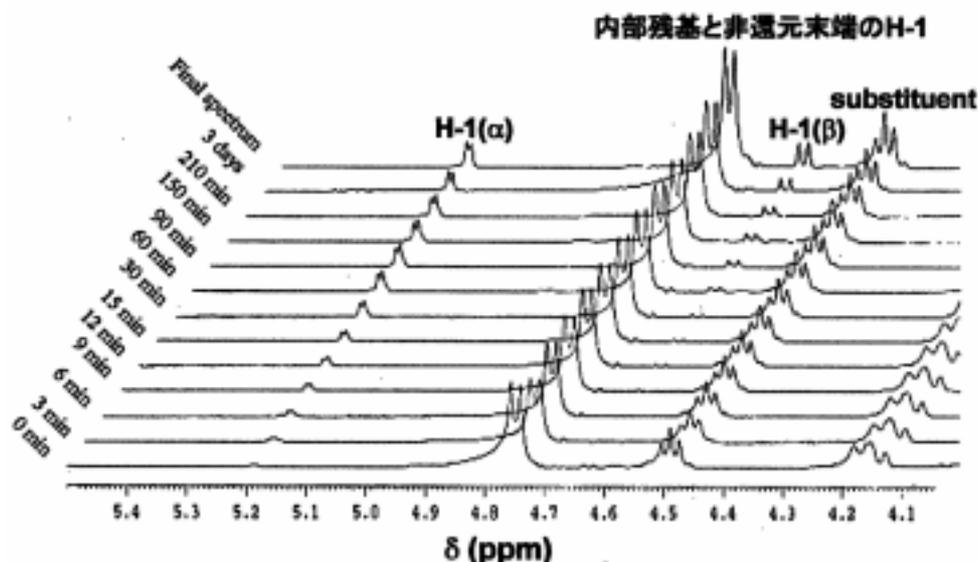
□: コントロール、●: コントロール+キシラン
▲: コントロール+キシロース
◆: コントロール+キシロオリゴ糖

(森林総研) 西村 健、(新潟大農) 渡邊剛志、(AFMB-CNRS) Bernard Henrissat

緒言 Laminaripentaose hydrolase (LPHase)はGH family 64に所属する*Streptomyces matensis*由来の α -1,3-グルカナーゼの一つであり、ラミナリンからペンタオースのみを特異的に遊離する¹⁾。しかし、その触媒機構や5糖単位で遊離する興味深いメカニズムについて今なお知られていない。本研究では、酵素反応をリアルタイムに追跡し定量的な解析を可能とする手段として、¹H-NMRに着目した。加水分解生成物のアノマー位プロトンの立体配置とピーク強度の変化を¹H-NMRで追跡することで、GH family 64の触媒機構をはじめ明らかにし、さらに本酵素の特異な分解特性の解析を試みたので報告する²⁾。

方法 ラミナリンとして*Laminaria digitata* (Sigma社)及び*S. matensis* DIC-108 LPHaseを使用した。これらをD₂Oで交換した後、¹H-NMR (Bruker DRX500)により、D₂O中、27 °C、pH 6.0 (sodium acetate buffer)の条件下で反応を追跡した。還元末端由来のアノマー位プロトンと非還元末端及び内部残基由来のアノマー位プロトンのピークの強度比からラミナリンの数平均重合度を算出した。

結果と考察 LPHaseによるラミナリンの加水分解に伴うスペクトラムの経時変化を示す。反応初期における加水分解生成物の還元末端の立体配置は β 型であり、本酵素はラミナリンを反転機構で分解することが明らかとなった。本酵素は反転機構の最初の α -1,3-グルカナーゼであり、LPHaseのユニークな基質分解特性とも関連する可能性も考えられるが、そのメカニズムを明らかにするためには活性サイトにおける3次元立体構造の解明が不可欠であろう。さらに反応開始とともにラミナリンの重合度は急激に低下して最終的には5に近づき、本酵素の特徴が示唆された。すでに触媒機構の判定に¹H-NMRの使用例が幾つか報告されているが、本研究により酵素反応の速度論的な解析にも使用可能であることが示唆され興味深い。さらに¹H-NMRを用いれば糖転移反応の解析も可能であり、この点についても報告する予定である³⁾。



- 1) Nakabayashi, M., Nishijima, T., Ehara, G., Nikaidou, N., Nishihashi, H., and Watanabe, T., *J. Ferment. Bioeng.* 85, 459-464 (1998).
- 2) Nishimura, T., Bignon, C., Allouch, M., Czjzek, M., Darbon, H., Watanabe, T., Henrissat, B., *FEBS Lett.*, 499 187-190 (2001).
- 3) Sulzenbacher, G., Bignon C, Nishimura, T., Tarling CA, Withers SG, Henrissat B, Bourne Y., *J. Biol. Chem.*, 279, 13119-13128 (2004).

(近大農) 益田貴文、板倉修司、田中裕美、榎章郎

[緒言] シロアリは他の動物が利用できない枯死植物をたいへん効率良く資化して繁殖している昆虫である。このシロアリの繁殖の秘密は様々な機能を有する微生物と共生関係を構築してきたことによると考えられる。なかでも、下等シロアリの消化管内では、シロアリのセルラーゼと共生原生生物のセルラーゼによるセルロース糖化機構が存在する。それぞれのセルラーゼ単独による天然セルロースの糖化率は数%でありその効率は低い。しかし実際のシロアリ消化管内での木材セルロースの糖化効率は70~80%にも達する。したがってシロアリの消化管内には弱いセルラーゼにより結晶性セルロースを高効率に糖化する機構が隠されていると考えられる。本研究では、シロアリと共生原生生物のセルラーゼを遺伝子組み換え技術を用いて大量に発現させ、その物理化学的性質を明らかにし、さらにシロアリ消化管内の高効率糖化機構を明らかにすることを目的とする。

[方法と考察] mRNA 抽出と cDNA 合成おこなうために、イエシロアリの職蟻 25 頭の唾液腺を実体顕微鏡下で切り出し、QuickPrep micro mRNA Purification Kit を用いて mRNA を抽出した。mRNA の抽出後、オリゴ dT プライマーを用いた RT-PCR を行い、cDNA ライブラリーを合成して、PCR の鑄型サンプルとした。また、DDBJ など WEB 上に公開されているイエシロアリ唾液腺のセルラーゼ遺伝子の塩基配列をもとに、制限酵素の認識配列を含むアダプター配列を付加した PCR プライマーを作製した。このプライマーを用いて、PCR による目的 DNA の増幅をおこなった。増幅された遺伝子産物を二種類の異なる制限酵素 (Nco I、BamH I) とともに、37 °C で 5 時間インキュベートし、酵素処理をおこなった。

制限酵素処理した DNA サンプルをアガロースゲル電気泳動にて泳動した。シロアリの全長セルラーゼ遺伝子に相当する 1400bp 付近のバンドを確認後、アガロースゲルから切り出し目的のセルラーゼ遺伝子を分離・精製した。

分離・精製したセルラーゼ遺伝子を発現ベクター pRSET (invitrogen) に組み込み、大腸菌 BL21 株へ形質転換させ LB プレートにて培養した。培地上に形成されたコロニーのインサートチェックをおこない、セルラーゼ遺伝子が組み込まれていない擬陽性のコロニーを排除した。インサートチェックにより陽性となったコロニーを液体培養により大量培養した。大量培養した大腸菌からプラスミドをアルカリ SDS 法により分離した。RNase 処理後、精製をおこない、蛍光 DNA シークエンサーにより塩基配列を解読した。得られた DNA の塩基配列とイエシロアリの唾液腺セルラーゼ遺伝子の塩基配列とを BLAST による相同性検索で確認した。

その後、CMC (カルボキシメチルセルロース) を混合した LB プレート上で上記の組換え体を培養し、Zymography (コンゴレッドで CMC-LB プレートを染色しさらに 1M NaCl でプレートを洗浄すると、セルラーゼにより CMC が低分子化されているプレート上の部分が透明になる) によりセルラーゼ活性をもつ大腸菌コロニーを選別した。

選別の後、セルラーゼ活性が陽性であった大腸菌を液体培地で大量培養した。増殖した大腸菌を遠心分離にて集菌し、超音波ホモジナイザーにより大腸菌を破碎した。破碎後、6 × His タグが付加されたセルラーゼをアフィニティークロマトグラフィーにより分離・精製をした。その後、セルラーゼ活性の測定のため、CMCase, Avicelase, -D-glucosidase, cellobiohydrolase 活性の測定した。しかし、顕著なセルラーゼ活性が検出されなかった。今後、大量培養にともなう培養条件および、セルラーゼの分離・精製方法についても検討していきたい。

各種界面活性剤のセルラーゼ反応に対する効果

森林総研 ○野尻 昌信

1. 緒言

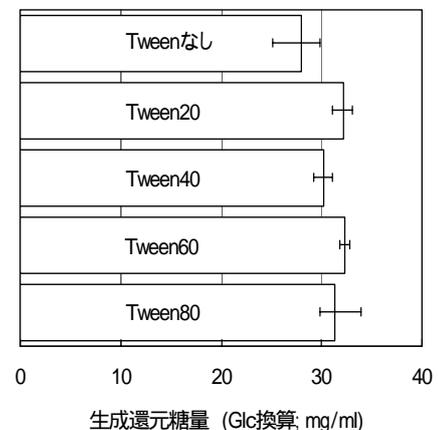
我々は木質系バイオマスからのエタノール生産を目指してセルロースの酵素糖化法の検討を行っている。その中でセルラーゼの反応効率に対して、セルラーゼのセルロースへの非特異的かつ非生産的な吸着が大きく影響していることが分かってきた。そしてある種の界面活性剤の添加が反応効率の向上に効果があることを発表してきた。今回は、各種界面活性剤の添加によるセルラーゼの分解反応促進効果について比較する。

2. 方法

酵素は、*Trichoderma viride* 由来のセルラーゼ製剤メイセラージェ(明治製菓)および、これから精製したCBH-Iを使用した。基質はAvicelを使用した。界面活性剤にTween20、40、60、80、リグニンスルホン酸製品(日本製紙)、PIERCE社製界面活性剤サンプルパックを使用した。分解反応はpH5の酢酸ナトリウム緩衝液中で行った。基質への吸着量は、分解反応液を遠心し、上清の酵素活性から算出した。生成糖は、KS-802(Shodex)カラムを使ってオリゴ糖、単糖をそれぞれ分析した。飽和吸着量は、1.5、6時間攪拌後に測定した。

3. 結果及び考察

ソルビタン系非イオン界面活性剤である Tween の添加による分解促進効果を図に示した。界面活性剤の添加により Avicel 単独の場合に比べ若干の差はあるものの全ての場合で分解が促進された。この濃度での界面活性剤水溶液の対鉱油界面張力は Tween20 が他と比べて低い(界面活性剤便覧参照)が、分解促進に対して、その効果ははっきりとしていない。固体のセルロースと水溶液、酵素分子との界面での状態は、単純に界面張力で説明できないと考えられる。つまり、酵素とセルロースの間には特異的な吸着力が存在すること、さらには、セルロースに結晶表面と非晶表面が存在することなど多くの要因が複雑に影響しあっていると考えられるからである。今回は、これらの界面張力の減少が酵素の吸着性にどう影響しているか考察するとともに、他の界面活性剤の効果についても合わせて報告する。



ソルビタン系界面活性剤の分解促進比較