

核磁気共鳴スペクトルによる多糖類の構造化学的研究

甲野裕之

苫小牧工業高等専門学校 創造工学科 (応用化学・生物系)

〒059-1275 北海道苫小牧市錦岡443

E-mail : kono@tomakomai-ct.ac.jp

Structural chemical studies of polysaccharides by
nuclear magnetic resonance spectroscopy

Hiroyuki KONO

Division of Applied Chemistry and Biochemistry, National Institute of Technology, Tomakomai College

443 Nishikioka, Tomakomai, Hokkaido 059-1275, Japan

E-mail : kono@tomakomai-ct.ac.jp

2022年3月18日 受理

核磁気共鳴法 (NMR) は、多糖類やその誘導体の構造解析における最も強力な分析手法の1つである。しかし、NMRを用いて多糖の構造に関する有益な情報を得るには糖鎖としての特性に加え、側鎖と主鎖ドメインの運動性の差と相関時間が非常に長い高分子としての特徴を考慮する必要がある。本稿では、多糖類の共鳴線の帰属とその一次構造の決定に焦点を当て、多糖類の構造解析に適したNMR測定プロトコルについて概説する。また水溶性の黒酵母 (*Aureobasidium pullulan*) 由来 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-グルカンとセルロース、キトサンの誘導体を例に挙げ、一般的なNMR装置を用いた複雑な多糖一次構造解析について説明する。本稿で示した測定プロトコルは、溶媒可溶な全ての多糖類の構造解析に適用でき、構造と物性の関係を明らかにする上で有益なものとなる。

Nuclear magnetic resonance (NMR) is one of the most powerful analytical techniques for structural analysis of polysaccharides and their derivatives. However, it is very difficult to obtain valuable information about the structure of polysaccharides unless the optical methods are chosen taking into account not only the characteristics of the glycans, but also the difference in mobility between the side chains and the main chain domain and the very long correlation time as in polymers with high-molecular weight. This article focuses on the resonance assignment and determination of the primary structure of polysaccharides using NMR, and provides an overview of suitable NMR measurement protocols for structural analysis of polysaccharides. In addition, this article shows how to analyze the primary structure of the complex polysaccharides using common NMR systems, using a water-soluble *Aureobasidium pullulan* β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and derivatives of cellulose and chitosan as examples. The protocol used in this paper is applicable to any polysaccharide soluble in solvent to elucidate the relationship between its structure and properties.

Keywords: 核磁気共鳴, 多糖構造, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカン, セルロースとキトサン誘導体
NMR, polysaccharide structure, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan, cellulose and chitosan derivatives

1. 緒言

デンプン、セルロース、キチン・キトサンなどの多糖類は単糖がグリコシド結合により連続的に結合した極めて単純な構造であり、自然界に普遍的に存在するバイオマスである。これら構造多糖類の積極的な活用を図ることは化石燃料消費の低減、CO₂排出の抑制に直結し、カーボンニュートラルな社会形成に多大な貢献をなしえる。特に有機化合物として最大生産量を誇るセルロース、キチン・キトサンは非可食性バイオマスであるため、再生可能資源としてプラスチック代替材料や高機能性素材への可能性を秘めている。一方でこれら多糖類の多くは発達した高次構造を形成しており、その階層構造がゆえに溶解性と成形加工性の課題を克服する必要がある。これら課

題を化学的に克服する手法は誘導体化であり、具体的には多糖類水酸基、もしくはアミノ基を反応点とした有機化学的反応となる。現在も多糖類の誘導体化による機能化と物性制御に関する研究は益々活発化しており、その分子構造と機能性の相関付けは機能性発現を解明する上で必須である。

核磁気共鳴 (NMR) 法は有機化合物の分子構造解析における最も強力な手段の一つであり、多糖類を含む糖質科学分野でも広く活用されている。特に近年はNMR装置の高磁場化と検出プローブの高感度化は目覚ましく、構造生物学におけるたんぱく質の立体構造解析を飛躍的に進めさせたように、複雑なオリゴ糖鎖の構造解析が可能となった¹⁻³⁾。一方、多糖類やその誘導体は高粘度、高重合

度といった高分子鎖の特徴を持つため、相関時間が長いがゆえに横緩和時間が短くなり、結果的に非常に広幅な共鳴線となる。同時に共鳴線の広幅化はスペクトルそのものの分解能を低下し、非常に長時間にわたる測定時間を必要とする。よって効率的にかつ効果的な測定手法を適切に選択することが重要であり、複数の測定法を組み合わせることで膨大な構造情報を取得できる。本稿では筆者を含む多糖構造研究者が蓄積してきた知見をもとに、複雑な多糖構造に適したNMR解析アプローチについて概説する。さらに近年実施してきた多糖類およびその誘導体に関する研究成果を通じて、多糖類化学におけるNMRの果たす役割について論述する。

2. 多糖類のNMR解析

2.1. 多糖類のNMR解析アプローチ

一般に構成糖が約10残基以下のオリゴ糖など比較的低分子糖鎖の構造解析において、研究者はまず高感度核である ^1H NMRに焦点を当てて、その共鳴線の帰属を行う。具体的にはDQF (Double quantum filtered) -COSY (COrrelation Spectroscopy) やTOCSY (Total Correlation Spectroscopy) など ^1H - ^1H 二次元相関スペクトルを駆使して隣接水素原子や構成残基内の相関カップリングを追跡し、 ^1H 共鳴線の化学シフト帰属を完了させる^{4,5)}。次にNOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) やROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) など各共鳴線の空間距離情報を取得し、各構成糖の結合状態を明らかにすることができる。しかし一部の単純多糖を除き、一般的な多糖やその誘導体は多くの構成残基に由来する共鳴線が互いに重複し、 ^1H - ^1H スピン分裂が加わり、その帰属が困難な場合が多い。さらに高分子特有の長い相関時間のため横緩和時間 (T_2) が極めて短く、結果として非常に広幅な共鳴線が得られる^{6,7)}。よって多糖類やその誘導体の構造解析に対しては、スピン分裂の無い ^{13}C NMRが有力な解析手段となる。

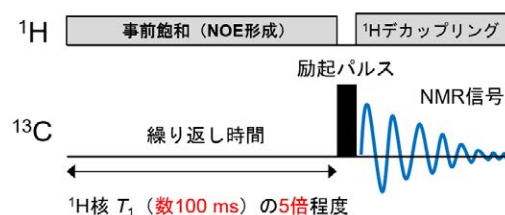
天然存在比がほぼ100%である ^1H 核と比較して、 ^{13}C 核の天然存在比は僅か1.07%であるため、 ^{13}C NMRスペクトルを取得するには比較的長時間の測定が必要である。一方で ^1H - ^{13}C 核間スピン-スピン相互作用は ^1H 核のデカップリングにより完全に消去でき、 ^{13}C 核の低い天然存在比によって ^{13}C - ^{13}C 核間スピン-スピン相互作用は無視できる(図1)。この結果、 ^{13}C 共鳴線は分裂のない極めて単純な一重線となる。また ^1H 核に対して事前飽和を行えば核オーバーハウザー効果(NOE)が誘起され、 ^1H 核と ^{13}C 核の磁気回転比 ($\gamma^{\text{H}}/\gamma^{\text{C}} = 4$) に相当する最大4倍の感度向上を図ることができる。さらにNOE形成は ^1H 核の横緩和時間 (T_1 、一般的に数100 ms) に依存するため、長い ^{13}C 核 T_1 (一般的に数秒~数10秒) を待つことなく、積算を重ねることができる。よって一般的に我々が取得している ^{13}C NMRでは、信号-ノイズ比の向上を ^1H 核へのNOE照射によって達成している。一方でNOEは空間的相互作用であり、 ^{13}C 核近傍に存在する ^1H 原子核数やその空間的距離に依存する。

つまり通常の ^{13}C NMRは定量性がなく、 ^1H NMRのようなスペクトルの積分操作を行うことができない。言い換えれば、定量性のある ^{13}C NMRスペクトル(図1)を得るためには、 ^1H 核の事前飽和を行わず、長い ^{13}C 核 T_1 に合わせた繰返し時間を設定すれば良い⁸⁾。しかし、定量 ^{13}C NMR法は極めて長時間の測定となるため、 ^{13}C 核励起パルスのフリップ角を 90° ではなく、 30° 程度に設定するなど、積算効率の向上を図る必要がある⁹⁾。得られるスペクトルは単純かつ定量性があるため、定量 ^{13}C NMRは複雑な構造を持つ多糖類の構造解析において、極めて有益な構造情報を与える。

代表的なセルロース誘導体である酢酸セルロースでは、その有機溶媒への溶解性をはじめとする諸物性は置換度(DS;グルコース一残基あたりに置換した平均アセチル基数)に依存する^{10,11)}。一般的には酢酸セルロースのDSは酸加水分解によって生じた酢酸を滴定法によって定量しているが、定量 ^{13}C NMRを測定することで、簡便にDSを決定することができる(図2)。酢酸セルロース(DS = 2.7)の ^{13}C NMRスペクトルにおいて、グルコース残基の1位炭素の積分値を1とした場合、アセチル基に含まれるカルボキシ炭素とメチル炭素の積分値は順に1.72, 2.59と異なる値となる。これは上述のとおり、カルボキシ基や四級炭素のように ^1H 核が近傍に存在しない ^{13}C 核はNOE効果を受けにくいのである。一方、定量 ^{13}C NMRスペクトルでは、カルボキシ炭素とメチル炭素はともに2.7と同一の積分値となり、この値から直接DSを求めることができる¹⁰⁾。またカルボキシ炭素領域の拡大からわかるように、スペクトルの分解能は測定法に依存しない。よって定量 ^{13}C NMRは多糖誘導体の置換基の定量、分岐多糖の分岐度の決定など、分子構造を決定する上で簡便かつ有力な方法といえる。

より高度かつ詳細な構造情報を取得するためには ^{13}C 共鳴線の完全な帰属が必要となる。骨格炭素の帰属には ^{13}C

^{13}C NMR実験



定量 ^{13}C NMR実験

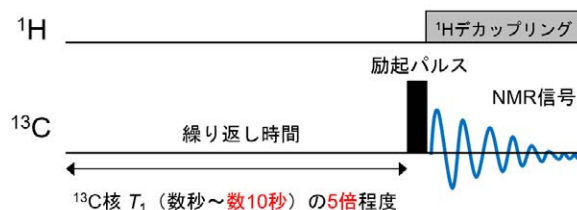


図1 ^{13}C NMRと定量 ^{13}C NMR実験

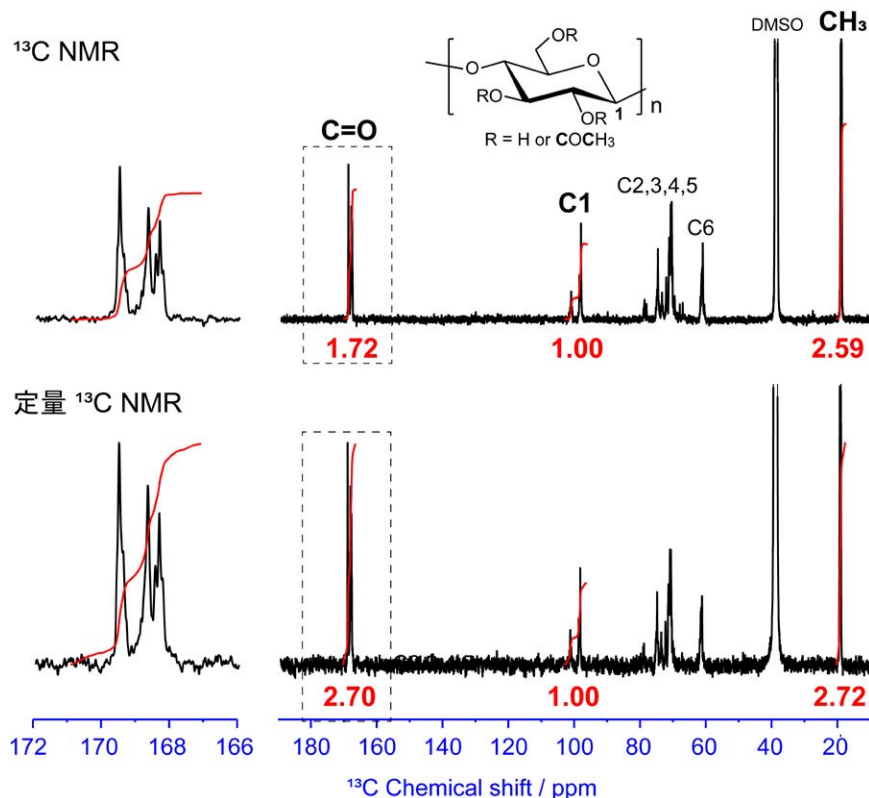


図2 セルロース酢酸エステル (DS =2.7) の ^{13}C NMRスペクトルと ^{13}C 定量NMRスペクトル (Ref. 10を改編引用)

COSYや ^{13}C TOCSY, さらにINADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUantum Technique)のような二次元 ^{13}C - ^{13}C 相関NMRスペクトルで簡便に決定できる¹²⁾. 微生物を用いた多糖類の ^{13}C 標識法とその解析に関しては筆者らの報告を参考頂きたい^{8,9,11-17)}. しかし通常の天然存在比の試料における ^{13}C 核の隣接確率は僅か0.01%であり, 多糖類の二次元 ^{13}C - ^{13}C 相関NMR測定では試料の ^{13}C 標識が必須となる.

天然存在比の試料の ^{13}C 共鳴線帰属ではINEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer)などの分極移動を使用した ^1H - ^{13}C 二次元相関スペクトル法を用いる. 分極移動は ^{13}C 核情報を ^1H 核へ移動させ, 同時に高感度を図る方法であり, 一般的にインバース(逆)測定と呼ばれている. INEPTを使用した代表的な測定として, 炭素と水素の直接結合を相関として検出する ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)法, 2ないし3結合離れた炭素と水素間の相関を検出する ^1H - ^{13}C HMQC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)等があり, 現在ではルーチン的にオリゴ糖解析などで使用されている. またINEPTを改良したDEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer)をHSQCやHMBCに組み込めば炭素の級数を決定することもできる.

オリゴ糖鎖の構造決定では, 最初に ^1H 共鳴線の帰属を行うために ^1H - ^1H TOCSYスペクトルを測定し, 二次元マップから糖鎖を構成する各残基の共鳴線抽出から着手することが多い. 多糖類では ^1H - ^1H TOCSYで ^1H 共鳴線の抽

出は困難であることから, ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSYスペクトルが各残基の抽出に有効となる(図3). HSQC-TOCSY法はINEPTによって ^{13}C 情報を直接結合した ^1H 核に与え, 引き続き, その ^1H 核とスピン結合した ^1H 核との相関をロングレンジまで得ることができる. すなわち, ^1H - ^1H TOCSYの相関ピークが ^{13}C の次元へ分解することができ, 複雑な1次元NMRスペクトルから各残基の ^1H と ^{13}C 共鳴線の抽出が簡便に行うことが可能である. 例えばある多糖にグルコース残基が1種類存在している場合, そのグルコース残基は水酸基を除く6個の炭素と7個の水素原子の共鳴線を与えるが, その多糖の ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSYスペクトルを測定すれば, そのスペクトル上にグルコース残基に相当する 6×7 格子状の相関が確認できる¹⁰⁾. つまりある多糖のHSQC-TOCSYスペクトルに三種類の 6×7 格子状相関が存在すれば, その多糖は3種類の残基から構成されていることが明らかとなり, 同時にそれら構成残基の ^1H と ^{13}C 共鳴線の抽出が完了する. 各残基の共鳴線が明らかになれば, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMQC等を用いて, ^1H , ^{13}C 化学シフトが完全帰属することが可能となる¹⁰⁾. ^{13}C 共鳴線の帰属結果を定量 ^{13}C NMRスペクトルに反映させれば, 各残基組成と結合位置の決定^{18,19)}, さらには各残基のコンフォメーションに関して情報を得ることができる²⁰⁾. 組成決定は定量 ^{13}C NMRスペクトルにおける分離が良好な領域に積分を適用するか, もしくは波形分離を用いることで対応できる²¹⁻²³⁾.

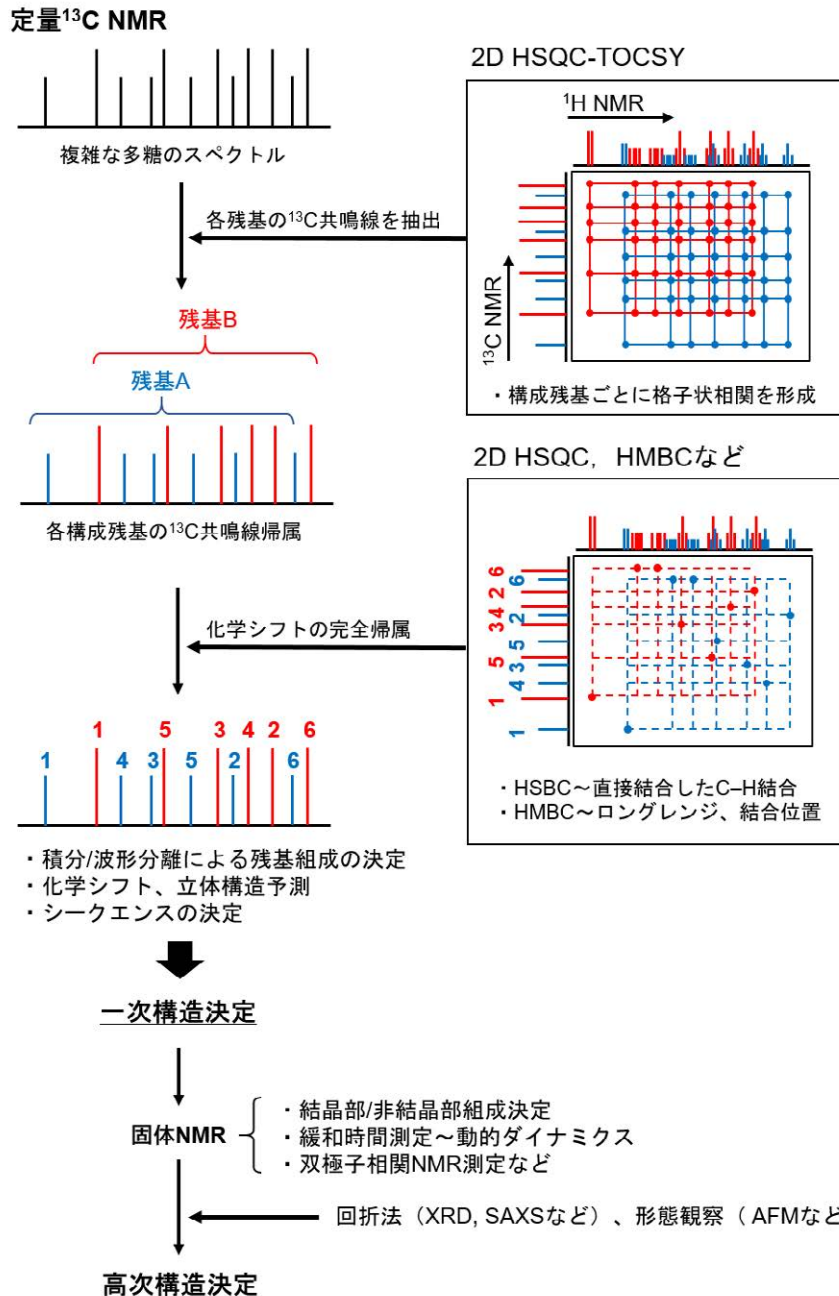


図3 多糖類に適したNMR構造解析スキーム

溶液NMRによる¹³C共鳴線の完全帰属はさらなる構造取得を可能とする。試料温度とスペクトルの関係性、緩和時間解析、拡散測定など、様々な測定法を適用することで、他の測定法では解明できない、原子核レベルでのダイナミクスに関する構造情報を得ることができる²⁴⁾。さらに固体測定が可能であれば、結晶・非結晶ドメインの組成比^{9,25-29)}、結晶構造^{8,9)}、構造転移現象¹⁵⁾、高次構造形成や階層構造^{25,27)}まで明らかにすることが可能である (図3)。

2.2. β -(1→3, 1→6) グルカン

β -(1→3, 1→6)グルカンはグルコースの β -(1→3)結合主鎖に β -(1→6)分岐した構造を持ち、キチンと結合して細菌、真菌、酵母、キノコなどの細胞壁を構成している。レ

ンチナン、シゾフィランなど一部の β -(1→3, 1→6)グルカンは抗腫瘍性活性を持ち、抗悪性腫瘍剤として医薬品として注目されてきた³⁰⁾。これら β -(1→3)結合主鎖を持つ多糖は一般に β -(1→3)ファミリーと呼ばれ、分子間水素結合により螺旋形成するものが多い³⁰⁾。 β -(1→3, 1→6)グルカンの構成糖は全てグルコースであることから、構造解析におけるプローブとなる官能基が無い。またその結合様式、分岐パターンが複雑であり、一次構造を正確に決定することが極めて困難な多糖の一つである。

ある種の黒酵母は培地中に非水溶性 β -グルカンを大量に産生することが知られており、伊藤忠製糖(株)は熱水処理法を適用することで水溶性 β -グルカンの開発に成功し

た³¹⁾。この構造不明な新規 β -グルカンの構造物性の解明にNMRが極めて有効に機能した。筆者らは上記の解析プロトコル(図3)に準じて、本 β -グルカンのHSQC-TOCSYスペクトルを測定した結果、各構成糖の格子状相関が6種類存在すること明らかにした(図4)。また ^{13}C 定量スペクトルの積分値から6種類の構成残基A1, A2, B1, B2, C1, C2の組成比は順に1:3:1:1:1:3であること、さらに各 ^{13}C 共鳴線化学シフトの比較、HMBCスペクトルによる結合位置とそのシーケンス決定に基づいて、本 β -グルカンは6残基の β -(1 \rightarrow 3)結合主鎖と β -(1 \rightarrow 6)分岐が4残基の繰返し構造からなる規則的な β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンであることが明らかになった(図4)^{32,33)}。黒酵母 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンは新規な構造体であり、 β -(1 \rightarrow 3)主鎖に対する β -(1 \rightarrow 6)分岐糖の割合である分岐度が67%と、既存の β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-グルカンよりも極めて高い点に特徴がある³²⁾。

また黒酵母 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンは極めて親水性の高い一次構造(図4)を持つが、DMSOへの溶解度が30%以上であるのに対して、水への溶解度が10%と相対的に極めて低い値を示した³¹⁾。よって本 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンは水とDMSO中で異なる高次構造を形成していると予想し、その高次構造について固体NMRによる解析を行った。水およびDMSOに溶解した β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンを凍結乾燥により、溶液構造を維持したまま固体として回収し、各種緩和時間測定による検討を実施した。その結果、黒酵母

β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンは水中において三本の分子鎖が分子間・分子内結合により強固な三重螺旋構造を形成すること、一方、DMSO中では三本鎖は解離してランダムコイル構造で存在することが明らかになった^{34,35)}。水中での規則的三重螺旋構造は広角および小角X線回折データによって支持され、 β -グルカンは繰返し単位で1回螺旋し、そのピッチ長が1.82nmであることも明らかになった³⁴⁾。

NMRを用いることで溶媒などによって生じる多糖類の構造転移現象も明らかにすることができる。例えば、黒酵母 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンの三重螺旋構造とランダムコイル構造の不規則-規則構造転移現象について、重DMSO中でランダムコイル形成した β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンに対して重水を一定量添加し、その重DMSO/重水溶媒比を変化させたところ、NMRスペクトルが鋭敏に応答した。ランダムコイル型 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンの共鳴線は運動性が高く、主鎖骨格炭素も比較的シャープな共鳴線で現れるが、重水組成の増加に伴い、その共鳴線強度は低下した。一方、重水組成の増加は広幅な共鳴線の増加を引き起こし、特に三重螺旋構造形成時に螺旋中心に位置する β -(1 \rightarrow 3)-グリコシドの線形変化が顕著であった(図5)³⁴⁾。水の組成比が40(v/v)%を超えると広幅な共鳴線が出現したことから、この組成比でランダムコイルから一部規則的構造への転移が生じていることが確認できている。さらに水の組成比を上昇させた結果、広幅な規則性構造に

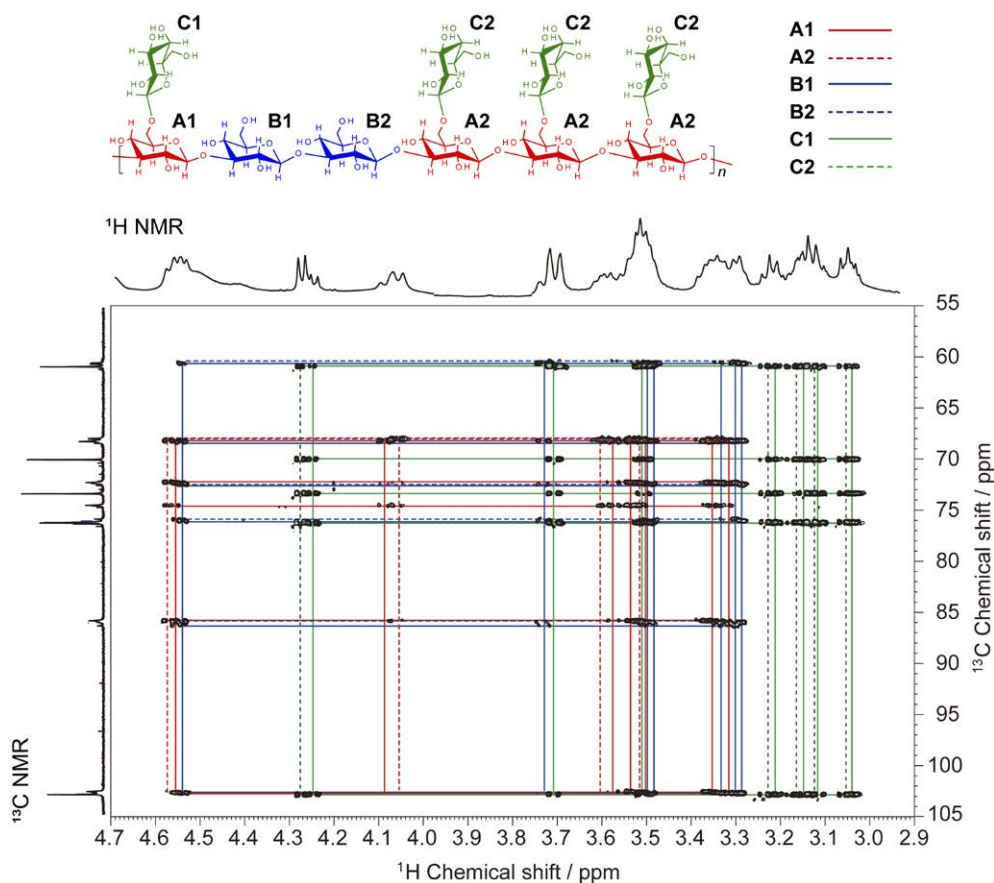


図4 水溶性黒酵母 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)グルカンの ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSYスペクトル(文献33を改編引用)とその一次構造。磁気的不等価な6種類のグルコース残基の相関が確認できる。

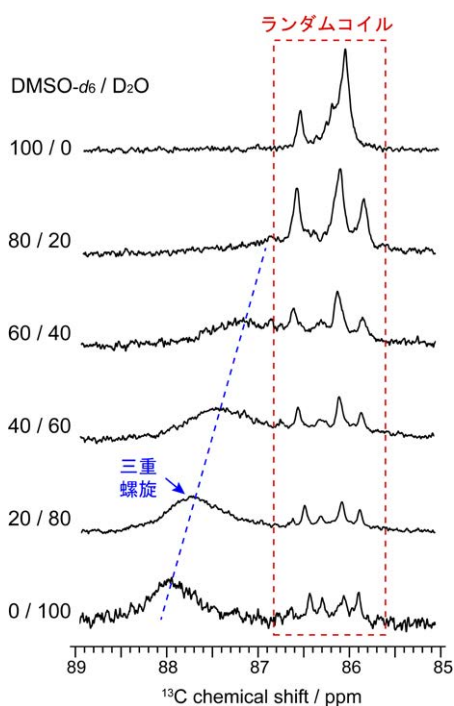


図5 水溶性黒酵母 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6) グルカンにおける β -(1 \rightarrow 3) 主鎖グルコース残基3位炭素共鳴線の溶媒依存性 (文献34を改編引用)

帰属できる共鳴線は低磁場へシフトしたことから、三重螺旋の形成が螺旋軸方向に発達したことが確認できる。逆方向の転移現象も同様に解析を行った結果、黒酵母 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6) グルカンの規則-不規則構造転移は可逆的に進行することが立証された³⁴⁾。このように溶媒のみだけでなく、熱やpHなどの外部刺激に応答する多糖類の構造解析にも応用することができる。

2.3. セルロースとその誘導体

セルロースは地球上でもっとも大量に生産される有機化合物かつ高分子である。構造的にはグルコースが β -(1 \rightarrow 4) グリコシド結合した直鎖状の高分子鎖であり、モノマーである無水グルコース残基 (AGU) は2,3,6位に水酸基を持つ。各水酸基は隣接AGUと強固な水素結合を形成し、同時に隣接分子鎖と水素結合を形成することでシート構造を形成する。各シートは同様の水素結合を形成することで、セルロース特有の繊維状階層構造体を構築している³⁶⁾。セルロースの誘導体化において、その反応点は水酸基に限定されることから、その多くは水酸基のエステル化とエーテル化反応である。古くから様々な官能基によるセルロース誘導体が合成され、その置換基特有の物性をセルロースへ付与することが試みられてきた。さらにその階層構造については不明な点が多く、誘導体化法と得られる誘導体物性の関係に基づいた議論が継続されている。

セルロース誘導体特性を決定する主たる構造パラメータは置換基とそのDSであるが、置換基とDSが同一であっ

ても、その2, 3, 6位における置換基の分布状態によって物性が変化することが報告されている³⁷⁾。これは置換基の分布状態によって未置換水酸基間での水素結合と相関がある。一方でその置換基の分布状態を決定することはセルロース化学における難題の1つとされてきた。例えば単一置換基で置換したセルロース誘導体であっても、完全置換体 (DS=3) を除くと、最大で8種類の置換状態が異なるAGUが分子鎖に沿ってランダムに分布している (図6)。さらにこれらAGUの構造的類似性は、その定性と定量を極めて困難なものとしてきた。例えばセルロース誘導体を酸、もしくは酵素加水分解により低分子化し、クロマトグラフィーやNMRで定性する方法が報告³⁸⁾されているが、AGUレベルへの完全分解は不可能である。またセルロースエステルでは酸加水分解は適用できず、酵素による加水分解は高DS試料には不向きであり、その精度には課題が残る。

セルロース誘導体に対しても多糖類解析プロトコル (図3) に沿って、その構造に直接アプローチすることができる。図7はセルロース水酸基の一部をプロピル基置換したプロピルセルロース (DS=1.02) の¹H-¹³C HSQC-TOCSY スペクトルのグルコース骨格領域である³⁹⁾。¹Hと¹³C NMRスペクトルから分子構造に関する情報を得ることは難しいが、二次元スペクトル上では8種類のグルコース残基に相当する8個の6 \times 7格子状相関が検出でき、各AGUの化学シフトが決定できる (図7)。プロピルセルロースのようなセルロースエーテルでは、置換位置の炭素はその置換基効果によって8~10 ppm低磁場シフトすることが明らかになっており³⁹⁻⁴²⁾、各AGUの置換位置は容易に見積もることがきる。さらにHSQCやHMBCなど一般的なNMR測定で、全化学シフトの帰属は達成することができる (図8)。各AGU組成は定量¹³C NMRスペクトルの1位や6位炭素領域など、比較的分離の良い領域に対してローレンツ曲線近似による波形分離と最小二乗法による波形の最適化によって算出することもできる³⁹⁻⁴¹⁾。

セルロース誘導体の置換基とグルコース残基間の相関は¹H-¹³C HSQC-TOCSYスペクトル上で検出することはできない。これは糖炭素原子と置換基間に介在するエステルやエーテルの酸素原子により、スピン-スピン相互作用が消失することによる。置換基の詳細な化学シフトが必要であれば、グリコシド結合様式の決定と同様に、¹H-¹³C HMBCスペクトルを使用することになる。一例であるが、カルボキシメチルセルロースのカルボキシメチル置換基中のメトキシ炭素を帰属するには、HSQCスペクトル (赤の等高線) とHMBCスペクトル (黒の等高線) を重ね合わせて解析を行う (図9)^{43,44)}。置換された糖炭素の¹³C化学シフトを出発点として、HSQC相関 \rightarrow HMBC相関を辿ることでカルボキシメチル基のメトキシ基を帰属することができる。またカルボキシ炭素はメトキシ水素とのHMBC相関で直接帰属することができる。この手法によって置換基が結合したAGUとその置換位置を解明することが可能である⁴³⁾。

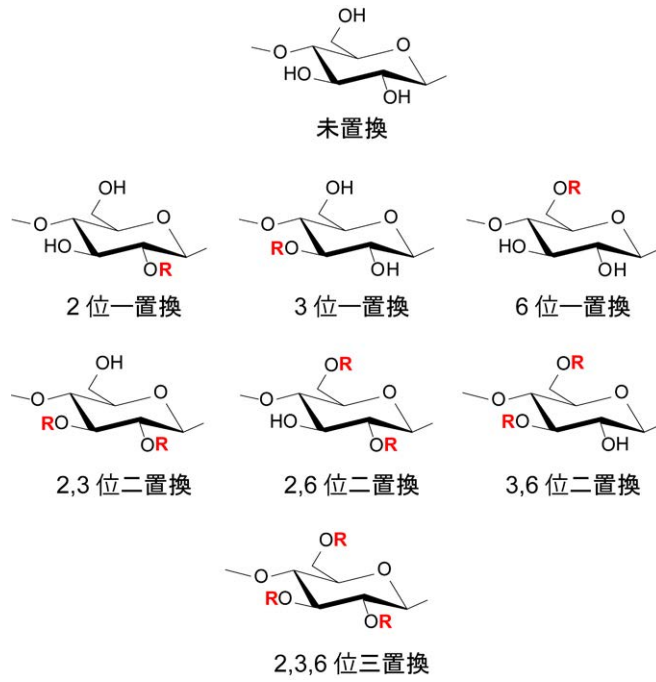


図6 単一の官能基で置換したセルロース誘導体の構成残基

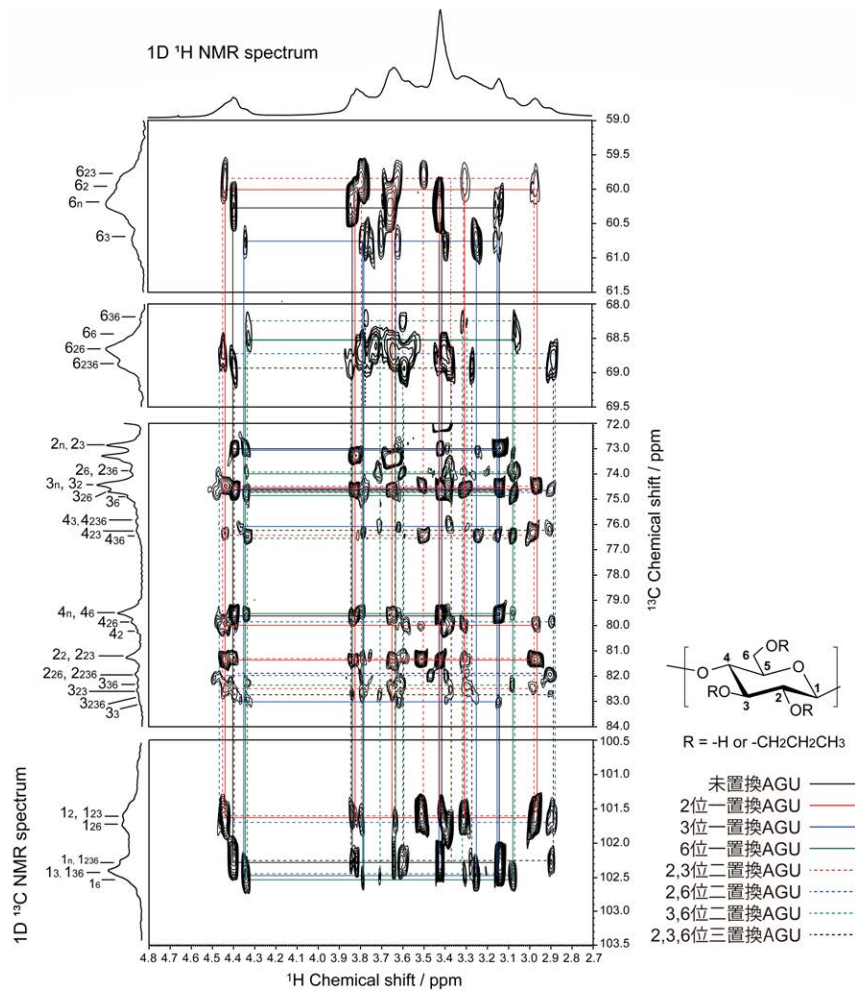


図7 プロピルセルロース (DS=1.02) の¹H-¹³C HSQC-TOCSYスペクトル (文献39を改編引用)。

¹³C NMRスペクトルの帰属は炭素位置と置換基の置換位置を表す。
 例えば1_nと1₂₃₆は未置換AGUおよび2,3,6位三置換AGUの1位炭素を示す。

2.4. キチン・キトサンとその誘導体

前項で示したセルロース誘導体の解析手法はキチン・キトサン誘導体にも直接適用できる。最近筆者らは、キトサンのエーテル化反応における水酸基とアミノ基の反応性を実験的に明らかにする目的で、そのカルボキシメチルキトサンの詳細なNMR構造解析を行った⁴⁵⁾。N-アセチルグルコサミン残基の影響を無くすために、脱アセチル化度99.96%キトサンを使用し、アルカリ触媒下、水-イソプロパノール分散液中でカルボキシメチルキトサンを合成した。反応時間をパラメータとして、DSが0.65~2.03の試料を複数合成し、DSと置換基分布状態の関係を見出した(図10)。NMRによる構成グルコサミン残基共鳴線の抽出と帰属、定量¹³C NMRに対する波形分離解析を実施し、DS変化に対する2, 3, 6位の置換度(図10a)、未置換、一置換、二置換、三置換グルコサミン残基のモル分率(図10b)、2位、3位、6位一置換体のモル分率(図10c)、2,3位、2,6位、3,6位二置換体のモル分率(図10d)を決定した。各図においてDSは反応の進行度と考えることができ、DSの増加に伴う各構成糖のモル分率変化はキトサンのカルボキシメチル化反応の置換状態を明瞭に反映していた。

例えば、カルボキシメチル化反応はグルコサミンの6位水酸基、3位水酸基、2位アミノ基の順で生じやすく(図10c)、DSが1程度から二置換体が急激に増加した。二置換グルコサミンでは3,6位二置換が主であり、2,3位および2,6位グルコサミンの生成は比較的抑制されていた(図10d)。DSが2を超えると二置換体の未置換置換基への置換が進行し、最終的に完全置換体となる。モル分率の変化からアルカリ条件での水-イソプロパノールスラリーではキトサンは水酸基、特に立体障害の少ない一級6位水酸基で優先して置換反応が進行し、2位アミノ基は極めて反応性が低いことが確認できた。カルボキシメチルキトサンの合成方法と水酸基/アミノ基の反応性の関係については古くから議論が続いており、本手法を様々な合成法で調製した試料に対して適用することで、反応と生成物の構造の関係がより明確になると考えられる。またカルボキシ基以外の誘導体反応に適用することで、置換基と位置選択性の官能が立証できるであろう。さらに α -、 β -キチンのように異なる結晶構造を持つ原料や、非晶質などを使用して誘導体化を行い、その置換状態を詳細まで明らかにすれば、誘導体化に対する原料の階層構造の影響なども明らかにすることができるかもしれない。

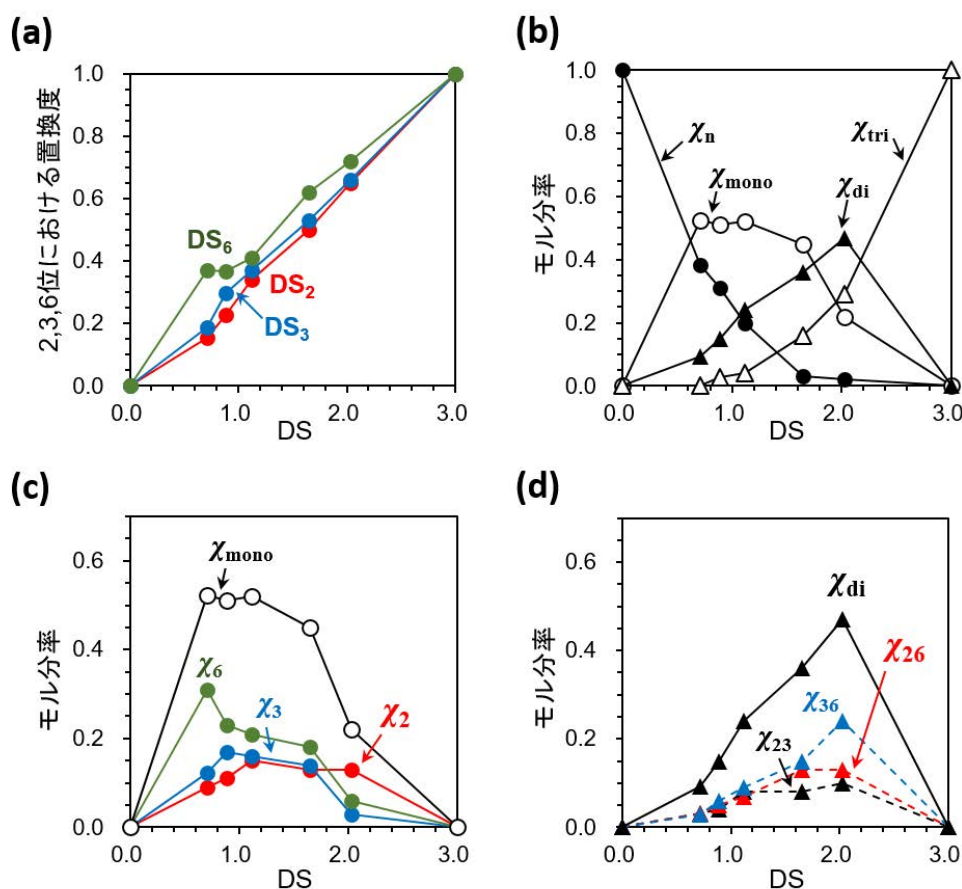


図10 カルボキシメチルキトサンに含まれる構成グルコサミン残基のモル分率(χ)とDSの関係(文献45を改編引用)。

χ の添え字は置換状態を示す。例えば、 χ_n 、 χ_{26} は順に未置換および2,6二置換グルコサミン残基のモル分率を、 χ_{mono} 、 χ_{di} 、 χ_{tri} は順に一置換、二置換、三置換グルコサミン残基のモル分率を示す。

3. 総括

本総説ではNMRによる多糖類の構造研究について、筆者が実施した実験結果をもとに紹介した。本研究に使用した装置は500MHzのNMRであり、一般的な5mm径の検出プローブを使用している。今後、NMRメーカーの努力により、超高磁場NMRや極低温プローブが一般化すれば、高感度、高分解能化は短時間で明瞭なスペクトルが得られるであろう。さらに¹³C標識をせずに¹³C核間相関信号が得られる時代が到来するかもしれない。多糖のNMRは極めて難解な方程式の解を導く作業に近いが、本稿で紹介した適切な解法、即ち¹³C核情報を¹H核で検出する方法、を選ぶことで、効率的にその分子構造の全貌に近づくことができる。

今後の社会形成において再生可能な資源である多糖類の産業利用は益々加速することは間違いない。一方で水酸基の塊とも捉えることができる多糖類を化学的に改良し、機能化を図るには構造制御が必須となる。構造と機能性はつねに表裏一体の関係にあり、機能性向上を図る上でNMRは極めて強力なパートナーとして、重要な役割を果たすであろう。

参考文献

- Poveda A, Fittolani G, Seeberger PH, Delbianco M, Jiménez-Barbero J: The flexibility of oligosaccharides unveiled through residual dipolar coupling analysis. *Front Mol Biosci* 10: 784318, 2021.
- Battistel MD, Azurmendi HF, Yu B, Freedberg DI: NMR of glycans: shedding new light on old problems. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 79: 48-68, 2014.
- Novakovic M, Battistel MD, Azurmendi HF, Concilio MG, Freedberg DI, Frydman L: The incorporation of labile protons into multidimensional NMR analyses: glycan structures revisited. *J Am Chem Soc* 143: 8935-8948, 2021.
- Mohrous EA, Farag MA: Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. *J Adv Res* 6: 3-15, 2015.
- Fardus-Reid F, Warren J, Le Gresley A: Validating heteronuclear 2D quantitative NMR. *Anal Methods* 8: 2013-2019, 2016.
- Martin-Pastor M, Bush CA: Comparison of the conformation and dynamics of a polysaccharide and of its isolated heptasaccharide repeating unit on the basis of nuclear Overhauser effect, long-range C-C and C-H coupling constants, and NMR relaxation data. *Biopolymers* 5: 235-248, 2000.
- Saalwächter K: Applications of NMR in Polymer Characterization – An Introduction. In: *NMR Methods for Characterization of Synthetic and Natural Polymers*. Zhang R, Miyoshi T, Sun P (eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 1-22, 2019.
- Kono H, Erata T, Takai M: CP/MAS C-13 NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 2. Complete assignment of the C-13 resonance for the ring carbons of cellulose triacetate polymorphs. *J Am Chem Soc* 124: 7512-7518, 2002.
- Kono H, Yunoki S, Shikano T, Fujiwara M, Erata T, Takai M: CP/MAS C-13 NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 1. Complete assignment of the CP/MAS C-13 NMR spectrum of the native cellulose. *J Am Chem Soc* 124: 7506-7511, 2002.
- Kono H, Oka C, Kishimoto R, Fujita S: NMR characterization of cellulose acetate: Mole fraction of monomers in cellulose acetate determined from carbonyl carbon resonances. *Carbohydr Polym* 170: 23-32, 2017.
- Kono H, Hashimoto H, Shimizu Y: NMR characterization of cellulose acetate: chemical shift assignments, substituent effects, and chemical shift additivity. *Carbohydr Polym* 118: 91-100, 2015.
- Kono H, Anai H, Hashimoto H, Shimizu Y: C-13-detection two-dimensional NMR approaches for cellulose derivatives. *Cellulose* 22: 2927-2942, 2015.
- Okugawa A, Ishihara K, Taniguchi H, Kono H, Yamane C: In vivo decomposition of ¹³C-labeled cellulose in the mouse. *Cellulose* 27: 2417-2426, 2020.
- Kono H, Erata T, Takai M: Complete assignment of the CP/MAS C-13 NMR spectrum of cellulose III_i. *Macromolecules* 36: 3589-3592, 2003.
- Kono H, Erata T, Takai M: Determination of the through-bond carbon-carbon and carbon-proton connectivities of the native celluloses in the solid state. *Macromolecules* 36: 5131-5138, 2003.
- Kono H, Numata Y, Erata T, Takai M: C-13 and H-1 resonance assignment of mercerized cellulose II by two-dimensional MAS NMR spectroscopies. *Macromolecules* 37: 5310-5316, 2004.
- Kono H, Numata Y: Two-dimensional spin-exchange solid-state NMR study of the crystal structure of cellulose II. *Polymer* 45: 4541-4547, 2004.
- Kono H, Kusumoto R: Preparation, structural characterization, and flocculation ability of amphoteric cellulose. *React Funct Polym* 82: 111-119, 2014.
- Kono H, Otaka F, Ozaki M: Preparation and characterization of guar gum hydrogels as carrier materials for controlled protein drug delivery. *Carbohydr Polym* 111: 830-840, 2014.
- Kono H, Kusumoto R: Removal of anionic dyes in aqueous solution by flocculation with cellulose ampholytes. *J Water Proc Eng* 7: 83-93, 2015.
- Kono H: Chemical shift assignment of the complicated monomers comprising cellulose acetate by two-dimensional NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 375: 136-144, 2013.
- Kono H: ¹H and ¹³C chemical shift assignment of the monomers that comprise carboxymethyl cellulose. *Carbohydr Polym* 97: 384-390, 2013.
- Kono H, Fujita S: Biodegradable superabsorbent hydrogels derived from cellulose by esterification crosslinking with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic dianhydride. *Carbohydr Polym* 87: 2582-2588, 2012.
- Ezzawam WM, Ries ME: Diffusion and relaxometry to study carbohydrates dissolved in ionic liquids. In: *NMR Methods for Characterization of Synthetic and Natural Polymers*. Zhang R, Miyoshi T, Sun P (eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 36-62, 2019.
- Kono H, Tsujisaki H, Tajima K: Reinforcing poly(methyl methacrylate) with bacterial cellulose nanofibers chemically modified with methacryloyl groups. *Nanomaterials* 12: 537, 2022.
- Numata Y, Yoshihara S, Kono H: In situ formation and post-formation treatment of bacterial cellulose/ κ -carrageenan composite pellicles. *Carbohydr Polym Technol Appl* 2: 100059, 2021.
- Kono H, Tsukamoto E, Tajima K: Facile post-carboxymethylation of cellulose nanofiber surfaces for enhanced water dispersibility. *ACS Omega* 6: 34107-34114, 2021.
- Kono H, Uno T, Tsujisaki H, Matsushima M, Tajima K: Nanofibrillated bacterial cellulose modified with (3-aminopropyl)trimethoxysilane under aqueous conditions: applications to poly(methyl methacrylate) fiber-reinforced nanocomposites. *ACS Omega* 5: 29561-29569, 2020.
- Kono H, Uno T, Tsujisaki H, Anai H, Kishimoto R, Matsushima M, Tajima K: Nanofibrillated bacterial cellulose surface modified with methyltrimethoxysilane for fiber-reinforced composites. *ACS Applied Nano Mater* 3: 8232-8241, 2020.

- 30) Jayachandran M, Chen J, Chung SSM, Xu B: A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *J. Nutr Biochem* 61: 101-110, 2018.
- 31) Hirabayashi K, Kondo N, Hayashi S: Characterization and enzymatic hydrolysis of hydrothermally treated β -1,3-1,6-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *World J Microbiol Biotechnol* 32: 206-212, 2016.
- 32) Kono H, Kondo H, Hirabayashi K, Ogata M, Totani K, Ikematsu S, Osada M: NMR spectroscopic structural characterization of a water-soluble β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr Polym* 174: 876-886, 2017.
- 33) Kono H, Kondo H, Hirabayashi K, Ogata M, Totani K, Ikematsu S, Osada M: Two-dimensional NMR data of a water-soluble β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and schizophyllan from *Schizophyllum commune*. *Data in Brief* 15: 382-388, 2017.
- 34) Kono H, Kondo N, Isono T, Ogata M, Hirabayashi K: Characterization of the secondary structure and order-disorder transition of a β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *Int J Biol Macromol* 154: 1382-1391, 2020.
- 35) Kono H, Kondo N, Isono T, Ogata M, Hirabayashi K: Solid-state relaxation NMR dataset for a water-soluble β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and schizophyllan from *Schizophyllum commune*. *Data in Brief* 28: 104993, 2020.
- 36) Matsuki S, Kayano H, Takada J, Kono H, Fujisawa S, Saito T, Isogai A: Nanocellulose production via one-pot formation of C2 and C3 carboxylate groups using highly concentrated NaClO aqueous solution. *ACS Sustainable Chem Eng* 8: 17800-17806, 2020.
- 37) Takahashi SI, Fujimoto T, Miyamoto T, Inagaki H: Relationship between distribution of substituents and water solubility of O-methyl cellulose. *J Polym Sci A Polym Chem* 25: 987-994, 1987.
- 38) Glasser WG, McCartney BK, Samaranayake G: Cellulose derivatives with a low degree of substitution: 3. The biodegradability of cellulose esters using a simple enzyme assay. *Biotechnol Prog* 10: 214-219, 1994.
- 39) Kono H, Numata J: Substituent distribution of propyl cellulose studied by nuclear magnetic resonance. *Carbohydr Res* 495: 108067, 2020.
- 40) Kono H, Fujita S, Tajima K: NMR characterization of methylcellulose: chemical shift assignment and mole fraction of monomers in the polymer chains. *Carbohydr Polym* 157: 728-738, 2017.
- 41) Kono H: Determination of mole fractions of ethyl-cellulose-containing monomers by NMR. *Carbohydr Res* 445: 51-60, 2017.
- 42) Kono H: Cationic flocculants derived from native cellulose: Preparation, biodegradability, and removal of dyes in aqueous solution. *Res-Effic Technol* 3: 55-63, 2017.
- 43) Kono H, Oshima K, Hashimoto H, Shimizu Y, Tajima K: NMR characterization of sodium carboxymethyl cellulose 2: chemical shift assignment and conformation analysis of substituent groups. *Carbohydr Polym* 150: 241-249, 2016.
- 44) Kono H, Oshima K, Hashimoto H, Shimizu Y, Tajima K: NMR characterization of sodium carboxymethyl cellulose: substituent distribution and mole fraction of monomers in the polymer chains. *Carbohydr Polym* 146: 1-9, 2016.
- 45) Kono H, Kato T: Elucidation of substituent distribution states for carboxymethyl chitosan. *Carbohydr Polym Technol Appl* 2: 100175, 2021.



甲野裕之 (Hiroyuki KONO)

1994年3月 北海道大学工学部応用化学科卒業
 1996年3月 北海道大学大学院工学研究科分子化学専攻博士前期課程修了
 1996年4月～1997年3月 北海道立総合研究機構工業試験場研究員
 2000年3月 北海道大学大学院工学研究科分子化学専攻博士課程退学
 2000年4月～2007年3月 ブルカーバイオスピン株式会社NMRアプリケーション研究員
 2003年9月 博士(理学)取得(北海道大学)
 2007年4月 苫小牧工業高等専門学校 准教授
 2019年4月 苫小牧工業高等専門学校 教授