

# 論文の内容の要旨

生物材料科学専攻

1999年博士課程進学

氏名：金雄鎮

指導教官：空閑重則

論文題目：**Periodate oxidation of cellulose for functional derivatization**

(和訳：セルロースの過ヨウ素酸酸化による機能性材料の開発)

## 第1章 緒言

セルロースを過ヨウ素酸で酸化するとグルコース残基当たり二つのアルデヒド基を導入することができる。導入されたアルデヒド基を媒体として様々な官能基及び誘導体を調製することができる。

本研究では第一にセルロースの過ヨウ素酸酸化が固体セルロースでどのように進行するのかを結晶性の異なる試料を用いて調べた。第二にこの反応をセルロースからの機能性材料の調製に応用し、新しい型のセルロース系カラム充填剤を開発した。

## 第2章 結晶性セルロースの過ヨウ素酸酸化

セルロースの過ヨウ素酸酸化によるジアルデヒド化反応が結晶性セルロースに対してどのように進行するかを調べた。ジアルデヒド化反応は結晶性が高くなると反応が進みにくいことが分かった。反応度（置換度）が高まるにつれてセルロースの結晶化度は下がるがX線回折ピークの半価幅はほとんど変わらなかった。FTIR分析からジアルデヒドセルロース由来のピークが  $1740\text{ cm}^{-1}$  と  $880\text{ cm}^{-1}$  に現れたが、置換度の高いジアルデヒド化セルロースにおいても CP/MAS  $^{13}\text{C}$  固体 NMR ではアルデヒドに相当するピークは現れず、導入されたジアルデヒド基は free のアルデヒドとしては存在していないと考えられた。しかしジアルデヒド化物をさらに亜塩素酸で酸化した試料はジカ

ルポキシ化されていることが水溶液  $^{13}\text{C}$  NMR から示された。高結晶性のシオグサセルロースを中程度にジアルデヒド化して TEM で観察すると、マイクロフィブリルはジアルデヒドによって柔軟化していることが分かった。このアルデヒド基をチオセミカルバジドで修飾し金コロイドでラベルすると金粒子の分布が不均一であることから、過ヨウ素酸酸化は不均一に進むと考えられた。このジアルデヒド化シオグサセルロースを 50% 硫酸で処理すると、太さは元と同じだが短くなったマイクロフィブリル断片が多数生じた。以上の挙動から過ヨウ素酸酸化はマイクロフィブリル表面の互いに離散した場所で始まり、反応はそこから表面に沿って広がるのではなく結晶の内部方向に進んでいくと考えられる。

### 第 3 章 ジアルデヒドセルロース及び窒素含量セルロース誘導体の熱分解挙動

酸化度の異なるジアルデヒドセルロースおよびそれにヒドロキシルアミンあるいはヒドラジンを反応させたイミンの熱重量・示差熱分析を行なった。ジアルデヒドセルロースは酸化度が高くなるにつれ分解開始温度が下がるが炭化収率は酸化度の増加と共に上がり、酸化度 98% ではセルロースの約 2 倍であった。ジアルデヒドセルロースから得た窒素含有誘導体は窒素含量があるレベルを超えると 145~170℃ の範囲で特徴的な爆発的分解を示した。爆発的分解を示したものを還元するとこの現象は見られなくなったことから、この現象はシッフ塩基反応により形成された炭素-窒素二重結合の窒素が抜けやすくなったためと考えられる。

### 第 4 章 ジアルデヒドセルロースゲルによる反応クロマトグラフィー

アルデヒド基を導入したセルロースゲルを担体とするクロマトグラフィーにより、シッフ塩基反応を利用してアミン類を分離する新規な手法の開発を試みた。セルロースゲル (Cellulofine GC-700sf) を過ヨウ素酸酸化によりアルデヒド基含量の異なる二種類のゲルを調製した。ジアルデヒド化セルロースゲルは二、三級芳香族アミンおよび共役酸の酸解離定数 ( $\text{pK}_a$ ) が 6 以上の一級芳香族アミンとは相互作用を示さなかったのに対し、共役酸の  $\text{pK}_a$  が 5.3 以下の一級芳香族アミンとは特異的な相互作用を示した。共役酸の  $\text{pK}_a$  が 4~5.3 の一級アミンは  $\text{pH}$  が高くなるにつれ溶出が遅くなり、共役酸の  $\text{pK}_a$  が 3.4 以下の一級アミンは  $\text{pH}$  が高くなるにつれ溶出が早くなった。遅れの程度はアルデヒド基が増えるほど大きくなった。

これらの挙動は以下のように解釈される： シッフ塩基反応ではまずフリーのアミノ基がカルボニルの炭素に求核反応を起こし、続く脱水により炭素-窒素間の二重結合が形成される。この反応は可逆であり、酸で触媒される。二、三級アミンは一級アミン基を持っていないためシッフ塩基反応が起こらない。共役酸の  $\text{pK}_a$  が 6 以上の一級芳香族アミンは  $\text{pH}$  4.0-5.5 ではほとんどプロトン化されており、フリーのアミノ基の求

核は起こらない。共役酸の  $pK_a$  が 4.5.3 の一級芳香族アミンは pH が高くなるにつれフリーのアミノ基の量が増えるためカルボニルの炭素への求核が起こり、溶出が遅くなると考えられる。共役酸の  $pK_a$  が 3.4 以下の一級芳香族アミンは pH 4.0-5.5 ではほとんどフリーのアミノ基として存在するので求核反応はほぼ同じ程度で起こるが、pH が低くなるにつれシッフ塩基反応によって形成された炭素-窒素二重結合の窒素へのプロトン化が起こるので平衡が右にずれ、溶出が遅くなると考えられる。

## 第 5 章 ジカルボキシルセルロースゲルによるイオン交換クロマトグラフィー

セルロースゲル (Cellulofine GC-700sf) を過ヨウ素酸酸化によりアルデヒド基を導入した後、亜塩素酸酸化によりカルボキシル基とし、陽イオン交換体としての能力を市販の陽イオン交換体 (CM-Cellulofine C-500m) と比較した。ジカルボキシルセルロース (DCC) ゲルは共役酸の酸解離定数 ( $pK_a$ ) が 3.3 以上の芳香族アミンと強いイオン交換作用を示した。DCC ゲルのイオン交換挙動は緩衝液の pH に強く依存し、特に pH4 付近では大きな交換能を示した。

共役酸の  $pK_a$  が 3.3~5.3 のアミンは高 pH ではプロトン化が抑えられるため retention factor ( $k'$ ) が低下する。共役酸の  $pK_a$  が 6 以上のアミンはこの pH 域ではほとんどプロトン化しているので  $k'$  の pH 依存性はカルボキシル基の解離状態の変化によると考えられる。すなわち、高 pH ではジカルボキシル基はともに解離して相互に反発し、孤立したカルボキシル基のように振舞うのに対し、pH 4 付近では 1 つだけが解離した状態になる (ジカルボキシルセルロースゲルの酸解離定、3.66 と 4.76)。このとき陰イオンの数は半分になっているはずであるが、隣接した非解離のカルボキシル基がアミンと陰イオンの相互作用を強める作用を及ぼすため、なお高い交換能を示すと考えられる。

## 第 6 章 ポリアリルアミンを結合したセルロースゲルによるイオン交換クロマトグラフィー

セルロースゲル (Cellulofine GC-700sf) を過ヨウ素酸酸化してアルデヒド基を導入した後、ポリアリルアミン (分子量 5000) をシッフ塩基反応により結合し、ポリカチオンセルロースゲルを調製した。導入アミノ基の量の異なる三つのゲルのイオン交換能を市販の陰イオン交換体 (DEAE-Cellulofine A-500m) と比較した。結合ポリアリルアミンの量はアルデヒド基の増加とともに増加するが、比例関係にはならなかった。ポリアリルアミン分子鎖はいくつのアルデヒド基と反応すると考えられる。

ポリアリルアミン結合セルロースゲルは一価酸に対してアミノ基量の順でイオン交換能を示したが、二価酸には市販の陰イオン交換体よりアミノ基量は少ないにもかかわらず著しい相互作用を示した。ポリアリルアミン結合セルロースゲルはアミノ基が

集中的に存在するので強いイオン相互作用を示したと考えられる。またこのゲルでの二価酸の retention factor はアミノ基量の差による相違点は見られなかった。これはジアルデヒドセルロースゲルのアルデヒド基と結合されたポリアリルアミンの分子鎖の自由度がアミノ基の増加とともに減少するからと考えられる。

#### 第7章 ポリアリルアミンを結合したセルロースゲルによるタンパクの分離

孔の大きいセルロースゲル (Cellulofine GCL-2000m) を過ヨウ素酸酸化によりアルデヒド基を導入した後、ポリアリルアミン (分子量 5000) をシッフ塩基反応により結合し、ポリカチオンセルロースゲルを調製した。導入ポリアリルアミンの量の異なる三種のセルロースゲルと市販の陰イオン交換体 (DEAE-Cellulofine A-800m) でのタンパク質の溶出挙動を調べた。

ポリアリルアミン結合セルロースゲルは市販のゲルより窒素含量が少ないにも関わらず、強いイオン相互作用を示し、アミノ基の量が多くなるにつれイオン交換能は高くなった。またこれらのゲルは等電点と分子量の等しいタンパク質 (ヒト血清アルブミンと牛血清アルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン A と B) を分離することができた。

以上のようにポリアリルアミン結合セルロースゲルは低い窒素含量でも高いイオン交換能を示した。これはポリアリルアミンの高いアミノ基密度がアニオンとの結合力を強くすることを示している。