

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350119

研究課題名(和文)バイオマスのメソクリスタル化による新機能開発

研究課題名(英文)Fabrication of new materials from biomass by meso crystalization

研究代表者

木村 恒久(Kimura, Tsunehisa)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40264593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,600,000円

研究成果の概要(和文)：磁気プロセッシングによるバイオマス・バイオ素材の高次元異方化を行った。(1)セルロースについては、セルロースのナノクリスタルの結晶構造に関する基礎的知見を集積した。具体的には、セルロースの由来の違いによる、セルロースナノクリスタルの結晶構造を明らかにした。微結晶化する過程でキラルネマチック相を形成するため、その配向を制御し、3次元配向を試みた。(2)被解析結晶の回収が可能な擬単結晶化法を確立については、まず、擬単結晶化にUV硬化樹脂ではなく、ゲルを用いた方法を確立した。更に、懸濁媒体を固化せず得られた擬単結晶のX線回折像から構造解析を行いその構造決定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Fabrication of anisotropic new materials using biomass and biomaterial was carried out by the means of magnetic processing. (1)Basic data for cellulose crystal structure was obtained. We elucidated that correlation length of cellulose whisker is different depending on their origins. Alignment of cellulose chiral nematic phase using magnetic processing was performed and we also carried out three dimensional alignment of cellulose nanocrystals. (2)A new method for fabrication of pseudo single crystals has been established. We changed the dispersive materials from UV curable monomer to gel material and we succeeded to determine the crystal structure of a protein. We also obtained high-resolution X-ray diffraction images without solidification of samples. Determination of the crystal structure using pseudo single crystal without solidification of suspended media was also achieved successfully.

研究分野：磁気科学

キーワード：擬単結晶 セルロース 磁気プロセッシング 三次元配向 結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

無機酸化物、生体・合成高分子を含む有機化合物など、世に存在する物質のほとんどは反磁性体に分類される。これら反磁性物質に及ぼす磁場効果の研究は、この15年間ほどの間に日本を中心として飛躍的進歩を遂げた。特に、冷凍機冷却型の超電導磁石の出現以降、研究室レベルでも10 T級の強磁場を比較的容易に利用できるようになり、反磁性体の磁場応答を積極的に活用して物質の配向・配列の精密制御を試みる磁気プロセッシング技術が提案される。結晶性高分子の磁場配向や微粒子磁気パターンニング、さらには動的磁場を用いた二軸性結晶の3次元配向化(擬単結晶化)など、新たな現象の発見および手法の開拓を行い、磁気プロセッシングの基礎を築いてきた。これらの磁気プロセッシングは、現在「磁気科学」として認知されつつある新分野に属するものであり、磁場利用の展開と新規な用途開拓が必要である。

セルロース系材料は、環境調和型循環材料として、その利用拡大、高度利用が益々期待されている。我々はセルロース系材料の利用拡大・高度利用のため、高分子/セルロースナノクリスタル、パルプ(紙)/有機、無機フィラーの複合材料を磁気プロセッシングすることにより、光学的、力学的、電気的、熱的に、これまでにない特性を有するセルロースベースの異方性複合材料を作製することを試みている。

### 2. 研究の目的

磁気プロセッシングによるバイオマス・バイオ素材の高次元異方化と機能・用途開拓を目的として、次の研究課題(A)セルロース系、および(B)タンパク質結晶を遂行する。

(A) 擬単結晶化とメソクリスタル化の融合的手法によりセルロース巨大単結晶の作製を試みる。X線回折および固体NMR法によりセルロースの結晶構造に関する基礎的知見を集積。セルロースの3次元配向(セルロースメソクリスタル)を行う。

(B) 微結晶の3次元配向の固化過程にマトリクスゲル化法を導入し、旧来の擬単結晶化法を刷新。被解析結晶の回収が可能な擬単結晶化法を再確立し、希少タンパク質の結晶構造解析への応用展開を図る。

### 3. 研究の方法

(A) セルロースのメソクリスタル化と構造解析・物性制御

(i)セルロースの微細化の検討として塩酸・硫酸・テンボ酸化による加水分解方法を用いた。微細化セルロースの有機溶媒特にUV硬化樹脂の媒体への分散性を検討した。

セルロース微結晶/有機溶媒系に動的磁場を印加して静磁場配向、回転磁場配向、3次元配向させ、一軸配向及びメソクリスタル化を行った。

セルロースは微結晶化する過程でキラルネ

マチック相を形成するため、キラルネマチック相の形成を困難にする条件の検討を行った。

X線回折法および固体NMR法による結晶構造解析を行い、セルロース一軸配向体及びセルロースメソクリスタルの構造を評価した。(ii)セルロース3次元配向即ちメソクリスタル化を達成するためには、懸濁媒体であるUV硬化モノマーを取り除く必要があるため、懸濁媒体の除去方法を検討した。

(B) 被解析結晶の回収が可能な擬単結晶化法の確立とタンパク質結晶への応用

まず、モデル試料としてリゾチームを選択し、精製・再結晶化を行った。

(i)ゲル化による配向固化法の確立:擬単結晶化にUV硬化樹脂ではなく、ゲルを用いた方法の確立を試みた。リゾチーム微結晶の配向支持体として可逆的ゾル-ゲル転移能を有する高分子ゲルを選定した。ゲル化剤としては、低温度でゲル化するアガロースとゼラチンを検討した。ゾル状の媒体への分散性を改善し、強磁場により媒体中の微結晶を3次元配向を試みた。

ii)懸濁媒体を固化することなく、懸濁状態のまま、X線構造解析を可能にする方法を検討した。リゾチーム微結晶懸濁液を強磁場により3次元配向させ、懸濁媒体の凍結による配向の固化を検討し、強磁場マグネット内での急冷手法を検討した。

構造解析:上記(i)および(ii)により作製したリゾチーム擬単結晶のX線・中性子回折測定を行い、結晶構造を評価した。

### 4. 研究成果

磁気プロセッシングによるバイオマス・バイオ素材の高次元異方化と機能・用途開拓を目的として、研究課題(A)および(B)の研究成果は以下の通りである。

(A) (i)セルロースのナノクリスタルの結晶構造に関する基礎的知見を集積した。まず、セルロースの塩酸・硫酸・テンボ酸化による加水分解方法を検討した。キラルネマチック相を形成しない長さの違うウィスカーを塩酸処理により作製し、静磁場と回転磁場を印加した。静磁場では、ウィスカーの長軸方向が磁場と垂直に配向した面配向試料が得られた。一方、回転磁場を印加するとウィスカーの長軸方向が回転磁場の回転軸と平行に配向する試料が得た。得られたサンプルのX線回折像からセルロースの由来の違いによる、セルロースナノクリスタルの結晶構造を明らかにした(Fig. 1参照)。セルロースは微結晶化する過程でキラルネマチック相を形成するため、キラルネマチック相の形成を困難にする条件の検討を行った。具体的には、キラルネマチックのピッチを長くするため、種々の界面活性剤、塩等の影響を検討した。セルロースナノクリスタル懸濁液に変調磁場を印加し、3次元配向を試みた。セルロースナノクリスタルの磁化容易軸と磁化

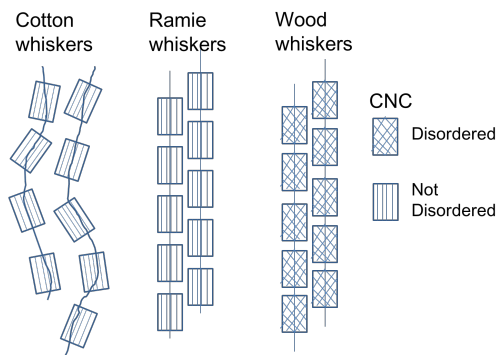


Fig. 1 磁場配向サンプルの X 線回折像より得られた、セルロースの由来の違いによる、セルロースナノクリスタルの結晶構造

中間軸の差は非常に小さいことので、出来るだけ高磁場を印加する必要がある。そこで、東北大の 15 T の強磁場を用いた。しかし、静磁場配向と回転磁場配向には成功したが、X 線構造解析に耐えうる高濃度の 3 次元配向体を得ることは至らなかった (メソクリスタル化には成功しなかった)。

(ii) セルロース 3 次元配向を達成するためには、懸濁媒体である UV 硬化モノマーを取り除く必要がある。そこで、モデル化合物として低分子微結晶を用い、3 次元配向達成後、懸濁媒体である UV 硬化モノマーを取り除く予備実験を行った。低分子結晶の 3 次元配向を大きく乱すことなく、ほぼ懸濁媒体を抜くことに成功した。

(B) 被解析結晶の回収が可能な擬単結晶化法を確立した。被解析結晶の回収が可能な擬単結晶化法を確立は、2 つの方向からアプローチした。

i) 擬単結晶化に UV 硬化樹脂ではなく、ゲルを用いた方法の確立。ゲル化剤としては、低温でゲル化するアガロースとゼラチンを検討した。被解析結晶はタンパク質のため、高温での固化はタンパク変性を伴うため、ゲル化温度は高温には出来ない。ゲル化温度は室温よりやや高温から低温が望ましい。しかし、試料を低温にすると結晶化剤が結晶化し、被解析結晶であるタンパク質の回折を妨害することが判明したので、ゲル化温度を 35 から 45 のゲル化剤を選定した。擬単結晶ゲルは Spring-8 や JPARC での実験に供した。UV 硬化樹脂を用いた X 線構造解析の結

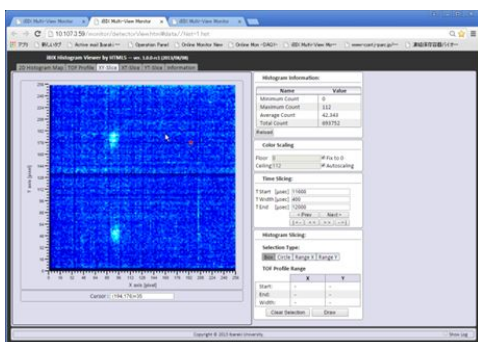


Fig. 2 ゲルで作製したリゾチーム微結晶の 3 次元配向体の中性子回折像

果は空間分解能が 2.7 であったが、今回の新手法では空間分解能が向上し 2 以下の分解能であった。同様に先行研究では、UV 硬化樹脂の擬単結晶を中性子回折に供したが、UV 硬化樹脂の水素が重水化されていないため、タンパク質の回折が観測できなかった。今回、新たに開発した系では、水とゲル化剤を懸濁体として用いているため、水を重水に置き換えることにより、中性子回折のピークが観測され、この新しい擬単結晶法が中性子構造解析に有用であることが示された (Fig. 2 参照)。

i) i) 懸濁媒体を固化することなく、懸濁状態のまま、X 線構造解析を可能にする。被解析結晶懸濁液を磁場中で変調回転すると、擬単結晶が得られる。しかし、この磁場印加装置と試料回転装置を研究室レベルの X 線回折装置に設置したとしても、磁化困難軸が一軸配向した X 線回折像しか得

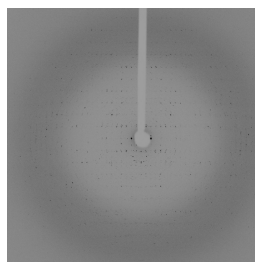


Fig. 3 リゾチーム懸濁液の CMOS で得られた X 線回折像。リゾチーム微結晶が 3 次元配向し擬単結晶化 (メソクリスタル化) していることが分かる。

られない。そこで、SPing-8 の超高速応答が可能な CMOS 検出器を用いた。CMOS 検出器は約 0.3 秒おきに回折像を取得できるため、単結晶構造解析に必要ないろいろな角度での振動回折像が得られる。

Spring-8 に磁場印加装置と試料回転装置を設置し、タンパク質の懸濁液を変調回転させて、X 線回折実験を行った。得られた回折像は、単結晶と同等の回折像が得られ、構造解析が可能である事が示された (Fig. 3 参照)。懸濁媒体を固化することなく、懸濁状態のまま、X 線構造解析を可能にすることに成功した。

以上より、被解析結晶の回収が可能な擬単結晶化法を確立し、希少タンパク質の結晶構造解析への応用展開を図る事を可能にした。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 17 件)

Determination of Anisotropic Diamagnetic Susceptibility Using X-ray Diffraction, T. Kimura, G. Song, K. Matsumoto, K. Fujita, and F. Kimura, Jpn. J. Appl. Phys., 51, 040202 (2012).

Chemical shift tensor determination using magnetically oriented microcrystal array (MOMA): <sup>13</sup>C solid-state CP NMR without MAS, R. Kusumi, F. Kimura, G. Song, and T. Kimura, J. Magn. Reson., 223, 68 (2012).

Orientational Distribution of Cellulose Nanocrystals in a Cellulose Whisker As Studied by Diamagnetic Anisotropy, G. Song, F. Kimura, T. Kimura, and G. Piao, *Macromolecules*, 46, 8957-8963 (2013).

Light-driven Bending of Polymer Films in Which Salicylidenephenylethylamine Crystals are Aligned Magnetically, H. Koshima, M. Matsudomi, Y. Uemura, F. Kimura, and T. Kimura, *Chem. Lett.*, 42, 1517-1519 (2013).

Crystalline Supramolecular Nanofibers Based on Dehydrobenzoannulene Derivatives, H. Shigemitsu, I. Hisaki, E. Kometani, D. Yasumiya, Y. Sakamoto, K. Osaka, T. S. Thakur, A. Saeki, S. Seki, F. Kimura, T. Kimura, N. Tohnai, and M. Miyata, *Chem. Eur. J.*, 19, 15366-15377 (2013).

Optimum Conditions of Dynamic Fields for the Three-Dimensional Magnetic Alignment of Magnetically Biaxial Particles, M. Yamaguchi, I. Yamamoto, and T. Kimura, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 52, 098003 (2013).

Orientation Fluctuation of Microcrystals under Three-Dimensionally Constraining Dynamic Magnetic Fields, T. Kimura, T. Tanaka, G.J. Song, K. Matsumoto, K. Fujita, and F. Kimura, *Cryst. Growth Des.*, 13(5), 1815-1819 (2013).

Characterization of Three-Dimensional Magnetic Alignment for Magnetically Biaxial Particles, M. Yamaguchi, S. Ozawa, I. Yamamoto, and T. Kimura, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 52, 013003 (2013).

Anisotropic Polymer Composites Synthesized by Immobilizing Cellulose Nanocrystal Suspensions Specifically Oriented under Magnetic Fields, M. Tatsumi, F. Kimura, T. Kimura, Y. Teramoto, and Y. Nishio, *Biomacromolecules*, 15, 4579-4589 (2014).

Synchrotron Microscopic Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analyses of Biogenic Guanine Crystals Along Axes of Easy Magnetization, Y. Mizukawa, Y. Ikemoto, T. Moriwaki, T. Kinoshita, F. Kimura, T. Kimura, and M. Iwasaka, *IEEE Transactions on Magnetics*, 50, 5001804 (2014).

Crystal System Determination from X ray Diffraction of Magnetically Oriented Microcrystal Suspensions, K. Matsumoto, F. Kimura, G. Song, S. Yamane, H. Kikuchi, T. Tanaka, S.

Higuchi, N. Kitamura, and T. Kimura, *Cryst. Growth Des.*, 14, 6486-6491 (2014).

Strong Highly Anisotropic Magnetocellulose Nanocomposite Films Made by Chemical Peeling and In Situ Welding at the Interface Using an Ionic Liquid, M. Mashkour, M. Tajvidi, F. Kimura, H. Yousefi, and T. Kimura, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6, 8165-8172 (2014).

Determination of anisotropic magnetic susceptibility of a biaxial crystal via orientational fluctuation of its microcrystalline suspension under magnetic field, K. Matsumoto, K. Fujita, T. Tanaka, F. Kimura, and T. Kimura, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53, 055501 (2014).

One-dimensional core-shell cellulose-akaganeite hybrid nanocrystals: synthesis, characterization, and magnetic field induced self-assembly, M. Mashkour, T. Kimura, F. Kimura, M. Mashkour, and M. Tajvidi, *RSC Adv.*, 4, 52542-52549 (2014).

Single crystal structure analysis via magnetically oriented microcrystal arrays, F. Kimura, W. Oshima, H. Matsumoto, H. Uekusa, K. Aburaya, M. Maeyama, and T. Kimura, *CrystEngComm*, 16, 6630-6634 (2014). Tunable Self-Assembly of Cellulose Nanowhiskers and Polyvinyl Alcohol Chains Induced by Surface Tension Torque, M. Mashkour, T. Kimura, F. Kimura, M. Mashkour, and M. Tajvidi, *Biomacromolecules*, 15, 60-65 (2014).

Magnetic Alignments of Endohedral Metallofullerene Nanorods under Magnetic Fields, M. O. Ishitsuka, H. Nikawa, N. Mizorogi, F. Kimura, T. Kimura, T. Kato, S. Nagase, T. Akasaka, *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.*, 23, 35-39 (2014).

[学会発表](計 20 件)

Anisotropic Fluctuation of Crystallographic Axes under Three-Dimensionally Constraining Dynamic Magnetic Field, T. Tanaka and T. Kimura, *International Conference on Magneto-Science 2013*, a45, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France).

Determination of Chemical Shift Tensor of L-Threonine Using Magnetically Oriented Microcrystal Array, M. Kimata,

R. Kusumi, F. Kimura, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a22, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France).

Preparation of Magnetically Oriented Green Compact of Amino Acid, M. Ishibashi, F. Kimura, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a23, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France)

Orientation Fluctuation of Microcrystals Under Frequency-Modulated Magnetic Fields, K. Fujita, F. Kimura, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a24, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France)

Crystal Structure Analysis by In-situ X-ray Diffraction Measurement of Magnetically Oriented Microcrystal Suspension, K. Matsumoto, F. Kimura, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a28, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France).

In-situ X-ray Diffraction Measurements of Three Dimensional Magnetically Oriented Microcrystal Suspension, C. Tsuboi, F. Kimura, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a29, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France).

X-ray Diffraction Analysis of Magnetically Oriented Microcrystal Array of Lysozyme, S. Tsukui, F. Kimura, K. Mizutani, B. Mikami, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a31, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France).

Solid-state NMR Study on <sup>13</sup>C Chemical Shift Tensor of Magnetically Oriented Microcrystal Array of Cellobiose, G. Song, R. Kusumi, F. Kimura, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a35, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France).

Magnetically Oriented Microcrystal

Array: Complete Characterization of Chemical Shift Anisotropy from Microcrystalline Powder, R. Kusumi, F. Kimura, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a11, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France).

In-situ X-ray Diffraction Measurements Using Magnetically Oriented Microcrystal Suspension of L-Alanine, F. Kimura, K. Matsumoto, C. Tsuboi, S. Tsukui, and T. Kimura, International Conference on Magneto-Science 2013, a55, (October 13-17, 2013, Mercure Bordeaux Cité Mondiale Centre Ville, Bordeaux, France).

Determination of Crystal System from Microcrystalline Powder, T. Kimura, K. Matsumoto, F. Kimura, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), MS72.004 (August 5-12, 2014, Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada).

Single Crystal Solid-State NMR of Magnetically Oriented Powder, R. Kusumi, F. Kimura, T. Kimura, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), MS73.004 (August 5-12, 2014, Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada).

Magnetically Oriented Powder Crystal to Indexing and Structure Determination, F. Kimura, W. Oshima, H. Matsumoto, H. Uekusa, K. Aburaya, M. Maeyama, T. Kimura, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), MS107.004 (August 5-12, 2014, Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada).

X-Ray Diffraction of Magnetically Oriented Microcrystals of Protein, S. Tsukui, F. Kimura, K. Mizutani, B. Mikami, T. Kimura, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), MS22.P30.A221 (August 5-12, 2014, Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada).

X-Ray Diffraction from Magnetically Oriented Microcrystal Suspension, K. Aburaya, C. Tsuboi, F. Kimura, K. Matsumoto, M. Maeyama, T. Kimura, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), MS76.P01.B311 (August 5-12, 2014,

Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada).

X-Ray Single Crystal Structural Analysis of Magnetically Oriented Microcrystals, C. Tsuboi, K. Aburaya, S. Higuchi, F. Kimura, M. Maeyama, T. Kimura, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), MS76.P03.B313 ( August 5-12, 2014, Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada).

Crystal Structure Analysis of Magnetically Oriented D-Arabinitol Microcrystal, S. Yamane, K. Matsumoto, F. Kimura, T. Kimura, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), MS76.P04.B314 ( August 5-12, 2014, Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada).

Orientation of poly(L-lactic acid) induced by epitaxial growth on a magnetically-aligned nucleating agent, R. Kusumi, T. Kimura, 6th International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP6), O-10 (July 8-11, 2014, the Southern Beach Hotel & Resort OKINAWA and the Bankoku Shinryoukan, Okinawa, Japan).

Single crystal structure analysis of magnetically oriented powder crystal, C. Tsuboi, S. Higuchi, K. Aburaya, F. Kimura, M. Maeyama, T. Kimura, 6th International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP6), P-19 (July 8-11, 2014, the Southern Beach Hotel & Resort OKINAWA and the Bankoku Shinryoukan, Okinawa, Japan).

X-ray diffraction analysis of magnetically oriented microcrystals of protein, S. Tsukui, F. Kimura, K. Mizutani, B. Mikami, T. Kimura, 6th International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP6), P-20 (July 8-11, 2014, the Southern Beach Hotel & Resort OKINAWA and the Bankoku Shinryoukan, Okinawa, Japan)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ：  
<http://www.fiber.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

木村 恒久 ( KIMURA, Tsunehisa )  
京都大学・大学院農学研究科 教授  
研究者番号：40264593

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

久住 亮介 ( KUSUMI, Ryosuke )  
京都大学・大学院農学研究科 助教  
研究者番号：70546530

木村 史子 ( KIMURA, Fumiko )  
京都大学・大学院農学研究科 研究員  
研究者番号：40425559