

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14769

研究課題名(和文)セルロース高次階層構造に対するセルロース膨潤タンパク質の作用

研究課題名(英文)Action of swollenin for cellulose which has hierarchical structure

研究代表者

天野 良彦 (AMANO, Yoshihiko)

信州大学・学術研究院工学系・教授

研究者番号：80273069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：最近ではセルロースナノファイバーが注目を集めているが、セルロースの階層構造を破壊してマイクロフィブリルレベルまでサイズダウンすることにより、新たな機能が期待される。本研究ではその階層構造に働く膨潤タンパク質のスウォレニンの機能を調べることを目的に行った。本タンパク質を異種発現生産することに成功したが、良好な結晶が得られなかったため、3次元構造の解析には至らなかった。一方、結晶型の異なるセルロースに対して、型結晶には作用したが、型および型の結晶にはほとんど作用しなかった。これは本タンパク質の作用する部位が、マイクロフィブリルの集合部位であり、階層構造の有無と密接に関連していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Recently cellulose nanofiber is paid attention as functional materials. Cellulose nanofiber commonly produces by means to break down of hierarchical structure of cellulose to microfibril. In this study, we investigated the action of swollenin to cellulose with different crystalline structure. Swelling activity of this protein appeared to cellulose I which has hierarchical structure, while no activity was observed for cellulose II and III. Since regenerated cellulose has uniform structure, it is suggested that susceptible point for swollenin was not existed on the substrate. So we concluded that swollenin was favor to attack the boundary of microfibril assembly, and resulting the fibrillation of cellulose I surface, but not cellulose II or III.

研究分野：生物工学

キーワード：セルロース スウォレニン 階層構造 フィブリル化

1. 研究開始当初の背景

セルロースは植物の細胞壁の主成分であり、グルコースが β -1,4-グルコシド結合した直鎖状の多糖である。セルロース分子は、分子内の水酸基だけでなく、分子間の水酸基間でも水素結合を形成すると同時に、グルコピラノシル環の環平面に起因する疎水性により、他のセルロース分子間と疎水的な相互作用を形成している。その結果、天然では、複数のセルロース鎖が会合した、非常に強固な結晶構造を有した物質として存在している。また、地球上では、主に植物の光合成によって二酸化炭素と水とから合成される再生可能なポリマーであり、最も豊富に存在する有機物である。こうした理由から、既存の化石資源由来の材料に置き換え可能な環境に優しい高分子材料として、学術研究のみならず、工業利用に向けた応用技術開発が精力的に進められている。中でも、最近ではセルロースナノファイバーの材料特性が注目されており、様々な製法が提案されてきているが、製造コストが高いという問題がある。この問題の解決法として、生物学的処理と物理的処理の組み合わせが注目される。水や液体に周波数20 kHzから数MHzの強力な超音波を照射すると、微小な気泡が発生し、この現象は超音波キャビテーションと呼ばれている。この時の気泡の生成・圧縮時には高温・高圧の反応場が形成されると報告されている。このように超音波処理は水中に分散した繊維全体にその効果が作用できる点や、簡便な操作かつ低環境負荷という非常に優れた性質を持っている。

2. 研究の目的

我々は、セルロースの階層構造に働くと考えられるswolleninのセルロース膨潤能に着目した。セルロースの階層構造を壊す上で課題になるのは、セルロース繊維間に形成されている水素結合であり、その結合を切ることで繊維の構造を緩ませることができないかと考えた。また、swolleninは酵素と異なりセルロース分子を分解しないことから、歩留まりの向上や今までにない長鎖長のセルロースマイクロフィブリルを調製することが可能になると考えられる。Swollenin処理によってセルロース構造が緩和された後のフィブリル化の方法には、超音波処理を併用して、ナノファイバー化について観察を行うこととした。本研究ではセルロース膨潤能を持ったタンパク質swolleninによる処理と、またその補助的な処理としての超音波処理による物理的処理によって分散したセルロースマイクロフィブリルの調製を試みた。

3. 研究の方法

(1) 使用したセルロース試料

セルロースナノファイバー調製用試料には、日本製紙ケミカル社製のコットンリントーを用いた。コットンリントーはシート状のバルブであったため、シュレッダー (MS シュ

レッダー、C-38S、MEIKO) にて短冊状に切んだ後、小型粉砕機ワンダープレンダーWB-1 (700W、25,000 rpm、大阪ケミカル) にて乾式粉砕処理したものをを用いた。そのほか、再生セルロースのレーヨンや、各種染料などで表面処理がなされたものを使用した。

(2) Swolleninの調製

遺伝子組換え swollenin の発現は、*Trichoderma reesei* 由来の swollenin をコードする cDNA を組み込んだ発現用ベクター-pPIC9K によって形質転換された酵母 *Pichia pastoris* KM71 (Invitrogen) を用いた RBD/geneticin 寒天培地に上記形質転換体 *P. pastoris* のコロニーを植菌した後、30°C で 5 日間静置培養し、コロニーを形成させた。調製した BMGY 培地を滅菌処理した後、60 mL に対してコロニーを 1 つ植菌し、30°C、120 rpm で 4 日間培養した。その後 4,000 rpm、5 分、遠心して回収した菌体を BMMY 培地 400 mL に懸濁させ、30°C、120 rpm で 7 日間培養し、24 時間ごとにメタノールを培養液全量の 1% になるように添加した。得られた培養液を 8,000 rpm、10 分間遠心分離し、得られた上清を粗酵素液とした。粗酵素液に対し、終濃度が 80 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で緩やかに回転させながら、タンパク質を沈殿させた。沈殿物を 10,000 rpm、15 分、遠心分離し、得られた沈殿を 60 mL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に溶解させた。次に、12 g の微結晶性セルロース粉末 (Merck) を 1 M 硫酸アンモニウムを含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に懸濁させ、これをエコノカラム (ϕ 2.8 cm \times 12.8 cm、Bio-Rad) に詰め、アフィニティークラムを用いて精製を行った。この操作によって得られた溶液を、swollenin 溶液として 4°C で保存した。

(3) 試料の酵素及び超音波処理

セルロース 5 mg に対して、swollenin 溶液を 1500、1000、750、500、250、100、10、1 μ g を添加し、終濃度 1 M となるように硫酸アンモニウム粉末を添加し、それぞれ 40°C で 1、2、3、4、5 日間、静置にて作用させた。ついで、超音波処理は次のように行った。バス型超音波洗浄機 SD-32CP-200K 型 300W (三井電気精機) を用いた。この超音波洗浄機には 3 つの種類があり、照射できる周波数 (28、200、950 kHz) がそれぞれ異なるため、各周波数において条件検討を行った。Swollenin 処理したセルロースを 10 mL の共栓フラスコ (三商) に入れ、温度を 20°C に設定し、それぞれの周波数に 10、20、30 分間作用させた。超音波処理を行うと、セルロース繊維同士の凝集が起こった試験区が存在したため、超音波処理を 10 分行う毎に、超音波槽から繊維の入った共栓フラスコを取り出し、ピペッティ

ングおよび攪拌を行うことで、繊維を分散させた。超音波処理後の繊維はよく脱イオン水で洗浄、遠心分離を繰り返し、凍結乾燥させ、その後の各分析を行った。

(4) 金コロイドで標識した swollenin の調製

Swollenin がコットンリンターに対して作用している部分を分析する手法として、金コロイドで処理した swollenin (swo-gold) を作製し、FE-SEM SU8000 による評価を行った。Swo-gold の作製方法は、5 nm の金コロイド溶液 (Sigma) 5 mL に希酢酸を加えて pH を 4.5 に調整したものを用意した。そして、0.05 M の酢酸ナトリウム緩衝液へ swollenin を 0.2 mg/mL になるように加えたものを 1 mL 作製し、先ほどの金コロイド溶液 5 mL と混合した。この溶液に 5% 塩化ナトリウム (和光純薬) 0.5 mL と 1% ポリエチレングリコール 20000 (純正化学) 溶液 0.5 mL を加えた。この混合溶液を遠心分離 (10,000 rpm, 4 °C, 60 分) して上清を回収し、回収した上清を swo-gold とした。酵素処理時にはセルロース濃度 0.02 ~ 1 mg/mL のセルロース溶液と swo-gold を 1 : 2 の割合になるように加えた。その後、SEM 観察時に繊維表面上で邪魔となる塩化ナトリウムや、ポリエチレングリコールなどの物質を除くために、よく遠心分離を行った。

(5) FE-SEM (電界放射型走査電子顕微鏡) 観察

各セルロース試料を凍結乾燥器 FDU-1200 (東京理科) にて一晚凍結乾燥させたものを、試料台に張り付けたカーボンテープ (日新 EM) 上に固定させた。各セルロース試料を乗せた試料台と真空蒸着装置 Twin Coater JEC-550 (日本電子) に入れ、1.5 kVA で 2 分 30 秒スパッタリングし、白金蒸着させた後に FE-SEMSU-8000 (日立) にて繊維表面を観察した。

(6) 平均重合分子量測定

各種セルロース懸濁液を凍結乾燥させたものを測定試料として用いた。はじめにねじ口試験管にセルロース粉末を 10 mg 加え、ジメチルスルホキシドを 1 mL、400 μ L のイソシアン酸フェニルを加えた。この溶液の入った試験管を 90 °C で 48 時間、時折攪拌しながらセルロース誘導体化を行った。加熱後、10 mL の 50 v% メタノールを加え、誘導体化セルロースを析出させ回収し、50 v% エタノールで洗浄し、五酸化二リンを同封したデシケータ内で吸引しながら乾燥させた。その誘導体化セルロース (セルローストリカルバニレート) をテトラヒドロフランに 1 mg/mL の濃度になるように溶かし、0.2 μ m フィルターに通したものをゲル浸透クロマトグラフィー用の試料とした。重量平均分子量の測定は重量平均分子量から算出した。

目的物質の検出ピークにおける保持時間を t とし、検出ピークにおけるベースラインからの高さを Mt としたとき、次式から重量平均分子量を算出した。

$$M_w = \frac{\sum tiMt_i}{\sum ti}$$

この式から算出した重量平均分子量の値を誘導体化セルロース (セルローストリカルバニレート) の単量体の値 (519.42) で割ることにより重量平均分子量を求めた。GPC システムは、カラムは TSKgel GMHHR-N (7.8 \times 300 mm) (東ソー) 用いて島津社製の HPLC にて分析を行った。測定条件は、カラム温度内を 40 °C、流速を 0.5 mL/min、試料の分析時間は 45 分にて行った。移動相には、テトラヒドロフラン (安定剤不含有 99.8+% for HPLC) 使用し、試料をカラムに供した。標準物質はポリスチレン (昭和電工) を用い、分子量が 3.0 \times 10³ ~ 2.0 \times 10⁶ の範囲のものを使用した。

(7) 窒素吸着測定

通常の凍結乾燥では水中で繊維が膨潤していても処理後は再び繊維同士が凝集してしまうことが考えられる。そこで、繊維の膨潤した形状を保つために t-butyl alcohol 置換処理を行った。t-butyl alcohol 置換処理をした各セルロース試料を凍結乾燥処理し、BELSORP-mini (日本ベル) を用いて窒素吸着による繊維の比表面積を計測した。

(8) 粉末 X 線回折法 (XRD) による結晶構造解析

各セルロース試料を凍結乾燥させたものを測定試料として用意した。島津製作所社製 XRD-6000 (管電圧 : 30 kV、管電流 : 30 mA、走査範囲 : 3-60 °、走査速度 : 0.02 ° / min、連動 : 2 /) を用いて試料に X 線を照射し、繊維の結晶化度 (CrI) および結晶構造を X 線回折パターンより計測した。また、繊維の結晶化度 (CrI) 計算は次式から算出した。結晶化度は Segal 法により算出した。即ち、セルロース繊維の非晶性部分 ($2\theta = 18.5^\circ$) の回折強度値を、結晶性部分 ($2\theta = 22.6^\circ$) の回折強度値で割ることで相対的に結晶化度を求めた。

4. 研究成果

(1) Swollenin のコットン表面における局在 Swollenin がコットンリンターに対してどのような部分に働くのかを分析するため、金コロイドを付加した Swollenin (Swo-gold) を作製し、コットンリンターに 40 °C で、48 時間作用させ、コットンのどの部分に作用しているかを SEM により観察を行った。金コロイドによる非特異的なセルロースへの吸着を確認するために、金コロイドだけをコットンリンターに作用させたが、吸着は観察されなかった。ついで、Swo-gold を作用させると、

未処理のコットンリンターの時には見られなかった金コロイドに由来する粒子が、コットンリンター表面に吸着していることが確認された(図1)。これらの粒子について電子線回折像を見たところ金粒子であることが確認された。Swolleninの吸着は表面に様々というよりは、むしろ特定の部位に集団で吸着していることが観察された。

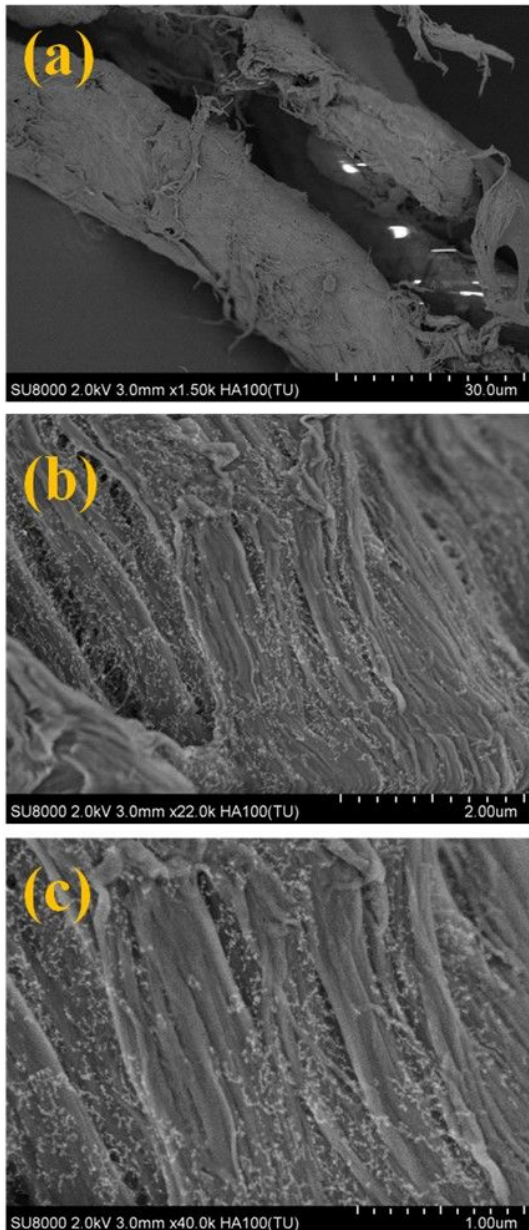


図1 . Swo-gold のコットンリンターへの吸着

(2) swollenin およびセルラーゼ処理によるコットン繊維への影響

起源および酵素のファミリー分類が異なる2種類のエンドグルカナーゼ En-1 (GH5、*Irpex lacteus* 由来) および EG V (GH48、*Trichoderma reesei* 由来) として swollenin の作用の差異について、形態変化を観察した。未処理のコットンリンターは、ワンダープレンドーで粉碎しているため、繊維表面の一部分

は毛羽立ちが起こっているが、多くの部分において、繊維幅約 20 μm 程度の非常に太いセルロース繊維であった。次に、未処理のコットンリンターに対して swollenin 処理を 40 $^{\circ}\text{C}$ で3日間行くと、未処理の時に見られた繊維の毛羽立ちの部分はほとんどなくなり、非常に滑らかな繊維表面となっていた。また、繊維には、繊維の長軸方向に対して斜めに、比較的長い裂け目が生じていた(図2)。一方、EG V 処理を行った場合では、未処理のコットンリンターと比べると、若干毛羽立ちが少なくなり、滑らかなコットン繊維表面が増加したが、大きな変化は認められなかった。さらに En-1 処理では、swollenin 処理と同様に未処理の時の毛羽立ちはほとんど見られなくなり、また、頻度は swollenin よりも少ないものの、繊維表面に裂け目の発生が見られた。このように、swollenin の効果はミクロフィブリル間の構造の弛緩による割れを引き起こす効果が高いことが特徴であった。この時、生成した還元糖量を比較すると、EG V および En-1 ではそれぞれ 0.600 mg/mL および 0.912 mg/mL であったのに対して、swollenin 処理では 0.312 mg/mL と、少ないながらも加水分解を触媒していることが明らかになった。可溶性の生成物量に比較して、構造の変化は swollenin のほうが多いことが判明した。

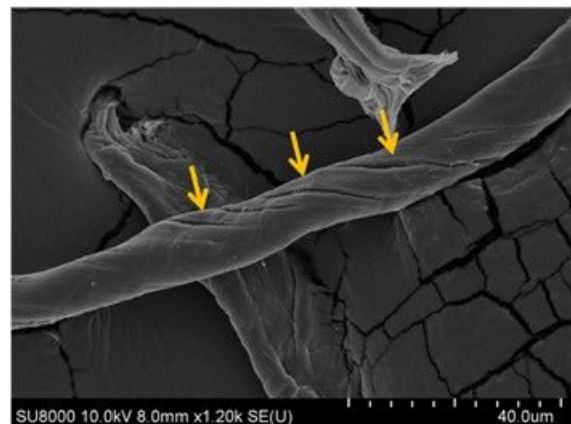


図2 . swollenin 処理後の表面の割れ

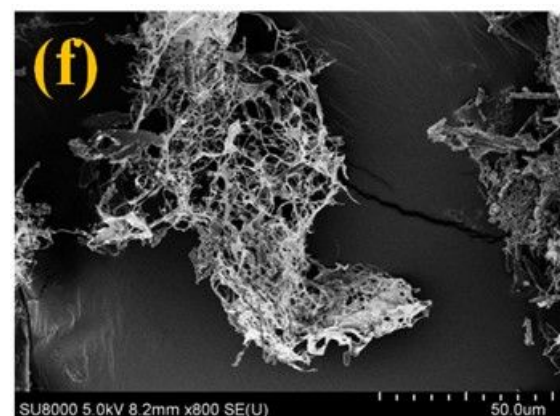


図3 . 組み合わせ後のナノファイバー化

(3) Swollenin および超音波処理を組み合わせた処理による効果

Swollenin 処理後に、超音波処理を組み合わせた時の構造変化を図3に示した。超音波は200 kHz の時が最も構造変化が大きく、30 分処理では一部がナノファイバー化していた。

(4) セルロースナノファイバーの物性評価

粉末X線回折法を用いて swollenin 処理後のコットンリンターの構造解析を行った結果、未処理と比べてスペクトル波形にはほとんど変化は見られず、天然セルロース I 型の結晶構造を保っていた。比較対照のセルラーゼ処理をした結果も同様に、全ての試験区においてセルロース I 型の結晶構造を持ったセルロース繊維が得られた。また、XRD スペクトルから得られたピークより各繊維の結晶化度の算出も行った結果、swollenin 処理後に超音波処理した繊維の結晶化度は、未処理と比べて大きな低下は無く、結晶化度約 70% を維持していた。一方で、セルラーゼ処理ではむしろ結晶化度が上昇する傾向にあった。

次いで重合の変化においては、未処理のコットンリンターの重合平均重合度は 1,726 であったが、そこに超音波処理を行うと、重合度は約 68.5%低下し、1,183 となった。未処理のコットンリンターに対して swollenin 処理をすると、重合度は 969 まで低下した。この低下の割合は、エンド型のセルラーゼ処理と同程度であった。

さらに、処理前後での比表面積を評価した。未処理のコットンリンターの比表面積を測定すると、3.50 m²/g であったが、超音波処理をした繊維では、3.02 m²/g となり、未処理と比べて大きな変化は認められなかった。しかし、swollenin 処理後に超音波処理を行った試験においては、繊維の比表面積は 24.1 m²/g となり、未処理および超音波処理のみと比べて約 8 倍程度の比表面積の増加が確認された。

(5) 結晶系の異なるセルロースに対する swollenin の作用

これまで、コットンリンターに加えてパルプに対する Swollenin の効果の観察を行ってきた。そこで、他の結晶型のセルロース（レーヨン等）に対し同様の処理を行った際に、繊維の形態変化が現れるかどうかの確認を行った。その結果、パルプと同じ 型セルロースに対しては同様に表面のフィブリル化が確認されたが、パルプほど顕著には現れなかった。一方、 型、 型のセルロースに対してはほとんど効果が確認されなかった（図4）。

まとめ

天然の 型のセルロース繊維、特にパルプに対しては、繊維のフィブリル化による高次構造の崩壊の様子が観察されたが、 型の再セルロースに関しては膨潤能やフィブリ

ル化は観察されなかった。Swollenin は 型のセルロースのミクロフィブリルの束の間の緩みを誘発して、繊維の膨潤を行うものと考えられたが、再セルロースのような均一な構造のものに対しては、活性を示す作用点がないことが原因であることが示唆された。このことから、swollenin の作用は水素結合の多さや結晶構造の強さに起因せず、構造の不均一性に関係するものと考えられた。

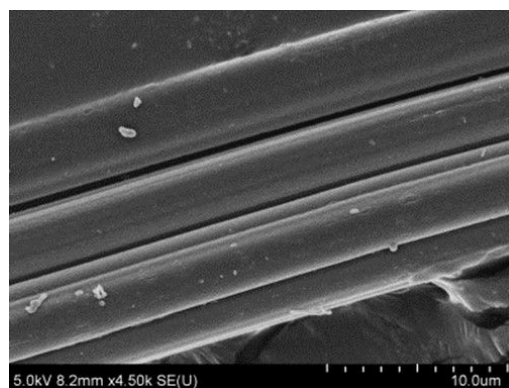


図4．レーヨンの swollenin 処理後の形態

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕(計 1 件)

水野正浩、佐藤健人、野崎功一、天野良彦：swollenin 及び超音波処理の組み合わせによるセルロース繊維の微細化，セルロース学会第 22 回年次大会、2015 年 7 月 9 日，北海道大学学術交流会館（北海道・札幌市）

6．研究組織

(1)研究代表者

天野 良彦（AMANO, Yoshihiko）
信州大学・学術研究院工学系・教授
研究者番号：80273069

(2)研究分担者

水野 正浩（MIZUNO, Masahiro）
信州大学・学術研究院工学系・助教
研究者番号：60432168