

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05928

研究課題名（和文）竹バイオマスのバイオリファイナリーの基盤構築

研究課題名（英文）Foundation of Biorefinery delivered from Bamboo Material

研究代表者

椎葉 究（Shiiba, Kiwamu）

東京電機大学・理工学部・教授

研究者番号：20621981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：世界で初めて竹から特別な薬品や溶媒を用いることなくソフトな方法（低コスト）で、様々な機能性を持つ成分の分離・調製する技術を開発した。これらを、環境面とコスト面からバイオリファイナリー（カスケード利用）方式で、生活用品や環境資材として利用することが考えられた。

有望なバイオマス資源である竹から、蒸圧処理と細胞壁崩壊酵素で抽出した成分（以下 BOSと略）は、特殊な構造をしたオリゴ糖類を主成分として含有しており、この成分にコレステロール上昇抑制効果と抗酸化活性などの生理効果があることが明らかになった。更に免疫賦活化作用があることも明らかになった。これらの生理活性の機構解明を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

孟宗竹はイネ科であり国内外でその繁殖力の強さと地球温暖化の影響もあり、バイオマス量を増大させている。孟宗竹は、地球上でも最も成長速度の高い植物であり国内にも膨大なバイオマスが存在している。竹の繁殖分布は年々拡大しており、ほとんどは放置されている。そのため、自然林・人工林を侵食し枯死させ、地下茎が強固でないため、地盤が緩み土砂崩れを招きやすい等の「竹害」が発生し、問題が深刻化している。その一部は、これまででも筍や竹林景観としての利用等はあるが、利用は限定的であった。有望なバイオマス資源である竹から、生理効果を有する成分を抽出、最終的にはバイオリファイナリーの基盤技術として確立できた。

研究成果の概要（英文）：For the first time in the world, we have developed a technology for separating and preparing components with various functionalities from bamboo by a soft method (low cost) without using special chemicals or solvents. From the environmental and cost perspectives, it was considered to use these as daily necessities and environmental materials in a biorefinery (cascade use) method.

The component extracted from bamboo, which is a promising biomass resource, by steam pressure treatment and cell wall disintegration enzyme (hereinafter abbreviated as BOS) contains oligosaccharides with a special structure as the main component, and this component has the effect of suppressing the rise in cholesterol. It was revealed that it has physiological effects such as antioxidant activity. Preliminary studies have shown that it may also have an immunostimulatory effect. We verified the elucidation of the mechanism of these physiological activities.

研究分野：環境化学工学

キーワード：孟宗竹 ヘミセルロース 免疫賦活 コレステロール低下作用 抗酸化作用 バイオリファイナリー

## 1. 研究開始当初の背景

孟宗竹はイネ科であり国内外でその繁殖力の強さと地球温暖化の影響もあり、バイオマスを増大させている。孟宗竹は、地球上でも最も成長速度の高い植物であり国内にも膨大なバイオマスが存在している(乾物で約9,300万トンと推定されている)。竹の繁殖分布は年々拡大しており、ほとんどは放置されている。そのため、自然林・人工林を侵食し枯死させ、地下茎が強固でないため、地盤が緩み土砂崩れを招きやすい等の「竹害」が発生し、問題が深刻化していることが、多くの都道府県で報告がされている。その一部は、これまでも筍や竹林景観としての利用等はあるがその需要は減少傾向にあり、その利用法については世界中で研究開発されてきた。国内でも、竹の焼却処理による竹炭の脱臭剤への利用法などが開発されてきたが、まだ利用は限定的であった。

## 2. 研究の目的

当該申請者は、世界で初めて竹から特別な薬品や溶媒を用いることなくソフトな方法(低コスト)で、様々な機能性を持つ成分の分離・調製する技術を開発している。これらを、環境面とコスト面からバイオリファイナリー(カスケード利用)方式で、生活用品や環境資材として利用することが考えられた。

有望なバイオマス資源である竹から、蒸圧処理と細胞壁崩壊酵素で抽出した成分(以下 BOS と略)は、特殊な構造したオリゴ糖類を主成分として含有しており、この成分にコレステロール上昇抑制効果と抗酸化性活性などの生理効果があることが明らかになってきた。更に免疫賦活化作用がある可能性が予備試験で得られていた。これらの生理活性の機構解明を検証する。最終的にはバイオリファイナリーの基盤技術として確立する。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 生理活性を有する成分の調製

減圧マイクロ波処理と蒸圧/植物崩壊酵素処理により抽出した成分(BOS)を、吸着カラムクロマトグラフィー(Cellufine や PD-10)、陰イオン交換 DEAE カラムクロマトグラフィーによって分離・調製した。

### 3-2. 分離した成分の検出と化学構造解析

調製した成分は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により UV および RI による検出、溶出成分をマススペクトルにより化学構造の検討を行った。

### 3-3. 生理活性の測定

BOS または BOS からカラム吸着により分離した成分の生理活性(免疫賦活化活性作用、抗酸化活性、コレステロール低下作用)を測定した。また、その生理活性を有する機構として、腸内細菌叢変化との関連性を探索した。

免疫賦活化活性測定は、以下の方法で行った。

RAW264.7 細胞(マウスマクロファージ様細胞株)を  $5 \times 10^5$  cells/mL に調製し、100  $\mu$ L ずつを 96well plate に播種した。一晚培養後、培地を除去し、種々の濃度の LPS (Positive Control) または、試料を含む培地 100  $\mu$ L を添加する。試料は、倍希釈系列を作成( $\times 1$ 、 $\times 1/2$ 、 $\times 1/4$ 、 $\times 1/8$ )後、各希釈系列を 10% FCS (豚胎児血清)含有 DMEM 培地に対して 2% (v/v) 混和し、添加サンプルとした。炭酸ガス培養器(5%CO<sub>2</sub>)で 22 時間培養後、培地中の NO<sub>x</sub> 量を NO<sub>x</sub> 測定キット(NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II(Colorimetric) /Griess Reagent Kit) で定量した。試料の NO<sub>x</sub> 産生上昇活性は、LPS(10  $\mu$ g/mL)の NO<sub>x</sub> 産生に対する相対活性として評価する。なおコントロールとして LPS を添加して NO<sub>x</sub> キット(Griess Reagent)により、NO 産生能を比較した。

算出式は試料の NO<sub>x</sub> 産生上昇活性 = [試料添加群の NO<sub>x</sub> 産生量 ( $\mu$ M) / LPS10  $\mu$ g/mL 添加群の NO<sub>x</sub> 産生量 ( $\mu$ M)]  $\times 100$  それぞれの条件は n=4 で行い、平均値、標準偏差を算出した。各条件の有意差検定は、Tukey-Kramer の多重比較検定を用い、p<0.05 を有意差水準とした。

血中コレステロールと抗酸化活性は、下記の方法に従った。

M.MAEMURA, M.HORIUCHI, T.ABE, K. SHIIBA. Preparation of Bamboo Hemicellulose Hydrolysate Possessing Anti-oxidative Properties and Their Effects on Mice Plasma Cholesterol. Food Science and Technology Research, 22(4):537-543 (2016)

腸内細菌叢の測定は、糞中のメタゲノム解析を行った。下記に記載されている。

N.Ikeyama, M.Sakamoto, M.Ohkuma, S.Hiramoto, J.Wang, S.Tone., and K.Shiiba. Fecal Microbiota Perspective for Evaluation of Prebiotic Potential of Bamboo Hemicellulose

## 4. 研究成果

### 4-1. 分画成分の HPLC/GC による構造解析

蒸圧酵素により抽出した成分 (Bamboo Oligo Saccharides, 以下 BOS と省略) は、季節や産地によって異なるが糖質が約 35% (内訳キシロース約 50%、グルコース 40%、アラビノース 10% が)、ポリフェノール類が約 40%、タンパク質類が約 20% であった。

これらの成分は、更に、種々のカラムクロマトグラフィー (ゲル濾過、陰イオン交換、疎水性、親水性、活性炭) や溶媒分離で成分分離・精製が可能であるが、ここでは、吸着カラム (Cellufine Phenyl, JNC 製) を用いた溶出パターンを Fig. 1 に示した。カラムに非吸着成分の凍結乾燥した区分を NA (Non-Adhere) 画分、吸着し、20-100% エタノールで溶出した成分を AD (Adhere) 画分とした。

BOS から分離した AD と NA 画分中に含まれる成分の 1% (w/w) 水溶液を、親水性カラム (HILIC) 高速液体クロマトグラフィーにより分離した時の RI による検出した時のパターンを Fig. 2 に示した。この成分は、大きく 4 種の成分 (P-1 ~ P-4) に分離できる。AD 画分は P-1 成分を主成分として、約 60% を多く含まれるのに対して、NA 画分は P-3 と P-4 成分を多く含むことが分かった。また、ゲル濾過法により、P-1、P-2 は、分子量 1000 以上、P-3、P-4 は分子量 1000 以下であることが分かった。詳細な化学構造についてはさらに NMR などの情報が必要であり、今後さらに検討する。

竹からは、フェルラ酸のキシログルカン配糖体の物質が多く見出されている。特に、Fig. 3 に示されるようなフェルラ酸がキシロースの 4 位で結合しているフェルロイルキシロースが多数報告されている。フェルラ酸などの桂皮酸は 320nm 付近にスペクトル吸収があることから、RI のピークと UV320nm モニタでの溶出ピークの重なりは、桂皮酸類を含む配糖体の可能性がある。P-1、P-2、P-3、P-4 いずれも UV320nm に対する吸収は認められている。

HPLC/MS 分析の結果から、Fig. 3 に示されるようなフェルラ酸がキシロースの 4 位で結合しているフェルロイルキシロース成分の存在が推測された。フェルラ酸などの桂皮酸は 320nm 付近にスペクトル吸収があることから、RI のピークと UV320nm モニタでの溶出ピークの重なりは、桂皮酸類配糖体の可能性がある。

### 4-2. 抽出した成分の生理活性

#### 4.2.1 BOS の抗酸化活性と局所光保護効果

桂皮酸類、特にフェルラ酸は強い抗酸化性を示すことが知られている。また、これらの配糖体は、桂皮酸単独よりも抗酸化性が強いことが報告されている。BOS、および AD 画分、NA 画分の DPPH による抗酸化活性測定と、3M トリフルオロ酢酸で加水分解したのち HPLC によりフェルラ酸量を測定した結果を示す。フェルラ酸量と抗酸化活性はほぼ比例関係にあり、抗酸化性は AD 画分に多いことが示され、それはフェルラ酸量と相関していることが示された (Table 1)。フェルラ酸による抗酸化活性は、*in vivo* での活性も報告されている。さらにそれらの成分は、日焼け止めなどの局所光保護的な効果も報告されている

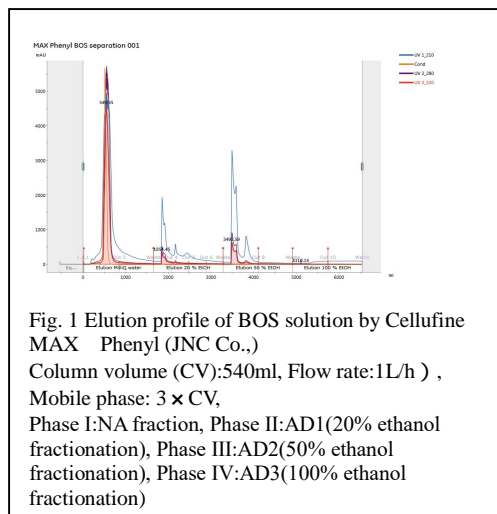


Fig. 1 Elution profile of BOS solution by Cellufine MAX Phenyl (JNC Co.), Column volume (CV): 540ml, Flow rate: 1L/h, Mobile phase: 3 × CV, Phase I: NA fraction, Phase II: AD1 (20% ethanol fractionation), Phase III: AD2 (50% ethanol fractionation), Phase IV: AD3 (100% ethanol fractionation)

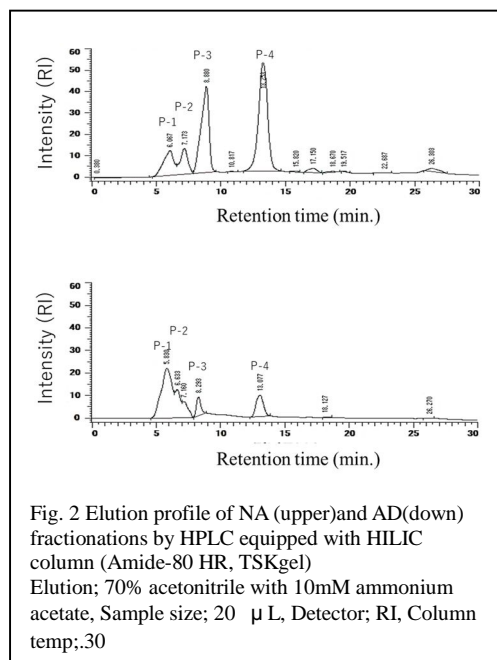


Fig. 2 Elution profile of NA (upper) and AD (down) fractions by HPLC equipped with HILIC column (Amide-80 HR, TSKgel) Elution; 70% acetonitrile with 10mM ammonium acetate, Sample size; 20 μL, Detector; RI, Column temp; 30

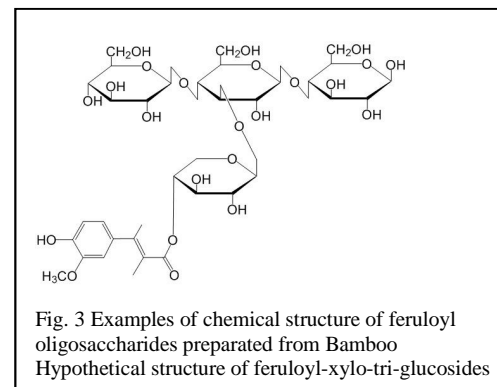


Fig. 3 Examples of chemical structure of feruloyl oligosaccharides prepared from Bamboo Hypothetical structure of feruloyl-xylo-tri-glucosides

#### 4.2.2 免疫賦活性

BOS およびその分画物である AD, ND の免疫賦活性を、マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) を用いて NO 産生活性により評価を行った。なお、活性比較のために大腸菌由来のリポポリサッカライド (LPS) との評価も同時に行った。

その結果を、Fig. 4 に示した。この結果から、BOS と AD 添加区では濃度依存的に NO 産生活性が認められ、ND 添加区にその活性が認められないことから、BOS 中 AD 成分に特に強い免疫賦活性があった。LPS との濃度活性比較から、AD 成分 10 µg/ml は LPS 1 µg/ml 相当の活性であった。また、AD と ND の成分の比較から、P-1 成分にその活性がある可能性が高いことが示唆された。竹稈から調製した成分 (P-1 成分) にそのような活性があることは知られていない。BOS はまた、0.01-1mg/ml において TNF- $\alpha$  に対しても濃度依存的な産生亢進活性を示した (Fig. 5)。TNF- $\alpha$  は代表的な炎症性サイトカインであり、好中球を活性化させることから細菌や病原菌に対する感染防御能を高める効果があることが知られている。よって、BOS は花粉症予防や感染症の予防機能が期待される。

マクロファージの活性化経路としては、転写因子である NF- $\kappa$ B の核内への移行と DNA への結合が重要であることが明らかになっている。BOS のマクロファージ活性化には、NF- $\kappa$ B 経路の修飾が考えられるが、詳細は今後の課題である。

#### 4.2.3 コレステロール低下と腸内細菌叢解析

BHH (Bamboo hemicellulose hydrolysate: マイクロ波処理後の残渣から調製した BOS) 混合餌は高脂肪食のみ給与区 (コントロール区) と比較して、1) 血清コレステロールが低下した。2) 糞便 pH が低下した。3) 腸内細菌叢の多様性 (群間種多様性) の変化が抑制された。4) 腸内細菌のうち Firmicutes 門: Bacteroidetes 門比率の減少が認められ、Lachnospiraceae 科・Ruminococcaceae 科・S24-7 科細菌類のわずかな増加が認められた。

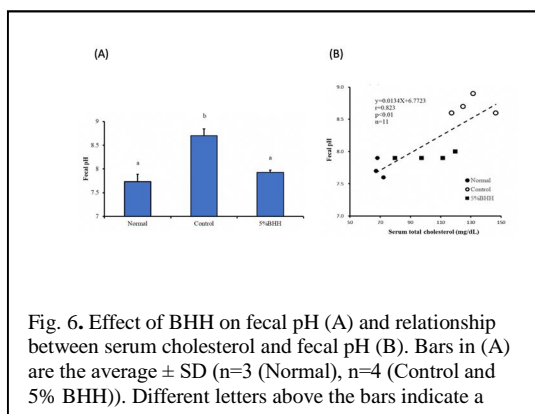


Fig. 6. Effect of BHH on fecal pH (A) and relationship between serum cholesterol and fecal pH (B). Bars in (A) are the average  $\pm$  SD (n=3 (Normal), n=4 (Control and 5% BHH)). Different letters above the bars indicate a

コントロール区では糞便 pH や血清コレステロールの上昇、腸内細菌叢の多様性が有意に変化していることを確認した。高脂肪食と BHH 混合餌をマウスに給与することにより、BHH が上記変化を抑制していることが見出され、それは BHH の主要構成成分であるセルロースやヘミセルロースによって食物繊維分解菌が増加することで短鎖脂肪酸の産生効率が向上しただけでなく、その二次代謝産物の糖や酢酸などの増加が非分解菌の生育と代謝を支持していると考えられた。さらに、有機酸濃度の上昇による pH の低下が酪酸の産生効率も向上させ、血清コレステロールを低下させる有益な生理活性を發揮している可能性が示唆された。BHH の血清コレステロール上昇抑制作用機構は、大腸内における細菌構成の変化により短鎖脂肪酸の分泌が増加することで肝臓におけるコレステロール合成阻害が引き起こされると推定された。

Table 1 The total carbohydrate and antioxidant activities of content fractionated by Cellufine MAX Phenyl (JNC Co.,)

	Dry weight (DW)		Total carbohydrate (TC)		Anti-oxidative activities (AO)		Ratio (AO/DW)	
	(mg)	Yield (%)	(mg)	Yield (%)	(AA, $\mu$ mol)	Yield (%)	(AA, $\mu$ mol/mg)	(AA, $\mu$ mol/mg)
BOS	1000	100	174	100	146	100	0.15	0.84
NA fractionation	720	72	102	59	108	74	0.15	1.08
AD(20% ECH Fractionation)	46	4.6	11	6	35	24	0.77	3.18
AD(60% ECH Fractionation)	76	7.6	16	9	24	16	0.31	1.50
AD(100% ECH Fractionation)	11	1.1	0.24	0	0.2	0	0.02	0.59
AD Fractionation Total	133	23.2	27.34	15	59.2	41	0.45	2.17

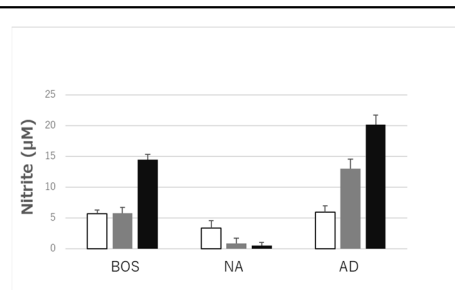


Fig. 4 NO generation activities of NA and AD fractionations separated from BOS. White bar: 0.01 mg/ml, Gray bar: 0.1 mg/ml, Black bar: 1 mg/ml

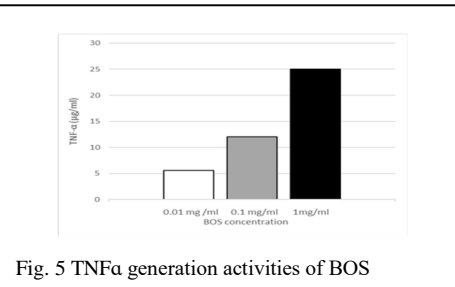


Fig. 5 TNF $\alpha$  generation activities of BOS

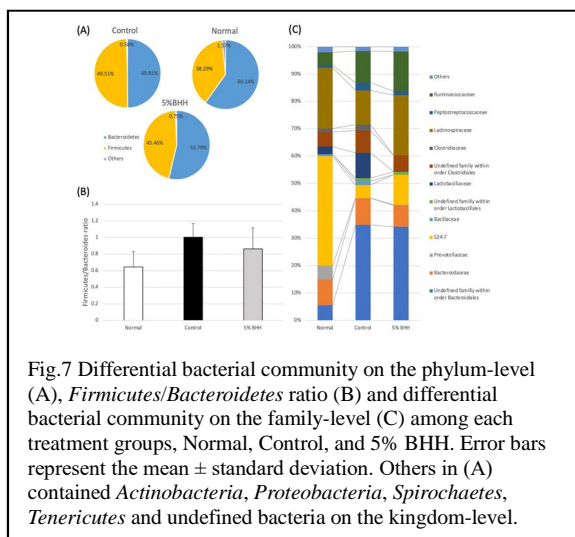


Fig. 7 Differential bacterial community on the phylum-level (A), Firmicutes/Bacteroidetes ratio (B) and differential bacterial community on the family-level (C) among each treatment groups, Normal, Control, and 5% BHH. Error bars represent the mean  $\pm$  standard deviation. Others in (A) contained Actinobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes, Tenericutes and undefined bacteria on the kingdom-level.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe Tomoko, Kobayashi Kenta, Kawamura Sho, Sakaguchi Tatsuya, Shiiba Kiwamu, Kobayashi Michihiko	4. 巻 65
2. 論文標題 Dipeptide synthesis by internal adenylation domains of a multidomain enzyme involved in nonribosomal peptide synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2018.03.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王建鵬 他
2. 発表標題 孟宗竹の総合利用に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 矢田堀裕聖、関本智登、藤田誠史、布施有里奈、平本茂、椎葉究
2. 発表標題 孟宗竹ヘミセルロース加水分解物中の生理活性成分の分離と精製
3. 学会等名 日本農芸化学学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kiwamu Shiiba, Tomoko Abe	4. 発行年 2018年
2. 出版社 LAMBERT	5. 総ページ数 51
3. 書名 Separation and Application of Pollutant-degradation Microbes from Sea	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 2019-010087	発明者 椎葉究、平本茂	権利者 東京電機大学
産業財産権の種類、番号 特許、竹由来の免疫賦活作用を有する生体活性物質とその製造方法	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 免疫賦活組成物及び竹抽出物、並びにそれらの製造方法	発明者 椎葉究、平本茂	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-10087	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------