

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380104

研究課題名（和文）人工細胞壁を用いたヘミセルロースの機能解明と機能性材料の創出

研究課題名（英文）Clarification of hemicellulose functions using artificial wood cell wall and development of its functional materials

研究代表者

浦木 康光 (URAKI YASUMITSU)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：90193961

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞壁の構造を模倣した“人工細胞壁”を用いて、細胞壁中のヘミセルロースの機能を解明することと、ヘミセルロース吸着人工細胞壁を肝実質細胞の培養基質として利用するための検討を行った。人工細胞壁の基本骨格はハニカムパターン化セルロースフィルムであり、これに、広葉樹の代表的ヘミセルロースであるキシランとカラマツに特有なアラビノガラクトタン（AG）を吸着させ、その物性変化を追跡した。両ヘミセルロースとも吸着によりフィルムの引張強度を向上させた。キシラン吸着フィルムをマイクロ波処理することで、吸着を強固にでき、弾性率が向上することを見出した。また、力学測定の結果を基に、木材の荷重下における変形モデルの検証を行ったところ、**Bending-stretching model** がハニカム状の配列を取る細胞壁断面の変形を適確に表現していることが明らかとなった。

一方、培養基質としての検討では、小孔径のハニカムフィルムが肝細胞の機能を発現させると報告されているスフェロイドを形成させ、AGの吸着で見かけ上の接着細胞数は増加した。しかし、生細胞数は減少した。この結果より、弱い吸着しか示さないAGは培養中に溶出して細胞接着を阻害することが示された。また、大孔径フィルムでは、一つの孔に一つの細胞が嵌り込む現象が観測され、細胞アレイとしての有用性が示唆されたが、接着細胞数が少なく、この改善が今後実用に向けての課題あることも分った。

研究成果の概要（英文）：

In this study, hemicellulose-adsorbed honeycomb-patterned cellulose films termed as “artificial wood cell wall” were developed to investigate the function of hemicelluloses in wood cell wall and to develop the cell culture for liver cells. Tensile strength and its modulus of the cellulosic films were enhanced by the adsorption of hemicelluloses, xylan and arabinogalactan (AG). Xylan adsorption and its tensile modulus were improved by microwave irradiation. We judged proposed theory for the elucidation of deformation mechanism of wood cross-section upon the mechanical stress from the tensile properties of honeycomb-patterned films. As a result, the theory of bending-stretching model was suitable for the elucidation, and xylan-adsorbed film showed more fitting to the theory.

In addition, we evaluated AG-adsorbed honeycomb-patterned film as a culture substrate for mouse liver cells. The films with small pores were found to be a new type candidate substrate for the culture. On the other hand, the films with larger pores would be suggested to be a plate for cell array, but the number of attached cell was so small. For the industrial application, this problem should be overcome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質化学

キーワード：木質バイオマス

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、「木質バイオマスの包括的利用」を目標に、これまで木質バイオマス成分の新規のリファイナリーシステムの構築と、分離成分の高機能化に取り組み、特に、分離成分を再構築して、樹木・木材の細胞壁構造に由来する特異的機能（軽量高強度や水分通導のための耐水性など）を再現化する材料“人工細胞壁”の創製を最終目的に設定した。この目的を達成するために、先ず、人工細胞壁の基本骨格となる、ハニカム状に孔が配列したハニカムパターン化セルロースの 2

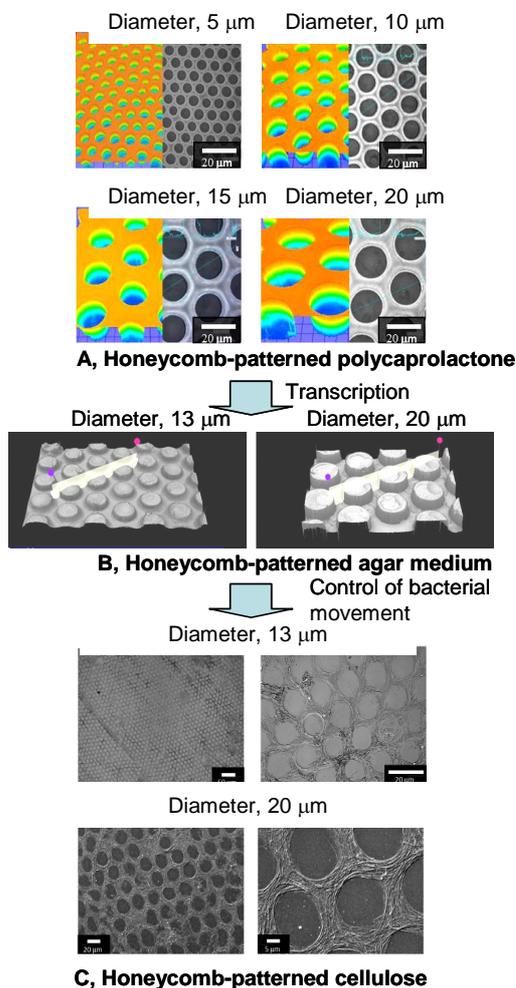


Fig. 1. Fabrication of honeycomb-patterned cellulose (C) as a framework of artificial cell wall. A, 1<sup>st</sup> mold (honeycomb-patterned polycaprolactone); B, honeycomb-patterned agar medium.

種の調製法を確立した。最初の方法は、セルロース II 型のハニカムフィルムを調製する方法で、従来から提案されている水を鋳型とする高分子の自己組織を利用する手法であ

る。他方は、研究代表者らの独自の方法で、I 型のセルロースを産生する酢酸菌の運動をハニカム状寒天培地を用いて制御することで、目的とするセルロース I 型ハニカムパターン化セルロースフィルムを作製する手法である。

これらのハニカムフィルムに単離リグニンを吸着させることで、高湿度条件下で顕著な強度増加が見られることを見出したが、ヘミセルロースの効果については、未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、人工細胞壁の基本骨格となるハニカムパターン化セルロース材料にヘミセルロースを吸着させて、物性の変化を明らかにすると共に、このヘミセルロース吸着ハニカムフィルムを細胞培養基質、または細胞機能探索用培養基質（細胞アレイ）としての有用性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ハニカムパターン化セルロースフィルムの調製

我々が開発した調製法に従い (Fig. 1)、孔径 5~20  $\mu\text{m}$  のセルロース II 型ハニカムパターン化フィルムを調製した。また、孔径 13 および 20  $\mu\text{m}$  のセルロース I 型フィルムも調製した。なお、本研究で用いた第一鋳型は、自己組織化で作製したフィルムをマスキング材として、シリコン基板上にこのフィルムを置き、イオンエッチングして鋭角状の孔をもつシリコンである。

#### (2) ハニカムフィルムへのヘミセルロースの吸着と機器分析

セルロース II 型ハニカムパターン化セルロースフィルムを、カンバとブナのキシラン、およびカラマツから抽出したアラビノガラクトタン水溶液に浸漬した。その後、風乾または、マイクロ波照射を行った。

セルロース I 型ハニカムパターン化フィルムでは、アラビノガラクトタンを吸着させ、高崎量子応用研究所の協力で電子線照射を行った。

両フィルムとも、ヘミセルロース固定化量を測定した後、次の実験を行った。セルロース II 型フィルムでは、3-D 光学顕微鏡で観察しながら引張強度を測定した。

また、アラビノガラクトタンが吸着したフィルムに、5~7 週齢の SD ラットの肝実質細胞を播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  で培養した。培養後

3日目と7日目に培地を交換し、その直後の精細胞の割合を Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて測定した。測定後さらに、測定プレートを洗浄して、ホルマリン固定、オスミウム酸化固定を行い低真空 SEM (日本電子 JSM-5310LV) で細胞の形態を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) セルロース II 型ハニカムフィルムの力学特性に及ぼすヘミセルロースの効果

##### ① ヘミセルロースの吸着量とマイクロ波照射の効果

ブナのキシラン水溶液にハニカムフィルムを 16 時間浸漬し、未吸着のキシランを水洗で除去すると、フィルムの 14% に相当する量の吸着が観測された。水洗前に、マイクロ波処理を行うと吸着量が 43% に増加した。同様に、カンバキシランでも 18% から 32% に増加し、マイクロ波がキシラン吸着を強固にすることが示された。

しかし、アラビノガラクトタンでは、未処理でも 27% 吸着するが、マイクロ波の有意な効果は観測されなかった。後述するように、水洗時間を長くすると、アラビノガラクトタンがフィルムから遊離してきて、アラビノガラクトタンとセルロースの吸着は非常に弱いことが明らかとなった。

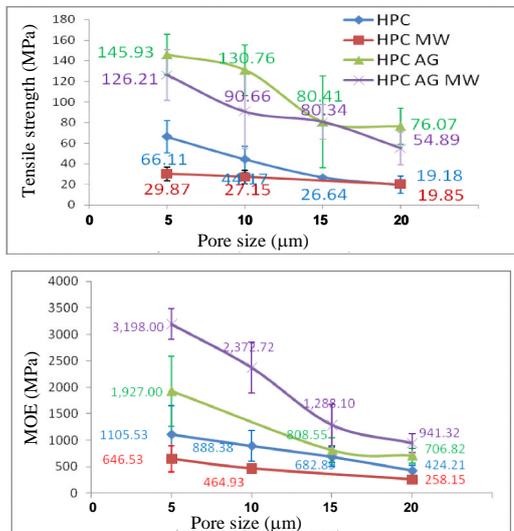


Figure.2. Tensile strength (A) and modulus of elasticity (MOE, B) of arabinogalactan (AG)-adsorbed honeycomb-patterned film of cellulose II. MW stands for microwave treatment.

##### ② 引張強度に及ぼすヘミセルロースの効果

セルロース II 型のハニカムフィルムは孔径が大きくなるに従い、引張強度および弾性率が低下した。これは、フィルム中のセルロース量が低下したことに起因する。このフィルムに、キシラン、アラビノガラクトタン、どちらのヘミセルロースを吸着させても、これら

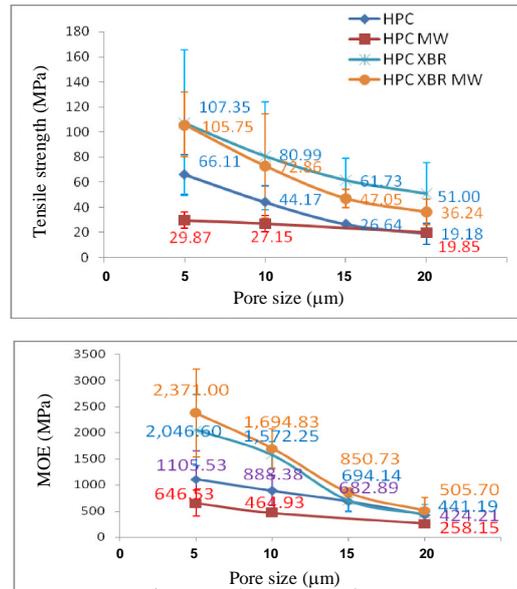


Figure.3. Tensile strength (A) and modulus of elasticity (MOE, B) of birch xylan (XBR)-adsorbed honeycomb-patterned film of cellulose II. MW stands for microwave treatment.

の力学物性は向上した。アラビノガラクトタンでは、マイクロ波処理で力学特性が低下した (Fig. 2)。これは、前述と同様に、マイクロ波がアラビノガラクトタン吸着の促進より、フィルムの構造破壊に働いたことを示す。一方、キシランでは、マイクロ波照射で弾性率が向上した。FT-IR 解析より、セルロースとキシラン間の水素結合形成がマイクロ波照射によって起きていることが示され、この結果、より堅いフィルムに変換されたことが明らかとなった。

##### ③ 木材細胞壁の変形理論の評価

引張試験中のフィルムの変形を 3-D 顕微鏡で観察した結果、Poisson' ratio がほぼ 1 となり、木材小口面の変形と一致した。このことより、ハニカムフィルムの引張試験から細胞壁の変形モデルを検証できると考え、これまで提案されてきた stretching model、bending model および bending-stretching model theory に本実験結果を適用して、それらの妥当性を判断した。

本実験結果が最も高い決定係数 ( $R^2$ ) を与えたのは、bending-stretching model theory であり、セルロースの弾性率を 112.3 GPa と仮定したとき  $R^2=0.89$  となった。松尾らが X 線回折 (Macromolecules 1990) で求めた弾性率と非常に近い値であり、ハニカムパターン化セルロースフィルムが、木材中のセルロースの構造解析の好適なモデルとなることを示唆した。

さらに、キシランが吸着したハニカムフィルムは  $R^2=0.989$  を示し、この時、セルロースの弾性率は 97.1 GPa となった。この値はセ

ルロース II 型の理論弾性値 (160 GPa) の 61% に相当し、非晶領域の推定も可能になった。

以上より、ヘミセルロース吸着フィルムは、木材の荷重変形を解析するのに相応しいモデルとして利用できることが明示された。

(2) アラビノガラクトサン吸着ハニカムパターン化セルロースへの肝実質細胞の接着

孔径制御が容易なセルロース II 型ハニカムパターン化フィルムを用いて、孔径及びアラビノガラクトサン吸着によるマウス肝実質細胞の接着性を、まず、SEM を用いて観察した。この結果、ハニカムの径が小さいほど肝実質細胞は、多数吸着しスフェロイドを形成していた。また、アラビノガラクトサンを吸着させることで、吸着量が増加することが、定性的ではあるが観測され、大孔径フィルムでは細胞が孔に嵌り込む減少が観測された。この結果は、小孔のフィルムは、細胞培養基質として有用であり、また、大孔フィルムは、細胞アレイとしての利用可能性を示唆した。

しかし、この SEM 観察では、吸着した細胞の生死が不明であり、培養基質あるいは細胞アレイとしての有用性を評価するには、実際の生細胞を測定する必要がある。そこで、生細胞数の測定を可能にする Cell Counting Kit-8 を用いて、培養 3 日後と 7 日後の精細胞の数とその形態を観測した。

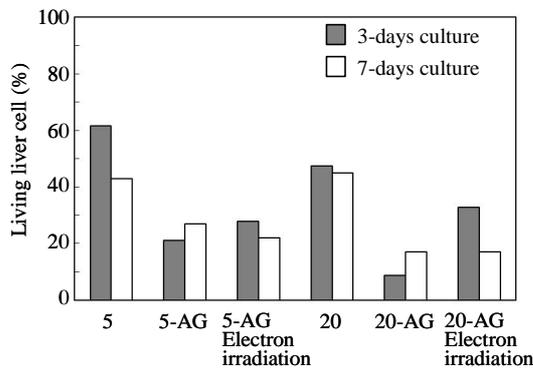


Fig. 4. Ratio of the number of living liver cell on artificial wood cell wall to that on collagen dish as a control.

Fig. 4 に、コントロールに対する生細胞数を示す。コントロールには、肝実質細胞の接着に一般的に使用されるコラーゲンコーティングシャーレを用いた。また、図横軸の数字はセルロース II 型フィルムのハニカム径、AG はアラビノガラクトサン吸着フィルムを表す。孔径 5 μm も 20 μm とともに、AG が吸着することにより、生細胞数は、予想に反して減少した。以前の我々の研究から、AG とセルロースとは親和性が低いことが示されており、したがって、予想外の結果は AG がハニカムフィルムより溶出して、吸着阻害を生じさせたことに起因すると推測された。そこで、より強固な結合を図るために、電子線照射を行っ

た。これは、照射により、AG とセルロースにラジカルを生じさせ、両者のラジカルカップリングにより架橋をしようとする試みである。電子線照射により、若干吸着生細胞数は上昇したが、依然として AG 無しの方が細胞数は多かった。

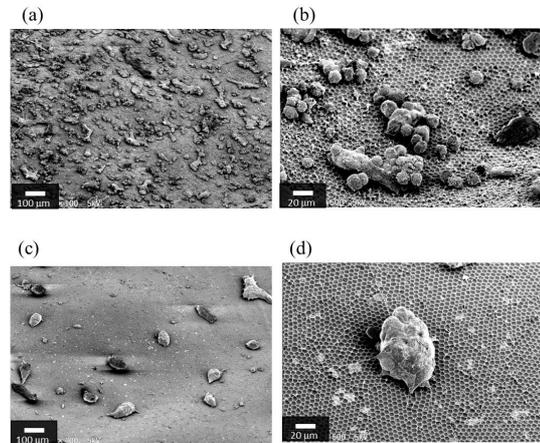


Fig. 5. Cultured liver cell on honeycomb-patterned film of cellulose-II with the diameter of 5 mm. (a) and (b), 3-days culture; (c) and (d), 7-days culture.

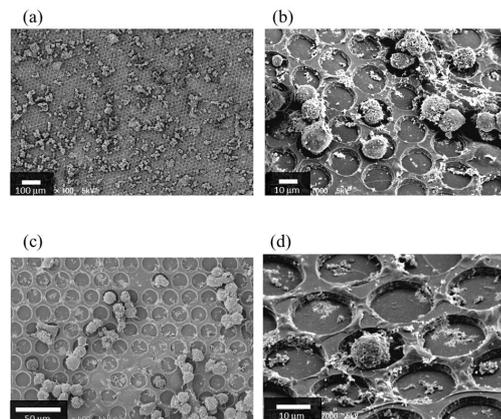


Fig. 6. Cultured liver cell on honeycomb-patterned film of cellulose-II with the pore diameter of 20 μm. (a) and (b), 3-days culture; (c) and (d), 7-days culture.

Fig. 5 に孔径 5 μm、Fig. 6 に 20 μm のセルロース II 型ハニカムフィルムに吸着した肝細胞の形態を示す。図 3 の方が多数の球形細胞が接着しているのが分り、一部の細胞はスフェロイド状の集合体を形成した。7 日の培養では、集合体が更に集まり、立体的に大きな集合体へと変化した。スフェロイドの形状は、肝機能発現に重要とされているので、人工肝細胞への創製に期待が持たれる。一方、20 μm では、個々のハニカムの孔に細胞が埋まっており、DNA チップのような細胞チップへの応用が期待される。

Fig. 7 に、セルロース I 型ハニカムフィルムへ接着した肝細胞の形態を示す。同じハニカム径を用いても、Fig. 5 のような接着形態は

見られず、一般に用いられるコーゲンコートシャーレ上での培養と同様に、細胞が平板上に広がった形態となった。化学構造が同じセルロースでも、結晶構造の違いが、細胞の接着様式に影響を与えることが、本研究で明らかとなった。

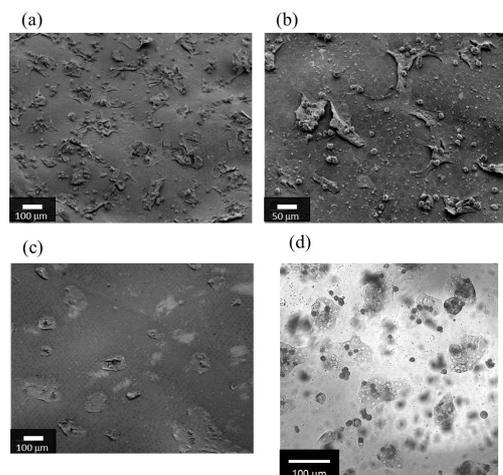


Fig. 7. Cultured liver cell on honeycomb-patterned film of cellulose -I with the diameter of 20  $\mu\text{m}$ . (a) and (b), 3-days culture; (c) and (d), 7-days culture.

以上、本研究の成果を纏めると、

- ①ヘミセルロース吸着ハニカムパターン化セルロースは、木材の荷重変形を解析・理論化するための好適なモデル材料である。
- ②アラビノガラクトンが吸着した小径ハニカムフィルムは、肝実質細胞培養基質として有望視される。一方、大径フィルムは細胞アレイとしての可能性が示唆されたが、実用化には、固定化する細胞数の増加を図る必要性が今後の課題として示された。

## 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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Y. Uraki, Y. Sugiyama, K. Koda, S. Kubo, T. Kishimoto, J. F. Kadla: Thermal mobility of  $\beta$ -O-4-type artificial lignin. *Biomacromolecules*, 査読有, 13 (3), 2012, 867-872. (DOI: 10.1021/bm201772v)
- ② Y. Uraki, Y. Tamai, T. Hirai, K. Koda, H. Yabu and M. Shimomura: Fabrication of honeycomb-patterned cellulose material that mimics wood cell wall formation processes. *Mat. Sci. Eng. C.*, 査読有, 31 (6), 2011, 1201-1208. (DOI: 10.1016/j.msec.2010.11.009)
- ③ Y. Uraki, C. Matsumoto, T. Hirai, Y. Tamai, M. Enoki, H. Yabu, M. Tanaka and M. Shimomura: Mechanical effect of acetic acid

lignin adsorption on honeycomb-patterned cellulosic films. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 査読有, 30(4), 2010, 348-359.

(DOI: 10.1080/02773810902731408)

[学会発表] (計4件)

- ① 浦木康光: 木材バイオマス成分の再構築による人工細胞壁の創製. 日本材料学会北海道支部講演会、札幌、(2010年3月29日) (招待講演)
- ② Y. Uraki, Y. Tasaki, T. B. Bardant, Y. Tamai, T. Hirai, K. Koda, H. Yabu, M. Shimomura: Arabinogalactan-coated, Honeycomb-Patterned Cellulosic Films., 6<sup>th</sup> IUPAC international Symposium on Novel Materials and their Synthesis & 20<sup>th</sup> International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers, Wuhan, China (Oct. 12, 2010) (招待講演)
- ③ Y. Uraki, Y. Tamai, T. Hirai, K. Koda, H. Yabu, M. Shimomura: Fabrication of honeycomb-patterned cellulose material mimicking wood cell wall formation. Proceedings of the COST Strategic Workshop -Principles and Development of Bio-Inspired Materials- pp. 64-65 (2010) Vienna, Austria, (Apr. 15, 2010) (招待講演)
- ④ Y. Uraki, C. Matsumoto, T. Hirai, Y. Tamai, H. Yabu, M. Shimomura: Fabrication of artificial woody cell wall based on honeycomb-patterned bacterial cellulose. International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics -Toward Paradigm Shift for Innovation-, Tokyo, Japan (Oct. 2, 2009). (招待講演)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浦木 康光 (URAKI Yasumitsu)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 90193961

### (2) 研究分担者

玉井 裕 (TAMAI Yutaka)  
北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号: 50281796

幸田 圭一 (KODA Keiichi)  
北海道大学・大学院農学研究院・講師  
研究者番号: 80322840

### (3) 連携研究者

平井 卓郎 (HIRAI Takuro)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 20173205

杉山 淳司 (SUGIYAMA Junji)  
京都大学・生存圏研究所・教授  
研究者番号：40183842