

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19203

研究課題名（和文）新規前処理技術と構造解析法による松かさ開閉運動の機構解明への挑戦

研究課題名（英文）Understanding the mechanism of pine cone opening and closing motion using novel pretreatment techniques and structural analysis

研究代表者

堀川 祥生（Horikawa, Yoshiki）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：90637711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：「松かさ」の開閉機構におけるマトリックス成分の意義を理解するため、新規前処理技術を用いて、その機構解明に取り組んだ。まず、松かさ鱗片の形態を維持したままセルロース成分を除去する化学処理方法を確立した。さらにマクロからミクロにまで至る構造解析を行い、階層構造が維持されていることを確認した。得られた試料を屈曲評価したところ、飽水時は未処理試料と同様であったが、オープン乾燥させると異常なほど湾曲した。続いて再飽水しても乾燥時のままであった。以上の結果から、松かさ鱗片の屈曲はセルロースに加え、マトリックス成分も重要な役割を担っており、屈曲角度および屈曲の再現性を制御していることを強く示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規前処理技術と構造評価によってマトリックス成分の松かさ形態変化への寄与について重要な知見を得た。明確な構造がないマトリックス成分の関与を理解するため、選択的に除去した試料の挙動を解析するという「引き算」によるアプローチは学術的意義が非常に高い。その結果、これまでセルロースの構造特性によって説明されてきた屈曲機構はマトリックス成分も屈曲角と再現性に重要な役割を果たしていることを見出した。松かさという生物材料と水の相互作用によって駆動する天然のアクチュエーターの機構に関する知見はエコフレンドリーな次世代材料開発に弾みをつけるため社会的意義が非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the significance of matrix components in the opening and closing mechanism of pine cone, we have applied a novel chemical treatment technique to elucidate the mechanism. First, we established a chemical treatment method to remove non-cellulose components with maintaining the morphology of pine cone scales. Next, we conducted structural analysis from the macro- to the micro- stage and confirmed that the hierarchical structure was maintained. The bending test has been performed for pine cones. When saturated, it was similar to the untreated samples, but when oven-dried, the sample became significantly curved. The sample remained the same when re-saturated with water as when dried. These results strongly suggest that matrix components also play an important role in the bending of pine cone scales, controlling the bending angle and repeatability.

研究分野：木質科学

キーワード：セルロース マトリックス成分 赤外分光分析 階層構造 水

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる生物は自身の種を存続させるため、一定の生育地に留まることはなく、様々な地へと生活の場を拡大していくことが重要である。しかしながら、植物は動物等とは異なり、自由に移動することが困難であるため、種子や胞子を介して子孫を繁栄させていく。媒介として動物、風、重力といった様々な外的要因を利用して散布するため、それらに応じて種子の形態を変化させてきた。例をあげるとクサノオウやトウゴマは、種子にエライオソームという粘性の付属物を利用してアリを介した種子散布を行う。一方、カエデや一部のマツの種子は翼状となり、風による種子散布を行う。さらに果実の特異的な構造によっても散布効率を上げることが知られている。マツ科マツ属の球果である「松かさ」は種子を遠方へと散布する生存戦略のため湿度に応じて開閉する。すなわち乾燥時に開き、湿潤時に閉じる特性を有し、このような運動は乾湿運動と呼ばれ、種子の放出をより高効率化する。この振る舞いは松かさ鱗片の基部において、セルロースマイクロフィブリル傾角が異なる組織が複層構造を形成することに起因する。維管束組織は一般的な木質細胞壁と同様の構造をしており、細胞長軸に対してある一定の角度を持つヘリックスが主に堆積している。一方で、厚壁組織ではマイクロフィブリル傾角がほぼ  $90^\circ$  方向になっている壁層と  $0^\circ$  方向になっている壁層が交互に堆積しており、前者の方が主に堆積している。そのため、細胞長軸に対して、維管束組織の収縮率は  $1.5\%$ 、厚壁組織の収縮率は  $15\%$  と差があり、その結果、湿度に応じて鱗片が駆動する。このように松か사의運動はセルロースの構造に関する研究がなされてきた。一方、マトリクス成分は組織の強度といった物理的な特性等に限られており、屈曲運動への寄与に関する知見は少なく、議論も展開されていない。

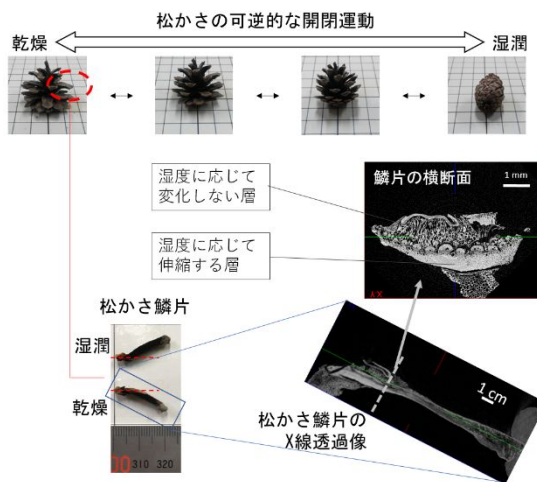


図1 湿度に応じた松か사의開閉運動とそれを制御する組織・細胞構造

## 2. 研究の目的

本研究では松か사의開閉挙動におけるマトリクス成分の役割を解明することを研究目的とした。そのために以下の課題に取り組んだ。

- (1) 新規化学成分分離技術によるマトリクス成分の選択的除去と階層構造評価
- (2) 水分変化に伴う松か사의屈曲挙動評価

## 3. 研究の方法

松かさ試料は東京農工大学府中キャンパスにてアカマツ (*Pinus densiflora*) を採取した。カッターを用いて松かさから鱗片をサンプリングした。化学処理はアルコールシスを行い、エチレングリコールに少量の硫酸を添加した反応溶媒を用いた。これに鱗片を浸漬し、ダイアフラム型真空ポンプで脱気した。次に耐圧管にセットした後、様々な温度で1時間アニリングを行った。得られた試料は茶褐色を呈しており、完全に非セルロース成分を除去するため、亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬させた。試料が完全に脱色するまで繰り返し反応を行った。得られた試料は水で繰り返し洗浄した。

構成成分分析を行うため、得られた試料を凍結乾燥し、全反射減衰(ATR)法を用いた赤外分光分析装置に供した。8回スキャンで分解能が  $4\text{ cm}^{-1}$  の測定条件でスペクトルを取得した。単糖とリグニンの含有率を評価するため、測定試料約  $100\text{ mg}$  を  $72\text{ wt}\%$  硫酸条件下で  $30^\circ\text{C}$ 、1時間の処理を施した。  $3\text{ wt}\%$  硫酸に希釈し、  $120^\circ\text{C}$ 、1時間で処理した後、吸引濾過で溶液と固形画分に分離した。溶液画分について、オートサンプラーが付属した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて単糖の含有量を算出した。算出した含有量から、セルロース、ヘミセルロース、不溶性残渣(リグニンなど酸不溶成分)を計算した。

セルロースの配向ならびに結晶構造特性を理解するため、X線回折実験を行った。2次元のX線繊維回折図パターンからマイクロフィブリル傾角を、一次元のデータからセルロースの結晶性を評価した。

屈曲性の評価は、鱗片試料を方眼紙上にセットし、上部からカメラで撮影した。得られた写真を画像解析ソフトで解析し、屈曲性を評価した。この時、松かさが閉じる方向をプラス、開く方向をマイナスの値として数値化した。

## 4. 研究成果

未処理の松かさ鱗片と比較してアルコールシスした鱗片は黒変していた。アルコールシスした鱗片を漂白処理することで、白い松かさ鱗片の調製に成功した。次に、化学処理を行った鱗片の構成成分を評価するため赤外吸収スペクトルを収集した。未処理ではヘミセルロースのアセチル基に帰属される  $1725\text{ cm}^{-1}$ 、リグニンに帰属される  $1508\text{ cm}^{-1}$  ならびに  $1265\text{ cm}^{-1}$  のバンドに加えて、

多糖に吸着する水に由来する  $1650\text{ cm}^{-1}$  のバンドが観測された。アルコリス 120 で処理した試料は  $1725$ 、 $1650\text{ cm}^{-1}$  のバンドが減少していた。このことから、多糖が減少し、それに伴い、吸着していた水も減少したと解釈できる。一方で、リグニンを含む芳香族化合物にはあまり変化が見られなかった。このことから、アルコリス 120 で処理した松かさ鱗片はヘミセルロースが主に減少した試料であった。アルコリス 150 で処理した試料ではヘミセルロースのバンドに加えて、リグニンに帰属される  $1508$  ならびに  $1265\text{ cm}^{-1}$  のバンドも減少した。しかし、いずれも完全に消失することはなかった。このことから、アルコリス 150 で処理することでマトリックス成分が減少した松かさを得られた。亜塩素酸ソーダ処理に供した白い松かさ鱗片では、ヘミセルロースに帰属されるバンドに加え、リグニンに帰属されるバンドはほぼ完全に消失した。これらの結果は、化学成分分析の結果と矛盾しなかった。以上から、白い松かさ鱗片はマトリックス成分フリーな試料であることが示された。

調製した松かさ鱗片の階層構造が未処理の松かさとは変化していないか確認するため、X線を用いた結晶構造解析を行った。未処理の松かさにおいて、セルロースに典型的なパターンが観測された。化学処理した試料でも同様のパターンが観測されたが、 $150$  のアルコリスした松かさとは白い松かさでは未処理と比べてピークがシャープになった。未処理の結晶化度がアルコリスの処理条件が厳しくなるに従い、増加した。漂白処理によって更に増加した。そして半値全幅は処理条件の厳しさに伴い、減少していたことから、非晶性成分の消失が示された。しかしながら、天然セルロースのパターンや面間隔が変化しなかったことから、化学処理を施しても結晶構造が維持されることが示された。次にX線繊維図をセルロースの配向性を評価した。未処理の松かさ鱗片の先端では、赤道上に強い回折スポットが観測されたが、子午線上には認められなかった。一方で、鱗片の基部では、赤道および子午線上どちらにも強い回折が観られた。これはこれまでの報告と同様、先端と基部において組織が異なることに起因する。白い松かさの先端、基部が未処理と同様のパターンであったことから、白い松かさは未処理と同様のセルロースマイクロフィブリル傾角を維持していることが示された。

松かさの飽水・乾燥・再飽水による開閉挙動を評価した。未処理の松かさでは、飽水時、基部が松かさが閉じる方向(上側)に湾曲したが、乾燥時、松かさが開く方向(下側)に湾曲した。これを再度飽水させたとき、基部は閉じる方向にふたたび湾曲したことから、開閉挙動が湿度に応じて繰り返して引き起こされることが明らかとなった。アルコリス 120 で処理した場合も未処理と同様の傾向が観察された。アルコリス 150 で処理した試料は飽水時、上記の試料と同様だったが、乾燥させると驚くべきことに松かさ鱗片が開く方向に著しく湾曲した。さらに、再飽水しても乾燥時に湾曲した状態のままであり、変化が認められなかった。白い松かさもアルコリス 150 で処理した松かさと同様の挙動を示した。

松かさの開閉挙動が湿度によってどのような変化を及ぼすかより詳細に理解するため、調湿し、その際の振る舞いを数値化した。松かさが閉じる方向の角度をプラス、松かさが開く方向をマイナスとした。最初の飽水時では、全ての試料で松かさが閉じる方向に湾曲した。相対湿度  $86.1\%$  で調湿後、未処理とアルコリス 120 で処理した松かさとは比べて、アルコリス 150 で処理した松かさとは白い松かさは異常な屈曲性を示していた。これを再度飽水した場合、未処理とアルコリス 120 で処理した松かさは閉じる方向に湾曲したが、アルコリス 150 で処理した松かさとは白い松かさは湾曲しなかった。その後、調湿と飽水を繰り返すと、未処理とアルコリス 120 の松かさは湿度に応じた開閉挙動を示した。一方で、アルコリス 150 で処理した松かさとは白い松かさは開く方向に湾曲した後、再度閉じる方向に湾曲することはなかった。相対湿度は周辺環境であるため、構成成分が異なる松かさでは相対湿度が同じでも含水率が異なる可能性が挙げられる。アルコリスした松かさの方が未処理に比べて平衡含水率は低かったが、未処理の松かさでも相対湿度が  $86.1\%$  で平衡含水率が約  $16.9\%$  だった。クラフトパルプでは、セルロースマイクロフィブリル同士による共結晶化は含水率が  $31 - 70\%$  の時に起こることが知られている。そして  $11 - 31\%$  にはヘミセルロースの収縮に伴う結晶、共結晶化が起こることによって角質化が引き起こされる。調湿後では含水率が  $15\%$  より低かったことから、アルコリス 150 で処理した松かさとは白い松かさでは、この二つの要因によって角質化が起き、不可逆的な開閉挙動が起きたと考えられる。

本研究では松かさの開閉挙動にマトリックス成分がどのように作用しているか明らかにするため、階層構造が維持しながら、特定成分を選択的に除去した試料調製法を確立した。得られた松かさ鱗片を評価することで、屈曲挙動に寄与する重要な知見を得た。明確な構造がないマトリックス成分の関与を理解するため、マトリックス成分そのものを抽出するのではなく、選択的に除去した試料の挙動を解析するという「引き算」によるアプローチは学術的意義が非常に高い。また、松かさという生物材料と水の相互作用によって駆動する天然のアクチュエーターの機構に関する知見は環境に優しい次世代材料開発に弾みをつけるため社会的意義が非常に大きい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Horikawa Y.	4. 巻 68
2. 論文標題 Structural diversity of natural cellulose and related applications using delignified wood	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Rheology	6. 最初と最後の頁 683 692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s10086-022-02061-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hozumi H., Nohara Y., Horikawa Y., Shikata T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Rigid rod particle like viscoelastic responses of poly(vinylidene fluoride) in N-methylpyrrolidone solution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 683 692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1122/8.0000610	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Hirano Seiya, Kurei Tatsuki, Nakaba Satoshi, Funada Ryo, Horikawa Yoshiki	4. 巻 30
2. 論文標題 Elucidation of alcoholysis for the preparation of lignin-free wood sections from <i>Cryptomeria japonica</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 6589 ~ 6600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10570-023-05291-9	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Kurei Tatsuki, Hirano Seiya, Nakaba Satoshi, Funada Ryo, Horikawa Yoshiki	4. 巻 58
2. 論文標題 Anatomical and compressive characterization of <i>Cryptomeria japonica</i> hydrolyzed with phosphoric acid for lignin residue utilization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Materials Science	6. 最初と最後の頁 11680 ~ 11696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10853-023-08753-4	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kurei Tatsuki, Sakai Shunsuke, Nakaba Satoshi, Funada Ryo, Horikawa Yoshiki	4. 巻 259
2. 論文標題 Structural and mechanical roles of wood polymer assemblies in softwood revealed by gradual removal of polysaccharides or lignin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 129270 ~ 129270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2024.129270	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Saiki Erika, Iwase Hiroki, Horikawa Yoshiki, Shikata Toshiyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Structure and Conformation of Hydroxypropylmethyl Cellulose with a Wide Range of Molar Masses in Aqueous Solution Effects of Hydroxypropyl Group Addition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 4199 ~ 4207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.3c00517	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nakagawa Daiki, Saiki Erika, Horikawa Yoshiki, Shikata Toshiyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Rigid Rod-like Viscoelastic Behaviors of Methyl Cellulose Samples with a Wide Range of Molar Masses Dissolved in Aqueous Solutions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 466 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules29020466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 平野聖也、暮井達己、中西千聡、堀川祥生
2. 発表標題 松かさの開閉挙動に及ぼすマトリックス成分の機能解析
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 暮井達己、酒井俊輔、堀川祥生
2. 発表標題 酸処理による脱多糖や脱リグニンを施したスギ材の解剖学的特徴と力学特性に関する研究
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井俊輔、暮井達己、平野聖也、半 智史、船田 良、堀川祥生
2. 発表標題 針葉樹材の圧縮特性とそれに寄与する組織・細胞構造および化学成分評価
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野聖也、暮井達己、堀川祥生
2. 発表標題 松かさの開閉機構の解明を目指したマトリックス成分の特性解析
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 暮井達己、半 智史、船田 良、堀川祥生
2. 発表標題 脱多糖・脱リグニン木材からみた圧縮負荷に対する木質高分子の応答性
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井俊輔、暮井達己、平野聖也、半 智史、船田 良、堀川祥生
2. 発表標題 木材の圧縮特性とそれに寄与する組織・細胞構造ならびに化学成分評価
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 WEI XIAOYI、暮井達己、平野聖也、小園拓馬、堀川祥生
2. 発表標題 アルコリスがスギ材の早材・晩材部のマトリックス成分に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野こころ、暮井達己、平野聖也、安藤恵介、堀川祥生
2. 発表標題 脱リグニン処理を施した高密度木材の階層構造評価 および圧縮挙動の観察
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野聖也、暮井達己、中西千聡、堀川祥生
2. 発表標題 松かさの開閉挙動に及ぼすマトリックス成分の機能解析
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 暮井達己、酒井俊輔、堀川祥生
2. 発表標題 酸処理による脱多糖や脱リグニンを施したスギ材の解剖学的特徴と力学特性に関する研究
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井俊輔、暮井達己、平野聖也、半 智史、船田 良、堀川祥生
2. 発表標題 針葉樹材の圧縮特性とそれに寄与する組織・細胞構造および化学成分評価
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野聖也、暮井達己、堀川祥生
2. 発表標題 松かさの開閉機構の解明を目指したマトリックス成分の特性解析
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 暮井達己、半 智史、船田 良、堀川祥生
2. 発表標題 脱多糖・脱リグニン木材からみた圧縮負荷に対する木質高分子の応答性
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 酒井俊輔、暮井達己、平野聖也、半 智史、船田 良、堀川祥生
2. 発表標題 木材の圧縮特性とそれに寄与する組織・細胞構造ならびに化学成分評価
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 WEI XIAOYI、暮井達己、平野聖也、小園拓馬、堀川祥生
2. 発表標題 アルコリスがスギ材の早材・晩材部のマトリックス成分に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡野こころ、暮井達己、平野聖也、安藤恵介、堀川祥生
2. 発表標題 脱リグニン処理を施した高密度木材の階層構造評価 および圧縮挙動の観察
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 俊輔、暮井 達己、平野 聖也、半 智史、船田 良、堀川 祥生
2. 発表標題 針葉樹材および広葉樹材の圧縮特性とそれに寄与する組織・細胞構造ならびに化学成分評価
3. 学会等名 セルロース学会第30回年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsuki Kurei, Yoshiki Horikawa
2. 発表標題 Chemical purification of cellulose from lignocellulosic biomass without heating process
3. 学会等名 The 5th International Cellulose Conference [ICC 2022+1] (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Xiaoyi Wei, Tatsuki Kurei, Seiya Hirano, Takuma Kozono, Yoshiki Horikawa
2. 発表標題 Effects of alcoholysis on the matrix composition of earlywood and latewood in Japanese cedar ( <i>Cryptomeria japonica</i> )
3. 学会等名 The 5th International Cellulose Conference [ICC 2022+1] (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 俊輔、宮林 真海、津島 梨乃、半 智史、船田 良、暮井 達己、堀川 祥生
2. 発表標題 異なる組織・細胞構造の三樹種からなる「白い広葉樹材」の最適な調製方法
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 安田 祐基、宮林 真海、暮井 達己、半 智史、船田 良、堀川 祥生
2. 発表標題 脱リグニン処理を施したシダレザクラの枝における構成成分と形態変化の関係
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 暮井 達己、宮林 真海、半 智史、船田 良、堀川 祥生
2. 発表標題 仮道管細胞壁の表面からみるAlcoholysisの脱リグニン機構
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 WEI XIAOYI、暮井 達己、堀川 祥生
2. 発表標題 スギ材(Cryptomeria japonica)が低温のWise処理で促進される脱リグニン反応の新たな展望
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分 担 者	四方 俊幸  (Shikata Toshiyuki)  (10178858)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授   (12605)	

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
---------	---------