

平成 21年 5月 15日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380100

研究課題名（和文） 樹木細胞壁の二次壁構造を模倣したセルロース材料の創製

研究課題名（英文） Creation of cellulosic materials mimicking secondary wall structure in tree cell wall

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：

樹木細胞壁の二次壁の特徴は、他の壁組織に比べ多量に存在するリグニンとその化学構造である。本研究では、二次壁模倣材料の創出を目的に、二次壁リグニン模倣高分子を創製して、その物性を明らかにした。さらに、ハニカムパターン化セルロースにリグニンを吸着させて二次壁模倣セルロース材料を創製して、その物性解析からリグニンが高湿度における細胞壁の強度低下を抑制することを見出すと共に、木材成分のみで高強度材料を創出できることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2007年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・ 林産科学・木質工学

キーワード：接着・木質材料、人工細胞壁、セルロース、人工リグニン、リグニン、

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の浦木は、平成15～17年度に科学研究費補助金基盤研究A-2「細胞壁の構築過程を模倣した人工細胞壁の創製」の助成を受けて、樹木細胞壁の形成過程の解明と共に、人工細胞壁を創製の基本骨格となるハニカムパターン化セルロースフィルムの調製法を二種開発した。これらの調製法は、セルロースI型及びII型の結晶構造を有するフィルムの調製法であり、セルロースII型のフィルムは、下村ら（東北大多元研）が開発した方法の応用することで、達成できた(1,2)。一方、セルロースI型は、ハニカム鑄型を用

いてセルロース産生菌の運動性を制御することで得られ、高分子科学と微生物工学を融合させた方法(3)であった。

このハニカムパターン化フォームにヘミセルロースおよびリグニンを堆積させることで、完全な人工細胞壁が創出できると考えられ、さらに、堆積過程におけるフィルムの物性を測定することで、細胞壁構成成分の細胞壁への物理的寄与について解明できると考えられた。これらの背景を元に、本研究を始めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、樹木細胞壁の中で特に存

在量が多い二次壁の構造を模倣した材料の創出であり、二次壁に特徴的な以下の項目について検討することとした。

第1点は、二次壁中のリグニンの物性解明である。このリグニンは他の組織のリグニンに比べ β -O-4結合に富むという特徴あり、 β -O-4結合のみで形成されるリグニンモデルを開発することで、物性解明が進み、その成果をフィードバックすることで、より完成度の高い二次壁模倣材料が調製できると考えた。そこで、まず、 β -O-4結合のみで形成されているリグニンモデル化合物(人工リグニンポリマー)の調製を試み、得られたモデル化合物の分子運動解析を行った。

第2点は、細胞壁の力学的強度に与えるリグニンの寄与の解明である。二次壁リグニンは、細胞間層等の他の部位に比べ濃度は低いが、その重量は最も多いので、細胞壁の力学的強度に与える影響は大きいと考えられる。この効果を検証するために、リグニン吸着八ニカムパターン化セルロースフィルムの調製して、*in vitro*でのリグニンの寄与を検討した。

3. 研究の方法

(1) β -O-4結合のみからなる人工リグニンポリマーの合成と物性解明

C6-C2型人工リグニンポリマー(I)の合成

図1に示すように、アセトバニロンを出発物質として4段階の反応で目的物を合成した。

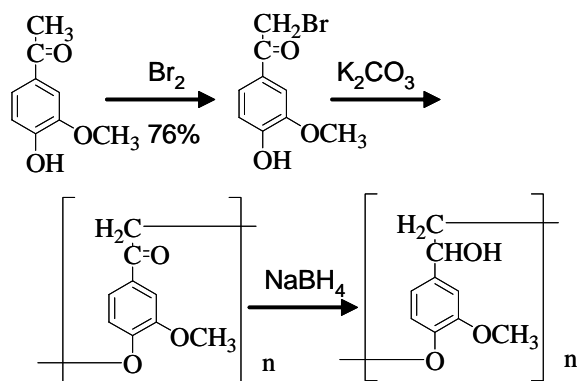


図1. C6-C2型人工リグニンポリマーの合成

C6-C3型人工リグニンポリマー(II)の合成

図2に示すように、アセトバニロンを出発物質として6段階の反応で目的物を合成した。また、次の分析用にこのポリマーのアセテートも合成した。

熱機械分析

人工リグニンポリマーIおよびIIを約10mgを所定のアルミニウムの容器に入れ、試料に5gの荷重を架けながら、室温から約300まで10/minの昇温速度で加熱して、体積変化を測定した。

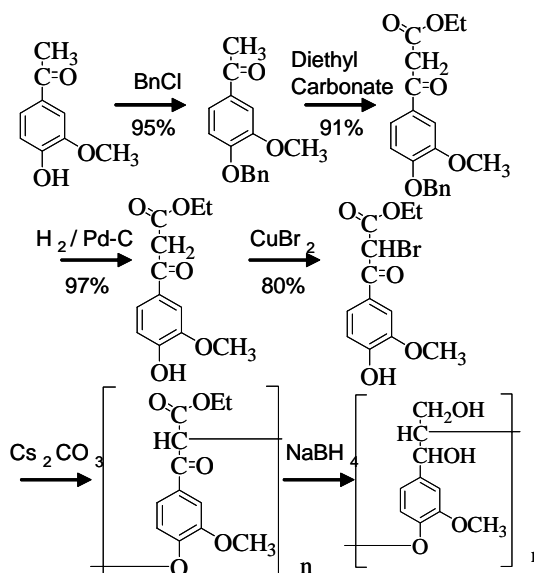


図2. C6-C3型人工リグニンポリマーの合成

温度可変 FT-IR 測定

ポリマーIおよびIIの溶液をIR測定用NaCl板に滴下して、溶媒を溜去させた。このNaCl板を、図3に示す新たに設計・作成した温度制御可能な測定セルに設置して、2.5ずつ昇温させてスペクトルを測定した。

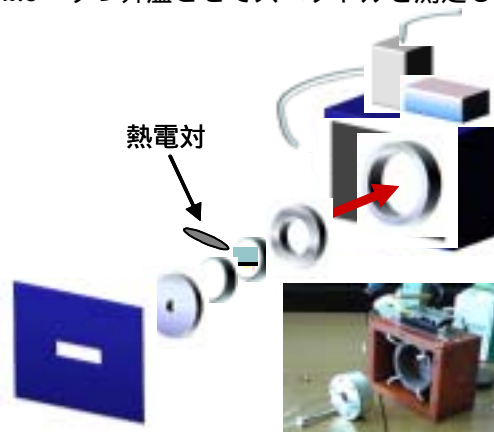


図3.作成した温度可変FT-IR用測定セル

(2)リグニン吸着八ニカムパターン化セルロースフィルムの調製

第一八ニカム鑄型の調製

ポリカプロラクトンとアクリルアミド系両親媒性高分子のクロロホルム溶液に、水蒸気を噴霧しながら溶媒を自然蒸発させることで、八ニカムの六角形状が凸(山脈状)の八ニカムパターン化フィルム(第一鑄型)を得た。

第二及び第三八ニカム鑄型の調製

第一鑄型にポリジメチルシロキサン(PDMS)の粘稠液を硬化剤と共に流し込み、室温でPDMSを48時間硬化させた。PDMSを鑄型から剥がし、六角形状が凹(溪谷状)の第二鑄型を得た。さらに、第二型にPDMSを流延させて、硬化により第三鑄型(山脈状)

を得た。

セルロース II 型ハニカムパターン化フィルムの調製

上記の第二鋳型をセルローストリアセテートのクロロホルム溶液に押し付け、クロロホルムを自然留去して、ハニカムフィルムを得た。このフィルムを鋳型から剥がし、NaOCH₃で脱アセチル化して、セルロース II 型ハニカムパターン化フィルムを得た。

セルロース I 型ハニカムパターン化フィルムの調製

第三鋳型を寒天の熱水溶液に押し付け冷却した。凝固した寒天を鋳型から剥がし、ハニカムパターンを渓谷状に持つ培地を作成した。この培地上で、酢酸菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) を相対湿度 90%、90%CO₂ 雰囲気下で培養した。

ハニカムパターン化セルロースフィルムへのリグニンの吸着

常圧酢酸パルプ化法(4)でシラカンバより単離したリグニンを NaOH 水溶液に溶解させ、この溶液にハニカムパターン化セルロースフィルムを1晩浸漬した。その後、フィルムを水洗して、以下の実験に供した。

フィルムを臭素雰囲気下に 24 時間放置して臭素化を行い、SEM-EDX で臭素の分布を調べ、リグニンの吸着部位を推定した。

フィルムの引張強度

微小フィルムの引張試験を行うために、試験機の設計を行い、製作を業者に委託した。この試験機を用いて、通常状態(相対湿度 50%、温度 23)と高温状態(相対湿度 90%、温度 30)での測定を恒温恒湿室にて行った。

4. 研究成果

(1)人工リグニンを用いた二次壁リグニンの物性解明

二次壁リグニンはβ-0-4 結合に富むといわれている。この結合構造が細胞壁の物性に与える影響を明らかにする目的で、β-0-4 結合のみで形成されている人工リグニンポリマーを合成して、熱挙動を調べた。合成したポリマーは、天然リグニンの基本構造であるフェニルプロパノイドの C6-C3 型ポリマー(II)と、γ位のヒドロキシメチル基がない C6-C2 型ポリマー(I)である。

ポリマーIIはポリマーIより低温で熱分解を始め、熱に不安定であることが示された(表1)。これは、200 以上の温度で脱ホルムアルデヒド反応が進行した結果と推定した。

また、熱機械分析および示差走査熱量分析から、分子運動性の指標となるガラス転移温度は、ポリマーIの方が低い温度を示し(表1)、熱運動性に富むことが示唆された。さらに、ポリマーIは、図4に示すように熱機械分析において二段階の体積変化を示し熱溶

融性を持つことが明らかとなったが、ポリマーIIは1段階の体積変化しか示さず熱溶融しないことが分かった。このことより、C6-C3 型の天然リグニンは、熱運動性がかなり抑制されていることが明らかとなった。

この低い運動性の原因を解明するために、表1.人工リグニンポリマーの熱分解温度(Td)とガラス転移温度(Tg)

試料名	Td (°C)	Tg (°C)
C6-C2型	302	93
C6-C3型	263	111
Fir-MWL	260	143

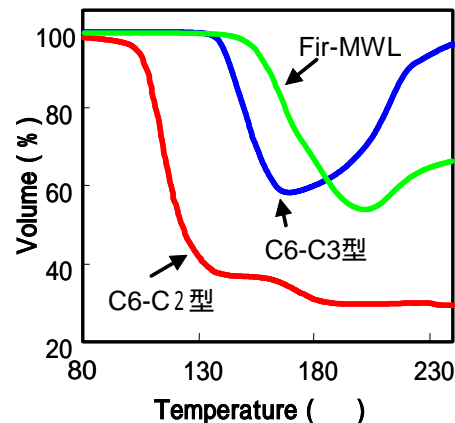


図4.人工リグニンポリマーの熱機械分析

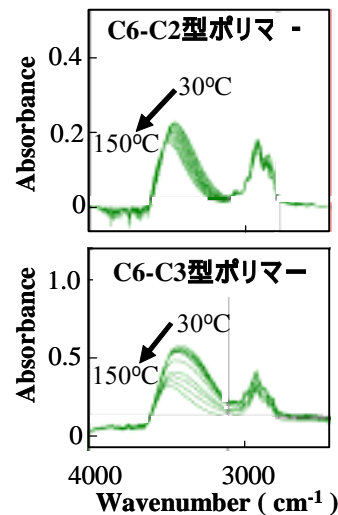


図5.人工リグニンの温度可変FT-IRスペクトル

温度可変 FT-IR 測定を行った(図5)。C6-C2 型のポリマーIは、3000 cm⁻¹ 以上の水酸基の最大吸収バンドが1次的に高波数側にシフトするのに対し、C6-C3 型のポリマーIIでは、ガラス転移温度で屈曲点が存在する二段階のシフトを示した(図6)。このことは、ポリマーIIでは、2 種の水素結合が存在することを示唆している。ポリマーIIの水酸基を保護したアセテートが熱機械分析により熱溶融

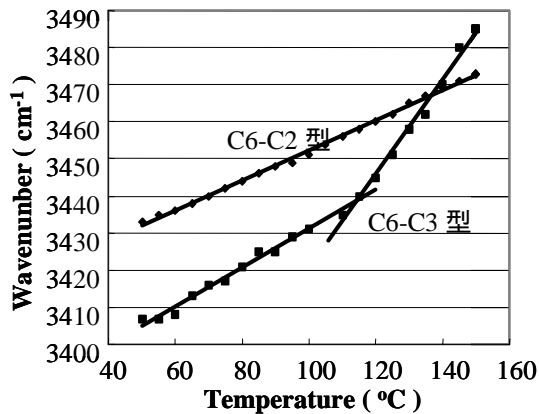


図6. 人工リグニンの水酸基バンドの吸光最大波長

性を示すことが明らかとなったことから、ポリマーIIのいずれかの水酸基は、分子運動を抑制する分子間水素結合に参与することが推定された。ポリマーIとIIの構造的差異は、 γ 位の水酸基の有無であるために、 γ 位の一級水酸基が分子間水素結合を形成し、リグニンの分子運動を抑制していることが明示された。研究当初は、二次壁リグニンが直鎖状の β -0-4結合に富むためにフレキシブルな構造であると想定していたが、本研究から、このリグニンは、温度変化による木材の寸法変化を抑制する成分として機能することが示唆された。

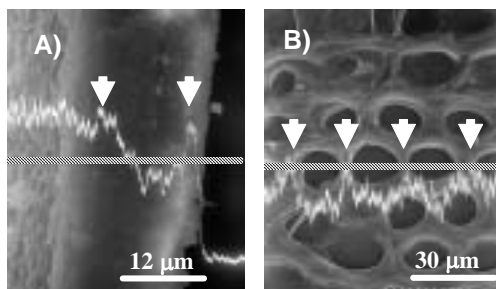


図7. 臭素化した平滑フィルム(A)とセルロースI型のハニカムフィルム(B)のSEM写真
中央の線は、臭素濃度を測定した領域。矢印がついた線は、臭素濃度。

(2) リグニン吸着ハニカムパターン化セルロースフィルムの特性

吸着リグニンの分布

図7にリグニンを吸着させた無孔の平滑フィルムとハニカムフィルムのSEM-EDX像を示す。図中の直線は、臭素の測定位置を示し、ジグザグ線は臭素濃度、即ちリグニンの分布量を示している。平面フィルムのEDX像より、リグニンはフィルム表面にのみ吸着し、内部に侵入していないことが示された。ハニカムフィルムでも空隙(孔)と空隙(孔)の間のみリグニンが分布していた。また、Klason法により吸着したリグニン量を測定した結果、フィルム総重量に対し、リグニン量は30%であった。この量は、針葉樹のリグニン量と一致

する。

樹木中のリグニンは、細胞間層において最も濃度が高く、その後細胞壁外層の一次壁で濃度が高い。また、二次木部細胞の殆どが細胞質を喪い空洞化していることを考慮すると、本研究で開発したセルロースI型のリグニン吸着ハニカムフィルムは、高度に細胞壁構造を模倣した材料と見做せる。

微小フィルム用引張試験機的设计と製作

ハニカムパターン化フィルムの厚さは、現状では5 μ mと薄く、また、第一鑄型において、直径5 cm程度の円形にしか孔径が均一な領域が得られないために、ハニカムフィルムの力学特性評価には、3 cm四方の切片しか利用できない。そこで、この微小試料にも適用できる引張試験機的设计と製作を行った。

设计のための条件として、幅5 mm、試料長1 cm程度の試験片でも測定可能、歪を10 μ mのオーダー(1 cmの試験片長で0.1%の歪)で測定可能で、歪を可視化する、応力を50 mgのオーダーで測定可能、を設定した。この条件を基に设计し、図8に示す引張試験機を製作した。

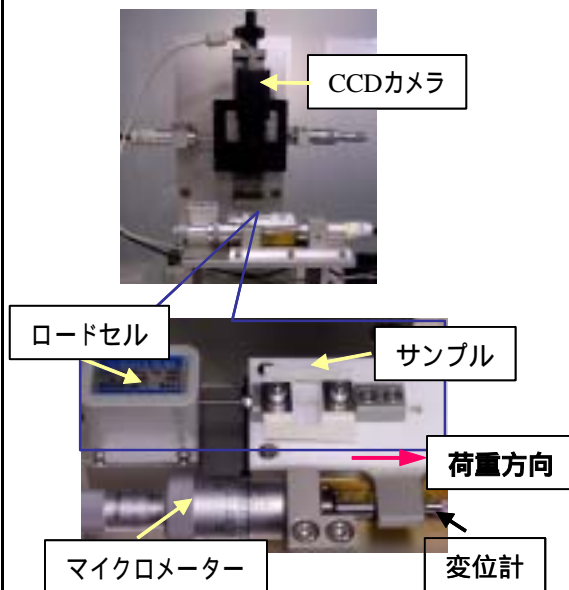


図8. 微小フィルム用に制作した引張試験機

この試験機では、応力をマイクロメーターで負荷して、歪測定を歪計と、可視化を兼ねたCCDカメラで行うようにした。製作段階で入手できるCCDカメラは、200万画素しかなく、マイクロメーターオーダーの測定には不適であることが製作後判明したが、画素数の多い最近のカメラでは、この点が克服できることが示されている。また、本試験機の特徴は、試料を水平応力で引張る点であり、自重で切断されるような弱いフィルムでも測定可能であり、種々の試料に対応できる。

ハニカムフィルムの力学特性

1) ハニカムの孔径とフィルム強度

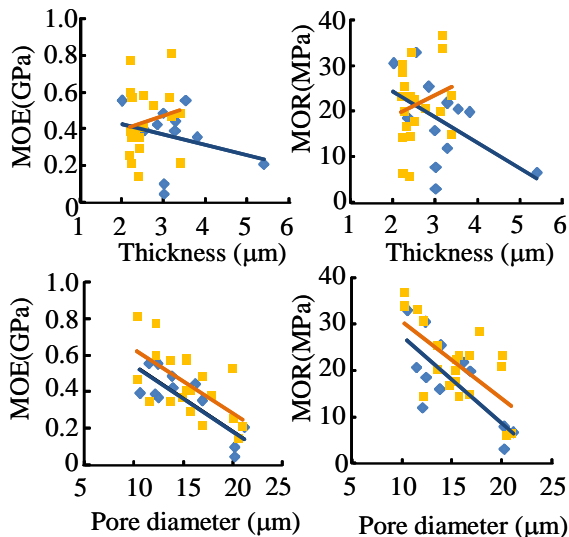


図9. セルロースII型のハニカムパターン化フィルムの通常状態における引張強度
青色はリグニン未吸着、橙色はリグニン吸着。

表2.セルロースII型ハニカムパターン化フィルムの力学特性

	MOE (GPa)	R ² (厚さ)	R ² (孔径)	
リグニン未吸着フィルム	0.36 ±0.16	0.09	0.40	
リグニン吸着フィルム	0.44 ±0.18	0.03	0.67	

	MOR (MPa)	R ² (厚さ)	R ² (孔径)	伸び率 (%)
リグニン未吸着フィルム	17.9 ±8.99	0.27	0.57	14.0
リグニン吸着フィルム	21.0 ±8.41	0.05	0.43	12.1

ハニカムの孔径制御が容易なセルロースII型のハニカムフィルムを用いて、孔径と引張強度との関係を調べた。図9及び表2に示すように、ハニカムフィルムの引張強度は、フィルムの厚さには依存せず、ハニカムの孔径が小さくなるほど減少した。このことは、フィルム中に存在するセルロース量に強度が依存することを示している。この物性は、ハニカム構造が軽量高強度という特徴に反しているように思われるが、一般に、ハニカムフィルムは、フィルム面に対して垂直な応力に対し強く、面に平行な応力には弱いという特徴があり、このフィルムにおいてもその特性は維持されている。さらに、この結果は、木材が水平応力に弱いこととも一致する。引張強度に及ぼすリグニンの効果

2)引張強度に及ぼすリグニンの効果

図3及び表2に、リグニンを吸着させたフィルムの強度も一緒に掲載した。リグニンを吸着したフィルムはヤング率(MOE)、破壊応力(MOR)とも上昇している。この結果は、リグニンがセルロースの力学強度向上に寄与にしていることを示唆している。

樹木セルロースと同じ結晶構造を持つセルロースI型のハニカムフィルムにおいても、同様な測定を行い、ハニカムフィルムと無孔の平滑フィルムの物性の違いを検討した。測定は通常状態と高湿度状態で行った。リグニンの吸着により平滑フィルム、ハニカムフィルム共にMOEとMORが上昇して、リグニンがセルロースI型の構造も強化することが確認できた。また、湿度条件の異なる測定から、ハニカムセルロースは高湿度で顕著に引張強度が低下する現象が観測された(図10)。しかし、リグニン吸着ハニカムフィルムでは、MORが高湿度で若干低下したが、吸着前の通常状態より依然として高く、MOEは殆ど変化しなかった。以上のことから、リグニンは、水への親和性の高いセルロースに疎水性を付与して、力学強度の低下を抑制する機能があることが、本研究により明らかとなった。樹木中においても、リグニンが同様な機能を果たしていると推定されていたことから、このハニカムパターン化セルロースは、樹木構成成分の機能を *in vitro* で検証する好適なモデルになることが示され、人工細胞壁と呼ぶに相応しい材料であることが示された。

また、本研究の成果として、木材成分のみで高強度のハニカムフィルが調製可能なことも明らかとなった。

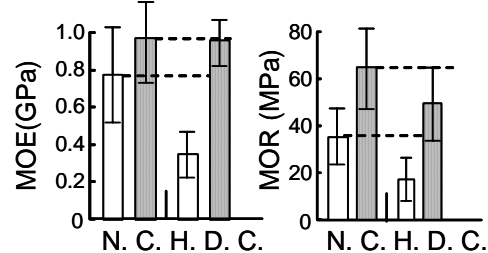


図10. セルロースI型ハニカムフィルムの通常条件(N.C.)及び高湿度条件(H.D.C.)における引張強度。
□, リグニン未吸着;
■, リグニン吸着フィルム

【参考文献】

- (1) T. Nishikawa, M. Nonomura, et. al., *Langmuir* 19, 6193-6201 (2003).
- (2) J. Nemoto, Y. Uraki, et. al., *Bioresource Technology*, 96(17), 1955-1958 (2005).
- (3) Y. Uraki, *Cellulose Communications*, 12(4), 170-173 (2005).
- (4) 浦木康光, 佐野嘉拓, 笹谷宜志, *紙パ技協誌*, 45(9), 1018-1024 (1991).

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 8 件)

T. Kishimoto, Y. Uraki and M. Ubukata: Synthesis of β -O-4-type artificial lignin polymers and their analysis by NMR spectroscopy. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6(16), 2982-2987 (2008). 査読有

T. Kishimoto, Y. Uraki and M. Ubukata: Synthesis of Bromoacetophenone Derivatives as Starting Monomers for β -O-4 Type Artificial Lignin Polymers. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 28(2), 97-105 (2008). 査読有

Y. Uraki, K. Suzuki and M. Ubukata: Polymerization of coniferyl alcohol by chain reaction. Another reaction for lignin formation. *Cellulose Chemistry and Technology*, 41(9-10), 505-509 (2007). 査読有

Y. Uraki, J. Nemoto, H. Otsuka, Y. Tamai, J. Sugiyama, T. Kishimoto, (他 4 名): Honeycomb-like architecture produced by living bacteria, *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 1-6 (2007). 査読有

Y. Uraki, A. Nakamura, T. Kishimoto and M. Ubukata: Interaction of hemicelluloses with monolignols. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 27(1), 9-21 (2007). 査読有

T. Kishimoto, Y. Uraki and M. Ubukata: Chemical synthesis of b -O-4 type artificial lignin. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4(7), 1343-1347 (2006). 査読有

Y. Uraki, J. Nemoto and Y. Sano: A novel preparation of microcast for wood micromorphology using polydimethylsiloxane without digesting cell wall. *Journal of Wood Science*, 52(2), 163-166 (2006). 査読有

Y. Uraki, Y. Usukura, T. Kishimoto and M. Ubukata: Amphiphilicity of lignin-carbohydrate complex. *Holzforschung*, 60(6), 659-664 (2006). 査読有

[学会発表](計 5 件)

C. Matsumoto, Y. Uraki, T. Hirai, (他 4 名): Mechanical properties of honeycomb-patterned cellulosic films. *2nd International Cellulose Conference*, Tokyo, Japan, Oct. 22, 2007.

T. Kishimoto, Y. Uraki and M. Ubukata: Synthesis of β -O-4 type artificial lignin polymers and their properties. *14th International Symposium of Wood, Fiber, Pulping Chemistry*, Durban, South Africa, Jun. 26, 2007.

C. Matsumoto, Y. Uraki, Y. Tamai, M. Ubukata, T. Hirai and M. Enoki: Fabrication of honeycomb-patterned regenerated and bacterial celluloses. *14th International Symposium of Wood, Fiber, Pulping Chemistry*, Durban, South Africa, Jun. 26, 2007.

Y. Uraki, C. Matsumoto, T. Kishimoto, M. Ubukata, H. Yabu, M. Tanaka and M. Shimomura: Fabrication of honeycomb-patterned polysaccharides. *23rd ACS National Meeting*, Chicago, USA., Mar. 29, 2007.

Y. Uraki, C. Matsumoto, Y. Tamai, T. Kishimoto, (他 4 名): Patterned cellulose films. *3rd International Symposium on Emerging Technologies of Pulping and papermaking*, Guanzhou, China, Oct. 22, 2006.

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: β -O-4-type artificial lignin polymer and its preparation.

発明者: T. Kishimoto, Y. Uraki, M. Ubukata

種類: 国際特許

出願番号: 国際公開番号 WO 2006/092883 A1

公開日: 2006 年 9 月 8 日

国内外の別: 国際

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

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

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

岸本崇生 (KISHIMOTO TAKAO)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号: 60312394 (H18 のみ分担)

(3) 連携研究者

杉山淳司 (SUGIYAMA JUNJI)

京都大学・生存研・教授

研究者番号: 40183842 (H18 は分担者)