

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00433

研究課題名（和文）細胞壁構成全成分の分子特性に関する統合的研究 -バイオマスの高機能化のために-

研究課題名（英文）Integrated Study on Molecular Characterization of All Cell Wall Components - Functionalization of Biomass

研究代表者

上高原 浩 (Kamitakahara, Hiroshi)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10293911

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 28,900,000円

研究成果の概要（和文）：独自開発した「木質三成分分離技術」について、その原理を明らかにするため実験を行なった。具体的には、アルキル化試薬の炭素鎖数の違いや、針葉樹、広葉樹、草本植物の違いが分離に与える影響をNMRを用いた詳細な化学構造分析、DSCを用いた熱特性解析により検討した。その結果、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの分離には、分子量および分子の親水性-疎水性バランスの違いが大きな影響を与えていることが明らかになった。また、木材から誘導した化合物でしか得られない微量の混合物が熱特性や力学特性に好影響を与えることも明らかになった。更に、木質成分の特性を生かし、樹皮抽出成分も含め多様な機能性材料の合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱炭素社会の構築は喫緊の課題であり、再生可能資源である植物材料の重要性が高まっている。石油資源を代替すべく、生分解性を有する植物資源の有効活用に関する研究を推進できれば、海洋プラスチック問題など環境汚染問題の解決にも繋がり社会的意義が大きい。木材から一挙に3種類の高分子誘導体を合成する方法を様々な植物種に適用できる事を明らかにした点、異なる植物種から得られる材料の物性に明らかな違いが発現した点、本法でのみ得られる物性値を有する材料が得られた点などが、本研究の特に重要な研究成果である。この研究は、バイオリファイナリー研究分野に大きなインパクトを与えると考えており学術的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：This study aims at exploring the fundamentals of the originally developed "three-component separation technology of wood". Specifically, the influence of carbon numbers in alkylation reagents and that of plant species, conifers, hardwoods, and herbaceous plants on separation of three components were investigated by detailed chemical structure analysis using NMR and by thermal property analysis using DSC. The results revealed that differences in molecular weight and the hydrophilic-hydrophobic balance of the molecules had a significant effect on the separation of cellulose, hemicellulose, and lignin. It was also revealed that a small amount of mixture, which can only be obtained from compounds derived from wood, has a positive effect on thermal and mechanical properties. Furthermore, we succeeded in synthesizing a variety of functional materials by taking advantage of the characteristics of wood components including bark-extracted components.

研究分野：複合材料化学

キーワード：バイオリファイナリー セルロース ヘミセルロース リグニン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高等植物の細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成され、バイオマスとして注目されるものの、それぞれが別のもので研究されている。申請者はこれら全てを有効利用するために、日本の代表的な針葉樹の一つであるカラマツの鋸屑のメチル化を検討した。セルロース・ヘミセルロース・リグニンを分解せずに完全に分離することは極めて難易度が高いが、メチル化により3成分を高分子のまま余すことなく分離し得た(本申請書では、研究代表者が発見した「木質三成分分離技術」と呼ぶこととする)。一方で、3つの成分のなかで、近年、セルロースだけではなく、リグニンが天然芳香族化合物として注目を集めているものの、ヘミセルロースは依然として重要視されていない。ヘミセルロースの理解を深めなければ木材を全体として理解することに繋がらない。

針葉樹、広葉樹、草本植物では、特にヘミセルロース、リグニンに違いがある。ヘミセルロースは細胞壁中に存在するセルロース以外の多糖であり、代表的にはグルコマンナンやキシランを挙げることが出来る。また、リグニンは針葉樹、広葉樹、草本植物で構成するフェニルプロパン単位の種類が異なり、メトキシ基の数により高分子としての化学構造や性質に違いが生じる。この違いは科学的にどのような意味を持つのであろうか。針葉樹にはグルコマンナンが、広葉樹・草本植物にはキシランが多く含まれている。針葉樹・広葉樹・草本植物のヘミセルロースがそのような構成になっている理由は不明である。予備的に広葉樹や草本植物の鋸屑のメチル化実験を行ったところ、メチル化セルロース部分に一部のメチル化キシランが混入し、純度の高いメチル化セルロース部を得ることが出来なかった。この結果は針葉樹と広葉樹・草本植物は三成分分離能が異なること、ヘミセルロースの中でもグルコマンナンとキシランの分子特性は明らかに異なることを示唆している。

現在の学術的知見では、3成分に分離出来る理由や、細胞壁中での3種の高分子間の分子レベルでの相互作用について深く理解できない。植物細胞壁の組織学研究者、セルロース研究者、リグニン研究者らが、別個のアプローチで木材の基礎研究を行なっていることも一因である。複雑な階層構造を有するセルロース・ヘミセルロース・リグニンに関する分子レベルの知見が不足していることは否めない。細胞壁構成全成分の分子特性を統合的かつ化学的に明らかにする本研究は木材科学分野における未開拓領域を切り開く可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物細胞壁を構成する分子の特性・分子間相互作用について統合的に理解すること、本研究で確立する学理に基づきバイオマスを原料とした機能性材料を創成することである。その目的を達成するために、研究代表者独自の「木質三成分分離技術」や有機化学的なアプローチ「ブロックコポリマー」を用いてエーテル化前の3成分の分子特性を評価する。幾つかの実験指標を通じて分子特性・分子間相互作用を数値化する。

具体的には、以下の3点を行い研究目的を達成する。

- (1) バイオマスの直接エーテル化による3成分分離に関する基礎研究 -何故エーテル化により3成分に分離できるのか?-
- (2) 樹種の違いは3成分分離に影響を与えるのか?
- (3) 木質細胞壁成分由来成分の高機能化

3. 研究の方法

材料：カラマツ、ブナ、モウソウチクの鋸屑を作成した。篩を用い、粒径の異なる3種類の鋸屑を調製した。

鋸屑のエーテル化：エーテル化のアルキル炭素数 ($C_x, x=1, 2, 3$) を変数としてエーテル化反応を体系的に検討することとした。本研究では、主にスターラーバーを用いた攪拌により、エーテル化反応を検討した。反応後、反応溶液を中和し、水不溶部と水可溶部(エーテル化ヘミセルロース)に分離した。水不溶部は、メタノール不溶部(エーテル化セルロース)とメタノール可溶部(エーテル化リグニン)に分離した。

生成物の分析：NMR, GPC, FT-IR, DSCにより、反応生成物を分析した。

4. 研究成果

(1) エーテル化の炭素鎖長の違いが「木質三成分分離」に与える影響

カラマツ鋸屑のメチル化、エチル化、プロピル化を行った。その結果、メチル化により鋸屑中の成分は最も分離し易いという結果が得られた。エチル化の場合、セルロース画分の重量比が減少した。ヘミセルロース画分も減少したが、メタノール可溶部は相対的に増加した。プロピル化の場合、ほぼ分離されずにメタノール不溶部として回収された。

分子量分析の結果から3成分に分離される要因について考察する。第1段目の分離操作では、

親水性か否かにより分離される。しかしながら、ヘミセルロースのみ親水性画分に分離される理由は不明である。次いで、第2段目の分離操作では、高分子量の化合物はエーテル化セルロース画分に分離される。メタノール可溶画分には、分子量が高くなく疎水性が高い成分が含まれる。このように、複数の要因が3成分分離に関与していることが明らかとなった。エチル化では、3成分分離は達成できるものの、プロピル化では、アルキル基の疎水性が高いため、水可溶成分はほとんど得られないため、「木質三成分分離」の手段としては不適切であることが明らかとなった。しかしながら、依然として理解できない点として、ヘミセルロースが何故、両親媒性物質として分離される部分と疎水性物質として分離される部分に分かれるのか挙げなければならない。何れにせよ、3成分を別個に利用するためには、メチル化が最適であるという結論が得られた。

(2) 樹種の違いが「木質三成分分離」に与える影響

上記結果に基づき、針葉樹、広葉樹、草本植物の鋸屑をメチル化反応に供し、成分分離状況を調べた。針葉樹ではセルロース成分に微量のリグニンが、広葉樹および草本植物ではセルロース成分にキシラン成分およびリグニンが含まれることがわかった。本研究では、この画分を詳細に分析した。

スターラーバーによる攪拌により反応を行う場合、クロロホルム可溶部(完全メチル化部)とクロロホルム不溶部(一部メチル化あるいは未反応部)が得られた。更に、クロロホルム可溶部をテトラヒドロフラン (THF) 可溶部と不溶部に分画できることが判明した。

カラマツの場合、THF 可溶部にメチル化セルロース-リグニン成分が濃縮された。NMR 分析により、これまでよりも明瞭にリグニン成分の存在が確認できた。今後、この成分を用いて、セルロースとリグニンが共有結合していることを明らかにしたい。

一方、ブナおよびモウソウチクにおいて、メチル化キシランとメチル化セルロースの存在が確認された。現時点では、セルロースとキシランが共有結合している直接的な証拠は存在しないが、今後2次元 NMR 分析を駆使し、現時点では教科書的に存在すると考えられていない分子種の同定を行う必要がある。

(3) 木質細胞壁成分由来成分の高機能化

(3-1) 分子末端に細胞接着性ペプチドを導入したメチルセルロースの合成とその機能

完全メチル化セルロースの分子末端に RGD ペプチド(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)をアジド-アルキン環化付加反応により導入した。この化合物の水溶液はヒトの体温付近で可逆的熱ゲル化を示した。この性質を利用し、37℃にて動物細胞を培養したところ、細胞がシート状に成長することを確認した。温度応答性ヒドロゲルを冷却しゾル状態とすれば、細胞シートを単離することが出来た。

(3-2) シラカバ樹皮抽出成分ベツリン誘導体の合成とセルロース誘導体へのグラフト化

ベツリンの二重結合にアジド基を導入する方法を確立した。アジド-アルキン環化付加反応により、セロビオース誘導体、あるいはセルロース誘導体と反応させる方法論を確立した。疎水性の高いベツリンが導入されたフィルム、溶媒中への分散など、ベツリン単独では得られない機能を付与することに成功した。

(3-3) エチルセルロースのコレステリック液晶形成

エチルセルロースの分子量の違いがコレステリック液晶形成能に影響を与えるのかどうか、我々の知る限り研究されていなかった。様々な分子量を有するエチルセルロースを合成し、液晶系性能を検討したところ、液晶を形成する分子量に下限値が存在することが明らかになった。

(3-4) 「木質三成分分離技術」により獲得したエチルセルロースの性能評価

市販のエチルセルロースとは異なり、木材から1段階の反応で調製したエチルセルロースはリグニンを含有する。「木質三成分分離技術」により獲得したエチルセルロースフィルムは、市販のエチルセルロースと比較し、柔軟性と引張強度が高いという結果が得られた。DSC 測定結果はリグニンがセルロースと直接結合している可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Dhar Prodyut, Sugimura Kazuki, Yoshioka Mariko, Yoshinaga Arata, Kamitakahara Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Fabrication of wood-inspired high-performance composites through fermentation routes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 2927 ~ 2947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10570-021-04354-z	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 該当する

1. 著者名 Miki Kentaro, Kamitakahara Hiroshi, Yoshinaga Arata, Tobimatsu Yuki, Takano Toshiyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Methylation-triggered fractionation of lignocellulosic biomass to afford cellulose-, hemicellulose-, and lignin-based functional polymers via click chemistry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Green Chemistry	6. 最初と最後の頁 2909 ~ 2928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0GC00451K	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 Dhar Prodyut, Sugimura Kazuki, Yoshioka Mariko, Yoshinaga Arata, Kamitakahara Hiroshi	4. 巻 252
2. 論文標題 Synthesis-property-performance relationships of multifunctional bacterial cellulose composites fermented in situ alkali lignin medium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 117114 ~ 117114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2020.117114	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 6件／うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Hiroshi Kamitakahara
2. 発表標題 Etherification-triggered fractionation of lignocellulosic biomass to afford cellulose-, hemicellulose-, and lignin-based functional materials
3. 学会等名 WCCE11 - The V International Symposium on Lignocellulosic Materials - ISLCM 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Kamitakahara
2. 発表標題 Design, synthesis, and functions of cellulosic diblock copolymers: from organic chemistry to biomass refinery
3. 学会等名 8th EPNOE International Polysaccharides Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Kamitakahara
2. 発表標題 Biomass use in the perspective of Japan
3. 学会等名 8th EPNOE International Polysaccharides Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Teruki Sugahara, Kazuki Sugimura, Hiroshi Kamitakahara*
2. 発表標題 Synthesis, structure, and property of trifurcate derivatives having cellobiose arms
3. 学会等名 The 5th International Cellulose Conference (ICC2022+1) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shiori Itoga, Kazuki Sugimura, Hiroshi Kamitakahara
2. 発表標題 Design, synthesis, and characterization of cellulose/betulin conjugates via click chemistry
3. 学会等名 The 5th International Cellulose Conference (ICC2022+1) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Misato Yamada, Naotaka Nishio, Mariko Yoshioka, Hiroshi Kamitakahara*
2. 発表標題 Functional materials prepared via direct methylation of lignocellulosic biomass
3. 学会等名 The 5th International Cellulose Conference (ICC2022+1) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 糸賀汐里, 上高原浩
2. 発表標題 シラカバ樹皮抽出成分ベツリンの親水性セルロース誘導体への固定および特性評価
3. 学会等名 第67回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田 美紗登1、西尾 直高2、吉岡 まり子1、上高原 浩1
2. 発表標題 メチル化によるリグノセルロースの機能化と成分分離：樹種による性質の違い
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会（京都大会）2024年3月15日
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 菅原 輝紀1、杉村 和紀1、上高原 浩1
2. 発表標題 アセチル化セロオリゴ糖鎖を有する3本鎖星型ポリマーの合成
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会（京都大会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 糸賀 汐里1、杉村 和紀1、今井 友也2、上高原 浩1
2. 発表標題 セルロース誘導体へのシラカバ樹皮抽出成分ベツリンの導入および生成物の性質
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会（京都大会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuuka Sakurai, Seiji Masuda, Hiroshi Kamitakahara
2. 発表標題 Thermo-responsive methylcellulose end-functionalized with RGD peptide for cell sheet fabrication
3. 学会等名 ACS Spring 2024（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 櫻井優佳, 増田誠司, 上高原浩
2. 発表標題 細胞接着因子を導入したジブロック型メチルセルロース誘導体の合成とその温度応答性を活かした細胞シート用基板の設計
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 糸賀汐里, 杉村和紀, 上高原浩
2. 発表標題 クリック反応によるセルロース誘導体へのシラカバ樹皮抽出成分ベツリンの導入とその特性評価
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 上高原 浩
2. 発表標題 木材から1段階の反応で3種類の高分子機能性材料を一挙に分離製造する技術
3. 学会等名 第12回 CSJ化学フェスタ2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroschi Kamitakahara
2. 発表標題 Functionalization-triggered fractionation of lignocellulosic biomass to afford cellulose-, hemicellulose-, and lignin-based functional materials
3. 学会等名 EMSES 2022 15th Eco-Energy and Materials Science and Engineering Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井優佳, 増田誠司, 上高原浩
2. 発表標題 細胞接着因子を導入したジブロック型メチルセルロース誘導体の合成とその温度応答性を活かした細胞シート用基材の設計
3. 学会等名 繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮内優、杉村和紀、吉岡まり子、上高原浩
2. 発表標題 鋸屑のエチル化・分画により得られる微量のリグニンを含むエチルセルロースの優れた熱特性
3. 学会等名 令和3年度繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高分子学会（上高原 分担執筆）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 630
3. 書名 高分子材料の事典（1. 材料編, G. 天然由来材料, 1-51 セルロース誘導体）	

〔出願〕 計6件

産業財産権の名称 リグノセルロース誘導体組成物及びその製造方法	発明者 上高原 浩、山田 美 紗登、西尾 直高	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P230106JP01	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 エチルセルロース、低重合度化エチルセルロースの製造方法、及びエチルセルロースの低重合度化法	発明者 上高原 浩、杉村 和 紀、上野 敬紀、西尾 直高	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P230146W001	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 細胞培養に適した温度応答性ヒドロゲル	発明者 上高原 浩、櫻井 優 佳、増田 誠司、新 延 信吾	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-104280	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Azide-Alkyne Cycloaddition固定化多糖誘導体及びその前駆体	発明者 上高原 浩、糸賀 汐 里、西尾 直高	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-106553	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 木材由来材料の製造方法	発明者 上高原浩、ダール・ プロデュット	権利者 国立大学法人京 都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-135712	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 リグノセルロース誘導体組成物及びその製造方法	発明者 上高原 浩、北山 健 司、宮内 優	権利者 国立大学法人京 都大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/41399	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

京都大学大学院農学研究科森林科学専攻複合材料化学分野
<http://www.fukugou.kais.kyoto-u.ac.jp>

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	増田 誠司 (Masuda Seiji) (20260614)	近畿大学・農学部・教授 (34419)	
研究分担者	吉永 新 (Yoshinaga Arata) (60273489)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	田中 義正 (Tanaka Yoshimasa) (90280700)	長崎大学・先端創薬イノベーションセンター・教授 (17301)	

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