

令和元年6月15日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19283

研究課題名(和文)木質細胞壁を人工的に合成する新規基盤技術の創出

研究課題名(英文) Establishment of fundamental technology for artificial lignified cell wall

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)・特任准教授

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)：木質細胞壁を構造的に理解し、将来的には用途に応じたデザイン手法を確立するため、本研究では樹木の木化プロセスに準じながらも新規且つ独創的なアプローチで木質細胞壁を人工合成する基盤技術の創出に取り組んだ。樹木由来のカルスから最適化学処理によって一次壁モデルの多糖ネットワーク構造を構築し、抗原抗体反応を応用することでペルオキシダーゼの選択的な担持が可能となった。これにモノリグノールを添加することで、多糖ネットワーク内で不定形物質の沈着がTEM観察から確認された。顕微赤外分光分析によってこの不定形物質が人工リグニンであることが示唆され、樹木の木化プロセスに準じた木質細胞壁の人工合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞壁成分の必要なパーツを単離し、そこに高分子を人工的に合成する技術基盤の構築である。生体外での合成系を確立して構造的な理解を深める試みは、バイオマス科学の体系や方向性を大きく転換させる潜在性を有していることから学術的な意義が高いと言える。例えば、生体内で合成された細胞壁との比較を通して、樹種・組織・細胞における構造的な違いがどの要素に起因するか、木質資源の多様性が理解できる点でも非常に有意義である。さらに、強度や生分解性といった用途に応じた細胞壁の設計基盤ができれば、さらなる木質資源の利用拡大を促進させ、持続的社会的構築に大きく貢献できる点から社会的意義も高い研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Artificial woody cell wall synthesis was investigated based on 3 steps according to practical formation by using cellulose microfibrils extracted from callus derived from *Cryptomeria japonica*. First, we constructed a polysaccharide network by optimizing chemical treatment, followed by mechanical fibrillation. Second, we placed peroxidase on the microfibrils via immunostaining. Using a specific antibody, we could ensure that enzymes were widely and uniformly localized along the microfibril network. Third, we started to polymerize the lignin on the grid by simultaneously adding coniferyl alcohol and hydrogen peroxide. After artificial lignification, TEM observation showed that undefined substances like lignin were deposited on the polysaccharide network. In addition, FTIR spectra revealed that the bands specific for lignin were increased, demonstrating successful artificial formation of woody cell wall.

研究分野：木質科学

キーワード：細胞壁 セルロース ヘミセルロース リグニン 人工合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化石資源の大量消費による資源の枯渇ならびに地球規模の環境状況の悪化から持続的利用ならびに低環境負荷という特徴を有する再生可能資源が注目されている。太陽・風力・地熱等も期待が寄せられているが、バイオマスはエタノールなどの液体燃料や工業原料すなわち有機化合物の炭素供給源となりうることで大きな特徴であり、且つ、極めて重要な点である。地球上に備蓄されたバイオマスの中でも90%以上が木質系バイオマスであり、特に資源貧国ではあるが国土の7割が森林で占められる我が国において、効率的なバイオマス変換は喫緊の課題である。木質バイオマスの本質は木質細胞壁であり、効率的バイオマス変換の障壁となっているのがこの細胞壁の微細構造である。バイオリファイナリーの鍵を握る酵素がセルロースやヘミセルロースといった多糖へのアクセシビリティを高めるためには、リグニンの分離がポイントとなる。しかし、これら成分の詳細な構造に加え、成分間の物理的且つ化学的な結合様式、すなわち相互作用に焦点を当てた形成機構の理解は未だ不十分である。近年の分子生物学の発展に伴い、細胞壁の形成において遺伝子レベルの制御機構が明らかになりつつあるが、同時に様々なファクターが生体内で複雑に連結していることもわかり、何が必要条件なのか決定できない。

この閉塞的な状況を打開するためには、木質細胞壁を生体外にて構築する手法、つまり人工合成法の確立が活路となると考えた。しかし、生体内の細胞壁合成を模倣するためには、その基盤となる多糖のネットワーク構造を構築することに加え、多糖上で位置選択的にリグニンを重合させる必要がある。そんな中、近年、セルロースの表面にカルボキシル基を導入し、イオンの相互反発力を利用してマイクロフィブリルを孤立分散させる単離法が提案された。この成果を糸口として、未木化である樹木由来のカルスをを用いればヘミセルロースやペクチンが有するカルボキシル基を利用して、孤立分散したセルロースナノファイバーを調製できると考えた。さらに、抗ヘミセルロースや抗ペクチン抗体を用いた抗原抗体反応を応用すればリグニンの重合反応に必要な酵素を担持することにより、木質細胞壁の人工合成が実現できるという着想に至った。

2. 研究の目的

木質細胞壁を人工合成するための基盤を構築するため、下記の目的について研究を実施した。

(1)非セルロース多糖を纏ったセルロースナノファイバーの調製法を確立する。

- ・樹木由来カルスから多糖ネットワークの構築
- ・抗原抗体反応による非セルロース成分の局在評価

(2)ナノファイバー上で位置選択的にリグニンを重合させて人工細胞壁を創製する。

- ・赤外分光法を用いたリグニンの化学構造情報に対する検量モデルの構築
- ・位置選択的なリグニン重合による人工細胞壁の創製

3. 研究の方法

(1)非セルロース多糖を纏ったセルロースナノファイバーの調製法の確立。

- ・樹木由来カルスから多糖ネットワークの構築

樹木由来のカルスからペクチンやヘミセルロースを纏った状態でのセルロースを孤立分散させる。試料は針葉樹代表としてスギ、広葉樹はポプラから誘導したカルスを使用した。アルカリ処理や亜塩素酸ソーダ処理、その反応温度や時間を等、様々なパラメーターを検討しながら多糖精製に取り組んだ。これら前処理物は赤外分光法によって成分評価した。次に、ヒスコロンを用いて物理的に解繊しセルロースマイクロフィブリルを分散させ、透過型電子顕微鏡による形態評価を行った。

- ・抗原抗体反応による非セルロース成分の局在評価

位置選択的にリグニン重合を開始させるため、多糖ネットワーク上にペルオキシダーゼを担持させる方法を検討した。透過型電子顕微鏡用のグリッドに非セルロース多糖が沈着したセルロースナノファイバーをのせ、グリッド上で抗原抗体反応を作用させた。抗体には抗キシラン、抗ペクチン、抗キシログルカンなど様々な抗体を試験した。その局在を電子顕微鏡で評価するため、本年度は二次抗体に金コロイドが標識されたものを用いた。

(2)ナノファイバー上で位置選択的にリグニンを重合させた人工細胞壁の創製。

- ・赤外分光法を用いたリグニンの化学構造情報に対する検量モデルの構築

赤外線吸収スペクトルから人工リグニンを評価する基盤を構築した。そのために木粉に対し、水熱処理、酸処理、アルカリ処理、亜塩素酸ソーダ処理など様々な化学処理を施した。すべてに対し、化学分析を行い、リグニン含有量を評価した。同じ試料から赤外線吸収スペクトルを取得した。これら化学分析データとスペクトルデータを相関させることで検量モデルの構築を図った。

- ・位置選択的なリグニン重合による人工細胞壁の創製とその構造評価

多糖ネットワーク上において位置選択的なリグニンの重合反応を開始させ、人工細胞壁を創製した。抗原抗体反応における二次抗体にはペルオキシダーゼが付加したものをを用いた。次に、モノリグノール水溶液を滴下してリグニン重合を開始し、人工リグニンを合成した。モノリグノールについては針葉樹に含まれるコニフェリルアルコールを滴下して重合させた。得られた人工細胞壁は電子顕微鏡観察による形態評価に加え、顕微赤外分光分析により化学構造評価を行った。先に述べた赤外線吸収スペクトルと多変量解析を通じて構築した検量モデルを用いて、多糖に対するリグニン含有量について評価した。

4. 研究成果

29年度は(1)非セルロース多糖を纏ったセルロースナノファイバーの調製法の確立するため、まず樹木由来カルスから多糖ネットワークの構築と抗原抗体反応による非セルロース成分の局在評価に取り組んだ。

まずスギおよびポプラからから誘導したカルスを試料として用いた。植え継ぎ後、約1ヶ月以内のスギカルスを収集し、化学処理によって多糖成分の精製を行った。赤外分光分析の顕微システムを駆使して構成成分をモニタリングしながらアルカリ処理とブリーチング処理の組み合わせならびに薬剤濃度や反応時間を検討した。その結果、室温での5%KOH処理に続きWise処理3時間後、5%KOH水溶液煮沸処理が最適であった。得られた試料をヒスコトロンで物理解析することによって、多糖ネットワークを構築できることを透過型電子顕微鏡観察によって確認した。

次に抗原抗体反応を用いて、構築した多糖ネットワーク上のヘミセルロースならびにペクチンの局在について調べた。一次壁に堆積するキシログルカン、針葉樹二次壁に特徴的なキシラン、そしてペクチンに対するモノクローナル抗体を作用させた。二次抗体には金コロイド標識したものをを用いた。この際、バッファの種類や抗体の濃度、反応時間ならびに反応温度に関する最適条件を決定した。その結果、キシログルカン抗体がマイクロフィブリルに沿って効率よく認識していた。カルスは分化せずに分裂を繰り返すため、一次壁成分であるキシログルカンが他の非セルロース成分よりも堆積していたのは合理的な結果であった。興味深いことにペクチンも一定の割合で局在していることが明らかとなった。以上の結果から、次年度に取り組む多糖ネットワーク上にリグニンを重合させて合成する人工細胞壁の基盤が構築できた。

30年度は(2)ナノファイバー上で位置選択的にリグニンを重合させて人工細胞壁を創製するために、赤外分光法を用いたリグニンの化学構造情報に対する検量モデルの構築および位置選択的なリグニン重合による人工細胞壁の創製に取り組んだ。

赤外線吸収スペクトルから相対リグニン量を見積もるため、検量モデルの構築を試みた。針葉樹木粉を様々な化学処理を施し、得られた試料についてクラーソンリグニン量を分析した。そして分析データと赤外吸収スペクトルの相関を図った。すべての試料で観察された赤外吸収バンドについて検討した結果、リグニンに含まれるベンゼン環の骨格振動に相当する赤外吸収バンドとCHの伸縮振動に帰属されるバンドの高さの比を求めたところ、化学分析から見積もったリグニン量と高い相関が得られた。したがって、赤外分光分析からリグニン量のハイスルーブット解析が可能となった。

29年度の成果に基づき、カルスから調製した多糖ネットワーク構造に抗キシログルカン抗体を反応させた。ペルオキシダーゼが結合した二次抗体を反応させたところ、金コロイド標識の時と同様の局在がTEM観察から認められた。これにモノリグノール水溶液ならびに過酸化水素を滴下して、人工リグニンであるDHP(Dehydrogenation polymer)合成を開始した。その結果、合成開始30分後には多糖ネットワーク間隙に不定形物質の堆積がTEM観察によって認められた。さらに反応を続けたところ、多糖ネットワークの形態が不明瞭になるほど不定形物質の堆積が確認された。このTEMグリッドを顕微IR分光分析にそのままセットし、スペクトルを取得した。その結果、1600と1508 cm^{-1} というベンゼン環の骨格振動に帰属されるバンドに加え、1276 cm^{-1} というリグニンのCH変角振動に帰属される赤外吸収バンドも観察された。したがって、TEM観察による形態評価ならびに顕微赤外分析による成分評価の結果、多糖ネットワーク上に担持したペルオキシダーゼの活性による人工リグニンの重合に成功し、木質細胞壁を人工的に合成する新規基盤技術を構築できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Horikawa Y., Hirano S, Mihashi A., Kobayashi Y., Zhai S., Sugiyama J., Prediction of lignin contents from infrared spectroscopy: chemical digestion and lignin/biomass ratios of *Cryptomeria japonica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019 (in press) (査読あり)
2. Horikawa Y., Shimizu M., Saito T., Isogai A., Imai T., Sugiyama J., Influence

of drying of Chara cellulose on length/length distribution of microfibrils after acid hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 569-575, 2018. (査読あり)

3. Horikawa Y., Assessment of cellulose structural variety from different origins using near infrared spectroscopy. *Cellulose*, 24(12), 5313-5325, 2017. (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 平野聖也, 半 智史, 船田 良, 梶田真也, John Ralph, 堀川祥生 “人工細胞壁合成に向けた多糖ネットワーク調製法の最適化”, セルロース学会第 26 回年次大会, 福岡, 7 月, 2019.
2. 堀川祥生, 杉山淳司 “顕微赤外分光法によるヘミセルロースとリグニン分析に基づく日本産針葉樹材の多様性評価”, 第 69 回木材学会大会, 函館, 3 月, 2019.
3. 平野聖也, 船田 良, 堀川祥生, 梶田真也, 山岸祐介, John RALPH “樹木の木化プロセスに準じた木質細胞壁の人工合成”, 第 69 回木材学会大会, 函館, 3 月, 2019.
4. Seiya Hirano, Satoshi Nakaba, Ryo Funada, Shinya Kajita, Yusuke Yamagishi, John Ralph, Yoshiki Horikawa “Artificial Lignified Cell Wall Synthesis Based on Polysaccharide Extracted from Cultured Cells”, 2018 SWST/JWST INTERNATIONAL CONVENTION, Nagoya, Japan, November 2018.
5. 平野聖也, 半 智史, 船田 良, 梶田真也, John Ralph, 堀川祥生 “樹木の木化プロセスを模倣した木質細胞壁の人工合成”, セルロース学会第 25 回年次大会, 京都, 7 月, 2018.
6. 平野聖也, 梶田真也, 船田 良, 山岸祐介, John Ralph, 堀川祥生 “免疫染色法で多糖ネットワーク上に担持させたペルオキシダーゼによる人工細胞壁の合成”, 第 68 回木材学会大会, 京都, 3 月, 2018.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：船田 良

ローマ字氏名：FUNADA Ryo

所属研究機関名：東京農工大学

部局名：(連合) 農学研究科 (研究院)

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：20192734

研究分担者氏名：梶田 真也

ローマ字氏名：KAJITA Shinya

所属研究機関名：東京農工大学

部局名：(連合) 農学研究科 (研究院)

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40323753

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平野 聖也

ローマ字氏名：HIRANO Seiya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。