

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18188

研究課題名（和文）深海底にセルロースはどれほど存在するか

研究課題名（英文）Quantification of cellulose on the deep sea floor

研究代表者

磯部 紀之（Isobe, Noriyuki）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生物地球化学センター)・研究員

研究者番号：10802986

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：暗黒の世界である深海では、光合成による有機物生産ができないため、深海生物の栄養源は海洋表層から沈んでくる有機物に頼ることになる。このとき、海洋表層から落ちてくる有機物量と実際に深海底で消費されている有機物量には大きなギャップがあることが知られていた。このギャップを埋めるもののひとつとして、難分解性結晶多糖であるセルロースが提案されていた。しかしこの仮説の裏付けに必要な「深海底の底に溜まった泥のなかにどれくらいのセルロースがあるのか」を実際に測定する方法は存在しなかった。そこで本研究では、木質科学の知見を組み合わせて新たなセルロース抽出・定量方法を開発し、堆積物中のセルロースの定量を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セルロースを代表とする多糖とは単糖が鎖状に繋がったもので、生物が栄養源や細胞骨格として利用している。従来の海洋科学における多糖分析は、多糖を酸で切断して単糖にまで分解し、単糖の種類や個数からもともとの多糖を想像するという方法であった。しかし、この方法では同じ単糖からなる全く異なる多糖、たとえばセルロースとアミロースを見分けることはできない。本研究課題が達成したセルロース抽出・定量方法は、酵素により特定の多糖を認識して切断し、遊離した単糖から元の多糖を定量するため、確実にセルロースのみを定量することができる。この革新的な方法により、深海底の生態系理解に不可欠な海洋での多糖の動態解明が可能になる。

研究成果の概要（英文）：Discrepancy between organic matter sinking from upper surface and that consumed on the deep-sea floor has been a matter of debate. One of the candidates that can bridge the gap is cellulose, a recalcitrant crystalline polysaccharide. However, the current methodology does not allow us to quantify the amount of cellulose in the deep-sea sediments. Here, I developed a novel extraction/quantification method of cellulose from the deep-sea sediments and applied it to the sediments collected from the deep-sea environments.

研究分野：生物材料学

キーワード：セルロース 堆積物 重液分離 有機物 深海 溶剤 酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

深海では光合成ができないため、深海に生息する生物は上層から降り注ぐ沈降有機物を栄養源とする。この沈降有機物は、上層で活動する生物の死骸や排泄物などから構成されると考えられている。この沈降有機物の量は年間炭素量にして 14 g/m^2 と実測されているが、実際に深海で消費されている有機物量はそれを遥かに超える 20 g/m^2 であることが知られている (Smith, Kaufmann, *Science*, 1999)。つまり海洋には、人類が依然として把握しきれていない有機物の流入経路が存在する。結果として、深海生物の生態系理解に不可欠な「生物の栄養源となりうるものが深海にはどれくらいあるか」という情報が大きく欠損している。

上述の有機物収支の不一致を補完しうる物質として、Robison らはオタマボヤが産出するハウスを提案した (Robison, et al., *Science*, 2005)。オタマボヤとは世界中の海洋に生息する尾索動物の 1 種で、海水から栄養分を濾し取るためにナノスケールのフィルター状構造体「ハウス」を体外に分泌する。このハウスの 90% はセルロースという難分解性の多糖で構成される (Kimura, et al., *Protoplasma*, 2001)。セルロースとは、D グルコースが直鎖状に繋がった高分子で、海域ではオタマボヤなどが産出する一方、陸域では植物が産出する陸上最多量のバイオマスである。Robison らはこのハウスが沈降していく様子を世界で初めて追跡し、沈降量が年間炭素量にして 7 g/m^2 にも上ると推定した。このうち 90% がセルロースであるので、深海底における総有機物消費量の 30% に相当する 6 g/m^2 のセルロースが毎年深海底に向かって沈降していくことが予想される。これまでも陸地から 100 km 程度の沖合までは、河川から相当量の陸源性セルロースが流入しているとされてきた。しかし、この Robison らの新発見は海域を問わない。つまりこの新発見は、有機物収支問題を解決する可能性を含むとともに、ひとつの重要な問いを投げかけた。それは「海域に関係なく、深海底に存在する有機物の 30% はセルロースなのではないか」ということである。仮にこの問いが真であれば、「深海底にセルロースが存在したとしても極微量かつ難分解性であるから、セルロースは深海生物の主たる栄養源にはならない」という深海生態系における既存概念を大きく覆すことになる。

2. 研究の目的

この問いに答えるため、本研究で設定した目的は「深海底の堆積物（深海泥）にどれくらいセルロースが含まれているか、を定量的に理解する」ことである。

3. 研究の方法

上記で設定した目的遂行に向け、本研究課題では以下の 2 点が主たる研究方法として集約される。

- (1) セルロースを溶解抽出・定量する方法の確立
- (2) 実際の深海泥サンプルに対する適用の可否の検討、改良、高精度化

以下にそれぞれの具体的な方法を記述する。

- (1) セルロースを溶解抽出・定量する方法の確立

セルロース溶剤の選定

100 種類以上あるセルロース溶剤から、それぞれの適性をふまえて表 1 にある 5 種類を使用す

る。これら以外の溶剤も状況に応じて順次追加する。

人工海底試料を用いたセルロース抽出・定量法の確立

表2の組成で無機物とセルロースを混合させたものを人工海底試料として、セルロース抽出・定量法の確立を行う。図1に抽出・定量法の模式図を示す。まず透析により、人工海底試料を脱塩する。次にフッ化水素により SiO₂ を除去する。洗浄後、凍結乾燥したドライ試料をセルロース溶剤に分散させる。表1に記載の温度で一定時間攪拌ののち、遠心分離により上澄みを分離・回収する。この上澄みに不溶剤（エタノール）を加えセルロースを沈殿させ、洗浄する。この沈殿した粗セルロースから大まかなセルロース量を決定することができるが、本研究ではセルラーゼを用いた高精度の定量を行う。セルラーゼとはセルロースを分解する酵素で、基質特異性が高いためセルロースのみを識別し、ことごとく分解する。分解によってグルコースが生成するので、このグルコース量を高感度（80 ng/mL）の呈色法で測定すれば、精度よくセルロース量を決定することができる。仕込みセルロース量と定量結果とを比較することで、溶剤ごとの精度を吟味し、最も精度良く定量したものを、セルロース抽出・定量法として確定する。

表1. 使用予定のセルロース溶剤とその特徴

セルロース溶剤	溶解能	セルロースのみを溶解	溶解温度	セルロースへのダメージ
① アルカリ/水	○	◎	0~4°C	○ わずか
② 4級ホスホニウム塩/水	◎	×	室温	○ わずか
③ リチウム塩/水	◎	◎	120°C	×
④ リチウム塩/有機溶剤	○	◎	0~4°C	◎ なし
⑤ イオン液体	◎	×	室温	◎ なし

表2. 人工海底試料の組成

組成	wt%
SiO ₂	45
Al ₂ O ₃	17
Fe ₂ O ₃	8
セルロース	0.4
人工海水	29.6
計	100

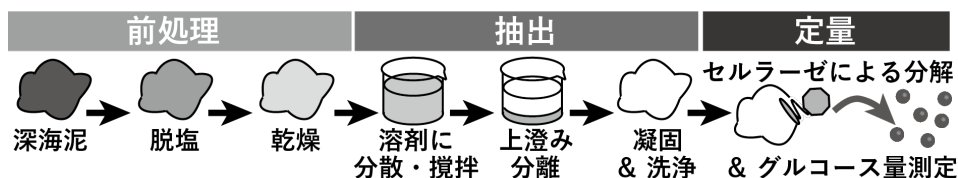


図1. 抽出・定量法の模式図

(2) 実際の深海泥サンプルに対する適用の可否の検討、高精度化

実際の深海泥へのセルロース抽出・定量法の適用

確立したセルロース抽出・定量法を実際の深海泥サンプルに適用し、深海泥に含まれるセルロースを定量する。

適用結果のフィードバック

適用の結果、予期せぬエラーを発見した場合、セルロース溶剤の選定も含め、抽出・定量法の改良を行う。

4. 研究成果

(1) セルロースを溶解抽出・定量する方法の確立

セルロース溶剤を使用したセルロース抽出の試み

予察的実験の結果、セルロース溶剤としてイオン液体である 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムアセテートを使用することが妥当であると考えられた。これは、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムアセテートは室温でセルロースを強力に溶解することが知られているためである。この溶剤を使用し抽出実験を行った結果、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムアセテートは、夾雑物の存在に極めて影響を受けやすく、正確にセルロースを溶解・抽出することはできなかった。

そこで、セルロースに対して親和性を持つ液体で、さらにセルロースの密度よりも高い比重を持つ液体であれば、比重差によりセルロースを浮かし出すことが可能であるのではないかとこの考えに至った。このような液体として飽和 (60 wt%) 臭化リチウム水溶液が挙げられる。飽和 (60 wt%) 臭化リチウム水溶液は高温 (>120 度) でセルロースを溶解し、さらに比重は 1.7 g/cm^3 であるため、セルロース (密度 $1.5\sim 1.6 \text{ g/cm}^3$) を密度差により浮かしだすことが理論上は可能であるはずである。そこで、実際に精製済みのセルロース粉末を 60 wt% 臭化リチウム水溶液に浸漬させたところ、セルロースは一切浮くことがなく、すべて遠沈管の底に沈んだ。

この原因を突き止めるため理論・実験熱力学的検討を行った結果、セルロース分子がセルロース溶剤の共用剤分子により強く溶媒和するためということがわかった。すなわち、臭化リチウム水溶液中の臭化リチウム分子がセルロース分子鎖にまとりつくことにより、セルロース分子の局所的な密度が 1.7 g/cm^3 より大きくなるということがわかった。このとき得られた一連の結果をまとめ、学術誌に投稿・受理された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Isobe Noriyuki, Tsudome Mikiko, Kusumi Ryosuke, Wada Masahisa, Uematsu Katsuyuki, Okada Satoshi, Deguchi Shigeru	4. 巻 2
2. 論文標題 Moldable Crystalline -Chitin Hydrogel with Toughness and Transparency toward Ocular Applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Polymer Materials	6. 最初と最後の頁 1656 ~ 1663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsapm.0c00087	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 磯部 紀之	4. 巻 Tome65
2. 論文標題 深海分解性素材の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日仏工業技術L'Echange	6. 最初と最後の頁 11-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Nicol Thomas W.J., Isobe Noriyuki, Clark James H., Matubayasi Nobuyuki, Shimizu Seishi	4. 巻 87
2. 論文標題 The mechanism of salt effects on starch gelatinization from a statistical thermodynamic perspective	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Hydrocolloids	6. 最初と最後の頁 593 ~ 601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodhyd.2018.08.042	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 Berga Laura, Bruce Isobel, Nicol Thomas W. J., Holding Ashley J., Isobe Noriyuki, Shimizu Seishi, Walker Adam J., Reid Joshua E. S. J.	4. 巻 27
2. 論文標題 Cellulose dissolution and regeneration using a non-aqueous, non-stoichiometric protic ionic liquid system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 9593 ~ 9603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10570-020-03444-8	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 該当する

1. 著者名 Isobe Noriyuki, Sagawa Naoya, Ono Yuko, Fujisawa Shuji, Kimura Satoshi, Kinoshita Keigo, Miuchi Takeshi, Iwata Tadahisa, Isogai Akira, Nishino Masayuki, Deguchi Shigeru	4. 巻 249
2. 論文標題 Primary structure of gum arabic and its dynamics at oil/water interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 116843 ~ 116843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2020.116843	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 Isobe Noriyuki, Shimizu Seishi	4. 巻 22
2. 論文標題 Salt-induced LCST-type thermal gelation of methylcellulose: quantifying non-specific interactions via fluctuation theory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 15999 ~ 16006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cp01687j	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 磯部紀之、岡田 賢、上谷幸治郎、大長一帆、井櫻勝悟、能木雅也、齋藤継之、磯貝明、出口茂
2. 発表標題 ミリメートル厚を有する半透明セルロース板の創出
3. 学会等名 セルロース学会第26回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯部紀之、津留美紀子、岡田 賢、和田昌久、出口 茂
2. 発表標題 高透明キトサンゲルの再発見
3. 学会等名 セルロース学会第25回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯部紀之
2. 発表標題 ミリメートル厚の板状セルロースは新たな窓材となるか？
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 セルロース系成型体及びヒドロゲル並びにこれらの製造方法	発明者 磯部紀之	権利者 国立研究開発法人海洋研究開発機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-204772	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

https://orcid.org/0000-0001-8571-3373 https://scholar.google.co.jp/citations?user=qrSiZU4AAAAJ&hl=ja&oi=ao http://www.jamstec.go.jp/res/ress/isoben/ https://researchmap.jp/isoben
--

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

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