様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４年　６月２８日現在

機関番号：１２６０５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９K０６１６７

研究課題名（和文）顕微赤外分光法を用いた高効率糖化に資するグルコマンナン定量法の開発

研究課題名（英文）Prediction of glucomannan contents by microscopic infrared spectroscopy for better saccharification

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）・准教授

研究者番号：９０６３７７１１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では針葉樹材の主要ヘミセルロースであるグルコマンナンについて赤外分光分析による簡便且つ迅速な評価法の確立を目的とした。グルコマンナンとナノファイバーやバクテリアセルロースを用い、これらを適切な割合で混合し顕微システムが装備された赤外分光分析装置を用いてスペクトルを収集し吸光度を算出した。その結果、非常に精度の高い検量モデルの構築に成功した。実バイオマス試料である針葉樹材等に対し、成果である検量モデルを用いて評価したところ高い精度で予測することが可能であった。また糖化阻害を起こした試料についても赤外分光分析によって高効率糖化に資する要因解析が有効であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
時間も労力も消耗する化学成分分析で評価するのが一般的であったヘミセルロースの一種であるグルコマンナンを迅速・簡便に赤外分光分析で評価することが可能となった成果は学術的意義が極めて高い。特に顕微システムを組み込むことによって組織・細胞レベルでの情報が得られるため、前処理条件の最適化や酵素阻害の解消に向けた方策にも期待できる。したがって本研究成果はさらなるバイオマス利用に向けた発展に大きく貢献できるため社会的意義も非常に高い。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to establish a simple and rapid method for the evaluation of glucomannan, the major hemicellulose in softwood, by infrared spectroscopy equipped with microscopy. Glucomannan and nanofibers from cedar or bacterial cellulose prepared were used as model samples, mixed in appropriate proportions, and spectra were collected using an infrared spectrometer, and absorbance was calculated. As a result, a highly accurate calibration model was successfully constructed. The achievement of the evaluation using the calibration model for actual biomass samples such as softwoods showed that the prediction could be done with high accuracy. It was also found that the factor analysis toward highly efficient saccharification was also effective for samples with inhibition of enzymatic hydrolysis by infrared spectroscopic analysis.

研究分野：木質科学

キーワード：赤外分光法　ヘミセルロース　グルコマンナン　細胞壁

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

針葉樹は我が国が保有する人工林の 95%以上を占めており、建築用材や合板用材の資源となっている。その育成過程における間伐や主伐により伐採された木材のうち、未利用のまま林地に残置されている間伐材や枝については、木材チップ等の利用に加え化石資源とは異なる再生可能資源として液体燃料や有用化合物原料への展開が活発に図られている。針葉樹材ではセルロースが約 50%、リグニンが約 30%、そしてヘミセルロースが約 20%を占めている。ヘミセルロースのうち、約 1/3 はアラビノグルクロノキシランから成り、残りの約 2/3 はグルコマンナンによって構成されている。グルコマンナンは細胞壁中において不均一に分布し、セルロースとは水素結合を、リグニンとはエーテル結合やエステル結合といった化学結合を直接的もしくは間接的に形成する非常に重要な役割を果たしている。その一方で、酵素分解の観点からセルロースの効率的な糖化を妨げる律速因子にもなっている。例えば亜塩素酸ソーダ処理によってリグニンが除去された木材前処理物でも組織・細胞によっては完全な糖化に至らない。なぜならグルコマンナンがセルロース表面を被覆しているからであり、高効率糖化の鍵となる細胞壁成分とみなされている。

しかしながらその重要性に相反してグルコマンナンの分析は主に 2 つの手法に限られている。1 つは化学的手法である糖分析である。これは定量評価が可能であるが、木材全体を反映する平均情報であり、組織・細胞レベルでの解析が困難である。もう 1 つの方法は抗体を用いた免疫染色法である。ただし、組織・細胞に対する局在を観察することは可能であるが、定性評価に留まっている。したがって、2 つの手法の間に横たわったギャップを埋める「木材組織・細胞におけるグルコマンナンの迅速で簡便な定量評価」が研究開発当初は強く望まれていた。また前者は 2 段階の酸処理に加え洗浄やろ過といった前処理が必要であり、後者は固定・包埋・薄切をした上でブロッキング処理に続き抗原抗体反応を行うという高度な技術を要するとともに時間や労力を消耗する。そこで新規技術が広く採用され数多くの試料を分析するためには、迅速且つ簡便で環境にも配慮した手法であることが期待されていた。

２．研究の目的

迅速且つ簡便な解析法として赤外分光分析法に着目した。赤外分光法とは赤外線という微弱なエネルギーを分子が振動運動に変換する性質を利用した分光法である。官能基の構造ならびに化学的な環境に応じて吸収する電磁波の波長が異なるため、試料の化学構造を理解することができる。加えて吸光度からランベルト・ベールの式を用いることで定量評価が可能である。近赤外分光分析法を用いてヘミセルロースを含めた植物細胞壁成分の定量評価に関しては数多くの報告がある。筆者のグループもイナワラやエリアンサスといった植物バイオマスのヘミセルロースの定量評価について成功してきた[1-2)]。ただし、予測精度は十分なのだが、多変量解析を組み込んだ複雑なアルゴリズムのせいか波及効果は限定的であった。また測光範囲が広く、組織・細胞構造レベルの解析にも至らなかった。

グルコマンナンは D-グルコース残基と D-マンノース残基がランダムにβ(1→4)結合した直鎖上の多糖である。D-グルコースはセルロースの構成要素でもあり、赤外吸収スペクトルにおいて重複するため定量情報として用いることは難しい。しかしながら、D-マンノースは D-グルコースの 2 位エピマーであり、2 位水酸基はアキシアル配置つまり 2 位水素原子がエクアトリアル配置となっている。この 2 位の C-H 変角振動は赤外吸収スペクトルにおいて 875 や 810 cm^{-1} 付近に吸収バンドが認められ、さらに他の細胞壁成分であるセルロース、キシラン、リグニンに加えてペクチンもこの吸収帯には大きく重ならない(図 1)。

そこで、赤外分光法を駆使した針葉樹ヘミセルロースの主要成分であるグルコマンナンの迅速・簡便な定量評価法の開発を本研究の主たる目的とした。まずはグルコマンナンのモデル試料を用いて、検量モデルの構築(相関係数 $R^2>0.95$)に取り組んだ。次に得られた検量モデルを使用して赤外分光法から実バイオマスのマンナン量の予測を図った。同様の試料ついて顕微システムを駆使して取り組んだ。最後に糖化阻害を起こしている分解残渣について、赤外分光法によりグルコマンナン量との関係を検討した。

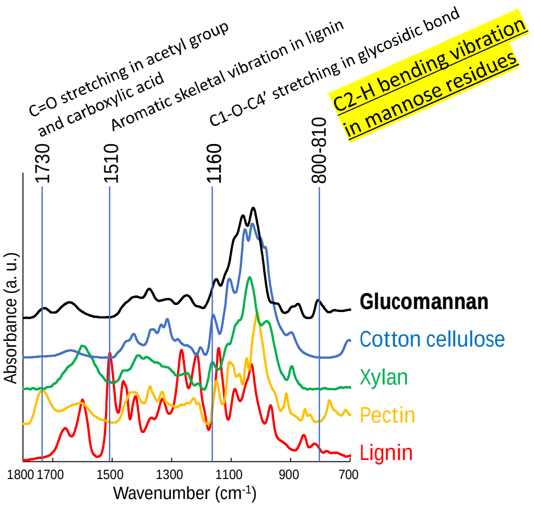

図１　木質細胞壁成分の赤外吸収スペクトルと主要なバンドの帰属。

３．研究の方法

グルコマンナンのモデル試料としてプロポール(清水化学株式会社)を用いた。またセルロースのモデル試料としてスギから調製したセルロースナノファイバーおよび純粋なセルロースとしてバクテリアセルロースを用いた。

赤外分光分析装置(PerkinElmer 社製、SpectrumFrontier)は ATR(Attenuated Total Reflectance：全反射測定法)アクセサリーを用いて波数範囲 4000-450 cm^{-1}、積算回数 8 回でスペクトルを取得した。また顕微システム(PerkinElmer 社製、Spotlight200i)を用いた場合は波数範囲 4000-700 cm^{-1}、積算回数 128 回でスペクトルを取得した(図 2)。

図 2　赤外分光分析装置。ATR アクセサリーと顕微システム。

糖分析を行うため濃硫酸と希硫酸による 2 段階の加水分解を採用した。十分に乾燥した耐圧チューブ内に試料をセットし、72 wt%の硫酸を加え、ガラス棒でよく混合した後に、ガラス棒ごとアルミホイルで蓋をし、60 分間 30 ℃の湯浴の中でインキュベートした。純水を加えて 4 wt%に希釈し、121 ℃で 1 時間オートクレーブした。オートクレーブ完了後に、ポアサイズ 1 μm のガラスフィルター (1821-021, GE Healthcare Life Science) で吸引ろ過し、採取した溶液に炭酸カルシウムを加えて中和した。中和後の溶液を遠心分離器にかけ,上澄み液を HPLC 用の測定試料とした。HPLC は RID20A システム(SHIMADZU 社)、糖分析用のカラムとしてポリマー系アミノカラム(A sahipak NH2P 50 4E, Shodex 社)を用いて分析した。

免疫染色法にはクエン酸ナトリウム(SSC)溶液 (pH 7.0)バッファーを用いて行った。１%BSA を含む SSC バッファーで室温、30 分間ブロッキング処理した。一次抗体には抗グルコマンナン抗体 LM21 を 1:100 の割合で調製し、室温で 2 時間処理した。SSC バッファーで洗浄後、5 nm の金コロイドが結合した anti-Rat の二次抗体を室温で 2 時間処理し、SSC バッファーで洗浄後、純水で繰り返し洗浄した。次に 2%酢酸ウラニルで電子染色し、透過型電子顕微鏡(JEM 1400 Plus、JEOL 社)で観察した。

酵素糖化は *Trichoderma reesei* から調製した市販セルラーゼ製剤(Accellerase 1500、DuPont 社)を用いた。前処理したスギを酵素入りの 100 mM 酢酸緩衝液(pH5.0)中で 45℃、120 ストローク/min の条件下で行った。糖化率は 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)試薬による還元糖の比色定量で評価した。

４．研究成果

グルコマンナンのモデル試料として用いたプロポールの構成成分評価を行うため HPLC で分析した(図 3)。その結果、ガラクトースのような側鎖のないグルコースとマンノースから構成されるグルコマンナンであることを確認した。

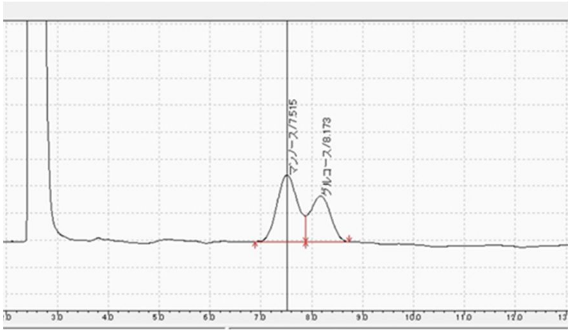

図 3　高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるプロポールの分析。

次に本研究では扱いやすさの観点から赤外分光分析から得たオリジナルスペクトルから見積もることを第一とした。そのためにはベースラインを確定する必要があった。本実験では、ベースライン確定のためにスギ木粉とプロポールの 2 次微分スペクトルを利用した。スギ木粉とプロポール両方の 2 次微分スペクトルにおいて、835 cm^{-1} でポジティブバンドを示しており、元の IR スペクトル上ではバンドの裾になっている。このことから、吸光度算出のためのベースラインとして 835 cm^{-1} を用いた。前述したスペクトル前処理を施した IR スペクトルに対して 835 cm^{-1} をベースラインとした 810 cm^{-1}—800 cm^{-1} の間のバンド高さを算出し吸光度とした。

赤外分光分析からマンナン量を定量評価するためモデル試料を用いて検量線の構築に取り組んだ。グルコマンナンはプロポールを用い、セルロースについてはスギから調製したセルロースナノファイバーとした。これらを乾燥重量比 100:0、 80:20、 60:40、 40:60、 20:80、 0:100 で調製し、純水中で 15 分間攪拌した後、凍結乾燥したものを測定試料とした。

図 4 にはセルロースとプロポールの比率を変えた試料から取得した赤外吸収スペクトルを示している。プロポールの割合が多くなるにつれて 810 cm^{-1}—800 cm^{-1} の間の吸収が増加することが認められた。ただし、セルロースナノファイバーが 100%の試料においても僅かながらこの吸収帯にバンドが認められた。そこでセルロースナノファイバーの構成成分分析を行ったところ、10%程度のグルコマンナンが含まれることが示唆された。さらに免疫染色法での検出を試みた。ブロッキング処理したセルロースナノファイバーに抗マンナン抗体(LM21)を作用させたあと、5 nm の金コロイドが標識された二次抗体を反応させた。酢酸ウラニル染色して透過型電子顕微鏡で観察した画像が図 5 である。その結果、セルロースナノファイバーの表面に明らかな標識が観察された。今回実験のために調製したセルローススナノファイバーはスギ木粉を亜塩素酸ソーダ処理してリグニンを除去し、5%の水酸化ナトリウム水溶液で煮沸処理して大部分のヘミセルロースを除いた試料である。しかし、グルコマンナンは非常に除去が困難な多糖であり、セルロースと強く相互要することでミクロフィブリル束表面に堆積していることが本実験により明らかとなった。

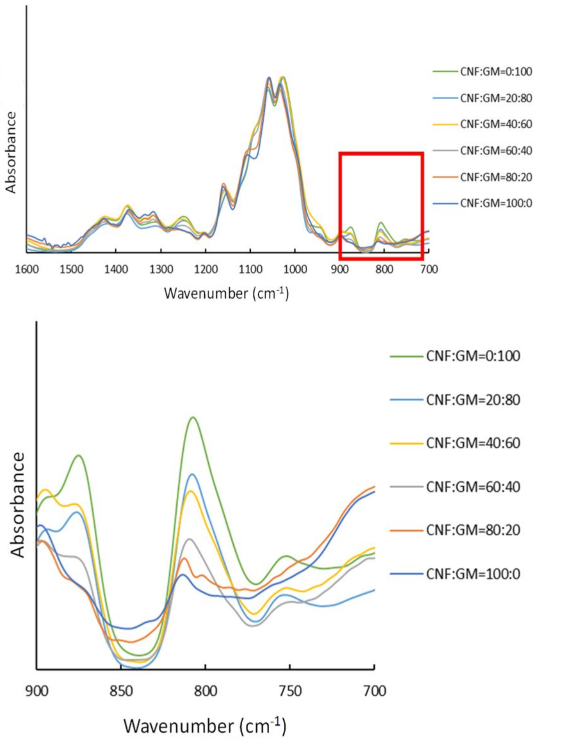

図 4　モデル試料を用いた場合のグルコマンナンの赤外吸収スペクトル(上)とその拡大図(下)

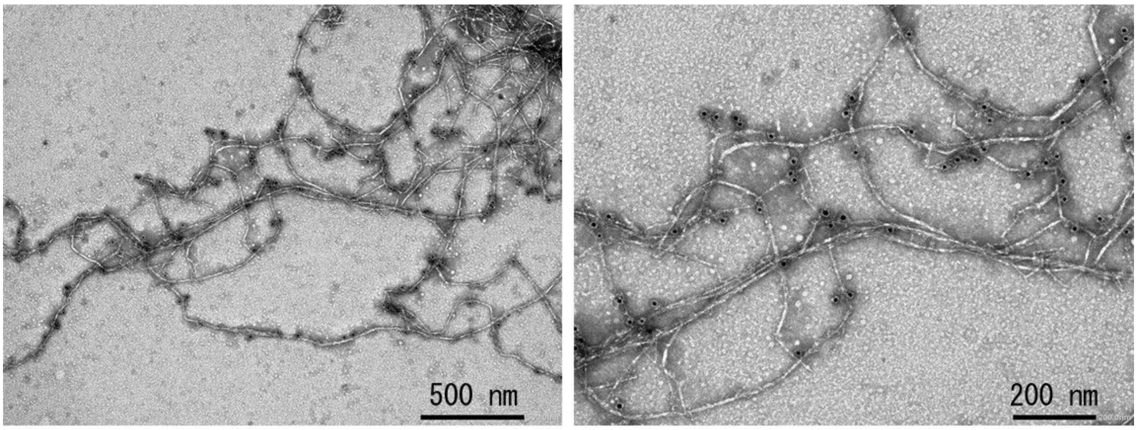

図 5　スギナノファイバーを抗グルコマンナン抗体および 5 nm の金コロイドが結合した 2 次抗体で染色した透過型電子顕微鏡画像(左)とその拡大図(右)

リファレンスデータを取得するため、HPLC を用いて糖分析を実施した。得られたマンノース量を赤外吸収スペクトルと相関させ、検量モデルの構築を試みた。検量モデルの精度は相関係数を用いて評価したところ、>0.95 という高い精度を示した。これは研究開始時に掲げた目標を達成する成果であった。モデルセルロースとしてバクテリアセルロースを用いて検討したところ、同様に>0.97 の予測精度が得られた(図 6)。したがって、結晶性が異なるセルロースにおいてもマンノースの予測が可能であることが示唆された。

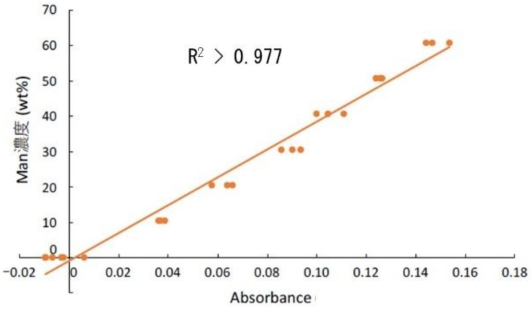

図 6　赤外分光分析法におるマンノース量を予測する検量モデルの構築

本研究で構築した検量モデルの予測精度を評価するため、実バイオマスから赤外吸収スペクトルを取得し、マンノース濃度を見積もった。そして同じ試料に対し HPLC を用いた化学分析によってマンノース量を分析し、両者の値を比較したのが図 7 である。スギやアカマツでは非常に良い予測精度が得られた。糸こんにゃくおよびグルコマンナン粉末においては赤外分光分析法で見積もった値はやや低いものであったが、それでも一定の予測性能を示した。

これらの結果から、赤外分光法を利用したマンノースの定量評価が可能であることが示唆された。グルコマンナンを含めたヘミセルロースの定量は非常に困難であることから、赤外分光分析によって簡便且つ迅速に評価できる成果は非常に意義が高いと言える。本成果については国際学会で発表したところ Best Poster Award を受賞した[3]。

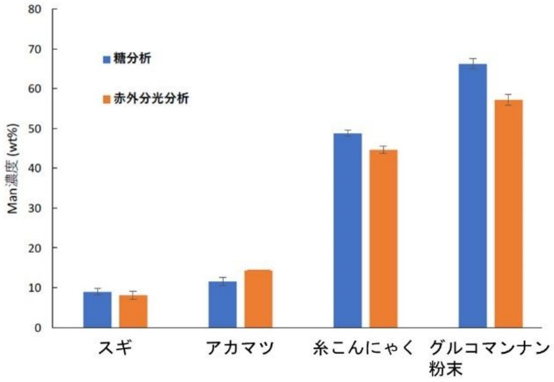

図 7　実バイオマスに対して赤外分光分析法におるマンノース量を予測する検量モデルの構築

同様の試料について顕微システムを用いて赤外吸収スペクトルを取得した(図 8)。するとプロポールの割合が増加するにつれて 810 cm^{-1}—800 cm^{-1}の間の吸収が増加することが認められた。そして検討したところ>0.90 というように精度は低下したものの一定の予測能は維持していた。したがって、バイオマス試料の微小領域においてもマンノース含有量を予測できる可能性が示された。

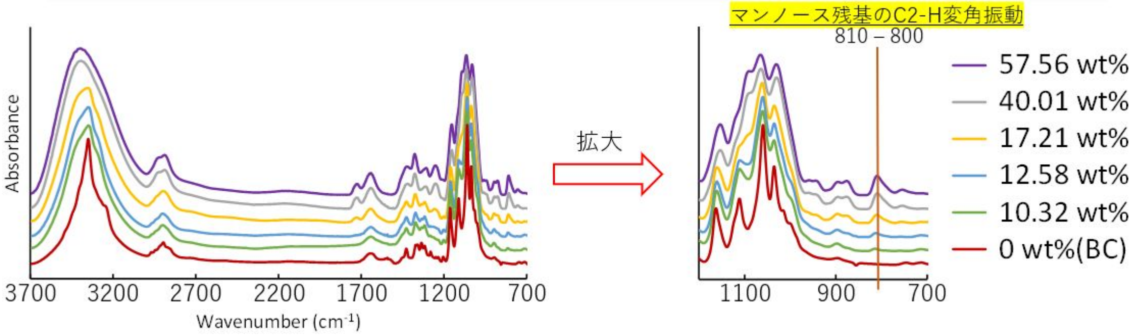

図 8　顕微システムを用いて取得したグルコマンナンの赤外吸収スペクトルとその拡大図

次にスギ木粉を亜塩素酸ソーダ処理し、リグニンを除去した。亜塩素酸ソーダ処理を 2 回行った試料と 5 回行った試料を市販セルラーゼで加水分解したところ、糖化阻害を引き起こした。この分解残渣から顕微システム赤外分光分析でスペクトルを取得したところマンナンが検出された。これまでの分析データも含めて検討したところ、このマンナンが糖化阻害の主たる原因であることが明らかとなった。

本研究の展開としてセルロースの構造形成にマンナンが及ぼす影響を調べるため、マンノースの吸着量と結晶性・結晶形の関係性について調べた。吸着量に関しては本研究で確立した赤外分光分析による検量モデルを用いた。その結果、マンナンの吸着に伴いバクテリアセルロースの結晶性は著しく低下した。また結晶形において三斜晶の割合が減少したが、ある一定の値で頭打ちすることを見出した。これらの結果は従来の化学分析では困難であった微小領域から成分情報が得られる顕微赤外分光システムを駆使した成果である。

参考文献

(1) Horikawa Y., Imai T., Takada R., Watanabe T., Takabe K., Kobayashi Y., Sugiyama J. (2011) *Appl Biochem Biotechnol* 164(2), 194-203.

(2) Horikawa Y., Imai T., Takada R., Watanabe T., Takabe K., Kobayashi Y., Sugiyama J. (2012) *Appl Biochem Biotechnol* 166(3), 711-721.

(3) Hioki Y., Seiya H., Matsuo F., Nakaba S., Funada R., Horikawa Y.: High-throughput evaluation of mannan content in softwood by using Fourier-transform infrared spectroscopy. The 5th Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science (2020)

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Hirano S., Yamagishi Y., Nakaba S., Kajita S., Funada R., Horikawa Y.	４．巻 251
２．論文標題 Artificially lignified cell wall catalyzed by peroxidase selectively localized on a network of microfibrils from cultured cells.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Planta	６．最初と最後の頁 －
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-020-03396-0	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 Horikawa Y., Tsushima R., Noguchi K., Nakaba S., Funada R.	４．巻 66
２．論文標題 Development of colorless wood via two-step delignification involving alcoholysis and bleaching with maintaining natural hierarchical structure.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Journal of Wood Science	６．最初と最後の頁 －
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s10086-020-01884-1	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 Kurei T., Tsushima R., Okahisa Y., Nakaba S., Funada R., Horikawa Y.	４．巻 75
２．論文標題 Creation and structural evaluation of the three-dimensional cellulosic material, “White-Colored Bamboo”	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Holzforschung	６．最初と最後の頁 180-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/hf-2020-0030	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 T., Hioki Y., Kose R., Nakaba S., Funada R., Horikawa Y.	４．巻 29
２．論文標題 Effects of orientation and degree of polymerization on tensile properties in the cellulose sheets using hierarchical structure of wood	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Cellulose	６．最初と最後の頁 2885-2898
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10570-021-04160-7	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19件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

1．発表者名 Horikawa Y., Tsushima R., Seiya H., Kurei T., Noguchi K., Nakaba N., Funada R.
2．発表標題 Development of colorless wood by two-step delignification with maintaining natural hierarchical structure
3．学会等名 The 5th Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science（国際学会）
4．発表年 2020年

1．発表者名 Hioki Y., Seiya H., Matsuo F., Nakaba S., Funada R., Horikawa Y.
2．発表標題 High-throughput evaluation of mannan content in softwood by using Fourier-transform infrared spectroscopy
3．学会等名 The 5th Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science（国際学会）
4．発表年 2020年

1．発表者名 堀川祥生
2．発表標題 水環境下における木質試料が発現する機能解析
3．学会等名 第70回高分子討論会
4．発表年 2020年

1．発表者名 津島梨乃、暮井達己、半　智史、船田　良、堀川祥生
2．発表標題 リグニンフリーな広葉樹材の創出とその特性評価
3．学会等名 第70回日本木材学会大会
4．発表年 2020年

１．発表者名
中西千聡、暮井達己、津島梨乃、半　智史、船田　良、堀川祥生

２．発表標題
天然のアクチュエーター"松かさ"を構成するマトリックス成分の機能解析

３．学会等名
第70回日本木材学会大会

４．発表年
2020年

１．発表者名
暮井達己、津島梨乃、半　智史、船田　良、堀川祥生

２．発表標題
白い木材の細胞壁層観察による高配向性木質材料への展望

３．学会等名
第70回日本木材学会大会

４．発表年
2020年

１．発表者名
平野聖也、日置優人、半　智史、船田　良、堀川祥生、梶田真也

２．発表標題
グルコマンナン存在下における木質細胞壁の人工合成

３．学会等名
第70回日本木材学会大会

４．発表年
2020年

１．発表者名
暮井達己，日置優人，小瀬亮太，半　智史，船田　良，堀川祥生

２．発表標題
スギの階層構造を活用した新規セルロースシートの物性評価

３．学会等名
第71回日本木材学会大会

４．発表年
2021年

１．発表者名
平野聖也，暮井達己，半　智史，船田　良，堀川祥生

２．発表標題
白い切片の創出と形態学的解析

３．学会等名
第71回日本木材学会大会

４．発表年
2021年

１．発表者名
日置優人，平野聖也，松尾風香，半　智史，船田　良，堀川祥生

２．発表標題
赤外分光分析によるマンノース量のハイスループット解析

３．学会等名
第71回日本木材学会大会

４．発表年
2021年

１．発表者名
日置優人，平野聖也，堀川祥生

２．発表標題
グルコマンナン存在下におけるバクテリアセルロースの特性解析

３．学会等名
第28回セルロース学会年次大会

４．発表年
2021年

１．発表者名
平野聖也，半智史，船田良，堀川祥生

２．発表標題
人工細胞壁の基板調製に向けた化学処理条件の最適化

３．学会等名
第28回セルロース学会年次大会

４．発表年
2021年

１．発表者名
暮井達己，日置優人，小瀬亮太，半智史，船田良，堀川祥生

２．発表標題
針葉樹材におけるセルロース繊維の集積構造を利用したシート材料の構造・物性評価

３．学会等名
第28回セルロース学会年次大会

４．発表年
2021年

１．発表者名
山崎真由，鈴木寛彬，堀川祥生

２．発表標題
結晶内重水素化法と赤外分光法によるセルロースの構造評価

３．学会等名
第28回セルロース学会年次大会

４．発表年
2021年

１．発表者名
平野聖也，暮井達己，半 智史，船田 良，堀川祥生

２．発表標題
リグニンフリー木材の創出における化学処理の影響

３．学会等名
第72回日本木材学会大会

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
酸加水分解による木材の解剖学的および材料力学的変化の追跡

３．学会等名
第72回日本木材学会大会

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
スギおよびアカマツ材の圧縮特性とそれに寄与する組織細胞構造・化学成分解析

３．学会等名
第72回日本木材学会大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
堀川祥生，日置優人，暮井達己，平野聖也，田鶴寿弥子

２．発表標題
赤外分光法を駆使した化学構造情報に基づく日本産二葉松材の多様性評価

３．学会等名
第72回日本木材学会大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
日置優人，鈴木寛彬，平野聖也，堀川祥生

２．発表標題
バクテリアセルロースの結晶変態に着目したグルコマンナンの機能解明

３．学会等名
第72回日本木材学会大会

４．発表年
2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Best Poster Award
Hioki Y., Seiya H., Matsuo F., Nakaba S., Funada R., Horikawa Y.
"High-throughput evaluation of mannan content in softwood by using Fourier-transform infrared spectroscopy"
The 5th Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science, 2020, on line

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