

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22655074

研究課題名（和文） 高分子ナノ繊維を用いた人工植物葉の開発と糖生産システムの構築

研究課題名（英文） Development of Artificial Plant Leafs using Polymeric Nanofibers and Formulation of Sugar-Production System

研究代表者

中根 幸治 (NAKANE KOJI)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50292446

研究成果の概要（和文）：LED光源を用い、マメ科植物であるクズ(*Pueraria lobata*)のカルスを大量培養できる方法を確立した。酵素溶液で単細胞化したクズの細胞をエチレン酢酸ビニル共重合体(EVOH)溶液（溶媒：イソプロパノール/蒸留水=70/30 wt%）に分散させた。これを紡糸液として電界紡糸を行ったところ、EVOH ナノ繊維間に植物細胞が固定化された不織布を作製することができた。エバンスブルー染色により、ナノ繊維に固定化されたクズ細胞は生体機能を保持していることを確認した。

糖が存在しない培養液中にクズ細胞を分散させ、LED光源下で一週間培養を行った。一週間後の培養液を液体クロマトグラフ質量分析により調べたところ、グルコースとスクロースが検出された。これは光合成で生産された糖が細胞外に分泌されることを示唆している。よって、クズ細胞を高分子ナノ繊維に固定化した場合、光合成により生産された糖をナノ繊維と通して回収できる可能性を確認することができた。EVOH ナノ繊維不織布に固定したクズ細胞を培養液中に分散させたが、培養液中から糖を検出することができなかった。このことから(1)さらに多くの細胞をナノ繊維に固定する、(2)さらに光合成能が優れた細胞を大量培養してナノ繊維に固定する必要があることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：We developed a new method of mass cultivation for plant (*Pueraria lobata*) cell using LED irradiation. The isolated plant cells were dispersed in ethylene vinyl acetate copolymer (EVOH) solution. The solution was used as a spinning solution for electrospinning, and we obtained the plant cells immobilized on EVOH nanofiber mat. We confirmed that the cell had a bioactivity after the electrospinning.

The cells were dispersed in a culture without sugar and it was cultured for a week under LED irradiation. The culture was tested by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) and thus glucose and sucrose were detected. This indicates that sugar produced by photosynthesis in the plant cells was secreted to outside the cell walls. On the other hand, we could not detect sugar from the culture containing the cells immobilized on EVOH nanofiber mat. It is likely that (1) the cells immobilized were small in number; (2) the cells with higher photosynthetic performance must be used instead of *Pueraria lobata* cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,500,000 | 0 | 2,500,000 |
| 2011年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 総計 | 3,100,000 | 180,000 | 3,280,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・高分子繊維材料

キーワード：繊維材料

1. 研究開始当初の背景

石油の大量消費は炭酸ガスの増加を招き、有効な炭酸ガスの減少方法を見いだせないまま、地球温暖化が進行している。このような現状から、CO₂ プラマイゼロの代替エネルギーの利用促進を図ることが必要である。プラマイゼロのエネルギー源の一つに植物の光合成産物がある。これまで光合成産物は食として捉えられてきたが、現在は食料用の農耕作物のエネルギー作物への転換が図られている。しかし、この方法は、作物価格の高騰など様々な問題を生みつつある。したがって、食料生産とバッティングしない、植物を用いた工業的なエネルギー源の有用物質生産法の開発が必要である。

まず、植物から有用物質を生産する細胞を採取して、大量培養・利用するプロセスの構築が必要である。このような研究はいくつか行われているが、工業化された例は少ない。また、植物細胞を天然高分子に固定化して、有用物質の生産を行う研究もみられるが、固定化用担体の種類、性能が限定されることもあり、実用化には至っていない。

近年、エレクトロスピンニング(ES)法による高分子ナノ繊維の形成と利用が注目されている。ナノ繊維は高比表面積を有し、高性能・高機能材料の開発の手段として期待されている。その例として、ナノ繊維に酵素を固定化させたり、ナノ繊維を動物細胞培養のスキヤホールドとして用いたりする研究が活発に検討されており、優れた成果が国内外で報告されている(当グループでも酵素を固定化したナノ繊維を用いて効率的に酵素反応が進行することを示している)。

ナノ繊維はバイオ・生体材料の開発に非常に有用であることが示唆されているが、ナノ繊維と植物細胞の複合系の報告例は無い。ナノ繊維は高比表面積体であり、空孔率も高い。このため、通気性に優れ、かつ、細胞と繊維の接触点が多くなり、固定化された細胞に光や栄養が供給されやすい環境が得られることが予想できる。そこで、ナノ繊維への植物細胞の固定化を行い、エネルギー源などの有用物質の生産を効率的に行えるのではないかと考え、本着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、光合成で糖を生産する植物の葉肉細胞以外を高分子ナノ繊維に置き換えることにより光合成機能を持つ人工葉の構築に挑戦する。まずは、光合成機能を保持したまま葉肉細胞を継続的に培養する方法を明らかにする。そして、高分子ナノ繊維と培

養葉肉細胞を用いた人工的な植物葉のアセンブルが行えることを明らかにする。これらを踏まえて、土地や季節に依存しないバイオ燃料源の生産システムを開発する。以上のことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) カルスの培養

マメ科植物であるクズ(*Pueraria lobata*)を採取し、5cm大に切り取り、0.5w%に調整した逆性石けん中に10分間浸漬し洗浄した。次に、5w%に調整した塩素水に移し変え、さらに30分殺菌した。塩素水を洗い流した後、1cmほどに切り分け、培地に植えた。白色LED照射下で4~6週間毎に新しい培地への植え替えを繰り返し、カルスを培養した。培地の成分は以下の通りとした。

【無機塩類】(mg/L)

| | |
|---|-------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| KNO ₃ | 1900 |
| CaCl ₂ ・2H ₂ O | 410 |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| Na ₂ -EDTA | 37.3 |
| FeSO ₄ ・7H ₂ O | 27.8 |
| MnSO ₄ ・4H ₂ O | 22.3 |
| ZnSO ₄ ・4H ₂ O | 8.6 |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 |
| KI | 0.83 |
| Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ ・5H ₂ O | 0.025 |
| CoCl ₂ ・6H ₂ O | 0.025 |

【有機物】(mg/L)

| | |
|------------|-----|
| スクロース | 30 |
| myo-イノシトール | 100 |
| グリシン | 2.0 |
| ニコチン酸 | 0.5 |
| 寒天 | 10 |
| 塩酸ピリドキシン | 0.5 |
| 塩酸チアミン | 0.1 |
| キネチン | 0.2 |

(2) カルスの単離

生成したカルスを酵素液中に入れ、30℃に保ち、3時間攪拌させた。洗浄液で酵素を洗い流し、5分間遠心分離した。

カルスの単離実験に使用した酵素液と洗浄液の成分は以下の通りとした。

【酵素液】

| | |
|---|------------|
| Cellulase Onozuka RS | 3wt% |
| Macerozyme R-10 | 2wt% |
| マンニトール | 0.5M |
| KH_2PO_4 | 27.2 mg/L |
| KNO_3 | 101 mg/L |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1480 mg/L |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 246 mg/L |
| KI | 0.16 mg/L |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 mg/L |

【洗浄液】

| | |
|---|------------|
| マンニトール | 0.5M |
| KH_2PO_4 | 27.2 mg/L |
| KNO_3 | 101 mg/L |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1480 mg/L |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 246 mg/L |
| KI | 0.16 mg/L |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 mg/L |

(3) クズ細胞を固定化した高分子ナノファイバーの作製

10w%のポリビニルアルコール (PVA) 水溶液にクズ細胞を分散させたものを紡糸溶液とし、無菌状態 (クリーンベンチ内) で電界紡糸法により植物細胞固定化 PVA ナノファイバーを作製した。

また、10w%のエチレンービニルアルコール共重合体 (EVOH: エチレン含有率 51mol%) 溶液 (溶媒: イソプロパノール: 蒸留水=70:30wt%) でもクズ細胞を溶液中に分散させた後、無菌状態で電界紡糸を行い、クズ細胞固定化 EVOH ナノファイバーを作製した。

電界紡糸の条件は次の通りである。

- ・電圧 20 kV
- ・紡糸液送り出し速度 0.150 ml/min
- ・針先からコレクターとの距離 150 mm
- ・針管の寸法 1.5×35 mm

4. 研究成果

(1) カルスの生成・単離

図 1(a) (b) に培養開始直後のクズと培養後 3 ヶ月後の写真を示す。クズのカルスが生成しているのがわかる。このカルスを単離し、得られた細胞の顕微鏡写真を図 2 に示す。細胞の大きさは 50~100 μm と判断できる。

(2) クズ細胞固定化ナノ繊維の作製

Fig. 3(a) (b) にクズ細胞を固定化した PVA および EVOH ナノ繊維の SEM 像を示す。PVA と EVOH で繊維径が異なるが、いずれの材料でも、高分子ナノ繊維間にクズ細胞が固定化された不織布を作製することができた。試料を乾燥させたために細胞は縮小している。

(3) エバンスブルー染色

ナノ繊維に固定化されたクズ細胞の生体

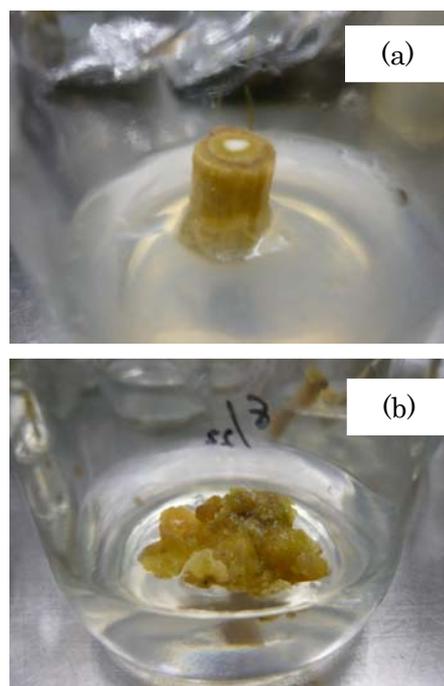


図 1 クズ(*Pueraria lobata*)

(a) 培養開始直後, (b) 3 カ月後

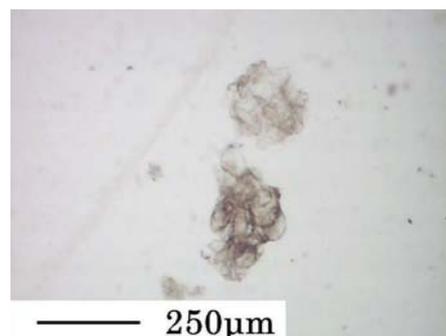


図 2 単離したクズ細胞

機能の有無を定性的に調べるために、エバンスブルーによる細胞の染色を行った。まず、Fig. 4(a) (b) はナノ繊維に固定化していないクズ細胞である。生体機能を保持している植物細胞は細胞核が色素を外へ出す働きをするため Fig. 4(a) のように青く染色されないが、生体機能を失った植物細胞は Fig. 4(b) のように青く染色される。

Fig. 5(a) は PVA に固定化したクズ細胞の顕微鏡写真である。固定化クズ細胞でも染色されていない植物細胞を確認出来た。

Fig. 5(b) は EVOH に固定化したクズ細胞の光学顕微鏡写真である。EVOH に固定化した植物細胞は紡糸溶液に含まれる IPA が原因で多くの細胞の生体機能が失われる事が予想されたが、生体機能を保持している可能性の高い植物細胞が多く見られ、その中から葉緑素を持ったものも確認できた。

以上の結果より、電界紡糸を経ても、植物

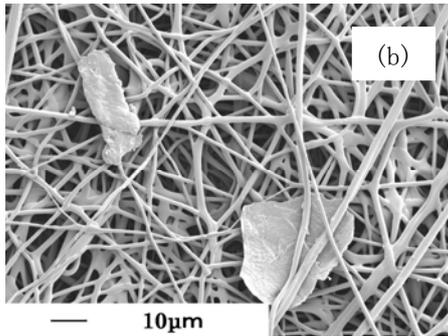
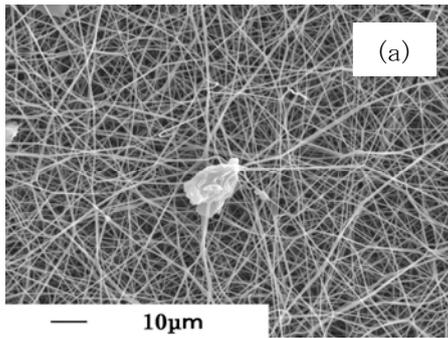


図3 クズ細胞を固定化した(a)PVA および(b)EVOH ナノ繊維のSEM像

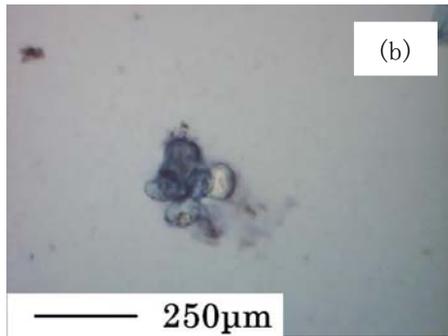
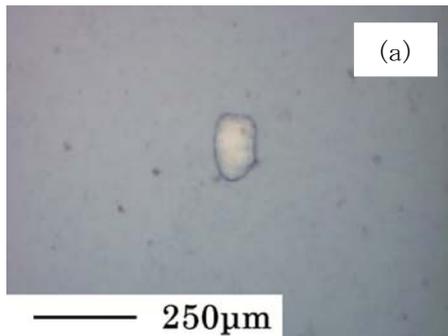


図4 エバンスブルーによるクズ細胞の染色 [(a)生体機能を保持した細胞, (b)死滅した細胞]

細胞の生体機能は保持されたままナノ繊維に固定化できることが確認できた。

(4) 光合成により生産された糖の細胞外への分泌
糖が存在しない培養液中でクズ細胞を分

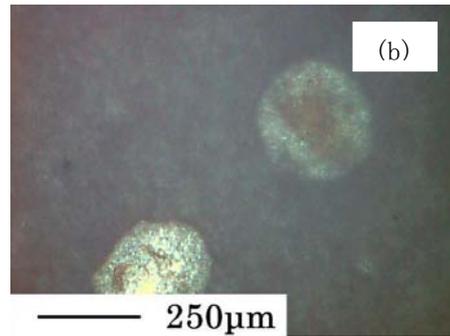
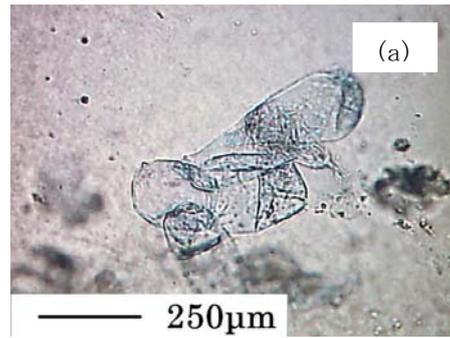


図5 エバンスブルーによるナノ繊維に固定化したクズ細胞の染色 [(a)PVA ナノ繊維, (b)EVOH ナノ繊維]

散させ、LED 光源下で一週間培養を行った。一週間後の培養液を液体クロマトグラフ質量分析により調べたところ、グルコースとスクロースが検出された。Fig.6 にクロマトグラムの一例を示す。7.32分と11.10分にそれぞれグルコースとスクロースのピークが見られる。これは光合成で生産された糖が細胞外に分泌されることを示唆している。よって、クズ細胞を高分子ナノファイバーに固定した場合、光合成により生産された糖をナノファイバーを通して回収できる可能性を確認することができた。しかしながら、検出された糖の濃度は十分ではなく、実用的には現時点よりも100倍程度は濃度を高くする必要が考えられる。また、電界紡糸法を用いて、EVOH ナノファイバー不織布に固定したクズ細胞を培養液中に分散させたが、培養液中からは糖を検出することができなかった。これは分泌された糖が微量であるためと考えられる。今後は、より多くの細胞をナノファイバーに固定するか、あるいは、より光合成能が優れた細胞を大量培養してナノファイバーに固定することが課題である。

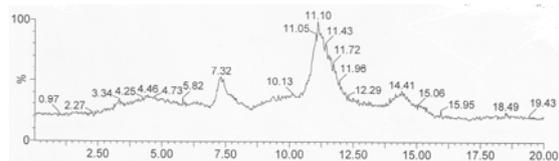


図6 クズ細胞を分散させた培養液の液体クロマトグラフ質量分析結果

PVA は水に膨潤し、ナノ繊維の形状を保持することが困難であるが、EVOH は親水性－疎水性のバランスを兼ね備えており、水中でのナノ繊維の形状安定性にも優れる。さらに、生体適合性に優れることから、EVOH のナノ繊維が人工植物葉の基材として有用であることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中根 幸治 (NAKANE KOJI)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50292446

(2) 研究分担者

小形 信男 (OGATA NOBUO)

福井大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70108249

前田 柁夫 (MAEDA MASUO)

福井大学・教育地域科学部・教授

研究者番号：10020140

(3) 連携研究者

該当なし