

基礎科学とセルロースの接点 —科学の発展を支えた物質—

今井 友也^{1*}

Cellulose as a material that has sustained development of science

Tomoya Imai^{1*}

概要

セルロース利用開発研究は近年ますます活発になっており、2014年から2016年にかけての「日本再興戦略」にも、その国際標準化・製品化にむけた研究開発を進めることで木材需要を創出し、林業の成長産業化を進めるべきとの方向性が明示されている。このように有望視されている材料・セルロースとはどんな物質なのか？ 実はX線回折現象の発見や電子顕微鏡の開発といった近代科学史上の重要なポイントでセルロースは試料として登場しており、科学の発展においても重要な役割を果たしてきた物質である。20世紀の科学史と絡めながら、近年注目が集まってきたセルロースについて概説し、このセルロースを合成する生物能力の凄さについて理解していただけたら幸いである。

1. はじめに

「セルロースは地球上に最も豊富に存在する天然高分子の一つであり・・・」 この一文は、セルロースに関する報文の緒言に十中八九見られる表現であり、セルロースの研究をしているものならば一度は使ったことがある表現である。専門家にとっては手垢のついた表現ではあるのみならず、テレビ・新聞等にもセルロースという言葉がしばしば登場する昨今では、一般の皆さんの中にも耳にされた方はいらっしゃると思う。セルロースのお話をするにあたって、まずこの文章を少し掘り下げてみたい。

「地球上に最も豊富に存在する」ということは、普段の生活で普通に目にするということである。我々がもっとも頻繁に目にするセルロースは紙や綿麻製衣料等の植物由来のものであろう。街路樹、庭木、道端の雑草から湖沼・田んぼの水草まで、植物はその細胞の周りに細胞壁をまとっているが、植物組織を化学処理することにより細胞壁から繊維状の物質を取り出し、それをセルロースと名付けたのは19世紀の科学者 Anselm Payen である¹⁾。私の主観による推測だが、このような繊維の外観から、セルロースが植物組織の強さの原因だと当時から考えられていたとしても何ら不思議はないし、実際にセルロースの力学特性は軽量な割には優れている。

ではセルロースが強い材料であるのはなぜだろうか？ ものの特性に関する素朴な疑問を解決する王道は構造解析である。現在も頻繁に使われる分子レベルでの構造解析方法として、X線回折と電子顕微鏡が挙げられるが、その黎明期に試料として頻用されていたのは実はセルロースである。本稿ではまず、X線回折と電子顕微鏡の研究初期で観察された結果を紐解きながら、セルロースの構造というものが現在どう理解されているかについて概説する。その上で、セルロースを合成する生物学的機構がいかに精巧にできているかについて説明する。

2018年7月2日受理。

¹⁾〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所バイオマス形態情報分野。

* E-mail: timai@rishi.kyoto-u.ac.jp

2. セルロースの構造研究

本節では、現在の科学における構造解析の王道である X 線回折と電子顕微鏡の黎明期の研究において、セルロースがしばしば試料として登場していたことを紹介する。これらの研究を経て得られた、セルロースの構造に関する現在の理解を簡単に説明する。なお現代の構造解析の主な手法として NMR（核磁気共鳴）という方法もあり、こちらにも優れた構造解析の方法であるが割愛させていただく。

2.1 X 線回折とセルロース

X 線回折とは、ドイツの Laue が 1912 年に発見した現象であり、塩の結晶など規則正しい原子の並びに X 線を当てると、その原子の配列に依存して X 線が特定の方向に飛ばされる現象のことを指す。この現象は 1913 年に Bragg 親子により定式化され、この現象を逆に利用することで X 線を物質に当てたときに得られる回折パターンから、物質の構造解析を原子分解能で行うことができる。古くは低分子の構造解析の主要な手法であったが、現在では高分子、特にタンパク質などの生体高分子の構造解析になくはならないツールの一つである。図 1 にセルロースの X 線回折像の一例を示す。

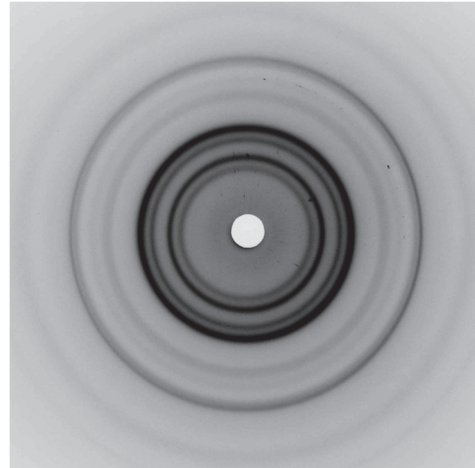


図 1：セルロースの X 線回折パターン
(デバイ・シェラー環)

この X 線回折を使って、Payen の処方で植物組織から取り出された繊維試料に分子がどう充填されているかを解明しようとする考えはごく自然なものだろう。かくして Laue の発見から時間をおかずして、X 線回折実験によるセルロースの構造解析の試みが始まり

(著者の調べた限りで 1920 年にはその報告がある²⁾)、目に見える繊維と平行にナノスケールの大きさのセルロース分子鎖が何本も集まって充填されていることが 1937 年に明らかとなった³⁾。毛利元就の 3 本の矢の逸話よろしく、一本の孤立した分子としてではなく、複数本の分子鎖を束ねることで強度を高めていると理解できる。

なお日本で最初に X 線回折実験を報告したのは東京大学の小野、西川らであり、Laue による X 線回折現象発見のわずか一年後の 1913 年である⁴⁾。この際に使われた試料には竹が含まれていた。すなわちセルロース性の物質である。私の個人的な想像だが、植物組織にセルロースが含まれることは当時すでに認識されており、その中でも竹の割裂しやすい性質に着想を得て規則正しい原子の並びを想像し、X 線回折実験に適切な試料だろうと考えたのではなかろうか。なおこの X 線回折像は、白色 X 線を使ったため構造解析を行うことはできなかったが、セルロースの X 線繊維回折像として世界初のものである⁵⁾。

2.2 電子顕微鏡とセルロース

その名の通り、光の代わりに電子線を使って試料を観察するのが電子顕微鏡である。電子線が光の一種であることが証明され（電子の波動性の証明、1927 年）、電子を使って顕微鏡を作ることが可能であることが示された。それを初めて実現したのがドイツの Ernst Ruska である。1931 年とのことである⁶⁾。Ruska は電子顕微鏡の開発を進める中で生物学者と共同研究を進めた。その一人である von Helmut Ruska は試料の一つとしてセルロースを選んで観察を行っており、1940 年に報告している⁷⁾。ところがこのときの電子顕微鏡写真はかなり質の悪いものであった。電子顕微鏡開発の黎明期の当時ではどうすれば見たいものを見ることができるのか、本当の手探りの状態であったと思われるが、ある程度の方法論や技術が確立された現在も、未知の試料を電子顕微鏡観察の際に一番大事なものは試料の作り方である。そこでよい試料を作るにあたり、電子顕微鏡の特性として一つの点が重要となってくる。

電子顕微鏡でものを見るためには、電子線が観察物により散乱される必要があるが、セルロースのような軽い原子からできている物質は電子線を強く散乱しない。したがって、そのまま観察しても非常にコントラストの薄い写真しか撮れない。この低コントラストの問題を解決するために、試料に金属の薄膜を蒸着して観察する方法が1946年に報告された⁸⁾。この論文において様々な試料が観察されているが、そのうちの 하나가セルロースであった。その後、セルロース試料の選択などでも工夫がなされ、重い元素である金属を試料表面にコートして試料表面の凹凸を強調することで、非常にはっきりとしたセルロース像が1948年に報告された⁹⁾。その写真には、幅10nm程度の微小な繊維が明らかに示されており、ナノメートルスケールにおいてもセルロースが繊維構造を持つことが明確に示された。現在では、生物が作るセルロースは由来を問わずすべてこのような繊維形態を取ることが示されている(図2)。なお図2の写真は金属コートではなく、重金属溶液に試料を浸して試料構造の輪郭を強調する「負染色法」という方法で、軽元素からなるセルロースをより明瞭に可視化する方法で観察した画像である。

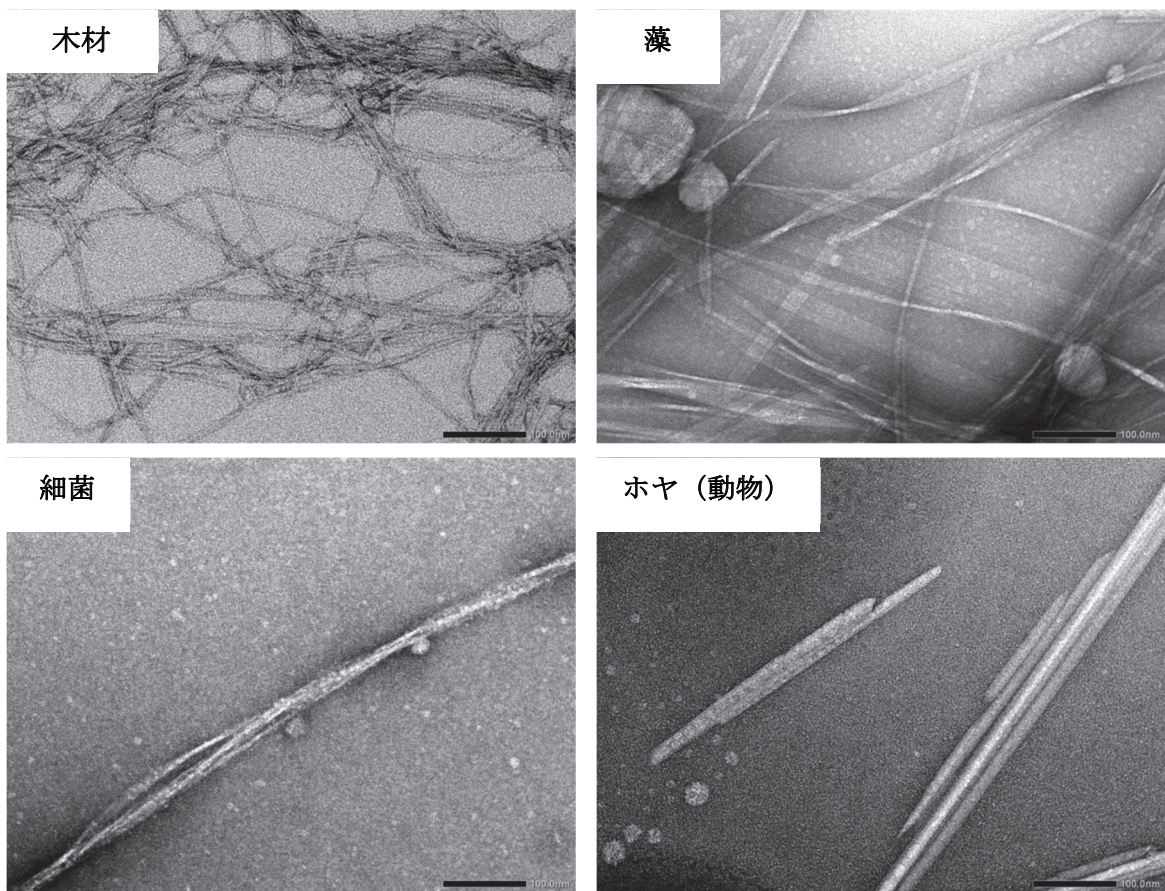


図2: セルロースの電子顕微鏡写真(負染色法による)。異なる4つの生物種から単離したセルロースについて撮影した(いずれも同倍率、スケールバーは100nm)

この微小繊維のことを学術上「マイクロフィブリル」と呼ぶ。X線回折の解析結果と電子顕微鏡のデータを合わせて、現在ではセルロース分子鎖が伸びきった形で何本か束ねられたものがマイクロフィブリルだと理解されている。この分子鎖が規則的に並んでいるためにセルロースは結晶性を示し、X線回折現象を引き起こすのだ。セルロースの優れた強度特性も根本はこの結晶性にある。セルロースのX線回折像の分析から、由来を問わず天然のセルロースは例外なくI型結晶という構造で説明できることが分かっている(正確にはI_α型とI_β型の亜型を含む)。生物種が違ってセルロースは複数本が

束ねられて繊維形態を形成し、しかもその分子鎖配置もいくつか可能性がある中で限られたパターンしかとらないことは驚きであり、研究者の探求心をくすぐる点である。

なお2017年のノーベル化学賞となったクライオ電子顕微鏡（単粒子構造解析）は、重元素による修飾なしの無染色で生体高分子を見ることで原子分解能での構造解析を可能にし、X線結晶構造解析の独壇場であった構造生物学の世界を一変させた。「真空環境に生体高分子を放り込んだらカラカラに乾いて、本来の構造なんか電子顕微鏡で見える訳がない」という常識を壊した Jacques Dubochet と、低コントラストや電子線損傷という問題があろうとも、電子顕微鏡画像には構造情報が含まれていることは間違いないのだから電子顕微鏡でも生体高分子の三次元構造再構築は可能だと、ひるまず研究を進めた Joachim Frank と Richard Henderson に、時代が技術革新を伴って追いついた結果であろう。それまでクライオ電顕データの単粒子構造解析での構造解析はあまり分解能があがらず、時には眉唾ものとして扱われることもあったが、2013年にそれまでのクライオ電顕では考えられないような小さなタンパク質から原子分解能での構造解析が報告されたときは、私も衝撃を受けた。そのわずか4年後にノーベル賞が授与されるわけだから鈍感な私でも衝撃を受けたわけである。同じく軽元素からなるバイオマスの研究にも導入が急がれる。

2.3 構造解析とは試料を小突いて応答を見ること

X線と電子顕微鏡の話が終わったところで、少し横道にそれで構造解析という科学的手法について触れてみたい。X線回折や電子線を使った構造解析法は、詳細を省いてエッセンスだけを言葉にして説明すると、物質に波を当てそこから帰ってくる応答を分析することにより構造を見る方法である。分析する応答の種類により得られる情報も構造情報から化学情報までさまざまである。前節のように構造情報を得るためには散乱波を分析することになる。この点で、本研究所で行われている電磁波を使った気象観測と原理的に似ている。次にもう少し詳しく説明する（難しいと思われる方はスキップしてください）。

波には「波長」という重要な性質がある。ここでいう波は連続的に一定間隔（周期・周波数）で揺れている波を指す（波を人工的におこすプールを想像していただければと思う）。X線も電子線も連続的に一定周期で揺れている波であり、この波の間隔（長さ）のことを波長という。先述したように構造解析では波を観察対象に当てて、返ってくる散乱波を分析することによりその構造を解明しようとするものであるが、観察対象に含まれる構造の大きさと同程度の波長をもつ波を当て、そこから返ってくる散乱波を分析すれば、その構造が見えてくるのである。

例えば、分子は原子と原子が共有結合を結ぶことで出来上がっているが、共有結合を結んでいる原子間の距離はおよそ0.1~0.2 nm である。そこで0.1 nm 程度の波長をもつ波を当て、観察対象から出てきた波を捉えることで、分子の構造（原子の配置）に関する情報を得ることができるのである。この0.1 nm 程度の波長をもつ電磁波がまさにX線である。このことが、X線が分子の構造解析に使用できる理由である。ちなみに電子顕微鏡で使用される電子線の波長は100 kV で加速された電子線で0.0037 nm であり、共有結合距離よりも十分に短く、同様に分子の構造解析に使うことが可能となっている。

現在では常識となっているこのような科学的観点・見識も、100年近く前のX線の発見から継承されてきた地道な努力に基づくものであり、その過程でセルロースはしばしば試料として使用されていたのである。当時のもっとも主要な高分子材料であるセルロースは産業上重要な物質であり、セルロースの構造に大きな興味が寄せられていたからであろう。

3. 生物によるセルロースの合成

3.1 セルロースは高分子一水に溶けない分子集合体！

「高分子」とは、共有結合でつながった大きな分子のことを呼ぶ。共有結合でつながった大きな分

子が存在するというこの学説も、1920年の Staudinger による提案当初は賛同が得られず、15年間の論争を経て認められたものである。実は前節で触れたセルロースの X 線回折実験の結果も、この高分子説をめぐる論争で使用されたそうである。つまり X 線回折現象は分子が規則正しく並んでいることを示しているが、セルロースの回折像から求められる分子間の距離は、大きな分子が規則正しく並んでいると考えるには小さすぎてセルロースが高分子であることに矛盾するという、高分子説に対する反論材料として使われたことがある（現在では、高分子の部分構造が同じ形で規則正しく配置されていれば、その部分構造の繰り返しは X 線回折を起こすと理解されており、上述の反論は退けられる）。

高分子は現代社会でなくてはならない材料である。いわゆる「プラスチック」あるいは「ビニル***（袋、板、管など）」は全て高分子であるし、弊所の主要な研究対象の一つである木材も高分子である。高分子の多くが通常環境下では水に不溶・難溶であり、シンプルだが重要な性質である耐水性をもつ固体であることが、材料としてよく使われる本質的な理由であろう（泥船には誰も乗りたくないでしょう）。

この「溶けない」という見た目の性質を分子レベルで説明すると、高分子同士が集合しておりそれが簡単には離れない性質ということになる。ここに、高分子ならではの「高次構造」という概念が発生する。つまり化学構造が同じ高分子でも、分子の集合の仕方が異なることが十分ありうるのである。そして分子の集合の仕方を制御することで様々な性質が現れるため、形態等を工夫して同じ高分子でも様々な性質を持たせることが可能である。

天然セルロースの場合は、前節で紹介した通り、I型結晶のマイクロフィブリルという構造になる。天然セルロースは例外なくこの構造になることから、生物によるセルロース合成機構には、グルコースを単純につなげるだけではなく、長いセルロース分子を絡み合いなく整然と並べて微小な繊維を形成する機能が備わっていることは明らかである。

3.2 セルロース合成酵素は高分子を合成し、さらに分子集積を行う多機能酵素である

生物活動は種々の化学反応の集積であると捉えることができる。細胞の内外で行われる数々の反応は酵素タンパク質により行われる。一般に酵素は生命活動にとって重要なだけでなく、産業でも広く利用されており、基礎科学と応用科学の両方で古くから盛んに研究が進められてきた。

そしてグルコースを連続的につなげて長いセルロース分子を作り、それを何本も束ねて繊維として仕立てる機能の実体がセルロース合成酵素である。セルロース合成酵素は合成産物が固体構造である点で特異な酵素であり、研究が比較的進んでいない一つの原因であった。2010年代になり、ようやく立体構造の解明¹⁰⁾など研究の進展がみられるが、解明すべき事項はまだ残されている。特に注目すべき点は、繰り返しになるが、セルロース合成酵素は例外なく I 型結晶のマイクロフィブリル構造を合成するという観察事実である。合成酵素を使わない方法でセルロースを人工合成する試みの多くでは、セルロースは正しく集合できず、繊維とはかけ離れた薄板構造となる¹¹⁾ (図 3)。その分子鎖の集合様式は天然構造とは全く異なる「II 型」と呼ばれる結晶構造をとる。

このことは、先述のセルロース合成酵素のもつ「長いセルロース分子を絡み合いなく整然と並べてマイクロフィブリルを合成するメカニズム」が、実は極めて高度な機能であることを意味している。人工高分子で糸を紡ぐときには、高分子を溶媒に溶解したり高温で高分子を溶融したり高電位差下に置いたりと厳しい環境に高分子を置いてようやく紡糸を達成できるが、セルロースの生合成は常温常圧水環境という明らかに穏和な条件での紡糸であり、しかもナノメートルスケールの糸を紡ぐのがセルロース合成酵素である。生物機能の離れ業に感心せずにはいられない。さらに図 2 のように大きさ・形の違う様々な構造のセルロースが存在するということは、セルロースのマイクロフィブリル構造は制御可能であることを示唆している。

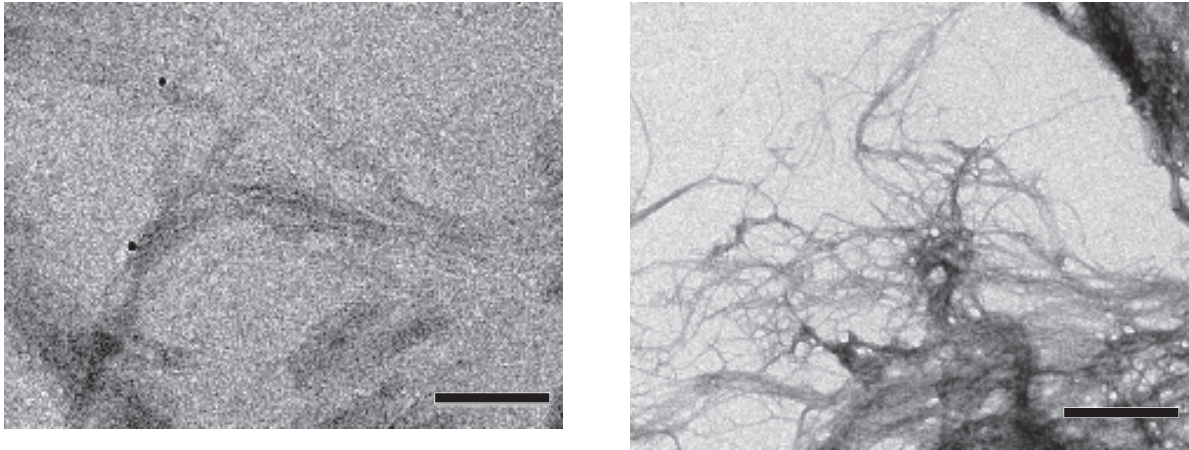


図3：加リン酸分解酵素の逆反応により合成されたセルロース（左）と天然セルロース（右）の電子顕微鏡写真（いずれも同倍率、スケールバーは1 μm）

※写真左は京都大学大学院農学研究科・和田昌久教授のご厚意による

3.3 セルロース合成酵素の機能を人工的に再構成・制御できるか？

上記の驚くべき生物機能を解明するためには、セルロース合成酵素を生物から取り出して、セルロースマイクロフィブリルを合成できる実験系を立てる必要がある。このような直球の試みは当然今までいくつか報告があり、特にここ数年よりレベルの高い実験系が何報か発表されている¹²⁾。しかし、私の分析では、これらの報告はいずれも生化学的にきちんと分析を進めているが、合成産物の解析が不十分であり、酵素活性も十分に高いとはいえず、マイクロフィブリル構造の形成過程の理解やその制御には至っていない。こういった競合グループの論文発表に肝を冷やしつつ、我々の研究グループも研究を進めているが、いまだマイクロフィブリル構造としてセルロースを合成できる実験系の開発には至っていない。しかし失敗から学ぶことは多いはずであり、未成功例からマイクロフィブリル構造形成機構を理解するためのヒントが得られないだろうかという観点で、我々のネガティブデータの例を2つ挙げる。

一つ目は酵素活性の再構成として最も基本的な試験管内系でのセルロース合成について紹介する¹³⁾。このアプローチでは酵素を生物より抽出し、試験管の中で酵素反応を行わせる。セルロース合成酵素は細胞膜に埋まった膜タンパク質であり、その抽出のためには界面活性剤という試薬を使って細胞膜を溶かす必要があるが、この界面活性剤の選択が大変重要であり、適当でないものを選ぶと酵素がたちまち失活してしまう。そこでできる限りマイルドな界面活性剤で酵素を抽出したつもりだったが、合成されたセルロースは高分子量ではあるもののマイクロフィブリルとはならず、塊状の凝集となってしまった。つまりこの実験系では、十分に高い酵素活性でもってグルコースを重合することはできるものの、重合した高分子量のセルロースを繊維として束ねることができなかった。

そこで一つの考察を行った。セルロース合成酵素は本来生きている細胞の細胞膜に存在する酵素である。それを細胞膜から溶かし出して合成反応を行わせること自体に無理があるのではなかろうか。そこでセルロース合成酵素を生きている細胞の中に据え付けて、その上でセルロースを合成させればマイクロフィブリルができるのではなかろうか？ こう考えて、ほとんどセルロースを合成しないとされる大腸菌にセルロース合成酵素を強制的に発現させ、セルロースを合成させることに成功した¹⁴⁾。しかし残念ながら、合成されたセルロースは非天然構造であり、天然活性を持ったセルロース合成酵素の再構成には至らなかった。現在は、酵素が細胞膜上で整然と並ぶことが重要ではないかと考え、酵素を整列させる因子の同定が必要でなかろうかと考えている。

4. おわりに

本稿ではセルロースの構造について、20世紀前半の科学史、特にX線回折および電子顕微鏡と絡めて概説した。そしてセルロースの構造を考えると、セルロース生合成機構は大変精巧な生物機構であることを主張した。この驚くべき生物機構を再現したうえで、セルロースの高次構造を自在に制御できるまでにそのメカニズムを理解したいと考えている。

そして今後、研究を展開していくべきさらに興味深い生物機構は、複数の高分子の混合物である木材細胞壁の生合成である。細胞壁の主成分はセルロース以外に、ヘミセルロース、リグニンという計3種の高分子であり、木材はいわば自然の高分子複合材料である。しかも均一に混じり合った複合材料ではなく、生物が能動的に構造を制御して作りこんだ複合材料である。しかも常温常圧水環境下でのプロセスであり、こんなに素晴らしいメカニズムに学ばない手はない。

この生物機構の解明のためには、構成分子が合成される「生物によるモノ作り」の現場を直接観察する必要があり、酵素反応の分析（生化学）とその産物である高分子固体の構造解析（高分子科学）の両者が必要である。このような複合研究を、木質細胞壁のみならずキチンなども含め広くバイオマスの形成を取り扱う「バイオマス形成学」として進めていく所存である。

最後に、「バイオマス形成学」はまだ研究の小さな種でしかありません。しかしこれが芽吹いて花が咲けば基礎応用の両面で大変面白い展開が待っています。一緒にこの研究を育ててくれる学生・研究者の方をお待ちしています。

謝辞

本稿の3.3で紹介した研究内容は、多くの大学院生（橋本章氏、市川典氏、下農健治氏、孫世静氏）と Paavo A. Penttilä 博士（現・Aalto 大学）の貢献によるものであり、彼らに感謝します。また各種機器分析については、杉山淳司教授、矢野浩之教授、渡辺隆司教授（京都大学生存圏研究所）、辻井敬亘教授（京都大学化学研究所）、和田昌久教授（京都大学大学院農学研究科）、堀川祥生博士（東京農工大学）、榊原圭太博士（京都大学化学研究所）、西村裕志博士（京都大学生存圏研究所）、吉岡康一博士（京都府立大学）にご協力・ご教授いただいて遂行しました。ここに深謝します。透過型電子顕微鏡観察と LCMS 分析に関しては、それぞれ京都大学生存圏研究所全国共同利用システム ADAM と DASH/FBAS により行いました。

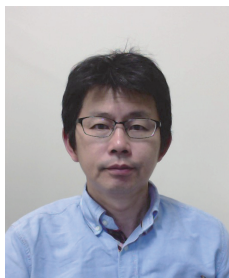
また研究の一部は科研費(19208017, 22658053, 23688021, 25650033) および JST-CREST (JPMJCR13B2) による援助を受けて行いました。ここに感謝いたします。

参考文献

- 1) Fisher C.H. Anselm Payen Pioneer in Natural Polymers and Industrial Chemistry. In: *Pioneers in Polymer Science. Chemists and Chemistry*, vol 10. Seymour R.B. (eds), Springer, Dordrecht, 1989, pp47-61
- 2) Herzog R. O. and W. Jancke, *Zeitschrift für Physik*, **3**, 196, 1920
- 3) Meyer K. H. and L. Misch, *Helv. Chim. Acta*, **20**, 232-244, 1937
- 4) Nishikawa S. and S. Ono, *Proc. Tokyo Math. Phys. Soc.*, **7**, 131-138, 1913
- 5) 梶慶輔 *高分子*, **50**, 468-469, 2001
- 6) ノーベル賞公式サイト https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/ruska-bio.html
- 7) Ruska von H. and M. Kretschmer, *Kolloid-Z.*, **93**, 163-166, 1940
- 8) Williams R. C. and R. W. G. Wyckoff, *J. Appl. Physics*, **17**, 23-33, 1946

- 9) Kinsinger W. G. and C. H. Hock, *Indust. Engineer. Chem.*, **40**, 1711-1716, 1948
- 10) Morgan J. L. W. *et al.*, *Nature* **493**, 181-187, 2013
- 11) 例えばHiraishi M. *et al.*, *Carbohydr. Res.* **344**, 2468-2473, 2009
- 12) Cho S. H. *et al.*, *Biochem. J.* **470**, 195-205, 2014; Purushotham P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 11360-11365, 2016; Cho S. H. *et al.*, *Plant Physiol.* **175**, 146-156, 2017
- 13) Hashimoto A. *et al.*, *Carbohydr. Res.* **346**, 2760-2768, 2011; P. A. Penttilä *et al.*, *Carbohydr. Polym.* **136**, 656-666, 2016
- 14) Imai, T. *et al.*, *Biomacromolecules* **15**, 4206-4213, 2014; S.-j. Sun *et al.*, *Carbohydr. Res.* **434**, 99-106, 2016

著者プロフィール



今井 友也 (Tomoya Imai)

<略歴> 1995 年京都大学農学部林産工学科卒業／2000 年京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了(京都大学博士(農学))／2000~2002 年フランス科学研究庁植物高分子研究所ポスドク／2002~2008 年京都大学大学院理学研究科ポスドク／2008 年より京都大学生存圏研究所准教授

<研究テーマと抱負>顕微鏡と膜タンパク質の生化学を武器に「バイオマス形成学」を興し広めたい。<趣味>山歩き、自転車、ウサギ