

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻

平成 11 年度博士課程 進学

氏名 樋口 暁浩

指導教官名 飯山 賢治

論文題目 Studies on Structural Feature and Biodegradability of Cell Walls of Tropical Grasses

(熱帯産イネ科植物の細胞壁化学構造と消化性に関する研究)

第 1 章 緒言

全世界には約 3.4 億ヘクタールの草地が存在している。これらの草地のバイオマス量は非常に莫大であるが、バイオマスとしてのイネ科植物はその低消化率のため、すべてが飼料として利用されたとしてもわずか 20-30%ほどが反芻家畜の飼料として利用されているに過ぎない。特に熱帯産イネ科植物の細胞壁消化性は温帯産イネ科植物に比べ低いことが知られている。家畜生産性の向上の目的で配合飼料の利用が考えられるが、熱帯地域に存在する国の多くが発展途上国であり、コスト面から利用は困難である。また、我が国でも牛海綿状脳症（狂牛病）の感染が報告され、飼料の安全性が求められている。このような状況下、高品質（高消化性）の牧草の開発が求められている。消化性を阻害する因子に関する研究は温帯産イネ科植物について多く行われてきており、これまでリグニン量が消化率を阻害する因子として考えられていた。しかし、リグニン定量法をはじめとする飼料分析法への疑問や試料サンプリング方法などの問題点が指摘され研究が進められた結果、近年、フェルラ酸を介したリグニン-多糖架橋結合が消化性を阻害する因子として考えられてきている。一方、光合成機構が異なり、構成成分組成も異なる熱帯産イネ科植物の消化性に関する研究は温帯産イネ科植物に比べ少ないのが現状である。本研究では植物細胞壁科学の分野で用いられている分析方法を用いて、細胞壁化学成分、組織構造、細胞壁化学構造など様々な観点から細胞壁消化性を阻害する因子を検討した。

第2章 熱帯産イネ科牧草の最適刈り取り間隔の検討および家畜の嗜好性因子の検討

沖縄県西表島において、熱帯産イネ科植物{セタリアグラス(*Setaria sphacelata* (schumach.) Staph & Hubbard ex M.B. Moss)とギニアグラス(*Panicum maximum* Jacq.)}を刈り取り間隔を変えて収穫量の変化を調べた。いずれの牧草も刈り取り間隔を長くすると収穫量は増加し、年間最大収穫量は43 t/haに達し、二酸化炭素固定の中心的役割を果たしていると考えられている熱帯雨林の年間成長量(15~6t/ha)の2倍以上に達した。熱帯産牧草は地球環境保全という観点からも注目に値する。しかし一方で、牧草の消化率は刈り取り時期および刈り取り間隔によって変化した。これらの、収穫量と消化率およびタンパク質含有量から年間の可消化養分総量を算出することにより、セタリアグラスで60日、ギニアグラスで30日間隔で刈り取りを行うのが家畜生産量の増大をはかる上で最も有効的な刈り取り間隔であることを明らかにした。また、放牧地においては侵入した雑草を家畜が採食しないことにより草地が荒れることが放牧地を維持する上で大きな問題となっている。これらは家畜(放牧牛)のイネ科植物に対する採食嗜好性によっているが、この嗜好性に関して、消化性および化学成分との関係を検討した結果、嗜好性の低いイネ科植物では消化性が低い傾向にあった。

第3章 細胞壁消化性と細胞壁化学成分の関係

セタリアグラス及びギニアグラスの葉部と茎部について、ペプシンおよびブロードスペクトルのセルラーゼを用いた好気条件下での *in vitro* 細胞壁消化率と化学成分分析を行い相関を検討した。葉部の細胞壁消化性は成熟するにつれ減少する傾向があった。また、刈り取り日が夏に近づくにつれ葉の消化率は減少する。茎部では逆の傾向がみられた。主要構成糖の消化率を検討した結果、茎部のキシロース残渣の消化率はセルロース等、他の多糖に比べて低い結果となった。これはキシラン主鎖へのアラビノース残基、ヒドロキシ桂皮酸およびアセチル基がキシラン主鎖の酵素分解を阻害しているためと考えられる。ヒドロキシ桂皮酸類の定量を行ったところ、葉部及び茎部とも温帯産イネ科植物と異なり *p*-クマル酸がフェルラ酸より多く結合していた。温帯産イネ科植物では消化性を阻害する因子としてフェルラ酸によるリグニン-多糖架橋結合が主要な要因となることが知られているが、熱帯産イネ科植物では *p*-クマル酸の関与が推定された。葉部では *p*-クマル酸、フェルラ酸共に消化後の値が減少していた。一方、茎部ではフェルラ酸は消化後に減少しているのに対し、*p*-クマル酸はあまり減少していなかった。これは、フェルラ酸が酵素処理によって糖とともに可溶化しているためと考えられる。これまで、消化率とリグニン量が高い相関を示すと言われていたが、本研究の結果ではギニアグラス

の茎部($R^2=0.84$)を除いてリグニン量と消化率の相関は高くない。また、温帯産イネ科植物でリグニンと多糖の架橋結合に関与している(リグニンにエーテル結合している)フェルラ酸に関しては消化性との間に全く相関は見られなかった。一方で、細胞壁をあらかじめ酵素処理した後に残存するヒドロキシ桂皮酸類、特にエステル結合タイプの *p*-クマル酸が非常に高い相関を示した。この結果から、単純な成分量ではなく、ある特定の構造をした成分が消化を阻害する因子の一つとして働いている事が示唆された。

第4章 節間部位組織構造の消化性の違いおよび化学成分の検討

セタリアグラス節間部位の組織構造の違いによる消化性を光学・電子顕微鏡により観察をした。茎中央部に分布する柔組織は酵素処理により速やかに分解されていく。表皮、厚壁、維管束と一部の柔組織はほとんど分解されなかった。この結果は既往の報告と一致する結果だった。また、熱帯産イネ科植物では温帯産のものに比べ、維管束の割合が高く、これが熱帯産イネ科植物の低消化性の一因と考えられる。これらの組織を光学顕微鏡下で分離し、熱分解ガスクロマト・マススペクトログラフィ分析した。各組織から数種の芳香核生成物を検出し、主要ピークは、4-vinylphenol と 4-vinylguaiacol であった。これらはリグニンおよびヒドロキシ桂皮酸の熱分解生成物であるが、主にヒドロキシ桂皮酸に由来していると考えられる。これは、アルカリ加水分解によるヒドロキシ桂皮酸量の測定結果とも一致していた。最も消化された柔組織にはほとんど *p*-クマル酸は検出されず、第2章の結果同様に、消化性と *p*-クマル酸の関係が示唆された。

第5章 Lignin-Carbohydrate Complex (LCC)の単離

Björkman (1956) の方法に準じ、有機溶媒による Lignin-Carbohydrate Complex(LCC)の単離を試みた。分析に用いたイネ科植物はギニアグラス、セタリアグラスおよびチガヤ(*Imperata cylindrica* Beau. Var major C.E. Hubb)である。消化率はそれぞれ、38.2%、34.1%、17.2%であった。未処理試料の消化率と各区分の収率との関係は見られなかった。しかし、消化残渣に対する溶媒抽出では、ほぼ全量が抽出された。このことから、酵素処理で分解できずに残存している細胞壁多糖は、リグニンとの結合を持つ構造を形成していると考えられる。

各区分の構成糖分析を行った結果、90%ジオキサン (DS90) 可溶区分にはアラビノキシラン由来と考えられる中性糖組成を示した。一方、DMSO (DMS) 可溶区分ではグルコース量が多く、キシロース量は少ない結果となった。リグニン量は未処理試料では DS90 区分が最も多く、既往の報告で言われているようなアラビノキシランとリグニンからなる LCC を形成していると考えられる。

えられる。この区分の分子量分布を HPSEC により検討した。ポリスチレンスタンダードで分子量約 65500~1260 の広い範囲で 6 つの区分からなることがわかった。また、酵素処理残渣の同区分の分子量分布は低分子側にシフトしている。これは酵素処理により、LCC を構成する一部の糖が分解され低分子化したためと考えられる。分子量の変化からリグニンに結合した糖鎖は最低でも重合度数百と推定された。

今回用いた溶媒抽出による LCC 区分の単離法は、各溶媒で特徴的な LCC が単離され、今後、LCC の化学構造分析などを詳細に進める上で有効な方法である。

6. 総括

収穫量と消化率から可消化養分総量を求めることにより効率的な飼料刈り取り間隔を求めることができた。また、牧草地に混入する雑草と牧草に対する家畜の嗜好性について消化率および化学成分との関係を調べた結果、嗜好性の高い草は消化性が高かった。

細胞壁消化性と化学成分の関係を検討したところ、リグニン量と消化率に有意な相関は見られなかった。また、温帯産イネ科植物で報告されているフェルラ酸量に関しても相関は見られなかった。一方で、細胞壁をあらかじめ酵素処理した後に残存するヒドロキシ桂皮酸類、特にエステル結合タイプの *p*-クマル酸が非常に高い相関を示した。この結果から、単純な成分量ではなく、ある特定の構造をした成分が消化を阻害する因子の一つとして働いている事が示唆された。

播種後 40 日のセタリアグラス節間部位の組織構造の違いによる消化性を光学・電子顕微鏡により観察をした。中央の柔組織は酵素処理により速やかに分解されていく。表皮、厚壁、維管束と一部の柔組織はほとんど分解されなかった。熱帯産イネ科植物では温帯産のものに比べ、維管束の割合が高く、これが熱帯産イネ科植物の低消化性の一因と考えられる。また、各組織の化学成分分析の結果、最も消化された柔組織にはほとんど *p*-クマル酸は検出されず、上述の結果同様に、消化性と *p*-クマル酸の関係が示唆された。

上述の結果から、微粉碎試料から有機溶媒抽出により *p*-クマル酸を含む Lignin-carbohydrate complex (LCC) の単離を試みた。単離された LCC には有意な量のヒドロキシ桂皮酸類が含まれており、今回用いた方法は LCC 単離法として有効であった。得られた LCC は各区分で異なっており、DS90 区分の分子量分布を HPSEC により検討した結果、分子量約 65500~1260 の広い範囲で 5 つの区分からなることがわかった。今後、これら単離された LCC を詳細に分析することにより、細胞壁消化阻害機構が明らかになると思われる。