

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07510

研究課題名(和文) 13C二酸化炭素投与による植物細胞壁リグニンの化学構造および形成過程の解析

研究課題名(英文) Study on plant cell wall lignin by 13C02 administration

研究代表者

青木 弾 (Aoki, Dan)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：80595702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では植物細胞壁リグニンの化学構造および形成過程の解析を目的とする本研究では、構造解析における感度および測定手法の拡張を目的とし、13Cを高濃度に含有する植物試料の育成および得られた試料の分析を目的とした。密閉型グロースチャンバーの新規設計ならびに運用ノウハウを確立し、長期の環境制御育成を実施した。得られた試料を各種分析手法に供したところ、高濃度に13Cを含み、超高感度分析が実現できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the cultivation of plant samples under 13C02 atmosphere was examined for supersensitive structural analyses. At first, the environmentally controlled growth chamber was designed and built up. Plant samples were cultivated under N2+O2+CO2 (in chamber), N2+O2+13C02 (in chamber), or air for 2 months. The resultant plant samples had high 13C ratio and supersensitive analyses was achieved successfully.

研究分野：木質科学

キーワード：13C二酸化炭素 NMR リグニン

1. 研究開始当初の背景

木質バイオマスの化学構造に基づいた最適活用ならびにバイオリファイナリーを考える上で、構成成分の化学構造を詳細に知ることは必要不可欠である。主要構成成分のうち、例えばセルロースはその化学構造・結晶状態などの解析が比較的進んでおり、材料・バイオリソースとしての利用活路にも大きな進展がみられる。しかしながらリグニンなどのポリフェノール系物質は未だ化学構造の解析が不十分であり、その生成過程についても不明な点が多い。

近年特に進展の大きい測定技術として、NMR 分光法がある。しかしながらリグニン骨格には水素が少なく、四級炭素をいくつも含むため、 ^{13}C NMR 測定ならびに二次元 NMR 測定の感度が低く、有用なデータを得ることが難しい。

ここで、化学的育成手法によって、天然では 1%しか存在しない ^{13}C を数十倍の濃度まで引き上げることができれば、 ^{13}C NMR および二次元 NMR 分光法における感度が増大し、より詳細な構造解析が可能となる。また水素と結合していない四級炭素を解析する方法として、炭素-炭素結合の直接観測 (INADEQUATE 測定) がある。 ^{13}C - ^{13}C の結合を必要とするため、その名の通りに天然状態ではほぼ不可能であるが、 ^{13}C 濃度を飛躍的に増大させた試料を用いることで、リグニン内に多数存在する四級炭素について詳細な情報が得られるものと期待される。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき本研究では、リグニン構造中の ^{12}C を可能な限り ^{13}C に置換することで、上記問題点の解決を目指す。 ^{13}C 置換の手法として、 $^{13}\text{CO}_2$ 雰囲気下での植物育成を行い、得られた試料を用いて細胞壁構成成分の構造解析を行う。

3. 研究の方法

研究は以下の手法を用いて行った。

(1) グロースチャンバーの作製および密閉環境下における植物育成手法の確立

まず簡易チャンバーを試作し、グロースチャンバー設計に必要な種々の知見蓄積を行った。得られた知見に基づいて密閉型チャンバーを作製した。おおよその外観図について図 1 に示す。

通常の CO_2 ガスを用いたコントロール試料、そして $^{13}\text{CO}_2$ ガスを用いた試料を育成する。また解放環境下あるいは屋外圃場においてもそれぞれ試料を育成し、比較検討する。

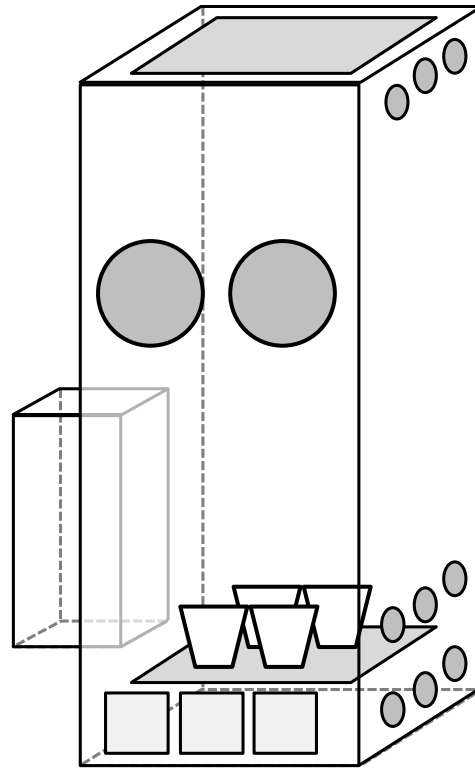


図 1 密閉型グロースチャンバーの概要：それぞれの部位についての詳細は以下の通りである。

本体 (アクリル製)

密閉環境を維持しながら試料・道具を輸送するためのパスボックス

植物育成用 LED ライト

内部作業用のグローブ

空気、 CO_2 、および水導入用の連絡孔

データロガーおよび除湿器用の電源、データロガー通信用 USB ケーブル、および空気循環 FAN 制御用 USB ケーブルの連絡孔

空気および排水用の連絡孔

除湿器 (結露は外部排出可)

内部の空気循環 FAN

データロガー：温度・湿度・ $^{12}\text{CO}_2$ 濃度

植物育成用 POT

(2) 試料の組織観察と ^{13}C 置換率の評価

得られた試料について、各種顕微鏡観察より当年度に生長した組織の状態を確認し、通常環境下で育成した試料と同様に生長したことを確認した。採取した試料を各種の化学分析に供して、 ^{13}C 置換率を評価した。

(3) リグニン構造解析

リグニンの構造を解析するため、チオアシドリシス法、二次イオン質量分析法、固体 NMR および液体 NMR 分析を行った。

4. 研究成果

(1) グロースチャンバーの作製および密閉環境下における植物育成手法の確立

必要な器具類、育成期間中に必要な作業と測定、予想される環境変動とその対策について検討するため、簡易チャンバーを試作した。結果より、試験期間中の生長量、必要な酸素および二酸化炭素量、それらを経時追跡するための手順について検討した。特に植物の呼吸速度ならびにチャンバー内部の温度湿度制御については各種センサーを用いて入念にデータ取得を行った。チャンバー内のCO₂濃度について、一般的に入手できるCO₂濃度計は¹²CO₂にしか対応していないため、別途赤外分光測定を用いた¹³CO₂濃度の定量分析手法についても確立した。

図1に示したように、植物苗を完全密閉環境下で育成するため、チャンバーには各種の連絡孔および作業設備を配置した。チャンバーは空調設備のある暗室におかれ、LEDライトおよび配水をタイマー管理した。CO₂の導入速度について、実際の吸収量を確認しながら微調節できるよう、流量計とガス弁タイマーを設置した。

(2) 試料の組織観察と¹³C置換率の評価

顕微鏡観察の結果、通常環境下で育成された試料と、制御環境下で育成された試料との間に、明確な差は確認されなかった。¹³C置換率についてはガスクロマトグラフィー・質量分析およびイメージング質量分析を用いて評価し、天然の数倍の濃度で¹³Cを含む細胞壁が形成されていることが確認された。

(3) リグニンの構造解析

得られた細胞壁試料について、特にリグニンに焦点を当てて、化学分析ならびに固体/液体NMR分析を行った。化学分析結果より、例えば構造単位について、おおよその結合タイプ比、細胞壁に対する含有率などについて、天然試料由来のリグニンとの差は確認されなかった。一方でNMR分析においては天然試料と比べて著しく高感度にシグナルを検出することができた。

図1には天然試料ならびに本研究で得られた¹³CO₂投与試料について同一条件(積算100回)で測定された固体¹³C NMRスペクトルの例を示す。結果より、天然状態ではほとんど観測できないレベルの測定条件においても、十分なシグナルを得ることが可能であった。

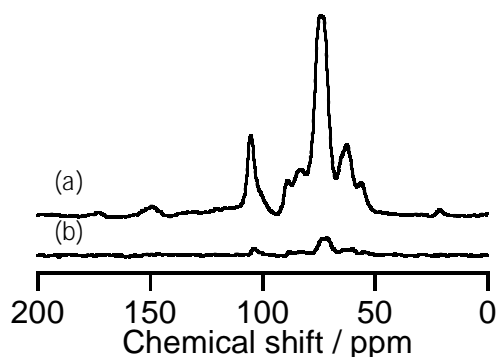


図2 (a) ¹³CO₂投与試料木粉および(b) 天然試料木粉の固体¹³C NMR スペクトル。

以上より、環境制御型グロースチャンバーを用いて¹³CO₂雰囲気下で植物を育成し、細胞壁リグニンの超高感度分析を達成した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. D. Aoki, Y. Hanaya, T. Akita, Y. Matsushita, M. Yoshida, K. Kuroda, S. Yagami, R. Takama, K. Fukushima (査読有), Distribution of coniferin in freeze-fixed stem of *Ginkgo biloba* L. by cryo-TOF-SIMS/SEM, *Sci. Rep.* **6**, 31525; doi: 10.1038/srep31525 (2016).
2. 青木弾, 松下泰幸, 福島和彦 (査読有), 細胞壁構成成分のケミカルマッピング, *紙パ技協誌*, **70**, 308-315 (2016) DOI: 10.2524/jtappij.1506

[学会発表](計 8 件)

1. 橋浦雅, 野村健太, 松下泰幸, 寺島典二, 青木弾, 福島和彦, 選択的¹³C標識法と固体NMRを用いたHG-DHPの構造解析, 第62回リグニン討論会, 2017年10月26-27日, 名古屋
2. D. Aoki, Y. Matsushita, K. Fukushima, On the role of monolignol glucoside in the lignification of tree xylem, 2017 Annual Meeting of The Korean Society of Wood Science and Technology, 15th April, Chonbuk National University, New silkroad center, South Korea
3. 青木弾, 木材における顕微レベルでの化学成分分析, 第46回木材の化学加工研究会シンポジウム, 2016年9月29-30日, 山形
4. D. Aoki, Y. Matsushita, K. Kuroda, and K. Fukushima, Analyses of freeze-fixed plant samples by cryo-TOF-SIMS, SISS-18, 2016年7月21-22日, 武蔵野
5. D. Aoki, Y. Hanaya, T. Akita, Y. Matsushita, M.

- Yoshida, K. Kuroda, S. Yagami, R. Takama, K. Fukushima, Chemical mapping of coniferin and mono/di-saccharides in freeze-fixed Ginkgo biloba by cryo time-of-flight secondary ion mass spectrometry, International Conference on Polyphenols 2016, 2016年7月11-15日, Vienna
6. D. Aoki, Y. Hanaya, Y. Matsushita, M. Yoshida, K. Kuroda, R. Takama, and K. Fukushima, Chemical Mapping of Plant Biomolecules by cryo Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, 10th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices'15 (ALC'15), 27p-A-4, 2015年10月25-30日, 松江
7. K. Fukushima, Y. Hanaya, D. Aoki, Y. Matsushita, K. Kuroda, Chemical mapping of lignin precursors in the xylem of freeze-fixed Ginkgo biloba by the cryo-TOF-SIMS/SEM system, 18th International Symposium on Wood, Fibre and Pulping Chemistry (ISWFPC2015), 2015年9月9-11日, Vienna
8. D. Aoki, Y. Hanaya, Y. Matsushita, M. Yoshida, K. Kuroda, R. Takama, and K. Fukushima, Chemical mapping of organic/inorganic chemicals in frozen-hydrated biological samples, SISS-17, 2015年6月25-26日, 武蔵野

〔図書〕(計 2 件)

1. 青木弾、福島和彦, 4.4 TOF-SIMS 法, In: “植物細胞壁実験法” 石井忠、石水毅、梅澤俊明、加藤陽治、岸本崇生、小西照子、松永俊朗 編著, 弘前大学出版会 (2016), pp. 184-191, ISBN 978-4-907192-21-1
2. D. Aoki, K. Saito, Y. Matsushita, K. Fukushima, Chapter 17. Distribution of Cell Wall Components by TOF-SIMS, In: “Secondary Xylem Biology” Edited by Yoon Soo Kim, Ryo Funada, and Adya P. Singh, Academic Press, 363-377 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕ホームページ等
名古屋大学 森林化学研究室
<http://forestchem.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 弾 (AOKI, Dan)
名古屋大学大学院生命農学研究科・講師
研究者番号: 80595702

(2) 連携研究者

福島 和彦 (FUKUSHIMA, Kazuhiko)
名古屋大学大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 80222256

松下 泰幸 (MATSUSHITA, Yasuyuki)
名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号: 60335015