

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82508

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14779

研究課題名(和文) リグニン分解反応の網羅的解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of comprehensive analytical method for depolymerized lignin

研究代表者

佐藤 大 (Sato, Masaru)

公益財団法人かずさDNA研究所・バイオ研究開発部・特任研究員

研究者番号：30454052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：芳香族バイオマス資源として着目されているリグニンについて、低分子化のための分解反応を解析する技術開発を検討した。液体クロマトグラフ-高分解能質量分析装置によるリグニン分解物の一斉分析法を確立し、メタボローム解析技術を活用して網羅的なリグニン分解物のデータを解析した。分解経時変化サンプルの分析からは、ピーク強度の変動パターンの類似性によるグループ化により、分解中間体や分解産物と考えられる挙動を示すグループを抽出することが可能であることが明らかとなった。また、精密質量値やMS/MSスペクトルによるリグニン分解物の構造推定のため、リグニンオリゴマーの理論構造式データを整備した。

研究成果の概要(英文)：Lignin is a potential alternative of aromatic resource. However, depolymerization process is necessary to utilize lignin as a practical resource, subsequently analytical methods for the process need to be developed. In this study, a comprehensive analytical method for depolymerized lignin was developed using liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. Applying techniques in metabolomics, a method to classify behaviors of depolymerized lignins during alkaline cooking process was demonstrated. In addition, computational data of diverse theoretical chemical formulae of lignin oligomers were generated for structural elucidation of depolymerized lignins.

研究分野：応用生物化学

キーワード：リグニン 高分解能質量分析 バイオインフォマティクス

### 1. 研究開始当初の背景

リグニンバイオマスの 15~30% を占める膨大な量の芳香属性ポリマーである。植物の二次代謝により生合成されるモノリグノール (図 1) がラジカルカップリングによって重合することで、複雑な構造を有するリグニンが構成されている。

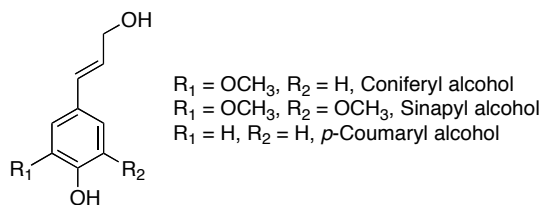


図 1. モノリグノールの化学構造

リグニンは、化石資源より生産されているベンゼン、トルエン、キシレン (BTX) など芳香族化合物の代替原料としての利用が期待されている<sup>1</sup>。しかし、リグニンの極めて複雑な構造 (図 2) が障壁となり、燃焼による熱利用以外ではほとんど有効な資源として利用されていない。

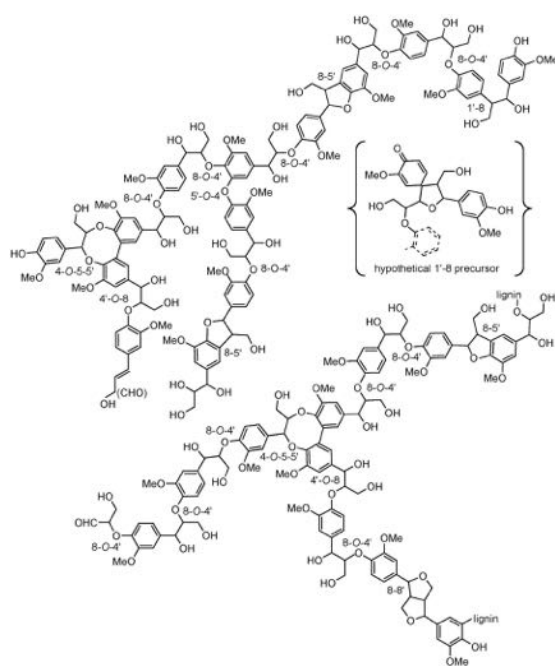


図 2. リグニン構造の模式図

The U. S. Department of Energy, <http://genomicscience.energy.gov> より引用

高分子であるリグニンを BTX などの原料とするためには化学的あるいは酵素的な処理により分解する必要があるが、分解処理はリグニンの化学構造の変化を引き起こし、分解物の複雑性はさらに増大する。リグニンおよび分解物の全体像を理解するには、全ての成分の分子レベルでの解析が必要となる。このような複雑な化合物群の分析には、超高分解能質量分析が有効な手段の 1 つとして考えられる。しかし、リグニン分解物の超高分解能質量分析は始まったばかりであり、得られた分

析データから有用な情報を得るための解析手法がなかった<sup>2</sup>。

### 2. 研究の目的

リグニン分解物の分析では、多数の化学構造が未知の成分の量的変動や化学構造を効率的に解析する手法の確立が必須である。そこで、超高分解能質量分析により得られるデータを効率的に解析する技術を駆使して、生物の代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析技術に着目した。本研究では、このようなバイオインフォマティクスの技術をリグニン分解反応に応用し解析技術を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

リグニン分解物として主にエリアンサスのアルカリ分解物を使用し、分解時間の異なる試料を使用することで量的変動解析のためのデータを得た。分解物の分析には高速液体クロマトグラフ Agilent1100 シリーズ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) とフーリエ変換イオンサイクロトロン型超高分解能質量分析装置 LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を連結した LC-MS システムを使用した。

LC-MS 分析によって得られたデータは、ProteoWizard<sup>3</sup>によって、マススペクトルデータを格納する共通ファイルフォーマットである mzXML に変換し、各種のデータ解析に使用した。マススペクトルデータをバッチ処理が可能に改良された PowerGet<sup>3</sup> (REF) を使用して解析し、全ピーク成分の抽出と試料間のピーク整列化 (アラインメント) を実施した。また、データ解析の前段階の処理として分析機器のノイズデータを低減するためのプログラムを Java 言語により作成した。

アラインメント後のピークデータの解析には、相関ネットワーク解析ツール ConfeitoGUI<sup>4</sup>、化学構造ファイルフォーマット変換ライブラリ Open Babel、MS/MS フラグメント予測プログラム Mass Frontier (Thermo Fischer Scientific)、および Java、Python 言語による自作プログラムを使用した。

### 4. 研究成果

#### (1) リグニン分解物の分析とデータ解析

LC-MS によるリグニン分解物の分析のためには、分解物を効果的にイオン化できる手法の選択が必要である。LC-MS で主に使用されるエレクトロスプレーイオン化法と大気圧化学イオン化法 (APCI) について分解物のイオン化を検討したところ、APCI のネガティブモードでの測定で、分解物が多く検出可能であることが明らかとなった。一方で、APCI による分析では、分解物とともに環境や装置由来のノイズが多数検出された (図 3A)。これらのノイズを含んだデータを用いたデータ解析では分解物に由来するピークの検出が困難になり、分解物の成分数を著しく過大に

見積もる可能性が考えられた。そのため、分析データからノイズを低減するためのプログラムを作成した。本プログラムでは、二次元クロマトグラム上の全般に渡って検出される微弱なノイズイオン (Base Noise) と、分析中に継続して検出され続ける特定の  $m/z$  のノイズイオン (Line Noise) を低減するアルゴリズムを実装した。Base Noise は、分析データの全イオン強度を集計し、その中央値に任意の倍率を乗じた値を全イオンの強度から差し引く設計とした。また、分析データの全イオンの  $m/z$  を集計し、総分析時間の 10% 以上の時間に渡って検出され続ける  $m/z$  を特定し考慮する Line Noise とした。Line Noise については、特定した  $m/z$  に対して任意のマス値の範囲内に入るイオン強度をそれぞれ集計し、その平均値に任意の倍率を乗じた値を Line Noise に含まれるイオンの強度から差し引く設計とした。このノイズ低減処理により、環境や装置由来のノイズを低減させることができ、分析試料由来のピークをより正確に解析することが可能となった (図 3B)。

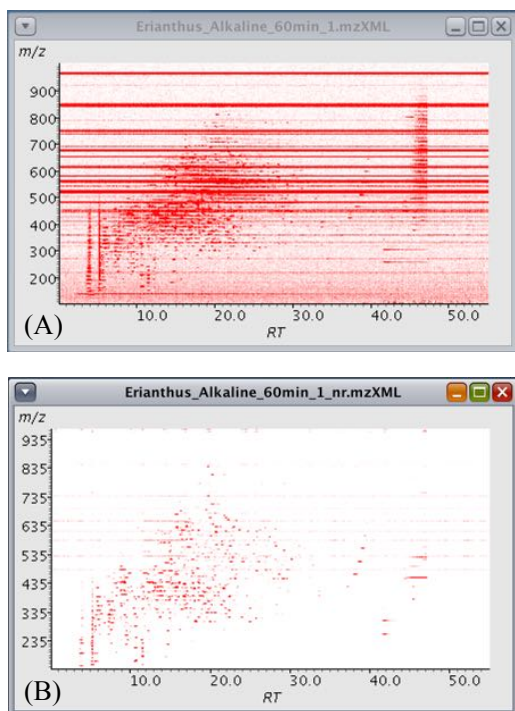


図 3. ノイズ低減処理前 (A) と後の (B) のリグニン分解物の LC-MS 二次元クロマトグラム  
赤色の点が検出されたイオンを示す

#### (2) リグニン分解物の量的変動解析

エリアンサスのリグニンからアルカリ分解によって調製したリグニン分解物をモデルとして、分解時間と分解物の量的変動の関係性を解析した。分解時間を 0 分から 150 分まで 30 分ごとに設定した 6 群 3N の分解物について LC-MS 分析データからのピーク抽出とピークアラインメントを行なったところ、全サンプルにおいてのべ 935 種類のピークの変動データが得られた。ConfeitoGUI を用いて、これらのピークを変動パターンによってク

ラスタリングすると、分解時間中に類似したパターンで変動しているピークのグループが抽出された (図 4A)。

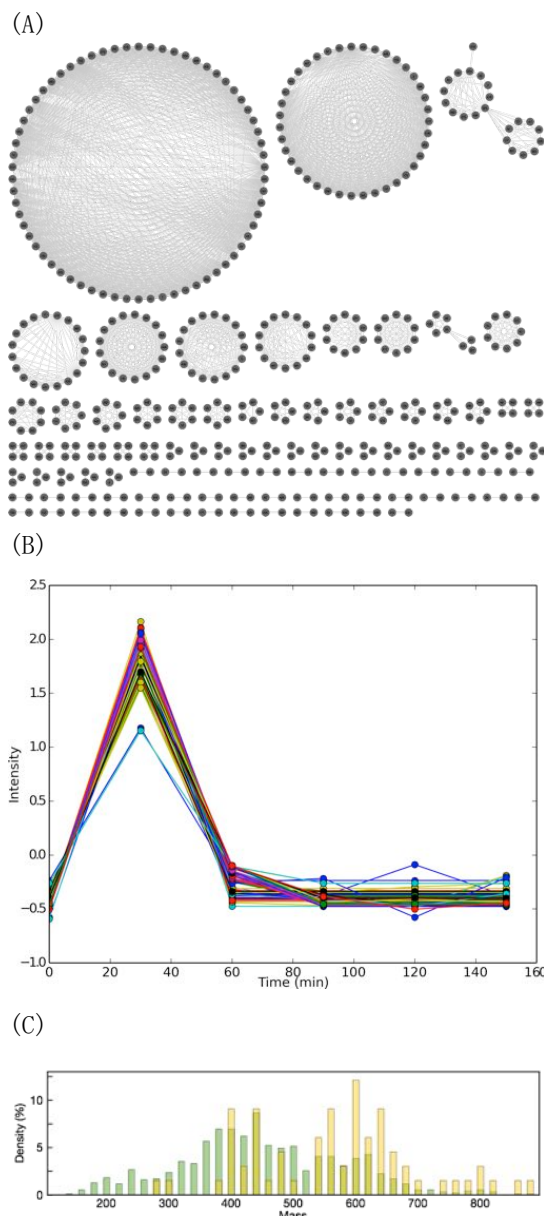


図 4. 相関ネットワーク解析による分解物のクラスタリング  
(A) 相関ネットワーク図、(B) 最大グループの変動パターン、(C) 全ピーク (緑) と最大グループのピーク (橙) の分子量分布

含まれるピーク数が最大のグループ (66 ピーク) の変動をグラフ化すると、このグループに含まれる分解物のピークは、分解初期の 30 分に特徴的に多く存在していた (図 4B)。また、これらのピークの分子量分布は全ピークの分子量分布と比較して高分子量側にシフトしていた (図 4C)。これらのことからエリアンサスのリグニンのアルカリ分解では、分解初期に多種類のオリゴマー単位の構造が脱離し、それらが分解時間の経過に伴ってさらに低分子化している様子が推察された。このように、量的変動解析と質量情報を活用す

ることで、分解反応中の分解物の挙動を理解することが可能であることが示唆された。

### (3) リグニン分解物の構造推定

高分解能質量分析からは、化合物の精密質量と部分構造のマススペクトル (MS/MS スペクトル) を得ることができる。これらのデータからリグニン分解物の構造を推定するために、リグニンオリゴマーの理論構造式データを作成した。理論構造は、グアイアシル、シリンギル、ヒドロキシフェニルの3種類のモノリグノール構造と Morreel らのレビュー<sup>5</sup>において報告されているモノマー間の結合様式を使用して作成した (図 5A)。

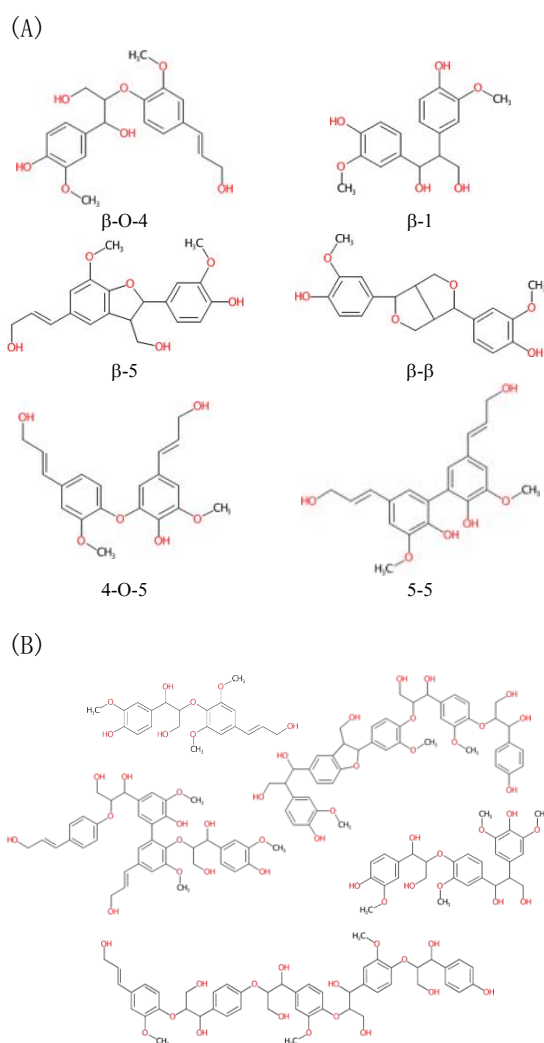


図 5. 理論リグニンオリゴマー構造 (A)モノリグノールと結合様式の構造、(B)作成した理論構造の一部

2~5 種類のモノリグノールから構成される理論構造式は約 5 万種類となった (図 5B)。この理論構造データから、理論精密質量と MS/MS スペクトル上に生じ得るフラグメントの理論質量電荷比を計算した。エリアンサスのリグニン分解物のより得られた 935 種類のピークについては、46 種類のピークが理論構造式の精密質量と一致した。現在はずべてのピーク成分について妥当な構造を予測する

には至っていないが、今後、理論構造データに分解によって生じる構造変化の情報を付加することで、分解物全体についての構造予測が可能になるものと考えられる。

### <引用文献>

- Holladay J.E. et al., Top Value-Added Chemicals from Biomass - Volume II, Pacific Northwest National Laboratory, 2007
- 吉岡康一ら, 超高分解能質量分析法 FT-ICR MS によるリグニンの構造解析, リグニン利用の最新動向, CMC 出版, pp 84-93, 2013
- Sakurai N. et al., Tools and Databases of the KOMICS Web Portal for Preprocessing, Mining, and Dissemination of Metabolomics Data, BioMed Res. Int., 2014, 194812, 2014
- <http://www.plant.osakafu-u.ac.jp/~kagiana/confeito/confeitogui.html>
- Morreel K, et al., Mass Spectrometry-Based Fragmentation as an Identification Tool in Lignomics, Anal. Chem., 82, 8095-8105, 2010

### <謝辞>

本研究においてエリアンサス試料の提供、およびアルカリ分解方法の技術指導をいただいた京大生存圏研究所 梅澤俊明教授、山村正臣特任助教に厚く御礼申し上げます。

### 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) 該当なし

[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]

ホームページ等

該当なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

佐藤 大 (SATO, Masaru)

公益財団法人かずさ DNA 研究所・バイオ研究開発部・機器分析グループ・質量分析チーム・特任研究員

研究者番号：30454052