

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08166

研究課題名(和文)木材の腐朽過程をミミックした機能性リグニン分解化合物の高効率生成と高機能化

研究課題名(英文)Efficiency production of functional lignin degradation product by mimic of degradation mechanism in nature

研究代表者

三亀 啓吾 (Mikame, Keigo)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：70571701

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)：木材腐朽菌処理後に化学的酸化分解することで自然界のリグニン分解をmimicし、生理活性を有する機能性リグニン分解物の高効率生成手法を構築し、リグニンの高付加価値利用を確立することを目的として行ってきた。シイタケ腐朽処理木粉のアルカリ酸化銅分解を行った結果、腐朽処理前と比べ長波長UV吸収リグニンオリゴマーの生成量が約4倍増加した。高脂肪食マウスと動物培養細胞を用いて長波長UV吸収リグニンオリゴマーの生理活性試験を行った結果、それぞれ腎障害と酸化ストレスの軽減効果が確認された。この長波長UV吸収リグニン分解物は、機能性食品、医薬品、化粧品原料、電子デバイス材料などへの利用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然界のリグニン分解をmimicした木材腐朽菌前処理後のアルカリ酸化銅分解を行うことにより、生理活性を有する長波長UV吸収リグニン分解物の高効率生成手法を構築した。リグニンの高付加価値利用は、木質多糖類からの糖化・発酵やリグニンからのフェノール誘導体生産など、技術としては確立されているが、コスト面で進展していないリグノセルロースの利活用も可能となる。これにより炭水化物から石油代替脂肪族化学原料生産、リグニンから芳香族化学原料生産への流れを作ることにも可能である。これらの流れは森林資源の新たな利用分野を作り、荒廃が進む日本の森林を蘇らせることにつながるものが期待でき、地球温暖化対策へ寄与できる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we study efficiency production of functional lignin degradation products with high added value by mimic of degradation mechanism in nature. The yields of lignin oligomers having long-wavelength UV absorption from white rot fungi treated bamboo greatly increased with alkaline cupric (II) oxidation compared to untreated birch wood. As physiologically activities evaluation of lignin oligomers having long-wavelength UV absorption, administration test of these lignin oligomers to mouse fed a high-fat diet and animal cell culture were conducted. As a result of test, relieving effect of kidney damage and oxidative stress.

研究分野：木質バイオマス

キーワード：リグニン 酸化分解 木材腐朽菌 生理活性 UV吸収

1. 研究開始当初の背景

現在、石油は、エネルギーとして約 80%、プラスチック、溶剤、合成繊維などの化学原料として約 20%が使われている。石油に代わるエネルギーは、太陽エネルギー、水素、風力などに代えることができるかもしれないが、石油代替化学原料は、石油に含まれる脂肪族化合物と芳香族化合物の両方を持つ植物資源以外は考えられない。近年、サトウキビ、トウモロコシなどからバイオエタノールやプラスチック、パームオイルを原料にした洗剤やバイオディーゼル燃料などが実用化されている。これらは主に植物資源の炭水化物や脂質から誘導した脂肪族化合物としての利用が中心となっている。しかし、もう一つの重要な芳香族化合物の植物資源からの代替は進展していない。この芳香族系代替原料としてなりうるのが、植物資源に約 30%含まれるリグニンと言われている。しかし、リグニンは不規則三次元高分子としてセルロース及びヘミセルロースと高度な複合体を形成しているため分離が困難であり、高エネルギー処理により得られたリグニン分解物は、さらに複雑な構造となる。現在その用途開発は熱エネルギー変換などに限定されている。

2. 研究の目的

生態系でリグニンは土壤中で徐々に分解され、腐植物質の主成分として堆積している。そして、タンパク質や金属イオンの吸着剤など様々な機能を果たしながらさらに分解し、二酸化炭素へと変換される(図 1)。大気中の二酸化炭素濃度を減らすためには、リグニンの土壤中での機能を参考に石油代替原料として長く循環活用することが重要である。

リグニンと同じ生合成経路を持つリグナンやフラボノイドなどの生理活性を有する天然フェノール系化合物の機能は、フェノール性水酸基数と芳香環と側鎖の共役構造に起因していることが多い。リグニンは前駆体の状態ではフェノール性水酸基と側鎖二重結合基を有しているが、その重合過程でフェノール性水酸基は主に単位間のエーテル結合やメトキシル基となり、水酸基が不活性になっている。これらの要因によりリグニンは生理活性をほとんど示さないとされている。

しかし、リグニンは土壤中での堆積過程で、白色腐朽菌や褐色腐朽菌などにより部分酸化分解を受け、その後、カビや放線菌など様々な微生物により分解される。これら微生物による酸化分解により、リグニンは低分子化するとともに水酸基やカルボニル基などの含酸素基が増加し、フラボノイドやリグニン前駆体のような生理活性物質と類似構造をとる。このようにリグニンを逐次的に酸化分解することにより生理活性などの機能を分解物に発現させることが可能である。

申請者らは、これまで広葉樹木粉のアルカリ系酸化銅分解を行い、その分解物から図 2 のような新規化合物を含む、多くの高い抗酸化能を有するリグニン 2 量体を単離している(参考文献 1)。しかしこれらリグニン 2 量体の収率はまだ低い。

これらのことから、土壤中での分解と同様に、リグニンを逐次的に分解すれば、生理活性などの機能を持つ分解物が得られるとの着想に至った。本申請課題では、分解の効率化のために土壤中でのリグニン分解過程を mimic する。まず、木粉を木材腐朽菌で部分分解(キノコ廃菌床も利用可能)した後、カビや放線菌などの微生物が行うような酸化分解を金属酸化物や過酸化水素等を用いて行う。木材腐朽菌を用いた前処理ではリグニンの部分分解とともに、結晶構造を持つため難分解性であるセルロースも部分分解される。そのため、より緩和な条件で酸化分解を行うことが可能となり、分解過程でのリグニン構造の過分解を抑制することが期待できる。さらに、木材腐朽菌で処理した木粉の酸化分解により得られる分解物の構造特性評価を行うとともにタンパク質や金属吸着能、そして、抗酸化能試験などの生理活性試験を行う。これらの結果を踏まえ、さらに高い生理活性を有する構造特性を持つ高機能性リグニン分解物の高効率誘導方法を確立し、リグニン由来生理活性物質などの高付加価値物質の用途へつなげる。

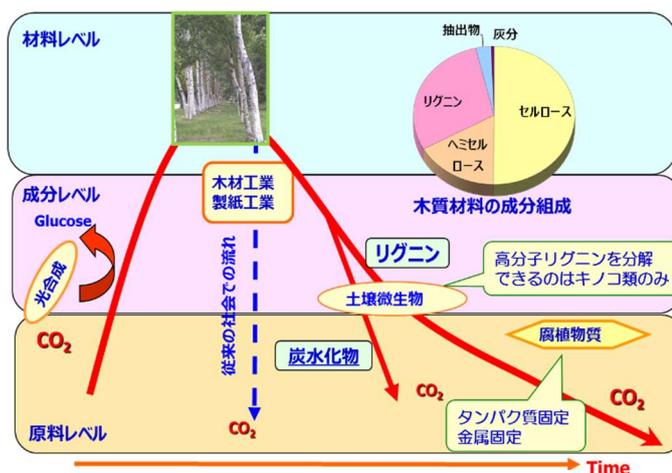


図 1 生態系における植物バイオマスの流れ

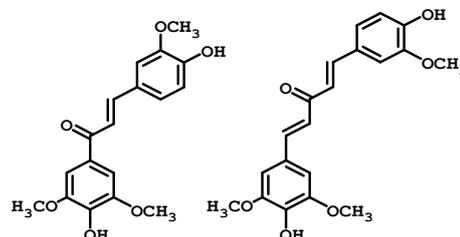


図 2 広葉樹リグニンの酸化分解物に含まれる新規長波長 UV 吸収化合物

3. 研究の方法

(1)木粉および竹粉培地での木材腐朽菌の培養と構成成分の分解挙動解析

研究室保存菌株からバーベンダムダム反応によりフェノール酸化活性が高い菌株シイタケおよびキクラゲ(2種)をシラカバ木粉および竹粉培地にて培養した。2ヶ月培養後、培地を回収し、50°C送風乾燥、振動ミル粉碎し、成分分析試料とした。これらの白色腐朽菌処理シラカバおよび竹粉試料の抽出物量、リグニン量の定量、相分離系変換処理によるリグノフェノール(LP)への変換と水層に分離される炭水化物の中性糖組成分析を行った。

(2)木材腐朽菌処理木粉および竹粉の酸化分解

シイタケ及びキクラゲを培養したシラカバ木粉および竹粉をオイルバスを用いてアルカリ酸化銅分解(1.0 N NaOH, 180°C, 60 min)し、低分子リグニン分解物を含む酸可溶性画分を酢酸エチルで抽出した(ACSL)。この ACSL を分子量分布と UV スペクトルが同時解析可能な PDA-GPC システムで分析した。

また、アルカリ酸化銅分解処理をマイクロ波処理装置でも行い、オイルバス処理と比較した。また、長波長オリゴマーの収率改善の検討として、長波長 UV 吸収 2 量体の推定生成機構から、モノマーへのアセトンのアルドール縮合が重要であると考え、少量のアセトンをアルカリ酸化銅分解処理時に添加した。得られた分解物の PDA-GPC 分析及び LC/MS 分析、FT-IR 分析を行った。

(3)リグニン分解物の機能性試験

動物実験を行うには試料量が少ないため、予備検討してカテキン相当の抗酸化活性を有していることが確認できた LP アルカリ酸化銅分解物を用いて高脂肪食投与マウスに投与し、内臓疾患への影響を調べた。0.3%または 0.6%LP CuO 分解物含有高脂肪食を 8 週間投与し、血液生化学検査を行った。線維化面積率を計測、免疫染色を施してマクロファージ(Mφ)陽性数を計測した。そして、リアルタイム PCR 法によって炎症性関連サイトカインの mRNA 量を解析した。

続いて、シイタケ腐朽処理竹粉酸化銅分解物の生理活性試験を行うため、マイクロ波処理装置を用いて木材腐朽菌処理竹粉の大量酸化銅分解処理を行い、分取 GPC を用いてモノマー画分とオリゴマー画分に分画した。このオリゴマー画分を用いて動物培養細胞による生理活性試験を行った。ヒト大腸癌細胞を用いてリポポリサッカライド添加による酸化ストレスの抑制効果を調べた。

4. 研究成果

(1)木粉および竹粉培地での木材腐朽菌の培養と構成成分の分解挙動解析

シイタケおよびキクラゲ(2種)を 3 か月間培養したシラカバおよび竹粉培地のリグニンは、白色腐朽菌処理で一般的に見られるリグニン含有率の低下が確認された。また、相分離処理を用いた解析で、Klason リグニンには菌糸成分も含まれるにもかかわらず、リグニンあたりの LP 収率が高くなった。相分離処理では LP 精製過程でエーテル可溶低分子区分は除去されることから、白色腐朽菌により低分子区分の資化が進行していることが示唆された。GPC 分析を行った結果、白色腐朽菌処理前後で大きな違いは見られなかった。また、中性糖組成は、培養前と比べキシロース量が低下し、ヘミセルロースの分解が確認された。これらの結果から、白色腐朽菌処理過程で、分解が容易部分から分解が進むことが確認された。また、栄養補助剤として培地に添加した米糠のデンプンが優先的に消費されたこと、そして、水洗処理を行った結果、低分子分解物が洗浄により除去され残渣中の高分子リグニンと炭水化物の比率が高くなったことも考えられた。

(2)木材腐朽菌処理木粉および竹粉の酸化分解

シイタケ竹粉をアルカリ酸化銅分解の低分子リグニン分解物を含む ACSL 画分の収率は、培養前よりも高くなった。また、シラカバ培地と比較しても高くなった。この ACSL 画分の PDA-GPC 分析を行った結果(図 3)、分子量 1000 以下のオリゴマー画分が多く含まれていた。未処理シラカバの ACSL は、ほとんどがモノマーであり、320nm における Retention time 33min のモノマーピークと 30min 付近のオリゴマーピークハイト比を求め比較した結果、未処理シラカバ培地が 0.2 であつ

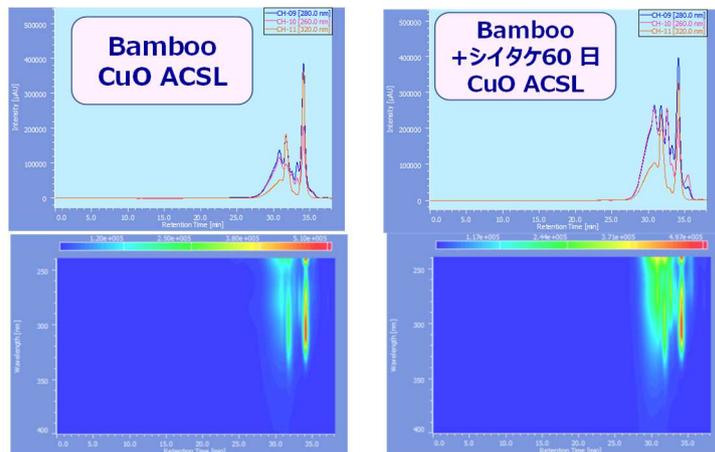


図 3 シイタケ培養竹粉培地酸化銅分解 ACSL 画分の PDA-GPC 分析結果

0.2 であつ

たのに対し、未処理竹粉で 0.5、シイタケ培養竹粉では 0.8 となり、シイタケ普及処理により図 2 で示したような長波長 UV 吸収リグニンオリゴマーの生成が大きく増加することが確認された。また、アルカリ酸化銅分解処理をマイクロ波処理装置でも行い、比較した結果、ACSL 画分の収率と Vanillile などの長波長 UV 吸収リグニン 2 量体の比率は、マイクロ波処理時のほうが高くなり、目的物の生成効率が向上した。これは、この処理は不均一系の反応であるため、マイクロ波処理によりエネルギー伝搬効果が高くなったことによると考えられる。

また、オリゴマーの収率改善の検討として、長波長 UV 吸収 2 量体の推定生成機構から、モノマーへのアセトンへのアルドール縮合が重要であると考え、アセトンをアルカリ酸化銅分解処理時に添加した。アセトンがバニリンとシリングアルデヒドとアルドール縮合反応し、2 量体の前駆体となる化合物 Dehydrogingerone と天然由来としては初めての単離となるシリングタイプ Dehydrogingerone の収率が大きく改善され、長波長 UV 吸収オリゴマーの生成量が多くなることが確認された。これにより、木材腐朽菌処理とアセトン添加処理により、長波長 UV 吸収リグニンオリゴマーの生成が大きく促進されることが期待できる。(参考文献 2)

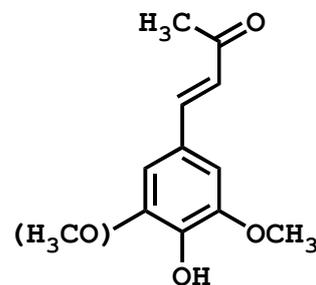


図 4 Syringyl type dehydrogingerone

(3)リグニン分解物の機能性試験

動物実験を行うには試料量が少ないため、今年度は、研究代表者らが行っている LP アルカリ酸化銅分解物ではオリゴマー画分が高収率で得られ、カテキン相当の抗酸化活性を有していることから、この試料を用いて高脂肪食投与マウスに投与し、内臓疾患への影響を調べた。結果、高脂肪食誘発肥満マウスの腎臓における Mφ 浸潤や線維化の抑制を介して腎障害を軽減することが示唆された。(参考文献 3)

続いて、シイタケ腐朽処理竹粉マイクロ波酸化銅分解物を分取 GPC により分画したオリゴマー画分を用いて動物培養細胞による生理活性試験を行った。これまで行ってきたリグニン分解物含有飼料を投与することによる動物実験ではなく、動物培養細胞に変更したのは、用いるリグニン分解物量が少なくても可能であるためである。ヒト大腸癌細胞を用いてリポポリサッカライド添加による酸化ストレスの抑制効果を調べた結果、シイタケ腐朽処理竹粉マイクロ波酸化銅リグニン分解物オリゴマーは、酸化ストレスを軽減する可能性が示唆された。

(4)総括

本申請課題では、木材腐朽菌を前処理に用いた後、金属酸化物等により化学的に処理することで、自然界のリグニン分解を mimic し、生理活性を有する機能性リグニン分解物の高効率生成手法を構築し、リグニンの高付加価値利用を確立し、森林資源の新たな利用分野を切り開くことを目的として行ってきた。

木材腐朽菌で処理した木粉および竹粉のマイクロ波処理アルカリ酸化銅分解を行った結果、腐朽処理前と比べ低分子リグニン分解物の収率が大幅に向上した。低分子リグニン分解物の PDA-GPC 分析と LC/MS 分析を行った結果、高い生理活性を有する長波長 UV 吸収リグニンオリゴマーの生成量が約 4 倍増加した。

高脂肪食マウスと動物培養細胞を用いて長波長 UV 吸収リグニンオリゴマーの生理活性試験を行った結果、それぞれ腎障害と酸化ストレスの軽減効果が確認された。

これらの結果から、自然界のリグニン分解を mimic した長波長 UV 吸収リグニン分解物は、機能性食品、医薬品、化粧品原料、電子デバイス材料などの高付加価値への利用が期待できる。また、木材腐朽菌処理が機能性リグニン分解物生産に有効であるという今回の結果は、キノコ廃菌床の有効利用にもつながる。

リグニンの高付加価値利用は、木質多糖類からの糖化・発酵やリグニンからのフェノール誘導体生産など、技術としては確立されているが、コスト面で進展していないリグノセルロースの利活用も可能となる。これにより炭水化物から石油代替脂肪族化学原料生産、リグニンから芳香族化学原料生産への流れを作ることにも可能である。これらの流れは森林資源の新たな利用分野を作り、荒廃が進む日本の森林を蘇らせることにつながることを期待でき、地球温暖化対策へ寄与できる。

参考文献

- 1) 渡辺隆司, 三亀啓吾, 大橋康典, 菅原智, 小池謙造, 「紫外線吸収剤」, 特許 5586644
- 2) Sato, S., T. Norikura, Y. Mukai, S. Yamaoka, K. Mikame, , *Chemico-Biological Interactions*, **318**, 108977 (2020)
- 3) Tsuchida, T., T. Watanabe, K. Mikame, *Trans. MRS- J*, **46**, 25-28 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuchida Teppei, Watanabe Takashi, Mikame Keigo	4. 巻 46
2. 論文標題 Facilitation of aldol condensation for lignin alkaline cupric (II) oxidation products having long-wavelength UV absorption	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transactions of the Materials Research Society of Japan	6. 最初と最後の頁 25 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14723/tmrsj.46.25	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shin, Norikura Toshio, Mukai Yuuka, Yamaoka Shin, Mikame Keigo	4. 巻 318
2. 論文標題 Lignin-derived low-molecular-weight oxidized lignophenol stimulates AMP-activated protein kinase and suppresses renal inflammation and interstitial fibrosis in high fat diet-fed mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemico-Biological Interactions	6. 最初と最後の頁 108977 ~ 108977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbi.2020.108977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 T. Tsutida, T.Watanabe K. Mikame
2. 発表標題 The facilitation of aldol condensation for lignin alkaline cupric (II) oxidation products having long-wavelength UV absorption
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-J
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Watanabe, Y. Kuboi, T.Watanabe, S. Sato, M. Funaoka, K. Mikame
2. 発表標題 Molecular design for physiologically active compounds from lignin by oxidative degradation
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-J
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉澤春奈, 乗鞍敏夫, 三亀啓吾, 山口満里奈, 鹿野綾乃, 高橋なごみ, 山岡伸, 向井友花, 佐藤伸
2. 発表標題 高脂肪食を摂取したマウスの腎障害に及ぼす天然リグニン由来低分子リグノフェノールの影響
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土田哲平、渡辺隆司、三亀啓吾
2. 発表標題 アルドール縮合反応促進による長波長UV吸収リグニン酸化銅分解物の効率生産
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺くるみ、渡辺隆司、船岡正光、三亀啓吾
2. 発表標題 生理活性発現を目指したリグニンの分子設計と分解物の機能
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Mikame, K. Sato, T. Watanabe
2. 発表標題 The effect of alkaline cupric (II) oxidation conditions for lignin oligomers having long-wavelength UV absorption
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 K. Mikame, S Kiuchi Y. Kuboi, T.Watanabe, M. Funaoka
2. 発表標題 Derivative of physiologically active compounds from uniformized lignin by oxidative degradation
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 三亀啓吾, 木内咲来, 久保井友夏梨, 渡辺隆司, 船岡正光
2. 発表標題 構造均一化リグニンの酸化分解とその分解物の抗酸化活性
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 佐藤賢矢, 三亀啓吾, 渡辺隆司
2. 発表標題 酸化銅分解による長波長UV 吸収リグニンオリゴマーの選択的生産
3. 学会等名 第68回 日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋詰みずき, 小松博幸, 三亀啓吾, 多島 秀男, 山際和明
2. 発表標題 ソルボリシス反応におけるリグニン分解挙動に及ぼす反応条件と酸触媒の影響
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. TSUCHIDA, T.WATANABE K. MIKAME
2. 発表標題 Efficiently production of lignin alkaline cupric () oxidative degradation products with long-wavelength UV absorption capacity by acceleration of aldol condensation reaction
3. 学会等名 30th Annual Meeting of MRS-J
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 伸 (Sato Shin) (40310099)	青森県立保健大学・健康科学部・教授 (21102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------