

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06168

研究課題名（和文）13C02投与と顕微サンプリングによる樹木リグニンの部位選択的高感度構造解析

研究課題名（英文）Site-selective and high-sensitivity structural analysis of wood lignin by 13C02 administration and microsampling

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は植物細胞壁リグニンの化学構造および形成過程、特に組織特異的なリグニンの構造を明らかにすることである。組織特異的な分析では得られる試料が少ないため、高感度分析が必要である。そこで高感度NMR分析を実現するため、13C02雰囲気下で植物を育成した。傾斜育成されたクロマツ試料から、傾斜下側に形成されたあて材組織を採取した。得られた試料を各種化学分析に供し、針葉樹あて材に特有の化学構造について調査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、構造解析手法として応用性の高い核磁気共鳴（NMR）法を高感度で、かつ一部の特異的な組織から得られた微量サンプルを用いて利用するための手法を考案し、実験を行った。結果より、環境制御型育成によって得られた特異な微量サンプルについて、超高感度分析が実施できた。植物体内では様々な組織が状況に応じて形成されているが、それぞれが個別に分析できているわけではない。特に、大型で樹齢の長い木本植物に関して、このような環境制御育成を実施した例は少ない。本研究結果によって、物性と構造の相関に関してより具体的な議論を進めることが可能となった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the chemical structure and formation process of plant cell wall lignin, especially for the tissue-specific lignin.

High-sensitivity analysis is required because the amount of samples obtained only from the specific tissue is small. Therefore, in order to realize high-sensitivity NMR analysis, plants were grown in a 13C02 atmosphere in a closed growth chamber. From the black pine sample grown on a slope, the compression wood formed on the lower side of the slope was collected. The obtained samples were subjected to various chemical analyses, and the specific chemical structure was investigated.

研究分野：木質科学

キーワード：13C02 リグニン NMR

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、その生合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 を数十倍の濃度に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。

以前の研究 (基盤 C、15K07510) において、密閉型グロースチャンバーを新規設計することで、 $^{13}\text{CO}_2$ 雰囲気下で植物試料を育成し、超高感度分析を実現した。この超高感度分析法においては、必要な試料量が少量となるため、例えば顕微サンプリング技術と組み合わせることで、組織特異的な分析に適用することが可能になるのではないかと考えた。

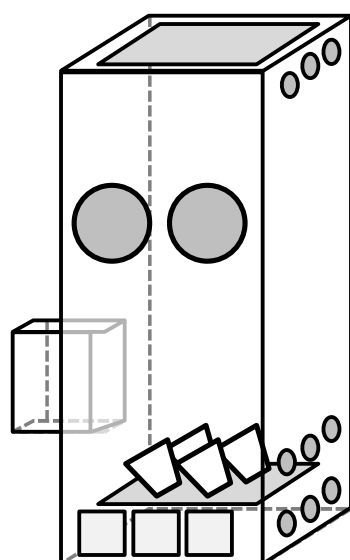
2. 研究の目的

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の目的は、構造解析における感度および測定手法の拡張を $^{13}\text{CO}_2$ 雰囲気下育成によって実現し、部位選択的な高感度構造解析を達成することである。具体的には傾斜状態で育成することによって形成される特異な組織であるあて材を対象として、その組織特異的な樹木リグニンの構造解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 密閉環境下における樹木の傾斜育成

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、傾斜させながら育成し、あて材を形成させた。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、比較検討した。育成に用いた密閉型グロースチャンバーについて図 1 に示す。なお試料としては、典型的な針葉樹あて材を形成する樹種としてクロマツを用いた。



- 本体 (アクリル製)
- 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
- 電源 & 通信ケーブル連絡孔
- 空気および排水用連絡孔
- 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 (傾斜設置)

図 1 密閉型グロースチャンバーの概要

(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/GC-MS 法、固体 NMR および液体 NMR 分析を行った。またモデル化合物として *p*-ヒドロキシフェニル核のみからなる人工リグニンを別途合成し、NMR 測定に供した。

4. 研究成果

(1) 密閉環境下における樹木の傾斜育成

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、通常の CO₂ ガスを用いて、予備育成を行った。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確認した。特に植物の呼吸速度ならびにチャンパ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。確認された育成手法により、第 2 年度では ¹³CO₂ を投与しながらの長期育成を行った。育成から各種分析用試料の調製に至るまでのプロセスを図 2 にまとめた。

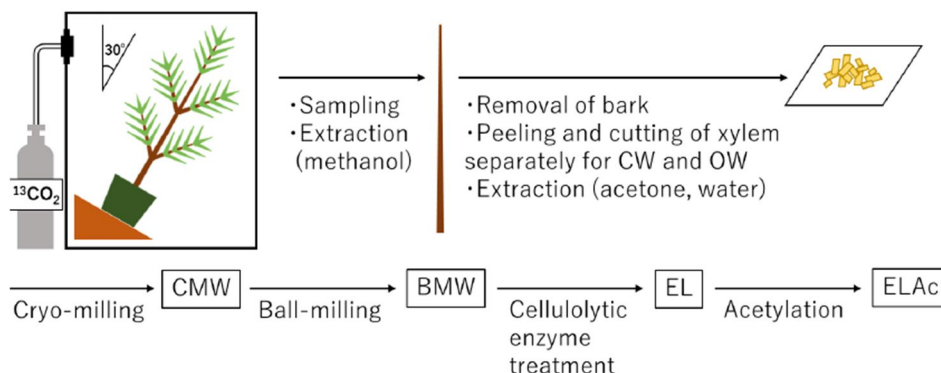


図 2 ¹³CO₂ 雰囲気下におけるクロマツ傾斜育成および分析用試料の調製

(2) 試料の組織観察と ¹³C 置換率の評価

結果より、傾斜育成によってあて材が得られていることを確認し、おおよそ 50% 程度が ¹³C に置換された新生木部が得られた。針葉樹あて材は樹幹中において傾斜下側に形成されるが、木口面内においてはおおよそ下方 1/4 の範囲にのみ形成されること、また根に近い領域や、幹の湾曲により傾斜が解消されてしまう上部ではあて材が継続的には形成されにくいことから、鉛直に育成した場合と比べて、その量は十分の一以下となる。本研究では顕微鏡観察によりあて材の形成範囲を確認し、新生木部部位を採取した。

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、天然の数十倍の濃度で ¹³C を含む細胞壁が形成されていることを確認した。

(3) リグニン構造解析

本研究では特に針葉樹圧縮あて材に特有のリグニン構造、すなわち *p*-ヒドロキシフェニル核に関する構造に注目して分析を行った。試料量は一般的なリグニン分析必要量に対しては少なかつたものの、高い ¹³C 標識率が達成できたことから、特に NMR 分析においては十分な感度での分析が可能であった。得られたスペクトルの一例を図 3 に示す。これにより、極めて長大な計測時間の必要な定量測定（緩和待ち時間 200 s × 積算 20000 回 = 1111 h）を、現実的な時間（緩和待ち時間 200 s × 積算 768 回 = 43 h）で実施することが可能であった。解析結果より、あて材リグニン中における芳香環の化学構造に関して多くの知見が得られた。

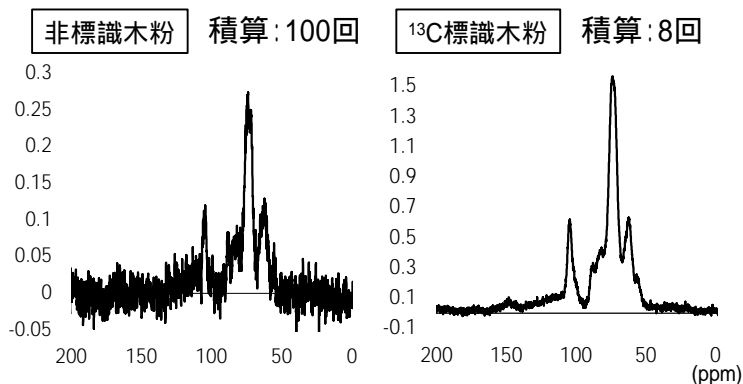


図 3 非標識および標識木粉の固体 ¹³C NMR スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤優依、青木弾、松下泰幸、吉田正人、福島和彦
2. 発表標題 13C02投与によるクロマツ圧縮あて材リグニンの構造解析
3. 学会等名 第72回日本木材学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学 森林化学研究室 http://forestchem.sakura.ne.jp/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------