

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780128
 研究課題名 (和文) 電子スピン共鳴法を用いたラジカル反応によるリグニン分解機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of mechanism of lignin model degradation by radical reactions using electron spin resonance spectroscopy.

研究代表者

大橋 康典 (OHASHI YASUNORI)
 京都大学・生存圏研究所・研究員
 研究者番号：50467437

研究成果の概要 (和文)：白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* によるリグニン分解にはラジカル反応が関与しているが、生成するラジカル種を直接測定した例はない。本研究では、ESR法によるラジカルの直接測定を行い、ラジカル反応によるリグニンモデル化合物の分解機構の解明をおこなった。その結果、ラジカルによってモデル化合物のベンジル位からの水素引き抜き反応が引き起こされていること、その反応性はラジカルの反応性およびモデル化合物のベンジル位における C-H 結合解離エネルギーと高い相関を持つことが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：A white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota* degrades lignin by radical reactions. In the present study short-lived radicals from lignin model compounds produced by hydrogen abstraction at benzyl position by carbon-centered and alkoxy radicals were directly detected using UV-ESR analysis. The reactivity of the reactant radicals and the model compounds revealed correlation with C-H bond dissociation energy of the model compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：バイオマス・新エネルギー・リグニン・ラジカル反応・廃棄物再資源化

1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化・石油資源の減少等の問題と関連し、バイオマス資源を利用した物質・エネルギー生産に注目が集まっている。特に、地上のバイオマスの大部分を占める木質バイオマスに対する期待は大きい。ここで、

木質バイオマス中のセルロースを取り出してパルプ化し、資源として有効に利用するためには、木材中に2～3割程度含まれているリグニンを取り除かなければならない。しかしながら、現在用いられている方法は酸やアルカリ等の有害物質を大量に使用するもの

であり、時代の要請に逆行する。そこで、環境に付加を与えないバイオパルピング法の開発が求められている。特に、選択的リグニン分解菌一種である *Ceriporiopsis subvermispora* は、木材中のセルロースの分解を最小限に抑えながら木材細胞壁および細胞間層を脱リグニンすることから注目されている。しかしながら、この菌によるリグニン分解機構に関しては、同菌が酵素から遠く離れた位置に存在するリグニンをも分解することから酵素直接ではなく低分子量の化合物が分解に関与していることが推測されるものの、その詳細な機構に関しては明らかになっていなかった。例えば、同菌が代謝するリグニン分解酵素の一つであるマンガンペルオキシダーゼは、 Mn^{2+} との反応を開始反応としてリノール酸の過酸化連鎖反応を引き起こす。しかしながら、この反応で生成するラジカル種がリグニン分解に関与していることが提案されているものの、生成する多数のラジカル種のうち、実際に反応に関与しているものは特定されていない。そこで申請者はこれまでに、同反応の過程で生成するカーボンセンターラジカルおよびアルコキシルラジカルが非フェノール性リグニンモデル化合物分解を分解しうることを、従来考えられていたペルオキシルラジカルによる同モデル化合物の分解は起こらないことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、フリーラジカル反応によるリグニンモデル化合物分解機構に関してより詳細な知見を得るため、ラジカル発生用のUV照射装置をESR測定用に最適化し、リグニンモデル分解反応の中間体である短寿命ラジカル種を直接検出してその構造の決定を試みた。また、計算化学的手法を取り入れて結果の妥当性を検証した。

3. 研究の方法

(1) ESR 実験

まず、実験に必要なリグニンモデル化合物の有機合成をおこなった。合成したモデル化合物は、フェノール性および非フェノール性の単量体および二量体、計 16 種類である(図 1)。合成経路等は当該分野では広く知られているものがほとんどであるため、ここでは省略する。その他、市販されているベラトリルアルコール、グアイアコール、2,6-ジメトキシフェノール等、リグニンの部分構造に類似した数種類の化合物も実験に使用した。

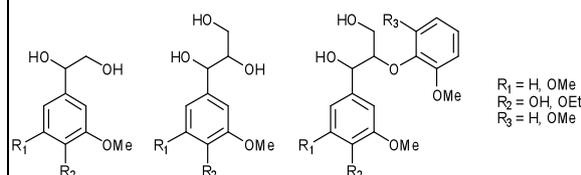


図 1 リグニンモデル化合物

また、合成と並行して、UV照射装置(LIGHTEST社製・CUREMATE 200)とESR装置(日本電子製・FR30)とを組み合わせたUV-ESR装置のセットアップをおこなった(図 2)。緑色の管はUVライトガイドであり、橙色および黄色の部品はライトガイドをESR装置に接続して固定するためのアダプタである。

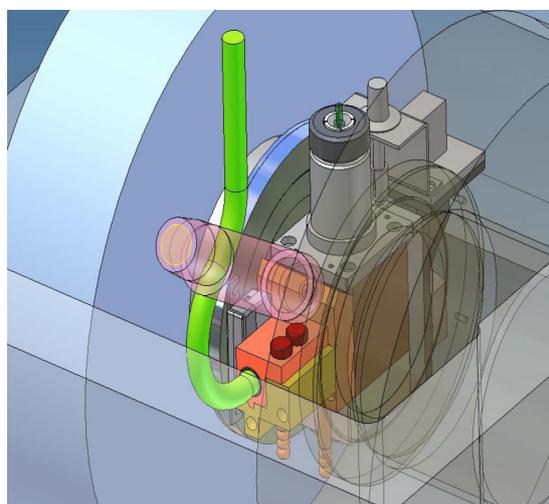


図 2 UV-ESR 装置の概略図

まず、リグニンモデル化合物と反応させる初発ラジカルが確実に発生しているか、装置が正確にセッティングされているかを確認する為に、リグニンモデル化合物を添加していない系にラジカル発生剤のみを添加してUV照射をおこない、生成する初発ラジカルを検出する予備実験をおこなった。ラジカル発生剤としては、カーボンセンターラジカルおよびペルオキシルラジカル発生剤としてAAPH、AIBN等のアゾ化合物を、アルコキシルラジカル発生剤としてジ-tert-ブチルペルオキシドを用いた。これらはラジカル重合の開始剤として用いられることの多い物質であるが、本研究においては逆にリグニンモデル化合物および将来的にはリグニンポリマーの分解を想定して用いた。

次に、上記ラジカル発生剤を用い、種々のリグニンモデル化合物および市販されてい

る数種類の化合物との反応で生成するラジカル種を ESR 法によって直接測定した。その後、得られた ESR スペクトルを解析し、ラジカル種がリグニンモデル分子中のどの部位を最初に攻撃するのかを解析した。

(2) 分子軌道計算

今回の計算では、ある化合物 (A-H) および A-H から水素原子が引き抜かれた生成物 (A·) それぞれのポテンシャルエネルギーを計算し、両者の差を計算することで A-H 結合の結合解離エネルギー (BDE) を求めた。まず分子構造を描画したのちに AM1 によって立体構造の最適化をおこない、その後密度汎関数法 (DFT) によって B3LYP/6-311G*レベルにおけるポテンシャルエネルギー計算をおこなった。また、ラジカル種に関しては非制限 DFT 計算 (UB3LYP/6-311G*)をおこなった。ここでは、水素ラジカルのエネルギーは -0.50000 au、すなわち -313.75 kcal/mol に固定した。これら全ての計算は Wavefunction 社製 Spartan' 06 によっておこなった。また、ラジカルがリグニンモデル化合物に接近して反応する際の活性化エネルギーについても同様に計算し、反応が実際に進行するか否かの検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) ESR 実験

ベラトリルアルコール (VA) を LMC として用いた際には ACVA および AAPH 由来カーボンセンターラジカルが、二量体型の非フェノール性 LMC (図 1 右側の化合物において、 $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = OEt$) を用いた際には AIBN および ACVA 由来カーボンセンターラジカルがそれぞれ LMC と反応することが明らかになった。一方、VA を用いた際には ACVA 由来カーボンセンターラジカルは反応したが、AIBN 由来のものは反応しなかった。その他、それぞれのアゾ化合物由来カーボンセンターラジカルと VA および LMC との反応性について表 1 にまとめた。尚、AAPH 由来ラジカルと二量体 LMC との反応は溶媒への溶解度の関係でおこなうことができなかった。

表 1 各種アゾ化合物由来カーボンセンターラジカルと VA および LMC との反応性

アゾ化合物	VA	LMC
ANVN	×	×
AIBN	×	○
ACVA	○	○
AAPH	○	—

本実験により、カーボンセンターラジカルの反応性はその構造によって違いがみられることが明らかになった。

(2) 分子軌道計算

はじめに、VA および LMC のすべての水素原子に関して、それらを引き抜く際の (A-H → A· + H·) BDE をそれぞれ計算したところ、ベンジル位からの水素引き抜きのエネルギーがそれぞれの分子内で最も小さいという結果となった。このことは、ラジカル反応によってリグニンモデル化合物のベンジル位の水素が引き抜かれやすいとされる過去の研究結果と一致している。また、同 LMC は光学異性体が存在するため、それぞれの BDE を計算して比較したところ、*erythro* 型は VA よりも小さく、*threo* 型は VA よりも大きな BDE 値となった。ESR 実験では VA よりも LMC の反応性が大きいという結果となったが、本計算結果から、カーボンセンターラジカルとの反応では *erythro* 型の LMC が優先的に反応している可能性が示唆された。

次に、各アゾ化合物由来カーボンセンターラジカルが水素を引き抜き安定化する際 (A· + H· → A-H) のエネルギー変化、すなわち -BDE を計算し比較したところ、その値は AAPH 由来のカーボンセンターラジカルは最も小さく、ついで ACVA、AMVN、AIBN 由来のカーボンセンターラジカルという順番になった。この数値が小さいほど反応性が大きいといえるため、本計算結果は ESR 実験の結果をよく反映しているといえる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 大橋 康典, 他, 「フリーラジカルによるリグニンモデル化合物の反応部位に関する研究(2)」, 第 54 回リグニン討論会, 2009 年 10 月 29 日, 静岡県男女共同参画センター.
- ② 安東 大介, 他, 「フリーラジカルによるリグニンモデル化合物の立体選択的分解」, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 29 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡.
- ③ 渡辺隆司, 他, 「木質バイオリファイナリーに向けての担子菌リグニン分解系の解析と応用」, 日本農芸化学会 2008 年度関西支部大会 (第 456 回講演会), 2008 年 9 月 12 日, 京都学園大学.

- ④渡辺 隆司, 他, 「木質バイオマス変換のための酵素的および非酵素的リグニン分解ラジカル反応」, 第 60 回生物工学会大会, 2008 年 8 月 29 日, 東北大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 康典 (OHASHI YASUNORI)
京都大学・生存圏研究所・研究員
研究者番号: 5 0 4 6 7 4 3 7