

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580210

研究課題名（和文） 樹木の葉リグニンの構造検証とその役割の解明

研究課題名（英文） Structural analysis of leaf lignin and investigation of its role

研究代表者

松井 直之（MATSUI NAOYUKI）

独立行政法人森林総合研究所・バイオマス化学研究領域・主任研究員

研究者番号：80353853

研究成果の概要（和文）：

樹木の葉に含まれるリグニンについて、その構造と量に関して DFRC 法を用いた分析を行った。針葉樹の葉にはグアイアシル構造から成るリグニンが、また広葉樹の葉にはグアイアシルとシリンギルの両構造を合わせて持つリグニンが存在したことから、葉のリグニンは材リグニンと同様の基本構成単位を有していることが明らかとなった。針葉樹・広葉樹いずれの場合も、葉に含まれるリグニンの量は樹種によって 0.01%以下～1%前後と違いが大きいことが示された。

研究成果の概要（英文）：

The structural and quantitative analysis of lignins in Japanese wood leaves was achieved with DFRC method. Needle leaves gave guaiacyl-type degradation product, and broad leaves gave both guaiacyl- and syringyl-type units. These results show leaf lignins are fundamentally made up of the same structural units with xylem lignin. The content of leaf lignin widely varied from less than 0.01% to 1%, depending on the wood species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：葉、リグニン、DFRC法

1. 研究開始当初の背景

未利用バイオマスの価値を見直す動きが広がる中で、林地残材として多くが放置されている樹木の葉の利活用についても関心が集まりつつある。これまで葉の化学的分析を進める上で常に問題となっているのが樹葉中

のリグニンの存在である。一般にリグニン含有量の測定にはクラーソン処理と呼ばれる硫酸分解処理の残渣が多く用いられるが、葉に対して同処理を適用すると様々な夾雑物の値が加算されて過大な結果を与えることが指摘されている。樹木の葉中のリグニンに

対しては、特に土壌学の分野において落葉の分解に伴う成分の変遷などの点で多くの報告がある。しかしながらそれらの報告においては先に述べたクラーソン残渣をリグニンとして扱っていることがほとんどであり、木材化学的な意味におけるリグニンとは大きく異なった解釈がなされている。葉中のリグニンの存在に対して厳密な検証を試みた例は極めて少ないのが現状であった。

2. 研究の目的

リグニンの構造分析を行う上で、近年新しく開発された DFRC 法を用いることにより、リグニンの構造中に固有の β -アリエーテル結合を選択的かつ効率よく開裂させ、C6-C3型の構成単位にまで分解することが可能である。すなわちリグニンのみからの分解生成物を得ることができる。さらに分解生成物の構造を詳細に検討することで元のリグニン中での結合の形をある程度まで推定できることから、DFRC 法は植物試料中のリグニンの構造を解析するための優れた手法として用いることができる。これらの特徴を踏まえた上で、本研究では DFRC 法を用いた樹葉リグニンの存在の確認、ならびにその分布と木部リグニンとの差異の検証を行った。

3. 研究の方法

日本産の針葉樹 5 樹種と広葉樹 9 樹種の葉を試料として使い、DFRC 法による分析を行って以下の三点を中心とした解析を行った。

- (1) 葉試料に対する DFRC 法の最適分析条件の検討：葉の組織は一般的なリグニン分析が行われる樹木木部とは大きく異なっている。葉リグニンの分析のため、各種夾雑物による分析結果への影響を調べると共に分解生成物の収率などを基に分析の最適条件を見出した。
- (2) 針葉樹の葉におけるリグニンの存在状態の解明：針葉樹の葉の形状、性質は樹種によって大きく異なっている。物理的な構造の違いと同様、葉のリグニンの分布には針葉樹の種間の差はあるのかどうかを DFRC 法の分解生成物の量をもとに検証した。また、顕微鏡観察によるリグニン分布の可視化を試みた。
- (3) 広葉樹の葉におけるリグニンの存在状態の解明：針葉樹と広葉樹の材リグニンの違いは針葉樹リグニンがほぼ単一の構成単位のみから成るのに対し、広葉樹リグニンは 2 種類の単位から構成される点である。葉のリグニンの構造は木部リグニンと同様な特徴を見せるのかどうか、またその量と存在比率について種間

の相違がどの程度見られるのかについて検証し、材リグニンの結果と比較することによりその役割について考察した。

4. 研究成果

(1) 最初に試料にスギ葉を用い、葉への DFRC 法 (図 1) の適用の有効性と分析を行う上で重要である前処理についての検討を行った。葉は木部とは異なる様々な夾雑物を含むが、分析前にまず熱ヘキサンで抽出して葉表面のワックス成分を除去し、ミルを用いた組織の粉碎の後にさらにエタノール・ベンゼン混液での抽出を徹底して行うことで低分子の抽出成分を除去し、DFRC 分析を行う上で問題のない試料を調製することができた。実際に DFRC 分析を行った結果、スギ葉から木部と同様にリグニンのグアイアシル核由来の分解生成物が得られ、この手法での葉からのリグニン検出が行えることが証明された (図 2)。分解生成物量を木部試料の値と比較した結果、スギ葉中のリグニン含量は 1%以下であると推定された。当年枝の若い葉と前年の成熟葉との比較では分解生成物の量に明確な差は観察されなかったことから、スギ葉におけるリグニン形成は葉の成長の比較的早い段階で起きていることが判明した (表 1)。

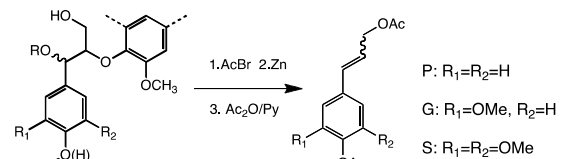


図 1 DFRC 法の手順と分解生成物

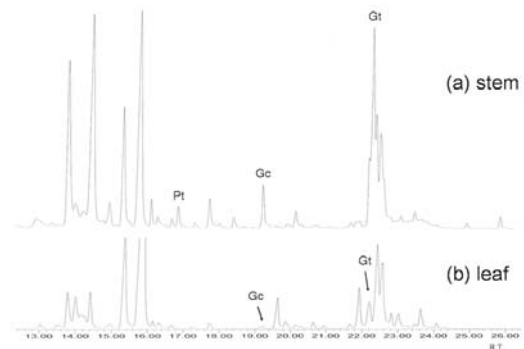


図 2 スギ材(a)と葉(b)の DFRC 分解生成物の GC 分析

(2) 日本産の様々な針葉樹の葉に含まれるリグニンについてその分布を詳細に検討した。既に確認したスギに加え、アカマツの葉に対絶乾重量で約 0.8%と多くのリグニン分解生成物を検出した (表 1)。これに対してヒノキやイチヨウの葉ではリグニンは痕跡量

の検出に留まり、針葉樹の間でも葉のリグニン量には種によって大きな差が存在することが明らかとなった。その原因として、葉の中の通道組織の存在とその発達の度合いが鍵となると予想された。この結果では一般的なニトロベンゼン酸化分解法よりも樹種による差異がはっきりと出ており、リグニンのみから分解生成物を与える DFRC 法の特徴がよく現れたものであると考えられた。

表1 日本産針葉樹葉の DFRC 分析結果
(単位: $\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥葉, tr:痕跡量)

生成物	スギ(若)	スギ(成熟)	ヒノキ
G型	1.20	1.26	tr
生成物	アカマツ	トドマツ	イチョウ
G型	7.90	1.07	tr

アカマツとスギの葉の断面切片をフロログルシン塩酸染色して顕微鏡観察を行った。リグニンの存在を示す赤い染色は葉中央部付近の維管束組織と表皮下層に集中して認められた(図3)。未染色の状態ではこれらの組織は葉緑素を持たない無色の細胞として観察された。維管束組織へのリグニンの沈着は木部細胞と同じく細胞壁の構造強化や疎水性付与などをもたらすと考えられる。表皮下部の染色に関してはスベリンなどリグニン以外の成分の関与の可能性も考えられた。

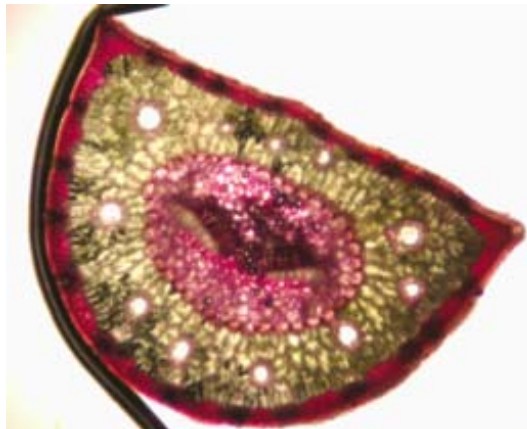


図3 アカマツ葉の横断切片のフロログルシン塩酸染色処理写真

(3) 広葉樹の葉に含まれるリグニンの樹種による量の違いとその構造について詳細に検討を行った。日本産の9種類の広葉樹の葉に含まれるリグニンを DFRC 法で分析した結果、多くの樹種でグアイアシル型に加えてシリングル型の分解生成物を得られたことか

ら、広葉樹の葉においてもリグニンは木部と同様の2種類の構成単位から成る構造を有することが確認できた(図4)。その量に関しては、1%以上のリグニン含量を示すマテバシイ葉から、ほとんどリグニンの含まれないソメイヨシノ・カキの葉に至るまで、樹種によって含量に大きな差があることが判明した(表2)。また、分析によって得られる生成物の量比より、リグニン構成単位のS/G比は木部の値と比較して大幅に小さいことが明らかとなった。微視的には木部のリグニンの中でも道管など木化時期の早い組織に沈着するリグニンのS/G比は比較的小さいことが知られており、顕微鏡で観察された針葉樹葉リグニンの維管束組織への局在を合わせて考えると、葉のリグニンは葉全体の構造的な強化よりは、水分輸送を確実にを行うための通道組織の疎水性向上を主な目的として沈着していると考察された。

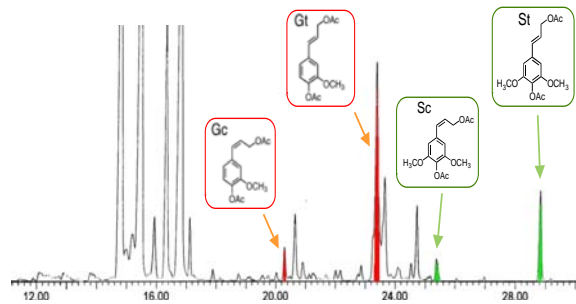


図4 マテバシイ葉の DFRC 分解生成物の GC 分析

表2 日本産広葉樹葉の DFRC 分析結果
(単位: $\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥葉, tr:痕跡量)

生成物	イロハモミジ	ヤブツバキ	クスノキ
G型	2.12	0.81	1.85
S型	0.88	0.46	0.55
S/G比	0.42	0.57	0.30
生成物	カキ	ソメイヨシノ	マテバシイ
G型	tr	tr	8.14
S型	tr	tr	2.19
S/G比	-	-	0.27
生成物	シラカシ	ブナ	キンモクセイ
G型	2.18	0.92	0.89
S型	0.49	0.19	0.11
S/G比	0.23	0.21	0.12

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5件)

(1) 松井直之、大平辰朗：広葉樹の葉リグニンの DFRC 法による検出 (1)、第 56 回リグニン討論会、2011 年 9 月 16 日、山形大学(鶴岡市)

(2) 松井直之、大平辰朗：DFRC 法による針葉樹の葉リグニンの検出(2) - ニトロベンゼン酸化分解法との比較：第 61 回日本木材学会大会、2011 年 3 月 18 日、京都大学(京都市)

(3) 松井直之、大平辰朗：DFRC 法による針葉樹の葉リグニンの検出、第 55 回リグニン討論会、2010 年 10 月 22 日、京都大学(京都市)

(4) 松井直之、大平辰朗：Detection of guaiacyl lignin in Japanese gymnospermous leaves by DFRC analysis、XXVth International Conference on Polyphenols、2010 年 8 月 25 日、モンペリエ市 Le Corum 会議場(フランス)

(5) 松井直之、大平辰朗：スギ針葉中のリグニン - DFRC 法による分析の試み：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(静岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 直之 (MATSUI NAOYUKI)

独立行政法人森林総合研究所・バイオマス
化学研究領域・主任研究員

研究者番号：80353853