

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24880022

研究課題名(和文)木質バイオマスの精密定量解析と生分解過程の可視化

研究課題名(英文)Accurate quantification of wood biomass and analyses during its biodegradation

研究代表者

西村 裕志(Nishimura, Hiroshi)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：50553989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：木質バイオマスの生分解過程を包括的に理解するためには、その構造を精密かつ定量的に捉えるとともに、分解過程の変化を分子レベルで観測することが重要である。本研究では、複雑で多様な分子を含むバイオマス試料において、二次元NMR法を用いて高分解能に各成分を識別しつつ、定量的に見積もることを達成するため、各成分の緩和過程とスピン結合状態の相違に由来するシグナル積分値のばらつきをなくし、定量分析を達成する方法論の開発を行った。また、木質生分解時に生じる二次代謝物を安定同位体標識し、NMR試料セル内で直接観測する手法により、生分解過程における菌体外代謝物の動的な変化と細胞壁成分の構造変化を測定した。

研究成果の概要(英文)：Accurate and quantified analysis is needed to understand the biological degradation of wood biomass at a molecular level. In order to estimate quantitatively in the biomass sample containing complicated and various molecules, we have developed methodology to correct errors occurring in the 2D-HSQC NMR measurements. The variation in the signal integration value originating in the relaxation process of each molecule and differences of a spin couple state were. We also measured the dynamic change of extracellular metabolites and the structural change of a cell wall molecules in a wood decay.

研究分野：木質科学

キーワード：バイオマス NMR リグニン

### 1. 研究開始当初の背景

持続可能な社会とは、ヒトを含めた生態系全体のバランスを維持しながら、豊かな社会を実現することである。産業革命以降の化石資源の急速な消費によるアンバランスな物質循環は、地球温暖化、環境汚染、資源枯渇といった地球規模の重大な問題を引き起こしてきた。地球に降り注ぐ太陽光は、主に植物による光合成によって炭化水素として蓄えられる。そして動物により消費され、菌類による分解されるという生態系の循環がある。こうした生態系本来の循環システムに調和する技術が求められている。本研究では、生物由来の有機物であるバイオマスを含めた原子・分子レベルで分析する技術開発を通じて、生存圏に多様な形態で存在するバイオマスを分子構造の解析を通じて診断し、有用資源として効果的に利用・変換する技術の確立へ貢献することを目指している。特に、樹木に代表される木質バイオマスは、地球上に最も多く蓄積されている有機資源であり、これを有効に変換、利用して、化成品をはじめとした有用物質やバイオエネルギーを生産することは、環境調和型の持続可能な社会の実現に貢献すると期待される。

### 2. 研究の目的

植物細胞壁は、主にセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンによって構成されていて、互いに多様な結合で三次元の高分子を形成している。この高分子ネットワークの結合構造を正確に把握することは植物バイオマスの戦略的な変換、利用につながる。バイオマスの構成成分は分子量分布をもった高分子であり、多様な結合構造が存在するため、分析と定量評価が難しい。核磁気共鳴法(NMR)は、バイオマス成分の結合構造を分子レベルで包括的に分析することができる強力な分光法であり、NMR法を中心に木質バイオマスの構成成分の構造分析および変換反応過程における構成成分の変化を評価する手法の開発を目的とした。また、木質バイオマスの生分解過程におけるリグノセルロース構造の変化や生分解過程で分泌される腐朽菌由来の二次代謝物を分析することで、環境負荷の小さい効果的なバイオマス変換法構築へ向けた基盤構築を目指した。

### 3. 研究の方法

試料調製段階での構造変化の影響を防ぎつつ、木材組織内部の化学構造を分子レベルで分析するためには、できる限り温和な条件での微粉末木粉の調製が必要である。そこで、窒素雰囲気下、乾式粉碎によりのべ3時間の遊星型ボールミル処理を行った。

NMR測定は超高感度検出器(クライオプローブ)を装着したBruker社製600MHz NMR装置を用いた。NMR溶媒としてはDMSO-*d*<sub>6</sub>を用いφ5mm NMR試料管に500μl試料を加えて<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC、およびHMBC測定を行っ

た。

木材腐朽菌による木質生分解過程の解析は供試菌として選択的的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora*、褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum*、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* を用いた。ブナ木粉を用いて1ヶ月間培養し経時的にサンプリングを行い<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR測定を行った。

### 4. 研究成果

二次元HSQC NMR法は炭素と水素の直接結合を観測する方法で、一次元のNMRスペクトルではオーバーラップするシグナルを分離することができるため、バイオマス分子の構造、特に多様な結合ユニットの状態を判別することができる。本研究ではHSQC法に加えて、ロングレンジ相関NMR法(炭素と水素の2-3結合離れた相関を観測する手法)であるHMBC法を用いて、リグニンの分岐構造の相関情報を得た。木質バイオマスのNMR試料の特徴として、高分子であり、微粉碎後有機溶媒に溶解させた溶液は粘性が高いという点が挙げられる。これはNMRスペクトル上において、ブロードで分解能が低いシグナルを与える原因となる。そこで本研究では、主に蛋白質などの生体高分子に適用されていたTROSY法をバイオマス分子に初めて応用し、より高分解能のスペクトルを取得することに成功した。

溶液NMR法を用いて、試料の物質量を定量することができるが、通常は一次元の<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR測定法が用いられる。バイオマスは様々な物質が混合した複雑系であり、それぞれのシグナルを分離するためには2次元NMRへの展開が必須である。ところが、2次元NMRにおいては原理的に定量性が担保されない。シグナルの強度はオフレゾナンス、結合定数( $J_{HH}$ ,  $J_{CH}$ )、分子の緩和過程(T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>)により影響を受ける。これまでに、定量HSQC NMR法としてQ-HSQC (quantitative HSQC)法が報告されている。この測定法は結合定数( $J_{CH}$ )による分極移動効率の差を修正する優れた方法であるが、通常のHSQCと比較して、測定時間が長く、感度が低下する点や、パルスシーケンスが複雑で定量可能な条件が限定される点など、木質バイオマスの構造解析を効果的に進める上で問題があった。分極移動効率の差によるシグナル強度差は結合定数( $J_{CH}$ )の相違に由来するが、木材中の構造は多様であるため、定量する結合の $J_{CH}$ はそれぞれ異なる。そこで、本研究では、前述のTROSY法を応用し、TROSYおよびanti-TROSY測定を行うことにより、バイオマス分子の各結合における $J_{CH}$ を正確に算出し、通常のHSQC法を元に補正定量する方法を考案し、その検証を行い、有効な手法であることがわかった。

次に、木質バイオマスのように様々な分子量の物質の混合物に関しては、この定量法のみでは不十分であるため、さらに新しい定量

法の検討を行った。HSQC のパルス系列における INEPT 期と逆 INEPT 期において、各物質の磁化は横緩和速度  $1/T_2$  で減衰する。分子量が大きい物質ほど横緩和速度が大きいので、磁化がより大きく減衰する。これにより HSQC スペクトル上の分子量が大きい物質の相関ピークは、分子量が小さい物質の相関ピークよりも小さくなり、正確な物質量の定量ができない。そこで我々は TROSY 法を応用する事で、INEPT 期と逆 INEPT 期における磁化の減衰を算出し、この情報を用いて減衰の無い場合の相関ピークの強度を求める手法を開発した。これにより、物質量を分子量の大小による影響を受けずに正確に定量する事が可能となった。バイオマスの変換過程においては、構成成分の構造とその分子量が刻々と変化する。こうした複雑系内における各物質の物質量を、正確に定量できる方法論は幅広い分野に応用できると期待される。

実際の木質バイオマス試料への応用として、木材腐朽菌による木質生分解過程の解析を行った。自然界における樹木の分解者は木材腐朽菌であり、この炭素還元システムを学ぶことは、本質的な解決策へつながる重要なアプローチである。供試菌として選択的的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermisporea*、褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum*、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* を用いた。ブナ木粉を用いて1ヶ月間培養した前後の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを測定し、それぞれのスペクトル差し引いた差スペクトルを作成した。白色腐朽菌と選択的的白色腐朽菌においては、木質バイオマス中のリグニンの分解が経時的に進み、対応したピークの強度は減少する。これにより、差スペクトルにおいては、負のピークが現れる一方、ベンジル位の酸化に伴うピーク強度の増加が観察された。褐色腐朽菌においては、芳香環の分解は少ないものの、リグニンの結合様式の変化が観察された。このように腐朽菌の種類に依存した木質バイオマスの物質変換を、差スペクトルを得ることにより、木質構成成分の構造変化の特徴を効果的に解析できることを見出した。生分解過程において、腐朽菌が分泌する菌体外二次代謝物の解析も行った。特に選択的的白色腐朽菌として知られる *Ceriporiopsis subvermisporea* はリグニンを高選択的に分解する一方、セルロースの分解率が低いというユニークな腐朽メカニズムを有し、特徴的な二次代謝物が分解反応に関与すると考えられている。我々は  $^{13}\text{C}$  標識法を用いて二次代謝物の生成を実際の腐朽状態を観察しながら NMR 法によりモニタリングするとともに、LC-ESI-MS による質量分析法と合わせて二次代謝物の動態に関する解析を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 30 件)

西村裕志, 神谷 明宏, 片平正人, 渡辺隆

司, 木質バイオマスのエーテル型リグニン-糖結合構造の解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山, 2015.3.27.

Nishimura H., Analysis of lignocellulosic biomass by solution-state NMR spectroscopy, Seminar, Swedish NMR Centre, Gothenburg, 2015.3.23.

Nishimura H., Kamiya A., Katahira M., Watanabe T., S Structural studies on the chemical linkage between lignin and polysaccharide, IAWPS International Symposium on Wood Science and Technology, Tokyo, 2015.3.17.

酒井洋尚, 西村裕志, 片平正人, 渡辺隆司, リグニンモデル化合物の生分解過程における挙動, 東京, 2015.3.17.

西村裕志, 革新的なバイオマス構造解析技術を基盤とした新領域の創成, 生存圏科学の新領域開拓シンポジウム, 11-17, 宇治, 2014.11.26.

Okamura, H., Nishimura, H., Nagata, T., Kigawa, T., Watanabe, T. and Katahira, M., Development of new methods to compensate distortion of quantitation caused by difference in molecular weight (transverse relaxation time), 53<sup>rd</sup> Ann. Meeting NMR Soc. Japan, 2014.11.4-6.

Nishimura H., Kamiya A., Katahira M., Watanabe T., Structural analysis of lignin-carbohydrate complex., Lignobiotech III, Concepcion CHILE, 2014.10.27, 3<sup>rd</sup> Symp. Biotechnol. Appl. Lignocelluloses: 39, 2014.

Okamura, H., Nishimura, H., Nagata, T., Kigawa, T., Watanabe, T. and Katahira, M., Development of new NMR methods for correct quantitation on biomass components, 5th Int. Symp. Adv. Energy Sci., Kyoto, 2014.9.30-10.2.

西村裕志, 酒井洋尚, 片平正人, 渡辺隆司, 木材腐朽菌によるリグニン分解過程の解析, 第 59 回リグニン討論会, 福井, 2014.9.12, Proc. 59th Lignin Symp., 120-121.

西村裕志, 渡邊崇人, 本田与一, 渡辺隆司, 選択的リグニン分解菌 *Ceriporiopsis subvermisporea* が産生するラジカル反応を統御する二次代謝物, 第 18 回日本きのこ学会, 京都, 2014.9.11-12

Nishimura H., Kamiya A., Katahira M., Watanabe T., NMR study of Lignin-carbohydrate Linkage in Milled Wood, Polyphenols Communications 2014, 331-332, 2014.9.3.

西村裕志, 木質バイオマスの生分解機構の解析, 第 259 回生存圏シンポジウム 第 5 回 DASH/FBAS 成果報告会要旨集, 22-23, 宇治, 2014.6.16

神谷明宏、西村裕志、片平正人、渡辺隆司, 遠隔相関二次元 NMR 法によるリグニン-多糖結合構造の解析, 第 64 回日本木材学会大会, 松山, 2014.3.14

西村裕志, 田頭英朗, 岡村英保, 片平正人, 渡辺隆司, NMR を用いたバイオマス生分解過程の追跡および解析法の開発, 第 9 回バイオマス科学会議, 高知, 2014.1.16

西村裕志, バイオリファイナリーへ向けた木質バイオマスの NMR 分析, 理研シンポジウム「第 14 回分析・解析技術と化学の最先端」, 理化学研究所 (協賛日本化学会), 和光市, 2013.12.11 (招待講演)

西村裕志, 田頭英朗, 岡村英保, 小澤佑, 片平正人, 渡辺隆司, NMR 法によるリグノセルロースの微生物分解の解析, 日本農芸化学会, 仙台, 2013.3.25

Hiroshi Nishimura, Biodegradation of Wood Biomass by Selective White-rot Fungi, The first Bristol-Kyoto Symposium 2013, Bristol, England, 2013.1.11

Hiroshi Nishimura, High resolution and quantitative NMR analysis of whole milled wood and biodegraded wood, International Symposium on Sustainable Development and Human Security in Southeast Asia through Biorefinery and Low Cost House, Proc. SABH2012, 59-62, 宇治, 2012.12.11

Hiroshi Nishimura, Masato Katahira, Takashi Watanabe, Analysis of wood cell wall structures and secondary metabolites during the biodegradation of white-rot fungi using solution NMR, Lignobiotech II, Fukuoka, Japan (Plenary Lecture), 2012.10.16

Hiroshi Nishimura, Wood Biomass Conversion: Lignin Biodegradation and Structural Analysis, Humanosphere Science School (HSS2012), 46-51, Bandung, Indonesia (Symposium Lecture), 2012.8.28

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lbc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 裕志 (NISHIMURA, Hiroshi)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：50553989