

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292104

研究課題名(和文)代謝工学と有機化学の連携による新規有用リグニンの開発

研究課題名(英文) New approaches towards high-value added lignin production by the combination of metabolic engineering and organic chemistry

研究代表者

梅澤 俊明 (Toshiaki, Umezawa)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：80151926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：再生可能資源・エネルギーの利用技術開発においては、リグニンの高付加価値有効利用方法の確立が必須であるが、このためにはリグニン構造の複雑性回避、すなわち構造単純化が鍵となっている。本研究では、リグニンの構造単純化のための新規化学変換法の開拓を進めるとともに、植物代謝工学によるリグニンの構造改変を進めた。その結果、イネにおけるリグニンの芳香核構造を単純化することに成功すると共に、有機化学的にもリグニン芳香核組成を単純化することに成功した。また、リグノセルロースの構造反応性についても新規知見を得ることが出来、今後のリグノセルロース利用に向けた基盤的知見が多数蓄積した。

研究成果の概要(英文)：Towards development of technologies for sustainable utilization of renewable lignocellulose biomass, development of high-value added products from lignin is critically important. To do so, simplification of lignin structures are of fundamental importance. Herein, we developed a new reductive reaction to decrease the complexity of lignin aromatic composition. In addition, we engineered lignin biosynthesis in rice to give rise to transgenic rice plants where aromatic composition of lignins was largely simplified yielding lignins composed mainly of p-hydroxyphenyl, guaiacyl or syringyl units. New findings on reactivity of the engineered lignocelluloses was also obtained. Taken together, this study provided basic knowledges for future lignocellulose utilization.

研究分野：植物代謝機能化学

キーワード：リグニン 代謝工学 有機化学 イネ科植物 還元分解 芳香核構造単純化

1. 研究開始当初の背景

様々な再生可能資源・エネルギーのうち、バイオマスは賦存量が多いこと、カーボンニュートラルであることに加え、液体燃料や工業原材料等の有機化合物の供給性を有する点が特に要である。バイオマスのうちで最も賦存量の多い木質について、既に多糖の利用技術開発は実用段階のものが多い。一方、リグニンの大規模利用は、過去数十年に亘りパルプ廃液リグニンの燃料・分散剤・粘結剤としての利用等に限定されており、高付加価値利用に至っていない。しかし、中・長期的にはいずれ化石資源が枯渇すること、昨年発生した原発事故以来安全な資源・エネルギー供給に対する世界的な希求度が高まっていること、近年様々な技術革新の進展がみられたこと、さらにバイオプラスチックの高機能化に芳香族成分の利用が必須であること等、様々な社会的背景の変化に伴い、今や、地球上で最多蓄積量を誇る芳香族資源であるリグニンの有効利用法の開拓をあらゆる角度から再度総合的に進めることが強く求められている。

しかし、リグニンの有効利用は大変チャレンジングな課題であり、その研究の難しさは、主にリグニンの構造の複雑さ、単離の難しさ、及び誘導体化起点となる官能基の乏しさに起因する。そこでこの隘路を回避するために、構造が単純且つ反応性が高い新規リグニンを代謝工学により作出すること、及び既存のリグニンの構造を有機化学的に単純化することに基づく、有機化学と代謝工学の融合によるリグニンの新規有効利用に向けた基盤構築が希求されていた。

2. 研究の目的

上記の背景のもとで、本研究では、リグニンの新規化学変換法の開拓を進めるとともに、近年格段に進化した植物バイオテクノロジーを駆使して、単離が容易で、反応性に富み、かつ単純な芳香核構造を有する新規リグニンを産生する植物を作出するための基礎研究を推進することを目指した。

3. 研究の方法

(1) リグニン生合成を代謝工学により制御した形質転換イネの作出とリグニンの構造解析

リグニン構造を様々に変異させた形質転換イネを栽培し、そのリグニンの構造を詳細に解析する。さらに、大型の実用イネ科植物(エリアンサスなど)について、リグニン構造を詳細に検討し、組換えイネリグニンの構造と比較解析する。

(2) 有機化学反応によるリグニン芳香核構造の複雑性の低減

メトキシ基置換状況の異なる各種リグニンモデル化合物を用い、従来未開拓の酸性還元反応における脱メトキシ機構を詳細に解

析する。

(3) 構造改変リグニンの反応性解析

リグニン構造を様々に変異させた形質転換イネおよび大型の実用イネ科植物(エリアンサスなど)のリグニンについて、構造と反応性を詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) リグニン生合成を代謝工学により制御した形質転換イネの作出とリグニンの構造解析

既に作出したシリギル(S)リグニン合成を抑制した組換えイネ、およびリグニン中のケイ皮アルデヒド構造を増加させた組換えイネを大量に栽培し、そのリグニン構造を2次元NMR法などを用いて詳細に解析した。また、イネリグニンは、通常

-ヒドロキシフェニル(H)、グアイアシル(G)、およびS型リグニンから構成されているが、代謝工学により、主にH型、G型、S型のリグニンからなるイナワラをそれぞれ作出することに初めて成功し、これらのリグニン構造を2次元NMR法などを用いて詳細に解析した。

さらに、大型の実用イネ科植物(エリアンサス、ソルガム、サトウキビ)について、リグニン構造を詳細に検討し、組換えイネリグニンの構造と比較解析した。その結果、器官、組織により、リグニン構造が多様であることが示された。

(2) 有機化学反応によるリグニン芳香核構造の複雑性の低減

H型、G型、S型のリグニンモデル化合物を用いた芳香核置換基の単純化を試み、メトキシ基の還元的脱離によりG型およびS型芳香核がH型に収束する新規な還元的反応を見出した。本反応は、リグニン及びリグニン由来芳香族化合物の芳香核構造の単純化に有用と考えられ、現在、この反応を組換えイネリグニンなどに適用することによる、応用展開を図っている。

(3) 構造改変リグニンの反応性解析

リグニン生合成改変形質転換イネ試料並びに大型イネ科植物(エリアンサス、ソルガム、サトウキビ)試料を用いリグニンの反応性と構造の相関について検討した。すなわちまずこれらの植物試料につき、細胞壁区分を調整した。ついで、これらのイネ試料を塩基性加水分解に供し、得られた分解産物のリグニン分析などを行った。特に、従来報告のない超高分解能質量分析のリグニンオリゴマー画分への適用を行った。そこで結果を、従来分析済みのこれらの形質転換イネおよびエリアンサスのリグニンの基本性状と比較することにより、シリギルリグニン含量の多いリグニンの場合、オリゴマー画分量が増加することが示唆された。

さらに、組換えイネおよび各大型イネ科植物から得たリグノセルロースについて、酵素糖化性、熱分解特性や酸化分解反応特性について検討し、構造と反応性に関する多くの知見を得た。これらの知見は、今後のリグノセルロース利用の勤番情報として有用である。

以上により、本研究では、イネにおけるリグニンの量と構造を大幅に改変し、芳香核構造を単純化することに成功すると共に、有機化学的にもリグニン芳香核組成を単純化することに成功した。さらに、リグノセルロースの構造反応性についても新規知見を得ることが出来、今後のリグノセルロース利用に向けた基盤的知見が多数蓄積した。

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1件)

Tomoyuki Nakatsubo, Safendri Komara Ragamustari, Takefumi Hattori, Eiichiro Ono, Masaomi Yamamura, Laigeng Li, Vincent L. Chiang, Toshiaki Umezawa, A new O-methyltransferase for monolignol synthesis in *Carthamus tinctorius*, Plant Biotechnology, 31, 2014, 545-553
<http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0903a>

[学会発表](計30件)

梅澤俊明、リグニンバイオマスリファイナリーの可能性、JBA植物バイオ研究会第7回会合、2016/4/25、東京都

松本直之、武田ゆり、飛松裕基、小柴太一、鈴木史朗、坂本正弘、梅澤俊明、イネリグニン生合成に関わるシンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子群の発現解析と変異体の性状評価、第66回日本木材学会、2016/3/27-29、名古屋市

林 晃大、山村正臣、飛松裕基、宮本託志、児嶋美穂、高部圭司、鈴木史朗、梅澤俊明、エリアンサスおよびソルガム茎の組織分画物におけるリグノセルロースの性状解析、第66回日本木材学会、2016/3/27-29、名古屋市

宮川泰幸、山村正臣、鈴木史朗、飛松裕基、高野俊幸、梅澤俊明、ヨウ化水素酸によるリグニン由来芳香族化合物の還元的酸分解、第66回日本木材学会、2016/3/27-29、名古屋市

宮本託志、山村正臣、飛松裕基、鈴木史朗、児嶋美穂、高部圭司、梅澤俊明、大型イネ科バイオマス植物エリアンサス及びサトウキビのアルカリ処理前・後におけるリグノセルロース性状解析、第66回日本木材学会、2016/3/27-29、名古屋市

武田ゆり、小柴太一、飛松裕基、村上真也、

山村正臣、坂本正弘、鈴木史朗、梅澤俊明、*p*-クマロイルエステル 3-ヒドロキシラーゼ遺伝子の発現制御によるイネリグニンの構造改変、第66回日本木材学会、2016/3/27-29、名古屋市

Toshiaki Umezawa, Daisuke Shibata, Kenji Umemura, Masaru Kobayashi, Didik Widayatmoko, I Made Sudiana, Endang Sukara, Production of Biomass Energy and Material through Revegetation of Alang-alang (*Imperata cylindrica*) Fields, SCEJ 81st Annual Meeting (2016) International symposium for biomass utilization and perspectives in Southeast Asia-, 2016/3/15, Suita

Toshiaki Umezawa, Daisuke Shibata, Kenji Umemura, Masaru Kobayashi, Producing Biomass Energy and Material through Revegetation of Alang-alang (*Imperata cylindrica*) Fields, The 6th Flagship Symposium of Tropical Artificial Forest (The 306th Sustainable Humanosphere Symposium) Producing Biomass Energy and Material through Revegetation of Alang alang (*Imperata cylindrica*) Fields, 2016/2/19, Uji

梅澤俊明、熱帯リグノセルロース資源の持続的生産利用、植物CO₂資源化研究拠点ネットワーク(NC-CARP)産学連携コンソーシアム第11回バイオマスリファイナリー研究会、2016/1/22、東京都

武田ゆり、小柴太一、飛松裕基、山村正臣、服部武文、坂本正弘、高野俊幸、鈴木史朗、梅澤俊明、フェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ OsF5H1 の発現制御によるイネリグニンの構造改変、第60回リグニン討論会、2015/11/5-6、つくば市

Yuri Takeda, Taichi Koshiba, Yuki Tobimatsu, Masaomi Yamamura, Masahiro Sakamoto, Toshiyuki Takano, Shiro Suzuki, Takefumi Hattori, Toshiaki Umezawa, 54th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America (PSNA 2015), 2015/8/8-12, Urbana-Champaign, Illinois, USA

武田ゆり、小柴太一、飛松裕基、山村正臣、服部武文、坂本正弘、高野俊幸、鈴木史朗、梅澤俊明、OsF5H1発現制御によるイネリグニンの芳香核組成改変、第33回日本植物細胞分子生物学会大会、2015/8/10-12、東京都

梅澤俊明、奥西智哉、坂本正弘、鈴木史朗、山村正臣、飛松裕基、武田ゆり、林晃大、イネリグニン合成パスウェイの改変、第288回生存圏シンポジウム、第6回DASH/FBAS全国共同利用成果告会、2015/6/24、宇治市

梅澤俊明、リグニンの生合成と構造特性、SIPリグニンワークショップ、2015/6/12、つくば市

山村正臣、梅澤俊明、エリアンサスの化学

構造特性、第279回 生存圏シンポジウム (第5回 生存圏熱帯人工林フラッグシップシンポジウム) 熱帯バイオマスの持続的生産利用 - 荒廃草原の利用とバイオマス生産利用 -、2015/3/26、宇治市

林 晃大、山村正臣、高部圭司、坂本正弘、鈴木史朗、梅澤俊明、大型イネ科植物エリアンサスのリグノセルロース特性における組織間の差異、第65回 日本木材学会、2015/3/16-18、東京都

武田ゆり、小柴太一、飛松裕基、山村正臣、坂本正弘、高野俊幸、鈴木史朗、梅澤俊明、OsF5H1 ノックダウンによるイネリグニン合成の改変、第65回 日本木材学会、2015/3/16-18、東京都

Toshiaki Umezawa, Masahiro Sakamoto, Taichi Koshiba, Takefumi Hattori, Shiro Suzuki, Masaomi Yamamura, Lignin metabolic engineering in *Oryza sativa* for biomass refining, International Symposium on Wood Science and Technology 2015, 2015/3/15-17, Tokyo

Masaomi Yamamura, Shiro Suzuki, Takefumi Hattori, Toshiaki Umezawa, High-throughput protocols of lignin analysis, International Symposium on Wood Science and Technology 2015, 2015/3/15-17, Tokyo

梅澤俊明、熱帯植物の持続的生産利用と植物バイオマスの高度利用に向けたリグニン代謝工学、香川大学応用生命化学研究センター第6回公開シンポジウム 生命を分子レベルで探求する、2015/3/9、三木町、香川県

21 Toshiaki Umezawa, Lignin Metabolic Engineering for Biomass Refinery, Workshop on the Research for Genetically Modified Woody Plants and Biomass 2014, 2014/10/17-18, Nanjing, China

22 小柴太一、向井まい、服部武文、鈴木史朗、坂本正弘、梅澤俊明、リグノセルロース酵素糖化に及ぼす試料加熱前処理の効果、第59回リグニン討論会、2014/9/11-12、福井市

23 Taichi Koshiba, Naoki Yamamoto, Takefumi Hattori, Mai Mukai, Shiro Suzuki, Masahiro Sakamoto, Toshiaki Umezawa, ICP2014, Upregulation of Lignin Biosynthesis in *Oryza sativa* for Biomass Refining, XXVIIth International Conference on Polyphenols, 2014/9/2-6, Nagoya

24 Taichi Koshiba, Shinya Murakami, Takefumi Hattori, Mai Mukai, Akira Takahashi, Akio Miyao, Hirohiko Hirochika, Shiro Suzuki, Masahiro Sakamoto, Toshiaki Umezawa, CAD2 deficiency causes both *brown midrib* and *gold hull and internode* phenotypes in *Oryza sativa*, 53rd Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America (PSNA 2014), Raleigh, North Carolina, USA

25 Toshiaki Umezawa, Plant biotechnology towards sustainable production and utilization of tropical plant biomass resources, Bandung Symposium on ASEAN University Network (AUN) - Kyoto University (KU) Student Mobility Program toward Human Security Development, 2014/6/24-25, Bandung, Indonesia

26 梅澤俊明、高辻博志、坂本正弘、鈴木史朗、山村正臣、野田壮一郎、村田久美子、安井あゆみ、イネリグニン合成パスウェイの改変、第259回生存圏シンポジウム、第5回 DASH/FBAS 全国共同利用成果告会、2014/6/16、宇治市

27 安井あゆみ、山村正臣、高部圭司、鈴木史朗、梅澤俊明、イネ科植物細胞壁成分フェルラ酸二量体の測定のための基盤構築、第64回日本木材学会大会、2014/3/13-15、松山市

28 梅澤俊明、矢崎一史、杉山暁史、鈴木史朗、山村正臣、柴田大輔、三位正洋、我有満、上床修弘、熱帯バイオマス植物の持続的生産と利用の応用展開、第248回生存圏シンポジウム ミッションシンポジウム、2013/3/10-11、宇治市

29 小柴太一、村上真也、向井まい、服部武文、宮尾安藝雄、廣近洋彦、鈴木史朗、坂本正弘、梅澤俊明、イネ *brown-midrib* 変異体の解析、第58回リグニン討論会、2013/11/12-13、高松市

30 梅澤俊明、植物バイオマスの高度利用に向けたリグニン代謝工学の展望、第28回植物バイテクシンポジウム、2013/7/18、京都市

〔図書〕(計1件)

梅澤俊明、弘前大学出版会、植物細胞実験法 (石井忠、石水毅、梅澤俊明、加藤陽治、岸本崇生、小西照子、松永俊明編)、2016、403

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都大学生存圏研究所森林代謝機能化学分

野ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅澤 俊明 (UMEZAWA, Toshiaki)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号： 8 0 1 5 1 9 2 6

(2) 研究分担者

鈴木 史朗 (SUZUKI, Shiro)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号： 7 0 4 3 7 2 6 8

飛松 裕基 (TOBIMATSU, Yuki)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号： 2 0 7 3 4 2 2 1

(3) 連携研究者

柴田 大輔 (SHIBATA, Daisuke)

かずさDNA研究所・部長

研究者番号： 1 0 3 7 0 9 2 5

鈴木 秀幸 (SUZUKI, Hideyuki)

かずさDNA研究所・主任研究員

研究者番号： 8 0 2 7 6 1 6 2

河本 晴雄 (KAWAMOTO, Haruo)

京都大学・大学院エネルギー科学研究科・

准教授

研究者番号： 8 0 2 2 4 8 6 4

菊地 淳 (KIKUCHI, Jun)

理化学研究所・先端NMRメタボロミクス

チーム・チームリーダー

研究者番号： 0 0 3 2 1 7 5 3