

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850109

研究課題名(和文) 13C同位体標識リグニンを用いた化学構造と酵素分解の反応速度論的解析

研究課題名(英文) Relationship between chemical structure and enzymatic degradation reaction kinetics of synthesized 13C labeled lignin model compound

研究代表者

米田 夕子 (Yoneda, Yuko)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：90638595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リグニンは木材主要成分の一つで高分子芳香族化合物である。リグニンを化成品原料へと変換する方法の一つにリグニン分解酵素を用いた低分子化がある。本研究では、リグニン分解酵素によるリグニンモデル化合物分解機構について、13C-NMR法にて反応を観察し、その反応機構を解明することを目的とした。13C-NMR測定に適した13C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物の化学合成を行い、これを酵素分解し、反応過程を13C-NMR法にて追跡した結果、特定の低分子芳香族化合物が得られることを確認した。

研究成果の概要(英文)：13C Labeled lignin dimeric model compound, a guaiacyl unit linked to a syringyl one by -O-4 bond, was synthesized, and treated by laccase/1-hydroxybenzotriazole. Following the process of laccase-generated reaction by 13C-NMR, an oxidation at benzylic position and a cleavage of C-C bond of lignin dimeric model compound were observed. Veratric acid was determined as a reaction product, although it was not found in the laccase-generated reaction solution of the oxidized dimeric model compound product as a substrate.

研究分野：森林生物化学

キーワード：リグニン ラッカーゼ 13C同位体標識

1. 研究開始当初の背景

持続可能な循環型社会を構築する上で、再生産可能資源である木質バイオマスの利用拡大は欠かせない。木質バイオマスをケミカル素材としてとらえると、化学成分による分類から、セルロース、ヘミセルロース、リグニン、抽出成分に大別できる。このうち、紙、繊維、食品添加物などさまざまな分野でケミカル素材として利活用されているセルロースに比べ、リグニンの有効利用には検討の余地が残されている。

リグニンはモノリグノールが多数重合した高分子芳香族化合物である。これを1つの芳香環からなる化合物(モノマー)まで低分子化できれば、我々の身の回りのさまざまな化学工業製品素材となり得る。リグニンのケミカル素材としての利用が拡大すれば、化石資源利用量の削減、二酸化炭素排出量の低減につながる。

2. 研究の目的

リグニンをケミカル素材である有用な芳香族化合物、つまり、モノマーへと資源化する手法として、化学分解法、熱分解法、酵素分解法などが挙げられる。ただし、リグニンは多様かつ強固な構造をとるため、現在まで効率的なモノマーへの変換技術は確立されていない。本研究では、最も環境負荷の小さい、酵素を利用したリグニンモノマー化技術に焦点を絞り、その第一ステップとして基質であるリグニン化学構造と酵素分解反応の特異性を明らかにすることを目的とする。

本研究の最終目標は、リグニンのモノマーへの資化、言い換えれば、リグニンの構成単位であるモノリグノール間の結合を切断する技術の開発である。モノリグノールとは、プロピル鎖を有する芳香環のことであり、リグニンの基本構成単位となっている。モノリグノール間の結合の種類は、 β -O-4、 β -5-O-4、 β -1、 β -2、 β -5-5結合などさまざまなものあり、天然リグニンではこのうち β -O-4結合が最も多く存在する。高分子リグニンは、多数のモノリグノールが上記のような結合により不規則に結合しており、複雑で一定の構造をもたない。そのため、高分子リグニンを用いて酵素分解反応を解析しようとするれば、どの結合様式に対し酵素が作用しているのかの判別が難しく、化学構造と酵素分解反応の特異性の解明に至らない。そこで本研究期間内では、反応の解析を可能にするリグニンモデル化合物を用いた研究を展開する。即ち、モノリグノール間の結合様式が明確なリグニンオリゴマー(モノリグノールが2~3個結合した化合物)をモデル化合物とし、これの酵素分解反応の観察および反応速度論的考察から、酵素分解反応の反応機序を明らかにすることを目的とする。

ところで、自然界ではリグニンは数十年単位のスパンで酵素分解される。分解に長時間を要するのは高分子リグニンの化学構造に

由来する。つまりそれは、高分子リグニン中の反応起点部位へのアクセシビリティの低さであり、高分子リグニンの骨格を形成する芳香環の難分解性である。ただし、後者は本研究の目的であるモノマーへの資源化による利用の観点において有利な事象である。

自然界で進行するリグニンの酵素分解は、白色腐朽菌から分泌されるラッカーゼ、マンガネロキシダーゼなどのリグニン分解酵素によるものである。このうちラッカーゼはフェノール類を酸化できる酵素であり、複雑な化学構造をもつ高分子リグニン中に存在する遊離フェノール性水酸基に作用し得る。しかしながら、先述の通り、高分子リグニン中の反応起点部位へ巨大なたんぱく質であるラッカーゼが物理的に接近できる程度は低い。また、反応起点となるラッカーゼが作用し得る遊離フェノール性水酸基がモノリグノールでは1単位あたり1つ存在するが、モノリグノールが重合した高分子リグニンでは遊離フェノール性水酸基が消失するため、化学構造の点からもラッカーゼは作用し難くなる。

このように、ラッカーゼだけでは高分子リグニンを効率よく分解できない。そこで、自然界では、ラッカーゼによる酵素分解の際、メディエーターと呼ばれる仲介化合物が介在することが知られている。メディエーターはラッカーゼよりも小さな分子であり、また、遊離フェノール性水酸基に限らず作用する。つまり、リグニンはメディエーターによって酸化を受け、これに続いて電子の分子内転移などにより結合が切断され、低分子化される。

以上のように、ラッカーゼによる高分子リグニンの分解反応は酵素反応ではあるが、メディエーターを介するため幅広い基質特異性を有する。そのため、この酵素分解反応は高分子リグニン分子内の酸化されやすい部位から反応が開始する。つまり、基質である高分子リグニン化学構造の酸化還元電位に反応速度が依存することとなる。

高分子リグニンの資化を実現するには、リグニンの酵素分解反応を「微視的な化学構造に起因する要素(酸化還元電位)」と、「巨視的な構造的特徴に起因する要素(立体障害)」の二つの観点から考察しなければならないが、本研究では、1つ目の基質の化学構造と酵素分解反応との関連性について明らかにする。高分子リグニンを単純化したリグニンオリゴマーモデル化合物を作製し、これを基質として酵素分解反応を行い、反応速度論に基づき正確な反応機序を把握することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 酵素分解反応の観察法

反応機序を明らかにするため、リグニンオリゴマーモデル化合物を基質とした酵素分解反応を行い、基質量の変化や反応により新たに生成する化合物を精査する。基質量の変

化を観察する手法としては、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析や紫外可視分光法による分析などが挙げられる。しかし、これらの方法では、反応の直接的な観察が不可能であったり、反応生成物の化学構造に関する情報が得られないなどの短所がある。そこで本研究では、これらの短所をもたない¹³C-NMR法による観察を選択した。

自然界に存在する化合物はほとんどが¹²C同位体から構成され、¹³C同位体の存在比は1%である。そのため、通常、¹³C-NMR測定にはある程度の化合物量（mgスケール）と化合物量に反比例する測定時間を要する。つまり、微量な化合物の¹³C-NMRスペクトルを得るには長時間（日単位）の測定が必要となる。

本研究では酵素分解反応の反応機序を解明することを目的としている。その際、数時間で消長する極微量の分解生成物が観察対象となり得る。そこで、酵素分解反応に因らない長時間の¹³C-NMR測定中に生じる反応を可能な限り除外するため、基質であるリグニンオリゴマーモデル化合物を¹³C同位体標識し、¹³C-NMR測定に適した基質とすることで測定時間を短縮することとした。

(2)¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物の合成

過去の研究において、酵素分解反応によりリグニン構造の β -O-4エーテル結合の開裂が確認されている。そこで、基質とするリグニンオリゴマーモデル化合物は、高分子リグニンの分子内に最も多くみられる β -O-4エーテル結合によりモノリグノールが結合した二量体モデル化合物（b04-1）とした。また、酵素分解反応により酸化されると予想されるプロパン鎖の炭素（ α -、 β -、 γ -炭素）を¹³C同位体標識することとした。

入手可能な¹³C同位体標識化合物の種類は限られているため、既報のリグニンオリゴマーモデル合成法では α -、 β -、 γ -炭素を¹³C同位体標識することは不可能である。よって、市販されている¹³C同位体標識化合物を原料としてモデル化合物（b04-1）を得るための新たな有機合成経路を確立する。¹³C同位体標識化合物は高価であり、これらを使用した実験は安易に行えないため、事前の合成経路の最適化は必須である。そこで、まず始めに十分量の原料が確保できる通常の化合物（¹²C化合物）を用い合成法を検討する。このとき、各反応工程ならびに全行程の収率が最も高くなるよう反応条件の最適化を行った。

最適化した合成法に従い、入手可能な¹³C同位体標識化合物を用いて¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物（b04-1）の有機合成を行った。

(3)¹³C-NMR法による酵素分解反応の追跡

研究方法(2)において合成した¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物（b04-1）を基質とし、ラッカーゼ-メディエーター系による酵素分解反応を実施した。反応に用いる酵素、メディエーター、緩衝液や溶媒を構

成する炭素は通常の炭素（¹³C存在比が約1%）である。そのため、¹³C-NMR測定では酵素およびメディエーター混在下であっても¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物由来のシグナルのみが検出可能となる。

(2)で合成した¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物（b04-1）（DMSO-*d*₆溶液）、ラッカーゼ（天野エンザイム、重水溶液）、メディエーターとして1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HBT、酢酸重水緩衝液）がそれぞれ20 mM、100 nkat/mL、2.0 mMとなるよう三角フラスコ（100 mL）に添加し、さらに酢酸重水緩衝液（50 mM、pH 4.5）を加え全量を10 mLに調製した。この溶液を酸素雰囲気下、30、150 rpmで24時間反応させた。反応開始6、12時間後にラッカーゼ（50 nkat/mL）、HBT（1.0 mM）を反応溶液に添加した。反応開始1、2、3、4、5、6、12、24時間後に反応溶液をNMRテストチューブに採取し、¹³C-NMR測定を行った。

(4)反応生成物の同定と酵素分解反応の反応速度論的解析

¹³C-NMRスペクトルに現れる、 α -、 β -、 γ -炭素由来シグナルの変化（消長すると予想される）をとらえ反応の様子を観察する。まず、¹³C-NMRスペクトルから基質の分解速度について検討した。次に、¹³C-NMRスペクトルから取得できるその他の情報、つまり、酵素分解反応により生成した化合物の化学構造などから分解反応を多角的に解析した。なお、反応生成物特定のため、補助実験として¹³C同位体標識していない通常のリグニンオリゴマーモデル化合物を基質とした酵素分解反応を行った。

4. 研究成果

(1)¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物の合成

ペラトロールを出発物質とし、酢酸-¹³C₂を反応させ、 α -、 β -炭素が¹³C同位体標識されたアセトフェノン誘導體-¹³C₂を調製した。これを原料とし、既報の合成法に従い、¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物（b04-1）の合成を達成した。¹³C同位体標識 α -炭素の導入はホルムアルデヒド-¹³Cを用いて行った。¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物（b04-1）の酢酸-¹³C₂からの総収率は36%であった。

得られた¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物（b04-1）はジアステレオマー混合物であったため、 α -、 β -炭素の水酸基をアセタール保護し、エリスロ体とスレオ体を分別した。その結果、得られたジアステレオマーの生成比は約3:7であった。

(2)¹³C-NMR法による酵素分解反応の追跡

¹³C-NMRスペクトルでは、¹³C同位体標識リグニンオリゴマーモデル化合物（b04-1）の α -、 β -、 γ -炭素のシグナルは、それぞれ73 ppm、86 ppm、60 ppmに観察された。反応開始24時間後のスペクトルでは基質の α -、

-、-炭素のシグナルがほとんど消失した。反応時間の経過に伴い、62 ppm、64 ppm、83 ppm、89 ppm、172 ppm、198 ppm に新たなシグナルの出現が認められた。

新出シグナルのうち、62 ppm、83 ppm、198 ppm のシグナルは、基質 (b04-1) のベンジル位が酸化された化合物 (b04-2) 由来であることがわかった。そこで、他の 64 ppm、89 ppm、172 ppm に現れたシグナルの化合物の特定を試みた。

64 ppm および 89 ppm のシグナルは隣接する 2 個の炭素に由来すると考えられた。これまでに報告されているリグニンオリゴマーモデル化合物の酵素分解推定反応機構より、グリコールアルデヒドの生成が予見された。グリコールアルデヒドは、水溶液中ではグリコールアルデヒド水和物として存在する。このグリコールアルデヒド水和物の化学シフト値は、反応開始 24 時間後のスペクトルに見られた 64 ppm と 89 ppm のシグナルと完全に一致した。

最後に、172 ppm に現れたシグナルを示す化合物について検討した。上述したリグニンオリゴマーモデル化合物からのグリコールアルデヒドの生成を考慮すると、172 ppm のシグナルはベラトル酸由来であることが推察された。¹³C-NMR スペクトルの 1 つのシグナルから化学構造を断定するのは難しいが、補助実験の結果からベラトル酸の生成を確認した。

(3) 酵素分解反応の反応速度論的解析

リグニンオリゴマーモデル化合物 (b04-1) の酵素分解反応では、ベンジル位が酸化された化合物 (b04-2)、グリコールアルデヒド、ベラトル酸が生成することがわかった。また、その他の反応生成物はほとんど観察されなかった。そこで、基質 (b04-1) からこれら 3 つの化合物がどのように生成するのかを ¹³C-NMR スペクトルから解析した。

経時的に測定した ¹³C-NMR スペクトルにおいて、反応生成物由来シグナルの反応時間経過に伴う減衰は観察されなかった。ただし、グリコールアルデヒドとベラトル酸の生成は化合物 (b04-2) から起こり得るため、化合物 (b04-2) を基質とし同様の酵素分解反応を実施した。その結果、反応開始 24 時間後のスペクトルにおいても変化が認められなかった。

以上の結果、リグニンオリゴマーモデル化合物 (-O-4 エーテル結合型) のラッカーゼ-HBT 分解反応機構は次のようにまとめられる。つまり、モノリグノール間の -O-4 エーテル結合に隣接する -炭素の水酸基が酸化され、これと同時に -炭素と -炭素間の結合が開裂する。このとき、側鎖の開裂のみが惹起され、芳香環の開裂はほとんど観察されない。このことから、高分子リグニンに多数存在する -O-4 エーテル結合部位においては、プロピル鎖の炭素-炭素結合の開裂が低分子化の主要因であり、一方、芳香環は開裂

せずに残存することが示唆された。即ち、本研究成果は、ラッカーゼ-HBT 酵素分解法が、高分子リグニンから効率的に芳香環を製出するモノマー化技術の基盤となる有用な方法であることを示すことができた。

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)

[学会発表](計 3 件)

中村亮太、米田夕子、河合真吾、¹³C NMR 法による二量体モデル化合物分解機構の解析、第 61 回リグニン討論会、2016 年 10 月 27-28 日、京都大学宇治キャンパス・宇治おうばくプラザ(京都府・宇治市)

中村亮太、米田夕子、河合真吾、¹³C-NMR 法によるリグニンモデル化合物酵素分解機構の解析、第 66 回日本木材学会大会、2016 年 3 月 27-29 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

米田夕子、中村亮太、平井理恵子、河合真吾、西田友昭、¹³C 同位体標識リグニンをを用いた酵素分解の反応速度論的解析-¹³C 同位体標識リグニンモデル化合物の化学合成-、2015 年度日本木材学会中部支部大会、2015 年 10 月 30-31 日、飛騨地域地場産業振興センター(岐阜県・高山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 夕子 (YONEDA, Yuko)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：90638595