

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07468

研究課題名(和文) リグニンは落葉の生分解を強く規定するか？

研究課題名(英文) Is biodegradation of leaf-litter strongly regulated by the occurrence of lignin?

研究代表者

幸田 圭一 (Koda, Keiichi)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：80322840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の葉に対する新規のリグニン定量法を提案した。木材ならびに葉の試料を対象として、定法(クラソン法、アセチルブロミド法)との比較により、この方法の定量性を検証した。その結果、針葉樹、広葉樹ともに、当該手法が有効であり、葉のリグニン量は従来考えられていた値よりかなり小さいことが確認できた。その上で、この新規定量法を野外実験に適用した結果から、ミズナラ落葉の分解挙動とリグニンの分解挙動との間に大きな差はなく、リグニンが必ずしも生分解の律速因子であるとは言えないこと、また、他の環境因子(外部から落葉への窒素流入など)にも影響されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で提案したリグニン定量法は、リグニンに特徴的な基本構造に着目した定量法であり、妨害物質の影響により従来の方法ではリグニンの定量が困難な試料、特に樹木の葉のみならず、草本類などの非木材試料に対しても適用できる可能性が高いと考えられ、今後の検証が必要である。また、その上で、高等植物ばかりでなく、維管束組織の発達が未熟な段階にある植物体に対して適用した場合、リグニンの存在が植物体に対して果たしている役割の進化論的な意義づけにも、有用な手法になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A novel method applicable to determination of lignin content of tree leaves was developed and proposed. The validity and reliability of this method was confirmed by the comparison with the conventional methods such as Klason and acetyl bromide methods, using wood and leaf samples. It was shown that this method was applicable to leaf samples from conifer and broad-leaved trees, and that lignin contents of leaf samples were found much lower than those obtained by the conventional methods. This method was further applied to field experiments, using leaf litter. Lignin itself was not necessarily the most important rate-limiting factor affecting biodegradation of oak leaf litter, because it was found that oak leaf litter was decomposed in accordance with its lignin at a similar rate. Our results also showed that other environmental factors such as nitrogen influx could affect the degradation of leaf litter.

研究分野：森林圏科学/木質科学/木材化学

キーワード：lignin leaf litter biodegradation microorganisms nitrobenzene oxidation methoxy group

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リグニンは樹木をはじめとする維管束植物を強く特徴づける細胞壁構成成分である。落葉・落枝等の植物遺骸(リター)に含まれるリグニンは、セルロースのような多糖類成分と比べて分解速度が遅く、酸化分解や低分子化などの構造変化を受けながら、他方では土壤中の他の有機物と縮合するなど複雑な反応を経て長期にわたって土壤中に堆積し、条件が許せば徐々に分解されて最終的には炭酸ガスへと無機化される。そのため土壤中の有機炭素の動態、ひいては地球上の炭素循環において、極めて重要な役割を果たしていると考えられており、森林土壌においても、リターの生分解挙動を規定する重要な律速因子であると一般には認識されている(文献1)。

申請者はこれまでに研究協力者と共に、リター重量の過半を占める落葉を対象を絞って共同研究を行ってきた。すなわち、ミズナラの新鮮落葉をリターバックに詰めて積雪期直前の試験林内に埋設し、一定期間ごとにサンプリングを行ない、特に北海道の冬期積雪下においても生分解過程が進行することを、分解に関与する菌類群集の遺伝子解析や、分解過程にある落葉の全体重量とリグニン含有率の変化を指標として行ってきた(文献2)。その結果、対照となる夏期ではもちろん、冬期積雪下の土壤凍結が起こらない条件においても着実に落葉分解が進行すること、ならびに夏期の落葉分解には主として担子菌類が深く関与するのに対し、冬期積雪下では主として子囊菌類が深く関与することが示唆された(文献3)。他方、申請者はこの生分解過程の追跡において前提となるリグニンの定量法についても慎重を行い、その過程で、森林生態学分野の先行研究で多用されてきた従来のリグニン定量法の限界を示し、リグニンの化学構造に基づいた改良法を開発、提案するに至った。次にその概要を示す。

木材化学の分野では脱脂した木材試料を対象としたリグニン定量法として、古くからクラークソン法やアセチルプロミド法といった手法が確立されている。クラークソン法は、常温での72%硫酸処理により試料中の多糖類を十分に膨潤させ、希釈後に加熱条件下で行われる酸加水分解を経て多糖類を可溶化してから濾別し、その残渣重量を測定することで、リグニンを硫酸不溶残渣として定量する方法である。他方、アセチルプロミド法は試料をアセチルプロミドで処理し、280nm付近に芳香核構造に由来する紫外吸収を持つリグニンとその波長領域に紫外吸収を持たない多糖類の両者を誘導体化して有機溶媒に可溶化させ、別途求めた吸光度とリグニン量との関係式から、分光学的にリグニンの定量を行うものである。

温帯産樹木を対象とする場合、脱脂した木材試料には通常、リグニンと多糖類の他には夾雑成分がごく微量しか含まれないため、いずれの方法でも特殊な補正操作を行うことなく、リグニンを定量できるとされる。ただし、定量妨害物質となりうる成分、例えばポリフェノールやタンパク、クチン質といった、木材に含まれない成分を著量含む樹木の葉や草本類を対象とする場合には、クラークソン法やアセチルプロミド法の直接適用には問題があると指摘する研究者も多い(文献4,5)。しかしながら森林生態学の分野では、こうしたリグニン定量の本質的な方法論に関して慎重に論じられ、適切な方法が選択されている研究例はほとんどなかった。

申請者はこの弱点を克服するため、リグニンの化学構造に基づき、より妥当なリグニン定量法を模索し、提案した(文献6)。すなわち、メトキシ基の定量法とニトロベンゼン酸化法を組み合わせた方法である。リグニンの芳香核構造中にはメトキシ基が特徴的に見られ、ヨウ化水素酸で処理することでこれをヨウ化メチルの形で定量できる。また、ニトロベンゼン酸化処理により、芳香核一つあたりのメトキシ基数が異なる、リグニン構造単位の種類(H核、G核、S核)の存在比が計算できる。これらの情報を組み合わせると、サンプル中のリグニン量を計算することができる。この改良法をミズナラの緑葉に適用し、従来法と比較した。その結果、脱脂等の前抽出処理に使用した溶媒の種類に関わらず、この方法が非常に再現性のいいリグニン定量値を与えることがわかった。次に、この方法をミズナラ落葉の生分解過程の追跡に適用したところ、ミズナラ落葉のリグニンの減少挙動を、従来法であるクラークソン法よりも明確に示すことに成功するとともに、落葉全体の重量減少傾向との比較から、リグニンが必ずしも難分解性物質とは言えないことが示唆された。

以上の背景を踏まえ、本研究ではこれまでに学会発表等の機会に指摘された疑問点や論点を整理し、以下の3つの小課題の解明を目指す。すなわち、〔1〕ミズナラ以外の樹種の落葉分解過程の追跡に対する本改良法の有効性の証明。リグニンの化学構造的特徴に基づき、従来よりも論拠のしっかりとした定量法を提案できたが、幅広い樹種の葉に対して本定量法が有効であるか否かはなお検証が必要である。〔2〕チオグリコール酸法との比較検討による本改良法の評価。チオグリコール酸法はリグニンの単離法としてだけでなく近年では迅速な多検体定量法(文献7)として、タンパクやポリフェノールを含んだバイオマス試料にも適用可能とされているが、なお、タンパクの一部をカウントしてしまう可能性や、生分解過程にある試料に対する適用に疑問符が付けられている。〔3〕樹木の葉におけるリグニン構造の解明。木材のリグニンと葉のリグニンはそもそも同質のものであるか否か、という疑問に答え「葉のリグニンとは何か?」という根本的な定義づけに迫る。こうしたリグニン定量法の基本問題を解決した上で、リグニンが難分解性物質であり、リグニンの存在が樹種を問わず真に落葉の生分解挙動を規定するのかという長年疑問が持たれなかった点に明確な解答を与えることを最終目的とする。

[文献]

1. Berg, B. & McClagherty C., 2004. Chapter 5 In: Plant Litter. Decomposition, humus formation, carbon sequestration. Springer-Verlag, Berlin, pp. 79-106.

2. 宮本敏澄 (研究代表者): 日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究 (C)(H25 ~ H27、課題番号 21570013)
3. 宮本敏澄、幸田圭一 2010. 日本菌学会第 54 回大会講演要旨集, 東京, 104.
4. 川上日出國ら 1987. 名古屋大学演習林研究報告 9, 44-50.
5. Jin, Z. *et al.*, 2003. *Phytochem.* 64, 1023-1031.
6. 幸田圭一ら, 2014. 第 59 回リグニン討論会講演要旨集, 福井, 10-13.
7. Suzuki, S. *et al.* 2009. *Plant Biotechnol.* 26, 337-340.

2. 研究の目的

落葉などのリター (植物遺骸) の生分解過程において、主成分の一つであるリグニンの分解は他の成分の分解と比べて緩慢であり、落葉全体の生分解挙動を規定する律速因子であるとされている。しかし、その根拠となるリグニンの定量法、特に代表的で汎用されるクラソン法やアセチルプロミド法については、妨害物質の存在により定量値が過大になるなど、以前から多くの問題点が指摘されている。この弱点はリグニンに関する議論の根幹にかかわる問題点であり、将来的にも、リグニン由来の土壌有機物の炭素動態を把握する上で大きな障害となるため、森林生態学の分野でも再検討を要する課題だと申請者らは考えた。本研究では、リグニンの化学構造的特徴に基づき、従来法よりも論拠の明確な定量法を提案してその有効範囲を明らかにし、非木材である、樹木の葉のリグニンについて明確な定義づけを与えるとともに、リグニンの存在が真に落葉の生分解挙動を規定すると言えるのかという点を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

これまでに申請者らが確立したリグニン定量法 (改良法) を、収集が北海道でも比較的容易な、ミズナラ以外の樹木の葉に対して直接適用し、同時に同じ個体から採取した木部組織に対し適用した結果と比較することで、この定量法の妥当性や適用範囲を検証した。

北海道大学雨竜研究林、ならびに苫小牧研究林、といったこれまでにサンプリング経験がある試験林を設定し、北海道を代表する針葉樹としてカラマツやトドマツの緑葉、落葉広葉樹としてシラカンバの緑葉をサンプリングした。また木材中のリグニンを対照とするため、上記の樹種の木部組織も入手した。

これらの葉のサンプルに対し、脱脂などを目的とした前抽出を行ない、前抽出処理や樹種が、申請者らが開発した改良リグニン定量法 (以下、改良法) によるリグニン定量値に与える影響について検証した。また、脱脂した木部試料に対し、改良法によるリグニン定量値を従来法 (クラソン法、アセチルプロミド法) による定量値と比較することで、この改良法の妥当性について検証した。さらに脱脂した木部試料と脱脂した葉の試料の比較により、葉に含まれるリグニン含有率が木部よりも明確に低いかが検証した。以上から、我々が開発した改良法が幅広い樹種の葉について適用可能であることの検証を試みた。

幾つか選定した樹種 (ミズナラ、トドマツ等) の落葉について、野外実験において、様々な環境下 (立地条件や高窒素供給条件) でのリター分解挙動を検証し、落葉全体の生分解挙動とリグニン含有量の変化を追跡することで生分解挙動に与えるリグニンの影響について考察した。

4. 研究成果

樹木の葉に対する新規のリグニン定量法を提案した。木材ならびに葉の試料を対象として、定法 (クラソン法、アセチルプロミド法) との比較により、この方法の定量性を検証した。その結果、広葉樹の葉ばかりでなく、針葉樹の葉に対しても当該手法が有効であり、一般に葉のリグニン量は従来の定量法で報告されてきた値よりもかなり小さいこと (これまでに測定した樹種では針葉樹・広葉樹とも、葉の重量のせいぜい 10% 程度であること) が確認できた。その上で、この新規定量法を野外実験に適用した結果から、落葉の分解挙動とリグニンの分解挙動との間に大きな差があるとは言えず、リグニンが必ずしも生分解の律速因子であるとは言えないこと、また、他の環境因子 (外部から落葉への窒素流入など) にも影響されることが示唆された。

本研究で提案したリグニン定量法は、リグニンに特徴的な基本構造に着目した定量法であり、妨害物質の影響により従来の方法ではリグニンの定量が困難な試料、特に樹木の葉のみならず、草本類などの非木材試料に対しても適用できる可能性が高いと考えられ、今後の検証が待たれる。また、その上で、リターの生分解挙動の追跡のみならず、他方面への研究展開も期待できる。すなわち、高等植物ばかりでなく、維管束組織の発達が未熟な段階にある植物体に対して適用すれば、植物体に対するリグニンの存在意義、あるいはその進化論的な意味づけを考える際にも、有用な手法になる可能性がある。

なお、緑葉を対象とした、改良法による定量性の検証に時間がかかり、初年度のサンプリング計画がうまくいかなかったことも影響して、当初計画していた範囲にまで研究を進めるには至らなかった。すなわち、葉からのリグニンの単離や単離リグニンの物性分析、葉試料に対す

る改良法とチオグリコール酸法との比較検討、ならびにラボレベルで制御された環境下における落葉の生分解試験と低分子分解生成物の追跡については未達成であり、今後の継続課題として引き続き検討を続ける。

逆に、当初計画には含まれていなかったものの、提案した改良法の検証過程で派生した研究課題として、ミズナラの緑葉試料に関し、葉脈組織と葉肉組織でのリグニン含有率や単位構造の種類を検証した。その結果、両者に明確な差異が認められ、高等植物の維管束系通導組織におけるリグニンの存在形態の重要性が改めて示唆され、木部組織における既往の知見と比較しても、興味深い結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Toshizumi Miyamoto, Keiichi Koda, Arata Kawaguchi, Yasumitsu Uraki: Ligninolytic activity at 0 °C of fungi on oak leaves under snow cover in a mixed forest in Japan. *Microbial Ecology*: 74(2), 322-331 (2017); DOI: 10.1007/s00248-017-0952-8 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

小出祥平、宮本敏澄、長坂晶子、長坂 有、幸田圭一、玉井 裕、重富顕吾、速水将人：林相の異なる小流域における陸域から水域にかけての落葉分解特性. 第 130 回日本森林学会大会、P1-152、新潟 (2019)

小出祥平、宮本敏澄、長坂晶子、長坂 有、速水将人、幸田圭一、玉井 裕：集水域のトドマツ人工林と天然林の落葉分解. 第 66 回北方森林学会大会、P-31、札幌 (2017)

Keiichi Koda, Arata Kawaguchi, Toshizumi Miyamoto, Yasumitsu Uraki: Measurement of leaf lignin of a Japanese oak tree (*Quercus crispula*) by a combination of methoxy determination with alkaline nitrobenzene oxidation and its application. Proc. 19th International Symposium on Wood, Fiber and Pulping Chemistry 461-466, Aug. 30-Sep. 1, 2017, Porto Seguro, Brazil (Poster Presentation)

福井喬史、宮本敏澄、長坂 有、長坂晶子、幸田圭一、玉井 裕、矢島 崇：遡上したサケがもたらす窒素の落葉層への滞留、第 126 回日本森林学会大会・大会学術講演集 144(P1B129)、札幌 (2015)

〔図書〕(計0件)

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮本敏澄

ローマ字氏名：Toshizumi Miyamoto

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。