

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006 - 2008
 課題番号：18208016
 研究課題名（和文） 安定同位体トレーサー法によるリグニン生合成代謝中間物質の細胞内分子マッピング
 研究課題名（英文） Direct molecular mapping of the intermediates in lignin biosynthesis by stable isotope tracer method
 研究代表者
 福島 和彦（FUKUSHIMA KAZUHIKO）
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
 研究者番号：80222256

研究成果の概要：

リグニン形成の制御機構を前駆物質の貯蔵と輸送という動的な観点から捉え、モノリグノールの貯蔵と供給機構に着目し、細胞レベルで解明することを目的とした。安定同位体トレーサー法によるリグニン生合成中間物質の選択的な標識と飛行時間型二次イオン顕微質量分析（ToF-SIMS）による分子マッピングを組み合わせ、分子レベルの情報と組織レベルの情報を同時に入手することができるのが本研究の特徴である。

まず、細胞レベルでの細胞壁成分の顕微レベルでの分子マッピングを可能にするための技術開発を行った。樹木木部細胞壁におけるシリングル、グアイアシルリグニンのマッピング手法を確立するため、カエデを用いて、飛行時間型二次イオン質量分析を行った。その結果、シリングルリグニンとグアイアシルリグニンの細胞壁中での分布を正確に可視化する手法を開発した。化学分解法や組織化学的手法とデータを比較検討することにより、本法の妥当性を証明するとともに、顕微領域における定量分析も可能とした。心材成分の樹幹内での分布も細胞レベルで可視化することに成功した。このことは、リグニン生合成中間体である低分子フェノール性化合物の選択的なマッピングにも適用できることを示した。

次に、リグニン生合成代謝中間物質の細胞内分布を明らかにするため、モノリグノールグルコシドの ToF-SIMS を用いた解析法を確立した。LC-MS と ToF-SIMS 分析を組み合わせることにより、配糖体の定性・定量分析を行った。また、特定の位置を ^{13}C で標識した前駆物質（コニフェリン）を合成し、イチョウ切り枝に投与した。一定期間代謝させた後、新生木部を採取し、標識前駆物質からリグニンへの取り込みを解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2007年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	34,000,000	10,200,000	44,200,000

研究分野：生物系・農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：樹木、細胞壁、リグニン、同位体、質量分析

1. 研究開始当初の背景

従来の研究では、生合成に直接関与する酵素にのみ焦点が絞られていたが、輸送と供給機構に着目した研究はほとんどない。リグニンは細胞壁の20から30%を占めており、その前駆物質の輸送機構は、形態形成において大きな役割を担っている。本研究では、リグニン前駆物質の大量かつ迅速な細胞内（あるいは細胞間）輸送を、ToF-SIMS法による生体分子の新可視化技術を駆使してダイナミックに捕らえることが特色である。細胞内で生産されたリグニン前駆物質が、どこを通過して細胞壁に供給されるのか、従来の方法では解析困難であったが、本法を用いることにより、その分布の可視化が達成できるものと期待される。

木質化細胞壁は、主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンより構成されていることが知られているが、それらが細胞壁においてどのようなプロセスで組み立てられるのか、あるいはどのような3次元構造を有しているのかは完全にはわかっていない。リグニンの沈着、すなわち、高分子化のプロセスは、安定同位体で標識したリグニン前駆物質の挙動を可視化することにより達成できる。これにより、細胞壁超微細構造が推定でき、軽くて強い木質の本質に迫ることができる。

2. 研究の目的

樹木木部を構成する細胞は、すべて形成層より派生したものであるが、機能発現のために、幾多の種類に分化する。さらに、それぞれの細胞は、伸長、拡大、2次壁の肥厚といった高度に制御された細胞壁分化過程を経て細胞壁を完成させる。この、木部細胞の形成は、連続して行われ、木部形態形成や年輪構造の形成に直接的に関わっている。樹木木部細胞の特徴は、リグニンを多く含むことにある。そして、その構造は、細胞の種類や同一細胞であっても壁層部位により異なる。リグニンの生合成に関する研究は、最近非常に活発で、モノリグノール生成に関わるいろいろな経路が提唱されているが、実際の植物体においてどの経路が真に発現しているのか類推の域を脱していない。木部細胞は多様で、また、細胞壁分化過程も時空間的に制御されていることから、細胞レベルでの木質化の分子機構は明らかになっていない。

本研究では、リグニン形成の制御機構を前駆物質の貯蔵と輸送という動的な観点から捉え、細胞レベルで明らかにすることを目標とする。とくに、モノリグノールの貯蔵と供給機構に着目し、物質輸送機構について解明

した。また、木材の性質に大きく影響を与える心材成分（二次代謝産物）についても、その分布を可視化することを目的とした。

本研究では、安定同位体トレーサー法によるリグニン生合成中間物質の選択的な標識と飛行時間型二次イオン顕微質量分析（ToF-SIMS）による分子マッピングを組み合わせ、分子レベルの情報と組織レベルの情報を同時に入手しようとするものである。本研究の完了により、時空間的に制御された木質細胞壁の生成機構が明らかとなる。

3. 研究の方法

(1) 安定同位体標識リグニン前駆物質の合成

質量分析において、代謝中間物質の特定を行うためには、安定同位体で特定の位置を標識した前駆物質を合成し、フィーディング実験に供することが必要である。コニフェリルアルコール、コニフェリルアルデヒド、それらの配糖体を重水素や ^{13}C で標識した。

(2) 安定同位体トレーサー法によるリグニン生合成の動的解析

現在提唱されている様々なリグニン生合成経路は、植物より抽出した酵素を試験管内で反応させた結果に基づいたものが多く、実際のリグニン生合成の場において関与しているかどうかは完全にはわかっていない。さらに、同じ、植物にあっても、細胞の種類や年齢によりリグニン生合成経路が変化することも指摘されており、信頼性の高い実験系で、これまでに提唱された仮説の全てを検証することが求められている。本研究では、安定同位体で標識した様々なリグニン前駆物質を樹木切枝に投与し、その挙動を分子レベルで追跡することにより検証した。現在、特に、広葉樹リグニンのシリングル、グアイアシル単位の組成比の制御が生合成経路のどの段階で行なわれているのかが大問題となっているので、この部分に焦点をあてて解析していく。モノリグノール生合成中間体であるケイヒ酸、それに対応するCoA、アルデヒド、アルコール、さらにそれらのグルコシドを重水素や ^{13}C などの安定同位元素で標識し、数種の広葉樹新生木部に投与し、その挙動、すなわちどのような化学構造にとりこまれたのかを分子レベルで追跡した。

(3) リグニン生合成代謝中間物質の高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) による解析

本研究では、シンナミルアルコールおよびシンナムアルデヒド配糖体を分析する必要がある。配糖体は一般に不揮発性であり、ガスクロマトグラフィーによる分析には適さない。本研究では、高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) を用いて、配糖体前駆物質の挙動を詳細に追跡した。微量成分であっても、標品とのマスフラグメント比較により物質の同定が容易にできること、誘導体に変換しなくても分析が可能であることから、定量における精度が格段に向上する。LC-MS を用いたリグニン代謝中間物質である配糖体の分析系を確立する。また、時空間的に制御されているリグニン合成において $\delta^{13}\text{C}$ 測定を行うことにより、代謝の流れの指標を探索した。

(4) 細胞壁成分の分布の可視化

飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) を樹木細胞壁の構造解析に応用し、細胞壁構成成分を非破壊的に細胞レベルで分析した。対象とした化合物は、リグニン、セルロース、ヘミセルロース、抽出成分 (ヒノキニン、ヒノキレジノールなど)、無機元素である。

4. 研究成果

(1) ToF-SIMS による樹木細胞壁リグニン分子のケミカルマッピング

これまでに、紫外線顕微分光法やモイレ反応といった組織染色法などによって、G と S リグニンからなる広葉樹組織では、支持組織である木繊維は S リグニンに富むが、通水組織である道管は G リグニンに富むことが示唆されていた。しかしこれらの方法では、入手できる化学構造には限界があった。今回、ToF-SIMS による G と S リグニンの分子マッピングによってリグニン分布を可視化した結果、カエデ木部組織において、木繊維は S リグニンに富むのに対し、道管は G リグニンに富む構造をとることが明らかとなった (図 1)。とりわけ、道管と道管の間に存在する穿孔板部分において、G リグニンが豊富であることが顕著であった。

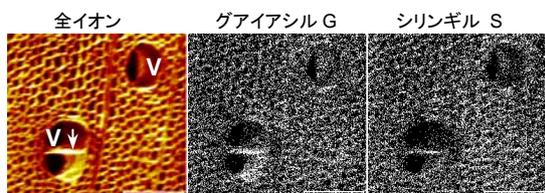


図 1. 広葉樹カエデにおける G (グアイアシル、 m/z 137) と S (シリングル、 m/z 167) のマッピング。V は道管を示し、矢印は道管と道管の間の穿孔板を示す。

これにより、顕微による組織的な情報も持ち併せた ToF-SIMS 分子マッピングを用いることは、特定組織のリグニンの特徴的分布解明に適していることが示された。

(2) コニフェリンの炭素安定同位体比に関する研究

名古屋大学演習林内にて伐採したスギ (*Cryptomeria japonica*) から樹液および新生木部を採取した。樹液からはコニフェリンを単離し、新生木部からは Klason リグニンおよび α -セルロースを調製した。これらの炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$ 値) を測定したところ、コニフェリンは $-25 \sim -28 \text{ ‰}$ 、Klason リグニンは $-26 \sim -29 \text{ ‰}$ 、 α -セルロースは $-24 \sim -26 \text{ ‰}$ の値をとっていることがわかり、コニフェリンの $\delta^{13}\text{C}$ 値が予想していたよりも低いことが明らかになった。また個体により $\delta^{13}\text{C}$ 値に大きな違いがあることも明らかになった。これらの結果は、炭素安定同位体比を測定することにより、代謝の流れを解析することが可能であることを示唆した。

(3) モノリグノールグルコシドの ToF-SIMS 測定

モノリグノール、グルコースおよびモノリグノールグルコシド (*p*-coumaryl alcohol 4-O- β -D-glucoside, coniferin, syringin) を ToF-SIMS を用いて分析し、それらのマススペクトルを得た。モノリグノールの分析において、C6-C1 ベンジルイオンおよび C6-C1 ベンゾイルイオン、C6-C2 イオンに加えて、 $[\text{M} - \text{OH}]^+$ および $[\text{M} - \text{H} + \text{Na}]^+$ などのイオンが観察された。グルコースはナトリウムが付加した形でイオン化した。モノリグノールグルコシドの分析では、モノリグノールのスペクトルにおいて見られた二次イオンに加え、 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 、 m/z 284 および 312 イオンが観察された。モノリグノールグルコシドのフラグメンテーションを調べるため、安定同位体でラベルしたコニフェリンを ToF-SIMS で分析した。これらの結果は、ToF-SIMS は配糖体の分析において有力な方法であることを示唆した。

(4) 二次代謝成分の分布

ヒノキ心材形成過程において、心材抽出成分であるヒノキニン、ヒノキレジノール由来の二次イオン (m/z 353, 261) の同定、マッピングに成功し、心材成分の生合成をダイナミックかつ細胞レベルで追跡することに成功した。ヒノキ心材切片の ToF-SIMS イメージにおいて、ヒノキニンは、移行材の放射柔細胞内に特異的に分布することが示された

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 13 件)

- ① 齋藤香織, 光谷拓実, 福島和彦, 法隆寺の古材はいつ伐採されたか—TOF-SIMS の古材伐採年推定への適用—, 表面科学, **29**(12), 777-781, 査読有り, (2008)
- ② 齋藤香織, 福島和彦, TOF-SIMS の植物細胞壁化学への応用, 植物化学調節学会誌「植物の生長調節」, **43**(2), 156-163, 査読無し, (2008)
- ③ Kaori Saito, Takumi Mitsutani, Takanori Imai, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Fukushima, Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discoloured ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using ToF-SIMS, *Analytical Chemistry*, **80**, 1552-1557, 査読有り, (2008)
- ④ Kaori Saito, Takumi Mitsutani, Takanori Imai, Yasuyuki Matsushita, Akira Yamamoto, and Kazuhiko Fukushima, Chemical differences between sapwood and heartwood of *Chamaecyparis obtusa* detected by ToF-SIMS, *Applied Surface Science*, **255**, 1088-1091, 査読有り, (2008)
- ⑤ Katsushi Kuroda, Takanori Imai, Kaori Saito, Toshiyuki Kato, and Kazuhiko Fukushima, Application of ToF-SIMS to the study on heartwood formation in *Cryptomeria japonica* tree, *Applied Surface Science*, **255**, 1143-1147, 査読有り, (2008)
- ⑥ Yasuyuki Matsushita, Ayumi Suzuki, Takuya Sekiguchi, Kaori Saito, Takanori Imai, and Kazuhiko Fukushima, Mapping of the cationic starch adsorbed on pulp fibers by ToF-SIMS, *Applied Surface Science*, **255**, 1022-1024, 査読有り, (2008)
- ⑦ Kenichi Kato, Kazunaka Endo, Daisuke Matsumoto, Tomonori Ida, Kaori Saito, Kazuhiko Fukushima, and Nobuhiko Kato, Simulation of SIMS for monomer and dimer of lignin under the assumption of thermal decomposition using QMD method, *Applied Surface Science*, **255**, 1040-1043, 査読有り, (2008)
- ⑧ Kazunaka Endo, Daisuke Matsumoto, Kenichi Kato, Yusuke Takagi, Tomonori Ida, Motohiro Mizuno, Kaori Saito, Kazuhiko Fukushima, and

Nobuhiko Kato, Fragment distribution of thermal decomposition for lignin monomer by QMD calculations using the excited and charged model molecules, *Applied Surface Science*, **255**, 1048-1051, 査読有り, (2008)

- ⑨ 福島和彦, 齋藤香織, ToF-SIMS (飛行時間型二次イオン質量分析) による木材化学研究, 木材学会誌, **53**(6), 291-297, 査読有り, (2007)
- ⑩ Kaori Saito, Noritsugu Terashima, Takanori Imai, Yasuyuki Matsushita and Kazuhiko Fukushima, TOF-SIMS imaging of lignin after the removal of polysaccharides by periodate oxidation followed by hydrolysis in xylem of *Pinus thunbergii*, *Cellulose Chemistry and Technology*, 583-589, 査読有り, (2008)
- ⑪ Yasuyuki Matsushita, Takuya Sekiguchi, Kaori Saito, Takanori Imai and Kazuhiko Fukushima, The characteristic fragment ions and visualization of cationic starches on pulp fiber using ToF-SIMS. *Surface and Interface Analysis*, **39**(6), 501-505, 査読有り, (2007)
- ⑫ Kaori Saito, Toshiyuki Kato, Hitomi Takamori, Takao Kishimoto, Akira Yamamoto and Kazuhiko Fukushima, A new analysis of the depolymerized fragments of lignin polymer in the plant cell walls using ToF-SIMS, *Applied Surface Science*, **252**, 6734-6737 (2006), 査読有り
- ⑬ Rikiya Nakamura, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Umemoto, Arimitsu Usuki, Kazuhiko Fukushima, Enzymatic Polymerization of Coniferyl alcohol in the Presence of Cyclodextrins. *Biomacromolecules*, **7**(6), 1929-1934 (2006), 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

- ① 齋藤香織、吉田正人、今井貴規、松下泰幸、福島和彦、TOF-SIMS によるヒノキ心材抽出成分の分子マッピング、第 59 回日本木材学会大会、松本大学 (松本)、3 月 15 日、2009
- ② 齋藤香織、渡邊陽子、岸本崇生、家田真理子、勝山さやか、松下泰幸、今井貴規、船田良、小池孝良、深澤和三、福島和彦、TOF-SIMS による TOF-SIMS によるリグニン S/G 比顕微分析法の開発、第 53 回リグニン討論会、東京大学 (東京)、10 月 31 日、2008

- ③ K. Saito, T. Mitsutani, T. Imai, Y. Matsushita, K. Fukushima, Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discoloured ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using TOF-SIMS, IAWPS2008(International Symposium on Wood Science and Technology), September, 27-29, Harbin, China, **2008**
- ④ K. Saito, T. Imai, Y. Matsushita, K. Fukushima, Direct molecular imaging of heartwood compounds in Hinoki cypress using TOF-SIMS, ICP2008 (XXIVth International Conference on Polyphenols), Salamanca, Spain, July 8-11, **2008**
- ⑤ K. Fukushima and K. Saito, The chemical analysis of plant cell wall using ToF-SIMS, *8th International Symposium on Biomimetic Materials*, Nagoya, Japan, January 21-24, **2008**
- ⑥ K. Saito, T. Imai, Y. Matsushita, T. Mitsutani, and K. Fukushima, Visualization of heartwood extractives using ToF-SIMS, *14th International Symposium on Wood, Fiber and Pulp Chemistry*, Durban, South Africa, June 25-28, **2007**
- ⑦ 齋藤香織、渡邊陽子、勝山さやか、松下泰幸、今井貴規、船田良、小池孝良、深澤和三、福島和彦、ToF-SIMS による広葉樹木部におけるリグニン分布の解析、第 52 回リグニン討論会、宇都宮大学(宇都宮)、11 月 14 日、**2007**
- ⑧ 齋藤香織、今井貴規、松下泰幸、福島和彦、ToF-SIMS によるヒノキ心材抽出成分のケミカルマッピング、第 57 回日本木材学会大会、安田女子大学(広島)、8 月 8 日、**2007**
- ⑨ 齋藤香織、光谷拓実、松下泰幸、今井貴規、福島和彦、ヒノキ古材における ToF-SIMS を用いた辺材と心材の識別、第 74 回紙パルプ研究発表会、船堀(東京)、6 月 12 日、**2007**
- ⑩ 波濤千尋、松下泰幸、今井貴規、福島和彦、コニフェリンの炭素安定同位体比に関する研究、広島 2007 年 8 月 8 日
- ⑪ 齋藤香織、今井貴規、松下泰幸、福島和彦、光谷拓実、ToF-SIMS によるヒノキ心材と辺材の識別およびその古材への適用、秋田 2006 年 8 月 9 日
- ⑫ 波濤千尋、齋藤香織、辻幸子、松下泰幸、今井貴規、福島和彦 ToF-SIMS 法によるモノリグノールグルコシドの分析 秋田 2006 年 8 月 9 日

[その他]

・新聞掲載:福島和彦・齋藤香織ら、ToF-SIMS を用いて、古代の木造建築に使われた建材の伐採年代を測定する技術を開発、2008 年 3 月 15 日掲載、読売新聞、中日新聞、毎日新聞各朝刊(論文(1) *Analytical Chemistry*, **80**, 1552(2008)の発表に伴う。)

・研究室ホームページ：
<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~lignin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 和彦 (FUKUSHIMA KAZUHIKO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：80222256

(2) 研究分担者

今井 貴規 (IMAI TAKANORI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：20252281
松下 泰幸 (MATSUSHITA YASUYUKI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：60335015