

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14767

研究課題名(和文)還元処理を利用したリグニンの化学構造解析

研究課題名(英文)Chemical structure analysis of lignin using reductive treatment

研究代表者

秋山 拓也(Akiyama, Takuya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：50553723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：針葉樹あて材と対向部のリグニンについて化学構造の微細な違いを検出することを目的に、新規の分析手法の開発を試みた。側鎖位をメチレン基へ還元し、不斉炭素を半減させて立体異性を起因とする構造の複雑さを解消する手法の開発を試みた。モデル化合物を用いた実験で本手法の有効性が示されたものの、リグニンの新規分析法の確立には至らなかった。このため、分析法を既存のニトロベンゼン酸化法へと変更して実験スキームを再検討した結果、分析の適用範囲が広がり非縮合型構造だけでなく縮合型構造が分析可能となり、本手法を用いてあて材リグニンの縮合型構造の頻度に関する新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木質材料の特性や木質化現象を理解するために、ニトロベンゼン酸化法はリグニンの基本構造や化学的特徴を調べる手法として広く用いられ、その再現性の高さから最も信頼性の高い分析手法の一つとみなされている。通常、非縮合型構造の含有量や芳香核型(H、G、S核型)の構成比など基本構造の比較に利用されるが、これに加えて縮合型構造に関する情報を引き出すことが可能であると1950年代から指摘されてきた。本研究成果により縮合型分解生成物の定量的評価が可能となり、非縮合型/5型/ビフェニル型の構成比に関して、リグニン試料間における微細な違いをニトロベンゼン酸化法で比較することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a new chemical analytical method of lignin to detect microstructural differences between compression wood of softwood and the opposite wood. It was investigated to convert the benzyl hydroxy group at the position to a methylene group, thereby reducing the number of asymmetric carbons by half and eliminating the structural complexity caused by stereoisomerism. Although the experiments using model compounds showed the effectiveness of this method, it did not lead to the establishment of a new analysis method for a lignin sample. Therefore, as a result of changing the analysis method to the existing nitrobenzene oxidation method and re-examining the experimental scheme, the scope of analysis was broadened, and it became possible to analyze not only non-condensed-type but also condensed-type structures. New findings were obtained regarding the frequency of condensed-type structures in compression wood lignins.

研究分野：木材化学

キーワード：リグニン 還元 木質細胞壁 圧縮あて材 縮合型構造 ビフェニル 5-ホルミルバニリン ダイバニ

1. 研究開始当初の背景

ある天然物の化学構造が判明するとその生合成機構や反応性が予測可能になると同様に、リグニンの構造にも高分子化機構の情報や、化学・生物変換利用法を設計するために必要な反応性に関する情報が含まれている。しかし、リグニンの化学構造は、モノマー骨格の種類（芳香核型）、結合型、および立体異性が多様で構造が複雑なため、試料間の微細な構造の差異を検出しづらい。植物種の違いや組換え体で生じるダイナミックなリグニン構造の変化を比較する場合と異なり、あて材と正常材等を比較する場合には構造変化が比較的小さいため分析の手段と対象構造が制限とされる。新たな分析手法を開発してリグニン構造に生じた微細な構造変化を検出可能となれば、木質化現象を深く理解するために有用な化学構造に関する情報が得られると期待される。

2. 研究の目的

針葉樹あて材と対向部のリグニン構造の詳細な違い調べることを目的に、新たな分析手段の開発を試みた。はじめに、還元処理により不斉炭素を半減させることで立体異性を起因とする構造の複雑さを解消する分析手法の開発を試みた。還元処理を NMR 測定の前処理に用いることで NMR スペクトルの単純化やピークの先鋭化を期待して定量性の向上をねらった。次に、既存のニトロベンゼン酸化法の分析スキームを再検討することで分析対象を広げ、縮合型構造の定量的な分析に応用できるかを検討した。

3. 研究の方法

(1)還元処理による α 位メチレン基構造への変換法の検討

β -O-4 型 2 量体モデル化合物として veratrylglycerol- β -guaiacyl ether (VG)、リグニン試料としてアカマツ辺材から調製した単離リグニン (milled wood lignin, MWL) をそれぞれシリルヒドリド還元処理した後、反応生成物の化学構造を NMR 法およびオゾン分解法で調べた。

(2)ニトロベンゼン酸化法の再検討

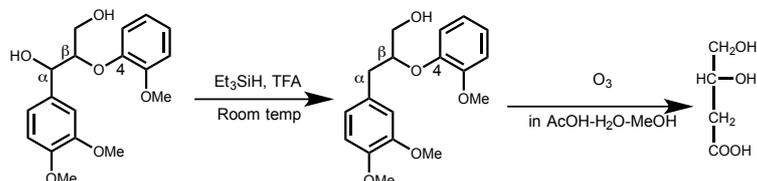
H 核および G 核型リグニンのニトロベンゼン酸化で想定される分解生成物を定量することを目的に、13 種の標品化合物を購入または合成により調製した。次に、スギ木粉をニトロベンゼン酸化法に供し、その分解生成物について標品を用いて GC-MS 分析で同定し、GC-FID 分析により分解生成物の定量を行った。また、ニトロベンゼン酸化反応の反応温度に対する分解生成物の収率へ影響を調べることで、反応条件の最適化を試みた。

(3)針葉樹あて材リグニンの構造解析

針葉樹あて材試料として、スギあて材の幹 (直径 13cm)、ヒマラヤスギの枝 (直径 8cm)、およびメルクシマツあて材の幹 (直径 30cm) から円盤試料を切り出した。円盤試料の圧縮あて部 (下側) を 0° 、対向部 (上側) を 180° として、髄を中心に 6 つに分割した後、同一年輪部分から木片を切り出した。6 区画の木片から木粉を調製した後、ソックスレー抽出 (エタノール-ベンゼン、1:2) で脱脂した。脱脂木粉を Klason 法によるリグニン定量、Klason 残渣のメトキシ定量、およびニトロベンゼン酸化法に供した。尚、あて材の特徴として偏心成長を確認し、また、スギとヒマラヤスギについては木口切片をフロログルシン・塩酸染色後に光学顕微鏡観察し、圧縮あての特徴として丸い形状の細胞壁と強い呈色反応を確認した。

4. 研究成果

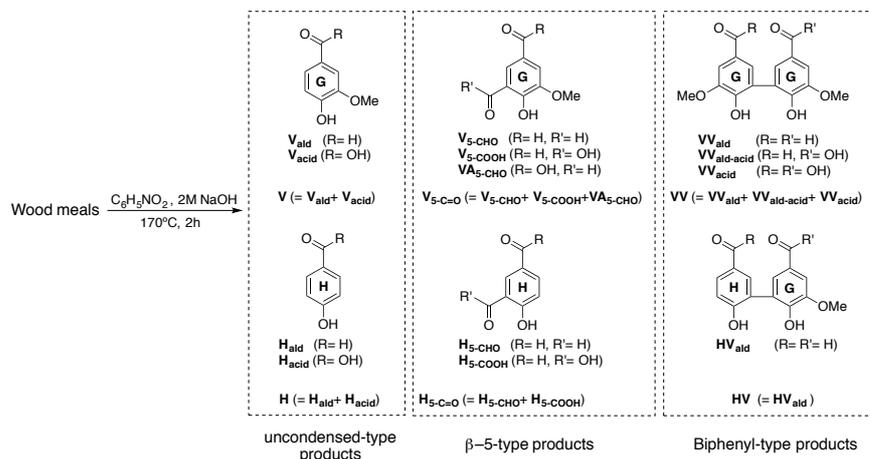
(1) 還元処理による α 位メチレン基構造への変換: β -O-4 型モデル化合物 VG のシリルヒドリド還元処理により、73% のモル収率で α 位不斉炭素 (ベンジル位炭素) がメチレン基へ還元されることを確認した。ここで得られた α 位メチレン型 VG のオゾン分解により、3,4-ジヒドロキシブタン酸が比較的高い収率 (79 モル%) で得られたことから、還元処理の定量的評価法としてオゾン分解法を使用できることを確認した。次に、アカマツ MWL について、シリルヒドリド還元処理を行った。このメチレン基の導入量をオゾン分解法で調べると、想定した 3,4-ジヒドロキシブタン酸は得られなかった。これに加えて、還元処理の前後で β -O-4 構造のオゾン分解生成物 (erythronic acid と threonic acid) の収量が同程度であることから、 α 位の還元反応がほぼ進まなかったと判断した。モデル化合物を用いた還元処理で本手法の有効性が示されたもののリグニン試料への適合条件が得られず、本研究課題の期間内に新規分析法を確立するには至らなかった。このため、本手法に代わる分析手段の開発が必要となった。



(2) ニトロベンゼン酸化法の再検討: スギあて材試料のニトロベンゼン酸化生成物として、下図に示した 13 種の分解生成物を、標品化合物との比較により GC-MS 分析で同定した。このう

ち、非縮合型生成物 (H, V) と H 核型 β -5 分解生成物 ($H_{5-C=O}$) の標品 6 種は市販品として購入可能であり、その他の縮合型生成物については、G 核型 β -5 分解生成物 ($V_{5-C=O}$) とビフェニル生成物 (VV, HV) の標品 7 種を合成した。

ニトロベンゼン酸化法の反応温度の影響を調べるため、スギあて材および対向部の 2 種類の木粉試料について、170, 190, 210°C×2 時間の 3 条件で反応をおこない分解生成物を調べた。非縮合型および縮合型生成物の両収率は、170 と 190°C の条件で高く大きな差はなく、210°C の条件で著しく低い値を示した。このため、ニトロベンゼン酸化法に通常用いられる反応温度の範囲にある 170°C、2 時間の反応条件を、縮合型生成物の分析に採用した。この反応条件を用いてスギ対向部の木粉から得られた分解生成物の収率 (芳香核あたりの収率) は、バニリン等の非縮合型分解生成物 (V+H) が 42%、さらにダイバニリンや 5-フォルミルバニリン等の縮合型構造由来の分解生成物 (11%) を合わせるとリグニン芳香核の 5 割に達した。



(3) 針葉樹あて材リグニンの構造解析

針葉樹リグニンの芳香核骨格は G 核と若干量の H 核で構成されるのに対し、圧縮あて材リグニンでは H 核の割合が高い。この H 核はメトキシ基を持たずリグニン生成時に芳香核 3 位と 5 位で結合可能なため、3 位がメトキシ基で置換された G 核に比べて、5-5 結合や β -5 結合などの縮合型構造を形成しやすいと予想できる。このため、H 核リッチなあて材リグニンでは、対向部に比べて縮合型構造の割合が高くなると想定していた。しかし予想に反して、今回調べた 3 樹種の試料について、縮合型生成物と非縮合型生成物の割合はあて部と対向部でほぼ同じであった。その結果の詳細を以下に示す。

本実験で使用した針葉樹 3 樹種の圧縮あて材試料について、あて部は対向部に比べて H/G 比が高いことが、メトキシ基の定量分析とニトロベンゼン酸化法で確かめられた。次に、縮合型構造を調べると、対向部に比べて、あて部は H 核型の β -5 分解生成物や HG 核型のビフェニル生成物の収率が高くなった。しかしこれらの増分は、それぞれ G 核型の β -5 分解生成物と GG 核型のビフェニル生成物の収率減少で相殺された。このため、H 核と G 核型分解生成物の合計で比べると、 β -5 分解生成物やビフェニル型生成物の収率はあて部と対向部であまり違いはなかった。

むしろ H 核の少ない対向部でこれら縮合型生成物の収率が、若干高い値を示したが、この原因として、いくつかの実験結果から、ニトロベンゼン酸化法による H 核の反応変換効率の低さが考えられた。その根拠として、一つには、H 核と G 核型の β -5 型 2 量体モデル化合物をニトロベンゼン酸化法に供すると反応変換効率は G 核 > H 核であること、また、もう一つには、上記の 3 樹種から得られた分解生成物は、非縮合型生成物の収率についても若干対向部で少なく、結果として、全ての分解生成物の合計収率が対向部 > あて部であったこと、が挙げられる。

そこで、全ての分解生成物に対する相対収率として比較すると、非縮合型 : β -5 型 : ビフェニル型の比 $\{(V+H) : (2HV + 2VV) : (V_{5-C=O} + H_{5-C=O})\}$ は、あてと対向部を含む円盤試料内で違いはほとんど見られず、スギで 78.9 (± 0.5): 13.6 (± 0.6): 7.4 (± 0.4)、ヒマラヤスギで 79.0 (± 0.4): 13.8 (± 0.3): 7.3 (± 0.6)、メルクシマツで 81.6 (± 0.6): 12.3 (± 0.5): 6.1 (± 0.3)となった。

これまでに、遺伝子組換えにより H 核リッチとなったリグニンの NMR 解析では、野生株に比べ縮合型構造に富むことが報告されている一方で、針葉樹あて材のチオアシドリシス分析では H/G 比の異なる未成熟材と成熟材で非縮合型と縮合型構造の量比に優位差は見られないとの報告もある。本研究で用いたあて材の分析結果は、後者の報告例の結果に近く、相対収率で比較すると縮合型と非縮合型構造の割合はあてと対向部でほとんど差がなく、絶対収率で比較しても縮合型構造の量は似ていた。このことから、リグニン生成時、H/G 比が変化しても、縮合型構造量に必ずしも影響があるとは限らない、ことが示唆された。

ニトロベンゼン酸化法は、通常、非縮合型構造の含有量や芳香核型 (H, G, S 核型) の構成比などリグニンの基本構造の比較に利用されるが、これに加えて縮合型構造に関する情報を引き出すことが可能であると 1950 年代から指摘されてきた。本研究成果により、非縮合型/ β -5 型/ビフェニル型の構成比に関して、リグニン試料間における微細な違いをニトロベンゼン酸化法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

で比較することが可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Haruka Hirayama, Takuya Akiyama, Satoshi Kimura, Deded S. Nawawi, Wasrin Syafii, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto. Influence of the *p*-hydroxyphenyl/guaiacyl ratio on the biphenyl and β -5 contents in compression wood lignins. *Holzforschung*, 査読有り (論文受理 2019年4月2日), DOI: 10.1515/hf-2019-0012
- ② Haruka Hirayama, Takuya Akiyama, Akari Tamai, Deded S. Nawawi, Wasrin Syafii, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto. Variation of the contents of biphenyl structures in lignins among wood species. *Holzforschung*, 査読有り (論文受理 2018年12月6日), DOI: 10.1515/hf-2018-0196
- ③ Xuhai Zhu, Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto. Lignin-biosynthetic study: Reactivity of quinone methides in the diastereopreferential formation of *p*-hydroxyphenyl- and guaiacyl-type β -O-4 structures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有り, 67 (8), 2139-2147, 2019, DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06465
- ④ Deded Sarip Nawawi, Takuya Akiyama, Wasrin Syafii, and Yuji Matsumoto. Characteristic of β -O-4 structures in different reaction wood lignins of *Eusideroxylon zwageri* T. et B. and four other woody species. *Holzforschung*, 査読有り, 71(1), 11-20, 2017, DOI: 10.1515/hf-2016-0100

〔学会発表〕(計10件)

- ① 平山晴加、秋山拓也、木村聡、Deded S. Nawawi、Wasrin Syafii、横山朝哉、松本雄二、針葉樹あて材のリグニンにおける H/G 比とビフェニル型構造量との関係性、第 69 回日本木材学会大会、L14-07-1300、函館、2019年3月
- ② 羽田尚希、秋山拓也、横山朝哉、松本雄二、針葉樹単離リグニンの分子量分画とビフェニル型構造の分布、第 63 回リグニン討論会、pp 124-125、東京、2018年11月
- ③ Haruka Hirayama, Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama and Yuji Matsumoto. Difference in the content of biphenyl structures between the compression and the opposite wood lignins of Japanese cedar. International Convention of Society of Wood Science and Technology and Japan Wood Research Society, pp 468-469, Nagoya, November, 2018
- ④ Xuhai Zhu, Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama and Yuji Matsumoto. Stereo-preferential formation of *p*-hydroxyphenyl-type β -O-4 structures from the quinone methides: Part 2. Water addition to a quinone methide β -etherified with a biphenyl unit. 第 68 回木材学会大会、L15-P-16)、京都、2018年3月
- ⑤ 平山晴加、秋山拓也、松本雄二、スギあて材のリグニンにおける H/G 比とビフェニル型構造量との関係性、第 68 回日本木材学会大会、L15-P-17、京都、2018年3月
- ⑥ Xuhai Zhu, Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama and Yuji Matsumoto. Stereo-preferential formation of *p*-hydroxyphenyl-type β -O-4 structures from the quinone methides. 第 62 回リグニン討論会、要旨集 6-9 頁、名古屋、2017年10月
- ⑦ Yanding Li, Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto. NMR assignment for diaryl ether structures (4-O-5 structures) in pine wood lignin. *5th International Symposium on Emerging Technologies of Pulp and Papermaking & 3rd International Papermaking and Environment Conference (5th ISETPP and 3rd IPEC)*, Guangzhou, China, Nov 2016.
- ⑧ Deded S. Nawawi, Wasrin Syafii, Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto. Syringyl-guaiacyl lignin in reaction wood of the vesseled-gymnosperm, *Gnetum gnemon*. *International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS)*, Tokyo, Japan, March 2015. 3WC-P23
- ⑨ Yanding Li, Takuya Akiyama and Yuji Matsumoto. Nitrobenzene oxidation of 5-O-4 lignin model compounds and the characteristics of NMR chemical shifts of the models. *International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS)*, Tokyo, Japan, March 2015. 3WC-P13
- ⑩ Haruka Goto, Akari Tamai, Takuya Akiyama, and Yuji Matsumoto. Variety of the content of biphenyl structures in softwood and hardwood lignins. *International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS)*, Tokyo, Japan, March 2015. 3WC-O01

〔図書〕(計5件)

① 秋山拓也

NMRによるリグニンの化学構造解析(分担:2章1.2項, p59-65)

植物細胞壁実験法(石井忠、石水毅、梅澤俊明、加藤陽治、岸本崇生、小西照子、松永俊朗)

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

編者)、弘前大学出版会、2016年 (ISBN 978-4-907192-21-1) 2016年2月24日初版

② 秋山拓也

ニトロベンゼン酸化 (分担: 3章5.1項、p128-131)

同上

③ 秋山拓也

オゾン分解法 (分担: 3章5.7項、p147-150)

同上

④ 秋山拓也

メトキシ基定量 (分担: 3章5.10項、p156-158)

同上

⑤ 秋山拓也

リグニン NMR データベース (分担: 9章4項、p388-389)

同上

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.woodchemistry.fp.a.u-tokyo.ac.jp/>

総説

①秋山拓也、リグニンの β -0-4 構造の化学構造的特徴とその樹種間における多様性について
触媒, 58(2), 61-66, 2016.

招待講演

①Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto. Identification of β -1 structure existing as spirodienone unit in lignin. The 2nd Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science. Kihada Hall, Uji Campus, Kyoto University, Kyoto, Japan, July 19th, 2017

②秋山拓也、解析法の概要と樹木リグニンの化学構造的特徴、第61回リグニン討論会、企画講演: リグニンの最新像と関連分野との連携、2016年10月27日、京都大学宇治キャンパス・宇治おうばくプラザ、要旨集 204-205 頁

③秋山拓也、化学反応性に則したリグニン高分子構造の解析、バイオマスエキスポフォーラム、第10回 バイオマスエネルギー&マテリアル製造装置・材料展、2016年6月16日、東京国際展示場

④秋山拓也、リグニン化学構造の多様性、15-1 エコマテリアル研究会、高分子学会エコマテリアル研究会主催、2015年7月17日、東京大学農学部フードサイエンス棟中島董一郎記念ホール

6. 研究組織

(1) 研究分担者 無し

(2) 研究協力者 無し

※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。