

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：32690

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23654196

研究課題名（和文） 海藻起源リグニンの存在とその意義

研究課題名（英文） EXISTENCE OF LIGNIN IN SEAWEEDS AND THE SIGNIFICANCE

研究代表者

山本 修一 (YAMAMOTO SHUICHI)

創価大学・工学部・教授

研究者番号：20182628

研究成果の概要（和文）：褐藻、紅藻、緑藻、約 30 種を用いて、アルカリ加水分解法と熱化学分解法による分析を行った。前者ではリグニンフェノールが検出されなかったことから、海藻中リグニンフェノールはエステル結合ではなく、エーテル結合で架橋されていることがより確実になった。また、後者の方法において、いずれの海藻においても *p*-クマル酸が多く検出されたことは、陸上植物と同様のリグニン合成系が存在している可能性があること、またシリंगा酸が最も多く検出された褐藻類のヒバマタ目・ホンダワラ科は、リグニン様構造を発達させている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Chemical analyses were conducted using about 30 species of brown, red and green algae in seaweeds by the alkaline hydrolysis and the thermochemolysis methods. Since lignin phenol was not detected by the former method, it became more certain that the lignin phenols included in seaweeds are bridged not by an ester bond but by an ether bond. By the latter method, *p*-coumaric acid was the most abundant in all seaweeds. This has suggested that seaweeds have the same lignin synthesis system as land vascular plants. Moreover, Sargassaceae of Fucales in the brown algae has a possibility of developing the lignin structure, because it was the most abundant of syringic acid.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |

研究分野：有機地球化学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：海藻、リグニン構造、熱化学分解法、陸起源有機物、海起源有機物

1. 研究開始当初の背景

リグニンはこれまで海洋生物には存在しないこと、また微生物分解に対して高い抵抗性もつことから、土壌、湖沼堆積物、河川堆積物、また海洋堆積物に含まれる有機物のなかで、陸起源有機物の典型的な指標化合物として用いられてきた。しかしながら、近年海藻にもリグニン様構造がある可能性が出てきた (Martone et al., 2009)。Martone らは紅藻類 1 種の電子顕微鏡観察により陸上被子植物の木質部構造に類似した構造を発見し、

さらに臭化アセチル/酢酸による化学的分解生成物を分析した結果、*p*-クマリルアルコールおよびコニフェニルアルコールを見出した。これらの化合物は裸子植物や被子植物に含まれるリグニン構造ユニットの生合成の出発物質であることから、リグニン様構造があることを報告した。一方、申請者らは、海藻 (褐藻類 6 種類) の構成有機物の分析を行い、その中にリグニンフェノールの存在を確認した。このようなことから陸上高等植物だけでなく、海藻類にもリグニン様構造が存在

する可能性が出てきた。

2. 研究の目的

リグニンはこれまで海洋生物には存在しないことから、陸上高等植物に由来する陸起源有機物の典型的な指標化合物として用いられてきた。しかしながら、海藻にもリグニン様構造がある可能性が出てきた。海藻起源のリグニフェノールの存在が明らかになれば、陸起源有機物の海洋への輸送経路の推定やその量的見積もりなど有機地球化学分野に大きな影響を与えるだけでなく、リグニン構造の進化過程に海藻が関わることになり、植物の進化過程にも影響を与える可能性がある。

そこで、海藻中に広くリグニフェノールが存在すること、またそれらは陸上植物と同様のリグニン構造を持つかどうか、またリグニフェノールの組成上の特徴から、陸上植物との類似性などを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 採取した緑藻、褐藻および紅藻の海藻中に広くリグニフェノールが存在することを確認する。

(2) リグニフェノールがリグニン様構造に由来するかどうか、を検討する。これは、溶媒抽出法、アルカリ加水分解法、TMAH (水酸化テトラメチルアンモニウム) 加熱化学分解法によって、リグニフェノールが遊離態、エステル結合態、エーテル結合態のいずれの形態で存在するのかを確認することによって行う。これは植物のリグニン構造はエーテル結合で架橋されていることが知られているからである。

(3) 海藻中に含まれるリグニフェノールの組成的な特徴を、陸上植物と比較することによって、海藻中のリグニフェノールがリグニン構造を発達させているかどうかを検討する。

4. 研究成果

褐藻類 15 種、紅藻類 12 種、緑藻類 5 種の計 32 種類を用いて、まず海藻中のリグニン用構造の存在を確かめるために、TMAH (水酸化テトラメチルアンモニウム) 熱化学分解法とアルカリ加水分解による分析を行った。前者はエステル結合とエーテル結合を加水分解可能であり、後者はエステル結合のみを加水分解する

(1) アルカリ加水分解法による分析

アルカリ加水分解法ではいずれの海藻類にもリグニフェノールは検出されなかった。このことから、少なくとも加水分解によって生成するリグニフェノールはほとんどないことを示している。また、同時に溶媒抽出

法による遊離態のリグニフェノールも存在しないことになる。ゆえに、海藻中のリグニフェノールは遊離態またエステル結合で存在していないと考えられる。このことから TMAH 熱化学分解法にて海藻中から確認されるリグニフェノールは、エーテル結合で架橋されている可能性が高くなった。

(2) TMAH 熱化学分解法による分析

TMAH 熱化学分解法による各海藻類におけるリグニフェノールの平均相対組成を図 1 に示す。リグニフェノールの濃度は、857-1332 $\mu\text{g/g}$ で、そのうち紅藻類が最も低い値を示している。平均濃度は 1113 $\mu\text{g/g}$ で、この値は、陸上植物、たとえばコナラの葉と比較して、1/20 程度の濃度であることを示している。全体的な組成の傾向として、*p*-クマル酸(Pc)は最も多く、濃度としては 500 $\mu\text{g/g}$ 以上の値を示した。次に *p*-ヒドロキシアルデヒド(Ph)やバニリン酸(Va)が多くなり、他のフェノール類は極めて少量であった。組成の特徴としては、緑藻類では *p*-ヒドロキシアルデヒド(Ph)が、また褐藻類ではシリング酸(Sa)の割合が高いことである。

陸上植物では、*p*-クマリルアルコールや *p*-クマル酸が始めに合成され、高分子化合物であるリグニンになることが知られている。したがって、海藻類に *p*-クマル酸が多いことは、陸上植物と同様の合成系が存在していること、また海藻類に原始的なリグニン様構造があることを示唆している。

以上のことから、TMAH 熱化学分解法にて分析された海藻中のリグニフェノールはエーテル結合で架橋されており、陸上植物と同様のリグニン構造由来である可能性がある。

しかしながら、上記の結果だけから海藻中にリグニン様構造が存在していると結論することはできないことがわかってきた。TMAH 熱化学分解法では、エステル結合やエーテル結合を加水分解すると同時にメチル誘導体化も行われる。リグニンを構成するリグニフェノールを特徴づける化学構造は、ベンゼン環の 3-あるいは 5-位にメトキシ基(-OCH₃)や 4-位に水酸基(-OH)が存在することである。しかし、TMAH 熱化学分解法では、メチル誘導体化されているものを GC-MS で同定しているため、反応前の構造として水酸基かメトキシ基かを知ることはできない。植物などに含まれるタンニンには、ベンゼン環に水酸基が 3-, 4-位あるいは 3-, 4-, 5-位に水酸基がついた構造をもっている。そのため、タンニンを TMAH 熱化学分解法によって得られる分解産物は、リグニフェノールに類似した構造を持つことが報告されている(Nierop et al., 2005)。したがって、海藻から分析されたリグニフェノールが、植物と同様のリグニン構造由来であることを決定づけるために

は、タンニンによる分解産物ではないことを今後確認していく必要がある。

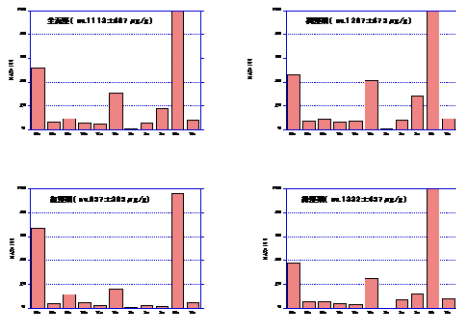


図1 各海藻類のリグニンフェノール組成 (最大値を100)

(3) 紅藻類 (真正紅藻綱)

図2に紅藻類の代表4種のリグニンフェノール相対組成を示す。リグニンフェノール組成は、図に明らかなように有意な差はみられなかった。いずれにおいても *p*-クマル酸が多く、次に *p*-ヒドロキシアルデヒド(Ph)やバニリン酸(Va)が多い。他の海藻類と比較して、*p*-ヒドロキシアルデヒドの割合が高いこと、またシリングル類の割合が低いことである。

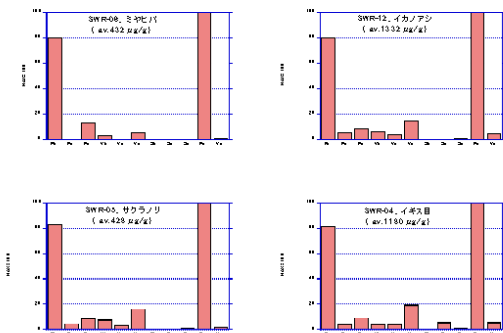


図2 代表的な紅藻類のリグニンフェノール組成 (最大値=100)

(4) 緑藻類 (アオサ藻綱)

図3に緑藻類4種のリグニンフェノールの相対組成を示す。紅藻類と比較して、シリング酸などのシリングル類を含む各種リグニンフェノールが検出された。

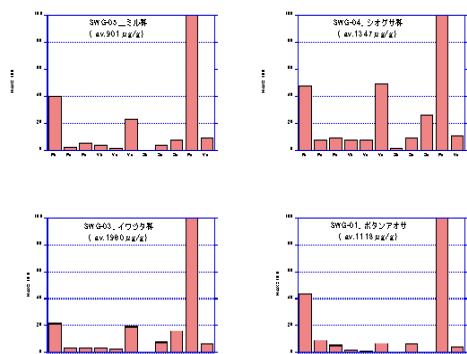


図3 代表的な緑藻類のリグニンフェノール組成 (最大値=100)

(5) 褐藻類 (褐藻綱)

褐藻類を2つのグループに分けて、図4にアミジクサ目、コンブ目、シオミドロ目・カモヤノリ科および図5にヒバマタ目・ホンダワラ科のリグニンフェノール相対組成を示す。図4に示したように、アミジクサ目、コンブ目、シオミドロ目・カモヤノリ科のリグニンフェノール組成は、緑藻類の組成(図3)に類似していることを示している。しかしながら、図5に示したようにヒバマタ目・ホンダワラ科のリグニンフェノール組成は他の海藻類と比べて明らかにシリング酸(Sa)の割合が高いことを示している。

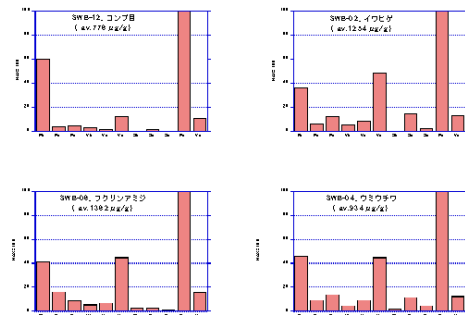


図4 褐藻類 (アミジクサ目、コンブ目、シオミドロ目・カモヤノリ科) のリグニンフェノール組成 (最大値=100)

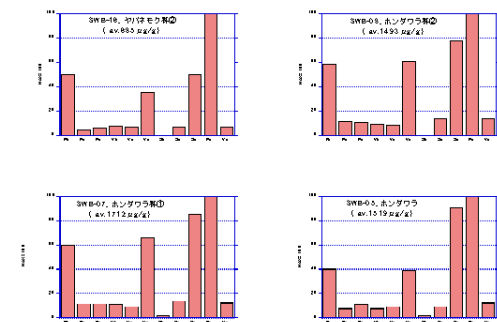


図5 褐藻類 (ヒバマタ目・ホンダワラ科) のリグニンフェノール組成 (最大値=100)

このことは、ヒバマタ目・ホンダワラ科がシリング酸を生成するような構造をもつようになったことを示唆している。TMAH法によって生成するシリング酸は、メトキシ基を3-, 5-位にもっているリグニンフェノールか、あるいはタンニンのエピガロカテキン、エピガロカテキンガラートに由来する可能性がある。リグニンフェノールに由来すると仮定した場合、リグニンフェノールの合成系にお

いて、*p*-ヒドロキシ類やバニリン類より後に合成されることが知られている。また、植物においてもシリング酸は被子植物に多く存在し、裸子植物にはほとんどない。このことは、植物においても、裸子植物から被子植物に進化する過程において、シリング類を合成することが可能になったことを示している。ゆえに、海藻類においてもリグニンフェノールのシリング酸が存在するならば、海藻類や植物の進化系統を考察する上で重要な知見と考えられる。

(5) まとめ

① TMAH 熱化学分解法によってリグニンフェノールは検出されたが、アルカリ加水分解法ではリグニンフェノールは検出されなかった。ゆえに、海藻中のリグニンフェノールはエーテル結合で架橋されている可能性が高いことが明らかになった。このことは海藻類にリグニン様構造があることを示唆している。

② 褐藻類のヒバマタ目・ホンダワラ科は他の海藻類と比べて明らかにシリング酸(Sa)の割合が高いことから、シリング酸を生成するような構造をもつようになったことを示唆している。しかしながら、シリング酸はタンニンのエピガロカテキン、エピガロカテキンガラートに由来する可能性があるため、今後確認が必要である。

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5件)

- ① Kawasaki, Y., Aoki, M., Makino, Y., Sakai, H., Tsuboi, Y., Ueda, J., Sonoda, K., Watanabe, K., Yamamoto, S. and Kurosawa, N. (2011) Characterization of Moderately Thermophilic Bacteria Isolated from Saline Hot Spring in Japan, *Microbiology Indonesia*, 5, 56-60
- ② Satoh, T., Watanabe, K., Yamamoto, H., Yamamoto, S., Kurosawa, N. (2013) Archaeal community structures in the solfataric acidic hot springs with different temperature and elemental compositions. *Archaea*. Vol. 2013, Article ID 723871, 11, doi.org/10.1155/2013/723871
- ③ Nakatomi, N., Hirahara, M., Natori, N., Toda, T. and Yamamoto, S. (2013) Change in amino acid metabolism and nitrogen isotopic composition through egg production of the calanoid copepod *Acartiastoeuri*, *Res. Org. Geochem.* (印刷中)
- ④ Nishiyama, M., Yamamoto, S., Kurosawa, N. (2013) Microbial community analysis of

a coastal hot spring in Kagoshima, Japan, using molecular- and culture-based approaches. *J. Microbiology*, (印刷中)

- ⑤ Ueda, J., Yamamoto, S., Kurosawa, N. (2013) *Paenibacillus thermoaerophilus* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (印刷中)

[学会発表] (計10件)

- ① 上間美穂・園田和彦・吉木朝子・菊池知彦・山本修一，相模川上流から下流における水中有機物の動態，第45回日本水環境学会年会，北海道大学，2011年，3月18～20
- ② 園田和彦・船田正史・上間美穂・山本修一，当幌川から湿原を経て湾へ輸送される陸起源有機物の分子レベル炭素安定同位体比の解析，第45回日本水環境学会年会，北海道大学，2011年，3月18～20
- ③ 園田和彦・高橋昌城・山本修一，C3, C4植物におけるリグニンフェノールの炭素安定同位体比の測定と新たな指標の作成，日本有機地球化学会，九州大学，2011，9/1-3
- ④ 江舟光夫・山本修一・石渡良志，過去2万年間における琵琶湖堆積物における有機物分析による古環境解析，日本有機地球化学会，九州大学，2011，9/1-3
- ⑤ 中國正寿・関幸・山本修一・石渡良志・ODP Leg167 乗船研究者一同，カリフォルニア沖堆積物におけるホパン組成の変動と古環境，第30回有機地球化学シンポジウム，2012/8/22-23，東北大学
- ⑥ 五十嵐明子・山本修一・石渡良志，日本海堆積物中有機物から見た過去8万年間の古環境解析，第30回日本有機地球化学シンポジウム，2012/8/22-23，東北大学
- ⑦ 兒山和子・上間美穂・山本修一，相模川流域の水中溶存態画分に含まれる人為起源有機物，第28回日本腐植物質学会講演会，2012/11/21-22，首都大学東京
- ⑧ 中富伸幸・園田和彦・山崎春華・中嶋亮太・栗原晴子・戸田龍樹・山本修一，炭素安定同位体比分析を用いたサンゴ礁生態系における動物プランクトン群集の食物網解析，第15回日本サンゴ礁学会，2012/11/21-22，東京大学
- ⑨ 五十嵐明子・山本修一・石渡良志，日本海堆積物中有機物から見た過去8万年間の古環境解析，2013年度日本海洋学会春季大会，2013/3/21-3/25，東京海洋大学
- ⑩ 中富伸幸・園田和彦・山崎春華・中嶋亮太・栗原晴子・戸田達樹・山本修一，安定同位体比を用いた動物プランクトン群集の食物網解析—沖縄とマレーシアのサンゴ礁での比較，2013年度日本海洋学会春季大会，2013/3/21-3/25，東京海洋大学

〔図書〕（計〇件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計〇件）

○取得状況（計〇件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 修一 (YAMAMOTO SHUICHI)

創価大学・工学部・環境共生工学科・教授

研究者番号：20182628

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：