

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658140

研究課題名(和文)細胞壁におけるリグニンの存在形態 - 形状、大きさ、分布 - に関するナノレベル分析法

研究課題名(英文) Nano-level observation of shape, size, and, distribution of lignin in cell wall

研究代表者

松本 雄二 (Matsumoto, Yuji)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30183619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：樹木細胞壁におけるリグニンの形と分布をナノレベルで知るために、リグニンと - 相互作用を持つことが期待される化合物を結合させた探針を用いて、樹木細胞壁の原子間力顕微鏡観察を行うことを試みた。テトラシアノエチレンは、リグニン芳香核との間にきわめて強い相互作用を有することを見出した。しかし、これを探針に結合させた原子間力顕微鏡観察では、解析可能な画像を今のところ得ることはできていない。探針へのこの化合物の結合法、結合量などにコントロールすべき要素があるものと考えている。本法の比較対象手法として開発した近接場赤外分光光度法による細胞壁観察では、生体試料への適用に成功するなど成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the shape and distribution of lignin in wood cell wall, atomic force microscopic observation by the use of special needle (cantilever) was examined. This needle was covered by a compound which was expected to exhibit pi-pi interaction with lignin aromatics. Tetracyano ethylene was found to have very strong interaction with lignin as expected. However, atomic force microscopic observation of lignin by the use of this needle was not successful. The amount and linkage method of this compound to the needle has to be modified.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：リグニン 原子間力顕微鏡 テトラシアノエチレン 木質細胞壁

1. 研究開始当初の背景

細胞壁におけるリグニンの存在形態や分布を知る手法は、現在では、サブミクロンオーダーまでは可能性が開けていると言える。TOF-SIMS や近接場光顕微赤外分光法をその性能いっぱい活用すればサブミクロンオーダーでの分布の知見が得られるかもしれない。しかし、セルロースやヘミセルロースとの相互作用の中でのリグニンの形を議論しようとするれば、サブミクロンオーダーでは不十分であり、セルロースマイクロフィブリルの太さと同じナノオーダーでの観測が必要になる。ところが、細胞壁におけるリグニンの形をこのレベルで直接観測する手法は現在のところ存在しない。結晶構造を有するセルロースと異なり、リグニンは特有の形態を持たない無定形の高分子であると考えられる。しかし細胞壁という特有の場においては、セルロースおよびヘミセルロースとの相互作用の中で、リグニンは意味のある形を持って存在していることは確実である。リグニンの果たしている機能に適した、意味のある形を与えられていると言っても良いだろう。したがってリグニンが細胞壁において与えられている形状や大きさ、分布を明らかにすることは、リグニンの細胞壁における機能を明らかにする上で大変に重要な情報となる。本研究では、今までリグニンに適用されたことの無い測定原理を用いて、細胞壁におけるリグニンの大きさ、形状、多糖類との位置関係を明らかにすることを目指した。細胞壁におけるリグニンのナノオーダーでの存在形態を明らかにすることは、それ自体が貴重な知見と言えるが、細胞壁におけるリグニンの機能を実証的基礎に立脚して理解する上で、これらの情報がきわめて重要であることを考えれば、それらの情報の観測を可能にする手法を確立することの意義はきわめて大きいと考えた。

2. 研究の目的

リグニン芳香核は、メトキシル基や水酸基などの形で酸素原子が直接結合しているため、

その共鳴効果により比較的電子リッチである。したがって、電子欠乏状態の二重結合系を持つ化合物との間に - 相互作用に基づく強い相互作用を示すことが期待される。この相互作用を利用した原子間力顕微鏡によって樹木細胞壁断面の観察を行えば、リグニンの細胞壁における存在形態や分布についての情報が得られると考えられた。この研究では、どのような化合物がリグニン芳香書くとともに強い相互作用を有し得るかをスクリーニングし、有望な化合物を探針に結合させた原子間力顕微鏡でリグニンの直接観察が可能かどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

原子間力顕微鏡は、物質表面のナノオーダーでの形状観測を可能にする装置である。原子間力顕微鏡の多様な測定モードのうち、測定部位である探針と物質表面との間に働く吸着力を測定するモードを用いればリグニンの微細分布の観測が可能になると考えられた。リグニンはセルロースとはまったく異なる化学構造を有する。メトキシル基が置換したリグニン芳香核は電子密度の高い電子系であり、電子密度の低い電子系の化合物（例えばテトラシアノエチレン）とは非常に強く相互作用することが予備実験において確かめられた。したがって、探針の表面に何らかの方法を用いて電子密度の低い電子系の化合物を結合させれば、探針はリグニン芳香核との間に強い相互作用を有するようになり、それが吸着力として観測されると期待される。リグニンの存在しない部位では、そのような吸着力は働かない。このような原理によって、リグニンの存在形態をナノオーダーで観測する方法を確立することを本研究は目指している。その実現のために、次の手順で実験を進めた。

- (1) リグニン芳香書くとともに強い相互作用を有する化合物の探索
- (2) (1)で見出した化合物の探針への結合法の開発
- (3) (2)で開発した探針を装着した原子間力

顕微鏡による細胞壁の観測

(4) 観察した試料が細胞壁のオリジナルの状態を反映しているかどうかの検討。

4. 研究成果

前項の(1)については、テトラシアノエチレンおよびその類似化合物がリグニン芳香核との間に強い親和力を持つことを見出すことができた。特にテトラシアノエチレンは、きわめて強い相互作用を示し、続いて、これらの化合物を探針上に結合する手法を検討した。化学結合法と塗布法の両者を試みたが、いずれの場合にも、探針への結合を確認し結合量を測定する事自体が非常に困難であり、結論としては、得られた探針を用いて細胞壁断面の観測を行い、得られた画像から判断せざるを得なかった。

それらの化合物を探針に塗布して原子間力顕微鏡による細胞壁断面の観察を行ったが、現在までに、解析可能な画像が得られていない。探針への塗布量や観察モードの選定など、改良すべき点がいくつも考えられるので、今後、それらを一つ一つつめて、本手法をぜひ完成させたい。

ところで、本手法で得られた画像を判断する上で、比較対照する手法が必要であったため、近接場赤外分光光度計の観測用探針を装着した原子間力顕微鏡観察を行っていた。この手法自体が生体試料の観察に適用された例がない非常に難しいものであったが、それによって画期的な成果が得られた。その際に観察対象としたのは、虫害によって「リグニン様充填物質」と呼ばれる分泌物を細胞孔内に蓄積した細胞である。この手法によって得られた成果は次のように要約できる。

近接場顕微赤外分光装置 (IR-SNOM) は、近接場光という波長に依存しない小さなサイズの光を用いる事で、潜在的には 1 μ m よりも小さな分解能で IR スペクトルが得られる装置である。本研究では、閉塞物質の分析に IR-SNOM を適用し、得られた近接場 IR スペクトルの解析により閉塞物質の化学構造上の情報を得ることを試みた。植物試料を IR-SNOM で分析する手法は確立されてい

ない為、まず分析法の確立を行った。様々な試みの結果、プローブ先端に付着した閉塞物質を測定することにより、良好な近接場 IR スペクトルが得られた。閉塞物質の近接場 IR スペクトルは、木部組織の近接場スペクトルとは異なっており、エステル由来の吸収ピークが強い反面、C-H 結合振動由来の吸収が殆ど確認できない程弱いものであった。樹木成分に関連した種々の化合物の近接場 IR スペクトルと比較した結果、閉塞物質は、リグニン様物質と呼ばれているにもかかわらず、化学構造上の特徴は、リグニンよりはむしろタンニンに近いものであることが明らかになった。この成果は近接場顕微赤外分光装置の生体試料への適用として世界で初めてのものであり、二つの学術論文として発表することができた。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

Takayuki Yamagishi, Kento Aizawa, Toshihiro Yamada, and Yuji Matsumoto,

IR-SNOM analysis of occluding substances in lumina of xylem elements in sapwood of *Quercus serrata* attacked by *Platypus quercivorus*

Anal. Sci., 査読有, **29** (4), 2013. 411-415

Takayuki Yamagishi, Tomoya Yokoyama, Toshihiro Yamada, and Yuji Matsumoto,

Structure of cell wall components in the sapwood of *Quercus serrata* Thunb. attacked by *Platypus quercivorus*

J. Wood Chem. Technol., 査読有, **33** (1), 2013, 65-75

[学会発表] (計 2 件)

T. Yamagishi, T. Yamada, and Y. Matsumoto, IR-SNOM analysis of occluding substances in lumina of xylem elements in sapwood of *Quercus serrata* infected with *Raffaella quercivora*.

16th ISWFPC, Tianjin, China, 2011, June

山ギシ崇之, 松本雄二. IR-SNOM による木
質組織の分析
第 56 回リグニン討論会, 山形, 山形大学,
2011 年 9 月

無し:

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.woodchemistry.fp.a.u-tokyo.a
c.jp/](http://www.woodchemistry.fp.a.u-tokyo.ac.jp/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 雄二 (MATSUMOTO, Yuji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教
授

研究者番号: 30183619

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者