

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：23201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658156

研究課題名(和文)規則性人工リグニンポリマーによるモノリグノール重合の制御

研究課題名(英文) Monolignol polymerization in the presence of artificial lignin polymer

研究代表者

岸本 崇生 (Kishimoto, Takao)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：60312394

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)：-0-4型人工リグニンオリゴマーを、成長しつつあるリグニンの鋳型(テンプレート)として作用させることにより、モノリグノールの脱水素重合の制御やリグニンの化学構造に及ぼす因子の解明を行うことを計画した。テンプレートとなるリグニンオリゴマーの合成では、少量ながら5量体までの合成を達成した。酸化銀を用いたシナピルアルコール(SA)の重合では、位にアセチル基を有するSAは、-0-4構造が優先することが判明した。化学計算の結果、アセチル基によりラジカル同士のクーロン反発が抑制されるために-0-4構造が優先することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Biomimetic oxidations of sinapyl alcohol and sinapyl acetate were carried out with Ag₂O to better understand the high frequency of -0-4 structures in highly acylated natural lignins. The yield of the -0-4-coupled products from sinapyl acetate was much higher than that from sinapyl alcohol. Computational calculations suggest that the Coulombic repulsion between C₁ and O₄ in sinapyl acetate radicals was significantly reduced by the acetyl group, contributing to the preferential formation of -0-4 structures from sinapyl acetate. In addition, several -0-4 type lignin model oligomers, including dimer, trimer, tetramer and pentamer were synthesized to use as templates during monolignol polymerization.

研究分野：木質バイオマス

キーワード：リグニン 脱水素重合 モノリグノール

1. 研究開始当初の背景

リグニンは、ペルオキシダーゼによりモノリグノールが脱水素重合した複雑なバイオポリマーである。Lewis らは、Dirigent Protein(Science, 1997)というタンパク質を発見し、Dirigent Proteinによりまず規則的なリグニン鎖が生成し、それが鋳型となり、DNA 鎖の複製時のように、規則的なリグニン鎖が繰り返し形成されるという、新しいリグニン形成モデルを提唱した。しかし、従来のランダム重合説と異なるこのモデルは、他の研究者によって検証されておらず、国際学会や論文で議論が続いている。そこで、構造の明確な β -O-4型人工リグニンオリゴマーを、伸長中のリグニンの鋳型として、モノリグノールのテンプレート重合を行なうことにより、Lewisらのリグニン形成モデルの検証や、リグニンの化学構造に及ぼす因子の解明、さらにはフェノール類の脱水素重合の制御ができると考えた。

2. 研究の目的

β -O-4型人工リグニンオリゴマーを鋳型(テンプレート)として、モノリグノールの脱水素重合の制御を行うとともに、どのような機構によってリグニンの化学構造が決定されるのかを明らかにすることを目的とした。そのために、構造の明確な人工リグニンオリゴマーの合成、有機溶媒耐性ペルオキシダーゼの調製、モノリグノールの脱水素重合と化学構造解析を行うことを計画した。

3. 研究の方法

(1) 構造の明確な人工リグニンオリゴマーの合成

特定の重合度を持つ β -O-4型リグニンモデルオリゴマーの合成を計画した。リニア型合成法と収束型合成法を検討し、最終的にリニア型合成法を用いて、5量体までのオリゴマーの合成を行った。

(2) 有機溶媒耐性ペルオキシダーゼの調製
テンプレートが溶解した状態でモノリグノールの脱水素重合を行うため、市販の西洋わさびペルオキシダーゼに、PEG(ポリエチレングリコール)化試薬を作用させ、有機溶媒耐性ペルオキシダーゼを調整した。

(3) モノリグノールの脱水素重合
シナピルアルコールおよびシナピルアルコールアセテートを、酸化銀を用いて脱水素重合を行い、反応生成物を単離し、その収率を比較し、アセチル基がモノリグノールの脱水素重合に影響を及ぼすかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 構造の明確な人工リグニンオリゴマーの合成

研究開始当初は、重合度の分散がある人工リグニンオリゴマーをテンプレートとすることを考えていたが、よりテンプレート効果が期待できる、重合度が一定で構造が明確な β -O-4リグニンオリゴマーを用いることにした。合成には、収束型合成法およびリニア型合成法の両方を試みた。

収束型合成

収束型合成法は、一般的に反応段数が少ないというメリットがある。図のアセト酢酸エチル誘導体を出発物質とし、フェノール性水酸基の脱保護および臭素化を行い、得られたフェノール性水酸基を持つ化合物と臭素化物をウィリアムソンエーテル合成法を用いて結合させることにより、2量体が得られる。この方法を繰り返すことにより、2量体、4量体、8量体と重合度を上げることが可能である。しかし、ベンジル基およびベンゾイル基のいずれの保護基を用いた場合も、2量体の収率は20~30%程度であり、満足のいく結果は得られなかった。

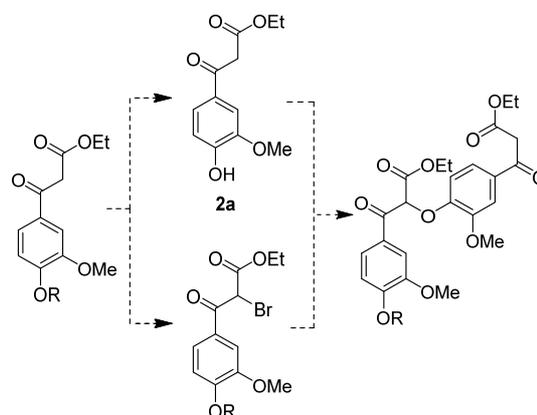


図 収束型合成

リニア型合成

リニア型合成法では、以下の図の臭素化物を鍵となるビルディングブロックとして用いた、グアイアコールとのカップリングによる2量化から始め、段階的に一つずつ重合度を上げていくことができる。2量体合成の際にベンジル基、ベンゾイル基等の保護基の検討を行った結果、ベンジル基を用いた場合に最も収率が高かったため、ベンジル基を保護基としたリニア型合成法を用いることにした。



図 鍵となるビルディングブロック

同様の手法を繰り返した結果、5量体までのβ-O-4型リグニンモデルオリゴマーの合成に成功した(図は3量体まで記述)。しかし、それぞれのオリゴマーは、テンプレートとしてモノリグノールの脱水素重合実験に用いるのに十分な量を得ることはできなかった。

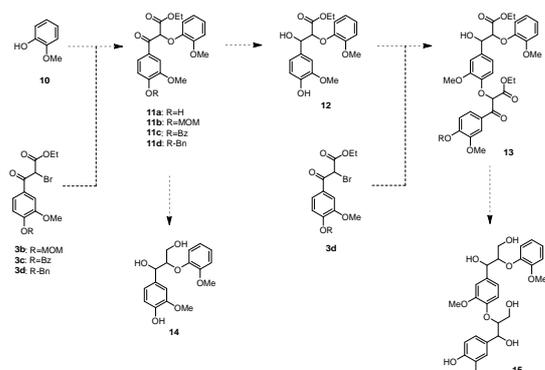
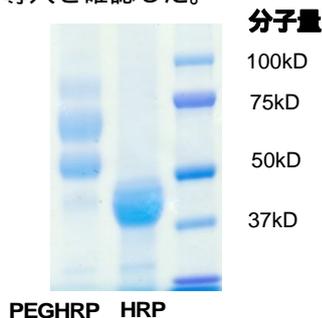


図 リニア型合成法

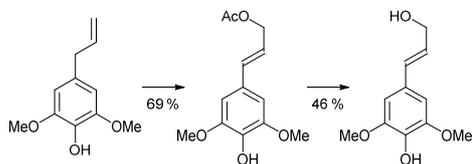
(2) 有機溶媒耐性ペルオキシダーゼの調製
アミノ基と選択的に反応する炭酸エステルで活性化されたメトキシ PEG 化試薬(分子量 5000)を用いて、西洋わさびペルオキシダーゼにメトキシ PEG 基を結合させた。PEG 化した西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)は、遊離する p-ニトロフェノールの UV 測定、および、電気泳動(SDS-PAGE)測定(図)により、PEG 鎖の導入を確認した。



(3) モノリグノールの重合

モノリグノールの重合に与える因子の一つとして、位のアシル基の影響を検討するため、シナピルアルコールおよびシナピルアルコール アセテートの Ag₂O による酸化カップリングを行った。

まず、シナピルアルコール アセテートは、以下のルートにより合成した。



図シナピルアルコール アセテートの合成

シナピルアルコールおよびシナピルアルコール アセテートの酸化銀を用いた脱水素重合を行った結果、シナピルアルコールを

用いた場合は、シナピルアルデヒド (14%), -O-4-型 2量体(32%), -型 2量体(3%) が得られた。一方、シナピルアルコール アセテートを用いた場合には -O-4-型 2量体 (66%)、主に -O-4 構造でできたオリゴマー (18%)が生成した。シナピルアルコール アセテートを用いた場合には、-O-4 構造が優先することがわかった。

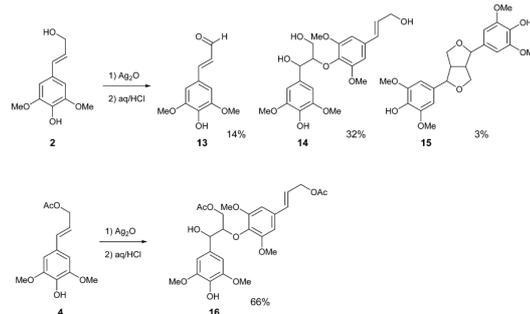


図 シナピルアルコールおよびシナピルアルコール アセテートの Ag₂O による酸化カップリング

シナピルアルコール アセテートの酸化カップリング反応では、-O-4 構造が優先した理由を考察するため、DFT 法を用いて化学計算を行った。シナピルアルコールラジカルおよびシナピルアルコール アセテートラジカルのそれぞれの原子のスピ密度および電荷をそれぞれ表に示す。

表 化学計算によるモノリグノールラジカルのスピ密度

| | Sinapyl alcohol radical | Sinapyl acetate radical |
|------------|-------------------------|-------------------------|
| C α | -0.0841 | -0.0845 |
| C β | 0.1797 | 0.1767 |
| C γ | -0.0078 | -0.0080 |
| O4 | 0.3597 | 0.3611 |

表に示すスピ密度の値から、アセチル基は、ラジカルの電子密度やその分布にはほとんど影響を及ぼさないことがわかった。

表 化学計算によるモノリグノールラジカルの電荷

| | Sinapyl alcohol radical | Sinapyl acetate radical |
|------------|-------------------------|-------------------------|
| C α | -0.2133 | -0.1974 |
| C β | -0.1953 | -0.1619 |
| C γ | 0.1579 | 0.0067 |
| O4 | -0.4313 | -0.4244 |

一方、位のアセチル基により、シナピルアルコール アセテートラジカルの位の負電荷が、有意に減少することがわかった。このことから、モノリグノールラジカルの接近時のクーロン反発が、位のアセチル基により抑制され、それにより、β-O-4 構造が優先

していると考えられた。この結果は、ケナフなどの位にアセチル基が導入された天然リグニンは、 β -O-4 構造量が非常に多いことを矛盾なく説明できる。

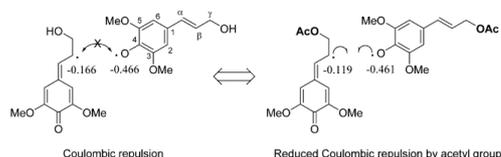


図 アセチル基によるクーロン反発の抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takao Kishimoto*, Nana Takahashi, Masahiro Hamada and Noriyuki Nakajima. Biomimetic oxidative coupling of sinapyl acetate by silver oxide: preferential formation of β -O-4 type structures Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, 2277–2283, (2015).査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

岸本崇生、高橋奈々、濱田昌弘、中島範行：「酸化銀によるシナピルアセテートの酸化カップリング」、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3 (岡山)

板倉圭佑、岸本崇生、濱田昌弘、中島範行：「 β -O-4 型オリゴリグノールの合成研究」、第 59 回リグニン討論会、2014.9.11 (福井)

岸本崇生、高橋奈々、濱田昌弘、中島範行：「オリゴリグノールの合成研究」、生物工学センター研究成果発表会、2014.9.19 (富山)

板倉圭佑、岸本崇生、濱田昌弘、中島範行：「 β -O-4 型リグニンオリゴマーの合成研究」、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013.3 (仙台)

岸本崇生：「 β -O-4 型リグニンオリゴマーの合成研究」、第 11 回北陸若手化学者談話会、2013.09 (あわら)

岸本崇生、板倉圭佑、濱田昌弘、中島範行：「 β -O-4 型オリゴリグノールの合成研究」、第 58 回リグニン討論会、2013.11 (香川)

板倉圭佑、岸本崇生、濱田昌弘、中島範行：「 β -O-4 型リグニンモデルオリゴマーの合成研究」、平成 24 年度有機合成化学北陸セミナー、2012.10 (富山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岸本 崇生 (KISHIMOTO, Takao)
富山県立大学・工学部・准教授
研究者番号：60312394

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし