

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26252022

研究課題名(和文) 木材細胞壁模倣多糖類マトリックス中でのリグニンの形成とその構造決定因子の解明

研究課題名(英文) Lignification in polysaccharide matrix mimicking wood cell wall and clarification of lignin structure -control factor

研究代表者

浦木 康光 (Uraki, Yasumitsu)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：90193961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リグニン形成(木化)に及ぼす多糖類、特に、ヘミセルロースの影響について解明することを目的とした。木材で代表的なヘミセルロースであるキシランとグルコマンナンをセルロースに吸着させて、多糖類マトリックスを構築した。このマトリックス存在下で、リグニンのモノマーであるコンニフェリルアルコールの脱水素重合を行った。その結果、キシランは脱水素重合を促進したが、グルコマンナンは阻害するという、従来報告されていない知見を得た。さらに、リグニンモデル高分子の溶液物性と得られた重合物(DHP)の溶液物性を比較することによって、DHPは枝分かれに富む構造を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：An aim of this study is to elucidate lignin formation mechanism (lignification), especially influence of hemicelluloses, with polysaccharide matrix mimicking wood cell wall structure. Polysaccharide matrix was successfully prepared by the deposition of hemicelluloses, xylan and glucomannan, onto bacterial cellulose. Dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol, which was one of monolignols, was attempted in the presence of such polysaccharide matrix. As a result, the polymerization was accelerated by xylan deposition, but was inhibited by glucomannan.

In addition, the structure of the resultant polymerized product (Dehydration Polymer: DHP) was investigated on a size-exclusion chromatography equipped with a laser light-scattering detector by the comparison with solution structure of a non-branched lignin model compound that is comprised of only 8-O-4' linkage. This investigation revealed that DHP had a significant frequency of branched structure.

研究分野：木質バイオマス構成成分の生合成過程の解明とその利用

キーワード：リグニン ヘミセルロース 多糖類マトリックス 脱水素重合 分枝構造

### 1. 研究開始当初の背景

リグニンの化学構造を解明することは、学術的な興味ばかりでなく、パルプ化やリグニン製品の製造などといった工業的利活用にも重要な課題である。リグニンの化学構造が、その重合過程に依存することは容易に想像できるが、樹木中のリグニンが“**なぜ、 $\beta$ -0-4 結合に富むのか?**”については、不明である。

$\beta$ -0-4 結合に富む人工リグニンの作製は、この課題を解決する一つの取り組みである。そこで、人工リグニンの作製法として、horse radish peroxidase などの酸化酵素を用いた脱水素重合法が提案された。この方法の中で、リグニンのモノマーであるモノリグノールを逐次添加する“Zutropfverfahren (滴下法)”が、 $\beta$ -0-4 ( $\beta$ -0-4') 結合量を増加させることが見出されたが、樹木中のリグニンより少なかった。したがって、リグニン形成は、他の因子、即ち、セルロースとヘミセルロースから成る多糖類マトリックスが $\beta$ -0-4 結合の形成に多大な影響を及ぼしていると推定される。しかし、ペクチンや $\alpha$ -シクロデキストリンなど木材由来でない多糖類の効果は検討されたが、実際の木材多糖類を用いた研究例は無い。よって、木材多糖類の関与の解明が重要であった。

また、リグニン中の分枝構造が立体構造や分子量測定に影響を与えることが、高分子学的には予想されるが、リグニンの溶液構造を含めた立体構造研究は殆ど進展しないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、木材中のリグニンが $\beta$ -0-4 結合に富む理由を、多糖類の関与という観点から解明することを目的とする。そのために、木材細胞壁形成初期の構造を人為的に模倣した多糖類マトリックスを作製し、そのマトリックス中でモノリグノールの重合を試み、 $\beta$ -0-4 結合形成に及ぼすセルロースおよびヘミセルロースの関与について解明する。さらに、 $\beta$ -0-4 結合の量とリグニンの立体構造との関連性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞壁模倣多糖類マトリックスの調製

セルロースを産生する酢酸菌の運動方向を制御して得られるハニカム状セルロース(HC)と、運動を制御しない無配向セルロースフィルム(UC)を多糖類マトリックスの基盤材料として調製した。これらの基盤材料を、ブナ由来のキシラン、およびエゾマツから熱水抽出したグルコマンナンの水溶液に浸漬し、その吸着量を測定した。

#### (2) コニフェリルアルコール(CA)の脱水素重合

メトキシ基の水素を重水素で置換した CA と無置換の CA を合成した。次に、ヘミセルロース吸着セルロースフィルムを、horse radish peroxidase (HRP) が溶解しているリ

ン酸緩衝液に浸漬した。この浸漬液に、CA と過酸化水素のリン酸緩衝液を 20 時間かけて滴下し、さらに、12 時間を放置した。

緩衝液中に生成した DHP とフィルム分離し、フィルムは、ジオキサンで洗浄した。洗浄前後のフィルムは、アセチルプロミド法とニトロベンゼン酸化法に供した。

#### (3) DHP 堆積フィルムの免疫標識観察

DHP が堆積したセルロースフィルムを、リグニンの  $\beta$ -0-4、 $\beta$ - $\beta$  と  $\beta$ -5 結合を認識する一次抗体の緩衝液に浸漬し、さらに、蛍光発色団を結合させた二次抗体で染色して、蛍光顕微鏡観察を行った。

#### (4) DHP および $\beta$ -0-4 結合のみから成るリグニン高分子モデルの SEC-MALLS 測定

上記で得られた DHP と、合成したリグニン高分子モデルをアセチル化し、光散乱検出器を備えたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC-MALLS) に供した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヘミセルロースのセルロースへの吸着

図 1 に、二種のヘミセルロースのセルロースへの等温吸着線を示す。キシランの溶解度から、1 g/L までしか測定できなかったが、グルコマンナンの方がセルロースに多量吸着することが示された。この結果は、グルコマンナンの方がキシランより、セルロースに対し高い親和性を持つことを意味している。

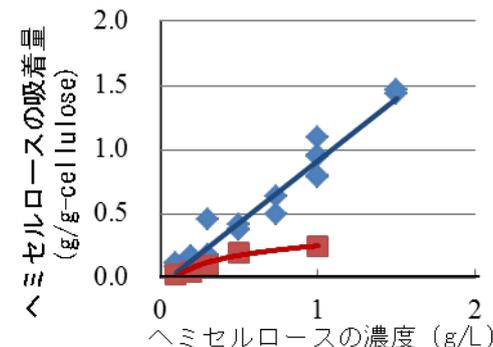


図1. セルロースに対するヘミセルロースの吸着等温線。

◆, グルコマンナン (GM); ■, キシラン (XY)

#### (2) ヘミセルロース吸着セルロース存在下での DHP の形成

##### DHP 形成に及ぼすキシランの影響

図 2 に、フィルム横断面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像と、エネルギー分散型 X 線分析装置 (EDXA) でマッピングした像を示す。EDXA 測定では、DHP を臭素化し<sup>1)</sup>、その臭素を検出して、存在を黒点で示している。

キシランが未吸着の UC では、フィルムに内部に黒点が観測されなかった。しかし、キシランが吸着すると、フィルム内部に黒点が高密度で出現した。このことは、キシランの存在により、DHP がフィルム内部にまで形成されたことを意味している。

また、HC を用いると、キシランが未吸着でも黒点が観察された。しかし、黒点の密度は、

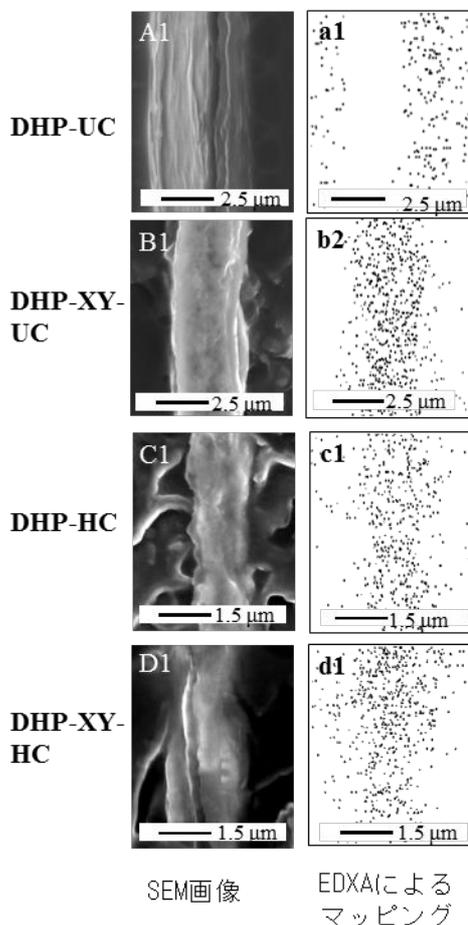


図2. セルロースフィルムに堆積したDHP.  
試料名のXYは、キシランの吸着を表す。

キシランが吸着することで増加した。この異なる現象は、フィルムの形態に依存すると考えられる。HCでは、セルロースマイクロフィブリルが多数表面に露出しているが、UCでは、露出量が少ないために、CAの浸透性に違いが生じ、その結果、UCでは、DHPが生成しなかったと考えられた。

この仮説の検証のために、重水素化標識したCAを用いて、フィルム中での分布を同位体顕微鏡（北大独自の機器）で検証した。予想通り、キシランが吸着すると、フィルム内部のCA量が増加することが確認できた。

図3に、アセチルプロミド法によって定量したDHPの堆積量、および図4に、ニトロベンゼン酸化法によって得られた収率を示す。ニトロベンゼン酸化法は、 $\beta$ -O-4結合で代表されるリグニンのアリアルエーテル結合量を推定する分析法で、収率が高い程、結合量が多い。EDXA観察から示唆されたように、キシランが吸着するとフィルムに堆積したDHPの量が増加した。特に、HCでは、その傾向が顕著で、CAと多糖類マトリックスとの接触性がDHPに重要であることが確認できた。また、図4から、キシランの吸着によりニトロベンゼン酸化収率が向上したことより、キシランの存在でアリアルエーテル結合が増加したことが示され、 $\beta$ -O-4結合が、キシランで誘

起されることが推定された。

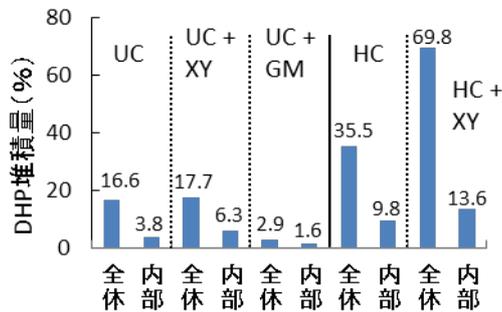


図3. セルロースフィルムに堆積したDHP量（対セルロース量）.  
試料名中の全体と内部は、それぞれフィルム全体と内部に堆積したDHP量を表す。

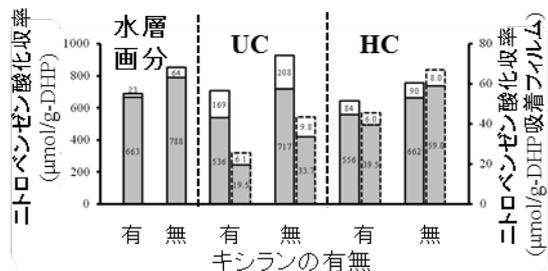


図4. DHPのニトロベンゼン酸化収率.  
■, バニリンの収率.  
□, バニリン酸の収率.  
実線の棒は、DHPに対する収率（右軸）.  
点線の棒は、DHP堆積フィルムに対する収率（左軸）.

#### DHP形成に及ぼすグルコマンナンの影響

グルコマンナンが吸着したUCを用いて、キシラン吸着セルロースフィルムと同一条件でDHPの形成を検討した。SEM-EDXAの結果から、DHPの生成は確認できなかった。

このことを確認するために、アセチルプロミド法による、DHPの定量を行った（図3）。グルコマンナンの吸着により、DHP量は未吸着のものより、顕著に減少した。このことは、グルコマンナンがDHPの形成を阻害していることを明示している。

#### ヘミセルロースと木化との関係のまとめ

本研究により、キシランはDHPの形成を促進し、さらに、DHPの構造にも影響を与えることが示され、一方、グルコマンナンはDHP形成を阻害するという、研究当初には、予想できなかった結果が得られた。ここで、これらの違いについて、原因を探ることとする。本研究で得られたグルコマンナンがキシランよりセルロースへの親和性が高いことを考慮すると、ヘミセルロースとCAとの親和性がDHP形成に影響を与えたと推測される。しかし、代表者の浦木は、既に、これらヘミセルロースとCAの親和性はほぼ同等であることを報告している<sup>2)</sup>。したがって、DHP形成は、CAを重合させる酵素（HRP）とヘミセルロースとの相互作用に依存するとの仮説に到達した。この仮説は、我々が最初の提案

者であり、今後の重要な解決課題である。

## (2) DHP の構造

### フィルム中の DHP の構造

溶媒に不溶なリグニンの構造分析は、これまで困難であった。そこで、本研究では、フィルム内部に堆積した DHP の構造を検討するために、免疫蛍光標識法を用いた (図 5)。その結果、従来からリグニンで報告されている  $\beta$ -O-4、 $\beta$ - $\beta$ と $\beta$ -5 結合が、この DHP にも存在することが示された。今回は、蛍光標識のために分解能が低く、明確な分布の解明には至らなかったが、金粒子などを担持させた二次抗体を用いることで、詳細な分布が明示できると期待している。

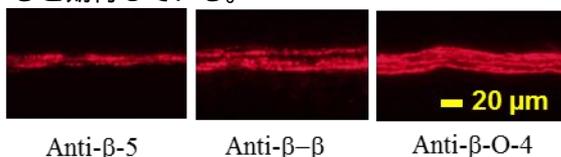


図5. 三種抗体を用いて免疫蛍光標識した DHP.

### DHP の溶液構造

多糖類が存在しない系で、DHP を調製し、その有機溶媒画分の分析を SEC-MALLS を用いて行った。対照試料として、リグニン高分子モデル、広葉樹クラフトリグニンと分子量マーカーのポリスチレンを用いた。MALLS 検出器を用いて得られた絶対分子量と、保持時間との関係を図 6 に示す。

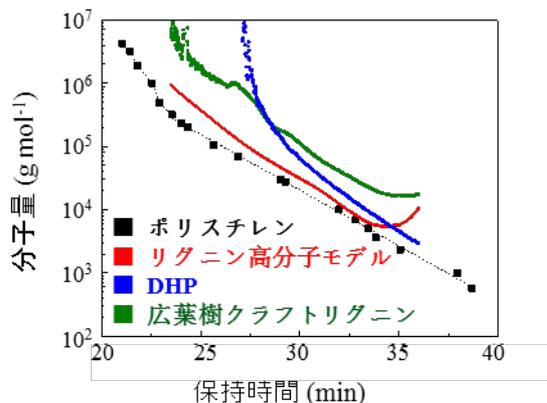


図6. SEC-MALLSにおける分子量と保持時間の関係。

$\beta$ -O-4 結合のみから成るリグニン高分子モデルは、ポリスチレンに近い分子量 保持時間相関曲線を与えた。クラフトリグニンは、ポリスチレンより 1 桁大きい分子量を示す相関曲線を与えた。DHP は、それらの中間の位置に相関曲線が出現した。この分析において、同じ保持時間で分子量が大きいということは、非常に高密度の構造を有していることの証であり、分枝構造に依存すると予想できる。したがって、クラフトリグニンは非常に分枝の多い構造と結論付けられる。クラフトリグニンは、 $\beta$ -O-4 結合の開裂によって抽出可能となったリグニンであることを考慮すると、分枝の多い構造は理解できる。

この結果を元に DHP の構造を推定すると、クラフトリグニンほど高頻度ではないが、かなり分かれした構造をもち、分子がコンパクトに密集した構造で溶液中に存在することが示唆された。

一方、分枝の無いリグニン高分子モデルがポリスチレンに近い相関曲線を与えたことは、ポリスチレンのランダムコイルと同様な溶液構造をとることに加え、分枝構造がリグニンに稠密な構造をもたらす一因となることを支持している。

## <引用文献>

S. Saka, R. J. Thomas, J. S. Gratzl: Lignin distribution –Determination by energy-dispersive analysis of X-rays. *Tappi*, 61, 73-75 (1978).

Y. Uraki, A. Nakamura, T. Kishimoto and M. Ubukata: Interaction of hemicelluloses with monolignols. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 27(1), 9-21 (2007).

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1) A. Higaki, A. Yoshinaga, K. Takabe: Heterogeneous distribution of xylan and lignin in tension wood G-layers of the S1+G type in several Japanese hardwoods. *Tree Physiology* 37, 1767-1775 (2017).

DOI: 10.1093/treephys/tpx144

2) S. Afrida, T. Watanabe, Y. Tamai: A pronounced improvement of the kappa number reduction and pulp properties associated with the use of extracellular enzymes secreted by selected fungal strains, " *BioResources*. 12(4), 8272-8285 (2017).

DOI: 10.15376/biores.12.4.8272-8285

3) Q. Li, K. Koda, A. Yoshinaga, K. Takabe, M. Shimomura, Y. Hirai, Y. Tamai, Y. Uraki: Dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol in artificial polysaccharides matrices: Effects of xylan on the polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 63(18), 4613-4620 (2015).

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01070

[学会発表](計 16 件)

1) Yasumitsu Uraki: Elucidation of hemicellulose functions on lignification using artificial wood cell wall based on honeycomb- patterned cellulose. 255<sup>th</sup> ACS National Meeting & Exposition. New Orleans, USA, 19 March, 2018.

2) 松尾朱実、古川貴大、玉井 裕、幸田圭一、浦木康光、吉永 新、高部圭司: コニフェリルアルコールの脱水素重合に及ぼすヘミセルロースの効果. 第 68 回日本木材学会大会,

京都, 2018年3月14-16日.

3) 有泉 慧、吉永 新、高部 圭司: 偏光顕微  
ラマン分光法によるミズナラ材細胞壁にお  
けるリグニン芳香核の配向解析 第68回日  
本木材学会大会, 京都, 2018年3月14-16日.

4) K. Ariizumi, A. Yoshinaga, K. Takabe:  
Orientation of lignin in tracheid secondary walls  
in *Cryptomeria japonica* as revealed by polarized  
Raman microscopy. The 9th Pacific Regional  
Wood Anatomy Conference, Bali, Indonesia,  
26-29 September, 2017.

5) 古川貴大、吉永 新、高部圭司、松尾朱実、  
玉井 裕、幸田圭一、浦木康光: 木化に及ぼ  
すヘミセルロースの影響、第62回リグニン  
討論会, 名古屋, 2017年9月26-27日.

6) Keiichi Koda, Mayu Ogawa, Kengo Shigetomi,  
Naoya Sakamoto, Arata Yoshinaga, Keiji Takabe,  
Yasumitsu Uraki: Visualization of the distribution  
of stable isotope labelled- monolignols in woody  
tissue by isotope microscopic observation. 19th  
International Symposium on Wood, Fiber and  
Pulping Chemistry Porto Seguro, Brazil, Aug.  
30-Sep. 1, 2017.

7) T. Furukawa, A. Yoshinaga, K. Takabe, Y.  
Tamai, K. Koda, Y. Uraki: Function of  
glucomannan in lignin formation using artificial  
wood cell wall. 19th International Symposium on  
Wood, Fiber and Pulping Chemistry, Porto  
Seguro, Brazil, Aug. 30-Sep. 1, 2017,

8) A. Yoshinaga, M. Wada, S. Hoshikawa, S.  
Kiyoto, H. Kamitakahara, K. Takabe:  
Monoclonal antibody directed against 8-O-4'  
linked structure of lignin. The XIVth Cell Wall  
Meeting, Chania, Greece, 12-17 June, 2017.

9) 小川真由、幸田圭一、重富顕吾、坂本直哉、  
高部圭司、吉永 新、浦木康光: 樹木組織中  
での安定同位体標識モノリグノール類の移  
動 ~ 同位体顕微鏡による可視化 ~、第67  
回日本木材学会大会, 福岡, 2017年3月  
17-19日.

10) 小川真由、幸田圭一、浦木康光: 同位体  
顕微鏡を用いたモノリグノール結合セルロ  
ースフィルムの観察、第66回日本木材学会  
大会, 名古屋, 2016年3月27-29日.

11) 清都晋吾、吉永 新、高部圭司: 免疫標  
識と組織化学染色による、ミズメ木部におけ  
る木化および8-5型構造の形成過程の解析  
第66回日本木材学会大会, 名古屋, 2016年  
3月28日.

12) 星川慎一郎、吉永 新、高部圭司: モノ  
クローナル抗体を用いたリグニン中の  
8-0-4型構造の標識. 第66回日本木材学会

大会, 名古屋, 2016年3月28日.

13) 辻井珠奈、吉永 新、高部圭司: 広葉樹  
引張あて材木部のG層におけるペルオキシダ  
ーゼ活性の検出及び人為的木化, 第65回日  
本木材学会大会、東京, 2015年3月18日.

14) 星川慎一郎、吉永 新、高部圭司: 抗  
8-0-4型リグニンオリゴマーモノクローナ  
ル抗体によるミズナラ分化中木部の免疫標  
識, 第65回日本木材学会大会, 東京, 2015年  
3月18日.

15) Q. Li, Y. Tasaki, A. Yoshinaga, K. Takabe, K.  
Koda, Y. Uraki: Xylan as a scaffold for DHP  
deposition on cellulose, International Symposium  
on Wood Science and Technology 3WC-O08,  
Tokyo, Japan, Mar. 15-17, 2015.

16) Q. Li, Y. Tasaki, K. Koda, Y. Uraki:  
Dehydrogenative polymerization of coniferyl  
alcohol on the xylan-deposited honeycomb-  
patterned bacterial cellulose films. The 13th  
Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Seville,  
Spain, Jun. 24-27, 2014.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浦木 康光 (URAKI, Yasumitsu)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 90193961

### (2) 研究分担者

幸田 圭一 (KODA, Keiichi)  
北海道大学・大学院農学研究院・講師  
研究者番号: 80322840

玉井 裕 (TAMAI, Yutaka)  
北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号: 50281796

高部 圭司 (TAKABE, Keiji)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号: 70183449

吉永 新 (YOSHINAGA, Arata)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 60273489

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

重富 顕吾 (SHIGETOMI, Kengo)  
北海道大学・大学院農学研究院・講師  
研究者番号: 20547202