

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450239

研究課題名(和文) 樹木の葉へのリグニンの沈着機構

研究課題名(英文) Mechanism of lignin deposition into tree leaves

研究代表者

松井 直之 (Matsui, Naoyuki)

国立研究開発法人森林総合研究所・森林資源化学研究領域・主任研究員

研究者番号：80353853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物の主要構成成分の一つであるリグニンが樹木の葉にどのように沈着するか、またその組成と量に関して葉の組織によって、あるいは樹木の中での葉の位置によって違いがあるかを調べた。春の葉の伸長後、比較的早い時期に短期間でリグニンの沈着が完了すること、葉脈組織にグアイアシル構造の多いリグニンが存在すること、一方で葉脈以外の葉の組織にはシリングル構造の多いリグニンが存在していることが判明した。また、光を多く受ける樹頂部の葉は比較的グアイアシル構造が多いリグニンを含むなど、葉の樹体内での位置によってもリグニンの構造には違いがあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The process of lignin deposition in the course of leaf growth was investigated by DFRC analysis. The increase of lignin in leaves of *Fagus*, *Magnolia* and *Cercidiphyllum* was observed in a short period, from late April to mid May. The distribution of lignin in beech leaf was investigated in detail to find out the heterogeneity in lignin composition. Leaf vein separated from beech leaf contained lignin with low S/G ratio, and other blade tissue had apparently syringyl-rich lignin. The hypothesis that these syringyl lignin in leaf tissue has some defensive roles against light stress was denied by the results of increased S-lignin in leaves under weaker light condition.

研究分野：樹木化学

キーワード：葉 リグニン DFRC法 S/G比 光ストレス

1. 研究開始当初の背景

未利用バイオマスの中でも樹木の葉は莫大な資源量がありながら、これまで有効な利用法は極めて限られていた。しかしこれは、逆に葉には新たな活用法を見出す余地が非常に大きく残されているということもできる。そこで樹木の葉の基礎的な化学的性質を明らかにしようとする試みの中で、葉に含まれるリグニンの存在が常に問題となる。木材のリグニンと比較して、その機能、構造共に不明な点が数多く残されているからである。

我々はこれまでにリグニン由来の β -アリルエーテル結合を選択的に分解する DFRC (Derivatization Followed by Reductive Cleavage, 還元的開裂を伴った誘導体化) 法¹⁾(図1)を用いた葉の分解生成物の解析を行い、この手法が葉に対し有効な分析法であることを示すと同時に、葉のリグニンは針葉樹、広葉樹共に木部リグニンと共通した構造を有していること、その含有量は痕跡量から数%程度まで、樹種によって大きな違いがあること、顕微鏡観察では葉のリグニンは維管束組織に多く分布していたことから、通道組織の強化の役割を有している可能性があることなどを示してきた²⁾³⁾。

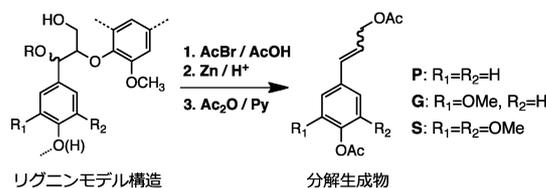


図1 DFRC法の概略

しかしながら、葉へのリグニンの沈着プロセスについてはまだ不明な点が多い。木質細胞壁の場合、リグニンの沈着は均質的に起こっているのではなく、空間的および時間的に多様性が大きいことが明らかにされている⁴⁾。葉においても、その成長に伴ってリグニンがどの段階で出現し、かつその分布の様子がどのように変化するかを経時的に詳細に検討した例はなく、これにより、葉へのリグニン沈着の時間的な遷移を明らかにすることができると考えられる。さらに、葉のリグニンの維管束組織への局在を立証するため、葉の組織を分画してその成分を精密に検証することも必要となる。

また、我々のこれまでに行った葉の横断面組織観察では、維管束組織とともに表皮に近い部分にもリグニン様物質の局在が見られた。リグニンには機械的強度の付与以外にも、環境ストレスに対抗するための役割もあることが指摘されており⁵⁾、このことから葉の表皮組織では光などの環境ストレスに対抗するための手段としてリグニン沈着が起きている可能性が示された。光条件が異なる葉のリグニン沈着に、量的および部位的にどのような差異が生じるかの検討によって葉のリグニンの対光ストレス的な存在意義が検証できる。

2. 研究の目的

本研究では樹木の葉のリグニンについて以下の3点について解明を行う。これにより、樹木の葉の中でのリグニン沈着における時期と場所を明確にとらえるとともに、その対光ストレス性機能を検証し、葉の中でリグニンが果たしている役割を解明する。

(1) 新芽が成長して葉となるまでのリグニン沈着の実態

新しい葉が新芽の段階から成長して成葉となるのに伴うリグニンの沈着過程を、様々な段階でサンプリングした葉を DFRC 法を用いて分析することにより、時間経過を追って明らかにする。

(2) 葉のリグニンの組織的な局在

葉の内部でのリグニンの分布をより明確に把握するため、葉の組織の化学的あるいは物理的な分画を行い、分画ごとの DFRC 分析を実施する。これにより、葉の組織でのリグニンの存在場所をより明確にする。

(3) 異なる環境条件にある葉のリグニンに生じる差異

同じ樹木個体上で光条件が異なる場所に存在する葉のリグニン量とその組成を比較することにより、光ストレスが葉のリグニン量に与える影響を解明する。

3. 研究の方法

本研究で用いる DFRC 法は、リグニン高分子中に特有かつ豊富に存在する結合形式である β -アリルエーテル結合のみを切断し、分解生成物を与える手法である。この手法はニトロベンゼン酸化分解法などの他の木材の分析方法とは異なり、リグニンのみから分解生成物を得ることができる。すなわち、リグニンに似た構造を有する他の成分の影響を除外した上で、純粋に葉に含まれるリグニン量だけを評価することができる利点をもつ。この特徴を活かし、以下の各問題点を解明するための実験を行った。

(1) 葉へのリグニン沈着の経時的変遷：4月から5月にかけての葉の伸長期に、森林総合研究所構内にてブナ、コブシ、カツラの葉を採取した。採取後直ちにヘキサンを用いて6時間のソックスレー抽出処理を行い、葉表面のワックス分を除去した。乾燥した試料を粉碎した後、さらにエタノール：ベンゼンの1:2 (v/v) 混合液で8時間のソックスレー抽出処理を行った。抽出済みの葉試料に対してDFRC処理¹⁾³⁾を行い、得られたDFRC分解生成物に対してGC、GC-MS分析を行った。

(2) 葉のリグニンの組織的局在：ブナの葉の葉脈組織の単離のため、a) 1N炭酸カリウム水溶液を用いた煮沸処理、b) カミソリ

刃を用いた主脈および側脈各組織の切り出し、の各処理を行い、それぞれ得られた葉脈と残りの葉組織（図2、図3）に対して(1)に述べた一連のDFRC処理によりリグニン分析を行った。

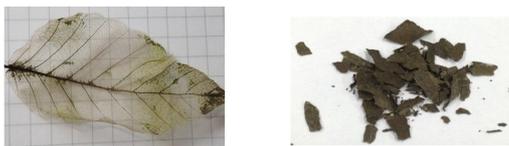


図2 プナ葉のアルカリ処理により得られた葉脈残渣（左）とアルカリで除去された葉組織（右）

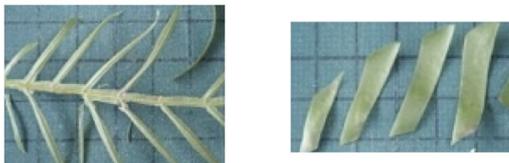


図3 プナ葉の解剖的分画で得られた葉脈組織（左）と葉脈以外の組織（右）

(3) 異なる光条件下の葉のリグニンの差異：7月から8月にかけて、イロハモミジとマテバシイの葉を、樹木の南向き頂部付近（樹頂）南向き下部外側および陽の当たりにくい内側の3ポイントからそれぞれ採取した（図4）。1つのポイントにつき複数個体より計数十枚の葉を得て、(1)に述べた一連の抽出およびDFRC処理によりリグニン分析を行った。

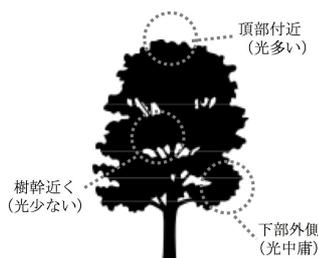


図4 光条件の異なる葉の採取

4. 研究成果

(1) カツラ葉、コブシ葉、ブナ葉の3樹種の葉の伸長期のリグニン量の変化を追うため、DFRC生成物量、すなわちリグニンの分解生成物量の推移をまとめた結果を表1(a)-(c)に示す。いずれの樹種においても4月末～5月上旬にかけて葉のリグニン分解生成物量の明瞭な増加が観察されたことから、この時期に葉へのリグニン沈着が集中的に生じていることが判明した。リグニン分解生成物の組成に着目すると、葉のリグニン含量の比較的小さいカツラとコブシでは、グアイアシル(G)型の生成物がほとんどであり、シリリングル(S)型の生成物が観察期間の後半に少量のみ観察された。一方、リグニン含量の多いブナではリグニン沈着のごく初期でのみグアイアシル型構造の割合が多かったが、この比率はすぐに逆転して、その後はシリリングル型の生

成物が多い傾向が続いた。この結果から、葉の通道組織（葉脈）の水分通道機能の確保のためには基本的に葉の伸長後、速やかにグアイアシル型のリグニンが沈着することが重要であると考えられる。ブナの葉に多く含まれるシリリングル型のリグニンは他の機能を担っていることが示唆される結果となった。

表1 葉の伸長期のリグニン分解物量の変化

(a) カツラ（リグニン量：小）			
日付	G型生成物	S型生成物	S/G比
4/24	0.06	0.00	0.00
4/30	0.25	0.00	0.00
5/7	0.37	0.00	0.00
5/14	0.39	0.00	0.00
5/22	0.54	0.04	0.08

(b) コブシ（リグニン量：中）			
日付	G型生成物	S型生成物	S/G比
4/24	0.81	0.04	0.05
4/30	0.78	0.00	0.00
5/7	3.96	0.42	0.11
5/14	6.40	0.93	0.14
5/22	7.42	1.43	0.19

(c) ブナ（リグニン量：大）			
日付	G型生成物	S型生成物	S/G比
4/24	2.95	0.19	0.06
4/30	9.71	13.50	1.39
5/7	11.03	18.54	1.68
5/14	10.89	14.35	1.32
5/22	8.98	13.56	1.51

(G: guaiacyl, S: syringyl. μg/mg dry leaf)

(2) 葉の維管束組織のリグニンの組成をより明確にするため、ブナの葉の葉脈部分の分画について、熱アルカリを用いた化学的分解法とカミソリ刃を用いた解剖的分離法の二手法を試み、得られた分画物（図2、図3）に対してDFRC分析を行った。結果を表2に示す。いずれの手法においても葉脈部分のS/G（シリリングル/グアイアシル）比が他と比べて明らかに低いことが判明し、太い葉脈組織のリグニンはグアイアシル型構造に富むことが示された。これは葉の通道組織の強化のためにグアイアシルリグニンが用いられているとする我々のこれまで推測の裏付けとなる結果である。逆に主要な葉脈以外の葉組織ではS/G比が高い結果が得られた。残りの葉組織の部分に存在する通道組織は網目状のごく細い葉脈のみであることから、ここに多く含まれるシリリングルリグニンは維管束の木化以外の、例えば環境ストレスへの対応等の何らかの役割を果たしているのではないかと推測された。

表2 葉脈を分画したブナ葉の DFRC 生成物の分布

		G 型 生成物	S 型 生成物	S/G 比
化学的 分画法	葉脈残渣	13.11	7.55	0.58
	アルカリ除去 葉組織	2.47	9.41	3.81
解剖的 分画法	葉脈組織	10.11	6.46	0.64
	葉脈以外の 組織	6.76	10.67	1.58

(G: guaiacyl, S: syringyl. $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry leaf)

(3) 葉のシリングリグニンの役割として光ストレスへの耐性への関与を仮定し、その検証のために光条件の異なる葉のリグニン組成の比較をカエデ、マテバシイの2樹種で試みた(表3)。いずれの樹種でも樹体の下部および内側の葉でのシリングリグニンの割合とリグニン分解生成物量がいずれも大きい結果となった。葉のシリングリグニンが光ストレスへの対抗手段として存在しているのであれば、受光量の多い樹頂付近の葉にシリングリグニンが多く含まれているはずであると予想されたが、実際は逆に、光ストレスが比較的小さい条件の葉に含まれるシリングリグニンの量が多い傾向が見出された。このことから葉のシリングリグニンは光ストレス耐性に貢献しているとは考えにくく、それ以外の別の役割を有していることが示唆される結果となった。

表3 異なる光条件の葉の DFRC 生成物の分布

樹種	葉の位置	G 型 生成物	S 型 生成物	S/G 比
カエデ	樹頂	1.48	0.09	0.06
	下部外側	1.84	0.08	0.04
	内側	3.46	0.35	0.10
マテバシイ	樹頂	3.45	1.25	0.36
	下部外側	4.51	2.29	0.51
	内側	3.62	1.95	0.54

(G: guaiacyl, S: syringyl. $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry leaf)

(4) 成果のまとめ

本研究では樹木の葉に含まれるリグニンについて、その時系列的な増加の進行、分布の組織特異性、樹体内の葉の位置による違いについて解明を行い、その役割についての考察を行った。その結果、グアイアシルリグニンについては葉の葉脈の水分通道機能の強化に用いられ、葉の伸長後比較的早い時期に沈着が起きていることが判明した。一方でシリングリグニンの役割として仮定した光ストレス対抗機能には否定的な結果が得られたが、樹体の中の葉の位置によって含まれるシリングリグニンの割合に違いがあることが明らかとなった。その違いにより、どのように異なる機能が発揮されるかにつ

いては今後のさらなる研究を要する。

樹木の葉はソフトバイオマス的一种とされており、将来的には化学的処理を経たマテリアル利用へと用途の発展が予想されることから、成長に伴う成分の変化をリグニンが沈着する過程と共に把握できたことは大きな意味があると考えられる。様々な樹木が作り出す葉それぞれについて、その資源的な価値を判断する上でこの研究の結果が基礎知見として役立つことが期待される。

<引用文献>

- 1) Lu and Ralph, *J.Agric.Food Chem.* **45**, 4655 (1997)
- 2) Matsui and Ohira, *Polyphenol Communications 2010*, 570 (2010)
- 3) Matsui and Ohira, *Plant Physiol. Biochem.* **72**, 112 (2013)
- 4) Terashima et al, "Forage cell wall structure and digestibility" (ASA) pp.247-270 (1993)
- 5) Boudet, *Plant Physiol.Biochem.* **38**, 81 (2000)

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)

[学会発表](計 4件)

(1) 松井直之、大平辰朗、広葉樹の葉リグニンの DFRC 法による検出(3)、第 61 回リグニン討論会、2016 年 10 月 27~28 日、京都大学宇治キャンパス(京都府宇治市)

(2) MATSUI Naoyuki, OHIRA Tatsuro, Detection of heterogeneity in lignin composition of leaf tissues by DFRC method, 28th International Conference on Polyphenols (28th ISWPC), 2016 年 7 月 11~15 日、ウィーン(オーストリア)

(3) 松井直之、大平辰朗、広葉樹の葉リグニンの DFRC 法による検出(2)、第 60 回リグニン討論会、2015 年 10 月 5~6 日、筑波大学(茨城県つくば市)

(4) MATSUI Naoyuki, OHIRA Tatsuro, Observation of deposition process of lignin in young tree leaves by DFRC method, International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS2015), 2015 年 3 月 16~17 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松井 直之 (MATSUI, Naoyuki)
国立研究開発法人森林総合研究所・
森林資源化学研究領域・主任研究員
研究者番号: 80353853