

リグニン芳香核構成を分析するためのアルカリニトロベンゼン酸化分解法の高速・高精度マイクロスケールプロトコール*

山村 正臣^{1,2}, 服部 武文^{1,5}, 鈴木 史朗¹, 梅澤 俊明^{1,3,4}

High throughput and accuracy microscale protocol of alkaline nitrobenzene oxidation method

Masaomi Yamamura^{1,2}, Takefumi Hattori^{1,5}, Shiro Suzuki¹, Toshiaki Umezawa^{1,3,4}

概要

リグニンの芳香核構成を分析する手法であるニトロベンゼン酸化分解法を改良し、微量多検体の分析を可能にするマイクロスケールプロトコールを開発した。

1. はじめに

リグニンは一般的に大きく3つのグループ、すなわちグアイアシル(G)リグニン、シリングル(S)リグニン、*p*-ヒドロキシフェニル(H)リグニンに分けられる。裸子植物(針葉樹)は主にGリグニン、被子植物(広葉樹)はGおよびSリグニン、イネ科植物はGおよびSリグニンそして少量のHリグニンで構成されている。S/G比は植物種によって異なり、高S/G比の植物はクラフトパルプ法においてより簡単に脱リグニン化される。したがって、リグニンの芳香族構成は、リグニンを特徴づけるために用いられる必要不可欠な基準の一つである。

これまでリグニンの芳香族構成の分析にはニトロベンゼン酸化分解法が広く用いられてきた。近年、リグニン生合成の代謝工学が活発に研究されている。これらの研究ではそれぞれの遺伝子の発現制御実験において、最低でも20ラインの組換え体の分析が必要であるなど、多検体のハイスループット分析が必須となっている。しかし、従来のニトロベンゼン酸化分解法は、技術員の勤務時間(9:00~17:00)内で消化できる検体数が4~6検体と非常にスループットが低く、また、比較的多くのサンプル量が必要であるため、少量しか得られない組換え植物サンプルに従来法を用いることは困難である。

そこで、遺伝子組換え植物のような微量多検体の分析を可能にするために、反応および後処理の工程をマイクロスケール化した¹⁾。これにより、スループットが従来の約10倍まで上昇し、さらに重水素標識化合物を内標として用いることにより高精度の定量が可能となった。また、本マイクロスケール・ニトロベンゼン酸化分解法は、試薬の節約、廃液の減少、ディスポーザブルチューブおよびチップの使用による洗いや物の減少などの利点も有している。本稿では、前報¹⁾で記載しきれなかった詳細なプロトコールを資料として公表する。

* 2013年8月29日受理

¹〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所 森林代謝機能化学研究室分野

²E-mail: zenstyle@rish.kyoto-u.ac.jp

³E-mail: tomezawa@rish.kyoto-u.ac.jp

⁴京都大学生存基盤科学研究ユニット

⁵現住所: 徳島大学大学院 ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部

2. 実験方法

2.1 試料調製

1. 乾燥試料^aを5×5 mm程度に細断する。
2. 粉碎作業直前に1時間ほど真空ポンプで乾燥させる。
3. TissueLyser(Qiagen)専用粉碎容器に試料(0.6 g)とステンレススチール製粉碎ボールを入れ、25Hzで1.5分間(2回、計3分間)粉碎する。
4. 得られた粉末試料をメタノール(60°C、5分×20回)、ヘキサン(室温、5回)、水(60°C、5分×5回)の順に抽出し、抽出後の残渣をそのまま凍結乾燥する。
5. 得られた粉末試料を細胞壁残渣(CWR, Cell Wall Residue)とし、マイクロスケール・ニトロベンゼン酸化分解法に供する。

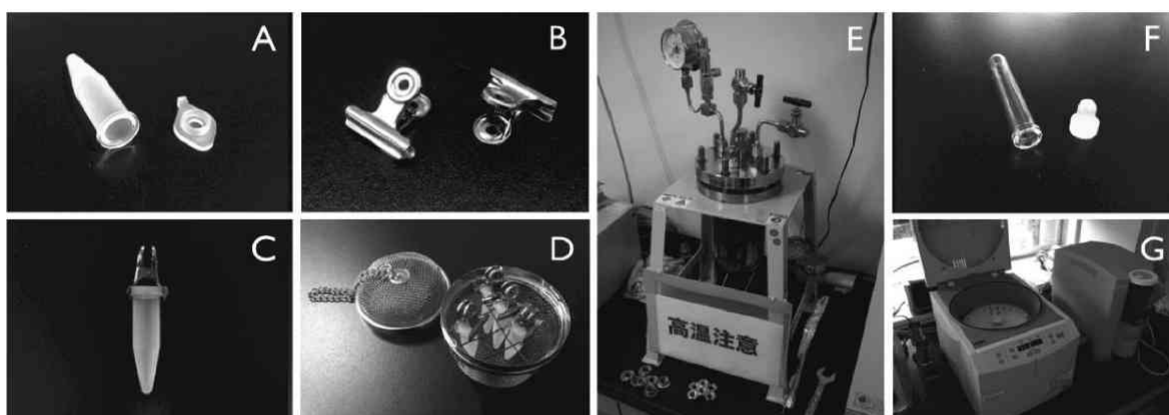


図1：マイクロスケールプロトコールで用いる器具および装置

(A) 1.5ml テフロン製遠心チューブ, (B) 目玉クリップ, (C) 反応容器の蓋の閉じ方, (D) 反応容器の置き方, (E) オートクレーブ, (F) 1ml ガラス製マイクロチューブ, (G) 濃縮遠心機

2.2 ミクロスケール・ニトロベンゼン酸化分解法

(下記の工程 3-5, 9-20 はドラフトチャンバー内で作業する。手袋着用。)

1. 実験前にCWRを1時間ほど真空ポンプでよく乾燥させる。
2. 2N NaOH (250 μ L)が入った1.5 ml テフロン製遠心チューブ(Flonchemical Co.; 1.5 mL PFAサンプリングカップ; 図1-A)にCWR (5-10 mg)を入れる。
3. さらに2N NaOH (250 μ L) とニトロベンゼン (30 μ L) を添加し、蓋を押さえながらよくボルテックスする。
4. チューブの蓋が開かないように、目玉クリップ (Cat. No. クリ-17B, KOKUYO Co., Ltd.; 図1-B) で挟む(図1-C)。
5. このチューブを網カゴにセットする(図1-D)。
6. オートクレーブ (Metal Reactor TEM-D1000M, Taiatsu Techno Co., Ltd.; 図1-E) 内にビーカーを一つ入れ、水を一定量^b入れる(図2)。
7. オートクレーブ内のビーカーの上に網カゴを置いた後(図2)、オートクレーブを密閉し、加熱および加圧する(170°C, 0.7-0.8 MPa, 1時間)。

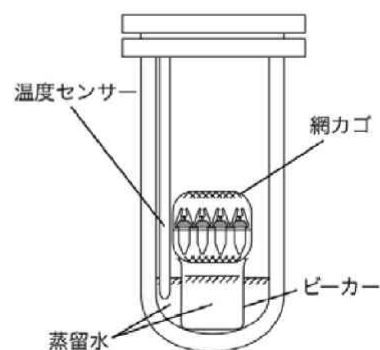


図2：オートクレーブ内の様子

8. オートクレーブの電源をオフにした後、装置内の温度が 80°C 以下、且つ常圧になるまで自然冷却させる。
9. オートクレーブから反応容器を取り出し、氷上で5分冷却した後、卓上遠心機でスピンドウンする。
10. 内部標準の混合液を 10 μL (4 μL [OC^2H_3]Vanillin, 4 μL [$\text{OC}^2\text{H}_3 \times 2$]Syringaldehyde, 2 μL [ring- $^{13}\text{C}_6$] *p*-Hydroxybenzaldehyde, 各10 mg/mL)^{c, d}を反応液に添加し、10 秒間ボルテックスし、卓上遠心機でスピンドウンする。
11. 上清(250 μL)を 1.5 ml ポリプロピレン製(PP)チューブに移す。
12. 酢酸エチル(200 μL)を加え、10 秒間ボルテックスする。
13. 卓上遠心機を用いて有機層(上澄み)と水層に分離し、有機層は捨てる。
14. 工程 12~13 をさらに 3 回繰り返す。
15. 水層のみを新しい PP チューブに移し、6N HCl で慎重に pH 2~3 に合わせる。
16. 酢酸エチル(200 μL)を加え、10 秒間ボルテックスする。
17. 卓上遠心機を用いて有機層と水層に分離し、有機層を新しいPPチューブに回収する。
18. 工程 16~17 をさらに 2 回繰り返す。
19. 適量の固体の Na_2SO_4 を加え、10 秒間ボルテックスし、次いで卓上遠心機でスピンドウンする。
20. 有機層の一部(5~20 μL)を 1 mL ガラスマイクロチューブ(図1-F)に移す。
21. 遠心濃縮器^e(図1-G)を用いて溶媒を減圧溜去する。
22. さらに 1 時間、真空ポンプで乾固する。^f
23. GC-MS 分析に供する。

2.3 分析方法

1. *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamide (8 μL)を加え、TMS 化する(60°C、45 min)。
2. 卓上遠心機でスピンドウンする。
3. TMS化産物(0.8 μL)^gを GC-MS にインジェクションする。

2.4 分析装置および条件

ガスクロマトグラフィーカラムは Shimadzu Hicap CBP10-M25-025 (内径 0.22 mm \times 長さ 20 m \times 膜厚 0.25 μm)を用い、インジェクションポートの温度は 240°C、インターフェースの温度は 250°C に設定する。分析時のカラムの昇温条件は、0~2 min までは 40°C で維持し、その後毎分 40°C で 230°C まで昇温させ、以降は 230°C の温度を 5 min 維持し続ける。キャリアガスはヘリウムを用い、スプリットレスインジェクションで行なう。キャリアガスのカラム入り口圧は 35 kPa、カラム流量は 0.7 mL/min、線速度は 38 cm/秒、全流量は 50 mL/minに設定している。

2.5 後片付け

有機廃液は決められた規則に従って処理する。テフロンチューブは三時間以上洗剤に浸けてから洗う。当研究室ではテフロンチューブを最大で三回は繰り返し使用するが、チューブの変形など劣化がひどい場合は早めに処分することもある。ディスプレイのチップ及びチューブはチャック付きビニール袋にまとめて捨てる。

2.6 備考

^a 前報¹⁾ではアカシアを分析試料として用いたが、本プロトコールを用いてシロイヌナズナ、シロイヌナズナ T87 培養細胞、エリアンサス、ミスカンサス、スイッチグラス、ヤトロファ、ミナトカモジグサ等の植物種についてもこれまでに分析を行っている。

- ^b 温度センサーの先が蒸留水に浸かるように水面の高さを調節する。
- ^c 標識体化合物は非常に貴重であるため、植物試料のリグニンの特性によって混合すべき標識体化合物の種類、また添加量についても適宜検討が必要である。
- ^d 内部標準として 5-ヨードバニリンを用いることも可能であるが、標識体化合物を内部標準として用いた場合と比較すると精度が劣る。また、5-ヨードバニリンを用いる際は、後処理の過程で PP チューブの代わりにガラス製マイクロチューブを使用する。
- ^e 遠心濃縮機がない場合は、ダイアフラムポンプ等で代替する。
- ^f 後日分析する場合は、窒素置換し、シリカゲルを入れたチャック付き袋に入れた状態で冷凍 (-20°C) 保存する。
- ^g 使用している分析機器の性能及びコンディションによって異なるため適宜検討が必要である。

引用文献

- 1) Yamamura, M., Hattori, T., Suzuki, S., Shibata, D., Umezawa, T., Microscale alkaline nitrobenzene oxidation method for high-throughput determination of lignin aromatic components. *Plant Biotechnol* 27, 305-310, 2010.