

チオグリコール酸リグニン法によるリグニンの迅速定量*

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

High-throughput determination of thioglycolic acid lignin

Shiro Suzuki^{1,2}, Keiko Tsuchida¹, Masaomi Yamamura¹,
Takefumi Hattori^{1,5} and Toshiaki Umezawa^{1,3,4}

概要

リグニン定量法の一つであるチオグリコール酸リグニン法を改良して、微量多検体の迅速分析を可能とするプロトコルを開発した。

1. はじめに

植物二次細胞壁の主要成分の一つであるリグニンは、細胞壁多糖同士の隙間を埋めるように蓄積しており、細胞壁に物理的強度や疎水性を付与している。しかしながら、これらのリグニンの特性は、パルプ化、飼料の消化、バイオ燃料生産における酵素糖化などに対しては阻害的に働く。そこで、これらの阻害効果を軽減するため、代謝工学により、リグニンの量や構造を改変する研究が進められている。現行の遺伝子組換え技術の技術的制約により、得られた遺伝子組換え植物におけるリグニン改変の程度は、系統ごとにばらつきがあるため、目標とするリグニン改変植物を得るためには、多数の遺伝子組換え体を作成し、リグニンの量や構造に基づいてスクリーニングする必要がある。しかし、従来のリグニン分析法では、一回の実験で処理できるサンプル数が非常に少ないことから、多検体を迅速簡便に分析できる手法の確立が必須であった。そこで、我々は、リグニン定量法の一つであるチオグリコール酸リグニン法を改良して、微量多検体の迅速分析を可能とするプロトコルを開発した¹⁾。一連の実験操作では、ピペットマンとディスポーザブルのポリプロピレンチューブを用い、マイクロプレートリーダーを用いた吸光度測定により、従来の定量法が簡便・迅速化された。

2. 実験方法

2.1 試料粉碎

1. 植物試料^aを自然乾燥もしくは凍結乾燥する。
2. 乾燥試料を5×5 mm程度にはさみで細断する。
3. TissueLyser (キアゲン製) 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、25 Hz、1.5分間 (2回、計3分) 粉碎する。
4. あらかじめ風袋を秤量した2.0 mLのループ付スクリュウキャップマイクロチューブ (ザルスタット製、Cat No. 72.693.100) に得られた粉末試料を20 mg (±0.5 mg) 秤り取り、乾燥剤入りデシ

* 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 森林代謝機能化学分野

² E-mail: shiro-s@rishi.kyoto-u.ac.jp

³ E-mail: tumezawa@rishi.kyoto-u.ac.jp

⁴ 京都大学生存基盤科学研究ユニット

⁵ 現所属：徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部

ケーターに入れる。真空ポンプで1時間デシケーターの内部を吸引し、リーク後20分程度において秤量し、チューブの風袋を差し引き、乾燥細胞壁(DCW, Dried Cell Wall)の重量とする。

2.2 夾雑物除去（工程 4, 7 はドラフトチャンバー内で実施する）

1. 試料入りマイクロチューブに蒸留水 1.8 mL を添加し、10 秒間ボルテックスする。
2. 小型遠心機を使って、室温、16,100 g、10 分間遠心する。
3. 上澄みはピペットマンで吸って廃棄する。
4. 100%特級メタノール 1.8 mL を入れる。
5. 60℃のアルミブロックで 20 分インキュベートする。途中 2 回ほどボルテックスを行う。
6. 小型遠心機を使って、室温、16,000 g、10 分間遠心する。
7. 上澄みはピペットマンで吸って廃棄する。
8. 4～7 の操作をさらに 1 回以上繰り返す（抽出液が着色しなくなるまで）。
9. チューブのふたをゆるめて、デシケーターにチューブを入れる。

ダイアフラムポンプで 30 分、真空ポンプで 1 時間乾燥する。リーク後 20 分程度において秤量し、チューブの風袋を差し引き、細胞壁残渣(CWR, Cell Wall Residue)の重量とする。

2.3 チオグリコール酸リグニン調製（全工程をドラフトチャンバー内で実施し、手袋を着用する）

1. アルミブロックを 80℃にセットする。
2. 試料入りマイクロチューブに 3M 塩酸を 1 mL 添加する。
3. 試料入りマイクロチューブに特級メルカプト酢酸（ナカライテスク）を 100 μ L 添加する。
4. しっかり蓋を閉め、軽くボルテックスする。
5. アルミブロックにセットし、80℃、3 時間インキュベートする。インキュベートの途中で 2 回軽くボルテックスする。
6. インキュベート後、チューブを氷中に移し、5 分静置する。
7. 小型遠心機を使って、室温、16,000 g、10 分間遠心する。
8. 上澄みをピペットマンで吸って廃棄する。
9. 沈殿に 1 mL の蒸留水を添加する。
10. 30 秒間ボルテックスする。
11. 小型遠心機を使って、室温、16,000 g、10 分間遠心する。
12. 上澄みをピペットマンで吸って廃棄する。
13. 9～12 の操作をさらに 1 回繰り返す。
14. 生じた沈殿に 1 mL の 1N NaOH を添加する。
15. 蓋をしっかり締め、チューブを横にし、室温、16 時間、80rpm で緩やかに往復振とうする。
16. 小型遠心機を使って、室温、16,000 g、10 分間遠心する。
17. 上澄み全量を新しい 1.5 mL チューブに移す。
18. 200 μ L の濃塩酸を添加する。
19. 蓋をしっかり締め、5 秒間ボルテックスする。
20. 4℃、4 時間静置する。
21. 小型遠心機を使って、室温、16,000 g、10 分間遠心する。
22. 上澄みを廃棄する。
23. 沈殿に 1 mL の蒸留水を添加する。
24. 30 秒間ボルテックスする。
25. 小型遠心機を使って、室温、16,000 g、10 分間遠心する。
26. 上澄みを廃棄する。

2.4 プレートリーダーによる定量

1. 1 mL の 1N NaOH を試料入りチューブに添加して溶解させる。
2. 新しい 1.5 mL チューブに 980 μ L の 1N NaOH を分注し、20 μ L の試料溶液を加えて混合する^b。
3. UV 領域が測定可能な 96 穴プレート^cに、2. で得られた希釈試料 200 μ L を添加する。また、ブラック用ウェルには、1N NaOH を 200 μ L を添加する。
4. 280 nm の吸光度を測定する。ウェル中の希薄チオグリコール酸リグニン溶液の濃度は、次の計算式で求める^d。

$$\text{ウェル内溶液のリグニン濃度 (mg/L)} = 233.42 \times A_{280}$$

5. 希釈試料の濃度から、希釈前試料の濃度を求め（希釈倍率を乗ずる）、1 チューブに含まれているリグニン量を求める。この値をDCWまたはCWRの重量で割ってリグニン含量を求める。

2.5 備考

^a これまで分析された植物種として、イネ^{1,3,4)}、ポプラ、エリアンサス⁵⁾、ミスカンサス、アカシア・マンギウム、ヤトロファ⁶⁾、スイッチグラス、シロイヌナズナ等がある。

^b 吸光度が低い場合 ($A_{280} < 0.1$)、希釈倍率を適宜変更する。

^c UV-Star 96 well plate (グライナー社) など。

^d マイクロプレートではなく、分光光度計用10mmセルを用いて測定する場合の計算式は、以下のとおりである。

$$\text{セル内溶液のリグニン濃度 (mg/L)} = 127.12 \times A_{280}$$

3. まとめ

本方法によって求めたイネの各部位のリグニン含量の値¹⁾は、クラークソン法で求めたリグニン含量の値²⁾よりもやや小さな値を示した。この理由として、イネの植物体に一割程度含まれるシリカによって、クラークソン法ではリグニン量が多く見積もられるためと考えられる。本法は、イネ変異体³⁾、多種類の形質転換イネ⁴⁾ほか、エリアンサス⁵⁾やヤトロファ⁶⁾などの様々な植物試料に適用例があることから、植物試料一般に広く適用可能であると考えられる。

参考文献

- 1) Suzuki, S., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Hattori, T., Sakamoto, M., Umezawa, T., High-throughput determination of thioglycolic acid lignin from rice, *Plant Biotechnol*, **26**, 337-340, 2009.
- 2) Zhang, K., Qian, Q., Huang, Z., Wang, Y., Li, M., Hong, L., Zeng, D., Gu, M., Chu, C., Cheng, Z., GOLD HULL AND INTERNODE2 Encodes a Primarily Multifunctional Cinnamoyl-Alcohol Dehydrogenase in Rice, *Plant Physiol.*, **140**, 972-983, 2006.
- 3) Suzuki, S., Ma, J. F., Yamamoto, N., Hattori, T., Sakamoto, M., Umezawa, T., Silicon deficiency promotes lignin accumulation in rice, *Plant Biotechnol*, **29**, 391-394, 2012.
- 4) Hattori, T., Murakami, S., Mukai, M., Yamada, T., Hirochika, H., Ike, M., Tokuyasu, K., Suzuki, S., Sakamoto, M., Umezawa, T., Rapid analysis of transgenic rice straw using near-infrared spectroscopy, *Plant Biotechnol*, **29**, 359-366, 2012.
- 5) Yamamura, M., Noda, S., Hattori, T., Shino, A., Kikuchi, J., Takabe, K., Tagane, S., Gau, M., Uwatoko, N., Mii, M., Suzuki, S., Shibata, D., Umezawa, T., Characterization of lignocellulose of *Erianthus arundinaceus* in relation to enzymatic saccharification efficiency, *Plant Biotechnol*, **30**, 25-35, 2013.
- 6) Yamamura, M., Akashi, K., Yokota, A., Hattori, T., Suzuki, S., Shibata, D., Umezawa, T., Characterization of *Jatropha curcas* lignins, *Plant Biotechnol*, **29**, 179-183, 2012.