

木材細胞壁成分同士はどのように接着しているのか？

ー リグニン-多糖複合体の構造解析 ー

安藤 大将^{1*}

What are the bonding structures between cell wall components?

- Analysis of Lignin-Carbohydrate Complex (LCC) bonding sites -

Daisuke Ando^{1*}

概要

化石燃料への過度な依存が地球環境面に深刻な影響を及ぼしており、国連では持続可能な開発目標である SDGs が採択され、持続可能な社会の構築は直近の世界の課題となっている。そのため、近年、非可食性バイオマスの有効利用が着目され、研究が盛んである。なかでも、木質バイオマスは地球上最大の物質量を誇るため、未使用バイオマスをいかに利用していくかが今後の課題である。多量の物質量を誇っている木質バイオマスの主成分はセルロース、ヘミセルロースを主とした多糖類と芳香族高分子であるリグニンからなる。そのため、バイオマスは3種類の高分子のコンポジットであるといえる。その複雑さゆえ、化学構造に立脚した利用戦略はまだ展開の余地がある。その上で、成分間はどうなっているのかを知ることは木材の性質の解明やバイオマスの利用において重要な知見となりうる。本総説では、木材細胞壁成分のなかでも複雑な成分であるリグニンに着目し、細胞壁中の他成分とどのような結合様式で結合しているのかに焦点をあて、近年、よく用いられている NMR(Nuclear Magnetic Resonance)法を用いた木材細胞壁成分の構造解析研究を紹介する。また、それに関して筆者が関わってきた研究についても紹介する。

1. はじめに

木質バイオマスは主に細胞壁成分からなり、その主成分としてセルロース、ヘミセルロース、リグニンが挙げられる。植物細胞壁はよく鉄筋コンクリートに例えられ、セルロースは鉄筋、ヘミセルロースおよびリグニンはコンクリートのように説明される。セルロースは繊維という形態をとり、ヘミセルロースとリグニンがそれらの間隙を充填するように存在しており、未だ各成分を完全に分離することはできない。このとき、"細胞壁成分はどのように接着されているか？"という疑問が浮かぶ。分子同士の絡み合い、物理的結合など様々な要因が考えられるが、その一つの要因に細胞壁成分間の共有結合の存在が挙げられる。これらはリグニン多糖複合体 LCC (Lignin-Carbohydrate Complex) 中に存在する LC 結合(Lignin-Carbohydrate linkage)と呼ばれている。この LC 結合は木材中での存在量が少ないにも関わらず、木材の物性や化学反応性に大きな影響を与えられているため、以前から研究が行われてきた。

2020 年 9 月 4 日受理.

¹〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所 生存圏学際萌芽センター.

* E-mail: andodaisuke@rishi.kyoto-u.ac.jp

本総説では、近年バイオマス（特にリグニン）の化学構造解析によく用いられている Kim および Ralph らが開発した木材への NMR 適用法¹⁾を簡単に解説するとともに、2 次元 NMR 法を用いた LC 結合に関する研究をいくつか紹介する。

2. 木材細胞壁中の成分間の結合様式

2.1 NMR を用いた木材の構造解析手法

2.1.1 木材細胞壁の NMR 分析の困難さ

これまで、様々な手法を用いて木材成分の化学構造解析研究は行われてきた。なかでも、NMR 法は有機化学分野での構造決定に一般的に利用される手法であり、木材成分に対しても利用されてきた。たとえば、磨砕リグニン（Milled Wood Lignin: MWL）など、溶媒溶解性を有する試料が測定されてきた。木材細胞壁試料は複雑な高分子複合体であり、1 次元のスペクトルではオーバーラップによるピーク分離が困難であるため、詳細な情報を得ることは難しかった。そこで、近年では、2 次元 HSQC(Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy) NMR での構造解析が盛んになっている。一方で、木材細胞壁試料は不溶性であるため、液体 NMR ではほぼスペクトルは得られず、木材中の各成分の構造情報を得ることはできなかった。

2.1.2 木材細胞壁のための gel state NMR 法

それらの問題を解消したのが、Kim と Ralph らが開発した gel state NMR 法である。この手法では木材細胞壁成分のためのサンプル調製法が鍵となっている。

サンプル調製法を次に示す。アルベン抽出後、ウィーレーミルで調製した脱脂木粉を遊星型ボールミルで粉砕し、ボールミル処理木粉を得る。これを 50 mg 程度、NMR の測定用サンプルチューブに入れ、NMR 測定用混合溶媒である DMSO-*d*₆/Pyridine-*d*₅ (v/v, 4/1) を 0.6 ml 加えて、ソニケーターを用いて膨潤させる。得られたサンプルチューブを HSQC NMR 測定に供する。そして、Kim 博士、Ralph 教授らによるデータベース¹⁾²⁾³⁾に基づいて、帰属することができる。その方法に従い、筆者が得たスペクトルと検出された成分を図 1 に示す。NMR 測定機器（500MHz 以上のクライオプローブ付きが望ましい。それ以下でも時間をかければ測定できる場合がある。）であれば、

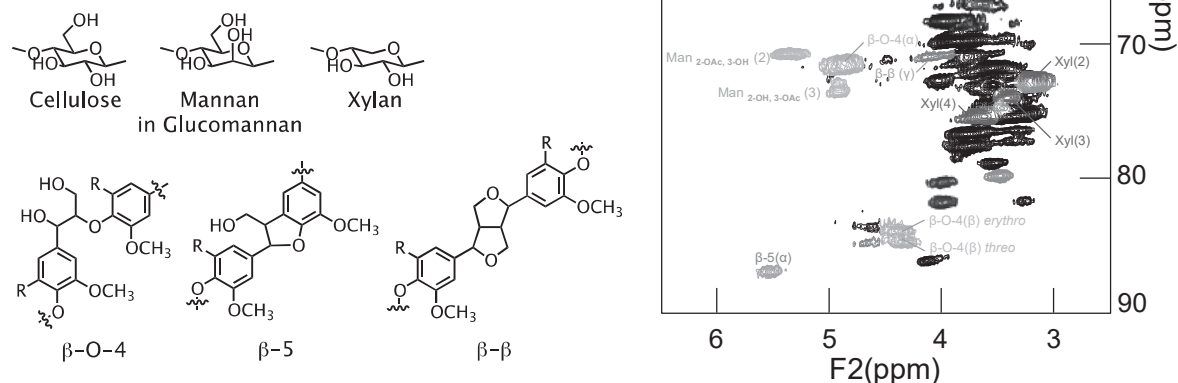


図 1：(左) スペクトル中に検出される細胞壁成分の主な化学構造 (右) HSQC スペクトル (スギ)

定性分析の場合は通常の HSQC NMR 測定パラメータを用いればよく、パラメータの詳細は Kim らの文献⁴⁾に記載されており、それほど特別なものではない。この手法により様々なリグニンおよびリグニンを含む細胞壁成分の化学構造が示され、遺伝子組換え植物の研究分野のみならずさまざまな分野で盛んに利用されている。

2.1.3 2 次元 NMR の良さ

ここで、HSQC NMR で検出しているシグナルは"C-H の結合"である。この利点であるが、まず、図 1 (上部) に示すように ^1H 軸 (F2 軸) だけ、すなわち一次元の ^1H -NMR スペクトルだけ見た時、3~5 ppm の領域に存在するピークは検出されるが、ピークはほとんど分離されず、ブロードなものとなる。これだけでは、重要な情報は得られない。しかし、 ^{13}C 軸 (F1 軸) を加え、展開することで、F1 軸方向にピークが分離され、図 1 (下部) に示すようなスペクトルが得られ、木材成分の構造情報を得ることができる。このような成分の化学構造情報を抽出された木材成分からだけではなく、木材からも得ることが大きな進歩であり、これらの情報は細胞壁成分の謎の解明や、バイオマスの利用に役立つことが期待される。具体的には、完全な成分分離技術の開発などである。

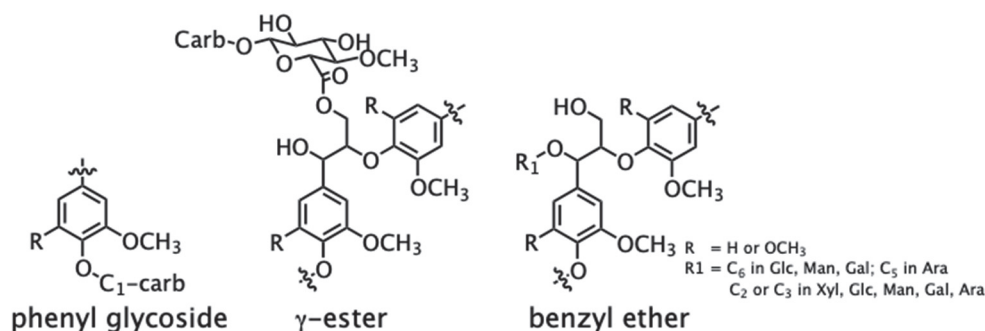


図 2：主なリグニン多糖複合体：フェニルグリコシド型、 γ エステル型、ベンジルエーテル型（左から）

2.2 リグニンと多糖類との成分間の結合

Erdman⁵⁾がその存在を提唱して以来、細胞壁におけるリグニン-多糖間の共有結合、すなわち LC 結合について、多くの研究が行われてきた。バイオマス成分を分離するための様々な分画法の研究^{6) 7)}からはじまり、開発された様々な分解法から得られた分解物のフラグメント解析^{8)~11)}に至り、近年では NMR 法を用いた構造解析^{12)~16)}へと展開されている。これらの研究の結果、リグニンと多糖類、特にヘミセルロースとの結合の可能性が示唆されてきた。リグニンの主要構造である $\beta\text{-O-4}$ 構造に着目すると、結合できる箇所が 3 つ：フェノール性ヒドロキシ基、 γ 位（一級）ヒドロキシ基、 α 位（二級）ヒドロキシ基、であり、そのそれぞれに特徴的な結合が存在する。現在、LC 結合構造として、フェニルグリコシド型、エステル型、ベンジルエーテル型が存在すると考えられている（図 2）。以下、ここでは分解法を伴う解析を"破壊的アプローチ"、NMR 法を用いた解析を"非破壊的アプローチ"とする。破壊的アプローチ、非破壊的アプローチを一部紹介し、最後に筆者らが以前関わったハイブリットなアプローチについて紹介する。

2.2.1 破壊的(分解法などを用いた)アプローチ

破壊的アプローチとは、試料をアルカリ加水分解、酸加水分解、酵素処理などの方法で分解し、得られた分解物を解析することで、LC 結合構造を推定するものである。このアプローチには、色々な試料に適用できるという利点があるが、厳しい反応条件下では分析対象とする LC 結合が完全にもし

くは部分的に開裂してしまうという欠点がある。また、得られたデータは間接的である。その中でも、Watanabe らによる DDQ(2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone)酸化反応を用いた LC 解析¹⁷⁾では、非常に詳細なデータが報告されている。ベンジルエーテル型とエステル型に対して、それぞれに合わせた分解および解析法を開発した。

ベンジルエーテル型の分析では、試料のアセチル化後、続く DDQ 酸化により、LC 結合を開裂したのち、メチル化する。これにより、多糖におけるリグニンとの結合位置がメチル基によりタグづけされる。その後、加水分解による多糖分解物の解析を行うことで、リグニンと結合している多糖類に関する知見を得た。その結果、アセチルグルコマンナンの一級ヒドロキシ基もしくはアラビノグルクロノキシランの二級ヒドロキシ基(2位もしくは3位)がリグニンと結合していることを報告している。また、エステル型の分析では、ジアゾメタンメチル化後の DDQ 酸化により結合を開裂する。その後、グルクロン酸残基に存在するカルボン酸を分解物から検出することで結合の存在を明らかにした。それにより、 α 位もしくは γ 位にエステル結合が存在することを結論づけている。¹⁷⁾

2.2.2 非破壊的(NMR 法を用いた)アプローチ

非破壊的アプローチとは試料を物理的破壊以外の処理を伴わず、そのまま分析し、解析することで、LC 結合構造を推定するものである。利点として、分解反応などを伴わないため、天然に存在するままの LC 結合の化学構造を見ることができる。一方で、欠点としては LC 結合の含有量が少ないため、多段階の抽出操作を行うなどの試料調製が必要である。

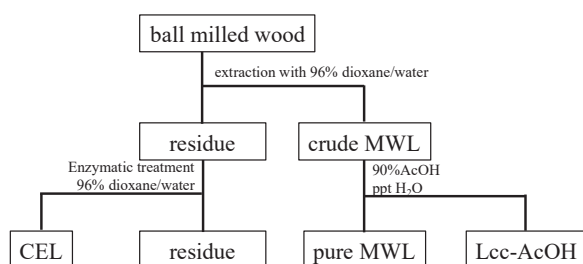


図3：分画法

しかし、一度測定して得られた 2 次元 HSQC NMR スペクトル上では、これらの構造由来の一部のシグナルは特異な位置に現れる。フェニルグリコシド型では結合している多糖の 1 位の CH のシグナルが、エステル型では結合している γ 位の CH のシグナルが、ベンジルエーテル型では α 位の CH のシグナルが、通常とは異なる領域に検出される。2 次元 NMR での解析例については Balakshin らによる研究が広く知ら

れている^{12) 13)}。抽出リグニンである crude MWL から抽出した糖含有画分を試料として、分析を行っている。このように LC 結合の含有量が少ないため、分析するための試料調製は必須である。試料の分画法を図3に示す。ボールミル木粉から、96%ジオキサン・水混合溶液で crude MWL を抽出し、その後の精製により pure MWL を得て、別途 LCC-AcOH を得た。また、一方で抽出残渣に対し、酵素処理を施すことで、Cellulose Enzymatic Lignin (CEL) という試料を得た。この 4 種の試料 (crude MWL, pure MWL, LCC-AcOH, CEL) を分析に供している。MWL はリグニンリッチな、LCC-AcOH と CEL は多糖リッチな試料である。

実際にこれらの HMQC NMR 分析を行い、フェニルグリコシル型の糖の一位のシグナルが 101.4~102.6 ppm / 4.94~5.17 ppm の領域に、 γ エステル型のリグニンの γ 位のシグナルが 62~65 ppm / 4.00~4.50 ppm の領域に、ベンジルエーテル型のリグニンの α 位のシグナルが 80.0~82.5 ppm / 4.3~4.7 ppm の領域に各々存在することを示した。スペクトルは著作権の関係上載せることはできないので論文¹²⁾を参照していただきたい。その結果、フェニルグリコシド型はリグニンのフェノール性ヒドロキシ基に多糖の 1 位が、 γ エステル型はリグニンの γ 位にグルクロン酸基の 6 位カルボン酸が、ベンジルエーテル型はリグニンの α 位には多糖の 6 位の一級ヒドロキシ基もしくは 2,3 位の二級ヒドロキシ基が、結合していることを報告している。

さらに、定量¹³CNMR と HSQC NMR の組み合わせ、定量測定をおこなっている。その結果によると試料に依存するものの、針葉樹である Pine ではベンジルエーテル型が 2.3~5.8 (100 芳香核単位あたり)、フェニルグリコシド型が 0~7.2、 γ エステル型が 1.8~4.9、広葉樹である Birch ではベンジル

エーテル型が 0.7~2.5 (100 芳香核単位あたり)、フェニルグリコシド型が 0~7.2、 γ エステル型が 1.8~4.9 存在していることが明らかになった。すなわち、針葉樹ではベンジルエーテル型やフェニルグリコシド型の含有量が高く、一方で広葉樹では γ エステル型の含有量が高い傾向があった。また、溶媒抽出で調製する LCC-AcOH や MWL はフェニルグリコシド型や γ エステル型の LCC を、抽出残渣から調製する CEL はベンジルエーテル型の LCC をそれぞれ多く含むことも示唆された。さらに、最近 Nishimura ら¹⁴⁾は HSQC-NMR 測定だけでなく、HMBC-NMR 測定、HSQC-TOCSY-NMR 測定を用いて、C-H の結合だけでなく、それに隣接する H のつながりを追跡した。ベンジルエーテル型 LC 結合に焦点を絞り、アカマツの MWL 抽出残渣からの水抽出物を精製した LCC 試料を用いている。リグニン部分に関してはグルコマンナンの 6 位におけるリグニン α 位との相関、そしてその α 位における γ 位との相関により、リグニン部分を β -O-4 構造と確定し、糖部分は 6 位における 5 位との相関、そして、4 位における 3 位および 1 位との相関からグルコマンナンのマンノース残基であることを確定している。結果として、リグニンの β -O-4 構造の α 位とグルコマンナンのマンノース残基の 6 位の 1 級ヒドロキシ基が結合していることを報告した。また、Miyagawa ら¹⁵⁾¹⁶⁾はフェニルグリコシド型モデル化合物を合成し、NMR 解析のためのデータベースを構築した。グルコース、ガラクトース、キシロース、マンノースの 1 級ヒドロキシ基で各種モノリグノールもしくはその類似体とフェニルグリコシド結合させた 12 種のフェニルグリコシド型モデル化合物を合成しており、糖残基の 1 位の C-H シグナルをまとめたデータベースを報告した。そして、マツ、ユーカリ、アカシア、ポプラ、タケ由来の LCC-AcOH の HSQC-NMR スペクトルにおいて、G 核とのフェニルグリコシド結合に一致するピークがみられ、また、アカシア、タケについては S 核とのフェニルグリコシド結合由来のピークがみられた。それにより、フェニルグリコシド結合の存在を示し、関わっているリグニンの芳香核情報を得たことは重要である。

さらに、このグルコースとのモノリグノールフェニルグリコシドモデル化合物とコニフェリルアルコールを用いた、ペルオキシダーゼおよび β -グルコシダーゼを含むバイオメティックな環境下での脱水素重合により得た DHP 中でもフェニルグリコシドの存在を確認した。このことから、その生成機構において、グリコシドのキノンメチドへの求核付加と β グルコシダーゼによるグリコシル基の転移が関わっている可能性を示唆している。このように、2 次元 NMR が導入され、研究が進められたことで、天然に存在する LCC に関する様々な知見がより詳細に解明されてきた。しかし、木材中の LC 結合については未知な部分が存在する。そこで、筆者はリグニン分解法と NMR の解析を組み合わせることで材の主要な部位に含まれる LC 結合の構造解析を試みており、最後にこれを紹介する。

2.2.3 ハイブリッド(分解法+NMR 法)な新規アプローチ

ハイブリッドな新規アプローチとは、LC 結合を保持するリグニン分解法を試料に適用したのち、NMR 法による解析に供するものである。利点は様々なサンプルに適用できる可能性があること、すなわち、非常に希少な抽出試料だけでなく、材など多量に存在する試料にも適用できる。欠点はそのような温和なリグニン分解法が存在しなかったことである。そこで、筆者は LC 結合の解析のための温和なリグニン分解法を開発し、LC 結合の構造解析を試みてきた。図 4 に示すように、まず複雑な構造のリグニンを選択的に分解し、その後、多糖類を酵素処理により分解するというアプローチである。

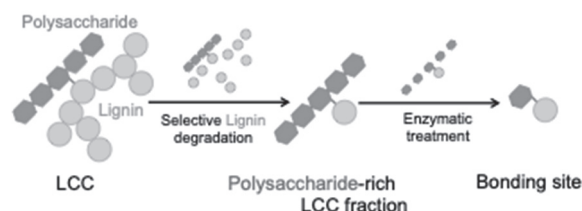


図 4: LC 結合部位単離のためのアプローチ

今回は、リグニンの選択的分解法の開発、および、それを利用した LCC 構造解析について紹介する。まず初めに、LC 結合の開裂を伴わないリグニン分解法である γ -TTSA 法を開発した (図 5)。¹⁸⁾ 従来

のリグニン分解法では、強反応条件であるため副反応として LC 結合の開裂反応が進行し、LCC の構造解析には適さなかったからである。この手法では、リグニンの主要結合である β -O-4 結合を選択的に開裂することで、リグニンを分解する。 γ 位のヒドロキシ基の反応性を利用して、スルホン基を導入し（図 5 反応 a-c）、温和な条件で結合を開裂することができるため、余分な副反応を抑制でき、 γ エステル型以外の天然の LC 結合が保持される。リグニン構造をうまく制御すれば、副反応を極力抑えたリグニン分解が可能であることを示す共に、リグニンの化学構造に立脚した戦略の重要性を示した結果である。

この γ -TTSA 法を、実際に、比較的 β -O-4 構造の比率が高いユーカリ由来のリグニン試料に適用した。¹⁹⁾ 結果、 β -O-4 結合を選択的に開裂し、リグニン分解物を得ることができた。実際に HSQC NMR 分析を用いた分解前後（図 6①②）のスペクトル比較では、分解後のスペクトル（図 6②）において β -O-4 構造由来のシグナルがほぼ消失していることがわかる。天然に存在するアセチル基のようなエステル結合の開裂以外は、その他の構造にほとんど変化のないことが確認された。さらに、得られた分解物中のリグニン低分子分解物を各種溶媒洗浄により除去することで、多糖類リッチなリグニン分解物を得た。さらに、その解析により、多糖類ではキシランが、リグニンでは β - β 構造が多く含まれていることが明らかになった。この分解法ではキシランは分解されないため、高分子量分解物中に存在するリグニンはキシランと何らかの結合を介している可能性が非常に高いことが示された。その生成および結合様式についてはまだ明らかになっていないものの、この結果は今まで報告されておらず、非常に興味深い。 β - β 構造が LC 結合の鍵を握っている可能性がある。このアプローチはまだ初期段階ではあるが、今後の展開が期待される。

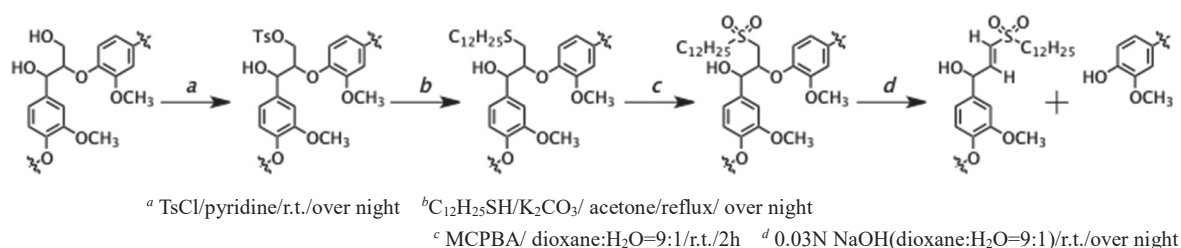


図 5 : γ -TTSA (γ -Tosylation Thioetherification Sulfonylation Alkali degradation) 法

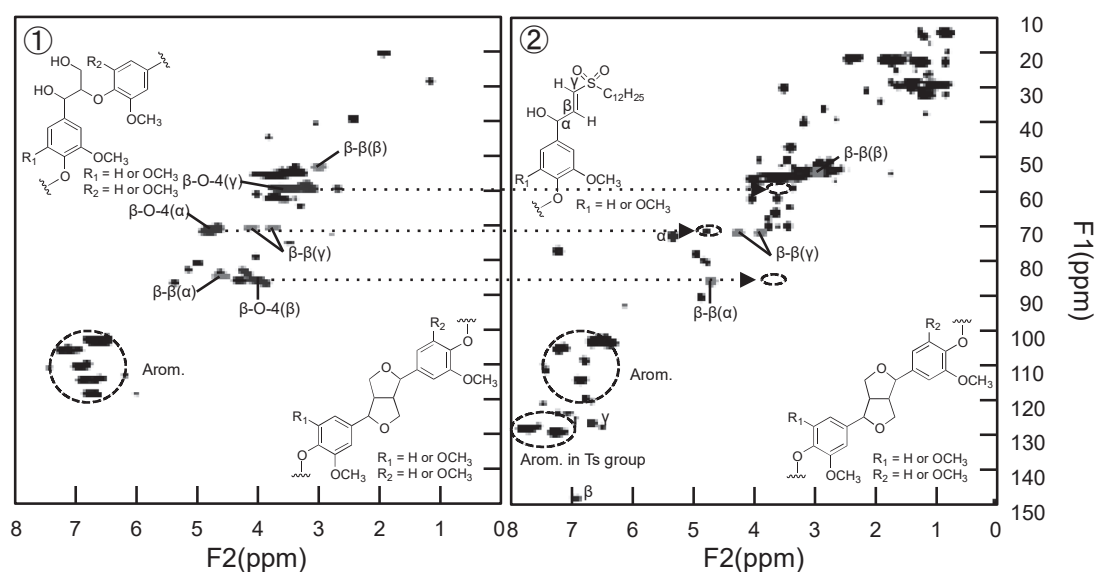


図 6 : HSQC NMR スペクトル ①分解前、②分解後

3. おわりに

木材細胞壁成分はセルロース、リグニン、ヘミセルロースと簡単には言われることが多いが、その化学構造および特性はまだ謎が潜んでいるかもしれない。実際、一例として未だ完全な成分分離技術は開発されていない。その要因として考えられる木材細胞壁間の成分構造（LC 結合）の研究例をいくつか紹介した。しかし、未知な領域があり、得られる新たな知見は細胞壁成分の生合成やバイオマス利用のためのマイルストーンになることが期待される。特に、木材中の LC 結合の存在量の少なさにも関わらず、成分分離ができないほどの大きな影響を与えていることは驚きである。これは裏を返せば、分離ができないほどに接着しているという見方もできる。そのため、成分間の構造様式の解明を含めた分離が困難な理由を明らかにすることができれば、成分分離だけでなく、ウッドミメティックな木材接着剤の創製など新たな利用展開がひらけるかもしれない。

参考文献

- 1) Kim, H., Ralph, J., Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-*d*₆/pyridine-*d*₅, *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 576-591, 2010.
- 2) Kim, H., Ralph, J., A gel-state 2D-NMR method for plant cell wall profiling and analysis: a model study with the amorphous cellulose and xylan from ball-milled cotton linters, *RSC Adv.*, **4**, 7549-7560, 2014.
- 3) Ralph, S. A., Landucci, L. L., Ralph, J., NMR database of model compounds for Lignin and related plant cell wall components, https://www.glbc.org/databases_and_software/nmrdatabase/
- 4) Mansfield, S. D., Kim, H., Lu, F., Ralph, J., Whole cell wall characterization using 2D-NMR, *Nature Protocol*, **7**, 1579-1589, 2012.
- 5) Erdman, J., Über die Concretionen in den Birnen., *Ann. Chem. Pharm.*, **138**, 1-19, 1866.
- 6) Björkman, A., Studies on finely divided wood. Part 3. Extraction of lignin-carbohydrate complexes with neutral solvents, *Svensk Papperstidn.*, **60**, 243-251, 1957.
- 7) Lowako, M. et al., Structural differences between the lignin carbohydrate complexes in wood and in chemical pulps, *Biomacromolecules*, **6**, 3467-3474, 2005.
- 8) Eriksson, O., Lindgreen, B.O., About the linkage between lignin and hemicelluloses in wood. *Svensk Papperstidn.*, **80**, 59-63, 1977.
- 9) Eriksson, O. et al., Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood, *J. Wood Sci. Technol.*, **14**, 267-279, 1980.
- 10) Takahashi, N., Koshijima, T., Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood., *Wood Sci. Technol.*, **22**, 231-241, 1988.
- 11) Koshijima, T., Watanabe, T., Association between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues, Springer, 2003.
- 12) Balakshin, M. et al., MWL fraction with a high concentration of lignin- carbohydrate linkages: Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis, *Holzforschung*, **61**, 1-7, 2007.
- 13) Balakshin, M. et al., Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy, *Planta*, **233**, 1097-1110, 2011.
- 14) Nishimura, H. et al., Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls, *Scientific Reports*, **8**, 6538-6548, 2018.
- 15) Miyagawa, Y. et al., Synthesis and fundamental HSQC NMR data of monolignol β -glycosides, dihydromonolignol β -glycosides and *p*-hydroxybenzaldehyde derivative β -glycosides for the analysis of phenyl glycoside type lignin-carbohydrate complexes (LCCs), *Holzforschung*, **68**, 747-760, 2014.
- 16) Miyagawa, Y. et al., Possible mechanisms for the generation of phenyl glycoside- type lignin-carbohydrate linkages in lignification with monolignol glucosides, *Plant journal*, 2020, just accepted.

- 17) Watanabe, T., Structural studies on the covalent bonds between lignin and carbohydrate in lignin-carbohydrate complexes by selective oxidation of the lignin with 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, *Wood research*, **76**, 59-123, 1989.
- 18) Ando, D. et al., Multi-steps degradation method for β -O-4 linkage in lignins: γ -TTSA method. Part 1. Reaction of non-phenolic dimeric β -O-4 model compounds, *Holzforschung*, **66**, 3, 331-339, 2012.
- 19) Ando, D. et al., Elucidation of LCC bonding sites via γ -TTSA lignin degradation: Crude milled wood lignin (MWL) from *Eucalyptus globulus* for enrichment of lignin xylan linkages and their HSQC-NMR characterization, *Holzforschung*, **70**, 6, 489-494, 2016.

著者プロフィール

安藤 大将 (Daisuke Ando)

＜略歴＞ 2008 年 京都大学農学部森林科学科卒業／2014 年 京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了(博士(農学))／同年 京都大学生存圏研究所特定研究員／2015 年 日本学術振興会特別研究員(PD)／2018 年 日本学術振興会海外特別研究員／2020 年 京都大学生存圏研究所 生存圏学際萌芽センターミッション専攻研究員、現在に至る。＜研究テーマと抱負＞リグニンの構造解析とその利用に関する研究