

リグニン β -O-4 構造を分析するためのチオアシドリシス法の 高速ミクロスケールプロトコール*

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

High-throughput microscale protocol of thioacidolysis method

Masaomi Yamamura^{1,2}, Keiko Tsuchida¹, Takefumi Hattori^{1,5}, Shiro Suzuki¹, Toshiaki Umezawa^{1,3,4}

概要

リグニンの特徴的な構造である β -O-4 構造の分析手法の1つであるチオアシドリシス法を改良し、微量多検体の分析を可能とするミクロスケールプロトコールを開発した。

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、細胞壁の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。それゆえ、目的に適った木質を得るため、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。これらの研究では膨大な数の遺伝子組換え植物が作出されるが、従来のリグニン分析法は非常に処理能力(スループット)が低いいため、多検体のハイスループット分析法の確立が必須となっている。リグニンには特徴的で主要な構造でもある β -O-4 構造があるが、本構造由来の分解生成物を与える分析手法があり、この分析は試料中のリグニンの存在も決定できるという点で重要である。数種の手法が知られているが、その中でも酸分解を利用してリグニンを脱ポリマー化する分析法の一つであるチオアシドリシス法が最も頻繁に用いられている。近年、Robinson らによりスループットが10倍上昇したチオアシドリシス法のプロトコールが開発¹⁾されたが、その抽出工程にはまだ改良の余地が残っていると考えられた。そこで、我々はチオアシドリシス法の特に出抽出工程を改良したミクロスケールプロトコールを開発した²⁾。本プロトコールは、Robinson らのプロトコールに匹敵するスループットを有しながら、反応生成物の収率を僅かではあるが上昇させることに成功した。収率の上昇は、微量しか得られない貴重な植物試料(例えば、形質転換植物体)等の分析をする上で、非常に重要である。また、本プロトコールは、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物の減少などの利点も有している。本稿では、前報²⁾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

² E-mail: zenstyle@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℃、5 分 × 20 回) 、ヘキサン (室温、5 回)、水 (60℃、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、ミクロスケール・チオアシドリシス法に供する。



図1:ミクロスケールプロトコールに用いる器具及び装置
(A)1ml ガラスバイアル, (B)1ml ガラスマイクロチューブ, (C)遠心濃縮機

2.2 ミクロスケール・チオアシドリシス法

(以下の工程 3-17 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乾燥させる。
2. CWR (5-10 mg)^b をスクリューキャップ付き 1 ml ガラスバイアル [マルエム マイティーバイアル (No. 3); 図1-A] に入れる。
3. チオアシドリシス試薬 (1,4-ジオキサン:エタンチオール:三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体=87.5:10:2.5, v/v) をガラス製三角フラスコもしくはビーカーに調製する。
4. 試料が入ったガラスバイアルにチオアシドリシス試薬 (0.9 ml) と内部標準としてドコサン (5-10 μ L, 10 mg/mL)^b を加え、蓋を閉める。
5. 蓋の部分をつでフロンテープでしっかりシールし、よくボルテックスする。
6. ヒートブロックを用いて、ガラスバイアルを加熱する (100℃、4 時間) 。
7. ガラスバイアルを氷上で 5 分間冷却する。
8. 反応液のうち 200 μ L を 1.5 ml ポリプロピレン製 (PP) チューブ^c に移す。
9. 1N NaHCO₃ (100 μ L) を添加し、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。
10. 1N HCl を添加し、反応液の pH を 3~4 にあわせる。
11. ジエチルエーテル (250 μ L) を添加し、10 秒間ボルテックスする。
12. 卓上遠心機を用いて有機層と水層に分離し、有機層のみを新しい 1.5 ml PP チューブ^c に回収する。
13. 工程 11~12 をさらに 2 回繰り返す。
14. 回収した有機層に飽和食塩水 (100 μ L) を加え、10 秒間ボルテックスし、次いで卓上遠心機で有機層と水層を分離する。
15. 有機層のみを新しい 1.5 mL PP チューブに移す。
16. 適量の固体の Na₂SO₄ 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。

17. 有機層の一部 (5–20 μL)^d を 1 mL ガラスマイクロチューブ (図1-B) に移す。
18. 遠心濃縮器 (図1-C) を用いて溶媒を減圧溜去する。^e
19. さらに 1 時間、真空ポンプで乾固する。^f
20. 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アウンする。
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 × 長さ 20 m × 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 26 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

後片付けの作業はドラフトチャンバー内で行う。チオアシドリシス試薬の調製等に使用したガラス器具及び残ったチオアシドリシス試薬はバケツにまとめる。そのバケツに水で希釈した次亜塩素酸ナトリウムを加え、一晩浸けておく。次の日に悪臭が消えていればドラフトチャンバーから出し、水で濯ぎ、洗剤に三時間以上浸けてから洗う。悪臭が消えてない場合はさらに次亜塩素酸ナトリウムを加え、悪臭が消えたら上記と同様に洗う。ディスポーザブル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²⁾ ではイナワラ及び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エリアンサス、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 分析する植物試料のリグニンの特性 (特にリグニン含量) によって植物試料量及び内部標準添加量を適宜検討する必要がある。
- ^c シリコナイズした PP チューブを使用することにより、若干収率が上昇する。
- ^d 低リグニン含量の植物試料の場合は、あらかじめ多めの液量をドライアップすることをお薦めする。
- ^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 分析機器の性能およ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) Robinson, A. R., Mansfield, S. D., Rapid analysis of poplar lignin monomer composition by a streamlined thioacidolysis procedure and near-infrared reflectance-based prediction modeling. *Plant J* 58, 706–714, 2009.
- 2) Yamamura, M., Hattori, T., Suzuki, S., Shibata, D., Umezawa, T., Microscale thioacidolysis method for the rapid analysis of β -O-4 substructures in lignin. *Plant Biotechnol* 29, 419–423, 2012.