

令和 2 年 5 月 5 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2018年度(平成30年)

受付番号 201860447

氏 名 安藤 大将

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: マディソン (国名: 米 国)
2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
リグニン高分子のシーケンスと分子特性
3. 派遣期間: 平成 30年 4月 13日 ~ 令和 2 年 4月 12日
4. 受入機関名及び部局名
ウィスコンシン大学マディソン校(University of Wisconsin, Madison)、生化学部門(Biochemistry)
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

本研究(“リグニン高分子のシーケンスと分子特性”)はリグニン高分子において既知の様々な単位間結合がどのような順序(シーケンス)でどれくらいの長さ(分子量)でつながっているかをリグニン分解およびリグニン分子特性の観点から考察する研究である。

① β - β 構造は分子中か? 分子末端か?

β - β 構造はリグニンの主要結合構造の一つであり、 β -O-4 構造に次いで、 β -5 構造に並ぶ構成要素である。針葉樹リグニン中では 10%ほど、広葉樹リグニン中では 15%ほどを占めている。 β - β 構造の前駆体であるジリグノール、すなわちレジノール類は一分子中に二つのフェノール性水酸基を有しており、その他のジリグノール類と異なり、両方向に重合可能である。そのため、重合開始構造の一つとも考えられる。また、筆者の最近の研究において、 β - β 構造が LCC における多糖とリグニンの結合に関与している可能性が示唆された。そのため、 β - β 構造の分子中の位置を知るとはリグニン分子構造を読み解く上で非常に重要であると考えている。

まず、初めにシリンガレジノール構造に着目した。S 核リグニンを豊富に含む広葉樹リグニンは主に G 核リグニンからなる針葉樹リグニンと比べると、 β -O-4 構造およびレジノール(β - β)構造の含有量が多いため分析が容易であると考えられる。このとき、試料としてユーカリ由来リグニン(MWL)を選択し、 β -O-4 結合を選択的に開裂させるリグニン分解法である γ -TTSA 法を用いて分解した。ここで用いる γ -TTSA 法はトシル化、チオエーテル化、スルホン化、アルカリ処理の 4 段階反応からなる β -O-4 結合開裂法である。トシル化は一級水酸基だけでなく、フェノール性水酸基にも進行するが、その後の連続した反応はフェノール性に結合したトシル基は置換されず、その後も保持される。よって、リグニンの末端フェノール性水酸基はトシル基で保護される。予想される β - β 構造分解物を図 1 に示す。分子中の β - β 構造からはシリンガレジノールが、分子末端の β - β 構造からはモノトシル化シリンガレジノールが生成すると予想される。

実際に、 γ -TTSA 分解物を LC-MS 分析したところ、 m/z 419 と m/z 573 のマスキロマトグラムにおいて予想されるモデル化合物であるシリンガレジノールとモノトシル化シリンガレジノールのピークと一致するピークを検出した。よって、分解物中にシリンガレジノールとモノトシル化シリンガレジノールの存在(比率 5:1)を確認した。

結果として、ユーカリ由来の天然リグニン中の β - β 構造は分子中だけでなく、分子末端にも存在することが明らかになった。これまで、分子末端情報としては“フェノール性水酸基”という情報しか得ることができなかったが、分解物の分析により β - β 構造が末端に存在することを示す新規な知見を得ることができた。現在、これらを論文にまとめている。また、リグニンの生合成を考慮すると β - β 構造はリグニンの重合開始構造と考えられるが、以上の結果から、リグニン重合後期でも生成するという可能性、またはモノエーテルレジノール構造におけるフェノール性水酸基の反応性が低い可能性が示唆された。

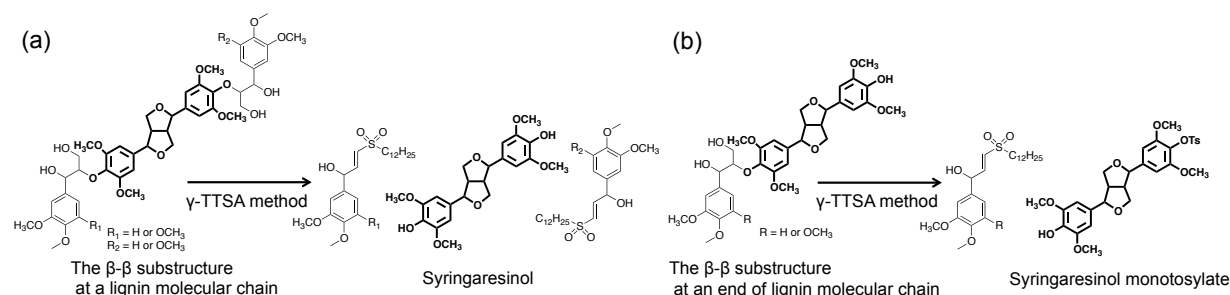


図 1 予測される γ -TTSA 分解物 (a)分子中の β - β 構造の分解 (b) 分子末端の β - β 構造の分解

② リグニンの末端をモニタリングする。

①ではリグニン分解法により得られた分解物を解析することで、リグニンの化学構造に関する情報を得た。しかし、分解法の欠点は分解中に一部の試料の消失が見られるため、サンプル量が必要であることがあげられる。そこで分解することなく HSQC-NMR 測定によりシーケンス情報を得ることができれば、より速く、簡単に構造情報を得ることができる。また、分解法と非分解法の双方向から知見を得て、比較、検討することができれば、より精度の高い知見が得られると考えられる。

まず、リグニンの HSQC-NMR スペクトルの芳香核領域において、G 核、S 核、H 核、C 核などの核の違いは検出できるものの、C 核を除いてはフェノール性・非フェノール性については大きな違いが現れない。芳香核領域には、G 核において 2, 5, 6 位のシグナルが、S 核には 2, 6 位のシグナルが、

H核においては2, 3, 5, 6位のシグナルが確認される。S核の2, 6位、H核の2, 6位、3, 5位のシグナルはそれぞれオーバーラップするため、S核では1つの、H核では2つのシグナルとなる。そこで、官能基を導入し、芳香核の電子密度を変化させ、シグナルをシフトさせることでピークを分離することを計画した。2種類の方法:(a)メシル-タグ(フェノール性のメシル化)、(b)ヨウ素-タグ(フェノール性芳香核のヨウ素化)を検討した(図2)。(a)ではフェノール性水酸基へ、(b)ではフェノールのオルト位への反応を利用した。

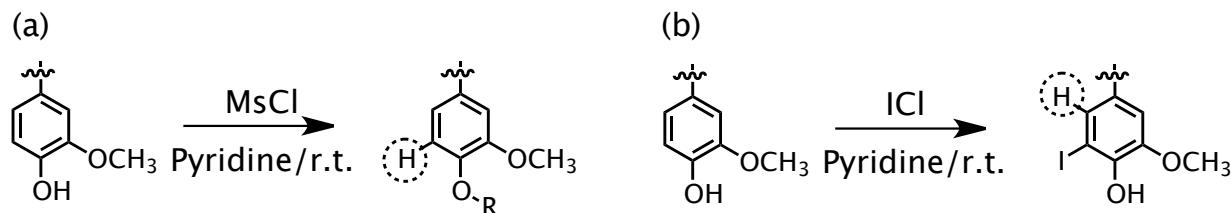


図2 (a)メシル化反応 (b)ヨード化反応

(a)メシル-タグ法

シグナルのシフトのために、フェノール性水酸基への官能基導入に着目した。官能基として、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンジル基、トシル基、メシル基など様々な官能基を検討した結果、トシル基とメシル基を選択した。まず、モノマーモデル化合物として、G核にはアセトバニロンおよびその還元物を、S核にはシリングアルデヒドおよびその還元物を用いた。

G核での検討では、トシル基、メシル基を導入した際に隣接する5位のピークが大きく低磁場側へシフトすることが確認された。その際、2, 6位のシグナルはほとんど変化しなかった。このことから、官能基の導入により、5位のシグナルを選択的にシフトさせることができると考えられる。一方で、S核での検討では、2, 6位のシグナルは大きく変化せず、シフトさせることはできなかった。理由としては、芳香核において官能基の影響を受けるのはオルト位であり、メタ位はそれほど大きな影響を受けないことが考えられる。実際に、結果は官能基を導入されたフェノールの4位を起点にして、オルト位である5位は影響を受けシフトするものの、メタ位である2, 6位は大きな影響を受けないことを示している。よって、5位にもメトキシ基を有するS核ではこの方法ではシグナルをシフトさせることは難しいことがわかる。そこで、G核のみをターゲットとすることにした。

そこでG核の β -0-4ダイマーモデル化合物として検討した。官能基はトシル基とメシル基を選択した。トシル化において、モノトシレートおよびジトシレートが得られたことから、トシル基がフェノール性水酸基だけでなく、 γ 位の1級水酸基にも進行することがわかった。また得られたモノトシレートにおいてトシル基が γ 位に導入されていることを確認した。この結果から、一般的にはフェノール性水酸基の方が1級水酸基よりも反応性が高いに関わらず、このモデル実験では1級水酸基の反応性が高いことが示された。また、フェノール性芳香核の5位シグナルのシフトは見られたものの、他方の非フェノール性芳香核の5位のシグナルにもシフトが見られ、オーバーラップすることから、トシル基は導入官能基として適さないことが明らかになった。

メシル基においては、ジメシレートとトリメシレートが得られ、 α 位の2級水酸基への反応の有無はあるものの、フェノール性水酸基には問題なく反応することがわかった。また、問題なくフェノール性芳香核の5位のシグナルがシフトし、どのシグナルともオーバーラップしないことを確認した。メシル基が有効であることが示された。

最後に、針葉樹由来の抽出リグニンをメシル化し、HSQC-NMR分析した。その結果、HSQCスペクトルの芳香核領域において、モデル実験の結果と一致する末端芳香核の5位のシグナルを確認した。しかしながら、元の非末端芳香核の5位のシグナルも消失して、末端芳香核5位のシグナルの周辺に一部オーバーラップしたシグナルが見られることからメシル化の影響により末端および非末端芳香核5位のシグナルがシフトしている可能性が示唆された。末端芳香核を単独で分離することはできなかった。しかしながら、 γ 位の官能基が距離的に近い非末端芳香核の5位のシグナルにも影響を与える可能性を示す結果であり、非常に興味深い。なぜなら、官能基の導入により、リグニン分子の芳香核の電子密度が変化することで、新たな分子特性の発現および制御の可能性があるからだ。今後、ここで得た知見を発展させ、論文化に取り組む予定である。

(b)ヨウ素-タグ法

(a)では、フェノール性水酸基選択的な反応ではなかったため、モデルでのピーク分離は見られたものの、実際のリグニンでは γ 位に導入されたメシル基の影響により、末端フェノールのピークのみを分離することはできなかった。そこで、(b)ではフェノール性オルト位の反応性に着目した。様々な反応の中でも、比較的温和な条件であるハロゲン化に焦点を絞った。ハロベンゼンのデータベースから、オルト位のピークのシフトを予測したところ、フッ素は高磁場側へ、塩素はほぼ変

らず、臭素、ヨウ素は低磁場側へとピークがシフトすることが予測された。そのため、ブロモ化とヨウ素化を選択し、モデル実験に適用した。

モノマーモデル実験では、アセトバニロンと 4-ヒドロキシ 3-メトキシベンジルアルコールとそれらの 5-ブロモ化物、5-ヨウ素化物を比較したところ、予想通り、6 位のピークが低磁場シフトした。このときブロモ化とヨウ素化を比較したとき、ヨウ素の方がシフトの変化が大きいたことが明らかとなった。また、反応性が高く、臭素と比べると安全性が高いため、ヨウ素化を選択した。

β -O-4 ダイマーモデルを用いて、図 3 に示す反応条件によりヨウ素化を試みた。期待された 5-ヨード誘導体が得られ、単離収率は 70%であったものの、H-NMR による反応のモニタリングから、ほぼ定量的に反応が進行することを確認した。この結果、得られた 5-ヨード誘導体の HSQC-NMR スペクトルでは、A 環の 5 位へのヨウ素の導入により、5 位のピークが消失し、6 位のピークが低磁場側へ大きくシフトした。一方で非フェノール構造である B 環にヨウ素は導入されず、ピークもほとんど大きくシフトしないことがわかった。念の為、非フェノール性の β -O-4 ダイマーモデルで同様の条件で処理したところ、反応は進行せず、H-NMR において試薬と原料化合物ピークのみを確認した。よって、このヨウ素化条件では、選択的にフェノール性芳香核にヨウ素を導入できることが明らかになった。また、ヨウ素化は NMR チューブ内で反応でき、そのまま HSQC-NMR 分析に供することができ、ハイスループットな分析が可能となった。

次に、同様に各種ダイマーモデル(β -5, β - β , dibenzodioxocin)にヨウ素化を適用したところ、それぞれ問題なくヨウ素化が進行し、予期した 5-ヨード誘導体が得られた。その後の HSQC NMR 測定の結果、結合の違いによって、6 位のピークが分離することが明らかになった。すなわち、末端のフェノールに隣接する単位間結合の違いによるピークの分離が示唆された。

実際に、リグニンモデルポリマーである G 型 DHP と針葉樹(スギ)木粉から抽出された天然リグニンである MWL にヨウ素化を適用した。得られた HSQC NMR スペクトルにおいて、上記のモデル化合物のフェノール性芳香核の 6 位のピークと一致するピークの存在が確認された。これらのピーク体積から比率を求めた。DHP では単位間結合は β -O-4: β -5: β - β = 1.00: 2.30: 1.49 であるにもかかわらず、末端のフェノールに隣接する結合は β -O-4: β -5: β - β = 1.00: 0.29: 0.91 となった。単位結合比と末端の結合比は一致せず、末端構造には β -O-4 構造型フェノール構造が多く存在することがわかった。一方で、単位間結合比と比べたとき、 β -5 と β - β 結合は末端には多く存在していないということが明らかになった。MWL では単位間結合は β -O-4: β -5: β - β = 1.00: 0.41: 0.15 であり、末端のフェノールに隣接する結合は β -O-4: β -5: β - β = 1.00: 0.66: 0.18 となった。DHP とはことなり、結合比に対応する結果となった。DHP とは分子量、結合比が異なるという事実にさらに、末端フェノールに隣接する結合構造が異なることが明らかになった。これはリグニン分子の新たな着眼点であり、リグニンの化学構造の解明の糸口を広げるものであると考えている。

最後に、このヨウ素タグ法を木粉試料(不溶性サンプル)に適用し、上記同様に HSQC NMR スペクトルを得た。その結果、結合型の違いによるピーク分離は厳しいものの、MWL と同様のフェノール性芳香核のピーク分離がみられた。よって、不溶性の木粉試料でも適用可能であることが証明された。

また、この手法はフェノール性芳香核に選択的に反応するため、フェノール性認識のタグとしても有効であると考えられる。しかし、フェノール末端のオルト位がフリーである必要があるため、S 核以外において有効である。

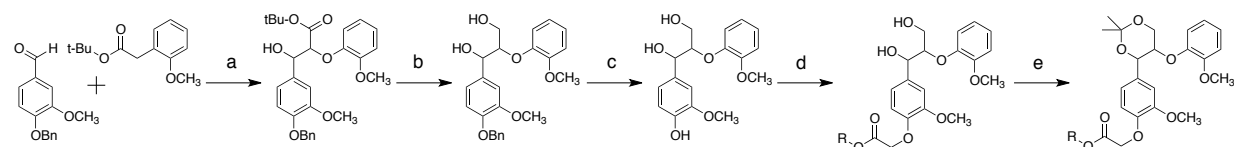
さらに、まださらなる改善の必要はあるものの、ピーク体積の比率からリグニン分子のおおよその DP を求めることができる。芳香核領域のピーク体積を比較することで、二量体モデルでは DP は約 2、DHP では DP は約 8~10(分子量だと 1600~2000 程度)の値が算出された。二量体モデルではもちろんのこと一致し、GPC で算出される DHP の分子量 2000 程度と比べると少し小さい値はあるものの、おおよそ一致する。MWL については、数値が一致しない。しかし、MWL に関しては、DHP と比べるとまだまだ検討の余地はあるものの、関数などを検討することでより精度をあげる可能性があると考えている。これは、MWL は DHP と比べると含まれる分子の分子量の幅が大きく、それらを考慮する必要がある。

③モデルポリマーの合成

重合度既知のモデル化合物が合成できれば、その分子特性からリグニン高分子の様々な知見を得ることができる。そのため、構造既知の高分子モデル化合物の合成に取り組んだ。ステップワイズ合成法のための二量体の合成および混合法で合成されたオリゴマーの分離に取り組んだ。

ステップワイズ合成法は 2 量体同士を結合し 4 量体に、得られた 4 量体同士を結合することで 8 量体のようにすることで、構造既知の高分子モデル化合物を合成する方法である。リグニン β -O-4 二量体の水酸基の保護を検討した(図 3)。その後、対となる β -O-4 二量体を合成し、4、8、16 量体の順に合成を試みた。しかしながら、GPC スタンダードとして最低でも 16 量体は必要であるが、多量体になるに従い、副反応、分離の難しさなど様々な要因により、単離するにはいたらなか

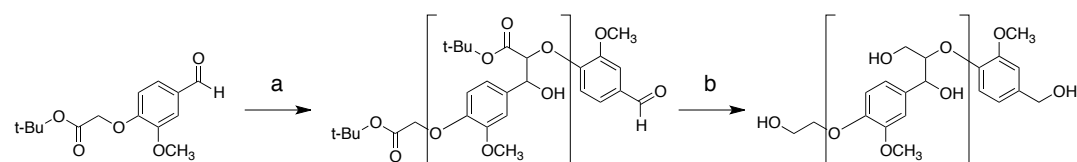
った。そのため、代替として、上記②の(b)においてピーク体積からのリグニン分子の DP の算出に取り組んだ。実現すればハイスループットな解析が可能となる。



^a LDA/anhydrous THF/-30°C, ^b NaBH₄/EtOH/r.t., ^c Pd-C/MeOH, ^d Ethyl or t-Butyl chloroacetate/ K₂CO₃/ KI/ Acetone/ reflux, ^e Me₂C(OCH₃)₂/CH₂Cl₂/r.t.

図3 ステップワイズ合成法のための二量体の合成

β-O-4 オリゴマーの分離では、片平らの方法(R. Katahira et al. 2006)で合成されたリグニンオリゴマーの分離を試みた。得られたオリゴマーは様々な重合度のオリゴマーが生成しており、それらを分離することができれば、容易に構造既知のモデルオリゴマーを得ることができる。図4に示す方法で合成し、カラムにより分離を試みた。様々なカラムを用いて分取した各フラクションを NMR 分析したものの、スペクトルにおいて混合物であることがわかった。最終的に、完全な単一化合物の分離までは達成できず、GPC の標準物質に足るものは得ることができなかった。しかし、その代替として、上記②の(b)においてピーク体積からのリグニン分子の DP の算出に取り組んだ。



^a LDA/anhydrous THF/-30 °C, ^b NaBH₄/ EtOH/ r.t.

図4 リグニンオリゴマーの合成

(まとめ)

以上が 2018 年度~2019 年度(2018 年 4 月 13 日~2020 年 4 月 12 日)の報告である。計画通り、リグニンの分子情報を得るために、リグニン分子の末端であるフェノール性水酸基に着目し、その知見を収集するための分解型、非分解型分析手法を開発し、分析結果からリグニン分子を考察した。β-O-4 結合の開裂による分解法では、β-β 構造の結合型を分析し、リグニン中の β-β 構造は分子中だけでなく、分子末端にも存在することを明らかにした。さらに非分解型分析手法として、ヨウ素タグと HSQC-NMR 分析により、フェノール性芳香核のピーク分離に成功した。さらに、隣接する単位間結合の差異によってもピークはさらに分離し、"どの結合が末端にあるか"を明らかにすることができた。さらに、ピーク面積から数平均的な DP を求めることができる可能性が示唆された。その結果、DHP と MWL の新たな違いを見いだした。DHP では β-5, β-β 構造が主要な結合であるにも関わらず、β-O-4 結合型フェノール末端が多く存在する。一方で、針葉樹(スギ)の MWL では結合比に対応して、β-O-4 型、β-5 型、β-β 型フェノール末端の順番に多く存在する。また、広葉樹(ユーカリ)の MWL では、拡大時にピークが検出されるほどで、定量化は厳しいものの、末端は S 核が多くしめることが推測される。このように、フェノール末端の結合型がわかることで、リグニン分子の新たな一面が明らかになった。さらなる考察が必要ではあるものの、リグニンのフェノール性末端の結合型は、リグニンの重合終了時に残存しているため、生合成における重合末期に生成する結合情報を示す可能性があると考えている。

モデルポリマーの合成では、試行したものの、残念ながら、GPC のスタンダードに適した高 DP モデルポリマーを単離することはできなかった。しかし、その代替法として上記の HSQC-NMR 分析を用いた DP 算出法を考案した。まだまだ改善の必要はあるものの、実現すればハイスループットな解析が可能となると考えている。今後、ここで得られた結果を将来につなげ、さらなる知見を収集することで、リグニン分子の新たな側面を明らかにしていきたい。また、COVID-19 の影響により 2020 年 3 月からは大学が閉鎖されたため、一部データを解析できていないため、閉鎖解除後に解析し、それらをまとめて論文にまとめる予定である。

成果の発表・関係学会への参加状況等

(学会誌への発表)

- ① Yasuko Saito, Takashi Endo, Daisuke Ando, Fumiaki Nakatsubo, Hiroyuki Yano, "Influence of drying process on reactivity of cellulose and xylan in acetylation of willow (*Salix schwerinii* E. L. Wolf) kraft pulp monitored by HSQC-NMR spectroscopy", *Cellulose*, 2018, 25, 11, 6319-6331
- ② Daisuke Ando, Fumiaki Nakatsubo, Hiroyuki Yano, "Thermal stability of lignin in ground pulp(GP) and the effect of lignin modification on GP's thermal stability. TGA experiments with dimeric lignin model compounds and milled wood lignins", *Holzforshung*, 2019, 73, 5, 493-499
- ③ Daiki Murayama, Daisuke Ando, Shinya Ikeda, "Surfactant-Induced Competitive Displacement of Poteto Pectin-Protein Conjugate from the Air-Water Interface", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67, 29, 8197-8204
- ④ Daisuke Ando, John Ralph, "Method to regioselectively iodine-tag free-phenolic aromatic end groups in lignin for 1H-13C HSQC NMR analysis", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7, 22, 18624-18629

現在、他の結果についても論文投稿準備中である。

(関係学会への発表状況)

- ①○斎藤靖子、安藤大將、岩本伸一朗、中坪文明、矢野浩之、遠藤貴士
“HSQC-NMR 分光法によるパルプの表面化学修飾の追跡”
第 14 回バイオマス科学会議、P-38、東広島、2018 年 11 月 16～17 日
- ②○上谷幸治郎、宇都卓也、安藤大將、鈴木望
“捻れたセルロースナノ繊維の数理モデルが示す力学的特徴”
第 69 回日本木材学会、K16-04-1015、函館、2019 年 3 月
- ③○上谷幸治郎、宇都卓也、安藤大將、鈴木望
“セルロースナノファイバーの捻れと非線形力学挙動”
セルロース学会第 26 回年次大会、K01、福岡、2019 年 7 月
- ④○Daisuke Ando, Fumiaki Nakatsubo, Hiroyuki Yano, John Ralph
“Selective lignin degradation of a LCC insoluble fraction from *Eucalyptus globulus* with γ -TTSA method.",
The 20th International Symposium on Wood Fiber. and Pulping Chemistry (ISWFPC), P-76, Tokyo, Sep. 2019
- ⑤○Daisuke Ando, John Ralph
“A method to regioselectivity iodine-tag free-phenolic aromatic endgroups in lignin for 1H-13C-HSQC NMR analysis.", 1st International Lignin Symposium, P30, Sapporo, Sep. 2019