

## 研究報告書

### 「化学反応性に則したリグニン高分子構造の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 秋山 拓也

#### 1. 研究のねらい

リグニンは、植物体が巨大化するための力学的強度や耐候性を細胞壁に付与する中心的な役割を果たしている一方で、その難分解な性質は、植物細胞壁をバイオマスとして利用する際に障害となる。従来、細胞壁のバイオマス利用の主たる対象はセルロース等の多糖類であり、細胞壁の4分の1を占めるリグニンを如何に効率よく取り除くか、に主眼を置いて分離技術が開発されてきた。その分離工程でリグニンは著しい構造変化を受けるが、製紙産業においてはパルプ蒸解後の変性リグニンは燃焼エネルギーとして効率よく利用されるため、変性リグニンに生じる構造変化を考慮する必要はない。しかし、リグニンの高付加価値利用が期待される現在、分離後の利用法を考慮しながらリグニン高分子にどのような構造変化を与えながら低分子化していくかが今後、重要な課題になると予想される。そのために、リグニンの詳細な化学構造とその反応性を把握することが欠かせない。本研究では、リグニン高分子を切断する際に成分分離や低分子化の要になり得る  $\beta$ -O-4 型構造以外の部分構造に着目した。リグニンは難分解性の高分子と呼ばれるが、その性質は高分子内で一様ではなく、反応性に富み細胞壁成分の分離や低分子化に寄与するジエノン型の部分構造が含まれると期待されており、また、ビフェニル型およびジアリールエーテル型の部分構造は高分子の形状や物性に密接に関わっていると考えられている。本研究では、これらの部分構造の詳細と頻度、および反応性を明らかにし、また、自然界におけるリグニン構造の多様性と上記の部分構造との規則性を見いだすことによって、植物細胞壁の高選択的反応の設計や利用目的に適した植物種の選抜指標など、木質系バイオマスの化学変換利用の基盤技術の確立に貢献することを目的とした。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では、リグニン高分子を切断する際に成分分離や低分子化の要になると想定される部分構造として、ジエノン型構造および、高分子の分岐点の候補構造の解析を行った(テーマ A、B)。これに加え、リグニン構造の樹種間における多様性とその規則性について調べ(テーマ C)、以下の研究結果を得た(図 1)。スピロジエノン構造は、0.1M 塩酸、室温の温和な酸処理条件下で低分子化し、ジアリールプロパン構造へ変換されることが、モデル化合物を用いた実験で明らかとなった。これにより、スピロジエノン型構造が高分子内部にある場合、高分子を切断し低分子化に寄与する反応が、比較的温和な塩酸処理によって進行することが示唆された。高分子分岐点の候補であるビフェニル構造の含有量について、ニトロベンゼン酸化法を精査して分析手法を確立し、針葉樹スギリグニンでは、少なくとも芳香核の 6.7%(下限値)がビフェニル型構造として含まれることが示された。もう一つの分岐点候補であるジアリ-

ルエーテル構造については、NMR 法による検出が可能となり、同結合が少量ながらもリグニンに含まれることが明確となった。針葉樹と広葉樹を含む 21 樹種について上記の化学分解法を適用した結果、ビフェニル含有量は芳香核構造の構成比と密接な関係にあることが示された。さらにリグニン構造の多様性の一環として裸子植物グネツムグネモンあて材を分析した結果、概ね広葉樹あて材(被子植物)に似た特徴を持つ一方、針葉樹あて材の化学的特徴を併せ持つことが明らかとなった。

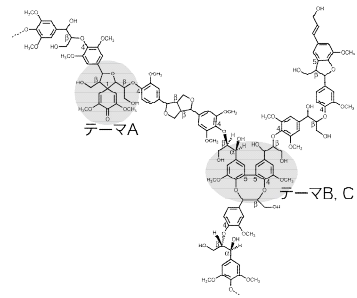


図1. リグニン構造の模式図

(2) 詳細

研究テーマ A「ジエノン型構造の構造解析」

リグニン生成時、カップリング反応によって生成したキノンメチド等の中間体の多くは、芳香核の再生によって安定化される。一方で、芳香核の再生を伴わないまま、ジエノン型、エノン型構造として高分子に含まれるものがある、と古くから想定されてきた(図 2)。現在のところ、その一つとして  $\beta$ -1 結合型スピロジエノン構造が含まれる、と NMR 法による詳細な解析結果から推定されている。しかし、そのモデル化合物とその NMR データが無いので、同定にまでは至っておらず、その反応性は不明のままであった。

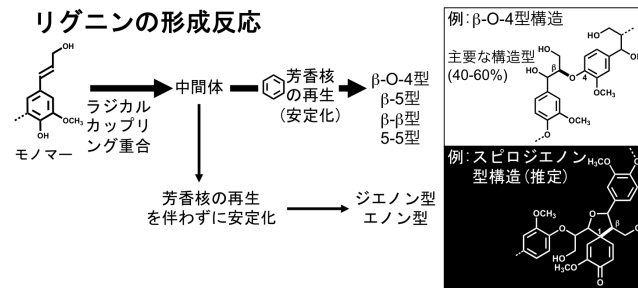


図 2. リグニン生成時に想定されるジエノン型構造の形成

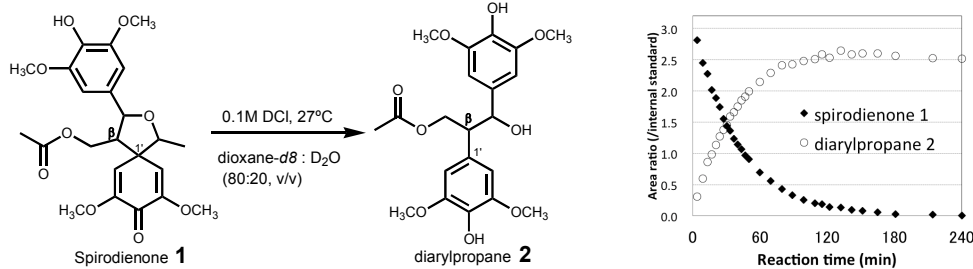


図 3. 酸処理によるスピロジエノン型モデル化合物の分解と、ジアリールプロパン型化合物の生成挙動

これまでに、 $\beta$ -1 結合型スピロジエノン構造の簡易型モデル化合物 1(図 3)の調製に成功しているが、本研究テーマにおいて、調製法の検討により、これまで問題であった収率と再現性の低さを改善し、反応性を調べるために十分な量の簡易型モデル化合物 1 を得た。同モデル化合物 1 に対して、温和な酸処理を行い、反応の進行を  $^1\text{H-NMR}$  測定で追跡した。その結果、

化合物 1 は 0.1M 塩酸、27°C、3 時間の酸処理条件下でほぼ消失した。その際、化合物 1 はジアリールプロパン型化合物 2 へと高い割合で変換された(収率 80 %以上)。ここで生じた開裂反応は、図 1 の様にスピロジエノン型構造が高分子内部にある場合、高分子を切断し低分子化に寄与する反応に相当する、ことが明らかとなった(学会発表1および3)。

### 研究テーマ B「リグニンの分岐構造の解析」

リグニンには、直鎖型ではなく、分岐型の高分子であると考えられている。これは、分岐点候補となるビフェニル構造(5-5 結合)およびジアリールエーテル構造(5-O-4 結合)の存在が広く認識されているためである(図 4)。しかしながら、ビフェニル構造の含有量については不明瞭で、異なる分析方法で様々な値が報告されている。また、ジアリールエーテル構造については、化学分解法で検出されるのに対して、NMR 法ではその存在が確認できていなかった。

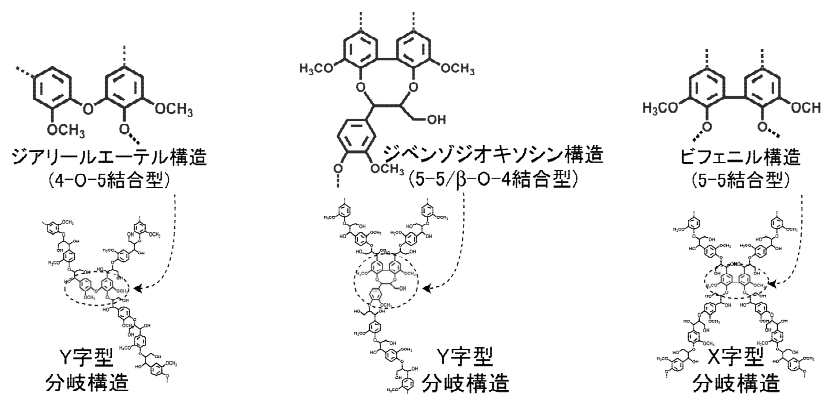


図 4. リグニン高分子の枝分かれ構造の分岐点候補

本テーマ B では、ビフェニル構造について、再現性が高い、定量的な分析手法を得ること目的に、非縮合型構造の解析に従来から広く用いられているニトロベンゼン酸化法を精査し分析手法を確立した。まず、ビフェニルモデル化合物および想定される同酸化生成物を合成し、モデル実験を行った。ビフェニルモデル化合物を同化学分解法に供した結果、ビフェニル型分解生成物の収率は約 7 割であり(反応条件:170°C, 2h)、 $\beta$ -O-4 モデル化合物からの非縮合型生成物の収率(約 8 割)と比べて遜色のない値を示した。また、これに加えて同分解反応中に  $\beta$ -O-4 構造からビフェニル構造が二次的に生成する可能性が否定されたことで、リグニンのビフェニル型構造量を過大評価することなく分析できることが示された。この手法を木粉試料に適用し、反応条件を最適化した結果、針葉樹リグニン(スギ)には、芳香核 100 単位あたり 6.7 単位(下限値)がビフェニル型構造として含まれることが明確となった(論文発表 1)。

また、高分子分岐点のもう一つの候補であるジアリールエーテル構造について NMR 法による検出を試みた。その結果、モデル化合物との比較により、リグニンの NMR ピークを同構造に帰属することが可能となった。リグニン構造を反映した詳細なモデル化合物(4 量体モデル化合物)を合成し、測定溶媒条件の違いによる NMR ピークの化学シフト値への影響を利用することにより、初めて帰属することが可能となった。これにより、ジアリールエーテル構造が少量ながらもリグニンに含まれていることが明確となった(学会発表 2 および 7)。

### 研究テーマ C「リグニン化学構造の規則性」

リグニン構造の多様性を調べることを目的に、針葉樹(裸子植物)と広葉樹(被子植物)を含む 21 樹種のビフェニル型構造について、研究テーマ B で確立した分析手法を用いて分析を行った。その結果、樹種間でビフェニル含有量は大きく変動し、樹種間でのビフェニル含有量の多様性が示されると共に、その含有量は芳香核構造の構成比(シリングル/グアイアシル核比)と密接な関係があることが明らかとなった(図 5)。

この関係は、リグニン生成反応を考慮すると容易に想定される結果であるものの、樹種の違いを超えて極めて高い相関( $R^2 = 0.95$ )と共に示された(学会発表 4 および 8、投稿予定)。さらに、リグニン構造の多様性の一環として裸子植物グネツム門に属する木本植物(Gnetum gnemon)を分析した結果、多糖類・リグニン共に、広葉樹(被子植物)に似た化学構造的特徴を有することが示された。また、そのあて材の化学分析結果についても、概ね広葉樹あて材に似た特徴を持つ一方で、針葉樹(裸子植物)あて材に似た特徴として、リグニンの  $p$ -ヒドロキシ核(H 核)の含量が幹下側のあて部で高くなる傾向を示した(学会発表 6、論文投稿中)。

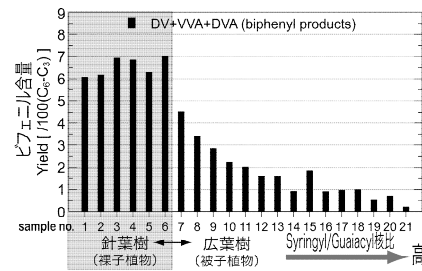


図 5. 樹種間におけるビフェニル含量の違い

### 3. 今後の展開

スピロジエノン構造のリグニンモデル化合物の調製法を確立したことでリグニンのジエノン部分構造の反応性や反応機構の詳細を調べることが可能である。本研究では、一例として塩酸処理によってスピロジエノン化合物が容易に開裂することを示すことができたが、今後、様々な酸や塩基に対する反応性や反応機構等の基礎的知見を蓄積・分類することによって、現在、バイオマス利用研究で多様な反応条件が用いられる中、どのような処理条件を用いればリグニンの低分子化に寄与する反応が進行し、また、どのような条件下で脱リグニンを阻害するような高分子化を伴う副反応が生じるのかを予測できるようになると期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

脱リグニン過程で低分子化の要となり得る部分構造を探索することを目的に本研究課題に取り組んだ結果、当初の研究計画からの若干の遅れはあったものの、新たな知見として 1. スピロジエノン型構造が当初の予想を超えて容易に酸処理で解裂可能なこと、2. 脱リグニンに負の影響を与えると予想されるビフェニル型構造の含有量は樹種間で大きく変動しシリングル/グアイアシル比に依存すること、を明確に示すことができた。一方で、分岐点の候補構造について高分子内における位置情報を得ようと試みたが、研究期間内に目的を達成するには至らなかった。この課題については、リグニン高分子の反応制御に有用な情報が得られることから、今後も研究を継続したい。また、これらの研究結果を得る過程で、簡易型スピロジエノン型化合物の調製手段、および、ビフェニル型構造の分析手段を確立したことで、木質バイオマスの研究・評価手段の幅を広げることができたと考えている。以上の研究成果は、植物細胞壁成分の効率的な分離法や選択的反応の設計、および植物種の選抜法を開発す



る上での基盤的な研究であり、今後、リグニンを含め、木質バイオマスを有用物質へと化学転換する基盤技術の創出に大きく寄与すると期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

木材成分のうち、リグニンの活用・利用の技術がまだ十分に開発されていない一因に、その構造の複雑さがある。本研究は、NMR の手法を駆使して、リグニンの部分構造の詳細を明らかにし、リグニン分子の化学反応性との関係を明らかにしようとするものである。本研究では秋山氏は、特に化学反応性が高いと考えるスピロジエノン構造の有無について、化学合成と酵素合成を組み合わせる三量体モデル化合物を合成し、NMR の解析から、その構造がリグニン分子に確かに存在し、また、それが酸で容易に開裂することを示した。秋山氏の着実な研究手法は高く評価される。こうした基礎的な研究成果を木材などのリグニン成分の利活用の基盤技術の開発につなげるには、この分野の研究者の連携が重要であろう。バイオマスの利用の中で、リグニンの利活用が最も遅れている現状で、秋山氏はこの分野の貴重な人材であり、今後、幅広く、木質バイオマスやリグニン化学・生化学の分野の研究者と交流し、その中核的な研究者として発展していくことを期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Akari Tamai, Haruka Goto, Takuya Akiyama, and Yuji Matsumoto.  
Revisiting alkaline nitrobenzene oxidation: quantitative evaluation of biphenyl structures in cedar wood lignin (*Cryptomeria japonica*) by a modified nitrobenzene oxidation method.  
Holzforschung.(2015) 69(8):951-958. DOI: 10.1515/hf-2014-0153

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

#### 1. 秋山拓也、松本雄二

スピロジエノン構造に関する研究: 同モデル化合物の酸処理によるジアリールプロパン構造の形成

第 58 回リグニン討論会、要旨集 22-25 頁、香川、2013 年 11 月

#### 2. Yanding Li, 秋山拓也、松本雄二

Nitrobenzene oxidation of a 4-O-5 lignin model compound

第 64 回木材学会大会、要旨集 179 頁(L13-P-03)、松山、2014 年 3 月

#### 3. Takuya Akiyama and Yuji Matsumoto.

Formation of diarylpropane structure from spirodienone model compound by acid treatment.

247th ACS National meeting, Dallas, USA, April 2014. #CELL123

4. 後藤晴加、玉井あかり、秋山拓也、松本雄二  
樹種間におけるビフェニル型構造量の多様性  
第 59 回リグニン討論会、要旨集 18-21 頁、福井、2014 年 9 月
5. 阿部雄一郎、秋山拓也、松本雄二  
リグニンのビフェニル型分岐構造の探索: モデル実験と NMR(HMBC)測定条件の検討  
第 59 回リグニン討論会、要旨集 104-105 頁、福井、2014 年 9 月
6. Deded S. Nawawi, Wasrin Syafii, Takuya Akiyama, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto.  
Syringyl-guaiacyl lignin in reaction wood of the vesseled-gymnosperm, Gnetum gnemon.  
International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS), Tokyo, Japan,  
March 2015. 3WC-P23
7. Yanding Li, Takuya Akiyama and Yuji Matsumoto.  
Nitrobenzene oxidation of 5-O-4 lignin model compounds and the characteristics of NMR  
chemical shifts of the models.  
International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS), Tokyo, Japan,  
March 2015. 3WC-P13
8. Haruka Goto, Akari Tamai, Takuya Akiyama, and Yuji Matsumoto.  
Variety of the content of biphenyl structures in softwood and hardwood lignins.  
International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS), Tokyo, Japan,  
March 2015. 3WC-O01

#### 招待講演

1. 秋山拓也  
リグニン化学構造の多様性  
高分子学会エコマテリアル研究会、東京、2015 年 7 月

#### 著作物

1. 秋山拓也  
リグニンの高分子構造(第 2 章第 7 項 6)、植物細胞壁(西谷和彦、梅澤俊明 編著)、講談社、2013 年、pp. 130-134 (ISBN: 978-4-06-153818-4)