

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 森 哲 哉

論 文 題 目

Preparation and advanced characterization of lignocellulose  
using multidimensional NMR

( 多次元NMR法のためのリグノセルロースの  
調製及び解析技術の高度化 )

論文審査担当者

主 査	名古屋大学客員教授	菊 地	淳
委 員	名古屋大学教授	小 鹿	一
委 員	名古屋大学教授	福 島	和 彦
委 員	名古屋大学教授	柘 植	尚 志

植物は炭酸固定してバイオマスを生産する代謝能を有しているため、持続的な炭素素材の供給を化石資源から植物バイオマスに代替するバイオリファイナリーへの転換が模索されている。その原料バイオマスの中でも木質バイオマスは、リグノセルロースが主成分であり、細胞壁成分のセルロース、ヘミセルロース、リグニンが自己組織化した超分子構造を形成している。バイオリファイナリーが発展するためには、このリグノセルロース超分子構造の理解が望まれている。しかし、セルロースは成分均一性が高い反面剛直な結晶性を有し、一方でヘミセルロースやリグニンは複雑な化学組成のため非晶性を呈する等、各高分子成分が異なる物性を有するため難しい研究対象である。リグノセルロースの超分子構造解明の鍵として、リグノセルロースの可溶化が挙げられる。リグノセルロースの可溶化によって、分析が容易になるだけではなく、実用的にも可溶化状態での各成分の分離・再構成や、効率的分解といったバイオリファイナリーの各プロセスへ利用することも可能となる。

本研究では、リグノセルロースの超分子構造の解明への基礎的検討を行うために、まず均一成成分系であるセルロースの非晶構造解析に着手し、続いて実バイオマスの解析例として形質転換ポプラと野生型との比較を遂行した。両試料ともリグノセルロースの可溶化を利用し、 $^{13}\text{C}$  標識化を行うことで固体および溶液 NMR 法の各種パルス系列の適用を可能とした。

#### ① NMR 化学シフトを用いた非結晶セルロースの立体配座空間の探索

セルロースは、地球上で最も多量に存在する生体高分子であり、古くから衣服や紙パルプとして用いられてきたのみならず、近年ではナノテク材料としても有望視されている。こうした材料物性は、結晶構造と非晶構造の両方が密接に関わって発現される。結晶構造は NMR、IR およびラマンの各種分光法、X 線回折法や分子動力学計算を用いて詳細に解明されているが、非結晶構造の構造的特徴は不明な点が多い。そこで本研究では、 $^{13}\text{C}$  標識化セルロースを調製し、イオン液体処理による可溶化を経て再生非晶セルロースを調製した。この非晶化試料に 2 次元固体 NMR 法のパルス系列である  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  INADEQUATE 法を適用し、非晶構造の炭素の化学シフトの全帰属に成功した。さらに、結晶および非晶構造で最も化学シフト差の大きい C4 位に着目し、ランダムに分子動力学計算によって発生させた 5000 構造から、結晶・非晶構造の化学シフト差を再現する局所構造モデルを探索するため、密度汎関数法に基づく量子化学計算を遂行した。その結果、実験および理論化学シフト値が一致した非晶構造モデルでは  $\beta$ -1-4 結合を繋ぐグリコシド結合が大きい

く回転し、結晶構造では水平方向のみ配向していた水酸基が種々の方向に向くことで、炭素の露出表面積が著しく減少し、分子間パッキングに重要な疎水相互作用が弱まるために材料物性が変化することが解明された。

## ②多次元 high-resolution magic angle spinning (HR-MAS)及び溶液 NMR 法を用いた植物の $^{13}\text{C}$ -代謝物とリグノセルロース成分の NMR シグナル帰属

次に多成分からなる実バイオマスの試料系として、早生樹であるポプラを用いることとした。しかし、実バイオマスに NMR 法を用いる場合、各成分のシグナルが重なり合い、固体 NMR 法では正確なシグナル帰属が行えないことが多い。そこで、 $^{13}\text{C}$  標識化ポプラを調製し、各種多次元 NMR パルス系列の利用によって、シグナル重複の問題を解決した。まず、 $^{13}\text{C}$  標識化ポプラに対して抽出操作を経ずにインタクトな組織を計測することが可能な HR-MAS 法を用い、組織中で拡散運動が可能な低分子代謝物の NMR シグナルを帰属することができた。さらに、強固に自己組織化したリグノセルロース成分を DMSO/pyridine 溶媒に可溶化させ、多次元溶液 NMR 法を用いて解析した。これらの方法を用いて、 $^{13}\text{C}$  標識化ポプラの低分子、高分子物質の化学シフトを明確に帰属した。得られた化学シフトデータを参照することによって、バイオマス生産に関わる *VND6* 及び *VND7* 遺伝子が過剰発現するポプラ形質転換体の比較を行った。生育期間の短いポプラサンプルを対象として、後生木部道管に分化する *VND6* の過剰発現体では可溶化リグノセルロース画分が野生型と比べ少なく、一方、原生木部道管に分化する *VND7* の過剰発現体では多い結果となり、本法によって化学的表現型を評価出来ることを示した。

以上のように、森哲哉は、 $^{13}\text{C}$  標識化と各種多次元 NMR 法の適用により、均一成分系としてセルロースの非晶構造モデル、および多成分の実バイオマス系としてポプラ形質転換体の化学的表現型の評価を可能とした。本研究で用いたバイオマス解析法を援用し、バイオリファイナリー研究の更なる進展が期待できる。よって、本審査委員会は、本論文の内容が博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと認め、論文審査に合格と判定した。

