

実施課題名: ^{13}C CO₂で育成した樹木細胞壁の超高速MAS-NMRによる定量的構造解析

【背景】

植物細胞壁の主成分の1つであるリグニンは、溶剤溶解性がなく、他の高分子成分との結合を有するため、構造を変質させずに単離することは不可能である。そのため、天然状態を維持したままでの定量的構造解析は困難であった。現在は、多少の分解を伴いながら抽出・溶剤に可溶化させた上で、液体NMR分析による構造解析が行われている。一方、固体NMRではより天然に近い状態での分析が可能であるものの、四級炭素が多く、構造の複雑なリグニンでは定量分析に耐えるスペクトルの取得は困難であった。

【実施内容】

本研究では、高濃度 ^{13}C 化試料の調製による感度改善と定量分析パラメータ(緩和時間)の評価、超高速MAS固体NMRによる定量かつ分離能の高いスペクトルの取得、そして液体NMR分析を参考にしたピークフィッティング解析を組み合わせ、課題の解決に取り組んだ。

【 ^{13}C 樹木の育成と緩和分析】 ^{13}C CO₂雰囲気化で樹木を育成し、高濃度 ^{13}C 化植物細胞壁試料を得た。試料中の炭素は80%程度が ^{13}C 化されており、現実的な分析時間でリグニンの定量分析用パラメータを決定できた。

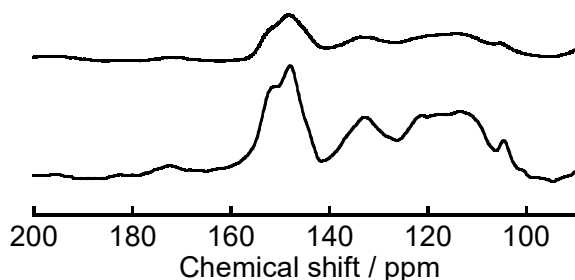
【超高速MAS固体NMR分析】NMR共用PF所有の700 MHz超高速MAS(70 kHz)固体NMR装置を用いてCP/MASおよびDD/MAS分析を行った。得られたスペクトルはシグナル強度の増大のみならず、一般的な固体NMR装置(MAS 10-15 kHz)では判別できなかったシグナルが認識され、ピークフィッティング解析の適用が可能となった。

【ピークフィッティング解析】液体NMR分析および既存データベースに基づいて初期パラメータを決定し、ピークフィッティング解析を行った。結果より、液体NMR分析への前処理過程における一部結合の開裂を定量的に評価することができた。

• Fig.1

(a) 従来装置
(MAS 14.7 kHz)

(b) 超高速MAS
(MAS 70.0 kHz)



酵素糖化残差リグニンのDD/MASスペクトル

• Fig.2

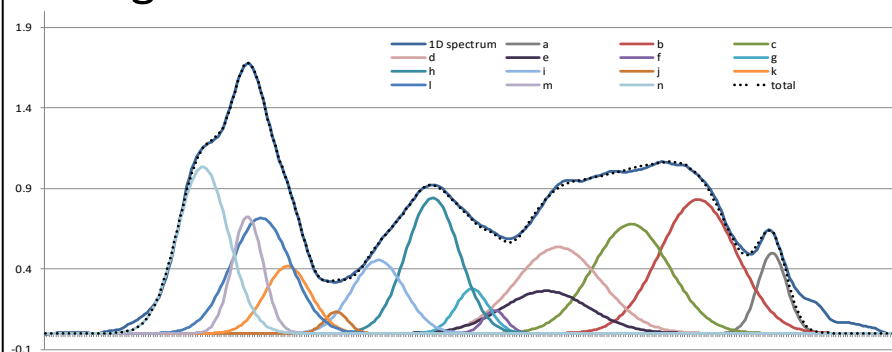


Fig. 1 (b)のピークフィッティング結果

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題

利用報告書

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	PF19-01-R-025		
利用課題名	13C02 で育成した樹木細胞壁の超高速 MAS-NMR による定量的構造解析		
実施機関名	名古屋大学		
実施部署名	生命農学研究科		
実施責任者管理職名・氏名	職名	講師	氏名 青木 弾
実施部署所在地	愛知県名古屋市千種区不老町		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	<p>リグニン化学構造解析の歴史は長い、リグニンを細胞壁から損傷なく取り出す技術は確立されておらず、世界的にスタンダードとされている二次元液体 NMR 分光法による分析では、リグニンの構造変質が避けられない。そのため、前処理を共通化することでスペクトルの変化を議論しているが、真に天然状態のリグニン構造に関する議論は未だ決着していない。しかしながら細胞壁の損傷を可能な限り抑えて調製した粉末を固体 NMR 分析に供しても、非常にブロードなシグナルが得られるのみであり、かつ四級炭素の多い芳香族構造が主体となるリグニンは感度が低く、定量条件の検討すら難しいのが実情であった。これを解決するため申請者は、13C02 の長期投与による新生木部の高濃度 13C 化を目指した研究(科研費 基盤 C 15K07510)を実施した。得られた高濃度 13C 樹木試料を用いて、緩和時間測定、DP/MAS 分析を行い、定量的な固体 13C NMR スペクトルを得た。しかしながらシグナルの広幅性は解決できておらず、個々の部分構造に関する高精度な定量的情報の抽出には至らなかった。そこで本研究課題では固体 NMR 装置の最近の進展として特に重要である超高速 MAS を用いることで、リグニン 13C 固体 NMR スペクトルの定量的かつ超高分解能な構造解析を目指した。</p>		
利用実施時期、及び期間	2019 年 11 月 27 日～2019 年 11 月 28 日 2019 年 12 月 24 日～2019 年 12 月 26 日 総利用日数： 5 日 <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)当初 2 週間予定であったが、高速 MAS 条件最適化が円滑にできたこと、緩和時間測定を省略できたことから、合計日数を短縮することができた。		

利用施設 理化学研究所	NMR装置 (該当部分に ○)	<p>利用装置①</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、(○) 固体 700MHz、() 固体 900MHz <p>利用期間 1 : 2019 年 11 月 27 日～2019 年 11 月 28 日 利用期間 2 : 2019 年 12 月 24 日～2019 年 12 月 26 日 利用期間 3 : 20 年 月 日～20 年 月 日</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz <p>利用期間 1 : 20 年 月 日～20 年 月 日 利用期間 2 : 20 年 月 日～20 年 月 日 利用期間 3 : 20 年 月 日～20 年 月 日</p>
	立体構造解析 パイプライン	<ul style="list-style-type: none"> ・ 発現確認 : 利用回数 回 ・ フォールド判定 : 利用回数 回 ・ 大量調製 : 利用回数 回 ・ 精製試験 : 利用回数 回 ・ 多種変異体 : 利用回数 回 ・ SiCode : 利用回数 回
その他の 利用施設	※4 NMR 施設以外の装置、支援などを利用した場合は記載してください	
成果の 概要	<p>実施内容 (字数制限はありませんが 400 字～800 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>※申請書との整合性にご配慮ください。</p> <p>13C02 環境で育成した樹木試料について、超高速 MAS 固体 NMR 測定を行った。当初、高速 MAS 条件では試料の回転が安定しなかったものの、担当者と議論しながら、詳細に検討した結果、高速 MAS 条件での安定した測定が可能となった。測定の結果、既存装置での通常 MAS 条件のスペクトルと比べて、重複シグナル中のショルダー位置が識別できるようになり、ピーク分離計算の根拠として重要なデータを得ることができた。しかしながら、非晶性高分子成分は結晶性成分と比較して超高速 MAS によるシグナルの先鋭化には限界があり、複雑な構造を有する高分子のシグナルを完全分離することは不可能であった。そのため、それぞれの試料から得られたスペクトルについて、フィッティング解析を進め、液体 NMR との比較を行った。事前測定に利用していた固体 NMR 装置と共鳴周波数が同一であり、緩和時間測定の結果をそのまま利用できたため、合計の分析日数を短縮することができた(申請 2 週間→5 日間)。</p>

	<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが400字～800字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>超高速 MAS 法によって、実際にどの程度のシグナル先鋭化が達成されるのかは、対象成分の化学構造、分子集合体構造に強く依存するため、測定を実施するまでは不明であった。実際に得られたスペクトルについて、結晶性成分での例と比較すると、先鋭化の程度は小さかったといえる。しかしながら一般的な既存装置 (MAS 14.7kHz) と比較すると、シグナル強度は増大し、さらにこれまで判別できなかった多くのシグナルが認識され、ピークフィッティング解析の適用が可能となった。化学分解を伴わず、かつ定量評価の可能な固体 NMR 手法であることを考慮すれば、非常に重要な成果である。</p>
	<p>成果発表</p>	<p>今後、学会発表 (日本木材学会、リグニン学会など) および英語論文での発表を計画しているが、現時点では未発表である。</p>
	<p>今後の展開 (字数制限はありませんが300字～600字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>※特に、本課題により得られた NMR 技術を用いた応用について 事前にはあまり重視していなかったが当該分析装置の特に優れた点として、微量サンプルでの分析が可能であることが挙げられる。植物細胞壁中の各成分は、樹種・組織、さらには細胞壁中の部位においても異なった構造を有しているが、それらについて、化学分解を伴わない手法で、超高感度かつ定量的に分析する手法は皆無であった。13C 標識および超高速 MAS 固体 NMR 分析の組み合わせにより、この課題について飛躍的な進展が期待できる。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し (字数制限はありません 300字～600字以内(程度)でお書きください。)</p>		<p>当該課題は基礎分野であり、すぐさまに社会・経済への波及効果を期待できるものではないが、木質バイオマスの最適な利活用のためには、その構造情報の精確な理解が不可欠である。また樹木の強く長寿命な構造がどのように形成されているのかについての理解は、今後のマテリアル分子、分子集合体の設計指針に貢献できる可能性がある。</p>

<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>※本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。なお複数機関の利用の場合は、どの施設に対する感想かも明記して下さい。</p> <p>担当者には非常に親切かつ丁寧に対応して頂いた。特殊な試料への対応が多いため、様々なノウハウを有することもポイントであると考えられる。施設内には購買・食堂・休憩所なども完備されており、非常に良好な環境であった。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>学術的に大変貴重かつ強力な分析をさせて頂いた。今後も当該プロジェクトを継続して頂きますよう、お願い申し上げます。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>※特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前に利用機関先の課題担当者にご相談ください。</p> <p>() あり : (○) なし</p> <p>「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>