

公益財団法人 江間忠・木材振興財団 研究助成金
報告書

「未利用バイオマスからの新奇植物成長促進剤の開発」

東京農工大学大学院農学研究院
松下泰幸

【背景】

脱炭素社会への世界的方向転換にはもはや一刻の猶予もなく、カーボンニュートラルな木質バイオマスの効率的なマテリアル変換手法が喫緊の開発目標の一つとなっている。木質バイオマスのうち7割程度がセルロースなどの多糖類であり、これらは繊維、フィルム、エタノールなどに変換可能であるが、約3割程度占めるリグニンは、地球上において貴重な芳香族性化合物でありながら、そのほとんどは有効的な利活用がなされていない。

リグニンは繰り返し構造を持たない非常に複雑な高分子化合物であり、それゆえ高度な利活用を阻んできた。世界中で行われているほとんどの研究は“石油製品に匹敵する工業製品の開発”に重心が置かれおり、化石資源脱却においては重要な課題であるものの、複雑な天然物高分子化合物であるリグニンから、低エネルギーかつ簡便な方法で精密工業製品を創製するにはハードルが高く、短期間で開発するには難しい状態である。

我々の研究グループでは、以前より木材糖化に着目して研究を行ってきた。木材糖化とは、木材に含まれる多糖成分を硫酸などによって加水分解し、単糖を得る方法である。得られた単糖はバイオエタノールの原料や家畜の飼料などに利用可能である。しかしながら、副産物である硫酸リグニン（SAL）は樹脂化してしまい、反応性が低いために、利用価値が見出されていなかった。我々は、鋭意研究を続けた結果、アルカリ水熱反応という非常に簡単な方法で水溶性の化合物に変換することに成功した（図1）。

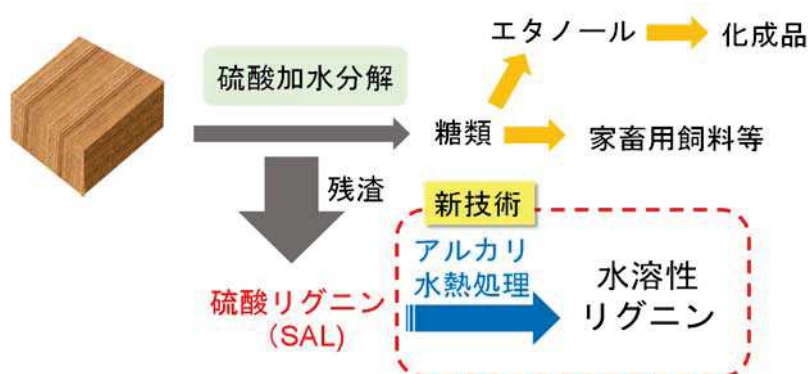


図1. 木材糖化と残渣リグニンの水溶化に関する概念図

この水溶化した硫酸リグニン（HSAL）の性質について調べたところ、フェノール性ヒドロキシ基の量が多く、高い抗酸化性を示すことが判明した（図 2, 3）。

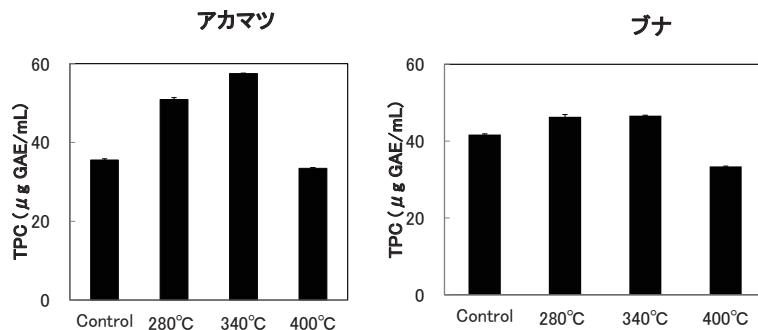


図 2. 水熱処理温度とフェノール性ヒドロキシ基量

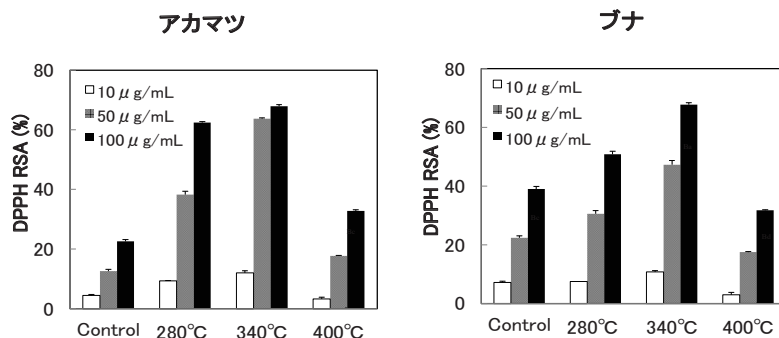


図 3. 水熱処理温度と抗酸化性（ラジカル補足能）

また、モデル化合物を用いた実験結果より、HSAL はカテコール核を有していることが判明した（図 4）。

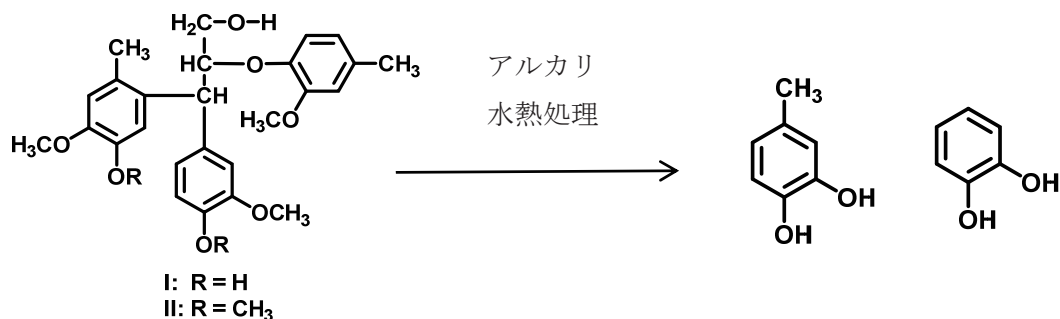


図 4. モデル化合物を用いた水熱反応

フェノール性ヒドロキシ基の増加や抗酸化性を示すことから、HSAL は生理活性を示すことが期待できた。HSAL の植物に対する成長促進効果を調べたところ、イネの水耕栽培において根の著しい成長が見られた（図 5）。

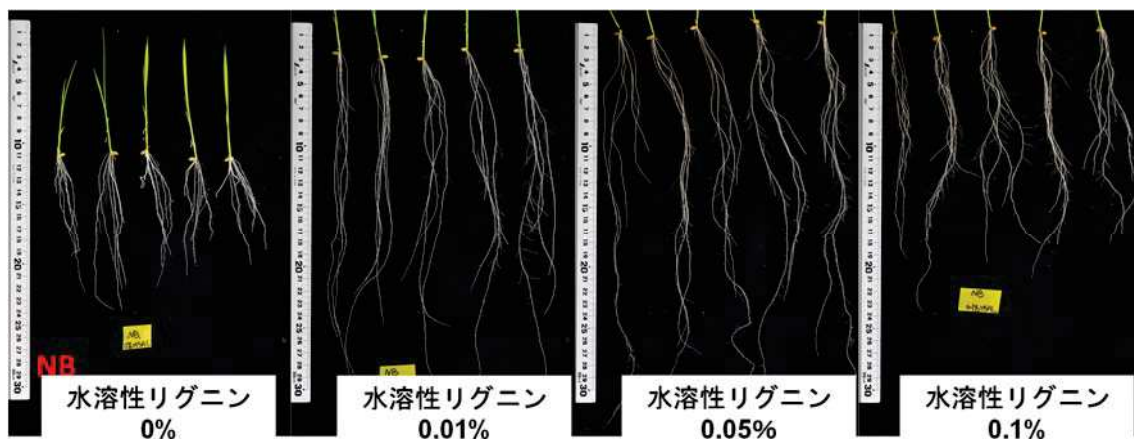


図 5. 水溶化したリグニンの根の伸長作用

水溶化したリグニン自体には、必須元素である窒素、リン、カリウムが含まれていないにもかかわらず、成長促進作用を示すことから、これまでにないメカニズムが存在すると考えられる。このメカニズムが解明できれば、新奇肥料の開発にもつながり、食糧生産の増産も期待できる。

上記、研究結果を踏まえ、このプロジェクトで行った研究項目は以下の 3 点である。

1. 伸長したイネの形態的観察
2. イネを通年育成した場合の成長量および収穫量増加量
3. 成長促進メカニズムの解析

【検討結果】

1. 伸長したイネの形態的観察

図 6 にイネの水耕栽培における根の伸長曲線を示す。

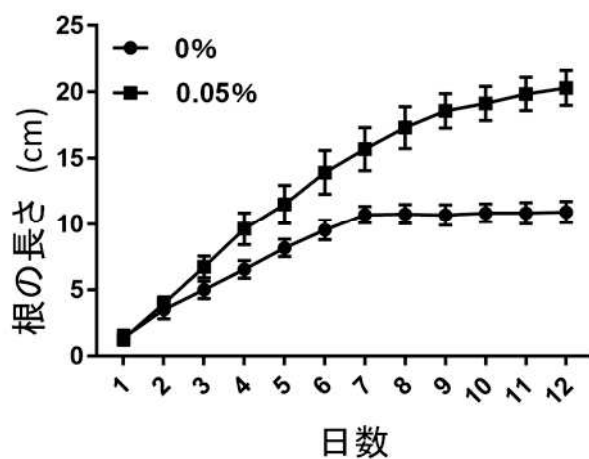


図 6. イネの根の伸長曲線

なにも加えない場合、7 日目で成長が止まったが、水溶化したリグニンを 0.05% 加えた場合、7 日を過ぎても成長を続け、12 日以降も成長していることがわかった。

根の顕微鏡観察結果を以下に示す（表 1、図 7）。

表 1. イネの根の大きさ(um)

	外皮	皮層	内皮
0%	50-60	70-90	50-80
0.05%	40-70	35-75	50-60

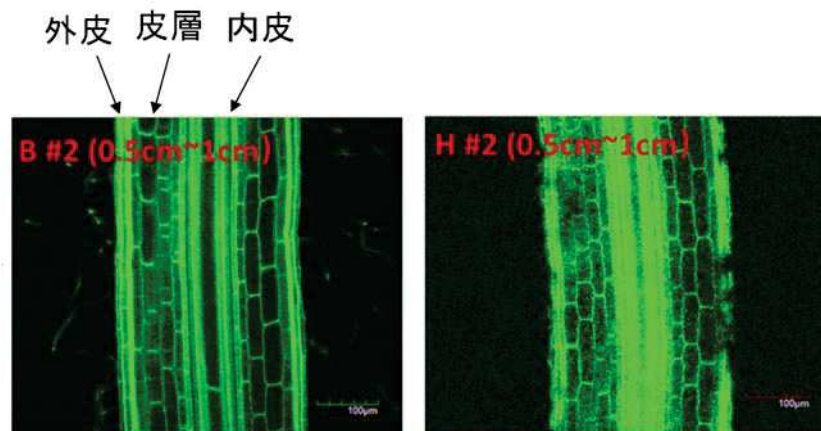


図 7. イネの根の顕微鏡写真

顕微鏡観察によって、水溶化したリグニンを添加することによって、細胞が長くなるのではなく、細胞分裂活性が高まり、細胞数が増加することが分かった。

電子顕微鏡写真を図 8 に、根の直径及び各細胞の太さを表 2 に示す。

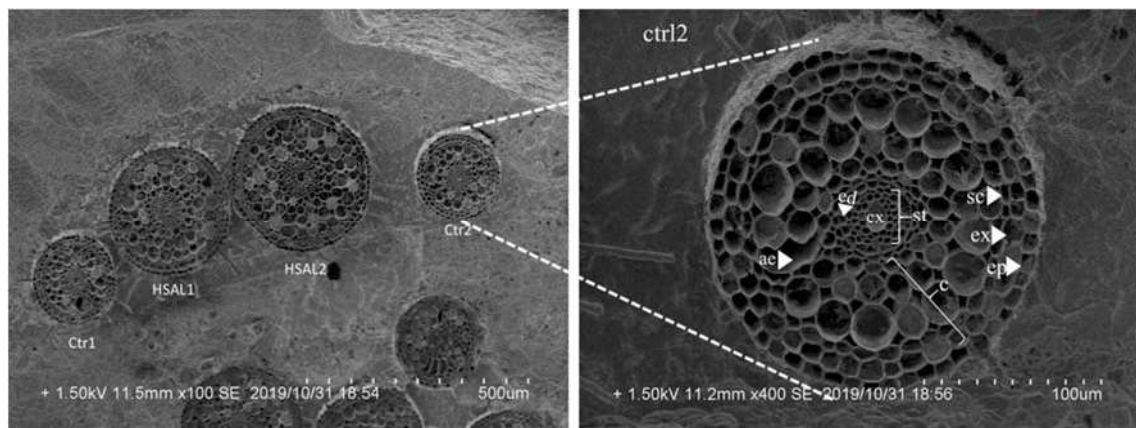


図 8. イネの根（断面）の電子顕微鏡写真

表 2. 根の直径及び各細胞の太さ (um)

	0%		0.05%	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
直径	185-195	190-197.5	273.3-286.7	305.5-320
後生木部 (cx)	13-15	15-17.5	20-22.5	21.8-24
中心柱 (st)	32.5-3.5	31-32.5	60-63.3	58.2-60
皮層 (c)	50.5-2.5	47.5-52.5	83.3-86.7	90.9-94.6
厚膜組織 (sc)	5-10	5-10	3.3-10	3.6-11
内皮 (ex)	12.5-15	10-15	15-20	14.6-21.8
表皮 (ep)	5-7.5	5-10	10-15	7.3-14.6

この結果から、水溶性リグニンの添加によって根が太くなっていることが分かった。

2. イネを通年育成した場合の成長量および収穫量増加量

これまでの研究で、水溶化したリグニンがイネの成長に大きな影響を及ぼすことが判明した。そこで、一年を通じてイネを栽培し、成長量および収穫量について調査することとした。

生育方法

東京農工大学内のファイトロンを用いて、図 9 に示した実験計画に沿って、イネを生育させた。

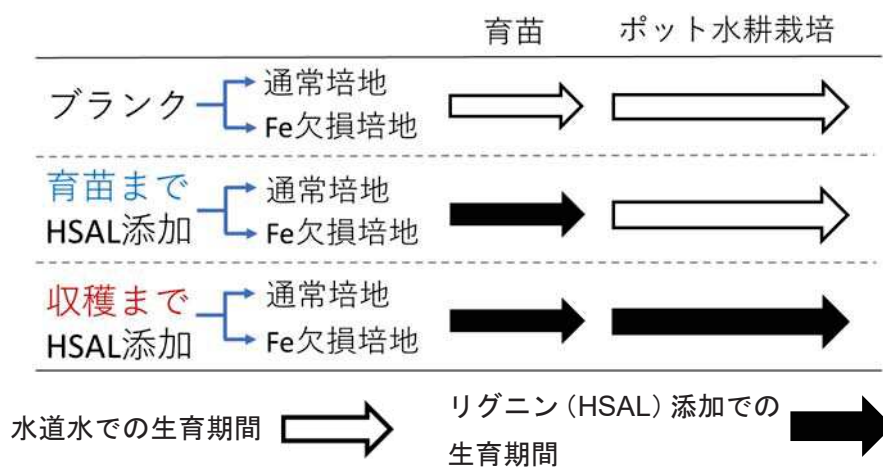


図 9. 水耕栽培計画

また、土壌栽培においては、土壌に種をまき、所定量の HSAL 溶液を加えた。その後の生育は水道水のみで行った（図 10）。



図 10. 土壌栽培実験（種まき及び HSAL 溶液添加後）

結果

・水耕栽培

育苗期間までの写真を以下に示す。HSAL を添加した場合、根張りがよくなり、シュートも大きく育った（図 11）。



図 11. ファイトトロンでの稲の生育実験（育苗期間）

ポット水耕栽培の結果、収穫まで HSAL を与えるとイネの収穫量が約 3 倍に増加した。また、Fe 欠損培地では、育苗まで HSAL を与えると収穫量増加の効果があつたが、生育期間まで与えると逆に負の効果があつた。

・土壌栽培

HSAL 添加することにより、土壌栽培においてもイネの成長促進作用が観察された。

3. 成長促進メカニズムの解析

モデル化合物を用いた実験により、HSAL はカテコール核を持つことが分かり、金属キレート性を持つことが期待できた。そこで、成長促進のキーポイントはこの金属キレート性にあると考え、遺伝子変異体シロイヌナズナを用いて、HSAL と鉄イオンの関係を調査した。

用いた遺伝子変異体シロイヌナズナ

opt3-2 変異体

OPT3 は鉄のトランスポーターとして機能し、師部へのローディングを担う。*opt3-2* 変異体はその機能が低い。

irt1-1 変異体

IRT1 は根の表皮などの細胞膜（イネ科植物以外）に存在する金属二価陽イオン輸送体であり、鉄の場合、 Fe^{2+} を細胞内に輸送する。*irt1-1* 変異体はその能力が低い。

fro2 変異体

FRO2 は根の細胞膜表層（イネ科植物以外）に存在する鉄キレート還元酵素であり、 Fe^{3+} から Fe^{2+} へと還元する。*fro2* 変異体はその能力が低い。

結果

生育結果を図 12 に示す。

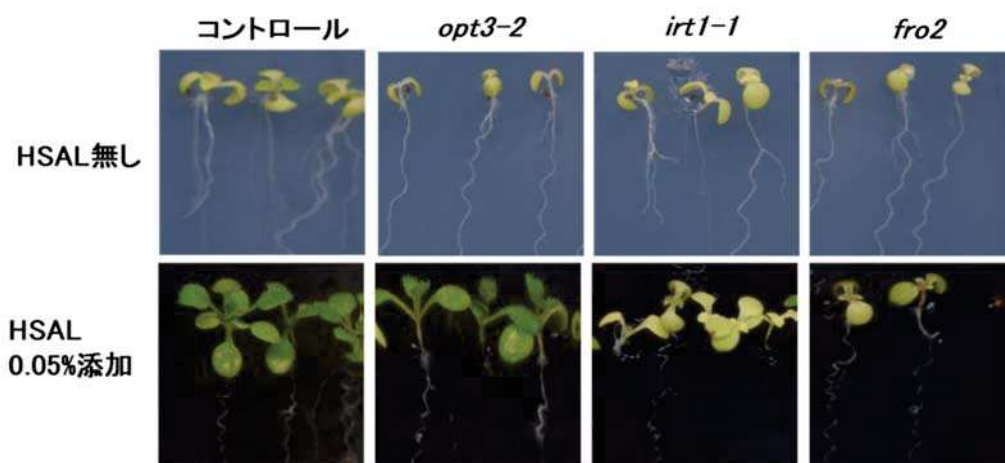


図 12. 鉄欠損培地でのシロイヌナズナの栽培実験

opt3-2 変異体においても、HSAL の添加により良好な生育を示した。しかしながら、*irt1-1* および *fro2* 変異体では HSAL 添加でも良好な生育は見られなかった。このことから HSAL は IRT1 および FRO2 のような働きはせず、アポプラストに効率よく Fe^{3+} を運搬するキレーターとして働いていることが考えられる。

以上の結果より、以下の成長促進メカニズムが考えられる（図 13）

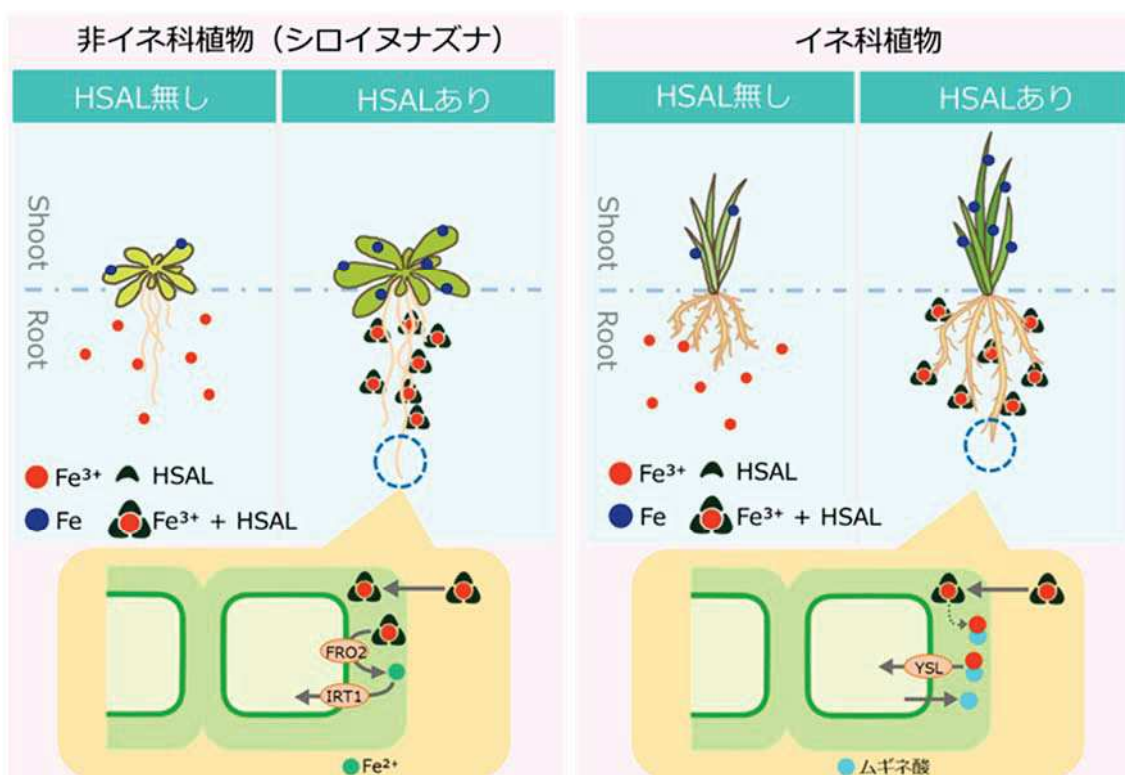


図 13. 本研究により得られた HSAL による鉄のキレート作用とそれによる植物の成長促進作用に関する模式図。

HSAL はイネとシロイヌナズナの両方において、根の成育促進作用を示す。HSAL は Fe^{3+} をキレート化することにより、効率的に植物に鉄を供給する。シロイヌナズナでは、HSAL でキレートされた Fe^{3+} は FRO2 第二鉄還元酵素によって Fe^{2+} に還元され、IRT1 輸送体を通して植物細胞内に輸送される。イネ科植物では、 Fe^{3+} は HSAL キレート複合体から放出され、フィトシデロフォア（ムギネ酸）キレート複合体の形で YSL トランスポーターを介して根細胞に輸送されると考えられる。

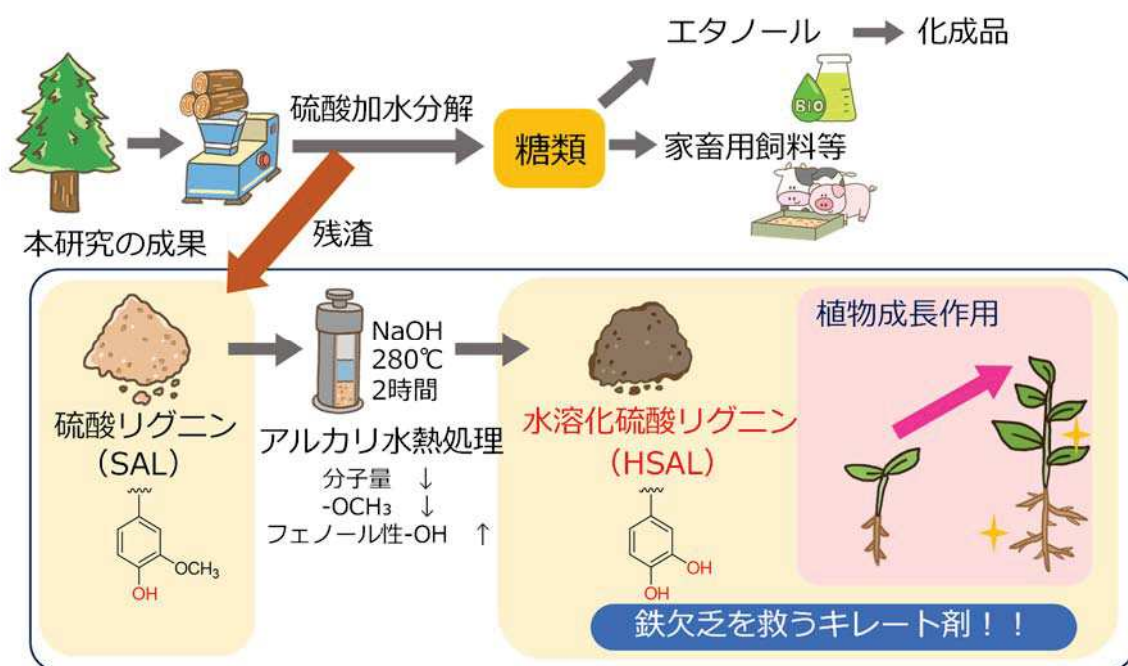
まとめ

グリーンカーボンである樹木は、人間の食糧や家畜飼料と競合しないことから、バイオ燃料やその他の製品の原料を精製するための理想的なバイオマスである。樹木のうち多糖成分であるセルロースやヘミセルロースは、紙パルプやレーヨン、さらにはエタノールや化学原料などにも変換することができるが、樹木中に多量に含まれている“リグニン”は構造が非常に複雑であるため、有用な化学原料として使用することが難しく、有効な活用方法が見出されていなかった。

木質材料を硫酸で加水分解することにより、単糖類を得ることができ、家畜飼料として利用できるとともに、発酵によりエタノールを得ることもできる。このプロセスは、非常に優れた活用方法といえるが、残渣として得られる硫酸リグニン（SAL）は樹脂化してしまい、化学反応性が乏しいため、化成品などに利用することは非常に困難であった。

我々はこの SAL をアルカリ水熱処理という非常に簡便な処理により、水溶化させることに成功した。さらに、水溶化した硫酸リグニン（HSAL）はその金属キレート能により、植物成長促進作用を示すことが分かった。

現在、アルカリ性土壌により世界の農地の 3 分の 1 が鉄欠乏土壌とされ、これによって作物の収量が減少し、品質が低下しているという問題が存在している。鉄不足を補うため、現在は土壌に化学合成品のキレート剤を添加する方法が取られているが、これらは生分解性がなく、環境に対する負荷が非常に大きいばかりか、重金属汚染を引き起こす可能性も指摘されている。我々が開発した HSAL は天然由来のポリフェノール性高分子であり、安心して使える土壌改質剤として活用可能であり、耕作不適地においても作物の収量と品質を向上させ、食糧の安定供給に大きく貢献することが期待される。



研究体制：

東京農工大学、浙江大学、名古屋大学、佛山科学技術学院、中国科学院、ソーク研究所
の共同研究

研究成果：

- ・第 73 回日本木材学会 口頭発表 宮島亜美、大川泰一郎、松下泰幸「硫酸リグニンからの植物成長剤の開発」
- ・ Q. Liu, T. Kawaii, Y. Inukai, D. Aoki, Z. Feng, Y. Xiao, K. Fukushima, X. Lin, W. Shi, W. Busch, Y. Matsushita, B. Li. A lignin-derived material improves plant nutrient bioavailability and growth through its metal chelating capacity. *Nature Communications*, 14, 4866 (2023). DOI: 10.1038/s41467-023-40497-2

謝辞：

江間忠・木材振興財団様から多大なる援助を頂き、厚く御礼申し上げます。また、浙江大学の劉強 博士、Baohai Li 教授、Zhihang Feng 博士、Yihui Xiao 修士学生、Xianyong Lin 教授、名古屋大学の河合翼 博士、犬飼義明 教授、青木弾 准教授、福島和彦 教授、佛山科学技術学院および中国科学院の Weiming Shi 教授、ソーク研究所の Wolfgang Busch 教授、東京農工大学の大川泰一郎 教授、宮島亜美 修士学生、その他、多くの方々のご協力に深く感謝申し申し上げます。