

信州大学審査学位論文

植物細胞壁中のリグニン-キシラン複合体の単離と
その酵素分解

2021 年 3 月

高相 昊

Sangho Koh

目次

第1章 緒論

1-1. バイオマス資源としての植物細胞壁	1
1-2. 植物細胞壁の構成成分	1
1-3. 植物細胞壁構成成分の複合体	3
1-4. 植物細胞壁分解酵素	4
1-5. 植物細胞壁分解酵素研究における問題点及び課題	6
1-6. 研究の目的	7
第1章 参考文献	8
第1章 図表	10

第2章 リグニン-キシラン複合体に作用する酵素群の単離及び性質決定

2-1. はじめに	16
2-2. 実験材料及び方法	
2-2-1. 菌株及びベクター	17
2-2-2. cDNA の調製	17
2-2-3. キシラナーゼ発現用プラスミドの構築	17
2-2-4. グルクロノイルエステラーゼ発現用プラスミドの構築	18
2-2-5. アセチルキシランエステラーゼ発現用プラスミドの構築	18
2-2-6. グルクロニダーゼ発現用プラスミドの構築	18
2-2-7. 形質転換及び組換え体の発現	18
2-2-8. キシラナーゼ活性の測定	19
2-2-9. α -グルクロニダーゼ活性の測定	19
2-2-10. グルクロノイルエステラーゼ活性の測定	19
2-2-11. エステラーゼ活性の測定	20
2-3. 結果	
2-3-1. エンド- β -1,4-キシラナーゼ遺伝子の cDNA クローニング	20
2-3-2. <i>PesXyn10A</i> の異種発現系構築及び酵素学的諸性質	21
2-3-3. グルクロノイルエステラーゼ遺伝子の cDNA クローニング	22
2-3-4. <i>PesGE</i> の異種発現系構築及び酵素学的諸性質	23
2-3-5. α -グルクロニダーゼ遺伝子の cDNA クローニング	24
2-3-6. <i>IIAgu115A</i> の異種発現系構築及び酵素学的諸性質	24
2-3-7. アセチルキシランエステラーゼ遺伝子の cDNA クローニング	25

2-3-8. //AXE1 の異種発現系構築及び酵素学的諸性質	25
2-4. 考察	26
第2章 参考文献	28
第2章 図表	32

第3章 リグニン-キシラン間のベンジルエステル結合を模倣したモデル基質の合成及びその酵素分解

3-1. はじめに	46
3-2. 実験材料及び方法	
3-2-1. 実験材料及び試薬	47
3-2-2. キシランの酵素分解及び MeGlcA ³ Xyl ₃ の分取・精製	48
3-2-3. MeGlcA ³ Xyl ₃ のベンジルエステル化反応	49
3-2-4. 酵素活性測定	49
3-3. 結果	
3-3-1. MeGlcA ³ Xyl ₃ の精製	50
3-3-2. MeGlcA ³ Xyl ₃ のベンジルエステル化	51
3-3-3. PesGE の活性評価	52
3-4. 考察	53
第3章 参考文献	56
第3章 図表	59

第4章 イオン液体処理によるリグニン-キシラン複合体の単離及びその酵素分解

4-1. はじめに	72
4-2. 実験材料及び方法	
4-2-1. 実験材料	73
4-2-2. IL 溶解処理及び溶解成分の分画方法	74
4-2-3. アルカリ抽出キシランの調製	74
4-2-4. リグニン及び構成糖の分析	75
4-2-5. FT-IR	75
4-2-6. 側鎖修飾基分析	
4-2-6-1. アセチル基の定量	75
4-2-6-2. 4-O-メチルグルクロン酸の定量	76
4-2-6-3. フェルラ酸及び <i>p</i> -クマール酸の定量	76
4-2-7. サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)	76

4-2-8. 酵素反応	77
4-3. 結果	
4-3-1. イオン液体抽出処理による植物細胞壁成分の抽出及び分画	77
4-3-2. XP 画分及び XS 画分に含まれるキシランの修飾基分析	78
4-3-3. XP 画分及び XS 画分の分子量分布	79
4-3-4. リグニンとキシランの複合状態の解析	80
4-3-5. XP 画分及び XS 画分の酵素分解性	81
4-4. 考察	
4-4-1. IL 抽出法による植物細胞壁成分の抽出及び分画	82
4-4-2. XP 画分及び XS 画分に含まれるキシランの構造的特徴	84
4-4-3. LXC 中に含まれるベンジルエステル結合の酵素分解性	85
4-4-4. LXC 中に含まれるキシランの酵素分解性	86
第 4 章 参考文献	88
第 4 章 図表	92
 第 5 章 総論	
5-1. 研究成果の概要	105
5-2. 今後の課題及び展望	107
5-3. 総括	108
第 5 章 参考文献	109
 学位論文の成果一覧	111
 謝辞	

略字一覧

LCC	lignin-carbohydrate complex
LXC	lignin-xylan complex
CMC	carboxymethyl cellulose
Xyl	D-xylose
Xyl ₂	1,4-β-D-xylobiose
Xyl ₃	1,4-β-D-xylotriose
Xyl ₄	1,4-β-D-xylotetraose
Xyl ₅	1,4-β-D-xylopentaose
Ara	α-L-arabinose
MeGlcA	4- <i>O</i> -methyl-D-glucuronic acid
GlcA	D-glucuronic acid
GalA	D-galacturonic acid
MeGlcA ³ Xyl ₃	1,2 ³ -α-D-(4- <i>O</i> -methyl-glucuronoyl)-1,4-β-D-xylotriose
GlcA ³ Xyl ₃	1,2 ³ -α-D-glucuronoyl-1,4-β-D-xylotriose
MeGlcA ³ Xyl ₄	1,2 ³ -α-D-(4- <i>O</i> -methyl-glucuronoyl)-1,4-β-D-xylotetraose
Bnz-MeGlcA ³ Xyl ₃	benzyl-1,2 ³ -α-D-(4- <i>O</i> -methyl-glucuronoyl)-1,4-β-D-xylotriose
Me-MeGlcA- <i>p</i> NPXyl	4-nitrophenyl 2- <i>O</i> -(methyl-4- <i>O</i> -methyl-α-D-glucopyranosyluronate)-β-D-xylopyranoside
Bnz-GlcA	benzyl-D-glucuronate
Bnz-OH	benzyl alcohol
Bnz-Br	benzyl bromide
αNAc	α-naphthyl acetate
<i>p</i> NPAc	<i>p</i> -nitrophenyl acetate
MuAc	4-methylumbelliferyl acetate
MeCou	methyl- <i>p</i> -coumarate
EtFe	ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate
AcOH	acetic acid
FA	ferulic acid
<i>p</i> CA	<i>p</i> -coumaric acid
CAZy	carbohydrate-active enzymes
PDB	protein data bank
GH	glycoside hydrolase
CE	carbohydrate esterase
AA	auxiliary activity

EG	endoglucanase
CBH	cellobiohydrolase
BGL	β -glycosidase
CBM	cellulose binding module
CBD	carbohydrate binding domain
LPMO	lytic polysaccharide mono-oxygenase
XYN	xylanase
BXL	β -xylosidase
AGU	α -glucuronidase
ABF	α -L-arabinofuranosidase
AXE	acetylxylan esterase
FAE	feruloyl esterase
GE	glucuronoyl esterase
DMF	<i>N, N</i> -dimethylformamide
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
THF	tetrahydrofuran
DMSO	dimethyl sulfoxide
IL	ionic liquid
[Emim][Cl]	1-ethyl-3-methylimidazolium chloride
[Emim][OAc]	1-ethyl-3-methylimidazolium acetate
HPAEC-PAD	high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection
SDS-PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate
TLC	thin-layer chromatography
R_f	retardation factor
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
HPLC	high-performance liquid chromatography
RI	refractive index
SEC	size exclusion chromatography
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
NMR	nuclear magnetic resonance
Frc.	fraction
XS	xylan-rich supernatant fraction
XP	xylan-rich precipitation fraction
IR	IL insoluble-residues fraction

RE	regenerated fraction
Mw	weight average molecular weight
Mn	number average molecular number

第 1 章

緒論

第1章 緒論

1-1. バイオマス資源としての植物細胞壁

1950 年以降の石油化学を基盤とした工業技術は、人類文明に豊かさをもたらした反面、化石資源の大量消費による資源の枯渇問題や、地球温暖化および環境汚染問題などの地球環境に大きな負荷を与えることが強く問題視されている。この問題に対応するために、2009 年に欧州連合が環境経済政策であるバイオエコノミー (OECD 2009、<http://www.oecd.org/futures/bioeconomy/2030>) を実施して以降、世界の潮流は欧州諸国が牽引する、あらゆる経済活動に対する地球規模での“持続可能性”が大前提となった。2019 年以降、遅ればせながら我が国においても同様のバイオ政策が押し進められてきている (バイオ戦略 2019、<https://www8.cao.go.jp/cstp/bio>)。

こうした背景のなか、化石資源の代替資源として、再生可能な非可食性バイオマスの利活用は急務な課題であり、持続可能な社会を構築するために、バイオマスを基盤とする産業構造への変革が重要となってきた。陸上に最も豊富に存在するバイオマスは植物であり、その主体は植物細胞を囲む細胞壁である。植物細胞壁は、光合成によって大気中の二酸化炭素が多糖類として固定化された再生可能資源であり、地球上で最も豊富に存在する有機炭素源である¹⁾。植物由来のバイオマスは、酵素糖化により低分子化合物へ分解することで、バイオエタノールやバイオプラスチックなどの原料として用いることが可能となる²⁾。

1-2. 植物細胞壁の構成成分

植物細胞壁は、主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されているため、資源としてこれを指す場合、リグノセルロース系バイオマスと称されている。これらの構成成分の構造や比率は、植物起源や組織、生育段階によって異なるが、一般的には、セルロースが約 50 %、ヘミセルロースが 20–30 %、リグニンが 20–30 %程度で含まれるとされている³⁾。以下に、それぞれの構成成分の概要を示す。

・セルロース

セルロースは、グルコースが β -1,4-結合した直鎖状のグルカンである。隣り合うグルコース分子は 180 度ずつ反転した構造であるため、セルロースの構成単

位はセロビオースであるとも考えられている。セルロース鎖は、水素結合や疎水性相互作用、ファンデルワールス力を介して分子内および分子間の非共有結合によって、束となったセルロースミクロフィブリルと呼ばれる結晶性の繊維を形成している³⁾。また、個々のセルロース鎖の重合度や階層構造は生物種により異なっており、植物起源のセルロースは産業的な素材としても有用である。

・ヘミセルロース

ヘミセルロースとは、ペクチンを除く、アルカリ溶液によって抽出される植物細胞壁の多糖類の総称である。ヘミセルロースは、植物起源や組織、生育段階によって多様性があるが、グルコース、マンノース、キシロース、ガラクトース、アラビノース (Ara)、グルクロン酸 (GlcA)、4-*O*-メチルグルクロン酸 (MeGlcA) などの糖から構成されたヘテロ多糖類である。そのため、セルロースの様にヘミセルロース同士で高度な高次構造を形成することなく、セルロースの結晶表面を覆っており、セルロース繊維間を網目状に架橋するマトリックス多糖として存在している⁴⁾。針葉樹の主なヘミセルロースは、マンナンであり、グルコース単位とマンノース単位が β -1,4 結合した主鎖からなるグルコマンナンと、マンノース単位が β -1,4 結合した主鎖に対して、ガラクトース残基が α -1,6 結合で分岐したガラクトマンナンの2種類がある^{4,5)}。

・キシラン

広葉樹と草本植物中に最も多く含まれているヘミセルロースは、キシランである。キシランは、キシロース単位が β -1,4 結合した主鎖骨格に対して、キシロース単位の C2 位または C3 位の水酸基に対して、アセチル基や GlcA あるいは MeGlcA、または、Ara などにより修飾された分岐鎖多糖であり、こうした修飾基の種類や頻度の特徴は、植物起源や組織ごとによって多様である。広葉樹のキシランは、主鎖のキシロース単位の C2 位の水酸基に対して MeGlcA 側鎖が付加するため、グルクロノキシランと呼ばれる。MeGlcA による置換頻度は、起源により異なり 4–16 個のキシロース残基あたりに 1 箇所と報告されている。また、キシロース単位の C3 位または C2 位は、アセチル化されている^{6,7)}。針葉樹、草本植物のキシランは、GlcA に加えて、キシロース単位の C3 位の水酸基に対して Ara 側鎖が付加するため、アラビノグルクロノキシランと呼ばれる。また、一部のイネ科などの草本植物のキシランは、Ara のみが側鎖として含まれるアラビノキシランとして報告されているものもあるが、分析対象とする植物起源・細胞壁組織ごとに側鎖の種類や頻度が大きく異なるため⁸⁾、明確な分類については、不明な点が多い。これらのキシランは、キシロース単位の C2 位または C3 位がアセチル化されている。さらに、Ara 側鎖には、Ara 側鎖の C5 位の水酸基とフ

エルラ酸 (FA) および *p*-クマール酸 (*p*CA) がエステル結合によって修飾されている特徴がある。キシランの平均重合度は、セルロースと比べて短く、グルクロノキシランで 150–200 程度、アラビノグルクロノキシランで 70–130 程度と報告されている⁷⁾。これらキシランの化学構造の特徴について、**Fig. 1-1** に示した。

・リグニン

リグニンは、*p*-クマリルアルコール、コニフェリルアルコール、シナピルアルコールの 3 種類のモノリグノールを前駆体として生合成されるフェニルプロパノイド重合体である。これらの各モノリグノールに由来するリグニンの芳香核単位は、それぞれ *p*-ヒドロキシフェニル核 (H 核)、グアイアシル核 (G 核)、シリングル核 (S 核) と呼ばれている。天然リグニンは、針葉樹リグニン、広葉樹リグニン、イネ科植物リグニンに大別され、一般に、針葉樹リグニンでは G 核、広葉樹リグニンでは G 核と S 核、草本 (イネ科植物) リグニンは H 核、G 核、S 核を有する特徴がある。天然リグニンは、モノリグノール同士のラジカル酸化重合によって形成されるため多様な結合様式を有するが、 β -O-4 結合はリグニンに含まれる主要な結合様式である⁸⁾。リグニン構成単位と β -O-4 結合ユニットの化学構造については、**Fig. 1-2** に示した。このように、リグニンは天然の酸化重合により構築される化学的に安定な疎水性の芳香族ポリマーであり、植物体に物理的強度の付与、維管束での水分や養分、代謝物の輸送や、生分解抵抗性の付与などの機能を果たしていると考えられている⁸⁾。

1-3. 植物細胞壁構成成分の複合体

天然の植物細胞壁中では、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの主要 3 成分は、個別に存在しているわけではなく、部分的にはそれぞれが繋がった複合体を形成している。細胞壁の骨格となる構造は、セルロース繊維を基本として、それらの繊維間をリグニンによって充填されたコンポジットである。これらの化学的性質が大きく異なる両成分を繋ぐ役割を果たしているのが、ヘミセルロースである。以下では、ヘミセルロースに主要なキシランに焦点を当て、成分間の界面における構造について述べる。

ヘミセルロースとセルロースの成分間界面に着目すると、ヘミセルロースの主要成分であるキシランが、セルロースマイクロフィブリル表面における水素結合によって相互作用していると考えられている⁹⁾。さらに、この相互作用には C2 位、C3 位の水酸基に修飾したアセチル基が、セルロース鎖の長さ方向に対して、キシランが平行鎖として配向するためのコンフォメーション形成に寄与するこ

とが知られている¹⁰⁾。このように、キシランはセルロースと非共有結合的に複合化しているほか、リグニンと共有結合によって部分的に複合体を形成している。

ヘミセルロースとリグニンの成分間界面に着目すると、両成分を繋ぐ架橋結合が存在しており、草本植物ではリグニンに結合した *p*CA や FA を介したキシラン側鎖の Ara とのフェルロイルエステル結合¹¹⁻¹³⁾、草本植物と広葉樹では β -O-4 ユニット中のリグニンアルコールとキシラン側鎖の MeGlcA とのベンジルエステル結合などが知られている^{14,15)} (**Fig. 1-3**)。針葉樹においてはキシランのほか、グルコマンナンがリグニンとの複合化に関わっていることが知られており¹⁶⁾、リグニンアルコールとマンノピラノースの水酸基とのエーテル結合なども存在する。これらの架橋結合により複合化したリグニンとヘミセルロースの複合体のことを総称し、リグニン-多糖複合体 (lignin-carbohydrate complex, LCC) と呼んでいる。一方、一般的にはセルロースはリグニンとの複合化に直接的には関与しないと考えられているが、クラフトパルプ中には漂白過程で生じた非天然型のリグニン-セルロース間の共有結合の存在が知られている¹⁷⁾。

このようにキシランが水素結合によってセルロースと相互作用していることや、エステル結合によって LCC を形成していることは、アルカリ溶液によって植物細胞壁からキシランが効率良く抽出されることから支持される。つまり、キシランは、細胞壁中の基本骨格を構築するセルロースと、その間隙を埋めるリグニンを繋ぐための接着成分として機能していると言える (**Fig. 1-4**)。こうした化学的性質の大きく異なる多糖類とリグニンと繋ぎ合わせているキシランの存在が、細胞壁構成成分を完全に分離・回収することを妨げる主要な要因となっている¹⁸⁾。

1-4. 植物細胞壁分解酵素

自然界の循環系において、植物細胞壁は糸状菌や細菌類、昆虫またはこれらと共生する原生生物などによって分解・資化されており、これらの生物は、構成成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンを完全に分解するための多種多様な酵素を保有している。特に、地球上で最大のバイオマスである木質資源の分解には担子菌及び子囊菌に分類される糸状菌類が重要な役割をしていることが知られている。これらは、細胞壁の構成成分を栄養素として体内へと取り込むために、菌体外へと多種多様な細胞壁分解酵素を分泌している。一般的に、セルロースやヘミセルロースの分解には、グリコシドヒドロラーゼ (glycoside hydrolases, GHs) と糖質エステラーゼ (carbohydrate esterases, CEs) が関わって

おり、リグニンの分解には、酸化還元酵素が関わっている。これらの酵素は、アミノ酸配列の疎水クラスター解析による蛋白質の立体構造情報に基づいて、それぞれ、GH ファミリー、CE ファミリーに分類されており、酸化還元酵素は AA (auxiliary activity) ファミリーとして分類されている¹⁹⁾。同一ファミリー内に分類された酵素は、例外なく同じフォールディングの骨格構造を有しており、触媒残基の位置が一致することが本分類法の特徴である。これらの細胞壁分解関連酵素の多くは、Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) データベース (<http://www.cazy.org/>) に登録されている¹⁹⁾。以下にその代表的なものを示す。

・セルロース分解関連酵素

セルロースは、複数の性質の異なるセルラーゼの相乗作用によって効率良く分解される。主要なセルラーゼとしては、GH5 及び GH7 に属するエンドグルカナナーゼ (endoglucanase、EG、EC 3.2.1.4)、GH6 及び GH7 に属するセロビオヒドロラーゼ (cellobiohydrolase、CBH、EC 3.2.1.91)、GH1 及び GH3 に属する β -グリコシダーゼ (β -glycosidase、BGL、EC 3.2.1.21) の大きく 3 つの酵素群に分類される。基本的には、セルロースの分解は、EG が非晶性のセルロース領域のセルロース鎖をランダムに作用したのちに、新たに生成されたセルロース鎖の末端に対し CBH が作用し、セロビオースを連続的に生産することで進行する。最終的には、遊離したセロビオースやセロオリゴ糖は、BGL によってグルコースにまで分解される。一般的に、セルラーゼは、活性中心を含む触媒ドメインとセルロース鎖に特異的に結合する基質結合ドメイン (cellulose binding domain、CBM) が、セリン、スレオニンやプロリン残基に富んだフレキシブルなリンカー領域を挟んで結合したマルチドメイン構造を有することが多い。また、最近ではセルロースの酸化的なグリコシド結合の開裂が、酸化還元酵素の LPMO (lytic polysaccharide mono-oxygenase) により触媒されることも明らかとなってきた²⁰⁾。

・キシラン分解関連酵素

直鎖構造からなるセルロースと比べて、キシランは分岐構造を有するために、主鎖に作用する酵素群に加えて、側鎖などの修飾基に作用する酵素群が協調的に作用することによって、単糖であるキシロースにまで完全分解される。キシラン主鎖は、エンド- β -1,4-キシラナーゼ (xylanase、XYN、EC 3.2.1.8) と β -キシロシダーゼ (β -xylosidase、BXL、EC 3.2.1.37) によって、最終的にキシロースにまで低分子化される。キシラナーゼはキシラン主鎖をエンド型に分解する酵素であり、GH ファミリーの 5、8、10、11、30、43 に分類されているが、主要なキシラナーゼは GH10 と GH11 に分類される。GH10 と GH11 は立体構造や基質特異

性が異なることが示されており、GH11 は単糖を蓄積しないが、GH10 は GH11 と比べてより小さなオリゴ糖と単糖であるキシロースを生産する。これらのキシラン主鎖分解酵素の作用は主鎖に結合する様々な修飾基による制約を受ける。

側鎖の分解には、キシランの MeGlcA 側鎖遊離酵素である GH67 に属する α -グルクロニダーゼ (α -glucuronidase、AGU、EC 3.2.1.139)、GH115 に属するキシラン α -グルクロニダーゼ (xylan α -glucuronidase、AGU、EC 3.2.1.139)、キシランの Ara 側鎖遊離酵素である GH3、43、51、62 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼ (α -L-arabinofuranosidase、ABF、EC 3.2.1.55) や、キシランのアセチル基遊離酵素である CE1、2、3、4、5、6、7、12 に属するアセチルキシランエステラーゼ (acetylxylyl esterase、AXE、EC 3.1.1.72) が関与する。さらに、Ara 側鎖に対して修飾した FA や *p*CA の遊離酵素である CE1 に属するフェルロイルエステラーゼ (feruloyl esterase、FAE、EC 3.1.1.73) など、側鎖分解酵素系において重要な役割を果たす。また、これらのキシラン分解関連酵素においても、セルラーゼのように CBM を有する酵素が存在する。

これらの側鎖遊離酵素に加えて、LCC 分解酵素の候補として、グルクロノイルエステラーゼ (glucuronoyl esterase、GE、EC 3.1.1.-) が発見されている²¹⁾。GE は、 α -1,2-結合でキシロピラノースの糖骨格に付加した MeGlcA の C6 位のカルボキシ基をメチル化した、メチルエステル誘導体基質の分解活性をもとに、木材腐朽菌の培養液から単離された²¹⁾。このメチルエステル基質は、天然の LCC に含まれるリグニンアルコールとキシラン側鎖の MeGlcA を架橋するベンジルエステル結合に極めて類似している。そのため、GE は LCC に作用する酵素として推定され、新しく CE15 が開設された。上記で述べた一連のキシラン分解関連酵素の作用位置は、**Fig. 1-5** に示した。

1-5. 植物細胞壁分解酵素研究における問題点及び課題

これまでの植物細胞壁分解酵素の研究は、細胞壁の個々の構成成分 (セルロース、ヘミセルロース、リグニン) に着目し、純度良く精製されたそれぞれの成分を“基質”として用いた活性評価によって発展してきた。しかし、天然の植物細胞壁からそれぞれの成分を分離・精製する過程では、本来存在したはずの修飾基や架橋結合などが分解されてしまうことや、それぞれの成分間での相互作用によって生じる物理的環境が再現されていないなどの欠点がある。そのために、細胞壁の成分間界面に作用する酵素の触媒作用については、まだ十分な評価がなされていない可能性がある。特に、植物細胞壁内でキシランは、化学的性質の異なるリグニンとセルロースを接着させ、複合体を形成するためのキー構造である

ため、天然状態のキシランの酵素分解についての詳細を明らかにすることは、細胞壁の 3 成分の効率的な分離方法を開発するための重要な研究課題となる。しかしながら、これまでのキシランの酵素分解に関する議論については、自然界での複合体としての構造的特徴が欠損した市販の精製キシランや、利便性を追求した *p*-ニトロフェノール等の発色団を有する人工基質が用いられる場合がほとんどである。こうした基質は、天然構造が反映されないために、酵素本来の触媒活性や、他の酵素間における協奏的な作用や役割などの、天然における酵素の触媒活性に対して本来のポテンシャルが評価できない。そのため、従来の非天然型構造を有する基質を用いた活性評価系だけでは、バイオマス分解に重要な役割をする酵素の存在を見落としてしまっている可能性がある。従って、天然構造に基づいた複合体の状態のままの天然型基質が必要であり、それを用いた酵素の分解機作を適切に評価する必要がある。

1-6. 研究の目的

リグノセルロース系バイオマスの主体である植物細胞壁は、地球上で最も豊富に存在する再生可能資源であり、構成成分であるセルロース、ヘミセルロースやリグニンを、酵素によって低分子化合物へと分解することで、バイオ燃料などの化成品原料として利用することができる。しかし、リグニンとセルロースは、キシランによって接着した複合体を形成しているため、効率的に分離・分解することは容易ではない。そのためには、キシランやその他の成分との複合体を分解するための酵素反応を理解することが重要であるが、天然構造を反映させた細胞壁基質が存在しないため、酵素の適切な評価系自体がないという問題がある。本論文では、リグニンとヘミセルロースの成分間界面に存在するリグニン-キシラン複合体 (lignin-xylan complex, LXC) に着目し、その酵素分解の詳細を明らかにすることを目的とした。そのため、酵素分解を適切に評価可能なモデル基質を調製するとともに、天然型の LXC を単離し、その酵素分解メカニズムの解明に向けた基礎的な知見を得ることを目指した。本研究の全体の概要と各章の関係性について、**Fig. 1-6** に図示した。

第 2 章では、リグニンとキシランの両成分を架橋するベンジルエステル結合を含む LXC の酵素分解機構を明らかにするために、GE をはじめとする LXC 分解酵素群のそれぞれを単一成分として取得した。

第 3 章では、GE の本来の天然基質に対する作用を解析するため、LXC の架橋結合におけるキシラン糖骨格と芳香環骨格の両構造を有するベンジルエステル誘導体を合成し、その酵素分解を評価した。

第4章では、LXC に対する酵素分解を評価するために、植物細胞壁から天然型の LXC を抽出する手法を開発した。また得られた LXC を基質として、前章で作製した各種精製酵素による酵素分解について解析し、酵素分解機構について考察した。

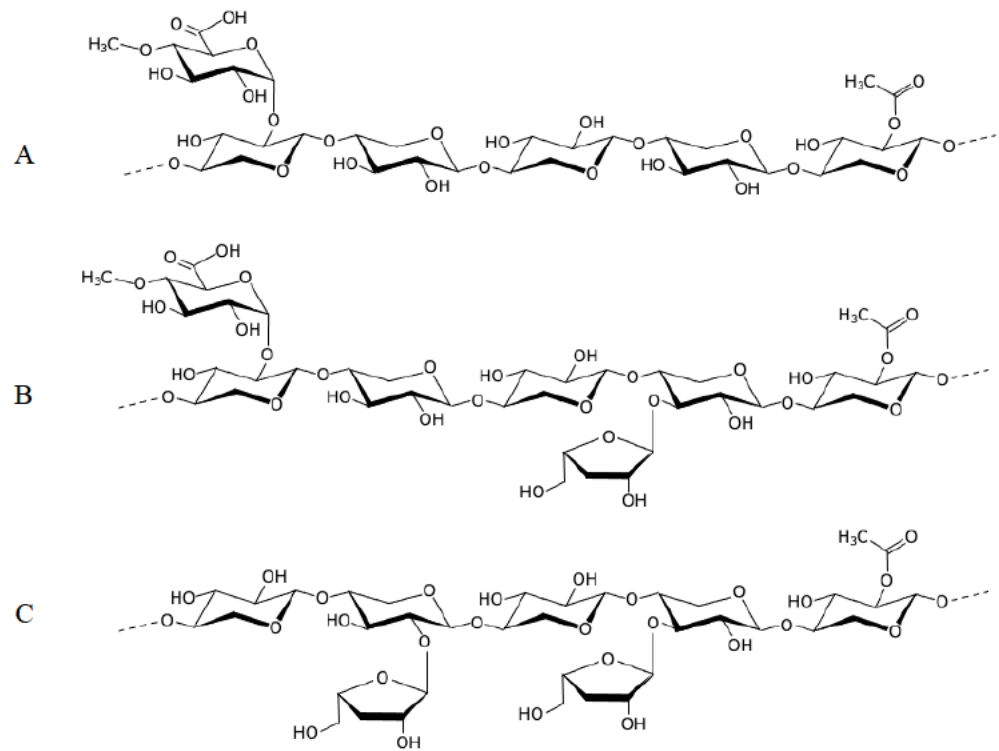
第5章では、これらの知見をまとめ、自然界における LXC の複合体構造と、その酵素分解機構について考察を行い、さらに今後の研究の方向性について論述した。

第1章 参考文献

1. Y.M. Bar-On, R. Phillips, and R. Milo: The biomass distribution on earth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **114**, E6089–E6096 (2017).
2. D.N. Himmel, S.-Y. Ding, D.K. Johnson, W.S. Adney, M.R. Nimlos, J.W. Brady, and T.D. Foust: Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, **315**, 804–807 (2007).
3. G. Henriksson and H. Lennholm: Cellulose and carbohydrate chemistry. In: *Wood chemistry and biotechnology*. Ed. By M. Ek, G. Gellerstedt and G. Henriksson., Berlin, New York: Walter de Gruyter (2009).
4. A. Teleman: Hemicellulose and pectins. In: *Wood chemistry and biotechnology*. Ed. By M. Ek, G. Gellerstedt and G. Henriksson., Berlin, New York: Walter de Gruyter (2009).
5. L.R.S. Moreira and E.X.F. Fillo: An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 165–178 (2008).
6. A. Ebringerová, Z. Hromádková, and T. Heinze: Hemicellulose. *Adv. In Poly. Sci.*, **186**, 1–67 (2005).
7. A. Ebringerová: Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol. Symp.* **232**, 1–12 (2006).
8. G. Henriksson and H. Lennholm: Lignin. In: *Wood chemistry and biotechnology*., Berlin, New York: Walter de Gruyter (2009).
9. M.A. Kabel, H. van den Borne, J.P. Vincken, A.G.J. Voragen, and H.A. Schols: Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydr. Polym.*, **69**, 94–105 (2007).
10. N.J. Grantham, J. Wurman-Rodrich, O.M. Terrett, J.J. Lyczakowski, K. Stott, D. Iuga, T.J. Simmons, M. Durand-Tardif, S.P. Brown, R. Dupree, M. Busse-Wicher, and P. Dupree: An even pattern of xylan substitution is critical for interaction with cellulose in plant cell walls. *Nat. Plants*, **3**, 859–865 (2017).

11. T. Watanabe: Analysis of native bonds between lignin and carbohydrate by specific chemical reactions. In: *Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues*. Springer Series in Wood Science. Berlin, Heidelberg (2003).
12. M. Balakshin, E. Capanema, H. Gracz, H.M. Chang, and H. Jameel: Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. *Planta*, **233**, 1097–1110 (2011).
13. T.Q. Yuan, S.N. Sun, F. Xu, and R.C. Sun: Characterization of lignin structures and lignin-carbohydrate complex (LCC) linkages by quantitative ^{13}C and 2D HSQC NMR spectroscopy. *J. Agric. Food. Chem.*, **59**, 10604–10614 (2011).
14. N. Takahashi and T. Koshijima: Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sci. Technol.*, **22**, 231–241 (1988).
15. T. Watanabe and T. Koshijima: Evidence for an ester linkage between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2953–2955 (1988).
16. M. Toikka, J. Sipilä, A. Teleman, and G. Brunow: Lignin-carbohydrate model compounds. Formation of lignin-methyl arabinoside and lignin-methyl galactoside benzyl ethers via quinone methide intermediates. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3813–3818 (1998).
17. M. Lawako, G. Henriksson, and G. Gellerstedt: Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. *Biomacromolecules*, **6**, 3467–3473 (2005).
18. Y. Tokunaga, T. Nagata, T. Suetomi, S. Ohshiro, K. Kondo, M. Katahira, and T. Watanabe: NMR analysis on molecular interaction of lignin with amino acid residues of carbohydrate binding module from *Trichoderma reesei* Cel7A. *Sci. Rep.*, **9**, 1977 (2019).
19. V. Lombard, H.G. Ramulu, E. Drula, P.M. Coutinho, and B. Henrissat: The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 490–495 (2014).
20. K.S. Johansen: Lytic polysaccharide monooxygenases: The microbial power tool for lignocellulose degradation. *Trends in Plant Sci.*, **21**, 926–936 (2016).
21. S. Špáníková and P. Biely: Glucuronoyl esterase - Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Lett.*, **580**, 4597–4601 (2006).

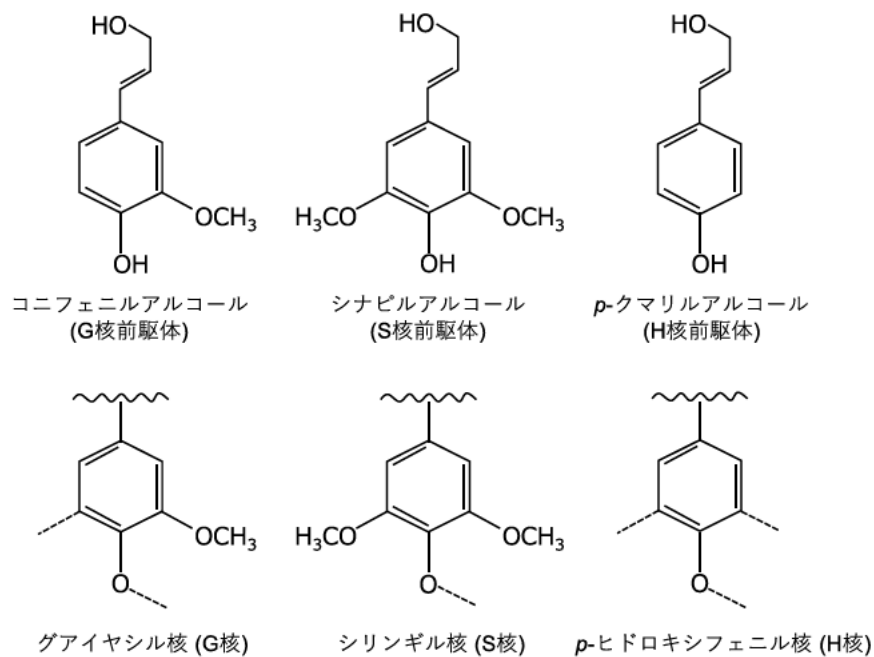
第 1 章 図表



	植物起源	主鎖	修飾基	側鎖糖	比率
A	グルクロノキシラン 広葉樹	β -1,4-linked xylopyranose	acetyl group at Xylp C2, C3	α -1,2-linked 4-O-methyl glucuronic acid	Xyl : MeGlcA = 4-16 : 1
B	アラビノグルクロノキシラン 針葉樹、草本植物	β -1,4-linked xylopyranose	acetyl group at Xylp C2, C3	α -1,2-linked 4-O-methyl glucuronic acid α -1,2-, α -1,3- linked α -L-arabinofuranose	Xyl : MeGlcA : Ara = 100 : 20 : 13
C	アラビノキシラン 草本植物	β -1,4-linked xylopyranose	acetyl group at Xylp C2, C3	α -1,2-, α -1,3- linked α -L-arabinofuranose	Xyl : Ara = 0.5-1 : 1

Fig. 1-1. キシランの化学構造

(a)



(b)

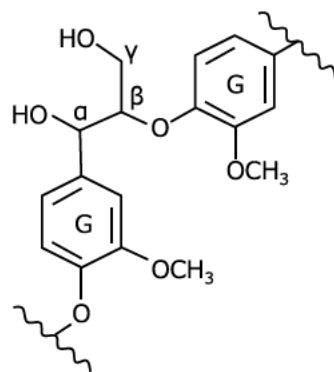


Fig. 1-2. リグニン前駆体及び芳香核単位の構造 (a) とリグニン中に含まれる主要な β -O-4 結合様式の構造 (b)

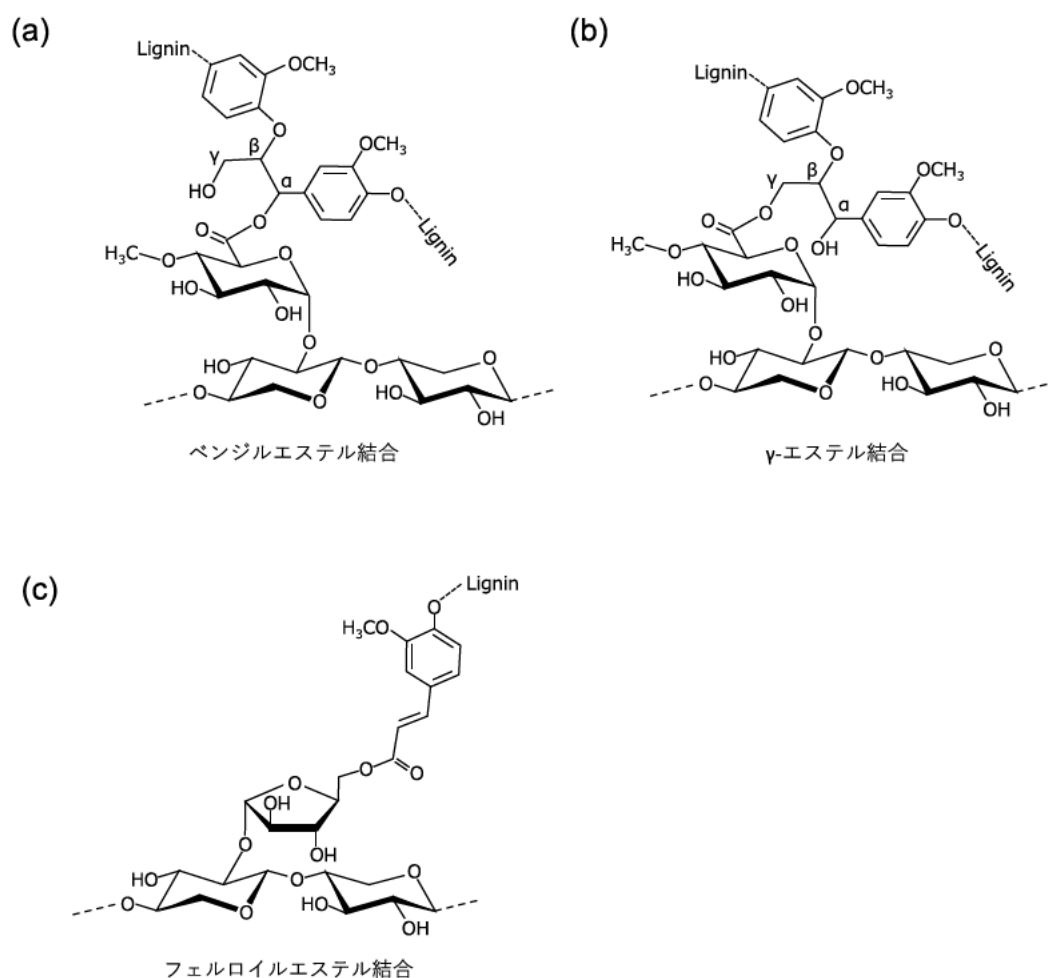


Fig. 1-3. リグニン-キシラン間を架橋する代表的なエステル結合

(a) リグニンの C α 位水酸基とキシラン側鎖の 4-O-メチルグルクロン酸との間に形成されるベンジルエステル結合、(b) リグニンの C γ 位水酸基とキシラン側鎖の 4-O-メチルグルクロン酸との間に形成される γ -エステル結合、(c) フェルラ酸とキシラン側鎖のアラビノースとの間に形成されるフェルロイルエステル結合

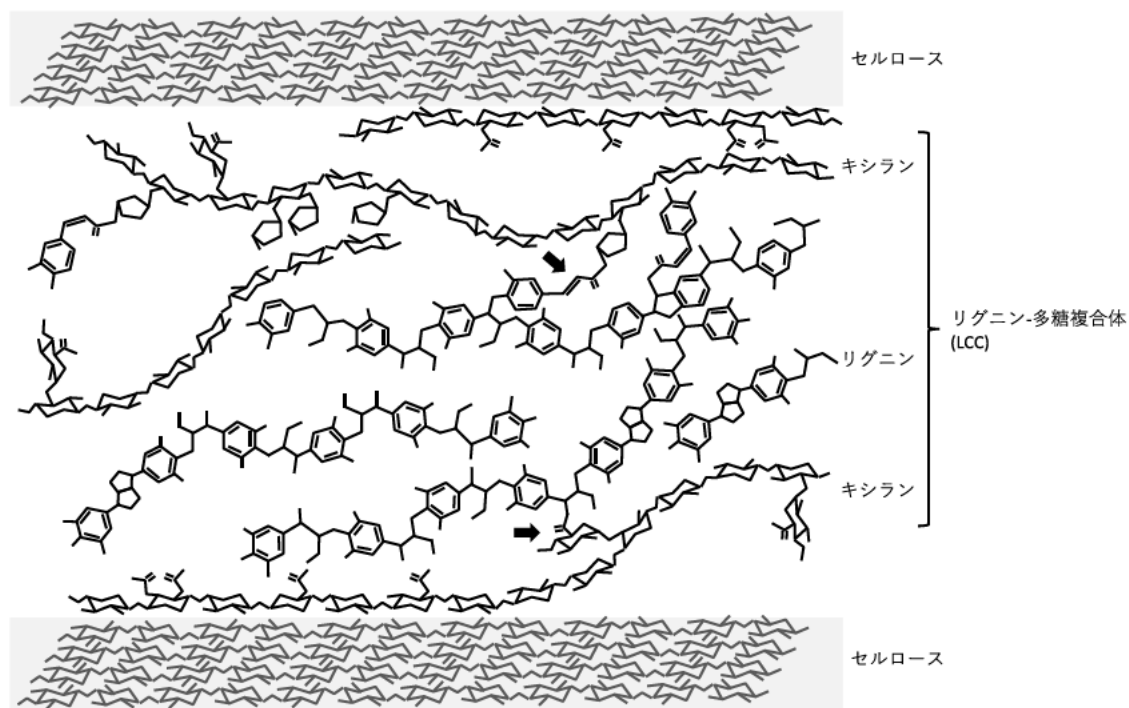


Fig. 1-4. 植物細胞壁内の主要 3 成分のモデル図

セルロース繊維の間隙を埋めるようにして、ヘミセルロースやリグニンが充填されており、部分的にはそれらが複合体となった LCC を形成していると考えられている。図中の矢印は、リグニン-キシラン間の架橋結合を示している。

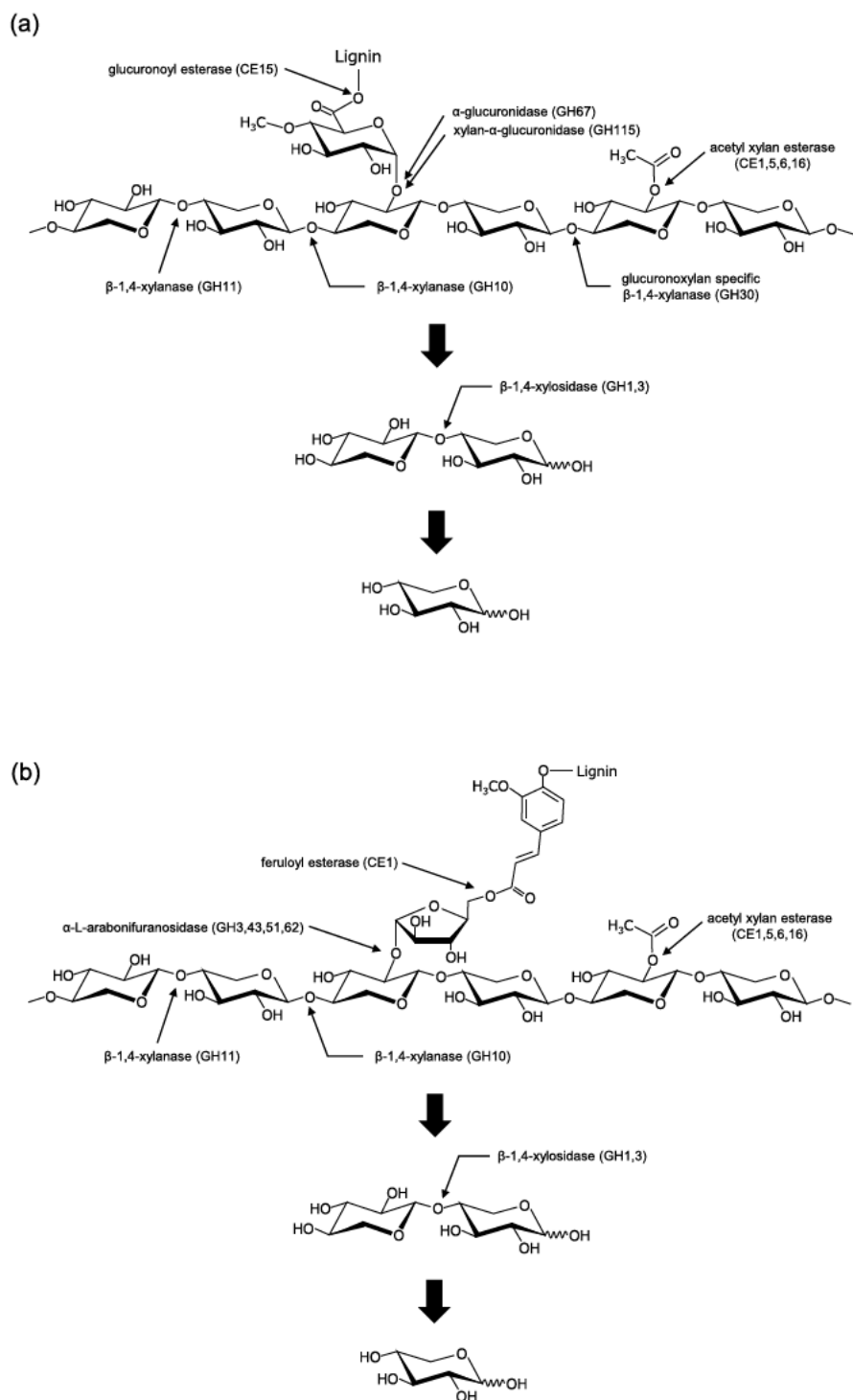


Fig. 1-5. キシランの酵素分解様式

(a) グルクロノキシランの分解様式、(b) アラビノキシランの分解様式

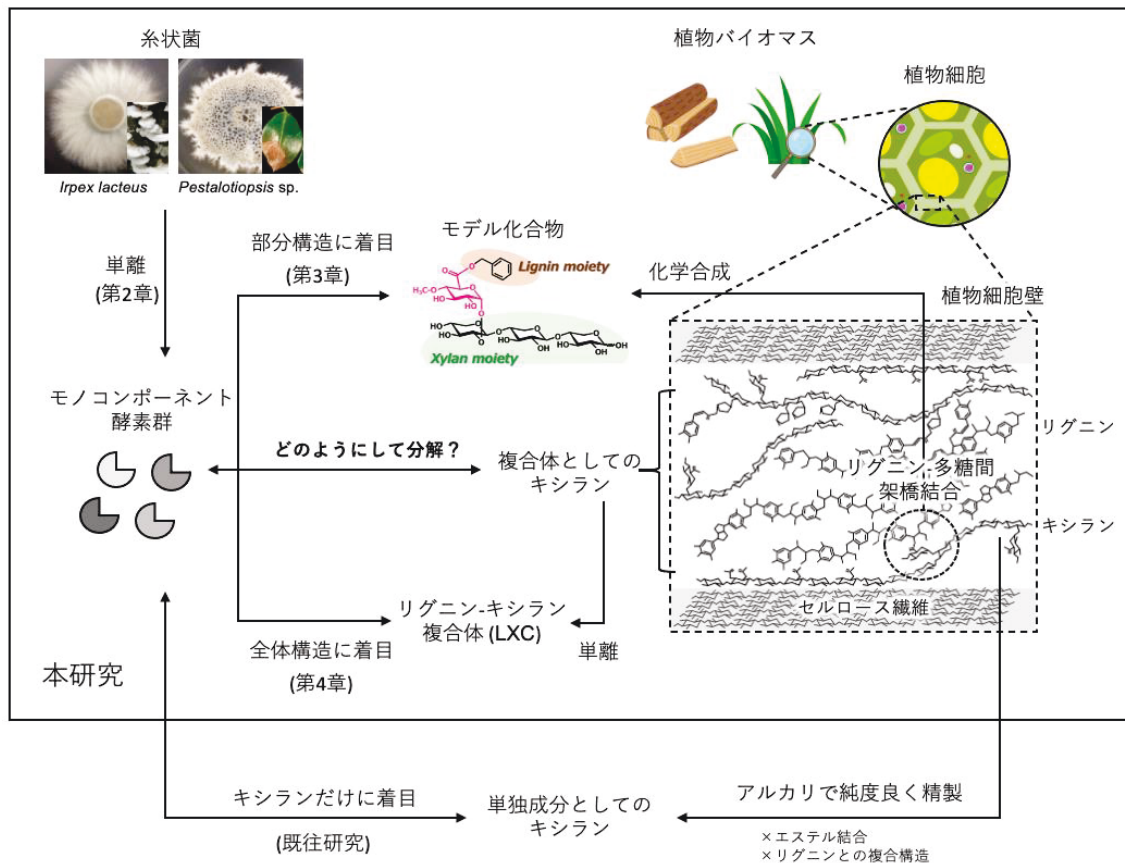


Fig. 1-6. 本研究の概要と各章の関係性についての概念図

第 2 章

リグニン-キシラン複合体に作用する酵素群の
単離及び性質決定

第2章 リグニン-キシラン複合体に作用する酵素群の単離及び性質決定

2-1. はじめに

植物バイオマスの分解には、糸状菌の酵素を利用した糖化方法が有効であるが、現行の工業的プロセスでは、セルラーゼが作用する上での立体的障害となるヘミセルロースやリグニンを取り除くため、アルカリ・漂白などの薬剤処理等によるバイオマスの前処理工程が前提となっている¹⁾。しかし、前処理時の副産物や廃液の処理に環境負荷が大きいこと、また、細胞壁構成成分の半分以上を占めるリグニンとヘミセルロースについては化学変性を伴った状態で取り除かれているため、原料バイオマスに含まれる多くの成分を有効活用できていない等、未だ多くの課題を抱えている。これらの課題を克服するためには、これまでのようにセルロースの分解だけに着目するだけでなく、自然界におけるヘミセルロースとリグニンの酵素等による分解様式を詳細に解明し、主要 3 成分からなる全体構造としての効率的な酵素分解系を確立する必要がある。

キシランは、植物細胞壁でリグニンおよびセルロースの両成分と複合体を形成しているため、3 成分の効率的な分解を考える上でのキー構造と考えられる。その一方で、これまでのキシラン分解酵素の研究においては、アルカリ性の溶媒によって抽出・精製されたキシラン基質を用いた活性評価によって、作用機序に関する議論を中心として進められてきた²⁾。一方、キシランを単なる構成成分としてではなく、リグニンとセルロースを繋ぎとめている構造機能的な複合体として捉えれば、キシラン分解関連酵素群は、細胞壁全体構造の分解において重要な役割を果たすものと考えられる。しかし、現在、そうした構造を反映させるような基質はなく、天然の複合状態のキシラン、すなわち、リグニンとキシランとの複合体である LXC に対する酵素分解を評価・解析した例はない。

白色腐朽菌 *Irpex lacteus* NK-1 および子囊菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7 は、植物細胞壁を分解するための多種多様な酵素を保有しており、セルロース分解に関与するセルラーゼ群のほか、ヘミセルロース分解酵素、リグニン分解に関与する酸化還元系酵素を菌体外に分泌する³⁻⁵⁾。これまでに我々は、*I. lacteus* NK-1 ならびに *Pestalotiopsis* sp. AN-7 の両菌株においてトランスクリプトーム解析を実施しており、既に、LXC に含まれる架橋結合を含めたキシランの分解に関わる一連の酵素遺伝子を同定している。

これらを踏まえて、本章では、LXC の構造と分解機構の解明に向けて、基質特異性の高い酵素を分析ツールとして利用するために、LXC に作用する酵素群

を取り揃えることを目的とした。そのため、リグニンとキシランの両成分を繋ぐ架橋点の MeGlcA とその周辺構造に着目し、リグニンとキシラン側鎖である MeGlcA 間のベンジルエステル結合の分解酵素 (*PesGE*)、キシランの主鎖分解酵素 (*PesXyn10A*)、キシランのアセチル基分解酵素 (*IIAXE1*)、キシラン側鎖の MeGlcA 酸遊離酵素 (*IIAgu115A*) をコードする塩基配列を単離・解析し、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を発現宿主とする異種発現系を利用することで、それぞれの単一酵素の取得を試みた。さらに、本章では、得られた個別酵素について酵素学的性質について明らかにした。

2-2. 実験材料及び方法

2-2-1. 菌株及びベクター

酵素の遺伝子源には、*I. lacteus* NK-1 株及び *Pestalotiopsis* sp. AN-7 株を用いた。大腸菌を宿主とするクローニング実験には、クローニングベクター T-vector pMD19 (simple) (Takara Bio.) と *Escherichia coli* DH5 α 株 (Takara Bio.) を使用した。酵母を宿主とする異種蛋白質発現系として、ベクターには、pPIC9K (Invitrogen) または pPICZ α A (Invitrogen)、宿主には *P. pastoris* GS115 株 (Invitrogen) を使用した。*P. pastoris* の培養には、YP 培地 (1 % Yeast extract、2 % pepton、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0)) を使用した。

2-2-2. cDNA の調製

I. lacteus NK-1 株と *Pestalotiopsis* sp. AN-7 株をそれぞれ、単一炭素源として 1 % の Avicel、と 3 % NaCl、0.07 % KCl、1.0 % MgCl₂、0.53 % MgSO₄、0.1 % CaCl₂、0.1 % NH₄NO₃、0.1 % Na₂HPO₄ を含んだ液体培地で、25 °C、140 rpm の条件で 7 日間振とう培養した。回収した菌体から、TRIzol RNA Isolation Reagents (Thermo Fisher Scientific) を用いて全 RNA を調製した。操作は付属のマニュアルに従った。

2-2-3. キシラナーゼ発現用プラスミドの構築

Pestalotiopsis sp. AN-7 株から調製した全 RNA を鋳型に、PesGH10-Pic-F1 (5'-GAATTCCAGTCGACCACCTCGATCGTC-3'、下線部は EcoRI 配列) と PesGH10-Pic-R1 (5'-GCGGCCGCTTACTGCAGTGC GTT-3'、下線部は NotI 配列) の 2 対のプライマーを用いた PCR によって増幅させた後に、pPIC9K の EcoRI 配列と NotI 配列の間に挿入されるように組み込んだ。*P. pastoris* の形質転換には、制限酵素 SacI (Takara Bio) によって切断した線状化 DNA を用いた。

2-2-4. グルクロノイルエステラーゼ発現用プラスミドの構築

Pestalotiopsis sp. AN-7 株から調製した全 RNA を鋳型に、PesCE15-Pic-F1 (5'-GAATTCGAGCGCCAGAACACCACATG-3'、下線部は EcoRI 配列) と PesCE15-Pic-R1 (5'-GCGGCCGCTTAAGACAACGTTGGC-3'、下線部は NotI 配列) の 2 対のプライマーを用いた PCR によって増幅させた後に、pPIC9K の EcoRI 配列と NotI 配列の間に挿入されるように組み込んだ。*P. pastoris* の形質転換には、SacI によって切断した線状化 DNA を用いた。

2-2-5. アセチルキシランエステラーゼ発現用プラスミドの構築

I. lacteus NK-1 株から調製した全 RNA を鋳型に、IrpAXE1ful-Pic_F (5'-GAATTCCAATCCCAAGTATGGGGTCAG-3'、下線部は EcoRI 配列) と IrpAXE1-Pic-R (5'-TCTAGAGCGATACCCAAGAACTGGAGG-3'、下線部は XbaI 配列) の 2 対のプライマーを用いた PCR によって増幅させた後に、pPICZαA の EcoRI 配列と XbaI 配列の間に挿入されるように組み込んだ。*P. pastoris* の形質転換には、制限酵素 PmeI (New England Biolabs) によって切断した線状化 DNA を用いた。

2-2-6. グルクロニダーゼ発現用プラスミドの構築

I. lacteus NK-1 株から調製した全 RNA を鋳型に、Irp115-Pic_F (5'-CCATGGGGAATTCATTGGTCAGACCAGCTGTGTTGCG-3'、下線部は EcoRI 配列) と Irp115-Pic_R (5'-CCATGGTTCTAGACCAACTCTGATACTTTCCGGTGGGCC-3'、下線部は XbaI 配列) の 2 対のプライマーを用いた PCR によって増幅させた後に、pPICZαA の EcoRI 配列と XbaI 配列の間に挿入されるように組み込んだ。*P. pastoris* の形質転換には、PmeI によって切断した線状化 DNA を用いた。

2-2-7. 形質転換及び組換え体の発現

精製した 10 μg のリニア化 DNA を用いて、エレクトロポレーション法により *P. pastoris* GS115 株の形質転換を行なった。形質転換操作及び形質転換体の選別は、EasySelect Pichia expression kit (Invitrogen) に従って行なった。*PesXyn10A* 及び *PesGE* を調製するため、各酵素の発現株を 1.0 % グリセロールを含む YP 培地で 30 °C、180 rpm で 2 日間の菌体増殖培養を行ったのち、0.5% メタノールを含む YP 培地で、30 °C、180 rpm で 5 日間の発現誘導培養を行った。*PesXyn10A* 及び *PesGE* は、80 % 飽和濃度の硫酸アンモニウムによる塩析沈澱により培養上清液から回収し、疎水性相互作用カラム Toyopearl Butyl-650M (Tosoh) によって精製し、以降の実験で使用した。*IIAgu115A* 及び *IIAXE1* を調製するために、各酵素の発現株を、1.0 %のグリセロールを加えた YP 培地で 30 °C、180 rpm で 2 日間の菌体増殖培養を行ったのち、0.5%のメタノールを加えた YP 培地で、25 °C、

180 rpm で発現誘導培養を行った。*IIAgu115A* は 5 日間、*IIAXE1* は 1 日間の発現誘導培養の後に、80 % 飽和濃度の硫酸アンモニウムによる塩析沈澱により培養上清液から回収し、ニッケルアフィニティカラム HisTrapTM HP (GE Healthcare) 及びゲル濾過カラム Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare) の 2 段階の工程を経て精製した。精製蛋白質量は、Bradford 法に従って測定し、脱糖鎖処理は、ペプチド-*N*-グリコシダーゼ F (PNGaseF) (Roche Diagnostics K.K.) を用いてマニュアルの記載に従って行った。

2-2-8. キシラナーゼ活性の測定

PesXyn10A の活性測定は、バーチウッドキシラン (Sigma-Aldrich)、ビーチウッドキシラン (Sigma-Aldrich)、オートスペルトキシラン (Sigma-Aldrich)、カルボキシメチルセルロース (CMC) (Sigma-Aldrich)、グルコマンナン (Shimizu Chemical Co.) を脱イオン水に溶解させ、基質溶液として用いて行った。酵素反応液は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中に、最終濃度 0.5 wt% の基質溶液及び精製酵素を加えて調製した。40 °C で反応させたのち、還元糖の遊離量を Somogyi-Nelson 法にて定量した。1 U の酵素活性は、1 分間に 1 μ mol のキシロースに相当する還元糖量を遊離する酵素量と定義した。酵素分解生成物は、分析カラムとして Asahipak NH2P-50 4E (粒子径 5 μ m、内径 4.6 mm \times 250 mm) (Showa Denko K.K.) を使用し、検出はフェニルヒドラジンによるポストラベル化蛍光検出法を用いた HPLC によって分析を行った。

2-2-9. α -グルクロニダーゼ活性の測定

IIAgu115A の活性測定は、バーチウッドキシラン、ビーチウッドキシランを基質として行った。酵素反応液は、50 mM 酒石酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中に、最終濃度 0.5 wt% の基質溶液及び精製酵素を加えて調製した。40 °C で反応させたのち、酸性糖の遊離量を Avidad-Milner 法⁶⁾に従って定量した。1 U の酵素活性は、1 分間に 1 μ mol の GlcA に相当する還元糖量を遊離する酵素量と定義した。酵素分解生成物は、分析カラムとして CarboPac PA1 (Thermo Fisher Scientific) を取り付けた HPAEC-PAD 法によって分析を行った。

2-2-10. グルクロノイルエステラーゼ活性の測定

PesGE の活性測定は、ベンジルグルクロン酸 (Bnz-GlcA) (Carbosynth Ltd.) を基質として使用した。活性測定の方法は、Sunner らによる手法⁷⁾に従った。Bnz-GlcA はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ 80 mM に調製して、酵素反応に使用した。酵素反応液は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中に、最終濃度 0.1 mM の基質溶液及び精製酵素を加えて調製した。30 °C で反応させた

のち、HPLC で定量した。1 U の酵素活性は、1 分間に 1 μmol のベンジルアルコール (Bnz-OH) を遊離する酵素量と定義した。

2-2-11. エステラーゼ活性の測定

IIAXE の活性測定は、 α -ナフチル酢酸 (αNAc) (Sigma-Aldrich)、*p*-ニトロフェニル酢酸 (*p*NPAC) (Sigma-Aldrich)、4-メチルウンベリフェリル酢酸 (MuAc) (Sigma-Aldrich)、*p*-クマール酸メチル (MeCou) (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.)、フェルラ酸エチル (EtFe) (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.) を基質として使用した。各基質は、エタノールに溶解させ 1 mM に調製して、酵素反応に使用した。酵素反応液は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 中に、最終濃度 0.5 mM の基質溶液及び精製酵素を 96 穴-マイクロプレートで調製した。酵素反応は反応温度を 30 °C に設定した Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific) 内で行い、各基質の分解物は比色定量法によって定量した。1 U の酵素活性は、1 分間に 1 μmol のナフトール、*p*-ニトロフェノール、4-メチルウンベリフェロンを遊離する酵素量と定義した。

2-3. 結果

2-3-1. エンド- β -1,4-キシラナーゼ遺伝子の cDNA クローニング

小麦ふすまを炭素源とした培養液から回収した *Pestalotiopsis* sp. AN-7 菌体より抽出した全 RNA を鋳型に用いることで、全 cDNA を合成した。得られた全 cDNA を鋳型にした PCR によって、キシラナーゼ遺伝子 (*xyn10a*) の ORF 全長の cDNA クローニングに成功した。*xyn10a* の ORF は、開始コドン ATG と終始コドン TAA を含む 987 bp の塩基配列からなり、328 残基からなる蛋白質をコードしていた。塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベース上に、アクセッション番号 LC584173 として登録した。また、以降では、*xyn10a* によってコードされる蛋白質を *PesXyn10A* と表記する。

PesXyn10A のアミノ酸配列を分泌シグナル推定プログラム SignalP-4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1>) で解析したところ、N 末端側の 16 残基 (Met1 – Ala16) までのアミノ酸配列はシグナル配列と予測された。Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 検索を行うと、同属の *P. fici* W106-1 が保有する 5 つのキシラナーゼ遺伝子のホモログのうち、一つの XYN (hypothetical xylanase, accession No. XP_007828407.1) に対して 95 %と最も高い相同性を示した。その他、CAZy データベース上で GH10 に分類されている *Thermascus aurantiacus* 由来 TAX (91 %, AAF24127.1) 等の糸状菌類由来の XYN

と高い相同性を示した。X 線結晶構造解析による立体構造が報告されている GH10 の XYN とのアミノ酸配列を比較した結果、GH10 の XYN の触媒残基として報告されている 2 対のグルタミン酸残基⁸⁾が、*PesXyn10A* においても Glu156 及び Glu263 として保存されていた。また、*Caldicellulosiruptor bescii* 由来の *CbXyn10C* とキシロヘプタオースとの複合体構造で報告されているキシラン結合サブサイト -2、-1、+1 を構成する 6 つのアミノ酸残基 (Lys75、His108、Asn155、His235、Trp293)⁹⁾についても、*PesXyn10A* で保存されていた。

2-3-2. *PesXyn10A* の異種発現系構築及び酵素学的諸性質

シグナル配列として推定されたアミノ酸領域 (Met1 – Ala16) を除いた成熟蛋白質に相当する *PesXyn10A* を、*P. pastoris* を発現宿主として用いることで、組換え体として得ることに成功した。*PesXyn10A* は、カラム精製によって、活性収率 59.1 %で、蛋白質量 6.0 mg を 0.3 L の培養液から回収した。SDS-PAGE によって精製蛋白質の分子量を解析したところ、*PesXyn10A* は約 35 kDa の単一バンドとして確認されたが、この値は成熟蛋白質の理論分子量 (約 33.4 kDa) よりも少し大きかった (**Fig. 2-1**)。このことは、酵母細胞内での糖鎖付加による影響であると考えられたため、*N*-型脱糖鎖酵素 (PNGaseF) によって処理したところ、理論分子量と同等の位置にバンドが移動した。これに加えて、*PesXyn10A* のアミノ酸一次配列上には、2 箇所の *N*-結合型糖鎖付加配列 (Asn102 及び Asn313) が推定されたため、*PesXyn10A* は糖蛋白質として生産されたものと考えられた。こうした糖鎖による修飾は、酵素活性には影響がないものと判断し、以降の実験では脱糖鎖処理をせずに、精製した状態の *PesXyn10A* を使用した。

PesXyn10A の基質特異性を調査するため、まず、市販の多糖類基質に作用させた。広葉樹由来グルクロノキシランであるバーチウッドキシランとビーチウッドキシランに対して、それぞれ 33.0 及び 33.1 U/mg と高い比活性を示した。また、小麦由来のオートスペルトキシランに対しては、10.2 U/mg とグルクロノキシランよりも低い比活性を示した。一方、CMC やグルコマンナンに対しては活性が全く検出されなかった。*PesXyn10A* の酵素学的諸性質は、**Table 2-1** にまとめた。バーチウッドキシランを基質にした際の、分解生成物を HPLC によって分析した (**Fig. 2-2**)。反応初期においては、キシロペンタオース (Xyl₅) やキシロテトラオース (Xyl₄)、キシロトリオース (Xyl₃) 等のキシロオリゴ糖を生成したが、最終的には 3 糖以上の中性糖は完全に分解され、キシロース (Xyl) 及びキシロビオース (Xyl₂)、Xyl₃ の非還元性末端のキシロースに MeGlcA 側鎖の分岐を有する 1,2³- α -D-(4-*O*-methyl-glucuronoyl)-1,4- β -D-xylotriose (MeGlcA³Xyl₃) が生成された。

バーチウッドキシランを基質に用いた場合、*PesXyn10A* の反応最適温度は

50 °C であり、最適 pH は 6.0 であった。温度耐性試験の結果、30 °C 以下では 24 時間の間、90 % の残存活性を維持し安定であったが、40 °C を超える温度では、ほとんどの活性が短時間で失われた。pH 安定性は、4 °C の低温条件下において pH 3.0 – 8.0 の範囲で 80 % の残存活性を維持し安定であったが、50 °C の高温条件下では、pH 6.0 が最も安定していた。

さらに、海水を含む土壌から単離された *Pestalotiopsis* sp. AN-7 の生育環境を想定し、塩に対する酵素活性への影響を調査した (Fig. 2-3)。5 mM MgCl₂ 及び CaCl₂ の添加条件下での相対活性は、それぞれ、166 % と 161 % にまで活性値が向上した。また、50 mM NaCl 及び KCl 添加条件下では、それぞれ、149 % と 148 % に活性値が向上した (Fig. 2-3a)。また、最も活性への影響が高かった NaCl 及び MgCl₂ の温度安定性への影響を調査した。50 mM NaCl 及び 5 mM MgCl₂ 添加条件下では 30 °C 及び、40 °C での熱安定性が 48 時間後も 80 % 以上の残存活性を維持しており、未添加条件下と比べて熱安定性の改善が認められた (Fig. 2-3b)。こうした現象は、海洋由来菌である *Bacillus* sp. SN5 や *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1、*Glaciecola mesophila* KMM 241 などから生産される XYN においても報告されているが¹⁰⁻¹²、これらの酵素における酵素活性化は海水塩分と同程度の濃度帯 (0.5 – 2 M) において生じており、*PesXyn10A* での酵素活性化が確認された濃度 (50 mM) よりも 10 倍以上も濃い塩濃度であった。*Pestalotiopsis* sp. AN-7 は、汽水域に生息するマングローブ林の土壌より単離された菌であるため、*PesXyn10A* は汽水域に近い低濃度帯の金属塩存在下における適応性を有するものと考えられる。

2-3-3. グルクロノイルエステラーゼ遺伝子の cDNA クローニング

xyn10a と同様に、小麦ふすまを炭素源として生育させた *Pestalotiopsis* sp. AN-7 の菌体から全 RNA を抽出した。この全 RNA を用いて合成した全 cDNA を鋳型に用いることで、グルクロノイルエステラーゼ遺伝子 (*ge*) の ORF 全長のクローニングに成功した。*ge* の ORF は、開始コドン ATG と終始コドン TAA を含む 1185 bp の塩基配列からなり、394 残基からなる蛋白質 (推定分子量 41.1 kDa) をコードした。*ge* の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベース上に、アクセッション番号 LC584174 として登録した。また、以降では、*ge* によってコードされる蛋白質を *PesGE* と表記する。

ge の推定アミノ酸配列を分泌シグナル推定プログラム SignalP-4.1 Server によって解析したところ、N 末端側の 17 残基 (Met1 – Ala17) が、シグナル配列として予測された。同属である *P. fici* W106-1 のゲノムには、2 つの *ge* 遺伝子ホモログとして XP_007841831 (94 % 相同性、394 残基) 及び XP_007837912 (44 % 相同性、393 残基) が存在しており⁵、*Pestalotiopsis* sp. AN-7 の *ge* によってコード

される蛋白質は、XP_007841831 に対してのみに高い相同性を示した。

Protein BLAST 検索の結果、CE15 に分類されている GE としての性質が報告されている酵素と相同性を示した。相同性が高いものとして、*Thermothelomyces thermophilus* ATCC 42464 由来の StGE2 (63 %、XP_003665709)¹³⁾、*Acremonium alcalophilum* 由来の AaGE1 (53 %、AOT21131)¹⁴⁾、*Trichoderma reesei* 由来の Cip2 (52 %、AAP57749.1)¹⁵⁾、*C. unicolor* 由来の CuGE (48 %、AIY68500.0)¹⁶⁾、*S. commune* H4-8 由来の ScGE (48 %、XP_003026289.1)¹⁷⁾などが検索された。

また、CE15 酵素に典型的な 3 箇所の保存配列 VTGCGCSR $\underline{\text{X}}$ GKGA (Val207 – Ala219) 及び、PQESG (Pro234 – Gln238)、HC (His346 – Cys347) に加え、それらの保存配列中に活性中心の触媒 3 残基 (Ser213、Glu236、His346) が保存されていた。GE には、Cip2 のように多糖結合性ドメイン (CBD) を有する酵素も存在するが¹⁵⁾、本蛋白質のアミノ酸配列には CBD と推定されるドメインは存在しなかった。

2-3-4. PesGE の異種発現系構築及び酵素学的諸性質

PesGE は、*P. pastoris* を発現宿主に用いることで、組換え体として得ることに成功した。StGE2 及び Cip2 の X 線結晶構造を参考にして、PesGE の N 末端が 24 番目のグルタミン酸 (Glu24) になるように組換え体を作製した。PesGE は、カラム精製によって、活性収率 27 %で、蛋白質量 2.6 mg を 0.3 L の培養液から回収した。SDS-PAGE によって精製蛋白質の分子量を解析したところ、PesGE は約 45 – 47 kDa にスメアバンドとして確認されたが、この値は成熟蛋白質の理論分子量 (約 38.7 kDa) よりも少し大きかった (Fig. 2-4)。このことは、酵母細胞内での糖鎖付加による影響であると考えられたため、PNGaseF によって脱糖鎖処理した結果、理論分子量と同等の位置にバンドが移動した。これに加えて、PesGE のアミノ酸配列には、1 箇所の N-結合型糖鎖付加配列 (Asn27) の存在が推定されたため、PesXyn10A は糖蛋白質として生産されたものと考えられた。こうした糖鎖による修飾は、活性には影響がないものと判断し、以降の実験では脱糖鎖処理なしの精製酵素を使用した。

Sunner らの方法⁷⁾に従って、GE 活性を測定したところ、PesGE は汎用基質である Bnz-GlcA を分解することが分かった (Fig. 2-5)。この際、比活性は 0.21 U/mg と算出された。Bnz-GlcA を基質に用いた場合、PesGE の反応最適温度は 50 °C であり、最適 pH は 5.0 であった。温度耐性試験の結果、50 °C 以下では 24 時間の間、80 %以上の残存活性を維持し安定であったが、50 °C を超える温度では、ほとんどの活性が短時間で失われた。pH 安定性は、4 °C の低温条件下において pH 4.0 -7.0 の範囲で 80 %の残存活性を維持し安定であった (Table 2-2)。

2-3-5. α -グルクロニダーゼ遺伝子の cDNA クローニング

セルロースを炭素源とした培養液から回収した *I. lacteus* NK-1 菌体より抽出した全 RNA を用いることで、全 cDNA を合成した。この全 cDNA を鋳型にした PCR によって、 α -グルクロニダーゼ遺伝子 (*agul15a*) の ORF 全長の cDNA クローニングに成功した。*agul15a* の ORF は、開始コドン ATG と終始コドン TAA を含む 3000 bp の塩基配列からなり、999 残基からなる蛋白質をコードした。また、以降では、*agul15a* によってコードされる蛋白質を *IIAgu115A* と表記する。

agul15a の推定アミノ酸配列 (*IIAgu115A*) を分泌シグナル推定プログラム SignalP-4.1 Server によって解析したところ、N 末端側の 22 残基 (Met1 – Ala22) がシグナル配列として予測された。Protein BLAST 検索の結果、*IIAgu115* は、CAZy のデータベース上で GH115 に属する AGU 活性が確認されている既報の 8 種の酵素と高い相同性を示した。検索上位には、真核生物では *Sizophilum commune* FGSC 9210 由来の *ScAgu115* (55 %, ADV52250.1)¹⁸⁾、*Scheffersomyces stipites* CBS 6054 由来の *PsAgu115* (44 %, ABN67901.2)¹⁹⁾、原核生物では、立体構造が解明されている *Saccharophagus degradans* 2-40 由来の *SdeAgu115A* (44 %, ABD81015.1、4ZMH)²⁰⁾、*Bacteroides ovatus* ATCC 8483 由来の *BoAgu115A* (39 %, EDO10816.1、4C90)²¹⁾ がヒットした。*IIAgu115* には、GH115 に分類される AGU の活性中心として報告されている 3 つの触媒残基 (Glu207、Arg335、Asp339)²¹⁾ が保存されていた。

2-3-6. *IIAgu115A* の異種発現系構築及び酵素学的諸性質

成熟蛋白質に相当する *IIAgu115A* は、*P. pastoris* の発現系を用いることで、組換え体として得ることに成功した。組換え *IIAgu115A* は C 末端にヒスチジンタグが付加されるように構築されており、ニッケルアフィニティーカラム、ゲルろ過カラムの 2 段階のステップによって精製した。精製した *IIAgu115A* は、活性収率 4.8 %、蛋白質量 0.05 mg を 0.4 L 培養液から回収することができた。SDS-PAGE の結果、培養上清には複数の蛋白質が含まれていたが、精製後、*IIAgu115A* は約 120 kDa 付近に単一のバンドとして精製された (Fig. 2-6)。ヒスチジン抗体を用いたウェスタンブロットの結果では、精製蛋白質は理論分子量に近い約 120 kDa 付近のバンドとして検出されたが、その他として 120 kDa 以下に複数のバンドも確認された (Fig. 2-6)。いずれのバンドもヒスチジン抗体に反応していることから、これらは、宿主由来の内在性プロテアーゼによって、培養過程で分解された *IIAgu115A* 由来の蛋白質断片であるものと考えられる。アフィニティークラム精製後は、酵素活性に影響はなかったため、以後の実験には精製酵素を使用している。*IIAgu115* に含まれる N-結合型糖鎖修飾位置は、13 箇所 (Asn82、Asn114、Asn221、Asn318、Asn367、Asn420、Asn495、Asn527、Asn541、Asn760、Asn805、

Asn833、Asn865) 存在するため、PNGase F による脱糖鎖処理を行った結果、分子量の低下が認められた。そのため、*IIAgu115* は酵母細胞壁内で、過剰に糖鎖が付加された糖蛋白質として生産されているものと考えられる。

Avigad と Millner らの方法⁶⁾に従って、AGU 活性を測定したところ、*IIAgu115A* はバーチウッドキシラン及びビーチウッドキシランに対して、それぞれ、0.4 U/mg、2.1 U/mg の比活性を有することが分かった (Table 2-3)。また、HPAEC-PAD により分解生成物を分析したところ、遊離生成物として MeGlcA が検出された (Fig. 2-7)。これらの結果から、既報の相同性酵素と同様に、*IIAgu115A* が長鎖のグルクロノキシランに対して作用し、キシラン側鎖である MeGlcA を遊離する酵素であることが明らかとなった。

2-3-7. アセチルキシランエステラーゼ遺伝子の cDNA クローニング

agu115a と同様に、セルロースを炭素源とした培養液から回収した *I. lacteus* NK-1 菌体より抽出した全 RNA を用いることで、全 cDNA を合成した。この全 cDNA を鋳型にした PCR によって、アセチルキシランエステラーゼ遺伝子 (*axe1*) の ORF 全長の cDNA クローニングに成功した。*axe1* の ORF は、開始コドン ATG と終始コドン TAA を含む 1098 bp の塩基配列からなり、365 残基からなる蛋白質をコードした。*axe1* の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベース上に、アクセッション番号 LC490788 として登録した。また、以降では、*axe1* によってコードされる蛋白質を *IIAXE1* と表記する。

IIAXE1 を分泌シグナル推定プログラム SignalP-4.1 Server によって解析したところ、N 末端側の 20 残基 (Met1 – Gly20) までのアミノ酸配列は高い信頼性でシグナル配列と予測された。Protein BLAST 検索の結果、N 末端側には CBM family 1 に分類される CBM ドメイン (Gly26 – Ile56) と、リンカー配列領域 (Pro57 – Met109) を挟み、C 末端領域に存在する触媒ドメイン (Phe110 – Pro317) の 2 つのドメインから構成されるものと推定された。尚、この触媒ドメインは、CAZy のデータベース上で CE1 ファミリーに分類される酵素に対して高い相同性を示した。CE1 内において AXE 活性を有する酵素として報告されている *Phanerochaete chrysosporium* 由来 *PcAXE2* (77 %、AEX99761.1)²²⁾、*Volvariella volvacea* 由来 *VvAXE* (56 %、ABI63599)²³⁾、や *Chrysosporium lucknowense* C1 (47 %、ABI63599)²⁴⁾などと相同性が確認できた。

2-3-8. *IIAXE1* の異種発現系構築及び酵素学的諸性質

成熟蛋白質に相当する *IIAXE1* は、*P. pastoris* の発現系を用いることで、組換え体として得ることに成功した。組換え *IIAXE1* は C 末端にヒスチジンタグが付加されるように構築されており、ニッケルアフィニティーカラムによって精製

した。精製した *IIAgu115A* は、活性収率 4.8 %、蛋白質量 0.4 mg を 0.4 L 培養液から回収することができた。SDS-PAGE 及び抗ヒスチジインタグを用いたウェスタンブロットの結果、組換え *IIAXE1* は約 50 kDa 付近の発現蛋白質に起因するバンドとして検出された (**Fig. 2-8**)。一次構造から計算される理論分子量は 39.7 kDa であり、実際の分泌蛋白質は、10 kDa 程度増大していた。*IIAXE1* には、*N*-結合型糖鎖修飾可能な 2 箇所のアスパラギン残基 (Asn320 及び Asn332) が含まれていることから、*P. pastoris* の翻訳後修飾による糖鎖付加が生じたものと考えられた。そこで、PNGaseF による処理を行ったところ分子量の低下が認められたが、理論分子量と完全には一致しなかった。*IIAXE1* には、CBM1 と触媒ドメインの間にセリンやスレオニンを多く含むリンカー領域が存在するため、*O*-結合型糖鎖修飾の影響も含むものと考えられる。こうした糖鎖による修飾は、活性には影響がないものと判断し、以降の実験では脱糖鎖処理なしの精製酵素を使用した。

精製した組換え *IIAXE1* を用いて基質特異性を調査した。基質には、アセチル結合型として *p*NPAc、 α NAc、MuAc、FA または *p*CA 結合型としてそれぞれ EtFe 及び MeCou を使用した。*p*NPAc、 α NAc、MuAc に対する比活性は、それぞれ、 11.8 ± 0.9 U/mg、 5.9 ± 0.4 U/mg、 27.0 ± 0.9 U/mg と算出された (**Table 2-4**)。一方で、EtFe 及び MeCou には全く作用しなかった。反応速度論解析の結果、MuAc に対して、基質結合親和性定数 K_m 値が最も低く、触媒効率定数 k_{cat}/K_m 値が最も高い値を示した。 α NAc は、0.5 mM 以上の濃度では溶解性が低く、ミカエリス-メンテン式における反応初速度の変曲点と最大点に至るまで、濃度条件を検討できなかったため、 K_m や V_{max} 値を算出することができなかった (**Fig. 2-9**)。

2-4. 考察

本章では、LXC に作用するモノコンポーネント酵素の取得を目的として、酵素遺伝子の cDNA クローニングとそれらの組換え体を発現する *P. pastoris* の異種発現系の構築を試みた。

Fig. 2-1、**Fig. 2-4**、**Fig. 2-6**、**Fig. 2-8** に示すように、*Pestalotiopsis* sp. AN-7 及び *I. lacteus* NK-1 からは、GH10 に分類される β -1,4-キシラナーゼ (*PesXyn10A*)、CE15 に分類されるグルクロノイルエステラーゼ (*PesGE*)、GH115 に分類される α -グルクロニダーゼ (*IIAgu115A*)、CE1 に分類されるアセチルキシランエステラーゼ (*IIAXE1*) と相同性を有する 4 種類の遺伝子を単離し、これらの個別酵素の組換え体の作製に成功した。

市販のキシラン系基質を用いて *PesXyn10A* 及び *IIAgu115A* の酵素学的性質を

解析した。Table 2-1 に示すように、*PesXyn10A* の活性評価においては、広葉樹由来バーチウッドキシランを基質として作用し、本酵素がエンド- β -1,4-キシラナーゼとしての性質を有しており、キシラン主鎖の低分子化と同時に、酸性オリゴ糖 $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ の生成酵素としての性質を有することを決定できた。これらの結果は、GH10 に分類されるキシラナーゼに共通する性質²⁵⁾であった。また、Fig. 2-7 に示されたように、*IIAgu115A* の活性評価においては、本酵素がキシランの側鎖に付加した MeGlcA を分解するキシラン- α -グルクロニダーゼの活性を有することを確認した。キシラン- α -グルクロニダーゼは、その性質の差異から大きく 2 種類の酵素があり、長鎖のキシランから MeGlcA を分解可能な GH115 酵素と、短鎖のキシランから MeGlcA を分解可能な GH67 酵素に大別されている²⁶⁾。GH67 酵素は、長鎖のキシランや GH11 キシラナーゼから生産される 1,2³- α -D-(4-O-methyl-glucuronoyl)-1,4- β -D-xylo-tetraose ($\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_4$) には作用せず、GH10 キシラナーゼから生産される $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ のみに作用できる。一方、GH115 酵素は、長鎖のキシランだけでなく、 $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ 及び $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_4$ に対しても作用可能である²¹⁾。*IIAgu115A* は、既報の報告と同様に長鎖キシランに作用でき、また、GH10 キシラナーゼから生産される $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ に対しても作用することを確認している (データ未掲載)。これらの結果から、*IIAgu115A* はキシランの鎖長に関わらず MeGlcA を遊離可能な、GH115 のキシラン α -グルクロニダーゼとしての性質を有することを決定した。

上述したように、XYN と AGU の酵素活性は、市販のキシラン標品を基質として用いることで、比較的容易に活性の検出・評価が可能であった。しかし、市販のキシラン系基質には、調製過程でのアルカリ処理によって、エステル結合を介して複合化したリグニンや、アセチル修飾基などが脱離してしまうため、キシランの修飾基分解に関わるエステラーゼの活性評価のための基質に用いることができない。従って、エステラーゼのスクリーニングには、評価する酵素の活性や機能に応じた基質を適切に選択することが重要となる。

CE1 ファミリー内には、AXE と、FAE の 2 種類の酵素が分類されている²⁷⁾。また、CE1 の中には、AXE と、FAE の両方の活性を有する二機能性酵素も存在することが知られている²⁸⁾。そこで、Table 2-4 に示した通り、CE1 エステラーゼである *IIAXE1* の基質特異性を決定するために、基質にアセチルエステルの *p*NPAc、MuAc、 α NAc と、フェルロイルエステルの EtFer、MeCou を用いて活性評価を行った結果、*IIAXE1* は、アセチルエステルに対してのみ特異的に作用する酵素であることが分かった。また、同じアセチルエステル系基質の中でも、 K_m 値や k_{cat} 値に差があったことから、エステル基質中のアセチル基の構造認識以外にも、発色団側の構造についても、*IIAXE1* が活性を示す上で重要であることが示唆された。本酵素は AXE と推定されたことから、アセチル基に加えてキシ

ラン側の基質構造についても認識していると考えられるが、より詳細な触媒作用を明らかにするためには、人工基質だけでなく実際のアセチルキシランを基質とした活性評価によって議論する必要がある。

次いで、CE15 に分類される GE は、グルクロン酸メチルエステルを基質として認識し、加水分解反応によって、GlcA とアリアルアルコールを遊離させるエステラーゼである²⁹⁾。GE の活性を評価するためには、分子内に GlcA を有する基質を用いる必要があり、汎用性の高い基質として Bnz-GlcA が唯一販売されている。2015 年には Sunner らによって、それまでに性質解明が進んでいた ScGE や StGE2 に対して、Bnz-GlcA を用いた活性評価が行われたことで、本基質が GE の活性測定方法として標準化されるようになった⁷⁾。本研究では、*Pestalotiopsis* sp. AN-7 が生産する PesGE の組換え体の性質を調査するため、既報に従って Bnz-GlcA を用いた活性評価を行った。Fig. 2-5 に示すように、PesGE は既報の相同性酵素と同様に、pNPAc には作用しなかったが、Bnz-GlcA に対しては作用し、加水分解反応の進行に伴って、Bnz-OH と GlcA を遊離したことから、GE 活性を有することが認められた。さらに、Table 2-2 に示すように、pH や温度に対する諸性質を決定することができた。しかし、Bnz-GlcA は天然には存在しない化学構造を有する擬似基質であるため、PesGE が GE であることは決定できたが、天然の LCC に対して作用するかどうか、本来の役割や機能に関する議論は、天然本来の部分構造を有する基質、あるいは、実際の植物細胞壁に作用させ、リグニンとキシラン間を架橋するエステル結合に対する分解反応を詳細に解析する必要がある。

本章で作製した酵素の LXC に対する推定作用位置を Fig. 2-10 に示した。得られた 4 つの酵素は、広葉樹、針葉樹、草本植物に含まれている LXC のうち、MeGlcA を介したリグニンとの架橋点と、その周辺のキシランに作用するため、LXC の酵素分解に関与するキー酵素であると考えられる。

第 2 章 参考文献

1. A.B. Agbor, N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin, and D.B. Levin: Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.*, **29**, 675–685 (2011).
2. M.J. Bailey, P. Biely, and K. Poutanen: Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.*, **23**, 257–270 (1992).
3. D. Salvachúa, A.T. Martínez, M. Tien, M.F.L. Lucendo, F. García, V.I. Ríos, M.J. Martínez, and A. Prieto: Differential proteomic analysis of the secretome of *Iepex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 115 (2013).

4. M. Yao, W. Li, Z. Duan, Y. Zhang, and R. Jia: Genome sequence of the white-rot fungus *Irpex lacteus* F17, a type strain of lignin degrader fungus. *Stand. Genomic. Sci.*, **12**:55 (2017).
5. X. Wang, X. Zhang, L. Liu, M. Xiang, W. Wang, X. Sun, Y. Che, L. Guo, G. Liu, L. Guo, C. Wang, W.-B. Yin, M. Stadler, X. Zhang, and X. Liu: Genomic and transcriptomic analysis of the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici* reveals its lifestyle and high potential for synthesis of natural products. *BMC Genomics*, **16**:28 (2015).
6. Y. Milner and G. Avigad: A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. *Carbohydr. Res.*, **4**, 359–361 (1967).
7. H. Sunner, D. Charavgi, L. Olsson, E. Topakas, and P. Christakopoulos: Glucuronoyl esterase screening and characterization assays utilizing commercially available benzyl glucuronic acid ester. *Molecules*, **20**, 17807–17817 (2015).
8. W.W. Wakarchuk, R.L. Campbell, W.L. Sung, J. Davoodi, and M. Yaguchi: Mutational and crystallographic analysis of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein*, **3**, 467–475 (1994).
9. Y. Chu, T. Tu, L. Penttinen, X. Xue, X. Wang, Z. Yi, L. Gong, J. Rouvinen, H. Luo, N. Hakulinen, B. Yao, and X. Su: Insight into the roles of non-catalytic residues in the active site of a GH10 xylanase with activity on cellulose. *J. Biol. Chem.*, **292**, 19315–19327 (2017).
10. W. Bai, Y. Xue, C. Zhou, and Y. Ma: Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5. *Biotechnol. Lett.*, **34**, 2093–2099 (2012).
11. K. Hung, S. Liu, T. Fang, W. Tzoum F. Lin, K. Sun, and S. Tang: Characterization of a salt-tolerant xylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Biotechnol. Lett.*, **33**, 1441–1447 (2011).
12. B. Guo, X. Chen, C. Sun, B. Zhou, and Y. Zhang: Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- β -1,4-xylanase from marine *Glaciecola mesophile* KMM 241. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1107–1115 (2009).
13. E. Topakas, M. Moukouli, M. Dimarogona, C. Vafiadi, P. Christakopoulos: Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 1765–1772 (2010).
14. S. Hüttner, S. Klaubauf, R.P. de Vries, and L. Olsson: Characterization of three fungal glucuronoyl esterases on glucuronic acid ester model compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 5301–5311 (2010).
15. P. R. Pokkuluri, N. E. Duke, S. J. Wood, M. A. Cotta, X. L. Li, P. Biely, and M. Schiffer: Structure of the catalytic domain of glucuronoyl esterase Cip2 from *Hypocrea jecotina*. *Protein*, **79**, 2588–2592 (2011).
16. C. d'Errico, J. Börjesson, H. Ding, K.B.R.M. Krogh, N. Spodsberg, R. Madsen, and R.N. Monrad,

- Enzyme degradation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs): model studies using a fungal glucuronoyl esterase from *Cerrena unicolor*. *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 914–922 (2015).
17. S. Špáníková and P. Biely: Glucuronoyl esterase - Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Lett.*, **580**, 4597–4601 (2006).
 18. S. Chong, E. Battaglia, P. M. Coutinho, B. Henrissat, M. Tenkanen, and R. P. de Vries: The α -glucuronidase Agu1 from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycosidase hydrolase family (GH115). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 1323–1332 (2011).
 19. O. Ryabova, M. Vršanská, S. Kaneko, W. H. van Zyl, and P. Biely: A novel family of hemicellulolytic α -glucuronidase. *FEBS Lett.*, **583**, 1457–1462 (2009).
 20. W. Wang, R. Yan, B. P. Nocek, T. V. Vuong, R. D. Leo, X. Xu, H. Cui, P. Gatenholm, G. Toriz, M. Tenkanen, A. Sabchenko, and E.R. Master: Biochemical and structural characterization of a five-domain GH115 α -glucuronidase from the marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40^T. *J. Biol. Chem.*, **291**, 14120–14133 (2016).
 21. A. Rogowski, A. Baslé, C.S. Farinas, A. Solovyova, J.C. Mortimer, P. Dupree, H.J. Gilbert, and D.N. Bolam: Evidence that GH115 α -glucuronidase activity, which is required to degrade plant biomass, is dependent on conformational flexibility. *J. Biol. Chem.*, **298**, 53–64 (2014).
 22. N.D. Huy, S. Thiyagarajan, D. Kim, and S. Park: Cloning and characterization of a novel bifunctional acetyl xylan esterase with carbohydrate binding module from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 507–513 (2013).
 23. S. Ding, J. Cao, R. Zhou, and F. Zheng: Molecular cloning, and characterization of a modular acetyl xylan esterase from the edible straw mushroom *Volcariella volvacea*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **274**, 204–310 (2007).
 24. L. Pouvreau, M.C. Jonathan, M.A. Kabel, S.W. Hinz, H. Gruppen, and H.A. Schols: Characterization and mode of action of two acetyl xylan esterases from *Chrysosporium lucknowense* C1 active towards acetylated xylans. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **49**, 312–320 (2011).
 25. K. Kolenová, M. Vršanská, and P. Biely: Mode of action of endo- β -1,4-xylanase of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *J. Biotechnol.*, **121**, 338–345 (2006).
 26. K. Kolenová, O. Ryabova, M. Vršanská, and P. Biely: Inverting character of family GH115 α -glucuronidase. *FEBS Lett.*, **584**, 4063–4068 (2010).
 27. D. Komiya, A. Hori, T. Ishida, K. Igarashi, M. Samejima, T. Koseki, and S. Fushinobu: Crystal structure and substrate specificity modification of acetyl xylan esterase from *Aspergillus luchuensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, e01251–17 (2017).
 28. K. Hashimoto, S. Kaneko, and M. Yoshida: Extracellular carbohydrate esterase from the basidiomycete *Coprinopsis cinerea* released ferulic and acetic acid from xylan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1722–1724 (2010).

29. P. Biely: Microbial esterases: 10 years after discovery. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 7014–7018 (2006).

第2章 図表

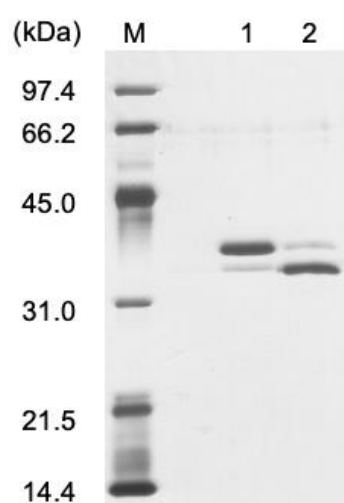


Fig. 2-1. 精製 *PesXyn10A* の SDS-PAGE

レーン 1, 精製 *PesXyn10A*; レーン 2, 脱糖鎖処理後の *PesXyn10A*

Table 2-1. *PesXyn10A* の酵素学的諸性質

理論分子量 (kDa) ^a	33.4
分子量 (kDa) ^b	35.0
最適 pH	6.0
最適温度 (°C)	50
pH 耐性 (> 80 %) ^c	3.0 - 8.0
温度耐性 (°C) (> 80 %) ^d	< 30
比活性 (U/mg)	
バーチウッドキシラン	33.1 ± 0.5
ビーチウッドキシラン	33.0 ± 1.9
オートスペルトキシラン	10.2 ± 0.6
CMC	N.D. ^e
グルコマンナン	N.D. ^e

a) 成熟蛋白質のアミノ酸配列から計算した理論分子量値

b) SDS-PAGE から計測した分子量値

c) 各 pH で、4 °C、24 時間処理時の pH 耐性

d) pH 5.0、24 時間処理時の温度耐性

e) N.D., not detected

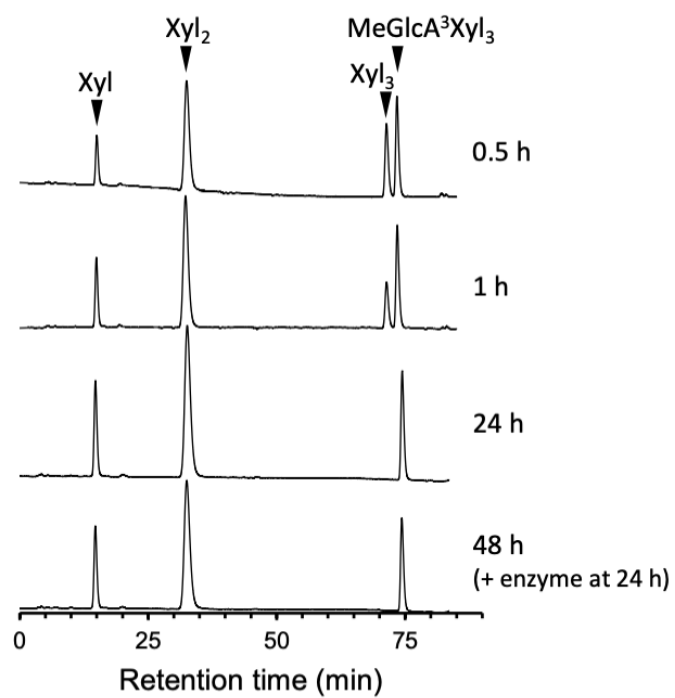


Fig. 2-2. *PesXyn10A* のグルクロノキシランを基質とした分解生成物の HPLC 分析

PesXyn10A (24 U) を 0.1 % バーチウッドキシランと 30 °C で 0.5、1、2、24 時間反応させた。24 時間経過後、酵素を再度添加し、さらに 24 時間反応させた。

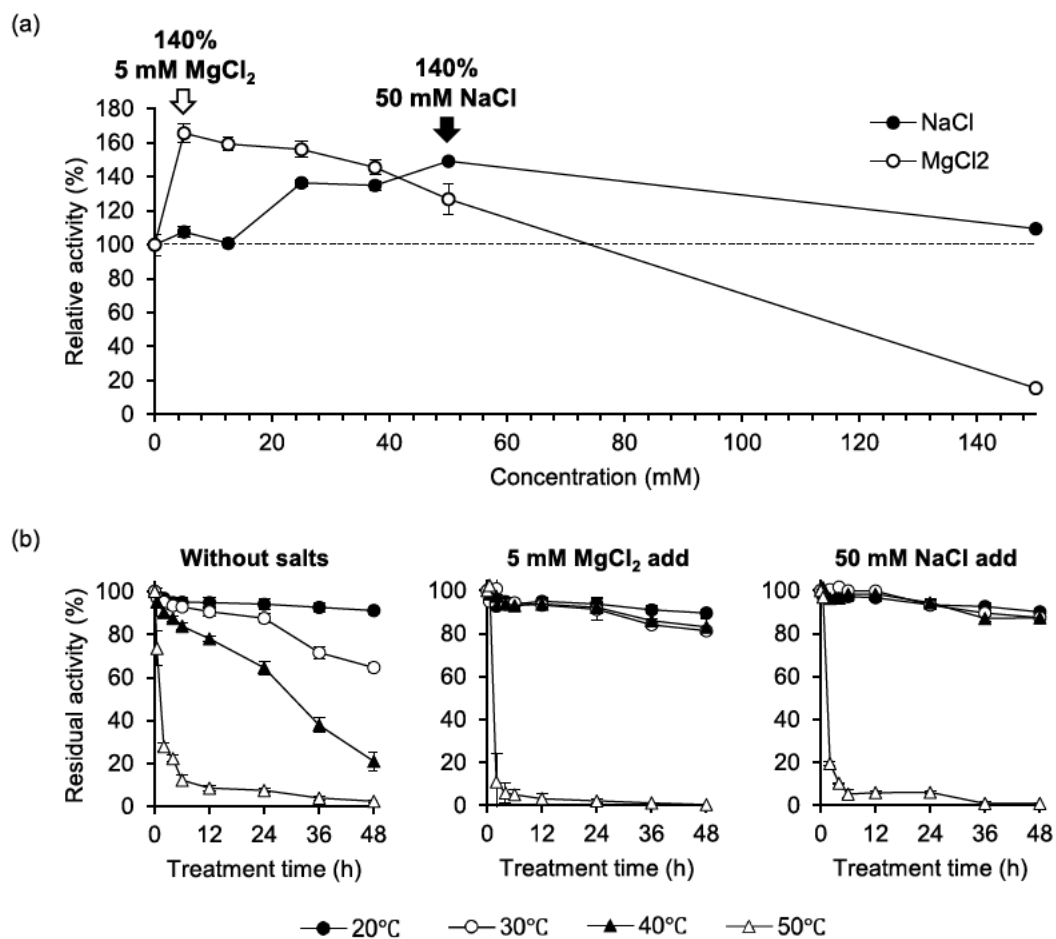


Fig. 2-3. *PesXyn10A* の金属塩添加条件下における酵素活性 (a) 及び耐熱性 (a) への影響

(a) 0 – 150 mM MgCl₂ (○) 及び NaCl (●) 存在下における *PesXyn10A* の相対活性の推移、(b) 塩未添加、5 mM MgCl₂、及び 50 mM NaCl 存在下での 20 °C (●)、30 °C (○)、40 °C (▲)、50 °C (△) における *PesXyn10A* の残存活性の推移

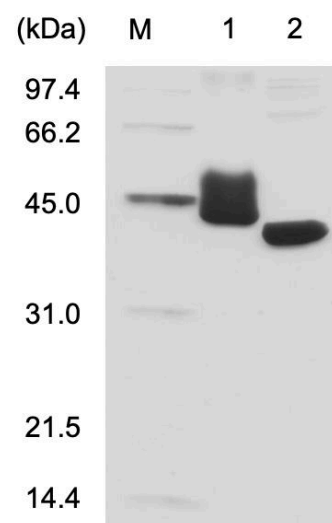


Fig. 2-4. 精製 *PesGE* の SDS-PAGE

レーン 1, 精製 *PesGE*; レーン 2, 脱糖鎖処理後の *PesGE*

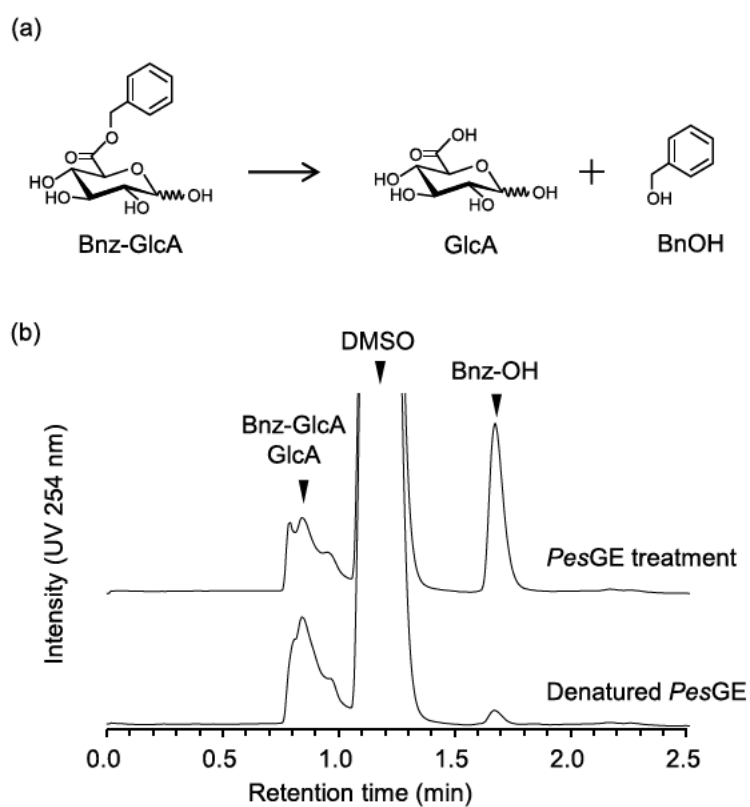


Fig. 2-5. Bnz-GlcA を用いた *PesGE* の酵素活性測定

(a) Bnz-GlcA の加水分解反応、(b) *PesGE* による加水分解生成物の HPLC 分析

Table 2-2. *PesGE* の酵素学的諸性質

理論分子量 (kDa) ^a	39.0
分子量 (kDa) ^b	45 - 50
最適 pH	5.0
最適温度 (°C)	50
pH 耐性 (> 80 %) ^c	3.0 - 8.0
温度耐性 (°C) (> 80 %) ^d	< 50
基質特異性 (U/mg)	
Bnz-GlcA	0.15 ± 0.05
<i>p</i> NPAc	N.D. ^e

a) 成熟蛋白質のアミノ酸配列から計算した理論分子量値

b) SDS-PAGE から計測した分子量値

c) 各 pH で、30 °C、6 時間処理時の pH 耐性

d) pH 5.0、24 時間処理時の温度耐性

e) N.D.、not detected

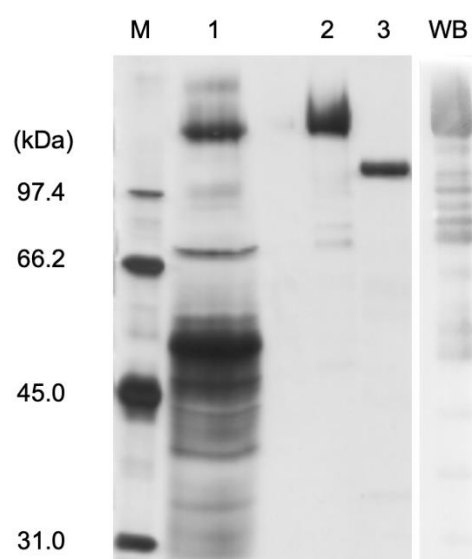


Fig. 2-6. 精製 *HAgu115A* の SDS-PAGE

レーン M, 量マーカー; レーン 1, 養上清液; レーン 2, 製後の *HAgu115A*; レーン 3, 糖鎖処理後の *HAgu115A*; WB, ヒスチジンタグ抗体を用いた精製 *HAgu115A* のウェスタンブロッティング

Table 2-3. //Agu115A の酵素学的諸性質

理論分子量 (kDa) ^a	110
分子量 (kDa) ^b	120
基質特異性 (U/mg)	
ビーチウッドキシラン	2.1 ± 0.5
バーチウッドキシラン	0.4 ± 0.0
a) 成熟蛋白質のアミノ酸配列から計算した理論分子量値	
b) SDS-PAGE から計測した分子量値	

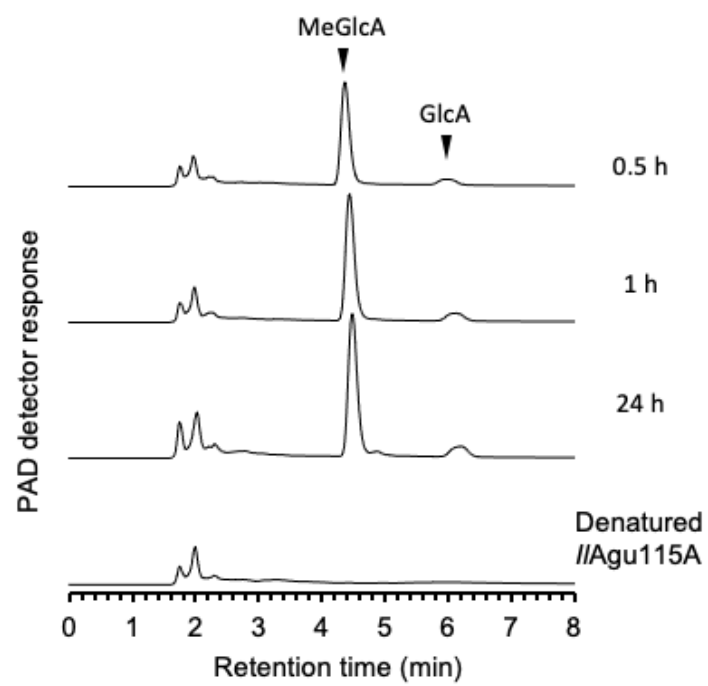


Fig. 2-7. //Agu115A のビーチウッドキシランを基質とした分解生成物の HPAEC-PAD 分析

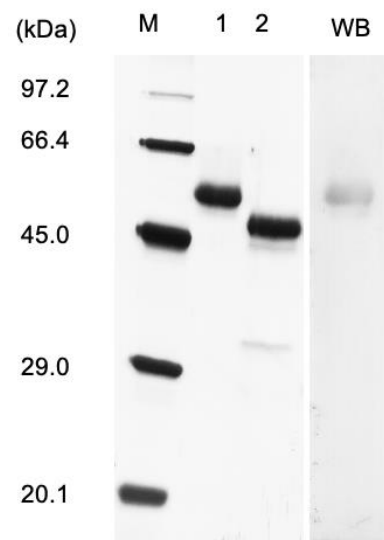


Fig. 2-8. 精製 //AXE1 の SDS-PAGE

レーン M, 分子量マーカー; レーン 1, 精製後の //AXE1; レーン 2, 脱糖鎖処理後の //AXE1; WB, ヒスチジンタグ抗体を用いた精製 //AXE1 のウェスタンブロッティング

Table 2-4. *II*AXE1 の酵素学的諸性質

理論分子量 (kDa) ^a	39.7
分子量 (kDa) ^b	50
基質特異性 (U/mg)	
<i>p</i> NPAc	11.8 ± 0.9
αNAc	5.9 ± 0.4
MuAc	27.0 ± 0.9
EtFer	N.D. ^c
MeCou	N.D. ^c

a) 成熟蛋白質のアミノ酸配列から計算した理論分子量値
b) SDS-PAGE から計測した分子量値
c) N.D., not detected

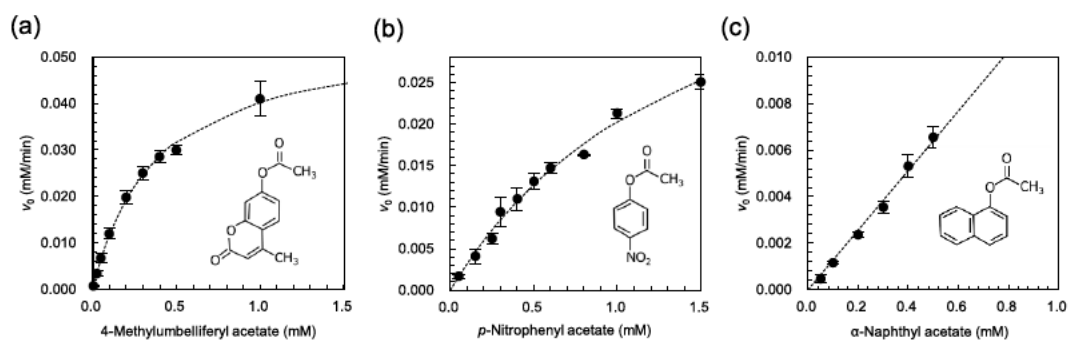


Fig. 2-9. //AXE1 の人工基質に対する酵素反応速度論解析

(a) *p*NPAc (0.050 - 1.5 mM); (b) MUAc (0.0050 - 1.0 mM); (c) α NAc (0.050 - 0.5 mM). 各プロットは、平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) を示し、ミカエリス-メンテン式にフィッティングさせた理論曲線を点線で示した。

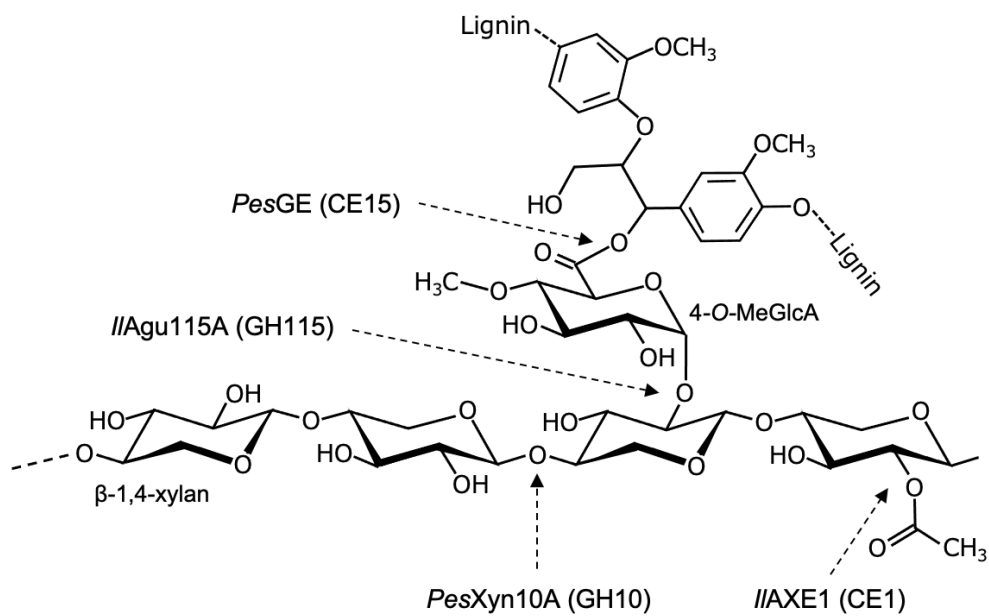


Fig. 2-10. 第2章で作製した4種類の単一酵素のLXCに対する推定作用位置

第 3 章

リグニン-キシラン間のベンジルエステル結合を
模倣したモデル基質の合成及びその酵素分解

第3章 リグニン-キシラン間のベンジルエステル結合を模倣したモデル基質の合成及びその酵素分解

3-1. はじめに

植物細胞壁を構成するセルロース、ヘミセルロース、リグニンの主要 3 成分は、それぞれ独立して存在しているわけではなく複合体を形成しているため、その分解は容易ではない。セルロース繊維の周囲を取り巻く様にして接着したキシランは、リグニンとの架橋結合によって LXC を形成している。LXC に含まれるリグニン-キシラン間の架橋に関わる共有結合には、リグニン中の FA とキシラン側鎖の Ara に結合した FA とのフェルロイルエステル結合の他、 β -O-4 リグニンユニットの α 位、及び γ 位水酸基と、キシラン側鎖の MeGlcA のカルボキシル基とのベンジルエステル結合の存在が知られている (Fig. 1-3)¹⁻⁶⁾。リグノセルロース系バイオマスの変換プロセスにおいて、ベンジルエステル結合はアルカリや酸処理などの過酷な前処理方法によって分解されるが⁷⁾、こうした過酷な前処理方法はリグニン及びヘミセルロースの化学変性や収率低下を招いてしまうという欠点がある。一方で、水蒸気爆砕処理や物理的前処理などの温和な前処理ではベンジルエステル結合は分解されにくく、バイオマス糖化反応の抵抗性の要因となる。そのため、植物細胞壁の全ての構成成分の有効利用を考える上では、温和な条件でベンジルエステル結合をいかに特異的に分解できるかが重要となる。

2006 年に Spániková と Biely らによって、リグニンと MeGlcA を架橋するベンジルエステル結合の分解酵素として、担子菌 *Schizophyllum commune* から GE が発見、単離された⁸⁾。GE は LXC の分解に関わる酵素の候補として、バイオマス変換プロセスにおける産業用酵素としての利用が期待されている。その後、セララーゼ生産菌株として利用されている *Trichoderma reesei* から GE が発見され、そのアミノ酸配列をもとに、遺伝子配列が決定され、2007 年には新しく CAZy ファミリーとして CE15 が開設されることとなった⁹⁾。GE をコードする遺伝子は、原核生物のほか、植物細胞壁を分解する子囊菌や担子菌などでも保有されており、現在 (2020 年 11 月)、CAZy の CE15 ファミリーには、489 個の遺伝子が掲載されている。その後、*Thermothelomyces thermophilus* 由来の StGE2 の X 線結晶構造が MeGlcA との基質結合状態で解明され、活性中心の詳細が明らかとなった¹⁰⁾。GE は、セリン、グルタミン酸、ヒスチジンの 3 つの触媒残基から構成される活性中心をもつエステラーゼであるが、pNPAc などの合成基質、または、植物細胞壁に含まれるペクチンの構成成分となるガラクトuron酸 (GalA) のメ

チルエステルには全く作用しない⁸⁾。GE が触媒作用を示すためには、基質構造中に少なくとも GlcA または、MeGlcA を含むことが必須の条件であることが知られている。

酵素の性質を適切に評価するためには、基質の選定が極めて重要な要素となる。GE がリグニンとキシランの高分子同士を繋ぐベンジルエステル結合に作用することを考えると、LXC を植物細胞壁から構造を損ねることなく調製する必要があるが、これを酵素反応測定用の基質として調製することは容易なことではない。そのために、これまで、GlcA や MeGlcA を原料にしたエステル誘導体の作製によって、いくつかの活性測定用の基質の開発が試みられてきた¹¹⁻¹⁴⁾。このように GE については、オリジナル基質による限られた研究者による報告であったが、2015 年には市販で入手可能な Bnz-GlcA を基質に用いた活性測定方法¹⁵⁾が標準化されて以降は、多くの機能未知酵素が GE としてアノテーションされるようになった。しかし、現在においても基質の種類は限られており、天然に実在する LXC の構造を反映させた基質がないため、GE の触媒機構や自然界で生じる細胞壁分解における役割については不明な点が多くある。

GE の本来の触媒活性についてより深く議論するためには、より天然に近い LXC 構造のモデルとなる基質を調製する必要がある。すでに、第 1 章において、バーチウッドキシランに対して *PesXyn10A* を反応させることで、Xyl₃ と MeGlcA が結合した MeGlcA³Xyl₃ が生産されることについて述べた。本研究では、この MeGlcA³Xyl₃ に含まれるカルボキシル基を標的としたベンジルエステル誘導体化反応によって、リグニンとキシラン間のベンジルエステル結合を模倣した天然の部分構造を再現できるのではないかと考えた (Fig. 3-1)。

本章は、LXC の酵素分解機構の解明に向けて、リグニンとキシランの両成分を架橋するベンジルエステル結合に焦点を当てた。本章では、MeGlcA³Xyl₃ のベンジルエステル化によるモデル基質の作製の方法論について述べ、得られたモデル基質に対する GE の反応性、ならびに既存基質との比較によって、ベンジルエステル結合の酵素分解について論述した。

3-2. 実験材料及び方法

3-2-1. 実験材料及び試薬

使用した精製酵素 *PesXyn10A* 及び *PesGE* は、2-2-7 の記載に従って調製した。合成基質の原料となるキシランには、バーチウッドキシラン (Sigma-Aldrich) を使用した。ベンジルエステル化反応の化学合成には、超脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF、super dehydrated、FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.)、フッ化テ

トラ-*n*-ブチルアンモニウム溶液 (1 M TBAF in THF、Sigma-Aldrich)、臭化ベンジル (Bnz-Br、Sigma-Aldrich) を使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析は、アルミシートシリカゲル TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA) を使用し、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製には、球状シリカゲル Wakosil C-200 (64 - 210 μm、FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) をガラス製クロマトグラフ管 (内径 1.5 cm × 30 cm) に充填し使用した。GE の活性測定用の基質には、自作した合成基質のほか、CarboSynth 社から販売されている Bnz-GlcA 及び、Prof. Peter Biely から恵与頂いたメチルエステル Me-MeGlcA-*p*NPXyl を使用した。

3-2-2. キシランの酵素分解及び MeGlcA³Xyl₃ の分取・精製

酵素反応液は、1 L の 0.025 % アジ化ナトリウム水溶液に 10 g のバーチウッドキシランを溶解させ、精製した *PesXyn10A* を添加して調製した。酵素の反応条件は、酵素の安定性を考慮し、16.9 U/mL の *PesXyn10A* を 24 時間おきに添加し、合計で 254 U のキシラナーゼを使用し、30 °C、18 日間酵素処理を行った。酵素反応は 20 分間の煮沸によって停止させ、エバポレーターによって酵素反応溶液の濃縮液を得た。濃縮した酵素反応溶液 8–12 mL を Hi Load 26/60 Superdex 30 PG (内径 2.6 cm × 60 cm) と XK16/40 Sephadex G-10 (内径 1.6 cm × 40 cm) の 2 本を連結させたカラム取り付けたゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した。分離条件は、移動相として脱イオン水を流速 3.0 mL/min で送液し、送液量 100 mL–400 mL の溶出区間を 5 mL ずつ分取した。オリゴ糖の溶出は、各フラクションについて DNS 法による還元糖比色定量と、各フラクションの HPLC 分析によって確認した。HPLC 分析は、超純水を移動相とする SUGAR KS-802 (Showa Denko K.K.) で分離し、示差屈折率検出器 (RI) で検出した。MeGlcA³Xyl₃ の同定ならびに精製の確認は、LC-MS システム UPLC Xevo QToF (Waters Co.) を用いて分析した。LC 分析条件は、SUGAR KS-802 カラムを使用し、カラム温度を 65 °C に制御した。移動相は、超純水を用い、流速 0.7 mL/min で送液した。ToF MS 分析条件は、イオン化法は ESI ネガティブ、キャピラリー電圧は 2.0 kV、コーン電圧は 30 kV、スキャン範囲は *m/z* 100–1000 に設定した。Bnz-MeGlcA³Xyl₃ の同定ならびに精製の確認は、上記と同様の LC-MS を用いて、LC 分析条件は、YMC-Pack ODS-AQ (粒子径 5 μm、内径 4.6 mm × 250 mm) カラムを使用し、カラム温度を 40 °C に制御した。移動相には 0.2% ギ酸とアセトニトリルを用いて、流速 0.5 mL/min で、25 分間にかけてアセトニトリル濃度が 0% から 100 % となるグラジエント条件で溶離した。ToF MS 分析条件は、イオン化法は ESI ポジティブ、キャピラリー電圧は 2.0 kV、コーン電圧は 30 kV、スキャン範囲は *m/z* 100–1000 に設定した。

3-2-3. MeGlcA³Xyl₃ のベンジルエステル化反応

1 気圧の窒素ガス雰囲気下で、MeGlcA³Xyl₃ (0.51 g、0.84 mmol) を 20 mL の超脱水 DMF に溶解させ、反応管を氷冷させた。窒素ガス雰囲気下、冷却状態のまま、TBAF 溶液 (0.92 mL、0.92 mmol、1.1 equiv.) を反応液へと滴下し、十分に混和させたのちに、Bnz-Br (0.11 mL、0.92 mmol、1.1 equiv.) を数分間かけてゆっくりと滴下させた。その後、室温に戻し、遮光、窒素ガス雰囲気下で、20 時間磁気攪拌させた。反応後、恒温湯浴を 40 °C に設定した減圧ロータリーエバポレーターを用いて、反応液全量を 400 mL のエタノールと共沸させた。共沸によって乾固させた残渣をクロロホルム : メタノール : 水 (70 : 30 : 5、v/v) に溶解させ、同溶媒を移動相とするシリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 1.5 cm×20 cm) に供した。同溶媒を展開溶媒とする TLC によって、移動比 (*R_f*) 値が 0.24 - 0.30 付近に、目的化合物の溶出を確認した。スポットの検出は、30 % 硫酸含有エタノール溶液を噴霧し、120 °C で発色させた。カラム精製後に、エバポレーターによって溶媒を除去し水飴状となった目的化合物は、その後、常温下での約 3 日間の減圧乾燥によって粉末試料とした。

3-2-4. 酵素活性測定

Bnz-MeGlcA³Xyl₃ ならびに Bnz-GlcA はジメチルスルホキシドに溶解させ、Me-MeGlcA-*p*NPXyl は脱イオン水に溶解させた基質溶液として使用した。

ベンジルエステルに対する活性測定は、Sunner らによる既存の手法に従って行った¹⁵⁾。酵素反応は、50 μL の Bnz-GlcA 溶液 (終濃度: 0.50 - 16.0 mM) と 50 μL の酵素溶液 (終濃度: 0.31 μM)、400 μL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) からなる反応液中で行い、30 °C で 30 分間反応させた後、0.1 mL の酢酸を添加することにより停止させた。Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対する酵素反応は、50 μL の Bnz-MeGlcA³Xyl₃ 溶液 (終濃度: 0.06 - 3.74 mM) と 50 μL の酵素溶液 (終濃度: 0.005 - 0.01 μM)、400 μL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) からなる反応液中で行い、30 °C で 20 分間反応させた後、0.1 mL の酢酸を添加することにより停止させた。各反応液中で生成した Bnz-OH は、反応液全量を 0.22 μm フィルターで濾過したのちに、HPLC で分析した。分析条件は、50 % アセトニトリルを 0.7 mL/min で送液し、Inertsil ODS-3 カラム (粒子径 3 μm、内径 3.0 mm × 150 mm) で分離し、UV 254 nm の波長で検出した。対照区は、予め煮沸失活させた酵素を用いて上記と同様の反応液を調製し、同条件での反応後に同様の分析手法によって遊離した Bnz-OH を測定した。酵素反応によって生じた生成物の量は、対照区から生じる生成物量との差し引きから算出した。ベンジルエステルに対する反応初速度は、毎分あたりに生産される Bnz-OH の増加量から求めた。1 U の酵素活性は、1 分間に 1 μmol の Bnz-OH を生成する酵素量と定義し

た。

メチルエステルに対する活性測定は、Špáníková らによる既存の方法に従って実施した⁸⁾。酵素反応は、400 μL の Me-MeGlcA-*p*NPXyl 溶液 (終濃度: 0.06 - 3.74 mM) と 50 μL の酵素溶液 (終濃度: 0.005 - 0.006 μM)、50 μL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) からなる反応液中で行い、30 °C で 15 分間反応させた後、0.1 mL の酢酸を添加することにより停止させた。各反応液中に含まれる Me-MeGlcA-*p*NPXyl は、反応液全量を 0.22 μm フィルターで濾過したのちに、HPLC で分析した。分析条件は、30 % アセトニトリルを 0.5 mL/min で送液し、カラム Inertsil ODS-3 で分離し、UV 308 nm の波長で検出した。メチルエステルに対する反応初速度は、毎分当たり分解される Me-MeGlcA-*p*NPXyl の減少量から求めた。1 U の酵素活性は、1 分間に 1 μmol の Me-MeGlcA-*p*NPXyl を消費する酵素量と定義した。

各基質について、3 から 5 点の濃度条件から求められた反応初速度の値を、非線形最小二乗法によってミカエリス-メンテン式に近似し、酵素反応速度論定数 K_m 、 V_{\max} 、 k_{cat} を算出した。

3-3. 結果

3-3-1. MeGlcA³Xyl₃ の精製

まず、10 g のバーチウッドキシランを原料とした *PesXyn10A* によって酵素処理を行った。精製工程において、SEC では MeGlcA³Xyl₃ (Mw: 604) と分子量値の近い Xyl₃ (Mw: 414) の分離が困難なために、酵素反応の終了点は Xyl₃ が完全に分解された時点とした。*PesXyn10A* の熱安定性が低い (Table 2-1) ことを考慮し、酵素の添加方法は逐次的に行った。HPLC によって反応液中に含まれる Xyl₃ の分解過程を経時的に分析した (Fig. 3-2)。結果的に、10 g のキシランを完全に分解するためには、16.9 U/mL の *PesXyn10A* を 24 時間おきに分割して添加した場合、合計で 254 U の *PesXyn10A* を添加する必要があり、18 日間の日数を要した。

次いで、グルクロノキシランの完全分解によって生じる MeGlcA³Xyl₃、Xyl₂、キシロース (Xyl) を含む酵素反応液を、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。サイズ排除クロマトグラフィーの結果を Fig. 3-3a に示した。各種オリゴ糖の溶出確認は、各フラクションについて HPLC 分析を行うことで検出した (Fig. 3-3b)。その結果、MeGlcA³Xyl₃ は、Xyl₂ 及び Xyl と分離可能であることが示された。MeGlcA³Xyl₃ だけが溶出される 225 mL – 275 mL (Frc. 26 - 36) のフラクションのみを回収し、精製完了とした。Xyl と Xyl₂ が含まれている 275 mL – 375

mL (Frc. 37 - 56) のフラクションについては、MeGlcA³Xyl₃ が完全に回収されるまで、繰り返しリクロマトグラフィーを行った。最終的に、MeGlcA³Xyl₃ は 1.6 g/10 g-xylan (乾燥重量基準) の収率で精製が完了した。精製試料について、LC-MS 分析したところ、m/z [M-H]⁻ 603 (理論分子量 604) のピークが観測され、他の糖や不純物を含まない高純度の精製標品を得ることができた (Fig. 3-4)。この際、側鎖グルクロン酸の 4 位水酸基にメチル修飾がない 1,2³-α-D-glucuronoyl-1,4-β-D-xylotriose (GlcA³Xyl₃) の m/z 590 のピークは、全く検出されなかった。

3-3-2. MeGlcA³Xyl₃ のベンジルエステル化

LXC 中のリグニンとキシランを繋ぐベンジルエステル結合 (Fig. 1-3a) の部分構造に着目して、MeGlcA の C6 位のカルボキシ基のベンジルエステル誘導体化を行うため、MeGlcA³Xyl₃ を Bnz-Br との反応に供した (Scheme 1)。本反応は、すでに GlcA のエステル誘導体化反応での報告があり¹⁴⁾、これらの文献の手法に従って実施した。本反応は Williamson 反応¹⁶⁾に基づくものであり、理論的には、非プロトン性極性溶媒中において、Bnz-Br、あるいは TBAF とのハロゲン置換によるフッ化ベンジルの求電子種に対して、MeGlcA の C6 位のカルボキシ基の負電荷が求核種として働き、求核置換反応 (S_N2 反応) によって進行する。

合成実験は、水分子の存在による逆反応の進行を防ぐため、試料と材料の乾燥状態を維持し、化学反応は全て窒素ガス雰囲気下で行った。反応開始時の反応液は、MeGlcA³Xyl₃ は DMF に溶解し難く、当初は濁った状態の懸濁液であったが、反応開始約 2 時間後には、完全に溶解し、透明な紅茶色の溶液へと変化した。反応開始 20 時間後、TLC によって、合成反応の進行を確認したところ、クロロホルム/メタノール/水系の極性の高い展開溶媒で展開される新たなスポット (R_f 0.5) が生じた (Fig. 3-5)。このスポットの化合物物に対して PesGE を処理したところ、酵素分解によって、R_f 0.5 のスポットが消失し、原料である MeGlcA³Xyl₃ のスポット (R_f 0.0) が新たに生じた (Fig. 3-5)。このことから、R_f 0.5 のスポットがエステル化反応によって生じた Bnz-MeGlcA³Xyl₃ であることが示唆された。

次いで、この目的化合物をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製を行った。通常、シリカゲルクロマトグラフィーを行う際の移動相溶媒は、目的化合物をシリカゲルに保持させるため、R_f が 0.1 から 0.3 となる展開溶媒を選択することが望ましいとされている¹⁷⁾。展開溶媒の混合比を検討したところ、クロロホルム/メタノール/水 (70 : 30 : 5) において、R_f が 0.24 を示したことから、この組成の溶液をシリカゲルクロマトグラフィーの移動相として用いることに決定した (Fig. 3-6a)。まず、エステル化反応液をエタノールとの共沸によって DMF 溶媒を除去した後、反応濃縮液として、シリカゲルクロマトグラフィーに供した (Fig. 3-6b)。精製の結果、R_f の高い Bnz-Br 等の試薬は、カラムに保持されること

なく 75 mL 以下 (Frc. 6 まで) で溶出され、3 – 5 column volume に相当する 75 – 138 mL の溶出区間 (Frc. 6 – 11) で目的化合物が溶出した (**Fig. 3-6b**)。この際、未反応の $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ については、原点で溶離されないまま留まっており、原料との分離もできていた。目的化合物のフラクションを回収し、エバポレーターによって、移動相溶媒を取り除くと、黄金色の水飴状の化合物が得られた。これを常温の減圧乾燥によって、2 – 3 日間乾燥させ、最終的に薄黄色の乾燥粉末が得られた。収率は 45%-yield であり、510 mg の $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ から 260 mg の目的化合物が得られた。

精製した目的化合物を LC-MS に供した。ネガティブイオンモードでは検出されないが、ポジティブイオンモードにおいて $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ のアンモニウムイオン (NH_4^+) 型の理論分子量 (694+18) と一致する m/z $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 712 のピークが観測された (**Fig. 3-7**)。このことから、目的とする化合物である $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ が生成されたと考えられた。以降の実験では、この精製した目的化合物 $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ を、*PesGE* の酵素活性評価のための基質として使用した。

3-3-3. *PesGE* の活性評価

PesGE は、ベンジルエステルに対して pH 5、50 °C で最大活性を示したが、30 °C 以上では基質の自発的分解が生じてしまうために、以下での活性測定は pH 5、30 °C の比較的な温和な条件下で実施した。

ベンジルエステルに対する *PesGE* の触媒活性を確認するため、酵素処理後の分解物を HPLC で分析した結果を **Fig. 3-8** に示した。その結果、市販のベンジルエステルである Bnz-GlcA と同様に、 $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ に対しても活性を示し、加水分解の結果として Bnz-OH が検出された (**Fig. 3-8a**)。また、熱処理を行った失活酵素を添加にした対照区におけるクロマトグラムから分かるように、pH 5、30 °C の条件下において、 $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ は分解されることなく安定して存在するのに対して、 Bnz-GlcA では酵素反応に依らず自発的な分解が生じていることが分かった (**Fig. 3-8b**)。この結果は、それぞれの化合物の安定性の違いを示すものであり、基質として使用する際は反応条件に注意することが必要になる。次に、これらの 2 種類の基質に対する酵素反応の経時変化を比較した結果を **Fig. 3-9** に示した。その結果、 Bnz-GlcA と比較して $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ に対する *PesGE* の反応初速度は顕著に高く、基質濃度が 4 mM の際、30 °C、pH 5 におけるそれぞれの比活性値は、 Bnz-GlcA で 0.21 U/mg、 $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ で 32.5 U/mg となり、270 倍の差があった。

ベンジルエステル基質間における分解性の差異についてより詳細に調べるため、*PesGE* の酵素反応速度パラメーターを比較した。酵素反応の初速度の実験値と基質濃度との関係をプロットし、ミカエリス-メンテン式にフィッティングさ

せた結果を **Fig. 3-10a** 及び **10b** に示した。*PesGE* の Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対する K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} は、それぞれ 0.43 ± 0.01 mM、 55.5 ± 1.1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg-enzyme⁻¹、 35.8 ± 0.7 s⁻¹ と算出された。一方、Bnz-GlcA に対しては、Bnz-GlcA が溶媒に溶解可能な 16 mM 以下の基質濃度帯において、最大速度の 0 次反応状態が確認できなかったため、 K_m 及び k_{cat} 値を算出することができなかった (**Fig. 3-10b**)。この区間のプロットの直線性が高いため、ミカエリス-メンテン式の一次式 ($[S]$ と v が比例) と近似することができ、Bnz-GlcA に対する k_{cat}/K_m 値は 0.13 mM⁻¹ s⁻¹ と算出された。これに対して Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対する本酵素の触媒効率 (k_{cat}/K_m) を算出すると、 83.8 mM⁻¹ s⁻¹ であり、Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対する触媒効率は Bnz-GlcA よりも 645 倍高いことが示された (**Fig. 3-10a**)。これらの結果から、Bnz-GlcA に対する K_m 値が非常に高いことが推定され、基質-酵素間の親和性が極めて低いことが考えられた。

さらに、ベンジルエステルのほか、メチルエステル基質である Me-MeGlcA-*p*NPXyl に対する本酵素の速度論パラメーターを解析したところ、 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} は、それぞれ 0.47 ± 0.10 mM、 65.4 ± 7.6 $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg-enzyme⁻¹、 42.1 ± 4.9 s⁻¹ と算出された。また、 k_{cat}/K_m は 89.6 mM⁻¹ s⁻¹ であり、Bnz-MeGlcA³Xyl₃ と同程度の値を示した (**Fig. 3-10c**)。

3-4. 考察

本研究では、子囊菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来の GE に着目し、種々の基質に対する酵素反応の解析を行った。そのために、*P. pastoris* を宿主として利用し、異種発現酵素として *PesGE* を生産した (**Fig. 2-4**)。精製した *PesGE* は、市販の活性測定用基質の Bnz-GlcA に対して分解活性を示し、既報の相同性酵素と類似した酵素学的性質を示した。これまで、一般的に GE の活性評価には、リグニンの部分構造を模倣する様々なアルキルアルコールと GlcA あるいは MeGlcA とのエステル誘導体が基質として用いられてきた。その中でベンジルエステルは、天然に存在する β -O-4 リグニンにキシランが結合した α -位型のベンジルエステルと構造上類似しているため、シンナミルエステルや、アリルエステル、メチルエステルなどと比べて、GE によって分解され易く、リグニン部分の基質構造として適していると報告されている¹⁴⁾。一方、天然の MeGlcA は、キシランに付加した状態でリグニンと結合しているにも関わらず、こうした天然構造を反映させた基質はなく、糖質部分の影響については十分に調べられていない。そこで、本研究では、リグニン部分を模倣するベンジルエステルに加えて、キシラン糖部分を含む LXC の部分構造に焦点を当て、新たな活性測定用基質の作製を目指した。

作製した Bnz-MeGlcA³Xyl₃ は、GH10 の XYN の酵素反応によって得られる MeGlcA³Xyl₃ の天然由来キシランの部分構造を有するベンジルエステルであり、天然の LXC 中に含まれる MeGlcA を介して架橋した、リグニンとキシランの成分間の共有結合構造のモデルである。既往研究における合成基質は、エステル化反応の原料である MeGlcA の糖骨格の作製に煩雑な有機合成的手法を伴うため、5 段階以上に及ぶ多段階の合成ステップを経て調製されていた^{14,18)}。それに対して、本基質の合成方法では、植物細胞壁由来のキシランを原料とした酵素反応だけで糖骨格を調製でき、初発原料から 2 段階のシンプルな手法でベンジルエステル基質の作製が可能となった (Fig. 3-1)。その上、本基質は、キシラン断片に付加した MeGlcA のベンジルエステルであるため、GlcA の 4 位のメチル基や 1 位から繋がるキシラン骨格が欠損した市販基質と比べて、より天然の LXC 構造に近いという特徴がある。

PesGE の活性測定では Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対して顕著に高い反応性を示した。Bnz-GlcA に対しては、 k_{cat}/K_m が 0.13 mM s^{-1} と極端に低く、 K_m 値が 16 mM を超える高い値を示すことから、Bnz-GlcA との親和性が極めて低いことが考えられた。Bnz-GlcA に対する速度論解析については他の相同性酵素の *StGE2*、*ScGE*、*AaGE1*、*PcGE1*、*WcGE1* での検証例があり、いずれの k_{cat}/K_m の値も $0.4 - 0.6 \text{ mM s}^{-1}$ であり、*PesGE* と同程度の値が報告されている。さらに、担子菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 由来 *CsGE* (K_m : 55.8 mM)¹⁹⁾、担子菌 *Pleurotus eryngii* 由来 *PeGE* (K_m : 23.9 mM)¹⁹⁾、バクテリア *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* 由来 *CkGE15A* (K_m : 18.5 mM)²⁰⁾ では、*PesGE* と同様に Bnz-GlcA に対する非常に高い K_m 値が報告されていることから、Bnz-GlcA の基質構造は *GE* が触媒作用を示すのに適切でないと考えられた。Bnz-MeGlcA³Xyl₃ と Bnz-GlcA の 2 種類のベンジルエステルの違いは糖質骨格部分だけであるが、Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対する方が Bnz-GlcA と比べて、 K_m 値が極端に低く (親和性が高い)、触媒効率が 645 倍高いということが示された (Fig. 3-10a, 10b)。これらの結果から、*GE* によって MeGlcA³Xyl₃ の糖質部分が認識されているということが考えられた。これらの結果を踏まえて、糖質部分の構造が酵素活性に与える影響についてより詳細に調べるため、Bnz-MeGlcA³Xyl₃ と糖質骨格構造が類似した 4-ニトロフェニルキシロースに結合した MeGlcA のメチルエステルである Me-MeGlcA-*p*NPXyl を基質とした *PesGE* の速度論解析を実施した (Fig. 3-10c)。Me-MeGlcA-*p*NPXyl に対する *PesGE* の K_m 及び k_{cat} の値は、それぞれのアルキルアルコール部分の構造が異なっているにも関わらず、Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対する値と同程度であった。このことから、アルコール部分の基質構造において、メチルエステルとベンジルエステルの違いには大きな影響がなく、Bnz-GlcA には含まれない GlcA の 4 位のメチル基と、1 位に付加したキシラン骨格の構造が触媒作用を示す上で重要であると

ということが示唆された。

これまで、基質認識のメカニズムについて、5 件の GE の X 線結晶構造解析の結果から議論されてきた^{10,21,22,23,24})。その内、*St*GE2 の活性中心において、MeGlcA との複合体として立体構造が明らかにされており、4 位のメチル基を認識するためのロイシン残基、リジン残基が確認されている¹⁰)。さらに、近年では MeGlcA³Xyl₃ との複合体として *Cu*GE の立体構造が明らかとなり²⁴)、MeGlcA とキシロピラノース間の α -1,2-グリコシド結合の認識には、トリプトファン残基が重要な役割を果たしていると報告されている。*Cu*GE の立体構造²⁴)を鋳型に *Pes*GE の活性中心のモデリングを行ったところ、これまで報告されてきた 4-O-メチル基の認識に関わる K215 及び L309 と、MeGlcA とキシロピラノース間の α -1,2-グリコシド結合の認識に関わる W308 が保存されていることがわかった (Fig. 3-11)。この他、*Pes*GE には既報の GE に典型的な触媒 3 残基 (S211、H344、R212) や MeGlcA の C2 位、C3 位の水酸基を認識する 2 つのアミノ酸 (Q257、E265) が保存されていた。これらのことを踏まえると、活性中心において MeGlcA³Xyl₃ を認識するためのアミノ酸残基が *Pes*GE においても保存されており、このことよって Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対して高い親和性を示したものと考えられた。

さらに、等温滴定型カロリメトリーによる *Cu*GE の基質結合性の解析では、*Cu*GE が MeGlcA³Xyl₃ に対しては、キシロース骨格を含まない MeGlcA よりも 10 倍低い解離定数 K_d 、即ち、高い結合性を示しており、キシラン骨格の有無は酵素との複合体形成に大きく影響すると報告されている²⁴)。この MeGlcA³Xyl₃ に対する *Cu*GE の K_d 値 (0.3 mM) は Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対する *Pes*GE の K_m 値 (0.43 mM) とよく一致していたことから、*Pes*GE においてもベンジルエステル基質の MeGlcA³Xyl₃ 部分を認識しているものと考えられた。Špáníková と Biely らによる議論では、キシラン主鎖の長さは酵素活性に影響しないと結論付けられており^{11,25})、本研究においてキシラン鎖長の異なる Bnz-MeGlcA³Xyl₃ と Me-MeGlcA-*p*NPXyl に対して *Pes*GE の分解性が同程度であったことは、この議論を支持する結果であった。これらのことを踏まえると、GE は基質構造中のキシランの糖鎖部分を積極的に認識するわけではなく、キシランと α -1,2-グリコシド結合によって固定された MeGlcA を認識していると言える。以上のこと踏まえて、*Pes*GE が触媒活性を示す上で 4 位のメチル基と、1 位のキシロピラノースとの α -1,2-グリコシド結合を認識することが、GE の活性中心に取り込まれるために重要であり、このことが Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対して高い触媒活性を示す要因であると結論付けた。一方、Bnz-GlcA は、4 位にメチル基を持たないことに加えて、水溶液中ではピラノース環の α/β の 2 つのアノマー型、あるいは開環型の 3 つの構造の平衡状態にあり、尚且つ、自発的な加水分解を受けやすい不安定な構造が原

因となって活性中心へと取り込まれにくいものと考えられた。その結果として *PesGE* が Bnz-GlcA よりも Bnz-MeGlcA³Xyl₃ に対して特異的に作用したものと考えられた。

以上をまとめると、本研究では、新たにリグニンとキシラン間を架橋するベンジルエステルの部分構造を再現する Bnz-MeGlcA³Xyl₃ の合成に成功した。本モデル基質は、市販で入手可能なバーチウッドキシランあるいは、MeGlcA³Xyl₃ を原料に利用することで、簡便に調製することが可能である。得られた Bnz-MeGlcA³Xyl₃ は *PesGE* によって特異的に分解されることが明らかとなり、天然状態でのキシラン断片を含む MeGlcA の糖質構造が GE の触媒作用を示す上で基質認識のために重要であることが明らかとなった。これらの結果から、本モデル基質が GE の触媒機構の詳細解明、またはスクリーニングのための基質として有効であることが示された。さらに、本基質は、リグニンとキシランの両構造を有するために、GE による作用位置を有するだけでなく、その他にも、GH115 グルクロニダーゼ、キシラナーゼ、β-キシロシダーゼなどの酵素による作用位置を有することを特徴とする LXC のモデル化合物である (Fig. 3-12)。従って、ベンジルエステル結合の周辺に作用する複数の酵素間の作用機序の解明のためにも有効な基質であることが期待できる。

第3章 参考文献

1. A. Kato, J.I. Azuma and T. Koshijima: Isolation and identification of a new feruloylated tetrasaccharide from bagasse lignin-carbohydrate complex containing phenolic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1691–1693 (1987).
2. T. Watanabe and T. Koshijima: Evidence for an ester linkage between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2953–2955 (1988).
3. N. Takahashi and T. Koshijima: Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sci. Technol.*, **22**, 231–241 (1988).
4. T. Watanabe: Analysis of native bonds between lignin and carbohydrate by specific chemical reactions. In: *Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues*. Springer Series in Wood Science. Berlin, Heidelberg (2003).
5. M. Balakshin, E. Capanema, H. Gracz, H.M. Chang, and H. Jameel: Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. *Planta*, **233**, 1097–1110 (2011).
6. T.Q. Yuan, S.N. Sun, F. Xu, and R.C. Sun: Characterization of lignin structures and lignin-

- carbohydrate complex (LCC) linkages by quantitative ^{13}C and 2D HSQC NMR spectroscopy. *J. Agric. Food. Chem.*, **59**, 10604–10614 (2011).
7. D.N. Himmel, S.-Y. Ding, D.K. Johnson, W.S. Adney, M.R. Nimlos, J.W. Brady, and T.D. Foust: Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, **315**, 804–807 (2007).
 8. S. Špáníková and P. Biely: Glucuronoyl esterase – Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Lett.*, **580**, 4597–4601 (2006).
 9. X. Li, S. Špáníková, P. deVries, and P. Biely: Identification of genes encoding microbial glucuronoyl esterases. *FEBS Lett.*, **581**, 4029–4035 (2007).
 10. D. Charavgi, M. Dimarogona, E. Topakas, P. Christakopoulos, and D. Chrysina: The structure of a novel glucuronoyl esterase from *Myceliophthora thermophila* gives new insights into its role as a potential biocatalyst. *Acta. Cryst. D.*, **69**, 63–73 (2013).
 11. S. Špáníková, M. Poláková, D. Joniak, J. Hirsch, and P. Biely: Synthetic esters recognized by glucuronoyl esterase from *Schizophyllum commune*. *Arch. Microbiol.*, **188**, 185–189 (2007).
 12. M. Ďuranová, K. Kolenová, J. Hirsch, and P. Biely: Fungal glucuronoyl esterases and their substrate uronic acid recognition. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2483–2487 (2009).
 13. C. Katsimpouras, A. Bénarouche, D. Navarro, M. Karpuss, M. Dimarogona, G. Berrin, P. Christakopoulos, and E. Topakas: Enzymatic synthesis of model substrates recognized by glucuronoyl esterases from *Podospora anserina* and *Myceliophthora thermophile*. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, **98**, 5507–5516 (2014).
 14. C. d’Errico, J.O. Jørgensen, K.B.R.M. Krogh, N. Spodsberg, R. Madsen, and R.N. Monrad: Enzymatic degradation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs): model studies using a fungal glucuronoyl esterase from *Cerrena unicolor*. *Biotechnol. Bioengin.*, **112**, 914–922 (2015).
 15. H. Sunner, D. Charavgi, L. Olsson, E. Topakas, and P. Christakopoulos: Glucuronoyl esterase screening and characterization assays utilizing commercially available benzyl glucuronic acid ester. *Molecules*, **20**, 17807–17817 (2015).
 16. W. Williamson: On etherification. *J. Chem. Soc*, **4**, 229–239 (1852).
 17. W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra: Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, **43**, 2923–2925 (1978).
 18. J. Hirsch, V. Langer and M. Kooš: Synthesis and molecular structure of methyl 4-*O*-methyl- α -D-glucopyranuronate. *Molecules*, **10**, 251–258 (2005).

19. M. Lin, A. Hiyama, K. Kondo, T. Nagata, and M. Katahira: Classification of fungal glucuronoyl esterase (FGEs) and characterization of two new FGEs from *Ceriporiopsis subvermispola* and *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 9635–9645 (2018).
20. D. Krska and J. Larbrink: Investigation of a thermostable multi-domain xylanase-glucuronoyl esterase enzyme from *Caladicellulosiruptor kristjanssonii* incorporating multiple carbohydrate-binding domain. *Biotechnol. Biofuels*, **13**, 68 (2020).
21. P.R. Pokkuluri, N.E.C. Duke, S.J. Wood, M.A. Cotta, X.L. Li, P. Biely, and M. Schiffer: Structure of the catalytic domain of glucuronoyl esterase Cip2 from *Hypocrea jecorina*. *Protein*, **79**, 2588–2592 (2011).
22. S. Mazurkewich, J.C.N. Poulsen, L.L. Leggio, and J. Larsbrink: Structural and biochemical studies of the glucuronoyl esterase OtCE15A illuminate its interaction with lignocellulosic components. *J. Biol. Chem.*, **294**, 19978–19987 (2019).
23. J.A. Bååth, S. Mazurkewich, J.C.N. Poulsen, L. Olsson, L.L. Leggio, and J. Larsbrink: Structure-function analyses reveal that a glucuronoyl esterase from *Teredinibacter turnerae* interacts with carbohydrates and aromatic compounds. *J. Biol. Chem.*, **294**, 6635–6644 (2019).
24. H.A. Ernst, C. Mosbech, A.E. Langkilde, P. Westh, A.S. Meyer, J.W. Agger, and S. Larsen: The structural basis of fungal glucuronoyl esterase activity on natural substrates. *Nat. Commun.*, **11**, 1026 (2020).
25. P. Biely, A. Malovíková, I. Uhliariková, X.L. Li, and D.W.S. Wong: Glucuronoyl esterases are active on the polymeric substrate methyl esterified glucuronoxylan. *FEBS lett.*, **589**, 2334–2339 (2015).

第3章 図表

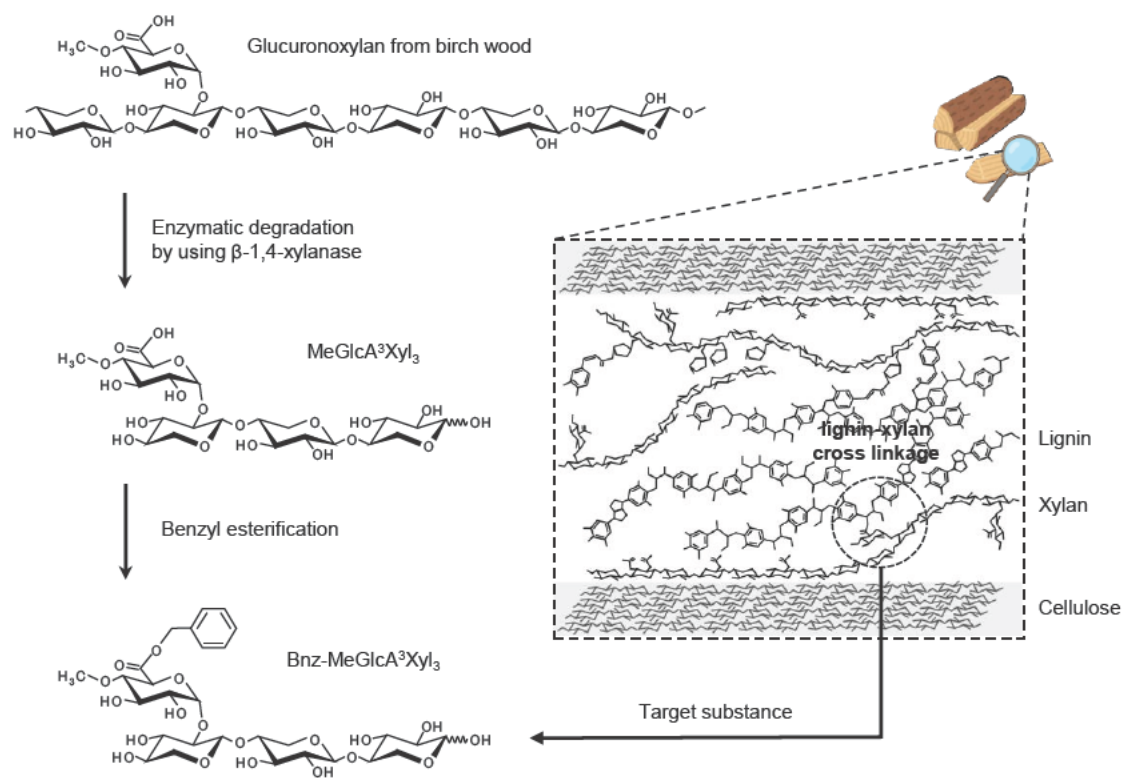


Fig. 3-1. Bnz-MeGlcA³Xyl₃ の合成スキーム

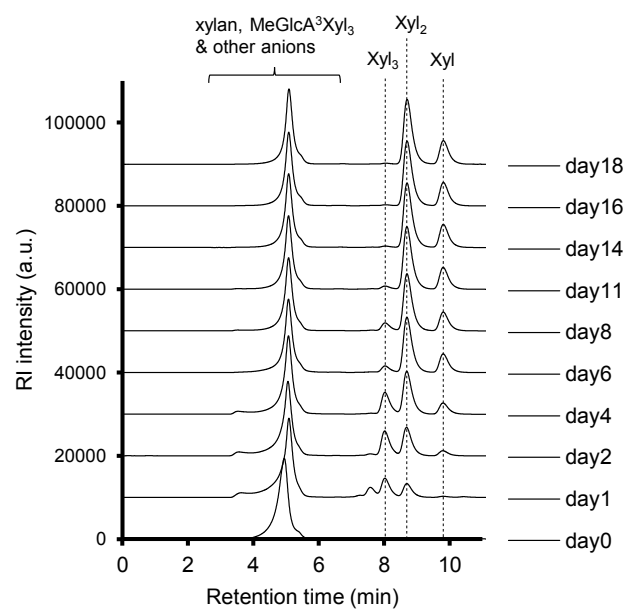


Fig. 3-2. バーチウッドキシランの *PesXyn10A* による分解反応の経時的変化
 10 g/L のバーチウッドキシランに対して、合計で 254 U の *PesXyn10A* を逐次的に添加し、pH 6、30 °C で酵素反応を行った。各反応日数における分解生成物の HPLC 分析の結果を示した。

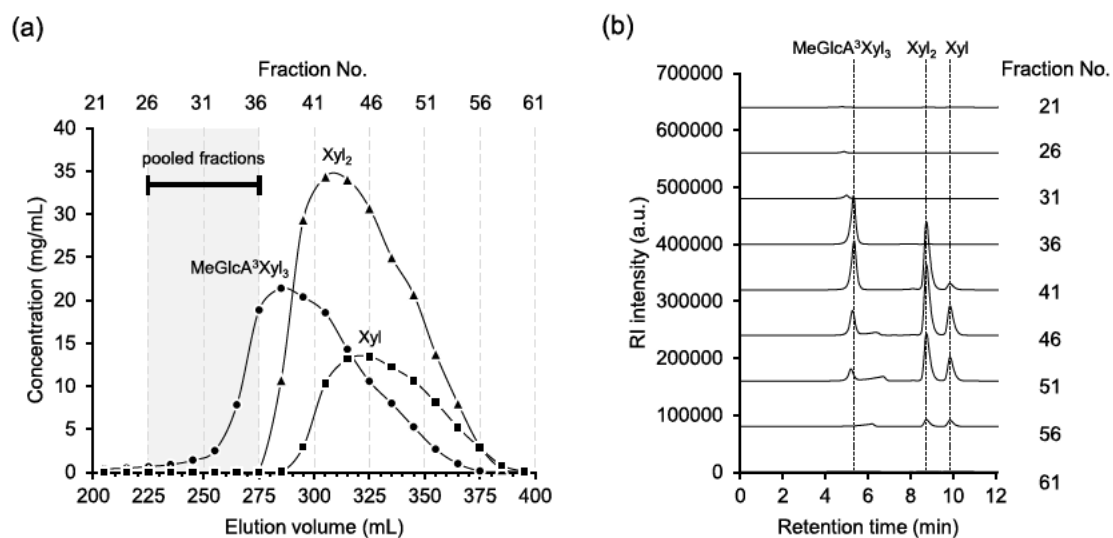


Fig. 3-3. グルクロノキシラン分解液からのサイズ排除クロマトグラフィーによる $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ の精製

(a) Superdex 30 + Sephadex G10 カラムによる分取クロマト、(b) 各フラクションに含まれる溶出物を同定するために行った HPLC (KS-802 カラム) のクロマトグラムを示した。各グラフの番号は、(a) でのフラクション番号に対応している。

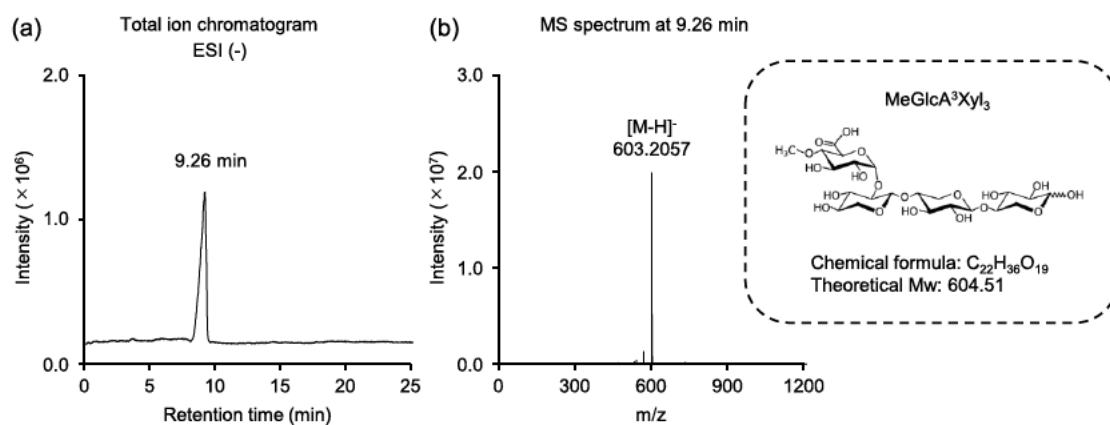
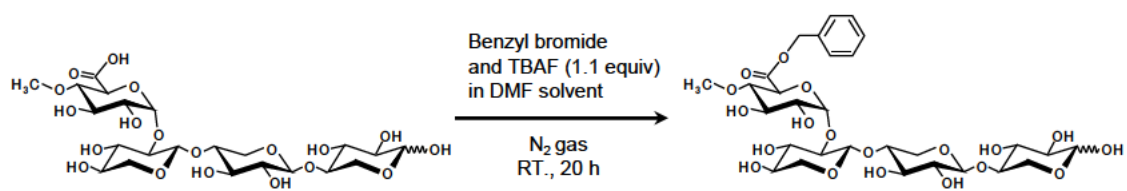


Fig. 3-4. LC-ESI-ToFMS 分析による MeGlcA³Xyl₃ の構造同定

(a) トータルイオンクロマトグラム、(b) 9.26 min に観測されたイオン種のマスペクトラム



Scheme 1. $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ から $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ への化学合成反応

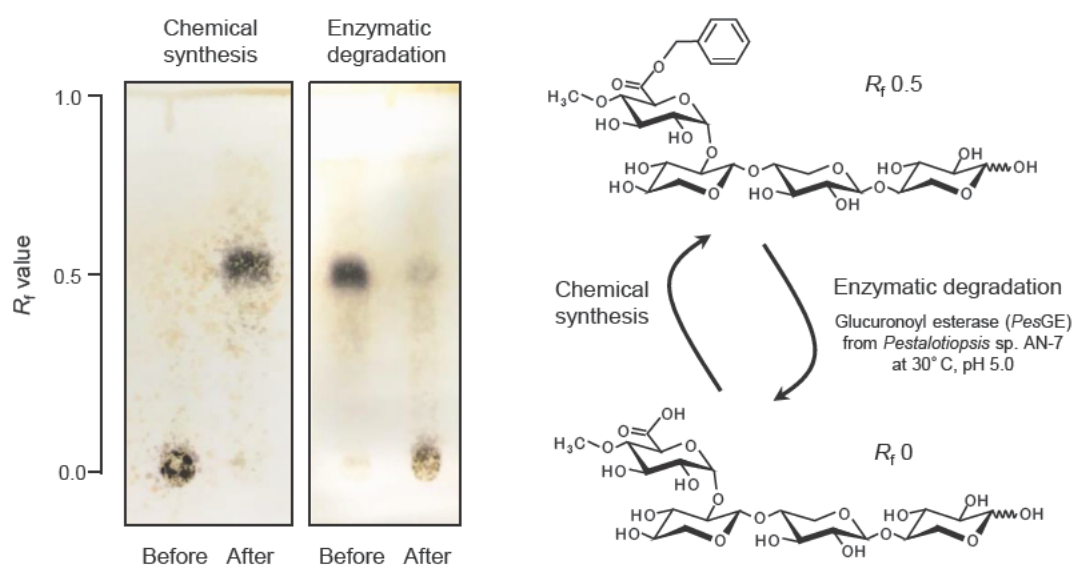


Fig. 3-5. TLC によるベンジルエステル化反応の進行確認

展開溶媒には、クロロホルム/メタノール/水 (40:25:5) を用い、30 % 硫酸含有エタノール溶液で 120 °C 加熱することでスポットの発色を行った。ベンジルエステル化反応によって得られた生成物が *PesGE* の酵素処理後、MeGlcA³Xyl₃ に分解されることも確認している。

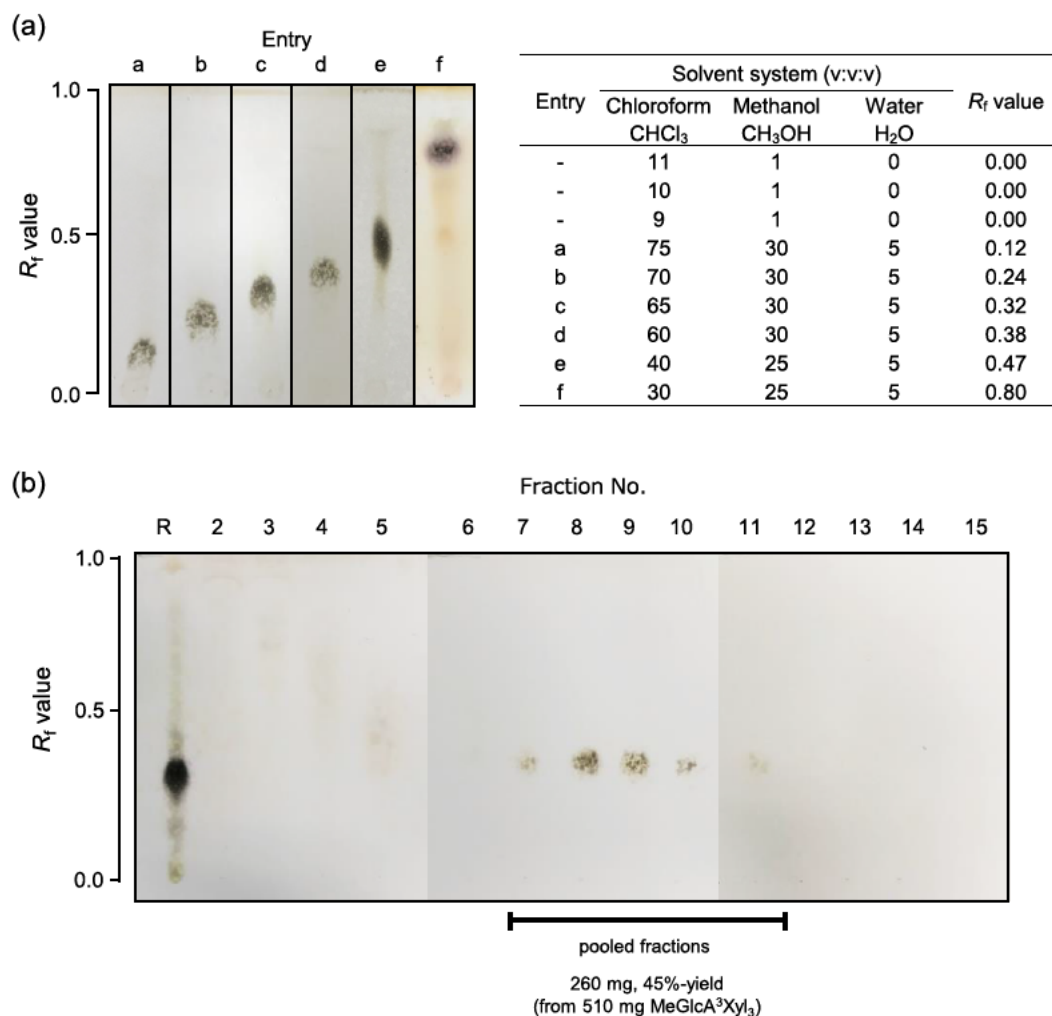


Fig. 3-6. シリカゲルクロマトグラフィーによる $\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ の精製

(a) 精製に適した展開溶媒組成の検討結果、(b) シリカゲルクロマトグラフィーによる溶出確認の TLC; 上部の番号 2 – 15、フラクション番号; R、精製前の反応液; カラムサイズ、 $1.5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ (約 30 mL); 移動相、クロロホルム/メタノール/水 (70:30:5, R_f 0.24); 分取量、12.5 mL/フラクション

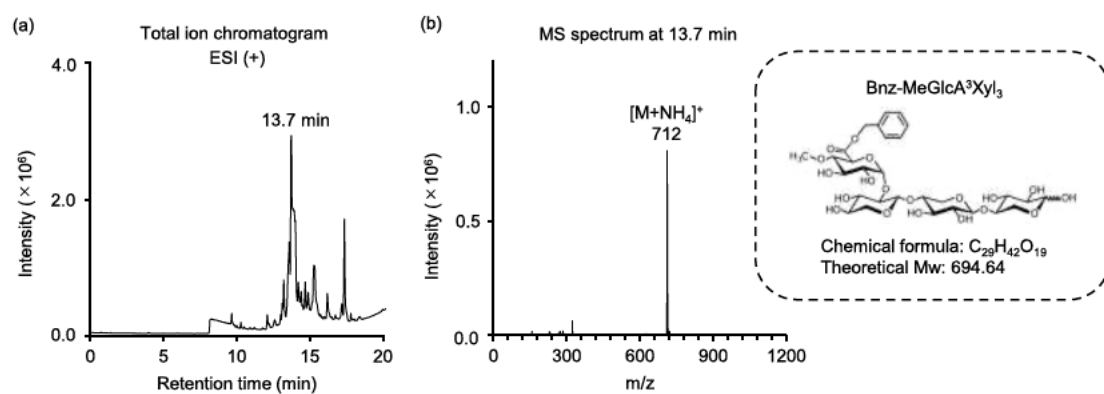


Fig. 3-7. LC-ESI-ToFMS 分析による Bnz-MeGlcA³Xyl₃ の構造同定

(a) トータルイオンクロマトグラム、(b) 13.7 min に観測されたイオン種のマススペクトラム

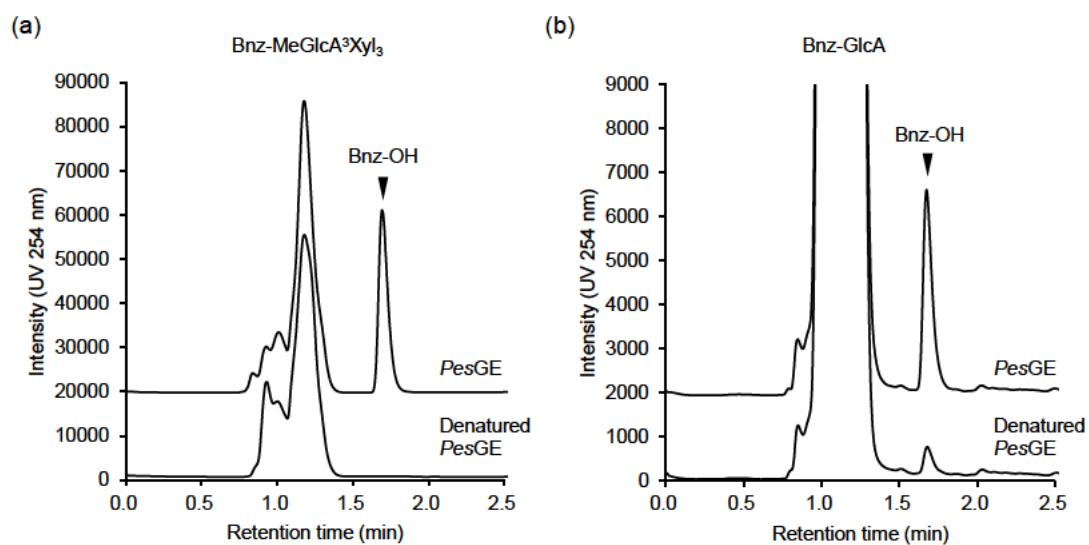


Fig. 3-8. ベンジルエステルを用いた *PesGE* の酵素活性測定

(a) Bnz-MeGlcA³Xyl₃ の加水分解反応後の HPLC 分析、(b) Bnz-GlcA の加水分解反応後の HPLC 分析; 遊離した Bnz-OH を定量することで *PesGE* の活性を評価した。

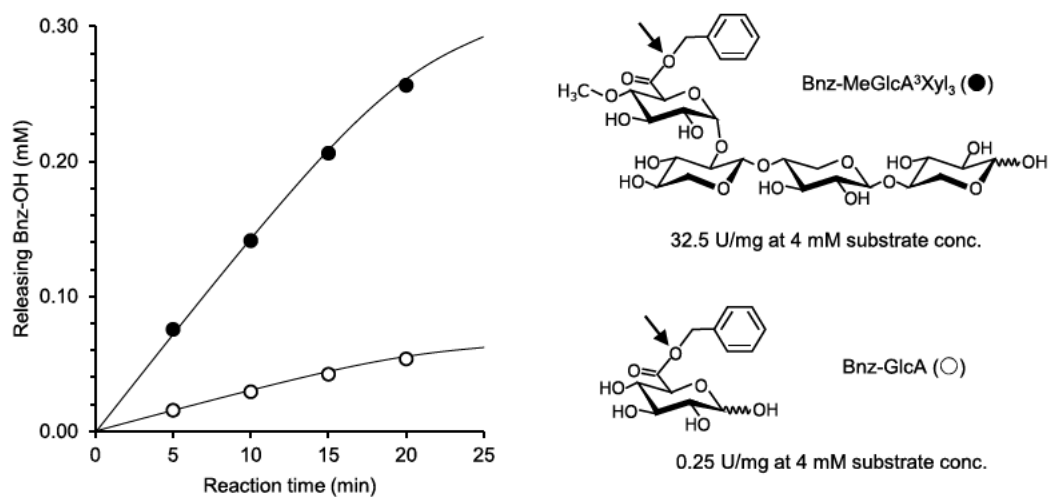


Fig. 3-9. *PesGE* の分解初速度の比較

(左) Bnz-MeGlcA³Xyl₃ (黒プロット) 及び Bnz-GlcA (白プロット) を基質とした際の *PesGE* の Bnz-OH 遊離速度の比較、(右) 各合成基質に対する比活性値の比較

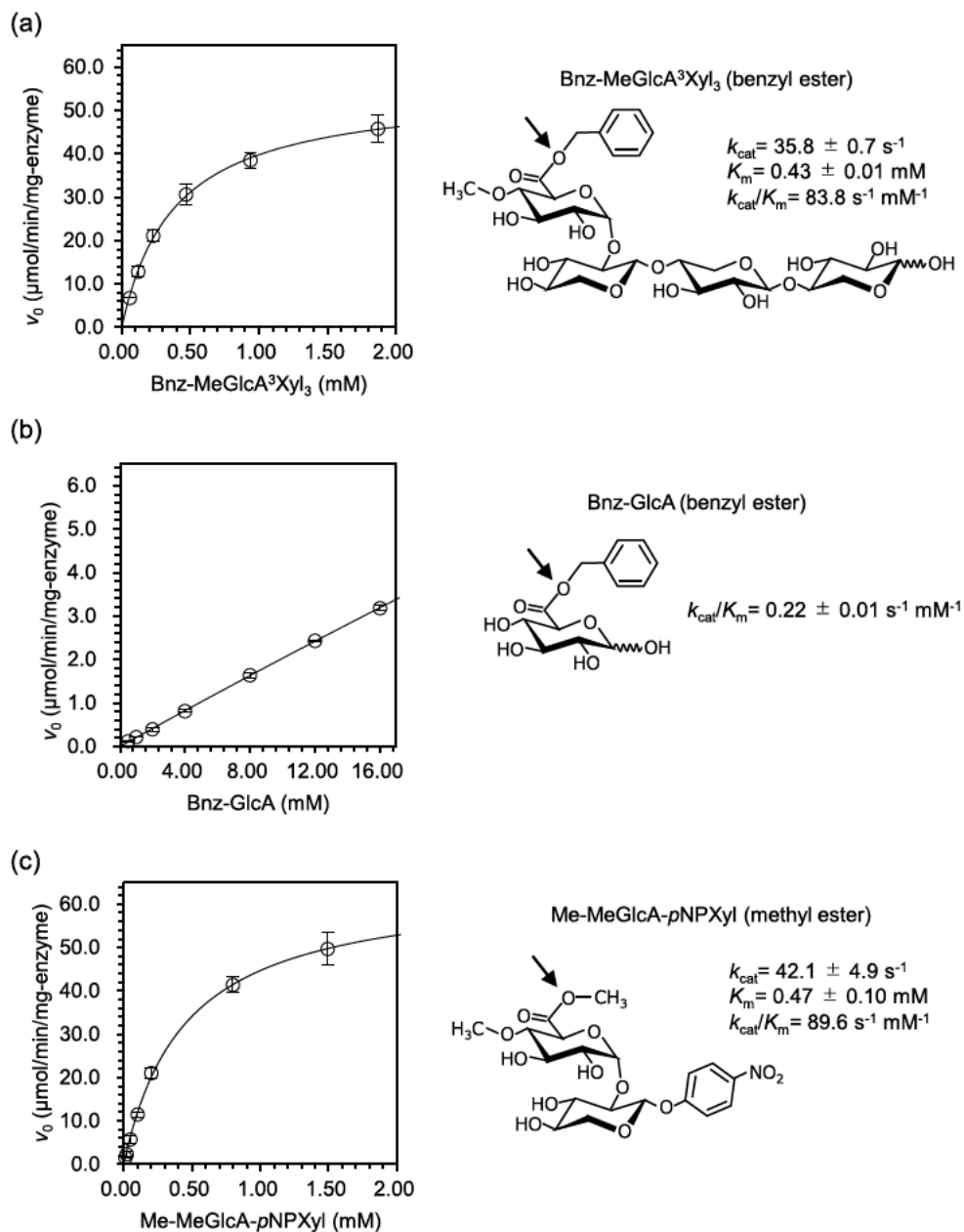


Fig. 3-10. *PesGE* の酵素反応速度論解析

(a) Bnz-MeGlcA³Xyl₃ (0.0 – 2.0 mM)、 (b) Bnz-GlcA (0.0 – 16.0 mM)、 (c) Me-MeGlcA-pNPXyl (0.0 – 2.0 mM) に対する [S]- v プロットを示した。酵素反応は、全て 30 °C、pH 5.0 で実施した。各プロットは、平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$) で示し、実線はミカエリス-メンテン式にフィッティングさせた際の曲線を示している。化学構造に示した矢印は、本酵素による作用位置を示している。

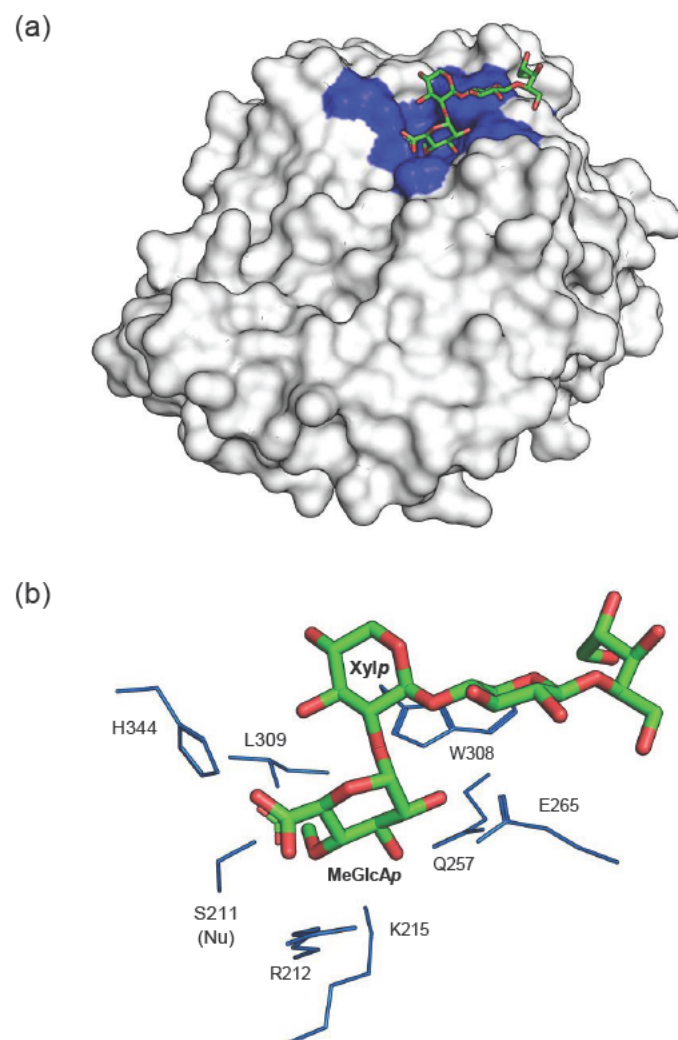


Fig. 3-11. *PesGE* の活性中心におけるモデル構造

(a) 分子全体の表面構造; 活性中心の分子表面は青色で示している。(b) 活性中心を構成するアミノ酸残基とリガンド分子 ($\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$); *PesGE* のモデリングは、*CuGE* (6rv7) を鋳型として SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) によって作製した。リガンドには、*CuGE* (6rv7) の活性中心で確認された $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ を用いた。分子モデルの表示は、Pymol (Schrödinger、LCC) を用いた。

第 4 章

イオン液体処理によるリグニン-キシラン複合体の 単離及びその酵素分解

第4章 イオン液体処理によるリグニン-キシラン複合体の単離及びその酵素分解

4-1. はじめに

ヘミセルロースとは、アルカリ溶液によって抽出される植物細胞壁の多糖類の総称である。代表的なヘミセルロースには、マンナン、キシログルカンなどもあるが、その中でもキシランは最も多く含まれる主要成分である。キシランは、主鎖骨格を構成するキシロース残基に対して、側鎖糖骨格を有する分岐鎖多糖であり、こうした側鎖糖の種類や頻度の特徴は、植物起源、組織ごとによって多様である。そのため、キシランは側鎖糖の特徴によって大きく3つに分類され、草本植物由来のアラビノース側鎖が付加したアラビノキシランと、広葉樹に代表される MeGlcA 側鎖が付加したグルクロノキシラン、針葉樹ではアラビノースと MeGlcA の両者が付加したアラビノグルクロノキシランと称される。キシランは、側鎖の分岐糖だけでなく、アセチル基やアラビノースのフェルラ酸エステル基、クマール酸エステル基、さらに MeGlcA にはリグニンアルコールとの架橋エステル結合が含まれていることが特徴である。

これまでに、キシランの側鎖やエステルに作用する個々の酵素に関する多くの報告がなされており、純粋な合成基質や市販の多糖類基質を用いた酵素学的な解析が中心に進められている。一方、自然界で起こる植物細胞壁の酵素分解では、多くの酵素の協調的な作用によって、複雑な構造を有するキシランが効率的に分解されていると考えられているが、現時点では不明な点が多い。その理由の一つとして、解析に適した基質の選定が難しいことが挙げられる。

一般に、キシランの抽出にはアルカリ性の溶液（水酸化ナトリウムでは 4–5 %）が用いられ、比較的容易にキシランを回収できるが、セルロースやリグニンの溶解性が乏しいため、これらの成分と強固に相互作用したキシランについては抽出自体が困難である。従って、高い抽出効率を達成するためには、より高濃度のアルカリ性の溶液（20–24 %）が必要となるが、アルカリに不安定な官能基、たとえばエステルなどは、分離、抽出過程で切断を伴うために天然の構造を欠損してしまう欠点がある¹⁾。市販で入手可能なキシランはアルカリ抽出法で調製されているため、これを基質として酵素を研究する場合、天然のキシラン構造に対する本来の酵素活性を適切に評価できないという問題点がある。

イオン液体 (IL) は植物細胞壁の可溶化剤としても知られており、100 °C 以下で液体のカチオンとアニオンから構成される塩の総称である。2002 年に Rogers ら²⁾がセルロースの溶解性を示す IL を報告してからは、汎用性の高い有機溶媒

に難溶なセルロースの化学分析や、化学修飾のための溶媒として用いられるようになった。セルロースの溶解性を示す IL として、イミダゾリウムカチオンを有する 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride ([Emim][Cl]) や 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][OAc]) が知られている。イミダゾリウム系 IL はセルロース溶解能が極めて高く、微結晶性セルロースの可溶化処理では、IL に対する質量分率にして 8–14 wt% と高濃度にセルロースを溶解でき³⁾、さらにマイクロ波を照射させることによって最大で 25 wt% にまで達する²⁾。IL によるセルロースの溶解は、セルロース繊維が束となり形成される階層構造の解消によって引き起こされ、IL のアニオンがセルロース繊維間の相互作用の解離に重要であると考えられている。一方、IL に可溶化したセルロースは、水などの貧溶媒を添加することで容易に再析出物として回収することが可能である。また、再析出した再生セルロースは、結晶形が I 型から II 型へと変化し、セルラーゼによる酵素糖化性が顕著に向上することが報告されている⁴⁾。こうしたことから、イミダゾリウム系 IL は、純粋なセルロースだけでなく、リグニンやヘミセルロースを含む植物バイオマスの効率的な酵素糖化に向けた前処理溶剤としての利用も試みられている。これまでに、カチオンにイミダゾリウム骨格を有し、アニオンが異なる 5 種類の IL を用い、草本系バイオマスであるエリアンサスが、IL に溶解していく様子を偏光顕微鏡で観察したところ (Fig. 4-1)⁵⁾、[Emim][OAc] による溶解処理では、特徴的に偏光面の露出が短時間で観察されることに加えて、セルロース繊維が顕著に膨潤し、解繊していく様子が観察された。この特徴的な現象は、[Emim][OAc] がセルロース繊維を覆っているヘミセルロースやリグニンを優先的に溶解させたことに起因すると考えられた⁵⁾。また、[Emim][OAc] は草本植物にのみならず、木本植物に対しても高い溶解性を示すことが報告されている⁶⁾。こうしたことから、[Emim][OAc] は、異なる植物起源から、ヘミセルロースやリグニンを抽出するための溶媒として利用できるのではないかと考えた。

本章では、[Emim][OAc] による草本植物のエリアンサスと木本植物のナラの 2 種類の植物原料からの細胞壁成分の抽出及び分画方法の検討結果、およびその結果得られた LXC の構造的特徴と、これを基質にした酵素分解に関する知見について論述する。

4-2. 実験材料及び方法

4-2-1. 実験材料

長野県長野市産の広葉樹ナラの外皮を除いた幹のおがくずと、エリアンサスの幹部分を Wonder Blender (大阪ケミカル) を用いて粉碎処理を行い、250 μ m 孔のメッシュ (60 mesh) を通したものを植物細胞壁粉末の試料とした。1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][OAc]) (> 95.0%) は Sigma-Aldrich より購入した。使用した精製酵素 *PesXyn10A*、*PesGE*、*IIAgu115A*、*IIAXE1* は、2-2-7 の記載に従って調製した。

4-2-2. IL 溶解処理及び溶解成分の分画方法

IL 処理および分画操作工程のフローチャートを **Fig. 4-2** に示した。250 mL のトールビーカーに[Emim][OAc]を 161.6 g 量り取り、160 °C で 15 分間保温した。次に、[Emim][OAc]に対して 3 wt%となるようにナラ及びエリアンサスの乾燥粉末を 5.0 g 加え、200 rpm、3 時間攪拌を行った。恒温油槽からトールビーカーを取り出し、粘度を低下させるため 100 mL のジメチルスルホキシド (DMSO) を加えて混合した。放冷後、100 mL の DMSO を用いて、器具の洗浄を行い、洗浄液を含めた反応液を 50 mL の遠沈管に移した。16000 rpm、25 °C に設定した遠心分離機で 15 分間遠心分離を行った。沈澱物を IR (IL-insoluble residue) 画分とし、50 mL の DMSO を加えて攪拌および同条件での遠心分離による洗浄を行った。この洗浄操作を 3 回行った。洗浄液を含めた上清は 2 本の 500 mL 遠沈管に均等に移した。再析出操作として、270 mL (各遠沈管に 135 mL ずつ) の脱イオン水を加え、激しく混合した。8000 rpm、25 °C で 30 分間の遠心分離によって得られた沈澱物を RP (regenerated precipitation) 画分とし、100 mL の脱イオン水を加えて攪拌および同条件での遠心分離による洗浄を行った。洗浄液を含めた上清はエバポレーターで、濃縮を行った。[Emim][OAc]と DMSO を除去するため、濃縮上清を分画分子量 3500 Da の透析膜 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、透析外液は脱イオン水で透析操作を行った。同時に残渣画分と再析出画分においても、乳鉢ですりつぶした後、同様の透析操作を行った。透析後、析出物が確認された上清の透析膜内液を 500 mL の遠沈管に移して、8000 rpm、25 °C で 30 分間の遠心分離を行った。この際の上清を XS (xylan-rich supernatant) 画分とし、沈澱物を XP (xylan-rich precipitation) 画分とした。XS 画分はエバポレーターにより約 150 mL まで濃縮した。それぞれの画分は凍結乾燥器を用いて凍結乾燥を行い、回収した。回収物は秤量を行い、試料管瓶に入れて、乾燥デシケーター内で保管した。

4-2-3. アルカリ抽出キシランの調製

ナラ及びエリアンサスの乾燥粉末を 10 g 量り取り、そこに 10 % 水酸化ナトリウム水溶液を 150 mL 加え、55°C で 48 時間攪拌させた。反応後、pH 7 になるように中和し、吸引濾過によって濾液を回収した。その後、透析によって脱塩を行い、この際に不溶化する析出物を遠心分離によって回収し、これをアルカリ抽出キシラン (Alikali-xylan) として用いた。

4-2-4. リグニン及び構成糖の分析

リグニン及び構成糖の組成分析は、NREL protocol に従って行なった⁷⁾。酸不溶性リグニン含有量は、72 % 硫酸を用いる JIS P8008; 1976 の方法に従った。酸可溶性リグニンは、クラークソン法に従って UV 210 nm の吸光度より算出した。中性糖の含有量は、段階的な硫酸加水分解処理後の HPLC 分析によって算出した。HPLC 分析は、Asahipak NH2P-40 3E (粒子径 4 µm、内径 3.0 mm × 250 mm) (Showa Denko K.K.) を分析カラムに用いて、フェニルヒドラジンによるポストラベル化蛍光検出法を用いた。

4-2-5. FT-IR

錠剤器、メノー乳鉢、メノー乳棒、臭化カリウムは 120 °C に設定した恒温槽で一晩乾燥させてから測定に用いた。全ての測定は臭化カリウム錠剤法を用いて行った。試料と臭化カリウムをおよそ 1:50 の比で混合し、メノー乳鉢中ですり潰し、錠剤器とプレス機によって錠剤を形成した。形成した錠剤は 90 °C に設定した恒温槽中で 10 分間乾燥させたのち、フーリエ変換赤外分光光度計 FT/IR-4200 (JASCO) を用いて IR スペクトル測定を行った。測定波数範囲 4000 – 400 cm⁻¹、積算回数 100 回で 3 回測定を行った。また、測定データはスムージング処理を行った。バックグラウンドには臭化カリウムのみで形成した錠剤を用いた。

4-2-6. 側鎖修飾基分析

4-2-6-1. アセチル基の定量

乾燥粉末試料 10 mg を 1 M 水酸化ナトリウム溶液 500 µL に加え、80 °C で 3 時間保温した。放冷後、1 M 塩酸を 500 µL 加えた。その後、12000 rpm、25 °C で 10 分間遠心分離を行った。上清を 0.22 µm のシリンジフィルターに通して、HPLC に供する試料とした。分析カラムには RSpak KC-811 (粒子径 6 µm、内径 8.0 mm × 300 mm) (Showa Denko K.K.) を二連結させたものを用いた。カラム温度は 60 °C で、試料注入量は 10 µL で行った。移動相には 3 mM 過塩素酸を用いて、流速 0.5 mL/min で送液した。カラムで分離された有機酸は、流速 0.5 mL/min で送液している pH 指示薬 (0.1 M ブロモチモールブルーを含む 30 mM

リン酸水素二ナトリウム) とのポストカラム法によって、波長 440 nm で検出した。標準物質には、0.1、0.5、1.0、10.0 mM の酢酸を用いた。

4-2-6-2. 4-*O*-メチルグルクロン酸の定量

乾燥粉末試料 10 mg を量り取り、3.6 wt%の硫酸を 1.1 mL 加え、121 °C で 1 時間加熱処理した。その後、遠心分離を行い、上清を 0.22 µm のフィルターに通して、HPLC に供する試料とした。分析カラムには RSpak KC-811 を二連結させたものを用いた。カラム温度は 60 °C で、試料注入量は 10 µL で行った。移動相には 3 mM 過塩素酸を用いて、流速 0.5 mL/min で送液した。カラムで分離された有機酸は、流速 0.5 mL/min で送液している pH 指示薬 (0.1 M ブロモチモールブルーを含む 30 mM リン酸水素二ナトリウム) とのポストカラム法によって、波長 440 nm で検出した。標準物質には、50、100、1000 mg/L の GlcA、及び、GalA の一水和物を用いた。

4-2-6-3. フェルラ酸及び *p*-クマール酸の定量

乾燥粉末試料 10 mg を量り取り、1 M の水酸化ナトリウム溶液を 500 µL 加え、80 °C で 3 時間処理した。1 M の塩酸を 500 µL 加えた後、12000 rpm、25 °C で 10 分間遠心分離を行った。上清を 0.22 µm のシリンジフィルターに通して、バイアル瓶に封入し、HPLC に供する試料とした。分析カラムには Shim-pack XR-ODS (粒子径 2.2 µm、内径 3.0 mm × 75 mm) (Shimadzu) を用いた。カラム温度は 45 °C で、試料注入量は 10 µL で行った。移動相には 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.0) とアセトニトリルを用いて、流速 0.9 mL/min でアセトニトリル濃度のグラジエント条件 (0.00 - 5.67 min : 濃度 10 % → 50 %、5.67 - 6.62 min: 50 %、6.62 - 7.54 min : 50 % → 10 %、7.54 - 9.33 min: 10%) で溶離した。UV 波長 280 nm で検出した。標準物質には、0.2、2.0、20 µM の FA、及び、*p*CA を用いた。

4-2-7. サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

DMSO と DMF を体積比 40 : 60 で混合した溶媒に 0.1 %の塩化リチウムを添加し、完全に溶解するまでマグネティックスターラーで攪拌した。溶液は、Omni-pore™ 0.45 µm ポリテトラフルオロエチレン製メンブレンフィルター (Merck Millipore) を用いて濾過を行い、移動相とした。分析カラムには OHpak SB-806M HQ (粒子径 13 µm、内径 8.0 mm × 300 mm) (Showa Denko K.K.) を用い、検出には、示差屈折検出器 (RI) と UV-vis (280 nm) 検出器の 2 種類を用いた。カラム温度は 60 °C で、試料注入量は 10 µL で行った。移動相は、流速 0.3 mL/min で溶出を行った。

4-2-8. 酵素反応

分子量分布分析のために、XP 画分、XS 画分及びアルカリ抽出キシランの乾燥粉末を 50 mg/mL となるように DMSO に溶解させ、0.1% (w/v) となるように 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で希釈し、0.4–0.7 µg の各種精製酵素を添加し、30 °C で 24 時間の条件で酵素反応を行った。酵素反応後の SEC 分析には、この反応液を当量の移動相 (0.1% LiCl 含有 DMSO/DMF = 40/60) と混合させたものを使用し、前述した SEC 条件で分析した。

酵素分解性の定量分析のために、DMSO に溶解させた XP 画分、XS 画分及びアルカリ抽出キシラン試料をキシラン量換算で 0.2 g になるように 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に添加し、*PesGE* (18 µg) または、*IIAXE1* (10 µg) で 30°C、30 分間前処理した後に *PesXyn10A* (2 µg) を添加し、30 °C で酵素反応を行った。反応液中の還元糖の遊離量を Somogyi-Nelson 法にて定量した。1 U の酵素活性は、1 分間に 1 µmol のキシロースに相当する還元糖量を遊離する酵素量と定義した。

4-3. 結果

4-3-1. イオン液体抽出処理による植物細胞壁成分の抽出及び分画

本研究では、草本系イネ科植物のエリアンサス及び、木本系植物のナラの 2 種類の植物を原料として、キシランを抽出することにした。まず、エリアンサス及びナラの IL 溶解処理を行った。原料濃度 3 wt%、140 °C、3 時間の溶解条件では、エリアンサスの 85.3 %が IL へと溶解した。しかし、エリアンサスと比べてナラは IL に対する溶解性が低く、同条件における溶解率は 24 %であった (データ未掲載)。ナラの溶解温度条件を 160 °C に変更したところ、溶解率は 76 %に達した。そこで、細胞壁成分の IL への溶解率が同程度になるように、エリアンサスとナラの処理温度をそれぞれ、140 °C 及び 160 °C とし、各温度で 3 時間処理することとした。

エリアンサス及びナラの IL 抽出及び分画処理によって得られた各画分の構成成分の収率を **Table 4-1** に示した。IR 画分を見てみると、両原料ともに、全リグニンのうちエリアンサスで 36 %、ナラで 24 %が残渣として IR 画分に残っており、リグニンは IL に溶解され難いことが明らかとなった。また、IR 画分には、両原料ともにキシラン成分は少なく、90 %近いキシラン成分が IL に溶解しており、キシラン成分は IL に溶解しやすいことが明らかとなった。次に、再析出操作によって得られる RP 画分について見てみると、両原料ともに IL に溶解した植物細胞壁の主要 3 成分のうちグルカン成分だけが選択的に回収されており、

RP 画分と IR 画分を合計すると、全グルカンのうちエリアンサスで 70 %、ナラで 84 %が、他の細胞壁成分から分離されていた。透析による IL 除去工程を経て回収された XP 画分と XS 画分には、主に IL に溶解出したキシラン成分が回収されていたが、XP には、キシラン成分に加えてリグニン成分も多く回収されていた。こうしたキシランとリグニンの分画挙動は、エリアンサスとナラで類似していた。

次に、各画分の構成成分組成を分析した結果を **Table 4-2** に示した。エリアンサスの分析結果からは、原料と比べて、IR 画分に含まれる多糖類の割合が減少し、リグニンの割合が増加していた。原料と比較した IR 画分の組成の違いは、リグニンと多糖類の IL に対する溶解性の差異に基づくものと考えられた。RP 画分には、リグニン量は極微量であり、多糖類の割合が多く、構成単糖のうちグルカンが 88 %を占めていた。そのため、RP 画分には貧溶媒によって再凝集した再生セルロース由来の成分が主に分画されているものと考えられた。XP 画分には、リグニンが 27 wt%、多糖類が 58 wt%であり、構成糖のうち 91 %がキシランに由来する不溶性のキシラン成分が分画されていた。XS 画分には、リグニンが 10 wt%、多糖類が 63 wt%から成る水溶性ヘミセルロースが分画されており、多糖類はキシランとその他ヘミセルロースが含まれていた。

ナラの分析結果からは、原料と比べた IR 画分の成分組成は、多糖類のみが減少していた。構成糖のうち、グルカンは増加したが、一方でキシランやマンナン等は減少していた。このことからナラの IL 処理では、セルロースに比べて、ヘミセルロースに由来するキシランやマンナン等がよく溶解していることが分かった。エリアンサスと同様に RP 画分では、リグニンは極微量であり、多糖類の割合が多く、構成単糖のうちセルロースに由来すると考えられるグルカンが 98 %を占めていた。XP 画分には、リグニンが 38 wt%、多糖類が 46 wt%であり、構成糖のうち 96 %がキシランに由来する不溶性のキシラン成分が分画されていた。XS 画分には、リグニンが 10 wt%、多糖類が 64 wt%から成る水溶性ヘミセルロースが分画されており、多糖類はキシランに由来するキシロースや Ara、GlcA に加えて、マンノースやガラクトース、ラムノース、フコースなども検出されたことから、マンナンやガラktanなどのペクチン由来のヘミセルロースも含まれていると考えられた。

4-3-2. XP 画分及び XS 画分に含まれるキシランの修飾基分析

XP 画分と XS 画分に含まれているキシラン成分の構造的特徴を明らかにするため、赤外吸光スペクトルを FT-IR によって測定し、その FT-IR スペクトルを **Fig. 4-3** に示した。エリアンサスとナラを原料として調製した XP 画分と XS 画分のスペクトルには、糖の C-O 伸縮運動に起因する 1045 cm^{-1} とリグニンの芳香

環骨格振動に起因する 1600 cm^{-1} に加えて、エステル結合に関連するカルボニル基の $\text{C}=\text{O}$ 結合伸縮運動に起因する 1730 cm^{-1} と $\text{C}-\text{O}$ 結合伸縮運動に起因する 1245 cm^{-1} のピークが観察された。XP 画分と XS 画分をアルカリ処理した試料のスペクトルには、これらのエステル結合に関連するピークが消失していた。また、アルカリ抽出法によって調製したエリアンサスとナラからのキシランには、エステル結合に関連するピークは観察されなかった。以上の結果より、IL 抽出によって得られたキシランには、アルカリ抽出法では加水分解されてしまうエステル結合が保持されたまま残存していることが明らかとなった。

次いで、キシランにエステル結合を介して修飾される成分の種類と含量を明らかにするために、XP 画分と XS 画分のアルカリ処理によって生じる酸性化合物を HPLC によって分析した。その結果、酢酸及び FA、*p*CA が検出されたことから、IL 抽出キシランにはこれらの修飾基が結合した状態で残存していることが明らかとなった。XP 画分と XS 画分に含まれる各修飾基の定量結果と、キシロース及びアラビノース残基に対する修飾頻度を **Table 4-3** にまとめた。アセチル基については、XS 画分及び XP 画分において若干の差はあるものの、修飾頻度はほぼ同程度であった。ナラの XP 画分と XS 画分では、キシロース 6 – 7 残基あたりに 1 つの頻度でアセチル基が修飾されていたが、エリアンサスの XP 画分と XS 画分では、キシロース 18 – 22 残基あたりに 1 つの頻度と少なかった。また、草本植物であるエリアンサスの XP 画分と XS 画分には、*p*CA が多く含まれていたが、木本植物であるナラでは *p*CA はなく、FA が多く含まれていた。

4-3-3. XP 画分及び XS 画分の分子量分布

SEC を用いて XP 画分及び XS 画分の分子量分布を分析した。リグニンと多糖類の両成分を検出可能な RI 検出器と、リグニンの検出が可能な UV-vis 検出器を連結させたタンデム検出によって、XP 画分と XS 画分に含まれるリグニンとキシランの分子量分布を評価した。

エリアンサスから IL 処理で得られた XP 画分と XS 画分、アルカリ処理で得られたキシランの SEC クロマトグラムと、そこから算出した相対分子量値を、それぞれ **Fig. 4-4a** と **Table 4-4** に示した。XP 画分の RI 検出による分子量分布は、高分子領域 ($M_w 23,000$) と低分子領域 ($M_w < 6,000$) に分離された 2 つの複合ピークであるのに対して、XS 画分の RI 検出による分子量分布は、主に高分子領域に 1 つのピークとして現れており、アルカリ抽出キシランと類似していた。XP 画分と XS 画分の UV 検出による分子量分布は、ともに高分子領域及び低分子領域の 2 つのピークとして現れていることから、XP 画分と XS 画分に含まれるリグニン成分は分子量分布が異なる主に 2 つの成分を含んでいることが明らかとなった。また、高分子領域の UV ピークは、RI における高分子量ピー

クと一致し、アルカリ抽出キシランの溶出位置とおおよそ一致していた。一方、XP 画分と XS 画分ともに低分子領域の UV ピークは、UV の検出強度に対する RI 検出の相対強度が低かった。エリアンサスから IL 処理により得られた XP 画分及び XS 画分と、アルカリ抽出キシランの重量平均分子量 (Mw) の値は、XP 画分 > XS 画分 > アルカリ抽出キシランの順に高く、これはリグニンの含有量に比例しており、リグニン含量が高いほど、Mw が高いことが分かった。また、溶液中でのポリマー分散度を示す Mw/Mn 値は、XP と XS がキシランよりも高く、リグニン含有量の多い XP が最も高い分散度を示した。

次いで、ナラのプロファイルを、**Fig. 4-4b** と **Table 4-4** に示した。ナラの XP 画分の RI 検出による分子量分布は、エリアンサスの XP 画分と同様に主に 2 つのピークが重なった複合ピークであった。ナラの XS 画分では、ナラの XP 画分の高分子領域のピークトップと同溶出位置にシャープなピーク形状を有しており、ナラのアルカリ抽出キシランと類似していた。XP 画分及び XS 画分の UV によるピーク分布は、エリアンサスとは異なっており、複数のピークが低分子領域に重なったブロードなピーク形状であった。ナラから得た各種キシランの重量平均分子量 (Mw) の値は、XS 画分 > アルカリ抽出キシラン > XP 画分の順に高く、リグニンの含有量の多い XP 画分の分子量が最も低いことが分かった。XP 画分に含まれるリグニン量の多さからも、リグニン同士の相互作用による凝集の影響を受け、LXC としてのキシラン骨格部分の分子サイズが小さくなったことにより、XS 画分やアルカリ抽出キシランの分子量よりも低いものと考えられた。この結果は、エリアンサスから得た各種キシランの分子量の関係とは異なる結果であり、植物起源ごとのリグニンの構造特徴や分子量の大きさの違いに基づくものと考えられた。尚、ポリマー分散度 Mw/Mn 値は、XP 画分と XS 画分がキシランよりも高く、リグニンを最も多く含む XP 画分が最も高い分散度を示した。この分散度の大きさ順はエリアンサスとナラで共通していた。

4-3-4. リグニンとキシランの複合状態の解析

XP 画分及び XS 画分には、キシランとリグニンが含まれることが明らかになった。しかし、これらの画分中においてそれぞれの成分が LXC のような複合体を形成しているかどうかについては、明らかになっていない。そこで、エリアンサスとナラを原料として得られた XP 画分と XS 画分に対して、2 章で得られた単一酵素を作用させ、酵素反応前後の分子量分布の変化を RI と UV により検出することで LXC の有無の検証を行った。

まず、キシラン主鎖を分解する XYN である *PesXyn10A* による酵素処理前後の SEC クロマトグラムを比較した。エリアンサスから得られた XP 画分と XS 画分の分子量分布の変化を **Fig. 4-5a** に示した。XP 画分及び、XS 画分ともに

PesXyn10A による加水分解反応後に、高分子領域 (M_w 112,000–6,000) の RI と UV のピークが共に完全に消失し、UV 検出では新たに低分子領域にピークが確認された。また、ナラについても、エリアンサスと同様の傾向で、*PesXyn10A* による加水分解反応後に、高分子領域の RI と UV のピークが共に完全に消失し、UV 検出では新たに低分子領域にピークが確認された (**Fig. 4-5**)。このことは、高分子領域のピークには、キシランとともに低分子のリグニンが存在するということを示しており、LXC が含まれていることを強く示唆する結果であった。

次に、キシランの MeGlcA 側鎖とリグニン間で形成されるベンジルエステル結合を加水分解する GE である *PesGE* による酵素処理前後の SEC クロマトグラムを比較した結果を **Fig. 4-6** に示した。エリアンサスから得られた XP 画分と XS 画分はともに *PesGE* による酵素反応に伴って、高分子領域ピークの分布が低分子側へと広がった (**Fig. 4-6a**)。この低分子化挙動は、RI と UV 検出の両方で観察されており、リグニンとキシラン間を架橋するベンジルエステル結合の開裂に伴って生じたものと考えられる。また、このピークシフトは、キシランがオリゴ糖や単糖にまで分解されるキシラナーゼ処理のような極端な低分子化挙動 (**Fig. 4-5a**) とは異なっていた。これらの結果からも、XP 画分と XS 画分に含まれるリグニンとキシランの 2 成分は、*PesGE* によって分解可能なベンジルエステル結合によって架橋していることを強く示唆するものと考えられた。一方、ナラの XS 画分については、*PesGE* を作用させるとエリアンサスと同様に、RI 分布と、UV 分布ともに低分子化が認められたが、XP 画分については RI 分布の低分子化は認められるものの、UV 分布においてはほとんど変化しなかった (**Fig. 4-6b**)。このことから、ナラにおいてもエリアンサスと同様に XP 画分と XS 画分にはリグニンとキシランがとの複合体が含まれているものの、ベンジルエステル結合の開裂だけでは解消されない複合体の存在が示唆された。

また、キシラン主鎖から MeGlcA 側鎖を遊離する Agu である *IIAgu115A* による酵素処理前後の SEC クロマトグラムを比較した結果を **Fig. 4-7** に示した。本酵素については、いずれの画分についても酵素反応前後で RI 分布と UV 分布に変化が認められなかった。このことから、リグニンとの結合した状態の MeGlcA に対して Agu は作用できず、LXC の分解には Agu は関与しないことが示唆された。

4-3-5. XP 画分及び XS 画分の酵素分解性

PesXyn10A 及び *PesGE* を単一酵素としてエリアンサス及びナラから得られた XP 画分及び XS 画分に作用させた結果、両画分中にはリグニンとキシランが複合体となっている LXC が存在することが示唆された。そこで、それらに対する酵素分解性を評価するために、両画分を基質とし、単一酵素を単独、または複数

の単一酵素を逐次的に作用させた場合の生成還元糖量測定を行った。

まず、ナラから得られた XP 画分及び XS 画分を基質とし、*PesXyn10A* を作用させた時の生成還元糖量の経時的変化を **Fig. 4-8a** に示した。*PesXyn10A* の分解初速度から計算された比活性は、XS 画分に対する方が XP 画分よりも 2.5 倍高かった (**Fig. 4-8b**)。そこで、キシラン主鎖に修飾されたアセチル基による影響を考慮し、*ILAXE1* による脱アセチル化反応を行った後に *PesXyn10A* を反応させ、その反応性を比較した (**Fig. 4-9a**)。その結果、XS 画分では顕著な効果が見られず、更に XP 画分では、むしろ反応性が低下した。*ILAXE1* による酵素反応中、溶液が徐々に白濁化していく様子が観察されたことから、キシラン側鎖のアセチル基が除去されることで高分子としての高次構造の変化または、分子間の凝集などが起こり、その結果、*PesXyn10A* の作用に影響を与えたものと考えられる。

次いで、リグニンの影響を考慮し、*PesGE* によって前処理を行った後に、XYN 活性を比較した(**Fig. 4-9b**)。その結果、XS 画分では、*PesGE* の添加効果によって XYN 活性が 1.4 倍向上することがわかった。この結果は、ベンジルエステル結合開裂によるリグニンの分離によって XYN のアクセシビリティが向上したものと考えられた。その一方、XP 画分では *PesGE* の添加効果は確認できなかったため、LXC の結合様式が XP 画分と XS 画分では異なっていることを示唆する結果であった。

4-4. 考察

4-4-1. IL 抽出法による植物細胞壁成分の抽出及び分画

一般に、キシランの抽出には希アルカリ溶媒 (1 %) が用いられ、選択的かつ比較的容易にキシランを回収できるが、セルロースやリグニンの溶解性が乏しいため、これらの成分と強固に相互作用したキシランについては抽出自体が困難であった。従って、高い抽出効率を達成するためには、20–24 %の高濃度のアルカリ溶液が必要となるが、その反面、アルカリに不安定な修飾基やリグニンとの結合が抽出過程で切断を伴うために天然の状態を欠損してしまう欠点がある。

本研究で使用した[Emim][OAc]は、キシランにのみならず、セルロース、リグニンを含めた全ての構成成分に対して溶解性を示すことが利点である。エリアンサスとナラの細胞壁粉末から、それぞれ原料キシラン基準の収率で 88 %、96 %と、極めて高い抽出効率で、キシランを抽出することができた。しかしながら、抽出時には、セルロースやリグニンなども IL に溶解するため、これらの成分を分離し、キシラン成分を回収する方法について新たに検討した。

[Emim][OAc]に可溶化したセルロースは、水やエタノールなどの貧溶媒の添加によって、容易に再析出物として回収することができ⁵⁾、また、純粋なセルロースにのみならず、バイオマスを用いた際、つまり、リグニン、ヘミセルロースが混在する溶解液中からも同様の手法によってセルロースを回収することができる⁵⁾。こうしたことから、本研究ではセルロースを選択的に取り除いた後に、キシラン成分を回収することを狙って、IL に可溶化した細胞壁溶解液に対して脱イオン水を貧溶媒として添加した。この再析出の際、脱イオンの添加量には最適があり、添加量が少ないとセルロースは析出されず、逆に添加量が多いと、セルロースだけでなく目的とするヘミセルロースやリグニンも同時に析出してしまふことがわかった (データ非掲載)。本研究では、グルカンを選択的に析出可能な、エリアンサスで、23.6 mL: 20 mL (IL+DMSO : 脱イオン水)、ナラで 49.6 mL: 27 mL (IL+DMSO : 脱イオン水) の割合を、最適添加条件として脱イオン水を添加することに決定した。

Table 4-1 に示した通り、貧溶媒の添加によって RP 画分を分画することで、IL 溶解液の中からセルロースを分離することができたが、依然、7-9 割のキシランが回収されないまま、リグニン成分とともに IL を含む水溶液中に溶解した状態であった。そこで、IL を含む水溶液中に溶解状態のキシランを回収するため、透析により水溶液中から IL を除去した結果、透析チューブ内には新たに不溶性の XP 画分と水溶性の XS 画分の 2 種類の画分が生成した。原料に含まれるキシランのうち、エリアンサスで 27%、ナラで 44% のキシラン成分が、リグニンを含有する不溶性キシランとして回収された。一方、原料キシランのうち、エリアンサスでは 10%、ナラでは 17% のキシラン成分が、ペクチンなどのヘミセルロースと共に水溶性キシランとして回収された。また、XP 画分と比べて、XS 画分のキシランには、キシランの側鎖糖を構成する GlcA や Ara が多く含まれていることから、分岐の多いキシランが回収されたと考えられる。一方、RP 画分にもセルロースとともに再析出したキシランが含まれるが、この画分には側鎖糖はほとんど含まれておらず、直鎖状キシランが回収されたと考えられる (**Table 4-2**)。この IL 抽出処理と 2 段階の分画方法によって、原料の細胞壁粉末から性状の異なるキシランが分離された。RP 画分、XP 画分、XS 画分の糖分析の結果をもとに、もとの天然キシランの構造を考察すると、キシランの側鎖分岐を有する部分や、リグニンと複合体を形成する部分は、均一に分布しているのではなく、ある一定の間隔をとったブロック状のドメイン構造として、修飾基はある領域に集中していることが予想される。こうした不均一な構造は、キシランがセルロース表面に吸着すると共に、リグニンといった異なる成分間を繋ぎ止めている構造を示唆するものと考えられる。すなわち、セルロースに吸着しやすい未置換の直鎖部分と、セルロース繊維間のマトリックスとして機能する分岐鎖部分、そ

して、リグニンと相互作用する部分に分かれた構造を持つことが示唆された。こうしたキシランのドメイン構造に関する議論は、近年、Kable ら、Busse-Wicher らによる分析^{8,9)}や、Zhang ら、Grantham らによるキシラン生合成に関わる酵素研究の観点からも推測されており^{10,11)}、今回の IL による抽出方法と分画操作によって分けた性状の異なるキシランの存在は、これらの結果を支持する結果であった。

4-4-2. XP 画分及び XS 画分に含まれるキシランの構造的特徴

IL 抽出液から分画した XP 画分及び XS 画分に含まれるキシランの構造的特徴を明らかにするために、既存のアルカリ抽出法によって同じ原料から調製したキシランとの構造比較を行った。

IL 抽出で得られた XP 画分及び XS 画分に含まれるキシランには、アルカリ抽出キシランとは対照的に、カルボニル基に関連する 1730 cm^{-1} 付近に強いピークが観察されることから、エステルが結合状態で含まれていた (**Fig. 4-3**)。このことから、キシランの修飾基は、通常アルカリ抽出時に加水分解に伴って分解されるが、IL による抽出方法では、エステル結合の開裂なしに天然状態のまま抽出されるという特徴が明らかとなった。さらに、XP 画分と XS 画分には、アセチルエステル基に由来する酢酸、フェルロイルエステルに由来する FA、クマロイルエステル基に由来する *p*CA が結合状態で含まれていることが、アルカリ処理後の HPLC の分析によって明らかとなった (**Table 4-3**)。キシランに対するアセチル基の修飾頻度は、ナラで 6–7 残基に 1 箇所、エリアンサスで 22 残基に 1 箇所であり、XP 画分と XS 画分に含まれるキシラン間で大きな差異は見られなかった。また、こうしたアセチル基の頻度については、広葉樹グルクロノキシランで 2–5 残基に 1 箇所¹²⁾という既報の分析値もあるが、それよりも明らかに少なかった。キシランの修飾基頻度は不均一であることが知られており⁸⁾、植物起源や抽出方法、すなわち、何由来の、どこに存在するキシランを分析するかによって、大きく異なる。本研究で得られた分析値は、あくまで平均値にすぎないため、同一のキシランとの比較によって、正確な数の議論を行う必要がある。

さらに、本研究では SEC 分析と基質特異性の高い単一酵素をツールとして利用することで、リグニンとキシランの複合状態について考察した。XP 画分の分子量分布は、異なる分子量をもつ 2 つの高分子として分離された。これをキシラナーゼ (*PesXyn10A*) で処理すると、RI と UV で検出された高分子領域のピークは、キシランの酵素分解に伴って完全に消失し、RI 分布において単糖または 2 糖に相当する大きさにまで低分子化された (**Fig. 4-5**、**Fig. 4-6**)。一方、低分子領域のピークは、キシラナーゼ処理によって RI 分布と UV 分布の形状に全く変化がないことから、キシランを含まない単独の成分として存在しているリグニ

ンであると推定された。また、グルクノイルエステラーゼ (*PesGE*) によって処理すると、高分子領域のピークが低分子化する挙動が示された。これらの結果より、XP 画分及び XS 画分に含まれるリグニンとキシランの一部は、同一の分子としての複合体を形成しているものと考えられ、その一部は、ベンジルエステル結合によるものと考えられた。このように、IL 抽出処理方法を用いることで、天然状態のリグニンとキシランとの架橋結合を維持した LXC が得られることが強く示唆された。

リグニンとキシランの複合体の存在については、古くから知られおり、1954 年に、木粉をボールミルで微粉碎し 96 % ジオキサン水によって抽出される MWL 画分 (milled wood lignin)^{13,14)}にリグニンとヘミセルロースからなる複合体が含まれことが Björkman らによって報告された。その後、Koshijima と Watanabe らによって、MWL 画分に含まれるリグニンとキシランの 2 成分は、共有結合によって複合体を形成していることが NMR により決定されている^{15,16)}。本研究で抽出溶媒として用いた IL は、ジオキサン水と同様に、リグニンとヘミセルロースの両成分に対して高い溶解特性を有するとともに、エステル結合の分解が生じないため、リグニンとキシランが複合体となった LXC の回収につながったと考えられる。

4-4-3. LXC 中に含まれるベンジルエステル結合の酵素分解性

PesGE の酵素反応に伴って XP 画分と XS 画分に含まれる LXC の低分子化挙動が生じたことから、これらの LXC にはベンジルエステル結合が存在することが明らかになった(**Fig. 4-6**)。近年では、GE の実バイオマスや天然基質に対する触媒活性について、いくつかの報告がなされている。Bååth らは、針葉樹及び広葉樹から単離した MWL を基質として、*AaGE1* (*Acremonium alcalophilum* 由来 GE) を作用させ、SEC の分子量分布が緩やかに低分子化されることを報告している¹⁷⁾。この低分子化挙動は、*PesGE* の反応による IL 抽出 LXC の挙動と極めて類似していた。さらに、³¹P-NMR 分析から MWL に含まれるフェノール性水酸基とカルボキシ基の量を測定し、GE の酵素処理前後の比較によって、これらの量の増加によってベンジルエステル結合の開裂が生じたことを示した¹⁷⁾。これらの報告例は、GE が天然の LCC 中に含まれているベンジルエステル結合の分解に関わっていることを述べている。さらに、その根拠は GE 遺伝子を導入した植物の表現型からも示されており^{18,19)}、GE を発現するシロイヌナズナやポプラは易分解性の細胞壁構造へと変化し、その酵素糖化において特にキシロース収率が向上することが報告されており、このことは、GE による触媒作用がバイオマス糖化反応に効果的であることを示している。

一方、キシランから MeGlcA を遊離する *IIAgu115A* を XP 画分と XS 画分に対

して作用させた場合、*PesGE* による分解で確認されたような低分子化挙動は示さなかった (**Fig. 4-7**)。つまり、*Agu* は、リグニンとの結合状態の *MeGlcA* には反応できないものと示唆された。*Agu* の反応性についてはこれまでにいくつかの報告があり、*MeGlcA* の C6 位のカルボキシ基がメチルエステル化された合成基質に対しては全く活性を示さないことが報告されている^{20,21)}。また、*Geobacillus stearothermophilus* T-1 由来の *AguA* では、*GlcA* との複合体構造 (PDB ID: 1MQQ) が解析されており、活性中心のアルギニン残基と *GlcA* の C6 位のカルボキシ基との間で静電的相互作用することで、*GlcA* のカルボキシ基の基質認識を厳密に行っていることが報告されている²²⁾。これらのことから、*IIAgu115A* についても、リグニンとの結合状態の *MeGlcA* には反応できないことが示唆された。

以上のことから、ベンジルエステル結合を架橋点とする LXC に対する *PesGE* 及び *IIAgu115A* の酵素分解性を考察すると、*PesGE* が先行して *MeGlcA* に付加したリグニンを切り離し、次に、フリーとなった *MeGlcA* を認識して *IIAgu115A* が作用し、*MeGlcA* をキシランから遊離すると考えられる。

さらに、植物種の違いという観点から、ナラとエリアンサスの XP 画分の *PesGE* の分解挙動の違いについて考察する。ナラの XP 画分だけは、GE の酵素処理後もリグニン分布にほとんど変化がなく、低分子化挙動を示さなかった (**Fig. 4-6b**)。このことから、植物種によってベンジルエステル結合開裂によるリグニン脱離の効果が異なっているものと考えられた。これと類似した検証結果として、エステル結合の開裂効果があるアンモニアを用いたバイオマス前処理の効果についての報告例が挙げられる。*Sakuragi* と *Samejima* らは、草本植物のアンモニア前処理によってリグニンとヘミセルロース間のエステル結合の開裂が生じ、酵素のアクセシビリティが向上した結果として、酵素糖化性が顕著に向上すると報告している²³⁾。その一方で、木本植物などにはエステル結合開裂の効果が低く、草本植物と比べてヘミセルロースがより複雑で強固な複合体を形成していると考察している^{23,24)}。これらのことを踏まえると、本研究で示されたエリアンサスとナラの XP 画分の *PesGE* による低分子化挙動の違いは、草本植物と木本植物との LXC の結合様式の違いに起因するものと考えられた。

4-4-4. LXC 中に含まれるキシランの酵素分解性

本論文では、LXC に対する *XYN* の分解性を定量的に議論するため、ナラから得られた XP 画分と XS 画分を基質として、*PesXyn10A* による分解性を比較した。まず、*PesXyn10A* だけを反応させた場合、XP 画分に対する *PesXyn10A* の比活性は、XS 画分と比べて顕著に低かった (**Fig. 4-8**)。次に、*IIAXE1* を作用させてから *PesXyn10A* を反応させた場合、XP 画分への比活性は減少し、XS 画分

ではほとんど変化しなかった (**Fig. 4-9a**)。また、*PesGE* を作用させてから *PesXyn10A* を反応させた場合、XP 画分への比活性はほとんど変化せず、XS 画分では増加した (**Fig. 4-9b**)。これらのことから、キシランと結合するアセチル基やリグニンにより、XYN の反応性が影響を受けることが明らかになった。

まず、アセチル基による影響については、アセチル基が除去されることによって XYN の分解性を低下させる傾向が見られており、このことから考察する。*//AXE1* の処理過程において、XP 画分と XS 画分の溶液が徐々に白濁化していく様子が観察されたことから、基質の溶解性が変化したものと考えられた。キシランの溶解性については、アセチル基の修飾量²⁵⁾や高次構造²⁶⁾に依存して、水系溶媒への溶解性が低下することが知られている。また、アルカリ処理によってアセチル基が除かれたキシランに対して XYN の分解性が低下することについては、Kong らによってすでに報告されている²⁷⁾。これらのことから、アセチル基の修飾状態によって、キシランの高次構造変化が起こってしまい、酵素の反応性に影響を与えてしまうことが考えられた。従って、XYN と AXE との相乗効果について正確に検証するためには、アセチル基による修飾状態、リグニンとの複合状態、キシラン鎖長などの高次構造の影響による基質の溶解性を考慮する必要がある。また、今回は AXE で前処理した試料に対する XYN の作用について検討したが、同時処理では修飾基を除去したことによる凝集が起こる前に、XYN が作用できるとすると、もう少し違った結果になるかもしれない。

次に、リグニンによる影響については、XS 画分に対する *PesGE* の添加効果から考察する。これまでも、GE の XYN との相乗効果についていくつかの研究から報告されている。d'Errico らは、水熱処理したコーンコブに対して、GE を添加することで、セルラーゼ製剤 Cellic Ctec による糖化性が向上することともに、生成するキシロース収量が向上することを報告している²⁸⁾。さらに、Mosbech らは、エタノール抽出成分に対して、GE を添加することで、XYN の分解活性が向上することを報告している²⁹⁾。さらに、多糖を被覆したリグニンの存在が、糖質加水分解酵素が基質へと接近するためのアクセシビリティに影響することは、広く受け入れられている³⁰⁻³²⁾。これらのことを踏まえると、*PesGE* によるベンジルエステル結合の開裂がリグニンの脱離に効果的であり、*PesXyn10A* の基質に対するアクセシビリティに寄与したものと考えられた。以上のことから、*PesGE* によって XS 画分の LXC の分解性を向上させたことが明らかとなった。

しかしながら、XP 画分に対しては *PesGE* による添加効果は認められず、複合体が解消されないものと考えられた (**Fig. 4-9b**)。また、**Fig. 4-6** の SEC 解析において、ナラの XP 画分だけには *PesGE* の酵素処理後もリグニンの分子量に変化が生じなかったこと、**Table. 4-2** に示されたように XP 画分と XS 画分のリグニ

ン含有量に大きな差異があったことから、XP 画分に含まれるリグニン中に分解抵抗となる何らかの要因があると考えられた。本研究では、LXC に含まれる架橋点をベンジルエステル結合に絞って検証してきたが、リグニン-キシラン間の架橋結合には、他の共有結合も存在する。近年の NMR の高感度化に伴って、植物細胞壁の抽出成分からリグニンとキシラン間の共有結合が直接的に同定できるようになっている³³⁾。エステル結合の他にも、針葉樹アカマツのグルコマンナン中の Manp C6 位水酸基と C α 位のリグニンアルコールとの間のベンジルエーテル結合³⁴⁾や、広葉樹ブナ木のキシラン中の Xylp C2 位あるいは C3 位水酸基と C α 位のリグニンアルコールとの間のベンジルエーテル結合³⁵⁾、キシラン末端と C α 位のリグニンアルコールとの間のフェニルグリコシド結合³⁵⁾が同定されている。さらに、リグニンとキシランの間には、共有結合以外でも相互作用が観察されるようになり、これらの 2 成分が複合化していることが証明されている³⁶⁾。従って、XP 画分と XS 画分に含まれている LXC の違いは、酵素のアクセシビリティという観点において、それぞれの複合体の結合状態が異なっており、XP 画分には既存の酵素では解消できないベンジルエステル結合以外のその他の架橋結合や、相互作用などの複合化の要因が含まれているものと示唆された。今後は、ベンジルエステル結合以外に作用する酵素と XYN との作用についても検証する必要がある。そのためには、より詳細な LXC 構造についての精密分析と、酵素による生化学的分析に基づくデータを蓄積し、天然の構造を明らかにしていく必要がある。

第 4 章 参考文献

1. 越島哲夫: ヘミセルロース・リグニン conjugate, *化学と生物*, **20**, 23–32 (1982).
2. R.P. Swatloski, S.K. Spear, J.D. Holbrey, and R.D. Rogers: Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4974–4975 (2002).
3. J. Vitz, T. Erdmenger, C. Haensch, and U. S. Schubert: Extended dissolution studies of cellulose in imidazolium based ionic liquids. *Green Chem.*, **11**, 417–424 (2009).
4. M. Mizuno, S. Kachi, E. Togawa, N. Hayashi, K. Nozaki, T. Itoh, and Y. Amano: Structure of regenerated celluloses treated with ionic liquids and comparison of their enzymatic digestibility by purified cellulase components. *Aust. J. Chem.*, **65**, 1491–1496 (2012).
5. 水野正浩: セルロースの高次構造改変とその酵素分解性の評価. *応用糖質化学*, **7**, 10–15 (2017).
6. I. Kilpeläinen, H. Xie, A. King, M. Granstrom, S. Heikkinen, and D.S. Arygyropoulos: Dissolution of wood in ionic liquids. *J. Agric Food Chem.*, **55**, 9142–9148 (2007).

7. A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker: Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass laboratory analytical procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory, TP-510-42618 (2008).
8. M.A. Kabel, H. van den Borne, J.P. Vincken, A.G.J. Voragen, and H.A. Schols: Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydr. Polym.*, **69**, 94–105 (2007).
9. M. Busse-Wicher, A. Li, R.L. Silveira, C.S. Pereira, T. Tryfona, T.C. Gomes, M.S. Skaf, and P. Dupree: Evolution of xylan substitution patterns in gymnosperms and angiosperms: implications for xylan interaction with cellulose. *Plant Physiol.*, **171**, 2418–2431 (2016).
10. B. Zhang, L. Zhang, F. Li, D. Zhang, X. Liu, H. Wang, Z. Xu, C. Chu, and Y. Zhou: Control of secondary cell wall patterning involves xylan deacetylation by a GDSL esterase. *Nat. plants*, **3**, 17017 (2017).
11. N. J. Grantham, J. Wurman-Rodrich, O.M. Terrett, J.J. Lyczakowski, K. Stott, D. Iuga, T.J. Simmons, M. Durand-Tardif, S.P. Brown, R. Dupree, M. Busse-Wicher, and P. Dupree: An even pattern of xylan substitution is critical for interaction with cellulose in plant cell walls. *Nat. Plants*, **3**, 859–865 (2017).
12. D.V. Evtuguin, J.L. Tomas, A.M.S. Silva, and C.P. Neto: Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus*. *Carbohydr. Chem.*, **338**, 597–604 (2003).
13. A. Björkman: Isolation of lignin from finely divided wood with neutral solvents. *Nature*, **174**, 1057–1058 (1954).
14. A. Björkman: Studies on finely divided wood. Part I. Extraction of lignin with neutral solvents. *Sven Papperstidn*, **59**, 477–485 (1956).
15. T. Watanabe and T. Koshijima: Evidence for an ester linkage between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2953–2955 (1988).
16. T. Watanabe: Analysis of native bonds between lignin and carbohydrate by specific chemical reactions. In: *Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues*. Springer Series in Wood Science. Berlin, Heidelberg (2003).
17. J.A. Bååth, N. Giummarella, S. Klaubauf, M. Lawoko, and L. Olsson: A glucuronoyl esterase from *Acremonium alcalophilum* cleaves native lignin-carbohydrate ester bonds. *FEBS lett.*, **590**, 2611–2618 (2016).
18. M.L. Gandla, M. Derba-Maceluch, X. Liu, L. Gerber, E.R. Master, E.J. Mellerowicz, and L.J. Jönsson: Expression of a fungal glucuronoyl esterase in *Populus*: effect on wood properties and saccharification efficiency. *Phytochemistry*, **112**, 210–220 (2015).
19. A.Y.-L. Tsai, T. Canam, A. Gorzsas, E.J. Mellerowicz, M.M. Campbell, and E.R. Master: Constitutive expression of a fungal glucuronoyl esterase in *Arabidopsis* reveals altered cell wall composition and structure. *Plant Biotechnol. J.*, **10**, 1077–1087 (2012).

20. P. Biely, R.P. de Vries, M. Vršanská, and J. Visser: Inverting character of α -glucuronidase A from *Aspergillus tubingensis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1474**, 360–364 (2000).
21. P. Biely, J. Hirsch, D.C. la Grange, W.H. van Zyl, and B.A. Prior: A chromogenic substrate for a β -xylosidase-coupled assay of α -glucuronidase. *Anal. Biochem.*, **286**, 289–294 (2000).
22. G. Golan, D. Shallom, A. Teplitsky, G. Zaider, S. Shulami, T. Baasov, V. Stojanoff, A. Thompson, Y. Shoham, and G. Shoham: Crystal structures of *Geobacillus stearothermophilus* α -glucuronidase complexed with its substrate and products. *J. Biol. Chem.*, **279**, 3014–3024 (2004).
23. K. Sakuragi, K. Igarashi, and M. Samejima: Application of ammonia pretreatment to enable enzymatic hydrolysis of hardwood biomass. *Polym. Degrad. Stab.*, **148**, 19–25 (2018).
24. 鮫島正浩: セルロース系バイオマスは酵素分解の視点からどのように見えるか. *Cellulose Commun.*, **26**, 110–116 (2019).
25. N.G.V. Fundador, Y. Enomoto-Rogers, A. Takemura, and T. Iwata: Acetylation and characterization of xylan from hardwood kraft pulp. *Carbohydr. Polym.*, **87**, 170–176 (2012).
26. S. Kishani, A. Escalante, G. Toriz, F. Vilaplana, P. Gatenholm, P. Hansson, and L. Wagberg: Experimental and theoretical evaluation of the solubility/insolubility of spruce xylan (arabino glucuroxylan). *Biomacromolecules*, **20**, 1263–1270 (2019).
27. F. Kong, C.R. Engler, and E.D.J. Soltes: Effect of cell-wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **34**, 23–35 (1992).
28. C. d’Errico, J. Börjesson, H. Ding, K.B.R.M. Krogh, N. Spodsberg, R. Madsen, and R.N. Monrad: Improved biomass degradation using fungal glucuronoyl-esterases-hydrolysis of natural corn fiber substrate. *J. Biotechnol.*, **219**, 117–123 (2016).
29. C. Mosbech, J. Holck, A.S. Meyer, and J.W. Agger: The natural catalytic function of CuGE glucuronoyl esterase in hydrolysis of genuine lignin-carbohydrate complexes from birch. *Biotechnol. Biofuels*, **11**, 71 (2018).
30. L. Kumar, V. Arantes, R. Chandra, and J. Saddler: The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresour. Technol.*, **103**, 201–208 (2012).
31. J. A. Rollin, Z. Zhu, N. Sathitsuksanoh, and Y.-H.P. Zhang: Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnol. Bioenging.*, **118**, 22–30 (2011).
32. M. A.T. Hansen, J.B. Kristensen, C. Felby, and H. Jørgensen: Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) – the impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility. *Bioresour. Technol.*, **102**, 2804–2811 (2011).
33. N. Giummarella, Y. Pu, A.J. Ragauskas, and M. Lawako: A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chem.*, **21**, 1573 (2019).
34. H. Nishimura, A. Kamiya, T. Nagata, M. Katahira, and T. Watanabe: Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. *Sci. Rep.*, **8**, 6538 (2018).

35. N. Giummarella and M. Lawako: Structural basis for the formation and regulation of lignin-xylan bonds in Birch. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **4**, 5319–5326 (2016).
36. X. Kang, A. Kirui, M.C.D. Widanage, F. Mentink-Vigier, D.J. Cosgrove, and T. Wang: Lignin-polysaccharide interaction in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR, *Nat. Commun.*, **10**, 347 (2019).

第4章 図表

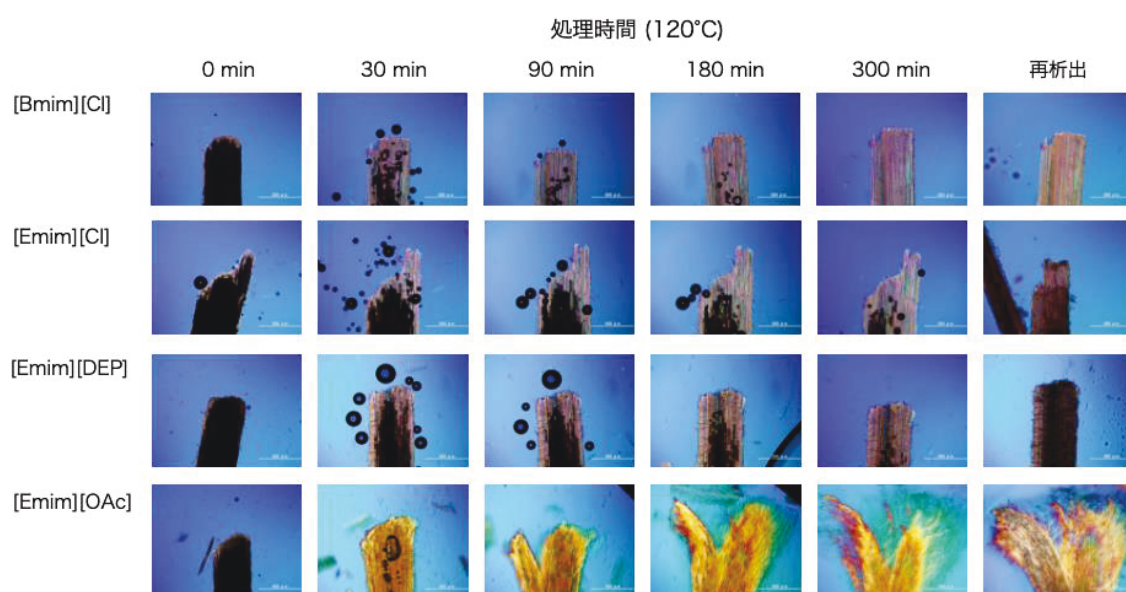


Fig. 4-1. イオン液体処理過程におけるエリアンサスの溶解挙動 (水野ら、2017)⁵⁾ を一部加工転載)

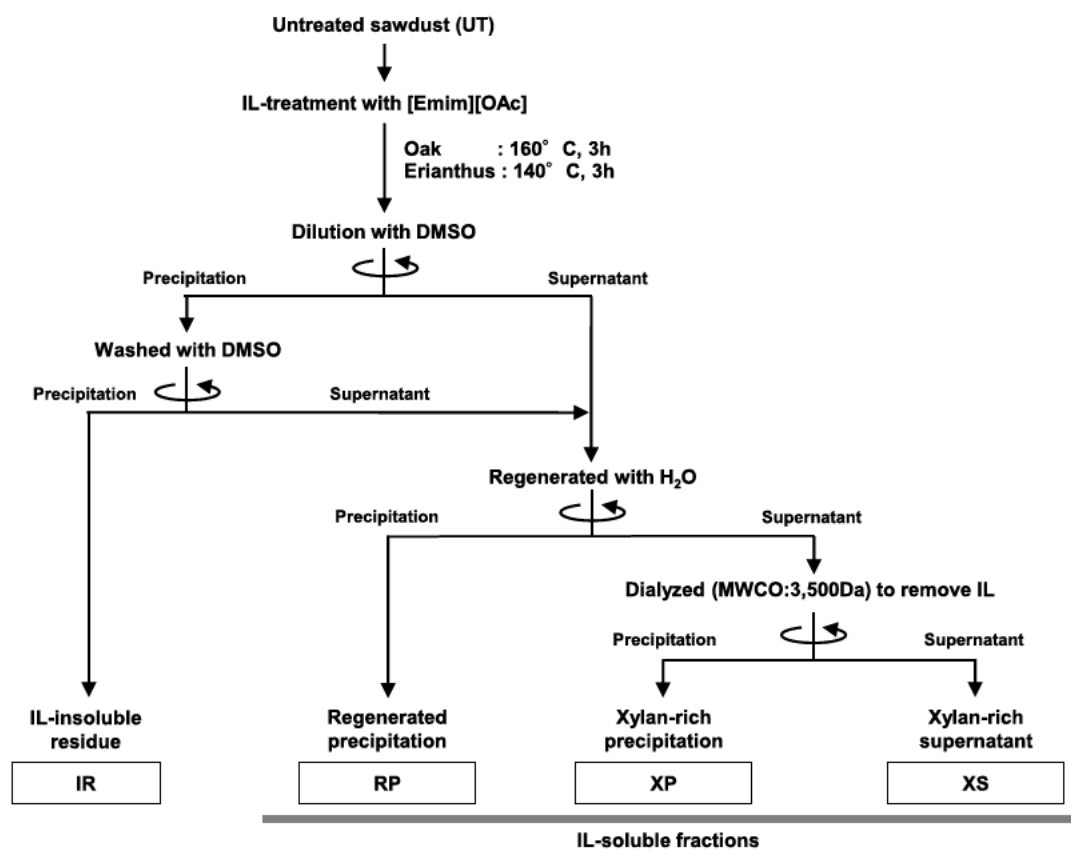


Fig. 4-2. IL 抽出法による植物細胞壁成分の分画手順

Table 4-1. IL 抽出法によって得られた各画分の原料を基準とした回収率

Fractions		Dry mass yields (wt%)		Yield relative to UT (each components) (%)					
		Erianthus	Oak	Klason lignin		Glucan		Xylan	
				Erianthus	Oak	Erianthus	Oak	Erianthus	Oak
Untreated	UT	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
IL-insoluble	IR	14.7 ± 2.2	24.4 ± 1.2	36.1	23.8	8.5	33.6	12.9	4.1
IL-soluble	RP	35.3 ± 1.2	26.8 ± 0.4	8.0	7.0	61.8	50.6	12.7	3.3
	XP	10.8 ± 0.8	15.9 ± 1.6	14.3	22.7	0.0	0.0	26.8	44.4
	XS	5.5 ± 0.8	5.2 ± 0.7	2.7	1.9	0.6	0.1	10.2	17.3
Collected ^a		66.3	72.3	61.1	55.5	70.9	84.3	62.6	69.1
Uncollected ^b		33.7	27.7	38.9	44.5	29.1	15.7	37.4	30.9

a) IR、RP、XP、XS として回収された重量の総和から算出した。

b)原料の重量との差し引きによって算出した。

Table 4-2. IL 抽出法によるナラ及びエリアンサスから得られた各画分の構成成分割合 ^{a)}

	Contents (wt%) ^{b)}			Monosaccharide compositions ^{c)}									
	Klason lignin	Carbohydrate		Glc	Xyl		GlcA	Ara	Man	Gal	GalA	Rha	Fuc
Erianthus													
UT	20.4 ± 1.4	59.4 ±	4.1	58.5 ± 2.7	35.3 ±	0.6	0.5 ± 0	2.8 ± 1.0	N.D.	0.1 ± 0.1	N.D.	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
IR	50.1 ± 1.5	47.1 ±	4.9	50.8 ± 9.7	38.2 ±	5.6	N.D.	5.8 ± 1.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
RP	4.6 ± 1.3	75.4 ±	10.8	87.7 ± 1.9	11.9 ±	2.0	N.D.	0.5 ± 0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
XP	27.1 ± 2.1	57.7 ±	0.3	N.D.	90.6 ±	0.7	0.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
XS	9.9 ± 2.7	62.8 ±	3.0	5.6 ± 2.0	69.1 ±	10.3	1.7 ± 0.1	13.9 ± 3.1	N.D.	2.2 ± 0.8	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.1
Oak													
UT	26.6 ± 0.7	63.0 ±	2.6	66.3 ± 1.0	25.5 ±	0.6	2.5 ± 0.2	0.5 ± 0.0	1.7 ± 0.7	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2
IR	26.0 ± 0.9	61.2 ±	5.7	94.1 ± 0.6	4.5 ±	0.6	N.D.	1.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	N.D.	0.1 ± 0.0	N.D.
RP	7.0 ± 0.5	81.1 ±	9.9	97.5 ± 0.8	2.4 ±	0.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
XP	38.0 ± 1.5	45.8 ±	0.8	0.3 ± 0.4	96.4 ±	0.6	2.7 ± 0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1
XS	9.8 ± 1.4	63.5 ±	4.0	1.6 ± 1.0	84.2 ±	0.7	4.3 ± 0.5	1.1 ± 0.3	2.9 ± 1.4	2.0 ± 0.9	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.1

^{a)} 実験値は、平均値 ± 標準偏差 (n = 3) によって示した。N.D.、未検出。

^{b)} 乾燥粉末 100 g 当たりに含まれるリグニン及び多糖類の重量。クラークソンリグニン量は、クラークソンリグニン定量法に従って算出される酸不溶性リグニン及び酸可溶性リグニンの総和から算出した。

^{c)} 酸加水分解物として HPLC によって分析されたグルコース (Glc)、キシロース (Xyl)、グルクロン酸 (GlcA)、アラビノース (Ara)、マンノース (Man)、ガラクトース (Gal)、ガラツクロン酸 (GalA)、ラムノース (Rha)、フコース (Fuc) の総量を 100 とした際の各単糖の割合を示した。

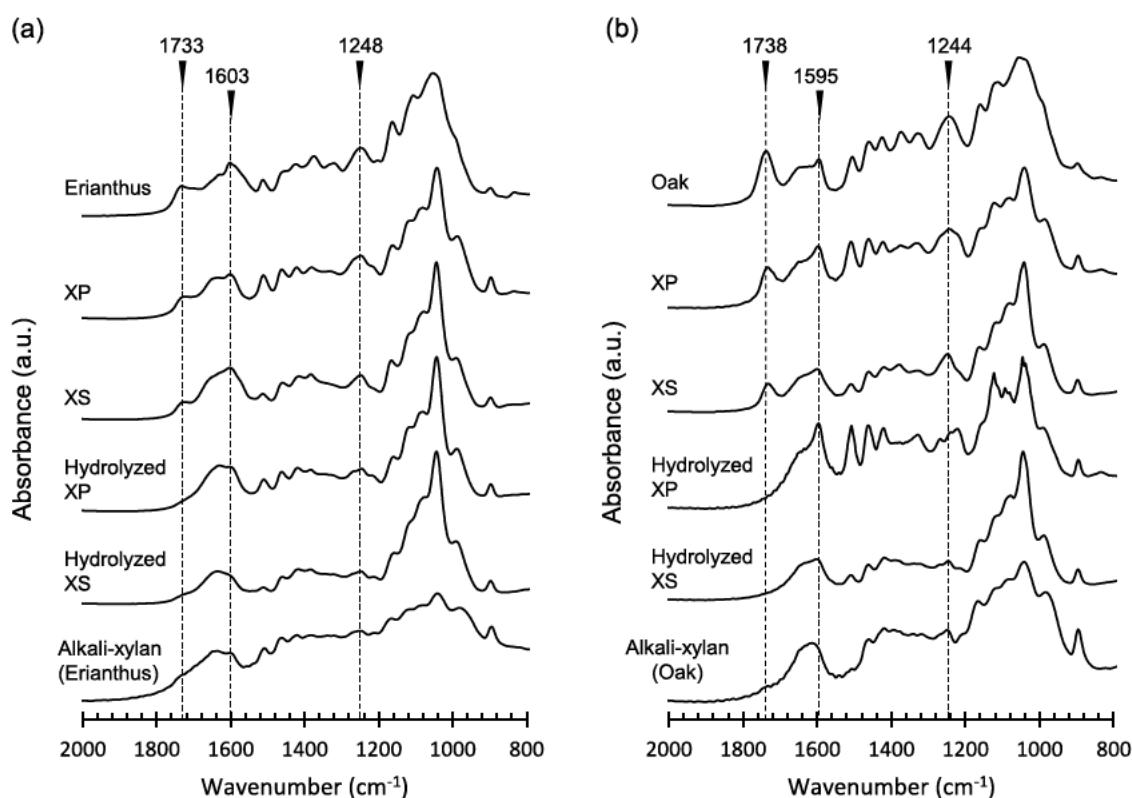


Fig. 4-3. XP 画分及び XS 画分の FT-IR スペクトル

(a) エリアンサス (b) ナラ

Erianthus、エリアンサス原料粉末; Oak, ナラ原料粉末; XP、IL 抽出法で各原料より得られた不溶性キシラン画分; XS、IL 抽出法で各原料より得られた可溶性キシラン画分; Hydrolyzed XP、アルカリ加水分解処理後の XP; Hydrolyzed XS、アルカリ加水分解処理後の XS 画分; Alkali-xylan (Erianthus)、アルカリ抽出法によってエリアンサスから得られたキシラン成分; Alkali-xylan (Oak)、アルカリ抽出法によってナラから得られたキシラン成分; 逆矢印は、エステルとリグニンに特徴的な波長を示している。

Table 4-3. IL-抽出キシラン (XP 画分, XS 画分) に含まれるアセチル基, フェルロイル基, クマロイル基の含有量

Fraction	Origin	Contents ($\mu\text{mol/g}$) ^a			Molar ratio (mol/mol)		
		AcOH	FerA	CouA	Xyl/AcOH	Ara/FerA	Ara/CouA
XS	Erianthus	0.1×10^3	9.1	39.4	22	132	20
	Oak	0.5×10^3	7.1	N.D.	7	7	-
XP	Erianthus	0.2×10^3	5.9	61.6	18	85	5
	Oak	0.5×10^3	10.5	N.D.	6	-	-

^a アルカリ処理によって生成された酢酸、フェルラ酸、クマル酸の量から算出した.

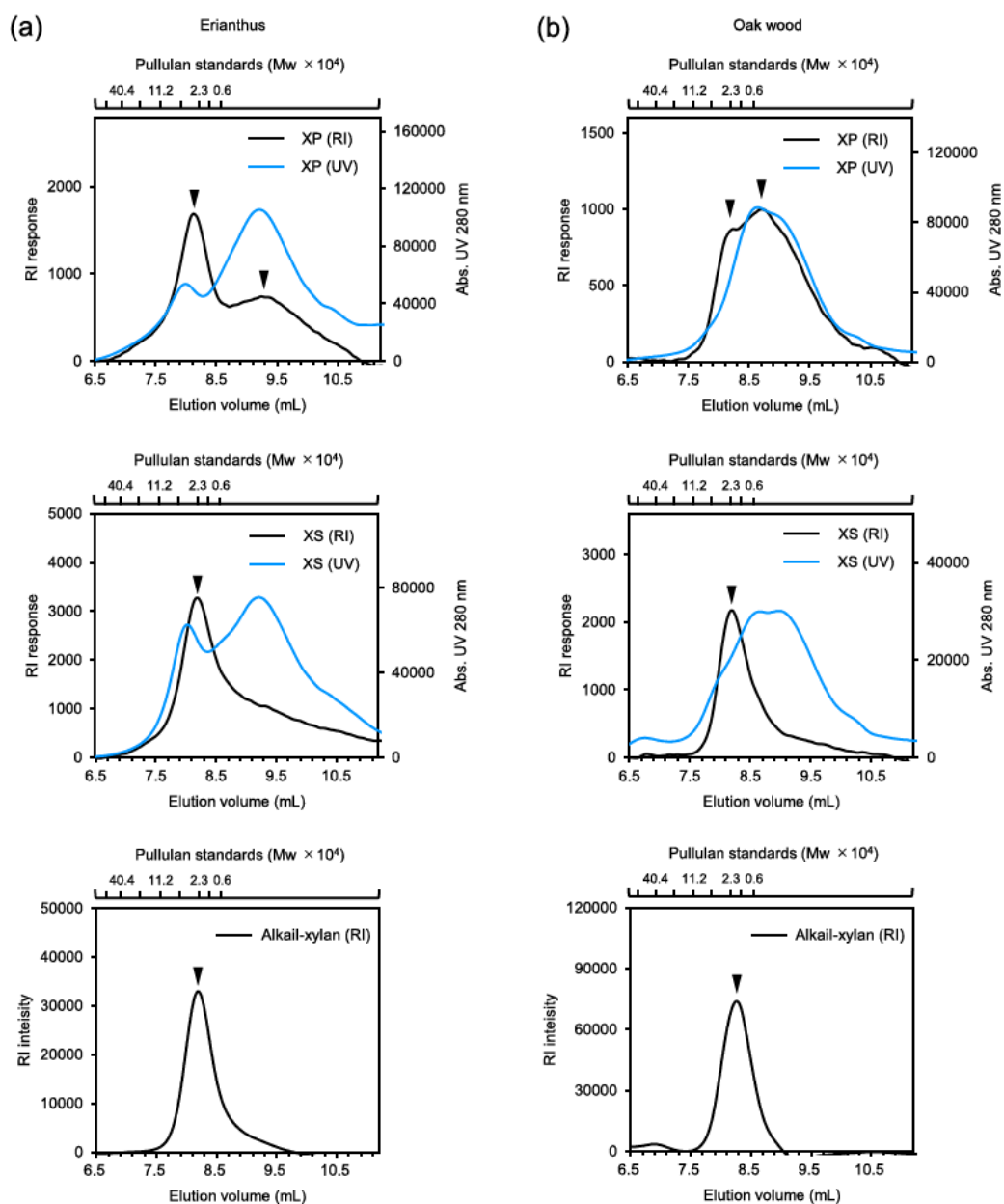


Fig. 4-4. XP 画分及び XS 画分の分子量分布の比較

(a) エリアンサスから抽出した XP、XS、アルカリ抽出キシランの SEC 溶出曲線の比較; (b) ナラから抽出した XP、XS、アルカリ抽出キシランの SEC 溶出曲線の比較; 黒線、多糖類成分とリグニン成分の溶出を示す RI 分布; 青線、リグニン吸収波長 UV 280 nm を指標にしたリグニン成分の溶出を示す UV 分布; 図注の逆三角は、RI 分布のピークを示している。

Table 4-4. IL 抽出キシラン及びアルカリ抽出キシランの重量平均分子量、数平均分子量 (Mw, Mn)、多分散指数 (Mw/Mn)

	Erianthus			Oak wood		
	IL-xylan		Alkali-xylan	IL-xylan		Alkali-xylan
	XP	XS		XP	XS	
Mw	16,800	14,600	14,200	9,400	15,100	13,600
Mn	1,500	1,700	8,600	1,700	3,400	9,500
Mw/Mn	11.1	8.6	1.7	5.8	4.7	1.4

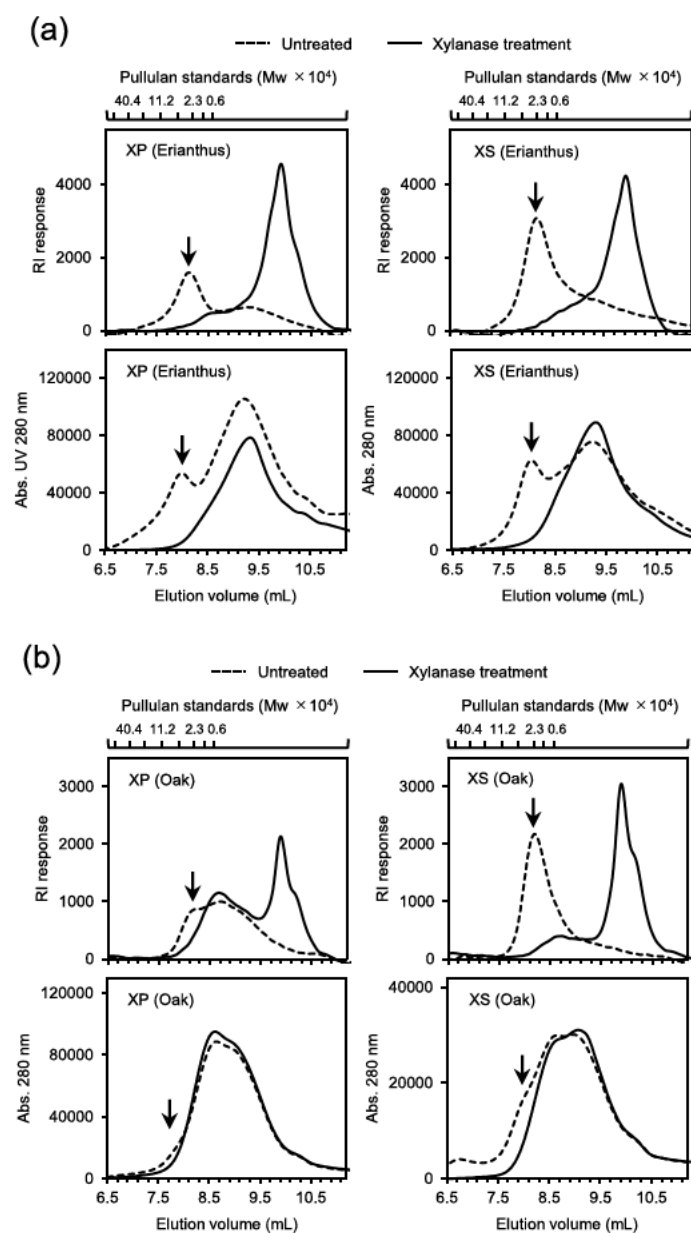


Fig. 4-5. *PesXyn10A* 処理による XP 画分及び XS 画分の酵素分解挙動の解析

(a) ナラの XP 画分、XS 画分の酵素分解挙動の比較 (上段; RI、下段; UV)、(b) エリアンサスの XP 画分、XS 画分の酵素分解挙動の比較 (上段; RI、下段; UV); *PesXyn10A* で酵素処理した試験区を実線、未反応の試験区を点線で示した。図注の矢印は、酵素反応後に消失したピークを示している。

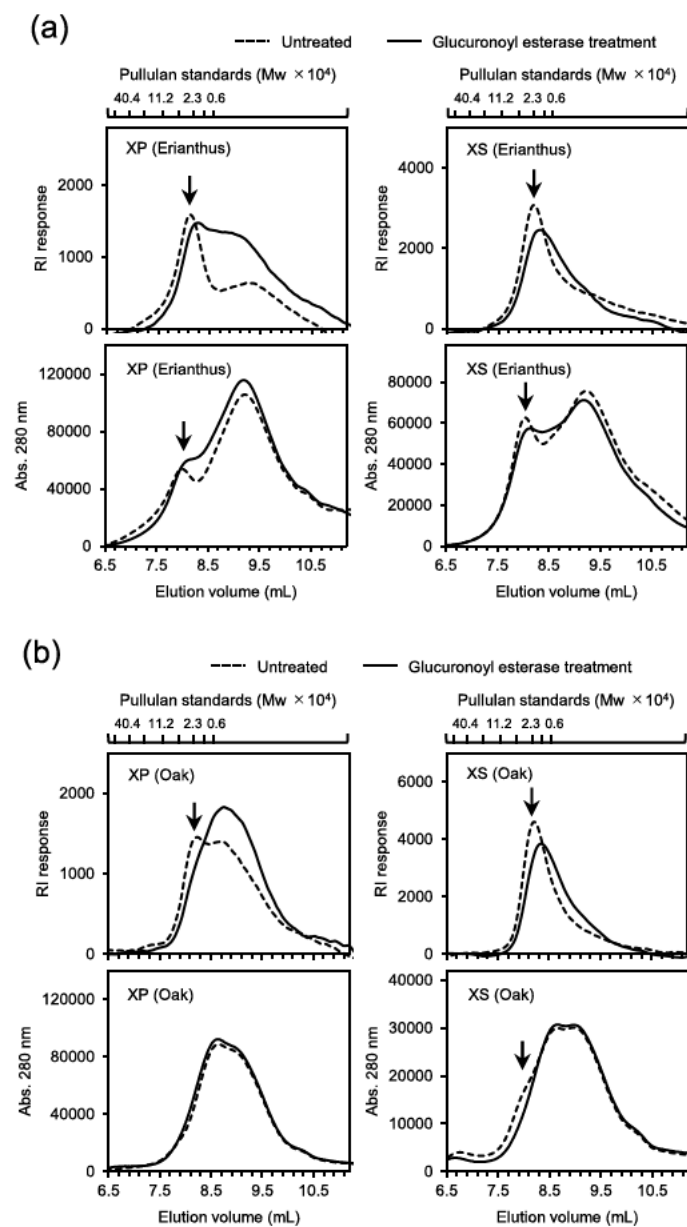


Fig. 4-6. *PesGE* 処理による XP 画分及び XS 画分の酵素分解挙動の解析

(a) ナラの XP 画分、XS 画分の酵素分解挙動の比較 (上段; RI、下段; UV) (b) エリアンサスの XP 画分、XS 画分の酵素分解挙動の比較 (上段; RI、下段; UV); *PesGE* で酵素処理した試験区を実線、未反応の試験区を点線で示した。図注の矢印は、酵素反応後に消失したピークを示している。

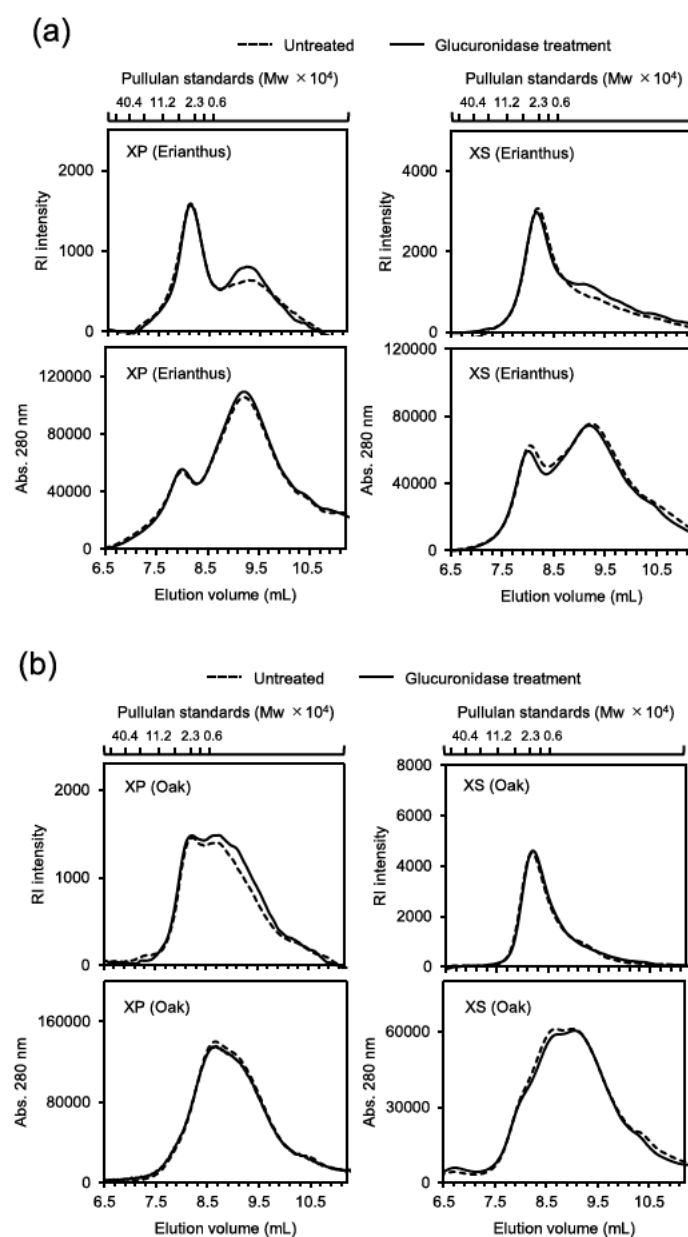


Fig. 4-7. //Agu115 処理による XP 画分及び XS 画分の酵素分解挙動の解析

(a) ナラの XP 画分、XS 画分の酵素分解挙動の比較 (上段; RI、下段; UV)、(b) エリアンサスの XP 画分、XS 画分の酵素分解挙動の比較 (上段; RI、下段; UV); //Agu115A で酵素処理した試験区を実線、未反応の試験区を点線で示した。図注の矢印は、酵素反応後に消失したピークを示している。

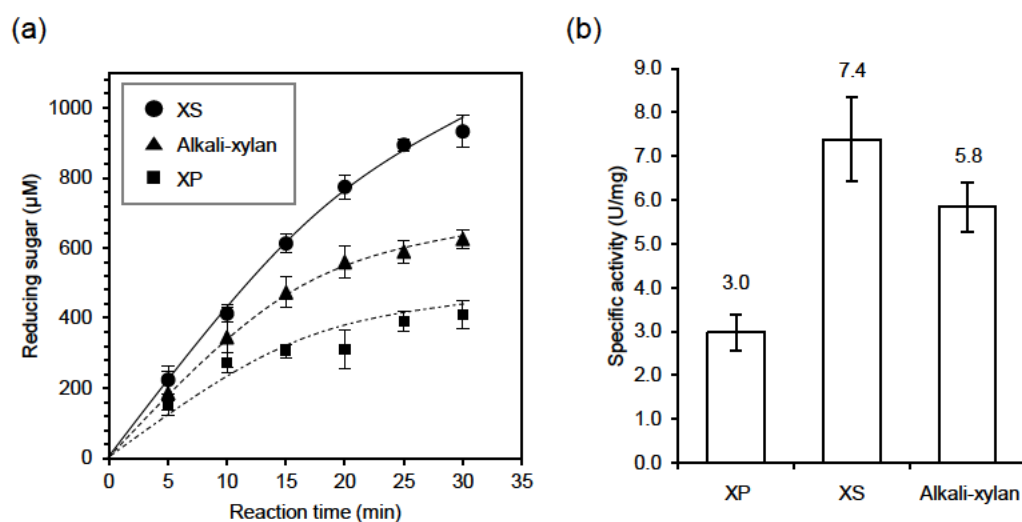


Fig. 4-8. XP 画分及び XS 画分の酵素分解性

(a) *PesXyn10A* の還元糖遊離速度の比較、(b) *PesXyn10A* の比活性値の比較; ナラから得た XP 画分、XS 画分、アルカリ抽出キシランをキシラン量換算にして 190 mg となるよう反応液へ添加し、*PesXyn10A* と pH 5.0、30 °C、20 分間反応させ比活性を測定した。活性値は、平均値 ±標準偏差 (n = 5) で示した。

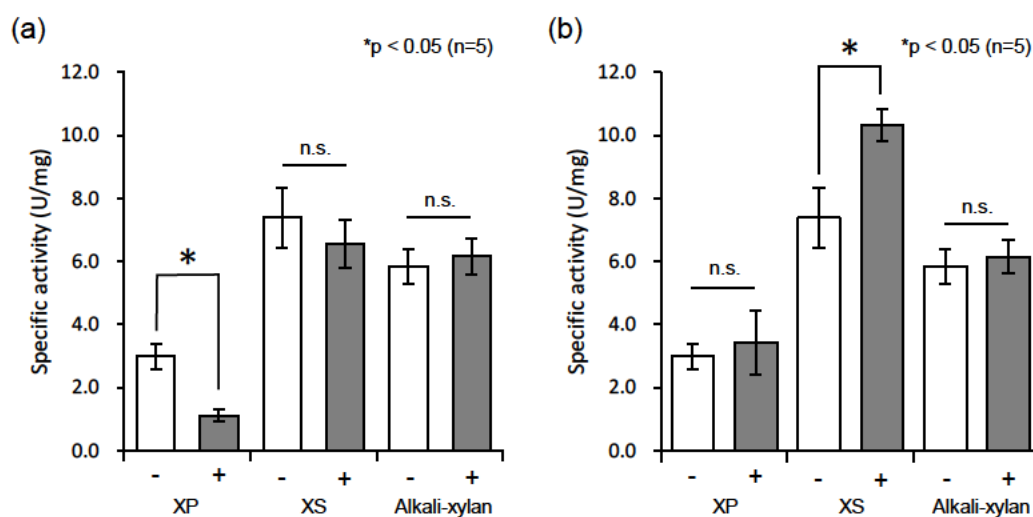


Fig. 4-9. IIAXE1 及び *PesGE* の添加が *PesXyn10A* 活性に与える影響

(a) *IIAXE1* 処理後の *PesXyn10A* 活性の比較、(b) *PesGE* 処理後の *PesXyn10A* 活性の比較; ナラから得た XP 画分、XS 画分、アルカリ抽出キシランを基質として、30 °C、30 分間 *IIAXE1* 及び *PesGE* によって前処理した後に、*PesXyn10A* を pH 5.0、30 °C、20 分間反応させ測定した比活性を示している。活性値は、平均値 ± 標準偏差 (n=5) で示し、*IIAXE1* 及び *PesGE* を添加した試験区を (+)、添加しない試験区 (-) とした。また t 検定による比較を行い、有意水準は 5% とした。n.s.、有意差なし ($p > 0.05$)。

第 5 章

総論

第5章 総論

5-1. 研究成果の概要

現在の地球では、石炭紀の時のように有機物が多量に蓄積することはない。これは、植物の生産と微生物の分解のバランスが取れているからである。このように自然界では、地球上で最も豊富に存在する植物バイオマスを完全に分解し、炭素資源が循環している。我々の研究分野が果たすべき最大の目的は、このように自然界で果たされている効率的な炭素循環系を深く理解し、得られた知見を活かすことで、人類のエネルギー問題の解決に導くためのバイオマスリファイナリープロセスの実現を目指すことにあると考える。

植物細胞壁の主要 3 成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンのそれぞれを付加価値の高い素材に変換し、利用することが、これからのバイオマスリファイナリーに求められている。そのためには、各成分が植物細胞壁の中でどのように存在しているのかを知ることは、非常に重要となる。本研究では、リグニンとヘミセルロースの成分間界面に含まれるリグニン-多糖複合体 (LCC) に焦点を当てた。複雑な構造を有する LCC は、微生物によって生産される複数の酵素による協奏的な作用によって分解され、ゆえに植物細胞壁が効率的に分解されていると考えられるが、詳細な分解機構は明らかでない。その主要因としては、LCC に作用する酵素を評価するための基質が用意されていないことが挙げられる。本研究では、LCC の中でも草本類や広葉樹に主要なリグニン-キシラン複合体 (LXC) に着目し、天然構造に基づく“基質”の作製によって、その酵素分解メカニズムの解明に向けた基礎的な知見を得ることを目的とした。以下には、構成する研究の得られた成果について記す。

天然のリグニンとキシランとの成分間界面には、これらの成分を架橋するベンジルエステル結合の存在が知られている。はじめに、本研究ではベンジルエステル結合とその周辺構造に着目し、そこに作用する複数の酵素による作用機構を明らかにするため、それぞれの単一酵素を得ることにした。従って、第2章では、木質細胞壁を腐朽する担子菌 *I. lacteus* NK-1 及び子囊菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7 の両菌株由来の 4 種類の遺伝子に着目し、それぞれの酵素を組換え体として発現する *P. pastoris* を作製した。その結果、GH10 に属するキシランナーゼ (*PesXyn10A*)、CE15 に属するグルクロノイルエステラーゼ (*PesGE*)、CE1 に属するアセチルキシランエステラーゼ (*IIAXE1*)、GH115 に属する α -グルクロニダーゼ (*IIAgu115*) のそれぞれの酵素を単一成分として得ることに成功した。それ

ぞれの酵素の性質を調べたところ、広葉樹及び草本類の細胞壁の構成成分である LXC に含まれるベンジルエステル結合の分解に加えて、これら酵素の組み合わせによりリグニンから遊離されたグルクロノキシランを、単糖にまで分解できる酵素群である可能性を示唆した。

第 3 章では、LXC 中でリグニンとキシランを架橋するベンジルエステル結合に着目し、そのモデルとなる基質の合成と、その酵素分解性を評価した。まず、ベンジルエステル結合のキシラン糖骨格部分を切り取るため、第 1 章で調製した *PesXyn10A* を広葉樹由来グルクロノキシランに作用させた後、カラムクロマトグラフィーによって分解生成物を分離したところ、 Xyl_3 に MeGlcA が付加した $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ を精製品として得ることに成功した。さらに、この $\text{MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$ のカルボキシ基に対して、有機合成反応によるベンジル基の導入によって、 β -O-4 リグニンユニットの α 位に MeGlcA が付加した天然のベンジルエステル結合の部分的構造を模倣する基質 ($\text{Bnz-MeGlcA}^3\text{Xyl}_3$) を得ることに成功した。このベンジルエステルは、リグニンと天然由来のキシランの部分構造を有することとを特徴とする、GE 活性評価に利用可能な新規な基質である。この基質を用いた *PesGE* の酵素反応速度論解析では、市販基質である Bnz-GlcA に対する触媒効率と比べて、645 倍も高いことが示され、GE によって特異的に分解されることを明らかにした。本研究は、GE の本来の触媒活性をより正確に解析可能なモデル基質を世界に先駆けて提案するものであり、酵素の基質特異性についての基礎的な知見を提供した。また、本基質は GE だけでなく、他にも 4 種類の酵素が作用可能な構造を有するので、複数の酵素群による LXC の分解機序についての議論を行うことや、LXC の分解に重要な酵素をスクリーニングするための基質としての利用も期待される。

第 4 章では、LXC の全体の構造に着目し、細胞壁溶解性の高い IL を抽出溶媒として用いて、天然の植物細胞壁から、リグニンとキシランの複合体の単離を試みた。 $[\text{Emim}][\text{OAc}]$ を抽出溶媒として用いた結果、既存のアルカリ抽出法では脱離してしまうエステル結合が維持されており、天然状態の複合体のまま LXC として抽出されていることが明らかとなった。このことは、IL を用いた細胞壁の溶解過程では、成分間の共有結合を損ねることなく、非共有結合の解離効果により、個々の構成成分が分離されたためであると考えられる。さらに、本章では、IL によって単離した LXC を基質として、第 1 章で調製したモノコンポーネント酵素を作用させ、SEC 分析により生じる構造変化を解析することにより、リグニンとキシランの複合状態について推定した。これらの結果から、*PesGE* によるベンジルエステル結合の開裂に伴って、LXC の低分子化が起こることを明らか

にした。このことは、GE が植物細胞壁内のリグニンとキシランの複合体におけるエステル結合の開裂に関わっていることを支持する結果であった。さらに、この基質を用いて *PesXyn10A* の分解性を評価したところ、*PesGE* の酵素処理によって *PesXyn10A* の分解性が向上することが示された。このことから、ベンジルエステル結合の開裂がリグニンと多糖類の分離に効果があり、特に酵素が基質に接近するためのアクセシビリティの向上に効果的であると考えられた。その一方で、広葉樹由来 LXC には、エステル結合以外にもフェニルグリコシド結合やエーテル結合などの複雑な結合様式を有することが示唆された。これらの結果は、天然の LXC の構造と、複数の酵素による分解機構に関する新たな知見を与えるものである。

5-2. 今後の課題及び展望

近年での NMR の高感度化によって、リグニンとヘミセルロース間の架橋結合が詳細に調べられるようになった¹⁾。植物細胞壁の抽出成分から、リグニン-キシラン間のエステル結合のほかにも、エーテル結合²⁾、フェニルグリコシド結合³⁾や、リグニン-マンナン間のエーテル結合が直接的に同定されている。本論文ではベンジルエステル結合とその分解酵素を中心として LXC の分解性について議論してきたが、それ以外のリグニン-キシラン間の共有結合の存在の可能性についても示唆された。今後は、NMR を用いて新たに単離した LXC を調べていくことで、リグニンと多糖類の架橋様式について更なる知見の蓄積が望まれる。一方で、このように天然ではリグニンとヘミセルロースが複数の共有結合によって架橋しているにも関わらず、これまで架橋結合の分解に関わる酵素として報告されている例は、GE と FAE の僅か 2 つだけに留まっている。天然の LCC にはエステル結合の他にも結合が存在している以上、それらに作用する酵素も数多く存在するはずであり、多くの酵素が未発見のままとなっている可能性が極めて高い。実際、2021 年現在の CAZy データベース上で、糖質加水分解酵素は 168 個のファミリーにまで分類が広がっており、80 万件を超える遺伝子が登録されているが、そのうち機能が明らかにされた酵素は僅か 1% に満たない程度である。このことは、遺伝子工学分野の進展から日々新たな遺伝子が同定されていく一方で、個々の酵素が果たす機能や役割に関する反応解析が追いついていないことを示している。本研究の取り組みは、“細胞壁の構造”と“酵素”の双方の視点からのバイオマスを理解しようとするものであり、自然界における細胞壁構造とその酵素分解機序に関する重要な情報を蓄積させていくことで、これまで知られていない重要な酵素の発見に貢献することが期待される。

現在のリグノセルロース系バイオマスのリファイナリー技術は、セルロースを主体として捉えた変換プロセスである。そのため、セルロースを被覆しているリグニンやヘミセルロースを除去するために、漂白やアルカリ処理など前処理が行われている。パルプ工場から排出される黒液は、ヘミセルロースが過分解されているほか、リグニンがサルファイト化され反応性に乏しいため、燃焼エネルギーの回収という観点での利用しかされていない。つまり、人工的な前処理プロセスでは、植物資源のおよそ半分以上の有効成分が有効に利用できていないと言える。その一方で、自然界の循環系に目を向けてみると、糸状菌類は、常温・常圧の温和な環境下において、糖質のみならず、難分解性のリグニンを含む全ての構成成分を無駄なくエネルギー源として利用している。環境に優しく全成分を変換利用するプロセスを開発するためには、植物細胞壁分解における鍵となる構造の解明と、その分解に有効な酵素をスクリーニングすることが重要である。このようなプロセスが開発されると、リグノセルロース利用のボトルネックとなるリグニンやヘミセルロースの活用にも道が切り開けるものと期待される。

5-3. 総括

人工的なバイオマス分解では前処理を必須としているが、自然界では微生物のみで完全分解が可能であるものの、その詳細については明らかとなっていない。その原因としては、実際の酵素分解を適切に評価するための基質が用意されていない点にある。そこで本研究では、リグニンとキシランの複合体のキー構造を含む基質を合成し、天然の基質に対する触媒活性評価法を確立した。さらに、植物細胞壁より直接天然型の LXC を単離したことより、種々の酵素の特異性や作用機序について新たな知見を明らかにした。具体的には以下の通りである。

1. *P. pastoris* を宿主とする異種発現系構築によって、木材腐朽菌が生産する LXC に作用する 4 種類のモノコンポーネント酵素の単離に成功した。それぞれの単独酵素あるいは複数の組み合わせによる反応解析が可能となった (第 2 章)。
2. リグニンとキシランを架橋するベンジルエステル結合のモデル基質の合成に成功した。天然の部分構造を有する本基質を用いることで、GE の触媒速度を正確に測定することができ、LXC 分解の新たな評価系としての有用性を提案した (第 3 章)。
3. IL を用いることで、植物細胞壁から LXC を単離することに成功した。これを基質に用いることで、GE がベンジルエステル結合に対して直接的に作用

することを明らかにした。さらに、XYN の作用において、ベンジルエステル結合の分解が効果的であり、酵素糖化における GE の添加効果を証明した (第 4 章)。

キノコに代表される木材腐朽菌の一群は、常温常圧の自然環境下において、多糖類を含めて難分解性のリグニンを効率的に分解する稀な性質を有する。最近では、次世代シーケンサーの登場によって、250 種類以上の菌類ゲノムの情報が解読され、それに基づいて、これまで自然で観察されてきた腐朽現象についての分子メカニズムが明らかにされつつある。2012 年には 31 種の比較ゲノム解析によって、腐朽菌が辿ってきた進化の過程において、リグニン分解能を獲得することをきっかけとして白色腐朽菌が出現したと述べられている⁵⁾。さらに驚くべきことに、木材腐朽菌は、針葉樹や広葉樹の異なる細胞壁構造に適応するために、それぞれの分解に最適な酵素群を備えるように進化を遂げてきたことが明らかとなった⁶⁾。これは、極めて驚くべきことで、多種多様に存在するバイオマスを有効利用するためのヒントは木材腐朽菌の進化の歴史に隠されており、自然によって選択されてきた酵素群を理解することが重要だと言える。しかし、未だ多くの機能未知酵素が存在していることを忘れてはならない。実際の腐朽環境下では、木材腐朽菌しか保有しない多数の機能未知酵素が分泌されている⁷⁾。また、共生環境において木材腐朽菌以外の微生物からも機能未知酵素が分泌されている⁸⁾。これらの事実から、未解明となっている酵素やそれらの複数の酵素が関与する分解メカニズムが、バイオマス分解においての鍵となる反応を担っている可能性は十分にあり得る。本研究において、多糖類から難分解性のリグニンを切り離すための酵素反応の一部を、酵素化学的検証によって明らかにした。本研究の成果は、これまでに解析自体が困難であった LCC の分解に関わる新規酵素の探索に役立つものと期待され、植物バイオマスの全ての構成成分を無駄なく酵素によって分離・分解する環境調和型のプロセス開発に寄与するものがある。そして、我が国そして世界で行われているバイオマスリファイナリーに貢献し、今後の人類の持続可能な発展と、生態系の健やかな営みに貢献することを切に願っている。

第 5 章 参考文献

1. N. Giummarella, Y. Pu, A.J. Ragauskas, and M. Lawako: A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chem.*, **21**, 1573 (2019).
2. H. Nishimura, A. Kamiya, T. Nagata, M. Katahira, and T. Watanabe: Direct evidence for α ether

- linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. *Sci. Rep.*, **8**, 6538 (2018).
3. N. Giummarella and M. Lawako: Structural basis for the formation and regulation of lignin-xylan bonds in Birch. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **4**, 5319–5326 (2016).
 4. X. Kang, A. Kirui, M.C.D. Widanage, F. Mentink-Vigier, D.J. Cosgrove, and T. Wang: Lignin-polysaccharide interaction in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR, *Nat. Commun.*, **10**, 347 (2019).
 5. D. Floudas, M. Binder, R. Riley, K. Barry, R.A. Blanchette, B. Henrissat, A.T. Martínez, R. Otillar, J.W. Spatafora, J.S. Yadav, A. Aerts, I. Benoit, A. Boyd, A. Carlson, A. Copeland, P.M. Coutinho, R.P. de Vries, P. Ferreira, K. Findley, B. Foster, J. Gaskell, D. Glotzer, P. Górecki, J. Heitman, C. Hesse, C. Hori, K. Igarashi, J.A. Jurgens, N. Kallen, P. Kersten, A. Kohler, U. Kües, T.K.A. Kumar, A. Kuo, K. LaButti, L.F. Larrondo, E. Lindquist, A. Ling, V. Lombard, S. Lucas, T. Lundell, R. Martin, D.J. McLaughlin, I. Morgenstern, E. Morin, C. Murat, L.G. Nagy, M. Nolan, R.A. Ohm, A. Patyshakuliyeva, A. Rokas, F.J. Ruiz-Dueñas, G. Sabat, A. Salamov, M. Samejima, J. Schmutz, J.C. Slot, F. St John, J. Stenlid, H. Sun, S. Sun, K. Syed, A. Tsang, A. Wiebenga, D. Young, A. Pisabarro, D.C. Eastwood, F. Martin, D. Cullen, I.V. Grigoriev, and D.S. Hibbett: The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, **336**, 1715–1719 (2012).
 6. F-S. Krah, C. Bässler, C. Heibl, J. Soghigian, H. Schaefer, and D.S. Hibbett: Evolutionary dynamics of host specialization in wood-decay fungi. *BMC Evol. Biol.*, **18**, 119 (2018).
 7. R. Riley, A.A. Salamov, D.W. Brown, L.G. Nagy, D. Floudas, B.W. Held, A. Levasseur, V. Lombard, E. Morin, R. Otillar, E.A. Lindquist, H. Sun, K.M. Labutti, J. Schmutz, D. Jabbour, H. Luo, S.E. Baker, A.G. Pisabarro, J.D. Walton, R.A. Blanchette, B. Henrissat, F. Martin, D. Cullen, D.S. Hibbett, and I.V. Grigoriev: Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 9923–9928 (2014).
 8. C. Hori, J. Gaskell, D. Cullen, G. Sabat, P.E. Stewart, K. Lail, Y. Peng, K. Barry, I.V. Grigoriev, A. Kohler, L. Fauchery, F. Martin, C.A. Zeiner, and J.M. Bhatnagar: Multi-omic analyses of extensively decayed *Pinus contorta* reveal expression of a diverse array of lignocellulose degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e01133-18 (2018).

学位論文の成果一覧（博士課程在学期間）

1. 学位論文に関する原著論文（2 報）

1. Sangho Koh, Seika Imamura, Naoto Fujino, Masahiro Mizuno, Nobuaki Sato, Satoshi Makishima, Peter Biely, Yoshihiko Amano: Characterization of acetylxyln esterase from white-rot fungus *Irpex lacteus*. *Journal of Applied Glycoscience*, **66** (4), 131-137 (2019).
https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2019_0007
2. Sangho Koh, Masahiro Mizuno, Yuto Izuoka, Naoto Fujino, Hamada-Sato Naoko, Yoshihiko Amano: Xylanase from marine fungus *Pestalotiopsis* sp. AN-7 was activated with diluted salt solution like brackish water., *Journal of Applied Glycoscience*, **68** (1), 11-18 (2021).
https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2020_0011

2. 学位論文に関する総説等（1 報）

1. 高相晃, 水野正浩, 河本啓太, 三森亮, 早川源矢, 天野良彦：イオン液体を用いた天然型キシランの抽出とその構造的特徴. *応用糖質科学*, **10** (2), 76-82 (2020).

3. その他論文（1 報）

1. Yosuke Kageshima, Takumi Yoshimura, Sangho Koh, Masahiro Mizuno, Katsuya Teshima, Hiromasa Nishikiori: Photoelectrochemical complete decomposition of cellulose for electric power generation. *ChemCatChem*, **13**, 1-9 (2021).
<https://doi.org/10.1002/cctc.202001665>

4. 学会発表（14 報、内筆頭 9 報）

1. 高相晃, 水野正浩, 天野良彦： *Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来 CE15 グルクロニルエステラーゼの機能解析. セルラーゼ研究会第 31 回大会, 長野, 2017 年 7 月
2. 千葉康貴, 藤野尚人, 高相晃, 水野正浩, 天野良彦： *Irpex lacteus* NK-1 株由来アセチルキシランエステラーゼの発現及び諸性質の解析. セルラーゼ研究会第 31 回大会, 長野, 2017 年 7 月
3. 高相晃, 今村星香, 千葉康貴, 藤野尚人, 水野正浩, 天野良彦： *Irpex lacteus* NK-1 由来 CE1 アセチルキシランエステラーゼの基質特異性. セルロース学会第 25 回年次大会, 京都, 2017 年 8 月

4. 高相晃, 今村星香, 千葉泰貴, 藤野尚人, 天野良彦, 水野正浩 : 水熱処理抽出した天然型キシランを用いた CE1 エステラーゼの脱アセチル化反応の解析. セルラーゼ研究会第 32 回大会, 長野, 2018 年 7 月
5. 倉崎大城, 高相晃, 藤野尚人, 天野良彦, 水野正浩 : *Irpex lacteus* 由来 GH131 酵素の異種発現と多糖への吸着特性. セルラーゼ研究会第 32 回大会, 長野, 2018 年 7 月
6. 三森亮, 河本啓太, 高相晃, 水野正浩, 天野良彦 : イオン液体を用いた植物細胞壁からのキシラン成分の抽出. 日本応用糖質科学会平成 30 年度大会, 秋田, 2018 年 9 月
7. 高相晃, 三森亮, 河本啓太, 水野正浩, 天野良彦 : イオン液体で抽出されるキシラン成分に対する酵素分解性の評価. 日本応用糖質科学会平成 30 年度大会, 秋田, 2018 年 9 月
8. 高相晃, 河本啓太, 水野正浩, 天野良彦 : イオン液体で抽出したリグニン・ヘミセルロース複合成分の分子量解析. セルロース学会第 26 回年次大会, 福岡, 2019 年 7 月
9. 河本啓太, 高相晃, 水野正浩, 天野良彦 : イオン液体を用いた木質細胞壁構成成分の分画および組成分析. セルロース学会第 26 回年次大会, 福岡, 2019 年 7 月
10. 高相晃, 竹内啓一郎, 河本啓太, 水野正浩, 天野良彦 : キシランに修飾したリグニンおよびアセチル基が酵素反応に及ぼす影響. セルラーゼ研究会第 33 回大会, 長野, 2019 年 8 月
11. 今村星香, 高相晃, 水野正浩, 天野良彦 : *Irpex lacteus* 由来アセチルキシランエステラーゼの人工基質および天然型基質への活性評価. 日本応用糖質科学会 2019 年度大会, 岐阜, 2019 年 9 月
12. 高相晃, 河本啓太, 三森亮, 今村星香, 水野正浩, 天野良彦 : イオン液体を用いた天然型キシランの抽出とその構造的特徴. 日本応用糖質科学会 2019 年度大会・応用糖質科学シンポジウム, 岐阜, 2019 年 9 月
13. 高相晃, 河本啓太, Mika Sipponen, 水野正浩, 鮫島正浩, 天野良彦 : 植物細胞壁から抽出したリグニン-キシラン複合体の酵素分解挙動. 日本応用糖質科学会 2020 年度大会, Web, 2020 年 9 月 9 日～11 日
14. 高相晃, 水野正浩, 天野良彦 : 天然構造類似基質を用いた植物細胞壁分解酵素の研究. 日本応用糖質科学会東日本支部ミニシンポジウム, Web, 2020 年 12 月

5. 受賞等

1. セルラーゼ研究会 ポスター賞

セルラーゼ研究会第 33 回大会，長野，2019 年 8 月

2. 日本応用糖質科学会東日本支部 東日本支部奨励賞

「天然構造類似基質を用いた植物細胞壁分解酵素の研究」，2020 年 6 月

謝辞

本論文は、筆者が生物化学研究室でこれまで取り組んできた研究をまとめたものである。

指導教員として本研究を実施する機会を与えて頂き、その遂行において学術面、技術面ともに多大なるご指導とご助言をして下さった**天野良彦教授**に感謝申し上げます。まだ未熟な私を生物化学研究室のメンバーとして快く迎え入れて下さり、多くの成長の機会を与えて下さり、いつも暖かくご指導を頂きました。私にとって研究室で過ごした7年間は、毎日が充実して貴重な時間でした。

本研究を進めるにあたり、日々の研究活動で丁寧なご指導をしてくださった**水野正浩准教授**に感謝申し上げます。水野先生には、研究面でご指導して頂いただけでなく、多くのご指導をして頂いたことを重ねて感謝致します。時に私は間違った方向に進んでしまうことがありましたが、その度に真摯に私と向かい合って、辛抱強く議論を重ねて下さり、いつも正しく進むべき道を照らして頂きました。また、学会への参加や研究者と接する機会を与えて下さったことは、自分自身の視野を大きく広げるきっかけになりました。

本論文の作製においてご指導とご助言を下さった**鮫島正浩特任教授**に感謝致します。鮫島先生との議論では、いつも新鮮かつ刺激的な発見があり、本研究の価値や意義について深く考えることができました。研究室のゼミにも毎回欠かさずにご出席して頂き、時には遅い時間まで熱く議論に付き合っ下下さり、成長させて下さったことを重ねて感謝致します。

生物化学研究室の諸先輩方、所属学生の皆様には、様々な形でお世話になりました。本研究で重要となる組換え酵素の作製の実験（本論文第2章）では、同研究室卒業生の**出岡佑斗氏、橋本和慈氏、千葉康貴氏、今村星香氏**をはじめとする多くの方にご協力を頂き進めることができました。イオン液体によるLXCの単離の実験（本論文第4章）では、同研究室卒業生の**三森亮氏、河本啓太氏**にご協力を頂き進めることができました。皆様のご協力に心から感謝申し上げます。また、事務手続きをはじめとして多くの仕事をお引き受けくださり、研究室を支えて下さった事務補佐員の**込山嘉津さん、小林里子さん**に深く感謝申し上げます。いつも優しくお声掛け下さり毎日の励みになりました。お一人ずつお名前を挙げることはできませんが、それぞれのお立場から様々な形でのお力添えがあり、本研究を遂行することができました。本当にありがとうございました。

学士課程在籍時に、研究に対する姿勢や遺伝子実験の基礎を丁寧にご指導下さった信州大学学術研究院（工学系）酵素化学研究室の**野崎功一准教授**に感謝申し上げます。同研究室博士研究員の**藤野尚人博士**には、酵母の扱い方や、遺伝子組換え実験をはじめ多くのご指導を頂き、また困ったことがある度に相談に

乗って頂き、いつもの的確なアドバイスを頂きました。同研究室卒業生の**西島拓人博士**と**郭博洋博士**には、博士課程進学において多くの相談と、励ましを頂きました。心より感謝申し上げます。

HPLC の分析法の基礎、扱い方を教えて下さった協和化成株式会社の上條岳巳様に感謝申し上げます。分析機器を日々使い続ける上でのメンテナンスにご協力いただいただけでなく、実験についての多くのことを相談に乗って頂き、いつもの的確なご助言を頂いたおかげで、円滑に実験を進めることができました。

本論文の第 3 章で扱ったモデル基質の LC-MS 分析では、長野県工業技術総合センター食品加工部門研究員の**山崎慎也様**に大変お世話になりました。快く分析装置を利用させて頂いただけでなく、実験的相談にも多くのご助言を頂き、目的化合物の構造を決定することができました。

本論文の第 3 章で扱ったモデル基質の化学合成の際、丁寧なご指導とご助言を頂きました信州大学学術研究院（繊維学系）**大川浩作教授**に感謝申し上げます。大川先生には、快く実験室を利用させて頂いただけでなく、国際シンポジウムへの参加の機会を与えて頂きました。また、化学合成の実験では、信州大学大学院 信大-理研連携研究室の**金山直樹准教授**にも大変お世話になりました。金山先生には、有機化学合成実験の基礎的な作法や目的化合物合成のための的確なご指導とご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。

I would like to express my appreciation to Drs. **Monika Österberg, Paavo Penttilä, Mika Sipponen** and lab members in Aalto University in Finland.

副査として本論文をご精査頂き、貴重なコメントの数々を賜りました信州大学学術研究院（繊維学系）**田口悟朗教授**、信州大学学術研究院（繊維学系）**野川優洋准教授**、並びに外部審査委員を務めて頂いた農業・食品産業技術総合研究機構ユニット長の**徳安健博士**にこの場を借りて御礼申し上げます。

また、本研究は JSPS 科研費 (17K07874) などの助成を受けて行われました。さらに、信州大学大学院サステイナブルソサイエティグローバル人材養成プログラムからは、国内外での学会、研究会参加のための支援を頂いたほか、海外留学、企業インターンシップを行うための助成を頂きました。本プログラムでの様々な活動を経験して、研究者として大きく成長を遂げることができたと感じております。この場を借りて、プログラム代表の**佐藤敏郎教授**と**故宮入圭一名誉教授**、並びに事務局の**藤澤和子さん**に心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、いつもそばで支えてくれた飯田葵さん、そして、自分のやりたいことを応援してこれまで育ててくれた父、母、兄弟に感謝を表し、謝辞とさせていただきます。

2021 年 3 月
高 相 昊