

## 博士論文審査の結果の要旨

氏名	高 相昊
学位名	博士 (工学)
学位番号	甲第 744 号
論文題目	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
論文審査委員	主査 天野 良彦 田口 悟朗 野川 優洋 水野 正浩 徳安 健(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)

(博士論文審査の結果の要旨)

本博士論文は、地球上で最大のバイオマス資源である植物細胞壁のうち、植物細胞壁中のセルロースとリグニンを接着する役割をもつリグニン-糖複合体 (Lignin Carbohydrate Complex : LCC) に着目し、これらの微生物酵素による分解機構の一端を明らかにしようとするものである。近年、植物細胞壁の酵素分解において、植物細胞壁の個別成分の分解だけでなく、各成分に跨る領域に対する酵素の作用機序解明の重要性が認識されつつある。一方で、こうしたことを明らかにするのに適した基質がないという課題がある。本論文では、こうした課題に対して、酵素と基質の両面からアプローチすることで、新たな知見を得ると同時に、複雑な植物細胞壁構造を明らかにするための手法の提案に至っている。以下に本博士論文の構成及び得られた成果についてまとめる。

第 1 章では、植物細胞壁の構造とそれを分解する酵素との関係が概説され、複数の成分から形成される固体基質に対する酵素の作用を分析することの難しさについて論述されている。また、既存の基質だけでは新たな知見を得ることの限界が述べられている。その上で、本論文ではイネ科植物や広葉樹に豊富に存在すると考えられるリグニン-キシラン複合体 (LXC) に焦点を当て、上記の研究目的を達成するための概略が述べられている。

第 2 章では、LCC の分解に関与すると考えられるアセチルキシランエステラーゼ (AXE)、グルクロノイルエステラーゼ (GE)、グルクロニダーゼ (AGU) 及びキシラナーゼ (XYN) の単一酵素としての取得についてまとめられている。いずれの酵素も木質を分解可能な担子菌および子囊菌から取得されており、遺伝子組換えによる異種発現系を構築して生産され、その酵素化学的性質が明らかにされている。

第 3 章では、LXC においてリグニンとキシランとの結合点の一つとなるベンジルエステル結合に着目し、この結合に作用する GE の評価が行われている。本項目の新規性は、天然の構造を模倣した基質を酵素処理および化学合成により調製した点にある。すなわち、キシランを XYN で処理して得たグルクロノキシロオリゴ糖 (1,2<sup>3</sup>- $\alpha$ -D-(4-O-methyl-glucuronoyl)-1,4- $\beta$ -D-xylotriase : MeGlcA<sup>3</sup>Xyl<sub>3</sub>) に、ベンジルブロマイドを用いてベンジル基をエステル結合させた benzyl-1,2<sup>3</sup>- $\alpha$ -D-(4-O-methyl-glucuronoyl)-1,4- $\beta$ -D-xylotriase (Bnz-MeGlcA<sup>3</sup>Xyl<sub>3</sub>) の合成に成功している。本基質に対する GE の速度パラメータを算出したところ、 $K_m$  値が 0.47 mM であり、ターンオーバー数  $k_{cat}$  は 42.1 s<sup>-1</sup>、触媒効率を示す  $k_{cat}/K_m$  は 89.6 と、これまで使用されていた市販のベンジルグルクロン酸 (Bnz-GlcA) に対する  $k_{cat}/K_m$  (0.22) と比べて 407 倍も高く、GE の酵素反応性をより適切に評価可能な基質であることが示された。本研究で作製した Bnz-MeGlcA<sup>3</sup>Xyl<sub>3</sub> を用いることで、リグニンとキシランの界面と酵素の分解機構の詳細解明に役立つものと期待される。

第 4 章では、LXC の部分構造ではなく、より実際の LXC に近い基質の調製を目指し、イオン液体 [Emim][OAc] を用いた植物細胞壁分画方法を確立した。草本植物であるエリアンサス及び木本

植物であるナラ木の 2 種類の植物原料から、リグニンとキシランに富む 2 つの画分が得られることが成分分析によって示され、また、FTIR 分析より、エステル結合に由来する吸収や、リグニン骨格に特異的な吸収が示されている。更に、第 2 章で得られた GE や XYN を作用させることによりこれらの画分中に LXC が含まれることを証明すると同時に、AGU や AXE を含む酵素による分解機構解明の発展に貢献するための基礎的な知見を提供している。

第 5 章では全体を総括し、植物細胞壁の複雑なコンポジット構造の解明に資するモデル基質の合成と、天然型の基質の調製に成功したことによる、微生物によるバイオマス資源の分解機構に迫る重要な知見を与えたことを述べている。

以上のような内容は、自然界での植物細胞壁の循環における微生物が関与するシステムの解明に資するとともに、これをバイオマス資源の活用に活かす応用面にも貢献する研究であり、博士論文として十分な内容を含むものと評価される。

(公表主要論文名)

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