

博士論文の内容の要旨

氏名	高 相 昊
学位名	博士（工学）
学位授与年月日	2021年3月20日
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

(博士論文の内容の要旨)

持続可能な社会の実現には、再生可能資源である非可食性リグノセルロース系バイオマスの利活用の推進が不可欠である。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は、酵素糖化によって低分子化合物に変換することで、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。

植物細胞壁に含まれるキシランは、ヘミセルロースの主成分であり、主鎖を構成するキシロース残基に対してアセチル基、側鎖糖のグルクロン酸やアラビノースが付加された分岐鎖多糖である。天然状態でキシランは、側鎖糖を介してリグニンと結合したリグニン-多糖複合体 (lignin-carbohydrate complex, LCC) を形成するため、細胞壁中のリグニンとセルロースを繋ぐための接着成分として機能しており、酵素糖化の際のボトルネック構造である。本論文では、LCCのうちでも草本類や広葉樹の主要成分であるリグニン-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基質を作製するとともに、天然型のリグニン-キシラン複合体を単離し、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。

1. 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

天然型の LXC には糖とリグニンの間の共有結合のほかにも、種々の結合が存在することが言われているが、その詳細な構造についてはいまだ明らかにされていない。そこで、エステル結合を含む天然型キシランの分解に関わる複数の酵素を用いて、構造解明を行うために、それぞれの単一酵素を得ることにした。*Pichia pastoris* の異種発現システムを利用することで、糸状菌由来のグルクロノイルエステラーゼ (GE)、キシラナーゼ (XYN)、アセチルキシランエステラーゼ (AXE)、グルクロニダーゼ (AGU) を組換え生産した。これらの4つのモノコンポーネント酵素は LXC を単糖にまで分解するためのキー酵素と考えられる。本章では個別酵素の酵素化学的性質を明らかにした。

2. 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

GE の本来の基質に対する作用を解析するため、LXC の架橋結合の部分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。本基質はリグニンとキシランの両構造の基本的な骨格を有するベンジルエステル結合のモデル基質 (Bnz-MeGlcA³Xyl₃) である。この基質に対する GE の酵素活性値は、天然構造が欠損した市販基質と比べて顕著に高く、酵素が極めて厳密にキシランの糖骨格を認識していることを明らかにした。これらの結果より、GE は実際に LXC の分解に関与している可能性を支持するものであり、LXC 分解酵素の活性評価の新たな評価系を提案するものである。

3. 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

作製したモデル基質は、GE の LXC 分解活性の評価のための基質としては有用であるが、天然の基質に対する本来の作用については明らかとなっていない。そこで、植物細胞壁から天然状態の LXC そのものを抽出する方法について検討した。イオン液体 (IL) を抽出溶媒として用いた結果、既存法のアルカリ抽出法では脱離してしまう LXC のエステル結合が維持されていることが明らかとなった。このことは、IL 抽出法では、細胞壁中の共有結合を損ねることなく、非共有結合の分解により個々の構成成分が分離されたためと考えられる。この単離した基質 (LXC) と前章

で調製した酵素を用いて、高分子成分の低分子化の挙動を解析し、キシラン主鎖の分解に加えてエステル結合の開裂についても考察した。これらの結果は、天然の LXC の酵素分解に関する新たな知見を与えるものである。

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構造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。これらの知見は、自然界における植物細胞壁の構造とその酵素分解機序に関する重要な情報を提供するものであり、これまで知られていない重要な酵素の発見やバイオマスの高効率変換システムの構築に貢献することが期待される。