

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07874

研究課題名(和文)水熱処理及びイオン液体処理から得られる天然型キシランの構造と酵素による分解挙動

研究課題名(英文)Structure of xylan prepared by hydrothermal and ionic liquid treatment and its enzymatic degradation behavior

研究代表者

水野 正浩(Mizuno, Masahiro)

信州大学・学術研究院工学系・准教授

研究者番号：60432168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞壁成分の一つであるキシランは、エステル結合による修飾を多く含み、既存のアルカリ抽出法では、天然状態の形で抽出することが難しい。本研究では、天然型キシランに対するキシラン分解酵素の反応性を明らかにすることを目的とし、イオン液体による天然型キシランの抽出と、その構造解析、酵素分解性評価を行った。その結果、イオン液体抽出によりアセチル基だけでなく、リグニンとの結合も含む天然型キシランが得られた。また、キシラン分解酵素の反応性から、アセチル基やリグニンが酵素分解を妨げていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオマスの利活用を推進する上で、植物細胞壁の2～3割を占めるキシランなどのヘミセルロースの利用は重要となる。本研究では、イオン液体を用いることで、植物細胞壁から天然状態のキシランを調製する方法を構築した。本成果は、植物の種類によって大きく構造が異なるため、統一的な理解が進んでいなかったキシランの構造を正確に把握するための手法を提供するものである。これにより、キシランの酵素分解に必要な情報を蓄積することが可能となり、更なるキシラン利用の拡大につなげることに貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Xylan is one of the plant cell wall components. As it contains some acetyl substituents attached to the xylan backbone, it is difficult to extract in the natural state using general alkali extraction methods. In this study, for the purpose of clarifying the reactivity of xylan-degrading enzyme to natural xylan, extraction of natural xylan by ionic liquid, its structure analysis and evaluation of enzymatic degradability were performed. As a result, natural xylan containing not only acetyl group but also binding to lignin was obtained by ionic liquid extraction. In addition, it was shown that the reactivity of xylan-degrading enzyme was hindered by acetyl group and lignin.

研究分野：木質科学

キーワード：植物細胞壁 イオン液体 リグニン 糖複合体 キシラン キシラナーゼ アセチルキシランエステラーゼ -グルクロニダーゼ 4-O-メチルグルクロニルエステラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化やプラスチック製品による環境汚染問題などを背景に、セルロース系バイオマスの有効活用は、世界的にますます強く求められている。セルロース系バイオマスに含まれる植物細胞壁は、主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンの3成分から構成されており、セルロースについては、バイオエタノールなどの液体燃料化や、セルロースナノファイバーといった材料化が強力に進められている。また、近年では、リグニンについても機能性高分子材料としての応用研究が展開されている。一方、ヘミセルロースについては、未だに有効な活用方法が見出されていないのが現状である。こうした背景には、植物細胞壁における天然状態でのヘミセルロースの構造情報が不足していることが挙げられる。例えば、ヘミセルロースの1つであるキシランには、キシラン主鎖にアセチル基がエステル結合により付加されている。また、リグニンとキシランとの間には、リグニンモノマー中の水酸基とキシラン側鎖である4-O-メチルグルクロン酸のカルボキシ基によるエステル結合が存在している。しかし、こうしたエステル結合は、キシランやリグニンの一般的な抽出法であるアルカリ処理により、容易に加水分解を受けてしまう。その結果、市販のキシラン基質はエステル結合を含んでおらず、天然状態のキシランの酵素分解を考える際の基質には適していない。

これまでに、我々は、亜臨界状態(高温・高圧)の水を用いてバイオマスを連続的に処理することで、植物細胞壁中のキシランが、数~数十程度の重合度幅を有する可溶性のキシロオリゴ糖となって可溶化すると同時に、アセチル基やフェルラ酸基などの修飾基が残存した状態であることを明らかにしてきた。また、イオン液体(IL)を用いて植物細胞壁を溶解させると、植物細胞壁成分であるセルロース、キシラン、リグニンをそれぞれに分画できる可能性があることを見出ししてきた。

### 2. 研究の目的

本研究は、植物細胞壁内に含まれるキシラン構造の多様性に着目し、天然での構造を維持したキシラン画分を調製することで、実バイオマスに対する酵素の正確な反応特性を解析し、キシラン成分の利用拡大に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。具体的には、(1)天然状態のキシラン画分調製法の確立、(2)精製酵素を用いたキシラン画分への作用機序の解明、(3)植物起源の違いによる構造特性を明らかにし、実バイオマスのヘミセルロースの利用拡大に向けたデータの蓄積を図ることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (3-1)天然状態のキシラン画分調製法の確立

本研究では、バイオマスとして、草本であるエリアンサスと木質として広葉樹のナラを使用した。いずれも乾燥後に粉末化し、60メッシュのふるいを通したものを実験試料として用いた。ILには1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][OAc])を用いて、各種細胞壁の抽出に適した温度(120°C-160°C)での抽出、分画条件を検討した。IL抽出処理によって得られたキシランについて、中性糖及び酸性糖の単糖組成分析、アセチル基の含有量測定、リグニン量の分析、及びサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による分子量解析を行った。

#### (3-2)精製酵素を用いたキシラン画分への作用機序の解明

海洋性子囊菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7 からキシラン主鎖に作用するキシラナーゼ (*PesXyn10A*)、白色腐朽菌 *Irpex lacteus* からキシランに修飾したアセチル基を加水分解するアセチルキシランエステラーゼ (*IIAXE1*)、キシラン側鎖である4-O-メチルグルクロン酸基を加水分解する $\alpha$ -グルクロニダーゼ (*IIAgu115*)、4-O-メチルグルクロン酸基とリグニンとのエステル結合を加水分解する4-O-メチルグルクロニルエステラーゼ (*PesGE*) の4つの酵素を、酵母 *Pichia pastoris* の発現系を利用して生産し、精製後にそれぞれをモノコンポーネント酵素として使用した。酵素反応の解析は、遊離したキシロース、キシロオリゴ糖、酢酸についてHPLCを用いて定量することによって行なった。

#### (3-3)植物起源の違いによる構造特性の比較

ILによってエリアンサス及びナラから抽出したキシランの構造的特徴を比較するために、抽出試料に対するフーリエ変換型赤外分光(FT-IR)測定を行い、エステル結合やリグニンの結合状態に関する情報収集を行った。

### 4. 研究成果

#### (4-1)天然状態のキシラン画分調製法の確立

まず、イネ科植物であるエリアンサスを用いて、IL処理によって可溶化された細胞壁溶解液から、キシラン成分の分離を試みた。図1に、[Emim][OAc]への溶解成分の分画方法を示した。原料濃度が3wt%、140°C、3時間の溶解条件では、原料エリアンサスの86.6%がILへと溶解した。このILに溶解した細胞壁成分から、脱イオン水の添加による再析出操作によって、セルロースを主体とするグルカンを含む成分を除去することができた。次いで、ILに溶解したままの状態に残ったキシラン成分は、透析操作によって、原料から17%の収率で回収することに成功した。また、この透析過程で、水不溶性のリグニンを多量に含むキシラン(D-P画分)と、

水溶性のキシラン (D-S 画分) の 2 成分に分画された。これらの 2 種類の IL 抽出キシランの構造を明らかにするために、キシランに修飾した側鎖構造を HPLC によって分析すると、従来のアルカリ抽出法では分解されてしまうフェルラ酸エステル、クマル酸エステル、酢酸エステルが、抽出操作後も修飾状態のまま残存していることが明らかとなった。さらに、IL 抽出キシランのリグニンとの結合について考察するため、リグニンの吸収波長を指標とした SEC 分析によって分子量分布ならびに、キシラン分解酵素処理の併用による分子量の変化を詳細に解析した。その結果、IL 抽出キシランは、アルカリ抽出法で得たキシラン成分の分子量分布とは異なり、リグニンとキシランが単に混合しているだけではなく、同一の分子として複合化したリグニン-多糖複合体として存在していることが明らかとなった。以上の結果から、IL を用いることで、植物細胞壁から天然に近い状態のままキシランを抽出・分離することが可能な、新たな調製方法を確立させることに成功した。

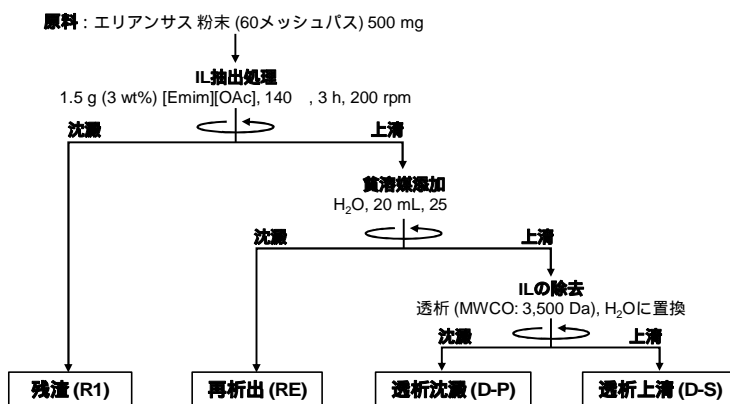


図 1 イオン液体を用いたバイオマスの溶解処理液及び溶解成分の回収方法

#### (4-2) 精製酵素を用いたキシラン画分への作用機序の解明

本研究では、(4-1) で調製したキシランの構造解析及び、酵素反応性を明らかにするために、*PesXyn10A*、*IIAXE1*、*IIAgu115*、*PesGE* の 4 つの酵素について、*P. pastoris* を異種発現宿主として用いた組換え酵素として調製することに成功した。

*IIAXE1* については、パラニトロフェノールアセテートを基質とした従来の活性評価系に加えて、コーンコブの水熱処理により得られたアセチル基とフェルラ酸エステルを有するキシランを基質として、基質特異性を評価した。その結果、本酵素はフェルラ酸エステルには作用せず、キシラン上のアセチル基を特異的に分解する酵素であることが明らかとなった (図 2)。一方、本酵素によるキシランからのアセチル基の遊離率は 100% には到達しなかった。これは、アセチル基に近接する 4-O-メチルグルクロン酸などの他の置換基による立体障害によるものだと考えられた。以上の結果から、天然状態のキシラン分解には、複数酵素の協調的な作用による立体障害の解消が必要になると考えられた。

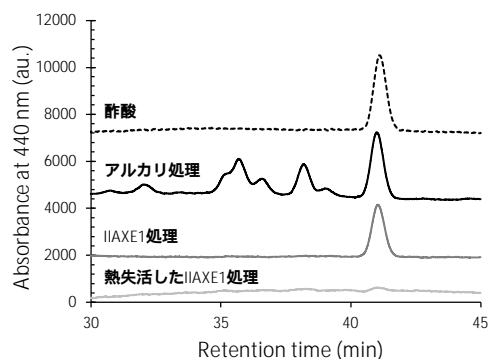


図 2 コーンコブキシランから *IIAXE1* の酵素反応によって遊離される酢酸の HPLC による定量

次に、IL 抽出法で得られた天然型キシランを基質として、上記で得た 4 種類のキシラン分解酵素群を組み合わせることで作用させ、キシラン分解活性を評価した。キシラン主鎖の修飾基や側鎖に作用する *IIAXE1* 及び *IIAgu115* の添加により、キシラン主鎖分解を行う *PesXyn10A* の分解促進が期待されたが、いずれの酵素の組み合わせにおいても明確な相乗効果は認められなかった。これは、酵素反応中に白色沈澱が生じる様子が観察されたことから、修飾基や側鎖の除去により、キシラン主鎖の溶解性が低下し、キシラナーゼが作用する前にキシランが凝集沈澱してしまうためだと考えられた。本結果は、キシランの酵素分解においては、これまでに議論されてきた側鎖修飾基の分布情報だけでなく、キシランの側鎖修飾基の脱離に伴うキシラン自体の高次構造変化についても考慮する必要があることを示すものである。

#### (4-3) 植物起源の違いによる構造特性の比較

植物の種類の違いによる、キシラン構造の特徴を比較するために、エリアンサスを用いて確立した IL によるキシラン抽出法を、木質植物であるナラに対しても適応可能か検討した。ナラの場合、エリアンサスと同条件では原料粉末の IL への溶解性が低く、より高温 (160°C) での処理条件によって IL への溶解量が増加し、キシラン画分の抽出が行えることが明らかとなった。エリアンサスと比較して、ナラで IL 処理温度が高くなったのは、木質細胞壁では草本細胞壁と比べてリグニンやセルロースなどの他の植物細胞壁成分と高度に複合化している可能性が示唆された。FT-IR による解析から、エリアンサス及びナラから得た IL 抽出キシランには、アセチル基やリグニンとの複合化に関与するエステル結合の存在を確認することができた。今後は、これらの IL 抽出キシランを酵素分解させて得られる断片物に対する構造解析を進めることで、より詳細な構造的な特徴の比較を行うことが可能になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koh Sangho, Imamura Seika, Fujino Naoto, Mizuno Masahiro, Sato Nobuaki, Makishima Satoshi, Biely Peter, Amano Yoshihiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Characterization of Acetylxyylan Esterase from White-Rot Fungus Irpex lacteus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 131 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.JAG-2019_0007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 高相昊、水野正浩、河本啓太、三森亮、早川源矢、天野良彦	4. 巻 10
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 76-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高相昊、河本啓太、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 セルロース学会第26回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河本啓太、高相昊、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 セルロース学会第26回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高相昊、竹内啓一郎、河本啓太、三森亮、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 イオン液体で抽出した天然型キシランを基質とする酵素反応性の解析
3. 学会等名 セルラーゼ研究会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高相昊、河本啓太、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 イオン液体抽出法によって得られた天然型キシランのアセチル修飾基構造の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会（第68回）・応用糖質科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村星香、高相昊、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会（第68回）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高相昊、今村星香、千葉康貴、藤野尚人、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 セルロース学会第25回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高相昊、今村星香、千葉康貴、藤野尚人、天野良彦、水野正浩
2. 発表標題 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
3. 学会等名 セルラーゼ研究会 第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉崎大城、高相昊、藤野尚人、天野良彦、水野正浩
2. 発表標題 Irpex lacteus由来GH131酵素の異種発現と多糖への吸着特性
3. 学会等名 セルラーゼ研究会 第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高相昊、三森亮、河本啓太、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会（第67回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三森亮、河本啓太、高相昊、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 イオン液体処理における植物細胞壁多糖成分の溶解と回収
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会（第67回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高相昊、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 Pestalotiopsis sp. AN-7由来CE15 グルクロニルエステラーゼの機能解析
3. 学会等名 セルラーゼ研究会 第31回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 千葉康貴、藤野尚人、高相昊、水野正浩、天野良彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 セルラーゼ研究会 第31回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masahiro Mizuno, Genya Hayakawa, Yoshihiko Amano
2. 発表標題 Ionic liquid treatment and enzymatic degradation of soft biomass
3. 学会等名 The 4th International Cellulose Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	天野 良彦	信州大学・工学部・教授	糖質の構造解析など
	(Amano Yoshihiko)		
	(80273069)	(13601)	