

「イオン液体と酵素を用いた植物細胞壁構造の精密解析」

信州大学工学部 水野正浩

【背景及び目的】

植物細胞壁の利活用におけるボトルネックは、植物細胞壁の構成成分 (セルロース, ヘミセルロース, リグニン) 間の相互作用に関する情報が少ない点である。特に、リグニンとヘミセルロースなどの糖が共有結合により架橋されたリグニン-糖質複合体 (lignin-carbohydrate complex, LCC) は、酵素分解を行う際に重要な分解対象になる。近年、NMR による高度な分析手法により LCC に含まれる架橋結合が証明されつつあるが、こうしたミクロな構造情報だけでなく、LCC 全体のマクロな構造情報はあまり得られていない。

本研究では、リグニンと草本や広葉樹等のヘミセルロースの主成分であるキシランとの複合体 (lignin-xylan complex, LXC) に着目し、細胞壁溶解性を示すイオン液体を用いて調製された LXC の化学構造を、遺伝子組み換えにより取得した単一酵素処理及び NMR を中心とした機器分析とを組み合わせた研究手法により解析することを目的とした。

【方法】

1. 植物細胞壁分解酵素の機能解析

白色腐朽菌 *Irpex lacteus* NK-1 より α -L-アラビノフラノシダーゼ (*I*Abf51A) をコードする cDNA を取得し、酵母 *Pichia pastoris* を用いて異種発現系を構築した。発現確認後、*I*Abf51A は疎水性カラム (TOYOPEARL Butyl-650) を用いて精製を行った。精製後、*I*Abf51A の温度及び pH に対する性質を、*p*-ニトロフェニル α -L-アラビノフラノシド (*p*NPAraf) を用いて測定した。天然基質としては、 $2^3,3^3$ -di- α -L-arabinofuranosyl-xylotriose (A^{2^3XX}) 及び 3^2 - α -L-arabinofuranosyl-xylobiose (A^{3X})、小麦アラビノキシランを用いた。

2. LXC の構造解析

エリアンサス粉末をイオン液体 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][OAc]) に 3 wt%になるように加え、溶解処理を行なった。その後、既報の手法によって分画を行い、水溶性の LXC 混合画分 (DiS) を分画した。さらに、DiS から遊離のオリゴ糖やリグニン成分を除去するためにエタノール沈澱を行い、沈澱物である EtP 画分を得た。この EtP に対して FT-IR, HPLC, NMR 等の分析を行い、化学構造情報の取得を行った。

【結果及び考察】

1. 植物細胞壁分解酵素の機能解析

得られた組換え体 *IIAbf51A* は, *pNPAraf* に対して 45.4 U/mg の比活性を示した。*IIAbf51A* の至適 pH は 3.0, 至適温度は 50 °C であった。また, pH 2.5-8.0, 30-40 °C で最大活性の 80 % 以上の残存活性を保持していた。*IIAbf51A* の *pNPAraf* に対する K_m 値は 0.94 mM, k_{cat} 値は $1.09 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ であった。アラビノース側鎖を有するアラビノキシロオリゴ糖 ($A^{2,3}XX$ 及び A^3X) に *IIAbf51A* を反応させた結果, アラビノース一置換体及び二置換体の両方に分解活性を示した。また, 小麦アラビノキシランに *IIAbf51A* を反応させた結果, アラビノースの遊離が確認されたことから, *IIAbf51A* は短鎖だけでなく長鎖基質に対しても反応することが明らかとなった。

2. LXC の構造解析

EtP の IR スペクトル分析より, 1733 cm^{-1} のエステル結合の C=O 伸縮運動に起因するピークが確認され, このピークはアルカリ処理により減少した。同時に, HPLC によってフェルラ酸及び *p*-クマール酸の遊離が確認された。更に, NMR によりエステル結合及びフェニルグリコシド結合が同定された。以上の結果より [Emim][OAc] によって抽出される LXC にはフェルロイルエステル結合及びフェニルグリコシド結合が含まれることが明らかとなった。

本研究では, 草本由来の LXC の構造解析に必要となる α -L-アラビノフラノシダーゼの取得と基質特異性の解明に成功した。また, NMR により LXC に含まれる架橋構造を同定することにも成功した。今後は, これらを組み合わせてより詳細な LXC の構造解析を進めていき, 酵素を用いた植物細胞壁の利活用に貢献したいと考えている。

1. 鈴垣光, 水野正浩, 高相昊, 田川聡美, 鮫島正浩, 天野良彦: イオン液体を用いた草本バイオマスからのリグニン-キシラン複合体の分画. PA31, セルロース学会第 28 回年次大会
2. 西良典, 水野正浩, 高相昊, 河本啓太, 田川聡美, 鮫島正浩, 天野良彦: イオン液体と酵素分解による木質リグニン-キシラン複合体の分画. PA30, セルロース学会第 28 回年次大会
3. 矢田江里奈, 高相昊, 田川聡美, 鮫島正浩, 水野正浩, 天野良彦: *Irpex lacteus* NK-1 が生産する α -L-アラビノフラノシダーゼの異種発現系の構築及び性質解析. 日本応用糖質科学会 2021 年度大会

謝辞

杉山産業化学研究所研究助成により, LCC の構造解析に必要となる酵素及び分析手法の基盤を築くことができました。多大なるご支援をいただき, 心より御礼申し上げます。