

## 「リグニン/キシラン複合体に作用する酵素の取得と性質の解明」

信州大学工学部 水野正浩

### 1. 背景及び目的

植物細胞壁の利活用には、構成成分を最小単位にまで分解する必要があり、酵素分解は環境負荷の低い手法として魅力的である。しかし、植物細胞壁を構成するセルロース・ヘミセルロース・リグニンは、天然では種々の官能基による修飾や、各成分間における相互作用等により複雑な構造を形成しているため、酵素分解を受け難い。一般的に、酵素研究では反応相手となる基質の構造が明らかになっているものを利用する。そのため、天然の植物細胞壁の酵素分解においては、より天然の構造を反映した基質を調製することが重要となる。本研究では、イオン液体抽出法によって調製されるリグニン/キシラン複合体 (LXC) に着目し、LXC に含まれる化学結合の構造を明らかにすると同時に、LXC の完全分解に必要となる LXC 分解酵素の諸性質を明らかにすることを目的とした。

### 2. 実験方法

#### 2-1. キシラン/リグニン複合体構造の構造決定

エリアンサス（草本）及びナラ（広葉樹）の乾燥粉末を、3wt%になるようにイオン液体 ([Emin][OAc]) に加え、140 °C（エリアンサス）及び 160 °C（ナラ）で 180 分の溶解処理を行った。脱イオン水の添加によりセルロースを再析出させ除去した後、更に透析チューブを用いてイオン液体の除去を行った。この際、透析チューブ内に生じる沈澱画分を DiP、溶液に解けた状態の画分を DiS とし、それぞれ凍結乾燥粉末として調製した。LXC 混合画分となる DiP 及び DiS 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。

#### 2-2. リグニン/キシラン複合体に作用する分解酵素の取得と機能解析

白色腐朽菌 *Irpex lacteus* NK-1 より既に得られている  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ (IIAbf51A) に加え、海洋性子囊菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7 から取得したキシラナーゼ (*PesXyn10A*) 及びグルクロノイルエステラーゼ (*PesGE*) の LXC への反応性や、酵素学的な諸性質を決定した。

### 3. 結果及び考察

#### 3-1. キシラン/リグニン複合体構造の構造決定

エリアンサスの DiS 画分をエタノール沈澱して得られた多糖画分 (EtP) については、既

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ていたが、ナラの DiS 画分から同様にして得られて EtP の NMR 分析では、エステル結合及びフェニルグリコシド結合の存在が確認できなかった。ナラのイオン液体処理は、エリアンサスの 140 °C よりも更に高い 160 °C で行っており、溶解処理中に分解が進んでいる可能性が示唆された。また、試薬グレードのキシランを用いてイオン液体 ([Emim][OAc]) 処理を行うと、処理温度が 130 °C 以上になるとイオン液体のアニオンに由来するアセチル化が起こることも明らかとなった。一方、エリアンサスの EtP に対してアルカリ処理及び *PesXyn10A* を行うと、芳香族環を有する比較的 low molecular weight のオリゴ糖が得られることも明らかとなった。これらは、フェニルグリコシド結合等で結合した LXC の可能性もあるため、更なる構造決定を進めたい。

### 3-2. リグニン/キシラン複合体に作用する分解酵素の取得と機能解析

本研究では、LXC を形成する化学結合のうち、キシランのグルクロン酸側鎖とリグニン間で形成されるエステル結合に作用する *PesGE* の酵素学的諸性質の解析を中心に進めた。*PesGE* の X 線結晶構造解析によって 2.7-Å 分解能での初期構造が決定され、更に本酵素が作用するエステル結合を含む天然型基質を合成し、速度論的な解析を行うことに成功した。これらにより、*PesGE* は LXC 中のグルクロン酸側鎖を厳密に認識し、リグニン部分については比較的緩やかな認識を示すことが示唆された。

今回の研究では、イオン液体を用いることで草本及び広葉樹から LXC を含む画分が得られることが示された。一方で、イオン液体へのバイオマスの溶解量を増やすことを目的に処理温度を上げると、LXC の収率が下がることや、修飾基の導入などが起こることが新たに示された。こうした知見をもとに、更なるイオン液体による LXC の分取効率をあげる手法を構築していきたい。LXC に作用する酵素としては、残念ながら LXC に作用する新規酵素の取得には至らなかったが、既に得られている酵素の作用特性などを構造情報とともに明らかにすることができた。また、複数の酵素間による相乗効果なども確認されつつあり、天然の LXC に対する酵素分解の作用機序が明らかになりつつある。今後は、本研究で得られた知見をもとに、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。

### 成果報告

1. 水野正浩, 阿部佑介, 福岡遥奈, 田川聡美, 鮫島正浩, 天野良彦: *Irpex lacteus* 由来  $\alpha$ -グルクロノダーゼの酵素学的諸性質の解析. Aa1, 日本応用糖質科学科 2022 年度大会, 2022 年 8 月
2. 西良典, 水野正浩, 田川聡美, 鮫島正浩, 天野良彦: グルクロノイルエステラーゼを用いた広葉樹リグニン-キシラン複合体の構造解析. 第 53 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2J07, オンライン, 2022 年 11 月

3. 阿部佑介, 水野正浩, 高相昊, 田川聡美, 鮫島正浩, 殿塚隆史, 天野良彦 : *Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来グルクロノイルエステラーゼの反応特異性と立体構造解析. B1p-8, 日本応用糖質科学科 2023 年度大会, 2023 年 9 月
4. 水野正浩, 矢田江里奈, PAN KAITONG, 田川聡美, 榎島聡, 鮫島正浩, 天野良彦 : *Irpex lacteus* 由来  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの酵素学的諸性質の解析. B1p-9, 日本応用糖質科学会 2023 年度大会, 2023 年 9 月
5. Masahiro MIZUNO, Yasuko SAITO, Akio KUMAGAI, Satomi TAGAWA, Yoshihiko AMANO : Structural characterization of lignin-xylan complex extracted by ionic liquid. PB12, The 5<sup>th</sup> International Cellulose Conference (ICC2022+1), 2023 年 9 月
6. 夜久優太, 水野正浩, 田川聡美, 鮫島正浩, 天野良彦, 齋藤靖子, 熊谷明夫 : 植物細胞壁分解酵素を用いたエリアンサスのリグニン-糖質複合体の構造解析. P063, セルロース学会第 30 回年次大会, 2023 年 9 月

## 謝辞

杉山産業化学研究所研究助成により, LXC 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。