

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18723

研究課題名(和文) ミクロフィブリルの長さ方向に存在する非晶領域とヘミセルロースの相互作用

研究課題名(英文) Interaction of hemicellulose with disordered regions along cellulose microfibril

研究代表者

堀川 祥生 (Horikawa, Yoshiki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：90637711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：効率的なバイオマス変換を行うためには、細胞壁の構造を正しく理解する必要がある。ヘミセルロースはセルロースの表面で水素結合を介して相互作用していると考えられている。しかし、この水素結合を切断するのに十分なアルカリ処理を行っても完全にヘミセルロースを除去できない。このような背景からセルロースの非晶領域を特異的に切断するエンドグルカナーゼを用いて、これら両成分間における相互作用の探索を試みた。興味深いことにスギセルロースの重合度減少に伴ってキシランとマンナンの含有量の低下が認められた。得られた結果は、ミクロフィブリルの繊維方向の非晶領域とヘミセルロースが相互作用していることを示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：For better biomass conversion, it is important to understand precise information about main components as well as interaction mechanism between these macromolecules. It has been accepted hemicelluloses interact with the surface of cellulose microfibril by hydrogen bonding. But strong alkaline treatment which is enough for cutting those linkages does not remove hemicellulose completely. We therefore verify other interaction of hemicellulose with cellulose microfibril by using endoglucanase which specifically hydrolyze amorphous region. Interestingly, cellulose DPs decreased with decrease of amounts of mannan and xylan, both of which are main components of softwood hemicellulose. The results obtained indicated hemicellulose partially interact with disordered regions existed along cellulose microfibril.

研究分野：木質科学

キーワード：セルロース ヘミセルロース ミクロフィブリル 重合度 エンドグルカナーゼ 赤外分光分析

1. 研究開始当初の背景

再生可能資源として注目されている木質バイオマスの本質は木質細胞壁である。その構造は鉄筋コンクリートに例えられ、鉄骨がセルロース、コンクリートがリグニン、そして針金のようにこれら両成分を繋ぐ役割を果たしているのがヘミセルロースである。成分間の界面に注目するとヘミセルロースとリグニンは共有結合(エーテル、エステル、グリコシル結合など)によって相互作用していることが古くから報告されている。その一方、セルロースとヘミセルロース間はマイクロフィブリル表面における水素結合によって相互作用していると一般的に考えられている。ただし、水素結合を切断するために十分な高濃度のアルカリ処理を行っても完全にヘミセルロースを除去することは不可能である。この結果は、セルロース表面上の水素結合以外にヘミセルロースを繋ぐ結合様式の存在を示唆している。このような背景からマイクロフィブリル表面での水素結合とは別の結合様式の有無の検証に取り組んだ。この課題に対し、マイクロフィブリルの繊維方向に局在するセルロース分子鎖が乱れた領域に着目した。非晶領域を選択的に加水分解するエンドグルカナナーゼを作用し、重合度減少と基質に残ったヘミセルロース量の関係性を詳細に調べるといふ考えに至った。

2. 研究の目的

最適化したセルロース試料に対してエンドグルカナナーゼを添加し、分解残渣の分子量測定ならびに単糖分析を行う。重合度減少に伴って低下する単糖を精査し、マイクロフィブリルの非晶領域と相互作用しているヘミセルロースの存在を明らかにする。また、赤外分光分析と多変量解析を組み合わせ、その結合様式を明らかにする。

3. 研究の方法

始めに、出発物質となるセルロース基質の標準化を行った。針葉樹からスギ、広葉樹からユーカリ、草本類からバガスバイオマスとして採用した。リグニンを溶脱する方法として Wise 処理、大部分のヘミセルロースの溶脱には水酸化ナトリウム水溶液による煮沸処理を行った。得られたセルロースに対し、酵素のアクセシビリティを上げるためディスクミル処理し、高分散性セルロースを取得した(図1)。得られた試料を化学分析により出発物質の構成成分情報を取得した。

次に、上記のセルロース基質をエンドグルカナナーゼ(*Trichoderma reesei* 由来の EGI)で加水分解を行った。酵素濃度をパラメータとして 45°C、24 時間処理し分解残渣を洗浄した。その一部を化学分析にかけ、構成成分情報を取得した。また、銅エチレンジアミン水溶液に溶解後の粘度測定から見積もった重合度評価も併せて行った。

加えて、それぞれの分解残渣から赤外線吸収スペクトルを取得した。上記のパラメータと相関させるため、スペクトル領域や前処理等を最適化した後に多変量解析を行った。得られた検量モデル情報や決定係数からセルロースとヘミセルロースの相互作用の結合様式について考察を行った。

4. 研究成果

まず出発物質であるセルロースの標準化に取り組んだ。各種バイオマスから温和な条件で亜塩素酸ソーダによりリグニンを溶脱した。次に、セルロースの重合度を比較的維持した状態でヘミセルロースを除去するため水酸化ナトリウム処理を行った。コントロールとして市販の微結晶セルロースに対し、水酸化ナトリウム濃度を上げながら処理を試みると 6%以上で結晶性の低下が認められたため、本課題では 5%で煮沸処理し、得られた化学処理残渣を標準セルロース基質とした(図1)。

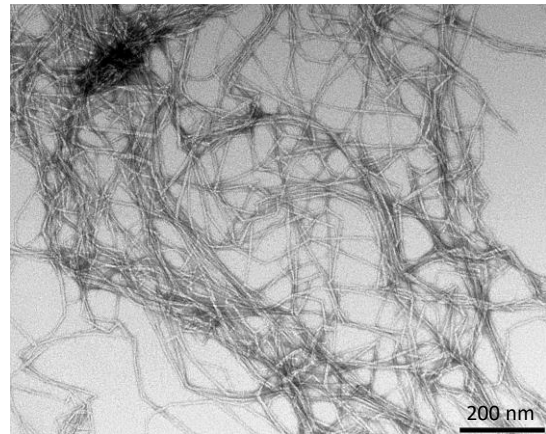


図1 スギから調製した分散性セルロース

セルロース試料の構成成分分析を行ったところ、興味深いことにいずれにおいてもヘミセルロース由来の単糖が約 10%程度残存していた。ユーカリではほぼキシランが残っていたのに対し、バガスではキシロースとマンノースが 3:1 の割合であった。スギにおいては処理前でのキシロース：マンノース比が 4:5 であったのに対し、セルロース精製後では 2:9 と大きな変化が認められた。これはキシランに比べてマンナンがセルロース近傍に沈着し、マイクロフィブリルとの相互作用による影響であると考察できることから、細胞壁多糖の局在に関する知見として意義が大きい結果であった。

スギセルロースの重合度を測定したところ約 1000 程度であった。これを *T. reesei* エンドグルカナナーゼで酵素量をパラメータとして 45°C、24 時間処理した結果、低酵素濃度においても重合度が急激に減少したが、その後、頭打ちの傾向が認められた(図2)。

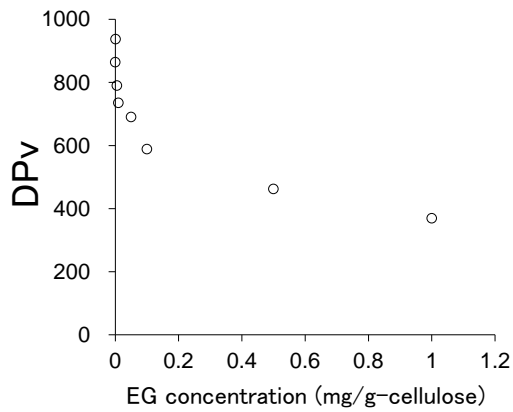


図2 EGI 濃度とセルロースの重合度減少の関係

次に各分解残渣の構成成分間の関係性を検証した。エンドグルカナーゼによる重合度の減少過程において、マンノース vs. ガラクトース、キシロース vs. アラビノースとの間には高い相関が認められた。

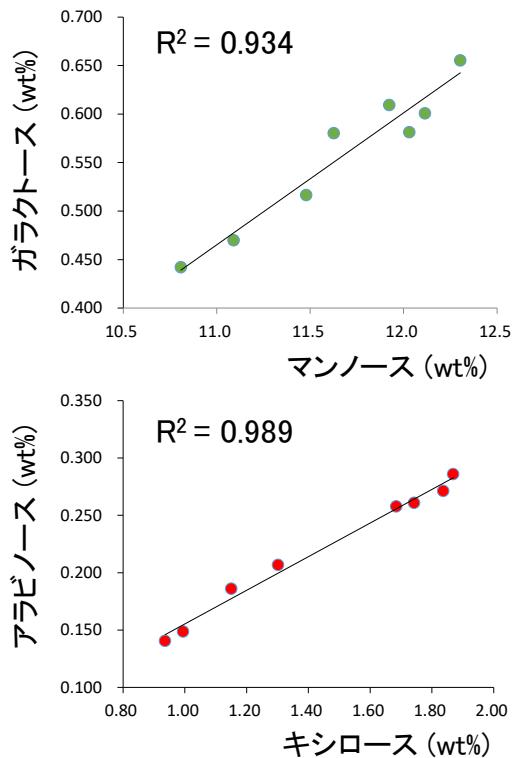


図3 EG 分解残渣におけるマンノース vs. ガラクトース、キシロース vs. アラビノースの関係性

針葉樹ヘミセルロースは約 2/3 がガラクトグルコマンナン、約 1/3 はアラビノグルクロキシランが占める。前者はグルコマンナンのマンノース残基の 6 位に α -D-ガラクトースが 1 つ結合した構造を持つ。後者は α -(1→3) 結合した L-アラビノフラノースがグルクロキシランのキシロース残基に結合した多糖である。したがって、マンノースとガ

ラクトース、キシロースとアラビノースが関連することは当然である。視点を変えると、エンドグルカナーゼはヘミセルロースに対して特定の分解活性を持たないことを示している。

次に、重合度とヘミセルロース量の関係性を検証した。もしエンドグルカナーゼが分解するセルロースの非晶領域とヘミセルロースが相互作用していなければ重合度に関係なくヘミセルロース量は一定である。もしくは相対的に増加する可能性もありうる。一方、非晶領域と相互作用している場合は、重合度が低下していくにつれて、ヘミセルロース量も低下する傾向が予測される。

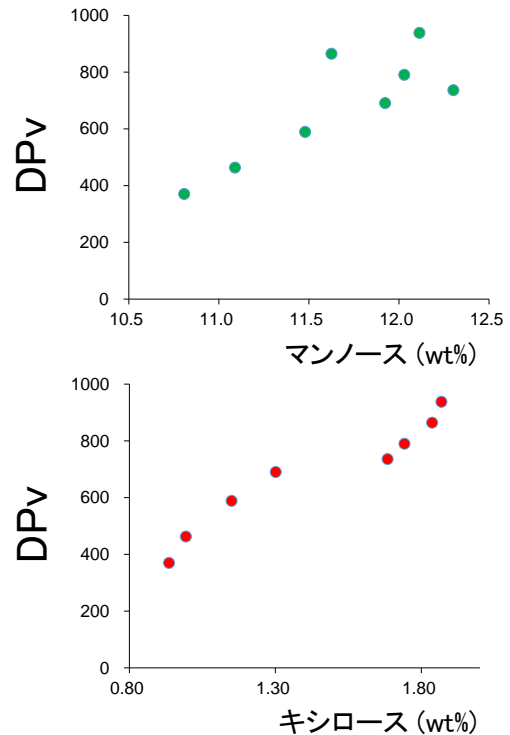


図4 マンノースおよびキシロースと EGI 分解残渣の重合度の関係

多少のデータのばらつきはあるもののセルロース重合度の減少に伴いマンノース、キシロースいずれにおいても低下する傾向が認められた。以上の結果から、セルロースの非晶領域においてヘミセルロースが相互作用している可能性が示唆された。加えて、その結合強度は 5%NaOH の煮沸処理では除去できないほどであることも示された。

分解残渣から赤外線吸収スペクトルを取得し、重合度をパラメータに検量モデルの構築を試みた。得られたスペクトルをベースラインならびに規格化した結果、重合度を目的変数として PLS 回帰分析により比較的精度の良い検量モデルが構築できた。得られた検量モデルに関する決定係数を解析したところ、特別な化学結合に相当するバンドの増減が認められなかった。そのため、物理的な相互作用をしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Horikawa Y., Imai T., Sugiyama J., Visualization of cellulase interactions with cellulose microfibril by transmission electron microscopy. *CELLULOSE*, **24** (1), 1-9, 2017. (査読あり)
2. Horikawa Y., Imai T., Abe K., Sakakibara K., Tsujii Y., Mihashi A., Kobayashi Y., Sugiyama J., Assessment of endoglucanase activity by analyzing the degree of cellulose polymerization and high-throughput analysis by near-infrared spectroscopy. *CELLULOSE*, **23** (3), 1565-1572, 2016. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1. 堀川祥生, 半 智史, 船田 良, 山岸 祐介, 斎藤継之, 磯貝 明, 杉山淳司: スギから誘導したカルスのセルロースマイクロフィブリルにおける長さ方向の高次構造, 第 66 回日本木材学会大会, 2017 年 3 月 17-19 日, 九州大学箱崎キャンパスとアクロス福岡, 福岡
2. 堀川祥生, 清水美智子, 斎藤継之, 磯貝明, 今井友也, 杉山淳司: セルロースマイクロフィブリルの長さ方向における高次構造, 第 23 回日本セルロース学会年次大会, 2016 年 7 月 14-15 日, つくばカピオ, つくば
3. Horikawa Y., Shimizu M., Saito T., Isogai A., Imai T., Sugiyama J.: Longitudinal order on cellulose microfibrils in aquatic algae. American chemical society 251th national meeting, Apr. 2016, San Diego, USA
4. 堀川祥生, 清水美智子, 斎藤継之, 磯貝明, 今井友也, 杉山淳司: 水生藻類シャジクモセルロースにおける長さ方向の高次構造, 第 66 回日本木材学会大会, 2016 年 3 月 27-29 日, 名古屋大学, 名古屋
5. 堀川祥生, 今井友也, 杉山淳司: 水生藻類シャジクモセルロースの長さ方向における高次構造, 第 22 回日本セルロース学会年次大会, 2015 年 7 月 9-10 日, 北海道大学学術交流会館, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀川祥生 (HORIKAWA Yoshiki)

東京農工大学・大学院農学研究院・特任准教授

研究者番号: 90637711