

令和元年6月16日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04949

研究課題名(和文) 木質バイオマスの酵素糖化のボトルネックとなるキシランの構造と性状に関する研究

研究課題名(英文) Studies on structure and properties of xylan which is a bottleneck on enzymatic saccharification of woody biomass

研究代表者

鮫島 正浩 (Samejima, Masahiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：30162530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：6種の広葉樹材由来のアンモニア処理バイオマスに対して酵素糖化を行ったところ、シラカンバではセルロースの表面に存在する易酵素分解性キシラン量が多く、逆に、アカシア、ユーカリでは易分解性キシラン量が低く、セルロースと複合体化されたと思われる難分解性のキシランが多いことが示唆された。また、シラカンバ由来の易酵素分解性キシランにおいては、他樹種の場合に比べて、キシラン主鎖に対するグルクロン酸残基の置換度が低い特徴を有することが示された。また、広葉樹材からホロセルロースを調製する過程では、酵素糖化のボトルネックとなる難酵素分解性キシランが新たに形成されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広葉樹由来の木質バイオマスにおいては、セルロースの表面に存在すると思われるキシランとセルロース構造の内部に取り込まれたと考えられるキシランが存在し、その比率は樹種間で大きな差があることが明らかとなった。また、キシラン主鎖に対するグルクロン酸残基の置換度とその分布が樹種によって大きく異なり、これらの相違が酵素糖化の効率に大きな影響を与えていることが示唆された。さらに、ホロセルロースの調製過程でグルクロン酸残基の脱離が起こることが明らかとなり、その結果によりキシランの一部が酵素糖化に対して難分解性となることが示された。以上は、新規の発見であり、その学術的ならびに応用的価値は高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：When enzymatic saccharification was performed on ammonia-treated biomass derived from six species of hardwood, the amount of easily enzymatic degradable xylan, which might exist on the surface of cellulose, is large in birch wood biomass. On the contrary, it revealed that the amount of easily enzymatic degradable xylan was quite low in wood biomasses of Acacia and Eucalyptus. Consequently, in the later case, a large part of xylan might exist as an recalcitrant form against enzymatic saccharification in the complex with cellulose. In addition, it was shown that the degree of substitution of the glucuronic acid residue attached on the xylan main chain is lower in the easily degradable xylan in birch wood biomass compared to the case of other species. Furthermore, in the preparation of holocellulose from hardwood, it was suggested that some part of xylan are incorporated into cellulose and it makes another bottleneck for enzymatic saccharification.

研究分野：木質科学

キーワード：木質バイオマス セルロース ヘミセルロース キシラン リグニン 酵素糖化

## 1. 研究開始当初の背景

草本植物ならびに木本植物の細胞壁を主体とするセルロース系バイオマスの酵素糖化において、リグニンの存在はその効率化においてボトルネックとなることは良く知られている。その影響を軽減するために、セルロース系バイオマスの酵素糖化においてはリグニンの除去あるいは酵素糖化の対象となるセルロースやヘミセルロース等の多糖との結合を緩める前処理が必要である。また、もう一つの酵素糖化のボトルネックとして、セルロースが結晶性の繊維構造を有しており、酵素のアクセシビリティを低下させる要因となっていることが挙げられる。

研究代表者らの過去の研究では、イネ科の草本植物由来のセルロース系バイオマスから燃料用エタノールを生産する一貫プロセスの確立を目指して、その酵素糖化の効率化について研究を推進してきたが、その中で、アンモニア前処理により、草本植物ではエステル結合を主体としているリグニンとヘミセルロース間の結合及びキシランを修飾するアセチル基等のエステル結合の切断し、さらにセルロース結晶構造を I 型から III 型に改変することで、リグニンとセルロースに基づく酵素糖化のボトルネックは大幅に軽減できることを明らかにした。

一方、最近の研究代表者らの研究により、アンモニア前処理を施したシラカンバ材由来木質バイオマスの酵素糖化実験を行う中で、キシランの一部がセルロースの結晶構造の中に取り込まれて、これが酵素糖化のボトルネックとなっているという新たな事実を明らかにした。

以上のことから、広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化の効率化を図るためには、セルロースとの関係においてキシランの構造的な特徴を明らかにし、そのボトルネックを解除する方策を検討することが必要と考え、本研究を実施するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、シラカンバをはじめとする広葉樹由来木質バイオマスに対して、それらの酵素糖化のボトルネックとなる難酵素分解性キシランの構造的な特徴とセルロースとの複合状態を明らかにし、その上で、酵素糖化の効率化に資するな酵素の特定を試み、木質バイオマスの酵素糖化の効率化に向けた酵素剤組成の最適化に向けた方策を得ることを研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

シラカンバ材をはじめ、ブナ、ヤナギ、ポプラ、アカシア、ユーカリ等 6 種の広葉樹由来の木質バイオマスを木粉試料として調製した。得られた各木質バイオマス並びにそのアンモニア処理バイオマス及び亜塩素酸ナトリウム処理 (Wise 処理) によって得たホロセルロースについて、中性糖、酸性糖、アセチル基およびリグニン量等について化学分析を行い、キシランを構成するキシロース残基、グルクロン酸残基、さらにアセチル基等の構造的な特徴について情報を得た。また、各試料について、FTIR を測定し、アンモニア処理によるエステル結合の消失とアミド結合の形成について情報を得た。

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のキシラナーゼ (PcXyn10C および PcXyn11B)、 $\alpha$ -キシロシダーゼ (PcBxl3ste-)、 $\beta$ -グルクロナダーゼ (PcGH115)、アセチルキシランエステラーゼ (PcCE1B) 等の cDNA 遺伝子を酵母菌 *Pichia pastoris* の発現系を利用して、それぞれをモノコンポーネント酵素として生産した。また、これらを再構成することでキシラン分解酵素剤を調製した。さらに、これとは別に、セロビオヒドロラーゼ (CBH: PcCel7D, PcCel6A)、エンドグルカナーゼ (EG: PcCel5A) および  $\beta$ -グルコシダーゼ (PcBg13Acat) をそれぞれモノコンポーネント酵素として生産し、これらを再構成することでセルロース分解酵素剤を調製した。

各樹種から得たアンモニア前処理バイオマスあるいはホロセルロースに対して、市販

酵素剤 (Cellic CTec+ HTec) による酵素糖化実験およびモノコンポーネント酵素を再構成して調製したキシラン分解酵素剤とキシラン + セルロース分解酵素剤を用いた二段階の酵素糖化実験を行った。酵素糖化反応は、50mM酢酸ナトリウム中、pH5.0、40 °C で、最大 48 時間行った。また、得られたグルコース、キシロース、グルクロン酸及び酢酸の定量について HPLC を用いて行った。

シラカンバ由来のアンモニア処理バイオマスの酵素糖化の効率化を目的に、同バイオマスを基質とした培地で担子菌 *P. chrysosporium* を培養し、得られた菌体外液に対して二次元電気泳動ならびに LC-MS/MS 解析に基づきセクレトーム解析を行い、同バイオマス分解時に特徴的に生産される酵素を同定した。

#### 4 . 研究成果

アンモニア前処理を行った 6 種の広葉樹由来木質バイオマスを構成するキシランについて分析を行った。FTIR 分析の結果は、アンモニア処理バイオマスではバイオマス中のエステル結合については、ほぼ全てがアミド化されていることを示していた。すなわち、アンモニア処理により、キシランを修飾している全てのアセチル基はキシラン主鎖から脱離していると考えられた。一方、キシラン側鎖のグルクロン酸残基についてもアミド化はされているものの、アンモニア処理前後でその定量値は大きな差異がないことから、ほぼキシラン主鎖上に保持された状態で存在すると考えられた。

市販酵素剤 (Cellic CTec 及び HTec) を用いて、6 種の広葉樹由来アンモニア処理木質バイオマスに対して酵素糖化を行い、得られた生成単糖収量について分析を行った。その結果、化学分析におけるバイオマス構成成分としてのリグニンに対するキシランの比 (X/L 値) の高いシラカンバ、ヤナギ、ブナ等の樹種では効率的に酵素糖化が進行し、高い単糖収率が得られ、一方、X/L 値の低いアカシア、ユーカリ、ポプラ等の樹種では酵素糖化は効率的に進行しないことが明らかとなった。

また、モノコンポーネント酵素を組み合わせた二段階の酵素糖化実験により、キシラン分解酵素剤だけで分解できる易酵素分解性キシランとキシラン + セルロース分解酵素剤でないと分解できない難酵素分解性キシランの量比を比較すると、シラカンバやヤナギのように酵素糖化が効率的に行える広葉樹由来木質バイオマスにおいては易分解性キシラン量が高く、一方、アカシア、ユーカリ、ポプラのように酵素糖化の効率が低い広葉樹由来木質バイオマスでは、易分解性キシラン量が低いことが明らかとなった。さらに、キシラン主鎖に対するグルクロン酸残基の置換度を比較すると、シラカンバの場合、易酵素分解性キシランにおける結合度が難酵素分解性キシランに比べて低いものに対して、アカシア、ユーカリ、ポプラ等の広葉樹では逆の傾向を示すことが示され、キシラン構造の特徴に大きな樹種差があることが明らかとなった。

さらに、担子菌 *P. chrysosporium* によるシラカンバ由来のアンモニア処理バイオマスの分解過程で分泌される菌体外タンパク質のプロテオーム解析を行った結果、キシラナーゼ PcXyn11B の生産量が特異的に増加することが明らかとなった。この結果を受けて、糸状菌由来の市販酵素 NpXyn11 を酵素剤に添加すると、糖化効率が著しく向上することが明らかとなった。

一方、キシラン構造の差異が酵素糖化に与える影響をさらに詳細に調べるためには、あらかじめリグニンを選択的に除去したホロセルロースを亜塩素酸ナトリウム処理 (Wise 処理) によって調製し、これらに対する酵素糖化データを取得していくことが必要と判断された。そこで、シラカンバ材由来のホロセルロースに対してモノコンポーネント酵素を組み合わせたキシラン分解酵素剤およびキシラン + セルロース分解酵素剤による二段階酵素糖化を行い、アンモニア処理バイオマスの結果と比較を行った。

驚くべきことに、Wise 処理の過程で全体の約 3/4 のアセチル基とグルクロン酸残基がバイオマスから脱離することが明らかとなった。それとともに、キシラン分解酵素剤のみでは分解できず、キシラン + セルロース分解酵素剤でないと分解できない難酵素分解性キシランの量が著

しく増加することが明らかとなった。また、易酵素分解性キシランでは、特に酵素糖化によるグルクロン酸の収量が大きく低下していることから、Wise 処理によって脱離するグルクロン酸残基の多くがこの部分に存在していた可能性が示唆された。一方、キシラン+セルロース分解酵素剤による糖化によって得られるグルクロン酸量は相対的に著しく増加することから、Wise 処理による過程で、酵素糖化に対して難分解性のキシラン/セルロース複合体があらたに形成された可能性も示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Kiyoshi Sakuragi, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima: Application of ammonia pretreatment to enable enzymatic hydrolysis of hardwood biomass, *Polymer Degradation and Stability*, 148, 19-25 (2018)
- 2) Kiyoshi Sakuragi, Chiaki Hori, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima: *J. Wood Sci.*, 64 845-853 (2018)

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) 櫻木潔, 古久保美樹, 堀千明, 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 木質バイオマスの酵素糖化に向けた木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の全分泌タンパク質解析, セルラーゼ研究会第 30 回大会(2016)
- 2) 木根啓太, 砂川直樹, 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 担子菌由来 -L-アラビノフラノシダーゼの機能解析, セルラーゼ研究会第 30 回大会(2016)
- 3) 櫻木潔, 古久保美樹, 堀千明, 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の全分泌タンパク質解析に基づく木質バイオマスの酵素糖化, 第 25 回日本エネルギー学会大会 (2016)
- 4) Takuya Ishida, Michiko Maruyama, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima: Expression and characterization of beta-xylosidase from *Phanerochaete chrysosporium*., 4<sup>th</sup> Asian Conference on Biomass Science (2016)
- 5) Kiyoshi Sakuragi, Miki Kokubo, Takuya Ishida, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima: Secretome analysis of the extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* for enzymatic saccharification, 4<sup>th</sup> Asian Conference on Biomass Science (2016)
- 6) 櫻木潔, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 脱リグニン処理が木質バイオマスの酵素糖化に与える影響, 第 12 回バイオマス科学会議(2017)
- 7) 小島圭輔, 砂川直樹, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 -xylosidase の機能解析, セルラーゼ研究会第 31 回大会(2017)
- 8) Kiyoshi Sakuragi, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima: Application of Ammonia Pretreatment towards Enzymatic Saccharification of Hardwood Biomass, The 5<sup>th</sup> Asian Conference on Biomass Science (2018)
- 9) 木根啓太, 砂川直樹, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する -L-アラビノフラノシダーゼの機能について, 第 68 回日本木材学会大会 (2018)
- 10) 小島圭輔, 砂川直樹, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 糸状菌由来 GH Family 3 -キシロシダーゼの構造と反応特性の比較解析, セルラーゼ研究会第 32 回大会(2018)
- 11) Kiyoshi Sakuragi, Miki Kokubo, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima: Xylan as Another Recalcitrant Factor on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass, The 6<sup>th</sup> Asian Conference on Biomass (2018)
- 12) Keisuke Kijima, Naoki Sunagawa, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima: Substrate Specificity and Kinetic Analysis of beta-Xylosidase from the basidiomycete

*Phanerochaete chrysosporium*, The 6<sup>th</sup> Asian Conference on Biomass Science (2018)

- 13) 鮫島正浩: 酵素の目を通して見たバイオマスとセルロースの姿, セルロース学会関東支部  
ミニシンポジウム (2018)
- 14) 小島圭輔, 砂川直樹, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 二種の糸状菌由来  $\beta$ -キシロシダーゼに  
おける構造と機能の比較, 第 69 回日本木材学会大会(2019)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。