

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23248025

研究課題名(和文)木質系バイオマスのリファイナリー技術構築を目指した木材細胞壁の微細構造の解明

研究課題名(英文) Investigation on the ultrafine structure of wood cell wall for establishment of biorefinery technology of woody biomass

研究代表者

鮫島 正浩 (Samejima, Masahiro)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30162530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：白色木材腐朽菌由来のセルロースならびにキシラン分解酵素を遺伝子組換えモノコンポーネント酵素として各種取り揃え、これらを元にキシラン成分を特異的に分解する酵素カクテル剤、さらにセルロースを分解するため、 β -グルコシダーゼ、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼを調製した。これらを用いて、アンモニアで前処理を施したシラカバ (*Betula platyphylla*) 木粉を多段的に酵素糖化を行ったところ、キシランの約70%は結晶性セルロースの外部に存在するが、約10%はセルロースのアモルファス構造とともに存在し、残りの約20%はセルロースの結晶構造の内部に存在するという新たな学術的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：A library of monoclonal xylanolytic and cellulolytic enzymes from the wood-decay fungi was prepared by the gene expression system of the yeast *Pichia pastoris*. An enzyme cocktail of several monoclonal xylanolytic enzymes without addition of any cellulolytic enzyme was used for selective saccharification of xylan in the ammonia-treated wood biomass from *Betula platyphylla*. After 24 hrs of incubation, 70% of xylan in the biomass was degraded to xylose. Addition of monoclonal β -glucosidase and endoglucanase in the reaction mixture was partially effective to degrade only 10% of the remaining xylan in the biomass. Finally, two cellobiohydrolases were added to degrade crystalline cellulose. Surprisingly, the last 20% of xylan in the biomass decomposed to xylose in parallel with degradation of crystalline cellulose to glucose, suggesting that a part of xylan exists in the the crystalline cellulose in the wood cell wall of *B. platyphylla* to form a novel complex structure.

研究分野：農学

キーワード：酵素 バイオマス 木質科学 木材細胞壁 セルロース ヘミセルロース リグニン バイオリファイナリー

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化防止対策としての二酸化炭素排出削減、石油資源代替への安全対策あるいは地域資源の利用に基づく社会経済の活性化を目的に、バイオマス利用拡大の推進に向けて世界各国が大きく動いている。その中において、我が国では2010年6月に新成長戦略が閣議決定され、環境・エネルギー対策の基軸となるグリーン・イノベーションの推進が大きな政策課題として取り上げられた。また、それを実行していくためのアクションプランとして「木質系バイオマス利用の研究開発」が大きな柱として掲げられた。木質系バイオマスの利用方法としては、既存の木質材料加工の中で副産されてくる端材や鋸屑、林地残材などの低質木材を原料とする直接燃焼によるエネルギー利用などがすでに行われている。しかし、さらに新たな用途としてバイオエタノールなどのバイオ液体燃料あるいは化成品原料としての利用に大きな期待が寄せられている。一方、これらの利用を事業化するためには解決すべき多くの技術課題が残されており、その中でも、強固な固体組織として存在する木質系バイオマスを低分子の可溶性物質に効率的かつ選択的に変換する技術、すなわち木質系バイオマスのリファイナー技術の構築が問題解決のためのブレイクスルーとなることが広く認識されているが、事業化に向けた効率性ならびに経済性を満足させるための解決策を得るには至っていない。以上のことから、木質系バイオマスの本質である木材細胞壁について、各構成成分間の複合構造に注目して、その詳細構造を解明し、その上で新たな着想を得てリファイナー技術を構築することが必要との見解に至った。

2. 研究の目的

木質系バイオマスをさまざまな有用低分子化合物に変換するリファイナー技術の構築を目指すためには、木材細胞壁中で各構成成分が形成する複合構造の詳細解析が非常に重要な研究課題である。本研究では、植物系バイオマスのリファイナー技術として知られているアンモニア前処理と酵素糖化の組み合わせを逆手にとり、これらを木材細胞壁の微細構造を解析ツールとして利用して課題解決に応えることを大きなポイン

トとしている。アンモニア処理では木材を構成する各成分間の結合開裂と膨潤化が起こるが各成分はほぼ固体状態のまま細胞壁中に残るという利点がある。機能既知の各酵素とその組み合わせ酵素剤で細胞壁構造のペールを一枚一枚剥いでいくようなイメージで各構成成分を段階的に分解し、各過程での細胞壁構造の変化を各種顕微鏡観察と化学分析することで各成分間の複合構造の詳細を解明することを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 広葉樹(アカシア、シラカバ、ブナ、ポプラ、ヤナキおよびユーカリ)の6樹種から木粉(40メッシュパス)を調製し、これらに対してエタノール・ベンゼン(1:2)抽出を行った(未処理木粉)。未処理木粉を超臨界状態のアンモニア中に保持した後(140℃、1時間)、一晚風乾した(アンモニア処理木粉)。未処理木粉とアンモニア処理木粉を硫酸加水分解した後、上澄に含まれる中性糖の定量を行った。また、未処理木粉およびアンモニア処理木粉に含まれる窒素を窒素分析装置(三菱化学アナリテック)により定量した。さらに、未処理木粉については硫酸加水分解あるいはニトロベンゼン酸化を行うことで、酢酸、グルクロン酸、酸可溶性リグニン、クラソンリグニンの定量およびS/V比を調べた。加えて、未処理木粉およびアンモニア処理木粉をセルラーゼ製剤(Cellic CTec、Novozyme社)およびヘミセルラーゼ製剤(Cellic HTec、Novozyme社)を用いて処理し、処理後の上澄に含まれるグルコースを定量した。

また、シラカバ材から20μm厚の木口切片を作成した(未処理切片)。未処理切片を超臨界状態のアンモニア中に保持した後(140℃、1時間)、直ちにメタノールで洗浄した(アンモニア処理切片)。未処理およびアンモニア処理切片をセルラーゼ製剤およびヘミセルラーゼ製剤で処理した。酵素処理前後の未処理およびアンモニア処理切片を、サフラニンおよびファストグリーンを用いて色素染色した後、光学顕微鏡を用いて観察した。また、アンモニア処理および酵素処理前後の切片についてTOF-SIMSを用いてキシランの表面露出度を観察した。

(2) (独) 森林総合研究所林木育種センター内で取得した植栽後 45 年のシラカバ (*Betula platyphylla*) 幹部より得た丸太から調製した木粉に対して、耐圧容器内で 11Mpa、140°C、1 時間の条件下でアンモニア処理を行った。その後、大気圧下でアンモニアをガスとして留去させることで、前処理バイオマスを得た。また、東京大学農学部生態調和農学機構の西東京フィールド内で栽培したエリアンサス (*Erianthus arundinaceus*) の茎部から得た粉体試料に対しても、同様の条件下でアンモニア処理を行い、これをシラカバ由来の前処理バイオマスの対照試料とした。

白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* ならびにエノキタケ (*Flammulina velutipes*) から、セロビオヒドロラーゼ遺伝子 (*Pccel6A*)、エンドグルカナーゼ遺伝子 (*Pccel5A*)、キシラナーゼ遺伝子 (*Pcxyn10C* および *Pcxyn11B*)、 β -キシロシダーゼ遺伝子 (*Pcbxl3*)、アラビノフラノシダーゼ遺伝子 (*Fvgh51*)、 α -グルクロニダーゼ遺伝子 (*Pcgh115*)、アセチルキシランエステラーゼ遺伝子 (*Pcce1A*)、フェルロイルエステラーゼ遺伝子 (*Pcce1B*)、ポリガラクトチュロナーゼ遺伝子 (*Pcgh28*)、さらに β -グルコシダーゼ遺伝子 (*Pcbgl3Acat*) をそれぞれ cDNA として取得し、これらを酵母菌 *Pichia pastoris* の発現系を利用して、遺伝子組換えモノコンポーネント酵素として生産した。また、これとは別に、白色木材腐朽菌 *P. chrysosporium* のセルロース分解培養系からセロビオヒドロラーゼ *PcCel7D* をモノコンポーネント酵素として精製した。

得られたモノコンポーネント酵素を適宜組み合わせたヘミセルラーゼ剤 (*PcXyn10C*, *PcXyn11D*, *PcBxl3*, *FvGH51*, *PcGH115*, *PcCe1A*, *PcCe1B*, *PcGH28*) を調製し、前処理バイオマス (基質濃度 1% w/v) に対して、50 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)、50 °C で、48 時間の酵素糖化を行った。その後、*PcBgl3Acat*、*PcCel5A*、*PcCel6A+PcCel7A* の順でセルロース分解に関与するモノコンポーネント酵素を添加し、酵素糖化反応をさらに行った。以上の各過程において、酵素糖化によって得られたグルコースならびにキシロースの定量を行った。

4. 研究成果

(1) 各樹種から得られた木粉に対するアンモニア処理では、木粉重量変化はほとんど認められなかった。また、いずれの樹種においても、アンモニア処理前後で固体画分の中性糖含有率についても変化はほとんど見られなかった。これに対して、アンモニア処理によって窒素含有率および酵素処理によって得られるグルコースの収率は増大した。窒素含有率については、未処理木粉の場合、0.1~0.2% であったのに対して、アンモニア処理木粉では 0.6~0.7% となった。また、アンモニア処理木粉における酵素糖化によって得られるグルコース量の増加においては、シラカバ、ヤナギ、ブナ等の樹種では著しく、木粉中に含まれる全グルカン量の 50% 前後がグルコースに変換された。一方、ポプラやユーカリでは酵素糖化によって得られるグルコース量は全体の 20% 前後であり、さらにアカシアではアンモニア処理の効果はほとんど認められなかった。このようにアンモニア処理が木粉の酵素糖化の効率化に与える影響は樹種の違いに大きく影響された。また、各樹種から得られた木粉の成分の化学構成と酵素糖化におけるグルコース収率との相関性を調べると、未処理木粉のキシロース含有率、アセチル基含有率およびリグニン中の S/V 比の高い樹種ほど、酵素処理によって得られるグルコースの収率が高くなる傾向を示した。

一方、シラカバ材から得た切片の光学顕微鏡による観察では、未処理切片では色素染色で赤色に染まるのに対して、アンモニア処理後の切片では赤色には染色されず、青色を呈した。また、アンモニア処理後の切片で細胞壁の膨張が観察された。さらに、アンモニアおよび酵素で処理した切片では、木部繊維二次壁が青色に染色されにくかった。また、TOF-SIMS によって細胞壁表層に露出するキシランについて C5 糖 (m/z 115) を検出することでマッピングした。アンモニア処理前後で、C5 糖の含有率はすべての組織でアンモニア処理後に高くなった。また、アンモニア処理によって、酵素処理後の C5 糖含有率は、すべての組織で減少した。

以上の結果から、アンモニア処理後も主要な木材構成成分は固体画分に残っていると考えられた。また、アンモニア処理後の固体画

分に含まれる窒素は、常温常圧では気化しないことから、これらのアンモニアについては、キシラン構造中のアセチル基の脱離やグルクロン酸残基のエステル開裂等によるアミド基の導入に伴ってバイオマス中に保持されている可能性が示唆された。

アンモニア処理とメタノール洗浄によって、切片表面のリグニンが除去あるいは一部の構造が変化したと考えられた。そのため、アンモニア処理後の切片は、サフラニンの赤色にほとんど染まらなかったと思われる。また、アンモニア処理と酵素処理によって、木部繊維二次壁の多糖成分が分解可溶化し、固体画分から除かれたと考えられた。そのため、アンモニアおよび酵素で処理した切片は、木部繊維二次壁がファストグリーン青色に染まらなくなったと考えられた。これらのことから、アンモニア処理が木材細胞壁の酵素分解性に与える効果は、各組織によって異なることが示唆された。

TOF-SIMS による細胞壁構造の分析から、キシラン由来すると考えられる C5 糖の検出量が、すべての組織においてアンモニア処理後に高くなった。しかし、アンモニア処理後も主要な木材構成成分は固体画分に残っていると考えられる。そのため、細胞壁表面における成分の変化は、木粉における成分の変化と分けて考える必要があることが示唆された。特に TOF-SIMS の結果から、アンモニア処理によって、切片表面のキシランが露出あるいは検出されやすい状態になったことが示唆されたことから、アンモニア処理に伴うキシランとその周辺の化学結合開裂等による細胞壁構造の変化が、酵素糖化に重要な役割を果たしていると考えられた。酵素は基質表面にのみアクセス可能であることから、酵素がアクセス可能な細胞壁表面の理解が木質バイオマスの酵素糖化のために重要であると考えられた。以上の結果は、2012年度日本エネルギー学会大会で公表した。また、現在、論文公表の準備を進めている。

(2) 酵素糖化に対してアンモニア前処理が最も効果をあげたシラカバ材を対象として、白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* がこの材を分解する際に分泌する菌体外酵素について、二次元電気泳動法を利用したセクレトーム解析により網羅的

な検索を行った。また、その結果に基づきアンモニア処理木材の分解に必要な各酵素を選択し、必要な酵素についてはモノコンポーネントとして組換え酵素を作成した。

シラカバならびにエリアンサスから得たバイオマス粉体試料について構成糖分析を行った結果、どちらの試料についても、アンモニア前処理前後でこれらのバイオマスから硫酸加水分解糖化によって得られるグルコースとキシロース量には大きな変化はないことが示された。

次に、アンモニア処理後のバイオマスに対して遺伝子組換えモノコンポーネント酵素を組み合わせたヘミセルラーゼ剤を利用して酵素糖化を行うと多量のキシロースが得られるが、一方、グルコースはまったく生成されなかった。また、このヘミセルラーゼ剤を用いた酵素糖化によって、エリアンサスの場合は構成糖分析で得られた値にほぼ近いキシロースが得られたのに対して、シラカバにおいては全体の 70 %程度のキシロースが得られるに留まり、残りの 30 %は固体のまま前処理バイオマス中に残されることが明らかとなった。

その後、 β -グルコシダーゼ、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼを順次添加して酵素糖化反応を継続すると、シラカバならびにエリアンサスともに、セロビオヒドロラーゼを添加した以降に著しいグルコース生成の増加が認められた。また、その増加速度はエリアンサスでは著しく速く、セロビオヒドロラーゼ添加後 4 時間程度でバイオマス中の結晶性セルロースはほぼ完全にグルコースに変換された。一方、シラカバの場合、これに比べてグルコースの生成速度は遅く、セロビオヒドロラーゼ添加後、24 時間を経過しても結晶性セルロースからのグルコースの生成は増加を続けた。また、ヘミセルラーゼ剤による酵素糖化で残存した 30 %程度のキシランの分解によるキシロースの生成については、10%程度は β -グルコシダーゼとエンドグルカナーゼの添加によってキシロースに分解されるが、驚くべきことに、最後に残った 20%程度のキシランはセロビオヒドロラーゼの添加後、結晶性セルロースの分解とほぼ併行して進行することが明らかとなった。また、ヘミセルラーゼ処理後、熱処理によりヘミセルラーゼを失活させても、エリア

ンサスの場合はセロビオヒドロラーゼ等の添加によって結晶性セルロースの大部分がグルコースに分解されるのに対して、シラカバの場合、結晶性セルロースの約 40 %程度しかグルコースに分解されない。

以上の結果を総括すると、エリアンサスのような草本植物の細胞壁中ではキシランの大部分は結晶性セルロースの表面上に存在しているのに対して、シラカバのような広葉樹木材の場合、キシランの約 70 %は結晶性セルロースの表面上に存在しているが、残りの約 30 %のキシランはセルロースと複合体を形成して存在し、特に約 20 %のキシランはセルロースの結晶構造の内部に取りこまれて酵素分解に対して抵抗性を示す新規な複合体の存在を示唆しており、新たな学術的な知見と得たと判断している。このような見解が草本植物と木本植物でのセルロースとキシランの複合形態の差に基づくものなのか、あるいは植物細胞壁の一次壁と二次壁における結晶性セルロースとキシランの複合形態の差に基づくものであるかについては、さらに詳細な実験データを蓄積して慎重に検討していくことが必要と考えている。一方、本研究によって提示されたキシランと結晶性セルロースの複合体の存在はセルロース系バイオマスのリファイナリー技術を検討して行く上で、特に酵素糖化の効率化等を検討する上でも重要な知見と言える。

以上の研究成果については、第 65 回日本木材学会大会（2015 年 3 月）において発表した。また、現在、論文公開の準備を進めている。

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 4 件）

- 1) C. Hori, K. Igarashi, M. Samejima: Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on cellulose, FEMS. Microbiol. Lett., 321,14-23 (2011)
- 2) C. Hori, J. Gaskel, K. Igarashi, M. Samejima, D. Hibbert, B. Henrissat, D. Cullen: Genome-wide analysis of polysaccharides degrading enzymes in

eleven white- and brown-rot Polypetales provides insight into mechanisms of wood decay, *Mycologia*, 105, 1412-1427 (2013)

3) A. Nakamura, H. Watanabe, T. Ishida, M. Uchihashi, M. Wada, T. Ando, K. Igarashi, M. Samejima: Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose, *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 4584-4592 (2014)

4) 堀千明、五十嵐圭日子、鮫島正浩: 白色腐朽菌および褐色腐朽菌のゲノム・ポストゲノム解析から木材腐朽のメカニズムを理解する, *木材保存*, 40, 152-161 (2014)

〔学会発表〕（計 9 件）

1) M. Samejima, M. Maruyama, K. Igarashi: Utilization of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* as a source of enzymes for biorefinery of lignocellulosic biomass, 19th European Biomass Conference and Exhibition, 2011年6月7日, ベルリン国際会議センター（ドイツ国）

2) 櫻木潔, 堀千明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: アンモニア処理木材分解時における担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の全分泌タンパク質（セクレトーム）解析, セルラーゼ研究会第25回大会, 2011年10月15日, 花王霞ヶ浦研修所（茨城）

3) 櫻木潔, 堀千明, 林礼子, 三橋秀一, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* がアンモニア処理木材の分解時に生産する酵素のセクレトーム解析, 第11回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2011年11月17日, 東京大学弥生講堂（東京）

4) 櫻木潔, 秋山拓也, 木村聡, 和田昌久, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 真清高志, 高間瑠佳, 福島和彦: アンモニア処理と酵素分解が木材細胞壁微細構造に与える影響, 第62回日本木材学会大会, 2012年3月15日, 北海道大学（札幌）

5) 櫻木潔, 秋山拓也, 木村聡, 和田昌久, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 真清高志, 高間瑠佳, 福島和彦: 木質バイオマスの酵素糖化に与えるアンモニア処理の効果とその可視化, 2012年度日本エネルギー学会大会, 2012年8月6日, 工学院大学（東京）

5) 山下大地, 木村聡, 和田昌久, 鮫島正浩:
アンモニア処理したシラカバ細胞化学観察,
第63回日本木材学会大会, 2013年3月13日,
岩手大学 (盛岡)

7) 山下大地, 木村聡, 和田昌久, 鮫島正浩:
アンモニア処理したシラカバ材におけるリ
グニンの組織化学観察, 第64回日本木材学会
大会, 2014年3月14日, 愛媛大学 (松山)

8) M. Samejima: The wood-decay fungus
Phanerochaete chrysosporium - A treasure
box of enzymes for conversion of
lignocellulosic biomass (招待講演),
MieBioforum2014, 2014年11月18日, 合歓
の郷 (志摩)

9) 鮫島正浩, 古久保美樹, 石田卓也, 五十嵐
圭日子, 櫻木潔, 山下大地, 高部圭司: シラカ
ンバ材ではキシランの30%は結晶性セルロー
スの内部に取りこまれて存在する!, 第65回
日本木材学会大会, 2015年3月18日, 船堀タ
ワーホール (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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・
教授
研究者番号: 30162530

(2)研究分担者

木村 聡 (KIMURA Satoshi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
助教
研究者番号: 00420224

和田 昌久 (WADA Masahisa)
京都大学・大学院農学研究科・
准教授
研究者番号: 40270897

秋山 拓也 (AKIYAMA Takuya)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
助教
研究者番号: 50553723

五十嵐 圭日子 (Igarashi Kiyohiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号: 80345181

(3)連携研究者

福島 和彦 (FUKUSHIMA Kazuhiko)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
教授
研究者番号: 80222256