

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660138

研究課題名(和文)ハイスループット分子量測定によるセルロース加水分解酵素群の新しい評価法の開発

研究課題名(英文) Novel technique for monitoring enzymatic hydrolysis of cellulose through high throughput DP analysis

研究代表者

杉山 淳司 (Sugiyama, Junji)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：40183842

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)：木質バイオマスの高効率糖化のためには、セルラーゼ中の各酵素の活性を正確に評価する必要がある。そこで基質に高分散性のセルロース懸濁液を調製し、分解過程における「重合度」の変化から成分酵素の活性を評価した。セルロースの重合度はカルバニル化後にGPCにより分析した。トリコデルマ由来のEG IとEG II、CBH IとCBH IIに関して評価を行った。その結果、EG IIの活性がEG Iより高く、エンド活性があるとされるCBH IIもCBH Iと大差がないことなど、重要かつ新規な結果を得ることができた。さらに、この評価法の迅速・簡便化を検討し、残渣の近赤外分光スペクトルによる重合度の予測を可能とした。

研究成果の概要(英文)：In order to improve saccharification performance, it is important to obtain precise information about functions and activities of individual enzymes in a cocktail of the cellulase. Particularly, endo-activity conventionally estimated by digestion of CMC, a model amorphous compound, did not often conform to the degradation of pretreated biomass. Since the accurate characterization of cellulose chain length seemed critical to the measure of endo-performance, highly dispersed microfibrillated cellulose samples were prepared as a standard substrate and the degree of polymerization (DP) was precisely monitored by GPC after tricarbanilation of cellulose. Surprisingly, for the first time, endo-activity of EG II was found to possess higher than that of EG I, while no considerable differences were found in those between CBH II and CBH I. Furthermore, facile and quick chemometrical monitoring system of DP was successfully developed using Near Infrared (NIR) spectra from the hydrolysates

研究分野：セルロース科学 バイオマス科学

キーワード：ケモメトリクス 木質バイオマス 分子量 ハイスループット セルロース セルラーゼ 近赤外分光分析

1. 研究開始当初の背景

植物バイオマスから高効率でエタノールを生産するためには、糖化システムの最適化が必要不可欠である。つまり化学組成や構造特性が変化した前処理バイオマスを余すことなく低分子化および可溶化させる酵素カクテル(セルラーゼ)を構築しなければならない。そのためには、セルラーゼに含まれる各酵素の活性を正確に評価する必要がある。しかしながら基質となる天然セルロースは結晶性多糖であり、不溶性であることがセルラーゼの活性測定を困難にしている。特に、セルロース鎖を長さ方向に沿って切断するエンドグルカナーゼはマイクロフィブリルに作用しても低分子化した還元糖を遊離しないため、その代替法として可溶性基質であるカルボキシメチルセルロース(CMC)が用いられてきた。しかし実バイオマスを対象とした場合、この活性値が酵素の機能を正しく反映しているという保証はなく、これまでも CMC 活性値と糖化データとの間に齟齬があると報告されている。つまり従来法で用いられてきたモデル基質ではなく、実バイオマスを念頭に置いた不溶性基質、つまりセルロースマイクロフィブリルに対するエンドグルカナーゼの酵素活性法を確立する必要があった。

2. 研究の目的

セルロースマイクロフィブリルの重合度評価によるエンドグルカナーゼ活性測定法を確立する。さらに、この新規評価技術を迅速化ならびに簡便化するため、分光分析法を用いたハイスループット解析について検討する。

3. 研究の方法

まず酵素分解に適合した基質の標準化を行った。そのために、各種バイオマスからリグニンおよびヘミセルロースを除去することによってセルロースを精製した。さらに、組織・細胞構造による凝集状態を解消させるためグラインダーを用いて高分散性のセルロース懸濁液を調製した。

次に *Trichoderma reesei* 由来のエンドグルカナーゼ(EG)を上記のセルロースに作用させた。遊離グルコース量を測定した後に分解残渣を洗浄し、テトラヒドロフラン(THF)に溶解させるためセルロースカーバメートへ誘導体化した。得られた試料をゲル浸透クロマトグラフ(GPC)に供して分子量を測定し、重合度を算出した。酵素に関しては、同菌株由来のセロビオヒドロラーゼ(CBH)や β -グルコシダーゼ(BGL)だけでなく、市販セルラーゼに関しても評価を行った。

分光分析によるハイスループット評価については、ラマンならびに近赤外分光法によってスペクトルを取得した。蓄積したスペクトルデータと化学分析による重合度データを多変量解析することによって検量モデル

を構築した。前処理やスペクトル領域を最適化し、予測精度を評価した。

4. 研究成果

バイオマス種は針葉樹スギ、広葉樹ユーカリならびにイネ科植物のエリアンサス、バガスを検討した。当初の計画ではイナワラも検討予定であったが、灰分を非常に多く含むことからグラインダーの石製ディスクを傷つける懸念が生じたため、その代替としてバガスを用いた。いずれの試料においても Wise 法による脱リグニンに続いて水酸化ナトリウム処理によってヘミセルロースを除去した。4 種類全てのバイオマスにおいてグラインダー処理すると分散性セルロースを調製することができた(図 1)。ただし、エリアンサスとバガスにおいて灰分を比較的多く含むこと、スギに関してはリグニン除去のために Wise 処理を多く繰り返す必要があるためユーカリから調製したセルロースを以後の実験に使用することとした。

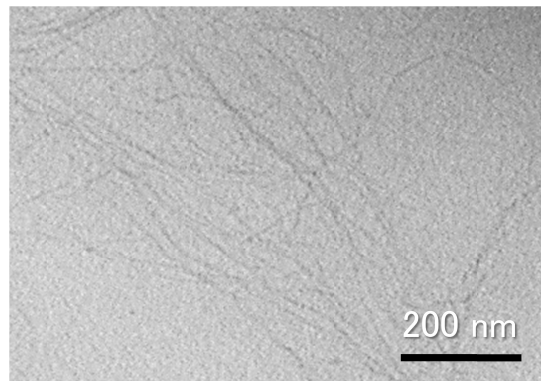


図 1 ユーカリから調製した分散性セルロースのクライオ電子顕微鏡観察像

最初の評価対象酵素である *T. reesei* の EG I と EG II を従来法である CMC 活性を測定したところ、それぞれ $242 (\pm 6.54)$ と $244 (\pm 5.43)$ U/mg であった。T 検定を行ったところこれら 2 つの酵素には有意な差が見られなかった。

調製した分散性セルロースを酵素分解させ、重合度の経時変化を追跡したところ、EG II では糖化 1 時間後に半分程度の分子量となり、その後減少率が緩和し、DP200 程度で安定した(図 2 上図)。この値は高等植物のセルロースを酸加水分解したときにあらわれるベルオフ重合度(LODP: Level Off Degree of Polymerization)と合致している。一方、EG I で分解した場合、明らかに重合度の減少スピードが遅かった。糖化率を横軸、重合度を縦軸にとると EG I の方が EG II よりも上部に位置していた。独立 2 群間の差の検定法である Mann-Whitney 検定を行うとこれらには有意な差があることから、CMC 活性評価結果とは異なり EG II の方が EG I よりもエンドグルカナーゼ活性が高いことが示された(図 2

下図)。

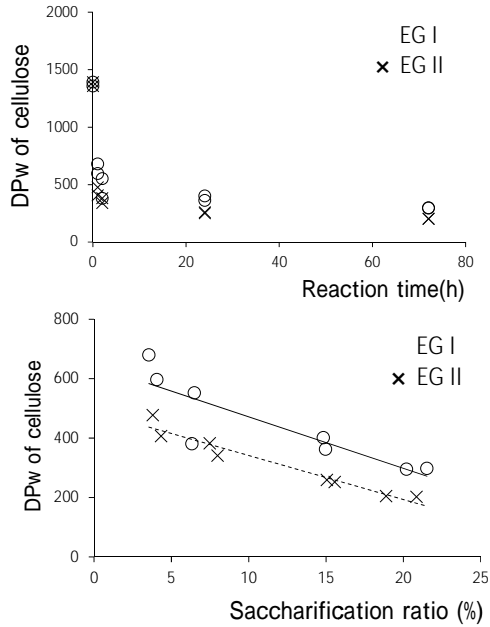


図 2 反応時間(上図)および糖化率(下図)に対する分解残渣の重合度。

エンドグルカナーゼ以外の単一酵素、例えば *T. reesei* 由来の CBH I や CBH II についても同様の評価を行った。特に、CBH II は一部でエンドグルカナーゼ活性を持つと報告されている。糖化率-重合度相関において、いずれの CBH もエンドグルカナーゼよりはるか上部に位置していた。さらに CBH I と CBH II の間には統計的に有意な差がなく、したがって本研究で用いた重合度評価法では CBH II が明確なエンドグルカナーゼ活性を持つことは示されなかった。

ケモメトリクス法を用いたハイスループット重合度解析の検討に際しては、ラマン分光スペクトルおよび近赤外分光スペクトルに対して、化学分析より求めた重合度データを目的変数とした多変量解析を行った。再現性の高いスペクトルを得るためには試料表面の平滑性が重要であるため、ハンドプレス機で錠剤を成型した。さらにショルダーや重複しているバンドの情報を引き出すためスペクトルの前処理として二次微分法を採用した。ラマン分光データを用いて重合度の回帰を試みたところ、非常に予測精度が低い結果となった。これは、ラマンスペクトルに重合度変化の情報が含まれていないというよりも試料間の変動よりスペクトルの再現性が低いことが原因であると考えた。そのため、安定したスペクトルが取得可能な近赤外分光法で検量モデルの構築を検討したところ、決定係数が 0.86 という高精度な予測モデルの構築することができた(図 3)。近赤外スペクトルによるセルロースの重合度評価の成功例は本研究課題が初めての報告である。スペクトル領域の最適化ならびに寄与率が高い近赤外線吸収帯を特定するため、第 2 倍音

領域(10000-7300 cm^{-1})、OH の第 1 倍音領域

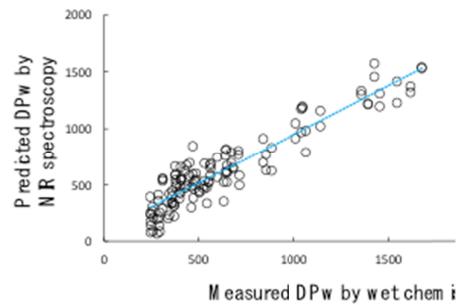


図 3 セルロース重合度に関する化学分析値と近赤外スペクトルによる予測値の相関。

(7300-6050 cm^{-1})、CH の第 1 倍音領域(6050-5500 cm^{-1})に分けると、OH の第 1 倍音領域> CH の第 1 倍音領域>第 2 倍音領域の順で検量モデルの精度が高かった。つまり、酵素分解における重合度の減少はセルロースの水酸基が関与していることが示唆された。

さらに近赤外スペクトルと重合度変化の原因を明らかにするため、OH の第 1 倍音領域から構築した検量モデルの回帰係数を計算した(図 4 上図)。すると 6950 cm^{-1} あたりに下に凸のピークが認められた。この吸収帯は比較的セルロース分子が乱れた構造に起因すると報告されている。実際に、EG で糖化した低重合度の分解残渣に比べると CBH で処理した高い重合度基質の方が 6950 cm^{-1} のショルダーピークは低かった(図 4 下図)。つまり、重合度とセルロースの結晶性には負の相関が認められた。

一見無関係に見える重合度が官能基の変化から予測されたことは大変興味深い。マイクロフィブリルの長さ方向に存在する秩序の乱れた領域がエンドグルカナーゼによって除去されるとともに、マイクロフィブリル内に

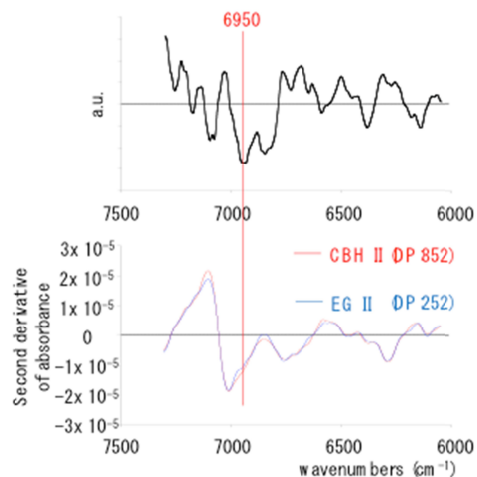


図 4 回帰係数(上図)とそれぞれの酵素で糖化した分解残渣の二次微分近赤外スペクトル(下図)

蓄積されたストレスが解放されることにより、分子配列の秩序が相対的に向上することが示唆された。

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., Mizuno-Tazuru, S., Sugiyama, J.: Near-infrared spectroscopy as a potential method for identification of anatomically similar Japanese diploxyloids. *Journal of Wood Science*, **61**(3), 251-261, 2015.
2. Horikawa, Y., Imai, M., Kanai, K., Imai, T., Watanabe, T., Takabe, K., Kobayashi, Y., Sugiyama, J.: Line monitoring by near-infrared chemometric technique for potential ethanol production from hydrothermally treated *Eucalyptus globulus*. *Biochemical Engineering Journal*, **97**, 65-72, 2015.

[学会発表](計6件)

1. 항성옥, 이원희, Yoshiki Horikawa, Junji Sugiyama: 목재문화재의 수종식별을 위한 새로운 접근 방법에 관한 고찰 -근적외선분광법과 케모메트릭 분석을 이용한 수종분류- (木材文化財の種の同定のための新しいアプローチに関する考察 -近赤外分光法とケモメトリクス分析を利用した種の分類), 韓国木材工学, 2015年4月, 春川, 韓国
2. 堀川祥生, 今井友也, 杉山淳司: TEMによる酵素-基質相互作用の可視化, 第65回日本木材学会大会, 2015年3月, 東京
3. 堀川祥生, 今井友也, 杉山淳司: TEMによる酵素-基質相互作用の可視化, 第21回日本セルロース学会年次大会, 2014年7月, 鹿児島
4. 堀川祥生, 今井友也, 杉山淳司: 透過型電子顕微鏡を用いた酵素-基質相互作用の可視化, 第28回セルラーゼ研究会, 2014年7月, 習志野

5. 堀川祥生, 阿部賢太郎, 今井友也, 榊原圭太, 辻井敬亘, 小林良則, 杉山淳司: セルロースの重合度測定によるエンドグルカナーゼ活性評価法の開発とそのハイスループット解析, 第64回日本木材学会大会, 2014年3月, 松山
6. 堀川祥生, 阿部賢太郎, 今井友也, 榊原圭太, 辻井敬亘, 小林良則, 杉山淳司: 重合度測定によるセルラーゼ活性評価法の開発とそのハイスループット化, 第20回日本セルロース学会年次大会, 2013年7月, 宇治
7. 堀川祥生, 阿部賢太郎, 今井友也, 榊原圭太, 辻井敬亘, 小林良則, 杉山淳司: セルロースの固体構造から観た基質と酵素の相互作用, 第27回セルラーゼ研究会, 2013年7月, 土浦

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 淳司(SUGIYAMA, Junji)
京都大学・生存圏研究所・教授
研究者番号: 40183842

(2) 研究分担者

堀川 祥生(HORIKAWA, Yoshiki)
京都大学・生存圏研究所・特定研究員
研究者番号: 90637711