

2-1 前処理バイオマスに適した糖化酵素

河合 哲志

初めに

セルロース系バイオマスを酵素糖化するにはバイオマスに対する前処理が不可欠である。一般的な方法としては水熱処理や希硫酸処理、NaOH処理などがある。これらの前処理を行うことでセルロースを覆うヘミセルロースやリグニンが分解/可溶化することなどにより酵素による分解効率が上昇し、使用する酵素量の低減化につながる。しかし、この不可欠なプロセスである前処理が酵素糖化を複雑にしている一因にもなる。その原因は前処理の種類によってバイオマスの組成や性質が大きく異なるためである。そのため、酵素も変化したバイオマスの性質に合わせたものを選択する必要性が生まれ、バイオマスの種類だけではなく前処理を考慮して酵素を最適化する必要がある。そこで本稿では様々な前処理バイオマスに対する酵素の最適化について述べる。

バイオマス糖化酵素

バイオマスの糖化に用いられる酵素は糸状菌である *Trichoderma reesei* が生産するセルラーゼ・ヘミセルラーゼが有名であり、すでに産業用として海外酵素メーカーから市販されている。*T. reesei* は酵素の生産性がきわめて高く（～100 g/L）、生産する糖化酵素のほとんどを菌体外へ分泌することなどが特徴としてあげられる。さらに、セルラーゼやヘミセルラーゼは成分酵素と呼ばれる多種類の糖化酵素で構成されており、*T. reesei* は分泌する成分酵素の種類が豊富なことも特徴の一つである。このような多種類の酵素がバイオマス分解に必要な理由はバイオマスがグルコースやキシロース、アラビノースなど複数の糖類から成るためである。そもそも、グルコースのみから成るセルロース自身が均一な状態にはなっておらず結晶領域や非結晶領域からなるため、セルロースを分解するだけでも複数の成分酵素が関与することが効率的分解に不可欠だと言える。セルロース結晶領域の分解には2種類のセロビオヒドロラーゼ（CBH）が働く。CBH Iはセルロースの還元末端から、CBH IIは非還元末端から作用し、セルロース鎖をトンネル構造をした活性部位に取り込むことでセルロース鎖を引き剥がしながらセロビオース単位で連続的に切断していく。セロトリ

オースなどのセロオリゴ糖単位で切断するエンドグルカナーゼ（EG）は7種類存在し、EG I、EG II、EG III、EG Vがセルロースの非晶領域に対して典型的なエンド型の活性を持つと言われている。EG IVおよびEG VIIはGlycoside Hydrolase（GH）Family 61に属する酵素であるが、近年この酵素はモノオキシゲナーゼであることが報告されている¹⁾。そのためこれらの酵素は典型的な加水分解酵素ではないものの本稿では慣例のままEGと表記する。EG VIはむしろキシログルカナーゼ活性が強いためヘミセルラーゼに分類した方がよいかもしれないがセルロースに対するエンド活性も持っている。CBHおよびEGによりオリゴ糖単位に切りだされた後はグルコシダーゼ（BGL）がグルコースに分解するまでがセルロース分解の一連の流れとなる。さらに、ヘミセルロース分解のためには同様にさまざまなGHファミリーに属する成分酵素が関与しているが、本稿ではセルラーゼ分解に絞って話を進める。

セルラーゼ研究の問題点

成分酵素を最適化するためには上記のさまざまな酵素がバイオマス分解に対してそれぞれどの程度関与しているか調べる必要がある。しかし、各成分酵素の関与を個別に明らかにすることは非常に難しい。その理由は各成分酵素の酵素活性を独立して測定することができないためである。代表的なセルラーゼの酵素活性測定法であるフィルターペーパー分解（FPU）活性はセルロース分解に関わる成分酵素すべて、カルボキシメチルセルロース分解（CMC）活性はEGのようなエンド活性を有する成分酵素とBGLも合わせて酵素活性として表れる。この傾向は

-nitrophenyl- β -D-cellobioside

や

-nitrophenyl- β -D-lactoside

のような人工基質を用いた場合も同様に複数の成分酵素が作用する。そもそも、FPU活性やCMC活性はバイオマス分解能と相関がなく、酵素学的解析がそのままバイオマス分解に反映できないこともこの分野の研究を困難にする要因の一つである²⁾。さらに、成分酵素はセルロース分解に対して相乗的に作用するため分解に対する関係はより複雑になる。たとえばエキソ作用をもつCBHはエンド作用をもつEGがセルロース鎖に切れ目を入れることでアタックできる還元

末端が増えることや障害を取り除くことで単独で働くよりも数倍高い酵素活性を表す³⁾。このような分かりやすい例だけではなく、たとえばSwolleninという成分酵素は自身に分解活性はないけれどセルラーゼに添加すると相乗効果を表すことが報告されているなど、補助的な役割を持つ成分酵素も多く含まれる⁴⁾。 *T. reesei*は数十種類の成分酵素を分泌していることが報告されており、これらの成分酵素すべての相乗効果の関係を明らかにすることは容易ではない。そのため、数種類の成分酵素を精製して酵素のカクテル化を行っても、その結果を直接、 *T. reesei*が分泌する糖化酵素全体の改良に反映させることはできない。

成分酵素の網羅的解析

上記のような問題点をクリアした条件でバイオマス糖化に与える各成分酵素の影響を調べるために単一成分欠損セルラーゼを用いてさまざまな前処理バイオマスに対する網羅的な解析を行った⁵⁾。この欠損セルラーゼは目的とする単一成分のみを遺伝的に欠損させた酵素であるためそれ以外の成分酵素はすべて含まれている。 *cbh1-2*, *egl1-7* 遺伝子をそれぞれ欠損させた9種類の単一成分欠損セルラーゼ（それぞれ Δ CBH I-II, Δ EG I-VII）を用いて前処理バイオマスを糖化し、野生株（WT）と比較することで各成分酵素がどの程度バイオマス糖化に影響を与えるか調べた。基質はイナワラ・エリアンサス・ユーカリ・スギの4種類を用い、前処理方法はNaOH・

希硫酸・水熱処理を行った。ただし、スギは前述の前処理方法では適切なサンプルを作成することが困難であるため蒸気爆砕処理を行った。NaOH処理バイオマスの特徴はリグニンの大部分が可溶化されることである。また、草本植物に対しては比較的低温で処理をすることが可能であるためヘミセルロースが分解されずに大部分が固形分として残存する。希硫酸・蒸気爆砕処理はヘミセルロースがほぼすべて可溶化し、固形分としてはセルロースとリグニンのみとなる。水熱処理は温度に依存し、比較的低温で処理できるイナワラは半分程度残存するがエリサンサス・ユーカリではほとんどが可溶化する。前処理バイオマスに加えて市販されている微結晶セルロース（Avicel）も用いた。なお、糖化率は硫酸加水分解法により基質の糖組成分析を行い、それらを基に酵素反応で生成したグルコース・キシロースから算出した。これらを欠損セルラーゼで糖化した結果、 Δ CBH Iはすべての基質でもっとも糖化率が低いため、CBH Iはバイオマス・Avicelの糖化反応に対して大きな影響を与えていることが明らかとなった（表1）。これは *T. reesei*の分泌タンパク質に占めるCBH Iの割合が大きいことも要因の一つであると考えられるが、CBH Iの結晶性セルロースに対するプロセッシブな分解機構などの特徴的な作用がバイオマス分解に対しても重要であるためと考えられる。ただし、条件により比較的分解が容易な硫酸処理稲わらに対してCBH Iの影響は他のバイオマスと比べるとかなり低くなるため、基質による影響の差があると考えられる

表1. 各成分酵素のバイオマス糖化に対する影響

	Δ CBH I	Δ CBH II	Δ EG I	Δ EG II	Δ EG III	Δ EG IV	Δ EG V	Δ EG VI	Δ EG VII
NaOH処理 稲わら	■	■		■					
硫酸処理 稲わら	■	■		■					
NaOH 処理 エリアンサス	■	■	■						
硫酸処理 エリアンサス	■	■	■			■			
水熱処理 エリアンサス	■					■			
水熱処理 ユーカリ	■	■	■	■	■	■			
爆砕処理 スギ	■			■		■			
Avicel	■	■							

WTの糖化率を100とした時の相対値。□：100 ≤ 相対値 < 95, ■：95 < 相対値 ≤ 90, ■：90 < 相対値 ≤ 85, ■：85 < 相対値 ≤ 80, ■：80 < 相対値

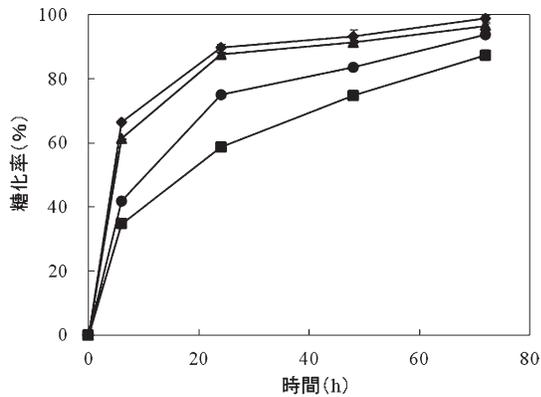


図1. 硫酸処理稲わら糖化反応の経時変化. ◆: WT, ■: ΔCBH I, ●: ΔCBH II, ▲: ΔEG I.

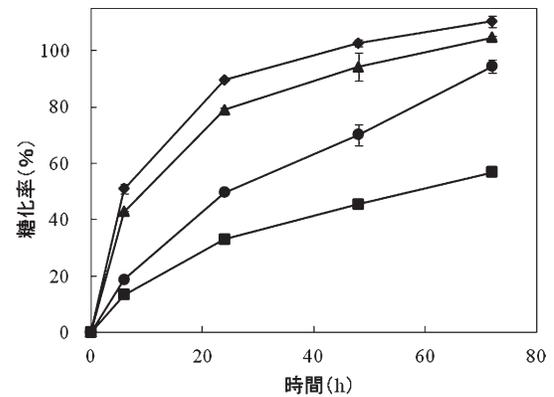


図3. 硫酸処理ユーカリ糖化反応の経時変化. ◆: WT, ■: ΔCBH I, ●: ΔCBH II, ▲: ΔEG I.

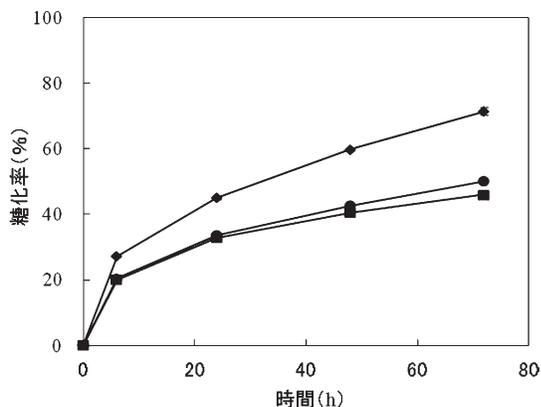


図2. Avicel糖化反応の経時変化. ◆: WT, ■: ΔCBH I, ●: ΔCBH II.

(図1). これに対してΔCBH IIの糖化率がΔCBH Iと同程度に低かったのはAvicelに対してのみである(図2). Avicelに対してはこのCBH IIとCBH Iのみが極端に大きな影響を与えておりEGはまったく欠損効果が表れなかった(表1). この傾向はバイオマスとは大きく異なるため活性測定に用いる標準的な基質とバイオマスでは各成分酵素の影響はまったく異なることが示唆された. そのためFPU活性やCMC活性がバイオマス分解能に反映されないのはむしろ当然と言える. CBH IIの前処理バイオマスに対する影響はCBH Iより小さいものの, 植物種や前処理の種類によって大きく異なる. CBH IIはCBH Iと同様にセロビオヒドロラーゼとして分類されているがファミリーはCBH IがGH7, CBH IIがGH6と異なり, 作用機構も明確なプロセシブ作用が確認できず, エクソ型とエンド型を持ち合わせた中間的な存在と言われている⁶⁾. このような違いが起因したためか, 今回の結果からはCBH IIはバイオマスと比較するとAvicelに対して特に大きな影響を持つことが示唆された. バイオマス

分解初期をみるとΔCBH IIの糖化率はWTの糖化率と大きな差がありΔCBH Iとほぼ同じ値であった(図3). そのため, 糖化反応初期の反応速度を高めるためには必須であるが, 最終的なバイオマス分解そのものに対しては他の成分酵素である程度代替可能であることが考えられる. 4種の典型的なEGを比較するとEG IIIやEG Vはほとんどの基質に対して欠損の影響が見られないが, EG IやEG IIは基質種によって欠損の影響が異なった. 特に3種類の前処理エリアンサスの結果がそれぞれ異なることから, 同じ植物種でも前処理によりセルロースの性質やその他の構造がかなり異なってくるため, それが成分酵素の働き方に影響していることが推察される. EG IはEGの中でもっとも主要な働きをしていると考えられていたが, 今回の結果からはその影響はそれほど大きくなく, 基質種によってはまったく影響しない場合もみられた. ただし, EG IのプロモーターはCBH I, CBH IIに続く強力なものであり非常に魅力的である⁷⁾. そこで*eglI* プロモーターを利用して作られたのがBGL組換えセルラーゼJN13である. JN13の詳細は次の2-2で触れるがそのバイオマス分解能力は最新市販酵素を上回り, 酵素を最適化することの重要性が改めて確認できた. EG IVとEG VIIはどちらも同じファミリーであるにも関わらずその影響はまったく異なり, EG VIIがすべての基質に対してまったく影響がないことに対してEG IVは欠損効果がまったくない基質もあるが水熱処理ユーカリや爆砕処理スギに対しては大きな影響を与えていることが判明した(表1). EG IV自身に高いセルロース分解活性は見られないためその働きはあくまで補助的なものであり, また分泌タンパク質に占める割合は1%前後と非常に少ないにも関わらずここまで大きな影響を与えるのは予想外であった. EG IVの効果バイオマス種によってここまで大きく違う要因の一つはエレクトロンド

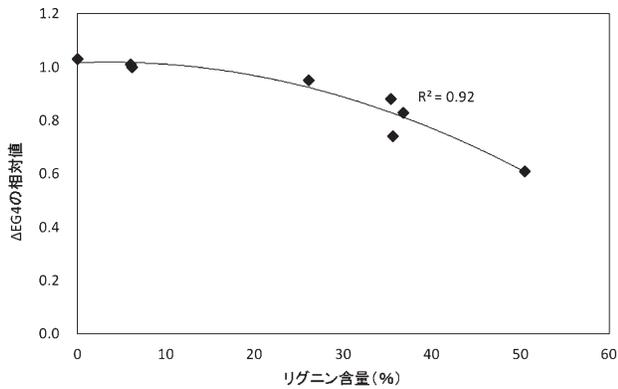


図4. リグニン含量とEG IVの欠損効果の相関図

ナーの存在が考えられる。GH61はセロピオースデヒドロゲナーゼ (CDH) を介して電子の授受を行っていることが報告されている⁸⁾。しかし、ゲノム解析の結果から *T. reesei* はCDHを持っていないことは明らかにされている。そこでCDHの代わりにするのがバイオマス中に含まれるリグニンと考えられる。リグニンは抗酸化活性があり、その活性値と相関してGH61酵素の糖化率増強効果が上昇するという報告がある⁹⁾。今回のデータからもリグニン量とEG IVの影響に相関が見られた(図4)。

おわりに

今回用いた単一成分欠損セルラーゼを用いることで *T. reesei* に含まれる成分酵素が前処理バイオマスに対してどの程度影響を与えているか明らかとなった。その中で、

EG IVのようにバイオマスの種類による違いの原因が明らかになったものもあるが、各成分酵素と前処理バイオマスの関係は非常に複雑であり、まだ完全に説明できる部分は少ない。また、今回はセルロース分解に焦点を合わせたのが、複数の糖から成るヘミセルロースは植物種によるバラエティーが増し、おのずと必要になる成分酵素の複雑さも増すことが予想されるためさらなる解析が必要となる。酵素をさらに改良し酵素コストを低減化することはリグノセルロース系バイオマスを利用するために必須であり、今回得られた知見がさらに高機能な酵素の開発につながることを期待する。

文 献

- 1) Quinlan, R. J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15079 (2011).
- 2) Kawai, T. *et al.*: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 1741 (2012).
- 3) Eriksson, T. *et al.*: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **101**, 41 (2002).
- 4) Saloheimo, M. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4202 (2002).
- 5) Kawai, T. *et al.*: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 805 (2013).
- 6) Boisset, C. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1444 (2000).
- 7) Rahman, Z. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 899 (2009).
- 8) Phillips, C. *et al.*: *ACS Chem. Biol.*, **6**, 1399 (2011).
- 9) Dimarogona, M. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **110**, 480 (2012).