

ヘミセルロースの構造と分解酵素

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	前原, 智子 金子, 哲
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	2巻3号
掲載ページ	p. 165-168
発行年月	2012年8月

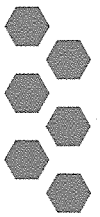
農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





β-結合糖質の
有効活用—ヘ
ミセルロース
の利用—

緒言 ヘミセルロースの構造と分解酵素 —キシラン分解酵素を例とした ヘミセルロースの分解機構について—



前原智子 (まえはら ともこ)¹

金子 哲 (かねこ さとし)²

¹食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域・生物機能利用ユニット 食品総合研究所特別研究員

²食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域・生物機能利用ユニット ユニット長

1. はじめに

近年、二酸化炭素排出削減や化石資源代替のため、バイオ燃料製造研究が盛んに行われている。しかしながら、バイオ燃料の本格的な利用実現に向けては、現代の石油化学産業の土台である石油リファイナリーに取って代わる、バイオマスから燃料のみならず、化成品、ファインケミカル等も生産するバイオリファイナリー技術の確立が必須である。多糖類を主成分とする植物細胞壁は、年間生産量約1,500~2,000億トンといわれ、地球上に最も多く存在するバイオマス資源である。ヘミセルロースは植物細胞壁多糖の約40%を占めるが、現在利用されているヘミセルロースは、その賦存量のごく一部であり、大部分のヘミセルロースについては有効な利用法が開発されていない。

ヘミセルロースの最大の特徴は、ヘテロ多糖であること、構成糖の種類・分岐構造が植物種や植物の生長段階・部位により異なることである。したがって、ヘミセルロースはホモ多糖類であるセルロースに比べ、この構造特性を生かして多種多様な用途へ展開が可能であり、高付加価値的に利用できる潜在能力を持っていると考えられる。しかしながら、その構造の複雑さや局在の問題から、ヘミセルロースやヘミセルラーゼに関する理解はあまり進んでいない。本稿では、ヘミセルロースの構造と分解酵素について概説する。

2. ヘミセルロースの種類と構造

ヘミセルロースとは、「水や0.2%程度のNaOH溶液に不溶であるが、4~5% NaOH溶液に溶ける植物細胞壁性の炭水化物で、薄い無機酸と共に加熱するとセルロースと比べてはるかに容易に加水分解され、ペントースとヘキソースを生ずるもの」と定義されている¹⁾。上述の通り、ヘミセルロースはペントースを含むものが多い。

代表的なヘミセルロースとしては、マンナン、β-1,3-1,4-グルカン、キシラン、キシログルカンがあげられる²⁾。これらの構造を図1に示す。ヘミセルロースはヘテロ多糖

であり、複数の構成糖で構成される。名前の由来となる主鎖に対し、別の構成糖が側鎖を形成した分岐構造を有するのが一般的である。

マンナンとしては、ガラクトマンナン、グルコマンナン、ガラクトグルコマンナン等が知られている。ガラクトマンナンはマンノピラノースがβ-1,4結合した主鎖に、ガラクトースがα-1,6結合している。一方、グルコマンナン、ガラクトグルコマンナンは、グルコースとマンノースがβ-1,4結合した多糖を主鎖に持つ。キシログルカンはβ-1,4-グルカンの主鎖に、ガラクトース、アラビノース、フコースといった単糖で修飾されたキシロースが結合している。1,3-1,4結合グルカンは、β-1,4結合のグルコースを主鎖にβ-1,3結合が混じる。キシランはβ-1,4結合のキシロースを主鎖に持ち、アラビノースやグルクロン酸側鎖等によって修飾されている。

詳細は紙面の都合で割愛するが、それぞれのヘミセルロース成分については、参考書等を参照されたい³⁾。

3. ヘミセルロース分解酵素

ヘミセルロースはヘテロ多糖であり、多くの分岐構造を有するため、その分解は側鎖により大きく制約を受ける。したがって、ヘミセルラーゼの性質は側鎖の認識機構を理解することに尽きるといっても過言ではない。図1に示すように、各々のヘミセルロースを完全分解するには種々のエンド型、エキソ型酵素が必要となる。非常に多種に渡ることから、本文中に全ての酵素について詳細を示すことはできない。ここでは、最も賦存量の多いヘミセルロース成分である(セルロースに次いで天然に最も多く存在するバイオマス資源である)キシランを例として、ヘミセルラーゼの特徴(側鎖の認識)について説明する。

3.1 Xylanase (EC 3.2.1.8)

キシランナーゼはキシランの主鎖をランダムに加水分解するエンド型酵素である。糖加水分解酵素ファミリー (Glycoside Hydrolase family) のGH5, 8, 10, 11, 30, 43に分類さ

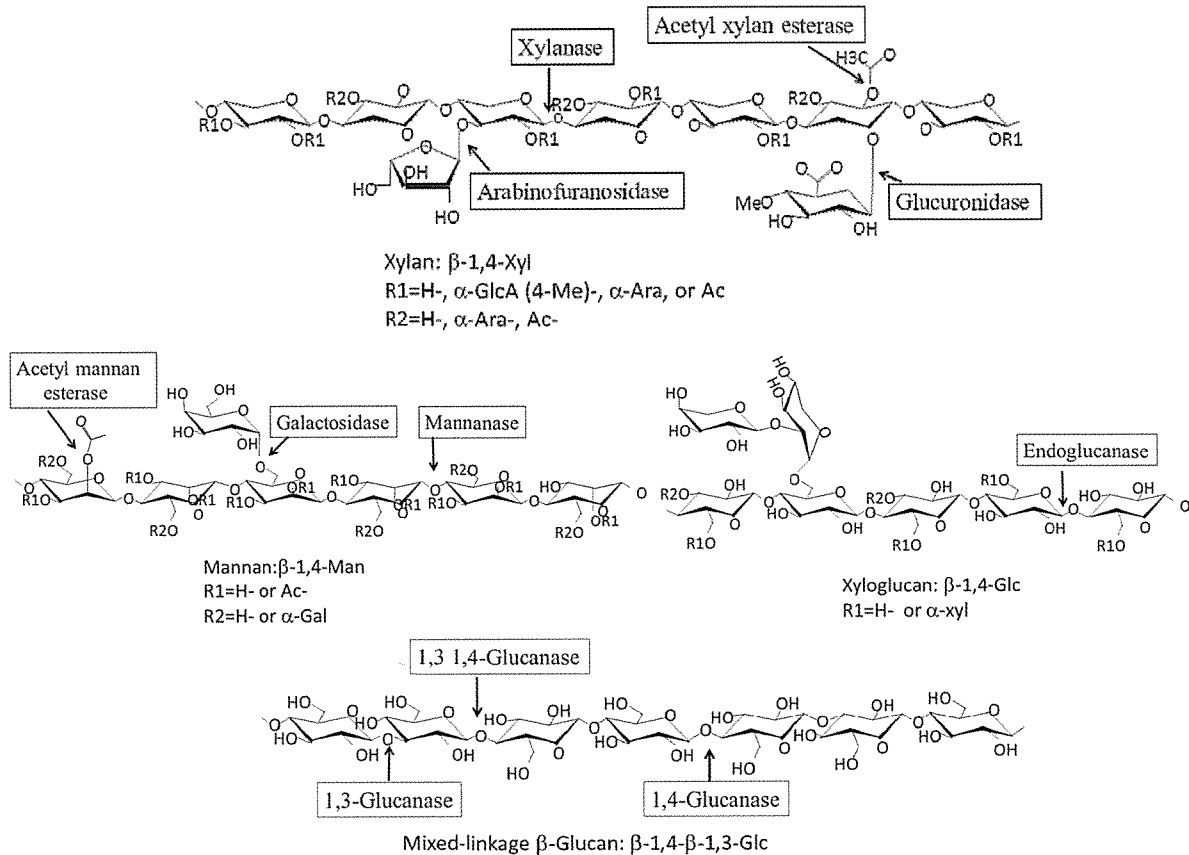


図1. ヘミセルロースの構造とキシラン分解酵素

れるが、ほとんどはGH10とGH11に分類されている。GH10キシラーゼとGH11キシラーゼでは、異なる反応生成物を生産することが知られているが⁵⁷⁾、そのメカニズムや、酵素の基質特異性がキシラン分解にどのように影響しているかについては、あまり研究されていない。

Streptomyces olivaceoviridis E-86のGH10キシラーゼ(SoXyn10A)は、古くからキシラン側鎖の認識について詳細に研究されてきた。SoXyn10Aとそのキシラン分解プロダクトであるキシロビオース、キシロトリオース、グルクロノキシロオリゴ糖、アラビノキシロオリゴ糖との結合構造⁵⁸⁾や生化学的な解析⁵⁹⁾から、SoXyn10Aは5個のキシロースを認識する活性部位(サブサイト-3~+2)を有していることが明らかされた。さらにこの活性部位のうち4-O-Me-グルクロン酸側鎖を持つキシロース残基はサブサイト-3へ、アラビノース側鎖を持つキシロース残基はサブサイト-2へ、それぞれ結合している様子が観察された。キシロース残基は隣の糖と120°回転した状態で基質結合クレフトに結合している。各サブサイトにおける糖認識の様子を詳細に観察すると、サブサイト+2、-1、-2に位置しているキシロースの2位水酸基部分は、クレフトの両壁や底部方向を向いており、 α -1,2結合で繋がるグルクロン酸側鎖が侵入可能なスペースがない(図2(a))。一方、サブサイト+1と-3に位置するキシロース残基の2位水酸基は、溶媒面を向いており、グルクロン酸側鎖を酵素の外側に向けて保有することが可能であるようにみえる。同様に、 α -1,3結合のアラビノース側鎖について、キシロース残基の

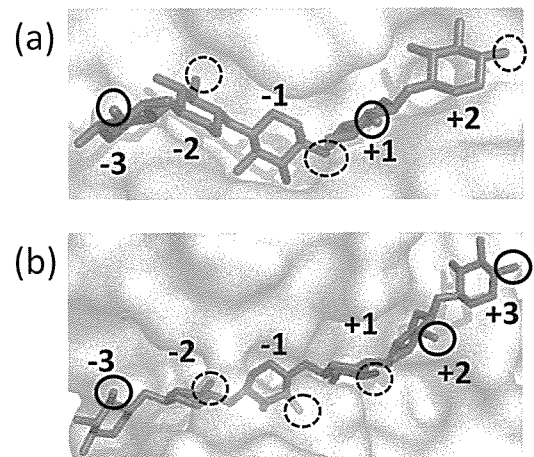


図2. GH10, GH11キシラーゼの基質結合クレフトにおける基質認識

(a) GH10, (b) GH11. キシロオリゴ糖の結合構造を示している。線で囲った部分はキシロース残基の2位水酸基。線はグルクロン酸側鎖の結合スペース有り。点線はグルクロン酸側鎖の侵入は不可。

3位水酸基の向きに注目すると、サブサイト+2, +1, -2, -3に位置するキシロース残基の3位水酸基は溶媒面を向いており、アラビノース側鎖を有することができると考えられた。他のGH10酵素についても同様の観察がなされていることから、SoXyn10Aにみられる側鎖認識機構は、GH10キシラーゼに共通のメカニズムと考えられる。

一方、GH11キシラーゼについては前述のような基質認識に関する研究が少なく、側鎖の認識についてフェルロイルアラビノキシロオリゴ糖をソーキングした構造から考

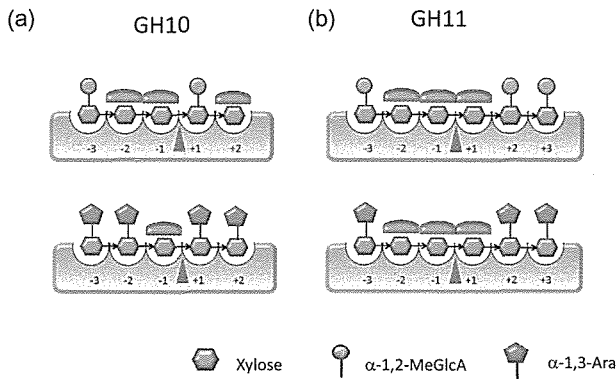


図3. GH10, GH11の基質認識概略図

(a) GH10. α -1,2結合のグルクロン酸側鎖を有するキシロースは、酵素の構造上の理由により、サブサイト-3, +1にのみ位置することが可能。それ以外のサブサイトは側鎖の入る空間がない。一方、 α -1,3結合のアラビノース側鎖を有するキシロースは、サブサイト-3, -2, +1, +2に位置することが可能。(b) GH11. α -1,2結合のグルクロン酸側鎖を有するキシロース、および α -1,3結合のアラビノース側鎖を有するキシロースは、サブサイト-3, +2, +3にのみ位置することができる。

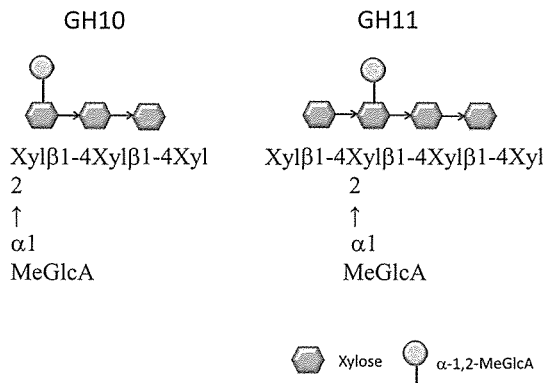


図4. GH10, GH11による分解産物例

察している例が1つあるのみである¹⁰⁾。*S. olivaceoviridis* E-86由来GH11キシラナーゼ (SoXyn11A) のモデル構造から推察すると、GH11キシラナーゼの側鎖認識は下記のようなになる。

SoXyn11Aはサブサイトが6個(-3~+3)存在している。GH10の場合と同様に、結合しているキシロース残基は隣接する糖と120°回転した状態で位置している。各サブサイトにおけるキシロースの2位水酸基の方向をみると、サブサイト-3, +2, +3に位置するキシロースの2位水酸基は溶媒面を向いていることから、 α -1,2結合グルクロン酸側鎖が存在することが可能といえる(図2(b))。またキシロース残基の3位水酸基の方向から、サブサイト-3, +2, +3のキシロース残基はアラビノース側鎖を保有することができることが予想される。

上記の構造から観察された知見をまとめると図3のようになる。これまでの研究により、GH10, GH11によって図4に示した分解産物が得られることが知られているが、構造からの観察はこれらの結果と一致する。グルクロン酸側鎖を持つキシロース残基を基質とした場合では、グルクロン酸側鎖の結合しているキシロース間に、GH10は最低2個、GH11では3個の、側鎖を持たないキシロース残基

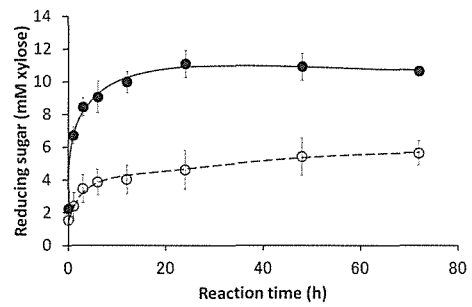


図5. GH10, GH11によるキシラン分解

BirchwoodキシランにGH10キシラナーゼ (SoXyn10A), GH11キシラナーゼ (SoXyn11A) を作用させた結果、得られた分解物の量は異なっていた。黒丸はGH10による分解物、白丸はGH11による分解物。

が存在しなければ、酵素が作用することは不可能である。以上のように、エンド型ヘミセルラーゼの側鎖認識は、側鎖がクレフトに入れるか否かといった、立体障害により識別されていることがわかる。

同モル量のGH10キシラナーゼおよびGH11キシラナーゼを用いてキシランを分解した場合、図5に示すような異なる分解曲線が得られる。キシラナーゼの側鎖認識特性がキシラン分解に与える影響についてはほとんどわかっていないが、GH10キシラナーゼは、GH11キシラナーゼに比べて基質にアタックできるポイントが多いため、このような結果になるのではないかと推察される。

3.2 α -Glucuronidase (EC 3.2.1.131)

次に側鎖の分解酵素について考えてみたい。グルクロノキシランの側鎖にアタックする酵素として、 α -グルクロニダーゼが知られている。グルクロニダーゼとして初めてクローニングされた酵素は、GH67に分類された¹¹⁾。GH67ファミリーのグルクロニダーゼは非還元末端キシロースについてグルクロン酸側鎖のみを遊離する性質を有している。このため、図4に示したようなGH10キシラナーゼの分解産物には作用するが、GH11キシラナーゼの分解産物には作用しない。しかしながら、ごく最近になって、GH11の分解産物に作用することの可能なグルクロニダーゼが発見され、新たにGH115ファミリーとして分類されることとなった¹²⁾。

このように側鎖に作用するエキソ型酵素には、多糖に作用できるものと、できないものが存在する。

4. おわりに

ヘミセルロースの分解は側鎖に影響を受けるため、主鎖を分解するエンド型酵素と側鎖を遊離するエキソ型酵素について、側鎖との関係を解説したが、ヘミセルロースの完全分解には、主鎖由来オリゴ糖を分解するエキソ型酵素など、様々な酵素が必要である。キシラン分解においてはキシロシダーゼが必要であるが、キシロシダーゼが反応系に存在した場合、図6のような分解メカニズムが考えられ、

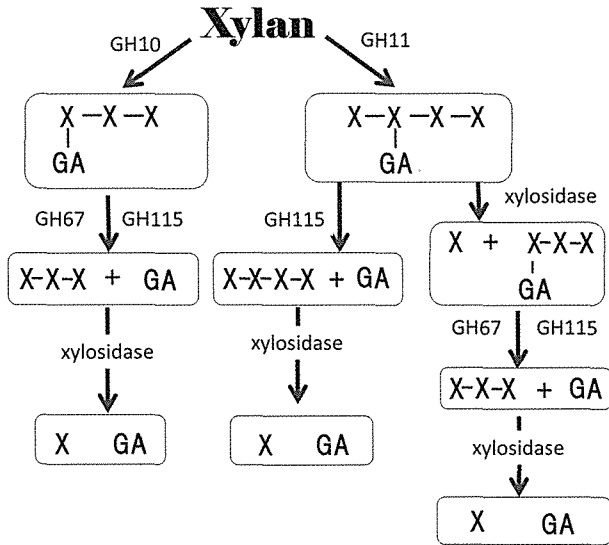


図6. キシラン分解酵素によるキシラン分解例
Xはキシロース, GAはグルクロン酸。

GH10とGH11, GH67とGH115の基質特異性の違いは問題にならなくなる。

生物がなぜこのような多様な酵素を作り出し、使い分けられているかは、その生物種の生き残り戦略にほかならない。したがって、ヘミセルロース分解酵素にはまだまだ多様な珍しい基質特異性を有する未発見の新規酵素が多数存在していると考えられ、基礎研究としても魅力的である。また、応用を考えた際には、ヘミセルロースの利用はバイオマスリファイナリーが成り立つ上で非常に大きなポイントとなる。複雑で多様な構造を有することから、これまで情報が整理されず、理解も進んでこなかったヘミセルロースであるが、今後、その特性を逆に生かした利用法が数多く見出されることを期待する。

文献

1) E. Schulze: Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung

der pflanzlichen Zellmembranen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **24**, 2277-2287 (1891).

- 2) D. Mohnen, M. Bar-Peled and C. Somerville: Cell wall polysaccharide synthesis. in *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*, Himmel M.E., ed., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 94-187 (2008).
- 3) D.B. Jordan, M.J. Bowman, J.D. Braker, B.S. Dien, R.E. Hector, C.C. Lee, K.A. Mertens and K. Wagschal: Plant cell walls to ethanol. *Biochem. J.*, **442**, 241-252 (2012).
- 4) P. Albersheim, A. Darvill, K. Roberts, R. Sederoff and A. Staelin: *Plant Cell Walls, 1st edition*. Garland Science, New York, pp. 1-350 (2010).
- 5) P. Katapodis, M. Vrsanská, D. Kekos, W. Nerinckx, P. Biely, M. Claeysens, B.J. Macris and P. Christakopoulos: Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*. *Carbohydr. Res.*, **338**, 1881-1890 (2003).
- 6) G. Pell, E.J. Taylor, T.M. Gloster, J.P. Turkenburg, C.M. Fontes, L.M. Ferreira, T. Nagy, S.J. Clark, G.J. Davies and H.J. Gilbert: The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9597-9605 (2004).
- 7) K. Kolenová, M. Vrsanská and P. Biely: Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *J. Biotechnol.*, **121**, 338-345 (2006).
- 8) Z. Fujimoto, S. Kaneko, A. Kuno, H. Kobayashi, I. Kusakabe and H. Mizuno: Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9606-9614 (2004).
- 9) S. Kaneko, H. Ichinose, Z. Fujimoto, A. Kuno, K. Yura, M. Go, H. Mizuno, I. Kusakabe and H. Kobayashi: Structure and function of a family 10 β -xylanase chimera of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 FXYN and *Cellulomonas fimi* Cex. *J. Biol. Chem.*, **279**, 26619-26626 (2004).
- 10) M. Vardakou, C. Dumon, J.W. Murray, P. Christakopoulos, D. P. Weiner, N. Juge, R.J. Lewis, H.J. Gilbert and J.E. Flint: Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanases. *J. Mol. Biol.*, **375**, 1293-1305 (2008).
- 11) T. Nagy, K. Emami, C.M.G.A. Fontes, L.M.A. Ferreira and H. J. Gilbert: The membrane bound α -glucuronidase from *Pseudomonas cellulosa* hydrolyses glucuronoxylooligosaccharides but not glucuronoxylan. *J. Bacteriol.*, **184**, 4925-4929 (2002).
- 12) S.L. Chong, E. Battaglia, P.M. Coutinho, B. Henrissat, M. Tenkanen and R.P. de Vries: The α -glucuronidase Agul from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycoside hydrolase family (GH115). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 1323-1332 (2011).