

セルロースの高次構造改変とその酵素分解性の評価

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	水野,正浩
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	7巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 10-15
発行年月	2017年2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





—受賞論文—

Deconstruction of the Hierarchical Structure of Cellulose and Its Enzymatic Hydrolysis*

セルロースの高次構造改変とその酵素分解性の評価*

水野正浩 (みずの まさひろ)^{1,2,*}

Masahiro Mizuno^{1,2,**}

¹ 信州大学学術研究院工学系

380-8553 長野県長野市若里 4-17-1

² 信州大学先鋭領域融合研究群国際ファイバー工学研究所バイオ・メディカルファイバー研究部門

386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

¹ Institute of Engineering, Academic Assembly, Shinshu University

4-17-1 Wakasato, Nagano-shi, Nagano 380-8553, Japan

² Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research, Institute for Fiber Engineering, Division of Biological and Medical Fibers, Shinshu University

3-15-1 Tokida, Ueda-shi, Nagano 386-8567, Japan

要旨：セルロースはD-グルコースから構成される、枝分かれ構造を含まない直鎖状の多糖である。また、直線上に配置した分子同士が会合し、結晶性の高い高次構造を形成するため、セルラーゼなどの酵素による分解性が低い。筆者らは、セルロース溶解性を示すイオン液体に着目し、セルロースの高次構造と酵素分解性の関係を調査した。イオン液体による溶解後に再析出された再生セルロースは、II型セルロースに近い結晶型を示したが、その構造は用いるイオン液体の種類によって異なることを明らかにした。次に、作用機序が異なる3種類のセルロース分解酵素を用いて再生セルロースの分解性評価を行った結果、非晶領域に作用しやすいエンドグルカナーゼによる分解性が、イオン液体の種類によらず大きく上昇することが明らかとなった。また、再生セルロースの構造がよりII型セルロースに近くなるほど、酵素分解性は低下した。実バイオマスに対するイオン液体処理においては、イオン液体の種類により溶解挙動が大きく異なることと、完全溶解を行わなくても十分に酵素反応性を改善させることが可能になることを明らかにした。

キーワード：セルロース、再生セルロース、イオン液体、セルラーゼ、バイオマス***

1. はじめに

セルロースは地球上で最も豊富に存在する有機物であるといわれる多糖である。その理由は、陸上植物の細胞壁を構成する主要成分の1つであり、光合成における代謝産物として豊富に生産されるからである。セルロースの構成単糖は、澱粉と同様にD-グルコースである。しかし、澱粉とは異なり、枝分かれ構造を含まない直鎖状分子であり、分子鎖間で水素結合や疎水的な相互作用を介し“セルロース鎖の束”を形成する。こうした束はセルロースマイクロフィブリルと呼ばれ、これらが更に会合し、より太いセルロース繊維の束が形成される。このような“セルロースの高次構造”は、セルロースに対して非常に強固で安定な性

質を付与している。たとえば、セコイアなどの木の中には樹高が100 mを越すものも珍しくない。また、法隆寺の西院伽藍の建築群は世界最古の木造建築であるとされており、1,300年近い年月を経た今もなお、現存している。このように、天然に存在するセルロースは、植物が進化の中で獲得した強固な構造体を形成するための材料ともいえる。

一方、植物が自然循環の中で朽ちていく過程では、セルロースの分解も非常に重要となる。この際に大きな役割を果たすのが、担子菌をはじめとする様々な微生物により生産されるセルロース分解酵素である。バイオエタノールに代表されるバイオリファイナリーへの酵素利用は、こうした微生物がもつ性質を利用するものであるが、前述のとおりセルロースの高い結晶性は、酵素分解を妨げる要因と

* 本原稿は、日本応用糖質科学会平成28年度大会の奨励賞受賞講演で一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 026-269-5395, Fax. 026-269-5394, E-mail: m-mizuno@shinshu-u.ac.jp)

*** Key words: cellulose, regenerated cellulose, ionic liquid, cellulase, biomass

略記: [N₂₂₁ME] [Ala], N-(2-methoxyethyl),N,N-diethyl,N-methylammonium alanine; [N₂₂₁ME] [Lys], N-(2-methoxyethyl),N,N-diethyl,N-methylammonium lysine; [N₂₂₁ME] [Trp], N-(2-methoxyethyl),N,N-diethyl,N-methylammonium tryptophan; [Emim] [Cl], 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride; [Emim] [OAc], 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate; [Emim] [DEP], 1-ethyl-3-methylimidazolium diethyl phosphate; MCC, microcrystalline cellulose.

なっている。そのため、結晶性の高いセルロースの酵素分解においては、結晶性を弱めるような前処理を施すことが必要となる。

筆者らは、これまでに水熱処理によるバイオマスの前処理効果の研究¹⁻³⁾に従事してきたが、本研究では基質であるセルロースの高次構造と酵素による分解性について調べるために、イオン液体と呼ばれるセルロース溶剤に着目した。イオン液体は、温和な条件下でセルロースを溶解させることが可能であると同時に、容易に再生セルロースを調製することも可能である。ここでは、種類の異なるイオン液体処理によって得られる再生セルロースの高次構造と酵素分解性の関係、実バイオマスに対するイオン液体処理の効果等について紹介する。

2. イオン液体によるセルロースの溶解

多くのセルロースは、植物により結晶性のセルロースとして生産される。綿（コットン）や麻は、そのまま繊維として利用されるが、木材などのパルプから製造されるレーヨン、一度、可溶化させた後に紡糸された再生繊維である。産業的には、19世紀半ばから後半にかけ、銅アンモニア溶液（Schweizer 試薬）やビスコース法に代表される誘導体化によるセルロース溶解方法が開発、利用されてきた。実験室規模では、非水系有機溶剤として *N,N*-ジメチルアセトアミドを用いてセルロースを分散後、塩化リチウムを添加することで錯体形成を行い、溶解させる方法などがよく知られている。こうした溶剤により一度溶解され、その後、再び固体として再生されたセルロースは、再生セルロースと呼ばれる。天然のセルロースは、セルロース鎖が同一方向に配向した結晶構造（I 型）をとるのに対し、再生セルロースは逆並行に配向した結晶構造（II 型）をとる。

2002 年、米国アラバマ大の Rogers らのグループによりセルロース溶解性を示すイオン液体が報告されてから、セルラーゼ溶剤の利用は新しい局面を迎えた⁴⁾。イオン液体は 100°C 以下で液体である塩の総称であり、蒸気圧が低く揮発しにくい塩であることから、グリーンで安全な溶媒と

して産業利用もされている。セルロース溶剤としてのイオン液体の利点は、溶解条件が他のセルロース溶剤と比較すると温和であることや、溶解操作が非常に簡便であることなどが挙げられる。また、イオン液体に溶解したセルロースは、水などの貧溶媒を添加することで、容易に再生セルロースとして再析出させることが可能である（図 1）。セルロース溶解性を示すイオン液体の種類や溶解度については、Wang らや Pinkert らの文献に詳しくまとめられている^{5,6)}。

3. アミノ酸イオン液体の開発

イオン液体を構成するカチオン種とアニオン種のセルロース溶解機構における役割については、イミダゾリウム系イオン液体を用いた実験において、主にアニオン種とセルロースとの相互作用が重要であることが報告されている⁷⁾。多くのセルラーゼは、基質であるセルロースとはセルロース結合ドメインまたは、触媒ドメインの活性領域付近に存在する芳香族アミノ酸残基の側鎖との間で相互作用することが多い。そこで、こうしたアミノ酸側鎖とセルロースとの親和性に着目し、アミノ酸をイオン液体のイオン種に用いることで、セルロースの溶解性を高め、かつ再会合を防ぐようなイオン液体の開発を試みた。実際のアミノ酸イオン液体の合成については、鳥取大学の伊藤敏幸先生に行っていただいた。既に報告されているアミノ酸イオン液体の合成法⁸⁾に基づき、カチオン種に 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムをもつアミノ酸イオン液体を合成したがセルロース溶解性を示さなかった。次いで、カチオン種に 4 級アンモニウム塩を用いた結果、いくつかのアミノ酸においてセルロース溶解性を示すアミノ酸イオン液体の合成に成功した⁹⁾。最も高いセルロース溶解性を示したのは、アニオン種にアラニンをもつ *N*-(2-methoxyethyl)-*N,N*-diethyl-*N*-methyllumonium alanine ([N₂₂₁ME][Ala]) であり、次いで [N₂₂₁ME][Lys] であった。[N₂₂₁ME][Ala] は、12 wt% の微結晶性セルロースを 100°C、10 分で溶解させることが可能である。[N₂₂₁ME][Ala] 処理によって得られる再生セルロースの構造解析と酵素分解性については、事項で述べる。また、芳香族アミノ酸を用いた場合のセルロース溶解性は [N₂₂₁ME][Trp] で 5 wt% であった。このように、イオン液体のデザインにおいてカチオン種とアニオン種は様々に組み合わせることが可能であり、今後、セルロース溶解性を示すイオン液体は更に増えていくものと考えられる。



図 1. [Emim][OAc] へのセルロースの溶解と再析出の様子

5 wt% 微結晶性セルロースを 120°C、2 時間で溶解させた後、脱イオン水を添加して再析出させたもの。

4. イオン液体処理再生セルロースの構造解析

先ず、異なる種類のイオン液体によって微結晶性セルロース（MCC）を溶解させた後、貧溶媒を加えることで再析出される再生セルロースの構造の解析を試みた。イオン液体には、カチオン部に 1-エチル-3-メチルイミダゾリウムイオンを有し、アニオン部にそれぞれ塩化物イオン、酢

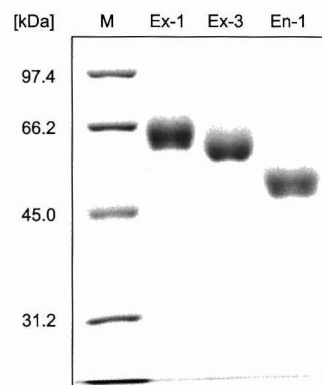
酸イオン, リン酸イオンを有する3種類のイオン液体 ([Emim][Cl], [Emim][OAc], [Emim][DEP]) に加え, アミノ酸イオン液体である [N₂₂₁ME][Ala] を用いた (図2). セルロース濃度は5 wt%とし, 120°Cで攪拌しながら2時間加熱し, 目視でMCCが完全に溶解したことを確認した. セルロースの再析出は, 3倍量の脱イオン水を添加することで行い, 得られた再生セルロースを, 固体NMR, X線回折, ゲル浸透クロマトグラフィーにより, それぞれ分析を行った (図3)¹⁰⁾.

各再生セルロースの構造の詳細についてはここでは省略するが, イオン液体による溶解という過程を経るため, いずれの再生セルロースも未処理のMCCでみられるI型セルロースの構造は保持していないことがわかる. 一方で, 結晶型や鎖長分布については用いたイオン液体の種類によって異なることがわかった. たとえば, [N₂₂₁ME][Ala] 処理による再生セルロースは, 固体NMRおよびX線回折のチャートからも, 典型的なII型セルロースに近い構造を有していることが明らかである. また, [Emim][OAc] 処理についても [N₂₂₁ME][Ala] 処理と比較的類似した構造であった. 一方, [Emim][Cl] および [Emim][DEP] 処理では, 未処理にみられる典型的なI型セルロースのピークは消失しているものの, [N₂₂₁ME][Ala] 処理でみられたII型セルロースのパターンではなく, 無定形セルロースに近いパターンを示した. また, [Emim][Cl] 以外のイオン液体処理ではセルロース鎖長の低下は認められないが, [Emim][Cl]

で処理するとやや低分子化することが明らかとなった. このように, 視覚的に溶解されている状態であったとしても, 再生されてくるセルロースの構造は用いたイオン液体の種類によって異なってくる.

5. イオン液体処理再生セルロースの酵素分解性

イオン液体処理によって得られる再生セルロースのセルラーゼによる酵素分解性については, これまでに多くの報告がある^{11,12)}. これらの文献の多くでは, 市販酵素剤が用いられているが, こうした酵素剤中には作用機序が異なる複数のセルロース分解酵素が含まれている. イオン液体の種類に起因する再生セルロースの構造の違いと酵素分解性の関係を調べるためには, 作用機序が異なる複数のセルロース分解酵素を単一酵素として調製する必要がある. そこで, 本研究では白色腐朽菌ウスバタケ (*Irpex lacteus*) 由



酵素	略称	GH	Family	作用機序	作用領域
Cellobiohydrolase I (CBH I)	Ex-1	GH7		Exo	結晶
Cellobiohydrolase II (CBH II)	Ex-3	GH6		Exo	結晶 非結晶
β-1,4-endoglucanase (EG)	En-1	GH5		Endo	非結晶

図4. 本研究で使用した単一酵素
上, 精製後のSDS-PAGE写真; 下, 酵素の分類.

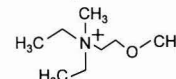
カチオン	アニオン	略称
1-ethyl-3-methylimidazolium	Chloride	[Emim][Cl]
	Acetate	[Emim][OAc]
	Diethyl phosphate	[Emim][DEP]
N-(2-methoxyethyl)-N,N-diethyl-N-methylammonium		
	Alanine	[N ₂₂₁ ME][Ala]

図2. 本研究で使用したイオン液体

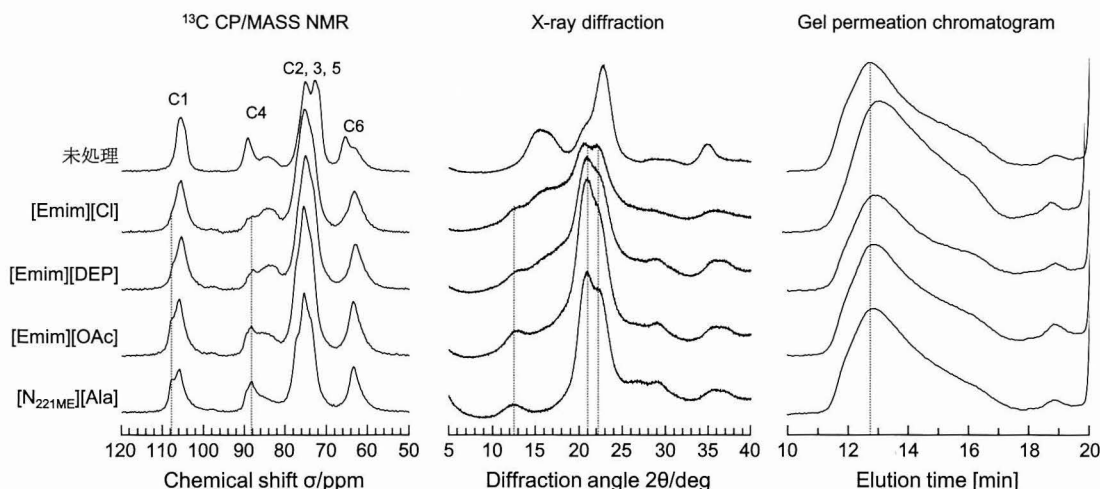


図3. 未処理およびイオン液体処理再生セルロースの構造解析

Mizuno *et al.* (2012)¹⁰⁾を一部加工転載.

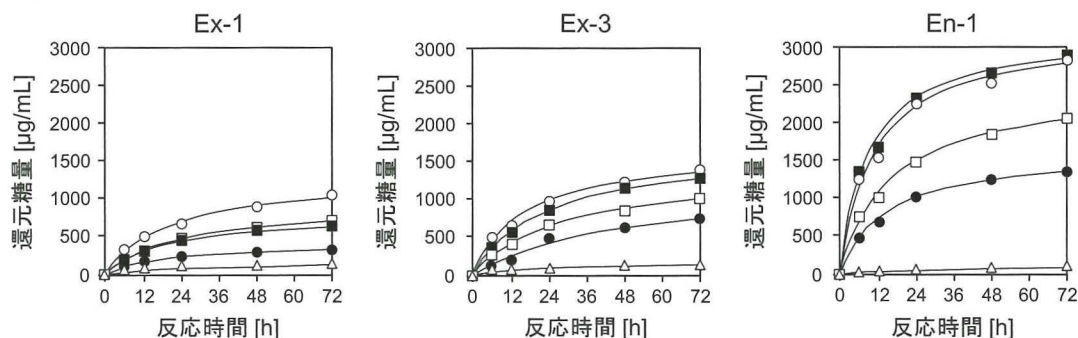


図 5. 未処理およびイオン液体処理再生セルロースの単一酵素による分解

△, 未処理; ○, [Emim][Cl]; ■, [Emim][DEP]; □, [Emim][OAc]; ●, [N₂₂₁ME][Ala]. Mizuno *et al.* (2012)¹⁰⁾を一部加工転載.

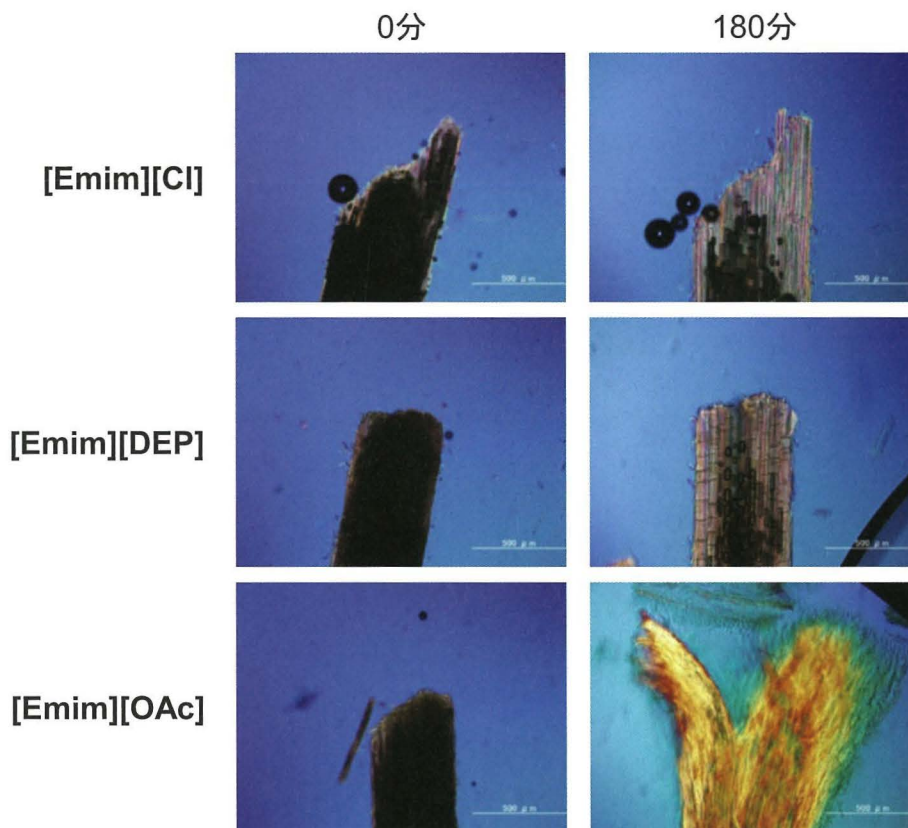


図 6. 偏光顕微鏡によるエريانサスのイオン液体への溶解挙動観察

来のセロビオヒドロラーゼ I (Ex-1), セロビオヒドロラーゼ II (Ex-2), エンドグルカナーゼ (En-1) を, 麹菌 *Aspergillus oryzae* で異種発現させ, 精製したものをを用いた (図 4)^{13,14)}.

いずれの酵素も, 未処理 MCC に対する酵素分解性は著しく低い, イオン液体処理によって得られる再生セルロースに対しては作用しやすくなった (図 5)¹⁰⁾. とくに, En-1 による分解性が増加したが, 改善の程度はイオン液体の種類によって異なっていた. いずれの酵素においても高い分解性を示すのは, [Emim][Cl] 処理であり, 次いで [Emim][DEP] 処理であった. これらのイオン液体処理から得られる再生セルロースの特徴は, 非晶領域を多く含む不定形セルロースである. 一方, [Emim][OAc] や [N₂₂₁ME][Ala] はより II 型セルロースに近いセルロースであり, [Emim][Cl] や [Emim][DEP] に比べ非晶領域が少ない

ことが考えられる. その結果, 酵素による分解性が低くなったと考えられる.

6. バイオマスのイオン液体処理

ここまでは, MCC のような純粋なセルロースを用いての試験であったが, 最後に, 資源作物であるエريانサスをバイオマス原料として用い, イオン液体への溶解挙動および酵素分解性を評価した結果を簡単に紹介する. 先ず, イオン液体処理によってバイオマスがどのように変化するかを確認するために, [Emim] 系イオン液体を用いて 120°C におけるイオン液体への溶解挙動を偏光顕微鏡で観察した (図 6). 処理前はリグニンやヘミセルロースなどによってセルロースが覆われているため, セルロースに起因する偏光面が観察されないが, いずれのイオン液体におい

でも処理時間とともに偏光面が露出した。180分後の [Emim][Cl] および [Emim][DEP] 処理のようすは、アルカリ処理を行った場合と類似しており、束になっているセルロースマイクロフィブリルの束を崩すことなく、リグニンやヘミセルロースが取り除かれている。一方、[Emim][OAc] 処理の場合、セルロース表面の露出だけにとどまらず、セルロースマイクロフィブリルの束がばらけるような現象が観察された。

次に、[Emim][OAc] を用いてエリアンサスを処理し、その酵素糖化性を調べた。今回使用した未処理エリアンサス中には、セルロース、ヘミセルロース、リグニンがそれぞれ、37、26、23% 含まれていた。バイオマス中にはセルロース以外の成分も多く含まれており、MCCのような純セルロースとは異なり、完全に溶解させることは困難である。本試験においても、[Emim][OAc] に対して3 wt% エリアンサス粉末を添加し、120°C、最長300時間の反応を行ったが、完全に溶解させることはできなかった。30、90、300分後におけるイオン液体に溶解しなかった不溶性残渣は、それぞれ80、70、28%であった。そこで、反応系に脱イオン水を添加させることでイオン液体中に溶解した成分を再析出させると同時に、不溶性残渣も固体成分として同時に回収した。この際、固形分として回収できたものは30、90、300分処理で、それぞれ86、80、68%で

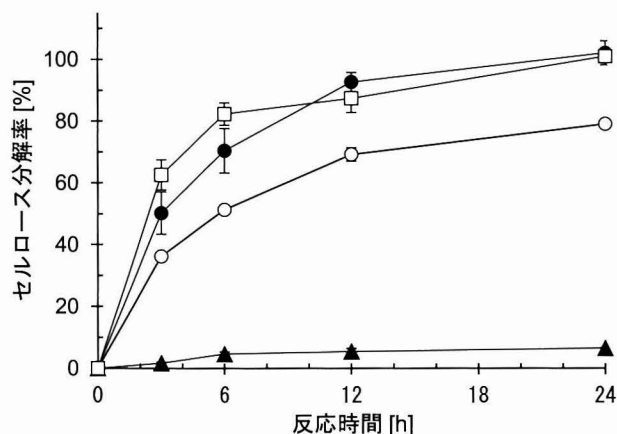


図7. [Emim][OAc] 処理エリアンサスの酵素糖化

▲, 未処理; ○, 30分処理; ●, 90分処理; □, 300分処理。

あった。回収できなかった成分の多くは、リグニンおよびヘミセルロース (キシラン) であり、こうした成分の分画にもイオン液体の利用が可能である。回収した固体成分に対する市販酵素製剤 (Accellerase® DUET) による分解性を評価した結果、24時間後のセルロース分解率は30分のイオン液体処理でも70%、90分処理以降では90%に達した (図7)。これらのことから、バイオマス糖化における前処理としての利用においては、必ずしもバイオマス成分の完全溶解を行う必要はなく、むしろヘミセルロースやリグニンの溶解性や、セルロースの結晶性を低下させる能力などの点から用いるイオン液体を選択することが重要であると考えられる。

7. おわりに

本稿では、近年セルロース溶剤として様々な分野で注目されているイオン液体を用いたセルロースの溶解と再生セルロースの酵素分解性について、筆者らが行った研究の一部について紹介した。図8にその概要を示したが、イオン液体は結晶性の高いI型セルロースを容易に溶かすことが可能であり、また、再析出させることも可能である。この際、イオン液体の種類によって再生セルロースの構造、特に結晶性への影響が大きく現れたことから、再生セルロースの用途に応じて使用するイオン液体を選択することが大事である。また、再生セルロースの構造は、イオン液体の種類以外にも、貧溶媒の種類や添加方法などの析出条件によっても変わってくると考えられる。今後はこうした点についても検討を行っていかうと考えている。

謝辞

このたび日本応用糖質科学会奨励賞を受賞するにあたり、御選考いただきました選考委員会の諸先生、ならびに推薦していただきました東日本支部支部長 北村義明先生 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門) および支部理事の皆様へ厚く御礼を申し上げます。本研究は、非常に多くの方々からの支援を頂きながら遂

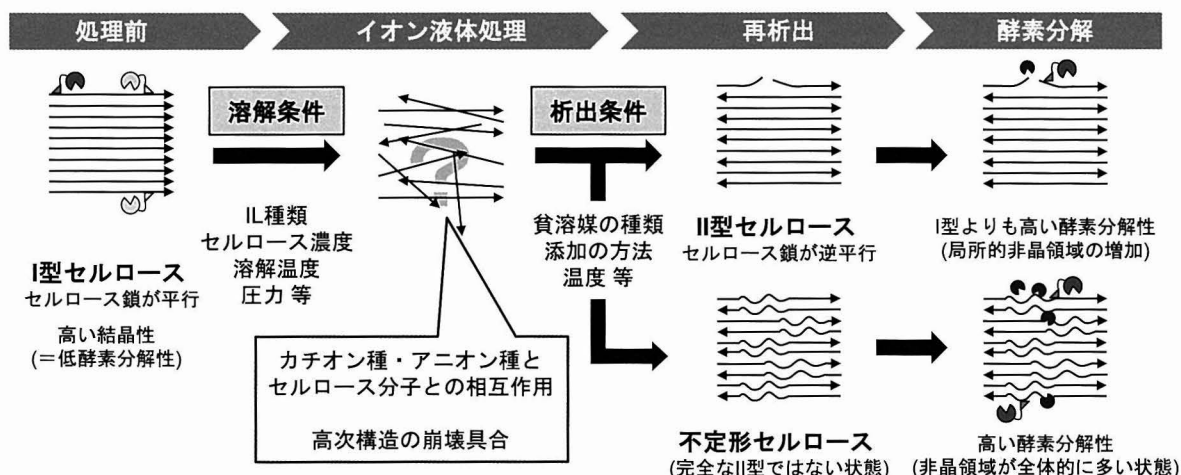


図8. イオン液体によるセルロース構造への影響と酵素分解の概要

行したものです。とくに、研究全体に渡って適切な御助言を頂いた天野良彦先生 (信州大学)、組換え酵素を提供していただいた野崎功一先生 (信州大学) には、心より御礼申し上げます。また、セルラーゼ研究の基礎とこれまでの研究の歴史を熱く語ってくださった神田鷹久先生 (元信州大学) にも感謝申し上げます。イオン液体の取扱いと装置の組み上げについては、佐藤伸明先生 (現物産フードサイエンス株式会社) に大変お世話になりました。アミノ酸イオン液体の合成と提供に関して、伊藤敏幸先生 (鳥取大学) に心より御礼申し上げます。イオン液体処理再生セルロースの構造解析については、林徳子先生ならびに戸川英二先生 (国立研究開発法人森林総合研究所 新素材研究拠点) にお世話になりました。また、卒業論文、修士論文の研究テーマとして一生懸命に取り組んでくれた西島拓人博士、野田将司氏、渡邊忠敬氏、可知修史氏、前嶋洗紀氏、古邸洋紀氏、吉崎涼氏、早川源矢氏に感謝致します。本研究の一部は、新エネルギー技術研究開発/バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発 (先導技術開発) 「疎水性イオン液体や耐塩性酵素を用いた前処理・糖化技術に関する研究開発」(平成21-22)、科学研究費若手研究 (B) (25850122) の支援を受けて行ったものです。最後に、多くの方々、新しい研究分野との出会いの場となった日本応用糖質学会に感謝いたします。

文献

- 1) S. Makishima, K. Nozaki, M. Mizuno, E. Netsu, K. Shinji, T. Shibayama, T. Kanda and Y. Amano: Recovery of soluble sugars from waste medium for Enokitake (*Flammulina velutipes*). *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 261-266 (2006).
- 2) S. Makishima, M. Mizuno, N. Sato, K. Shinji, M. Suzuki, K. Nozaki, F. Takahashi, T. Kanda and Y. Amano: Development of continuous flow type hydrothermal reactor for hemicellulose fraction recovery from corncob. *Bioresour. Technol.*, **100**, 2842-2848 (2009).
- 3) N. Sato, K. Shinji, M. Mizuno, K. Nozaki, M. Suzuki, S. Makishima, M. Shiroishi, T. Onoda, F. Takahashi, K. Kanda and Y. Amano: Improvement in the productivity of xylooligosaccharides from waste medium after mushroom cultivation by hydrothermal treatment with suitable pretreatment. *Bioresour. Technol.*, **101**, 6006-6011 (2010).
- 4) R.P. Swatloski, S.K. Spear, J.D. Holbrey and R.D. Rogers: Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4974-4975 (2002).
- 5) H. Wang, G. Gurau and R.D. Rogers: Ionic liquid precessing of cellulose. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 1519-1537 (2012).
- 6) A. Pinkert, K.N. Marsh, S. Pang and M.P. Staiger: Ionic liquids and their interaction with cellulose. *Chem. Rev.*, **109**, 6712-6728 (2009).
- 7) R.C. Remsing, G. Hernandez, R.P. Swatloski, W.W. Massefski, R.D. Rogers and G. Moyna: Solvation of carbohydrates in *N*, *N'*-dialkylimidazolium ionic liquids: A multinuclear NMR spectroscopy study. *J. Phys. Chem.*, **112**, 11071-11078 (2008).
- 8) K. Fukumoto, M. Yoshizawa and H. Ohno: Room temperature ionic liquids from 20 natural amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2398-2399 (2005).
- 9) K. Ohira, Y. Abe, M. Kawatsura, K. Suzuki, M. Mizuno, Y. Amano and T. Itoh: Design of cellulose dissolving ionic liquids by nature. *ChemSusChem*, **5**, 388-391 (2012).
- 10) M. Mizuno, S. Kachi, E. Togawa, N. Hayashi, K. Nozaki, T. Itoh and Yoshihiko Amano: Structure of regenerated celluloses treated with ionic liquids and comparison of their enzymatic digestibility by purified cellulase components. *Aust. J. Chem.*, **65**, 1491-1496 (2012).
- 11) H. Zhao, C.L. Jones, G.A. Baker, S. Xia, O. Olubajo and V.N. Person: Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.*, **139**, 47-54 (2009).
- 12) W. Xiao, W. Yin, S. Xia and P. Ma: The study of factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose after ionic liquid pretreatment. *Carbohydr. Polym.*, **87**, 2019-2023 (2012).
- 13) H. Toda, S. Takada, Y. Amano, T. Kanda, M. Okazaki and M. Shimozaki: Expression of a cellobiohydrolase cDNA from the white rot fungus *Irpex lacteus* in *Aspergillus oryzae*. *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 23-26 (2005).
- 14) K. Nozaki, H. Nishijima, T. Arai, M. Mizuno, N. Sato and Y. Amano: Regulation of adsorption behavior of carbohydrate-binding module family 1 and endo- β -1,4-glucanase onto crystalline cellulose. *J. Appl. Glycosci.*, **58**, 133-138 (2011).