

Ⅵ エタノール製造コスト低減に向けて (連結バイオプロセスとヘミセルロースの利用)

1. はじめに

「地球温暖化対策(二酸化炭素の削減)、石油依存社会からの脱却へ向け、バイオ燃料を利用する必要がある。食糧と競合しないセルロース系バイオマスを利用する必要がある。しかしながら、セルロース系バイオマスを原料としたエタノール製造は製造コストが高く実用化が困難である。」というの、良く目にするフレーズである。しかしながら、このような記述には大きな落とし穴がある。セルロース系バイオマスを原料としたエタノールは本当に高価なのだろうか? 安価にエタノールを製造できたら、バイオ燃料の利用は実用化するのだろうか? 図1に物の需要と付加価値の関係を示したが、燃料は大量のニーズがあるものの付加価値が非常に低いものである。この様に安価な燃料としては、バイオ燃料の製造コストは高いのであって、現在の技術でも飲料用のアルコールに比べて非常に安価にエタノールを製造できる。しかしながら、飲料としてのエタノールは遙かに高価格であるが産業化されているという現実もある。このことから分かることは、逆ピラミッドの関係にある「物の需要と付加価値」に見合う産業化モデルを作り



図1 物の需要と付加価値の関係

物の需要と付加価値は互いに逆ピラミッドの関係にある。

上げなければ、バイオ燃料の利用を実用化することは厳しいということである。

また、バイオ燃料という言葉が先行している為に誤解を生じていると思うが、石油の利用は燃料に限ったものではない。図2に石油リファイナリーのイメージを示したが、原油を分留して様々な物質を取り出し、これを原料としてエネルギー製品の他、化学製品、素材など様々な物を作り出すことで、現在の石油化学産業が成り立っている。従って、石油をバイオ燃料で代替するためには、バイオマスリファイナリーを実現し、燃料以外の化学製品、素材などをバイオマスから作り出す必要がある。

植物細胞壁は地球上に最も多く存在するバイオマス資源であり、全世界で1年間に生産される植物の量は、乾燥重量として陸上で1000億トン、海で500億トンと見積もられている。植物の乾燥重量の約60%以上は細胞壁であり、植物細胞壁の主成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンといった成分である(図3)。現在のエタノール製造技術では、セルロース以外の成分からエタノールを製造することは困難であり、バイオマスの約3分の2を利用してきていない。従って、ヘミセルロース、リグニンを原料として化学製品、素材などを作る技術確立し、バイオマスリファイナリーを可能にすることが、バイオ燃料を実用化していくためには必須であることは自明のことである。

本稿では、バイオ燃料実用化に向け、エタノール製造コストの削減、さらにはバイオリファイナリーの実現へ向け、著者らがこれまで行ってきた試みについて解説する。

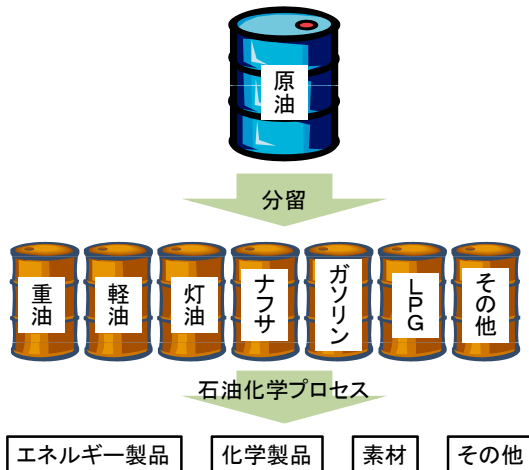


図2 石油リファイナリー

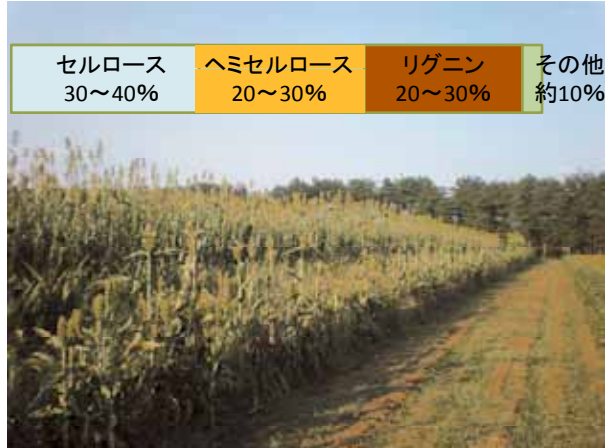


図3 バイオマスの組成

2. エタノール変換コストの削減に向けて

2.1 連結バイオプロセス

一般的なバイオマスのエタノールへの変換法は、「前処理」、「糖化」、「発酵」を段階的に別プロセスとして実施するものであるが、「前処理」及び「糖化酵素の生産または購入」に関わる費用が、コスト面の主要なハードルとなっていることが示されている¹⁾。リグノセルロース系バイオマスは前処理をしなければ糖化できないため、安価なエタノール製造法の開発へ向けには、糖化酵素の製造コスト削減や糖化酵素使用量の削減が重要な意味を持つ。このような背景から酵素生産から糖化、発酵までのプロセスを生物的に1バッチで行う「連結バイオプロセス (Consolidated Bioprocessing; CBP)」つまり、同一の生物に糖化酵素生産とエタノール発酵を行わせるという方法が、近年、注目を集めるようになってきた (図4)^{2,3)}。酵素生産をプロセスに含むことがCBPの最大の特徴であり、これにより従来法で問題となっている酵素の価格をゼロにできると共に、設備費や投入エネルギーを削減できるため、大幅な製造コストダウンに加え、二酸化炭素削減における貢献度も大きいことが期待される⁴⁾。しかしながら、本プロセスに適合する微生物は現時点では開発されていない。この優れた方法であるCBPを可能にするため、遺伝子組換えにより本プロセスに適合する微生物の開発が行われている。一つ目のやり方としては、セルラーゼを生産する微生物の改良である。本方向性の研究は、嫌気性菌である *Clostridium* 属を対象とした研究が中心であり、最初にCBPを提唱したLyndのグループにより研究が行われている。*Clostridium* 属の菌の中には、エタノール発酵能を有する種も存在す

酵素糖化系

適切な前処理を行なったバイオマスを経験処理で糖化し、発酵によりエタノールを得るもの

バイオマス → 前処理 → 酵素糖化 → 糖 → 発酵 → 濃縮脱水 → エタノール

一貫微生物系

(世界に開発例なし)

微生物技術を中心に、糖化・発酵同時反応など、ワンポット反応系でエタノールを得るもの

バイオマス → 前処理・糖化・発酵(同時) → 濃縮脱水 → エタノール

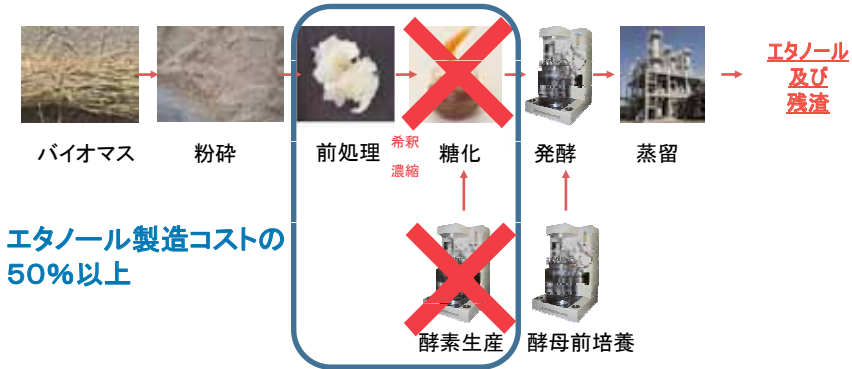


図4 エタノール製造プロセスの比較

酵素糖化系は一般的なプロセスである。それに対し、一貫微生物系はプロセスを統合し、バイオマスを直接エタノールへ変換するため、酵素生産設備、糖化設備が不要となる。また、一段階の反応となるため、投入エネルギーも減らすことが可能となる。

(平成20年3月 バイオ燃料技術革新計画の図を改変)

ることからCBP微生物として有望と考えられるが、エタノール耐性が極めて低い、ペントースを資化できない、バイオマスを前処理した際に生成する発酵阻害物質への耐性が低いなどの問題があげられている。これらの問題を解決した変異株の開発が求められているが、嫌気性菌の遺伝子組換えは非常に困難であることが大きな障害となっている。このような状況から2種の微生物を用いた変換が試みられ、CBPとしては最も効率の良い結果が得られたとして報告されている⁵⁾。C. thermocellum と Thermoanaerobacterium sacchrolyticum を混合培養した場合、アビセル原料から92.2 g/Lのエタノールが変換効率90%で生産されたという報告であるが⁵⁾、精製されたセルロースを原料とした実験であり、実バイオマスを原料とした場合の変換率は不明である。単独株を用いた実験では、C. cellulolyticum 改良株がセルロースから50 g/Lのエタノールを生産した報告やC. thermocellum 変異株がセルロースからのエタノール変換効率94%を達成した

報告があるが、前者は変換率が64%と低く⁶⁾、後者はエタノール濃度が19.5 g/Lと著しく低い⁵⁾。従って、*Clostridium* 属単独によるCBPは非常に難しいように思われる。

2つめのアプローチとしてエタノール生産性微生物の改良が行われている。本研究においては、*Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* などのエタノール生産性バクテリアや *Saccharomyces cerevisiae*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* などのエタノール生産酵母に遺伝子を組換えて、エキソ-グルカナーゼ、エンド-グルカナーゼ、ヘミセルラーゼなどの種々の糖化酵素生産能を付与し、さらにアラビノースやキシロースなども含めたバイオマスから得られる糖を全てエタノールに変換できるにすることが望まれる²⁾。しかしながら、これらエタノール生産微生物はエタノール生産能に優れる反面、バイオマスの糖化酵素をほとんど保有しないことから、詳細は「4. おわりに」の部分で説明するが、複雑な構造をしたバイオマスの糖化に対応するのは不可能であると考えられる。実際に、現状では糖化の壁を越えられておらず、*Trichoderma reesei* の培養液中の全タンパク質の約50~70%を占め、*T.reesei* の生産する酵素の中でセルロース分解に最も重要な役割を果たしていると考えられている酵素であるセロビオハイドロラーゼI (CBH I) およびII (CBH II) のうち、CBH II を *S. cerevisiae* の細胞表層へディスプレイした菌株を用いて、200 g/Lの水熱処理したイナワラを変換効率89%でエタノールに変換したという報告があるが、変換には10 FPU/g バイオマス相当のセルラーゼの添加が必要である。また、5 FPU/g バイオマス量のセルラーゼを添加した場合にはエタノール収率が野生株とほぼ同じ値となり、CBH II を発現させた効果が出ない⁷⁾。また、CBH I は異種発現が極めて困難な酵素であり、*S. cerevisiae* で発現に成功したという近年の報告でも、全タンパクの4~5%に相当する量に留まるうえ⁸⁾、酵素生産は好気培養での結果であり、嫌気条件となるCBPにおける有用性は疑問視されている³⁾。

2.2 きのことによる連結バイオプロセス

筆者らは、新たなCBP生物の候補として、エタノールを生産する種が存在し、地球上で唯一単独でリグノセルロースの完全分解が可能な木材腐朽菌である“担子菌”に着目し研究を行ってきた。後述するメリットを考え、食用担子菌、つまりは「きのこ」を対象にエタノール生産性とバイオマス分解酵素の生産性を調べ、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の野生株である Fv-1 株をCBPの候補株として選抜した⁹⁾。担子菌のエタノール発酵特性については、殆ど報告が無く、どの様な糖選択性を示すのか不明であったため、まず、単糖類の発酵特性を検討した(図5)。本菌は、グルコース、マンノース、フルクトースに関しては、培養開始直後より糖の消費が始まり、糖の消費に反比例してエタノールの生産が

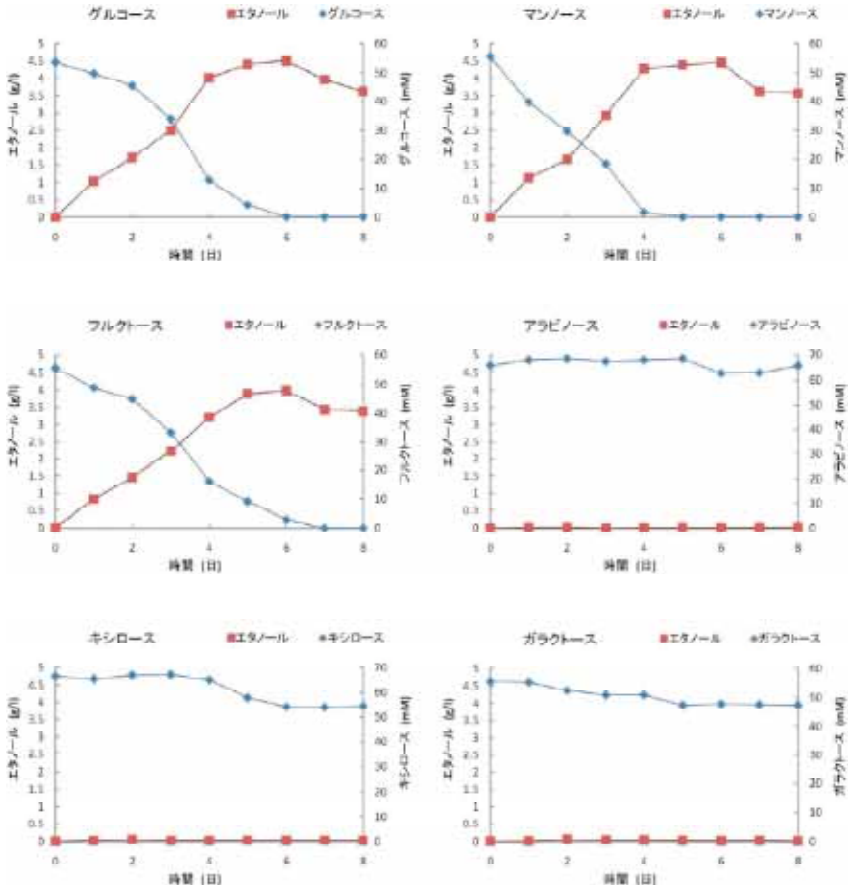


図5 エノキタケによるエタノール発酵における単糖類の発酵特性

観察された。培養開始6日後にエタノール濃度が最大になり、理論上のエタノール回収率はそれぞれ88%（グルコース）、86%（マンノース）、77%（フルクトース）となった。一方、キシロース、アラビノース等のペントースやガラクトースに関しては、殆ど糖が消費されず、エタノールの生産は見られなかったことから、エノキタケはこれらの糖類を嫌気条件下では殆ど代謝できないか、非常にゆっくり消費することが示唆された。以上の様に、単糖類の発酵特性は一般的にエタノール発酵に用いられている *S. cerevisiae* と同様であった。次に、エノキタケは糖化酵素を生産可能であることから、種々のオリゴ糖類の発酵特性を検討した。図6に示すように、エノキタケ Fv-1 株は、シヨ糖、マルトースを高度に発

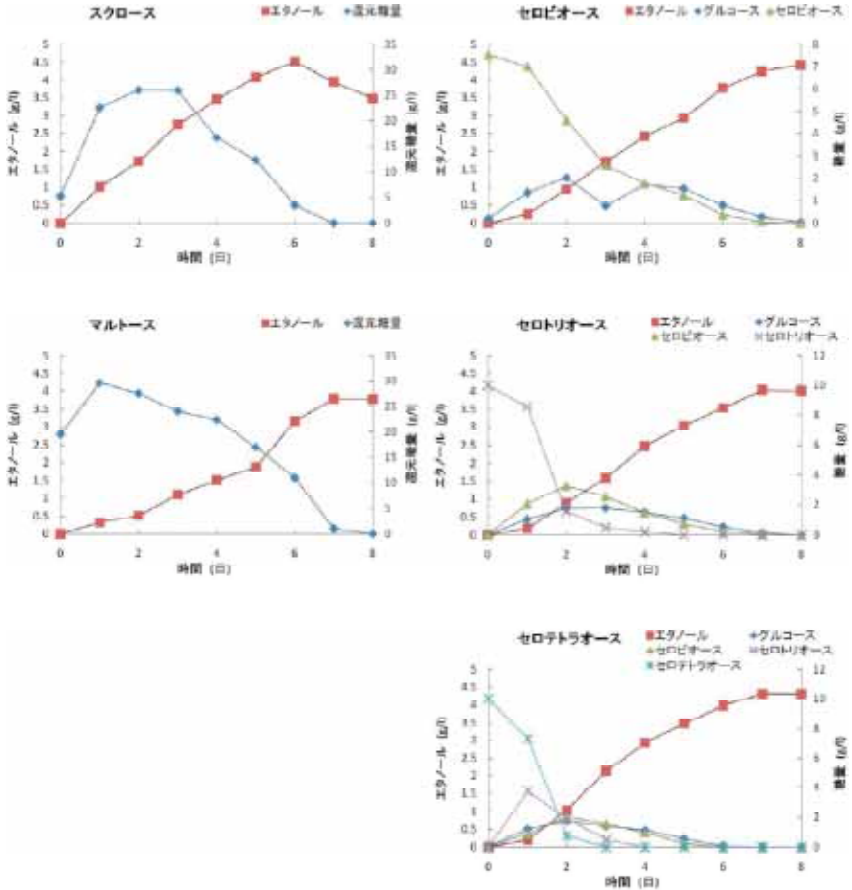


図6 エノキタケによるエタノール発酵におけるオリゴ糖類の発酵特性

酵することができた。培地の還元糖量が培養初期に一次的に増加し、徐々に低下することから、オリゴ糖を単糖に分解して代謝していることが示唆された。エタノール生産は培養6～7日目で最大となり、理論上のエタノール回収率はショ糖からは83%、マルトースからは77%であった。リグノセルロースを原料とした場合、セルロース成分を如何に発酵するかがポイントであるが、エノキタケは*S. cerevisiae*が発酵できないセロビオースを高度にエタノールに変換することができた(図6)。培養初期よりセロビオースの濃度は徐々に低下し、反比例してエタノール生産が見られた。培地中のグルコース濃度は培養2日目まで増加し、その後、一旦減少した後、再度上昇し、また減少した。この挙動はセロビオースが

β -グルコシダーゼにより、グルコースに分解され、代謝されていくことを示唆している。更に鎖長が長いセロオリゴ糖に対しても試験したが、エノキタケは、これらの糖類をグルコースと遜色なく発酵することができた(図6)。セロトリオースの場合、培養開始2日間で、約80%のセロトリオースがグルコースとセロビオースに分解され、5日後までには完全に分解された。セロビオースの場合と同様に、 β -グルコシダーゼにより、オリゴ糖を糖化しながら発酵していることが示唆された。セロテトラオースの場合には、培養2日目までに約90%のセロテトラオースが分解され、グルコース、セロビオース、セロトリオースが検出された。セロビオースが検出されたことから、セロテトラオースの分解には、 β -グルコシダーゼのみでなく、エンド型の酵素も糖化に関わっている可能性が示唆された。これらセロオリゴ糖からの理論上のエタノール回収率は83% (セロビオース)、76% (セロトリオース)、78% (セロテトラオース)であった。以上の様に、エノキタケはセルロースの発酵に適した能力を有することが明らかとなった。しかしながら、ペントースに対する発酵能がない為、キシロピオースは発酵できなかった。また、糖濃度を高くした場合にも、この糖選択性は同様であり、また、変換率もさほど低下することなく、15%のセロビオースから70 g/Lのエタノールを生産し、変換率は83%であった。

本菌が優れた特性を示すのは特に高濃度の原料を変換する時であり、サトウキビバガスより調整したセルロースを15% w/v という条件で、9 mg/g バイオマ

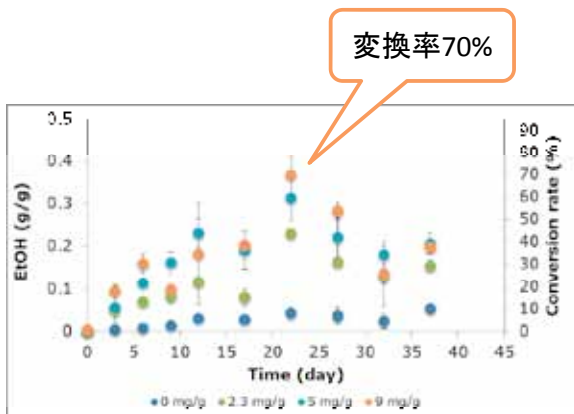


図7 サトウキビバガスより調整したセルロースを原料とした場合のエノキタケ CBP によるエタノール変換

15% w/v という高濃度の原料に対してもエノキタケは優れたエタノール変換能を有する。

ス相当の酵素を添加した場合、変換率は実に70%であった(図7)。この様な高い原料濃度では、酵素によるバイオマスの糖化は著しく困難になる。発酵と同条件下で、原料が使用したセルラーゼでどれだけ分解しているかを図8に示したが、9 mg/g バイオマス相当のセルラーゼではバイオマスを20%しか分解することができなかった。従って、酵素糖化法では、酵素の使用量を減らす為にバイオマス濃度を下げて分解し、エタノールを蒸留する際のコストを抑えるために、糖化された糖液を濃縮した後に酵母で発酵するというプロセスとなることから、本法は廃液の量や糖液の濃縮に関わるエネルギーを節約できるというメリットがある。このセルロースに対してごく僅かな酵素使用で高濃度のエタノールが得られる現象は、実バイオマスを用いた場合においても同じであり、アンモニア処理後のイナワラに対しては、5 mg/g バイオマスという、ごく少量の糖化酵素の添加を要するものの、バイオマス濃度30% (w/v) という高濃度条件下で、セルロースに対するエタノールの回収率76%という非常に高い変換率を達成しており、エノキタケはCBP生物として有望であると考えられる¹⁰⁾。筆者らは、エノキタケにおける異種遺伝子発現系を構築し^{11,12)}、異種発現が極めて困難である*T. reesei*のCBH Iをエノキタケで発現させることにも成功しており、今後、糖化酵素の添加を要さないCBPに適したエノキタケ株の開発やエタノール生産性を向上させた株等を開発する基盤が整っている。

前述した理由以外にも、エノキタケをCBP生物としてバイオ燃料製造に利用

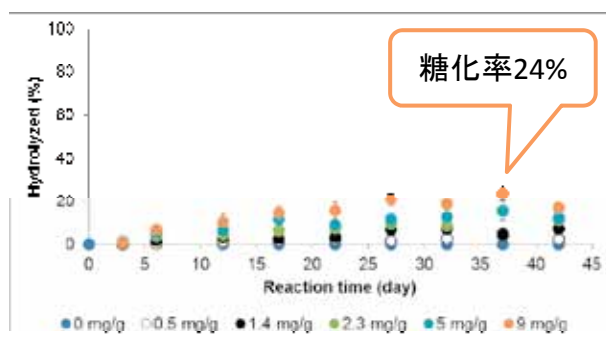


図8 図7の条件におけるサトウキビバガスの酵素による分解

15% w/vと原料濃度が高い場合、少量の酵素では、時間を掛けても十分な分解が得られない。エタノール製造コストを抑えるためには高濃度のエタノールを得ること、つまりは高濃度のバイオマスの変換が必須であるが、本結果は糖化酵素の使用量を低減させることは困難であることを示唆している。糖化酵素の使用量を減らすためには原料濃度を薄める必要があり、その場合には分解された糖液を濃縮する必要が生じ、投入するエネルギー量が増え、エタノール製造コストが増加する。

するメリットが存在する。エノキタケは言わずと知れた食用きのこであるが、きのこ産業は、国内の年間生産額が約 2240 億円（林業の総生産量の約 50% を占める）の巨大な産業である。近年のきのこ栽培は菌床栽培が主流であり、木粉、コーンコブ、バガス等のバイオマスを利用しているバイオマス利用産業である。きのこを収穫した後の廃菌床は年間 100 万トン発生すると言われており、これだけのバイオマスを利用している産業は他には存在しない。従って、きのこ産業は現在実用化しているバイオマス利用産業としては最大規模である。きのこ収穫後に不要となった廃菌床は、きのこ産業的には廃棄物であり、有料で処分している等、処分に困っているのが実状であるが、きのこを CBP 生物として利用する観点からみると、廃菌床は、きのこの菌糸とバイオマスの塊であり、木材腐朽菌による「前処理」と「糖化酵素生産」を終えた状態と捉えることができる。従ってバイオ燃料製造を、きのこ産業の廃棄物処理技術（図 9）と位置付けることにより、バイオマスより、付加価値の高いきのこ付加価値の低い燃料の両方を作り出すことが可能となる。さらに、バイオ燃料製造における前処理の部分をきのこ栽培（既に産業として成り立っているプロセス）として実施できることから、バイオ燃料製造プロセスより、前処理の部分の費用をゼロにできると共に糖

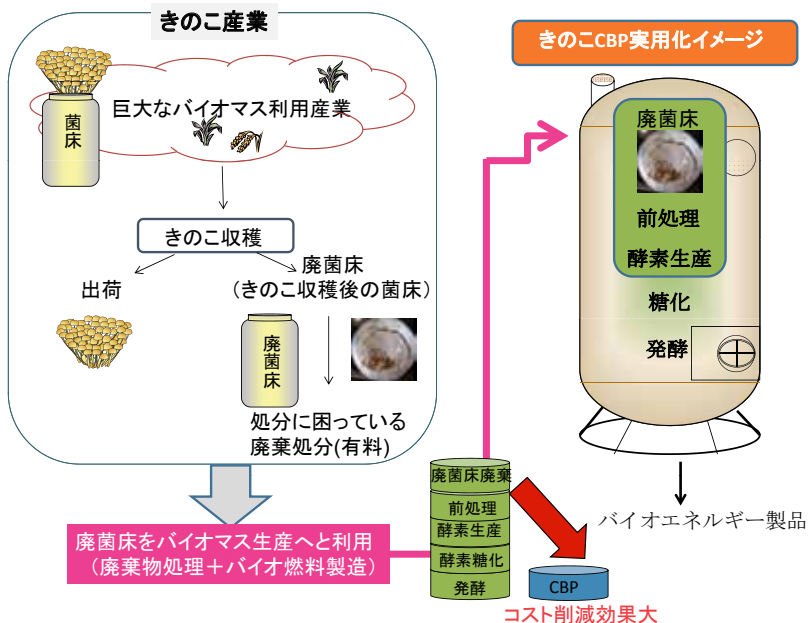


図 9 きのこによる CBP バイオエタノール製造と食用きのこ生産を融合する場合のメリット

化酵素生産や発酵菌の前培養を終えている状況となり（図 10），エタノール製造コストが高いという問題も解決できることが期待される。この組み合わせは双方にメリットがあるコラボレーションであり，実用化しているバイオマス利用産業としては最大規模であるきのこ産業に，バイオ燃料製造を組み込んだ新規なバイオリファイナーの形態を取れる可能性が高いことが，きのこによる CBP の最大の長所であり，従来の方法に比べ実用化に近い位置にいると考えられる。

3. ヘミセルロースの利用に向けて

3.1 ヘミセルロース

ヘミセルロースは、「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¹³⁾。ヘミセルロースの最大の特徴は，デンプンやセルロースと異なり，ヘテロ多糖であることである。従って複数の構成糖から構成され，分岐構造を有する複雑な構造をしている。さらに，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が，よりヘミセルロース

(2) 酵素糖化系

適切な前処理を行なったバイオマスを酵素処理で糖化し，発酵によりエタノールを得るもの



(3) 一貫微生物系

（世界に開発例なし）

微生物技術を中心に，糖化・発酵同時反応など，ワンポット反応系でエタノールを得るもの

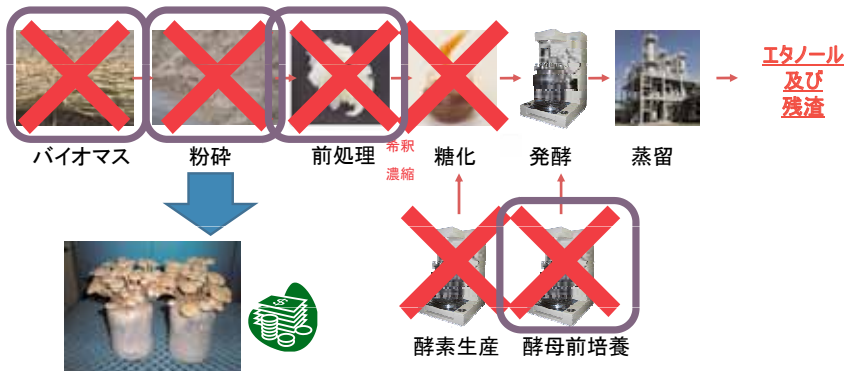


図 10 きのこと産業ときのこによる CBP を統合した場合に不要となる工程

の理解を困難にし、敬遠される要因となっている。また、上述の様に、酸によって容易に分解されるため、希硫酸前処理や水熱前処理を行う場合にはバイオマスの前処理段階で分解されることから、バイオマスの糖化においてはあまり注目されていない。しかしながら、ヘテロ多糖を酸で完全分解した場合、分解物を利用するためには精製する必要がある。従ってヘミセルロースはヘテロ多糖で複雑な構造をしているからこそ、酵素を利用する必要がある。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が、イナワラ、バガス、コーンストーパーといった世界中で利用が検討されているリグノセルロース系バイオマスに含まれるヘミセルロースはキシランが殆どを占める。従って、キシランは地上に最も多く存在するヘミセルロースであり、セルロースについて2番目に多く存在するバイオマス資源である。キシランの構造は図11に示すように、D-キシロースが β -(1 \rightarrow 4)結合した基本構造に対し、殆どの場合には側鎖を有している。側鎖の種類、分岐度は植物の種類、組織、加齢の程度で異なるが、一般的にはD-キシロースのO-3位にL-アラビノース残基、O-2位に4-O-メチル-D-グルクロン酸又はグルクロン酸残基が結合した構造である。また、主鎖にはアセチル基が、草本系のキシランの側鎖のL-アラビノースのO-5位にはp-クマル酸やフェルラ酸が部分的にエステル結合していることが知られている。キシランの完全分解には β -キシラナーゼ、 β -キシロシダーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、フェルラ酸エステラーゼといった酵素が必要であるが、キシランの側鎖やエステル基による修飾は、主鎖の分解に著しく影響を与える。従って、これらの修飾を除く酵素を如何に使うかが、ヘミセルロースの分解をコントロールすることになる。

3.2 キシラン分解酵素

キシラン分解酵素のうち、最も主要な酵素は主鎖をランダムに分解するキシラ

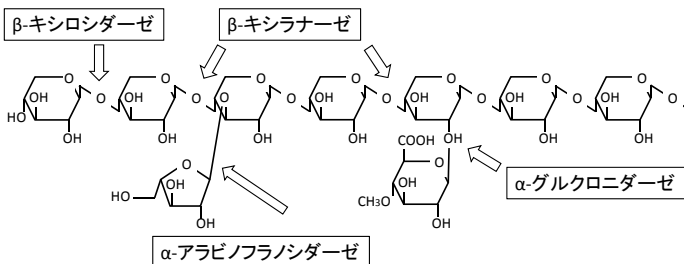


図11 キシランの構造と分解酵素

ナーゼである。前項で述べたように主鎖に作用する酵素は側鎖の影響を受けるが、この影響がキシラン分解にどのように反映されているかについては、あまり一般的に知られていない。エステル結合はアルカリ処理において容易に除かれるが、前処理を施していないバイオマスには、糖化酵素が作用できないことから、アセチル基やフェルラ酸が、酵素の基質認識にどれだけ影響するかは、不明な点が多い。木材を蒸射し、部分的にアセチル基を除いたサンプルにキシラナーゼを作用させて得られる分解産物を解析すると、その殆ど全てのプロダクトに最低1残基のアセチル基が残留していることが示されているが、アセチル基は分子内転移するため、酵素との相互作用については詳細が解明されていない。ここでは、アラビノースやグルクロン酸といった側鎖が、キシラナーゼがキシラン主鎖を分解する際に、どの様に影響するのかについて解説する。著者が研究している *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 のキシラナーゼを例として解説するが、ここで説明する基質認識のメカニズムは全ての糖加水分解酵素ファミリー (Glycoside Hydrolase family) GH10 及び GH11 キシラナーゼに共通である。

キシラナーゼはアミノ酸配列をもとに、GH5, 8, 10, 11, 30, 43 に見出されているが、殆どのキシラナーゼは GH10 と GH11 に分類されている。GH10 キシラナーゼと GH11 キシラナーゼでは、図 12 に示すように全く異なる立体構造をしてお

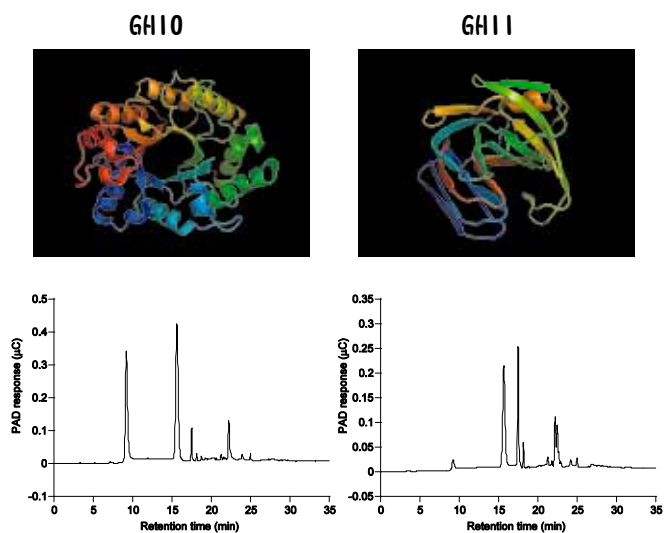


図 12 キシラナーゼのファミリーとキシラン分解特性の違い

GH10 キシラナーゼと GH11 キシラナーゼでは全く異なる立体構造をしており、キシランに作用した際に異なる生産物を生じる。

左 : SoXyn10A, 右 : SoXyn11A

り、そのキシラン分解特性も異なる。

GH10 キシラナーゼ (SoXyn10A) は、立体構造が解明されており、本酵素がどのように基質と結合するかが明らかとなっている。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) を有しており、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ている¹⁴⁾。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が、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 (酵素側) を向いており、 α -1,2-結合のグルクロン酸側鎖が障害となり、グルクロン酸側鎖を有するキシロース残基はこれらのサブサイトには結合できないことが示唆される (図 13)。一方、サブサイト-3 と +1 に位置するキシロース残基の 2 位水酸基は、溶媒面 (外側) を向いており、グルクロン酸側鎖が酵素とキシラン主鎖と結合する際に障害にならないと考えられる。同様に、 α -1,3-結合のアラビノース側鎖について見てみると、サブサイト-3, -2, +1, +2 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が、サブサイト-1 のキシロース残基の 3 位水酸基は酵素側を向いており、アラビノースを有するキシロース残基が結合できないと考えられ

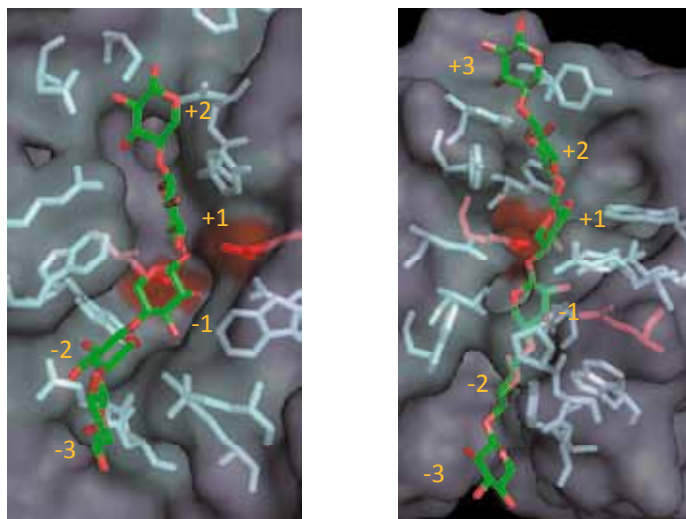


図 13 キシラナーゼの基質結合クレフト

左 : SoXyn10A, 右 : SoXyn11A

る。一方、GH11 キシラーゼ (SoXyn11A) については立体構造が解明されていないが、SoXyn11A の立体構造モデルから考察可能である。SoXyn11A にはサブサイトが6個 (-3 ~ +3) 存在している (図 13)。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位水酸基の方向を見ると、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おり、 α -1,2-結合グルクロン酸側鎖を有するキシロース残基が結合可能であることが予想される (図 13)。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 にはアラビノース側鎖を有するキシロース残基が結合できることが予想される。上記の様に、キシ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が、GH10 及び GH11 の酵素全てに共通のメカニズムであり、規則性がある (図 14)。こうした規則性を明確にし、側鎖を除く酵素も含め、組合せていくことで、植物種や生育時期で異なる多様な構造をしたヘミセルロースに対応し、多様な生産物を作り出す技術を完成することができれば、ヘミセルロースの利用用途拡大に繋がるはずである。

ごく最近、新規なキシラーゼが見出された。これらは側鎖を積極的に認識する酵素であり、グルクロノキシラン特異的、アラビノキシラン特異的に作用する (図 15)。グルクロノキシラン特異的キシラーゼである *Erwinia chrysanthemi* 由来 XynA は GH30 に分類される TIM バレル型の酵素であり、還元末端側から2番目のキシロースにグルクロン酸側鎖を有するオリゴ糖を生産する。立体構造が解明され、 α -D-xylopyranosyl-(1 → 4)-[4-O-methyl- α -D-glucuronosyl-(1 → 2)]- α -D-xylopyranosyl-(1 → 4)-D-xylose (MeGlcA²Xyl₃) との結合構造から、側鎖の認識機構が解明されている。MeGlcA²Xyl₃ は XynA の基質結合クレフトの -1 ~ -3 に結合し、サブサイト -2 のキシロースの側鎖 MeGlcA は、近接する Trp 及び

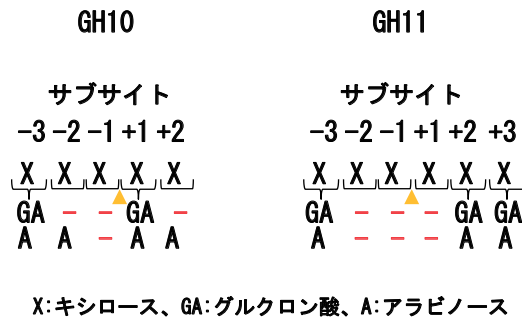


図 14 GH10 及び GH11 キシラーゼのサブサイトと側鎖を有するキシロース残基の結合の可否

グルクロノキシラン特異的キシラナーゼ GH30 アラビノキシラン特異的キシラナーゼ GH5

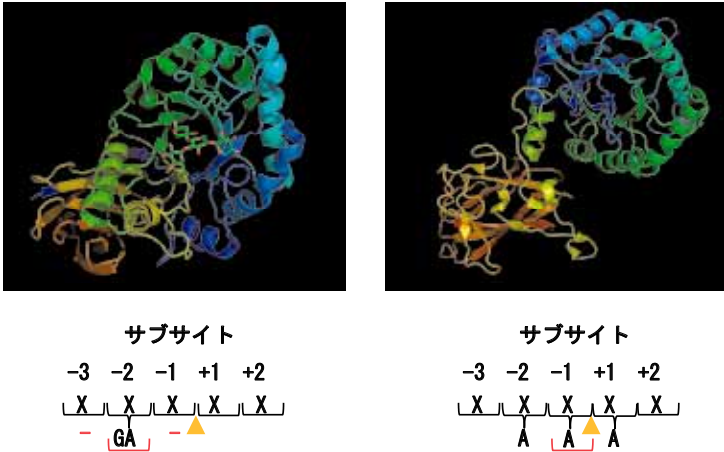


図 15 グルクロノキシラン特異的キシラナーゼとアラビノキシラン特異的キシラナーゼの構造と側鎖認識機構

Tyr と相互作用し，更に塩基性アミノ酸である Arg とグルクロン酸のカルボキシル基のイオニックな結合によって，酵素と強く結合していることが示された。この様にサブサイト -2 における MeGlcA と酵素の強い相互作用により，本酵素は還元末端側から 2 番目のキシロースにグルクロン酸側鎖を有するオリゴ糖を生産することが解明された¹⁵⁾。一方，アラビノキシラン特異的キシラナーゼである *Clostridium thermocellum* 由来 CtXyl5A は GH5 に分類され，アラビノキシランに作用した場合に重合度 3～5 のアラビノキシロオリゴ糖を主産物として生産する¹⁶⁾。基質との結合構造は解明されていないが，CtXyl5A の結晶構造と生産されたオリゴ糖の構造解析により，本酵素の基質認識機構が推察されている。本酵素は (β/α)₈-バレル型の酵素であり，マイナス側に 3 つ，プラス側に 2 つの計 5 つのサブサイトを有し，サブサイト -1 の部分に通常のエンド型酵素には存在しないポケットが観察された。反応生成物が還元末端のキシロースに必ずアラビノース側鎖を有することから，サブサイト -1 にアラビノシルキシロースが結合することが示唆された。また，本酵素の反応生成物の側鎖の位置から，サブサイト -2，-1，+1 の 3 箇所には側鎖を有するキシロース残基が結合できることが示唆された。この様にキシラナーゼの例のみを見ても，酵素の側鎖認識機構は非常に多様である。ヘミセルロースの分解は，酵素がヘミセルロースの分岐をどの様に認識しているかを理解することにつきる。側鎖を除く酵素については，多糖

に良く作用するものと、多糖には殆ど作用せず、オリゴ糖に良く作用する酵素が存在するが、いずれの場合にも分岐の形態で影響を受ける。従って、側鎖認識機構が解明された酵素を如何に多く保有し、それらを利用していかかということがヘミセルロースの利用を実用化するうえで、非常に重要である。また、バイオマスの糖化という側面からもヘミセルラーゼの側鎖認識機構を理解することは非常に重要である。図14に示す側鎖認識機構は、グルクロン酸側鎖を持つキシランを基質とした場合、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では最低3個の、アラビノースを側鎖に持つキシランを基質とした場合には、GH10は最低1個、GH11では最低3個の、側鎖を持たないキシロース残基が存在しなければ、酵素は作用できないということを意味する。従って、側鎖が多く存在する基質に対してはGH10の方がより耐性があり、切断できる箇所が多くなることから分解率が高くなることが予想される。

側鎖を除く酵素についての詳細は紙面の都合で省略するが、著者が他で纏めたものがあるので、そちらを参照されたい¹⁷⁾。

4. おわりに

安価なエタノール製造を目指し、安価な原料を用いて酵素生産菌を培養する、酵素の生産量を上げる、といった糖化酵素の生産コスト削減へ向けた研究が行われている。しかし、ここにも大きな落とし穴があり、酵素のコストばかりに目が行き、酵素生産量の高い *Trichoderma* のセルラーゼのコストを如何に下げかという方向に研究が収束していく方向にある。しかし、図16に示すように、バイオマスの糖化はヘミセルロースを如何に除くかに懸かっている。図16は、*Trichoderma* のセルラーゼ製剤（粗酵素のため、ヘミセルラーゼ活性を含む）の量を一定にし、先に示した放線菌 *S. olivaceoviridis* E-86 由来GH10キシラナーゼの量を変えて添加していった場合の結果である。通常、バイオマスの分解は縦軸に分解率（または還元糖量）、横軸に時間を表示して評価しているが、本結果は縦軸に発生したグルコース量、横軸に発生したキシロース量を表示している。*Trichoderma* のセルラーゼ製剤のみの場合もキシラナーゼを含むため、キシロースが生じるが、時間が経過しても発生するキシロース量とグルコース量には相関がある。少量のキシラナーゼを添加した場合、生じるキシロース量が増加し、それによってセルラーゼの量を増やしていないにも関わらず、グルコースの量が増加する。キシラナーゼの量を増やすほど分解率が高まり、生じるキシロースが増えるが、それに伴いグルコース量も高まる。使用するセルラーゼ量を5倍増やして実験を行った場合も同様であり、どの様な酵素比、どの反応時間のものでも、グルコースとキシロースの発生量は相関がある。このことはヘミセルロースを除かなければバイオマスは糖化できない（糖化率はキシランの分解率に一致する）ことを意味する他、かなり大量のセルラーゼを使用しているにも関わらず、

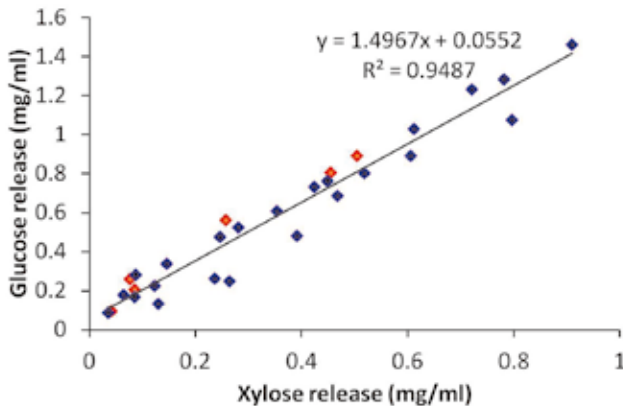


図 16 バイオマス分解におけるキシロース生成量とグルコース生成量の関係

キシロースとグルコースの生産量は反応時間、酵素使用量に関係なく、相関関係がある。キシラナーゼの添加によりキシラン分解量が増加すると、セルロースの分解も促進され、グルコース生成量も増加する。

アンモニア処理イナワラの 20 倍希釈したセルクラストによる分解 (赤)：反応時間は 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間, 20 倍希釈したセルクラストに *S. olivaceoviridis* 由来 GH10 キシラナーゼを 0.01 μ M, 0.5 μ M, 5 μ M 添加 (青)：反応時間は 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間

少量の放線菌のキシラナーゼの添加が糖化を促進することから、*Trichoderma* の酵素に含まれるヘミセルラーゼは性質が悪く、バイオマスの糖化に向かないということを示唆している。従って、付加価値の高い産物をヘミセルロースから生み出すという形態のバイオリファイナリーを実現し、バイオマスからヘミセルロースを除く工程を入れなければ、*Trichoderma* の酵素によってバイオマスの糖化を実現することは難しい。

近年、著者は未処理のイナワラを溶解できる放線菌を見出した (図 17)。こういった現象は *Trichoderma* では起こらない。本菌はバイオマス分解における重要な酵素、特に重要なヘミセルラーゼを持っていると考えられることから、本菌のゲノム DNA 配列解析を行なった。今後、本菌の生産するヘミセルラーゼを詳細に解析していくことで有用なヘミセルラーゼを数多く見出せることが期待される。また、先に示したエノキタケはペントース (キシラン) をエタノールに変換できないという性質を有していることから、エノキタケによる CBP にヘミセルロースを利用するバイオリファイナリーを組み込んで行ける可能性がある (図 18)。ヘミセルロースの利用やきのこを用いた CBP は、バイオマス利用を現実の

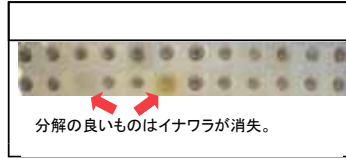


図 17 イナワラ分解に優れる放射菌



図 18 きのこ産業、ヘミセルロースの利用を実現したバイオリファインリーの実現による地域資源循環モデル

ものとするための核となるものであるが、これらの技術が二酸化炭素削減、石油依存型社会からの脱却における救世主となり得るかどうかは、今後の研究が鍵となる。

謝辞

エノキタケによる CBP の研究は農水省委託プロジェクト「地域活性化」の補助により推進された。ヘミセルラーゼの研究の一部は NEDO（先導技術開発）の助成により実施したものである。

引用文献

- 1) M.E. Himmel, S.Y. Ding, D.K. Johnson, W.S. Adney, M.R. Nimlos, J.W. Brady & T.D. Foust: *Science*, **315**, 804 (2007).
- 2) Q. Xu, A. Singh & M.E. Himmel: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 364 (2009).
- 3) D.G. Olson, J.E. McBride, A.J. Shaw & L.R. Lynd: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 1 (2011).
- 4) L.R. Lynd, W.H. van Zyl, J.E. McBride & M. Laser: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 577 (2005).
- 5) D.A. Argyros, S.A. Tripathi, T.F. Barrett, S.R. Rogers, L.F. Feinberg, D.G. Olson, J.M. Foden, B.B. Miller, L.R. Lynd, D.A. Hogsett & N.C. Caiazza: *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8288 (2011).
- 6) E. Guedon, M. Desvaux & H. Petitdemange: *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 53 (2002).
- 7) Matano, Y., Hasunuma, T., Kondo, A: *Bioresource Technol.* **108**, 128 (2012).
- 8) M. Ilmén, R. den Haan, E. Brevnova, J. McBride, E. Wiswall, A. Froehlich, A. Koivula, S.P. Voutilainen, M. Siika-Aho, D.C. la Grange, N. Thorngren, S. Ahlgren, M. Mellon, K. Deleault, V. Rajgarhia, W.H. van Zyl, M. Penttilä: *Biotechnol Biofuels.* **4**, 30 (2011).
- 9) R. Mizuno, H. Ichinose, T. Maehara, K. Takabatake & S. Kaneko: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2240 (2009).
- 10) S. Kaneko, R. Mizuno, T. Maehara & H. Ichinose: in *Bioethanol*, 191 (2012).
- 11) T. Maehara, M. Yoshida, Y. Ito, S. Tomita, K. Takabatake, H. Ichinose & S. Kaneko: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1126 (2010).
- 12) T. Maehara, S. Tomita, K. Takabatake & S. Kaneko: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2523 (2010).
- 13) E. Schulze: Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der pflanzlichen Zellmembranen. *Ber.*, **24**, 2277 (1891).
- 14) 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)
- 15) Ľ. Urbániková, M. Vršanská, K.B. Mørkeberg Krogh, T. Hoff, and P. Biely: Structural basis for substrate recognition by *Erwinia chrysanthemi* GH30 glucuronoxylanase. *FEBS J.*, **278**, 2105 (2011)
- 16) M.A. Correia, K. Mazumder, J.L. Brás, S.J. Firbank, Y. Zhu, R.J. Lewis, W.S.

York, C.M. Fontes, and H.J. Gilbert: Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *J. Biol. Chem.*, **286**, 22510 (2011)

- 17) 金子哲：ヘミセルラーゼの構造, バイオマス分解酵素研究の最前線. 170 (2012)