

# 0-1 両親媒性リグニン誘導体とセルラーゼ間の相互作用の解明

北大院農 〇及川千皓、イナウィナルニ、幸田圭一、浦木康光、  
森林総研 山田竜彦、野尻昌信、東大院農生科 五十嵐圭日子

## 1. 緒言

木質バイオマスを原料とするバイオエタノール製造において、その第一段階として、セルラーゼを用いた酵素糖化が、現行法の酸糖化に代わる方法として注目されている。当研究室では、両親媒性リグニン誘導体 (PEGDE-AL) をセルラーゼに加えるだけで、繰り返し使用してもセルラーゼの活性を高いレベルで維持することを見出した<sup>1)</sup>。本研究では、より酵素活性を維持させるリグニン誘導体の開発とその作用機作の解明を目的に、まず、2種の新たなリグニン誘導体を開発した。これらの誘導体を用いて、リグノセルロースの酵素加水分解に及ぼす効果と、その機能発現に関わるセルラーゼとの相互作用について検討した。

## 2. 方法

**リグニン誘導体の調製**：Fig. 1 に示すエポキシ基を有するポリエチレングリコール (PEG) 誘導体と酢酸リグニン (AL) とを反応させて、PEGDE-AL、EPEG-AL 及び DAEO-AL の3種の両親媒性リグニン誘導体を調製した。**パルプの酵素加水分解**：酵素は GC220 (ジェネンコア株式会社製) 及びメイセラゼ (明治製菓株式会社製) を使用し、残存リグニン 6.75% 及び 10.4% のスギ未漂白ソーダパルプを基質とした。上記の3種のリグニン誘導体をそれぞれ基質に対し 1/10 量加え、50°C、pH 4.8 の条件で酵素加水分解実験を行った。**リグニン誘導体-セルラーゼ間の相互作用解析**：両親媒性リグニン誘導体と、セルラーゼから単離した CBH II との吸着-脱着現象を、表面プラズモン共鳴に基づく生体分子間相互作用解析システム (商品名: Biacore X-100) を用いて追跡した。

## 3. 結果および考察

### スギ未漂白パルプの酵素加水分解に及ぼす両親媒性リグニン誘導体の効果

3種の両親媒性リグニン誘導体を用いて未漂白パルプの酵素分解を行った。Fig. 2 にメイセラゼおよび GC220 によるスギ未漂白パルプの酵素加水分解の結果を示す。GC220 はメイセラゼよりも加水分解率、残存活性率ともに高く、未漂白パルプの酵素糖化に対して、好適な酵素であることが示された。また、リグニン誘導体を添加することで、いずれの酵素も加水分解効率が向上し、加水分解反応後も高い活性が維持されていた。特にメイセラゼでは DAEO-AL が、ジェネンコア GC220 では EPEG-AL が最もセルラーゼ活性を向上させると共に、その活性を維持させることが明らかとなった。

2007年に、セルラーゼの活性を向上させる助剤として PEG4000 が報告された<sup>2)</sup>。そこで、この化合物の有効性をリグニン誘導体と比較した。その結果、PEG4000 は最も高い加水分解率の向上をもたらしたが、残存活性はリグニン誘導体より低く、両親媒性リグニン誘導体が酵素の繰り返し利用に有効であることが確認できた。

### リグニン誘導体とセルラーゼの相互作用

分子量分画した PEGDE-AL と CBHI 及び II の複合体形成を Native-PAGE で評価した。その結果、このリグニン誘導体は、CBH I, II とともに強固な複合体は形成しないことが示唆された。したがって、リグニン誘導体がセルラーゼ活性に及ぼす効果は、セルラーゼとの弱い相互作用に起因すると推測された。この弱い相互作用を観測する目的で、Biacore のセンサーチップ上に CBH II を固定化し、3種のリグニン誘導体の吸-脱着現象を追跡した。Fig. 4 に、吸-脱着過程を示すセンサーグラムを示す。セルラーゼへの吸着量は EPEG-AL、PEGDE-AL、DAEO-AL の順に増大した。また、脱着に注目すると、セルラーゼの活性向上に効果があった DAEO-AL と EPEG-AL は、その量、速度とも小さく、酵素に安定的に吸着していることが示唆された。一方、PEG4000 は、リグニン誘導体に比べ CBHII との相互作用がほとんど観測されなかった。これらの結果から、リグニン誘導体は、物理的な相互作用によってセルラーゼに吸着し、その活性の維持に寄与することが示唆された。

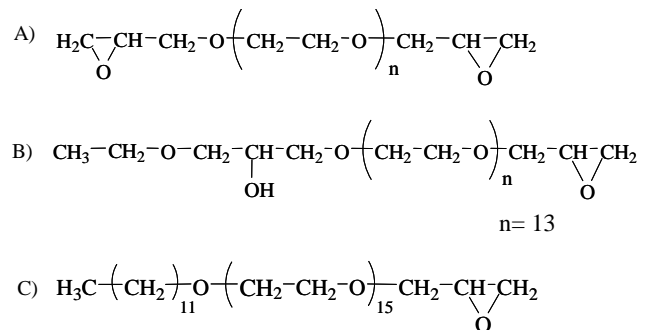


Figure 1. Chemical structure of polyethylene glycol diglycidylether (PEGDE, A), ethoxy (2-hydroxy)propoxy polyethylene glycol glycidylether (EPEG, B) and dodecyloxy-polyethylene glycol glycidyl ether (DAEO, C).

1) Y. Uraki, N. Ishikawa, M. Nishida, Y. Sano, J. Wood Sci. 47, 301-307 (2001)

2) J. Borjesson, R. Peterson, F. Tjerneld, Enzyme Microb. Technol. 40, 754-762 (2007).

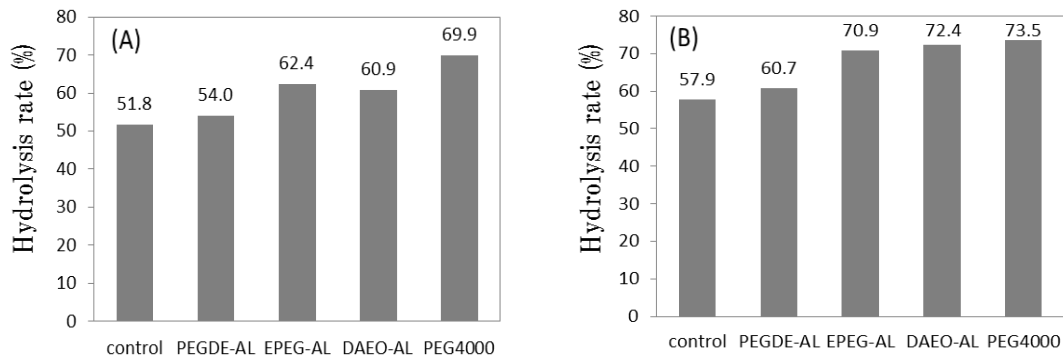


Figure 2. Hydrolysis rate of unbleached cedar pulp with Meicelase (A) and Genencor GC220 (B) (10 FPU/g of substrate) for 48 h at pH4.8 and 50 °C.

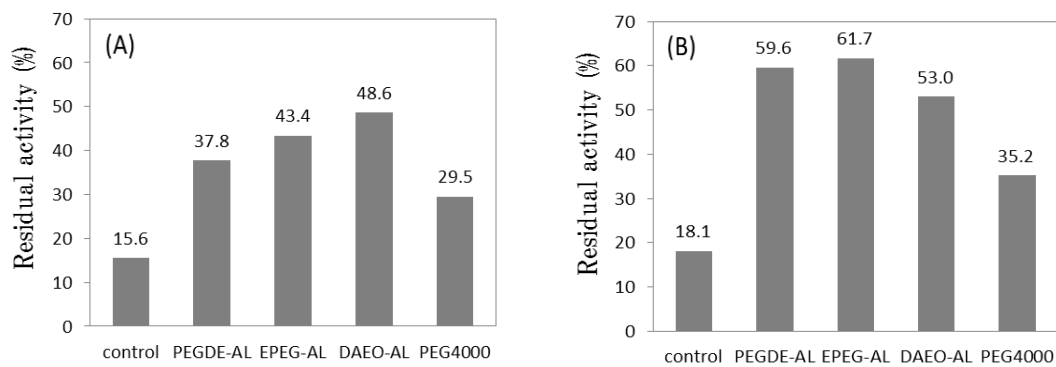


Figure 3. Residual cellulase activity of Meicelase (A) and Genencor GC220 (B) after enzymatic hydrolysis of unbleached cedar pulp at pH4.8 and 50 °C for 48 h.

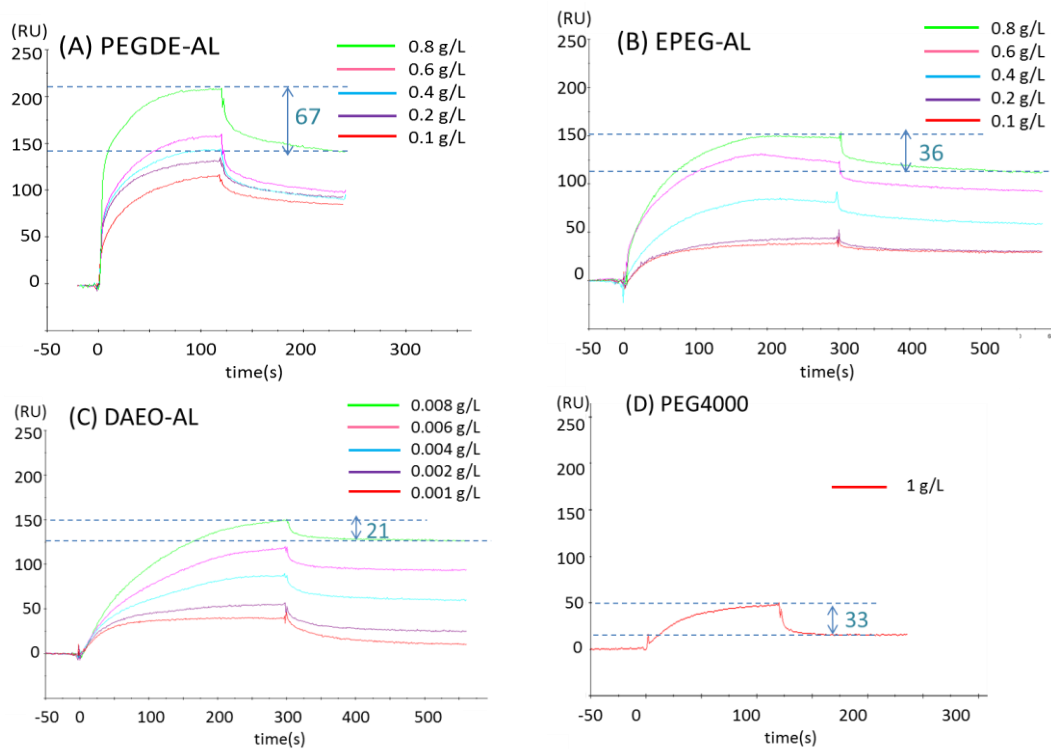


Figure 4. Sensorgrams of lignin derivatives adsorption onto the CBHIII immobilized on the sensor chip CM5. (A), PEGDE-AL; (B), EPEG-AL; (C), DAEO-AL; (D), PEG4000.