

# 細胞壁分解酵素の機能と食品への利用

## 1. はじめに

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、植物細胞壁は地球上に最も多く存在するバイオマス資源である。植物細胞壁の主成分はセルロース、ヘミセルロースといった多糖類であるが、人類は古くからこれら糖類を甘味料、保水剤、繊維等として食品、化粧品、衣料等の分野で利用してきた。しかしながら、利用されているのは限られた極く一部のみであり、大部分は未だ有効な利用には至っていない。近年、環境問題に関連して、カーボンニュートラルとなることからバイオマスを燃料として利用することに関心が高まっている。石油価格の上昇に伴い、バイオマス燃料、特にバイオエタノールの製造熱は加速的に高まってきている。植物細胞壁（セルロース系バイオマス）はデンプンやショ糖を利用するよりCO<sub>2</sub>削減効果が大いことから、これまでにセルロース系バイオマスよりエタノールを製造するための研究は盛んに行われてきているが、全世界をみても殆ど実用化に至っておらず、カナダのIogen社が国の補助金に支えられ、麦わらからエタノールを製造しているのみである。セルロース系バイオマスを原料とした場合、エタノールの製造コストが高いことが実用化に向けて大きな障壁になっているが、こうした問題点を解決するために、バイオマスから複数の化学製品を生産し、余すことなく利用することで、バイオ製品市場の拡大、収入の安定化、生産コスト低減を実現すると同時に、新しい生産物を中心とした新規事業展開を狙ったバイオマスリファイナリーという考えが一般的になりつつある。この様なカスケード利用を可能にするためには植物細胞壁の主成分である多糖類の利用用途を拡大する必要がある。多糖類の構造を修飾することにより、分子量の大きさや枝分かれの数を調整する等を意図的に行い、物性や機能性を自在に調節できれば、その利用価値が高まると考えられる。

植物細胞壁多糖の構造の修飾に欠くことができないのは糖質関連酵素である。これら酵素の多くは通常その触媒機能を有するドメインのみではなく、酵素の基質となる糖類へ結合するドメインと繋がったモジュラー構造をしていることが知られている。Henrissatらは糖質関連酵素の分類を行っているが、現在のところ、糖加水分解酵素：108ファミリー、糖転移酵素：87ファミリー、多糖脱離酵素：18ファミリー、糖エステラーゼ：14ファミリー、糖結合モジュール：49ファミリーが存在している（CAZy website: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>）。このファミリー分類は酵素のアミノ酸配列中に見られる疎水性アミノ酸クラスターのパターンから判断しているため、タンパク質の立体構造を反映する物となっている。実際に同一のファミリーに分類された酵素は一つの例外もなく、同じフォールディ

ングをしており、活性中心の位置が保存され、同一のメカニズムにより酵素反応を行うことが知られていることから、ゲノム情報より目的とする糖質関連酵素を探す場合や精製した酵素の部分アミノ配列情報を得た様な場合には酵素の機能についてもある程度推定することが可能であり、有益な情報を与えてくれる。

本稿では、著者らがこれまで研究を行ってきた放線菌由来のキシラナーゼを例として、植物細胞壁分解酵素の立体構造と機能解析、酵素の食品への応用について解説する。

## 2. キシラナーゼ

### 2.1 放線菌キシラナーゼの構造

一般に高等植物の細胞壁は約90%がリグニン及びセルロース、ヘミセルロース、ペクチン等の多糖、残りの10%がタンパク質であるが、キシラナーゼの基質であるキシランはヘミセルロースの成分として最も主要なものであり、セルロースに次いで天然に2番目に多く存在する多糖である。D-キシロースが $\beta$ -(1-4)結合した基本構造をしているが、殆どの場合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、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。

キシラナーゼはキシランの主鎖であるD-キシロースの $\beta$ -(1-4)結合をランダムに加水分解するエンド型の酵素である。前述の糖質加水分解酵素のファミリー5, 8, 10, 11の4つのファミリーに分類されているが、ファミリー10と11が大きなファミリーであり、殆どのキシラナーゼはこの2つのファミリーに分類される。ファミリー10と11のキシラナーゼでは触媒ドメインの大きさ、立体構造や基質特異性が異なる事が明らかとなっている(図1)。ファミリー11のキシラナーゼはアミノ酸200個程度で $\beta$ ジェリーロール構造をしており、酵素反応分解

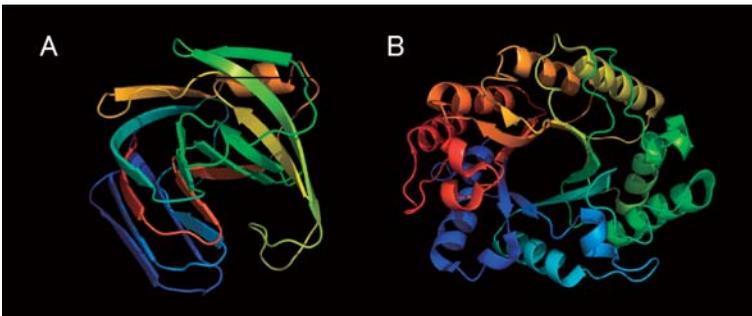


図1 ファミリー10キシラナーゼとファミリー11キシラナーゼの立体構造の比較  
A: ファミリー11キシラナーゼ, B: ファミリー10キシラナーゼ

物には単糖であるキシロースがあまり蓄積しない。一方、ファミリー10キシラナーゼはアミノ酸300個程度で構成されるTIMバレル構造を持ち、ファミリー11に比べてサイズの小さいオリゴ糖と単糖であるキシロースを生産する。

著者が研究対象としてきたキシラナーゼは放線菌 *Streptomyces olivaceoviridis* E-86が生産する分子量45,000の酵素 (SoXyn10A) であるが、アミノ酸配列や立体構造の情報が全くなかったことから、遺伝子のクローニングと結晶構造解析を行った<sup>1,2)</sup>。SoXyn10Aのゲノム遺伝子をクローニングしたところ、本キシラナーゼは1,431bpの塩基からなり、477アミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列の解析によると、N末端側41アミノ酸は分泌シグナル配列に相当し、成熟タンパク質のN末端側の約300アミノ酸がファミリー10キシラナーゼと類似しており、C末端側の約120アミノ酸はガラクトース結合レクチンと類似していた。そこで、C末端側のレクチン様ドメインの機能を調べるため、本ドメインを欠失した変異体酵素を構築し、キシランの分解性を天然型酵素と比較した(図2)。可溶性キシランに対しては両酵素に分解性の違いは見られなかったが、不溶性キシランに対しては、C末端ドメインを欠失した変異体酵素の活性が低下していたことから、本ドメインはキシランと結合する機能を持つ基質結合ドメインであると考えられ

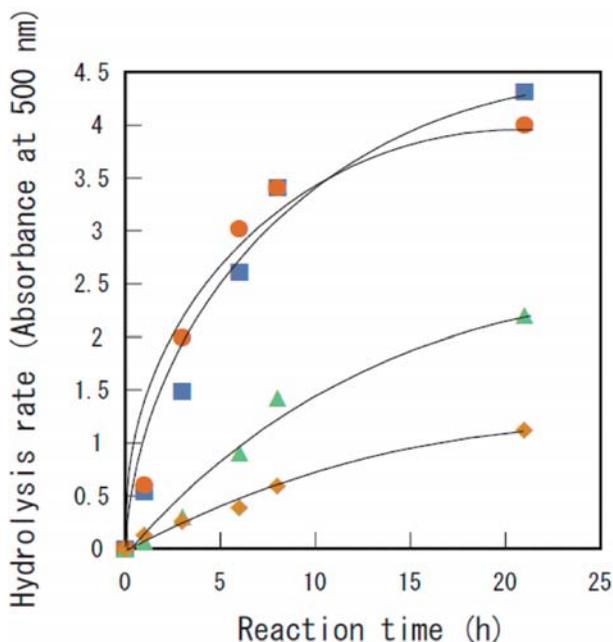


図2 C末端ドメイン欠失変異体のキシランに対する活性

: 天然型 SoXyn10A (可溶性キシラン), : C末端ドメイン欠失変異体 (可溶性キシラン),  
 : 天然型 SoXyn10A (不溶性キシラン), : C末端ドメイン欠失変異体 (不溶性キシラン)

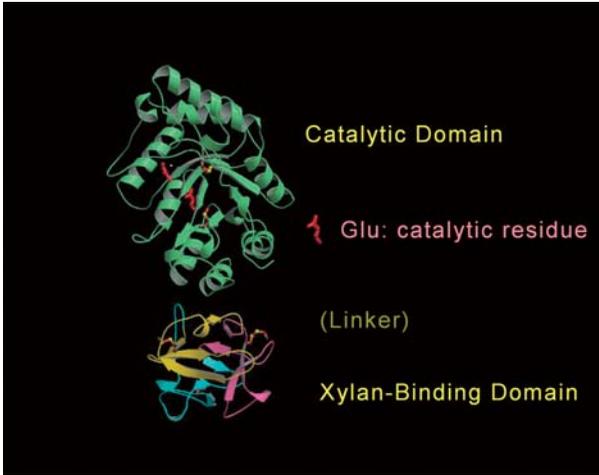


図3 SoXyn10Aの結晶構造

た。一方、X線結晶構造解析により1.9 Åの分解能でSoXyn10Aの構造が決定された(図3)。触媒ドメインは他のファミリー10キシラナーゼと同様(β/α)<sub>8</sub>-バレルからなっており、C末端側のキシラン結合ドメインはサブドメインα、β、γの3つのサブドメインからなる3回繰り返し配列でできたβ-トレフォイル構造をしていた(図3)。両ドメインはプロリンとグリシンに富むリンカー配列で繋がっていることが明らかとなった。リンカー配列で繋がった2つのドメインを含むインタクトな状態での構造決定は、数多く研究されている糖質関連酵素の中でも極めて珍しく、本酵素において初めてなされた物である。この構造を用いて研究を行うことで、これまで解明されていないモジュラー構造を持つ酵素の機能解析を優位に進められることが期待された。

次にSoXyn10Aの結晶に様々な糖をソーキングし、本キシラナーゼがどのように基質を認識しているのかについて調べた<sup>3,4)</sup>。図4にSoXyn10Aにキシロピオースが結合した構造を示したが、基質であるキシロオリゴ糖は触媒ドメイン、キシラン結合ドメインの両方に結合していたのに対し、グルコース、ガラクトース、ラクトース等の糖は基質結合ドメインにのみ結合していた(図5)。興味深い事に、基質結合ドメインにおいて糖との結合に関与するアミノ酸は全く同じであったが(図6)、糖のリングの向きがガラクトースとキシロースで異なり、ラクトースとの結合はガラクトース結合レクチンであるリシンと同じ様式であり、基質結合ドメインに突き刺さる様な方向に結合するのに対し、キシロースは基質結合ドメインに横たわる様に結合し、多糖であるキシランと結合するのに適した結合様式をしていた(図7)。一方、触媒ドメインに結合したキシロオリゴ糖の結合様式から本キシラナーゼは5個のキシロースを認識するポケット(サブサイト・3

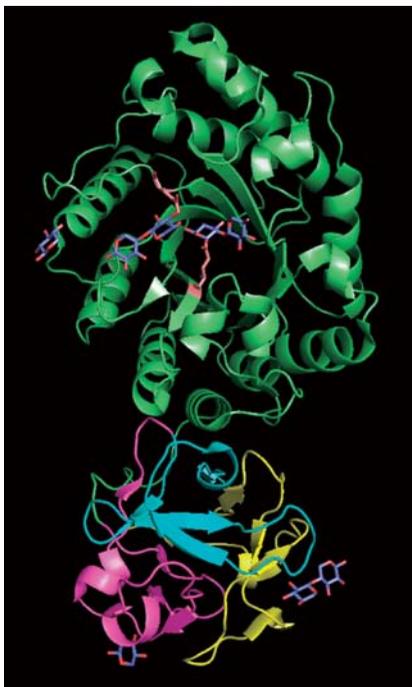


図4 SoXyn10A のキシロピオース結合構造

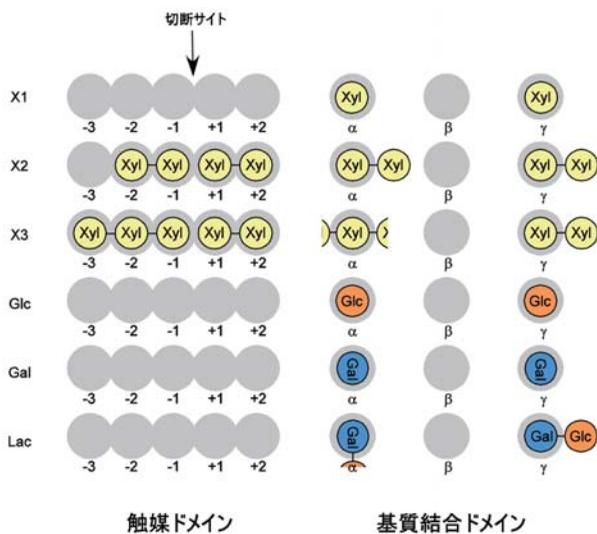


図5 SoXyn10A の糖結合様式

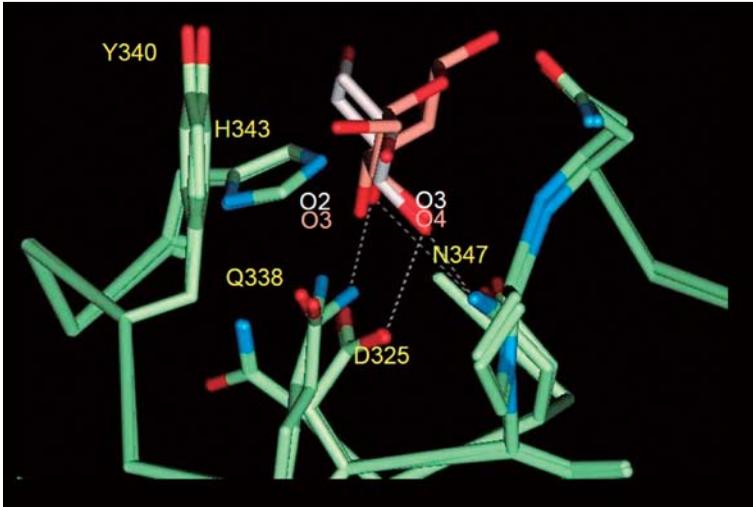


図6 キシラン結合ドメインとキシロース及びガラクトースとの結合様式  
白：キシロース，赤：ガラクトース

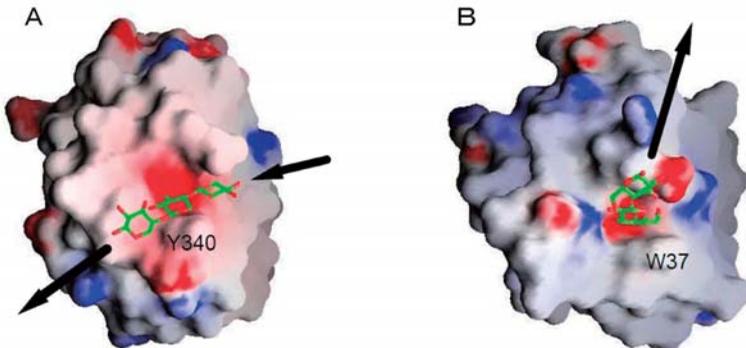


図7 キシラン結合ドメインの基質結合様式

A：キシラン結合ドメインとキシロトリオースの結合様式，  
B：リシン（ガラクトース結合レクチン）とラクトースの結合様式

～ + 2) を有していると判断された。また、天然基質に近いアラビノフラノースや4-O-Me-グルクロン酸の側鎖を有するオリゴ糖との結合構造についても解析したが、これらの基質も触媒ドメインと基質結合ドメインの両方に結合していた(図8)。基質結合ドメインにおいてはキシロースのC-2位及びC-3位の水酸基が基質結合ドメインの糖認識に関わるアミノ酸と水素結合しているが、これら

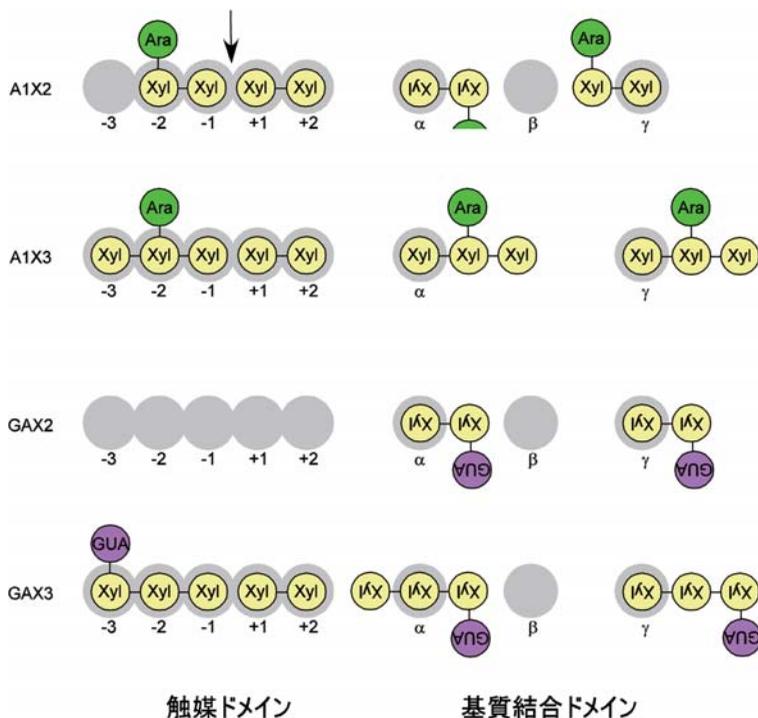


図8 側鎖を有するオリゴ糖に対する SoXyn10A の結合様式

の水酸基はトランスの位置関係にあり、180度回転しても同じ位置関係になることから、リバーシブルに結合がなされることが予想されていたが、側鎖付きの基質を用いることで、実際にリバーシブルな結合が可能であることを証明した(図8)。一方、触媒ドメインにおいてはアラビノフラノース側鎖を持つキシロース残基はサブサイトの-2の位置に結合していたのに対し、4-O-Me-グルクロン酸の側鎖を有するキシロース残基はサブサイト-3の位置に結合していた(図9, 10)。アラビノース側鎖は $\alpha$ -1,3-結合であり、主鎖のキシロースと並行方向に伸びるために障害を生じることなくサブサイト-2に入ることができるが、4-O-Me-グルクロン酸の結合は $\alpha$ -1,2-結合であり、酵素の内側方向に伸びるために立体障害が起これ、4-O-Me-グルクロン酸の側鎖を有するキシロース残基はサブサイト-2には入れないと考察された。この結合様式は SoXyn10A がキシランを分解したときに生産するオリゴ糖の構造を反映しており、この結合構造から SoXyn10A により特定の構造をした側鎖を有するキシロオリゴ糖が生産されるメカニズムが解明された(図11)。



図9 SoXyn10Aのアラビノシルキシロトリオース結合構造

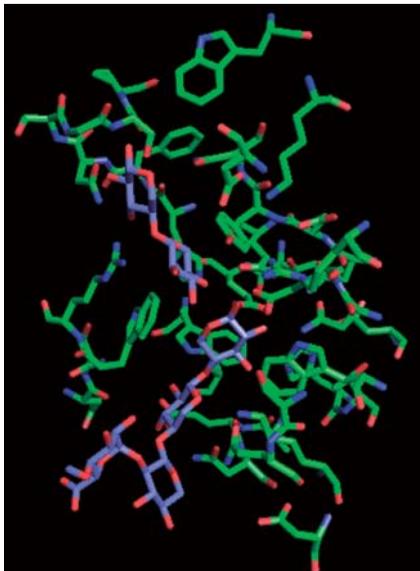


図10 SoXyn10Aのグルクロノシルキシロトリオース結合構造

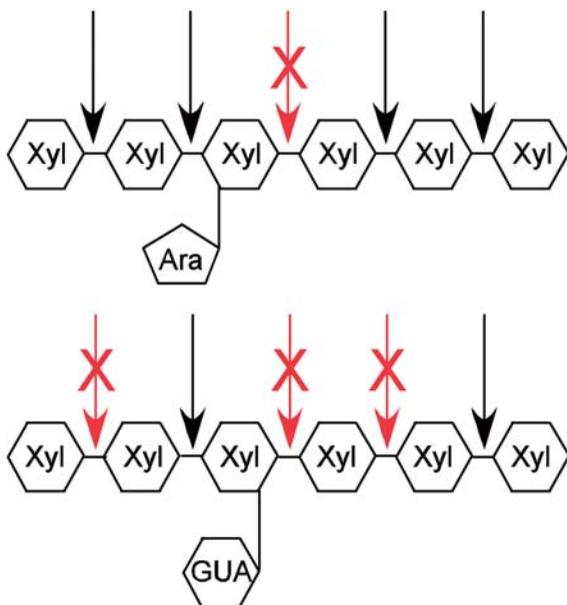


図11 キシランの側鎖と SoXyn10A が切断できるサイトの関係

## 2.2 機能解析

これまでに構造の明らかになっているファミリー10のキシラナーゼの構造と SoXyn10A の構造を比較するとサブサイトの -3 ~ +1 までは非常に構造が保存されているが、サブサイト +2 の構造はそれぞれの酵素に特異的であった。そのことから酵素の基質特異性を決定しているのはサブサイト +2 の構造であるという仮説が考えられた。同じファミリー10に属し、立体構造が明らかになっている *Cellulomonas fimi* の Cex (CfXyn10A) と SoXyn10A の基質結合クレフトの構造を比較すると SoXyn10A にはサブサイト +2 の部分に余分なループが存在し、この部分が直接基質との結合に関与するが、CfXyn10A にはそれが存在しない為、異なる様式で基質と結合していると考えられる (図12)。実際にキシロオリゴ糖やキシランに作用させると酵素分解産物や反応速度に違いが見られた。

ファミリー10キシラナーゼの触媒ドメインは基質結合クレフトに沿った境界で大きな2つの塊に分かれている (図13)。そこで SoXyn10A のサブサイト +2 のループ側の塊を CfXyn10A に置換した変異体 (図13に示す SoXyn10A の左側部分を CfXyn10A に置換した変異体) を構築し、親酵素である SoXyn10A, CfXyn10A と共に特性の解析を行った<sup>5)</sup>。構築したハイブリッド酵素は SoXyn10A と CfXyn10A の中間的な性質を有していたが、サブサイト +2 置換の効果は顕著であり、ハイブリッド酵素がサブサイト +2 を使う反応様式の場合にはサブサイト +2 が由来する CfXyn10A と同様の性質を示した。キシロオリゴ糖の分解速度、

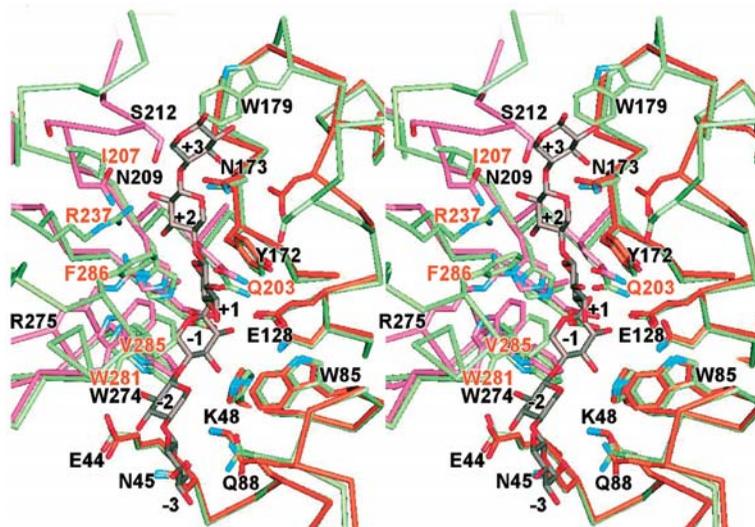


図12 SoXyn10A と CfXyn10A の基質結合クレフトの比較

グリーン：SoXyn10A の N 末端側ブロック，オレンジ：CfXyn10A の N 末端側ブロック，  
ピンク：SoXyn10A の C 末端側ブロック

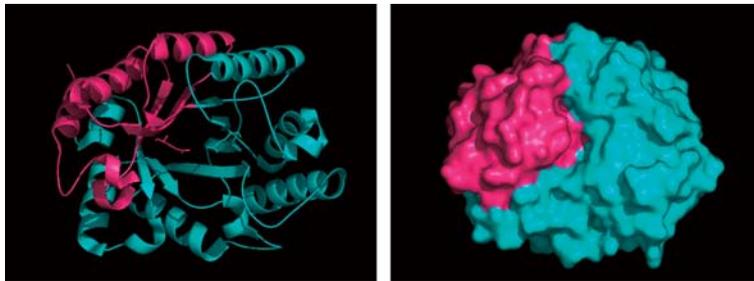


図13 SoXyn10A が基質結合クレフトを境界に2つのブロックに分かれる様子

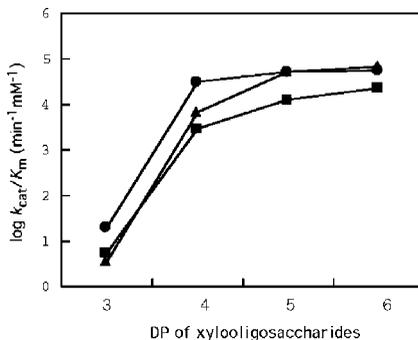


図14 ハイブリッド酵素によるキシロオリゴ糖の分解速度

● : CfXyn10A, ■ : SoXyn10A, ▲ : ハイブリッド酵素

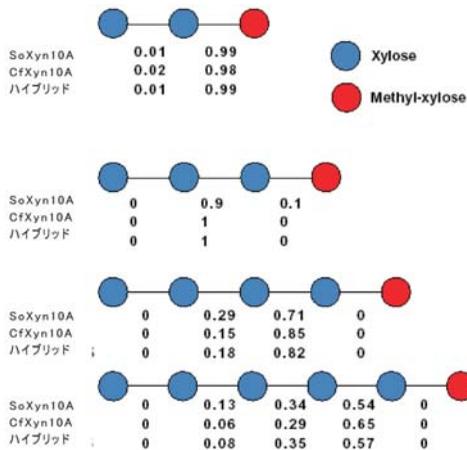


図15 ハイブリッド酵素の Bond Cleavage Frequency

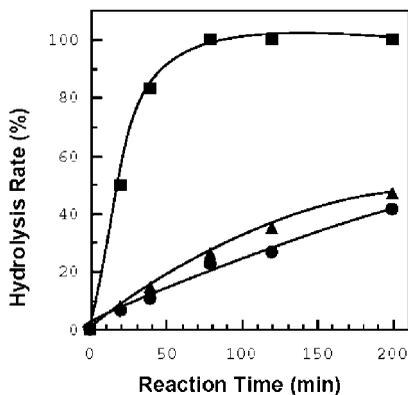


図16 ハイブリッド酵素の4-O-Me-グルクロノシルキシロテトラオースの分解  
 : CfXyn10A, : SoXyn10A, : ハイブリッド酵素

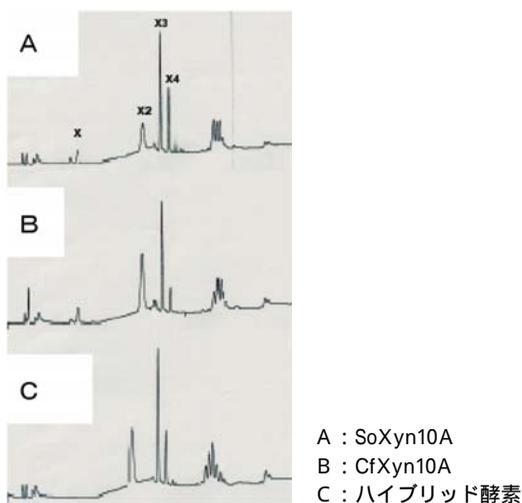


図17 ハイブリッド酵素のキシラン分解物の分解

分解パターン何れもハイブリッド酵素がサブサイト+2を使用するキシロテトラオースより長鎖の基質の分解においては CfXyn10A と一致したが、サブサイト+2を使用しないキシロトリオースの分解については SoXyn10A と一致した(図14, 15, 16)。その結果として、ハイブリッド酵素は分解物にキシロースを生産するキシロトリオース、キシロテトラオース、グルクロノキシロテトラオース等の基質に対しての活性を弱い方の性質のみを両方の親酵素から継承したことになり、キシランに作用した際に親酵素よりキシロースを生産しない性質を持った。

以上の様に、酵素の立体構造，基質との結合様式を解析し，酵素の基質を認識する部分を改変することにより，酵素の基質特異性を改変することが可能であることが示された。この様な実験結果を蓄積することで，酵素の自在なデザインが可能になり，将来的には意図した特性を持つ様に酵素を自在に改変できるようになることが期待される。

### 3．キシランの利用

キシランの実用化されている利用法には大きく分けて二通りの方法がある。一つは酸分解して，主成分である D-キシロースを利用する方法であり，もう一つはキシランを酵素分解し，生じたキシロオリゴ糖を利用するものである。

D-キシロースは，既存添加物（天然添加物）である。甘味は上品でさわやかさを呈し，苦味，渋味を伴う不快味はなく，果糖の甘さに類似しており，ショ糖の約60%の甘味度を有する。摂取してもほとんど吸収されないが，動物実験では一時的な白内障を引き起こすことが知られている。しかしながら，米国で一般に安全と認められる物質とされており，安全性に問題はないものと考えられている。

キシロースの一般的な性質を列記すると，溶解度が大きい。浸透圧が大きい。吸湿性が少ない。褐変反応が起こりやすく，独特の香気，抗酸化作用，防腐作用がある。甘味度はブドウ糖より若干少なく，上品で爽快な甘味がある。腸管からの吸収性が非常に低い（ノンカロリー）。難発酵性である。整腸作用がある等であり，これらの特性を利用して下記の様に食品分野において利用されている。

- ・みそ，しょうゆの収量低下を抑え，着色を増進するため，製造時に添加する。
- ・燻製品の発色，風味，保存性等を改善し，燻製時間を短縮するために，塩漬工程へ添加する。
- ・煮豆，つくだ煮，外観，風味，貯蔵性向上のための有機酸と併用する。
- ・ハム，ソーセージ，水産練り製品の光沢，風味をそこなわずに，貯蔵性を向上させるために塩漬液に添加する。
- ・焼菓子，パン，ビスケット，クッキー，パン等の焼きあがりの色合い，品質改良，また風味改善のためのアミノ酸と併用する。
- ・脂質酸化防止，焼菓子，練り製品，揚げ物等の脂質酸化の防止に使用する。
- ・カラメル，キシロースカラメルの独特な香りを食品に利用する。
- ・その他，難発酵性，高溶解，高浸透性を利用する。

現在，キシロースの最も多い利用法はキシリトールの原料としてであり，キシロースに水素添加することにより化学的にキシリトールを製造している。キシリトールは甘く，さわやかな味がするが，虫歯や肥満の原因にならず，細菌の発育を妨げるため，口中の細菌による感染症の予防にもなり，ガム，キャンディーや歯磨き粉に多く利用されている。また，カロリーにはなるが，血糖の上昇はなく，糖尿病患者甘味料として利用されている。

一方、キシランの酵素分解により生産されるキシロオリゴ糖はビフィズス菌の育成を促して腸内環境を改善し、お腹の調子を整える効果が期待できるオリゴ糖として、特定保健健康食品の有効成分として認可されている。ビフィズス菌を増殖させる活性は既存のオリゴ糖の中で最も優れており、少量の摂取で効果が期待できる。キシロオリゴ糖は、腸や小腸などの消化液の影響を受けることなく、そのまま大腸等の下部消化管に到達する。大腸菌を始めとする他の菌に消費されることなく、効率良くビフィズス菌の栄養源になることから、キシロオリゴ糖を摂取すると、徐々にお腹の中でビフィズス菌が増殖するというメカニズムであることが明らかとなってきた。キシロオリゴ糖のカロリーは砂糖の半分程度であり、甘味は約1/3である。消化されにくく、低カロリーで虫歯の原因なりにくい糖であり、継続して摂取することにより、便秘傾向の人の排便を増やす効果があることが報告されている。また、継続して摂取するとカルシウムやマグネシウムなどのミネラル吸収を高める効果もあることが知られている。

著者らが研究している放線菌のキシラナーゼ (SoXyn10A) は中国の山東省にある会社 (山東龍力生物科技有限公司) でトウモロコシの穂軸であるコーンコブよりキシロオリゴ糖を生産する工程に用いられている。同社は現在は年間300t程のキシロオリゴ糖を製造しているが、更に大きなキシロオリゴ糖製造プラントを建築しており、完成すれば年間10,000tものキシロオリゴ糖の生産が可能になるようである。

キシロオリゴ糖を添加してパンを製造すると、ふっくらすることから、欧米においては小麦粉にキシラナーゼを添加してパンの製造を行っている。また、最近では側鎖にウロン酸を持つ長鎖のキシロオリゴ糖にアレルギー改善作用があることが明らかになってきており、新規な構造のオリゴ糖が新しい機能を有する可能性が期待される。キシラナーゼの基質特異性を改変することにより新規なオリゴ糖の製造や新規なキシランの利用法が見出され、キシランの用途が拡大されることが期待される。

#### 4. おわりに

キシラン分解酵素及びキシランの利用を例にして記述してきたが、キシランのみならず植物細胞壁多糖へ目を向けても、利用へ向けた多くの研究がなされてきており、実用化されている技術もあるが、天然に存在する豊富な資源量を考えると未だ充分な利用には至っていないと言わざるを得ない。環境問題、エネルギー問題から、バイオマス燃料の利用技術の開発が大きな課題であるが、利用対照となる植物の種類が多様であり、植物細胞壁の構造が非常に複雑である上に種によって構造が異なるため、詳細な構造が解明されておらず、また、植物細胞壁成分を容易に分画するための酵素が多様な植物種に対してオプティマイズされていない事等が大きな問題となっている。植物細胞壁の最も主要な成分はグルコースの

固まりであるセルロースであり，グルコースはバイオエタノールや生分解性素材等への変換が比較的容易である。従って，ヘテロ多糖類で構造が複雑な上，生物が利用しにくい5炭糖を多く含むヘミセルロースを如何に有効に利用できるかが，植物細胞壁を材料としたバイオマスリファイナリーが成り立つかどうかのキーポイントであり，植物細胞壁バイオマス利用上の最も大きな課題である。今後，酵素のタンパク質工学，酵素生産菌の遺伝子組換え等の技術も含め，多様な植物種各々に対してオプティマイズされた植物細胞壁分解酵素の安価な製造の開発が望まれる。

## 謝辞

キシラナーゼの構造機能解析の研究は藤本瑞氏（農業生物資源研究所）及び久野敦氏（現産業総合技術研究所）との共同研究として行ったものである。本研究の一部は生研機構基礎研究事業の補助により推進された。

（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 金子 哲）

## 参考文献

- 1) A. Kuno, D. Shimizu, S. Kaneko, Y. Koyama, S. Yoshida, H. Kobayashi, K. Hayashi, K. Taira and I. Kusakabe: PCR cloning and expression of F/10 xylanase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86, *J. Ferment. Bioengin.* 86, 434-439 (1998).
- 2) Z. Fujimoto, A. Kuno, S. Kaneko, S. Yoshida, H. Kobayashi, I. Kusakabe and H. Mizuno: Crystal structure of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86  $\beta$ -xyylanase containing xylan-binding domain, *J. Mol. Biol.* 300, 575-585 (2000).
- 3) Z. Fujimoto, A. Kuno, S. Kaneko, H. Kobayashi, I. Kusakabe and H. Mizuno: Crystal structure of the sugar complexes of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase: Sugar binding structure of family 13 carbohydrate-binding module, *J. Mol. Biol.* 316, 65-78 (2002).
- 4) 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).
- 5) S. Kaneko, H. Ichinose, Z. Fujimoto, A. Kuno, K. Yura, M. Go, H. Mizuno, I. Kusakabe and H. Kobayashi : Structure and function of a chimeric  $\beta$ -xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 FXYN and *Cellulomonas fimi* Cex, *J. Biol. Chem.*, 279, 26619-26626 (2004).