

## 広葉樹キシランの酵素糖化における 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖遊離酵素

石原光朗<sup>(1)</sup>, 稲垣祥子<sup>(2)</sup>, 林 徳子<sup>(3)</sup>, 志水一允<sup>(4)</sup>

ISHIHARA, Mitsuro, INAGAKI, Shoko, HAYASHI, Noriko and SHIMIZU, Kazumasa :

### 4-O-Methyl-D-Glucuronic Acid Residue Liberating Enzyme in the Enzymatic Hydrolysis of Hardwood Xylan

**要 旨** : 広葉樹キシランから 4-O-メチル-D-グルクロン酸を遊離する酵素  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-グルクロニダーゼを生産する微生物を探索し、その酵素の生産条件を検討するとともに、その酵素を分離精製し、その機能を調べた。酵素の基質としてはアルドヒオウロン酸を還元した 2-O-(4-O-メチル- $\alpha$ -D-グルコピラノシルウロン酸)-D-キシリトールを用いた。

9 種の *Trichoderma* 及び 6 種の担子菌が産出する菌体外酵素中の  $\alpha$ -グルクロニダーゼ活性を調べた結果、いずれも本酵素を生産することが認められた。それらの中でオオウズラタケ (*Tyromyces palustris*) は  $\alpha$ -グルクロニダーゼの最もすぐれた生産菌であった。適当な培養条件下でオオウズラタケは高活性の  $\alpha$ -グルクロニダーゼを生産したが、この酵素は冷凍保存下でも不安定であった。

つぎに、*T. viride* が産出する  $\alpha$ -グルクロニダーゼを市販酵素であるメイセラゼ (Meicelase CEPB-10, 明治製菓) から分離精製した。イオン交換クロマトグラフィー及びゲルクロマトグラフィーにより約 0.5 g の市販酵素から 4.2 mg の精製  $\alpha$ -グルクロニダーゼを得ることができた。精製酵素は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一のバンドであり、分子量は 10 万と推定された。精製酵素の作用至適 pH は 5.0 にあり、また、至適温度は 45°C であった。メイセラゼからさらにキシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼをそれぞれ分離精製し、広葉樹キシランの分解に及ぼす 3 種の酵素成分の相乗効果を確認した。

## 1. 緒 言

未利用の低質広葉樹やササ、木材工場の残廃材などリグノセルロース資源を食・飼料、化学工業原料、エネルギー等へ変換し、木材成分を総合利用する可能性が検討されるようになった。蒸煮・爆砕は広葉樹材のセルロース、ヘミセルロース、リグニンの三成分を効率よく分離できる方法であり、また、ヘミセルロース及びリグニンの抽出後の残渣であるセルロースの酵素に対する反応性を著しく改善する処理方法であることが知られている (SHIMIZU *et al.*, 1983)。広葉樹材にはヘミセルロースとして 20~35% のキシランが含まれているが、蒸煮・爆砕処理によりキシランの大部分はオートヒドロシスを受けて低分子化し、水可溶性のオリゴ糖となる。このオリゴ糖をキシロースに加水分解するためには、キシラナーゼや  $\beta$ -キシロシダーゼのほかに側鎖として一部のキシロース残基の C-2 に  $\alpha$ -結合している 4-O-メチル-D-グルクロン酸を遊離する酵素 ( $\alpha$ -グルクロニダーゼ) が必要である。そこで本酵素生産菌の探索、酵素生産条件、酵素の分離精製法、さらに、キシランの酵素糖化における本酵素とキシラナ

ーゼ,  $\beta$ -キシロシダーゼとの相乗効果について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試菌

Table 1 に示す 9 種の *Trichoderma* と 6 種の担子菌を使用した。

### 2.2 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖遊離酵素の生産菌の探索

供試菌類の酵素生産能の探索は振盪フラスコで液体培養し、生成された菌体外酵素を分析することにより行った。*Trichoderma* の培地は MANDELS 及び WEBER (1969) に準じ、また、担子菌では著者らが以前に使用したのと同じ組成のもの (石原ら, 1984) を使用した。炭素源には広葉樹クラフトパルプを使用した。*Trichoderma* は 28°C で 5 日間、担子菌は同温度で 10 日間それぞれ培養した。培養後、遠心分離して (8000 rpm, 10 min) 培養上清を集め、これに硫酸を 90% 飽和になるように加えた。生成した沈殿を 0.05 M 酢酸バッファーに対して透析し、得られた透析内液を限外濾過により一定量にまで濃縮し酵素試料とした。

### 2.3 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖遊離酵素の基質の調製

4-O-メチル-D-グルクロン酸遊離酵素の基質には 2-O-(4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcAp)-D-Xylitol を使用した。シラカンバキシラン 20 g を 2 M トリフルオロ酢酸で 120°C, 1 h 加水分解し、アニオン交換樹脂 (Dowex 1x8, OAc<sup>-</sup> form) を用いて分解生成物を中性部と酸性部に分別した。得られた酸性部をアニオン交換カラムクロマトグラフィー (Diaion CA 08 Y, 23-25 $\mu$ ) によりアルドビオウロン酸の画分 (0.08 M 酢酸ナトリウムが溶出液の場合で Dv 値が 2.74) を分離精製した (ISHIHARA *et al.*, 1978)。酵素分析を容易にするため、得られたアルドビオウロン酸のキシロース還元末端を 0.2 M 水素化ホウ素ナトリウムによりキシリトールに還元した。2-O-(4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcAp)-D-Xylitol の収量は 1.24 g であった。

### 2.4 酵素活性の測定

キシラナーゼ,  $\beta$ -キシロシダーゼ活性は広葉樹キシラン、フェニル- $\beta$ -D-キシロシド (半井化学) を基質とし、それぞれ 0.5%, 0.25% 溶液 (pH 5.0) 0.5 ml に適当な濃度の酵素液を 50  $\mu$ l 加えて 40°C で 5~60 min インキュベーションした後、生成した還元糖を Somogyi-Nelson 法 (SOMOGYI, 1952) で定量した。 $\alpha$ -グルクロニダーゼ活性は 0.2% の基質溶液 (pH 5.0) 1ml に酵素液を 200  $\mu$ l 加えて 40°C で 2~16 h インキュベーションし、遊離した 4-O-Me-D-GlcA を Somogyi-Nelson 法で定量して測定した。また、キシリトールの遊離はイオンクロマトグラフ (HPIC-AS6 カラム, Dionex 2000 i) により確認した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖の遊離酵素の生産菌の探索

キシラナーゼの中には、アラビノキシランやアラビノグルクロノキシランからキシラン主鎖の  $\beta$ -キシロピラノシド結合を切る能力に加えて、L-アラビノフラノシル側鎖を遊離することのできるものの

Table 1. ブナクラフトパルプを基質とした場合のトリコデルマと担子菌類によるキシラン分解系酵素の生産

 Xylanolytic enzyme production of *Trichoderma* and basidiomycete species on buna Kraft pulp.

| 菌 類<br>Species of fungi                                      | 培養濾液の pH<br>pH of culture filtrate | 菌体外蛋白量<br>Extracellular protein<br>(mg) | $\alpha$ -グルクロニダーゼ<br>$\alpha$ -Glucuronidase<br>(単位)<br>(unit) | $\beta$ -キシロシダーゼ<br>$\beta$ -Xylosidase<br>(単位)<br>(unit) | キシラナーゼ<br>Xylanase<br>( $10^2$ 単位)<br>( $10^2$ unit) |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| トリコデルマ・アウレオビリデ<br><i>Trichoderma aureoviride</i>             | 3.5                                | 96                                      | 3.4                                                             | 46                                                        | 11.7                                                 |
| トリコデルマ・ハマツム<br><i>T. hamatum</i>                             | 3.8                                | 57                                      | 3.4                                                             | 63                                                        | 20.7                                                 |
| トリコデルマ・ハージアヌム<br><i>T. harzianum</i>                         | 3.7                                | 79                                      | 1.3                                                             | 4                                                         | 4.2                                                  |
| トリコデルマ・コニンギイ<br><i>T. koningii</i>                           | 5.6                                | 58                                      | 1.9                                                             | 20                                                        | 4.8                                                  |
| トリコデルマ・ロンギブラチツム<br><i>T. longibrachiatum</i>                 | 4.0                                | 39                                      | 3.9                                                             | 17                                                        | 3.1                                                  |
| トリコデルマ・ビリデ<br><i>T. viride</i>                               | 3.5                                | 71                                      | 1.8                                                             | 26                                                        | 4.8                                                  |
| トリコデルマ sp. No. 3<br><i>T. sp. No. 3</i>                      | 3.5                                | 88                                      | 2.8                                                             | 54                                                        | 8.8                                                  |
| トリコデルマ sp. No. 4<br><i>T. sp. No. 4</i>                      | 3.5                                | 77                                      | 2.4                                                             | 151                                                       | 6.1                                                  |
| トリコデルマ sp. No. 5<br><i>T. sp. No. 5</i>                      | 3.0                                | 35                                      | 0.7                                                             | 0                                                         | 31.2                                                 |
| ツクリタケ 306<br><i>Agaricus bisporus</i> 306                    | 6.4                                | 68                                      | 0.7                                                             | 1                                                         | 0.0                                                  |
| ツクリタケ 307<br><i>A. bisporus</i> 307                          | 6.1                                | 69                                      | 1.3                                                             | 3                                                         | 0.2                                                  |
| マスタケ<br><i>Laetiporus sulphureus</i><br>var. <i>miniatus</i> | 3.8                                | 34                                      | 1.2                                                             | 17                                                        | 5.7                                                  |
| ヒラタケ<br><i>Pleurotus ostreatus</i>                           | 5.3                                | 27                                      | 0.9                                                             | 0                                                         | 0.2                                                  |
| カワラタケ 1030<br><i>Polyporus versicolor</i> 1030               | 5.1                                | 58                                      | 3.2                                                             | 0                                                         | 5.0                                                  |
| オオウズラタケ<br><i>Tyromyces</i> 0507<br><i>palustris</i> 0507    | 2.6                                | 68                                      | 7.3                                                             | 18                                                        | 3.3                                                  |

Note: 酵素の生産量は振盪培養液 100 ml 当たりの総単位数で表された  
 Enzyme production was expressed as total units per shaking culture 100ml.

存在が知られている (TAKENISHI *et al*; SINNER *et al*, 1975; DEKKER *et al*; SINNER *et al*, 1976; JOHN *et al*, 1979)。しかしながら、広葉樹 4-O-メチルグルクロノキシランについては、これまで単一成分にまで精製されたキシラナーゼによって 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖が遊離されたという報告はなく、広葉樹 4-O-メチルグルクロノキシランの分解に関わる酵素系の詳細ははまだ明らかにされていない。そこで、著者らは広葉樹 4-O-メチルグルクロノキシランからの中間分解生成物アナログとして 2-O-(4-O-Me- $\alpha$ -GlcAp)-D-Xylitol を基質とし、ヘミセルラーゼ生産菌の菌体外酵素系の 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖遊離酵素 ( $\alpha$ -グルクロニダーゼ) を探索した。

*Trichoderma* 9 株、担子菌類 6 株を用いて、ブナクラフトパルプ 2% を唯一の炭素源とする振盪培養により、 $\alpha$ -グルクロニダーゼを含むキシラン分解に関与する酵素の生産能を調べた。菌体外酵素の力価を測定した結果を Table 1 に示す。培養期間は *Trichoderma* で 5 日間、担子菌で 10 日間と固定したが、これらの培養日数は著者らのこれまでの培養実験の結果を参考にした (石原ら, 1984; Ishihara, 1986)。培養終了後の培養濾液の pH は、用いた微生物の系によって差が認められた。すなわち、*Trichoderma* の pH 値は *T. koningii* の 1 株を除いて 3.0 から 4.0 の間にあった。また、担子菌の場合は褐色腐朽菌で pH の低下が認められたのに対して、白色腐朽菌では pH の低下が顕著でなく対照的であった。

$\alpha$ -グルクロニダーゼを生産する能力は  $\beta$ -キシロシダーゼやキシラナーゼの生産力に必ずしも伴うものではなかった。セルラーゼ生産菌として知られる *Trichoderma* のほとんどは担子菌に比較してより高いレベルで  $\beta$ -キシロシダーゼ及びキシラナーゼを生産したが、 $\alpha$ -グルクロニダーゼの生産能は低かった。

探索に用いた 14 菌株の中では、褐色腐朽菌である *Tyromyces palustris* が最もすぐれた  $\alpha$ -グルクロニダーゼの生産菌であった。最近、白色腐朽菌である *Agaricus bisporus* は、キシランに対する分解力は旺盛ではないが、この 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖遊離酵素を高いレベルで生産することが報告されている (PULS *et al*, 1987)。そこで、森林総合研究所で保存している培養系統から 2 菌株の *A. bisporus* について  $\alpha$ -グルクロニダーゼの生産能を調べたが、用いた培養条件下ではその生産能は期待に反して低かった。

最もすぐれた  $\alpha$ -グルクロニダーゼの生産能が褐色腐朽菌 *T. palustris* に認められたので、この菌株による本酵素の生産条件をキシロース、キシロオリゴ糖、キシランを含む各種の炭素源で検討した。Table 2 に結果を示すが、*T. palustris* による  $\alpha$ -グルクロニダーゼの生産のためには 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖を有する炭素源が必要であり、また、培地の pH も本酵素の生産の重要なファクターになることが分かった。代謝の容易な炭素源の場合には有機酸の集積により培地の pH が極端に低下することが認められたので、アルカリの添加により pH の低下を抑制することを試みた。Table 2 の結果から判断すると、*T. palustris* の場合培地の pH が 2.6 から 3.6 の間に入るようにコントロールすることが必要であると思われた。

適当な培養条件の下では、*T. palustris* は高いレベルで  $\alpha$ -グルクロニダーゼを生産することが認められたが、この  $\alpha$ -グルクロニダーゼは凍結条件下でさえも、同時に菌体外に生産された  $\beta$ -キシロシ

Table 2. オオウズラタケのキシラン分解系酵素の生産に及ぼす炭素源の影響  
Effect of carbon source on xylanolytic enzyme production of *Tyromyces palustris*.

| 炭素源<br>Carbon source                    | 培養濾液の pH<br>pH of culture filtrate | 菌体外蛋白量<br>Extracellular protein<br>(mg) | $\alpha$ -グルクロニダーゼ<br>$\alpha$ -Glucuronidase<br>(単位)<br>(unit) | $\beta$ -キシロシダーゼ<br>$\beta$ -Xylosidase<br>(単位)<br>(unit) | キシラナーゼ<br>Xylanase<br>( $10^2$ 単位)<br>( $10^2$ unit) |
|-----------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| キシロース<br>Xylose                         | 2.2                                | 99                                      | 0.6                                                             | 6                                                         | 0.4                                                  |
| キシロース*<br>Xylose*                       | 3.0**                              | 123                                     | 0.5                                                             | 12                                                        | 1.2                                                  |
| キシロオリゴサッカライド<br>Xylooligosaccharides    | 1.6                                | 19                                      | 1.8                                                             | 3                                                         | 0.6                                                  |
| キシロオリゴサッカライド*<br>Xylooligosaccharides*  | 3.0**                              | 59                                      | 1.3                                                             | 19                                                        | 1.3                                                  |
| トウモロコシ穂軸のキシラン<br>Corn cob xylan         | 6.0                                | 264                                     | 0.5                                                             | 9                                                         | 0.6                                                  |
| トウモロコシ穂軸のキシラン*<br>Corn cob xylan*       | 5.0                                | 336                                     | 0.7                                                             | 10                                                        | 0.7                                                  |
| 広葉樹キシラン<br>Hardwood xylan               | 1.9                                | 37                                      | 4.0                                                             | 13                                                        | 1.1                                                  |
| 広葉樹キシラン*<br>Hardwood xylan*             | 3.5**                              | 69                                      | 7.7                                                             | 55                                                        | 3.1                                                  |
| 広葉樹ホロセルロース<br>Hardwood holocellulose    | 4.2                                | 33                                      | 3.4                                                             | 7                                                         | 1.4                                                  |
| 広葉樹ホロセルロース*<br>Hardwood holocellulose*  | 3.6                                | 77                                      | 9.0                                                             | 32                                                        | 7.3                                                  |
| ヒドロキシエチルセルロース<br>Hydroxyethyl cellulose | 8.5                                | 0                                       | 0.0                                                             | 0                                                         | 0.0                                                  |
| 広葉樹クラフトパルプ<br>Hardwood kraft pulp       | 2.6                                | 68                                      | 7.3                                                             | 18                                                        | 3.3                                                  |

Note: 酵素の生産量は振盪培養液 100 ml 当たりの総単位数で表された。

Enzyme production was expressed as total units per shaking culture 100 ml.

\* 培養日数: 12日

\*\*pH 調節: 10日目にアルカリを添加

Culture period: 12 days

pH adjustment: addition of alkali at 10 th day.

ダーゼやキシラナーゼに比較して不安定であることが分かった。Table 3 に示すように、*T. palustris* の生産したキシラン分解酵素系の中で  $\alpha$ -グルクロニダーゼの活性単位は 12 か月の経過で 2 分の 1 以下に低下したのに対して、 $\beta$ -キシロシダーゼやキシラナーゼの活性単位はほとんど変化しなかった。 $\alpha$ -グルクロニダーゼの劣化の傾向を比べるために培地の炭素源は異なるが、同じ菌株の菌体外酵素で 3 年間保存していたもののキシラン分解に関する酵素の力価を測定してみたところ、やはり  $\beta$ -キシロシダーゼやキシラナーゼに比較して相対的に  $\alpha$ -グルクロニダーゼの活性の低いことが見出された。

褐色腐朽菌 *T. palustris* の  $\alpha$ -グルクロニダーゼが劣化しやすい傾向にあることは広葉樹 4-O-メチルグルクロノキシランの酵素加水分解生成物の酸性部のアニオン交換クロマトグラフィーによってさらに確認された。著者ら (ISHIHARA *et al.*, 1978) は以前に *T. palustris* の菌体外のキシラナーゼによる広葉樹 4-O-メチルグルクロノキシランの酵素分解生成物の酸性部として、4-O-メチル-D-グルクロン酸及びアルドビオウロン酸からアルドヘキサオウロン酸までの酸性オリゴ糖類をアニオン交換グラフィーにより分離同定した。凍結乾燥して約 8 年保存していた、同じ *T. palustris* の菌体外酵素系から同じ精製法を繰り返すことによりキシラナーゼ成分を分離し、さらに、広葉樹 4-O-メチルグルクロノキシランの分解を試みた。そして生成した分解物の酸性部をアニオン交換クロマトグラフィーによって分析した。Fig. 1 の結果に見られるように、アルドビオウロン酸までの酸性オリゴ糖類の生成したことは確認できたが、4-O-メチル-D-グルクロン酸の生成は認められなかった。

### 3.2 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖遊離酵素の分離精製及び精製酵素と

#### $\beta$ -キシロシダーゼ、キシラナーゼとの相乗作用

広葉樹 4-O-メチルグルクロノキシランから 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖を遊離する酵素、 $\alpha$ -グルクロニダーゼの探索をした結果、褐色腐朽菌である *T. palustris* に最も高い酵素生産能が認められた。しかし、*T. palustris* の  $\alpha$ -グルクロニダーゼは、凍結保存条件下でも不安定であり、分離精製し、精製酵素の性質を解明する酵素試料として不適当であった。そこで、*T. viride* 起源の市販セルラーゼであるメイセラゼ (Meicelase CEPB-10, 明治製菓) を出発材料として  $\alpha$ -グルクロニダーゼの精製を試みた。

まず、DEAE-Sephrose CL-6 B を用いたアニオン交換カラムクロマトグラフィーによりメイセラゼの分画を行った。結果を Fig. 2 に示す。カラムの溶出には pH 5.0 の酢酸バッファーに NaCl のグラジェントを用いたが、メイセラゼの酵素蛋白は四つのピークに分かれた。酵素活性を分析したところキシラナーゼは 1 番目の蛋白のピークに、 $\beta$ -キシロシダーゼは 2 番目と 3 番目のピークに、また、 $\alpha$ -グルクロニダーゼは 2 番目のピークに位置することが分かった。そこで、2 番目の蛋白のピークに相当する部分を集め、次に S-Sephrose を用いたカチオン交換カラムクロマトグラフィーにより、さらに  $\alpha$ -グルクロニダーゼの分離を試みた。カラムの溶出には pH 3.0 の酢酸バッファーに NaCl のグラジェントを用いた。その結果、さらに四つの蛋白のピークに分かれ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼの活性は、1 番目と 3 番目のピークにも一部認められたが、主要な部分は 4 番目のピークに分布していることが分かった。

カチオン交換カラムクロマトグラフィーで得られた  $\alpha$ -グルクロニダーゼの活性をもつ画分のうち、

Table 3. オオウズラタケのキシラン分解系酵素の時間経過による劣化  
Time-course deterioration of xylanolytic enzymes of *Tyromyces palustris*.

| 炭素源/培養形式<br>Carbon source/Culture                      | 時間経過<br>Time course<br>(月数)<br>(month) | 蛋白質<br>Protein amount<br>(mg) | $\alpha$ -グルクロニダーゼ<br>$\alpha$ -Glucuronidase<br>(単位)<br>(unit) | $\beta$ -キシロシダーゼ<br>$\beta$ -Xylosidase<br>(単位)<br>(unit) | キシラナーゼ<br>Xylanase<br>( $10^2$ 単位)<br>( $10^2$ unit) |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 広葉樹クラフトパルプ/<br>振盪培養<br>Hardwood kraft pulp/<br>Shaking | 0                                      | 68                            | 7.3                                                             | 18                                                        | 3.3                                                  |
| 広葉樹クラフトパルプ/<br>振盪培養<br>Hardwood kraft pulp/<br>Shaking | 5                                      | 68                            | 6.4                                                             | 17                                                        | 3.3                                                  |
| 広葉樹クラフトパルプ/<br>振盪培養<br>Hardwood kraft pulp<br>Shaking  | 12                                     | 68                            | 3.3                                                             | 15                                                        | 3.1                                                  |
| 蒸煮処理広葉樹/<br>固型培養<br>Steamed hardwood/<br>Solid-state   | 36                                     | 117                           | 5.1                                                             | 49                                                        | 6.6                                                  |

Note: 酵素活性は総蛋白質当たりの単当たりの単位数で表された。  
Enzyme activity was expressed as units per total protein.

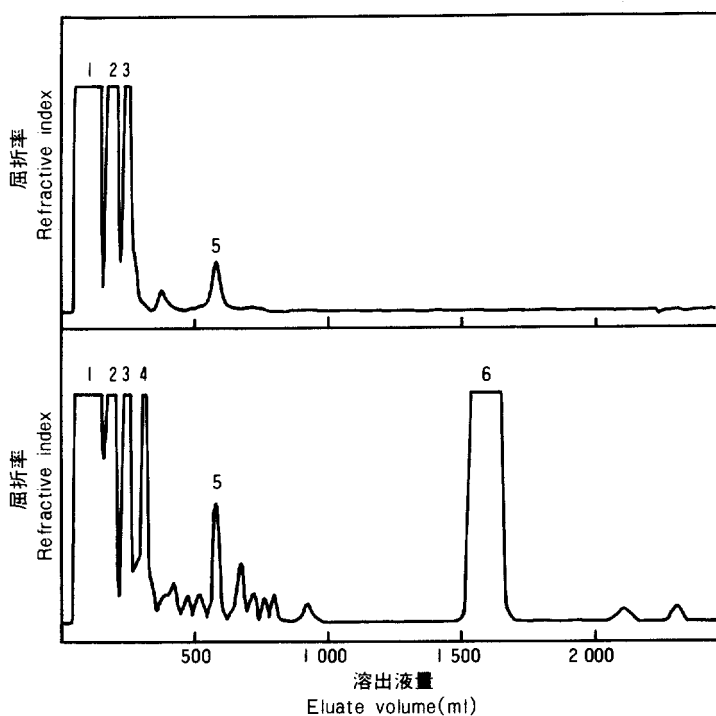


Fig. 1. 4-O-メチルグルクロノキシランの酵素分解生成物の酸性部のアニオン交換クロマトグラム

Anion exchange chromatogram of acidic sugars from the hydrolyzate of 4-O-methylglucuronoxylan.

広葉樹キシランが、培養後8年経過した粗酵素（上部）及び培養直後の粗酵素（下部）から精製したキシラナーゼでそれぞれ酵素分解された。

Hardwood xylan was hydrolyzed with xylanases purified from 8 year-old crude enzyme (upper) and from the same crude enzyme immediately after cultivation (lower).

溶出液 Eluent: 0.08 M 酢酸ナトリウム 0.08 M sodium acetate

カラム Column: 15 × 930 mm; ダイアイオン Diaion (23-25 $\mu$ , アセテート型 acetate form)

流速 Flow rate: 2 ml/min

ピーク 1: アルドヘキサオ, アルドペンタオ, 及びアルドテトラオウロン酸

Peak 1: Aldohehao-, aldopentao-, and aldotetraouronic acid

ピーク 3: アルドトリオウロン酸

Peak 3: Aldotriouronic acid

ピーク 5: アルドビオウロン酸

Peak 5: Aldobiouronic acid

ピーク 6: 4-O-メチル-D-グルクロン酸

Peak 6: 4-O-Methyl-D-glucuronic acid

主要な4番目の蛋白のピークについてさらに SephadexG-75 を用いた分子篩クロマトグラフィーによる精製を試みた。分子篩クロマトグラフィーでさらに二つの蛋白のピークに分かれたが (Fig. 3),  $\alpha$ -



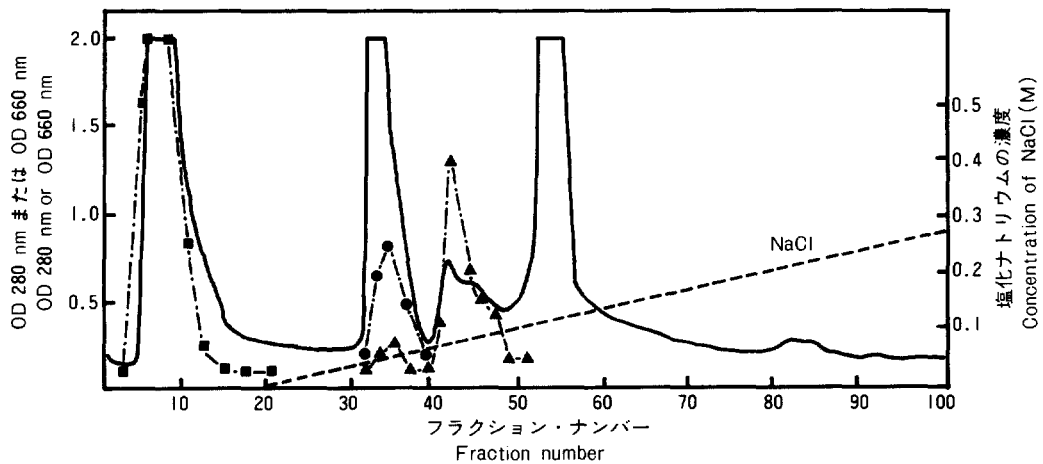


Fig. 2. トリコデルマ・ピリデ起源の市販セルラーゼ(メイセラーゼ CEPB-10)の DEAE-Sepharose CL-6 B カラムクロマトグラム  
DEAE-Sepharose CL-6 B column chromatogram of *Trichoderma viride* commercial cellulase preparation (Meicelase CEPB-10).

カラム Column: 15 × 300 mm フラクシオン液量 Fraction volume: 5 ml

- : キシラーゼ活性 Xylanase activity
- : α-グルクロニダーゼ活性 α-Glucuronidase activity
- ▲— : β-キシロシダーゼ活性 β-Xylosidase activity
- : 蛋白 Protein

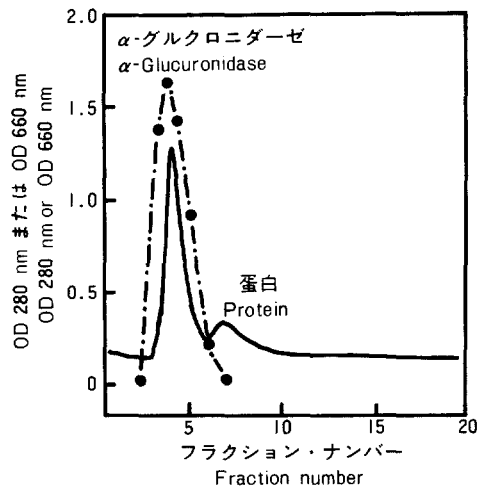


Fig. 3. α-グルクロニダーゼ (フラクシオンII-4) の Sephadex G-75 分子篩クロマトグラム

Sephadex G-75 gel chromatogram of α-glucuronidase fraction II-4.

カラム Column: 25 × 400 mm

フラクシオン液量 Fraction volume: 5 ml

グルクロニダーゼの活性は主要な高分子側のピークとよく一致していることが認められた。分子篩クロマトグラフィーで得られた  $\alpha$ -グルクロニダーゼの画分について SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったが、単一バンドであり電気泳動的に単一成分にまで精製できていることが分かった。また、Fig. 4 に見られるように、分子量マーカーを用いて Rf 値により精製  $\alpha$ -グルクロニダーゼの分子量を推定したところ 10 万であった。

Table 4 に  $\alpha$ -グルクロニダーゼのカラムクロマトグラフィーによる各精製段階での蛋白及び酵素活性の収量と回収率を示す。 $\alpha$ -グルクロニダーゼの活性はインキュベーション 1 h 当りに遊離する 4-O-メチル-D-グルクロン酸  $\mu\text{mol}$  相当量で表した。約 0.5g の市販酵素から 4.2mg の  $\alpha$ -グルクロニダーゼを精製することができ、精製酵素の出発材料に対する相対的精製度は 11.5 倍であった。精製酵素の回収率は必ずしも満足できる数字でなかったため、そこで、アニオン交換及びカチオン交換クロマトグラフィーで分離溶出にグラジェントで用いた NaCl の  $\alpha$ -グルクロニダーゼ活性に及ぼす濃度の影響を調べた。結果を Fig. 5 に示す。NaCl の存在による酵素活性の低下は、0.1 M で 10% 程度、0.2 M で 30% 以上になることが認められ、イオン交換クロマトグラフィーでの酵素の回収率を上げるためには NaCl によるグラジェント溶出を避け、pH 勾配などの溶出条件を検討する必要がある。

精製することのできた *T. viride* 起源の  $\alpha$ -グルクロニダーゼの作用至適 pH 及び至適温度を調べてみた。結果を Fig. 6 及び Fig. 7 に示す。作用至適 pH は 5.0 にあり、5.0 より酸性側では活性低下

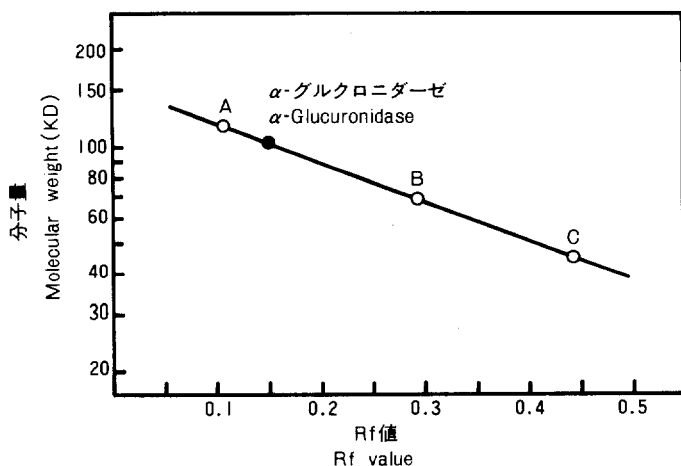


Fig. 4. 精製  $\alpha$ -グルクロニダーゼ (フラクション II-4-1) の SDS ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動による分子量の推定

Estimation of molecular weight of purified  $\alpha$ -glucuronidase fraction II-4-1 by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

分子量マーカー Molecular markers :

A ;  $\beta$ -ガラクトシダーゼ  $\beta$ -galactosidase (116 KD)

B ; ウシ血清アルブミン bovine serum albumin (67 KD)

C ; オブアルブミン ovalbumin (45 KD)

Table 4. 精製段階における蛋白と酵素の回収率

Recovery of protein and enzyme in purification steps.

| 精製段階<br>purification step                          | 蛋白量<br>Protein<br>(mg) | 回収率<br>Recovery<br>(%) | $\alpha$ -グルクロニダーゼ<br>$\alpha$ -Glucuronidase<br>(単位*)<br>(unit*) | 回収率<br>Recovery<br>(%) |
|----------------------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 粗酵素<br>Crude enzyme                                | 508.7                  | 100                    | 59.0                                                              | 100                    |
| DEAE セファロースCL-6B (II)<br>DEAE Sepharose CL-6B (II) | 39.7                   | 7.8                    | 30.6                                                              | 52.0                   |
| S-セファロース (II-4)<br>S-Sepharose (II-4)              | 5.6                    | 1.1                    | 6.25                                                              | 10.6                   |
| セファデックス G-75 (II-4-1)<br>Sephadex G-75 (II-4-1)    | 4.2                    | 0.8                    | 5.42                                                              | 9.2                    |

\* 1 時間あたりに遊離した 4-O-Me-D-GlcA  $\mu$  モル当量  
 $\mu$ mol 4-O-Me-D-GlcA equivalents liberated per h.

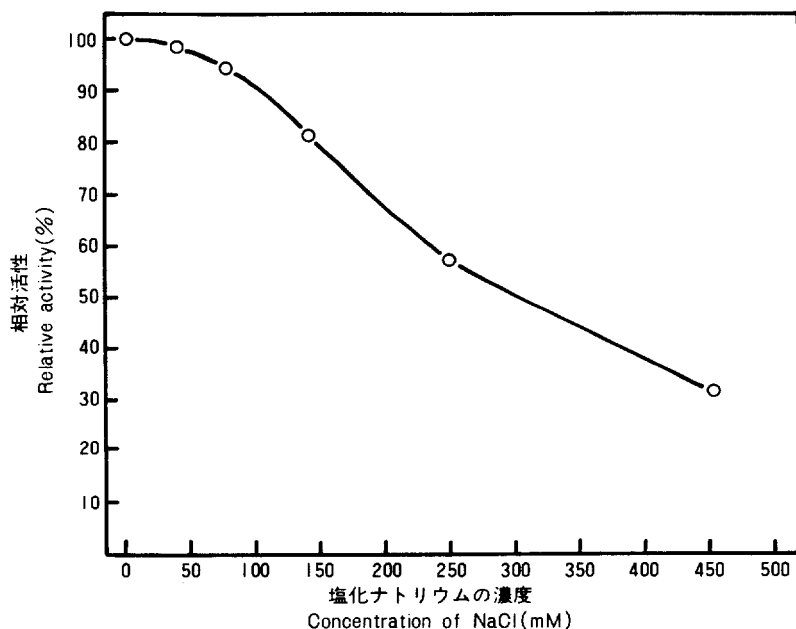


Fig. 5.  $\alpha$ -グルクロニダーゼ活性に及ぼす NaCl の濃度の影響  
 Effect of concentration of NaCl on  $\alpha$ -glucuronidase activity.

が著しいが中性側での低下は比較的緩やかであった。作用至適温度は 45℃ にあり、30℃ 及び 65℃ で活性は 45℃ のときの約 2 分の 1 であった。

広葉樹キシランの 4-O-メチル-D-グルクロン酸側鎖を遊離する酵素の分離精製とその性質については、これまでのところ、PULS らの報告 (1987) が唯一あるだけである。PULS らは 2-O-(4-O-Me- $\alpha$ -

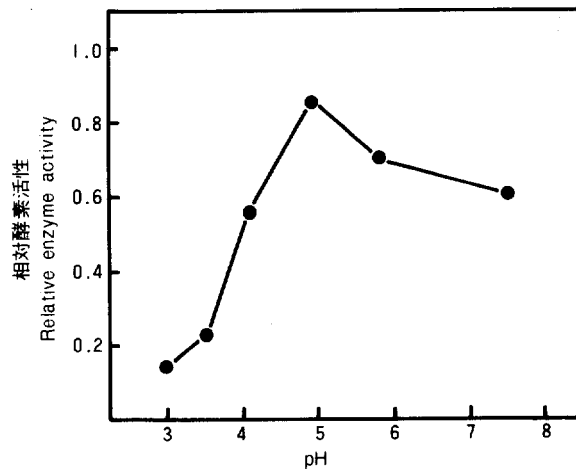


Fig. 6. 精製  $\alpha$ -グルクロニダーゼ (フラクション II-4-1) の pH 依存性  
pH dependence of purified  $\alpha$ -glucuronidase fraction II-4-1.

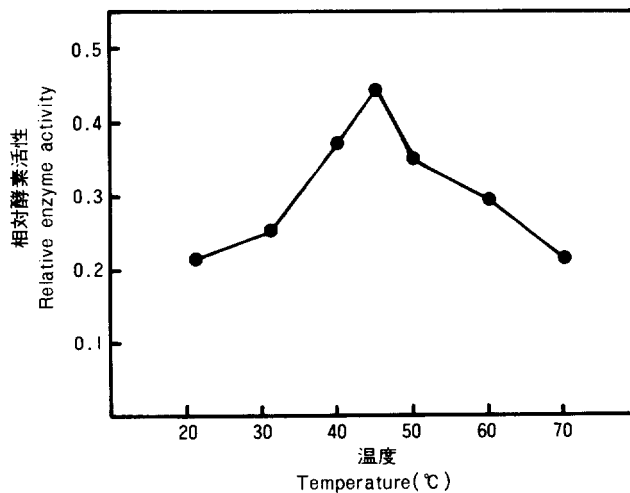


Fig. 7. 精製  $\alpha$ -グルクロニダーゼ (フラクション II-4-1) の温度依存性  
Temperature dependence of purified  $\alpha$ -glucuronidase fraction II-4-1.

D-GlcAp)-D-Xylobiose を基質としてその分解生成物を液体クロマトグラフで分析することにより、*A. bisporus* の生産する  $\alpha$ -グルクロニダーゼを分離した。分子量は >45 万ないしは 45 万相当で *T. viride* の酵素と比較するとかなり高分子領域にある。作用至適 pH は 3.3 で pH 2.2 及び pH 5 では活性の 60% が失われた。作用至適温度は 52°C で、熱安定性では 50°C で 20%、60°C では 50% の活性が失われた。また、凍結乾燥することによっても 40% の活性が失われるなど *A. bisporus* の  $\alpha$ -グルクロニダーゼも不安定であることが報告されている。

広葉樹キシランの酵素分解における  $\alpha$ -グルクロニダーゼ、キシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼの共存による相乗効果について検討するために、メイセラゼから DEAE Sepharose CL-6 B のアニオン交換カラムクロマトグラフィーで部分精製できたキシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼのそれぞれの画分（Fig. 2 参照）について、S-Sepharose のカチオン交換カラムクロマトグラフィーでさらに精製した。Table 5 に市販酵素であるメイセラゼから分離精製することのできたキシランの分解に関与する各酵素成分の収量と比活性を示す。どの酵素成分もその酵素成分以外の酵素活性をもたないことが確認された。

まず、キシラナーゼに  $\beta$ -キシロシダーゼまたは  $\alpha$ -グルクロニダーゼの共存する単位を変えることによって広葉樹キシランの酵素分解の速度や作用様式にどのような影響があるかを調べた。すなわち、メイセラゼ 2.7  $\mu$ g 中に含有されているキシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ及び  $\alpha$ -グルクロニダーゼの酵素量をそれぞれ 1 部とし、キシラナーゼ 1 部に  $\beta$ -キシロシダーゼまたは  $\alpha$ -グルクロニダーゼを 1 ～ 40 部加えた場合のキシランからの還元糖の増加量を追跡した。結果を Fig. 8 に示す。キシラナーゼ 1 部に  $\beta$ -キシロシダーゼ 1 部または  $\alpha$ -グルクロニダーゼ 1 部を加えた場合に生成する還元糖量をそれぞれ 100 として相対値で表したが、 $\beta$ -キシロシダーゼの方が  $\alpha$ -グルクロニダーゼよりも相乗作用の効果が大きく、8 部加えた場合で生成する還元糖量は 200 にまで達した。還元糖量の増加への  $\beta$ -キシロシダーゼと  $\alpha$ -グルクロニダーゼの寄与率の差は、重合度が約 200 で  $\beta$ -1, 4-結合したキシラン主鎖に 10 個のキシロース残基当たり 1 個の 4-O-メチル-D-グルクロン酸残基を側鎖としてもつ基質の構造（GLAUDEMANS *et al*, 1958）を考えてみると興味深い。

Fig. 9 にはキシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼの 3 種の酵素成分の広葉樹キシ

Table 5. 市販セルラーゼ・メイセラゼ CEPB-10 から分離精製したキシラン分解系酵素成分の比酵素活性

Specific enzyme activities of purified xylanolytic enzyme fractions from a commercial cellulase preparation Meicelase CEPB-10.

| 精製したフラクション<br>Purified fraction                                 | 蛋白質<br>Protein<br>(mg) | 回収率<br>Recovery<br>(%) | 比酵素活性<br>Specific enzyme activity                   |                                                 |                        |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------|
|                                                                 |                        |                        | $\alpha$ -グルクロニ<br>ダーゼ*<br>$\alpha$ -Glucuronidase* | $\beta$ -キシロシ<br>ダーゼ**<br>$\beta$ -Xylosidase** | キシラナーゼ**<br>Xylanase** |
| 粗酵素<br>Crude enzyme                                             | 508.7                  | 100                    | 0.116                                               | 0.080                                           | 2.24                   |
| $\alpha$ -グルクロニダーゼ (II-4-1)<br>$\alpha$ -Glucuronidase (II-4-1) | 4.2                    | 0.8                    | 1.29                                                | 0.000                                           | 0.00                   |
| $\beta$ -キシロシダーゼ (III-3)<br>$\beta$ -Xylosidase (III-3)         | 12.4                   | 2.4                    | 0.00                                                | 0.133                                           | 0.00                   |
| キシラナーゼ (I-6)<br>Xylanase (I-6)                                  | 16.5                   | 3.2                    | 0.00                                                | 0.000                                           | 15.15                  |

\* 1 時間当たり 1 mg の酵素で遊離した 4-O-Me-D-GlcA  $\mu$  モル当量  
 $\mu$ mol 4-O-Me-D-GlcA equivalents liberated per mg enzyme per h.

\*\* 1 分当たり 1 mg の酵素で遊離したキシロース  $\mu$  モル当量  
 $\mu$ mol xylose equivalents liberated per mg enzyme per min.

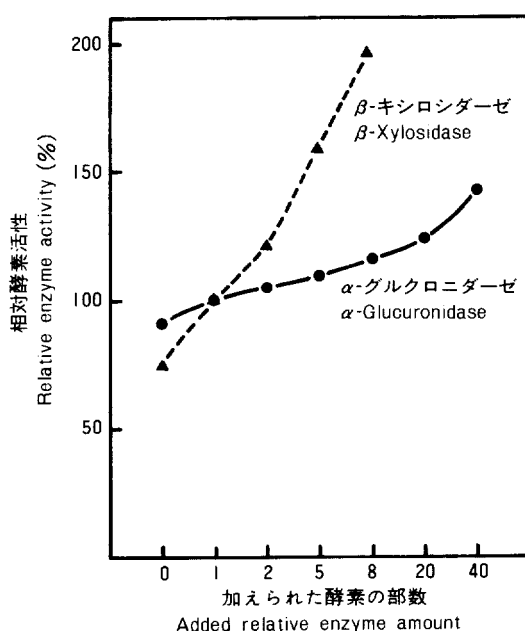


Fig. 8. キシラナーゼによる 4-O-メチルグルクロノキシランの酵素分解に及ぼす  $\beta$ -キシロシダーゼまたは  $\alpha$ -グルクロニダーゼの添加割合の影響

Effect of addition of various portions of  $\beta$ -xylosidase or  $\alpha$ -glucuronidase to one volume of xylanase on the hydrolysis of 4-O-methylglucuronoxylan.

各精製酵素の一部は以下の粗酵素の量に相当した：

One volume of each purified enzyme corresponded to the following amount of the crude enzyme：

キシラナーゼ xylanase : 2.7  $\mu$ g

$\beta$ -キシロシダーゼ  $\beta$ -xylosidase : 2.6  $\mu$ g

$\alpha$ -グルクロニダーゼ  $\alpha$ -glucuronidase : 2.7  $\mu$ g

ランの分解に及ぼす相乗効果を検討した結果を示す。この場合もメイセラーゼ 2.7  $\mu$ g 中に含まれている酵素量をそれぞれ 1 部とし、3 種の酵素を各 1 部合わせた場合の生成した還元糖量を 100 として酵素を様々に組み合わせたときの分解量を相対値で表した。3 種の酵素成分のうち、 $\beta$ -キシロシダーゼが欠如した場合で 74、 $\alpha$ -グルクロニダーゼが欠如した場合で 95 であった。 $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼを単独または両者でキシランに作用させた後、それらの酵素を熱で失活させ、改めてキシラナーゼを作用させた場合、分解量の相対値はキシラナーゼ単独による場合と  $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ単独または両者による場合の算術和にとどまった。従って、 $\beta$ -キシロシダーゼ及び  $\alpha$ -グルクロニダーゼは高分子基質よりも、キシラナーゼによってある程度低分子化した分解生成物に対して作用するものと考えられる。キシランを分解する酵素成分の主体は当然キシラナーゼであるが、 $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼの存在もキシランの糖化を考える上では不可欠であるといえることができる。

なお、本研究は農林水産省のバイオマス変換計画の一部として行われたものである。

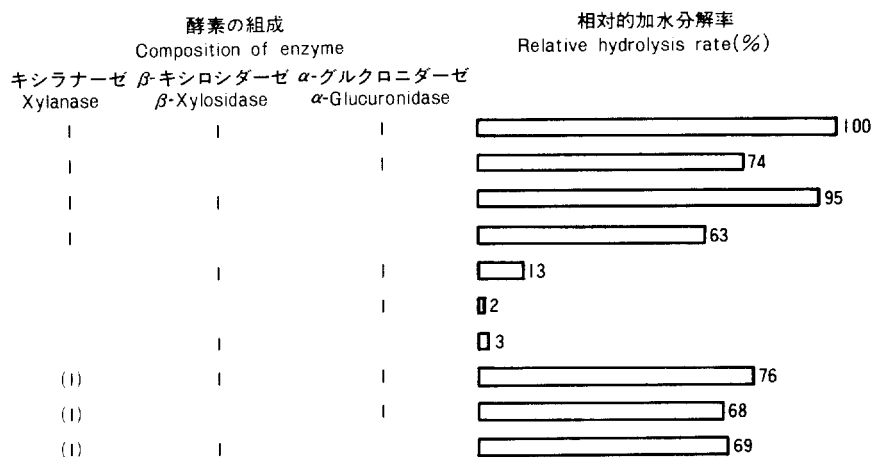


Fig. 9. 4-O-メチルグルクロノキシランの分解に及ぼすキシラナーゼ,  $\beta$ -キシロシダーゼ,  $\alpha$ -グルクロニダーゼの各酵素成分の相乗効果

Synergistic effect of xylanase,  $\beta$ -xylosidase, and  $\alpha$ -glucuronidase on the hydrolysis of 4-O-methylglucuronoxylan.

括弧をつけたキシラナーゼは,  $\beta$ -キシロシダーゼ及び  $\alpha$ -グルクロニダーゼの両者または単独で基質と一緒にあらかじめインキュベートし, その後 100°C, 10 分間の加熱で酵素を失活させた反応混合物に加えられた

Parenthesized xylanase was added to the reaction mixture in which  $\beta$ -xylosidase and/or  $\alpha$ -glucuronidase had been incubated with the substrate and denatured by heating at 100°C for 10 min.

各精製酵素の一部は以下の粗酵素の量に相当した:

One volume of each purified enzyme corresponded to the following amount of the crude enzyme:

キシラナーゼ xylanase: 2.7  $\mu$ g

$\beta$ -キシロシダーゼ  $\beta$ -xylosidase: 2.6  $\mu$ g

$\alpha$ -グルクロニダーゼ  $\alpha$ -glucuronidase: 2.7  $\mu$ g

## 引用文献

- DEKKER, R.F.H. and RICHARDS, G.N.: Hemicellulases: their occurrences, purification, properties, and mode of action., Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., **32**, 277-352 (1976)
- GLAUDEMANS, C.P.J. and TIMELL, T.E.: The polysaccharides of white birch (*Betula papyrifera*) IV. The constitution of the hemicelluloses., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1209-1213 (1958)
- ISHIHARA, M., SHIMIZU, K. and ISHIHARA, T.: Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. III. Partial purification and mode of action of an extracellular xylanase., Mokuzai Gakkaishi, **21**, 680-685 (1978)
- 石原光朗, 志水一允: 褐色腐朽菌オオウズラタケのセルラーゼ, ヘミセルラーゼ生産のための培養条件, 林試研報, **330**, 153-164 (1984)
- ISHIHARA, M.: An approach to biomass utilization. V. Screening of cellulolytic *Tricho-*

- derma* and *Hypocrea* species., Mokuzaigakkaishi, **32**, 59-66 (1986)
- JOHN, M., SCHMIDT, B. and SCHMIDT, J. : Purification and some properties of five endo-1, 4- $\beta$ -D-xylanases and a  $\beta$ -xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*., Can. J. Biochem., **57**, 125-134 (1979)
- MANDELS, M. and WEBER, J. : The production of cellulases., Adv. Chem. Ser., **95**, 391-414 (1969)
- PULS, J., SCHMIDT, O. and GRANZOW, C. :  $\alpha$ -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems., Enzyme Microb. Technol., **9**, 83-88 (1987)
- SINNER, M. and DIETRICH, H.H. : Enzymatic hydrolysis of hardwood xylans. III. Characterization of five isolated  $\beta$ -1,4-xylanases., Holzforschung, **29**, 207-214 (1975)
- SINNER, M. and DIETRICH, H.H. : Enzymatic hydrolysis of hardwood xylans. IV. Degradation of isolated xylans., *ibid.*, **30**, 50-59 (1976)
- SOMOGYI, M. : Notes on sugar determination., J. Biol. Chem., **195**, 19-23 (1952)
- TAKENISHI, S. and TSUJISAKA, Y. : On the mode of action of three xylanases produced by a strain of *Aspergillus niger van Tieghem*., Agric. Biol. Chem., **39**, 2315-2323 (1975)
- WISE, L.E., MURPHY, M. and D'ADDIECO, A.A. : Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses., Paper Trade J., **122**, 35-43 (1952)



# 4-O-Methyl-D-Glucuronic Acid Residue Liberating Enzyme in the Enzymatic Hydrolysis of Hardwood Xylan

ISHIHARA, Mitsuro<sup>(1)</sup>, INAGAKI, Shoko<sup>(2)</sup>, HAYASHI, Noriko<sup>(3)</sup>  
and SHIMIZU, Kazumasa<sup>(4)</sup>

## Summary

A screening of fungi producing  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glucuronidase, which liberates 4-O-methyl-D-glucuronic acid from the main chain of hardwood xylan, was performed using a reduced aldobiouronic acid, 2-O-(4-O- $\alpha$ -D-GlcAp)-D-xylitol, as a substrate of the enzyme. Among nine *Trichoderma* and six basidiomycete species, *Tyromyces palustris* was the highest active producer of  $\alpha$ -glucuronidase. The fungus produced  $\alpha$ -glucuronidase at high levels under the appropriate cultural conditions, but the  $\alpha$ -glucuronidase was labile even in frozen storage.

An  $\alpha$ -glucuronidase was isolated from a commercial enzyme preparation (0.5 g, Meicelase CEPB-10, Meiji Seika Kaisha Ltd.), derived from *T. viride* and purified by column chromatography in ion exchangers and molecular sieving. The purified enzyme (4.2 mg) showed a single protein band on SDS polyacrylamide gel electrophoresis and was estimated to have a molecular weight of 100 000. The optimum pH and temperature were 5.0 and 45°C, respectively. The xylanase and  $\beta$ -xylosidase components from the enzyme preparation were also separated by column chromatography to test for the cooperative action of the three enzymes. The functional significance of  $\alpha$ -glucuronidase as well as  $\beta$ -xylosidase in the hydrolysis of hardwood xylan was demonstrated.

---

Received January 22, 1990

(1) (2) (3) Wood Chemistry Division

(4) Research Coordinator