—受賞論文—

Functional Study on Biomass Degradation Enzymes from Basidiomycetes*

担子菌バイオマス分解系酵素群の機能解析*

野崎功一(のざき こういち)^{1,**}

Kouichi Nozaki^{1,**}

¹ 信州大学工学部物質工学科
380-8553 長野市若里 4-17-1

¹ Faculty of Engineering, Shinshu University
4-17-1 Wakasato, Nagano 380-8553, Japan

要旨：白色腐朽菌に代表される担子菌は、その生育環境に応じて多様なバイオマス分解系酵素を生産し分泌することが知られている。彼らの独特な分解システムの中には、効率的なバイオマスの分解に向けた多くの学べき知見が存在すると考えている。本論文では白色腐朽菌が生産するセルロース分解系酵素に着目し、以下の内容について解説する。(1) 担子菌 *Irpex lacteus* のセルロース分解系酵素の構成を明らかにすることで、各種酵素の種類や機能を明らかにした。また、酵素翻訳後のプロテアーゼ分解がセルラーゼの作用特性に影響し、セルロース分解にさらなる多様性を生み出していることを見出した。(2) セルラーゼのセルロースへの吸着挙動を CBM 1-GFP を用いることで明らかにした。これにより、酵素の吸着はセルロースの吸着特性が異なる2つの領域で生じ、それぞれの吸着が加水分解活性の発現に関与する生産的結合および関与しない非生産的な結合であることを明らかにした。また、塩濃度によって酵素吸着量を制御する技術を開発し、バイオマス分解における酵素回収技術への応用の可能性を検討した。

キーワード：セルラーゼ, carbohydrate-binding module, セルラーゼの回収, セルロース分解***

1. はじめに

バイオマスの中に存在する高結晶性セルロースを酵素によって容易に分解するという研究は、セルラーゼ研究者にとって一生をかけて取り組むべき課題の1つである。大量の酵素を使って純粋なセルロースを完全にグルコースまで加水分解することは可能である。しかし、バイオマス中から特定の成分を分離する難しさとセルロースの構造から生じる酵素反応性の低さが大きな障壁となり、その完全な実現に至っていないのが現状であろう。筆者は、セルラーゼ研究に携わる前に澱粉やペクチンの分解系酵素および生合成系酵素に関する研究を行ってきた。本研究を始めたとき、これら酵素群に比較してセルラーゼの反応性は著しく低いことに驚いた。すなわち、高結晶性セルロースに対する多くのセルラーゼの比活性は mU オーダーである。この問題を解決するためには、少しでも効率が良い反応系の確立を地道に模索していくことが、最短の近道になるのではないかという見解が現在の筆者の結論である。

白色腐朽菌に代表される担子菌は、バイオマス主成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを分解する全ての酵素群を生産し分泌する¹⁾。すなわち、筆者らの

研究グループにとって学べき多くの知見がその中に存在すると考えている。担子菌は、その生育速度や酵素生産性の面では、他の有用なセルラーゼ生産菌に遠く及ばない。しかし、その独特な分解機構には、他菌では見出せない、また他菌由来のセルラーゼ反応を促進できる因子を見つけ出せると考えている。

2. ウスバタケ (*Irpex lacteus*) のバイオマス分解酵素

本菌のセルラーゼに関する研究は、故 西沢一俊・東京教育大学名誉教授と神田鷹久・信州大学名誉教授らにはじまり、筆者らに継続される研究グループによって行われてきた。彼らは、*I. lacteus* K株を用いて、培養時に分泌されるセルラーゼ成分やその酵素製剤 (Driselase) に含まれる酵素成分を解析してきた^{2,7)}。現在、Driselase 製剤はあすか製薬株式会社から販売され、その改良株 (MC-2 株) を用いて生産されている。図1に示すように、本酵素製剤は、*Trichoderma reesei* や *Acremonium cellulolyticus* のセルラーゼ製剤と比較して、ペクチンや大麦β-グルカンに対する比活性が高く、微結晶セルロースに対する比活性は低

*本原稿は、日本応用糖質科学会平成24年度大会の奨励賞受賞講演で一部発表された。

**連絡先(Tel. 026-269-5396, Fax. 026-269-5394, E-mail: knoza@shinshu-u.ac.jp)

*** Key words: cellulase, carbohydrate-binding module, cellulase recycling, cellulose degradation

CBM 1, Carbohydrate-binding module family 1; GFP, 緑色蛍光タンパク質; GH, Glycoside hydrolase; PASC, リン酸膨潤ろ紙粉末; CMC, カルボキシメチルセルロース。

図1. 各種酵素製剤中の酵素活性バランス

各酵素活性について3種類の酵素製剤の中で最も高い比活性を100%として相対比活性で表した。酵素活性は、いずれもpH 5.0, 40°Cで測定した。PASC, PASC分解活性；CMC, CMC分解活性；BGL, *p*-ニトロフェニル-β-D-グルコシド分解活性；Pec, ペクチン酸分解活性；BGLc, 大麦β-グルカン分解活性；Lam, ラミナリン分解活性；BXL, *p*-ニトロフェニル-β-D-キシロシド分解活性；Xyn, パーチウッドキシラン分解活性。

表1. *I. lacteus* と *T. reesei* のセルラーゼ関連遺伝子の比較

		<i>I. lacteus</i>	<i>T. reesei</i> ¹³⁾
ゲノムサイズ		44.4 Mb	33. Mb
GC 含量		50.9%	52.0%
CBH I	GH7	3 個*(Ex-1 を含む)	1 個*
CBH II	GH6	1 個*(Ex-3)	1 個*
Endo-type	GH	7 個 5*(En-1), 5*, 9, 12, 45, 61*, 74*	8 個 5*, 5, 7*, 12, 45*, 61*, 61, 74*
β-Glucosidase	GH1	1 個	2 個
	GH3	1 個*	8 個
Swollenin	—	—	1 個* ¹⁶⁾
Expansin-like protein	2 個	3 個 (EEL 1~3 ¹⁷⁾)	—
Cellobiose dehydrogenase	1 個	—	—

*CBM1 を持つタンパク質。

い。このことは、本酵素製剤が家畜の消化改良材として草本系バイオマスの分解に利用されていることから理解できる。

我々は、*I. lacteus* K株のドラフトゲノム解析を行い、本菌のセルロース分解系酵素群の遺伝子構成を明らかにした(表1)。本菌のゲノムサイズは44.4 Mbpであり、予測されるセルラーゼ遺伝子群は、CAZyのデータベース⁸⁾におけるGH7に属するCellobiohydrolase (CBH) Iタイプの酵素が3個、GH6に属するCBH IIタイプの酵素が1個、およびGH5 (2個), GH9, GH12, GH45, GH61, GH74に属するエンド型酵素からなる。これらのうちCBH IタイプのEx-1^{9,10)}, CBH IIタイプのEx-3¹¹⁾およびGH5のEn-1^{9,12)}については、その酵素化学的性質が詳細に解析されている。こ

図2. 活性染色による Driselase 製剤中の CMC 分解活性の確認

Driselase を微結晶セルロースに吸着させた。吸着画分は SDS-PAGE 試料処理液中で煮沸することによって溶出した。左はタンパク質染色、右は CMC 分解の活性染色。全、Driselase 製剤；吸、セルロース吸着画分；非、セルロース非吸着画分。

れらの構成は、*T. reesei*¹³⁾とよく似ているが、CBH Iが複数個存在することや *T. reesei* GH7 酵素の代わりに GH9 酵素を有することなどが特徴的なことである。β-グルコシダーゼに関しては、GH1 の細胞内酵素と CBM1 を持つ GH3 の酵素が1個ずつ存在する。これら遺伝子数から推測されるエンド型セルラーゼが Driselase 製剤にも含まれていることが活性染色からも示唆された(図2)。一方、*T. reesei* と比較して本菌に特徴的なことは、セロビオース脱水素酵素やリグニン分解系酵素の遺伝子が存在することである。これら酸化還元酵素は、セルラーゼ反応生成物の酸化とリグニン分解物の還元による連鎖反応経路を形成し、バイオマスの分解に寄与していることも報告されている^{14,15)}。一方、本菌には *T. reesei* に存在するセルロース膨潤タンパク質 Swollenin 遺伝子¹⁶⁾は見出されていないが、*T. reesei*¹⁷⁾および *Bacillus* sp.¹⁸⁾で報告されている Expansin 様の遺伝子がいくつか見出されている。

3. *I. lacteus* セルラーゼの多様性

Driselase を出発材料に本菌が生産する主要セルラーゼ成分が精製され、その酵素化学的性質が明らかにされてきた^{2-7,9-12)}。これらの構造を遺伝子情報と比較すると、精製された Ex-1, Ex 3, En-1 はいずれも CBM1 を欠損していることが明らかとなった^{10,19)}。このことは、大部分の CMC 分解活性画分がセルロースに吸着しないことから支持される結果である(図2)。転写レベルではこれら酵素の CBM1 領域が存在することから、CBM1 の欠損は翻訳後の修飾によって生じていることがわかった。この現象を確かめるべく、組換え麹菌で発現させた CBM1 を持つ En-1 (rEn-1) を Driselase と混合し、その分子量変化を観察した。その結果、rEn-1 は反応時間の経過に伴ってプロテアーゼによりリンカー部分が切断され、CBM1 を欠損した酵

図3. 各水分量の培地で生産されるセルラーゼ活性とCBM1除去活性

I. lacteus K株を小麦フスマ5gを用いて25℃で2週間培養を行った。100 mLの50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて培地中の酵素を抽出し、活性測定を行った。(a) rEn-1に対するCBM1除去活性。rEn-1 (1 µg) と培地抽出液を37℃で40時間反応後、SDS-PAGEに供した。(b) セルロース分解における比活性。

図4. セルロース分解におけるrEG1とΔCBM1の相乗効果

各濃度のPASC, 0.2 µM酵素および0.1 M酢酸緩衝液 (pH 5.0) からなる反応液を37℃で反応させ、上清の還元糖量を定量した。灰色, rEG1; 白, ΔCBM1; 黒, rEG1 + ΔCBM1。棒グラフ中の数値は相乗効果の割合。下の写真は反応開始前の反応液の様子。

素が生成することが明らかとなった。それでは、このプロテアーゼ分解はどのような条件で起こるのだろうか。糸状菌の一種である麹菌は、培地の水分量によって分泌する酵素成分を大きく変化させることが知られている²⁰。本菌におけるセルラーゼ分泌量も培地水分量の影響を強く受け、全セルラーゼ活性の指標となるリン酸膨潤セルロースの分解活性は、比較的低水分量で高くなる傾向が観察された(図3(b))。一方、rEn-1からCBM1を除去するプロテアーゼ活性は培地水分量が多くなるほど高くなり、CBM1を欠損したものの割合が増加することが示唆された(図3(a))。不溶性セルロースに吸着し、酵素を基質表面に局在させるために重要なCBM1が除去されることには、どのような意味があるのだろうか。仮にCBM1を欠損した酵素がもとの酵素に比較して有利な反応特性を持つならば、両酵素

が共存する反応において相乗効果が確認されるはずである。図4は、En-1と同じGH5に属するEG1 (*Trametes hirsuta* 由来)²¹のCBM1があるもの(rEG1)とないもの(ΔCBM1)を組換え麹菌によって作製し、リン酸膨潤セルロースに対する加水分解の相乗効果を調べた結果である。単独で作用させた場合、ΔCBM1の反応性はrEG1に比べて明らかに低く²²、基質濃度が下がるほど顕著に低下した。一方、相乗効果は基質濃度が低いほど高くなり、特に固液分離が顕著になる基質0.2% (w/v) 以下で大きく増加した。高基質濃度や十分な攪拌条件下では、酵素が基質と接触する機会が十分にあるため、CBM1がない酵素でも十分に作用できることが予想される。しかし、低基質濃度では固液分離が顕著になり、CBM1を持つ酵素の大部分は基質に結合した状態で存在する。一方、ΔCBM1はその全てが遊離した状態で存在する²³。酵素分解で液層へ遊離したセルロース断片やオリゴ糖が、ΔCBM1によって優先的に分解されることで、相乗効果が生じると考えられる。一方、rEG1はこの条件では約35%が遊離した状態で存在するが²³、その可溶性基質に対する比活性はΔCBM1よりも低く、効率良く作用できないことがわかっている²²。つまり、CBM1欠損酵素の存在意義は十分にあると考えられる。結論として、CBM1の有無によって酵素の局在性に差が生じ、それぞれの場所においてセルロース分解を進行するために反応性が増加することが推定された。また、CBM1の除去はプロテアーゼ活性によって制御されており、培地水分量が多いときにはCBM1を欠損した酵素が生成し、セルロースの分解をより有利に進行できることが予想される。高結晶性セルロースでは、さらに高濃度でも固液分離が顕著に起こり、CBM1がない酵素の役割がますます重要になってくるであろう。

4. セルロースに対するCBM1の吸着挙動

セルラーゼのセルロースへの吸着は、酵素反応を開始するために重要なステップであり、CBM1の果たす役割は非常に大きい。それは、CBM1を欠損させたセルラーゼは、結晶性セルロースに対する反応性が半分以下にまで低下することからも理解できる^{22,24-27}。しかし、セルロースに吸着するCBM1の表面はフラットであるため、吸着における特異性は低く、酵素の活性部位を最適位置に正確に配置させたり、CBM1がセルロース以外の疎水性物質への吸着するのを避けることは難しい²⁸⁻³⁰。バイオマスに対するCBM1の吸着部位や吸着挙動を調べることによって、酵素反応に及ぼす影響を明らかにした。CBM1 (*T. hirsuta* EG1由来)とGFPを融合させたCBM1-GFPを用いることで、実際の糖化反応で使用する酵素濃度 (0.2 µmol/g of cellulose 以下) でも感度良く測定することを可能とした。なお、この融合タンパク質は、CBM1と同等の吸着定数によりセルロースに吸着することを確認している²⁹。図5は各種処理を施したイナワラ粉砕物に対するCBM1-GFPの吸

図5. 各処理を施したイナワラへのCBM1-GFPの吸着挙動

着挙動である。いずれにおいても低濃度と高濃度側に吸着挙動が異なる2つの吸着領域が存在することを明らかにした。低濃度側の吸着は細胞壁間層を中心とした局所的な吸着であり、最大吸着量 (W) は低いが吸着親和性 (K_{ad}) が非常に高い。これに対し高濃度側の吸着は、広範囲に及ぶ吸着であり、吸着定数はこれまでに報告されているCBM1と近い値であった。これらの異なる2つの吸着挙動は、微結晶セルロースでも観察されたが、構造が均一なバクテリアセルロースではみられなかった。つまり、セルロースには構造の不均一性から生じるCBM1の吸着挙動が異なる2つの領域が存在することが予想された。次に、各処理を施したバイオマスを用いて2つの吸着挙動が占める濃度範囲を観察した。つまり、ある処理によって低濃度側の吸着の濃度範囲が狭まれば、バイオマス中でその領域が減少したと推察できる。図5に示すように、反応系にウシ血清アルブミン (BSA) を添加することで低濃度側の濃度範囲が極端に狭くなることから、この吸着はBSAの共存で抑制されることがわかった。また、イナワラのアルカリ処理によってリグニンやヘミセルロース含量を低下させても、その濃度範囲に変化がないことから、セルロース以外の成分は2つの吸着挙動を生み出す要因ではないこともわかった。さらに、アルカリ処理したイナワラを酵素糖化 (セルロース成分の約80%を分解) した試料に対しては、低濃度側の濃度範囲が明らかに増加することを確認した。以上のことから、低濃度側の吸着は酵素分解に寄与しない非生産的な吸着であり、高濃度側の吸着は酵素分解に結びつく生産的な結合であることが予想された。CBM1の吸着は、非生産的な吸着が優先的に生じ、飽和状態になった後で生産的な吸着が生じると推定された。少ない酵素量で効率的に反応を進行させるためには、非生産的な結合を抑えることが非常に重要であると考えられる。

5. セルラーゼ吸着量の制御

5.1 CBM1吸着量の制御

バイオマス分解における酵素使用量の削減を目指して、糖化反応が終了した残渣に吸着するセルラーゼを回収し、再利用する技術が開発検討されてきた³¹⁻³⁵。酵素化学的性質が異なる多種類のセルラーゼの全てを、容易にかつ効率良く回収することは非常に難しい。筆者は、糸状菌由来のセルラーゼの大部分がCBM1を持つことから、その吸着力の制御が酵素回収技術の開発に結びつくのではないかと考えた。CBM1はセルラーゼのN末端もしくはC末端にリンカーを介して存在し、主にFlat faceに存在する3つの芳香族アミノ酸残基とセルロースのグルコースリング間の疎水的相互作用によってセルロースに吸着することが知られている²⁸⁻³⁰。これら芳香族アミノ酸の種類は酵素によって異なり、セルロースへの吸着力に強く影響することが報告されている^{30,36}。筆者がこの性質をCBM1の吸着制御に応用することを思いついたきっかけは、ある学生の実験の失敗であった。セルロースに吸着したセルラーゼを緩衝液に対して十分に透析すると、全く吸着しなくなったのである。すなわち、この疎水的相互作用の強さは、塩濃度によって調節が可能である^{37,38}。例えば、酵素精製で使用する疎水性カラムクロマトグラフィーは、溶媒の塩濃度を上げることでタンパク質を吸着させ、塩濃度を下げることで溶出する³⁹。一方、核酸の精製においても、高塩濃度でシリカゲルに吸着させたDNAを蒸留水で溶出するなど⁴⁰、塩濃度による疎水結合力の調節は様々な分野で使用されている。そこで、CBM1を持つセルラーゼでも同様な方法で吸着と脱離ができるのではないかと考えた。

筆者らは、CBM1-GFPの吸着量が、酢酸、硫酸アンモニウムや塩化ナトリウムの濃度増加に従って増加することを明らかにした²³。この中でも、特に酢酸存在下での吸着量が高く、酢酸ナトリウム緩衝液の濃度を2~100 mMに

図 6. 塩濃度による CBM1-GFP の吸着挙動の制御

CBM1-GFP を様々な酢酸緩衝液濃度で微結晶セルロースに吸着させた。(a) 吸着後の上清の蛍光発色。(b) 吸着画分の SDS-PAGE。Ct, 100% 吸着したときのタンパク質量。(c) セルロースへの吸着量。

することで 3~70% の範囲で CBM1 の吸着量を制御することに成功した (図 6)。

5.2 セルラーゼ吸着量の制御

同様に, CBM1 を持つ EG1 (*T. hirsuta* 由来) においても, 吸着の制御範囲は狭まるものの, 吸着量が調節可能であることを明らかにした (図 7)²³。しかし, CBH I タイプの Ex-1 (*I. lacteus* 由来) は, いずれの種類の塩や濃度においても吸着量の制御が不可能であった。このタイプの酵素は活性部位にトンネル構造を持ち, 基質の抱え込むことでセルロースを連続的に分解することが知られている^{41,42}。つまり, CBM1 の吸着力を上回る触媒領域の結合力が, 酵素吸着量の制御を困難にしている理由であると考えられる。

さらに, 本技術を利用して酵素の吸着と脱離を連続的に試みた。図 8 に示すように, 全ての吸着は 3 時間以内に飽和状態に達した。30℃ で吸着させた酵素は, 図 7 に示す 4℃ で吸着させたものに比較して, 全体的に吸着量が低下した。このことは, 温度上昇による吸着親和力の低下や基質の加水分解が生じたためと推察される。溶液を蒸留水に置換することで全ての酵素の脱離が生じたが, 吸着した酵素全てを脱離させることは不可能であった。酵素の脱離は温度が高いほど効果的であり, 40℃ における脱離では 30 分以内に平衡状態に達した。

5.3 酵素吸着量と加水分解活性関連性

本方法を利用することで, 緩衝液濃度を除く全ての酵素反応に影響する因子を変化させることなく, 酵素の基質へ

図 7. 塩濃度によるセルラーゼの吸着挙動の制御

各種セルラーゼを様々な酢酸緩衝液濃度で微結晶セルロースに吸着させた。(a) 吸着画分の SDS-PAGE。Ct, 100% 吸着したときのタンパク質量。(b) セルロースへの吸着量。○, rEx-1; ▲, rEG1; ●, CBM1-GFP。

図 8. セルラーゼのセルロースへの吸着と脱離の制御

吸着は微結晶セルロースに対して, 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中で 30℃ にて行った。脱離は 40℃ の蒸留水で行った。●, rEx-1; ○, rEG1; ◆, CBM1-GFP。

の吸着量を厳密に制御可能である。図 9 は, CBM1 を持つ rEG1 と CBM1 を欠損させた rEG1 (Δ CBM1) を様々な吸着量になる塩濃度で基質と反応させた結果である。10 mM 以上の緩衝液濃度においては, 不溶性セルロースに EG1 を作用させた場合にだけ反応性が徐々に増加した。すなわち, Δ CBM1 や可溶性基質の分解には酵素の吸着が関与せず, CBM1 を持つ酵素が不溶性基質に作用するときだけに吸着が必要になることを示している。さらに, その反応性は酵素の吸着量が増加するに伴って増加し, 吸着は酵素反応の進行に重要な役割を果たしていることを改めて証明する結果となった。一方, 10 mM までの緩衝液濃度では, 全ての酵素, 基質の組み合わせにおいて反応性の増加が確認された。塩濃度は, 疎水的相互作用だけでなく触媒アミ

図9. セルロースへの吸着量と加水分解活性の関連性

微結晶セルロース (a) と CMC (b) に対する反応性。●, rEG I; ○, ΔCBM1。

ノ酸残基のイオン化や静電的な相互作用にも影響し、基質がサブサイトに結合したり、酵素の構造維持に対しても影響を及ぼす。低い塩濃度ではこれらの確立が不十分となり、本来の活性を発揮できない可能性が考えられた。

セルロース分解系酵素の吸着量の制御に関しては、いくつかの報告が存在する。これまで、エチレングリコールやセロデキストリンの添加⁴³⁾および pH 変化⁴⁴⁾による吸着の制御が試みられてきた。しかし、これら方法による吸着量の制御範囲は非常に狭い⁴⁴⁾。本方法は、その制御範囲が広く、さらに溶媒を置換するだけで吸着と脱離を制御可能であることから、既存の酵素回収技術と組み合わせることも容易である。

5.4 吸着量の制御を利用した酵素の精製

CBM1 を持つ酵素の精製に関しても本法が利用できる。筆者らは、これまでに本法を利用したセルロースアフィニティーカラムによって *I. lacteus* 由来の麹菌組換え酵素 Ex-1, Ex-3, En-1 や *T. reesei* 由来の組換え酵素 CBH I (Cel7A), CBH II (Cel6A), EG I (Cel7B), EG II (Cel5A), EG V (Cel45A) および Swollenin (Swo I) を精製してきた。

微結晶セルロースを小型のカラム容器に詰め、酵素を高塩濃度で吸着・洗浄し、蒸留水で溶出する。先の実験で述べたパッチ式の吸脱着に比較して、吸着量や回収率が格段に高いことに気がついた。おそらく、カラムではパッチ式に比べ溶媒交換が完全であることや溶媒の流れが酵素の脱離を促進している可能性がある。溶出液には酵素生成物であるセロオリゴ糖が混在するため、さらなる精製が不可欠であるが、CBM1 を持つ酵素を容易に精製できる効果的な手段であるといえよう。

6. おわりに

セルラーゼの研究は、非常に多くのセルロース分解酵素を1つずつ精製し、酵素化学的な性質を調査していくことから始まった。これまでに多くの種類の酵素が単離され、主要なセルロース分解酵素の酵素化学的諸性質が明らかにされてきた。しかし、微量にしか存在しない分解系酵素やセルロースの分解に直接関与しない酵素もバイオマス中のセルロース分解を促進するためには重要な役割を持つこと

が明らかとなってきた。今後は、これらの酵素群の役割をさらに解明することで、少しずつではあるがセルロースの酵素糖化の効率を高めることができると考えられる。

謝辞

このたび、長年私が研究活動の中心としてきた日本応用糖質科学会で奨励賞を受賞できたことは、身に余る光栄であると実感しております。ご推薦いただきました林 清東日本支部長ならびに天野良彦先生、松井博和会長をはじめご選考を賜りました選考委員の諸先生方には、この場を借りて厚く御礼を申し上げます。信州大学の神田鷹久先生や水野正浩先生をはじめとする研究室の皆様には多大なご指導とご協力を賜りました。この場をお借りして深く感謝を申し上げますとともに、引き続き良き研究仲間として一層のご鞭撻をお願い申し上げます。

最後に、本研究の一部はバイオマスエネルギー等高効率転換技術開発 (NEDO) のご支援によって実施されました。バイオインダストリー協会をはじめとするプロジェクト関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

文献

- 1) Č. Novotný, T. Cajthaml, K. Svobodová, M. Šušla and V. Šašek: *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological. *Folia Microbiol.*, **54**, 375–390 (2009).
- 2) 西澤一俊, 松崎 博, 樋口 昭: 繊維素分解酵素に関する研究 第1報: 種々なる繊維素試料のウスパタケ (*Irpex lacteus*) より得たる cellulase による分解度の比較. 信州大学繊維学部研究報告, **3**, 69–71 (1953).
- 3) 西澤一俊, 田中治雄, 市川能富子: 繊維素分解酵素に関する研究 (第4報): 組成を異にする数種の培養液における *IrPex-Cellulase* の産生について. 信州大学繊維学部研究報告, **4**, 56–59 (1954).
- 4) T. Kanda, K. Wakabayashi and K. Nisizawa: Purification and properties of an endo-cellulase of avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.*, **79**, 977–988 (1976).
- 5) T. Kanda, K. Wakabayashi and K. Nisizawa: Synergistic action of two different types of endo-cellulase components from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) in the hydrolysis of some insoluble celluloses. *J. Biochem.*, **79**, 997–1006 (1976).
- 6) T. Kanda, S. Nakakubo, K. Wakabayashi and K. Nisizawa: Purification and properties of an exo-cellulase of Avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.*, **84**, 1217–1226 (1978).
- 7) T. Kanda, K. Wakabayashi and K. Nisizawa: Purification and properties of a lower-molecular-weight endo-cellulase from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.*, **87**, 1625–1634 (1980).
- 8) B.L. Cantarel, P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard and B. Henrissat: The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, **37**, D 233–238 (2009).
- 9) E. Hoshino, Y. Sasaki, K. Mori, M. Okazaki, K. Nisizawa and T. Kanda: Electron microscopic observation of cotton cellulose degradation by exo- and endo-type cellulases from *Irpex lacteus*. *J. Biochem.*, **114**, 236–245 (1993).
- 10) N. Hamada, R. Okumura, N. Fuse, R. Kodaira, M. Shimozaki, T. Kanda and M. Okazaki: Isolation and transcriptional analysis of a cellulase gene (*cell*) from the basidiomycete *Irpex lacteus*. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 97–102 (1999).
- 11) H. Toda, N. Nagahata, Y. Amano, K. Nozaki, T. Kanda, M. Okazaki and M. Shimozaki: Gene cloning of cellobiohydrolase II from the white rot fungus *Irpex lacteus* MC-2 and its expres-

- sion in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3142–3147 (2008).
- 12) H. Toda, S. Takada, M. Oda, Y. Amano, T. Kanda, M. Okazaki and M. Shimosaka: Gene cloning of an endoglucanase from the basidiomycete *Irpex lacteus* and its cDNA expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1262–1269 (2005).
 - 13) D. Martinez, R.M. Berka, B. Henrissat, M. Saloheimo, M. Arvas, S.E. Baker, J. Chapman, O. Chertkov, P.M. Coutinho, D. Cullen, E.G.J. Danchin, I.V. Grigoriev, P. Harris, M. Jackson, C.P. Kubicek, C.S. Han, I. Ho, L.F. Larrondo, A.L. de Leon, J.K. Magnuson, S. Merino, M. Misra, B. Nelson, N. Putnam, B. Robbertse, A.A. Salamov, M. Schmoll, A. Terry, N. Thayer, A. Westerholm-Parvinen, C.L. Schoch, J. Yao, R. Barabote, M.A. Nelson, C. Detter, D. Bruce, C.R. Kuske, G. Xie, P. Richardson, D.S. Rokhsar, S.M. Lucas, E.M. Rubin, N. Dunn-Coleman, M. Ward and T.S. Brettin: Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnol.*, **26**, 553–560 (2008).
 - 14) P.Q. Hai, K. Nozaki, Y. Amano and T. Kanda: Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from *Irpex lacteus* and its adsorption on cellulose. *J. Appl. Glycosci.*, **47**, 311–318 (2000).
 - 15) P.Q. Hai, K. Nozaki, Y. Amano and T. Kanda: Synergistic effects of cellobiose dehydrogenase, cellulases, and β -glucosidase from *Irpex lacteus* in the degradation of various types of cellulose. *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 9–17 (2002).
 - 16) M. Saloheimo, M. Paloheimo, S. Hakola, J. Pere, B. Swanson, E. Nyyssonen, A. Bhatia, M. Ward and M. Penttilä: Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4202–4211 (2002).
 - 17) J. Verbeke, P. Coutinho, H. Mathis, A. Quenot, E. Record and M. Asther: Transcriptional profiling of cellulase and expansin-related genes in a hypercellulolytic *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Lett.*, **31**, 1399–1405 (2009).
 - 18) E.S. Kim, H.J. Lee, W.G. Bang, I.G. Choi and K.H. Kim: Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, **102**, 1342–1353 (2009).
 - 19) N. Hamada, R. Kodaira, M. Nogawa, K. Shinji, R. Ito, Y. Amano, M. Shimosaka, T. Kanda and M. Okazaki: Role of cellulose-binding domain of exocellulase I from white rot basidiomycete *Irpex lacteus*. *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 359–362 (2001).
 - 20) A. Kobayashi, M. Sano, K. Oda, H. Hisada, Y. Hata and S. Ohashi: The glucoamylase-encoding gene (*glab*) is expressed in solid-state culture with a low water content. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1797–1799 (2007).
 - 21) K. Nozaki, T. Seki, K. Matsui, M. Mizuno, T. Kanda and Y. Amano: Structure and characteristics of an endo- β -1,4-glucanase, isolated from *Trametes hirsuta*, with high degradation to crystalline cellulose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2375–2382 (2007).
 - 22) 野崎功一, 関 高宏, 松井慶子, 天野良彦, 神田鷹久: アラゲカワラタケの生産するエンド型セルラーゼの発現系の構築と機能解析. *J. Appl. Glycosci.*, **51** Suppl., 32 (2004).
 - 23) K. Nozaki, H. Nishijima, T. Arai, M. Mizuno, N. Sato and Y. Amano: Ion-dependent adsorption of carbohydrate-binding module family 1 and endo- β -1,4-glucanase onto crystalline cellulose. *J. Appl. Glycosci.*, **58**, 133–138 (2011).
 - 24) P. Tomme, H.V. Tilbeurgh, G. Pettersson, J.V. Damme, J. Vandekerckhove, J. Knowles, T. Teeri and M. Claeysens: Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.*, **170**, 575–581 (1988).
 - 25) J. Ståhlberg, G. Johansson and G. Pettersson: A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I. *BioTechnology*, **9**, 286–290 (1991).
 - 26) S. Takashima, H. Iikura, A. Nakamura, M. Hidaka, H. Masaki and T. Uozumi: Isolation of the gene and characterization of the enzymatic properties of a major exoglucanase of *Humicola grisea* without a cellulose-binding domain. *J. Biochem.*, **124**, 717–725 (1998).
 - 27) M. Srisodsuk, T. Reinikainen, M. Penttilä and T.T. Teeri: Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20756–20761 (1993).
 - 28) M.L. Mattinen, M. Kontteli, J. Kerovuo, M. Linder, A. Annala and G. Lindeberg: Three-dimensional structures of three engineered cellulose-binding domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Protein Sci.*, **6**, 294–303 (1997).
 - 29) M.L. Mattinen, M. Linder, A. Teleman and A. Annala: Interaction between cellobiohydrolase and cellulose binding domains from *Trichoderma reesei* cellulases. *FEBS Lett.*, **407**, 291–296 (1997).
 - 30) M. Linder, M.L. Mattinen, M. Kontteli, G. Linderberg, J. Ståhlberg, T. Drakenberg, T. Reinikainen, G. Pettersson and A. Annala: Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Sci.*, **4**, 1056–1064 (1995).
 - 31) J. Xu and H. Chen: A novel stepwise recovery strategy of cellulase adsorbed to the residual substrate after hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **143**, 93–100 (2007).
 - 32) L.P. Ramos and J.N. Saddler: Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **45–46**, 193–207 (1994).
 - 33) D. Lee, A.H.C. Yu and J.N. Saddler: Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 328–336 (1995).
 - 34) D. Lee, D. A.H.C. Yu, K.K.Y. Wong, J.N. Saddler: Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **45–46**, 407–415 (1994).
 - 35) M. Meshartree, C.M. Hogan and J.N. Saddler: Recycle of enzymes and substrate following enzymatic-hydrolysis of steam-pretreated aspenwood. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 558–564 (1987).
 - 36) S. Takashima, M. Ohno, M. Hidaka, A. Nakamura, H. Masaki and T. Uozumi: Correlation between cellulose binding and activity of cellulose-binding domain mutants of *Humicola grisea* cellobiohydrolase I. *FEBS Lett.*, **581**, 5891–5896 (2007).
 - 37) G. Salvi, P.D.L. Rios and M. Vendruscolo: Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins*, **15**, 492–499 (2005).
 - 38) C. Déjugnat, J.F. Dufrêche and T. Zemb: Ion-specific weak adsorption of salts and water/octanol transfer free energy of a model amphiphilic hexapeptide. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 6914–6924 (2011).
 - 39) P.M. Cummins and R.F. O'Connor: Hydrophobic interaction chromatography. *Methods Mol. Biol.*, **681**, 431–437 (2011).
 - 40) R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen and J. van der Noordaa: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 495–503 (1990).
 - 41) C. Divne, J. Ståhlberg, T. Reinikainen, L. Ruohonen, G. Pettersson, J.K. Knowles, T.T. Teeri and T.A. Jones: The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science*, **265**, 524–528 (1994).
 - 42) C. Divne, J. Ståhlberg, T.T. Teeri and T.A. Jones: High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.*, **275**, 309–325 (1998).
 - 43) G. Henriksson, A. Salumets, C. Divne and G. Pettersson: Studies of cellulose binding by cellobiose dehydrogenase and a comparison with cellobiohydrolase I. *Biochem. J.*, **324**, 833–838 (1997).
 - 44) M. Linder and T.T. Teeri: The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12251–12255 (1996).