総 説

セルラーゼ—天然セルロースの酵素的分解機構

岡田巖太郎*, 田中義正*

(昭和 63 年 9 月 30 日受付)

Cellulase — Enzymatic Degradation Mechanism of Native Cellulose

Gentaro OKADA and Yoshimasa TANAKA

*Department of Biology, Faculty of Education, Shizuoka University
(836 Ohya, Shizuoka 422, Japan)*

Living organisms produce a wide variety of polymeric carbohydrates, of which cellulose is the most abundant. The main deterioration of cellulose is caused by microorganisms, and the biological degradation of cellulosic substances is an extremely important process for the maintenance of the carbon balance in nature.

Since crystalline cellulose is an insoluble substance with a supramolecular structure, the enzymological approaches to this substrate are rather complicated and difficult. In most cellulolytic microorganisms, several cellulase components together constitute a "cellulase system" and cellulosic materials are converted to soluble sugars by their synergistic action. To understand completely the biodegradation mechanism of cellulose, therefore, the strict purification and characterization of each cellulase component is absolutely necessary.

This review describes the cellulolytic enzymes and focuses on the mechanism of their action. It is divided into seven sections and includes the historical background of cellulase. Our recent findings concerning the enzyme mechanisms involved in native cellulose degradation are also described.

1. はじめに

セルロースは化学的にいうと、D-グルコースのみが β -1,4-グルコシド結合で高度に重合した β -1,4-グルカンで、ヘミセルロース、ペクチン、リグニン、細胞壁タンパク質などと共存しながら、ほとんどすべての植物細胞壁の主要な構成成分として、その形態保持に寄与している。また、ある種の酢酸菌や動物のホヤなども、高等植物起源のセルロースに酷似したセルロースを生合成することが知られている。セルロースは光合成作用を通して、太陽の放射エネルギーを効率よく変換・備蓄した代

表的なグルコースポリマーで、年間実に約 10^{11} トンも生産されるといわれ、全天然有機物量のほぼ 2/3 を占めている。したがって、この多糖は太陽エネルギーが存在する限り、再生産可能な地球上にもっとも豊富に存在するバイオマス資源といえよう。

天然セルロースはその高度に発達したミクロフィブリル結晶構造に加え、水に不溶性であるため、セルラーゼによる酵素分解にはきわめて強い抵抗性を示し、難分解性である。IUB の Enzyme Nomenclature¹⁾によると、セルラーゼの系統名は 1,4-(1,3; 1,4)- β -D-グルカン 4-グルカノヒドロラーゼ (EC 3.2.1.4) で、セルロース、リケニン、穀類グルカンの β -1,4-グルコシド結合をエンド様式 (非特異的) に水解する酵素と定義されている。本酵素は原生動物、軟体動物、細菌、菌類や高等植物などにより生産され、その分布は広く生物界全般に

* 静岡大学教育学部生物学教室 (422 静岡市大谷 836)
略語: CMC, カルボキシメチルセルロース; G_1 , D-グルコース; $G_2 \sim G_7$, セロビオース〜セロヘプタース。

およんでいる²³⁾。なかでも、糸状菌や木材腐朽菌など菌類起源のセルラーゼは強力でもっともよく研究されており、天然セルロースの酵素分解に関する重要な知見がもたらされている。セルロース分解菌 (cellulolytic microbe) のもっとも重要な役割は、枯死した植物が地球表面に堆積するのを防ぎ、自然界の炭素収支 (carbon balance) を円滑に維持することにあると考えられている。

セルラーゼ研究の歴史はかなり古いが、精製酵素を用いた本格的な酵素学的研究は 1970 年前後から開始されたといつてよい。おりしも、爆発的な人口増加の予測やオイルショックなどを契機に、世界的に食糧危機や石油・石炭などの“化石燃料”の枯渇が叫ばれ、人類福祉の視点からセルロース系資源の有効利用がにわかにクローズアップされた時期でもあった。このような社会的ニーズに呼応して、今後の実用化が大いに期待されるセルラーゼに関する基礎ならびに応用研究が積極的に推進され、多数の知見が集積された。それらの研究成果の概要は各種の総説・成書・シンポジウムの記録などに紹介されている⁴⁻¹⁷⁾。

このように、セルラーゼに関する基礎研究が飛躍的に進展した反面、セルラーゼに対する呼称やその作用機作、これまでに提唱された各種の天然セルロースの酵素的分解機構などについて、多くの研究者の間でそれらの解釈をめぐり、必ずしも一致した見解には至らず、相当の混乱が見られる現状である。本稿ではセルラーゼに関する従来の諸研究を解説・整理しながら、積極的に問題点を指摘し、今後の研究に資するように努めた。さらに、*Trichoderma viride* のセルラーゼ系に関する筆者らの最新の研究成果を述べるとともに、天然セルロースの酵素的分解機構に関する新規概念についても紹介したい。

2. セルラーゼ研究の歴史的な背景とその推移

植物組織においては、50~70 のセルロース分子鎖が水素結合により互いに結びつき、ミクロフィブリルという結晶性超分子構造を形成している。セルロースと澱粉はグルコースポリマーの双壁であるが、セルロースはこの多糖を直接利用しうる一部の微生物や間接的に利用可能な反芻動物以外には、ほとんど栄養的価値に乏しく、しかも水に不溶性であることも手伝って、セルラーゼに関する初期研究の進捗は緩慢であった。セルラーゼの研究はかなり古くから始まり、天然セルロースの酵素的分解機構についてはさまざまな考え方・議論が展開され、今日に至っている。最近のセルラーゼ研究を理解する上

で、その歴史的な背景・推移を概観することは有意義なことであろう。本稿ではセルラーゼの研究史を便宜上、3 期に分けて話を進めるが、紙面の制約上代表的なもののみを取りあげることとした。

1) 初期 (1906~1945)

セルラーゼの酵素学的研究については、1906 年に Seillièvre¹⁸⁾がカタツムリ (*Helix pomatia*) の消化液を木綿繊維に作用させたものが、*in vitro* でセルロースの酵素的分解を試みた最初のものでされている。ついで、Pringsheim¹⁹⁾はある種の高熱細菌をセルロースに作用させ、その生成糖として G₂ と G₁ が得られたことから、天然セルロースの酵素分解は、(1) セルロース繊維のミセル構造の開裂、(2) 露出したセルロース鎖のセロオリゴ糖への分解、(3) セロオリゴ糖のグルコースへの分解という 3 段階を経て行われるという段階的な分解機序を想定した。もちろん酵素レベルでの証明には欠けるが、これが天然セルロースの酵素的分解機構について述べた最初のものであろう。その後、ノーベル化学賞受賞者の Karrer ら²⁰⁻²²⁾はカタツムリ消化管のセルラーゼについてかなり系統的に研究し、セルロースからの生成糖が主として G₂ であったことから、セルラーゼはセルロース鎖の末端から G₂ を切り出すのではないかと考えた。さらに、Grassmann ら²³⁾は糸状菌 *Aspergillus* 属のセルラーゼを用い、主としてセルラーゼとセロビアーゼの基質特異性などについて調べた。その結果、セルラーゼは長鎖のセルロースに作用して重合度 5~6 程度のセロオリゴ糖を生成し、セロビアーゼはこれらのセロオリゴ糖を分解してグルコースを生成するという結論に達した。これらの結果は前述した Pringsheim の考え方を支持するものであった。Freudenberg ら²⁴⁾は *Aspergillus oryzae* 由来の粗酵素製剤 (Luicym) とカタツムリの消化液を酵素源として、セルラーゼとリケナーゼの異同を論じ、これらが互いに相連していることを主張した。わが国では、宮本²⁵⁾が軍馬の飼糧確保のため、約 20 種の菌類について発培養における菌体外セルラーゼの生成量を比較し、*Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) のものが最高であることを見出した。

上述した諸研究は無論粗酵素レベルのものであったが、セルラーゼ研究の歩みはアミラーゼのそれに比し、遅々としたものであった。しかし、その後、次のような理由から活発に研究が行われるようになった。それは、水に不溶性であるセルロースの酵素的分解機作の本質が、水溶性多糖の場合とほぼ同様であろうという認識、およびセルラーゼの有効利用の必要性が考慮されはじめたこと

などである。

2) 中期 (1946~1970)

この時期に米国では、木材、テント、綱、紙、衣料品など軍需品の防衛対策の必要性からセルラーゼの研究が急速に進展した。このような事情を背景に、1950年、Reese ら²⁶⁾ は綿などの天然セルロースの酵素的分解機構について、基質特異性の異なる2種のセルラーゼ成分 C_1 と C_x の存在を仮定した歴史的に有名な“ C_1 - C_x 説” (詳細については後述) を発表し、セルラーゼの多様性について言及した。この説の背景には前述した Pringsheim¹⁹⁾ の考え方があるものと思われる。1953年に Whitaker^{27,28)} は、*Myrothecium verrucaria* の培養濾液から得た精製セルラーゼ標品が、天然セルロースから G_2 に至る各種セルロース性基質をエンド機作で水解したことから、“単一酵素説” (詳細については後述) を主張し、Reese らの“ C_1 - C_x 説”と真っ向から対立した。一方、このころ西澤²⁹⁾ は、木材腐朽菌 *Irpex lacteus* の培養濾液から、冷アセトンを用いた分別沈澱を繰り返して、六角板状または柱状の結晶セルラーゼ標品を得た。

“ C_1 - C_x 説”と“単一酵素説”の激しい論争の最中、Marsh ら³⁰⁾ は、セルロース分解菌の培養液中にセルロース鎖束 (ミクロフィブリル) を弛緩させる水解酵素とは別の“膨潤因子” (swelling factor) の存在を提唱した。さらに、Siuz^{2,31)} はセルロースの超分子構造を水解以外の方法で変化させる“hydrogen bondase”の存在の可能性を示唆した。一方、Reese ら³²⁾ は、(1) *T. viride* の各セルラーゼ成分 (彼らの定義によると、すべて C_x) の CMC などに対する水解様式には、“more” endwise = “more” random 型と “less” endwise = “less” random 型があること、(2) 各セルラーゼ成分間のリン酸膨潤セルロースに対する分解相乗作用があることなどを見出した。使用した酵素標品は低純度のもものではあったが、これらの発見はその後のセルラーゼ研究に根本的な課題を提起した重要なものとして特筆できる。

このころから、本格的な C_1 および C_x 酵素の実体追求が始められた。イギリス Shirley Institute の Selby³³⁾ は古くからセルラーゼ研究者により観察されてきた、天然セルロースが生菌ではよく分解されるが、培養濾液や細胞抽出液を用いるとあまり分解されないことについてとくに注目し、その原因として次の2点を示唆した。すなわち、生菌を用いると、(1) きわめて不安定な酵素または cofactor が連続的に生産される可能性と、(2) 阻害作用を及ぼす分解物が除去される可能性とがそれである。そこで、Selby ら³⁴⁾ はカタン糸の強伸度 (tensile

strength) を測定するという、彼ら独特の C_1 活性測定法を考案し、*M. verrucaria* の培養濾液を用いて種々実験した。その結果、綿繊維中には酵素に対し異なる抵抗性を示す部分が存在することや、培養濾液中にはセルロース構造を攻撃するのに作用の異なる少なくとも2種の酵素 A, B が存在することなどが推察された。彼らはA酵素はセルロース繊維を分解して、その強伸度を15~20%以上減少する能力をもつものとし、B酵素は最初の15~20%の強伸度減少をもたらすものと考えた。このように、Selby らの A, B 酵素は Reese らの仮定した C_1 , C_x 酵素よりやや具体性を帯びていることが注目された。

また、米国 Virginia Polytechnic Institute の King ら³⁵⁾ も新しい角度から C_1 酵素の追求を行った。彼らは *T. viride* のフスマ固形培養物から得た市販セルラーゼ製剤である Meicelase (明治製菓 K. K. 製) を用いて、新しい C_1 酵素の活性測定法を案出した。この方法はヒドロセルロースの代用として市販のアビセル (微結晶セルロース) を用い、その濁度の減少度から酵素活性を求めるものである。King らは基質の d. p. (重合度) には関係なく、セルロースの結晶構造に作用できるものを C_1 酵素と考えて、この測定法に基づいて C_1 酵素 (ヒドロセルラーゼ) の精製を行った。得られた精製ヒドロセルラーゼは天然綿、精製リンターなどによく作用して、著しい重量減少を示し、ヒドロセルロースからの反応生成糖はほとんど G_2 であった。King らはこのヒドロセルラーゼに関する知見に基づいて、天然セルロースの酵素分解には少なくとも、ヒドロセルラーゼ、エンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼの3成分が関与するものとした。

その後、Selby らは *T. viride* の培養濾液から C_1 酵素の単離を目的として研究を進めた。彼らはアビセル糖化活性に比し、CMC 糖化活性が非常に高いセルラーゼ成分を C_x 酵素 (CMCase) と見なし、綿の可溶化の際にこれと相乗作用を示すセルラーゼ画分を C_1 と考え、そのようなセルラーゼ画分を探索した。*T. viride* の培養濾液を精製し、それを CMCase 画分と混合すると、綿の可溶化を著しく促進するタンパク質画分が得られたので、彼らはこれが C_1 成分であろうと考えた³⁶⁾。彼らがこの画分を C_1 酵素であるとしたもう一つの理由は、*Penicillium funiculosum* の培養濾液から抽出・精製した C_1 酵素と C_x 酵素に相当する画分を、上述の *T. viride* 由来の C_1 酵素と C_x 酵素画分と交互に組み合わせた場合 (*Trichoderma*- C_1 +*Penicillium*- C_x および *Penicillium*- C_1 +*Trichoderma*- C_x)、いずれも綿の

可溶化に対して交叉相乗作用 (cross-synergism) が観察されたからであった³⁷⁾。残念なことに、彼らはこの時点で、上述の C_1 、 C_x 酵素と見なした各セルラーゼ成分のセロオリゴ糖、リン酸膨潤セルロースやアビセルなどに対する作用を検討してはいないので、これら両セルラーゼ成分の詳細な基質特異性は不明であり、その他の酵素学的性質についてもほとんど追求されなかった。

一方、岡田ら³⁸⁾は Reese らの仮定した独立した C_1 および C_x 酵素の存在に疑問を抱き、それらの実体の確認・追求を目指した。そこで、強力な天然セルロース分解菌として世界的に有名な *T. viride* 由来のセルラーゼを徹底的に純化・精製することを意図した。前述した Meicelase 粉末を酵素精製の出発材料とし、粗酵素標品を Amberlite CG-50 のカラムクロマトグラフィーにかけ、Peak I~III の 3 個のタンパク質画分を得た。ついで、 β -グルコンダーゼ活性をまったく示さない Peak II セルラーゼ画分を DEAE-Sephadex A-50 のカラムクロマトグラフィーにかけ、FI~FV の明らかに相互に分離した 5 個のセルラーゼ画分を得た。このうちの FII, FIII, FIV セルラーゼ画分をさらに精製し、いずれも超遠心分離像が均一性を示す 3 種のエンドセルラーゼを得て、それらをセルラーゼ II (分子量 60,200)、III (分子量 62,400)、IV (分子量 58,900) と名付けた。これら 3 種の精製セルラーゼは、いずれも G_2 や p -ニトロフェニル β -D-グルコシド (β -PNPG) にはまったく水解作用を示さないが、 p -ニトロフェニル β -D-セロビオシド (β -PNPC)、 G_3 以上の一連のセロオリゴ糖、CMC、リン酸膨潤セルロース、濾紙、アビセル、脱脂綿などにはそれぞれ固有の水解パターンで作用した。すなわち、3 種の精製セルラーゼ標品はいずれも独立した C_1 でもなく、また C_x でもなく、それぞれの水解比率は違うが、セロオリゴ糖から天然セルロースまで作用するいわば $C_1 + C_x$ 的性質を示すセルラーゼであった。この結果から、Reese らの仮定した独立した C_1 や C_x 酵素の存在性に強い疑問を投げかけたのである。その後、小川ら³⁹⁾も *T. viride* の市販セルラーゼ製剤である Cellulase-Onozuka (近畿ヤクルト製造 K. K. 製) を用いてエンドセルラーゼを精製し、その基質特異性などを検討した結果、筆者らとはほぼ同様の結論を得た。

一方、細菌起源のセルラーゼ系に関して、King らは好気性中温菌 *Cellvibrio gilvus* を用いて一連の研究を行った。まず、本菌の培養濾液 (粗酵素液) を澱粉ゾーン電気泳動にかけセルラーゼの多様性を確認し、4 種 (I~IV) のセルラーゼ成分を部分精製し、それらの基質特

異性などを調べた⁴⁰⁾。ついで彼らは、これら 4 種のセルラーゼ画分の還元性および非還元性各種セロオリゴ糖や、¹⁴C セロデキストリンなどに対する作用を調べ、基質中に存在する各グルコシド結合間の被水解頻度を検討した。セロテトライトールにセルラーゼを作用させた際の水解生成物のアノマー型は α 型であった^{41,42)}。

このように、セルラーゼ研究の中期には Reese らの仮定した C_1 および C_x 酵素の追求を中心に展開されたわけである。1968 年、アメリカ化学会の分科会で“セルロース、木材、繊維化学”に関連した、シンポジウムが開催され、翌年そのプロシーディングスも刊行された。これを契機として、1970 年代に入って精製酵素を用いた本格的な酵素化学的な研究が開始され、セルラーゼの多様性とセルロースの酵素的分解機構に関する重要な知見が集積された。

3) 後期 (1971~現在)

この時代の研究は、まず Selby らが C_1 酵素と呼んだセルラーゼ成分の実体究明の研究から幕を開けた。すなわち、Wood ら⁴³⁾は *T. koningii* の培養濾液を用いて、Selby らの C_1 成分を等電点電気泳動でさらに精製した。その結果、小ピーク画分 (pI 3.80) と大ピーク画分 (pI 3.95) の 2 個のセルラーゼ画分が得られ、両者とも前述の C_x 画分と共存させると綿セルロースの可溶化に相乗作用を示す成分であった。両 C_1 成分はそれぞれ単独では 2% と 4% 程度の綿可溶化率であったが、 C_x 成分の共存下ではいずれも約 60% の可溶化率を示した。両者ともリン酸膨潤セルロースや脱脂綿に長時間作用させると、多量の G_2 と少量の G_1 を生成した。また、セロオリゴ糖に対しては、 G_2 には作用せず、 G_3 からは等量の G_2 と G_1 を、 G_4 と G_6 からは G_2 以外に少量の G_3 と G_1 を、 G_5 からは G_2 、 G_3 と少量の G_1 を生成した。Wood らはこれらの結果を総合して、 C_1 成分はセルロース鎖の非還元末端から順次 G_2 を切り取るエキソ型セルラーゼであるとし、“1,4- β -D-グルカン・セロビオヒドロラーゼ” (EC 3.2.1.91, 以下 CBH と略記する) と命名した。

Wood らの研究とほぼ時を同じくして、Pettersson らのグループと西澤らのグループは独立して、*T. viride* の市販セルラーゼ製剤 (Cellulase-Onozuka) から、その精製方法は異なるが、リン酸膨潤セルロースよりアビセルによく作用し、高エンド型の CMCase に比し CMC に対する糖化力が 1/1500~1/2000 と極度に低い、高度に精製されたセルラーゼ画分を得た。Pettersson らも、西澤らもこの精製セルラーゼ成分を CMCase (エンド

型セルラーゼに対する便宜的な呼称) に対して “Avicelase” と呼んだ。

Berghem ら⁴⁴⁾ は、粗酵素をカラムクロマトグラフィーで分画・精製し、得られた I～IV 画分のうち、IV を等電点電気泳動にかけ IV-A～IV-D の 4 個の Avicelase 画分を得た。このうち、CMCase 作用のもっとも弱い IV-D 画分 (pI 3.79) をさらに精製し、超遠心分離像および PAGE で均一性を示す標品 (分子量 46,000) を得た。精製酵素の Avicelase 対 CMCase の糖化活性比は約 2000 で、アビセル、リン酸膨潤アビセルおよび G_4 からの生成糖はいずれも痕跡程度の G_1 以外はすべて G_2 のみであった。Berghem らはこれらの結果に基づいて、彼らの精製した Avicelase は Wood らによって提唱された CBH と同一のものであると考えた。その後、Berghem ら⁴⁵⁾ はこの Avicelase について、反応主生成糖である G_2 を連続的に除去すれば、アビセルを 72 時間以内に約 80% も水解することが可能であり、このアビセル糖化力はエンドグルカナーゼや β -グルコニダーゼの添加によって、さらに促進されると報告している。

また、富田ら⁴⁶⁾ の得た Avicelase (FIII C) は、前述した岡田ら³⁸⁾ の DEAE-Sephadex A-50 を用いた精製過程で得られる FIII 画分を等電点電気泳動でさらに精製したものである。精製酵素 FIII C (pI 4.15, 分子量 53,000) は超遠心分離像や PAGE で均一性を示す標品であった。また、この FIII C を Cellulase-Onozuka から戸田らが精製した CMCase (FII pC) と共存させると、綿やアビセルの糖化において強い相乗作用を示した。FIII C をアルカリ膨潤セルロース、アビセル、綿などに作用させた際の主生成糖は G_2 であったが、生成糖中の G_1 の含有量はそれぞれの基質から 0.6, 2.8, 5.8% の値を示し、相当量の G_1 の生成が認められた。また、 G_6 に対する反応初期生成糖として、 G_2 以外に G_1 や G_3 なども検出された。これらの事実に基づいて、富田らは FIII C をランダム (エンド) 水解度の低い、つまりエキソ型に近い “less” ランダム型のセルラーゼであろうと考えた。CBH や Avicelase などの出現により、Reese らの C_1 - C_x 説は根本から再検討する必要に迫られたわけである。

1973 年以降、*T. viride* 由来の各種市販セルラーゼ製剤を粗酵素標品として、セルラーゼ成分の分画・精製がかなり系統的に進められた。岡田らは Meicelase を用いて、主要な 3 種のセルラーゼ成分を高度に精製した。すなわち、前述した DEAE-Sephadex A-50 のカラム

Table 1. Michaelis constants of cellulases II-A, II-B and III for cellooligosaccharides and CMC. The values were calculated from Lineweaver-Burk plots.^{48,49)}

Cellulase	Substrate (mM)				
	G_3	G_4	G_5	G_6	CMC (%)
II-A	—	0.04	0.15	0.33	0.081
II-B	1.63	0.42	0.28	0.46	0.096
III	2.94	0.60	0.56	0.45	0.054

クロマトグラフィーで得られる FII セルラーゼ画分をさらに精製し、2 種のセルラーゼ成分、セルラーゼ II-A (分子量 30,000) と II-B (分子量 43,000) を得、それらの示す諸性質を詳細に検討した^{47,48)}。さらに、FIII セルラーゼ画分由来のセルラーゼ III (分子量 43,000) も高度に精製し、その諸性質を II-A, II-B のそれと比較した⁴⁹⁾。これら 3 種のセルラーゼ成分はいずれも、PAGE で単一のタンパク質染色バンドを与える標品であった。CMC を基質とした場合の粘度低下力対還元力生成比 (エンド水解度) の強弱は、II-A > II-B > III の順であり、3 者とも典型的なエンドセルラーゼであった^{47,49)}。とくに、セルラーゼ III は II-A や II-B に比べて、はるかにエンド水解度の低い標品であった。

ここで、これら 3 種のエンドセルラーゼが示す酵素学的に興味ある 2, 3 の知見を紹介しよう^{48,49)}。II-A, II-B, III をそれぞれ別個に G_5 に作用させた場合、生成還元糖の変旋光の向きは 3 者とも上向き変旋光 ($\beta \rightarrow \alpha$) を示した。この事実は水解生成糖が β -アノマーであることを意味している。つまり、生成糖のアノマー炭素の configuration は基質分子内でグルコースが配置されている configuration を保持していることになる。また、II-A, II-B をそれぞれ比較的高濃度 (0.01 M) の β -PNPC に作用させると、糖転移生成物の G_3 を合成するセロビオシル残基転移作用を示す (転移能の強さは II-A > II-B)。さらに、高濃度 (0.1 M) の G_2 に作用させると顕著な G_4 合成能が見られた。これは、加水分解の逆反応 (縮合反応) によるもので、一種のセロビオシル残基転移作用として理解される (縮合能の強さは II-B > II-A)。これはセルラーゼが触媒する縮合作用に関する初めての報告である。III についても高濃度の G_2 に作用させると強力な縮合作用が確認された。Table 1 は 3 種の精製セルラーゼの各種セロオリゴ糖と CMC に対する K_m 値をまとめたものである。最大の特徴は、II-A が G_3 にほとんど作用しないことと、他の 2 者に比べて G_4 に対す

る親和力が一桁高いことである。

これら 3 種の精製セルラーゼはいずれも、 G_2 や β -PNPG をまったく水解しないが、 β -PNPC、 $G_3 \sim G_6$ 、不溶性セロデキストリン ($d.p. = 25$)、CMC、濾紙、アビセル、脱脂綿なども程度の違いはあるが水解し、幅広い基質特異性を示した。すなわち、これら 3 種のセルラーゼ成分は、いずれも独立した C_1 や C_x 酵素ではなく、水解比率は違うが両者の性質を兼ね備えた $C_1 + C_x$ 的性質を示すセルラーゼであった。この事実の前に、Reese らの仮定した C_1 酵素の存在はますます疑問視されるに至った。

Berghem らは *T. viride* の市販セルラーゼ製剤である Cellulase-Onozuka SS (近畿ヤクルト製造 K. K. 製) を酵素精製の出発材料として、各種カラムクロマトグラフィーを駆使して 2 種のエンドグルカナナーゼ⁵⁰⁾、1 種の CBH⁴⁹⁾ および 1 種の β -グルコシダーゼ⁵¹⁾ を得、それらの諸性質を検討している。CBH および β -グルコシダーゼの活性回収率はそれぞれ 6% および 11% であったが、エンドグルカナナーゼの活性回収率については記載がない。

また、Brown Jr. らは *T. viride* の市販セルラーゼ製剤である Pancelase SS (近畿ヤクルト製造 K. K. 製) を粗酵素に用いて、各種カラムクロマトグラフィーにより 4 種のエンドグルカナナーゼ⁵²⁾、1 種の CBH⁵³⁾ および 1 種の β -グルコシダーゼ¹⁰⁾ を精製した。エンドグルカナナーゼ I ~ IV の活性回収率はそれぞれ 1.64, 7.09, 0.94, 4.87% で、合計 14.54% の活性回収率であったが、CBH と β -グルコシダーゼの活性回収率は記載されていない。彼らは全セルラーゼタンパク質中で CBH の占める割合を 50% 程度としている。

最近、Beldman らは *T. viride* QM9414 の市販セルラーゼ製剤である Maxazyme (Gist-Brocades 社製) から 6 種のエンドグルカナナーゼ、3 種のエキソグルカナナーゼおよび 1 種の β -グルコシダーゼを分画・精製した⁵⁴⁾。残念なことに、いずれの精製酵素についても活性およびタンパク質の回収率の記載がないので、これら 10 種の示す総セルラーゼ活性が粗酵素標品のもつ全セルラーゼ活性と対応するかどうかも不明である。彼らは単離した β -グルコシダーゼがセロピオース分解活性を示さない新規酵素であると主張している。さらに、6 種のエンドグルカナナーゼ (I ~ VI) と 2 種のエキソグルカナナーゼ (II, III) について、各酵素のアビセルに対する吸着特性、 K_m , V_{max} , 反応生成糖などについて検討している⁵⁵⁾。

この時期には *Trichoderma* 属について、*Aspergillus*

属のセルラーゼに関する研究も比較的活発に行われた。ここでは、その主要なものをいくつか取り上げることとする。まず、池田ら⁵⁶⁾は *Asp. niger* の市販セルラーゼ製剤である Taka-cellulase 4000 (マイルス社製) から、異常に低い至適酸度 (pH 2.3 ~ 2.5) を示す酸性セルラーゼの 1 成分を単離・精製した。精製標品の pI および分子量はそれぞれ 3.3 および 46,000 (沈降法) であった。本酵素の基本的な性質やアミノ酸組成などについても詳細に調べられている。その結果、Archibald 法による分子量の値 (46,000) に基づくと、本酵素は 378 個のアミノ酸残基から構成されていることになり、グルコサミンとアラビノースを各 10 残基含むことになる。

Hurst ら⁵⁷⁾は *Asp. niger* の市販粗セルラーゼ標品 type II (シグマ社製) を用いて、1 種のセルラーゼ成分を分画・精製した。精製酵素の分子量は 26,000 (SDS-PAGE 法) で、アミノ酸分析により、酸性アミノ酸と芳香族アミノ酸の含量が高いことが判明した。また、各種修飾剤による酵素タンパク質の化学修飾⁵⁸⁾や本酵素の示す基質特異性・作用様式⁵⁹⁾などについても検討が加えられた。

ところで、*Asp. niger* 起源のセルラーゼについては種々の報告があるが、精製標品を用いた研究は意外に少ないことから、岡田⁶⁰⁾はフスマ固形培養後の市販セルラーゼ製剤 (天野製薬 K. K. 製) から 1 種のエンドセルラーゼを徹底的に純化・精製した。精製酵素の活性回収率は約 60% と高率で、その pI , 分子量および至適 pH それぞれ 3.67, 31,000 (SDS-PAGE 法) および 4.0 であった。本酵素の CMC に対する比活性 (units/mg protein) および K_m 値はそれぞれ 116.83 および 0.086% で、セロベンタオースからの水解生成糖のアノマー型は β 型であった。さらに、精製酵素の示す基質特異性についても検討された。

一方、村尾らは従来知られていないセルラーゼ産生優良株のスクリーニングを精力的に進め、強力なセルラーゼ産生菌 *Asp. aculeatus* No. F-50 の単離に成功し、本菌の産生するセルラーゼ系を系統的に解析した。彼らは *Asp. aculeatus* の培養濾液由来の粗酵素標品 (アクセラゼと命名されている) からセルラーゼ系の構成メンバーとして、3 種のエンドセルラーゼ、1 種のヒドロセルラーゼ、2 種のアビセラゼ、および 3 種の β -グルコシダーゼの計 9 種の酵素を単離・精製し、それらの示す物理化学的・酵素学的な諸性質を詳細に比較した。また、これら 9 種のセルラーゼ成分の各種セルロース性基質に対する基質特異性や作用様式などを比較・検討し、

本菌のセルラーゼ系による天然セルロースの分解機構について考察している。さらに、彼らはアクセルラーゼが現在世界最強といわれている *T. viride* 由来のセルラーゼ (Meicelase) と非常に強い相乗作用を発揮することを報告している。この知見に基づいて、草本繊維性物質の酵素糖化液のアルコール生産への利用などが試みられた。*Asp. aculeatus* のセルラーゼ系に関する一連の研究成果の詳細については、村尾らにより著された成書など¹⁶⁾を参照されたい。

次に、木材腐朽菌のセルラーゼ系について 2, 3 紹介しよう。Eriksson ら⁶¹⁾ は *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) の濃縮培養濾液を 90% 飽和の硫酸アンモニウムで分画後、各種カラムクロマトグラフィーにかけ各セルラーゼ成分を精製した。その結果、 T_1 , T_{2a} , T_{2b} , T_{3a} , T_{3b} (各セルラーゼ成分の培養濾液中の量比は 4:1:1:1:1) の 5 個のエンドグルカナナーゼと 1 個のエキソグルカナナーゼを得た。このエキソグルカナナーゼのアビセルからの生成糖の量比は $G_1:G_2:G_3:G_4=1:2:1:1$ で、 G_4 からのそれは $G_1:G_2:G_3=1:1:1$, G_5 からのそれは $G_2:G_3=1:1$, G_6 からのそれは $G_2:G_3:G_4=1:2:1$ であった。彼らはこれを CBH であると主張しているが、セロオリゴ糖に対しては、あたかもエンド型のセルラーゼの作用に似た挙動を示している。また、従来報告されてきた CBH や Avicelase をアビセルに作用させた際に見られる作用特性 (アビセルから多量の G_2 と非常に少量の G_1 を生成する) と比べ、大きな相違が見られることを指摘したい。

一方、神田らは *I. lacteus* の培養濾液を硫酸アンモニウムで分画後、さらに精製を進め、F-1, F-2, S-1 の 3 種のエンドセルラーゼを得た。CMC に対するランダム水解度は $F-1>F-2>S-1$ の順であった^{62, 63)}。さらに、彼らは同一菌由来の市販セルラーゼ製剤である Driselase (協和発酵 K.K. 製) から、Ex-1 と名づけた Avicelase 型のエキソセルラーゼを単離・精製し、その諸性質を検討している⁶⁴⁾。

菌類起源のセルラーゼ研究に比し、細菌起源のセルラーゼの研究例は少ない。そのうちの代表的なものとして、まず *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* のセルラーゼ系を取り上げよう。山根ら⁶⁵⁾ は本菌の生産するセルラーゼ成分として、細胞外部に分泌されるセルラーゼ A, B と細胞内部に存在する細胞膜結合型セルラーゼ C とをそれぞれ分画・精製し、それらの示す具体的な諸性質と基質特異性などについて検討した。その後、セルロース系バイオマスの有効利用の機運の高まりと共に、好

気性中温菌 *Cellulomonas uda* CB4⁶⁶⁾、嫌気性高温菌 *Clostridium thermocellum*⁶⁷⁾、嫌気性ルーメンバクテリア *Ruminococcus albus* SY3⁶⁸⁾ などのセルラーゼが積極的に研究された。

ところで、各種の微生物から多数のセルラーゼが高度に精製され、それらの示す基質特異性や作用様式などが詳細に検討されている反面、セルラーゼの反応機構に関する研究はきわめて少ない現状である。目につくものとしては、Jurasek ら⁶⁹⁾ と Hehre ら⁷⁰⁾ による報告があるのみで、今後この分野の研究の一層の進展が望まれるところである。

3. セルラーゼの多様性

先に述べたように、多くのセルラーゼ産生菌、たとえば *T. viride*, *T. koningii*, *T. reesei*, *Asp. aculeatus*, *F. solani*, *P. funiculosus* などの糸状菌, *I. lacteus*, *S. pulverulentum* などの木材腐朽菌や *P. fluorescens*, *C. gilvus* などの細菌が産生するセルラーゼ分子は単一成分ではなく、多成分からなる複雑なセルラーゼ系 (cellulase system) を構成している。このセルラーゼの多様性 (multiplicity) はほとんどすべてのセルロース分解菌に共通しており、天然セルロースの酵素分解過程においては、それぞれのセルラーゼ成分の役割分担が存在するものと思われる。ところで、天然セルロースに対する分解力が強力なため、もっとも活発に研究が行われてきた *Trichoderma* 属のセルラーゼ系がいったい何個のセルラーゼ成分から構成されているのか確かな知見は得られていない。同一菌株から調製された粗酵素標品といえども、培養条件の違いにより産生されるセルラーゼ成分の数や量比が微妙に異なっていることは十分考えられる。また、研究者により酵素の精製法がまちまちであるため、単離・精製された酵素を相互に対応・特定させることが困難で、個々の精製酵素が示す触媒作用の解釈をめぐり、かなりの混乱が生じている現状である。

セルラーゼ系の中で個々のセルラーゼ成分の果たす役割を理解するためには、当然のことながら、系統的で再現性の高い酵素精製法を確立し、それを用いて個々のセルラーゼ成分を徹底的に分画・精製し、それらの機能を解明することが何よりも肝要である。一般に、セルラーゼ系がかなり多数のセルラーゼ成分から構成される複合酵素系であるため、個々のセルラーゼ成分を厳密に分画・精製することは非常に困難で、莫大な時間と労力を要する仕事である。すでに述べたように、筆者らは *T. viride* のフスマ固形培養物から得た Meicelase を用いて、主

Fig. 1. Elution patterns of the starting enzyme material (Meicelase) on Amberlite CG-50 column chromatography.

Fig. 2. Schematic diagram of the overall procedures of fractionation and purification for the cellulase system components from *Trichoderma viride*.

Fig. 3. Relationship between increases in fluidity and reducing power during the hydrolysis of CMC by the purified cellulases and a crude enzyme (G. Okada and Y. Tanaka, unpublished results).

要なセルラーゼ成分の特性解析を行ってきたが^{38,47-49)}, 本菌のセルラーゼ系の全貌を知るまでには至らなかった。その後、本菌の液体培養が工業的に可能となり、その粗酵素製剤 (Meicelase) も調製されるようになった。そこで、筆者らは数年前より、*T. viride* の構築するセルラーゼ系の完全解明を意図し、上記 Meicelase (lot No. CEPB-5019) を酵素精製の出発材料に用いて研究を進めた。これは、筆者らの *T. viride* のセルラーゼ系解明へ向けての3度目の挑戦である。きわめて最近、ようやく Meicelase 中に存在する全セルラーゼ成分の完全精製法を確立し、すでにその一部を報告したが⁷¹⁾, ここで簡単に酵素精製の全過程を紹介することにしよう。今回も、1968年に岡田ら³⁸⁾により確立された陽イオン交換体 Amberlite CG-50, ついで DEAE 系の陰イオン交換体を用いる精製法を踏襲した。すなわち、5 g の Meicelase 粉末を 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解し、Amberlite CG-50 のカラムにかけ、溶出緩衝液の塩濃度と pH を同時に上昇させる段階的な溶出法により、Peak I~III の3個のタンパク質画分を得た (Fig. 1)。Peak I 画分にはセルラーゼ活性も β -グルコシダーゼ活性も認められず、Peak II 画分は多種のセルラーゼ成分の混合画分で、この画分中には β -グルコシダーゼ活性はまったく認められなかった。Peak III 画分は、きわめて少量のセルラーゼと β -グルコシダーゼの混合画分であった。

本精製法は複雑な精製過程の最初の段階で、Amberlite CG-50 を用いる点に特徴があり、この段階で大部分のセルラーゼと β -グルコシダーゼをきわめて効率よく分離できるという大きな利点がある。

次に、Peak II セルラーゼ画分を DEAE-Sephadex A-50 のカラムにかけ、FI-a, FI-b, FII, FIII の4個のセルラーゼ画分に分画した。この FI-a~FIII および Peak III 画分をイオン交換体、等電点電気泳動、ゲル濾過法などを適宜組み合わせ、各種のセルラーゼ成分と β -グルコシダーゼをさらに分画・精製した。このように、分画操作をていねいに行った結果、Meicelase から最終的に12種のセルラーゼ成分 (I-a₁, I-a₂, I-a₃, I-b₁, I-b₂, II-a₁, II-b, II-c, III-a₁, III-a₂, III, IV) と1種の β -グルコシダーゼを高度に精製した。これら13種の精製酵素はいずれも、PAGE, SDS-PAGE および等電点電気泳動で均一性を示した。したがって、Meicelase 中に存在する *T. viride* のセルラーゼ系は、 β -グルコシダーゼを含めて13種のセルラーゼ成分から構築されていることになる。これら13種のセルラーゼ成分の分画・精製法の全貌が、Fig. 2 にまとめられている。われわれのこの分画法が、これまででもっとも多数のセルラーゼ成分を *T. viride* の培養物から単離したものと思われる。これらのセルラーゼ成分のうち代表的な7種の精製セルラーゼ成分と粗酵素標品をそれぞれ別個に CMC に作用させ、その際得られる CMC の粘度低下力 ($\phi_{sp.}$) と還元力の増加とを相関させたものが、Fig. 3 に示されている。いずれのセルラーゼ成分も CMC に対する水解様式に差異はあるが、CMC をエンド様式で水解している。直線の勾配は、DEAE-Sephadex A-50 のカラムから溶出されるそれぞれのセルラーゼ成分の溶出順序に応じて、高い値のものから低い値のものへと変化しており、セルラーゼ III のエンド水解度がもっとも低いことが特徴的である。

精製酵素の pI, 分子量 (SDS-PAGE 法) および糖含量 (グルコース換算) はそれぞれ 3.97~6.14, 55~85K および 0~25% の範囲にあった。また、精製酵素の至適 pH はいずれもおおむね 5.0 付近にあり、至適温度は 60~70°C の範囲にあった。*T. viride* のセルラーゼ系を構築するこれら13種のセルラーゼ成分のうち、天然セルロースの分解に主役を演ずる成分 (key enzyme) はセルラーゼ II-b と III である。この2成分の特筆すべき機能については後述する。

このようなセルラーゼの多様性 (多成分性) はいったい何に起因するのであろうか。現在のところ各セルラー

Fig. 4. Original C₁-C_x hypothesis.³²⁾

セ成分がそれぞれ別個の遺伝子の支配を受けて生合成されるのか、あるいは最初に1~2種の基本的なセルラーゼタンパク質（プロセルラーゼ）が *de novo* に合成され、細胞外に分泌される過程でプロテアーゼなどにより修飾を受けるためであるかは定かでない。むしろ、両方の場合が存在する可能性が高いと思われる。しかし、少なくとも CMC に対して、高いエンド水解度を示す成分や極端に低い水解度を示す成分などは、それぞれ独立した遺伝子支配を受けているのであろう。また、いくつか存在するセルラーゼ成分にあっては、その基本成分がプロテアーゼなどによる修飾を受けたために生じた可能性が高い⁷²⁾。その結果、CMC 水解の際に見られる、いわゆるエンド水解度の相違などが生ずることも考えられる。いずれにしても、セルラーゼの多様性の原因追求はセルラーゼタンパク質の改変とも関連して、今後の重要な研究課題である。

4. 既存の学説と問題点

天然セルロースの酵素分解に関しては、これまでにさまざまな学説が提唱されてきた。本節ではその代表的なものを取り上げ、紹介・解説すると共に積極的に問題点を指摘し、考察することにしてしよう。

1) C₁-C_x 説

1950年に Reese ら²⁶⁾は、綿などの天然セルロースを唯一の炭素源として種々の菌を培養すると、なかには綿などを可溶化し、最終的にはほとんど全部を分解できるもの (*T. viride* など) と、再生セルロースはよく分解しても、綿などを十分分解できないもの (*Aspergillus* 属など) が存在することを見出した。さらに、前者に属する菌でも、その培養濾液を *in vitro* で綿に作用させた場合には、著しく高い酵素濃度を用いないと、容易に分解できないことを観察した。

Reese らはこれらの結果を説明するために、天然セルロース分解菌 *T. viride* のセルラーゼには基質特異性の異なる2種の成分、C₁ および C_x 酵素が存在するこ

Fig. 5. Modified C₁-C_x hypothesis.⁷⁵⁾

とを仮定した歴史的に有名な“C₁-C_x 説”を発表した。この説では、C₁ 酵素は不溶性セルロースによく吸着するため、培養濾液中には多量に溶出されず、C_x 酵素はセルロースへの吸着力が弱いので、培養濾液中には溶出されやすいものとした。また、天然セルロースの分解機作については、C₁ 酵素によりまずセルロース鎖束に切れ目 (nick) がいれられ、ついで C₁ 酵素の切り出したセルロース断片 (fragment) を C_x 酵素により直接 G₁ にまで分解するというもので、基質特異性の違う酵素の段階的な作用を仮定した。翌年、Reese らはこの考えを訂正し、C_x 酵素はセルロース断片から G₂ を生成し、ついで β-グルコシダーゼにより G₂ は G₁ に分解されるとした⁷³⁾。1959年に至り、彼らは上述の考え方をさらに修正して、Fig. 4 のような天然セルロースの分解過程のスキームを提示した³²⁾。これがオリジナルの“C₁-C_x 仮説”の最終版である。その後、Reese は Wood らのエンド-エキソ説 (後述) に納得せず、初期の“C₁-C_x 仮説”を修正したセルロースの分解過程のスキームを提出した (Fig. 5)^{74,75)}。Reese は彼の提唱したオリジナルの C₁ の考え方に最後まで固執し、この図に示した C₁ についてもセルロースの結晶構造を“膨潤”させるようなものを想定している。

この Reese らの C₁-C_x 仮説は考え方としては見事なもので、酵素レベルでの実体が証明されないまま、その後約20年間にわたって多くの研究者によって信じられてきた。しかし、(1) 岡田ら^{38,48,49)}の指摘のように、*T. viride* のセルラーゼ成分中には独立した C₁ 酵素、C_x 酵素に相当するセルラーゼ成分は存在せず、いずれ

の成分も程度の差はあるが、両者の性質を兼ね備えた $C_1 + C_x$ の性質を示すものであったこと、(2) *T. viride* のセルラーゼ成分として、セロビオヒドロラーゼ (CBH) あるいは Avicelase などと称されるセルラーゼが出現したことなどから、Reese らの C_1-C_x 仮説は根本から再検討する必要に迫られたわけである。すでに述べたように、*T. viride* セルラーゼの多様性については、その後、多くの研究者によって調べられたが、その成分中に存在するはずの C_1, C_x 酵素については今日に至るまで、その実体については証明されていない。また、上述した 1977 年の修正仮説に出てくるような C_1 をわざわざ仮定しなくても、タンパク質化学的に均一なエンド型セルラーゼと低エンド型セルラーゼとの協同作用で綿の可溶化は容易に行われるのである。現在までに集積された知見を総合すると、Reese らの提唱した C_1-C_x 説に基づく天然セルロースの分解過程のスキームは否定されるべきものである。しかし、天然セルロースの酵素分解に、連続した 2～3 段階の反応過程を想定した Reese らの考えは妥当なものとして受け入れられている。

2) 単一酵素説

Reese らがセルラーゼの多様性に基づいた C_1-C_x 説を提唱してまもなく、Whitaker は糸状菌 *Myrothecium verrucaria* の培養濾液から超遠心分離像で均一性を示すセルラーゼ標品を得た²⁷⁾。分子量は $63,000 \pm 1600$ で、分子の形は葉巻煙草 ($33 \times 200 \text{ \AA}$) に似ていると推論された⁷⁶⁾。この精製セルラーゼは G_3 以上の一連のセロオリゴ糖、CMC、綿などをエンド様式で水解するエンドセルラーゼであった。また、本酵素は G_5 の約 $1/80$ のターンオーバー数ではあるが、 G_2 にも作用する特異性を示した²⁸⁾。上記培養濾液中にはこのセルラーゼ成分以外のセルラーゼが検出されなかったことから、Whitaker は“単一酵素説”を主張し、Reese らの“ C_1-C_x 説”と真っ向から対立した。

Whitaker は Reese ら⁷⁷⁾が *M. verrucaria* の培養濾液をリン酸カルシウムゲルのカラムクロマトグラフィーで分画して得た数個のセルラーゼ画分の存在は、培養濾液中に混在する不純物が酵素と結合した結果によるものと考えた。単一セルラーゼ成分が、不溶性のセルロースから重合度の低いセロオリゴ糖まで作用することを初めて指摘した点は大いに評価できるが、その後の研究で、*M. verrucaria* のセルラーゼも *T. viride* のそれと同様、多様性を示すことが証明された。したがって、単一セルラーゼ成分のみで結晶度の高い天然セルロースを攻撃するよりは、セルラーゼ系を構成する複数のセルラーゼ成

分の協同作用によるほうが分解効率がよいことは明白である。この時点で Whitaker の単一酵素説は陰をひそめたのである。

3) 膨潤因子および hydrogen bondase 仮説

Reese らの C_1-C_x 仮説が提唱されてまもなく、Marsh ら³⁰⁾は綿などを *T. viride* の培養濾液に浸すと、還元力が測定できないほど短時間内に、反応前の基質に比べ、18% NaOH 溶液を吸収する割合が増加することを観察した。この解釈として、Marsh らはセルロース分解菌の培養濾液中に、セルロース鎖束を弛緩させる水解酵素とは別の“膨潤因子” (swelling factor, SF) が存在するものと仮定した。すなわち、SF はセルロース分子が酵素による水解作用を受ける以前に、セルロースに作用して、酵素被水解性を容易にする役割を演じるものとした。当時 Reese ら⁷⁸⁾も SF の存在を支持する見解を述べているが、彼らの仮定した C_1 酵素との関係については明らかにしていない。その後、この SF の実体を物質レベルで証明した報告はなく、このような膨潤現象は、多様性を示すセルラーゼの各成分の相互作用による結果とみる考え方^{79,80)}や、セルロース鎖束を反応初期に水解しやすいセルラーゼ成分による攻撃の結果、鎖間に弛緩した部分が生じるためであるという考え方⁸¹⁾などが発表され、SF の存在は疑問視されるに至った。

一方、Siu^{2,31)}はセルロースの超分子構造 (supramolecular structure) を加水分解以外の方法で変化させる“hydrogen bondase”の存在の可能性を示唆した。King ら⁸²⁾は市販のアビセルから懸濁法により 650 nm の吸光度が 0.3 を示す画分を集め、*T. viride* の市販セルラーゼ製剤 (Meicelase) の溶液と反応させ、その約 50% が可溶化した時点で反応を停止し、反応前後のアビセル粒子の状態を電子顕微鏡で観察した。その結果、アビセル粒子には明らかに断片化が起こっており、 D_2O を用いた水和試験でも H-D 弛緩率は低く、断片化の活性化エネルギーも $6000 \sim 7000 \text{ cal/ml}$ で、一般の水解酵素の場合より低めであった。これらのことから、彼らはこの断片化は水解酵素によるものではなく、セルロース鎖を密接に結合している水素結合を切断し、その結果アビセル粒子と酵素とが結合しうる表面積を拡大するものと推論し、これが Reese らの C_1 酵素に相当すると考えた。その後、King は彼自身でもこの推論を支持できない結果を得ている。King のこの考え方は、前述した Siu の考え方にかなり影響を受けていたのであろう。今日に至っても、“SF”や“hydrogen bondase”の実体はいまだに不明で、むしろ彼らの考え方に否定的な見解が一般的

Fig. 6. Hypothesis involving sequential action: endoglucanase (C_x) followed by cellobiohydrolase (C_1).⁸³⁾

である。

4) エンド-エキソ説

Reese らの C_1 - C_x 説に代わる考え方として、Wood ら⁸³⁾は *T. viride* 起源のセルラーゼを用いて得た実験結果に基づいて、Fig. 6 のような天然セルロースの分解過程のスキームを提唱した。これは、エンド機作で作用する C_x 酵素がセルロース鎖束の非晶質部分を最初に攻撃し、この C_x 酵素の作用で新たに生成されたセルロース鎖の非還元末端からエキソ機作で C_1 酵素（セロビオヒドロラーゼ、CBH）が作用するというものであり、Reese らのオリジナルの考え方とはまったく違う見解である。現在では、このエンド-エキソ説が主流となっているが、はたして、天然セルロースの酵素的分解機構がこのような単純な図式で行われるのか、はなはだ疑問である。ここで注意すべきことは、前述したように、Reese らの提案した C_1 酵素と Wood らのいうエキソ型酵素の C_1 (CBH) とは根本的に意味が異なる点である。また、Reese らの仮定した C_1 , C_x 酵素の実体も確認されていないので、混乱を避けるためにも今後、 C_1 , C_x という用語は使用すべきでないことを提案したい。

5. セルラーゼ成分間の相乗作用

Reese ら³²⁾はリン酸カルシウムゲルを支持体とするカラムで、*T. viride* 培養濾液を分画して得られる3個のセルラーゼ画分 (A, B, C) のうち、A (CMC の水解に対してもっとも高いエンド水解度を示すもの) および C (同じ条件下でもっとも低いエンド水解度を示すもの) 画分を組み合わせ、興味ある結果を得た。すなわち、CMC 水解の際には見られないが、リン酸膨潤セルロース水解の場合、両画分の混合比でそれぞれ単独に作用させたときの総和より、それと同量のものを混合して作用させた場合のほうが、その水解作用は著しく高められる現象を観察した (Fig. 7)。この事実から、Reese らは複数のセルラーゼ成分がセルロース分解の際に、相互に協力し合っているのであろうと予想した。図中の A および C のいずれかが C_1 および C_x 酵素に相当するものであるとすると、 C_1 と C_x 酵素との相乗作用で天然セルロースの分解が可能となるはずであると考えた。これがセルロースの酵素糖化の際に見られる、セルラーゼ成分間の

Fig. 7. Synergistic effect of one *T. viride* component on another. Substrate=Walseth cellulose; enzyme fraction are first and last eluted from Ca-PO₄ gel column.³²⁾

相乗作用に関する最初の記述であろう。

すでに述べたように、Selby や Wood らは *T. koningii* のセルラーゼを分画・精製した際に、CMC および結晶度の高いセルロース（綿やアビセル）を基質として用いると、CMC を他の基質より容易に水解するセルラーゼ成分 (CMCase) と CMCase の共存下で、アビセルや綿の糖化の際に強い相乗作用を示すセルラーゼ成分が存在することを見出した。彼らは CMCase のほうは Reese らが仮定した C_x 酵素で、後者のセルラーゼ成分は C_1 酵素であろうと考えた。このセルラーゼ成分は CMC には非常に作用しにくく、綿よりはアビセルによく作用したことから、Avicelase と呼称された。Avicelase はアビセル水解時の生成糖として、非常に少量のグルコースと多量のセロビオースのみを与え、CMC 水解時の反応初期には速やかにこれを水解するが、その後水解作用は停止すること⁸⁴⁾などから、本酵素は Reese らの仮定した C_1 酵素ではなく、エキソ機作で作用する型のセルラーゼであろうと考えた。これらを総合して、相乗作用の発現はエンド型セルラーゼである CMCase とこのエキソ型セルラーゼとの相互作用による結果であるとした。また、これら2種のセルラーゼ成分は、綿の可溶性⁴³⁾のみではなく、木綿糸の強伸度低下にも相乗作用を示した⁸⁴⁾。

一方、富田ら⁴⁶⁾により *T. viride* の市販セルラーゼ製剤である Cellulase-Onozuka から CMCase とは免疫反応で著しい相違を示したセルラーゼ (Avicelase) が高度に精製された。この Avicelase は種々の性質から真のエ

キノ型セルラーゼとは考えにくかったが、アビセル水解の際、CMCaseと著しい相乗作用を示した。すなわち、CMCaseとAvicelaseの混液は、2種の置換度(DS)の異なるCMCや再生セルロースに対しては相乗作用を示さないが、アビセルに対しては約3倍も強い相乗作用を示した。この相乗作用は水溶性のCMCや結

晶度の低い再生セルロースでは認められず、結晶度の高いアビセルに対してのみ認められた。一方、Pettersson⁸⁵⁾らはWoodらとは別の精製法でCellulase-OnozukaからAvicelaseを精製した。CMCaseとの相乗作用に関する詳細なデータは示されていないが、とにかく相乗作用が存在することを強調している。

すでに述べたように、多くの天然セルロース分解菌は多成分性を示し、これらのセルラーゼ成分がセルラーゼ系を構築していることは間違いのない事実である。セルラーゼ系中の各酵素は、それぞれ単独では天然セルロースに対する分解力はきわめて弱い、これらのセルラーゼ成分を混合して作用させると、強い分解活性を示す。これがいわゆる相乗作用 (synergistic action) の発現であり、セルラーゼ研究のうちでは興味あることのひとつとして注目されてきた。セルラーゼ系の解析が進展するのと平行して、精製酵素を用いた際に見られる相乗作用について、種々検討が加えられた。なかでも、イギリスのWoodら¹⁵⁾は各種起源のセルラーゼ系について、かなり系統的に相乗作用の研究を行った。彼らは *T. koningii* や *F. solani* のセルラーゼ系から高純度のセルラーゼ標品を調製し、それらを綿に作用させた際の相乗作用を調べた。得られた結果を比較したものがTable 2にまとめられている。試みたいずれの糸状菌においても、エンドグルカナーゼとCBHとの組合せが、綿の

Table 2. Cellulase activity of the components of *Trichoderma koningii* and *Fusarium solani* cellulase when acting alone and in combination^{a)15)}

Enzyme	Cellulase activity (solubilization, %)	
	<i>T. koningii</i>	<i>F. solani</i>
Cellobiohydrolase (CBH)	1	2
Endo-1,4- β -glucanase (Endo)	1	1
β -Glucosidase	Nil	Nil
Endo + CBH	55	58
Endo + β -glucosidase	6	4
CBH + β -glucosidase	20	18
Endo + CBH + β -glucosidase	72	71
Original unfractionated enzyme	71	71

^{a)} All enzymes were present in the same proportions in which they were present in the original unfractionated enzyme.

Table 3. Cellulase (cotton solubilizing) activity shown by cellobiohydrolase and endo-1,4- β -glucanase from various fungi alone and in combination^{a)15)}

Source of cellobiohydrolase (CBH)	Source of endo-1,4- β -glucanase (Endo)	Solubilization (%)		
		CBH alone	Endo alone	CBH + Endo
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>T. koningii</i>	2	1	51
<i>T. koningii</i>	<i>Fusarium solani</i>	1	1	79
<i>F. solani</i>	<i>F. solani</i>	1	1	59
<i>F. solani</i>	<i>T. koningii</i>	1	1	51
<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>T. koningii</i>	1	1	51
<i>P. funiculosum</i>	<i>F. solani</i>	1	1	51
<i>P. funiculosum</i>	<i>M. verrucaria</i>	1	6	20
<i>P. funiculosum</i>	<i>Stach. atra</i>	1	4	21
<i>T. koningii</i>	<i>M. verrucaria</i>	1	6	20
<i>T. koningii</i> ^{b)}	<i>S. pulverulentum</i>	1	5	61
<i>P. funiculosum</i> ^{b)}	<i>S. pulverulentum</i>	2	5	52
<i>F. solani</i>	<i>S. pulverulentum</i>	8	5	43

^{a)} All assays contained the same amount of endo-1,4- β -glucanase, cellobiohydrolase, and β -glucosidase. β -Glucosidase from *F. solani* was added where necessary to make all assays the same in terms of this activity.

^{b)} Recent preparations of enzyme.

Fig. 8. Cooperative action toward dewaxed cotton by the purified cellulases (G. Okada and Y. Tanaka, unpublished results).

Fig. 9. Cooperative action toward dewaxed cotton by the purified cellulases (G. Okada and Y. Tanaka, unpublished results).

可溶化に対して顕著な相乗作用を示した。

さらに, Wood らは起源を異にするエンドグルカナーゼと CBH とを組み合わせ、綿の可溶化に対する相乗作用について調べた¹⁵⁾。その結果が Table 3 にまとめられている。大抵の場合、異種起源の両酵素の組合せでも、顕著な相乗作用が認められた。しかし、興味深いことには、*P. funiculosum* や *T. koningii* 由来の CBH と *M. verrucaria* や *Stachybotrys atra* 由来のエンドグルカナーゼとを組み合わせた場合、その相乗作用の度合いがかなり低いことである。各種起源のすべてのエンドグルカナーゼは CBH と協同して、なぜ同程度の相乗作用を示さないのであろうか。この疑問に対して、Wood らはエンドグルカナーゼと CBH の両酵素がなんらかの方法で複合体を形成した場合に、効果的な相乗作用を発揮するのではないかと推論している。しかし、あまり納得のいく説明ではないように思われる。

ここで、*T. viride* セルラーゼ系の構成メンバーである各種の精製酵素 (Fig. 2 参照) を用いて、天然セルロース糖化の際に見られる相乗作用について検討した筆者らの結果を紹介しよう。基質には 40mg の脱脂綿を用い、一定量の高純度各種精製セルラーゼ成分を組み合わせ、

Fig. 10. Cooperative action toward dewaxed cotton by the purified cellulases (G. Okada and Y. Tanaka, unpublished results).

40℃、4 時間反応させた際に生成する総還元糖量 (□) とグルコース量 (■) とをそれぞれ定量した。各精製セルラーゼ成分の CMC に対するエンド水解度の相違は Fig. 3 を参照されたい。相乗作用の度合いは、2 種の精製酵素を組み合わせ脱脂綿に作用させた際に生成する総還元糖量あるいはグルコース量と、それぞれを単独で作用させた際に得られるそれらの総和との比を指標とした。相乗効果 1 というのは見かけ上、相乗作用が認められないことを示している。

Fig. 8 は CMC 糖化型セルラーゼ I-b₁ と他の 5 種の精製セルラーゼ成分間の相乗作用を調べたものである。この図から明かなように、セルラーゼ I-b₁ はセルラーゼ III (CMC に対してもっとも低いエンド水解様式を示す) とのみ顕著な相乗作用が認められた。さらに、アビセル糖化型セルラーゼ II-a₁ と他の 5 種の精製セルラーゼ成分間の相乗作用を検討した (Fig. 9)。この場合もセルラーゼ II-a₁ はセルラーゼ III とのみ顕著な相乗作用を示した。これらの結果から明かなように、セルラーゼ III との組合せを除いて、各成分間では顕著な相乗作用は見られず、セルラーゼ成分間の組合せで生ずる相乗作用には低エンド型のセルラーゼ III が必須成分であるとの予測が成り立つ。

そこで、セルラーゼ I-a₂, I-b₁, I-b₂, II-a₁, II-b とセルラーゼ III との間で相乗作用を検討した。予想どおり、いずれのセルラーゼ成分もセルラーゼ III との組合せで顕著な相乗作用を示した (Fig. 10)。ところで、セルラーゼ I-a₂, I-b₁, II-b は CMC 糖化型セルラーゼであり、セルラーゼ I-b₂, II-a₁, III はアビセル糖化型セルラーゼである。セルラーゼ I-b₂ と III あるいは II-a₁ と III という組合せは、従来の考え方でいうとアビセル糖化型酵素同士、あるいは CBH 同士の組合せとなるが、このいずれの組合せにおいても高い相乗作用を示した。さらに、

セルラーゼⅢと他のセルラーゼ成分とを組み合わせ、CMCに作用させても、相乗作用はまったく認められなかった。セルラーゼⅢが厳密な意味でのエキソ型酵素であれば、CMCに対して多少なりとも相乗作用を示すはずである。この結果はセルラーゼⅢがエキソ型酵素ではなく、低エンド型のセルラーゼである可能性を間接的に示唆している。これらの実験結果は、従来提唱されてきたCMC糖化型セルラーゼあるいはエンドセルラーゼとCBHとの間で相乗作用が発現するという概念に大きな疑問を投げかけるものである。

6. CBH の非存在性

すでに述べたように、イギリスのWoodとMcCrae(1972)は*T. koningii*の培養濾液からSelbyらがC₁と呼んだセルラーゼ成分の実体を探求した。彼らはこのセルラーゼ成分を等電電気泳動でさらに精製し、精製酵素の示す種々の性質を調べた。各種セルロース性基質に対する作用様式(mode of action)を検討した結果、本酵素をエキソ型セルラーゼであると規定し、エキソセ

ロビオヒドロラーゼ[1,4-β-D-グルカン・セロビオヒドロラーゼ(CBH), EC 3.2.1.91]と命名した⁴³⁾。引き続いて、スエーデンのBerghemら(1973)⁴⁴⁾および富田ら(1974)⁴⁶⁾はそれぞれ独立して、*T. viride*の市販セルラーゼ製剤(Cellulase-Onozuka)からWoodらの得たCBHと同じタイプのセルラーゼ成分を分画・精製し、その基質特異性からこのセルラーゼを“Avicelase”と呼称した。Berghemらは本酵素をWoodらの提唱したCBHと同一のものと見なしたが、富田らは本酵素によってアビセルや綿などから少量のG₁が生成されることを問題にして、これをエキソ型に近い“less”ランダム型のセルラーゼであろうと考えた。

その後、*Fusarium solani*⁸⁶⁾, *Penicillium funiculosum*⁸⁷⁾, *T. viride* QM9414⁵⁴⁾, *Trichoderma reesei*⁸⁸⁾, *Irpex lacteus*⁸⁹⁾, *Sporotrichum pulverulentum*⁶¹⁾など種々の微生物からCBHの存在が報告されている。反応生成物中に例外なく少量のG₁が検出されるにもかかわらず、厳密な証明もなされないまま、“CBH”あるいは“エキソ型セルラーゼ”の呼称が流布・常用されている

Table 4. Hydrolysis products from various substrates at the early and late stages of incubation with cellulase III.⁹⁰⁾

Substrate ^{a)}	Early stage ^{b)}	Late stage ^{c)}	
	Low conc. ^{d)}	Low conc. ^{d)}	High conc. ^{e)}
β-PNPG	—	—	—
G ₂	—	—	G ₁ >>> G ₂
G ₃	G ₂ = G ₁	G ₂ = G ₁	G ₁ >>> G ₂
G ₄	G ₂ >> G ₃ = G ₁	G ₂ >> G ₁	G ₁ >>> G ₂
G ₅	G ₃ = G ₂ > G ₁	G ₂ > G ₁	G ₁ >>> G ₂
G ₆	G ₃ > G ₂ > G ₁	G ₂ > G ₁	G ₁ >>> G ₂
G ₇	G ₂ > G ₃ = G ₁	G ₂ > G ₁	G ₁ >>> G ₂
Cellodextrin ($\overline{\text{d. p.}}=25$)	G ₂ >> G ₁ > G ₃	G ₂ >> G ₁	G ₁ >>> G ₂
CMC	G ₂ > G ₁	G ₂ > G ₁	G ₁ >>> G ₂
Filter paper	G ₂ >> G ₁	G ₂ >> G ₁	G ₁ >>> G ₂
Avicel	G ₂ >>> G ₁	G ₂ >>> G ₁	G ₁ >>> G ₂
Cotton	G ₂ >>> G ₁	G ₂ >>> G ₁	G ₁ >>> G ₂

^{a)} The final concentrations of substrates with low concentrations of enzyme were 5 mM (β-PNPG~G₇), 1 % (w/v, cellodextrin), and 2 % (w/v, CMC~cotton), and with high concentrations of enzyme were all 3.5 % (w/v).

^{b)} Incubations with low concentrations of enzyme were done at 30°C for 5 min (β-PNPG~CMC) and at 40°C for 2 hr (filter paper~cotton).

^{c)} Incubations with low concentrations of enzyme were done at 30°C for 24 hr (β-PNPG~CMC) and at 60°C for 24 hr (filter paper~Avicel); with high concentrations of enzyme, all incubations were done at 60°C for 5 days.

^{d)} Twenty μg of cellulase III was used for 200 μl of reaction mixture.

^{e)} Six mg of cellulase III was used for 200 μl of reaction mixture.

Fig. 11. Course of glucose formation from initially pure β -D-cellobiose by cellulase III.⁹⁰⁾

のが現状である。CBH の作用で必ず出現する少量の G_1 の生成については、(1) セルロース鎖から生じた奇数の重合度を示す中間セロオリゴ糖 (G_3 や G_5 など) から生ずる可能性、(2) G_2 単位で exolytic に作用するセルラーゼが何かの間違いで、セルロース鎖の末端から低い頻度で G_1 を切り取る可能性、(3) 上記 (1)、(2) 以外で G_1 が生成される機構が存在する可能性などが考えられよう。これらの可能性について、これまでになんらの検討・解明もなされてなかった。筆者らの研究室におけるこれまでのセルラーゼ研究の経緯から、われわれはこの種のセルラーゼをエキソ型酵素と認定することに疑問を抱き、CBH の存在性について種々検討を加えた。これに関連して、最近得られた知見⁹⁰⁾について紹介しよう。

前述した Meicelase (lot No. CEPB-5019) から高いアビセル吸着性を示すセルラーゼ成分を徹底的に純化・精製し、セルラーゼⅢと名付けた。本酵素の精製過程については Fig. 2 を参照されたい。精製酵素は β -グルコシダーゼ活性をまったく示さず、PAGE, SDS-PAGE および等電点電気泳動でそれぞれ均一性を示す標品であった。セルラーゼⅢの pI 、分子量および糖含量はそれぞれ 3.97, 72,000 (SDS-PAGE 法) および 5.4% (グルコース換算) であった。本酵素は Meicelase 中に存在するアビセル糖化型セルラーゼの主成分で、全セルラーゼ量の 65% 以上を占めるものであった。セルラーゼⅢはその物理化学的・酵素化学的性質および基質特異性などから、既報の CBH と相同のセルラーゼ成分であると判断された。本酵素の基質特異性を検討する過程で、われわれは綿やアビセルに長時間、高濃度の本酵素を作用させると多量の G_1 が生成されることに気付いた。そ

Fig. 12. Possible mechanism for glucose formation from β -D-cellobiose through the condensation reaction of cellulase III followed by hydrolysis.⁹⁰⁾

こで、各種のセルロース性基質に本酵素を作用させ、反応初期および終期における生成糖を PPC で分析した結果が Table 4 にまとめられている。 β -PNPG は高濃度酵素を用いても水解されず、 G_6 からの反応初期生成糖は G_3 で、また G_4 からの反応初期生成糖中に G_1 と G_3 が明瞭に検出された。もっとも驚くべき事実は高濃度酵素を用いると、例外なく試みたすべてのセルロース性基質から多量の G_1 が生成されたことである。

次に、8.6mg の β -セロビオース (β - G_2) に 250 μ l のセルラーゼⅢ溶液 (酵素量: 8mg, pH 5.0) を 30°C で最高 10 日間作用させ、その間に生成される G_1 量をグルコスタット法で定量した。得られた結果が Fig. 11 に示されている。セルラーゼⅢは 95% 以上という予想もしない高率で、 β - G_2 から G_1 を生成する触媒能を示した。さらにこの反応混液中には、 G_1 以外に少量の G_4 , G_3 およびゲンチオビオースなども存在することが PPC および TLC 分析により確認された。これらの結果から、 G_1 およびゲンチオビオースの生成は単純な single-step の反応ではなく、縮合反応とそれに続く水解反応を伴う multi-step の反応によることが強く示唆されたわけである。現時点では、Fig. 12 に示した反応機構が、 β - G_2 から G_1 およびゲンチオビオースが生成される現象を説明するのにもっとも妥当なものであろうと考えている。すなわち、この反応の初発段階として、 β - G_2 のヘミアセタール水酸基と他方のセロビオース分子の非還元末端 C_4 -カルビノールとの間で、セルラーゼⅢが触媒する特異的な縮合反応が起こり、 G_4 が合成される。合成された G_4 は引き続いて、同一酵素により水解され、 G_3 と G_1 あるいは 2 分子の G_2 を生じ、さらに G_3 は G_2 と G_1 に水解される。一方、 β - G_2 のヘミアセタール水酸基と他方のセロビオース分子の非還元末端 C_6 -カルビノールとの間で特異的な縮合反応が起こり、6-O- β -D-セロビオ

シル-D-セロビオースが生成されるものと考えられる。引き続いて、この β -グルコ 4 糖中の 2 個の β -1,4-グルコシド結合がセルラーゼ III 自身によって非特異的に水解され、グルコースとゲンチオビオースが生成されるものと理解される。

このように、高度に精製されたセルラーゼ III は β -グルコンダーゼの関与なしに、 β -G₂ から独自の縮合・水解作用によって、多量のグルコースを生成する機能を有していることが初めて明らかにされた。ここにおいて、いわゆる CBH あるいは Avicelase と呼称されている酵素作用の結果、必ず生成される少量のグルコースの生成機構に関する長年の謎が解けたわけである。このように、セルラーゼ III は単独で天然セルロースからグルコース生成を可能とするユニークなセルラーゼであり、結晶セルロースの酵素分解に際し、きわめて重要な役割を担っているものと思われる。われわれのこの発見は、天然セルロースの酵素的分解機構を解明する上で重要な意義があるばかりでなく、少なくとも *T. viride* のセルラーゼ系においては、厳密に CBH と定義しうるセルラーゼ成分は存在しないことを意味している。そこで、われわれは CBH という名称を廃し、このタイプのセルラーゼ成分を低エンド型セルラーゼと呼称することを提案している⁹⁰⁾。

7. 天然セルロースの酵素的分解機構に関する新規概念

第 4 節で述べたように、天然セルロースの酵素分解については、これまでに種々の学説が提出されてきたが、いずれも一長一短があり、天然セルロースの酵素的分解機構に関して本質的に正しい概念を与えるものは見あたらない現状である。ところで、セルラーゼ研究の歩みが、なぜ遅々としたものであったのだろうか。その最大の理由は、基質であるセルロース分子が水に不溶性であることと、天然セルロース分解菌のセルラーゼ系の複雑さに起因するものと思われる。セルラーゼが多成分系で、しかもそのほとんどが糖タンパク質であることなどから、それらの完璧な分画・精製は莫大な時間と労力を要する困難な仕事であった。加えるに、Reese らの提唱した C₁-C₂ 仮説があまりにも見事であったので、それにとらわれ、ふりまわされた感否めない。とくに、C₁ の実体をめぐってはさまざまな考え方が派生し、それは次のような変遷の道をたどった。

Reese ら (1950)²⁶⁾ は彼らが初めて提唱したオリジナルの C₁ について、綿などの天然セルロースに対する初

期攻撃の際、セルロース繊維束を“緩ませて”可溶化させる“ある物質”と考えた。ついで、Marsh ら (1953)³⁰⁾ は天然セルロースのアルカリ膨潤性を増大させる因子 (swelling factor) が C₁ であろうと想定した。その後、King ら (1965)³⁵⁾ は固形セルロースに作用して、主として G₂ を生成するヒドロセルラーゼが C₁ であるとした。さらに、Selby ら (1967)³⁶⁾ は CMCase を一応 C₂ とし、綿セルロースの可溶化の際、C₂ と相乗効果を示すセルラーゼ画分を C₁ とみなした。

天然セルロースの酵素的分解機構を解明する上で、もっとも重要な仕事の第一はセルラーゼ系を構成する個々のセルラーゼ成分の徹底的な純化・精製とそれらの機能特性を精査することである。その第二は単離・精製された各セルラーゼ成分を再構築し、セルラーゼ系全体が天然セルロースの酵素分解にどのように関わっているかを追究することであろう。そこで、われわれは酵素精製の原点に立ちかえり、精製酵素を大量に調製するために、同一ロットの製品が多量に入手可能な *T. viride* の市販セルラーゼ製剤 (Meicelase, lot No. CEPB-5019) を研究材料に選定した。天然セルロース分解菌のなかで世界最強といわれる *T. viride* の液体培養物を用いて、天然セルロースの酵素的分解機構の完全解明を目指したわけである。個々のセルラーゼ成分の精製法に関する概要は、すでに第 3 節で述べた。Meicelase 中に存在する 13 種のセルラーゼ成分のうち、天然セルロースの酵素分解に決定的な役割を演ずる key enzyme はセルラーゼ II-b と III である。このうち、セルラーゼ III の有する特殊な機能については第 5 および 6 節で詳述した。本節ではセルラーゼ II-b の示す特異な機能⁹¹⁾を紹介し、われわれがこれまでに得た実験事実を総合して、天然セルロースの酵素的分解機構について考察することとしよう。

Meicelase から DEAE-Sephadex A-50 のカラムクロマトグラフィーで分画される FII 画分中のセルラーゼ成分を徹底的に純化・精製し、セルラーゼ II-b と名付けた。本酵素の精製過程については Fig. 2 を参照されたい。精製酵素は β -グルコンダーゼ活性をまったく示さず、PAGE, SDS-PAGE および等電点電気泳動でそれぞれ均一性を示す標品で、CMC およびアビセルの両者に高い比活性を示す典型的なエンド型セルラーゼであった。セルラーゼ II-b の pI, 分子量および糖含量はそれぞれ 4.52, 76,000 (SDS-PAGE 法) および 5.4 % (グルコース換算) であった。本酵素に関する基質特異性の検討過程で、われわれは興味ある現象に気付いた。すなわち、低濃度の G₂ に対し本酵素はまったく水解活

Fig. 13. Glucose formation at an early stage due to the action of cellulase II-b from initially pure β -(-●-) or α -D-cellobiose (-○-).⁹¹⁾

Fig. 14. Course of glucose formation due to the action of cellulase II-b from initially pure β -D-cellobiose.⁹¹⁾

性を示さないが、比較的高濃度 (100 mM) の G_2 に本酵素を作用させると、多量の G_1 の生成が見られた。そこで、われわれは、厳密にアノマー型を規定した 100 mM の β -セロビオース (β - G_2) あるいは α -セロビオース (α - G_2) に、変旋光を考慮して、比較的短時間、30°C でセルラーゼ II-b を作用させた。その際、生成される G_1 量を経時的に定量した結果が Fig. 13 に示されている。この図から明らかなように、本酵素は β - G_2 を特異的に利用して、短時間内に多量の G_1 を生成する機能を具備している。反応時間 10 分における β - G_2 から生成される G_1 量は α - G_2 から生成される量の約 23 倍にも達し、 β - G_2 からの G_1 生成曲線は直線性を示さず、むしろエキスポネンシャルな様相を呈している。さらに、 α -および β - G_2 から経時的に等量の G_1 の生成が見られないことから、この G_1 生成反応は単純な水解反応としては説明がつかない現象である。

次に、100 mM の β - G_2 に精製セルラーゼ II-b を 30°C で作用させ、反応 4 時間まで経時的に G_1 の生成を観察した結果が Fig. 14 である。 G_1 生成曲線は明らかにシグモイド型を示しており、この事実は本 G_1 生成反応が single-step の反応ではなく multi-step の反応であることを強く示唆している。この反応条件下で、反応生成糖を経時的に PPC で解析すると、生成糖は G_1 ばかりでなく少量の G_3 , G_4 , ゲンチオビオースなども確認された。この事実から、グルコースおよびゲンチオビオースの生成過程はセルラーゼⅢの場合とまったく同様の反応過程をたどるものと思われる (Fig. 12 参照)。このように、高度に精製されたセルラーゼ II-b は β -グルコシダーゼの関与なしに、 β - G_2 から独自の縮合・水解作用

No.	β - G_2 (mM)	G_4 (mM)
1	100	10
2	100	5
3	100	1
4	100	0.5
5	100	0.1
6	100	0
7	0	10

Fig. 15. Effect of cellotetraose concentrations on the sigmoidicity of glucose formation curve (G. Okada and Y. Tanaka, unpublished results).

Fig. 16. Possible mechanism for glucose and gentiobiose formation from β -D-cellobiose through the condensation reaction of cellulase II-b followed by hydrolysis (G. Okada and Y. Tanaka, unpublished results).

によって多量のグルコースを生成する機能を有していることが明らかとなった。

Fig. 15 はセルラーゼ II-b を 100 mM の β -G₂ と各種濃度のセロテトラオース (G₄) との混合基質に 30°C で作用させ、G₁ 生成量を経時的に定量したものである。反応 1 から 5 はおのおの終濃 100 mM の β -G₂ に対し、10, 5, 1, 0.5, 0.1 mM となるようにそれぞれ調製した G₄ を加えたものであり、反応 6 は β -G₂ のみ、反応 7 は G₄ のみを基質としている。G₄ のみでは、反応開始 6 分後から G₁ 生成量がほぼ横ばい状態になっている。反応 1 から 5 においては、G₄ の濃度が高まるにつれて、G₁ 生成量は経時的に増加しつづけており、しかも反応曲線はシグモイダルなカーブからほぼ直線へと変化している。この事実は、 β -G₂ からプライマーとして G₄ が生成され、さらにそれが二次的に水解されて G₁ が生成されるものと考えられる。また、反応 1 と 2 の曲線においては、その反応進行曲線が重なっており、このことから、本実験条件下では、G₄ のプライマーとしての濃度が 5 mM のときに最大水解速度を与えるものと理解される。

β -G₂ から、セルラーゼ II-b の作用で G₁ ならびにゲンチオビオースが生成される機構は、各種のデータを総合して Fig. 16 のような経路をたどるものと思われる。

Fig. 17. Proposed scheme of the cooperative action by cellulases of *T. viride* in converting native cellulose to glucose (G. Okada and Y. Tanaka, unpublished results).

この図の中心部は β -G₂ が β -1,4-グルコシド結合で縮合・転移した際に生じた G₄ からのグルコース生成機構を示しており、 β -G₂ から多量の G₁ が生成される main path を示している。また、この図の最上部と最下部は β -G₂ が β -1,6-グルコシド結合で縮合・転移し、ひきつづき水解作用を受けて、ゲンチオビオースと G₁ を生成する機構を示している。このように、 β -G₂ から、セルラーゼ II-b の有する特異な縮合・転移・水解作用によりかなり複雑な経路をたどり、多量の G₁ および少量のゲンチオビオースがそれぞれ生成されるものと思われる。

以上述べてきたように、セルラーゼ II-b はその特異な縮合・転移・水解作用により、 β -グルコシダーゼの関与なしに β -D-セロビオースから多量のグルコースを生成する特殊な機能を具備している。したがって、本酵素は *T. viride* のセルラーゼ系による天然セルロースのグルコース化の過程で、中心的な役割を演ずるセルラーゼとして位置付けられるであろう。このセルラーゼ II-b の G₁ 生成機能を考慮すると、従来から *T. viride* の β -グルコシダーゼ活性は比較的弱いといわれている点が生理的に意味をもつものと思われる。第 4 節でも述べたように、天然セルロースの酵素的分解機構についてはこれまでにさまざまなスキームが提出されてきたが、いずれも観念的で実証性に乏しい感否めない。現在、われわれはこれまでに得た知見を総合して、*T. viride* のセルラーゼ系による天然セルロースの酵素的分解機構について、Fig. 17 のスキームに示されるような新規概念を提唱している。すなわち、天然セルロースは各種のエンド型セルラーゼ (FI および FII グループ由来) と低エンド型セルラーゼ (III) の協同作用、および β -グルコ

35 **44 +** **49** **52**

Glu-Ser-Ser-Phe-Asn-Thr-Gln-Ala-Thr-**Asn-Arg-Asn-Thr-----**Asp-Gly-Ser-Thr-Asp-Tyr-

さらに, Paice ら⁹⁶⁾は *S. commune* 由来の2種のエンド- β -1,4-グルカナーゼ (EG I と EG II) のアミノ酸配列を解析し, それらのN末端側のアミノ酸配列の一部

について比較検討した。EG I の最初の 16 残基は Ala 含量に富むフラグメント (16 残基中 12 残基は Ala) であるが、EG I の Ala-17~Ser-55 と EG II の Ala-1~Ser-39 を構成する 39 残基のアミノ酸配列は両者で完全に一致していることがわかった。彼らは、EG II に欠落しているこの Ala 含量に富むフラグメントの役割について、EG I が *de novo* に合成され、細胞外に分泌される際に必要な部分で、EG II は EG I が二次的なプロテオリシスを受けて生じたものと推察している。彼らは、また EG I の活性部位と思われる周辺のアミノ酸配列 (Asn-32~Tyr-51) と *T. reesei* の CBH I⁹²⁾ の N 末端側のアミノ酸配列 (Asn-64~Gly-83) とを比較して、活性部位の“かなめ”となるアミノ酸残基の配置が両者で非常によく一致していることを指摘し、エンド型とエキソ型セルラーゼはともに、同様な触媒機構による活性発現の可能性があることを示唆した。

きわめて最近、Béguin らは嫌気性高温細菌 *Clostridium thermocellum* のエンドグルカナーゼ A について、DNA のクローニングに基づく塩基配列からその一次構造を解明している。このアミノ酸配列を *T. reesei* 由来の CBH I のそれと比較すると、ほとんど相同性がないことがわかった⁹⁷⁾。さらに彼らは、同一細菌由来のエンドグルカナーゼ、EG A および EG B の C 末端近傍のアミノ酸配列を比較して、その 23 残基に顕著なホモロジーがあり、そのうちの 16 残基は同一であることを認めた⁹⁸⁾。今後、各種起源のセルラーゼタンパク質の一次構造に関する情報が続々と集積されることであろう。比較生化学的な見地から、他のカーボヒドラーゼとの比較がぜひとも望まれるところである。また、X線結晶回折などにより、セルラーゼタンパク質の高次構造の解析も積極的に進められることを期待したい。

近年、セルロース系バイオマスの有効利用とも関連して、遺伝子工学や、細胞融合などの手法を用いて、セルラーゼ高産生株の造成・育種が試みられている。これまでのところ、細菌起源のセルラーゼ遺伝子のクローニングがカビ起源のそれよりも活発に行われている。そのおもな理由は、(1) 遺伝子工学が細菌を用いて開始されたこと、(2) 真核生物であるカビに比べて細菌の遺伝子のほうが単純であること、(3) 細菌のほうが生育・増殖のスピードが速いなどの点であらう。Whittle ら⁹⁹⁾ は *Cellulomonas fimi* の中温性セルラーゼ遺伝子を、また Cornet ら¹⁰⁰⁾ は *Clostridium thermocellum* の高温性セルラーゼ遺伝子をそれぞれ *Escherichia coli* へクローニングすることに成功した。いずれの場合も、*E. coli*

は菌体外にセルラーゼを分泌することが確認されている。さらに、Collmer ら¹⁰¹⁾ は *Thermomonospora* YX 菌の高温性セルラーゼ遺伝子を *E. coli* へクローニングした場合、セルラーゼの約 30% が菌体外に分泌され、30% が細胞周辺腔にあり、40% 程度が細胞質中に残存することを報告している。その他、*Bacillus subtilis*¹⁰²⁾ や、*Erwinia chrysanthemi*¹⁰³⁾ などからの報告もある。

さて、今後緊急に取り組まねばならない課題の一つに、セルラーゼに関する呼称の問題がある。現在、セルラーゼ (EC 3.1.1.4) は C_x 、CMCase、エンドセルラーゼ、エンド-1,4- β -グルカナーゼ、エンドグルカナーゼなどの名称で、またエキソセロビオヒドロラーゼ (CBH, EC 3.2.1.91) については、 C_1 、セロビオヒドロラーゼ、エキソグルカナーゼ、エキソセルラーゼ、Avicelase、1,4- β -セロビオシルグルカナーゼなどの名称で、それぞれ無秩序に使用されている。第 6 節で言及したように、少なくとも *T. viride* のセルラーゼ系には厳密に CBH と定義されるようなセルラーゼ成分は存在しないものと思われる。これに関連して、IUB の Enzyme Nomenclature¹⁾ における CBH の項も再検討されるべきであらう。また、第 4 節でも述べたが、 C_1 や C_x という用語は、現在の知見にまったくなじまないもので、混乱を避けるためにも使用すべきではない。グルカンはセルロースだけを意味する用語ではないので、エンドグルカナーゼの名称も使用しないほうがよいと思われる。従来、CMCase や Avicelase の名称がセルラーゼの代名詞のように用いられてきたが、CMC やアビセルは天然に存在しない基質なので、これらの名称にも問題があらう。簡便だからといって、名付けた名称にひきづられてセルラーゼの本質的な機能を見失ってはならない。セルラーゼの真の基質は、当然のことながら綿のような天然セルロースであり、筆者らは天然セルロースを分解する機能をもつ酵素が真のセルラーゼであると認識している。このあたりで、常用されている酵素名を再検討し、整理・統一すべきものとする。本稿では原則として、原著に使用されている名称をそのまま用いた。

次に、基質の問題がある。セルロース性高分子基質は水に不溶性で、その反応系は当然不均一であり、いわゆるミカエリス・メンテンの理論はまったく通用しない環境である。微結晶セルロースであるアビセルも製造ロットによりかなり結晶度に相違があるようである。CMC や HEC (ヒドロキシエチルセルロース) などの水溶性セルロース誘導体はエンド型セルラーゼを検出するための便宜的な基質であると理解すべきであらう。くりかえ

し述べたように、天然セルロース分解菌のセルラーゼは多成分系であるので、各成分相互の微細な性質などを比較検討するためには、化学構造が明瞭なセロオリゴ糖や β -PNPC などの水溶性基質を使用すべきである。一方、セルラーゼの多様性の原因が単にプロテオリシスの結果であるのか、また、各セルラーゼ成分の示す CMC に対するエンド水解度の相違は、何に起因しているのかなども検討課題である。セルロース分子の結晶領域の崩壊機作とも関連して、天然セルロースの分解時に見られるセルラーゼ成分間の相乗効果の機作の解明も大きな課題である。天然セルロースに対する酵素作用を電子顕微鏡下で子細に観察することも必要である。また、微生物におけるセルラーゼ成分の生合成機構の解明は、その多様性の解析とも関連して重要である。これまでに精製されたセルラーゼ成分の多くは、5~20%程度の糖質を含む糖タンパク質であるが、この糖鎖の役割・生理的意義も興味深い問題である。さらに、セルラーゼ成分の多様性の解析と分子機構（一次構造や高次構造と反応機構との関わり）の解明は強力に推進されるべき研究課題である。これは糖質分解酵素に共通する分子機構を理解するためにぜひとも必要なことである。

オイルショック以来、セルロース系バイオマスの有用物質への変換・利用の開発研究が活発に行われるようになった。天然セルロースは高度に結晶化され、しかもヘミセルロースやリグニンなどと共存している。そこで、すでに着手され重要な知見も得られつつあるが、セルラーゼ作用とリグニン分解との相関性についての研究をさらに積極的に推進させる必要がある。これと関連して、天然セルロースの酵素分解と酸化酵素との関わりも追求されねばならない。また、セルロース性物質の酵素糖化については、低コストで効率のよい前処理技術の開発と共に、糖化方法そのものの改良により酵素の回収・再利用をもはかるべきであろう。また、高力価酵素産生菌の検索と遺伝子工学や細胞融合などの手法による有用菌株の造成・育種も大切な研究課題である。

9. おわりに

以上、セルラーゼについて、研究の歴史的背景と推移、既存の学説、多様性と各成分間の相乗作用、エキソセロビオヒドロラーゼ (CBH)、天然セルロースの酵素的分解機構、最近の研究動向などに焦点を当てて解説すると共に、筆者らの得た最新の知見をもまじえながら、問題点の指摘や今後の展望などについても述べてきた。

精製セルラーゼを用いて得られたこれまでの研究成果

を総合すると、かつて提唱されたセルロース繊維のミセルを弛緩・開裂させる C_1 (還元糖などは生成しない) や C_1 の作用で生じたセルロース断片や水溶性基質にのみ作用する C_x などの存在をわざわざ仮定しなくても、種類のセルラーゼ成分の協同作用により、天然セルロースは還元糖にまで分解されると理解される。最近筆者らにより、(1) *T. viride* のセルラーゼ系には厳密に CBH と定義されるようなエキソ型セルラーゼは存在しないこと、(2) セルラーゼ II-b に代表される、セルラーゼ自身が行う縮合・転移・水解作用により、 β -グルコンダーゼの関与なしに、 G_2 から多量の G_1 を生成する特異な機能の存在などが明らかにされた。これらの実験事実に基づくと、*T. viride* のセルラーゼ系による天然セルロースの酵素的分解機構は前述した概念をさらに進めて、第 7 節で述べた Fig. 17 のスキームにまとめうるものと思われる。すなわち、『天然セルロースの酵素分解は、エンド水解度を異にする各種セルラーゼ成分の協同作用 (cooperative action) のもとに行われ、セルラーゼ自身の具備する縮合・転移・水解能により、最終的に多量のグルコースが生成される』と理解される。

ここに至って、天然セルロースの酵素的分解機構に関する概念は、Reese らの提唱した C_1 - C_x 説 (1950) 以来の混迷からようやく抜け出した感がある。セルラーゼの酵素学的研究は、現在本格的な研究段階にさしかかったわけで、今後の進歩・発展が大いに期待される場所である。第 8 節でも述べたように、セルラーゼをめぐる、まだまだ解明されねばならない重要な諸問題が山積している。これらの解決のためには、学問分野が細分化されている今日では、各層の研究者による効率のよい連携プレーがぜひとも必要である。また、個々のセルラーゼ成分の作用機作をより深く理解するためにも、セルラーゼにとって真の基質である天然セルロースの超分子構造の完全解明が強く望まれるゆえんである。

国連人口活動基金の予測によると、現在 48 億人の地球人口は今世紀末までに 25% 以上増加し、61 億人に達する一方で、耕地面積の増加はわずか 4% 程度しか見込めないという。いずれわが国も、食糧危機の大波を被ることは必至である。今こそ、この地球上にもっとも多量に存在するグルコースポリマー (セルロース) の活用を真剣に考慮すべき時期の到来であろう。いよいよ、セルラーゼの出番近しの感がある。多くの研究者、とくに若手研究者がセルラーゼについて、一層の興味・関心を抱いてくださることを期待しつつ、筆を置く次第である。

最後に、本総説執筆の機会を与えてくださった、日本澱粉学会会長中村道徳先生に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) International Union of Biochemistry: *Enzyme Nomenclature*, pp. 308-309(1984).
- 2) R. G. H. SIU: *Microbial Decomposition of Cellulose*, Reinhold, New York(1951).
- 3) J. A. GASCOIGNE and M. M. GASCOIGNE: *Biological Degradation of Cellulose*, Butterworths, London, pp. 52-71(1960).
- 4) G. J. HAJNY and E. T. REESE, eds.: *Cellulases and Their Applications*, *Adv. Chem. Ser.*, **95**, American Chemical Society, Washington, D. C. (1969).
- 5) T. M. WOOD: in *World Review on Nutrition and Dietetics*, Vol. 12, G. H. BOURNE, ed., Karger, Basel, pp. 227-265(1970).
- 6) D. R. WHITAKER: in *The Enzymes*, Vol. 5, P. D. BOYER, ed., Academic Press, New York, pp. 273-290(1971).
- 7) E. T. REESE and M. MANDELS: in *High Polymers*, Vol. 5, N. M. BIKALES and L. SEGAL, eds., John Wiley & Sons, New York, pp. 1079-1094 (1971).
- 8) K. NISIZAWA: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 267-304 (1973).
- 9) 西澤一俊: セルラーゼ, 南江堂, 東京(1974).
- 10) G. H. EMERT, E. K. GUM, Jr., J. A. LANG, T. H. LIU and R. D. BROWN, Jr.: in *Food Related Enzymes*, *Adv. Chem. Ser.*, **136**, J. R. WHITAKER, ed., American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 79-100(1974).
- 11) M. BAILEY, T. M. ENARI and M. LINKO, eds.: *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, Aulanko, Helsinki(1975).
- 12) 西澤一俊: 蛋白質 核酸 酵素, **22**, 960-976(1977).
- 13) R. D. BROWN, Jr. and L. JURASEK, eds.: *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*, *Adv. Chem. Ser.*, **181**, American Chemical Society, Washington, D. C. (1979).
- 14) 岡田巖太郎: 化学と生物, **23**, 14-22(1985).
- 15) K.-E. ERIKSSON and T. M. WOOD: in *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, T. HIGUCHI, ed., Academic Press, New York, pp. 469-503(1985).
- 16) 村尾沢夫, 荒井基夫, 坂本禮一郎: セルラーゼ, 講談社, 東京(1987).
- 17) W. A. WOOD and S. T. KELLOGG, eds.: *Methods in Enzymology*, Vol. 160, Biomass Part A Cellulose and Hemicellulose, Academic Press, New York (1988).
- 18) G. SEILLIÈRE: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **61**, 205-206(1906).
- 19) H. PRINGSHEIM: *Z. Physiol. Chem.*, **78**, 266-291 (1912).
- 20) P. KARRER, P. SCHUBERT and W. WEHRLI: *Helv. Chim. Acta*, **8**, 797-810(1925).
- 21) P. KARRER and P. SCHUBERT: *Helv. Chim. Acta*, **9**, 893-905 (1926); **10**, 430-440 (1927); **11**, 229-230 (1928).
- 22) P. KARRER and P. O. MANGELLI: *Helv. Chim. Acta*, **12**, 989-990(1929).
- 23) W. GRASSMANN, L. ZECHMEISTER, G. TOTH and R. STADLER: *Ann. Chem.*, **503**, 167-179(1933).
- 24) K. FREUDENBERG and T. PLOETZ: *Z. Physiol. Chem.*, **259**, 19-27(1939).
- 25) 宮本三七郎, 西澤一俊: 陸軍獣医団報, **396**, 778-787(1942).
- 26) E. T. REESE, R. G. H. SIU and H. S. LEVINSON: *J. Bacteriol.*, **59**, 485-497(1950).
- 27) D. R. WHITAKER: *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 253-268(1953).
- 28) D. R. WHITAKER: *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 436-438, 439-449(1954).
- 29) K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **42**, 825-835(1955).
- 30) P. B. MARSH, G. V. MEROLA and M. E. SIMPSON: *Textile Res. J.*, **23**, 831-841(1953).
- 31) R. G. H. SIU: in *Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials*, E. T. REESE, ed., Pergamon Press, Oxford, pp. 257-259(1963).
- 32) E. T. REESE: in *Marine Boring and Fouling Organisms*, D. L. RAY, ed., University of Washington, Seattle, pp. 265-300(1959).
- 33) K. SELBY: in *Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials*, E. T. REESE, ed., Pergamon Press, Oxford, pp. 33-49(1963).
- 34) K. SELBY, C. C. MAITLAND and K. V. A. THOMPSON: *Biochem. J.*, **88**, 288-296(1963).
- 35) K. W. KING: *J. Ferment. Technol.*, **43**, 79-92 (1965).
- 36) K. SELBY and C. C. MAITLAND: *Biochem. J.*, **104**, 716-724(1967).
- 37) K. SELBY: in *Cellulases and Their Applications*, G. J. HAJNY and E. T. REESE, eds., American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 34-52 (1969).
- 38) G. OKADA, K. NISIZAWA and H. SUZUKI: *J. Biochem.*, **63**, 591-607(1968).
- 39) 小川喜八郎, 外山信男: 醸工, **50**, 236-243(1972).
- 40) W. O. STORVICK and K. W. KING: *J. Biol. Chem.*, **235**, 303-307(1960).
- 41) W. O. STORVICK, F. E. COLE and K. W. KING: *Biochemistry*, **2**, 1106-1110(1963).
- 42) K. W. KING: in *Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials*, E. T. REESE, ed., Pergamon Press, Oxford, pp. 159-170(1963).
- 43) T. M. WOOD and S. I. MCCRAE: *Biochem. J.*, **128**, 1183-1192(1972).
- 44) L. E. R. BERGHEM and L. G. PETTERSSON: *Eur.*

- J. Biochem.*, **37**, 21-30(1973).
- 45) L. E. R. BERGHEM, L. G. PETTERSSON and U.-B. AXIÖ-FREDRIKSSON: *Eur. J. Biochem.*, **53**, 55-62(1975).
 - 46) Y. TOMITA, H. SUZUKI and K. NISIZAWA: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 233-246(1974).
 - 47) G. OKADA: *J. Biochem.*, **77**, 33-42(1975).
 - 48) G. OKADA and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **78**, 297-306(1975).
 - 49) G. OKADA: *J. Biochem.*, **80**, 913-922(1976).
 - 50) L. E. R. BERGHEM, L. G. PETTERSSON and U.-B. AXIÖ-FREDRIKSSON: *Eur. J. Biochem.*, **61**, 621-630(1976).
 - 51) L. E. R. BERGHEM, L. G. PETTERSSON: *Eur. J. Biochem.*, **46**, 295-305(1974).
 - 52) S. P. SHOEMAKER and R. D. BROWN, Jr.: *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 147-161(1978).
 - 53) E. K. GUM, Jr. and R. D. BROWN, Jr.: *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 371-386(1976).
 - 54) G. BELDMAN, M. F. SEARLE-VAN LEEUWEN, F. M. ROMBOUTS and F. G. J. VORAGEN: *Eur. J. Biochem.*, **146**, 301-308(1985).
 - 55) A. G. J. VORAGEN, G. BELDMAN and F. M. ROMBOUTS: *Methods Enzymol.*, **160**, 243-251(1988).
 - 56) R. IKEDA, T. YAMAMOTO and M. FUNATSU: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1153-1159, 1169-1175(1973).
 - 57) P. L. HURST, J. NIELSEN, P. A. SULLIVAN and M. G. SHEPHERD: *Biochem. J.*, **165**, 33-41(1977).
 - 58) P. L. HURST, P. A. SULLIVAN and M. G. SHEPHERD: *Biochem. J.*, **167**, 549-556(1977).
 - 59) P. L. HURST, P. A. SULLIVAN and M. G. SHEPHERD: *Biochem. J.*, **169**, 389-395(1978).
 - 60) G. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1257-1265(1985).
 - 61) K.-E. ERIKSSON and B. PETTERSSON: *Eur. J. Biochem.*, **51**, 193-206, 213-218(1975).
 - 62) 神田鷹久, 若林和正, 西澤一俊: 醸工, **48**, 607-615(1970).
 - 63) T. KANDA, K. WAKABAYASHI and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **79**, 977-988(1976).
 - 64) T. KANDA, S. NAKAKUBO, K. WAKABAYASHI and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **84**, 1217-1226(1978).
 - 65) K. YAMANE, H. SUZUKI and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **67**, 19-35(1970).
 - 66) K. NAKAMURA and K. KITAMURA: *Methods Enzymol.*, **160**, 211-216(1988).
 - 67) T. K. NG and J. G. ZEIKUS: *Methods Enzymol.*, **160**, 351-355(1988).
 - 68) T. M. WOOD: *Methods Enzymol.*, **160**, 216-221(1988).
 - 69) M. G. PAICE and L. JURASEK: in *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*, Adv. Chem. Ser., **181**, R. D. BROWN, Jr. and L. JURASEK, eds., American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 361-374(1979).
 - 70) T. KANDA, C. F. BREWER, G. OKADA and E. J. HEHRE: *Biochemistry*, **25**, 1159-1165(1986).
 - 71) 岡田厳太郎, 田中義正: 第11回糖質シンポジウム講演要旨集, pp. 107-108, 岐阜(1988).
 - 72) M. NAKAYAMA, Y. TOMITA, H. SUZUKI and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **79**, 955-966(1976).
 - 73) H. S. LEVINSON, G. R. MANDELS and E. T. REESE: *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**, 351-365(1951).
 - 74) E. T. REESE: in *Biological Transformation of Wood by Microorganisms*, W. LEISE, ed., Springer Verlag, New York, pp. 165-181(1975).
 - 75) E. T. REESE: *Recent Adv. Phytochem.*, **VII**, 311-367(1977).
 - 76) D. R. WHITAKER, J. R. COLVIN and W. H. COOK: *Arch. Biochem. Biophys.*, **49**, 257-262(1954).
 - 77) W. GILLIGAN and E. T. REESE: *Can. J. Microbiol.*, **1**, 90-107(1954).
 - 78) E. T. REESE and W. GILLIGAN: *Textile Res. J.*, **24**, 663-669(1954).
 - 79) G. YOUATT and M. A. JERMYN: in *Marine Boring and Fouling Organisms*, D. L. RAY, ed., University of Washington, Seattle, pp. 397-409(1959).
 - 80) G. YOUATT: *Textile Res. J.*, **32**, 158-160(1962).
 - 81) T. NISIZAWA, H. SUZUKI and K. NISIZAWA: *J. Ferment. Technol.*, **44**, 659-668(1966).
 - 82) T. H. LIU and K. W. KING: *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 462-470(1967).
 - 83) T. M. WOOD and S. I. MCCRAE: in *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*, Adv. Chem. Ser., **181**, R. D. BROWN, Jr. and L. JURASEK, eds., American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 181-209(1979).
 - 84) T. M. WOOD and S. I. MCCRAE: in *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, M. BAILEY, T.-M. ENARI and M. LINKO, eds., Aulanko, Helsinki, pp. 231-254(1975).
 - 85) L. G. PETTERSSON: in *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, M. BAILEY, T.-M. ENARI and M. LINKO, eds., Aulanko, Helsinki, pp. 255-260(1975).
 - 86) T. M. WOOD and S. I. MCCRAE: *Carbohydr. Res.*, **57**, 117-133(1977).
 - 87) T. M. WOOD, S. I. MCCRAE and C. C. MACFARLANE: *Biochem. J.*, **189**, 51-65(1980).
 - 88) M. SCHÜLEIN: *Methods Enzymol.*, **160**, 234-242(1988).
 - 89) T. KANDA and K. NISIZAWA: *Methods Enzymol.*, **160**, 403-408(1988).
 - 90) G. OKADA and Y. TANAKA: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2981-2984(1988).

- 91) G. OKADA and Y. TANAKA: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 617-619(1988).
- 92) S. SHOEMAKER, V. SCHWEICKART, M. LADNER, D. GELFAND, S. KWOK, K. MYAMBO and M. INNIS: *Biotechnology*, **1**, 691-696(1983).
- 93) L. G. FÄGERSTAM, L. G. PETTERSSON and J. Å. ENGSTRÖM: *FEBS Lett.*, **167**, 309-315(1984).
- 94) R. BHIKHABHAI and L. G. PETTERSSON: *FEBS Lett.*, **167**, 301-308(1984).
- 95) M. YAGUCHI, C. ROY, C. F. ROLLIN, M. G. PAICE and L. JURASEK: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 408-411(1983).
- 96) M. G. PAICE, M. DESROCHERS, D. RHO, L. JURASEK, C. ROY, C. F. ROLLIN, E. DE MIGUEL and M. YAGUCHI: *Biotechnology*, **2**, 535-539(1984).
- 97) P. BÉGUIN, P. CORNET and J.-P. AUBERT: *J. Bacteriol.*, **162**, 102-105(1985).
- 98) O. GRÉPINET and P. BÉGUIN: *Nucleic Acid Res.*, **14**, 1791-1799(1986).
- 99) D. J. WHITTLE, D. G. KIBURN, R. A. J. WARREN and R. C. MILLER, Jr.: *Gene*, **17**, 139-145(1982).
- 100) P. CORNET, D. TRONIK, J. MILLET and J.-P. AUBERT: *FEMS Microbiol. Letts.*, **16**, 137-141(1983).
- 101) A. COLLMER and D. B. WILSON: *Biotechnology*, **1**, 594-601(1983).
- 102) N. MURPHY, D. J. MCCONNEL and B. A. CANTWELL: *Nucleic Acid Res.*, **12**, 5355-5367(1984).
- 103) F. VAN GIJSEGEM, A. TOUSSAINT and E. SCHOONEJANS: *EMBO J.*, **4**, 787-792(1985).