[澱粉科学 (Denpun Kagaku) 第 37 巻 第 4 号 p.287~298 (1990)]

平成 2 年度 日本澱粉学会賞受賞講演

Trichoderma viride の加水分解酵素に関する研究

岡 田 巖 太 郎*

Studies on the Hydrolases from *Trichoderma viride*

Gentaro OKADA

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

Twelve cellulase components and a β -glucosidase were extensively purified to essential homogeneity from a commercial crude cellulase preparation from *Trichoderma viride* (Meicelase) by a multi-step procedure involving Amberlite CG-50 and DEAE-Sephadex A-50 column chromatographic fractionations, affinity chromatography, isoelectric focusing, and gel filtration on Bio-Gel P-100. The purified enzymes were designated as cellulases I-a₁, I-a₂, I-a₃, I-b₁, I-b₂, II-a₁, II-b, II-c, III-a₂, III, and IV, and were judged to be homogeneous on polyacrylamide gel and SDS-polyacrylamide gel as well as ampholine electrophoresis. All purified cellulases were completely free from β -glucosidase.

The physicochemical and enzymatic properties of the purified enzymes were studied in detail and compared with each other. Of the twelve cellulase components, cellulases II-b and III were found to be the "key enzymes" in the cellulase system of *T. viride*. The purified cellulase II-b possessed a potent ability to produce glucose specifically from β -D-cellobiose through enzymic reversion and transcellobiosylation without any participation of β -glucosidase. It was strongly suggested that cellulase II-b would play an important role in glucose production in the enzymatic degradation of native cellulose. On the other hand, the purified cellulase III showed a high level of glucose production from crystalline cellulose by a multi-step reaction involving condensation followed by hydrolysis.

The purified cellulase III corresponded absolutely to the known cellobiohydrolase (CBH, EC 3.2.1.91) judging from its physicochemical properties and substrate specificities. Even though cellobiose was the predominant product in the initial hydrolysis stage, it was clearly demonstrated from the experimental results that cellulase III was not 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase (CBH) but rather essentially a glucose-forming enzyme. Consequently, so-called CBH does not exist, at least in the cellulase system of *T. viride*. Now, we present the proposed scheme of the cooperative action by cellulases from *T. viride* in converting native cellulose to glucose.

このたびは、はからずも栄誉ある日本澱粉学会賞をいただき、身に余る光栄と存じますとともに、心から感謝いたしております。ご推薦くださいました三輪泰造東日本支部長ならびに後藤富士雄中部支部長、ご選考をいただきました中村道徳会長はじめ、選考委員の諸先生方、ご支援を賜りました会員の皆様に、心より厚くお礼を申

しあげます。

1. はじめに

私が *T. viride* のセルラーゼ系に関する研究に手を染めてから、早くも四半世紀が経過いたしました。本菌のセルラーゼ系の完全解明を目指して、何度か挑戦いたしました。セルラーゼが多成分系であるため、ゴールに至る道のりは険しく、満足のいく結果がなかなか得られ

* 静岡大学教育学部生物学教室 (422 静岡市大谷 836)

ませんでした。その間の研究経緯につきましては、すでに本誌¹⁾に述べる機会を得ましたので、今回は省略いたします。

ご承知のように、天然セルロース分解菌の産生する菌体外セルラーゼは、作用様式の異なる複数の酵素から構成される複合酵素系を構築しております。微生物起源のセルラーゼ系について、その多様性の解析を進める中で、現在広く一般に受け入れられている (1) セルラーゼに対する各種の呼称、(2) エキソセロビオヒドロラーゼ (CBH, EC 3.2.1.91) の存在性、(3) 各種セルラーゼ成分の作用機作、(4) 天然セルロースの酵素的分解機構などに関する従来の定説に強い疑問を抱くに至りました。

そこで、天然セルロース分解菌の中では世界最強といわれる *T. viride* のセルラーゼ系を研究材料として再度取りあげ、その構成要員である個々のセルラーゼ成分の効率的な高純度精製法を確立し、精製酵素の示す分子特性ならびに酵素学的特性を精査することにより、セルラーゼが発揮する本質的な機能特性を究明し、天然セルロースの酵素的分解機構の完全解明を目指しました。これ

らの点につきまして、われわれの研究室で蓄積された最近の知見を中心に述べることにいたします。

2. セルラーゼ成分の精製と性質

われわれは、これまで数度にわたり、*T. viride* のフスマ固形培養物から得た市販セルラーゼ製剤 (明治製菓 K. K. 製) を用いて、主要なセルラーゼ成分の特性解析を行ってまいりましたが²⁻⁷⁾、本菌の構築するセルラーゼ系の全貌を理解するまでには至りませんでした。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, 明治製菓 K. K. 製) も調製されるようになりました。そこで数年前より、*T. viride* セルラーゼ系の完全解明を意図し、Meicelase (lot No. CEPB-5019) の原末を酵素精製の出発材料に用いて、研究を展開いたしました。これは、われわれの *T. viride* セルラーゼ系解明へ向けての、3 度目の挑戦であります。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効率的な完全精製法を確立し、報告いたしました^{1,8)}。今回も、1968 年に岡田ら³⁾により確立された

陽イオン交換体 Amberlite CG-50, 次いで DEAE 系の陰イオン交換体を用いる精製法を踏襲いたしました。本法の特徴は、複雑な精製過程の第一段階で、Amberlite CG-50 のカラムクロマトを用いる点にあり、この段階で大部分のセルラーゼ成分と 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ります。

Amberlite CG-50 のカラムクロマトで得られた Peak II セルラーゼ画分および Peak III 画分をイオン交換クロマト、等電点電気泳動、ゲル濾過法などを適宜組合せて、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・精製いたしました。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 (セルラーゼ 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することができました。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す標品であります。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ります。これら 13 種のセルラーゼ成分の分画・精製法の全貌が、Fig. 1 にまとめられております。われわれの実施したこの分画法が、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まます。

これら 13 種のセルラーゼ系構成成分のうち 10 種のセルラーゼ成分 (セルラーゼ I-a₁, I-a₂, I-b₁, I-b₂, II-a₁, II-b, II-c, III-a₁, III-a₂, III) および β -グルコシダーゼが示す基本的な性質が Table 1 にまとめられています。精製酵素の pI, 分子量, 糖含量 (グルコース換算) はそれぞれ 3.97~6.14, 55~85 kd, 0~25% の範囲にあります。各精製セルラーゼ成分は CMC (カルボキシメチルセルロース) やアビセル (微結晶セルロース) に対する比活性値はそれぞれかなり異なっているものの、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 の範囲にあります。また、 β -グルコシダーゼの性質は他のセルラーゼ成分のそれとは若干異なっております。

Table 2 は *T. viride* のセルラーゼ系を構成する高度に精製された主要な 8 種のセルラーゼ成分と 1 種の β -グルコシダーゼについて、アミノ酸分析の結果をまとめたものです。セルラーゼ I-a₁, I-a₂, I-b₁ のグループ、セルラーゼ I-b₂, II-a₁ のグループ、セルラーゼ II-b, III-a₁, III のグループがそれぞれ相対的に類似したアミノ酸組成を示していますが、 β -グルコシダーゼのそれは個

Table 1. Physicochemical and enzymatic properties of the purified cellulases from *T. viride* (unpublished results).

	Cellulases											
	I-a ₁	I-a ₂	I-b ₁	I-b ₂	II-a ₁	II-b	II-c	III-a ₁	III-a ₂	III	β	
Isoelectric point (pI)	6.14	4.91	4.36	4.88	4.41	4.52	4.11	4.10	3.63	3.97	5.30	
Molecular weight (SDS-PAGE)	55,000	55,000	56,000	71,000	66,000	76,000	70,000	66,000	63,000	72,000	85,000	
Carbohydrate content ^{a)}	15.6%	11.4%	15.5%	19.3%	25.1%	12.5%	11.6%	4.3%	4.7%	5.4%	< 1%	
Specific activities ^{b)} { CMC Avicel	23.75 0.057	27.25 0.15	23.86 0.40	0.411 0.20	1.87 0.67	35.90 0.36	16.54 0.349	0.056 0.065	0.015 0.050	0.0085 0.123	28.0 ^{d)}	
Optimum pH	4.8	4.8	4.8	5.0	5.0	4.8	5.0	4.5	5.0	4.7	5.0	
pH Stabilities ^{c)} { 4°C, 24 hr 45°C, 2 hr	3.2-8.0 3.7-7.0	3.2-8.0 3.7-7.0	3.2-8.0 3.7-7.0	3.2-8.0 3.7-7.0	3.2-8.0 3.7-6.5	3.2-8.0 4.2-7.0	3.2-7.5 3.3-6.0	3.2-8.0 3.5-7.0	3.2-8.0 3.5-7.0	3.2-8.0 4.0-8.0	4.2-7.5 4.8-6.8	
Optimum temperature	68°C	68°C	65°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	70°C	
Thermal stability ^{c)}	≤65°C	≤65°C	≤55°C	≤55°C	≤55°C	≤55°C	≤55°C	≤55°C	≤55°C	≤58°C	≤55°C	
Anomeric form of products	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	

a) Calculated as glucose. b) Unit/mg protein. c) Ranges to keep the full activity. d) Aryl β -glucosidase activity.

Table 2. Amino acid compositions of the purified cellulases from *T. viride* (unpublished results).

Amino acid	Molar ratio (%)								
	I-a ₁	I-a ₂	I-b ₁	I-b ₂	II-a ₁	II-b	III-a ₁	III	β
Arginine	3.30	2.51	2.53	2.72	2.49	1.83	1.88	1.74	3.43
Lysine	1.52	1.59	1.60	2.28	2.26	2.50	2.94	2.86	3.34
Histidine	1.43	1.28	1.17	1.02	1.25	1.59	0.92	1.18	1.26
Phenylalanine	2.53	3.17	3.26	2.60	2.85	1.99	3.74	2.97	2.86
Tyrosine	4.11	4.24	4.29	4.89	4.99	5.34	3.74	5.31	3.50
Leucine	5.58	6.46	6.57	7.22	7.10	5.98	5.49	5.79	6.94
Isoleucine	4.58	5.55	5.58	3.81	3.86	2.78	2.21	2.20	5.10
Methionine	0.61	0.61	0.65	1.12	0.82	1.41	0.75	1.30	0.88
Valine	5.58	5.29	5.40	5.17	5.83	5.14	4.61	4.90	8.25
Alanine	8.66	8.36	8.44	13.00	11.73	6.66	7.32	6.75	10.39
Glycine	11.31	11.51	11.39	9.22	9.94	12.15	12.88	13.48	11.12
Proline	6.36	4.66	4.84	7.24	7.43	6.82	5.39	5.23	5.68
Glutamic acid	7.02	8.20	7.62	6.68	6.36	6.64	7.64	8.37	6.83
Serine	11.82	9.52	9.37	9.26	8.86	11.11	11.07	11.24	7.51
Threonine	12.07	10.70	10.61	8.25	8.73	11.19	11.00	11.08	7.13
Aspartic acid	11.10	12.65	12.95	11.66	11.96	13.92	13.18	12.58	12.77
Tryptophan	0.90	2.45	2.41	2.53	2.37	0.98	1.96	0.97	1.92
Cystine	1.52	1.47	1.32	1.35	1.17	1.97	3.78	2.05	1.08

Table 3. Compositions of the major cellulase components in Meicelase (unpublished results).

Enzyme	Content (%)
I-a ₂	8.2
I-b ₂	17.3
II-a ₁	1.7
II-b	4.3
III	68.5

個のセルラーゼ成分とはかなり異なった組成を示しております。また、Meicelase 中に存在する 5 種のセルラーゼ成分 (セルラーゼ I-a₂, I-b₂, II-a₁, II-b, III) の含有比をまとめたものが、Table 3 であります。セルラーゼ III が最も多量に存在する成分で、全体の 70% 近くを占めております。ここで注目すべき事実は、セルラーゼ I-b₂, II-a₁, III がいわゆるアビセル糖化型セルラーゼであり、これら 3 種で全体の 90% 近くを占めていることです。

精製酵素のうち、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、経時的に得られる反応混液の粘度低下力 (ϕ_{sp}) と還元力の増加とを相関させた結果が、Fig. 2 に示されています。

Fig. 2. Relationships between increases in fluidity and reducing power during the hydrolysis of CMC by the purified cellulases and a crude enzyme.¹⁾

いずれのセルラーゼ成分も、CMC に対する水解様式に程度の差はありますが、CMC をエンド様式で水解しております。それぞれの直線の勾配はエンド水解度の程度

を示しておりますが、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、勾配値の高いものから低いものへと変化しており、セルラーゼ III のエンド水分解度が最も低いことが特徴的です。T. viride のセルラーゼ系を構築する 13 種のセルラーゼ成分のうち、天然セルロースの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 であり、両酵素が発揮する特筆すべき機能を中心に、これから順次述べてまいります。

3. セルラーゼ II-b の機能特性^{1,8-10)}

Meicelase を第 1 回 DEAE-Sephadex A-50 のカラムクロマトで分画し、その際得られる FII 画分中の主セルラーゼ成分を高純度に精製し、セルラーゼ II-b と名付けました。本酵素の精製過程については Fig. 1 を、また基本的な性質については Table 1 をそれぞれ参照してください。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、CMC およびアビセルの両者に高い比活性値を示す典型的なエンド型セルラーゼであります。

セルラーゼ II-b 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きました。すなわち、低濃度のセロビオース (G_2) に対し、本酵素はまったく水分解活性を示しませんが、比較的高濃度 (100 mM) の G_2 に本酵素を作用させると、驚くほど多量のグルコース

(G_1) が生成されました。そこで、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、30°C で比較的短時間セルラーゼ II-b を作用させ、経時的に生成される G_1 を定量した結果が Fig. 3A に示されています。この図から明かなように、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おります。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、また 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ます。一方、100 mM の α -あるいは β - G_2 に T. viride 起源の精製 β -グルコシダーゼを作用させると、両アノマーから経時的に等量の G_1 を生成いたします (Fig. 3B)。したがって、セルラーゼ II-b の作用で β - G_2 から G_1 が生成される反応は、単純な水解反応としては説明が付きません。

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、反応開始後 4 時間まで経時的に G_1 の生成を観測した結果が Fig. 4 に示されております。 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 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ます。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、生成糖には多量の G_1 ばかりでなく、少量のセロトリオース (G_3)、セロテトラオース (G_4)、ゲンチオビオースなども確認されました。このように、高純度に精製されたセ

Fig. 3. Glucose formation at an early stage due to the action of cellulase II-b⁹⁾ or β -glucosidase from initially pure β - (●) or α -D-cellobiose (○).

Fig. 4. Course of glucose formation due to the action of cellulase II-b from initially pure β -D-cellobiose.⁹⁾

Fig. 5. Effects of cellotetraose concentrations on the sigmoidicity of glucose formation curve.¹⁾

ルラーゼ II-b は β -グルコシダーゼの関与なしに、 β -G₂ から独自の縮合・転移・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明らかとなりました。

Fig. 5 は精製セルラーゼ II-b を 100 mM の β -G₂ と各種濃度の G₄ との混合基質に 30°C で作用させ、経時的に生成される G₁ を定量した結果を示しております。反応 1 から 5 はそれぞれ最終濃度 100 mM の β -G₂ に対し、10, 5, 1, 0.5, 0.1 mM の G₄ をそれぞれ添加した混合基質であり、反応 6 は β -G₂ のみを、反応 7 は G₄

のみを基質としております。G₄ のみでは、反応開始 6 分後から G₁ 生成量がほぼ平衡に達しております。反応 1 から 5 においては、G₄ の濃度が上昇するのに伴い、G₁ 生成量は経時的に増加し、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ます。この事実は、初発反応により β -G₂ からプライマーとして G₄ が生成され、次いで G₄ が二次的な水解作用を受けて、G₁ が生成されるものと考えられます。また、反応 1 と 2 においては、その反応曲線が重なっており、本実験条件下では、プライマーとしての G₄ の濃度が 5 mM のとき

Fig. 6. Courses of the formation of products due to the action of cellulase II-b from initially pure β -D-cellobiose (unpublished results).

に、最大水解速度を与えるものと理解されます。

さらに、100 mM の β -G₂ にセルラーゼ II-b を 30°C で作用させ、反応混液を逆相 HPLC にかけて、各種生成糖の量比を経時的に定量した結果が Fig. 6 に示されています。図から明らかなように、反応初期に、まず G₄ が生成されます。一方、G₃ の立ち上がりにはかなりのラグが認められます。この事実は、本反応の初発段階として、縮合により G₄ が生成され、それが二次的に水解されることにより G₁ と G₃ が生成されることを示しております。反応が進行するのに伴い、セロペンタオース (G₅)、セロヘキサオース (G₆) なども確認されました。

β -G₂ から、セルラーゼ II-b の作用で G₁, G₃, G₄, ゲンチオビオースなどが生成される機構は、各種のデータを総合して Fig. 7 のような経路をたどるものと思われます。図の中心部、すなわちルート B は β -G₂ が β -1, 4-グルコシド結合で縮合・転移した際に生ずる 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 です。またこの図のルート C および A は、それぞれ β -G₂ が β -1, 6-グルコシド結合で縮合および転移した際に生ずる 6-O- β -D-セロビオシル-D-セロビオースが二次的な水解作用を受けて、少量のゲンチオビオースと G₁ が生成される経路を示しています。このように、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

Fig. 7. Possible mechanism for glucose and gentiobiose formation from β -D-cellobiose through the condensation or transcellobiosylation reaction of cellulase II-b followed by hydrolysis.¹⁾

り、 β -G₂ から多量の 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ます。

4. セルラーゼ III と CBH との関係^{1, 11-13)}

Meicelase 中に存在し、アビセルに高い吸着特性を示すセルラーゼ成分を高度に純化・精製し、セルラーゼ III と名付けました。本酵素の精製過程については Fig. 1 を、また基本的な性質については Table 1 をそれぞれ参照してください。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 および等電電気泳動でそれぞれ均一性を示す標品で、アビセルに対しては高い比活性値を示しますが、CMC には極度に作用しにくい低エンド型セルラーゼであります。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、全セルラーゼ量のおよそ 70% を占めるものであります (Table 3)。セルラーゼ III はその物理化学的・酵素学的諸性質および基質特異性などに基づいて、既報の CBH (エキソセロビオヒドロラーゼ, EC 3.2.1.91) と相同のセルラーゼ成分であると判断されました。

そこで、T. viride のセルラーゼ系の構成メンバーである各種の精製酵素 (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、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いたしました。40mg の脱脂綿を基質に用い、一定量の各種高純度セルラーゼ成分を組合せて、40°C、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 (■) とをそれぞれ別個に定量いたしました。各精製セルラーゼ成分の

Fig. 8. Cooperative action toward dewaxed cotton by the purified cellulases.¹⁾

CMC に対するエンド水解度の相違については Fig. 2 を参照してください。相乗作用の程度は、2 種の精製酵素を組合せて、脱脂綿に作用させた際に生成され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ました。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おります。Fig. 8 に見られるように、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ますが、とくにセルラーゼ II-b と III の組合せにおいて、最大の相乗作用が認められました。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ります。セルラーゼ I-b₂ と III およびセルラーゼ II-a₁ と III という組合せは、従来の考え方ではアビセル糖化型酵素同士、あるいは CBH 同士の組合せとなりますが、いずれの組合せにおいても高い相乗作用を示しました。セルラーゼ III と他のセルラーゼ成分とを組合せて CMC に作用させても、相乗作用はまったく認められませんでした。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ります。この結果はセルラーゼ III がエキソ型酵素ではなく、低エンド型セルラーゼである可能性を間接的に示唆しております。

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高濃度の本酵素を長時間作用させると、多量の G₁ が生成される事実気付きました。そこで、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 に示されております。β-PNPG は高濃度酵素を用いても水解されず、G₆ からの反応初期生成糖は G₃ で、また G₄ からの反応初期生成糖中に G₁ と G₃ が明

瞭に検出されました。最も驚くべき事実は、高濃度酵素を用いると、試みたすべてのセルロース性基質から例外なく多量の G₁ の生成が確認されたことであります。

次に、β-G₂ (100 mM) に高濃度のセルラーゼ III を 30°C で、最高 10 日間作用させ、その間に生成される G₁ を定量した結果が Fig. 9 に示されています。本実験条件下で、セルラーゼ III は 95~97% という予想もしない高率で、β-G₂ から G₁ を生成する触媒能を示しました。さらに、上記反応混液中には、多量の G₁ 以外に少量の G₄, G₃ 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ました。これらの結果から、G₁ およびゲンチオビオースの生成は単純な single-step の反応によるのではなく、縮合反応とそれに続く水解反応を伴う multi-step の反応によるものが強く示唆されました。現時点では、Fig. 10 に示した反応機作が、β-G₂ から G₁ 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と考えております。すなわち、この反応の初発段階として、β-G₂ 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性末端 C4-カルビノールとの間で縮合反応が起こり、G₄ が生成されます。生成された G₄ は引き続いて、同一酵素により水解され、G₃ と G₁ あるいは 2 分子の G₂ を生じ、さらに G₃ は G₂ と G₁ に水解されます。一方、低頻度ではありますが、β-G₂ 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性末端 C6-カルビノールとの間で縮合反応が起こり、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ます。引き続いて、この β-グルコ 4 糖分子中の 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、ゲンチオビオースとグルコースが生成されるものと理解されます。このよう

Table 4. Hydrolysis products from various substrates at the early and late stages of incubation with cellulase III.¹²⁾

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 ($\overline{d.p.} = 25$)	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 μ g of cellulase III was used for 200 μ l of reaction mixture.

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

Fig. 9. Course of glucose formation from initially pure β -D-cellobiose by cellulase III.¹²⁾

Fig. 10. Possible mechanism for glucose and gentiobiose formation from $\beta\text{-D-cellobiose}$ through the condensation reaction of cellulase III followed by hydrolysis.¹²⁾

Fig. 11. Possible process for glucose formation due to the action of cellulase III from native cellulose (unpublished results).

に、高度に精製されたセルラーゼ III は β -グルコシダーゼの関与なしに、 $\beta\text{-G}_2$ 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ました。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生成機構に関する長年の謎が解明されたわけでありました。

天然セルロースからセルラーゼ III の作用でグルコースが生成される機構は、各種のデータを総合して、Fig. 11 に示されるようなサイクリックな経路をたどるものと思われます。すなわち、前述したように、セルラーゼ III が天然セルロースに作用すると、主として $\beta\text{-G}_2$ が生成され、次いで $\beta\text{-G}_2$ が $\beta\text{-1,4}$ -グルコシド結合で縮合し、 G_4 が生成されます。この G_4 が引き続いて本酵素により 2 次的な水解作用を受け、グルコースが生成されます。従来、本酵素はセロビオース生成酵素と言われてまいりましたが、それは反応条件が十分検討されないま

ま研究が進められ、セルロース鎖から $\beta\text{-G}_2$ が生成される部分のみが観察され、本酵素がエキソ型のセロビオース生成酵素と誤認されてきたわけでありました。セルラーゼ III は本質的にはグルコース生成酵素であり、セロビオースは中間生成糖であるといえます。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 と定義しうるエキソ型のセルラーゼ成分は存在しないことを意味しています。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おります。

5. 天然セルロースの酵素的分解機構に関する新規概念^{1,8)}

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り、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究明することです。われわれの研究もこれらのターゲットを目指して、なされてまいりました。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 であります。

第 3 節で述べましたように、セルラーゼ II-b は特異な縮合・転移・水解作用により、 β -グルコシダーゼの関与なしに単独で $\beta\text{-D-cellobiose}$ 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ます。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成分として位置づけられます。セルラーゼ II-b が有する効率的なグルコース生成機能を考慮すると、従来から *T. viride* の β -グルコシダーゼは比較的その活性が弱いと言われている点が、本菌にとって生理的に意味をもつものと思われます。また、第 4 節で述べましたように、*T. viride* のセルラーゼ系中で最多量を占めるセルラーゼ III は天然セルロースに高い吸着能を有し、単独で天然セルロースからグルコースを生成するユニークな低エンド型セルラーゼであり、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おります。

天然セルロースの酵素的分解機構に関しては、これまでさまざまなスキームが提出されてきましたが、いず

Fig. 12. Proposed scheme of the cooperative action by cellulases of *T. viride* in converting native cellulose to glucose.¹⁾

れもきわめて観念的で実証性に乏しい感は否めません。現在われわれは、これまでに集積した知見を総合して、*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. 12 のスキームに示されるような新規概念を提唱しております。すなわち、天然セルロースは各種のエンド型セルラーゼ (DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトにより分画される FI および FII グループ由来) と低エンド型セルラーゼ (III) の協同作用により、またその一部は β -グルコシダーゼによりそれぞれ分解を受け、一連の反応のトータルとして多量の G_2 と少量の G_1 が生成されます。さらに、セルラーゼ II-b の具備する特異な縮合・転移・水解作用により、 G_2 から多量の G_1 が生成されます。一方、反応系に最後まで残存する少量の G_2 は、 β -グルコシダーゼの作用を受け、 G_1 にまで分解されるものと考えられます。すなわち、『天然セルロースの酵素的分解は、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) を通して行われ、セルラーゼ自身の具備するグルコシレーション作用 (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最終的に多量のグルコースが生成される』と理解されます。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、かつて Reese らの提唱した C_1 - C_x 説 (1950)¹⁴⁾ 以来の混迷から、ようやく抜け出した感があります。

6. おわりに

以上、糸状菌 *T. viride* のセルラーゼ系の多様性を解析した結果に基づいて、天然セルロースの酵素分解にきわめて重要な役割を演ずる 2 種の "key enzyme", セル

ラーゼ II-b および III について、その機能特性を中心に述べてまいりました。セルラーゼに関する酵素学的研究は、現在本格的な研究段階にさしかかったところで、今後の進歩・発展が大いに期待されるところであります。すでに本誌¹⁾ および他誌¹⁵⁾ で指摘しましたように、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ます。われわれのささやかな研究成果が、天然セルロースの酵素的分解機構を理解する上で、また低利用資源であるセルロース系バイオマスの有効利用などにお役に立てばまことに幸いであります。

最後になりましたが、本研究を推進するにあたって、献身的な努力を惜しまなかった研究室の多くの学生諸君に、心より感謝いたします。また、貴重な Meicelase の原末をご提供いただき、かつ精製酵素すべてのアミノ酸分析をお引き受けくださった明治製菓株式会社生物科学研究所に、厚く御礼申しあげます。

文 献

- 1) 岡田殿太郎: 澱粉科学, **35**, 253-277 (1988).
- 2) G. OKADA, T. NIWA, H. SUZUKI and K. NISIZAWA: *J. Ferment. Technol.*, **44**, 682-690 (1966).
- 3) G. OKADA, K. NISIZAWA and H. SUZUKI: *J. Biochem.*, **63**, 591-607 (1968).
- 4) G. OKADA: *Bull. Fac. Educ. Shizuoka University*, Natural Science Series No. 24, 19-34 (1973).
- 5) G. OKADA: *J. Biochem.*, **77**, 33-42 (1975).
- 6) G. OKADA and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **78**, 297-306 (1975).
- 7) G. OKADA: *J. Biochem.*, **80**, 913-922 (1976).
- 8) 岡田殿太郎, 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).
- 9) G. OKADA and Y. TANAKA: *Agric. Biol. Chem.*,

- 52, 617-619 (1988).
- 10) G. OKADA and Y. TANAKA : *International Symposium on Cereal and Other Plant Carbohydrates*, Abstracts, pp. 34-35, Kagoshima (1990).
- 11) 岡田殿太郎, 田中義正 : 第 12 回 糖質シンポジウム講演要旨集, pp. 129-130, 大阪 (1989).
- 12) G. OKADA and Y. TANAKA : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2981-2984 (1988).
- 13) G. OKADA and Y. TANAKA : *XVth International Carbohydrate Symposium*, Abstracts, p. 250, Yokohama (1990).
- 14) E. T. REESE, R. G. H. SIU and H. S. LEVINSON : *J. Bacteriol.*, **59**, 485-497 (1950).
- 15) 岡田殿太郎 : 化学と生物, **23**, 14-22 (1985).

(平成 2 年 9 月 7 日受付, 受理)