セルロースの構造と酵素分解に関する研究

神田鷹久^{1,*}

¹ 信州大学工学部物質工学科 (380-8553 長野市若里 4-17-1)

Mechanism of Cellulase Action on Cellulose Structure

(Received September 9, 2002)

Takahisa Kanda^{1,*}

¹Department of Chemistry and Material Engineering, Faculty of Engineering, Shinshu University
 (4-17-1, Wakasato, Nagano 380-8553, Japan)

Abstract: The mode of degradation of native cellulose has not been fully established. The mode of hydrolysis of highly purified cellulases, exo- and endo-type cellulases from fungi (*Irpex lacteus*, *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*) were investigated by using pure cellulosic materials with different crystallinities of cellulose I type in addition to bacterial celluloses of two type different types (cellulose I and II) and *valonia* cellulose. At the same time, we also investigated the hydrolysis action of exo- and endo-type cellulases by using water soluble substrates such as cellobiosaccharide and barley glucan. From these results, it was found that the characteristic mode of action of each cellulase can be clearly understood by using only pure crystalline cellulosic substrates. Furthermore, we will describe the synergistic actions of cellulase components in addition to related enzyme on cellulose degradation in this paper.

Key words: cellulose, *valonia* cellulose, bacterial cellulose, cellulase, cellobiose dehydrogenase

天然セルロースは高度に発達したマイクロフィブリル (MF) の結晶構造のため水に不溶であり、従って酵素反応は不均一の反応となる。このため、水溶性基質に対する酵素反応と比較してその反応速度は遅く、また、酵素反応はセルロースの微細な結晶構造に大きく依存し、活性中心での酵素と基質の反応には複雑な因子が関与する。すなわち、基質分子の構造により各セルラーゼ成分の挙動が異なってくる。ここでは、起源の異なる各種セルラーゼを用いてセルロースの分解機作について、セルロース分子鎖、MF および繊維の構造に焦点を置き、分子から集合体への観点から得られた結果を紹介させていただきます。なお、詳細については、本誌に報告しており¹⁻⁴⁾、それらを参考にいただきたいと思います。

不溶性セルロースに対するセルラーゼの反応

1. 結晶化度の異なるセルロースに対する作用

1) エキソおよびエンド型セルラーゼの吸着挙動

Irpex lacteus の生産するエキソ型 (Ex-1) およびエンド型セルラーゼ (En-1) を用いて検討したところ、両酵素は

セルロースの形態を保持しつつマイクロフィブリル (MF) に強く吸着した⁵⁾。両酵素の最大吸着量は、結晶化度 (CrI) の増加に伴い減少し、また、各種セルロースに対し比較的大きな親和性を示した。その値は CrI の増大につれて大きくなった。この傾向は特に Ex-1 において顕著であった。両酵素の吸着に伴う自由エネルギー変化量は大きな負の値を示し、CrI の増加に伴いその値は増加した。さらに、両酵素の吸着はエントロピーの増大を伴う吸熱反応であり、その傾向は非晶性セルロースに対して顕著であることから、両酵素の吸着の際には脱水和を生じることが示唆された。

2) 各種セルロースに対する加水分解

Ex-1 および En-1 の不溶性セルロースに対する分解機作を、CrI の異なるセルロースを用いて比較検討した。従来用いられている還元糖生成能でみた場合と DP 低下能でみた場合の水解パターンは全く異なっており、エンド型セルラーゼが天然セルロースの非晶領域を、エキソ型セルラーゼが結晶領域を優先的に水解するという従来の概念には疑問を生じる。さらに両酵素は、結晶性セルロースに対してのみエキソ・エンド型機作をそれぞれ明確に示すが、CrI の低下、すなわち非晶性になるにつれて個々の機作は曖昧になることが確認された。セルラーゼ反応のランダム度は基質として用いるセルロースの結晶性の違いにより、大きく影響を受けることを明らかにした^{2,6)}。

起源の異なる各種セルラーゼ (*Trichoderma reesei* の CBH I, CBH II, EG II, *Aspergillus niger* の Exo-A, EG-I) について、*I. lacteus* の両酵素と比較検討した結果、エキソ型 (CBH I, CBH II, Ex-1, Exo-A) では CrI の異なる

*Corresponding author (Tel. +81-26-269-5394, Fax. +81-26-269-5394, E-mail: takanda@gipwc.shinshu-u.ac.jp)

Abbreviations: BC, bacterial cellulose; CMC, carboxymethyl cellulose; CBH, cellobiohydrolase; CDH, cellobiose dehydrogenase; CrI, relative crystallinity index; DP, average degree of polymerization; DSC, differential scanning calorimetry; EG, endo-glucanase; FE-SEM, field emission-scanning electron microscopy; G2-G6, cellobiose to cellobiose; MF, microfibril of cellulose; TEM, transmission electron microscopy; VC, *Valonia* cellulose; XG7, xyloglucan from the seeds of *Tamarindus indica* L.

いずれの基質に対しても生成物はセロビオース (G2) のみであり、水溶性基質のセロオリゴ糖、CMC ではこの限りではなかった²⁾。一方、エンド型 (EG II, En-1, EG-I) は結晶性の基質に対して、ごく少量の還元糖を遊離するが、非晶性セルロースに対しては一連のオリゴ糖を遊離した²⁾。一方、DP の変化から酵素活性を評価した場合、エンド型酵素は高結晶性の基質には良く作用し、DP 減少を顕著に引き起こした。特徴的なことは典型的なエンド型の機作を示す *T. reesei* の EG II (ファミリー 5)⁷⁾ は比較的 DP の減少を引き起こさないエキソ型の挙動を示した。このことは、置換基の導入された修飾セルロース (CMC) での測定では観察されないことである²⁾。従来、報告されてきた還元糖生成の測定や、CMC を用いた粘度低下測定で評価した場合には、実際の酵素の作用挙動を必ずしも反映しない結果となることがある。セルロース繊維の分解においても、エキソ型とエンド型によるセルラーゼの分類を必ずしも厳密に行うことができない^{8,9)}。むしろ、セルロースの構造の違いにより両酵素の挙動は異なってくるものと考えられる。

3) 電顕による形態的観察と示差走査熱量解析による非晶領域の測定

エキソ型およびエンド型セルラーゼによる木綿繊維の分解における、電顕観察 (SEM および TEM) の結果、その分解形態に大きな差異が認められた^{1,2,10,11)}。すなわち、エキソ型による分解では MF 配向に沿って深い亀裂が繊維内部に形成された。これに対しエンド型による分解では、単繊維の表面状態変化よりもむしろ内部構造に大きな変化を引き起こし、繊維内部のフィブリル層に対し強く作用することが観察された。

筆者らは、木綿繊維表面への結合水量を示差走査熱量計 (DSC) を用いて測定することにより、セルラーゼによるセルロースの分解過程における繊維表面上に存在する非晶領域を計測することが可能であることを初めて実証した¹²⁾。この方法を用いて、*I. lacteus* 由来の Ex-1 と En-1 による木綿繊維の分解を調べた。Fig. 1 A に示すように、En-1 と Ex-1 では非晶領域の形態とその分解過程に著しい差が認められた。すなわち、En-1 による水解では水解初期において非晶領域が著しく増大し、その後急速に非晶領域が減少した後、再び増大して一定値となった。これに対し Ex-1 は、水解初期からセロビオースを遊離させながら非晶領域を徐々に減少させた後、反応が進むにつれ徐々に非晶領域を増大させた。この結果、木綿繊維の非晶領域が減少した後、結晶領域の水解に基づくと考えられる非晶領域の増加が両酵素により行われることが明らかとなった。

セルロース繊維および MF に対するセルラーゼの吸着挙動、水解挙動、形態的観察および DSC による非晶領域の観察などの結果をもとに、エキソ型およびエンド型セルラーゼによるセルロースの分解機構を筆者らは提唱した (Fig. 1 B)。

(A)

(B)

Fig. 1. Changes in the relative amount of bound water (A) and mechanism for cellulose degradation (B) during hydrolysis by Ex-1 and En-1.

●, Ex-1; ○, En-1. The reaction mixture consisted of 2.0% (w/v) of cotton and 20 μ M of Ex-1 and En-1. The amount of bound water at each incubation period was converted into the relative value based on the amount of bound water in intact cotton.

2. バクテリアおよびバロニアセルロースに対する作用

バクテリアセルロース (BC) およびバロニアセルロース (VC) は MF の配向が網目状のネットワークを形成しており、結晶型として $I\alpha$ が 65% 程度、 $I\beta$ が 35% の含有率を示す複合結晶を形成していることが報告されている^{13,14)}。ちなみに、植物のセルロースは $I\beta$ が 85% 含まれている。また、BC および VC は木綿繊維と比較して結晶性が高く、特に BC は木綿繊維と比べて繊維の太さが 1/100–1/1000 である。このようなセルロースを基質とし、セルラーゼの挙動を追求することにより、酵素の作用特性をより明確にすることが可能である。

エキソ型セルラーゼ (Ex-1) とエンド型セルラーゼ (En-1) について、VC に対する作用の相違を検討した^{1,14)}。免疫二重標識電顕観察により両酵素は吸着の段階から、ネットワーク構造を形成している個々の MF の内部にまで侵入した。特に En-1 は反応時間と共に MF の表面への吸着が強かった。また、両酵素の機作による全く異なる形態変化が FE-SEM により MF 上に観察された。エキソ型酵素は個々のマイクロフィブリルを細く削った状態にし、そのネットワーク構造を弛緩させるのに対し、エンド型酵素はマイクロフィブリルの膨潤と溶解を促進することが確認された。

酢酸菌は通常のセルロース I 型 (BC I) の他に、結晶構造の異なるセルロース II 型 (BC II) を生産することが知

Table 1. Specific activities of various cellulases on bacterial celluloses I and II.

Enzyme	MW	Specific activity (U/ μ mol enzyme)			GF	CBD
		BC I (A)	BC II (B)	Ratio (A/B)		
CBH I from <i>T. reesei</i>	63000	0.858	0.214	4.02	7	+
CBH II from <i>T. reesei</i>	59000	0.817	0.351	2.33	6	+
Ex-1 from <i>I. lacteus</i>	49000	0.722	0.363	1.99	7	+
Exo-A from <i>A. niger</i>	64000	0.817	0.308	2.65	7	?
EG II from <i>T. reesei</i>	54000	0.501	0.633	0.792	5	+
En-1 from <i>I. lacteus</i>	36000	0.334	0.273	1.22	5	+
EG-1 from <i>A. niger</i>	30000	0.274	0.199	1.38	?	-

+, CBD exists in the enzyme molecule; -, CBD does not exist. MW, molecular weight; BC, bacterial cellulose; GF, glycosidase family.

Table 2. Hydrolysis products from bacterial celluloses I and II by various cellulases.

Enzyme	Products*	
	Bacterial cellulose I	Bacterial cellulose II
Exo-type CBH I	G 2>>G 1	G 2
CBH II	G 2	G 2
Ex-1	G 2>>G 1	G 2
Exo-A	G 2	G 2>>G 1
Endo-type EGII	G 1=G 2	G 1=G 2
En-I	G 2	G 2>G 3
EG-1	G 2	G 2>G 3=G 1

*Products after incubation with each enzyme for 12 h. G1, glucose; G2, cellobiose; G3, cellobiose.

られている¹⁶⁾. BC II はセルロース分子鎖が折り畳まれた構造をしており、そのため隣り合う分子鎖は逆平行となっている。また、酢酸菌の生産する BC II は、再生レーヨン（セルロース II 型）とは全く異なった構造をしている。Table 1 と 2 に各種酵素の活性および水解生成物を示す。また、多分散性の分子量分布を示す BC に対して、酵素処理による分子量分布変化をサイズ排除クロマトグラフィーを用いて測定した結果、エキソ型酵素は低分子量画分を優先的に水解することがわかった。また、エンド型酵素は BC II に強い親和性を示した。これらの結果から、各セルラーゼ成分はセルロースの結晶構造の違いを厳密に認識し、各々単独で異なった機作で強く作用することが MF 上において確認することができた^{1,3,7,17)}。

水溶性基質に対するセルラーゼの反応

筆者らは、天然セルロースに対する反応を解析する手段として、酵素反応が均一的に行われる水溶性基質を用いて検討してきた。詳細は本誌^{2,3)}に報告しているので参照していただきたい。ここで簡潔にその一部を報告する。起源の

異なる各種のエンド型およびエキソ型セルラーゼを用いて、セロオリゴ糖 (G2-G6)、合成基質に対する作用を調べた¹⁸⁾。エキソ型セルラーゼにおいて G4 に対しては、厳密に G2 単位で水解する CBH II と G2 および G3 単位で水解する CBH I, Ex-1, Exo-A に分類することができた。また、合成基質に対する反応性をみても、アグリコン結合を水解する後者のグループと、水解しない前者のグループに分類できた。しかしながら、G6 に対しては CBH II は G3 と G2 を同程度に生成し、他の酵素もランダム的水解をした。可溶性オリゴ糖鎖の分解位置パターンからみた場合、セルラーゼがエンドとエキソに分類される妥当性はない。

また、エキソ型セルラーゼは、 β -1,4 結合および β -1,3 結合からなるオオムギグルカンやスクレログルカンにも作用した^{19,20)}。起源を異にする 4 種のエキソ型セルラーゼの両結合を含むオリゴ糖に対する作用を検討した。この中で、CBH II が最も厳密な基質特異性 (β -1,4 結合のみ水解) を示すが、他の酵素は内部の β -1,3 結合も水解した (Table 3)。しかしながら、主鎖が β -1,4 結合であるが、側鎖にキシロースおよびガラクトースが結合したタマリンド種子由来のキシログルカンのオリゴ糖 (XG7) に対し、CBH II は最もよく作用し、側鎖のないグルコースの還元末端側で切断した (Fig. 2)¹⁹⁾。エキソ型セルラーゼによるオオムギグルカンの分解モデルを Fig. 3 に示す。オオムギグルカンは β -1,3 結合に続く β -1,4 結合の位置で曲がっており、全体として大きなヘリックス構造を形成している²¹⁾。エキソ型セルラーゼは、この折れ曲がった位置から G2 を認識するものと考えられる²⁰⁾。

Table 3. Substrate specificities of four exo-type cellulases on mixed-linked glucooligosaccharides.

Substrate	Ex-1 (<i>I. lacteus</i>)	CBH I (<i>T. reesei</i>)	CBH II (<i>T. reesei</i>)	Exo-A (<i>A. niger</i>)
3 ² -O- β -D-Glucosylcellobiose	G3G4G	G3G4G	G3G4G	G3G4G
	↓			↓
3-O- β -D-Cellobiosylglucose	G4G3G	G4G3G	G4G3G	G4G3G
	⇓	⇓		⇓
3 ² -O- β -D-Cellobiosylcellobiose	G4G3G4G	G4G3G4G	G4G3G4G	G4G3G4G
	↓	↓	↓	↓
3-O- β -D-Cellobiosylglucose	G4G4G3G	G4G4G3G	G4G4G3G	G4G4G3G

Hydrolysis ability: ↓, slow; ⇓, medium; ↓↓, rapid.

Fig. 2. Hydrolysis patterns of xyloglucan oligosaccharides by exo-type cellulases.

Arrow shows the cleavage site.

Fig. 3. Hydrolysis patterns of barley glucan by exo-type cellulase.

○, glucose unit; ●, reducing end; ⊙, (1,3)-β-linked glucosyl residue; —, (1,4)-β-D-glucosidic linkage; ·····, (1,3)-β-D-glucosidic linkage; ↓, linkage strongly attacked; ↓↓, linkage weakly attacked by exo-type cellulase.

Table 4. The effects of CDH and β-glucosidase (β-glu) on cellulose degradation by cellulases from *I. lacteus* after 6 h incubation.

Substrates	Degradation* ¹ (%)	Relative degradation (%)	Hydrolysis and oxidation products(%) ^{*2}			
			G1	G2	G3	GnL
Bacterial cellulose						
Cellulases only ^{*3}	20.6	100	7.9	92.1	—	—
Cellulases + β-glu	25.7	125	87.3	12.7	—	—
Cellulases + CDH	32.2	156	7.3	—	—	92.7
Cellulases + β-glu + CDH	33.9	165	14.3	—	—	85.7
H ₃ PO ₄ -swollen cellulose						
Cellulases only	39.5	100	8.9	77.7	13.4	—
Cellulases + β-glu	47.6	121	88.8	11.2	—	—
Cellulases + CDH	56.8	144	9.1	4.7	—	86.2
Cellulases + β-glu + CDH	59.1	150	22.4	8.9	—	68.7

*¹The degradation percentages of cellulose were calculated from the ratio between the soluble sugars produced and the amount of equivalents in the substrate. *²The hydrolysis and oxidation products are defined as the percentage of each generated product in the total degradation percentages of cellulose; G1, glucose; G2, cellobiose; G3, cellobiose; GnL, cellobiose-lactone. —, not detected.

*³The combination of exocellulase (Ex-1) and endo-cellulase (En-1) was used.

以上のように、水溶性基質に対するセルラーゼの反応機作は、セルロース分子鎖の加水分解様式をみる限り厳密でなく、すべてのセルラーゼが少なからずエンド型の機作を有しており、真の意味でのエキソ型セルラーゼが存在するとは言い難い⁹⁾。

セルラーゼの相乗作用と関連酵素

セルロースの酵素分解において、複数のセルラーゼ（特にエキソとエンド型）を組み合わせてることにより、効率的に分解が進むことが知られている。しかし、セルラーゼの相乗効果は、酵素の混合比、セルロース基質の性質（たとえばCrIの相違）によって異なることを筆者らは確認している⁴⁾。また、エキソ型酵素同士の組み合わせによっても顕著な相乗作用を示すことも確認している¹¹⁾。一方、BCに対するセルラーゼの分解時において、*T. reesei*のCBH I

およびEG IIを1:0.6 (w/w) から1:0.1 (w/w) の範囲で混合した際、MFの回転を生じダイナミックな結晶構造の変化が生じることも確認した^{22,23)}。この結果から、適量のエンド型酵素は、セルロース繊維の回転を促進し、MF集合体の崩壊を引き起こすものと考えられる。セルロース分解における相乗効果は、MF上を単に還元末端から非還元末端、あるいはその逆に向かってプロセス的に水解する機作のみで説明することは無理であり、エキソ型酵素によるエンド的な分子鎖の攻撃、MFの膨潤や分散化およびセルロースの構造変化の関与を含めて考察する必要がある²⁴⁾。

筆者らはまた、*I. lacteus*の培養液中にセルラーゼと共にセロピオース脱水素酵素 (CDH) が分泌されることを確認している²⁵⁻²⁷⁾。このCDHおよびβ-グルコシダーゼを含めて相乗作用を検討した⁴⁾ (Table 4)。セルロースの酵素分解において、CDHはセルラーゼと共役的に作用し、生成物阻害の解除だけでなく、CrIの異なる種々のセルロースにも間接的に作用することを確認した⁴⁾。

本学会の名誉ある学会賞をいただくにあたり、自に余る光栄を感じますと共に、心から感謝申し上げます。ご推薦を賜りました坂野好幸前東日本支部長、ご選考いただきました谷口 肇会長、岡田巖太郎前会長をはじめ、選考委員会の諸先生方、ご支援を賜りました会員の皆様に厚く御礼申し上げます。また、私を研究者として育ててくださった東京教育大学名誉教授の西澤一俊先生をはじめ、信州大学名誉教授の若林和正先生に心から感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くの共同研究者に恵まれましたことを深く感謝申し上げます。特に、信州大学工学部の天野良彦助教授、野崎功一助手の先生ならびに星野栄一博士（花王㈱）、城石雅弘博士（財長野県農村工業研究所）をはじめとする共同研究者、また信州大学繊維学部の共同研究者に心から感謝いたします。さらに、研究のご指導ならびに共同研究をしていただきましたアルバート・アインシュタイン医科大学名誉教授の故Edward J. Hehre先生、静岡大学名誉教授の岡田巖太郎先生、信州大学教授の岡崎光雄先生、東京大学教授の空閑重則先生、同教授の鮫島正浩先生、北海道大学教授の高井光男先生、京都大学助教授の林 隆久先生に感謝申し上げます。また、酵素剤を恵与していただきました協和発酵工業㈱、明治製菓㈱、ノボザイムジャパン㈱、新日本化学工業㈱に感謝いたします。

文 献

- 1) 星野栄一, 神田鷹久: 基質からみたセルラーゼの作用挙動. 応用糖質科学, **44**, 87-104 (1997).
- 2) 神田鷹久, 天野良彦, 城石雅弘, 星野栄一: 起源を異にするセルラーゼの反応性と特異性. 応用糖質科学, **41**, 173-282 (1994).
- 3) 天野良彦, 空閑重則, 柴崎秀樹, 神田鷹久: セルラーゼは

- セルロースの結晶構造の違いをどのように認識するのか? 応用糖質科学, **45**, 155-161 (1998).
- 4) 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).
 - 5) E. Hoshino, T. Kanda, Y. Sasaki and K. Nishizawa: Adsorption mode of exo- and endo-cellulases from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) on cellulose with different crystallinities. *J. Biochem.*, **111**, 600-605 (1992).
 - 6) E. Hoshino, Y. Sasaki, M. Okazaki, K. Nishizawa and T. Kanda: Mode of action of exo- and endo-type cellulases from *Irpex lacteus* in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities. *J. Biochem.*, **114**, 230-235 (1993).
 - 7) Y. Amano, K. Nozaki, T. Araki, H. Shibasaki, S. Kuga and T. Kanda: Reactivities of cellulases from fungi towards ribbon-type bacterial cellulose and band-shaped bacterial cellulose. *Cellulose*, **8**, 267-274 (2001).
 - 8) 神田鷹久, 天野良彦: セルロースの酵素分解機構. *Cell. Commun.*, **2**, 2-7 (1995).
 - 9) 神田鷹久, 鮫島正浩: セルロースの構造からみたセルラーゼの作用. 繊維学会誌, **55**, 193-197 (1999).
 - 10) E. Hoshino, Y. Sasaki, K. Mori, M. Okazaki, K. Nishizawa 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).
 - 11) E. Hoshino, M. Shiroishi, Y. Amano, M. Nomura and T. Kanda: Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 300-306 (1997).
 - 12) E. Hoshino, Y. Kubota, M. Okazaki, K. Nishizawa and T. Kanda: Hydrolysis of cotton cellulose by exo- and endo-type cellulases from *Irpex lacteus*: Differential scanning calorimetric study. *J. Biochem.*, **115**, 837-842 (1994).
 - 13) R.H. Atalla and D.L. Vanderhart: Native cellulose: A composite of two distinct crystalline forms. *Science*, **223**, 283-285 (1984).
 - 14) 杉山淳司: セルロースマイクロフィブリルの多様性. *Cell. Commun.*, **1**, 6-12 (1994).
 - 15) E. Hoshino, M. Nomura, M. Takai, M. Okazaki, K. Nishizawa and T. Kanda: Action of exo- and endo-type cellulases from *Irpex lacteus* on *valonia* cellulose. *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 496-502 (1994).
 - 16) S. Kuga, S. Takagi and R.M. Brown: Native folded-chain cellulose II. *Polymer*, **34**, 3293-3297 (1993).
 - 17) T. Kanda, Y. Amano, T. Araki, M. Shiroishi, H. Shibasaki and S. Kuga: Difference in the mode of action of cellulases on bacterial celluloses with type I and II. in *Genetics Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation*, K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita and T. Kimura, eds., Uni. Publishers, Tokyo, pp. 94-103 (1998).
 - 18) M. Shiroishi, Y. Amano, E. Hoshino, K. Nishizawa and T. Kanda: Hydrolysis of various celluloses, (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan, and xyloglucan by three endo-type cellulases. *Mokuzai Gakkaishi*, **43**, 178-187 (1997).
 - 19) Y. Amano, M. Shiroishi, K. Nishizawa, E. Hoshino and T. Kanda: Fine substrate specificities of four exo-type cellulases produced by *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, and *Irpex lacteus* on (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucans and xyloglucan. *J. Biochem.*, **120**, 1123-1129 (1996).
 - 20) T. Kanda, H. Yatomi, S. Makishima, Y. Amano and K. Nishizawa: Substrate specificities of exo- and endo-type cellulases in the hydrolysis of β -(1 $\rightarrow$ 3)- and β -(1 $\rightarrow$ 4)-mixed D-glucans. *J. Biochem.*, **105**, 127-132 (1989).
 - 21) K.H. Gardner and J. Blackwell: The structure of native cellulose. *Biopolymers*, **13**, 1975-2001 (1974).
 - 22) A.J. Bowling, Y. Amano, R. Lindstrom and M.R. Brown Jr.: Rotation of cellulose ribbons during degradation with fungal cellulase. *Cellulose*, **8**, 91-97 (2001).
 - 23) Y. Amano and T. Kanda: New insights into cellulose degradation by cellulases and related enzymes. *TIGG*, **14**, 27-34 (2002).
 - 24) 鮫島正浩, 天野良彦, 神田鷹久: セルロース分解酵素の作用機作. 「セルロース事典」, セルロース学会編, 朝倉書店, 東京, pp. 306-316 (2000).
 - 25) P.Q. Hai, Y. Amano, K. Nozaki and T. Kanda: Insights in the biological role of cellobiose dehydrogenase. *J. Biol. Macromol.*, **1**, 37-43 (2001).
 - 26) P.Q. Hai, K. Nozaki, Y. Amano and T. Kanda: Progress on studying the biological role of cellobiose dehydrogenase from *Irpex lacteus*. *J. Biol. Macromol.*, **2**, 11-18, (2002).
 - 27) 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).