糸状菌のセルロース分解系における 酸化還元酵素に関する最新の知見

梅 澤 究*

1. はじめに

木材腐朽菌により引き起こされる木材の劣化は、木造建築物の生物劣化における最も主要な原因の一つである。木材腐朽菌はカビ類などと同様に、形態的には糸状性を呈する真菌類（すなわち糸状菌）であり、菌体外に分泌した酵素系を主とした分解メカニズムにより木材を分解する。木材腐朽菌は分類学上は担子菌類に属するものが多く、一方、カビ類の多くは子のう菌に属するが、両者は類似したセルロース分解機構を有すると考えられてきたため、糸状菌として一括りにセルロース分解機構の研究が体系化されてきた。それによると、木材腐朽菌を含む糸状菌は、木材を構成する主成分であるセルロースをセルラーゼによりセロビオースにまで分解し、セロビオースを β -グルコシダーゼによりグルコースにまで分解するという、一連の加水分解酵素による反応経路で分解していると考えられてきた。しかしながら近年、糸状菌のセルロース分解系における酸化還元反応の重要性がにわかに注目されてきており、それに関連する酸化還元酵素が多数報告されてきている。そこで本総説では、近年注目を集めている糸状菌のセルロース分解に関わる酸化還元酵素について、現在までに明らかにされている知見を中心に概説する。ただし、木材腐朽菌の中でも褐色腐朽菌は一般の糸状菌類とは異なる分解メカニズムを保持していることが知られているため、本総説では褐色腐朽菌については議論の対象とはしないことをご了承願いたい。

2. 糸状菌のセルロース分解における酸化還元酵素の関与

セルロースはD-グルコースが β -1,4-グルコシド結合により重合した直鎖状高分子である。セルロースはその分子鎖同士が互いにパッキングされ、高結晶性の分子鎖束であるセルロースマイクロフィブリルを形成する。このマイクロフィブリルは高結晶性で非常に安定な物質であるために、セルロースは難分解な性質を有している。

自然界において、この難分解な物質であるセルロースを分解している主要な生物の一つが糸状菌である。糸状菌は多様な酵素を菌体外に分泌し、それによってセルロースを低分子化し、生成するグルコースもしくはオリゴ糖を細胞内に取り込み炭素源として利用する。これまでに、糸状菌によるセルロース分解機構に関しては数多くの研究がなされてきており、様々な知見が蓄積されている。まず、1950年代にReeseらにより C_1 - C_x 説が提唱され¹⁾、その後、エンド-エキソ説、さらには、プロセッシビティといった概念が導入されることで、糸状菌の加水分解酵素によるセルロース分解機構に関する理解が深められてきた。そのような一連の加水分解酵素に関する研究報告の一方で、セルロース分解において酸化還元酵素が重要な役割を担っていることを示唆する知見も報告されていた。1974年にErikssonらは、数種の糸状菌の培養液から調製した粗酵素液を用いたセルロースの糖化実験を行い、対象としたすべての糸状菌の粗酵素液において、酸素存在下でセルロースの糖

*近畿大学農学部

Corresponding author : Kiwamu Umezawa (umezawa@nara.kindai.ac.jp)

表1 Auxiliary Activities ファミリーに分類される酵素の機能

ファミリー	機能	分類されるタンパク質
AA1	マルチ銅オキシダーゼ	ラッカーゼ, フェロオキシダーゼ等
AA2	クラスIIペルオキシダーゼ	リグニンペルオキシダーゼ, マンガンペルオキシダーゼ等
AA3	グルコース-メタノール-コリン酸化還元酵素	CDH*, グルコースオキシダーゼ, アルコールオキシダーゼ等
AA4	バニリルアルコールオキシダーゼ	バニリルアルコールオキシダーゼ
AA5	銅ラジカルオキシダーゼ	グリオキサールオキシダーゼ, ガラクトースオキシダーゼ等
AA6	1,4-ベンゾキノンレダクターゼ	1,4-ベンゾキノンレダクターゼ
AA7	オリゴ糖オキシダーゼ	グルコオリゴ糖オキシダーゼ, キシロオリゴ糖オキシダーゼ等
AA8	CDH 様シトクロム	CDH, 糖質結合シトクロム <i>b</i> ₅₆₂ , PQQ***依存性ピラノース脱水素酵素
AA9	LPMO**	真菌類由来のセルロースまたはヘミセルロースを基質とする LPMO
AA10	LPMO	細菌類・ウイルス由来のキチンまたはセルロースを基質とする LPMO
AA11	LPMO	子囊菌由来のキチンを基質とする LPMO
AA12	PQQ 依存性ピラノース脱水素酵素	PQQ 依存性ピラノース脱水素酵素
AA13	LPMO	子囊菌由来のデンプンを基質とする LPMO

* CDH: セロビオース脱水素酵素, ** LPMO: 溶解性多糖モノオキシゲナーゼ, *** PQQ: ピロロキノリンキノン

糸状菌のセルロース分解への関与が予想されるファミリーを網掛けで示した。

化率が大きく上昇することを示した²⁾。さらに同年, Erikssonらは2種類の担子菌から, セルラーゼによるセルロース分解の最終産物であるセロビオースを酸化する酵素を発見している³⁾。Erikssonらによって発見されたこの酵素に関する研究が進展するに伴い, 本酵素はセロビオース脱水素酵素 (cellobiose dehydrogenase: CDH) と名付けられるに至った。その後, CDHに関連する様々な解析がなされてきたが, 糸状菌によるセルロース分解のメカニズムに関する研究は加水分解酵素に関するものが大部分であり, 近年に至るまでに酸化還元酵素のセルロース分解メカニズムにおける重要性についてはほとんど注目をされてこなかった。しかし近年, セルロースを酸化的に分解する活性を有する酵素である溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (lytic polysaccharide monooxygenase: LPMO) が発見され, 本酵素がセルラーゼによるセルロース分解を大きく促進することが示された^{4, 5)}。この発見を受けて, 糖質関連酵素データ

ベース (CAZy データベース) において, 新たに植物細胞壁分解に関わる酸化還元酵素が分類されるクラスとして, Auxiliary Activities (AA) ファミリーが設けられ, それによりセルロース分解における酸化還元酵素による反応経路が大きな注目を集めることになった (表1)。本総説では, これらのセルロース分解に関連する酸化還元酵素についてそれぞれ焦点を当て, その特性や役割について詳細に述べる。

3. セロビオース脱水素酵素 (CDH)

CDHは多くのセルロース分解性糸状菌により生産される菌体外酵素である。本酵素は適切な電子受容体存在下においてセロビオースの還元末端を酸化し, セロビオノラクトンを生成する反応を触媒する酸化還元酵素としての機能を有する。

1974年, Erikssonらは2種類の白色腐朽菌の培養液から, セロビオースの還元末端を酸化し, キノン類を還元するフラビン酵素として, セロビ

オース：キノン酸化還元酵素（cellobiose：quinone oxidoreductase：CBQ）を発見した³⁾。さらにその数年後、同グループはセロビオースを酸化する CBQ とは別の酵素としてセロビオース酸化酵素（cellobiose oxidase：CBO）を単離し、その結果を報告した⁶⁾。CBO は CBQ とは異なり、フラビンに加えてヘムを保持するフラボシクロム酵素であり、酸素を電子受容体としてセロビオースを酸化する酸化酵素であるとされた。その後しばらくの間、これらの酵素はそれぞれ別々の酵素として研究されてきたが、1990年代初頭に CBQ が CBO のプロテアーゼ分解により生成したものであることが明らかになり⁷⁻⁹⁾、さらには CBO が酸素と比較して、シトクロム *c* のような鉄を含む化合物をより高効率な電子受容体として用いることが明らかになったことによって、セロビオース脱水素酵素（CDH）と呼ばれるようになった¹⁰⁻¹²⁾。その後、CDH のフラビンドメインがセルロース吸着能を有することが示され^{7, 13, 14)}、また、免疫染色した CDH の共焦点レーザー顕微鏡による観察から、本酵素がセルロース表面に局在していることが示されたことにより¹⁵⁾、CDH がセルロース表面で働く酵素であることが強く示唆された。さらに、CDH 遺伝子は木質系基質やセルロース系基質を炭素源とした場合に発現誘導され、グルコース培地では発現抑制されることが示されたことにより¹⁶⁻²⁰⁾、CDH がセルロース分解系に関与していると見なす向きが強まっていった。しかしその一方で、発見当初、CDH がキノン類を電子供与体とすると考えられていたことから、CDH をセルロース分解とリグニン分解の共役系で機能する酵素として位置づける研究報告も多くなされるなど、その生理的位置付けは曖昧であった²¹⁾。しかしながら、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* を対象とした CDH 遺伝子破壊株を用いた実験から、遺伝子破壊株ではリグニン分解能が失われるのに対して、結晶性セルロースを炭素源とした場合に生育できなくなることが示されたことにより、CDH がリグニン分解に直接的には関わらない酵素であることが示唆された²²⁾。さらに近年、子囊菌 *Neurospora crassa* における CDH 遺伝子破壊株を用いた研究により、遺伝子破壊株の培養液は結晶性セルロース分解速度が大

きく低下し、外部から CDH を添加した場合や、遺伝子破壊株に再度 CDH 遺伝子を導入した培養液において、その分解速度が回復することが示されるなど、CDH がセルロース分解系に位置づけられる酵素であることを強く支持する研究結果が続々と報告されてきている²³⁾。CDH のセルロース分解系における役割については、セルロース分解性糸状菌の最も主要なセルラーゼである、セロビオヒドロラーゼ I の反応生成物阻害の解除などが提案されてきた²⁴⁾。これに加えて近年、後述する溶解性多糖モノオキシゲナーゼ（LPMO）が発見され、CDH が LPMO の電子供与体として働くことが明らかにされたことから、CDH の生理的役割として、LPMO の電子供与体としての働きが有力視されるようになった。

CDH はフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を補欠分子族とするフラビンドメインと、*b* 型のヘムを含有するヘムドメインの2つのドメインから構成されるフラボシクロムである（図1）^{7, 25)}。CAZy データベースにおいては、フラビンドメインが AA ファミリー3のサブファミリー1（AA3_1）に、ヘムドメインが AA ファミリー8（AA8）に分類されている（表1）。CDH の構造的特徴として、フラビンドメインは多くのフラビン酵素と同様にグルコース-メタノール-コリン酸化還元酵素ファミリーに属するのに対して²⁶⁾、ヘムドメインは9本のβ-シートを主要な骨格とする免疫グロブリン様β-サンドウィッチ構造を呈し、メチオニンとヒスチジンをリガンドとする6配位*b*型ヘムを保持するという、極めて珍しい構造を有している²⁷⁾。CDH のC末端側に位置するフラビンドメインは、セルロースへの吸着能を有するとともにセロビオースの還元末端を酸化する機能を有し、ここで獲得した電子はヘムドメインへと電子伝達される。一方、N末端側に位置するヘムドメインは、フラビンドメインから電子を受け取り、LPMO 等の電子受容体へと電子伝達する機能を有する。担子菌の CDH はすべてフラビンドメインとヘムドメインの2ドメインで構成されているが、子のう菌の一部の CDH は、フラビンドメインがセルロース結合能を欠損しており、その代わりにC末端にセルロース結合ドメインとして知られる糖質結合モ

図1 セロビオース脱水素酵素の反応模式図

ジュールファミリー1 (CBM1) が存在する²⁸⁾。

4. 溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO)

LPMO は分子内に1つの銅原子を有する銅依存性の酵素であり、様々な糖質を酸化的に低分子化する機能を有する。本酵素は構造的な多様性を有し、その全体構造の違いからAAファミリー9, 10, 11, 13 (AA9, AA10, AA11, AA13) の4つのファミリーに分類されている (図2)。その中でも、AA9のLPMO (LPMO9と呼ばれる) は真菌類のみで見出されているLPMOであり、糸状菌のセルロース分解に関与する主要な酸化還元酵素として注目を集めている。本酵素は担子菌 *Agaricus bisporus* を対象とした研究において、セルロース培地で発現する特有の遺伝子としてクローニングされたが、発見当初は機能が不明であったため Cellulose-growth-specific gene (Cell) と名付けられた²⁹⁾。その後、本酵素はセルラーゼの一種ではないかとの見方が強まりエンドグルカ

ナーゼIVと呼ばれるようになり、CAZy データベース上で糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase : GH) ファミリー61 (GH61) に分類され³⁰⁾、さらに2001年には極めて微弱なエンドグルカナーゼ活性を有するという報告がなされたものの、依然としてその機能の詳細については不明であった³¹⁾。しかしながら、2008年にカビ類の一種であるセルロース分解性糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来のGH61酵素 (Cel61Bと呼ばれていた) の三次元構造が解かれ、本酵素が金属結合性タンパク質であることが示唆された³²⁾。さらに、それと時を同じくする2000年代中盤には、本酵素がセルラーゼ活性を大きく促進させる機能を有することが論文や特許によって報告された^{4, 33)}。その後、2010年にEijssinkらのグループによりキチンを酸化的に分解する酵素 (後のAA10酵素) が見出されたのを契機にして³⁴⁾、その翌年には、GH61がセルロースを酸化的に低分子化する銅依存性の酸化還元酵素であることが明らかにされ⁵⁾、それによりCAZyにおいて新たにAAファミリー9に

図2 各ファミリーに属するLPMOの立体構造
各立体構造のPDB IDは、AA9 : 4B5Q, AA10 : 4ALC, AA11 : 4MAI, AA13 : 4OPB。
球は銅原子を表す。

てきている (図3)。

糸状菌においては, AA9に加えて AA11および AA13という異なるファミリーの LPMO が見出されており, 糸状菌の保持する LPMO の構造および基質には多様性があることが明らかになってきている。麹菌 *Aspergillus oryzae* において見出された AA11酵素はキチンを基質とする LPMO であり, ゲノム検索から子のう菌に分布する酵素であることが明らかになっている⁴⁶⁾。一方, アカパンカビ, *A. nidulans* および *A. oryzae* にて見出された AA13酵素は, デンプンを基質とする LPMO であり, AA11と同様に子のう菌に分布する酵素であることが明らかになっている^{47, 48)}。さらに, LPMO に特徴的な配列モチーフを有する機能未知の遺伝子の存在も報告されており⁴⁷⁾, 今後, さらに多様な LPMO の存在が明らかになっていくことが予想される。

5. 植物構成多糖の分解への関与が予想されるその他の酸化還元酵素

上述の通り, CDH の AA8ヘムドメインは, 電子受容体である LPMO9への電子伝達に不可欠なドメインであることが示されている。従来, この AA8ドメインは CDH にのみ見られるユニークなドメインであると考えられてきた。2000年代以降, 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* において全ゲノム情報が開示されたのを皮切りにして⁴⁹⁾, 様々なセルロース分解性糸状菌でゲノム解析が実施されてきた。その結果, CDH の AA8ドメインは CDH にユニークなものではなく, 様々な形態のタンパク質の一部 (すなわちドメイン) として糸状菌のゲノムにコードされていることが明らかになってきた。事実, 担子菌 *P. chrysosporium* のゲノム上には, AA8ドメインをN末端に保持し, C末端に CBM1を有する2ドメインからなるタンパク質である糖質結合シトクロム *b*₅₆₂ (CBCyt. *b*₅₆₂) が存在しており, このタンパク質の AA8ドメインが CDH の AA8ドメインとほぼ同様の構造的特徴および機能的特徴を有することが明らかにされている⁵⁰⁾。近年, 我々の研究グループは, AA8ドメインを有する新規酵素を探索し, CDH と同様に AA8ドメインを有するものの, その触媒ドメインが AA3_1フラビンドメインとは全く

相同性を示さない新規酵素をコードすると予想される遺伝子を見出した⁵¹⁾。この遺伝子をクローニングしたところ, その触媒ドメインはピロロキノリンキノン (PQQ) 依存性のグルコース/ソルボソン脱水素酵素に低い配列類似性を示し, N末端には AA8と相同性を示すドメイン, C末端には CBM1を有する3ドメインからなる酵素であることが明らかになった。本酵素を酵母菌 *Pichia pastoris* を宿主として組換え酵素として発現させ, その機能解析を行った結果, 本酵素の AA8ドメインは CDH のものと同様に6配位低スピンのb型ヘムを保持しており, 電気化学的特性も類似していた⁵²⁾。また, 触媒ドメインは PQQ およびカルシウムイオン存在下で活性を発現し, PQQ に対して極めて高い親和性し, 酵素と PQQ が 1 : 1 となるように結合していることが明らかになった。これらのことは, 本酵素が PQQ 依存性酵素であることを強く示唆するものである。これまでに報告されてきた PQQ 依存性の酵素は全て原核生物由来のものであったことから, 本酵素は真核生物由来の酵素として初の PQQ 依存性酵素の報告となった。本酵素は2-ケト-D-グルコースを最も良好な基質とし, その他複数のピラノースに対しても活性を有していたことから, PQQ 依存性ピラノース脱水素酵素 (pyranose dehydrogenase : PDH) と命名された。本酵素の生理的な機能はまだ明らかでないが, CDH 様の AA8ドメインの存在と, セルロースに結合能を示す CBM1の存在は, 本酵素が LPMO9の電子供与体としてセルロース分解に関与することを示唆している (図3)。

また前述の通り, CDH 以外の AA3酵素についても LPMO9に対する電子供給能を有するものが報告されていることから, セルロース分解に関与する可能性が考えられる。AA3ドメインを有する酵素は, CDH を除きすべて AA3ドメイン単独で存在していることが知られている。これらの酵素の電子受容体として, 従来, 酸素やキノン類が報告されてきたが, CBCyt. *b*₅₆₂のように, 触媒ドメインを持たない CDH 様ヘムドメインが存在していることから, AA3酵素がこのような電子のメディエーターを介して LPMO9に電子供給を行い, 間接的にセルロース分解に関わる可能性も考

えられるが（図3），これを結論付けるに足り得る知見は未だ得られておらず，その詳細は不明である。

その他に，セルロース分解への関与が示唆される酸化還元酵素として，AAファミリー7に分類されるグルコオリゴ糖酸化酵素がある。子のう菌 *Acromonium strictum* にて発見された本酵素はセロオリゴ糖を最も良好な基質とし，そのC1位を酸化する酵素と考えられている^{53, 54)}。本酵素の生理的機能もまた不明であるが，最近，同じファミリー内にキシロオリゴ糖を最適基質とする酵素が発見されたことから⁵⁵⁾，本ファミリーの酵素はヘミセルロース分解にも関与し，植物細胞壁分解において広く働く酵素ファミリーであることが示唆されている。

6. おわりに

糸状菌のセルロース分解に関する研究は，主に酵素の産業的利用を目的とした研究を中心に進められてきた。このため，多量のセルラーゼを生産する真菌である子のう菌 *Trichoderma reesei* がその研究の中心であった。不運なことに，本菌は糸状菌としては珍しくCDHを保持していない菌であったことから，その分解に関わる酵素の研究はセルラーゼなどの加水分解酵素ばかりを対象として詳細な研究が行われ，酸化還元酵素については見過ごされてきた感は否めない。しかしながら前述の通り，近年になってLPMOが発見されたことにより，酸化還元酵素によるセルロース分解系が大きく注目されるようになった。セルロース分解に関わる酸化還元酵素として現在注目されているLPMOとCDHに加えて，上述の通り，これまで知られてこなかった新しい酸化還元酵素が多数存在していることが示唆されている。近年のゲノム解析の結果，真菌類は木材腐朽菌への進化の結果，植物細胞壁分解に関わる酸化還元酵素遺伝子の多様性を大きく発達させたことが示唆された⁵⁶⁾。これは木材腐朽菌が，木質バイオマスという非常に難分解な物質を主な栄養源として生育していくために，それまでに有していた加水分解酵素に加えて，多様な酸化還元酵素およびそれに関連するタンパク質を複合的に作用させる，より複雑な植物細胞壁分解機構を発達させたことを意味

しているのかもしれない。したがって今後，木材腐朽菌のセルロース分解系における酸化還元酵素の研究が進められていくことで，これまで知られてこなかった未知の酸化還元酵素が多数発見されることになるかもしれない。

上記のごとく，木材腐朽菌の木材分解機構は多様な酵素（およびタンパク質）が複合的に働く複雑な反応経路であることが予想される。このため，一つ一つの遺伝子や酵素を対象として解析を行っていく従来の研究手法のみではその全容をあきらかにしていくことは極めて困難であると考えられる。近年，次世代シーケンサーや質量分析装置の飛躍的な発展により，トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析などの生命現象の網羅的解析を可能にする技術が急速に進歩し，誰でも利用できるレベルにまで普及してきている。また，革新的ゲノム編集技術として注目されているCRISPR/Cas9システムの登場により，木材腐朽菌のゲノム編集（高度な組換え技術）も容易なものになることが期待される。今後，これらの新たな技術を用いた木材腐朽現象の網羅的解析や，遺伝子工学的な解析が進められていくことで，木材腐朽菌による木材腐朽機構の全容が明らかにされることが期待される。

引用文献

- 1) Reese E. T., Siu R. G. H. and Levinson H. S., : The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis, *J. Bacteriol.*, **59**, 485-497 (1950).
- 2) Eriksson K.-E., Pettersson B. and Westermark U., : Oxidation : An important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose, *FEBS Lett.*, **49**, 282-285 (1974).
- 3) Westermark U. and Eriksson K.-E., : Cellobiose : quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi, *Acta Chem Scand B*, **28**, 209-14 (1974).
- 4) Harris P. V., Welner D., McFarland K. C., Re E., Navarro Poulsen J.-C., Brown K., Salbo R., Ding H., Vlasenko E., Merino S., Xu F., Cherry J., Larsen S. and Lo Leggio L., : Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61 : structure and function of a large, enigmatic family, *Bio-*

- chemistry*, **49**, 3305–3316 (2010).
- 5) Quinlan R. J., Sweeney M. D., Leggio L. L., Otten H., Poulsen J.-C. N., Johansen K. S., Krogh K. B. R. M., Jørgensen C. I., Tovborg M., Anthonsen A., Tryfona T., Walter C. P., Dupree P., Xu F., Davies G. J. and Walton P. H., : Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**, 15079–15084 (2011).
 - 6) Ayers A. R., Ayers S. B. and Eriksson K.-E., : Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*, *Eur. J. Biochem.*, **90**, 171–181 (1978).
 - 7) Henriksson G., Pettersson G., Johansson G., Ruiz A. and Uzcategui E., : Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains, *Eur. J. Biochem.*, **196**, 101–106 (1991).
 - 8) Wood J. D. and Wood P. M., : Evidence that cellobiose : quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* is a breakdown product of cellobiose oxidase, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1119**, 90–96 (1992).
 - 9) Habu N., Samejima M., Dean J. F. D. and Eriksson K.-E. L., : Release of the FAD domain from cellobiose oxidase by proteases from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.*, **327**, 161–164 (1993).
 - 10) Kremer S. M. and Wood P. M., : Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe (III) reductase, *Eur. J. Biochem.*, **205**, 133–138 (1992).
 - 11) Samejima M. and Eriksson K.-E. L., : A comparison of the catalytic properties of cellobiose : quinone oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Eur. J. Biochem.*, **207**, 103–107 (1992).
 - 12) Bao W. J., Usha S. N. and Renganathan V., : Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 705–713 (1993).
 - 13) Renganathan V., Usha S. N. and Lindenburg F., : Cellobiose-oxidizing enzymes from the lignocellulose-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* : interaction with microcrystalline cellulose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 609–613 (1990).
 - 14) Henriksson G., Salumets A., Divne C. and Pettersson G., : Studies of cellulose binding by cellobiose dehydrogenase and a comparison with cellobiohydrolase 1, *Biochem. J.*, **324**, 833–838 (1997).
 - 15) Igarashi K., Samejima M., Saburi Y., Habu N. and Eriksson K.-E. L., : Localization of Cellobiose Dehydrogenase in Cellulose-Grown Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *Fungal Genet. Biol.*, **21**, 214–222 (1997).
 - 16) Li B., Nagalla S. R. and Renganathan V., : Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1329–1335 (1996).
 - 17) Dumonceaux T. J., Bartholomew K. A., Charles T. C., Moukha S. M. and Archibald F. S., : Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*, *Gene*, **210**, 211–219 (1998).
 - 18) Vallim M. A., Janse B. J. H., Gaskell J., Pizzirani-Kleiner A. A. and Cullen D., *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase and cellobiose dehydrogenase transcripts in wood, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1924–1928 (1998).
 - 19) Moukha S. M., Dumonceaux T. J., Record E. and Archibald F. S., : Cloning and analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase, *Gene*, **234**, 23–33 (1999).
 - 20) Subramaniam S. S., Nagalla S. R. and Renganathan V., : Cloning and characterization of a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Sporotrichum thermophile*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 223–230 (1999).
 - 21) Henriksson G., Ander P., Pettersson B. and Pettersson G., : Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as a wood-degrading enzyme. Studies on cellulose, xylan and synthetic lignin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 790–796 (1995).
 - 22) Dumonceaux T., Bartholomew K., Valeanu L., Charles T. and Archibald F., : Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*, *Enzyme Microb. Technol.*, **29**, 478–489 (2001).
 - 23) Phillips C. M., Beeson W. T., Cate J. H. and Marletta M. A., : Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by

- Neurospora crassa*, *ACS Chem. Biol.*, **6**, 1399–1406 (2011).
- 24) Igarashi K., Samejima M. and Eriksson K.-E. L., : Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition, *Eur. J. Biochem.*, **253**, 101–106 (1998).
 - 25) Morpeth F. F., : Some properties of cellobiose oxidase from the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*, *Biochem. J.*, **228**, 557–564 (1985).
 - 26) Martin Hallberg B., Henriksson G., Pettersson G. and Divne C., : Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase, *J. Mol. Biol.*, **315**, 421–434 (2002).
 - 27) Hallberg B. M., Bergfors T., Bäckbro K., Pettersson G., Henriksson G. and Divne C., : A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase, *Structure*, **8**, 79–88 (2000).
 - 28) Harreither W., Sygmund C., Augustin M., Narciso M., Rabinovich M. L., Gorton L., Haltrich D. and Ludwig R., : Catalytic properties and classification of cellobiose dehydrogenases from ascomycetes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1804–1815 (2011).
 - 29) Raguz S., Yaguea E., Wood D. A. and Thurston C. F., : Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*, *Gene*, **119**, 183–190 (1992).
 - 30) Saloheimo M., Nakari-Setälä T., Tenkanen M. and Penttilä M., : cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast, *Eur. J. Biochem.*, **249**, 584–591 (1997).
 - 31) Karlsson J., Saloheimo M., Siika-aho M., Tenkanen M., Penttilä M. and Tjerneld F., : Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6498–6507 (2001).
 - 32) Karkehabadi S., Hansson H., Kim S., Piens K., Mitchinson C. and Sandgren M., : The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **383**, 144–154 (2008).
 - 33) Brown K., Harris P., Zaretsky E., Re E., Vlasenko E., McFarland K. and de Leon AL., : Polypeptide from a cellulolytic fungus having cellulolytic enhancing activity, U.S. Patent No. 7,361,495. (2008)
 - 34) Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S. J., Liu Z., Zhai H., Sørle M. and Eijsink V. G. H., : An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides, *Science*, **330**, 219–222 (2010).
 - 35) Levasseur A., Drula E., Lombard V., Coutinho P. M. and Henrissat B., : Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes, *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 41 (2013).
 - 36) Vu V. V., Beeson W. T., Phillips C. M., Cate J. H. D. and Marletta M. A., : Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 562–565 (2014).
 - 37) Isaksen T., Westereng B., Aachmann F. L., Agger J. W., Kracher D., Kittl R., Ludwig R., Haltrich D., Eijsink V. G. H. and Horn S. J., : A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides, *J. Biol. Chem.*, **289**, 2632–2642 (2014).
 - 38) Agger J. W., Isaksen T., Várnai A., Vidal-Melgosa S., Willats W. G. T., Ludwig R., Horn S. J., Eijsink V. G. H. and Westereng B., : Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 6287–6292 (2014).
 - 39) Kojima Y., Várnai A., Ishida T., Sunagawa N., Petrovic D. M., Igarashi K., Jellison J., Goodell B., Alfredsen G., Westereng B., Eijsink V. G. H. and Yoshida M., : Characterization of an LPMO from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* with broad xyloglucan specificity, and its action on cellulose-xyloglucan complexes, *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM.01768–16 (2016).
 - 40) Nekiunaite L., Petrović D. M., Westereng B., Vaaje-Kolstad G., Hachem M. A., Várnai A. and Eijsink V. G. H., : FgLPMO9A from *Fusarium graminearum* cleaves xyloglucan independently of the backbone substitution pattern, *FEBS Lett.*, **590**, 3346–3356 (2016).
 - 41) Langston J. A., Shaghasi T., Abbate E., Xu F., Vlasenko E. and Sweeney M. D., : Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 7007–7015 (2011).

- 42) Tan T.-C., Kracher D., Gandini R., Sygmund C., Kittl R., Haltrich D., Hällberg B. M., Ludwig R. and Divne C., : Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation, *Nat. Commun.*, **6**, 7542 (2015).
- 43) Garajova S., Mathieu Y., Beccia M. R., Ben-nati-Granier C., Biaso F., Fanuel M., Ropartz D., Guigliarelli B., Record E., Rogniaux H., Henrissat B. and Berrin J.-G., : Single-domain flavoenzymes trigger lytic polysaccharide monooxygenases for oxidative degradation of cellulose, *Sci. Rep.*, **6**, 28276 (2016).
- 44) Kracher D., Scheiblbrandner S., Felice A. K. G., Breslmayr E., Preims M., Ludwicka K., Haltrich D., Eijsink V. G. H. and Ludwig R., : Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation, *Science*, aaf3165 (2016).
- 45) Westereng B., Cannella D., Agger J. W., Jørgensen H., Andersen M. L., Eijsink V. G. H. and Felby C., : Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer, *Sci. Rep.*, **5**, 18561 (2015).
- 46) Hemsworth G. R., Henrissat B., Davies G. J. and Walton P. H., : Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 122–126 (2014).
- 47) Vu V. V., Beeson W. T., Span E. A., Farquhar E. R. and Marletta M. A., : A family of starch-active polysaccharide monooxygenases, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 13822–13827 (2014).
- 48) Leggio L. L., Simmons T. J., Poulsen J.-C. N., Frandsen K. E. H., Hemsworth G. R., Stringer M. A., Freiesleben P. von, Tovborg M., Johansen K. S., Maria L. D., Harris P. V., Soong C.-L., Dupree P., Tryfona T., Lenfant N., Henrissat B., Davies G. J. and Walton P. H., : Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase, *Nat. Commun.*, **6**, 5961 (2015).
- 49) Martinez D., Larrondo L. F., Putnam N., Gelpke M. D. S., Huang K., Chapman J., Helfenbein K. G., Ramaiya P., Detter J. C., Larimer F., Coutinho P. M., Henrissat B., Berka R., Cullen D. and Rokhsar D., : Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 695–700 (2004).
- 50) Yoshida M., Igarashi K., Wada M., Kaneko S., Suzuki N., Matsumura H., Nakamura N., Ohno H. and Samejima M., : Characterization of carbohydrate-binding cytochrome *b₅₆₂* from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4548–4555 (2005).
- 51) Matsumura H., Umezawa K., Takeda K., Sugimoto N., Ishida T., Samejima M., Ohno H., Yoshida M., Igarashi K. and Nakamura N., : Discovery of a eukaryotic pyrroloquinoline quinone-dependent oxidoreductase belonging to a new auxiliary activity family in the database of carbohydrate-active enzymes, *PLOS ONE*, **9**, e104851 (2014).
- 52) Takeda K., Matsumura H., Ishida T., Samejima M., Ohno H., Yoshida M., Igarashi K. and Nakamura N., : Characterization of a novel PQQ-dependent quinoxinoprotein pyranose dehydrogenase from *Coprinopsis cinerea* classified into auxiliary activities family 12 in carbohydrate-active enzymes, *PLOS ONE*, **10**, e0115722 (2015).
- 53) Lin S.-F., Yang T.-Y., Inukai T., Yamasaki M. and Tsai Y.-C., : Purification and characterization of a novel glucooligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum* T1, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1118**, 41–47 (1991).
- 54) Lee M.-H., Lai W.-L., Lin S.-F., Hsu C.-S., Liaw S.-H. and Tsai Y.-C., : Structural Characterization of Glucooligosaccharide Oxidase from *Acremonium strictum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8881–8887 (2005).
- 55) Ferrari A. R., Rozeboom H. J., Dobruchowska J. M., Leeuwen S. S. van, Vugts A. S. C., Koetsier M. J., Visser J. and Fraaije M. W., : Discovery of a xylooligosaccharide oxidase from *Myceliophthora thermophila* C1, *J. Biol. Chem.*, **291**, 23709–23718 (2016).
- 56) Floudas D., Binder M., Riley R., Barry K., Blanchette R. A., Henrissat B., Martínez A. T., Otillar R., Spatafora J. W., Yadav J. S., Aerts A., Benoit I., Boyd A., Carlson A., Copeland A., Coutinho P. M., Vries R. P. de, Ferreira P., Findley K., Foster B., Gaskell J., Glotzer D., Górecki P., Heitman J., Hesse C., Hori C., Igarashi K., Jurgens J. A., Kallen N., Kersten P., Kohler A., Kües U., Kumar T. K. A., Kuo A., LaButti K., Larrondo L. F., Lindquist E., Ling A., Lombard V., Lucas S., Lundell T., Martin R., McLaughlin D. J., Morgenstern I., Morin E.,

Murat C., Nagy L. G., Nolan M., Ohm R. A., Patyshakuliyeva A., Rokas A., Ruiz-Dueñas F. J., Sabat G., Salamov A., Samejima M., Schmutz J., Slot J. C., John F. S., Stenlid J., Sun H., Sun S., Syed K., Tsang A., Wiebenga A., Young D., Pisabarro A., Eastwood D. C., Martin F.,

Cullen D., Grigoriev I. V. and Hibbett D. S., :
The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes, *Science*, **336**, 1715–1719 (2012).

(2017.4.24受付)

(2017.5.2受理)