[木材学会誌 Vol. 61, No. 3, p. 212-216 (2015)]

バイオマスリファインリーのためのセルロース分解酵素の メカニズム解析温故知新^{*1}

五十嵐圭日子^{*2}

New Insights Taking Lessons from Past Mechanistic Analysis of Enzymatic Cellulose Degradation for Biomass Refinery^{*1}

Kiyohiko IGARASHI^{*2}

Cellulase is an enzyme family for the production of sugars from cellulosic biomass, and the key enzyme of future biomass utilization. The history of the enzyme family goes back to the 19th century, whereas its mechanistic analysis was initiated in the latter half of the 20th century. Biochemical and structural studies have been carried out independently at that time, and static information was expanded to dynamic analysis in this century. In the present review, I would like to introduce an overview of cellulase research in addition to our recent approaches to demonstrate single molecular observations.

Keywords: cellulase, biomass utilization, cellulose biodegradation.

セルラーゼは、セルロース系バイオマスを分解して構成糖を得るための酵素であり、将来のバイオマス利用に不可欠な鍵酵素である。その研究の歴史は19世紀まで遡ることが出来るが、反応機構の解析が行われたのは20世紀の後半である。その頃の研究は、生化学的または構造学的研究がそれぞれ独自に行われていたが、今世紀に入ってそれら静的な情報を元に動的な解析が多方面から行われている。本総説ではセルラーゼ研究の概史を紹介させていただくとともに、最近著者らが取り組んでいる単分子観察技術を紹介させていただく。

1. はじめに

セルロースは陸上植物の主成分であるとともに、細胞壁の強度発現に大きく貢献していることは、本誌の読者であれば広くご存知のことと思う。その化学的安定性と物理的特性を考えると、人類がセルロースを材木 (timber) や紙 (paper), すなわち繊維 (fiber) として何千年も利用してきたのは極め

てリーズナブルであると言える。しかしながら、世界的な人口増加と都市化、それに伴うエネルギーおよびマテリアルの大量消費は、様々な資源の奪い合いと枯渇を招いており、特に化石資源の乏しい我が国においてセルロース系バイオマスをより高度に利用することは必須かつ急務である。そのような観点からこれまでのセルロース系バイオマスの利用を見直してみると、その繊維特性に関してはこれまでも盛んに研究されて来ており、その知見は近年のナノファイバー技術の発展をもたらしている。ここでは、「なるべく強靱な繊維を合成して自分の体 (植物体) を保ちたい」という植物側の思惑と、「なるべく強靱な繊維を利用したい」というバイオマス利用側である人間の思惑が一致していると言える。同様に「時が来たら分解をしてエネルギー源として利用したい」と植物が考えている (はずの) 澱粉など貯蔵多

^{*1} Received December 17, 2014; accepted January 28, 2015.

^{*2} 東京大学大学院農学生命科学研究科 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan
Corresponding author: K. Igarashi (aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

糖を、「食べてエネルギーを獲得する」ために人間が栽培していることも、ある程度利害関係が一致しているといえる。このように植物と人間が同じ方向性の目的を持つ時は、比較的容易に利用につながると考えられるが、その一方でセルロース系バイオマスを構成糖にまで分解して利用したいという人間の思惑は、決して植物側に受け入れられるものではない。すなわち、なるべく軽くて強い繊維として利用できて、しかも長い時間分解されないように設計されているセルロース系バイオマスを、いかに低コストかつ低エネルギーで分解できるかを考えている著者らのような研究者は、植物とは反対の立場にいることになる。しかしながら、自然界というのはうまく出来ているもので、著者らと同じ立場にいる生物も存在する。一般的に「分解者」として知られている微生物である。すなわち、自然界で著者たちと同じような目的を持って生きている微生物そのもの、もしくはそれら微生物が生産する酵素を使いこなすことができれば、セルロース系バイオマスをより高度に利用できるに違いない、これが著者のような分解利用の研究を行っている研究者のモチベーションであると言える。

2. セルロース分解酵素研究の概史

セルロースの生分解に関する研究の歴史では、例えば Tetrault の総説¹⁾によると、1850年にはすでに Mitscherlich の細菌によるセルロースの分解に関して報告²⁾があるとされており、Pigman³⁾によるとセルロース分解に関する最初の「unequivocal (明確)」な研究は Seillière によるカタツムリ (*Helix pomatia*) の消化管の研究⁴⁾であるとされている。どちらも原著は英語で書かれた文献ではないので、著者には詳細に読むことができていないが、当時の科学レベルを考えると酵素の研究と言うよりはむしろ発酵の研究であったと想像される。セルロースの酵素による分解機構に関して最初に提示された学説は、著者が知る限りでは1950年に Reese らによって発表された C_1 - C_x 説である⁵⁾。本学説において Reese らは、セルロースの分子間（セルロース分子鎖間）の水素結合を切ることができる C_1 酵素（水素結合切断酵素, hydrogenbondase と呼ばれていた）がはじめに重合度 (Degree of polymerization; DP) を落とすことなくセルロース分子鎖を水和し、その後に加水分解活性を有するセルラーゼ (C_x 酵素) がセルロース分子内のグルコシド結合を加水分解するとしている。その後1960年代になると酵素を精製する技術がセルラーゼにも応用されるようにな

り、その過程で C_1 酵素の正体がセルロースから DP が2の生成物、すなわちセロビオースを生産する酵素であることが明らかとなり、セルロース分子鎖の末端から加水分解を行うという意味を持つエキソグルカナーゼ (exo- β -1, 4-glucanase) と名付けられた⁶⁾。後にこの酵素は定義を狭められて、セルロース分子の末端からセロビオースを切り出す酵素、すなわちセロビオヒドロラーゼ (cellobiohydrolase; CBH) と呼ばれるようになる。一方、 C_x 酵素に関しては、セルロース分子を鎖の途中からランダムに切断するエンドグルカナーゼ (endo- β -1, 4-glucanase; EG) であることが明らかとなり、これら2種類の酵素を混ぜ合わせると相乗作用が観察されたことから、1960年代後半以降は新しいセルロースの酵素分解機構として endo-exo 説が、子囊菌 *Trichoderma koningii* および担子菌 *Sporotrichum pulverulentum* (現在の *Phanerochaete chrysosporium*) などによって提唱された^{6, 7)}。すなわち、最初に EG によってセルロース中に存在する非晶領域が分解され、その後 EG によって作り出された末端を CBH がセロビオース単位で順に削りだしていくという機構が考えられた。

これらのセルラーゼに関する研究が、主に酵素の反応性をもとに議論されてきたのに対して、1980年代後半には分子生物学の進歩に伴って、これらの酵素をアミノ酸配列によって分類する試みが為されるようになった。Henrissat らは、様々なセルラーゼのアミノ酸配列を疎水的クラスター解析 (hydrophobic cluster analysis, HCA) に供することで、セルロースを加水分解するドメイン (触媒ドメイン) がいくつかの集合 (ファミリー) に帰属できることを示し、糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase: GH) ファミリーに分類するとともに、セルロース結合性ドメインに関しても同様に糖結合性モジュール (carbohydrate-binding module: CBM) ファミリーに帰属した⁸⁾。さらに1990年代に入ると、様々なセルラーゼの立体構造が明らかとなり、特に CBH と EG の活性の違いが立体構造の差異から説明されるようになった。子囊菌 *Trichoderma reesei* が生産する CBHI と EGI に関して触媒ドメインの構造⁹⁻¹¹⁾を比較すると、タンパク質としての全体構造は似ているが、活性部位の構造が異なることが明らかとなった。すなわち、CBHI では活性中心付近のループによってトンネル状の活性部位が形成されるのに対して、EGI ではこのようなループ構造は存在せず、活性部位は溝状であったことから、活性部位付近のループ構造がセルロース分子鎖を末端から

捉えるか途中から捉えるかを決めていると考えられるようになった。このようなCBHとEGが構造の違いは、他のGHファミリー(GHファミリー6など)にも当てはまったことから、活性中心を覆うループ構造がCBHとEGの活性の違いを生み出す理由であると考えられた。しかしながら、これらの構造情報はあくまで静的(static)であり、酵素の活性という動的(dynamic)な現象を説明するには至らなかった。

3. 静から動へ

今世紀に入ると、原油価格の高騰や地球温暖化問題を発端にバイオマス利用の機運が高まり、それと同時にセルラーゼ研究が再び脚光を浴びることとなった。20世紀のセルラーゼ研究と今世紀の研究の大きな違いは、これまでに得られた静的な情報をいかに動的な解析につなげるかというアプローチが行われたことであろう。その中で著者らは、セルラーゼが固液界面で働く酵素であることに着目し「表面密度」を用いた生化学的な解析手法を確立した¹²⁾。一方、著者らはそれまでに行われてきたようなバルク(bulk)の生化学実験だけでなく、酵素の動態を分子レベルで解析するいわゆる単分子解析をセルラーゼに当てはめる実験を精力的に行ってきた。高速原子間力顕微鏡を用いたセルラーゼの一分子動態解析(Fig. 1)に世界ではじめて成功し、セルロース表面におけるセルラーゼ分子の移動と活性が密接に関わっていることを示し^{13, 14)}、セルラーゼの速度低下がセルロース表面における分子の渋滞によることを証明した¹⁵⁾。さらにコンピュータシミュレーションに

よる分子動力学的(Molecular Dynamic; MD)解析¹⁶⁾や単分子蛍光顕微鏡観察¹⁷⁾を組み合わせることでセルラーゼの活性と構造の相関を明らかにすることを試みた。その一例として、上に書いたセルラーゼのループ構造とプロセシビティ(加水分解反応の連続性)の関係を調べたところ、ループの数が多い*T. reesei*由来のCBHI(Cel7A)は、プロセシビティが高くセルロース表面における分子の移動速度が遅いのに対して、同じファミリーに属する*P. chrysosporium*のCel7CおよびCel7Dでは、移動速度が速いがプロセシビティが低い、すなわちプロセシビティと移動速度の間には「トレードオフ」の関係が成り立つことを明らかにした¹⁸⁾。このような単分子解析は、自然界でセルロースと同じように構造多糖として存在するキチンの酵素分解にも応用されており¹⁹⁾、これら分解酵素の構造機能相関がより深く理解され、得られた情報がバイオリファイナリーの実現に貢献できると著者は確信している。

4. おわりに

今回木材学会60周年記念行事の一環として寄稿させていただいたが、60年前というとReeseが微生物によるセルロース分解過程における酵素の反応メカニズムを推測し始めた頃である。著者が生まれる20年も前、研究を始める40年も前にReeseが興味を持った「化学的に安定なセルロースがどのように酵素によって分解されるのか」という命題に対して、著者自身も20年間取り組み、その結果最近になってようやくセルロース分解の現場を分子レベルで観察することができるところに至ったのは、大変名誉なことである。この間、微生物の形態観察から光学顕微鏡を用いた組織の観察、電子顕微鏡を用いたミクロフィブリルの観察を経て、ついに高速原子間力顕微鏡によるセルラーゼ分子の観察にたどり着くことができた訳だが、この成功は技術の進化をなくしてはありえなかった。ただ、それにも増して重要なのは、Reeseが思いを馳せた(であろう)セルラーゼのメカニズムに関して、60年経った現在でも(少なくとも著者には)その興味が受け継がれているということではないだろうか。技術の進化は必ずしも一人の人間の一生のうちに起こるわけではないため、次世代にその重要性和楽しさをいかに伝えるかが、真実の追究には重要となる。そう考えると次の20年に向けてどのようなアプローチが可能かということになるのだが、すでにセルラーゼと呼べる最小単位である「分子」の観察に成功しており、分子動力学的計算によってその挙動まで明らかになりつつある

Fig. 1. (A) Time lapse images of *TrCel7A* molecules on crystalline cellulose observed by HS-AFM. Red and white arrows indicate individual mobile and immobile molecules, respectively. Bar indicates 50 nm. Schematic representation of the interaction of *TrCel7A* and the hydrophobic surface of crystalline cellulose (B) and slice image of crystalline cellulose with *TrCel7A* adsorbed at the 110 face of the crystal (C).

ことを考えると、セルラーゼの反応メカニズムに関しては近い将来その全貌が解き明かされることであろう。しかしながら、これはあくまで物質としての性質であり、生物の持つ複雑系を説明することは容易ではないと著者は考えている。はじめて *P. chrysosporium* によるセルロースの分解を目の当たりにした時の感動を、自分よりも20歳若い学生たちにいかに伝えるか、これこそが自然界におけるセルロース分解系の全貌を明らかにするために最も重要なテーマかもしれない。

5. 謝 辞

金沢大学の安藤敏夫教授、内橋貴之准教授、東京大学の鯨島正浩教授、和田昌久准教授（現京都大学准教授）、飯野亮太講師（現分子科学研究所教授）、木村聡助教、中村彰彦博士（現分子科学研究所助教）、VTT フィンランド国立技術研究センターのMerja Penttilä 研究教授、Anu Koivula 博士、東京工業大学の古田忠臣助教、その他セルラーゼの研究でお世話になった全ての方にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Tetrault, P. A.: The decomposition of cellulose in nature *Proc. Indiana Acad. Sci.* **39**, 137-151 (1930).
- 2) Mitscherlich, E.: Ueber die Zusammensetzung der Wand der Pflanzenzelle (in German) *J. Praktische Chemie* **50**, 144-152 (1850).
- 3) Pigman, W.: Introductory remarks. "Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials". Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford, 1963, pp. vi-vii.
- 4) Seillière, G. C.: Remarques sur l'hydrolyse diastasique de la cellulose du coton et de quelques autres polysaccharides (in French). *Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris)* **63**, 515-517 (1907).
- 5) Reese, E. T., Siu, R. G., 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).
- 6) Wood, T. M.: Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. Separation of components attacking native cotton. *Biochem. J.* **109**, 217-227 (1968).
- 7) Streamer, M., Eriksson, K. E., Pettersson, B.: Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. Functional characterization of five endo-1, 4- β -glucanases and one exo-1, 4- β -glucanase. *Eur. J. Biochem.* **59**, 607-613 (1975).
- 8) Henrissat, B., Claeyssens, M., Tomme, P., Lemesle, L., Mornon, J. P.: Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* **81**, 83-95 (1989).
- 9) Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K., Teeri, T. T., Jones, T. A.: The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* **265**, 524-528 (1994).
- 10) Divne, C., Stahlberg, J., Teeri, T. T., Jones, T. A.: High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* **275**, 309-325 (1998).
- 11) Kleywegt, G. J., Zou, J. Y., Divne, C., Davies, G. J., Sinning, I., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Srisodsuk, M., Teeri, T. T., Jones, T. A.: The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *J. Mol. Biol.* **272**, 383-397 (1997).
- 12) Igarashi, K., Wada, M., Hori, R., Samejima, M.: Surface density of cellobiohydrolase on crystalline celluloses. A critical parameter to evaluate enzymatic kinetics at a solid-liquid interface. *FEBS J.* **273**, 2869-2878 (2006).
- 13) Igarashi, K., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., Samejima, M.: High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* **284**, 36186-36190 (2009).
- 14) Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., Ando, T., Samejima, M.: Visualization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* moving on

- crystalline cellulose using high-speed atomic force microscopy. *Methods Enzymol.* **510**, 169-182 (2012).
- 15) Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttilä, M., Ando, T., Samejima, M.: Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science* **333**, 1279-1282 (2011).
- 16) Nakamura, A., Tsukada, T., Auer, S., Furuta, T., Wada, M., Koivula, A., Igarashi, K., Samejima, M.: The tryptophan residue at the active site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important for initiation of degradation of crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* **288**, 13503-13510 (2013).
- 17) Shibafuji, Y., Nakamura, A., Uchihashi, T., Sugimoto, N., Fukuda, S., Watanabe, H., Samejima, M., Ando, T., Noji, H., Koivula, A., Igarashi, K., Iino, R.: Single-molecule imaging analysis of elementary reaction steps of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I (Cel7A) hydrolyzing crystalline cellulose I α and III β . *J. Biol. Chem.* **289**, 14056-14065 (2014).
- 18) Nakamura, A., Watanabe, H., Ishida, T., Uchihashi, T., Wada, M., Ando, T., Igarashi, K., Samejima, M.: Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4584-4592 (2014).
- 19) Igarashi, K., Uchihashi, T., Uchiyama, T., Sugimoto, H., Wada, M., Suzuki, K., Sakuda, S., Ando, T., Watanabe, T., Samejima, M.: Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin. *Nat. Commun.* **5**, 3975 (2014).