ミニレビュー

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 69, No. 3, pp. 358~361, 1995]

カビのセルロース分解酵素遺伝子群†

荒井基夫

(大阪府立大学農学部)

1. はじめに

セルロース性物質は地球上で最も多く存在する有機物質であり、古くから人類はこのものをマキなどの燃料、建材、衣料、紙などに広く利用してきた。近年、世界的な人口増加とエネルギー危機が叫ばれているが、人類が消費するエネルギーに比べ、地球上で光合成で作られるバイオマスのエネルギーははるかに大きい。従って、バイオマスが再生産利用可能な資源として注目され、セルラーゼによるその利用開発が魅力ある研究分野となっている。また、農産廃棄物、都市ゴミの主成分はセルロース性物質であることを考えると環境問題からみてもセルラーゼは重要となろう。

2. セルラーゼによるセルロースの分解

カタクムリの消化管にセルラーゼが発見されて以来、生産する生物も多種多様である。セルラーゼは広く、動物、植物、微生物界に存在が知られてきたが、強いセルラーゼ生産生物としては細菌、放線菌、糸状菌などの微生物がある。中でも、カビが強いセルラーゼを生産し、市販のセルラーゼ剤もカビ由来のものが多く、表1にカビのセルラーゼ生産菌を示す。セルロースはグルコースが β -1, 4結合した直鎖状高分子であり、それらは水素結合で会合した強固な束となり、結晶性を有し、水不溶性であるが故にそれ自体は酵素（セルラーゼ）による分解がなかなか難しい。セルラーゼとはセルロースを分解する酵素（群）の総称として用いられているが、実はいろいろな作用をもつ酵素の集まりである。エンド型酵素、エキソ型酵素、 β -グルコシダーゼが主たるものでこれらの酵素が互いに協同（相乗）して天然セルロースを分解すると考えられている^(1,2)。まずエンド型酵素(EG)により非晶部分に切れ目が入り、

ついで増加した末端部をエキソ型酵素(CBH)がセロビオース単位に切断して徐々に分解される。そして生成したセロビオースなどは β -グルコシダーゼにより最終的にはグルコースにまで分解される。異なったセルラーゼ成分の相乗効果は不溶性セルロースを用いたときに現れる。その度合いは基質のタイプ、セルロースのオリジンによって異なり、この相乗効果のメカニズムは良く分かっていない。これを解析するためには、他のセルラーゼの混在があり得ない極めて純度の高い精製酵素群が必要であり、痕跡の不純酵素の混在を避けなければ結果の解釈を誤る可能性がある。今後、セルラーゼ遺伝子を実験菌などで発現させた他のセルラーゼ成分の混在があり得ない酵素を用い、これらの酵素の詳細な諸性質の解明とセルロース分解機構の解明が待たれている。

3. セルラーゼ遺伝子

セルラーゼ蛋白のエンドマン分解による酵素のアミノ酸配列の決定の例は極めて少なかったが、最近、DNAの塩基配列の分析の進歩によりセルラーゼ蛋白の一次構造が続々と解明されつつあり現在までに120以上のセルラーゼ一次構造が明らかになっている。これらのデータを基にしてコンピューターによるハイドロフォビッククラスター分析を含む相同性の解析からセルラーゼ群はいくつかのファミリーに分類されている。分類が試みられた初期には6~7ファミリーであったが、その後増えて、現在のところ11ファミリーに分けられている^(3~6)。このファミリーの酵素の分解生成物のアノマー型が一致しており、活性中心の構造、分解機作が良く似ているものと考えられる⁽⁷⁾。解析されているセルラーゼ群の中で、1種類の微生物が非常に多くのセルラーゼ成分を生産することが多いが、その微生物にとって何故これだけ多種のセルラーゼを生産する必要があるのか、微生物は一体セルラーゼ遺伝子は一体いくつ

† Cellulase Genes of Fungi.

Motoo ARAI (College of Agriculture, University of Osaka Prefecture)

表 1 セルラーゼを生成するカビ

<i>Acremonium</i> sp.	<i>Penicillium variable</i>
<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Penicillium verruculosum</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Pestalotiopsis westerdijkii versicolor</i>
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Pleurotus sajor-caju</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Polia placenta</i>
<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Polyporus schweinitzii</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Polyporus versicolor</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>
<i>Aspergillus saitoi</i>	<i>Rhizopus javanicus</i>
<i>Aspergillus sojae</i>	<i>Schizophyllum commune</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Scytalidium lignicola</i>
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<i>Sporotrichum pruinosum</i> 高
<i>Chaetomium cellulolyticum</i> 高	(<i>Chrysosporium pruinosum</i>)
<i>Chaetomium thermophile</i> 高	<i>Sporotrichum pulverulentum</i> 高
<i>Chaetomium globosum</i>	(<i>Chrysosporium lignorum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>)
<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Sporotrichum thermophile</i> 高
<i>Fusarium lini</i>	<i>Sporotrichum dimorphosporum</i> 高
<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Talaromyces emersonii</i> 高
<i>Fusarium solani</i>	<i>Termitomyces clypeatus</i>
<i>Humicola insolens</i> 高	<i>Thermoascus aurantiacus</i> 高
<i>Irpex lacteus</i> (<i>Polyporus tulipiferae</i>)	<i>Thielavia terrestris</i> 高
<i>Myceliophthora cellulophilum</i> 高	<i>Thielavia terrestris</i>
<i>Myrothecium verrucaria</i>	<i>Trametes sanguinea</i>
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Trichoderma koningi</i>
<i>Pellicularia fimentosa</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Penicillium notatum</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Penicillium putpurogenum</i>	

高：高温菌

あったら満足かという疑問がある。

これらのセルラーゼの一次構造の特徴は、シグナル配列のあとに、活性部位を含むコア部分（触媒ドメイン）、セルロース結合部位（バイディングドメイン、CBD）、それをつなぐリンカー（連結）領域からなっていることが多い。*Trichoderma reesei* のセルラーゼの例を図1に示す⁽⁸⁾。CBH 1とEG 1はC末端にリンカー、CBDが、CBH IIとEG IVはN末端にそれらがある。他のカビのセルラーゼにもこのようなドメインが認められることが多い。また、カビのセルラーゼ遺伝子にはイントロンが通常存在する。活性部位は未だ多くは明確にはされていないが、活性部位と考えられる部位には Asp, Glu が必ず存在している。

微生物由来の多くのセルラーゼは不溶性セルロースに吸着し、セルロースの非結晶部分から分解をはじめ

図 1 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ遺伝子の構造

る。セルラーゼがセルロースに吸着するためには、CBD^{9,10)}が必要である。このドメインはCBH I, IIでパパイン分解で明らかとなった。CBDはセルラーゼによるセルロースの効率的な分解のために重要な機能を果たしていると考えられる。このドメインはリンカーを介して触媒ドメインと隔てられており、触媒活性に必要なことが明らかにされている⁽¹¹⁾。CBDは5つのファミリーに分類される⁽⁹⁾。36から130アミノ酸残基からなり、触媒ドメインと比較すると分子量が小さい。CBDはヒドロキシアミノ酸の含量が高く、またトリプトファン、アスパラギン、グリシンおよびシステイン残基などは、種々のCBDによく保存されている。このような触媒ドメインと吸着ドメインとからなる構造は、キシラナーゼ、キチナーゼなどの他の不溶性多糖を分解する酵素にも存在することが明らかにされつつある^(10,12)。

リンカーはドメイン間に適当な距離を設けることによってドメインの機能を十分に発揮できるように働く⁽¹⁰⁾。リンカーはセルラーゼ以外にキシラナーゼ⁽¹⁰⁾やキチナーゼ^(13,14)などにも見いだされる。リンカーはプロリン、スレニオン、セリンに富む配列で、6残基から59残基までのアミノ酸で構成されるが、その長さやアミノ酸配列に関して法則性は見いだされていない。構成されるアミノ酸から考えると、この構造は棒状で、柔軟性に欠ける形態をとることから、プロテアーゼによる作用を受けやすいと考えられる。*T. reesei*⁽¹⁵⁾のセルラーゼでは、この領域にO-グリコシド型糖鎖が付加しており、プロテアーゼに対する抵抗性を高めている事が明らかになっている。また、この糖鎖が付加していることで、酵素と不溶性セルロースとアフィニティーが高まるという事も報告されている⁽¹⁶⁾。

4. セルラーゼの立体構造

いくつかのセルラーゼ蛋白の立体構造がX線結晶解析で明らかにされている。このうち、*Trichoderma*のCBHIのセルロース結合ドメインをプロテアーゼで除いたもの⁽¹⁷⁾、*Clostridium*のCelD⁽¹⁸⁾、*Thermomonospora*のEGE₂⁽¹⁹⁾などは β シートと α ヘリックスの堂々とした α/β バレル構造をとっており、互いによく似た立体構造をとっている。活性に関与するアミノ酸残基としてはAspなどが予想されている。これらのセルラーゼはいずれも分子量が4万以上する大きな蛋白であ

る。これに対して*Aspergillus aculeatus*のFICMセルラーゼ(分子量2万3千)の立体構造も明らかになっている。この蛋白は上記の酵素とは明らかに異なる構造をしている。即ち、3枚の大きな β シート構造と1つの α -ヘリックス構造を有しており、うち2枚の β シート構造は平行して頑丈な構造を作っている。他の β -シート構造は平行しているうちの2枚は1枚の β -シート構造とV字形に交差しており、2つの交差面の内側にクレフトが形成されている⁽²⁰⁾。この構造は*Bacillus pumilus*のXynA⁽²¹⁾と殆ど同じ構造をしていた。即ち、上記の分子量が4万以上のセルラーゼとは根本的に異なった構造をしている。即ち、セルラーゼの立体構造は分子量の大きさによって立体構造が2つのグループに分かれるのである。*Trichoderma*のCBHIのセルロース結合ドメインの立体構造がX線ではなく、NMRで解析されている。3つの β -シートから構成されており、親水性な面と疎水性な面からなり、2つのSS結合が存在している⁽²²⁾。セルロースへの吸着のメカニズムに関する知見が得られることが期待される。

5. おわりに

以上のべたように、セルラーゼ遺伝子や酵素蛋白の立体構造の解析はどんどん知見が蓄積されつつある。これとともに、セルラーゼの活性部位の解明、酵素のセルロースへの吸着の機構、CBHとEGの相乗効果の機構の解析も今後進められるべき課題である。相乗効果の機構が明らかになれば、いろいろのセルラーゼ群を目的に応じて好きなように調合して効率良いセルラーゼ剤を作ることが出来る。また、データを蓄積することにより、セルラーゼの蛋白化学、酵素化学、蛋白工学、遺伝子発現増強などの分野が発展することにより、キメラ酵素などを含む強力なセルラーゼ蛋白の設計が可能となろう。これにより、リグノセルロースを原料として付加価値の高い工業製品を作ることが可能となろう。一方、セルラーゼは最近木綿繊維の洗剤用としての生産が急速にのびており、さらに、繊維工業においては、木綿織物の減量加工による新しい風合いをもつ布地の開発、パルプ工業においては漂白、解繊などへの利用が試みられており、この方面でも注目すべき酵素となっている。以上、簡単にセルラーゼについて述べたが、別の文献^(23,24)などもを参照していただきたい。

- (1) M.C. Flickinger : *Biotechnol. Bioeng.*, **22** (Suppl 1) 27—48 (1980).
- (2) 村尾澤夫, 荒井基夫, 阪本禮一郎 : セルラーゼ, 講談社サイエンティフィック (1987).
- (3) P. Beguin : *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**, 219—248 (1990).
- (4) 大宮邦雄, 栗冠和郎 : 化学と生物, **32**, 373—380 (1994).
- (5) B. Henrissat, M. Claeyssens, P. Tomme, L. Lemesle & J.-P. Mornen : *Gene*, **81**, 83—95 (1989).
- (6) B. Henrissat & A. Bairoch : *Biochem. J.*, **293**, 781—788 (1993).
- (7) J. Gebler, N.R. Gilkes, M. Claeyssens, D.B. Wilson, P. Beguin, W.W. Wakarchuk, D.G. Kilburn, R.C. Miller, Jr., R.A.J. Warren, & S.G. Withers : *J. Bio. Chem.*, **267**, 12559—12561 (1992).
- (8) A. Goyal, B. Ghosh, and D. Eveleigh, Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, (Walker, L. P. & Wilson, D.B. eds.) pp.37—50, Elsevier (1991). (Reprinted from Bioresource Technology Vol.36 No.1)
- (9) J.B. Coutinho, N.R. Gilkes, R.A.J. Warren, D.G. Kilburn, & R.C. Miller, Jr. : *Mol. Microbiol.*, **6**, 1243—1252 (1992).
- (10) N.R. Gilkes, B. Henrissat, D.G. Kilburn, R.C. Miller, Jr., & R.A.J. Warren : *Microbiol. Rev.*, **55**, 303—315 (1991).
- (11) N. Din, N.R. Gilkes, B. Tekant, R.C. Miller, Jr., R.A.J. Warren, & D.G. Kilburn : *Bio/Technol.*, **9**, 1096—1099 (1991).
- (12) T. Watanabe, W. Oyanagi, K. Suzuki, K. Ohnishi, & H. Tanaka, *J. Bacteriol.* : **174**, 408—414 (1992).
- (13) K. Yanai, N. Takaya, N. Kojima, H. Horiuchi, A. Ohta & M. Takagi : *J. Bacteriol.*, **174**, 7398—7406 (1992).
- (14) M. Ueda, T. Kawaguchi & M. Arai : *J. Ferment. Bioeng.*, in press (1994).
- (15) M. Srisodsuk, T. Reinikainen, M. Penttila & T.T. Teeri : *J. Biol. Chem.*, **268**, 20756—20761 (1993).
- (16) E. Ong, D.G. Kilburn, R.C. Miller, & R.A. J. Warren : *J. Bacteriol.*, **176**, 999—1008 (1994).
- (17) Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J.K.C. & Jones, T.A. : *Science*, **249**, 380—386 (1990).
- (18) M. Juym A.G. Amit, P.M. Alzari, R.J. Poljak, M. Claeyssens, P. Beguin, & J.P. Aubert : *Nature*, **357**, 89—91 (1992).
- (19) M. Spezio, D.B. Wilson, & P.A. Karplus, *Biochemistry* : **32**, 9906—9916 (1993).
- (20) 畑 安雄, 名取耕一朗, 大井俊彦, 荒井基夫, 岡田弘輔, 勝部幸輝 : 農化 **65**, 356 (1991).
- (21) H. Moriyama, Y. Hata, H. Yamaguchi, M. Sato, A. Shimyo, N. Tanaka, H. Okada, & Y. Katube : *J. Mol. Biol.*, **193**, 237—238 (1987).
- (22) P.J. Kraukis, G.M. Clore, M. Nilges, A. Jones, G. Petterson, J. Knowles & A.M. Gronenborn : *Biochemistry*, **28**, 7241—57 (1989).
- (23) H.A. Gilbert & G.P. Hazlewood : *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 187—194 (1993).
- (24) K. Shimada, S. Hoshino, K. Ohmiya, K. Sakka, Y. Kobayashi, & S. Karita, ed., Genetics, Biochemistry, & Ecology of Liginocellulose Degradation, Uni Publishers, Co. Ltd. Tokyo (1994).