Aspects of Native Cellulose Microfibrils at Molecular Resolution

分子レベルの天然セルロースミクロフィブリルの課題

Sugiyama, Junji ; and Imai, Tomoya

Division of Wood Bioscience, Wood Research Institute, Kyoto University, Uji Kyoto 611-0011, Japan

FAX: 81-774-38-3635, E-mail: junjis@kuwri.kyoto-u.ac.jp, timai@kuwri.kyoto-u.ac.jp

Key Words : cellobiohydrolase, cellulose I, chain growth, electron diffraction, microfibril**Abstract**

Native cellulose is one of the best studied natural polymers. Cellulose is synthesized by the coordinated action of enzymatic polymerization coupled with instant crystallization into nascent cellulose microfibrils. This mechanism allows the generation of highly extended chains that can crystallize into microfibrils including two distinct crystalline moieties; cellulose I_α and I_β . The microfibrils are then assembled to form higher order structures such as layers, cell walls, fibers and tissues. Structural analyses of cellulose have been performed to determine both its primary structure and higher order structures as these markedly influence the function and properties of native cellulose. Here, we report recent advances in our knowledge regarding the structure of native cellulose at several different levels.

要 約

天然セルロースは数多い高分子の中でも最もよく研究されている。そしてセルロースが酵素によって重合・結晶化してミクロフィブリル構造を形成するという点については共通の認識となっている。この機構のおかげで、伸長鎖が形成され、それらが集合結晶化してミクロフィブリルとなる。またその際、 I_α と I_β に複合結晶化することが知られている。ミクロフィブリルはさらに、壁層、細胞壁、繊維、組織というようにレベルの異なる高次構造を形成する。セルロースの構造解析は、その一次構造から高次構造までを広く知ることの意味するが、それらがセルロース素材の機能や性質の根底にあるからである。本稿では、いくつかの異なる側面から見た、セルロースの構造に関する最近の我々の結果を紹介する。

A. Direction of Chain Growth

The development of molecular biological methods related to cellulose synthesis allows even those not well-acquainted with the field to imagine how it is produced in nature and how its mechanism of synthesis is related to the final structure of native cellulose. This field has been well covered in several review articles (1, 2). The biosynthesis of homopolysaccharides such as cellulose and chitin occurs by the sequential addition of subunits to elongating molecules. In both cases, polymerization includes the involvement of monomers with an activated group and its release, which leads to the addition of monomers to the polymer chain. There are two general mechanisms in this type of biosynthesis: addition may occur by the release of an activated group from the monomer, or by the release of an activated group from the growing end of the polymer chain. In the cellulose synthesizing system of *Acetobacter* sp., the nucleoside diphosphate glucose is known to be the precursor (3, 4). This molecule undergoes enzymatic polymerization coupled with instant crystallization to form nascent cellulose microfibrils (5). To date, all direct polymerization experiments from nucleotide sugars as substrates have shown that the addition of sugars occurs at the non-reducing end of the growing chain (6). However, if the lipid-linked intermediates found in the *Agrobacterium*

A. 分子鎖の伸長方位

最近のセルロース生合成に関する分子生物学の進歩は目覚しく、専門外の我々にもセルロースがいかに作られるかが、想像できるまでになってきている。この分野については、優れた総説がいくつもあるので参照いただきたい(1, 2)。セルロースやキチンのようなホモポリマーの生合成の場合は、伸長する分子鎖に連続的に構成サブユニットが結合していく。重合は、活性化されたグループを持つモノマーが、その部分を切り離して、伸長中のポリマー鎖に付加されることにより生じる。このような生合成機構には、一般に二通り考えられる。すなわちモノマーの付加が、活性化された官能基がモノマーから離脱することによっておきるか、それとも伸長中ポリマー鎖の末端から離脱することによっておきるかである。酢酸菌によるセルロース合成については、ヌクレオシド二リン酸グルコースが前駆体として知られており(3, 4)、この前駆体は、酵素による同時重合結晶化という一連の作業を通してミクロフィブリルとなる(5)。これまで、基質として糖ヌクレオチドを用いたセルロースの直接重合実験すべてにおいて、単糖は伸長中の分子鎖の非還元末端側に付加されることが示されている(6)。しかし、一部の土壌細菌で発見された脂質と結合した中間体が、セルロースの生合成

system are directly involved in cellulose biosynthesis (7, 8), the reducing end would be the acceptor for substrates as in the case of heteropolysaccharide synthesized *via* lipid-intermediates (9).

The chain polarity of cellulose in its crystallographic unit cell has long been a source of debate. This was mainly because the patterns of X-ray diffraction, electron diffraction, or spectroscopic techniques did not provide sufficient information to allow conclusive interpretation of the results. The monoclinic unit cell of cellulose was supposed to consist of two chains, which could be packed in either parallel or antiparallel orientation. By the middle of the 1970s, with the aid of computer chemistry such as packing energy calculation etc., the "parallel" model for cellulose I was found to be the most likely (10, 11).

The parallel model for cellulose had several advantages in that it is easy to envisage how the chains synthesized by a particular enzyme grow in one direction. The acceptance of this model coincided with the first demonstration of the ultrastructural features of putative cellulose synthases (12). Freeze fracture techniques revealed plasma membrane-bound synthase complexes in many cellulose-producing organisms, and thus elegantly demonstrated the tip-growth mechanism of cellulose.

Confirmation for the parallel orientation came in 1984 by two independent groups, both of whom visualized the chain polarity of cellulose microfibrils. By analogy to periodic acid-silver staining frequently used in histochemical identification of polysaccharides, the reducing ends of cellulose chains exposed at only one tip of a microcrystal were labeled with silver (13, 14). The other demonstration was based on the action of cellobiohydrolase II (now known as Cel6A (15)). This enzyme, regarded as an exo-type or more recently as an end-processive type (16, 17), eroded only one of the two tips of the microcrystals (18) (Fig. 1 bottom). These studies demonstrated unambiguously the parallel packing of the cellulose chains within native cellulose microfibrils.

Thus the parallel structure of cellulose was confirmed but there are two ways in which the two independent chains can be packed in a unit cell. This is not only because the monoclinic angle γ is obtuse but also because the cellulose chain is polar. Based on recent crystallographic nomenclature, alignment of chains with their reducing end pointing in the same direction as the crystallographic *c* axis is called "parallel-up" and the reverse is called "parallel-down".

Recently, we investigated the molecular directionality of the chains in a unit cell by electron microdiffraction analysis of labeled microcrystals (19). Our observations indicated the "parallel-up" model for native cellulose (Fig.1 middle). Having established the parallel-up model of cellulose, the directionality of the chains in a given microfibril could be identified simply by electron diffraction analysis because this technique does not require the visualization of the ends of the microfibrils nor any chemical labeling. We applied this technique to long microfibrils

と直接関係しているならば(7, 8)、脂質中間体経由で合成されるヘテロ多糖の場合(9)のように、還元末端側が基質のアクセプターになるであろう。

セルロース分子鎖の方位については、結晶学的単位胞における方位、ミクロフィブリルにおける方位というどちらの意味でも、最近までの長い間論議が交わされてきた。というのは、主に、X線回折、電子回折、または分光学的手法では十分な情報が得られず、断定するに至らなかったからである。セルロースの単斜晶の単位胞には分子鎖が二本存在するが、それを単位胞に充填するには、二本を同じ向きに配置するか(パラレル)、反対向き(アンチパラレル)に配置するかの二通りがある。1970年代の中頃までには、パッキングエネルギー計算等の計算化学の助けを借りて、「パラレル」構造がセルロースIに対して最も妥当であることがわかった(10, 11)。

セルロースのパラレルモデルは、ある一つの酵素によって合成される分子鎖が、一方向に伸びていく様子を無理なく考えることができるという点ですぐれている。これと時を同じくして、セルロース合成酵素と考えられる超微細構造の特徴が初めて示された(12)。凍結割断法により、セルロースを合成する多くの生物において、原形質膜に結合した合成酵素複合体が明らかにされ、セルロースの末端成長がみごとに示されたのである。

これらを確認する実験が1984年、2つの別々のグループにより報告された。両者とも、セルロースミクロフィブリルの分子鎖方位を視覚化したものであった。一つは、組織化学的に多糖類を同定する際によく用いられる、過ヨウ素酸-銀染色と同様の方法で、一本のセルロース微結晶の、片端のみに露出している分子鎖の還元末端を銀でラベルしたものである(13, 14)。もう一つの証明は、セロビオヒドロラーゼII(最近の命名法(15)ではCel6A)の作用に基づくものである。この酵素は、エクソ型、またより最近ではエンド-プロセス型とみなされているものであるが(16, 17)、微結晶の片方の末端のみを削り取ったのである(18)(図1下)。

セルロースのパラレル構造は議論の余地のないものになったが、単位胞の中に二本の独立な分子鎖を充填するには二通りある。これは単斜角 γ が鈍角であるということに加えて、セルロースの分子鎖に極性があることによる。最近の結晶学的な命名法に基づいて、その還元末端が、単位胞の*c*軸と同じ向きになるようにして分子鎖を配置した場合を、「パラレル-アップ」、逆の場合を「パラレル-ダウン」という。

我々は最近、還元末端をラベルした微結晶の微小部電子回折法により、単位胞内における分子鎖方位を調査し、「パラレル-アップ」構造の妥当性を結論づけた(19)(図1中)。セルロースの「パラレル-アップ」モデルが確立されたことにより、ミクロフィブリル内における分子鎖方位を微小部電子回折法により決定することが可能となった。ミクロフィブリルの末端の可視化、つまり化学的なラベリングが必要ないからである。よっ

Fig.1. Schematic presentation showing several structural aspects of cellulose microfibrils. (Top) Microfibrils are spun out from synthase complexes with their non-reducing ends toward the synthases. Short solid lines in cross-sections of microfibrils indicate cellulose molecules seen in cross-section. The number of chains depends on cellulose sources. Morphology of the microfibrils is distinct between typical I_{α} -rich and I_{β} -rich cellulose microfibrils. (Middle) Proposed unit cells of cellulose I_{α} and I_{β} , and the packing of cellulose chains in them. In both cases, reducing ends of chains have the same directionality of crystallographic c-axis. (Bottom) CBH I and CBH II have opposite sense of processivity. The morphology of degradation may be a clue to understanding more about the function of enzymes and also about the structure of a cellulose microfibril itself. R: reducing end, NR: non-reducing end, c: crystallographic c-axis

synthesized by and still attached to *Acetobacter* cells. Our results proved that the reducing end of the growing cellulose chains points away from the bacterium, and indicated that polymerization by cellulose synthase takes place at the non-reducing end of the growing cellulose chains(19) (Fig.1 top).

Acetobacter is known to incorporate UDP-glucose directly to polymerize cellulose (3, 4), and therefore the above mechanism agrees well with the experimental evidence of direct polymerization of UDP-sugars (6). Also this mechanism is highly likely in higher plant systems as there is good sequence

て、長いマイクロフィブリル、例えば、酢酸菌のような微生物に合成された直後のマイクロフィブリルの分子鎖方位を調しらべることが可能になった。この実験によって、伸長中のセルロース分子鎖の還元末端が、菌体の外側を向いていることが実証され、セルロース合成酵素による重合反応が、伸長分子鎖の非還元末端で起こることが示唆された(19) (図1上)。

酢酸菌は、UDPグルコースを直接取り込んでセルロースを重合することが知られているが(3、4)、今述べた重合機構はUDP糖からの直接重合の実験データと矛盾しない(6)。また、酢酸菌とコットンの間には、セルロース合成酵素の触媒部位の塩基配

homology in the catalytic units of cellulose synthase between *Acetobacter* and cotton (20). Apart from the directionality of the *c* axis, the *a** axis of cellulose I_α (see section B) is known to point outward from the cell, and thus cellulose synthesis seems highly organized (21). β -Chitin is another interesting and also important biopolymer that exists in the form of parallel-chain microfibrils (22). Similar analyses were carried out in our laboratory and revealed that the same mechanism applies to the β -chitin synthesizing system (23).

B. Crystal Structure

More than 60 years have passed since the general features of native crystalline cellulose were outlined by the Meyer and Mark group. The 3-dimensional structure of crystalline cellulose has been the focus of a number of investigations. Most of these studies assumed that all native celluloses have the same structure called cellulose I, and the structural variation among native celluloses of various biological origins has been ignored. This idea was proved to be false when the first CP/MAS ^{13}C NMR spectra of celluloses from a variety of sources became available. Atalla and VanderHart (24) were the first to analyze in detail such spectra and further studies proposed that each native cellulose was a composite of two different crystalline modifications, namely I_α and I_β . Infrared spectroscopy is another technique that can distinguish between cellulose samples from various organisms (25). Marrinan and Mann (26) were the first to describe the differences in the IR spectra of cellulose, and concluded that the structure of cellulose depends on the origins; however, their observation did not lead to the identification of two distinct crystalline phases.

In the scheme described above, all native celluloses can be classified into two families: those of algal and bacterial origins where the cellulose is rich in I_α component, and those of higher plants such as ramie and cotton where I_β is dominant. One important physical aspect of these allomorphs is that I_α is metastable and can be converted into I_β by hydrothermal treatment (27). This can also be achieved by high temperature treatment in organic solvents and even in helium gas (28).

The corresponding unit cells for cellulose I_α and I_β were determined as one-chain triclinic and two-chain monoclinic unit cells, respectively, by electron diffraction analysis of *Microdictyon* (green marine algae) cellulose (29) (Fig.1 middle). There is an emerging consensus for the existence of cellulose I_α and I_β (24), the corresponding unit cells, "parallel-up" packing of cellulose chains in the unit cell (19, 30), although the precise atomic coordinates of cellulose I_α and I_β are still to be established. With the development of new physical tools such as the synchrotron X-ray and neutron diffraction techniques together with the methods for the preparation of highly oriented specimens from highly crystalline cellulose materials (31), precise structures will be available in the near future (32).

列に相同性が見られることから(20)、酢酸菌で明らかになった合成機構は高等植物にも拡張可能であろう。また、*c*軸の方位に加えて、cellulose I_α の*a**軸(B章参照)は、常に細胞の外側を向いていることが知られており、セルロース合成は最終産物の結晶化まで高度に制御されていると思われる(21)。 β -chitinも重要かつ興味深い生体高分子の1つであり、平行鎖からなるマイクロフィブリルの形で存在する(22)。酢酸菌と同様の実験が我々の研究室で行われ、 β -chitinについても同じメカニズムが当てはまることが明らかにされた(23)。

B. 結晶構造

天然の結晶性セルロースの一般的な特徴が、MeyerとMarkのグループによって概説されてから60年以上が過ぎたが、結晶性セルロースの三次元構造は数多くの研究の焦点となってきた。ほとんどの研究は、セルロースIと呼ぶ統一的な構造を解明することを目標とし、生物種間における構造の変動についてはあまり注意が払われなかった。この種間における構造変動は、様々な起源のセルロースから、CP/MAS ^{13}C -NMRスペクトルが得られるようになって、再び注目されるようになった。AtallaとVanderHart (24)は、初めてこのスペクトルを詳しく分析し、個々の天然セルロースは、2つの異なる結晶成分、すなわち I_α と I_β の混合物であるという新しい提案に至った。赤外線吸収スペクトルもまた、セルロース試料の種特異性を調べることのできる手段である(25)。MarrinanとMann (26)が初めてこれを利用して、セルロースの構造がその起源によって二種類に大別できるという概念を導いたが、様々な量の二相の混合物であるという今日の見解には至らなかった。

上述した最近の二相説では、(MarrinanとMannが指摘したように)天然セルロースは2つのファミリーに分類される。すなわち、 I_α 量に富んでいる藻類とバクテリア由来のグループと、 I_β が多いコットン、ラミーなどの高等植物由来のグループである。これらのアロモルフについての重要な物理的特徴の一つは、 I_α は準安定であり水蒸気処理により I_β に変換可能であること(27)、またこれは有機溶媒やヘリウムガス中での高温処理によってもなされる(28)ということである。

I_α と I_β に対応する単位胞は、*Microdictyon*(海水性の緑藻)のセルロースの微小部電子回折実験より、一本鎖の三斜晶と二本鎖の単斜晶であると報告されている(29)(図1中)。セルロース I_α と I_β の存在(24)、各々に対応する単位胞、単位胞内におけるセルロース分子鎖の「パラレル-アップ」パッキング(19, 30)については、コンセンサスが得られつつあるようだが、 I_α と I_β のそれぞれに対する正確な原子座標はまだ決定されていない。高結晶性セルロースの高度配向化試料の調製方法の開発とともに(31)、シンクロトロンや中性子回折装置などの新しい分析装置の導入によって、新しい構造モデルが近いうちに発表されるだろう(32)。

In algal cellulose from the cell wall of *Microdictyon*, a microfibril model with distinct I_α and I_β domains along the fiber axis was proposed. The spatial distribution of the two crystalline domains is important to understand the mechanism of crystallization as well as the biosynthesis of cellulose microfibrils. This information, however, may not lead to a general model for cellulose microfibrils, partly because of the structural diversity depending on origin, and partly because of the lack of direct method for analysis. Atalla *et al.* (33) investigated the structure of nascent bacterial cellulose ribbons incubated in the presence of hemicellulosic materials. The addition of such molecules resulted in the formation of I_β -rich fibrillated sub-fibrils that were different from I_α -rich ribbons under normal culture conditions. A microfibril model was then proposed in which the I_β core sub-fibrils are packed into the superlattice of the I_α domain to form a ribbon-shaped microfibril. This model apparently explains the selective crystallization into I_α and I_β of higher plant cellulose under the influence of hemicellulose. However, electron diffraction with *Microdictyon* cellulose (29) did not support the existence of such a superlattice. Yamamoto *et al.* (34) proposed that cellulose I_α is formed under the stress caused by the twisting behavior of bacterial cellulose ribbons. In this model, the central part of the ribbon, the twisting axis of the corresponding ribbon, is considered to be rich in I_β and the I_α fraction increases in proportion to distance from the center. If this is the case, I_α and I_β domains should be located laterally rather than longitudinally. Kataoka and Kondo (35) investigated the structural change during the wood fiber formation by using FT-IR microscopy. They found that the primary cell wall was rich in I_α component, while the secondary wall was rich in I_β . Their results were interpreted as indicating that the induced strain by cell elongation may be the cause for the formation of metastable I_α phase and therefore the secondary wall deposited after cell elongation was rich in stress-free I_β .

Our recent study on several green algae showed again the existence of the two crystalline allomorphic domains along the fibril (36). These domains appeared either along the microfibril length as found in *Microdictyon* or laterally across the microfibril. When the two domains appear laterally, the interface between the two would be comprised of H-bonded (200) molecular sheets of cellulose. Interestingly, the details of the manner in which these two domains intermingle also seems to vary depending on the source of cellulose (36).

Diversity in morphology of the terminal complexes (TCs) and their pattern of aggregation could also yield the observed variety of cellulose structure (37). However, there is no simple relationship between the type of TC, the putative cellulose synthesizing apparatus, and the resulting crystal structure. The classification of native celluloses of various origins (38) and the systematic structural studies (39) in terms of the two crystalline phase system were performed to elucidate how the structure of

*Microdictyon*の細胞壁由来のセルロースで、 I_α と I_β の個々のドメインは、ミクロフィブリルの長さ方向に沿って存在しているというモデルが提案された。2つの結晶ドメインのこのような分布は、セルロースミクロフィブリルの生合成の理解と同様、結晶化のメカニズムを理解する上でも重要である。しかし、構造の種多様性のため、また一方では、直接的な解析手段を欠くため、セルロースミクロフィブリルに対する一般的なモデルを構築するのは一筋縄にはいかない。Atallaら(33)は、ヘミセルロース性物質の存在下で培養した、酢酸菌セルロースリボンの構造を調査した。このような物質を添加した結果、通常の培養条件ならば I_α -richのリボンが形成されるところ、 I_β -richのサブフィブリルが形成された。そこで、 I_β のコアから成るサブフィブリルが、 I_α の超格子の中に充填され、リボン状のフィブリルを形成するというモデルが提案された。このモデルは、ヘミセルロース成分の堆積が影響するという観点から、高等植物における I_α と I_β への選択的な結晶化を上手く説明できる。しかし、*Microdictyon*から得られた電子回折(29)は、このような超格子の存在を支持するものではなかった。より最近、Yamamotoら(34)は、酢酸菌セルロースの先天的なねじれによって生じた応力下では、 I_α が結晶化すると提案した。このモデルでは、リボンの中央部分、すなわちねじれの中心軸付近は I_β に富んでおり、 I_α 比は中心からの距離に応じて増加していくと考えられる。そうすると、 I_α と I_β のドメインは長さ方向にというよりは横方向に並ぶのが自然であろう。片岡と近藤により、分化中の木材繊維の構造変化が顕微FTIRにより調べられたところ、一次壁は I_α に富むが、2次壁は逆に I_β に富むことが判明した。その結果より、細胞伸長によってもたらされる応力下での結晶化が準安定な I_α の成因であり、それゆえに拡大後に堆積される2次壁はより安定な(内部応力の小さい) I_β に結晶化すると考えた(35)。

数種の緑藻についての最近の調査の結果、2つのアロモルフは分子軸に沿ったナノドメインを形成していることが再び結論づけられている。これらのドメインは、*Microdictyon*で見られたように分子の長さ方向に沿って交互に存在し、移行領域においてはミクロフィブリルを横切る方向にも混在しうる。これら2つのアロモルフが横方向に混在するとき、両者間の界面は水素結合により形成された(200)面の分子シートからなると予想され、興味深いことに、これら2つのドメインが混在している様子も、詳しく見るとセルロース種によって変動するように思われた(36)。

TCsの形態及び、それらの集合パターンの多様性もまた、セルロースの構造に様々な変化を与えうるであろう(37)。しかし、TCと上述したアロモルフの間に明らかな関係があると結論付ける直接的な証拠はまだない。一方で、セルロースミクロフィブリルの構造は生物の進化を反映しているのか、すなわち構造は遺伝学的に制御されているのかどうかについて解明するために、様々な種由来の天然セルロースの分類(38)及び、二相性

cellulose microfibrils reflects evolution or is genetically regulated. Such attempts are generating some interesting information, but full elucidation must wait until the cellulose synthases from various sources and their functions are unambiguously identified.

C. Microfibrils – Inner Lattice Organization and Molecular Topology at the Surface

At the ultrastructural level, the precision of description of the cellulose structure relies on the resolution of transmission electron microscopy (TEM) and the development of other methods of visualization such as STM and AFM. Although cellulose was examined by electron microscopy as early as the 1940s (40), the direct inspection of its structure had to await the development of electron diffraction, cryomicroscopy, and high-resolution low-dose imaging techniques. The first lattice image of native cellulose (41, 42) was obtained from *Valonia* (green marine algae) which is now known as typical I_α -rich cellulose. At present, it is possible to directly image the crystal lattice at a resolution of around 0.4 nm, and it is thus possible to visualize individual molecules when the crystals are properly viewed from their molecular axis (42, 43, 44).

Apart from the crystal unit cell, what is the difference between I_α and I_β ? This simple question prompted us to investigate the molecular arrangement in I_β -rich cellulose microfibrils (*Halocynthia* sp., tunicate cellulose) (44) and a comparison was made with the reported I_α -rich algal (*Valonia*) cellulose microfibril (42). The molecular arrangement of cellulose chains intersected by the 0.6 nm, 0.53 nm and 0.39 nm equatorial lattice planes was clearly imaged over the whole area of parallelogram-shaped cross-sections of microfibrils. One set of sides of the parallelogram was parallel to the 0.6 nm lattice plane, while the other set did not correspond to any crystallographic plane. Such organization is distinct from previous findings in algal cellulose I_α -rich microfibrils, which have an almost square cross-section bounded by 0.62 nm and 0.53 nm crystallographic planes (see Fig.1 top). This peculiar shape of tunicate microfibrils may give clues to understanding the details of the two-step crystallization mechanism proposed by Cousins and Brown (45).

Atomic force microscopy is a relatively new tool for the detailed structural investigation of biological materials. The sharp tip of a very elastic cantilever is raster-scanned over the specimen, and a detection system monitors the deflection of the cantilever as it passes over surface features. The usual mode is to control either the distance between the tip and sample or to monitor the force of direct contact with the specimen. Even in the first application to cellulose microcrystals, the resolution was good enough to visualize the displacement of surface molecular chains (46, 47).

A recent AFM study revealed the surface chain arrangements and differences between the triclinic I_α and monoclinic I_β

に基づいたセルロース結晶のシステマティックな構造の研究(39)がなされた。このような試みはまだ推測でしかないが、様々な生物種のセルロース合成酵素とその機能が明確に同定されるまでは、何らかの示唆を与えてくれると期待される。

C. ミクロフィブリル内部における格子の形成と表面における分子のトポロジー

超微細構造のレベルでは、セルロースの構造の記述における精度は、透過型電子顕微鏡(TEM)の分解能の向上や、STMやAFMなどの他の観察装置の発達によって決定される。セルロースは、1940年代の電子顕微鏡の発明直後から常に観察対象となってきたが(40)、直接観察が可能となったのは、電子回折、低温電子顕微鏡法、低照射量による高分解能電子顕微鏡法を使いこなすようになってからである。最初の天然セルロースの格子像(41, 42)は、今では典型的な I_α -richなセルロースとして知られている *Valonia* (海水産の緑藻)より得られたものである。現在では、結晶格子をおよそ0.4 nmの解像度で直接観察することができ、結晶を分子鎖の方向から正しく見た場合、個々の分子を可視化することすら可能となっている(42, 43, 44)。

結晶単位胞の差のほかに、 I_α と I_β の違いはあるのだろうか？この素朴な疑問をきっかけに、我々は I_β -richなセルロースミクロフィブリル(*Halocynthia* sp., ホヤのセルロース)における分子の配列を調査し(44)、すでに報告されている I_α -richな藻類(*Valonia*)のセルロースミクロフィブリル(42)と比較を行った。その結果、ミクロフィブリルの平行四辺形断面全域に0.6 nm、0.53 nm、0.39 nm間隔の赤道格子面を形成するセルロース分子鎖の配列を、明瞭に記録することができた。この平行四辺形の一辺は0.6 nm格子面に平行であったが、もう一辺はどの結晶格子面とも一致しなかった。このような構成は、藻類セルロースの I_α -richなミクロフィブリルとは明確に異なっていた。すなわち藻類セルロースでは、0.62 nmと0.53 nmの両結晶面で囲まれた、ほぼ正方形の横断面となっていた(図1上)。このような I_β -richなセルロースの直接観察結果は、セルロースが2段階に結晶化するとしたCousinsとBrownの提案(45)を支持するように思われる。

原子間力顕微鏡は、様々な生物素材の詳細な構造研究を可能とする比較的新しい装置である。高弾性のカンチレバーの先端に固定された鋭いチップが、試料上を走査し、検知系は、表面上の特徴を通過したときのカンチレバーの変位をモニターするようになっている。通常モードでは、チップと試料間の距離、もしくは試料と直接接触した後の力のどちらかをコントロールするよう操作される。はじめてセルロース結晶へ応用されたときすでに、表面分子鎖の配置を可視化するに十分なほど分解能は高かった(46, 47)。

最近の高分解能観察では、表面の分子鎖の配列や、三斜晶の I_α ドメインと単斜晶の I_β ドメインの間における違いが明らかに

domains (48, 49). The resolution achieved is already as good as that obtained from high resolution TEM, and thus this method will facilitate a new field of analysis of the interactions of cellulose molecules under various conditions, for instance with enzymes in a liquid environment.

D. Enzymatic Degradation

The enzymatic degradation of crystalline cellulose generally involves a number of steps related to the functions of enzymes as well as the structure of substrates. It is well known that the susceptibility of cellulose to cellulases from fungal sources varies depending of its origins. These variations have often been characterized in terms of crystallinity and the state of aggregation of cellulose microfibrils. However, neither crystallinity nor the aggregation of microfibrils is sufficient to fully describe the cellulose structure. As a crystalline substrate for cellulase experiments, microcrystalline cellulose standards such as Avicel and Whatman cellulose have been used. However, these materials are markedly different from cellulose microfibrils in the native state. This motivated us to analyze the degradation process of well-characterized native celluloses mainly by cellobiohydrolases.

Hayashi *et al.* (50, 51) demonstrated that the I_α -rich algal/bacterial celluloses are more susceptible to enzymatic degradation than I_β allomorphs. This seems to be consistent with the previous finding that I_α is thermodynamically less stable than I_β as indicated by the slightly lower density of I_α (29) and irreversible conversion to I_β (27). A comparison between degraded microcrystals of *Cladophora* (I_α rich) and tunicate (I_β rich) celluloses revealed that the former displayed shortening of the crystals and fibrillation after repeated treatments, whereas the latter primarily showed fibrillation (50). These differences suggest that there are supermolecular differences in cellulose crystals such as I_α/I_β allomorphy and their localization in microfibrils.

The initial stage of cellobiohydrolase action on crystalline cellulose materials is still controversial; *i.e.* whether it is *via* an endo-type mechanism that can initiate its reaction on any point of the surface or is an exo-type mechanism with an absolute requirement for chain ends. The ability to make sequential cuts once bound to the substrate and the one-way translational movement of the enzyme are generally accepted. Using soluble oligosaccharides as model compounds, cellobiohydrolases such as Cel7A (CBH I) have been shown to move from the reducing to non-reducing end, while others such as Cel6A (CBH II) move in the other direction (52, 53). This mode of action has been shown to be relevant to crystalline native substrates by electron microscopy visualization (18, 54) (Fig.1 bottom).

In conclusion, further characterization of cellulases from a variety of sources will provide an insight into the structures of native celluloses.

されている(47, 48)。達成された分解能は高分解能電子顕微鏡で得られるものと同程度であり、この方法が、例えば液体中での酵素との相互作用など、様々な条件下におけるセルロースの反応機構の研究分野において新しい切り口となることは間違いないだろう。

D. 酵素分解

酵素による結晶性セルロースの分解の過程は、本来、酵素の機能や基質の構造に関連した数多くの段階を含んでいる。菌由来のセルラーゼに対するセルロースの分解性が、セルロースの起源により変化することは、よく知られている。このような変化は、ミクロフィブリルの結晶性や集合状態といった観点から、しばしば調べられてきた。しかし、ミクロフィブリルの結晶性や集合状態のどちらも、セルロースの構造を完全に説明するには不十分である。AvicelやWhatmannセルロースなどの微結晶セルロース標準物質が、セルラーゼの実験における結晶性の基質としてよく使用されてきたが、これらの物質は、天然に存在するセルロースミクロフィブリルとは遠く似つかないものである。このことが、主にセロビオヒドロラーゼによる分解過程を、素性の明らかな天然セルロースについて解析する動機となった。

Hayashiら(50, 51)は、 I_α に富んだ藻類やバクテリアセルロースのほうが、 I_β よりも酵素による分解をより受けやすいことを示した。これは、 I_α の方が I_β よりも不安定であるという知見、すなわち I_α の方が若干密度が低いこと(29)や、不可逆的に I_β へ変態すること(27)を裏付けるものであろう。分解後の*Cladophora* (I_α -rich)とホヤ(I_β -rich)のセルロース微結晶を比較すると、前者では、結晶の短小化やフィブリル化が、繰り返し処理後に見られたが、後者ではもっぱらフィブリル化が見られた(50)。これらの違いは、 I_α/I_β アロモルフィズムや、それらのミクロフィブリル中での局在のような、セルロース結晶の超分子構造の違いを示唆している。

結晶性セルロースに対するセロビオヒドロラーゼの作用開始機構については、いまだ議論が続いている。すなわち、この酵素はエンド型で、その反応を表面上のどこからでも開始することができるのか、それともエクソ型であり、必ず分子鎖の末端を必要とするのかということについてである。一方、酵素が一度基質と結合すると、連続的に切断を行う能力を有すること(プロセッシビティ)、また酵素が基質上を一方通行的に移動することについては、一般的な合意が得られている。可溶性のオリゴ糖モデル化合物を分解した場合、Cel7Aのようなセロビオヒドロラーゼは、還元末端から非還元末端に向けて進行するが、一方Cel6A (CBHII)のような他のセロビオヒドロラーゼは、それとは反対方向に作用することが知られている(52, 53)。この反応機構は、今では結晶性の天然セルロースの場合についても、電子顕微鏡による可視化によって実証されている(18, 54)(図1下)。

結論として、どのような酵素がどのように分解するかをさらに突き詰めて明らかにすることで、セルロース構造の多様な側面がまだまだ見えてくる可能性がある。

References

1. Kawagoe, Y., and Delmer, D.P. (1997) *Genetic Engineer.*, **19**, 63–87
2. Delmer, D.P. and Amor, Y. (1995) *Plant Cell*, **7**, 987–1000
3. Glaaser, L. (1958) *J. Biol. Chem.*, **232**, 627–636
4. Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, H., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., and Benziman, M.: *Nature*, **325**, 279–281 (1987)
5. Benziman, M., Haigler, C.H., Brown, R.M.Jr, White, A.R. and Cooper, K.M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6678–6682
6. Robyt, J.F. (1979) *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 47–49
7. Matthyse, A.G., White, S. and Lightfoot, R. (1995) *J. Bacteriol.*, **177**, 1069–1075
8. Matthyse, A.G., Thomas, D.L and White, A.R. (1995) *J. Bacteriol.*, **177**, 1076–1081
9. Robbins, P.W., Bray, D., Dankert, M., and Wright, A. (1967) *Science*, **158**, 1536–1542
10. Gardner, K.H., and Blackwell, J. (1974) *Biopolymers*, **13**, 1975–2001
11. Sarko, A. and Muggli, R. (1974) *Macromolecules*, **7**, 486–494
12. Brown, R.M. Jr. and Montezinos, D. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 143–147 (1976)
13. Hieta, K., Kuga, S., and Usuda, M. (1984) *Biopolymers*, **23**, 1807–1810
14. Kuga, S. and Brown, R.M.Jr. (1988) *Carbohydr. Res.*, **180**, 345–350
15. Henrissat, B., Teeri, T., and Warren, R.A.J. (1998) *FEBS Lett.*, **425**, 352–354 (1998)
16. Henrissat, B. (1998) *Cellulose Commun.*, **5**(2), 84–90
17. Armand, S., Drouillard, Schüle, M., Henrissat, B., and Drigues, H. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 2709–2713
18. Chanzy, H. and Henrissat, B. (1984) *FEBS Lett.*, **184**, 285–288
19. Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J., and Henrissat, B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9091–9095
20. Pear, J.R., Kawagoe, Y., Schrechengost, W.E., Delmer, D.P. and Stalker, D.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12637–12642 (1996)
21. Sugiyama, J., Chanzy, H., and Revol, J.-F. (1994) *Planta* **193**, 260–265
22. Gardner, K.H. and Blackwell, J. (1975) *Biopolymers*, **14**, 1581–1595
23. Sugiyama, J., Boisset, C., Hashimoto, M., and Watanabe, T. (1999) *J. Mol. Biol.* **286**, 247–255
24. Atalla, R.H. and VandelHart, D.L. (1984) *Science*, **223**, 283–285
25. Sugiyama, J., Persson, J., and Chanzy, H. (1991) *Macromolecules* **24**, 2461–2466
26. Marrinan, J. and Mann, J. (1956) *J. Polym. Sci.*, **21**, 301–311; (1958) *ibid.*, **32**, 357–370
27. Yamanoto, H., Horii, F. and Odani, H. (1989) *Macromolecules* **22**, 4130–4132
28. Debzi, E.M., Chanzy, H., Sugiyama, J., Tekely, P. and Excoffier, G. (1991) *Macromolecules* **24**, 6816–6822
29. Sugiyama, J., Vuong, R., and Chanzy, H. (1991) *Macromolecules*, **24**, 4168–4175
30. Kroon-Batenburg, L., and Kroon, J. (1997) *Glycoconj J.*, **14**, 677–690
31. Nishiyama, Y., Kuga, S., Wada, M., and Okano, T. (1997) *Macromolecules*, **30**, 6395–6397
32. Nishiyama, Y., Langan, P., Okano, T., and Chanzy, H. (1998) Presented at 19th International Carbohydrate Symposium at San Diego.
33. Hackney, J.M., Atalla, R.H., and VandelHart, D.L. (1994) *Int. J. Biol. Macromol.*, **16**, 215–218
34. Yamamoto, Horii, F., and Hirai, A. (1996) *Cellulose*, **3**, 229–242
35. Kataoka, A. and Kondo, T. (1996) *Macromolecules*, **29**, 6356–6358
36. Imai, T., and Sugiyama, J. (1998) *Macromolecules*, **31**, 6275–6279
37. Brown, R.M.Jr. (1996) *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **10**, 1345–1373
38. Wada, M., Sugiyama, J., and Okano, T. (1995) *Mokuzai Gakkaishi*, **41**, 186–192
39. Koyama, M., Sugiyama, J., and Itoh, T. (1997) *Cellulose*, **4**, 147–160
40. Ruska, H. (1940) *Kolloid- Zeitschrift*, **93**, 163–167
41. Sugiyama, J., Harada, H., Fujiyoshi, Y., and Uyeda, N. (1984) *Mokuzai Gakkaishi*, **30**, 98–99; *Mokuzai Gakkaishi*, **31**, 61–67
42. Sugiyama, J., Harada, H., Fujiyoshi, Y., and Uyeda, N. (1985) *Planta*, **166**, 161–168
43. Helbert, W., Sugiyama, J., Kumura, S., and Itoh, T. (1998) *Protoplasma*, **203**, 84–90
44. Helbert, W., Nishiyama, Y., Okano, T., and Sugiyama, J. (1998) *J. Struct. Biol.* **124**, 42–50
45. Cousins, S.K. and Brown, R.M.Jr. (1995) *Polymer*, **36**, 3885–3888
46. Hanley, S.J., Giasson, J., Revol, J.-F., and Gray, D.G. (1992) *Polymer*, **33**, 4639–4642
47. Kuutti, L., Peltonen, J., Pere, J., and Teleman, O. (1994) *J. Microsc.*, **178**, 1–6
48. Baker, A.A., Helbert, W., Sugiyama, J., and Miles, M.J. (1997) *J. Struct. Biol.*, **119**, 129–138
49. Baker, A.A., Helbert, W., Sugiyama, J., and Miles, M.J. (1997) *Appl. Phys. A.*, **66**, s559–s563
50. Hayashi, N., Sugiyama, J., Okano, T., and Ishihara, M. (1998) *Carbohydr. Res.*, **305**, 109–116
51. Hayashi, N., Sugiyama, J., Okano, T., and Ishihara, M. (1998) *Carbohydr. Res.*, **305**, 261–269
52. Vrsanska, M., and Biely, P. (1992) *Carbohydr. Res.*, **227**, 19–27
53. Barr, B.K., Hsieh, Y.-L., Ganem, B., and Wilson, D.B. (1997) *Biochemistry*, **35**, 586–592
54. Imai, T., Boisset, C., Samejima, M., Igarashi, K., and Sugiyama, J. (1998) *FEBS Lett.*, **432**, 113–116

Received on November 4, 1998, accepted on December 4, 1998

Profile of the Authors

Junji Sugiyama

Junji Sugiyama obtained BS and MS degree in Agriculture from Kyoto University and a Doctor in Agriculture from the University of Tokyo. First visualization of cellulose crystal lattices by high-resolution electron microscopy was conducted by the late Prof. Harada during his MS thesis. He began his study on crystallography of native celluloses that have continued to date when he was a Research Associate of Prof. Okano, Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, the University of Tokyo.

His interest in crystallography and structure related chemistry was extended during his post-doctoral period in the laboratory of Dr. Chanzy, Plant Macromolecule Research Center (CNRS) at Grenoble in France. One of his many good memories is that he and his colleagues succeeded in proposing the unit cells of cellulose allomorphs; two crystal forms that exist in nature. More recently as an Associate Professor of Wood Research Institute, Kyoto University, he began structural studies that relate to the biological or biochemical aspects of cellulose and other related microfibrillar polysaccharides. A recent challenge has been the analysis of chain polarity during biosynthesis and biodegradation of these important biopolymers.

★★★★★★★★

Tomoya Imai

Tomoya Imai obtained BS degree from Department of Wood Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyoto University. He continued his MS degree at Wood Research Institute, Kyoto University, and began studies in crystallography of native celluloses by using electron microdiffraction and high-resolution cryomicroscopy. From 1997, he was awarded a scholarship for graduate students from the Japan Society of Promotion

of Science, and is now working towards his doctoral degree in Agriculture at the same institute. In his master thesis he was able to demonstrate that the algal cellulose microfibrils is a nano-composite consisting of cellulose I_α and I_β . One of his interests is to understand the co-crystallization mechanism of these cellulose allomorphs to form an apparently uniform microfibril and to regulate crystallization eventually. Although this goal still seems far away, he has the stamina to wrestle with this problem, thanks perhaps to his previous training as a long-distance cyclist.