

結晶性セルロース分解酵素の動的解析と

セルロース系バイオマス変換の高効率化

東京大学 大学院農学生命科学研究科 五十嵐 圭日子



緒言

セルロースは、グルコースが β -1, 4結合したホモ多糖であり、植物細胞壁の約50%を占める地球上で最も豊富に存在するバイオマスである。自然界では分子鎖が規則的にパッキングすることで結晶（セルロース I）を形成するが、天然セルロースは平均的に70%程度の結晶化度を有することから、セルロース系バイオマスの3分の1がセルロース I であると言える。セルロース I は構造多糖として優れた力学的強度を示すが、この力学的強度の高さがセルロース系バイオマスを利用するための大きな障害となっている。一方で、天然では光合成によって生産されたセルロースの大部分が、セルロース分解性の微生物によって資化されていることを考えると、私達が今後セルロース系バイオマスを有効利用していくためには、セルロース分解酵素（一般的にセルラーゼと総称されている）の分子機構を詳しく理解し、セルロース資化性の微生物によるセルロース分解系を模倣していくことが重要であると言える。

本発表では、不溶性基質であるセルロースをセルラーゼが分解し、可溶化した生成物を与えるという、一連の固液界面における反応を解析するために、演者らがこれまで取り組んできた生化学的な解析結果および、高速原子間力顕微鏡を用いた1分子観察結果を紹介するとともに、巧みにデザインされた糖質加水分解酵素の分子機構に関して考察したい。

セロビオヒドロラーゼの生化学的解析¹⁻⁷⁾

結晶性セルロースを分解する酵素の多くは、基質であるセルロースと反応させたときにセロビオース（グルコースの2量体）を生成物として与えることから、セロビオヒドロラーゼ（Cellobiohydrolase, CBH）と呼ばれてきた。我々はCBHの反応性を解析するために、結晶性セルロースの分解過程におけるCBHの吸着量（ A ）とセロビオース生成速度（ v ）を経時的にモニターし、飽和吸着量（ A_{\max} ）をセルラーゼに対するセルロースの相対的な表面積としたときに算出される表面密度（ $\rho = A/A_{\max}$ ）と、 v/A で定義される吸着酵素の比活性（ k ）を用いて、固液界面における酵素の反応速度を解析する手法を確立した。本解析手法を用いることで、セルロース試料の違いに由来するセルラーゼに対する表面積の違いや、加水分解反応時間に由来する表面積の変化を相殺し、セルロース表面に吸着した酵素1分子当たりの活性を算出できるようになり、固液界面におけるCBHの活性を詳細に評価することが可能となった。

シオグサ由来のセルロースに対して高温水蒸気処理、超臨界アンモニア流体処理、さらに両方の処理をして得られたセルロース I_{α} -rich, セルロース I_{β} , セルロース III_1 , セルロース I_{β}' に対する Ti Ce17A の活性を測定したところ、超臨界アンモニア流体処理を経て調製されたセルロース I_{β}' からのセロビオース生成速度は、同処理を経していないセルロース I_{β} と比較して1.5倍程度促進されていたが、酵素の吸着量も同程度増加していたことから、比活性はほとんど変化しないことが明らかとなった。この結果は、セルロース I_{β}' がセルロース I_{β} と比較してセロビオヒドロラーゼに対する反応点を多く持っていることを示しており、 Ti Ce17A が吸着すると考えられる疎水面が増加している可能性が示唆された。また、本解析手法が試料の調製過程の影響を受けることなく、セルロースの結晶構造に依存した $Ce17A$ 活性を測定できることが確認できた。さらに、セルロース III_1 に対する酵素の吸着量は他のセルロース試料と比較してほとんど変わらないのに対して、セロビオース生成速度は最大で10倍以上になることが明らかとなった。以上の結果は、 Ti Ce17A による高結晶性セルロースの分解において、酵素活性が結晶性セルロースのパッキングに大きく影響されることを示していると考えられた。

高速原子間力顕微鏡を用いたセロビオヒドロラーゼの1分子観察^{8,9)}

子囊菌 *Trichoderma reesei* は優れたセルロース分解性を有する糸状菌である。本菌が菌体外に生産する糖質加水分解酵素ファミリー7 に属する CBH (*TrCel7A*) が、結晶性セルロースを分解する様子を高速原子間力顕微鏡によって可視化したところ、本酵素は活性サイトに取り込んだ基質を 1 μm (約 1,000 セロビオース残基) 以上にもわたって連続的に加水分解しながら、基質表面を動く様子が観察された。さらに、不活性化した変異酵素 (E212Q) および活性サイトの入り口に位置するトリプトファンの変異酵素 (W40A) の動きを野生型酵素と比較した結果から、活性ドメインの基質結合サイト (サブサイト-7 から-1) および生成物結合サイト (サブサイト+1 から+2) のアンバランスさが連続的な加水分解 (プロセッシビティ) に重要な役割を果たしていると考えられた。また、天然セルロースではセルラーゼがモノレールのように一列に並んで進んでいるのに対して、アンモニアによる化学処理をして活性化したセルロースでは、表面に多くの「車線」ができていたために、酵素分子が動くことができる面積が広がっていることが明らかとなった。さらに、別の酵素 (*TrCel16A*) を添加することで、結晶性セルロースの表面に「入口」と「出口」が作られて、*TrCel7A* が渋滞せずに効率良く動けるようになっていた様子も観察された。アンモニア処理が結晶性セルロースの分解速度を向上すること、*TrCel16A* と *TrCel7A* の二つの酵素を使用することで効率良くセルロースが分解されることは、これまでも報告されていたが、これらの現象が「セルラーゼの渋滞解消」によって説明できるということは、今回の観察によって初めて明らかにされた。

まとめ

セルラーゼの動きを「空想」しながら行ってきた生化学的手法と、実際に分子を見るという「現実」の生物物理学的手法を組み合わせることで、これまで難解とされてきたセルラーゼの反応機構に多少なりともせまることができた。一方で、セルラーゼに組み込まれた基質を探し出すための工夫と、基質を探し出した後いかに基質から離れずに反応を進めるかという工夫、自然界がそのような分子機構の進化をセルロース高次構造の進化に沿わせてきたことは、石油から生分解性が低い物質を作り続けた私たちに反省を促しているようすらに思える。人類がセルロース系バイオマスを使いこなせるかは、その分子機構を利用できるかどうかにかかっていると演者は考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、金沢大学の安藤敏夫教授、内橋貴之准教授、岡本哲明博士、フィンランド技術研究センターの Anu Koivula 主任研究員、Merja Penttilä 研究教授、東京大学の鮫島正浩教授、和田昌久准教授、木村聡助教、(株) 生体分子計測研究所には多大なるご助力を賜りました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Igarashi, K., Wada, M., Hori, R., and Samejima, M., *FEBS J.* 273:2869-2878 (2006)
- 2) 五十嵐圭日子, 和田昌久, 鮫島正浩 *Cellulose Commun.* 13:173-177 (2006)
- 3) Igarashi, K., Wada, M., and Samejima, M., *FEBS J.* 274:1785-1792 (2007)
- 4) 五十嵐圭日子, 和田昌久, 鮫島正浩 *Cellulose Commun.* 15:164-167 (2008)
- 5) 五十嵐圭日子, 和田昌久, 鮫島正浩 *バイオブラジャーナル* 30:16-21 (2008)
- 6) Igarashi, K., Wada, M., and Samejima, M. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 21:13-22 (2009)
- 7) 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 *化学と生物* 47:323-328 (2009)
- 8) Igarashi, K., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., and Samejima, M., *J. Biol. Chem.* 284:36186-34190 (2009)
- 9) Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttilä, M., Ando, T., and Samejima, M., *Science* 333:1279-1282 (2011)