

トピックス

# 1 分子計測からわかるエクソ型セルラーゼの分子機構

飯野亮太<sup>1,2</sup>, 中村彰彦<sup>3</sup>, 五十嵐圭日子<sup>3</sup>, 鮫島正浩<sup>3</sup>

<sup>1</sup>自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター / 分子科学研究所

<sup>2</sup>総合研究大学院大学物理科学研究科機能分子科学専攻

<sup>3</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻

## 1. はじめに

植物の細胞壁から得られるセルロースは $\beta$ -グルコースが直鎖状に重合した高分子であり、バイオエタノールの原料として注目されている<sup>1)</sup>。しかしながらセルロースは植物の強度を担保する結晶性の構造多糖であり、その物理的・化学的安定性からオリゴ糖や単糖への分解が容易でなく、利用の障害になっている。

一方、自然界では、セルロースはカビやキノコなどの糸状菌や細菌などの微生物によって分解、代謝される。これらの微生物はセルラーゼと呼ばれる加水分解酵素群を菌体外に分泌してセルロースを分解する。糸状菌に特異的なセルラーゼの中で、セルロースを還元末端から分解するエクソ型セルラーゼのCel7は、結晶性セルロースの分解活性が高いことが知られている。

Cel7の中で最もよく研究されているのはカビの一種 *Trichoderma reesei* 由来の *Ti*Cel7A である。高速原子間力顕微鏡 (AFM) による観察で、*Ti*Cel7A は結晶性セルロースを分解しながら連続的に運動するリニア分子モーターであることが最近明らかにされた<sup>2), 3)</sup>。*Ti*Cel7A の運動を駆動するのは ATP ではなく、レールとなる結晶性セルロースの加水分解エネルギーである。また *Ti*Cel7A は固液界面で化学反応を触媒しつつ固体のセルロース上を運動する。これらの点で、*Ti*Cel7A はミオシンやキネシンとは作動機構が異なる新しいリニア分子モーターといえる。

結晶性セルロースにはいくつかの結晶形が存在する。自然界に存在するセルロース  $I_{\alpha}$  を超臨界アンモニアで処理するとセルロース  $III_1$  に変化する。興味深いことに、Cel7 によるセルロース  $III_1$  の分解速度はセルロース  $I_{\alpha}$  のそれに比べ5倍程度大きいことが報告されていた<sup>4)</sup>。この成果はセルロース分解の効率を改善する手法として注目されていたが、何故セルロース  $III_1$

がセルロース  $I_{\alpha}$  よりも分解されやすいのかは明らかではなかった。本研究では *Ti*Cel7A の生化学計測、蛍光1分子計測、および高速AFMによる1分子計測を駆使し、セルロース  $I_{\alpha}$  とセルロース  $III_1$  の加水分解反応のすべての素過程の速度パラメーターを求めて比較することで、その分解性の違いの原因を明らかにした<sup>5)</sup>。

## 2. 生化学計測: 酵素濃度依存性

まず生化学計測により、*Ti*Cel7A によるセルロース  $I_{\alpha}$  とセルロース  $III_1$  の分解活性を比較した。その結果、既報と同様の高い酵素濃度 (2  $\mu$ M) では確かに、単位酵素あたりのセルロース  $III_1$  の分解速度が3-4倍大きいことが確認された。ところが、酵素濃度を100 nM に下げたところ、単位酵素あたりセルロース  $I_{\alpha}$  の分解速度は上昇しセルロース  $III_1$  との差がみられなくなった。酵素濃度で分解速度が変わるのは何故だろう? セルラーゼの反応は固液界面で起こることがポイントになりそうだ。また *Ti*Cel7A はセルロース上で渋滞を起こし運動が阻害されることが報告されている<sup>3)</sup>。これもポイントになりそうだ。

## 3. 結合速度定数と解離速度定数の蛍光1分子計測

蛍光色素 Cy3 で標識した *Ti*Cel7A (Cy3-*Ti*Cel7A) を用い、結合速度定数と解離速度定数を1分子計測した。酵素濃度は30 pM で行った。Cy3-*Ti*Cel7A のセルロース  $I_{\alpha}$  および  $III_1$  への結合は非常に特異的で、ガラスへの結合はみられなかった (図 1)。尚、30 pM の低濃度ではセルロース上の Cy3-*Ti*Cel7A の密度は非常に低く (図 1B)、渋滞は起こらない。

セルロース  $I_{\alpha}$  および  $III_1$  への結合・解離のタイムコースから (図 1C)、セルロース単位長さ当たりの結合速度定数 ( $k_{on}$ , 図 2A)、および解離速度定数 ( $k_{off}$ , 図 2B) を計測した。興味深いことに、 $k_{on}$  の分布には

Molecular Mechanism of an Exo-type Cellulase Revealed by Single-molecule Analysis

Ryota IINO<sup>1,2</sup>, Akihiko NAKAMURA<sup>3</sup>, Kiyohiko IGARASHI<sup>3</sup> and Masahiro SAMEJIMA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Okazaki Institute for Integrative Bioscience/Institute for Molecular Science

<sup>2</sup>SOKENDAI

<sup>3</sup>The University of Tokyo

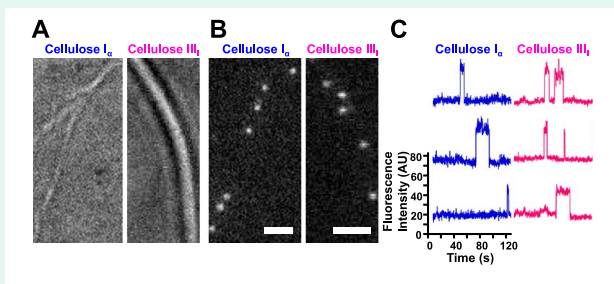


図 1 Cy3-TrCel7A の 1 分子蛍光イメージング。A, セルロースの明視野像。B, セルロースに結合した Cy3-TrCel7A 分子の蛍光像。スケールバー, 2 μm。C, 結合・解離のタイムコースの例。1 分子の輝点を含む 0.86 μm × 0.86 μm の領域の蛍光強度を計測。

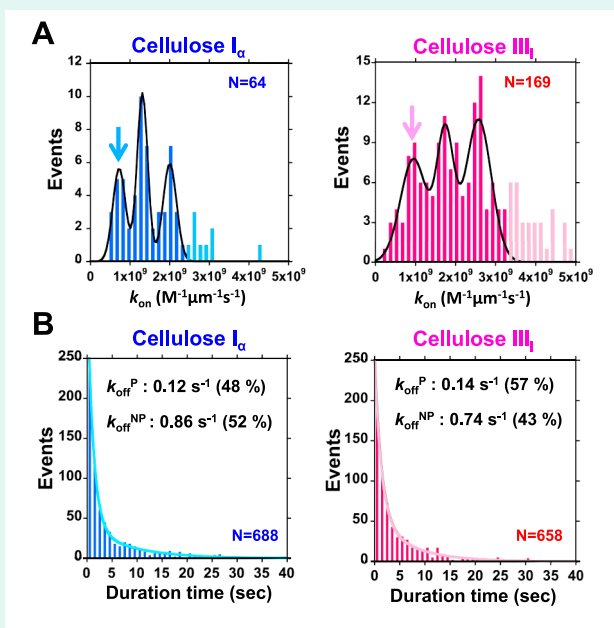


図 2 1 分子蛍光イメージングによる結合速度定数  $k_{on}$  と解離速度定数  $k_{off}$  の計測。A,  $k_{on}$  の分布。  $k_{on}$  は等間隔の複数のピークを示した。B, 結合持続時間の分布。分布から求めた  $k_{off}$  には 2 つの成分が存在した。

等間隔ずつ離れた複数のピークがみられた。高速 AFM と蛍光でセルロースを同時観察した結果<sup>6)</sup>, 複数のピークはセルロース微結晶の束の数に対応していることが明らかとなった。また, 微結晶 1 本の太さはセルロース I<sub>α</sub>, III<sub>1</sub> ともに 20 nm 程度でほぼ同じであった。微結晶 1 本に対応する最も小さいピーク (図 2B 矢印) を比較すると, セルロース I<sub>α</sub> と III<sub>1</sub> で  $k_{on}$  に大きな違いはみられなかった。また  $k_{off}$  の測定ではセルロース I<sub>α</sub>, III<sub>1</sub> ともに, 遅い解離と速い解離の 2 成分が観察された。遅い成分はセルロース上を運動・分解してからの解離 ( $k_{off}^P$ ), 速い成分は運動・分解を伴わない解離 ( $k_{off}^{NP}$ ) に相当する。セルロース I<sub>α</sub> と III<sub>1</sub> で  $k_{off}^P$  と  $k_{off}^{NP}$  の値や, 運動・分解後の解離の割合 (約 50%) に大きな違いはみられなかった。

尚, Cel7 がセルロースを分解するためにはセルロー

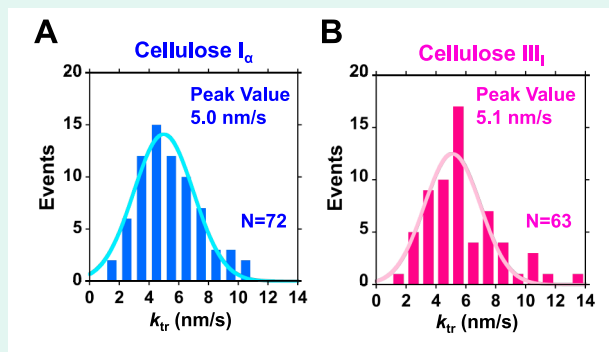


図 3 高速 AFM による運動速度  $k_r$  の 1 分子計測。

スの還元末端に結合する必要がある。本研究で用いた緑藻類由来のセルロースの重合度は  $10^3$  程度であり, 還元末端の密度は  $\beta$ -グルコース単位で  $1/10^3$  と非常に低い。運動・分解後の解離が約半分を占めるという結果は, TrCel7A は還元末端に非常に高い選択性で直接結合することを示唆している。

#### 4. 高速 AFM による運動速度の 1 分子計測

我々の蛍光 1 分子イメージングにおける位置決定精度は 10 nm 程度であり, Cy3-TrCel7A の運動速度の定量計測には十分ではなかった。そこで, 高速 AFM を用いてセルロース上の運動速度 ( $k_r$ ) を測定し比較した (図 3)。その結果, またもやセルロース I<sub>α</sub> と III<sub>1</sub> でほとんど違いがないという結果が得られた。

今回得られた  $k_{off}^P$  と  $k_r$  を考慮すると, Cy3-TrCel7A はセルロース I<sub>α</sub>, III<sub>1</sub> 上を約 40 nm ( $k_r/k_{off}^P$ ) 運動した後に解離すると予想される。実際に高速 AFM 観察では, TrCel7A はセルロース III<sub>1</sub> 上を同程度の距離移動した後に解離することが最近報告されている<sup>7)</sup>。

#### 5. セルロース I<sub>α</sub> と III<sub>1</sub> の分解性の違いのモデル

上述のように, 求めたすべての速度パラメーターはセルロース I<sub>α</sub> と III<sub>1</sub> で大きな違いはみられなかった。では, 高濃度の酵素で処理した時のセルロース I<sub>α</sub> と III<sub>1</sub> の分解性の違いは何に由来するのだろうか。セルラーゼの反応は固液界面で起こることを考慮し, セルロース I<sub>α</sub> と III<sub>1</sub> の構造モデルの違いに着目すると<sup>8),9)</sup>, 以下のように解釈できる。セルロース I<sub>α</sub> は親水的な (100) 面と (010) 面に挟まれた, 狭く疎水性の高い (110) 面を持つ (図 4A 左)。一方, セルロース III<sub>1</sub> は狭く疎水性の高い (110) 面に加え, 幅が広く中程度の疎水性を持つ ( $\bar{1}\bar{1}0$ ) 面を持っている (図 4A 右)。TrCel7A は疎水性のセルロース結合ドメインを介しセルロースに結合する。すなわち, TrCel7A のセルロースへの結合にはセルロース表面は疎水性である必要がある。セルロース I<sub>α</sub> は疎水性面の面積が小さいため, 高濃度の

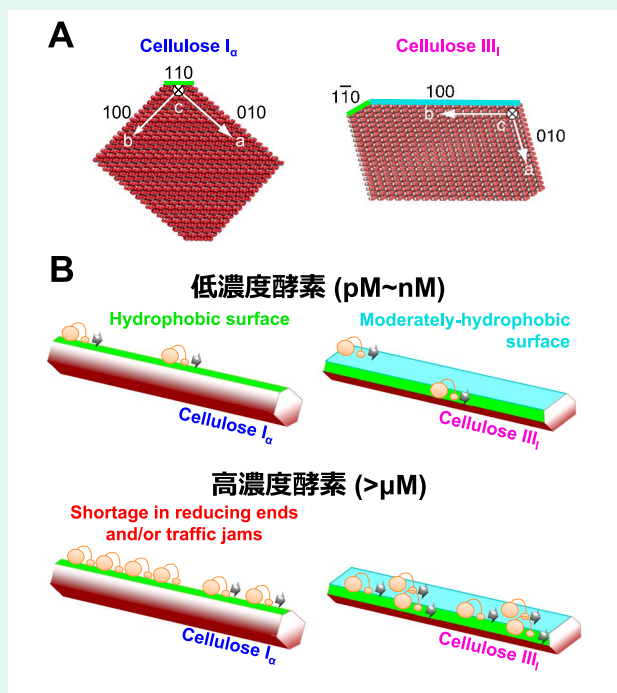


図4 A. セルロース<sub>I<sub>a</sub></sub>とIII<sub>I</sub>の構造モデル. B. セルロース<sub>I<sub>a</sub></sub>とIII<sub>I</sub>の分解性の違いを説明するモデル.

酵素では結合可能な表面が飽和し、さらにセルロース表面で容易に渋滞を起こすと考えられる(図4B左)。これらの原因で分解性が低下する。一方、セルロースIII<sub>I</sub>は広い疎水性面を持つため、高濃度の酵素でも結合可能な表面の飽和や渋滞が起こることなく高い分解性を保持できる(図4B右)。

## 6. | おわりに

冒頭で述べたように、TrCel7Aは新しいタイプの分子モーターである。今後は高精度な1分子計測により<sup>10)</sup>、運動のステップやポーズといった素過程を明らかにしたい。TrCel7Aは二糖単位でセルロースを分解するので予想されるステップサイズは1nmであり、計測は十分可能だと考えている。また運動の負荷依存性や化学力学共役の可逆性(後ろに引っ張ると合成するか?)も興味深い課題である。さらには、セルロースを非還元末端から分解するエクソ型セルラーゼのTrCel6AとTrCel7Aを同時に作用させると、結晶性セルロースの分解効率が大幅に向上するという「シナジー効果」が報告されている<sup>3)</sup>。1分子多色同時イメージングや1分子FRET等の手法を駆使し、この異種分子間の協調作用の仕組みを明らかにしたい。

## 謝辞

本研究は柴藤祐介氏(2014年修士号取得)が中心となり行ったものです。共同研究者の内橋貴之准教授

(金沢大学)、野地博行教授(東京大学)、安藤敏夫教授(金沢大学)に感謝します。また、セルロースを供給頂いた和田昌久准教授(京都大学)に感謝します。

## 文献

- Himmel, M. E. *et al.* (2007) *Science* **315**, 804-807. DOI: 10.1126/science.1137016.
- Igarashi, K. *et al.* (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 36186-36190. DOI: 10.1074/jbc.M109.034611.
- Igarashi, K. *et al.* (2011) *Science* **333**, 1279-1282. DOI: 10.1126/science.1208386.
- Igarashi, K. *et al.* (2007) *FEBS J.* **274**, 1785-1792. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05727.x.
- Shibafuji, Y. *et al.* (2014) *J. Biol. Chem.* **289**, 14056-14065. DOI: 10.1074/jbc.M113.546085.
- Fukuda, S. *et al.* (2013) *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 073706. DOI: 10.1063/1.4813280.
- Nakamura, A. *et al.* (2014) *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4584-4592. DOI: 10.1021/ja4119994.
- Nishiyama, Y. *et al.* (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14300-14306. DOI: 10.1021/ja037055Z.
- Wada, M. *et al.* (2006) *Macromolecules* **39**, 2947-2952. DOI: 10.1021/ma060228s.
- Ueno, H. *et al.* (2010) *Biophys. J.* **98**, 2014-2023. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.01.011.



飯野亮太

### 飯野亮太 (いいの りょうた)

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター/分子科学研究所. 博士(理学)  
研究内容: 分子機械の作動メカニズム  
連絡先: 〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山5-1

E-mail: iino@ims.ac.jp

URL: [http://groups.ims.ac.jp/organization/iino\\_g/index.html](http://groups.ims.ac.jp/organization/iino_g/index.html)



中村彰彦

### 中村彰彦 (なかむら あきひこ)

東京大学大学院農学生命科学研究科  
JSPS 特別研究員 PD. 博士(農学)  
研究内容: セルラーゼの分子機構

連絡先: 〒193-0843 東京都文京区弥生 1-1-1

E-mail: aki-naka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp



五十嵐圭日子

### 五十嵐圭日子 (いがらし きよひこ)

東京大学大学院農学生命科学研究科准教授. 博士(農学)

研究内容: セルロース分解に関わる酵素学および微生物学

連絡先: 同上

E-mail: kiyoi@kb3.so-net.ne.jp



鮫島正浩

### 鮫島正浩 (さめじま まさひろ)

東京大学大学院農学生命科学研究科教授. 農学博士  
研究内容: 林産学・森林生物化学

連絡先: 同上

E-mail: amsam@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp