

学 位 論 文 題 名

Studies on Enzymatic Degradation Mechanism of Native Cellulose

天然セルロースの酵素的分解機構に関する研究

学位論文内容の要旨

セルロースは太陽エネルギーを効率よく変換・備蓄したグルコースポリマーであり、年間およそ 10^{11} トン生産されると推定され、地球上の全有機物質の2/3を占める。セルロースを分解する酵素は、セルラーゼであるが、その最も重要な役割は枯死した藻類・植物が地球上に堆積することを防ぎ、自然界の炭素収支を円滑に維持することと考えられる。一方、将来における化石エネルギーの枯渇および食糧危機が指摘され、セルロース性バイオマスの有効利用に関する基礎研究の重要性が認識されてきた。本研究はセルロース分解菌 *Trichoderma viride* の産生するセルラーゼについて、その各種セルラーゼの精製法の確立、酵素学的諸性質の検討を行い、天然セルロースの酵素的分解機構を解明することを目的としてなされたものである。研究の結果は以下のように要約される。

1. セルラーゼの多様性：糸状菌 *T. viride* から得られた粗酵素標品（Meicelase, lot No. CEPB-5019）を酵素精製の出発材料とし、Amberlite CG-50, DEAE-Sephadex A-50, Bio-Gel P-100などの各種カラムクロマトグラフィーおよび等電点電気泳動法等により、電気泳動的に(PAGE および SDS-PAGE)それぞれ単一のバンドを与える10種のセルラーゼ（セルラーゼ I-a₁, I-a₂, I-b₁, I-b₂, II-a₁, II-b, II-c, III-a₁, III-a₂, III）および1種のβ-グルコシダーゼを得た。精製セルラーゼはそれぞれ固有の物理化学的性質を示し、セルロース性基質に対するエンド型水解度等、それぞれ特徴的な酵素学的諸性質を示した。
2. セルラーゼの相乗作用：従来、CMC およびアビセル糖化型セルラーゼによる天然セルロース分解において相乗作用が認められることが報告されてきた。アビセル糖化型セルラーゼ I-b₂, II-a₁, III と他のセルラーゼの相乗作用を検討した結果、セルラーゼ III と他のセルラーゼ間のみ相乗作用がみられた。
3. β-グルコシダーゼの転移・縮合作用：*T. viride* 由来のβ-グルコシダーゼは、セロオリ

ゴ糖，配糖体を水解して β -グルコースを生成する。本酵素に高濃度の β -グルコ二糖（セロビオース）を添加すると，その転移作用により， β -グルコ三糖，四糖等を生成することが明らかとなった。また，酵素・基質の高濃度下において，その縮合反応により， β -グルコースから特異的に β -グルコ二糖（ゲンチオビオース）を生成することが観察され，高温下，長時間反応においてその縮合・転移作用により収率50%以上で一連のゲンチオオリゴ糖が生成された。

4. セルラーゼの転移・縮合作用：セルラーゼII-bを *p*-nitrophenyl β -cellobioside (β -PNPG₂) に作用させると，セロトリオースの生成がみられた。これは，本酵素によりアグリコン結合が切断され，セロビオシル残基が他の β -PNPG₂ に転移されて *p*-nitrophenyl β -cellotetraoside が生成し，さらにそれが水解を受けセロトリオースと *p*-nitrophenyl β -glucoside が生成する反応機作によると推定された。通常，セルラーゼはセロビオースを分解できないがセルラーゼII-bを高濃度の β -セロビオースに作用させると，短時間で著しいグルコース生成がみられた。これは，セルラーゼII-bが β -セロビオースと他のセロビオースを特異的に縮合させ，セロテトラオースを生成させ，これを二次的に水解することにより，セロトリオースとグルコースを生成させることを示唆している。このグルコース生成を経時的に定量すると，シグモイド曲線を描くことから，このセロトリオースはさらに本酵素により還元末端側のグルコシド結合が切断され，グルコースが遊離し，一方，非還元末端側のセロビオシル残基は他のセロビオースに転移され，セロテトラオースが再生されるという経路が形成され，セロテトラオース濃度に比例して順次グルコース生成が行われることが推測された。

5. エキソセロビオヒドロラーゼ (CBH) の存在性： *T. viride* 由来の各セルラーゼのうち所謂CBHの範疇に属する可能性のある酵素は，セルラーゼI-b₂，II-a₁およびIIIである。これらのうち前二者はCMCに対するエンド水解度が明らかに高く，CBHには分類できない。一方，セルラーゼIIIは最もエンド水解度が低く，各種セルロース性基質に作用させるとセロビオースを生成したが，その他にグルコースを生成した。また，セロヘキサオースに作用させると反応初期において，セロトリオースを優先的に生成した。さらに高濃度のセロビオースに作用させると10日後には95%以上の転換率でグルコース生成が確認された。これは本酵素による縮合・転移・水解作用により，セロビオースから，セロテトラオース，セロトリオースが生成され，二次的にグルコースが生成したものと推測された。以上の結果，少なくとも *T. viride* のセルラーゼには，非還元末端側のセロビオシル基のみを認識する所謂CBHは存在しないことが明らかとなった。

6. 天然セルロースの酵素的分解機構： *T. viride* の各種生成セルラーゼ，あるいは *Trichoderma reesei*, *Hypocrea nigricans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium frequentans* 由来の各種

セルラーゼを高濃度のセロビオース溶液に作用させたところ、いずれもその縮合・転移・水解作用により、著しいグルコース生成がみられた。また、セロビオースにエンドセルラーゼを作用させる際、長鎖長のセルロース性基質を添加すると著しいグルコース生成がみられた。これは、セルロース性基質からセロビオシル基がセロビオースに転移され、セロテトラオースが生成し、さらにそれが水解を受けグルコースが生成するものと推測された。

以上の事実から、天然セルロースの酵素的分解は次の機作に従うと推測される。即ち、エンド型水解度を異にする各種セルラーゼの共同作用により、天然セルロースから主としてグルコースおよびセロビオースが生成される。そのセロビオースはエンドセルラーゼの転移・縮合・水解作用によりグルコースにまで変換される。セルロースから生成されたセロビオースが β -グルコシダーゼにより直接分解されずにグルコースに変換される機構の存在が明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 匂 坂 勝之助

副 査 教 授 冨 田 房 男

本論文は、英文148頁、図104、表11、5章からなり、ほかに参考論文3篇が付されている。

セルロースは地球上に年間およそ 10^{11} トン生産されると推定されているグルコースポリマーである。近年、セルロース性バイオマスの有効利用に関する基礎研究の重要性が指摘されてきた。

本研究は、セルロース分解菌 *Trichoderma viride* の産生するセルラーゼによる天然セルロースの酵素的分解機構を解明することを目的としてなされたものである。研究の結果は以下のように要約される。

1. セルラーゼの多様性：糸状菌 *T. viride* から得られた粗酵素標品 (Meicelase) を材料とし、Amberlite CG-50, DEAE-Sephadex A-50, Bio-Gel P-100等の各種カラムクロマトグラフィーおよび等電点電気泳動法等により、電気泳動的に (PAGE および SDS-PAGE) それぞれ単一のバンドを与える10種のセルラーゼ (セルラーゼ I-a₁, I-a₂, I-b₁, I-b₂, II-a₁, II-b, II-c, III-a₁, III-a₂, III) および1種の β -グルコシダーゼを精製した。精製セルラーゼはそれぞれ特徴的な酵素化学的諸性質を示した。

2. セルラーゼの相乗作用： 従来、CMC およびアビセル糖化型セルラーゼによる天然セルロース分解において相乗作用が認められることが報告されてきた。アビセル糖化型セルラーゼ I -b₂, II -a₁, III と他のセルラーゼの相乗作用を検討した結果、セルラーゼ III と他のセルラーゼ間のみ相乗作用がみられた。

3. セルラーゼの転移・縮合作用： セルラーゼ II -b を *p*-nitrophenyl β -cellobioside (β -PNPG₂) に作用させると、セロトリオースの生成がみられた。これは本酵素によりアグリコン結合が切断され、セロビオシル残基が他の β -PNPG₂ に転移されて、*p*-nitrophenyl β -cellotetraoside が生成し、さらにそれが水解を受けセロトリオースと *p*-nitrophenyl β -glucoside が生成する現象であると推定された。通常、セルラーゼはセロビオースを分解できないが、セルラーゼ II -b を高濃度の β -セロビオースに作用させると著しいグルコース生成がみられた。これはセルラーゼ II -b が β -セロビオースと他のセロビオースを特異的に縮合させ、生成したセロテトラオースを二次的に水解し、セロトリオースとグルコースを生成させることを示唆している。このセロトリオースはさらに還元末端側のグルコシド結合が切断され、グルコースが遊離する。非還元末端側のセロビオシル残基は他のセロビオースに転移され、セロテトラオースが再生すると推測された。

4. エキソセロビオヒドロラーゼ (CBH) の存在性： *T. viride* のセルラーゼのうち所謂 CBH の範疇に属する可能性のある酵素は、セルラーゼ I -b₂, II -a₁ および III である。前二者は CMC に対するエンド水解度が高く、CBH には分類できない。セルラーゼ III はエンド水解度が低く、各種セルロース性基質に作用させるとセロビオースを生成するが、その他にグルコースを生成した。セロヘキサオースに作用させると反応初期において、セロトリオースを優先的に生成した。高濃度のセロビオースに作用させると95%以上の転換率でグルコースが生成された。この結果は、本酵素の縮合・転移・水解作用により二次的にグルコースが生成したものと推測され、少なくとも *T. viride* のセルラーゼには、非還元末端側のセロビオシル基のみを認識する所謂 CBH は存在しないことを示している。

5. 天然セルロースの酵素的分解機構： *T. viride* のセルラーゼ、あるいは *T. reesei*, *H. nigricans*, *A. niger*, *P. frequentans* の各種セルラーゼを高濃度のセロビオースに作用させたところ、著しいグルコース生成がみられた。またセルロースの存在下でセロビオースに作用させると著しいグルコース生成がみられた。これはセルロースからセロビオシル基がセロビオースに転移されセロテトラオースが生成し、それが水解を受けグルコースが生成するものと推測された。以上の結果から、天然セルロースの酵素的分解は各種セルラーゼの相乗作用により天然セ

ルロースから主にグルコースおよびセロビオースが生成される。そのセロビオースはセルラーゼの転移・縮合・水解作用によりグルコースにまで変換される。セルロースから生成されたセロビオースが β -グルコシダーゼにより直接分解されずにグルコースに変換される機構の存在が明らかとなった。

以上のように本研究は、セルロースの酵素的分解機構の解明を意図してセルラーゼの反応性の解析を行ない、新しい分解機構を見出したものである。その成果は、学術的のみならず応用面においても寄与するところ大きいと評価される。

よって審査員一同は、別に行なった最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者田中義正は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。