

## 総説

# 高速原子間力顕微鏡による結晶性セルロース酵素分解のリアルタイム1分子イメージング

五十嵐圭日子<sup>1</sup>, 内橋貴之<sup>2</sup>, 鮫島正浩<sup>1</sup>, 安藤敏夫<sup>2</sup>

<sup>1</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

<sup>2</sup>金沢大学理工研究域数物科学系

We carried out the real-time visualization of individual cellulase molecules using a high-speed atomic force microscopy (HS-AFM), having sub-second time resolution and nanometer space resolution. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I (*Ti*Cel7A) molecules were observed to slide unidirectionally along the crystalline cellulose surface, and the catalytic domain without the cellulose-binding domain moved with a velocity similar to that of the intact *Ti*Cel7A enzyme although inactive mutant did not move, indicating a processive movement of the enzyme driven by the hydrolytic reaction. We also observed traffic jam of enzyme molecules and synergistic degradation of crystalline cellulose using HS-AFM.

cellulose / cellulase / high-speed atomic force microscopy / biomass utilization / cellobiohydrolase

## 1.

## はじめに

セルロースは、植物細胞壁の約半分を占める構成成分であり、地球上で最も豊富に存在する生物資源（バイオマス）である<sup>1)</sup>。化学的に安定な $\beta$ -1,4-結合と分子内および分子間の水素結合によって結晶性セルロース（セルロースI）を形成しているため、再生可能ではあるが難分解性のバイオマスである。その一方で、セルロース分解性の微生物はこのように難分解性のセルロースを常温、常圧下で分解してしまうことを考えると、セルロース分解酵素（セルラーゼ）による結晶性セルロース分解の仕組みを理解することで、**バイオリファイナリー**を基本とする環境適応型かつ循環型な社会の構築も実現可能となる。しかしながらセルロースの酵素分解で大きな問題とされているのが、セルラーゼによる結晶性セルロースの分解反応の遅さである。化学的に安定なセルロースの分解が、自然界において長い年月がかかることは当然のこととも言えるが、セルロースを工業的に利用するためには、短時間（長くとも数日程度）でグルコースにまで分解しなければ、石油を出発原料としたオイルリファイナリーには太刀打ちできない。このような背景の中、セルラーゼによる結晶性セルロースをいかに効率良く分解でき

るかを世界中の研究者が競い合っているのである。

本稿では、近年我々が結晶性セルロース表面におけるセルラーゼの挙動を観察するために取り組んでいる高速原子間力顕微鏡（high-speed atomic force microscopy; HS-AFM）によるセロビオヒドロラーゼ（cellobiohydrolase, CBH）分子の直接観察の結果に関して紹介させていただくとともに、そこから推測されたセルラーゼの反応機構に関して紹介させていただく。高速原子間力顕微鏡は、これまでの原子間力顕微鏡の1,000倍にも達する速い走査速度と、試料に与えるダメージを極限まで抑える制御回路の構築で、タンパク質のような柔らかい生物試料を無標識で直接観察することを可能にしたものであり<sup>2)</sup>、最近になって様々な生体分子の可視化に応用されてきている<sup>3)-5)</sup>。筆者らは、この高速原子間力顕微鏡を用いて、セロビオヒドロラーゼが結晶性セルロースを分解する様子を世界ではじめて観察することに成功したので報告する。

## 2. セロビオヒドロラーゼによるセルロースの分解

自然界において、セルロース分解性の微生物はCBHを生産することで、安定なセルロースIを加水分解して、セロビオース（グルコースが $\beta$ -1,4-結合し

Real Time Single Molecular Imaging of Enzymatic Degradation of Crystalline Cellulose by High-speed Atomic Force Microscopy

Kiyohiko IGARASHI<sup>1</sup>, Takayuki UCHIHASHI<sup>2</sup>, Masahiro SAMEJIMA<sup>1</sup> and Toshio ANDO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

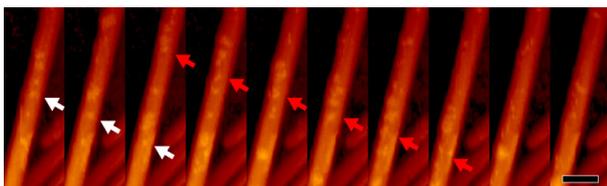
<sup>2</sup>Department of Physics, Kanazawa University

※図1-図4は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

た二糖)を生産する。そのような酵素の中で、子囊菌 *Trichoderma reesei* が生産する CBHI (*TrCel7A*) は、最も研究が進んでいる CBH の 1 つである<sup>6)</sup>。 *TrCel7A* は、糖質加水分解酵素ファミリー 7 に属する活性ドメイン、および糖質結合モジュールファミリー 1 に属するセルロース結合ドメインの 2 つのドメインからなるセロビオヒドロラーゼである<sup>7)</sup>。活性ドメインは、50 Å の長いトンネル構造をした基質結合サイトを有しており、セルロース分子鎖中のグルコース 9 残基を取り込んで、還元末端側からセロビオースを加水分解によって生成する<sup>8)</sup>。また、野生型 *TrCel7A* からセルロース結合性ドメインを欠落させると、結晶性セルロースの分解能が著しく低下するが、非晶性セルロースや可溶性のセロオリゴ糖の分解にはほとんど影響がないことが報告されている<sup>9)</sup>。このような生化学的および構造学的特徴から、*TrCel7A* はセルロース結合性ドメインによって結晶性セルロース表面に吸着し、さらに活性ドメインがセルロース分子鎖を連続的(プロセス)に加水分解して、セロビオースを生産していると考えられている<sup>10)</sup>。

### 3. 高速原子間力顕微鏡によるセルラーゼの可視化<sup>11)</sup>

緑藻由来の高結晶性セルロースをグラファイト基板に乗せ、*TrCel7A* を添加し、高速原子間力顕微鏡によって観察したところ、**図 1a** に示したように結晶性セルロース表面を動く粒子が多数観察され、この粒子は結晶性セルロースの軸方向に 1 方向に動いていることがわかった。以前の研究から、*TrCel7A* はセルロースの還元末端から加水分解を進行すると考えられており、さらに *TrCel7A* とインキュベートした結晶性セルロースは還元末端側から細くなっていくことが透過型電子顕微鏡によって観察されている<sup>12)</sup> ことから、*TrCel7A* は還元末端から非還元末端に向かって動いていると考えられた。*TrCel7A* のセルロース結合性ドメインは、3 つの芳香族アミノ酸によって結晶性セルロースの疎水表面 (110 面) に吸着すると考えられて



**図 1** 高速原子間力顕微鏡で 20 秒ごとの取得した *TrCel7A* の微速度映像。スケールバーは 50 nm で矢印はそれぞれ同じ *TrCel7A* 分子を示す。

いる<sup>13)</sup>。高速原子間力顕微鏡による観察では、結晶性セルロース表面だけでなく多数の *TrCel7A* 分子が基板であるグラファイト表面にも吸着している様子が観察された。しかしながら、グラファイト表面に吸着した分子は、ブラウン運動をしているだけで方向性を持った動きは観察されなかった。*TrCel7A* 分子がセルロース表面でのみ 1 方向に動くという事実は、基質表面への単純な疎水結合が運動性を引き起こしているのではなく、基質と酵素のコンビネーションによって移動していることがわかる。また、*TrCel7A* をタンパク質分解酵素で処理して得られる活性ドメインも同様に観察したところ、*TrCel7A* と同じ濃度で添加した場合はほとんど分子が観察されないが、10 倍の濃度 (20 μM) にした場合には明らかに *TrCel7A* と同様に動く分子が観察された。観察して得られる活性ドメインの移動速度は *TrCel7A* のそれとほとんど変わらないことから、*TrCel7A* が結晶性セルロース表面を移動するためにはセルロース結合ドメインは必須ではなく、活性ドメインが重要な役割を果たしていると考えられた。

### 4. セルラーゼはどうセルロース表面を動くのか

**図 2a** に示すように *TrCel7A* の活性ドメインは、基質結合サイトとして -7 ~ -1 までの 7 残基、生成物結合サイトとして +1 と +2 の 2 残基の計 9 個のグルコース残基が活性ドメイン内に取り込まれることが報告されている<sup>8)</sup>。その中で -1 と +1 サイトの間に位置している 212 番目のグルタミン酸 (<sup>212</sup>Glu) は、加水分解反応時の求核性残基であることが知られている<sup>14)</sup>。その残基をグルタミンに置き換えた変異酵素 (E212Q) は、シオグサ由来結晶性セルロース、非晶性セルロースおよび可溶性モデル基質 (*p*-ニトロフェニル-β-D-ラクトシド) のすべてに対して活性を示さなくなる。一方で、-7 サイトに位置する 40 番目のトリプトファン (<sup>40</sup>Trp) は、基質結合サイトの入り口付近に位置しており、基質であるセルロース分子と疎水的相互作用をしていると考えられている残基であるが、それをアラニンに置き換えた変異酵素 (W40A) では、非晶性セルロースと可溶性モデル基質に対しては *TrCel7A* と同等の活性を示すものの、結晶性セルロースの分解活性が著しく低下していた。これらの変異酵素の結晶性セルロース表面での挙動を、高速原子間力顕微鏡によって観察してみたところ、E212Q は、多くの分子が結晶性セルロース表面で観察されるが、それらの分子はまったく動くことがなく、非常に長い時間セルロース表面に止まっていることがわかった。また、W40A を同様の実

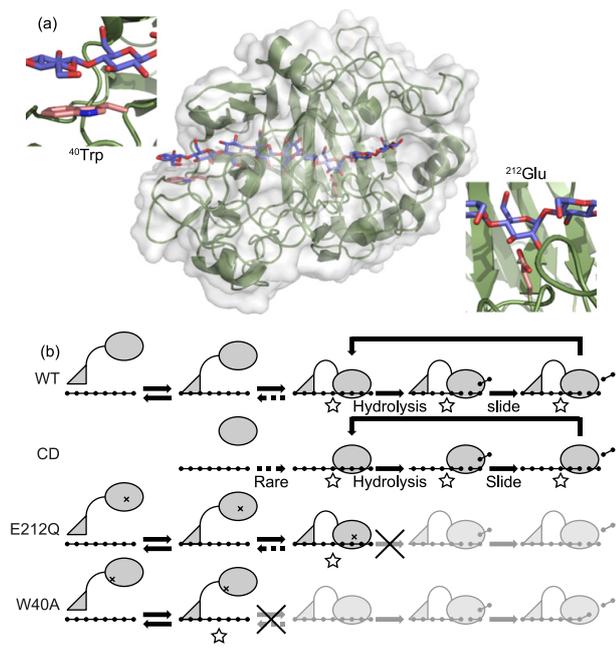


図2 (a) *TrCel7A* 活性ドメインの3次元構造と40番目のトリプトファン (<sup>40</sup>Trp) および212番目のグルタミン酸 (<sup>212</sup>Glu). (b) 高速原子間力顕微鏡による観察から推測された *TrCel7A* および変異酵素の動き. WT および CD はそれぞれ野生型 *TrCel7A* および *TrCel7A* 活性ドメインを指す. 星印は高速原子間力顕微鏡で観察されたと考えられる分子の状態.

験に供したところ、E212Qとは違ってW40A分子はほとんどセルロース表面に止まっていない。そこで観察する速度を毎秒1フレームから毎秒4フレームまで上げてさらに高速走査を行うと、多くの分子が結晶性セルロース表面への吸着と脱着を繰り返している様子が観察された。これらの変異酵素の挙動から、図2bに示したようにE212Qはセルロース分子鎖を掴んでいる状態で止まっているのに対して、W40Aではセルロース分子鎖を捉えることができなくてセルロース表面から離れてしまうという分子メカニズムが考えられた。これまで、セロビオヒドロラーゼがセルロース表面に吸着するとき、セルロース結合ドメインが結晶表面を荒らし、1本鎖になったセルロースが活性ドメインに送り込まれるというメカニズムが提唱されてきた<sup>15)</sup>。しかしながら、本研究での高速原子間力顕微鏡による変異酵素の観察結果から、活性ドメインにおける基質結合と加水分解の双方が、結晶性セルロース表面を動くために必須であることが示された。さらに、*TrCel7A* と活性ドメインの移動速度がほとんど変わらないという結果から、セルロース結合ドメインはセルロース表面を活性化する機能はなく、むしろ不溶性基質である結晶性セルロースの表面における酵素濃度を高めるために働いている可能性が高いことも示唆された。

### 5. セルラーゼ分子が渋滞する?<sup>16)</sup>

上述のように、セルラーゼを利用する上で最も問題とされているのが、その分解反応の遅さである。私たちは、高速原子間力顕微鏡を用いた観察によって、セルラーゼの「遅さ」は何が原因なのかを把握することを試みた。セルロース I 上を動く *TrCel7A* 分子挙動をさらに詳細に調べたところ、*TrCel7A* 分子は止まっている状態（平均速度は毎秒-0.32 nm）と動いている状態（毎秒 7.1 nm）を断続的に繰り返していることがわかり、道路を走る自動車のように「止まる」と「動く」という動作を繰り返していると考えられた（図3）。また、基質としてシオグサ由来のセルロース I に加えて、セルラーゼによる分解性が非常に向上したセルロース III<sub>1</sub> を用い、*TrCel7A* による2種類の結晶性セルロースの分解を比べたところ、セルロース I ではセルラーゼ分子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、セルロース III<sub>1</sub> では、結晶の表面全体を酵素が進んでいることがわかった。この現象に関しても、結晶性セルロース表面を動く酵素分子を自動車として例えると、セルロース I 上には「車線」が1レーンしかないのに対して、セルロース III<sub>1</sub> では複数の車線があるために、セルロース III<sub>1</sub> の分解性が高くなることが示唆された。また、セルラーゼが同じ（実際には多少ずれているが）車線を前後で通っていき、直前の分子が何かしらの理由で動けなくなると、引き続く複数の *TrCel7A* 分子による「渋滞」が起きてしまう様子も観察された（図4）。これまで、*TrCel7A* に同菌由来のセロビオヒドロラーゼ II (*TrCel6A*) を添加すると結晶性セルロースの分解が相乗的に促進されることが報告されている。そこで、本現象を高速原子間力顕微鏡によって観察したところ、はじめに *TrCel6A* が結晶性セルロースを分解したところから

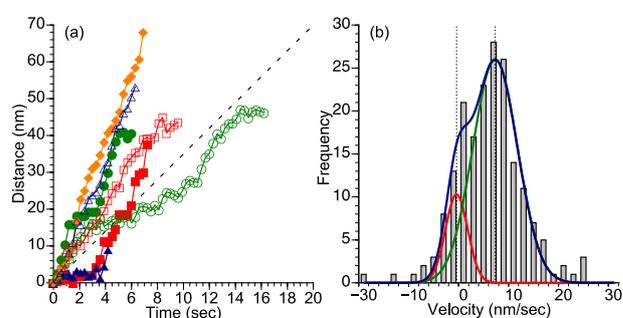


図3 高解像度の高速原子間力顕微鏡による結晶性セルロース表面を動く *TrCel7A* の移動度比較 (a) および移動速度のヒストグラム (b). (b) における赤線と緑線はそれぞれ「止まっている」分子と「動いている」分子のヒストグラムを表している。

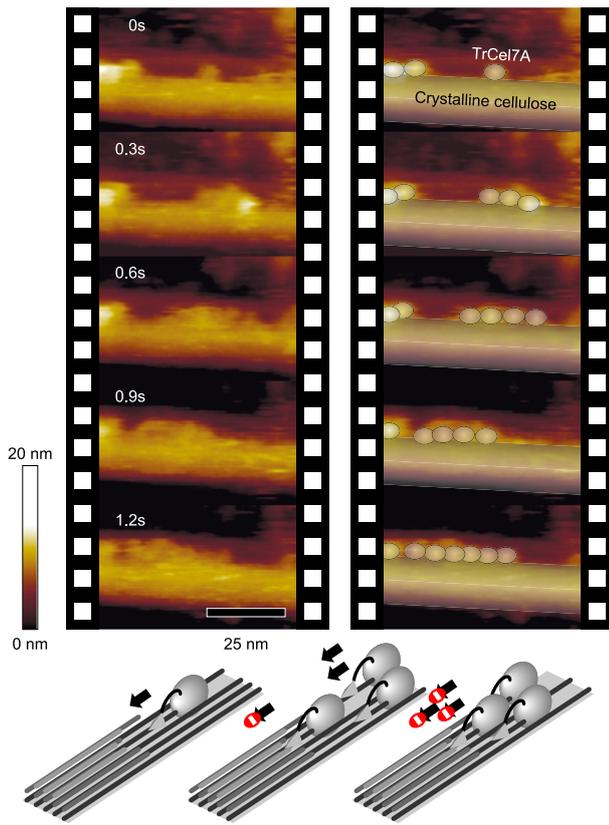


図4 高速原子間力顕微鏡により捉えられたセルラーゼ *TrCel7A* 分子。 *TrCel7A* 分子がセルロース結晶上を右から左へ移動している様子が観察されるが、時間経過とともにセルラーゼが“渋滞”を起こしている。

*TrCel7A* が動き始める様子が観察されたことから、相乗的に促進される結晶性セルロースの分解機構は、*TrCel6A* が表面に作った「入口」と「出口」を利用して、*TrCel7A* が渋滞せずに効率良く動けるようになっているからであることが推察された。アンモニア処理によってセルロース I 型からセルロース III<sub>I</sub> 型に結晶が変換されることで結晶が膨潤し、結晶性セルロースの分解速度を向上すること、*TrCel6A* と *TrCel7A* の2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、今回の高速原子間力顕微鏡を用いた観察によってはじめて明らかにされた。

## 6. おわりに

本実験において私たちは、高速原子間力顕微鏡によって結晶性セルロース繊維に沿って移動する *TrCel7A* 分子の様子を世界ではじめて可視化することに成功した。また、*TrCel7A* は活性ドメインにおける連続

的（プロセッシブ）な加水分解反応によって動くことを明らかにするとともに、セルロース結合ドメインが主にセルロース表面における酵素濃度を高めるために働いている可能性も示唆した。さらに、加水分解だけでなくセルロース分子鎖に対する基質結合サイトの親和性が、プロセッシブな動きをするために重要であることも明らかにしたが、一方でそのプロセッシブな動きのせいで *TrCel7A* はセルロース表面で渋滞が起ってしまうというユニークな現象を発見した。確かにこれまでに得られた情報でもこれらの分子機構を推測することは可能であるが、古典的な生化学では決して証明することができない現象であり、異なる学問の融合がブレークスルーをした典型的な例だと思われる。しかしながら、本実験で得られた *TrCel7A* 分子の移動速度（毎秒 7.1 nm）から算出される加水分解速度は、セロビオース単位を約 1.0 nm とすると毎秒 7 回であり、実際に結晶性セルロースからセロビオースを生成する速度（毎分約 1 回）の 400 倍にも達する。これまで、セルラーゼが「遅い酵素」であると考えられてきた理由は、セルラーゼを用いてセルロースやセルロースを含むバイオマスを糖化する際に得られる糖の生産速度の遅さにあるのだが、今回の高速原子間力顕微鏡による 1 分子観察の結果は、セルラーゼの反応そのものが遅いのではなく、反応に加わっている酵素分子の数が少ないことを示している。つまり系に存在する酵素のほとんどが「駐車場」に止まっている状態で、実際には道路を走っていないのである。これを解消するために、より多くの自動車を道路に出せば、当然道路は渋滞をする。つまり、道を広げずに自動車を増やしたり自動車の速度を向上させたりしても、交通量の限界は道路によって決められていると言えるわけである。これまで、数多くの研究者がセルロースの糖化を向上させようとしてきたが、うまくいかなかった理由は「ボトルネック」が基質であるセルロースの側にあることを認識してこなかったことが原因だと著者らは考えている。本研究で得られたような情報を今後も蓄積していくことが、セルロース系バイオマスの糖化過程でのボトルネックである酵素糖化速度の向上に繋がると筆者は確信している。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、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、東京大学の和田昌久准教授、木村聡助教、金沢大学の岡本哲明博士、(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。

文 献

- 1) Hon, D. N. S. (1994) Cellulose **1**, 1-25.
- 2) Ando, T. *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12468-12472.
- 3) Kodera, N. *et al.* (2003) Adv. Exp. Med. Biol. **538**, 119-127.
- 4) Shibata, M. *et al.* (2010) Nature Nanotechnol. **5**, 208-212.
- 5) Kodera, N. *et al.* (2010) Nature **468**, 72-76.
- 6) Teeri, T. T. (1997) Trends Biotechnol. **15**, 160-167.
- 7) Abuja, P. M. *et al.* (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. **165**, 615-623.
- 8) Divne, C. *et al.* (1994) Science **265**, 524-528.
- 9) Srisodsuk, M. *et al.* (1993) J. Biol. Chem. **268**, 20756-20761.
- 10) Kipper, K. *et al.* (2005) Biochem. J. **385**, 527-535.
- 11) Igarashi, K. *et al.* (2009) J. Biol. Chem. **284**, 36186-36190.
- 12) Imai, T. *et al.* (1998) FEBS Lett. **432**, 113-116.
- 13) Lehtio, J. *et al.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 484-489.
- 14) Ståhlberg, J. *et al.* (1996) J. Mol. Biol. **264**, 337-349.
- 15) Mulakala, C., Reilly, P. J. (2005) Proteins **60**, 598-605.
- 16) Igarashi, K. *et al.* (2011) Science **333**, 1279-1282.



**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)

1999年東京大学大学院農学生命科学研究科修了, 99年から2002年まで日本学術振興会特別研究員(PD), その間00年から01年までスウェーデン国ウプサラ大学バイオメディカルセンター博士研究員, 02年から07年まで東京大学大学院農学生命科学研究科助手. 07年から身分名称変更により同上助教. 09年より現職.

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: 〒193-0843 東京都文京区弥生 1-1-1

E-mail: [aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

URL: [http://www.fp.a.u-tokyo.ac.jp/graduate/introduction/forest\\_chemistry/index.html](http://www.fp.a.u-tokyo.ac.jp/graduate/introduction/forest_chemistry/index.html)

五十嵐圭日子



内橋貴之

**内橋貴之 (うちはし たかゆき)**

金沢大学理工研究域数物科学系准教授, 博士(工学) 1998年大阪大学工学研究科電子工学博士後期課程修了, 98年から2000年までアトムテクノロジー研究体博士研究員, 00年から02年まで姫路工業大学工学部助手, 02年から04年までダブルン大学トリニティカレッジSFI研究所シニアサイエンティスト, 04年から06年まで金沢大学自然科学研究科助手. 06年から07年まで同上助教, 07年から身分名称変更により同上准教授. 08年から現職.

研究内容: 走査型プローブ顕微鏡

連絡先: 〒920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: [uchihast@staff.kanazawa-u.ac.jp](mailto:uchihast@staff.kanazawa-u.ac.jp)

URL: <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>



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 1982年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了, 82年から83年まで日本学術振興会奨励研究員, 83年東京大学農学部助手, 90年から92年まで米国ジョージア大学生化学科博士研究員, 95年東京大学大学院農学生命科学研究科助教, 2001年より現職.

研究内容: 森林生物化学

連絡先: 〒193-0843 東京都文京区弥生 1-1-1

E-mail: [amsam@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:amsam@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

URL: [http://www.fp.a.u-tokyo.ac.jp/graduate/introduction/forest\\_chemistry/index.html](http://www.fp.a.u-tokyo.ac.jp/graduate/introduction/forest_chemistry/index.html)

**安藤敏夫 (あんどう としお)**

金沢大学理工研究域数物科学系教授

1980年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了. 同年 UC San Francisco 博士研究員, 83年同助手, 86年金沢大学理学部講師, 96年より現職.

研究内容: モータータンパク質, 高速 AFM の開発とバイオ応用の研究

連絡先: 〒920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: [tando@staff.kanazawa-u.ac.jp](mailto:tando@staff.kanazawa-u.ac.jp)

URL: <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>



安藤敏夫