

平成24年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21688023

研究課題名（和文） 高速原子間力顕微鏡を用いた固液界面におけるセルラーゼ分子の可視化

研究課題名（英文） Visualization of cellulase molecules at a solid/liquid interface using high-speed atomic force microscopy

研究代表者 五十嵐 圭日子 (Igarashi Kiyohiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：80345181

研究成果の概要（和文）：セルロースを分解する酵素（セルラーゼ）分子が、セルロース表面で「渋滞」を起こすことで、セルロースの分解効率を下げている様子を、高速原子間力顕微鏡によって直接観察することに成功しました。本結果は、「分子が渋滞する」という基礎科学的に新規な知見であるだけでなく、セルロース系バイオマスから液体燃料やプラスチック原料を高効率に生産するシステム構築にも重要な指針を与えます。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in observing “traffic jams” of cellulase molecules on the surface of cellulose using high-speed atomic force microscopy. This “molecular congestion” is not only a new finding as basic science, but also is the first proof that this traffic jam of cellulase molecules is responsible for reducing the rate of cellulase hydrolysis. The findings of the present study provide a useful guide to developing an efficient system for the utilization of cellulose biomass near future.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 11,300,000 | 3,390,000 | 14,690,000 |
| 2010年度 | 5,500,000 | 1,650,000 | 7,150,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 16,800,000 | 5,040,000 | 21,840,000 |

研究分野：境界農学

科研費の分科・細目：環境農学・バイオマス

キーワード：セルラーゼ，セルロース，高速原子間力顕微鏡，固液界面，セロビオヒドロラーゼ

1. 研究開始当初の背景

セルロースは、植物細胞壁中では主に結晶性セルロース（セルロース I）として存在しており、化学的に安定な β -1,4-結合と分子内および分子間の水素結合の存在によって、再生可能ではあるが難分解性のバイオマスとして自然界に存在している。一方、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。強度的に優れている素材が、ある条件の下ではいとも簡単に可溶化、無機化できる「仕組み」を理解し私たちの生活に応用することができれば、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、一方で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よ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。

2. 研究の目的

本研究では、高速原子間力顕微鏡 (High-Speed Atomic Force Microscopy: HS-AFM) を用いて、セルロースを加水分解するセルラーゼの無標識一分子観察を行う。HS-AFM は、これまでの原子間力顕微鏡の 1000 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、最近になって様々な生体分子の可視化に利用されてきている。これまでに応募者が得た生化学的実験結果と HS-AFM の観察結果を比較することで、セルラーゼによるセルロース分解機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

シオグサ由来の高結晶性セルロース (セルロス I) をグラファイト基板に乗せ、*Trichoderma* 属由来 *TrCel17A* を添加し、HS-AFM によって観察した。また反応液を高速液体クロマトグラフィーで用いて糖分析をした。さらに同様の実験を超臨界アンモニア処理して得られたセルロース III₁ および *TrCel16A* に対しても行った。

4. 研究成果

図 1 A に示したように HS-AFM によって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一方向に動いていることがわかった。得られた画像からこの粒子の高さを求めると 3.1nm 程度であり (図 1 B、図 1 C)、*TrCel17A* の 3 次元構造から推定される高さ (約 4nm、図 1 D) と一致しており、さらに酵素を添加していない場合はこのような粒子が観察されなかったこと

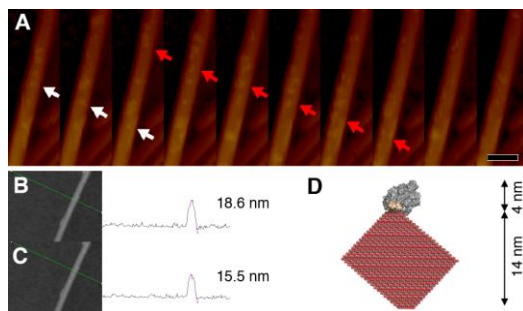


図 1 高速原子間力顕微鏡による *TrCel17A* の一分子観察。A: 高速原子間力顕微鏡で 2 秒毎の取得した *TrCel17A* の微速度映像。スケールバー: 50nm。B、C: 高速原子間力顕微鏡で観察された結晶性セルロースの高さ解析。*TrCel17A* 分子を含む場合 (B) と含まない場合 (C) の高さ。D: セルロース I の結晶構造と *TrCel17A* の 3 次元構造比較

から、高速原子間力顕微鏡によって高結晶性セルロース表面を動く *TrCel17A* の一分子観察に成功したことがわかった。本実験後、セロビオースの生成が観察され、さらに透過型電子顕微鏡で結晶性セルロースを観察すると繊維の一方が細くなった構造が観察されたことから、*TrCel17A* 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。*TrCel17A* 分子がセルロース表面でのみ一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 *TrCel17A* は移動していると考えられた。また、結晶性セルロース表面を移動している *TrCel17A* 分子の平均移動速度は、秒速 $3.5 \pm 1.1 \text{ nm}$ (69 分子の平均) であった。また、*TrCel17A* 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、*TrCel17A* 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 ($20 \mu \text{ M}$) にした場合には明らかに *TrCel17A* 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 *TrCel17A* のそれとほとんど変わらないことから、*TrCel17A* 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。

図 2 A に示すように *TrCel17A* 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。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 (E212Q) 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²⁷⁾。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) の全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 (W40) 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インタラクション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 *TrCel17A* 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、それらの分子は全く動くことが無く、非常に長い時間セルロース表面に止まっていることが分かった。また、W40A を同様の実験に供したところ、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。これらの変位酵素の挙動から、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、一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。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、*TrCel17A* 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無く、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。

さらにHS-AFM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 *TrCel17A* 分子挙動をさらに詳細に調べたところ、*TrCel17A* 分子は止まっている状態（平均

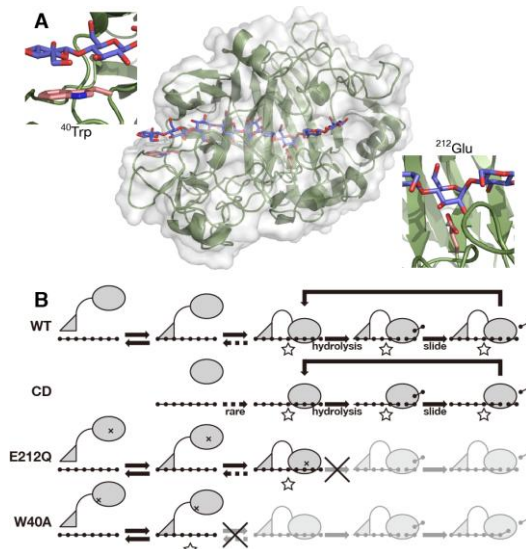


図2 A: *TrCel17A* 触媒ドメインの3次元構造とW40およびE212。B: 高速原子間力顕微鏡による観察から推測された *TrCel17A* および変位酵素の動き。星印は高速原子間力顕微鏡で観察されたと考えられる分子の状態。

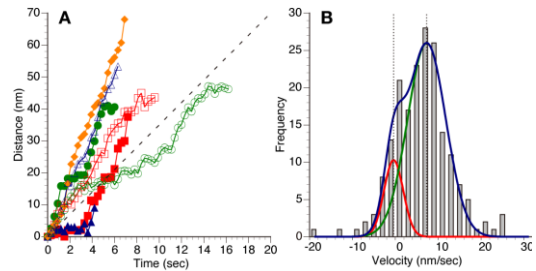


図3 高解像度の高速原子間力顕微鏡による結晶性セルロース表面を動く *TrCel17A* の移動度比較 (A) および移動速度のヒストグラム (B)。点線は図2における平均速度を表す。(B)における赤線と緑線はそれぞれ「止まっている」分子と「動いている」分子のヒストグラムを表している。

速度は毎秒0.32nm)と動いている状態(毎秒7.1nm)を断続的に繰り返していることが分かり、一般道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III₁を用い、*TrCel17A*による二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III₁では、結晶の表面全体を酵素が進んでいることが分かった。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レーンしか無いのに対して、セルロースIII₁では複数の車線があるために、セルロースIII₁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くとき、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 *TrCel17A* 分子による「渋滞」が起こってしまう様子も観察された(図4)。これまで、*TrCel17A*に同菌由来のセロビオヒドロラーゼII(*TrCel16A*)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 *TrCel16A*が結晶性セルロースを分解したところから *TrCel17A*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、*TrCel16A*が表面に作った「入口」と「出口」を利用して、*TrCel17A*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。アンモニア処理が結晶性セルロースの分解速度を向上すること、*TrCel16A*と *TrCel17A*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

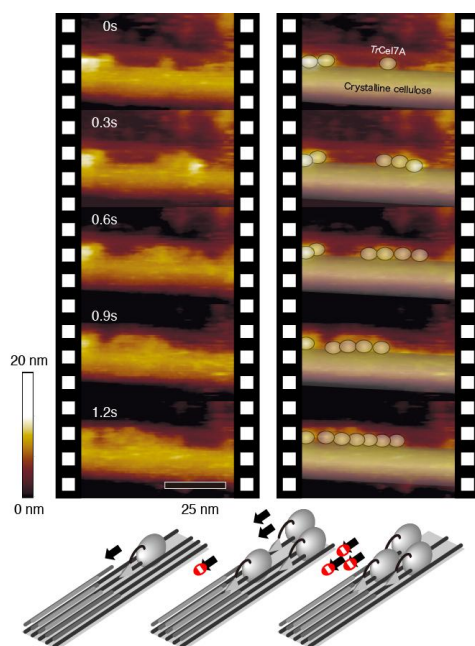


図4 高速原子間力顕微鏡により捉えられたセルラーゼ *TrCel7A* 分子。 *TrCel7A* 分子がセルロース結晶上を右から左へ移動している様子が観察されるが、時間経過とともにセルラーゼが“渋滞”を起こしている。

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初めて明らかにされた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttilä, M., Ando, T., and Samejima, M., Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface, *Science* 333: 1279-1282 (2011)

2. Igarashi, K., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., and Samejima, M., High-speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose, *J. Biol. Chem.* 284:36186-36190 (2009)

[学会発表] (計4件)

1. Igarashi, K. Gordon Research Conference

(Cellulosomes, Cellulases & Other Carbohydrate Modifying Enzymes)

「Single-molecule imaging of cellobiohydrolases on highly crystalline cellulose using high-speed atomic force microscopy」2009年7月29日 米国ニューハンプシャー州

2. Igarashi, K. JST/CREST

Symposium: WBMA'09 Watching Biomolecules in Action 「Single molecule observations of processive glycosidases on crystalline substrates」2009年12月15日 大阪府

3. 五十嵐圭日子、和田昌久、鮫島正浩 第24回キチン・キトサンシンポジウム「プロセッシング糖質加水分解酵素の分子機構」2010年7月12日 東京都

4. Igarashi, K., Uchihashi, T., Wada, M., Ando, T., Samejima, M. 第48回生物物理学会「Single molecular observations of processive glycosidases by high-speed atomic force microscopy」2010年9月20日 宮城県

[図書] (計1件)

1. Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., Ando, T., Samejima, M., Visualization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* moving on crystalline cellulose using high-speed atomic force microscopy. *Methods Enzymol.* 510:169-182 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2010/20100122-1.html>

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2011/20110902-1.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

五十嵐 圭日子 (Igarashi Kiyohiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：80345181

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：