

担子菌セルラーゼの高発現系の構築とセルロース分解機構の解析 および高分解機能セルラーゼの分子創製 —エキソ型セルラーゼ I のセルラーゼ結合ドメインの役割—

○岡崎光雄, 小平律子, 下坂誠, 林田信明*, 神田鷹久**, 天野良彦**
信州大学繊維学部応用生物科学科, *信州大学遺伝子実験施設
**信州大学工学部物質工学科

担子菌 *Irpex lacteus* からエキソ型セルラーゼ I (Ex-1) を精製し, 蛋白分解酵素パピンを用いて C-末端に存在するセルロース結合ドメイン(CBD)を除去し, 触媒活性部分(P-42)を分離した (FIG. 1)。この分離した P-42 の不溶性セルロースに対する加水分解活性と結合能は, 無傷の Ex-1 に比較して共に減少していたが, 可溶性基質に対する加水分解活性はほぼ同様であった (TABLE1)。上述の結果より, Ex-1 の CBD

は, 不溶性セルロースへの加水分解活性と酵素の結合能に対して重要なドメインであることを示している。

さらに, この分離 P-42 は, 無傷 Ex-1 と比べて, pH と温度安定性が異なっていた (Data not shown)。この pH と温度安定性に対する P-42 と無傷酵素の性質の差異は, リンカー領域に存在する糖結合部位 (O-linker) の欠如であると推定された (FIG. 2)。

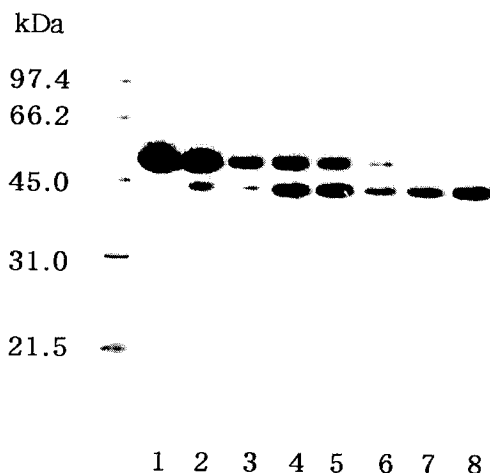


FIG. 1. SDS-PAGE analysis of Ex-1 digested with papain. Lane 1: Intact Ex-1; lanes 2-8: papain digests after 5, 10, 20, 30, 40, 60, and 120 min, respectively.

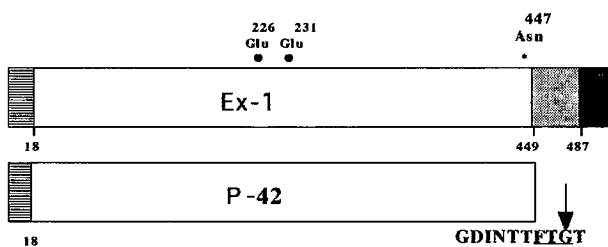


FIG. 2. Schematic representation of the deduced Ex-1 and P-42 proteins. Ex-1 is composed of the N-terminal signal peptide (horizontal lines), catalytic domain (white), linker region (light grey), and C-terminal CBD (black). The suggested catalytic residues are indicated by solid circles. The putative cleavage site by limited proteolysis using papain is indicated by an arrow. The amino acids with double underlines are C-terminal amino acids of P-42 determined by the carboxypeptidase method. N-Glycosylation site is indicated by an asterisk.

TABLE 1. Comparison of adsorption and catalytic properties of Ex-1 and P-42 using various cellulosic substrates

Substrate	Adsorption ($\mu\text{mol/g}$) ^a		Specific activity (mU/mg) ^b	
	Ex-1	P-42	Ex-1	P-42
BC ^c	1.4	0.6	14.5	2.1
Avicel ^c	1.3	0.5	20.9	1.2
Cotton ^c	1.1	0.4	14.2	1.1
CMC ^c	—	—	26.0	31.1
4-MeUmbLac ^d	—	—	24.3	24.4

^a Values indicate the quantity of adsorption per g of each cellulose.

^b Specific activity is defined as activity mU/ mg of enzyme protein.

^c One unit is defined as the amount of CMC, Avicel, or bacterial cellulose (BC) saccharification activity which produces a reducing power equivalent to 1.0 μmol of β -D-glucose per min.

^d One unit is defined as the amount of enzyme activity which releases 1.0 μmol of MeUmb.