

野崎功一

目的別テーマ：バイオテクノロジーを活用した新規繊維生物の作出

研究テーマ

15-2-13：難分解性物質分解に向けた酵素ライブラリーの構築
—染色剤脱色酵素の開発—

ABSTRACT

The decolorization activities of industrial dyes were investigated using extracellular enzymes produced by 21 kinds of basidiomycetes. Most of them showed decolorization activity against some dyes at acidic pH, but the ability and specificity were different. From the results of the activity staining on native-PAGE gel, it was revealed that one or more laccases which had different substrate specificity were responsible for these decolorizations. Especially, *Pleurotus salmoneostramineus* produced two laccase isozymes (Lcc I and Lcc II) showing strong decolorization against some dyes. During culture, Lcc II was produced at the early stage and Lcc I was produced at the later stage. Each Lcc was purified and the characterization was investigated. On the other hand, the partial cDNA sequences of eight Lcc isozymes were identified by RFLP combined with RT-PCR. They were divided into two groups, and all showed high similarity to the other Lcc from wood-rot fungi. The expression systems were constructed for four laccase cDNAs using *Aspergillus oryzae*. The recombinant laccases showed different decolorization as compared with Lcc I or Lcc II. These enzymes might be available for degradation of other dyes and pollutants.

研究目的

担子菌の一部には、フェニルプロパノイドを骨格とした複雑な重合体であるリグニンを分解する能力が備わっている。これに関与する酵素群は基質特異性が広く、またある種のメディエーターを介して分解反応を行う酸化還元酵素であり、リグニンのみならず人工的に作り出した多くの化合物に対しても作用することが知られている。特に、リグニンの部分構造に類似したある種の芳香族化合物に対しての分解能力は高く、これらを含む難分解性物質の分解への利用が期待されている。各担子菌の生産する酵素の基質特異性がわかれば、分解に最適な酵素を選択することができ、また生分解可能な構造を予測して化合物を設計・合成することも可能になると考えられる。本研究では、繊維工業において排出される染色剤廃液の処理に向けた酵素の利用法を開発する目的で、構造の類似した数多くの染色剤を基質とし、その分解に適した酵素群を選抜するとともに、脱色に関与する酵素の精製と同定、異種生物における大量発現系を構築することを目的とする。

5年間の研究内容と成果

21種類の担子菌から染色剤の脱色活性を有する菌株の選抜を行った結果、大部分の菌に特定の染色剤の脱色活性が確認できた。そのほとんどは、酸性域において活性が高く、リグニン分解系酵素の一部が分解に関与していると予想された。これら担子菌の中でも、トキイロヒラタケの抽出液は、アゾおよびフトロシアニン系染料に強い脱色活性を示すことが明らかとなった。いくつかの高い脱色活性を示す菌株を選抜し、リグニン分解系酵素との関連性を調査した結果、ラッカーゼ(Lcc)が脱色に関与していることを確認した。菌株によっては、複数のLccアイソザイムが存在し、その中には幅広い基質特異性を示すものや特定の種類の染色剤に強い脱色活性を示すものなど、基質特異性の異なる多くのアイソザイムが存在することを明らかにした(図1)。

トキイロヒラタケ由来のラッカーゼアイソザイムの精製にあたり、培養日数における活性の経時変化を活性染色にて調査した。Lcc Iは培養35日目に、Lcc IIは培養初期に活性が高くなることが明らかとなった(図2)。培養35日目の培地抽出液から精製した各酵素

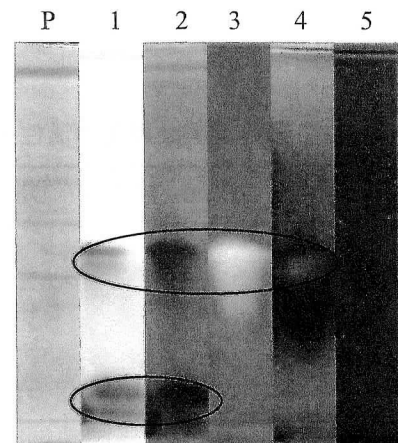


図1. トキイロヒラタケ培養液による各種染色剤の脱色結果

1. ABTS (Lcc 検出用基質), 2. アゾ系染料, 3. ジアゾ系染料, 4. フトロシアニン系染料, 5. トリフェニルメタン系染料を基質として電気泳動ゲル上で活性染色を行った. Pはタンパク質染色

は、Lcc I が約 6 万、Lcc II が約 5.8 万の分子量であり、至適 pH はともに 3.5 であった。基質特異性は、Lcc I が各種染色剤の脱色に特異的であり、Lcc II は染色剤よりも一般的な Lcc の基質に対して活性が高いことを明らかにした。染色剤脱色における至適 pH は、いずれの酵素も基質によって変化するものの、中性から弱酸性域に存在することが明らかとなった。また、Lcc I の脱色活性は各種メディエーターの存在下において最大 6 倍まで活性化されることが確認できた。

一方、その cDNA の取得を行った。Lcc に保存性が高い領域からプライマーを設計し、RT-PCR を行った。また、これら大腸菌にサブクローニングした後、再び PCR で増幅し、各クローンについて RFLP 解析を行った。これにより、本菌には少なくとも 8 種類の Lcc アイソザイム (*lcc 1*~*lcc 8*) が存在し、これらは図 3 に示すように大きく 2 系統に分類された。この中でも *lcc 1* と *lcc 2* の発現量は特に高く、精製した 2 つのアイソザイムに一致する可能性も考えられた。

現在までに 4 種の cDNA (*lcc1*, *lcc2*, *lcc4*, *lcc6*) に由来する酵素の発現に成功し、図に示す 3 種については活性染色によってバンドが確認された。いずれの酵素においても培養液に銅イオンを添加することによって酵素の活性が 2~20 倍に増加することを明らかにした。これら酵素の電気泳動における移動度 (図 4) および染色剤の分解特性 (表) は、これまでに精製した Lcc I、Lcc II のいずれとも異なるものであり、本菌における新規の酵素である可能性が考えられた。

本研究によって各種染色剤の脱色に適した菌と分解条件を設定することが可能となった。また、麹菌における新規脱色酵素の発現により、さらに特性の異なる脱色酵素が存在することが明らかとなった。これら結果は、各染色剤に適した酵素の選択に有用な情報となることが推察される。

さらに、酵素化学的性質を詳細に解析することで、適用できる分解化合物の範囲を広げられる可能性があるとともに、リグニン分解における各酵素の機能を解明する上でも興味深い結果であると考えられる。

表. 組換え酵素の活性と染色剤脱色特性

	U/ml (ABTS)	DB1	DB86	AO20
<i>lcc1</i>	1.02	—	—	+
<i>lcc2</i>	14.2	++	—	+++
<i>lcc4</i>	0.683	+	—	++
<i>lcc6</i>	0.0191	—	—	+

DB1, Direct Blue 1; DB86, Direct Blue 86; AO20, Acid Orange 20.

脱色活性は+が多いほど強い。— は活性なし。

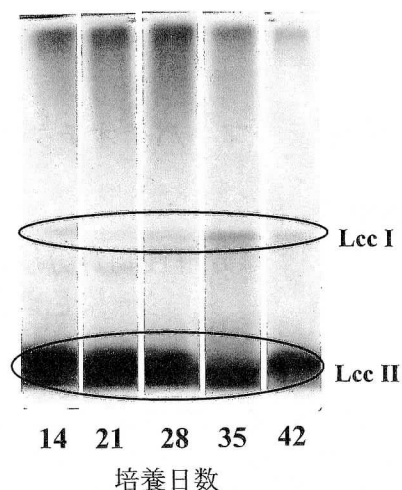


図 2. 培養期間における Lcc I、Lcc II の経時変化

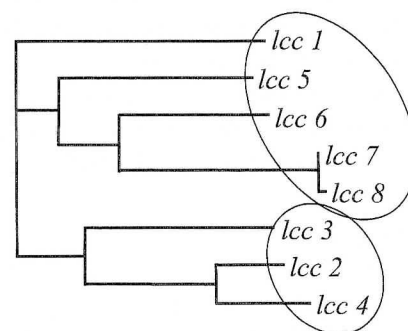


図 3. Lcc アイソザイムの系統樹

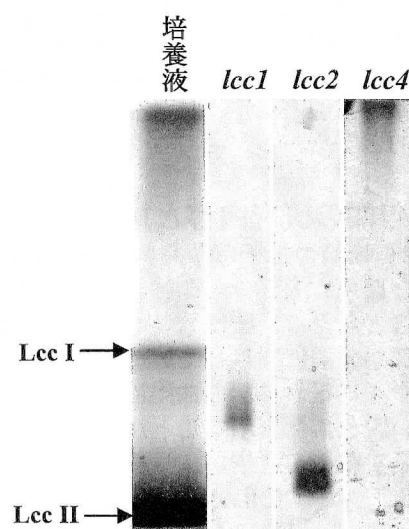


図 4. 組換え酵素の活性染色
左レーンはトキイロヒラタケ培養液