

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

17 年度研究テーマ

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 two laccase isozymes (*Lcc I* and *Lcc II*) showed different specificity for dye decolorization were isolated from the culture of *Pleurotus salmoneostramineus*. The optimum pH of both enzymes was around 4 to 7 against each dye. The decolorization activity of *Lcc I* was also activated to 6 times in the presence of mediator, though the activity of *Lcc II* was no influenced. On the other hand, 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 have the possibility to degrade other dyes and pollutants.

研究目的

これまでの研究でトキイロヒラタケが生産するラッカーゼには、ジアゾ系染料 (Direct Blue 1) とフタロシアニン系染料 (Direct Blue 86) に強い脱色活性を示す *Lcc I* とモノアゾ系染料 (Acid Orange 20) を脱色する *Lcc II* が存在することを明らかにしてきた。これら酵素を実際の染料排水の処理に利用するにあたり、各種基質、染料に対する分解能および酵素化学的性質の決定を行った。また、これまでに取得した *Lcc* cDNA の幾つかについて、麴菌を利用した発現系の構築を行い諸性質の決定を行った。

一年間の研究内容と成果

トキイロヒラタケ培養液から精製した脱色に関与する 2 種のラッカーゼ (*Lcc I*、*Lcc II*) の基質特異性は、*Lcc I* が各種染料の脱色に特異的であり、*Lcc II* は染料よりも一般的な *Lcc* の基質に対して活性が高いことを明らかにした。染料脱色における至適 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。これまでに取得した 9 種の *Lcc* cDNA をもとに麴菌における発現系を構築し、その性質を調査した。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) および染料の分解特性 (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。

展望

今回調査した 2 種の酵素の性質をもとに各種染料の脱色に適した分解条件を設定することが可能となった。麴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。今後は、精製酵素に一致する cDNA を同定するとともに、本菌が生産する全ての *Lcc* の性質の決定を試みる。

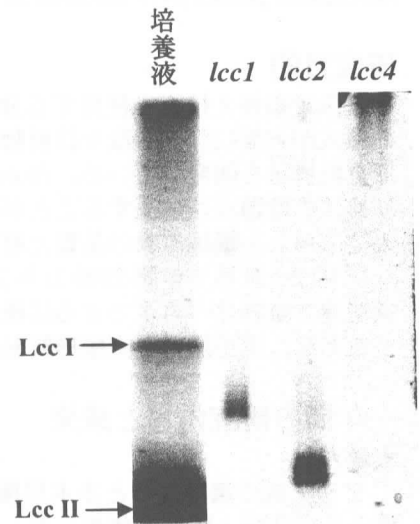


図 組換え酵素の活性染色  
左レーンはトキイロヒラタケ培養液

表 組換え酵素の活性と染料脱色特性

	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。