

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

16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

Pleurotus salmoneostramineus produced two laccase (Lcc) isozymes showing different specificity for dye decolorization. Lcc I showed the decolorization against phthalocyanine and diazo dyes, and Lcc II decolorized monoazo dye. 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. Their molecular masses were estimated to be 60 kDa (Lcc I) and 58 kDa (Lcc II), and the optimum pH commonly showed at 3.5. Lcc II showed stability at alkaline pH and high temperature more than Lcc I. 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 produced by wood-rot fungi. These sequences might be Lcc I, Lcc II and contain a more available enzyme for degradation of many 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。これら脱色特性の異なるラッカーゼの精製を行うとともに、その酵素化学的性質を調べることを目的とした。また、これら酵素の発現系を構築するにあたり、ラッカーゼアイソザイムの一次構造の決定を行うとともに、さらに有用なアイソザイムの検索を行った。

一年間の研究内容と成果

各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 (図1)。Lcc I は培養 35 日目に、Lcc II は培養初期に活性が高くなるのが明らかとなった。培養 35 日目の培地抽出液から精製した各酵素は、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。一方、Lcc II は塩基性領域における安定性および温度安定性が Lcc I に比べて高いことが明らかとなった。両酵素の発現系を構築するにあたり、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2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。

展望

今後、取得した cDNA を利用し脱色に関与する酵素の発現系を構築できると考えられる。また、これらの中には発現量は少ないが、さらに有用な分解特性を示す酵素も含まれている可能性が考えられる。これらを解析することは、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。

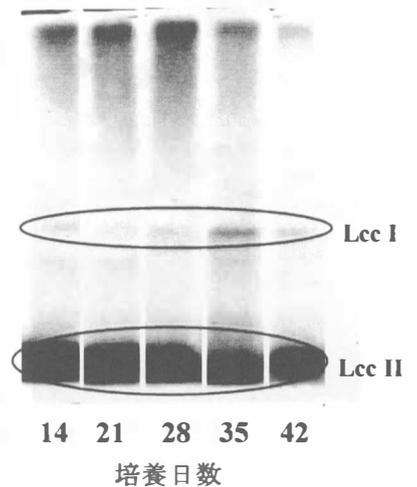


図1 培養期間における Lcc I, Lcc II の経時変化

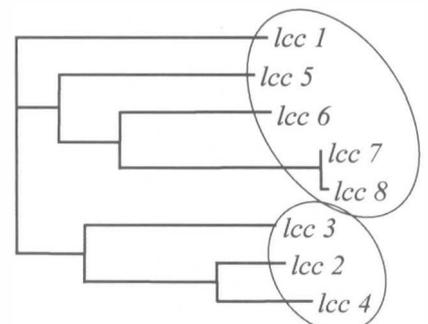


図2 Lcc アイソザイムの系統樹