

環境汚染物質代謝に関与する新規ラッカーゼのスクリーニング

Screening of novel laccases degrading the environmental pollutants

其木茂則

麻布大学大学院 環境保健学研究科 環境保健科学専攻 環境化学

Shigenori Sonoki

Environmental Chemistry, Course of Environmental Health Science, Graduate School of Environmental Health, Azabu university

Abstract. Several laccase isoforms showing the different enzymatic property were obtained from the culture fluid of some species of white-rot fungus, *Trametes versicolor*, *T. cervina*, *T. conchifer* and *T. elegans*. Each strain produced two kinds of laccases in the culture, one of which passed through the ion-exchange DEAE-Sepharose column at pH 5.0 (fraction A) and the other adsorbed the column (fraction B). Using 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) as the substrate for laccase, the enzymatic property such as the optimum pH, the optimum temperature or the thermostability was investigated. As a result, every laccase from each strain had the higher activity in the acidic range, pH 3.8-4.4, and at the higher temperature, 60 °C ~ 80 °C. Every laccase except the fraction B from *T. conchifer* and *T. elegans* showed the higher stability until 60 °C; however, the fraction B still reserved the higher activity at 80 °C. The degradation of hydroxyPCBs which are suspected of endocrine disruptors in the in vitro incubation with laccases was examined. Overall, the fraction A has a higher activity to reduce each level of hydroxyPCBs than the fraction B. In equally chlorinated 4-hydroxy-tetrachlorobiphenyl congeners, 4-hydroxy-2',3',5,5'-tetrachlorobiphenyl was more degraded than 4-hydroxy-2',3',4',5'-tetrachlorobiphenyl. It seems that the chlorine binding position is responsible for the rising susceptibility to the enzymatic degradation of hydroxyPCBs.

1. 目的

近年、ダイオキシン類に代表されるような難分解性の化学物質による環境汚染が深刻化している(1,2)。このような難分解性有機汚染物質を環境中から速やかに除去すること、またこれらの化学物質の環境への放出を押さえることが、今世紀われわれ人類に課せられた大きな問題である。しかし、これらの汚染が現在地球規模で広がっていることを考えると、これまでの物理化学的な方法では対応できなくなっている。そこで、今後は広範囲な汚染を、

長期にわたり持続可能な方法で、なおかつ環境に負荷の掛からない方法で浄化していく必要があることから、微生物や植物などの多様な機能を利用した新しい環境浄化法、いわゆるバイオレメディエーション、ファイトレメディエーションが注目されてきている。バイオレメディエーションの環境浄化への利用について盛んに研究されている微生物の一つに担子菌の一種である白色腐朽菌があげられるが、特に、白色腐朽菌が菌体外に産生するリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、ラッカーゼなどのリグニン分解酵素による化学物質の酸化分解性

に注目し、これを環境汚染物質の代謝に応用していく研究が進んでいる(3-6)。リグニン分解酵素の中でも特に広い基質特異性と反応特性を持つラッカーゼは、パルプ漂白、人工色素脱色、バイオセンサーなど様々な分野での応用が期待されていることから、今回このラッカーゼに着目し、四種の白色腐朽菌(*T. versicolor*, *T. cervina*, *T. conchifer*, *T. elegans*)からラッカーゼを獲得して、酵素化学的な性質を比較検討して、将来の環境汚染物質代謝への応用について考察した。

2. 方法

2-1 白色腐朽菌

本研究で用いた四種類の白色腐朽菌のうち、*T. versicolor* (UAMH8272) はアルバータ大学の菌株保存機関から購入し、*T. cervina*, *T. conchifer*, *T. elegans* は鳥取大学農学部菌類キノコ遺伝資源研究センターの前川教授より分与された。

2-2 白色腐朽菌培地

白色腐朽菌の増殖用培地としてPDA (Potato Dextrose Agar) 培地を用いた。超純水100 ml中にPDA (Becton, Dickinson and Company) 3.92 gを加え、滅菌後pH調整のためフィルター滅菌済みの10%酒石酸水溶液(和光純薬:特級) 0.96 mlを加えた。白色腐朽菌培養用培地としてポリペプトン液体培地を用いた。純水100 ml中にポリペプトン(日本製薬) 10 g, D (+) -グルコース(和光純薬:特級) 10 g, リン酸二水素カリウム(和光純薬:特級) 1.5 g, 硫酸マグネシウム七水和物(和光純薬:特級) 0.5 g, 16 g/ml 硫酸銅(II)五水和物水溶液(和光純薬:特級) 1 mlを加え、三角フラスコに100 mlずつ分注したものを滅菌し、その後フィルター滅菌済みの2.0 mg/l チアミン塩酸塩水溶液(和光純薬:特級)を各三角フラスコに100 μ lずつ加えた。

2-3 試薬

本研究で用いた水酸化PCBはWellington Labs (Ontario, Canada)より購入した。4-水酸化-3,5-ジクロロピフェニル, 4-水酸化-2',3,5'-トリクロロピフェニル, 4-水酸化-2',3,5,5'-テトラクロロピフェニル, 4-水酸化-2',3',4',5'-テトラクロロピフェニル, 4-水酸化-2',3,3',4',5'-ペンタクロロピフェニル, 4-水酸化-2',3,3',4',5,5'-ヘキサクロロピフェニルの計6種類の

水酸化PCBを用いた。

これら6種類の水酸化PCBはそれぞれ100 μ g/mlのイソオクタン溶液で保存されており、これらをそれぞれ10 μ g/mlになるよう6種類を合わせ、N,N-ジメチルホルムアミド(和光純薬:特級)で希釈したものを標準溶液とした。

2-4 白色腐朽菌培養液からのラッカーゼ調製

白色腐朽菌をポリペプトン液体培地で、37 $^{\circ}$ C, 約30日間培養した。培養液を回収し、ロータリーエバポレーターを用いて1/8程度に濃縮した後、0.02 M (pH 5.0) コハク酸で18時間透析を行った。次にDEAEカラムクロマトグラフィー(pH 5.0)を用いて、培養液中のラッカーゼをカラム未吸着画分(フラクションA)と吸着画分(フラクションB)に分画した。ラッカーゼ活性は、ABTSを基質として420 nmの吸光度を測定することで酵素量を定量した。酵素量は室温、1分間に1 μ molのABTSを酸化するのに必要な酵素量を1 unitとした。

2-5 等電点電気泳動法

DEAEカラムクロマトグラフィーで部分精製したラッカーゼ(フラクションA及びフラクションB)を試料として、両性担体(Pharmalyte: GE Healthcare)を含んだ0.5%ゲルにて300 V, 400 Vで各30分, 600 Vで60分, 泳動を行った。泳動後、ABTSを含んだ1.2%ゲルを泳動用ゲルに重ね、ラッカーゼ活性染色を行い、等電点を求めた。

2-6 作用最適pH測定法

酵素量5 units, 基質として0.4 mM シリングアルダジン(SIGMA)を用い、pH 2.8~pH 7.3のMcIlvaineバッファー中で1分間反応させ、525 nmの吸光度を測定した。

2-7 作用最適温度

2-6で求めた作用最適pHのMcIlvaineバッファーを用い、10 mMのABTSを基質として30 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ Cの温度条件下で1分間酵素反応を行い、3 M塩酸で反応を止めて速やかに420 nmの吸光度を測定した。

2-8 熱安定性

酵素量5 unitsの酵素液を40 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ Cの各条件下で10分間加熱した後、氷で15分間冷却し、この加熱処理した酵素を用いて、0.4 mM シリングアルダジンを基質として作用最適pHのMcIlvaineバッファー中で1分間酵素反応を行い、525 nmの吸光度を測定

した。

2-9 ラッカーゼと水酸化PCBの反応試験

共線付試験管にラッカーゼ 5 units, 0.2 M コハク酸溶液バッファー 250 μ l, 水酸化PCBを各 100 ngを入れた後, 純水を加えて全量を 1.5 mlとした。酵素液の代わりに酵素液と同量のポリペプトン液体培地を添加したものを対照とした。37 $^{\circ}$ Cで酵素反応を行った後, 固相抽出カートリッジ (昭和電工, 充填剤: スチレン-ジビニルベンゼン共重合体)に通して水酸化PCBを吸着させ, ジクロロメタン 10 mlで溶出した。溶出液を加熱乾固した後, GC用誘導体化剤 (tert-ブチルジメチルシリル-N-メチルトリフルオロアセトアミド, 東京化成)を 20 μ l添加し, 80 $^{\circ}$ Cで 30分間反応させた後, 誘導体化剤を飛ばし, アセトンで 100 μ lに定容し, GC-ECDの測定に用いた。

3. 結果と考察

3-1 等電点

図1の泳動結果から, 研究に用いた菌種由来のラッカーゼの多くは pH 3.7 ~ pH 4.0 付近に等電点をもつことがわかった。しかし, *T. versicolor* のフラクション A の等電点は pH 4.4 ~ 5.4 付近にあり, 他のラッカーゼに比べてタンパク化学的な相違が示唆された。

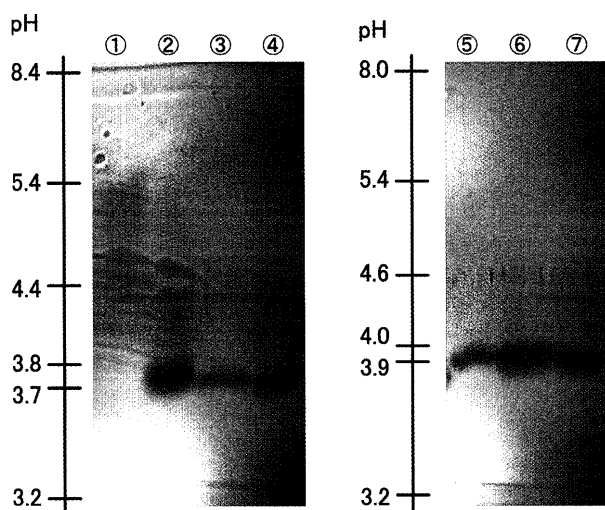


Fig.1 Isoelectric focusing of laccases from white-rot fungi.

- ① *T. versicolor* fraction A
- ② *T. versicolor* fraction B
- ③ *T. cervina* fraction A
- ④ *T. cervina* fraction B
- ⑤ *T. conchifer* fraction A
- ⑥ *T. conchifer* fraction B
- ⑦ *T. elegans* fraction B

3-2 酵素化学的性状

3-2-1 作用最適 pH

どの菌種のラッカーゼでも, pH 3.8 ~ pH 4.4 付近で最も高い活性を示した。他の菌種とは異なり, *T. versicolor* ではフラクション A が pH 3.8, フラクション B が pH 4.4 と最適 pH に違いがみられた。全体としては, pH 2.8 ~ pH 3.4 では活性が低いが, pH 3.8 ~ pH 4.4 付近で急激に上昇し, pH 5.0 ~ pH 5.7 付近で低下し始め, pH 6.4 ~ pH 7.3 で活性が完全にならなくなるといった傾向がみられた。

3-2-2 作用最適温度

T. conchifer のフラクション B 及び *T. elegans* のフラクション B は 60 $^{\circ}$ C, その他は 80 $^{\circ}$ C と高い作用最適温度を示した。どのラッカーゼにおいても 60 $^{\circ}$ C と 80 $^{\circ}$ C での活性にはわずかな差しかみられなかったため, 作用最適温度は 60 $^{\circ}$ C ~ 80 $^{\circ}$ C であるといえる。

3-2-3 熱安定性

ラッカーゼの熱安定性については, 各菌種間, あるいはフラクション間で顕著に相違が認められた。すなわち, *T. versicolor*, *T. cervina* においては, フラクション A, B 共に 60 $^{\circ}$ C までは高い安定性を示すが, 70 $^{\circ}$ C を境に急激に活性が低下するという特徴がみられた。*T. conchifer* では, フラクション A, B 共に 60 $^{\circ}$ C まで安定であるのは共通しているが, 70 $^{\circ}$ C になるとフラクション A は最大値の 40% まで活性が下がるのに対し, フラクション B はほぼ活性を維持していた。*T. elegans* のフラクション B は, *T. conchifer* のフラクション B と同様に, 70 $^{\circ}$ C でも最大値の 80% 程度の活性がみられた。以上のことから, 60 $^{\circ}$ C までは活性を保ち 70 $^{\circ}$ C を境に活性が低くなるものと, 70 $^{\circ}$ C でも最高値の 8 割以上の活性を保つものが存在することがわかった。

3-3 ラッカーゼによる水酸化PCBの代謝

3-3-1 反応時間の検討

反応時間が 4 時間, 12 時間のものは水酸化PCBがほとんど代謝されてしまったことから, 反応時間は 1 時間が妥当であると考え, 今後, ラッカーゼと水酸化PCBの反応試験は反応時間を 1 時間として行うこととした。

3-3-2 作用最適 pH の検討

陰イオン交換樹脂未吸着画分 (フラクション A) との反応では, 低塩素化のものは pH の違いに関わ

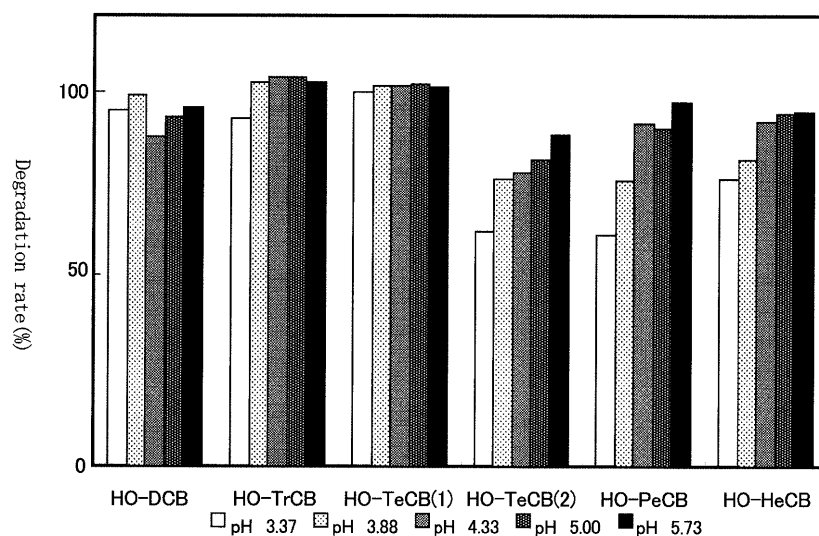


Fig.2 Degradation of hydroxyl PCBs by the non-adsorbed laccase fraction from *T. versicolor* separated by DEAE column chromatography.
 HO-DCB : 4-hydroxy-3,5-dichlorobiphenyl
 HO-TrCB : 4-hydroxy-2,3,5-trichlorobiphenyl
 HO-TeCB (1) : 4-hydroxy-2',3,5,5'-tetrachlorobiphenyl
 HO-TeCB (2) : 4-hydroxy-2',3',4',5'-tetrachlorobiphenyl
 HO-PeCB : 4-hydroxy-2',3,3',4',5'-pentachlorobiphenyl
 HO-HeCB : 4-hydroxy-2',3,3',4',5,5'-hexachlorobiphenyl

らず分解率がほぼ100%となった。高塩素化のものでは分解率に差がみられ、酸性側より中性側のほうで分解率が高くなるという結果が得られた。五塩素化のものではpH 3.37とpH 5.73で分解率に30%以上も差が生じる結果となった。また、同じ四塩素化の同族体でも塩素の結合位置により分解率が異なるという興味ある結果が得られた。(図2)

陰イオン交換樹脂吸着画分(フラクションB)との反応では、全体的に未吸着画分に比べて分解率が低い結果となった。二塩素化のものではpHの違いによる分解率の差はあまり見られなかったが、それ以外のものでは酸性側より中性側のほうが高い分解率を示し、塩素化数三、五、六のものではpHの違いにより分解率に40%も差が生じた。また、未吸着画分との反応と同様に、四塩素化の同族体間で差が見られた。この差はかなり大きく、60%も分解率が異なる結果となった。(図3) この結果から、同じラッカーゼであっても、各アイソフォーム間で代謝性に大きな違いがあることがわかった。また水酸化PCB分解における作用最適pHはシリングアルダジンを基質として得られた作用最適pHとは異なり、より中性側にあることがわかった。

4. 要約

白色腐朽菌の菌種間、また同一の菌種内で互いに酵素化学的な性質の異なるアイソフォームが存在し、水酸化PCBの代謝性も異なることがわかった。

T. versicolor 産生ラッカーゼにおける水酸化PCB分解では、陰イオン交換樹脂未吸着画分との反応では、高塩素化水酸化PCBは酸性側よりも中性側で分解率が高く、陰イオン交換樹脂吸着画分との反応では、低塩素化水酸化PCBについても同様の動向を示すことがわかった。さらに、同じ四塩素化水酸化PCBでも塩素の結合位置の違いにより、分解率に差が生じることが明らかとなった。

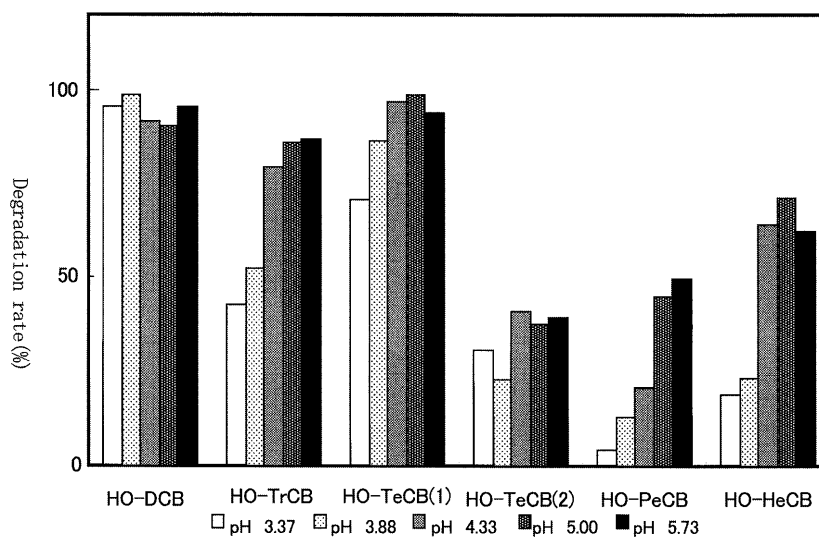


Fig.3 Degradation of hydroxyl PCBs by the non-adsorbed laccase fraction from *T. versicolor* separated by DEAE column chromatography.

HO-DCB : 4-hydroxy-3,5- dichlorobiphenyl

HO-TrCB : 4-hydroxy-2',3,5'-trichlorobiphenyl

HO-TeCB (1) : 4-hydroxy-2',3,5,5'-tetrachlorobiphenyl

HO-TeCB (2) : 4-hydroxy-2',3',4',5'-tetrachlorobiphenyl

HO-PeCB : 4-hydroxy-2',3,3',4',5'-pentachlorobiphenyl

HO-HeCB : 4-hydroxy-2',3,3',4',5,5'-hexachlorobiphenyl

文 献

- 1) Ohsaki, Y., Matsueda, T., Kurokawa, Y., Environ. Pollution 96, 79-88, 1997.
- 2) Soong, D.K., Ling, Y.C., Chemosphere 34, 1579-1586, 1997.
- 3) Kubatova, A., Erbanova, P., Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F., Sasek, V., Chemosphere 43, 207-215, 2001.
- 4) Mori, T., Kondo, R., FEMS Microbiol. Lett. 216, 223-227, 2002.
- 5) Suhara, H., Daikoku, C., Takata, H., Suzuki, S., Matsufuji, Y., Sakai, K., Kondo, R., Appl. Microbiol. Biotechnol. 62, 601-607, 2003.
- 6) Manji, S., Ishihara, A., Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 438-444, 2004.