

# *Coriolus versicolor* によるリグニン 分解酵素の生産および酵素の性質

川口 浩一, 星野 一宏, 諸橋 昭一, 笹倉 寿介

## 1. はじめに

地球上で広大な面積を占めている未利用な広葉樹林, ひのきや杉などの人工林における切り株などの残材, 木材加工場における廃材などセルロース系バイオマスは年間数十億トンに達するといわれている。これらの木材資源は, セルロース, ヘミセルロース, およびリグニンより構成され, 莫大な炭水化物とエネルギーを含んでいる。このために, 近年, 石油資源の枯渇とともにこれら未利用なバイオマスの有効利用が地球的規模で話題となっている。本研究室では, 数年前よりセルロースおよびヘミセルロースの有効利用に関する研究を行っており, その一貫として本研究では, 担子菌(キノコ)によるリグニンの有効利用を最終目標として, リグニン分解関連酵素の生産について検討した。

担子菌は, 自然界物質循環において木材の構成成分であるリグニンの還元者として役割を担っている。つまり, リグニンを資化, もしくは分解する能力を有している。これは担子菌により菌体外へ分泌される酵素によって行われる。本研究で使用する担子菌, すなわち白色腐朽菌 *Coriolus versicolor* はラッカーゼ, リグニンパーオキシダーゼなどリグニン分解に関連した酵素を生産する。両酵素は天然ポリマーであるリグニンに対してどのように作用を及ぼすかは複雑な反応が多いため完全に解明されていないが, リグニン分解に必須な酵素である。そこで, まずこれらの酵素を効率良く生産させるために *C. versicolor* を液体表面培養し, ラッカーゼ, リグニンパーオキシダーゼの生産特性について検討した。さらに, これらの酵素を有効利用するために, 各酵素を分離精製し, その性質についてもした。

## 2. 材料と方法

### 2.1 使用菌株

本研究では担子菌として白色腐朽菌 *Coriolus versicolor* IFO 4937 (Institute of Fermentation, Osaka, Japan) を使用した。

### 2.2 培養法

本研究で使用した液体培地の組成を以下に示す。グルコース; 10g/l, ポリペプトン; 10g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1.5g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.5g/l, チアミン塩酸塩; 2.0mg/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 16mg/l。培地のpHは塩酸により5.6に調節し, 準備しておいたメリクロン用三角フラスコ(100ml)に25mlずつ加えた。これらを121°Cで15分間オートクレーブすることにより滅菌した。冷却後, 継代培養しておいたペトリディッシュより菌糸を採取し, ホモジナイザーを用いて生理食塩水に懸濁させる。その懸濁液

を三角フラスコに等量殖菌することにより培養を開始した。培養は28°Cに制御されたインキュベーター内で静置して行った。

### 2.3 乾燥菌体重量

各サンプリング時間ごとに菌体の増殖を調べるため、培養したフラスコ内の乾燥菌体重量を測定した。具体的には、ろ紙（東洋ろ紙 No. 131）を用いて三角フラスコ中の菌体と培養液を分離した。その後、乾燥菌体重量は、ろ紙上の菌体を蒸留水で5～6回洗浄し、80°Cで一晩乾燥して秤量することにより調べた。この重量を培養液の体積で割った値を乾燥菌体濃度として使用した。

### 2.4 酵素活性

**2.4.1 ラッカーゼ活性** ラッカーゼ活性は反応基質であるシリングアルダジンの酸化速度より測定した。活性は527nmにおける吸収の増加を分光光度計を用いて測定することにより行った。反応は分光光度計のセル中で以下の試料を加えることにより行った。0.1M酢酸緩衝液（pH 6.0）2.8ml, 0.1%シリングアルダジンエタノール溶液0.1ml, 培養液0.1ml。ラッカーゼ活性1 katは反応基質であるシリングアルダジンを1秒間に1 mol 酸化する酵素量と定義した。また、ラッカーゼ活性はシリングアルダジン酸化物の分子吸光係数  $65,000\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を使用することにより計算した。

**2.4.2 リグニンパーオキシダーゼ活性** リグニンパーオキシダーゼ活性は Tien & Kirk 法<sup>1)</sup>に改良を加えた方法を用いて測定した。反応は0.1Mグリシン-塩酸緩衝液（pH 3.0）1.5ml, 12mM ベラトリルアルコール0.5ml, 0.3mM 過酸化水素水0.5ml, 培養液0.5mlを順に加えて行った。ラッカーゼ活性と同様に、分光光度計を用いて310nmにおける吸収の増加を測定した。リグニンパーオキシダーゼ活性1 katは1秒間に1 molのベラトリルアルコールをベラトリルアルデヒドに変換する酵素量と定義した。また、活性の計算には生成物であるベラトリルアルデヒドの分子吸光係数  $9,300\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を使用した。

### 2.5 リグニン分解酵素の分離精製

培養液中の酵素を分離精製するため、弱陰イオン交換体である DEAE-Toyopearl 650M を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムの高さは50cm, 直径1.5cmである。キャリアーとして50mM リン酸緩衝液（pH 7.0）を使用した。各酵素の溶出は塩化ナトリウムの濃度を連続的に0.5Mまで徐々に増加させることにより行った。また、流速は1.30ml/min, 分画体積は2.5ml/tubeで行い、120本に分画した。

### 2.6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

2種のリグニン分解酵素の分子量測定、および分離精製後の酵素の純度を調べるためにポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動はアトー社製の電気泳動キットを使用し、標準タンパク質としての分子量マーカーキット MW-SDS-70（シグマ社）を使用した。まず、DEAE-Toyopearlにより分離した酵素液を脱塩するために、透析を行った。次に、酵素液を濃縮するために限外ろ過ユニット（アドバンテック社）により約1 mg-protein/mlになるまで濃縮した。これらの処理をした後、分離ゲルとして10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。また、泳動後の染色はクマジーブリリアントブルーGにより行った。

### 2.7 その他の定量

培養液の残存グルコース濃度、および過酸化水素濃度はそれぞれ酵素法<sup>2)</sup>により測定した。また、

プロテアーゼ活性はカゼインの加水分解より測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 C. versicolorの培養および酵素生産

図1は、C. versicolorを液体表面培養したときの菌体の増殖、ラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼ活性、培養液の炭素源(グルコース)濃度、プロテアーゼ活性、pH値の経時変化を示している。

菌体は培養6日目より炭素源の消費に対応して増殖し、培養10日目においてグルコースの枯渇とともに増殖は乾燥菌体重量で約5g/lに達し、完全に停止した。培養液のpHは5.6から菌体の増殖にともなって低下し、増殖が停止した培養10日目には4.5まで下がった。しかし、その後酵素の蓄積とともに6.0~6.5まで再び上昇した。また、定常期にはラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼが培養液中へ分泌され、菌体の重量は徐々に減少した。

ラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼ活性は、培養16日目に最大となりそれぞれ約1.6、および0.45nkat/mlに達した。しかし、培養16日以後この2種のリグニン分解酵素の活性はともに減少傾向を示した。これは菌体の増殖とともに生産されるプロテアーゼによる酵素分解、リグニン分解酵素の分泌とともに培養液中に放出される過酸化水素による失活などが原因と考えられる。特に、培養液中の過酸化水素の蓄積は培養16日目を以降、約1.7mMと非常に高く、この蓄積がリグニン分解酵素活性の減少における主な原因であると考えられる。以上の結果より、表面培養法においてリグニン分解酵素を得るには、約16日間培養後に培養液を回収すると効率が良いとわかった。また、酵素の安定性を上げるためには、生成した過酸化水素を常温で分解する酸化マンガン(IV)、カタラーゼなどを添加して培養を行えばよいと考えられる。また、今回は報告しないが、さらに効率良くリグニン分解酵素を得る手段として、炭素源にグリセロールを用いる方法、あるいはナリンギンやバニルルアセトンなどリグニンの単位構造物質を誘導剤として使用する方法が良好であるという結果を得ている。<sup>3)</sup>

#### 3.2 酵素の分離精製

次に、リグニン分解酵素の性質を調べるため、C. versicolorを表面培養法により培養したとき得られた粗培養液から2種のリグニン分解酵素の分離精製を試みた。まず、2種のリグニン分解酵素を分離するため、硫安沈殿法により培養液を濃縮した後、DEAE-Toyopearl 650Mを用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った。図2は、各フラクションにおける溶出液の紫外吸収およびラッカーゼ、リグニンパーオキシダーゼ活性を示している。ピークIはゲルに吸着しなかったタンパク質を示し、

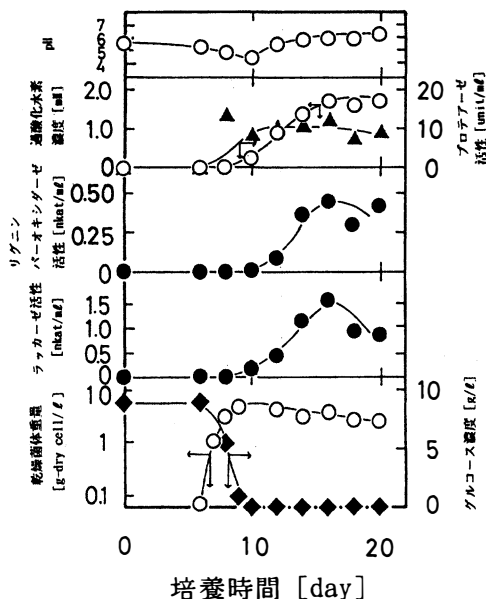


図1 C. versicolorの培養

食塩グラジェントによる吸着タンパク質の溶出は、この吸着しなかったタンパク質が完全に排除された分画数40番目より行った。食塩溶出開始後、紫外吸収の測定によりII～Vの4つのピークが確認できた。ラッカーゼは吸着しなかったピークI、およびIIIで検出された。また、リグニンパーオキシダーゼ

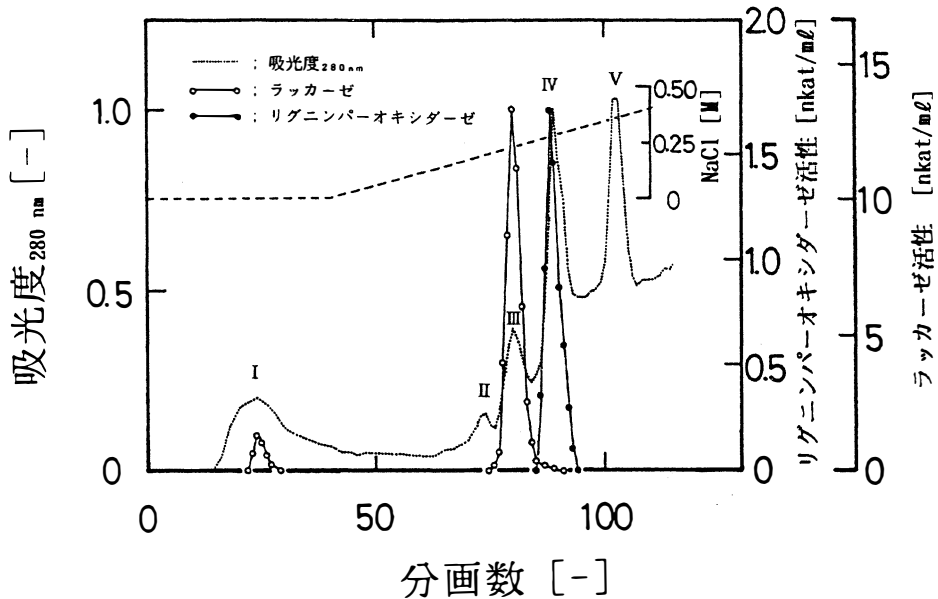


図2 DEAE-Toyopearlによるリグニン分解酵素の分離精製

表1 精製の各段階におけるリグニン分解酵素の比活性

ーゼはピークIVでのみ検出され、リグニン分解酵素であるラッカーゼとリグニンパーオキシダーゼはDEAE-Toyopearlを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより容易に分離できることがわかった。

表1は、精製の各段階におけるラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼの比活性の変化を示した結果である。Step1は菌体と培養液をろ過により分離した培養液の比活性を示す。

ろ過した培養液のラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼの比活性はそれぞれ0.662、および0.018nkat/mlであった。Step2はStep1より得られた培養液を蒸留水で透析した後の比活性を示す。この操作により培養液中の低分子物質を除去することができ、ラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼの比活性はろ過のみ行った培養液と比較しそれぞれ1.4、および9.1倍にすることができた。

|        | ラッカーゼ比活性<br>[nkat/mg-pro.] | リグニンパーオキシダーゼ<br>比活性 [nkat/mg-pro.] |
|--------|----------------------------|------------------------------------|
| Step 1 | 0.662 ( 1 )                | 0.018 ( 1 )                        |
| Step 2 | 0.946 (1.4)                | 0.163 (9.1)                        |
| Step 3 | 4.01 (6.1)                 | 0.718 (39.9)                       |
| Step 4 | 64.5 (97.4)                | 67.6 (3760)                        |

Step 1 ; ろ過 (粗酵素液)

Step 2 ; 透析

Step 3 ; 硫酸沈殿法による濃縮

Step 4 ; DEAE-Toyopearlによる分離精製

( )はstep 1の比活性を1とした相対比活性

また、Step 3は Step 1の培養液について硫酸沈殿、および透析を行った後の比活性を示す。この操作は培養液中の低分子物質、および担子菌により生産された可溶性の高分子などを除去した比活性を示し、ラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼの比活性は Step 1と比較してそれぞれ約6および、40倍に増大できた。さらに、Step 4は Step 3で得られた酵素液を DEAE-Toyopearlにより分離精製した後の比活性を示す。比活性は粗培養液に比較してラッカーゼでは約100倍、リグニンパーオキシダーゼでは約3700倍と極めて活性の高い酵素を得ることができた。したがって、DEAE-Toyopearlを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより得られたラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼは極めて純度が高いと予想される。

### 3.3 リグニン分解酵素の性質

#### 3.3.1 リグニン分解酵素の分子量

ラッカーゼ、リグニンパーオキシダーゼの分子量を決定するため、DEAE-Toyopearlで分離したピークⅢ、Ⅳの各分離濃縮液を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。図3は、電気泳動を行った後の結果を示す。レーンAはピークⅣのリグニンパーオキシダーゼ、BはピークⅢのラッカーゼを電気泳動した結果である。また、レーンCは分離前の粗酵素溶液、Dは分子量マーカーの結果を示す。図4は分子量マーカーの分子量と移動距離の関係を示す。この図を用いてAおよびBのタンパク質の電気泳動値を比較することによりラッカーゼ、リグニンパーオキシダーゼの分子量は、それぞれ約38,000、42,000であることがわかった。また、図3の電気泳動の結果より、2種のリグニン分解酵素のバンドが単一であることから極めて高純度に精製できていることが確認できた。

#### 3.3.2 リグニン分解酵素の至適温度

図5は DEAE-Toyopearlにより分離精製した後のラッカーゼ（ピークⅢ）、およびリグニンパーオキシダーゼ（ピークⅣ）の至適温度を示している。この図より至適温度において両酵素とも大きな差は見られず、ラッカーゼでは

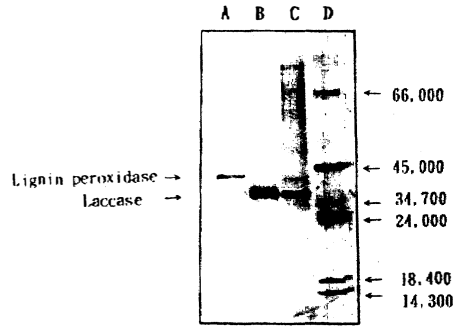


図3 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

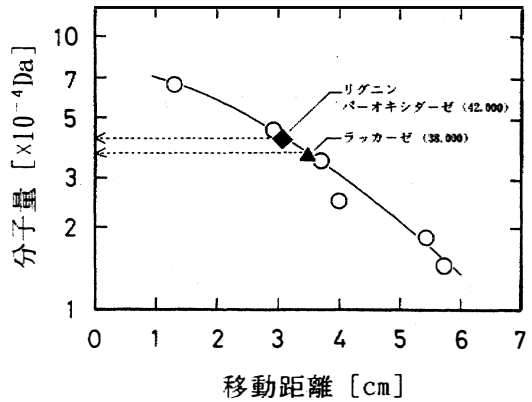


図4 リグニン分解酵素の分子量

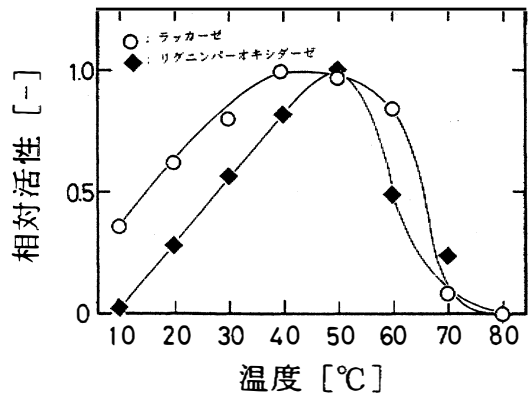


図5 リグニン分解酵素の至適温度

40°C, リグニンパーオキシダーゼでは50°Cであることがわかった。また、両酵素とも約50°C以上より急激に活性が減少した。したがって、*C. versicolor*により生産される2種類のリグニン分解酵素は40°Cまで利用できると考えられる。

### 3.3.3 リグニン分解酵素の至適 pH

図6はリグニン分解酵素の至適 pH を調べた結果である。各酵素の至適 pH はリグニンパーオキシダーゼでは pH2.5, ラッカーゼでは pH4.5 となった。また、この図よりリグニンパーオキシダーゼとラッカーゼが同時に反応する pH 域は約3.5~4.5と非常に狭いことがわかった。したがって、粗酵素液を用いて反応を効率良く行うためには、2種の酵素がともに働くように培養液の pH を3.5~4.5でコントロールする必要があると考えられる。

### 3.3.4 リグニン分解酵素の pH 安定性

図7はラッカーゼ, およびリグニンパーオキシダーゼの pH 安定性を示している。各 pH に調節した酵素液を1時間, 1日, および1週間後にそれぞれの酵素活性を測定した結果である。活性は初期の活性値を1とした相対活性で示した。この図よりリグニンパーオキシダーゼは、特に pH5 以上の中性, アルカリ性領域において不安定な酵素であることがわかった。また、ラッカーゼについてはリグニンパーオキシダーゼとは対照的に、pH 4 以下の弱酸性領域で失活が速かったが pH 8 前後においては全く失活することなく極めて安定であることがわかった。この結果より、ラッカーゼを生産する場合は菌体の増殖が停止した後、培養液の pH を8前後に、リグニンパーオキシダーゼの場合は3.5前後に調節して培養することによりそれぞれのリグニン分解酵素を別々に生産できるものと考えられる。

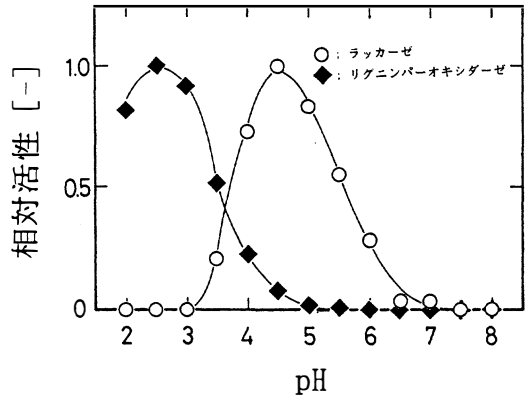


図6 リグニン分解酵素の至適 pH

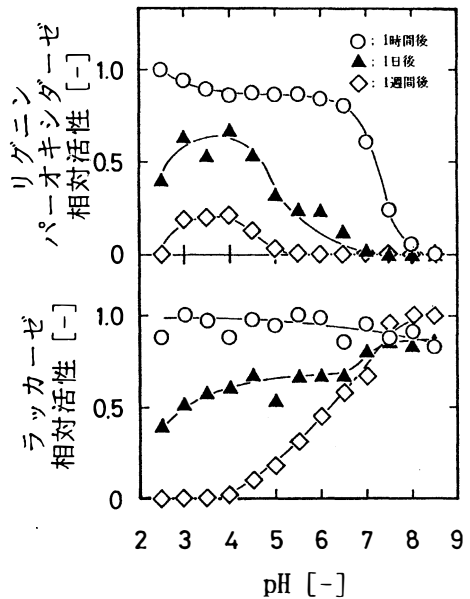


図7 リグニン分解酵素の pH 安定性

## 4. ま と め

- (1) 白色腐朽菌 *C. versicolor* を液体表面培養することによりラッカーゼ, およびリグニンパーオキシダーゼの最大酵素活性はそれぞれ約1.60, および0.45nkat/mlに達した。
- (2) 培養液中のラッカーゼ, およびリグニンパーオキシダーゼは、DEAE-Toyopearlを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより容易に分離精製できた。

- (3) *C. versicolor* により生産されるラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼの分子量は、それぞれ約38,000、および42,000であった。
- (4) ラッカーゼの至適温度は40°C、至適 pH は4.5であった。また、リグニンパーオキシダーゼの至適温度は50°C、至適 pH は2.5であった。

#### 参考文献

- 1) M. Tien and T.K. Kirk: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 2280-2284 (1983).
- 2) 日本生物工学会編, 生物学実験書, p. 291, 培風館 (1992).
- 3) 川口浩一, 星野一宏, 笹倉寿介: 表面培養法を用いた *C. versicolor* によるリグニン分解関連酵素の生産および酵素の性質, 日本農芸化学会誌, **69**, 2, (1994).

## Production and Characterization of Ligninolytic Enzymes by *Coriolus versicolor*

Kouichi Kawaguchi, Kazuhiro Hoshino, Shoichi Morohashi  
and Toshisuke Sasakura

It has been reported that *C. versicolor* produces extracellularly lignin-decomposing enzymes such as laccase and lignin peroxidase. In order to achieve the high yield of two enzymes, we cultured the fungi by the surface culture method, investigated the production of enzymes. Moreover, purification and characterization of these enzymes were also investigated. As a result, the activities of laccase and lignin peroxidase achieved about 1.60, and 0.45nkat/ml, respectively. Further, it was found that two enzymes could be purified easily by DEAE-Toyopearl and the molecular weights of laccase and lignin peroxidase were estimated to be 38,000, 42,000, using electrophoresis, respectively.

〔英文和訳〕

### *Coriolus versicolor* によるリグニン 分解酵素の生産および酵素の性質

川口 浩一, 星野 一宏, 諸橋 昭一, 笹倉 寿介

白色腐朽菌 *C. versicolor* IFO 4937 は、木材中のリグニンを分解するラッカーゼやリグニンパーオキシダーゼを生産すると報告されている。本研究では、より効率的な酵素生産を目的として、表面培養法を用いたリグニン分解酵素の生産について検討した。さらに、この2種の酵素を分離精製し、それぞれの性質も検討した。その結果、本菌株は最大酵素活性でラッカーゼ、およびリグニンパーオキシダーゼを1.60、および0.45nkat/ml 生産することができた。また、両酵素は DEAE-Toyopearl を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより容易に分離精製できた。精製したラッカーゼ、リグニンパーオキシダーゼの分子量はポリアクリルアミドゲル電気泳動によりそれぞれ38,000、42,000であることがわかった。