

フェノール系化合物添加による *Coriolus* リグニン分解酵素の誘導生産

松永 薫, 星野 一宏, 赤壁 節子, 諸橋 昭一, 笹倉 寿介

1 緒 言

森林植物の主成分であるリグニンは茶色の特性を持つ芳香族生体ポリマーである。パルプ製造業界において、パルプ中のリグニンの除去は必須のことである。リグニンを化学的に分解することは難しく、さまざまな化学的分解方法が考えられているが環境へ悪影響を及ぼすものが多い。このような問題に対して、近年、環境への影響を減少させることを目的としてリグニンを生物学的に分解することが注目されている。自然界において木材中のリグニンは様々な微生物、特に、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* と *Coriolus versicolor* (カワラタケ) によって分解されることが知られており^{1,2)} これらの菌株はリグニンの生物学的分解に関する研究には必要不可欠のものである。この担子菌類(白色腐朽菌)によるリグニンの分解は菌体外へ分泌される酵素(ラッカーゼ, リグニンパーオキシダーゼ, マンガンペルオキシダーゼなど)によって行われる。しかしながら、これらの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のかは複雑な反応が多いため現時点において完全には解明されていないが、リグニン分解には必須の酵素である。³⁾

本研究では、過去のデータから最もリグニン分解酵素を生産した担子菌 *C.versicolor* を使用し、培養条件および各種フェノール系化合物の添加による誘導的生産について検討した。具体的には、振とう培養と静置培養の比較、フェノール系化合物を添加することによるラッカーゼ等のリグニン分解酵素の誘導、さらに異なる *C.versicolor* 株への添加剤によるラッカーゼの誘導効果について検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 使用菌株

本研究では、担子菌 *Coriolus versicolor* IFO 4937 (Institute of Fermentation, Osaka, Japan) を使用した。また、リグニン分解酵素の生産能力および誘導剤の効果を比較するために *Coriolus versicolor* IFO 8954, 9791, 30340, 30388 の4種類の菌株を使用した。

2.2 培養の方法

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, KH_2PO_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, 培地はpHを0.1N塩酸を用いて5.6に調整し、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℃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、約5日前より培養しておいたペトリディッシュより菌糸を採取し、生理食塩水に懸濁させた後、ホモジナイザーを用いて細分化

した懸濁液を三角フラスコに等量植菌することにより培養を開始した。培養は28℃にコントロールしたインキュベーター内で行った。

2.3 乾燥菌体重量

各サンプリング時間ごとの菌体の増殖量を調べるため、菌体の培地当たりの乾燥菌体重量を測定した。具体的には、ろ紙(Advantec, ろ紙NO. 131)を用いて三角フラスコ内の菌体と培養液を分離した。その後、菌体重量は、ろ紙上の菌体を蒸留水で5～6回洗浄し、80℃で一晩乾燥したあと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た。

2.4 酵素活性

2.4.1 ラッカーゼ活性⁴⁾ 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。測定は527nmにおける吸収の増加を分光光度法を用いて行った。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。セル中での各組成は以下の通りである。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, 粗酵素液0.1ml。ラッカーゼの活性(kat)は反応基質であるシリングアルダジンを1秒間に1mol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 $65,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 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⁵⁾ リグニンパーオキシダーゼ活性はTien & Kirk法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, 粗酵素液0.5mlを順に加えて行った。ラッカーゼ活性と同様に、分光光度法を用いて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の活性(kat)は1秒間に1mol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 $9,300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を使用することにより計算した。

2.4.3 マンガンペルオキシダーゼ活性⁶⁾ マンガンペルオキシダーゼ活性はGlenn & Gold法に改良を加えた方法を用いて測定した。反応は0.6mg/ml BSA, $200\mu\text{M}$ MnSO_4 , $80\mu\text{g/ml}$ 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenz Thiazoline-6-Sulfonic Acid) (以下ABTS)を含む0.1M酢酸緩衝液(pH 4.5) 1.5ml, $100\mu\text{M}$ 過酸化水素水1.4ml, 粗酵素液0.1ml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415nmにおける吸収の増加を測定した。マンガンペルオキシダーゼの活性(kat)は反応基質であるABTSを1秒間に1mol酸化する酵素量と定義した。また、マンガンペルオキシダーゼ活性はABTS酸化物の分子吸光係数 $36,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を使用することにより計算した。

2.5 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

*C. versicolor*が培地中へ分泌するリグニン分解酵素の分布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, MW-ND-500 (Sigma.Co.)を使用した。培養液を濃縮するためにmicrocon 10 (グレースジャパン社)を用いて遠心分離操作により約2～3 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、泳動後のタンパク質の染色はクマジープリアントブルー-Gによるタンパク質染色法により行った。

2.6 培養液の定量

培養液中の残存グルコース濃度は、グルコース-CII-テスト（和光純薬工業）を用いた酵素比色法により測定した。また、生成した酵素のタンパク質濃度はLowry法によって測定した。⁷⁾

3. 結果および考察

3.1 静置培養と振とう培養の比較

図1は、*C.versicolor*を20日間振とう培養、および静置培養した時の菌体の増殖、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）濃度変化を調べた結果である。菌体は静置培養において培養液の表面上でカーペット状に、また、振とう培養では培養液中でペレット状になった。グルコースの枯渇とともに菌体の増殖は停止し、各酵素の培地中への分泌生産が始まった。また、ラッカーゼ活性は、静置培養においては培養20日目で16.7nkat/mlとなり、振とう培養に比較して約2倍の活性を示した。リグニンパーオキシダーゼ活性も同様に静置培養が振とう培養の約4倍高い活性を示した。すなわち、本菌株は炭素源の枯渇とともにラッカーゼ、リグニンパーオキシダーゼを分泌生産し始めること、さらに振とう培養よりも静置培養を行った方がリグニン分解酵素の生産が良好であることがわかった。振とう培養で酵素の分泌量が低くなった主な原因は、菌体が培養液中でペレットを形成したため物質移動が低下したこと、振とうにより菌糸が刺激を受け炭素源の消費から作りだされるエネルギー（ATP等）を菌体の維持に利用したためと考えられる。したがって、以上のことから菌体の増殖、各リグニン分解酵素の生産において静置培養の方が適していると考えられるため、以下の実験では静置培養について検討した。

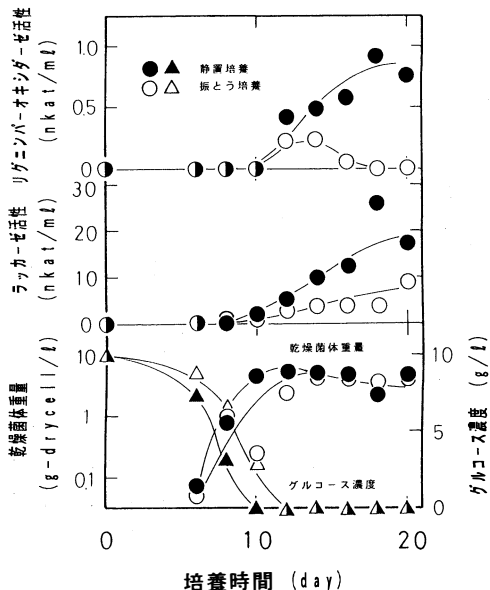


図1 *C.versicolor* IFO 4937株によるリグニン分解酵素の生産（静置培養と振とう培養の比較）

3.2 添加剤の誘導効果

リグニンは一般にフェニルプロパン系化合物が重合した高分子であるために、培養初期においてフェノール系化合物を添加しておくことによりリグニン分解酵素の培地への分泌量を増大できると期待される。そこで、リグニン分解酵素を効率よく培地へ分泌生産するためにフェノール系化合物の培地への添加効果について検討した。添加剤として表1に示した37種のフェノール系化合物を培養初期にそれぞれ1 mMになる

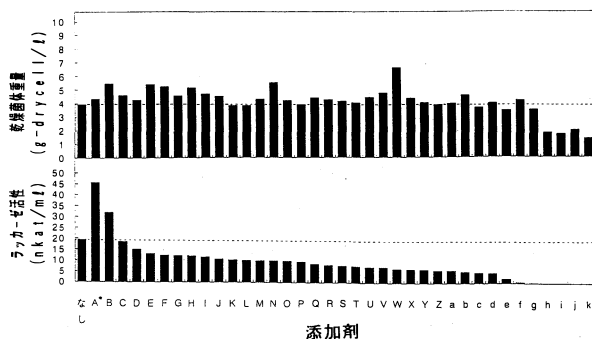


図2 *C.versicolor* IFO 4937によるラッカーゼの生産（添加剤による影響）※添加剤A～kは表1に示す

A	ヘスペリジン	N	バニリアセトン	a	ヒドロキシ安息香酸
B	1,3-ジヒドロキシナフトレン	O	バニリン	b	3-ヒドロキシチラミン
C	ピロガロール	P	シリングアルダジン	c	ベンジルアルコール
D	ナリンギン	Q	カテコール	d	アセトバニロン
E	3,4-ジヒドロキシ桂皮酸	R	L-DOPA	e	ペラトリルアルコール
F	trans-桂皮酸	S	プロトカテキュ酸	f	キシリジン
G	クロロゲン酸	T	フロログルシン	g	p-クロロフェノール
H	4-ヒドロキシ-3-メトキシ桂皮酸	U	レゾルシン	h	p-ヒドロキシビフェニル
I	3-フェニル-2-プロペン-1-オール	V	セサモール	i	4-クロロ-1-ナフトール
J	L-チロシン	W	p-アニシジン	j	フェノール
K	L-ラムノース	X	ABTS	k	p-クレゾール
L	L-フェニルアラニン	Y	ヒドロキノン		
M	没食子酸	Z	p-メトキシフェノール		

表1 添加剤の名称

ように培養液中に加えた。図2は添加剤の入った培地で *C.versicolor* を20日間培養したときの菌体濃度およびラッカーゼ活性を示す。破線は添加剤を加えないときの結果であり、菌体濃度は3.94g/l、ラッカーゼ活性は19.4 nkat/mlであった。ラッカーゼ活性の誘導に有効であると従来報告されているナリンギン⁸⁾、p-アニシジン⁹⁾よりもフラボノイドの一種であるヘスペリジン、1,3-ジヒドロキシナフトレン（図3に示す）の添加で顕著な誘導が認められた。図2よりこの2種類の化合物を添加したときの菌体濃度は添加していない場合と比較して大きな差はないものの、ラッカーゼ活性においてはヘスペリジン添加で無添加の約2倍の、また、1,3-ジヒドロキシナフトレン添加では約1.5倍の生産向上が認められた。したがって、これらの誘導剤の添加は菌体の増殖に影響を与えず、酵素の分泌生産量を増大させる効果があるものと考えられる。ヘスペリジンの構造について検討すると、従来、誘導効果があるとされているナリンギンとよく似たフラボノイド構造をしておりヘスペリジンとナリンギンの違いはベンゼン環の置換基だけである。一方、ヘスペリジン、ナリンギンともに2糖のラムノグルコシドを有する配糖体であるがラムノース（図2、添加剤K）だけでは誘導が認められなかった。以上のことより *C.versicolor* のラッカーゼ分泌生産はヘスペリジンのフラボノイドによって誘導が引き起こされるものと考えられる。今後、ラッカーゼ生産に対してヘスペリジンがいかに誘導に影響しているのかを詳細に検討する予定である。

図4は、さらに多量のラッカーゼを分泌生産させるために、最も誘導効果が認められたヘスペリジンの至適濃度を調べた結果である。まず、図より菌体の増殖速度はヘスペリジン添加量に依存せず、ほぼ一定の増殖曲線を示した。しかし、ラッカーゼの培

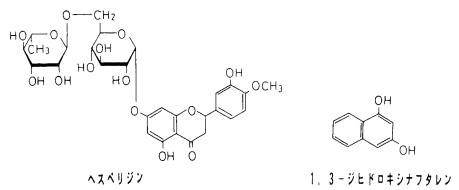


図3 添加剤の構造式

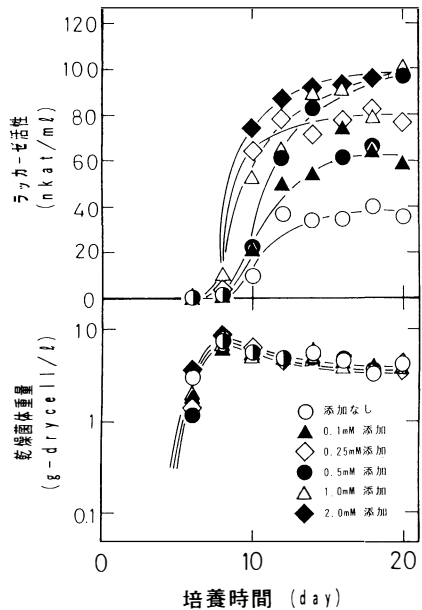


図4 *C.versicolor* IFO 4937によるラッカーゼの生産（ヘスペリジン濃度による影響）

地への分泌量はヘスペリジン濃度の増加とともに向上することがわかった。最大酵素活性で比較すると添加なしの培養では培養20日目に40.5nkat/mlであったがヘスペリジンを0.5、及び1.0mM添加することにより、培養20日目に97.9,101nkat/mlにまで達し約2.5倍に向上することができた。しかし、0.5mM以上の添加では最大酵素活性はほぼ等しく過剰に添加しても誘導効果は上がらないことがわかった。したがって、ラッカーゼを効率よく分泌生産させるためには、培地へ0.5mMになるようにヘスペリジンを添加することが有効であることがわかった。

3.3 各菌株による酵素生産

図5は *C.versicolor* IFO4937株のラッカーゼの誘導に対して効果のあったヘスペリジンが異なる *C.versicolor* 株に有効であるか調べた結果である。ヘスペリジンの培地への添加量を0.5mMとして、それぞれの株について添加の有無によるラッカーゼ、リグニンパーオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ活性を調べた。ヘスペリジンの添加は5種類すべての菌株に対しリグニン分解酵素を生産増大できることがわかった。またリグニンパーオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼはヘスペリジンを添加することで、無添加の場合の1.2~4倍に増大できた。さらに、IFO 4937株のラッカーゼはヘスペリジンを添加することで培養20日目に32.3nkat/mlとなり、無添加の場合の約2.4倍という顕著な誘導が認められた。したがって、ヘスペリジンは *C.versicolor* 株のリグニン分解酵素の分泌生産に対して有効な誘導剤であることがわかった。図6は図5に示した5種類の *C.versicolor* 株について、ヘスペリジン添加なし、0.5mM添加の計10種類について電気泳動を行い、培地への誘導効果を調べた結果である。レーン1はIFO 4937の場合でヘスペリジンを添加しなかった結果を、2はそのヘスペリジン添加した結果を示す。また、3、4はIFO 8754、5、6はIFO 9791、7、8はIFO 30340、9、10はIFO 30388また11は分子量マーカーの結果である。電気泳動の各サンプルは培養20日目の培養液を同じ割合で濃縮した液を用いた。この電気泳動の結果から各 *C.versicolor* の培地に分泌しているラッカーゼは分子量55.7kDa（主バンド）であることがわかった。さらに、ヘスペリジンを添加しない場合より、添加した場合、いずれの株でもラッカーゼのバンドが濃くなっていることがわかった。したがって、ヘスペリジンの添加は分泌する酵素の活性が高くなるのではなく、分泌する酵素量が多くなったためであることがわかった。

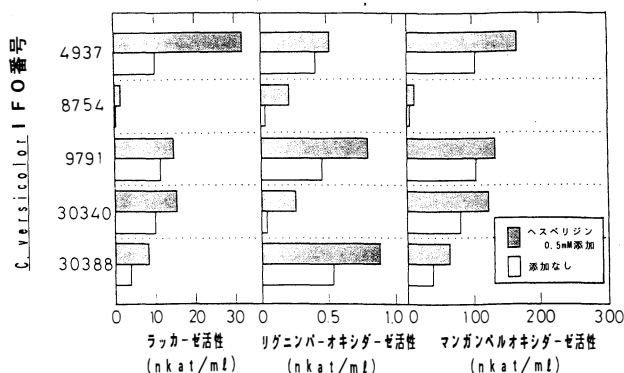


図5 各種菌株によるリグニン分解酵素の生産（ヘスペリジン濃度による影響）

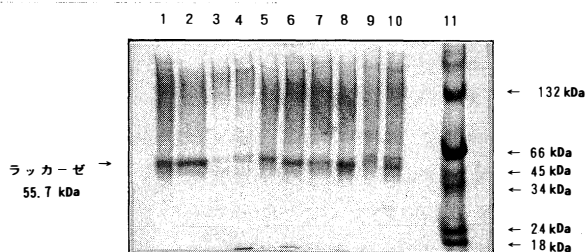


図6 各種菌株が生産するリグニン分解酵素の分子量分布 ※本電気泳動は10%アクリルアミドゲルを使用し、SDSは添加しなかった。レーン1は *C.versicolor* IFO 4937株でヘスペリジンを添加しなかった場合、2は添加した場合、3、4はIFO 8754株、5、6はIFO 9791株、7、8はIFO 30340株、9、10はIFO 30388株、11は分子量マーカーの結果を示す。

4. ま と め

- (1) *C.versicolor* IFO 4937によるラッカーゼ, リグニンパーオキシダーゼ分泌生産は振とう培養よりも静置培養が適していた。
- (2) ラッカーゼはフラボノイドの一種であるヘスペリジンを培地中へ0.5mM添加することで最大酵素活性は約100nkat/mlまで向上させることができた。
- (3) *C.versicolor*株が分泌生産するリグニン分解酵素は, ヘスペリジンを添加することによって増大することがわかった。

参 考 文 献

- 1) P.M.Coll, J.M.Fernández-Abalos, J.R.Villanueva, R.Santamaría, and P.Pérez: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2607-2613 (1993).
- 2) Y.Nishizawa, K.Nakabayashi, and E.Shinagawa: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 91-93 (1995).
- 3) J.P.Kaiser and K.W.Hanselmann: *Experientia*, **38**, 167-176 (1982).
- 4) O.Milstein, B.Nicklas, and A.Hüttermann: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 70-74 (1989).
- 5) M.Tien and T.K.Kirk: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 2280-2284 (1983).
- 6) Glenn, J.K. and Gold, M.H: *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 329-341 (1985).
- 7) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.J.Farr, and R.J.Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 8) 川口 浩一: 平成6年度 富山大学大学院工学研究科化学工学専攻 修士学位論文.
- 9) J.M.Bollag, K.L.Shuttleworth, and D.H.Anderson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 3086-3091 (1988).

Inductive Production of *Coriolus* Ligninolytic Enzymes by Adding Phenolic Compounds

Kaoru Matsunaga, Kazuhiro Hoshino, Setuko Akakabe,
Shoichi Morohashi, Toshisuke Sasakura,

Coriolus versicolor strain produces extracellularly lignin-decomposing enzymes such as laccase, lignin peroxidase, and Mn peroxidase. To achieve the high yield of these enzymes, we studied on the condition of culture method and/or the effect of several inducers on lignin-decomposing activities to effectively produce these enzymes. As a result, the production of lignin-decomposing enzymes by *C.versicolor* was higher using surface culture method than that using shaking culture method. Moreover, by adding hespersin to culture medium, the production of these enzymes was remarkably increased. Especially, in the case with 0.5mM hespersin, laccase produced by *C.versicolor* IFO 4937 achieved at ca.100nkat/ml, which was about 2.5-fold higher than that without one.

〔英文和訳〕

フェノール系化合物添加による *Coriolus* リグニン分解酵素の誘導生産

松永 薫, 星野 一宏, 赤壁 節子, 諸橋 昭一, 笹倉 寿介

C.versicolor は細胞外にラッカーゼ, リグニンパーオキシダーゼ, マンガンペルオキシダーゼなどのリグニン分解酵素を生産する。そこで, それらの酵素の生産量を増大するために, 培養条件とフェノール系化合物の添加効果について検討した。その結果, リグニン分解酵素を効率よく生産するには振とう培養よりも静置培養が有効であることがわかった。また, ヘスペリジンの添加はリグニン分解酵素の分泌生産量を増大することがわかった。特に, *C.versicolor* IFO 4937 によって生産されるラッカーゼはヘスペリジンを0.5mM添加することで最大酵素活性が約100nkat/mlに達し, 無添加の場合の約2.5倍まで向上することができた。