

耐冷性リター分解菌由来リグニン分解酵素の探索

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 木質生命化学分野 前川有也

1. 緒言

積雪下におけるリター分解は分解を担う木材腐朽菌の繁殖温度が一般に 20~30°C であることから、これまでその進行は遅いと考えられてきた。しかしながら近年、積雪下においてもリターの分解が十分に進行することが報告されたり。また、宮本らは積雪下から多数のリター分解菌を採取し、それらが 0°C という低温下でもリグニン分解作用を示すことを明らかにしている²⁾。これは低温でリグニンを分解する酵素が存在することを示唆している。そこでこれらのリター分解菌がどのような酵素系によってリグニン分解を達成しているかを解明するため、これら分解菌の培養物について既知のリグニン分解酵素であるリグニペルオキシダーゼ(LiP)、マンガンペルオキシダーゼ(MnP)、ラッカーゼ(Lac)の活性評価法を行い、また低温で活性を示す酵素の存在について探索を行った。

2. 方法

酵素液の調製: 本実験では低温で Bavendamm 反応陽性を示す 5 種の菌(*Ascomycota* sp.5Mo58 株, *Ascomycota* sp.5Mo59 株, *Basidiomycota* sp.5WMo92 株, *Coccomyces* sp.5WMo59 株, *Coccomyces* sp.5Mo96-1 株)を用いた。これらの菌株は北海道大学農学研究院森林資源生物学研究室の宮本敏澄先生よりご供与頂いた。菌糸体を 15 日間 PDA 培地で前培養した後 40 ml の PD 培地で 23°C, 4°C の二種類の温度で 45 日間培養を行った。培養終了後、菌体を取り除き、遠心分離後、上清を濾過したものを粗酵素液として活性評価に用いた。**LiP 活性評価:** 10 mM のベラトリルアルコールを基質として加え、生成したベラトルアルデヒド量($\epsilon_{310}=9,300$)から酵素活性 (U/ml) を求めた。**Lac 活性評価:** 0.5 mM の 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)を基質として加え、生成する ABTS カチオンラジカル量($\epsilon_{420}=36,000$)から酵素活性を求めた。また Lac に関しては反応温度が 4°C での活性評価も行った。**MnP の活性評価:** 基質として 10 mM の $MnSO_4$ を加え、生成するマンガン(III)イオン量($\epsilon_{238}=6,500$)から酵素活性を求めた。

3. 結果と展望

Lip 活性: LiP は最も高い活性が 5Mo58 株の 23°C 培養物において認められたものの(2.62 U/ml)、いずれの菌株においても Lac, MnP に比べ低い活性が示された。一方、興味深いことに 5WMo92 株では 4°C 培養物の酵素活性が 23°C 培養物に比べ高い酵素活性を示した。**Lac 活性:** Lac はいずれの培養温度に対しても 5WMo59 株が最も高い活性を示した。また 5Mo59 株は 4°C 培養物の方が高い酵素活性を示した。**MnP 活性:** 23°C 培養物では 5Mo96-1 株や 5Mo58 株が高い活性を示しているが、4°C 培養物では 5WMo92 株が最も高い活性を示し、23°C 培養物よりも高い酵素活性を示した。**低温条件下における Lac 活性:** 4°C 条件下における Lac 活性を評価したところ、5WMo59 株の培養物は 30°C での活性よりも高い活性を示した。これに注目し、5WMo59 株の培養物から低温下で働く Lac の精製を現在検討している。また、LiP, MnP での 4°C における酵素活性も行う予定である。

- 1) M.Uchida *et al.*, *Agricultural and Forest Meteorology*, 134, 102-109, 2005
- 2) 宮本敏澄、幸田圭一 日本菌学会第 54 回大会, 51, 2010