

ペルオキシダーゼ型リグニン分解酵素に対する生産誘導物質の探索

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 木質生命化学 落合 崇浩

1. 緒言

木材腐朽菌のうち、白色腐朽菌はその菌体外にラッカーゼ (Lac), リグニンペルオキシダーゼ (LiP) やマンガンペルオキシダーゼ (MnP) といった酸化還元酵素を分泌することによりリグニン分解を達成する。これらの酵素の各種工業用途への応用が期待されているが、その生産機構の詳細はほとんど明らかにされていない。著者はリグニン分解酵素に対する化合物レベルの生産誘導に着目して研究を進め、真菌が産生するシクロスポリン A が担子菌 *Trametes versicolor* の Lac 生産を誘導することを見出した。本研究では、さらに LiP や MnP といった白色腐朽菌特有のペルオキシダーゼ型酵素の生産を誘導する化合物の探索について検討した。この際、スクリーニングソースとして芳香族化合物資化性と多様な二次代謝産物の生産性を有する放線菌を対象とした。また、スクリーニングに先立ち、白色腐朽菌の粗酵素液からペルオキシダーゼ活性のみを特異的に検出できる評価法の確立も検討した。

2. 方法

リグニン分解酵素として LiP, MnP および Lac 標品を用いた。3種の染料 Coomassie Brilliant Blue R-250, Basic Blue 12 (BB12) および Trypan Blue (TB) に対して西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) および Lac 反応を 96 穴マイクロプレート内で行い、吸光度を測定することで HRP 特異的に退色する染料を選抜した。HRP 特異的に退色が確認できた染料について同反応を行い、分光光度計を用いて 400–700 nm の吸光スペクトル変化を測定した。さらに、選抜された染料を用いた評価法が LiP および MnP ならびに *T. versicolor* 培養液に対して有効であるかを検討した。

スクリーニングソースとなる放線菌は腐植酸-ビタミン寒天培地および同ジェランガム培地を用いて選択的に分離した。分離源となる土壌サンプルは北海道および宮崎県内の 32 地点から採集した。単離した放線菌を 96 穴マイクロプレート内で液体培養し、1 次スクリーニングのソースとした。また、2 次スクリーニングではヒットサンプルを濾過滅菌したものをソースとした。得られたソースを 96 時間 PD 培地にて本培養した *T. versicolor* (NBRC 9791) に添加し、さらに 24 時間培養を行った。得られた培養液に対して BB12 を用いたペルオキシダーゼ活性評価を行った。

3. 結果と考察

BB12 は HRP および LiP 反応特異的に 595 nm の吸光度減少を示した。また、*T. versicolor* 培養液を用いた際にも有意な退色が見られたため、BB12 の 595 nm における吸光度減少をペルオキシダーゼ型酵素特異的活性とした。1 次スクリーニングを行なった 713 菌株の放線菌から 11 株のヒットが得られた。2 次スクリーニング段階において放線菌 *Streptomyces* sp. LS10 株の濾過滅菌培養液を添加した *T. versicolor* のペルオキシダーゼ活性が増加した (Fig.)。現在、リグニン分解酵素生産を誘導する物質を LS10 株の培養液中から特定することを試みている。

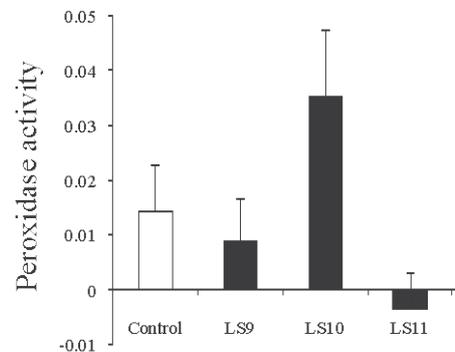


Fig. Peroxidase activity of *T. versicolor*