

多糖類とリグニン重合酵素の相互作用解析

—水晶振動子マイクロバランス法を用いて—

環境資源学専攻 森林資源科学講座 森林化学 松尾 朱実

1. はじめに

卒業研究において、セルロースにキシラン (XY) が堆積すると、人工リグニンであるモノリグノールの脱水素重合物 (DHP) の生成量が増加する一方、グルコマンナン (GM) の堆積は DHP 生成量を減少させることを見出した。これらヘミセルロースの機能差は、ヘミセルロースとモノリグノールを重合させる酵素との親和性に起因しているとの仮説を立てた。本研究では、分子間相互作用を解析する水晶振動子マイクロバランサー (QCM-D) を用いて、モノリグノールに対し重合活性を持つ市販酵素と多糖類 (セルロース, ヘミセルロース) との吸着特性について検討し、仮説の検証を試みた。

2. 方法

SiO₂ ベースの市販のセンサーに、機械解繊で得たセルロースナノファイバー (CNF) を吸着させて、CNF センサーを作製した。このセンサーに、XY 又は GM の水溶液 (濃度 1 g/L) を流速 5 μ L/min で 3.5 時間流入し、Milli-Q 水で 1.5 時間洗浄した。続いて 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: pH 6.1, NaCl 0.8 w/v%, KCl 0.02 w/v%) を 1 時間送液した後、濃度 0.1 g/L の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の PBS 溶液を 2 時間流入した。また、ウルシ由来の Laccase についても PBS の代わりに 0.1 M リン酸カリウム緩衝液を用いて同様の測定を行った。物質の吸脱着量変化は、周波数変化 (ΔF) として測定した。

3. 結果と考察

CNF センサーに対し XY と GM を流入した予備実験では、GM が XY に比べ明らかに速い速度で多量に吸着した。このヘミセルロース吸着センサーに、HRP と Laccase の溶液を流入した。図 1 には、多種の多糖類センサーに対する HRP 流入時の ΔF を示す。 ΔF の減少は流入した物質がセンサーに吸着していることを示し、その絶対値は吸着量の尺度である。XY 存在時の ΔF の絶対値は、GM 存在時の絶対値よりも僅かに大きかった。ここで、センサー中の XY と GM の存在量を考慮すると、少量の XY に同程度の HRP が吸着したと言える。よって、HRP は GM に比べ XY への親和性が高いと推測され、先述の仮説を支持した。

次いで、ウルシ由来の Laccase と多糖類との相互作用について検討した。この酵素はリグニン形成と無関係かもしれないが、DHP 生成能があることが示されている。XY 及び GM への Laccase 流入時の ΔF の減少は同一で、HRP の場合のような差は観測されなかった。

これらの測定において最も興味深い結果は、HRP と Laccase の両方とも、ヘミセルロースが存在していない CNF センサーに最も多量に吸着したことである。その理由として、これらのモノリグノールを酸化する酵素が、結晶性多糖類に対して高い親和性を示す可能性が提示できる。

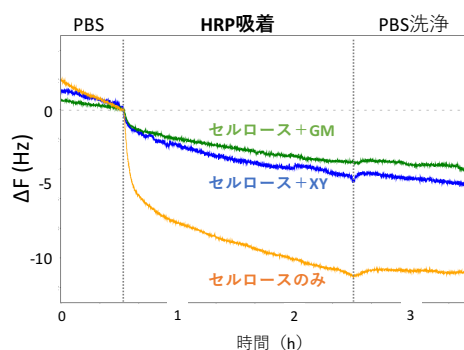


図 1 HRP 吸着時の周波数変化