

# 耐熱性ラッカーゼの発見

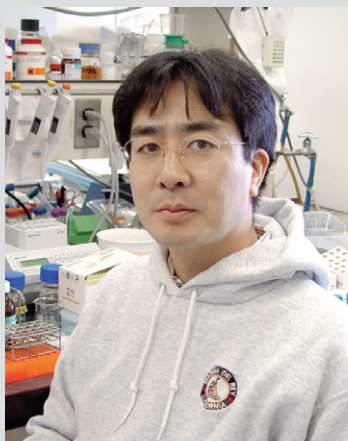
## 高純度ラッカーゼの簡便な量産化が可能に

ラッカーゼは、ポリフェノールの合成・分解をはじめ、さまざまな酸化反応を触媒する酵素であり、各種バイオテクノロジー産業での利用が期待されている。最近、我々は好熱菌からラッカーゼ遺伝子をクローニングし、組換え酵素の量産化に成功した。これにより、従来にない高い安定性をもつ好熱菌ラッカーゼの幅広い分野での利用が期待できるようになった。

A thermophilic laccase has been identified in an extremely thermophilic bacterium when grown in the presence of copper. The protein was purified and the gene was cloned, sequenced, and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant enzyme displayed a blue color typical of laccases and copper-dependent oxidase activity on canonical laccase substrates such as guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate), and syringaldazine at acidic pH. The enzyme was most notable for its striking thermophilicity; the optimal reaction temperature was ~92°C and a half-life of thermal inactivation at 80°C was >14 h, ranking it the most thermophilic laccase reported thus far.

宮崎 健太郎 Kentaro Miyazaki  
miyazaki-kentaro@aist.go.jp  
生物機能工学研究部門  
酵素開発研究グループ グループ長

産業用酵素の開発に関連した研究を行っている。シーズとなる酵素の発見は、古典的な微生物スクリーニング、ゲノム情報を利用した遺伝子クローニング、微生物の分離・培養を介さずに環境試料から直接分離したDNA(メタゲノム)を利用する方法など、種々の手法を織り交ぜて行っている。自然界から単離された酵素は必ずしも工業的な利用環境には適してはいない。そこで、進化分子工学的な手法(遺伝子変異・酵素機能のスクリーニングのサイクル)により、実利用環境に合わせた酵素機能の改変も行っている。



日本の伝統工芸である漆塗りは、ウルシ樹液に含まれるフェノール性化合物ウルシオールがラジカル重合してきた高分子皮膜である。この重合促進物質は「ラッカーゼ」と呼ばれる酵素であり、植物中ではリグニンの生合成に関わっている。植物以外に目を転じると、ラッカーゼはカビやキノコ類などの真菌からも見出されている。これら微生物由来の酵素は、植物酵素とは対照的に、酸化還元メディエーターの存在下でリグニンをはじめとするポリフェノール類を分解することができる。

このようにラッカーゼは広い基質特異性と反応特性をもつことから、ポリマー合成・パルプ漂白・人工色素の脱色・食品・バイオセンサーなどさまざまなバイオテクノロジー分野での応用が期待されており、一部で利用されはじめている。しかし、現在利用されている酵素は、カビやキノコ類の産するものが中心であり、安定性の欠如や純度(混入酵素)が問題となっていた。一方、近年の急速な微生物ゲノム情報の蓄積により、これまでラッカーゼのソースとしては考えられていなかった真性細菌

にも、ラッカーゼ様蛋白質が存在することが示唆された。

そこで、我々は、まだ研究の蓄積が乏しい真性細菌性ラッカーゼで新たな可能性を模索し、従来の問題を克服できないかと考えた。とくに、過酷な条件での利用や保存安定性を考慮し、耐熱酵素の取得を目指した。しかし一方では、耐熱酵素の宝庫とも言える超好熱菌の大半は嫌気性菌であり、ラッカーゼのように酸素を基質とする酵素を持ち合わせていないとも考えられた。そこで、好気的な好熱菌でゲノム情報が明らかなものについてラッカーゼ様蛋白質の遺伝子検索を行った。その結果、大半の好熱菌には存在しなかったが、3種の菌で推定ラッカーゼ配列が見つかった。

そこで、そのうちのひとつの好熱菌を実際に培養し、ラッカーゼ活性を確認することにした。その際、ラッカーゼの活性には銅イオン(Cu<sup>2+</sup>)が必要であり、遺伝子発現の誘導にもCu<sup>2+</sup>が関わるということが知られていたため、培地に硫酸銅を添加した。その結果、Cu<sup>2+</sup>の濃度上昇(0-1 mM)とともに酵素活性

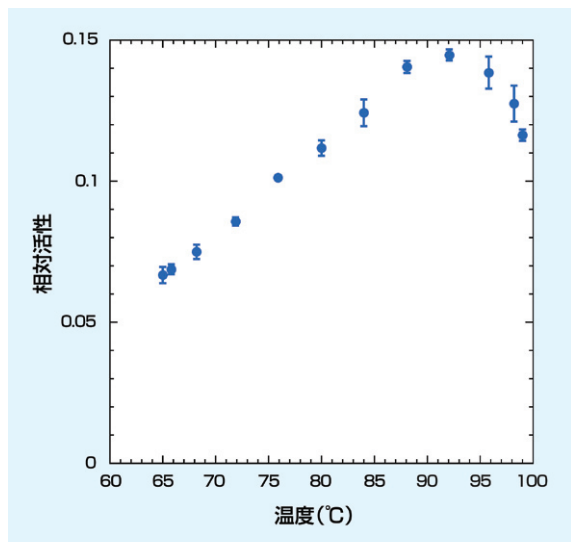


図1 反応の至適温度  
90°C付近で最も効率的に反応する。

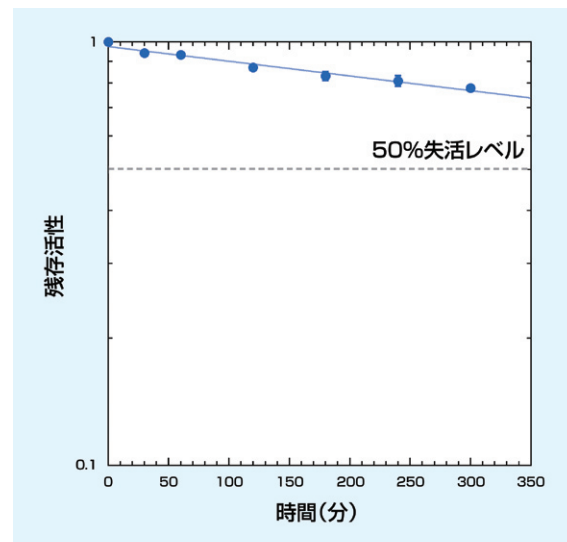


図2 酵素の耐熱性  
酵素を80°Cに加温し、高温変性に伴う酵素活性の減少を経時的にモニターした。

が増大し、SDS-PAGE（変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動）上で分子量約53 kDaの蛋白質の発現量が特異的に増大していた。そこで53 kDa蛋白質がラッカーゼであると推定し、カラムクロマトグラフィーにより精製した。さらにSDS-PAGEにより分離された53 kDa蛋白質を含むゲル断片をトリプシン分解した。マスフィットフィンガープリンティングと呼ばれる手法により好熱菌の既知のゲノム配列と比較したところ、配列の一致するオープンリーディングフレーム\*が検出され、同時にN末端にシグナル配列をもつ分泌酵素であることも判明した。

次に、成熟酵素に相当する遺伝子領域をPCRで増幅し、プラスミドベクターに挿入して、大腸菌内で酵素を発現させた。既述のとおりラッカーゼは銅を要求する金属蛋白質であるが、宿主の大腸菌に存在するラッカーゼ様蛋白質が培地中の銅に応答して発現するため、組換え酵素はアポ体（補因子の欠けた酵素）として発現させた。通常、補因子を取り除いた場合、蛋白質が構造をとれなかったり、とったとしても安定性に

欠けたりすることが多い。しかし、この酵素は好熱菌由来であるためか、菌体抽出物を加熱処理することでほぼ均一なアポ酵素を取得することができた。次いで硫酸銅を含む緩衝液に対してアポ酵素を透析し、銅イオンを酵素に取り込ませた。銅イオンの取り込みは透析チューブ内の溶液が徐々に青変することで簡単にモニターできた。その後、定法に従ってカラムクロマトにより微量の混在蛋白質を除去した。

さらに、この酵素の詳細な性状解析を行った。酵素はラッカーゼに特有の青色を呈しており、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)、シリungalダジン、グアイアコール、2,6-ジメトキシフェノールなどの

典型的なラッカーゼ基質に対して酸性pH領域で強く作用した。また、反応は90°C程度の高温で最も効率的に進行した（図1）。さらに、酵素を高温下にさらし活性の減少から耐熱性を見積もったところ、80°Cでの熱失活の半減期は半日以上（14時間程度）であった（図2）。これらの結果、この酵素は従来にない非常に高い耐熱性と至適温度をもつラッカーゼであることが判明した。

このようにして、高純度な耐熱性ラッカーゼを簡便に量産化することが可能になった。今後は、ポリマー合成やリグニン分解能などについて検討し、必要であれば進化分子工学的な改良も加えて、実際のバイオプロセスに活かしていきたい。

#### 用語解説\*

◆ オープンリーディングフレーム：  
開始コドンから終止コドンまでの遺伝子の読み枠

#### 関連情報：

● 宮崎健太郎「耐熱性ラッカーゼおよびその製造法」（特願 2004-352349）。