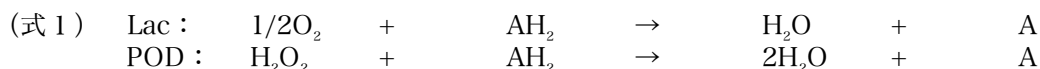


3 微生物の代謝・生理学

3.1. Laccase の生産と精製

Laccase (Lac) および Peroxidase (POD) は、それぞれ酸素もしくは過酸化水素を酸化剤として種々の水素供与体 (AH₂) の酸化反応 (式 1) を触媒する酵素であり、動物、植物、微生物界に広く分布し、それぞれ性質が異なっている。微生物においては糸状菌、担子菌において効率良く生産され、Lac は *Coriolus versicolor*、*Pleurotus ostreatus* により、POD は *Arthromyces ramosus*、*Coprinus cinereus* により培養液中に著量に分泌生産されることが知られている。



Lac、POD はともに木材の主要構成成分であるリグニンの合成・分解に関与しており、木材がキノコ類により腐敗分解するプロセスにおいて重要な働きを担っている。Lac としてはウルシ由来のものが有名であり、漆器の塗装剤である漆の合成に関与している。POD は生体にとって有害な過酸化物の分解除去に機能しているとも言われている。

Lac、POD はともに実用的にも価値ある酵素である。Lac はジーンズなどの染料であるインディゴを効率よく分解することから自然な着古し感を出す酵素漂白に用いられている。POD は、高感度色原体を水素供与体として用いることにより臨床分析に広く利用されている。また近年、溶液中に遊離した色素を脱色する作用を利用して、洗濯時の色移り防止を目的とした洗剤用酵素として期待されている。さらに Lac、POD は、工場廃液に含まれるフェノール、塩素化芳香族化合物、発癌性芳香族アミンなどの除去、種々の複合建材の生産におけるリグニンの重合、フェノール樹脂の合成、パルプ廃液の脱色など、様々な用途への応用が期待されている。微生物酵素は、菌体内酵素と菌体外酵素に大別できるが、本実験では、担子菌 *Coriolus versicolor* の菌体外 Lac を取り上げる。

3.1.1. *Coriolus versicolor* による Laccase の生産 (4 人 1 組)

C. versicolor を用い Laccase (Lac) の分泌生産を試み、培養にともなう Lac の生産量を Lac 活性を測定することによりモニターする。本 Lac は分子量約 63,000 の単量体の糖タンパク質であり、酵素 1 分子あたり 4 原子の銅を有する。

【実験方法】

1. 前培養培地* (オートクレーブ済、5 ml/16×165 mm 試験管、シリコ栓) を調製する。
2. *C. versicolor* IFO 30388 を前培養培地に植菌する。
3. 28°C で 4 日間振とう培養する。
4. 本培養培地* (オートクレーブ済、50 ml/500 ml 容坂口フラスコ、シリコ栓) に前培養液を移植する。
5. 28°C で 3 日間振とう培養する。また、培養期間中、オートクレーブ済の 5 ml メスピペットで培養 1,2 日目の培養液 3 ml を採取し、4°C にて保存する。
6. 培養液 (約 4 ml) を円形濾紙とブフナーロートを用いて吸引しながら濾過し、培養液上清を得る。
7. 培養液上清を 3 ml 取り培養 3 日目のサンプルとし、培養 1,2 日目のサンプルとともにタンパク質濃度と活性の測定を行い (3.1.3. Laccase の活性測定参照) Lac 生産の経時変化を解析する。残りは、Lac の精製に用いる。

* 1% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, pH 6.0 (前培養・本培養培地いずれもシリコ栓で)

【実験結果】

培養 1,2,3 日目のサンプルについて 3.1.3. の方法に従い測定した活性値 (unit/ml) とタンパク質濃度 (mg/ml) を培養日数に対してプロットし、Lac の分泌生産の経時変化を解析する。

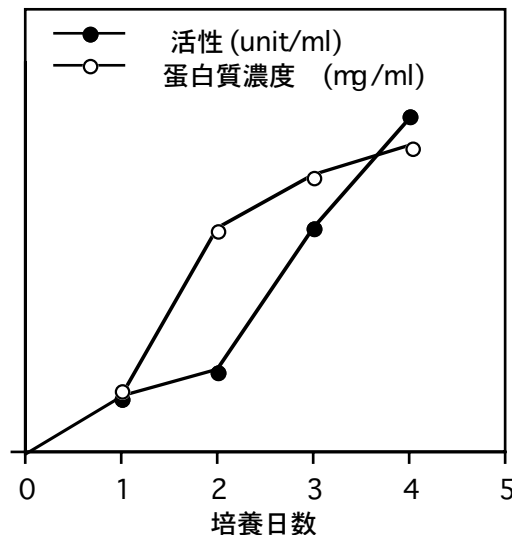


図2.3 Lac生産の経時変化(一例)

3.1.2. Laccaseの精製(2人1組)

精製に際しては、イオン交換クロマトグラフィーを行う。蛋白質はそれぞれ固有の等電点を持ち、等電点より高いpHでは負に、低いpHでは正に帯電している。帯電している蛋白質はイオン交換樹脂に吸着され、吸着の強度により溶出される条件が異なる。溶出は通常、塩濃度勾配下で行い、吸着分子は最も吸着の弱い分子から吸着の強さの順に溶出されることにより分離精製される。本実験は、2人1組で実験を行う。

3.1.2 (1) 透析

イオン交換樹脂への良好な吸着を得るために、サンプルをあらかじめ低イオン強度に調整しておく必要がある。このために、透析を行う。

【実験方法】

1. 培養液上清 20 ml を透析チューブに入れる
(空気を残して両端を糸でしっかり閉じる。
透析は、低分子塩類を除き、イオン強度を下げるために行う。高分子のタンパク質はチューブ内に残る)。
2. 1ℓの0.01 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)中に浸けて一晩4°Cで安置し、透析処理液を得る。
3. 不溶性沈殿物が生じている場合は10,000 rpm、20分間遠心分離し、上清を粗酵素溶液として回収する。生じていない場合は、そのまま次の操作に供する。
4. 粗酵素溶液の体積を測定した後、3 ml サンプルリングし4°Cにて保存する。残りは、次のイオン交換クロマトグラフィーにかける。

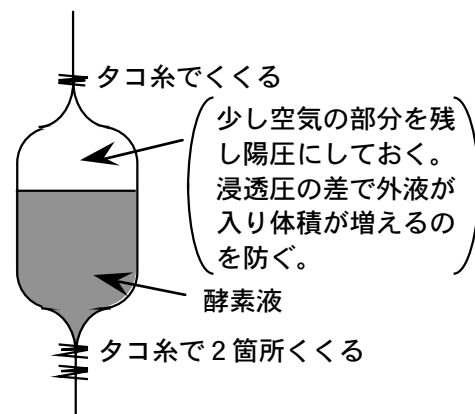


図2.4 透析の方法

3.1.2 (2) イオン交換クロマトグラフィーによる酵素の精製

吸着剤としてDEAE (diethylaminoethyl)-Sephacel というアニオン交換樹脂を用いる。これは、中性領域では全体的に正にチャージしている。精製するLacは負に荷電しているため、アニオン交換樹脂に吸着される。吸着されたLacは塩類を含んだ高イオン強度溶液により溶出される。

【実験方法】

1. クロマトグラフィー用カラム(φ1.5×20~30 cm)に水を少量入れ、予め水に浸した脱脂綿をカラムの底に詰める。(あまりきつく詰めないこと、脱脂綿を詰めた後にコックの流路がつかっていないか確認しておくこと。空気が脱脂綿内にあると溶出が遅くなる。)
2. DEAE-Sephacelを一様に懸濁したものを15 ml 充填する。

3. 0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) でカラム中の樹脂を洗浄する (20 ml、カラム容量の約3～4倍量で洗浄する)。
4. 緩衝液の液面が樹脂の上端ぎりぎりにまで達した時点でコックを閉じる (カラムを枯らさないようにすること)。
5. 粗酵素溶液を (ガラスピペットなどで) 静かに流し込む。
6. コックを開き、溶出を開始し、酵素タンパク質を樹脂に吸着させ、溶出液を三角フラスコに回収する (溶出速度のおおよその目安は、1～5秒間に1滴落下するくらい)。
7. 粗酵素液の液面が樹脂の上端ぎりぎりにまで達した所でコックを閉じる。次に 0.01 Mリン酸緩衝液 (20 ml、カラム容量の約3～4倍量) で非吸着タンパク質を洗い出す。溶出液は上記6の溶出液とまとめて三角フラスコに回収し、非吸着画分とする。
8. 0.3 MのNaClを含む0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 30 mlで、樹脂に吸着したLacを溶出する。溶出される液をあらかじめ約3 mlの所に印をした試験管で3 mlずつ10本分受け取る (試験管には必ずナンバーリングしておくこと)。
9. 溶出液フラクション10本を4°Cで保存する。

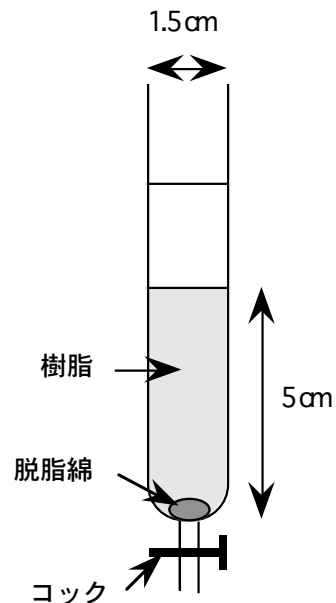


図25 イオン交換クロマトグラフィーカラム

【実験結果】

溶出液フラクション10本について3.1.3.の方法に基づいて測定した活性値 (unit/ml) とタンパク質濃度の尺度である280 nmの吸光度をフラクションNo.に対してプロットし、イオン交換クロマトグラフィーにおけるLacの溶出挙動を解析する。

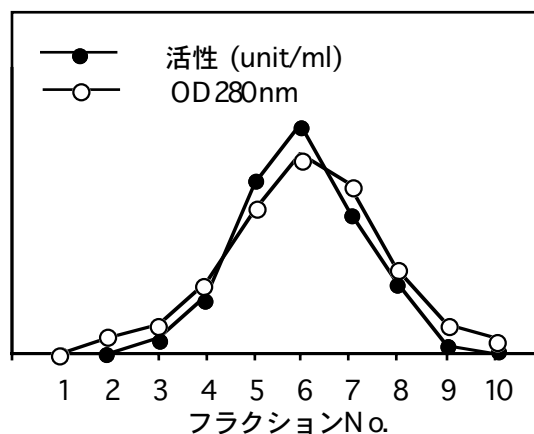


図26 イオン交換クロマトグラフィーの結果 (一例)

粗酵素液、溶出液フラクションで最も活性が高かったフラクションについて3.1.3.の方法に基づいて測定した活性値 (unit/ml)、タンパク質濃度 (mg/ml) とサンプルの体積から総タンパク質量、総活性、比活性などを算出し、下に示す精製表を作成し、精製の効率を評価する。

表4 酵素精製表の例

Step	体積 (ml)	総タンパク質 (mg)	総活性 (unit)	比活性 (unit/mg)	精製率 (fold)	収率 (%)
1. 粗酵素液	-	-	-	-	1	100
2. DEAE-Sepharcel	-	-	-	-	-	-

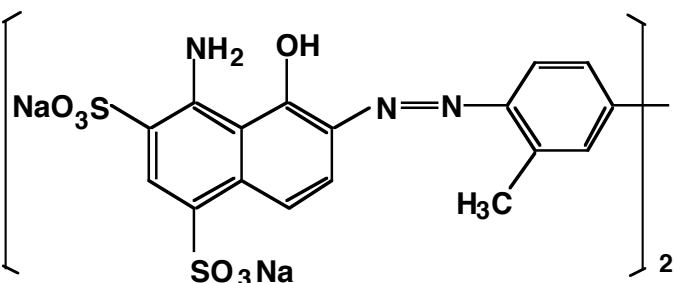
3.1.3. Laccase の活性測定

各段階のサンプルおよび精製した Lac について、酵素活性、タンパク質濃度を測定し、比活性、総活性を算出する。これらの数値を基に Lac 生産のタイムコース、精製の効率を評価する。

3.1.3(1) 活性測定

Lac はジーンズなどに用いられる染料色素を脱色する活性を有している。この性質を利用して、ジーンズのストーンウォッシュならぬ、エンザイムウォッシュ（酵素脱色）技術が実用化されている。今回の活性測定では、青色色素 Direct Blue 53 に対する脱色活性を評価する。

(Direct Blue 53 の構造)



【実験方法】

1. 表5に示す酵素反応液に 1.2 ml の酵素液*を加え、反応を開始する。
2. 室温で 2～60 分間反応させ、目視で脱色が確認できた時点で吸光度測定を行う。この際、反応は停止させず、反応開始時点から吸光度測定までに要した時間を反応時間とする（60 分以上反応させても脱色が確認できない場合は、一晩放置し翌日吸光度の測定を行う）。
3. 600 nm での吸光度を測定し酵素活性を算出する**。

表5 酵素反応液の組成

0.05 M マロン酸緩衝液 (pH 4.5)	1.5 ml
0.25 mM Direct Blue 53 水溶液	0.3 ml

- * 次の酵素液について処理する。
- ・ブランクとして酵素溶液の代わりに H₂O
 - ・培養 1,2,3 日目の培養液上清
 - ・粗酵素溶液、非吸着画分、溶出液フラクション 10 本

** 上記の反応条件で、1 分間に 600 nm の吸光度を 1 減少させる酵素活性を 1 unit とする。

酵素活性の計算方法

$$\text{Activity (unit/ml)} = (\text{OD ブランク} - \text{OD サンプル}) \times (1/\text{反応時間(min)}) \times (1/\text{酵素量(ml)}) \times \text{希釈率}$$

3.1.3 (2) タンパク質濃度の測定

(a) 280 nm の吸収による測定

タンパク質は 280 nm 付近に紫外部の吸収極大を示す。これは主としてチロシンとトリプトファンによる吸収である。この性質を利用して、280 nm での紫外吸光を測定し、タンパク質濃度の尺度とする。

溶出液フラクション 10 本についてそれぞれ 300 μ l を 3 ml へと 10 倍希釈したものについて、280 nm での紫外吸光を測定する。

(b) 色素結合法による測定

繊維用の triphenylmethane 色素である Coomassie Brilliant Blue G-250 が酸性 pH 条件下で、タンパク質と結合すると、色調が赤紫色から青色に変化することを利用して、タンパク質濃度を測定する。

【実験方法】

1. 酵素液* 0.05 ml に Bio-Rad protein assay の 5 倍希釈を 2.5 ml 加える（泡立てると正確な値が出ないので、泡立てないこと）。
2. 5~60 分以内に 595 nm での吸光度を測定する**。

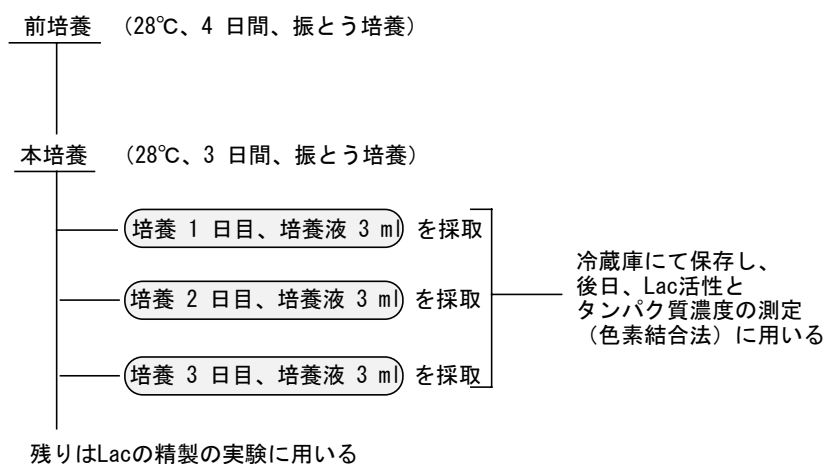
* 次の酵素液について処理する（希釈せず、そのまま処理する）

- ・培養 1, 2, 3 日目の培養液上清
- ・粗酵素溶液
- ・溶出液フラクションで最も活性が高かったフラクション

** 標準卵白アルブミン溶液を準備し、検量線を測定する。標準液の濃度は、0, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml のものを作成する。

Laccaseの生産と精製実験のフローチャート

Lacの生産実験（4人1組）



Lacの精製実験（2人1組）

