

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K00995

研究課題名(和文) 日本産漆由来の新規黄色ラッカーゼの機能と構造の解明

研究課題名(英文) Functional and structural characterization of novel yellow laccase from Japanese lacquer tree, *Toxicodendron vernicifluum*

研究代表者

高野 麻理子 (Takano, Mariko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：10353749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：ウルシ樹液の非青色成分からSP-Sepharoseカラムクロマトグラフィと等電点電気泳動により黄色ラッカーゼを精製した。シリンガルダジン、2,6-ジメトキシフェノール、グアヤコール、3-メチルカテコール、4-メチルカテコールを基質とした結果、ラッカーゼ活性の最適pHは青色ラッカーゼpH8.0、黄色ラッカーゼpH6.0-7.5であった。黄色ラッカーゼはSDS-PAGEで約110 kDaに単一バンドとして検出され、ICP-MS分析よりタンパク質一分子当たり銅を1原子含むことが判明した。これらよりウルシの非青色ラッカーゼは、青色ラッカーゼとは異なる性質を持つ黄色ラッカーゼであることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漆は、ウルシ樹木の樹液であり、重要文化財や伝統工芸品等に使用されてきた日本最古の塗料である。漆は主成分であるウルシオールがラッカーゼによって酸化重合することで、硬化乾燥して塗膜を作り塗料として機能する。ウルシの青色ラッカーゼは最初に発見されたマルチ銅オキシダーゼであり、モデル酵素として詳細に研究されてきた。一方、漆樹液中の非青色成分は、青色ラッカーゼの精製過程で除去されるため分析されなかった。本研究では漆樹液の非青色成分中に新たに検出したラッカーゼ活性を分析し、黄色ラッカーゼであることを明らかにした。また、漆塗膜生成因子としての黄色ラッカーゼの重要性を示した。

研究成果の概要(英文)：Yellow laccase was separated and purified from non-blue components of urushi sap by column chromatography (SP-Sepharose) and isoelectric electrophoresis. Laccase activity was measured in the pH range of 2.5-8.0 using syringaldazine, 2,6-dimethoxyphenol, guaiacol, 3-methylcatechol, and 4-methylcatechol as substrates, and the optimal pH range of yellow laccase was 6.0-7.5 compared to the optimal pH of blue laccase of 8.0. The yellow laccase was detected as a single band with 110 kDa by SDS-PAGE analysis. ICP-MS analysis revealed that the enzyme contained one atom of copper per protein molecule. These results indicate that the non-blue laccase of urushi is a yellow laccase with different properties from the blue laccase.

研究分野：リグニン生分解

キーワード：ラッカーゼ ウルシ

## 1. 研究開始当初の背景

ラッカーゼはフェノールオキシダーゼの一種であり、ウルシなどの植物や白色腐朽菌などの菌類、細菌類などに広く分布することが知られている。ウルシラッカーゼは、青色を呈する酸化還元酵素として、最初に発見されたマルチ銅オキシダーゼであり、モデル酵素として、単離酵素の触媒機構、機能、性質、構造等について詳細に研究されてきた。近年では、ウルシラッカーゼの糖鎖構造や遺伝子構造の詳細な分析が報告されている。菌類では、多種多様なラッカーゼの存在が知られており、近年では、イエローラッカーゼやホワイトラッカーゼといった非青色ラッカーゼの存在が報告されている。一方、ウルシラッカーゼの研究では、青色ラッカーゼの分析が目的であったため、本課題の新規酵素を含む非青色成分は精製過程の始めに除去され、分析対象とされなかった。本課題の予備試験では、非青色成分に青色成分と同等以上のラッカーゼ活性が検出されており、漆塗膜の生成には、従来の青色ラッカーゼとともに、非青色ラッカーゼが重要な機能を果たしていると考えられる。ラッカーゼはウルシオールとの重合を触媒するため、漆塗膜の生成に直接関与しているが、その機能やメカニズムの詳細は未だに不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

漆ラッカーゼは、漆樹液中に発見された青色酵素であり、始めて発見されたマルチ銅オキシダーゼとして詳細に研究された。しかし、非青色成分は青色酵素の精製過程で除去されるため分析されていなかった。本研究では非青色成分中に検出した新たな非青色ラッカーゼの機能と構造を分析し、漆塗膜生成に果たす役割を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 黄色ラッカーゼの精製

漆樹液 10ml を、50ml 遠心管に採取し、冷却したアセトンを 30ml 加え、良く混合した後、-20℃ で 3 日間静置した。冷却遠心機で遠心沈降し (13000rpm × 10 分)、上清が無色になるまで沈殿をアセトンで洗浄した。沈殿を回収し、60℃ で 3 日間乾燥してアセトンパウダーを得た。これに蒸留水を 15ml 加え、シェーカーで一晩抽出した。遠心沈降して不溶物を除き、溶液に 500g/L の硫酸アンモニウムを加えて、攪拌し溶解した。これを再度、遠心沈降して青色の上清を回収し、100%飽和量 (767g/L) となるまで硫酸アンモニウムを追加した。遠心沈降して、上清を取り除き、青色沈殿を回収した。青い沈殿に蒸留水 5ml を加えて溶解し、PD-10 で脱塩後、VIVA SPIN で濃縮した。SP-Sepharose をカラム (1cm × 10cm) に充填しリン酸緩衝液 (pH6.0, 10mM) を用いて平衡化した。ラッカーゼ粗酵素をカラムに添加した後、30ml の同リン酸緩衝液を添加し、溶出液を採取した (黄色ラッカーゼ)。次にリン酸緩衝液 (pH6.0, 300mM) を 20ml 添加し、溶出液を採取した (青色ラッカーゼ)。黄色ラッカーゼはさらに等電点電気泳動により分離精製した。

## (2) 酵素活性測定法

ラッカーゼ活性は、基質に応じて下記の反応溶液を調製し、25℃で1分間に基質の酸化によって生じる吸光度の変化を測定した。グアヤコール(GU)は100mM溶液、シリングアルダジン(SA)は1mM溶液を調製した。3-メチルカテコール(3MC)、4-メチルカテコール(4MC)、2,6-ジメトキシフェノール(2,6-DMP)は、各10mM水溶液を調製した。ABTSは40mg/L水溶液を調製した。緩衝液はMcIlvaine緩衝液(pH2.5-8.0)を使用した。酵素活性測定試料は緩衝液365μl、基質溶液25μl、酵素試料10μlを含んでいた。吸光度はABTS 414nm、SA 525 nm、GU 460nm、2,6-DMP 477nm、3MC 430nm、4MC 400nmの各波長で測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 黄色ラッカーゼの酵素活性の分析

黄色Lacのラッカーゼ活性の特徴を青色Lacと比較するため、図.1に示したように、各基質のラッカーゼ活性をpH2.5-8.0の範囲で測定した。基質に3MCを用いた場合、黄色Lac活性はpH6.5で、青色LacはpH8.0で、最大値を示した。pH7.0以下では黄色Lacが青色Lacより高い活性を示し、pH7.5-8.0では青色Lacが黄色Lacより高い活性を示した。SAの場合は、黄色LacはpH6.5、青色LacはpH8.0で最大値を示した。pH5.0-7.5の領域で、黄色Lacは青色Lacより高い活性を示した。2,6-DMPの場合は、黄色LacはpH6.5-7.5、青色LacはpH8.0で最大値を示した。黄色Lacは青色LacよりpH4.0-8.0の領域で高い活性を示した。4MCの場合は黄色LacはpH6.0、青色LacはpH8.0で最大値を示した。黄色LacはpH5.5-7.0で青色Lacより高い活性を示し、青色LacはpH7.5-8.0で黄色Lacより高い活性を示した。ABTSの場合は黄色LacはpH3.5、青色LacはpH3.0で最大値を示した。pH2.5-3.0で青色Lacは黄色Lacより高い活性を示した。GUの場合は、黄色LacはpH7.0、青色LacはpH8.0で最大値を示した。pH5.0-8.0の領域で黄色Lacは青色Lacより高い活性を示した。以上の結果より、ウルシの黄色ラッカーゼの酵素活性は青色ラッカーゼとは異なる性質を示すことが明らかになった。

### (2) 黄色ラッカーゼの化学構造解析

精製した黄色ラッカーゼをSDS-PAGEにより分析した結果、分子量11万kDaに単一バンドが検出された(図.2)。従って、黄色ラッカーゼは分子量11万kDaの単一ユニットからなる酵素タンパク質であることが明らかになった。さらに同試料をICP-MS分析した結果、本酵素はタンパク質一分子当たり、銅を1原子含むことが判明した。これらの結果より、ウルシの黄色ラッカーゼは化学構造も青色ラッカーゼとは異なることが明らかになった。

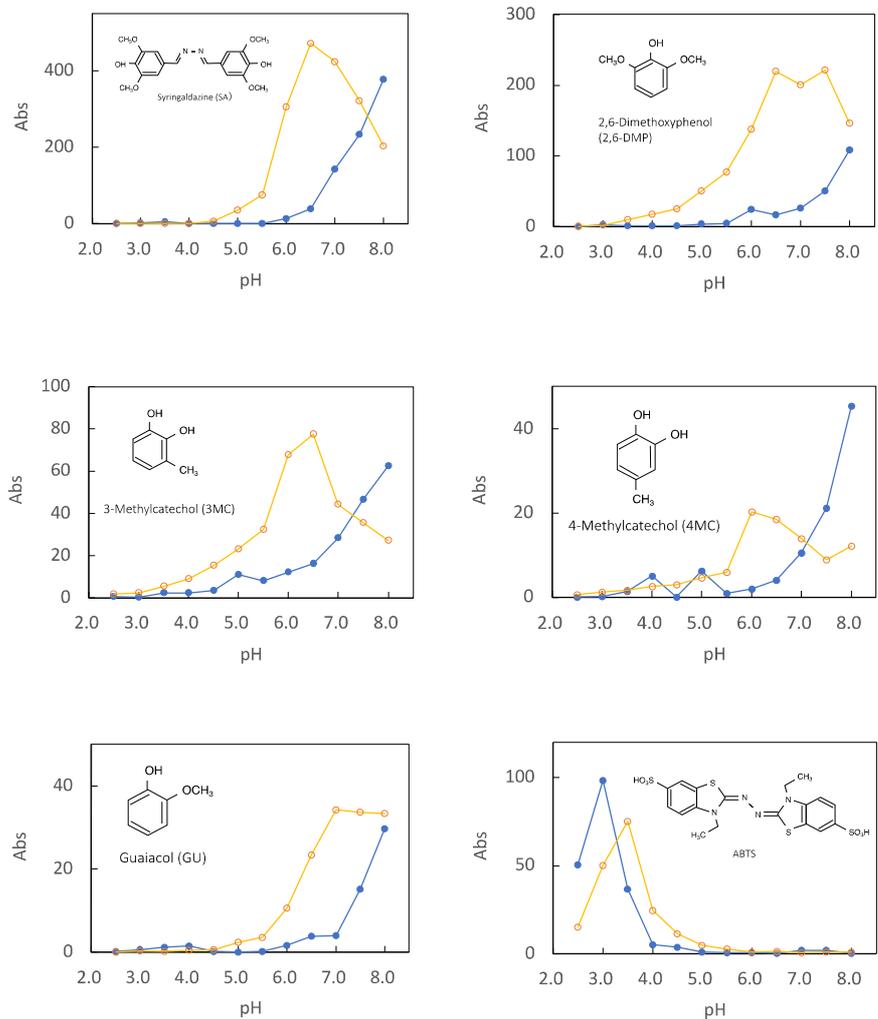


図.1 ウルシの黄色ラッカーゼと青色ラッカーゼの pH による酵素活性の比較

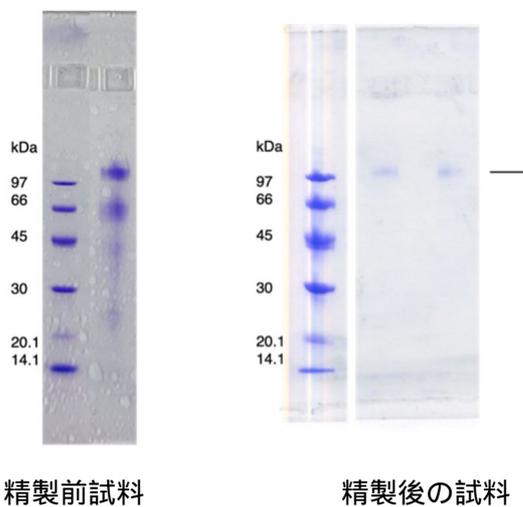


図. 2 ウルシの黄色ラッカーゼの精製前後の SDS-PAGE の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野麻理子
2. 発表標題 ウルシ樹液の非青色成分中のラッカーゼ活性について
3. 学会等名 第67回リグニン討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------