

805 *Cryptococcus* sp. S-2 由来リパーゼ（クチナーゼ）によるポリ乳酸の分解

○正木和夫¹, N.R. Kamini², 池田博子², 庄林 愛², 家藤治幸² (¹日本学術振興会・科学技術特別研究員, ²酒総研)

【目的】近年の環境問題（化石資源依存社会からの脱却、循環型社会形成）に対する関心の高きから、次世代プラスチックとして、生分解性プラスチックが注目されている。その中でも、植物資源由来の原料を利用した生分解性プラスチックであるポリ乳酸が特に注目されている。近年、大手企業がその大規模プラントの設立及び設立計画を発表しており、ポリ乳酸に関しては、その普及に対する最大の問題点であった価格面での競争力もクリアされるようになってきている。しかしながら、他の生分解性プラスチックと比べポリ乳酸の酵素による分解性は格段に低く、高分子ポリ乳酸に対してはセリンプロテアーゼである *Tritirachium album* 由来 Protease K による分解が報告されているのみである。そこで、我々は、本研究室で単離された *Cryptococcus* sp. S-2 由来リパーゼを用いて、そのポリ乳酸分解能を検証した。

【方法及び結果】本酵素は Protease K と比較し 500 倍以上の効率でポリ乳酸を分解することが確認できた。さらに、本酵素の cDNA を取得し、その推定アミノ酸配列解析より、本酵素はクチナーゼとの相同性があることが確認された。

また、ポリブチレンサクシネート (PBS) や、ポリεカプロラクトン (PCL) についても、本酵素を用いた分解実験を行ったところ、PLA に対して示した以上の高い効率で分解することが確認できた。したがって、本酵素は、非常に広い基質特異性を持ち、なおかつ高い分解活性を持つ生分解性プラスチック（ポリエステル）分解酵素であるといえる。

Enzymatic degradation of poly lactic acid

○ Kazuo Masaki¹, Kamini N.R.², Ikeda Hiroko², Shobayashi Megumi², Iefuji Haruyuki² (¹Japan Society for the Promotion Sci., ²Nat. Res. Inst. Brewing)

Key words poly lactic acid, *Cryptococcus* sp. S-2, lipase, cloning, cutinase, enzymatic degradation

807 土壌分離菌産ラッカーゼを用いた内分泌攪乱物質の酵素分解

○斎藤隆雄, 加藤且也, 横川善之 (産総研)

【目的】プラスチック樹脂や界面活性剤原材料などの一般産業化学物質に内分泌攪乱作用の可能性が指摘されている。本研究ではこれら内分泌攪乱物質の生分解を目指して、分解活性を有する酵素（ラッカーゼ：EC 1.10.3.2）を生産するカビの探索とその酵素の性質を調べた。

【方法及び結果】カフェ酸を基質とした発色プレートを用いて土壌から分離したラッカーゼ生産菌 I-4 株は Chaetromiaceae (科) に系統上含まれるアナモルフ菌類と推定された。カフェ酸を誘導剤として添加したポテトデキストロス培養液中には、内分泌攪乱物質である Bisphenol A(BPA) や Nonylphenol(NP) に対して分解活性を有するラッカーゼが分泌生産されていた。培養液から硫酸沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィにより SDS-PAGE 上でほぼ単一バンドまで精製した。本ラッカーゼは至適 pH は 7.0、至適温度は 42°C、分子量は約 70 kDa-80kDa、等電点は 3.5 を示した。紫外可視分光スペクトルと電子スピン共鳴スペクトルより、他の菌類由来ラッカーゼと同様に 1 分子中に Cu(II) を 4 分子含む銅酵素であった。本ラッカーゼは BPA(Km=10.4 mM)、NP(Km=5.1 mM) 以外にも内分泌攪乱物質である 4-Octylphenol(Km=20 mM)、2,4-Dichlorophenol などのフェノール性化合物を分解した。さらに本ラッカーゼと 17β-estradiol をメチエータ (HOBt) 存在下で 40°C、24 時間反応したところ、TLC でほぼ完全分解されることも示された。各種内分泌攪乱物質のラッカーゼによる酸化反応産物のエストロゲン活性はレポータ遺伝子を組み込んだヒト乳ガン細胞を用いて評価した。

本研究の一部は、文部科学省の平成 14 年度科学技術振興調整費による地域先導研究「カビの酵素高生産能を活用した環境調和型工業プロセス技術の基盤研究」の一環として行ったものである。

Biodegradation of endocrine disrupters by laccase derived from a fungus isolated from soil

○ Takao Saito, Katsuya Kato, Yoshiyuki Yokogawa (Nat. Inst. Adv. Ind. Sci. Technol.)

Key words ラッカーゼ, 内分泌攪乱物質, 酵素分解

806 ラッカーゼを用いたクロロフェノール類の分解とその分解経路の解明

○神藤高光¹, 和田直之¹, 鈴木弘之¹, 星野一宏², 田中孝明¹, 谷口正之¹ (¹新潟大・工, ²富山大・工)

【目的】担子菌が生産するリグニン分解酵素群は、リグニンだけでなく芳香環を有する多くの環境汚染物質を分解できる。我々は、これまでにリグニン分解酵素の中で、特にラッカーゼがクロロフェノール (CP) 類を分解することを報告してきた。本研究では、ラッカーゼによる脱塩素の反応機構を解明するために、担子菌由来のラッカーゼを用いたペンタクロロフェノール (PCP) とテトラクロロヒドロキノン (TeCHQ) の分解およびそれらの分解産物について検討した。

【方法及び結果】*Trametes* sp. 由来のラッカーゼダイワ (大和化成株式会社) を酵素としておもに用いた。反応液中の分解産物は、固相抽出法を用いて濃縮分画した後、それぞれ HPLC を用いて定量した。その結果、PCP は TeCHQ を経た後、2,3,5,6-tetrachlorophenol に変換され、その後 2,3,5-triCP, 3,5-diCP, m-CP, phenol に順次変換されることが推定された。この脱塩素反応において、分解産物濃度から計算した遊離塩素イオン濃度の経時変化は、チオシアン酸水銀を用いた比色定量法により求めた結果と一致した。

Degradation of chlorophenols with laccase and clarification of their degrading pathways

○ Takamitsu Kando¹, Naoyuki Wada¹, Hiroyuki Suzuki¹, Kazuhiro Hoshino², Takaaki Tanaka¹, Masayuki Taniguchi¹ (¹Dept. Mat. Sci. Technol., Niigata Univ., ²Dept. Mat. Syst. Eng. Life Sci., Toyama Univ.)

Key words pentachlorophenol, chlorophenols, laccase, enzymatic degradation

808 固定化コレステロールエステラーゼによるフタル酸エステル類の加水分解反応

○加藤且也, 斎藤隆雄, Irimescu Roxana, 横川善之 (産総研・セラミックス研)

【目的】プラスチック可塑剤・樹脂・非イオン性界面活性剤原材料などの一般産業化学物質が、強い内分泌攪乱活性を有することが明らかとなってきた。これらの化合物は環境中に低濃度及び広範囲に存在しており、その効率的分解処理技術の確立が求められている。本研究では、内分泌攪乱性を有していると考えられているフタル酸エステル類の酵素分解法の確立を目指し、加水分解酵素の探索及び固定化による反応プロセスの検討を行った。

【方法及び結果】p-ニトロフェニルエチルヘキシルフタレート (pNPEHP) を酵素基質として、入手可能な酵素を用いて加水分解活性を調べた。その結果、Porcine Pancreas リパーゼ (PPL, SIGMA 製) が高い加水分解活性を示した。さらに PPL に含まれていると考えられるコレステロールエステラーゼ (CE) が、最も高い分解活性を有することが明らかとなった。CE の固定化には表面処理セラミックス担体 (東洋電化製) を用いた。様々な表面処理剤の検討を行ったところ、ビニルトリエトキシシラン修飾セラミックス担体に固定化された CE が、高い反応効率を示した。以上最適化された固定化 CE を用いて各種フタル酸エステルの加水分解を行った。

Enzymatic hydrolysis of various phthalates with immobilized cholesterol esterase

○ Katsuya Kato, Takao Saito, Roxana Irimescu, Yoshiyuki Yokogawa (Nat. Inst. Adv. Ind. Sci. Technol.)

Key words コレステロールエステラーゼ, 固定化酵素, 加水分解, 内分泌攪乱物質, セラミックス, プラスティック