

## 酵素を利用した内分泌攪乱物質の分解

斎藤隆雄、Peng Hong、阿知波初美、加藤且也、横川善之  
産業技術総合研究所 セラミックス研究部門

【目的】プラスチック可塑剤、プラスチック樹脂や非イオン系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。これら化学物質は環境中で低濃度・広範囲に存在するため、効率的分解技術の確立が強く望まれている。本研究では、内分泌攪乱性が疑われるフタル酸エステル、ビスフェノール A(BPA)やノニルフェノール(NP)の生物的分解を目指して、これら化学物質に対して分解活性を有する酵素を生産するカビの探索と酵素的性質を調べた。

【方法及び結果】リパーゼ、ラッカーゼ検出用発色プレートを用いて土壌からカビを分離した。それらのカビの中から、フタル酸エステル(フタル酸ジエチル;DEP)、BPA や NP に対して分解活性を有するリパーゼ、ラッカーゼを分泌生産するカビを取得した。ラッカーゼ生産株 B<sub>2</sub> をカフェイン酸(1mM)と硫酸銅(30 μ M)を添加した Peptone Yeast Glucose Medium(PYGM)を用いて 30°C で 7 日間振とう培養した。培養液から硫酸沈殿(60-80%)、ゲル濾過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーによって、ラッカーゼを SDS-PAGE 上で単一まで精製し、syringaldazine を基質として酵素的性質を調べた。反応至適 pH=6.5、反応至適温度=34°C、1 時間加熱後の残存活性は 50°C で 93%、60°C で 3.3% となった。また 4°C と 30°C での 1 週間後の残存活性はそれぞれ 91%、75% となった。酵素反応は L-cysteine(0.1mM)、p-coumaric acid(10mM)によって強く阻害された。またゲル濾過、SDS-PAGE による推定分子量から B<sub>2</sub> 株由来のラッカーゼは分子量 73-80kD の monomeric protein と考えられた。等電点電気泳動では 4 本のメジャーバンド(pI=5.5, 5.2, 5.0, 4.9)と数本のマイナーバンドが確認された。紫外可視分光スペクトル解析から type I 及び type III Cu(II)の存在が示唆された。

### Enzymatic degradation of endocrine disrupters by fungal lipase and laccase

Takao Saito, Peng Hong, Hatsumi Achiwa, Katsuya Kato, Yoshiyuki Yokogawa

Ceramics Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan

Lipase or laccase producing fungi were screened from soil to utilize these enzymes for degradation of endocrine disrupting compounds, such as phthalates, bisphenol A and nonylphenol. Laccase producing fungus strain B<sub>2</sub> was grown at 30°C for 7 days in Peptone Yeast Glucose Medium supplemented with caffeic acid and CuSO<sub>4</sub>. Laccase was purified from culture medium to homogeneity on SDS-PAGE gel by ammonium precipitation, gel-filtration and anion exchange column chromatography. The optimum pH and temperature were 6.5 and 34°C respectively. The residual activities of the purified laccase after 1h incubation at 50°C and 60°C were 3.3% and 93%, respectively. The oxidation reaction was strongly inhibited by L-cysteine (0.1mM) and p-coumaric acid (10mM). The purified laccase was found to be monomeric polypeptide of 73 kDa (by gel filtration) or 80 kDa (by SDS-PAGE). On isoelectric focusing gel, this laccase had 4 major bands with pI of 5.5, 5.2, 5.0 and 4.9. The presence of type I and type III copper atom were deduced from the UV/visible spectrum of the purified enzyme.