

天然型ラッカーゼメディエーターの検索と

グリーンケミストリーへの利用

課題番号：17580139

平成17年度-平成18年度科学研究費補助金

(基盤研究(C))研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 河合真吾

静岡大学農学部助教授

はしがき

白色腐朽菌から普遍的に分泌されるラッカーゼは、フェノール性基質の分解しか触媒できないが、反応系に適切な化合物が存在するとその化合物がメディエーターとなり、リグニンの約 80%を占める非フェノール性構造にも作用しうることが知られている。

ラッカーゼメディエーターの存在は 1989 年の研究代表者の提案に始まり、その後、ラッカーゼが代表的な合成型メディエーターである 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT)存在下で非フェノール性 β -O-4型リグニンモデル化合物や¹⁴C 標識した高分子リグニン (DHP) を効率的に分解することを報告してきた。

ラッカーゼ/メディエーター系は脱リグニンを必要とするパルプ漂白に有効であり、環境への影響が憂慮される塩素系漂白法の代替となりうる「環境調和型パルプ漂白」として注目されている。さらに、ラッカーゼ/メディエーター系による芳香族系内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) の毒性除去も多数報告されており、この系による効率的な「バイオレメディエーション技術」も注目されている。しかしながら、パルプ漂白やバイオレメディエーションに有効なメディエーターとしては、HBT などの合成型化合物しか報告されておらず、これらの化合物が毒性を有し、コストも高いことなどから実用へ供されるには至っていないのが現状である。

白色腐朽菌が分泌する天然型メディエーターの検索において、ラッカーゼ単独では分解できない非フェノール性リグニンモデル化合物を用い、その分解性を指標として検索する方法がオーソドックスであるが、非常に煩雑なクリーンアップ操作や分析技術を要する難点がある。そこで本研究では、メディエーター化合物の検索をクラフトパルプの漂白 (パルプ白色化) ならびに芳香族系環境汚染物質の分解を指標として行うことを最大の特色とし、これによって比較的簡便かつ迅速にメディエーターをスクリーニングす

ることを目的とした。

天然由来のラッカーゼメディエーターの発見は、グリーンケミストリーを志向した塩素に代替できるパルプ漂白技術や、環境ホルモン類除去といったバイオレメディエーション技術の確立に大いに貢献しうるものであり、各種染料の脱色技術といった工業的応用へも展開しうる可能性は高い。さらには、自然界における天然リグニンの分解にラッカーゼが関与しているのか否かという長年の疑問を解決に導く可能性を秘めており、地球上の炭素循環の解明という極めて重要な基礎研究としての面も持ち合わせていると考えている。

研究組織

研究代表者： 河合真吾 （静岡大学農学部助教授）

研究分担者： 平井浩文 （静岡大学農学部助教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,700,000円	0円	2,700,000円
平成18年度	900,000円	0円	900,000円
総計	3,600,000円	0円	3,600,000円

研究発表

(1) 学会誌等 該当なし

(2) 口頭発表 該当なし

(3) 出版物 該当なし

目次

第1章	緒言	1
第2章	実験方法	7
2.1	カワラタケラッカーゼの調製及び精製	7
2.1.1	グルコース・ペプトン・銅(GPC)培地での培養	7
2.1.2	Fåhraeus & Reinhammar 改変(MFR)培地での培養	7
2.1.3	酵素の精製	7
2.1.4	酵素活性の測定	8
2.2	バイオブリーチングを指標とするアッセイ系の検討	10
2.2.1	未晒パルプ	10
2.2.2	ラッカーゼ/メディエーター処理	10
2.2.3	白色度及び Kappa 値の測定	10
2.3	アントラセンの分解を指標とするアッセイ系の検討およびラッカーゼメディエーターの検索	12
2.3.1	アントラセン分解反応	12
2.3.2	HPLC 分析条件	12
2.3.3	各種メディエーター候補の調製	13
2.3.4	メディエーター候補溶液濃度の検討	13
2.3.5	界面活性剤の影響	13
2.3.6	各種抽出物のメディエーター効果と活性画分の有機溶媒による分画	14
第3章	結果および考察	16
3.1	カワラタケラッカーゼの調製及び精製	16
3.2	バイオブリーチングを指標とするアッセイ系の検討	18
3.3	アントラセンの分解を指標とするアッセイ系の検討およびラッカーゼメディエーターの検索	21
3.3.1	メディエーター候補溶液濃度の検討	21
3.3.2	菌体水抽出物(F)と限外ろ液濃縮物(B)のメディエーター効果	21
3.3.3	界面活性剤の影響	24
3.3.4	フラクションFおよびBの有機溶媒による分画とそのメディエーター活性	24
第4章	総括	28
第5章	参考文献	30

第1章 緒言

木材はその主要構成成分として、リグニン及び多糖類のセルロース、ヘミセルロースを有している。リグニンは、高等植物の主に二次木部細胞壁に存在している。その含有率は針葉樹材で25~35%、広葉樹材で20~25%に達し、草本植物のうち、イネ科植物では15~25%を占め、セルロースなどの植物の構成成分をつなぎ合わせる接着剤としての働きにより植物の生体構造を完全なものとし、害虫や病原体から植物を保護している。また天然高分子としてセルロースに次いで多量に存在し、芳香族を持った高分子としては地球上で最も多量に存在する有機化合物である。光合成によって年々地球上に蓄積されるリグニン量は莫大であるが、その一方でこれに匹敵する量のリグニンが微生物によって分解されていると言われている。このことから、リグニンの代謝は地球上の炭素循環において重要な役割を担っていると考えられている (樋口, 1979)。

リグニンは、フェニルプロパン単位を基本骨格とする点で共通しているが、その芳香核構造の違いから、大きく3種に分けられる。まずは、グアヤシルプロパン構造 (G)、シリギルプロパン構造 (S)、4-ヒドロキシプロパン構造 (H) である。リグニンの存在は植物の進化と密接に関係しており、針葉樹は G を有し、これより進化した広葉樹は GS、最も進化したイネ科植物は GSH から成るリグニンを有している。リグニンはフェニルプロパンを基本骨格とする *p*-ヒドロキシ桂皮アルコール類 (シナピルアルコール、コニフェニルアルコール、*p*-クマリルアルコール) が、ペルオキシダーゼ/H₂O₂ により脱水素重合され、フェノキシラジカルとその共鳴体を生じる。これらが脱水素重合することによりリグニンが生成する。その結合様式には一定の規則は無く、C β -C β 、C β -C5、C β -O-C4、C α -O-C4、C5-C5、C4-O-C5、C β -C1 など様々な炭素間結合や β -エーテル結合から成る。さらにリグニンは樹木組織中でセルロースやヘミセルロース等

と複雑なマトリックスを形成している。これらのリグニン間同士の結合は、生物学的に安定であり、微生物による分解を受けにくくしている (Alder, 1977、Crawford, 1981、Higuchi, 1990a)。

微生物によるリグニンの分解機構を解明することは、リグニンが炭素循環にどのように関与しているかという基礎的な興味に加え (Higuchi, 1985)、応用面ではバイオブリーチングなどのパルプ産業での利用や、近年特に、その環境や人体への影響が懸念されているダイオキシンなどの芳香族系環境汚染物質除去等の知見を得るのに重要である。

リグニンを分解する主要な微生物は、単子菌類の白色腐朽菌であると言われており、ほかにこれと近縁の植物遺体分解菌、褐色腐朽菌、軟腐菌のような細菌もリグニン分解に関与していると言われている。代表的な白色腐朽菌としては、カワラタケ (*Trametes vesicolor*)、*Phanerochaete chrysosporium*、アラゲカワラタケ (*Coriolus hirstus*)、シイタケ (*Lentinus edodes*) 等が上げられる。

リグニン分解に関わる酵素としては現在までに、ラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) の 3 種類が確認されている。これら 3 種の酵素が初発反応として基質からの一電子酸化を触媒し、それにより生じたフェノキシラジカルやアリールカチオンラジカルは、さらに自動酸化的に水分子、側鎖水酸基、酸素分子などと反応し、C α -C β 開裂、C α 位の酸化、アルキル-アリール開裂、芳香環開裂が起きることが明らかになっている。しかしながら、カワラタケではラッカーゼ、LiP、MnP が 3 種とも分泌されるのに対して、*Phanerochaete chrysosporium* はラッカーゼをほとんど分泌しない (Yokota et al., 1991)。また、シイタケのように LiP をほとんど分泌しない (Kofujita et al., 1991) ものもあり、その分泌様式は菌種により様々である (Higuchi, 1971)。さらに、同じ菌を用いた場合でも、その培養条件により

酵素の発現が多様であるという報告もされている (Boyle et al., 1992, Orth et al., 1993, Hattaka, 1994)。

ラッカーゼは、一般に銅を補欠分子として持つ酸化酵素である。植物界において、ウルシオール¹の重合や果実の褐変等に関与することが知られているが、糸状菌類、特に白色腐朽菌に広く分布していることも古くから知られていた。リグニン分解におけるラッカーゼの役割は古くから注目されており、特にリグニン分解菌のスクリーニング法であるバーベンダム反応を引き起こすが陽性であることと、ラッカーゼ活性の相関は以前に指摘されている。報告者はラッカーゼが分子状酸素を利用してフェノール性の基質を酸化し、フェノキシラジカルを経由して、C α -C β 開裂、C α 位の酸化、アルキル-フェニル開裂、そして芳香環開裂を引き起こすことなどを明らかにしている (Kawai et al. 1987, 1988a,b)。しかし、ラッカーゼ単独では非フェノール性の基質には作用できず (Kawai, 1989)、試験管レベルのラッカーゼ反応ではリグニンの重合反応が主反応で、低分子化がほとんど起こらない。また、Kerstenらは、いくつかの非フェノール性リグニンモデル化合物の酸化について、ラッカーゼ、LiP、ホースラディッシュペルオキシダーゼを比較し、ラッカーゼは他の酵素と比べると酸化電位が低く、低い半波電位を持つ化合物しか酸化できず、酸化剤になりにくいことが原因であると結論した (Kersten et al., 1990)。これらのことから、リグニン分解へのラッカーゼの関与は疑問視されていた。しかし、リグニンペルオキシダーゼおよびマンガンペルオキシダーゼが触媒する反応は、芳香環あるいはフェノールの一電子酸化であることや、リグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼを分泌せずにラッカーゼのみを分泌する白色腐朽菌の存在が確認されたことから、リグニン分解におけるラッカーゼの重要性が再確認された (太田・本田, 2002)。

報告者らは、リグニン分解物であるシリングアルデヒドの存在下で、ラッカーゼによってベラトリルアルコール及び 3,4,5-トリメトキシベンジルアルコールの酸化が起こり、アルデヒドを生成するという報告をし、ラッカーゼ単独では作用できないリグニン中の非フェノール性構造部分の分解に何らかの低分子化合物（メディエーター）が関与し、非フェノール性構造部分の分解も引き起こされる可能性を提案した（Kawai et al., 1989）。また Bourbonnais らは低分子合成化合物の 2,2-アジノビス-(4-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸アンモニウム塩) (ABTS) を共存させることで、非フェノール性 b-1 型リグニンモデル化合物の C α -C β 開裂が起きることを証明した (Bourbonnais & Paice, 1990)。さらに、ラッカーゼのみ及びラッカーゼにより酸化された ABTS カチオンラジカル体のみではこの基質の分解は進行しないことを確認した (Bourbonnais & Paice, 1992)。これらの報告を受け、ラッカーゼ/メディエーター系に関する様々な研究が行われた。これらの研究によりフェノチアジン、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) などの様々なメディエーターが報告されたが、HBT が単独では最も強力なメディエーターであることが明らかになっている (Bourbonnais et al., 1997, 杉浦・福永, 1999)。

そこで報告者らは、ラッカーゼ/HBT 系による非フェノール性 β -O-4 型リグニンモデル化合物の分解を検討し、LiP と類似の反応である C α -C β 開裂、 β -エーテル開裂、芳香環開裂を経て分解が進行すること、¹⁴C 標識した脱水素重合 (DHP) リグニン高分子モデル化合物の低分子化が触媒されることなどを明らかにした (Kawai et al., 1999a,b)。また LiP の反応と異なる分解として、ベンジル位での水素引き抜きによって生成したベンジルラジカルを初発とする C α -C β 開裂や β -エーテル開裂が触媒されることを ¹⁸O₂ の取り込み実験や化学的分解反応を駆使して証明した (Kawai et al., 2002, 2004)。

HBT または ABTS の存在下でラッカーゼをクラフトパルプに作用させると、残量リグニン量の指標となる **Kappa** 値の減少が見られる。このことから、ラッカーゼ/メディエーター系は脱リグニンを必要とするパルプ漂白に有効であり、環境への影響が憂慮される塩素系漂白法の代替となりうる「環境調和型パルプ漂白」として注目されている。さらに、ラッカーゼ/メディエーター系による芳香族系内分泌攪乱物質（環境ホルモン；ビスフェノールA、ノニルフェノール、メトキシクロル、エチニルエストラジオールなど）の分解と毒性除去も多数報告されており、この系による効率的な「バイオレメディエーション技術」も注目されている（Tsutsumi et al., 2001, Suzuki et al., 2003, Hirai et al., 2004, Tamagawa et al., 2005, 2006）。

しかしながら、パルプ漂白やバイオレメディエーションに有効なメディエーターとしては、HBT などの合成型化合物しか報告されていない。また、これら化合物の毒性や、コスト面などから実用へ供されるには至っておらず、コストや安全性でより有利な天然由来のものが求められている。白色腐朽菌によるリグニン分解という観点からも、実際の木材腐朽過程におけるこのような低分子化合物の関与を明らかにする必要がある。

天然起源のメディエーターの例としては、リグニン分解酵素としてラッカーゼのみを分泌する白色腐朽菌で *Pycnoporus cinnabarinus* が特異的に代謝する 3-ヒドロキシアンスラニネートがラッカーゼに対してメディエーターの役割を行う可能性があることが報告されているのみである（Eggert et al., 1995）。著者らは、これまでに、このようなメディエーターが天然に普遍的に存在するのかどうかを検討するために、カワラタケ、アラゲカワラタケに加え、*Schizophyllum commune*（スエヒロタケ）、*Ganoderma lucidum*（マンネンタケ）、*Cyathus stercoreus*（ハタケチャダイゴケ）合計 5 種の白色腐朽菌を、ラッカーゼ産生培地（Fåhraeus & Reimhammer, 1967）、リグニン分解

最適培地 (Tien & Kirk, 1988)、木粉培地で培養を行い、その菌体外培養液をメディアエーター溶液として用い、非フェノール性 β -O-4型リグニンモデル化合物の分解を指標とした天然型メディアエーターの検索を行った (稲垣, 2002)。しかし、モデル化合物の調製や、非常に煩雑なクリーンアップ操作や分析技術を要する難点があった。

そこで本研究では、メディアエーター化合物の検索をクラフトパルプの漂白 (パルプ白色化および脱リグニン) ならびに芳香族系環境汚染物質の分解を指標としたアッセイ系を開発することとし、これによって比較的簡便かつ迅速に菌体由来のメディアエーターをスクリーニングすることを目的とした。

第2章 実験方法

2.1 カワラタケラッカーゼの調製及び精製

2.1.1 グルコース・ペプトン・銅(GPC)培地での培養

カワラタケ (*Trametes versicolor* IFO30340) を PDA (Potato dextrose agar; 和光純薬) 培地上に接種し、30°Cで7日間培養した後、プレートの外縁付近をコルクボーラー (内径 8.5 mm) で打ち抜き、菌体ディスク 4 個を 50ml のグルコース・ペプトン・銅培地 (表 1) に加えて、ワーリングブレンダーでホモジナイズした。これを 200 ml のグルコース・ペプトン・銅培地を含む 500 ml 容三角フラスコに添加し、30°C、150 rpm で 13 日間振とう培養した。培養後、菌体を含む培養液 50 ml を採取し、新たに調製したグルコース・ペプトン・銅培地 200 ml に加え、さらに 8 日間培養した。

2.1.2 Fåhraeus & Reinhammar 改変 (MFR) 培地での培養

1.1 でのグルコース・ペプトン・銅培地に含まれるペプトン由来と考えられる着色物質が、酵素精製の際にラッカーゼフラクションと分離することが困難であったため、GPC 培地を Fåhraeus & Reinhammar (1967) の報告を一部改変した新しいラッカーゼ (Modified Fåhraeus & Reinhammar) 培地 (表 2) に変更し、2.1.1 と同様にカワラタケを培養した。

2.1.3 酵素の精製

培養が終了した GPC 培地または MFR 培地から菌体を除去した後、ガラス繊維ろ紙 (Advantec, GA-100 および GB-140)、メンブレンフィルター (Advantec, ポアサイズ 0.65 mm、0.45 mm) でろ過した後、攪拌型ウルトラホルダー (Advantec, Membrane:

Q0100) で約 50 ml まで濃縮し粗酵素液とした。

この粗酵素液は凍結乾燥し、ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G-50、内径 2.5 cm×35 cm) に供し分画した。溶出緩衝液として 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.0) を使用し、各フラクションは 5.0 ml とした。ラッカーゼ活性を有するフラクションを集め、部分精製酵素液とした。以降の実験の多くはこの段階の酵素を用いた。

粗酵素溶液の一部はイオン交換クロマトグラフィー (HiTrap Q) に供し精製した。溶出緩衝液として、10 mM リン酸バッファー (pH 6.0) を用いた。また各フラクションは 4.0 ml とし、活性を有するフラクションを集め、精製ラッカーゼを得た。

2.1.4 酵素活性の測定

ラッカーゼ活性は 1 mM 2,6-ジメトキシフェノールを含む 50 mM マロン酸バッファー (pH4.5) を基質として、30°C で 5 分間インキュベートし、470 nm における吸光度増加から測定した。この際に、1 秒間に 1 nmol の酸化生成物 ($\epsilon = 49.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) を与える酵素量を 1nkat と定義した。

表 1 Glucose-Peptone-Copper (GPC) Medium

Medium	Amount (L ⁻¹)	mM
Glucose	30 g	167
Peptone (Bacto)	10 g	
KH ₂ PO ₄	1.5 g	11.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500 mg	2.03
CuSO ₄ ·5H ₂ O	16.0 mg	6.4 x 10 ⁻²
Thiamine-HCl	2.0 mg	5.9 x 10 ⁻³

表2 Modified Fåhraeus & Reinhammar (MFR) Medium

Medium	Amount (L ⁻¹)	mM
Glucose	30 g	167
L-Asparagine	2.5 g	18.9
D, L-Phenylalanine	150 mg	0.91
Adenine	27.5 mg	0.20
Thiamine-HCl	2 mg	5.9 x 10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	1.0 g	7.35
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	100 mg	0.56
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500 mg	2.03
CuSO ₄ ·5H ₂ O	16 mg	6.4 x 10 ⁻²
Tracer elements solution	10 ml	

Tracer elements solution (L ⁻¹)		
CaCl ₂	10 mg	9.0 x 10 ⁻²
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg	3.6 x 10 ⁻²
MnSO ₄ ·H ₂ O	1 mg	5.9 x 10 ⁻³
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 mg	3.5 x 10 ⁻²

2.2 バイオブリーチングを指標とするアッセイ系の検討

2.2.1 未晒パルプ

広葉樹未晒パルプ (HWKP) (Kappa 価 24.6) は、王子製紙株式会社よりご恵送いただいたものを使用した。パルプ中に含まれる Mn を取りのぞく目的で 1% EDTA 水溶液に一晩浸し、十分洗浄後乾燥させ、Mn-less HWKP とした。

2.2.2 ラッカーゼ/メディエーター処理

50 mM マロン酸バッファー (pH4.5) に前述のパルプを濃度が 1% になるように懸濁し、ワーリングブレンダーで解繊した後、ラッカーゼ粗酵素液 (酵素量 50 nkat) と合成メディエーターとして HBT 10 mM もしくは、Tween 80 を 1% となるように添加し、室温で 12 時間、150 rpm で振とう処理した。HBT 処理に関しては、反応溶液中に連続的に酸素を供給した系でも実験を行った。

所定時間反応したパルプは、蒸留水で十分に洗浄後、パルプシートを作成し、アルカリ抽出処理前試料とした。

その後、パルプシートは 3% NaOH 水溶液に再懸濁させ、60°C の湯浴中で 1 時間アルカリ抽出を行った。抽出したパルプは、蒸留水で十分に洗浄後、再度パルプシートを作成し、アルカリ抽出処理後試料とした。

2.2.3 白色度及び Kappa 価の測定

得られたアルカリ抽出前パルプシートおよびアルカリ抽出後パルプシートは、十分に乾燥させた後、色彩色差計 (コニカミノルタ CR300) により白色度を測定した。

また、アルカリ抽出後パルプシートに関しては、TAPPI standard T236-60 に従って

Kappa 値を測定した。

2.3 アントラセンの分解を指標とするアッセイ系の検討およびラッカーゼメディエーターの検索

2.3.1 アントラセン分解反応

50mM マロン酸バッファー (pH4.5) に、基質として 0.1mM となるようにアントラセンを添加した。この反応溶液に、ラッカーゼ、HBT (0.2 mM)、Tween 80 (1%) を所定濃度添加し (反応液量 1 ml)、37°C湯浴中で 24 時間振とうした。反応は、アセトニトリル 1 ml を加えて反応を停止し、内部標準物質としてピレンを用いて HPLC で定量分析した。基質と内部標準物質とのエリア比からアントラセンの分解量を定量し、分解率を算出した。

2.3.2 HPLC 分析条件

溶離液	アセトニトリル : 水 = 6 : 4
流速	1 ml/min
分析時間	20 min
測定波長	240 nm
使用カラム	Cadenza CD-C18 (Imtakt、75×4.6 mm)
注入量	10 µl

2.3.3 各種メディエーター候補の調製

2.1 でラッカーゼ調製に使用した GPC 培地で培養したカワラタケ菌体および菌体外培養液を、以降のメディエーター候補として使用した。

2.3.3.1 菌体水抽出物（フラクション F）

カワラタケ菌体は、所定時間培養しろ別し、-80℃凍結保存したものを使用した。

凍結菌体（約 49 g）を 300 ml 容コニカルビーカーにとり、超純水 100 ml を加え、室温で 24 時間攪拌した。終了後、抽出液を菌体からろ別し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。得られた抽出物を水抽出物（F, 1.7 g）として使用した。

2.3.3.2 菌体エタノール抽出物（フラクション FE）

前項でろ別した菌体は円筒ろ紙に移し、ソックスレー抽出器を用いて、24 時間エタノールで再抽出した。エタノール層は集め、減圧濃縮しエタノール抽出物（FE, 0.78 g）を得た。

2.3.3.3 限外ろ液濃縮物（フラクション B）

ラッカーゼ調製時の限外ろ液（分子量 10,000 以下） 600ml をロータリーエバポレーターにて濃縮し、限外ろ液濃縮物（B, 13.1 g）を得た。

2.3.4 メディエーター候補溶液濃度の検討

2.3.3 で調製した各抽出物はジメチルスルホキシドに溶解し、候補溶液とした。

2.3.1 の分解条件を参考に、メディエーター候補の濃度を、HBT（30.6 mg/ml）に対する重量比で、1～100 倍量に設定し分解実験を行った。

2.3.5 界面活性剤の影響

アントラセン分解に対する界面活性剤の影響を調べる目的で、不飽和脂肪酸を分子中

に持たない Tween 20、不飽和脂肪酸を分子中に有し、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) のメディエーターとして知られる Tween 80 を、分解反応系にそれぞれ 1% 添加して分解実験を行った。

2.3.6 各種抽出物のメディエーター効果と活性画分の有機溶媒による分画

2.3.6.1 各種抽出成分によるメディエーター効果

前述の条件検討の結果、実験条件を以下のように設定し、メディエーター候補によるアントラセンの分解を行った。

基質： アントラセン 0.1 mM

酵素： ラッカーゼ 50 nkat

メディエーター量： 306 mg (0.2 mM HBT (30.6 mg/ml) の 10 倍量)

界面活性剤： Tween 80 1%

反応液量： 1 ml (50mM マロン酸バッファー、pH 4.5)

反応温度： 37°C

反応時間： 24 時間

2.3.6.2 菌体水抽出物 (F) のヘキサン画分 (F-Hex) 及び酢酸エチル (F-Et) 画分

2.3.3.1 で得た水抽出物のうち 1.2 g は、水に再溶解し、ヘキサン 200 ml を加え室温で攪拌した。24 時間後、ヘキサン層を集め、減圧濃縮して菌体水抽出物ヘキサン可溶部 (F-Hex、1.8 mg) とした。残った水層は、酢酸エチル (EtOAc) 200 ml を加え同様に処理し、菌体水抽出物 EtOAc 可溶部 (F-Et、14.2 mg) とした。残った水層はそ

のまま減圧濃縮し水層画分 (F-W) とした。これらフラクションは、前述の条件でアントラセンの分解率を調べた。

2.3.6.3 限外ろ液濃縮物 (B) のヘキサン画分 (B-Hex) 及び酢酸エチル (B-Et) 画分

2.3.3.3 で得た限外ろ液濃縮物約 9.1 g は、水に再溶解し、ヘキサン 500 ml を加え室温で攪拌した。24 時間後、ヘキサン層を集め減圧濃縮して限外ろ液濃縮物ヘキサン可溶部 (B-Hex、14.7 mg) とした。残った水層に EtOAc を 500 ml 加え、同様の処理をし、EtOAc 可溶部 (B-Et、40.7 mg)、水層残渣 (B-W) に分画した。これらフラクションは、前述の条件でアントラセンの分解率を調べた。

第3章 結果および考察

3. 1 カワラタケラッカーゼの調製及び精製

Sephadex G-50 ゲルろ過クロマトグラフィーのクロマトグラムを図1に示した。ラッカーゼ活性及び吸光度からフラクション 8~13 を Hi-Trap Q イオン交換クロマトグラフィーでさらに精製することとした。

図2に、Hi-Trap Q イオン交換クロマトグラムを示した。ラッカーゼ活性及び吸光度の高いフラクション 13~15 を集め、SDS-page 電気泳動 (図3) で純度を確認した結果、ラッカーゼがほぼ単一に精製されたことを確認した。また、マーカー分子量から、精製されたラッカーゼの分子量は約 60 kDa と算出した。

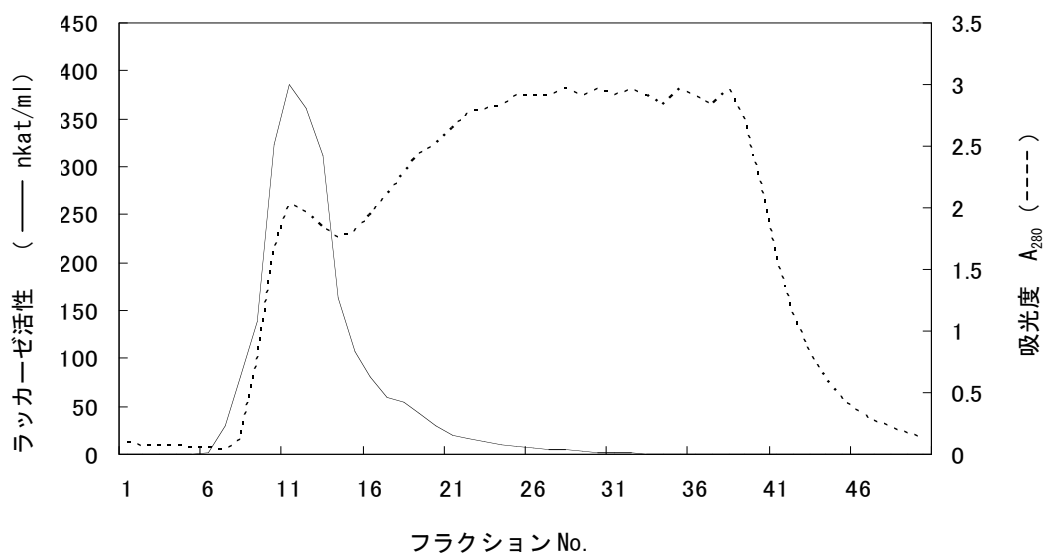


図1 Sephadex G-50 によるラッカーゼの分画

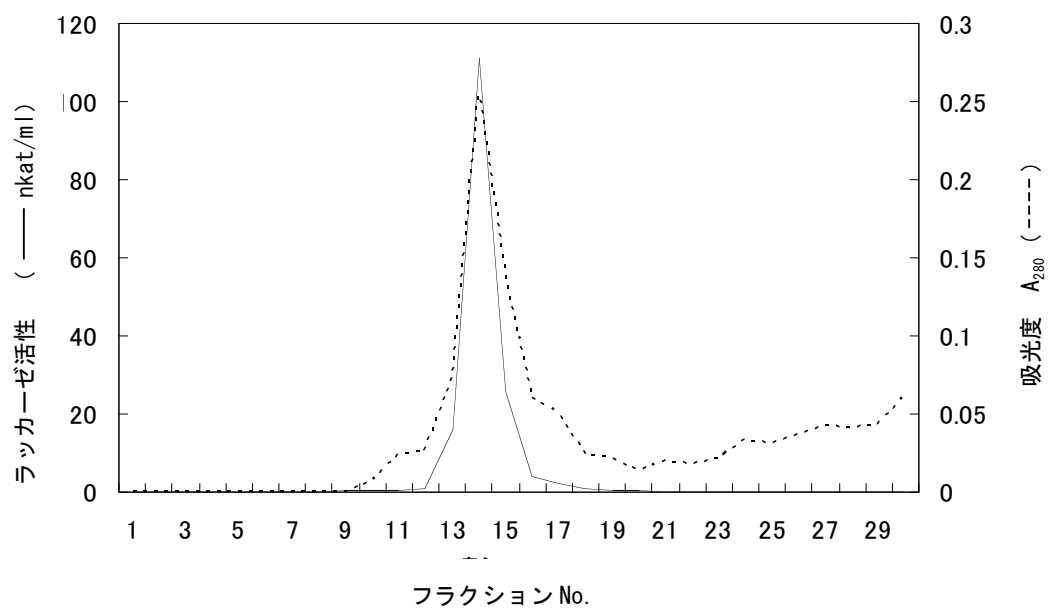


図2 HiTrap Qによるラッカーゼ画分の精製

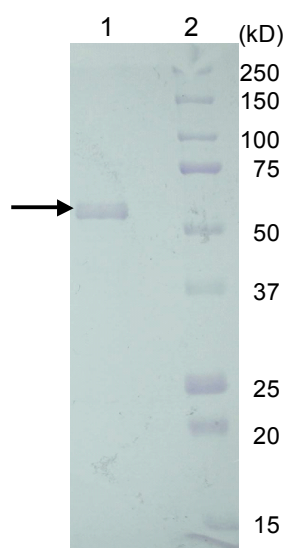


図3 精製ラッカーゼのSDS-PAGE

lane 1: ラッカーゼ, lane 2: 分子量マーカー

3. 2 バイオブリーチングを指標とするアッセイ系の検討

未晒クラフトパルプから、残留するリグニンを除去することで白色度増加が見られると考え、まず、ラッカーゼ-メディエーター系での処理前後での白色度の変化を調べた。

広葉樹未晒パルプは、HBT および Tween 80 共存下あるいは単独でラッカーゼ処理し、処理後のパルプシートの白色度を測定した（図2、処理後）。しかしながら、これらパルプシートの白色度には顕著な変化は見られず、ラッカーゼ+HBT+酸素導入の系では無添加やラッカーゼ単独の系と比較して、2ポイント以上濃色化することが明らかとなった。これは、パルプ中に残存するリグニン断片が酸化反応を起こし、オルトキノンなどの発色団を有する構造に変化し、濃色化したリグニン構造がパルプ中に残存している可能性が考えられた。このため、処理したパルプシートを、アルカリで抽出し、再

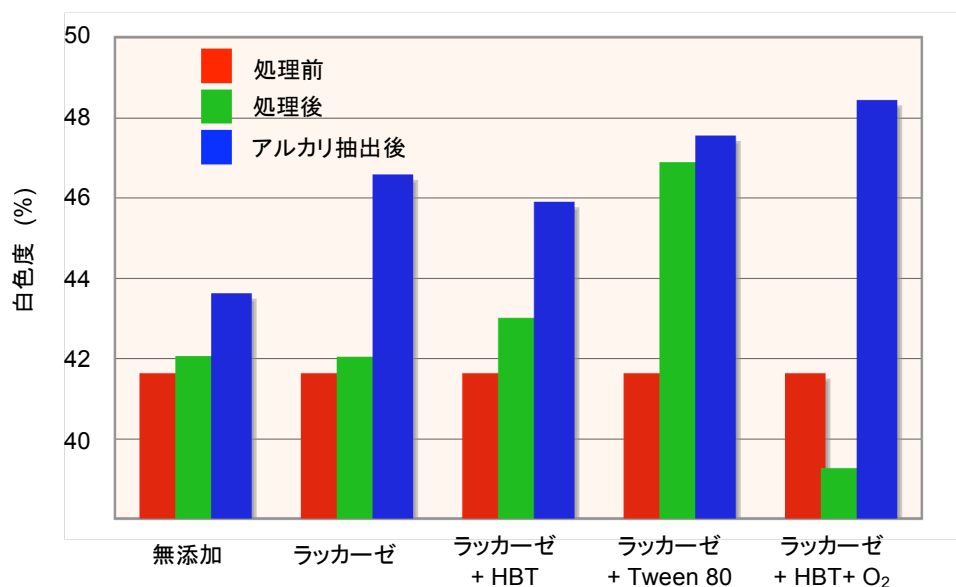


図4 各種処理による白色度の変化

度白色度を測定した（図4、アルカリ処理後）。しかしながら、最も高い白色度上昇が認められたラッカーゼ+HBT+酸素導入の系でも、メディエーターを添加していないラッカーゼ単独のコントロールと比べ、2ポイント程度しか白色度上昇しかみられず、このアッセイ系でメディエーター検索を行うことは困難であると結論した。

Katagiri ら（1997）は、リグニン分解酵素 MnP を用いたバイオブリーチングの研究で白色度とリグニン分解率とはパラレルな関係にないことを報告しており、直接リグニン量を測定する必要があると結論している。従って、本実験でも同様な傾向があると考え、このシートの Kappa 価を測定しリグニン除去率を求めた。結果を図5に示した。

ラッカーゼを添加することで、幾分リグニン含量が低下している傾向は見られるものの、酸素を導入しない系では、ラッカーゼ単独の場合と HBT あるいは Tween 80 を添加した系でカップー価の減少に差がなく、メディエーター効果は認められないという

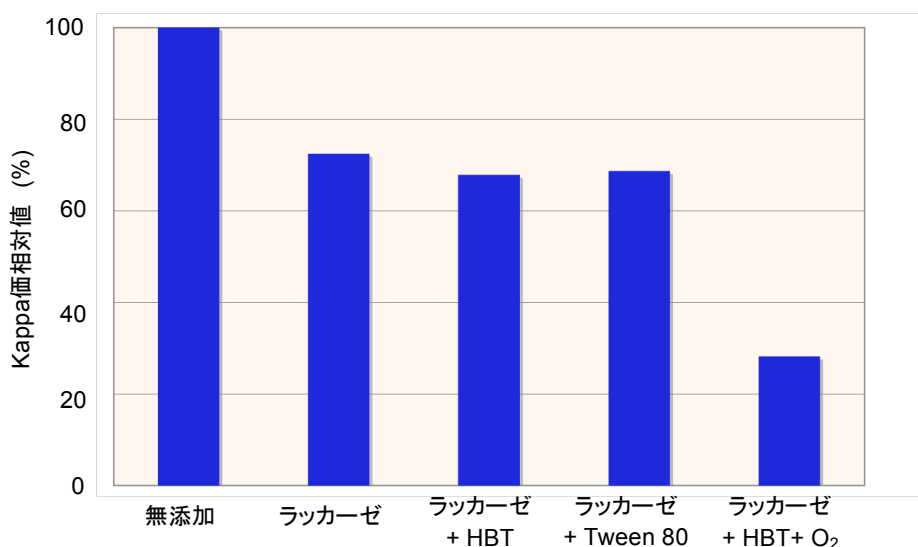


図5 各種処理によるアルカリ抽出後の Kappa 価の変化

結果になった。しかし、HBT を添加しさらに反応中の酸素圧を高めた系では約 70%の Kappa 値の減少が生じており、リグニン分解が急速に進んでいることが伺え、顕著なメディエーター効果が確認された。

これらの結果は、バイオブリーチングによってメディエーター効果を評価する場合には、単純に処理後のパルプの白色度測定だけでは不十分であり、白色度を測定するにもアルカリ抽出が必要であること、さらにラッカーゼメディエーター反応の本質であるリグニン分解を確認するためには、Kappa 値の変化を追跡する必要があると判断した。

従って、バイオブリーチングによるアッセイ系でメディエーター能を評価するためには、アルカリ抽出や酸素圧を高くするなど煩雑な操作を必要とし、リグニンモデル化合物を用いる場合と比較しても、簡便なスクリーニング法とは言い難いことが明らかとなった。そこで、多環式芳香族化合物であるアントラセンの分解を指標としたアッセイを検討することとした。

3.3 アントラセンの分解を指標とするアッセイ系の検討およびラッカーゼメディエーターの検索

アントラセンは多環式芳香族化合物の一種であり、難分解性の環境汚染物質とされている。Johannes ら (1996) は、このアントラセンがラッカーゼ単独では分解されないのに対し、HBT などのメディエーターを添加することにより分解が進行することを報告している。そこで、アントラセンの分解を指標とすることがメディエーター検索のアッセイ法として適当かどうかを検討した。

3.3.1 メディエーター候補溶液濃度の検討

アントラセンの分解実験の結果、ラッカーゼ 100 nkat のみの添加ではアントラセン残存率は約 95 % となりほとんど分解されなかったのに対し、HBT (0.2 mM、30.6 mg/ml、1% Tween 80) を添加した系では 90 % 以上の分解率となった (図 6)。このことは、アントラセンの分解が、メディエーターの存在によって大きく異なることを示している。また、この方法は煩雑な操作もなく簡便に行えるためにスクリーニング法として適当であると判断し、天然メディエーターによる分解実験に用いた。

まず初めに、添加するメディエーター量を検討した。抽出成分中にはメディエーター候補以外の化合物も含まれているため、HBT (30.6 mg/ml) に対する重量比で、1 倍 (30.6 mg/ml) と 100 倍 (3.06 mg/ml) 濃度のメディエーター溶液濃度で分解実験を行った (図 6)。

いずれの画分も添加量の増加に伴いアントラセンの分解率が上昇し、メディエーター存在の可能性が示唆された。特に水抽出物 (F) に関しては、添加量の増加に伴いアントラセン分解率が著しく上昇した。このことは、菌体水抽出物 (F) 中に強力なメディ

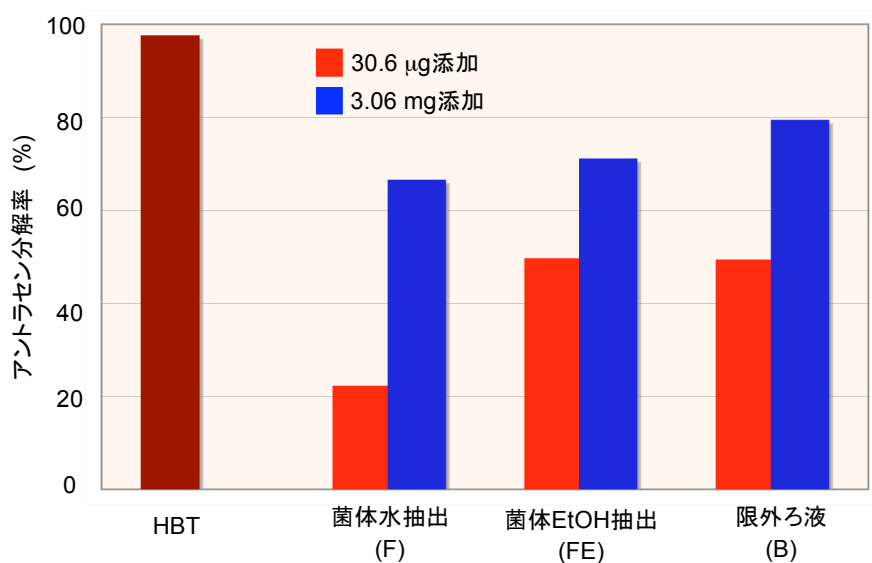


図6 メディエーター候補添加量とアントラセン分解

エーターが含まれていることを示唆している。また、限外ろ液濃縮物 (B) は培地成分が夾雑物として多量に含まれるにもかかわらず最も高い分解率を示した。

これら以外の予備実験の結果も合わせ、メディエーター候補を菌体水抽出物 (F) 及び限外ろ液濃縮物 (B) に限定し、メディエーター濃度を HBT の 10 倍にあたる 306 mg/ml、ラッカーゼ活性を 50 nkat/ml に固定し、各種条件における分解を検討することとした。

3.3.2 菌体水抽出物(F)と限外ろ液濃縮物(B)のメディエーター効果

予備実験の結果から、菌体または菌体外培養液中にメディエーターの存在が推察された。しかしながら、前述の反応系には界面活性剤である Tween80 が含まれている。界面活性剤 Tween 80 は、正式名を Poly(oxyethylene)sorbitan monololate といい、分子内に不飽和脂肪酸であるオレイン酸を有している (図7)。リグニン分解酵素の一つで

あるMnPもラッカーゼ同様、単独では非フェノール性の基質には作用しないと言われているが、反応系に不飽和脂肪酸を共存させると非フェノール性構造にも作用し、MnP-Tween 80系による非フェノール性リグニンモデル化合物の分解が報告されている(Bao et al.,1994、河合ら、未発表)。ラッカーゼ-メディエーター系とMnP-不飽和脂肪酸系の反応機構は極めて類似している。即ち、酵素によって生成したメディエーターや不飽和脂肪酸のラジカル中間体が、リグニンモデル化合物のベンジル位からの一電子酸化を引き起こし、生成したラジカルを経由してリグニンモデル化合物のC α 酸化やC α -C β 開裂反応が進行する点である。従って、ラッカーゼ-不飽和脂肪酸系でも同様のラジカル種が生成する可能性は極めて高く、反応系から不飽和脂肪酸を排除する必要がある。そこで、反応系から、Tween 80を除いたアントラセンの分解を検討してみた。

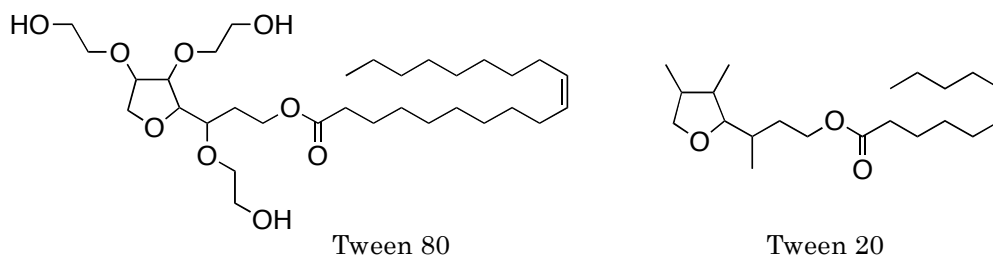


図7 Tween 80 と Tween 20 の化学構造

その結果、ラッカーゼ単独では全く分解されなかったアントラセンが、菌体水抽出物(F)または限外ろ液濃縮物(B)を反応系に添加することで、それぞれ10.3%、15.9%とわずかながら分解することが明らかとなった(図8)。このことは、これら抽出物中にラッカーゼメディエーターとなる化合物が存在することを示唆している。しかしながら、予備試験に比べ、アントラセンの分解率はかなり低く、Tween 80の添加がア

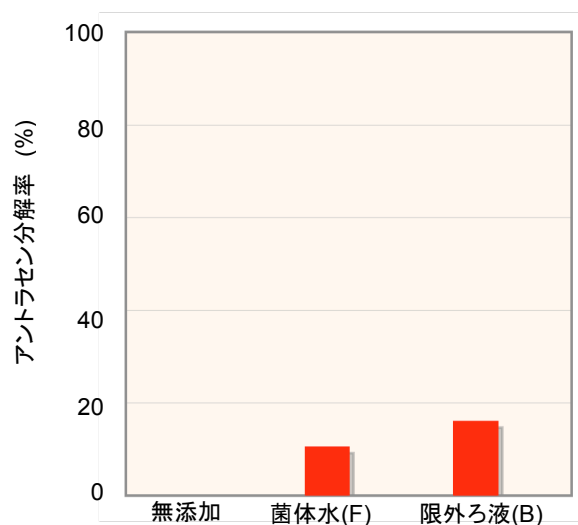


図8 メディエーター候補単独でのアントラセン分解

アントラセン分解に強く影響していることが明らかとなった。そこで、アントラセン分解に対する界面活性剤の影響を比較した。

3.3.3 界面活性剤の影響

実験は、まず分子内脂肪酸部分に不飽和脂肪酸であるオレイン酸を有する Tween 80 と類似の分子骨格を有するが、分子内脂肪酸部分が飽和脂肪酸であるラウリン酸（ドデカン酸）である Tween 20（図7）を用いて行った。その結果、F、B どちらの系においても、界面活性剤を加えない場合と比較してアントラセン分解が促進されることが明らかとなった（図9、F: 22.0 %、B: 21.9 %）。このことは、ラッカーゼとアントラセンのアクセシビリティーが界面活性作用により増加し、分解が進行することを示している。

しかしながら、Tween20 を、不飽和脂肪酸を有する Tween 80 に変更して分解を試

みたところ、分解率が著しく上昇し、Tween 20 と比較して約 3 倍の分解率を与えた (図 9、F: 67.3 %、B: 75.5 %)。このことは Tween 80 が界面活性作用に加えて、分子中に不飽和脂肪酸を有するラッカーゼメディエーターとして働く可能性を強く示唆している。

ラッカーゼ-不飽和脂肪酸系によりアントラセンの分解が進行するという結果は、これら反応系における反応機構が MnP-不飽和脂肪酸系の反応と類似しており、ラッカーゼが不飽和脂肪酸存在下で非フェノール性リグニンモデル化合物を分解するという可能性を想起させた。そこで、ラッカーゼ-Tween 80 系における非フェノール性リグニンモデル化合物の分解を検討した。その結果、 β -エーテル開裂、芳香環開裂が確認され、予想通りラッカーゼ-不飽和脂肪酸系でも非フェノール性リグニンモデル化合物の分解が触媒されることが初めて確認された (河合ら、未発表)。

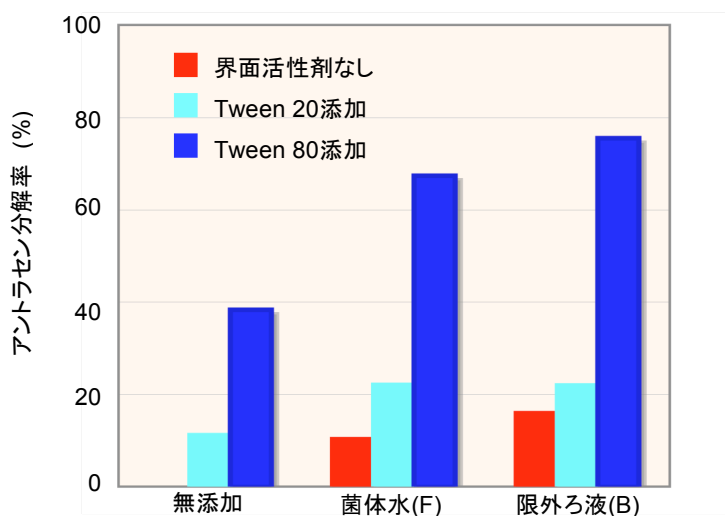


図 9 アントラセン分解の界面活性剤の影響

3.3.4 フラクシオンFおよびBの有機溶媒による分画とそのメディエーター活性

両抽出物（F， B）にメディエーター活性がみられたので、これらフラクシオンをヘキサンおよび酢酸エチルで抽出し活性成分の分画を試みた。以降の実験には界面活性剤として Tween 80 を添加した系で分解実験を行っている。

まず、それぞれの抽出物を、ヘキサンと酢酸エチルで順次抽出した。菌体水抽出物（F）中の、ヘキサン可溶部（F・Hex）は 0.2 %、酢酸エチル可溶部（F・Et）は 1.2 %であった。一方、限外ろ液濃縮物（B）に関しては、ヘキサン可溶部（B・Hex）0.2 %、酢酸エチル可溶部（B・Et） 0.4 %と極めて低い回収率であった。

図10に、各フラクシオンのアントラセン分解率を示した。現在知られている最も強力なメディエーターである HBT の分解率（97.3 %）には及ばないものの、菌体抽出

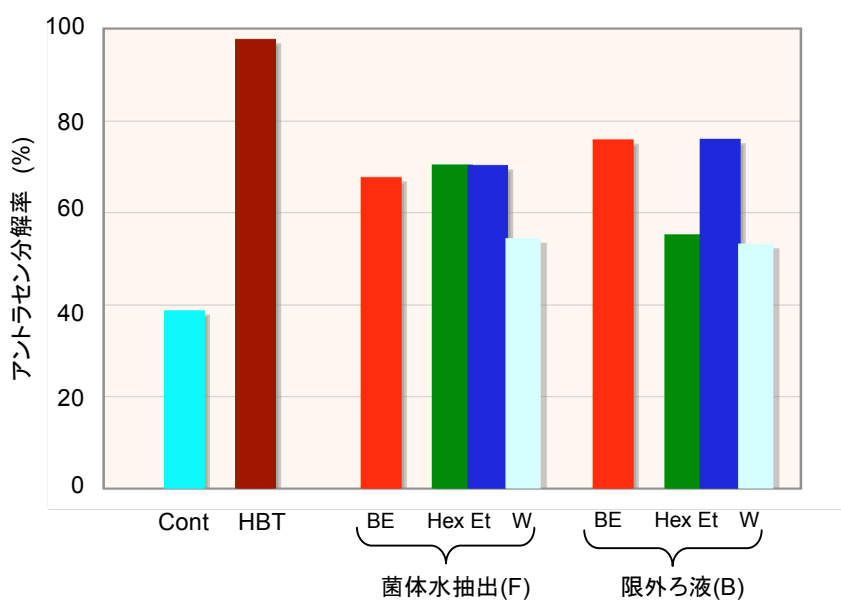


図10 有機溶媒可溶画分のアントラセン分解率

■ ラッカーゼのみ、■ HBT、■ 分画前 (BE)、■ ヘキサン可溶部 (Hex)
■ 酢酸エチル可溶部 (Et)、■ 抽出残渣 (W)

物のヘキサン (F-Hex、70.0 %) および酢酸エチル抽出物 (F-Et、69.9 %)、限外ろ液の酢酸エチル抽出物 (B-Et、75.6 %) が抽出前のフラクションと同等の分解率を示した。また、コントロール (メディエーター候補なし、38.3 %) と比較しても、およそ 2 倍の分解率を示し、これら抽出物中にラッカーゼメディエーターとなりうる化合物が含まれている可能性が強く示唆された。

しかしながら、各フラクションの収率は極めて低く、今回の実験スケールではこれ以上分画を進めることはできなかった。今後は、分解活性が高く抽出物量が多い限外ろ液の EtOAc 抽出物 (B-Et) フラクションなどを大量に調製し、カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、それぞれのフラクションについてアントラセンに対する分解活性を精査することでラッカーゼメディエーターを特定したいと考えている。また、これらフラクションを GC-MS 分析し、それぞれのピークのマスペクトルからライブラリー検索などを駆使して、メディエーターの構造を推定することも考えている。

さらには、これらフラクションを用いたリグニン中最も大量に存在する構造を有する非フェノール性 β -O-4 型リグニンサブストラクチャーモデル化合物を用いた分解機構の解明についても計画している。

第4章 総括

白色腐朽菌から普遍的に分泌されるラッカーゼは、フェノール性基質の分解しか触媒できないが、反応系に適切な化合物が存在するとその化合物がメディエーターとなり、リグニンの約 80%を占める非フェノール性構造にも作用しうることが知られている。

ラッカーゼ／メディエーター系は脱リグニンを必要とするパルプ漂白に有効であり、環境への影響が憂慮される塩素系漂白法の代替となりうる「環境調和型パルプ漂白」として注目されている。さらに、ラッカーゼ／メディエーター系による芳香族系内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の毒性除去も多数報告されており、この系による効率的な「バイオレメディエーション技術」も注目されている。しかしながら、パルプ漂白やバイオレメディエーションに有効なメディエーターとしては、**HBT** などの合成型化合物しか報告されておらず、これらの化合物が毒性を有し、コストも高いことなどから実用へ供されるには至っていないのが現状である。

本研究では、白色腐朽菌由来の天然型メディエーター化合物を検討する目的で、まずクラフトパルプの漂白（パルプ白色化）を指標としたアッセイ系の確立を目指した。その結果、バイオブリーチングによってメディエーター効果を評価するためには、単純な酵素処理後のパルプの白色度測定だけでは不十分であり、白色度を測定するためにはアルカリ抽出が必要であること、さらにラッカーゼメディエーター反応の本質であるリグニン分解を確認するためには、**Kappa** 価の変化を追跡する必要であるなど煩雑な操作を必要とし、簡便なスクリーニング法とは言い難いことが明らかとなった。

そこで、多環式芳香族化合物であるアントラセンの分解を指標としたアッセイを検討することとした。その結果、ラッカーゼのみの添加では分解されないアントラセンが、合成メディエーターとして知られる **HBT** の添加で分解されることが示され、このアッ

セイ系がスクリーニング法として適当であると判断した。

様々な分解条件を検討した結果、分解系に不飽和脂肪酸を有する界面活性剤 Tween 80 を 1% 添加した場合が最も分解率が高く、Tween 80 が共存すればラッカーゼのみでも分解が進行するという新しい知見が得られた。

そこで、菌体あるいは菌体培養液由来の抽出物をメディエーター候補としてアントラセン分解率を測定した結果、現在知られている最も強力なメディエーターである HBT 共存下でのアントラセン分解率(97.3%)には及ばないものの、菌体抽出物(F) 67.3%、菌体外培養液濃縮物(B) 75.5%の分解率を示し、メディエーター成分がこれらフラクションに含まれている可能性が示された。そこで、二つのフラクションを有機溶媒による逐次抽出によって分画しその活性を調べた。その結果、菌体抽出物のヘキサン(F-Hex、70.0%)および酢酸エチル抽出物(F-Et、69.9%)、限外ろ液の酢酸エチル抽出物(B-Et、75.6%)が抽出前のフラクションと同等の分解率を示した。また、コントロール(メディエーター候補なし、38.3%)と比較しても、およそ2倍の分解率を示し、これら抽出物中にラッカーゼメディエーターとなりうる化合物が含まれている可能性が強く示唆された。しかしながら、各フラクションの収率は極めて低く、今回の実験スケールではこれ以上分画を進めることはできなかった。今後は、分解活性が高く抽出物量が多い限外ろ液の EtOAc 抽出物(B-Et)フラクションなどを大量に調製し、カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、それぞれのフラクションについてアントラセンに対する分解活性を精査することでラッカーゼメディエーターを特定したいと考えている。

天然由来のラッカーゼメディエーターの発見は、グリーンケミストリーを志向した塩素に代替できるパルプ漂白技術や、環境ホルモン類除去といったバイオレメディエーシ

ヨン技術の確立に大いに貢献しうるものであり、各種染料の脱色技術といった工業的応用へも展開しうる可能性は高い。さらには、自然界における天然リグニンの分解にラッカーゼが関与しているのか否かという長年の疑問を解決に導く可能性を秘めており、地球上の炭素循環の解明という極めて重要な基礎研究としての面も持ち合わせていると考えている。

第5章 参考文献

- Adler, E.** (1977) Lignin chemistry - past, present and future, *Wood Sci. Technol.*, **11**: 169-218.
- Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K. A., Moen, M. A. and Hammel, K. E.** (1994) Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett.*, **354**: 297-300.
- Bourbonnais, R. and Paice, M. G.** (1990) Oxidation of non-phenolic substrate. An expanded role for laccase in lignin biodegradation, *FEBS Lett.*, **267**: 99-102.
- Bourbonnais, R. and Paice, M. G.** (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 823-827.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Fretermuth, B., Bodie, E. and Borneman, S.** (1997) Reactivities of various mediators and laccase with kraft pulp and lignin model compound, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4627-4632.
- Boyle, C. D., Krop, B. R. and Reid, I. D.** (1992) Solubilization and mineralization of lignin by white-rot fungi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3217-3224.
- Crawford, R. L.** (1981) Lignin biodegradation and transformation, pp. 99-104, Wiley-Interscience, New York.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D. and Eriksson, K. -E.** (1995) Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabaric acid, *FEBS Lett.*, **376**: 202-206.
- Fåhraeus, G. and Reinhammer, B.** (1967) Large scale production and purification of laccase from culture of the fungus *Polyprus vesicolor* and some properties of laccase A, *Acta. Chem. Scand.*, **21**: 2367-2378.
- Hattaka, A.** (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi : production and role in lignin degradation, *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**: 125-135.
- 樋口隆昌 (1979) リグニンの化学 中野準三編、ユニ出版、pp. 303-308.
- Higuchi, T.** (1971) Formation and biological degradation of lignins. *Adv. Enzymol.*

34: 207.

Higuchi, T. (1985) Biosynthesis and biodegradation of wood components. (Higuchi, T. Ed.) pp.141-160, 557-558, Academic Press, Orlando, Florida.

Higuchi, T. (1990) Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation, Wood Sci. Technol., **24**: 36-41.

Hirai, H., Nakanishi, S. and Nishida, T. (2004) Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. Chemosphere, **55**: 641-645.

稲垣真澄 (2002) ハタケチャダイゴケ (*Cyathus stercoreus*) によるリグニン分解—ラッカーゼメディエーターの検索と非フェノール性 β -O-4 型リグニンモデル化合物の分解—、岐阜大学農学部修士論文.

Johannes, C., Majcherczyk, A. and Hüttermann, A. (1996) Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol., **46**: 313-317.

Katagiri, N., Tsutsumi, Y. and Nishida, T. (1997) Biobleaching of softwood kraft pulp by white-rot fungi and its related enzymes. Mokuzaï Gakkaishi, **48**: 678-685.

Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N. and Haraguchi, T. (1987) C α -C β cleavage of phenolic β -1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. Mokuzaï Gakkaishi, **33**: 792-797.

Kawai, S., Umezawa, T. and Haraguchi, T. (1988a) Degradation mechanisms of phenolic β -1lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. Arch. Biochem. Biophys., **262**: 99-110.

Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M. and Higuchi, T. (1988b) Aromatic ring cleavage of 4,6-di(*tert*-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. FEBS Lett., **236**: 309-311.

Kawai, S., Umezawa, T. and Higuchi, T. (1989) Oxidation of methoxylated benzyl alcohol by *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde, Wood Res., (76): 10-16.

- Kawai, S., Asukai, M., Ohya, N., Okita, K., Ito, T. and Ohashi, H.** (1999a) Degradation of a non-phenolic β -*O*-4 lignin substructure and of polymeric lignin model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. FEMS Microb. Lett., **170**: 51-57.
- Kawai, S., Nakagawa, M. and Ohashi, H.** (1999b) Aromatic ring cleavage of a non-phenolic β -*O*-4 lignin model dimer by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. FEBS Lett., **446**: 355-358.
- Kawai, S., Nakagawa, M. and Ohashi, H.** (2002) Degradation mechanisms of a non-phenolic β -*O*-4 lignin model dimer by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. Enz. Microb. Technol., **30**: 482-489.
- Kawai, S., Iwatsuki, M., Nakagawa, M., Inagaki, M., Hamabe, A. and Ohashi, H.** (2004) An alternative β -ether cleavage pathway for a non-phenolic β -*O*-4 lignin model dimer catalyzed laccase-mediator system. Enz. Microb. Technol., **35**: 154-160.
- Kersten, P. J., Kalyanalam, B., Hammel, K. E., Reinhammar, B. and Kirk, T. K.** (1990) Composition of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes, Biochem. J., **268**: 475-480.
- Kofujita, H., Ohta, T., Asada, Y. and Kuwahara, M.** (1991) Purification and characterization of laccase from *Lentinus edodes*. Mokuzai Gakkaishi, **37**, 562-569.
- 太田 明, 本田与一 (2002) 木材科学講座 11 バイオテクノロジー 片山義博ら編、海青社、pp. 107-108, pp. 119-120.
- Orth, A. B., Royse, D. J. and Tien, M.** (1993) Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi, Appl. Environ. Microbiol., **59**: 4017-4023.
- 杉浦純、福永信幸 (1999) 酵素によるクラフトパルプ漂白技術、Bio Industry, **16**: 40-47.
- Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H. and Nishida, T.** (2003) Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. Water Res., **37**: 1972-1975.

- Tamagawa, Y., Hirai, H., Kawai, S. and Nishida, T.** (2005) Removal of estrogenic activity of endocrine-disrupting genistein by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, **244**: 93-98.
- Tamagawa, Y., Yamaki, R., Hirai, H., Kawai, S. and Nishida, T.** (2006) Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* **65**: 97-101.
- Tien, M. and Kirk, T. K.** (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.*, **161**: 238-249.
- Tsutsumi, Y., Haneda, T., and Nishida, T.** (2001) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere*, **42**: 271-276.
- Yokota, S., Umezawa, T. and Higuchi, T.** (1991) Degradation of phenolic β -O-4 lignin model dimers by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Mokuzai Gakkaishi*, **37**: 535-541.