

# 漆ラッカーゼの至適pHの測定

高分子系チーム 池永 誠, 橘 洋一

## 要 旨

伝統的な塗料である漆は、植物由来の環境負荷の低い材料として注目されている。漆の硬化は、漆中にわずかに含まれるラッカーゼの酵素反応により達成される。そのためラッカーゼの酵素反応における至適条件を調べることは、漆の硬化反応を制御するためには非常に重要である。これまで報告された漆ラッカーゼの至適pHにはばらつきがあった。そこで、改めて漆ラッカーゼの至適pHの測定を行ったところ、グアイアコール基質においてpH 8.8、カテコール基質においてpH 8.4であった。報告された至適pHにばらつきがあった要因の一つは、基質の非酵素的酸化反応によって生成する過酸化水素がラッカーゼ活性を阻害するためであると推察する。

## 1. 緒言

東アジア地方で古くより塗料として利用されている漆は、植物由来の環境負荷の低い材料として注目されている。一般的な塗料の硬化は、溶剤の揮発、熱や光による重合反応、または主剤と硬化剤の化学反応により起こる。一方、漆の硬化は、漆中にわずかに含まれるラッカーゼの酵素反応により達成される<sup>1)</sup>。ラッカーゼは、植物や菌類などに広く存在する酸化還元酵素であり、図1に示すフェノール化合物の酸化反応を触媒する機能を有する。漆の主成分は、ウルシオールというフェノール化合物であり、ウルシオールがラッカーゼにより酸化され、さらに酸化体が反応することで漆の硬化が起こる<sup>1)</sup>。そのため、ラッカーゼの性質を調べることは、漆の硬化反応を制御するために非常に重要である。

酵素反応は、pHや温度などそれぞれに最適な条件があり、同じ種類の酵素においても由来によってその条件

は異なる。これまでの先行研究において、漆に含まれるラッカーゼの至適pHについて様々な報告がされてきた<sup>2-6)</sup>。天然物であるため、ある程度のばらつきは予想されるが、報告された至適pHの値には大幅なばらつき(5.6-9.0)があり、正確な値は未だ不明である。これまでの我々の研究により、塩基性のウルシオールから過酸化水素が生成し、その過酸化水素が漆ラッカーゼの活性を阻害することを見出した<sup>7,8)</sup>。つまり、漆ラッカーゼの至適pHの測定において、生成される過酸化水素の影響を考慮に入れる必要がある。そこで、本研究では改めて漆ラッカーゼの至適pHについて検討を行い、過去の報告の値にばらつきがあった要因について考察を行った。

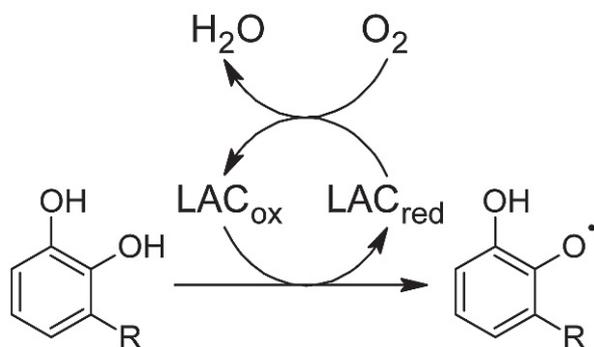
## 2. 実験方法

### 2.1 材料

実験に用いた試薬は、富士フィルム和光純薬社製のものを使用した。漆ラッカーゼは、佐藤喜代松商店より購入した中国産の生漆より抽出したのものを使用した。生漆は、ウルシノキより採取した漆液を濾過のみ行ったものである。

### 2.2 漆ラッカーゼの活性の測定

生漆10 gに30倍重量のアセトンを加え、濾過、乾燥してアセトン不溶物を得た。この不溶物に5倍重量の水を加え、沈殿物を遠心分離によって除去し、得られた水溶液を漆ラッカーゼ溶液とした。この溶液を所定のpHのBritton-Robinson緩衝液で2倍に薄め、pH調整溶液を作製した。緩衝液による希釈後の漆ラッカーゼの濃度は、8.4 g/Lであった。漆ラッカーゼ溶液と同



## ウルシオール

図1. ウルシオールとラッカーゼ (LAC) による反応  
Rは飽和もしくは不飽和の長鎖炭化水素。  
下付き文字のoxは酸化体, redは還元体を表す。

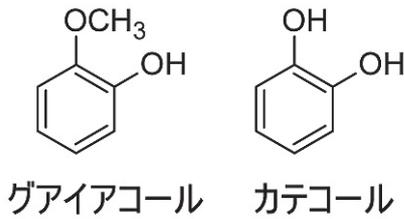


図2. 本実験に用いた基質の構造式

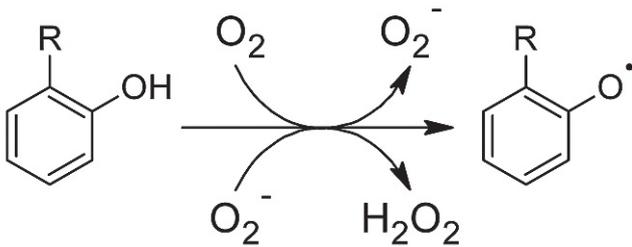


図3. フェノール化合物の非酵素的酸化反応  
Rは置換基を表す。

じ緩衝液で希釈した50 mmol/Lのグアイアコール、及び25 mmol/Lのカテコール水溶液を漆ラッカーゼの基質溶液として調製した。グアイアコールとカテコールの構造式を図2に示す。基質溶液3 mLを25 °Cの恒温槽内の容器に移し、酸素電極（YSI社製 YSI 5300A）を取付けて攪拌し、そこにpHを調整した漆ラッカーゼ溶液を20 μL加えて、酸素の消費速度を測定した。基質のフェノール化合物は、ラッカーゼによる酸化反応だけでなく、図3に示す非酵素的酸化反応<sup>7)</sup>により空気中の酸素を消費することで自動的に酸化反応が進行する。そこで、基質の非酵素的酸化反応のみによる酸素消費の測定を同様に行い、正確なラッカーゼの酵素活性を測定した。測定した酵素活性から、それぞれの基質で最も活性が高かった値を100%として相対活性を算出した。

### 3. 実験結果と考察

グアイアコールとカテコールを基質に用いた漆ラッカーゼにおける相対活性の結果を図4に示す。この結果、漆ラッカーゼの至適pHは、それぞれ塩基性のpH 8.8及びpH 8.4であった。pHを更に増加させた場合、カテコール基質を用いた測定では、pHが9.6より高い領域において測定できなかった。これは、フェノール化合物の非酵素的酸化反応（図3）の速度が、酸性から塩基性になるにしたがって増加し<sup>7)</sup>、ラッカーゼによる酸化反応を検出できなくなったためである。

本研究では、漆ラッカーゼの酸化反応における至適pHを見出すことを目的とする。そのために、非酵素的酸化反応によって生成する過酸化水素（図3）がラッカーゼ活性を阻害することが問題であった<sup>7, 8)</sup>。特に、高いpH領域において、非酵素的酸化反応に伴う過酸化水素の生成が増加することから、過酸化水素によるラッカーゼ活性の阻害が強くなり、誤差が生じやすくなる。そのため、本実験では、基質溶液の作成から活性の測定まで速やかに行うことで、非酵素的酸化反応による過酸化水素の生成を可能な限り排除した。

過去の研究において、同じカテコール基質を用いて測定した漆ラッカーゼの至適pHは7.6と報告<sup>2)</sup>されている。しかしながら、本実験での至適pHは8.4と高い値となった。この差は、過酸化水素が生成しやすい塩基性領域にて、時間経過により生成した過酸化水素が、ラッカーゼ活性を強く阻害することを考慮に入れていないためと考えられる。また、フェノール性ヒドロキシ基が1つである基質として図5に示す2,6-ジメトキシフェノール、イソオイゲノール、及びコニフェリルアルコールを用いた漆ラッカーゼの至適pHは、それぞれ8.5、8.5-9.0、及び8.5-9.0と報告されており、今回のグアイアコールの測定と良い一致を示した<sup>5, 6)</sup>。この一致は、グアイアコールを含むこれらフェノール性のヒドロキシ基が1

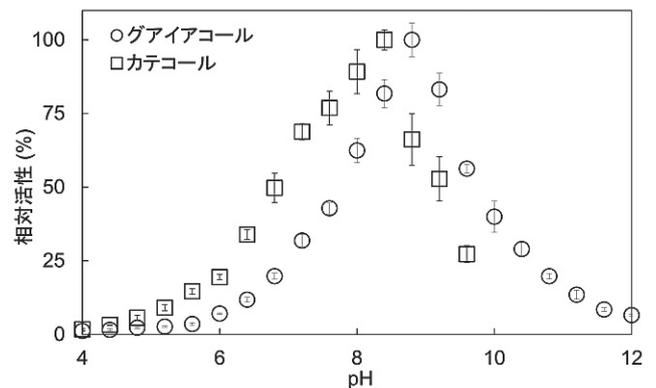


図4. 漆ラッカーゼの相対活性

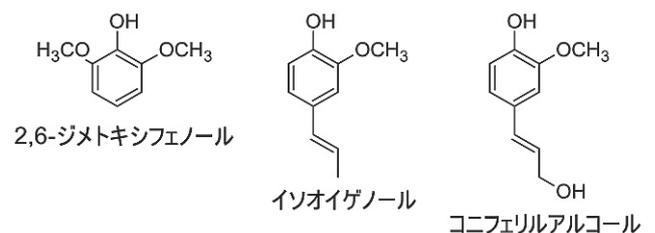


図5. 漆ラッカーゼの至適pHが一致した基質

つの基質がいずれも非酵素的酸化反応を起こさず、ラッカーゼ活性の阻害要因となる過酸化水素が生成しないためと推察される。

#### 4. 結論

今回、漆ラッカーゼの至適pHを測定したところ、グアイアコールでpH 8.8、カテコールでpH 8.4であった。ヒドロキシ基が1つのグアイアコールでは、これまで報告された同様の化合物の至適pHと良い一致を示した。

一方、ヒドロキシ基が2つのカテコールでは、測定時に非酵素的酸化反応が観測され、過去の報告との差が見られた。以上の結果より、至適pHの報告にばらつきがあった要因の一つが、基質の非酵素的酸化反応によって生成する過酸化水素がラッカーゼ活性を阻害するためであると推察される。

#### 参考文献

- 1) 寺田晁, et al.: “漆—その科学と実技”, 理工出版社, (1999).
- 2) Tsuneo Omura: The Journal of Biochemistry, 3, 50 (1961).
- 3) 小田圭昭, et al.: 日本農芸化学会誌, 36, 6 (1962).
- 4) 鈴鹿清之助: 工芸研究, 29 (1963).
- 5) Tadahiro Shiba, et al.: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 10, 6 (2000).
- 6) Rong Lu, and Tetsuo Miyakoshi: Enzyme Research, 2012 (2012).
- 7) Makoto Ikenaga, et al.: Progress in Organic Coatings, 138 (2020).
- 8) 池永誠, et al.: 京都市産業技術研究所研究報告, 9 (2019).