

目的別テーマ：新規バイオファイバーの産生

研究テーマ

15-2-4：セルロース生産微生物による機能性セルロースの創製

—セルロース合成における高次構造制御—

ABSTRACT

Cerboxymethylcellulose (CMC) degrading activity and various sugars in addition to cellulose were detected in the culture broth after one day culture of Acetobacter xylinum. Cellulose morphology changed as it was cultured in the presence of oligosaccharides such as gentiobiose and cellobiose. It is confirmed that cellulose structures such as the width of microfibril and cellulose ribbon, the crystallinity, and the ratio of Ia and Ib were different from native bacterial cellulose when it was cultured in SH medium with oligosaccharides. It is proposed that cellulose production was influenced with the amount of cellulase produced in the culture broth, because the activity of cellulase produced in the medium containing with gentiobiose was higher than that in normal medium.

*Asaia bogorensis is a kind of acetic acid bacteria newly isolated from tropical plants. We found that it produced cellulose-like polymer though there is no report that this strain produces cellulose before. We clarified the structure of cellulose by using FT-IR, ¹³C-NMR, FE-SEM and enzymatic degradation (cellulase). Furthermore we confirmed *A. bogorensis* had the cellulose synthesis gene that has the homology to *Acetobacter xylinum* cellulose synthase gene *bcsA*.*

研究目的

セルロースは地球上で最も多く生産される天然ポリマーであるが、その合成機構には未解明な部分も多い。そこで、植物のセルロース合成のモデルケースとして、酢酸菌 *Gluconoacetobacter xylinus* を用いたセルロース合成メカニズムに関する報告が多数なされてきた。酢酸菌の生産するセルロースは植物由来のセルロースと著しく高次構造が異なっており、特徴的な物性を示す。我々は、*A. xylinum* 培養過程において、培地中には様々なオリゴ糖類が蓄積されていること、さらに培地中にβ-グルコ2糖を添加した時セルロースの形態が変化することを見出した。そこで、このセルロースの構造について、通常の培地で生産されるものと比較するとともに、その原因について追及することとした。また、これまでセルロース合成の報告のない微生物 *Asaia bogorensis* が培養液表面に薄膜を生成することを見出したので、この薄膜を構成する物質についてその構造を明らかにすると共に、その合成系遺伝子をクローニングすることを目的に研究を行った。

5年間の研究内容と成果

酢酸菌 *G. xylinus* をβ-グルコ2糖類を添加した培地で培養すると、生産されるセルロースの形態が変化することを初めて見いだした。このときのセルロースの構造を詳細に検討し、リボンおよびマイクロフィブリルのサイズが減少すること、これにより酵素吸着性が高くなり、生分解性が高くなること、また生産されたBCシートの強度が上がることを示した。また、この時セルロースの結晶構造も変化し、ゲンチオビオース添加培地で生産されたBCはアモルファス領域が増加することが明らかとなった(図1)。この傾向は特にゲンチオビオースを添加した時に最も顕著であるが、この糖はアセタンの構成糖でもあり、培地中にも少量生産されていることが明らかになっている。さらに、ゲンチオビオース添加培地ではセルラーゼ(CMCax)の生産も高く、セルロース生産における本酵素の関与を裏付けるものと考えられた。また、この酵素の性質を明らかにした。

次に *A. bogorensis* を静置培養すると培養液表面に薄膜を形成することがわかった。この薄膜を精製し電子顕微鏡により観察すると、*G. xylinus* 由来のバクテリアセルロースより幅の狭い微細なファイバーが観察された(図2)。多段階における精製を経た後FT-IRにより分析を行った結果 *G. xylinus* 由来のセルロースと類似のスペクトルが得られた(図3)。

セルロース合成遺伝子の解析ではPCRにより得られたDNA断片をシークエンスして塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を比較したところ、既知のセルロース合成遺伝子 *bcsA* と57%の相同性が認められた。これらのことから *A. bogorensis* は従来のバクテリアセルロースよりさらに微細なセルロースファイバーを生成していることが明らかとなった。

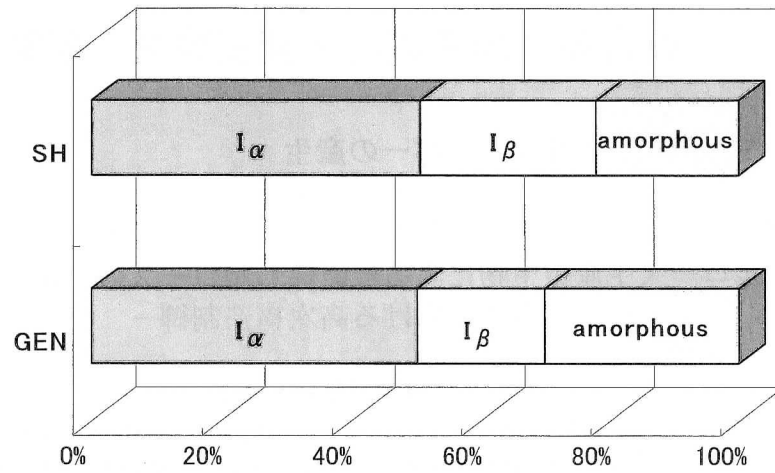


図1. セルロースの結晶系の変化

SH : コントロール培地,

GEN : ゲンチオビオース添加培地

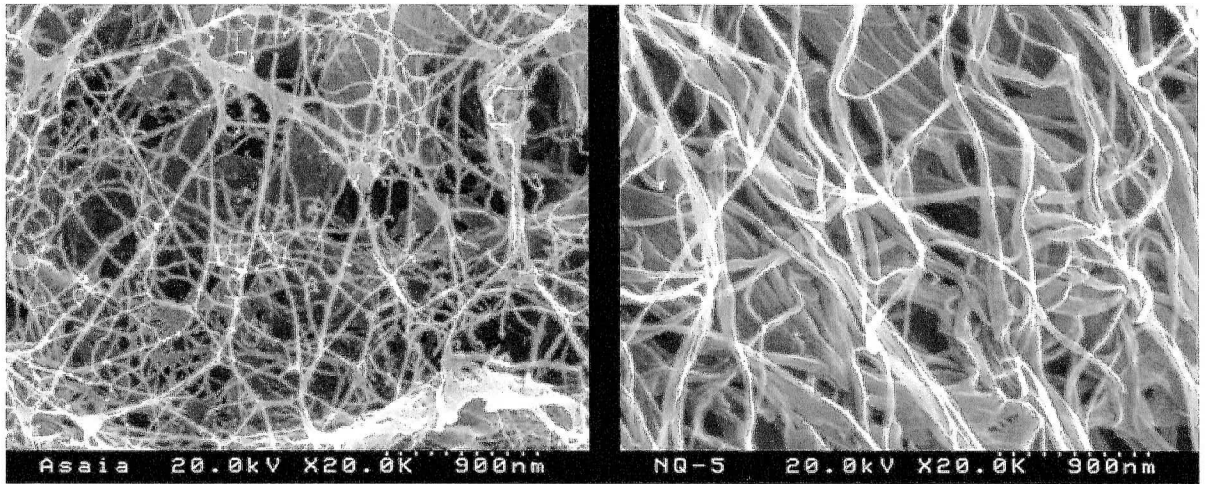


図2. セルロースファイバーの電子顕微鏡像 (FE-SEM)

左: *Asaia bogorensis* が生成したセルロースファイバー、

右: *Gluconoacetobacter xylinus* が生成したセルロースファイバー

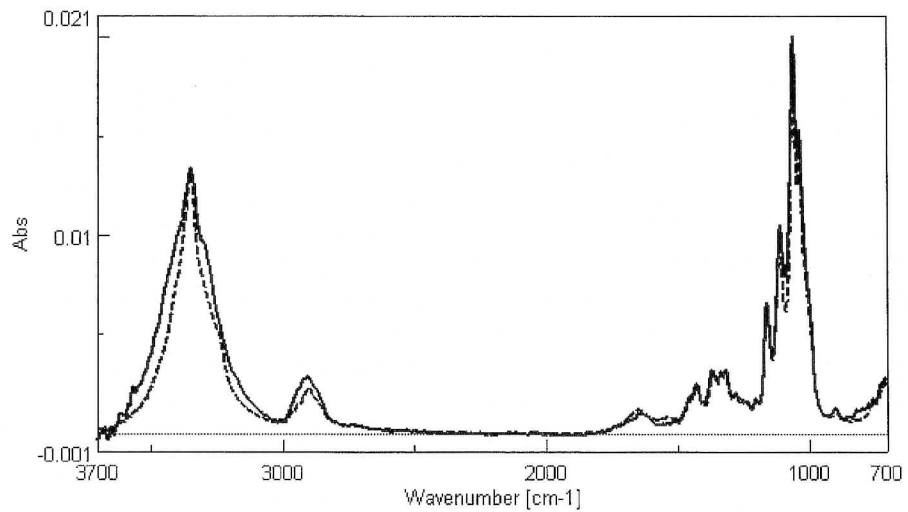


図3. 生成したセルロースのFT-IRスペクトル

実線: *Asaia bogorensis* の生成したセルロース

点線: *Gluconoacetobacter xylinus* が生成したセルロース