

## 枯草菌による長鎖レバンの高生産

(信州大・織) 関口順一、志田敏夫、山本博規、矢嶋征雄

枯草菌は納豆生産に使われる納豆菌の類縁菌であり、毒素の生産性や人体への寄生性のない安全な細菌である。グラム陽性の代表的な細菌として広く研究されていて、全ゲノム配列が決定された微生物でもある。α-アミラーゼやプロテアーゼなどの有用タンパク質を多量に培地中に分泌する能力を持ち、さらに遺伝的改変が容易であるという特徴を持っている。枯草菌が分泌するタンパク質の1つにレバンシュークラゼがある。レバンシュークラゼはショ糖を原料に、フルクトースがβ-2,6結合した多糖レバン(フルクタン)を合成する酵素である。しかし、枯草菌はこのレバンを分解する酵素であるレバナーゼも生産していて、レバンの鎖長はさほど長くないことが分かっている。

本研究ではこのレバンをバイオファイバーとして利用するために、より鎖長の長いレバンを高生産する株の作成を試みた。レバン高生産株として、枯草菌327UH株を選んだ。枯草菌327UH株はレバン合成酵素レバンシュークラゼを過剰生産し、レバンを高生産する株として知られている。しかし生産されたレバンはレバナーゼにより低分子化していると思われるため、枯草菌327UH株のレバナーゼ欠損株を作成し、欠損株の生産するレバンと元株の生産するレバンについて比較した。

レバン分解酵素レバナーゼをコードする*sacC*遺伝子中に2回交叉によりクラフェニコール耐性遺伝子を挿入することで*sacC*を挿入失活させた枯草菌327UHΔ*sacC*株を作成した。作成した327UHΔ*sacC*株と元株327UHのレバン生産量は非常に高く、培地に加えたシュークロースの約60%をレバンに転化していることが分かった。両株とも菌体増殖及びレバンの生産量にはほとんど差が見られなかった。両株で生産されたレバンの平均鎖長を調べたところ、327UH株の生産するレバンは約10、327UHΔ*sacC*株の生産するレバンは約33であり、レバナーゼ遺伝子*sacC*を欠失させることでレバンの鎖長が約3倍になることが分かった。しかし、レバナーゼを失活させたはずの327UHΔ*sacC*株の生産するレバンの中にレバナーゼにより分解を受けたと思われるものがあり、SacC蛋白質以外にもレバンを分解する酵素を枯草菌が持っていることが示唆された。

枯草菌には*sacC*と相同性の高い*yveB*という遺伝子がある。レバナーゼ活性を持つと思われるYveBタンパクを失活させることによりレバンの鎖長がさらに長くなることが期待でき、*B. subtilis* 327UH株の*sacC*と*yveB*の二重欠損株を作成すること計画している。それと同時に枯草菌の培養条件の最適化をはかり、レバンの鎖長をさらに長くすることを試み、ショ糖のレバンへの転化率の向上も目指すことが必要であると思われる。今後、生産された長鎖レバンの物性評価を行い、バイオファイバーとして利用可能であるかどうか検討する予定である。

---

Productiu of Long-chain Levan by *sacC* Insertional Mutant of *Bacillus subtilis* 327UH, Junichi SEKIGUCHI, Toshio SHIDA, Hiroki YAMAMOTO, and Masao YAJIMA: Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science and Tech., Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda, Nagano 386-8567 Japan, Tel 0268-21-5344, Fax 0268-21-5345, e-mail: jsekigu@giptc.shinshu-u.ac.jp