

土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* が生産する 環状多糖とその新生物繊維素材としての利用

馬場茂治・野末雅之・小島峯雄

信州大学 繊維学部 応用生物科学科

緒言

Agrobacterium tumefaciens は植物に腫瘍を引き起こす病原性土壌細菌として古くから知られている。本菌が植物に感染すると、*A. tumefaciens* の Ti プラスミド上に存在する T-DNA 領域が、植物細胞の核染色体 DNA に組み込まれる。T-DNA は植物染色体中で安定に維持され、その遺伝子が発現されクラウンゴールと呼ばれる腫瘍が形成される。その遺伝子伝達の分子機構についての解析が進められており（小島、1995）、*A. tumefaciens*-Ti プラスミドを利用した形質転換系が多くの植物で既に確立されている。*A. tumefaciens* は、菌体表面および培養濾液中に 17 から 40 個のグルコースが β -1,2 結合した環状グルカンを多量に分泌することが以前から知られてきた（Hisamatsu *et al.*, 1983; Paleschi and Crescenzi, 1985; Hisamatsu, 1992）。これらの環状多糖の本菌の病原性発現における役割については必ずしも明確でない（露無、1997）。

環状グルカンは β -1,4 結合からなる直鎖状のセルロースとは異なる特性が予測され、新たな生物繊維素材としての利用を目指し、現在までにグルカン生産性の高い *Agrobacterium* 菌株を探索し、グルカン高生産培養条件を明らかにし、培養濾液および菌株からのグルカン抽出、精製方法の確立を目的として研究を行ってきた。それらの検討により、*A. tumefaciens* による環状グルカ

ン生成系が確立されたが、繊維素材という観点からは十分なグルカン生産性とは言い難い。

今回、今までに確立した *A. tumefaciens* による環状グルカン生成系での生産性について検討した。

2. 実験方法

供試菌として *A. tumefaciens* 野生株（A208 菌）を用いた。本菌を 0.5% (w/v) グルコースを含む AB プレート培地で 1 週間、28°C で継代培養した。

AB プレート培地上の A208 菌を 0.5% (w/v) グルコースを含む多糖生産性前培養培地 10 ml に植菌し、28°C で 2 日間 120 rpm で振盪培養した（前培養）。続いて、4% (w/v) グルコース、0.5% (w/v) 炭酸カルシウムを含む多糖生産性培地 125 ml に前培養菌 10 ml を植菌（合計 135 ml）、28°C、120 rpm で 7 日間振盪培養した。

A. tumefaciens A208 培養液を遠心して得られた上清〔培養濾液〕と沈殿〔菌体〕にそれぞれ別々にエタノールを添加し、不溶性物質を遠心除去した。その上清を濃縮後、エタノールを再度添加し、遠心した。その上清を最後にエバポレーターで濃縮し、その濃縮液をセファデックス LH20 カラム (3 × 50 cm) および DEAE-セルロースクロマトグラフィー (4.2 × 25 cm) で精製した。最後に凍結乾燥し、環状グルカン標品を得た。

結果と考察

今回、*A. tumefaciens* A208 菌を 270 ml の多糖生産性培地で 7 日間培養し、遠心分離により得られた培養濾液および菌体から環状多糖の精製を行った。濾液からの抽出には、99.9%(v/v) エチルアルコールを、菌体には 70% (v/v) エチルアルコールを加え、80°C で 60 分間抽出を行った。

その後、両抽出物を合わせ、セファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーのボイド分画 (分子量 4,000 以上) に溶出された試料を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーに添加し、非吸着分画から中性糖を回収して凍結乾燥した。最後に得られた純白のパウダーを環状グルカン標品とした (図 1)。

今回、上記方法で最終的に得られた標品は、*A. tumefaciens* A208 菌の培養液 270ml から 20~30 mg であった (約 90 mg/Liter)。

細菌による環状グルカンの生成は、*Agrobacterium* 以外にも *Rhizobium* (Hisamatsu *et al.*, 1983) や *Ralstonia* (露無, 1997) でも報告されている。これらの多糖は、大腸菌の MDO (membrane-derived oligosaccharides) あるいは OPG (osmoregulated periplasmic glucans) と呼ばれている。OPG は、低浸透圧環境下でペリプラズムに生産され細菌細胞の浸透圧調整に関与する多糖と考えられている。今回、低張下 (0.5% グルコース) で前培養した *Agrobacterium* を、高張下 (4% グルコース) で培養することによりグルカン生成が誘導されたと考えられる。環状グルカンの浸透圧調節機能あるいは病原性発現における機能の詳細は不明だが、菌本来の生成量はさほど多く無いものと思われる。

繊維素材としての *Agrobacterium* が生産する環状グルカンの利用にあたっては、更なる生産性の向上が重要となろう。



図 1 . *A. tumefaciens* A208 菌が生産する環状グルカン

引用文献

1. Hisamatsu, M., Amemura, A., Koizumi, K., Utamura, T. and Okada, Y. (1983). Structural studies on cyclic(1-2)-beta-D-glucan (cyclosophoraose) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Carbohydrate Research* **121**: 31-40.
2. Hisamatsu, M. (1992). Cyclic (1 → 2)-β-D-glucans (cyclosophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydrate Research* **231**: 137-146.
3. 小島峯雄 (1995). クラウンゴール誘導の分子機構 原核生物から真核生物への遺伝子伝達 科学、65: 171-180.
4. Palleschi, A. and Crescenzi, V. (1985). On the possible conformation of cyclic β (1→2)-D-glucans. *Gazzetta Chimica Italiana* **115**: 243-245.
5. 露無慎二 (1997). 細菌の宿主植物認識における *hrp* と *avr* 遺伝子の役割、分子レベルからみた植物の耐病性、山田哲治他編、pp38-45、秀潤社.