

# ニューバイオテクノロジーによる微生物からの バイオフィ이버、バイオフィバーマテリアル 生産の研究

関口順一\*、兒玉 徹#、志田敏夫\*、矢嶋征雄#、山本博規\*

信州大学 繊維学部 応用生物科学科\*、付属農場#

## 1. 緒言

微生物は多様な能力を発揮して、様々な物質を多量に、短期間に生産することができる。その中には既存のバイオフィバーマテリアルとして重要なもの以外に、新しい種類のバイオフィバーマテリアルとして期待される多糖質、高分子蛋白質やポリエステルの素材と成るものなどが考えられ、それゆえ微生物は潜在能力の高いバイオフィバーマテリアル生産の生物である。一方バイオフィバークとして実用化されたものは少なく、バクテリアセルロースやポリ乳酸などに限られるのが現状である。一般に微生物素材のファイバーは均一素材であり、生分解を持つ意味からも、環境にやさしいファイバーとして期待されている。一方微生物表面を人為的に操作し、細胞表面に特殊な機能を持つ蛋白質を局在化させる技術が急速に発展してきている。この技術を使えば微生物そのものを繊維状化しその上に酵素を多量に、かつ安定に局在化させることができ、種々の機能を有するろ紙としての利用や、バイオリクターへの応用も考えられる。これらのことから、本年度は以下の2つのサブテーマを実施した。(1)細胞表面工学技術を用いて微生物表面に人為的に局在化させた酵素を表面に安定化させる技術の開発、(2)微生物、特に化学独立栄養微生物である水素細菌からバイオポリマーとして多糖質を生産する菌株の分離と培養条件の検討を行なった。

## 2. 実験方法

(1)細胞表面に目的の酵素(枯草菌リパーゼ)を局在させる技法は平成11年度に報告した方法を用いた。プラスミドは細胞壁結合ドメイン(CWB)の遺伝子と枯草菌リパーゼ遺伝子*lipB*とを融合させ(図1)、pHY300PLKに挿入したプラスミドpHCB3RLBを用いた。宿主としては、親株である枯草菌168株または168AB株とともに、表面結合プロテアーゼ遺伝子(*wprA*)欠損株、表面タンパクの多くの発現を支配するシグマD遺伝子(*sigD*)欠損株、ならびに*wprA sigD2*重欠損株を構築し用いた。

(2)バイオポリマー生産性の水素細菌の分離には液体培地として完全無機培地を用い、気相は水素、酸素、二酸化炭素の比率がおおよそ7:2:1になるように調製し、炭素源は二酸化炭素のみにした混合気体を用いた。ガス類の定量はTCD検出器を持つガスクロマト装置で行い、多糖類の定量はフェノール硫酸法で行なった。

## 3. 結果と考察

(1)表面局在化リパーゼ遺伝子を持つpHCB3RLBプラスミドを168株または168AB株、*wprA*欠損株(WA)、*sigD*欠損株(SDC)、*wprA sigD2*重欠損株(WASD)にSpizizenらの方法で形質転換し、形質転換体はテトラサイクリンを含むLB培地で細胞増殖が定常期初期になるまで37°Cで振とう培養を行なった。その後菌体を遠心分離で集めた後、洗浄し、続いて表面のタンパク

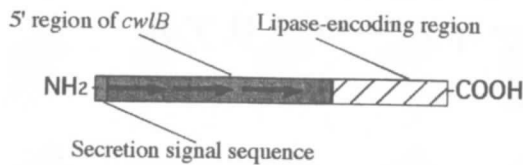


Fig. 1. General structure of the plasmid pHCB3RLB for expression the CWB-LipB fusion protein.

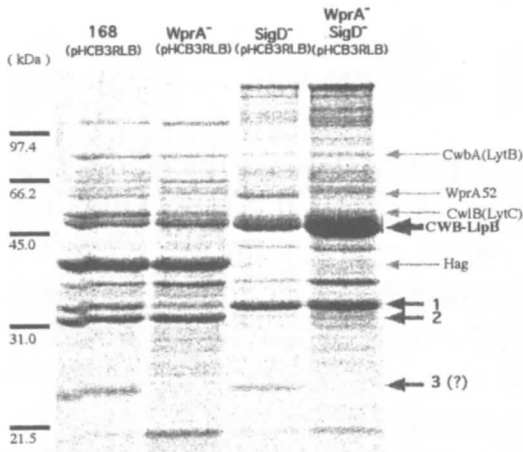


Fig. 2. SDS-PAGE of surface proteins from various mutants harboring pHCB3RLB. Samples were taken at OD = 2.0 and surface proteins were extracted with 3 M LiCl.

を3 MのLiClで抽出した。抽出タンパクはTCA沈殿で濃縮した後、SDS-PAGEで分析した(図2)。その結果 *wprA* 変異株では少量のCWB-LipB(約50kDaタンパク)の蓄積が認められたに過ぎなかったが、*sigD* 変異株では顕著な蓄積効果が認められ、*wprA sigD2* 重欠損株では大量のリパーゼの細胞表層への蓄積が認められた。一方33kDa, 32kDaに強いタンパクバンドが認められ、これらは融合リパーゼ遺伝子を持たない株では認められないことより、CWB-LipBが分解を受け、CWBのドメインの部分が表層に吸着して残ったものと考えられる。

そこで168AB株、*sigD* 変異株、*wprA sigD* 変異株を宿主として、表層局在性リパーゼの生産量を経時的に測定した(図3)。168AB株と比較して *sigD* 変異株、*wprA sigD* 変異株の順に蓄積が向上しているのが解る。しかし定常期中頃から顕著な分解がすべての株で認められた。

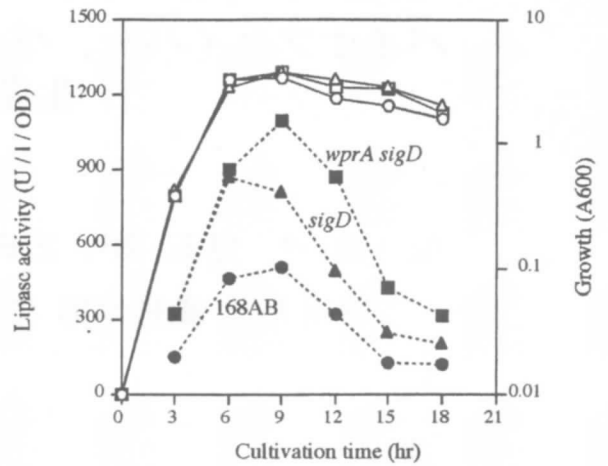


Fig. 3. Yields of CWB-LipB on cell surface. Cells of *B. subtilis* 168AB (*lipA, lipB*), SDC (*sigD*) or WASD (*wprA sigD*) harboring pHCB3RLB were grown in LB medium under inducing conditions. Closed symbols, lipase activity; open symbols, growth.

(2) バイオポリマー生産のためのスクリーニングの結果、3-4種類の水素資化性微生物を得ることができた。その中でM7と名付けた菌は他の分離株および多糖類を生産することが知られている *Pseudomonas hydrogenovora* と比較して菌の生育および多糖の生産量とも明らかに優れていた。この菌株を2 L-容ジャー・ファーメンターにより培養を行なった。その結果混合気体を毎分0.27 L供給し、30°C、攪伴回転数500rpmの条件下、約60時間の培養で培養液1 L当り乾燥菌体量約25g/L、多糖生産量2g/Lが得られた。

多糖生成パターンは *P. hydrogenovora* の場合と対比的に増殖が止まると多糖の生産も止まるように思われた。菌体量が20g/Lを越える50時間目頃から培養液の粘性により気相との接触が悪くなったと思われたため115時間目に回転数を上げたところ、多糖の生成量は向上した。

#### 4. 結論

1. *wprA sigD2* 重欠損株を宿主に用いることにより、顕著に表層局在性リパーゼ量を向上させることができた。
2. 新たに水素資化性菌を分離し、ジャー・ファーメンターで培養したところ、1 L当り2gの多糖を生産することができた。