

# 土壤細菌 *Agrobacterium tumefaciens* の生産する 繊維状および環状多糖に関する研究

小島峯雄・野末雅之

信州大学 繊維学部 応用生物科学科

## 1. 緒言

*Agrobacterium tumefaciens* は、植物に外来遺伝子を導入するための形質転換用ベクター系として現在盛んに用いられているグラム陰性の土壤細菌である。本菌は、培地中に多量のセルロース（繊維状）や cyclic  $\beta$  1,2-glucan（環状）等の多糖を分泌することが知られており、それら多糖を用いた新たな生物繊維素材の開発を目指すことを目的として本研究を開始した。昨年度、当研究室で保有している多数の *A. tumefaciens* 菌株や変異株を用いて、上記の多糖類の生産性について比較検討した。その結果、*Agrobacterium* 変異2菌株（いずれもトランスポゾン Tn5 挿入による変異株）の  $\beta$  1,2-glucan の合成能が、野生株に比べ著しく低下していることがわかった。

そこで、本年度は *Agrobacterium* 野生菌株を用いて効率的な多糖生産条件および菌体、培養濾液からの精製方法について検討した。

## 2. 実験方法

### 供試菌株と培養方法

*A. tumefaciens* 野生株（A208菌）を本研究に供試した。A208菌は、0.5% (w/v) グルコースを含む AB プレート培地で1週間おきに28℃で継代培養した。

### 多糖生産のための培養方法

AB プレート培地上の A208 菌のシングルコロニーを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℃で2日間120 rpm で振盪培養した。

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 に先に2日間培養した前培養菌10 ml を植菌し、28℃で120 rpm で6日間振盪培養し多糖を生産させた。

### 培養濾液からの多糖の抽出と精製

28℃、6日間培養した A208 菌（135 ml）を10,020 g で60分間遠心し、得られた上清に2倍量のエタノールを加え、4℃に一晩置いた。続いて、10,020 g で60分間遠心し、その上清をエバポレートし約1/10に濃縮した。それに2倍量のエタノールを加えて、生じた不溶物を16,000 g で30分遠心して除去した。その上清を4倍量のエタノールで希釈し、16,000 g で30分間遠心した。得られた上清に含まれるエタノールをエバポレーターで除去し、DEAE-セルロースカラム（1.6×5 cm）に添加した。蒸留水で非吸着多糖を溶出した後、1 mM KCl および1-15 mM KCl 直線的濃度勾配で吸着した多糖を溶出した。各溶出分画の多糖をフェノール硫酸法で定量した。最後に、中性多糖分画（非吸着分画）を凍結乾燥した。

### 菌体からの多糖の抽出と精製

6日間培養した A208 菌（135 ml）を上記のように遠心し、得られた菌体を含む沈殿分画に少量の5 N HCl を加えて炭酸カルシウムを溶解した。16,000 g で30分間遠心後の沈殿に、200 ml の70% エタノールを加え、80℃で60分間ボイルし多糖を抽出した。続いて、16,000 g で30分間遠心して、その上清をエバポレーターで濃縮しエタノールを除去し、上記の培養濾液の場合と同様に、DEAE-セルロースカラムに添

加し、多糖を溶出した。溶出された分画の多量をフェノール硫酸法で定量し、中性多糖を含む非吸着分画を凍結乾燥した。

### 3. 結果と考察

*A. tumefaciens* 野生株 (A208菌) を高濃度グルコース含有(4%, w/v)培地で培養し、その濾液および菌体から多糖を抽出し、中性多糖である  $\beta$  1,2-glucan (cyclophorans) をイオン交換クロマトグラフィーで精製した。培養濾液および菌体ともに、大部分の多糖が中性多糖として非吸着分画に溶出された (Fig. 1)。

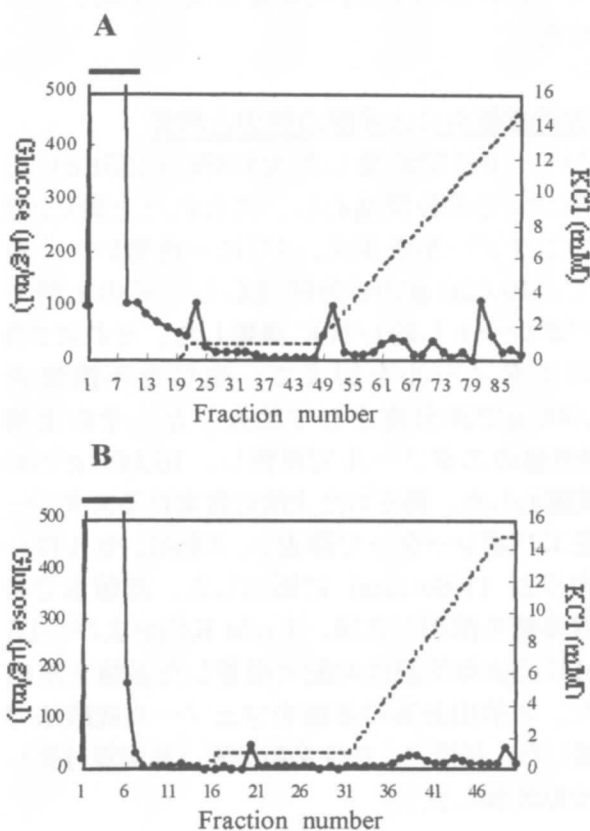


Fig. 1 DEAE-cellulose column chromatography of the polysaccharides prepared from culture filtrate (A) and cell-surface (B) of *A. tumefaciens* A208 strain. Samples (ca. 15 ml) were applied to a column, and eluted with water, 1 mM KCl and then with a linear gradient of 1 to 15 mM KCl (.....). Fractions (120 drops) were analyzed for carbohydrate by phenol-sulfuric acid method (—). Bars indicate the fraction of neutral  $\beta$ 1-2 glucans.

今回は、15 mM以上のKCl濃度での溶出は行わなかったが、*A. tumefaciens* A208菌が生産する多糖の大部分は中性多糖であると思わ

れる。また、今回培養濾液中から抽出された  $\beta$  1,2-glucan量は、菌体から抽出量の約1.7倍であった。しかし、A208菌野生株と2変異株との  $\beta$  1,2-glucan生産量を比較した昨年度の結果では、いずれの菌株でも、濾液よりも菌体からの  $\beta$  1,2-glucan抽出量の方が高い値を示した。この相違の原因が菌の培養条件あるいは培養日数の違いに基づくものかもしれないが、今回の検討からは明らかでない。

*A. tumefaciens* A208菌の生産する多糖の大部分は、細胞外へ分泌されると思われる。その一部は、細胞壁(細胞表面)に結合(菌体結合型)し、何らかの生物学的機能を果たしていると考えられる。そしてその他の多糖は、培養濾液の中に放出(遊離型)されることになる。これら両者の多糖間で、どのような構造および生化学的な特性に相違があるのかは明らかでない。

今後、培地中のグルコース濃度等の培養条件の  $\beta$  1,2-glucan生成量に対する影響、また菌の増殖過程と  $\beta$  1,2-glucan生成量および菌体と濾液中での存在比との関係について検討を行う。そして、*A. tumefaciens* A208菌によるより効率的な  $\beta$  1,2-glucan生成法を確立し、新たな生物繊維素材としての特性と可能性について多角的に検討する。

### 4. 結論

*A. tumefaciens* A208菌を高濃度(4%, w/v)グルコースを含む培地で培養し、その培養濾液および菌体から多糖を抽出し、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで精製した。その結果、菌体および培養濾液とも中性多糖である  $\beta$  1,2-glucanが抽出された多糖の大部分を占め、非吸着分画に回収されることがわかった。また、培養濾液中から抽出、精製された  $\beta$  1,2-glucan量は、菌体からの精製された量の約1.7倍であった。