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ァイバー、バイオファイ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

微生物の多様な能力を利用して，バイオファイバー、バイオファイバーマテリアルを生産する試みは、バクテリアセルロース等で一部実用化され、均一成分からなる生分解を持つ素材として期待されている。一方微生物の生産するバイオファイバーの報告は少なく、今後バイオファイバー、バイオファイバーマテリアル生産菌の検索と高生産化技術の開発が必要である。

本研究テーマの下で，以下の３つのサブテーマを実施した。(1) 微生物の生産するβ-2,6-フルクタンであるレバンの高生産とファイバーマテリアルとしての利用の検討、(2)細胞表層工学技術を用いた微生物表層へのタンパク質の人為的局在化と、それら微生物を用いたバイオポリマーの高生産法、バイオポリマーの改質法の検討、(3)微生物からのバイオポリマー生産株の分離である。

2. 実験方法

(1) レバン生産菌として枯草菌327UH(*his-1 smo-1 degU32*(Hy))を使用した。この株はlevansucraseを過剰発現する株として知られており、レバンの生産に適していると考えた。培地は無機塩類を多く含み、そこに0.2%の酵母エキスを加えたＣ培地、栄養源の豊富なＬＢ培地を基本に、それに20%ショ糖または10%グリセリンを加えて用いた。培養は37℃で行ない、経時的にサンプルを取り、遠心後上澄みに33%の終濃度になるようにエタノールを加え、レバンを沈殿させた。

(2) 細胞表層に目的の酵素を局在させる技法を確立するため、枯草菌細胞壁溶解酵素の細胞壁結合ドメイン(CWB)の遺伝子をPCRで増幅させた。一方局在化させたいタンパクとしてレバンシュクラーゼが考えられるが、酵素活性の測定の容易さと、基礎的知見を確立する目的で、本年度は枯草菌リパーゼ遺伝子*lipB*を用いた。クローニングのための宿主として大腸菌JM109、枯草菌として*lipAB*欠損株であるAB株を用いた。プラスミドとしては、大腸菌ー枯草菌シャトルベクターであるpHY300PLKを用いた。

(3) バイオポリマー生産株の分離には種々の培地を用いた。

3. 結果と考察

枯草菌327UH株をＣ培地＋20%ショ糖、Ｃ培地＋20%ショ糖＋10%グリセリン、ＬＢ培地＋20%ショ糖の培地で培養して、ショ糖からのレバンの生成率を調べたのが図１である。Ｃ培地にショ糖を加えた培地が最も高い変換率(52%)を示した。一方ＬＢ培地＋20%ショ糖を用いた場合、細胞増殖は最も盛んであったが、逆にレバンの生産率は低いものであった。

培養経過中のレバンの性質では、菌体濃度がOD=1の増殖の初めの時期に、アルコール沈殿で明瞭にレバンが析出してきたが、一方培養時間の経過とともアルコール添加後の析出が悪く、遠心分離をしなければならなかった。この結果は培養の経過とともに絶対量のレバンの生産

は増えて行くが、レバン分解酵素であるlevanaseにより、分解を受け、鎖長が短くなっているものと思われる。

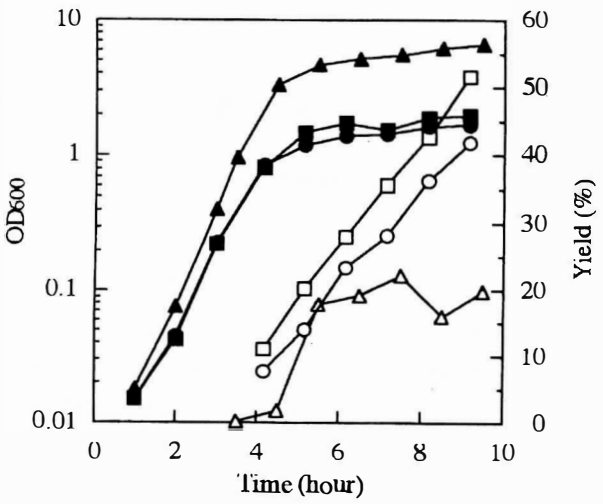

Fig. 1 Time course of levan production.
Squares, C medium + 20% sucrose;
circles, C medium + 20% sucrose + 10% glycerol;
triangles, LB medium + 20% sucrose

枯草菌表層へのリパーゼの人工的局在化のため、細胞壁結合ドメイン(CWB)の遺伝子をPCR増幅し、pHY300PLKの*Eco*RI、*Bam*HI部位に挿入し、pHCB3Rプラスミドを作製した。続いてリパーゼB遺伝子もPCR増幅し、この増幅断片を制限酵素処理し、pHCB3RのCWB遺伝子の直後に挿入し、pHCB3RLBを作製した（図２）。

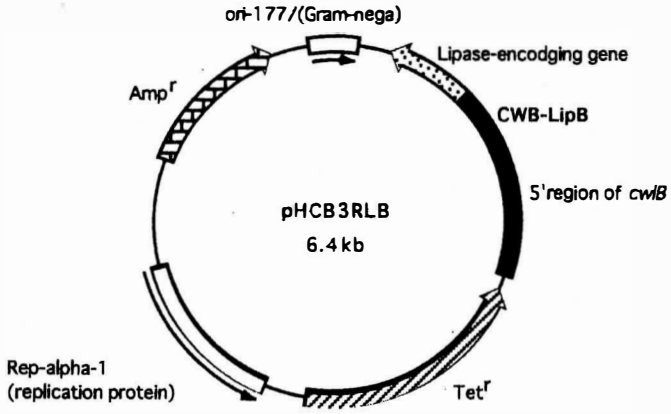

Fig. 2. Constructed plasmid pHCB3RLB

枯草菌をpHY300PLK、CWBをコードするpHCB3R、CWB-LipBをコードするpHCB3RLBを用いて形質転換し、それらの菌体より表層タンパクを5M LiClで抽出し、SDS-PAGEで分析した結果を図３Ａに示した。pHCB3Rを持つ菌体では、CWBタンパクに相当するおよそ31kDaのタンパクのバンドが認められた。抽出したCWBタンパクを再度細胞壁と吸着させ、吸着したタンパクを5M LiClで再度溶出した結果、CWBタンパクが細胞壁に再吸着したことが解った。一方、CWB-LipBをコードするpHCB3RLBを持つ菌株では47kDa付近にpHCB3Rには見られないバンドが現れ、さらにこのタンパクは弱いながらも細胞壁に再吸着することが解った（レーン５、６）。一方、zymographyの結果より、47kDaバンドがリパーゼ活性を示した。これらのことよりCWB-LipB融合タンパクは細胞表層に局在化し、リパーゼ活性を保持しているものと考えられる。それゆえ本方法はlevansucrase遺伝子にも適応できると考えられる。

微生物からのバイオポリマー生産菌の検索は現在継続中である。

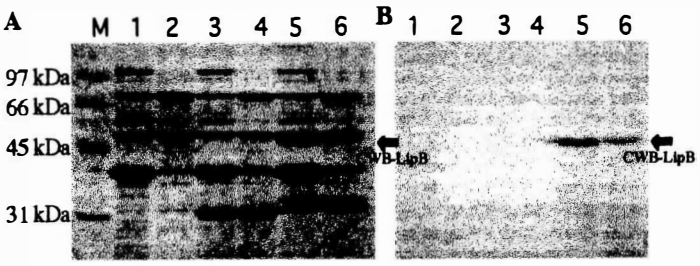

Fig. 3. SDS-PAGE (A) and Zymography (B) of crude and cell wall binding proteins from 168AB (*lipA lipB*) harboring pHY300PLK, pHCB3R or pHCB3RLB. M, protein marker (BIORAD) ; lanes 1, 3, and 5, 5M LiCl extracts ; lanes 2, 4, and 6, extracts after cell wall binding. Lanes 1 and 2, *B. subtilis* (pHY300PLK) ; lanes 3 and 4, *B. subtilis* (pHCB3R) ; lanes 5 and 6, *B. subtilis* (pHCB3RLB).

４．結論

１。52%収率ではあるがショ糖からレバンを生産する技術が確立できた。

２。細胞表層にタンパクを局在化する技術を確立した。