土壌細菌*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*はグラム陰性の土壌細菌の一つで、双子葉植物に感染し、癌（クラウンゴール）を誘導する能力を持つ。近年、*A. 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盛んに使われている。一方、本菌は、培地中に多量のセルロース（繊維状）やcyclic β1,2-glucan（環状）等の多糖を分泌する特徴を持つ。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を試み、それらの物性を調べることにより、新たな生物繊維素材の開発を目指すことを本研究の目的とする。

2. 実験方法

供試菌株の調製：　*A. tumefaciens*野生株（A208菌）からトランスポゾン5が挿入されることにより生じた環状多糖、β1,2-glucan生産性変異2菌株（M3菌とM14菌）を分離し、親株A208菌とともに本研究に供試した。

各Agrobacterium菌株の培養と菌体および培地からのβ1,2-glucanの分離：　A208菌はAB最小寒天培地で、M3とM14菌はカナマイシンを含むAB最小寒天培地、28℃でそれぞれ培養した。各菌のシングルコロニーを多糖生産前培養培地に接種し、20℃、2日間の前培養の後、多糖生産培地（100ml）で各菌株を30℃、6日間振盪培養した。培養液を遠心により、上清（培地画分）と沈殿（菌体画分）とに分け、各画分からβ1,2-glucanを抽出した。培地画分に2倍量のエタノールを加え4℃で一晩放置した。遠心後の上清をエバポレーターで濃縮し、さらに2倍量のエタノールを加え、遠心した。得られた上清に4倍量のエタノールを加え、得られたその上清を濃縮後、DEAE-Sephadex A-50カラムクロマトグラフィーにかけ、β1,2-glucanを1mM KClで溶出し、続いてHW-40Sカラムクロマトグラフィーで脱塩した。菌体画分は、200mlの70%エタノールを加え80℃で30分間抽出し、その抽出液を遠心した。得られた上清に4倍量のエタノールを加えて遠心し、その上清を回収し、培地画分と同様にDEAE-Sephadex A-50およびHW-40Sカラムクロマトグラフィーにかけた。それぞれ、最後に得られた試料を凍結乾燥しβ1,2-glucanの精製標品とした。

β1,2-glucanの重合度分析：　β1,2-glucanの重合度をHPLCで分析した。カラムは、アミドカラム（エルマ光学株式会社）、溶媒はアセトニトリル：水（6：4）、検出器は、東ソーのRI-8000を用いた。

3. 結　果

A. tumefaciensの親菌株（A208菌）と変異菌株（M3およびM14菌）のβ1,2-glucan合成能の比較：　トランスポゾン、Tn5の挿入により得られた2変異菌株と親株(A208菌）のβ1,2-glucan合成能を比較した（Table 1.）。各菌株を6日間培養し、菌体に結合したβ1,2-glucanと培地中に存在するβ1,2-glucanとを分けて定量した。A208菌では菌体に結合したものの約1/5量のβ1,2-glucanが培地中に存在した。M3菌でもほぼ同比率で菌体結合型と培地中の遊離型とが存在した。これに対して、M14菌では、菌体に結合したβ1,2-glucanは全く検出されず、培地中僅かに検出された。菌体に結合したβ1,2-glucan量は、M3菌ではA208菌の19%、

M14菌では0%であった。一方、培地中の遊離型β1,2-glucan量は、M3菌はA208菌の21%、M14菌では12%であった。以上の結果より、M3菌では、β1,2-glucanの合成能と菌体保持能ともに親株の20%に減少していることがわかった。M14菌ではβ1,2-glucanの合成能が僅かに残存していたが、合成されたβ1,2-glucanを菌体に保持する能力は完全に消失していた。

Table 1. Production of β 1,2-glucan in various *Agrobacterium* strains*

Strain	Genotype	β 1,2-glucan (g/cell x 10^{14})	
		Binding type (in cells)	Free type (in medium)
A208	*chvA*$^+$, *chvB*$^+$	89.9 (100)	16.8 (100)
M3	*chvA*$^-$	17.2 (19)	3.45 (21)
M14	*chvB*$^-$	Not detected	1.96 (12)

*Each strain was cultured at 30 ℃ for 6 days.

A. tumefaciensの親菌株（A208菌）と変異菌株（M3およびM14菌）の合成するβ1,2-glucanの重合度の比較： *A. tumefaciens*の各菌株が合成するβ1,2-glucanの重合度をHPLCで分析した(Fig. 1)。A208菌が合成するβ1,2-glucanは、菌体中および培地中ともに保持時間17分から24分の間の成分より構成されていた。M3菌の菌体に結合したβ1,2-glucanは、A208菌でみられた重合度の成分の他に、保持時間8分と15分の位置に特徴的なピークが認められた。また、A208菌と比べ、保持時間が19分と22分の成分が多いこともM3菌の菌体結合型β1,2-glucanの特徴である。M3菌の培地中のβ1,2-glucanについては、生産量は少ないもののA208菌で認められたすべての重合度の成分が検出され、さらに保持時間12分の位置に別のピークも認められた。

M14菌培地中のβ1,2-glucanは、A208菌やM3菌のように、保持時間が17分から24分の間の成分は検出されず、代わりに保持時間12分の位置にピークが認められた。

以上の結果より、M3菌やM14菌ではβ1,2-glucanの合成量が減少しているだけでなく、合成されるβ1,2-glucanに質的な変化が生じていることが明らかになった。

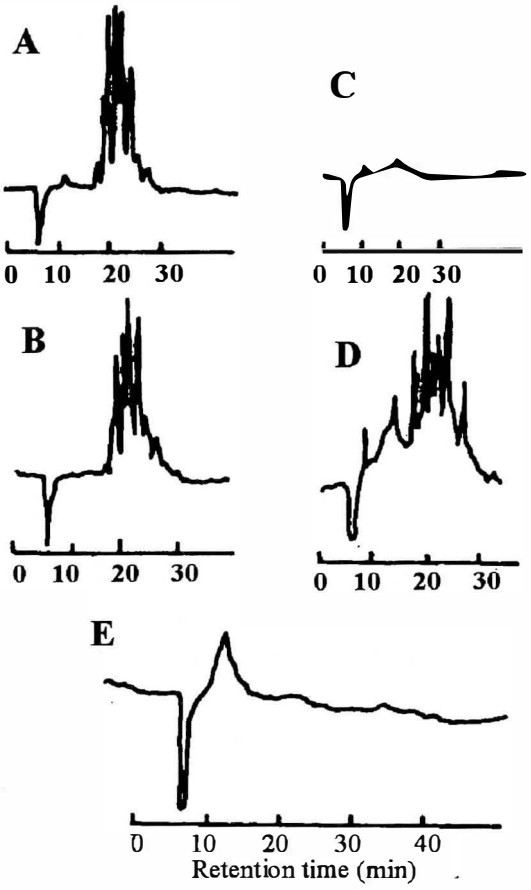

Fig. 1. HPLC patterns of β1,2-glucans produced by 3 strains of A. tumefaciens. A208(A and B), M3(C and D), M14(E). A, C and E: Free type (in medium), B and D: Binding type (in cells).

4. 考　察

Tn5の挿入により生じた2変異株、M3およびM14菌のβ1,2-glucanの合成能は、親株A208菌と比べて著しく低下した。Tn5挿入により機能喪失した遺伝子(*chvA*と*chvB*)は、β1,2-glucan合成およびその分泌に関与している考えられる。今後これらの遺伝子のクローニングと解析が進めば、β1,2-glucanのより高い生合成能を備えた*Agrobacterium*の育種が可能と思われる。またβ1,2-glucanの重合度を決める要因は何か、重合度と物性との関係についても明らかにする必要がある。

5. 結　論

*Agrobacterium*3菌株（2菌株はTn5挿入による変異株）のβ1,2-glucanの合成能と合成されたβ1,2-glucanの重合度を調べた。変異2菌株では、β1,2-glucanの合成能が低下し、質的変化がおきていることがわかった。