

学位論文題名

Studies on the incorporation of  
amino sugar into bacterial cellulose—  
biosynthesis and functions of a novel polysaccharides—  
(バクテリアセルロースへのアミノ糖の導入に関する研究  
—その新規多糖の生合成と機能—)

学位論文内容の要旨

【緒言】天然多糖の生化学的修飾は母体となる多糖へのさらに有用な機能の付与あるいは異なった機能を有する新しい多糖を導く方法の一つである。本研究は、穏和な条件・立体特異性・短い反応時間などの利点を有する酵素反応を多糖修飾の手法として選択した。酢酸菌は化学合成で最も難しいとされる $\beta$ ,1 $\rightarrow$ 4結合を持つセルロース(Bacterial Cellulose; BC)を菌体外に高純度・高収率で生産することで知られている。酢酸菌のセルロース合成酵素を*in vivo*のまま利用し、グルコース(Glc)の2位置換体であるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)をBC分子鎖中に導入し直鎖状ムコ多糖を生合成できれば、キチンとセルロース両者の機能を合わせ持つ高機能性多糖と成ることが期待される。この生化学的修飾が、最も簡単な手法である培地成分の変化だけで達成されれば、BCへのGlc置換体単糖導入及び酵素的天然多糖の修飾に新しい分野をもたらすものと思われる。

【実験】酢酸菌は、*Acetobacter xylinum* ATCC 10245 及び NBI 1051を用いた。これらの菌を、炭素源としてのGlcをGlcNAcに置換した液体培地に3日おきに接種を繰り返す、あるいは、GlcNAc寒天培地上で培養することによりGlcNAcへの馴養を行った。GlcNAc馴養菌をGlcとGlcNAcを種々の比率で含む培地に接種後、4-7日間、28℃で静地培養してセルロースの生産を行った。BCに導入されたGlcNAc含量は、酸加水分解物をアミノ酸分析でグルコサミン塩酸塩として定量した。また、比較のためにグルコサミン(GlcN)、ガラクトサミン(GalN)についても同様の実験を行った。得られた

GlcNAc含有BCの酵素受容性（セルラーゼ・リゾチーム・キチナーゼ）、面配向性、ヤング率をそれぞれ濁度法、X線回折法、引張強度試験法により検討した。GlcNAc含有BCの対照として通常のBCと $\beta$ -キチンを使用した。また、酵素加水分解により生じた水溶性オリゴマーの分子量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定し、セルロース鎖中のGlcNAcの分布状態について考察した。

【結果・考察】酢酸菌のGlcNAcへの馴養操作（GlcNAc液体培地への接種の繰り返し、GlcNAc固体培地での培養）によって、成長速度に遅れが生じたが、変異は起こさないことがコロニーの形態及び液体培地中の状態観察により示唆された。また、GlcNAcへの馴養操作を行った酢酸菌に、Glc培地でのセルロース合成能及び成長速度の敏速な再生が見られ、酢酸菌はGlcNAcに対し比較的高い親和性を持つことも示唆された。GlcNAc液体培地に接種を繰り返した菌株が生産するBC中のGlcNAc含量は、接種回数5回時に約2mol%の最大導入率を示した。また、この菌株をGlcNAc寒天培地上で培養し再び液体培地に戻して多糖を生産させると、GlcNAc含有率は約4mol%に上昇した。GlcNAc寒天培地上でコロニー形成能を持つ菌株により生産されたBCは、上述のGlcNAc液体培地で培養を続けた菌株が生産したBCとほぼ同程度のGlcNAc含量（2mol%）を示し、GlcNAcへの馴養を行った菌株を使用することにより、単に培地にGlcNAcを添加するという培地組成の変化だけでGlcNAcを分子中に含むBC（N-AcGBC）が生合成可能であるという結果を得た。一方、GalNを添加した培地上に生成したセルロース中にはGalNは検出されず、GlcNのみが検出され、生化学的修飾過程でGlcNのエピ化が起こっていることが示唆された。以上の結果と通常のBC分子中にも非常にわずかではあるがムコ糖が検出されたことから、GlcNAc導入機構は次のように考えられる。

（1）酢酸菌のセルロース合成酵素内には、Glc類似体を基質として認識する酵素が存在する、

（2）その酵素の基質（Glc類似体）は、細胞質内の糖新生経路を通して合成される、

（3）GlcNAcへの馴養操作は、その酵素を活性化する。

また、一度GlcNAc寒天培地上で培養を行うとGlcNAc導入は非常に活性化されるが、その後のGlcNAc液体培地への接種操作は、GlcNAc導入率の低下をもたらし、セルロース合成酵素が通常状態へ再生されることが示唆された。このことにより、4mol%以上のムコ糖導入は、*in vivo*では現在のところ不可能と思われる。また、GlcNはGlcNAcの

場合よりもさらに0.2-0.5mol%多く含まれていることが示され、アセタミド基はその酵素に対して立体障害をもたらす可能性が示唆された。

濁度法によりN-AcGBCと $\beta$ -キチンのリゾチーム受容性を観察したところ、N-AcGBCは、短時間で顕著な濁度減少を示し、また、濁度減少速度もリゾチーム濃度に依存することを見いだした。さらに、濁度減少値とN-AcGBCのGlcNAc含量に比例関係が認められた。これらのことは、GlcNAc残基の導入は $\beta$ -1,4結合によりセルロース主鎖中へ導入されたことを示している。一方キチンは酵素濃度を高くしても短時間内では顕著な濁度減少は観察されず、N-AcGBCの方がリゾチームのより高感度の基質となることが示唆された。リゾチーム消化により生じた水可溶部の分子量は、N-AcGBCの場合は反応時間を変えても変化は小さかったが、キチンの方は、ほとんどが2, 3糖にまで分解されており、N-AcGBCより生じたオリゴマーはGlcNAc残基がブロック状につながったものではないことが予想される。実際、リゾチーム処理により生じたN-AcGBCの水溶性オリゴマーをセルラーゼと反応させた場合、比較的重合度の高いフラクションが消失し、グルコース及びセロビオースのピークが現れた。N-AcGBCをキチナーゼで処理した場合、濁度減少と水溶性オリゴマーの生成量はリゾチーム処理の時に比べ、非常に小さなものであるが、N-AcGBCはキチナーゼ受容性をも有することが示された。セルラーゼ処理による濁度減少速度とGlc生成量の時間変化をGPCにより求めた結果、N-AcGBCの場合は通常のBCの場合に比べその両者の速度は遅くなっていることが観察された。これは、GlcNAc残基導入によるBCの結晶構造の変化、あるいは、セルラーゼ活性に対するアセタミド基の立体障害が原因と思われる。以上のように、導入されたGlcNAc残基量が少ないにもかかわらず、リゾチーム及びキチナーゼ受容性を示し、セルロース分解酵素によっても加水分解を受ける新しいバクテリア由来ムコ多糖を生合成することが出来た。さらに、得られたN-AcGBCは通常のBCよりも高い面配向性とヤング率を持つことがX線回折と引張り強度試験により示され、アミド結合を有するGlcNAcの導入により膜形成の際に生成する水素結合が強まったことが示唆された。このことは、偏光FT-IR分析によっても観察された。

【結論】遺伝子操作の様な複雑な手法ではなく、培地組成変換だけで4mol%までGlcNAc残基をバクテリアセルロース分子鎖中へ導入することに成功した。この手法の確立は酵素的多糖の修飾手法に新しい分野を開くであろう。

## 学位論文審査の要旨

主査 教授 戸倉清一  
副査 教授 引地邦男  
副査 教授 高井光男 (工学研究科)  
副査 教授 駒井 喬 (三重大学工学研究科)  
副査 助教授 西 則雄

### 学 位 論 文 題 名

Studies on the incorporation of amion sugar into bacterial cellulose

- Biosynthesis and functions of novel polysaccharides -

(バクテリアセルロースへのアミノ糖の導入に関する研究

- その新規多糖の生合成と機能 - )

機能性多糖として注目され出した甲殻類・昆虫類由来のムコ多糖キチンは、化学構造・結晶構造共にセルロースと類似しているが、C-2位にあるアセタミド基に起因する強固な水素結合とリゾチーム受容性が唯一セルロースと異なる点と言える。このキチンを医用材料などの高機能性素材として供給するためには、キチンの結晶構造、特にその要因となっている強い水素結合の性質を明らかにすることが求められる。しかし、キチンはN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の $\beta$ -1,4グリカンのため結晶構造が強固で機能解析を非常に困難にしている。

申請者は、ムコ多糖キチンが強い水素結合に支えられた固い結晶構造を持ち、これがキチンの機能性解析の妨げとなっていることに注目した。このため、固い結晶構造が他の弱い水素結合性糖類で希釈された新しいムコ多糖を合成し、キチン分子鎖を形成するアミノ糖の機能を検討する目的で本研究を行った。新しいムコ多糖を合成する方法は、化学的重合法、セルロース等の化学修飾法、生物を用いた生合成が考えられる

が、申請者は現在最も高分子量・高純度でセルロースを菌体外に作り出す *Acetobacter* 種による生合成法を採用し、その合成条件を詳細に検討した。申請者は、まず、グルコース (Glc) と GlcNAc の化学構造の類似性に注目し煩雑な遺伝子操作をする事なく、培地の組成を変えるだけの単純な操作でアミノ糖を含む新しい多糖が合成できることを見いだした。さらに通常の培養操作 (静地培養) を変えて超低速で培地を攪拌することによって高配向性フィブリル生成にも成功している。この高配向性フィブリル生成により結晶構造の解析やアセタミド基由来水素結合の特性解明が非常に容易になった。申請者はさらにこのムコ多糖生合成の機構についても化学構造の異なるアミノ糖を用いて研究し、Glc同様UDP-GlcNAcやUDP-Glcを経由する通常の代謝系によって合成されることを明らかにしている。申請者は得られたムコ多糖についての物性及び酵素受容性についても調べている。即ち、GlcNAcのバクテリアセルロース中への導入に伴うリゾチーム、キチナーゼ及びセルラーゼ受容性を濁度法により詳細に研究し、この多糖懸濁液を用いてキチナーゼとリゾチームの選択動力学及びセルラーゼの簡単な測定法についても新しい知見を得ている。そしてこのムコ多糖がセルラーゼとリゾチームで容易に加水分解され、キチナーゼではわずかに加水分解されるという全く新しい性質 (生分解性) を持つ多糖であることを見いだした。この研究から新たに導入されたGlcNAcまたはGlcNがセルロース主鎖中に $\beta$ -1,4結合で導入されていることも示唆された。また得られたフィルムの弾性率、面配向性についても研究し、わずか数%のGlcNAc或はGlcNの導入で面配向性やヤング率が高くなる現象を見だし、この面でも新しい多糖であることを示した。

このように申請者は、この新しい多糖の培養条件について詳しく検討し、その生合成機構を提案し、ムコ多糖類に関する新しい研究分野を切り開いた。その機能性についても種々の可能性を示唆した研究は、新機能性多糖として国際的にも高い評価を得ている。

よって審査員一同は、申請者が博士 (理学) の学位を受けるにふさわしい資格を持つものと判断した。