

学 位 論 文 題 名

Studies on the Incorporation Mechanism of
Aminosugar into Bacterial Cellulose

(バクテリアセルロースへのアミノ糖の導入機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

バクテリアセルロース(BC)は、酢酸菌が菌体外に高純度で生産するセルロースとして知られている。この酢酸菌はセルロース生合成に際して通常グルコース(Glc)を炭素源とするが、これをGlcの2位置換アミノ糖であるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に変えて継代培養を行なうと、セルロース主鎖中に β -1,4結合したGlcNAc残基を含む新規直鎖状ムコ多糖が生産されることが明かとなった。しかし酢酸菌によるアミノ糖のBC中への導入機構、およびその代謝経路は明らかになっていない。そのため、酢酸菌の培養条件や炭素源の取り込みなどについて詳しく検討し、BC中へのアミノ糖導入機構の解明を目的として研究を行った。

酢酸菌は*Acetobacter xylinum* ATCC10245を用いた。前培養としてGlcNAcのみを炭素源とした液体培地で数代継代培養し、GlcNAcに対する酢酸菌の順応化を行った。これをGlcとGlcNAcとの混合培地に接種、28℃で静置培養した。培養中の糖濃度の経時変化の観察から、混合培地中ではGlcが優先的に消費されること、またBC中へのGlcNAc残基の導入量は、糖資源のGlcNAc濃度の割合が増えるにしたがって増加することを見出した。混合培地中からGlcが消失してもBC膜の生産は継続し、GlcNAcの濃度がわずかずつではあるが減少しはじめることから、酢酸菌はGlcNAcを炭素源として取り込み、BCを生産することが示唆された。しかし培地中の糖成分がGlcNAcのみの場合でも生産されるBCの構成糖の大部分はGlc残基であったことから、菌体内に取り込まれたGlcNAcは脱アセトアミド化、または脱アセチル化、脱アミノ化によりGlcへと変換されセルロース合成に利用されると思われ、それらを触媒する酵素系の存在が示唆された。

アミノ糖の代謝経路とそれらの立体特異性の関与について検討するため、GlcNAcの脱アセチル化体であるグルコサミン(GlcN)、およびそのエピマーで

あるガラクトサミン (GalN)、マンノサミン (ManN) を炭素源として酢酸菌の培養を行った。培地の糖組成の観察から、Glcとの混合培地ではGlc消費の優先性が見られたが、GlcN、またはGalNの濃度も減少していた。アミノ糖のみの培地においてもManN以外のGlcNとGalNの濃度の減少が確認された。GlcNとGalNを用いた場合にBCへのアミノ糖導入量は植継回数に依存して増加したが、ManNでは依存性は認められなかった。またGlcNをアミノ糖資源として用いてもBCへ導入されたアミノ糖はアミノ酸分析、IRスペクトルよりGlcNAc残基であることがわかった。さらにGlcNのみの培地でもほとんどの構成糖はGlcであったことから、GlcNAcとGlcの平衡にGlcNが関与していることが示唆された。またGalNを用いてもBC膜中にGlcN残基が検出されることから、菌体に取り込まれたGalNはエピ化された後、代謝されるものと思われる。このようにアミノ糖の立体異性により取り込みとBCへのアミノ糖導入に違いが見られたことから、アミノトランスフェラーゼやエピメラーゼ等のアミノ糖代謝に関連する酵素系が酢酸菌内に存在することが示唆された。

代謝経路でのアミノ基転移酵素の存在が示唆されたことから、平衡種と考えられるアンモニウムイオンの濃度依存性について検討した。炭素源をGlcのみとし、培地にアンモニウム塩を添加し培養を行った。また酢酸菌は好気性菌であるため、培養方法も静置培養に加えて攪拌通気培養についても検討した。その結果、炭素源がGlcのみに関わらず、攪拌通気条件下でアンモニウム塩を添加することにより生産されたBCへのアミノ糖導入が確認された。同様の培地組成で静置培養、または攪拌のみを行ってもアミノ糖はほとんど導入されなかったことから、通気条件がアンモニウム塩によるアミノ糖導入に不可欠であると思われる。またBC中に導入されたアミノ糖はGlcNAc残基であったことから、アンモニウムイオン存在下、アミノ糖変換酵素系の平衡によりGlcNが生じ、さらにGlcNAcへと誘導されたものと思われる。

一方、糖リン酸エステルは酢酸菌におけるセルロース合成経路の中間体であることから、GlcNAc-6-リン酸を糖資源として培養を行った。Glcとの混合培地においてGlcNAc-6-リン酸の培地では、GlcNAcの培地よりも3~4倍高いアミノ糖含量が確認された。このことよりBCへのGlcNAc残基の導入機構にも中間体として糖リン酸が重要であることが示唆された。

キチンはGlcNAc残基が β -1,4結合した生分解性ムコ多糖であるため、リン酸化

キチン誘導体はアミノ糖の炭素源としてその導入を促進することが期待できる。リン酸化キチンの調製はトシルキチンをリン酸化の合成中間体として行い、生分解性を有するものと生分解性のない2種のリン酸化誘導体を調製してその関連性を検討した。

GlcNAcのみの培地にリン酸化キチンを添加して培養した結果、生産されるBC中へのGlcNAc導入量は、添加したリン酸化キチンの濃度に依存して増加した。また生分解性のリン酸化誘導体の方が生分解性のないものよりもGlcNAc含量が高かった。培地成分のGPC分析より生分解性リン酸化キチンの低分子化が確認されたことから、培養中に生成した加水分解物、リン酸化GlcNAcがGlcNAc残基導入を促進したものと思われる。リン酸化キチン存在下では、Glc培地でもGlcNAc残基の導入が確認され、培地中のリン酸化キチンがアミノ糖として酢酸菌に取り込まれていることが示唆された。キチン水酸基のほとんどが置換されている高リン酸化誘導体、またはその加水分解物を培地に加えてもGlcNAcは導入されないことから、糖二リン酸は代謝経路中でリン酸基転移などを阻害しているものと思われる。リン酸化キチンを添加した培地で生産されたBC膜のIRスペクトル、元素分析、アセチル化、キチンの溶媒の抽出処理の結果から、膜中にリン酸化キチンが夾雑していないことが確認されたため、上述のリン酸化GlcNAc中間体がアミノ糖導入を促進することは明らかである。

本研究により酢酸菌の代謝経路にアミノ糖変換の酵素系が存在し、そのアンモニウムイオン平衡の機構により、生産されるBC中へGlcNAc残基が導入されることが明らかとなった。また攪拌通気条件下での培地へのアンモニウム塩の添加、またリン酸化キチンがアミノ糖導入の促進に有効であることが示された。酢酸菌により生産される多糖へのアミノ糖の導入機構に関する基礎的な知見が本研究によって得られ、これらの成果は微生物利用領域における新規機能性多糖の生合成やその探索に大いに貢献するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 倉 清 一

副 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 長 田 義 仁

副 査 教 授 西 則 雄 (地球環境科学研究科)

学 位 論 文 題 名

Studies on the Incorporation Mechanism of Aminosugar into Bacterial Cellulose

(バクテリアセルロースへのアミノ糖の導入機構に関する研究)

バクテリアセルロース(BC)は、酢酸菌が菌体外に高純度で生産するセルロースとして知られている。この酢酸菌はBC生合成に際して通常グルコース(Glc)を炭素源としてセルロースを合成するとされている。最近この炭素源をGlcの2位置換アミノ糖であるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に変えて継代培養を行なうと、酢酸菌はセルロース主鎖中に β -1,4GlcNAc残基を含む新規直鎖状ムコ多糖を生産し始めることが明かとなった。申請者はこの酢酸菌によるアミノ糖のBC中への導入機構、およびその代謝経路が未だ不明のままであることを注目し、これらの機構を解明する目的で研究を行った。

申請者は先ず培養中の糖濃度の経時変化の観察から、混合培地 (GlcとGlcNAc) 中ではGlcが優先的に消費されること、またBC中へのGlcNAc残基の導入量は、糖資源のGlcNAc濃度の割合が増えるにしたがって増加することを見出した。更に、GlcNAcのみの培地中でも混合培地の場合と同程度の導入量であることから菌体内に取り込まれたGlcNAcは脱アセトアミド化、または脱アセチル化、脱アミノ化によりGlcへと酵素により変換されることを予測した。またアミノ糖の代謝経路とそれらの立体特異性の関与について検討するため、GlcNAcの脱アセチル化体であるグルコサミン (GlcN)、およびそのエピマーであるガラクトサミン (GalN)、マンノサミン (ManN) を炭素源として酢酸菌の培養を行った。GlcNとGalNを用いた場合にBCへのアミノ糖導入量は植継ぎ回数に依存して増加したが、ManNでは依存性は認められなかった。またGlcNをアミノ糖資源として用いてもBCへ導入されたアミノ糖はアミノ酸分析、IRスペクト

ルよりGlcNAc残基であったことからさらアミノ基転移酵素等のアミノ糖代謝に関連する酵素系が酢酸菌内に存在することを示唆した。更に、アミノ基転移酵素の存在を示すため、平衡種と考えられるアンモニウムイオンの濃度依存性について検討した。その結果、炭素源がGlcのみにも関わらず、攪拌通気条件下でアンモニウム塩を添加することにより生産されたBCへの転移酵素によるアミノ糖導入が確認された。

一方、糖リン酸エステルは酢酸菌におけるセルロース合成経路の中間体であることから、GlcNAc-6-リン酸を糖資源として培養を行った。Glcとの混合培地においてGlcNAc-6-リン酸の培地では、GlcNAcの培地よりも3～4倍高いアミノ糖含量が確認された。このことよりBCへのGlcNAc残基の導入機構にも中間体として糖リン酸が重要であることが示唆された。この際、GlcNAc残基が β -1,4結合した生分解性ムコ多糖であるキチンを取り上げ、リン酸化キチン誘導体はアミノ糖の高エネルギー炭素源としてその導入促進について研究した。その結果、リン酸化キチン存在下では、Glc培地でもGlcNAc残基の導入が確認され、培地中のリン酸化キチンがアミノ糖として酢酸菌に取り込まれていることが示唆された。リン酸化キチンを添加した培地で生産されたBC膜中にリン酸化キチンが夾雑していないことが確認されたため、上述のリン酸化GlcNAc中間体がアミノ糖導入を促進することは明らかである。

本研究により酢酸菌の代謝経路にアミノ糖変換の酵素系が存在し、そのアンモニウムイオン平衡の機構により、生産されるBC中へGlcNAc残基が導入されることが明らかとなった。また攪拌通気条件下での培地へのアンモニウム塩の添加、またリン酸化キチンがアミノ糖導入の促進に有効であることが示された。酢酸菌により生産される多糖へのアミノ糖の導入機構に関する基礎的な知見が本研究によって得られ、これら一連の成果は、微生物利用領域における新規機能性多糖を大量に生合成するためのバクテリアクローニングへの道を拓いた点で高く評価できる。よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得るのに十分な資格があると判定した。