

学位論文題名

酢酸菌セルロース合成関連遺伝子群の解析

学位論文内容の要旨

セルロースは自然界で最も豊富に存在する生分解性の高分子材料であり、古くから紙や建材、繊維材料、食品添加物など広く我々の生活に利用されている。セルロースは主に高等植物によって生産されるが、一部の微生物もセルロースを合成することが知られており、それはバクテリアセルロース、BC と呼ばれている。特に酢酸菌によって合成されたセルロースの材料としての性質は植物由来のものにはない様々な特性を有していることから、新規のセルロース材料として注目されている。しかしながら、酢酸菌のセルロース生産性は非常に低く、改善が強く望まれている。

本論文は、酢酸菌のセルロース生産性の向上を目指し、セルロース合成関連遺伝子群の解析と機能解明を詳細に行ったものであり、以下の5章から構成されている。

第1章は序論であり、研究の背景および本研究の目的を明らかにした。

第2章ではセルロース合成関連遺伝子群の配列解析を行った。2-1節では、酢酸菌 ATCC23769 株および ATCC53582 株のセルロース合成関連遺伝子群のクローニングおよびシーケンスを行い、DNA 塩基配列について明らかにした。配列決定領域は両菌株ともに6個の open reading frame を含んでおり、上流側から CMCax (セルラーゼ)、CcpAx (機能未知)、AxCeSAB・AxCeSC・AxCeSD (セルロース合成酵素)、BglxA (オリゴ糖加水分解酵素) タンパク質をコードしていた。両菌株の推定アミノ酸配列および DNA 塩基配列には大きな違いが見られなかった。しかし、一部の遺伝子の発現調節部位と考えられる領域が異なっており、実際に酵素の活性量が異なっていることを明らかにした。2-2節では両菌株の性質および合成されるセルロースの違いについて明らかにした。培地の pH、グルコース消費量、グルコン酸生成・消費量については両者で明確な違いは見られなかった。しかしながら、ATCC53582 株は非常に多量のセルロース合成し、ATCC23769 株の約5倍量のセルロースを合成したのに対して、菌体量は ATCC23769 株が ATCC53582 株の約2倍量であることが明らかとなった。これらのことから、酢酸菌によるセルロース合成と菌体の増殖はお互いに相反する性質であると結論した。また、ATCC53582 株の合成したセルロースは重合度が非常に大きく、グルコースが UDP-グルコース (セルロース合成の基質物質) に直接変換されセルロースに至る直接重合の経路を通る割合が少ないことが明らかとなった。これらのことから、両菌株のセルロース合成量の違いは、セルロース合成酵素が異なるのではなく、セルロース合成の前駆体である UDP-グルコースの生成経路が異なっているためと結論した。

第3章では酢酸菌セルラーゼのセルロース合成時における機能について検討した。3-1節では酢酸菌 ATCC23769 株のセルラーゼ(CMCax)をクローニングし、大腸菌での発現系を構築した。また、発現させたタンパク質の精製を行い、酢酸菌セルラーゼの生化学的性質について検討した。その結果、酢酸菌セルラーゼはカルボキシメチルセルロース分解に対する至適温度が 50℃、至適 pH が 4.5、5 糖以上の β -1,4 グルコース鎖を基質として認識し、 β 結合しているセルロースを分解したときに新たに生じる還元末端は α アノマーへと転移することが明らかとなった。また、酢酸菌セルラーゼは他の一般的なセルラー

ゼとは異なりセルロース結合ドメインを持たず、触媒ドメインのみからなっていることが明らかとなった。3-2 節では酢酸菌セルラーゼの分布について検討した。抗 CMCax 抗体を作製し、免疫電子顕微鏡法にて酢酸菌培地中でのセルラーゼの局在を調べた。その結果、酢酸菌セルラーゼは菌体の表面に特異的に分布していることが明らかとなった。3-3 節では酢酸菌セルラーゼのセルロース合成への影響について検討した。培地中にごく低濃度の精製セルラーゼを添加して酢酸菌を培養した場合、セルロースの合成量が約 1.2 倍に増加した。セルラーゼ添加によるセルロース合成量増加効果は培養の初期のみに見られたこと、最も効率的にグルコースがセルロースになる代謝経路である直接重合の経路を通る割合が増加していたことから考えて、セルラーゼはセルロースの合成速度を増加させていると結論した。次にセルラーゼ過剰発現酢酸菌を作製し、これによるセルロース合成について検討した。その結果、セルラーゼ過剰発現株でのセルロース合成量は増加し、このとき合成されたセルロースマイクロフィブリルが野生株と比べて菌体から分散して排出される様子が観察された。セルロースマイクロフィブリルの凝集は酢酸菌セルロース合成の律速過程であると考えられており、セルラーゼによってセルロース合成の律速が変化したためにセルロースの合成速度が増加し、セルロース合成量の増加につながったと結論した。

第 4 章では β -グルコシダーゼのセルロース生合成における機能について検討した。4-1 節では β -グルコシダーゼ添加培地におけるセルロース合成量について調べた。その結果、100 mg/l~という比較的高濃度添加した場合にセルロース合成量の増加が見られ、しかも培養後期に効果があることが明らかとなった。このことから、 β -グルコシダーゼはセルロース合成系に直接作用して合成量を増加させたセルラーゼとは異なり、間接的に作用して合成量を増加させたものと考えられた。本研究では β -グルコシダーゼの糖転移反応により生じたオリゴ糖が酢酸菌セルラーゼの発現を誘導し、合成量増加につながったものと考えた。そこで、4-2 節では酢酸菌セルラーゼの誘導について検討した。その結果、ゲンチオビオースを培地中に添加したときに培地中のセルラーゼ活性が増大した。また、ゲンチオビオース添加によって mRNA の発現量も増大したことから、酢酸菌セルラーゼの誘導物質はゲンチオビオースであることが明らかとなった。4-3 節では酢酸菌の粗精製タンパク質での糖転移反応について検討した。酢酸菌のタンパク質を菌体外・菌体内・菌体膜に分けて粗精製した。それぞれの粗精製タンパク質とグルコースとを反応させ、その生成物について調べた。その結果、菌体内・菌体膜のタンパク質との反応でゲンチオビオースの生成が確認された。また、菌体膜タンパク質との反応では、ゲンチオビオース以外にもラミナリビオース、セロビオース、ソフォロース、イソトレハロースの生成を確認した。これらの結果から、 β -グルコシダーゼの機能として、糖転移反応→オリゴ糖生成→セルラーゼの発現誘導→セルロース合成量の増加、というモデルを示した。

第 5 章は総括である。本研究では、酢酸菌セルロース合成関連遺伝子群の配列について明らかにした。また、セルラーゼおよび β -グルコシダーゼによる酢酸菌セルロース合成量の増加機構を明らかにした。本研究で得られた成果は、酢酸菌によるセルロース合成効率化を目指す上で重要であり、酢酸菌セルロースの工業的生産への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高井光男
副査	教授	木下晋一
副査	教授	棟方正信
副査	教授	上館民夫
副査	助教授	恵良田知樹

学位論文題名

酢酸菌セルロース合成関連遺伝子群の解析

セルロースは自然界で最も豊富に存在する生分解性の高分子材料であり、古くから紙や建材、繊維材料、食品添加物など広く我々の生活に利用されている。セルロースは主に高等植物によって生産されるが、一部の微生物もセルロースを合成することが知られており、それはバクテリアセルロースと呼ばれている。特に酢酸菌によって合成されたセルロースの、材料としての性質は植物由来のものにはない様々な特性を有していることから、新規のセルロース材料として注目されている。しかしながら、酢酸菌のセルロース生産性は非常に低く、改善が強く望まれている。

本論文は、酢酸菌のセルロース生産性の向上を目指し、セルロースの合成量を左右する遺伝子群を解析し、その機能解明を詳細に行ったものであり、以下の5章から構成されている。

第1章は序論であり、研究の背景および本研究の目的を明らかにしている。

第2章ではセルロース合成関連遺伝子群の配列解析を行っている。セルロース生産能の異なる2種の酢酸菌、ATCC23769株およびATCC53582株のセルロース合成関連遺伝子群のクローニングおよびシーケンスを行い、そのDNA塩基配列を決定し、両者のDNA塩基配列間には大きな違いがないとの結論を得ている。また、両菌株の性質および合成されるセルロースの違いについて明らかにし、酢酸菌によるセルロース合成と菌体の増殖はお互いに相反する性質であり、生産量の違いはセルロース合成の前駆体であるUDP-グルコースの生成経路が異なっているためであると結論している。

第3章では酢酸菌セルラーゼのセルロース合成時における機能について

検討している。はじめに、酢酸菌エンドグルカナーゼの性質について明らかにし、*in vivo*での分布について明らかにしている。さらに、酢酸菌エンドグルカナーゼのセルロース合成への影響について検討し、同酵素はセルロースの合成速度を増加させていることを明らかにした。合成速度の増加は、酢酸菌セルロース生合成の律速段階であるリボン化の過程を阻害し、菌体からのセルロースの排出を促進したためだと結論している。

第4章では β -グルコシダーゼ添加によるセルロース生合成への影響について検討している。はじめに、 β -グルコシダーゼ添加培地におけるセルロース合成量増加効果について明らかにし、同酵素が間接的にセルロース生合成系に作用して合成量を増加させた結論している。また、 β -グルコシダーゼは糖転移反応により数種のオリゴ糖を生じ、その1種であるゲンチオピオースが酢酸菌エンドグルカナーゼの発現を誘導していることを明らかにしている。さらに、酢酸菌も β -グルコシダーゼを発現することから、酢酸菌の粗精製タンパク質での糖転移反応についても検討を行い、菌体内および菌体膜に位置するタンパク質がゲンチオピオースを合成することを明らかにした。これらのことから、外部から添加した β -グルコシダーゼの機能として、糖転移反応→オリゴ糖生成→セルラーゼの発現誘導→セルロース合成量の増加、というモデルを提案した。

第5章は総括である。本研究では、酢酸菌セルロース合成関連遺伝子群の配列について明らかにした。また、セルラーゼおよび β -グルコシダーゼによる酢酸菌セルロース合成量の増加機構を明らかにした。本研究で得られた成果は、酢酸菌によるセルロース合成効率化を目指す上で重要であり、酢酸菌セルロースの工業的生産への応用が期待される。

これを要するに、著者は、酢酸菌セルロース生合成の効率的な合成方法およびその機構について解明したものであり、高分子化学と材料工学の発展に貢献すること大なるものがある。また、持続可能なセルロース資源の保全の観点からも重要である。よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格があるものと認める。