

オリゴ糖 DFA IV の *Bacillus subtilis* による

1 菌株生産系の構築

学位論文内容の要旨

di-D-fructofuranosyl 2,6':2',6 anhydride (DFA IV)は難消化性のオリゴ糖であり、その機能としてタイトジャンクションを開放することで Ca や Mg, Zn などのミネラル吸収を促進することや腸内細菌による資化を受け有機酸へと変換されることが知られている。これらの機能から DFA IV はプレバイオティクスの素材として期待されており、その大量生産系の構築が求められている。DFA IV は levan (fructose が β -2,6 結合したフラクタン)から DFA IV 合成酵素 levan fructotransferase (EC 4.2.2.16; LFTase)の働きによって合成される。levan は sucrose から levansucrase の働きによって合成される。当研究室において LFTase をコードする遺伝子 *lft* は既にクローニングされ、その大腸菌における大量発現系も構築されていた。しかし、DFA IV の大量生産には、その基質である levan が長鎖高分子体であるため回収操作が困難であるという問題が残っており、この問題を解決し、DFA IV 大量生産を可能にするために、単一培養系による sucrose からの DFA IV 生産に取り組んだ。

1. 1 菌株による DFA IV 生産系の構築

levan 生産菌の中から *Bacillus subtilis* 168 を宿主として選択した。IPTG 誘導によって *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 由来の *lft* を発現させるプラスミド pLFT-G を作製して、*B. subtilis*/pLFT-G の培養上清に LFTase を産生させた。その後、Terrific broth を使用することで LFTase の生産量が上昇することが分かり、その培養中に、sucrose を添加することで、培養上清に DFA IV が生産されることを示した。この際の培養上清の LFTase 活性は最大で 0.062 U/ml であり、培養 96 時間後に 20.5 g/l の DFA IV が生産された。一方で、培養 96 時間後の上清に 53.9 g/l の sucrose が残存しており、添加した sucrose の 27.9%が利用されずに培地中に残存した。sucrose 消費量に対する DFA IV 生産量の重量収率は 14.7%であった。

次に、高価な誘導剤である IPTG を用いずに DFA IV 生産を可能にするため、本生産系の基質である sucrose によって誘導可能な *lft* 遺伝子発現ベクター pLFT-S を構築した。pLFT-S は *sacB* (levansucrase 遺伝子)のプロモーター配列および分泌シグナルをコードする配列を含んでいる。坂口フラスコを用いた培養では *B. subtilis*/pLFT-S の培養上清に DFA IV が生産されたが、一方で、ジャーファーマンターを用いた培養では、DFA IV は生産されず、その原因が消泡剤の添加であると考えた。そこで、起泡性の低い培地に変更し、再びジャーファ

一メンターを用いて DFA IV の直接生産を試みた結果、培養 96 時間後に 22.8 g/l の DFA IV が生産された。しかし、培地中には添加量の 29.5% に相当する 53.5 g/l の sucrose が残存しており、DFA IV 生産の改善には sucrose からの levan 生産の促進が必要であると考えた。

2. 調節因子 *degQ* の追加導入が levan および DFA IV 生産に与える影響

B. subtilis における *sacB* の発現は調節因子 DegQ によって正に制御される。しかし、本研究の宿主 *B. subtilis* 168 において *degQ* の発現レベルは低く抑えられていることが報告されており、宿主の細胞内に *degQ* を効率よく発現させることを試みた。*degQ* 高発現変異(*degQ36*)を導入した *degQ* 遺伝子(以下 *degQ36* 遺伝子と呼称)を作製し、pHT43 または *lft* 発現ベクターに挿入した。levan 生産に対する *degQ* 追加導入の影響を調べた結果、*degQ36* 遺伝子を含む *B. subtilis*/pHT-D36 はコントロール株 *B. subtilis*/pHT43 に比べ、sucrose 消費速度、および levan 生産速度の著しい上昇を示した。2 株の最終的なレバン生産量に差は見られなかった。IPTG 誘導型の *lft* 発現ベクターを用いた DFAIV 生産において *degQ36* 遺伝子を含む *B. subtilis*/pLFT-GD36 は、コントロール株 *B. subtilis*/pLFT-G に比べ sucrose 消費速度、DFA IV 生産速度の上昇を示し、また、*B. subtilis*/pLFT-GD36 の培養 72 時間後の DFA IV 生産量は *B. subtilis*/pLFT-G の 1.86 倍に増加した。さらに、sucrose 誘導型の発現ベクターを用いた DFA IV 生産においても、*degQ36* 遺伝子を含む *B. subtilis*/pLFT-SD36 は、コントロール株 *B. subtilis*/pLFT-S に比べ、sucrose 消費速度、DFA IV 生産速度の上昇を示し、DFA IV 生産量も増加した。以上の結果より、*B. subtilis* 168 への *degQ* 追加導入が sucrose からの levan 生産を促進すること、また、DFA IV 生産を増強することを示した。

3. 直接生産系の課題とその対策

本研究で構築した DFA IV 直接生産系の課題として培地中の glucose 蓄積に着目した。levan が生成される際には 1 分子の sucrose から 1 分子の glucose が遊離する。*B. subtilis*/pLFT-GD36 を用いた培養において、sucrose を 250 g/l 添加した条件では培養 96 時間後の上清に約 120 g/l の glucose が蓄積した。高濃度の glucose が levan 合成を阻害するとの知見から、蓄積する glucose の変換を試みた。glucose を gluconic acid に変換する glucose oxidase を DFA IV 直接生産系に添加したところ、培地中の glucose 蓄積が軽減され、培養 72 時間後、および 96 時間後の DFA IV 生産が非添加の条件に比べ増加した。この結果から glucose oxidase の添加による glucose 変換が DFA IV 生産を増加させることを示した。

以上、本研究では *B. subtilis* を宿主とし、*lft* 遺伝子を発現させることで単一培養系による sucrose からの DFA IV 生産を可能にした。また、*degQ* 追加導入によって sucrose からの levan 生産が促進可能であることや、DFA IV 生産が増強されることを示した。さらに、glucose oxidase の添加によって培地中に蓄積した glucose を除去することで、DFA IV 生産のさらなる増強が可能であることを示した。今後、levansucrase および LFTase の生産を増強させた生産株の構築や培養条件の最適化、さらには glucose oxidase の利用などの改善策を積み重ねることで DFA IV 生産性の向上は十分可能であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 准教授 曾 根 輝 雄

副 査 助 教 田 中 みち子

副 査 名誉教授 富 田 房 男 (放送大学北海道学習

センター長)

学 位 論 文 題 名

オリゴ糖 DFA IV の *Bacillus subtilis* による

1 菌株生産系の構築

本論文は、本文 119 頁、図 33、表 4、8 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

論文審査内容

di-D-fructofuranosyl 2,6':2,6 anhydride (DFA IV)は難消化性のオリゴ糖である。DFA IV はプレバイオティクスとして期待されており、その大量生産系の構築が求められている。DFA IV は levan から DFA IV 合成酵素 levan fructotransferase (LFTase)の働きによって合成される。levan は sucrose から levansucrase の働きによって合成される。LFTase をコードする遺伝子 *lft* は既にクローニングされ、その大量発現系も構築されていた。しかし、基質である levan が長鎖高分子体であるため回収操作が困難であるという問題が残っており、この問題を解決し、DFA IV 大量生産を可能にするために、単一培養系による sucrose からの DFA IV 生産に取り組んだ。

1. 1 菌株による DFA IV 生産系の構築

levan 生産菌の中から *Bacillus subtilis* 168 を宿主として選択した。IPTG 誘導によって *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 由来の *lft* を発現させるプラスミド pLFT-G を作製して、*B. subtilis*/pLFT-G の培養

上清に LFTase を産生させた。その培養液に sucrose を添加することで、培養上清に DFA IV が生産されることを示した。培養 96 時間後に 20.5 g/l の DFA IV が生産され、53.9 g/l の sucrose が残存した。sucrose 消費量に対する DFA IV 重量収率は 14.7% であった。

次に、sucrose によって誘導可能な *lft* 発現ベクター pLFT-S を構築した。DFA IV の直接生産を試みた結果、培養 96 時間後に 22.8 g/l の DFA IV が生産された。しかし、53.5 g/l の sucrose が残存しており、DFA IV 生産の改善には levan 生産の促進が必要であると考えた。

2. 調節因子 *degQ* の追加導入が levan および DFA IV 生産に与える影響

B. subtilis における *sacB* の発現は調節因子 DegQ によって正に制御される。*degQ* 高発現変異(*degQ36* 変異)を導入した *degQ* 遺伝子(以下 *degQ36* 遺伝子と呼称)を作製し、pHT43 または *lft* 発現ベクターに挿入した。levan 生産に対する *degQ* 追加導入の影響を調べた結果、*degQ36* 遺伝子を含む *B. subtilis*/pHT-D36 はコントロール株 *B. subtilis*/pHT43 に比べ、sucrose 消費速度、levan 生産速度の著しい上昇を示した。IPTG 誘導型の発現ベクターを用いた DFAIV 生産において *degQ36* 遺伝子を含む *B. subtilis*/pLFT-GD36 は、*B. subtilis*/pLFT-G に比べ sucrose 消費速度、DFA IV 生産速度の上昇を示し、また、培養 72 時間後の DFA IV 生産量も増加した。さらに、sucrose 誘導型の発現ベクターを用いた DFA IV 生産においても、*degQ36* 遺伝子を含む *B. subtilis*/pLFT-SD36 は、*B. subtilis*/pLFT-S に比べ、sucrose 消費速度、DFA IV 生産速度の上昇を示し、DFA IV 生産量も増加した。以上の結果より、*degQ* 追加導入が levan 生産を促進すること、また、DFA IV 生産を増強することを示した。

3. 本生産系の課題とその対策

本研究で構築した DFA IV 生産系の課題として glucose の蓄積に着目した。高濃度の glucose が levan 合成を阻害するとの知見から、蓄積する glucose の変換を試みた。glucose oxidase を DFA IV 直接生産系に添加したところ、培地中の glucose 蓄積が軽減され、glucose oxidase 非添加の条件に比べ DFA IV 生産が増加した。

以上、本研究では単一培養系による sucrose からの DFA IV 生産を可能にした。また、*degQ* 追加導入によって levan 生産、および DFA IV 生産が促進されることを示した。さらに、glucose oxidase の添加によって DFA IV 生産のさらなる増強が可能であることを示した。

これらの研究結果のうち、*B. subtilis*/pLFT-G を用いた DFA IV 生産系の構築については原著論文一報が英文学術誌である *Enzyme and Microbial Technology* に受理された(2007 年 41 巻 673-676 頁)。また、DFA IV の製造方法として特許出願し、すでに公開されている JP 2008-307010 A. *degQ* 追加導入の影響については原著論文一報が英文学術誌である *Journal of Bioscience and Bioengineering* に受理された。

よって、審査員一同は、竹末 信親 が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。