

# *Bacillus megaterium* を利用したバイオナイロン素材の効率合成

芦内 誠  
(高知大学 農学部)

## 研究の目的

ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸（以後PGAと略す）はナイロンに似た基本骨格を持つバイオポリマーである。その  $\alpha$ -カルボキシル基側鎖のエステル化に係る研究から、PGAは本質的にナイロン様の化学特性を発揮すると考えられている<sup>1)</sup>。ただし、化成ナイロンとは異なり、多数の不斉炭素を保持するPGAには明確な生分解性やその他にも有用な機能が備わっている<sup>2)</sup>。そのため、PGAはバイオのナイロンと見なされている。可食PGAは日本の「納豆」のネバネバから得られる<sup>3)</sup>。残念ながら、そのDLの立体化学的な配列（標準的なD-グルタミン酸含有率、60%±15%；標準的なL-グルタミン酸含有率、40%±15%）や分子サイズ分布（分子量、1万〜100万）の制御は難しく<sup>2)</sup>、産業材料応用の観点から納豆PGAの弱点と考えられている。立体規則性PGA（L型）が、最近、古細菌の菌体外ポリマーから単離された<sup>4)</sup>。しかし、古細菌型PGAの低生産性はその実用性（実効性）を保証する段階で致命的な欠点となりかねない。以上より、有用PGA生産菌についてさらなる調査が求められていた。

さて、PGAの立体化学性を決定する最も重要な因子の一つがグルタミン酸ラセマーゼと呼ばれる酵素である。本酵素は、事実上、細胞内D-グルタミン酸プールの形成に役立つ<sup>2)</sup>。*Bacillus subtilis* に属する納豆菌は、確かに本酵素を大量に生産するが<sup>2)</sup>、*Bacillus megaterium*は、D-グルタミン酸の供給に係る酵素活性をほとんど示さないことが分かってきた<sup>5)</sup>。むしろD-グルタミン酸を作らないL型PGA生産微生物（古細菌群）と類似した性質といえる。本研究では、応用性に優れたバイオナイロン素材である立体規則性PGAの効率合成を目指して、*B. megaterium*のPGA生産能について精査した。

## 方法

本実験では*B. megaterium* WH320 株（MoBiTec社製）を用い、PGAの合成については、以下を標準条件として実行した。まず、生育細胞を適切な濃度（1 L当たり 8 g湿菌体）になるように標準液体培地に加え、30°Cで5日間、培養した。また、本標準培地は5% スクロース（糖質）、2% L-グルタミン酸（基質）、5% NaCl（塩類）、1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.27% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.42% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O及び MSビタミン溶液（PhotoTechnology Laboratories社製）の各成分を含むように調製された。

PGAはParkらの方法<sup>6)</sup>で単離した。単離したPGAの一部は、6 M蒸留塩酸存在下、105°Cで8時間の加水分解操作に供した<sup>2)</sup>。これにより発生したグルタミン酸モノマーはキラル分割液体クロマトグラフィー（HPLC）で解析し、DL含有比（→立体化学性）とグルタミン酸総量（→ポリマー生産量）を算出した<sup>2)</sup>。ちなみに、本法ではD-グルタミン酸はL-グルタミン酸よりも確実に速く溶出してくる。本HPLCプロファイルのピーク面積とグルタミン酸量を相関させた標準曲線を作製、データ解析に用いた。実際は

D-グルタミン酸量は $y_{D-Glu} = 2.97x$  (fmol)、L-グルタミン酸量は $y_{L-Glu} = 2.91x$  (fmol) の各関係式から算出した（ここでのx値はピーク面積に相当する）<sup>5)</sup>。一方、単離したPGAの一部はSDS-PAGEにも供試し、メチレンブルー（塩基性色素）染色により特異的に本ポリマーが視覚化できるようにした。

## 結果

**基質濃度の最適化:** アミノ酸のグルタミン酸は、*B. megaterium*PGAの合成に必須の基質であった。0~10%にわたる種々の濃度での試験を基に、最適基質濃度を2%と定めた。2%L-グルタミン酸を含む標準培地では、*B. megaterium*PGAの最大収量が $8.6 \text{ g L}^{-1}$ に達した。この値は納豆PGAの収量に匹敵するものである。一方、*B. megaterium*は*B. subtilis*と比べると、基質としてのD-グルタミン酸の利用能が明らかに劣ることも分かった。

さらに、*B. megaterium*PGAの立体化学性を解析した。その結果、L-グルタミン酸を基質に用いると、最大でL-体比率が95%に達する立体規則性PGAが再現性よく得られるのに対し、D-グルタミン酸（2%）を用いた場合、45:55のDL比の立体不規則性PGAが生成されてくることが分かった。

**塩及び浸透圧ストレスの効果:** 図1に示すように、*B. megaterium*は2%を超える高塩液体培地中にPGAを大量蓄積（生産）することが分かった。さらに、分子量にして200万を超える巨大な*B. megaterium*PGAが、より塩濃度の高い液体培地（海水の塩濃度の約3倍にあたる10%が最適）を使うことで得られるという事実もまた注目に値する（図1上部、SDS-PAGEゲルの写真）。

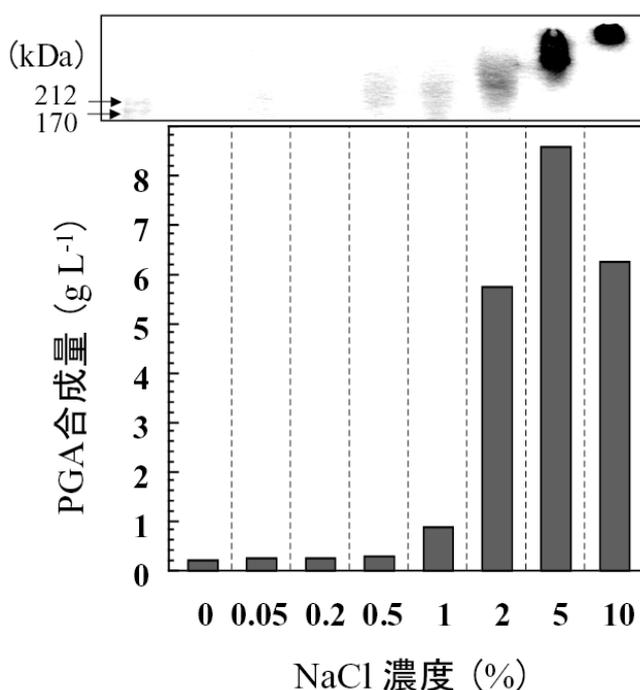


図1. *B. megaterium*の塩応答性PGA<sup>5)</sup>. 上, PGAのSDS-PAGEと視覚化. 下, 各種塩濃度(0~10%)の標準培地に蓄積したPGA(PGA合成量).

さて、塩ストレスは一般に、細胞内への過剰な塩の蓄積に起因するイオンストレスとともに、高い溶質濃度によりもたらされる浸透圧ストレスを引き起こすとされている。そこで、*B. megaterium*のPGA生産に及ぼす浸透圧変化の効果について、塩化ナトリウムの代わりにソルビトール (0.1 M~1 M)<sup>7)</sup>を使うことにより調査した。その結果、試験した如何なるソルビトール濃度でもPGAの蓄積は認められなかったことから、*B. megaterium*のPGA生産性は浸透圧よりはむしろイオン負荷によって優位に影響されることが示唆された。

**糖溶質濃度の効果:** 糖溶質の効果についてさらに調べるため、種々のスクロース濃度 (0~10%) の条件で生産された*B. megaterium*PGAの構造特性を調査した。結果、分子サイズ分布に関してはいずれの条件でも大差はなかったが、ポリマーの立体化学性に及ぼす影響については無視できない水準であった。すなわち、糖溶質の添加 (好ましくは5%以上、少なくとも2%) は、PGAが好ましい立体化学性 (例えば、90%を超えるL体比率) を維持するのに重要であった。糖質無添加培地を使用すると、*B. megaterium*PGAのL体比率は75%にまで低下してしまっただ。これまでに金属イオンの共存によりバシラス起源のPGAの立体化学性が有意に変化するとの報告はあるものの<sup>2)</sup>、これとよく似た現象が糖溶質によっても誘導されるという発見例はこれが最初である。

**糖質資化能:** 糖質は、*B. megaterium*のPGA生産に関し、ほぼ間違いなく重要な役割を演じている。そのため、このような糖質効果に係るさらなる調査は、立体規則性PGAの効率合成システムを開発するための一助となる。本実験で、*B. megaterium*の資化性はグルコース、フルクトース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、スクロース、マルトース、セロビオース、ラクトース、並びにデンプン (各5%) にまで及んだ (実際、これらを唯一の炭素源に十分な生育が認められた)。ちなみに、セロビオースはセルロースの分解により、キシロースやアラビノースはヘミセルロースの分解により得られる (ともに有効活用が期待されるバイオマス糖質の一種という位置付けにある)。

**好適糖質の同定:** スクロースの他に、他の糖質についても*B. megaterium*のPGA生産に及ぼす効果を調べた。本実験では、スクロース共存下でのPGA生産性を100%と定めた (図2、棒グラフ②)。また、この際に得られたポリマーのL体比率は約92%であった。図2上部のSDS-PAGEゲル写真のように、ここで得られた全てのPGAについて、分子サイズ分布には大差がなかった。しかし、糖質無添加培地を使用すると、その生産性は半減した (図2、棒グラフ①)。試験した糖質のなかでも、アラビノース (棒グラフ⑥) とフルクトース (棒グラフ⑦) はPGA収量を著しく増大させることが分かった。標準条件 (棒グラフ②) のものと比べ、その生産性は少なくとも1.8倍に達する (前者では、2%グルタミン酸を基質にした場合のPGA変換効率は約40%に止まったが、これに比して後者では実に75%を上回ることになる)。さらに、図中カッコ内書き記したL体比率 (%) の数値を基に、立体規則性PGA合成の効率まで考慮すると、アラビノースがPGA合成に最も好適な糖質の一つといえる。

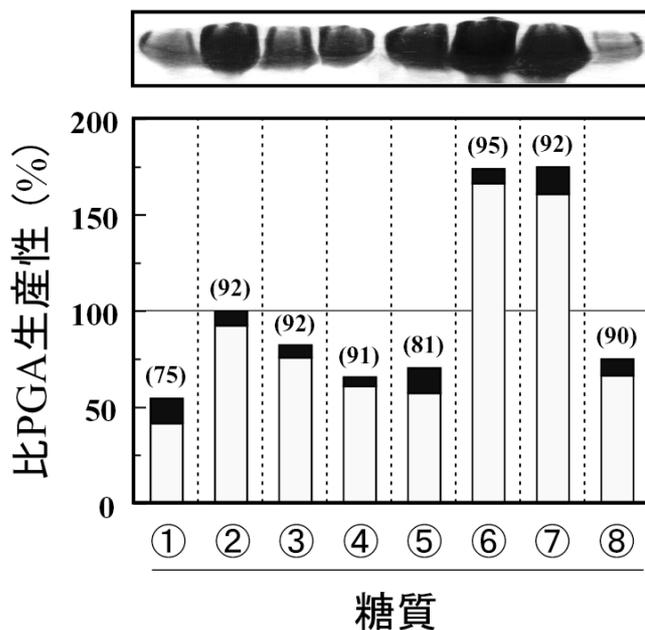


図2. *B. megaterium* のPGA生産能に対する糖質の効果。

上, PGAのSDS-PAGEと視覚化。

下, 各種糖質を利用した際の比PGA生産性. 条件①, 糖無添加; ②, スクロース; ③, グルコース; ④, キシロース; ⑤, ガラクトース; ⑥, アラビノース; ⑦, フルクトース; 及び⑧, ラクトース. カッコ内の数値は合成されたPGAのL体比率(%)を示す。

## 結論

本研究において、*B. megaterium* のPGA生産は浸透圧ストレスよりもむしろイオンストレスにより顕著に誘導されることを示し、塩化ナトリウム添加の有効性を明らかにした。さらに、培地中の基質及び糖質濃度の最適化や好適糖質の同定により、有用ナイロン素材として期待されている立体規則性PGAの効率合成を可能にした。好適糖質は木質バイオマスや食品廃棄物から派生する分解産物と同質であるため、本菌はバイオマスポリマーリファイナリーの実現に寄与しうる有用微生物であることが示唆された。現在、バイオマス分解能を高めた*B. megaterium*の分子育種について検討している。

## 文献

- 1) Melis, J., Morillo, M., Martínez de Ilarduya, A., and Muñoz-Guerra, S., *Polymer* **42**, 9319-9327 (2001).
- 2) Ashiuchi, M., and Misono, H., In *Biopolymers* vol. 7, eds. Fahnstock, S. R., and Steinbüchel, A., Wiley-VCH, Weinheim, pp. 123-174 (2002).
- 3) Sung, M.H., Park, C., Kim, C.J., Poo, H., Soda, K., and Ashiuchi, M., *Chem. Rec.* **5**, 352-366 (2005).
- 4) Hezayen, F.F., Rehm, B.H., Tindall, B.J., and Steinbüchel, A., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1133-1142 (2001).
- 5) Shimizu, K., Nakamura, H., and Ashiuchi, M., *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2378-2379 (2007).
- 6) Park, C., Choi, J.C., Choi, Y.H., Nakamura, H., Shimanouchi, K., Horiuchi, T., Misono, H., Sewaki, T., Soda, K., Ashiuchi, M., and Sung, M.H., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **35**, 128-133 (2005).

- 7) Ashiuchi, M., Shimanouchi, K., Horiuchi, T., Kamei, T., and Misono, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1794-1797 (2006).
- 8) Kubota, H., Matsunobu, T., Uotani, K., Takabe, H., Satoh, A., Tanaka, T., and Taniguchi, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1212-1213 (1993).