

セルロース繊維産生微生物をナノビルダーとする3次元構造体の自動構築

A Hierarchical Organizing Design for a Bottom-up 3-D Architecture Using a Bacterium Extruding a Cellulose Nanofiber

近藤 哲男

1. はじめに

これまで著者らは、高等植物の細胞壁形成について、セルロースマイクロフィブリル間の相互作用、結晶繊維構造、層構造のモルフォロジー等の変化を、独自の顕微分光学的手法と水中原子間力顕微鏡観察技術を駆使して詳細に *in situ* 解析した¹⁻³⁾。この結果から、樹木形成過程における細胞壁階層構造形成をボトムアップ的繊維の集合構造構築とみなし、それをヒントとして微生物産生セルロースナノ繊維の自動堆積による低エネルギー型3次元構造構築法を提案してきた⁴⁻⁷⁾。これは、酢酸菌がセルロースナノ繊維を分泌する際の反作用による任意走行に着目したところに端を発する。

酢酸菌(*Acetobacter xylinum*)は、食品の分野でナタデココとして一般に知られる結晶性セルロースナノ繊維であるバクテリアセルロースを生産する。この菌は、同時に菌体外への繊維分泌の際の噴出エネルギーを駆動力として分泌方向と逆方向に走行する。それぞれの菌が任意の方向に走

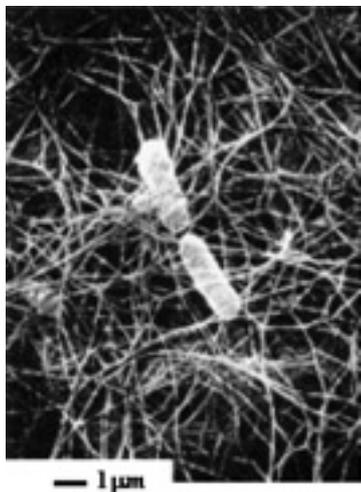


図1 酢酸菌と分泌されるセルロースナノ繊維(セルロースリボン：幅40-60nm)

行するため、結果として、幅40-60nmの分泌ナノ繊維からなるネットワークが形成され、ペリクルと呼ばれるゲル状の膜ができあがる(図1)。本研究のコンセプトは、このような菌体外物質産生微生物のランダムな方向への走行を、セルロース分子からなる種々の2次元足場パターンを持つ高分子レールテンプレートをを用いて制御することにある。しかも、その結果、パターン上に3次元構造が構築される。このことは、あたかも家を建築する際に、まず土台を作り、その上に建材を積み重ねていくことを連想していただくと理解しやすいと思う。土台が高分子レールテンプレートであり、酢酸菌が分泌する繊維が建材、菌自身が家を建てていく大工さんということになる。このシステムを簡単に述べると、この建材がまず土台に強固に接着されていくために、大工さんが建材をつみあげるように働かされ、最終的に土台パターン上にセルロースナノ繊維からなる3次元構造が構築される。本稿では、まず酢酸菌の産出するバクテリアセルロースナノ繊維の基礎知見を紹介し、このような酢酸菌をナノビルダーとして用いた新規3次元構造体構築法を述べる。

近年、ナノスケールでの物質の表面構造、界面での相互作用が生物体にまで拡大され、さらに、高分子と生物体とのナノスケールでの界面相互作用の利用が、新たな構造体を生み出す可能性を秘めている⁸⁾。最近、足場(Scaffold)を用いて種々の細胞を培養し、医療材料として用いようとする再生医療材料形成法が注目されている。この足場は、主として強度の補強材の役割を期待して用いられている。本稿で取り上げる手法は、これをさらに発展させたものとなっている。すなわち、強度補強の役割をもつ単なる足場ではなく、構造構築の方向を制御させる「レール」という機能をテンプレートに加えたものを用いる。その上で酢酸菌の培養を行うと、分泌セルロースナノ繊維がレールとの界面で強く吸着し、堆積方向が同時に制御され、あるパターンを有する3次元構造体が自動的に構築されていくという低エネルギーで生産から構造形成までをおこなうプロセスが出来上がる。しかも、この3次元構造体は、高結晶性のセルロースナノ繊維から成っているため、十分な強度をもち、生分解性があるのはもちろんのこと、生体適合性もある、ナノからビルドアップ的に構築される機能材料として期待される。



KONDO TETSUO
九州大学 バイオアーキテクチャーセンター 教授 農学博士、博士(工学)
〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
Tel: 092-642-2997 Fax: 092-642-2997
E-mail: tekondo@agr.kyushu-u.ac.jp
〈専門〉高分子物理化学、多糖化学、ナノ生物学
〈趣味〉映画・音楽鑑賞、熱狂的長嶋終身名誉監督ファン

2. バクテリアセルロースとは？

図2は、酢酸菌が、セルロース結晶繊維を産生するまでの工程を模式的に描いたものである。酢酸菌の細胞壁(下部表面)には、セルロース合成顆粒(ターミナルコンプレックス：TC)と呼ばれる酵素の集合体が存在し、特にこの菌の場合にはそれが3個ずつのサブユニットで一つのTCを構成し、それらが直線状に配列している。サブユニットは微小結晶性繊維(サブエレメンタリーフィブリル)を合成し、1つのTCは、3.5-4nm程度のマイクロフィブリルを形成させる。さらに、この直線配列により、リボン状のさらに高次の結晶構造体が形成され、そのセルロースリボンは酢酸菌の生産時の自己回転運動に起因してねじれる。このように生合成され、階層構造形成されたセルロースナノ繊維をバクテリアセルロースと呼ぶ。

以前から、このバクテリアセルロースから成るペリクルは、ナナデココとして食用に用いられてきたが、そのほかにその強度と特異的な高音響特性を利用した、合板の補強材や高価なステレオヘッドホンやスピーカーの高感度振動板(スピーカーコーン)としても用いられてきた。また、最近ではバクテリアセルロースペリクルがナノ繊維のネットワークあることで透明性を示すことから、それを生かしたフレキシブルフィルム⁹⁾なども注目されている。

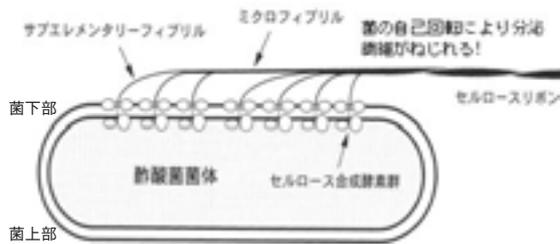


図2 階層構造形成されるセルロースリボン(分泌セルロースナノ繊維)

また、2004年4月にアメリカ化学会で、テキサス大学のBrown教授と著者がバクテリアセルロースのセッションを開催したが(Chemical & Engineering News, 82, 17 (2004))、医療用利用の研究発表が多くみられた。これまで、コットンセルロースからなる脱脂綿やガーゼで血栓ができるからなどの理由で、セルロース材料が長く医療用材料として遠ざけられてきた。しかし、同じセルロースでも、酢酸菌から産生される結晶構造やその表面構造が異なるセルロースナノ結晶繊維により創製される材料の医療用途への拡大が期待できるようになってきた。

3. 分子レールテンプレート：ネマティックオーダーセルロース¹⁰⁻¹²⁾とハニカム型セルロース薄膜¹³⁾

上述のように、再生医療材料分野を中心に足場としてのフィルムやゲルの機能が注目されている。著者らは、以前から酢酸菌などの物質生産菌や植物細胞などに対して、独自の足場を用いた培養に着手している⁴⁻⁷⁾。その表面に独特の2次元パターンを有するテンプレートについて以下に

述べる。この特殊な表面構造こそが、分泌直後のバクテリアセルロースの表面と強固に界面相互作用して、酢酸菌の走行制御を誘発させ、結果的に酢酸菌にナノビルダーとしての機能を付加させて、自動3次元材料構築を可能にさせる。

セルロース分子、すなわち(1→4)-β-グルカン一本鎖は単独では存在できず、高次構造を形成して特性を発現しているわけであるから、天然セルロースの繊維高分子としての利用は、その結晶構造(セルロースI)に依存する構造材料として用いることになる。著者らはここ数年来、上記のような従来のセルロース利用からの脱却を目指し、誘導体化せず、セルロースそのまま高次構造のみを積極的に変化させる試みを続けてきた。その結果、セルロース溶液を飽和水蒸気下に放置することにより、分子間水素結合形成を極めて低く抑え、それを水と溶媒交換して得られる高水膨潤セルロースゲルを開発した。これは透明な不可逆ゲル状シートとなって生成されるため、さらに延伸し、乾燥固定することにより、分子鎖が極めて良好に一軸配向した、しかし非結晶性を示す新たなセルロース高次構造が形成されることを発見した。この構造に対して、「ネマティックオーダーセルロース」(Nematic Ordered Cellulose: NOC)と名付けた¹⁰⁻¹²⁾。この特徴を、高分解能電子顕微鏡による分子像、高分解能原子間力顕微鏡による表面解析等の手法で解析したところ、表面構造は、図3に示すように、グルコピラノース環面が表面に対して垂直(Narrow axis)に位置し、平行な分子鎖間隔が0.66nmで配列した構造であ

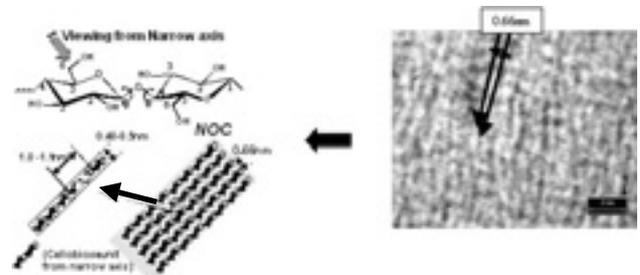


図3 高分解能電子顕微鏡によるNOC中のグルカン分子鎖像の画像解析(左図が模式図)。試料は負染色されている。右図では、白い点から点までがセロビオース(2量体)単位。

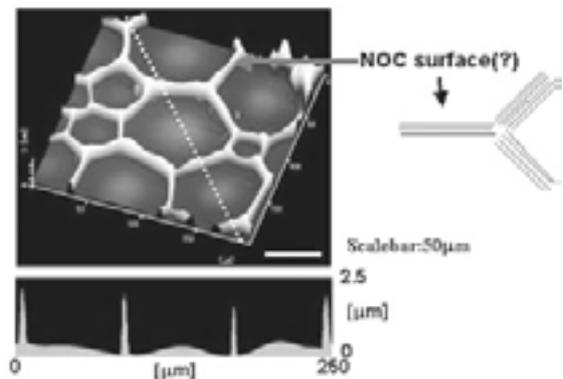


図4 ハニカム型細孔を有するセルロース薄膜の原子間力顕微鏡による立体像

ることが明らかとなった¹⁰⁾。さらに、グルコース残基の水酸基が赤道結合(環面に平行方向)していることから、この分子鎖の配列を考えると、いずれの水酸基も表面に対して垂直方向を向くことになる。したがって、グルコース面のみでなく水酸基も表面に対して垂直に配向していることから、表面の極性が高く、その極性の方向は延伸配向方向に平行であることが示唆された。さらに、この極性基である水酸基が表面で配向していることが他の物質(繊維、有機・無機高分子)¹⁴⁻¹⁶⁾との強い相互作用を促し、その結果として、その物質を含む溶液あるいは懸濁液を NOC 上に展開すると、エピタキシャル的に表面に配向誘発させながら堆積をさせるといふ現象を引き起こすことを見出した。また、セルロースのみならず、キチンでも同様の方法により、このネマティックオーダー構造が形成されることを報告している¹²⁾。

また、最近著者らは、分子の自己組織化を利用して、飽和水蒸気下でまず酢酸セルロースのハニカム(蜂の巣)型フィルムを作製し、それを脱アセチル化することでセルロースのハニカム型フィルムを創製した(図4)¹³⁾。この方法で作られた酢酸セルロースならびにセルロース両フィルムでは、数 μm から数百 μm までの範囲でハニカム径の制御が可能であった。セルロースあるいは酢酸セルロースフィルムは生体適合性を持っている可能性があることから、輸血の際に赤血球、白血球、血小板などの分離に使う血液フィルターや限外ろ過膜のような医療用材料としての利用が期待される。また、細孔を用いるハニカム構造という特徴を生かした利用法に加えて、二次元の細胞壁モデルや動物細胞(肝細胞、骨芽細胞)などの培養の足場、シングルセルの培養器としての利用、さらに光学材料としての利用では、細孔のサイズで光の透過を抑える偏光膜やある特定の波長の光を封じ込めるフォトニック結晶としての利用といった新しい機能性材料への展開も期待できる。

しかも、特徴的なことに、そのハニカム骨格の表面が、NOCの場合と同じように、エピタキシャル的に他の物質を配向誘発させながら堆積をさせる効果を有することが認められた。

4. 酢酸菌をナノビルダーとして用いる

自動3次元構造構築

セルロース、キチンなどの生物由来の構造材料では、一般的に任意の構造制御は困難ではあるが、モノマーから構造構築まで一連の低エネルギー型プロセスで進行する。したがって、3次元構造を人為的に制御できるかどうか为新規生物系構造材料創製への課題となっていた。著者は、以下に述べる方法により、この点を解決する糸口を見出したことになると考えている。

セルロースナノ繊維を産生する酢酸菌を用いて、特定のナノパターンを有するテンプレート上での培養を試みた。足場としてまず、水酸基がその表面で一軸方向にレールのように配向する上述のネマティックオーダーセルロース

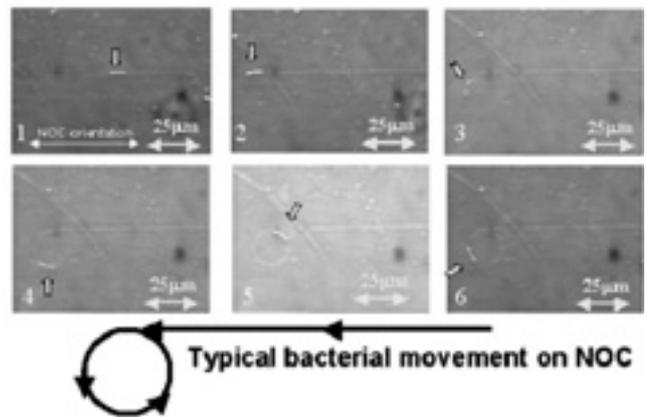


図5 CCDカメラ付きタイムラプス光学顕微鏡によるNO C上における菌の運動挙動の連続観察1-2:酢酸菌の分子レールに沿った走行、3-6:レールから脱線し、スパイラルを巻きながらの運動。

(NO C)を用いた。テンプレート上で酢酸菌が培養されると、生合成直後のセルロースマイクロファイブリンが、NO Cテンプレート表面の水酸基とその配列方向に沿って強い相互作用をし、それがアンカーとなり、さらに分泌を続けるため繊維が押し出された結果として、配向方向に菌の走行が限定される現象(図5)が見出された⁴⁻⁵⁾。同時に、堆積されるセルロースナノ繊維もレールに沿ってエピタキシャル的に堆積され、格子状三次元構造体が構築されていくことも明らかとなった。この一連の作用は、ナノスケールでの相互作用にはじまり、マイクロスケールでの三次元構造制御を可能にするものであった。言い換えると、テンプレート表面の特性が、酢酸菌の走行パターンに反映することが推定された。

まず、CCDカメラ付き光学顕微鏡下で、NO C上における菌の運動挙動を連続観察した際の典型的なパターンを図5に示す。このNO Cの分子配向方向、すなわち水酸基の極性方向は左右である。基本的には酢酸菌は表面の水酸基レールに沿ってまっすぐファイバーを生産しながら走行する。NO C上で構造の欠陥が存在すると、レールから脱線し、スパイラルを巻きながら運動と生産を続ける。そのまま運動を中止する場合もあれば、来たコースを逆行する場合も見られた。運動速度は、直進、スパイラル走行のいずれの場合も変わらず、24 $^{\circ}\text{C}$ で4.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ であった。条件が異なるので単純には比較できないが、これまでに報告されている25 $^{\circ}\text{C}$ での酢酸菌の運動速度2.0 $\mu\text{m}/\text{min}$ ¹⁷⁾よりかなり高速であった。しかし、この条件の違いによる生産速度の差異に関してはまだ検討する必要がある。

さらに、培養を続けると、24時間後にはもとのNO Cテンプレートの配向パターンは保持したまま、高さ方向に10倍程度増大していることが判明した。パターンが保持されたことにより、選択的にパターンに沿って酢酸菌が走行し、同様にナノ繊維を堆積させる挙動が推定される。

また、ハニカム細孔骨格を有するセルロースフィルムをテンプレートとする酢酸菌の自動3次元構造構築を試みたところ、培養方法によって酢酸菌がハニカム骨格上に選択

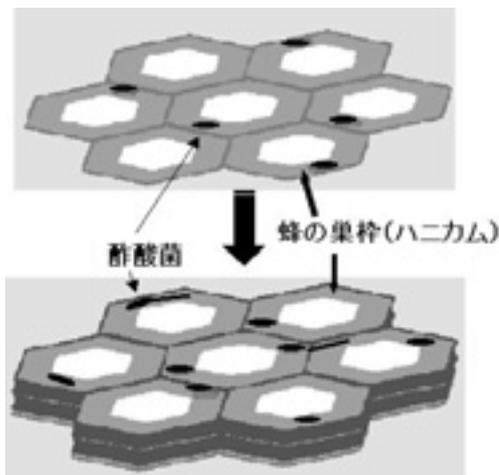


図6 蜂の巣枠の上でセルロースナノ繊維を分泌・堆積させながら制御走行する酢酸菌(模式図)。この繊維の堆積により三次元ハニカム構造体が自動的に出来上がる。

的に吸着し、同時に骨格に沿ってセルロースナノ繊維を分泌しながら走行するというNOCの場合と同様の現象が生じた(図6)¹⁸⁾。このことにより、非結晶性であり、一方で水酸基が極めて良好にレール状に配列する表面構造が形成されれば、酢酸菌のナノビルダーとしての機能が発揮されるのではないかという仮説に現在至っている。

5. おわりに

本研究は、セルロース繊維からなる種々のナノ/マイクロパターンを有する3次元構造への機能性の付与については、まだ、その途についたばかりであり、今後更なる検討が必要であることは言うまでもない。本稿でバクテリアセルロースとはどういうものか、それを菌体外に分泌し続けて走行するナノビルダーとしての酢酸菌とテンプレートの役割、そしてテンプレートになりうる構造条件、さらには実際にどのようにして3次元構造がテンプレート上で自動的に構築されるかという著者らの提案しているビルドアップ型構造構築ナノテクノロジーの一端がご理解いただけたら幸いである。また、この用途拡大の可能性について、ご意見をいただけたら幸甚である。

謝辞 本研究は、九州大学大学院生物資源環境科学府 森田光博教授、九州大学バイオアーキテクチャーセンター 笠井雅子博士をはじめ、資源高分子科学およびバイオマテリアルデザイン両分野の在籍・卒業の学生諸氏、ならびに独立行政法人森林総合研究所の戸川英二氏、菱川裕香子氏をはじめとする学内外の多くの方の共同研究の成果であり、

記してここに深く感謝いたします。

また、本研究の一部は、「農林水産省プロジェクト生物機能の革新的利用のためのナノテクノロジー・材料技術の開発」で実施しており、ここに感謝の意を示します。

文献

- 1) Y. Kataoka and T. Kondo, *Macromolecules*, **29**, 6356 (1996).
- 2) Y. Kataoka and T. Kondo, *Macromolecules*, **31**, 760 (1998).
- 3) Y. Kataoka and T. Kondo, *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**, 37 (1999).
- 4) 近藤ら、特開 2002-142796.
- 5) T. Kondo, M. Nojiri, Y. Hishikawa, E. Togawa, D. Romanovicz and R. M. Brown, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **99**, 14008(2002); T. Kondo *Nature Science update*, October 8 (2002), <http://www.nature.com/nsu/021007/021007-1.html>
- 6) S. Hesse and T. Kondo, *Carbohydr. Polym.* **60**, 457 (2005).
- 7) 近藤哲男, *Cellulose Commun.*, **12**, 52(2005).
- 8) T. A. Taton, *Nature Materials*, **2**, 73(2002).
- 9) 矢野浩之、杉山淳司、A.N. Nakagaito、能木雅也、松浦 徹、疋田 真、半田敬信 セルロース学会第11回年次大会要旨集 p1(2004)
- 10) T. Kondo, E. Togawa and R. M. Brown, Jr., *Biomacromolecules*, **2**, 1324(2001).
- 11) 近藤哲男 繊維学会誌, **57**, 234(2001).
- 12) T. Kondo, W. Kasai and R. M. Brown, Jr., *Cellulose*, **11**, 463(2004).
- 13) W. Kasai and T. Kondo, *Macromol. Biosci.*, **4**, 17(2004).
- 14) M. Kinoshita, T. Kondo and M. Morita, *ACS Meeting Abstract Part 1*, CELL59 (2004).
- 15) 谷中輝之、近藤哲男、森田光博 セルロース学会第11回年次大会要旨集 p.58(2004).
- 16) M. Takemura, T. Kondo and M. Morita, *American Chemical Society Meeting Abstract Part 1*, CELL53 (2004).
- 17) R. M. Brown, Jr., J. H. M. Willison and C. L. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci USA(PNAS).*, **73**, 4565(1976).
- 18) T. Kondo, W. Kasai, Y. Tomita and M. Morita, *ACS Meeting Abstract Part 1*, CELL 168 (2004).