

第1編 生物の働きとバイオケミカルエンジニアリングの基礎

特定研究 10

微生物産生セルロースの 生成機構と応用

九州大学大学院 近藤 哲男

特定研究 10

微生物産生セルロースの 生成機構と応用

九州大学大学院 近藤 哲男

1 はじめに

酢酸菌 (*Acetobacter xylinum*) は、幅40～60 nmの結晶性セルロースナノ繊維であるマイクロバイアルセルロース (俗称：バクテリアセルロース) を生産する。同時にこの菌は、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行するため、結果として、分泌ナノ繊維の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)。このペリクルが、食品の分野でナタデココとして一般に知られている。このバクテリアセルロースペリクルは、食用に用いられてきたほか、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) として用いられてきた。さらに



図1 酢酸菌と産生された結晶性セルロースナノ繊維 (幅40～60 nm) よりなるペリクル (ナタデココ) の電子顕微鏡像

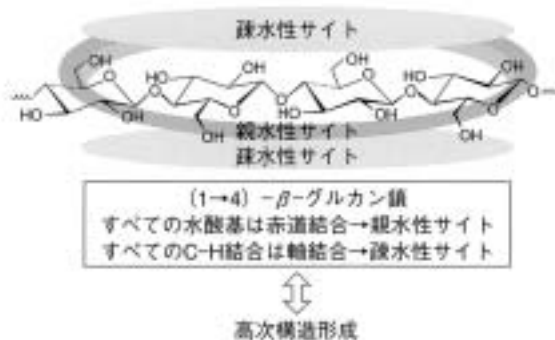
最近、ナノテクノロジー的観点から新しいコンセプトでの材料設計が活発に行われてきており、2004年4月のアメリカ化学会では、テキサス大学のBrown教授と著者がマイクロバイアルセルロースのセッションを開催し、そこでも注目される分野であった¹⁾。このように、この微生物が産生するセルロースナノ繊維からの機能材料創製は期待されている。ここでは、この微生物産生セルロースの生成機構、ならびにこの天然ナノ繊維を用いた新しい生物材料構築ナノテクノロジーについて概説する。

2 マイクロバイアルセルロースとは

2.1 セルロースの合成

1990年代から21世紀に入り、化石燃料代替エネルギーの開発、循環型社会の構築といった環境関連問題が最重要視されるようになり、持続可能なバイオマス資源であるセルロースが、本来の環境に優しい材料という性質に加えて、バイオマスエネルギーの供給源という別の形でも注目されるようになってきている。グルコース環が β -1,4グリコシド結合した直鎖状多糖高分子であるセルロースは、結晶性を示し、また、グルコース面に対して平行な方向は、水酸基のために親水性を示し、反対に垂直な方向は疎水性を示す(図2)。天然では分子単独で存在せず、ミクロフィブリルとよばれる微小結晶繊維を形成して存在することが知られている。この分子の生合成から、結晶化、そして繊維化に至るまでの過程が、セルロースの合成とみなされる。

酢酸菌 (*Acetobacter xylinum* = *Gluconacetobacter xylinus*) は好気性のグラム陰性菌で、大きさは菌株によって若干異なるが、幅 $0.5\sim 1\mu\text{m}$ 、長軸方向の長さが $2\sim 10\mu\text{m}$ 程度で、培地中のグルコースを炭素源にセルロースを合成する。このような菌が産生するセルロースをマ



グルコース残基が β -1,4グリコシド結合したもの、すなわちグルコースが2回らせんして連結した、セロビオースユニットを一単位とした鎖状高分子であり、分子構成単位であるグルコース残基は、C-2、C-3およびC-6位に水酸基を有し、2,3位の水酸基は二級、6位の水酸基は一級水酸基となっている。また、グルコース面に対して平行な方向は、水酸基のために親水性を示し、反対に垂直な方向は疎水性を示す。

図2 セルロース分子の化学構造(一次構造)

イクロバイアルセルロース（特に酢酸菌産生物を俗称でバクテリアセルロース）と呼ぶ。

セルロースは、ウリジン2リン酸グルコース（UDPグルコース：略号UDPG、**図3**）を前駆物質として細胞膜上のセルロース合成酵素により合成される。合成酵素がターミナルコンプレックス（TC）と呼ばれる集合体を形成する結果、そこから生合成された高分子鎖が自己集合し、最終的に微小結晶繊維が生成される。

セルロースの合成酵素遺伝子オペロンは、*bcsA*、*bcsB*、*bcsC*、*bcsD*で構成されている。*bcsA*は、84.4 kDaのタンパク質をコードし、それがUDPGに結合するサブユニットを持つ。*bcsB*は、85.3 kDaのタンパク質をコードし、それは合成活性化因子が結合するサブユニットを持つ。さらに、*bcsC*は、141.0 kDaのタンパク質をコードし、マイクロフィブリルの結晶化に関与し、17.3 kDaのタンパク質をコードする*bcsD*は、マイクロフィブリルの押し出しに関与すると考えられている^{2),3)}。これら4つの遺伝子にコードされた4つのポリペプチド（A～D；*bcsA*、*bcsB*、*bcsC*、*bcsD*に対応）によるセルロース合成複合体のモデルを**図4**に示す。

セルロース生合成の合成経路の全容は明らかではないが、上記のUDPGを基質として

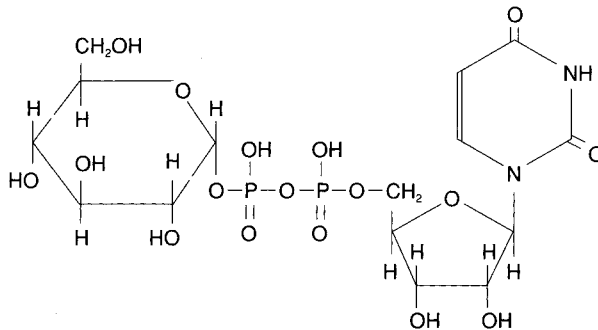


図3 ウリジン2リン酸グルコース（UDPグルコース：略号UDPG）

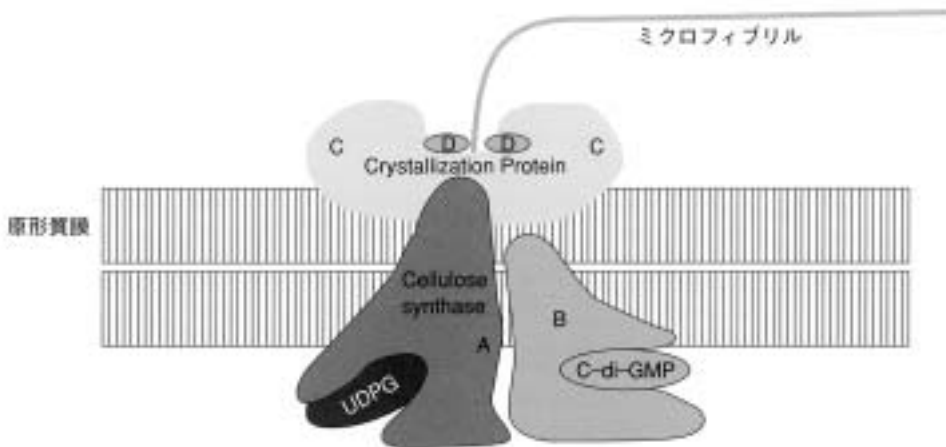
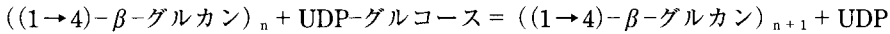


図4 酢酸菌の合成オペロンと4つの遺伝子にコードされた4つのポリペプチドによるセルロースの合成モデル^{2), 4), 5)}

CesAと呼ばれる酵素がグルコシル転移反応を触媒すると考えられている。このCesA酵素は、グルコースのドナーであるUDPGとアクセプターであるグルカン鎖の非還元末端とに特異的に結合する。この(1→4)-β-グルカン合成酵素の反応は、次のような簡単な化学反応式で示される。



2.2 酢酸菌のセルロース結晶繊維産生

酢酸菌に存在するセルロース合成酵素顆粒(ターミナルコンプレックス: TC)は、細胞の長軸にはほぼ平行に(やや角度がある)一列に直線型に並んでいる。個々のTCによって合成され、押し出し孔から培地中に噴出された直径1.5 nmのフィブリルをサブエレメンタリーフィブリル、サブエレメンタリーフィブリルが数本集まって形成されたフィブリルをマイクロフィブリル(幅4 nm程度)、マイクロフィブリルがさらに集合しリボン状になったものを「セルロースリボン」あるいは「バンドル」と呼ぶ。

図5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、セルロース合成酵素顆粒(TC)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1つのTCを構成し、さらに上述のように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、マイクロフィブリルを形成させる。すなわち、セルロース分子鎖一本を生合成するCesA酵素がノズルの役割を果たし、それが配列する(TC化)ことにより、分子の生合成直後のナノ繊維化を促す。さらに、このTCの菌体を横断するような直線配列により、高次のリボン状結晶構造体が形成される。また、酢酸菌は、長軸の周りを右回りに自己回転しながら、菌体外への繊維噴出の反作用から、噴出方向と180度反対方向に25℃で約2 μm/minの速度で走行する⁶⁾。さらに、そのセルロースリボンは生産時の菌の自己回転運動に起因してねじれる(図6)。このように菌によって生合成され、階層構造形成されたセルロースナノ繊維材料をマイクロバイアルセルロースと呼ぶ。この産生繊維は、前述図1の

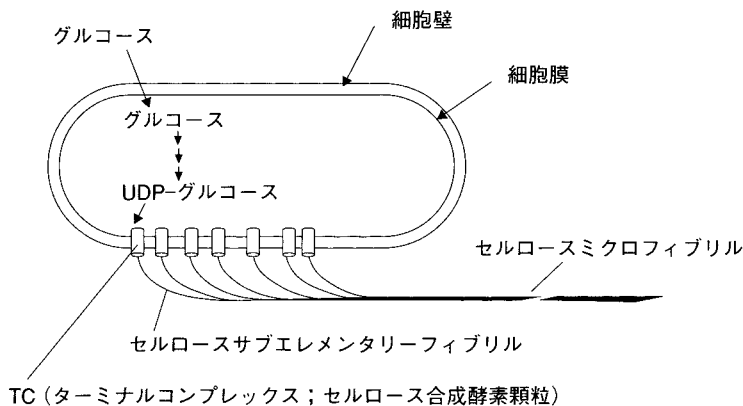


図5 酢酸菌および細胞膜貫通合成酵素から菌体外に産生される階層構造を有するセルロースナノ繊維(幅40~60nm)の模式図

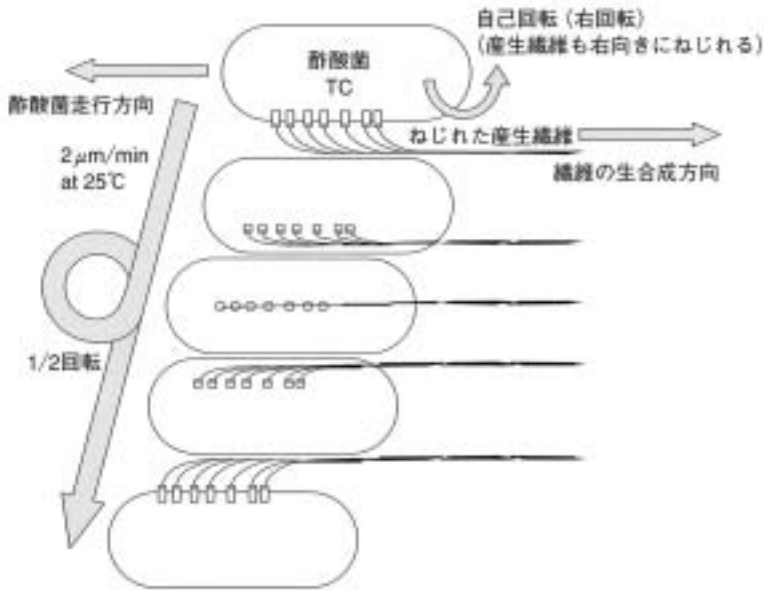


図6 酢酸菌のセルロース繊維産生に伴う走行、自己回転、およびねじれるセルロースナノ繊維 (幅40~60nm) の模式図

ようにネットワークを形成しながら堆積され、ペリクルと呼ばれるゲル状の膜ができあがる。これが食品のナタデココとして、一般に知られている。

このマイクロバイアルセルロースナノ繊維は、極めて高結晶性 (95%以上) を示し、1本鎖の三斜晶のI α と呼ばれる結晶形と2本鎖単斜晶I β と呼ばれる結晶形の2種が混在する複合結晶 (比I α /I β = 35/65) からなる。それらの繊維中での存在形態についてまだ定説はないが、繊維軸あるいはラテラル方向に共存していると考えられている^{7),8)}。単斜晶のI β は、コットンなどの植物細胞壁に形成される天然セルロース繊維に共通する結晶形である。したがって、I α とI β が混在する酢酸菌産生セルロースナノ繊維の表面特性は、綿セルロースのそれとは異なるものとして考えなければならない。

3 マイクロバイアルセルロースの可能性

3.1 医療用利用

筆者らが開催した上記のアメリカ化学会でのマクロバイアルセルロースのセッションでは、医療用利用の研究発表が多く、その一部を以下に示す (図7)。ポーランドのCzajaらの研究で、マクロバイアルセルロース膜が保水性の極めて高いことを利用して、火傷の患者治療における治癒性能を検討した。最近、彼らは、アメリカのテキサス大学のBrownとの共同研究でさらに展開し、この材料は火傷治療材として実用化レベルまで到達している。また、ドイツのKlemmとSchumannらの研究で、手術時の動脈、神経などの保護に、種々のサイズ

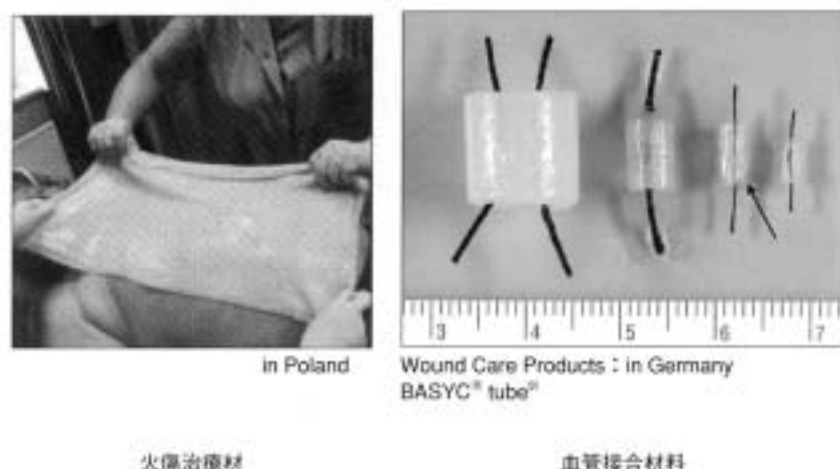


図7 生体材料分野での研究例

に成型可能なBASYS[®]バクテリアセルロースチューブの使用が可能となっている。このように、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、セルロース材料が医療用材料分野から長く遠ざけられてきたが、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からの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。これらの新規なセルロース材料の性質は、上述のように従来の植物由来のセルロース材料との表面構造の違いに起因するものと推定される。

3.2 高強度複合材料、透明繊維強化材料

矢野らは、フェノール樹脂中にマイクロバイアルセルロースペリクルを圧縮したシートを含浸させ、積層熱圧縮して、木材セルロース繊維を用いた場合より、1.5倍のヤング率(約30 Gpa)を示す高強度複合材料を作製している¹⁰⁾。これは、ペリクルのナノからマイクロまで均一に形成されているネットワーク構造に由来すると考えられる。また、彼らは熱機械的特性、光学特性においてユニークな特性を発現する透明繊維強化材料を、同様にセルロースペリクルをエポキシ樹脂に含浸させて作製した¹¹⁾。これらは、ペリクルがナノ繊維からなることから、繊維による強度補強のみならず、その透明性に着目している点で、マイクロバイアルセルロース利用に新たな方向性を提案している。

3.3 酢酸菌をナノビルダーとして用いる自動三次元構造構築

高分子と生物体とのナノスケール界面での相互作用の利用は、新たな構造体を生み出す可能性を秘めている。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的役割を期待して用いられている。筆者らは、強度補強の役割を持つ足場に、構造構築の方向を制御させる「テンプレート(レール)」という機能を加えた¹⁰⁾。図8で模式的に示すように、

そのレール上で酢酸菌の培養を行うと、分泌セルロースナノ繊維の堆積方向が同時に制御され、足場パターンそのまま、その三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行うプロセスができあがる。しかも、この三次元構造体は、高結晶性のセルロースナノ繊維からなっているため、十分な強度を持ち、生分解性があるのはもちろんのこと、生体適合性もあり、ナノからボトムアップ的に構築される機能材料として期待される。

この材料構築法のコンセプトは、酢酸菌の物質生産に起因する自由運動を、セルロース分子からなる種々の二次元足場パターン（配向レール（ネマティックオーダーセルロース：NOC）¹²⁾、ハニカム¹³⁾、その他）を持つ高分子レールを用いて制御することにある。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であろう。土台が高分子レールからなる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（ナノビルダー）ということになる。このようにして最終的にパターン表面上にセルロースナノ繊維からなる三次元構造が構築されてくる^{14),15)}。この方法が、酢酸菌をナノビルダーとして用いた三次元構造体構築法となる。

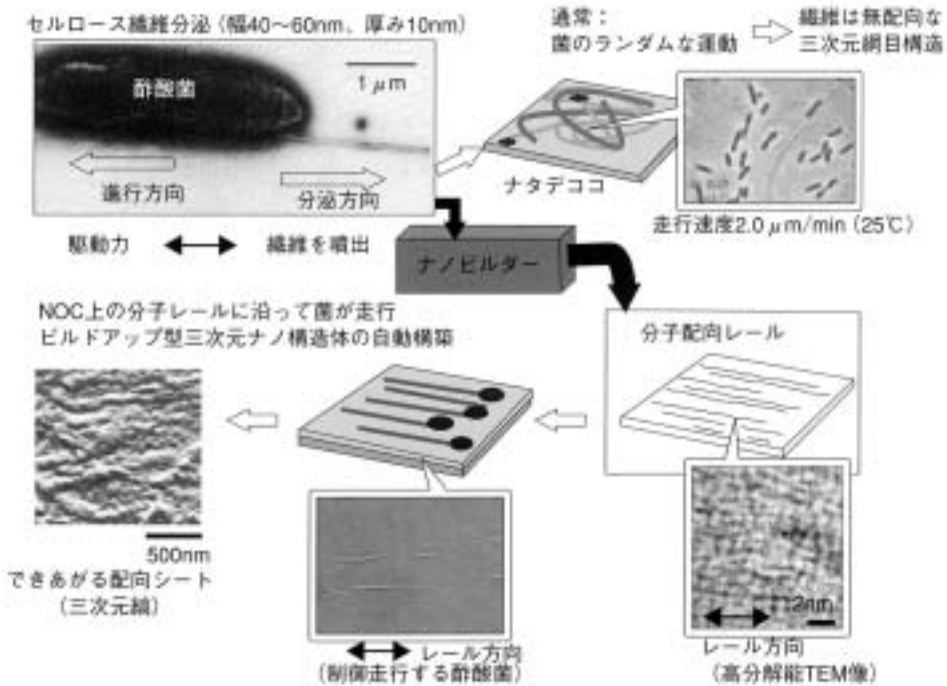


図8 ナノビルダー - 酢酸菌 (*Acetobacter xylinum*) の三次元構造体自動構築プロセス¹³⁾

4 おわりに

通常のコットンや紙などを構成するセルロース繊維と、マイクロバイアルセルロースファイバーとの大きな違いは、繊維の結晶構造、マイクロカナノかの大きさ(幅)の違い、そして結晶体がどのように存在するかの階層構造の違いである。最近、従来のセルロース材料とマイクロバイアルセルロースとは極めて性質が異なり、特に、その表面特性が著しく異なることが筆者らの研究からわかってきた。しかし、この酢酸菌産生セルロースからなる種々の三次元構造材料への機能性の付与については、その途についたばかりであり、今後さらなる検討が必要であることは言うまでもない。

参考文献

- 1) Chemical & Engineering News, **82**, p17 (2004).
- 2) H. C. Wong et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, **87**, p.8130 (1990).
- 3) I. M. Saxena, F. C. Lin, R. M. Brown Jr. : *Plant Mol. Biol.*, **15**, p.673 (1990).
- 4) G. Volman, P. Ohara, M. Benziman : *Carbohydr. Eur.*, **12**, p.20 (1995).
- 5) S. Kimura, T. Kondo : *J. Plant Res.*, **115**, p.297 (2002).
- 6) R. M. Brown Jr., J. H. M. Willison, C. L. Richardson : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, p.4565 (1976).
- 7) T. Imai, J. Sugiyama : *Macromolecules*, **31**, p.6375 (1998).
- 8) N. Hayashi, T. Kondo, M. Ishihara : *Carbohydr. Polym.*, **61**, p.191 (2005).
- 9) D. Klemm, D. Schumann et al. : *Prog. Polym. Sci.*, **26**, p.1561 (2001).
- 10) A. N. Nakagaito, S. Iwamoto, H. Yano : *Appl. Phys.*, A80, p.93 (2005).
- 11) H. Yano et al : *Adv. Mater.*, **17**, p.153 (2005).
- 12) T. Kondo, E. Togawa, R. M. Brown Jr. : *Biomacromolecules*, **2**, pp.1324-1330 (2001).
- 13) W. Kasai, T. Kondo : *Macromol. Biosci.*, **4**, p.17 (2004).
- 14) 近藤ら、特開2002-142796
- 15) T. Kondo, M. Nojiri, Y. Hishikawa, E. Togawa, D. Romanovicz., R. M. Brown Jr. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14008-14013 (2002) ; T. Kondo : *Nature Scienceupdate* : Bugs trained to build circuit, October 8 (2002) , <http://www.nature.com/nsu/021007/021007-1.html>