

ENGINEERING OF CELLULOSE-PRODUCING BACTERIA FOR DESIGNING BIOMATERIALS

高濱, 良

<https://hdl.handle.net/2324/4784685>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏名	高濱 良			
論文名	ENGINEERING OF CELLULOSE-PRODUCING BACTERIA FOR DESIGNING BIOMATERIALS (生体材料設計のためのセルロース合成細菌の改変)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	近藤 哲男
	副査	九州大学	教授	北岡 卓也
	副査	九州大学	教授	竹川 薫
	副査	東京大学	教授	五十嵐 圭日子

論文審査の結果の要旨

木質系新素材としてセルロースナノファイバー (CNF) が注目を集めている。木質由来 CNF ばかりでなく、微生物である酢酸菌が菌体外に分泌するセルロース純度の高いバクテリアセルロースナノファイバー (BNC) が物理的に架橋した網目構造からなるゲル状膜 (ペリクル) は、優れた力学特性や生体適合性を有するヒドロゲルであり、医用材料などの分野への応用研究が進められている。本論文は、このペリクルのさらなる機能材料化を目指し、酢酸菌を遺伝子導入により改変し、生理活性の高い多糖であるヒアルロン酸 (HA) と BNC からなるナノコンポジット繊維を菌体により *in vivo* で合成・分泌させた。得られたナノコンポジットのキャラクタリゼーションを通して、その物質生産・構築メカニズムの理解を試み、それらの知見をもとにした工学的応用の可能性を提示している。

まず、微生物体内での HA 合成代謝経路を検討したのち、HA の菌体内合成に最低限必要な 2 つの酵素遺伝子 (HA 合成酵素遺伝子 *pmhas*、UDP-グルコース脱水素酵素遺伝子 *ugd*) の酢酸菌への導入を検討し、この遺伝子工学的操作で改変した酢酸菌が通常の酢酸菌と同様に、主に BNC ネットワークからなるペリクルを生成することを見出している (以下、*in vivo* 複合化 HA/BNC ペリクル)。

次いで、HA に選択的に結合する蛍光色素 (ビオチン化 HABP と iFluor546-streptoavidin を用いた二段階染色剤) と BNC の選択的蛍光色素であるカルコフローールホワイトとを用いて酢酸菌菌体からの分泌物を二重染色した共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) 観察より、HA が菌体外に分泌され BNC を被覆し、しかも一本のナノ繊維形態をとることを明らかにしている。また、形成される *in vivo* 複合化 HA/BNC ペリクルでは、通常の酢酸菌の場合に比べ架橋密度が 70%程度であり、繊維幅の太いナノコンポジット繊維が網目状に架橋した構造であることを見出している。

また、精製した *in vivo* 複合化 HA/BNC ペリクルの分光分析法等を駆使した特性解析を行い、遺伝子導入酢酸菌が重量平均分子量 53,000 程度の HA を菌体内合成し、分泌された HA がペリクル中に存在することを明らかにしている。さらに、イオン液体を用いてペリクル中の HA を抽出し定量を行ったところ、HA を加えた培地で酢酸菌を培養して BNC と複合化する場合の HA 含有率 300 $\mu\text{g/g}$ と比べ、本 *in vivo* 複合化では 95 $\mu\text{g/g}$ と約 1/3 ではあるものの、種々の化学処理に対

して被覆 HA が安定で強固に吸着していることを見出している。これは、*in vivo* 複合化では、より強く HA と BNC とが相互作用し、HA と BNC が機械的表面複合化ではなく、階層的に複合化していることを示唆する新たな知見である。

この強固に HA が吸着した複合ナノファイバーを含有するペリクルへの正常ヒト表皮角化細胞の接着、分裂・増殖に関し、細胞接着性の指標として細胞占有面積で検討したところ、*in vivo* 複合化 HA/BNC ペリクル表面において顕著に向上した。*in vivo* 複合化 HA/BNC ペリクルの HA 含有量が微量であるにもかかわらず、HA の安定性と細胞適合性で優れた性状を示すことは、菌体から直接分泌される本プロセスに特有の結果と考えられ、生体材料への応用も期待される。

最後に、遺伝子導入酢酸菌がナノコンポジットの分泌の際に、どのようにセルロース合成と HA 分泌が連動するか明らかにするため、セルロース合成酵素複合体 (TC) のコンポーネントを欠損した変異株に、蛍光タンパク質マーカーを導入した欠損遺伝子を相補的に導入することで TC を可視化し、CLSM により HA の分泌挙動の解明を試みている。その結果は、コンポジット繊維分泌が酢酸菌のもつ本来の BNC 合成・排出機能と密接に関連するという示唆を与えており、加えて相補組換え株を用いた実験により、通常酢酸菌を宿主とした場合に比べてより高収率で HA が合成されることも明らかにしている。さらに、これらの結果をもとに複合材の生産性向上に向けた戦略を提案するに至っている。

以上要するに、本論文は、遺伝子導入酢酸菌によるナノコンポジット物質生産・構築メカニズムの理解をもとにした工学的応用の可能性を示し、循環型生物材料設計への新たな展開を与えることから、生物材料設計学のみならず、サステナブル資源科学に寄与する価値のある業績と認める。

よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。