

組換え枯草菌によるショ糖からの DFA IV 生産の向上にむけて

応用生物科学専攻 生命分子科学講座 応用菌学 村尾 和樹

1. 背景と目的

DFA IV (di-D-fructofuranosyl-2,6'-2',6-dianhydride) は新規のプレバイオティック効果をもつオリゴ糖として期待されている。DFA IV はレバンから levanfructotransferase (LFTase) により生産される。先行研究においてショ糖からレバンを生成する levansucrase をもつ *Bacillus subtilis* 168 に *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 由来の LFTase 遺伝子を発現させることで、単一培養系によるショ糖からの DFA IV 生産が可能となった。しかしながら、未だ高効率な生産には至っておらず、本研究では組み換え枯草菌を用いた単一培養系における生産効率の更なる向上を目指した。

2. 結果と考察

DFA IV 直接生産菌である *B. subtilis* 168/pLFT-SD36 を、スクロースを基質とした DFA IV 生産培地で坂口フラスコを用いて 37°C で振とう培養した。スクロースは培養 72 時間においてすべて消費され、培養終了後 DFAIV 濃度は 35g/L に達しており、その収率は 17.6% であった。培養液中からエタノール沈殿によりレバンを回収、定量したところ、13g/L のレバンが残存しており、レバンからの DFAIV 生産が律速段階であることが示唆された。ベクターの脱落、プロテアーゼによる分解による LFTase の発現量の低下が考えられたが、ベクターの保持率に有意な差はなく、プロテアーゼ阻害剤、プロテアーゼ欠損株を用いても生産量は改善されなかった。次に、単一培養系における LFTase の濃度の影響を検討するため、His-タグをつけた LFTase を pET ベクターへと組み込み、大腸菌で発現させた後、アフィニティクロマトグラフィーによって精製し、培養液への途中添加を試みた。その結果、精製 LFTase の添加によって DFA IV 生産速度の上昇は見られたが、最終的な生産量に変化は見られなかった。さらに、高濃度で精製 LFTase を添加した条件では DFA IV の生産量が減少し、代わりにレバンビオースが生成していることが分かった。

さらに、LFTase の諸性質を明らかにするため、精製した LFTase と *B. subtilis* の培養液中から抽出したレバンを用いて酵素反応を行った。その結果、レバン溶液に対する酵素反応は変換効率で 65% が上限であると分かった。また、LFTase が長時間の反応では加水分解によって DFAIV からレバンビオースを生成させること、および DFA IV の高濃度条件では分子間転移反応によって三糖、四糖を生成させることが示唆された。これらの結果から、レバンからの DFAIV 生成の向上には酵素量の増加ではなく、レバンの生成量の増加あるいは LFTase の改変による平衡状態の改善が必要であることが示唆された。今後はスクロースからのレバン変換効率の向上、および LFTase のアミノ酸置換による DFAIV 加水分解の阻害を試みることで生産効率の向上を目指したい。

