

ポリグルタミン酸をベースにした革新的な  
抗菌性接着剤の開発

大阪市立大学大学院 工学研究科

尾島 由紘

$\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) は、バシラス属細菌により生産される高親水性のアニオン性ポリマーで、生体適合性に優れ増粘性や保湿性を有するため、食品や化粧品、凝集剤に使用されている。本研究グループは、 $\gamma$ -PGA を高生産する *Bacillus licheniformis* RK14-46 株を土壌から獲得したのち、市販の  $\gamma$ -PGA より大きな分子量を持つことを明らかにし [参考文献 1]、この株の育種により培地中に 45 g/L で生産可能な大量生産株の構築に成功した[参考文献 3]。

一方で、細菌が培地中に生産した  $\gamma$ -PGA 回収方法に関して、従来のエタノール沈殿法は大量のエタノールを必要とする点と操作が煩雑である点が問題となっていた。筆者らは、 $\gamma$ -PGA を含む培地に殺菌効果を持つ第四級アンモニウム塩(DOBP10)を添加するだけで、凝集沈降する複合体を形成し、回収が格段に容易になることを学術論文で発表した[参考文献 2]。本

方法によりエタノール使用量を大幅に削減できたと同時に、得られた複合体は優れた抗菌性と粘性を持つ新規な抗菌性接着剤としての可能性を持っていた(図 1)。本内容は、編集者が優れた論文を選ぶ Editor's choice 賞を受賞するなど、専門家からも高い評価を得ている。従来の文化財修復工程には、水で剥離が可能であることなどが理由で、伝統的にでんぷんのりが使用されてきたが、カビが発生するなどの問題点が指摘されている。本研究では、 $\gamma$ -PGA をベースにした革新的な抗菌性接着剤の開発を目的とし、でんぷんのりに代わる接着剤としての詳細な機能評価を行う。

## 【実験方法】

### ・ *B. licheniformis* RK14-46 株の培養と $\gamma$ -PGA の精製

RK14-46 株を LB 寒天培地に植菌し、1 晩培養したものを蓋つき試験管に入った 3 mL の 3YD 培地に植菌し、30°C、16 時間、140 rpm で振とうして前培養した。次に、前培養液を 500 mL のバッフル付き三角フラスコ中に入った 100 mL の半合成培地に菌体濁度 ( $OD_{600}$ ) が約 0.05 になるよう植菌した。本培養は 37°C、140 rpm で 48 時間行った。 $\gamma$ -PGA の精製は、エタノール沈殿法によって行った。サンプリングした培養液を純水で 10 倍希釈しボルテックス後、4°C、20,000 × g、30 分間遠心し、菌体と培養上清に分離した。培養上清をファルコンチューブに入れ、-20°C に冷却された 99.5% エタノールを培養上清

### バシラス属細菌が生産する $\gamma$ -ポリグルタミン酸

- ・当研究室独自に単離した細菌で生産 T. Liu et al., J. Chem. Eng. Jpn., 50(3), 201-206 (2017)
- ・市販品よりも大きな分子量 T. Liu, Y. Ojima et al., J. Chem. Eng. Jpn., 51(5), 431-437 (2018)
- ・大量生産株の育種に成功 **さらに** ⇒ Editor's choice 賞

Y. Ojima et al., J. Biotechnol., 304, 57-62 (2019)

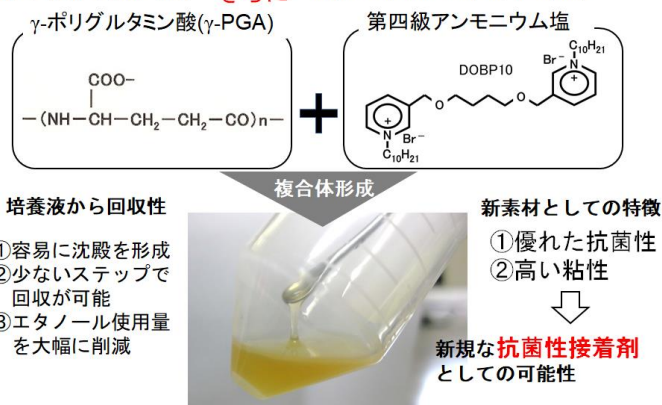


図 1  $\gamma$ -PGA を用いた新規抗菌性接着剤の開発

の2倍量加えて、 $\gamma$ -PGAを沈殿させた。その後、4°C、20,000×g、30分遠心した。沈殿物を純水10 mLで溶解し、透析膜チューブを用いて1晩透析した。透析した溶液を凍結乾燥して精製 $\gamma$ -PGAを得た。また、得られた $\gamma$ -PGAの重量を測定し、培養液中の $\gamma$ -PGA濃度を計算した。

- ・アガロースゲル電気泳動による分子量の推定

2%(w/v)のアガロースゲルに、サンプル10  $\mu$ LとLoading buffer 1  $\mu$ Lを混合してアプライし、100 V、30分電気泳動した。泳動後、0.1%メチレンブルーを用いてゲルを染色し、脱色は純水を用いた。分子量の指標として、市販 $\gamma$ -PGA（平均1,500 kDa、ヤクルト製薬工業社）と本学理学研究科の藤田憲一先生よりいただいた分子量既知の $\gamma$ -PGA（平均3,000 kDa[参考文献4]）を用いた。

- ・第4級アンモニウム塩(DOBP10)と $\gamma$ -PGAの複合体の作製

水溶液中で、精製した $\gamma$ -PGAのカルボキシ基とDOB10のモル比が1:1.2となるように混合し、60°Cの湯浴で5分間反応させた。12,000×gで30分間遠心した後に60°Cの純水で洗浄し、再び遠心して凍結乾燥を行い、 $\gamma$ -PGA複合体を回収した。回収した $\gamma$ -PGA複合体をエタノールに再溶解したものを接着剤として用いた。

- ・ $\gamma$ -PGA複合体の抗菌試験

これまで、 $\gamma$ -PGA複合体の大腸菌に対する抗菌活性が報告されているが[参考文献2]、接着剤として使用する際に主要なターゲットとなるカビに対する抗菌活性は確認されていなかった。そこで、黒カビとして知られている*Aspergillus niger*と青カビとして知られている*Penicillium chrysogenum*に対する抗菌活性を評価した。方法としては、試験官にでんぷんのりを付着させたもの、 $\gamma$ -PGA複合体を付着させたものを用意し、培養液を添加した条件で上記の菌種を培養した。

- ・接着試験、引張試験、簡易剥離試験

接着試験は、スライドガラスや、ろ紙同士を $\gamma$ -PGA複合体を用いて接着させ、一晚乾燥させることで行った。接着強度は、指で力をかけて見積もった。引張試験は、スライドガラス同士を25 mm×25 mmの範囲で接着させ、引張せん断試験機AGS-X(島津製作所)を用いて1mm/minの速度で引っ張り、引張強度を測定した。測定前は、接着後にずれないようにクリップで固定し、1晩減圧乾燥を行った。簡易剥離試験は、OHPフィルム(ポリエステル)を幅5 mm、長さ6 cmに切り取り、0.1% $\gamma$ -PGA複合体溶液20  $\mu$ Lを、長さ3 cmの部分まで塗布した。そして、スライドガラスに張り付け、3日間乾燥させた。セロハンテープとビニールテープは同様の大きさに切り取り、そのままスライドガラスに張り付けた。乾燥後、指で力をかけておおよその剥離強度を見積もった。

【結果および考察】

・回収した  $\gamma$ -PGA の分子量の推定

RK14-46 株の培養液中に約 20 g/L の濃度で  $\gamma$ -PGA が生産され、エタノール沈殿により回収した。続いて、アガロースゲル電気泳動により精製した  $\gamma$ -PGA の分子量を推定する実験を実施した。結果を図 2 に示す。分子量のより大きいサンプルの方が写真において上部にバンドが出現する。この結果から、回収された RK14-46 株の  $\gamma$ -PGA は、市販の  $\gamma$ -PGA(平均 1500 kDa)より、明らかに分子量が大きいことが確認された。一方で、分子量既知のサンプル(平均 3000 kDa)よりは少し小さいことが同時に確認された。以上の結果から、RK14-46 株が生産する  $\gamma$ -PGA の分子量は、1500 から 3000 kDa の間であると推定された。

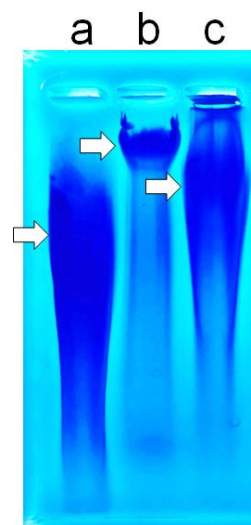


図 2  $\gamma$ -PGA のアガロースゲル電気泳動写真。a:市販品(約 1500 kDa)、b:分子量既知サンプル(約 3000 kDa)、c: RK14-46 株由来サンプル

・  $\gamma$ -PGA 複合体のカビに対する抗菌試験

RK14-46 株の培養液から精製した  $\gamma$ -PGA と DOBP10 を溶液中で混合し、複合体を形成させた。エタノールに再融解することで図 1 の写真にあるような粘性の高い化合物が回収された。これまで、大腸菌への抗菌活性は確認されていたが、今回想定している接着剤の使用用途は、文化財修復工程などであり、伝統的にでんぷんのりが使用されてきた。

		添加なし	でんぷんのり	$\gamma$ -PGA複合体
1晩培養	大腸菌 <i>E. coli</i>			
	黒カビ <i>A. niger</i>			
3日培養	青カビ <i>P. chrysogenum</i>			

図 3  $\gamma$ -PGA 複合体の抗菌活性試験結果

でんぷんのりにおいては、カビの発生が問題となっていることから、今回の抗菌試験では、黒カビ(*A. niger*)や青カビ(*P. chrysogenum*)への効果を確認した。結果を図 3 に示す。まずは、大腸菌に関しては、栄養成分が入った培養溶液中において、でんぷんのりには抗菌活性は全く確認されず、菌が増殖し濁っている様子が確認された。一方で、 $\gamma$ -PGA 複合体を添加した場合は、溶液が透き通っており、大腸菌が増殖していないことが確認

され、過去の報告通りの結果となった。一方で、黒カビならびに青カビにおいては、培養液中において、白く見える菌糸の塊を形成し増殖している様子が確認された。またでんぷんのりを添加した条件においても同様の菌糸が確認された。一方で、 $\gamma$ -PGA 複合体を添加した場合は、菌糸がほとんど観察されず、添加時から増殖していないことがわかった。以上の結果から、 $\gamma$ -PGA 複合体はカビに対しても強い抗菌作用を持つことが確認できた。

#### ・ $\gamma$ -PGA 複合体を用いた接着実験、接着強度測定、剥離試験

続いて、 $\gamma$ -PGA 複合体を用いて、スライドガラスやろ紙を対象とした接着試験を実施した。この際に、市販の  $\gamma$ -PGA を用いて作製した複合体と接着強度を比較した。図 4 に示すように、市販の  $\gamma$ -PGA で作製した複合体は、混合直後において小さな複合体が形成し、白濁した状態となったが、RK14-46 株が生産する  $\gamma$ -PGA で作製した複

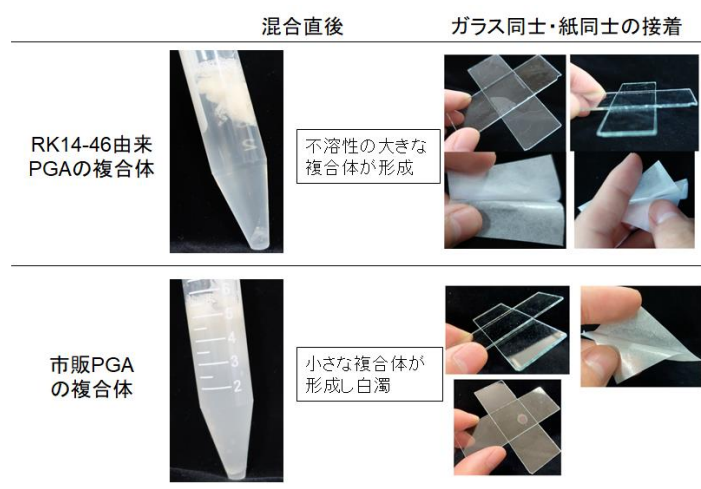


図 4  $\gamma$ -PGA 複合体を用いた接着実験

合体は、不溶性の大きな塊が形成されるなど、複合体の見た目にも違いが表れた。さらに、これらの複合体により、スライドガラス同士、ろ紙同士を接着させたところ、どちらの複合体を用いても接着された。しかしながら、指を用いて力をかけて接着強度を見積もったところ、RK14-46 の PGA 複合体の方が接着強度が大きく、分子量に依存することが考えられた。この結果から、RK14-46 株の  $\gamma$ -PGA 複合体が接着剤として機能する可能性が示唆された。

続いて、引張せん断試験機を用いた引張試験を行い、接着面に平行な引張りせん断荷重の評価を試みた。まずは、比較対象として、でんぷんのりを用いたところ、0.5 MPa という値が計測され、接着剤として機能していることが確認された。一方で、RK14-46 株の PGA 複合体では、0.0005 MPa ほどの荷重で、接着面の滑りが生じ、でんぷんのりに比べて引張強度が大幅に小さいことが明らかとなった。また予想外にも、この引張試験から、 $\gamma$ -PGA 複合体は接着剤よりも粘着剤に近い性質を持つことが同時に判明した。接着剤が「使う前は液体で、貼り付けると固体になる」のに対し、粘着剤は「液体と固体の両方の性質を持ち、常に濡れた状態を安定して保っている」ものである。

そこで、スライドガラスに対する簡易剥離試験を行い、 $\gamma$ -PGA 複合体の粘着剤としての剥離強度を評価したところ、市販のセロハンテープやビニールテープと比較して、剥離強度は小さいという結果となった。

以上の検討より、 $\gamma$ -PGA 複合体は接着剤よりも粘着剤に近い性質を持つことが明らかとなったが、その剥離強度は市販の粘着剤と比較すると小さく、今後は RK14-46 株の更なる遺伝子改変等により生産する  $\gamma$ -PGA の分子量を大きくすることや、 $\gamma$ -PGA 複合体の形成条件を検討することで、より剥離強度の大きな粘着剤を作製する予定である。

#### 【要約】

本研究では、土壌から単離した *B. licheniformis* RK14-46 株が生産する  $\gamma$ -PGA の分子量が 1500 から 3000 kDa の間であることを明らかにした。さらに、第 4 級アンモニウム塩である DOBP10 との反応で作製した  $\gamma$ -PGA 複合体が大腸菌のみならず、でんぷんのりの劣化を引き起こすカビに対しても強い抗菌作用を示すことを実証した。得られた  $\gamma$ -PGA 複合体の接着剤としての機能を評価したところ、ガラスやろ紙を接着できることを明らかにしたが、引張試験の結果より、引張強度は市販のでんぷんのりと比較して小さく、接着剤よりは粘着剤に近い性質を持つことが明らかとなった。粘着剤としての剥離強度を簡易試験により評価すると、市販のセロハンテープやビニールテープと比較して小さいことが判明したため、今後は RK14-46 株の更なる遺伝子改変等により生産する  $\gamma$ -PGA の分子量を大きくすることや、 $\gamma$ -PGA 複合体の形成条件を検討することで、より剥離強度の大きな粘着剤を作製する必要がある。

#### 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に感謝いたします。分子量既知の  $\gamma$ -PGA をご提供いただきました本学理学研究科の藤田憲一先生、引張強度試験にご協力いただきました本学工学研究科の佐藤絵里子先生に謝意を表します。また、第 4 級アンモニウム塩(DOBP10)をご提供いただきましたタマ化学工業(株)に謝意を表します。

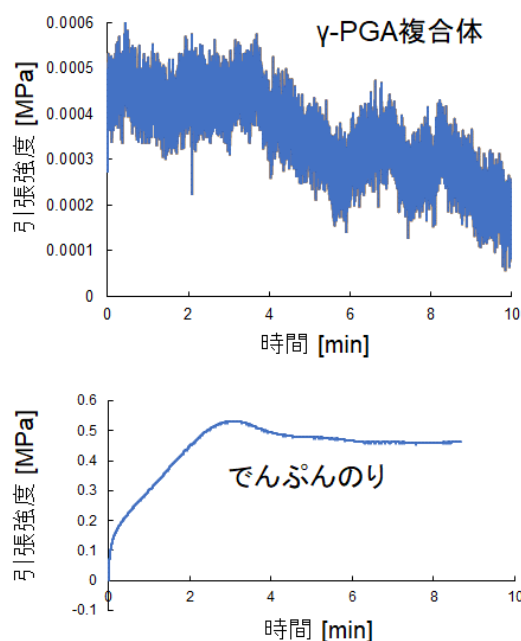


図 5  $\gamma$ -PGA 複合体を接着剤として用いた際の引張試験

【参考文献】

1. Liu T, Yamashita K, Fukumoto Y, Tachibana T, Azuma M. Flocculation of real sewage sludge using polyglutamic acid produced by *Bacillus* sp. isolated from soil. *J Chem Eng Jpn.* 2017;50(3):201-206.
2. Liu T, Nobeshima H, Ojima Y, Azuma M. A new method to purify poly- $\gamma$ -glutamic acid using gemini quaternary ammonium salts and characterization of its ionic complex. *J Chem Eng Jpn.* 2018;51(5):431-437.
3. Ojima Y, Kobayashi J, Doi T, Azuma M. Knockout of *pgdS* and *ggt* gene changes poly- $\gamma$ -glutamic acid production in *Bacillus licheniformis* RK14-46. *J Biotechnol.* 2019;304:57-62.
4. Fujita K, Tomiyama T, Inoi T, Nishiyama T, Sato E, Horibe H, Takahashi R, Kitamura S, Yamaguchi Y, Ogita A, Tanaka T. Effect of *pgsE* expression on the molecular weight of poly( $\gamma$ -glutamic acid) in fermentative production. *Polymer J.* 2021;53:409–414.