

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658146

研究課題名(和文) マイクロチャンネル酢酸菌培養による新規微生物ナノ紡糸

研究課題名(英文) Novel microbial spinning of nanofibers using micro-channel culture of *Gluconacetobacter xylinus*

研究代表者

近藤 哲男 (Kondo, Tetsuo)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30202071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、細胞壁形成におけるナノからマイクロサイズに至る繊維化システムをヒントに、新たなナノ繊維化プロセスの構築に挑戦するものである。研究代表者は、マイクロメートルサイズの流路(マイクロチャンネル)の空間を用い、その中の流動場で酢酸菌を培養するという方法で分泌ナノファイバーの自己形成を誘導した。その際、流路内で菌の走行とファイバーの形状とを同時制御させ、ナノサイズで制御可能な新規の微生物紡糸システムまでへの展開を検討した。

研究成果の概要(英文)：This project deals with an attempt for proposing a novel nano-fiber spinning process. The concept was based on formation of hierarchical structure of higher plant cell walls from cellulose molecules through nanofibers till micro-sized bundle to be deposited as 2-dimensional walls. The micro-sized channels were employed as a limited and flow field for controlled culturing of an aerobic bacterium, *Gluconacetobacter xylinus*, which secrete a cellulose nanofiber into the culture media. When cultured in fact, an assembly of just secreted nanofibers from the individual bacteria was induced to result in formation of a larger nano-bundle of the initial nanofiber, by controlling movements of the bacterium in the channel.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：セルロース 微生物ナノ紡糸 マイクロチャンネル ナノファイバー ゲル 三次元網目構造 層流

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 樹木細胞壁二次壁の主成分であるセルロースマイクロフィブリル(CMF)の配向パターンを決定するのは、直下に存在する束上の微小管である。マイクロフィブリル合成の際、微小管は膜貫通 TC のレールの働きをして、それに沿って合成が進行すると同時に TC の走行方向も制御すると考えられている(図1)<sup>2)</sup>。また、合成された CMF は、すでに構築されていた細胞壁に堆積する。

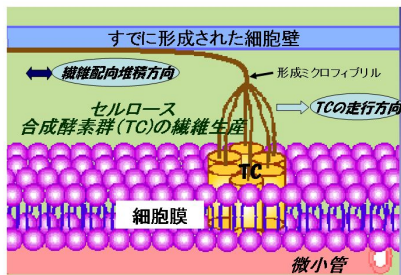


図1 細胞壁繊維配向層がどのように形成されるか?

(2) 研究代表者らはこれまでに、二次壁でのセルロース繊維堆積をイメージさせる「微生物を用いた新たなセルロースナノファイバーの配向堆積法」を提案してきた<sup>1)</sup>。この方法では、一方向にセルロース分子が配向したネマティックオーダーセルロース(NOC)と呼ばれるテンプレートが、重要な分子レールの働きをする<sup>3)</sup>。また、用いる微生物として酢酸菌は、糖を炭素源にして菌体外に平均で幅約 50nm、厚み約 10nm のセルロースファイバーを分泌する。その際、噴出エネルギーを駆動力として、菌体自体が噴出方向と反対方向に走行する(図2)。そこで、この菌を NOC テンプレート上で培養すると、分子レールの配向方向に沿って菌が走行することを見出した。同時に分泌セルロース繊維もレールに沿って堆積され、配向シートが構築された。このことから、培養中に適切な足場を与えることにより、酢酸菌の繊維分泌走行を制御し、同時に繊維の堆積による自動3次元構造構築を可能とするプロセスが提案された<sup>1)</sup>。これは、まさに樹木二次壁でのセルロース繊維堆積を微生物で具現化したものと考えられる。



図2. 酢酸菌と菌体外に分泌されたセルロースナノ繊維

## 2. 研究の目的

(1) 本課題は、上記の原理を発展させ、新たなナノ繊維化プロセスの構築に挑戦するものである。すなわち、本課題では、酢酸菌

の分泌したナノファイバーのさらなる自己凝集化を誘導して、ナノスケールでこれまでに得られていない大きな繊維幅のナノファイバーを形成させる。

(2) そのため、分子レールの代わりに、マイクロチャンネル流路<sup>4)</sup>を導入し、その空間中の流動場で酢酸菌を培養するという方法で、走行とファイバーの形状とを同時制御させ、ナノサイズで制御可能な新規の微生物紡糸システムまでへの展開を検討する。これにより、マイクロチャンネルのパターンに依存したナノファイバーの自己集合化が誘発され、得られる構造体がチャンネルから押し出されることになる。すなわち、「新規微生物ナノ紡糸法へと展開」される。

### (参考文献)

1. Kondo, T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14008 (2002); *Nature : Science update* 2002 年 10 月 <http://www.nature.com/nsu/021007/021007-1.html>
2. Haigler, C. H. & Brown Jr. R. M., *Protoplasma*, **134**, 111(1986); 佐藤靖, "木質の形成", 海青社, pp.210 (2002).
3. Kondo, T., Togawa, E. and Brown Jr., R. M., *Biomacromolecules*, **2**, 1324 (2001).
4. 北森武彦、田中有希、*応用物理* **74**, 623 (2005).

## 3. 研究の方法

本課題では、酢酸菌の運動に注目するものの、足場を使うかわりにマイクロチャンネル空間を用い、その流動場で酢酸菌を培養するという方法で、セルロースナノファイバーの菌体外への分泌に伴う走行方向を制御させる。この際、同時に、菌体一つ一つの分泌する 50nm 程度のナノファイバーが、通過するチャンネルの幅(空間)ならびにパターンに応じて自己集合することになる。結果として、ナノからマイクロサイズでの任意に制御されたユニークな断面形状を持つセルロースファイバーの紡糸を可能とさせるシステム構築まで展開される。そのため、以下の三段階の研究成果の積み重ねを必要とする。実施3年間で最終的に、各成果をまとめたのち、「新規微生物ナノ紡糸法」を提案した。

(1) 平成 23 年度は、第一段階として、液体培地中の溶存酸素により酢酸菌のファイバー分泌が可能かどうかの検討を行った。表面をシリコンオイルで被覆した Schramm-Hestrin (SH) 液体培地中で、酢酸菌を 14 日間、30 °C で静置培養した。透過型電子顕微鏡(TEM)観察、広角 X 線回折(WAXD)測定、固体核磁気共鳴(NMR)測定により、得られたゲル状物質(ペリクル)を構成するファイバーのサイズならびに結晶構造を評価した。

(2)平成24年度では、実際に2種類のパターンを有するマイクロチャンネルを構築した。Y字凸型マイクロチャンネル(幅200 $\mu\text{m}$ 、深さ100 $\mu\text{m}$ 、総長5cm)ガラス製基板を鋳型として、polydimethylsiloxane (PDMS)を熱硬化させて、Y字凹型マイクロチャンネル基板を作製した。これを平滑なPDMS製基板に貼り合わせ、マイクロチャンネルチップとした。チャンネル末端に開けた注入口と排出口にマイクロチューブを接続し、マイクロ流体デバイスを作製した。

(3)平成25年度では、層流が形成された閉鎖マイクロチャンネル内で、ナノファイバー製造マシンとしての酢酸菌を生産走行させ、得られるファイバーの性状を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 溶存酸素下での酢酸菌のセルロースナノファイバー産生挙動

液体培地中の酢酸菌が直接に酸素と接触するのを妨げるため、シリコンオイルで被覆した培地にて菌を培養した結果、セルロースナノファイバーからなるゲル状膜(ペリクル)が産生された。ファイバーの産生量は通常の場合と比較して10分の1であった。また、繊維幅は通常の約3分の2の45nmであった。さらに、得られたファイバーは従来の高い結晶化度(86%)を示したものの、通常培養と異なりセルロースI $\beta$ とI $\alpha$ との結晶量比が9:1(通常は6:4)であった。このように、酢酸菌は閉鎖空間中でも培地中の溶存酸素を用いて生育可能なだけでなく、ユニークな複合結晶性を示すナノファイバーを産生することを見出した。

##### (2) マイクロチャンネル内での層流形成とマイクロファイバーの構築

死活させた酢酸菌をマイクロチャンネル内でフローさせたところ、シリンジポンプの吸引速度が1-100 $\mu\text{l/h}$ の範囲において、菌体が管軸に対して平行にフローしている様子が観察された。また、吸引速度100 $\mu\text{l/h}$ で算出した、層流と乱流を区別する指標であるレイノルズ数(Re)は8であった。この値は層流の理論的形成条件である $Re < 2300$ を満たしており、可視化した実際の菌の運動との相関が認められた。

そこで、実際にマイクロチャンネル内に酢酸菌培養液を送液し続けながら培養したところ、図に示すような幅200 $\mu\text{m}$ 程度(図中の繊維は幅179 $\mu\text{m}$ )のマイクロファイバーが形成された。鋭敏色検板を挿入した状態での偏光顕微鏡観察により、層流で構築されたこのナノファイバー集合繊維は単一波長の干渉色を示し、一軸配向性を有することが示唆された。

(3)「新規微生物ナノ紡糸法」の提案  
本研究では、層流が形成された閉鎖マイクロ

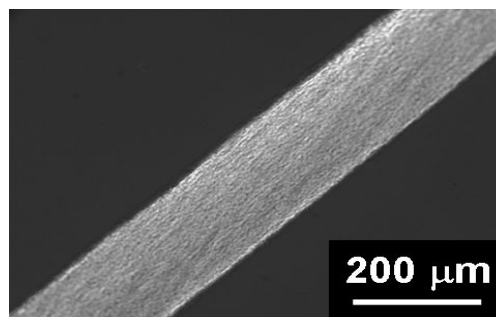


図3. マイクロチャンネル中で酢酸菌の分泌したナノファイバー同士が自己凝集したことにより形成されたマイクロファイバー

チャンネル内での酢酸菌培養の結果、菌体外繊維分泌に伴う菌の走行が層流方向に制御された。同時に、分泌ナノファイバーの配向が維持されたまま、自己凝集が促進され、最終的にマイクロファイバーが構築された。この結果は、ナノサイズのファイバーの自己凝集方向を制限して、ボトムアップ的にマイクロファイバーを構築するという新たな微生物ナノ紡糸法を提案したことになる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計5件)

平田 愛美子、宇都宮 ひかり、永島 綾、横田 慎吾、近藤 哲男、溶存酸素下で酢酸菌が産生するセルロースナノファイバーの水中カウンターコリジョン法によるナノ微細化挙動、第64回日本木材学会大会、2014年3月14日、愛媛大学城北キャンパス

Utsunomiya, H., Yokota, S. and Kondo, T., Preferential cleavage of reducing ends in cellulose fibers for nano-pulverization using aqueous counter collision, EPNOE 2013 Conference, October 23, 2013, Nice Acropolis Convention and Exhibition Center

平田 愛美子、宇都宮 ひかり、永島 綾、横田 慎吾、近藤 哲男、酢酸菌産生セルロースナノファイバーゲルからの"Cellulose nanoanemone"創製、第20回日本木材学会九州支部大会、2013年9月3日、九州大学箱崎キャンパス

宇都宮 ひかり、横田 慎吾、近藤 哲男、セルロースファイバー末端の極性に依存する水中カウンターコリジョンナノ微細化挙動、セルロース学会第20回年次大会、2013年7月19日、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ

宇都宮 ひかり、横田 慎吾、近藤 哲男、水中対向衝突法によるセルロース繊維の

ナノ微細化の起点となる還元性末端、第  
50 回化学関連支部合同九州大会、2013 年  
7 月 6 日、北九州市国際会議場

〔図書〕(計 2 件)

近藤 哲男、シーエムシー出版、機能性セ  
ルロース次元材料の開発と応用(第 1 章  
セルロースの階層構造形成と両新媒性)、  
2013、3-17

近藤 哲男、シーエムシー出版、機能性セ  
ルロース次元材料の開発と応用(第 2 章  
バクテリアセルロースの機能発現)、2013、  
21-33

〔その他〕

ホームページ等

<http://biomat.agr.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

近藤 哲男 (KONDO, Tetsuo)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号： 3 0 2 0 2 0 7 1