

令和5年度 東京情報大学総合情報研究所プロジェクト研究
研究実績報告書

1. 研究課題名

酢酸菌の易変異性を利用したファインセルロース生産のための有用復帰変異の取得と
機構解明

2. 研究組織

区分	氏名	所属・職名
研究代表者	石川 森夫	応用生物科学部 醸造科学科・教授
	田中 啓介	総合情報学部 総合情報学科・准教授
研究分担者	松谷 峰之介	生物産業学部 食香粧化学科・准教授
	村上 洋一	総合情報学部 総合情報学科・教授

3. 研究期間

2023年6月7日～2024年3月31日

4. 研究の目的

酢酸菌が生成するバクテリアセルロース (BC) は微細なナノファイバーであり、ナノセルロース素材として化粧品などに利用されている。本研究者は、酢酸菌のBC生成能が、ゲノム不安定性に起因する変異により消失し、アミノ酸置換を伴い復帰することを見出している。本研究は、BC生成能及び性状の解析を行うことで復帰変異箇所との関係を明らかにするとともに、BC生産能力改変の機構解明を目的とした。

5. 研究報告

酢酸菌においては菌膜生成能を有する Rough 株 (R 株) と生成能を失った Smooth 株 (S 株) が見いだされている。R 株で振盪培養を繰り返すと、菌膜形成能を失った S 株が出現し、S 株で静置培養を繰り返すと、再び菌膜形成能を有する復帰変異株 (R' 株) が現れる。これまでに我々は、この RSR' 転換の性質を利用して *Komagataeibacter oboediens* MSKU3 株 (R 株) から E3 株 (S 株) を取得し、そして静置培養により4種のアミノ酸置換を伴う R' 株を得ることに成功した。また、取得した R' 株が親株の数倍を上回る BC の生産能や、より微細な繊維質をもつことを明らかにした。現在までに、復帰変異株の大量取得を目指して、変異箇所が異なる 19 種の S 株を取得している。

スタート株として使用した 19 種の S 株のセルロース生合成オペロンへの遺伝子変異の内訳として、塩基の挿入欠損によるフレームシフトが 6 箇所、1 塩基置換によるアミノ酸の置換が 8 箇所、同じく 1 塩基置換によるストップコドンの挿入が 4 箇所およびトランスポゾン挿入変異が 1 箇所となる。我々は、これら S 株から新たに 13 株を取得し、これまでに取得してきた 5 株と合わせ、8 種の S 株を起点とする計 18 株のセルロース生合成能復帰株 (R' 株) を取得することができた (図 1)。また、これら復帰変異の取得を可能とした S 株の変異パターンの内訳は、塩基の挿入欠損によるフレームシフトが 4 箇所、1 塩基置換によるア

ミノ酸の置換が2箇所、同じく1塩基置換によるストップコドンの挿入が2箇所となり、フレームシフト変異が復帰変異を獲得しやすい傾向にあるという結果が得られた。一方で、残り11種のS株からは復帰変異株を取得することができなかった。しかしながら、復帰変異を得ることができない株もフレームシフト変異を含めて変異様式に関わらず複数存在していることから、復帰変異の可否と高次構造との関係性について検討している。

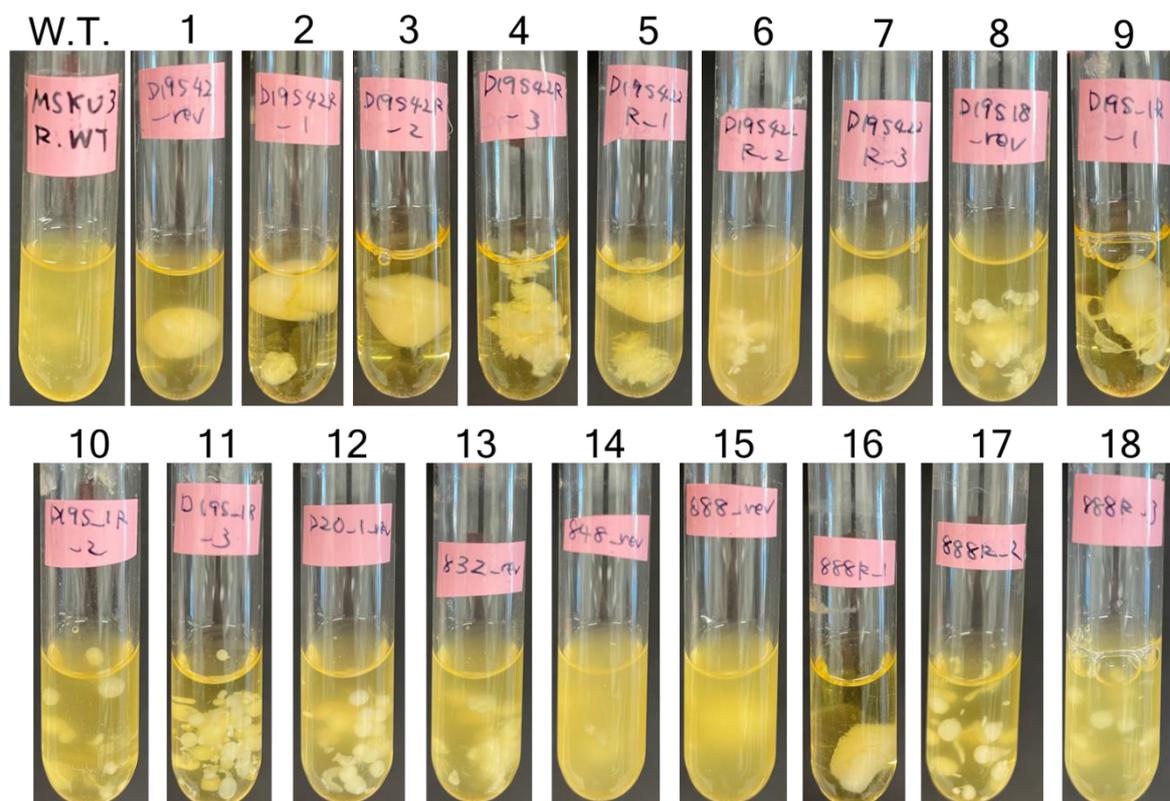


図1 取得した18株のセルロース生産量の比較 (W. T. : 野生株)

高次構造モデルと復帰変異の可否の関係性については、現在もデータ解析を進めているところであるが、セルロースを排出するBcsCでは、8箇所中5箇所(約60%)が復帰変異可能であったのに対して、セルロースの生合成に関わるBcsAでは、9箇所中2箇所(約20%)と概ねBcsCの1/3程度の復帰変異に留まっていたため、その高次構造およびドメインが担っている機能により、復帰変異の可否が大きく異なることが示唆された(図2A-E)。

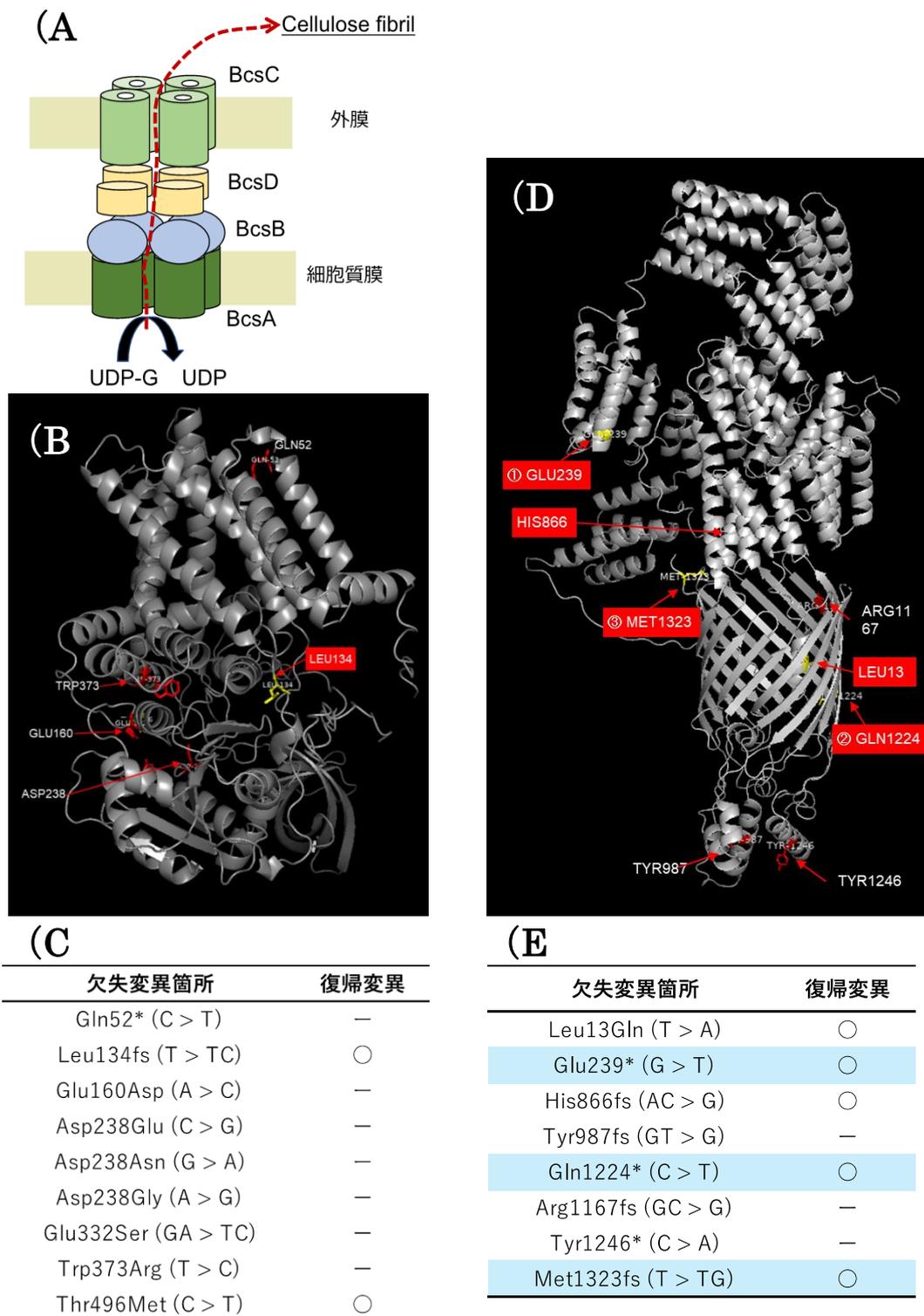


図2 復帰変異の可否と高次構造との関連

(A) セルロース合成を担う複合タンパク質のイメージ図。BcsAではセルロース合成に関わり、BcsCではセルロース排出に関わる。(B) BcsAの構造モデリング結果。

(C) リシーケンス解析によるBcsAの復帰変異箇所の解析結果。(D) BcsCの構造モデリング結果。(E) リシーケンス解析によるBcsCの復帰変異箇所の解析結果。

これまでに取得した 5 株を用いて、セルロースの生産量を比較したところ大幅な差異が見られたが、親株（非変異株、R 株）の生産量を大きく上回る株を取得することはできなかった（図 3）。今回、新たに取得した 13 株の生産量については、現在データの取得を進めている。また、今後も復帰変異を取得できた 8 種の S 株に絞り、更なる復帰変異株（R' 株）の取得を進める予定である。

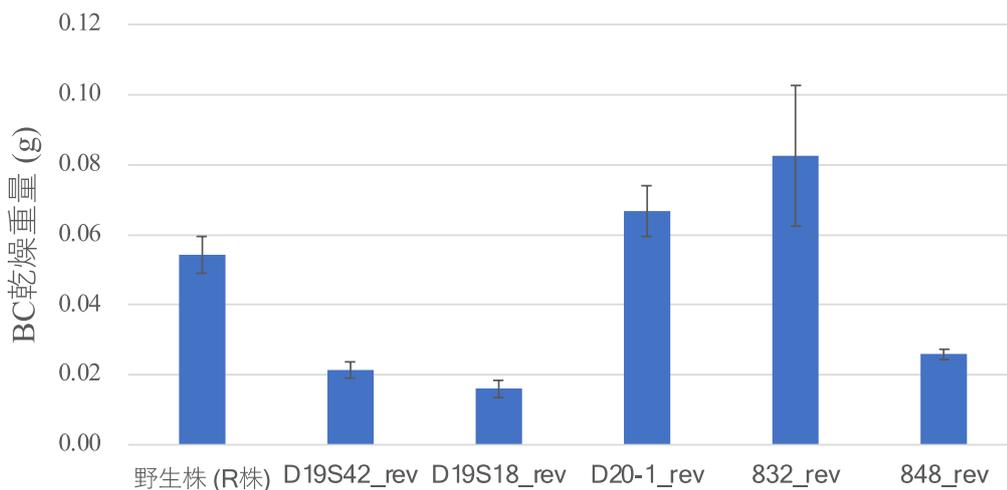


図 3 復帰変異株の BC 生成量の比較

6. 成果の公表

学会発表

- 1) 酢酸菌の易変異性を利用したセルロース生合成オペロンの改変、松谷 峰之介, 川嶋 牴牾, 薬師 寿治, 松下一信, 石川 森夫、酢酸菌研究会 第 11 回 研究集会（東京）、令和 5 年 11 月 9 日（木）