

令和6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	東京農業大学 応用生物科学部 醸造科学科・教授
	田中 啓介	東京情報大学 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	東京農業大学 生物産業学部 食香粧化学科・准教授
	村上 洋一	東京情報大学 総合情報学部 総合情報学科・教授
	海野 良輔	東京農業大学 応用生物科学部 醸造科学科・助教

3. 研究期間

2024 年 6 月 11 日～2025 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。我々は、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。こ
の性質を利用して、BC の増産や物性改変を可能にする多数の BC 生産変異株を育種し、その
原因について、蛋白質構造変化の観点から明らかにすることを目的とした。

5. 研究報告

酢酸菌においては菌膜生成能を有する R (Rough) 株と生成能を失った S (Smooth) 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。この性
質を利用し、*Komagataeibacter oboediens* MSKU3 株 (R 株) から 19 種の S 株、ならびにこ
れらを起点とした 18 株の R' 株を得ている。

本研究では、これらの R' 株について、BC 生成能及び性状の解析を行うことで復帰変異
箇所との関係を調べるとともに、蛋白質の高次構造モデリングと組み合わせることにより
BC 生産能力改変の機構解明を目指した検討を行った。さらに、R' 株はセルロースの排出
に関わる BcsC をコードする遺伝子に変異が生じた S 株から頻度高く得られることが明ら
かになっている。そこで、これら S 株を基盤に静置培養を実施し、復帰変異株の高効率な獲

得を目指した検討を行った。

これまでに獲得した R' 株 18 株について、グルコースおよびグリセロールを炭素源とした液体培養で得られた BC を回収し、乾燥重量および細胞あたりのセルロース生産量を測定した。また、これら BC について SEM 観察に供し、BC の繊維径や密度と変異様式、高次構造モデルとの関連について検証した。

R' 株の追加取得として、*bcsC* 遺伝子に変異が生じた 8 株中 6 株の S 株をスタート株として使用し、それぞれの株について、グリセロールが添加された YPD 培地に接種し、静置条件にて約 1 週間毎に継代培養を行った。液面に不溶性の膜が確認された培養液からコロニーを単離後、DNA 抽出・ゲノムリシーケンス解析を行い、野生株 (R 株) との比較により変異箇所を特定した。

R' 株 18 株のセルロース生成量は親株と比して様々であったが、その多少は細胞あたりの生産量の違いに概ね依存していた。その中で BC の生産量 (図 1) および状貌 (図 2) に特徴が見られた 3 株 (D19_1R_3 株, 848_rev 株, 888R_3 株) に着目し、それらが生産した BC について SEM 観察に供した。

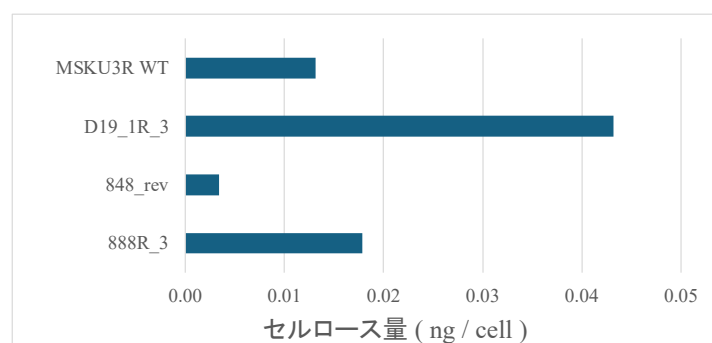


図 1. R' 株の BC 生産量

その結果、BC 生産量が増加した D19_1R_3 株の繊維径や密度は親株と類似していた一方、848_rev 株については BC の繊維径が太く、888R_3 株では細いことが観察された (図 3)。これら R' 株の *bcsC* 遺伝子に生じた変異パターンを WT 株と比較すると、D19_1R_3 株は 1 アミノ酸置換、848_rev 株は変異箇所の異なる 1 塩基の欠失および挿入により 32 残基のアミノ酸が変異、888R_3 株では C-末端の 5 アミノ酸が 2 アミノ酸に変異していた。

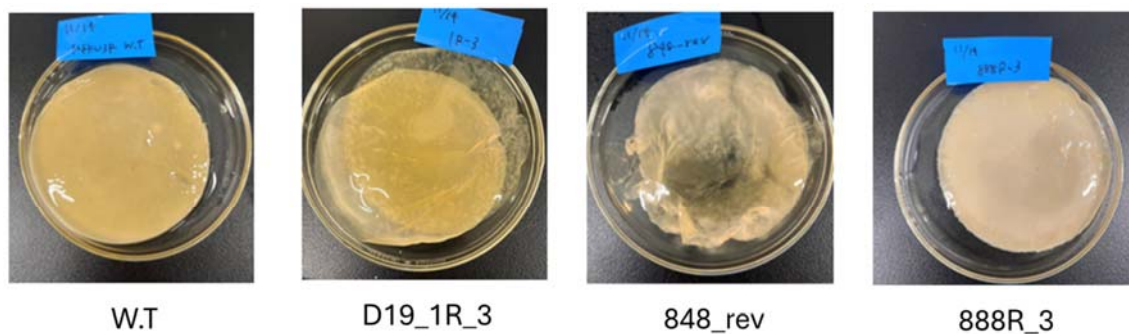


図 2. R' 株が生産するBC

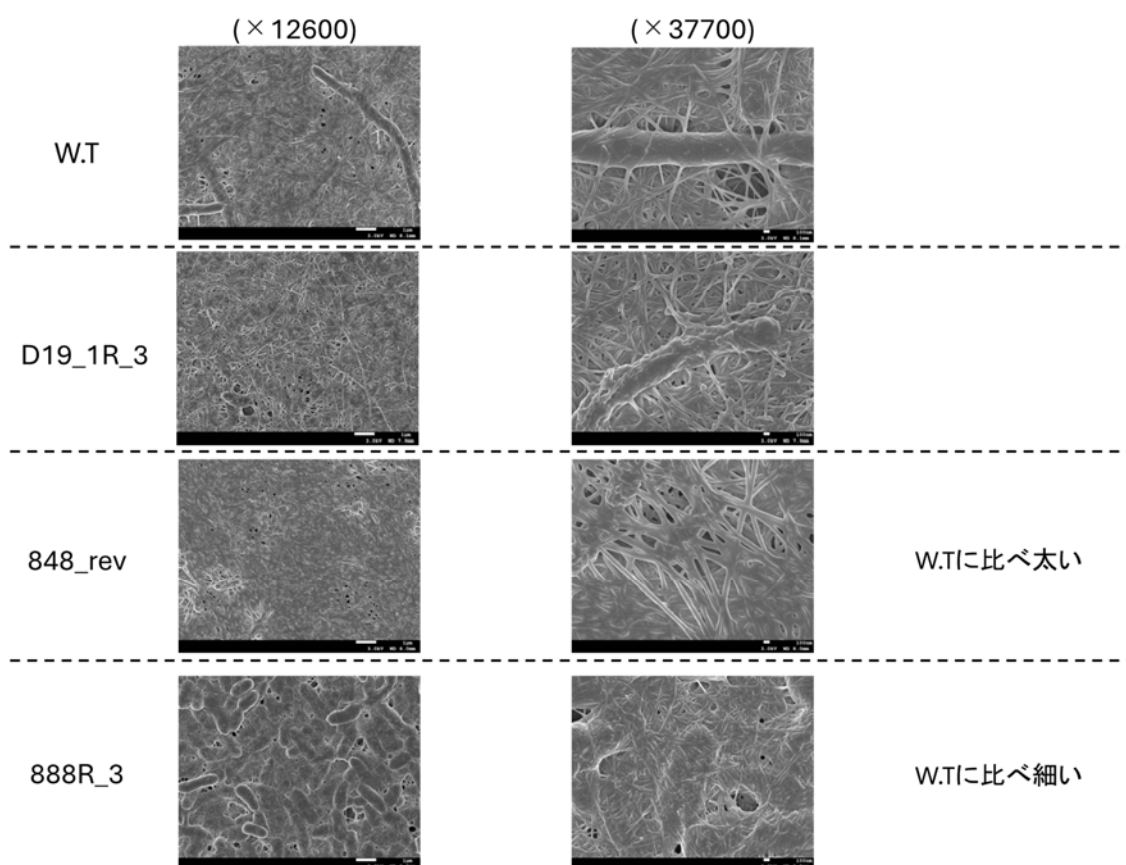


図 3. R' 生産するBCのSEM像

これらのBCの性状の変化と *bcsC* 遺伝子に生じた変異の関連については現在、高次構造モデリングを進めているが、特に繊維径の増加が認められた 848_rev 株の Bcs C は多数のアミノ酸変異が生じているため、顕著な高次構造の変化が予測される。さらに、1 から 5 残機のアミノ酸変異が BcsC の立体構造変化にどのように影響するかについても手掛かりが得られるものと考えられる。これらのことより、セルロースを排出する機能を担う BcsC に生

じるアミノ酸変異は、その変異パターンにより生成される BC の性状に大きな影響を与えることが示唆された。

bcsC 遺伝子に変異が生じた 8 株の S 株中 6 株をスタート株として R' 株の追加取得を目指し、静置継代培養を行ったところ、2 から 4 代の継代によって全ての S 株から BC 合成復帰 R' 株を取得した。このことより、*bcsC* 遺伝子に変異が生じた S 株を起点とすることは、効率良く復帰変異株を取得する手段として有効で、BC 実用化に向けた候補株のコレクション化に寄与しうることが示唆された。現在、新たに得られた R' 株より 18 株を選択し、ゲノムリシーケンス解析を実施しており、変異箇所や変異パターンについてまとめる予定である。

酢酸菌のセルロース生産能は、セルロース生合成オペロン以外をターゲットにして遺伝子破壊などの遺伝子工学の実験を実施する場合には生育を阻害する足枷となる。この問題を解決するために、復帰変異が出来ないセルロース非生産変異株を利用した。現在、外部の共同研究先に提供し遺伝子実験に使用している。

取得した復帰変異株の変異箇所について、ゲノムリシーケンス解析および高次構造モデリングを現在進めているところであり、本報告までに達成できなかった。したがって、今後以下のような解析に取り組む予定である。引き続き、残りの株のゲノムリシーケンス解析を進め、変異リストや変異パターンについてまとめる。そして、取得した全ての復帰変異とセルロース生産量などの表現型を明らかにすることで高次構造の情報も含めた機構解明を目指す。

6. 成果の公表

特になし