第36回糖質科学懇話会

Biosynthesis of Ultrafine Cellulose Fibers in *Asaia bogorensis*, an Acetic Acid Bacterium 酢酸菌 *Asaia bogorensis* による微細セルロースの生合成

信州大学工学部物質工学科 研究員

現在：独立行政法人産業技術総合研究所中国センター 特別研究員

熊谷明夫 (くまがい あきお)

Research Associate, Department of Chemistry and Material Engineering, Shinshu University

Present: Research Associate, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Chugoku

Akio Kumagai

1. はじめに

セルロースはグルコースが β -1,4-グルコシド結合した直鎖状のホモポリマーで、地球上に最も豊富に存在する天然高分子である。一般的には植物細胞壁や植物繊維の主成分として知られているが、一部の動物や多くの微生物もセルロース生合成能を有しており、原索動物であるホヤの体を覆う被囊と呼ばれる膜や、バクテリアが分泌する細胞外多糖などによって構成されているバイオフィームなどにもセルロースが含まれている¹⁾。中でもバクテリアが生産するセルロースはバクテリアセルロース (BC) と呼ばれ、純粋なセルロースからなる微細繊維が複雑な三次元網目構造を形成していることから、高強度、高弾性、高保水性といった植物由来のセルロースにはみられない物理的特性を示す²⁾。一般的に知られる BC としては、セルロース生産能の高い酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* を利用して生産されるナタデココが有名であるが、食用としてだけでなく、その優れた物理的特徴を活かした新素材としての利用が期待され、産業・医療分野において応用研究が進められている。また、*G. xylinus* は応用分野に限らずセルロース生合成機構解明のモデル生物として基礎研究にも利用されており、特に遺伝子工学分野では植物に先行して研究が進められ、セルロース生合成に関わる遺伝子とタンパク質、その合成機構の関係について多くの知見を与えてきた。

バクテリアによるセルロース生産は *G. xylinus* が代表的であり、セルロース生産が直接確認されているバクテリアは少ない。しかし、ゲノム解析が盛んに行われるようになり、既知のセルロース生合成に関わる遺伝子との相同性が高い遺伝子の存在が確認され、多くのバクテリアがセルロース生産能を有することが示唆されている。また、バクテリアにおけるセルロースの役割は完全には明らかになっていないが、例えば植物に対して病原性をもつアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) においては植物への吸着³⁾、バイオフィームを形成する大腸菌 (*Escherichia coli*) においては凝集に関わっているのではないかと考えられている⁴⁾。

このようにバクテリアのセルロース生産についていくつ

かの研究が報告されている中、我々は酢酸菌から新規の BC 生産菌をスクリーニングするため、酢酸菌に属する *Acetobacter* 属、*Gluconacetobacter* 属、*Asaia* 属、*Kozakia* 属から選抜した菌株を液体培地で静置培養し、気液界面への薄膜形成から *Asaia bogorensis* が BC を生産することを見出した⁵⁾。ここでは *A. bogorensis* が生産する BC と遺伝子解析の結果得られたセルロース生合成関連遺伝子の特徴を *G. xylinus* との比較を交えながら紹介する。

2. *A. bogorensis* が生産するセルロース

A. bogorensis はインドネシアに生育する植物の花から単離された周毛性の鞭毛を有する好気性のグラム陰性桿菌で、高糖濃度酢酸菌と呼ばれる⁶⁾。16S rRNA 系統解析では酢酸菌と同じ系列に分類されるが、0.35% の酢酸中で生育が抑制され、エタノール酸化活性をもたずエタノールから酢酸を生産できないなど、他の酢酸菌とは異なる特徴的な性質を示す。これまで *A. bogorensis* における BC 生産については報告されて来なかったが、静置培養時に気液界面に形成された薄膜を *G. xylinus* の薄膜から BC を単離する方法と同様、アルカリ処理などによって洗浄した成分をセルラーゼによって分解すると、セロビオースとグルコースが産生されることや、FT-IR などの機器分析の結果から、*A. bogorensis* が形成する薄膜中にはセルロースが含まれていることが明らかとなった⁵⁾。天然のセルロースはセルロース I α 、セルロース I β 、異なる2種類の結晶からなる複合結晶であることが提唱されており⁷⁾、BC はセルロース I α の比率が高いのに対し、植物はセルロース I β の比率が高い。ここに機器分析の結果として *A. bogorensis* および *G. xylinus* から単離した BC の CP/MAS ¹³C NMR スペクトルを図1に示す。*A. bogorensis* から単離された BC にも *G. xylinus* 同様、セルロースの構成糖であるグルコースの C1 から C6 に帰属される特徴的な共鳴線が確認された。一方、*A. bogorensis* から単離された BC はセルロース I α に由来する C1 (106 ppm)、C4 (90~89 ppm)、そして C6 (66 ppm) の共鳴線の強度が *G. xylinus* に比べて弱く、*A. bogorensis* の BC は *G. xylinus* よりもセルロース I β の比率が

図 1. BC の CP/MAS ^{13}C NMR スペクトル(a) *A. bogorensis*, (b) *G. xylinus*.

図 2. FE-SEM による BC の観察

(a) *A. bogorensis*, (b) *G. xylinus*.

高いことが示唆された⁹⁾。加えて C1 および C4 にみられるシャープな低磁場成分とブロードな高磁場成分はそれぞれ結晶成分と非晶成分に帰属されるが⁸⁾、その強度の比率から、*A. bogorensis* 由来の BC は *G. xylinus* に比べて結晶化度が低いといえる。また、両者の BC を FE-SEM によって観察すると、両者共に三次元網目構造を形成しているものの、*G. xylinus* 由来 BC のセルロース繊維幅が 40~100 nm であるのに対し、*A. bogorensis* 由来 BC は 5~20 nm と著しく繊維幅が狭い非常に微細な繊維であることがわかる (図 2)。セルロース生合成はターミナルコンプレックス (TC) と呼ばれるタンパク質複合体で行われており、*G. xylinus* の TC は菌体の長軸方向に沿って菌体表層に直線状に並んでいる⁸⁾。それぞれの TC から合成される 10 数本の

セルロース分子はサブエレメンタリーフィブリルと呼ばれる微細な束となって排出され、自発的に互いに凝集することでマイクロフィブリルを形成し、最終的には菌自身の長軸回りの回転運動も加わり、捻じれたセルロースリボンが形成される^{8,9)}。セルロースの結晶化はこの凝集過程で生じ、マイクロフィブリルのサイズがセルロースの $\text{I}\alpha/\text{I}\beta$ 分率に起因することが明らかになっており¹⁰⁾、セルロース $\text{I}\beta$ の比率が高く繊維幅の狭い *A. bogorensis* の BC の特徴は、マイクロフィブリルサイズが小さい場合に $\text{I}\beta$ が優先的に誘起されることと相関している。以上のことから、結晶化度の低さも含めた *A. bogorensis* が生産する上記の BC の特徴は、マイクロフィブリルの凝集、結晶化に関わる TC の配列や数に起因しているのではないかと考えられる。

3. *A. bogorensis* のセルロース生合成関連遺伝子

A. bogorensis におけるセルロース生合成関連遺伝子の同定はセルロース生合成酵素遺伝子の保存領域から作製したプライマーを元に、*A. bogorensis* のゲノム DNA から相同領域の伸長を行い、最終的にセルロース合成オペロンと呼ばれる TC を構成するタンパク質をコードする遺伝子群やセルロース生合成に関係すると考えられる遺伝子を含む 14,859 bp の配列を決定した。解析結果から得られた *A. bogorensis* の遺伝子情報を、*G. xylinus* を含むゲノムデータベース上で確認されたバクテリアのセルロース生合成関連遺伝子情報と比較した結果を図 3 に示す。TC は 4 種類のタンパク質 CesA, B, C, D によって構成されたタンパク質複合体で、CesA はセルロース生合成酵素であり、CesB は CesA の活性化、CesC は孔の形成、CesD はセルロースの分泌と結晶化にそれぞれ関与していると考えられているが、その機能は未だ完全には解明されていない。CesD 遺伝子の欠落やオペロンの構成が異なるバクテリアが多い中、*A. bogorensis* は *G. xylinus* と同じ遺伝子構成のセルロース合成オペロンを有し、個々の遺伝子も *G. xylinus* 由来のものと高い相同性を示した。*G. xylinus* のオペロンの上流と下流には、それぞれセルロース分解酵素として知られるエンド- β -1,4-グルカナーゼと β -グルコシダーゼの遺伝子 (*cmcaX* および *bglX*) が存在しており、これらは分解酵素ではあるものの、それぞれセルロース生合成に関与していることが実験により証明されている^{11,12)}。セルロース合成オペロン近傍にエンド- β -1,4-グルカナーゼ遺伝子を有するバクテリアは他にも存在するが、データベース上ではオペロン上流に存在するバクテリアは *A. bogorensis* のみであった。一方、 β -グルコシダーゼをコードする遺伝子は、いずれのバクテリアからもオペロン近傍には見出されなかった。*A. bogorensis* と *G. xylinus* の間でみられるセルロース合成オペロンとその近傍の遺伝子の違いは、この β -グルコシダーゼ遺伝子の有無とオペロン上流に存在する遺伝子 *ccp* と *yhjQ* の違いのみで、*A. bogorensis* のセル

図3. バクテリアのセルロース生合成関連遺伝子の比較

ロース生合成関連遺伝子の構成と配置は他のバクテリアと比較して *G. xylinus* と非常によく似ている。*ccp* は *G. xylinus* のセルロース生合成に必須とされているが²¹³⁾、この遺伝子は *G. xylinus* に特有で、*A. bogorensis* を含む他のバクテリアのオペロン上流には *yhjQ* が存在しており、大腸菌 (*E. coli*) においては、細胞の形態に関与すると示唆されている¹⁴⁾。しかし、実際の機能は明確にはなっておらず、*ccp* と *yhjQ* の遺伝子の違いがセルロースの生産性や特徴に関与している可能性も考えられる。

上記の通り、現在までに酢酸菌の中から *G. xylinus* とは異なる特徴的な BC を生産する *A. bogorensis* を見出し、セルロース生合成に関わる遺伝子にわずかな違いがあることを見出した。しかし、その遺伝子的な違いが、BC の形態にどのような影響を及ぼしているかについてはまだ研究の段階にある。また、*G. xylinus* では 100 mL の液体培地中から約 120 mg の BC が得られるのに対し、*A. bogorensis* から得られる BC は約 15 mg であり、セルロースの生産性は *G. xylinus* が群を抜いて優れている。こうした生産性に影響を与える要因を明らかにしていくことも、BC をより広く工業的に利用していく上でも重要な知見になると考えられる。

4. おわりに

今回は上高原浩先生の代理という形で、第36回糖質科学懇話会で発表する機会を与えて頂き、上記の内容を含め、筆者が博士課程で行った研究の一部を紹介させて頂きました。日本応用糖質科学学会は筆者が初めて参加した学会で、学生の間よくお世話になった学会であっただけに、急遽決定した発表ではありましたが、大学を去る直前に若手の会である糖質科学懇話会で大学最後の発表できたことは筆者にとって感慨深く、良い経験となりました。発表当日は急遽用意した発表資料で辿々しいものになってしまいましたが、活発な意見を投げ掛けて頂いた先生方に感謝申し上げます。また本発表の研究の遂行に当たり、ご指導して頂きました信州大学物質工学科の天野良彦教授、野崎功一准教授、水野正浩助教、佐藤伸明講師、そして神田鷹久特任教授に厚く御礼申し上げます。また、研究に携わってく

ださった同大学の生物化学研究室の学生の皆様に感謝致します。なお、本研究は (独) 日本学術振興会のグローバル COE プログラムの研究支援を受けて行いました。

文献

- 1) P. Ross, R. Mayer and M. Benziman: Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **55**, 35–58 (1991).
- 2) K. Watanabe, M. Tabuchi, Y. Morinaga and F. Yoshinaga: Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, **5**, 187–200 (1998).
- 3) A.G. Matthyse: Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol.*, **145**, 1349–1357 (1983).
- 4) X. Zogaj, M. Nimtz, M. Rohde, W. Borkranz and U. Römling: The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.*, **39**, 1452–1463 (2001).
- 5) A. Kumagai, M. Mizuno, N. Kato, K. Nozaki, E. Togawa, S. Yamanaka, K. Okuda, I.M. Saxena and Y. Amano: Ultrafine cellulose fibers produced by *Asaia bogorensis*, an acetic acid bacterium. *Biomicromolecules*, **12**, 2815–2821 (2012).
- 6) Y. Yamada, K. Katsura, H. Kawasaki, Y. Widyastuti, S. Saono, T. Seki, T. Uchimura and K. Komagata: *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 823–829 (2000).
- 7) R.H. Atalla and D.L. VanderHart: Native cellulose—a composite of two distinct crystalline forms. *Science*, **223**, 283–285 (1984).
- 8) R.M. Brown Jr., J.H. Willison and C.L. Richardson: Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4565–4569 (1976).
- 9) C.H. Haigler, R.M. Brown Jr. and M. Benziman: Calcofluor white ST alters the *in vivo* assembly of cellulose microfibrils. *Science*, **210**, 903–906 (1980).
- 10) H. Yamamoto, F. Horii and A. Hirai: *In situ* crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of cellulose Ia and Ib at the early stage of incubation. *Cellulose*, **3**, 229–242 (1996).
- 11) H.M. Koo, S.H. Song, Y.R. Pyun and Y.S. Kim: Evidence that a β -1,4-endoglucanase secreted by *Acetobacter xylinum* plays an essential role for the formation of cellulose fiber. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2257–2259 (1998).
- 12) S. Kawano, K. Tajima, H. Kono, Y. Numata, H. Yamashita, Y. Satoh and M. Muneoka: Regulation of endoglucanase gene (*cmcA*) expression in *Acetobacter xylinum*. *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 88–94 (2008).
- 13) R. Standal, T.G. Iversen, D.H. Coucheron, E. Fjærvik, J.M. Blatny and S. Valla: A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the *bcs* operon. *J. Bacteriol.*, **176**, 665–672 (1994).
- 14) M.K. Kim, S.R. Park, S.J. Cho, W.J. Lim, S.K. Ryu, C.L. An, S. Hong, Y. Park, G. Kahng, J. Kim, H. Kim and H. Yun: The effect of a disrupted *yhjQ* gene on cellular morphology and cell growth in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 134–138 (2002).