



Title	グラム陰性細菌Burkholderia stabilis由来コレステロールエステラーゼの基質結合メカニズムと高生産化に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	小西, 健司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15294号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89480
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Konishi_Kenji_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 小西 健司

学 位 論 文 題 名

グラム陰性細菌 *Burkholderia stabilis* 由来コレステロールエステラーゼの 基質結合メカニズムと高生産化に関する研究

コレステロールエステラーゼ（Che）は、脂肪酸コレステロールエステルを加水分解する酵素であり、原核生物から哺乳類に至るまで広く生物に存在する。特に、微生物の Che は多様な基質特異性、有機溶媒耐性、耐熱性を示すことから、異なる環境下で多種多様な脂肪酸エステルの分解に関与することが知られており、商業利用されているものも多数存在する。グラム陰性細菌である *Burkholderia stabilis* FERMP-21014 株が分泌する Che（BsChe）は、血清中の総コレステロールを測定する体外診断薬として商業化されており、トリアシルグリセロールを加水分解する酵素として知られている *Burkholderia* 由来リパーゼ（Lip）と高いアミノ酸配列相同性を示す。Lip は、Che と同様、動物や植物、微生物に広く存在し、両酵素ともに製紙産業や洗剤等に使用される産業上非常に重要な酵素である。しかしながら、新規な特性を持つ Che や Lip を得るために機能改変を試みている例は少ない。*Burkholderia* Lip について多数の結晶構造解析が行われているが、基質複合体の構造情報に乏しく、基質結合機構に関する知見は限定的である。また、*Burkholderia* Lip の効率的な組換え大量生産系も報告されていない。Che や Lip はフォルダーゼによるフォールディングと分泌システムが融合した複雑な成熟化機構を介して分泌生産されているが、汎用宿主発現系では分泌できず封入体として生産される。我々は BsChe を研究対象とし、本酵素の基質結合メカニズムの解明と高生産化に関する研究を行った。

第一章において、BsChe の基質結合メカニズムの解明に関する研究について記述する。我々は 2 つの異なる晶系および格子定数からなる結晶を取得し、最大 1.08 Å の分解能にて BsChe の立体構造を解析した。さらに、BsChe のステロール特異性の構造メカニズムを解明するために、コレステロールリノレートを用いてドッキングシミュレーションを行った。その結果、触媒アミノ酸と基質のエステル結合部位が隣接した 17 個のドッキングモデルにおいて、ステロール骨格の A、B、C、D 環は全てほぼ同じ場所に結合し、Thr18、Tyr23、Leu266、Ile287 の側鎖と相互作用していた。そのうち、Thr18 と Tyr23 は Lip ホモログ間でほぼ保存されており、一方、Leu266 や Ile287 の保存性が低いことから、両アミノ酸が BsChe のコレステロール特異性に関係している可能性が考えられた。この仮説を確かめるために部位特異的変異導入実験を行ったところ、Leu266 と Ile287 が Che 活性に必要な残基であることを見出した。この知見を用いることで、Lip ホモログに Che 活性を付与することや、Lip 活性と Che 活性を併せ持つ酵素から Che 活性のみを取り除くことにより、自在に基質特異性を改変することが可能となった。

次に第二章において、BsChe の高生産化に関する研究について記述する。我々は以前の研究で *B. stabilis* FERMP-21014 株を用いた新たな宿主ベクター系を構築し、活性を持つ組換え BsChe を分泌生産することに成功した。しかし、その生産量はまだ低く、商業化は困難であった。そこで我々は、変異剤として N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）を用いて野生株にランダム変異導入を行い、得られた高生産株に BsChe 発現ベクターを導入したところ、同様に発現ベクターを導入した野生株に比べ 1 ml 培地あたり約 12.4 倍高い Che 活性を示した。この活性値は、発現ベクターを導入し

ていない野生株の約 700 倍に相当する。DNA シーケンス解析の結果、この高生産株は Chromosome 3 (Chr3) を欠失していた (以下、 Δ Chr3 株と呼ぶ)。次に、高生産化に寄与する遺伝子を特定するために、変異導入箇所が NTG 変異導入よりも少ないと考えられるトランスポゾン変異導入を行った。その結果、得られた複数の BsChe 高生産株では、共通のトランスポゾン挿入位置を特定できなかったが、それとは別に、Chr3 上の遺伝子である BSFP_068720 と BSFP_068730 に共通する変異点が存在していた。BSFP_068720 と BSFP_068730 は BSFP_068740 とオペロンを形成していたことから、BSFP_068720/30/40 の 3 遺伝子が BsChe の高生産化に寄与していると考えられた。そこで各遺伝子の破壊実験と相補実験を行い、これらの遺伝子破壊が組換え BsChe 生産量向上に寄与していることを確認した。各遺伝子破壊株 (Δ BSFP_068720/30/40 株) および Δ Chr3 株におけるプラスミドのコピー数、およびプラスミドの安定性を確認したところ、いずれの株においても野生株に比べてプラスミドのコピー数、およびプラスミドの安定性ともに有意に高かった。この結果から、 Δ BSFP_068720/30/40 株は導入した発現ベクターのコピー数と安定性を高く維持することによって組換え BsChe 生産量が向上したと考えられる。BSFP_068720/30/40 の機能を予測するために、三次元構造予測プログラムである AlphaFold2 を用いて立体構造モデルを構築した。その結果、BSFP_068730 と BSFP_068740 は大腸菌の SMC (Structural maintenance of chromosome) タンパク質である MukB、MukE と構造的に類似していることを見出した。大腸菌において MukB、MukE は MukF と三者複合体を形成し、細胞分裂期の染色体分離に関与していることが知られている。しかしながら、BSFP_068720 は MukF ではなく、DNA topoisomerase と構造相同性が高かった。また、BSFP_068720/30/40 遺伝子を破壊しても染色体分離に異常をきたすことはなく、プラスミドの安定性とコピー数のみが増加することから、BSFP_068720/30/40 はこれまで見出された SMC タンパク質とは異なる機能を持つ新規 SMC 様タンパク質であった。最後に、 Δ BSFP_068720/30/40 株、 Δ Chr3 株を用いて、2 種類の Lip (*Burkholderia cepacia* 由来 Lip および *Burkholderia plantarii* 由来 Lip) を組換え発現させたところ、野生株に比べて有意に高い生産量を示した。この結果から、これら各破壊株は、BsChe だけでなく様々な *Burkholderia* Lip ホモログの高生産を可能にすると考えられる。第一章の知見と組み合わせることで、新たな Che や Lip の遺伝子工学による設計から、それら酵素の大量生産までが可能となった。

Che や Lip は現在、日常生活や産業上欠くことのできない重要な酵素である。我々が見出した二つの知見により、これまでになかった新規な Che や Lip が工業的に生産され、様々な分野で利用されることが期待される。