HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

【課程博士】

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博 士（農学）　　氏名　小 西 健 司

審査担当者	主 査	客員 教授	田 村 具 博
	副 査	客員 教授	湯 本 勲
	副 査	客員准教授	北 川 航
	副 査	客員准教授	菊 池 義 智
	副 査	教 授	曾 根 輝 雄(本学国際食資源学院)

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

本学位論文は、図 45、表 16、引用文献 105 編を含む 2 章 142 ページから構成され、参考論文 2 編が付されている。

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、商業利用されているものが多数存在する。本研究ではグラム陰性細菌である *Burkholderia stabilis* FERMP-21014 株が分泌する Che（BsChe）を対象に、同酵素の機能改変や商業生産につながる酵素生産性向上に寄与する内容であり、BsChe と同類の酵素の改変や生産に対して非常に有益である。

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おり、トリアシルグリセロールを加水分解する酵素である *Burkholderia* 由来リパーゼ（Lip）と高いアミノ酸配列相同性を示す。Lip も産業上非常に重要な酵素であることから、多数の結晶構造解析が行われているが、基質結合機構に関する知見は限定的である。そこで BsChe の基質結合メカニズムの解明に関する研究を展開した結果、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 1.08Åの分解能にて BsChe の立体構造を解析することに成功している。さらに、コレステロールリノレートを用いたドッキングシミュレーションより、ステロール骨格は、Thr18、Tyr23、Leu266、Ile287 の側鎖と相互作用しているという有益な情報を見出している。

相互作用する 4 アミノ酸残基のうち、Leu266 と Ile287 のみ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与していると仮説を立て、部位特異的変異導入実験を行い、Leu266 と Ile287 が Che 活性に必要な残基であることを証明した。この知見により、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など基質特異性を改変することが可能になり、得られた成果は評価に値する。

次に、BsChe の高生産化に関する研究について展開されている。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。そのため、*B. stabilis* FERMP-21014 株を宿主とした生産系を既に構築していたが酵素生産量が低いままだった。そこで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、スクリーニングによって得られたChe高生産変異株に対しBsChe発現ベクターを導入したところ、野生株に同発現ベクターを導入した場合に比べ約12.4倍、発現ベクターを導入していない野生株に対し約700倍高い活性を獲得することに成功している。また、他のLip酵素（*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、両酵素とも野生株に比べて有意に高い生産量が得られることを確認しており、Cheのみならず発現系としての汎用性が高いことを示している。

酵素の高生産につながる原因について解析を進めることにより、Chromosome 3（Chr3）を欠失することが原因であること、さらにはChr3上にコードされている原因遺伝子を特定することに成功している。特定した遺伝子、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740はオペロン構造をとっており、各遺伝子の破壊実験と相補実験により、これらの遺伝子が組換えBsChe生産量向上に寄与していることを明らかにした。さらに、酵素生産性向上の理由として、これら遺伝子の欠失により導入した発現ベクターのコピー数と安定性が細胞内で高く維持されることに起因するという重要な情報を見出した。

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すると、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が、BSFP_068720はMukFではなく、DNA topoisomeraseと構造相同性が高かった。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様タンパク質である可能性を示した。

このように本研究では、産業上有用なCheについて、その機能改変や高生産化に繋がる研究を、生化学、遺伝子工学、構造生物学等の研究を広く展開し新たな知見を見出し、その知見をもとに商業生産として実装しうる技術を確立した。本技術はBsChe同様の発現機構により分泌される他酵素への応用展開も可能であり酵素生産技術の新たな発展性を示しており高く評価される。

よって、審査員一同は、小西健司が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。