



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15294
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89486
Type	doctoral thesis
File Information	Konishi_Kenji.pdf



博士学位論文

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

小西 健司

北海道大学大学院農学院

生命フロンティアコース 応用生物化学ユニット

基礎環境微生物学

2023年3月

略語表

略称	正式名称
Che	コレステロールエステラーゼ
Lip	リパーゼ
Lif	Lipase-specific foldase
POD	ペルオキシダーゼ
LB 培地	Luria-Bertani 培地
YS 培地	Yeast sorbitol 培地
YSO 培地	Yeast sorbitol oleic acid 培地
NB 培地	Nutrient broth 培地
TYSS 培地	Tryptone yeast sodium chloride sucrose 培地
RNA-seq	RNA sequence
DNA-seq	DNA sequence
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Chr	Chromosome
CLL	コレステロールリノレート
4-AA	4-アミノアンチピリン
NTG	N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	SDS ポリアクリルアミド電気泳動
RMSD	平均二乗偏差
FPKM	Fragments per kilobase of exon per million reads mapped
CFU	Colony forming unit
DUF	Domain of unknown function
SMC	Structural maintenance of chromosome
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDB	Protein Data Bank

目次

序論.....	1
（１）研究の背景.....	1
コレステロールエステラーゼについて.....	1
リパーゼについて.....	5
<i>Burkholderia stabilis</i> 由来 Che と Lip について.....	9
BsChe と Lip は大腸菌での組換え発現が困難.....	15
<i>Burkholderia stabilis</i> を用いた発現系の構築.....	18
（２）研究の目的.....	22
本論.....	23
第 1 章 コレステロールエステラーゼの基質結合メカニズムの解析.....	23
第 1 節 緒言.....	23
第 2 節 材料および方法.....	24
1-2-1. 菌株、プラスミド、培地.....	24
1-2-2. 遺伝子クローニング.....	27
1-2-3. BsChe の精製.....	29
1-2-4. 結晶化条件の最適化.....	29
1-2-5. 構造決定と精密化.....	30
1-2-6. ドッキングシミュレーション解析.....	34
1-2-7. His タグ付き組換え酵素の作製.....	34

1-2-8. <i>B. stabilis</i> のコンピテントセル作製と形質転換法.....	36
1-2-9. 形質転換体の培養および Che 精製.....	36
1-2-10. Che および Lip 活性の測定.....	36
第 3 節 結果および考察.....	40
1-3-1. BsChe の結晶構造解析.....	40
1-3-2. コレステロールリノレートをを用いたドッキングシミュレーション解析.....	47
1-3-3. BsChe のコレステロールエステル特異性に関するアミノ酸.....	50
1-3-4. L266/1287 の導入による <i>Burkholderia</i> Lip への Che 活性付与.....	52
第 2 章 コレステロールエステラーゼの高生産化.....	58
第 1 節 緒言.....	58
第 2 節 材料および方法.....	59
2-2-1. 菌株、プラスミド、培地.....	59
2-2-2. 遺伝子クローニング.....	62
2-2-3. <i>B. stabilis</i> のコンピテントセル作製と形質転換法.....	62
2-2-4. NTG 変異導入.....	66
2-2-5. トランスポゾン変異導入.....	66
2-2-6. リコンビナントタンパク質 (BsChe、BcLip、BpLip) の発現検討.....	67
2-2-7. BsChe、BcLip、BpLip 活性測定.....	68
2-2-8. SDS-PAGE とウェスタンブロットティングによる BsChe の検出.....	68
2-2-9. DNA-seq 解析.....	69
2-2-10. 遺伝子破壊.....	69
2-2-11. 遺伝子相補実験.....	73
2-2-12. RNA-seq 解析.....	73
2-2-13. プラスミドのコピー数測定.....	74
2-2-14. プラスミド保持アッセイ.....	76
2-2-15. 染色体保持アッセイ.....	76
2-2-16. 形質転換効率の測定.....	76

2-2-17. 遺伝子機能の予測	77
2-2-18. 統計解析と再現性	77
第3節 結果.....	78
2-3-1. BsChe 高生産化に Chr3 が関与している	78
2-3-2. Chr3 上の BSFP_068720、BSFP_068730 は BsChe の生産を抑制する	83
2-3-3. BSFP_068720/30/40 の機能予測	99
2-3-4. BSFP_068720/30/40 はプラスミドのコピー数抑制と安定性低下に関与する	105
2-3-5. BSFP_068720/30/40 の欠失は、Chr3 の安定性に影響しない	115
2-3-6. BSFP_068720/30/40 の破壊により、類縁酵素の生産性も向上する	117
第4節 考察.....	119
2-4-1. Ch3 はリコンビナント BsChe の生産量抑制に寄与する	119
2-4-2. BSFP_068720/30/40 はプラスミドのコピー数低下と安定性低下に寄与する	120
2-4-3. BSFP_068720/30/40 は従来の SMC タンパク質とは異なるメカニズムで働く ..	123
2-4-4. まとめ.....	130
総括.....	131
参考文献.....	132
謝辞.....	142

序論

(1) 研究の背景

コレステロールエステラーゼについて

コレステロールエステラーゼ (Che, EC 番号: 3.1.1.13) は、コレステロールエステルの加水分解を触媒し、コレステロールと脂肪酸を生成する (図 1)。Che は原核生物から哺乳類に至るまで様々な生物に普遍的に存在している。特に哺乳類の Che は、生化学分野において最も研究が進んでいる酵素の一つであり、例えばヒトの Che として知られる胆汁酸塩刺激リパーゼは、脂質代謝や腸管内腔からの遊離コレステロールの取り込みを促進する (Mukherjee 2003; Shamir et al. 1996)。胆汁酸塩刺激リパーゼは分子量約 110 kDa の単量体であり、活性型となるためには胆汁酸塩が必要である (Chen et al. 1998; Comte et al. 2006; Hyun et al. 1972)。真核生物では例えば *Aspergillus* 属や *Saccharomyces* 属において Che が確認されており (Köffel et al. 2005; Tóke et al. 2007)、様々な生物がコレステロールエステルを炭素源として利用する能力を有していると考えられる (表 1)。特に、微生物の Che は、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から、様々な基質特異性や、有機溶媒耐性、耐熱性などを示すことが知られている。アシルグリセロールやアリアルエステルなどのエステル結合を含む幅広い化合物の加水分解や合成を触媒するもの (Vaquero et al. 2016) や、パルプ中のピッチと呼ばれる粘着性材料の構成成分であるステロールを分解することにより、紙の品質を向上させるもの (Calero-Rueda et al. 2002)、また食品や化粧品の添加物として有用なステロールエステルを生産するための触媒として利用されているもの (Vaquero et al. 2016) などが知られており、商業利用のために特許出願されているものも多数存在する (表 2)。また、血清中の総コレステロール値を測定する体外診断用医薬品にも使用されている (Allain et al. 1974)。このように、Che は産業上非常に重要な酵素の一つである。

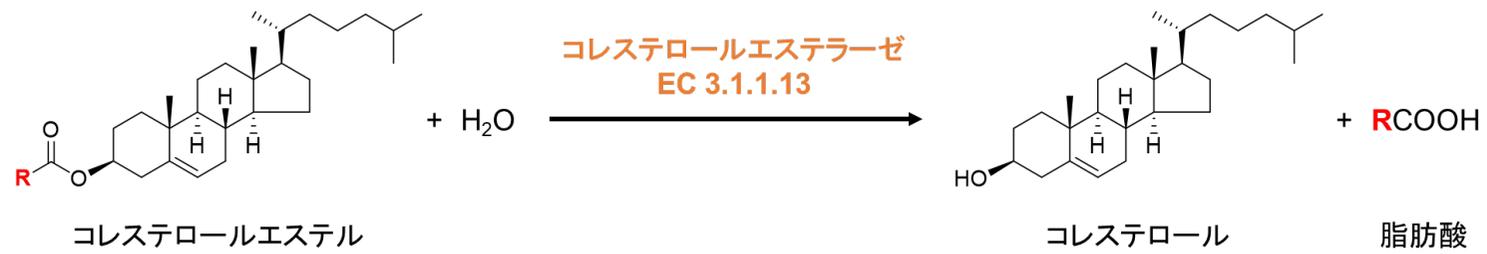


図 1. コレステロールエステラーゼの触媒反応

コレステロールエステラーゼはコレステロールエステルをコレステロールと脂肪酸に加水分解する。図中の R は炭化水素を表す。

表 1. Che を持つことが報告されている微生物・真菌

(Vaquero et al. 2016)の Table 1 を一部改変

Organism	Reference
Bacteria	
<i>Acinetobacter</i> sp.	(Duan et al. 1999)
<i>Burkholderia cepacia</i>	(Takeda et al. 2006)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	(Peters et al. 2012)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	(Kontkanen et al. 2004)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Sugihara et al. 2002)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Uwajima and Terada 1976)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	(Svendsen et al. 1995)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	(Svendsen et al. 1995)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Harvie 1977)
<i>Streptomyces</i> sp.	(Xiang et al. 2006)
<i>Streptomyces avermitilis</i>	(Xiang et al. 2007)
<i>Streptomyces griseus</i>	(Xiang et al. 2007)
<i>Streptomyces lavendulae</i>	(Kamei et al. 1977)
Fungi	
<i>Candida rugosa</i>	(Rúa et al. 1993)
<i>Fusarium oxysporum</i>	(Okawa and Yamaguchi 1977)
<i>Melanocarpus albomyces</i>	(Kontkanen et al. 2006)
<i>Nectria haematococca</i>	(Vaquero et al. 2015)
<i>Ophiostoma piceae</i>	(Calero-Rueda et al. 2002)
<i>Phoma glomerata</i>	(Pollero et al. 2001)
<i>Trichoderma</i> sp.	(Maeda et al. 2008)
<i>Trichoderma reesei</i>	(Vaquero et al. 2015)

表 2. 商業利用されている Che
 (Vaquero et al. 2016)の Table 2 を一部改変

Organism	Applications	出願人	特許番号
<i>Pseudomonas fragi</i>	卵、製紙用パルプ、 ステロール等の処理	Novo Nordisk、Barfoed	WO 1994023052 A1
<i>Pseudomonas</i> sp.	洗濯、食器洗い用洗剤	The Procter & Gamble company、 Vijayarani et al.	EP0968268
<i>Ophiostoma piceae</i>	ピッチ濃度低減（製紙産業）	Calero-Rueda et al.	WO 2002075045 B1
	コンタクトレンズ用洗浄剤	Menicon Co.、Masaki et al.	WO 2003066792 A1
	アシル化反応による フィトステロールの合成	Barba Cedillo et al.	BPCT/ ES 2395582 1

リパーゼについて

リパーゼ (Lip、EC 番号 : 3.1.1.3) は、トリアシルグリセロールの加水分解を触媒し、グリセロールと脂肪酸を生成する (図 2)。Lip は Che と同様、動物や植物、微生物に広く存在している。特に微生物由来リパーゼは産業用途で使用されており、例えば食品製造や皮革加工、製紙、繊維、洗剤、化粧品、医薬品、バイオディーゼル合成、バイオレメディエーション、廃棄物処理など用途は多岐にわたる。商業利用されている Lip の一例を表 3 に記す (Akram et al. 2022)。このように Lip は Che と同様、産業上非常に重要な酵素である。

微生物において Lip は *Pseudomonas* 属細菌や *Burkholderia* 属細菌に広く分布している (Gilbert 1993; Quyen et al. 1999)。特に *Burkholderia cepacia* の Lip と *Burkholderia glumae* 由来 Lip はその逆反応を利用してアシル化反応に利用され、その選択性の解明のために多数の結晶構造が報告されている (Kim et al. 1997; Lang et al. 1998; Luić et al. 2001; Mezzetti et al. 2005; Noble et al. 1993; Schrag et al. 1997)。

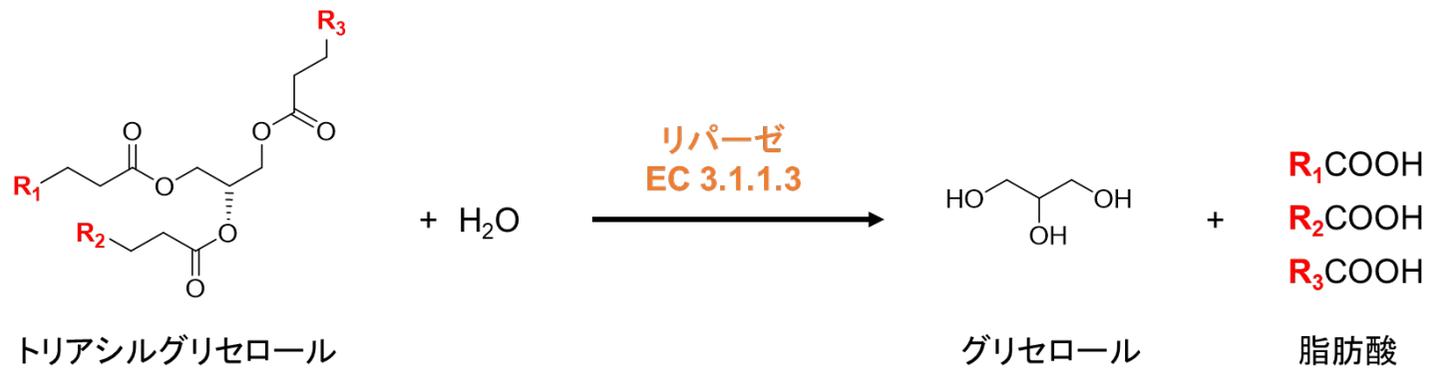


図2. リパーゼの触媒反応

○ リパーゼはトリアシルグリセロールをグリセロールと脂肪酸に加水分解する。図中の R₁、R₂、R₃ は炭化水素を表す。

表 3. 商業利用されている Lip

(Akram et al. 2022)の Table 5 を一部改変

Commercial lipase	Applications	Manufacturing company	References
GreaseX® Ultra	牛皮の脱脂（皮革産業）	Novozymes	[1]
Lipex® Evity®	市販の洗剤への添加剤、油脂・グリース状の汚れ落とし	Novozymes	[2]
Resinase® A 2X	ピッチの沈殿防止（製紙産業）	Novozymes	[3]
Palatase®	チーズフレーバー付与（乳製品産業）	Novozymes	[4]
NovoCor® AD-L	小さな皮の脱脂（皮革産業）	Novozymes	[5]
Lipozyme® TL IM	エステル交換油脂合成、トランス脂肪酸フリーマーガリンなどの製造	Novozymes	[6]
Eversa® Transform 2.0 FG	バイオディーゼルの工業的合成	Novozymes	[7]
Lipopan® 50	生地の強化、均一なクラム構造形成。（製パン業界）	Novozymes	[8]
Veron® Hyperbake-ST Flex	生地の安定性とボリュームアップ（製パン業界）	AB Enzymes	[9]
Rohalase® PL-XTRA	低 pH での植物油の脱ガム	AB Enzymes	[10]
Maxapal® A2	卵黄の乳化性改善	DSM	[11]
Panamore®	生地の強化と品質向上（製パン業界）	DSM	[12]
CakeZyme®	柔らかくきめ細かいケーキの製造（製パン業界）	DSM	[13]
KM450 Lipase	チーズの熟成時間短縮、苦み低減	DuPont	[14]
Lipase 300; 400; and 500	ロマーノチーズやプロヴォローネチーズの製造	DuPont	[14]
Lipase 600	ブルーチーズ、フェタチーズ、モッツァレラチーズ等の製造	DuPont	[14]

- [1] <https://biosolutions.novozymes.com/en/leather/products/degreasing/greases-ultra>
- [2] <https://biosolutions.novozymes.com/en/laundry/products/lipexr-evityr-200-l>
- [3] <https://biosolutions.novozymes.com/en/pulp-paper/products/resinaser-2x>
- [4] <https://biosolutions.novozymes.com/en/dairy/products/cheese/palatase>
- [5] <https://biosolutions.novozymes.com/en/leather/products/degreasing/novocor-ad-l>
- [6] <https://biosolutions.novozymes.com/en/oils-fats/products/interestified-fats/lipozyme-tl-im>
- [7] <https://biosolutions.novozymes.com/en/oils-fats/products/biodiesel/versa-transform-20-fg>
- [8] <https://biosolutions.novozymes.com/en/baking/products/dough-strengthening/lipopan-50>
- [9] <https://www.abenzymes.com/en/your-industry/baking-flour-milling-and-pasta/baking-improvers/emulsifier-free-improvers/>
- [10] <https://www.abenzymes.com/en/your-industry/grain-and-oilseed-processing/vegetable-oil-degumming/rohalase-pl-xtra/>
- [11] https://www.dsm.com/food-beverage/en_US/ingredients/savory/table-sauces-and-condiments/maxapal-a2.html
- [12] https://www.dsm.com/food-beverage/en_US/ingredients/bakery-cereal-and-bars/bakery/panamore.html
- [13] https://www.dsm.com/food-beverage/en_US/ingredients/bakery-cereal-and-bars/bakery/cakezyme.html
- [14] <https://www.dupontnutritionandbiosciences.com/products/natural-flavor-enzymes.html>

Burkholderia stabilis 由来 Che と Lip について

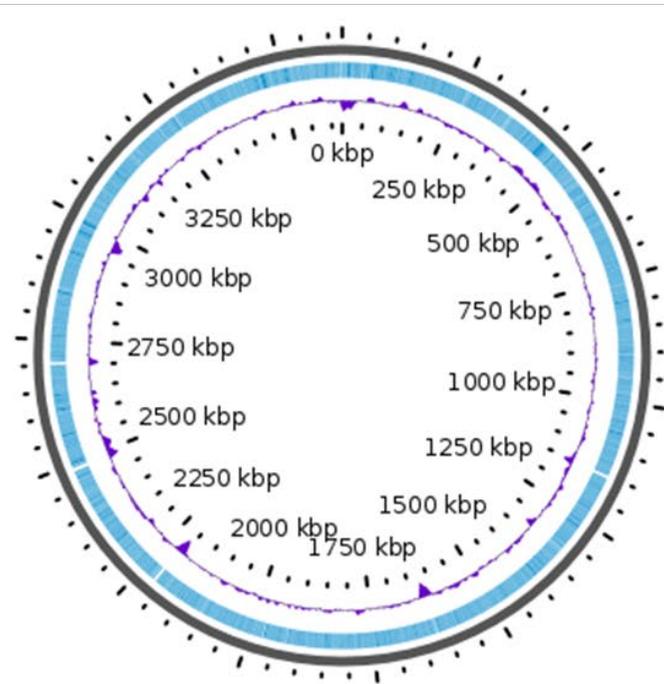
グラム陰性菌である *Burkholderia stabilis* FERMP-21014 株は Che (BsChe、GenBank accession number: WP_096474789.1)を分泌生産することが知られている菌株の一つである (Konishi et al. 2017; Yoshida et al. 2019)。我々は以前、本菌株の全ゲノム配列を解読し、本菌株ゲノムが 3 本の染色体 (Chromosome 1: 3.6 Mbp、Chromosome 2: 3.2 Mbp、Chromosome 3: 0.9 Mbp) から構成されており、プラスミドは保有していないことを明らかにした (Konishi et al. 2017) (図 3)。Chromosome 2 にコードされている BsChe は、高活性、水溶性、有機溶媒耐性、広い基質特異性を持つ有用な酵素であり、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的に利用されており、その近縁種である *Burkholderia cepacia* や *Burkholderia glumae* 由来 Lip と相同性が高い。

Pseudomonas 属細菌および *Burkholderia* 属細菌由来の Lip は、Lip 特異的なシャペロンであるフォルダーゼ (Lif: Lipase-specific foldase) 遺伝子を Lip 遺伝子の直後に持ち、オペロンを形成していることが知られている。そして Lif は Lip の活性化に寄与していると報告されている (Ogino et al. 2013; Rosenau et al. 2004; Verma et al. 2020)。BsChe も独自のフォルダーゼ (BsLif) を直後にコードし、同一のオペロン構造を持つ (図 4)。我々は以前の研究により、微生物由来の Lif と同様、BsLif は BsChe の活性化に必要であることを明らかにした (Yoshida et al. 2019) (後述)。

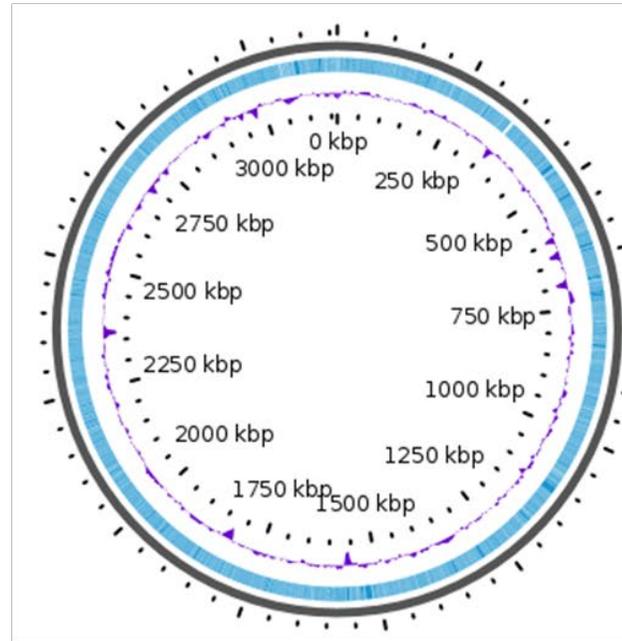
Pseudomonas 属細菌および *Burkholderia* 属細菌由来の Lip は Type II 分泌機構によって細胞外に分泌されていることが報告されており (Rosenau et al. 2004; Verma et al. 2020)、以下のように分泌生産される (図 5)。まず細胞質内において Lip は転写、翻訳され、Unfolded Lip として合成される。Unfolded Lip は N 末端のシグナルペプチドにより Sec pathway (Tsirigotaki et al. 2017) を介してペリプラズムに輸送される。Unfolded Lip はペリプラズムにおいて Lif の働きにより、活性型に折り畳まれる。その後、活性型 Lip は Xcp 分泌装置 (Douzi et al. 2011) によって細胞外に分泌される。我々は以前の研究 (Yoshida et al. 2019) において、UV を用いたランダム変異実験により、BsChe を分泌生産しなくなる変異体を得た。変異点解析の結果、この変異株は Chr1 上の Type II secretion system protein GspF (General secretion pathway protein) をコードする BSFP_020620 遺伝子 (GeneBank Accession number: BAX59237.1) にのみアミノ酸変異が入っていることが判明した。GspF は複数の Type II 分泌機構をコードする遺伝子とオペロンを形成していた (図 6)。この結

果と、BsChe が Lip と同様、独自のフォルダーゼである BsLif を持つことから、BsChe も Lip と同様、フォルダーゼによるフォールディングと Type II 分泌機構が融合した複雑な制御システムを介して分泌生産されていると考えられる。

Chromosome 1
3.6 Mb



Chromosome 2
3.2 Mb



Chromosome 3
0.9 Mb

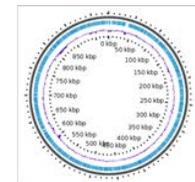


図3. 各染色体のゲノムマップ

Chromosome 1 (GenBank accession number: AP018111.1) は 3.6 Mbp、Chromosome 2 (GenBank accession number: AP018112.1) は 3.2 Mbp、Chromosome 3 (GenBank accession number: AP018113.1) は 0.9 Mbp であり、いずれも環状染色体であった。それぞれ ORF 数は 3324、2821、830 であり、プラスミドは保持していなかった。青色で ORF を、紫色で GC 含量を表す。

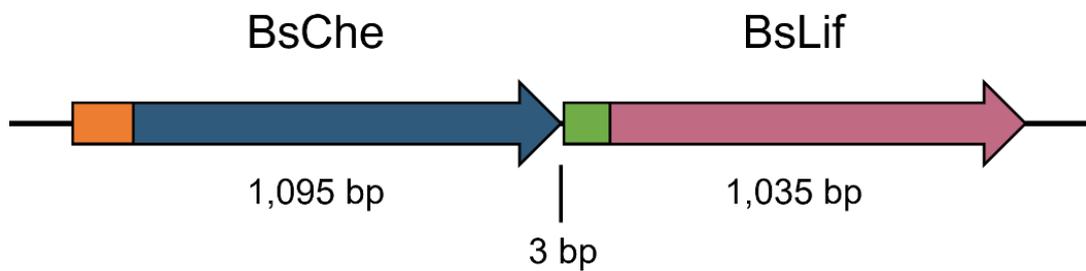


図 4. BsChe と BsLif オペロンの構造

Chromosome 2 に存在する BsChe (GenBank accession number: WP_096474789.1)、BsLif (WP_096474788.1) オペロン。BsChe は 1,095 bp、BsLif は 1,035 bp であり、遺伝子間領域は 3 bp である。BsChe にはシグナルペプチド (図中オレンジ色) が、BsLif には膜貫通領域 (図中緑色) が存在する。

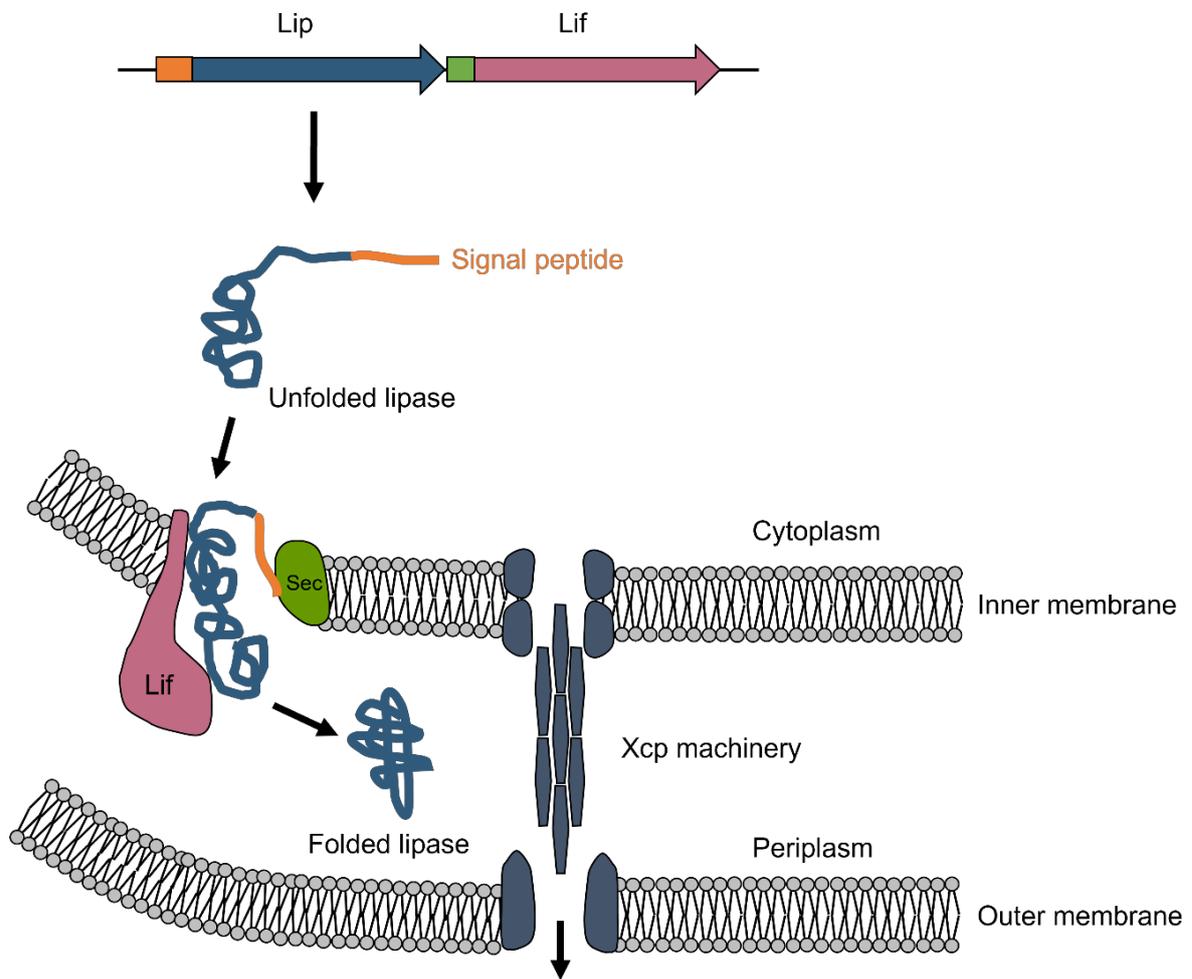


図5. Type II 分泌機構による Lip の分泌経路

Rosenau ら (Rosenau et al. 2004) の模式図を一部改変した。Unfolded Lip はシグナルペプチドによりペリプラズムに運ばれた後、膜に貫通している Lif によりフォールディングされ活性型 Lip となる。活性型 Lip は Xcp 分泌装置により細胞外に分泌される。

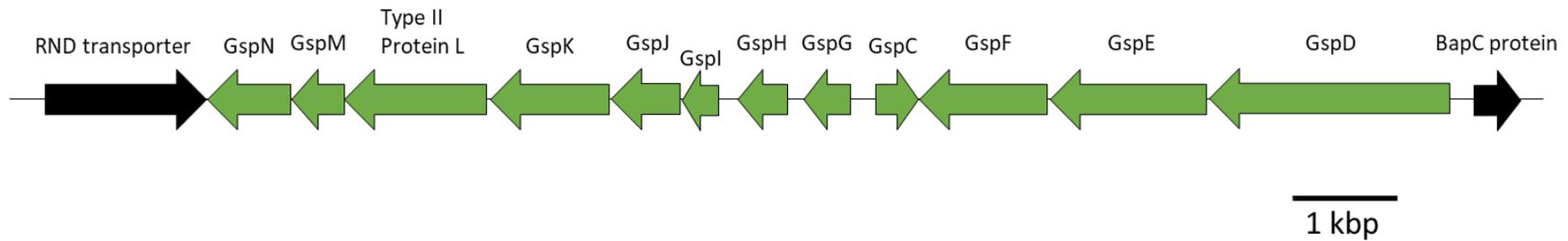


図 6. GspF をコードする遺伝子の前後の遺伝子

Type II 分泌機構を形成すると考えられるオペロン構造。GenBank accession number は以下の通り：GspN (BAX59228.1)、GspM (BAX59229.1)、TypeII protein L (BAX59230.1)、GspK (BAX59231.1)、GspJ (BAX59232.1)、GspI (BAX59233.1)、GspH (BAX59234.1)、GspG (BAX59235.1)、GspC (BAX59236.1)、GspF(BAX59237.1)、GspE (BAX59238.1)、GspD (BAX59239.1)。

BsChe と Lip は大腸菌での組換え発現が困難

Pseudomonas 属細菌および *Burkholderia* 属細菌由来の Lip は、図 5 に示したように Lif 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制御システムを介して生産されている。そのため、同様の分泌システムを持たない汎用的な宿主発現系を用いて生産することが難しい。最も汎用的に使用されている大腸菌を宿主として発現系を構築した場合、組換え Lip は封入体として発現する。そのため、別途発現させた組換え Lif 存在下において Lip 封入体をリフォールディングし、活性型 Lip を得るという方法が報告されている (El Khattabi et al. 2000; Frenken et al. 1993; Ihara et al. 1995)。

我々は BsChe においても他の Lip と同様、大腸菌での発現が困難であることを以前報告している (Yoshida et al. 2019)。BsChe を大腸菌で単独発現させると、その大部分は封入体として発現した (図 7)。しかし、BsLif を共発現することで Che 活性を確認することができたことから、BsChe の活性化には BsLif が必須であることが示唆された。このとき、BsChe と BsLif を共発現した細胞由来の可溶性画分を電気泳動しても BsChe は明確なバンドとして確認できなかったことから、ごくわずかな活性型 BsChe が得られただけに過ぎないと考えられた (図 7)。このことから、BsChe においても分泌機構が異なる大腸菌での発現が困難であることが示された。

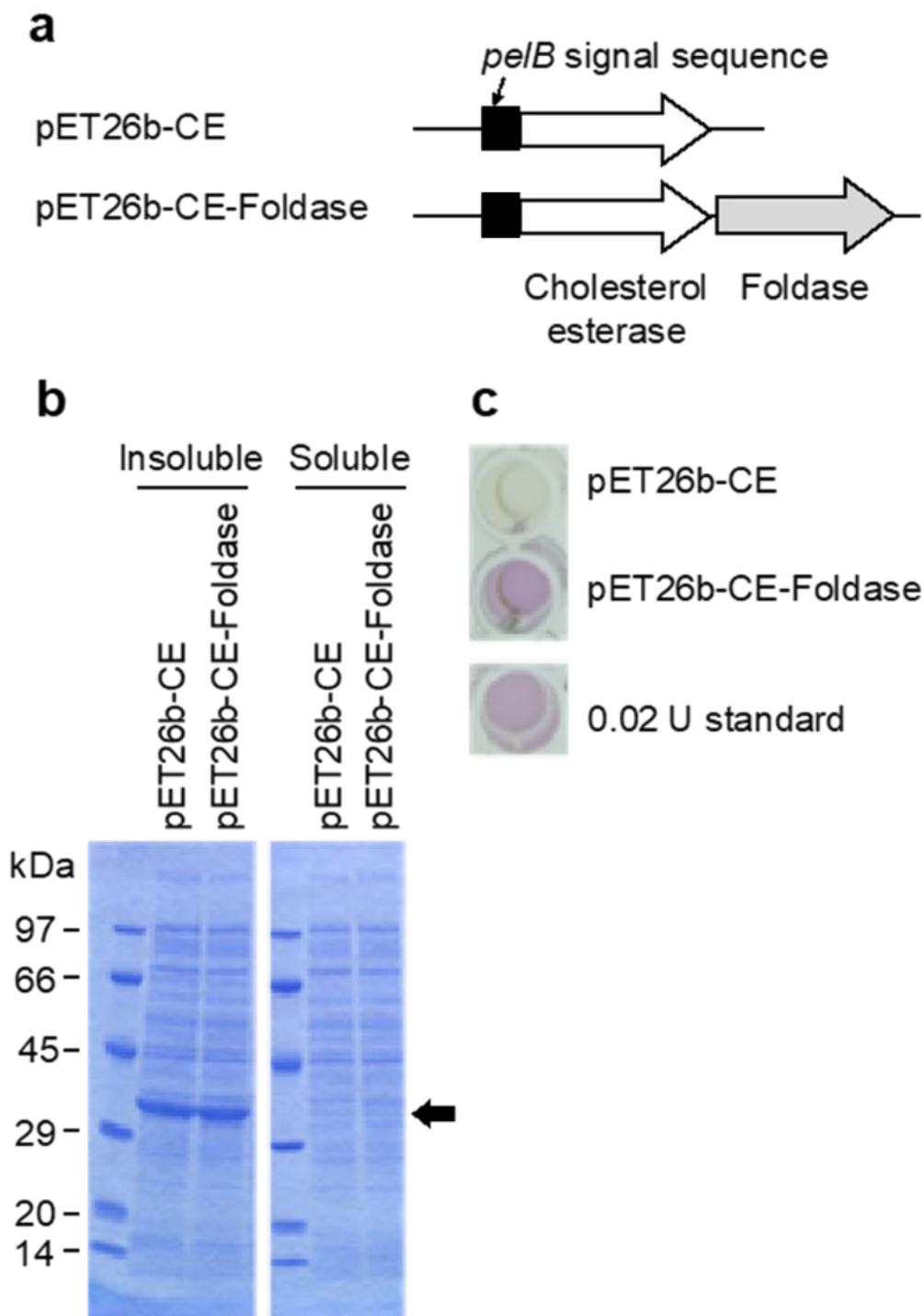


図7. 大腸菌における BsChe 発現検討

pET26b ベクターを用いて大腸菌での BsChe 発現を試みた。

- (a) pET26b ベクターをベースとしたプラスミドコンストラクト。BsChe（図中では Cholesterol esterase または CE と記載）のみ、あるいは BsChe と BsLif（図中では Foldase と記載）を pET26b ベクターの pelB シグナル配列下流に挿入したプラスミドを作製した。
- (b) 各プラスミドを導入した BL21(DE3)株を用いて BsChe を発現誘導後の可溶性画分と不溶性画分の SDS-PAGE。黒矢印で BsChe のバンド位置を示した。
- (c) Che 活性を比色法により検出した結果。0.02 U の BsChe を用いて Che 活性を比較検出した。BsChe と BsLif を共発現した可溶性画分でのみわずかに Che 活性が確認された。我々の以前の報告(Yoshida et al. 2019)から引用。

Burkholderia stabilis を用いた発現系の構築

このように、BsChe は他の Lip と同様、汎用の宿主発現系での発現が難しいと考えられた。そこで、我々は BsChe をリフォールディングなどの操作なく分泌生産可能である新規な *B. stabilis* 宿主発現系を開発した(Yoshida et al. 2019)。

発現ベクターとして広域宿主ベクターである pBBR1(Antoine and Loch 1992; Renault-Mongénie et al. 1996)由来の pBBR122 を使用して開発を行った。*B. stabilis* で使用できる構成発現プロモーターを探索するために、ベースとなる栄養培地に4つの異なる炭素源を添加した培地(オレイン酸、パルミチン酸、グルコース、グリセロール)と添加していない培地の計5つの培地で培養した菌株から経時的に RNA を抽出し、RNA シーケンス(RNA-seq)解析を行った。解析の結果、炭素源の違いに関わらず構成的に高発現する9つの遺伝子(BSFP_002050、BSFP_006100、BSFP_007200、BSFP_010140、BSFP_025280、BSFP_030000、BSFP_034630、BSFP_042710、SFP_052790)を選択し、その遺伝子上流配列350 bp にプロモーター領域が含まれると仮定し、BsChe 発現ベクターを構築した(図8)。

9つの遺伝子上流配列を連結したBsChe発現ベクターを*B. stabilis*野生株(FERMP-21014株)に形質転換した。得られた形質転換体を液体培地で培養し、その培養上清の培地当たりのChe活性を測定したところ、複数の形質転換体においてBsCheの発現が見られた。特にBSFP_002050 遺伝子上流配列を有する pP002050-BsChe-BsLif ベクターおよびBSFP_007200 遺伝子上流配列を有する pP007200-BsChe-BsLif ベクターを導入した形質転換体の培地当たりのBsChe活性は、1.01 U/mL および 0.76 U/mL であり、*B. stabilis*野生株(0.15 U/mL)に比べて約6.7倍および約5.1倍のBsChe活性を示した(図9)。それぞれの培養上清においてBsCheタンパク質が生産されていることを、BsCheポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した(図10)。以上の結果から、BSFP_002050 遺伝子上流配列およびBSFP_007200 遺伝子上流配列には各遺伝子のプロモーター領域が含まれていると考えられた。

なお、本論で述べる研究はすべてBSFP_002050 遺伝子プロモーター領域を含むと考えられる pP002050-BsChe-BsLif ベクターを使用した。

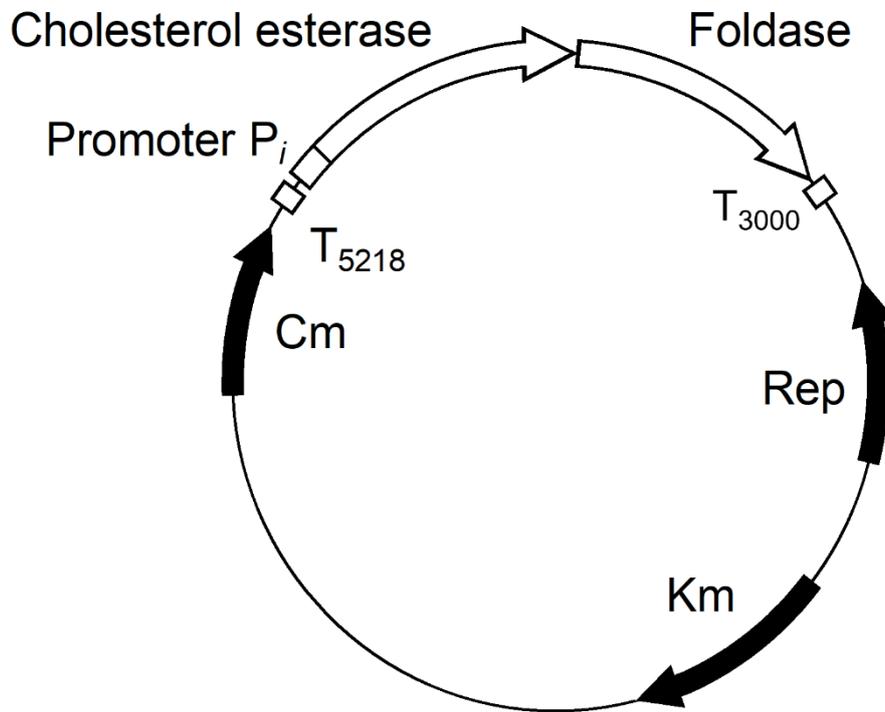


図 8. pBBR122 を用いた発現ベクターマップ

黒の矢印は pBBR122 由来の遺伝子を表し、白の矢印は新たに導入した遺伝子を表す。BsChe (図中では Cholesterol esterase と記載) および BsLif (図中では Foldase と記載) の上流に各遺伝子 (BSFP_002050、BSFP_006100、BSFP_007200、BSFP_010140、BSFP_025280、BSFP_030000、BSFP_034630、BSFP_042710、SFP_052790) のプロモーター領域が含まれると考えられる遺伝子上流配列 350 pb (Promoter P_i) を連結した。コントロールとして Promoter P_i 領域に遺伝子を導入しないベクターも作製した (図 9、図 10)。前後の遺伝子からの影響を避けるために、*B. stabilis* 由来のターミネーター配列を含むと考えられる T3000 (BSFP_030000 遺伝子のストップコドン下流 87 bp) と T5218 (BSFP_052180 遺伝子のストップコドン下流 97 bp) を前後に連結した。

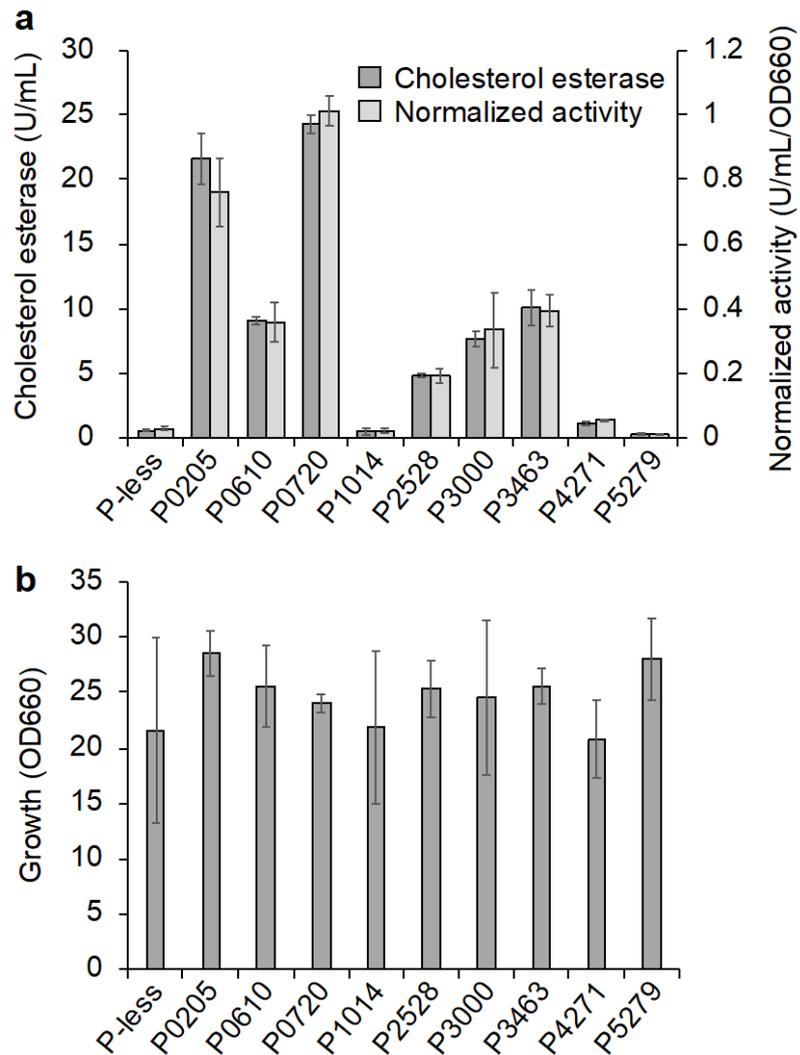


図9. 各プロモーターによるBsChe発現量

各遺伝子上流領域を有する発現ベクターを導入した形質転換体の培地当たりのBsChe活性(a)とOD₆₆₀(b)を示す。Cholesterol esteraseと記載したバーは培地当たりのChe活性を、Normalized activityと記載したバーはOD₆₆₀あたりのChe活性を表す。P0205はBSFP_002050、P0610はBSFP_006100、P0720はBSFP_007200、P1014はBSFP_010140、P2528はBSFP_025280、P3000はBSFP_030000、P3463はBSFP_034630、P4271はBSFP_042710、P5279はBSFP_052790それぞれの遺伝子上流配列(350bp)を有する発現ベクターを導入した形質転換体の結果を表す。プロモーター配列を持たない発現ベクターを導入した形質転換体(P-less)をコントロールとした。実験はN=3で行い、エラーバーは平均値±SDで示した。

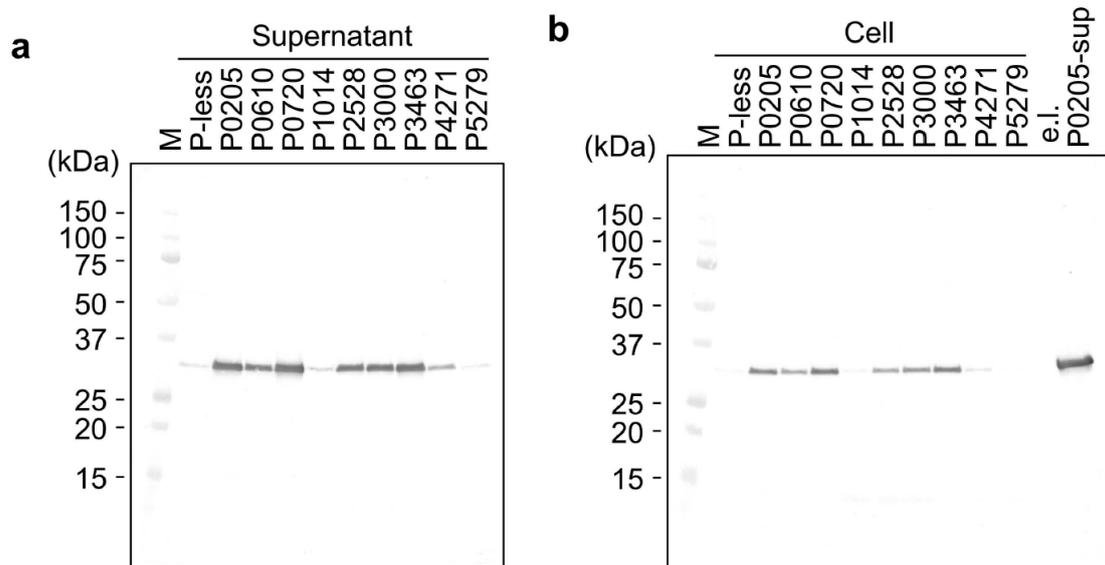


図 10. ウェスタンブロッティングによる Che 検出

各遺伝子上流領域を有する発現ベクターを導入した形質転換体の培養上清(a)および可溶化上清(b)の BsChe を、BsChe ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検出した。M はマーカー、P0205 は BSFP_002050、P0610 は BSFP_006100、P0720 は BSFP_007200、P1014 は BSFP_010140、P2528 は BSFP_025280、P3000 は BSFP_030000、P3463 は BSFP_034630、P4271 は BSFP_042710、P5279 は BSFP_052790 それぞれの遺伝子上流配列 (350 bp) を有する発現ベクターを導入した形質転換体の結果を表す。プロモーター配列を持たない発現ベクターを導入した形質転換体 (P-less) をコントロールとした。e.l(empty lane)は何も泳動していないレーンを表し、P0205-sup は培養上清の P0205 と同じサンプルを表す。

(2) 研究の目的

研究の背景で記述したように Che や Lip は産業上非常に有用な酵素であり様々な分野で利用されている。しかしながら、新規な特性を持つ Che や Lip を得るための機能改変を試みている例は少なく、微生物群から目的とする機能を有する酵素を発現している菌体の単離が主な方法である。これは以下の 2 つの理由に起因すると考えられる。

- (1) Che や Lip について多数の酵素の結晶構造解析が行われているにもかかわらず、基質結合性や選択性に関する知見は限定的であり、機能改変を行うに足る十分な情報が得られていない。
- (2) BsChe や *Burkholderia* 由来 Lip は専用のフォルダーゼ分子による成熟化（フォールディング）と TypeII 分泌システムが融合した複雑な制御システムを介して生産されているため、大腸菌等の汎用宿主発現系での発現が困難である。

そこで我々は BsChe の結晶構造解析や *in silico* 解析を通して、Che や Lip の基質結合メカニズムを明らかにすることを目的とし研究を行った（本論 第 1 章）。また、得られた知見を用いて Lip に Che 活性を付与するなど、基質特異性を改変することができるか検討を行った。

次に我々は BsChe を産業上実用生産可能なレベルまで高生産化することを目的として研究を行った（本論 第 2 章）。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、活性を示す組換え BsChe を分泌生産することに成功した。しかし、その生産量は大腸菌で通常使用される T7 プロモーターを用いた組換え発現システムの生産量と比較して低く (Dubendorff and Studier 1991)、実用的ではなかった。そこで我々は、ランダム変異導入と DNA シーケンス (DNA-seq) 解析を用いて高生産化に寄与する遺伝子の特定を行うとともに、得られた宿主ベクター系にて BsChe ホモログである Lip の高生産化検討も実施した。

本論

第1章 コレステロールエステラーゼの基質結合メカニズムの解析

第1節 緒言

コレステロールエステラーゼ (Che) は、コレステロールエステルの加水分解を触媒し、コレステロールと脂肪酸を生成する。Che は真核生物から哺乳類に至るまで普遍的に存在しており、様々な Che が産業利用されている。その一つである *Burkholderia stabilis* 由来コレステロールエステラーゼ (BsChe) は血清中の総コレステロール値を測定する体外診断用医薬品に使用されている。

リパーゼ (Lip) は、トリアシルグリセロールの加水分解を触媒し、グリセロールと脂肪酸を生成する。Che と Lip はそれぞれ触媒反応が異なるが、*Burkholderia cepacia* 由来 Lip (BcLip) は BsChe と 90%以上の高いアミノ酸配列相同性を有している。興味深いことに、BsChe は Che 活性と Lip 活性の両方の活性を示すが、BcLip は Lip 活性のみを有し Che 活性を持たない。これはコレステロールエステルの嵩高いステロール骨格構造が影響している可能性が考えられる。

そこで我々は BsChe の基質結合メカニズムの解明を目的として研究を行った。最初に、BsChe について2つの異なる晶系および格子定数からなる Crystal を得たため、それぞれの結晶を用いた BsChe の立体構造解析結果を記述する。その後、これらの結晶構造に対して BsChe の基質であるコレステロールリノレート (CLL) を用いたドッキングシミュレーションを行い、基質特異性に寄与するアミノ酸を推定した。部位特異的変異導入による検証を行い、推定したアミノ酸が基質特異性に寄与していることを証明した。一連の実験により、BsChe や Lip の基質特異性について新たな知見を見出した。

第2節 材料および方法

1-2-1. 菌株、プラスミド、培地

本研究で使用した菌株およびプラスミドをそれぞれ表4および表5に示す。培地は以下の通りである。

- Luria-Bertani (LB) 培地：Becton Dickinson and Company 社製。1%の Tripton、0.5%の Yeast extract、および1%の塩化ナトリウムを含む培地。
- Yeast sorbitol (YS) 培地：30 g/L の Yeast extract (Becton Dickinson and Company 社製) と 30 g/L のソルビトールを含む培地 (pH7.0 に調整)
- Nutrient broth (NB) 培地：Becton Dickinson and Company 社製。0.5%のペプトン、0.3%の Beef extract を含む培地。

必要に応じてカナマイシンを添加した。寒天培地はそれぞれの培地成分に 1.5% アガロースを加えて作製した。

表 4. 本研究で使用了した菌株

Strain	Relevant characteristic	Origin or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Cloning host and helper host of conjugal transfer	Takara Bio
<i>B. stabilis</i>		
FERMP-21014	Expression host, wild-type	(Konishi et al. 2017)

表 5. 本研究で使用したプラスミド

Plasmids	Properties and construction information	Origin or reference
pP002050-BsChe-BsLif	pBBR122-pP002050-BsChe-BsLif	(Yoshida et al. 2019)
pP002050-BsChe (WT)	pBBR122-pP002050-BsChe(WT)-BsLif	This study
pP002050-BsChe (L266V)	pBBR122-pP002050-BsChe(L266V)-BsLif	This study
pP002050-BsChe (I287V)	pBBR122-pP002050-BsChe(I287V)-BsLif	This study
pP002050-BsChe (L266V/I287V)	pBBR122-pP002050-BsChe(L266V/I287V)-BsLif	This study
pP002050-BcLip (WT)	pBBR122-pP002050-BcLip(WT)-BcLip	This study
pP002050-BcLip (V266L)	pBBR122-pP002050-BcLip(V266L)-BcLip	This study
pP002050-BcLip (L287I)	pBBR122-pP002050-BcLip(L287I)-BcLip	This study
pP002050-BcLip (V266L/L287I)	pBBR122-pP002050-BcLip(V266L/L287I)-BcLip	This study
pP002050-BuLip (WT)	pBBR122-pP002050-BuLip(WT)-BcLip	This study
pP002050-BuLip (V266L)	pBBR122-pP002050-BuLip(V266L)-BcLip	This study
pP002050-BuLip (L287I)	pBBR122-pP002050-BuLip(L287I)-BcLip	This study
pP002050-BuLip (V266L/L287I)	pBBR122-pP002050-BuLip(V266L/L287I)-BcLip	This study
pP002050-BtLip (WT)	pBBR122-pP002050-BtLip(WT)-BcLip	This study
pP002050-BtLip (L287I)	pBBR122-pP002050-BtLip(L287I)-BcLip	This study
pP002050-BgLip (WT)	pBBR122-pP002050-BgLip(WT)-BcLip	This study
pP002050-BgLip (L287I)	pBBR122-pP002050-BgLip(L287I)-BcLip	This study

1-2-2. 遺伝子クローニング

本研究で使用したプライマーを以下に示す（表 6）。

プラスミドへの遺伝子クローニングには Takara Bio 社製 In-Fusion HD Cloning Kit を用いた。方法は In-Fusion HD Cloning Kit のプロトコルに従い以下のように行った。プラスミド上の挿入部位の近辺 15 bp のオーバーラップ配列を付加してプライマーを設計し、PCR を行った。PCR は KOD Plus Neo もしくは KOD FX Neo（いずれも東洋紡社製）を用いて行い、それぞれのプロトコルに従い実施した。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、目的の DNA を含むゲル断片を QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen 社製) を用いて精製した。精製 DNA 断片を In-Fusion HD Cloning Kit によりプラスミドと連結し、大腸菌 DH5 α に導入した。25 μ g/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地に塗布し 30°C で 24 時間培養し形質転換コロニーを得た。得られたコロニーを、抗生物質を含む LB 培地に植え継ぎ、30°C で 12 時間培養後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて、プラスミドを抽出した。

表 6. 本研究で使用したプライマー

下線は In-Fusion HD Cloning Kit で使用するオーバーラップ配列を表す。

Primer name	Sequence (5' to 3')	Used for
vector-F	5'- GCCGCGGTTTTCGACTGCTTCAAAG -3'	Cloning of BsChe, BcLip, BuLip, BtLip, and BgLip
vector-R	5'- TGCTTTACCTCCGCTAAGTGGTGATGAAC -3'	Cloning of BsChe, BcLip, BuLip, BtLip, and BgLip
BsChe-F	5'- <u>AGCGGAGGTAAAGCA</u> ATGGCCAGATCGATGCGTTC -3'	Cloning of BsChe
BsChe-R	5'- <u>GTCGAAAACCGCGGCTT</u> ACTGCGCGCTGCCCCGCC -3'	Cloning of BsChe
BcLip-F	5'- <u>AGCGGAGGTAAAGCA</u> ATGGCCAGATCGATGCGTTCCAGG -3'	Cloning of BcLip
BcLip-R	5'- <u>GTCGAAAACCGCGGCTT</u> ACTGCGCGCTGCCCCGCCCGCGA -3'	Cloning of BcLip
BuLip-F	5'- <u>AGCGGAGGTAAAGCA</u> ATGGCCAGATCAATGCGTTCCAGGGT -3'	Cloning of BuLip
BuLip-R	5'- <u>GTCGAAAACCGCGGCTT</u> ACCGAGGGGCCGCCGCGCCGCGA -3'	Cloning of BuLip
BtLip-F	5'- <u>AGCGGAGGTAAAGCA</u> ATGGCCAGAACGATGCGATCCAGG -3'	Cloning of BtLip
BtLip-R	5'- <u>GTCGAAAACCGCGGCCT</u> ATTGCGTCTGCGCCGCCGCGC -3'	Cloning of BtLip
BgLip-F	5'- <u>AGCGGAGGTAAAGCA</u> ATGGTCAGATCGATGCGTTCCAGGGT -3'	Cloning of BgLip
BgLip-R	5'- <u>GTCGAAAACCGCGGCCT</u> AACCGCCCCGCCGCGATCGAG -3'	Cloning of BgLip

1-2-3. BsChe の精製

結晶構造解析を行うために、市販の BsChe (旭化成ファーマ株式会社製) を再精製して使用した。BsChe を 5 mg/mL になるように Buffer A (10 mM Tris-HCl、pH 8.0) に溶解した後、Buffer A を用いて 4°C で一晩透析を行った。DEAE Sepharose Fast Flow カラム (GE Healthcare 社製) を Buffer A で平衡化した後、透析後の BsChe 溶液をロードした。カラムに結合した BsChe は、0-500 mM 塩化ナトリウムの linear gradient によって溶出した。得られた各フラクションの純度は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した。BsChe が高純度に精製されているフラクションを回収し、Buffer A を用いて再度透析を行い、精製 BsChe を得た。精製 BsChe は Amicon Ultra 遠心限外ろ過デバイス (分画分子量 10kDa、Merck Millipore 社製) を用いて約 12 mg/mL に濃縮し、4°C で保存した。

1-2-4. 結晶化条件の最適化

初期結晶化実験は、Sparse-matrix crystallization-screening kit (Crystal Screen I and II、Index Screen、PEG-Rx (Hampton Research 社製)、Wizard Screen I and II (Rigaku 社製)) を用いて、20°C で 96 ウェルプレート内にてシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。サンプル溶液とリザーバー溶液 (各 100 nL) を混合し、70 μ L のリザーバー溶液で平衡化した。初期ヒット条件は、20°C の 24 ウェルシッティングドロッププレートで、沈殿剤濃度と pH を変化させることにより最適化した。1.0 μ L のサンプル溶液と 1.0 μ L のリザーバー溶液を混合した後、500 μ L のリザーバー溶液で平衡化させた。その結果、2 条件において X 線構造解析に適した結晶を得た。0.1 M イミダゾール (pH 6.5)、15% PEG 3350、40% 2-プロパノールからなるリザーバー溶液で立方体の結晶 (Crystal I) を成長させた。0.5 M クエン酸ナトリウム (pH 6.0)、8% PEG 4000、30% 2-プロパノールからなるリザーバー溶液を用いて、針状結晶 (Crystal II) を得た。

1-2-5. 構造決定と精密化

結晶は、10% 2-プロパノールと 20% グリセロールを含むリザーバー溶液に短時間浸した後、液体窒素で急冷した。X 線回折実験は Photon Factory (PF、つくば市) のビームライン AR NE-3A および BL-17A で放射光を利用して実施した。得られた回折データに対して、XDS ソフトウェア(Kabsch 2010)を用いて反射の指数付けを行い、各反射スポット間のスケーリング、およびデータのマーキングを行った。Crystal I は C-centered orthorhombic space group $C222_1$ に属し、Unit-cell dimension は $a = 58 \text{ \AA}$ 、 $b = 61 \text{ \AA}$ 、 $c = 147 \text{ \AA}$ であった。つぎに、BcLip (Protein Data Bank [PDB] accession code: 1YS1) の原子座標を検索プローブとして用い、MOLREP(Vagin and Teplyakov 2010)による分子置換法によって構造を決定した。異方性温度因子を用いた水素含有モデルの精密化は REFMAC5(Murshudov et al. 2011)と Phenix(Adams et al. 2010)を用いて行った。Crystal II の X 線データは、Orthorhombic space group ($P2_12_12_1$)、Unit-cell dimension として $a = 47 \text{ \AA}$ 、 $b = 70 \text{ \AA}$ 、 $c = 186 \text{ \AA}$ で初期処理を行った。分子置換は、Crystal I の BsChe 構造を探索プローブとして、MOLREP(Vagin and Teplyakov 2010)を用いて行った。その結果、 $P2_12_12_1$ 格子の非対称ユニットにある 2 つの BsChe モノマーについて、明確な解を得ることができた。しかし、REFMAC5(Murshudov et al. 2011)を用いたモデル精密化計算の結果、 R_{work} と R_{free} ファクターは約 35%までしか低下せず、実験データと構築したモデルの間の誤差が非常に大きく、実験データに何らかの問題が存在していることが示唆された。一般にこのようなケースは、結晶の対称性を誤って取り扱っているか、あるいは 2 成分の結晶が混合した twin 結晶である可能性が考えられる。そこで、twin 結晶であるかどうかを検定するための解析手法である L-test を行い、Crystal II は確かに twin であることを確認した(Padilla and Yeates 2003)。そこで、我々はデータを再処理し、Monoclinic space group ($P2_1$)、Unit-cell dimension を $a = 186 \text{ \AA}$ 、 $b = 47 \text{ \AA}$ 、 $c = 70 \text{ \AA}$ 、 $\beta = 90.1^\circ$ に対称性を縮小させた。すなわち、消去した 2 回軸対象は twin に由来する非結晶学的擬似対称であったと仮定した。このようにデータを再処理し、より精度の高い分子置換法計算が可能なソフトウェアである PHASER(McCoy et al. 2007) を利用することで、正しい分子置換法の解を得ることに成功した。モデルの精密化は REFMAC5(Murshudov et al. 2011)と Phenix(Adams et al. 2010)を用い、Twinning operator (-h, -k, l)を用いて行った。非結晶学的対称性の拘束は、モデル精密化中に適用されなかった。手動でのモデルフィッティングは、Coot(Emsley et al. 2010)を使用して行った。

最終的な精密化モデルの立体化学的妥当性を MolProbity(Chen et al. 2010)を用いて評価した。データ収集と精密化の統計情報を表 7 にまとめた。分子図は、PyMol version 2.3.4 (Schrödinger 社製)を用いて作成した。斜方晶および単斜晶の BsChe の原子座標と構造因子の振幅は、それぞれ accession code: 7COF および 7COG で RCSB Protein Data Bank (PDB)に登録し、公開した。

表 7. BsChe の結晶回折データの収集とモデル精密化の統計

	Crystal I	Crystal II
Data collection		
Beamline	PF BL-17A	PF AR-NE3A
Wavelength (Å)	0.9800	1.0000
Temperature (K)	100	100
Detector	Pilatus 3S 6M	Pilatus 2M-F
Space group	$C222_1$	$P2_1$
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 58.2, b = 61.4,$ $c = 147.2$	$a = 186.3, b = 47.1,$ $c = 70.1, \beta = 90.1$
Resolution (Å) ^a	50–1.08(1.15–1.08)	50–2.10 (2.23–2.10)
Unique reflections	103,889	71,702
$R_{\text{meas}}^{\text{a,b}}$	0.040 (0.220)	0.122 (0.552)
Mean $I/\sigma(I)^{\text{a}}$	28.9 (7.1)	8.7 (2.3)
Completeness (%) ^a	93.0 (62.0)	99.5 (98.7)
Multiplicity ^a	6.02 (3.92)	3.36 (3.36)
Wilson B value (Å ²)	6.6	16.2
Model refinement		
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}^{\text{c,d}}$	0.098/0.118	0.219/0.252
Twinning operator (twinning fraction)	-	$-h, -k, l(0.44)$
Number of atoms	5,172/309	9,472/88
All/solvent		
Average B -factors (Å ²)	9.2/20.0	24.9/18.3
All/solvent		
R.m.s.d. from ideal		
Bond lengths (Å)/Bond angles (°)	0.011/1.31	0.002/0.50
Ramachandran plot		
Favored/allowed/outliers (%)	98.43/1.57/0.0	96.46/3.38/0.16

^a The values shown in parentheses are for the outermost resolution shell.

^b $R_{\text{meas}} = \sum_h \sum_i |I_{h,i} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_i I_{h,i}$, where $\langle I_h \rangle$ is the mean intensity for a set of equivalent reflections.

^c $R_{\text{work}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$ for 95% of the reflection data used in the refinement. F_{obs} and F_{calc} are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.

^d R_{free} is the equivalent of R_{work} , except that it was calculated for a randomly chosen 5% of reflections, which were excluded from refinement.

1-2-6. ドッキングシミュレーション解析

分子ドッキング計算には、Crystal I のデータを精密化し、水素原子を含む BsChe の原子モデルを使用した。コレステロールリノレート (CLL) の原子モデルは PDB の Chemical Component Library から入手した (Ligand code: CLL)。入力原子座標ファイルは、Autodock Tool Kit version 1.5.6 (Morris et al. 2009) を用いて生成した。ドッキングシミュレーションは、Autodock Vina version 1.1.2 (Trott and Olson 2010) を用いて実施した。BsChe モデルは rigid body として扱い、動的残基の定義は行わなかった。グリッドボックスのサイズは $30 \times 45 \times 20 \text{ \AA}$ とし、BsChe の活性部位クレフトを完全にカバーするように設定した。Exhaustiveness value を 8~800 の間で変更し複数回ドッキング計算を行った。触媒残基である Ser87 の側鎖 OG と CLL の C28 の原子間距離が 4 \AA 以内に収まるドッキングモデルを、酵素活性に適したドッキングモデルと定義した。

1-2-7. His タグ付き組換え酵素の作製

各 His タグ付き組換え酵素を作製した。*B. stabilis*、*B. cepacia* (GenBank accession number: AAA50466.1)、*B. ubonensis* (WP_059898556.1) (Yang et al. 2016)、*B. thailandensis* (AIP27624.1) (Daligault et al. 2014)、*B. glumae* (CAA02073.1) をコードする各遺伝子のシグナルペプチドの直後に 6 つのヒスチジンから成る His タグ配列を接続した配列、およびその下流の Lif をコードする遺伝子を含む配列を GenScript 社に依頼して全合成した。また、以下に示すアミノ酸置換酵素が得られるように変異点を挿入した遺伝子についても全合成した。得られた配列を BsChe (WT)、BsChe (L266V)、BsChe (I287L)、BsChe (L266V/I287L)、BcLip (WT)、BcLip (V266L)、BcLip (L287I)、BcLip (V266L/L287I)、BuLip (WT)、BuLip (V266L)、BuLip (L287I)、BuLip (V266L/L287I)、BtLip (WT)、BtLip (L287I)、BgLip (WT)、BgLip (L287I) とする。

BsChe 発現ベクターの構築：得られた合成遺伝子配列 (BsChe (WT)、BsChe (L266V)、BsChe (I287L)、BsChe (L266V/I287L)) を鋳型とし、BsChe-F と BsChe-R プライマーを用いて PCR を行い、各遺伝子断片を得た。また、pP002050-BsChe-BsLif を鋳型とし、vector-F と vector-R プライマーを用いて PCR を行い、ベクター断片を得た。このベクター断片は他の宿主由来 Lip 遺伝子をクローニングする際にも使用した。遺伝子断片とベクター断片

を In-Fusion HD Cloning Kit により結合し、pP002050-BsChe (WT)、pP002050-BsChe(L266V)、pP002050-BsChe(I287L)、pP002050-BsChe(L266V/I287L))を作製した。

BcLip 発現ベクターの構築：得られた合成遺伝子配列 (BcLip (WT)、BcLip (V266L)、BcLip (L287I)、BcLip (V266L/L287I)) を鋳型とし、BcLip-F と BcLip-R プライマーを用いて PCR を行い、各遺伝子断片を得た。この遺伝子断片と BsChe 形質転換体時に作製したベクター断片を In-Fusion HD Cloning Kit により結合し、pP002050-BcLip(WT)、pP002050-BcLip(V266L)、pP002050-BcLip(L287I)、pP002050-BcLip(V266L/L287I)を作製した。

BuLip 発現ベクターの構築：得られた合成遺伝子配列 (BuLip (WT)、BuLip (V266L)、BuLip (L287I)、BuLip (V266L/L287I)) を鋳型とし、BuLip-F と BuLip-R プライマーを用いて PCR を行い、各遺伝子断片を得た。この遺伝子断片と BsChe 形質転換体時に作製したベクター断片を In-Fusion HD Cloning Kit により結合し、pP002050- BuLip (WT)、pP002050-BuLip(V266L)、pP002050-BuLip(L287I)、pP002050-BuLip(V266L/L287I)を作製した。

BtLip 発現ベクターの構築：得られた合成遺伝子配列 (BtLip (WT)、BtLip (L287I)) を鋳型とし、BtLip-F と BtLip-R プライマーを用いて PCR を行い、各遺伝子断片を得た。この遺伝子断片と BsChe 形質転換体時に作製したベクター断片を In-Fusion HD Cloning Kit により結合し、pP002050- BtLip (WT)、pP002050-BtLip(L287I)を作製した。

BgLip 発現ベクターの構築：得られた合成遺伝子配列 (BgLip (WT)、BgLip (L287I)) を鋳型とし、BgLip-F と BgLip-R プライマーを用いて PCR を行い、各遺伝子断片を得た。この遺伝子断片と BsChe 形質転換体時に作製したベクター断片を In-Fusion HD Cloning Kit により結合し、pP002050- BgLip (WT)、pP002050-BgLip(L287I)を作製した。

Bsche、BcLip、BuLip、BtLip、そして BgLip それぞれの発現ベクターは、「1-2-8 項 *B. stabilis* のコンピテントセル作製と形質転換法」に従い *B. stabilis* 野生株 (FERMP-21014 株) に形質転換した。

1-2-8. *B. stabilis* のコンピテントセル作製と形質転換法

B. stabilis 野生株 (FERMP-21014 株) を 100 mL の LB 培地にて対数増殖期に至るまで 30°C で振盪培養した後、遠心分離にて菌体を回収した。回収した菌体に 100 mL の氷冷滅菌水を加え、懸濁後再び遠心分離し菌体を回収した。この操作をもう一度繰り返した後、回収した菌体に 5 mL の冷却 10% グリセリン溶液を加え、よく懸濁し、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体に 5 mL の氷冷 10% グリセリン溶液を加え、懸濁し、40 μ L ずつ分注し、-80°C で凍結しコンピテントセルを得た。コンピテントセルを氷中で融解し、得られた各発現ベクターをエレクトロポレーション法 (2.5kV、200 Ω 、25 μ F) により導入した。100 μ g/mL カナマイシンを含む NB 寒天培地に植菌し、28°C で 2 日間培養することで、形質転換体を得た。

1-2-9. 形質転換体の培養および Che 精製

得られた各形質転換体 1 コロニーを寒天培地上からかきとり、100 μ g/mL カナマイシンを含む 5 mL の YS 培地に植菌し、28°C で 72 時間培養した。培養液を遠心分離し、各組換え体酵素を含む培養上清を得た。Ni キレートアフィニティーカラム (樹脂量: 0.1 mL) を平衡化溶液 (50 mM リン酸ナトリウム (pH 8.0)、300 mM 塩化ナトリウム) で平衡化した後、培養上清をアプライした。洗浄 Buffer (50 mM リン酸ナトリウム Buffer (pH 6.0)、300 mM 塩化ナトリウム、20 mM イミダゾール) でカラムを洗浄した後、0.1 mL の溶出 Buffer (50 mM リン酸ナトリウム Buffer (pH 6.0)、300 mM 塩化ナトリウム、400 mM イミダゾール) を用いて各 His タグ付き組換えタンパク質を溶出した。溶出サンプルを SDS PAGE に供し、クーマシーブリリアントブルー (CBB) により染色後、脱イオン水により脱色した。単一バンドに精製できていることを確認し、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて総タンパク質濃度を計算した。

1-2-10. Che および Lip 活性の測定

精製した His タグ付きタンパク質の Che 活性は、コレステロールオキシダーゼとペルオキシダーゼ (POD) の作用により生成するキノンイミン色素を測定する比色法を用いて測定した (図 11)。

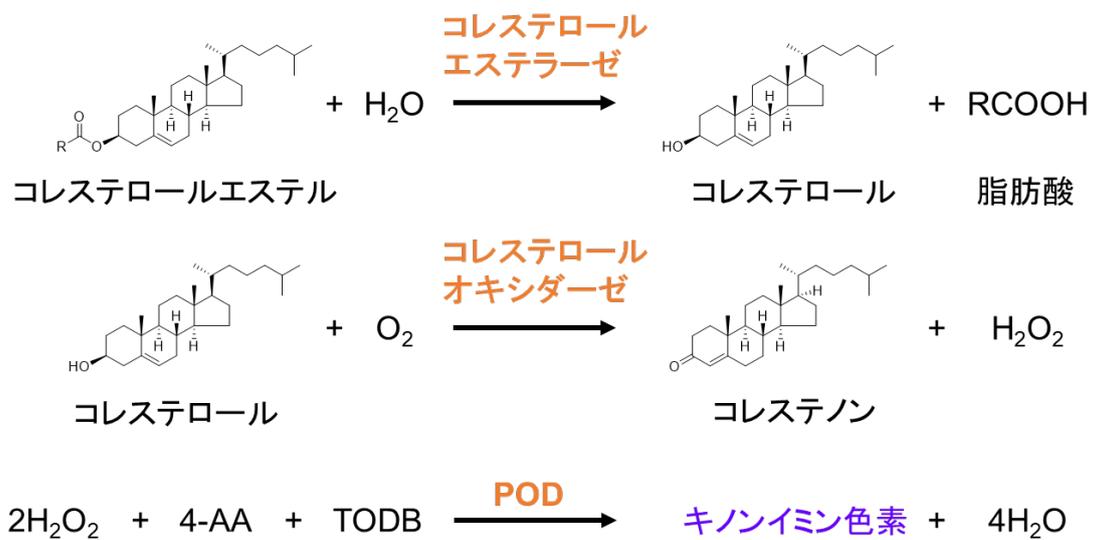


図 11. Che 活性測定 の原理

コレステロールエステルはコレステロールエステラーゼによりコレステロールと脂肪酸に加水分解される。続いて精製したコレステロールがコレステロールオキシダーゼの働きによりコレステノンへ変換され、その過程で過酸化水素 (H₂O₂) が発生する。生成した過酸化水素は POD の働きにより 4-AA、TODB と縮合し、キノニンイミン色素が生成する。キノニンイミン色素は 546 nm の吸収極大を持つ。

活性測定には、以下の反応試薬を調整した。

[反応試薬]

40 mM	リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8)
0.02%	N,N-bis(4-sulfobutyl)-3-methylaniline (TODB) (同仁化学研究所製)
10 U/mL	ペルオキシダーゼ (Sigma-Aldrich 社製)
0.3%	Triton X-100
2.5 U/mL	コレステロールオキシダーゼ (旭化成ファーマ株式会社製)
10%	仔牛血清液 (Thermo Fisher Scientific 社製)
0.035%	4-アミノアンチピリン (4-AA) (同仁化学研究所製)

反応試薬を 37°C で 10 分間予備加温し、日立 7080 自動分析装置 (日立製作所製) を用いて、150 μ L の反応試薬に 3 μ L の Che を含む培養上清等のサンプルを添加し、37°C で反応させた。反応がリニアになった添加後約 77 秒から約 119 秒の主波長 546 nm、副波長 660 nm における吸光度を測定し、単位時間当たりの吸光度変化量 ($\Delta A/\text{min}$) を得た。下記の式から Che 活性を算出した。

$$\text{Enzyme activity (U/mL)} = \frac{\Delta A_{546 \text{ nm}}/\text{min}}{36 \times 1/2} \times \frac{153}{3} \times \frac{1}{1000}$$

なお、式中の $\Delta A_{546 \text{ nm}}/\text{min}$ は上記反応試薬を添加した 76.69 秒から 119.35 秒の主波長 546 nm、副波長 660 nm における吸光度を測定し、得られた単位時間当たりの吸光度変化量を示す。36 はキノンイミン色素の 546 nm におけるミリモル分子吸光係数、1/2 は 2 mol の過酸化水素が 1 mol のキノンイミン色素を生成することから計算される係数、153 は反応総体積、3 は上記培養上清等サンプルの体積をそれぞれ意味する。37°C で 1 分間に 1 μ mol のコレステロールを生成する酵素量を 1 Unit (1 U) の Che 活性と定義した。

精製した His タグ付きタンパク質の Lip 活性は、Oil-polyvinyl alcohol method (Yamaguchi et al. 1973) を一部改変した方法を用いて測定した。50 g のオリーブ油 (日本薬局方) と 50 g のアデカトール SO-120 (ADEKA 社製) を 150 mL の精製水に懸濁し基質懸濁液を調整した。5 mL の基質懸濁液と 2 mL の精製水を試験管にて攪拌したあと、37°C で 10 分間イ

ンキュベートした。10 分後、0.5 mL の培養上清等のサンプルを加え混和し、37°C で 20 分間インキュベートした。インキュベート後、アセトン-エタノールを 1:1 の比率で混合した反応停止液を 16mL 加えた。さらに、1% フェノールフタレイン-エタノール溶液を加え、50 mM 塩化ナトリウムで滴定した。盲検としてサンプルの代わりに盲検サンプル (0.1 M リン酸二水素カリウム緩衝液、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% アジ化ナトリウム) を用いて同様の滴定を行った。Lip 活性は下記の式から算出した。

$$\text{Enzyme activity (U/mL)} = \frac{(V_s - V_c) \times F}{20} \times 50 \times \frac{1}{0.5}$$

なお、式中の V_s はサンプルを使用した時の滴定量 (mL) を、 V_c は盲検を使用した時の滴定量 (mL) を表す。F は JIS K8001 試薬試験方法通則によって算出された滴定液 (50 mM NaOH) の濃度補正係数を表す。50 は滴定液の濃度、0.5 は反応に供したサンプル液量 (mL) を表す。37°C で 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の脂肪酸を生成する酵素量を 1 Unit (1 U) の Lip 活性と定義した。

第3節 結果および考察

1-3-1. BsChe の結晶構造解析

BsChe について結晶化を行い、2つの異なる晶系および格子定数からなる Crystal を得た (Crystal I と Crystal II) (図 12)。Crystal I の回折強度データに基づく原子モデルは分解能 1.08Å まで精密化され、 R_{work} と R_{free} はそれぞれ 11.8% と 9.8% であった。この非対称ユニットには、1つの BsChe モノマー (Chain A^{CI})、1つの Ca²⁺ イオン、1つのイミダゾール分子、2つのグリセロール分子、2つの 2-プロパノール分子、および 324 個の溶媒分子が含まれていた。Crystal II の原子モデルは 2.1Å まで精密化され、 R_{work} と R_{free} はそれぞれ 21.9% と 25.2% であった。Crystal II の非対称ユニットには、4つの BsChe モノマー (Chain A^{CII}-D^{CII})、4つの Ca²⁺ イオン、および 90 個の溶媒分子が含まれていた。BsChe は 35×35×40Å の典型的な α/β -ヒドロラーゼの構造を持ち (図 13)、疎水性の活性部位は中央の β シートの C 末端にあり、触媒残基 Ser87 と His286 はその活性部位の底に位置していた。

BsChe の構造は、これまでに報告されている *B. cepacia* 由来 Lip (BcLip, PDB code: 1YS1) の構造 (Kim et al. 1997; Noble et al. 1993; Schrag et al. 1997) とよく重なっており、DALI サーバーによるペアワイズ構造比較 (Holm and Rosenström 2010) を用いて解析したところ、BsChe と BcLip 構造の相同性は高く、平均二乗偏差 (RMSD) は 0.4Å、主鎖原子の Z score は 57.5 であった。この結果から、BsChe の活性部位クレフトの形状は、BcLip と非常によく似ていることがわかった。しかしながら、BcLip は Che 活性を持つという報告はない。

今回得られた結晶構造モデルの 5つのモノマー (Chain A^{CI} と A^{CII}-D^{CII}) の主鎖の RMSD は約 0.6Å であり、互いによく重なった。しかしながら、活性部位クレフト付近の 18~27 番目のアミノ酸残基には明らかな立体構造の違いが見られた。構造変化の様子を図 14 に、構造変化領域の電子密度マップ (2mFo-DFc マップ) を図 15 に示す。構造変化の詳細は以下のとおりである。Chain A^{CI}、A^{CII}、B^{CII}、D^{CII} の 18-27 番目のアミノ酸残基は BcLip の構造と同様に主鎖間および側鎖間の多数の水素結合相互作用を介してコンパクトに折りたたまれ (コンパクトコンフォメーション)、 α ヘリックス 5 ($\alpha 5$) の下方に収まることで活性部位クレフトの下側の壁を形成していた (図 14、図 16A)。一方、Chain C^{CII} の 18-27 番目のアミノ酸残基は $\alpha 5$ 上に拡張しており (拡張コンフォメーション)、コンパクトコンフォメーションで観察された水素結合が失われ、活性部位クレフトの下側の壁が部分的に崩れていた (図 14、図 16B)。このように、18-27 部位の構造変化は、ヒンジの動きによって 18-

27 領域の構造塊の位置が移動したのではなく（すなわち、酵素の構造変化でよくみられるオープン／クローズの構造変化ではなく）、18-27 領域のアンフォールディングだと解釈できる。

BcLip のこれまでの三次元構造研究および計算機シミュレーションの結果、基質結合時および触媒反応時に全体的なコンフォメーションダイナミクスが起こる可能性が示されている (Barbe et al. 2009; Trodler et al. 2009) が、BsChe で見られた今回の拡張コンフォメーションは BcLip の構造研究では報告されていない。この拡張コンフォメーションは、隣接する A^{CD} 鎖の 221~223 番目のアミノ酸残基との分子間接触によって安定化されていた。コンパクトコンフォメーションでは Thr18 と水素結合を形成してクレフトの側壁を作っていた Tyr23 は、拡張コンフォメーションでは大幅に離れており (約 5Å)、溶媒に完全に露出している。このような 18~27 番目のアミノ酸残基の構造的側面を考慮すると、コンパクトコンフォメーションと拡張コンフォメーションの二つのコンフォメーション変化は、基質の結合と生成物の放出による構造変化を反映しているのかもしれない。Crystal II の非対称ユニットは大きな容積を有し 4 分子の BsChe を含むことができたため、拡張コンフォメーションの状態で偶発的に捕縛できた可能性が考えられる。

A



B



図 12. 2つの BsChe 結晶

構造解析に使用した (A) 立方体の結晶 (Crystal I) および(B)針状結晶 (Crystal II) を示した。

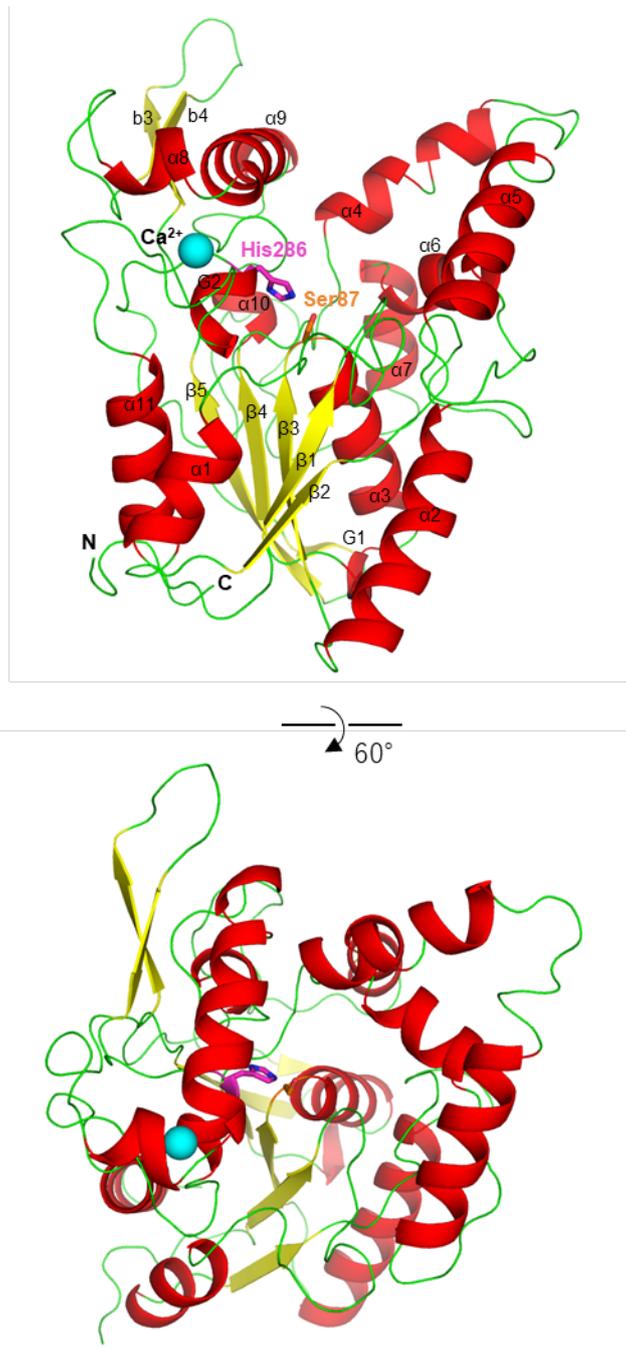


図 13. BsChe 結晶構造

BsChe 単量体の構造と 60° 回転させた構造をリボン図で示した。 α -ヘリックス、 β -ストランド、ループはそれぞれ赤、黄、緑で色分けした。二次構造要素 ($\alpha 1$ - $\alpha 11$ 、 $\beta 1$ - $\beta 5$ 、 $b 1$ - $b 2$ 、および $G 1$ - $G 2$ (3_{10} -helix))は、以前に報告されている表示方法(Lang et al. 1996)に従ってラベルした。また、結合している Ca^{2+} イオンは水色の球体で示した。触媒残基である Ser87 と His286 はそれぞれオレンジとマゼンタの棒状モデルとして示した。

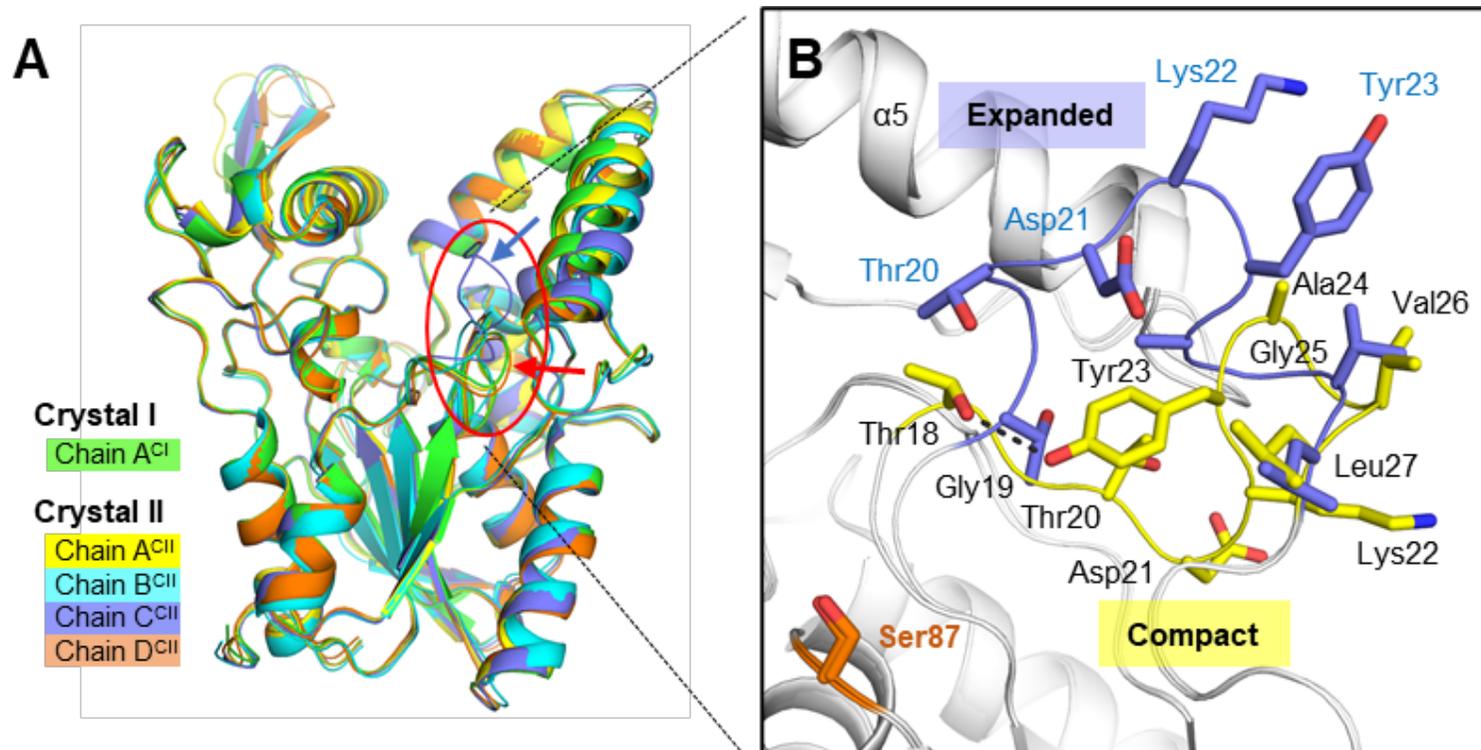


図 14. Chain A^{CI} と A^{CII}-D^{CII} の構造の違い

(A) 決定した 5 つの BsChe モノマー (Chain A^{CI} と A^{CII}-D^{CII}) の構造を重ね合わせた。コンフォメーションが異なる 18~27 番目のアミノ酸残基を赤丸で示した。また、コンパクトコンフォメーションと拡張コンフォメーションを、それぞれ赤と青の矢印で示した。

(B) 18~27 番目のアミノ酸残基の 2 つのコンフォメーション状態を拡大した図。コンパクトコンフォメーション (Chain A^{CII}) と拡張コンフォメーション (鎖 C^{CII}) を示し、それぞれ黄色と青色で示した。Thr18 と Tyr23 の側鎖水酸基の間に形成される水素結合を点線で示した。

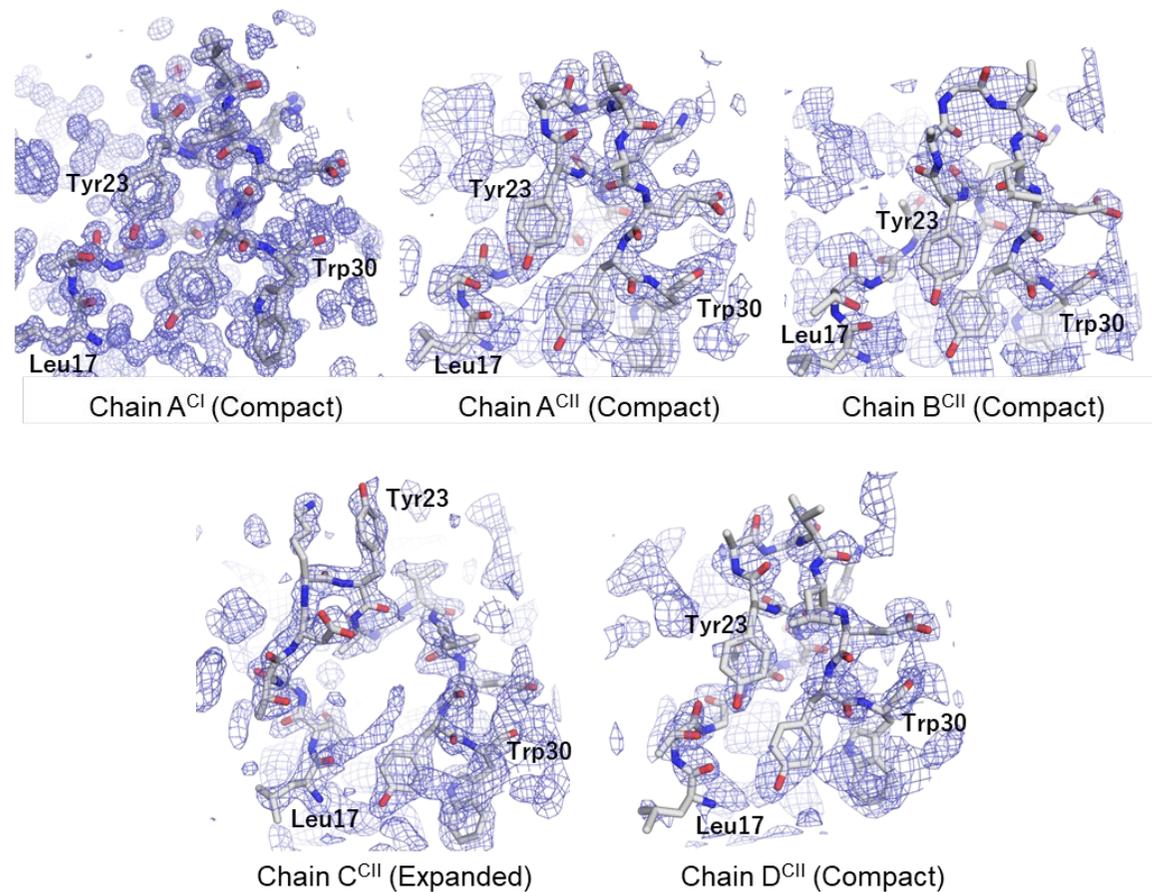


図 15. 5 つの BsChe モノマー (Chain A^{CI} と A^{CII}-D^{CII}) の構造変化領域 (18-30) の最終モデルと 1.2σ レベルで計算した電子密度マップ (2mFo-DFc マップ)

構造変化が始まる両端の Leu17 と Trp30、及び最も遠い位置まで移動していた Tyr23 にラベルした。それぞれの主鎖の流れに従って、明瞭な電子密度マップが観察される。

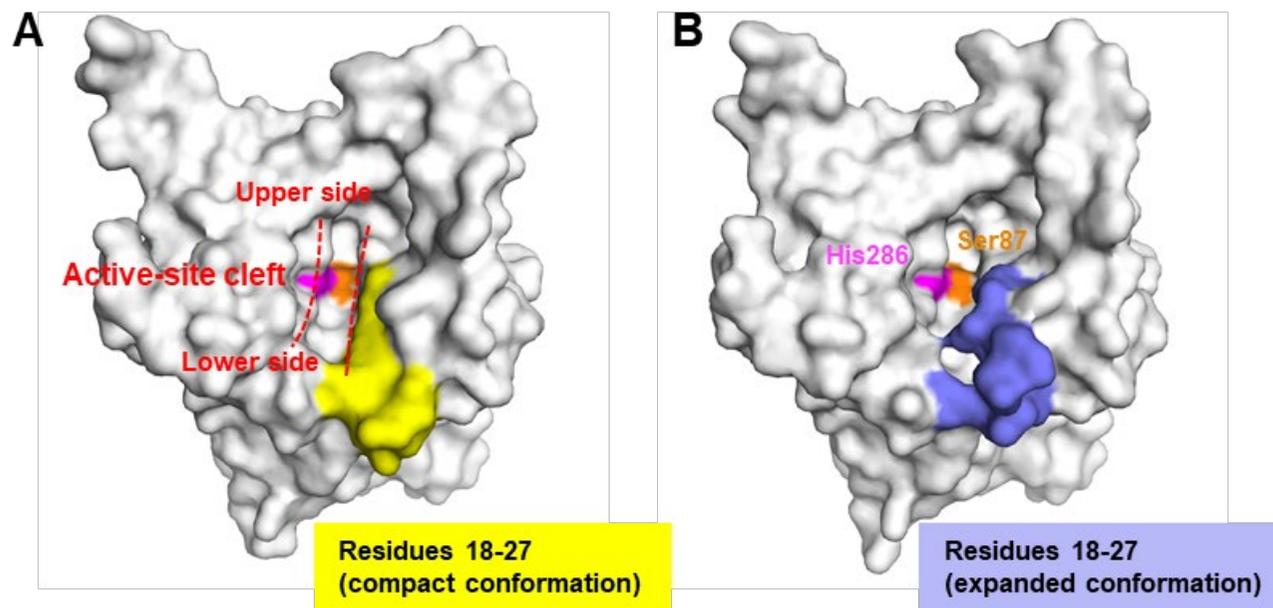


図 16. 各コンフォメーションの分子表面図

(A) コンパクトコンフォメーションの分子表面。活性部位クレフトを赤い点線で示し、クレフトの上側 (Upper side) と下側 (Lower side) も示した。18~27 番目のアミノ酸残基は黄色で着色した。触媒残基である Ser87 と His286 はそれぞれオレンジとマゼンタで示した。

(B) 拡張コンフォメーションの分子表面。18~27 番目のアミノ酸残基は青で着色し、触媒残基である Ser87 と His286 はそれぞれオレンジとマゼンタで示した。拡張コンフォメーションでは、18~27 番目のアミノ酸残基によって活性部位クレフトの下側のコンフォメーションが部分的に崩れていることがわかる。

1-3-2. コレステロールリノレートをを用いたドッキングシミュレーション解析

BsChe のステロール特異性の構造的メカニズムを調べるために、BsChe の結晶を飽和コレステロールエステルまたはコレステロールの入った溶液に浸した。しかし、結晶化した BsChe の活性部位クレフト中に基質や生成物は見出されなかった。そこで、BsChe の原子モデル (Chain A^{CI}) と、BsChe の基質中で最も反応性が良いコレステロールリノレート (CLL) を用いてドッキングシミュレーションを行った。Exhaustiveness-input value を 8~800 の間で変更し複数回ドッキング計算を行った結果、結合エネルギーが-7.4 から-9.6 kcal/mol の範囲となる 79 個のドッキングモデルが生成された。CLL はいずれのドッキングモデルにおいても活性部位クレフト内にドッキングし、様々なコンフォメーションと方位でドッキングした。BsChe の触媒残基である Ser87 と CLL の C28 (エステル結合開裂のために Ser87 が攻撃する標的炭素原子) は近くに存在していると考えられるため、これらのドッキングモデルのうち Ser87 の側鎖水酸基と CLL の C28 の原子間距離が 4.0 Å 以下であるモデルを触媒反応に適したモデルと定義した。79 個のモデルのうち触媒反応に適したモデルは 17 個であった (図 17)。

同じドッキングシミュレーション手順を BsChe の拡張コンフォメーション (Chain C^{CI}) にも適用し、結合エネルギーが-7.9~-9.0 kcal/mol の範囲となる 60 個のドッキングモデルを作成した。しかしながら、これら 60 個のモデルの中に触媒反応に適したモデルは含まれていなかった。これはコンフォメーションの拡張により、クレフトの下側の体積が大幅に減少し、ステロール基のクレフト下部への結合を妨げているためと考えられる。特に、18~23 番目のアミノ酸残基は、触媒反応に適したドッキングモデルではステロール基の近くに位置していたが、拡張コンフォメーションでは突出し、溶媒に露出していた。以上の結果から、コンパクトコンフォメーションは基質との結合とそれに続く触媒反応に適した状態であり、触媒反応後の生成物はコンパクトコンフォメーションから拡張コンフォメーションへ移行する際に起こる構造変化によって放出される可能性が示唆された。

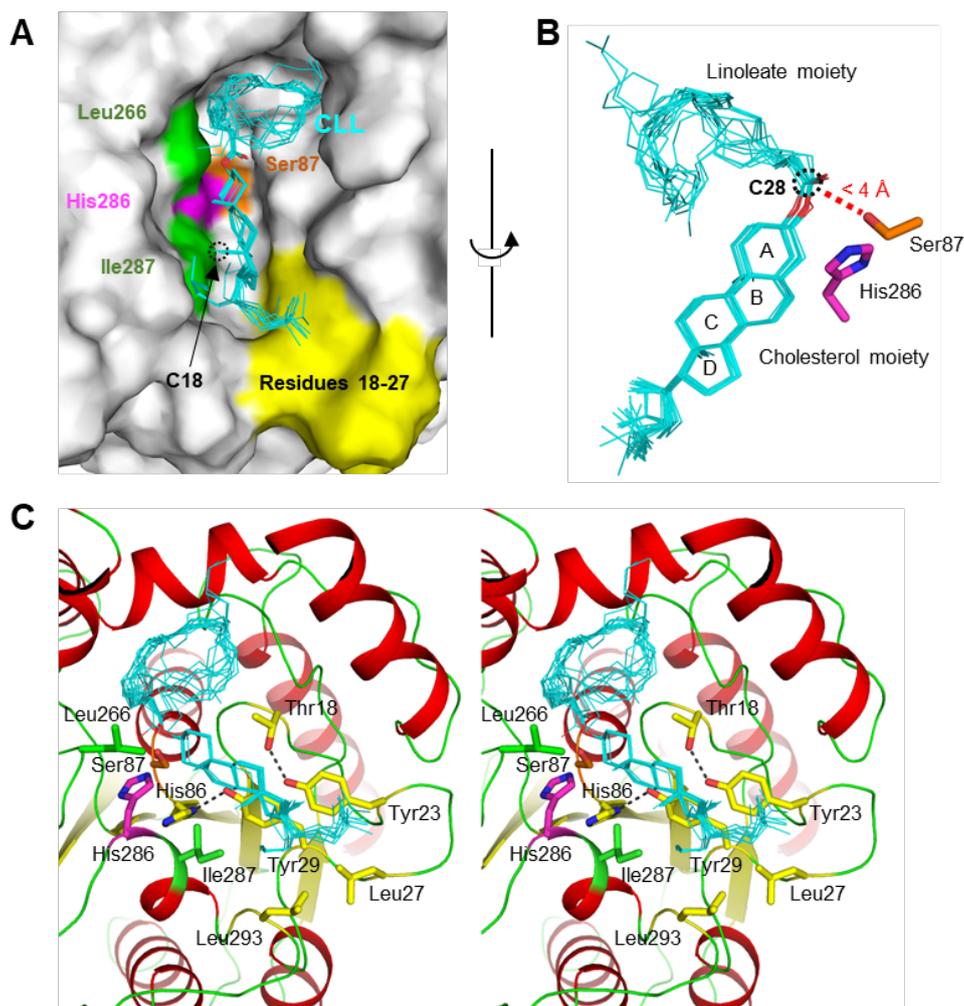


図 17. BsChe と CLL を用いたドッキングシミュレーション結果

ドッキング計算には BsChe のコンパクトコンフォメーションの構造を用いた。

(A) CLL がドッキングした活性部位クレフトの分子表面図の拡大図を示す。17 種類のドッキングモデルを細い棒状のモデルで表し、シアンで示した。触媒残基である Ser87 と His286、および 18~27 番目のアミノ酸残基は、前図と同様オレンジ、マゼンタおよび黄色で示した。さらに、ステロール特異性のための 2 つの重要なアミノ酸残基である Leu266 と Ile287 を緑色で示した。Ile287 の側鎖分岐付近のステロール構造の C18 の位置を黒の丸い点線と矢印で示した。

(B) A で示した 17 個のドッキングモデルを約 90° 回転させた図。Ser87 と His286 の側鎖も示した。赤い点線は Ser87 の側鎖水酸基と CLL のエステル結合の C28 との距離を表し、距離が 4Å 以内であればドッキングモデルは妥当であると判断した。

(C) ドッキングモデルによる活性部位構造の立体視。CLL のコレステロール部位に近い残基の側鎖を棒モデルで表し、ラベルを付与した。下部クレフトの側壁にある 2 つの水素結合は点線で示されている。

選択した 17 個のモデルすべてにおいて、ドッキングした各 CLL のステロール基はクレフトの下側のほぼ同じ位置に存在し、リノール酸部分は様々なコンフォメーションでクレフトの上側に結合していることがわかった。この結果は、ステロール基がクレフトの下側を形成する残基によって認識されていることを示している。

1-3-3. BsChe のコレステロールエステル特異性に関するアミノ酸

ドッキングシミュレーション解析の結果、触媒反応に適したドッキングモデルにおけるステロール骨格の A、B、C、D 環は、主に Thr18、Tyr23、Leu266、Ile287 の側鎖によって挟まれていることがわかった (図 17C)。これらのアミノ酸残基のうち、Thr18 と Tyr23 は Lip ホモログ間で保存されていることから、保存性が高くない Leu266 や Ile287 の 2 つのアミノ酸残基が BsChe のコレステロール特異性に必須である可能性が考えられた。そこで His タグを付与した BsChe 変異体を *B. stabilis* により組換え生産した。それぞれの単一変異体である BsChe^{L266V}、BsChe^{I287L} および二重変異体である BsChe^{L266V/I287L} を作製した。得られた各変異体は His タグにより精製し、Che 活性と Lip 活性を測定した。その結果、いずれの変異体も野生型 BsChe に比べて Che 活性が大幅に低下し、特に BsChe^{L266V/I287L} は野生型 BsChe (135 U/mg) よりかなり低い活性 (1.0 U/mg) を示した (図 18A)。一方、すべての変異体は、野生型 BsChe と同程度の Lip 活性を保持していた (図 18B)。

これらの結果から、Leu266 と Ile287 は BsChe 活性部位クレフトでのステロール基の結合において重要な役割を担っていることが示唆された。ドッキングモデルでは、Leu266 の側鎖はステロール A 環の上に位置しており、エステル結合部位と触媒部位の配置を安定化させていると考えられる。Leu266 がより小さな Val に置換されている場合、A 環の配置を安定化させないと考えられる。同様に、Ile287 はステロール環 B~D の近くに位置し、特にステロールの C18 は Ile287 の sec-ブチル基の分岐形状によくフィットする (図 17)。一方、BcLip Leu287 の側鎖は C18 と立体障害を起こす可能性があり、ステロールの認識には不適當であると考えられる。

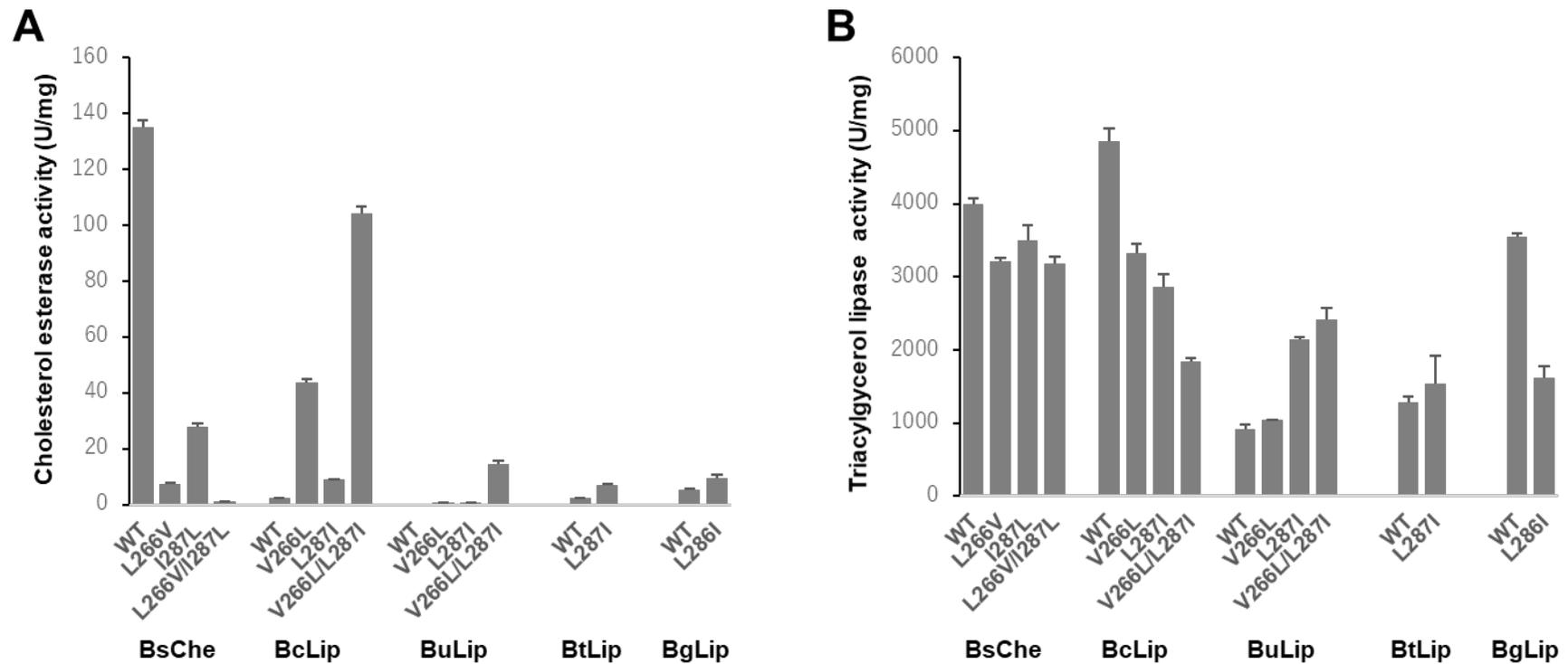


図 18. 各変異体酵素の Che 活性と Lip 活性

His タグ付き BsChe、BcLip、BuLip、BtLip、BgLip とそれらの部位特異的変異体の Che 活性 (A) と Lip 活性 (B) を示す。各実験は N=3 で行い、エラーバーは平均値±SD で示した。

1-3-4. L266/I287 の導入による *Burkholderia* Lip への Che 活性付与

以上の結果から、BsChe の Leu266 と Ile287 が Che 活性に必要な残基であることが示唆された。この仮説が正しいとすると、Lip ホモログに対し Leu と Ile を導入することにより Che 活性を獲得することができる可能性が考えられた。そこで、BsChe とのアミノ酸配列相同性が 78% から 96% である 4 種類の *Burkholderia* Lip ホモログである BcLip、*Burkholderia glumae* 由来 Lip (BgLip)、*Burkholderia ubonensis* 由来 Lip (BuLip) (Yang et al. 2016)、*Burkholderia thailandensis* 由来 Lip (BtLip) (Daligault et al. 2014) および *B. cepacia* ST-200 株由来 Che (CheS) (Takeda et al. 2006) を選択した (表 8)。これら BcLip、BuLip、BtLip、BgLip に対し、BsChe の Leu266 と Ile287 に該当するアミノ酸残基に部位特異的突然変異導入を行った (図 19)。

表 8. BsChe、BcLip、BuLip、BtLip、BgLip、CheS の相同性 (identity)

	BsChe	BcLip	BuLip	BtLip	BgLip	CheS
BsChe	100.0	96.25	89.06	78.02	83.12	96.25
BcLip		100.0	89.69	89.34	84.06	95.31
BuLip			100.0	85.89	81.25	88.44
BtLip				100.0	84.33	89.69
BgLip					100.0	82.19
CheS						100.0

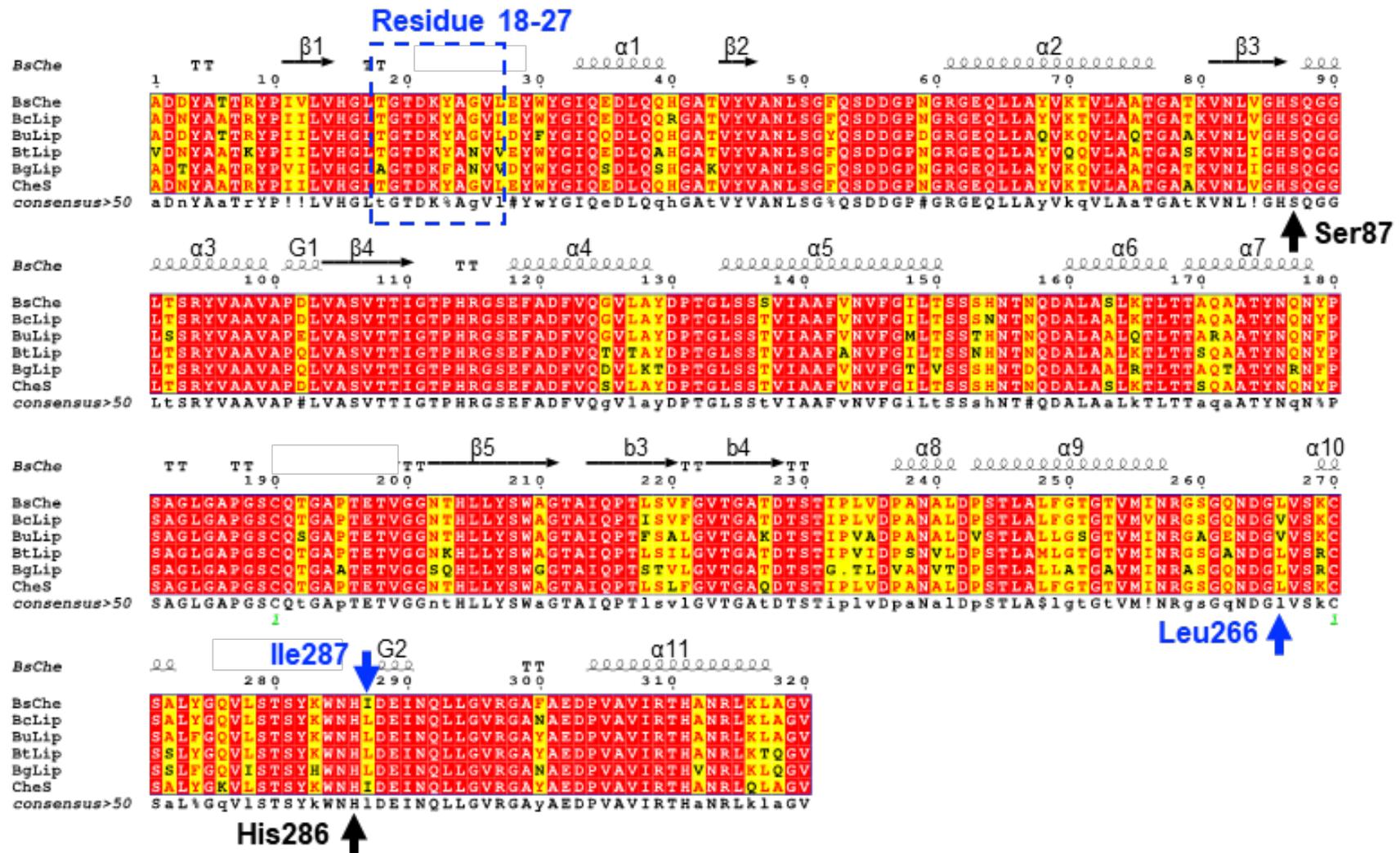


図 19. BsChe、BcLip、BuLip、BtLip、BgLip、CheS のアミノ酸配列アライメント

本研究で見出された 18~27 番目のアミノ酸残基を青い点線で示した。また、触媒残基である Ser87 と His286、Che 活性を決定する残基である Leu266 と Ile287 をそれぞれ黒と青の矢印で示した。完全に一致しているアミノ酸残基を赤で、高く保存されているアミノ酸残基を黄色で示した。図 13 で示した二次構造要素 ($\alpha 1$ - $\alpha 11$ 、 $\beta 1$ - $\beta 5$ 、b1-b2、および G1-G2 (3_{10} -helix))をアラインメントの上部に示し、アミノ酸配列のアラインメントは ESPript プログラム(Robert and Gouet 2014)を用いて行った。

His タグを付与した各酵素および各変異体タンパク質を *B. stabilis* 発現系を用いて作製した。野生型の BcLip と BuLip の Che 活性は非常に低かったが、V266L と L287I を含む変異体は野生型酵素に比べて最大で 500 倍高い Che 活性を示した (図 18A)。特に、BcLip^{V266L/L287I} 二重変異体の比活性は 104.2 U/mg であり、野生型 BsChe と同程度であった。野生型 BtLip と BgLip はある程度の Che 活性 (~5 U/mg) を示したが、これは両酵素が BsChe の Leu266 に該当するアミノ酸残基 (BtLip は Leu266、BgLip は Leu265) を持つためと考えられる。単一変異体である BtLip^{L287I} と BgLip^{L286I} もそれぞれ野生型 BtLip と BgLip 酵素の約 3 倍高い Che 活性を示した。本研究で検証した *Burkholderia* Lip ホモログの変異体はすべて Che 活性が上昇しており、Leu と Ile 残基が様々な *Burkholderia* Lip ホモログにおける Che 活性の主要な決定要因であることが強く示唆された。興味深いことに、BcLip のアイソザイムである CheS は、BsChe よりも低い Che 活性レベルではあるものの、Che 活性を持つ酵素として報告されている (Takeda et al. 2006)。Leu266 と Ile287 は共に CheS に保存されており、CheS の Che 活性においても同一の役割を担っていることが示唆される。

今回検討した変異体では Lip 活性に有意な差は見られなかった (図 18B)。このことから、Leu と Ile 残基は活性部位クレフトにおけるアシル鎖の結合様式に影響を及ぼさないことが示唆された。BcLip において、活性部位クレフトのアミノ酸置換によって酵素のアシル鎖長選択性が変化することが報告されている。しかしながら、Lip 活性を劇的に増減させるアミノ酸残基は同定されていない (Yang et al. 2002)。アシル鎖は構造的に柔軟であることから、特定のアミノ酸残基によってではなく、疎水性の活性部位クレフトの全体的な構造によってアシル鎖が認識されると考えられる。Lang らは、BcLip と長鎖アシル鎖を含む阻害剤との複合体の構造を報告しているが (Lang et al. 1998)、この構造では、アシル鎖は強固に結合しているのではなく、活性部位クレフトの側壁に沿って横たわっており、長い鎖部分は溶媒中に突き出ると予測される。これに対し、ステロール基は構造的に剛直な構造をしており、ステロール基を活性部位クレフトに収容するためには、活性部位のアミノ酸残基との特異的な相互作用が必要である可能性がある。本研究で明らかになった Che 活性に重要なアミノ酸残基の存在は、トリグリセリドとステロールエステル化合物の物理化学的特性の違いを反映していると考えられる。

本研究で得られた知見を用いることで、遺伝子改変により Lip ホモログに Che 活性を付与することが可能となった。また、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で基質特異性を高めることも可能である。これにより全く新しい Che や Lip の創出が可能になることが期待される。

第2章 コレステロールエステラーゼの高生産化

第1節 緒言

コレステロールエステラーゼ (Che)はコレステロールエステルを遊離コレステロールと脂肪酸に加水分解する。*Burkholderia stabilis* FERMP-21014 株は Che (BsChe)を生産することが知られている菌株の一つである(Konishi et al. 2017; Yoshida et al. 2019)。

BsChe は自身のシャペロンである BsLif による成熟化 (フォールディング) と分泌システムが融合した複雑な制御システムを介して生産されている。汎用的に使用される宿主発現系ではその複雑な制御システムを持たないため生産が困難である。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たが、その生産量は大腸菌で通常使用される T7 プロモーターを用いた組換え発現システムの生産量と比較して低く実用的ではなかった。

そこで我々は BsChe の高生産化を目的として研究を行った。最初に変異剤とトランスポゾンを用いた変異実験により高生産化株を作製し、DNA シーケンス (DNA-seq) 解析により高生産株に共通する変異遺伝子を推定した。推定された各遺伝子の破壊・相補実験により推定された遺伝子が高生産化に寄与する遺伝子であることを証明した。本章では高生産化した原因についても考察した。得られた高生産化株を用いた発現系は BsChe のホモログである Lip の大量生産にも応用可能であり、一連の実験により、新たな高生産化機構の知見を見出した。

第2節 材料および方法

2-2-1. 菌株、プラスミド、培地

本研究で使用した菌株およびプラスミドをそれぞれ表9および表10に示す。培地は以下の通りである。

- Luria-Bertani (LB) 培地：Becton Dickinson and Company 社製。1%のトリプトン、0.5%の Yeast extract、および 1%の塩化ナトリウムを含む培地。
- Yeast sorbitol (YS) 培地：30 g/L の Yeast extract (Becton Dickinson and Company 社製) と 30 g/L のソルビトールを含む培地 (pH7.0 に調整)
- Yeast sorbitol oleic acid (YSO) 培地：30 g/L の Yeast extract、30 g/L のソルビトール、30g/L オレイン酸を含む培地 (pH7.0 に調整)
- Nutrient broth (NB) 培地：Becton Dickinson and Company 社製。0.5%のペプトン、0.3%の Beef extract を含む培地。
- Tryptone yeast sodium chloride sucrose (TYSS) 培地：0.33% トリプトン、0.17% Yest extract、0.5% 塩化ナトリウム、10% スクロース、1.5% アガロースを含む培地

必要に応じて各培地にカナマイシン、アンピシリン、亜テルル酸カリウムを添加した。寒天培地はそれぞれの培地成分に 1.5% アガロースを加えて作製した。

表 9. 本研究で使⽤した菌株

Strain	Relevant characteristic	Origin or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Cloning host and helper host of conjugal transfer	Takara Bio
DH5 α λ pir	Donor host of conjugal transfer	Biomedal
HB101	Helper host of conjugal transfer	Takara Bio
<i>B. stabilis</i>		
FERMP-21014	Expression host, wild-type	(Konishi et al. 2017)
Δ Chr3	Chromosome3 deletion mutant	This study
Δ BSFP_068720	BSFP_068720 deletion mutant	This study
Δ BSFP_068730	BSFP_068730 deletion mutant	This study
Δ BSFP_068740	BSFP_068740 deletion mutant	This study

表 10. 本研究で使用したプラスミド

Plasmids	Properties and construction information	Origin or reference
pUTmini-Tn5 Tel	Ap ^R , Tet ^R	Biomedal
pRK2013	Km ^R	Biomedal
pP002050-BsChe-BsLif	pBBR122-pP002050-BsChe-BsLif	(Yoshida et al. 2019)
pK18mobsacB	Km ^R	(Schäfer et al. 1994)
pBBR122	Km ^R , Cm ^R	Mobitec
pK18mobsacB-P002050	pK18mobsacB-P002050	This study
pK18mobsacB-BSFP_068720-UpDown	pK18mobsacB-P002050-BSFP_068720-Upstream-Downstream	This study
pK18mobsacB-BSFP_068730-UpDown	pK18mobsacB-P002050-BSFP_068730-Upstream-Downstream	This study
pK18mobsacB-BSFP_068740-UpDown	pK18mobsacB-P002050-BSFP_068740-Upstream-Downstream	This study
pP015170-BsChe-BsLif	pK18mobsacB-P015170	This study
pP015170-BSFP_068720	pBBR122-pP015170-BSFP_068720	This study
pP015170-BSFP_068730	pBBR122-pP015170-BSFP_068730	This study
pP015170-BSFP_068740	pBBR122-pP015170-BSFP_068740	This study
pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068720	pBBR122-pP002050-BsChe-BsLif-pP015170-BSFP_068720	This study
pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068730	pBBR122-pP002050-BsChe-BsLif-pP015170-BSFP_068730	This study
pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068740	pBBR122-pP002050-BsChe-BsLif-pP015170-BSFP_068740	This study
pBBR122- <i>asd</i>	pBBR122- <i>asd</i> fragment	This study
pP002050-BcLip-BsLif	pBBR122-pP002050-BcLip-BsLif	This study
pP002050-BpLip-BpLif	pBBR122-pP002050-BpLip-BpLif	This study
pRK2-P002050-BsChe-BsLif	pRK2-P002050-BsChe-BsLif	This study

2-2-2. 遺伝子クローニング

本研究で使用したプライマーを以下に示す（表 11）。

プラスミドへの遺伝子クローニングには Takara Bio 社製 In-Fusion HD Cloning Kit を用いた。方法は In-Fusion HD Cloning Kit のプロトコルに従い以下のように行った。プラスミド上の挿入部位の近辺 15 bp のオーバーラップ配列を付加してプライマーを設計し、PCR を行った。PCR は KOD Plus Neo もしくは KOD FX Neo（いずれも東洋紡社製）を用いて行い、それぞれのプロトコルに従い実施した。得られた PCR 産物を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲルはミドリグリーンアドバンス（日本ジェネティクス社製）で染色した。目的の DNA を含むゲル断片を QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen 社製) を用いて精製した。精製 DNA 断片を In-Fusion HD Cloning Kit によりプラスミドと連結し、大腸菌 DH5 α に導入した。必要に応じてカナマイシンまたはアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布し 30°C で 24 時間培養し形質転換コロニーを得た。得られたコロニーを、抗生物質を含む LB 培地に植え継ぎ、30°C で 12 時間培養後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて、プラスミドを抽出した。

2-2-3. *B. stabilis* のコンピテントセル作製と形質転換法

B. stabilis の各株を 100 mL の LB 培地にて対数増殖期に至るまで 30°C で振盪培養した後、遠心分離にて菌体を回収した。回収した菌体に 100 mL の氷冷滅菌水を加え、懸濁後再び遠心分離し菌体を回収した。この操作をもう一度繰り返した後、回収した菌体に 5 mL の冷却 10%グリセリン溶液を加え、よく懸濁し、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体に 5 mL の氷冷 10%グリセリン溶液を加え、懸濁し、40 μ L ずつ分注し、-80°C で凍結しコンピテントセルを得た。

コンピテントセルを氷中で融解し、各発現ベクターをエレクトロポレーション法 (2.5kV、200 Ω 、25 μ F) により導入した。100 μ g/mL カナマイシンを含む NB 寒天培地に植菌し、28°C で 2 日間培養することで、形質転換体を得た。

表 11. 本研究で使用したプライマー

下線は In-Fusion HD Cloning Kit で使用するオーバーラップ配列を表す。

Primer name	Sequence (5' to 3')	Used for
Chr1-check-F	5'-GACGGCGAACTCGTGTGCATCTTC-3'	Chr1 check
Chr1-check-R	5'-GTCCTTGCTGCGCTGGTTCGGTATTG-3'	Chr1 check
Chr3-checkA-F	5'-GCTGAAAGCTTACCTGAGCTTAAAAAG-3'	Chr3 check
Chr3-checkA-R	5'-CAGCGTGTTTCAGCATTATTCATTTG-3'	Chr3 check
Chr3-checkB-F	5'-ACGAGCTCCGCGTAGATCGTTTCCGGCGTGTC-3'	Chr3 check
Chr3-checkB-R	5'-CAGTATAGTACCCGTCGAAATCGAG-3'	Chr3 check
pK18 <i>mobsacB</i> -F	5'-ATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAGCAAC-3'	pK18 <i>mobsacB</i> modification for <i>B. stabilis</i>
pK18 <i>mobsacB</i> -R	5'-ATGGGTTAAAAAGGATCGATCCTCTAGCG-3'	pK18 <i>mobsacB</i> modification for <i>B. stabilis</i>
P002050-F	5'- <u>TCCTTTTTTAACCCAT</u> GCAATTCCACGTCTACCGAT-3'	pK18 <i>mobsacB</i> modification for <i>B. stabilis</i>
P002050-R	5'- <u>CTTTTTGATGTTCA</u> TGCTTTACCTCCGCTAAGTG-3'	pK18 <i>mobsacB</i> modification for <i>B. stabilis</i>
BSFP_068720Up-F	5'- <u>ACATGATTACGA</u> ATTGGCGCATGAATATTGTCAAC-3'	Gene deletion
BSFP_068720Up-R	5'-CCAGCCGGCCTGATGACGCTCCAGCTGACGCCGGC-3'	Gene deletion
BSFP_068720Down-F	5'- <u>CATCAGGCCGGCTG</u> GCGATGGGGCGAACGCCGTCG-3'	Gene deletion
BSFP_068720Down-R	5'- <u>GGCCAGTGCCAAGCT</u> TCCGCCGAAGTCGTGGATAC-3'	Gene deletion
BSFP_068730Up-F	5'- <u>ACATGATTACGA</u> ATTCCGGACAAGATGGCGTTGTG-3'	Gene deletion
BSFP_068730Up-R	5'-TGTCGGGCGATGATCCTCTCCCCTATG-3'	Gene deletion
BSFP_068730Down-F	5'- <u>GATCATCGCCGACA</u> ATGGCGCATCGACGGCTGCT-3'	Gene deletion
BSFP_068730Down-R	5'- <u>GGCCAGTGCCAAGCT</u> CGTAGGGCAGTCACATTGTT-3'	Gene deletion
BSFP_068740Up-F	5'- <u>ACATGATTACGA</u> ATTGATGACTGAGGCGATTGCAG-3'	Gene deletion

BSFP_068740Up-R	5'-CGCGTCCGCTGTGCCTGTCCGAAATTCGGTC-3'	Gene deletion
BSFP_068740Down-F	5'-GGCACAGCGGACGCGAGACCAGCAGAGGTCGATGG-3'	Gene deletion
BSFP_068740Down-R	5'-GGCCAGTGCCAAGCTCCGTGTGATGCTCCTGATAC-3'	Gene deletion
BSFP_068720delcheck-F	5'-GGCGCATGAATATTGTCAAC-3'	Deletion check
BSFP_068720delcheck-R	5'-TCCGCCGAAGTCGTGGATAC-3'	Deletion check
BSFP_068730delcheck-F	5'-CCGGACAAGATGGCGTTGTG-3'	Deletion check
BSFP_068730delcheck-R	5'-CGTAGGGCAGTCACATTGTT-3'	Deletion check
BSFP_068740delcheck-F	5'-GATGACTGAGGCGATTGCAG-3'	Deletion check
BSFP_068740delcheck-R	5'-CCGTGTGATGCTCCTGATAC-3'	Deletion check
P015170-F	5'-TCGCGCGCGGTGCCCGCACGACGTCTGCAGGTC-3'	Complementation test
P015170-R	5'-CTGCTGTCCTTATCGTCTGATGGAAATGGGTGAAC-3'	Complementation test
pP002050-BsChe-BsLif-Prm-F	5'-ACGTTGGCCAGATCTTCGCGCGCGGTGCCGCCGCA-3'	Complementation test
pP002050-BsChe-BsLif-Prm-R	5'-CATCGATCTGGCCATCTGCTGTCCTTATCGTCTGA-3'	Complementation test
pP015170-BsChe-BsLif-F	5'-ACGGGAATTGGCATGCGGGATTTCCGGCGAAACAAT-3'	Complementation test
pP015170-BsChe-BsLif-R	5'-CTGCTGTCCTTATCGTCTGATGGAAATGGGTGAAC-3'	Complementation test
BSFP_068720-F	5'-CGATAAGGACAGCAGATGCCACTGGATGAACTTGG-3'	Complementation test
BSFP_068720-R	5'-CATGCCAATTCCCGTTCAAGAATAAGTCCATTGGC-3'	Complementation test
BSFP_068730-F	5'-CGATAAGGACAGCAGGTGGAGACAGCCCAGCTATT-3'	Complementation test
BSFP_068730-R	5'-CATGCCAATTCCCGTTTAGTCCTCGCTCTGCGGCA-3'	Complementation test
BSFP_068740-F	5'-CGATAAGGACAGCAGATGACCTCGATTAGCAAACG-3'	Complementation test
BSFP_068740-R	5'-CATGCCAATTCCCGTTACTCCCCGTCCATCACAC-3'	Complementation test
pP015170-BSFP-F	5'-GTGGAATTGCAGATCTCGCGCGCGGTGCCGCCGCA-3'	Complementation test
pP015170-BSFP-R	5'-AACGTTGGCCAGATCGGTGGCGTTGAAGTGACAAG-3'	Complementation test
asd-insertF	5'-ACCACTGCGATCCCCACTGGATGACGGCGATGACC-3'	qPCR
asd-insertR	5'-GAATGCTGTTTTCCCGTCGATGTGCGAGGATGGCGG-3'	qPCR
qPCR-asd-F	5'-ACTGGATGACGGCGATGACC-3'	qPCR

qPCR-asd-R	5'-GTCGATGTCGAGGATGGCGGAAG-3'	qPCR
qPCR-pBBR122-F	5'-CTGTGGCCGATCTAGGGCTG-3'	qPCR
qPCR-pBBR122-R	5'-ACGCGCTTTGAGATTCCCAG-3'	qPCR
BcLip-F	5'- <u>CGATAAGGACAGCAGATGGCCAGATCGATGCGTTC</u> -3'	Cloning of BcLip
BcLip-R	5'- <u>ACGTGCCGCCATCGATTACACGCCCCGCCAGCTTCA</u> -3'	Cloning of BcLip
Bc-002050-F	5'-TGCTTTACCTCCGCTAAGTGGTGATGAAC-3'	Cloning of BcLip
Bc-002050-R	5'-TCGATGGCGGCACGTGAAGGGCGCGCCGCTGGC-3'	Cloning of BcLip
BpLip-F	5'- <u>AGCGGAGGTAAAGCAATGGTCAGATCGATGCGTTC</u> -3'	Cloning of BpLip and BpLif
BpLif-R	5'- <u>GTCGAAAACCGCGGCCTAACCGCCCCGCGCCGCGAT</u> -3'	Cloning of BpLip and BpLif
Bp-002050-F	5'-TGCTTTACCTCCGCTAAGTGGTGATGAAC-3'	Cloning of BpLip and BpLif
Bp-002050-R	5'-GCCGCGGTTTTCGACTGCTTCAAAG-3'	Cloning of BpLip and BpLif

2-2-4. NTG 変異導入

B. stabilis 野生株 (FERMP-21014 株) を LB 寒天培地にて培養し、1 コロニーを 5 mL の LB 培地に植菌し、30°C で一晩培養した。得られた培養液を新しい 100 mL の LB 培地に 1 mL 植菌し、28°C で 20 時間培養した。培養液 30 mL を遠心分離し、上清を取り除き、菌体を得た。菌体に 30 mL の 0.85% 塩化ナトリウム水溶液を加え懸濁した。懸濁した菌体 9.5 mL に 0.5 mL の トリス - マレイン酸緩衝液 (2M Tris、2M マレイン酸、pH6.2) を加えたのち、80 μ L の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 溶液 (NTG を 50 mg/mL となるように N,N-ジメチルホルムアミド(脱水) (関東化学社製) で溶解した溶液) を加え、28°C、200 rpm で 60 分振盪した。振盪後、NTG を除去するため遠心分離を行い上清を取り除き、得られた菌体に 10 mL の 0.85% 塩化ナトリウム水溶液で懸濁し遠心分離をした。この操作をもう一度繰り返し、得られた菌体に 10 mL の LB 培地を加え、28°C で 2 時間振盪培養した。抗生物質を含まない LB 寒天培地に希釈濃度を変え 100 μ L ずつ植菌し、28°C で 48 時間培養し生育したコロニーを別の LB 寒天培地にシングルコロニーとなるように植菌し、変異体を得た。

得られた変異体に pP002050-BsChe-BsLif プラスミド (Yoshida et al. 2019) を「2-2-3 項 *B. stabilis* のコンピテントセル作製と形質転換法」に従い導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体の Che 活性を「2-2-6 項 リコンビナントタンパク質 (BsChe、BcLip、BpLip) の発現検討」に記載した方法で測定した。

NTG 変異株の形質転換体と野生株の形質転換体の染色体の有無は、以下のプライマーを用いた PCR で確認した。Chr1 の確認には Chr1-check-F と Chr1-check-R、Chr3 の確認には Chr3-checkA-F と Chr3-checkA-R、Chr3-checkB-F と Chr3-checkB-R。ネガティブコントロールとして、テンプレートを加えずに PCR を行った。

2-2-5. トランスポゾン変異導入

B. stabilis 野生株 (FERMP-21014 株) に pP002050-BsChe-BsLif プラスミドを導入した形質転換体を親株として接合によるトランスポゾン変異導入を行った。方法は pUTmini-Tn5 Tel Kit (Biomedal 社製) のプロトコルに従い、ドナー株である pUTmini-Tn5 Tel プラスミドを導入した大腸菌 DH5 α λ pir、ヘルパー株である pRK2013 を導入した大腸菌

DH5 α を用いて、トランスポゾン成形質転換体に導入した。それぞれ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含む LB 寒天培地と 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含む LB 培地に生育したドナー株、ヘルパー株である大腸菌を、それぞれ 1 コロニーずつかきとり、それぞれの抗生物質を含む 10 mL の LB 培地に植菌し、37°C で一晩培養した。親株である *B. stabilis* の成形質転換体を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含む NB 培地にて 30°C で一晩培養した。1 コロニーをかきとり、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含む 10 mL の LB 培地に植菌し、30°C で一晩培養した。ドナー株、ヘルパー株、親株の 3 種の各培養液を 1 mL ずつ遠心分離し、LB 培地で 2 回洗浄した。洗浄後の各細胞ペレットを 500 μL の LB 培地にそれぞれ懸濁した後すべて混合し 3 種の菌の混合液を調整した。この混合液を LB 寒天培地に直径約 1.5 cm~2 cm になるように滴下し、30°C で一晩培養した後、生育した菌体すべてをコンラージ棒をかきとり 1 mL の 10 mM 硫酸マグネシウム水溶液に懸濁した。懸濁液をさらに 10 mM 硫酸マグネシウム水溶液で希釈し、この溶液を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシン(pP002050-BsChe-BsLif の選択)と 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亜テルル酸カリウム(Tn5 の選択)を含む NB 寒天培地に植菌した。30°C で 2 日間培養後、トランスポゾン挿入変異株を得た。

2-2-6. リコンビナントタンパク質 (BsChe、BcLip、BpLip) の発現検討

B. stabilis 変異株や成形質転換体の BsChe を以下のようにして分泌生産させた。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む NB 寒天培地に生育させた *B. stabilis* 変異株または成形質転換体 1 コロニーをかきとり、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む 5 mL の YSO 培地に植菌し、28°C で 72 時間培養した。得られた培養液を遠心分離し得られた培養上清を必要に応じて希釈液 (1% Triton X-100 を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)) で希釈し Che 活性を測定した。

Burkholderia cepacia 由来 Lip をコードする遺伝子 (UniProtKB accession code: P22088.2) (BcLip) の配列を GenScript 社に依頼し全合成した。全合成遺伝子を鋳型とし、プライマーである BcLip-F と BcLip-R を用いて PCR を行い、遺伝子断片を得た。一方、pP002050-BsChe-BsLif を鋳型として、Bc-002050-F および Bc-002050-R プライマーを用いて PCR 増幅を行い、プラスミド断片を得た。これらの断片を In-Fusion HD Cloning Kit により結合し、pP002050-BcLip-BsLif プラスミドを作製した。同様に、*Burkholderia plantarii* 由来の Lip および Lif をコードする遺伝子 (ALK34136.1 および ALK34135.1) を全合成した (BpLip、BpLif)。全合成遺伝子を鋳型とし、プライマーである BpLip-F および BpLif-R を用いて PCR

を行い、遺伝子断片を得た。一方、pP002050-BsChe-BsLif を鋳型としてベクター断片は、プライマーBp-002050-F と Bp-002050-R を用いて PCR 増幅を行い、プラスミド断片を得た。BcLip と同様にこれらの断片を連結し、pP002050-BpLip-BpLif プラスミドを作製した。得られた pP002050-BcLip-BsLif、pP002050-BpLip-BpLif プラスミドを *B. stabilis* 野生株 (FERMP-21014 株) に「2-2-3 項 *B. stabilis* のコンピテントセル作製と形質転換法」に従い導入し、形質転換体を得た。

これらの形質転換体を 100 μ g/mL カナマイシンを含む 5 mL の YS 培地に植菌し、28°C で 72 時間培養した。培養液を遠心分離し、得られた上清は BsChe と同様に必要に応じて希釈液で希釈し、「2-2-7 項 BsChe、BcLip、BpLip 活性測定」に記載した方法で Lip 活性測定を行った。

RK2 プラスミド (Schmidhauser et al. 1983) をベースとした発現ベクターを構築するために、RK2 プラスミドの複製に必要な領域である RK2 ori、*trfA* に加え、カナマイシン耐性遺伝子、P002050 プロモーター、BsChe、BsLif、ターミネーター領域を含む遺伝子を GenScript 社に依頼し全合成し、pRK2-P002050-BsChe-BsLif を得た。得られたベクターを *B. stabilis* 野生株に「2-2-3 項 *B. stabilis* のコンピテントセル作製と形質転換法」に従い導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体の BsChe の活性を「2-2-7 項 BsChe、BcLip、BpLip 活性測定」に記載した方法で測定した。

2-2-7. BsChe、BcLip、BpLip 活性測定

BsChe の活性測定は、第 1 章 第 2 節 材料および方法の「1-2-10 項 Che および Lip 活性の測定」と全く同じように、コレステロールオキシダーゼとペルオキシダーゼの作用により生成するキノノイミン色素を測定する比色法を用いて測定した。

BcLip および BpLip 活性においても、第 1 章 第 2 節 材料および方法の「1-2-10 項 Che および Lip 活性の測定」と全く同じように、Oil-polyvinyl alcohol method (Yamaguchi et al. 1973) を一部改変した方法を用いて測定した。

2-2-8. SDS-PAGE とウェスタンブロッティングによる BsChe の検出

各株を 28°C で 72 時間培養した培養上清をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。SDS-PAGE はクーマシーブリリアントブルー (CBB)

により染色後、脱イオン水により脱色した。また、ウェスタンブロッティングは以前報告されている方法(Yoshida et al. 2019)を改変し以下のように実施した。なお、BsChe 抗体も同論文に記載のホクドー社に依頼して作製されたものを使用した。125 倍に希釈した培養上清 10 μ L に 10 μ L のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含むサンプルバッファーである EzApply (ATTO 社製) を加え、95°Cで 10 分間加熱した。加熱後のサンプルのうち 10 μ L を SDS-PAGE に供し、タンパク質をポリビニリデンフルオライド (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜を抗 BsChe ポリクローナル抗体で標識した後、結合した抗体をペルオキシダーゼ結合抗ウサギ二次抗体 (Cytiva 社製) で標識した。標識後の BsChe は ECL Western Blotting Detection Reagents (Cytiva 社製) を用いて Bio-rad Universal Hood II GelDoc System (Bio-rad 社製) を用いて可視化した。

2-2-9. DNA-seq 解析

各変異体から、フェノール-クロロホルム法を用いて全 DNA を抽出した。DNA を TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit (Illumina 社製) の標準プロトコル (350 bp Insert) に従いシーケンスライブラリ調整を行った。続いて、Illumina HiSeq2500 (Illumina 社製) を用いて Paired end、100 bp/リードで DNA-seq を行った。得られた配列データからトランスポゾン挿入位置をマッピング法によって同定した(Heaton et al. 2013; Ikegame et al. 2020)。トランスポゾンの配列 (「5'-CTGTCTTGATCAGATC-3'」) を全シーケンスデータのリード中から検索し、HIT した配列の上流側の配列を抽出した。これらの配列を Bowtie 2(Langmead and Salzberg 2012)を用いて *B. stabilis* 野生株 (FERMP-21014 株) ゲノムにマッピングし、挿入位置を特定した。各変異体の変異点は、Pilon (Walker et al. 2014)を用いて抽出した。

2-2-10. 遺伝子破壊

遺伝子破壊は pK18*mobsacB*(Schäfer et al. 1994)上の *sacB* (レバンスクラゼ) 遺伝子を用いた 2 回組換え法によって行った。しかしながら、*B. stabilis* においては *sacB* 遺伝子が発現しなかった。そこで *sacB* プロモーターを *B. stabilis* の構成的プロモーター P002050 に置き換えるように以下のように改変し使用した。pK18*mobsacB* を鋳型とし、pK18*mobsacB*-F および pK18*mobsacB*-R プライマーを用いて PCR により pK18*mobsacB* のベクター断片

を得た。次に *B. stabilis* ゲノムを鋳型として P002050-F と P002050-R プライマーを用いて PCR により P002050 のプロモーター断片を得た。これらベクター断片とプロモーター断片を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、pK18*mobsacB*-P002050 ベクターを作製した。BSFP_068720 遺伝子の上流領域と下流領域を含む DNA 断片を *B. stabilis* ゲノムを鋳型にして BSFP_068720Up-F と BSFP_068720Up-R プライマー、BSFP_068720Down-F と BSFP_068720Down-R プライマーを用いて PCR-増幅させた。同様に BSFP_068730 遺伝子の上流領域と下流領域を含む DNA 断片を *B. stabilis* ゲノムを鋳型にして BSFP_068730Up-F と BSFP_068730Up-R プライマー、BSFP_068730Down-F と BSFP_068730Down-R プライマーを用いて、BSFP_068740 遺伝子の上流領域と下流領域を含む DNA 断片を *B. stabilis* ゲノムを鋳型にして BSFP_068740Up-F と BSFP_068740Up-R プライマー、BSFP_068740Down-F と BSFP_068740Down-R プライマーを用いて増幅した。

pK18*mobsacB*-P002050 を *EcoRI* と *HindIII* で消化してベクター断片を得た。ベクター断片と BSFP_068720 の上流領域断片と下流領域断片の 3 つの遺伝子断片を In-Fusion HD Cloning Kit で連結し、破壊用ベクター pK18*mobsacB*-BSFP_068720-UpDown を得た。同様にして、ベクター断片と BSFP_068730 の上流領域断片と下流領域断片の 3 つの遺伝子断片を連結し、破壊用ベクター pK18*mobsacB*-BSFP_068730-UpDown を、ベクター断片と BSFP_068740 の上流領域断片と下流領域断片の 3 つの遺伝子断片を連結し、破壊用ベクター pK18*mobsacB*-BSFP_068740-UpDown を得た。これらの 3 つ破壊用ベクターをそれぞれ大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、100 μ g/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地に植菌し、37°Cで一晩培養することでドナー株を得た。ドナー株とヘルパー株 (pRK2013 を導入した大腸菌 HB101 株) それぞれ 1 コロニーをかきとり、100 μ g/mL カナマイシンを含む 10mL の LB 培地にそれぞれ植菌し、37°Cで一晩培養した。別途、NB 寒天培地にて 28°C で 2 日間培養した *B. stabilis* 野生株 (FERMP-21014 株) 1 コロニーを 5mL の LB 培地に植菌し、30°Cで 12 時間培養した。各培養時間後、ドナー株、ヘルパー株、*B. stabilis* 野生株を遠心分離し、上清を取り除き、2mL の LB 培地を加えて懸濁し菌体を洗浄した。これを 2 回行い、菌株を洗浄した。さらに遠心分離を行い得たドナー株、ヘルパー株、*B. stabilis* 野生株のペレットを 100 μ L の LB 培地で懸濁、混合し、LB 寒天培地にスポットした。30°Cで一晩培養した後、生育した菌体すべてをコンラージ棒をかきとり、1 mL の 10 mM 硫酸マグネシウム溶液に懸濁した。懸濁液をさらに 10 mM 硫酸マグネシウム水溶液

で希釈し、この溶液を 200 μ g/mL カナマイシンと 50 μ g/mL アンピシリンを含む NB 寒天培地に植菌した。30°Cで 2 日間培養し、1 回組換え体を得た (図 20A)。この形質転換体を LB 培地に植菌し、30°Cで 12 時間培養した後、LB 培地で希釈し、TYSS 寒天培地にプレーティングし、30°Cで 2 日間培養した。1 回組換え体は TYSS 寒天培地に含まれるスクロース存在下で致死になるため、遺伝子破壊株か野生株が得られる。得られたコロニーを 200 μ g/mL カナマイシンを含む NB 寒天培地に植菌し、カナマイシン耐性を失っている株を破壊株候補とした (図 20B)。各遺伝子が破壊できているかを確認するために、BSFP_068720delcheck-F と BSFP_068720delcheck-R プライマー、BSFP_068730delcheck-F と BSFP_068730delcheck-R プライマー、BSFP_068740delcheck-F と BSFP_068740delcheck-R プライマーを用いてコロニーPCR を行った。得られた PCR 断片をアガロース電気泳動に供し、該当遺伝子が短くなっている株を破壊株とした。「2-2-3 項 *B. stabilis* のコンピテントセル作製と形質転換法」に従い、得られた各遺伝子破壊株のコンピテントセルを作製し、pP002050-BsChe-BsLif を導入した。得られた形質転換体の BsChe の活性を「2-2-7 項 BsChe、BcLip、BpLip 活性測定」に記載した方法で測定した。

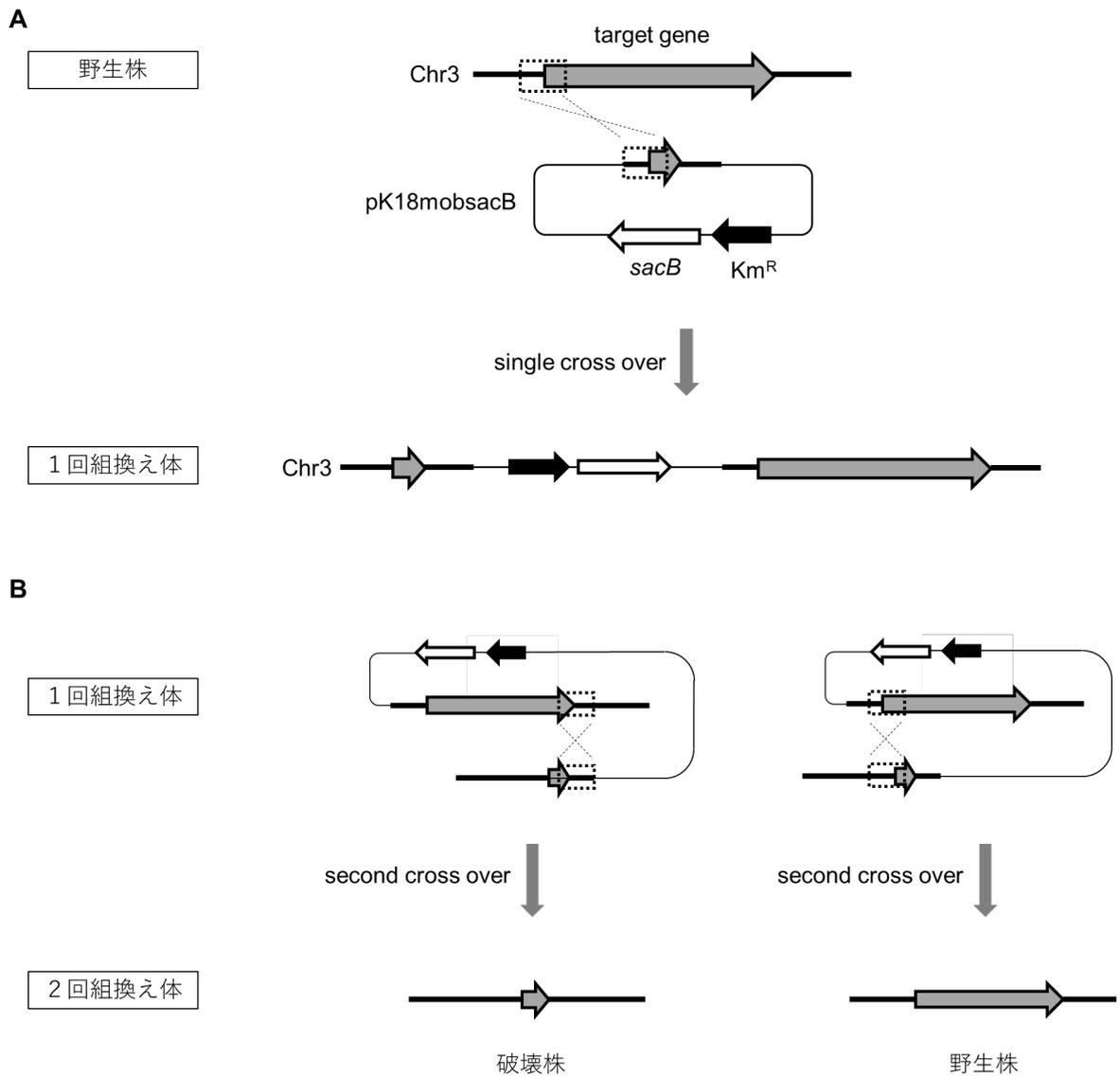


図 20. 2 回組換え法による遺伝子破壊

破壊遺伝子の上流領域断片と下流領域断片を含む pK18*mobsacB* を用いて破壊を行った。1 回組換え体はカナマイシン耐性を得るが、SacB によりスクロースはレバンに変換されることにより致死になる。Second cross over が起きる領域によって遺伝子破壊株か野生株のどちらかが得られる。

2-2-11. 遺伝子相補実験

各破壊株にそれぞれの遺伝子を相補し、表現型が回復するか試験した。まず、遺伝子相補ベクターを以下の手順で作製した。*B. stabilis* ゲノムを鋳型として P015170-F と P015170-R プライマーを用いて PCR にて増幅し、BSFP_015170 プロモーター断片を得た。同様に pP002050-BsChe-BsLif を鋳型にして pP002050-BsChe-BsLif-Prm-F と pP002050-BsChe-BsLif-Prm-R プライマーで増幅しベクター断片を得た。これらプロモーター断片とベクター断片を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、BsChe の上流に BSFP_015170 プロモータを配置した pP015170-BsChe-BsLif を作製した。次に、pP015170-BsChe-BsLif を鋳型にして pP015170-BsChe-BsLif-F と pP015170-BsChe-BsLif-R プライマーを用いて PCR により増幅し、pP015170-BsChe-BsLif ベクター断片を得た。BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の各遺伝子断片は *B. stabilis* ゲノムを鋳型にして BSFP_068720-F と BSFP_068720-R プライマー、BSFP_068730-F と BSFP_068730-R プライマー、BSFP_068740-F と BSFP_068740-R プライマーを用いて増幅した。pP015170-BsChe-BsLif ベクター断片とそれぞれの遺伝子断片を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、pP015170-BSFP_068720、pP015170-BSFP_068730、および pP015170-BSFP_068740 を作製した。これらのベクターでは BSFP_015170 プロモーターが各遺伝子の上流領域に結合している。pP015170-BSFP_068720、pP015170-BSFP_068730、pP015170-BSFP_068740 それぞれを鋳型にして pP015170-BSFP-F と pP015170-BSFP-R プライマーを用いて増幅し、P015170 プロモータを含む遺伝子断片を得た。pP002050-BsChe-BsLif ベクターを BglII で消化し、得られたベクター断片とこれら P015170 プロモータを含む遺伝子断片を In-Fusion HD Cloning Kit を用いてライゲーションし、pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068720、pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068730、および pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068740 を得た。各ベクターを Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株に形質転換し、相補性試験用の形質転換体を得た。

2-2-12. RNA-seq 解析

B. stabilis 野生株 (FERMP-21014 株) と Δ Chr3 株ならびに両株に pP002050-BsChe-BsLif ベクターを導入した形質転換株それぞれ 1 コロニーを 5 mL の YS 培地 (pP002050-

BsChe-BsLif ベクターを導入した株においては 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でカナマイシンを添加) に植菌し、28°Cで 24hr 培養した。培養液 50 μL を新しい 50 mL の YS 培地 (pP002050-BsChe-BsLif ベクターを導入した株においては 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でカナマイシンを添加) に植菌し、28°Cで 24 時間培養した。24 時間後、オレイン酸を 1 mL 添加し引き続き 28°Cで培養した。オレイン酸添加後の各時間 (0, 6, 12, 24, 36, 48 時間) で 1 mL ずつ菌体を回収した。RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen 社製) を用いて各菌体から RNA を抽出した。方法は RNeasy Lipid Tissue Mini Kit のプロトコルに従って実施した。抽出した RNA の rRNA 除去を RiboMinus Transcriptome Isolation Kit (Bacteria) (ThermoFisher 社製) のプロトコルに従って行い、TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina 社製) を用いてシーケンスライブラリ調整を行った。続いて、Illumina HiSeq2500 (Illumina 社製) を用いて Paired end、100 bp/リードで RNA-seq を行った。得られた配列を、fastp(Chen et al. 2018)により前処理し、Bowtie 2(Langmead and Salzberg 2012)により *B. stabilis* 野生株ゲノムにマッピングし、Cuffnorm(Trapnell et al. 2010)により各遺伝子の FPKM (Fragments per kilobase of exon per million reads mapped) を算出した。

2-2-13. プラスミドのコピー数測定

B. stabilis 野生株 (FERMP-21014 株)、 $\Delta\text{BSFP}_{068720}$ 株、 $\Delta\text{BSFP}_{068730}$ 株、 $\Delta\text{BSFP}_{068740}$ 株、 ΔChr3 株に pBBR122 を導入した各形質転換体を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む 5 mL の LB 培地に植菌し、28°Cで 12時間前培養した。前培養液を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む 5 mL の LB 培地に菌体濁度 OD_{660} が 0.2 になるように添加し、28°Cで 48 時間培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen 社製) を使用して菌体からベクターを抽出し *Xho*I で消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。

ベクターのコピー数は Choi ら(Choi et al. 2008)の qPCR (quantitative PCR) の方法を参考に以下の手順で *B. stabilis* 染色体上の Aspartate β -semialdehyde dehydrogenase 遺伝子 (*asd*)で検量線を作成し測定した。

(1)pBBR122-*asd* の作製

B. stabilis 野生株を鋳型とし、*asd*-insertF と *asd*-insertR プライマーを用いて PCR により増幅し、*asd* 遺伝子中の約 140 塩基からなる *asd* 遺伝子断片得た。pBBR122 を *Sma*I で消

化して得たベクター断片と *asd* 遺伝子断片を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、pBBR122-*asd* を得た。

(2) *asd* 遺伝子上の領域と pBBR122 上の領域について検量線を作成

pBBR122-*asd* を 10 倍ずつの連続希釈したサンプルを作製した。各サンプルを鋳型とし、qPCR-*asd*-F と qPCR-*asd*-R プライマー (*asd* 遺伝子上の領域を増幅)、または qPCR-pBBR122-F と qPCR-pBBR122-R プライマー (pBBR122 上の領域を増幅) を用いて、LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics 社製) を用いて qPCR を行った。装置は LightCycler 480 (Roche Diagnostics 社製) を用い、条件は 95°C で 10 分間のプレインキュベーション、95°C で 10 秒間の変性反応、60°C で 30 秒間のアニーリング反応、72°C で 1 秒間の伸長反応で行った。各サンプルについて、閾値サイクル値が出力された。次に、各希釈サンプルのベクターのコピー数を、以下の式で算出した。

$$DNA\ copy\ number\ (copy) = \frac{6.02 \times 10^{23} (copy/mol) \times DNA\ amount\ (g)}{DNA\ length\ (bp) \times 660 (g/mol / bp)}$$

各希釈ベクターのコピー数の対数値を x 軸に、閾値サイクル値を y 軸にプロットして検量線を作成した。*asd* 遺伝子上の領域と pBBR122 上の領域について増幅効率が異なるため異なる検量線が得られた。

(3) ベクターのコピー数算出

B. stabilis 野生株、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pBBR122 を導入した各形質転換体を 100 μ g/mL カナマイシンを含む 5 mL の LB 培地に植菌し、28°C で 12 時間前培養した。前培養液を 100 μ g/mL カナマイシンを含む 5 mL の LB 培地に菌体濁度 OD₆₆₀ が 0.2 になるように添加し、28°C で 24 時間培養した。QIAprep Spin Mini Kit (Quiagen 社製) を使用して pBBR122 を含む全 DNA を細胞から抽出し、この DNA を用いて検量線作成時と同様に qPCR-*asd*-F と qPCR-*asd*-R プライマー (染色体上の *asd* 遺伝子上の領域を増幅)、または qPCR-pBBR122-F と qPCR-pBBR122-R プライマー (pBBR122 上の領域を増幅) を用いて qPCR を行った。qPCR-*asd*-F と qPCR-*asd*-R プライマーを用いて qPCR を行った結果出力された閾値サイクル値から(2)で作成した検量線を用いて *asd* 遺伝子のコピー数、すなわち染色体のコピー数を算出した。qPCR-pBBR122-F と qPCR-pBBR122-R プライマーを用いて qPCR を行った結果出力された閾値サイクル

値から(2)で作成した検量線を用いて pBBR122 上の領域のコピー数、すなわち pBBR122 のコピー数を算出した。染色体のコピー数は 1 コピーであることから、pBBR122 のコピー数は pBBR122 のコピー数を染色体のコピー数で割ることにより算出した。

2-2-14. プラスミド保持アッセイ

B. stabilis 野生株 (FERMP-21014 株)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pP002050-BsChe-BsLif を導入した形質転換体を、抗生物質を含まない 5 mL の LB 培地に植菌し、28°C で 24 時間培養し、1 日目の培養液を得た。得られた培養液 2 μ L を新たな 5 mL の LB 培地に植菌し、28°C で 24 時間培養し、2 日目の培養液を得た。さらに同様にして新たな LB 培地に植菌し、3 日目の培養液を得た。1 日目、2 日目、3 日目の培養液をそれぞれ希釈し、100 μ g/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地およびカナマイシンを含まない LB 寒天培地にプレーティングし、30°C で 2 日間培養し、Colony forming unit (CFU) を計測した。

2-2-15. 染色体保持アッセイ

1 回組換え体を、抗生物質を含まない 5 mL の LB 培地に植菌し、28°C で 24 時間培養し、1 日目の培養液を得た。得られた培養液 2 μ L を新たな 5 mL の LB 培地に植菌し、28°C で 24 時間培養し、2 日目の培養液を得た。さらに同様にして新たな 5 mL の LB 培地に植菌し、3 日目の培養液を得た。1 日目、3 日目の培養液をそれぞれ希釈し、100 μ g/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地およびカナマイシンを含まない LB 寒天培地にプレーティングし、30°C で 2 日間培養し、CFU を計測した。

2-2-16. 形質転換効率の測定

B. stabilis 野生株 (FERMP-21014 株)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pP002050-BsChe-BsLif をエレクトロポレーション法により導入し、200 μ g/mL カナマイシンを含む NB 寒天培地にプレーティングした。形質転換効率は CFU をプラスミド DNA 濃度 (μ g) で割ることで算出した。

2-2-17. 遺伝子機能の予測

Hypothetical protein としてアノテーションされている BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の機能を予測するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて検索を実施した。また保存ドメインの検索には、NCBI conserved domain search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) を用いた。アミノ酸配列のアライメントは、ClustalW (Thompson et al. 1994) を用いて行い、三次元構造は AlphaFold2 (Jumper et al. 2021; Mirdita et al. 2022) を用いて予測した。予測原子モデルを DALI サーバー (Holm 2020; Mirdita et al. 2022) を用いて検索し、類似のフォールディングトポロジー、構造モチーフを持つタンパク質を同定した。結晶構造の重ね合わせと分子図作成は、PyMOL version 2.3.4 (Schrödinger 社製) を用いて作成した。

2-2-18. 統計解析と再現性

統計解析の詳細については図の説明中に記載したが、2~5 回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差 (SD) を表すデータを用いてグラフを作成した。データは一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。すべての統計的検定には $p < 0.05$ の有意性閾値を用いており、統計解析は R バージョン 4.1.3 (R Core Team, 2022; <https://www.R-project.org/>) を用いて実施した。

第3節 結果

2-3-1. BsChe 高生産化に Chr3 が関与している

BsChe の生産量を向上させるために、*B. stabilis* 野生株 (FERMP-21014 株) に対して NTG を作用させ、ランダム変異導入を行った。得られた 4,089 個の変異株それぞれの株を 5 mL の培養液で培養し、Che 活性を測定した。その結果、多くの株で野生株と同等の活性を示したが、活性が失われる株や活性が向上する株が得られた (図 21)。活性向上株のうち野生株の 120%以上の活性を示す 43 株を選択し、培養液量を 100 mL に増やして培養したところ、すべての株で野生株よりも Che 活性が高かった (図 22)。

変異による内在性 Che の発現が向上したことから、変異が導入された遺伝子依存的に発現ベクター由来 BsChe の生産量が変化するか検討を行った。活性向上株変異株 43 株から無作為に選んだ 5 つの株 (No.1, 10, 37, 40, 42 株) について、BsChe の発現ベクターである pP002050-BsChe-BsLif (Yoshida et al. 2019) を導入した。得られた形質転換体を同様に培養し、Che 活性を確認したところ、Clone No. 37 株において、野生株の 1.5 倍程度の活性向上から発現ベクター導入により約 12.4 倍という高い Che 活性 (109.0 U/mL) を示すことがわかった (図 23)。

この結果から、Clone No.37 株は NTG による変異導入により発現ベクター由来 BsChe の生産量が向上したと考えられる。そこで高生産化に寄与した原因遺伝子を調べるために、Clone No.37 株から染色体 DNA を抽出し、次世代ゲノムシーケンサーによる DNA-seq 解析を行い、野生株と比較した。その結果、Open reading frame (ORF) と推測される領域に 9 か所、遺伝子間領域に 3 か所の変異が入っていることがわかった。また、Chromosome 3 (Chr3) にリード配列がマッピングできなかったことから、Chr3 が欠損している可能性が示唆された。そこで野生株と Clone No.37 株の染色体に対し、PCR による染色体の有無の確認を行った。それぞれ染色体 1 (Chr1) 上の遺伝子と Chr3 上の遺伝子を増幅可能なプライマーセットを用いて PCR を行い、増幅した PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供した。その結果、野生株において増幅が確認された Chr3 上の領域は Clone No.37 株では増幅されなかった (図 24)。以上のことから、Clone No. 37 株は Chromosome 3 を欠損していると考えられる。以後、この Clone No.37 株を Δ Chr3 株と呼ぶ。

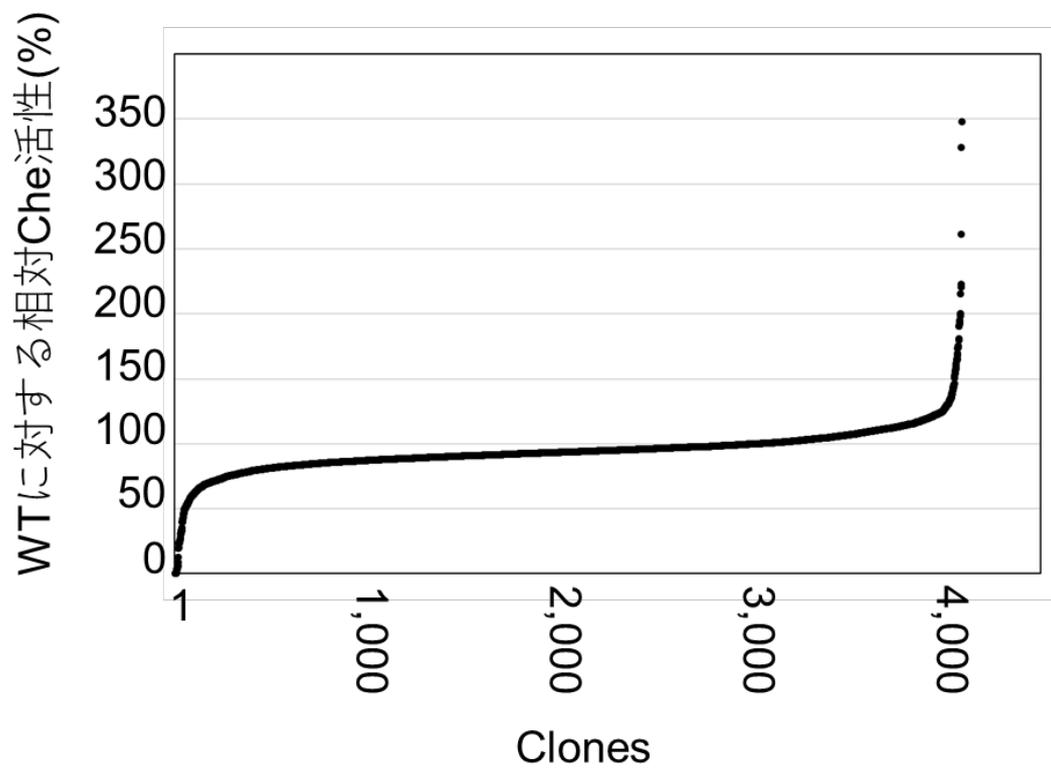


図 21. NTG 変異株の野生株に対する相対 Che 活性(%) (5 mL 培養液)

NTG 変異株 4,089 株の野生株に対する相対 Che 活性を低いものから順に並べたもの。5 mL の培養液を用いてスクリーニングを実施した。

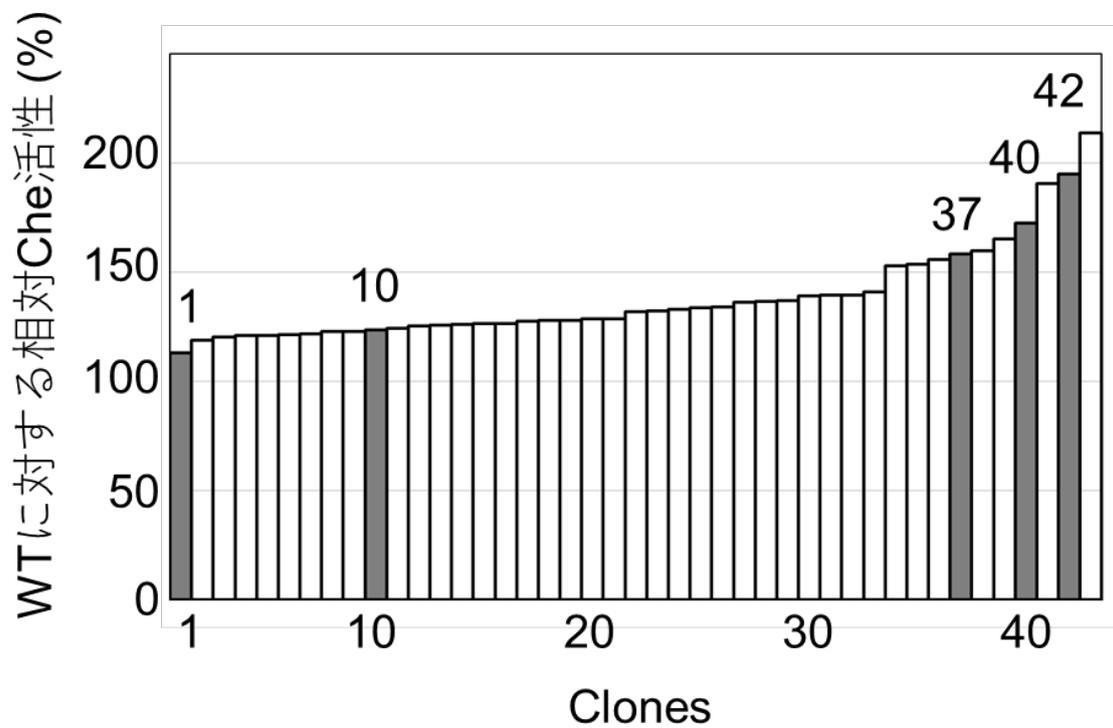


図 22. NTG 変異株の野生株に対する相対 Che 活性(%) (100 mL 培養液)
 5 mL の培養液スクリーニングで野生株よりも高い Che 活性を示した 43 株について 100 mL の培養液で再度相対 Che 活性を確認した結果。灰色で示した株を選択し、発現ベクター導入を行った。

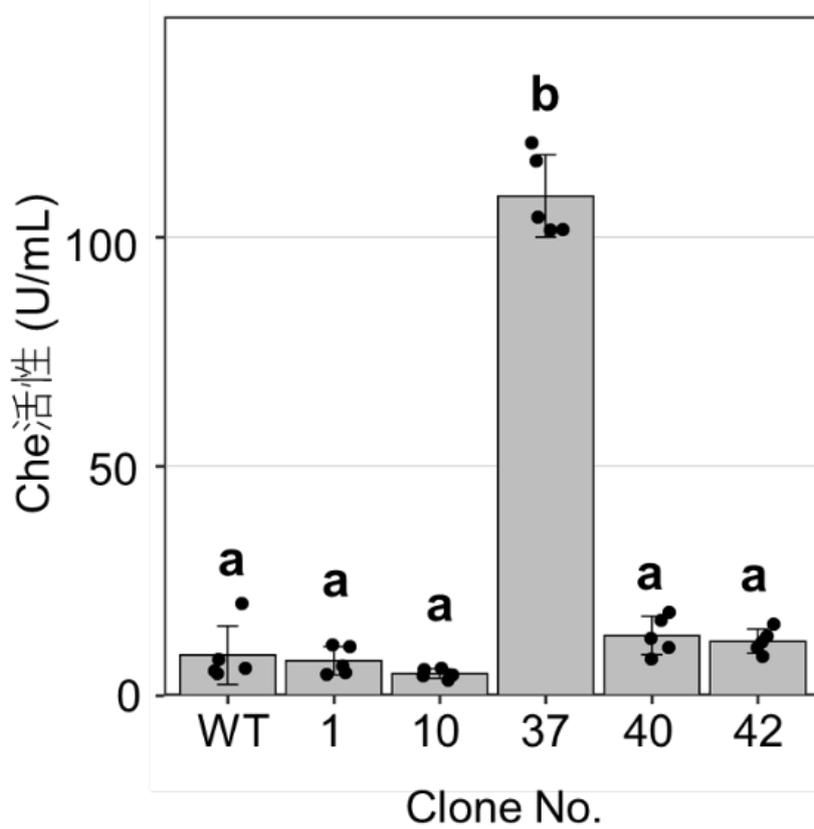


図 23. 形質転換体の Che 活性

野生型および無作為に選んだ 5 つの NTG 変異株へ pP002050-BsChe-BsLif を導入した形質転換体の Che 活性。各実験は N=5 で行い、エラーバーは平均値±SD で示した。統計的有意性は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。異なる文字は統計的に有意差があること示す ($p < 0.05$)。

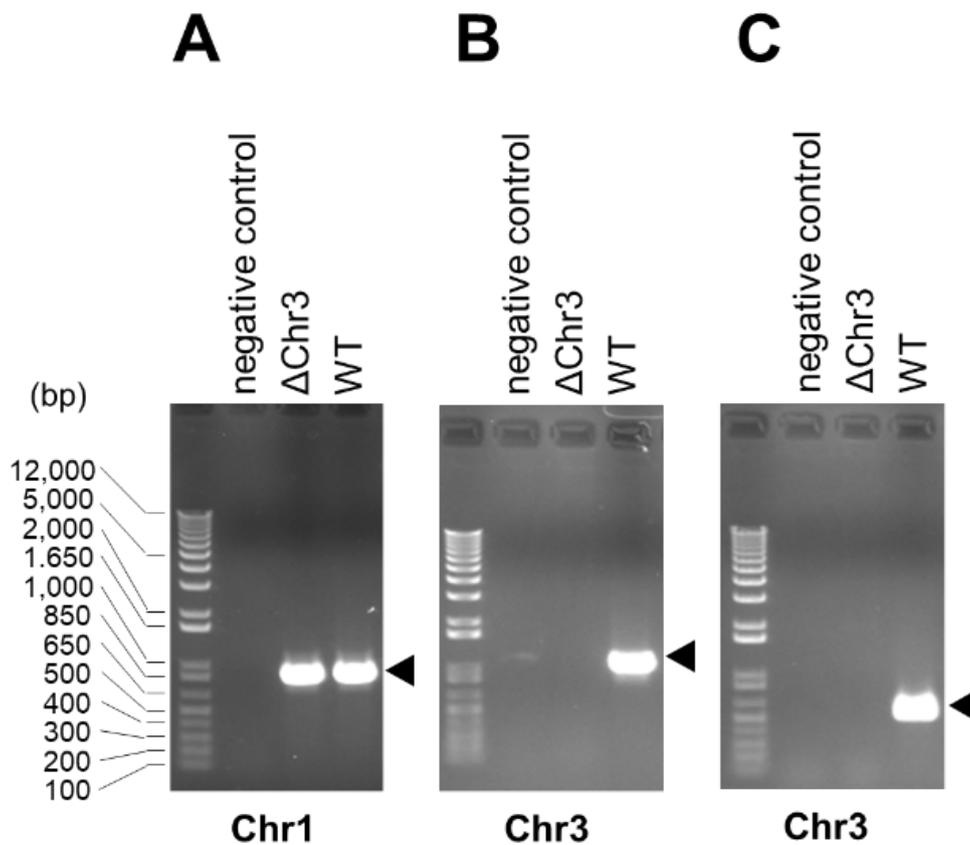


図 24. Chr1 と Chr3 の PCR 増幅結果

Clone No.37 株 (Δ Chr3 株) および WT に対して、Chr1 (831 bp、ゲノム上の領域：232859-233689)、Chr3 (1024 bp、ゲノム上の領域：597271-598294)、Chr3 (559 bp、ゲノム上の領域：613885-614443) を PCR にて増幅した。ネガティブコントロール (negative control) としてテンプレートを加えずに PCR を行った。得られた PCR 産物を 0.8% アガロースゲル電気泳動で分離し、ミドリグリーンアドバンス (日本ジェネティクス社製) で染色した。

2-3-2. Chr3 上の BSFP_068720、BSFP_068730 は BsChe の生産を抑制する

BsChe 高生産化に寄与する遺伝子を特定するために、トランスポゾン変異導入を行った。NTG による変異導入ではゲノム上の多数の箇所に変異が入るが、トランスポゾン変異導入ではトランスポゾンの転移による変異が行われるため、変異箇所は 1 か所、多くとも数か所となることが期待され、NTG による変異導入よりも原因遺伝子の特定が容易であると考えられる。NTG による変異導入実験で pP002050-BsChe-BsLif ベクターを導入することで劇的に高生産化する株 (Δ Chr3 株) が得られたため、トランスポゾン変異導入では親株として野生株に BsChe 発現ベクターである pP002050-BsChe-BsLif ベクターを導入した形質転換体を使用し、発現ベクター導入により高生産化される変異株の取得を目指した。

野生株が亜テルル酸耐性を持たないことを確認できたため、pUTmini-Tn5 Tel Kit (Biomedal 社製) を用いて、亜テルル酸耐性遺伝子をマーカーとして染色体にトランスポゾン導入を行った。その結果、亜テルル酸耐性を獲得したトランスポゾン挿入株として 1,200 株の変異体を取得した。これらの変異株を培養し、Che 活性値が高い株から低い株までをランダムに 140 株を選抜した (0.2~117.6U/mL)。さらに 140 株について再度培養を行い、Che 活性を測定したところ、親株よりも高い Che 活性を示す 88 個の変異体を得られた (図 25)。

BsChe 高生産化に寄与する遺伝子を特定するため、88 個の変異体について染色体を抽出し、次世代ゲノムシーケンサーによる DNA-seq 解析によりトランスポゾンの挿入位置を特定した。しかしながら、Che 活性が高い変異体に共通するトランスポゾン挿入部位は同定されなかった (図 26A)。そこで、これら Che 活性が高い変異株はトランスポゾン挿入部位とは無関係にゲノム上に変異があり、その変異により BsChe 生産量が向上している可能性を考えた。次世代ゲノムシーケンスで得られたリード配列を用いてゲノム上の変異点を調べた結果、仮説通りトランスポゾンの挿入とは無関係にゲノム上に変異が入っており、活性が高い株に共通する変異が見られることが分かった (図 26B)。Che 活性が高かった上位 10 個の変異体と下位 10 個の変異体についてトランスポゾンが挿入された領域を確認したところ (表 12、表 13)、上位の変異株において、Chr3 上の遺伝子である BSFP_068720 と BSFP_068730 に変異点が集中しており、これらの変異点はアミノ酸変異を伴っていた (図 27)。この結果から、アミノ酸変異により BSFP_068720 と BSFP_068730 の働きが失われることにより BsChe の生産量が向上している可能性が示唆された。

BSFP_068720 と BSFP_068730 のゲノム上の並びを確認したところ、BSFP_068720 と BSFP_068730 は BSFP_068740 とオペロンを形成していた (図 27)。以上の結果から、このオペロンが BsChe の生産に関与していると考えられた。

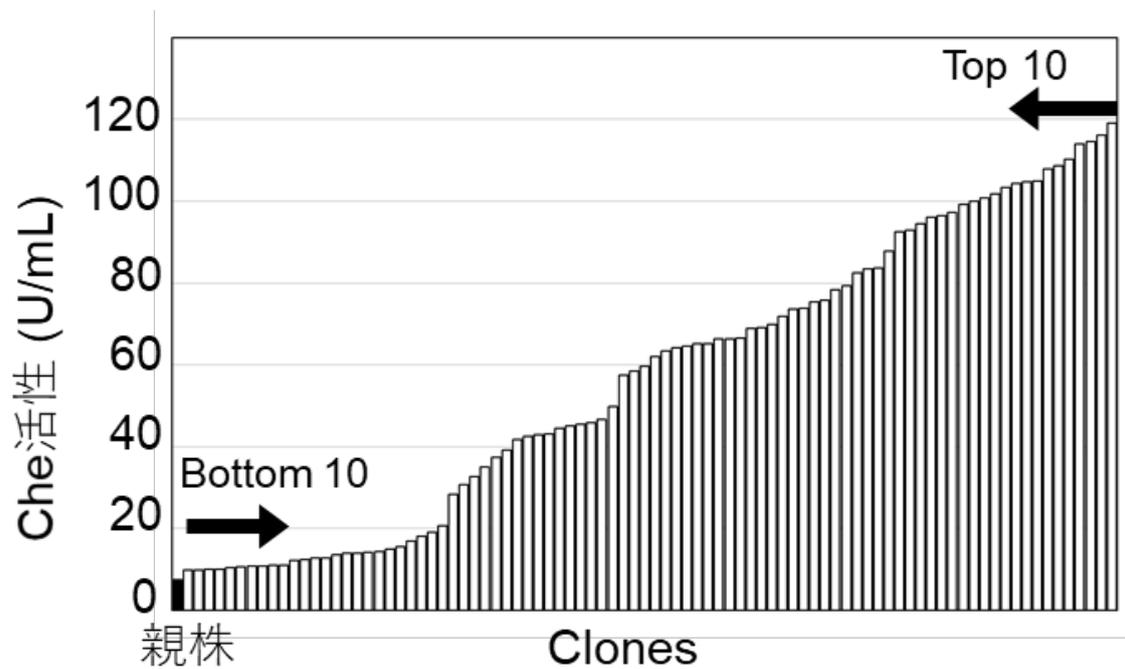


図 25. トランスポゾン変異導入により得られた高活性化株

親株とトランスポゾン変異導入によって得られた変異体の Che 活性。黒色で親株の Che 活性を示し、その他はトランスポゾン変異株の Che 活性を示す。矢印で示す Che 活性が高い上位 10 株と Che 活性が低い下位 10 株のゲノム DNA を解析した。

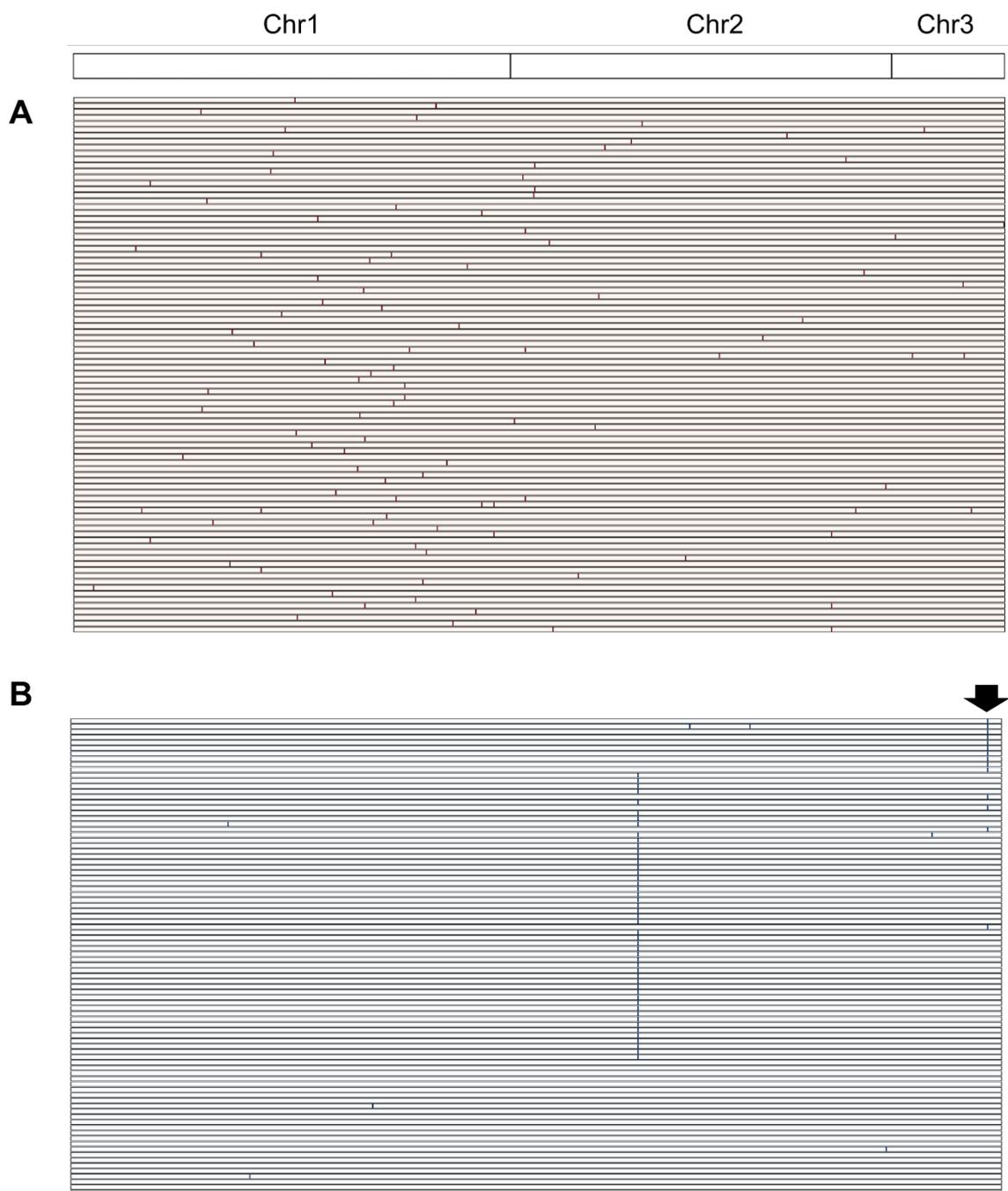


図 26. ゲノム上のトランスポゾン挿入部位とゲノム上の変異点

上部に Chr1、Chr2、Chr3 の位置を示した。各変異株を一つの細い長方形で表し、Che 活性が高かった変異株から順に並んでいる。トランスポゾンが挿入された遺伝子上の位置 (A) とトランスポゾンとは無関係に変異が挿入された遺伝子上の位置 (B) を点で示した。高活性株で変異点が集中していた領域 (BSFP_068720 と BSFP_068730) を矢印にて示した。

表 12. ゲノム上のトランスポゾン挿入部位とゲノム上の変異点 (活性上昇株)

BSFP_068720 と BSFP_068730 への挿入があるものを太字で示した。

No.	Che Activity [U/mL]	The transposon insertion sites				Transposon-unrelated mutation sites					
		Insertion site 1		Insertion site 2		Mutation site 1		Mutation site 2		Mutation site 3	
		Chr.	Insertion gene/site	Chr.	Insertion gene/site	Chr.	Mutation gene (mutation) / mutation site	Chr.	Mutation gene (mutation) / mutation site	Chr.	Mutation gene (mutation) / mutation site
Top 10											
1	119.2	1	BSFP_016640			3	BSFP_068730 (p. Leu472Arg)				
2	116.1	1	BSFP_027350			2	1514012-1514065	2	BSFP_050750 (silent)	3	BSFP_068730 (p. Leu472Arg)
3	114.5	1	BSFP_009260			3	BSFP_068720 (p. Val337Gly)				
4	113.9	1	BSFP_026060			3	BSFP_068720 (p. Val337Gly)				
5	110.2	2	1087268			3	BSFP_068730 (p. Leu472Arg)				
6	108.7	1	BSFP_011530	3	267705	3	BSFP_068720 (p. Val337Gly)				
7	107.9	2	2287503			3	BSFP_068720 (p. Val337Gly)				
8	104.4	1	BSFP_014970			3	BSFP_068720 (p. Val337Gly)				
9	103.4	1	BSFP_014790			3	BSFP_068730 (p. Met844Argfs*20)				
10	101.7	2	BSFP_033940			3	BSFP_068730 (p. Leu472Arg)				

表 13. ゲノム上のトランスポゾン挿入部位とゲノム上の変異点 (活性低下株)

No.	Che Activity [U/mL]	The transposon insertion sites				Transposon-unrelated mutation sites					
		Insertion site 1		Insertion site 2		Mutation site 1		Mutation site 2		Mutation site 3	
		Chr.	Insertion gene/site	Chr.	Insertion gene/site	Chr.	Mutation gene (mutation) / mutation site	Chr.	Mutation gene (mutation) / mutation site	Chr.	Mutation gene (mutation) / mutation site
Bottom 10											
1	9.8	2	BSFP_036340	2	BSFP_056720						
2	9.9	1	BSFP_028630								
3	9.9	1	1851790								
4	10.0	1	BSFP_030520			1	BSFP_013330 (silent)				
5	10.5	1	BSFP_021920	2	BSFP_056720						
6	10.6	1	BSFP_025960								
7	10.7	1	BSFP_019490								
8	10.8	1	BSFP_001200								
9	11.0	1	2893344			2	3139894				
10	11.1	2	BSFP_038090								

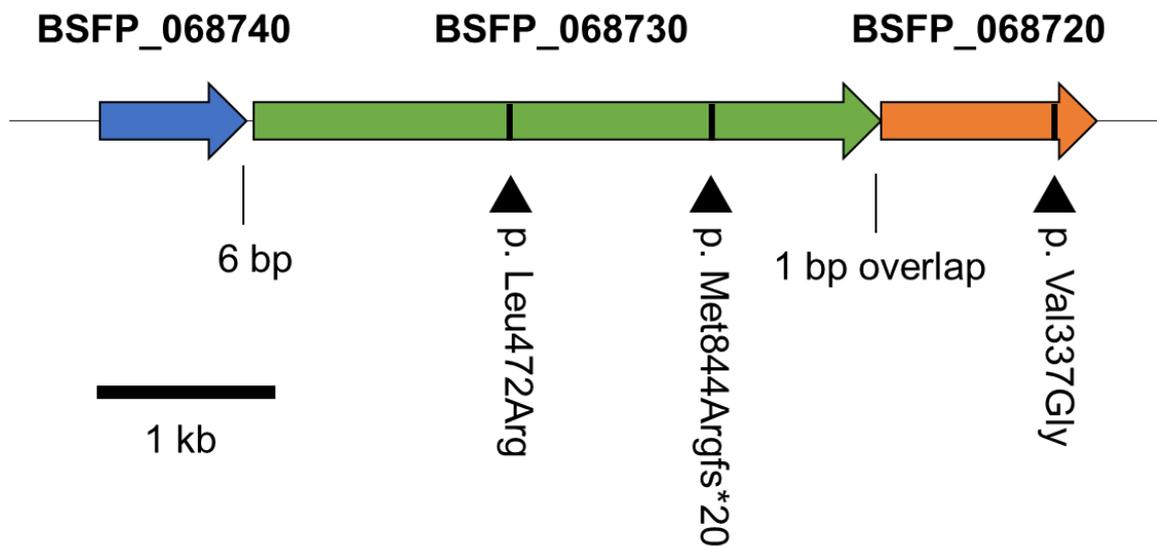


図 27. BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 オペロンの構造

BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の ORF の長さは、それぞれ 1209 bp、3450 bp、864 bp である。すべての遺伝子は GeneBank では Hypothetical protein としてアノテーションされていた。黒い三角形はトランスポゾン変異導入実験時に偶発的に突然変異が起きた箇所を示す。変異は BSFP_068730 においては 2 箇所（472 番目の Leu が Arg への変異、844 番目の Met が 1 塩基欠失により Arg へ変異し、フレームシフトにより 20 残基下流の配列が停止コドンとなる変異）、BSFP_068720 においては 1 箇所（337 番目の Val が Gly への変異）で確認された。変異点の表記法は den Dunnen らの方法(den Dunnen et al. 2016)に従った。

BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 が BsChe の高生産化に寄与しているかを調べるためにそれぞれの遺伝子破壊株を pK18*mobsacB* (Schäfer et al. 1994)を用いた 2 回組換え法により作製した。1 回組換え株は pK18*mobsacB* 上のカナマイシン耐性遺伝子により、2 回組換え体は *sacB* 遺伝子によるカウンターセクションにより容易に取得することができる。しかし、*B. stabilis* では *sacB* 遺伝子が働かず 2 回組換え体の取得が困難であった。この原因は、*sacB* 遺伝子上流のプロモーターであることが考えられたため、プロモーターを *B. stabilis* で働くことを確認済みである BSFP_002050 プロモーターに置換した。その結果、*sacB* 遺伝子が機能し、2 回組換え体を取得することができた。得られた 2 回組換え体に対し、コロニーPCR による遺伝子破壊の確認を行った。各遺伝子を増幅するプライマーセットを用いて PCR を行い各遺伝子を増幅し、アガロースゲル電気泳動に供した(図 28)。その結果、各遺伝子が短くなっていることから、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 が破壊できていることが確認できた。以後、それぞれの破壊株を Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株とする。

得られたこれらの破壊株において、BsChe 生産量が向上しているかを確かめるために野生株、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に空ベクターである pBBR122 または発現ベクターである pP002050-BsChe-BsLif を導入した。得られた各形質転換体を培養し、Che 活性を測定した。その結果、空ベクターの導入による Che 活性に有意差はなかった。一方、発現ベクターを導入した Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株の Che 活性はそれぞれ 103.2、110.6、110.8、90.2 U/mL であり、発現ベクターを導入した野生株の Che 活性 (6.9 U/mL) の約 15.0、16.1、16.1、13.1 倍であり、各破壊株の Che 活性は野生株に比べて有意に高かった (図 29)。以上の結果から、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株において、リコンビナント BsChe 生産量が向上していることが示唆された。

さらに、野生株に Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株および Δ Chr3 株に発現ベクターを導入した形質転換体における BsChe の生産量を SDS-PAGE とウェスタンブロッティングにより確認した (図 30)。ウェスタンブロッティングは BsChe ポリクローナル抗体を用いて行った。SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング共に、野生株の形質転換体に比べ、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株および Δ Chr3 株の形質転換体で BsChe 生産量が向上していることがわかった。

以上、Che 活性のデータと SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングの結果から、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株および Δ Chr3 株の発現ベクター形質転換体において BsChe が有意に高生産されていることが示された。

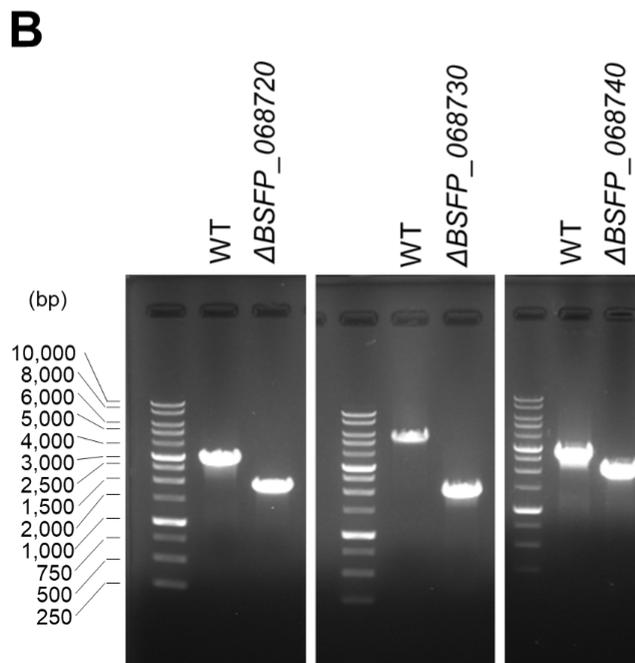
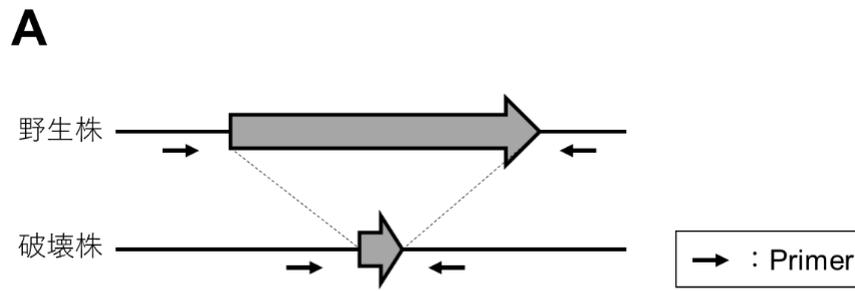


図 28. PCR による遺伝子破壊の確認

(A) 遺伝子破壊の模式図。各遺伝子を増幅するようにプライマーを設計し PCR を行った場合、破壊株は野生株よりも短い PCR 産物が得られる。

(B) BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 が破壊できていることを、BSFP_068720delcheck-F と BSFP_068720delcheck-R プライマー、BSFP_068730delcheck-F と BSFP_068730delcheck-R プライマー、BSFP_068740delcheck-F と BSFP_068740delcheck-R プライマーを用いたコロニーPCR により確認した。得られた PCR 産物を 0.8% アガロースゲル電気泳動で分離し、ミドリグリーンアドバンス（日本ジェネティクス社製）で染色した。遺伝子破壊株において PCR 産物が短くなっていることを確認した。

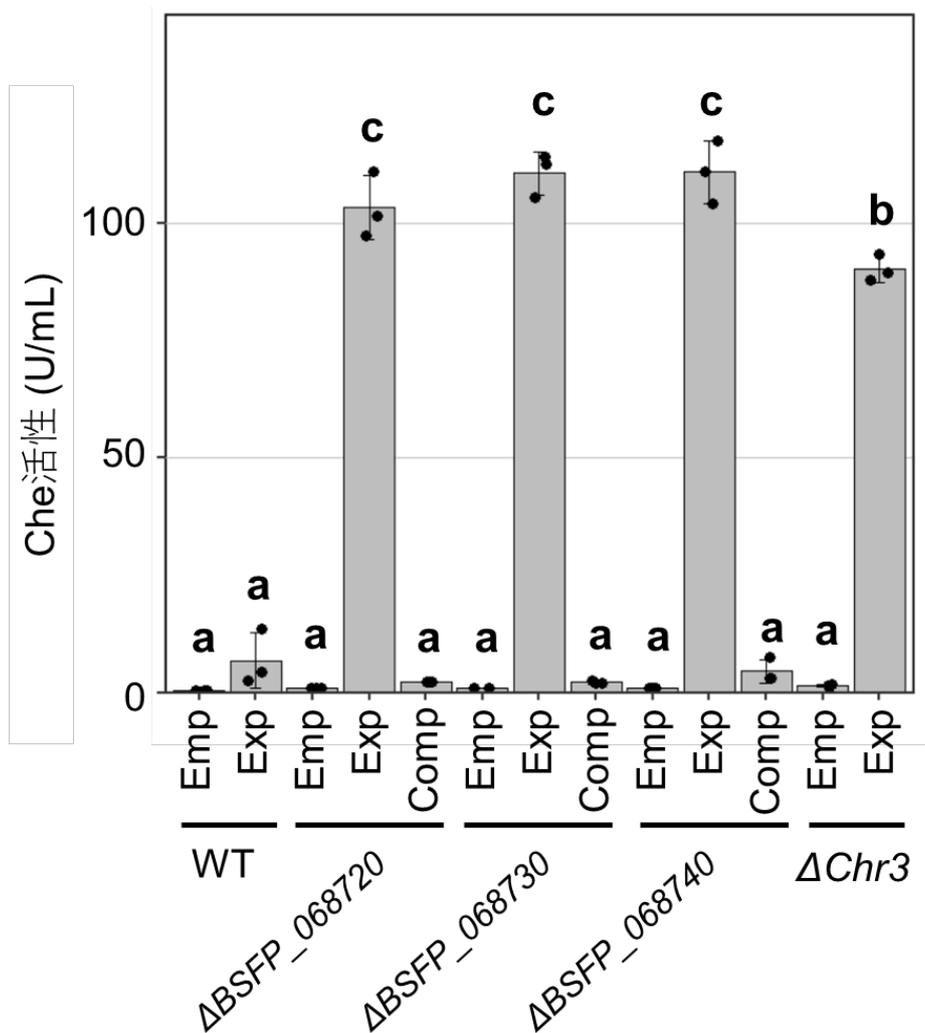


図 29. 各形質転換体における Che 活性

野生株(WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に空ベクターである pBBR122 (Emp)、発現ベクターである pP002050-BsChe-BsLif (Exp)、または相補ベクターである pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068720、pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068730、pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068740 (Comp) を導入した形質転換体における Che 活性を示す。各実験は N=3 で行い、エラーバーは平均値 \pm SD で示した。統計的有意性は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。異なる文字は統計的に有意差があること示す(p < 0.05)。

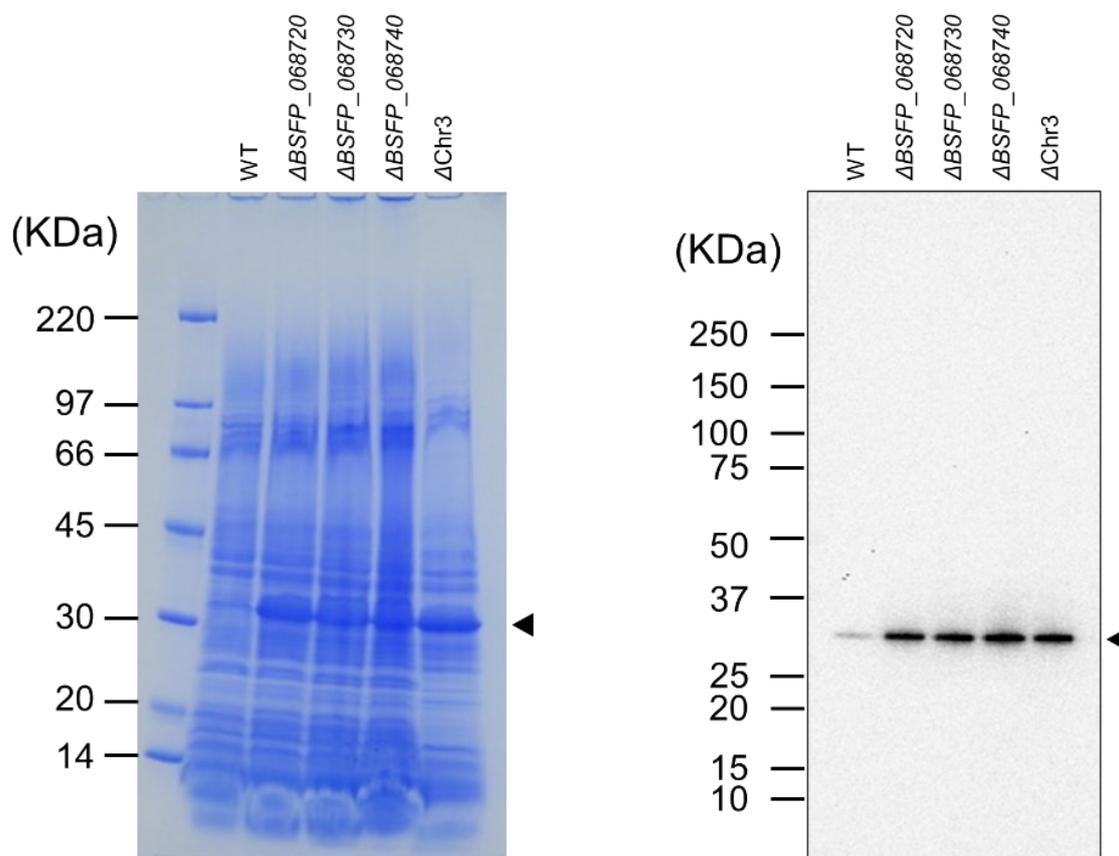


図 30. SDS-PAGE およびウェスタンブロットティング

野生型 (WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に発現ベクターである pP002050-BsChe-BsLif を導入した形質転換体の培養上清の SDS-PAGE およびウェスタンブロットティングの結果。BsChe は 33.2 kDa であり、黒い三角形で示される位置に見られる。

BsChe 生産量向上が BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の破壊によるものであることを確かめるために、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株にそれぞれの遺伝子を相補し BsChe 活性の変化を確認した。リコンビナント BsChe を発現するために必要な BsChe-BsLif オペロンに加え、各破壊遺伝子を含む pBBR122 を骨格に持つ相補ベクターを作製し (図 31)、各破壊株に導入した。なお、各遺伝子のプロモーターとしてグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼとアノテーションされている BSFP_015180 遺伝子 (GenBank accession number: WP_0964719.1) のプロモーターを用いた。この BSFP_015180 遺伝子は、我々が以前行った RNA-seq 解析で構成的に発現していると推測された遺伝子であり (Yoshida et al. 2019)、各相補遺伝子は構成的に発現すると考えられる。

相補ベクターを導入した各破壊株 (遺伝子相補型株) について、Che 活性を確認したところ、野生株と有意差のないレベルまで BsChe 活性が低下した (図 29)。この結果から、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 遺伝子の導入により各破壊株の表現型が相補され、野生株と同等の表現型になったと考えられる。以上の結果から、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 は破壊することによってリコンビナント BsChe の生産量が向上することが示された。

pBBR122 以外のベクターでも同様に BsChe 生産量が向上するかを確かめるために、広域宿主ベクターである RK2 プラスミドを用いて検討を行った。pBBR122 と同様に BsChe を P002050 プロモーターで発現させる発現ベクターである pRK2-P002050-BsChe-BsLif を作製した (図 32)。野生株、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pRK2-P002050-BsChe-BsLif を導入し、得られた各形質転換体を培養し、Che 活性を測定した。その結果、発現ベクターを導入した Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株の Che 活性はそれぞれ 48.2、48.4、50.4、31.9 U/mL であり、発現ベクターを導入した野生株の Che 活性 (9.0 U/mL) の約 5.3、5.4、5.6、3.5 倍であり、各破壊株の Che 活性は野生株に比べて有意に高かった (図 33)。以上の結果は、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株におけるリコンビナント BsChe 生産量は発現ベクターの種類にかかわらず向上することを示している。

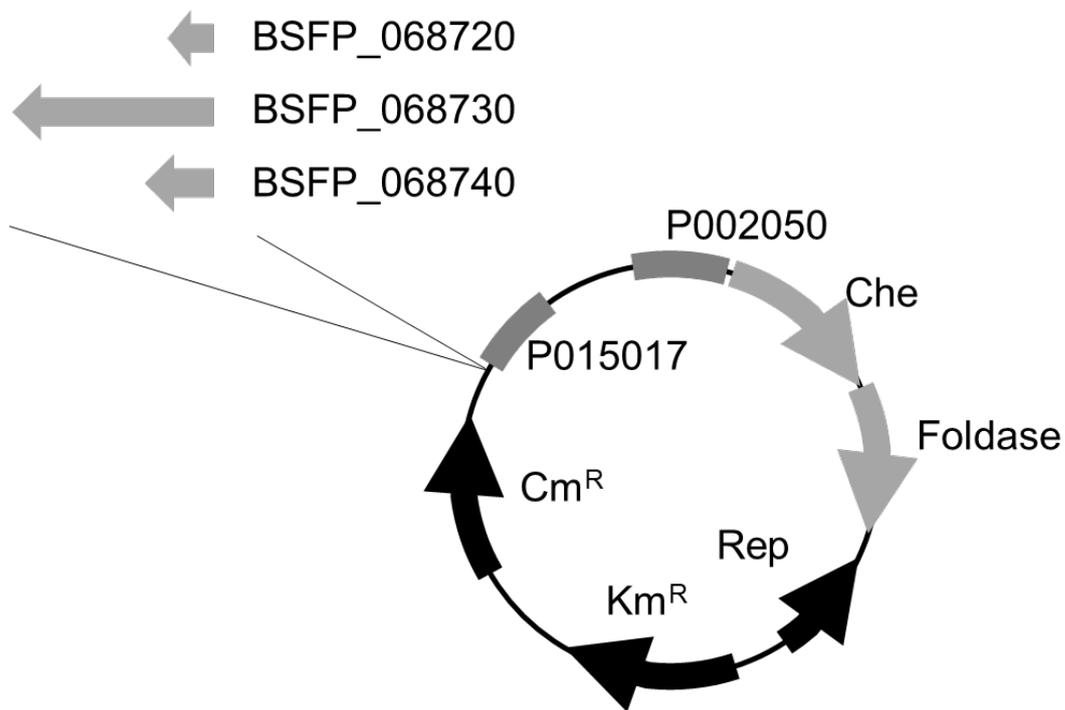


図 31. 相補ベクターのプラスミドマップ

pBBR122 を骨格に持つ各相補ベクター (pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068720、pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068730、pP002050-BsChe-BsLif-BSFP_068740) のプラスミドマップ。相補用の各遺伝子は BSFP_015170 のプロモーター配列 (P015170) で発現し、BsChe 発現の干渉を避けるために、BsChe-BsLif と逆向きに配置した。

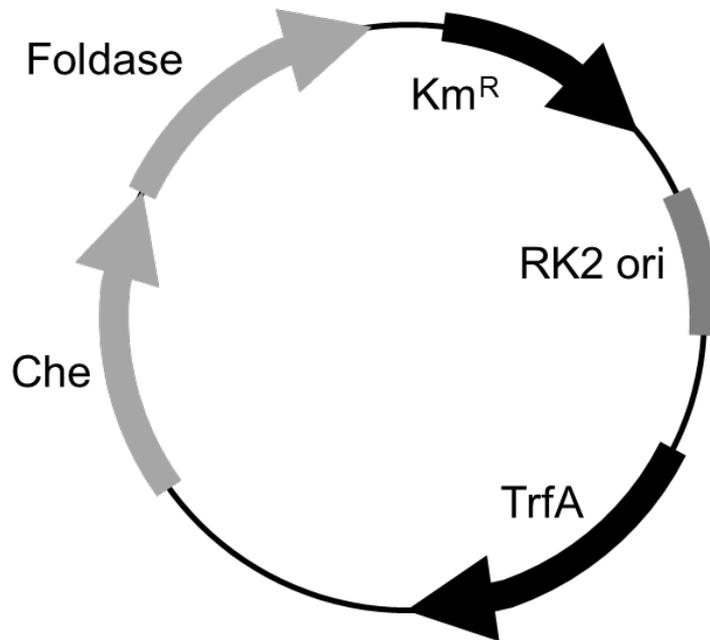


図 32. pRK2-P002050-BsChe-BsLif のプラスミドマップ

広域宿主ベクターである RK2 プラスミド由来 pRK2-P002050-BsChe-BsLif のプラスミドマップ。RK2 ベクター由来の RK2 ori、TrfA を持つ。*B. stabilis* での発現のためにカナマイシン耐性遺伝子も持つ。

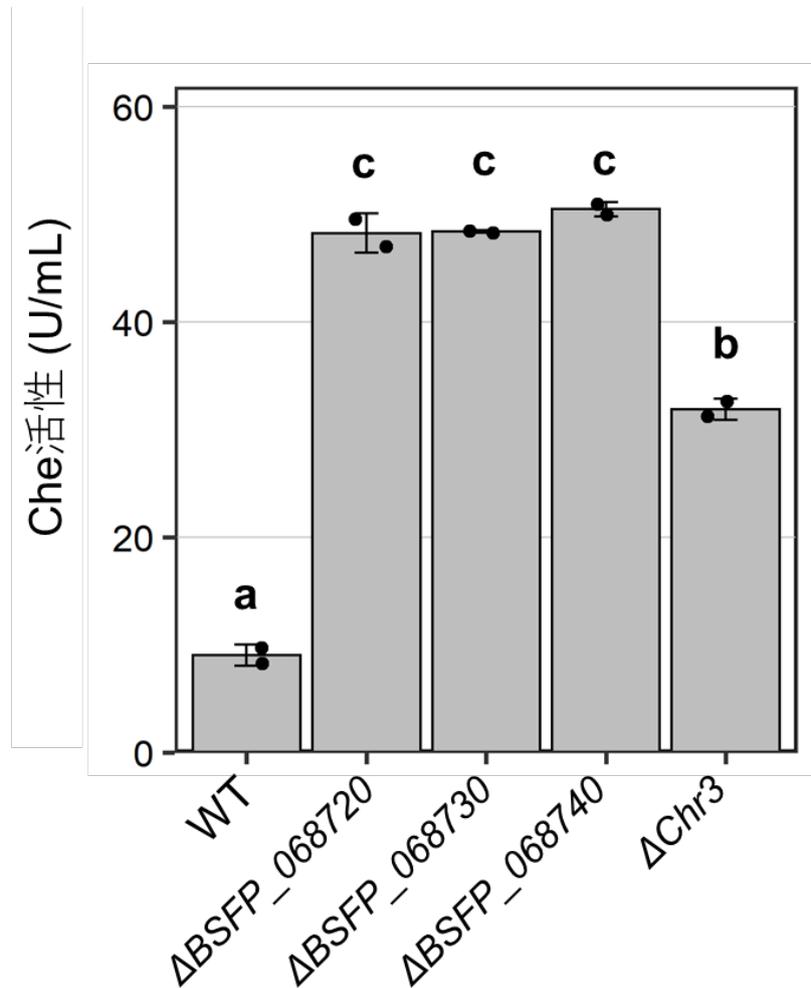


図 33. 各形質転換体における Che 活性

野生株(WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に発現ベクターである pRK2-BsChe-BsLif を導入した形質転換体における Che 活性を示す。実験は N=2 で行い、エラーバーは平均値 \pm SD で示した。統計的有意性は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。異なる文字は統計的に有意差があること示す($p < 0.05$)。

2-3-3. BSFP_068720/30/40 の機能予測

BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 は Hypothetical protein とアノテーションされている。これらの遺伝子の機能を相同性の高いタンパク質から予測するために、BLAST 検索を行った。その結果、相同性が高い遺伝子は *Burkholderia* 属由来であり、Hypothetical protein や DUF (Domain of unknown function) domain-containing protein などの機能未知タンパク質であった (表 14)。

相同性が高いタンパク質からは機能予測が難しかったため、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 のドメイン構造を確認した。NCBI Conserved Domain Search によりドメイン構造を検索したところ、BSFP_068730 には SMC (Structural maintenance of chromosome) superfamily に属するドメインが含まれていることがわかった。SMC superfamily は細胞分裂の際の染色体の凝縮分離に関与する SMC タンパク質に保存されており、SMC タンパク質には Walker-A、C-motif、Walker-B/D-loop と呼ばれる ATP 結合と加水分解に関連する配列モチーフが報告されている (Nolivos and Sherratt 2014; Petrushenko et al. 2011)。BSFP_068730 にもこれらのモチーフ配列が存在するかを調べたところ、Walker-A、C-motif、Walker-B/D-loop の配列モチーフが存在することがわかった (図 34)。この結果から、BSFP_068730 は SMC タンパク質と類似した機能を有している可能性が考えられた。

表 14. BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の相同性タンパク質

Query protein	Homologous protein	Accession number	Sequence identity
BSFP_068720	DUF3322 and DUF2220 domain-containing protein	WP_081076493.1	99%
BSFP_068720	DUF2220 family protein	WP_212116153.1	93%
BSFP_068720	DUF3322 and DUF2220 domain-containing protein	WP_110386206.1	92%
BSFP_068720	hypothetical protein CA831_14020	OXH89423.1	92%
BSFP_068730	hypothetical proteins	WP_155637459.1	99%
BSFP_068730	hypothetical proteins	WP_110386205.1	94%
BSFP_068730	hypothetical proteins	WP_060097226.1	94%
BSFP_068740	DUF4194 domain-containing protein	WP_081076492.1	99%
BSFP_068740	DUF4194 domain-containing protein	WP_155633426.1	91%
BSFP_068740	DUF4194 domain-containing protein	WP_110386204.1	91%

	WalkerA	C-motif	Walker B/D-loop
BSFP_068730	70-HLLVGPSGSGKST	1018-AGKSGGQR	1052-CTVLMDEAFDKADSE
EcMukB	30-TTLSGGNGAGKST	1363-GALSTGEA	1401-RLLFLDEA-ARLDAR
BsSmc	27-TAVVGPNGSGKSN	1087-NLLSGGER	1112-PFCVLDEVEAALDEA
CcSmc	27-TGIVGPNGCGKSN	1045-SLMSGGEQ	1069-PICVLDEVDAPLDDA

図 34. BSFP_068730 と SMC タンパク質のアミノ酸配列アラインメント

BSFP_068730 と代表的な細菌由来 SMC タンパク質と BSFP_068730 とのアミノ酸配列のアラインメントを示す。EcMukB は大腸菌由来 MukB、BsSMC は *Bacillus subtilis* 由来 SMC、CcSMC は *Caulobacter crescentus* 由来 SMC を示し、Walker-A、C-motif、Walker-B/D-loop におけるコンセンサスモチーフを示す。黒い枠は完全一致するアミノ酸を、灰色の枠は相同性が 50% より高いアミノ酸を示す。

さらに BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 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。

BSFP_068740 の N 末端と C 末端領域は信頼性スコア (pLDDT) が低かったが、その他の領域、および BSFP_068720、BSFP_068730 については pLDDT が高く予測できた。

(図 35A~C)。

DALI サーバーを用いて、これらの予測された結晶構造と相同性が高いタンパク質を PDB (Protein Data Bank) から探索した。その結果、BSFP_068720 は、Type II DNA topoisomerase subunit A (PDB code: 2ZBK chain A (Graille et al. 2008) ; Z score: 12.2 ; rmsd (root mean square deviation) :194 C α atoms, 8.8Å)、BSFP_068730 は SMC タンパク質 MukB (PDB code: 7NYW chain A(Bürmann et al. 2021) ; Z score: 24.1 ; rmsd: 367 C α atoms, 6.0 Å)、BSFP_068740 は Kite family protein MukE (PDB code: 7NYW chain E(Bürmann et al. 2021) ; Z score: 11.5 ; rmsd: 162 C α atoms, 4.0 Å) と相同性が高いことがわかった。

MukBEF 三者複合体は大腸菌の SMC タンパク質としてよく知られている(Bürmann et al. 2021)。BSFP_068730 と BSFP_068740 の結晶構造はそれぞれ MukB と MukE と相同性が高かったが、BSFP_068720 の結晶構造は MukF ではなく、Type II DNA topoisomerase II A subunit と相同性が高かった。Type II DNA topoisomerase II A subunit の触媒残基である Glu209 と Asp261 は、BSFP_068720 ではそれぞれ Glu266 と Asp309 と対応し、保存されていた (図 35A)。BSFP_068720 は Type II DNA topoisomerase II A subunit のほかに、Small topoisomerase-primase domain protein (PDB code: 2FCJ (Řezáčová et al. 2008) ; Z score: 8.4)、Ribonuclease M5 (PDB code: 6TPQ(Oerum et al. 2020) ; Z score: 7.3)、DNA primase (PDB code: 5GUJ (Zhou et al. 2017) ; Z score: 6.8) と相同性が高かったが、これらのタンパク質はすべて DNA/RNA の切断または合成に関連していると考えられることから、BSFP_068720 も DNA/RNA の切断または合成に関与している可能性が考えられる。

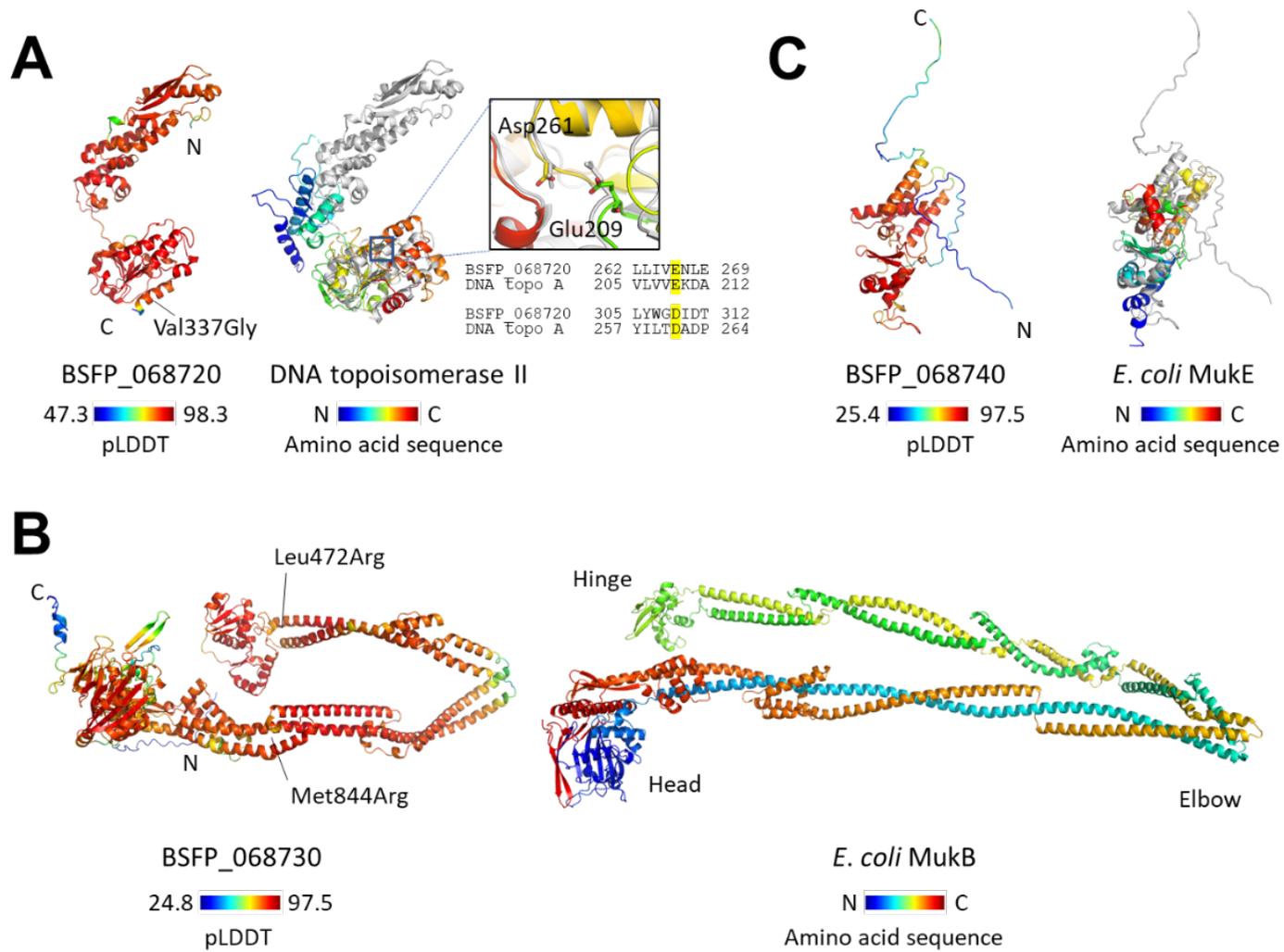


図 35. 予測された結晶構造と相同性タンパク質の結晶構造

(A) BSFP_068720 の AlphaFold2 三次元予測モデルと、DALI サーバーによって導き出された予測モデルと最も構造相同性が高いタンパク質である Type II DNA topoisomerase subunit A (PDB code : 2ZBK chain A) の構造モデル。左側に示した AlphaFold2 三次元予測モデルは、残基ごとに信頼性スコア (pLDDT) で色分けされており、赤色が最も信頼度が高く、青になるにつれて信頼度は低い。トランスポゾン変異導入で同定された変異 (Val337Gly) の位置も示されている。右側に示した Type II DNA topoisomerase subunit A の構造モデルは、N 末端から C 末端に青色から赤色になるようにグラデーションで色付けされており、灰色で AlphaFold2 三次元予測モデルを重ねて示している。拡大図として保存されている Glu/Asp 残基を含む金属結合部位を示し、部分的なアミノ酸配列のアラインメントも示されている。

(B) BSFP_068730 の AlphaFold2 三次元予測モデルと予測モデルと最も構造相同性が高いタンパク質である大腸菌の MukB(PDB code: 2NYW chain A) の構造モデルを示す。トランスポゾン変異導入で同定された変異 (Lau472Arg、Met844Arg) の位置も示されている。

(C) BSFP_068740 の AlphaFold2 三次元予測モデルと予測モデルと最も構造相同性が高いタンパク質である大腸菌の MukE(PDB code: 2NYW chain E) の構造モデルを示す。

2-3-4. BSFP_068720/30/40 はプラスミドのコピー数抑制と安定性低下に関与する

ΔBSFP_068720 株、ΔBSFP_068730 株、ΔBSFP_068740 株、ΔChr3 株において、リコンビナント BsChe の生産量が向上した。これは発現ベクターを導入することにより BsChe の mRNA 量が増加したためと予想される。そこで、培養経過における BsChe の mRNA 量の変化を確認した。野生株と ΔChr3 株、およびそれぞれの株に BsChe 発現ベクター (pP002050-BsChe-BsLif) を導入した株を YS 培地にて 24 時間培養後、オレイン酸を添加した。オレイン酸添加時点を 0 時間として 48 時間までの BsChe の mRNA 量 (FPKM) の変化を確認した (図 36)。オレイン酸はネイティブの BsChe の誘導剤として働くことから、いずれの株においてもオレイン酸添加直後に BsChe の mRNA 量の上昇がみられた。オレイン酸添加時点(0 時間)において、ΔChr3 株に BsChe 発現ベクターを導入した株の mRNA 量は野生株に BsChe 発現ベクターを導入した株に比べて顕著に mRNA 量が高かった。また、野生株に BsChe 発現ベクターを導入した株では 12 時間をピークにそれ以降 mRNA 量の低下がみられたのに対し、ΔChr3 株に BsChe 発現ベクターを導入した株では 36 時間まで mRNA 量の低下は見られなかった。これらの現象から、ΔChr3 株において、プラスミドのコピー数の増加やプラスミドの安定化が起きている可能性が考えられる。

この仮説を確かめるために、まずプラスミドのコピー数を調べた。野生株、ΔBSFP_068720 株、ΔBSFP_068730 株、ΔBSFP_068740 株、ΔChr3 株に pBBR122 を導入した形質転換体を作製し、プラスミドのコピー数を調べた。それぞれの形質転換体を、カナマイシンを含む LB 培地に植菌し、28°C で 12 時間振盪培養した後、新しいカナマイシンを含む LB 培地に菌体濁度 OD₆₆₀ が 0.2 になるように添加し、28°C で 48 時間振盪培養した。培養後の菌体からベクターを抽出し、*Xho*I で切断後アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、各破壊株にベクターを導入した形質転換体のベクター濃度は野生株にベクターを導入した形質転換体にくらべて高いことがわかった (図 37)。次に、ベクターのコピー数を定量するために、qPCR を行った。検量線は Choi ら(Choi et al. 2008)の報告の通り、*B. stabilis* の Aspartate β-semialdehyde dehydrogenase (*asd*) 遺伝子を用いて行った。野生株、ΔBSFP_068720 株、ΔBSFP_068730 株、ΔBSFP_068740 株、ΔChr3 株に pBBR122 を導入し、これらの形質転換体をカナマイシン含有 LB 培地で 28°C、24 時間、振盪培養し、pBBR122 を含む全ゲノムを抽出した。検量線を用いて pBBR122 のコピー数を算出したところ、ΔBSFP_068720 株、ΔBSFP_068730 株、ΔBSFP_068740 株、ΔChr3 株のコピー数

はそれぞれ 374 コピー、449 コピー、354 コピー、354 コピーであり、野生株の 48 コピーに対してそれぞれ 7.8 倍、9.4 倍、7.4 倍、7.2 倍であった。各破壊株におけるベクターのコピー数は野生株に比べて有意に高かった (図 38)。

pBBR122 以外のプラスミドにおいてもコピー数が増加するかどうかを確かめるために、RK2 プラスミドをベースとしたベクター-pRK2-P002050-BsChe-BsLif 用いて pBBR122 と同様の検討を行った。その結果、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株において、アガロースゲル上にプラスミドに由来する明確なバンドが見られ、pBBR122 だけでなく RK2 プラスミドにおいてもコピー数が向上することが示唆された (図 39)。

以上の結果から、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 を破壊することによりベクターのコピー数が向上することから、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 はベクターのコピー数の抑制に寄与していることが示唆された。そして、各破壊株でリコンビナント BsChe 生産量が向上したのはコピー数の増加が要因の一つとして考えられた。

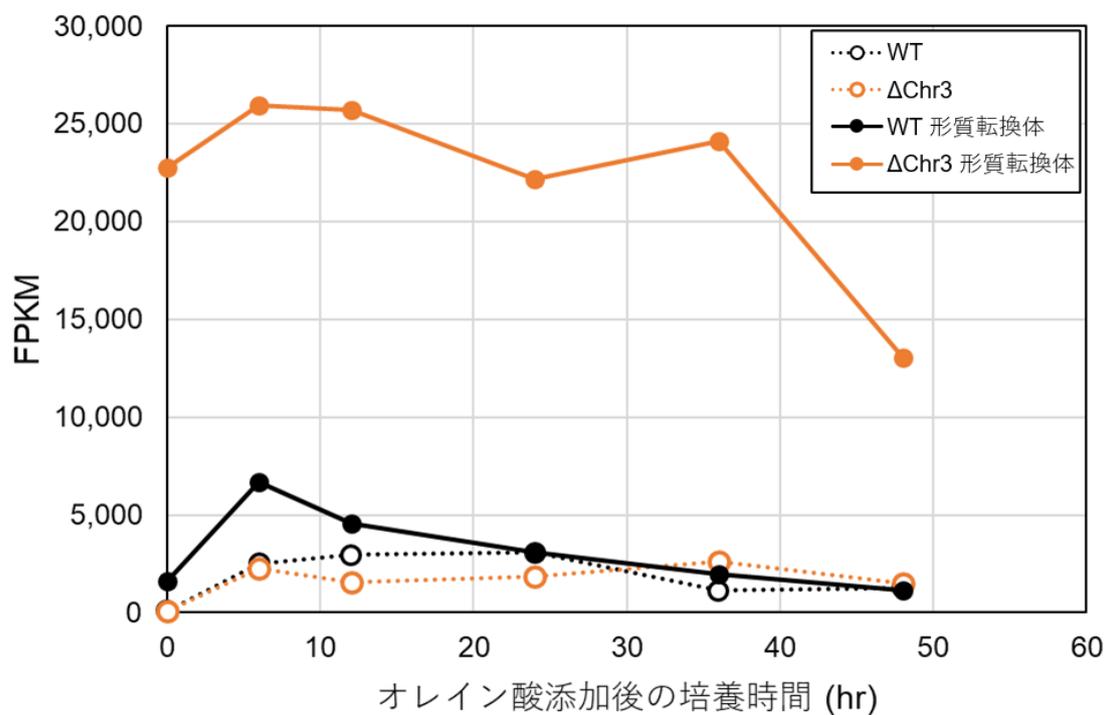


図 36. 各株における Che 活性と BsChe 転写量

オレイン酸添加後の培養上清における BsChe の mRNA 量 (FPKM) の変化。黒色塗りつぶしの丸は野生株、黒色の白抜きの丸は野生株に pP002050-BsChe-BsLif ベクターを導入した株、オレンジ色塗りつぶしの丸は Δ Chr3 株、オレンジ色の白抜きの丸は Δ Chr3 株に pP002050-BsChe-BsLif ベクターを導入した株の結果を表す。

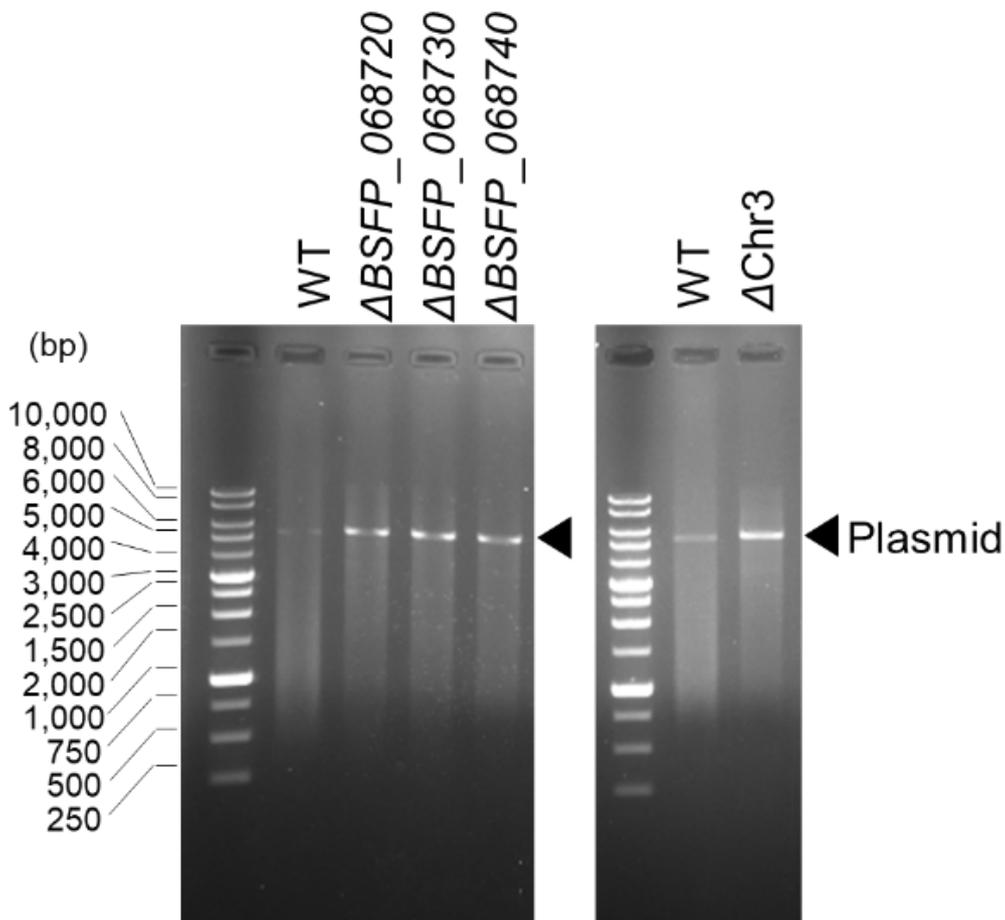


図 37. アガロースゲル電気泳動による pBBR122 濃度の確認

野生株 (WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pBBR122 を導入した形質転換体から抽出した pBBR122 を *Xho*I で消化した断片を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供した結果。アガロースゲルは、ミドリグリーンアドバンス (日本ジェネティクス社製) で染色した。pBBR122 は 5,304 bp であり、pBBR122 は黒い三角形で示した場所に見られる。野生株の形質転換体に比べ、各破壊株の形質転換体でバンドが濃いことから、pBBR122 の濃度が濃いと考えられる。

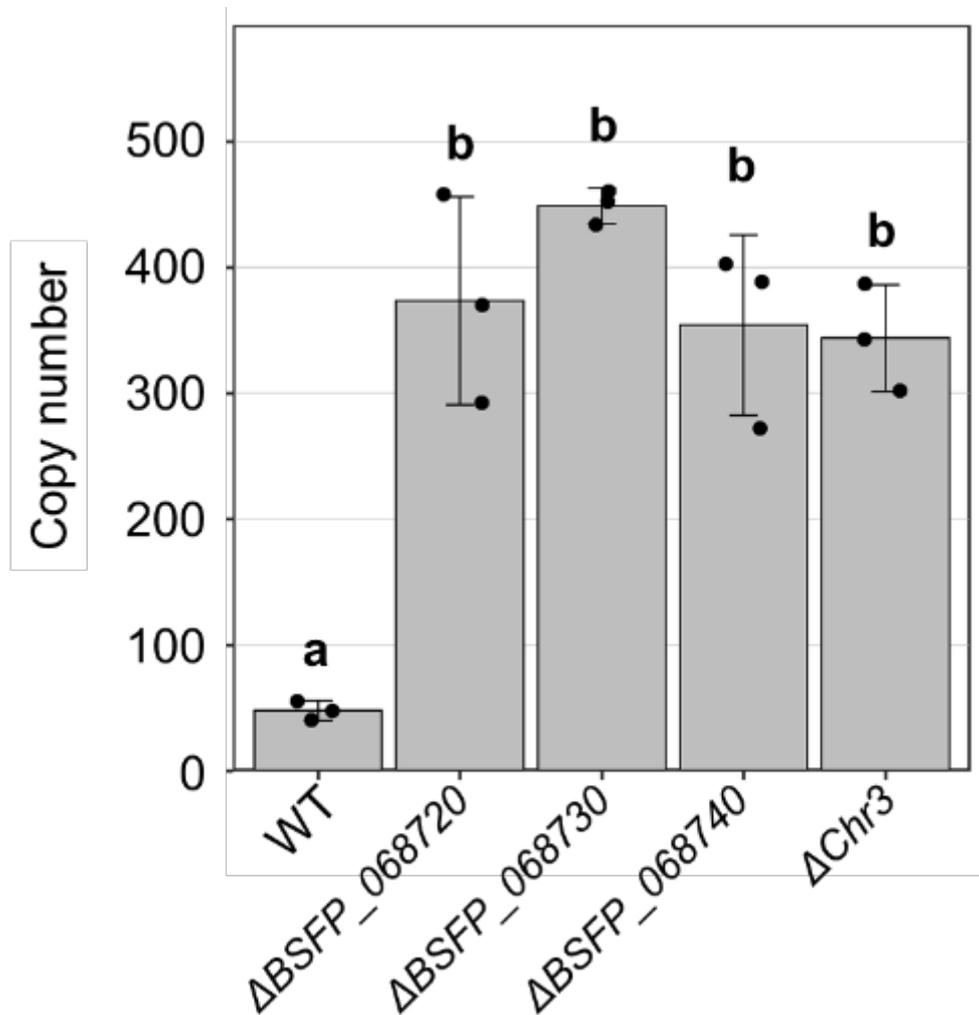


図 38. 各株における pBBR122 のコピー数

野生株 (WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pBBR122 を導入した形質転換体から抽出した pBBR122 を qPCR により定量した。実験は N=3 で行い、エラーバーは平均値 \pm SD で示した。統計的有意性は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。異なる文字は統計的に有意差があること示す($p < 0.05$)。

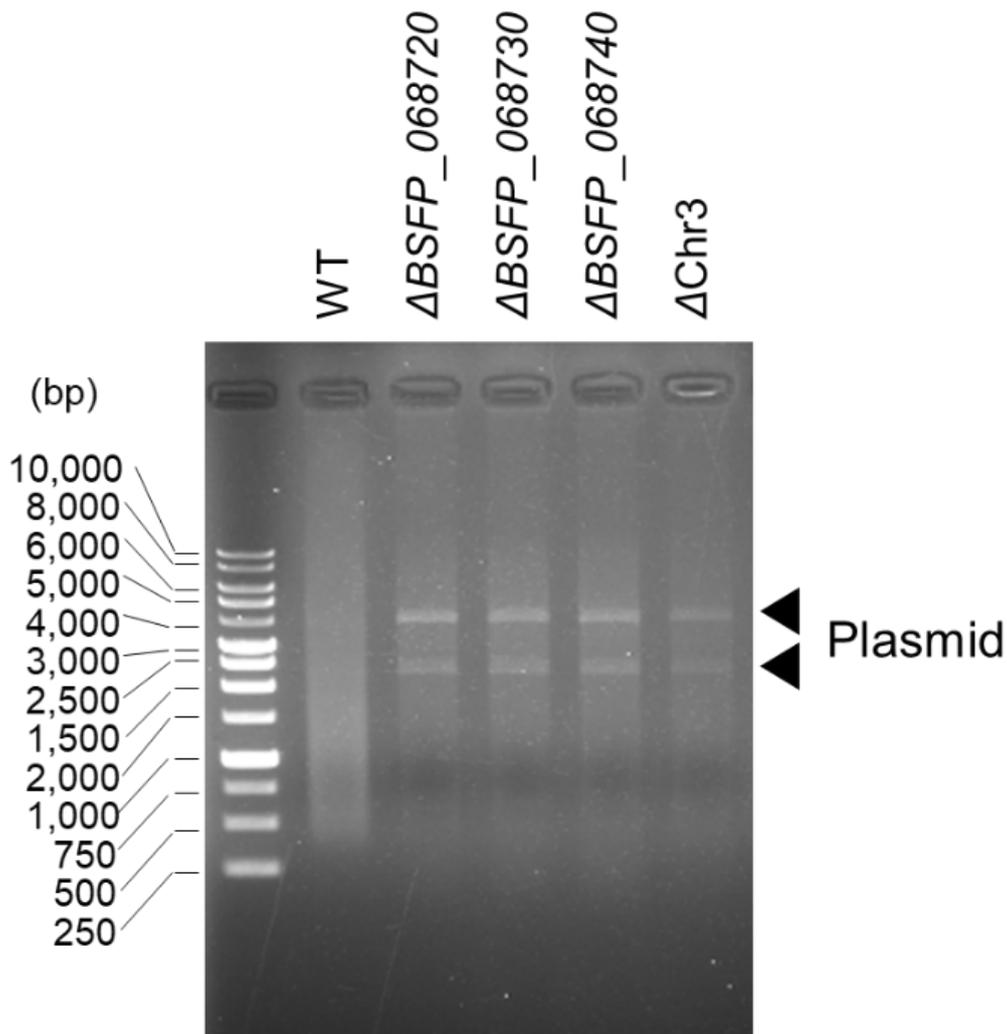


図 39. アガロースゲル電気泳動によるプラスミド濃度の確認

野生株 (WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pRK2-P002050-BsChe-BsLif を導入した形質転換体から抽出したベクターを *Xho*I で消化した断片を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供した結果。アガロースゲルはミドリグリーンアドバンス (日本ジェネティクス社製) で染色した。pRK2-P002050-BsChe-BsLif は *Xho*I で消化された場合、黒い三角形で示した 3804 bp と 2192 bp にバンドが見られる。野生株の形質転換体に比べ、各破壊株の形質転換体でバンドが濃いことから、pRK2-P002050-BsChe-BsLif の濃度が濃いと考えられる。

次に、プラスミドの安定性を確認した。発現ベクターである pBBR122-P002050-BsChe-BsLif を形質転換した Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株、野生株それぞれの形質転換体について、以下に示す方法でプラスミド保持アッセイを行った。 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株、野生株それぞれの形質転換体を、抗生物質を含まない LB 培地で 1 日、2 日、3 日間振盪培養した。この培養条件では培地に抗生物質を含まないため、選択圧が働かずプラスミドは脱落することが可能である。各日数培養後、カナマイシンを含む LB 寒天培地とカナマイシンを含まない LB 寒天培地に植菌し、CFU を計測した。カナマイシンを含む LB 寒天培地での CFU は発現ベクターを保有している細胞数を表し、カナマイシンを含まない LB 寒天培地での CFU はすべての細胞数を表す。そのため、プラスミド保持率は、カナマイシンを含む LB 寒天培地の CFU を、カナマイシンを含まない LB 寒天培地の CFU で割ることで算出した。LB 培地での培養後の発現ベクターを保有している野生株の細胞数は発現ベクターを保有している各破壊株の細胞数よりも有意に少ないことがわかった (図 40)。形質転換体のプラスミド保持率を計算すると、野生株はそれぞれ $6.7 \pm 0.4\%$ 、 $2.7 \pm 0.4\%$ 、 $1.4 \pm 0.3\%$ であり 10% 未満であったが、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株は、約 80-104% の保持率であり、各破壊株における発現ベクター保有率は野生株よりも有意に高かった。

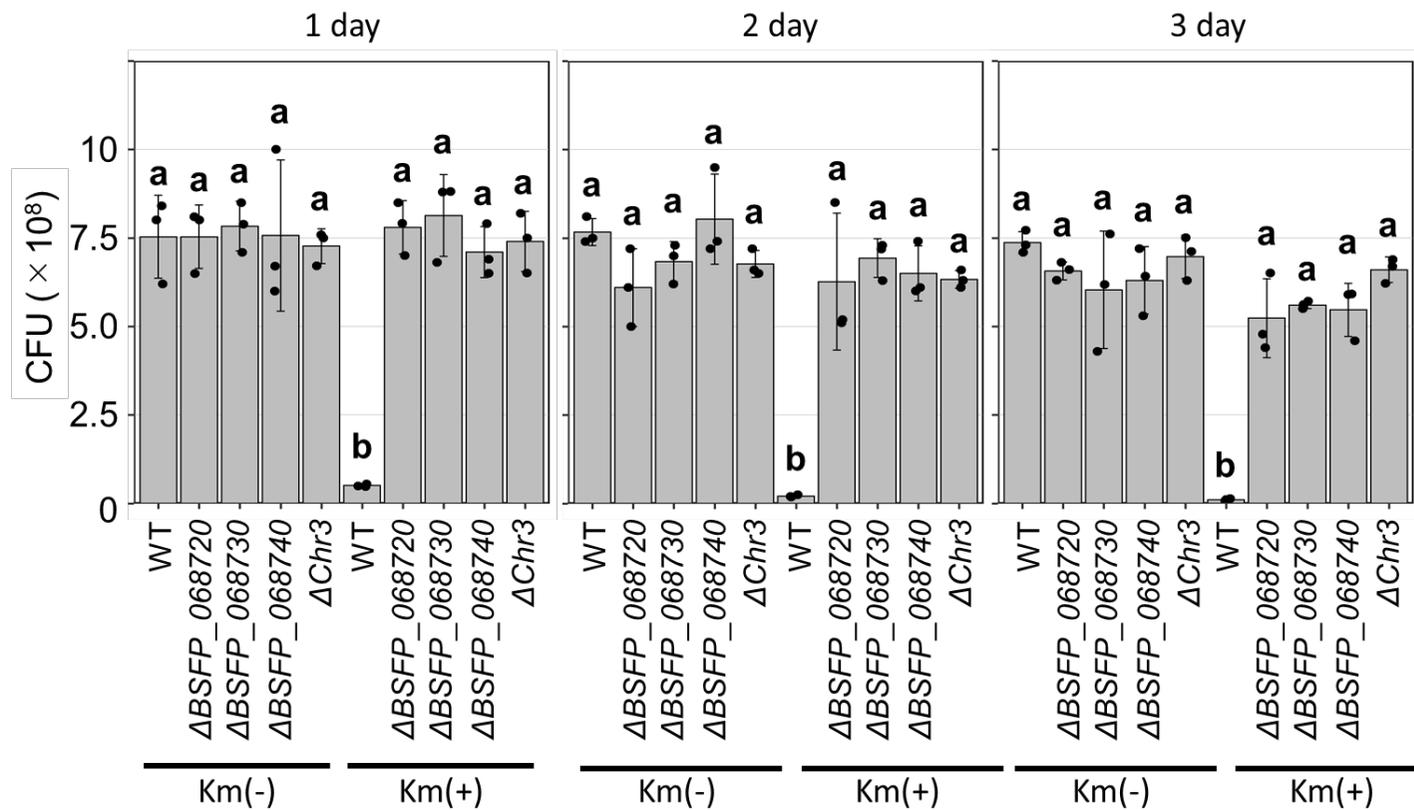


図 40. カナマイシンを含まない LB 培地で振盪培養後の CFU

野生株 (WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pP002050-BsChe-BsLif を導入した形質転換体を、カナマイシンを含まない LB 培地で 1 日 (1day)、2 日 (2day)、3 日 (3day) 間、振盪培養した後の CFU。Km(-)はカナマイシンを含まない培地、Km(+)^はカナマイシンを含む培地での CFU を表す。実験は N=3 で行い、エラーバーは平均値 \pm SD で示した。統計的有意性は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。異なる文字は統計的に有意差があること示す(p < 0.05)。

この結果から、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 を破壊することによりベクターの保持率が向上することから、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 はプラスミドの安定保持を妨げることが示唆された。

以上のように、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 はその機能が失われることにより発現ベクターのコピー数と安定性が増加することから、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 が外来プラスミドの排除を積極的に行っている可能性が示唆された。

*Mycobacterium smegmatis*由来 SMC 様タンパク質である EptABCD および *Pseudomonas aeruginosa* 由来 SMC 様タンパク質である JetABCD は、外因性プラスミドの形質転換効率を抑制する因子として最近報告されている (Deep et al. 2022; Doron et al. 2018; Panas et al. 2014; Snapper et al. 1990)。前述の機能予測の結果、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 は SMC タンパク質と相同性があることが示唆されたことから、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 においても、形質転換効率に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、野生株、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に pP002050-BsChe-BsLif をエレクトロポレーション法により導入し、形質転換効率を算出した。その結果、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株の形質転換効率は野生株よりも有意に低いことがわかった。一方、 Δ Chr3 株の形質転換効率は野生株と有意差が見られなかった (図 41)。

以上の結果から、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 は、EptABCD や JetABCD とは異なり、形質転換効率向上に寄与している可能性が示された。また、 Δ Chr3 株においては、形質転換効率は野生株と有意差は見られなかったが、これは Chr3 上の他の遺伝子が欠失したことにより BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 破壊の効果が失われたと考えられる。

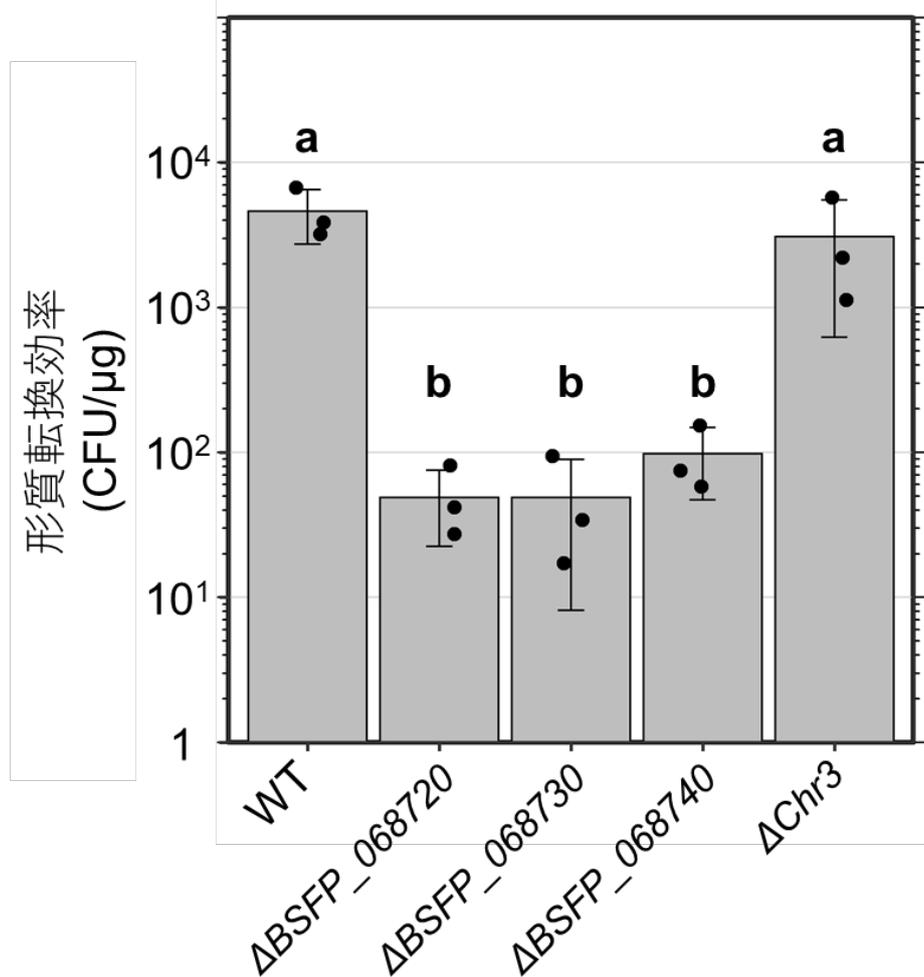


図 41. 各株における形質転換効率

pP002050-BsChe-BsLif を用いた野生株 (WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株における形質転換効率。実験は N=3 で行い、エラーバーは平均値 \pm SD で示した。統計的有意性は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。異なる文字は統計的に有意差があること示す ($p < 0.05$)。

2-3-5. BSFP_068720/30/40 の欠失は、Chr3 の安定性に影響しない

SMC タンパク質は細胞分裂期の染色体分離に関与しており、大腸菌の SMC タンパク質 (MukB) を破壊すると、破壊株は染色体をもたない細胞となることが報告されている (Nolivos and Sherratt 2014)。NTG 変異誘導を行った際、Chr3 欠損株が得られたことから、Chr3 は *B. stabilis* において必須ではなく、脱落しやすい可能性が考えられる。BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 が SMC タンパク質と同様の働きをしている場合、各破壊株は Chr3 を脱落する可能性が考えられたため、染色体保持アッセイを行った。

BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の各 1 回組換え体は、Chr3 上にある BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 各遺伝子の機能が pK18*mobsacB* の挿入により失われており、なおかつカナマイシン耐性を獲得している (図 20A)。そのため、これら 1 回組換え体において Chr3 が脱落すると pK18*mobsacB* の挿入領域ごとカナマイシン耐性遺伝子が脱落するため、カナマイシン感受性を示すようになると考えられる。ベクター保持アッセイと同様に、カナマイシンを含まない LB 培地で 1 日または 3 日間、振盪培養した後、LB 寒天培地に植菌して CFU を計測した。その結果、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の各 1 回組換え体はいずれも 3 日間の培養後でもカナマイシン耐性を有しており、このことから Chr3 は脱落していないと考えられた (図 42)。

以上の結果より、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 は、Chr3 の安定性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

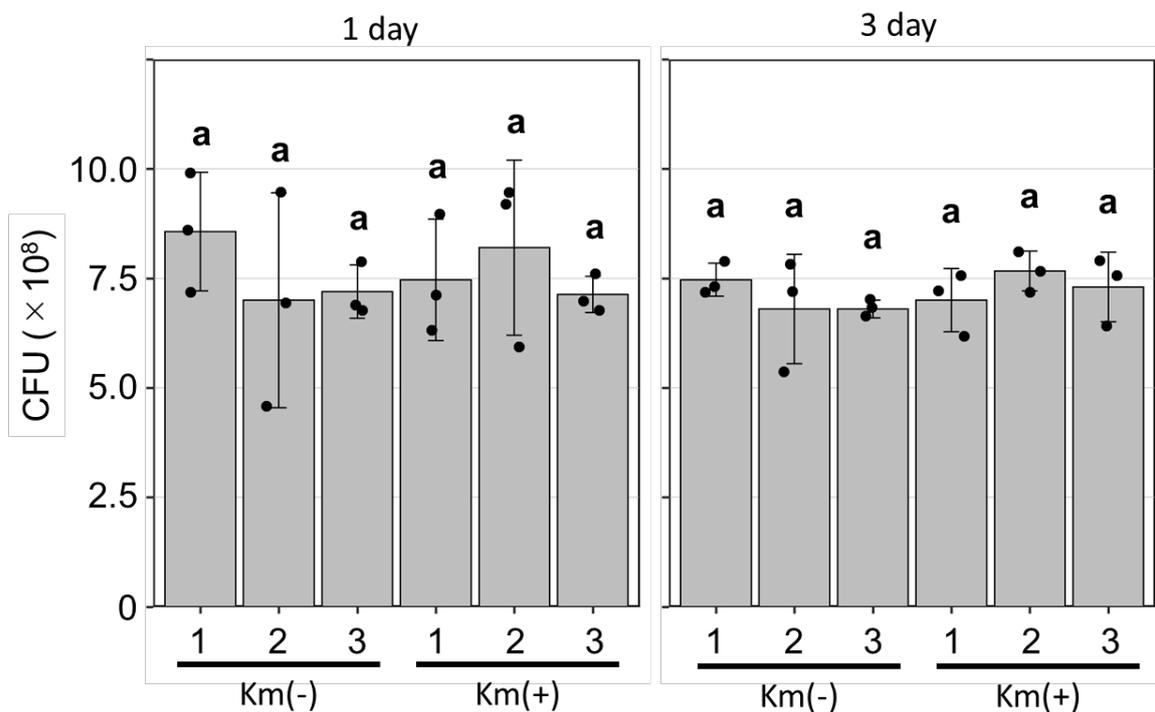


図 42. カナマイシンを含まない LB 培地で振盪培養後の CFU

BSFP_068720 (レーン 1)、BSFP_068730 (レーン 2)、BSFP_068740 (レーン 3) の各 1 回組換え体を、カナマイシンを含まない LB 培地で 1 日 (1day)、3 日 (3day) 間、振盪培養した後の CFU。Km(-)はカナマイシンを含まない培地、Km(+)はカナマイシンを含む培地での CFU を表す。実験は N=3 で行い、エラーバーは平均値 \pm SD で示した。統計的有意性は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。異なる文字は統計的に有意差があること示す($p < 0.05$)。

2-3-6. BSFP_068720/30/40 の破壊により、類縁酵素の生産性も向上する

BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740、および Chr3 の破壊が、BsChe 以外のリコンビナントタンパク質の生産量向上にも寄与するかを調べるために、*Burkholderia cepacia* 由来 Lip (BcLip) および *Burkholderia plantarii* 由来 Lip (BpLip) の発現検討を行った。BsChe と同様にリコンビナント BcLip、BpLip を pBBR122 ベクター上で P002050 プロモーターを用いて発現させ、培養上清の Lip 活性を測定した。ΔBSFP_068720 株、ΔBSFP_068730 株、ΔBSFP_068740 株、ΔChr3 株に各発現ベクターを導入した形質転換体の培養上清における BcLip 活性はそれぞれ 860.7、884.7、847.9、1435.6 U/mL であり、BpLip 活性はそれぞれ 942.0、984.2、799.2、676.1 U/mL であった。これらは、野生株 (BcLip: 178.7 U/mL、BpLip: 85.4 U/mL) と比較して、それぞれ 4.8、5.0、4.7、8.0 倍 (BcLip)、11.0、11.5、9.4、7.9 倍 (BpLip) であり、有意に高かった (図 43)。以上の結果から、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740、および Chr3 の破壊が、BsChe 以外のリコンビナントタンパク質の生産量向上にも寄与していることが示唆された。

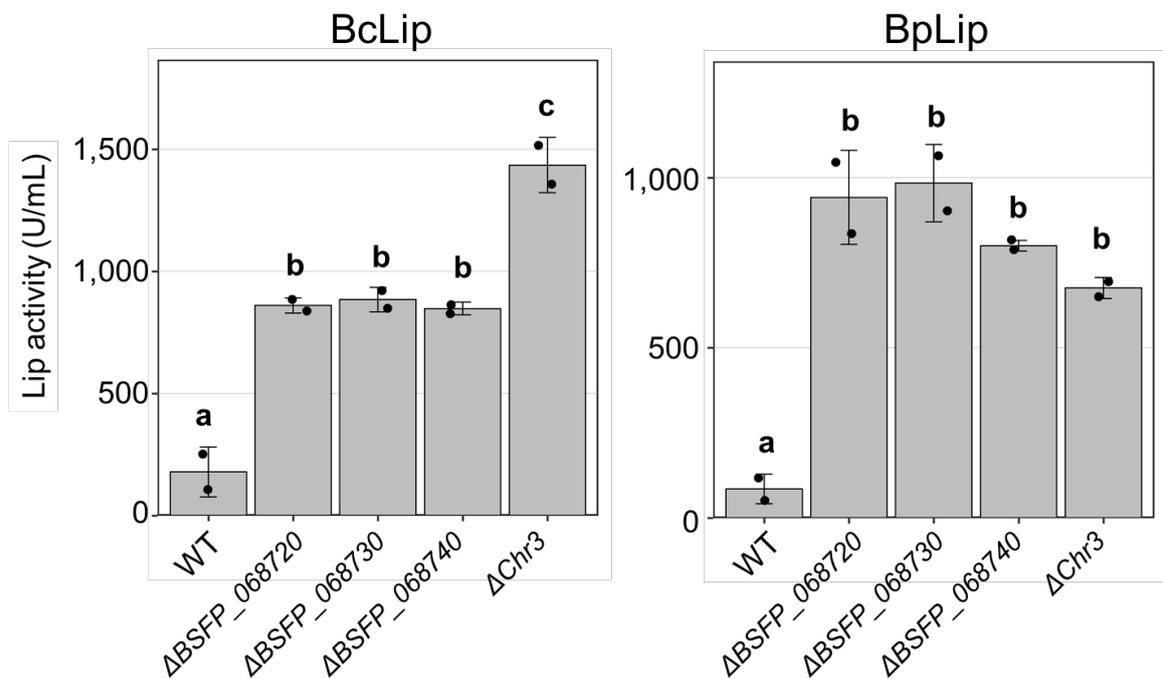


図 43. 各形質転換体における BcLip、BpLip 活性

野生株(WT)、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に各発現ベクターを導入した形質転換体の培養上清における BcLip および BpLip 活性を示す。実験は N=2 で行い、エラーバーは平均値 \pm SD で示した。統計的有意性は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey の Post hoc test で評価した。異なる文字は統計的に有意差があること示す($p < 0.05$)。

第4節 考察

2-4-1. Ch3 はリコンビナント BsChe の生産量抑制に寄与する

BsChe の生産量を向上させるためには BsChe の発現量を制御している転写因子等の責任遺伝子の特定が必要であると考え、まず野生株に対して NTG による染色体への変異導入を行った。その結果、BsChe の生産量に影響を与える責任遺伝子を特定するには至らなかったが、発現ベクターを導入することにより顕著に高い Che 活性を示す変異株を得ることができた。DNA-seq 解析の結果、この変異株では Chr3 が欠損していたことから、発現ベクター上の遺伝子の発現を抑制する因子が Chr3 上に存在し、リコンビナント BsChe の生産量を抑制していることが示唆された。また、 Δ Chr3 は通常の条件下で生育可能であったことから Chr3 は *B. stabilis* の生育に必須ではないことがわかった。Chr3 の欠失変異株は、一部の *Burkholderia* 属細菌において報告されており (Agnoli et al. 2012; Price et al. 2017)、*B. stabilis* においても Chr3 は脱落しやすいことがわかった。このことから、Chr3 上には生育上必須な遺伝子はコードされていないと考えられる。

B. stabilis は BsChe を分泌生産しているが、我々の以前の研究で BsChe の分泌は Chr1 上の Type II secretion system protein である GspF (図 6) を含むオペロンが関与していることが明らかにした。また、*B. stabilis* に BsChe 発現ベクターを導入した際の培養上清と可溶化上清のウェスタンブロッティングにより、BsChe は培養上清だけでなく可溶化上清にも検出された (図 10)。このことから、BsChe の分泌生産量向上に向けて Type II 分泌機構が律速となる可能性が考えられた。しかしながら、本研究において、Chr3、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 遺伝子のいずれかの破壊により BsChe 分泌生産量は劇的に向上した。このことから、*B. stabilis* の野生株における本研究で示した Che 生産レベルでは Type II 分泌機構は律速にはならないと考えられる。

2-4-2. BSFP_068720/30/40 はプラスミドのコピー数低下と安定性低下に寄与する

トランスポゾン変異導入を行い、リコンビナント BsChe の発現量を増加させる因子の同定を試みた。この結果、野生株よりも有意に高いリコンビナント BsChe 生産性を示す変異体が得られた。この株の変異点を DNA-seq 解析により同定したところ、Che 活性が高い上位の株において、オペロンを構成する 2 つの遺伝子 (BSFP_068720 と BSFP_068730) に共通の変異が見られた。BSFP_068720 と BSFP_068730 は BSFP_068740 とオペロンを形成しており、このオペロンが BsChe の生産量に影響を与えていることが示唆された。実際、各遺伝子の破壊株を作製し発現ベクターを導入した Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株は野生株に比べ 16.1 倍高い Che 活性を示した。

発現ベクターの導入により顕著な活性上昇がみられたことから、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 遺伝子から成るオペロンは、プラスミドのコピー数と安定性に関与している可能性が考えられた。そこで、各株のコピー数と安定性を確認したところ、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株の発現ベクターのコピー数は野生株の約 9.4 倍と野生株に比べて有意に高く、安定性も野生株に比べて有意に高いことがわかった。なお、 Δ Chr3 株はプラスミドコピー数が増加している点、プラスミド安定性が向上している点、組換え BsChe 生産量が向上している点すべてにおいて Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株と同じ表現型であったことから、 Δ Chr3 株表現型は Chr3 上にコードされた遺伝子群のうち BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の欠失により表現型が現れた可能性が考えられる。

pBBR122 とは異なるベクターでも同様の効果が得られるかを確認するために、pBBR122 とは別の RK2 プラスミドを用いて BsChe 生産量とコピー数を調べたところ、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株において、BsChe 生産量とコピー数の増加が見られた。RK2 は θ 型複製プラスミドである (Duan et al. 1999)。一方、pBBR122 の複製機構は未だ解明されていないが (Antoine and Lochter 1992)、以下の 4 つの特徴を有することから pBBR122 はローリングサークル (RC) 型複製プラスミドと考えられる。

(1) pBBR122 のニック領域は RC 型複製プラスミド pMV158 のニック領域と一致する (Szpirer et al. 2001)。

- (2) pBBR122 には *Staphylococcus* 由来の RC 型複製プラスミドである pC194 の DSO 領域 (Double-strand origin) および SSO 領域 (Single-strand origin) (Bikard et al. 2010; Wassenaar et al. 2016) と相溶性が高い領域が存在する (図 44)。
- (3) pBBR122 は多数の RC 型複製プラスミドに共通してみられる MOB 領域 (Mobile element) を有する (Ruiz-Masó et al. 2015)。
- (4) pBBR122 には θ 型複製プラスミドに特徴的にみられる DnaA ボックスや AT-rich 領域が存在しない。

以上から、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 によるプラスミドコピー数の抑制と安定性低下機構は、プラスミドの複製機構に依存しないことが示唆された。このような現象はこれまでに報告がなく新規な発見である。

プラスミド上の発現遺伝子の転写量を高く保つためには、プラスミドのコピー数と安定性に加えてプロモーターが恒常的に発現する必要がある。 Δ Chr3 株に発現ベクターを導入した株では、BsChe の mRNA 量が 36 時間まで高く保たれており (図 36)、本研究で使用した P002050 プロモーターは恒常的に働いていることが示唆された。一方、野生株に発現ベクターを導入した株では 12 時間以降に BsChe の mRNA 量の低下がみられたが、これはプラスミドの脱落の影響を受けていると考えられる。これらの結果から、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に発現ベクターを導入した株が顕著に高い BsChe 活性を示したのは、高いプラスミドコピー数と安定性を獲得した Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株に加え、恒常的に働く P002050 の組み合わせの相乗効果のためであると考えられ、この宿主発現ベクター系は *B. stabilis* におけるタンパク質発現において非常に有用であると考えられる。

DSO

pC194	TATTATCAAGATAAGAAAGA
pBBR122	TAATGTCATGATAATAATGG

SSO

pC194	ATTTTCTCGGCATAAATGC
pBBR122	ATTTTCTCTGGGAAAAGC

図 44. pC194 と pBBR122 の DSO 領域、SSO 領域の相同性

pC194 と pBBR122 の DSO 領域と SSO 領域の相同性を示す。黒い枠で完全一致している塩基を示した。pBBR122 は DSO 領域と SSO 領域と相同性が高い領域が存在する。

2-4-3. BSFP_068720/30/40 は従来の SMC タンパク質とは異なるメカニズムで働く

AlphaFold2 で予測した立体モデルに基づき、BSFP_068730 と BSFP_068740 は SMC 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。SMC タンパク質は原核生物から真核生物に至るまで広く保存されており、細胞分裂時の染色体の分離に関与していることが知られている。細菌由来の SMC タンパク質としては、現在までに MukBEF、SMC-ScpAB、MksBEF の 3 つのファミリーが知られている。MukBEF は大腸菌と *Gammaproteobacteria* に保存されており、その他のほとんどすべての細菌では SMC-ScpAB が保存されている。MksBEF は多くの病原性細菌を含む多様な細菌に保存されており、MukBEF もしくは SMC-ScpAB と同一ゲノム内に共に存在する。そして、MksB は複製部位に集まり細胞複製の開始を助けることが知られている (Hiraga et al. 1989; Nolivos and Sherratt 2014; Petrushenko et al. 2011; Zhao et al. 2020)。BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 は以下の 3 つの理由からこれまで見出された SMC タンパク質とは異なる可能性が考えられる。

- (1) *B. stabilis* には、SMC タンパク質と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子群が存在する。染色体分離に関与するとアノテーションされた 6 つの遺伝子 (BSFP_002120、BSFP_008030、BSFP_012470、BSFP_037270、BSFP_059150、BSFP_061680) と、すでに調べられている SMC タンパク質 (大腸菌由来 MukBEF、*Bacillus subtilis* と *Caulobacter crescentus* 由来 SMC-ScpAB) との相同性を確認した (表 15)。その結果、Chr1 上の 3 つの遺伝子 (BSFP_008030、BSFP_012470、BSFP_002120) はそれぞれ *B. subtilis* 由来 SMC、ScpA、ScpB と相同性が高かった (Identity はそれぞれ 29%、37%、41%)。この結果から、これらの 3 つの遺伝子は従来の SMC タンパク質として染色体の分離に寄与している可能性が考えられる。
- (2) SMC タンパク質は例えば大腸菌の MukBEF のように 3 つのタンパク質から構成されている。しかし、BSFP_068730 と BSFP_068740 はそれぞれ MukB と MukE に対応するが、BSFP_068720 は Type II DNA topoisomerase もしくは Small topoisomerase-primase domain protein と相同性が高く、MukF との相同性は見出されなかった。
- (3) BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 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した。

以上3つの理由から、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740はSMCタンパク質とは構造上の類似性を示すものの機能的には異なるSMC様タンパク質である可能性が示された。

これまでの研究で、プラスミド安定性に関連する因子として、Fプラスミドにおける *sopABC* システム、Rプラスミドにおける *parRMC* システムなどが知られている (Million-Weaver and Camps 2014)。*sopABC* システムはFプラスミド上の *sopA*、*sopB*、*sopC* 遺伝子がプラスミド安定性に関与し、染色体複製には全く関与しないことが報告されている (Tomizawa and Som 1984; Watanabe et al. 1992)。また、*parRMC* システムでは、DNA分配複合体を形成するためにプラスミド上の *parR*、*parM* 遺伝子と *parC* 領域が必要である。また、ColE1型プラスミド上にコードされる Rop タンパク質はプラスミド複製開始に関与していることが知られており、Rop タンパク質の欠失はプラスミドのコピー数を5倍程度増加させると報告されている (Cesareni et al. 1991; Tomizawa and Som 1984)。以上の通り、*sopABC* システム、*parRMC* システム、および ColE1 型プラスミド、いずれのシステムにおいてもプラスミドの安定性やコピー数の制御に関与する各種遺伝子や塩基配列領域はプラスミド DNA 上にコードされている。一方、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 は染色体上にコードされていることから、ゲノム上の遺伝子として様々なタイプの外来プラスミドの複製の抑制やプラスミド不安定性に関与している可能性がある。

表 15. *B. stabilis* における染色体分離にかかわると考えられるタンパク質

Gene	Location	Annotation	Number of amino acid residues
BSFP_002120	Chr1	SMC-Scp complex subunit ScpB	343
BSFP_008030	Chr1	Chromosome segregation protein SMC	1170
BSFP_012470	Chr1	Segregation and condensation protein A	290
BSFP_037270	Chr2	Chromosome segregation ATPase	122
BSFP_059150	Chr2	Condensation protein	453
BSFP_061680	Chr3	Chromosome segregation protein SMC	1156

MukBEF などの SMC タンパク質複合体は V 字型の構造をとり染色体 DNA と相互作用することが知られている。BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 から成る 3 者複合体も、他の SMC タンパク質複合体と同様、巨大な V 字型構造を形成してプラスミド DNA と相互作用している可能性が考えられる。一方、立体構造予測モデルから、BSFP_068720 は DNA topoisomerase、Primase、Ribonuclease と構造相同性が高く、触媒残基である Glu/Asp 残基も保存されていたことから、BSFP_068720 は V 字構造体に参加して、結合した DNA 鎖を切断する役割を担っているのかもしれない。

Mycobacterium smegmatis 由来 SMC 様タンパク質である EptABCD および *Pseudomonas aeruginosa* 由来 SMC 様タンパク質である JetABCD は、外因性プラスミドの形質転換効率を抑制する因子として最近報告されている (Deep et al. 2022; Doron et al. 2018; Panas et al. 2014; Snapper et al. 1990)。アミノ酸配列比較の結果、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 遺伝子は、それぞれ EptD/EptC/EptB、JetD/JetC/JetB に対応し、アミノ酸配列同一性は 18~26%であった (表 16、図 45)。

表 16. BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 と EptABCD/JetABCD の相同性

Query protein	Homologous protein	Similarity
EptA1	-	-
EptB1	BSFP_068740	20%
EptC1	BSFP_068730	26%
EptD	BSFP_068720	26%
JetA	-	-
JetB	BSFP_068740	18%
JetC	BSFP_068730	19%
JetD	BSFP_068720	22%

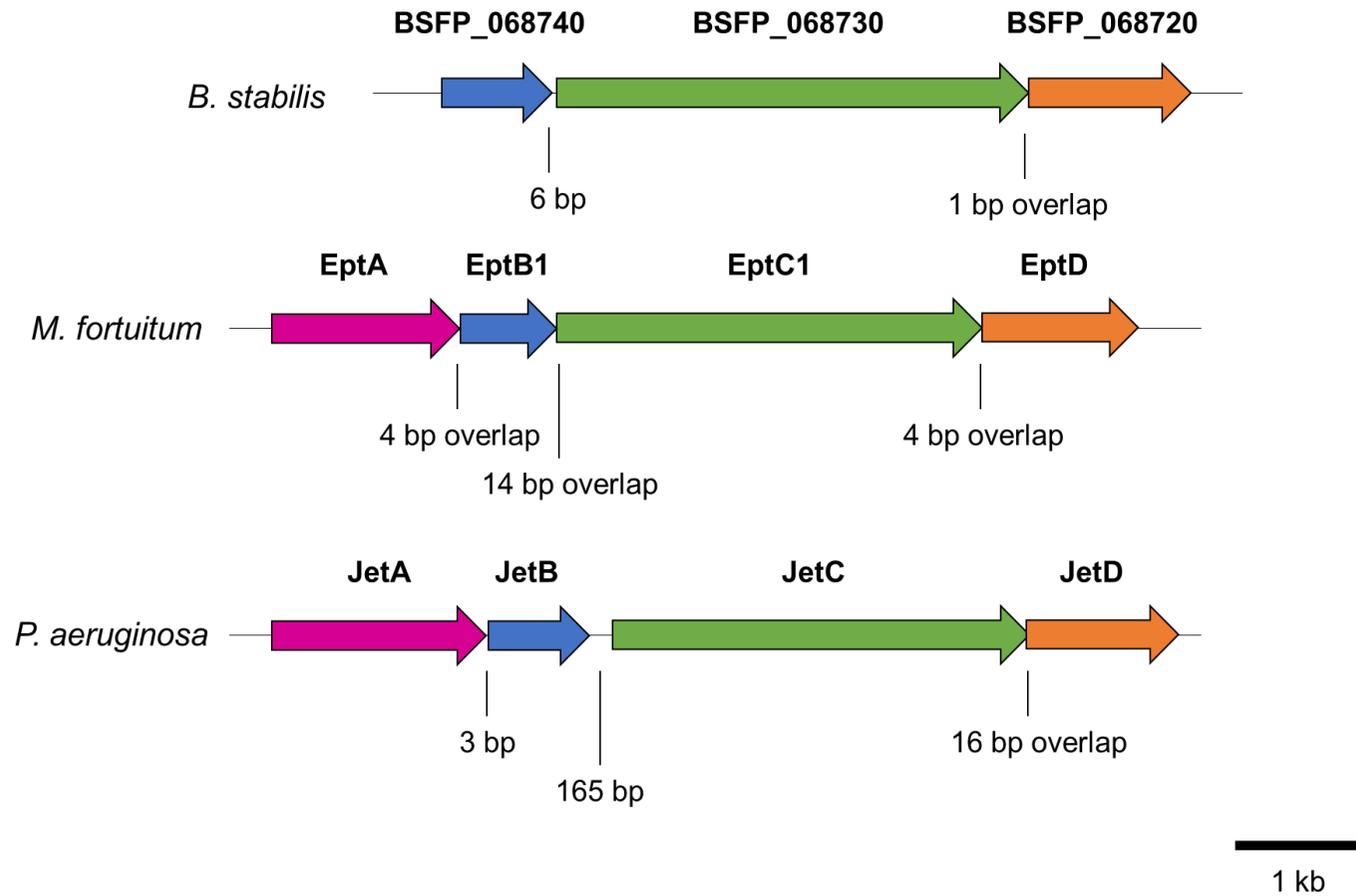


図 45. BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 と EptABCD、JetABCD のオペロン構造比較

対応する遺伝子を同じ色で示した。遺伝子間の距離および重複する塩基数を示した。

一方、SMC 様タンパク質であると考えられる BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 と EptABCD、JetABCD には2つの大きな違いが存在する。

- (1) MukF ホモログをコードする遺伝子 (EptA、JetA) は、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 オペロンには存在しない。
- (2) Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株は、外因性プラスミドによる形質転換効率が低下したが、EptABCD においては、EptC の破壊、JetABCD においては JetC または JetD の破壊により、外因性プラスミドの形質転換効率が向上したと報告がある (Deep et al. 2022; Panas et al. 2014)。このように、BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 の破壊と EptABCD、JetABCD の破壊では完全に逆の表現型を示した。

以上 2 点から、新たな SMC 様タンパク質である BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 は EptABCD オペロン、JetABCD オペロンと似た構造を取りながらも、EptABCD や JetABCD とは異なる仕組みを持ち、外来遺伝子の排除という新規な機能を有していることが示された。

B. stabilis では、0.9 Mb という大きなサイズの Chr3 の脱落が見られたように、遺伝子を積極的に排除する機構が備わっている可能性が考えられる。そして、その遺伝子排除機構により外来遺伝子の侵入から自身を防御している可能性が考えられる。一方、*Mycobacterium smegmatis* や *Pseudomonas aeruginosa* は遺伝子排除機構ではなく形質転換時に外来遺伝子からの防御を行っているのかもしれない。今回見出した SMC 様タンパク質である BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 により、さらなる SMC タンパク質の研究が促進されることが期待される。

2-4-4. まとめ

我々は BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 オペロンはプラスミドのコピー数低下と安定性低下に寄与していることを見出した。そのため、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株は、外来プラスミドのコピー数が高く安定に保たれるためリコンビナントタンパク質の生産に適していると考えられる。また、恒常的に発現する P002050 プロモーターをこれらの株と組み合わせて使用することでリコンビナントタンパク質を高生産できることを見出した。実際、 Δ BSFP_068720 株、 Δ BSFP_068730 株、 Δ BSFP_068740 株、 Δ Chr3 株 を用いた組換え発現系を用いて BsChe だけでなく、2 種類の *Burkholderia* 属由来 Lip (BcLip, BpLip) の高生産化に成功した (図 43)。

Burkholderia 属細菌には進化的に近縁な多数の Lip が保存されており、広い基質特異性と高い耐熱性、有機溶媒耐性を有することから工業的に有用な酵素であると考えられる。一方、その多くが自身のタンパク質に加えシャペロンタンパク質をその直後にコードしており、大腸菌等での組換え発現は困難であるものが多い。今回得られた宿主発現系を用いることで新たな機能を持った Che や Lip の高生産化が期待される。また、組換え Che および Lip を工業的に大量生産することにより、大幅な省エネルギー化の実現が期待される。

総括

我々は産業上非常に有用な酵素である Che と Lip に着目して研究を行った。

第一章では BsChe の結晶構造解析を通して、Leu266 と Ile287 が Che 活性に必要な残基であることを見出した。また、これらのアミノ酸残基に変異を加えることで、Che から Che 活性を失わせて Lip に改変したり、Che 活性を持たない Lip に Che 活性を付与したりすることが可能となった。この知見により遺伝子改変による新たな機能をもつ Che や Lip の創出が可能となった。一方、Che や Lip は組換え発現が難しい酵素である。そのため、遺伝子改変ができたとしても有用な新規 Che や Lip の大量生産は難しい。

そこで、第二章で我々はランダム変異実験と DNA-seq 解析を通して、Chr3 上の BSFP_068720、BSFP_068730、BSFP_068740 オペロンがベクターの不安定性、コピー数低下を介して外来遺伝子の排除に寄与していることを見出した。そしてこれらの遺伝子破壊株ではベクターのコピー数増加と安定化により組換えタンパク質発現量が劇的に向上することを見出した。この知見により、難生産であった Che や Lip の大量発現が可能となった。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工業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。

参考文献

- Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 2):213-21 doi:<https://doi.org/10.1107/s0907444909052925>
- Agnoli K, Schwager S, Uehlinger S, Vergunst A, Viteri DF, Nguyen DT, Sokol PA, Carlier A, Eberl L (2012) Exposing the third chromosome of *Burkholderia cepacia* complex strains as a virulence plasmid. *Mol Microbiol* 83(2):362-78 doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07937.x>
- Akram F, Mir AS, Haq IU, Roohi A (2022) An Appraisal on Prominent Industrial and Biotechnological Applications of Bacterial Lipases. *Mol Biotechnol* doi:<https://doi.org/10.1007/s12033-022-00592-z>
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20(4):470-5 doi:<https://doi.org/10.1093/clinchem/20.4.470>
- Antoine R, Loch C (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* 6(13):1785-99 doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01351.x>
- Bürmann F, Funke LFH, Chin JW, Löwe J (2021) Cryo-EM structure of MukBEF reveals DNA loop entrapment at chromosomal unloading sites. *Mol Cell* 81(23):4891-4906.e8 doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.10.011>
- Barbe S, Lafaquière V, Guieysse D, Monsan P, Remaud-Siméon M, André I (2009) Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins* 77(3):509-23 doi:<https://doi.org/10.1002/prot.22462>
- Bikard D, Loot C, Baharoglu Z, Mazel D (2010) Folded DNA in action: hairpin formation and biological functions in prokaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 74(4):570-88 doi:<https://doi.org/10.1128/mmlbr.00026-10>
- Calero-Rueda O, Plou FJ, Ballesteros A, Martínez AT, Martínez MJ (2002) Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *Biochim Biophys Acta* 1599(1-2):28-35 doi:[https://doi.org/10.1016/s1570-9639\(02\)00378-3](https://doi.org/10.1016/s1570-9639(02)00378-3)
- Cesareni G, Helmer-Citterich M, Castagnoli L (1991) Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet* 7(7):230-5 doi:[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90370-6](https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90370-6)
- Chen JC, Miercke LJ, Krucinski J, Starr JR, Saenz G, Wang X, Spilburg CA, Lange LG, Ellsworth JL, Stroud RM (1998) Structure of bovine pancreatic cholesterol esterase at 1.6 Å: novel

- structural features involved in lipase activation. *Biochemistry* 37(15):5107-17
doi:<https://doi.org/10.1021/bi972989g>
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34(17):i884-i890 doi:[10.1093/bioinformatics/bty560](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560)
- Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 1):12-21
doi:<https://doi.org/10.1107/s0907444909042073>
- Choi KH, Mima T, Casart Y, Rholl D, Kumar A, Beacham IR, Schweizer HP (2008) Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ Microbiol* 74(4):1064-75 doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.02430-07>
- Comte B, Franceschi C, Sadoulet MO, Silvy F, Lafitte D, Benkoel L, Nganga A, Daniel L, Bernard JP, Lombardo D, Mas E (2006) Detection of bile salt-dependent lipase, a 110 kDa pancreatic protein, in urines of healthy subjects. *Kidney Int* 69(6):1048-1055
doi:<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000133>
- Daligault HE, Davenport KW, Minogue TD, Bishop-Lilly KA, Broomall SM, Bruce DC, Chain PS, Coyne SR, Frey KG, Gibbons HS, Jaissle J, Koroleva GI, Ladner JT, Lo CC, Munk C, Palacios GF, Redden CL, Rosenzweig CN, Scholz MB, Johnson SL (2014) Whole-genome assemblies of 56 *Burkholderia* species. *Genome Announc* 2(6)
doi:<https://doi.org/10.1128/genomeA.01106-14>
- Deep A, Gu Y, Gao Y-Q, Ego KM, Herzik MA, Jr., Zhou H, Corbett KD (2022) The SMC-family Wadjet complex protects bacteria from plasmid transformation by recognition and cleavage of closed-circular DNA. *Mol Cell* doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.09.008>
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE (2016) HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 37(6):564-9
doi:<https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, Amitai G, Sorek R (2018) Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science* 359(6379) doi:<https://doi.org/10.1126/science.aar4120>
- Douzi B, Ball G, Cambillau C, Tegoni M, Voulhoux R (2011) Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *J Biol Chem* 286(47):40792-801 doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294843>
- Duan K, Liu Cq, Liu Yj, Ren J, Dunn NW (1999) Nucleotide sequence and thermostability of pND324, a 3.6-kb plasmid from *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53(1):36-42
doi:<https://doi.org/10.1007/s002530051611>

- Dubendorff JW, Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219(1):45-59 doi:[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90856-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90856-2)
- El Khattabi M, Van Gelder P, Bitter W, Tommassen J (2000) Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *J Biol Chem* 275(35):26885-91 doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M003258200>
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 4):486-501 doi:<https://doi.org/10.1107/s0907444910007493>
- Frenken LG, de Groot A, Tommassen J, Verrips CT (1993) Role of the lipB gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol Microbiol* 9(3):591-9 doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01719.x>
- Gilbert EJ (1993) *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb Technol* 15(8):634-45 doi:[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90062-7)
- Graille M, Cladière L, Durand D, Lecointe F, Gadelle D, Quevillon-Cheruel S, Vachette P, Forterre P, van Tilbeurgh H (2008) Crystal structure of an intact type II DNA topoisomerase: Insights into DNA transfer mechanisms. *Structure* 16(3):360-370 doi:<https://doi.org/10.1016/j.str.2007.12.020>
- Harvie NR (1977) Cholesteryl de-esterifying enzyme from *Staphylococcus aureus*: separation from alpha toxin, purification, and some properties. *Infect Immun* 15(3):863-70 doi:<https://doi.org/10.1128/iai.15.3.863-870.1977>
- Heaton NS, Sachs D, Chen C-J, Hai R, Palese P (2013) Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(50):20248-20253 doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1320524110>
- Hiraga S, Niki H, Ogura T, Ichinose C, Mori H, Ezaki B, Jaffé A (1989) Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J Bacteriol* 171(3):1496-505 doi:<https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1496-1505.1989>
- Holm L (2020) Using dali for protein structure comparison. *Methods Mol Biol* 2112:29-42 doi:https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0270-6_3
- Holm L, Rosenström P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W545-9 doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkq366>
- Hyun J, Treadwell CR, Vahouny GV (1972) Pancreatic juice cholesterol esterase. Studies on molecular weight and bile salt-induced polymerization. *Arch Biochem Biophys* 152(1):233-42 doi:[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(72\)90211-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(72)90211-1)
- Ihara F, Okamoto I, Akao K, Nihira T, Yamada Y (1995) Lipase modulator protein (LimL) of *Pseudomonas* sp. strain 109. *J Bacteriol* 177(5):1254-8 doi:<https://doi.org/10.1128/jb.177.5.1254-1258.1995>

- Ikegame S, Beaty SM, Stevens C, Won T, Park A, Sachs D, Hong P, Lee B, Thibault PA (2020) Genome-wide transposon mutagenesis of paramyxoviruses reveals constraints on genomic plasticity. *PLoS Pathog* 16(10):e1008877 doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008877>
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873):583-589 doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kabsch W (2010) Xds. *Acta Crystallogr* 66:125-132 doi:<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- Kamei T, Suzuki H, Matsuzaki M, Otani T, Kondo H, Nakamura S (1977) Cholesterol esterase produced by *Streptomyces lavendulae*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 25(12):3190-7 doi:<https://doi.org/10.1248/cpb.25.3190>
- Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Suh SW (1997) The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5(2):173-185 doi:[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00177-9)
- Köffel R, Tiwari R, Falquet L, Schneiter R (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Mol Cell Biol* 25(5):1655-68 doi:<https://doi.org/10.1128/mcb.25.5.1655-1668.2005>
- Konishi K, Kumagai T, Sakasegawa SI, Tamura T (2017) Complete genome sequence of *Burkholderia stabilis* FERMP-21014. *Genome Announc* 5(29) doi:<https://doi.org/10.1128/genomeA.00636-17>
- Kontkanen H, Tenkanen M, Fagerström R, Reinikainen T (2004) Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations. *J Biotechnol* 108(1):51-9 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.11.003>
- Kontkanen H, Tenkanen M, Reinikainen T (2006) Purification and characterisation of a novel steryl esterase from *Melanocarpus albomyces*. *Enzyme Microb Technol* 39(2):265-273 doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.013>
- Lang D, Hofmann B, Haalck L, Hecht HJ, Spener F, Schmid RD, Schomburg D (1996) Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 angstroms resolution. *J Mol Biol* 259(4):704-17 doi:<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0352>
- Lang DA, Manesse ML, de Haas GH, Verheij HM, Dijkstra BW (1998) Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem* 254(2):333-40 doi:<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540333.x>

- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9(4):357-359 doi:<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Luić M, Tomić S, Lescić I, Ljubović E, Sepac D, Sunjić V, Vitale L, Saenger W, Kojic-Prodić B (2001) Complex of *Burkholderia cepacia* lipase with transition state analogue of 1-phenoxy-2-acetoxybutane: biocatalytic, structural and modelling study. *Eur J Biochem* 268(14):3964-73 doi:<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02303.x>
- Maeda A, Mizuno T, Bunya M, Sugihara S, Nakayama D, Tsunasawa S, Hirota Y, Sugihara A (2008) Characterization of novel cholesterol esterase from *Trichoderma* sp. AS59 with high ability to synthesize steryl esters. *J Biosci Bioeng* 105(4):341-9 doi:<https://doi.org/10.1263/jbb.105.341>
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40(Pt 4):658-674 doi:<https://doi.org/10.1107/s0021889807021206>
- Mezzetti A, Schrag JD, Cheong CS, Kazlauskas RJ (2005) Mirror-image packing in enantiomer discrimination molecular basis for the enantioselectivity of B.cepacia lipase toward 2-methyl-3-phenyl-1-propanol. *Chem Biol* 12(4):427-37 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.01.016>
- Million-Weaver S, Camps M (2014) Mechanisms of plasmid segregation: Have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid* 75:27-36 doi:<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.07.002>
- Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 19(6):679-682 doi:<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30(16):2785-91 doi:<https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mukherjee M (2003) Human digestive and metabolic lipases—a brief review. *J Mol Catal B: Enzym* 22(5):369-376 doi:[https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00052-3)
- Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F, Vagin AA (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67(Pt 4):355-67 doi:<https://doi.org/10.1107/s0907444911001314>
- Noble ME, Cleasby A, Johnson LN, Egmond MR, Frenken LG (1993) The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett* 331(1-2):123-8 doi:[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80310-q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80310-q)
- Nolivos S, Sherratt D (2014) The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes. *FEMS Microbiol Rev* 38(3):380-92 doi:<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12045>

- Oerum S, Dendooven T, Catala M, Gilet L, Dégut C, Trinquier A, Bourguet M, Barraud P, Cianferani S, Luisi BF, Condon C, Tisé C (2020) Structures of *B. subtilis* maturation RNases captured on 50S ribosome with pre-rRNAs. *Mol Cell* 80(2):227-236.e5 doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.008>
- Ogino H, Inoue S, Yasuda M, Doukyu N (2013) Hyper-activation of foldase-dependent lipase with lipase-specific foldase. *J Biotechnol* 166(1):20-24 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.05.002>
- Okawa Y, Yamaguchi T (1977) Studies on sterol-ester hydrolase from *Fusarium oxysporum*. I. Partial purification and properties. *J Biochem* 81(5):1209-15 doi:<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131571>
- Padilla JE, Yeates TO (2003) A statistic for local intensity differences: robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59(Pt 7):1124-30 doi:<https://doi.org/10.1107/s0907444903007947>
- Panas MW, Jain P, Yang H, Mitra S, Biswas D, Wattam AR, Letvin NL, Jacobs WR (2014) Noncanonical SMC protein in *Mycobacterium smegmatis* restricts maintenance of *Mycobacterium fortuitum* plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(37):13264-13271 doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1414207111>
- Peters J, Onguri V, Nishimoto SK, Marion TN, Byrne GI (2012) The *Chlamydia trachomatis* CT149 protein exhibits esterase activity in vitro and catalyzes cholesteryl ester hydrolysis when expressed in HeLa cells. *Microbes Infect* 14(13):1196-204 doi:<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.020>
- Petrushenko ZM, She W, Rybenkov VV (2011) A new family of bacterial condensins. *Mol Microbiol* 81(4):881-96 doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07763.x>
- Pollero RJ, Gaspar ML, Cabello M (2001) Extracellular lipolytic activity in *Phoma glomerata*. *World J Microb Biot* 17(8):805-810 doi:<https://doi.org/10.1023/A:1013517116198>
- Price EP, Sarovich DS, Webb JR, Hall CM, Jaramillo SA, Sahl JW, Kaestli M, Mayo M, Harrington G, Baker AL, Sidak-Loftis LC, Settles EW, Lummis M, Schupp JM, Gillece JD, Tuanyok A, Warner J, Busch JD, Keim P, Currie BJ, Wagner DM (2017) Phylogeographic, genomic, and meropenem susceptibility analysis of *Burkholderia ubonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 11(9):e0005928 doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005928>
- Quyen DT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD (1999) High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. *Appl Environ Microbiol* 65(2):787-94 doi:<https://doi.org/10.1128/aem.65.2.787-794.1999>
- Renauld-Mongénie G, Cornette J, Mielcarek N, Menozzi FD, Loch C (1996) Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Bacteriol* 178(4):1053-1060 doi:<https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1053-1060.1996>

- Řezáčová P, Borek D, Moy SF, Joachimiak A, Otwinowski Z (2008) Crystal structure and putative function of small Toprim domain-containing protein from *Bacillus stearothermophilus*. *Proteins* 70(2):311-319 doi:https://doi.org/10.1002/prot.21511
- Robert X, Gouet P (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42(Web Server issue):W320-4 doi:https://doi.org/10.1093/nar/gku316
- Rosenau F, Tommassen J, Jaeger KE (2004) Lipase-specific foldases. *ChemBioChem* 5(2):152-61 doi:https://doi.org/10.1002/cbic.200300761
- Rúa L, Díaz-Mauriño T, Fernández VM, Otero C, Ballesteros A (1993) Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta* 1156(2):181-9 doi:https://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90134-t
- Ruiz-Masó JA, Machó NC, Bordanaba-Ruiseco L, Espinosa M, Coll M, Del Solar G (2015) Plasmid rolling-circle replication. *Microbiol Spectr* 3(1):Plas-0035-2014 doi:https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0035-2014
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145(1):69-73 doi:https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Schmidhauser TJ, Filutowicz M, Helinski DR (1983) Replication of derivatives of the broad host range plasmid RK2 in two distantly related bacteria. *Plasmid* 9(3):325-30 doi:https://doi.org/10.1016/0147-619x(83)90010-0
- Schrag JD, Li Y, Cygler M, Lang D, Burgdorf T, Hecht HJ, Schmid R, Schomburg D, Rydel TJ, Oliver JD, Strickland LC, Dunaway CM, Larson SB, Day J, McPherson A (1997) The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* 5(2):187-202 doi:https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00178-0
- Shamir R, Johnson WJ, Morlock-Fitzpatrick K, Zolfaghari R, Li L, Mas E, Lombardo D, Morel DW, Fisher EA (1996) Pancreatic carboxyl ester lipase: a circulating enzyme that modifies normal and oxidized lipoproteins in vitro. *The Journal of Clinical Investigation* 97(7):1696-1704 doi:10.1172/JCI118596
- Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR, Jr. (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 4(11):1911-9 doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02040.x
- Sugihara A, Shimada Y, Nomura A, Terai T, Imayasu M, Nagai Y, Nagao T, Watanabe Y, Tominaga Y (2002) Purification and characterization of a novel cholesterol esterase from *Pseudomonas aeruginosa*, with its application to cleaning lipid-stained contact lenses. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(11):2347-55 doi:https://doi.org/10.1271/bbb.66.2347

- Svendsen A, Borch K, Barfoed M, Nielsen TB, Gormsen E, Patkar SA (1995) Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Biochim Biophys Acta* 1259(1):9-17 doi:[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00117-u](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00117-u)
- Szipirer CY, Faelen M, Couturier M (2001) Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J Bacteriol* 183(6):2101-10 doi:<https://doi.org/10.1128/jb.183.6.2101-2110.2001>
- Takeda Y, Aono R, Doukyu N (2006) Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant *Burkholderia cepacia* strain ST-200. *Extremophiles* 10(4):269-77 doi:<https://doi.org/10.1007/s00792-005-0494-8>
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-4680 doi:<https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tóke ER, Nagy V, Recseg K, Szakács G, Poppe L (2007) Production and Application of Novel Sterol Esterases from *Aspergillus* Strains by Solid State Fermentation. *J Am Oil Chem* 84(10):907-915 doi:<https://doi.org/10.1007/s11746-007-1127-4>
- Tomizawa J, Som T (1984) Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein. *Cell* 38(3):871-8 doi:[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90282-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90282-4)
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28(5):511-5 doi:10.1038/nbt.1621
- Trodler P, Schmid RD, Pleiss J (2009) Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. *BMC Struct Biol* 9:38 doi:<https://doi.org/10.1186/1472-6807-9-38>
- Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31(2):455-61 doi:<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tsirigotaki A, De Geyter J, Šoštarić N, Economou A, Karamanou S (2017) Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev Microbiol* 15(1):21-36 doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.161>
- Uwajima T, Terada O (1976) Purification and properties of cholesterol esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Agric Biol Chem* 40(10):1957-1964 doi:<https://doi.org/10.1080/00021369.1976.10862345>
- Vagin A, Teplyakov A (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 1):22-5 doi:<https://doi.org/10.1107/s0907444909042589>

- Vaquero ME, Barriuso J, Martínez MJ, Prieto A (2016) Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(5):2047-61 doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7258-x>
- Vaquero ME, Prieto A, Barriuso J, Martínez MJ (2015) Expression and properties of three novel fungal lipases/sterol esterases predicted in silico: comparison with other enzymes of the *Candida rugosa*-like family. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(23):10057-67 doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6890-9>
- Verma N, Dollinger P, Kovacic F, Jaeger K-E, Gohlke H (2020) The membrane-integrated steric chaperone Lif facilitates active site opening of *Pseudomonas aeruginosa* lipase A. *J Comput Chem* 41(6):500-512 doi:<https://doi.org/10.1002/jcc.26085>
- Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng Q, Wortman J, Young SK, Earl AM (2014) Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9(11):e112963 doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
- Wassenaar TM, Ussery DW, Ingmer H (2016) The *qacC* gene has recently spread between rolling circle plasmids of *Staphylococcus*, indicative of a novel gene transfer mechanism. *Front Microbiol* 7:1528 doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01528>
- Watanabe E, Wachi M, Yamasaki M, Nagai K (1992) ATPase activity of SopA, a protein essential for active partitioning of F plasmid. *Mol Gen Genet* 234(3):346-52 doi:<https://doi.org/10.1007/bf00538693>
- Xiang H, Masuo S, Hoshino T, Takaya N (2007) Novel family of cholesterol esterases produced by actinomycetes bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1774(1):112-20 doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.11.001>
- Xiang H, Takaya N, Hoshino T (2006) Novel cholesterol esterase secreted by *Streptomyces persists* during aqueous long-term storage. *J Biosci Bioeng* 101(1):19-25 doi:<https://doi.org/10.1263/jbb.101.19>
- Yamaguchi T, Muroya N, Isobe M, Sugiura M (1973) Production and properties of lipase from a newly isolated *Chromobacterium*. *Agri Biol Chem* 37(5):999-1005 doi:<https://doi.org/10.1080/00021369.1973.10860802>
- Yang J, Koga Y, Nakano H, Yamane T (2002) Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. *Protein Eng* 15(2):147-52 doi:<https://doi.org/10.1093/protein/15.2.147>
- Yang W, He Y, Xu L, Zhang H, Yan Y (2016) A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *J Mol Catal B Enzym* 126:76-89 doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.005>

- Yoshida K, Konishi K, Magana-Mora A, Rougny A, Yasutake Y, Muramatsu S, Murata S, Kumagai T, Aburatani S, Sakasegawa SI, Tamura T (2019) Production of recombinant extracellular cholesterol esterase using consistently active promoters in *Burkholderia stabilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 83(10):1974-1984 doi:<https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1630256>
- Zhao H, Bhowmik Bijit K, Petrushenko Zoya M, Rybenkov Valentin V, Bowman Grant R (2020) Alternating dynamics of oriC, SMC, and MksBEF in segregation of *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *mSphere* 5(5):e00238-20 doi:<https://doi.org/10.1128/mSphere.00238-20>
- Zhou Y, Luo H, Liu Z, Yang M, Pang X, Sun F, Wang G (2017) Structural insight into the specific DNA template binding to DnaG primase in bacteria. *Sci Rep* 7(1):659 doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00767-8>

謝辞

本研究の進行にあたり、終始多大なご指導を賜った指導教官の田村具博先生に深く感謝申し上げます。

共同研究者である産業技術総合研究所の安武義晃さんには結晶構造解析に加え論文投稿へのご助言など多岐にわたってご指導いただきました。ここに感謝申し上げます。また、同じく共同研究者であった元産業技術総合研究所、現札幌医科大学 吉田圭太郎さんには特に宿主ベクターの開発にて多大なご助言をいただきました。ここに感謝申し上げます。産業技術総合研究所の油谷幸代さん、石谷孔司さんにおかれましても多大なご助言を賜りました。ここに感謝申し上げます。

旭化成ファーマ株式会社 診断薬製品部の酒瀬川信一さん、村松周治さんにおかれましては、本研究の遂行にあたり、多大なご指導を賜りました。ここに感謝申し上げます。また、多数の実験を実施いただいた同所属の村田里美さんに感謝申し上げます。

結晶 X 線回折データは、高エネルギー加速器研究機構（KEK；茨城県つくば市）のシンクロトロン放射光科学研究施設、Photon Factory (PF)の共同利用実験により取得しました。放射光実験において多くのサポートをいただいた PF ビームラインスタッフの皆様にお礼申し上げます。

なお、本研究は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務および助成業務（プロジェクトコード：P16009）、さらに日本学術振興会（JSPS）の科学研究費助成事業（助成番号: 21H05230）により得られたものです。