

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	細菌の生化学的特性に基づく in silico 酵素スクリーニング系の構築と検証
Title(English)	
著者(和文)	中村祐哉
Author(English)	Yuya Nakamura
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11488号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山田 拓司,伊藤 武彦,北尾 彰朗,本郷 裕一,平沢 敬
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11488号, Conferred date:2020/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

令和元年度

細菌の生化学的特性に基づく
in silico 酵素スクリーニング系
の構築と検証

東京工業大学 生命理工学院

生命理工学系 生命理工学コース

中村 祐哉

指導教員 山田 拓司 准教授

目次

第 1 章 序論	1
1.1 本論文の背景	1
1.1.1 微生物発酵生産	1
1.1.2 天然化合物の微生物発酵生産	2
1.1.3 持続可能な開発と微生物発酵生産	3
1.1.4 微生物発酵生産の課題	3
1.2 本論文の目的・構成	5
第 2 章 TILAMS; 遺伝子発現誘導によるスクリーニング系の構築と検証	6
2.1. 緒言	6
2.1.1. TILAMS; Time Lapse Analysis of Massive-RNA Sequences	6
2.1.2. レブリン酸	7
2.1.3. <i>meso</i> -ジアミノピメリン酸	7
2.2. 材料・方法	9
2.2.1 自然環境由来微生物群集サンプルの採取	9
2.2.2 自然環境由来微生物群集の培養とレブリン酸による集積培養	9
2.2.3 レブリン酸分解活性の測定	12
2.2.4 HPLC によるレブリン酸、及び <i>meso</i> -ジアミノピメリン酸の定量	12
2.2.5 微生物群集サンプルの経時的採取	12
2.2.6 mRNA 抽出・cDNA ライブラリの作成	13
2.2.7 メタトランスクリプトーム解析	15
2.2.8 候補遺伝子のスクリーニング	17
2.2.9 プライマーの設計	18
2.2.10 レブリン酸代謝候補遺伝子の発現プラスミドベクター構築	19
2.2.11 酵素活性	22
2.3. 結果	24
2.3.1 レブリン酸代謝酵素探索	24
2.3.1.1 レブリン酸による集積培養	24

2.3.1.2 集積培養サンプルのメタトランスクリプトームデータによる系統解析	25
2.3.1.3 集積培養サンプルのメタトランスクリプトーム解析	26
2.3.1.4 候補遺伝子の酵素活性測定	26
2.3.1.5 土壌サンプルのメタトランスクリプトームデータによる系統解析	29
2.3.1.6 土壌サンプルのメタトランスクリプトーム解析	29
2.3.2 <i>meso</i> -ジアミノピメリン酸代謝酵素探索	32
2.3.2.1 土壌サンプルのメタトランスクリプトームデータによる系統解析	32
2.3.2.2 土壌サンプルのメタトランスクリプトーム解析	32
2.4 考察	35
2.4.1 レブリン酸代謝酵素の反応について	35
2.4.2 レブリン酸に対する誤反応について	37
2.4.3 レブリン酸代謝可能な微生物について	38
2.4.4 <i>meso</i> -ジアミノピメリン酸代謝酵素の反応について	38

第3章 Enzyme Repositioning; 反応類似性による酵素探索法の構築と検証 39

3.1 緒言	39
3.1.1 Enzyme Repositioning	39
3.1.2 植物二次代謝化合物としてのヌートカトン	40
3.2 材料・方法	42
3.2.1 KEGGデータベースに含まれる植物特異的二次代謝反応の取得	42
3.2.2 植物特異的二次代謝反応に対する細菌代替酵素の反応類似性探索	42
3.2.3 E-zyme2による反応間類似性評価	43
3.2.4 細菌由来の代替酵素の系統的分布解析	45
3.2.5 植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の機能的分布解析	45
3.2.6 ヌートカトン合成酵素の探索	45
3.2.7 プラスミドベクター構築	46
3.2.8 酵素活性確認実験	48
3.2.9 GC/MSによるヌートカトンの検出	48
3.2.9 SCO3770の相補性試験	49
3.2.10 新規ヌートカトン合成酵素の配列相同性評価	51
3.3 結果	52
3.3.1 植物特異的二次代謝反応に対する細菌由来代替酵素の探索	52
3.3.2 植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の機能的分布解析	58
3.3.3 細菌由来の代替酵素の系統的分布解析	62

3.3.4 新規ヌートカトン合成酵素の発見	65
3.3.5 SCO3770の酵素活性評価	69
3.3.6 SCO3770の配列相同性評価	70
3.4 考察	71
3.4.1 Enzyme Repositioning法によるオーファン酵素反応の代替酵素の発見	71
3.4.2 植物特異的二次代謝反応の代替酵素を所有している細菌系統	71
3.4.3 SLIV_19455について	72
3.4.4 Enzyme Repositioning法の適用範囲	72
第4章 総括	74
<hr/>	
4.1 遺伝子発現誘導を利用した酵素探索法のまとめ	74
4.2 反応類似性を利用した酵素探索法のまとめ	74
4.3全体のまとめ	75
参考文献	77
謝辞	85
付録	86

目次

第2章

Figure 1	TILAMSによる新規酵素スクリーニング手順の概略図.....	8
Figure 2	多摩川河川サンプルと集積培養サンプルの増殖曲線とレブリン酸の代謝.....	24
Figure 3	集積培養サンプルの系統組成.....	25
Figure 4	レブリン酸代謝候補遺伝子の酵素活性測定.....	28
Figure 5	レブリン酸添加、及び不添加時の土壌サンプルの系統組成.....	30
Figure 6	<i>meso</i> -DAP添加、及び不添加時の土壌サンプルの系統組成.....	33
Figure 7	候補遺伝子によるレブリン酸代謝の反応予想図.....	36
Figure 8	レブリン酸とその類似化合物の構造.....	37

第3章

Figure 9	Enzyme Repositioningによる新規酵素スクリーニング手順の概略図.....	41
Figure 10	RDMパターンと部分構造プロファイル ((Moriya et al., 2016) より引用)	44
Figure 11	pIJ702Dのベクターマップ.....	47
Figure 12	pk18melCのベクターマップ.....	50
Figure 13	細菌によって代替可能な植物特異的二次代謝反応.....	53
Figure 14	植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の代謝機能的分布.....	59
Figure 15	植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の酵素分類分布.....	60
Figure 16	植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の酵素分類分布 (類似性スコア > 0.9)	61
Figure 17	細菌系統ごとの代替酵素を発見した植物二次代謝反応数の分布.....	63
Figure 18	細菌の代替酵素所有数とゲノムサイズとの関係.....	64
Figure 19	細菌系統ごとの代替酵素所有数とゲノム中の遺伝子数との関係.....	64
Figure 20	<i>S. coelicolor</i> A3(2)が代替可能な植物特異的二次代謝反応.....	66
Figure 21	SCO3770過剰発現株によるヌートカトン合成のガスクロマトグラフィー分析結果 ...	67
Figure 22	SCO3770過剰発現株によるヌートカトン合成のマススペクトロメトリー分析結果 ...	68
Figure 23	SCO3770の相補性試験結果.....	69

表目次

第2章

Table 1	自然環境由来微生物群集サンプルの詳細情報.....	9
Table 2	第2章で使用した実験用調製培地・試薬組成一覧.....	10
Table 3	プライマー作成条件.....	19
Table 4	Gflex PCR条件.....	22
Table 5	集積培養サンプル由来レブリン酸代謝候補遺伝子.....	27
Table 6	集積培養サンプル由来レブリン酸代謝候補遺伝子プライマー一覧.....	28
Table 7	土壌サンプル由来レブリン酸代謝候補遺伝子.....	31
Table 8	<i>meso</i> -DAPの添加によって誘導された遺伝子.....	34

第3章

Table 9	第3章で使用した実験用調整培地、試薬組成一覧.....	46
Table 10	<i>S. coelicolor</i> A3(2)由来ヌートカトン合成酵素候補遺伝子プライマー一覧.....	47
Table 11	KOD -Plus- Neo PCR条件.....	47
Table 12	GC/MS実行条件.....	48
Table 13	<i>SCO3770</i> 部分破壊遺伝子プライマー一覧.....	50
Table 14	PrimeSTAR PCR条件.....	50
Table 15	ガスクロマトグラフィー分析条件.....	51
Table 16	Enzyme Repositioning法による細菌代替酵素を検出したオーファン反応.....	54
Table 17	酵素分類におけるEnzyme Repositioning法の探索可能性への影響.....	57
Table 18	<i>S. coelicolor</i> A3(2)の持つヌートカトン合成酵素候補.....	66
Table 19	新規ヌートカトン合成酵素と既存のヌートカトン合成酵素の配列相同性.....	70

第1章 序論

1.1 本論文の背景

1.1.1 微生物発酵生産

人類は有史以前から、チーズや酒類の製造に微生物による発酵を利用して生活してきた。その詳細な仕組みもわからない頃から、人類は微生物の有用性に気づき活用してきたのである。この微生物発酵の仕組みである酵素の存在が明らかになったのは1833年のことで、このとき初めてPayenとPersozによってジアスターゼ（アミラーゼ）が発見された (Payen and Persoz, 1833)。これ以来、酵素に関する研究が少しずつ進められ、現在では5,000種類以上の酵素が発見・分類されている (McDonald and Tipton, 2014)。

日本における微生物の発酵の利用は、他国に比べ特に歴史が深い。日本は温暖湿潤な気候帯に属していることから、米や大豆の生産が盛んで、カビなどの微生物が繁殖しやすい環境にある。このため古くから、醤油や味噌、漬物、納豆など多様な発酵食品を生産し、微生物発酵の実用である醸造技術を大きく発展させてきた。その後、この優れた醸造技術に、近代の欧米で生まれた微生物学や分子生物学の知見がいち早く導入され、微生物の発酵による化合物の生産法が次々と開発された。その代表的な例が、グルタミン酸生産菌の発見による代謝制御発酵、微生物機能利用産業の発展である。1957年に、グルコースからグルタミン酸を直接生産できる細菌である *Micrococcus glutamicus* (Kinoshita et al., 1957) または *Micrococcus varians* (Asai et al., 1957)（これらの細菌は後に *Corynebacterium glutamicum* に統合 (LIEBL et al., 1991)）が発見された。その後、このグルタミン酸産生細菌に対し、脂肪酸合成の阻害 (Hoischen and Krämer, 1990; Takinami et al., 1963) やグルタミン酸の排出トランスポーターへの変異 (Nakamura et al., 2007) を導入することによりグルタミン酸の産生効率が向上することが発見された。現代ではこのグルタミン酸発酵技術を更に発展させ、様々なアミノ酸の発酵生産も進められている。

微生物発酵生産というと、一般にはどうしても発酵食品のイメージが強いが、実際には微生物は食品以外にも多様な化合物を生産することができる。中でも特に重要なのは、医薬品類の生産であろう。1929年にFlemingによりペニシリンが発見され (Fleming, 1929)、微生物が医薬学的に有用な化合物を生産することが広く知られている。これを皮切りに、これまでに様々な抗生物質、医薬品のリード化合物が

発見・生産されてきた (Bérdy, 2005; Bonnal et al., 2012; Demain and Sanchez, 2009)。特にアミノ酸や核酸、ビタミン類などの生体由来化合物の誘導体は、医薬品としての利用用途が広いが、光学異性体のように構造が複雑で有機化学的な合成が不向きなものも多い。微生物による発酵生産では、このような化合物も常温・常圧環境で安価に大量生産できるため、期待が高まっている。

1.1.2 天然化合物の微生物発酵生産

近年、微生物発酵生産が特に活躍すると目されているのが、天然化合物の生産である。天然化合物には様々な用途が存在し、食品や医薬品として利用されることが多い。また、これ以外にも香料や化粧品、化成品の原料などにも利用され、現代の日常生活に欠かせないものとなっている。天然化合物の中には、希少で高価な化合物も多い。例えば、抗インフルエンザウイルス剤タミフル (F. Hoffmann-La Roche Ltd) の原料であるシキミ酸は八角に含まれる成分であるが、直接抽出では取得できる量が微量なため、タミフルの需要に追いついていなかった。

天然化合物の生産方法としては、生物の体内で合成された化合物を直接抽出する方法が一般的である。しかし、直接抽出による化合物の利用には、特に希少な原料である場合、資源枯渇の問題が存在する。実際にインドの伝統的医学の薬品の原料である Ashtawarga は、絶滅危惧種のレッドリストに挙げられており、その利用が困難になっている (Virk et al., 2015)。また、天然香料の一種である麝香 (じゃこう) は、かつてはジャコウジカを屠殺して取得されていたが、現在は絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約 (ワシントン条約) によって取引を禁止されている。また、抽出生物が動物である場合は、屠殺に限らずその方法によっては、動物虐待の問題も存在する。抽出生物が植物である場合は、気候変動によって安定的な供給が難しい可能性が指摘されている。Costinot らによって実施されたシミュレーション研究によれば、農業市場に対する気候変動の影響は、総作物の約6分の1になると報告されている (Costinot et al., 2016)。

天然化合物生産において、生物からの直接抽出を避けるために、人工的に合成する方法の開発も進められている。このうち最も一般的な方法は有機化学合成で、安定的に化合物を生産することができる。しかし、天然化合物の多くは立体異性体や光学異性体などを含む複雑な構造を持つ。あるいは、ペプチドやヌクレオチドのように、分子量が非常に大きいこともある。このため、天然化合物を有機合成によって生産することは困難なことが多い。先に例を上げたシキミ酸であれば、その前駆体化合物を有機化学的に合成するために、原料化合物から11段階の反応 (このうちの大半は官能基の保護に関する反応) (Yeung et al., 2006) を必要とするため、最終的な収量が非常に微量で、工業的に大量生産するには至らなかった。また、天然化合物の有機合成では、危険な触媒や高温・高圧環境を必要とすることも多

い。シキミ酸の場合は、環境負荷の高い重金属を触媒として利用する反応が2反応含まれている (Yeung et al., 2006)。

天然化合物生産において、直接抽出、及び有機合成の両者の課題を解決可能な方法が、微生物発酵生産である。微生物発酵生産の主体である酵素は特異性が高く、化合物に対して特定の位置だけを選択的に反応させることができる。このため、有機合成における官能基の保護などの必要がなく、少ない手順で合成が可能である。また、微生物発酵は生物の培養条件で反応が進められるため、危険な触媒や高温・高圧環境を必要とせず、安全に大量生産することが可能である。さらに、天然化合物は元々何らかの生物が酵素によって生産している化合物であるため、同様に酵素を用いることで人工的に合成することができる可能性も高い。シキミ酸も、近年微生物発酵を用いてコーヒー粕から効率的に生産することが可能になった (ADACHI et al., 2008; Adachi et al., 2008)。

1.1.3 持続可能な開発と微生物発酵生産

現在、日常生活で用いられているエネルギー、化成品のほとんどは、化石燃料をもとに生産されている。しかし近年では、持続可能な開発が重要視され、化石燃料に依存しない、低炭素社会の構築が求められている。そこで注目されているのが、微生物発酵生産である。微生物発酵生産では化石燃料を原料とせずに、バイオマスから様々な化合物を生産することができる。その代表的な例がバイオエタノールである。バイオエタノールは、アルコール発酵に関する酵素機能を効率化された微生物により、トウモロコシなどの作物から生産される (Gupta and Verma, 2015)。最近では、原料が食料と競合しないように、非過食バイオマス（セルロース）を原料に用いたエタノールの生産も進められている (Gupta and Verma, 2015)。また、非過食バイオマスの利用はエタノールだけでなく様々な化合物に波及している。1997年には、非過食バイオマス中のフェルラ酸からバニラの香料として利用されるバニリンの生産方法が開発された (Faulds et al., 1997)。他にも、2001年には非過食バイオマス中のキシロースから乳酸を発酵生産する方法が開発されている (Dien et al., 2002)。

1.1.4 微生物発酵生産の課題

これまでに述べてきたとおり、微生物発酵生産は社会的に非常に重要な技術であり、その発展が望まれている。しかし、その広範な利用には様々な課題が存在する。その課題の中心にあるのは、生物の酵素反応について未解明な部分が多いことである。微生物発酵によって、目的の化合物を生産、あるいは分解するためには当然酵素が必要である。しかし、この酵素の種類は現時点で ~10,000種類程度しか発見されていない。一つの酵素が複数の反応を触媒するとしてもたかだか数万反応である。これに対し、

化合物の種類は、世界的に利用されている化合物データベースであるCAS Registry Numberにおいて、現在159,000,000種以上登録されている。このため、ある目的の化合物を生産したい場合に、そのために必要な酵素が既に発見されている可能性は非常に低い。そして、酵素が未発見の場合は新たに対応する酵素を探索する必要があるが、この酵素探索こそが、微生物発酵生産の最大のボトルネックとなっている。

自然界からの新規酵素の探索に掛ける時間と労力と経費は非常に多大である。その理由としては、自然環境中には数え切れないほどの微生物が存在し、しかもそのほとんどは未だに培養に成功していないことが挙げられる。この超大量の遺伝子リソースの中から、目的にあった酵素を探し出すのは非常に難しい。このため、多くの微生物の持つ酵素は未だその正確な機能が不明であり、実験することも困難であった。そこで近年では、メタゲノミクスを応用することで、酵素探索を行う方法（メタゲノム法）が開発され、多くの研究で利用されている (Jiang et al., 2011; Maimanacos et al., 2016; Popovic et al., 2017)。これは、環境中の未培養を含む微生物群集からDNAを抽出してライブラリ化し、組換えタンパク質として発現させた時の酵素活性を指標に、目的の酵素遺伝子をスクリーニングする方法である。これによって、環境中に存在する多様な微生物の持つ数多の遺伝子の中から、目的の酵素遺伝子を探索することができる。また2004年には、Uchiyamaらによって、基質による遺伝子発現誘導性を指標にスクリーニングを行うSIGEX法も開発されている (Uchiyama et al., 2005)。しかし、これらのスクリーニング方法は、いずれも組換えタンパク質の発現や酵素活性の測定に実験的な手順を必要とするため、多大な時間と労働力がかかってしまう。さらに、酵素遺伝子を特定の宿主細菌で発現させる場合、遺伝子発現の宿主依存性といった実験的な制約も存在する。遺伝子発現の宿主依存性とは具体的には発現量の低下や、フォールディングなどの影響で、酵素が本来の機能を発揮できない状態になってしまう問題である。これらの問題点から、現在では、メタゲノム法に代わるより簡易で制約の少ないスクリーニング方法が求められている。

また、既に酵素が発見されている場合でも、その酵素がそのまま利用できるとは限らない。例えば、ある植物由来の天然化合物を合成したい場合に、その植物の酵素が発見されているとする。このような場合、植物を培養してこの酵素を利用することと、微生物でこの酵素を発現させて利用することの二通りが考えられる。前者が可能であれば問題ないが、植物による発酵生産は難しい。植物は細菌に比べ増殖速度が遅いことに加え、細胞壁を持つため固着性が高く凝集してしまうためである (Hellwig et al., 2004)。後者でも遺伝子を微生物で発現させて酵素が活性を持てばよいが、宿主依存性の問題で多くケースでは活性が得られない。そこで、このような場合は、現在では配列類似性探索を利用することが多い。この方法は、既に発見されている酵素の塩基配列・アミノ酸配列を用いて、酵素・遺伝子データベースに対して配列相同性探索することで、よく似た酵素・遺伝子を探索する手法である。しかし、この手法では条件が厳しく、発見できる可能性が低い。特に植物酵素に類似の細菌酵素を探すような生物系統ド

メインをまたいだ条件である場合、進化的に遠いためほとんど配列が保存されておらず、発見しづらい問題がある。そこで、生物系統ドメインをまたいだ場合でも同様の機能を持つ酵素を探索する手法も必要とされている。

1.2 本論文の目的・構成

1.1の背景の通り、これまで、そしてこれからの社会に向けて微生物発酵生産は極めて重要な技術と言える。しかし、この技術の重大なボトルネックとして酵素探索の非効率性が挙げられる。メタゲノム法など、これまでに開発されてきた酵素探索手法の多くは、実験的な手順が大部分を占めており、これが非効率性の中心にあると考えられる。そもそも、自然環境中に無数にある遺伝子資源を手作業で探索することは非合理的である。そこで、本研究ではバイオインフォマティクスの技術を活用することで、計算機による*in silico* スクリーニング系を開発し、メタゲノムを含む膨大な酵素遺伝子リソースから効率よく目的の酵素を探索することを目指した。この詳細な方法とその開発・検証について、第2章で述べていく。続いて第3章では、1.1.4で述べた、酵素探索に付随する重要な課題である、生物系統ドメインをまたいだ場合の類似酵素の探索を目指し、その詳細な方法と、開発・検証について述べる。第4章では以上の結果を総括し、今後の展望を述べる。

第2章 TILAMS; 遺伝子発現誘導によるスクリーニング系の構築と検証

2.1 緒言

第1章で述べたように、微生物発酵生産は社会的に非常に重要な技術であり、その発展のためにメタゲノム法に代わる、より簡易なスクリーニング手法が求められている。そこで本章では、メタトランスクリプトーム解析を活用した新たなスクリーニング手法「TILAMS」を提案し、レブリン酸、*meso*-ジアミノピメリン酸 (*meso*-DAP) を用いて、その構築と検証を行った。

2.1.1 TILAMS; Time Lapse Analysis of Massive-RNA Sequences

TILAMS (Time Lapse Analysis of Massive-RNA Sequences; 大量RNA配列経時解析) では、原核生物の遺伝子の制御システムに注目し、これを利用して新規酵素のスクリーニングを行う。原核生物は一般的に機能的に関連する遺伝子をオペロンとしてゲノム中に連続して保有している。そして、この遺伝子群は同一の転写因子によって制御されている。原核生物では、常に発現しているハウスキーピング遺伝子と呼ばれる遺伝子とそれ以外の遺伝子が存在し、多くの遺伝子は不要な状態では発現しない。このため、ある化合物に対して細菌が代謝を行う場合、この転写因子が化合物と相互作用し、一連の代謝酵素遺伝子を発現誘導する。本手法では、この原核生物の発現誘導の仕組みを利用し、化合物に対する代謝酵素の探索を行う。

次に、TILAMSによる細菌が持つ目的の化合物の代謝酵素スクリーニングの手順を説明する。TILAMSの概略図をFigure 1に示す。TILAMSでは、ある化合物（以降、ターゲット化合物と呼ぶ）に対する代謝酵素を以下の手順により、高スループットにスクリーニングすることが可能である。

1. 自然環境中から取得した細菌群集に対し、ターゲット化合物を添加、及び非添加のサンプルを用意する。
2. 1.の両サンプルから経時的にmRNAを抽出し、cDNAに逆転写する。
3. 次世代シーケンサーによりcDNA配列を大規模に解読する。
4. ターゲット化合物の添加、非添加サンプルを比較解析し、ターゲット化合物の添加時に発現量が変動した遺伝子を抽出する。

5. バイオインフォマティクスによる各種解析により、偽陽性遺伝子の除去、ターゲット化合物の分解酵素候補を取得する。
6. 酵素活性確認実験により真に活性のある酵素を取得する。

TILAMSでは、自然環境中から取得した細菌群集に直接ターゲット化合物を作用させ、遺伝子の発現量を測定するため、従来のメタゲノムスクリーニングの課題であった、特定の細菌を宿主として利用することによる遺伝子発現、酵素機能の制限を考慮する必要がない。したがって、TILAMSは、次世代シーケンサーの利用とバイオインフォマティクスの利用による高スループット性と、特定の宿主生物に依らない独立性を併せ持つ手法であり、第1章で指摘したようなメタゲノムスクリーニングのボトルネックをすべて解消していると言える。

2.1.2 レブリン酸

レブリン酸は、近年、工業上利用価値の高い基礎化合物として注目されている物質である。2004年には、アメリカ合衆国エネルギー省の発表したバイオリファイナリーに使用する有用な12の化合物にも選定された (Werpy and Petersen, 2004)。レブリン酸は、非可食バイオマス（セルロースなど）を原料として触媒変換によって容易に生産でき、合成繊維やプラスチック、燃料添加剤などの様々な製品の原料となる。現在の工業上では、触媒を用いて化学的にレブリン酸から他の有用化合物に変換されている。一方で、レブリン酸の微生物発酵による利用は、ほとんど進んでいない。レブリン酸を資化する微生物は数件報告されており (Habe et al., 2015)、それらの微生物を利用すれば、酵素タンパク質によるレブリン酸の変換も可能になると考えられるが、具体的なレブリン酸代謝経路は未だ解明されておらず、関与する遺伝子も不明であった。そこで、本研究ではレブリン酸をターゲット化合物としてTILAMSによる酵素スクリーニングを行い、レブリン酸の代謝酵素の発見を目指した。

2.1.3 *meso*-ジアミノピメリン酸

生物に含まれるアミノ酸は、L-アミノ酸のみであり、光学異性体のD-アミノ酸はあまり重要な生理機能を持たないと長年考えられてきた。しかし、近年の分析技術の発展により生体におけるD-アミノ酸の解析が進み、様々な高等生物の細胞内には遊離のD-アミノ酸が存在し、生体内で特異的な生理機能を担っていることが明らかになってきている (Akita et al., 2015)。D-アミノ酸は主に不斉合成法や酵素法によって合成されるが、特に酵素法では合成に必要なエネルギーや副生成物が少なく工業化が進められている。2006年には、Vedha-Petersらが *Corynebacterium glutamicum* 由来の *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (*meso*-DAPDH) にタンパク質工学的に変異を導入してD-アミノ酸脱水素酵素 (D-AADH) を創製し、2-オキソ酸の還元的アミノ化反応によるD-アミノ酸の合成法を示した (Vedha-Peters et

al., 2006)。この合成法は、一段階のアミノ化反応でD-アミノ酸を合成できる点において、従来の合成法よりも簡便な方法であるが、Vedha-Petersらが創製したD-AADHは基質特異性が低く、工業利用への展開は困難であった。そこで、本研究では、*meso*-DAPを基質として、新たな*meso*-DAPDHのスクリーニングを目指した。

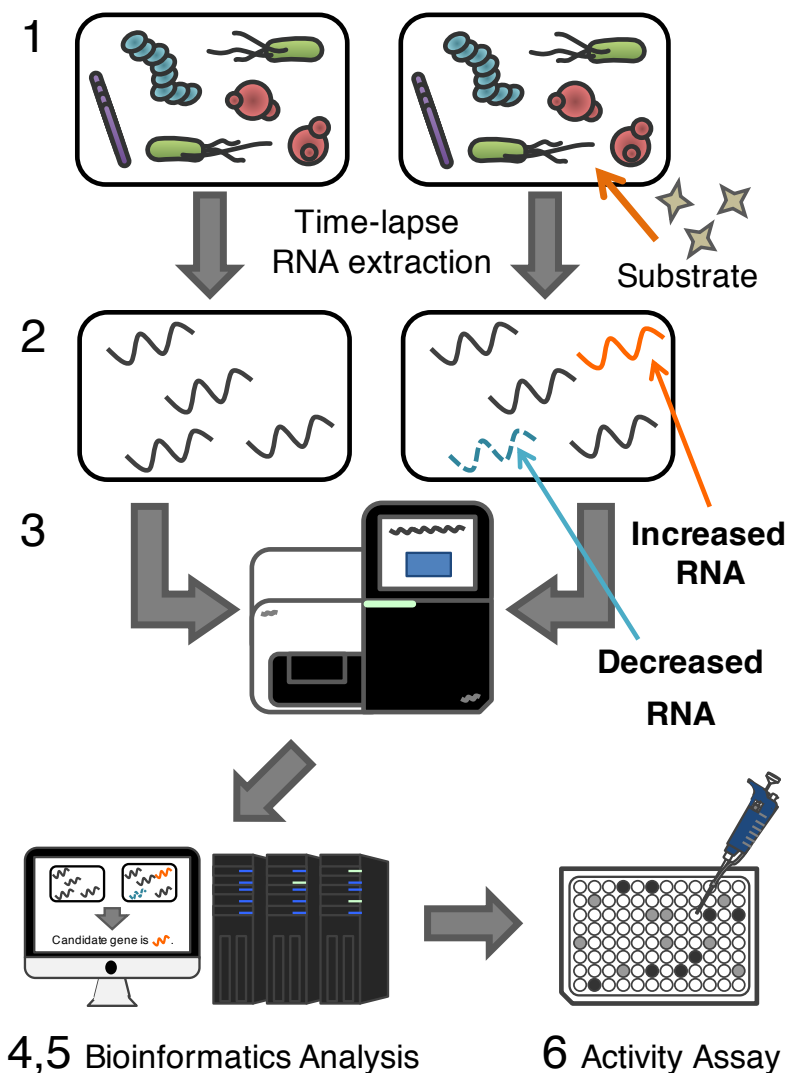


Figure 1 TILAMSによる新規酵素スクリーニング手順の概略図

環境から取得した微生物群集に、着目する基質を添加した試料としない試料を用意し、両試料から経時的にmRNAを抽出する。次世代シーケンサーを用いて、得られたmRNAを大量に配列解読し、基質添加によって発現量が変動した遺伝子を探し出す。さらに、バイオインフォマティクスによる各種解析を与えることによって、擬陽性の遺伝子を除去し、基質に作用する酵素遺伝子の候補を絞り込む。得られた候補遺伝子は、酵素活性測定によって実験的に検証する。

2.2 材料・方法

2.2.1 自然環境由来微生物群集サンプルの採取

本研究で用いる自然環境由来の微生物群集サンプルは、Table 1の各地点から採取した。これらの採取地点は全て公共の土地であり、野外調査における特別の許可などは必要ない。

Table 1 自然環境由来微生物群集サンプルの詳細情報

サンプル名	特徴	採取時期 [年/月]	採取地点	
			緯度 (北緯)	経度 (東経)
多摩川河川	二子玉川駅付近の多摩川の河川水	2014/12	35.611103	139.623266
緑ヶ丘土壌	東京工業大学 緑ヶ丘キャンパス内の土壌	2016/10	35.609023	139.678863

2.2.2 自然環境由来微生物群集の培養とレブリン酸による集積培養

本研究において、自然環境由来の微生物群集の培養は以下の手順に従って行われた。本章で使用した実験用調製培地・試薬はすべて、Table 2の組成で調整した。

1. 滅菌済みの試験管または三角フラスコに0.1% グルコース含有M9培地 (M9+Glu) を入れ、微生物群集サンプルを1/500倍量添加した。
2. 30°Cで、12時間振盪培養した。

また、レブリン酸を唯一の炭素源とした培地を用いて、多摩川河川サンプルの集積培養を行った。詳細な手順を以下に示す。

1. 滅菌済みの三角フラスコに 8 mMレブリン酸含有M9培地 (M9+Lev) 10 mLを入れ、多摩川河川サンプル 20 μ Lを添加した。
2. 30°Cで、10日間振盪培養した。
3. 1.5 mLチューブに、培養液 1 mLを入れた。
4. 60% グリセロール 500 μ Lを添加した。
5. -80°Cで冷凍保存した。

Table 2 第2章で使用した実験用調製培地・試薬組成一覧

名称	試薬名	量	単位	備考
5 x M9 Salt	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	85.5 g		調製後にオートクレーブ滅菌して使用
	KH ₂ PO ₄	15.0 g		
	NaCl	2.5 g		
	NH ₄ Cl	5.0 g		
	milliQ水	1.0 L		
	合計		1.0 L	
0.1% グルコース含有M9培地 (M9+Glu)	5 x M9 Salt	200.0 mL		使用直前に調製
	1M MgSO ₄	1.0 mL		
	0.05M CaCl ₂	2.0 mL		
	32% Glucose	6.5 mL		
	滅菌水	790.5 mL		
	合計		1.0 L	
8 mMレブリン酸含有M9培地 (M9+Lev)	5 x M9 Salt	200.0 mL		使用直前に調製
	1M MgSO ₄	1.0 mL		
	0.05M CaCl ₂	2.0 mL		
	Levlinic acid	206.0 μL		
	滅菌水	797.5 mL		
	合計		1.0 L	
0.1% グルコース、8mMレブリン酸含有M9培地 (M9+Glu+Lev)	5 x M9 Salt	200.0 mL		使用直前に調製
	1M MgSO ₄	1.0 mL		
	0.05M CaCl ₂	2.0 mL		
	32% Glucose	6.5 mL		
	Levlinic acid	206.0 μL		
	滅菌水	790.5 mL		
合計		1.0 L		
Stop Solution	Neutral Phenol	2.5 mL		
	Ethanol	47.5 mL		
	合計	50.0 mL		
Lysis Buffer	1 M CH ₃ COONa [pH 5.2]	20.0 mL		
	10% SDS	50.0 mL		
	1M EDTA	1.0 mL		
	滅菌水	929.0 mL		
合計		1.0 L		

SET Buffer	1 M NaCl	75.0 mL	
	1 M EDTA	25.0 mL	
	1 M Tris-HCl [pH 7.8]	20.0 mL	
	滅菌水	880.0 mL	
	合計	1.0 L	
Gflex PCR反応溶液	Nuclease Free Water	21.0 μ L	
	2 x Gflex PCR Buffer (Takara Bio)	25.0 μ L	
	Tks Gflex DNA Polymerase (Takara Bio)	1.0 μ L	
	鋳型DNA溶液	1.0 μ L	
	25 μ M Forward Primer	1.0 μ L	
	25 μ M Reverse Primer	1.0 μ L	
	合計	50.0 μ L	
制限酵素反応溶液	NEB Buffer 1.1または2.1 (New England Biolabs Japan)	2.5 μ L	NEB Bufferは制限酵素にあわせて選択
	NcoI、PciI、またはBspHI (New England Biolabs Japan)	1.0 μ L	
	BamHIまたはHindIII (New England Biolabs Japan)	1.0 μ L	
	DNA溶液	3.0 μ L	
	滅菌水	2.5 μ L	
	合計	10.0 μ L	
ライゲーション反応溶液	2 x Ligation Mix (Takara Bio)	5.0 μ L	
	インサートDNA溶液	3.0 μ L	
	ベクターDNA溶液	2.0 μ L	
	合計	10.0 μ L	
1% アガロースゲル	50x トリス/酢酸/EDTA(TAE) (Bio-Rad Laboratories)	1.0 mL	
	アガロース (Takara Bio)	0.5 g	
	miliQ水	49.0 mL	
	合計	50.0 mL	
臭化エチジウム染色液	50x TAE	10.0 mL	
	10 mg/mL 臭化エチジウム溶液	50.0 μ L	
	miliQ水	490.0 mL	
	合計	500.0 mL	

2.2.3 レブリン酸分解活性の測定

多摩川河川サンプル、及びレブリン酸集積培養後グリセロールストックサンプルに存在する微生物群集によるレブリン酸分解の活性を測定した。詳細な手順を以下に示す。

1. 多摩川河川サンプル、及びレブリン酸集積培養後グリセロールストックサンプルを、M9+Glu 20 mLで培養した。
2. 50 mL遠沈管に、培養液 10 mLを入れた。
3. 7,000 x g で3分間遠心し、上清を除去した。
4. 獲得した菌体を0.1% グルコース、8mM レブリン酸含有M9培地 (M9+Glu+Lev) 15mLに再懸濁した。
5. 30°Cで、12時間振盪培養した。
6. 培養0、3、6、24時間後、1.5 mLチューブに培養液 1 mLを採取した。
7. 7,000 x g で1分間遠心し、上清をHPLCにて分析した (詳細は2.2.4で示す)。

2.2.4 HPLC によるレブリン酸、及び *meso*-ジアミノピメリン酸の定量

レブリン酸、及び*meso*-DAPの定量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって行われた。HPLC装置には、Chromaster (Hitachi High-Tech Science) を使用した。HPLCカラムにはAminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用し、4 mM H₂SO₄を移動相として流速 0.5 mL/minで溶離させた。

2.2.5 微生物群集サンプルの経時的採取

TILAMSによるスクリーニングのために、微生物群集に対し基質物質の添加を行い、経時的に微生物群集を採取した。以降に詳細な手順を示す。レブリン酸代謝酵素探索については、1回目及び2回目のスクリーニングでは、それぞれFlow 1、Flow 2の手順で行った。*meso*-DAPDH探索では、Flow 2の手順で行った。

Flow 1

1. 微生物群集サンプルを、M9+Glu 120 mLで培養した。
2. 15 mL遠沈管に培養液 10 mLを採取し、培養直前サンプルとした。
3. 培養直前サンプルに、1/9倍量のStop Solutionを添加し、-80°Cで冷凍保存した。
4. 残りの培養液を、4本の50 mL遠沈管に等量ずつ分注した。

5. 7,000 x g で3分間遠心し、上清を除去した。
6. 獲得した菌体を2本ずつ、それぞれM9+Glu 90mL、M9+Glu+Lev 90mLに再懸濁した。
7. それぞれを三角フラスコに移し、30°Cで、8時間振盪培養した。
8. 培養1、3、6時間後、15 mL遠沈管に培養液 10 mLを採取した。
9. 採取したサンプルに、1/9倍量のStop Solutionを添加し、-80°Cで冷凍保存した。
10. 残りの培養液を、それぞれ50 mL遠沈管に入れた。
11. 7,000 x g で3分間遠心し、上清を除去した。
12. シャーレにリン酸緩衝食塩水 (PBS) 5 mLを優しく添加した。
13. 7,000 x g で3分間遠心し、上清を除去した。
14. 12-13を繰り返した。
15. 獲得した菌体をM9+Glu 30mLに再懸濁した。
16. それぞれを三角フラスコに移し、30°Cで、累積培養時間が24時間になるまで振盪培養した。
17. 累積培養時間10、24時間後、15 mL遠沈管に培養液 10 mLを採取した。
18. 採取したサンプルに、1/9倍量のStop Solutionを添加し、-80°Cで冷凍保存した。

Flow 2

1. 微生物群集サンプルを、M9+Glu 50 mLで培養した。
2. 15 mL遠沈管に培養液 4.5 mLを採取し、培養直前サンプルとした。
3. 培養直前サンプルに、1/9倍量のStop Solutionを添加し、-80°Cで冷凍保存した。
4. 2つの三角フラスコに15 mLずつ移し、それぞれに滅菌水、レブリン酸 (最終濃度 50 mM) または*meso*-DAP (最終濃度 500 μ M) を添加した。
5. 30°Cで、3時間振盪培養した。
6. 培養1、2、3時間後、15 mL遠沈管に培養液 4.5 mLを採取した。
7. 採取したサンプルに、1/9倍量のStop Solutionを添加し、-80°Cで冷凍保存した。

2.2.6 mRNA 抽出・cDNA ライブラリの作成

2.2.5で獲得した微生物群集からmRNAを抽出し、cDNAライブラリの作成を行った。以下に詳細な手順を示す。

まず、微生物群集のtotalRNA抽出を行った。これには、Acid hot phenol法(Aiba et al., 1981)を用いた。以下に詳細な手順を示す。

1. 1.5 mLチューブに350 μ Lの酸性フェノールを入れ、65°Cのヒートブロックで加熱した。

2. 微生物群集サンプルを9,000 x gで2分間遠心した。
3. 上清を除去した。
4. 350 μ LのLysis Buffer (20 mM 酢酸ナトリウム [pH 5.2]、0.5% SDS、1 mM EDTA) を添加し、再懸濁した。
5. 懸濁後、事前に加熱しておいた酸性フェノールの入った1.5 mLチューブに全量を添加した。
6. 5秒間、チューブをよく振って溶液を混ぜた。
7. 65°Cで1分間インキュベートし、その後、15秒間ボルテックスした。
8. 12,000 rpmで3分間遠心した。
9. 上清の水層を300 μ L採取し、新しい1.5 mLチューブに入れた。
10. 350 μ Lの酸性フェノール・クロロホルム (酸性フェノール：クロロホルム = 1：1) を添加し、ボルテックスした。
11. 12,000 rpmで3分間遠心した。
12. 上清の水層を250 μ L採取し、新しい1.5 mLチューブに入れた。
13. 100% エタノールを750 μ L添加し、ボルテックスした。
14. 常温で15分間静置した。
15. 4°C、15,000 rpmで20分間遠心した。
16. 上清を除去し、350 μ Lの75% エタノールを添加した。
17. 4°C、15,000 rpmで5分間遠心した。
18. ピペットで上清を完全に除去した。
19. 常温で5分間ペレットを乾燥させた。
20. 100 μ LのTE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 7.0) を添加し、ペレットを再溶解した。

獲得した抽出済みのtotalRNA溶液から、DNA、tRNA、5S rRNA、smallRNAの除去を行った。まず、DNAとsmallRNAの除去を行った。これには、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 、RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いた。詳細については、製造元のプロトコル (<http://www.bea.ki.se/documents/E-N-RNeasy%20handbook.pdf>) に従った。

次に、rRNAの除去を行った。これには、MICROBExpress Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。詳細については、製造元のプロトコル (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/fm_1905.pdf) に従った。

mRNA溶液からcDNAライブラリの作成を行った。これには、TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いた。詳細については、製造元のプロトコル (http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_t

ruseq/truseqstrandedmrna/truseq-stranded-mrna-sample-prep-guide-15031047-e.pdf) に従った。

得られたcDNAライブラリは、シーケンサーに投入する際に、正確な濃度が必要となる。今回は、Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量化し、BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies)、及びHigh Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) を用いて定量・定性分析を行った。

Qubitの使用方法については、Qubit Assays QUICK REFERENCE CARDに従った。Working Solutionは198 μ L、User Sampleは2 μ Lで行った。

BioAnalyzerについては、バイオアナライザ簡単マニュアル (2010年8月作成ver.01.02) のプロトコルに従った。

ここまでの手順により獲得した6サンプルのcDNAライブラリを、次世代シーケンサーMiSeq (Illumina) にてシーケンシングした。シーケンシングは、MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いて、paired-end readモード、600サイクルの条件で行われた。

2.2.7 メタトランスクリプトーム解析

2.2.6にてシーケンシングされて得られた配列データを用いて、メタトランスクリプトーム解析を行った。以下に詳細な解析手順を示す。

まず、配列データを以下の手順でフィルタリングして、ハイクオリティな配列のみを抽出した。

1. 解読された配列 (リード) 内にNを含むリードを除去した。
2. Bowtie2 version 2.2.3 (Langmead and Salzberg, 2012) を用いて、リードをPhiXゲノム配列にマッピングした。パラメータにはデフォルト値を用いた。
3. PhiXゲノム配列にマップされたリードを除去した。
4. cutadapt version 1.2.1 (Martin, 2011) を用いて、Forward側 (F側) アダプター配列を除去した。150–450 bpの長さのものを採用し、リード後続でQuality Valueが17以下で連続する領域をトリミングした。
5. cutadapt 及び TagCleaner version 0.16 (Schmieder et al., 2010) を用いて、Reverse側 (R側) アダプター配列を除去した。150–450 bpの長さのものを採用し、リード後続でQuality Valueが17以下で連続する領域をトリミングした。

6. 平均クオリティ25未満のリードを除去した。
7. F、R側のどちらかが欠損しているリードを除去した。
8. FASTQ形式からFASTA形式への変換を行った。

次に、得られたハイクオリティな配列を用いて、遺伝子の発現量を計算した。以下に詳細な解析手順を示す。

1. IDBA-UD version 1.1.0 (Peng et al., 2012) により、サンプルごとにアセンブルを行った。20 bpから5 bpごと120 bpまで段階的にアセンブルを行った。
2. MetaGeneMark 64 bit version 2.8 (Zhu et al., 2010) により、タンパク質コード領域（遺伝子）を予測した。
3. 予測された遺伝子に対して、Bowtie2を用いて配列データをマッピングした。
4. (* 3-1) 式から、遺伝子発現量を計算した。
5. BLAST version 2.3.0 (Altschul et al., 1990) により、全サンプルの全遺伝子をall to allで配列相同性検索した。
6. OrthoMCL version 2.0.9 (Li et al., 2003) を用いて、遺伝子オーソロググループを構築した。
7. 遺伝子オーソロググループの代表配列をそのグループに属する全遺伝子のうち塩基長が最大のものとした。
8. 遺伝子オーソロググループごとに遺伝子発現量を集計し、遺伝子組成テーブルを作成した。

$$\text{遺伝子発現量}_{ij} = \frac{\text{マップされたリード数}_{ij}}{\text{遺伝子長}_i \times \text{全リード数}_j} \cdots (* 3-1)$$

(i: 遺伝子, j: サンプル)

メタトランスクリプトームデータを用いた系統組成については、以下の手順により導出した。

1. BLASTにより、予測された遺伝子をKEGG Genes version 2014-03-26 (Kanehisa et al., 2019) に対して配列相同性検索し、遺伝子情報をアノテーションした。
2. BLASTの結果のうち、Identity >40%、Score >70のものを採用し、複数あるものはTop Hitのみを採用した。
3. 配列相同性検索結果から、K02470 (*gyrB*)、K03043 (*rpoB*) 及びK02906 (*rplC*) にアノテーションされた遺伝子を抽出した。
4. この遺伝子の発現量を属名ごとに集計し、系統組成テーブルを作成した。

5. 系統組成テーブルをサンプルごとに、全微生物の存在量の合計値で割り、Relative Abundanceとした。

2.2.8 候補遺伝子のスクリーニング

2.2.7で作成した遺伝子組成テーブルを用いて、基質化合物を含む培地で培養しているサンプル群 (SA; substrate added samples) と基質化合物を含まない培地で培養しているサンプル群 (SF; substrate free samples) における遺伝子発現量を比較することで、新規酵素遺伝子のスクリーニングを行った。まず、第一次スクリーニングとして、SFに対するSAにおける発現量の高い遺伝子オーソログの抽出を行った。詳細な手順を以下に示す。

1. (* 3-2) 式から、遺伝子発現量を計算した。
2. maximum value Fold Change > α の遺伝子オーソログを抽出した。
 - ただし、集積培養サンプルを用いたレブリン酸代謝酵素のスクリーニングでは、 $\alpha = 2$ 、土壌サンプルを用いたレブリン酸代謝酵素、及びmeso-DAPDHのスクリーニングでは、 $\alpha = 3$ とした。

$$\text{maximum value Fold Change}_i = \frac{\text{SAにおける最大値}_i}{\text{SFにおける最大値}_i} \quad \dots \quad (* 3-2)$$

(i : 遺伝子)

次に、第二次スクリーニングとして、遺伝子オーソログに対し機能情報をアノテーションし、リボソームや膜タンパク質などの基質化合物の代謝に無関係であると考えられるタンパク質の除去を行った。詳細な手順を以下に示す。

1. BLASTにより、第一次スクリーニング結果の遺伝子オーソログをKEGG Genesに対して配列相同性検索し、遺伝子情報をアノテーションした。
2. BLASTの結果のうち、Identity >40%、Score >70のものを採用し、複数あるものはTop Hitのみを採用した。
3. KEGG Genesの遺伝子情報から、KEGG Orthologyの遺伝子機能情報をアノテーションした。
4. 1-3でアノテーションできなかった遺伝子オーソログをNCBI Non-redundant protein sequences (nr) (NCBI Resource Coordinators, 2018) に対して配列相同性検索し、遺伝子機能情報をアノテーションした。

- 集積培養サンプルからのスクリーニングでは、2015年8月18日時点、土壌サンプルからのスクリーニングでは、2017年1月11日時点でのリリースバージョンを使用した。
5. 遺伝子オーソログのうち、基質化合物と酵素反応しないと考えられるもの（ハウスキーピング遺伝子、リボソームタンパク質、転写因子など）を除外した。

さらに、集積培養サンプルでは、類似基質に対する誤反応ではなく、レブリン酸に対する直接的な酵素反応を担う遺伝子オーソログをスクリーニングするために、第三次スクリーニングとして、炭水化物、及び脂肪酸の代謝に関連する酵素のアノテーションがついた遺伝子オーソログを抽出し、レブリン酸代謝候補遺伝子とした。また、機能未知の遺伝子がレブリン酸代謝酵素であることも考えられるため、hypothetical proteinにアノテーションされた遺伝子オーソログのうち、代表塩基配列長 > 300 bpのものを抽出し、レブリン酸代謝候補遺伝子とした。

2.2.9 プライマーの設計

レブリン酸代謝候補遺伝子の酵素活性測定を行うにあたり、これらの遺伝子を特異的にPCR増幅するためのプライマーを設計した。詳細な手順を以下に示す。

1. それぞれのレブリン酸代謝候補遺伝子に対し、2.2.8でアノテーションしたKEGG Genesの塩基配列を獲得した。
2. BLASTにより、レブリン酸代謝候補遺伝子をNCBI Nucleotide Collection (nr/nt) (2015年8月22日リリース) (NCBI Resource Coordinators, 2018) に対して配列相同性検索した。
3. Identity >90%の全塩基配列のタンパク質コード領域 (CDS) を獲得した。
4. ClustalW version 2.0.12 (Thompson et al., 1994) を用いて、レブリン酸代謝候補遺伝子の代表配列、KEGG Genes、及びNCBI Nucleotide Collection (nr/nt) から獲得した配列をマルチプルアライメントした。
5. アライメント結果から、Table 3の条件でプライマーを作成した。

Table 3 プライマー作成条件

条件
遺伝子全長を増幅可能であること
Primer3による融解温度 (Tm) が、60–65°C
GC含量が、40–60%
プライマーの長さが、20–30 bp程度
縮退塩基が、2 bp以下
Forward プライマーには、NcoI、PciI、またはBspHI切断部位を付加
Reverse プライマーには、BamHI、またはHindIII切断部位を付加

*：制限酵素の選択は、レブリン酸代謝候補遺伝子の代表配列、KEGG Genes、及びNCBI Nucleotide Collection (nr/nt) から獲得した配列の全てにおいて切断部位の検索を行い、内部に切断部位を持たないものを選択した。

2.2.10 レブリン酸代謝候補遺伝子の発現プラスミドベクター構築

2.2.8にて獲得したレブリン酸候補遺伝子について、*E. coli*を宿主として酵素活性測定を行うために、発現プラスミドベクターを構築した。まず初めに、集積培養後のグリセロールストックサンプルの微生物群集からDNAを抽出した。詳細な手順を以下に示す。

1. 微生物群集サンプルを、595 nmにおける吸光度 (OD₅₉₅) が1程度になるまで、M9+Glu 1 20 mLで培養した。
2. 1.5 mLチューブに培養液 1 mLを採取した。
3. 12,000 rpmで30秒間遠心し、上清を除去した。
4. SET Buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl [pH 7.8]) 250 µLに再懸濁した。
5. 5 mg/mL リゾチーム溶液 50 µLを添加した。
6. 優しく攪拌し、37°Cで30分間インキュベートした。
7. 5 mg/mL RNase 10 µL、20 mg/mL プロテイナーゼK溶液 7 µL、10% SDS溶液 30 µLを添加した。
8. 優しく攪拌して、55°Cで2時間インキュベートした。
9. 5 M NaCl 100 µLとフェノール・クロロホルム溶液 (フェノール:クロロホルム = 1:1) 500 µLを添加した。
10. 優しく攪拌しながら、常温で20分間インキュベートした。
11. 卓上遠心機で1分間遠心し、上清 500 µLを1.5 mLチューブに分注した。

12. 100% エタノール 1 mLを添加した。
13. 優しく攪拌した後、軽く遠心して上清を除去した。
14. 70% エタノール 500 μ Lを添加した。
15. 軽く遠心して上清を除去した。
16. 常温で5分間静置して、乾燥させた。
17. TE 100 μ Lに再溶解させた。

次に、獲得したDNAからレブリン酸候補遺伝子を2.2.9にて作成したプライマーを用いて、特異的にPCR増幅した。詳細な手順は以下に示す。

1. 0.2 mLチューブにGflex PCR反応溶液を調整した。
2. T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories) にセットし、Table 4の条件でPCRした。
3. 反応後の溶液は4°Cで保管した。

次に、反応後PCR溶液に含まれる不純物を除去し、精製を行った。まず反応後PCR溶液をアガロースゲル電気泳動し、候補遺伝子の塩基長の位置に現れたバンドを切り出した。以下に、アガロースゲル電気泳動の詳細な行程を示す。

1. 1%アガロースゲルを作成した。
2. アガロースゲルをTAEで満たされたMupid-exU (ミューピッド) に入れた。
3. 反応後PCR溶液に6 x Loading Buffer (Takara Bio) を添加し、wellに全量アプライした。
4. 残りのwellの一つに100 bp DNA Ladder (Dye Plus) (Takara Bio) 5 μ Lをアプライした。
5. 100 Vで30分間泳動を行った。
6. アガロースゲルを取り出して、臭化エチジウム染色液に入れ、30分間染色した。
7. 染色液からアガロースゲルを取り出してUVを照射し、バンドを確認した。
8. 塩基長約450 bpの位置のバンドをメスで切り出し、1.5 mLチューブに入れた。

その後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて、アガロースゲル中からDNAを抽出した。詳細については、製造元のプロトコル (http://www.promega.co.jp/jp/jp_tech/jp_manuals/TB308J.PDF) に従った。

精製された候補遺伝子のDNAをインサートとしてpET28aベクターに組み込み、*Escherichia coli* XL1-Blueへ導入した。まず、候補遺伝子のDNA、及びpET28aベクターDNAを制限酵素で切断し、切断済みDNAを反応後PCR溶液と同様の手順で精製した。以下に、その詳細な手順を示す。

1. 0.2 mLチューブに制限酵素反応溶液を調整した。
2. 37°Cで2時間インキュベートした。
3. アガロースゲル電気泳動、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemによる精製を行った。

続いて、切断済みの、候補遺伝子のDNA、及びpET28aベクターDNAをライゲーションした。詳細な手順を以下に示す。

1. 0.2 mLチューブにライゲーション反応溶液を調整した。
2. 16°Cで1時間インキュベートした。

ライゲーション反応済みのプラスミドDNAを*E. coli* XL1-Blueへ導入した。以下に、形質転換の詳細な手順を示す。なお、本手順は全てクリーンベンチ内、無菌状態で行われた。また、コンピテントセルには、事前にInoue法 (Inoue et al., 1990) により作成されたものを用いた。

1. コンピテントセルを-80°Cから取り出し、氷上で溶かした。
2. プレートの蓋を開け、裏返して乾燥させた。
3. Plasmid DNA 3 µLを1.5 mLチューブに入れた。
4. コンピテントセル50 µLを添加した。
5. 氷上で15分間静置した。
6. 42°Cで45秒間ヒートショックを行った。
7. 氷上で2分間静置した。
8. SOC (0.05% NaCl, 2% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM グルコース) 450 µLを添加。
9. 37°Cで1時間インキュベートした。
10. LB寒天培地に100 µL撒いた。
11. LB寒天培地を37°Cで12時間培養した。

形質転換した*E. coli* XL1-BlueをLB液体培地で培養して増殖させ、プラスミドを抽出した。これには、FastGene プラスミドミニキット (NIPPON Genetics) を用いた。詳細については、製造元のプロトコルのうち、「ハイコピープラスミドDNAの精製—スタンダードプロトコル」に従った ([http://www.n-genetics.com /file/Manual_FG-Plasmid_ Mini.pdf](http://www.n-genetics.com/file/Manual_FG-Plasmid_Mini.pdf)) 。

Table 4 Gflex PCR条件

温度	時間	繰り返し
94°C	60 sec	-
98°C	10 sec	30 cycle
60°C	15 sec	
68°C	45 sec	
68°C	60 sec	-

2.2.11 酵素活性

2.2.10にて構築したレブリン酸代謝候補遺伝子の発現プラスミドベクターを*E. coli* BL21に導入して遺伝子を発現させ、その酵素活性を測定した。まず、*E. coli* BL21の形質転換し、グリセロールストックの作成を行った。これについては、2.2.10の*E. coli* XL1-Blue形質転換と同様の手順で行った。続いて、形質転換済みの*E. coli* BL21を培養して、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) で遺伝子発現を誘導し、発現した酵素を含む全タンパク質を抽出した。詳細な手順を以下に示す。

1. グリセロールストックから、大腸菌をLB液体培地 5mLに植菌した。
2. 12時間振盪培養した。
3. 培養1時間後にIPTG (最終濃度 1 mM) で遺伝子発現を誘導した。
4. 培養後、培養液 5 mLを15 mL遠沈管に採取した。
5. 7,000 x g で3分間遠心し、上清を除去した。
6. PBS 500 μ Lに再懸濁した。
7. 2 mLチューブにガラスビーズ 200 μ Lを入れた。
8. 大腸菌の懸濁したPBSを2 mLチューブに全量添加した。
9. 氷上で1分間静置した。
10. Micro Smash (TOMY SEIKO) にて、4,000 rpmで30秒間細胞破碎した。
11. 氷上で3分間静置した。
12. 10-11を2回繰り返した。
13. 4°C、15,000 rpm で5分間遠心した。
14. 上清 400 μ Lを1.5 mLチューブに移した。

続いて、獲得したタンパク質溶液を用いて、発現酵素によるレブリン酸の分解量を測定した。詳細な手順を以下に示す。

1. タンパク質溶液 300 μ Lを1.5 mLチューブに入れた。

2. レブリン酸反応溶液 (40 mM レブリン酸, 4 mM ATP, 1 mM NAD⁺, 1 mM CoA) 300 μL 添加した。
3. 1時間後に溶液200 μLを採取しH₂SO₄ (最終濃度 4mM) を添加した。
4. HPLCにてレブリン酸分解量を定量した。

2.3 結果

2.3.1 レブリン酸代謝酵素探索

2.3.1.1 レブリン酸による集積培養

多摩川河川サンプルをM9+Glu+Lev培地で培養し、培地中に含まれるレブリン酸濃度を経時的に測定した (Figure 2)。この結果から、多摩川河川サンプルではレブリン酸をほとんど代謝できていなかった。そのため、レブリン酸を唯一の炭素源としたM9培地で多摩川河川サンプルを集積培養した。その結果、集積培養サンプルでは、3日間の培養でほとんどのレブリン酸を代謝し、別の化合物に変換できていることが分かった。このことから、以降では集積培養サンプルを対象として、TILAMSによるレブリン酸代謝酵素探索を行った。また、レブリン酸の分解は、微生物が十分に増殖した時に、活発に起こっていた。このことから、TILAMSによるスクリーニングでは、まず前培養として集積培養サンプルを培養し、十分に増殖させてから使用することとした。

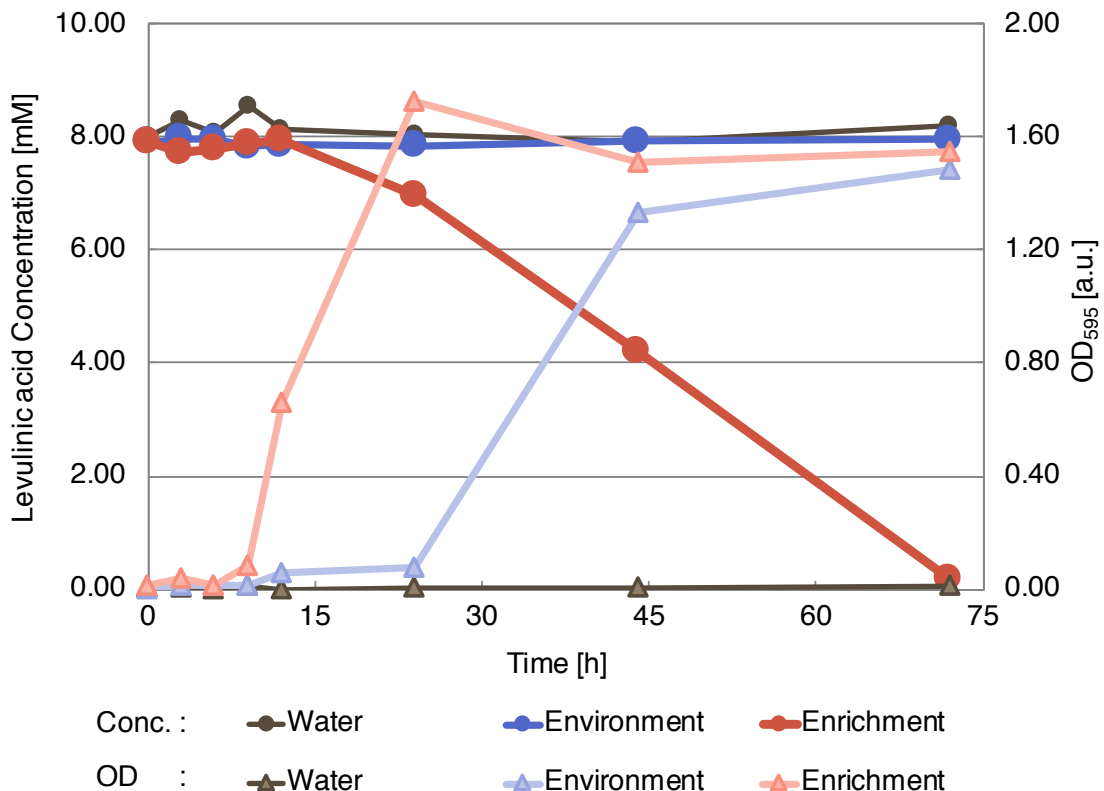


Figure 2 多摩川河川サンプルと集積培養サンプルの増殖曲線とレブリン酸の代謝

多摩川河川サンプルと集積培養サンプルの時系列による微生物の増殖量の変化とレブリン酸の分解量を表す。丸型はレブリン酸濃度 (左軸)、三角型は微生物の増殖量 (右軸) を表す。黒色はコントロール、青色は多摩川河川サンプル、赤色は集積培養サンプルを表す。

2.3.1.2 集積培養サンプルのメタトランスクリプトームデータによる系統解析

メタトランスクリプトームのデータを用いて、集積培養サンプルに含まれるレブリン酸を代謝している微生物を調べた。そのために、全配列データのうち、*gyrB*、*rpoB*及び*rplC*遺伝子にアノテーションされた配列を用いて、属レベルの系統解析を行った (Figure 3)。培養の初期段階 (1, 3 h) では、*Klebsiella*属と*Pseudomonas*属の2属の細菌が優占しているが、時間とともに*Pseudomonas*属の1属が大きく優占となった。また、この傾向は、8時間後にPBSで洗浄して培地を交換した場合も同様であった。レブリン酸の添加の有無では、系統組成に差はなく、レブリン酸に応じて増殖の変化している微生物は存在していなかった。このことから、レブリン酸の代謝は優占属である、*Klebsiella*属と*Pseudomonas*属によって行われていると考えられる。なお、メタトランスクリプトームデータによる系統解析では、細菌種の単純な存在比を反映していないことに留意する必要がある。

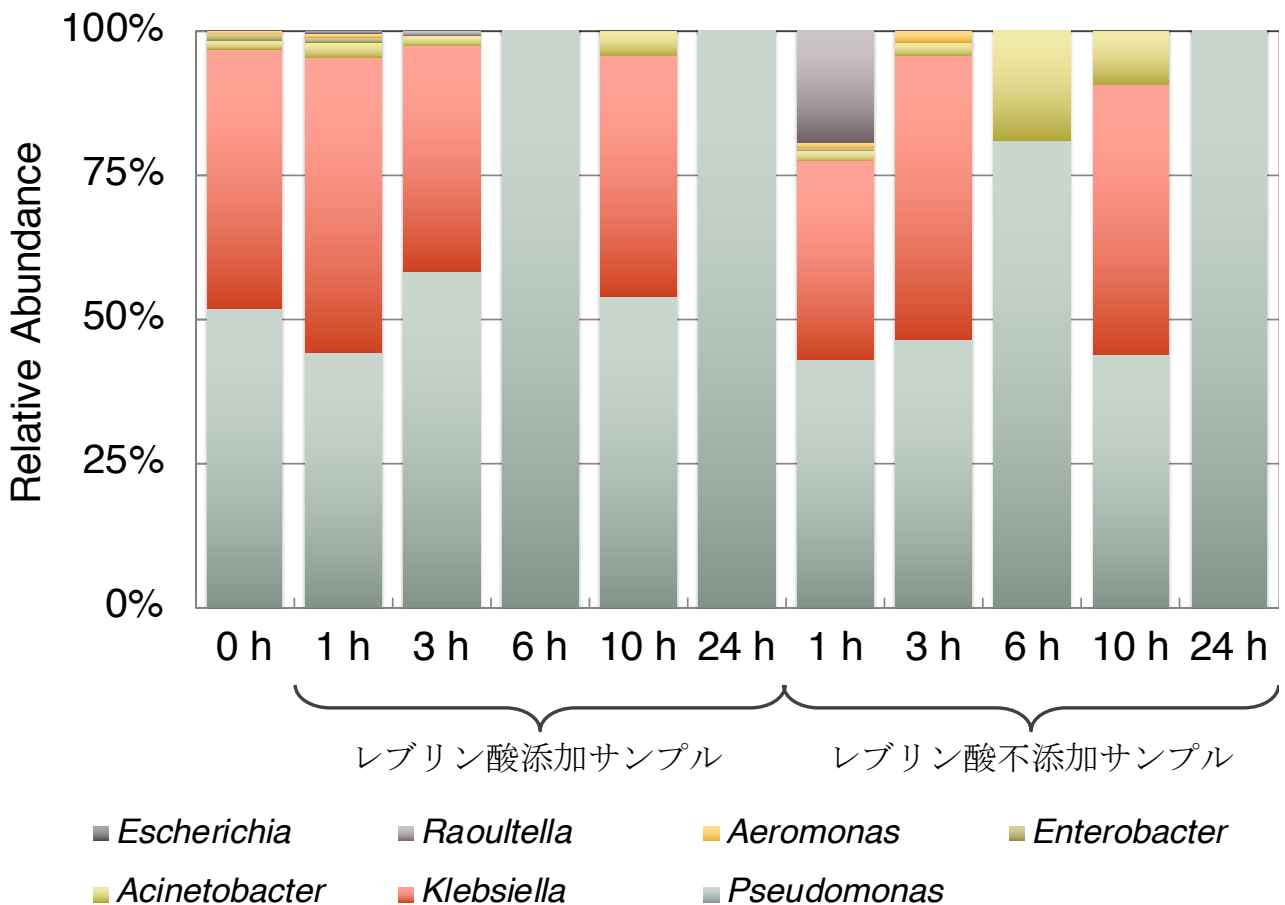


Figure 3 集積培養サンプルの系統組成

gyrB、*rpoB*及び*rplC*遺伝子の発現量を微生物ごとに集計したサンプルの系統組成を表す。縦軸は各微生物の相対存在量、横軸はサンプル名を表す。サンプル名上段は培養時間を表し、0 hがレブリン酸添加直前サンプル、左側の1-24 hがレブリン酸添加サンプル、右側の1-24 hがレブリン酸不添加サンプルを表す。

2.3.1.3 集積培養サンプルのメタトランスクリプトーム解析

メタトランスクリプトームデータを用いて、遺伝子オーソロググループを作成し、それぞれの発現量を導出した。この発現量のデータを用いて、レブリン酸を含む培地で培養しているサンプル群 (Lev[+]; レブリン酸添加1, 3, 6 時間後サンプル) とレブリン酸を含まない培地で培養しているサンプル (Lev[-]; 前培養サンプル、レブリン酸添加10, 24 時間後サンプル、レブリン酸不添加1, 3, 6, 10, 24 時間後サンプル) を比較することで、レブリン酸代謝酵素遺伝子のスクリーニングを行った。第一次スクリーニングとして、各遺伝子オーソログに対し、maximum value Fold Changeを計算し、Lev[+]における発現量の高い遺伝子オーソログを抽出した。その結果、全3,947グループから、173グループを獲得した (Table S1)。次に、この173グループそれぞれの代表配列を、BLASTを用いてKEGG Genesに対して相同性検索を行い、その機能を予測した。この結果を用いて、第二次スクリーニングとして、レブリン酸代謝に機能的に無関係な遺伝子オーソログを除去した (詳細な手順は、2.2.8を参照)。さらに、第三次スクリーニングとして、炭水化物、及び脂肪酸の代謝に関連する酵素のアノテーションがついた遺伝子オーソログを抽出した。これにより、最終的に27グループに絞り込まれ、これをレブリン酸代謝候補遺伝子とした (Table 5)。候補遺伝子には、特に反応にCoAの関わる酵素 (OG_4206、OG_4392、OG_3686、OG_4670、OG_2707、OG_3648、OG_3534、OG_3630、OG_4388、OG_2821、OG_2602) や酸化還元酵素 (OG_3402、OG_4670、OG_3332、OG_2365、OG_4927、OG_3540、OG_4388)、脱炭酸酵素 (OG_3332、OG_3097、OG_3555、OG_4927、OG_3164) が多く含まれていた。

2.3.1.4 候補遺伝子の酵素活性測定

レブリン酸代謝候補遺伝子の酵素活性測定を行うために、候補遺伝子の特異的にPCR増幅するためのプライマーを設計する必要があった。そのため、レブリン酸代謝候補遺伝子のオーソロググループに属する全配列とオーソロググループの代表配列をKEGG Genes、及びNCBI Nucleotide Collectionに対して配列相同性検索し、Identity > 90 %でヒットした配列をマルチプルアライメントした。その結果から、候補遺伝子特異的プライマーセットを設計した。これにより、27グループのうち、11グループのプライマーセットを設計することができた (Table 6)。

2.3.1.3で設計したプライマーセットを用いて、集積培養サンプルからレブリン酸代謝候補遺伝子の特異的にPCR増幅した。このPCR産物から発現ベクターを構築し、*E. coli* BL21に形質転換して発現酵素の活性測定を行った。Figure 4は反応開始1時間後の反応溶液中のレブリン酸濃度を表している。Controlと比較して、レブリン酸代謝候補遺伝子を発現させた場合でもレブリン酸の分解に有意な反応は確認されなかった。

Table 5 集積培養サンプル由来レブリン酸代謝候補遺伝子

遺伝子オーソログ グループID	タンパク質名	KEGG Orthology	maximum value Fold Change
OG_3402	putative redox protein	K07397	8.06
OG_3706	hypothetical protein		6.17
OG_4206	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	K00626	4.88
OG_4392	GNAT family acetyltransferase		4.45
OG_3686	succinyl-CoA synthetase alpha subunit [EC: 6.2.1.5]	K01902	4.11
OG_4867	hypothetical protein		3.85
OG_4670	short chain dehydrogenase/reductase		3.82
OG_3332	NADP-dependent oxidoreductase	K07119	3.75
OG_3097	pyruvate carboxylase subunit B [EC:6.4.1. 1]	K01960	3.71
OG_2605	hypothetical protein		3.48
OG_3915	acetyltransferase		3.22
OG_3555	carboxymuconolactone decarboxylase		3.06
OG_2365	homoserine dehydrogenase [EC:1.1.1.3]	K00003	2.74
OG_2707	acetyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.1]	K01895	2.52
OG_3648	acyl-CoA thioester hydrolase [EC:3.1.2.-]	K07107	2.51
OG_4927	monomeric isocitrate dehydrogenase famil y protein		2.45
OG_3542	hypothetical protein	K09897	2.44
OG_3072	hypothetical protein	K09983	2.40
OG_1777	acyl-homoserine-lactone acylase [EC:3.5.1. 97]	K07116	2.38
OG_3164	acetolactate decarboxylase [EC:4.1.1.5]	K01575	2.37
OG_3540	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol deh ydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	K04072	2.27
OG_3534	putative acetyltransferase		2.24
OG_3630	hydroxyacyl-ACP:CoA transacylase		2.24
OG_2833	acetyltransferase		2.23
OG_4388	acyl-CoA dehydrogenase	K00257	2.12
OG_2821	acetyl-CoA hydrolase		2.09
OG_2602	long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1. 3]	K01897	2.07

Table 6 集積培養サンプル由来レブリン酸代謝候補遺伝子プライマー一覧

プライマー名	塩基配列*	制限酵素
OG_2602_F	5'- ATCCATGGAACCTGATTTCTGGAATGATAAGC -3'	NcoI
OG_2602_R	5'- ATGGATCCTCAAGCGATATCCCGCAACTC -3'	BamHI
OG_3072_F	5'- TACCATGGGTATTTCTCTGTACGCAGCCTCC -3'	NcoI
OG_3072_R	5'- TAGGATCCTTAGAACGCGCCCATGAAGTC -3'	BamHI
OG_3164_F	5'- GCACATGTATCAYTCTGCTGAATGCACCTG -3'	PciI
OG_3164_R	5'- GTGGATCCTTAACTTCTACGGAACGGATGGC -3'	BamHI
OG_3402_F	5'- TGACATGTGTGGGTCCATTGTTTCGAG -3'	PciI
OG_3402_R	5'- ATGGATCCCTACACGAACGCTCTTCCGATCTC -3'	BamHI
OG_3534_F	5'- GTACATGTATCACCTTCGTGTACCGCAAAC -3'	PciI
OG_3534_R	5'- TTGGATCCTTACTCTTCCTCGTTGCCGCC -3'	BamHI
OG_3540_F	5'- GGTCATGACTGTTACTAATATCGCTGAACTG -3'	BspHI
OG_3540_R	5'- TTGGATCCTTAAAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTC -3'	BamHI
OG_3542_F	5'- GCACATGTTCGAAAGCTTTACGACGACTAATC -3'	PciI
OG_3542_R	5'- ACGGATCCTTAGTCATCGTTTTCGGTGTAATCG -3'	BamHI
OG_3555_F	5'- CAACATGTRCCAATTACGTCAGCCATTC -3'	PciI
OG_3555_R	5'- TAGGATCCCTACAGGCGCATGGCCAC -3'	BamHI
OG_3686_F	5'- AGACATGTCAGTTTTAATTAATAAAGATACCAAGGTTATCTGC -3'	PciI
OG_3686_R	5'- TTGGATCCTTACTTGATGATMGCTTTCAGCGCTTC -3'	BamHI
OG_4206_F	5'- GTACATGTACGAAGTCGTAATCGTTGCC -3'	PciI
OG_4206_R	5'- TAGGATCCTTARCGCTCGATRGCCAGG -3'	HindIII
OG_4670_F	5'- AACCATGGAGATTGATTTATCGGGGAAAGTC -3'	NcoI
OG_4670_R	5'- AAGGATCCTCAGAGAATATCATCCACCACGC -3'	BamHI

*: 下線は制限酵素切断部位、太字はプライマー配列を表す。

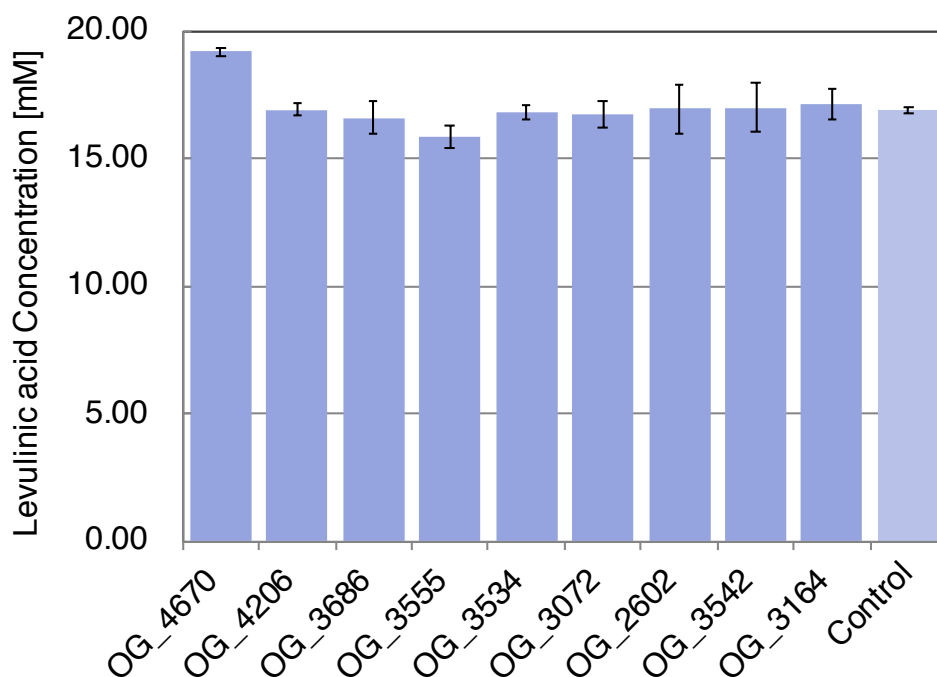


Figure 4 レブリン酸代謝候補遺伝子の酵素活性測定

縦軸は酵素反応1時間後のレブリン酸濃度、横軸はサンプルを表す。

2.3.1.5 土壌サンプルのメタトランスクリプトームデータによる系統解析

一度目のレブリン酸代謝酵素のスクリーニングでは、自然環境由来サンプルをレブリン酸で集積培養したが、より広く簡易にスクリーニングを行うためには集積培養を行わない方が良いと考えられる。また、DNAからmRNAの転写は基質物質に誘導されて、比較的短時間で起こっていることが推測される。これらから、二度目のレブリン酸代謝酵素のスクリーニングでは、自然環境由来サンプルを直接培養し、レブリン酸添加後早期にmRNAを採取してメタトランスクリプトーム解析を行った。

メタトランスクリプトームのデータを用いて、土壌サンプルに含まれるレブリン酸を代謝している微生物を調べた。そのために、全配列データのうち、*gyrB*、*rpoB*及び*rplC*遺伝子にアノテーションされた配列を用いて、属レベルの系統解析を行った (Figure 5)。レブリン酸添加直前 (Bfr) では、*Pseudomonas*属、*Enterobacter*属、及び*Acinetobacter*属の3属の細菌が優占し、レブリン酸添加後、及びコントロールでも同様の傾向が観察された。*Cronobacter*属はコントロール (Ctrl) のみ、*Shigella*属、*Yersinia*属、及び*Klebsiella*属はレブリン酸添加後 (Lev) のみで観察された。このことから、*Shigella*属、*Yersinia*属、及び*Klebsiella*属はレブリン酸に反応して活動していることが考えられる。なお、メタトランスクリプトームデータによる系統解析では、細菌種の単純な存在比を反映していないことに留意する必要がある。

2.3.1.6 土壌サンプルのメタトランスクリプトーム解析

メタトランスクリプトームデータを用いて、遺伝子オーソロググループを作成し、それぞれの発現量を導出した。この発現量のデータを用いて、レブリン酸を含む培地で培養しているサンプル群 (Lev[+]; レブリン酸添加1, 2, 3時間後サンプル) とレブリン酸を含まない培地で培養しているサンプル (Lev[-]; 前培養サンプル、レブリン酸不添加1, 2, 3時間後サンプル) を比較することで、レブリン酸代謝酵素遺伝子のスクリーニングを行った。第一次スクリーニングとして、各遺伝子オーソログに対し、maximum value Fold Changeを計算し、Lev[+]における発現量の高い遺伝子オーソログを抽出した。その結果、全1,961グループから、100グループを獲得した (Table S2)。次に、この100グループそれぞれの代表配列を、BLASTを用いてKEGG Genesに対して相同性検索を行い、その機能を予測した。この結果を用いて、第二次スクリーニングとして、レブリン酸代謝に無関係な機能を持つ遺伝子オーソログを除去した。これにより、42グループに絞り込まれ、これらをレブリン酸代謝候補遺伝子とした (Table 7)。候補遺伝子には、特に反応にCoAの関わる酵素 (LOG_1819、LOG_2949、LOG_2688、LOG_2951) や酸化還元酵素 (LOG_1819、LOG_2736、LOG_2787、LOG_2671、LOG_2806)、アミノ酸代謝酵素 (LOG_2667、LOG_2484、LOG_2711、LOG_2792、LOG_2786) が多く含まれていた。

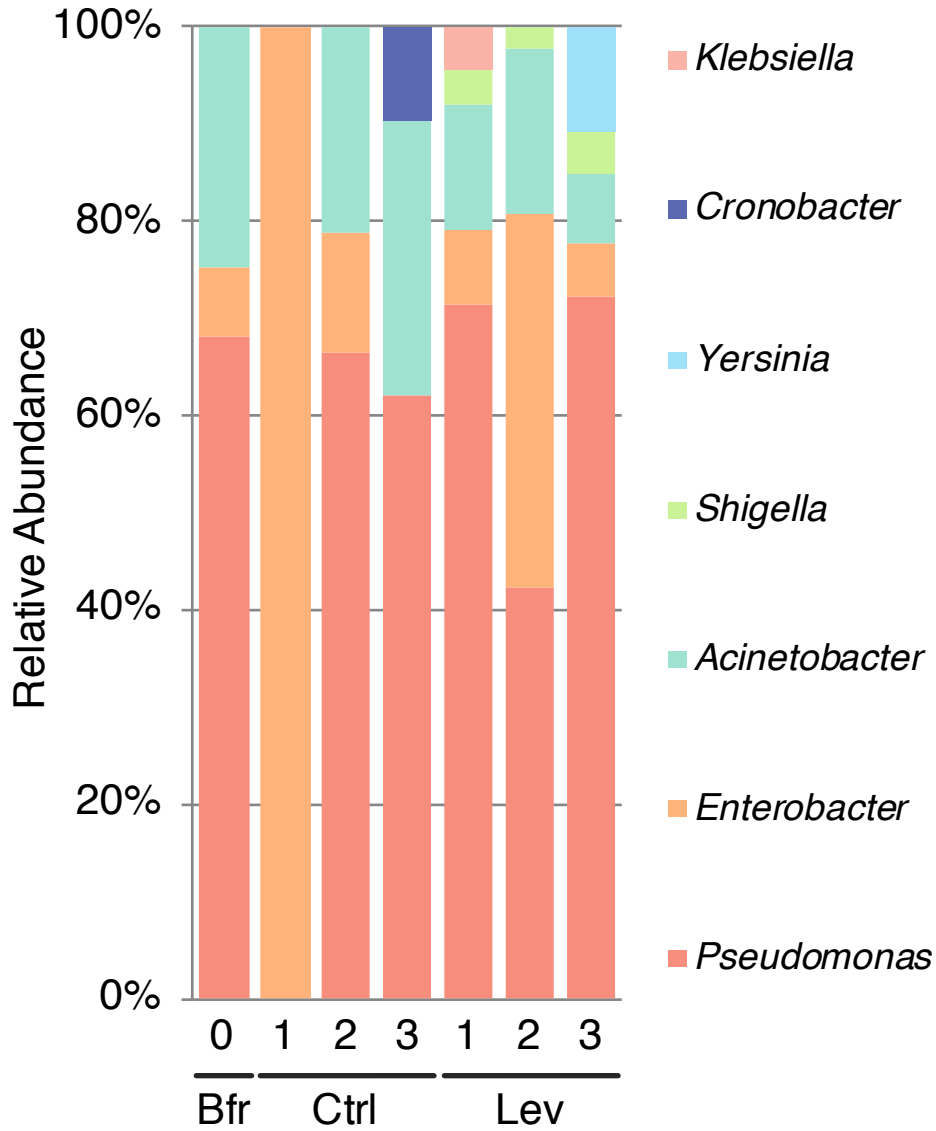


Figure 5 レブリン酸添加、及び不添加時の土壌サンプルの系統組成

gyrB、*rpoB*及び*rplC*遺伝子の発現量を微生物ごとに集計したサンプルの系統組成を表す。縦軸は各微生物の相対存在量、横軸はサンプル名を表す。サンプル名上段における数字は培養時間、サンプル名下段におけるBfr、Ctrl、及びLevは、それぞれレブリン酸添加直前サンプル、レブリン酸不添加サンプル、及びレブリン酸添加後サンプルを表す。

Table 7 土壌サンプル由来レブリン酸代謝候補遺伝子

遺伝子オーソログ グループID	タンパク質名	KEGG Orthology	maximum value fold change
LOG_2782	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase [EC:2.7.1.148]	K00919	12.52
LOG_2212	None	K07003	8.42
LOG_1819	putative oxidoreductase	K15977	5.83
LOG_2736	isocitrate dehydrogenase [EC:1.1.1.42]	K00031	5.42
LOG_2958	hypothetical protein		5.04
LOG_2226	hypothetical protein		4.82
LOG_2199	hypothetical protein		4.78
LOG_2751	hypothetical protein		4.78
LOG_1005	aconitate hydratase 2 / 2-methylisocitrate dehydra tase [EC:4.2.1.3 4.2.1.99]	K01682	4.60
LOG_2826	hypothetical protein		4.59
LOG_1912	hypothetical protein		4.49
LOG_2949	malate synthase [EC:2.3.3.9]	K01638	4.25
LOG_2787	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alc ohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	K00121	4.17
LOG_2684	hypothetical protein		4.15
LOG_2667	beta-alanine--pyruvate transaminase [EC:2.6.1.18]	K00822	4.05
LOG_2947	acetylacetyl-CoA synthetase I/II/III large subunit [EC:2.2. 1.6]	K01652	4.04
LOG_2831	hypothetical protein		4.04
LOG_2671	NADH-quinone oxidoreductase subunit M [EC:1.6. 5.3]	K00342	3.99
LOG_2484	ornithine carbamoyltransferase [EC:2.1.3.3]	K00611	3.94
LOG_2688	acetyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.1]	K01895	3.91
LOG_2827	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosp hatase (KDO 8-P phosphatase) [EC:3.1.3.45]	K03270	3.77
LOG_2939	2-isopropylmalate synthase [EC:2.3.3.13]	K01649	3.75
LOG_2711	ornithine cyclodeaminase [EC:4.3.1.12]	K01750	3.71
LOG_2954	CBS domain-containing protein	K07182	3.68
LOG_2792	phosphoserine aminotransferase [EC:2.6.1.52]	K00831	3.66
LOG_2821	hypothetical protein		3.60
LOG_2733	hypothetical protein		3.51
LOG_2823	hypothetical protein		3.47
LOG_2801	nicotinate-nucleotide adenylyltransferase [EC:2.7. 7.18]	K00969	3.46
LOG_2699	amidophosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.14]	K00764	3.44
LOG_2744	hypothetical protein		3.41
LOG_2950	hypothetical protein		3.38
LOG_2834	hypothetical protein		3.35
LOG_2786	branched-chain amino acid aminotransferase [EC: 2.6.1.42]	K00826	3.32
LOG_2771	hypothetical protein		3.22
LOG_2951	fatty-acyl-CoA synthase [EC:6.2.1.-]	K00666	3.22
LOG_2149	hypothetical protein		3.18
LOG_2706	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase [E C:2.1.1.79]	K00574	3.15
LOG_2701	hypothetical protein		3.10
LOG_2806	glutaredoxin 3	K03676	3.09
LOG_2814	hypothetical protein		3.08
LOG_2690	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglyc erate mutase [EC:5.4.2.12]	K15633	3.00

2.3.2 *meso*-ジアミノピメリン酸代謝酵素探索

2.3.2.1 土壌サンプルのメタトランスクリプトームデータによる系統解析

メタトランスクリプトームのデータを用いて、土壌サンプルに含まれる *meso*-DAP を代謝している微生物を調べた。そのために、全配列データのうち、*gyrB*、*rpoB* 及び *rplC* 遺伝子にアノテーションされた配列を用いて、属レベルの系統解析を行った (Figure 6)。レブリン酸添加直前 (Bfr) では、*Pseudomonas* 属、*Enterobacter* 属、及び *Acinetobacter* 属の3属の細菌が優占し、*meso*-DAP 添加後、及びコントロールでも同様の傾向が観察された。*Cronobacter* 属はコントロール (Ctrl) のみ、*Enterobacteriaceae* 科、*Salmonella* 属、*Shigella* 属、及び *Escherichia* 属は *meso*-DAP 添加後 (DAP) のみで観察された。このことから、*Enterobacteriaceae* 科、*Salmonella* 属、*Shigella* 属、及び *Escherichia* 属は *meso*-DAP に反応して活動していることが考えられる。なお、メタトランスクリプトームデータによる系統解析では、細菌種の単純な存在比を反映していないことに留意する必要がある。

2.3.2.2 土壌サンプルのメタトランスクリプトーム解析

メタトランスクリプトームデータを用いて、遺伝子オーソロググループを作成し、それぞれの発現量を導出した。この発現量のデータを用いて、*meso*-DAP を含む培地で培養しているサンプル群 (DAP[+]; *meso*-DAP 添加1, 2, 3時間後サンプル) と *meso*-DAP を含まない培地で培養しているサンプル (DAP[-]; 前培養サンプル、*meso*-DAP 不添加1, 2, 3時間後サンプル) を比較することで、*meso*-DAPDH のスクリーニングを行った。第一次スクリーニングとして、各遺伝子オーソログに対し、maximum value Fold Change を計算し、Lev[+]における発現量の高い遺伝子オーソログを抽出した。その結果、全1,961グループから、44グループを獲得した (Table 8)。次に、この44グループそれぞれの代表配列を、BLASTを用いてKEGG Genesに対して相同性検索を行い、その機能を予測した。*meso*-DAP の添加によって誘導された遺伝子には、全体的な傾向は確認されなかった。

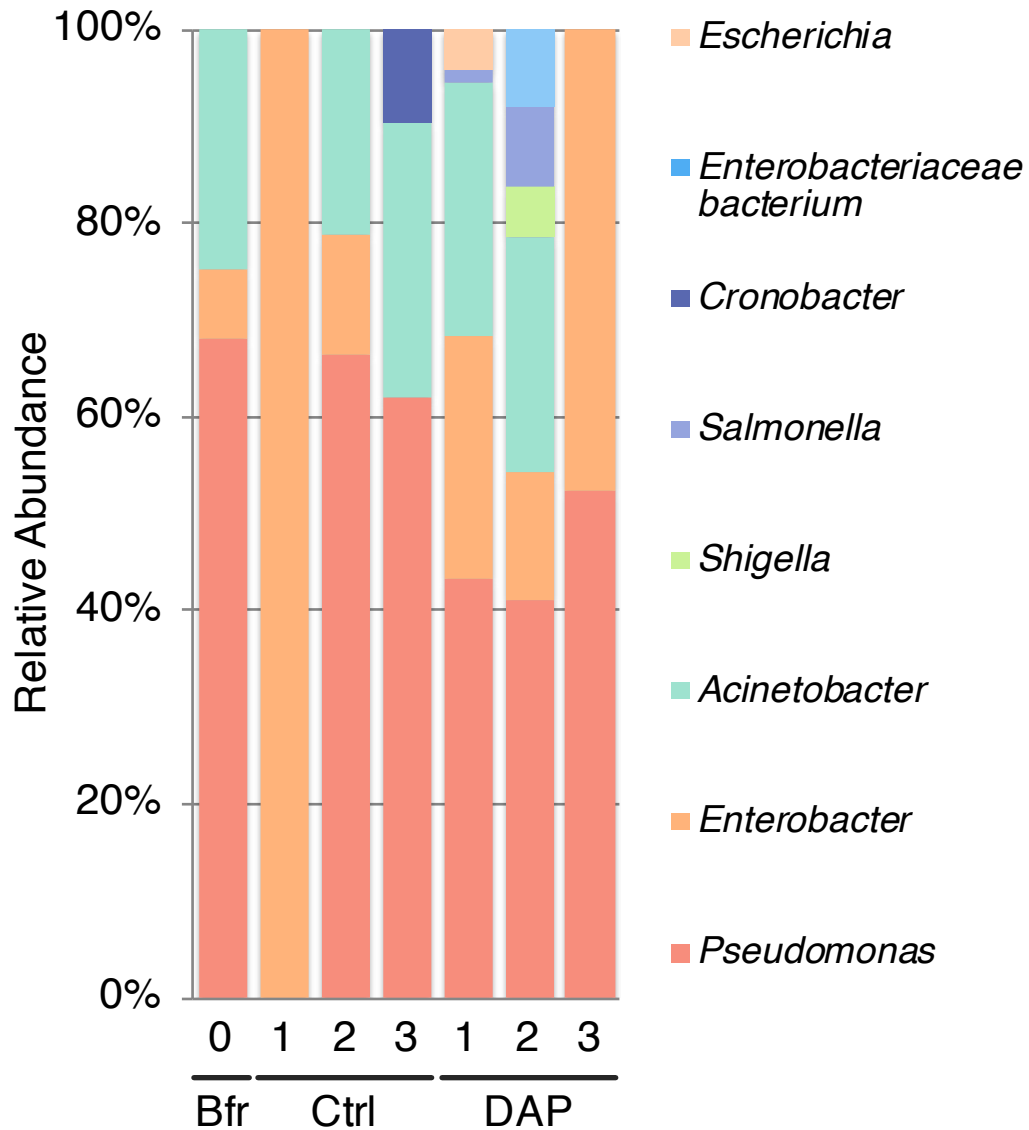


Figure 6 *meso*-DAP添加、及び不添加時の土壌サンプルの系統組成

gyrB、*rpoB*及び*rplC*遺伝子の発現量を微生物ごとに集計したサンプルの系統組成を表す。縦軸は各微生物の相対存在量、横軸はサンプル名を表す。サンプル名上段における数字は培養時間、サンプル名下段におけるBfr、Ctrl、及びDAPは、それぞれ*meso*-DAP添加直前サンプル、*meso*-DAP不添加サンプル、及び*meso*-DAP添加後サンプルを表す。

Table 8 *meso*-DAPの添加によって誘導された遺伝子

遺伝子オーソログ グループID	タンパク質名	KEGG Orthology	Maximum value fold change
DOG_1961	hypothetical protein		35.40
DOG_2597	hypothetical protein		18.00
DOG_2550	polar amino acid transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.21]	K02028	15.73
DOG_2617	heme oxygenase	K07215	7.41
DOG_2625	hypothetical protein		6.09
DOG_1129	hypothetical protein		5.95
DOG_2646	acetolactate synthase I/II/III large subunit [EC:2.2.1.6]	K01652	5.70
DOG_2638	isocitrate dehydrogenase kinase /phosphatase [EC:2.7.1.5 3.1.3.-]	K00906	5.62
DOG_2623	tRNA (guanine37-N1)- methyltransferase [EC:2.1.1.228]	K00554	5.61
DOG_2593	integration host factor subunit beta	K05788	5.60
DOG_2568	peptidylprolyl isomerase [EC:5.2.1.8]	K01802	5.35
DOG_2522	hypothetical protein		5.34
DOG_2505	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit beta [EC:3.6.3.14]	K02112	5.30
DOG_2534	hypothetical protein		5.00
DOG_2347	putative sigma-54 modulation protein	K05808	4.85
DOG_2269	GDP-L-fucose synthase [EC:1.1.1.271]	K02377	4.58
DOG_2611	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain [EC:1.17.4.1]	K00525	4.55
DOG_1820	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase [EC:2.7.7.9]	K00963	4.55
DOG_1889	malate synthase [EC:2.3.3.9]	K01638	4.50
DOG_1844	hypothetical protein		4.43
DOG_2596	hypothetical protein		4.38
DOG_2608	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase [EC:2.5.1.54]	K01626	4.38
DOG_1873	PTS system, mannose-specific IID component	K02796	4.28
DOG_2631	6-phosphofructokinase 1 [EC:2.7.1.11]	K00850	4.26
DOG_2753	hypothetical protein		4.24
DOG_2570	type VI secretion system secreted protein Hcp	K11903	4.11
DOG_2925	hypothetical protein		4.00
DOG_1241	hypothetical protein		3.99
DOG_2628	elongation factor Ts	K02357	3.93
DOG_1217	hypothetical protein		3.91
DOG_2645	single-strand DNA-binding protein	K03111	3.73
DOG_2580	hypothetical protein		3.73
DOG_2543	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit gamma [EC:3.6.3.14]	K02115	3.70
DOG_2560	hypothetical protein		3.54
DOG_2523	D-methionine transport system substrate-binding protein	K02073	3.54
DOG_2553	acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.-]	K06445	3.52
DOG_1795	osmotically inducible protein OsmC	K04063	3.51
DOG_2641	L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase [EC:4.1.1.86]	K13745	3.51
DOG_2268	peroxiredoxin (alkyl hydroperoxide reductase subunit C) [EC:1.11.1.15]	K03386	3.46
DOG_2633	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase [EC:2.1.1.79]	K00574	3.41
DOG_2520	hypothetical protein		3.39
DOG_2885	hypothetical protein		3.36
DOG_2621	starch synthase [EC:2.4.1.21]	K00703	3.33
DOG_2528	1,4-alpha-glucan branching enzyme [EC:2.4.1.18]	K00700	3.09

2.4 考察

2.4.1 レブリン酸代謝酵素の反応について

本研究ではレブリン酸の添加によって、CoAの関わる酵素 (OG_4206、OG_4392、OG_3686、OG_4670、OG_2707、OG_3648、OG_3534、OG_3630、OG_4388、OG_2821、OG_2602、LOG_1819、LOG_2949、LOG_2688、LOG_2951; Table 5, 7) や酸化還元酵素 (OG_3402、OG_4670、OG_3332、OG_2365、OG_4927、OG_3540、OG_4388、LOG_1819、LOG_2736、LOG_2787、LOG_2671、LOG_2806; Table 5, 7) 、脱炭酸酵素 (OG_3332、OG_3097、OG_3555、OG_4927、OG_3164; Table 5) 、アミノ酸代謝酵素 (LOG_2667、LOG_2484、LOG_2711、LOG_2792、LOG_2786; Table 7) の遺伝子の発現量が変動していた。特に、CoAの関わる酵素と酸化還元酵素は二度のスクリーニングの両方で多数検出されており、これらの反応によってレブリン酸が代謝されている可能性が非常に高い。また、これらの酵素がレブリン酸に対して反応した場合、Figure 7のような反応が起こることが予想される。

レブリン酸は直鎖のカルボン酸であり、構造が脂肪酸に類似している。このため、脂肪酸の代謝と同様の手順で分解されることが考えられる。脂肪酸は、アシルCoAシターゼによりアシルCoAに変換され、 β 酸化によって分解される。このことから、本研究においてCoAの関わる酵素と酸化還元酵素が多数検出されたことは、この仮説を支持していると言える。また、本研究ではTCA回路に関わる遺伝子 (OG_2707、OG_3097、OG_3686、OG_4206、LOG_1005、LOG_2688、LOG_2690、LOG_2736、LOG_2787、LOG_2792、LOG_2949; Table 5, 7) も多数検出された。これは、レブリン酸が脂肪酸の β 酸化により分解されて生成した物質の代謝を行うためであると考えられる。

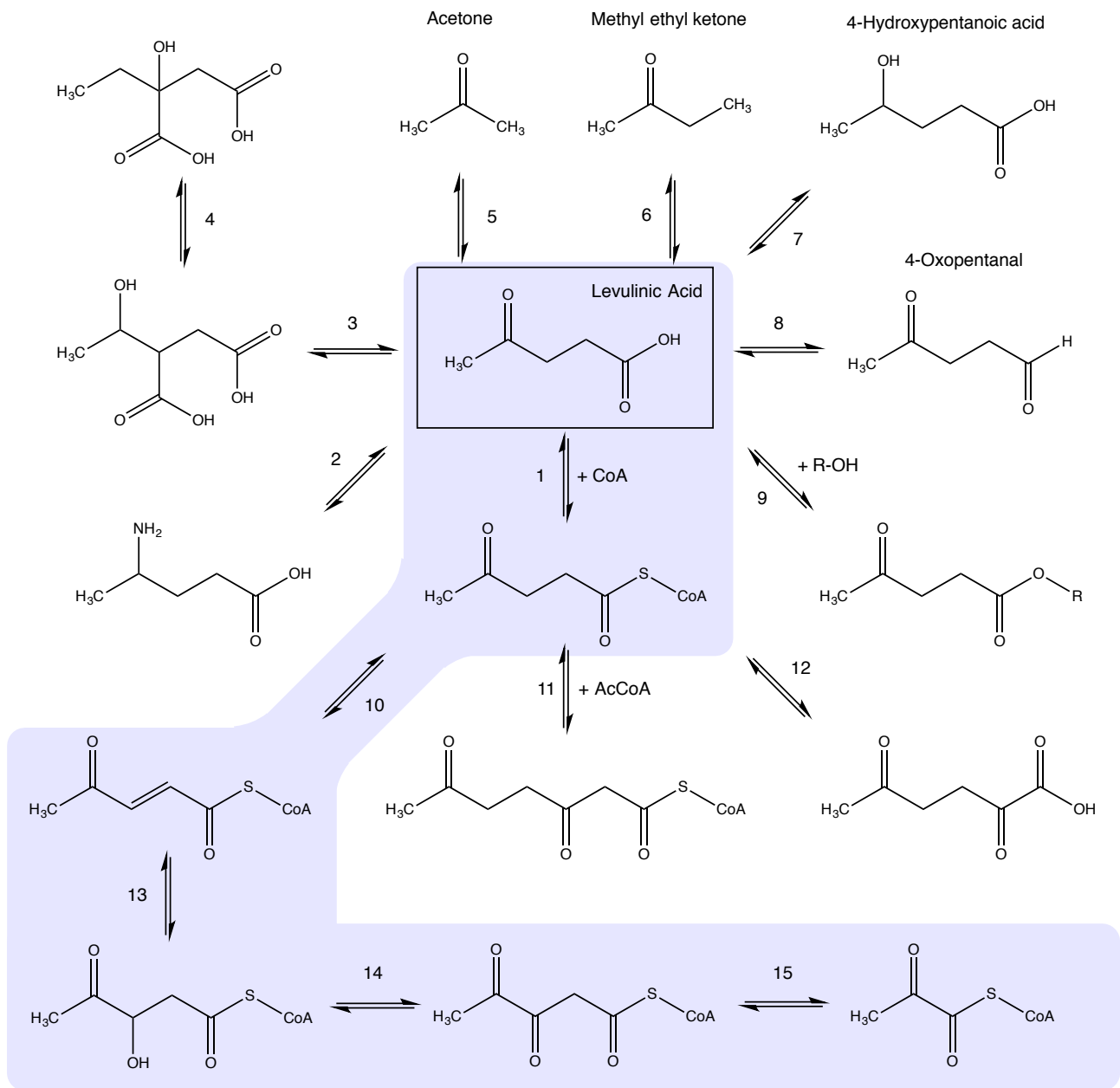


Figure 7 候補遺伝子によるレブリン酸代謝の反応予想図

本研究により得られたレブリン酸代謝候補遺伝子によるレブリン酸の代謝反応の予想図を表す。青背景は、脂肪酸のβ酸化経路と相似な反応経路を表す。各反応に対する対応遺伝子は以下の通りである。

1: OG_3402, OG_3686, OG_2707, OG_2821, OG_2602, LOG_2688, LOG_2951

2: LOG_2667, LOG_2792, LOG_2786 3: OG_4927, OG_3332, LOG_1819, LOG_2736

4: LOG_1005 5: LOG_2949 6: OG_3097, OG_3555, OG_4927, OG_3164

7: OG_4670, OG_2365, LOG_2787, LOG_2671 8: OG_3540 9: OG_3648

10: OG_4670, OG_4388

11: OG_4206, OG_4392, OG_3915, OG_3534, OG_3630, OG_2833

12: OG_3332, LOG_1819 13: - 14: OG_4670, OG_2365, LOG_2787, LOG_2671

15: OG_4206, OG_4392, OG_3915, OG_3534, OG_3630, OG_2833

2.4.2 レブリン酸に対する誤反応について

本研究において、レブリン酸の添加によって、GABA、グルタミン、グルタミン酸、オルニチンのトランスポーター (LOG_1904, LOG_1599, LOG_2945, LOG_2710, LOG_1221; Table S2) や代謝酵素 (OG_1915, OG_2584, OG_2955, OG_3399, LOG_2484, LOG_2711, LOG_2786; Table S1, S2) の発現量にも変化が起こっていた。これらの化合物はいずれもアミノ酸であるが、4または5つの炭素が直列に結合したカルボン酸でもあり、レブリン酸に構造が類似している化合物である (Figure 8)。先行研究において、レブリン酸やGABA、 β -アミノ酸が、 δ -アミノレブリン酸のトランスポーターの競合阻害することが報告されている (Moretti et al., 2002)。また、マウスにおいて、 δ -アミノレブリン酸の合成酵素とオルニチンの脱炭酸酵素が同じ転写因子によって制御されていることも報告されている (Mayr and Montminy, 2001)。このことから、本研究において検出されたGABA、グルタミン、グルタミン酸、オルニチンの代謝酵素も、レブリン酸を認識することができる酵素の可能性があり、活性が低い、もしくは無い場合でもタンパク質工学的に反応部位を改変することでレブリン酸代謝酵素を構築することができると考えられる。

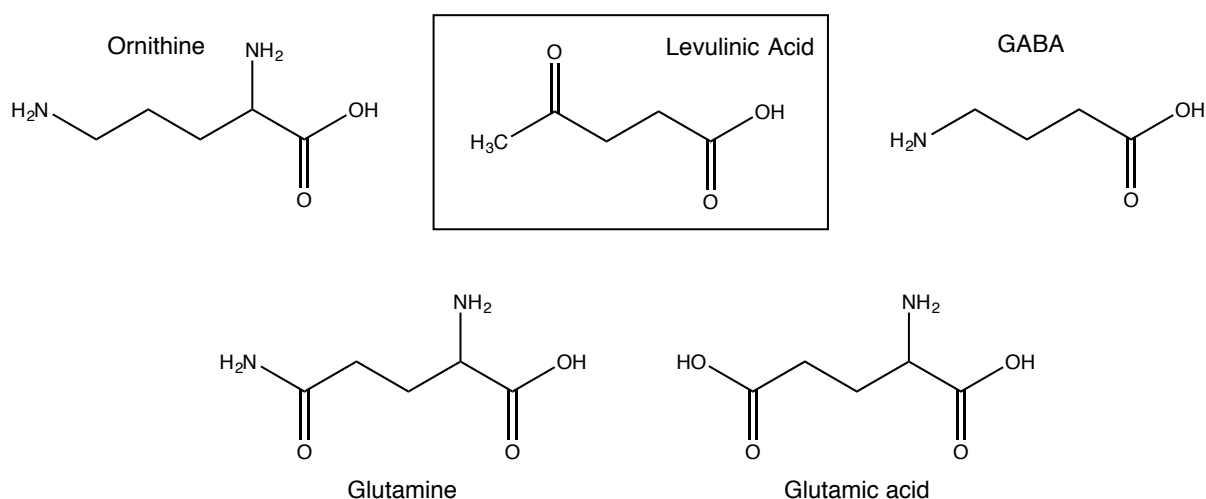


Figure 8 レブリン酸とその類似化合物の構造

オルニチン (左上)、レブリン酸 (中央上)、GABA (右上)、グルタミン (左下)、グルタミン酸 (右下) の構造を表す。

2.4.3 レブリン酸代謝可能な微生物について

本研究では、レブリン酸を唯一の炭素源として集積培養を行った。このため、2.3.1.2の集積培養サンプルのメタトランスクリプトームデータによる系統解析で検出された微生物 (*Pseudomonas*属、*Klebsiella*属、*Acinetobacter*属、*Enterobacter*属、*Aeromonas*属、*Raoutella*属、*Escherichia*属; Figure 3) はレブリン酸代謝可能な微生物である可能性が高いと言える。*Pseudomonas*属、*Klebsiella*属、*Acinetobacter*属、及び*Enterobacter*属については、土壌サンプルからのスクリーニングにおいても検出されている (Figure 5)。*Pseudomonas*属については、Steinbüchelらによって*Pseudomonas* sp. GP4BH1がレブリン酸を唯一の炭素源とした培地で単離培養可能であると報告されている (Steinbüchel and Wiese, 1992)。また、土壌サンプルからのスクリーニングにおいて、レブリン酸添加後サンプルのみで検出された*Klebsiella*属、*Shigella*属、及び*Yersinia*属についても、レブリン酸代謝可能な微生物である可能性が示唆された。特に*Klebsiella*属は先行研究においては報告されていないが、本研究の結果からレブリン酸を代謝している可能性が非常に高いと言える。

2.4.4 *meso*-ジアミノピメリン酸代謝酵素の反応について

meso-DAP代謝酵素の探索では、*meso*-DAPの添加によって誘導された遺伝子に有意な傾向は見られず、*meso*-DAPDHも誘導発現遺伝子としては検出されなかった。これは、*meso*-DAPが必須アミノ酸の一つであるリシンの前駆物質であるためであると考えられる (Denman et al., 1955)。*meso*-DAPはLys A (ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ; EC 4.1.1.20) によってリシンに変換される。LysAはKEGG Organisms (2014年3月26日リリース) に登録されている全微生物のうち96.3%が持っている酵素であるため、*meso*-DAPは非常に多くの微生物によって代謝可能な化合物であり、通常状態でも微生物の細胞内に存在していると言える。このため、有意な遺伝子を検出することができなかったのではないかと考えられる。このことを踏まえた上で、*meso*-DAPDHの探索については、目的の酵素が明確であるため、発現量ではなく、配列情報に基づいたスクリーニングが必要であると考察される。

第3章 Enzyme Repositioning; 反応類似性による酵素探索法の構築と検証

3.1 緒言

第2章では、第1章で述べた課題のうち、メタゲノム法の低スループット性の解消のため、*in silico*によるスクリーニングを用いることで効率化を図った。続いて第3章では、微生物発酵生産に向けた酵素探索のもう一つの大きな課題である、進化系統的に離れた生物種間で機能的に類似した酵素を探索するための、配列相同性に代わる探索手法の開発を目指した。本章では、新たに「Enzyme Repositioning」を提案し、ヌートカトンを用いてその構築・検証を行った。

3.1.1 Enzyme Repositioning

Enzyme Repositioningでは、酵素の基質化合物の認識の緩さに注目し、これを利用して新規酵素のスクリーニングを行う。特定の化合物と相互作用する生体分子は、その化合物と類似した部分構造を持つ別の化合物とも相互作用することがある。このことは、特に受容体の分野で注目され、アゴニストやアンタゴニストと呼ばれる生体内で働く物質の類似化合物によって生体内での神経伝達や免疫系の制御を行う薬剤が開発されている。一方で、このような類似化合物と相互作用を行うことは、酵素反応においても同様に発生する。酵素反応では、酵素の基質認識部位が基質化合物の特定の部分構造を認識して結合し、反応を引き起こす。このため、ある酵素はその基質化合物に類似した化合物であれば、同様に反応する可能性がある。そこで、本手法ではこの酵素の基質類似化合物への反応可能性を利用し、基質化合物の化学構造的類似性から、目的の化合物を合成できる酵素の探索を行う。

次に、Enzyme Repositioningによる細菌が持つ目的の化合物の合成酵素スクリーニングの手順を説明する。Enzyme Repositioningの概略図をFigure 9に示す。Enzyme Repositioningでは、ある化合物（以降、ターゲット化合物と呼ぶ）に対する合成酵素を以下の手順により、従来の探索手法とは異なる探索空間からスクリーニングすることが可能である。

1. ターゲット化合物を生成するための出発物質となる化合物を決定する。
2. 出発物質からターゲット化合物を生成する反応（以降、ターゲット反応と呼ぶ）と類似した酵素反応を酵素反応データベースから取得する。
3. ターゲット反応に対する類似酵素反応に関連付けられている酵素遺伝子を取得する。

4. 酵素活性確認実験により真に活性のある酵素を取得する。

Enzyme Repositioningでは、従来の合成酵素探索で主流であった配列類似性を利用しないため、従来法とは根本的に異なる探索空間から新規合成酵素を取得することが可能になると考えられる。

3.1.2 植物二次代謝化合物としてのヌートカトン

ヌートカトンは、植物二次代謝化合物の1つで、グレープフルーツの特徴的な香りの要因となっている化合物である。その爽やかな香りのため、香料や化粧品、洗剤など幅広い化成品に利用されている。また、近年ではヌートカトンには抗酸化作用 (Leonhardt and Berger, 2015; Nemmar et al., 2018) や抗炎症作用 (Leonhardt and Berger, 2015; Nemmar et al., 2018; Tsoyi et al., 2011) があることが報告されており、更に注目を増している。ヌートカトンの生産では、直接抽出以外の方法としては有機合成が一般的だが、有機合成では8段階の反応 (Laine, 2017) や、危険な物質である *t*BuOOH の使用 (Julien and Wallace, 2008)、または環境負荷の大きい重金属触媒 (MnO₂) (Serra, 2016) を利用する必要がある。近年では、*Chlorella* (藻類) (Asakawa et al., 2003)、*Botrytis cinerea* (真菌) (Huang et al., 2001)、*Mucor* (菌類) (Mihashi et al., 2008) または *Rhodococcus* (細菌) (Ito et al., 2002) を用いて、安価な化合物であるバレンセンまたはヒドロキシバレンセンからヌートカトンを生成する方法も開発されているが、工業的に大量生産するためにより適した酵素の発見が望まれている。そこで、本研究ではヌートカトンの合成酵素をターゲットとしてEnzyme Repositioningによる探索を行った。

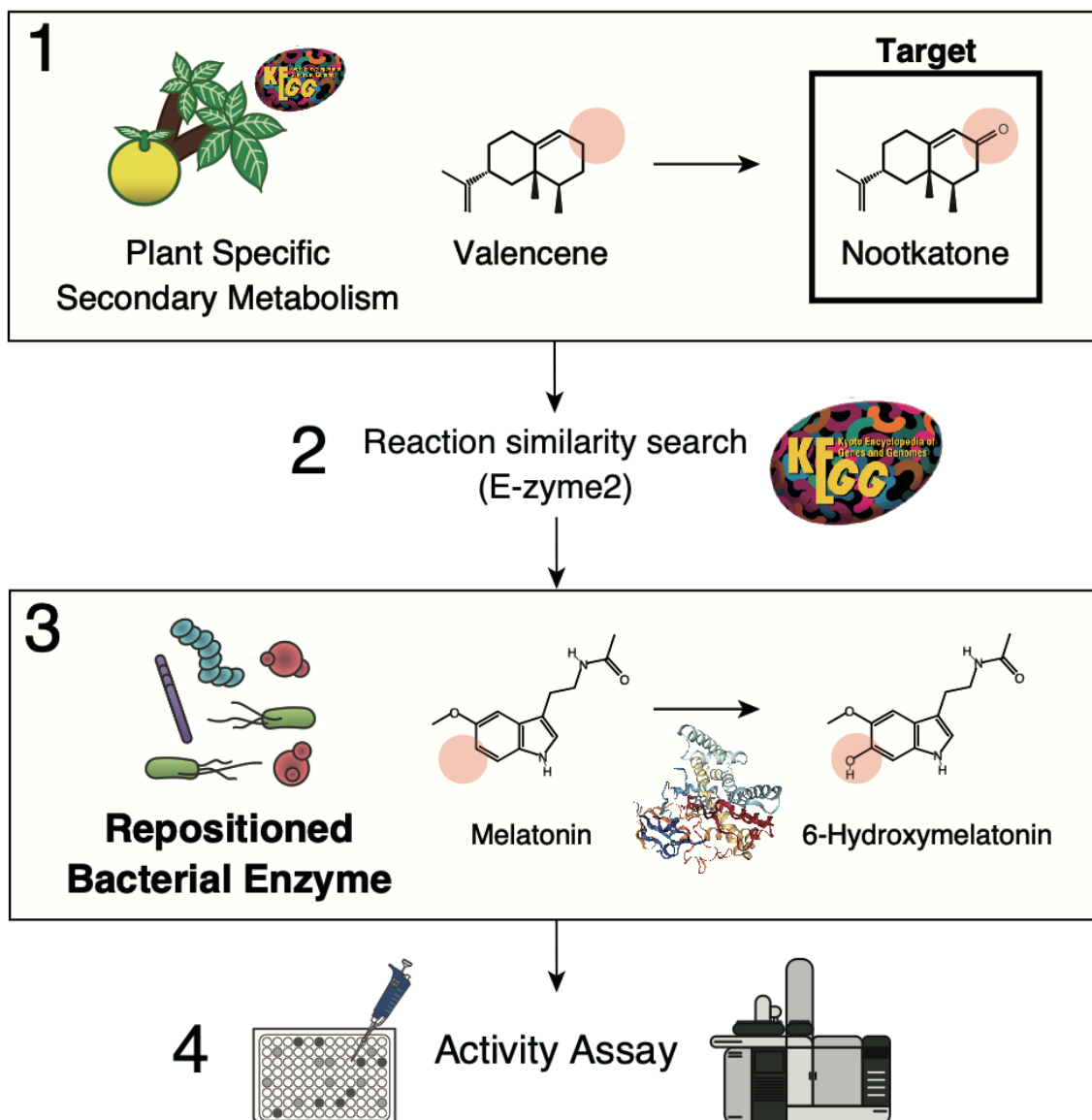


Figure 9 Enzyme Repositioningによる新規酵素スクリーニング手順の概略図

ターゲット化合物を生成するための出発物質となる化合物を決定し、出発物質からターゲット化合物を生成する反応と類似した酵素反応を酵素反応データベースから取得する。ターゲット反応に対する類似酵素反応に関連付けられている酵素遺伝子を検索し、代替酵素を発見する。この代替酵素候補の中から、酵素活性確認実験により真に活性のある酵素を取得する。

3.2 材料・方法

3.2.1 KEGGデータベースに含まれる植物特異的二次代謝反応の取得

本研究では、代替酵素を探索するターゲット反応として、全生物のうち植物だけが所有している二次代謝反応を利用した。植物特異的二次代謝反応はKEGG (Kanehisa et al., 2019) より取得した。KEGGは代謝反応のデータベースで、ゲノム解析などの機能アノテーションに使用されている。2019年12月9日時点において、6,269の生物種ゲノムを格納しており、11,334の代謝反応、18,652の化合物をデータベースとして利用できる。本手順ではversion 2015-03-19を使用した。以下に植物特異的二次代謝反応の取得の詳細な手順を示す。

1. KEGG Reactionに存在する反応のうち、KEGG Orthology (KO) が関連付けられている場合、KOに属する遺伝子 (KEGG Genes) がすべて植物の遺伝子の反応を取得した。
2. KEGG Reactionに存在する反応のうち、KEGG Orthology (KO) が関連付けられていない場合、その反応が関連付けられている代謝経路 (KEGG Pathway) が植物のみに対応している反応を取得した。
3. 1、2の反応のうち、代表となる反応 (main type) を取得した。

3.2.2 植物特異的二次代謝反応に対する細菌代替酵素の反応類似性探索

3.2.1により取得された植物特異的二次代謝反応に対する細菌由来の代替酵素を反応類似性に基づいて探索した。反応類似性探索には、E-zyme2 (Moriya et al., 2016) を用いた。E-zyme2は、酵素反応の存在は確認されているがその遺伝子が特定されていない酵素 (オーファン酵素) を反応類似性に基づいて探索するためのwebアプリケーションである。入力としてオーファン酵素の反応化合物と生成化合物のペアを要求し、化合物ペアをグラフアライメントすることで反応部位を検出する (詳細は3.2.3を参照)。この反応部位をKEGGデータベースに存在する全酵素反応に対し検索し、反応が類似している酵素反応を取得する。その後、取得した類似酵素反応と関連付けられている遺伝子を探索結果として出力する。本手順ではversion 2015-03-19を使用した。以下に詳細な実行手順を示す。

1. 植物特異的二次代謝反応の出発化合物、生成化合物を入力として、E-zyme2を実行した。
2. 1.を3.2.1により取得されたすべての植物特異的二次代謝反応に対して実行した。
3. E-zyme2の出力結果を酵素反応の類似性スコアごとに集計した。

3.2.3 E-zyme2による反応間類似性評価

E-zyme2は、以下のアルゴリズムにより酵素反応間の類似性を計算する。

1. SIMCOMP (Hattori et al., 2010) を用いて、基質化合物と生成化合物のペアの間で化学構造アライメントを計算する。
2. 構造アライメントから反応中心を検出し、RDM (Reaction center, Difference atom, Matched atom) パターンを検出する。
 - RDMパターンとは、反応中心 (Reaction center) となるR原子、基質と生成物で変化が生じたD原子 (Difference atom)、基質と生成物で変化の生じないM原子 (Matched atom) で定義される、反応前後の生化学的な構造変化の特徴を表現する文字列である (Figure 10)。
3. 2で検出したRDMパターンとKEGGデータベース中の酵素反応のRDMパターンを比較し、Tanimoto係数 (Tanimoto, 1957) を用いて類似度を計算し、反応による変化が類似している酵素反応を取得する。
4. 基質化合物と反応化合物のペアの部分構造の出現頻度で表現したプロファイルに変換し、3で取得した酵素反応の基質化合物と反応化合物のペアも同様に部分構造プロファイルに変換する (Figure 10)。
5. 部分構造プロファイル同士の類似度をTanimoto係数によって計算し、これを酵素反応間の類似性スコアとする。

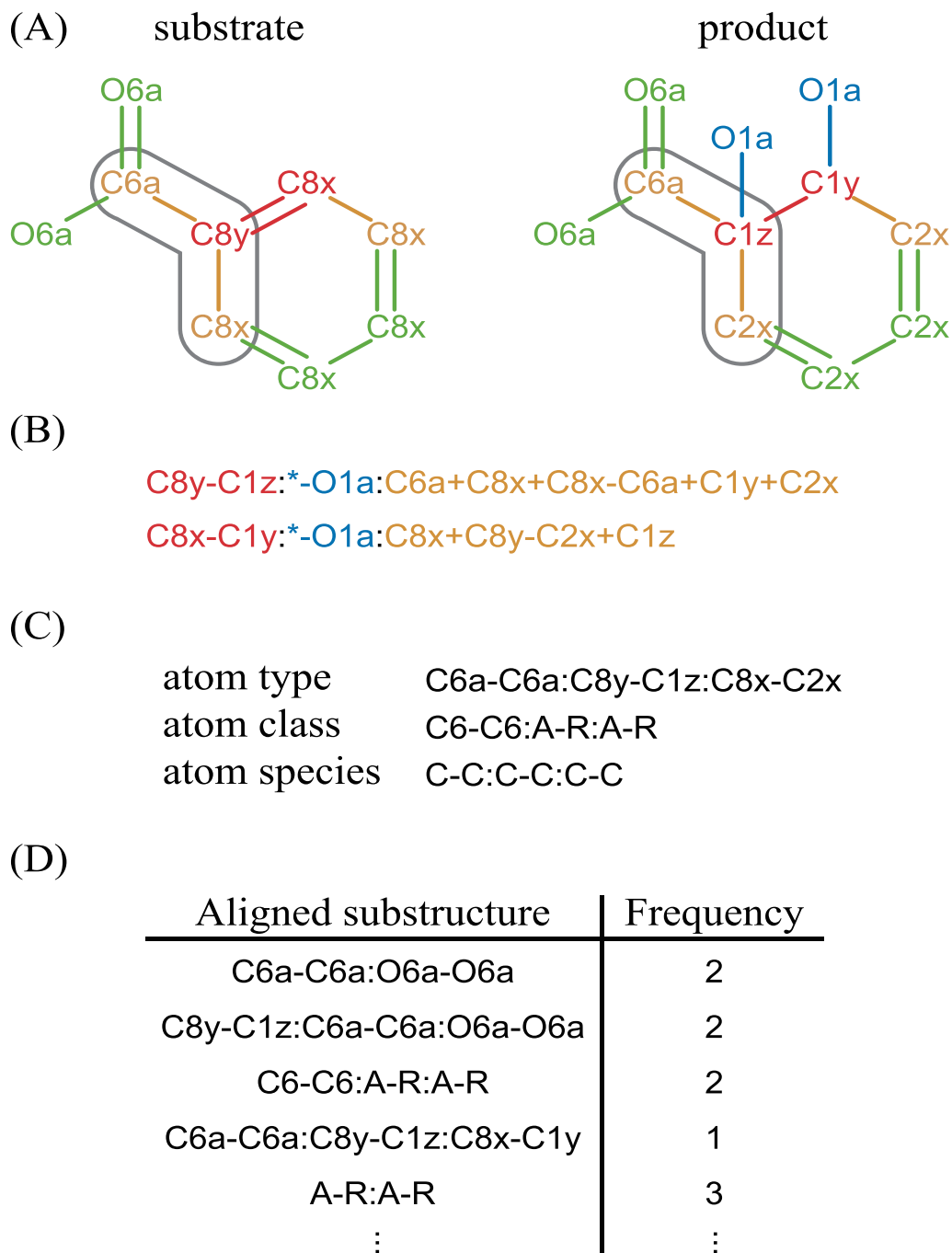


Figure 10 RDMパターンと部分構造プロファイル (Moriya et al., 2016) より引用)

各図は、それぞれ (A) 基質化合物と生成化合物の化学構造、(B) Aの反応のRDMパターン、(C) Aにおける灰色の囲いで示されている3原子のアラインメントから得られる部分構造、(D) 各部分構造の頻度を表した部分構造プロファイルを表す。

3.2.4 細菌由来の代替酵素の系統的分布解析

3.2.2により取得された植物特異的二次代謝反応の代替酵素が細菌系統的にどのように分布しているかを明らかにするために、以下の解析を実施した。

6. KEGG Organismsの種ごとに、代替酵素遺伝子が検出された植物二次代謝反応数を集計した。
7. KEGG Organismsの各種をNCBI taxonomy IDに変換した。
8. NCBI taxonomy IDのリストを用いて、NCBI Common Taxonomy Tree (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>) (Federhen, 2012) により、系統樹を作成した。
9. 2.及び、4.で取得したデータをiTOL4 (Letunic and Bork, 2019) により可視化した。

3.2.5 植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の機能的分布解析

植物特異的二次代謝反応とその代替酵素が代謝機能的にどのように分布しているかを明らかにするために、以下の解析を実施した。

1. 階層構造を持った代謝機能分類データベースであるKEGG Briteにより、植物特異的二次代謝反応を代謝機能によって分類した。
2. 1.と同様に、細菌代替酵素の本来の酵素反応を代謝機能によって分類した。
3. 1. および2.の機能分類から機能分類系統樹を作成した。
4. 植物特異的二次代謝反応とその代替酵素、それぞれを別に機能分類系統樹にマップし、その間を直線で結ぶことで、両者の関係性を可視化した。

3.2.6 ヌートカトン合成酵素の探索

バレンセンからヌートカトンを生合成するための合成酵素を探索するために、バレンセン (KEGG Compound ID: C17277) 、及びヌートカトン (KEGG Compound ID: C17914) を入力として、3.2.2と同様の手順で、E-zyyme2による代替酵素検索を実行した。本手順ではversion 2016-01-16を使用した。続いて、これによって得られた代替酵素遺伝子のうち、*Streptomyces coelicolor* A3(2)由来の遺伝子のみを抽出した。

3.2.7 プラスミドベクター構築

3.2.6により取得されたヌートカトン合成酵素候補遺伝子について、*Streptomyces lividans* TK64による酵素活性を測定するために、発現プラスミドベクターを構築した。本章で使用した実験用調製培地・試薬はすべて、Table 9の組成で調整した。

まず始めに、*S. coelicolor* A3(2)のゲノムDNAを抽出した。抽出にはフェノール・クロロホルム法を使用した。続いて、*S. coelicolor* A3(2)のゲノムDNAからヌートカトン合成酵素候補遺伝子をPCRによって増幅した。各遺伝子の増幅に使用したプライマーをTable 10に示す。PCRにはKOD -Plus- Neo (Toyobo) を用い、Table 11の条件で実行した。PCR産物を精製後、*SCO3636*以外については制限酵素SphIによって切断した。*SCO3636*のPCR産物は精製後、制限酵素EcoT22Iによって切断した。発現用ベクターには、pIJ702D (Harazono et al., 2014) を使用した (Figure 11) 。pIJ702Dを制限酵素StuIとSphI (*SCO3636*の場合はEcoT22I) で切断し、制限酵素で切断済みのPCR産物と合わせてライゲーション反応を実施した。ライゲーション反応にはLigation Mix (Takara Bio) を使用し、16°Cで1時間反応させた。

構築したプラスミドベクターは、*Escherichia coli* JM109 (Takara Bio) を用いてクローニングした。クローニング時、*Escherichia coli* JM109の培養はLB培地 (Nacalai tesque) で、37°C、16時間の条件で行われた。

Table 9 第3章で使用した実験用調整培地、試薬組成一覧

名称	試薬名	量	単位	備考	
TSB培地	pancreatic digest of casein	17.0	g	BD Tryptic Soy Broth (Catalogue no. 211825; BD, Heidelberg, Germany) を使用	
	papaic digest of meal	3.0	g		
	glucose	2.5	g		
		sodium chloride	5.0	g	調製後にオートクレーブ滅菌して使用
		dipotassium phosphate	2.5	g	
		miliQ水	1.0	L	
		合計	1.0	L	
SSMP培地	Glucose	50.0	g	調製後にオートクレーブ滅菌して使用	
	K ₂ HPO ₄	8.0	g		
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	g		
		yeast extract	5.0	g	
		polypeptone	5.0	g	
		miliQ水	1.0	L	
		合計	1.0	L	

Table 10 *S. coelicolor* A3(2)由来ヌートカトン合成酵素候補遺伝子プライマー一覧

プライマー名	塩基配列	制限酵素
SCO5223F	5'- ATGACCGTCGAGTCCGTCAACCCCGAAACC -3'	StuI
SCO5223R_SphI	5'- CCGCATGCTCACCGCGCCACGGGCCTGACC -3'	SphI
SCO3099F	5'- ATGACCGGCAGCTCTTCCGCCCCCGGTCCCC -3'	StuI
SCO3099R_SphI	5'- CCGCATGCTCACTTTTGGCGTCGGCGACGGA -3'	SphI
SCO3770F	5'- ATGGGGAGTGCTCCCCGTTTAATTGTCTCT -3'	StuI
SCO3770R_SphI	5'- CCGCATGCTCAGCCGAGCCGCACCGGCAGT -3'	SphI
SCO3636F	5'- ATGACGGCTGCAACCGATGG -3'	StuI
SCO3636R_EcoT22I	5'- CCATGCATTCAGAGTTCCACGCGTAGCT -3'	EcoT22I

Table 11 KOD -Plus- Neo PCR条件

温度	時間	繰り返し
94°C	120 sec	-
98°C	10 sec	30 cycle
68°C	90 sec	

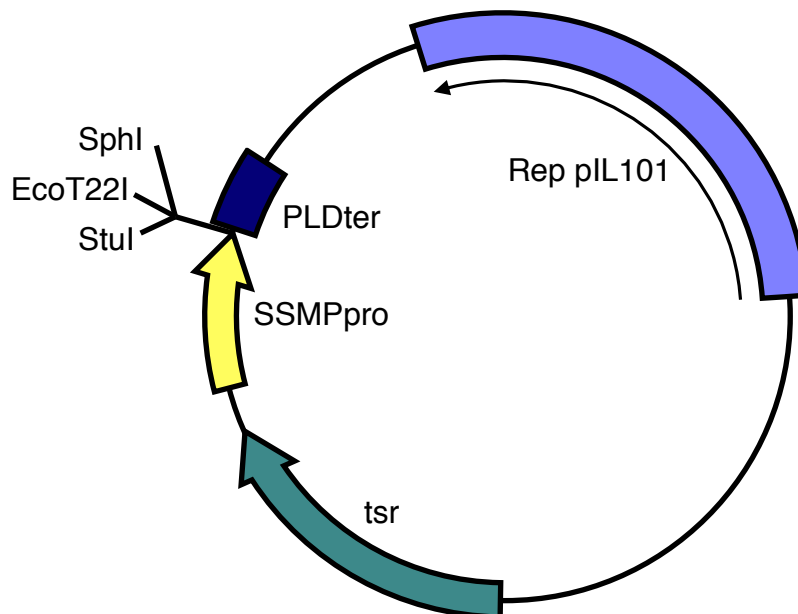


Figure 11 pIJ702Dのベクターマップ

SSMPproはプロモーター領域、PLDterは*Streptomyces cinnamoneus*由来のホスホリパーゼD遺伝子ターミネーター領域、tsrはチオストレプトン耐性遺伝子、rep pIJ101は複製起点を示す。

3.2.8 酵素活性確認実験

3.2.7により構築された発現プラスミドベクターを用いて、ヌートカトン合成酵素の酵素活性の有無を測定した。まず、発現プラスミドベクターをKieser法 (Kieser, 1984) により *S. lividans* TK64 (NBRC 15678) に導入した。*S. lividans* TK64は、製品評価技術基盤機構 (NITE) より分譲株を購入した。形質転換体は、50 µg/mL thiostreptonを添加したTSB培地 (BD Tryptic Soy Broth; BD) で、28°C、72時間培養し、ヌートカトン合成酵素発現株を構築した。

ヌートカトン合成酵素発現株のうち、シングルコロニーを50 µg/mL thiostreptonを添加したTSB培地 5 mLで28°C、72時間、200 rpmで振盪培養した。この培養液から1.5 mLを採取し、10 µg/mL thiostreptonを添加したSSMP培地 50 mLに添加して、バッフル付きフラスコを用いて 28°C、160 rpmで振盪培養した。72時間後、グルコースとバレンセン (SIGMA-ALDRICH) をそれぞれ最終濃度10%、0.025%となるように添加し、168時間培養した。

3.2.9 GC/MSによるヌートカトンの検出

3.2.8の培養液を2 mL採取し、14,000 x g、20分間、遠心分離することで細胞を収集した。細胞ペレットを1.5 mLのエタノールに再懸濁し、上清 1 mLを採取して、0.25 mLの蒸留水と0.5 mLの*n*-ヘキサンを添加した。混合攪拌後、14,000 x g、1分間の遠心分離により、*n*-ヘキサン層を回収した。この*n*-ヘキサン層中のヌートカトンをGC/MSにより分析した。ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC/MS) には、GC-2010 (Shimadzu) 、及び GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu) を使用した。分析は、Table 12の条件で行った。また、ポジティブコントロールとして、標品のヌートカトン (Tokyo Chemical Industry) も同様の条件で分析した。この条件のとき、ヌートカトンは、約12.0分の時点でピークとして検出された。

Table 12 GC/MS実行条件

条件	
イオン化方法	電子イオン化
イオン化電圧	70 eV
イオン源温度	200°C
カラム	InertCap5 (30 m length x 0.25 mm i.d. x 0.45 µm film thickness)
キャリアガス	ヘリウム (1.81 mL/min)
カラム温度	50°C (2 min) to 280°C (6.5 min) at a rate of 20°C/min
気化室温度	280°C

3.2.9 SCO3770の相補性試験

3.2.8の結果から、ヌートカトン合成酵素候補遺伝子のうち、SCO3770がヌートカトン合成活性を持つことが明らかとなった。続いて、SCO3770によるヌートカトン合成活性を定量的に測定することを考えた。しかし、本実験の宿主細菌である*S. lividans* TK64は、3.2.5により取得されたヌートカトン合成酵素候補遺伝子のホモログをゲノム中に保有しているため、SCO3770の正確なヌートカトン合成活性を定量するためには、この交絡因子を除いて評価する必要がある。そこで、次にSCO3770の相補性試験を実施した。

SCO3770の相補性試験を実施するために、まずSCO3770ホモログのノックアウト株を構築した。ノックアウト株の構築には、相同組換えによる方法を使用した。*SCO3770*遺伝子の部分領域 (Δ *SCO3770*; *SCO3770*の97塩基目から1090塩基目の領域)を増幅するためのプライマーを設計した (Table 13)。*S. coelicolor* A3(2)のゲノムをテンプレート、設計したプライマーを用いて、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio) によりPCR反応を行い、*SCO3770*部分破壊用遺伝子断片を増幅した。PCR反応はTable 14の条件で行った。PCR産物を精製後、制限酵素EcoRI、KpnIによって切断した。遺伝子破壊用ベクターには、pk18melCを使用した (Figure 12)。pk18melCを制限酵素EcoRI、KpnIで切断し、制限酵素で切断済みのPCR産物と合わせてライゲーション反応を実施した。ライゲーション反応にはLigation Mix (Takara Bio) を使用し、16°Cで1時間反応させた。

構築したプラスミドベクターは、*Escherichia coli* JM109 (Takara Bio) を用いてクローニングした。クローニング時、*Escherichia coli* JM109の培養はLB培地 (Nacalai tesque) で、37°C、16時間の条件で行われた。

遺伝子破壊用プラスミドベクターを用いて、Kieser法により*S. lividans* TK64を形質転換した。形質転換体は、カナマイシンを添加したTSB培地 (BD Tryptic Soy Broth; BD) で、28°C、72時間培養した。この結果、相同組換えによりゲノム中の*SCO3770*ホモログ遺伝子内に*SCO3770*遺伝子破壊用配列が挿入され、SCO3770破壊株を取得した。また、SCO3770破壊株に対し、3.2.6で作成したSCO3770発現用プラスミドベクターをKieser法により導入することで、SCO3770相補株を取得した。

S. lividans TK64野生株、SCO3770過剰発現株、SCO3770破壊株、SCO3770相補株の4株に対し、3.2.7と同様の手順で培養し、酵素活性確認実験を行った。

その後、培養液を2 mL採取し、14,000 x g、20分間、遠心分離し、上清1 mLと菌体を分けて回収した。上清については、0.5mLのヘキサンを加え振盪後、遠心 (14,000 rpm, 1分間) により、ヘキサン

層を回収した。菌体については、3.2.8と同様の手順で処理した。これにより得られたヘキサン層をGC/MSにて分析した。GC/MSには、GC-2010 (Shimazu) 、及び GCMS-QP2010 Plus, (Shimazu) を使用した。分析は、Table 15の条件で行った。ヌートカトンの量は、 β -カリオフィレン(Tokyo Chemical Industry)の検量線により算出した。

Table 13 *SCO3770*部分破壊遺伝子プライマー一覧

プライマー名	塩基配列	制限酵素
<i>SCO3770</i> dF_EcoRI	5'- TTTTGAATTCGTGCACCGGGTGTTCGTGCC -3'	EcoRI
<i>SCO3770</i> dR_KpnI	5'- TTTTGGTACCGATGCCGGTCGAGCAGCAGG -3'	KpnI

Table 14 PrimeSTAR PCR条件

温度	時間	繰り返し
98°C	30 sec	-
98°C	30 sec	30 cycle
55°C	30 sec	
68°C	60 sec	

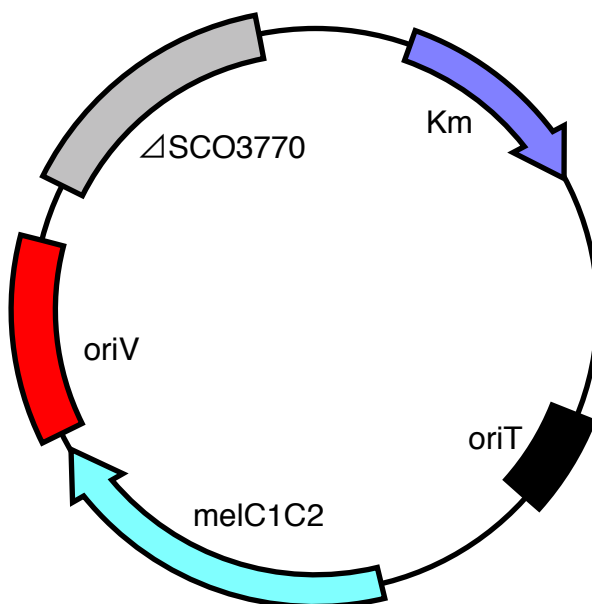


Figure 12 *pk18melC*のベクターマップ

oriTおよびoriVは、大腸菌の複製起点、Kmはカナマイシン耐性遺伝子、melC1C2は*Streptomyces antibioticus*由来のmelCオペロン領域、 Δ SCO3770は*SCO3770*遺伝子の部分配列を示す。

Table 15 ガスクロマトグラフィー分析条件

条件	
検出器	FID (検出器温度: 290°C)
カラム	InertCap5 (30 m length x 0.25 mm i.d. x 0.45 um film thickness)
キャリアガス	Helium (2.57 mL/min)
カラム温度	50°C (2 min) to 280°C (6.5 min) at a rate of 20°C/min
保持時間	ca. 12 min

3.2.10 新規ヌートカトン合成酵素の配列相同性評価

Enzyme Repositioningによる酵素探索と配列相同性探索を比較するために、Enzyme Repositioningによって新たに発見されたヌートカトン合成酵素と既存のヌートカトン合成酵素との配列相同性を評価した。以下に詳細な手順を示す。

1. Uniprotデータベース (Bateman et al., 2017) から、既存のヌートカトン合成酵素のアミノ酸配列を取得した。
 - a. 既存のヌートカトン合成酵素には以下の3種を使用した。
 - i. E1B2Z9 (*Cichorium intybus*)
 - ii. B8ZIU7 (*Pleurotus sapidus*)
 - iii. U5U1Z3 (*Bacillus subtilis*)
2. BLAST (Altschul et al., 1990) を用いて、SCO3770と既存のヌートカトン合成酵素との配列相同性を計算した。
3. COBALT (Papadopoulos and Agarwala, 2007) を用いて、SCO3770と既存のヌートカトン合成酵素のマルチプルアライメントを行った。
4. 既存のヌートカトン合成酵素をクエリとして、*S. coelicolor* A3(2)の遺伝子に対して配列相同性検索を行い、検出可能性を評価した。

3.3 結果

3.3.1 植物特異的二次代謝反応に対する細菌由来代替酵素の探索

Enzyme Relocation法によって、細菌が持つ植物の二次代謝化合物の合成を代替できる酵素を取得するために、まず、生物の代謝反応データベースであるKEGGから植物特異的二次代謝反応を取得した。これにより、植物特異的二次代謝反応880反応を獲得した。

次に、この880反応に対する細菌由来の代替酵素を探索するためにE-zyme2を使用した。E-zyme2は、出発化合物・生成化合物ペアを入力することで、KEGGデータベースに収録されている「よく似た反応」を探索し、その反応を担う遺伝子オーソロググループ (KEGG OC) と反応類似性スコアを出力する。ここで言う「よく似た反応」とは、単に出発化合物・生成化合物ペアが予測された酵素反応の出発化合物・生成化合物ペアと、化学的、構造的に類似していることだけでなく、その酵素反応の変化パターン (RDMパターン (Kotera et al., 2004)) が類似していることを意味する。これにより、遺伝子配列類似性ではなく、反応類似性に基づいて植物得意定期二次代謝反応に対する細菌由来の代替酵素を探索した。その結果、880反応のうち、693反応に対して、何らかの細菌による代替酵素遺伝子を発見した (Figure 13)。反応類似性スコアごとに集計すると、類似性スコア (E-zyme2 Score) > 0.4で447反応、> 0.9で74反応であった (Figure 13)。

E-zyme2の開発された経緯として、酵素反応の存在は確認されているがその遺伝子が特定されていない酵素 (オーファン酵素) 反応に対する遺伝子アノテーションがあるため、オーファン酵素反応についても評価した。上で取得した植物特異的二次代謝反応 880反応のうち、66反応がオーファン酵素反応であった。これに対し、E-zyme2によって何らかの細菌遺伝子を発見できた反応が59反応であった (Table 16)。

植物特異的二次代謝反応のうち、細菌由来の代替酵素を発見できた反応とそうでない反応の違いを確認するために、それぞれを反応の酵素の分類ごとに集計し、分類ごとに偏りがあるかどうかをFisherの正確確率検定により確認した (Table 17)。その結果、EC番号が発行されている反応については、有意な偏りは存在しなかった。一方で、EC番号が発行されていない反応、及びオーファン酵素反応については、有意に代替酵素を発見しやすかった。

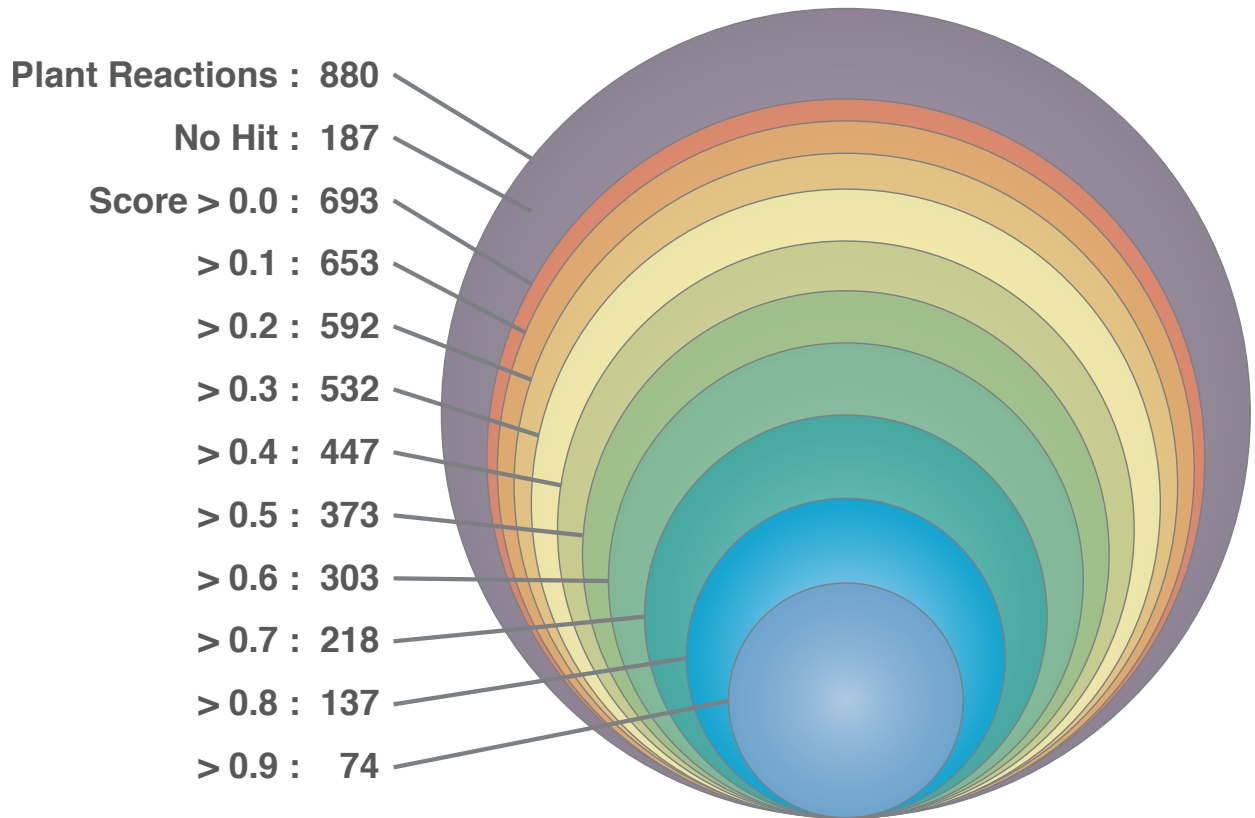


Figure 13 細菌によって代替可能な植物特異的二次代謝反応

KEGGデータベースから取得された植物特異的二次代謝反応880反応のうち、E-zyme2の反応類似性スコアごとに細菌による代替酵素候補を発見した反応数を示す。

Table 16 Enzyme Repositioning法による細菌代替酵素を検出したオーファン反応

Plants RPAIR	Max score	Substrate		Products			Pathway	Notes for products*
		KEGG ID	Name	KEGG ID	Name	KEGG ID		
RP00102	1.000	C00151	L-Amino acid	C00161	2-Oxo acid	rn00250 rn00400 rn00966	Alanine, aspartate and glutamate metabolism Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis Glucosinolate biosynthesis	-
RP03338	1.000	C01772	trans-2-Hydroxycinnamate	C05158	trans-beta-D-Glucosyl-2-hydroxycinnamate	rn00940	Phenylpropanoid biosynthesis	Anti-protozoal (Calzada et al., 2003)
RP02634	0.973	C00814	Biochanin A	C02675	Dihydrobiochanin A	rn00943	Isoflavonoid biosynthesis	-
RP03579	0.960	C02495	2'-Hydroxydaidzein	C03567	2'-Hydroxydihydrodaidzein	rn00943	Isoflavonoid biosynthesis	-
RP00723	0.890	C02646	4-Coumaryl alcohol	C05855	4-Hydroxycinnamyl alcohol 4-D-glucoside	rn00940	Phenylpropanoid biosynthesis	-
RP03204	0.871	C01514	Luteolin	C03515	Luteolin 7-O-glucuronide	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	Anti-tumor (Dória et al., 2016)
RP04168	0.853	C00015	UDP	C01623	UDP-apiose	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP00476	0.811	C00590	Coniferyl alcohol	C00761	Coniferin	rn00940	Phenylpropanoid biosynthesis	Anti-tumor (Alejandre-García et al., 2015)
RP09432	0.787	C11808	1,2-Dihydrovomilenine	C11809	17-O-Acetylnorajmaline	rn00901	Indole alkaloid biosynthesis	-
RP09408	0.769	C08620	Cyanidin 3-O-rutinoside	C12646	Cyanidin 3-O-rutinoside 5-O-beta-D-glucoside	rn00942	Anthocyanin biosynthesis	-
RP02213	0.763	C00389	Quercetin	C01750	Quercitrin	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	Anti-inflammatory (Comalada et al., 2005), Anti-tumor (Cincin et al., 2014)
RP09583	0.760	C12644	Pelargonidin 3-O-rutinoside	C12645	Pelargonidin 3-O-rutinoside 5-O-beta-D-glucoside	rn00942	Anthocyanin biosynthesis	-
RP02579	0.735	C00509	Naringenin	C09099	Naringenin 7-O-beta-D-glucoside	rn00941	Flavonoid biosynthesis	Anti-hyperglycemia, Anti-hyperlipidemia (Jung et al., 2017)
RP02668	0.735	C00848	6-Oxocineole	C03092	6-endo-Hydroxycineole	rn00902	Monoterpenoid biosynthesis	-

RP09250	0.718	C01761	Vomilenine	C11808	1,2-Dihydrovomilenine	rn00901	Indole alkaloid biosynthesis	-
RP11337	0.714	C01709	Hesperetin	C16422	Hesperetin 7-O-glucoside	rn00941	Flavonoid biosynthesis	-
RP00700	0.709	C01533	Syringin	C02325	Sinapyl alcohol	rn00940	Phenylpropanoid biosynthesis	Anti-tumor (Zhao et al., 2002)
RP09298	0.701	C03515	Luteolin 7-O-glucuronide	C12632	Luteolin 7-O-[beta-D-glucuronosyl-(1->2)-beta-D-glucuronide]	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP03066	0.690	C01265	3,7-Di-O-methylquercetin	C04444	3,7,4'-Tri-O-methylquercetin	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	Anti-allergic (Kawai et al., 2007)
RP09579	0.673	C12634	Kaempferol 3-O-beta-D-glucosyl-(1->2)-beta-D-glucoside	C12635	Kaempferol 3-sophorotrioside	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP03188	0.662	C01470	Acacetin	C01477	Apigenin	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	Anti-tumor (Yan et al., 2017), Anti-inflammatory (Dang et al., 2018)
RP09584	0.655	C12667	Quercetin 3-O-beta-D-glucosyl-(1->2)-beta-D-glucoside	C12668	Quercetin 3-O-beta-D-glucosyl-(1->2)-beta-D-glucosyl-(1->2)-beta-D-glucoside	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP04926	0.653	C01265	3,7-Di-O-methylquercetin	C04443	3-O-Methylquercetin	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	Anti-tumor (Martino et al., 2016)
RP04811	0.634	C06517	(S)-6-O-Methylnorlaudanosoline	C06518	(S)-Nororientaline	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP03181	0.629	C01460	Vitexin	C04024	Vitexin 2"-O-beta-D-glucoside	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP03313	0.628	C01714	Isovitexin	C04199	Isovitexin 2"-O-beta-D-glucoside	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP03351	0.626	C01804	Discadenine	C04083	N6-(Delta2-Isopentenyl)-adenine	rn00908	Zeatin biosynthesis	-
RP09350	0.624	C05625	Rutin	C10175	Quercetin 3-(2G-xylosylrutinoside)	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP11978	0.624	C15770	DIBOA	C15772	DIBOA-glucoside	rn00402	Benzoxazinoid biosynthesis	-
RP04341	0.601	C05193	12-Hydroxydihydrochelirubine	C05316	Dihydrumacarpine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP09347	0.598	C05623	Quercetin 3-O-glucoside	C12637	Quercetin 3-O-[beta-D-xylosyl-(1->2)-beta-D-glucoside]	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-

RP09253	0.597	C01852	Secologanin	C07304	Deacetyloisopecoside	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP05338	0.590	C03758	Dopamine	C07304	Deacetyloisopecoside	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP02787	0.588	C00371	Zeatin	C01513	Lupinate	rn00908	Zeatin biosynthesis	-
RP09270	0.578	C02151	Geissoschizine	C03677	4,21-Dehydrogeissoschizine	rn00901	Indole alkaloid biosynthesis	-
RP09578	0.576	C12628	Vitexin 2"-O-beta-L-rhamnoside	C12629	Isoswertisin 2"-rhamnoside	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP03169	0.565	C01433	Loganin	C01512	Loganate	rn00902	Monoterpenoid biosynthesis	Anti-inflammatory (Sozański et al., 2016), Anti-adipogenic (Park et al., 2018)
RP04343	0.558	C05194	Dihydrochelirubine	C05247	10-Hydroxydihydrosanguinarine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP04169	0.553	C04608	Apigenin 7-O-beta-D-glucoside	C04858	Apigenin 7-O-[beta-D-apiosyl-(1->2)-beta-D-glucoside]	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP02365	0.496	C00616	Quercetin 3-sulfate	C01155	Quercetin 3,3'-bissulfate	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP05417	0.460	C01852	Secologanin	C01957	Secologanate	rn00902	Monoterpenoid biosynthesis	-
RP02570	0.429	C00757	Berberine	C03329	(S)-Canadine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP11224	0.429	C00757	Berberine	C11818	(R)-Canadine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP12742	0.422	C00341	Geranyl diphosphate	C01500	Geraniol	rn00902	Monoterpenoid biosynthesis	-
RP02917	0.416	C01155	Quercetin 3,3'-bissulfate	C03897	Quercetin 3,3',7-trissulfate	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP09219	0.416	C01156	Quercetin 3,4'-bissulfate	C03898	Quercetin 3,4',7-trissulfate	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP03346	0.413	C01795	Columbamine	C04118	Isocorypalmine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP13798	0.391	C02890	Tetrahydropalmatine	C05315	Palmatine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	Anti-inflammatory (Tarabasz and Kukula-Koch, n.d.)
RP03615	0.384	C00010	CoA	C02611	(E,E)-Piperoyl-CoA	rn00960	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	-
RP11547	0.374	C05315	Palmatine	C15530	Corydaline	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-

RP02669	0.334	C00848	6-Oxocineole	C04718	1,6,6-Trimethyl-2,7-dioxabicyclo[3.2.2]nonan-3-one	rn00902	Monoterpenoid biosynthesis	-
RP03172	0.306	C01450	Ketone	C01612	Secondary alcohol	rn00073	Cutin, suberine and wax biosynthesis	-
RP09580	0.280	C12635	Kaempferol 3-sophorotrioside	C12636	Kaempferol 3-O-[6-(4-coumaroyl)-beta-D-glucosyl-(1->2)-beta-D-glucosyl-(1->2)-beta-D-glucoside]	rn00944	Flavone and flavonol biosynthesis	-
RP03614	0.271	C01746	Piperidine	C03882	Piperine	rn00960	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	-
RP04333	0.271	C05178	(R)-Reticuline	C06167	1,2-Dehydroreticuline	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP04340	0.174	C05191	Dihydrosanguinarine	C06162	Sanguinarine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	Anti-tumor (Fu et al., 2018)
RP04342	0.168	C05194	Dihydrochelirubine	C06327	Chelirubine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP04402	0.156	C05316	Dihydromacarpine	C06165	Macarpine	rn00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	-
RP00595	0.132	C00371	Zeatin	C02029	Dihydrozeatin	rn00908	Zeatin biosynthesis	-

Table 17 酵素分類におけるEnzyme Relocation法の探索可能性への影響

分類	detected	nondetected	P value*
Undefined	86	7	0.00094
EC1	279	87	0.368
EC2	196	50	0.595
EC3	47	15	0.631
EC4	64	23	0.277
EC5	27	10	0.415
EC6	2	0	1.00
合計	693	187	-
orphan	59	7	0.0396

* : Fisherの正確確率検定により検定

3.3.2 植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の機能的分布解析

KEGGデータベースに含まれる代謝反応は、生物学的意味を持った機能分類による階層構造を持っている (Kanehisa et al., 2019; Uchiyama et al., 2015)。そこで、この機能階層構造を用いて、植物特異的二次代謝反応に対する細菌代替酵素の機能的分布を解析した。機能階層構造から植物特異的二次代謝反応と、その細菌代替酵素の分類系統樹をそれぞれ作成し、元の反応と細菌酵素の対応を直線で結び、対応関係を可視化した (Figure 14)。その結果、植物特異的二次代謝反応は「Metabolism of terpenoids and polyketides」、「Biosynthesis of other secondary metabolites」に集中しているのに対し、細菌代替酵素は代謝反応全体に広く分布していた。また、一つの植物特異的二次代謝反応に対し、複数の代謝機能に属する細菌酵素が発見されていた。

酵素反応は、現在ではInternational Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) によるEC番号によって整理、分類されている。本手法は酵素反応の類似性によって代替酵素を探索しているため、植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素のEC番号は同じ、または近い分類になることが推測される。そこで、EC番号を用いた機能分類に対し、上と同様の機能分布解析を実施した。その結果、E-zyme2 による反応類似性スコアが高い多くの植物反応とその細菌代替酵素の組み合わせは同一の分類 (EC番号1桁) であった (Figure 15, 16)。一方で、一部の植物反応は、予想に反してEC番号をまたいだ細菌酵素が予測されていた。このうち特にスコアも高く多くの反応で同様の傾向であったのは、EC 2.4.1 - EC 3.2.1、EC 1.1.1 - EC 5.3.3の組み合わせであった。EC 2.4.1 - EC 3.2.1では、EC 2.4.1が六単糖の転移酵素、EC 3.2.1が糖鎖の加水分解酵素と、どちらも連続した糖から単糖、または短い糖鎖を分離する機能を持つため、類似していると判断されたと思われる。EC 1.1.1 - EC 5.3.3では、EC 1.1.1がNADまたはNADPを用いて、CH-OHを酸化する酵素、EC 5.3.1がC=Cの異性化酵素と、酸化還元に関する酵素であり、単結合を二重結合に変化させる機能を持つため、類似していると判断されたと思われる。

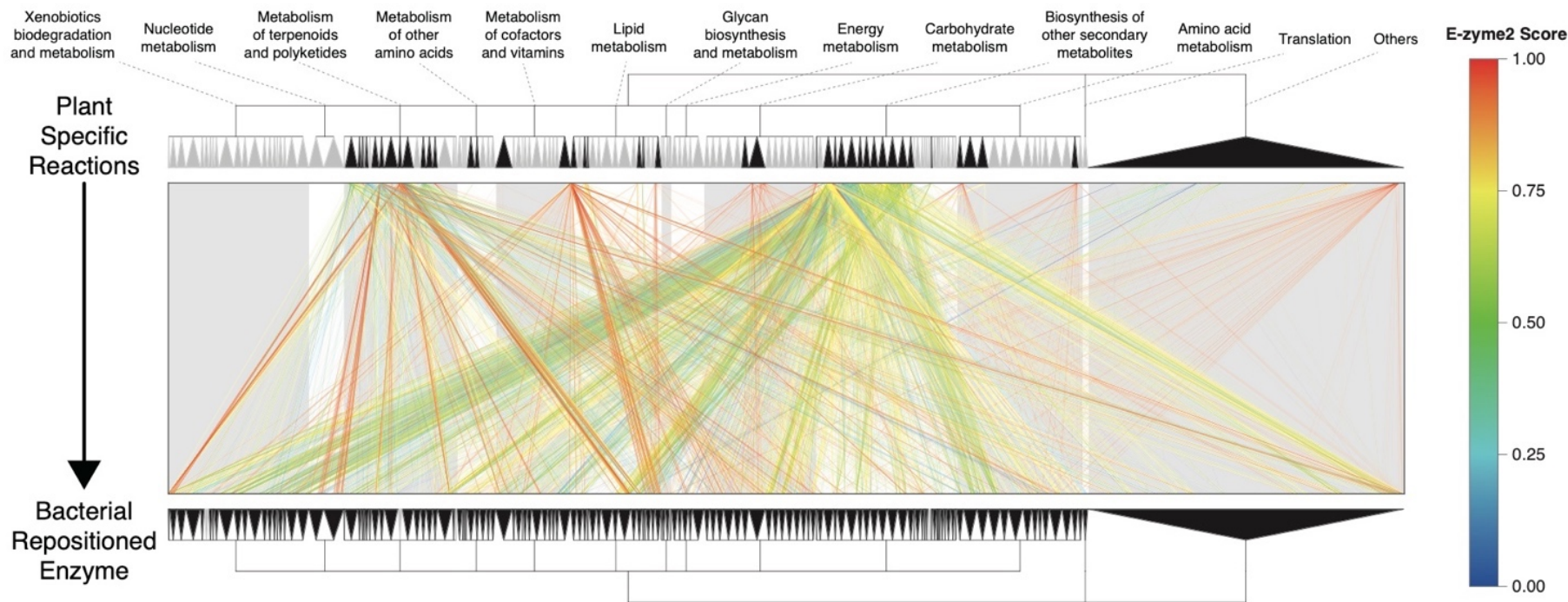


Figure 14 植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の代謝機能的分布

KEGG BRITEに基づいてKEGG REACTIONを代謝機能的に分類し、植物特異的二次代謝反応と細菌の代替酵素候補の機能分布を視覚化した。植物特異的二次代謝反応とその細菌の代替酵素候補との間を直線で接続し、直線の色がE-zyme2によるその反応類似性スコアを示す。上部および下部の木構造は機能分類を表す。木構造の葉部分の黒色は、植物反応または代替酵素候補が存在する反応経路を示し、灰色は存在しない反応経路を示す。

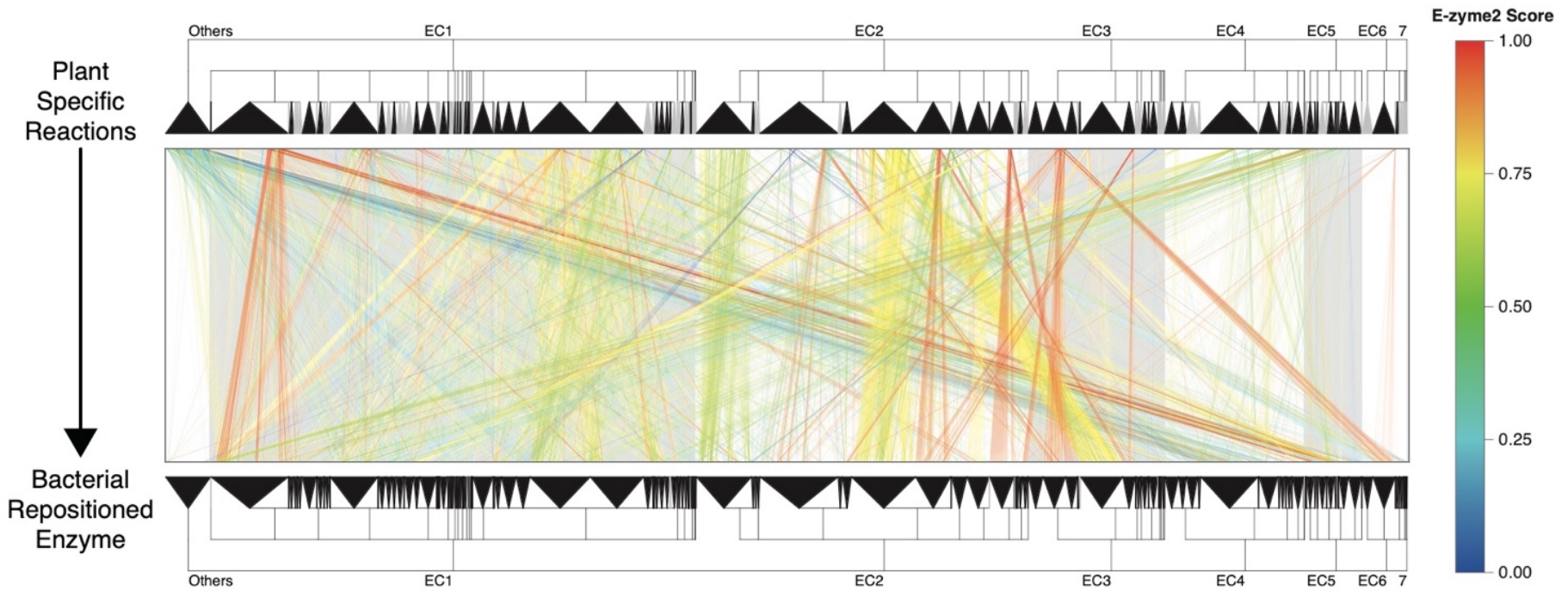


Figure 15 植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の酵素分類分布

酵素反応をIUBMBの発行するEC番号によって分類し、植物特異的二次代謝反応と細菌の代替酵素候補の機能分布を視覚化した。植物特異的二次代謝反応とその細菌の代替酵素候補との間を直線で接続し、直線の色がE-zyme2によるその反応類似性スコアを示す。上部および下部の木構造は機能分類を表す。木構造の葉部分の黒色は、植物反応または代替酵素候補が存在するEC番号を示し、灰色は存在しないEC番号を示す。

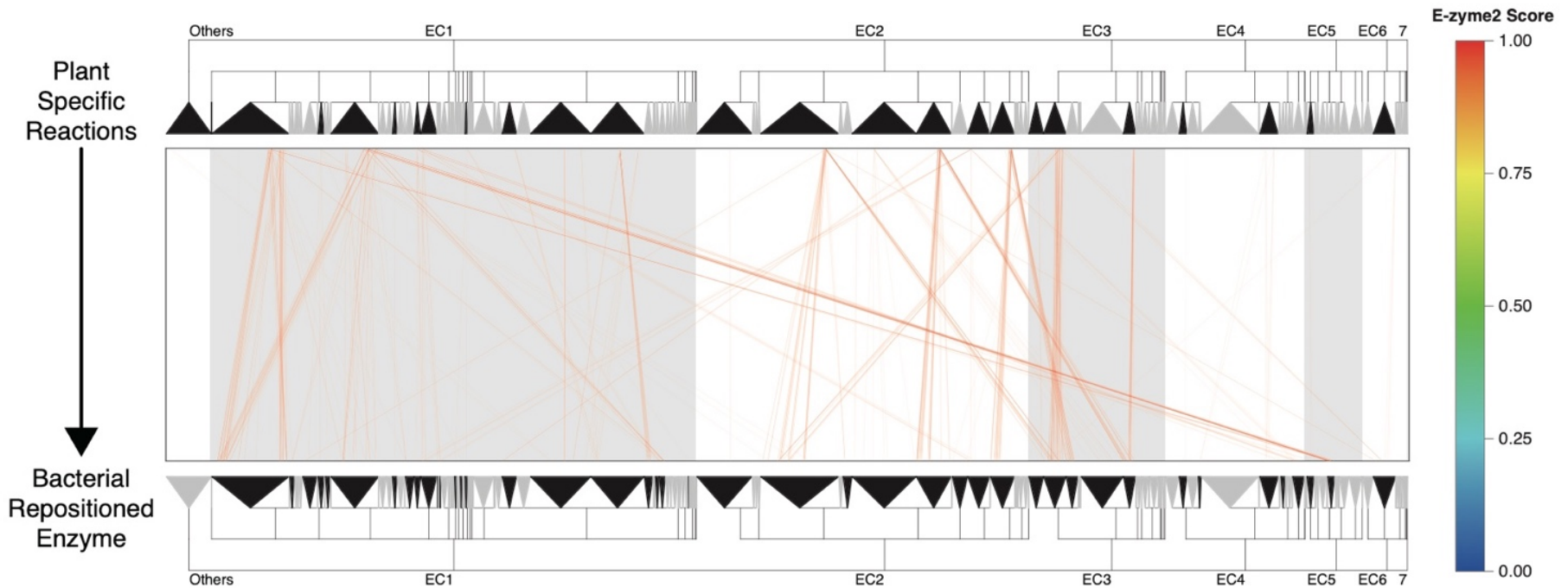


Figure 16 植物特異的二次代謝反応とその細菌代替酵素の酵素分類分布（類似性スコア > 0.9）

酵素反応をIUBMBの発行するEC番号によって分類し、植物特異的二次代謝反応と細菌の代替酵素候補の機能分布を視覚化した。このとき、E-zyme 2による反応類似性スコアが0.9より大きい植物特異的二次代謝反応とその細菌の代替酵素候補の組み合わせのみを使用した。植物特異的二次代謝反応とその細菌の代替酵素候補との間を直線で接続し、直線の色がE-zyme2によるその反応類似性スコアを示す。上部および下部の木構造は機能分類を表す。木構造の葉部分の黒色は、植物反応または代替酵素候補が存在するEC番号を示し、灰色は存在しないEC番号を示す。

3.3.3 細菌由来の代替酵素の系統的分布解析

植物特異的二次代謝反応の代替酵素候補を所有している細菌の系統的分布を解析するために、KEGG Organismsに属する細菌種ごとに代替酵素候補を発見できた反応数を集計した。この集計結果を系統情報と合わせて可視化するために、iTOL4 (Letunic and Bork, 2019) を使用した (Figure 17) 。その結果、細菌種によって代替可能な反応数には偏りがあり、ActinobacteriaとProteobacteriaが植物特異的二次代謝反応の代替酵素を特に多く所有していることが明らかになった。その中でも、*Streptomyces*、*Pseudonocardia*、*Mycobacterium*、*Myxococcus*と*Burkholderia*は他の細菌種と比べてより多くの代替酵素候補を所有していた。

代替酵素を多数所有している細菌種のうち、*Streptomyces*、*Pseudonocardia*、*Mycobacterium*、*Myxococcus*と*Burkholderia*は細菌二次代謝に関わる遺伝子を多数所有しており、多様な代謝を行っていることが報告されている。このため、単純に所有している遺伝子数が多い細菌ほど代替酵素を多く所有している可能性がある。そこで、各細菌のゲノムサイズ、ゲノム中の遺伝子数と代替可能な反応数をプロットした (Figure 18, 19) 。その結果、ゲノムサイズ、及びゲノム中の遺伝子数が大きいほど、代替可能な反応数も多いことが明らかになった。これについて、Spearmanの順位相関係数を計算すると、ゲノムサイズと代替可能な反応数が0.858、ゲノム中の遺伝子数と代替可能な反応数が0.851と高い相関が確認された。

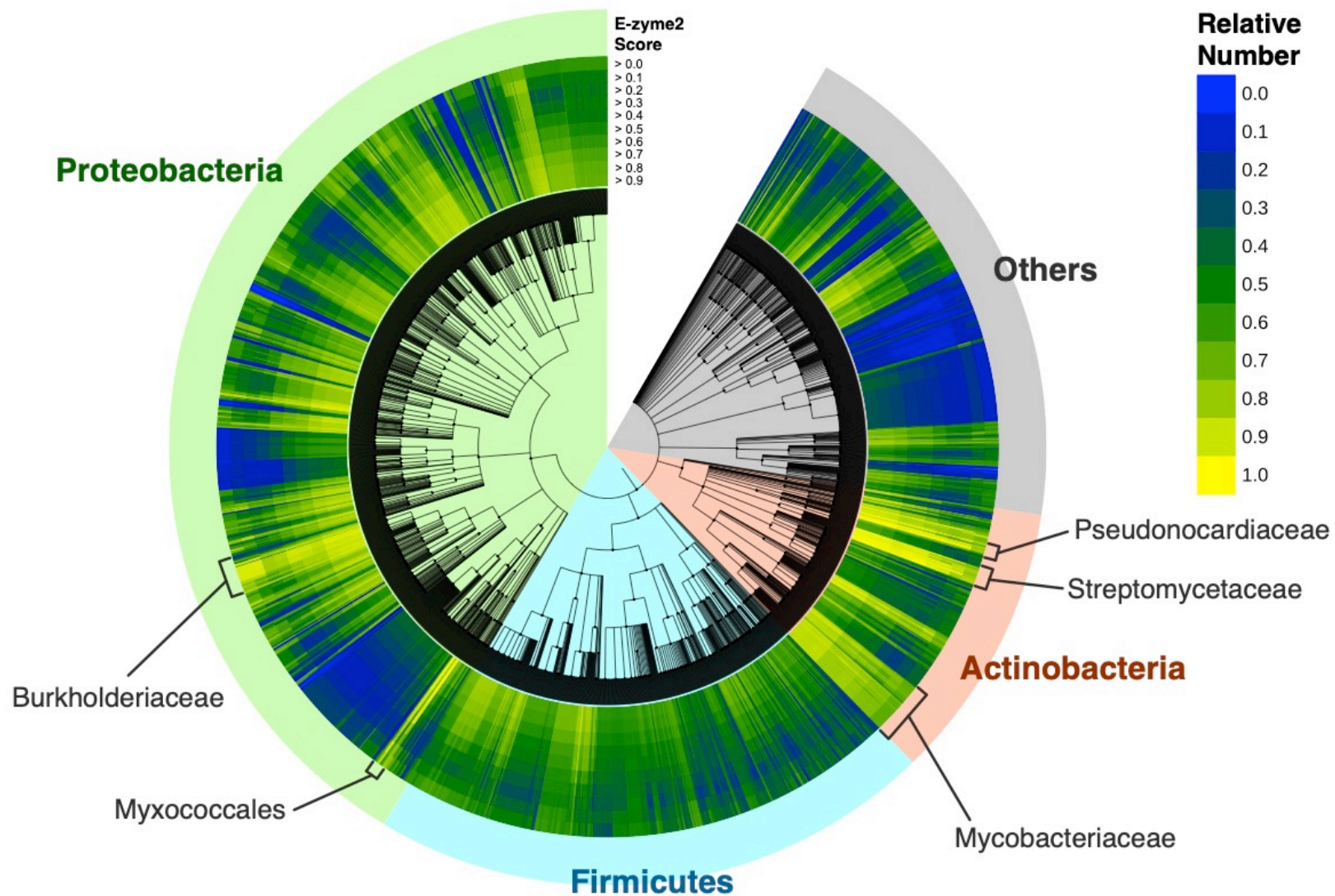


Figure 17 細菌系統ごとの代替酵素を発見した植物二次代謝反応数の分布

中央の樹状図が細菌の系統樹を表し、周囲のヒートマップは、各細菌種が代替すると予測される植物特異的二次代謝反応の相対数を示す。ヒートマップは、黄色に近いほど数多くの反応を代替し、青色に近いほど少ないことを表す。

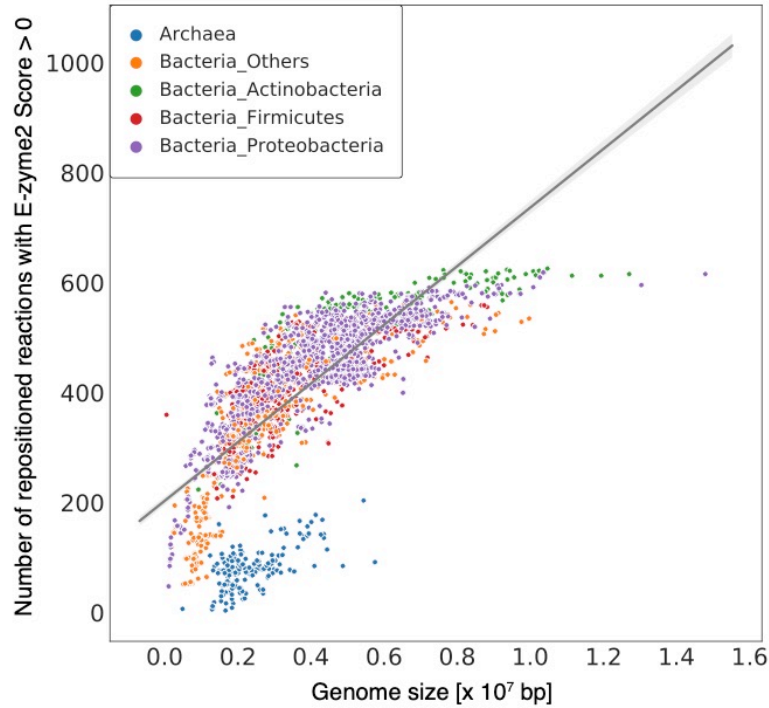


Figure 18 細菌の代替酵素所有数とゲノムサイズとの関係

縦軸は細菌種ごとの代替酵素を所有する植物特異的二次代謝反応数、横軸は細菌種のゲノムサイズを示す。プロットの色は、細菌種の系統分類を表す。

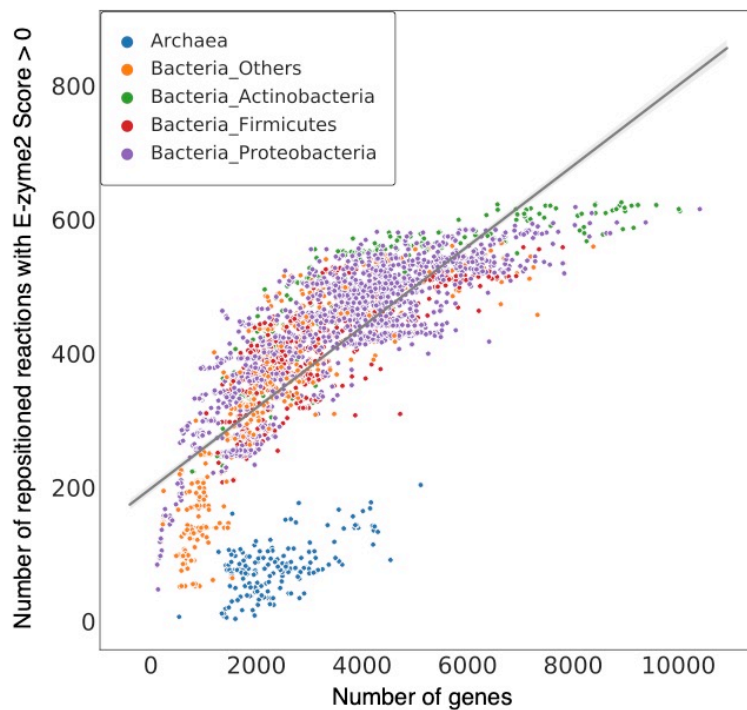


Figure 19 細菌系統ごとの代替酵素所有数とゲノム中の遺伝子数との関係

縦軸は細菌種ごとの代替酵素を所有する植物特異的二次代謝反応数、横軸は細菌種のゲノム中の遺伝子数を示す。プロットの色は、細菌種の系統分類を表す。

3.3.4 新規ヌートカトン合成酵素の発見

本研究で開発したEnzyme Repositioning法について、植物特異的二次代謝反応に対して細菌代替酵素を正しく探索できているかを検証するために、実際に新規酵素の探索を実施した。探索のターゲット化合物には、ヌートカトンを選択した。3.1.2の通り、ヌートカトンは香料として市販する様々な商品で使用されており、工業的に価値が高い。また、その生産のための原料物質であるバレンセンはヌートカトンに対して非常に安価に取得することができる。

バレンセン (KEGG Compound ID: C17277) からヌートカトン (KEGG Compound ID: C17914) を生成する酵素反応について、細菌による代替酵素反応をE-zyme2を用いて探索した。その結果、類似酵素反応として6反応を検出し、それに関連付けられている遺伝子オーソロググループ (KEGG OC) として19グループを発見した。この遺伝子群のうち、実際時に酵素活性確認実験によって使用する遺伝子抽出した。酵素活性確認実験では、*S. coelicolor* A3(2)を利用することとした。*S. coelicolor* A3(2)は、3.3.3において多数の代替酵素を所有していることが明らかになった *Streptomycetaceae*科に属する細菌の1種で、植物特異的二次代謝反応880反応のうち、365反応を反応類似性スコア > 0.4で、43反応を > 0.9 で所有していた (Figure 20)。また、本細菌は酵素スクリーニングにおいて一般的に使用されている種でもある。バレンセンからヌートカトン合成する反応に対する *S. coelicolor* A3(2)の持つ代替酵素候補は4遺伝子であった (Table 18)。4遺伝子はいずれもシトクロムP450に属する遺伝子であり、このうち、3遺伝子は同一オーソロググループに属していた。

続いて、4つのP450遺伝子の酵素活性を確認するために、*S. lividans* TK64を用いてそれぞれの遺伝子の過剰発現株を構築した。*S. lividans* TK64は、*S. coelicolor* A3(2)に非常に近縁なモデル生物で、遺伝子工学実験において一般的に使用されている株である (Kieser, 1984; Ma and Kendall, 1994; Miyashita et al., 1991; B. Wang et al., 2016; Whittaker and Whittaker, 2006)。このP450過剰発現株を72時間培養し、0.025% (w/v)バレンセン添加して168時間ヌートカトン合成を反応させた。P450酵素によるヌートカトンの合成反応は、P450の存在する細胞膜内部で進行していると考えられる。このため、培養液ではなく、培養した細胞を収集してヌートカトンの検出を行った。抽出には、ヌートカトン、バレンセンが脂溶性化合物であることを考慮して、ヘキサン溶液を用いた。ヘキサン溶液中のヌートカトンの検出は、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC/MS) を用いて行った。その結果、SCO3770過剰発現株において、ヌートカトンの生成を確認できた。SCO3770過剰発現株のGCの結果では、標品のヌートカトンと同一の位置にピークがあることがわかる (Figure 21)。このピークの画分を取得しMSを実施すると、標品のヌートカトンと同一のピークのパターンであった (Figure 22)。

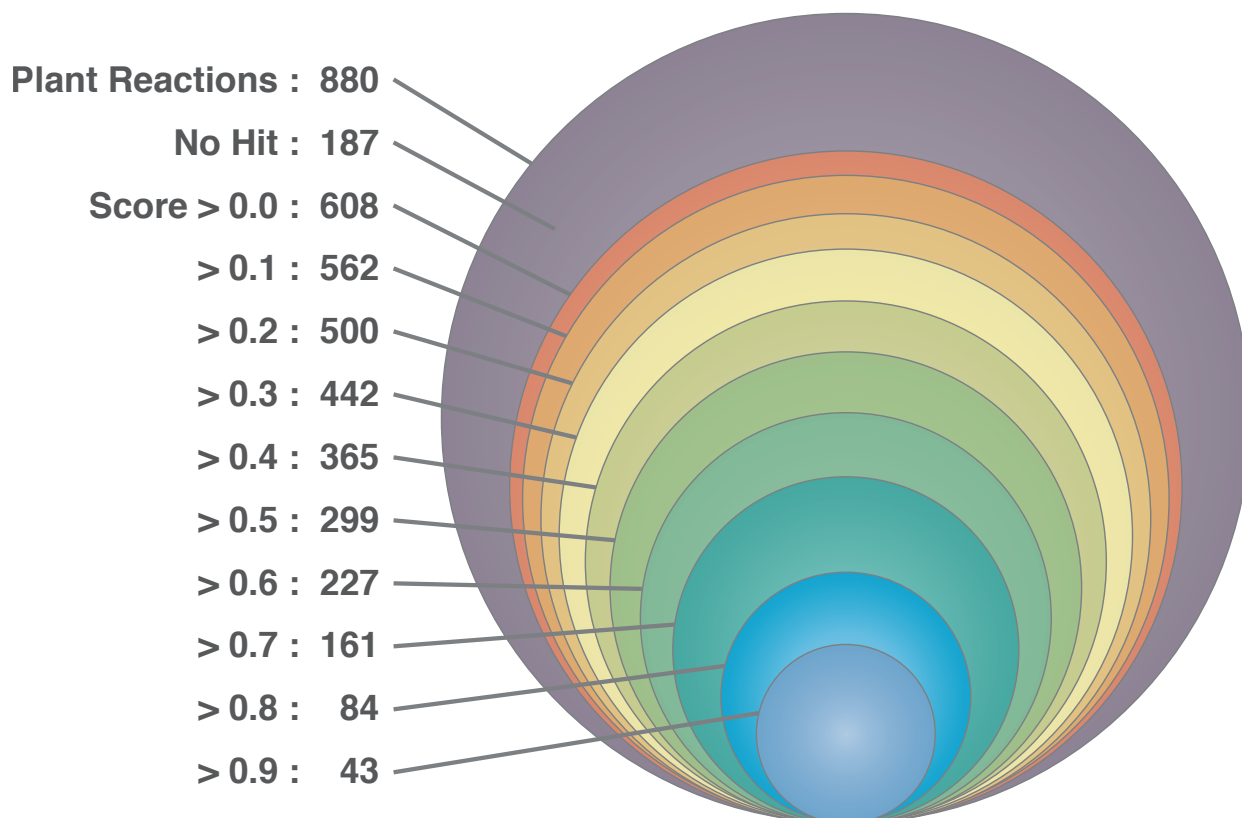


Figure 20 *S. coelicolor* A3(2)が代替可能な植物特異的二次代謝反応

KEGGデータベースから取得された植物特異的二次代謝反応880反応のうち、E-zyme2の反応類似性スコアごとに*S. coelicolor* A3(2)による代替酵素候補を発見した反応数を示す。

Table 18 *S. coelicolor* A3(2)の持つヌートカトン合成酵素候補

Gene name	Score	KEGG OC (ver. 2016-01-16)	Definition (RefSeq)	KEGG Orthology
SCO5223	0.646	OC.66774	cytochrome P450	K12645: epi-isozizaene 5-monooxygenase
SCO3099	0.411	OC.19251	cytochrome P450 hydroxylase	-
SCO3636	0.411	OC.19251	cytochrome P-450 hydroxylase	K00493: unspecific monooxygenase
SCO3770	0.411	OC.19251	cytochrome P450 oxidoreductase	-

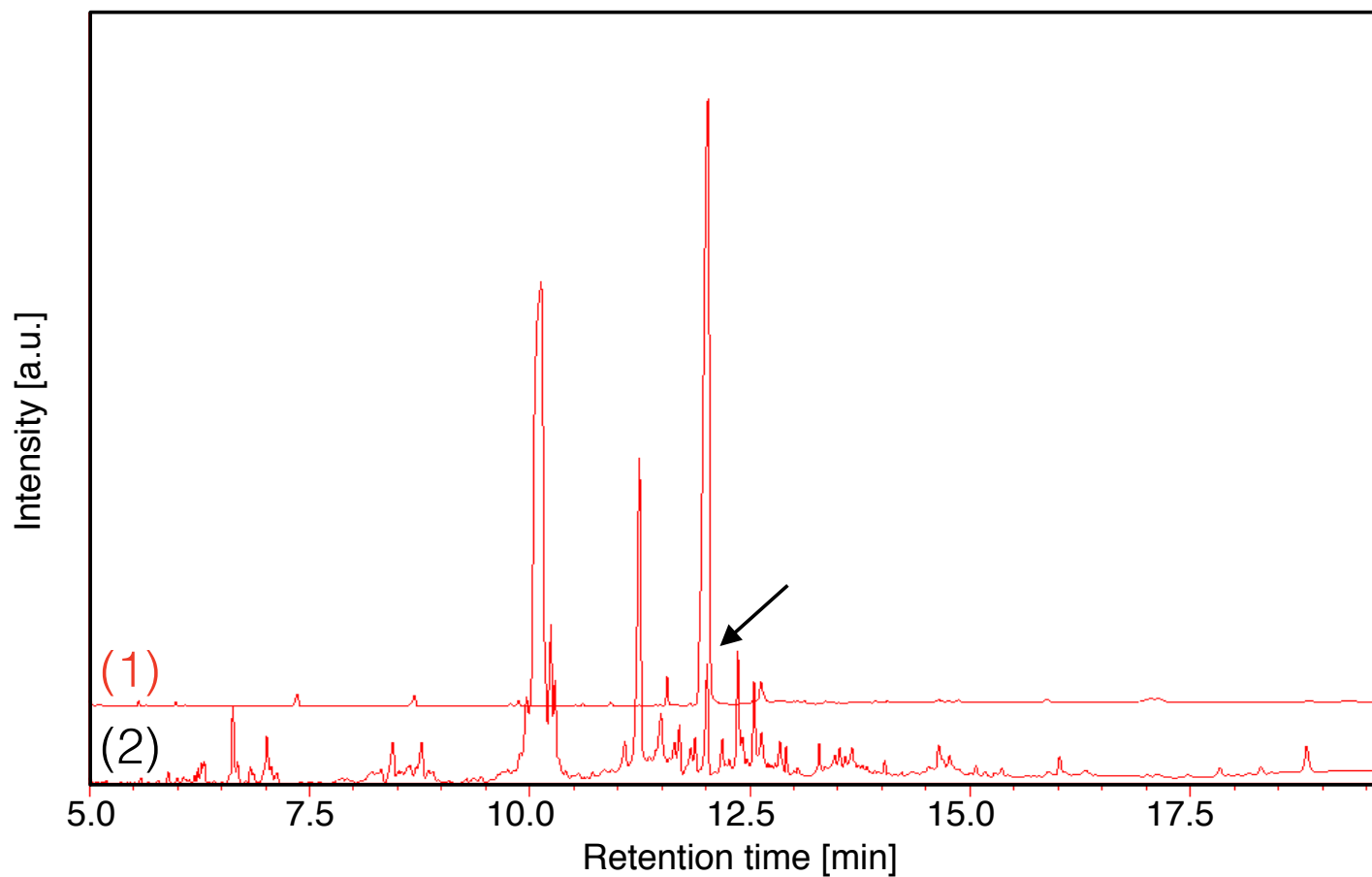


Figure 21 SCO3770過剰発現株によるヌートカトン合成のガスクロマトグラフィー分析結果

縦軸が検出強度、横軸が保持時間を表す。(1) のグラフが標品のヌートカトンの分析結果、(2) がSCO3770過剰発現株の培養液の分析結果を示す。矢印の位置（保持時間約12.0分）が、培養液中で検出されたヌートカトンの画分を表す。

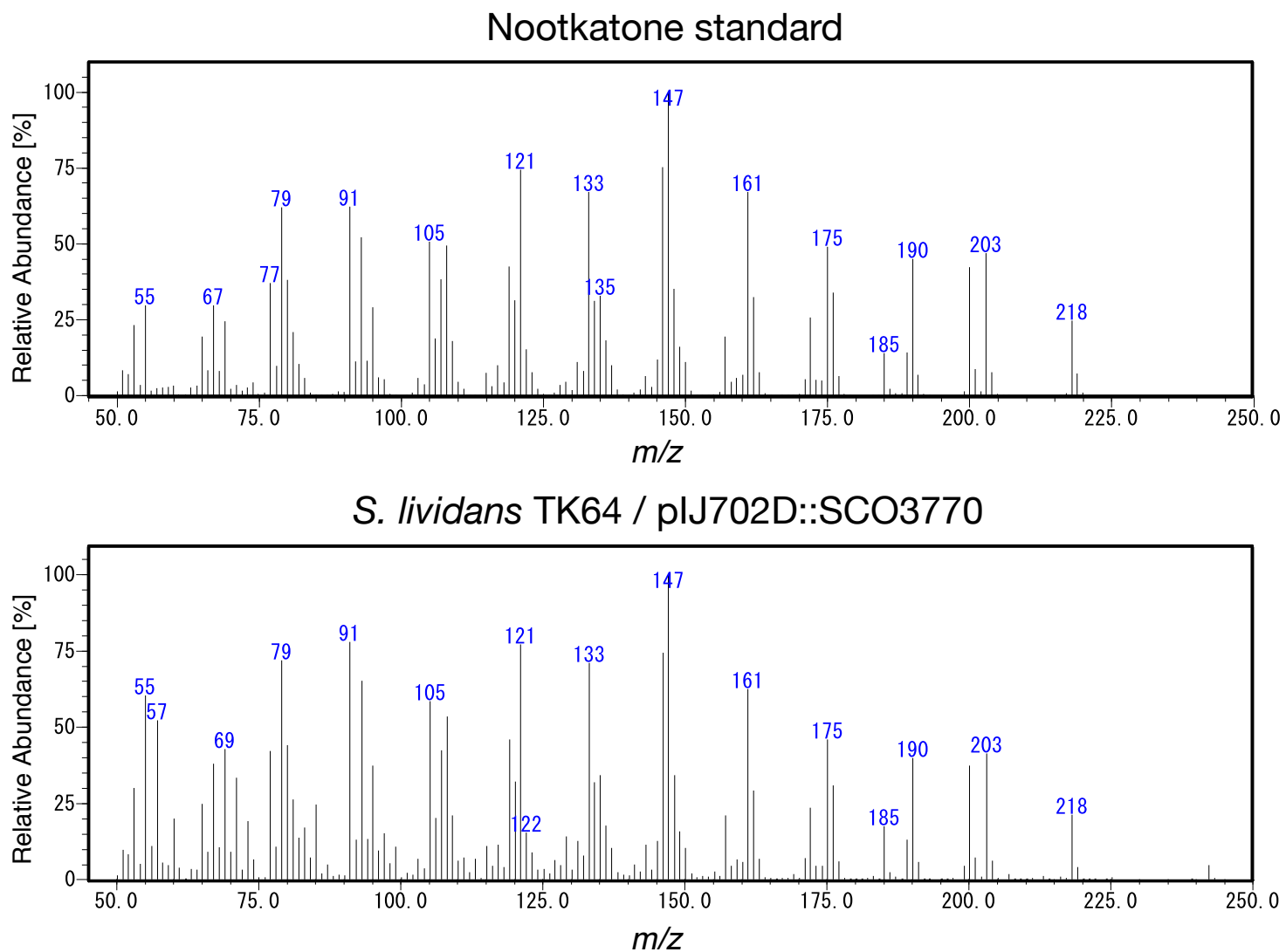


Figure 22 SCO3770過剰発現株によるヌートカトン合成のマススペクトロメトリー分析結果

縦軸が相対存在量、横軸が m/z を表す。上のグラフが標品のヌートカトンの分析結果、下がSCO3770過剰発現株の培養液のガスクロマトグラフィー分析画分のうち、12.0分に分離した画分（ヌートカトンと思わしき画分）の分析結果を示す。

3.3.5 SCO3770の酵素活性評価

3.3.4の結果から、*S. coelicolor* A3(2)の持つ4つのP450遺伝子のうち、SCO3770がヌートカトン合成活性を持つことが明らかになった。続いて、このSCO3770によるヌートカトン合成活性を定量的に測定することを考えた。しかし、本実験の宿主細菌である*S. lividans* TK64は、SCO3770のホモログ (SLIV_19455; SCO3770とは2アミノ酸ミスマッチ (D121G, G371D)) をゲノム中に保有しているため、これによるヌートカトン合成が行われている可能性がある。そこで、SLIV_19455による影響を除いてSCO3770を評価するために、SCO3770の相補性試験を実施した。まず、SCO3770過剰発現株 (*S. lividans* TK64/pIJ702D::SCO3770)、SCO3770ホモログ遺伝子部分破壊株 (*S. lividans* TK64 Δ SCO3770)、SCO3770相補株 (*S. lividans* TK64 Δ SCO3770/pIJ702D::SCO3770) を構築した。次に、これら3株と野生株をそれぞれ72時間培養し、0.025% バレンセン添加して168時間ヌートカトン合成を反応させた。ヘキササン溶液を用いて、培養後の細胞と培養液からそれぞれヌートカトン抽出し、GC/MSを用いて検出した (Figure 23)。その結果、野生株、SCO3770ホモログ遺伝子部分破壊株では、ヌートカトンの合成は行われていなかったが、SCO3770過剰発現株、SCO3770相補株では、ヌートカトンの合成が確認された。

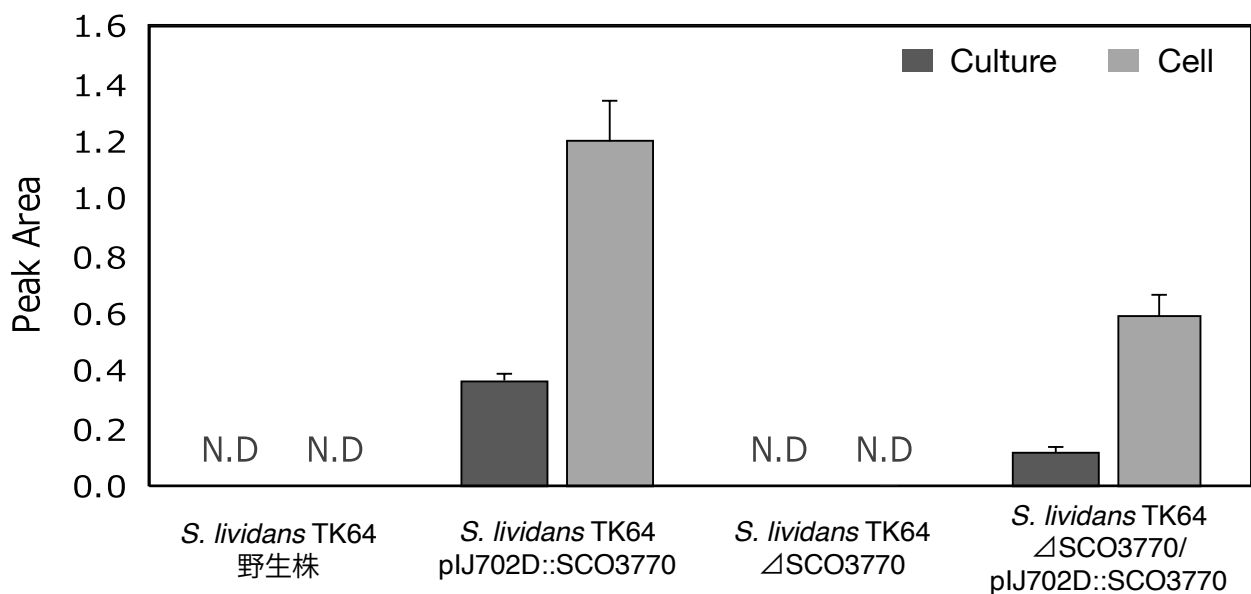


Figure 23 SCO3770の相補性試験結果

縦軸はガスクロマトグラフィー分析によるヌートカトン画分のピーク面積を示す。N.D.は検出されなかったことを表す。

3.3.6 SCO3770の配列相同性評価

本研究で開発したEnzyme Repositioning法では、酵素反応の類似性のみを基に細菌の持つ代替酵素を探索するため、目的の酵素のタンパク質配列を考慮していない。そこで、Enzyme Repositioning法が配列類似性に非依存的に細菌由来代替酵素を探索できていることを確認するために、今回発見したヌートカトン合成酵素候補遺伝子を既知のヌートカトン合成酵素 (Cankar et al., 2011; Fraatz et al., 2009; Girhard et al., 2009) と配列相同性を比較した (Table 19)。その結果、真核生物由来酵素であるE1B2Z9 (*Cichorium intybus*)、B8ZIU7 (*Pleurotus sapidus*) については、BLAST bit score < 55で、Identity < 30%と低い相同性であった。原核生物由来酵素であるU5U1Z3 (*Bacillus subtilis*) については、BLAST bit scoreが 99-229と、若干の相同性が確認されたが、Identityは24-36%と低い結果となった。また、既存のヌートカトン合成酵素をクエリとして*S. coelicolor* A3(2)の遺伝子に対して配列相同性検査を実施した。その結果、E1B2Z9とU5U1Z3からはヒットしたが、トップヒットではなかった。B8ZIU7からはヒットしなかった。

Table 19 新規ヌートカトン合成酵素と既存のヌートカトン合成酵素の配列相同性

Query	Target	Max Score	Query Cover	E value	Identity
SCO3770	U5U1Z3	202	82%	2.00E-65	36%
	E1B2Z9	44.7	42%	7.00E-09	26%
	B8ZIU7	22.7	28%	0.057	26%
SCO3636	U5U1Z3	204	93%	9.00E-66	30%
	E1B2Z9	20.8	25%	2.20E-01	30%
	B8ZIU7	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
SCO3099	U5U1Z3	229	91%	3.00E-75	33%
	E1B2Z9	54.7	75%	6.00E-12	23%
	B8ZIU7	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
SCO5223	U5U1Z3	99	87%	3.00E-26	24%
	E1B2Z9	42.7	61%	4.00E-08	21%
	B8ZIU7	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

N.A. : Not Aligned

3.4 考察

本研究では、細菌が持つ目的の化合物の合成酵素遺伝子を酵素反応の類似性に基づいてスクリーニングする手法「Enzyme Repositioning」を開発した。これによって、植物特異的な二次代謝反応880反応のうち、693反応に対して細菌由来の代替酵素候補を発見した。さらに、Enzyme Repositioning法をバレンセンからヌートカトン合成する反応に対して適用することで、既存のヌートカトン合成酵素と低い配列相同性である新規酵素SCO3770を発見した。この結果から、Enzyme Repositioning法はこれまでの配列類似性に基づく酵素スクリーニング手法とは異なる新たな探索空間から酵素をスクリーニングすることが可能であると言える。Enzyme Repositioning法を利用することで、これまで不可能であった化合物についても微生物発酵生産が可能になると期待される。

3.4.1 Enzyme Repositioning法によるオーファン酵素反応の代替酵素の発見

Enzyme Repositioning法では、酵素反応の類似性によって新規酵素のスクリーニングを行っているの、遺伝子配列が不明であるオーファン酵素反応についても探索が可能である。実際に、今回細菌由来の代替酵素候補を発見した植物特異的な二次代謝反応 693反応のうち、66反応 (9.5 %) はオーファン酵素反応であった。このうち23反応は、フラボノイド関連代謝経路に属していた。フラボノイド化合物には、抗がん作用(Cincin et al., 2014; Dória et al., 2016; Martino et al., 2016; Sung et al., 2016; Yan et al., 2017) や抗炎症作用(Comalada et al., 2005; Dang et al., 2018) が報告されており、医薬学的価値が高い。特に、フラボノイド化合物の一種であるアピゲニンがアポトーシスや、オートファジーを誘導することでがん化を抑制する機能を持つことが報告されており (Sung et al., 2016)、抗がん剤としての活用が期待されている (Yan et al., 2017)。このことから、本研究で発見された代替酵素候補は、新たな抗がん剤やその誘導体の微生物発酵生産に大きく貢献する可能性がある。

3.4.2 植物特異的な二次代謝反応の代替酵素を所有している細菌系統

植物特異的な二次代謝反応に対する細菌の代替酵素の系統的分布解析の結果、細菌由来代替酵素は一部の系統に偏って存在していることが明らかになった。具体的には、*Pseudonocardiaceae*、*Streptomyetaceae*、*Mycobacteriaceae*、*Myxococcales*と*Burkholderiaceae*は、他の系統よりも多くの代替酵素候補を所有していた。

*Streptomyetaceae*と*Burkholderiaceae* は、細菌の中でも特に多様な二次代謝機能をもつ細菌であることが知られている。このため、細菌の二次代謝関連酵素が植物二次代謝反応の代替酵素として検出さ

れた可能性がある。また、これらの細菌系統はすべて、土壌中から検出されることの多い系統でもある (Kim et al., 2015; Walters et al., 2018)。特に *Pseudonocardiaceae*、*Streptomycetaceae*、*Mycobacteriaceae* と *Burkholderiaceae* については、植物の根付近の土壌から検出されており (Child et al., 2007; Salles et al., 2004; Santos-Medellín et al., 2017; W. Wang et al., 2016; Yeoh et al., 2017)、これらの細菌が代替酵素を使用して植物の二次代謝化合物を代謝している可能性がある。いずれにせよ、より多くの代替酵素候補を所有する細菌が生息している土壌は、植物二次代謝化合物の微生物発酵生産において非常に重要なリソースであると考えられる。

3.4.3 SLIV_19455について

本研究では、Enzyme Repositioning法をバレンセンからヌートカトン合成する反応に対して適用することで、新規酵素SCO3770を発見した。このとき、ヌートカトン合成活性を評価するために、*S. lividans* TK64を宿主として使用した。*S. lividans* TK64は、ゲノム中にSCO3770のホモログ遺伝子 (*SLIV_19455*) 保有しており、SCO3770とSLIV_19455はどちらもP450ドメイン (PF00067; Cytochrome P450 domain) を含んでいる。加えて、このP450ドメイン内にはアミノ酸変異は存在しない。このため、両酵素はヌートカトンの合成について同様の活性を持つことが期待される。しかし、SCO3770の相補性試験では、SLIV_19455を保有している*S. lividans* TK64 野生株においては、ヌートカトン合成活性が確認されなかった (Figure 23)。これは、*S. lividans* TK64野生株においてSLIV_19455の発現量が低かったためであると考えられる。本研究でSCO3770の発現ベクターとして使用したpIJ702Dは50-400 copyのハイコピーベクターであったため、発現量の違いのためSCO3770ではヌートカトン合成活性が確認され、SLIV_19455では検出されなかった可能性がある。

3.4.4 Enzyme Repositioning法の適用範囲

本研究では、Enzyme Repositioning法を植物の二次代謝反応に対して適用したが、本手法の適用範囲は植物、あるいは二次代謝の反応に限定されず、すべての生物の持つ酵素反応に適用することが可能である。それどころか、出発化合物と生成化合物のペアさえあれば、そこに生物で確認された酵素反応が存在しなくても探索することが可能である。本手法は、Enzyme Repositioning (つまりターゲット反応の酵素を代替酵素で置き換えることを意味する) と命名しているが、実際にはターゲット反応は酵素反応である必要もない。一方で、従来法である配列相同性探索では、当然のことだが、遺伝子配列が必要であるため、ターゲット反応はオーファンでない酵素反応でなければならない。この点においても、Enzyme Repositioning法が配列相同性探索よりも汎用性の高い手法であると言える。

また、Enzyme Repositioning法の出発化合物と生成化合物のペアさえあれば良いという点を利用することで、これまでとは異なる視点からの微生物発酵生産を捉えることができる。これまでは、微生物発酵生産は、生物が生体内で生産している化合物を安価にあるいは容易に工業生産するために利用されていた。しかし、本手法を用いることで、（酵素が発見できるかは別として）どのような反応に対しても酵素反応を探索できるため、化学合成では難しい反応を酵素によって代替させるといった利用が可能になるかもしれない。

第4章 総括

4.1 遺伝子発現誘導を利用した酵素探索法のまとめ

本研究では、メタゲノム法に代わるより簡易なスクリーニング手法の開発として、メタトランスクリプトーム解析を活用した新たなスクリーニング手法「TILAMS」を提案し、その構築・検証を進めた。TILAMSでは、原核生物の持つ、基質化合物による遺伝子の発現誘導の仕組みを利用し、目的の化合物に対する代謝酵素の探索を行った。手法の検証のためのターゲット化合物としては、レブリン酸、及び*meso*-DAPを用いた。

集積培養サンプルからのレブリン酸代謝酵素の探索では、レブリン酸の添加によって発現量が変動した遺伝子を十分に絞り込むことが可能であった。これによって、最終的に27遺伝子をレブリン酸代謝酵素候補として取得した。レブリン酸代謝酵素候補のうち、本研究で酵素活性を検証した遺伝子については、残念ながら活性を持たない酵素であったが、未検証の遺伝子の中に真に活性を持つ酵素が存在している可能性がある。これらについては、今後も引き続き実験的に検証していく必要がある。一方で、今回酵素活性を検証した遺伝子には、その遺伝子オーソロググループ内で末端の塩基配列が保存されており、プライマー構築が用意であるものを優先的に選択した。このため、未検証の遺伝子の検証のためには、本研究で利用したPCRによる遺伝子の取得が難しいと考えられる。実験的に検証するためには、遺伝子の人工合成などの代替手段が必要であろう。また、土壌サンプルからのレブリン酸代謝酵素では、現時点ではレブリン酸の添加によって発現量が変動した遺伝子が42遺伝子と多いため、さらなる絞り込みが必要であると思われる。*meso*-DAP代謝酵素探索については、探索の主目的の酵素である*meso*-DAPDHは検出されなかった。

TILAMSでは、いずれの酵素探索においても多数のhypothetical proteinが検出された。本研究では、これらについて詳細な追求は行っていなかったが、ドメイン予測などの機能予測を行うことで、さらに候補を絞り込むこと可能になり偽陽性率を低下させることができるとと思われる。

4.2 反応類似性を利用した酵素探索法のまとめ

本研究では、配列相同性に代わる制限の少ないスクリーニング手法の開発として、化合物の構造類似性を利用した新たなスクリーニング手法「Enzyme Repositioning」を提案し、その構築・検証を進め

た。Enzyme Repositioningでは、酵素の基質化合物の認識の緩さに注目し、基質化合物の化学構造的類似性から、目的の化合物に対する代謝酵素の探索を行った。手法の検証のためのターゲット化合物としては、ヌートカトンを用いた。

KEGG データベースより抽出された植物特異的二次代謝反応に対し、Enzyme Repositioningを適用した結果、全880反応中693反応に対して、何らかの細菌による代替酵素候補を発見することができた。このうち、酵素の分類によって発見しやすさに偏りもなく、様々な反応に広く適用することが可能であると考えられる。細菌の持つ代替酵素は、代謝機能的には満遍なく様々な代謝グループに属しており、細菌の系統的にはActinobacteriaやProteobacteriaに偏って存在していた。

ヌートカトン合成酵素の探索では、代替酵素を多数所有している系統である*Streptomyces*属細菌の一つである*S. coelicolor* A3(2)の遺伝子にターゲットを絞り込むことで、4酵素を候補として取得できた。このうちの一つであるSCO3770は、実際にヌートカトン合成活性を示し、本手法の酵素探索性能について実験的に保証する結果となった。一方で、Enzyme Repositioningでは、一つのターゲット反応に対して、多数の代替酵素候補を検出するため、今回は反応類似性の他に*S. coelicolor* A3(2)の遺伝子という要素を追加して絞り込みを行った。また、今回のヌートカトン合成酵素探索では、4つの候補のうち、E-zyme2による反応類似性スコアが低いSCO3770が真に活性のある酵素であった。このことから、探索結果のスコアリングに対して、改善の余地があると考えられる。現在はE-zyme2の反応類似性スコアのみを用いているが、候補酵素と目的の反応の基質化合物のドッキングなどを利用し、計算機上で簡易的に活性を評価できれば、さらに候補を絞り込むこと可能になり偽陽性率を低下させることができると思われる。

4.3全体のまとめ

微生物発酵生産は社会的に非常に重要な技術だが、現在ではまだ課題が大きく、広く利用されるまでには至っていない。その課題の中心にあるのは、生物の酵素反応について未解明な部分が多く、多くの酵素が未発見なことである。酵素を探索するには、多くの実験的労力と時間を必要とであり、ボトルネックとなっている。そこで、本研究ではこの課題に対し、計算機を用いた2種類の*in silico* スクリーニング系、「TILAMS」と「Enzyme Repositioning」を開発することで、酵素探索の効率化を目指した。TILAMSとEnzyme Repositioningはそれぞれ活用される状況が異なり、TILAMSは従来法のメタゲノム法に、Enzyme Repositioningは配列類似性探索に置き換わる方法である。この2種類の酵素探索法を利用することで、高速で効率よく新規酵素の探索を行われれば、これまで以上に多くの化合物が微生物発酵によって生産可能になると期待される。また、この2種類の酵素探索法単独で用いるだけでなく、組

み合わせて利用することも可能である。TILAMSによって基質誘導的に発現した遺伝子から、Enzyme Repositioningによって基質と構造的に類似した化合物を代謝する酵素を探索する。これにより、それぞれでは発見できなかった新規酵素が発見される可能性がある。TILAMSとEnzyme Repositioning、あるいはその組み合わせを、状況に応じて使い分けることで、ますます微生物発酵生産が発展していくことが望まれる。

参考文献

- Adachi, O., Ano, Y., Akakabe, Y., Shinagawa, E., Matsushita, K., 2008. Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 143–151. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1659-z>
- ADACHI, O., ANO, Y., TOYAMA, H., MATSUSHITA, K., 2008. A Novel 3-Dehydroquinone Dehydratase Catalyzing Extracellular Formation of 3-Dehydroshikimate by Oxidative Fermentation of *Gluconobacter oxydans* IFO 3244. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72, 1475–1482. <https://doi.org/10.1271/bbb.70778>
- Aiba, H., Adhya, S., Crombrugghe, B. de, 1981. Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 256, 11905–11910.
- Akita, H., Ohshima, T., Sakuraba, H., 2015. Thermostable NADP(+)-dependent D-amino acid dehydrogenase created by site-directed mutation: characteristics and application. *Seikagaku* 87, 582–590.
- Alejandro-García, I., Álvarez, L., Cardoso-Taketa, A., González-Maya, L., Antúnez, M., Salas-Vidal, E., Díaz, J.F., Marquina-Bahena, S., Villarreal, M.L., 2015. Cytotoxic Activity and Chemical Composition of the Root Extract from the Mexican Species *Linum scaberrimum*: Mechanism of Action of the Active Compound 6-Methoxypodophyllotoxin [WWW Document]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2015/298463>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Asai, T., Aida, K., Ōishi, K., 1957. On L-Glutamic Acid Fermentation. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 21, 134–135. <https://doi.org/10.1080/03758397.1957.10857370>
- Asakawa Y., Emura M., Hashimoto T., Kanisawa T., Murakami C., Noma Y., Tanaka M., 2003. Method of producing nootkatone. JP2003070492A.
- Bateman, A., Martin, M.J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R., Bely, B., Bingley, M., Bonilla, C., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-A-Jee, H., Cowley, A., Silva, A.D., Giorgi, M.D., Dogan, T., Fazzini, F., Castro, L.G., Figueira, L., Garmiri, P., Georghiou, G., Gonzalez, D., Hatton-Ellis, E., Li, W., Liu, W., Lopez, R., Luo, J., Lussi, Y., MacDougall, A., Nightingale, A., Palka, B., Pichler, K., Poggioli, D., Pundir, S., Pureza, L., Qi, G., Renaux, A., Rosanoff, S., Saidi, R., Sawford, T., Shypitsyna, A., Speretta, E., Turner, E., Tyagi, N., Volynkin, V., Wardell, T., Warner, K., Watkins, X., Zaru, R., Zellner, H., Xenarios, I., Bougueleret, L., Bridge, A., Poux, S., Redaschi, N., Aimo, L., Argoud-Puy, G., Auchincloss, A., Axelsen, K., Bansal, P., Baratin, D., Blatter, M.-C., Boeckmann, B., Bolleman, J., Boutet, E., Breuza, L., Casal-Casas, C., Castro, E. de, Coudert, E., Cuche, B., Doche, M., Dornevil, D., Duvaud, S., Estreicher, A., Famiglietti, L., Feuermann, M., Gasteiger, E., Gehant, S., Gerritsen, V., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hinz, U., Hulo, C., Jungo, F., Keller, G., Lara, V., Lemercier, P., Lieberherr, D., Lombardot, T., Martin, X., Masson, P., Morgat, A., Neto, T., Noupikel, N., Paesano, S., Pedruzzi, I., Pilbout, S., Pozzato, M., Pruess, M., Rivoire, C., Roechert, B., Schneider, M., Sigrist, C., Sonesson, K., Staehli, S., Stutz, A., Sundaram, S., Tognolli, M., Verbregue,

- L., Veuthey, A.-L., Wu, C.H., Arighi, C.N., Arminski, L., Chen, C., Chen, Y., Garavelli, J.S., Huang, H., Laiho, K., McGarvey, P., Natale, D.A., Ross, K., Vinayaka, C.R., Wang, Q., Wang, Y., Yeh, L.-S., Zhang, J., 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 45, D158–D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
- Bérdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58, 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Bonnal, S., Vigevani, L., Valcárcel, J., 2012. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 847–859. <https://doi.org/10.1038/nrd3823>
- Calzada, F., Velázquez, C., Cedillo-Rivera, R., Esquivel, B., 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytotherapy Research* 17, 731–732. <https://doi.org/10.1002/ptr.1192>
- Cankar, K., Houwelingen, A. van, Bosch, D., Sonke, T., Bouwmeester, H., Beekwilder, J., 2011. A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Letters* 585, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.040>
- Child, R., Miller, C.D., Liang, Y., Narasimham, G., Chatterton, J., Harrison, P., Sims, R.C., Britt, D., Anderson, A.J., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates: their association with plant roots. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 655–663. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0840-0>
- Cincin, Z.B., Unlu, M., Kiran, B., Bireller, E.S., Baran, Y., Cakmakoglu, B., 2014. Molecular Mechanisms of Quercitrin-induced Apoptosis in Non-small Cell Lung Cancer. *Archives of Medical Research* 45, 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.08.002>
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., Zarzuelo, A., 2005. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *European Journal of Immunology* 35, 584–592. <https://doi.org/10.1002/eji.200425778>
- Costinot, A., Donaldson, D., Smith, C., 2016. Evolving Comparative Advantage and the Impact of Climate Change in Agricultural Markets: Evidence from 1.7 Million Fields around the World. *Journal of Political Economy* 124, 205–248. <https://doi.org/10.1086/684719>
- Dang, Y., Li, Z., Wei, Q., Zhang, R., Xue, H., Zhang, Y., 2018. Protective Effect of Apigenin on Acrylonitrile-Induced Inflammation and Apoptosis in Testicular Cells via the NF- κ B Pathway in Rats. *Inflammation* 41, 1448–1459. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0791-x>
- Demain, A.L., Sanchez, S., 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot* 62, 5–16. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>
- Denman, R.F., Hoare, D.S., Work, E., 1955. Diaminopimelic acid decarboxylase in pyridoxin-deficient *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 16, 442–443. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(55\)90257-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(55)90257-2)
- Dien, B.S., Nichols, N.N., Bothast, R.J., 2002. Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 221–227. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000299>
- Dória, G.A.A., Menezes, P.P., Lima, B.S., Vasconcelos, B.S., Silva, F.A., Henriques, R.M., Melo, M.G.D., Alves, Â.V.F., Moraes, M.O., Pessoa, C.Ó., Carvalho, A.A., Prata, A.P.N.,

- Junior, R.L.C.A., Lima-Verde, I.B., Quintans-Júnior, L.J., Bezerra, D.P., Nogueira, P. C.L., Araujo, A.A.S., 2016. In vivo antitumor effect, induction of apoptosis and safety of *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae) extracts. *Phytomedicine* 23, 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.05.001>
- Faulds, C.B., Bartolomé, B., Williamson, G., 1997. Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases. *Industrial Crops and Products* 6, 367–374. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00027-7)
- Federhen, S., 2012. The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Res* 40, D136–D143. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1178>
- Fleming, A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology* 10, 226.
- Fraatz, M.A., Riemer, S.J.L., Stöber, R., Kaspera, R., Nimtz, M., Berger, R.G., Zorn, H., 2009. A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61, 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.07.001>
- Fu, C., Guan, G., Wang, H., 2018. The Anticancer Effect of Sanguinarine: A Review. *Curr. Pharm. Des.* 24, 2760–2764. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180829100601>
- Girhard, M., Machida, K., Itoh, M., Schmid, R.D., Arisawa, A., Urlacher, V.B., 2009. Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microbial Cell Factories* 8, 36. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-36>
- Gupta, A., Verma, J.P., 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41, 550–567. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>
- Habe, H., Sato, S., Morita, T., Fukuoka, T., Kirimura, K., Kitamoto, D., 2015. Bacterial production of short-chain organic acids and trehalose from levulinic acid: A potential cellulose-derived building block as a feedstock for microbial production. *Bioresource Technology* 177, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.048>
- Harazono, K., Soda, M., Sakoda, A., 2014. Vector for protein production in actinomycete. *JP* 2014207898A.
- Hattori, M., Tanaka, N., Kanehisa, M., Goto, S., 2010. SIMCOMP/SUBCOMP: chemical structure search servers for network analyses. *Nucleic Acids Res* 38, W652–W656. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq367>
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., Fischer, R., 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol* 22, 1415–1422. <https://doi.org/10.1038/nbt1027>
- Hoischen, C., Krämer, R., 1990. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology* 172, 3409–3416. <https://doi.org/10.1128/jb.172.6.3409-3416.1990>
- Huang, R., Christenson, P.A., Labuda, I.M., 2001. Process for the preparation of nootkatone by laccase catalysis. US6200786B1.

- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)
- Ito, S., Okuda, M., Sonohara, H., Tajima, K., Takigawa, H., 2002. Process for the preparation of novel microorganisms and nootkatone using the same. JP3245254B2.
- Jiang, C.-J., Chen, G., Huang, J., Huang, Q., Jin, K., Shen, P.-H., Li, J.-F., Wu, B., 2011. A novel β -glucosidase with lipolytic activity from a soil metagenome. *Folia Microbiol* 56, 563–570. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0083-4>
- Julien, B.N., Wallace, D.M., 2008. NOVEL METHODS FOR PRODUCTION OF 5-EPI- β -VETIVONE, 2-ISOPROPYL-6,10-DIMETHYL-SPIRO[4.5]DECA-2,6-DIEN-8-ONE, AND 2-ISOPROPYL-6,10-DIMETHYL-SPIRO[4.5]DECA-1,6-DIEN-8-ONE. WO2008116056A2.
- Jung, H.A., Ali, Md.Y., Bhakta, H.K., Min, B.-S., Choi, J.S., 2017. Prunin is a highly potent flavonoid from *Prunus davidiana* stems that inhibits protein tyrosine phosphatase 1B and stimulates glucose uptake in insulin-resistant HepG2 cells. *Arch. Pharm. Res.* 40, 37–48. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0852-3>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., Tanabe, M., 2019. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res* 47, D590–D595. <https://doi.org/10.1093/nar/gky962>
- Kawai, M., Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Maruta, M., Kuwahara, Y., Ohkawara, T., Hagihara, K., Yamadori, T., Shima, Y., Ogata, A., Kawase, I., Tanaka, T., 2007. Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances. *Allergology International* 56, 113–123. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-06-135>
- Kieser, T., 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12, 19–36. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(84\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0147-619X(84)90063-5)
- Kim, J.-S., Lee, K.C., Kim, D.-S., Ko, S.-H., Jung, M.-Y., Rhee, S.-K., Lee, J.-S., 2015. Pyrosequencing analysis of a bacterial community associated with lava-formed soil from the Gortjawal forest in Jeju, Korea. *MicrobiologyOpen* 4, 301–312. <https://doi.org/10.1002/mbo3.238>
- Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M., 1957. Studies on the Amino Acid Fermentation. *The Journal of General and Applied Microbiology* 3, 193–205. <https://doi.org/10.2323/jgamm.3.193>
- Kotera, M., Okuno, Y., Hattori, M., Goto, S., Kanehisa, M., 2004. Computational assignment of the EC numbers for genomic-scale analysis of enzymatic reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16487–16498. <https://doi.org/10.1021/ja0466457>
- Laine, R., 2017. Reaction sequence for the synthesis of nootkatone, dihydronootkatone, and tetrahydronootkatone. WO2017100437A1.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Leonhardt, R.-H., Berger, R.G., 2015. Nootkatone, in: Schrader, J., Bohlmann, J. (Eds.), *Biotechnology of Isoprenoids, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 391–404. https://doi.org/10.1007/10_2014_279
- Letunic, I., Bork, P., 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47, W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>

- Li, L., Stoeckert, C.J., Roos, D.S., 2003. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Res.* 13, 2178–2189. <https://doi.org/10.1101/gr.1224503>
- LIEBL, W., EHRMANN, M., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H., 1991. Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, “*Brevibacterium flavum*” DSM 20411, “*Brevibacterium lactofermentum*” DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137 T to *Corynebacterium glutamicum* and Their Distinction by rRNA Gene Restriction Patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 255–260. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-2-255>
- Ma, H., Kendall, K., 1994. Cloning and analysis of a gene cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* 176, 3800–3811. <https://doi.org/10.1128/jb.176.12.3800-3811.1994>
- Maimanacos, J., Chow, J., Gaßmeyer, S.K., Güllert, S., Busch, F., Kourist, R., Streit, W.R., 2016. Sequence-Based Screening for Rare Enzymes: New Insights into the World of AM Dases Reveal a Conserved Motif and 58 Novel Enzymes Clustering in Eight Distinct Families. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01332>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 17, 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martino, R., Arcos, M.L.B., Alonso, R., Sülsen, V., Cremaschi, G., Anesini, C., 2016. Polyphenol-Rich Fraction from *Larrea divaricata* and its Main Flavonoid Quercetin-3-Methyl Ether Induce Apoptosis in Lymphoma Cells Through Nitrosative Stress. *Phytotherapy Research* 30, 1128–1136. <https://doi.org/10.1002/ptr.5615>
- Mayr, B., Montminy, M., 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599–609. <https://doi.org/10.1038/35085068>
- McDonald, A.G., Tipton, K.F., 2014. Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS Journal* 281, 583–592. <https://doi.org/10.1111/febs.12530>
- Mihashi K., Hurusawa M., Murakami C., Hashimoto T., Emura M., Asakawa Y., Kanisawa T., Noma Y., 2008. Process for the preparation of nootkatone. JP4082917B2.
- Miyashita, K., Fujii, T., Sawada, Y., 1991. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *Microbiology* 137, 2065–2072. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-9-2065>
- Moretti, M.B., García, S.C., Perotti, C., Batlle, A., Casas, A., 2002. δ -Aminolevulinic acid transport in murine mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *Br J Cancer* 87, 471–474. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600481>
- Moriya, Y., Yamada, T., Okuda, S., Nakagawa, Z., Kotera, M., Tokimatsu, T., Kanehisa, M., Goto, S., 2016. Identification of Enzyme Genes Using Chemical Structure Alignments of Substrate–Product Pairs. *J. Chem. Inf. Model.* 56, 510–516. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00216>
- Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H., Wachi, M., 2007. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 Gene, Encoding a Mechanosensitive Channel Homolog, Induce L-Glutamic Acid Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4491–4498. <https://doi.org/10.1128/AEM.02446-06>

- NCBI Resource Coordinators, 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 46, D8–D13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
- Nemmar, A., Al-Salam, S., Beegam, S., Yuvaraju, P., Ali, B.H., 2018. Thrombosis and systemic and cardiac oxidative stress and DNA damage induced by pulmonary exposure to diesel exhaust particles and the effect of nootkatone thereon. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 314, H917–H927. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00313.2017>
- Papadopoulos, J.S., Agarwala, R., 2007. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23, 1073–1079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm076>
- Park, E., Kim, J., Yeo, S., Kim, G., Ko, E.-H., Lee, S.W., Li, W.Y., Choi, C.W., Jeong, S.-Y., 2018. Antiadipogenic Effects of Loganic Acid in 3T3-L1 Preadipocytes and Ovariectomized Mice. *Molecules* 23, 1663. <https://doi.org/10.3390/molecules23071663>
- Payen, A., Persoz, J.F., 1833. Memoir on diastase, the principal products of its reactions, and their applications to the industrial arts. *Ann. Chim. Phys* 53, 73–92.
- Peng, Y., Leung, H.C.M., Yiu, S.M., Chin, F.Y.L., 2012. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28, 1420–1428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>
- Popovic, A., Hai, T., Tchigvintsev, A., Hajighasemi, M., Nocek, B., Khusnutdinova, A.N., Brown, G., Glinos, J., Flick, R., Skarina, T., Chernikova, T.N., Yim, V., Bröls, T., Paslier, D.L., Yakimov, M.M., Joachimiak, A., Ferrer, M., Golyshina, O.V., Savchenko, A., Golyshin, P.N., Yakunin, A.F., 2017. Activity screening of environmental metagenomic libraries reveals novel carboxylesterase families. *Scientific Reports* 7, 44103. <https://doi.org/10.1038/srep44103>
- Salles, J.F., Veen, J.A. van, Elsas, J.D. van, 2004. Multivariate Analyses of Burkholderia Species in Soil: Effect of Crop and Land Use History. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4012–4020. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4012-4020.2004>
- Santos-Medellín, C., Edwards, J., Liechty, Z., Nguyen, B., Sundaresan, V., 2017. Drought Stress Results in a Compartment-Specific Restructuring of the Rice Root-Associated Microbiomes. *mBio* 8, e00764-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00764-17>
- Schmieder, R., Lim, Y.W., Rohwer, F., Edwards, R., 2010. TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics* 11, 341. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-341>
- Serra, S., 2016. A process for the synthesis of nootkatone. EP2813484B1.
- Sozański, T., Kucharska, A.Z., Rapak, A., Szumny, D., Trocha, M., Merwid-Łąd, A., Dzimira, S., Piasecki, T., Piórecki, N., Magdalan, J., Szelağ, A., 2016. Iridoid–loganic acid versus anthocyanins from the Cornus mas fruits (cornelian cherry): Common and different effects on diet-induced atherosclerosis, PPARs expression and inflammation. *Atherosclerosis* 254, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.001>
- Steinbüchel, A., Wiese, S., 1992. A Pseudomonas strain accumulating polyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 37, 691–697. <https://doi.org/10.1007/BF00174829>

- Sung, B., Chung, H.Y., Kim, N.D., 2016. Role of Apigenin in Cancer Prevention via the Induction of Apoptosis and Autophagy. *J Cancer Prev* 21, 216–226. <https://doi.org/10.15430/JCP.2016.21.4.216>
- Takinami, K., Okada, H., Tsunoda, T., 1963. Biochemical Effects of Fatty Acid and its Derivatives on L-Glutamic Acid Fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry* 27, 858–863. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.27.858>
- Tanimoto, T.T., 1957. IBM internal report. Nov 17, 1957.
- Tarabasz, D., Kukula-Koch, W., n.d. Palmatine: A review of pharmacological properties and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research* n/a. <https://doi.org/10.1002/ptr.6504>
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 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, 4673–4680.
- Tsoyi, K., Jang, H.J., Lee, Y.S., Kim, Y.M., Kim, H.J., Seo, H.G., Lee, J.H., Kwak, J.H., Lee, D.-U., Chang, K.C., 2011. (+)-Nootkatone and (+)-valencene from rhizomes of *Cyperus rotundus* increase survival rates in septic mice due to heme oxygenase-1 induction. *J Ethnopharmacol* 137, 1311–1317. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.062>
- Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T., Watanabe, K., 2005. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature Biotechnology* 23, 88–93. <https://doi.org/10.1038/nbt1048>
- Uchiyama, T., Irie, M., Mori, H., Kurokawa, K., Yamada, T., 2015. FuncTree: Functional Analysis and Visualization for Large-Scale Omics Data. *PLOS ONE* 10, e0126967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126967>
- Vedha-Peters, K., Gunawardana, M., Rozzell, J.D., Novick, S.J., 2006. Creation of a Broad-Range and Highly Stereoselective d-Amino Acid Dehydrogenase for the One-Step Synthesis of d-Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 10923–10929. <https://doi.org/10.1021/ja0603960>
- Virk, J.K., Gupta, V., Kumar, S., Singh, A.R., Bansal, P., 2015. Lack of Pharmacological Basis of Substitution of an Endangered Plant Group *Ashtawarga*—A Significant Ingredient of Polyherbal Formulations.
- Walters, W.A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J.G., Sutter, J., Zhang, W., González-Peña, A., Peiffer, J., Koren, O., Shi, Q., Knight, R., Rio, T.G. del, Tringe, S.G., Buckler, E.S., Dangl, J.L., Ley, R.E., 2018. Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *PNAS* 115, 7368–7373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800918115>
- Wang, B., Wang, A., Cao, Z., Zhu, G., 2016. Characterization of a novel highly thermostable esterase from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans* TK64. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 63, 334–343. <https://doi.org/10.1002/bab.1465>
- Wang, W., Zhai, Y., Cao, L., Tan, H., Zhang, R., 2016. Illumina-based analysis of core actinobacteriome in roots, stems, and grains of rice. *Microbiological Research* 190, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.003>
- Werpy, T., Petersen, G., 2004. Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas (No. DOE/GO-102004-1992, 15008859). <https://doi.org/10.2172/15008859>

- Whittaker, M.M., Whittaker, J.W., 2006. Streptomyces coelicolor oxidase (SCO2837p): A new free radical metalloenzyme secreted by Streptomyces coelicolor A3(2). Archives of Biochemistry and Biophysics 452, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.06.020>
- Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., Shao, H., 2017. Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. Cell & Bioscience 7, 50. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0179-x>
- Yeoh, Y.K., Dennis, P.G., Paungfoo-Lonhienne, C., Weber, L., Brackin, R., Ragan, M.A., Schmidt, S., Hugenholtz, P., 2017. Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. Nature Communications 8, 215. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00262-8>
- Yeung, Hong, S., Corey, E.J., 2006. A Short Enantioselective Pathway for the Synthesis of the Anti-Influenza Neuramidase Inhibitor Oseltamivir from 1,3-Butadiene and Acrylic Acid. J. Am. Chem. Soc. 128, 6310–6311. <https://doi.org/10.1021/ja0616433>
- Zhao, Y., Hao, X., Lu, W., Cai, J., Yu, H., Sévénét, T., Guéritte, F., 2002. Syntheses of Two Cytotoxic Sinapyl Alcohol Derivatives and Isolation of Four New Related Compounds from Ligularia nelumbifolia. J. Nat. Prod. 65, 902–908. <https://doi.org/10.1021/np0200257>
- Zhu, W., Lomsadze, A., Borodovsky, M., 2010. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. Nucleic Acids Res 38, e132–e132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq275>

謝辞

本論文の第2章において述べた研究は、東京工業大学生命理工学研究科生命情報専攻（現・生命理工学院）において、中島信孝准教授（現・産業総合研究所 生物プロセス研究部門 応用分子微生物学研究グループ 主任研究員）の指導の下に行われました。中島准教授には遺伝子工学とバイオインフォマティクスの複合領域というWetとDryを組み合わせた最先端の分野で研究する機会と環境を与えて頂きました。特に遺伝子工学については、基礎の基礎から丁寧なご指導を頂き、wet実験への取り組み方、研究に対する姿勢を学ばせていただきました。また、研究外にも進路相談や修士課程、博士課程への進学へのサポートなど大変お世話になりました。心より深く感謝致します。

本論文の第3章において述べた研究は、東京工業大学生命理工学院において、山田拓司准教授の指導の下に行われました。山田准教授には、修士課程から博士課程にかけて本研究を含め様々な最新のバイオインフォマティクスに関する研究の機会と環境を与えて頂きました。また、山田准教授には現在までに身についたプログラミング技術、データ解析能力はご指導の賜物です。心より深く感謝致します。

また、本論文の第3章において述べた研究は、長瀬産業株式会社 廣瀬修一様、谷口優子様、ライフサイエンス統合データベースセンター 守屋勇樹特任助教のご協力を頂きました。忙しい日程での論文化でしたが、快く作業を進めて頂いたおかげで今日に至ることができました。改めて感謝いたします。

同研究室に在籍した多くの方に研究の上で大変お世話になりました。特に黒川顕教授（当時）、森宙史助教授（当時）には、研究に関する深い議論とご指導を頂きました。ありがとうございます。

また、研究室に所属した学生、ポスドクの皆様にも日々の研究室での日常から研究発表での議論まで幅広くお世話になりました。特に同期の鈴木真也君、渡来直生君、元同期の間中健介君、山手雄太君には、公私ともにお世話になりました。深く感謝いたします。研究室秘書や技術員の方々にも改めて感謝いたします。

最後に、20年間と長きに渡る学生生活を陰ながら支えてくれた両親と姉、妹、祖父母に心より感謝します。本当にありがとう。

付録

Table S1	集積培養サンプル由来レブリン酸代謝酵素探索、第一次スクリーニング結果	87
Table S2	土壌サンプル由来レブリン酸代謝酵素探索、第一次スクリーニング結果	90

Table S1 集積培養サンプル由来レブリン酸代謝酵素探索、第一次スクリーニング結果

遺伝子オーソログ グループID	タンパク質名	KEGG Orthology	Maximum value Fold Change
OG_1536	-		364.11
OG_4844	scaffolding protein		215.91
OG_3445	-		26.29
OG_4926	endoribonuclease		11.35
OG_3402	putative redox protein	K07397	8.06
OG_4357	-		6.47
OG_4284	-		6.23
OG_4672	iron-enterobactin transporter ATP-binding protein		6.17
OG_3706	-		6.17
OG_3739	-		5.75
OG_3689	ATPase AAA		5.51
OG_4661	transglycosylase		4.91
OG_4206	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	K00626	4.88
OG_4035	ABC transporter permease		4.66
OG_4168	membrane protein	K09129	4.63
OG_4392	GNAT family acetyltransferase		4.45
OG_4452	-		4.25
OG_3686	succinyl-CoA synthetase alpha subunit [EC:6.2.1.5]	K01902	4.11
OG_3662	endonuclease		3.95
OG_4688	-		3.90
OG_4867	-		3.85
OG_4670	short chain dehydrogenase/reductase		3.82
OG_4171	-		3.80
OG_3108	translation inhibitor protein		3.75
OG_3332	NADP-dependent oxidoreductase	K07119	3.75
OG_4730	NIPSNAP family containing protein		3.75
OG_3097	pyruvate carboxylase subunit B [EC:6.4.1.1]	K01960	3.71
OG_3644	elongation factor Tu		3.66
OG_3776	-		3.64
OG_3858	twin-arginine translocation pathway signal protein		3.60
OG_4418	-		3.60
OG_4878	30S ribosomal protein S13		3.59
OG_2605	-		3.48
OG_2892	secretion protein HlyD family protein		3.45
OG_3560	glycosyl transferase		3.44
OG_3109	-		3.40
OG_1202	secondary thiamine-phosphate synthase enzyme		3.35
OG_2905	Type IIA topoisomerase		3.35
OG_3261	transketolase 1		3.31
OG_3399	glutamine amidotransferase [EC:2.4.2.-]	K02501	3.23
OG_3915	acetyltransferase		3.22
OG_3668	nucleotide excision repair protein		3.21
OG_4922	-		3.18
OG_4064	-		3.17
OG_4785	phosphopantetheinyltransferase component of enterobactin synthase multienzyme complex		3.10
OG_3555	alkylhydroperoxidase		3.06
OG_2000	-		3.03
OG_3116	GntR family transcriptional regulator		3.00
OG_3749	aconitate hydratase 2 / 2-methylisocitrate dehydratase [EC:4.2.1.3 4.2.1.99]	K01682	2.99
OG_1922	ATPase AAA		2.98
OG_4567	DEAD/DEAH box helicase		2.96

OG_4891	GTP-binding protein		2.95
OG_4069	ankyrin	K06867	2.93
OG_4136	gamma-glutamyl-gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.-]	K09472	2.91
OG_4907	6-phosphogluconate phosphatase		2.88
OG_4599	isochorismate synthase		2.86
OG_2067	ABC transporter, ATP-binding protein		2.86
OG_4503	peptidase M23		2.85
OG_4650	-		2.84
OG_2365	homoserine dehydrogenase [EC:1.1.1.3]	K00003	2.74
OG_4427	capsid family protein		2.72
OG_2440	50S ribosomal protein L16 arginine hydroxylase		2.69
OG_3725	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha		2.68
OG_3680	-		2.68
OG_3740	StbA family protein		2.67
OG_4498	-		2.66
OG_2869	-		2.60
OG_4826	aldehyde dehydrogenase		2.56
OG_4739	tRNA-Thr(GGU) m(6)t(6)A37 methyltransferase TsaA		2.55
OG_1535	cp4-like integrase		2.54
OG_4848	-		2.52
OG_2707	acetyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.1]	K01895	2.52
OG_2665	peptidase		2.51
OG_3648	acyl-CoA thioester hydrolase [EC:3.1.2.-]	K07107	2.51
OG_4609	DNA gyrase inhibitor	K09862	2.49
OG_3447	-		2.48
OG_3166	ribosome association toxin Rata		2.48
OG_4927	monomeric isocitrate dehydrogenase family protein		2.45
OG_3542	hypothetical protein	K09897	2.44
OG_2658	membrane protein		2.44
OG_2216	transcriptional regulator		2.41
OG_3072	hypothetical protein	K09983	2.40
OG_4754	quinol monooxygenase		2.40
OG_4360	-		2.39
OG_4084	prolyl-tRNA synthetase		2.39
OG_2798	aldo/keto reductase		2.38
OG_1777	acyl-homoserine-lactone acylase [EC:3.5.1.97]	K07116	2.38
OG_3164	acetolactate decarboxylase [EC:4.1.1.5]	K01575	2.37
OG_2462	DNA helicase IV		2.37
OG_3457	sugar ABC transporter ATPase		2.34
OG_4820	-		2.34
OG_4520	cell envelope biogenesis protein OmpA		2.28
OG_3540	acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	K04072	2.27
OG_4889	-		2.26
OG_1915	glutamine synthetase [EC:6.3.1.2]	K01915	2.26
OG_1917	Cell division protein FtsI		2.26
OG_3754	replication protein		2.25
OG_3534	galactoside O-acetyltransferase		2.24
OG_4633	flagellin		2.24
OG_3630	hydroxyacyl-ACP:CoA transacylase		2.24
OG_4114	-		2.23
OG_2833	acetyltransferase		2.23
OG_4209	shikimate transporter		2.22
OG_4807	-		2.22
OG_2431	ribonuclease G		2.20

OG_2296	Salmochelinsiderophore protein IroE	K07017	2.20
OG_3789	-		2.19
OG_4004	Exodeoxyribonuclease V beta		2.19
OG_2561	aspartate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.11]	K00133	2.19
OG_2202	polysaccharide biosynthesis protein		2.18
OG_3347	GntR family transcriptional regulator		2.18
OG_3786	NmrA family transcriptional regulator		2.16
OG_2584	glutamate--cysteine ligase		2.16
OG_4469	phosphohydrolase		2.16
OG_4518	oligopeptidase A		2.15
OG_3383	transcriptional regulator		2.14
OG_1251	hypothetical protein	K09913	2.14
OG_1983	Fe-S cluster assembly transcriptional regulator IscR		2.13
OG_2778	phosphatase		2.13
OG_2955	glutamate dehydrogenase [EC:1.4.1.2]	K15371	2.13
OG_2176	kinase inhibitor	K06910	2.13
OG_4388	acyl-CoA dehydrogenase	K00257	2.12
OG_3306	peptide synthase		2.12
OG_4877	transcriptional regulator		2.11
OG_3437	XRE family transcriptional regulator		2.09
OG_2821	acetyl-CoA hydrolase		2.09
OG_4642	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase		2.08
OG_2602	long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3]	K01897	2.07

Table S2 土壌サンプル由来レブリン酸代謝酵素探索、第一次スクリーニング結果

遺伝子オーソログ グループID	タンパク質名	KEGG Orthology	Maximum value Fold Change
LOG_1311	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	K03088	26.35
LOG_2942	ribosome modulation factor	K03812	13.55
LOG_2782	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase [EC:2.7.1.148]	K00919	12.52
LOG_2813	imipenem/basic amino acid-specific outer membrane pore [EC:3.4.21.-]	K18093	10.80
LOG_2793	chemotaxis protein CheZ	K03414	9.89
LOG_2731	flagellar basal-body rod protein FlgG	K02392	8.62
LOG_2212	None	K07003	8.42
LOG_2243	bacterioferritin	K03594	7.19
LOG_1904	branched-chain amino acid transport system permease protein	K01997	7.13
LOG_2815	small subunit ribosomal protein S11	K02948	7.04
LOG_2209	cytochrome o ubiquinol oxidase operon protein cyoD	K02300	6.34
LOG_1287	DnaK suppressor protein	K06204	6.32
LOG_2794	proline iminopeptidase [EC:3.4.11.5]	K01259	6.28
LOG_2829	Bax protein	K03796	5.98
LOG_1599	branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	K01999	5.85
LOG_1819	putative oxidoreductase	K15977	5.83
LOG_2822	tRNA-dihydrouridine synthase B [EC:1.-.-.]	K05540	5.62
LOG_2736	isocitrate dehydrogenase [EC:1.1.1.42]	K00031	5.42
LOG_2955	small subunit ribosomal protein S7	K02992	5.28
LOG_2784	phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain [EC:6.1.1.20]	K01890	5.25
LOG_1221	glutamine transport system substrate-binding protein	K10036	5.09
LOG_2958			5.04
LOG_2226			4.82
LOG_2199			4.78
LOG_2751			4.78
LOG_2735	biopolymer transport protein TolR	K03560	4.72
LOG_1006	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [EC:2.7.7.6]	K03043	4.72
LOG_1005	aconitate hydratase 2 / 2-methylisocitrate dehydratase [EC:4.2.1.3 4.2.1.99]	K01682	4.60
LOG_2720	alanyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.7]	K01872	4.60
LOG_2826			4.59
LOG_2235	imipenem/basic amino acid-specific outer membrane pore [EC:3.4.21.-]	K18093	4.56
LOG_2945	putative spermidine/putrescine transport system ATP-binding protein	K02052	4.51
LOG_1912			4.49
LOG_2807	preprotein translocase subunit SecB	K03071	4.28
LOG_2949	malate synthase [EC:2.3.3.9]	K01638	4.25
LOG_2789	GTP pyrophosphokinase [EC:2.7.6.5]	K00951	4.20
LOG_2787	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	K00121	4.17
LOG_2684			4.15
LOG_2708	type VI secretion system secreted protein Hcp	K11903	4.08
LOG_2667	beta-alanine-pyruvate transaminase [EC:2.6.1.18]	K00822	4.05
LOG_2947	acetolactate synthase I/II/III large subunit [EC:2.2.1.6]	K01652	4.04
LOG_2831			4.04

LOG_2671	NADH-quinone oxidoreductase subunit M [EC:1.6.5.3]	K00342	3.99
LOG_2223	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase [EC:6.3.3.2]	K01934	3.97
LOG_2818	sulfate transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.25]	K02045	3.95
LOG_2484	ornithine carbamoyltransferase [EC:2.1.3.3]	K00611	3.94
LOG_2688	acetyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.1]	K01895	3.91
LOG_2779	GTP-binding protein	K03979	3.89
LOG_2152	flagellar hook protein FlgE	K02390	3.81
LOG_2827	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase (KDO 8-P phosphatase) [EC:3.1.3.45]	K03270	3.77
LOG_2939	2-isopropylmalate synthase [EC:2.3.3.13]	K01649	3.75
LOG_2711	ornithine cyclodeaminase [EC:4.3.1.12]	K01750	3.71
LOG_2759	DNA gyrase subunit B [EC:5.99.1.3]	K02470	3.69
LOG_2954	CBS domain-containing protein	K07182	3.68
LOG_1293	biopolymer transport protein ExbD	K03559	3.67
LOG_2792	phosphoserine aminotransferase [EC:2.6.1.52]	K00831	3.66
LOG_2762	type IV pilus assembly protein PilM	K02662	3.65
LOG_2704	putative sigma-54 modulation protein	K05808	3.62
LOG_2821			3.60
LOG_2758	cell division inhibitor Sula	K13053	3.57
LOG_2733			3.51
LOG_2809	outer membrane protein	K06142	3.50
LOG_2765	molecular chaperone HtpG	K04079	3.47
LOG_2823			3.47
LOG_2801	nicotinate-nucleotide adenyltransferase [EC:2.7.7.18]	K00969	3.46
LOG_2764	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpB	K03695	3.45
LOG_2938	UDP-glucose:(heptosyl)LPS alpha-1,3-glucosyltransferase [EC:2.4.1.-]	K02844	3.45
LOG_2699	amidophosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.14]	K00764	3.44
LOG_2744			3.41
LOG_2747	cystine transport system substrate-binding protein	K02424	3.41
LOG_2707	MoxR-like ATPase [EC:3.6.3.-]	K03924	3.40
LOG_2227	YidC/Oxa1 family membrane protein insertase	K03217	3.40
LOG_2668	aspartyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.12]	K01876	3.39
LOG_2710	branched-chain amino acid transport system permease protein	K01997	3.39
LOG_2950			3.38
LOG_2767	ATP-dependent RNA helicase DeaD [EC:3.6.4.13]	K05592	3.38
LOG_2833	lipoprotein NlpD	K06194	3.36
LOG_2777	imipenem/basic amino acid-specific outer membrane pore [EC:3.4.21.-]	K18093	3.36
LOG_2834			3.35
LOG_2786	branched-chain amino acid aminotransferase [EC:2.6.1.42]	K00826	3.32
LOG_2771			3.22
LOG_2951	fatty-acyl-CoA synthase [EC:6.2.1.-]	K00666	3.22
LOG_2824	purine-binding chemotaxis protein CheW	K03408	3.20
LOG_2149			3.18
LOG_2678	PTS system, mannitol-specific IIA component [EC:2.7.1.69]	K02798	3.16
LOG_2689	chemotaxis protein MotA	K02556	3.16
LOG_2804	cytoskeleton protein RodZ	K15539	3.16

LOG_2706	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase [EC:2.1.1.79]	K00574	3.15
LOG_2800	molybdate transport system substrate-binding protein	K02020	3.13
LOG_2687	putrescine transport system substrate-binding protein	K11073	3.12
LOG_2701			3.10
LOG_2806	glutaredoxin 3	K03676	3.09
LOG_2712	taurine transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.36]	K10831	3.08
LOG_2814			3.08
LOG_1922	flagellar hook-associated protein 1 FlgK	K02396	3.08
LOG_2740	NAD(P) transhydrogenase [EC:1.6.1.1]	K00322	3.07
LOG_2766	valyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.9]	K01873	3.05
LOG_2682	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid dehydratase [EC:1.1.1.336]	K02472	3.04
LOG_2270	phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase [EC:3.6.1.31]	K01523	3.04
LOG_2690	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.12]	K15633	3.00