

博士論文

天然ゴム資化性放線菌における  
ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解遺伝子の機能と転写制御

2022年6月

長岡技術科学大学  
大学院 工学研究科  
生物統合工学専攻

儀武 菜美子

序章 .....	1
1. 研究背景 .....	1
2. 天然ゴム (Natural rubber: NR) .....	1
3. NR 粒子 .....	2
4. IPP 生合成経路 .....	3
5. <i>H. brasiliensis</i> における NR の生合成 .....	3
6. NR の生産と利用 .....	4
7. NR 資化性細菌 .....	5
8. ポリ( <i>cis</i> -1,4-イソプレン)分解酵素 .....	8
9. Latex clearing protein (Lcp) .....	8
10. Rubber Oxygenase (RoxA, RoxB) .....	10
11. ポリ( <i>cis</i> -1,4-イソプレン)分解経路 .....	11
12. ポリ( <i>cis</i> -1,4-イソプレン)分解酵素の転写制御機構 .....	13
13. TetR 型転写制御因子 .....	14
14. オリゴイソプレンアルデヒドの代謝 .....	15
15. ポリ( <i>cis</i> -1,4-イソプレン)分解酵素の分布 .....	17
16. NR 資化性細菌の NR 分解能 .....	18
17. 本研究の目的 .....	18
第一章 <i>Actinoplanes</i> sp. OR16 株の NR 代謝に関連する遺伝子の同定と機能解析 .....	20
緒言 .....	20
材料と方法 .....	21
供給菌、プラスミド、及び培養条件 .....	21
酵素、試薬、基質、及び遺伝子操作 .....	22
NR 資化性細菌 OR16 株のスクリーニング .....	23
OR16 株からの total DNA の抽出 .....	23
全ゲノム配列の解読と解析 .....	23
OR16 株からの total RNA の抽出 .....	24
cDNA 合成 .....	24
RT-PCR 解析 .....	24
定量 RT-PCR 解析 .....	25
<i>lcp</i> 遺伝子の <sup>+</sup> 大腸菌での発現と Lcp の精製 .....	25
酵素活性測定 .....	26

<i>lcpR</i> 遺伝子の大腸菌での発現と LcpR の精製 .....	26
ゲルシフト解析 (EMSA) .....	27
<b>結果</b> .....	<b>29</b>
1. ゲノム配列の解析 .....	29
2. OR16 株における <i>lcp</i> のオルソログ同定 .....	32
3. Lcp の精製と機能解析 .....	35
4. 各 <i>lcp</i> 遺伝子の転写誘導性 .....	37
5. LcpR1 及び LcpR2 の結合能 .....	38
<b>考察</b> .....	<b>41</b>
<b>第二章 <i>Rhodococcus</i> sp. RDE2 株の NR 代謝に関連する遺伝子の同定と機能解析</b> .....	<b>45</b>
<b>緒言</b> .....	<b>45</b>
<b>材料と方法</b> .....	<b>46</b>
NR 資化性細菌 RDE2 株のスクリーニング .....	46
供給菌、プラスミド、及び培養条件 .....	46
酵素、試薬、基質、及び遺伝子操作 .....	46
全ゲノム配列の解読と解析 .....	47
ポリ( <i>cis</i> -1,4-イソプレン)分解能の評価 .....	48
大腸菌を用いた異種宿主発現と酵素精製 .....	48
酵素活性測定 .....	49
ポリ( <i>cis</i> -1,4-イソプレン)分解産物の同定 .....	49
遺伝子破壊株の作製 .....	50
RDE2 株からの total RNA の抽出と定量的 RT-PCR .....	50
ゲルシフト解析 (EMSA) .....	50
<b>結果</b> .....	<b>52</b>
1. ポリ( <i>cis</i> -1,4-イソプレン)分解能を持つ NR 資化性菌の単離 .....	52
2. RDE2 株のゲノム配列解析 .....	52
3. ポリ( <i>cis</i> -1,4-イソプレン)分解遺伝子の同定 .....	55
4. Lcp の精製と機能解析 .....	56
5. <i>lcp</i> と <i>lcpR</i> の欠失 .....	58
6. <i>lcp</i> <sub>RDE2</sub> の転写誘導性 .....	60
7. LcpR <sub>RDE2</sub> の結合能 .....	60
<b>考察</b> .....	<b>63</b>
<b>総括</b> .....	<b>66</b>

公表論文.....	68
引用文献.....	69



## 序章

### 1. 研究背景

天然ゴム (Natural rubber: NR)は、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を主成分とする天然高分子であり、現在、工業的な供給源はパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*)のラテックスが 99%以上を占めている (11)。NR が工業的に利用され始めた当初は、消しゴムやゴム管やゴムバンド、防水布などの材料として利用されていた。1839年にはチャールズ・グッドイヤーが加硫することによりNRの伸縮性や弾性、耐摩耗性が飛躍的に向上することを発見し、以降はタイヤやチューブなどをはじめとした様々な工業製品の原料として利用されるようになった。更に、石油を原料として化学合成された合成ゴムの登場により利用の幅は大きく広がり、現在では我々の生活に不可欠な資源となっている。世界でのゴムの消費量は年々増加傾向をたどっており、2020年には1,270万トンのNRと1,420万トンの合成ゴムが消費されている (www.statista.com. Natural and synthetic rubber - global consumption 1990-2020)。一方で、需要増加に伴い大量の廃ゴムが毎年排出されており、現在それら廃棄物の処理が問題となっている。ゴム廃棄物のほとんどは焼却や埋め立てにより処理されているが、温室効果ガスの増加や環境負荷を低減するために、早急な対応が求められている。微生物を用いた分解処理は環境負荷の少ない処理方法であるため、NRの廃棄物処理技術の一つとして技術開発と実用化が期待されている。

### 2. 天然ゴム (Natural rubber: NR)

NRの原料は、ラテックスと呼ばれる乳白色の植物由来の液体である。ラテックスとは、タンパク質、でんぷん、アルカロイドなどを含む乳白色の液体で、約2万種の植物が生産する (12)。その中でもラテックスにNR成分が含まれていることが明らかになっているのはおよそ2,500種である (4, 13)。植物における生物学的機能は完全には解明されていないが、植物内にはNR分解酵素が存在しないため、炭素源として貯蔵しているわけではなく、食害などで植物が傷ついた際に有害な細菌やウイルスが植物に侵入するのを阻止する役割を担うと考えられている。商業的に利用されるNRの原料は、パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*)から得られるラテックスが99%を占め、近年では *Parthenium argentatum* のラテックスも利用されている (14)。*H. brasiliensis* のラテックスは、ポリイソプレン:25-35% (w/w)、タンパク質:1.0-1.8% (w/w)、炭水化物:1-2% (w/w)、中性脂質:0.4-1.1% (w/w)、極性脂質:0.5-0.6% (w/w)、無機成分:0.4-0.6% (w/w)、水:50-70% (w/w)から構成されている (15)。

### 3. NR 粒子

植物の細胞内において、NR 粒子は球状で存在し、疎水性のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)でできたコアをリン脂質とタンパク質からなる単層が取り囲んでおり、脂質一重層をもつ脂肪滴と類似する構造である。脂肪滴と NR 粒子はどちらも小胞体膜からの出芽により形成されると提唱されている (16, 17)。ラテックス中の NR 粒子は、大粒子 (直径 ~0.4-1.0 μm)と小粒子 (直径 ~0.1-0.4 μm)が存在する二峰性のサイズ分布を示す (4, 18)。NR 粒子は、モノマーのイソプレンを重合する場であると同時に、生成したポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を貯蔵する場でもある。

*H. brasiliensis* において、光合成によって生成されたショ糖は、師管を通じて放射状柔組織を流れ、乳管へと運ばれる (Fig. 0-1)。乳管細胞内においてショ糖は、NR の骨格炭素に利用される。ATP や NADPH を利用した複数の変換経路を経由してイソプレンモノマーであるイソペンテニル二リン酸 (IPP) が生成される。この IPP は NR 粒子に局在する NR 重合酵素の働きによって付

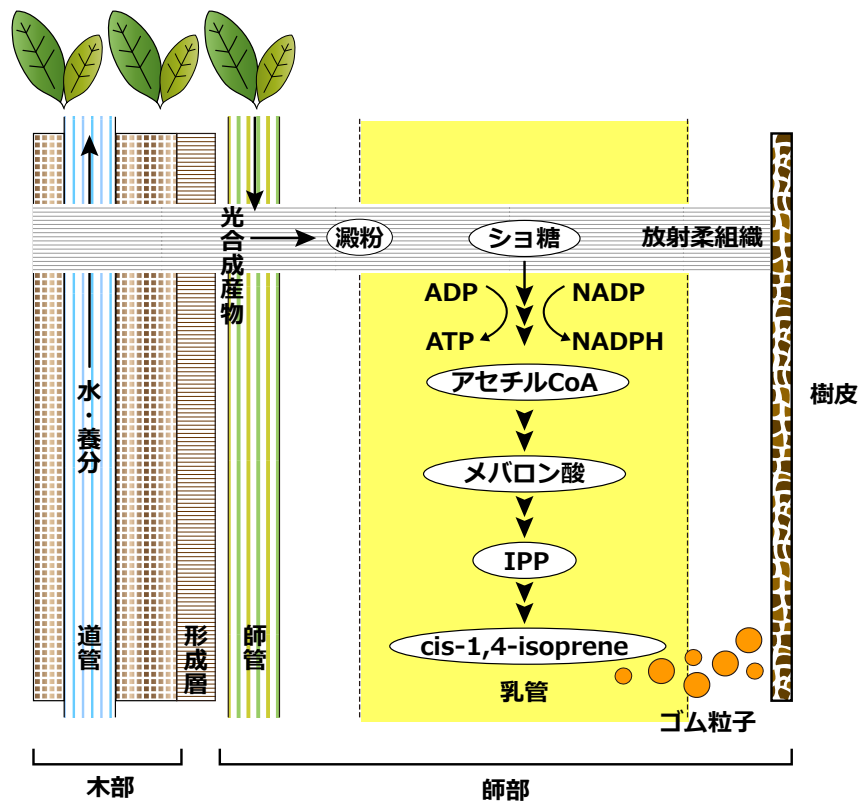


Fig. 0-1 NR 粒子の生成の流れを図に示した。乳管細胞内ではショ糖を出発物質として NR の骨格炭素に利用され、合成反応に必要なエネルギー (ATP)や還元力 (NADPH)を得て、複数の代謝物を経由してイソプレンモノマーであるイソペンテニル二リン酸 (IPP)が生成される。この IPP はゴム粒子に局在するゴム重合酵素の働きによって付加重合され、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)が合成される。乳管組織は木の成長に伴って外側に押し出されながら崩壊していくため、樹皮を傷つけることでラテックスが回収できる。

加重合され、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)が合成される。乳管組織は木の成長に伴って外側に押し出されながら崩壊していくため、樹皮を傷つけることでラテックスが回収できる (4, 19)。

#### 4. IPP 生合成経路

植物は、細胞質で行われるメバロン酸 (MVA)経路と葉緑体等のプラスチドで行われる非メバロン酸 (MEP)経路という2つの経路で、イソプレンモノマーである IPP を合成する。両経路の初酵素は、糖代謝から得られる中間体 (MEP 経路はピルビン酸、MVA 経路はグリセルアルデヒド3-リン酸、またはアセチル-CoA)を基質としている。細胞質の MVA 経路では、細胞質のアセチル-CoA が主要な基質である。MVA 経路は、アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ (AACT)、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA 合成酵素 (HMGS)、HMG-CoA 還元酵素 (HMGR)、メバロン酸キナーゼ (MVK)、リン酸化メバロン酸キナーゼ (PMK)とジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD)の酵素が触媒する6つのステップからなる (20)。

プラスチドの MEP 経路では、8つの酵素によって IPP とジメチルアリルニリン酸 (DMPAPP)を生成する。IPP は IPP イソメラーゼによって DMAPP に異性化され、DMAPP はその後 *trans*-プレニルトランスフェラーゼ (TPT)によって IPP と数段階で縮合し、ゲラニルニリン酸 (GPP, C10)、ファルネシルニリン酸 (FPP, C15)、ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP, C20)が生成する (21)。これらのトランス短鎖プレニルニリン酸は、さらなる IPP 縮合とイソプレノイド生成のための開始剤 (アリルプライマー基質)として機能する。植物において、この経路の酵素をコードする遺伝子はすべて原核生物由来である (22)。

#### 5. *H. brasiliensis* における NR の生合成

*H. brasiliensis* のゲノム解析の結果、NR 生合成関連遺伝子が94つあることが明らかになっている。そのうち18個がMVA経路に、22個がMEP経路に、15個が細胞質でのイニシエーター合成に、57個がNR粒子関連の遺伝子であることが推定されている。ラテックス生成時の発現解析を行った結果、*H. brasiliensis* ではMVA経路のみを利用して合成を行なっていることが示唆されている (23)。*H. brasiliensis* はNR粒子上に存在する *cis*-プレニルトランスフェラーゼが重合反応を行うことで合成する (Fig. 0-2)。

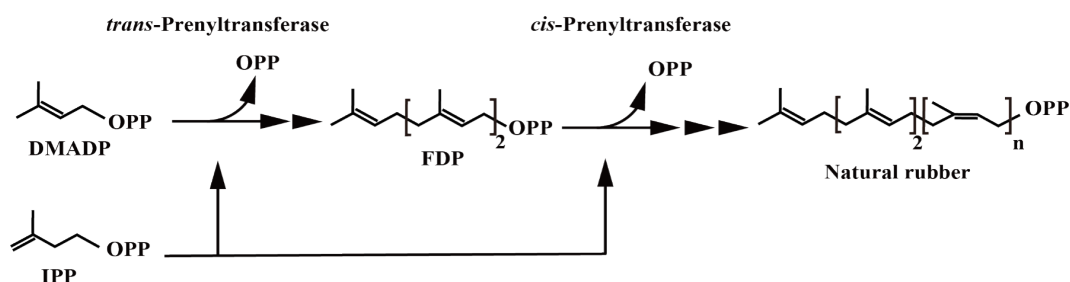


Fig 0-2. 天然ゴムの生合成経路。DMADP: dimethylallyl diphosphate, IPP: isopentenyl diphosphate, FDP: farnesyl diphosphate, OPP: diphosphate ester-OP<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>3-</sup>

*H. brasiliensis* の NR は、 $\omega$ -末端にイソプレノイド生成のための開始剤 (アリルプライマー基質)となる 2~3 個の *trans*-イソプレン単位を持つ (24)。 $\alpha$ -末端は脂肪酸とリン脂質のエステルが存在すると予想されていたが、近年の研究により一級アルコールあるいはカルボン酸エステルが存在することが明らかとなった (25, 26)。 $\omega$ -末端と $\alpha$ -末端の間に数百から数千個続くポリ(*cis*-1,4-イソプレン)が存在し、*H. brasiliensis* が生成する NR は平均分子量が 100 万と高いのが特徴である。NR の高次構造は NR 粒子の膜に局在するリン脂質とタンパク質が架橋することで形成されていると予想されている (27)。

## 6. NR の生産と利用

*H. brasiliensis* から採取された NR ラテックスは、加工工程において NR 含有量が 15% になるように希釈された後、ギ酸で凝固される。凝固した材料は、ローラーで圧縮して水分を除去し、シート状にされた後、熱風または煙火の熱で乾燥される。生産された生ゴムは、粉碎・機械的な剪断作用によって長いポリマー鎖が切断され、平均分子量が減少する。NR 化合物は、柔軟性、電気絶縁性、耐摩耗性、耐疲労性に優れているが、耐油性、耐熱性、耐オゾン性、耐光性には劣る。ゴム剛性を調節する硫黄 (通常 3~45%の硫黄を加える)や、強度や耐摩耗性を上げるカーボンブラックなどを添加することで、様々な製品への利用を可能にしている (28)。NR を利用した製品は医療機器や医療用グローブ、航空機のタイヤなどを含めて 50,000 種にも及ぶとされている (29)。

石油やナフサを原料として 1909 年に生成された合成イソプレンゴム (IR)は、NR と同様にポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を骨格として形成されているが、リン脂質やタンパク質が存在しないため、NR ほどの弾性がない。しかし、IR は NR と比べてオゾンによる劣化に強く、耐熱性や耐油性も勝る点の特徴である。現在では、NR と IR を混ぜて製品にしたり、それぞれの用途に合ったゴムを製品に利用したりしているため、どちらのゴム製品も生産は増加傾向にある。1990 年から 2017 年に

かけて、NRとIRの使用量がそれぞれ2.6倍、1.6倍と増え続けている(14)。なお、IRといった非ジエン系合成ゴムに対して、スチレンブタジエンゴム(SBR)やブタジエンゴム(BR)といったジエン系合成ゴムは、二重結合があることで硫黄との架橋が容易になり、物性の剛性を調節しやすくなる利点があるが、一方で二重結合が太陽光やオゾンにより破壊され劣化されやすくなるという欠点もある。SBRはNRに匹敵する機能を持つ合成ゴムとして、最も多く合成されている。自然界におけるゴム分解速度は種類、組成、環境に依存し、輪ゴムは1年、ラテックス手袋は数ヶ月から数年、ゴム靴底は50-80年、タイヤは2千年かかると言われている(14)。

## 7. NR 資化性細菌

近年、低環境負荷な廃棄NR処理とNR資源のリサイクルの実現に向けて、微生物によるNRの分解が注目されている。NR資化性細菌は、NRの主成分であるポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を唯一の炭素源として生育し、主にNR農園の土壌、ゴム製品工場の排水・廃棄物処理場などの土壌、あるいはNR片から単離されており、現在までに100株以上のNR資化性細菌が単離されている(14)。それらのほとんどは放線菌門に属し、プロテオバクテリア門に属するグラム陰性菌の報告例は2株のみである(Table 0-1)。NR資化性細菌は、2つのグループに分類される(30)。一つは、NRラテックスを含む白濁した寒天培地上で培養すると、コロニー周辺にクリアゾーンを形成するグループである。もう一方は、寒天培地上ではクリアゾーンを形成しないが、液体培地中で菌体がNRに直接付着し表面から分解するグループである。これらNRに直接付着するタイプのNR分解細菌は、表面にミコール酸によるバイオフィームを形成し、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)との疎水性相互作用によってNRに直接付着することで効率的に分解を進めていると考えられている(31)。

Table 0-1 これまでに単離されたポリ(*cis*-1,4-イソブレン)分解菌

Class	Genus	Species	Strain	Clear zone	Enzyme	REF
Actinomycetia	<i>Microtetraspora</i>		AC03309	+	Lep1,2	(32)
Actinomycetia	<i>Microtetraspora</i>		3880-19B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Actinomadura</i>	<i>libanotica</i>	DSM43554	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Actinomadura</i>		E6	+	ND	(33)
Actinobacteria	<i>Actinoplanes</i>	<i>italicus</i>	DSM43146	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Actinoplanes</i>	<i>violaceoruber</i>	DSM43147	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Actinoplanes</i>		OR16	+	Lep1,2,3	(34)
Actinobacteria	<i>Dactylosporangium</i>	<i>thailandense</i>	DSM43158	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Dactylosporangium</i>		AC04546	+	Lep1,2,3	(32)
Actinobacteria	<i>Gordonia</i>	<i>polyisoprenivorans</i>	YK2	-	ND	(35)
Actinobacteria	<i>Gordonia</i>	<i>westfalica</i>	Kb2	-	Lep	(36)
Actinobacteria	<i>Gordonia</i>	<i>polyisoprenivorans</i>	VH2	-	Lep1,2	(35)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>	<i>aurantiaca</i>	W2b	+	Lep	(37)
Actinobacteria	<i>Micromonosporas</i>		3831-24A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		3833-24C	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		3836-27B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		3849-37A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		3879-2A	+	ND	(32)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		3881-24D	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		3882-25C	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		3884-40A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		DSM43170	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		DSM43713	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>		DSM43423	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i>	<i>fortuitum</i>	NF4	-	ND	(37)
Actinobacteria	<i>Nocardia</i>	<i>farcinica</i>	E1	+	ND	(33)
Actinobacteria	<i>Nocardia</i>	<i>nova</i>	SH22a	+	Lep	(38)
Actinobacteria	<i>Nocardia</i>		DSM43191	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Nocardia</i>		835A	ND	ND	(1)
Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>pyridinivorans</i>	F5	-	ND	(10)
Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>rhodochrous</i>	RPK1	-	Lep	(10)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	1A	+	ND	(39)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	A3(2)	+	Lep1, (2)	(40)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	CH13	+	Lep	(9)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	3813-1A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	3815-1F	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	3817-3B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	3826-17A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>coelicolor</i>	3832-24B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3814-1D	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3816-1L	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3819-14B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3820-14C	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3821-14D	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3822-14F	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3823-14H	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3824-15A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	3827-17B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>halstedii</i>	3825-16B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>halstedii</i>	3837-30A	+	ND	(4)

Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>halstedii</i>	3839-30C	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>halstedii</i>	3847-34C	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>rochei</i>	3818-5E	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>rochei</i>	3829-17G	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>rochei</i>	3840-31A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>rochei</i>	3843-33B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>rochei</i>	3846-34B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>rochei</i>	3848-35A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>violaceoruber</i>	3844-33C	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>albogriseolus</i>	DSM40003	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>nitrosporeus</i>	DSM40023	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseobrunneus</i>	DSM40066	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>atroolivaceus</i>	DSM40137	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>daghestanicus</i>	DSM40149	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>flavoviridis</i>	DSM40153	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>olivoviridis</i>	DSM40211	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseoviridis</i>	DSM40229	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>griseoflavus</i>	DSM40456	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>albaduncus</i>	DSM40478	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>tauricus</i>	DSM40560	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		LCIC4	+	Lcp	(34)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		3838-30B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		3828-17C	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		3842-32D	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		3850-38A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		3834-25A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		3841-31B	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		3835-26A	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		3883-32C	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		DSM40533	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		DSM40441	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		DSM40566	+	ND	(4)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>		K30	+	Lcp	(41)
Betaproteobacteria	<i>Rhizobacter</i>	<i>gummiphilus</i>	NS21	+	RoxA/RoxB	(34)
Gammaproteobacteria	<i>Steroidobacter</i>	<i>cummioxidans</i>	35Y	+	ND	(5)



## 8. ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素

ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素は、NR 分解の初発を担う酸素添加酵素であり、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方に存在する。現在までに、Latex clearing protein (Lcp)、Rubber Oxygenase A 及び B (RoxA 及び RoxB)の2種類の酵素が発見されている (Table 0-2)。2種類の酵素は、それぞれ構造上の違いはあるものの、ポリマー骨格のシス二重結合への酸素添加型開裂を触媒し、その過程でケトン基やアルデヒド末端基を生成するジオキゲナーゼである点で共通している。

## 9. Latex clearing protein (Lcp)

*Streptomyces* sp. K30 株で初めて報告された Lcp は、N 末端に Twin-arginine motif (RRxxL) を有しており、TAT 分泌経路によって発現される細胞外分泌酵素である (Fig. 0-3)。Lcp<sub>K30</sub> はヘム結合領域 (CxxCH)を持っていないためシトクロム-*b* タイプのヘム含有タンパク質であり (42)、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)をアルデヒド基とケトン基を持つ C<sub>20</sub> 以上のテトライソプレノイドなどの低分子量生成物にランダム切断するエンド型酵素である (43)。また、Lcp とイミダゾールの反応では、Fe<sup>2+</sup>と反応させても 521 nm や 550 nm に吸光度を持つ生成物を生成しないことから、Lcp<sub>K30</sub> のヘム鉄は反応中に Fe<sup>3+</sup>の形になっているものと考えられる (42)。本菌株の Lcp<sub>K30</sub> 変異株 (*lcp* 遺伝子欠損株)は、NR ラテックス寒天培地上でクリアゾーンを形成する能力を失った。従って、この遺伝子はポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の分解に関与していることが示唆された (42)。さらに、Lcp<sub>K30</sub> をポリ(*cis*-

Table 0-2 既知のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素

	Lcp	RoxB	RoxA
First Identified From	<i>Streptomyces</i> sp. strain K30	<i>Steroidobacter cummioxidans</i> 35Y ( <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y)	
Accession no.	AY387589	KY498024	KC980911
Metabolite Products	Tetra C20, oligoisoprene/ aldehyde and ketone terminal		ODTDs
Bacteria	Mostly Gram-positive	Gram-negative only	
Gene Length (bp)	~1224–1227	~2037–2046	
Size (kDa)	43	73–74	
Pathway	TAT	SEC	
Co-factor	b-type heme	c-type heme	
Mechanism to Cleavage Isoprene	Endo-type	Endo and Exo-type	
Major Metal Atoms in Protein Molecule	1 Fe	2 Fe	
Oxidation State of Iron	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	



1,4-イソプレン)分解能を持たない *Streptomyces lividans* TK2 株および *Saccharopolyspora erythraea* TK25 株を用いて異種宿主発現を行うとポリ(*cis*-1,4-イソプレン)が分解できることが明らかとなった (44)。しかし、大腸菌と *Pseudomonas putida* では活性型の Lcp を得ることができなかった。

Lcp<sub>K30</sub> は微弱ながらも構成的な遺伝子発現が確認されており、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)存在下で転写量が増大する事が報告されている。この結果から、構成的に発現した Lcp の働きによってポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の分解産物が生成され、その分解産物が細胞内に取り込まれた後に *lcp* の転写誘導が引き起こされると推定された (45)。

Lcp の機能解析は、*Gordonia polyisoprenivorans* VH2 株 (31, 46, 47)、*Nocardia nova* SH22a 株 (48, 49)、*Rhodococcus rhodochrous* RPK1 株 (48)、などのグラム陽性細菌で主に機能解析が行われている。ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解に Lcp が必須であることや、エンド型の切断酵素であること、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)による転写誘導性など、Lcp<sub>K30</sub> の解析結果と同様の傾向を示すことが示唆されている。Lcp<sub>K30</sub> と異なる報告として、Lcp<sub>1VH2</sub> は Lcp<sub>K30</sub> と異なり遷移金属として銅イオンを有するホワイトラッカーゼファミリーに属することを示した (46)。また、Cu<sup>2+</sup>キレート剤であるバソクプロインスルホン酸は Lcp 反応を阻害しないことから、このイオンは Cu<sup>2+</sup>であることが示唆された。

Lcp のアミノ酸配列には DUF2236ドメインと呼ばれる保存領域が存在している (50)。Lcp<sub>K30</sub> は基質を取り込むために開いた結晶構造 (Open 型)と基質を取り込んだ結晶構造 (Close 型)を形成することが明らかにされている (51)。基質の取り込みに関わる Open および Close の制御は、

```

1  MDGFS RRRML MTGGA LGAVG ALGAA TRALA RPLWT WSPSA SVAGT GVGVD 50
51  PEYVW DEEAD PVLAA VIDRG EVPAV NALLK QWTRN DQALP GGLPG DLREF 100
101 MEHAR RMP SW ADKAA LDRGA QFSKT KGIYV GALYG LGSGL MSTAI PRESR 150
151 AVYYS KGGAD MKDRI AKTAR LGYDI GDLDA YLPHG SMIVT AVKTR MVHAA 200
201 VRHLL PQSPA WSQTS GGQKI PISQA DIMVT WHSLA TFVMR KMKQW GVRVN 250
251 TADAE AYLHV WQVSA HMLGV SDEYI PATWD AANAQ SKQVL DPILA HTPEG 300
301 EALTE VLLGI VAELD AGLTR PLIGA FSRYT LGGEV GDMIG LAKQP VLERL 350
351 IATAW PLLVA FREGL IPLPA VPAVL WTL EE ALRKF VLLFL SEGRR IAIDI 400
401 PDVNR PS

```

Fig. 0-3 *Streptomyces* sp. K30 株由来 Lcp のアミノ酸配列。シグナルペプチドとして推定された配列 (アミノ酸残基 1~30)を灰色背景、Lcp の保存領域 (DUF2236ドメイン)を赤字で表記した。アスタリスクはヘムの配位に必須なアミノ酸 (R164, T168, H198)とタンパク質安定性に関わる必須アミノ酸 (195R, 202R)を示した。

トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ (TDO)やインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)と同様の機構であると推定されており、活性酸素の生成を避けるための保護機構である可能性がある。Lcp<sub>K30</sub> のアミノ酸のうち約 3 分の 2 (63%)は $\alpha$ ヘリックス構造をとり、残りの部分は連結ループ領域を形成している。Lcp<sub>K30</sub> のヘム基は、近位のヒスチジン (His198)と遠位の軸リガンドとしてのリジン残基 (Lys167)によってポリペプチドにリガンドされている。また、部位特異的変異導入解析によって Arg195 と Arg202 残基がタンパク質の安定性に重要であることが示唆されている (50)。

## 10. Rubber Oxygenase (RoxA, RoxB)

Rubber Oxygenase A (RoxA)と Rubber Oxygenase B (RoxB)はグラム陰性菌にのみ存在するポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解の初発酵素である (Table 0-2)。Steroidobacter cummioxidans (*Xanthomonas* sp.) 35Y 株で初めて発見され、RoxA と RoxB が生成する低分子切断産物は放線菌と同じ経路で異化されると想定される (52)。RoxA<sub>35Y</sub> のアミノ酸配列は Lcp のアミノ酸配列と相同性がなく、Lcp とは異なり Sec 分泌経路で分泌されると予想されている (53)。RoxA<sub>35Y</sub> は 1 分子中に 2 つのヘム結合領域 (CXXCH)を持つ細胞外の c 型チトクロム (CCP)で、N 末端側のヘムが疎水性残基で囲まれた空洞部を形成して活性部位を構成すると推定されている (54)。しかし、RoxA<sub>35Y</sub> はペルオキシダーゼ活性を示さず、*Paracoccus denitrificans* や *Pseudomonas aeruginosa* に見られる CCP とは反応機構が異なると考えられている (55)。さらに、RoxA<sub>35Y</sub> をイミダゾールと反応させると、大きな Fe<sup>2+</sup>特異的吸収ピークが観測された。したがって、ヘム鉄は Fe<sup>2+</sup>となる (42)。精製した RoxA<sub>35Y</sub> の解析から、本酵素はポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の二重結合を切断し、酸素分子の取り込みにより末端アルデヒド基とケト基を持つトリイソプレノイド (12-oxo-4,8-dimethyl-trideca-4,8-diene-1-al:ODTD)を生成すると推察された。このことから、RoxA<sub>35Y</sub> はエキソ型切断酵素であると推察された (55, 56)。

RoxB<sub>35Y</sub> の推定アミノ酸配列は RoxA<sub>35Y</sub> と 36%の同一性を示した。RoxB<sub>35Y</sub> によるポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の開裂生成物は、末端にケト基とアルデヒド基を持つ C<sub>20</sub> 以上のオリゴイソプレノイドであることが確認された。これらの生成物の分子量から、RoxB<sub>35Y</sub> はエンド型の開裂酵素であると考えられる (57)。RoxA<sub>35Y</sub> と RoxB<sub>35Y</sub> の切断反応は、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解において相乗的な効果を持つことが指摘されている (57, 58)。

RoxA<sub>35Y</sub> と RoxB<sub>35Y</sub> のオルソログは *R. gummiphilus* NS21 株からそれぞれ RoxA<sub>NS21</sub> と RoxB<sub>NS21</sub> が単離されている (30, 59)。RoxA<sub>NS21</sub> 及び RoxB<sub>NS21</sub> のアミノ酸配列は、それぞれ RoxA<sub>35Y</sub> 及び RoxB<sub>35Y</sub> のアミノ酸配列と 65%の相同性を示した。roxA<sub>NS21</sub> と roxB<sub>NS21</sub> の遺伝子欠

損変異体は、NR 含有寒天培地上でクリアゾーンを生成する能力を著しく失った。さらに、これらの遺伝子を相補的に導入することにより、クリアゾーン形成能が回復した。このことから、これらの遺伝子は NS21 株の NR 代謝に必須であることが示唆された。また、*Myxobacteria* に属す *Haliangium ochraceum*、*Corallocooccus coralloides*、*Myxococcus fulvus*、*Chondromyces apiculatus* からも RoxA 配列が同定された (52)。しかし、ゴム分解活性は報告されていないため、今後更なる解析が必要である。

これまでに生化学的解析がなされた Lcp の系統樹を Fig. 0-4 に示した。Lcp<sub>NVL3</sub> は *N. farcinica* E1 株および *N. nova* SH22a 株の Lcp とそれぞれ 75% および 64% の同一性を持ち、最も近縁であることがわかった。さらに、*G. westfalica* Kb1 株由来の Lcp と *G. polyisoprenivorans* VH2 株由来の Lcp の間に密接な関係があることが示唆された。これらのことから、各 lcp 遺伝子はそれぞれの属で進化した可能性がある。

## 11. ポリ(cis-1,4-イソプレン)分解経路

ポリ(cis-1,4-イソプレン)の分解経路は *Streptomyces coelicolor* 1A 株 (60)、*Nocardia* sp. 835A 株 (1)、*S. cummioxidans* 35Y 株 (5) などの NR 資化性細菌による中間代謝物の同定により提唱された (61)。ポリ(cis-1,4-イソプレン)は、ポリ(cis-1,4-イソプレン)分解酵素により二重結合が切断され、アルデヒド基とケトン基を持つ低分子イソプレノイドへと変換される。この反応産物は、NR 資化性細菌の ATP 依存的、Mce タンパク質駆動的な機構により、細胞内に輸送されると推察

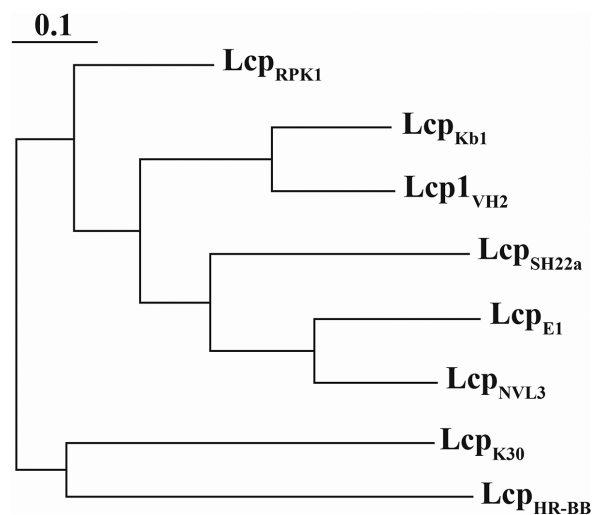


Fig. 0-4 Lcp の系統樹解析結果。Lcp<sub>K30</sub>; *Streptomyces* sp. strain K30 (AAR25849), Lcp<sub>1VH2</sub>; *G. polyisoprenivorans* VH2 (ABV68923), Lcp<sub>Kb1</sub>; *G. westfalica* Kb1 (ABV68924), Lcp<sub>SH22a</sub>; *N. nova* SH22a (WP025350295), Lcp<sub>RPK1</sub>; *R. rhodochrous* RPK1 (AMY60409), Lcp<sub>NVL3</sub>; *Nocardia* sp. strain NVL3 (API85527), Lcp<sub>E1</sub>; *N. farcinica* E1 (ABC59140), Lcp<sub>HR-BB</sub>; *Solimonas fluminis* HR-BB (WP104231946)。

されている (31, 61, 62)。アルデヒド基を含むオリゴイソプレノイドは、アルデヒドデヒドロゲナーゼにより脂肪酸へと変換され、菌体内に取り込まれた後に  $\beta$  酸化によって代謝されると考えられている (Fig. 0-5) (30)。 *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 株においては、全ゲノム配列の解読によってポリ(*cis*-1,4-イソプレン)代謝に関わる酵素遺伝子が推定されている (31)。

NR ラテックス寒天培地上のクリアゾーン形成は、グラム陽性細菌でもグラム陰性細菌でも観

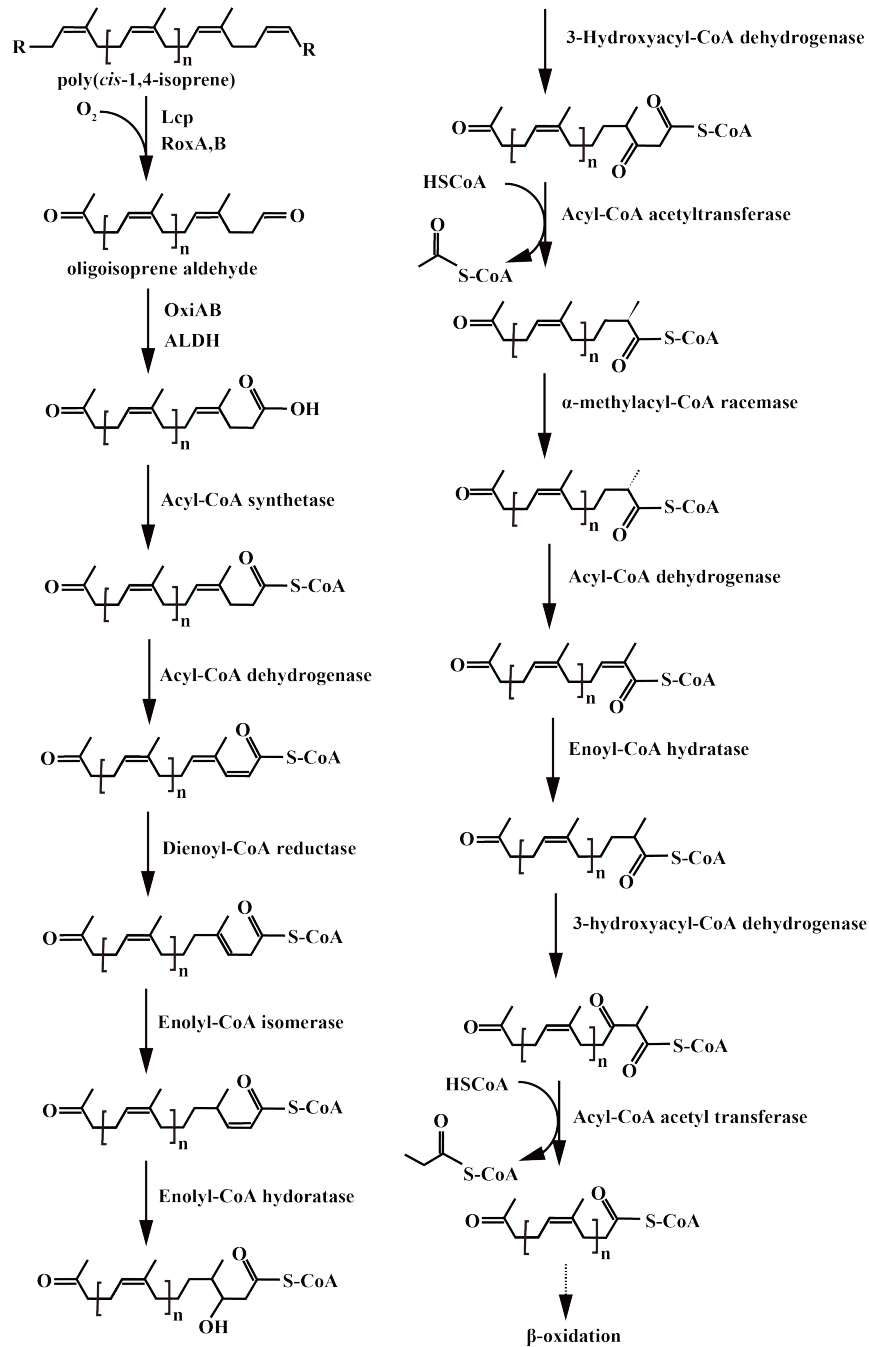


Fig. 0-5 ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解推定経路

察される。これまでの研究により、*lcp*<sub>K30</sub> 遺伝子欠損変異体はクリアゾーンが形成できなくなること (42)、*roxA*<sub>NS21</sub> と *roxB*<sub>NS21</sub> の遺伝子欠損変異体は、NR 含有寒天培地上でクリアゾーンを生成する能力を失い、これらの遺伝子を相補的に導入することにより、クリアゾーン形成能が回復することが明らかになっている (59)。このことから、グラム陽性細菌の Lcp とグラム陰性細菌の RoxA/RoxB がクリアゾーン形成に必須な酵素であることが示唆された。

## 12. ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素の転写制御機構

これまでに *Streptomyces* sp. K30 株において *lcp* の転写がポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の存在下で促進されていることが示されたことから、*lcp* の転写調節因子の存在が示唆されていた。最近の研究で *Streptomyces coelicolor* A3(2)株と *G. polyisoprenivorans* VH2 株で *lcp* の転写制御因子が見出された (40, 47)。*S. coelicolor* A3(2)株では *lcp* の下流に TetR 型転写制御因子をコードする遺伝子 (*lcpRB*)が同定されている。LcpRB<sub>A3(2)</sub>は 44 kDa のタンパク質であり、天然状態では単量体を形成している。A3(2)株の *lcp* と *lcpRB* はポリ(*cis*-1,4-イソプレン)存在下で転写が促進されたため、*lcp* が転写制御因子によって転写調節を受けていることが示唆された。LcpRB は、*lcp* の上流-117 から-87 に存在する (5'-TATGTTAAT-N2-AAATCACA-3')に結合することが示され、LcpRB<sub>A3(2)</sub>が *lcp* の転写調節に関与すると考えられた。しかし、LcpRB<sub>A3(2)</sub>による転写調節機構は明らかにはされていない (40)。

同様に *G. polyisoprenivorans* VH2 株内で *lcp1* の上流遺伝子に存在し、TetR 型転写制御因子をコードする遺伝子 (*lcpR*)が同定されている (63)。LcpR<sub>VH2</sub> は 24.1 kDa のタンパク質であり、天然状態では二量体を形成している。また、LcpR<sub>VH2</sub> の N 末端には DNA 結合性の helix-turn-helix (HTH)ドメインが存在することが確認されている。LcpR<sub>VH2</sub> は、*lcp1* の上流-72 から-29 領域に結合すること、*lcp1* のホモログである *lcp2* の転写にも関与することが示唆された (63)。さらに、VH2 株のグローバルレギュレーターである cAMP 受容タンパク (CRP<sub>VH2</sub>)が *lcp* の転写制御に間接的に関与していることが報告された (64)。CRP<sub>VH2</sub> は *lcpR* と *lcp1* の遺伝子間に結合し、*lcpR* の転写を抑制することが明らかとなっている。この上流領域には回文配列 (5'-GATGTTACAACG-N7-CGTTGTTACATC-3')が含まれている。この相同配列 (5'-GATACAGAGAAGCA-N5-TGTA ACTCGTTTC-3')は *lcp2*<sub>VH2</sub> の上流領域にも見出されており、LcpR<sub>VH2</sub> の結合に関与すると考えられている (63)。しかし、LcpR<sub>VH2</sub> と LcpRB<sub>A3(2)</sub>の結合配列には類似性は見られず (Fig. 0-6)、これらの制御因子は異なる結合コンセンサス配列を持っていることが示唆された (40)。

一方でグラム陰性 NR 資化性細菌の *R. gummiphilus* NS21 株では、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)培養時における *roxB* の転写誘導性が確認されている。NS21 株の *roxB* の上流には推定の LysR 型転写制御因子をコードする遺伝子の存在が確認されたが、*roxB* 転写における制御への関与は明らかとされていない (59)。

### 13. TetR 型転写制御因子

TetR 型転写制御因子は、N 末端の DNA 結合 Helix-Turn-Helix (HTH)ドメインと、より大きな C 末端の Tetracyclin repressor-like ドメインから構成されている。このタンパク質はほとんど  $\alpha$ -Helix であり、主に二量体として機能することが知られている。TetR 型転写制御因子の多くは転写抑制を行うことが知られているが、例外も存在する。ゲノムサイズが大きな細菌ほどより多くの TetR 型転写制御因子を保持する傾向が知られており、環境変動が大きい土壌細菌で特に多い傾向にある (65)。多くの TetR 型制御因子の結合部位には回文配列が存在することが報告されているが、回文配列のコンセンサス配列は存在しない。TetR 型転写制御因子は遺伝子の向きや距離から 3 つのタイプに分類される (66)。Type I は隣接する遺伝子と逆向きに位置し、この遺伝子間領域が 200 bp 以内の場合において TetR 型制御因子と隣接する遺伝子は制御関係にあることが濃厚で

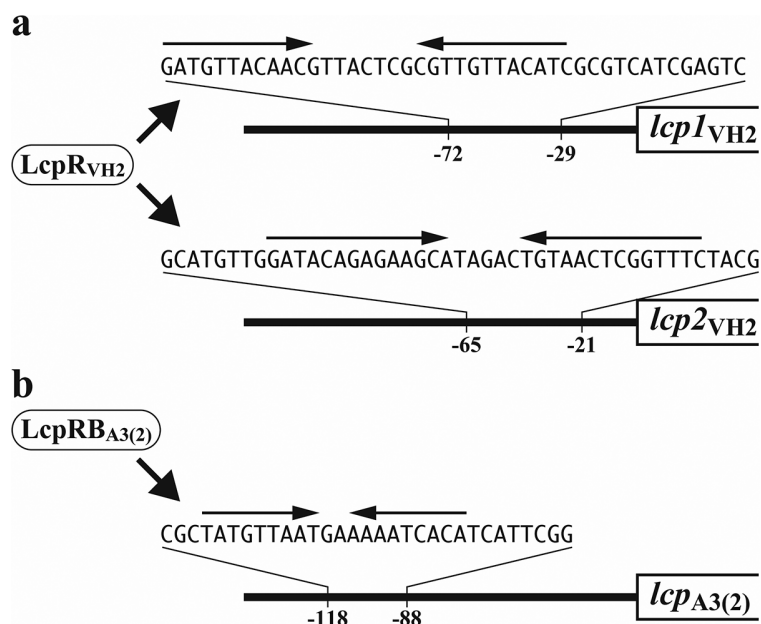


Fig 0-6 *lcp1<sub>vH2</sub>*, *lcp2<sub>vH2</sub>* と *lcp<sub>A3(2)</sub>* のプロモーター領域に存在する繰り返し配列。黒棒の上に記したヌクレオチドは、各 TetR 型転写制御因子の結合配列を示した。矢印は逆方向の繰り返し配列を示し、数字は各翻訳開始点からの距離 (bp) を示した。



ある。ほとんどの TetR 型転写制御因子はこの Type I であることが知られている。Type II は、遺伝子の向きが同じでその遺伝子間領域が 35 bp の場合、共転写されていると推察されるグループである。Type III は、隣接する遺伝子の向きに関わらず 200 bp 以上の遺伝子間領域が存在する場合である。Type III に属する TetR 型転写制御因子の場合、その制御は予測できないとされている。

#### 14. オリゴイソプレナルデヒドの代謝

NR 資化性細菌のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解過程では、RoxA/B や Lcp によるイソプレン鎖の切断後、末端にアルデヒド基とケト基を持つオリゴイソプレナルデヒドが形成される。このオリゴイソプレナルデヒドは細胞または細胞内で末端のアルデヒドをカルボン酸に酸化後、脂肪酸代謝と同様に  $\beta$ -酸化経路で代謝されると推定されている。オリゴイソプレナルデヒドに対して酸化触媒能を持つ酵素は、*Streptomyces* sp. K30 株が持つ Oxidoreductase (OxiAB)が報告されている (41)。OxiAB は molybdopterin cytosine dinucleotide cofactor の大サブユニット (OxiB)と、電子伝達体として鉄硫黄クラスターを有する小サブユニット (OxiA)で構成されている。また、OxiB は N 末端にシグナルペプチドを保有していることから、OxiAB は細胞外酵素として機能し、細胞外でオリゴイソプレナルデヒドを酸化することが推定されている。oxiAB は lcp の下流に存在しており、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)培養時では lcp の転写誘導と共に、oxiAB の転写誘導性が確認できたことから、lcp と oxiAB はオペロンを形成していることが示唆されている (45)。K30 株では OxiAB がオリゴイソプレナルデヒドの酸化を担っていると推定されているが、実際に OxiAB がオリゴイソプレナルデヒドに対して酸化活性を持っている事が示されている実験報告はなされていない。

オリゴイソプレナルデヒドの酸化活性が確認された酵素として、*G. polyisoprenivorans* VH2 株の 2 個の Aldehyde dehydrogenase (ALDH)が唯一報告されている (67)。VH2 株の lcp1 及び lcp2 の隣接には oxiAB が存在せず、VH2 株のゲノム中にも oxiAB は存在しない。VH2 株由来 Lcp とポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の反応によって生じるオリゴイソプレナルデヒドは C<sub>20</sub> 以上の炭素鎖を持っているため、長鎖アルデヒドに対して酸化活性を持つ ALDH が VH2 株のオリゴイソプレナルデヒドの酸化を担っている事が推定された。VH2 株のゲノム解析から推定 ALDH をコードする遺伝子が複数見つかり、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)培養時における転写誘導性や系統樹解析から限定していき、最終的に 2 個の ALDH (GPOL\_c02580, GPOL\_c37100)がオリゴイソプレナルデヒドに対して酸化活性を有していることが示された (67)。この 2 個の ALDH はシグナルペプチ

ドを有していないことから、VH2 株では Lcp とポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の反応産物であるオリゴイソプレンアルデヒドを細胞内に取り込んだ後、ALDH によってオリゴイソプレンアルデヒドが酸化されていることが推定された。また、2 個の ALDH 遺伝子欠損株のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)含有液体培地上での生育評価では、完全に生育能が失われなかったことから、他のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解に関与する ALDH 遺伝子の存在が示唆された (67)。Gordonia 属や Nocardia 属の NR 分解細菌では K30 株の様な *oxiAB* ホモログが見出されていないことから、Gordonia 属や Nocardia 属では ALDH 遺伝子がオリゴイソプレンアルデヒドの酸化に関与していると考えられている (62)。

グラム陰性 NR 資化性細菌の *S. cummioxidans* 35Y 株や *R. gummiphilus* NS21 株では、ゲノム解析からオリゴイソプレンアルデヒドを脂肪酸に変換する酸化還元酵素が推定されているが、実際にオリゴイソプレンアルデヒドに対して酸化活性を持っているかは不明である (58, 68)。



## 15. ポリ(*cis*-1,4-インプレン)分解酵素の分布

InterPro のタンパク質データベースには、Lcp が「Rubber Oxygenase Lcp like」として登録されており、2022年4月現在、DUF2236ドメインを含む6,066のタンパク質が登録されている (Fig. 0-7)。そのうち、1,138配列の真核生物 (主に菌類)と4,928配列の真正細菌で構成されている。真正細菌のうち、半数以上の2,900配列がアクチノバクテリア門に属し、1,242配列のプロテアバクテリア門、488配列のバクテロイデス門に分類される。アクチノバクテリア門は、601: *Streptomyces* 属、282: *Gordonia* 属、242: *Mycobacterium* 属、220: *Nocardia* 属、175: *Mycobacteroides* 属、161: *Rhodococcus* 属、157: *Mycolicibacterium* 属、141: *Amycolatopsis* 属から主に構成されている。プロテアバクテリア門に属する25%が *Acinetobacter* 属からなり (310配列)、バクテロイデス門に属する30%が *Chryseobacterium* 属から構成されている (154配列)。このことから、Lcpを有するメイ

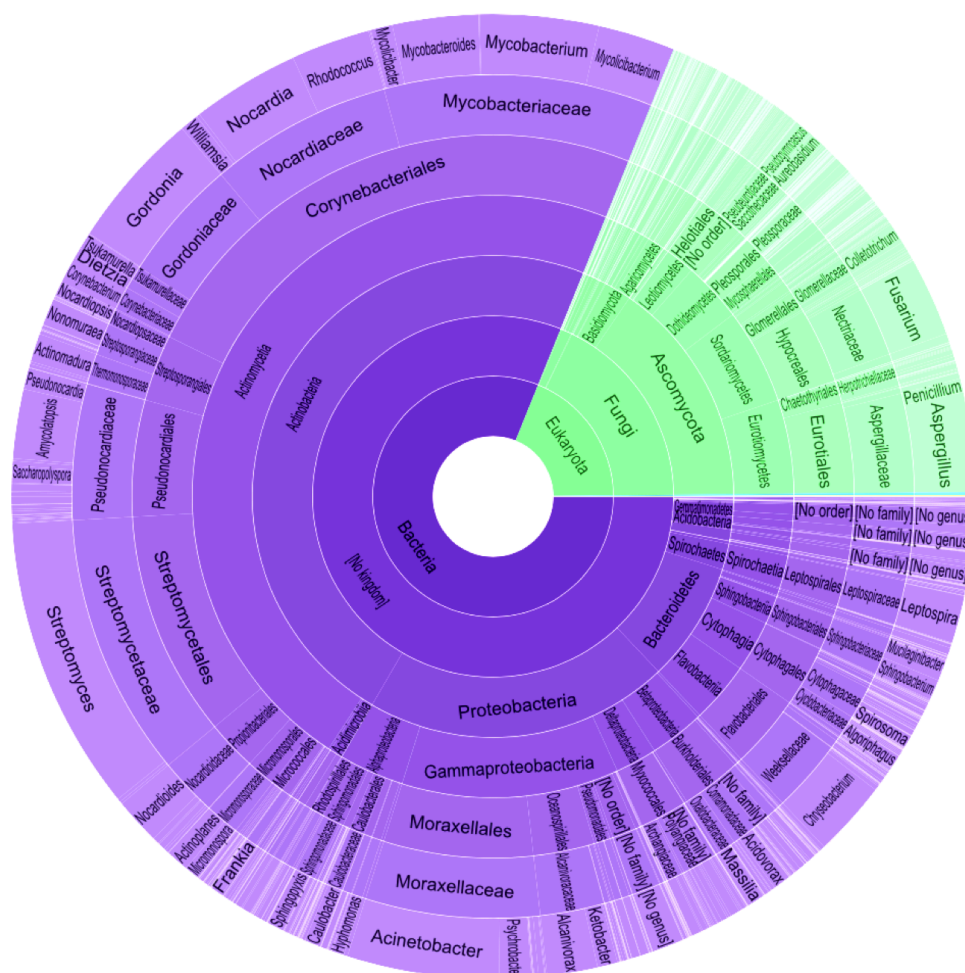


Fig.0-7 DUF2236ドメインを有するLcpを有する細菌の分類。この図は、Inter Pro から引用した。

ンの細菌はアクチノバクテリア門に属することが示唆された。現在までにポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解菌として単離されている菌を Table 0-1 に示した。ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解菌として報告された中で、アクチノバクテリア門に属していないのは、プロテオバクテリア門に分類される *R. gummiphilus* NS21 株と *S. cummioxidans* sp. 35Y 株の 2 例のみである。アクチノバクテリア門は、土壌、炭水、海水、空気中など、様々な場所に存在する菌である。アクチノバクテリア門に属する多くの菌が菌糸を形成し、二次代謝産物生産菌、芳香族化合物など難分解性化合物分解菌が多く知られている (69)。また、イソプレノイドを生合成する菌の多くはアクチノバクテリア門に属し、*Nocardia* 属や *Rhodococcus* 属でも生合成の報告がなされている (69, 70)。ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の分解を担う Lcp の多くがアクチノバクテリア門で発見されていることと、アクチノバクテリア門にイソプレノイド生合成経路を有する細菌が多いことは関連しているようでとても興味深い。

## 16. NR 資化性細菌の NR 分解能

これまでに知られている NR 資化性細菌のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解能は、最少栄養培地に NR 材料 (0.5~0.6% w/v)を加え、30°Cで 6~12 週間培養することにより評価されている (Table 0-3)。分解能の評価は、培養後のゴム材料の大きさ、最終的な質量、形態を調べることで評価された。*Nocardia* sp. 835A 株は 8 週間でラテックスグローブ重量を 90%減少させることができ、*S. cummioxidans* 35Y 株は 1 週間でラテックスグローブ重量を 60%減少させた。また、放線菌は硫黄架橋した SBR を分解する能力を有していることも明らかにされている (71)。*Streptomyces coelicolor* 1A 株は、IR (Mw: 80 万)を 6 週間で分子量 1 万未満に低分子化することが示された (60)。*Gordonia amicalisa* は加硫 IR と加硫 SBR の架橋密度をそれぞれ 13.7%と 22.1%減少させることが明らかとなった (72)。*Amycolaptopsis sulphurea* DSMZ 46092 株、*Gordonia* sp. DSMZ 44215 株、及び *Gordonia* sp. DSMZ 44369 株は、4 週間の培養でそれぞれ 20.90%、18.64%、及び 17.52%の硫黄が減少することが示されている (73)。これらの知見から、環境負荷の低い NR 廃棄物処理技術の一つとして、放線菌の利用が有用であることが示されている。

## 17. 本研究の目的

分解酵素や代謝経路について明らかにし理解を深めることは、NR の再資源化や有価物生産へ応用するために必須であると考えられる。また、転写制御機構について明らかにすることは、酵素の誘導性や発現をコントロールするために重要であり、環境中での効率的な NR 分解や分解速度

の向上へ応用できる。これらの知見を深めることは分解効率を高めることに繋がり、酵素利用の実現化に大きく貢献すると考える。これまでに 100 株以上の NR 資化性細菌が単離されているが、分解酵素が特定されているのはそのうち 10%である。さらに、転写制御因子の解析がなされているのは既知 NR 資化性菌の 2%であり、転写制御因子の同定は行われているが、どのような転写制御機構であるのかは明らかにされていない。そこで本研究では、Lcp を有するメイングループである放線菌に属する新規 NR 資化性放線菌 *Actinoplanes* sp. OR16 株と *Rhodococcus* sp. RDE2 株の全ゲノム配列を解読し、NR 代謝に関与する遺伝子を特定し、それらの転写制御機構を明らかにすることを目的とした。

Table 0-3 NR 資化性細菌のポリ(*cis*-1,4-イソブレン)分解能

Strains	Duration (Weeks)	Weight Loss (%)	Material	Pre-Treatment	Reference
<i>Nocardia</i> sp.835A	8	100	NR	–	(1)
		90	Latex glove	Acetone & CHCl <sub>3</sub>	
<i>S. cummioxidans</i> 35Y	1	60	NR	NS	(5)
<i>Amycolatopsis</i> S1A	6	11	Rubber coated slides (absence of organic nutrients)	Soxhlet purification	(7)
<i>Amycolatopsis</i> S1D		12			
<i>Nocardia</i> sp. S3F		13			
<i>Streptomyces</i> S1G		44			
<i>Streptomyces</i> S3D		21			
<i>Streptomyces</i> S4C		26			
<i>Streptomyces</i> S4D		43			
<i>Streptomyces</i> S4E		37			
<i>Streptomyces</i> S4F		43			
<i>Streptomyces</i> S4G		38			
<i>S. sp.</i> strain LA7	8.6	80	Emulgated latex	Dialysed latex	(8)
	3.3	60			
	10	29.4			
	10	31.3			
<i>S. coelicolor</i> CH13	6	14	Latex glove	–	(9)
		92	Latex glove + starch (65%)	NS	
<i>R. pyridinivorans</i> F5	2	9.36	Latex glove	NS	(10)

## 第一章 *Actinoplanes* sp. OR16 株の NR 代謝に関連する遺伝子の同定と機能解析

### 緒言

NR 資化性放線菌は、NR の主成分であるポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を唯一の炭素源として生育する。NR 資化性放線菌の一つとして単離された *Actinoplanes* sp. OR16 株は、NR 寒天培地上で NR を分解することでクリアゾーンを形成することが明らかとなっている。しかし、これまでに *Actinoplanes* 属細菌の NR 分解機構の解明や分解酵素の特定は行われていない。また、NR 寒天培地上でのクリアゾーン形成能を持たない *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 株では TetR 型転写制御因子による Lcp の転写制御機構が知られているが、クリアゾーン形成能を持つ NR 資化性放線菌におけるポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素系の転写制御機構は明らかにされていない。そこで本章では、*Actinoplanes* sp. OR16 株における NR 代謝系の全容を明らかにすることを目的として、OR16 株の全ゲノム解析を行うとともにポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素の機能解析と転写制御因子を明らかにした。

## 材料と方法

### 供試菌、プラスミド、及び培養条件

本研究で用いた菌株及びプラスミドを Table 1-1 に示した。また使用したプライマーは Table 1-2 に示した。OR16 株の培養には無機塩培地として W 培地 (74)、栄養培地として PYM 培地 (0.5% bacto tryptone、0.3% yeast extract 及び 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; pH7.0)あるいは Lysogeny broth (LB)培地 (1% tryptone、0.5% yeast extract 及び 0.5% NaCl)を用いた。また寒天培地に加える寒天濃度は 1.5% (w/v)とした。W 液体培地には 10 mM コハク酸、0.4%合成ポリイソプレン (IR)を加えて炭素源とし、W 寒天培地には 0.4%除タンパク質 NR ラテックス (DPNR)を炭素源として添加した。培養温度は 30°C とした。*E. coli* の培養には LB 培地を用い、30°C または 37°C で培養した。必要に応じて選択培地に加える抗生物質濃度は、アンピシリン (以下 Ap)で 100 mg/l、カナマイシン (以下 Km)で 50 mg/l、クロラムフェニコール (以下 Cm)で 30 mg/l、テトラサイクリン (以下 Tc)で 10 mg/l とした。

Table 1-1 使用した菌株及びプラスミド

Strain or Plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or origin
<b>Strains</b>		
<i>Rhodococcus</i> sp.		
RDE2	Wild type	This study
DT86	RDE2 derivative; $\Delta lcpR$ (RDE2_08760)	This study
DT87	RDE2 derivative; $\Delta lcpR$ (RDE2_08770)	This study
<i>E. coli</i>		
Mach1 T1	F <sup>-</sup> $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR(\tau_K^-, m_K^+) \Delta recA1398 endA1 tonA$	Invitrogen
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> $dcm ompT hsdS(\tau_B^-, m_B^-) gal \lambda$ (DE3)	(2)
NEB Turbo	F <sup>+</sup> $glnV44 thi-1 \Delta(lac-proAB) galE15 galK16 R(zgb-210::Tn10)Tet^S$	New England
Rosetta-gami(DE3)pLysS	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ (DE3) F <sup>+</sup> [ $lac^+ lacI^q pro$ ] gor522::Tn10 <i>trxB</i> pLysSRARE (CamR, StrR, TetR)	NOVAGEN
<b>Plasmids</b>		
pET23b	Expression vector, T7 promoter Ap <sup>r</sup>	NOVAGEN
pET23b+lcp1	pET23b with 1.2-kb NdeI fragment carrying lcp1, Ap <sup>r</sup>	This study
pET23b+lcp2	pET23b with 1.2-kb NdeI fragment carrying lcp2, Ap <sup>r</sup>	This study
pET23b+lcp3	pET23b with 1.2-kb NdeI fragment carrying lcp3, Ap <sup>r</sup>	This study
pColdI	Expression vector, <i>cspA</i> promoter Ap <sup>r</sup>	Takara
pColdI+lcpR1	pColdI with 670-bp NdeI fragment carrying lcp1, Ap <sup>r</sup>	This study
pColdI+lcpR2	pColdI with 1.2-kb NdeI fragment carrying lcp1, Ap <sup>r</sup>	This study

Table 1-2 使用したプライマー

Oligo nucleotide	Sequence (5' to 3')
lcp1_F	CATATGGAACCAATGAGCAGGCG
lcp1_R	CTCGAGGGTCGGGCGTTGGTG
lcp2_F	CATATGAAACGCAGAGTTCTGCTGTCC
lcp2_R	AAGCTTTTCGGGCCTGTTGATGG
lcp3_F	CATATGCAAAATCTCAGCAGACG
lcp3_R	GAGCGCTGACAAGCTTGGCG
lcp1_lcp2_F2	CGACATCATGGTCACCTGGCACAG
lcp1_lcp2_R2	CCCTTGGAGTAGTAGACCGACCAG
lcp2_oxiB_F2	GATCATCAGCCAGGAGGACATTCTC
lcp2_oxiB_R2	GTCGAGGTCCATCGCGAAGGTCTTG
oxiB_oxiA_F2	CAGTTCAGCCATACATCGCCGTACC
oxiB_oxiA_R2	TTGAGATGACTGGTGCACGCCC
QRTlcp1_F	GCGGACCTGGAAGAAGAAC
QRTlcp1_R	TAGAGGACGCCGAGGTAGAG
QRTlcp1_Probe	CCGTCGACTTCAACGAGAAG (FAM-TAMRA)
QRTlcp2_F	GAGGCCTGGTCGGTCTACTA
QRTlcp2_R	CCAGGTGACGAGAATGTCCT
QRTlcp2_Probe	GTGACTGCGTCGTCAACG (FAM-TAMRA)
QRTlcp3_F	CGTACGGCTACGACCTCAGT
QRTlcp3_R	GTTGCTGATCGGGATGAAGT
QRTlcp3_Probe	CGTCACCTCGAACAAGACG (FAM-TAMRA)
QRT16sOR16_F	AGCGTTGTCCGGATTTATTG
QRT16sOR16_R	CCTCCTGATATCTGCGCATT
QRT16sOR16_Probe	AGGCTAGAGTTCGGTAGGGG (FAM-TAMRA)
tetR_lcp1_F	GGCGCCGAGTGAATCCATCG
tetR_lcp1_R	CGATGTAAGGAGACCGGCAT
lcp3_UP_F	CAGCGGAGCGAGCTGCATGC
lcp3_UP_R	CATTCGTTACCTACTTACG
pColdI_ACTI_59620_F	TCGAAGGTAGGCATATGGATTCACTCGGCGCCATC
pColdI_ACTI_59620_R	GTACCGAGCTCCATATCACCCGGCGTTTACGCATGG
pColdI_ACTI_69510_F	TCGAAGGTAGGCATATGACTGACACGTATGGTCT
pColdI_ACTI_69510_R	GTACCGAGCTCCATACTAGATCGTCAGCGCTCC
pColdI_F	GTAAGGCAAGTCCCTTCAAGA
pColdI_R	CGCATTCTCATTGCACCCAA

## 酵素、試薬、基質、及び遺伝子操作

各種酵素は Takara Bio Inc. (Shiga)、Toyobo Co., Ltd. (Osaka)、New England Biolabs Inc. (USA)のものを取り扱い説明書に従って用いた。試薬及び基質には FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka)、Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)、Seikagaku Corporation (Tokyo)、Tokyo Chemical Industries Co. Ltd. (Tokyo)、Cosmo Bio Co., Ltd (Tokyo)、Nippon Genetics Co., Ltd (Tokyo)のものを用いた。基本的な遺伝子操作はバイオ実験イラストレイテッド (秀潤社)に従って行った。

## NR 資化性細菌 OR16 株のスクリーニング

日本各地から採取した土壌サンプル 1 g をサンプリングチューブにとり、5 ml の生理食塩水を加え、ボルテックスミキサーを用いてよく懸濁した。この懸濁液を 15 分間静置し、上清と沈殿に分離させた。上清 200  $\mu$ l をシクロヘキシミド含有 DPNR 寒天培地に塗布し、30°C で 3 日間培養した。シクロヘキシミドは土壌中の真菌の生育を抑えるために使用した。NR 寒天培地でクリアゾーンを形成したコロニーを新しい NR 寒天培地でさらに生育させ、同様の作業を数回繰り返すことでクリアゾーン形成の再現性を確かめた。得られた NR 分解候補株を LB 寒天培地上でシングルコロニーに分離し、純化を行った。単離した NR 分解候補株は 20%グリセロールストックを作製し、-80°C で保存した。

## OR16 株からの total DNA の抽出

LB 寒天培地で OR16 株を前培養した後、L 字管 10 ml の LB 液体培地に植菌し、200 rpm、30°C で 4 日間振とう培養した。培養した菌体を遠心分離により集菌し、3 ml の STE buffer で洗浄した後、1 ml の STE buffer で再度洗浄し、菌体を 300  $\mu$ l の STE buffer に再懸濁した。Lysozyme (10 mg/ml)を含む 100  $\mu$ l の STE buffer を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした後、サンプルに proteinase K (2 mg/ml)を含む STE buffer を 50  $\mu$ l 添加し、5 分間転倒混和し、その後 37°C で 1 時間インキュベートした。終濃度 0.5%になるよう SDS を添加し、5 分間転倒混和し、その後 65°C で 1 時間インキュベートした。フェノールクロロホルム法による除タンパクを 2 回行い、イソプロパノール沈殿により total DNA を回収した。回収した total DNA を乾燥させた後、RNase (10 mg/ml)を含む TE buffer 100  $\mu$ l に溶解した。その後、フェノールクロロホルム法により RNase を除去し、イソプロパノール沈殿により total DNA を回収した。回収した total DNA を乾燥させた後、TE buffer に溶解した。得られた total DNA の濃度と純度を A<sub>260</sub> の測定と A<sub>230</sub> との比較にて確認し、シーケンス解析のサンプルとした (34)。

## 全ゲノム配列の解読と解析

OR16 のゲノム配列は、MiSeq、PacBio RS II システム及びサンガー法による配列決定の組み合わせにより決定された。これらの配列データは、CLC genomics workbench (QIAGEN, DE)でアセンブルした。アノテーションは NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline ver.3.1 (75)を用いて行った。OR16 株及び近縁の *Actinoplanes* 属のゲノム配列は、JSpecies Web Service (76)を用いて平均塩基同一性 (ANI)値を計算することにより比較した。得られた CDS の機能分類は



eggNOG version 4.5.1 (77)、eggNOG-mapper version 1.0.3 で行った。Tat シグナル配列は、SignalP 4.0 (78)を用いて予測した。系統樹の作成には phylogeny.fr (79)を用い、Clustal W でのアライメント後、最尤法で系統樹を作成した。系統樹のブートストラップ値は 100 回の繰り返しによって算出された。

### OR16 株からの total RNA の抽出

LB 寒天培地で OR16 株を前培養した後、500 ml バッフル付き三角フラスコを用いて 100 ml LB 液体培地に植菌し、30°C、120 rpm で 5 日間振とう培養した。培養した菌体を遠心分離により集菌した。菌体を W 液体培地で洗浄した後、W 液体培地 5 ml に再懸濁した。10 mM のコハク酸を含む 20 ml W 液体培地に菌体懸濁液 1 ml を植菌し、静置培養した。誘導条件では 0.1%の DPNR を基質として予め添加した。誘導条件と非誘導条件には同じ培養液由来の菌体を用いた。菌体は 3 日間培養した後、遠心分離 (8,000 rpm、10 分)により回収した。total RNA の抽出には ISOGEN (Nippon Genetics Co., Ltd., Tokyo)と RNeasy Mini Kit (QIAGEN, DE)を用いた。菌体破砕は、ガラスビーズ (アズワン ガラスビーズ BZ-3 2.500-3.500 φmm)を 400 μg 用いて攪拌して行った。回収した total RNA に残存している DNA は、30 分間の TURBO DNA-free™ Kit による DNase 処理 (Applied Biosystems, USA)を二回繰り返すことで除去した。その後、Qubit Fluorometric (Thermo Fisher Scientific)を用いた蛍光定量法にて RNA 濃度を測定した。

### cDNA 合成

1 μg の total RNA から PrimScript II 逆転写酵素 (Takara Bio Inc., Shiga)とランダムプライマーを用いて、30 μl の反応混合液中で一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を RT-PCR 及び qRT-PCR 解析に利用した。

### RT-PCR 解析

cDNA 1 μl、dNTP mix 4 μl、5x PrimeSTAR GXL buffer 10 μl、primer 1 μl、DMSO 1.5 μl、PrimeSTAR GXL polymerase 1 μl を混合し、超純水で 50 μl にメスアップした。混合後、98°C 10 秒、60°C 15 秒、68°C 1 分で 30 サイクル反応を行い、反応液 5 μl を 0.8 %アガロースゲルで電気泳動した。



## 定量 RT-PCR 解析

qRT-PCR 反応に用いたプライマーと標識プローブを Table 1-2 に示した。qRT-PCR には ABI StepOne realtime PCR system (Applied Biosystems) を使用し、取扱説明書に従い実験を行った。cDNA 1  $\mu$ l、Taqman probe 2.5  $\mu$ l (終濃度 250nM)、primer 2.5  $\mu$ l (終濃度 250 nM)、TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5  $\mu$ l を混合した溶液を超純水で 25  $\mu$ l までメスアップした。反応液を混合後、Step1: 50°C 2 分、Step2: 95°C 10 分、Step3: 95°C 15 秒、60°C 1 分を 35 サイクルの条件で測定を行った。各 Lcp 発現用プラスミド及び OR16 株の 16S rRNA 配列を qRT-PCR の鋳型に用いて測定を行い、各 *lcp* 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子について検量線を作成した。得られた検量線を元にサンプルの転写量を算出し、これらを 16S rRNA 遺伝子の転写量で除すことで補正を行った。各サンプル間の cDNA 量を揃えるための内部標準には 16S rRNA 遺伝子の存在量を用いた。作成した検量線は *lcp1* が  $y=1E+7e^{-0.63x}$ 、*lcp2* が  $y=3E+7e^{-0.633x}$ 、*lcp3* が  $y=1E+7e^{-0.631x}$ 、16S rRNA 遺伝子が  $5E+6e^{-0.637x}$  となった。検量線の R<sup>2</sup> 値はすべてのサンプルで 0.99 以上であった。各サンプルの測定値を x に代入することで転写量を算出した。

## *lcp* 遺伝子の大腸菌での発現と Lcp の精製

*lcp1\_F* と R、*lcp2\_F* と R、*lcp3\_F* と R のプライマー対を用いて、*lcp1*、*lcp2* 及び *lcp3* の遺伝子領域を PCR により増幅した (Table 1-2)。各プライマーは、対応する標的遺伝子の開始コドンに NdeI 部位を含んでおり、増幅された断片は別々に pJET1.2 にクローニングした。各 *lcp* 遺伝子を含む NdeI 断片を、発現ベクターである pET23b に個別にクローニングした。得られたプラスミドをそれぞれ *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)pLysS に導入し、Km、Cm、Tc を含む LB 培地で 30°C にて培養した。培養液の 600 nm の吸光度 (A<sub>600</sub>) が 0.5 になったところで、1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside を加え、さらに 20°C で 16 時間培養した。得られた細胞を回収し、50 mM Tris-HCl (pH 7.4) に懸濁した後、細胞破碎によって細胞抽出液を調製した。遠心分離によって得られた上清を、バッファー A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、500 mM NaCl、100 mM imidazole) であらかじめ平衡化した Ni Sepharose 6 Fast Flow カラム (GE Healthcare, UK) にアプライした。His タグ付きタンパク質は、5 ml のバッファー B (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、500 mM NaCl、500 mM imidazole) で溶出し、その画分をプールして濃縮した。

目的タンパク質の精製を確認するために SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE には Mini-PROTIAN Tetra Cell (Bio-Rad) を使用した。細胞抽出液及び精製タンパク質に、2  $\times$  SDS-PAGE

sample buffer を加えて 5 分間 95°C でインキュベートした後、分子量マーカー (ExcelBand All Blue Regular Range Protein Marker, SMOBIO)とともに泳動した。泳動条件は分離ゲル (12%)、及び濃縮ゲル (5%)を用いて、1 枚のゲルにつき 20 mA で 50 分間泳動した。泳動後、Coomassie Brilliant Blue R250 にて染色を行い、脱色液 (50% Methanol, 5% Acetic acid)にて脱色した。

### 酵素活性測定

Lcp1、Lcp2、Lcp3 の活性は、基質依存的な酸素消費速度を測定することによって測定した。50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.2% NR 及び 25 µg 精製酵素からなる反応液を 30°C でインキュベートし、酸素電極 (Dual Digital Model 20; Rank Brothers Ltd., England)を用いて酸素消費量を測定した。酵素活性の 1U は、1 分間に 1mol の O<sub>2</sub> が消費される活性量と定義した。Lcp1、Lcp2、Lcp3 の至適 pH と至適温度は、50 mM Tris-HCl buffer を用いて、それぞれ pH 6.0 から 8.5 の範囲と温度 25 から 40°C の範囲で活性測定を行い決定した。

### *lcpR* 遺伝子の*E. coli*での発現と LcpR の精製

pColdI\_ACTI\_59620\_F と R、pColdI\_ACTI\_69510\_F と R のプライマー対を用いて、OR16 株のトータル DNA を鋳型に PCR 反応を行った。NdeI 酵素で線状化を行った pColdI と各 PCR 断片を電気泳動し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit を用いてゲル切り出し精製を行った。

ベクターとインサートの結合には NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit (Nippon Genetics Co., Ltd., Tokyo)を用いた。ベクター:インサートがモル比で 1:2 (0.03 pmol: 0.06 pmol)となるように混合し、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs Inc., USA)を添加し、最終容量 20 µl となるよう滅菌水で調製した。反応液を 50°C で 15 分間反応させた後、*E. coli*コンピテントセルに 4 µl 添加し、形質転換させた。インサートの導入を確認するために、Fastgene plasmid mini Kit (Nippon Genetics Co., Ltd., Tokyo)を用いて得られた組換え体からプラスミドを抽出し、制限酵素消化を行った。制限酵素消化によって予想通りのサイズが確認されたサンプルのシーケンス解析を pColdI\_F と pColdI\_R プライマーで行い、インサート断片にエラー挿入がないことを確認した。

N 末端にヒスチジンを付加した各 *lcpR* 配列をもつ pColdI\_ACTI\_59620 と pColdI\_ACTI\_69510 を *E. coli* BL21(DE3)株に導入し、10 ml の Ap 含有 LB 液体培地にて 37°C、200 rpm で培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 となった時点で IPTG を終濃度 1 mM となるように添加し、更に 20 時間振とう培養した。培養菌体を集菌した後、5 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)で洗浄後、5 ml

の同 Buffer に懸濁した。菌体を超音波破砕機 (UD201, トミー精工) で破砕 (Out put, 5; Duty, 50; 10 回×3) し、15,000 ×g、15 分間、4°C で遠心分離を行い、得られた上清を細胞抽出液とした。

タンパク質の精製にはクロマトグラフィーシステム (GE Helthcare, AKTA start) を使用し、カラムにはアフィニティーカラム (GE Healthcare, HisTrap TALON crude 5 ml) を用いた。カラムを binding buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4)、300 mM NaCl) で平衡化した後、LcpR1<sub>OR16</sub>-his または LcpR2<sub>OR16</sub>-his を含む細胞抽出液をアプライした。wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4)、300 mM NaCl、5 mM Imidazole) で洗浄した後、elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4)、500 mM NaCl、150 mM Imidazole) で目的タンパク質を溶出させた。

### ゲルシフト解析 (EMSA)

*lcp1* と *lcp3* の上流領域を含む DNA 断片は、それぞれ tetR\_*lcp1*\_F/R と *lcp3*\_UP\_F/R のプライマー対を用いた PCR により調製した。プローブ断片の 3' 末端は、第 2 世代 DIG ゲルシフトキット (F. Hoffmann-La Roche, Ltd., CHE) を用いて、メーカーの説明書に従って DIG-11-ddUTP で標識した。結合反応液は、10 nM DIG ラベル化プローブ、0.1 mg Poly-L-Lysine、5 mg Salmon Sperm DNA、20 mM HEPES (pH 7.5)、1 mM EDTA、10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 mM dithiothreitol、0.2% (w/v) Tween 20、30 mM KCl を混合させ 9 μl 系とした。この反応液に 50 mM Tris-HCl (pH7.5) で 50 ng、100 ng、300 ng に希釈した LcpR1<sub>OR16</sub>-his または LcpR2<sub>OR16</sub>-his を 1 μl 添加して穏やかに混和後、20°C で 20 分間インキュベートした。コールドプローブ添加の試験では、1 pmol/μl の DNA 断片を用いた。

反応後のサンプルの分離には、非変性ポリアクリルアミドゲル [1 枚:4.175 ml 滅菌水、325 μl 5× TBE buffer (445 mM Tris、445 mM Boric acid、10 mM EDTA)、1.3 ml Long Ranger 50% gel solution (Lonza, Ltd., Basel, Switzerland)、30 μl 10% ammonium peroxodisulfate、5 μl TEMED] を用いた。泳動バッファーには 0.5× TBE を用いて、4°C にて 80V 定電圧で 100 分間プレランした。電気泳動は 4°C にて 80V 定電圧で 200 分間行った。

メンブレンへの転写はエレクトロブロットティング法を用いた。Trans Blot SD Semi-Dry Transfer cell (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) の陽極側からフィルターペーパー (cat. No. 170-3958, Bio-Rad)、メンブレン (hybond N+, GE Helthcare, USA)、ゲル、フィルターペーパーの順に重ねて 15 V で 15 分間トランスファーした。この際、メンブレン及びフィルターペーパーはあらかじめ 0.5× TBE で平衡化したものを用いた。転写後のメンブレンはトランスイルミネーターにより 20 秒間 UV 照射によるクロスリンクを行った。

シグナルを検出するために、50 ml の DIG1 バッファーで 5 分間メンブレンを洗浄し、DIG1 バッファーを除去後、30 ml の DIG2 バッファーを加え 30 分間振とうさせた。30 ml の抗体入り DIG2 バッファーを加え更に 30 分間振とうさせた後、50 ml の DIG1 バッファーで 15 分間洗浄し、この操作を 2 度行った。次いで 20 ml の DIG3 バッファーを加えて 5 分間振とうさせ、メンブレンを平衡化させた。DIG3 バッファーを除去後、OHP シートにメンブレンをはさみ 200  $\mu$ l の DIG3 バッファーと 6  $\mu$ l の CSPD detection system (F. Hoffmann-La Roche, Ltd., CHE)を混合させ、37°C で 10 分間インキュベートした後、化学発光検出器 C-DiGit image analyzer (Li-Cor Biosciences, USA) に 12 分間露光させた。

## 結果

### 1. ゲノム配列の解析

NR 資化性菌として単離した OR16 株の 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、本株が *Actinoplanes* 属に分類されることが示された。OR16 株とこれまでに 16S rRNA 遺伝子が明らかにされている *A. utahensis* IFO 13244<sup>T</sup> 株 (AB037012)、*A. philippinensis* DSM 43019<sup>T</sup> 株 (X93187)、*A. teichomyceticus* DSM 43866<sup>T</sup> 株 (AJ865472)、*A. rectilineatus* IFO 13941<sup>T</sup> 株 (AB037010)、*A. liguriensis* DSM 43865<sup>T</sup> 株 (AJ865471)、*A. cyaneus* DSM 46137<sup>T</sup> 株 (X93186)、*A. italicus* JCM 3165<sup>T</sup> 株 (AB048217)、*A. palleronii* JCM 7626<sup>T</sup> 株 (AB048216)、*A. regularis* DSM 43151<sup>T</sup> 株 (X93188)、*Actinoplanes* sp. SE50/110 株 (LT827010) の 16S rRNA 遺伝子との相同性比較を行った。その結果、各株と 95.86% から 96.70% の相同性を示した (Fig. 1-1)。

OR16 株の完全ゲノム配列を解読するために、ハイスループット DNA シーケンサーである MiSeq とロングリード DNA シーケンサーである PacBio RS II システムを用いて配列データを出力した。出力したデータを Unicycler (Ver 0.4.7) によってアセンブルした結果、13 個のコンティグを得た。それぞれのコンティグの末端を PCR によって増幅した後、サンガーシーケンスによって配列を決定することで、コンティグ間のギャップを埋めた。その結果、OR16 株のゲノムは 9,293,892 bp か

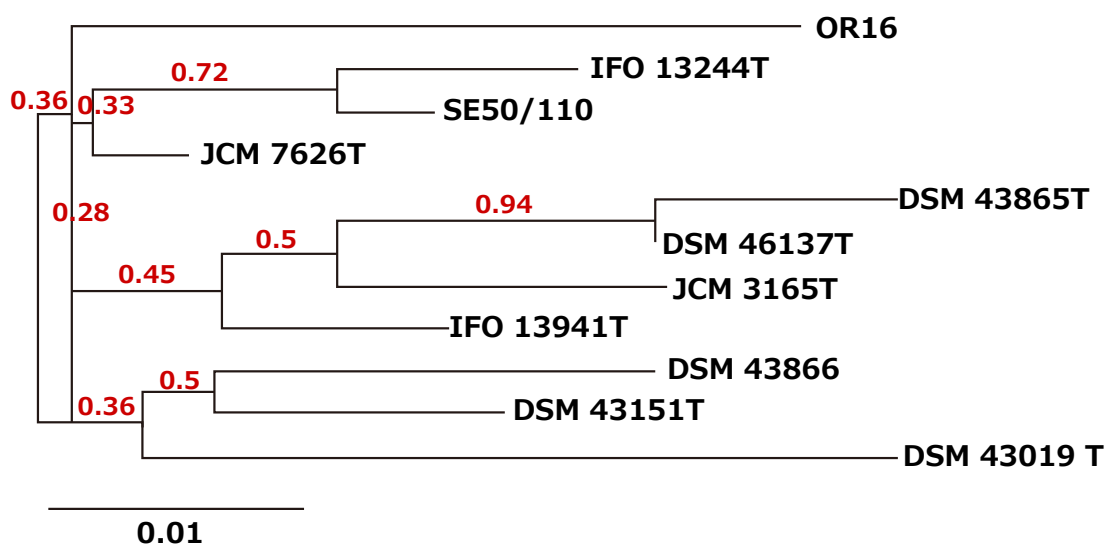


Fig. 1-1 *Actinoplanes* 属の 16S rRNA 遺伝子の系統樹。赤字はブートストラップ値を示し、解析に用いた配列は株名で表記した。それぞれの株の詳細は *A. utahensis* IFO 13244<sup>T</sup> (AB037012)、*A. philippinensis* DSM 43019<sup>T</sup> (X93187)、*A. teichomyceticus* DSM 43866<sup>T</sup> (AJ865472)、*A. rectilineatus* IFO 13941<sup>T</sup> (AB037010)、*A. liguriensis* DSM 43865<sup>T</sup> (AJ865471)、*A. cyaneus* DSM 46137<sup>T</sup> (X93186)、*A. italicus* JCM 3165<sup>T</sup> (AB048217)、*A. palleronii* JCM 7626<sup>T</sup> (AB048216)、*A. regularis* DSM 43151<sup>T</sup> (X93188)、*Actinoplanes* sp. SE50/110 (LT827010) である。

らなる1つの環状染色体からなることが明らかとなった。また、本ゲノムの平均 GC 含量は 70.34% であることが示された。DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST)によるアノテーションを行った結果、ゲノムには 8,896 のタンパク質コード配列 (CDS)と 18 コピーの rRNA 遺伝子及び 79 コピーの tRNA 遺伝子が含まれていることが示された。このゲノム配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)にアクセッション番号 AP019371 として登録した。

得られた CDS の機能分類を eggNOG version 4.5.1、eggNOG-mapper version 1.0.3 で行ったところ、8,896 の CDS のうち、7,651 の CDS が機能分類された (Table 1-3)。Table 1-3 には、OR16 株の eggNOG 分類結果に加えて、*S. coelicolor* A3(2)株と *E. coli* K-12 株の分類結果を記載した。その結果、OR16 株は代謝に関わる酵素が K-12 株に比べ多く存在することが明らかとなった。*S. coelicolor* A3(2)株は医薬品や農薬として使用されるポリケチド、イソプレニユニットが縮合することで合成されるテルペノイド (C10-C40)、カルシウム依存性抗生物質などを始めとして 32 種

Table 1-3 OR16 株の CDS 機能分類

Process	Class ID	Description	OR16	A3(2)	<i>E. coli</i> K-12
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	43	32	45
	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	272	251	307
	N	Cell motility	34	2	56
	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	185	159	165
	T	Signal transduction mechanisms	509	395	154
	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	48	43	92
	V	Defense mechanisms	124	120	55
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Z	Cytoskeleton	5	1	0
	A	RNA processing and modification	1	1	4
	B	Chromatin structure and dynamics	1	1	0
	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	188	194	180
	K	Transcription	817	786	321
METABOLISM	L	Replication, recombination and repair	219	329	279
	C	Energy production and conversion	391	378	286
	E	Amino acid transport and metabolism	441	390	341
	F	Nucleotide transport and metabolism	113	102	106
	G	Carbohydrate transport and metabolism	539	515	373
	H	Coenzyme transport and metabolism	181	169	134
	I	Lipid transport and metabolism	212	200	89
	P	Inorganic ion transport and metabolism	372	347	271
	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	159	175	62
	POORLY CHARACTERIZED	S	Function unknown	2797	2545
Total			7651	7135	4287

Table 1-4 *Actinoplanes* 属 5 株における全ゲノム平均塩基同一性 (%)

	OR16	431	SE50/110	N902-109	7358
OR16	*				
<i>A. missouriensis</i> 431	85.62	*			
<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	84.74	84.92	*		
<i>Actinoplanes</i> sp. N902-109	84.45	84.43	84.94	*	
<i>A. friuliensis</i> DSM 7358	87.35	95.58	84.77	84.36	*

類の二次代謝産物を合成することがゲノム解析により予想されている (80)。OR16 株においても A3(2)株と同等数の CDS が分類されていることから、様々な二次代謝産物合成経路を保持していると推察された。また、シグナル伝達 (T)や転写制御 (K)に関わる CDS が K-12 株に比べ多いことから、細胞外の栄養源感知とその取り込み、分解経路に関わる遺伝子の転写が高度に制御されている可能性が考えられた。

OR16 株の詳細な分類を明らかにするために、全ゲノム配列が解読されている *A. missouriensis* 431 株、*Actinoplanes* sp. SE50/110 株、*Actinoplanes* sp. N902-109 株、及び *A. friuliensis* DSM 7358 株と OR16 株のゲノム配列を比較し、全ゲノム平均塩基同一性 (ANI 値)を

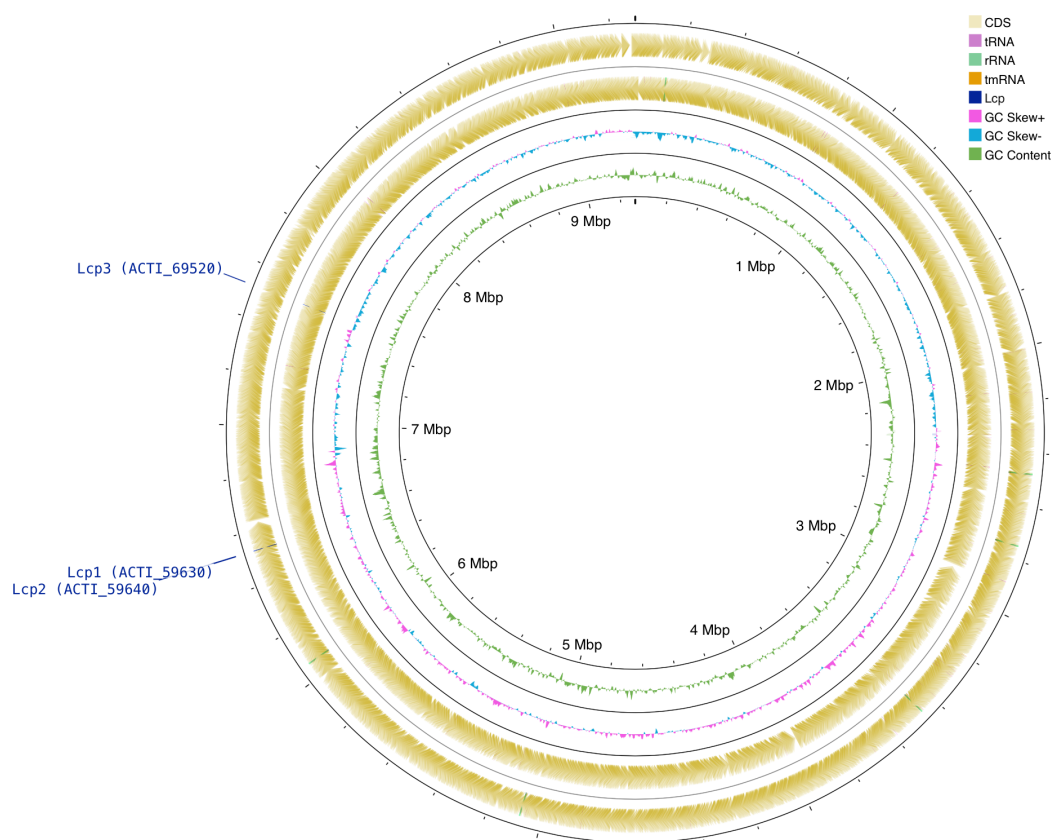


Fig. 1-2 OR16 株のゲノム全体像。CGView ソフトウェアを用いて作製した。lcp1 と lcp2 は隣接しており、lcp3 は離れた位置に存在する。

算出した。その結果、OR16 株のゲノム配列の ANI 値は、それぞれの株と 85.62%、84.74%、84.44%、及び 87.35%であることが示された (Table 1-4)。同一種であると定義されている閾値は 95%であることから (81)、OR16 株は既知の *Actinoplanes* spp.とは別種であることが示唆された。

## 2. OR16 株における *lcp* のオルソログ同定

OR16 株のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素をコードする遺伝子を同定するために、*Streptomyces* sp. K30 株の *Lcp*<sub>K30</sub> (AAR25849)の amino 酸配列を用いて OR16 株のゲノム配列に対する BLASTp 解析を行った。その結果、*Lcp*<sub>K30</sub>と 56.6%、53.9%、及び 47.6%の amino 酸配列同一性を示す ACTI\_59630、ACTI\_59640、及び ACTI\_69520 遺伝子が見出され、それぞれ *lcp1*<sub>OR16</sub>、*lcp2*<sub>OR16</sub>、及び *lcp3*<sub>OR16</sub>と命名した。Fig. 1-2 に OR16 株の染色体上に存在する *lcp1*<sub>OR16</sub>

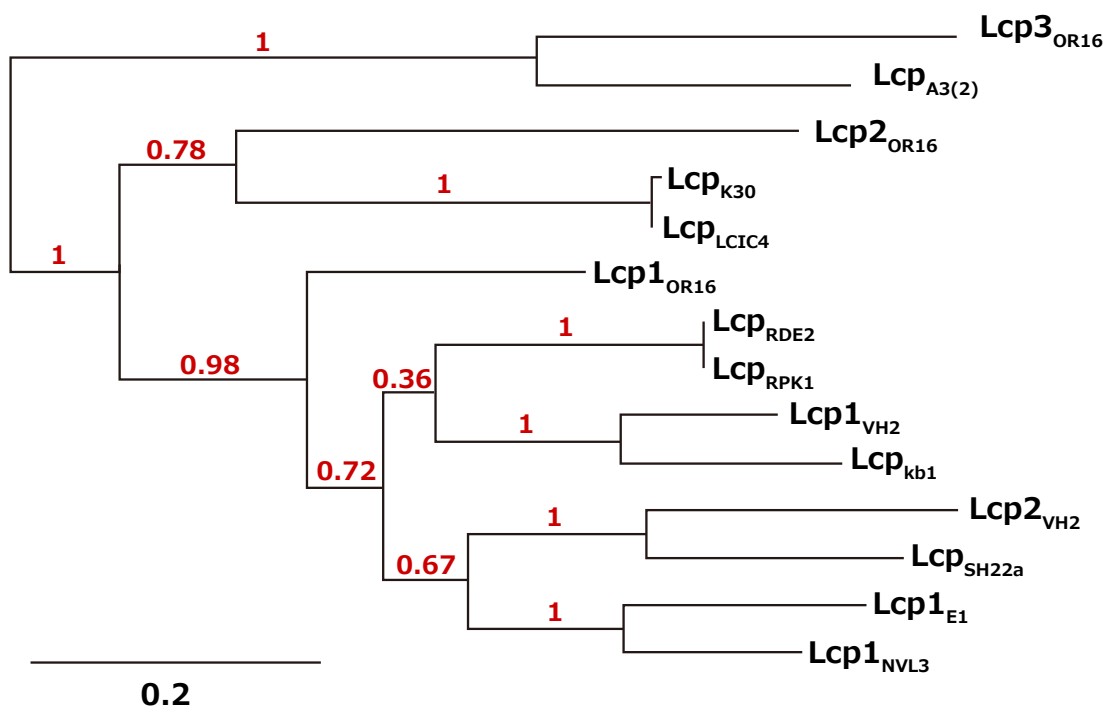


Fig. 1-3 NR 資化性放線菌の *lcp* 遺伝子の系統樹。赤字はブートストラップ値を示し、それぞれの配列の詳細は以下に示す。*Actinoplanes* sp. OR16 *Lcp1* (WP\_127551618)、*Actinoplanes* sp. OR16 *Lcp2* (WP\_127551620)、*Actinoplanes* sp. OR16 *Lcp2* (WP\_127552599)、*Actinoplanes* sp. OR16 *Lcp1* (WP\_127551618)、*S. coelicolor* A3 (2) *Lcp* (WP\_003972218)、*Streptomyces* sp. K30 *Lcp* (Q3L8N0)、*Streptomyces* sp. LCIC4 *Lcp* (BAK52801)、*Rhodococcus* sp. RDE2 *Lcp* (BDB59083)、*R. rhodochrous* PRK1 *Lcp* (AMY60409)、*G. polyisoprenivorans* VH2 *Lcp1* (AFA75827)、*G. polyisoprenivorans* VH2 *Lcp2* (AFA76036)、*G. westfalica* Kb1 *Lcp* (ABV68924)、*N. nova* SH22a *Lcp* (AHH18878)、*N. farcinica* E1 *Lcp* (ABC59140)、*N. farcinica* NVL3 *Lcp* (KX064785)。



Table 1-5 これまでに報告された Lcp のアミノ酸配列相同性

LcpRDH2	Lcp1OR16	Lcp2OR16	Lcp3OR16	LcpK30	Lcp1VH2	Lcp2VH2	LcpSH2a	LcpRRK1	LcpA(2)	LcpLGC4	LcpKb1	LcpEI	LcpNV13	
LcpNV13	66.1%	66.4%	47.4%	44.8%	54.7%	64.6%	56.1%	62.7%	66.6%	46.8%	54.7%	63.2%	75.1%	100%
LcpEI	66.6%	68.6%	49.5%	52.1%	56.8%	68.5%	57.5%	62.4%	66.6%	47.5%	56.6%	65.5%	100%	
LcpKb1	65.5%	62.7%	48.5%	42.3%	52.3%	78.1%	54.3%	60.5%	62.6%	65.5%	52.1%	100%		
LcpLGC4	56.6%	57.1%	54.1%	47.6%	99.3%	51.3%	43.4%	52.4%	56.6%	51.1%	100%			
LcpA(2)	47.5%	54.1%	47.2%	64.4%	51.1%	46.5%	39.8%	45.1%	47.5%	100%				
LcpRRK1	100.0%	72.4%	52.1%	44.6%	56.8%	68.2%	57.5%	62.4%	100%					
LcpSH2a	62.4%	59.5%	48.3%	42.1%	51.8%	62.6%	67.3%	100%						
Lcp2VH2	57.5%	57.0%	45.3%	38.3%	46.0%	60.7%	100%							
Lcp1VH2	68.5%	64.4%	49.9%	43.0%	51.6%	100%								
LcpK30	56.8%	56.6%	53.9%	47.6%	100%									
Lcp3K30	44.6%	49.4%	45.7%	100%										
Lcp2OR16	52.1%	52.1%	100%											
Lcp1OR16	72.4%	100%												
LcpRDH2	100%													

*lcp2*<sub>OR16</sub>、及び *lcp3*<sub>OR16</sub> の位置関係を示した。OR16 株の *lcp1*<sub>OR16</sub> 及び *lcp2*<sub>OR16</sub> はクラスターを形成しており、*lcp3*<sub>OR16</sub> は *lcp1*<sub>OR16</sub>-*lcp2*<sub>OR16</sub> クラスターと約 1 Mb 離れた位置に存在することが明らかとなった。各 NR 資化性放線菌の Lcp と OR16 株の系統樹を Fig. 1-3、Lcp の同一性を Table 1-5 示した。Lcp1<sub>OR16</sub> は *Rhodococcus rhodochrous* RPK1 株の Lcp と 72.4%、Lcp2<sub>OR16</sub> は *Streptomyces* sp. LCIC4 株の Lcp と 54.1%の同一性を示した。また、Lcp3<sub>OR16</sub> は *S. coelicolor* A3(2)の Lcp と 64.4%の同一性を示し、最も近縁であることが示された。

*lcp1*<sub>OR16</sub>-*lcp2*<sub>OR16</sub> クラスターの下流に存在する ACTI\_59660 及び ACTI\_59650 は、*Streptomyces* sp. K30 株の oxidoreductase の $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニット (OxiA 及び OxiB)とそれぞれ 71.6%、78.0%のアミノ酸配列同一性を示した (Fig. 1-4)。OxiA 及び OxiB は、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)代謝産物であるオリゴイソプレンアルデヒドの酸化に関与すると考えられていることから、これらの遺伝子産物も同様に OR16 株のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)代謝に関与する可能性が考えられた。

*lcp1*<sub>OR16</sub> の上流には、*lcp* の転写を負に制御することが示唆されている *G.*

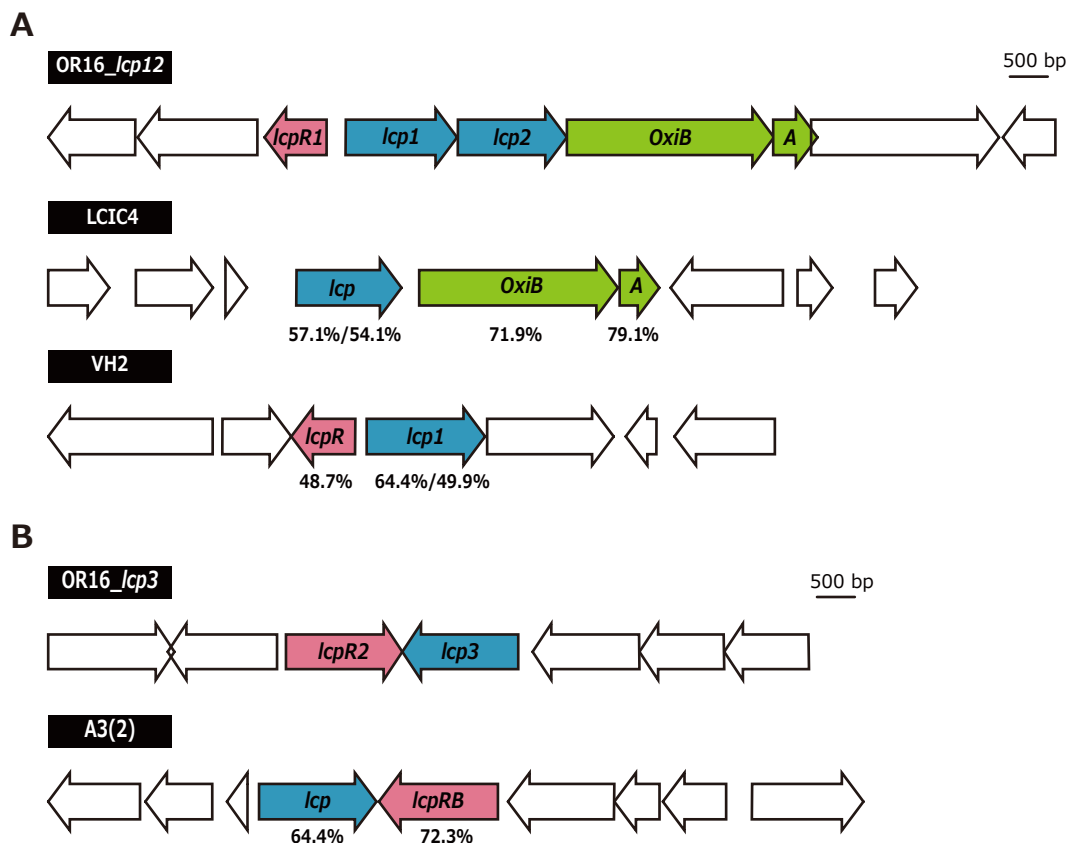


Fig. 1-4 OR16 株の *lcp* 周辺遺伝子と既知の NR 資化性放線菌の *lcp* 周辺遺伝子の比較。A: OR16 株の *lcp1*<sub>OR16</sub>、*lcp2*<sub>OR16</sub> 周辺遺伝子と *Streptomyces* sp. LCIC4 株の *lcp* 及び *G. polyisoprenivorans* VH2 株の *lcp1* 周辺遺伝子を示した。B: OR16 株の *lcp3*<sub>OR16</sub> 周辺遺伝子と *S. coelicolor* A3(2)の *lcp* 周辺遺伝子を示した。下の数字は OR16 株とのアミノ酸同一性を示した。

Table 1-6 これまでに報告された LcpR のアミノ酸配列相同性検索結果

	LcpR1 <sub>OR16</sub>	LcpR2 <sub>OR16</sub>	LcpR1 <sub>VH2</sub>	LcpRB <sub>A3(2)</sub>
LcpR1 <sub>OR16</sub>	100%	16.7% (72/432)	48.7% (109/224)	15.0% (63/420)
LcpR2 <sub>OR16</sub>		100%	13.1% (60/457)	72.3% (292/404)
LcpR1 <sub>VH2</sub>			100%	13.2% (56/425)
LcpRB <sub>A3(2)</sub>				100%

*polyisoprenivorans* VH2 株の LcpR (63)と 48.7%の同一性を有する 24 kDa の TetR 型転写制御因子をコードする遺伝子 (ACTI\_59620)が見出され (Table 1-6)、*lcpR1*<sub>OR16</sub>と名付けた (Fig. 1-4)。一方、*lcp3*<sub>OR16</sub> の周辺には、NR 分解に関連すると考えられる遺伝子は見出されなかったが、*lcp3*<sub>OR16</sub> の下流に存在する ACTI\_69510 が *S. coelicolor* A3(2)株の *lcp* の転写制御に関与すると考えられる TetR 型転写制御因子 (LcpRB)と 72.3%の同一性を示したことから (Table 1-6)、本遺伝子を *lcpR2*<sub>OR16</sub>と命名した (Fig. 1-4)。*lcp3*<sub>OR16</sub>に加えて *lcpR2*<sub>OR16</sub>も A3(2)株と相同であったことから、この遺伝子クラスター全体が A3(2)株の遺伝子クラスターと近縁であると考えられた。LcpR1<sub>OR16</sub>と LcpR2<sub>OR16</sub>はどちらも TetR 型転写制御因子と相同性を示したが、それらのアミノ酸配列は、LcpR1<sub>OR16</sub>が 222 アミノ酸であるのに対して、LcpR2<sub>OR16</sub>は 401 アミノ酸であった。LcpR2<sub>OR16</sub>の N 末端側 200 アミノ酸と C 末端側 201 アミノ酸はそれぞれ 23.8%の同一性を示した。さらに、LcpR2<sub>OR16</sub>は 35-81 アミノ酸領域と 226-268 領域に 2 つの DNA 結合ドメインを有することから、*lcpR2*<sub>OR16</sub>や A3(2)株の *lcpRB*では塩基配列の重複が生じたと考えられた。

OR16 株の *lcp* 遺伝子のオペロン構造を明らかにするために、10 mM コハク酸と 0.1% DPNR を含む無機塩培地で 3 日間培養した OR16 株から調製した total RNA を鋳型に RT-PCR 解析を行った。*lcp1-lcp2*、*lcp2-oxiB*、*oxiB-oxiA* の遺伝子間領域を増幅するプライマーセットを用いて PCR を行なった結果、予想されるサイズの増幅産物が検出された (Fig. 1-5)。このことから、*lcp1*、*lcp2*、*oxiB*、及び *oxiA* が同一の転写単位で構成されていることが示唆された。

### 3. Lcp の精製と機能解析

OR16 株の Lcp1、Lcp2、Lcp3 の酵素学的性質を明らかにするために、10×ヒスチジンタグと融合した各遺伝子を *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)pLysS 株に導入し、T7 プロモーターの制御下で発現させた。各遺伝子を発現させた *E. coli* の細胞抽出液を調製し、His タグ付きタンパク質 (Lcp1-his, Lcp2-his, Lcp3-his)をそれぞれ Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製

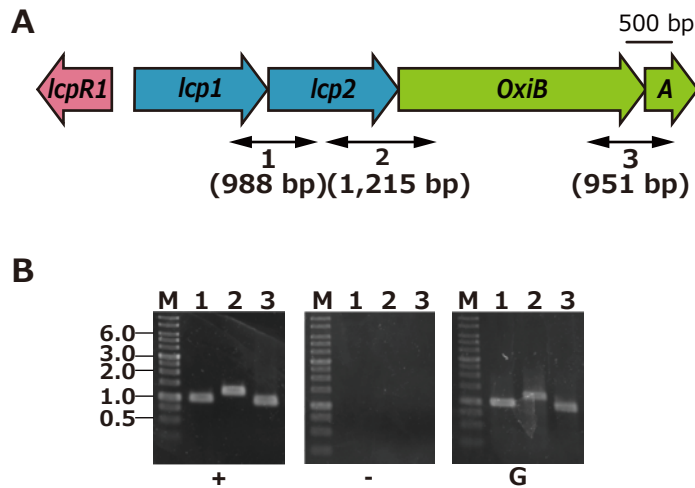


Fig. 1-5 *lcp* 遺伝子群のオペロン構造解析。A: *lcp* 遺伝子群の図の下の両端矢印は、パネル B のオペロン構造解析において使用した増幅 RT-PCR のプライマー位置を示した。B: RT-PCR 結果の電気泳動写真。M; 分子量サイズマーカー、+; 逆転写を行った RT-PCR 産物、-; 逆転写を行っていない PCR 産物、G; ゲノム DNA を用いた PCR 産物。

した。精製タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した結果、アミノ酸配列から算出した分子量 (Lcp1-his:44 kDa, Lcp2-his:43 kDa, Lcp3-his:44 kDa )と同等のサイズに単一のタンパク質のバンドが認められたことから (Fig. 1-6)、目的のタンパク質が精製されたと判断された。得られた 25  $\mu$ g 精製酵素と 0.2% DPNR を含む pH 6.0-8.5 50 mM Tris-HCl バッファーを 25°C-40°C で反応させた結果、有意な酸素消費が観察された。この結果から、本酵素がポリ(*cis*-1,4-イソプレン)に酸素を添加するオキシゲナーゼであることが強く示唆された。Lcp1-his、Lcp2-his、及び Lcp3-his の比活性を算出した結果、それぞれ  $4.02 \pm 0.65$  (30 °C, pH 7.0),  $1.17 \pm 0.07$  (35°C, pH 7.5),  $0.22 \pm 0.01$  (30°C, pH 6.5) U/mg タンパク質であることが示された。また、それ

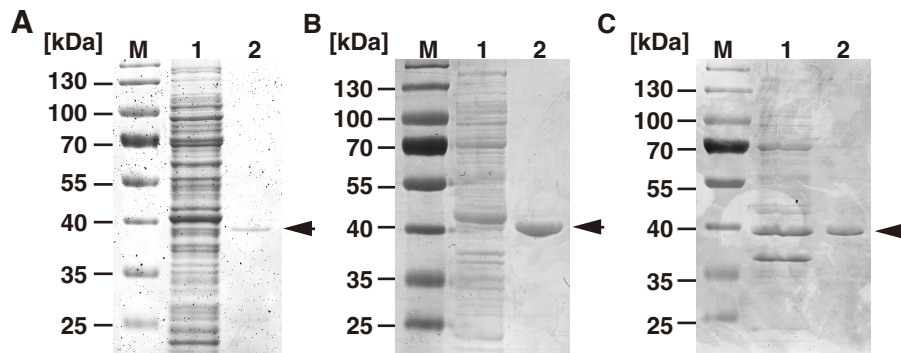


Fig. 1-6 タンパク質精製の SDS-PAGE 解析。タンパク質は 12%ポリアクリルアミドゲルで分離し、クマシーブリアントブルーで染色した。Lcp1-his、Lcp2-his、Lcp3-his はそれぞれパネル A、B、C に示した。M: 分子量マーカー、1: *lcp1*、*lcp2*、*lcp3* を含む大腸菌の細胞抽出液、2: 精製されたタンパク質。

それぞれの至適温度は 30°C、35°C、及び 30°C、至適 pH は 7.0、7.5、及び 6.5 であることが明らかとなった (Fig. 1-7)。

#### 4. 各 *lcp* 遺伝子の転写誘導性

OR16 株の *lcp* 遺伝子の転写誘導性を明らかにするために、10 mM コハク酸または 10 mM コハク酸と 0.1% IR を含む無機塩培地で培養した OR16 株から調製した total RNA を鋳型に定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 解析を行なった。その結果、IR 存在下で培養した菌体の各遺伝子の転写

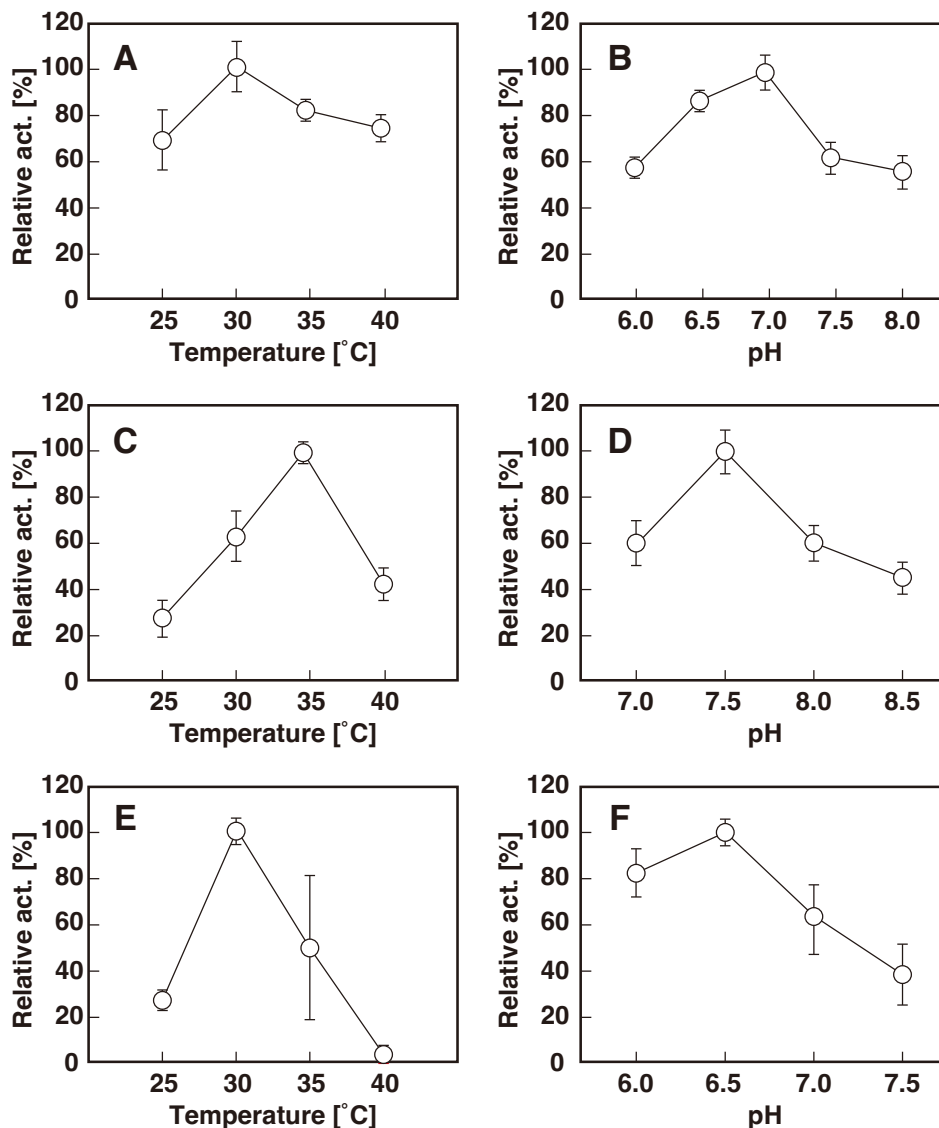


Fig. 1-7 Lcp1-his, Lcp2-his, Lcp3-his の機能解析。25  $\mu$ g 精製酵素と 0.2% DPNR を含む pH 6.0-8.5 50 mM Tris-HCl バッファーを 25°C-40°C で反応させた。Lcp1-his (A 及び B), Lcp2-his (C 及び D), Lcp3-his (E 及び F) を用い、温度変動 (A, C, E) 及び pH 変動 (B, D, F) 条件下における比活性を示した。それぞれの条件で最も高い活性値を 100% とし相対活性を求めた。

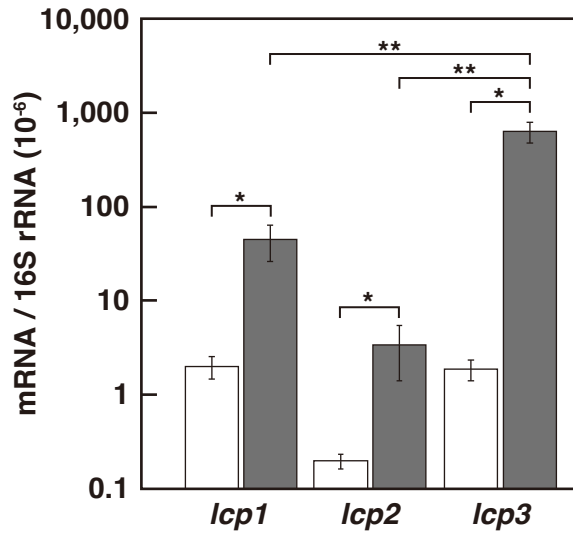


Fig. 1-8 *lcp* 遺伝子の定量的転写量解析。10 mM コハク酸を含む W 培地 (白)または 10 mM コハク酸と 0.1% IR を含む W 培地 (灰)で培養した菌体から RNA を抽出した。mRNA の転写量は、16SrRNA 遺伝子の転写量をリファレンス値として算出した。データは 4 つの独立した実験の平均値±標準偏差である。統計解析はスチューデントの t 検定を用いて行った。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$

量は、IR 非存在下の場合と比較して、それぞれ 22.2 倍、17.1 倍、335 倍に誘導されることが明らかとなった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1-8)。特に、IR 誘導時における *lcp3* の転写は、*lcp1* と *lcp2* の転写と比較して顕著に高かったことから、OR16 株のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)代謝時には Lcp3 が最も多く存在する可能性が考えられた。

## 5. LcpR1 及び LcpR2 の結合能

*lcpR1*<sub>OR16</sub> 及び *lcpR2*<sub>OR16</sub> 遺伝子産物の機能を明らかにするために、6×ヒスチジンタグと融合した各遺伝子 (*lcpR1*<sub>OR16</sub>-his 及び *lcpR2*<sub>OR16</sub>-his)を、*E. coli* BL21(DE3)株に導入し、*cspA* プロ

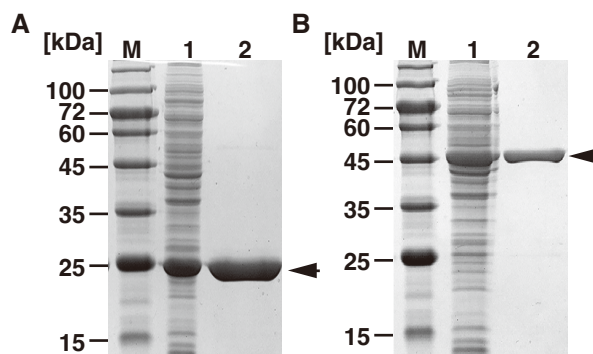


Fig. 1-9 タンパク質精製の SDS-PAGE 解析。タンパク質は 12%ポリアクリルアミドゲルで分離し、クマシーブリアントブルーで染色した。LcpR1、LcpR2 はそれぞれパネル A、B に示した。M: 分子量マーカー、1: *lcpR1*、*lcpR2* を含む大腸菌の細胞抽出液、2: 精製されたタンパク質。

モーターの制御下でタンパク質を生産させた。得られた菌体から調製した細胞抽出液から、Ni アフィニティーカラムを用いたカラムクロマトグラフィーによってそれぞれの目的タンパク質を精製した。精製タンパク質を SDS-PAGE によって分析した結果、アミノ酸配列から算出した分子量 (*lcpR*<sub>OR16</sub>-his: 24 kDa, *lcpR2*<sub>OR16</sub>-his: 43 kDa)と同等のサイズに単一のタンパク質のバンドが認められたことから (Fig. 1-9)、目的のタンパク質が精製されたと判断された。

精製した LcpR1<sub>OR16</sub>-his 及び LcpR2<sub>OR16</sub>-his の DNA 結合能を評価するために、*lcp1* と *lcp3* の上流領域それぞれ 199 bp と 203 bp (Fig. 1-10)を含む DNA プローブを用いたゲルシフト解析 (EMSA)を行なった。LcpR1<sub>OR16</sub>-his の結合能を評価した結果、10 fmol の *lcp1* 上流領域プローブに対して 100 ng の LcpR1<sub>OR16</sub>-his 存在下でシフトバンドの出現が観察された (Fig. 1-11A)。一方、*lcp3* 上流領域プローブに対する結合能は観察されなかった (Fig. 1-11B)。このことから、LcpR1<sub>OR1</sub> は、*lcp1* 上流領域に特異的に結合し、*lcp1* オペロンの転写を調節することが示唆された。

LcpR2<sub>OR16</sub>-his の結合能を調べた結果、LcpR2<sub>OR16</sub>-his は *lcp1* 及び *lcp3* 上流領域プローブ

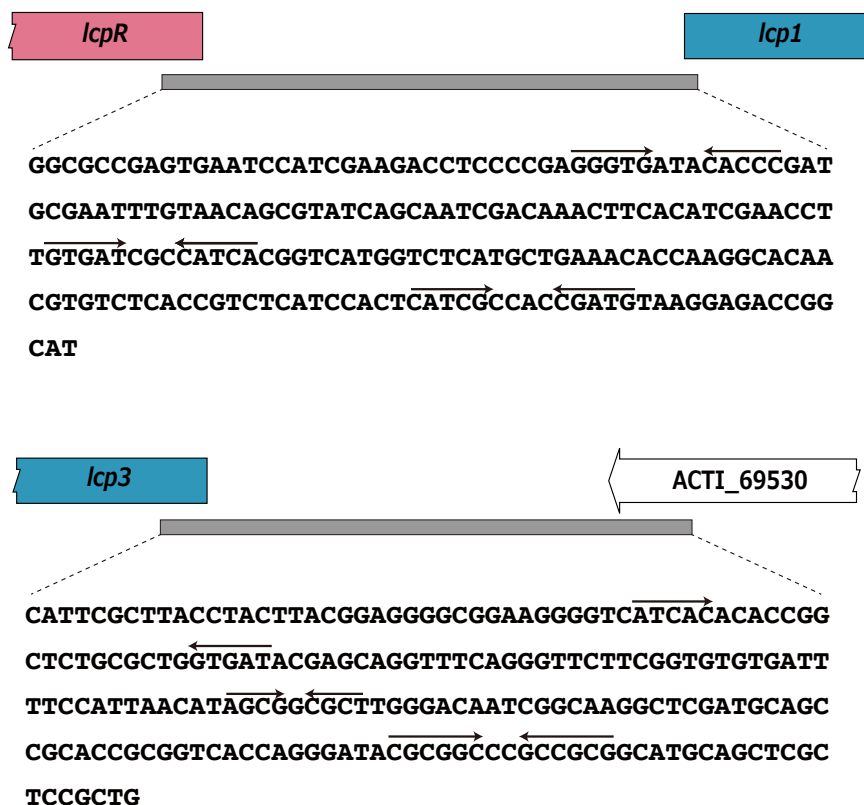


Fig. 1-10 EMSA 解析に用いたプローブ配列。塩基配列上の矢印は、プローブ配列中に観察された回文配列を示した。

の両方と複合体を形成することが明らかとなった (Fig. 1-11D 及び E)。このことから、LcpR2<sub>OR16</sub> は *lcp1* 及び *lcp3* の両方のプロモーターに作用することが示唆された。しかし、*lcp1* 上流領域への結合は、LcpR1<sub>OR16</sub>-his の 3 倍量 (300 ng)の添加を必要としたことから、細胞内では主に LcpR1<sub>OR16</sub>-

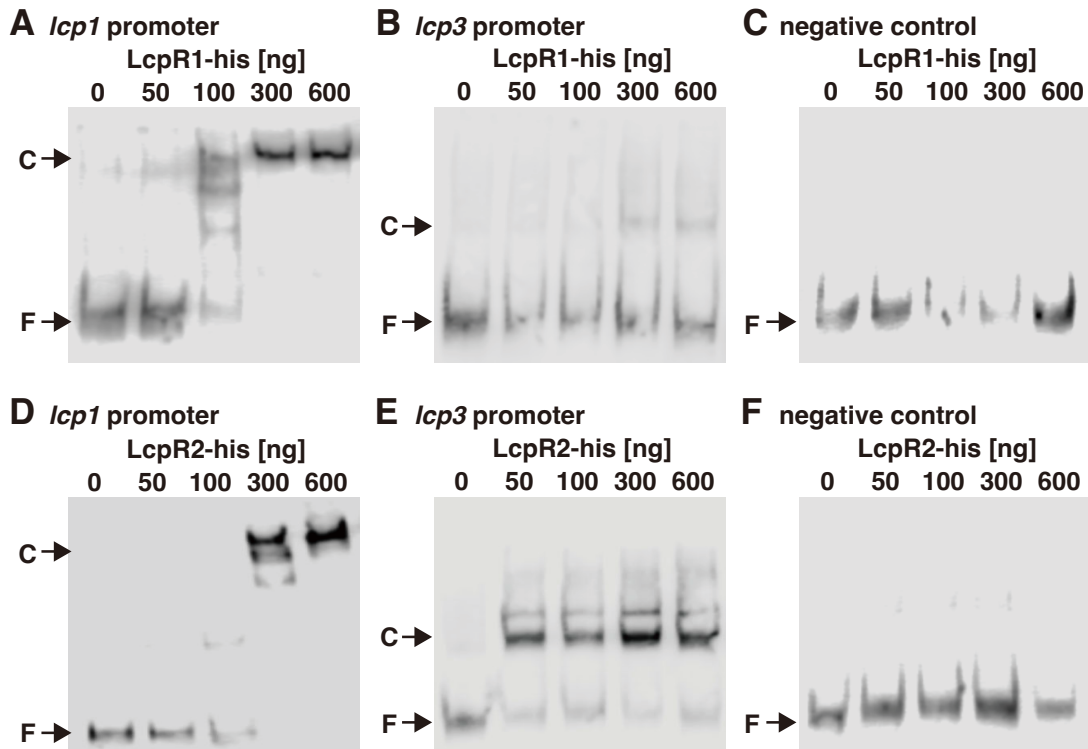


Fig. 1-11 LcpR1-his と LcpR2-his と *lcp1*, *lcp3* 上流領域との結合解析。DIG 標識 DNA プローブ (10nM)を精製 LcpR1-his (A-C)と LcpR2-his (D-F)の存在下で反応させた。EMSA のプローブとして、*lcp1* (A 及び D)、*lcp3* (B 及び E) 由来の上流領域と OR16 の 16S rRNA 遺伝子内部領域 (ネガティブコントロール; C 及び F)を含む DNA 断片を使用した。F と C の矢印は、それぞれ結合していないプローブ (F)とタンパク質-DNA 複合体 (C)の位置を示している。

his が *lcp1* オペロンの転写に関与していると考えられた。



## 考察

第一章では、OR16 株の全ゲノム解析を行うとともに、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素の機能解析と転写制御因子を明らかにした。*Actinoplanes* sp. OR16 株のゲノムは 9.2 Mb の環状染色体で構成されており、染色体上には 3 つの *lcp* ホモログが存在した (*lcp1*、*lcp2*、及び *lcp3*)。その内、*lcp1* と *lcp2* は同じ向きにタンデムに配置されていたことから、遺伝子の重複によって形成された可能性が考えられた。*Actinosynnema mirum* DSM43827 株と *Streptomyces* sp. CFMR7 株においても 3 つの *lcp* ホモログが見出されており、そのうちの 2 つがタンデムに配置されていることが示された (40, 82)。CFMR7 株の *lcp1*、*lcp2*、及び *lcp3* は、OR16 株のそれらとそれぞれ 53.3%、56.0%、及び 59.2%のアミノ酸同一性を示した (Fig. 1-12)。しかし、CFMR7 株及び DSM43827 株では、Lcp の生化学的解析はなされておらず NR 資化性の有無も明確にはされていない。生化学的解析が報告された複数の Lcp ホモログを持つ NR 資化性菌は、染色体とプラスミドにそれぞれ 1 つずつの *lcp* ホモログを有する *G. polyisoprenivorans* VH2 株のみである。VH2 株の *lcp1* 上流にはテルペノイドやカルテノイドの生合成に関わる遺伝子が存在しており、Lcp がポリ(*cis*-1,4-イソプレン)以外にもカロテノイドやイソプレノイド側鎖を持つキノンやステロイドのような細胞外テルペン含有化合物の分解にも関与している可能性があるかと推察されている (31)。OR16 株の *lcp* 周辺には、糖代謝に関わると考えられるトランスポーターやアミノトランスフェラーゼが存在しており、テルペノイドやカルテノイドの生合成遺伝子の存在は認められなかった (Fig. 1-12)。しかし、OR16 株のゲノムには 4 つのテルペン合成遺伝子群が存在していたことから、Lcp がテルペン遺伝子群の生成物分解に関与する可能性が予想された。

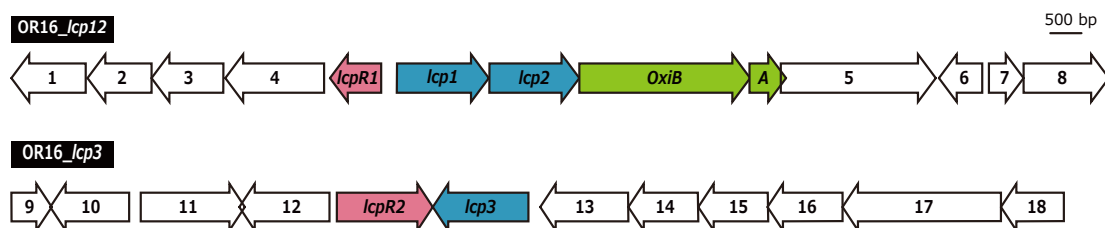


Fig.1-12. *Actinoplanes* sp. OR16 株の *lcp* 周辺遺伝子のアノテーション。1: ABC transporter ATP-binding protein, 2: carbohydrate ABC transporter permease, 3: sugar ABC transporter permease, 4: extracellular solute-binding protein, 5: PAS domain-containing sensor histidine kinase, 6: ABATE domain-containing protein, 7: DNA polymerase (DinB) family protein, 8: aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme, 9: flippase-like domain-containing protein, 10: triacylglycerol lipase, 11: hypothetical protein, 12: ATPase, 13: N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase, 14: MurR/RpiR family transcriptional regulator, 15: hypothetical protein, 16: ABC transporter ATP-binding protein, 17: ABC transporter permease, 18: ABC transporter permease

アミノ酸配列の解析から、Lcp は Twin Arginine Translocation (Tat)経路で分泌されると予測されている (31, 44)。OR16 株の Lcp では、Lcp1 で 6-10 残基、Lcp2 で 3-7 残基、Lcp3 で 6-10 残基に Tat 経路のシグナル配列である RRxxLx モチーフが見出された。また、AxA モチーフを含む Tat シグナルの推定切断部位が、Lcp1 で 30-31 残基間、Lcp2 で 26-27 残基間、Lcp3 で 33-34 残基間に見出された。従って、OR16 株における *lcp* 遺伝子産物は Tat 経路によって菌体外に分泌されることが示唆された。

RT-PCR 解析の結果から、*lcp1-lcp2* の下流に存在する ACTI\_59650 及び ACTI\_59660 が *lcp1-lcp2* とオペロンを形成していることが示されたことから (Fig. 1-5)、これらの遺伝子も OR16 株の NR 資化に関与している可能性が考えられた。ACTI\_59660 及び ACTI\_59650 は、*Streptomyces* sp. K30 株の oxidoreductase の $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニット (OxiA 及び OxiB)とそれぞれ 71.6%及び 78.0%のアミノ酸配列同一性を示した (Fig. 1-4)。OR16 株の *lcp1*、*lcp2*、*oxiB*、*oxiA* の 4 遺伝子がオペロンを形成するのと同様に、K30 株においても *lcp*、*oxiB*、*oxiA* の 3 遺伝子が同一の転写単位で構成されていることが明らかとされている (45)。Rose らは、NR 資化能を持たない *S. lividans* TK23 株に K30 株由来の *lcp*、*oxiB*、*oxiA* を発現させることで、NR 資化能と NR 寒天培地上でのクリアゾーン形成能が付与されたことを明らかにした。さらに、この組換え株を OxiAB の機能阻害をもたらすタングステン酸を加えた NR 寒天培地で培養したところ、Lcp の反応産物であるオリゴイソプレンアルデヒドは検出されたが、クリアゾーンを形成しないことが明らかとなった。このことから、OxiAB が Lcp の分解産物であるオリゴイソプレンアルデヒドを酸化すること、NR 寒天培地上でのクリアゾーン形成に関与することが示唆された (41)。OR16 株の ACTI\_59660 及び ACTI\_59650 は、OxiA 及び OxiB と高い同一性を示したことから、K30 株と同様に Lcp の分解産物であるオリゴイソプレンアルデヒドの酸化と NR 寒天培地上でのクリアゾーン形成に関与することが示唆された。OxiAB の作用によりオリゴイソプレンの末端が疎水性のアルデヒドから親水性の脂肪酸に変換されることで、オリゴイソプレンが可溶性となり培地に溶け込むことで、NR 寒天培地上でクリアゾーンが形成されると推察される。しかし、これまでに OxiAB の生化学的解析はなされておらず、オリゴイソプレンアルデヒドに対する酸化活性は明確にはされていないため、今後さらなる解析が必要である。

OR16 株の精製 Lcp の比活性は、Lcp1-his:4.02  $\pm$  0.65 U/mg (30°C、pH 7.0)、Lcp2-his:



基のミスマッチが存在する LcpR<sub>VH2</sub> 結合領域と類似の回文配列が観察されたことから (Fig. 1-13A)、本領域が LcpR1 の結合コンセンサス配列であると推察された。一方、LcpR<sub>BA3(2)</sub>が結合する lcp<sub>A3(2)</sub>の上流領域には、9 塩基中 4 塩基のミスマッチが存在する回文配列が存在する (Fig. 1-13B)。この回文配列と完全一致配列する配列が lcp<sub>3OR16</sub> 上流にも見出された。lcp<sub>A3(2)</sub>上流領域を含めた推定の lcp 上流領域のアライメントから、保存性が高い 16 塩基が明らかにされており、lcp<sub>3OR16</sub> 上流領域においても完全に保存された配列が存在した (Fig. 1-13B)。このことから、本領域に存在する配列が LcpR<sub>2OR16</sub> の結合コンセンサス配列であると考えられた。LcpR<sub>2OR16</sub> の lcp<sub>1OR16</sub> 上流領域への結合は、LcpR2 の結合特異性の低さが要因となっている可能性が考えられるが、詳細を明らかにするためには競合配列を用いた EMSA を行う必要がある。

## 第二章 *Rhodococcus* sp. RDE2 株の NR 代謝に関連する遺伝子の同定と機能解析

### 緒言

第一章では、NR 代謝時にクリアゾーンを形成する NR 資化性放線菌として *Actinoplanes* sp. OR16 株の NR 代謝に関連する *lcp* 遺伝子の構造と転写制御機構の解明を行なった。NR 資化性放線菌としては、クリアゾーン形成能を持たないタイプの放線菌も報告されており、*Gordonia* 属や *Nocardia* 属が含まれる。本研究では新たにクリアゾーン形成能を持たない NR 資化性放線菌として *Rhodococcus* sp. RDE2 株を単離した。

*Rhodococcus* 属細菌は、土壌中や海洋中など様々な環境で単離されており、難分解性化合物の分解能や有用物質の生産能を有することが知られている。NR 資化性を持つ *Rhodococcus* 属としては、*Rhodococcus rhodochrous* RPK1 株が報告されており、Lcp によってポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を分解することが示されている。しかし、Lcp をコードする遺伝子の遺伝子破壊や詳細な解析は行われていない。加えて、*lcp* の周辺領域や転写調節機構も解明されておらず、*Rhodococcus* 属における NR 資化の全容は明らかにされていない。そこで本章では、クリアゾーン形成能を持たないタイプの放線菌である *Rhodococcus* 属細菌における NR 資化能の解明を目的として、新たに単離した *Rhodococcus* sp. RDE2 株の全ゲノム配列を解読し、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解に関わる酵素と遺伝子の構造と機能、及び転写制御機構を明らかにした。

## 材料と方法

### NR 資化性細菌 RDE2 株のスクリーニング

ベトナムのタインホア省にあるゴム製造工場の排水汚泥に NR ラテックスを加えて 90 日間室温で馴養培養を行なった。その後、DPNR 寒天培地に塗布し 30°C にて培養した (68)。

### 供試菌、プラスミド、及び培養条件

本研究で用いた菌株及びプラスミドを Table 2-1 に、プライマーを Table 2-2 に示した。RDE2 株の培養には無機塩培地として W 培地 (74)、栄養培地として LB 培地 (1% tryptone、0.5% yeast extract 及び 0.5% NaCl)を用いた。また寒天培地に加える寒天濃度は 1.5% (w/v)とした。W 培地には 10 mM コハク酸、0.4% DPNR を加えて炭素源とし、30°C で培養した。*E. coli* の培養は第 1 章と同様に行なった。

### 酵素、試薬、基質、及び遺伝子操作

各種酵素は Takara Bio Inc. (Shiga)、Toyobo Co., Ltd. (Osaka)、New England Biolabs Inc.

Table 2-1 使用した菌株及びプラスミド

Strain or Plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or origin
Strains		
<i>Rhodococcus</i> sp.		
RDE2	Wild type	This study
DT86	RDE2 derivative; $\Delta lcpR$ (RDE2_08760)	This study
DT87	RDE2 derivative; $\Delta lcpR$ (RDE2_08770)	This study
<i>E. coli</i>		
Mach1 T1	F <sup>-</sup> $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR(r_K^-, m_K^+) \Delta recA1398 endA1 tonA$	Invitrogen
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> $dcm ompT hsdS(r_B^-, m_B^-) gal \lambda(DE3)$	(2)
NEB Turbo	F' $glnV44 thi-1 \Delta(lac-proAB) galE15 galK16 R(zgb-210::Tn10)Tet^S endA1 fhuA2 \Delta(mcrB-hsdSM)5(r_K^-, m_K^-) F'[traD36 proAB^+ lacI^q lacZ\Delta M15]$	New England
S17-1	F <sup>-</sup> , <i>thi, pro, hsdR</i> , [RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 (Tp Sm)]	(3, 4)
Plasmids		
pColdI	Expression vector, <i>cspA</i> promoter Ap <sup>r</sup>	Takara
pColdI+RDE08770	pColdI with 1.5-kb NdeI-XbaI fragment carrying RDE_08770, Ap <sup>r</sup>	This study
pColdI+RDE08670	pColdI with 1.5-kb NdeI-XbaI fragment carrying RDE_08760, Ap <sup>r</sup>	This study
pK18 <i>mobsacB</i>	Integrating vector, <i>oriT sacB</i> Km <sup>r</sup>	(6)
pK18 <i>mobsacB-lcp</i>	pK18 <i>mobsacB</i> with 2 kb fragment, Km <sup>r</sup>	This study
pK18 <i>mobsacB-lcpR</i>	pK18 <i>mobsacB</i> with 2 kb fragment, Km <sup>r</sup>	This study

Table 2-2 使用したプライマー

Oligo nucleotide	Sequence (5' to 3')
Construction of <i>lcp</i> expression plasmid	TCGAAGGTAGGCATATGGATAATCCGAGCAGGCGC
RDE2_08770_F	ACAATCCCAACTATCCCTGATATGGAGCTCGGTAC
RDE2_08770_R	
Construction of <i>lcpR</i> expression plasmid	TCGAAGGTAGGCATATGGGTATCGAGATCGACG
RDE2_08760_F	TACGGCTCGACGCGGTAGCTAGATAGGTAATCT
RDE2_08760_R	
DNA probe for EMSA	CATCGTGACCCGAGCCACGGTGTGGTTCATGTTACAGAG
<i>lcp90</i> _F	AAACTCCAGATGTTTCATTGCTACATCCACGAGTCGTAGG
	GGAGTGACAGT
	ACTGTCACTCCCCTACGACTCGTGGATGTAGCAATGAAAC
<i>lcp90</i> _R	ATCTGGAGTTTCTCTGTAACATGGAACACACCGTGGCTC
	GGGTCACGAT
qRT-PCR analysis	
qRT_recA_F	AGATGACCGGTGCTCTCAAC
qRT_recA_R	ACCGAGGCGTAGAACTTCAG
qRT_8770_F	TCGAAGACCGCAAATTTGGG
qRT_8770_R	ACGGACGTGACGATCATTTC
Construction of <i>lcp</i> disruption plasmid	CGGTACCCGGGGATCGATTGCCGATCAGTCTGTTC
DT87_UP_F	TTGAGCCAGTCGGCGTCGAGCAACGAGGCGACGAG
DT87_UP_R	CGCCGACTGGCTCAACATTCCACGC
DT87_DW_F	CGACTCTAGAGGATCCACCTCCCCATCCGAGAGAA
DT87_DW_R	
Construction of <i>lcpR</i> disruption plasmid	GTACAGGGTGATTTCGCGA
DT86_UP_F	CGACTCTAGAGGATCGCATTGCGAGAACCGATG
DT86_UP_R	CGGTACCCGGGGATCGGCGTACACCCTGAAGTT
DT86_DW_F	CGAATCACCTGTACGTGGTCCCTCGGATTTCGTC
DT86_DW_R	

(USA)のものを取り扱い説明書に従って用いた。試薬及び基質には FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka)、Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)、Seikagaku Corporation (Tokyo)、Tokyo Chemical Industries Co. Ltd. (Tokyo)、Cosmo Bio Co., Ltd (Tokyo)、Nippon Genetics Co., Ltd (Tokyo)のものを用いた。基本的な遺伝子操作はバイオ実験イラストレイテッド (秀潤社)に従って行った。

### 全ゲノム配列の解読と解析

RDE2 株の全ゲノム DNA は、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, DE)を用いてプロトコル通りに操作することで抽出した。RDE2 株のゲノム配列は、ハイスループット DNA シーケンサー

である DNBSEQ-400 (MGI Tech Co., Ltd., China)ロングリードシーケンサーである GridION (Oxford Nanopore Technologies Ltd., UK)を使用して行なった。ゲノムデータを Unicycler (Ver 0.4.7)でアセンブルし、DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST)を用いてアノテーションした。RDE2 株及び近縁の *Rhodococcus* 属のゲノム配列は、JSpecies Web Service (76)を用いて平均塩基同一性 (ANI)値を計算することにより比較した。得られた CDS の機能分類は eggNOG version 4.5.1 (77)、eggNOG-mapper version 1.0.3 で行った。Tat シグナル配列は、SignalP 4.0 (78)を用いて予測した。系統樹の作成には phylogeny.fr (79)を用い、Clustal W でのアライメント後、最尤法によって作成した。系統樹のブートストラップ値は 100 回の繰り返しによって算出された。

### ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解能の評価

ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解能力の分子量測定には Gel permeation chromatography (GPC) system (Shimadzu, Co., Kyoto)を用いた。RDE 株を 100 ml の LB 液体培地に植菌し、3 日間前培養した。前培養液を集菌し、0.9% (w/v)NaCl で 2 回洗浄後、湿菌体重量 2 mg の菌体を 0.4% (w/v) IR を含む 100 ml の W 液体培地に植菌し、30°C、180 rpm で 1、3、5 日間培養した。各培養日数後に培養液に 20 ml のペンタンを加え、1 日振とうすることで IR と分解産物を抽出した。ペンタン層を回収し乾燥した後に 2 ml のテトラヒドロフラン (THF)を加え溶解し、0.22 µm フィルターでろ過したものを分析試料とした。TSKgel GMHXL (7.8 mmI.D.×30 cm; Tosoh, Tokyo, Japan)を 3 本直列に繋いだカラムを用いて、移動層である THF を 1 ml/min の流速で流した。カラム温度は 40°C とした。試料注入量は 100 µl、分析時間は 40 分間とした。分子量マーカーとして標準ポリスチレン (PStQuick B (Mw:  $5.48 \times 10^6$ ,  $5.48 \times 10^6$ ,  $7.07 \times 10^5$ ,  $9.89 \times 10^4$ ,  $3.72 \times 10^4$ ,  $1.05 \times 10^3$ ), PStQuick C (Mw:  $3.72 \times 10^4$ ,  $2.80 \times 10^6$ ,  $3.97 \times 10^5$ ,  $3.72 \times 10^4$ ,  $5.87 \times 10^3$ ,  $4.95 \times 10^2$ ); Tosoh, Tokyo, Japan)を使用した。

### 大腸菌を用いた異種宿主発現と酵素精製

*lcp*<sub>RDE2</sub> 及び *lcpR*<sub>RDE2</sub> の発現系は、大腸菌を宿主としタンパク質発現用プラスミド pColdI を用いて構築した。*lcp*<sub>RDE2</sub> の遺伝子領域は RDE2\_08770\_F と RDE2\_08770\_R のプライマー対を用い、*lcpR*<sub>RDE2</sub> の遺伝子領域は RDE2\_08760\_F と RDE2\_08760\_R のプライマー対を用いて PCR により増幅した (Table 2-2)。各プライマーは、対応する標的遺伝子の開始コドンに NdeI 部位を含んでおり、精製した PCR 増幅産物を In-fusion HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., Tokyo)を用いて NdeI 及び XbaI で制限酵素消化した pColdI に導入した発現ベクターである pColdI に個別にクロ



ーニングした。得られたプラスミドをそれぞれ独立して *E. coli* BL21(DE3)に導入し、アンピシリンを含む LB 培地で 30°C にて形質転換体を培養した。培養液の 600 nm の吸光度 ( $A_{600}$ )が 0.5 になったところで、1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside を加え、さらに 15°C で 16 時間培養した。得られた細胞を回収し、50 mM phosphate buffer (pH 7.4)に懸濁させた。超音波破碎機を用いて、細胞抽出液を調製した後、得られた上清をバッファー A (50 mM phosphate buffer (pH 7.4)及び 300 mM NaCl)で平衡化した HiTrap TALON superflow column (Cytiva, Sweden)にアプライした。His タグ付きタンパク質は、5 ml バッファー B (50 mM phosphate buffer (pH 7.4)、300 mM NaCl、及び 500 mM imidazole)で溶出し、その画分をプールして濃縮した。

### 酵素活性測定

Lcp の活性は、基質依存的な酸素消費速度を測定することによって測定した。100 mM GTA バッファー (33.3 mM 3,3-dimethylglutaric acid、33.3 mM Tris、及び 33.3 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol)、0.2% DPNR、及び 40  $\mu$ g 精製 Lcp からなる 4 ml 反応液を 30°C でインキュベートし、溶存酸素計 (FireSting O2-C; BAS Inc., Tokyo, Japan)を用いて酸素消費活性を測定した。酵素活性の 1U は、1 分間に 1 mol の  $O_2$  が消費される活性量と定義し、比活性はタンパク質 1 mg あたりの単位で表した。Lcp の至適 pH と至適温度は、100 mM GTA バッファーを用いて、それぞれ pH 6.0 から 8.5 の範囲と温度 25 から 40°C の範囲で活性測定を行い決定した。

### ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解産物の同定

低分子オリゴイソプレノイドの同定には、liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) system (Infinity Lab LC/MSD; Agilent Technology Inc., Santa Clara, CA)を用いた。酵素反応は 5 ml の系で行い、25 mg の IR を含む 200 mM Phosphate Buffer (pH7.4)に精製 150  $\mu$ g Lcp を添加し 30°C、100 rpm で 12 時間反応させた。反応終了後、20 ml のペンタンを加え、1 日振とうすることで IR と反応産物を抽出した。ペンタン層を回収し、乾燥した後に、500  $\mu$ l の 0.1% (v/v)ギ酸を含むメタノールに溶解した。0.22  $\mu$ m フィルターでろ過後、試料 50  $\mu$ l を LC-MS で分析した。LC-MS の移動相には 0.1% (v/v)ギ酸水溶液 (溶液 A)と 0.1% (v/v)ギ酸を含むメタノール (溶液 B)を用いた。カラムは ZORBAX HPLC カラム (2.1 $\times$ 50 mm、1.8-Micron、600Bar) (Agilent Technology, Inc)を用いた。LC-MS の分析条件は、流速 0.5 ml/min、溶液 A と溶液 B を 4:6 の割合で混合し測定を開始した。その後、溶媒 B を 60%から 100%まで 20 分間かけて増加させた後、溶媒 B を 15 分間流した。Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)分析は、ポジティブモードで

行い、キャピラリーボルト 4000 V、キャピラリー温度 250°C、分析質量範囲は 100 Da から 1000 Da とした。

### 遺伝子破壊株の作製

*lcp*<sub>RDE2</sub> 及び *lcpR*<sub>RDE2</sub> 遺伝子は、その中央部を欠失させることにより破壊した。*lcp*<sub>RDE2</sub> 破壊株 (DT87 株) は、N 末端側の増幅を DT87\_UP\_F、DT87\_UP\_R、C 末端側の増幅を DT87\_DW\_F、DT87\_DW\_R のプライマー対を用い、PCR にて増幅した (Table 2-2)。*lcpR*<sub>RDE2</sub> 破壊株 (DT86 株) は、N 末端側の増幅を DT86\_UP\_F、DT86\_UP\_R、C 末端側の増幅を DT86\_DW\_F、DT86\_DW\_R のプライマー対を用い、PCR にて増幅した。増幅した各断片を In-fusion HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., Tokyo) を用いて連結し、ベクターである pK18*mobsacB* に挿入した。得られたプラスミドは、*E. coli* S17-1 株を用いた接合伝達により RDE2 株へ導入した。50 mg/l Km 及び 10%スクロースを含む 0.2×LB 寒天培地上で Km 耐性及びスクロース感受性を用いて形質転換体を選抜した。Km 耐性及びスクロース感受性の形質転換体から、スクロース含有 0.2×LB 寒天培地で生育するコロニーを選抜し、遺伝子欠失型変異体を得た (84, 85)。

### RDE2 株からの total RNA の抽出と定量的 RT-PCR

LB 寒天培地で RDE2 株を前培養した後、500 ml バッフル付き三角フラスコを用いて 100 ml LB 液体培地に植菌し、30°C、180 rpm で 2 日間振とう培養した。得られた菌体を遠心分離により集菌し、菌体を W 液体培地で洗浄した後、500 ml バッフル付き三角フラスコに作製した 10 mM ピルビン酸あるいは 10 mM ピルビン酸と 0.2% (w/v) DPNR を加えた 100 ml の W 培地に OD<sub>660</sub> が 0.2 となるように植菌し、30°C、180 rpm で 2 日間あるいは 7 日間振とう培養した。培養菌体を集菌し、ISOGEN II (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo) を用いて total RNA の抽出を行なった。一本鎖 cDNA の合成は、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo Co., Ltd., Japan) キットを用いて行なった。定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 解析は、Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo Co., Ltd. Osaka) と特異的プライマー (Table. 2-2) を用いて行なった。mRNA 発現量は *recA* 遺伝子発現に対する比率として算出した。なお、ゲノム DNA の混入がないことを確認するために、逆転写酵素を含まない RNA 試料をコントロールとした。

### ゲルシフト解析 (EMSA)

*lcp*<sub>RDE2</sub> の上流領域を含む DNA 断片は、*lcp*90\_F と R のプライマー対 (Table. 2-2) をアニー

リングすることにより調製した。12.5  $\mu$ M 一本鎖オリゴヌクレオチド、150 mM Tris-HCl (pH 8.0)、7.5 mM  $MgCl_2$ 、及び 375 mM NaCl を含む 20  $\mu$ l の反応液を 95°C で 5 分間保温した後に急冷した。同様の処理を行った相補鎖側の反応液と混合して 40  $\mu$ l とした後、95°C で 5 分間保温した後、0.1°C/sec で 35°C まで冷却することでアニーリングさせた。精製した His タグ付き LcpR<sub>RDE2</sub> (LcpR<sub>RDE2</sub>-His) (50-400 ng protein/ $\mu$ l)、30 fmol nonlabeled probe、1  $\mu$ g Poly(d(I-C))、及び結合バッファー (20mM HEPES (pH7.6)、1 mM EDTA、10mM  $(NH_4)_2SO_4$ 、1mM DTT、0.2% (w/v) Tween 20、及び 30 mM KCl)を含む 10  $\mu$ l の反応溶液を、20°C で 2 分間保温した。反応後、2.5  $\mu$ l のローディングバッファー (5mM Tris-HCl (pH 7.5)、50% (v/v) glycerol、及び 4% (v/v) bromophenol blue)を加え、0.5×TBE buffer 中の 4.5% nondenaturing Long Ranger gels (Lonza Rockland Inc, Rockland, ME, USA) で電気泳動を行なった。電気泳動後、ゲル中の DNA を SYBR Gold nucleic gel stain (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)で染色し、470 nm の青色 LED で写真撮影を行った。

## 結果

### 1. ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解能を持つ NR 資化性菌の単離

ベトナムのタインホア省にあるゴム製造工場の排水汚泥から DPNR を基質としたスクリーニングを行なった結果、1 つの NR 資化性菌 (RDE2 株)が単離された (68)。本株の 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、*Rhodococcus* 属に属することが明らかとなった。これまでに 16S rRNA 遺伝子が明らかにされている *Rhodococcus* 属である *Rhodococcus ruber* DSM43338<sup>T</sup> 株 (X80625)、*Rhodococcus jostii* RHA1 株 (CP000431)、*Rhodococcus erythropolis* PR4 株 (NC\_012490)、*R. rhodochrous* PRK1 株 (KU140418)、*R. opacus* (AB032565)、*R. rhodochrous* DSM43274<sup>T</sup> 株 (X80624)、及び *R. pyridinivorans* PDB9 株 (NR\_025033)の 16S rRNA 遺伝子と RDE2 株の 16S rRNA 遺伝子を比較した結果、それぞれ 92.6%から 96.6%の相同性を示した (Fig. 2-1)。

RDE2 株のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解能を明らかにするために、IR を添加した液体培地で RDE2 株を 14 日間培養した。培養液中に残存する IR の分子量を GPC によって分析した結果、培養開始時に分子量約 1,200 kDa の IR に由来するピークが、培養後には減少することが示された (Fig. 2-2)。さらに、低分子量のピークの出現が観察されたことから、RDE2 株がポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の低分子化能を有していることが示唆された。

### 2. RDE2 株のゲノム配列解析

RDE2 株のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解遺伝子を同定するために、本株のゲノム配列を決定した。ハイスループット DNA シーケンサーである DNBSEQ-400 とロングリード DNA シーケンサー

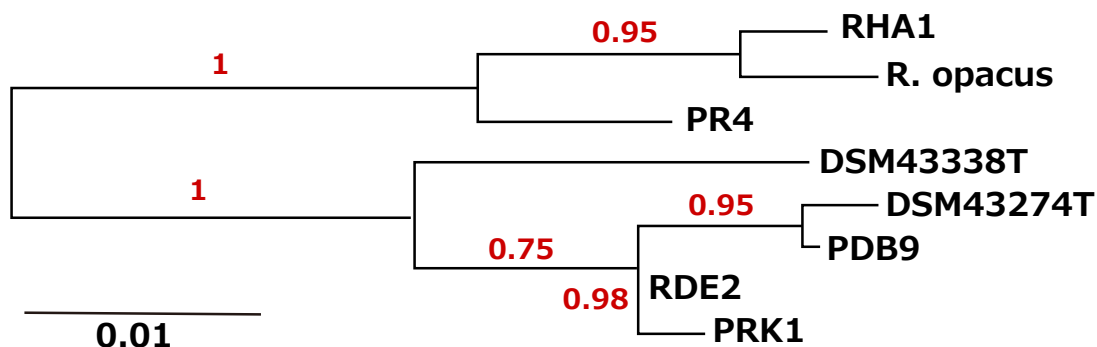


Fig. 2-1 *Rhodococcus* 属の 16S rRNA 遺伝子の系統樹。赤字はブートストラップ値を示し、解析に用いた配列は株名で表記した。それぞれの株の詳細は *R. ruber* DSM43338<sup>T</sup> 株 (X80625)、*R. jostii* RHA1 株 (CP000431)、*R. opacus* B4 株 (AB032565)、*R. erythropolis* PR4 株 (NC\_012490)、*R. rhodochrous* DSM43274<sup>T</sup> 株 (X80624)、*R. pyridinivorans* PDB9 株 (NR\_025033)である。

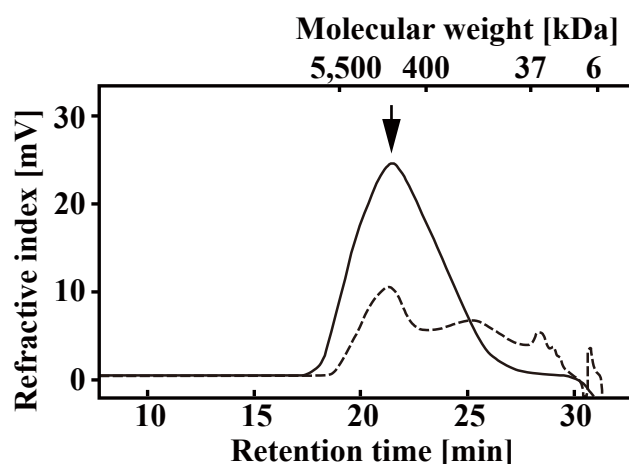


Fig. 2-2 GPC 分析による RDE2 株の IR 分解能の評価。実線は培養開始時を示し、点線は培養 14 日後の結果を示した。1,200 kDa に相当する位置は矢印で示した。

である GridION で出力した配列データを Unicycler (Ver 0.4.7)によってアセンブルした結果、RDE2 株のゲノムは、5,386,255 bp の環状染色体と 6 つの環状プラスミドから構成されることが示された。プラスミドの最大サイズは 224,658 bp、最小サイズで 2,034 bp であり、染色体とプラスミドを合わせたサイズは 5,715,406 bp であった。また、本ゲノムの平均 GC 含量は 66.27%であった。DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST)によるアノテーションを行った結果、ゲノムには 5,632 のタンパク質コード配列 (CDS)と 12 コピーの rRNA 遺伝子及び 54 コピーの tRNA の遺伝子が含まれていることが明らかとなった。このゲノム配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)にアクセッション番号 AP025186~AP025192 として登録した。

全ゲノム配列が明らかになっている *Rhodococcus* 属細菌である *R. jostii* RHA1 株、*R. erythropolis* PR4 株、*R. opacus* B4 株、*R. rhodochrous* NBRC 16069<sup>T</sup> 株、*R. pyridinivorans* AK37 株、及び *R. ruber* NBRC 15591 株と RDE2 株の全ゲノム平均塩基同一性 (ANI 値)を調べた結果、それぞれ 72.48%、71.42%、72.61%、94.45%、94.37%、及び 76.91%であることが示された (Table 2-3)。同一種であると定義されている閾値は 95%であることから、RDE2 株は既知の

Table 2-3 *Rhodococcus* 属 7 株における全ゲノム平均塩基同一性 (%)

	RDE2	RHA1	PR4	B4	NBRC 16069 <sup>T</sup>	AK37	NBRC 15591 <sup>T</sup>
RDE2	*						
<i>R. jostii</i> RHA1	72.48	*					
<i>R. erythropolis</i> PR4	71.42	73.70	*				
<i>R. opacus</i> B4	72.61	88.48	72.97	*			
<i>R. rhodochrous</i> NBRC 16069 <sup>T</sup>	94.45	73.56	71.86	73.74	*		
<i>R. pyridinivorans</i> AK37	94.37	73.82	71.80	73.76	93.62	*	
<i>R. ruber</i> NBRC 15591 <sup>T</sup>	76.91	74.72	72.41	75.06	76.82	77.02	*

*Rhodococcus* spp.とは別種であることが示唆された。

得られた CDS の機能分類を eggNOG version 4.5.1、eggNOG-mapper version 1.0.3 で行ったところ、5,259 の CDS のうち、4,615 の CDS が機能分類された (Table 2-4)。*Rhodococcus* 属細菌は、カロテノイドやトリアシルグリセロール、ポリヒドロキシアルカン酸、シデロフォアやテルペン化合物など、様々な二次代謝産物を生合成することが知られている (86)。また、ポリ塩化ビフェニルやベンゼン、アルカンなどの資化性細菌としても報告されている (87, 88)。RDE2 株の eggNOG 分類結果と、*Gordonia polyisoprenivorans* VH2 株及び *E. coli* K-12 株の CDS 分類結果を比較した結果 (Table 2-4)、RDE2 株と VH2 株は転写制御 (K)及び脂質輸送と代謝 (I)、二次代謝産物生産 (Q)に関わる酵素が K-12 株に比べ多く存在することが明らかとなった。このことから、RDE2 株や VH2 株の放線菌では様々な生合成経路や分解経路に関わる遺伝子の転写が高度に制御されていると推察された。

Table 2-4 RDE2 株の CDS 機能分類

Process	Class ID	Description	RDE2	VH2	<i>E. coli</i> K-12
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	29	30	45
	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	131	153	307
	N	Cell motility	0	0	56
	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	116	108	165
	T	Signal transduction mechanisms	132	147	154
	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	21	21	92
	V	Defense mechanisms	52	98	55
	Z	Cytoskeleton	1	3	0
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	A	RNA processing and modification	1	1	4
	B	Chromatin structure and dynamics	1	1	0
	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	157	151	180
	K	Transcription	412	428	321
	L	Replication, recombination and repair	253	214	279
METABOLISM	C	Energy production and conversion	324	302	286
	E	Amino acid transport and metabolism	259	292	341
	F	Nucleotide transport and metabolism	83	90	106
	G	Carbohydrate transport and metabolism	196	218	373
	H	Coenzyme transport and metabolism	150	150	134
	I	Lipid transport and metabolism	295	264	89
	P	Inorganic ion transport and metabolism	276	265	271
	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	185	189	62
POORLY CHARACTERIZED	S	Function unknown	1595	1629	967
Total			3074	3125	4287

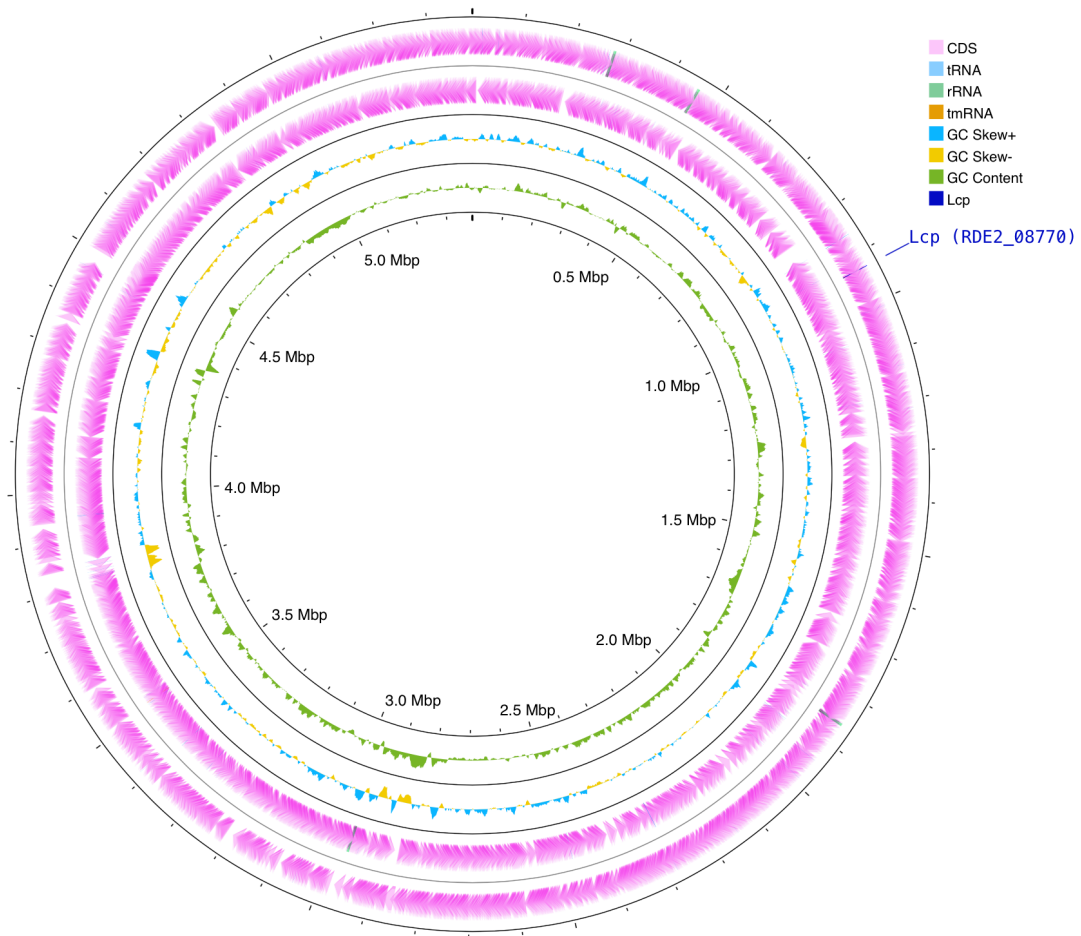


Fig. 2-3 RDE2 株の環状染色体の全体像。RDE2 株の  $lcp_{RDE2}$  は染色体に存在する。

### 3. ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解遺伝子の同定

RDE2 株のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解遺伝子を同定するために、*Streptomyces* sp. K30 株の  $Lcp_{K30}$  (AAR25849) のアミノ酸配列をクエリーとして RDE2 株のゲノム配列に対して相同性検索を行った。その結果、 $Lcp_{K30}$  と 55.4% のアミノ酸配列同一性を有する RDE2\_08770 遺伝子が見出され、本遺伝子を  $lcp_{RDE2}$  と命名した。 $lcp_{RDE2}$  は、RDE2 株の環状染色体上に存在した (Fig. 2-3)。 $lcp_{RDE2}$  遺伝子産物と各 NR 資化性放線菌で知られている Lcp のアミノ酸配列同一性を調べた結果、 $Lcp_{RDE2}$  は、*Rhodococcus rhodochrous* RPK1 株の Lcp (AMY60409) と 100% 一致することが示された (Table 1-5)。また、*Actinoplanes* sp. OR16 株の  $Lcp_{1OR16}$  (AB037012) とは 72.4%、*G. polyisoprenivorans* VH2 の Lcp (AFA75827) とは 68.5% の同一性を示した。また、 $lcp_{RDE2}$  の上流には TetR 型転写制御因子をコードする RDE\_08760 遺伝子が見出され、本遺伝子を  $lcpR_{RDE2}$  と命

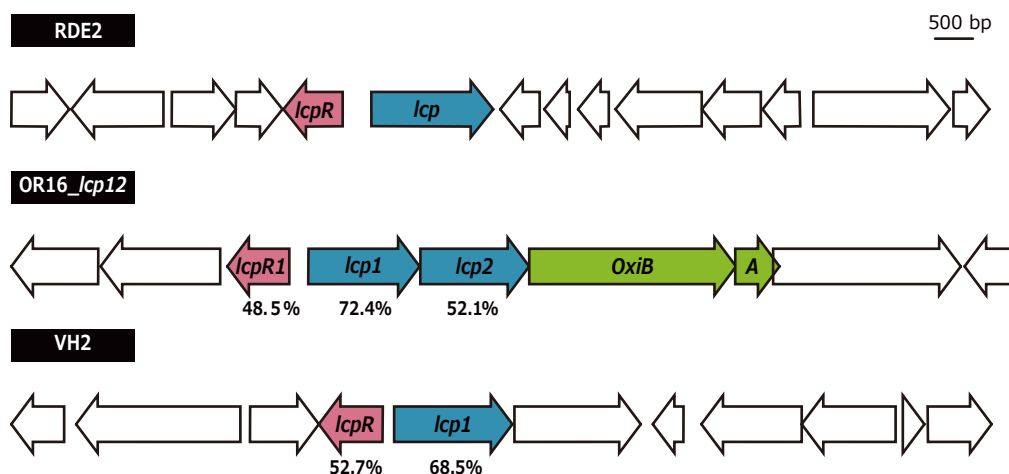


Fig. 2-4 RDE2 株の *lcp* 周辺遺伝子と *Actinoplanes* sp. OR16 株及び *G. polyisoprenivorans* VH2 株の *lcp* 周辺遺伝子の比較。遺伝子下の数字は RDE2 株との相同性を%で示した。

名した。RDE2 株、OR16 株、及び VH2 株の *lcp* 周辺の ORF マップを比較した結果 (Fig. 2-4)、どの株においても *lcp* の周辺に TetR 型転写制御因子をコードする遺伝子 (*lcpR*) が存在した。*lcpR*<sub>RDE2</sub> 遺伝子産物と既知の LcpR のアミノ酸配列を比較した結果、LcpR<sub>RDE2</sub> は LcpR<sub>1OR16</sub> と 48.5%、LcpR<sub>VH2</sub> と 52.7% のアミノ酸配列同一性を示した (Table 2-5)。なお、LcpR<sub>RDE2</sub> と 100% の同一性を示した *R. rhodochrous* RPK1 株の *lcp* 周辺は、配列情報が未解明のため、RDE2 株と同様の遺伝子が配置されているかは明らかにできなかった。

#### 4. Lcp の精製と機能解析

Lcp<sub>RDE2</sub> の酵素学的性質を明らかにするために、6×ヒスチジンタグを融合させた遺伝子を、

Table 2-5 これまでに報告された LcpR のアミノ酸配列相同性検索結果

	LcpR <sub>RDE2</sub>	LcpR <sub>1OR16</sub>	LcpR <sub>2OR16</sub>	LcpR <sub>VH2</sub>	LcpR <sub>BA3(2)</sub>
LcpR <sub>RDE2</sub>	100%	48.5% (110/227)	11.9% (51/428)	52.7% (119/226)	11.3% (52/462)
LcpR <sub>1OR16</sub>		100%	16.7% (72/432)	48.7% (109/224)	15.0% (63/420)
LcpR <sub>2OR16</sub>			100%	13.1% (60/457)	72.3% (292/404)
LcpR <sub>VH2</sub>				100%	13.2% (56/425)
LcpR <sub>BA3(2)</sub>					100%



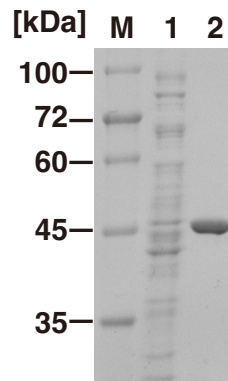


Fig. 2-5  $lcp_{RDE2}$  タンパク質精製の SDS-PAGE 解析。タンパク質は 12%ポリアクリルアミドゲルで分離し、クマシーブリアントブルーで染色した。M: 分子量マーカー、1:  $lcp_{RDE2}$  を含む大腸菌の粗抽出物、2: 精製されたタンパク質である。

*E. coli* BL21(DE3)株に導入し、*cspA* プロモーターの制御下で発現させた。遺伝子を発現させた *E. coli* の細胞抽出液を調製し、His タグ付きタンパク質 ( $Lcp_{RDE2}$ -his)を Co アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製  $Lcp_{RDE2}$ -his を SDS-PAGE で分析した結果、アミノ酸配列から算出した分子量 (45 kDa)と同等のサイズに単一のタンパク質のバンドが認められた (Fig. 2-5)。以上の結果から、目的のタンパク質が精製されたと判断した。得られた 40  $\mu$ g 精製  $Lcp_{RDE2}$ -his と 0.2% DPNR を含む 100 mM GTA バッファー (pH6.0-8.5)を 25°C-40°C の範囲で反応させ、反応液中の溶存酸素濃度の変化を測定した結果、有意な酸素消費が観察された。この結果から、本酵素がポリ(*cis*-1,4-イソプレン)に酸素を添加するオキシゲナーゼであることが強く示唆された。また、 $Lcp_{RDE2}$  の比活性は 1.43 U/mg であり、至適温度と pH はそれぞれ 30°C と 7.5 であることが

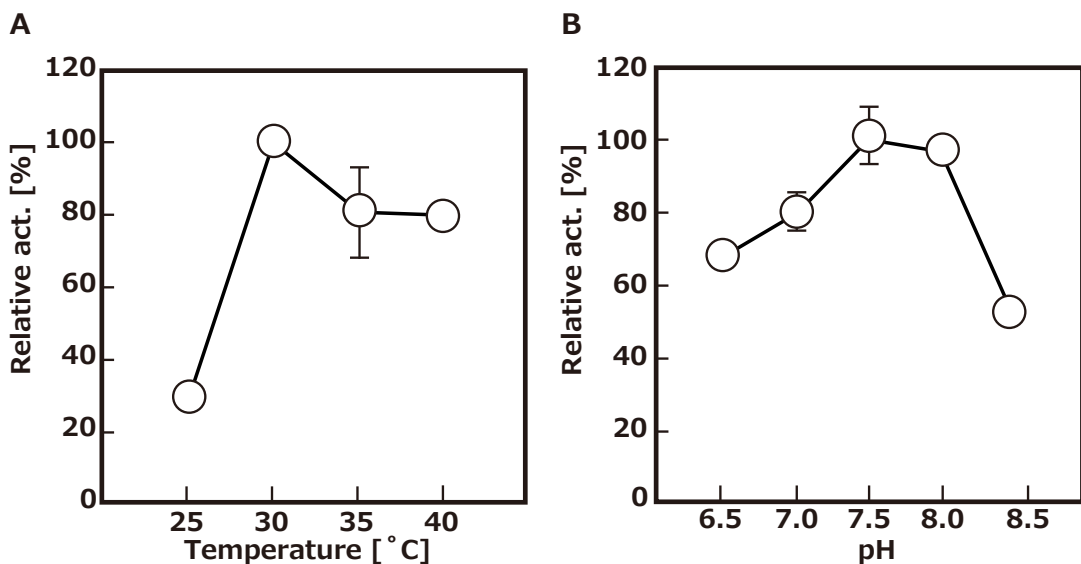


Fig. 2-6 RDE2 株の  $Lcp$  の酵素比活性解析。A: RDE2 株の  $Lcp$ -his による至適温度、B: RDE2 株の  $Lcp$ -his による至適 pH の解析結果を示した。それぞれ、最も高い活性値を示した条件を 100%とし、比活性として算出した。

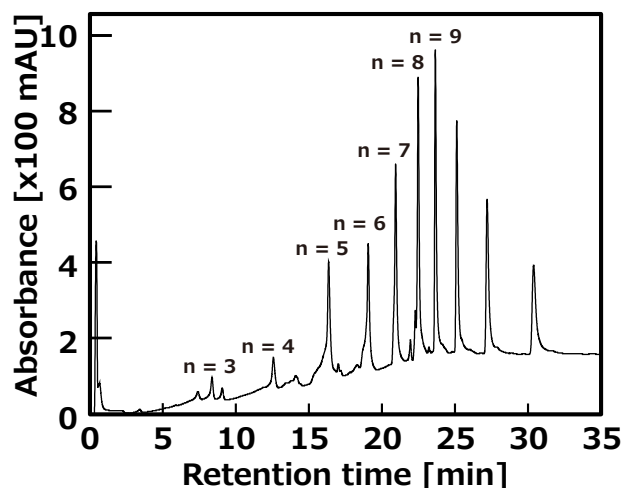


Fig. 2-7 Lcp が生成する IR の分解生成物の同定。25 mg の IR と 150  $\mu$ g のタンパク質を含む 4 ml の反応混合物を 30°C で 24 時間反応させた。反応後、低分子オリゴイソプレノイドを含む反応生成物の分子量を LC-MS によって分析した。ピーク上の n 数はイソプレノイドの数を示した。

示された (Fig. 2-6)。

Lcp<sub>RDE2</sub> の反応産物を明らかにするために、IR と精製 Lcp<sub>RDE2</sub>-his の反応液を LC-MS で分析した。その結果、保持時間 8.0、12.2、15.9、18.5、20.3、21.9、及び 23.0 min にそれぞれ *m/z* 値 305、373、441、510、578、646、及び 714 に相当するピークが観察された (Fig. 2-7)。これらの *m/z* 値は、末端アルデヒド基とケト基を含む 3 個 (C15) から 9 個 (C45) のイソプレノイドからなるオリゴイソプレノイドのプロトン化 [M+H]<sup>+</sup> 産物に相当したことから、Lcp<sub>RDE2</sub> の反応によって、ポリ(*cis*-1,4-イソプレノイド)がそれらのサイズのオリゴイソプレノイドへと低分子化されたことが示唆された。また、本分析条件では、24.5、26.5、29.6 min のピークの分子量は検出されなかった。

## 5. *lcp* と *lcpR* の欠失

RDE2 株のポリ(*cis*-1,4-イソプレノイド)分解における *lcp*<sub>RDE2</sub> 及び *lcpR*<sub>RDE2</sub> の役割を調べるため、相同組換えを用いた遺伝子置換法によってそれぞれの遺伝子破壊株を作製した。RDE2 株、*lcp*<sub>RDE2</sub> 破壊株 (DT87 株)、及び *lcpR*<sub>RDE2</sub> 破壊株 (DT86 株) を 10 mM ピルビン酸を含む DPNR 寒天培地で培養した際のアルデヒド産物の蓄積をシッフ染色によって評価した。その結果、野生株ではシッフ試薬による呈色が観察されたのに対して、DT87 株では呈色が確認されなかった (Fig. 2-8A)。さらに、0.2% DPNR を唯一の炭素源とした際の生育能を評価した結果、野生株は、5 日から 12 日が対数増殖期であり、その間の回帰直線の式は  $y = 0.9577x + 0.6049$  ( $R^2 = 0.9905$ ) となったのに対して、DT87 株は増殖能を完全に失っていた (Fig. 2-8B)。以上の結果から、

*lcp*<sub>RDE2</sub> がポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の低分子化と資化に必須であることが示された。

一方、DT86 株を用いた場合、シッフ試薬による呈色が野生株の場合と比較して増強した (Fig. 2-8A)。さらに、0.2% DPNR を唯一の炭素源とした際の生育能も野生株の生育能と比べて増大した ( $y = 1.0899x + 0.7813$  ( $R^2 = 0.9895$ )) (Fig. 2-8B)。DT86 株の生育における誘導期は、野生株の場合よりも短いことが示された。さらに、対数増殖期における野生株の倍加時間は 31.4 時間であったのに対して、DT86 株は 27.6 時間であった。以上の結果から、*lcpR*<sub>RDE2</sub> の欠失によりポ

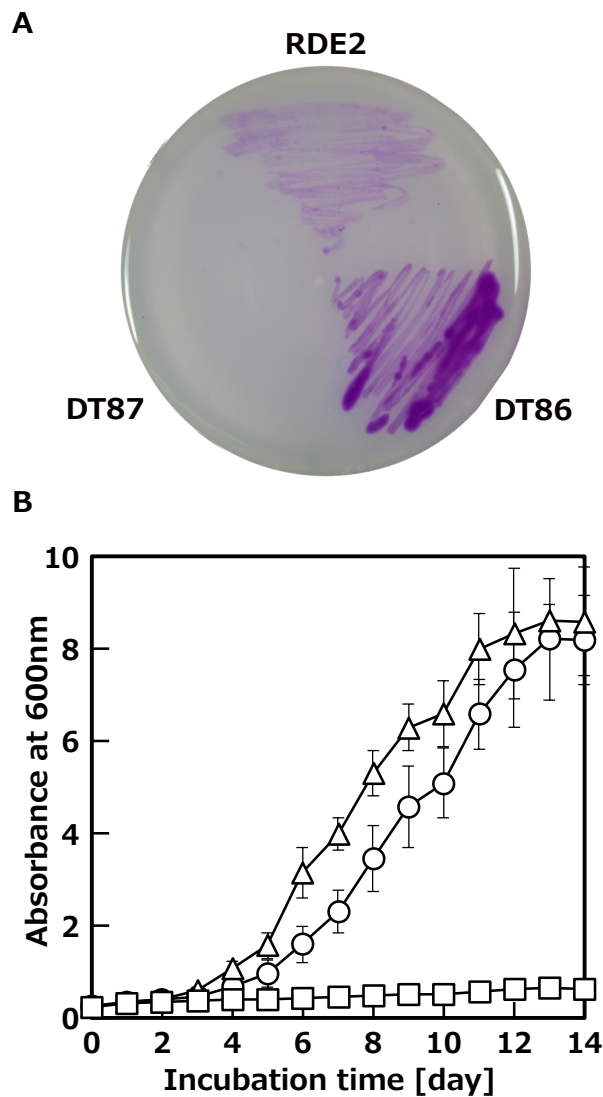


Fig. 2-8 RDE2 株による DPNR 生育能の評価。A: RDE2 株と *lcp* 欠失株 (DT87 株) 及び *lcpR* 欠失株 (DT86 株) を 10 mM ピルビン酸を含む DPNR 寒天培地で 3 日間培養した後、菌体を除去しシッフ試薬で染色を行った。B: RDE2 と DT87 株及び DT86 欠失株の DPNR 含有液体培地における生育曲線結果。RDE2 (丸)、DT86 (三角)、DT87 (四角) 株を 0.2% DPNR を含む W 培地で増殖させた。実験は 3 回行い標準偏差をエラーバーで示した。

リ(*cis*-1,4-イソプレン)資化能が向上したことが示唆された。

## 6. *lcp*<sub>RDE2</sub> の転写誘導性

*lcp*<sub>RDE2</sub> の転写誘導性を明らかにするために、10 mM ピルビン酸または 10 mM ピルビン酸と 0.2% DPNR を炭素源として培養した RDE2 株の total RNA を用いて qRT-PCR 解析を行なった。その結果、DPNR 存在下で培養した場合の *lcp* 転写量は、DPNR 非存在下の場合と比較して 26 倍に増加することが明らかとなった (Fig. 2-9)。このことから *lcp*<sub>RDE2</sub> の転写は、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の代謝時に誘導されることが示唆された。

*lcp*<sub>RDE2</sub> の転写への *LcpR*<sub>RDE2</sub> の関与を明確にするために、DT86 株における *lcp*<sub>RDE2</sub> の転写誘導性を評価した。10 mM ピルビン酸または 10 mM ピルビン酸と 0.2% DPNR を炭素源として培養した場合の *lcp*<sub>RDE2</sub> の転写量を測定した結果、両条件において同等の転写量を示した (Fig. 2-9)。さらに、DT86 株における *lcp*<sub>RDE2</sub> の転写量は、誘導、非誘導の両条件において、野生株の誘導条件よりも高かったことから、*LcpR*<sub>RDE2</sub> が *lcp*<sub>RDE2</sub> の転写を負に制御している可能性が考えられた。

## 7. *LcpR*<sub>RDE2</sub> の結合能

*lcpR*<sub>RDE2</sub> 遺伝子産物の機能を明らかにするために、6×ヒスチジンタグと融合した *lcpR*<sub>RDE2</sub>

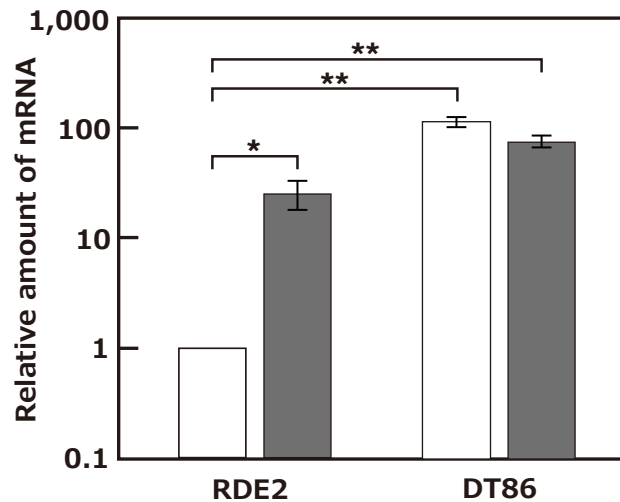


Fig. 2-9 *lcp* 遺伝子の定量的転写量解析。DPNR を添加した 10mM ピルビン酸含有 W 培地 (灰)または添加しない培地 (白)で培養した RDE2 及び DT86 細胞からトータル RNA を単離した。*lcp* の相対的 mRNA 転写レベルは、10 mM ピルビン酸で培養した RDE2 株の mRNA 含有量に対する増加倍率を表した。転写量は、*recA* の転写量に対する比率として計算した。結果は、4 回の測定の平均値と±標準偏差で示した。統計解析はスチューデントの t 検定を用いて行った。アスタリスクは、括弧でつながれた値の間の統計的に有意な差を示した。(\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )。



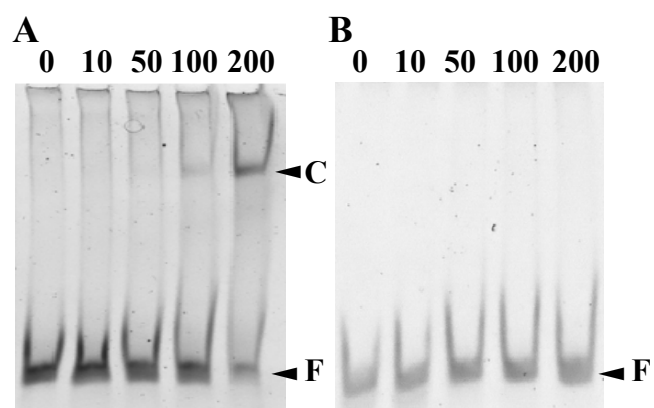


Fig. 2-12 LcpR<sub>RDE2</sub>-his と *lcp*<sub>RDE2</sub> 上流領域との結合解析。EMSA のプローブとして、*lcp*<sub>RDE2</sub> 上流領域 (A) 及び RDE2 の *recA* 遺伝子内部領域 (B) を含む DNA プローブ (30 fmol) を用いた。反応に用いた LcpR<sub>RDE2</sub>-his の濃度 (0-200 ng/ml) はレーンの上に示した。*lcp* 上流領域を含む DNA プローブのサイズと位置を Fig. 2-11 に示した。F と C でラベルされた矢印は、それぞれ結合していないプローブ (フリーDNA) とタンパク質-DNA 複合体の位置を示した。

いたゲルシフト解析 (EMSA) を行なった (Fig. 2-11)。LcpR<sub>RDE2</sub>-his の結合能を評価した結果、30 fmol の *lcp*<sub>RDE2</sub> 上流領域プローブに対して 100 ng の LcpR<sub>RDE2</sub>-his 存在下でシフトバンドの出現が観察された (Fig. 2-12)。このことから、LcpR<sub>RDE2</sub>-his は *lcp*<sub>RDE2</sub> 上流領域に結合し、*lcp*<sub>RDE2</sub> の転写を制御することが示唆された。

## 考察

第二章では、*Rhodococcus* sp. RDE2 株の全ゲノム解析を行うとともにポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解酵素の機能解析と転写制御機構を明らかにした。ゲノム解析の結果、RDE2 株は 5.4 Mb の環状染色体と 6 つの環状プラスミドから構成される 5.7 Mb のゲノムを有することが明らかとなった。RDE2 株は 1 つの *lcp* ホモログ (*lcp*<sub>RDE2</sub>) を染色体上に有していた。また、*lcp*<sub>RDE2</sub> の上流には TetR 型転写制御因子をコードする *lcpR*<sub>RDE2</sub> 遺伝子が見出された (Fig. 2-4)。それらの周辺には、亜硫酸塩の代謝に関わる遺伝子が存在したが、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)代謝へのそれらの関与は明確にされなかった (Fig. 2-13)。RDE2 株のゲノムには 3 つのテルペン合成遺伝子群が存在した。*G. polyisoprenivorans* VH2 株では、Lcp がテルペン含有化合物の分解に関与している可能性が示唆されていることから (31)、RDE2 株においても Lcp がテルペン遺伝子群の生成物分解に関与する可能性が予想された。

RDE2 株のゲノムには、*Streptomyces* sp. K30 株においてポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解産物であるオリゴイソプレンアルデヒドの酸化分解に関与すると考えられている *oxiAB* のホモログは確認されなかった。*oxiAB* ホモログを持たない NR 資化性細菌では、オリゴイソプレンアルデヒドの酸化に Aldehyde dehydrogenase (ALDH) が関与することが報告されている (67)。酵素として、*G. polyisoprenivorans* VH2 株においては、2 つの ALDH (GPOL\_c02580、GPOL\_c37100) が見出されている。これらのペプチド配列にはシグナル配列が存在しないことから、VH2 株ではオリゴイソプレンアルデヒドが細胞内に取り込まれた後に細胞内において ALDH による酸化分解を受けると考えられる。*oxiAB* ホモログを持たない RDE2 株においても、オリゴイソプレンアルデヒドの酸化には ALDH が関与すると考えられる。RDE2 株のゲノムには、GPOL\_c02580 及び GPOL\_c37100 とそれぞれ 52.72% 及び 75.61% のアミノ酸配列同一性を示す RDE2\_42360 及び RDE2\_08210 が存在した。従って、RDE2 株においてはこれらの遺伝子産物がオリゴイソプレンアルデヒドの酸化

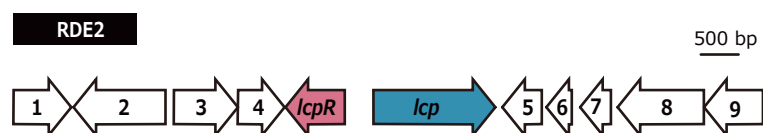


Fig.2-13. *Rhodococcus* sp. RDE2 株の *lcp* 周辺の ORF マップ。1: carboxymuconolactone decarboxylase family protein, 2: RNA polymerase sigma factor SigJ, 3: hypothetical protein, 4: hypothetical protein, 5: hypothetical protein, 6: metal-sensitive transcriptional regulator, 7: rhodanese-like domain-containing protein, 8: sulfite exporter TauE/SafE family protein, 9: sulfurtransferase.

に関与する可能性が考えられた。今後、各遺伝子産物の機能解析を行うことで RDE2 株におけるオリゴイソプレナルデヒド分解の詳細を明らかにできると考えられる。

Lcp<sub>RDE2</sub> の至適温度は 30°C、至適 pH は 7.5 であり、比活性は  $1.48 \pm 0.12$  U/mg タンパク質であった。Watcharakul らによって *R. rhodochrous* RPK1 株の Lcp (Lcp<sub>RPK1</sub>) の比活性は、3.1 U/mg であることが報告されている (83)。Lcp<sub>RDE2</sub> と Lcp<sub>RPK1</sub> のアミノ酸配列は完全に一致するにもかかわらず、比活性に 2 倍程度の違いが生じた。これは、基質に用いた NR の違いや活性測定系の違いによるものである可能性が考えられるが、明確な原因は特定されていない。今後、K30 株や VH2 株などの Lcp を評価基準に用いて活性評価を行うことで、正確な比活性の比較が可能になると考えられる。Lcp とポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の反応産物として、3 個 (C15) から 9 個 (C45) のイソプレンユニットを持つオリゴイソプレナルデヒドが検出された (Fig. 2-7)。C50 以上のオリゴイソプレナルデヒドに由来すると考えられるピークも同様に観察されたが、本条件では分子量の特定はできなかった。分解産物の分子量から、Lcp<sub>RDE2</sub> は、他の Lcp と同様にポリ(*cis*-1,4-イソプレン)のエンド型開裂に関与していると考えられた (31, 41, 54, 83)。

RDE2 株の *lcp* は、DPNR 代謝時に誘導的に発現することから (Fig. 2-9)、本遺伝子が RDE2 株の NR 資化に関与することが示唆された。RDE2 株における *lcp* 遺伝子の欠失は、DPNR 資化能を完全に欠失させた (Fig. 2-8)。以上のことから、RDE2 株における NR 資化には *lcp* が必須であることが示された。また、*lcp* 転写制御に関わると考えられる *lcpR* を欠失させた結果、NR 資化能が野生株と比較して向上することが明らかとなった。さらに、*lcpR* 欠損株では、DPNR の存在にかかわらず構成的に *lcp* が転写されたことから、*lcpR* 遺伝子産物 (Lcp<sub>RDE2</sub>) が *lcp* の転写を負に制御していることが示唆された。

*lcp* 上流領域と Lcp<sub>RDE2</sub> の結合解析の結果から、Lcp<sub>RDE2</sub> は、*lcp* 上流領域に特異的に結合することが示された。Lcp<sub>RDE2</sub> のアミノ酸配列は、*G. polyisoprenivorans* VH2 由来の Lcp<sub>VH2</sub>、*Actinoplanes* sp. OR16 由来の Lcp<sub>R1OR16</sub> とそれぞれ 52.7%、48.5% の同一性を示した。これらの TetR 型転写制御因子は、*lcp* の上流領域に結合し、*lcp* の転写を制御していることが示されている (63, 89)。Lcp<sub>VH2</sub> と Lcp<sub>R1OR16</sub> の結合領域には、それぞれ共通の回文配列が見出されている (Fig. 1-13)。そして、Lcp<sub>RDE2</sub> が結合した *lcp*<sub>RDE2</sub> の上流領域にも 15 塩基中 3 塩基ミスマッチが存在する回文配列が確認された (Fig. 2-14)。Lcp<sub>RDE2</sub> の上流領域には、他の *lcp* 上流で保存性が



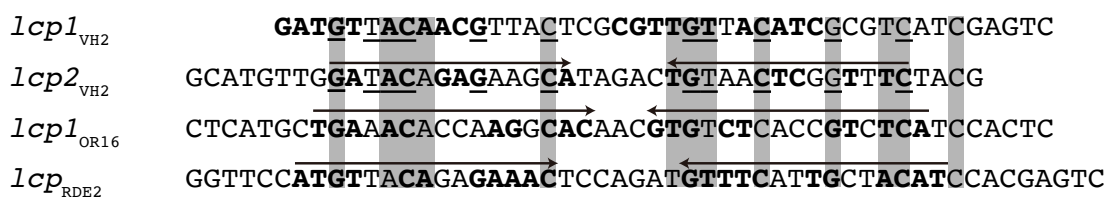


Fig.2-14. 各 *lcp* 上流領域の LcpR 結合配列と回文配列。100%一致した配列を灰色ボックスで示し、回文配列の位置を矢印、回文配列を示した塩基配列を太字で示した。機能解析がなされていない上流領域を用いたアライメントにより保存性が高かった配列を下線で示した。

高かった 11 塩基全てが保存されていたことから、本領域が LcpR<sub>RDE2</sub> との結合に関与することが強く示唆された。さらに、本領域には、推定の-35 配列 (TTCCAT)と-10 配列 (CCAGATGTT)が見出されている (Fig. 2-11)。これらの配列は、*Rhodococcus* 属で明らかにされた-35 (TTGNNN)及び-10 ((T/C)GNNA(A/C)AAT)領域のコンセンサス配列 (90)と相同であったことから、*lcp* の転写に関与すると考えられた。これらのコンセンサス配列は、上記の回文配列と重なっていたことから、LcpR<sub>RDE2</sub> が結合することによって、RNA ポリメラーゼとプロモーターの相互作用が阻害され、*lcp* の転写が抑制されていることが強く示唆された。

## 総括

天然ゴム (Natural rubber: NR)は、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を主成分とする天然高分子であり、様々な工業製品に利用されている。近年の需要増加に伴う廃棄物の増大から環境負荷への影響が懸念されており、微生物による NR の生分解に注目が寄せられている。NR 資化性放線菌は、NR を唯一の炭素源として生育する。そして、NR の主成分であるポリ(*cis*-1,4-イソプレン)骨格のシス二重結合への酸素添加型開裂を触媒する Latex clearing protein (Lcp)を用いて、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を低分子化し、ケトン基とアルデヒド基を末端に持つオリゴイソプレノイドへと変換することが知られている。これまでに、いくつかの NR 資化性放線菌から Lcp をコードする *lcp* 遺伝子が単離されており、機能解析がなされてきた。さらに *lcp* の転写制御に関与する転写制御因子が同定されている。しかし、NR 代謝遺伝子やそれらの発現機構が明確にされていない NR 資化性放線菌が存在していた。本研究では、Lcp が関与する NR 代謝の全容を明らかにすることを目的として、NR 資化性放線菌である *Actinoplanes* sp. OR16 株と *Rhodococcus* sp. RDE2 株の NR 代謝遺伝子の機能とそれらの転写制御機構の解析を行った。

第一章では、NR 寒天培地上での生育時にクリアゾーン形成能を持つ *Actinoplanes* sp. OR16 株における NR 代謝系を明らかにすることを目的として、OR16 株の全ゲノム解析を行った。その結果、OR16 株のゲノムは 9.2 Mb の環状染色体で構成されており、染色体上に 3 つの *lcp* ホモログ (*lcp1*<sub>OR16</sub>、*lcp2*<sub>OR16</sub>、及び *lcp3*<sub>OR16</sub>)が見出された。*lcp1*<sub>OR16</sub> 及び *lcp2*<sub>OR16</sub> は下流に存在する推定のおキシドレダクターゼ遺伝子 (ACTI\_59650 及び ACTI\_59660)とオペロンを形成していた。また、これら *lcp* ホモログは NR 代謝時に誘導的に転写されることが示された。さらに、これらの遺伝子産物は、それぞれポリ(*cis*-1,4-イソプレン)に対する酸素消費活性を示したことから、*lcp1*<sub>OR16</sub>、*lcp2*<sub>OR16</sub>、及び *lcp3*<sub>OR16</sub> が OR16 株の NR 資化に関与することが強く示唆された。*lcp1*<sub>OR16</sub>-*lcp2*<sub>OR16</sub> 及び *lcp3*<sub>OR16</sub> の近傍にはそれぞれ TetR 型転写制御因子 (LcpR1<sub>OR16</sub> 及び LcpR2<sub>OR16</sub>)をコードする遺伝子が見出された。それら遺伝子産物の DNA 結合能を評価した結果、LcpR1<sub>OR16</sub> は *lcp1*<sub>OR16</sub> 上流に、LcpR2<sub>OR16</sub> は *lcp1*<sub>OR16</sub> 上流及び *lcp3*<sub>OR16</sub> 上流にそれぞれ結合することが明らかとなり、LcpR1<sub>OR16</sub> 及び LcpR2<sub>OR16</sub> が、OR16 株の NR 資化に関わる遺伝子の転写制御に関与することが強く示唆された。

第二章では、NR 寒天培地上での生育時にクリアゾーンを形成しない NR 資化性放線菌である *Rhodococcus* sp. RDE2 株の全ゲノム配列を解読し、染色体上に 1 つの *lcp* ホモログ (*lcp*<sub>RDE2</sub>)を持つことを明らかにした。さらに、*lcp*<sub>RDE2</sub> の上流には TetR 型転写制御因子をコードする *lcpR*<sub>RDE2</sub> が存在した。*lcp*<sub>RDE2</sub> 遺伝子産物の生化学的な解析と *lcp*<sub>RDE2</sub> の遺伝子破壊株の解析か

ら、*lcp*<sub>RDE2</sub> は RDE2 株の NR 資化に必須なポリ(*cis*-1,4-イソプレン)オキシゲナーゼであることが示された。また、*lcp*<sub>RDE2</sub> 遺伝子産物は、*lcp*<sub>RDE2</sub> の上流領域に特異的に結合し *lcp*<sub>RDE2</sub> の転写を負に制御する転写制御因子であることが示された。*lcp*<sub>RDE2</sub> 遺伝子産物の結合領域は、*lcp*<sub>RDE2</sub> のプロモーター配列と重なっていたことから、LcpR<sub>RDE2</sub> が結合することによって、RNA ポリメラーゼとプロモーターの相互作用が阻害されることで、*lcp*<sub>RDE2</sub> の転写が抑制されていると考えられた。

本研究では、NR 寒天培地での生育時におけるクリアゾーン形成の有無の違いによる 2 種類の NR 資化性菌の解析を行った。そして、*lcp* の下流にオキシドレダクターゼをコードする *oxiAB* を持つ NR 資化性菌では、OxiAB によって細胞外でオリゴイソプレンアルデヒドが脂肪酸へと酸化され、それによって細胞周囲にクリアゾーンを形成すると考えられた。一方、クリアゾーン形成能を持たない NR 資化性菌には、*oxiAB* は存在せず、アルデヒドの酸化は細胞内で行われている可能性がある。これらの違いがクリアゾーン形成の有無に関連している可能性が考えられた。本研究によって、Lcp を利用した NR 生分解を実用化するために必要な Lcp の酵素学的諸性質を含む基礎的知見を得ることができた。さらに、LcpR によって *lcp* の発現が負に制御されていることが明らかとなったことから、*lcpR* を欠損させることで NR 資化性を向上させることが可能になると期待される。

## 公表論文

- (1) 令和2年9月, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 第104卷17号, pp. 7367-7376  
「Characterization of the genes responsible for rubber degradation in *Actinoplanes* sp. strain OR16」  
(Namiko Gibu, Tomoka Arata, Saya Kuboki, Dao Viet Linh, Masao Fukuda, Alexander Steinbüchel, Daisuke Kasai)
- (2) 令和4年2月, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 第133卷5号, pp. 452-458  
「Complete genome sequence and characterization of the poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation genes in *Rhodococcus* sp. strain RDE2」  
(Namiko Gibu, Dao Viet Linh, Natsuhei Suzuki, Nguyen Thi Thuy Ngan, Masao Fukuda, To Kim Anh, Nguyen Lan Huong, Daisuke Kasai)

## 参考論文

- (1) 令和元年10月, *Microorganisms*, 第7卷11号, 479  
「Characterization and transcriptional regulation of *n*-alkane hydroxylase gene cluster of *Rhodococcus jostii* RHA1」  
(Namiko Gibu, Daisuke Kasai, Takumi Ikawa, Emiko Akiyama, Masao Fukuda)
- (2) 令和元年6月, *Biotechnology Reports*, 第22卷, e00332  
「Complete genome sequence of natural rubber-degrading, gram-negative bacterium, *Rhizobacter gummiphilus* strain NS21<sup>T</sup>」  
(Dao Viet Linh, Namiko Gibu, Michiro Tabata, Shunsuke Imai, Akira Hosoyama, Atsushi Yamazoe, Daisuke Kasai, Masao Fukuda)

## 引用文献

1. Tsuchii A, Suzuki T, Takeda K. 1985. Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Appl Environ Microbiol* 50:965-70.
2. Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130.
3. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotechnol* 1:784-791.
4. Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt RM. 2006. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol Lett* 150:179-88.
5. Tsuchii A, Takeda K. 1990. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl Environ Microbiol* 56:269-74.
6. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73.
7. Heisey RM, Papadatos S. 1995. Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3092-3097.
8. Gallert C. 2000. Degradation of latex and of natural rubber by *Streptomyces* strain LA-7. *Systematic and Applied Microbiology* 23:433-441.
9. Watcharaku S, Umsakul K, Hodgson B, Chumeka W, Tanrattanakul V. 2012. Biodegradation of a blended starch/natural rubber foam biopolymer and rubber gloves by *Streptomyces coelicolor* CH13. *Electronic Journal of Biotechnology* 15.
10. Nawong C, Umsakul K, Sermwittayawong N. 2018. Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from soil samples. *Brazilian Journal of Microbiology* 49:481-488.
11. Mooibroek H, Cornish K. 2000. Alternative sources of natural rubber. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:355-365.
12. Hagel JM, Yeung EC, Facchini PJ. 2008. Got milk? The secret life of laticifers. *Trends Plant Sci* 13:631-9.

13. Perumal Venkatachalam NG, Palanivel Sangeetha and Arjunan Thulaseedharan. 2013. Natural rubber producing plants: An overview. *Afr J Biotechnol* 12:1297-1310.
14. Basik AA, Sanglier JJ, Yeo CT, Sudesh K. 2021. Microbial Degradation of Rubber: *Actinobacteria*. *Polymers* 13.
15. Shah AA, Hasan F, Shah Z, Kanwal N, Zeb S. 2013. Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 83:145-157.
16. Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT. 2012. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J Lipid Res* 53:215-26.
17. Yamashita S, Yamaguchi H, Waki T, Aoki Y, Mizuno M, Yanbe F, Ishii T, Funaki A, Tozawa Y, Miyagi-Inoue Y, Fushihara K, Nakayama T, Takahashi S. 2016. Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*. *Elife* 5.
18. Singh AP, Wi SG, Chung GC, Kim YS, Kang H. 2003. The micromorphology and protein characterization of rubber particles in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis* and *Hevea brasiliensis*. *J Exp Bot* 54:985-92.
19. Sando T, Hayashi T, Takeda T, Akiyama Y, Nakazawa Y, Fukusaki E, Kobayashi A. 2009. Histochemical study of detailed laticifer structure and rubber biosynthesis-related protein localization in *Hevea brasiliensis* using spectral confocal laser scanning microscopy. *Planta* 230:215-25.
20. Bouvier F, Rahier A, Camara B. 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* 44:357-429.
21. Abdel-Haleem H, Foster M, Ray D, Coffelt T. 2018. Phenotypic variations, heritability and correlations in dry biomass, rubber and resin production among guayule improved germplasm lines. *Industrial Crops and Products* 112:691-697.
22. Cordoba E, Salmi M, Leon P. 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J Exp Bot* 60:2933-43.
23. Tang C, Yang M, Fang Y, Luo Y, Gao S, Xiao X, An Z, Zhou B, Zhang B, Tan X, Yeang HY, Qin Y, Yang J, Lin Q, Mei H, Montoro P, Long X, Qi J, Hua Y, He Z, Sun M, Li W, Zeng X, Cheng H, Liu Y, Yang J, Tian W, Zhuang N, Zeng R, Li D, He P, Li Z, Zou Z, Li S, Li C, Wang J, Wei D, Lai CQ, Luo W, Yu J, Hu S, Huang H. 2016. The rubber tree genome reveals new insights

- into rubber production and species adaptation. *Nat Plants* 2:16073.
24. Tanaka Y A-HE, Ohya N, Nishiyama N, Tangpakdee J, Kawahara S, Wititsuwannakul R 1996. biosynthesis in *Hevea brasiliensis*: characterization of initiating species by structural analysis. *Phytochemistry* 41:1501-1505.
  25. Gimenez-Dejoo J, Tsunoda K, Fukushima Y, Numata K. 2022. Computational study of the interaction between natural rubber  $\alpha$ -terminal groups and L-quebrachitol, one of the major components of natural rubber. *Polymer Journal* 54:229-233.
  26. Oouchi M, Ukawa J, Ishii Y, Maeda H. 2019. Structural analysis of the terminal groups in commercial *Hevea* natural rubber by 2D-NMR with DOSY filters and multiple-wet methods using ultrahigh-field NMR. *Biomacromolecules* 20:1394-1400.
  27. Liu J, Wu SW, Tang ZH, Lin TF, Guo BC, Huang GS. 2015. New evidence disclosed for networking in natural rubber by dielectric relaxation spectroscopy. *Soft Matter* 11:2290-2299.
  28. Vijayaram TR. 2009. A TECHNICAL REVIEW ON RUBBER. *Int J Des Manuf Tech* 3:25-36.
  29. Priyadarshan PM, SpringerLink. 2017. *Biology of Hevea Rubber*, 1st 2017. ed. Springer International Publishing : Imprint: Springer, Cham.
  30. Kasai D. 2020. Poly(*cis*-1,4-isoprene)-cleavage enzymes from natural rubber-utilizing bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 84:1089-1097.
  31. Hiessl S, Schuldes J, Thürmer A, Halbsguth T, Bröker D, Angelov A, Liebl W, Daniel R, Steinbüchel A. 2012. Involvement of two latex-clearing proteins during rubber degradation and insights into the subsequent degradation pathway revealed by the genome sequence of *Gordonia polyisoprenivorans* strain VH2. *Appl Environ Microbiol* 78:2874-2887.
  32. Basik AA, Nanthini J, Yeo TC, Sudesh K. 2021. Rubber Degrading Strains: *Microtetraspora* and *Dactylosporangium*. *Polymers* 13.
  33. Ibrahim EM, Arenskötter M, Luftmann H, Steinbüchel A. 2006. Identification of poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional *lcp* homologue from *Nocardia farcinica* strain E1. *Appl Environ Microbiol* 72:3375-3382.
  34. Imai S, Ichikawa K, Muramatsu Y, Kasai D, Masai E, Fukuda M. 2011. Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes*, and *Methylibium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Enzyme Microb Technol*

- 49:526-531.
35. Arenskötter M, Baumeister D, Kalscheuer R, Steinbüchel A. 2003. Identification and application of plasmids suitable for transfer of foreign DNA to members of the genus *Gordonia*. *Appl Environ Microbiol* 69:4971-4.
  36. Linos A, Steinbuchel A, Sproer C, Kroppenstedt RM. 1999. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 4:1785-91.
  37. Linos A, Berekaa MM, Reichelt R, Keller U, Schmitt J, Flemming HC, Kroppenstedt RM, Steinbüchel A. 2000. Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Appl Environ Microbiol* 66:1639-45.
  38. Luo Q, Hiessl S, Poehlein A, Steinbüchel A. 2013. Microbial gutta-percha degradation shares common steps with rubber degradation by *Nocardia nova* SH22a. *Appl Environ Microbiol* 79:1140-9.
  39. Bode HB, Kerkhoff K, Jendrossek D. 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules* 2:295-303.
  40. Coenen A, Oetermann S, Steinbuchel A. 2019. Identification of LcpRBA3(2), a novel regulator of *lcp* expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Microbiol Biotechnol* doi:10.1007/s00253-019-09896-8.
  41. Rose K, Tenberge KB, Steinbüchel A. 2005. Identification and characterization of genes from *Streptomyces* sp. strain K30 responsible for clear zone formation on natural rubber latex and poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber degradation. *Biomacromolecules* 6:180-188.
  42. Birke J, Rother W, Jendrossek D. 2015. Latex clearing protein (Lcp) of *Streptomyces* sp. strain K30 is a *b*-type cytochrome and differs from rubber oxygenase A (RoxA) in its biophysical properties. *Appl Environ Microbiol* 81:3793-3799.
  43. Birke J, Jendrossek D. 2014. Rubber oxygenase and latex clearing protein cleave rubber to different products and use different cleavage mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 80:5012-5020.
  44. Yikmis M, Steinbüchel A. 2012. Importance of the latex-clearing protein (Lcp) for poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber cleavage in *Streptomyces* sp. K30. *Microbiologyopen* 1:13-24.
  45. Yikmis M, Arenskötter M, Rose K, Lange N, Wernsmann H, Wiefel L, Steinbüchel A. 2008.



- Secretion and transcriptional regulation of the latex-clearing protein, Lcp, by the rubber-degrading bacterium *Streptomyces* sp. strain K30. *Appl Environ Microbiol* 74:5373-5382.
46. Hiessl S, Böse D, Oetermann S, Eggers J, Pietruszka J, Steinbüchel A. 2014. Latex clearing protein-an oxygenase cleaving poly(*cis*-1,4-Isoprene) rubber at the *cis* double bonds. *Appl Environ Microbiol* 80:5231-5240.
  47. Oetermann S, Vivod R, Hiessl S, Hogeback J, Holtkamp M, Karst U, Steinbüchel A. 2018. Histidine at position 195 is essential for association of Heme-*b* in Lcp1<sub>VH2</sub>. *Earth Systems and Environment* 2:5-14.
  48. Watcharakul S, Rother W, Birke J, Umsakul K, Hodgson B, Jendrossek D. 2016. Biochemical and spectroscopic characterization of purified Latex Clearing Protein (Lcp) from newly isolated rubber degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain RPK1 reveals novel properties of Lcp. *BMC Microbiol* 16:92.
  49. Vivod R, Andler R, Oetermann S, Altenhoff AL, Seipel N, Holtkamp M, Hogeback J, Karst U, Steinbüchel A. 2019. Characterization of the latex clearing protein of the poly(*cis*-1,4-isoprene) and poly(*trans*-1,4-isoprene) degrading bacterium *Nocardia nova* SH22a. *J Gen Appl Microbiol* 65:293-300.
  50. Röther W, Austen S, Birke J, Jendrossek D. 2016. Cleavage of rubber by the latex clearing protein (Lcp) of *Streptomyces* sp. strain K30: Molecular Insights. *Appl Environ Microbiol* 82:6593-6602.
  51. Ilcu L, Rother W, Birke J, Brausemann A, Einsle O, Jendrossek D. 2017. Structural and functional analysis of latex clearing protein (Lcp) provides insight into the enzymatic cleavage of rubber. *Sci Rep* 7:6179.
  52. Birke J, Röther W, Schmitt G, Jendrossek D. 2013. Functional identification of rubber oxygenase (RoxA) in soil and marine *Myxobacteria*. *Appl Environ Microbiol* 79:6391-6399.
  53. Birke J, Röther W, Jendrossek D. 2017. RoxB Is a novel type of rubber oxygenase that combines properties of rubber oxygenase RoxA and latex clearing protein (Lcp). *Appl Environ Microbiol* 83.
  54. Seidel J, Schmitt G, Hoffmann M, Jendrossek D, Einsle O. 2013. Structure of the processive rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:13833-13838.
  55. Braaz R, Fischer P, Jendrossek D. 2004. Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-isoprene). *Appl Environ Microbiol* 70:7388-7395.

56. Schmitt G, Seiffert G, Kroneck PM, Braaz R, Jendrossek D. 2010. Spectroscopic properties of rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp., a new type of dihaem dioxygenase. *Microbiology* 156:2537-2548.
57. Birke J, Röther W, Jendrossek D. 2018. *Rhizobacter gummiphilus* NS21 has two rubber oxygenases (RoxA and RoxB) acting synergistically in rubber utilisation. *Appl Microbiol Biotechnol* doi:10.1007/s00253-018-9341-6.
58. Sharma V, Siedenburg G, Birke J, Mobeen F, Jendrossek D, Prakash T. 2018. Metabolic and taxonomic insights into the Gram-negative natural rubber degrading bacterium *Steroidobacter cummioxidans* sp. nov., strain 35Y. *PLoS One* 13:e0197448.
59. Kasai D, Imai S, Asano S, Tabata M, Iijima S, Kamimura N, Masai E, Fukuda M. 2017. Identification of natural rubber degradation gene in *Rhizobacter gummiphilus* NS21. *Biosci Biotechnol Biochem* 81:614-620.
60. Bode HB, Kerkhoff K, Jendrossek D. 2000. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules* 2:295-303.
61. Rose K, Steinbüchel A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 71:2803-12.
62. Luo Q, Hiessl S, Poehlein A, Daniel R, Steinbüchel A. 2014. Insights into the microbial degradation of rubber and gutta-percha by analysis of the complete genome of *Nocardia nova* SH22a. *Appl Environ Microbiol* 80:3895-3907.
63. Oetermann S, Jongtsma R, Coenen A, Keller J, Steinbüchel A. 2019. LcpR<sub>VH2</sub> - regulating the expression of latex-clearing proteins in *Gordonia polyisoprenivorans* VH2. *Microbiology-Sgm* 165:343-354.
64. de Witt J, Oetermann S, Parise M, Parise D, Baumbach J, Steinbüchel A. 2020. Global regulator of rubber degradation in *Gordonia polyisoprenivorans* VH2: Identification and involvement in the regulation network. *Applied and Environmental Microbiology* 86.
65. Cuthbertson L, Ahn SK, Nodwell JR. 2013. Deglycosylation as a Mechanism of Inducible Antibiotic Resistance Revealed Using a Global Relational Tree for One-Component Regulators. *Chemistry & Biology* 20:232-240.
66. Cuthbertson L, Nodwell JR. 2013. The TetR Family of Regulators. *Microbiology and Molecular*

Biology Reviews 77:440-475.

67. Vivod R, Oetermann S, Hiessl S, Gutsche S, Remmers N, Meinert C, Voigt B, Riedel K, Steinbuchel A. 2017. Oligo(*cis*-1,4-isoprene) aldehyde-oxidizing dehydrogenases of the rubber-degrading bacterium *Gordonia polyisoprenivorans* VH2. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:7945-7960.
68. Linh DV, Huong NL, Tabata M, Imai S, Iijima S, Kasai D, Anh TK, Fukuda M. 2017. Characterization and functional expression of a rubber degradation gene of a *Nocardia* degrader from a rubber-processing factory. *J Biosci Bioeng* 123:412-418.
69. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Clement C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80:1.
70. Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE, Alderson G. 1985. Menaquinone composition of mycolic acid-containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. *J Appl Bacteriol* 58:77-86.
71. Aboelkheir MG, Bedor PB, Leite SG, Pal K, Toledo RD, de Souza FG. 2019. Biodegradation of Vulcanized SBR: A Comparison between *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptomyces* sp. *Scientific Reports* 9.
72. Hu MH, Zhao SH, Li C, Wang BW, Fu YQ, Wang YQ. 2016. Biodesulfurization of vulcanized rubber by enzymes induced from *Gordonia amicalisa*. *Polymer Degradation and Stability* 128:8-14.
73. Ghavipankeh F, Rad ZZ, Pazouki M. 2018. Devulcanization of Ground Tires by Different Strains of Bacteria: Optimization of Culture Condition by Taguchi Method. *Journal of Polymers and the Environment* 26:3168-3175.
74. Araki N, Suzuki T, Miyauchi K, Kasai D, Masai E, Fukuda M. 2011. Identification and characterization of uptake systems for glucose and fructose in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J Mol Microb Biotech* 20:125-36.
75. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 44:6614-24.
76. Richter M, Rossello-Mora R, Oliver Glockner F, Peplies J. 2016. JSpeciesWS: a web server for

- prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32:929-31.
77. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, Cook H, Heller D, Walter MC, Rattei T, Mende DR, Sunagawa S, Kuhn M, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. 2016. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res* 44:D286-93.
  78. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-6.
  79. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:W465-9.
  80. van Keulen G, Dyson PJ. 2014. Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Adv Appl Microbiol* 89:217-66.
  81. Tong SYC, Schaumburg F, Ellington MJ, Corander J, Pichon B, Leendertz F, Bentley SD, Parkhill J, Holt DC, Peters G, Giffard PM. 2015. Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp nov and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:15-22.
  82. Land M, Lapidus A, Mayilraj S, Chen F, Copeland A, Del Rio TG, Nolan M, Lucas S, Tice H, Cheng JF, Chertkov O, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Rohde M, Goker M, Pati A, Ivanova N, Mavromatis K, Chen A, Palaniappan K, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CC, Brettin T, Detter JC, Han C, Chain P, Tindall BJ, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP. 2009. Complete genome sequence of *Actinosynnema mirum* type strain (101). *Stand Genomic Sci* 1:46-53.
  83. Watcharakul S, Rother W, Birke J, Umsakul K, Hodgson B, Jendrossek D. 2016. Biochemical and spectroscopic characterization of purified Latex clearing protein (Lcp) from newly isolated rubber degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain RPK1 reveals novel properties of Lcp. *BMC Microbiol* 16:92.
  84. Sharp JO, Sales CM, LeBlanc JC, Liu J, Wood TK, Eltis LD, Mohn WW, Alvarez-Cohen L. 2007. An inducible propane monooxygenase is responsible for *N*-nitrosodimethylamine degradation

- by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Appl Environ Microbiol 73:6930-6938.
85. van der Geize R, Hessels GI, van Gerwen R, van der Meijden P, Dijkhuizen L. 2001. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. FEMS Microbiol Lett 205:197-202.
  86. Cappelletti M, Presentato A, Piacenza E, Firrincieli A, Turner RJ, Zannoni D. 2020. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. Appl Microbiol Biotechnol 104:8567-8594.
  87. Seto M, Kimbara K, Shimura M, Hatta T, Fukuda M, Yano K. 1995. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Appl Environ Microbiol 61:3353-8.
  88. Gibu N, Kasai D, Ikawa T, Akiyama E, Fukuda M. 2019. Characterization and Transcriptional Regulation of *n*-Alkane Hydroxylase Gene Cluster of *Rhodococcus jostii* RHA1. Microorganisms 7.
  89. Gibu N, Arata T, Kuboki S, Linh DV, Fukuda M, Steinbuchel A, Kasai D. 2020. Characterization of the genes responsible for rubber degradation in *Actinoplanes* sp. strain OR16. Appl Microbiol Biotechnol 104:7367-7376.
  90. Jiao S, Yu H, Shen Z. 2018. Core element characterization of *Rhodococcus* promoters and development of a promoter-RBS mini-pool with different activity levels for efficient gene expression. N Biotechnol 44:41-49.