

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870731

研究課題名(和文) イオン液体耐性細菌のゲノム解読と耐性機構の解明、有用酵素の開発

研究課題名(英文) Genome sequence of an ionic liquid-tolerant bacteria and exploration of ionic liquid-tolerant enzyme

研究代表者

倉田 淳志 (KURATA, Atsushi)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：10416000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イオン液体は常温で液体の有機塩であり、既存の水系・有機系溶媒に換わって生体触媒の新たな反応溶媒として注目される。しかしイオン液体による細菌宿主の生育阻害や酵素の失活が問題であり、解決策が模索されている。

本研究では、親水性イオン液体[BMIM][Cl]耐性*Bacillus amyloliquefaciens* CMW1を発見した。10% (631 mM) [BMIM][Cl]で多くの細菌は生育できないが、本菌株は良好に生育した。ゲノムDNAを解読して、細菌のイオン液体耐性に関連する遺伝子を推定した。本菌株のプロテアーゼは各種イオン液体に耐性を示し、塩耐性、アルカリ耐性、有機溶媒耐性をも示した。

研究成果の概要(英文)：Ionic liquids are various kinds of molten organic salts, which are composed of a bulky asymmetric cation and a small anion. Extensive studies of biocatalytic reactions using ionic liquids have been carried out. An ionic liquid [BMIM][Cl] improved the digestibility of biomasses but was toxic to the bacteria. [BMIM][Cl] deactivated various enzymes. Therefore, there exists demand for a [BMIM][Cl]-tolerant bacterial host and an enzyme. In this study, *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 was isolated from a Japanese fermented soybean paste. Strain CMW1 grows in the presence of 10% (v/v, 631 mM) [BMIM][Cl], which inhibits the growth of various microorganisms. The genome sequence of strain CMW1 was determined and allowed for characterization of the molecular mechanism of the ionic liquid tolerance. A protease from strain CMW1 functioned in various hydrophilic and hydrophobic ionic liquids, and exhibited tolerance to ionic liquid and halo, alkaline, and organic solvents.

研究分野：応用微生物学

キーワード：イオン液体 *Bacillus* 属細菌 イオン液体耐性細菌 浸透圧ストレス ゲノム解析 次世代シーケンサー  
イオン液体耐性酵素 プロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

20%以上の高塩濃度環境は、通常の微生物には殺菌的な環境であり、自然界には塩湖などに存在する。耐塩性細菌はこの特殊な環境で生育する。我々は特殊な環境の細菌を活用して、物質変換技術を開発してきた[1, 2]。

イオン液体は常温で液体の有機塩であり、アニオンとカチオンから構成される。イオン液体は不燃性・不揮発性を示し、親水性と疎水性イオン液体に分類できる。リサイクル系の構築が容易でありグリーンケミストリーの実現に寄与できる。既存の水系・有機系溶媒に換わる新たな溶媒として注目されており、イオン液体を溶媒として化学製品群、医薬品などの生産技術が開発されつつある[3]。

これまでに我々は、疎水性イオン液体 1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([BMIM][NTf<sub>2</sub>], Fig.1 (B))を溶媒として、抗ガン作用を示す 3-Cyclohexylpropyl caffeate の酵素生産系を開発した[4]。一方、親水性イオン液体を用いた場合、多様な酵素の失活、細菌の生育阻害を見だし、生産系に利用できるイオン液体と酵素や微生物の組み合わせに制限があることを示した[5]。そこで、イオン液体耐性細菌の生産する酵素の特性解明、耐性細菌を利用した物質変換技術の開発を目的として研究を開始した。親水性イオン液体として 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl] Fig.1 (A))を用いた。[BMIM][Cl]は、セルロースやケラチン等の難水溶性バイオマスの溶解に用いられる[6]。

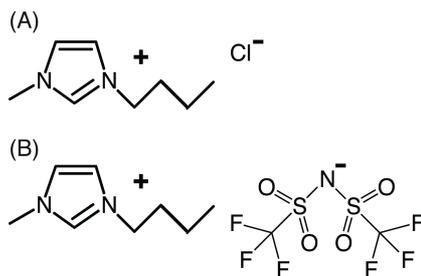


Fig. 1. イオン液体の構造

イオン液体は、様々なカチオンとアニオンを組み合わせる構成される。(A)親水性イオン液体 [BMIM][Cl]、(B)疎水性イオン液体 [BMIM][NTf<sub>2</sub>]

## 2. 研究の目的

親水性イオン液体を溶媒に用いた有用物質の生産技術が注目されているが、親水性イオン液体は酵素を失活させて細菌の生育を阻害するため、親水性イオン液体の利用には困難がある。そうした中、申請者は独自にイオン液体耐性酵素を生産するイオン液体耐性 *Bacillus* 属細菌を発見した。本研究ではこの菌株を用いて、細菌と酵素のイオン液体耐性機構を解明し、耐性酵素を開発する。具体的に (1) イオン液体耐性 *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 のゲノム DNA 解

読、(2)ゲノム情報を活用したイオン液体耐性酵素の開発、(3)酵素のイオン液体耐性機構の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) [BMIM][Cl]耐性細菌のスクリーニング  
海水や土壌、塩田、塩分を含む発酵食品サンプル (合計 60 種類)を単離源に、10% (v/v, 631 mM) [BMIM][Cl] 添加培地を用いて 37°C で 1 週間程度、集積培養を行った。得られた菌株は 10% [BMIM][Cl] 添加培地で培養した後、菌体を -80°C で保存した。

(2) イオン液体耐性 *Bacillus* 属細菌のゲノム DNA の解読

本菌株からゲノム DNA を抽出して、次世代シーケンサー (Mi-Seq, Illumina)によりゲノム DNA の解読を試みた。paired-end リードと mate-paired リードを得た後、Newbler を用いてアセンブルを行った。その後、GenoFinisher と AceFileViewer を用いて、ギャップクローズを行った。遺伝子予測や機能のアノテーションには Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP, <http://www.migap.org>)を用いて、mRNA、tRNA、rRNA を推定した。

(3) イオン液体耐性プロテアーゼの精製

全ゲノム解読の結果、本菌株から幾つかのプロテアーゼ遺伝子を同定できた。10% [BMIM][Cl] 添加培地で *B. amyloliquefaciens* CMW1 を培養した結果、この培養液上清中にプロテアーゼ (BapIL) 活性を検出できた。各種カラムワークにより BapIL の精製を試みた。精製酵素画分を用いて N 末端アミノ酸配列の決定を行い、遺伝子を探索した。精製画分を用いて各種イオン液体存在下での安定性を試験して、耐塩性、アルカリ耐性、各種有機溶媒耐性を検討した。

## 4. 研究成果

(1) [BMIM][Cl]耐性細菌のスクリーニング  
60 種類の海水や土壌、塩分を含む食品サンプルを単離源として [BMIM][Cl] 添加培地を用いた結果、10% (v/v) [BMIM][Cl] 存在下で生育する *B. amyloliquefaciens* CMW1 (Fig. 2)と *Staphylococcus cohnii* FSW1 を、京都味噌とくさや漬け汁からそれぞれ見いだした。1% [BMIM][Cl] 存在下では *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* は生育しなかった。これまで親水性イオン液体 1-Ethyl-3-methylimidazolium chloride ([EMIM][Cl]) 耐性細菌として *Enterobacter lignolyticus* SCF1 が報告されており、この菌株は 10% [EMIM][Cl] 存在下で良好に生育した[7]。以上から、*B. amyloliquefaciens* CMW1 と *S. cohnii* FSW1 は新奇 [BMIM][Cl]耐性細菌であった。

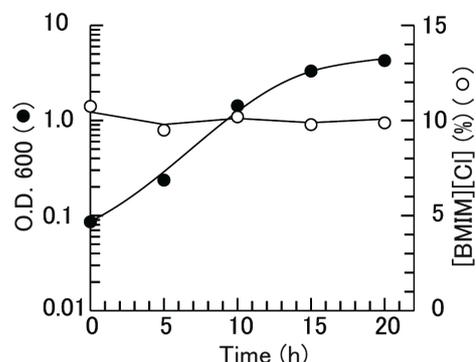


Fig. 2. [BMIM][Cl] 添加培地での *B. amyloliquefaciens* CMW1 の生育 (○)、培地中の[BMIM][Cl] 濃度 (●)。1% [BMIM][Cl] 存在下では *E. coli* や *B. subtilis* の生育を確認できなかった。

### (2) イオン液体耐性 *Bacillus* 属細菌のゲノム DNA の解読

得られた paired-end リード(930,000 本) と mate-paired リード (460,000 本) から scaffolds (8 本, 3,908,571 bp) を得た。Scaffolds 4 (61,368 bp) は、自己環化できたため、プラスミドであった。染色体 DNA は 3,847,203 bp であった。アノテーションの結果、タンパク質コード遺伝子(9,175 個)、rRNA 遺伝子(1 個)、tRNA 遺伝子(1,022 個)を見いだした。

### (3) イオン液体耐性酵素の諸性質

本菌株が培養液中に生産したプロテアーゼ (BapIL) を精製して、本酵素遺伝子 (1149 bp) を同定した。精製画分を用いて諸性質を検討した。10%イオン液体 (親水性イオン液体; [BMIM][Cl]、[BMIM][BF<sub>4</sub>]、[BMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]、[EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]、疎水性イオン液体[BMIM][PF<sub>6</sub>]、[BMIM][NTf<sub>2</sub>]) を酵素反応液に添加したところ、BapIL は 40%以上の活性を示した。本酵素は、80% 各種イオン液体存在下で失活しなかった (Fig. 2)。 *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 由来エンドグルカナーゼ (16% [BMIM][Cl] 存在下で 54% の活性を示す [8])、*B. amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼ (10% (v/v) [BMIM][Cl] 存在下で 70% の活性を示す [9]) が報告されている。BapIL は 15% [BMIM][Cl] 存在下で 35% の活性を示すイオン液体耐性酵素であった。

イオン液体は、塩および有機溶媒としての性質を持つため、本酵素を用いて耐塩性と有機溶媒耐性について検討した。BapIL は、23.4% (w/v) NaCl 存在下で失活せず、17.5% (w/v) NaCl 存在下で 32% の活性を示した。BapIL は、各種の親水性有機溶媒存在下では 17%以上の活性を示した。一方、疎水性有機溶媒存在下で、49%以上の活性を示した。アルカリ条件下でも高い安定性を示した。

BapIL はイオン液体耐性、アルカリ耐性、耐塩性、有機溶媒耐性を示した。イオン液体

は極性と非極性の官能基を持つ有機塩である。イオン液体耐性酵素は、疎水性・親水性化合物に耐性を示し、高塩濃度存在下でも安定であった。

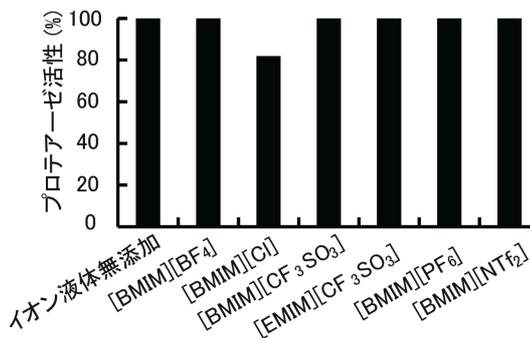


Fig. 3. BapIL のイオン液体耐性 80%各種イオン液体中で酵素を静置して、残存活性を測定した。

### (4) グラム陽性細菌のイオン液体耐性機構

*E. lignolyticus* SCF1 の[EMIM][Cl]耐性機構として浸透圧耐性機構が推定され、グリシンベタイン/プロリン ABC トランスポーター遺伝子や、プロリン生合成系の酵素遺伝子の関与が示唆されている [7]。これらの遺伝子は *B. amyloliquefaciens* CMW1 のゲノム DNA 中にも発見できた。スキムミルクをタンパク質源に用いて、本菌株の[BMIM][Cl]耐性を検討した結果、10% [BMIM][Cl]添加培地にスキムミルクを加えたところ本菌株は生育したが、スキムミルク無添加条件下では生育しなかった。CMW1 株の[BMIM][Cl]耐性機構に浸透圧耐性で作用する遺伝子が関与していると推定できた。

### <引用文献>

- 1 Kurata A, Kurihara T, Kamachi H, Esaki N. J Biol Chem, 2005, 280:20286-20291.
- 2 Kurata A, Fujita M, Mowafy AM, Kamachi H, Kurihara T, Esaki N. J Biosci Bioeng, 2008, 105:429-431.
- 3 Cull SG, Holbrey JD, Vargas-Mora V, Seddon KR, Lye GJ. Biotechnol Bioeng, 2000, 69:227-233.
- 4 Kurata A, Fujita T, Kishimoto N. Applications of Ionic Liquids in Science and Technology, 2011, 22-44.
- 5 Kurata A, Kitamura Y, Irie S, Takemoto S, Akai Y, Hirota Y, Fujita T, Iwai K, Furusawa M, Kishimoto N. J Biotechnol, 2010, 148:133-138.
- 6 Abe M, Ohno H. Production of Biofuels and Chemicals with Ionic Liquids, 2014, 29-59.
- 7 Khudyakov JI, D'Haeseleer P, Borglin SE, Deangelis KM, Woo H, Lindquist EA, Hazen TC, Simmons BA, Thelen MP. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012,

109:E2173-2182.

- 8 Liang C, Xue Y, Fioroni M, Rodríguez-Ropero F, Zhou C, Schwaneberg U, Ma Y. Appl Microbiol Biot, 2011, 89:315-326.
- 9 Dabirmanesh B, Daneshjou S, Sepahi AA, Ranjbar B, Khavari-Nejad RA, Gill P, Heydari A, Khajeh K. Int J Biol Macromol, 2011, 48:93-97.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

- 1 Kurata A, Yamaura Y, Tanaka T, Kato C, Nakasone K, Kishimoto N. Antifungal peptidic compound from the deep-sea bacterium *Aneurinibacillus* sp. YR247. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 査読有, 33(4), 73, 2017. <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-017-2239-0>
- 2 Kurata A, Senoo H, Ikeda Y, Kaida H, Matsuhara C, Kishimoto N. Properties of an ionic liquid-tolerant *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 and its extracellular protease. Extremophiles. 査読有, 20(4), 415-424, 2016. <http://link.springer.com/article/10.1007/s00792-016-0832-z>
- 3 Kurata A, Hirose Y, Misawa N, Wakazuki S, Kishimoto N, Kobayashi T. Complete genome sequence of the xylan-degrading subseafloor bacterium *Microcella alkaliphila* JAM-AC0309. Journal of biotechnology. 査読有, 221, 32-33, 2016. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616300281>
- 4 Kurata A, Hirose Y, Misawa N, Hurunaka K, Kishimoto N. Draft genome sequence of the ionic liquid-tolerant bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1. Genome announcements. 査読有, 2(5), e01051-14, 2014. <http://genomea.asm.org/content/2/5/e01051-14.short>
- 5 Kurata A, Nishimura M, Kishimoto N, Kobayashi T. Draft genome sequence of a deep-sea bacterium, *Bacillus niacini* strain JAM F8, involved in the degradation of glycosaminoglycans. Genome announcements. 査読有, 2(5), e00983-14, 2014. <http://genomea.asm.org/content/2/5/e00983-14.short>

[学会発表](計 21 件)

- 1 山口大志, 吉良将顕, 古中康平, 倉田淳志, 岸本憲明. *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 由来の推定ペプチド遺伝子の異種発現と抗菌活性の検討. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 30 日, 北海道札幌市.
- 2 倉田淳志, 妹尾文哉, 池田泰之, 貝田英明, 古中康平, 岸本憲明. イオン液体耐性細菌とイオン液体耐性酵素の特性解明, 極限環境生物学会 2015 年度(第 16 回)年会, 2015 年 11 月 8 日, 東京都港区.
- 3 山口大志, 倉田淳志, 岸本憲明. イオン液体耐性プロテアーゼの特性とイオン液体耐性細菌のゲノム解読. 第 62 回日本生化学会近畿支部例会, 2015 年 5 月 16 日, 滋賀県草津市.
- 4 倉田淳志, 妹尾文哉, 松原千明, 池田泰之, 貝田英彰, 岸本憲明. 特殊環境微生物のゲノム解析と有用遺伝子の探索, 第 19 回関西大学先端科学技術シンポジウム. 2015 年 1 月 23 日, 大阪府吹田市.
- 5 Kurata A, Ikeda Y, Kaida H, Hurunaka K, Hirose Y, Kishimoto N. Properties of an ionic liquid tolerant enzyme and genome analysis of an ionic liquid tolerant bacterium. Institute for Chemical Research International Symposium 2014 "The Science and Technology of Smart Materials", 2014 年 3 月 10 日, Uji, Japan.

[その他]

ホームページ等

- 1 *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 のゲノムプロジェクト  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=Bacillus+CMW1>
- 2 *Bacillus niacini* JAM-F8 のゲノムプロジェクト  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/258601>
- 3 *Microcella alkaliphila* JAM-AC0309 のゲノムプロジェクト  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/308978>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 淳志 (KURATA, Atsushi)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号: 10416000