

平成 25 年度 研究経過報告書

研究者名

倉田 淳志

研究課題名

次世代シーケンサーを活用したホワイトバイオテクノロジーの基盤構築

研究目的・内容

イオン液体は常温常圧で液体の有機塩であり、セルロースやケラチンなど難水溶性バイオマスを溶解できる。そのため、イオン液体と生体触媒（酵素や微生物）を利用した有用物質生産系の開発は、グリーンケミストリーの実現に寄与する。本研究では、独自にイオン液体耐性細菌を発酵食品から見いだしている。そこで本菌株のゲノム DNA を解読して、イオン液体酵素遺伝子の探索を試みた。

研究の経過

化石資源に依存しない化学製品群の生産系において、バイオマス利用技術の開発は必須である。有機塩の一種であるイオン液体は、アニオンとカチオンの組み合わせを変化させることで、親水性・疎水性を示す。親水性イオン液体はセルロースやケラチンなどの難水溶性バイオマスを溶解できるため、バイオマス利用技術に応用されつつある。親水性イオン液体は有用性が高いが、親水性イオン液体中では多くの酵素は変性して失活する。さらに親水性イオン液体存在下では *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* の生育は阻害される。現在、親水性イオン液体に耐性を示す微生物や酵素の開発が期待されている。

本研究では、イオン液体と利用できる細菌や酵素の開発を目的としている。すでにイオン液体耐性 *Bacillus* 属細菌を発酵食品から見だし、さらにイオン液体耐性を示すプロテアーゼの諸性質を解明しつつある。そこで今年度は、イオン液体耐性 *Bacillus* 属細菌のゲノム DNA の解読、プロテアーゼ遺伝子の同定を試みた。

具体的には、以下の①～③に記載した。

1. 分析用ゲノム DNA の調製

独自に見いだしたイオン液体耐性 *Bacillus sp.* CMW1 を、親水性イオン液体添加培地で培養して菌体（湿重量 61.4 mg）を得た。得られた菌体から 238 ng/μl ゲノム DNA 500 μl を得られたが、タンパク質の混入が認められたため、ゲノム DNA の再精製を行い、次世代シーケンサー分析用のゲノム DNA を調製した。

2. 次世代シーケンサーを用いたゲノム DNA の塩基配列の決定、アセンブル

①で調製した再精製を行ったゲノム DNA を用いて、次世代シーケンサー（Miseq、Illumina）によりゲノム DNA 全塩基配列の解読を行った。まず DNA ライブラリ（Paired end library、Mate-paired Library）を構築して、139 万本のコンティグ（295 Mbp）の塩基配列を決定した。その後、newbler を用いてコンティグ配列のアセンブルを行い、8 本のスキャフォールド（3.9 Mbp）を構築できた。ゲノム DNA のカバー率は 76 倍であった。世界に先駆けてイオン液体耐性グラム陽性細菌のド

ラフトゲノムを決定した。

3. ゲノム DNA のアノテーションとイオン液体耐性プロテアーゼ遺伝子の同定

スキャフォールド (3.9 Mbp) を用いて、本菌株のゲノム DNA の local BLAST データベースを構築し、親水性イオン液体耐性酵素遺伝子の探索を試みた。本酵素を精製して N 末端アミノ酸配列 AQSVPYGVVSQIKAP を決定した。このアミノ酸配列を用いて、独自の local BLAST データベースに対して、tBlastN 検索を行った。その結果、スキャフォールド 1 に、N 末端アミノ酸配列を有する酵素遺伝子 (1767611 bp) を見いだした。さらに本酵素遺伝子上流に、転写に關与する-35 領域や-10 領域、翻訳に關与する SD 配列を見いだした。一方、本酵素遺伝子下流に転写終結部位を見いだした。

以上①～③から親水性イオン液体耐性細菌 *Bacillus sp.* CMW1 のドラフトゲノムを解読し、親水性イオン液体耐性酵素を見いだした。現在、ゲノム DNA の解析から、さらに有用酵素遺伝子を見いだしている。

研究成果について、現在、投稿論文を作成中である。

本研究と関連した今後の研究計画

近年、有用物質生産を目的として、イオン液体を反応溶媒としたバイオプロセスの開発が行われている (Curr. Org. Chem., 2009, 13, (13), 1242-1258)。生体触媒を用いる変換反応は、高い変換率を示す点、反応条件が室温付近である点、優れた立体選択性を示す点など、一般的な化学反応と異なる特徴を示す。イオン液体に耐性を示す微生物を利用したバイオプロセスの開発が望まれているが、現在、イオン液体に耐性を示す微生物の報告はほとんどない。本研究では、イオン液体耐性細菌を見いだしており、さらに本菌株のドラフトゲノムを解読して、有用酵素遺伝子を見いだした。

今後は、得られた遺伝情報を元に、多様な親水性イオン液体耐性酵素の開発を試みる。具体的には、親水性イオン液体は、セルロースやキチンなど難分解性多糖も溶解できる。一方、疎水性イオン液体は非極性溶媒であるため、リパーゼを用いた合成反応が可能である。本研究で見いだした細菌は、親水性・疎水性イオン液体に耐性を示し、難分解性タンパク質を分解できる *Bacillus* 属細菌であった。次世代シーケンサーを用いて、本菌株のゲノム DNA の塩基配列を決定できたため、セルラーゼやキチナーゼ、リパーゼ等の有用遺伝子を探索して、酵素の発現系を構築して、各酵素のイオン液体耐性を検討する。

(平成 26 年 3 月 31 日現在)