

農学部特別研究費

平成 24 年度 研究経過報告書

研究者名

倉田 淳志

研究課題名

極限環境微生物由来の酵素の安定化機構の解明、耐性酵素の開発

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溶解できる。そのため、イオン液体と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、極限環境から好塩性・耐塩性細菌を探索して、親水性イオン液体存在下で利用できる酵素の開発を目的とした。

研究の経過

イオン液体を用いた酵素反応や微生物変換系については多くの報告があり、親水性イオン液体[BMIM][Cl]存在下では微生物は生育せず、酵素は失活することが報告されている。しかし本研究では、10% [BMIM][Cl]存在下で良好に生育する *Staphylococcus* 属細菌や *Bacillus* 属細菌を、高塩分濃度の発酵食品から見いだしている。さらにこれらの細菌の培養液上清からそれぞれリパーゼ活性やプロテアーゼ活性を見いだした。特に *Bacillus* sp. CMW1 由来プロテアーゼは、[BMIM][Cl]存在下で高い活性を示した。

そこで今年度は、プロテアーゼの精製を試みた。続いて、得られた精製酵素画分を用いて、酵素の諸性質を明らかにした。各種イオン液体を用いて、酵素の安定性、酵素反応への影響を検討した。さらに、難水溶性基質を用いて、酵素活性を検討した。具体的には、以下の①～④に記載した。

1. 粗酵素画分を用いた酵素安定性の検討、酵素活性の検出

Bacillus sp. CMW1 由来の粗酵素画分を用いたところ、本酵素は 80% [BMIM][Cl] 存在下でも安定であった。10% [BMIM][Cl] 存在下でも酵素活性を示し、本酵素は、[BMIM][Cl]耐性酵素であることを示した。

2. 酵素の精製条件の確立

硫酸濃縮、疎水性カラムクロマトグラフィー、親水性カラムクロマトグラフィーを用いて、本酵素を電気泳動的に均一に精製できた。SDS-PAGE の結果、本酵素は 27 kDa であった。

3. 酵素の諸性質の検討

精製酵素を用いて、酵素の諸性質を検討した。本酵素反応の最適 pH は 8.0-9.0 であった。最適反応温度は 55℃ であり、CaCl₂ の添加により 65℃ となった。本酵素は、pH 4.0-12.5 で安定であった。10% [BMIM][Cl] 存在下では本酵素反応は 45% の活性を示した。さらに、N 末端アミノ酸配列を検討したところ、本酵素は subtilisin 型アルカリセリンプロテアーゼと相同性を示した。

4. 精製酵素を用いたイオン液体の影響の検討

10% [BMIM][Cl] 存在下では、本酵素は 45% の活性を示した。精製酵素を用いて酵素安定性を検討したところ、80% [BMIM][Cl] 存在下まで安定であり、本酵素は [BMIM][Cl] 耐性酵素であった。さらに、本酵素は、10%NaCl 存在下で 34%の活性を示し、23% NaCl 存在下まで安定であったことから、耐塩性酵素であった。

ほとんどの酵素は、疎水性イオン液体存在下で活性を示すが、親水性イオン液体存在下で失活する。*Bacillus* sp. CMW1 由来のプロテアーゼを用いて、親水性イオン液体[BMIM][Cl]、[BMIM][BF₄]、[EMIM][CF₃SO₃]、[BMIM][CF₃SO₃]、疎水性イオン液体[BMIM][PF₆]、[BMIM][NTf₂]存在下での活性を検討したところ、全てのイオン液体存在下で活性を示した。本酵素は、難水溶性タンパク質であるコラーゲンにも作用した。

以上のように、本年度は、イオン液体耐性菌 *Bacillus* sp. CMW1 の生産するプロテアーゼを用いて、イオン液体への耐性を検討した。その結果、ほとんどの酵素が失活する条件でも、本酵素は活性を示すことを明らかにした。本酵素は、難水溶性バイオマスへの利用を期待できる。

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、親水性イオン液体存在下で活性を示すプロテアーゼを取得した。

今後は、プロテアーゼの大量生産系を構築して、難水溶性タンパク質分解系の構築を試みる。具体的には、以下の①～④を実施する。

1. 酵素遺伝子の取得

相同性を示した酵素のアミノ酸配列に基づいて、縮重プライマーを設計する。縮重プライマーを用いて、PCR により酵素遺伝子の増幅を試みる。

2. 組み換え大腸菌を用いたプロテアーゼ生産系の構築

組み換え大腸菌を用いて、プロテアーゼ遺伝子を発現させて、[BMIM][Cl]耐性プロテアーゼの生産系を構築する。

3. 組み換え酵素を用いた難水溶性バイオマス変換系の構築

本プロテアーゼは、難水溶性タンパク質に作用した。組み換え酵素を大量に用いて難水溶性タンパク質の分解系を構築することで、未利用である難水溶性タンパク質の利用技術を開発する。

4. ゲノム情報を用いた親水性イオン液体耐性酵素の探索

親水性イオン液体は、セルロースやキチンなどの多糖を溶解できる。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、タンパク質分解性 *Bacillus* 属細菌であった。そこで、次世代シーケンサーを用いて、本菌株のゲノム DNA の塩基配列を決定し、セルラーゼやキチナーゼ、リパーゼ等の有用遺伝子の探索を試みる。

(平成 25 年 3 月 31 日現在)