

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07736

研究課題名(和文) イオン液体耐性菌の耐性機構の解明と新奇微生物プラットフォームの開発

研究課題名(英文) Elucidation of an ionic-liquid resistance mechanism of an ionic-liquid resistant bacterium and development of a novel microbial platform

研究代表者

倉田 淳志 (Kurata, Atsushi)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：10416000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イオン液体は、生体触媒の新たな反応溶媒として注目される。しかし親水性・疎水性イオン液体による細菌の生育阻害が問題であり、解決策が模索されている。本研究では、独自に単離したイオン液体耐性菌 *Bacillus* sp. CMW1 を用いて、イオン液体耐性に関わる遺伝子を解明して、イオン液体耐性に優れた細菌宿主の開発を目的とした。

その結果、本菌株のイオン液体耐性には、多剤排出トランスポーター遺伝子が関与することを見いだした。本遺伝子を *Brevibacillus* 属細菌に導入して、イオン液体耐性に優れた細菌宿主を構築できた。CMW1 株の形質転換系を構築して、疎水性イオン液体耐性に優れた変異株を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオン液体耐性宿主を開発できれば、イオン液体存在下でイオン液体耐性酵素を菌体外に生産できる。イオン液体で難分解性バイオマスを溶解できるため、イオン液体耐性酵素により、溶解したバイオマスを分解できる。イオン液体存在下で本宿主細菌は、得られた分解産物から有用化合物を発酵生産できる。

これまで工業的に利用可能な *Bacillus* 属細菌が育種されているが、イオン液体はこれらの微生物の生育を阻害するため、実用的ではない。世界中でイオン液体耐性細菌の探索が進む中、独自のイオン液体耐性 *Bacillus* 属細菌とイオン液体を活用した有用物質変換系を開発することは、バイオマスの利用技術の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Ionic liquids have physical properties for use as reaction solvents. To solve the problems of growth inhibition of microorganisms by ionic liquids, we isolated the ionic liquid-tolerant *Bacillus* sp. CMW1. The first objective of this study is to identify the gene which are responsible for ionic-liquid tolerant. The second objective is to develop the novel bacterial host which exhibits tolerance to ionic liquids.

Consequently, I identified MFS transporter gene from strain CMW1 and showed that the gene is responsible for an ionic-liquid tolerant. The gene of CMW1 was transformed into *Brevibacillus* sp. bacterium and the recombinant strain could grow in the presence of an ionic liquid. Using tetracycline, pHY300PLK was successfully electroporated into strain CMW1 with the efficiency. I obtained the mutants which were able to grow in the presence of hydrophobic ionic liquids. The results will provide a basis for the future work in biocatalysis with various ionic liquids in industry.

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 多剤排出トランスポーター 浸透圧ストレス  
ゲノム解析 イオン液体耐性酵素 RNA-seq

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イオン液体は液体の有機塩であり、親水性と疎水性イオン液体に分類できる。現在、これらのイオン液体を溶媒に利用して、化学製品群、医薬品などの様々な生産プロセスの開発が進んでいる。申請者はこれまでに、疎水性イオン液体を溶媒として、抗ガン作用を示す 3-Cyclohexylpropyl caffeate などの酵素合成技術を開発してきた[①]。

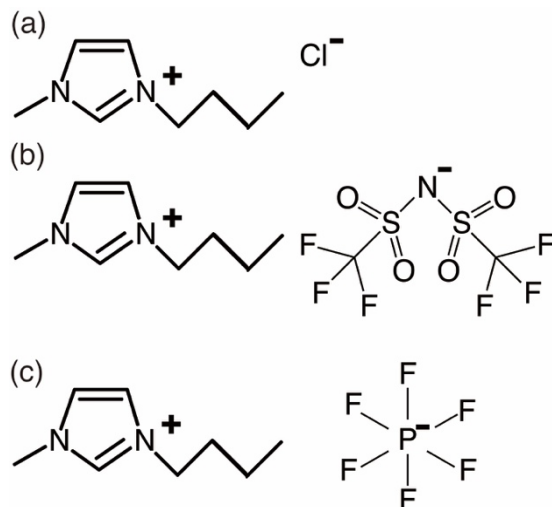


Fig. 1. イオン液体の構造

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。 (a) 親水性イオン液体 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl])、(b) 疎水性イオン液体 1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([BMIM][NTf2])、(c) 1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF6])。

すでに米国エネルギー省では、親水性イオン液体存在下でバイオマスを溶解させてバイオエタノールなどの有用物質の変換に利用できる、新規の細菌宿主が検討されつつある[②]。一方、申請者は親水性イオン液体を用いた場合、各種の細菌 (*Escherichia coli* K-12、*Bacillus subtilis* 168 など) の生育阻害、市販の多様な酵素の失活を見だし、変換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[③]。そのため現在、イオン液体を用いた有用物質変換系の開発では、新たな親水性イオン液体耐性宿主の育種、耐性酵素の取得が必要である。

この問題への対策として、申請者は耐塩性細菌に注目し、独自に選択培地を開発してイオン液体耐性酵素を生産する微生物を探索した。その結果、親水性・疎水性の多様なイオン液体存在下で良好に生育する耐塩性 *Bacillus* sp. CMW1 を獲得し、ゲノム解読を行った[④]。本菌株の親水性・疎水性イオン液体耐性酵素を解析して、イオン液体と使用できる酵素の基準を示し、各種イオン液体中で利用できる酵素を開発してきた[⑤]。

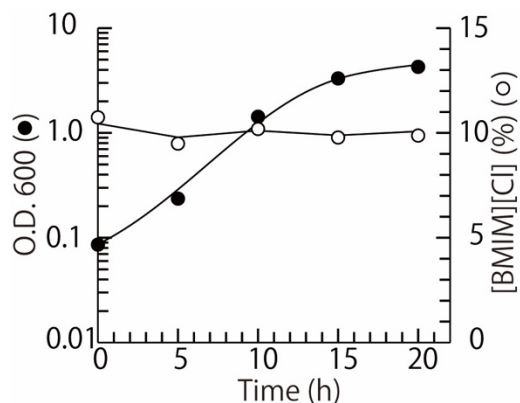


Fig. 2. [BMIM][Cl] 添加培地での *B. amyloliquefaciens* CMW1 の生育。●: CMW1 株の生育、○: 培地中の [BMIM][Cl] 濃度。1% [BMIM][Cl] 存在下では *E. coli* や *B. subtilis* の生育を確認できなかった。

2. 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。その困難の克服のため、申請者は独自にイオン液体耐性細菌を発見している。本研究の目的は、独自に見いだしたイオン液体耐性細菌を対象に、細菌のイオン液体耐性機構を解明して、イオン液体耐性の細菌宿主を開発することである。

3. 研究の方法

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]。一方、代表的な疎水性イオン液体 1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([BMIM][NTf2]) と 1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF6]) を用いた。

本研究の目的達成のため、独自に単離した *Bacillus* sp. CMW1 を対象に、(1)イオン液体耐性遺伝子の同定、(2)形質転換系の構築、(3)ゲノム情報を活用したイオン液体耐性を示す新たな細菌宿主の育種を実施した。

#### (1)イオン液体耐性遺伝子の同定

*Bacillus* sp. CMW1 を用いて、[BMIM]Cl 添加条件で発現量が増加・減少している遺伝子を探索した。RNesy Plus Universal kit (Qiagen; Venlo, Netherland) を用いて、10% [BMIM]Cl 添加・無添加条件、対数増殖期中期で CMW1 株の菌体から Total RNA を抽出した。

Total RNA から Ribo-zero rRNA Removal Kit (Bacteria) (illumina; CA, USA) を用いて rRNA を除去し、続いて RNA の断片化を行った。その後、逆転写反応を行い、2 本鎖 cDNA を合成して 3' 末端にポリ A 配列とアダプタを付加した。

PCR による増幅と AMPure XP ビーズによる精製を行って、10% [BMIM]Cl 添加・無添加条件の RNA-seq ライブラリを調製した。次世代シーケンサー (HiSeq, Illumina) を用いた Paired End 法で、それぞれの RNA-seq ライブラリを網羅的にシーケンシングして、[BMIM]Cl 添加、無添加条件の Read を取得した。

独自に解読した CMW1 株のゲノム DNA (3908571 bp) に得られた Read をマッピングして、10% [BMIM]Cl 存在下で発現量が 2 倍以上に増加した遺伝子、もしくは 1/2 倍以下に減少した遺伝子を探索した。

#### (2)イオン液体耐性細菌宿主の形質転換系の構築

独自に見いだした CMW1 株は、菌体外にプロテアーゼを生産した。そこで CMW1 株を細菌宿主として開発するために、対数増殖期の菌体を対象に UV 照射 (15 W, 30 min) を行って変異バンクを取得して、プロテアーゼ活性の低下した菌株を探索した。

一方、テトラサイクリン、エリスロマイシンを用いて、CMW1 株の薬剤耐性試験を行った。その後、プラスミド pPHY300PLK (Takara) を用いて、エレクトロポレーション法による CMW1 株の形質転換系の構築を試みた。

#### (3)ゲノム情報を活用したイオン液体耐性の細菌宿主の育種

RNA-seq 分析から、CMW1 株のイオン液体耐性に関与する遺伝子を探索した。独自に見いだした遺伝子を、[BMIM]Cl 感受性細菌宿主である *Brevibacillus choshinensis* (Takara) に形質転換して、5% [BMIM] [Cl] に対する耐性の付与を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) イオン液体耐性遺伝子の同定とタンパク質機能解析

10% [BMIM]Cl 添加・無添加条件、対数増殖期中期で CMW1 株の菌体を回収し、89.4 ng/ $\mu$ l RNA (10% [BMIM]Cl 添加)、76.5 ng/ $\mu$ l RNA (10% [BMIM]Cl 無添加) を抽出した。10% [BMIM]Cl 添加条件で得た RNA の RIN 値は 4.9、[BMIM]Cl 無添加で得た RNA の RIN 値は 7.7 であった。10% [BMIM]Cl 添加条件の Total RNA 7.0  $\mu$ g と、[BMIM]Cl 無添加条件の Total RNA 8.0  $\mu$ g から、それぞれ RNA-seq ライブラリを構築した。

それぞれの RNA-seq ライブラリを対象に RNA-seq を行い、10% [BMIM]Cl 添加条件では 46503904 本、[BMIM]Cl 無添加条件では 44402576 本の Read を取得できた。CMW1 株の全ゲノム (3908571 bp) に対して、10% [BMIM]Cl 添加条件の read の 99.15%、[BMIM]Cl 無添加条件の read の 99.11% をマッピングできた。

遺伝子の発現頻度解析をした結果、CMW1 株のタンパク質をコードする遺伝子 9175 個では 931 個の遺伝子で発現量が変化しており、2 倍以上に発現量が増加していた遺伝子 (548 個)、1/2 倍以下に発現量が減少していた遺伝子 (383 個) を確認できた。転写量が増加した遺伝子の分析から、CMW1 株のイオン液体耐性機構として以下の内容を明らかにできた。

まず転写因子 SigB の転写量は 3.5 倍に増加しており、10% [BMIM]Cl によるストレスに回答していた。補償溶質である Glycine betaine と Proline や Na<sup>+</sup> の取り込みに関わる遺伝子の転写量が、それぞれ 2.5 倍、6.0 倍、5.0 倍に増加していた。Proline や Glutamate への合成の転写が促進されるように関連遺伝子の転写量が、それぞれ 3.0 倍、4.2 倍に増加していた。さらに、2.8 倍に転写量が増加した多剤排出ポンプ遺伝子を発見でき、本遺伝子が [BMIM] カチオンの排出に関与していることが考えられた。

以上の結果から、転写因子 SigB によって輸送体、アミノ酸の代謝、多剤排出ポンプに関連する遺伝子の転写量が増加しており、細菌のイオン液体耐性として浸透圧調節機構と多剤排出ポンプ機構が関与していることを明らかにできた。

#### (2) イオン液体耐性細菌宿主の遺伝子組み換えベクターの構築

CMW 株は菌体外プロテアーゼ活性を示した。細菌宿主を開発するために、プロテアーゼ活性の低下した CMW1 株の取得を試みた。対数増殖期の CMW1 を用いて UV 照射 (15 W, 30 min) を行って変異バンク (生残率 3.3~4.0%) を取得して、得られた変異株のプロテアーゼ活性が低下した菌株を選抜した。その結果、プロテアーゼ活性が 30% に低下した菌株を見

いだした。一方、CMW1 株は 50  $\mu$ g/mL のテトラサイクリンもしくはエリスロマイシンに感受性を示すことを見いだした。

そこで、テトラサイクリン耐性プラスミド pHY300PLK を用いて CMW1 株の形質転換系の構築を試みた。その結果、対数増殖期前～中期の菌体から調製したコンピテントセルを用いて、エレクトロポレーション法 (1000V、25  $\mu$ F、200  $\Omega$ ) によって形質転換効率  $2.7 \times 10^{-1.4} \times 10^3$  (cfu/ $\mu$ g) で組み換え CMW1 株を得ることができた。独自に見いだしたイオン液体耐性菌 CMW1 株の形質転換系を構築できた。

### (3) ゲノム情報を活用してイオン液体耐性の細菌宿主の育種

本研究では、CMW1 株で BMIM カチオンの排出への関与が示唆される多剤排出ポンプ遺伝子を見いだした。[BMIM]Cl 感受性 *Brevibacillus choshinensis* を用いて、本遺伝子による *B. choshinensis* への [BMIM] [Cl] 耐性の付与を検討した。*B. choshinensis* 株に多剤排出ポンプ遺伝子 (1197 bp) を導入した結果、5% [BMIM] [Cl] 添加培地で組み換え株の生育と、多剤排出ポンプの発現を確認できた。

5% [BMIM] [Cl] 添加培では、組み換え *B. choshinensis* 株の生育は遺伝子導入前の本菌株の生育より 5.2 倍良好であった。全ゲノム解読と RNA-seq で得られた遺伝子情報に基づいて、新たなイオン液体耐性菌を開発することができた。

### <引用文献>

- ① Kurata A et al., J Mol Catal B Enzym, 2011 (69) 161-167.
- ② DeAngelis KM et al., Stand Genomic Sci, 2011 (5) 69-85.
- ③ Kurata A et al., J. Biol. Technol., 2010 (148) 133-138.
- ④ Kurata A et al., Genome Announc, 2014, 2 (5) e00983-14.
- ⑤ Kurata A et al., Extremophiles, 2016 (20) 415-424.
- ⑥ Abe M et al., Production of Biofuels and Chemicals with Ionic Liquids, 2014, 29-59.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Atsushi Kurata, Shota Shimizu, Yutaro Shiraishi, Mihoko Abe, Nobutoshi Naito, Mihoko Shimada, Noriaki Kishimoto.	4. 巻 31(4)
2. 論文標題 Degradation of ionic liquids by UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> process and CMCase from novel ionic liquid-tolerant alkaliphilic <i>Nocardiopsis</i> sp. SSC4	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biotechnology & Biotechnological Equipment	6. 最初と最後の頁 749-755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13102818.2017.1335613.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi Kurata, Sayo Minamino, Miwa Sugiura, Kento Kokoda, Hiroaki Tsujimoto, Tetsuya Numata, Chiaki Kato, Kaoru Nakasone, Noriaki Kishimoto	4. 巻 31(5)
2. 論文標題 Taxonomy of actinomycetes in the deep-sea Calyptogena communities and the antibacterial compound produced by <i>Actinomadura</i> sp. DS-MS-114	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biotechnology & Biotechnological Equipment	6. 最初と最後の頁 1000-1006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13102818.2017.1342563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi kurata, Noriaki Kishimoto	4. 巻 92(3)
2. 論文標題 イオン液体耐性微生物・酵素とその応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kagaku to Kogyo (Japanese)	6. 最初と最後の頁 71-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi Kurata, Taishi Yamaguchi, Masaaki Kira, Noriaki Kishimoto.	4. 巻 33
2. 論文標題 Characterisation and Heterologous Expression of an Antimicrobial Peptide from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CMW1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology & Biotechnological Equipment	6. 最初と最後の頁 886-893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13102818.2019.1627246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福井瑞季、倉田淳志、三好柚紀、山崎思乃、今井友也、栗原達夫、上垣浩一
2. 発表標題 相模湾由来単離株51-CSのメンブランベシクルの特性の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉田淳志
2. 発表標題 発酵食品に関する微生物によるメンブランベシクルの生産
3. 学会等名 第385回生存研シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Kurata
2. 発表標題 Antifungal Peptidic Compound from a Deep-Sea Bacterium
3. 学会等名 International Conference on Microbiology & Infectious Diseases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井瑞季、倉田淳志、三好柚紀、山崎思乃、今井友也、栗原達夫、上垣浩一
2. 発表標題 相模湾由来単離株51-CSのメンブランベシクルの特性の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉田淳志
2. 発表標題 発酵食品や腸管に由来する細菌の細胞外小胞の特性
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井 瑞季、山浦 由登、倉田淳志、岸本 憲明、上垣 浩一
2. 発表標題 深海細菌Aneurinibacillus sp. YR247株の抗真菌ペプチドの特性の解明
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉田 淳志、清原 昇悟、宮崎 綾乃、三好 柚紀、山崎 思乃、今井 友也、栗原 達夫、上垣 浩一
2. 発表標題 発酵食品に関する微生物のメンブランベシクルの特性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 瑞季、倉田 淳志、三好 柚紀、山崎 思乃、今井 友也、栗原 達夫、上垣 浩一
2. 発表標題 深海底泥由来単離株51-CSのメンブランベシクルの特性解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉田淳志
2. 発表標題 発酵食品や腸管に由来する細菌の細胞外小胞の特性
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾 啓史、笠行 康葉、高崎 友里恵、堂本 有美華、清水 浩美、大橋 正孝、都築 正男、首藤 明子、倉田 淳志、上垣 浩一
2. 発表標題 近畿大学構内の花からの酵母の分離及び醸造特性の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加塩 健悟、佐々本 康平、氷見山 幹基、倉田 淳志、中村 努、上垣 浩一
2. 発表標題 好熱性細菌Thermomicrobium roseum由来D-アミノ酸デアセチラーゼの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上國世（分担執筆：倉田淳志、岸本恵明）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 297
3. 書名 食品・バイオにおける最新の酵素応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----