

微生物による石油成分系化合物の代謝研究とその多角的応用研究

野村 暁彦



Analysis and Application of Microorganisms Utilizing Petroleum Constituents and Compounds Thereof

NOBUHIKO NOMURA (Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba 305-8572) Seibutsu-kogaku **84**: 127-132, 2006.

Interest in biosurfactants has been increasing in recent years due to their diversity, environmentally friendly nature, the possibility of producing them through bioconversion, and their potential applications in environmental protection, crude oil recovery and as medical agents. *Candida antarctica* synthesizes a biosurfactant when waste oils are added to the medium, indicating that biosurfactants can be produced utilizing waste oils as substrates. The author characterized the degradation properties of various alkylated poly-aromatic compounds of *Sphingomonas paucimobilis* TZS-7 and *Mycobacterium* sp. G3, and cloned and successfully expressed the related genes for each substance.

〔Key words: poly-aromatic compounds, microbial degradation, biosurfactants, conjugated polymers, waste oils〕

はじめに

n-アルカン, 脂肪酸, あるいは難分解性アルキル化多環芳香族などを代謝材料にできる微生物の機能を利用して, 石油, 油脂あるいは産業廃油の高度利用また深度処理を目的として研究を進めた. また, それらの機能を司る酵素遺伝子について遺伝子工学的手法を用いて改良することで, 高生産性などの機能強化あるいは新しい付加価値産物の創製を図った.

アルキル化含硫多環芳香族の微生物分解

これまで石油汚染の生物的処理 (バイオレメディエーション) や石油のバイオ脱硫 (BDS) を目的として, 石油系の多環芳香族炭化水素 (PAH) あるいは含硫多環芳香族炭化水素 (PASH), 石油汚染のマーカーであるジベンゾチオフェン (DBT) などの微生物分解に関する研究

が 40 年以上にわたって行われてきた. DBT 分解菌は, C-C 結合を切断する環開裂型と C-S 結合切断型に大別される¹⁻³⁾が, それらのほとんどはアルキル化されていない PAH, PASH の微生物分解の報告であった. 近年, 石油汚染サイトに残留している PAH, PASH の大部分はアルキル化されたものであることが明らかとなってきた⁴⁾. アルキル化 PAH および PASH において, アルキル基の数が多いほど分解性が低くなるとの報告があり⁵⁾, なかでも 4,6-dimethyl DBT (4,6-DMDBT) は特に難分解性であり, その毒性も高いことから, 近年注目を集めている物質である. 4,6-DMDBT は流出油の汚染の他に, ディーゼル自動車の動力源である軽油中にも多く存在しており, その脱流も困難であることから, ディーゼル排気ガスに含まれる diesel exhaust particles (DEP) としての人体への影響, また酸性雨の原因物質としても注目されている⁶⁾. そこで, 我々は 4,6-DMDBT 分解菌の探索を

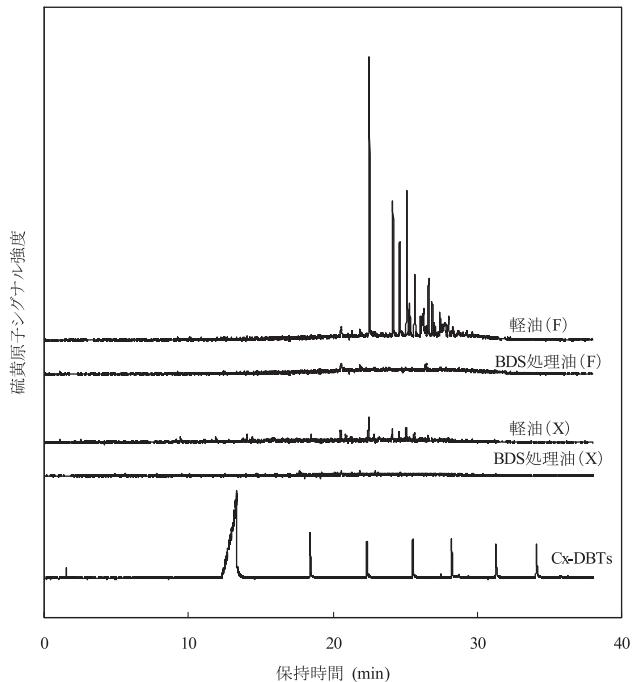


図1. 軽油脱硫のGC-AED解析. 4日間の脱硫反応(BDS)に供した2ロットの軽油についてのGC-AED解析. 22.4 minのピークは4,6-dimethyl DBT (C2-DBT), 24~25 minのピークはC3-DBTs. 最下段はモデル化合物の保持時間を示し, DBT, 4,6-dimethyl DBT, 4,6-diethyl DBT, 4,6-dipropyl DBT, 4,6-dibutyl DBTと4,6-dipentyl DBTは, それぞれ18.4, 22.4, 25.5, 28.2, 31.3と34.1 minを示す.

行った結果, そのC-C結合環開裂型分解菌 *Sphingomonas* strain TZS-7⁷⁾ と C-S 結合切断型分解菌 *Mycobacterium* sp. G3⁸⁾ を取得することができた. 解析の結果, それらの分解菌は DBT 以外の多環芳香族基質に対しても広い分解スペクトルを有しており, TZS-7 株は 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase, catechol 2,3-dioxygenase などの環開列酵素群を有していることが明らかとなつた⁹⁾. 一方, G3 株はより分子量の大きいアルキル化 DBT (4,6-dipentyl DBT) に対しても C-S 結合切断に伴う脱硫反応を示し, 従来菌にない高い基質取り込み能と広い脱硫スペクトルが示したことから¹⁰⁾, その脱硫酵素遺伝子群を取得し発現解析を行つた結果, それら酵素に高分子アルキル化 DBT に対する広い反応性が見いだされた¹¹⁾. この反応性は, 工業的な軽油 (2ロット) の脱硫反応に適用した結果においても同様であり, 高い脱硫率を得ることができた (図1). また, 通常の DBT 脱硫反応においては最終産物として硫酸イオンと 2-hydroxybiphenyl (2-HBP) が生成されるが, 興味深いことに, G3 株の DBT 代謝経路の詳細な解析を行つたところ, G3 株では DBT から 2-HBP 生成だけでなく, HBP からさらに 2-methoxybiphenyl (2-MBP) への変換反応が行われることが見いだされた¹²⁾. 脱硫菌の生育硫黄源

としては DBT が一般的に用いられていたが, DBT の代謝産物などが後段の脱硫反応を抑制することが危惧されていた. そこで, G3 株の菌体生育条件と高い脱硫活性を誘導する生育硫黄源を検討した結果, 最適硫黄源として硫酸イオンなどを見いだし, DBT を用いない新しい培養方法で従来の脱硫菌 (野生株) には報告例がない高い脱硫活性 (178 $\mu\text{mol/g-DCW/h}$) を得ることができた¹³⁾.

BDSにおいては油水二相系反応が想定され, 脱硫処理軽油と菌体懸濁液との油水分離が重要となるが, これまでに報告されている他の脱硫菌を用いた脱硫反応においてはエマルジョンが生成し, 油水分離が困難になることが問題とされてきた. G3 株の油水分離能を調査したところ, G3 株においては油相と水相が速やかかつ明確に分離され, エマルジョンの生成も見られず, すぐれた油水分離能が認められた¹⁴⁾. しかしながら, 油水二相系反応では分子量が比較的大きいアルキル DBT に関する油水二相系反応の脱硫速度は, 水系反応と比較し大きく低下した. そこで, 基質の疎水性に着目し, $\log k'$ 値として定量的に疎水性を評価した結果, 脱硫活性と相関することを見いだした¹⁵⁾. さらに, 油水二相系反応における反応速度論的解析を行い, この相関を裏づけた. また, 溶媒である *n*-アルカンについてはその鎖長に伴い反応性が向上し, 基質だけでなく溶媒の疎水性も脱硫反応に関わる可能性を見いだした.

以上, G3 株は分解能だけでなくその細胞特性もユニークな性質を有することが示された.

各種芳香族のモノヒドロキシル化と IT 素材

先述のように, それらの細菌はアルキル化多環芳香族を含む種々の多環芳香族に対して, 高い分解活性を示すことが示された. それは言い換えると, それら細菌は種々多環芳香族などの疎水性基質を許容しうる宿主細胞であるとともに, それら幅広い基質に対する代謝酵素遺伝子 (群) を有していることに他ならない. そこで, その能力に着目し, 多環芳香族化合物の分解から合成へと発想を転換してみた. 分解酵素遺伝子 (群) などに変異を導入することにより, 種々多環芳香族からモノヒドロキシ体へのバイオコンバージョン可能な分子育種に成功した¹⁶⁾. たとえば, DBT であれば休止菌体反応により 2 時間後には反応水溶液上清から, そのモノヒドロキシ体としてほぼ 100% 回収できた (図2). 同様に図3に示すような各種多環芳香族を短時間で種々多環芳香族のモノヒドロキシ体に変換し, かつそれを高効率で細胞外へ分泌できることが確認できた. ここで特徴的なことは, 高い変換効率のみだけでなく, その変換されたモノヒドロキシル体が細胞外の上清に移行しているところであ

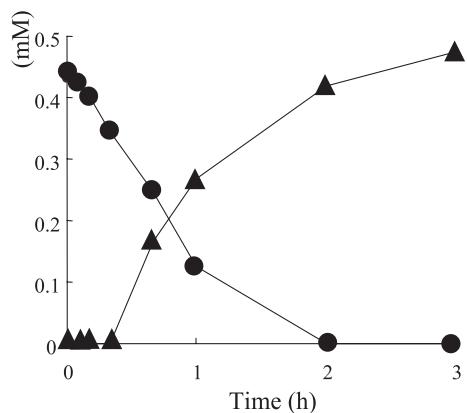


図2. 分子育種菌によるDBTからhydroxy DBTの生成. ●, DBT; ▲, hydroxy DBT.

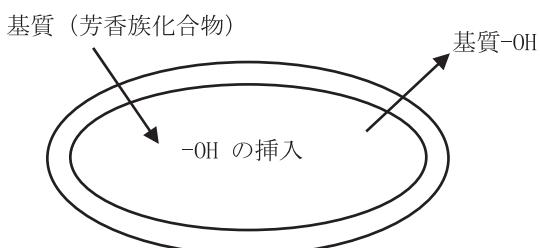
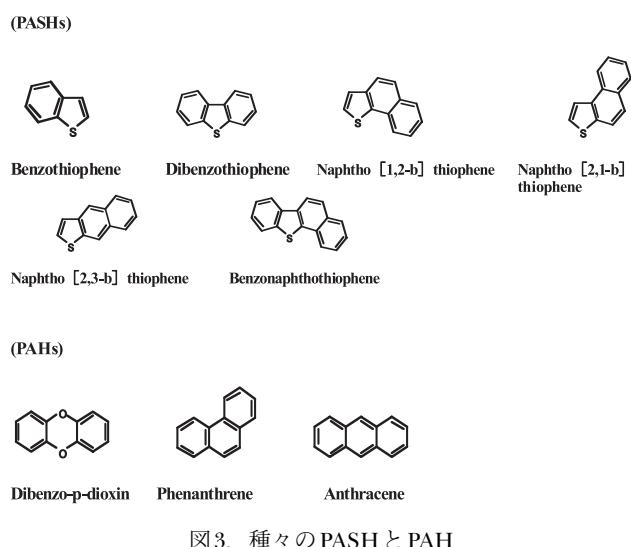


図4. 分子育種菌の細胞がモノヒドロキシル体を精製してくれている

る。これまで、化学合成法あるいは微生物反応による芳香族類のモノヒドロキシル体の合成はいくつか報告があるが、その回収に難があることがほとんどである。本育種菌は、その細胞自身がモノヒドロキシル体を粗精製する(図4)ので、反応後の上清から有機溶媒抽出するのみで、モノヒドロキシル体をガスクロマトグラフィーにてワンピークにまで精製できる、いわばすぐれた各種多

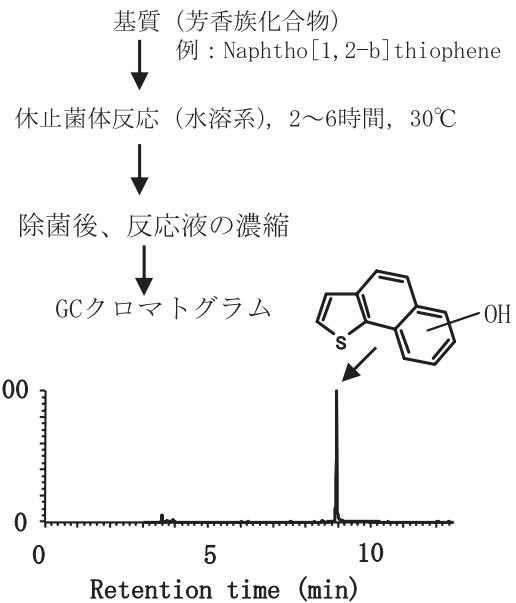


図5. 分子育種菌を利用した芳香族モノヒドロキシル体生産の流れ

環芳香族モノヒドロキシル体生産のハイスループットシステムであるといえる(図5)。

種々多環芳香族のモノヒドロキシ体は、OH部位において分子修飾を簡便に行うことが可能であるため医薬・化学さらにIT産業の原料として期待できる。特に種々の含硫多環芳香族のモノヒドロキシ体は、高分子型導電性ポリマー合成のためのモノマーとして有用である。近年、高分子型導電性ポリマー¹⁷⁾は、次世代液晶と目されている高分子型有機電界発光素子(EL素子)や、また太陽電池の材料としても開発が求められている。しかし、ポリマー合成にはそのモノマー素材である高分子多環芳香族の特異的部位に分子修飾を施す必要性があり、その化学合成が非常に困難あるいは不可能なことから、その材料開発がキーポイントとなっている。そこで、そのモノマー候補となりうる各種多環芳香族のモノヒドロキシル体を本育種菌を用いてハイスループット生産し、それらの性能を調べた。具体的には得られたモノヒドロキシル体のモノヒドロキシル基に、修飾基質を化学法により付加させ精製後、電解重合法により導電性ポリマーを合成する(図6)。そして、得られた新規導電性ポリマーをサイクリックボルタントリー法などを用いて評価した。その結果、酸化還元のバンドギャップが狭い特徴的な性質を示すものが得られた(図7)。酸化還元のバンドギャップが狭い高分子型導電性ポリマーは、有機EL素子の発光層あるいはバッファー層への使用が期待される。そこで、新規導電性ポリマーのエレクトロクロミック素子としての性能を調べたところ、光シャッター能を有し

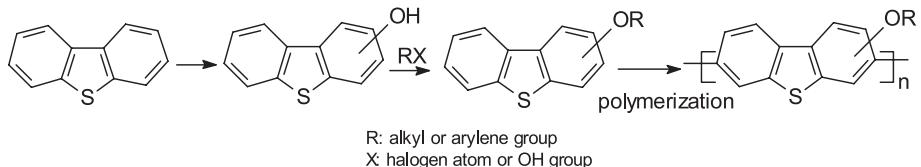


図6. 導電性ポリマーの合成. 分子育種菌により芳香族をモノヒドロキシル体に変換後, 化学法によりRに置換したものを電解重合させる.

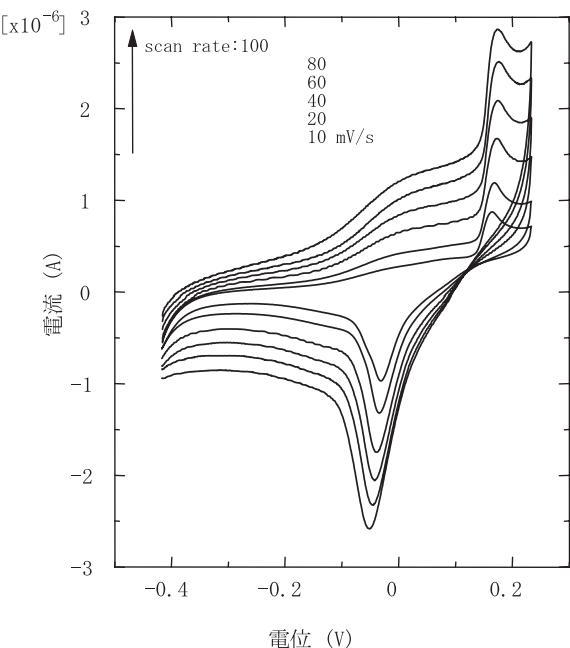


図7. 得られた新規導電性ポリマーのサイクリックボルタムトリー法による評価

ていることが明らかとなり発光素子として有望であることが示された. 高分子型の発光素子は、その加工性の容易さと柔軟性から電子ペーパーの表示素子として研究開発が進められており、また、太陽電池素材やさらに外部電場により発色を変えるエレクトロクロミック素子として、電子ペーパー分野への応用も可能である.

これらのバイオ（分子育種菌）を介してつくられる各種チオフェン化合物類のモノヒドロキシル体においてヒドロキシル基のつく位置は、化学合成法では非常に困難あるいは合成不可能な箇所であるため、そのヒドロキシル基に分子修飾したものを材料として合成された導電性ポリマーは、ほとんどすべて新規かつオリジナルなものとなる. さらに、その製法もバイオ技術を介することで常温・常圧での合成が可能となり、また純度も高いことから精製も含めて、化学合成法よりも環境に優しくかつ簡素である. しかし、性能評価程度に必要なモノヒドロキシル化体の生産量は本育種菌の性能で十分であるが、その大量生産にはまだ大きな改良が必要とされる.

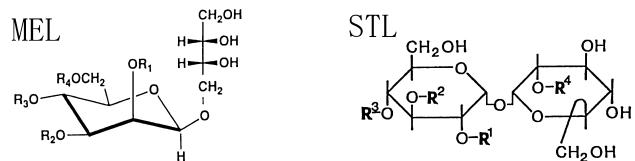


図8. マンノシルエリスリトールリピッド (MEL) とサクシノイルトレハロースリピッド (STL) の構造

油脂・廃油からの糖脂質生産とその生理活性

微生物が生産する糖脂質系のバイオサーファクタントは比較的多量に生産されることが知られており、その両親媒性の構造と生分解性の特質を利用した氷スラリー凝集・塊状化防止剤としての利用やバイオレメデーションへの利用、および生理活性作用を利用したナノバイオ素材として医薬品への利用などさまざまな機能面での応用が検討されており¹⁸⁾ 工業的な生産・利用に関して最も将来性のあるバイオサーファクタントの一つと考えられている. また、*Candida antarctica* T-34株が著量に生産する、炭化水素や油脂などを原料とする糖脂質マンノシルエリスリトールリピッド (MEL) (図8)¹⁹⁾ や、*Rhodococcus* sp. SD-74 株が石油成分中の n- アルカンなどから生産する脂肪酸糖エステル、サクシノイルトレハロースリピッド (STL) (図8)²⁰⁾ は新規な特性として、種々の癌細胞増殖抑制作用などの生理活性を持つことが明らかとなっている²¹⁻²⁵⁾. 興味深いのは、MEL、STL は両者とも HL-60 の分化を誘導するが、それぞれ異なった方向を有することである²⁶⁾. その違いがそれぞれの糖骨格の違いによるのかなどのメカニズムはまだわかっていない. しかし、それは微生物産生糖脂質の生理活性物質としてのさらなる用途を期待させる.

さらにSTL 生産菌である *Rhodococcus* sp. SD-74 株は非常に特徴的な性質を有している. これまで報告されている微生物は炭素源などの条件を変えても同じ糖脂質を生産するが、SD-74 株は、加える炭素源のアルカン類や脂肪酸をそのままトレハロース骨格に結合させ、その STL の側鎖として合成できる. その際、鎖の長さが 10 ~ 20 程度の炭素鎖であれば Cl の修飾あるいは不飽和結合などが入っていてもそのまま STL の側鎖となる²³⁾. この

特徴により STL の側鎖部位を自由に設計しうることから、用途に応じた STL の創製が可能となり、さまざまな分野での応用が期待できる。また、SD-74 株が有する側鎖とトレハロースの結合を媒介する酵素は、その側鎖の結合している部位がトレハロースの 2 位や 3 位と通常修飾が困難な位置であることから、トレハロースの誘導体合成にも応用が可能である。

微生物による物質生産を工業的に考える場合では依然として生産コストが高くつくという問題点があり、安価な原料の利用や生産および精製手段の効率化が求められている。その一方で、油脂はあらゆる産業活動や社会生活を通じて廃棄され、一部は環境中に放出されることにより水質悪化などの環境汚染の原因となっている。そこで産業廃油を原料として微生物変換技術によりバイオサーファクタントを生産することができれば、原料コストの削減と環境問題の両面の解決につながる再生資源を利用した環境調和型の微生物生産の一例となろう。

しょうゆ油は生揚醤油の清澄工程において液上面に浮上した油分で、その回収量は丸大豆醤油の場合では生揚醤油の数%に相当する。しょうゆ油は、リノール酸エチル、オレイン酸エチルなどの脂肪酸エチルエステルを 50% 程度、その他に脂肪酸、トリグリセライド、スフィンゴ脂質などの微量成分を含む²⁷⁾。また、しょうゆ油は醤油色素であるメラノイジンによる着色のため黒褐色を帶び、酸価が高いため金属を腐食するなどの欠点があることから、多くは焼却処分されているのが現状である。そこで、*C. antarctica* T-34 株の油資化能およびバイオサーファクタント生産能を利用することにより、しょうゆ油の微生物分解と糖脂質系のバイオサーファクタント生産について検討を行った。しょうゆ油を唯一の炭素源として T-34 株を培養した場合、しょうゆ油の主成分である脂肪酸エチルエステルはほぼ完全に分解され、その他の油成分も含めしょうゆ油の分解率を添加濃度に対する残存濃度の割合として求めると最終的には 87% の分解率を示した²⁸⁾。T-34 株の油分解率は、遊離脂肪酸、脂肪酸エチルエステル、しょうゆ油、大豆油の順に高かった。また、しょうゆ油特有の黒褐色が消失して透明になっていたことから、T-34 株は油脂の微生物脱色能力も有することが示唆された。続いて、T-34 株を用いた微生物変換によるしょうゆ油からのバイオサーファクタント生産について検討した。油脂の中で MEL を高収率で生産することが知られている大豆油との比較では、大豆油からの MEL 生産量は油脂濃度が 6, 12% で、それぞれ MEL が 25, 34 g/l であったのに対して、しょうゆ油の MEL 生産量は、それぞれ 24, 35 g/l であり、大豆油とほぼ同程度の生産量が認められた（しょうゆ油と大豆油とも原料に対

する収率は約 40%）。また、他の植物性廃食油やラードなどの動物性廃食油においてもそれぞれ分解率 80% 以上かつ MEL 生産量が 25 g/l 程度であった²⁹⁾。T-34 株とほぼ同等の MEL 生産能力をもつとされている *Kurtzmanomyces* sp.I-11 では、大豆油を炭素源とした流加培養法により、現在実用化されているバイオサーファクタントであるソホロリピッドに近い生産効率（約 200 g/l）が達成できることが実証されている³⁰⁾。T-34 株を用いると大豆油の代わりに種々廃油を用いても同程度のバイオサーファクタント生産が期待されることから、そのマスプロダクトとしての用途が見つかれば環境調和型の微生物変換技術による有用物質生産が実現できる可能性は高いといえよう。

おわりに

以上の研究に使用された菌株の中には、20 年以上前の当研究室の石油発酵の研究で分離された菌株を掘り起こしているものもある。昔に、目的は違えども得られた菌株でも、現在だからあるいは現在の技術があるからこそ別の応用あるいは基礎としても使用できる可能性がある。もともと日本は微生物のスクリーニングが上手な国であり、多くの微生物が分離保存されているはずである。それらをバイオリソースとして見直すことも必要かもしれない。

また本研究は、分解経路あるいは合成経路の代謝を基礎的に解析し、そこから有用物質・有用酵素の発見あるいは高生産につながった経緯があり、基礎から（予想もしなかった）応用が生まれることを経験した。また、そこには IT 分野の研究者（同大学）の偶然の出会いが不可欠であった。それは、たまたま官舎の上の住人があの白川先生のお弟子さんで、官舎の階段での立ち話から共同研究が始まった。今後とも、出会いやコミュニケーションを大切にし大学の特徴を生かしながら、本研究もより高度に、また学際的に発展させていきたい。

本研究は筑波大学の微生物生理化学研究室で行った仕事です。この間多大なご助言とご教示を頂きました中原忠篤教授（名誉教授）ならびに内山裕夫教授に深甚なる感謝を表します。中原先生からは農芸化学の、内山先生からは環境および微生物生態それぞれの視野を広げていただきました。また、本賞の受賞に際しまして、学会への推薦をしていただきました筑波大学大学院生命環境科学研究科の田中秀夫教授にお礼申し上げます。これらの研究を遂行するにあたり、共同研究者である同研究室の中島（神戸）敏明助教授、コスモ石油株式会社中央研究所の岡田秀樹博士、理化学研究所遺伝子材料開発室室長の横山和尚博士、ヒガシマル醤油株式会社研究所の古林万木夫博士に感謝いたします。また、全くの異分野の共同研究を快く受け入れてくださった旧白川英樹研究室の筑波大学大学院数理物質

研究科の赤木和夫教授ならびに後藤博正講師に感謝いたします。研究をサポートしていただいたNEDOに感謝いたします。そして、ここで紹介した研究成果は、間世田英明博士、篠原優子博士、呂傑博士、高田真樹博士、諸氏をはじめとする多くの博士研究員、大学院、および学部学生の努力の賜です。ここであらためて感謝いたします。

最後に、サイエンスの道へ誘っていただいた恩師である大阪大学大学院工学研究科の室岡義勝教授（現大阪大学サンフランシスコセンター長）に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Bressler, D. C. and Fedorak, P. M.: *Can. J. Microbiol.*, **46**, 397–409 (2000).
- 2) Nojiri, H., Habe, H., and Omori, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **47**, 279–305 (2001).
- 3) Ohshiro, T. and Izumi, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1–9 (1999).
- 4) Stephanie, G. M. and Wise, S. A.: *Anal. Chem.*, **71**, 58–69 (1999).
- 5) Fedorak, P. M. and Westlake, D. M. S.: *Can. J. Microbiol.*, **29**, 291–296 (1983).
- 6) Mori, Y., Taneda, S., Hayashi, H., Sakushima, A., Kama-
ta, K., Suzuki, A. K., Yoshino, S., Sakata, M., Sagai, M.,
and Seki, K.: *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 145–146 (2002).
- 7) Lu, J., Nakajima-Kambe, T., Shigeno, T., Ohbo, A., Nomura, N., and Nakahara, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 293–299 (1999).
- 8) Nekodzuka, S., Nakajima-Kambe, T., Nomura, N., Lu, J., and Nakahara, T.: *Biocatal. Biotrans.*, **15**, 17–27 (1997).
- 9) Lu, J., Nomura, N., Nakajima-Kambe, T., and Nakahara, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1492**, 493–498 (2000).
- 10) Okada, H., Nomura, N., Nakahara, T., and Maruhashi, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 228–233 (2002).
- 11) Nomura, N., Takada, T., Okada, H., Shinohara, Y., Nakajima-Kambe, T., Nakahara, T., and Uchiyama, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 398–402 (2005).
- 12) Okada, H., Nomura, N., Nakahara, T., and Maruhashi, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 491–497 (2002).
- 13) Okada, H., Nomura, N., Nakahara, T., and Maruhashi, K.: *Biotechnol. Lett.*, **23**, 2047–2050 (2001).
- 14) Takada, M., Nomura, N., Okada, H., Nakajima-Kambe, T., Nakahara, T., and Uchiyama, H.: *Biotechnol. Lett.*, **27**, 871–874 (2005).
- 15) Okada, H., Nomura, N., Nakahara, T., Saitoh, K., Uchiyama, H., and Maruhashi, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **83**, 489–497 (2003).
- 16) 特願138465 (2005)
- 17) Goto, H., Nomura, N., and Akagi, K.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. Ed.*, **43**, 4248–4252 (2005).
- 18) Kitamoto, D., Isoda, H., and Nakahara, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 187–201 (2002).
- 19) Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C., and Tabuchi, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 31–36 (1990).
- 20) Uchida, Y., Misawa, S., Nakahara, T., and Tabuchi, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 765–769 (1989).
- 21) Zhao, X., Wakamatsu, Y., Shibahara, M., Nomura, N., Geltlinger, C., Nakahara, T., Murata, T., and Yokoyama, K. K.: *Cancer Res.*, **59**, 482–486 (1999).
- 22) Shibahara, M., Zhao, X., Wakamatsu, Y., Nomura, N., Nakahara, T., Jin, C., Nagaso, H., Murata, T., and Yokoyama, K. K.: *Cytotechnology*, **33**, 247–251 (2000).
- 23) Sudo, T., Zhao, X., Wakamatsu, Y., Shibahara, M., Nomura, N., Nakahara, T., Suzuki, A., Kobayashi, Y., Jin, C., Murata, T., and Yokoyama, K. K.: *Cytotechnology*, **33**, 259–264 (2000).
- 24) Wakamatsu, Y., Zhao, X., Jin, C., Day, N., Shibahara, M., Nomura, N., Nakahara, T., Murata, T., and Yokoyama, K. K.: *Eur. J. Biochem.*, **268**, 374–383 (2001).
- 25) Zhao, X., Murata, T., Ohno, S., Day, N., Song, J., Nomura, N., Nakahara, T., and Yokoyama, K. K.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 39903–39910 (2001).
- 26) Isoda, H., Shinmoto, H., Kitamoto, D., Matsumura, M., and Nakahara, T.: *Lipids*, **32**, 263–271 (1997).
- 27) 小瀬吉茂樹ら：三重大学農学部学術報告，**72**, 105–111 (1986).
- 28) 特開101847 (2002)
- 29) 特開274994 (2003)
- 30) 財団法人広島県産業技術振興機構：平成10–12年度研究成果報告書, p.116–128 (2001).