

# 疎水性細菌を用いた非水バイオプロセスへの挑戦

本田 孝祐\*・大竹 久夫

## 疎水性細菌 *Rhodococcus opacus* の発見

微生物（由来酵素）による有用化学品生産プロセス、いわゆるバイオプロセスの成否は、用いる生体触媒のポテンシャルをいかにして最大限に引き出すかに依存する。このため生体触媒はその最適条件付近、すなわちこれらが本来機能している生体内環境に近い条件で使用されなければならない。一方、われわれの身の回りを埋め尽くした合成樹脂や塗料に目をやれば容易に気づくことであるが、汎用化学品のほとんどは水にまったく、あるいはほとんど溶けない物質である。これらの物質をバイオプロセスのターゲットとするには、生体触媒にとっての最適環境下とは大きく異なる有機溶媒存在下での生産プロセス開発が不可避となる。

筆者らのグループが非水環境下での微生物変換反応の実現に挑戦すべく研究に着手したのは今から6年ほど前にさかのぼる。当時、さまざまな有機溶媒共存下で生育可能な有機溶媒耐性細菌を触媒とした水/有機溶媒二相反応系プロセスの開発研究が、ドイツのグループなどを中心に盛んになされていたり。筆者らもこれになり、独自に単離・取得した有機溶媒耐性細菌である *Rhodococcus opacus* B-4<sup>2)</sup> を用い、同様のアプローチによる研究を開始した。しかし、間もなくして本菌の示す有機溶媒耐性は非常に不安定な表現型であり、継代培養を繰り返す間に分離当初のきわめて高い耐性（90% [v/v] のベンゼン存在下でも生育可能！）は跡形もなく損なわれてしまうことが明らかとなった。将来的な産業利用を目指す上で、このように不安定な表現型に基づいた技術開発を進めることは得策ではない。研究方針の大幅な見直しが求められる事態となったわけだが、失敗続きの実

験の中で筆者らは本菌が有する別の特徴を見いだすに至った。本菌を水/有機溶媒混合液中に投じると、ほぼすべての菌体が有機相に吸着するのである。さらに本菌は固定化や凍結乾燥といった特別な前処理を施すことなく湿菌体の状態で有機溶媒中に分散できる特徴も有する（図1）<sup>3)</sup>。有機溶媒耐性とは異なり、これらの疎水的特性は継代培養の繰り返しによっても損なわれることなく、安定な表現型として維持可能であった。

目的の反応が二次代謝産物生産などのように複雑な代謝活性に基づいたものである場合、有機溶媒を含む反応液中でも生理活性を保持できる耐性微生物の利用が望ましい。一方、マルチコンポーネント酵素（たとえばレドックスパートナータンパク質からの電子授受を必要とする酸化還元酵素）による反応や補酵素要求性酵素とその再生系とのカップリング反応のように、比較的少数の酵素のみで成立する変換反応の場合、宿主細胞に求められるのは生理活性よりも、これらの酵素を物理的に近接させ、各コンポーネントや補酵素の拡散距離を縮める「袋」としての機能であると考えられる。この場合、*R. opacus* B-4のように有機溶媒への親和性が高い疎水性の「袋」は、脂溶性基質に対する接触効率に優れ、有利に反応を触媒しうのではないだろうか？ 紆余曲折の末ではあったが、このような考えに基づき、筆者らは *R. opacus* B-4の疎水性を活用した有機溶媒存在下でのバイオプロセス開発へと歩を進めた。

## 細菌の疎水性

ここまで何の断りもなく *R. opacus* B-4を「疎水性」細菌であると表現してきたが、微生物を「親水性」や「疎水性」を指標に定性することは、発酵生産などの分野において馴染みの薄い考え方もかもしれない。しかし、バイオフィーム形成や活性汚泥槽におけるスカム（活性汚泥の異常浮上。汚泥内で生じた気泡への菌塊の吸着が主因とされる）発生など菌体の固（気）相表面への吸着の強弱を決める主要因となるため、これらの研究において細菌の疎水性は重要なパラメーターのひとつとなっている。では、細菌の疎水性を定量するには具体的にどうすればよいのだろうか？ 調べてみると実にさまざまな疎水度測定法がこれまでに提唱されていることがわかる<sup>4)</sup>。

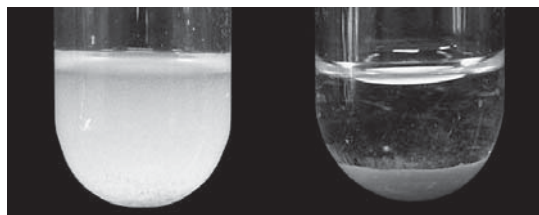


図1. 有機溶媒（*n*-テトラデカン）中での *R. opacus* B-4（左）および *P. putida* T-57（右）<sup>3)</sup>

\*著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（准教授） E-mail: honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

表1. 各法により定量した細菌の細胞表層疎水度とゼータ電位

	BATH (%) <sup>a</sup>	CAM (°)	HIC (%) <sup>b</sup>	GAT (%)	ゼータ電位 (mV)
<i>R. opacus</i> B-4	98	118	79	64	-1.7
<i>R. erythropolis</i> PR4	24	132	0	14	-18
<i>E. coli</i> JM109	13	21	18	6	-16
<i>P. putida</i> T57	1.1	ND <sup>c</sup>	17	6	0.2

<sup>a</sup> *n*-ヘキサデカンへの吸着度

<sup>b</sup> オクチルセファロースビーズへの吸着度

<sup>c</sup> 水滴が細菌ローンに浸透してしまうため測定不能

しかし、多くの異なる測定法が提唱されている事実は、細菌の疎水度測定において未だスタンダードと呼ぶべき手法が確立されていない現状の裏返しでもある。事実、各法により測定した疎水度に相関性が見られないという問題も指摘されている。そこで、筆者らは*R. opacus* B-4を含む複数の細菌の疎水度をさまざまな方法で定量するとともに、その結果を各細菌の有機溶媒への吸着性および分散性と比較検証することから研究をスタートさせた<sup>5)</sup>。

用いた測定法はbacterial adhesion to hydrocarbon (BATH), contact angle measurement (CAM), hydrophobic interaction chromatography (HIC), glass adhesion test (GAT) の4種類である。測定対象として、*R. opacus* B-4のほか、同じく*Rhodococcus*属細菌である*R. erythropolis* PR4、トルエン耐性細菌*Pseudomonas putida* T57、ならびに大腸菌JM109の4つの細菌を選定した(表1)。用いた測定法のうちBATH, HIC, GATは、それぞれ有機溶媒、アルキル化セファロース樹脂、シラン樹脂コートされたスライドガラスという疎水性担体への菌体の吸着性を指標とするものである。これらの方法を用いた場合、いずれも*R. opacus* B-4のみが顕著に高い疎水性を示した。一方、CAMは吸引ろ過によりメンブレンフィルター上に作製された細菌の層(ローン)が水滴をはじく力をローンと水滴の接触角(contact angle)により定量化する方法である。自動車のフロントガラスの撥水コートを想像してもらうと理解いただきやすいかもしれない。他の疎水度定量法と比較して、CAMは「定義上の疎水性」、すなわち水との親和性の低さを定量する上で最も適当な方法とされている。CAMによる疎水度測定では、*R. opacus* B-4に加え、*R. erythropolis* PR4が高い疎水性を示した。*R. erythropolis* PR4は、水/有機溶媒混合液中における有機相への吸着度は低いものの、*R. opacus* B-4と同様に湿潤状態で有機溶媒中に分散することができる。したがって、有機溶媒中での菌体の分散性には、BATH, HIC, GATによって定量される「見かけ

の疎水性」よりも、CAMによって測定される「定義上の疎水性」が重要なファクターとなると考えられる。*R. erythropolis* PR4における「定義上の疎水性」と「見かけの疎水性」の違いを説明するものとして、BATH, HIC, GATにおける各種担体への吸着度には菌体の表層疎水度のみでなく、そのゼータ電位が強く関与するという理由が考えられる。*R. opacus* B-4と*R. erythropolis* PR4のpH 7におけるゼータ電位を測定したところ、前者はニュートラルな値を示したのに対し、後者は-18 mVという負の電荷を有することが明らかとなった。水中に分散した有機溶媒の油滴は負に帯電しているとの報告もあり<sup>6)</sup>、*R. erythropolis* PR4における有機相への低い吸着度は、菌体と有機溶媒の静電的反発によるものと考察できる。ただし、ゼータ電位がニュートラルであっても「定義上の疎水性」に乏しい*P. putida* T-57は、やはり有機相に吸着することはできない。

このように、当初「疎水性」という言葉でひとくくりにされていた有機溶媒への吸着と分散という現象が、別々の物理的要因によってもたらされることが示された。この結果を受け、筆者らは吸着性と分散性を持ち合わせた*R. opacus* B-4の特性を表現するために「疎水性」ではなく「親油性」という言葉を意識的に用いている。本稿の記述も、以降はこれにならって進めたい。

#### 水/有機溶媒二相反応系における親油性細菌の利点

「疎水性」改め「親油性」細菌として特徴づけられた*R. opacus* B-4であるが、次に筆者らは本菌をモデルとして、有機溶媒を含む反応液中における親油性細菌の利点、すなわち「脂溶性基質に対する接触効率に優れ、親水性細菌よりも有利に反応を触媒しうる」という仮説の実証を試みた<sup>7)</sup>。

*R. opacus* B-4および比較対象の親水性細菌として大腸菌を用い、それぞれに*P. putida* F1由来のトルエンジオキシゲナーゼを発現させた組換え株を作製した。これ

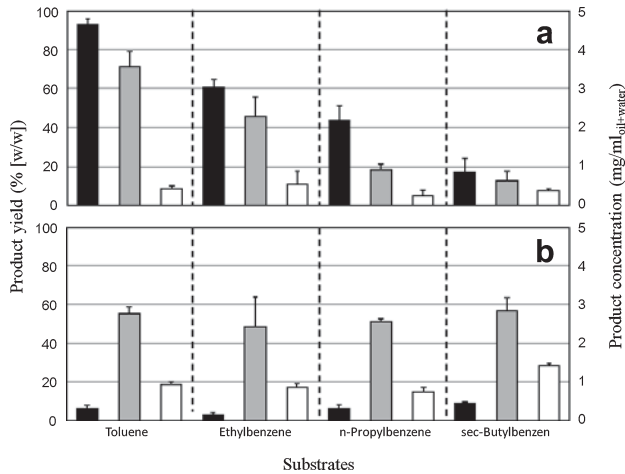


図2. 大腸菌 (a) および *R. opacus* B-4 (b) による水/有機溶媒二相反応系でのアルキル化ベンゼン水酸化反応. 反応液中の水:有機溶媒比を9:1 (黒), 5:5 (灰色), 1:9 (白) と変化した<sup>7)</sup>.

らを触媒とし, 比較的毒性の低いオレイルアルコールを有機相として含む反応液中にて各種アルキル化ベンゼン (トルエン, エチルベンゼン, プロピルベンゼン, ブチルベンゼン) の水酸化反応を実施した. これには, 側鎖アルキル基の炭素鎖数を変化させることで基質の水溶度を変化させ, 水溶度と変換能との相関を明確にするねらいがある. この結果, 大腸菌を触媒とした場合, 基質の水溶度が低下する (側鎖の炭素鎖長が長くなる) につれて生産物収率が低下していくのに対し, *R. opacus* B-4 使用時には目立った収率の低下は認められなかった (図2). すなわち, 親水性細菌である大腸菌は主として水相に分配された基質に対して作用するため, 基質の水溶度に強く影響されるのに対し, *R. opacus* B-4 は有機相中の基質に対する高い接触効率を保持しており, この影響を受けづらいためと推察できよう. 大腸菌における収率の低下について基質の毒性の影響を懸念されるかもしれないが, 一般に細菌に対する有機溶媒の毒性は, これらの  $\log P_{ow}$  (オクタノール:水混合液中での各相への分配比の対数) に相関するとされており,  $\log P_{ow}$  が1~4程度の範囲においては, この値が低くなるほど毒性が高くなることが知られている<sup>8)</sup>. 本実験で用いた基質の場合, アルキル鎖の炭素鎖数が長くなるほど  $\log P_{ow}$  は高くなり毒性は低下することから, 収率の低下が生菌率の低下に起因するとは考えづらい.

また, 有機相であるオレイルアルコールと水系反応液の体積比を変化させ, これらが収率に及ぼす影響についても検討を行った. この結果, 大腸菌では有機相の体積が低いほど反応効率が高まるのに対し, *R. opacus* B-4

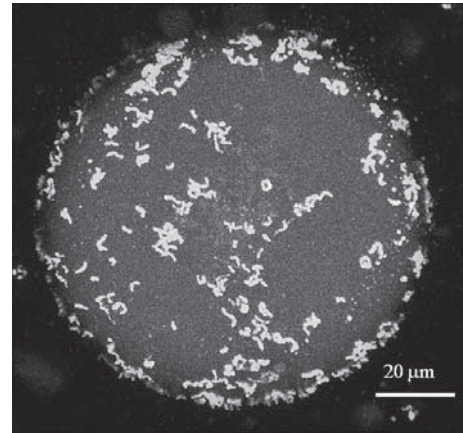


図3. *R. opacus* B-4 によって安定化された water-in-oil エマルジョン中の水滴. 蛍光標識された菌体が水滴と有機溶媒の界面に局在している<sup>9)</sup>.

の場合, 等量の水/有機溶媒混合液中にて最大の変換効率を得られた. 二相反応系における脂溶性基質の水相への分配は両相間での濃度勾配が推進力となる. したがって, 大腸菌の場合, 有機相の割合が小さく基質濃度勾配が大きくなるほど基質が水相中の菌体に供給されやすくなる. 一方, *R. opacus* B-4 では, 有機相中の基質に対しても高い接触効率を有することから, 水/有機溶媒間の比界面積が最大となる等量混合液中にて最大の変換効率を示したものと考察できる. なお, *R. opacus* B-4 を含む水/有機溶媒混合液は, 非常に均一な water-in-oil 型のエマルジョンを形成する<sup>9)</sup>. 菌体と水を蛍光染色し, エマルジョン中の水滴を顕微鏡観察すると, 菌体が水と有機溶媒界面に局在している様子がよくわかる (図3). ただし, 菌体は水滴の全面を覆っているわけではなく, エマルジョンの安定化には本菌に由来する界面活性剤様物質の関与が示唆される. 化学構造などの詳細はまだ明らかとはなっていないが, これらの物質が水/有機溶媒間の比界面積を高め, 難水溶性基質の菌体内への取り込み促進に一役買っていると考えられる.

#### 有機溶媒単相反応系の実現

先述のとおり, 筆者らは *R. opacus* B-4 の持つ有機溶媒への高い吸着性と分散性をひくくめた特性として「親油性」という表現を用いている. このうち, 前項で示された水/有機溶媒二相反応系における基質への接触効率の高さは有機相への吸着性に依るところが大きい. 次なる試みとして, 筆者らは親油性細菌の分散性を活用することで, 水を含まない有機溶媒中での微生物反応,

言うなれば有機溶媒単相反応系の実現に向けた取り組みを開始した。「水を含まない」と言っても湿菌体を用いる以上、細胞内や細胞間隙に残存する水分は無視できない。厳密に言えば、筆者らが提唱する有機溶媒単相反応系とは「きわめて水分含量の少ない水/有機溶媒二相反応系」とも換言できよう。しかし、水系反応液が不要となることにより、反応液体積を減少させることができるほか、バイオプロセスにおいてしばしば問題となる反応容器の雑菌汚染や生成物の分離・回収の煩雑さを軽減できるという通常の二相系にはないメリットが期待できる。

*R. opacus* B-4はオレイルアルコールやフタル酸ビスオクチル (BEHP) など $\log P_{ow}$ が高い有機溶媒中に分散した状態で少なくとも5日間の生存が可能である<sup>3)</sup>。オレイン酸を溶解させたBEHP中に*R. opacus* B-4をけん濁しておく、オレイン酸の経時的な分解が見られることから、本菌は有機溶媒中でじっと耐え忍んでいるだけではなく、異化代謝能を維持し続けていることが伺える。また、本菌のアルカンモノオキシゲナーゼ遺伝子のプロモーター制御下にGFP遺伝子を導入後、この菌体をBEHPにけん濁した状態でレポーターアッセイを実施したところ、アルカンの添加に応答したGFPの蛍光を検出することができた。すなわち、*R. opacus* B-4は有機溶媒中で異化代謝だけでなくタンパク質合成などの同化代謝能も維持できているという意外な事実も明らかとなっている<sup>10)</sup>。

とはいえ水をほとんど含まない過酷な条件下である。本来の最適生育条件下での代謝活性に比べ、有機溶媒中でのそれはかなり脆弱なものであることは容易に想像できる。たとえばNAD(P)H要求型の酵素反応を有機溶媒単相系で実施しようとする場合、オレイン酸のような脂溶性炭化水素の異化代謝により、これらの補酵素を再生することも可能ではある<sup>3)</sup>。しかし、有機溶媒中での脆弱な代謝活性に依存するよりも、菌体の役割はあくまで「親油性の袋」であることにとどめ、補酵素再生系を含む必要な酵素群をこれに詰め込んだ「親油性生体触媒パーティクル」を利用した方が、はるかに高い生産効率が達成されると期待できる。

そこで筆者らは、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27株由来の2種類のアロキシルデヒドロゲナーゼ (ADH) を共発現させた *R. opacus* B-4を用い、有機溶媒単相反応系での芳香族ケトンの立体選択的還元反応を実施した。用いたADHのうち、一方は目的反応であるトリフルオロアセトフェノン (TFAP) の立体選択的還元を触媒し、もう一方はシクロヘキサノールの酸化反応によりTFAPの還元で消費されるNADHを再生する(図4)。

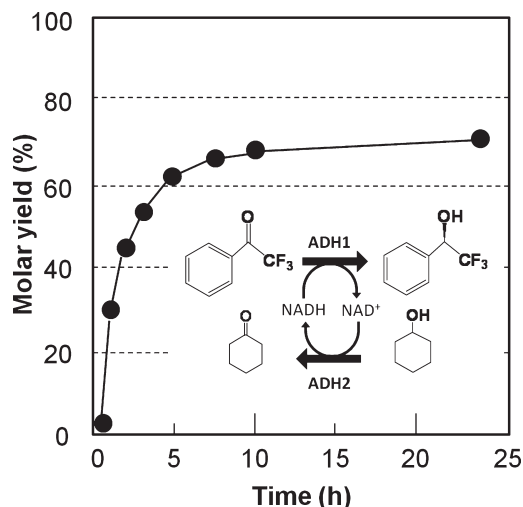


図4. *T. thermophilus* HB27由来アルコールデヒドロゲナーゼを発現させた*R. opacus* B-4によるTFAPの還元反応

好熱性微生物由来酵素を用いたのは、これらの酵素には熱だけでなく界面活性剤や有機溶媒などの化学ストレスに対しても優れた耐性を有するものが多く見られるという知見<sup>11)</sup>に着目してのことである。反応はADHの最適温度である70°Cで実施されたため、中温性細菌である*R. opacus* B-4は完全に死滅するが、その生死により有機溶媒への分散性に目立った変化は見られなかった。反応条件の最適化などを経て、最終的にTFAPとシクロヘキサノールの等モル混合液10 mlに組換え*R. opacus* B-4の湿菌体10 g、ならびに各基質の1/1000モルに相当するNADHを加えた混合液を、70°C、24時間の反応に供することで、モル変換率で約70%、濃度にして510 g/lという効率で生産物を得ることができた(図4)。1回のバッチ反応に多量の菌体を要するといった欠点もあり、コドン最適化などによる発現効率の向上など改善すべき点は残されているが、基質に微生物菌体を混ぜるだけの至って大胆かつシンプルな反応液組成でこれだけの生産効率が示された点は特筆すべきだろう。本反応系には水系溶媒はもちろんのこと、もはや有機溶媒すら含まれておらず、少々大げさな表現を用いれば、究極的にシンプルなバイオプロセスの実施形態が示されたとも言える。

## おわりに

以上のとおり、筆者らは*R. opacus* B-4の「親油性」をキーワードに非水環境下でのバイオプロセス開発に取り組んできた。本菌が非常にユニークな特性を有したきわめて特殊な微生物のように思われるかもしれないが、過去の報告を調べてみると1970~1980年代を中心に

*Rhodococcus* 属と近縁の *Nocardia* や *Corynebacterium* 属細菌を用いた有機溶媒単相反応系での微生物変換がわが国でも試みられている<sup>12)</sup>。 *R. opacus* B-4の親油性を見いだした経緯で述べたとおり、そもそも本菌は有機溶媒への吸着性や分散性を指標に分離された株ではない。今後こういった観点からのスクリーニングが実施されることにより、物質生産においてさらに使い勝手のよい親油性細菌が見つかる可能性は大いにあると思われる。これらの機能開発が進めば、産業レベルでの非水バイオプロセスの実現は十分に可能だと感じている。

本稿で紹介した研究は、NEDO「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」プロジェクトのもと実施された。共同実施者である広島大学・加藤純一教授、徳島大学・大政健史教授をはじめ、研究にご協力いただいた大阪大学大学院工学研究科の卒業生、在校生に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Schmid, A. *et al.*: *Extremophiles*, **2**, 249 (1998).
- 2) Na, K. S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 408 (2005).
- 3) Yamashita, S. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 761 (2007).
- 4) 岩淵範之ら：バイオフィルム—その生成メカニズムと防止のサイエンス—, p. 84, サイエンスフォーラム (1998).
- 5) Hamada, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 357 (2008).
- 6) Busscher, H. J. *et al.*: *Colloids Surf. Biointerfaces*, **5**, 111 (1995).
- 7) Hamada, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 116 (2009).
- 8) Inoue, A. and Horikoshi, K.: *Nature*, **338**, 264 (1989).
- 9) Honda, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 767 (2008).
- 10) Sameshima, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 119 (2008).
- 11) Atomi, H. *et al.*: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 166 (2005).
- 12) 山根恒夫：油化学, **42**, 50 (1993).