

論文の内容の要旨

論文題目 ヘプタノール感受性 *Pseudomonas putida* から得られたヘプタノール耐性変異株の脂肪酸トリポ多糖の変化による耐性機構の解明

氏 名 津幡 卓一

序論

石油は硫黄、硫酸、ベンゾチオフェン、ジベンゾチオフェン (DBT) などという形で 0.05 から 5% の硫黄を含んでいる。DBT は 現在の石油精製の脱硫過程では除去が困難だが、酸性雨となる原因物質と考えられ、日本を始め、アメリカ合衆国や欧州は規制を施している。石油精製は爆発の危険性があるので空気が希薄な状態で行われる。微生物を石油の精製に利用するためには、その微生物は空気の希薄な状況下で生存することが必要である。しかし、嫌気性菌は生命活動が低く、しかも完全な嫌気状態を作るにはコストがかかるので好ましくない。そこで、わずかな空気が存在するような窒素置換された条件下で成長する微生物なら、嫌気性菌より成長が早く、好ましいと考えた。また、石油の精製に使用する微生物は石油に接触することになるため、高濃度の石油の存在下で生存できなければいけない。この二つの条件を併せ持つ微生物は石油精製に有用だと考えられる。

石油から脱硫をする微生物を考えると、現行のプロセスでは難しい DBT を分解する微生物を得るのが最も良いと考えた。さらに、窒素置換条件下での成長と石油耐性を可能とする微生物でなければならない。この微生物のスクリーニングを考えると、窒素置換条件下で、

DBT と有機溶媒を加えて培養し、しかも DBT が分解していなくてはならないという選別の方法では条件が厳しすぎて微生物を得ることが難しいと考えた。また、DBT の分解だけでなく、他の有用な機能を持った微生物を有機溶媒に耐性にできれば、水に不溶な物質に微生物を作用させるためには大量の水が必要であったが、有機溶媒を用いることができれば、反応槽は小さくて済み、コストが低くて済む。そこで、選別の条件を厳しくするより、窒素置換条件下で DBT を分解する微生物を取得し、それを有機溶媒耐性にすることにした。

有用な性質を有する微生物を有機溶媒耐性にするとき、有用な性質が失われないようにしなければならない。強い毒性を有する変異源を用いると、有用な性質が失われ易い。そこで、自然の事象で起こりうる環境の変化ならば、有用な性質は損なわれにくいと考えた。その環境の変化として紫外線照射および有機溶媒との接触を行うことにした。

アルコールの中では非常に強い毒性があるヘプタノールに対して菌を耐性にするなら、毒性のあるさまざまな有機溶媒に対しても耐性になるであろう。さらにヘプタノールは揮発性でない。こうした理由でヘプタノールに耐性な菌の創製を試みた。

結果と考察

(1) 土壌試料から窒素置換条件下で、DBT を分解し(145.3±1.2 ppm)、成長する(OD₆₆₀ : 0.241 ±0.005) 微生物を得て、*Pseudomonas putida* No. 69 と名付けた。この菌株に紫外線の照射と *n*-ヘプタノールに浸すことで、窒素置換条件下、5%デカリンと 1000 ppm DBT を含む培地で 30 日間培養し、DBT の分解が 188 ppm である菌株を得た。この菌株を *Pseudomonas putida* No. 69-3 と名付けた。好気条件下で、10%有機溶媒を含む培地での No. 69-3 株の成長は、*n*-ヘプタノール、2-オクタノン存在下では OD₆₆₀ 値は 0.41 まで、エトキシベンゼンと *n*-オクタノール存在下では OD₆₆₀ 値は 1.22 まで成長した。さらに、50% ヘプタノール存在下で OD₆₆₀ 値は 0.15 まで成長した。

(2) No. 69-3 株を 10% *n*-ドデカノール、*n*-ウンデカノール、*n*-ノナノール、*n*-オクタノール、*n*-ヘプタノールを含む培地で培養し、脂肪酸、リポ多糖、表層の疎水性を調べた。No. 69-3 株は log *P* 値の大きいアルコール(log *P* 値:ドデカノール、5.0;ウンデカノール、4.5;ノナノール、3.4; オクタノール、2.9; ヘプタノール、2.4)と培養すると、成長が良かった。これはアルコールの毒性がその log *P* 値と深く関係あることを示す。

No. 69 株と全てのアルコールと培養した No. 69-3 株は脂肪酸として、*n*-テトラデカン酸、*n*-ヘキサデカン酸、トランス-9-ヘキサデセン酸、シス-9-ヘキサデセン酸、*n*-オクタデカン酸、トランス-11-オクタデセン酸、シス-11-オクタデセン酸を含んでいた。No. 69-3 株は *n*-ウ

ンデカノール、*n*-ノナノール、*n*-ヘプタノールと培養すると奇数炭素数の脂肪酸と分枝脂肪酸（*n*-ペンタデカン酸、*n*-ヘプタデカン酸、トランス-10-ヘプタデセン酸、シス-10-ヘプタデセン酸、イソオクタデカン酸）も検出した。トランス型不飽和脂肪酸とシス型不飽和脂肪酸の比はNo. 69 株よりNo. 69-3 株の方が大きかった。濁度が増加するにつれて、No. 69-3 株では奇数炭素数の脂肪酸は増加し、偶数炭素数の脂肪酸は減少した。No. 69 株では18個の炭素数の脂肪酸は減少し、16個の炭素数の脂肪酸は増加した。濁度の大きさに関わらず、トランス型とシス型不飽和脂肪酸の和はNo. 69 株とNo. 69-3 株で一定だった。しかし、No. 69-3 株のシス型不飽和脂肪酸は減少し、トランス型不飽和脂肪酸は増加した。これはトランス型不飽和脂肪酸がシス型不飽和脂肪酸由来であることを示唆している。

遊離脂肪酸の割合をどの程度脂肪酸が脂質に含まれていないかであると定義すると、遊離脂肪酸の割合はNo. 69-3 株を*n*-ドデカノール、*n*-オクタノールと培養したとき、および有機溶媒を加えず培養したとき、ほとんど全ての脂肪酸に対して遊離脂肪酸の割合は、使われたアルコールのlog *P*値が小さくなるほど大きくなった。No. 69-3 株を*n*-ウンデカノール、*n*-ノナノール、*n*-ヘプタノールと培養すると、使われたアルコールのlog *P*値が小さくなると、ほとんど全ての脂肪酸に対して遊離脂肪酸の割合は大きくなった。しかし、*n*-ドデカノールと培養したときより、*n*-ウンデカノールと培養したときに、いくつかの遊離脂肪酸の割合が小さかった。これは奇数炭素数の脂肪酸の生産に関係あるかもしれない。

膜を構成するリン脂質はリン酸基を膜の外側に向けている。それ故、脂質に含まれる脂肪酸と比較して、リン酸基のない遊離脂肪酸の増加は膜を疎水性にしうる。このことは水に比較的良く溶ける毒性のあるアルコールにさらされると、脂質に含まれる脂肪酸に対して、遊離脂肪酸の量を増加させ、膜を疎水性にしたことを示す。

No. 69-3 株のリポ多糖を20%ポリアクリルアミドゲルを使って分析した。*n*-ドデカノール、*n*-ウンデカノール、*n*-ノナノール、*n*-オクタノールで培養したときは二本の高分子量バンドを検出した。このアルコールの他に*n*-ヘプタノールで培養したときにも、共通の低分子量バンドを検出した。高分子量リポ多糖は親水性の糖を含んでいる。それ故、リポ多糖は低log *P* 値の毒性のあるアルコールと接触すると、疎水性となった。

No. 69-3 株の菌体溶液と*n*-ヘキサンと混合し、水層のOD₆₆₀ 値を測定し、菌体表層の疎水性を調べた。OD₆₆₀ 値の減少は低log *P* 値のアルコールと培養すると大きかった。これは毒性のあるアルコールと培養すると菌体表層は疎水性が増したことを示す。

(3) 表面の疎水性が増した菌体への界面活性剤の相互作用を調べるために、0.01% (v/v) の濃度のTriton X-100、Triton X-165、Emulgen911、tween 80、セチルメチルアンモニウム

ブロミド存在下での No. 69-3 株の成長は成長の stationary phase での OD₆₆₀ 値および培養液当たりのタンパク質量は界面活性剤存在の有無に拘わらず、同じだったが、Triton X-100 があると、成長の early-log phase までは早く成長した。成長の mid-log phase では成長は非常に似ていた。Triton X-100 濃度依存性を調べたところ、0.01% (v/v) の濃度で最も良く成長した。

Triton X-100 の成長を向上するための時間を決定するために、培養中に Triton X-100 を加えた。OD₆₆₀ 値が 0.070 で Triton X-100 を加え、0.01% (v/v) とした。2 時間後には Triton X-100 を加えない場合に比べて、OD₆₆₀ 値が 0.048 大きかった。さらに 2 時間後には OD₆₆₀ 値の差が 0.132 まで広がった。Triton X-100 が成長を向上させるのに 2 時間かからなかった。しかし、培養液は OD₆₆₀ 値が 0.251 のときに 0.01% (v/v) Triton X-100 にしても、成長は向上しなかった。

Triton X-100 による菌体の凝集の変化を理解するために菌体の沈降における変化と Triton X-100 の添加による菌体表面の疎水性を調べた。Triton X-100 なしに培養した No. 69-3 株は Triton X-100 存在下で培養したときより、早く沈殿した。このことは菌体の沈殿の速度の相違は凝集の程度によることを示唆する。

菌体の凝集の程度の減少は菌体表面の疎水性の減少によるかどうかを調べるために、菌体表面の疎水性の変化を調べた。No. 69-3 株の膜は No. 69 株より疎水性度が大きかった。しかし、Triton X-100 の添加に拘わらず、No. 69-3 株に対しては疎水性は非常に似ていた。凝集の程度が Triton X-100 非存在下で培養した No. 69-3 株より、Triton X-100 存在下で培養した No. 69-3 株の方が小さいのは Triton X-100 により菌体表層の疎水性度が減少したからではない。