

アルコール耐性 *Pseudomonas* 属細菌の分離

Isolation of Alcohol Tolerance *Pseudomonas* sp.

武田 耕治^{1*}, 成川 隆也¹, 高橋 澄人¹, 加藤 純一²
KOJI TAKEDA¹, TATSUYA NARIKAWA¹, SUMITO TAKAHASHI¹ and JUNICHI KATO²

¹ メルシャン株式会社生物資源研究所 〒438-0078 静岡県磐田市中泉1808

² 広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻 〒739-8530 広島県東広島市鏡山1-3-1

* TEL: 0538-21-1134 FAX: 0538-21-1135

* E-mail: takeda-k@mercian.co.jp

¹ *Bioresource Laboratories, Mercian Corporation, 1808 Nakaizumi, Iwata, Shizuoka 438-0078, Japan*

² *Dept. of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Science of Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan*

(原稿受付 2004年4月7日/原稿受理 2004年7月10日)

Biological process was well admitted as an energy saving process, and used for industrial production of high value-added materials. We searched aliphatic alcohol tolerant microorganisms to produce low value but widely used materials, which could serve as host cells in the presence of high concentrations of solvent. Twelve alcohol tolerant microorganisms were isolated from soil samples around an oil field, mainly, and identified of a genus as *Pseudomonas*. Among them, *Pseudomonas* sp. OCR002 was found to be able to growth in the medium containing high concentrations of toluene, 1-heptanol, cyclohexanol and other long chain alcohols. The strain OCR002 and some another alcohol tolerant microorganisms could not utilize n-alkane and short chain alcohol for growth. They were transformed easily by the broad-host-range plasmid pCF704. The isolated alcohol tolerant microorganisms could be used for industrial production of low value material such as cyclohexanol and other alcohols.

Key words: alcohol tolerance, cyclohexanol tolerance, *Pseudomonas* sp., pCF704

キーワード: アルコール耐性, シクロヘキサノール耐性, *Pseudomonas* 属, pCF704

1. 緒 言

近年, 地球環境保護を目的とした環境調和型生産システムの開発が望まれている。これまでの化学工業は産業発展に大きく寄与して来たが, 高温高圧の反応が必要なことから大量のエネルギーを消費し, かつ処理の困難な重金属触媒や副産物を生じてきた。一方, 微生物を用いた生産システムは, 常温常圧で反応が進行することから省エネルギー型であり, かつ処理困難な副産物は生じにくい環境調和型生産プロセスとして評価され始めている。しかしながら微生物を用いた生産システムは, 水系等の限られた環境下のみでしか機能しないという特性のため, 基質及び生産物濃度が比較的低濃度でも採算性の成り立つ医薬品等の高付加価値製品の生産で応用されることが多かった。一方, このような微生物の欠点を補うため, 本来生育阻害を示す有機溶媒を飽和濃度以上含む有機溶媒-水 2 相系で有機溶媒耐性菌を触媒として用いる事で油脂の加水分解や疎水性化合物の修飾が効率的に行なわれるという研究がなされており, 微生物を用いた生産システムの適用の拡大が示されている^{3,8)}。筆者らは, 高分子ポリマーの原料となるシクロヘキサノールを含む

脂肪族アルコールのような, 低付加価値でも汎用性のある非水溶性の基質から化学品原料を微生物を用いて生産するためには, 高濃度の有機溶媒存在下で機能する微生物を宿主細胞として用い, 高い基質濃度及び生産物濃度の微生物生産プロセスを実現することが望ましいと考え, 宿主細胞となりうる有機溶媒耐性微生物の取得を試みることにした。

微生物に対する有機溶媒の毒性を表す指標として, $\log P$ 値が用いられてきた¹⁰⁾。脂肪族炭化水素と鎖長の対応する脂肪族アルコールとを比較すると, アルコール体の方が $\log P$ 値が低く, $\log P$ 値が低いほど毒性が高いとされている事から, 脂肪族炭化水素より脂肪族アルコールの方が高い毒性を示す事が予想された⁹⁾。よって, 炭化水素酸化反応プロセス用の溶媒耐性微生物の取得を試みる際には, 生産物である脂肪族アルコールに対する耐性が高い微生物を取得することが有効であると推測し, 脂肪族アルコール耐性微生物の取得を試みた。本報告では, 得られたアルコール耐性微生物の特性及び宿主細胞としての評価を報告する。

2. 実験方法

2.1. 材料及び機材

アルコール耐性微生物の分離及び耐性試験に用いた有機溶媒及び試薬は、特に指定しない限り特級グレードを和光純薬工業（株）より購入して用いた。培養に用いた Nutrient Broth (NB 培地) 及び Bacto Ager は Difco 社より購入した。有機溶媒耐性微生物の分離を含む有機溶媒存在下での液体培養はテフロンライナー付 16 mL 容量ねじ栓付試験管 (CORNING 社製) により密栓下で行なわれ、有機溶媒の揮発を防いだ。形質転換能確認用のプラスミドベクターとして、プラスミド pUC19 のマルチクローニングサイトを含む 95 bp の断片を、プラスミド pBBR122 (Mo Bi Tec 社) の *EcoR* I-*Nco* I サイトへ連結した融合プラスミド pCF704 を用いた⁴⁾。

2.2. 有機溶媒耐性微生物分離用サンプルの収集

有機溶媒耐性微生物分離源として静岡県磐田市の自社工場敷地内とその周辺71ヶ所の土壌、及び静岡県相良町油田跡地3ヶ所の原油及び周辺土壌39サンプルを用いた。

また、アルコール耐性微生物をアルコール存在条件下で集積させ、効率よく耐性微生物を取得するため以下の方法を試みた。

静岡県磐田市の立地する自社工場廃水処理施設最終処理槽より生じる脱水済み活性汚泥約 2 kg を森林腐葉土約 2 kg と混合後 18 L 容量の金属製容器に移した。この汚泥混合土壌に炭素数 5~10 の一級アルコール、トルエン及びシクロヘキサノール各 200 mL をそれぞれ個別に添加混合し、室温にて放置した。放置後 7 日目及び 14 日目に各有機溶媒及び活性汚泥を含む廃液を 200 mL ずつ追加し、放置後 21 日目に混合物を有機溶媒耐性微生物の分離源として供した。

2.3. 有機溶媒耐性微生物の分離

収集した分離用サンプルからの有機溶媒耐性微生物の分離を以下の手法により実施した。

収集した微生物分離用サンプルまたは集積サンプル 10 mg を 2 mL の 0.9% (w/v) 生理食塩水に懸濁後 5 分間静置し、固形分を沈降させた上清を 100 μ L 抜き取り、2 mL の 20% (v/v) の 1-ペンタノール、1-オクタノール、シクロヘキサノール及びシクロオクタノールをそれぞれ含む NB 培地に移し、テフロンライナー付キャップにより密栓した。28°C、220 rpm の回転振とう条件下で 1~3 日間培養し、目視にて濁度の上昇が認められた培養液をアルコール耐性微生物が増殖したと判断し、耐性微生物の分離を行なった。微生物の分離のため、培養液を生理食塩水により段階的に希釈した後、1.5% (w/v) の Bacto Ager を含む Nutrient Broth 寒天平板培地 (NBA 培地) に塗布し、微生物コロニーを分離した。分離した微生物は NBA スラント培地にて冷蔵保存するとともに、濁度上昇が認められた有機溶媒を含む NB 培地で培養後、終濃度 25% (w/v) のグリセロール存在下で -80°C にて凍結保存した。また、有機溶媒非存在下の NB 培地で培養した培養液も、グリセロール存在下で凍結保存した。

2.4. 有機溶媒耐性評価

有機溶媒耐性度及び耐性溶媒種の評価を以下の手法により実施した。

単離した微生物を保存スラントより 1 白金耳又は凍結保存液より 10 μ L を 2 mL の 1% オクタノールを含む NB 培地に植菌し、28°C にて 16~20 時間 220 rpm にて前培養した。前培養液を 10 μ L 抜き取り 20% (v/v) の各種有機溶媒を含む 2 mL の NB 培地に添加し 28°C、220 rpm にて培養し微生物の増殖性を試験した。有機溶媒耐性能の有無は、培養開始後 1 日、3 日、6 日目の 600 nm における濁度 (OD₆₀₀ 値、日立製 D-2000 により測定) と植菌直後の OD₆₀₀ 値の差を算出し、その差が 0.1 以上であり、且つ顕微鏡観察により微生物菌体が認められた場合に有機溶媒存在下で生育したと認め、耐性能を示すと判断した。

2.5. 有機溶媒資化性評価

アルコール耐性能を有すると評価された微生物に関して、以下の手法により単一炭素源として有機溶媒の資化性を評価した。

単離した微生物を保存スラントより 1 白金耳又は凍結保存液より 10 μ L を 2 mL の NB 培地に植菌し、28°C にて 16~20 時間 220 rpm にて培養した。この培養液を終濃度 0.1% (v/v) の炭素数 5~10 の脂肪族炭化水素、シクロヘキサノール及びこれら炭化水素に対応するアルコールを含む MS 培地 (K₂HPO₄, 4.3 g; KH₂PO₄, 2.4 g; (NH₄)₂SO₄, 2.0 g; MgCl₂·6H₂O, 0.16 g; FeSO₄·7H₂O, 0.6 mg; MnCl₂·4H₂O, 1.0 mg; CaCl₂·2H₂O, 26 mg; NaMoO₄·2H₂O, 2.0 mg; ZnSO₄·7H₂O, 0.1 mg; CoCl₂·6H₂O, 0.1 mg; NiCl₂·6H₂O, 0.01 mg; CuSO₄·5H₂O, 0.1 mg; 蒸留水, 1.0 L) に植菌した。この際に、NB 培養液より持ち込む栄養源を利用して生育する可能性を確認するため、有機溶媒を含まない MS 培地での培養液を対照区とした。培養を 28°C にて 5 日間 220 rpm の条件で行い微生物の増殖を観察した。有機溶媒資化性の判定は有機溶媒耐性評価と同様に、培養 5 日目の OD₆₀₀ 値と培養開始時の OD₆₀₀ 値の差より判断し、この差が 0.1 以上あった場合に微生物の生育が認められるものとし、有機溶媒資化性を有すると判断した。

2.6. 分離微生物の分類同定

取得したアルコール耐性微生物の分類同定を、16S rRNA をコードする DNA (16S rDNA) の塩基配列相同性を指標として類縁属を検索する以下の方法で実施した¹⁵⁾。

取得した微生物のゲノム DNA を ISOPLANT (日本ジーン製) を用いて抽出した。この抽出 DNA を鋳型として、TaKaRa LA Taq および TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (共に TaKaRa 社製) を用いて 16S rDNA 遺伝子を増幅した。PCR プライマーとしては 16S rDNA 用の 9F と 536R を使用した¹⁵⁾。

PCR 増幅産物の塩基配列を ABI PRISM 310 (Applied Biosystems 社製) を用いて解析し、系統解析により微生物を分類同定した。

2.7. エレクトロポレーションの適用

取得したアルコール耐性微生物に対し、有効な形質転換系が存在するかを評価するため、グラム陰性細菌汎用ベクター pCF704 を用いて形質転換試験を実施した。使用した pCF704 はカナマイシン耐性マーカーを有するため、25 mg/L のカナマイシンを含む NBA 平板培地上での生育を確認する事を目的とし、取得したアルコール耐性微生物のカナマイシン感受性を確認した後、感受性株に関して以下の手法により形質転換試験を実施した。

NB 培地にて培養した有機溶媒耐性微生物を10% (w/v) のグリセロールに懸濁した後、エレクトロポレーション法 (25 μ F, 2.5 kV; GEAN PULSER II, BIO RAD 社製) により pCF704 を導入した。導入後、1×SOC 培地¹²⁾ に懸濁し 28°C にて60分間振とうした懸濁液を 25 mg/L のカナマイシンを含む NBA 平板培地に植菌しカナマイシン耐性に形質転換されたコロニーの有無を確認した。コロニーが出現した際には、本コロニーを形成する微生物より QIA prep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製) を用いてプラスミドを抽出した後、制限酵素 *Sph* I で消化し、アガロース電気泳動により抽出 DNA の塩基長を確認した。

3. 結果及び考察

3.1. 有機溶媒耐性微生物の分離と評価

多様な地点からの採取の結果、総計12株の微生物を取得し OCR001~012 株とした。耐性溶媒種としては 1-オクタノールのみで、短鎖の 1-ペンタノールや脂環系アルコール重層系で生育できる微生物はこの段階では取得できなかった。

微生物の分離源として自社工場内排水処理施設活性汚

泥を用いた集積法より 1 株 (OCR001) の耐性株が得られ、静岡県相良町油田跡付近の土壌から11株 (OCR002~012) の耐性株が得られた。他の土壌のサンプルからは、用いた有機溶媒に対する耐性微生物を得る事ができず、定常的に有機溶媒が存在しうる土壌等のサンプルから耐性微生物が分離されたのは理にかなっていた。これら12株の分離株を脂肪酸炭化水素を含む有機溶媒耐性評価を実施したところ、油田跡周辺から分離した OCR002 株がシクロヘキサノールに対する耐性を示した(表 1)。本株は顕微鏡観察により全長約 2 μ m の桿菌で、運動性を有していた。これまでに多種の有機溶媒耐性微生物が多様な環境から分離されてきた。中でも、堀越らのグループが分離した *Pseudomonas putida* IH-2000, *Pseudomonas* sp. DS-313 及び *Bacillus* sp. DS-1906 は低い Log *P* 値の溶媒種にも耐性で、IH-2000 は Log *P* 値2.4の 1-ヘプタノール存在下で、DS-313 及び DS-1906 は Log *P* 値 2.1のベンゼン存在下で生育する事が報告されている^{15,9)}。しかしながら、Log *P* 値が 2 未満の溶媒種に対する耐性微生物に関する報告はまれで、Log *P* 値1.2のシクロヘキサノールが飽和濃度以上存在環境で生育できる微生物は分離されていなかった。筆者らが分離した OCR002 株が有機溶媒耐性微生物としては新規な微生物であるといえた。しかしながら、OCR002 株は 1-オクタノールを用いた耐性株分離試験区より分離され、本株分離時に用いた分離用サンプルをシクロヘキサノール重層下で培養した際は、生育が見られなかった。Weber ら (1994) の研究によると、有機溶媒耐性 *Pseudomonas* 属細菌群における細胞膜リン脂質の脂肪酸組成は、有機溶媒の存在により *trans/cis* 比が高くなり細胞膜の構造を強くすることが示されており、これらの理由から、強度有機溶媒耐性微生物を取得するためには、低毒性有機溶媒あるいは低濃度有機溶媒においての培養を経た後に、強毒性

表 1. Growth of isolated microorganisms in 20% (v/v) of solvent in NB medium.

Solvent	Log Pow	Isolated strain code (OCR-)											
		001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011	012
<i>n</i> -Decane	6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Nonane	5.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Octane	4.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Heptane	4.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Hexane	4.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Decanol	3.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Nonanol	3.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cyclohexane	3.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Octanol	3.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Pentane	3.1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Toluene	2.8	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1-Heptanol	2.3	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1-Hexanol	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Pentanol	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyclohexanol	1.2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Alcohol tolerant microorganisms were cultivated in NB medium containing 20% organic solvent. OD600 was measured at beginning and after 1, 3 and 6 days cultivation. Symbols, +; OD600 difference of after 1, 3, 6 days cultivation and beginning of cultivation was above 0.1, and microorganism growth was confirmed by microscope. -; OD600 difference less than 0.1, or couldn't confirmed of microorganism growth by microscope.

有機溶媒あるいは高濃度有機溶媒にさらす手法が有効であるとされていた¹⁴⁾。本 OCR002 株を分離する際に、分離用サンプルを直接強毒性のシクロヘキサノールに添加した際は、耐性獲得のための細胞膜構造を構築できず、シクロヘキサノールに比較して低毒性のオクタノールに一度さらす事により、溶媒耐性に望まれる細胞膜構造を構築できたと思われた。

また、OCR002 株は log P 値2.3の 1-ヘプタノール及び Log P 値2.8のトルエンに対しても耐性を示した。多様な芳香族系化合物に対する耐性の検討は実施していないが、より広範囲の有機溶媒への耐性が期待された。一方、OCR002 株は log P 値が1.2のシクロヘキサノールに対して耐性を示すが、log P 値2.0の 1-ヘキサノール及び Log P 値1.4の 1-ペンタノールに対しては耐性を示さなかった。このような現象は、*Bacillus* sp. DS-1906 に於いても認められ、Log P 値2.1のベンゼンに耐性を示すが、Log P 値3.1の p-キシレンや2.9のステレンに対しては耐性を有しないことが示されている¹⁵⁾。有機溶媒耐性機構としては細胞膜構造の変化による構造の安定化と細胞内への溶媒の流入防止、リン脂質合成速度の向上による細胞膜修復の改善、細胞膜に存在する排出ポンプによる有機溶媒の排出等複数のシステムからなるとされているが、有機溶媒種により作用するシステムの重要性が異なるとされている¹⁶⁾。このことから、OCR002 株に於いては脂環式アルコールと直鎖アルコールでは作用点もしくは耐性機構が異なるかもしれないと推測した。

3.2. 有機溶媒資化性の評価

12株の有機溶媒耐性株の多くは、油田跡地の原油が土壌に染み込んだ地点より分離されたものであった。環境浄化への応用の可能性を探るため、本菌株群の炭化水素分解能を評価するとともに、生産プロセスを構築する上で原油成分をそのまま炭素源として用いることができるか探るため、これら12株のアルコール類や炭化水素の資

化性を確認した(表2)。ところが、全ての耐性株は脂肪族炭化水素やシクロヘキサノールを資化できず、一部の株が、炭素鎖8~10の一級アルコールを資化できるとどまった。アルコール耐性微生物を分離した相良町油田跡地は、森林中の腐葉土に囲まれており比較的富栄養な環境のため溶媒資化能を有さなくても生育できると推測した。よって、耐性株は環境浄化のための炭化水素分解には応用できないと判断した。しかしながら、アルコール生産プロセスの面からは、これら耐性株は原料である脂肪族炭化水素も生産物であるアルコールも資化しないことから、反応収率を向上させる面からは優れた宿主細胞としての特性をもつと思われた。また、OCR002 株は1-デカノールを資化できることからデカン酸化酵素遺伝子を用いて形質転換するとデカン資化微生物になりえると予想された。仮に、シクロヘキサノールよりシクロヘキサノールの生産を想定した場合、デカン資化性を付与する事ができれば安価な原油(デカンを含む)を炭素源・エネルギー源として用いる事ができることからプロセス構築上有利であると思われた。

3.3. 有機溶媒耐性株の分類同定と形質転換系の評価

アルコール耐性株の 16S rDNA の約 500 bp をシーケンシングし塩基配列相同性による分類同定を行なった結果、全ての株が *Pseudomonas* 属に分類された(図1)。それぞれの株の配列を比較したところ、OCR002 及び OCR005 は 16S rDNA 塩基配列上が完全に一致しており、両株の塩基配列は約 500 bp の範囲では *Pseudomonas putida* ATCC23835 及び *Pseudomonas gingeri* NCP-PB3147 の塩基配列と完全に一致した。また、OCR006, 008, 009 間の塩基配列及び OCR010, OCR011, OCR012 間の塩基配列が完全に一致した。*P. putida* ATCC23835 と *P. gingeri* NCP-PB3147 は 16S rDNA 全長塩基配列では相違が認められることより、16S rDNA 全長配列の解読及び生理学的分類同定を実施する必要があるが認められ

表2. Utilization of solvent for growth of alcohol tolerant microorganisms.

Solvent	Isolated strain code (OCR-)											
	001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011	012
Cyclohexanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Pentanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Hexanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Heptanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Octanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Nonanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Decanol	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
Cyclohexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Pentane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Heptane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Octane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Nonane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Decane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Alcohol tolerant microorganisms were cultivated in MS medium containing 0.1% organic solvent. OD600 was measured at beginning and after 5 days cultivation. Symbols were same as written in Table 2.

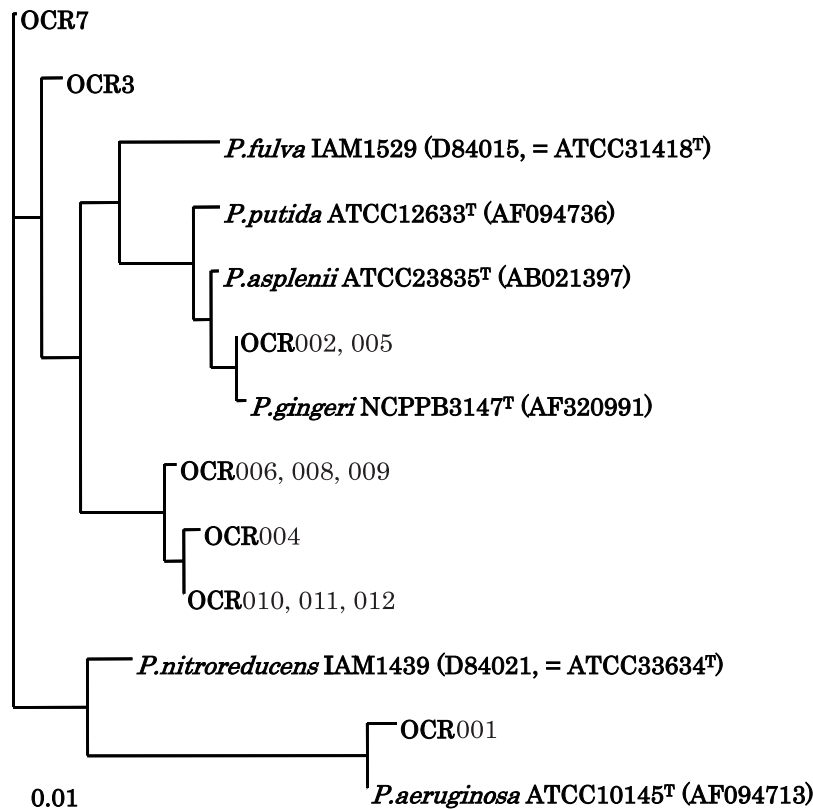


図1. Phylogenetic tree showing relationships between isolated bacteria and representatives of the genus *Pseudomonas*.

The tree was constructed by the neighbour-joining method based on a comparison of 16S rDNA sequences. The sequences used were partial sequences (485nt) from isolates and full sequences from *Pseudomonas* sp., respectively. Nucleotide sequence accession numbers are given in parentheses. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

た。これら 16S rDNA 塩基配列が一致した微生物群は有機溶媒耐性スペクトルの面で異なる特性を持つことより、種の異なる *Pseudomonas* 属細菌であると推測された。あるいは、共通の種より派生した変異株かもしれない。既に *Pseudomonas* 属細菌には多くの有機溶媒耐性微生物が存在する事が報告されている²⁾。また、グラム陰性菌と陽性菌の有機溶媒耐性を Log P 値により定量化した研究では、一般則としてグラム陽性菌よりグラム陰性菌のほうが有機溶媒耐性能が強く、グラム陰性菌の中では *Pseudomonas* 属細菌が毒性の高い溶媒種へ最も高い耐性能をしめすとされている⁶⁾。本研究結果も含め改めて同属の特殊環境適応力の高さが示された。

Pseudomonas 属はグラム陰性細菌であることから、グラム陰性細菌用汎用ベクター pCF704 により形質転換が可能であろうと推測し、pCF704 を用いた取得株の形質転換を試みた。なお、OCR001 株は分類同定の結果 Bio Safety Level 2 の *Pseudomonas aeruginosa* と近縁の可能性が高いと判断されたことから、以後の試験では研究対象から除外した。また、OCR009、OCR011 及び OCR012 株はスラント培地及び凍結による保存状態からの溶媒存在下液体培地における生育能が著しく低下した。このため、これら 3 株はアルコール耐性能を消失したと判断し、以後の評価試験より除外した。他の 8 株は全てカナマイシン感受性であることが判明したため、カナマイシン耐性マーカーを有する pCF704 をエレクトロポレーション法により導入した。その結果、OCR002 株及び OCR005

株は同時に試験した *Escherichia coli* JM109 株とほぼ等しい頻度でカナマイシン耐性形質転換体が出現した。また、OCR006、OCR008 及び OCR010 の 3 株は効率が少し劣るものの、やはり形質転換体を得られた。他の 3 株は形質転換体を得る事ができなかった。これら形質転換体の得られた 5 株のコロニーよりプラスミド DNA を抽出して Sph I 消化後、アガロース電気泳動により抽出されたプラスミド DNA の大きさを確認したところ、全ての株より約 5.5 kbp の単一バンドが確認できたことから、pCF704 が保持されていると判断した。

Wery らはトルエン及びスチレン耐性である *Pseudomonas putida* S12 株を宿主としてトルエンジオキシゲナーゼ遺伝子を発現させる試みを行い、形質転換された *Pseudomonas putida* S12 がオクタノール-水 2 相系を用いる事でトルエンから 3-メチルカテコールへの反応が水系の約 2 倍の蓄積濃度を示す事を報告している¹³⁾。OCR002 は飽和濃度以上の有機溶媒、特に毒性の高いシクロヘキサノールを含むアルコールが飽和濃度以上存在する培地中で生育可能であった。OCR002 においても *P. putida* S12 と同様な応用が期待できた。仮に、有機溶媒と水の 2 相系反応にて OCR002 を宿主としてシクロヘキサン水酸化酵素遺伝子を発現させた場合、原料のシクロヘキサンは容易に有機溶媒相に分配されるが、生産物であるシクロヘキサノールは n-アルカンを含む無極性溶媒には分配され難く、水相中のシクロヘキサノール濃度は高くなる事が予想された。また、シクロヘキサノール

ルを有機溶媒層に効率的に分配するためにはオクタノール等の中程度の極性溶媒を用いる必要性も予測された。いずれにしても、水相中には中程度の極性溶媒濃度が高くなると思われた。このような場合、OCR002の溶媒耐性の特性は効果的に作用すると思われ、且つ、OCR002が容易に形質転換される事から、脂肪族炭化水素からアルコールを生成する微生物反応プロセスを構築する上で特に優れた宿主細胞となりうるかと判断された。

ただし、これらアルコール耐性微生物をシクロヘキサノールやアルコール類の製造用宿主として工業生産に用いる場合、有機溶媒耐性能などの必要な形質を長期間、再現性良く保持する事が必要である。しかしながら、このたび取得した一部の株に於いて保存期間後の溶媒存在下液体培地における生育能が著しく低下することが確認された。このことより、現在、これら有機溶媒耐性株の保存法及び培養方法の検討を行なっている。形質を安定保持させるためにオクタノール又はシクロヘキサノール存在下で -80°C にて凍結保存したところ10ヶ月の保存期間でOCR007以外の微生物は死滅した。また、10ヶ月以内でも溶媒存在下液体培地における生育能が低下する傾向があった。有機溶媒非存在下で凍結保存した場合、保存期間中の死滅は確認されなかったが、やはり溶媒存在下液体培地における生育能の低下が認められた。*Pseudomonas*属有機溶媒耐性微生物における耐性機構に関わる遺伝子はプラスミド上に存在しないとの報告もあることから¹⁴⁾、プラスミドの欠落による有機溶媒耐性能の低下は生じにくいと思われた。詳細な検討は継続中であるが、保存法の検討以外に、本来の有機溶媒耐性能を発揮させるために必要と思われる膜構造維持のための馴化培養を含めた有機溶媒耐性微生物培養方法の検討の必要性が生じている。

筆者らは、アルコール耐性微生物 *Pseudomonas* sp. OCR002に導入する脂肪族炭化水素酸化酵素遺伝子を収集するため、本酵素遺伝子を有すると思われる脂肪族炭化水素酸化微生物ライブラリーを既に構築した。現在、脂肪族炭化水素水酸化酵素遺伝子を取得しているところである。今後、OCR002株に対し収集した炭化水素酸化酵素遺伝子を導入する予定である。また、有機溶媒-水2相系の反応を実施するためのリアクターも開発中である。これらの研究開発により、汎用化学物質製造法に対するバイオプロセスの有効性を高めてゆきたい。

4. 謝 辞

本研究を実施にあたり、ご協力頂いたメルシャン株式会社生物資源研究所の廣末慎嗣氏、佐々木美保氏及び橋本邦男氏、ならびに、土壌試料の採取に御協力いただいた相良町役場企画調整課、同商工観光課の方々、及び快くサンプリングを許可していただいた油田跡地所有者に心から感謝の意を表す。なお、本研究開発は、経済産業

省の産業科学技術プロジェクト「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) から委託を受けて実施したものである。

文 献

- 1) Abe, A., A. Inoue, R. Usami, K. Moriya, and K. Horikoshi. 1995. Properties of newly isolated marine bacterium that can degrade polyaromatic hydrocarbons in the presence of organic solvent. *J. Mar. Biotechnol.* 2: 182-186.
- 2) Aono, R., M. Ito, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1992. Isolation of Novel Toluene-Tolerant Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 145-146.
- 3) Aono, R., N. Doukyu, H. Kobayashi, H. Nakajima, and K. Horikoshi. 1994. Oxidative Bioconversion of Cholesterol by *Pseudomonas* sp. Strain ST-200 in a Water-Organic Solvent Two-Phase System. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2158-2523.
- 4) Fujii, T., T. Narita, H. Agematsu, and K. Isshiki. 2000. Cloning and characterization of *pcd* encoding Δ^1 -piperidine-6-carboxylate dehydrogenase from *Flavobacterium lutescens* IF03084. *J. Biochem.* 128: 975-982.
- 5) Inoue, A., and K. Horikoshi. 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338: 264-268.
- 6) Inoue, A., and K. Horikoshi. 1991. Estimation of Solvent-Tolerance of Bacteria by the Solvent Parameter Log P.J. *Ferment. Bioeng.* 71: 194-196.
- 7) Isken, S., A. Derks, P.F.G. Wolfs, and J.A.M. de Bont. 1999. Effect of Organic Solvents on the Yield of Solvent-Tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2631-2635.
- 8) Kim, M.K., and J.S. Rhee. 1993. Lipid hydrolysis by *Pseudomonas putida* 3SK cultured in organic-aqueous two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 612-616.
- 9) Moriyama, K., and K. Horikoshi. 1993. A Benzene-Tolerant Bacterium Utilizing Sulfur Compounds Isolated from Deep Sea. *J. Ferment. Bioeng.* 76: 397-399.
- 10) Nakajima, H., H. Kobayashi, R. Aono, and K. Horikoshi. 1992. Effective Isolation and Identification of Toluene-tolerant *Pseudomonas* Strains. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1872-1873.
- 11) Pinkart, H.C., J.W. Wolfram, R. Rogers, and D.C. White. 1996. Cell Envelope Changes in Solvent-Tolerant and Solvent-Sensitive *Pseudomonas putida* Strains following Exposure to o-Xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1129-1132.
- 12) Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. *Liquid Media For E. coli*. A2.3. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- 13) Weber, F.J., and M. da Silva DI, de Bont. 2000. A Genetically modified solvent-tolerant bacterium for optimized production of toxic fine chemical. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 180-185.
- 14) Weber, F.J., S. Isken, and J.A.M. de Bont. 1994. Cis/trans isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strain to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* 140: 2013-2017.
- 15) 中川恭好, 川崎浩子. 2001. 16S rDNA 遺伝子の塩基配列決定法, 日本放線菌学会 (編) 放線菌の分類と同定, pp 88~117, 東京, (財)日本学会事務センター