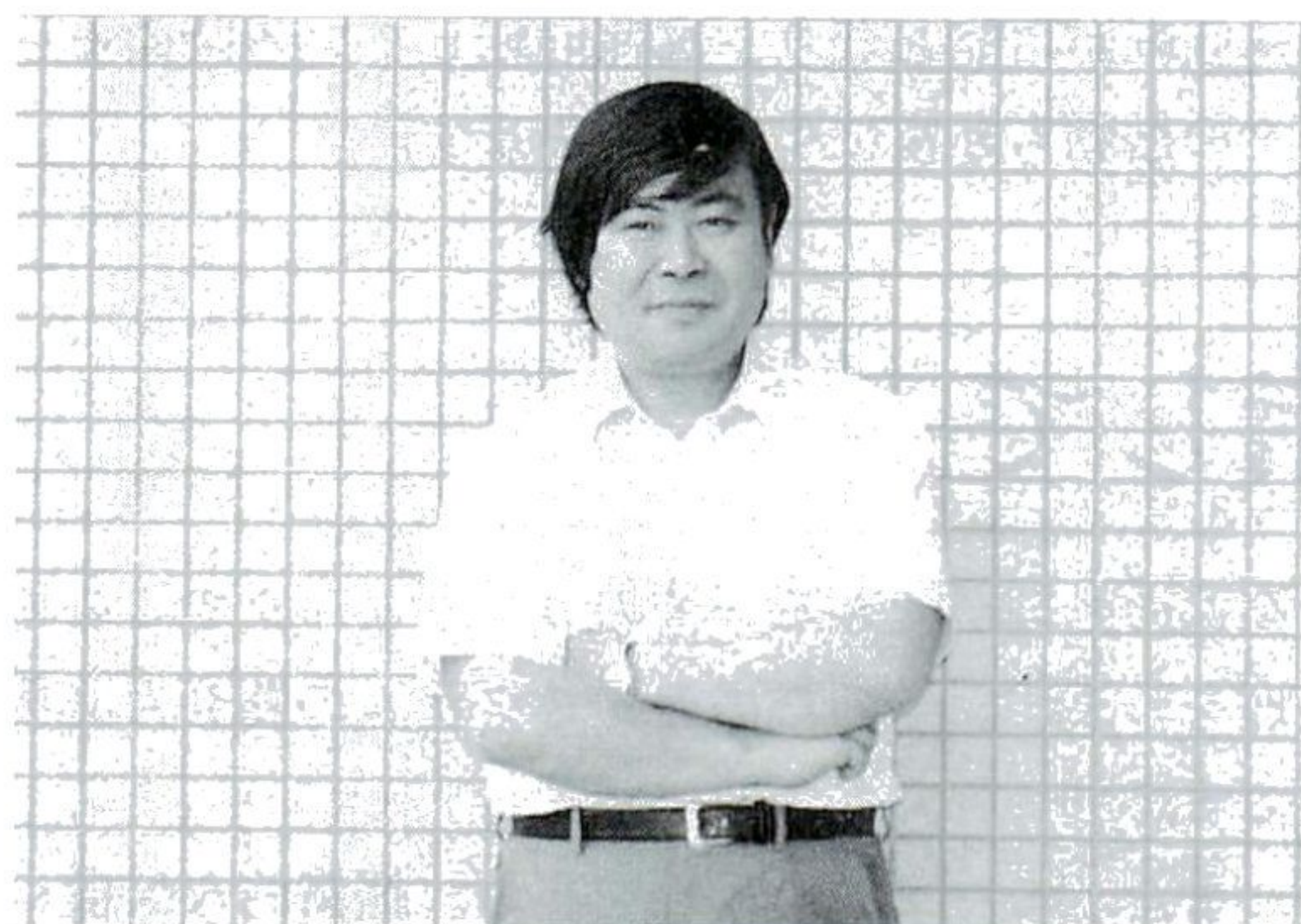




才能ある特殊環境微生物を役立てよう

—— 青野研究室～生物工学科 ——



青野 力三 助教授

「微生物」と聞いて皆さんは何を想像するだろうか。納豆菌、乳酸菌、酵母など人間が世話になっているものや、かびや大腸菌など、普段はあまり関わりたくないようなもの、またアメーバやゾウリムシなどが頭に浮かぶと思う。これらは我々人間が生活するのとそれほど変わらない環境で活動していると思われるかもしれない。だが、普通の生物ではとても生育できない環境にしぶとく耐えて生育する微生物も意外に多く存在する。青野研究室では、その中から人類に役立てられる特殊な才能を持つ微生物を見つけだし、工学的な応用に結びつけていくことを研究目標としている。



洗濯物を白くする微生物の底力

微生物の研究は、発酵食品の生産菌や人間をはじめとする高等動植物に寄生する病原菌を主な対象として進められてきた。これらの微生物は穏和な環境で生育しているのが普通である。このため、微生物全般が温和な環境でしか生育しないものと思われるがちだ。

しかし、実際のところ、単細胞微生物の環境に対する適応能力は高等動植物と異なり、きわめて多様性に富んでいる。高温の温泉や熱水の噴出地域、寒冷な極地や山岳地帯、深海底の高圧地域、塩の濃度が高い塩水湖、乾燥して貧栄養状態の砂漠、酸性の硫黄泉やアルカリ性の湖など、私たちの常識で考えると活動不可能と思われるような極限環境にも、数多くの微生物が適応して生息しているのである。このように、高温（70～90℃）、高圧（500気圧）、飽和食塩中、酸性、アルカリ性などで生育できる微生物を、特殊環境微生物あるいは極限微生物と呼んでいる。

特殊環境微生物そのものはかなり昔から発見されていた。だが、特殊環境微生物やそれが作り出す酵素の人類に対する重要性や利用価値はあまり

認識されてこなかった。これらの微生物から人類の生活に役立つ酵素を取り出せることが明らかになったのは、それほど昔のことではない。

特殊環境微生物が人間の生活に応用されている身近な例として“酵素入り洗剤”が挙げられる。汚れを落とすのに役立っている酵素。実は、微生物によって作られているのである。酵素はタンパク質で構成されている。このため普通の酵素は洗剤に混ぜると、アルカリ性であるセッケンにより変成を起こして洗浄を助ける能力を失ってしまうはずだ。ところが実際に酵素が洗剤に配合されているということは、それがアルカリ性物質に対して耐性を持っているということになるだろう。

微生物は細胞内で酵素を作り、その酵素を適当な場所で働かせるために体外に放出する。アルカリ性の環境で生育する微生物は、アルカリにより変性を起こし触媒作用を失うどころか、逆に活性が高まるような酵素を作り出せなければ生きてゆけないのである。また、微生物そのものもアルカリ性の環境に耐えられなければならない。このような微生物を好アルカリ性微生物と呼んでいる。

汚れを落とす性質を持つ酵素を作る能力と、アルカリ性の環境で活動する能力を兼ね備えた微生物が見い出され、さまざまな改良を経て、酵素入り洗剤は、はじめて実用化に至ったのである。

このように、好アルカリ性微生物は既に実用化の段階に入っている。だが、その耐性機構に関する研究はいまだに終わっていない。青野研究室ではそれについての研究を行っている。

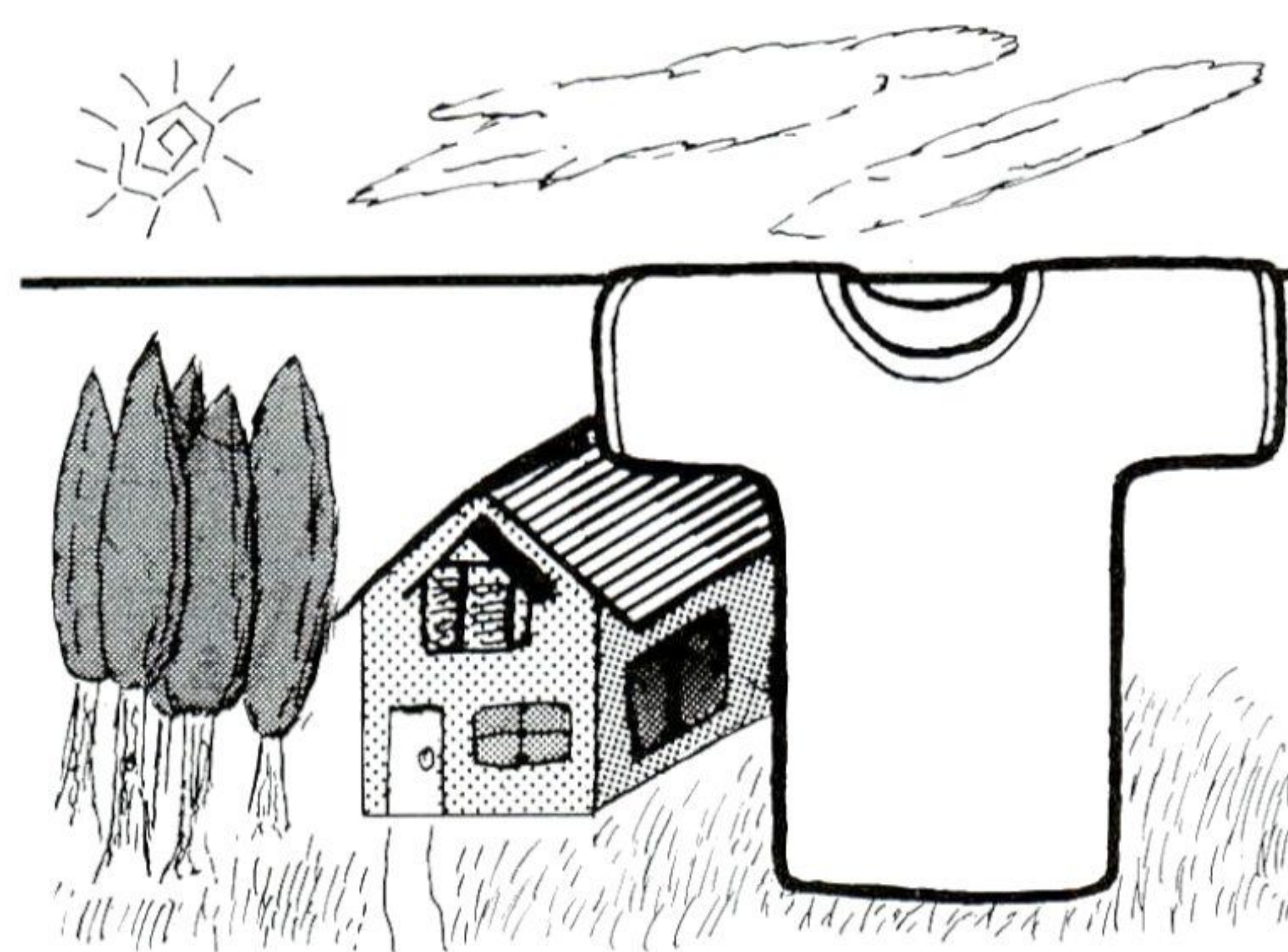
好アルカリ性微生物がアルカリ性の環境に接触する際に、最初に触れるのは微生物の表面である。そこに pH 10~11 を 8 くらいに下げる何か不思議な仕組みがあるのではないかと考えられる。

洗剤に用いられている酵素を作る微生物は細菌の一種である。ここで、細菌の表面構造について簡単に触れておこう。細菌は細胞膜によって包まれている。細胞膜は主にタンパク質と脂質からなり、浸透圧の調節、細胞への物質の出入り、さらには呼吸作用に関係する酵素群が存在して ATP（エネルギー）を合成するなど、さまざまな働きを行っている。そして、その外側を細胞壁が覆っている。細胞壁は植物にしかないものと思われがちであるが、細菌にもあるのだ。ただし、細菌の細胞壁の主成分は複合多糖であり、植物細胞のセルロースとは異なる。

青野先生は、細胞壁に謎があると考えて調べてみた。その結果、細胞壁に非常に強い酸性物質が多量に含まれていた。しかも、微生物をアルカリ性の環境で生育した場合、中性の環境で生育した

場合と比べてその酸性物質が多くなることが明らかになった。それがアルカリ性物質を中和するのに役立っているのではないかと青野先生は考えている。また、細胞膜では水素イオンを作るような呼吸が盛んになり、外側から入ってくる水酸化物イオンを中和しているのではないかと考えて、細胞膜についての研究も行っている。

一方、アメリカの研究室では青野研究室と異なる考え方で研究をしている。細胞内のナトリウムイオンと外にある水素イオンとを交換する機能が細胞膜にあって、それでアルカリを中和しているのではないかという考えである。青野先生はこれについて、電気的には置き換え可能であり否定はできないと評している。いずれにせよ、いろいろなことが働いて耐性機構を形成しているのではないかと見ているのである。



有機溶媒耐性微生物の利用のすすめ

微生物にとっての極限環境の一つに、有機溶媒を含んだ環境がある。多くの有機溶媒は微生物に対して毒性を示す、すなわち微生物の生育を阻害する。例えば、注射の際に皮膚をエタノールで消毒したりクレゾールで手足を消毒することはよく行われている。また、医者は採尿した時に、尿に微生物が生えないようにトルエンを一、二滴加えておく。すると、尿 1 l で一日ほどもつようになる。これらは、微生物に対する有機溶媒の毒性を利用したものである。有機溶媒が微生物にとっていかに有毒であるか分かっていただけだろう。

微生物は、人工的な触媒を用いた反応ではできなかったことを可能にする能力を持っている。化

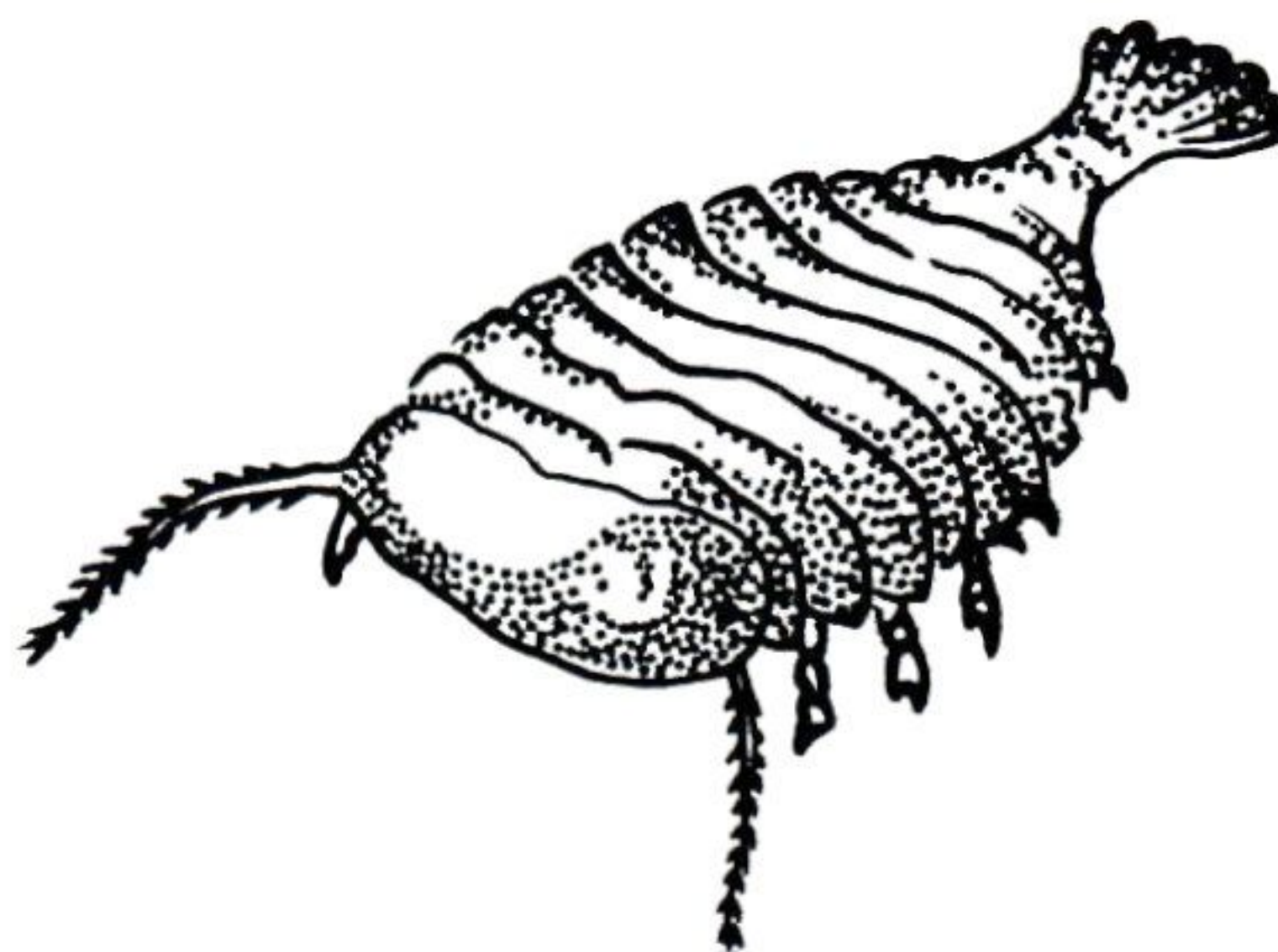
合物を合成・分解する場合、触媒を用いるなどして人工的に行うのが一般的である。だが、人工合成では細部の立体認識ができないために合成が難しかったり、高価な触媒を使わなければ作れない化合物も少なくない。これに対して、微生物が作り出す酵素は化合物の立体を認識しながら反応を進めていく。物質の特定の場所に水酸基を入れたり、特定の場所だけを酸化したりすることができるのである。酵素あるいは微生物細胞を用いることにより、これまでにさまざまな化合物の特異的な変換反応が多数確立されている。しかし、有機物を変換する場合には微生物が死なないように、有機物の蒸気を含む空気を供給することによって

それを役に立つ物質に変換する微生物を培養したり、培養液中の有機溶媒の濃度を1%以下という低濃度に保つように制御して培養したりしなければならなかった。

ところが、多量の有機溶媒が存在しても生育できる微生物が土壌の環境に限定されず、広範囲に存在していることが分かってきた。青野研究室では、このような有機溶媒耐性微生物を、新たに見つけたり作ったり改良したりしてそれを応用することを研究目標としている。では、どのように応用しようとしているのか、以下で触れてゆこうと思う。

微生物を用いて化合物の変換反応を行う場合、基質（ある酵素が働く物質）およびその反応生成物が疎水性であることが少なくない。現在のところ疎水性の基質を培養液にまぶして反応させている。これらの物質は水を主成分とする微生物の培養液にも当然溶けにくい。これでは変換効率が悪く培養液のコストも高く付く。

そこで青野先生は、有機溶媒耐性微生物を利用した「溶媒重層発酵法」という系を提案している（図）。ある疎水性の基質を有機溶媒に溶かして、それを培養液の上に乗せるのである。ここで使う有機溶媒はベンゼンのような、水に（わずかに溶け込むが）ほとんど混和せずに二層を形成する非極性溶媒である。そうすることで、微生物と反応生成物とを分離するのが容易になる。この系の仕組みを説明しよう。まず、疎水性の基質はわずかに水のほうへ溶け込む。それを微生物により生成物へ変換させる。そして再び疎水性の生成物が有機溶媒に回収される。これが継続的に繰り返されることにより最終的にすべての物質が変換される



のである。

溶媒重層発酵法は“多量”の有機溶媒に触れても活動できる微生物が作られて、はじめて可能となる。培養液中のわずかな有機溶媒が“普通”の微生物を活動できなくしてしまうのだから、微生物にとっては“多量”と言えるわけだ。微生物から見て“多量”な有機溶媒を含んでいる環境で活動できる微生物を「有機溶媒耐性微生物」と呼んでいるのである。

青野先生は、コレステロール（ステロイド化合物の一種）を別のステロイド化合物に変化させるような酵素を作れる有機溶媒耐性微生物を発見して、培養することに成功した。この微生物を用いることにより、コレステロールを疎水性物質の例とした培養系を確立したのだ。コレステロールは自然界に多量に存在し、安く手に入れられる物質である。また、反応生成物はステロイドホルモンの前駆体である。これを用いて、ステロイドホルモンを生産することをめざしている。今後、さまざまな反応を進める有機溶媒耐性微生物を見つけるまたは作ることができれば、溶媒重層発酵法を用いることによって、変換効率は一段と上がり、物質生成コストを下げるができるだろうと青野先生は考えている。

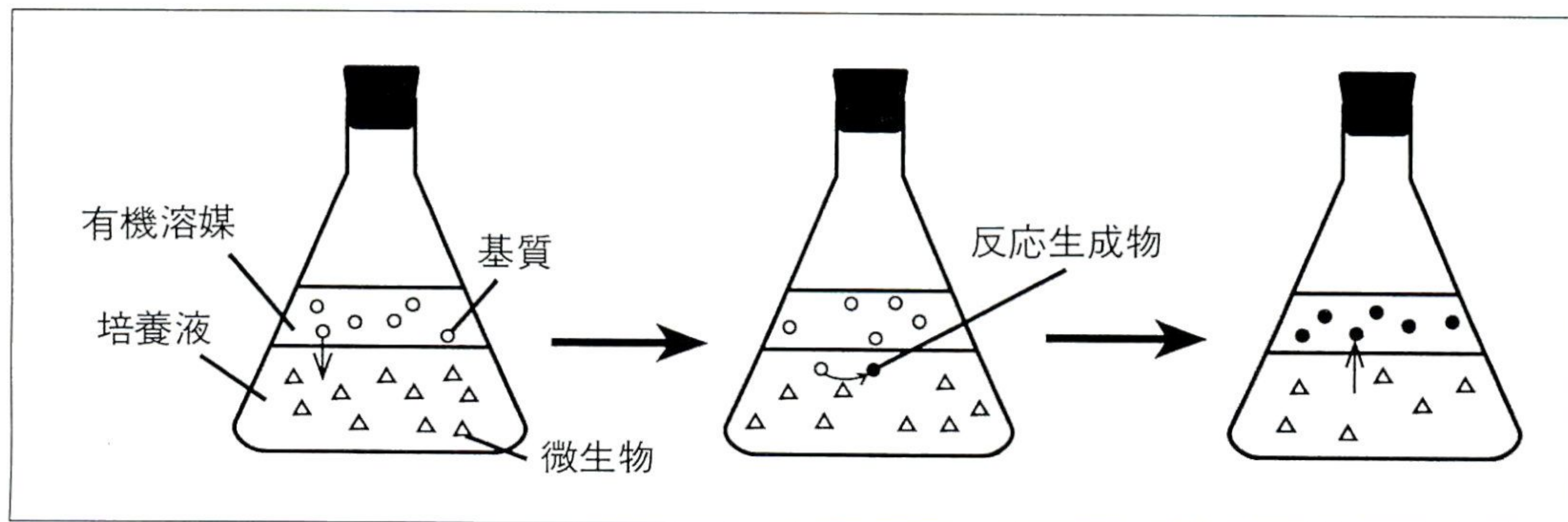


図 溶媒重層発酵法



有機溶媒耐性微生物の作り方

さて、ここまで「有機溶媒」と一言で済ませてきたが、有機溶媒にもさまざまな種類があり、それぞれ微生物に対する毒性の強さも異なる。いったい毒性の強さは何によって決まるのだろうか。有機溶媒の微生物に対する毒性を定量的に表す場合には、溶媒の物理化学的性質の一つである極性に着目する。極性の高い有機溶媒ほど毒性が強いことが実験の結果より分かっている。また、微生物の種類によって溶媒に対する耐性が異なることも認められている。現在のところ、微生物の有機溶媒に対する毒性が溶媒の極性と相関する原因ははっきりと分かっていない。今後、微生物の有機溶媒に対する耐性機構の解明が進むにつれて、有機溶媒の毒性が極性と相関する原因も明らかになるものと期待されている。

また、有機溶媒に限らず一般に、物質は同じ程度の極性を持つ分子同士で溶けやすい。青野先生が作った系を例にすると、コレステロールはヘキサンよりもトルエン（どちらも溶媒）のほうに極性が近く、非常に溶けやすい。さらに分子の構造も溶解性に関わっていて、似ている構造同士で馴染みやすい。コレステロールは、シクロヘキサン環がつながった基本骨格になっている。一方これを溶かす溶媒の構造であるが、ヘキサンは炭素の直鎖の分子であるのに対し、トルエンやp-キシレンはベンゼン環を持っている。よってコレステロールはヘキサンのような直鎖状の分子よりも芳香族のような環を持っているもののほうに溶けやすいということになる。

以上のことから、溶媒重層発酵法を実現するためには、基質および反応生成物を溶かすことができ、微生物が多量に触れても活動できるような疎水性有機溶媒が必要なが分かる。これは青野先生が作った系にもあてはまる。コレステロールを変換する微生物は、コレステロールを十分に溶かすことができる溶媒（例えばトルエンなど）が多量に存在する環境では生育できない。酵素を用いて変換したい物質が、毒性の強い溶媒によりよく溶ける場合には、酵素を作り出す微生物の有機溶媒耐性を上げる必要があるのだ。

では、どのようにすれば微生物に溶媒に対する

有機溶媒	log P_{ow}	微生物菌株						
		<i>P. putida</i> IH-2000, ST-42	<i>P. putida</i> IFO 3738	<i>P. fluorescens</i> IFO 3507	<i>Escherichia coli</i> IFO 3806	<i>E. coli</i> W2252	<i>Alkaligenes faecalis</i> JCM 1474	<i>Bacillus subtilis</i> AHU 1219
ドデカン	7.0	+	+	+	+	+	+	+
デカン	6.0	+	+	+	+	+	+	+
ノナン	5.5	+	+	+	+	+	+	+
n-ヘキシルエーテル	5.1	+	+	+	+	+	+	+
オクタン	4.9	+	+	+	+	+	+	+
イソオクタン	4.8	+	+	+	+	+	+	-
シクロオクタン	4.5	+	+	+	+	+	+	-
ジフェニルエーテル	4.2	+	+	+	+	+	-	-
n-ヘキサン	3.9	+	+	+	+	-	-	-
プロピルベンゼン	3.8	+	+	+	+	-	-	-
o-ジクロロベンゼン	3.6	+	+	+	-	-	-	-
シクロヘキサン	3.4	+	+	+	-	-	-	-
エチルベンゼン	3.3	+	+	+	-	-	-	-
p-キシレン	3.1	+	+	-	-	-	-	-
スチレン	2.9	+	-	-	-	-	-	-
トルエン	2.8	+	-	-	-	-	-	-
ヘプタノール	2.3	+	-	-	-	-	-	-
ベンゼン	2.1	-	-	-	-	-	-	-

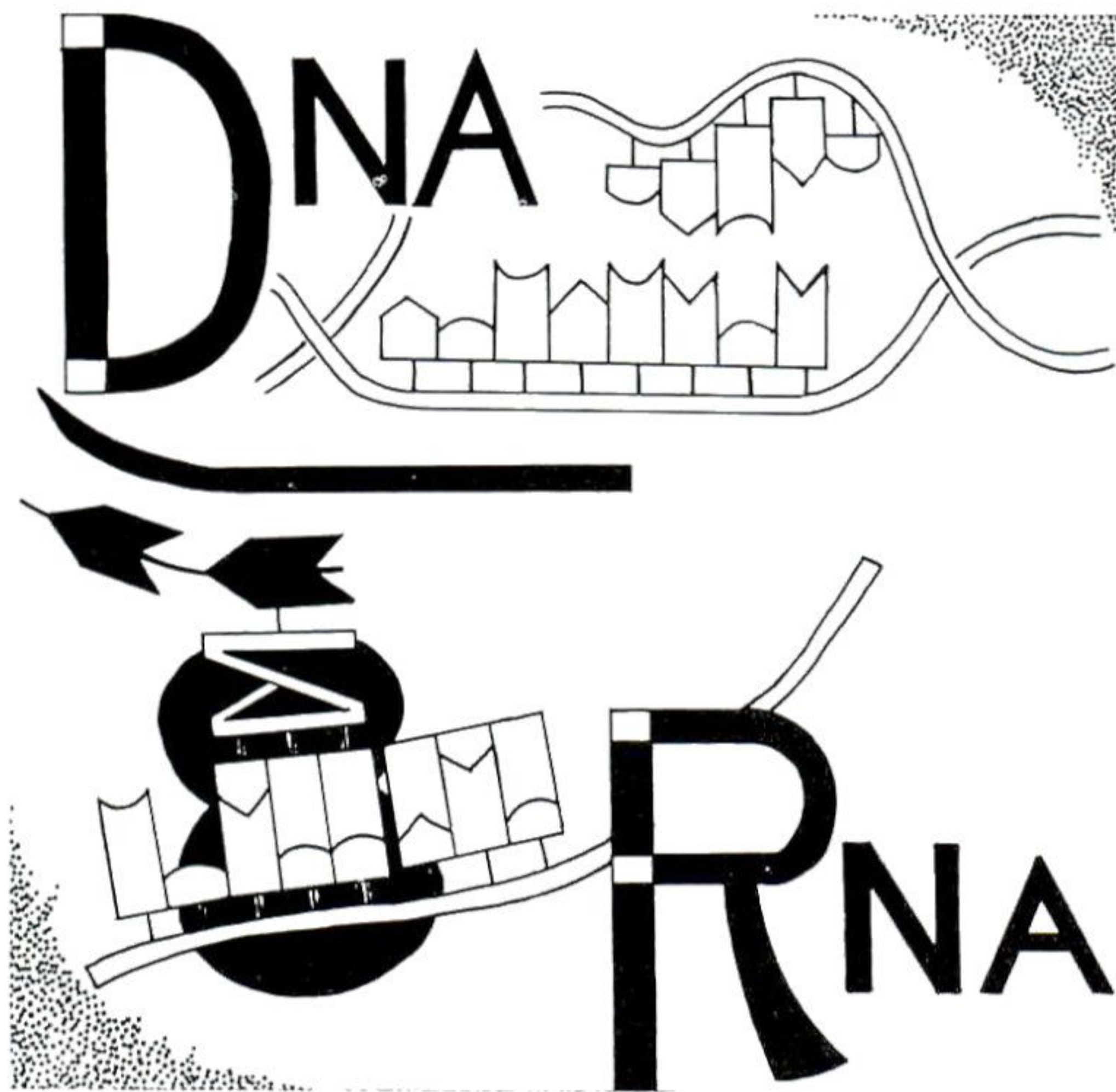
log P_{ow} ：有機溶媒の極性の指標として、n-オクタノールと水との間の分配係数 P_{ow} の常用対数を示す。
+：生育，-：生育不能。

表 微生物の有機溶媒耐性度

耐性を持たせることができるのだろうか。有機溶媒に対して耐性のない微生物の場合、有機溶媒に触れると、溶媒分子が細胞膜のリン脂質に入り込んできてしまう。すると、溶媒分子がリン脂質を押し退けてしまい膜が膨らんでくる。その結果、膜内のタンパク質などは無理やり歪められて機能しなくなる。だから、溶媒分子が膜に馴染みにくい極性に変えたり、有機溶媒が吸着しにくいような構造にするなどして、膜内への溶媒の進入を防ぐ、あるいは溶媒分子が入ってきても膨潤しないように細胞膜を改良できればよいということになる。今のところ、耐性機構は完全には解明されて

いない。現在、研究が進められている。

有機溶媒に耐性を持つなどといった特殊な能力を発現させる手段となるのが、いわゆる遺伝子工学と呼ばれるものである。酵素を作る、あるいは溶媒耐性の機能を持った細胞膜を作るといった指令を出しているのは、すべて遺伝子である。このような遺伝子は、自然界から取り出せる可能性がある。また既存の微生物に突然変異を起こさせることにより、ある環境に適応できるようにすることも可能である。突然変異を起こしやすくする道具として発がん剤を使う。これは、遺伝子の塩基配列を狂わせ、情報を壊してしまう性質を持つ。人間に対してはがんを引き起こすが、微生物に使えば普通の状態よりも効率よく突然変異を起こすことができる。突然変異により遺伝子がどのよう



このほかにも、世の中には得体の知れない微生物があまた存在しているらしい。原油を食べてタンパク質を作り出すもの、ガス状のメタンを食べて生活しているものなど人間の常識をはるかに超えた微生物が今日もどこかでごめいている。

そんな微生物をはじめとする生物のしくみは、物理や化学に比べて解明されていない部分が非常に多い。それだけに生物のしくみそのものを明らかにすることが、生物を工学的に応用するための近道となることも多いようだ。今後、微生物のしくみが明らかになるにつれて「溶媒重層発酵法」

に変わるのかは予測できないが、突然変異させたものの中に欲しい性質のものがあればそれを選び出すことができる。

自然界で見つけた、あるいは突然変異で作った有用な微生物は、工学的に応用する場合、そのまま用いても構わないが、その遺伝子は大腸菌に組み込んで用いたり、それをさらに改良したりすることが多い。大腸菌は数ある微生物の中で最も研究されている。十分研究されてきた細胞の方が、人為的制御をしやすいのである。このため、遺伝子を組み換える際に、外来の遺伝子を持ってきて発現させるための細胞として最もよく用いられている。

青野先生は、ある種の大腸菌から有機溶媒に対する抵抗性を高める遺伝子を分離することに世界で初めて成功した。この遺伝子を溶媒耐性を持たない普通の大腸菌に組み込んだところ、ヘキサンを滴下しても生きられるように性質を変えることに成功したのである。現在では、有機溶媒耐性の遺伝子を組み換えることで、シクロヘキサンまで耐えられるようなものを作ることができる。しかし、これ以上毒性の強い溶媒に耐性があるものはまだできていない。また、突然変異によってP-キシレンの耐性菌までは作ることができる。今は遺伝子操作によりこのレベルまで耐性を高めようとしている。

酵素など有用な物質を作り出す遺伝子はすでに多数分離されている。これらの遺伝子と有機溶媒耐性遺伝子を一つの大腸菌に組み込むことによって、溶媒重層発酵法は完成するのである。

も実用化へと進んでゆくことだろう。

今回、青野研究室の取材に伺ったメンバーは私を含めて皆、生物に関する知識が豊富であるとはいいがたい者ばかりであった。しかし、それだけに驚きも大きく、収穫の多い取材となった。研究内容について熱心に語っていただいた青野先生に感謝するとともに、今後の研究の成功をお祈り申し上げます。

(早川 知宏)