HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細菌によるバイオサーファクタント生産と石油代謝に関する研究
Author(s)	森川, 正章
Degree Grantor	大阪大学
Degree Name	博士(工学)
Issue Date	1994-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/20097
Type	doctoral thesis
File Information	morikawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

細菌によるバイオサーファクタント生産と石油代謝に関する研究

１９９４年８月

森　川　正　章

細菌によるバイオサーファクタント生産と石油代謝に関する研究

大阪大学工学部応用生物工学科

森 川 正 章

目次

略号一覧 1
序論 3

第１章　バイオサーファクタント生産菌の分離とその構造解析
第１節　緒言 8
第２節　実験材料および方法 9
第３節　結果 15
1.3.1.　ＢＳ生産菌の取得 15
1.3.2.　ＢＳ生産株の同定 16
1.3.3.　ＢＳの構造決定 16
第４節　考察 25
第５節　要約 26

第２章　バイオサーファクタントの構造-活性相関
第１節　緒言 27
第２節　実験材料および方法 27
第３節　結果 30
2.3.1.　アルスロファクチンとサーファクチンの界面活性 30
2.3.2.　アルスロファクチンとサーファクチンの油膜排除活性 31
2.3.3.　サーファクチンの化学修飾 32
2.3.4.　ラクトン環の開環 35
2.3.5.　化学修飾サーファクチンの活性測定 36
2.3.6.　油膜排除活性に対する pH の影響 38
第４節　考察 38
第５節　要約 41

第３章　バイオサーファクタント生産に関する遺伝子のクローニング
およびその解析
第１節　緒言 42
第２節　実験材料および方法 43
第３節　結果 50
3.3.1.　形質転換系の確立 50
3.3.2.　ショットガン法によるサーファクチン生産に関する遺伝子
のクローニング 54
3.3.3.　サーファクチン生産遺伝子psf-1の塩基配列決定 55

3.3.4. PSF-1蛋白質の発現ならびにその局在 58
3.3.5. サーファクチン生産制御遺伝子comP'およびcomA'のクローニングと塩基配列決定 59
第4節 考察 66
第5節 要約 67

第4章 嫌気的石油分解細菌の分離
第1節 緒言 69
第2節 実験材料および方法 70
第3節 結果 73
4.3.1. 嫌気的石油分解細菌の分離 73
4.3.2. HD-1 株の電子顕微鏡観察 73
4.3.3. HD-1 株の同定 76
4.3.4. n-TD 及びトルエンの資化 77
4.3.5. HD-1 株のバイオサーファクタント生産性 78
第4節 考察 79
第5節 要約 80

第5章 HD-1 株による嫌気的石油代謝経路の解析および CO_2 からの石油生産
第1節 緒言 81
第2節 実験材料および方法 81
第3節 結果 86
5.3.1. 嫌気条件下における石油分解中間体の検出ならびにその構造決定 87
5.3.2. HD-1 株による CO_2 固定と石油生産 96
第4節 考察 100
第5節 要約 101

総括と展望 103

参考文献 110

本論文に関連する文献 121

謝辞 122

略号一覧

Aec; S-aminoethylcysteine
AF; アルスロファクチン(arthrofactin)
Amp; ampicillin
1A-SF; 1ケ所アミド化サーファクチン
BM; basal medium
bp; base pair
BS; バイオサーファクタント(biosurfactant)
CAD; 衝突活性化開裂 (collisionally activated dissociation)
CI; 化学イオン化(chemical ionization)
Cm; chloramphenicol
CMC; 臨界ミセル濃度(critical micelle concentration)
EDC; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA; エチレンジアミン四酢酸
EI; 電子衝撃イオン化法(electron ionization)
FAB-MS; 高速原子衝撃質量分析法(fast atom bombardment mass spectrometry)
FID; 水素炎イオン化検出器(flame ionization detector)
FLEC; (+)-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate
FT-IR; フーリエ変換赤外分光法(Fourier transform infrared spectrpscopy)
GC-MS; ガスクロマト質量分析法(gas chromato mass spectrometry)
^{1}H-NMR; プロトン核磁気共鳴(^{1}H-nuclear magnetic resonance)
HPF; hydrophilic fraction
HPLC; 高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography)
K-acetate; 酢酸カリウム
kb; kilobase pair
kDa; kilodalton
Km; kanamycin
λex; 励起波長
λem; 検出波長(放出波長)
L-AF; 開環アルスロファクチン
LPF; lipophilic fraction
L-SF; 開環サーファクチン
MeOH; メタノール(methanol)
MIC; 最少生育阻止濃度(minimum inhibitory concentration)
Mly; methyllysine
1M-SF; 1ケ所メチル化サーファクチン
2M-SF; 2ケ所メチル化サーファクチン
n-TD; n-tetradecane
ODS; octadecyl silica

ORF; open reading frame
OTMS; trimethylsililoxy
PVDF; polyvinylidene difluoride
SDS; sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE; SDS-ポリアクリルアミド電気泳動
SF; サーファクチン(surfactin)
Tc; tetracycline
THF; tetrahydrofuran
TLC; 薄層クロマトグラフィー(thin-layer chromatography)
TMS; tetramethylsilane
V-Pテスト; Voges-Proskauer テスト

序論

生物の多様性あるいはその意外性を支えているのは、それぞれの環境に最も適した生物だけが長い年月をかけて選別されてきた歴史である。時間の因子が関係しない物理現象や化学現象とはこの点において大きく異なる。しかし近年になってそれぞれの学問分野が対象とする範囲は広がり融合した結果、タンパク質工学(1,2,3)や抗体工学(4)などのように新しい研究分野が発展している。それゆえに新しい生物現象(機能)を発見し、その仕組みを解析することは単に生物学に留まらず異分野の研究に対しても示唆する点は多く、様々な形で人間生活を豊かにすることが期待される。

新しい生物機能の発見を目的とした場合、特殊環境にその資源を求めることは自然であろう。かつては生命の影など見当たらないと信じられてきた、いわゆる『極限環境』にもそれぞれに対応する生物の存在が近年になって次々と明らかになってきた。
例えば、100 ℃ を越えるような高温下で生育する "超好熱菌(5,6,7,8)" や死海のような高い塩分濃度を好む "好塩菌(9)"、さらには水素と二酸化炭素からメタンガスを発生する "メタン菌(10)"などがその例である。また、これらが第三の生物界 Archaea(始原菌)に属することが広く認められている(11)。従来は、Archaebacteria; 古細菌と呼ばれていたが -bacteria という呼び方がふさわしくないことが様々な研究から明らかになってきた(12)。例えば Archaea の細胞膜を構成する脂質はエステル型脂質ではなくエーテル型脂質である点が従来の生物には見られない特徴でありその特異性を象徴している(8)。特殊環境微生物を研究対象に考えたとき、その切り口は実に多様である。上で述べた温度・塩濃度・ガス組成以外の尺度(圧力・pH・水分・電界・磁界など)で地球を眺めた場合にも、生物にとって特殊環境と呼べる場所はいくつか見いだすことができる。例えば、水分に関して両極端に位置するのが水中と砂漠であろう。生物の構成単位である細胞の 70%以上が水分であるため "海は生命の母" といわれるのと対照的に、乾燥は生物にとって極めて悪い環境のひとつである。実際、砂漠に生息する生物種の数は非常に限られている。

ところで疎水環境も一種の特殊環境(低水分)という見方ができる。地球上で最も一般的な疎水環境と言えば油田であろう。微生物の炭化水素(石油の主成分)に対する資化能力が

発見されてから半世紀以上を経た現在、化学試薬の作用にきわめて安定な物質である炭化水素を微生物が比較的容易に変換することができるということは既に疑う余地のない事実となっている(13)。しかしながら、炭化水素の化学物質としての特殊性、すなわち ① 極度に還元されている(酸素原子を含まない)ことと、それに伴う ② 水にほとんど溶けないという性質 から生化学の中で少し特異な研究分野となっていることも確かである。 炭化水素分子の疎水性は、菌の増殖特性や菌の生理に大きな影響をあたえる。例えば水にほとんど溶けないという性質のために炭化水素を細胞内に取り込んで代謝する生物には特別な手段が必要となる。すなわち、炭化水素を利用する微生物の多くは基質の水中への分散および細胞内への取り込みを効率よく行う目的で界面活性剤を生産する(図 1)。この生物由来の界面活性剤を人工合成品と区別してバイオサーファクタント(Biosurfactant; Biological surface-active agent 以下 BS) と呼ぶ。BS は生物由来であるため安全性の高い洗浄剤であることはもちろんであるが、その複雑な構造ゆえにいくつかの生理活性を示すことがある。ところが構造が複雑であるために構造決定に至った BS はそれほど多くはなく、さらに構造-活性相関についての研究に至ってはほとんど皆無である。そこで、細菌の石油代謝を研究する上でも BS の構造解析は重要な課題の一つであると考えられる。

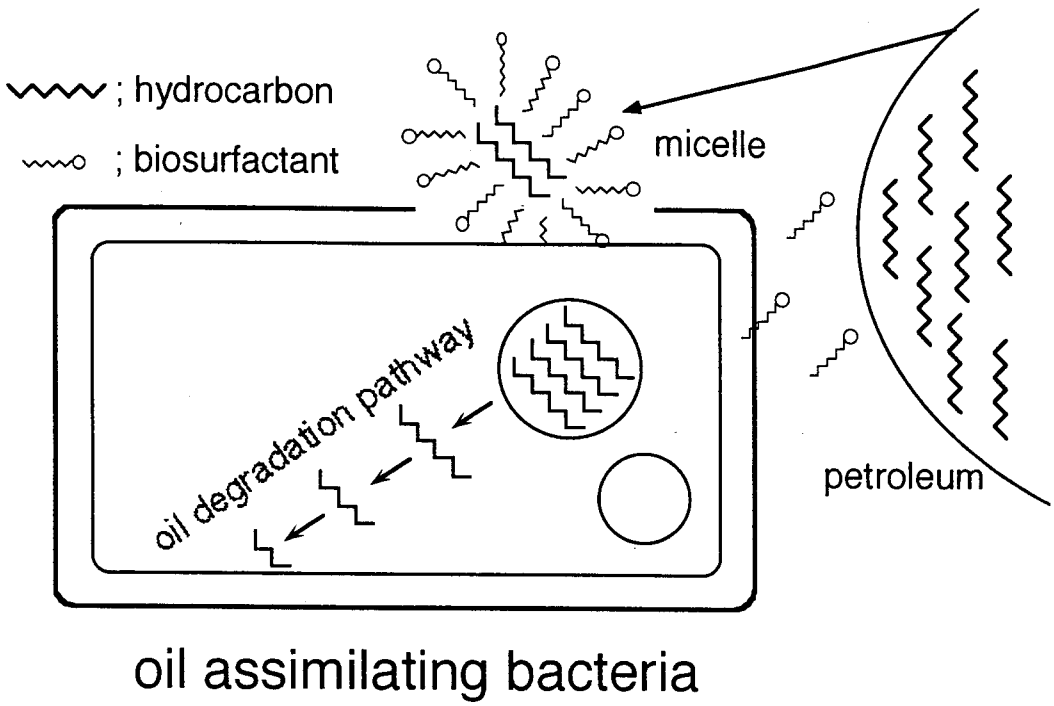


図 1. 石油資化菌におけるバイオサーファクタントの役割.
細胞外の油滴の取り込みを効率よく行うために石油資化菌の多くはバイオサーファクタントを細胞外に生産する。

本研究論文の前半ではこの BS を対象としている。実は研究を始めた当時の目的は、炭化水素の基本骨格 C-C 結合を酸化することなく切断して低分子化するような酵素(いわゆる生物的クラッキング反応触媒)を取得することであった。そのために考えた一次スクリーニング系は寒天培地上に塗布した原油薄膜を分解する細菌の選別であった。油田土壌試料を入手してこの培地で調べたところ比較的容易に周囲から油膜が消失した細菌コロニーを多数見いだすことができた。 細胞外成分からその活性本体が限外濾過法(分画分子量 1 万)により濃縮可能であることを確認した時は新規酵素の発見が期待されたが、その反応が温度にほとんど依存しないことやオートクレーブ後も活性を 100% 維持していたことなどから、それが BS の界面活性作用によるミセル形成(疎水物質の水溶性を高め、自身は高分子量化する)等の結果であることにようやく気付いた次第である。以上のような背景で BS の研究を始めるに至った。

ここで本研究論文前半の概略を述べる。【第１章】では油田土壌から強力なバイオサーファクタント生産菌を 3 株分離して、その菌株の同定および産物の構造を決定した。【第２章】では前章で得られたもののうち 1 種が極めて活性の高い新規のリポペプチド型 BS であることが判明し、これをアルスロファクチンと命名した。他の 2 種はいずれも既知物質サーファクチンであった。さらに、化学修飾法と新たに開発した微量活性測定法によりリポペプチド型 BS の構造-活性相関についても若干の考察を加えた。【第３章】においては新規バイオサーファクタント生産菌の形質転換系を構築した。さらにサーファクチン生合成経路の一部（制御系）の遺伝子クローニングおよびその解析を行った。その結果、外部環境シグナルを細胞内に伝達する two-component regulatory system (14,15)がバイオサーファクタント生産制御系と密接に関係していることが考察できた。

さらに本論文の後半では細菌による石油代謝のうち、いまだ明確な証明がなされていない "嫌気条件下（無酸素条件下）における石油分解" を扱っている。 先にも述べた通り、炭化水素のもうひとつの特徴は極端に還元された物質であるという点にある。そのため、生物が炭素源としてこれを資化利用する場合には強力な酸化剤が必要となる。炭化水素を利用する微生物のほとんどが好気性細菌であるのはこのためであり(16,17,18,19)、炭化水素の初期酸化反応において分子状酸素の導入(オキシゲナーゼ)は必須のステップである

というのが共通の認識であった(20)。 無酸素条件下における炭化水素の分解に関しては、1980年 になってようやく混合集積培養による Ward らの報告(21)を契機とし、トルエン、キシレン、フェノールなどヘテロな芳香族炭化水素類を中心として本格的に研究され始めた(22,23,24,25,26)。この場合、酸化剤(電子受容体)としては、硝酸(25)、鉄(Ⅲ)(24)などが報告されている。さらに反応性に乏しい側鎖のないタイプの芳香族(ベンゼンなど)の無酸素条件下の微生物分解については、メタン生成細菌(混合培養)によるものが唯一の報告(27)でありその分解経路についてはいまだ不明である。

一方、脂肪族炭化水素は好気条件下では芳香族炭化水素に比べて容易に分解されるが、これを生物が嫌気的に分解したという報告例になるとその数は極めて少なくなる。すなわち、芳香族炭化水素はその嫌気的分解経路についての解析がある程度進んでいるのに対して、飽和脂肪族炭化水素分解についてはまだその事実の真偽が問われている段階と言えよう。 脂肪族炭化水素分解に関する最初の報告は、1944年に Novelli らによりなされたが(28)、そこで分離された硫酸還元細菌(Desulfobacterium sp.)はすでに消滅している。それ以降のいくつかの報告(29,30)についても1981年に Atlas は再現性が疑しいことを指摘している(31)。1977年に Parekh らが報告した NAD 依存型のアルカンデヒドロゲナーゼ(32)については、エネルギー的に不可能であると言う意見もある(31)。しかしながら、最近になってまた硫酸還元菌の一種が飽和の脂肪族炭化水素を CO_2 まで完全分解することが報告されている(33)。不飽和脂肪族炭化水素分解についてはメタン菌の混合培養などでも報告されている(34)。一方、当研究室では既に嫌気性培養装置を所有しており、嫌気性菌を取り扱う環境は整っていた。さらに、土壌試料の入手先であった静岡県相良油田は私有地のため、幸いこれまでに細菌の分離を目的とした土壌採取の履歴がなかった。 以上で述べた研究状況と当研究室の環境から、現在でも議論が分かれる "分子状酸素以外の電子受容体により生物は脂肪族炭化水素を酸化分解できるのか" という命題に対して独自のアプローチを試みようと思い立った訳である。

後半部分の研究概略を以下に示す。【第４章】では嫌気条件下において炭素源として石油を添加することによって増殖が促進される菌（HD-1株）の分離と同定を行った。本菌が嫌気条件下において石油を単に取り込んでいるだけではなく資化分解していることも示した。【第５章】では HD-1株による石油分解代謝中間体（嫌気条件下）の検出とその構造決定を

行い、嫌気条件下における脂肪族炭化水素分解経路の存在を確証した。 また、本菌はCO_2を唯一の炭素源として生育可能であり、しかもその細胞内に炭化水素（テトラデカン、ヘキサデカン、エイコサジエン）が蓄積していることを発見した。 これは、化石燃料であると言われている石油が、現在もなお細菌により一部供給されていることを示唆する結果である。 最後に、これらの諸特性から嫌気条件下における HD-1 株の石油代謝経路について従来のものと比較しながら考察した。

第１章　バイオサーファクタント生産菌の分離とその構造解析

第１節　緒言

バイオサーファクタント（以下ＢＳ）は生物由来の界面活性剤の総称である(35,36)。界面活性剤とは一つの分子内に疎水基と親水基を持ついわゆる両親媒性物質であり(37)、合成品では親水基の極性にもとづきイオン性（陰イオン、陽イオン）界面活性剤と非イオン性界面活性剤に分類するのが一般的であるが、ＢＳの場合、その化学構造は複雑である反面疎水基を構成する基本骨格は共通して脂肪族脂肪酸であり、親水基を構成するユニットもその種類は限られている。そこで、ＢＳを分類する際には親水基の構造を指標とする場合が多い。すなわち、ホスホリピド型(38)、グリコリピド型(39,40,41)、リポペプチド型(42,43,44)、そしてその他(45)である。ＢＳの多くは本来、石油分解微生物が疎水性栄養源の効率良い取り込みを目的として生産する乳化剤であり(46)、生産コストの問題が解決されれば、安全でかつ環境に優しい洗浄剤としての実用が期待される。またその一方において、生体由来であるためにいくつかのＢＳは特異な生理活性を持つことも知られている(47,48,49)。例えば、免疫学においてある種類の微生物の細胞表層構成成分が脊椎動物の免疫システムを刺激し、抗原単独で投与した場合に比べて高い免疫応答を示すことが古くから知られていた(50)。その後、この成分(アジュバント)が Mycobacterium 属細菌が産するグリコリピド型ＢＳのひとつであるtrehalose dimycolateであることがつきとめられ、現在では合成品として広く供給されている。リポソーム製剤作製のため(51)に、あるいはまた食品産業においても乳化剤(52)として欠かせないレシチンは典型的なホスホリピド型ＢＳである。このように、ＢＳは単に合成品の代替物としての洗浄剤あるいは乳化剤ということよりむしろ、その複雑な化学構造に由来する潜在的な生理機能を開発することによりさらに実用化が進むものと期待される。

国内には産油量は少ないものの新潟県など日本海側を中心にいくつかの油田が知られていた(53)。ところが、静岡県の山中にも古くから石油を噴出している場所があるという情報を最近得ることができた。そこは自家用の油田でありこれまでほとんど人が足を踏み入れることがなかったことから新種の石油分解菌およびバイオサーファクタント生産菌を分

離できる可能性があると考え研究を開始した。本章では静岡県相良油田の土壌から新規ＢＳ生産菌を数株分離し、菌株の同定とその生産するＢＳの構造解析を行ったことについて述べる。

第２節　実験材料および方法

菌の分離源

静岡県相良油田の表層土（深度 0 ~ 30 cm）。

培地

Ｌ培地（バクトトリプトン 10 g, 酵母エキス 5 g, NaCl 5 g, NaOHにてpH 7.2に調整）を用いた。固形培地として用いる場合には、寒天を 1.5% 加えた。また、ＢＳ生産菌を分離する培地として、Ｌ寒天培地の表面に 30~40 μl の相良油田の原油を均一に塗布したものを利用した（以下、Ｌ－オイルプレート）。

ＢＳ生産菌の分離

土壌サンプルを無菌水に懸濁後、100 μl程度ずつＬ－オイルプレートに広げた。 培養は 30℃ と 37℃ にて行った。 各プレートを 1 晩から 2 週間の間培養を続け生育した多数のコロニーの内、その周囲に原油が除去されたハローを形成するものをＢＳ生産菌として選別した。そのうち特に大きなハローを形成するもの 3 株（A-1 株、B-1 株、MIS38 株)を選び、研究を進めた。

限外濾過装置

ＢＳは水溶液中ではミセル（巨大分子）を形成するため、限外膜モジュール UF-LSMⅡ（排除限界分子量 10,000、有効膜面積 200 cm^2）とチュービングポンプ LP-3000（いずれも東ソー製）により効率よく濃縮することができた。

薄層クロマトグラフィー（TLC）

・分析用 TLC　シリカゲル 60 プレート（200×200×0.2mm）　No. 5553

・分取用 TLC　シリカゲル 60 プレート（200×200×2mm）　No. 5745

・逆相 TLC　RP-18　$F_{254}S$ プレート（200×50×0.2mm）No. 15683

以上いずれもメルク社製。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

・本体;

東ソー CCPM グラジェントシステム

・カラム;

ナカライ製 コスモシル $5C_{18}$-AR（4.6×150mm、10×250mm）

---ＢＳ精製用

・ウォーターズ製 μBONDASPHERE C_4（0.3nmポアサイズ、3.9×150mm）

---アミノ酸光学異性決定用

バイオサーファクタントの精製

まずＢＳ生産条件を検討した。培養 pH を 5～9 まで変えてＢＳ生産性の時間経過（2、4、6、8、24、36、48 時間後）を比較した。各培養液上清 10 μlをＬ－オイルプレートに滴下した時に形成されるハローの大きさにより活性測定を行ったところ、いずれの菌においても pH = 7.0、36 時間と 48 時間のものが最も高い活性を示した。そこで、ＢＳの生産条件としてpH = 7.0、40 時間を決定した。A-1 株、B-1 株、MIS38 株が生産する BS をそれぞれ BS-A-1、BS-B-1、BS-38 と仮に命名した。

［ BS-A-1 ］

A-1 株はＬ寒天培地ではＢＳを生産するが、Ｌ液体培地では生産しない。そこで、Ｌ培地に 1 % 液状パラフィンを加えた培地 3 ℓからＢＳを回収した。37℃ 40 時間培養後、遠心分離（10000×g, 10 min)にて菌体およびパラフィンをできるだけ除去した培養液に等量のヘキサンもしくはクロロホルム/メタノール(1:1)を添加して脂質画分を計３回抽出した。

これを分取用 TLC に供した。クロロホルム/メタノール/水(65:25:4)で展開後各成分をヨウ素で発色させ、Rf 値 0.4 ~ 0.5 に展開される活性スポットをかきとる。同溶媒で抽出後、遠心分離（10000×g, 10 min)により樹脂を除去し、さらにエバポレーターにより乾燥した。これを 50% 程度のアセトニトリル溶液として最終的に HPLC により精製した。HPLC 条件は以下の通りである。

カラム; Cosmosil $5C_{18}$-AR

溶出液; アセトニトリル/酢酸(80:20)

検出波長; 210 nm

［ BS-B-1 ］

1ℓ のＬ培養液（37℃ 40 時間）から遠心分離（10000×g, 10 min)により、菌体を除去した。培養上澄液を限外濾過装置（分画分子量 10,000)を用いて 0.1 ℓ程度まで濃縮することができた。ＢＳは水中では巨大分子（ミセル；分子量 100,000 以上)を形成するためにこの方法により濃縮できる。 濃縮液に塩酸を加えて pH を 3 以下に調整し一晩放置した。生成した沈殿を遠心分離（10000×g, 10 min)により回収後、NaOH により pH を中性付近まで戻して水に溶かした。ヘキサンあるいはクロロホルム/メタノール混合溶媒による抽出操作以降については BS-A-1 と同様に行った。

［ BS-38 ］

5ℓ のＬ培養液（30℃ 40 時間）から遠心分離（10000×g, 10 min)により、菌体を除去した。MIS38 株は 37℃ では良く生育するがＢＳは生産しない。培養上澄液を限外濾過装置（分画分子量 10,000)を用いて 0.1 ℓ 程度まで濃縮した。BS-38 は塩酸によって沈殿しなかったため、上記溶媒にて抽出操作を行った。BS-38 の TLC における Rf 値は 0.3 付近であり、BS-A-1、BS-B-1 に比べて親水性であることが予想された。BS-38 はクロロホルム/メタノール/25%アンモニア水(65:35:4)で展開することによりさらに夾雑物が除かれた。 最終的には HPLC にて精製した。HPLC の条件は以下の通りである。また、精製した BS-38 を 50% アセトニトリル溶液で飽和溶液にして放置しておくと柱状の結晶が析出した（図１－１）。

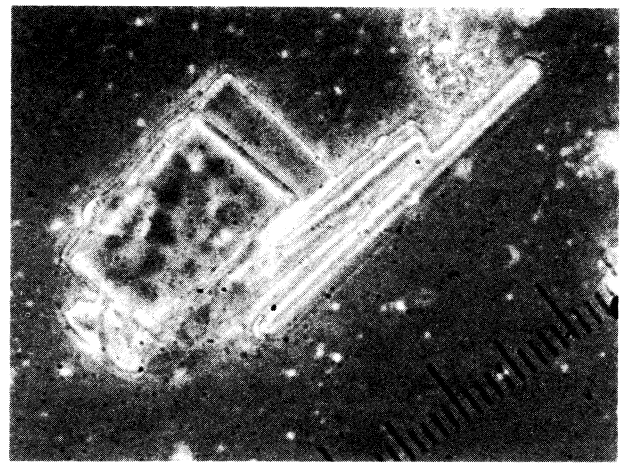


図１－１．BS-38（アルスロファクチン）の結晶.
1目盛りは0.1 mm。柱状あるいは板状の結晶が多数析出した。

［ HPLC 条件 ］

カラム; Cosmosil $5C_{18}$-AR

溶出液; A液 アセトニトリル/1%酢酸/水(10:20:70)、

B液 アセトニトリル/1%酢酸(80:20)

グラジェント; 0-15 min A:B=50:50

15-30 min A:B=0:100

検出波長; 210 nm

リポペプチド型ＢＳの確認

ＢＳ構成成分としてアミノ酸が含まれることをニンヒドリン反応により確認した。精製したＢＳを塩酸で完全加水分解後、分析用シリカゲル TLC（isopropanol/酢酸/水(75:10:15))で展開してニンヒドリン 0.25%エタノール溶液を噴霧した。 120℃ 数分間の加熱により赤~黄色に発色すればアミノ酸が含まれる。

赤外分析（FT-IR）

大阪大学工学部分析センター（JIR-AQS-20M）で分析した。KRS-5 セル薄膜法を主に用いた。

アミノ酸組成分析

蛋白質研究所化学構造部門(崎山研究室)に分析を委託した。方法は試料に 6 N 蒸留塩酸（含 0.2%フェノール）を添加後、減圧封管して 110℃ 24 時間加水分解を行う。クエン酸緩衝液に溶かした後、HITACHI 835-S アミノ酸分析装置（ポストカラム法）により分析した。アスパラギン、グルタミンは塩酸加水分解によりそれぞれアスパラギン酸、グルタミン酸と区別できなくなるためデータ解釈に注意が必要である。

ＢＳラクトン環部分のケン化分解

大まかなアミノ酸配列分析およびラクトン結合の位置を質量分析装置により決定する際にラクトン環を選択的に開環する必要があった。60 mM NaOH-40 %メタノール（含 40 atm % の $H_2{}^{18}O$, Isotec Inc.社製）50 μlにＢＳを溶解して、37℃ 18 時間加水分解した。1 N 塩酸により pH を 3.0 に調整した後、Disposil C_{18}カラム(ナカライ製）に吸着させ純水で洗浄した。80%アセトニトリル（含 12 mM HCl）で溶出した。質量分析法の欠点として質量数の同じ、ロイシンとイソロイシン（共に 113）を区別することは困難であった。

エドマン分解によるアミノ酸配列決定

ＢＳを 3% ホルムアミド溶液に溶かし 110℃ 24 時間保温して、アスパラギン酸残基を含むペプチド結合部分を特異的に加水分解した。分解物は C_4 カラム逆相 HPLC にて精製した。こうして得られたペプチドは非常に疎水性に富み、PVDF 膜やヘキサジメトリン ブロミド(ポリブレン)処理したグラスフィルターには固定されなかった。そこで、アリルアミンで修飾された Sequelon AA 膜（ミリポア社製）を使い、定法（54）に従ってペプチドのカルボキシル末端との間で共有結合させることによりペプチドを固定した。エドマン逐次分解反応および遊離アミノ酸誘導体の同定はペプチドシーケンサーＡＢ１４７６Ａ(アプライドシステムズジャパン社製)を使用した。

質量分析（FAB-MS）

大阪大学工学部分析センター（JMS-DX303）に委託あるいは、大阪大学蛋白質研究所蛋

白質有機化学部門(下西研究室)(JMA-DA5000)との共同研究により行った。衝突活性化開裂(CAD)/リンクドスキャン法は高尾らの方法(55)により行った。

ガスクロマト質量分析(GC-MS)

BS-38 脂肪酸部分の構造解析に主に使用した。まず、精製された遊離脂肪酸をジアゾメタンによりメチルエステル化した。さらに OV-1 相当の無極性キャピラリーカラム(φ0.53mm, 5m)により分離された成分について電子衝撃イオン化(EI)法によりイオン化した後、質量分析装置で分析した。

^{1}H-核磁気共鳴スペクトル(^{1}H-NMR)

BS-38 の脂肪酸部分の構造解析に主に利用した。精製した BS-38 (100 mg)を塩酸加水分解の後、エーテルで抽出される画分を TLC(ヘキサン/エーテル/酢酸(90:10:1))で分離した。遊離脂肪酸部分(Rf=0.16)を回収(6.3 mg)して、重クロロホルム($CDCl_3$)に溶解後トリメチルシラン(TMS)を内部標準として大阪大学工学部分析センター(JNM-GSX-4000, 400 MHz)で分析を行った。未分解の BS-38 についてもジメチルスルホキシド－d_6に溶解して同様に分析を行った。

各ＢＳ構成アミノ酸光学異性の決定

ＢＳに含まれる各アミノ酸のＤ／Ｌ比は全自動アミノ酸分析システム(AMINOMATE, ICL インスツルメンツ社製)を用いた。D-Asp, L-Asp, D-Leu, 及び L-Leu それぞれの位置決定は以下の方法で決定した。まず、ＢＳを濃塩酸で 37℃ 3 日間処理して部分加水分解物を取得した。加水分解物は C_4 逆相カラム HPLC にて各ピークを分離回収した。それぞれのペプチドのアミノ酸組成を分析して、Asp あるいは Leu を含むサンプルを選別した。続いてこれらを (+)-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate(ＦＬＥＣ)キラル試薬(Eka nobel AB,)(56)により修飾後、C_{18} 逆相カラム HPLC にて分離した。HPLC の条件は下に示す。この方法により、各アミノ酸のＤ体、Ｌ体は溶出位置(Rf値)の異なるピークとして分離され、その Rf 値を標品のものと比較することにより同定できる。

[HPLC 条件]

カラム; Wakopak $5C_{18}$ (4.6×250mm)

溶出液; A液, tetrahydrofuran(THF)/0.15%酢酸ナトリウム(pH4.0)(25:75)

B液, THF/0.15%酢酸ナトリウム(pH5.1)(50:50)

グラジエント; 0-60% B, 0-40 min

60% B, 40-60 min

検出器; 蛍光検出器 FS-8010 (東ソー製) λex 260 nm, λem 315 nm

第3節 結果

1.3.1. ＢＳ生産菌の取得

Ｌ－オイルプレートでＢＳ活性由来のハローを形成する株は 10 種類程度分離されたが、ハローが特に大きく、コロニー形態の異なる 2 株 (A-1 株、B-1 株、いずれも 37℃ での培養) と 30℃ での培養から１株 (MIS38 株) を選択して、以後の実験に使用した (図１－２)。MIS38 株は 37℃ でもよく生育したがこの温度ではＢＳを全く生産しなかった。

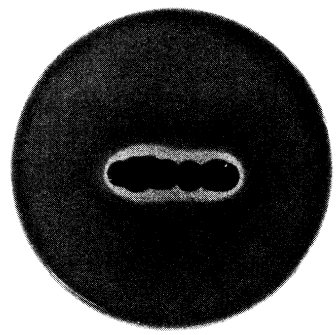


図１－２. MIS38 株のコロニーとＢＳ活性に由来するハロー.
菌株は血液寒天培地 (栄研化学製)にて 30 ℃ 2 日間培養した。菌株により分泌されるＢＳが赤血球を溶解するために、コロニー周囲の色が透明に抜ける。Ｌ-オイルプレート上でも同様に分泌されるＢＳにより油膜が排除されてハローが形成される。

1.3.2. ＢＳ生産株の同定

A-1 株はしわのある乾いたコロニーを形成したが B-1 株は表面に膜のあるムコイド状コロニーを形成した。それぞれの同定に用いた指標を（表１－１）にまとめた。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Section 13 に従ってそれぞれ、Bacillus pumilus A-1, Bacillus subtilis B-1 と同定された。

MIS38 株は胞子を形成しないグラム陽性の絶対好気性菌であり、細胞周期により桿菌と球菌の 2 つの形態をとる。運動性およびカタラーゼ活性を有し、細胞壁にはジアミノピメリン酸ではなくリジンを含むことから Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Section 15 の中の Arthrobacter属細菌と同定された。

表１－１．A-1 株 及び B-1 株の菌株特性．

	Ａ－１株	Ｂ－１株
グラム染色	＋	＋
形態	桿菌	桿菌
胞子形成	＋	＋
カタラーゼ	＋	＋
Ｖ－Ｐテスト	＋	＋
クエン酸の利用	＋	＋
カゼインの加水分解	＋	＋
デンプン　〃	－	＋
各 NaCl 濃度での生育		
2 %	＋	＋
5 %	＋	＋
7 %	＋	＋
各温度での生育		
30 ℃	＋	＋
40 ℃	＋	＋
48 ℃	＋	＋
55 ℃	－	－

1.3.3. ＢＳの構造決定

前節で述べた方法により今回取得された 3 株からそれぞれの生産するＢＳ(主成分)を精製した。B. pumilus A-1 由来のものを BS-A-1　B. subtilis B-1 由来のものを BS-B-1 さらに Arthrobacter sp. MIS38 由来のものを BS-38 と命名した。これらは 6 N 塩酸による 110℃ 16 時間の加水分解の結果、ニンヒドリン陽性であったことからいずれも

リポペプチド型ＢＳであると予想した。

［ BS-A-1 および BS-B-1 ］

BS-A-1 と BS-B-1 の IR スペクトルの結果およびアミノ酸組成分析の結果はいずれも既に有馬らにより報告されているサーファクチン(42)と同一（Asp:Glu:Val:Leu=1:1:1:4）であった（図１－３）。IR スペクトルの 1540 cm $^{-1}$と 1650 cm $^{-1}$の大きな吸収はペプチド結合に由来する。 1730 cm $^{-1}$の吸収からラクトン環の存在が示唆された。 続いて、FAB-MS により分子量を決定した（図１－４）。BS-A-1、BS-B-1 いずれも分子量は 1035 と決定された。1375, 1385, および 2950 cm $^{-1}$の吸収は 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸の構造を示唆している。以上の分析結果から BS-A-1, BS-B-1 はいずれもサーファクチンと同定された。サーファクチンの構造を（図１－５）に示す。

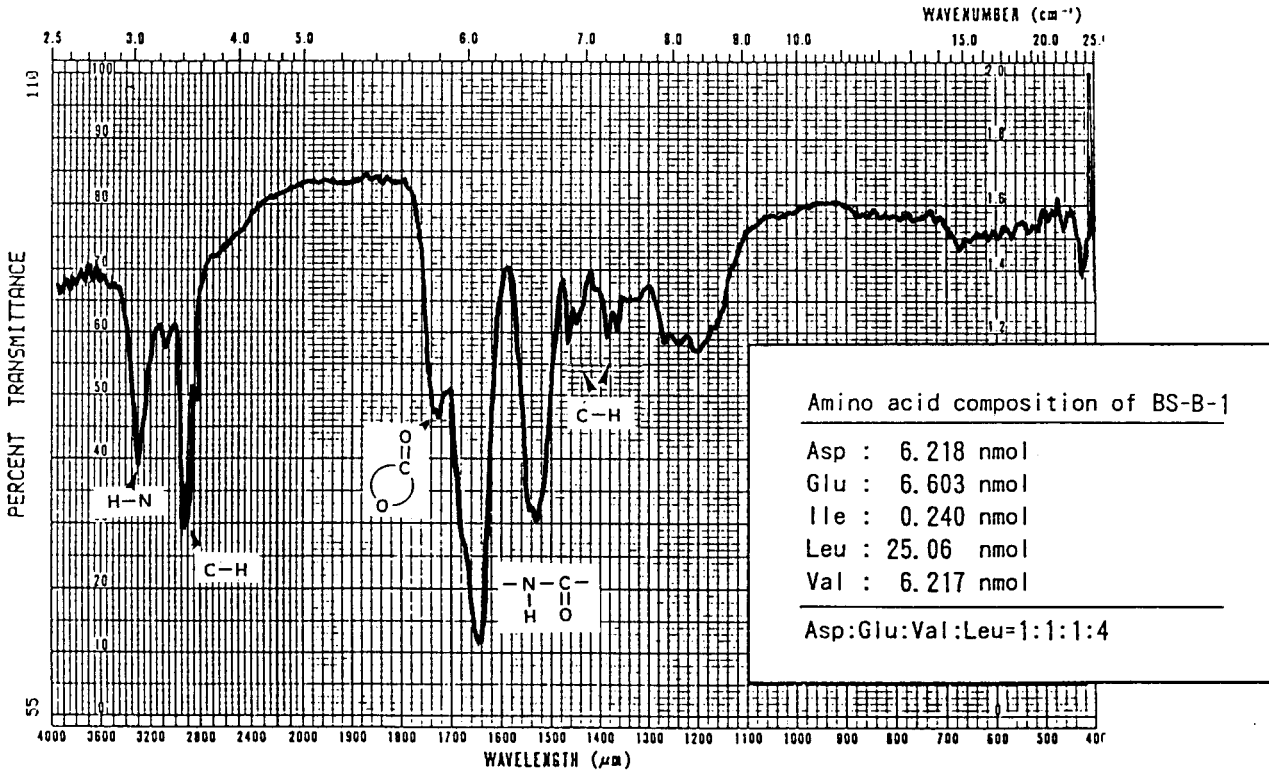


図１－３．BS-B-1 の IR 分析 および アミノ酸組成分析.
BS-A-1 も同様の結果であった。それぞれ 1360~1480 cm^{-1} は C-H 変角、1530 および 1650 cm^{-1} はアミド、1730 cm^{-1} はラクトン、2850~2950 cm^{-1} は C-H 伸縮、3300 cm^{-1} は N-H 伸縮に由来する吸収である。

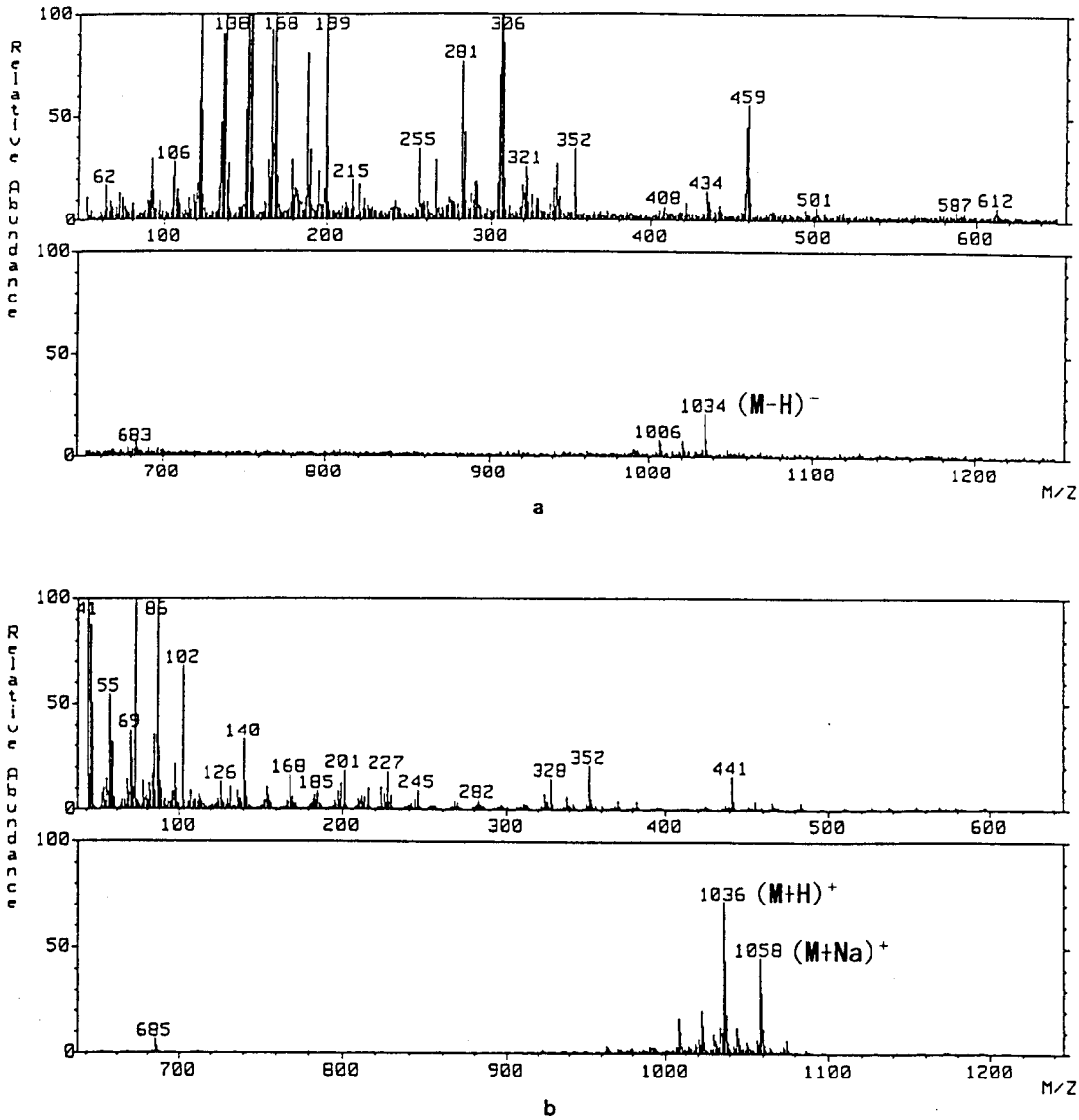


図１－４．BS-A-1 および BS-B-1 の質量分析.
a, BS-A-1 のネガティブ法による質量分析; b, BS-B-1 のポジティブ法による質量分析。いずれの結果からも、分子量は 1,035 と決定された。b, 1,058 は Na が付加したピーク。

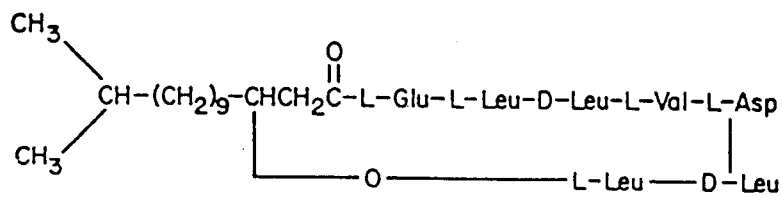


図１－５．サーファクチンの構造 (42)

[BS-38]

FT-IR の結果を（図１－６）に示した。1540, 1650, 3300 cm $^{-1}$に見られる特徴的な吸収は BS-38 がペプチドを含むことを示唆する。1730cm $^{-1}$付近に吸収が認められラクトン環の存在が予想された。 2850-2950 cm $^{-1}$の吸収は C-H 間の伸縮振動に由来するものであり、脂肪族鎖の存在が考えられた。これらの特徴はいずれもサーファクチン(16)と共通していた。しかしながらアミノ酸組成分析の結果（図１－６）から Asp:Thr:Ser:Ile:Leu=2:1:2:2:4 であることが判明した。FAB-MS の結果から BS-38 の分子量は 1354 と決定され、新規物質である可能性が示唆された（図１－７）。

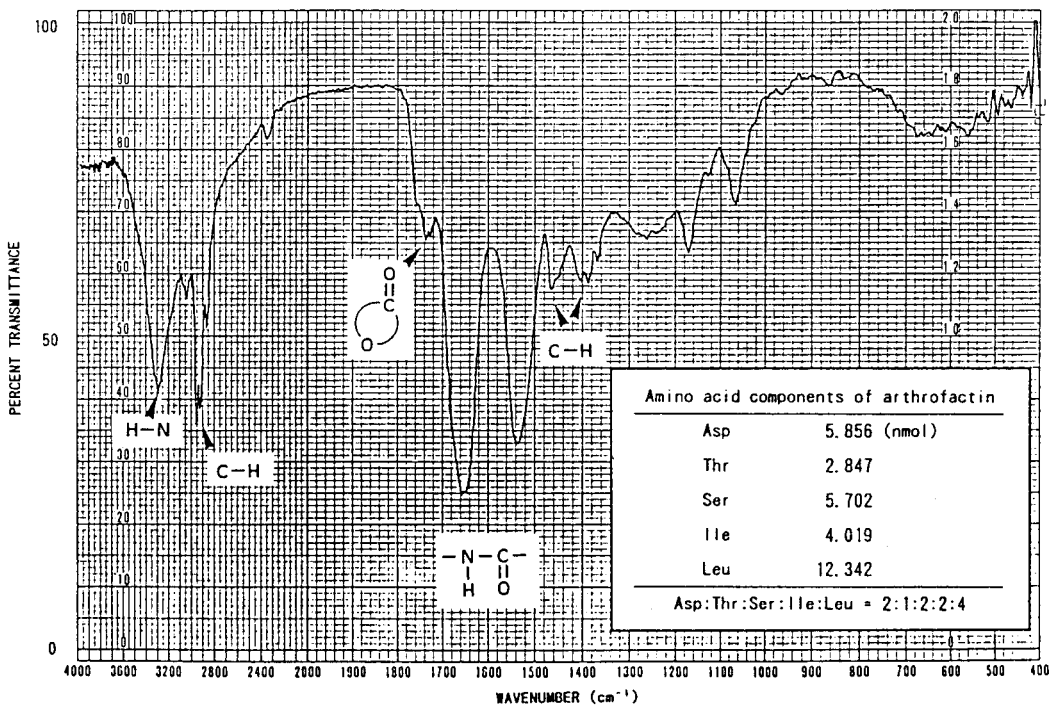


図１－６. BS-38 の IR 分析 および アミノ酸組成分析.
それぞれ 1380~1480 cm^{-1} は C-H 変角、1540 および 1650 cm^{-1} はアミド、1740 cm^{-1} はラクトン、2900~3000 cm^{-1} は C-H 伸縮、3300 cm^{-1} は N-H 伸縮に由来する吸収である。

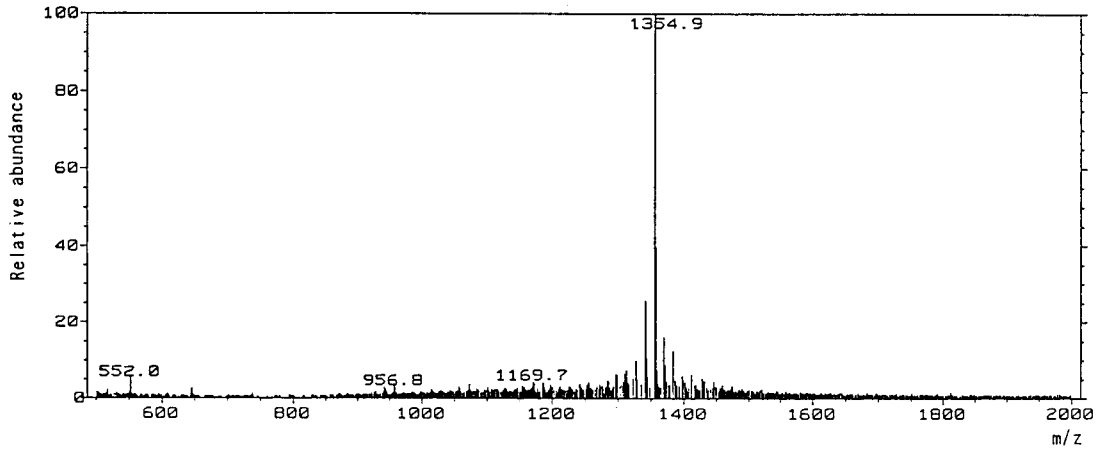


図１－７．BS-38 の質量分析（FAB-MS）.
ポジティブ法により分析した。BS-38 の分子量は 1,354 と決定された。

・脂肪酸部分の構造決定

まず、脂肪酸部分の構造から詳細に検討した。脂肪酸部分の ^{1}H-NMR の結果において、δ=0.85 ppm(methyl)のピークが単一であることからこの脂肪酸は直鎖であると思われた。また、δ=1.1~1.6 ppm(methylene)とのピーク面積比が 3:10 であったことから、その炭化水素鎖部分構造はｎ－ヘキシル基と決定された。その他のピークの帰属については図中（図１－８）に示した。脂肪酸メチルエステルを調製した後、GC-MS により分析した。イオンクロマトグラフィーの結果、2 つのメインピークが検出された。それぞれについてのマスクロマトグラム(EI法)を（図１－９）に示した。脂肪酸メチルエステルの親イオンは検出されなかったが、いくつかのフラグメントピークについて帰属することができた。m/z=87 および 103 の基本ピークはそれぞれ $[CH_2\text{-}CH\text{=}COH\text{-}OCH_3]^+$ と $[CH(OH)CH_2COOCH_3]^+$ に由来するものである。 以上の結果から、脂肪酸メチルエステルの構造は $C_7H_{15}CH\text{=}CHCOOCH_3$ と $C_7H_{15}CH(OH)CH_2COOCH_3$ の混合物であることが判明した。前者は脂肪酸調製の際に脱水されて二重結合が生成された可能性が高く、BS-38 の脂肪酸部分の構造は 3-ヒドロキシデカン酸であると決定した。

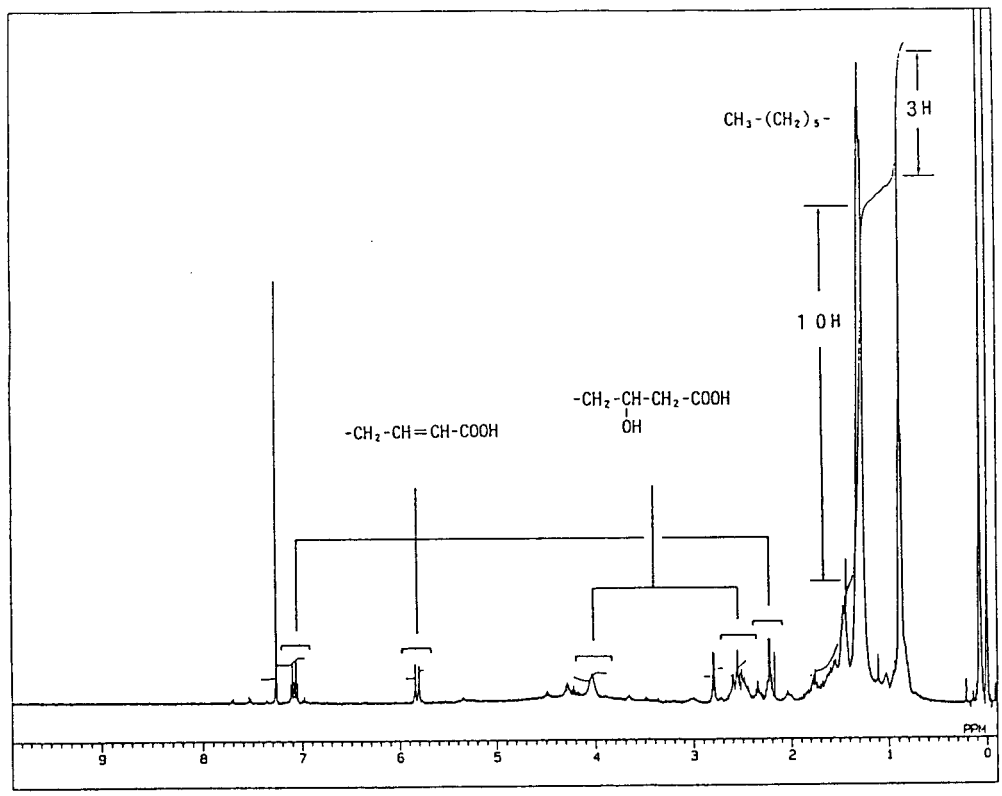


図１－８．BS-38 脂肪酸部分の ^{1}H-NMR スペクトル.

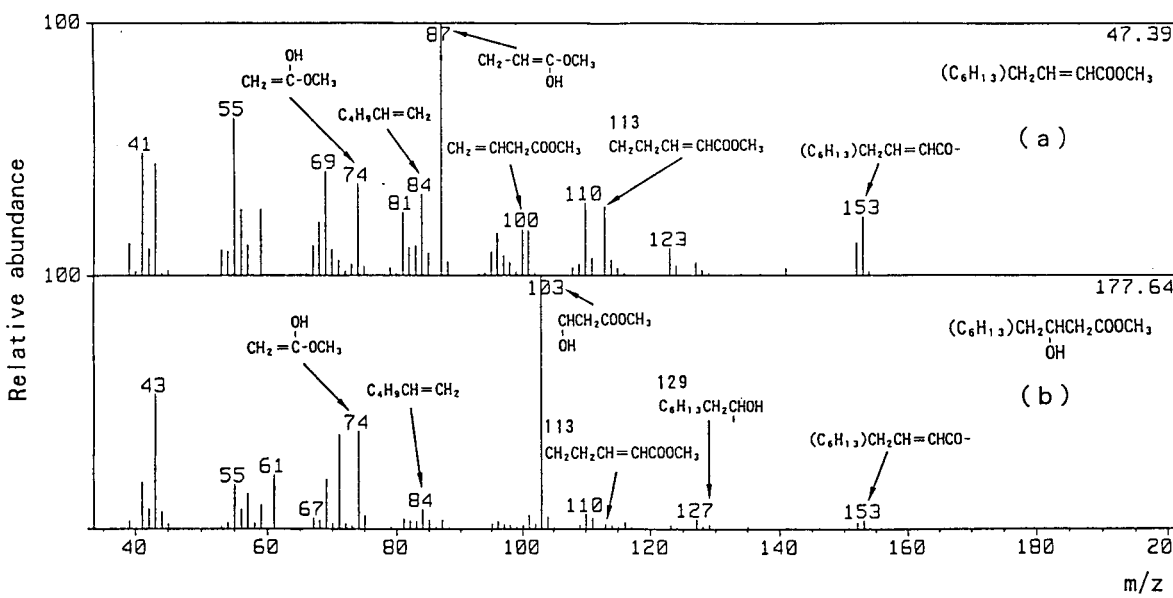


図１－９．BS-38 脂肪酸部分メチルエステルのガスクロマト-質量分析（GC-MS).
イオン化法は EI法により行った。GC（トータルイオンクロマト）分析により 2 つのピークが検出された（a, Scan number 650; b, Scan number 768)。それぞれの成分について質量分析を行った。

・ペプチド部分の配列決定

次に、ペプチド部分の構造を解析した。直接エドマン分解法により BS-38 から全くアミノ酸誘導体が生成されなかったことから、サーファクチンと同様にペプチドN末端部分に脂肪酸が結合していることが予想された。そこで、FAB-MS CAD/リンクドスキャン法(collision-induced dissociation method)によりアミノ酸配列の決定を試みた。未処理の BS-38 およびケン化分解した BS-38 を分析したところ m/zの値はそれぞれ、1354.9（図１－７）と1373.4（図１－１０の挿入図)であった。後者の値はアミノ酸組成分析の結果とN末端側に結合している脂肪酸の分子量との合計(理論値)と一致した。前者との質量数において、18.5の違いは BS-38 分子内にラクトン環が存在することを裏付けている。

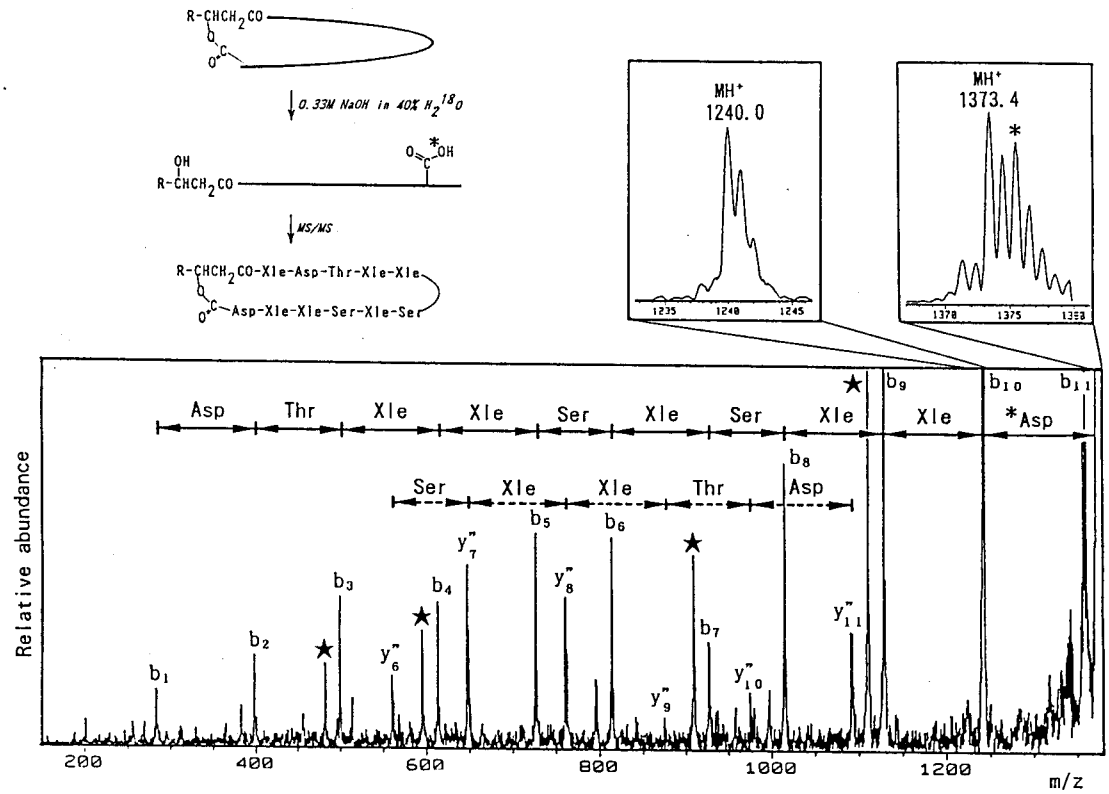


図１－１０．ケン化分解(^{18}Oラベル)した BS-38 の質量分析(CAD/リンクドスキャン).
実線および点線矢印はそれぞれ b および y 系列のフラグメントイオンピークを示す。
星印は b-18 系列のイオンを示す(57)。*Asp および 挿入図中の * はそれぞれ^{18}Oラベルされた Asp および 分子イオンピーク種を示す。
方法の概略および決定されたアミノ酸配列を枠外に示した。

図１－１０に示した通り、ケン化分解時に^{18}OでラベルされたＢＳからはy_n系列とb_n系列のシーケンスイオンがＮ末端およびＣ末端からそれぞれ明瞭に検出された。y_nとb_nシーケンスイオン質量数の差からアミノ酸配列が決定できる。すなわち、Ｎ末端からは、-Asp-Thr-Xle-Xle-Ser およびＣ末端からは -Asp-Thr-Xle-Xle-Ser-Xle-Ser-Xle-Xle-Asp であった。なお、Xle は Leu あるいは Ile である。アミノ酸組成および脂肪酸部分の分子量を考慮すると、必然的にＮ末端１番目のアミノ酸は Xle となり、^{N}-Xle-Asp-Thr-Xle-Xle-Ser-Xle-Ser-Xle-Xle-Asp-^{C} と同定される。さらに、Ｃ末端の Asp が切断された後に^{18}Oが失われたことから、分子内の水酸基とＣ末端の Asp カルボキシル基の間でラクトン(エステル)結合が形成されていると推定された。松山らは脂肪酸中の水酸基とＣ末端アミノ酸残基のカルボキシル基間で形成されたラクトンの NMR 分析結果を報告している(58)。この結果を参考にしたところ BS-38 に関する ^{1}H-NMR (400 MHz) 分析の特徴から Ser、Thr 側鎖ではなく脂肪酸中の水酸基が結合に関与していることが示唆された（データ示さず）。Ile と Leu は 2 残基の Asp 間で選択的に行った加水分解産物に関するエドマン分解の結果から同定した。最終的にアミノ酸配列は次のように決定された、^{N}(Leu)-Asp-Thr-Leu-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile-Ile-Asp^{C}。Ｎ末端の Leu はアミノ酸組成分析の結果から決定した。エドマン逐次分解反応後に遊離してくるアミノ酸誘導体のピーク溶出位置（特に、Ser と Thr）はいずれも標準サンプルと同じであったことからこれらの側鎖の水酸基はフリー、すなわちラクトン環形成には関与していないことが示唆された。

・アミノ酸光学異性の決定

全アミノ酸の光学異性について調べた結果を（表１－２）に示した。Leu については、Ｄ体からＬ体へのラセミ化が若干起こっているようであった。そこで BS-38 ペプチド部分加水分解物を分取した後、FLEC キラル試薬による誘導化反応を利用して D-Asp, L-Asp, D-Leu, そして L-Leu の位置を決定した（図１－１１）。以上により BS-38 の全化学構造は（図１－１２）のように決定された。BS-38 は新規のＢＳであったため、我々はこれを生産菌の属名に因んで「アルスロファクチン (Arthrofactin)(59)」と命名した。Asp には α位(主鎖)とβ位(側鎖)にカルボキシル基があり、いずれがラクトン環形成に拘わっているかについては、Asp のＣ末端側で切断する酵素 (Asparaginylendopeptidase,

表１－２．アミノ酸の光学異性体分析．

アミノ酸	光学異性 D体	光学異性 L体
Ser	200.89	0.00
Asp	117.00	116.83
Thr	4.33	0.00
Leu	266.35	127.29
Ile	0.00	125.34

それぞれの値は BS-38 100 pmol 当たりに含まれるアミノ酸の pmol数。
D-Thr の値が小さい原因は不明。

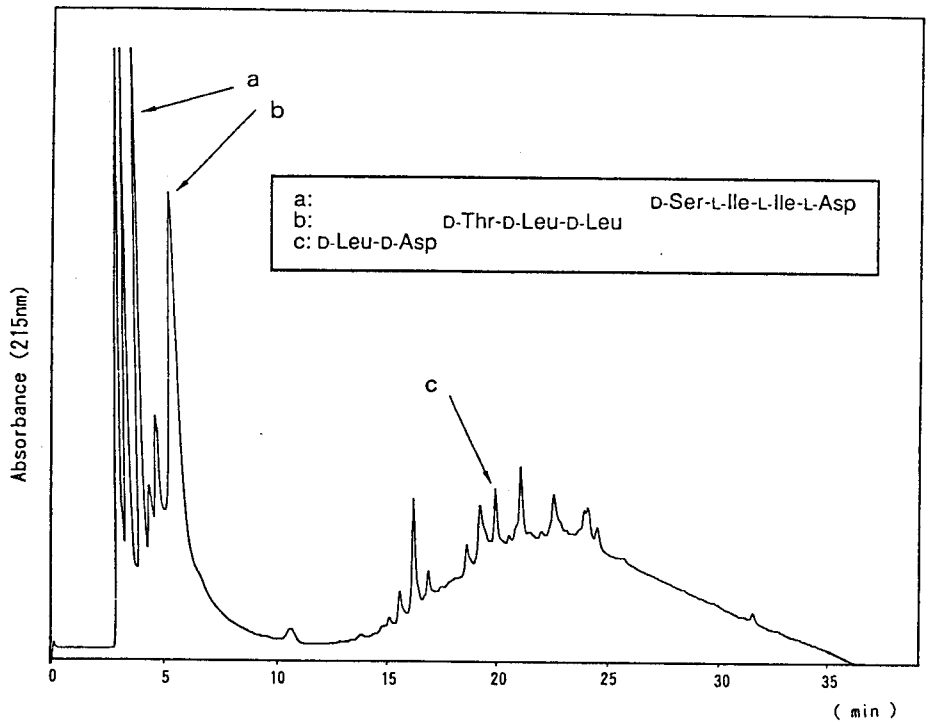
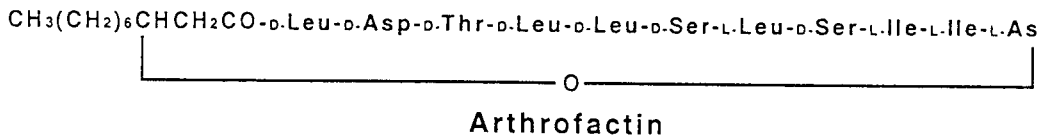


図１－１１．BS-38 ペプチド部分加水分解物の HPLC 分離と決定されたアミノ酸配列．分離された主要なピークのアミノ酸組成分析を行った。Leu もしくは Asp を含むペプチド（a, b, c）を選び、FLEC 試薬によりそれらの D/L 光学異性を決定した。



Arthrofactin

図１－１２．アルスロファクチン（BS-38）の化学構造．

TaKaRa)などを用いた解析がさらに必要であるが、これまで報告されたリポペプチド型ＢＳで側鎖のカルボキシル基がラクトン環に関与した例はない。

第４節　考察

本研究では静岡県相良油田から活性の高いＢＳ生産菌として 3 株取得した、コロニーの形態は全く異なったが同定の結果、A-1 株、B-1 株はいずれも Bacillus属細菌であり、生産しているＢＳも共にサーファクチンであった。B. subtilis がサーファクチンを生産することは既に有馬らにより報告されている(42)が、B. pumilus で生産することは本報告が初めてである。また、B. subtilis B-1 はＬ固形培地、Ｌ液体培地のいずれにおいても著量のＢＳを生産したのに対して、B. pumilus A-1 は液体培地におけるＢＳ生産性は極めて低く、パラフィンなどを添加する必要があった。これはＢＳ生産制御系において、両者の間で異なる機構が存在することを示唆していると考えられた。一方、MIS38 株は Arthrobacter属細菌と同定された。これまでにも Arthrobacter属細菌によるＢＳ生産が報告されているが、グリコペプチド型ＢＳ（トレハロースリピド）(60)であり MIS38 株由来のもの（アルスロファクチン）はリポペプチド型ＢＳであった。分子量 700 程度のリポペプチド型（セラウェッチン）は全構造を２次元ＮＭＲにより決定しているが、アルスロファクチンの場合分子量が大きい（1354）ため、２次元ＮＭＲ（400 MHz)のピークの帰属が困難であり、FAB-MS CAD/リンクドスキャン法によりペプチド部分構造決定を行った。FAB-MS によるアミノ酸配列決定は従来のエドマン逐次分解法と比較した場合、特に修飾されたペプチドのアミノ酸配列決定に威力を発揮する。本報告の他、ウシ網膜ＧＴＰ結合タンパク質（トランスデューシン）γサブユニットのＣ末端 Cys にファルネシール基が結合していることも同様の方法によって解明されている(61)。これまでに発見されたリポペプチド型ＢＳの殆どが環状構造（ラクトン環が多い）をとっているのは非常に興味深い。脂肪酸鎖やアミノ酸側鎖がＢＳの両親媒性にいかに寄与しているかについては２次構造や３次構造の解析が必要である。我々も、アルスロファクチンの結晶解析を試みた（大阪大学工学部応用精密化学科 甲斐研究室との共同研究）が、結晶がＸ線照射に対して弱

く残念ながら結晶格子決定までには至らなかった。今後の結晶解析技術や高分解能２次元ＮＭＲ法(62)を含めた有力な高次構造決定法の開発が望まれる。

第５節　要約

細菌による石油代謝とＢＳ生産は密接な関係があり、実際油田土壌からＢＳ生産菌が3 株取得された。菌株同定の結果、それぞれ B. pumilus A-1、B. subtilis B-1、Arthrobacter sp. MIS38 と同定された。ＢＳ構造解析の結果、A-1 株, B-1 株が生産するＢＳは共にサーファクチンであった。MIS38 株の生産するＢＳは新規の構造を有していたためこれを「アルスロファクチン」と命名した。種々の分析手法を駆使することによりアルスロファクチンの化学構造を 3-hydroxydecanoyl-D-leucyl-D-asparagyl-D-threonyl-D-leucyl-D-leucyl-D-seryl-L-leucyl-D-seryl-L-isoleucyl-L-isoleucyl-L-asparagyl lactone と決定した。アルスロファクチンの構造決定において、質量分析 CAD/リンクドスキャン法は極めて有効な方法であった。

第2章　バイオサーファクタントの構造－活性相関

第1節　緒言

合成界面活性剤は反応条件を変えることにより様々な同族体が得られ、その構造－活性相関に関する研究が既に進んでいる(37)。しかしながらＢＳは一般的に複雑な化学構造を持っており化学的に合成することが困難であるために系統的な研究が遅れている。今後、ＢＳが工業的に利用されるためには培養条件を検討しその生産性を向上させること(63,64,65,66,67)が重要である。一方、ＢＳの構造－活性相関を調べた上で分子活性を増強することは界面化学的に意義があるばかりではなくその実用化への貢献度も大きいと考えられる。前章で述べたように相良油田土壌から分離された細菌が生産する活性の高いＢＳ（サーファクチンおよびアルスロファクチン）はいずれも構造上の骨格としてα－アミノ酸ペプチドとβ－ヒドロキシ酸との環状エステルであった。そこでこれらをモデル物質として、リポペプチド型ＢＳの構造と活性の相関について検討を加えた。先ず、アルスロファクチンとサーファクチンの活性を比較した上で、それらのもつ環状構造の重要性を調べた。続いてサーファクチンを対象とした化学修飾により負荷電(カルボキシル基; Asp, Glu 由来)の活性に及ぼす影響を調べた。

第2節　実験材料および方法

ＢＳ

・サーファクチン（名古屋大学農学部教授 垣沼淳司先生より分譲）

・アルスロファクチン

合成界面活性剤

・Triton X-100

・Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ＯＤＳミニカラムによる反応試薬の除去

化学修飾反応後、各種反応試薬を除去するために、ODS ミニカラム（TOYOPAK ODS-S; 東ソー、あるいは SEP-PAK PLUS C18; ミリポア）を用いて精製を行った。カラムベッドボリュームの 3 倍量（3~10 ml）程度のメタノール、MilliQ 水、さらに 20 % アセトニトリル（含 0.5 N HCl）をシリンジを使って流すことによりカラムの洗浄および平衡化を行った。サンプルをシリンジにより添加した後、5 ~ 10 倍量（5~10 ml)の 20% アセトニトリル（含 0.5 N HCl）で洗浄（反応試薬、溶媒の除去）した。カラム等量（1~3 ml)程度の 80% アセトニトリル（含 0.5 N HCl）でサンプルを溶出した。HPLC による精製は第一章と同じ条件で行った。

サーファクチンの化学修飾

サーファクチン分子中に含まれる 2 つの酸性アミノ酸残基（Asp, Glu）の負荷電を消去する目的でアミド化およびメチル化を行った。

・アミド化(68)

サーファクチン 10 mg を 10 ml メタノールに溶解後、5.5 M 塩化アンモニウム（25% アンモニア水で pH 7.0 に調整したもの）を 1 ml 添加した。0.5 M 塩酸で pH 5.0 に調製した後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド（EDC）0.5 g を 1 時間毎に 3 回加えた。この間、0.5 M 塩酸で pH 5 を維持した。反応後、MilliQ 水を等量（約 10 ml）加えてから ODS ミニカラムにより精製した後、エバポレーターにより完全乾固した。さらに HPLC で精製した後、FAB-MS により質量分析を行うことによりアミド化を確認した。 サンプルを長時間放置した場合、メチル化も進行するため最終精製までは速やかに行うことが重要である。メタノールの代わりにアセトニトリルを用いた場合、メチル化は起らないがアミド化物の収率は低かった。

・メチル化(69)

サーファクチン 10 mg を無水メタノール 10 ml に溶解し、12 N HCl を 0.1 ml 加えて酸性にした後、22℃ で一晩放置した。MilliQ水を等量加えて ODSミニカラムで精製し、エバポレーターで乾固した。HPLC により各ピークを分取した後、FAB-MS により反応を確

認した。

・ラクトン環の開環

弱アルカリによる加水分解を試みた(70)が、全く開環されなかったので強アルカリにより低温で加水分解を行った。サーファクチン あるいは アルスロファクチン 5 mg を 60 mM NaOH/ 40% MeOH で溶解し、37℃ で一晩放置した。1.5 ml MilliQ 水を添加した後、0.5 N HCl を 5 μl ずつ加えて最終的に pH を 3 ~ 6 に調整した。ODSミニカラムで精製し、エバポレーターにより乾固した。

バイオサーファクタントの活性測定法

①表面張力の測定

界面活性を測定する方法としては、表面張力の低下力 と 限界ミセル濃度（CMC)で評価するのが一般的である。そこで、少量溶液の表面張力測定が容易におこなえる Traube's Stalagmometer（滴数計、TOP社製）を用い操作法は説明書に従って行った。液滴一滴の体積および重量を測定(計算)した後、表面張力（γ）= F × m {F; 測定温度における純水 1 g 当たりの表面張力（mN/m•g)、m; 試料一滴あたりの重量（g)} により算出した。CMC は試料の濃度を様々に変えたときの表面張力を測定しグラフにプロットした後、その変曲点あたりの濃度として決定した。

②油膜排除活性の測定

従来の方法に比べて飛躍的に微量の試料で活性を評価する方法を考案した。直径 16 cm のガラスシャーレに純水 20 ml を入れる。水面が安定した後、原油(相良油）10 μl を静かに滴下してオイル薄膜を形成する。その中央に試料溶液 10 μl を静かに滴下して、油膜が除去されることにより形成される円の面積をノギスを用いて正確に測定する。こうして形成される油膜排除円の面積は界面活性剤量に比例することが確認された。この方法により、物質固有の比活性（cm^2/mol）を決定することができる。

第3節　結果

2.3.1. アルスロファクチンとサーファクチンの界面活性

まず、界面活性剤の活性評価で一般的な尺度として用いられる CMC についてサーファクチンおよびアルスロファクチンを比較した。サーファクチンは純水、アルスロファクチン試料は 10 mM リン酸緩衝液（pH 8.0）に溶解したものを用いた。純水と 10 mM リン酸緩衝液の表面張力は同じであることは別途確認した。それぞれの表面張力低下の様子を（図２－１）に示した。CMC はそれぞれ、1.0×10^{-5} M（アルスロファクチン）、7.0×10^{-5} M（サーファクチン)であった。また、水の表面張力を 72 mN/m から 40 mN/m まで低下させるのに必要な量で比較した場合、アルスロファクチンでは 7.5×10^{-6} M、サーファクチンでは 4.0×10^{-5} M であることが読み取れる。最小表面張力を比べた場合においても、サーファクチンは 5×10^{-4} M で 27 mN/m であったのに対して、アルスロファクチンは 1.0×10^{-4} M 付近において 24 mN/m にまで低下していた。以上の結果、従来最も活性の高いリポペプチド型バイオサーファクタントと言われていたサーファクチンよりも今回分離した新規物質アルスロファクチンはさらに 5 倍（activity/mg）~ 7 倍（act./mol）程度高い活性を有することが判明した。

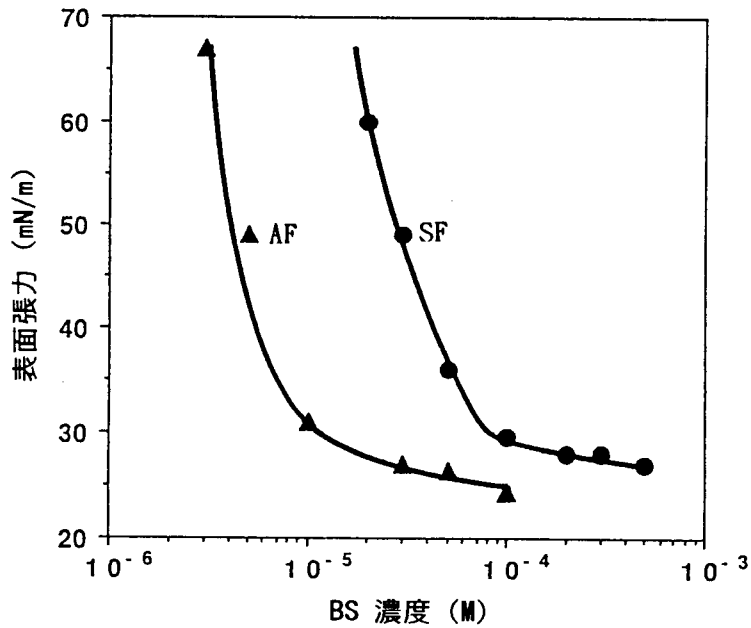


図２－１．アルスロファクチンおよびサーファクチンの界面活性比較.
表面張力は液滴計により測定した。水滴は約 10 秒間隔で滴下した。液温は 25 ℃ で行った。▲；アルスロファクチン。●；サーファクチン。

2.3.2. アルスロファクチンとサーファクチンの油膜排除活性

ＢＳ生産菌をＬオイルプレート上で分離する際に、コロニー周囲に透明なゾーンが形成されることを既に観察していた。そこで、バイオサーファクタントの活性測定にこの現象（油排除）の利用を試みた。いずれの界面活性剤の場合においてもその量と活性には比例関係が認められたことから、界面活性剤の活性評価に十分利用できると思われた（図２－２）。 またこの方法では従来法に比べてはるかに極微量で界面活性剤の活性を評価することができた。油膜排除活性の場合サーファクチンは合成界面活性剤 Triton X-100 と同程度の活性を示し、アルスロファクチンはサーファクチンの 1.7 倍（activity/mg）および 2 倍（activity/mol）の活性を保持していた。一方、SDS には油膜排除活性は全くなかった。Triton X-100 および SDS の CMC は それぞれ 3×10^{-4} (M) および 1.2×10^{-2} (M) (37)(アルスロファクチンの約 30 倍および 1200 倍)であることから表面張力低下能と油膜排除活性とは界面活性剤を異なる原理(基準)で評価しているものの、その間にはある程度相関性が認められる。また、SDS の場合において油膜活性が全く認められないのは CMC が大きいことに加えて、HLB (Hydrophile-Lipophile Balance)が 約40 と大きく(Triton X-100 は13.5)、極めて水溶性に富む性質を有することも原因の一つと考えられる(37)。

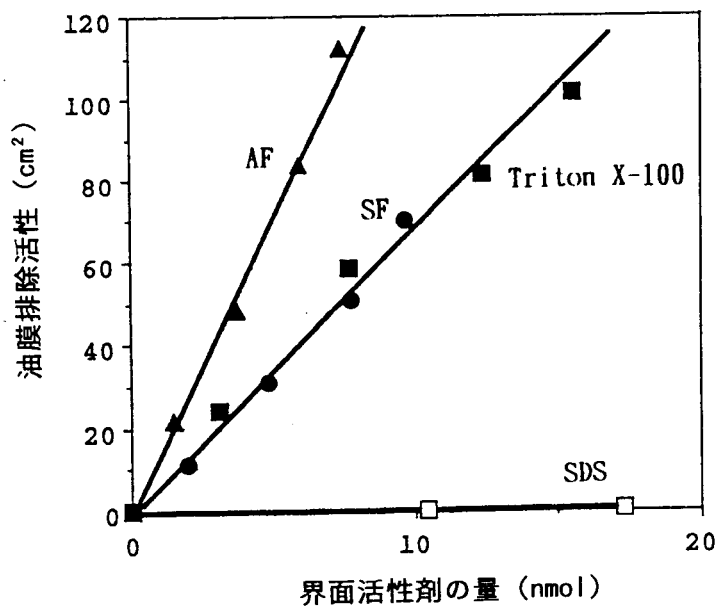


図２－２．界面活性剤量と油膜除去領域の関係.
▲；アルスロファクチン。●；サーファクチン。■；Triton X-100。□；SDS。

2.3.3. サーファクチンの化学修飾

アルスロファクチン(59)、サーファクチン(42)、イチュリン(71)、セラウェッチン(58)はいずれも環状リポペプチド型のバイオサーファクタントである（図２－３)。イチュリンとセラウェッチンの CMC はそれぞれ、37.5 mN/m および 33.9 mN/m でありアルスロファクチンやサーファクチンにくらべて活性が低い。その構造上の共通点を考えた場合、アルスロファクチンとサーファクチンには共通して 2 残基の酸性アミノ酸が含まれている。バイオサーファクタントの親水基としてアミノ酸残基が機能する場合、電荷をもったアミノ酸が有効であることは容易に想像できる。そこで、サーファクチンを材料として化学修飾法によりアスパラギン酸およびグルタミン酸側鎖のカルボキシル基をアミド化およびメチル化により電荷を消去した場合に活性にどのように影響するかを調べた。アミド化反応後、HPLC での分離とメインピークの質量分析の結果を（図２－４）に示した。質量数が 2 少ないピーク 1 が 2 ケ所アミド化されたサーファクチン（2A-SF）である。同様にメチル化物についての分析結果を（図２－５）に示した。この場合ピーク 2 と 3 にそれぞれ、1 ケ所 及び 2 ケ所 メチル化されたもの（1M-SF, 2M-SF）が分離された。ピーク 1 は質量数から未反応のサーファクチンと推定される。以上の化学修飾サーファクチンを HPLC により分画後、活性を測定した（2.3.5)。

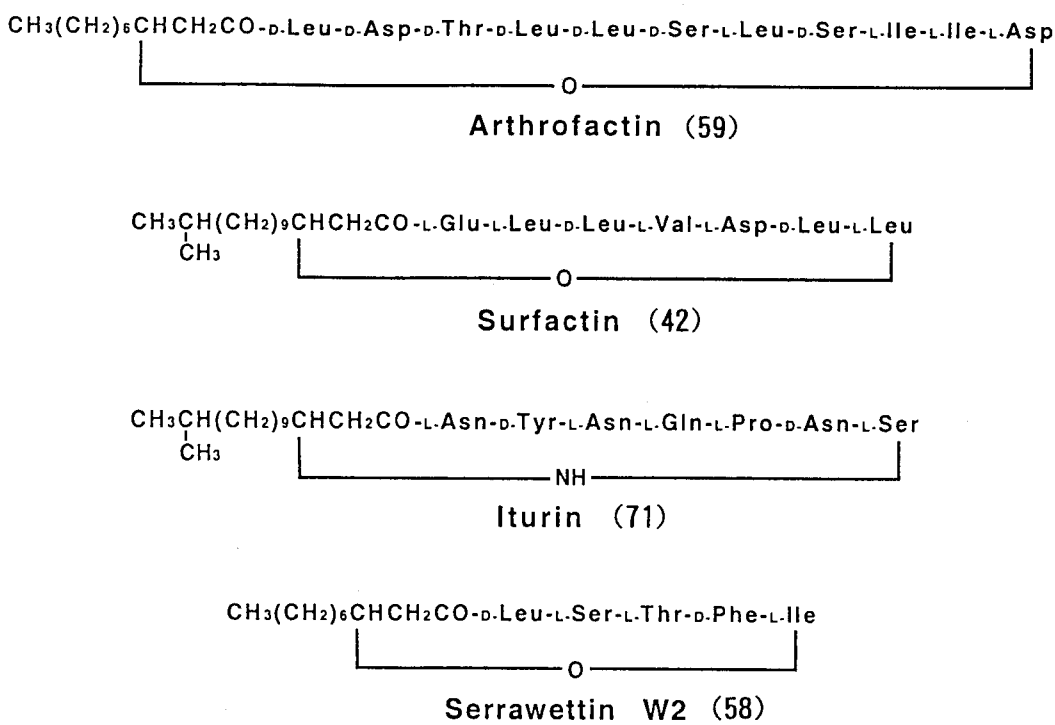


図２－３．構造の類似したリポペプチド型バイオサーファクタント.

サーファクチン

	$CH_3CH(CH_2)_9CHCH_2CO$-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu		予想される質量数
	(-COOH)	(-COOH)	1035
1ヶ所アミド化	(-$CONH_2$)	(-COOH)	1034
2ヵ所アミド化	(-$CONH_2$)	(-$CONH_2$)	1033
1ヵ所メチル化	(-$COOCH_3$)	(-COOH)	1049
2ヵ所メチル化	(-$COOCH_3$)	(-$COOCH_3$)	1063
反応中間体1	(-$CONH_2$)	(-COO-EDC)	1190
反応中間体2	(-$CONHCH_2SO_3H$)	(-COO-EDC)	1283

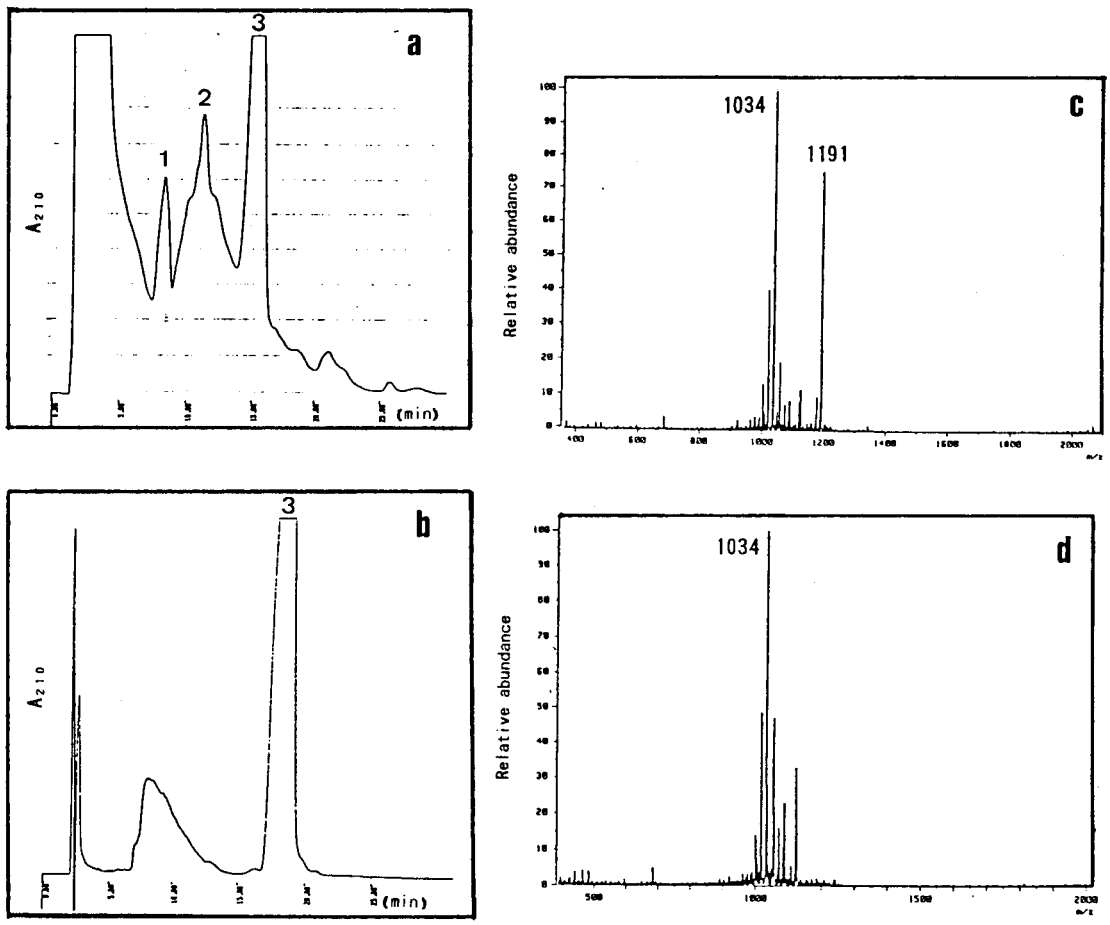


図2－4．サーファクチンアミド化反応物の HPLC および質量分析（FAB-MS）結果.
a; HPLC 分析。b; HPLC で精製されたピーク 3。c; 精製前ピーク 3 の FAB-MS 分析。
d; 精製後ピーク 3 の FAB-MS 分析。2A-SF; M/Z=1034。1A-SF-EDC; M/Z=1191。

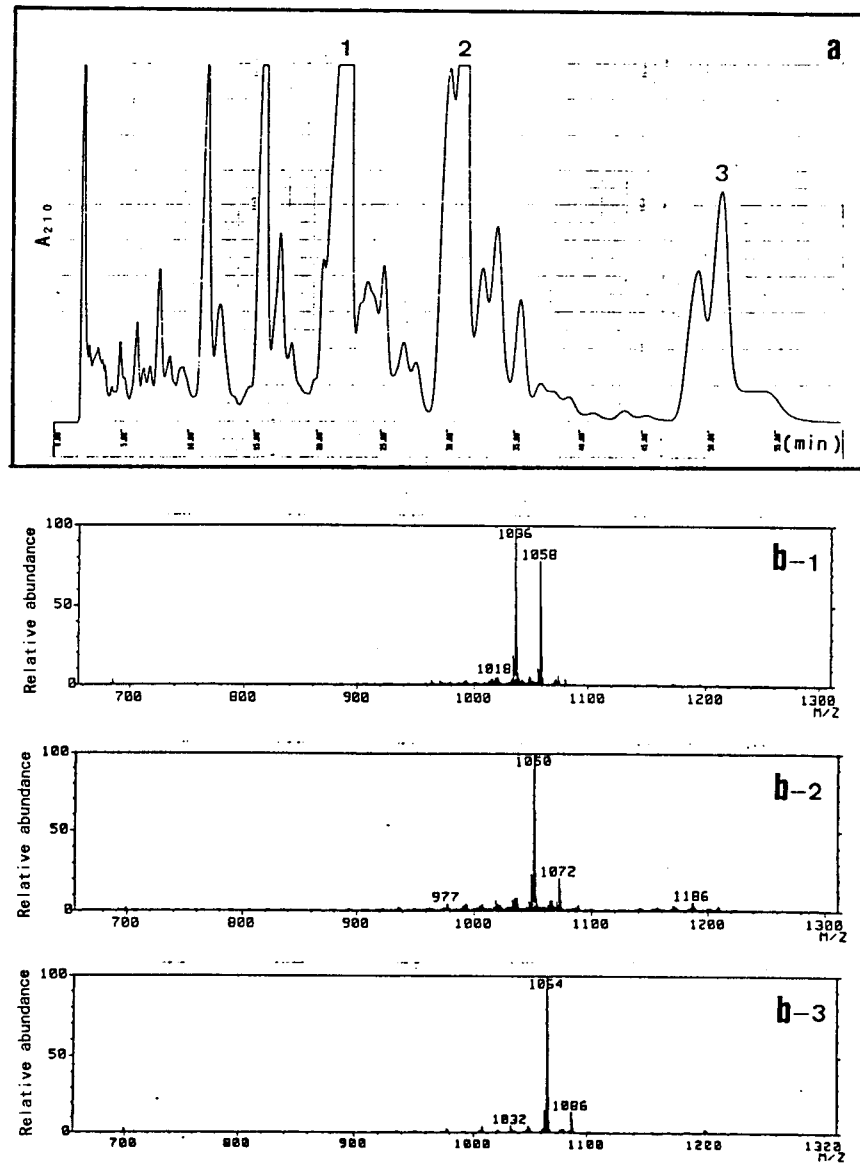


図２－５．サーファクチンメチル化反応物の HPLC および質量分析（FAB-MS）結果
a; HPLC 分析。b; HPLC で精製されたピーク 1, 2, 3 の FAB-MS 分析。
ピーク 1 は未反応サーファクチン SF; M/Z=1036。ピーク 2 は 1ケ所メチル化されたサーファクチン 1M-SF; M/Z=1050。ピーク 3 は 2 ケ所メチル化されたサーファクチン 2M-SF; M/Z=1064。

2.3.4. ラクトン環の開環

リポペプチド型ＢＳと合成界面活性剤の構造を比較した場合、もっとも大きな違いは前者の多くが環状構造を有している点が挙げられる（図２－３）。そこで、サーファクチンのラクトン環を部位特異的に加水分解してその活性に与える影響について調べた。加水分解反応に関する最適条件検討の後(前節参照)、試料を直接 FAB-MS により分析したところ完全にラクトン環が開環していたため HPLCによる精製を行う必要がないと判断し、溶媒交換後、活性測定サンプルとして供した（開環サーファクチン，L-SF; 開環アルスロファクチン，L-AF（図２－６）。

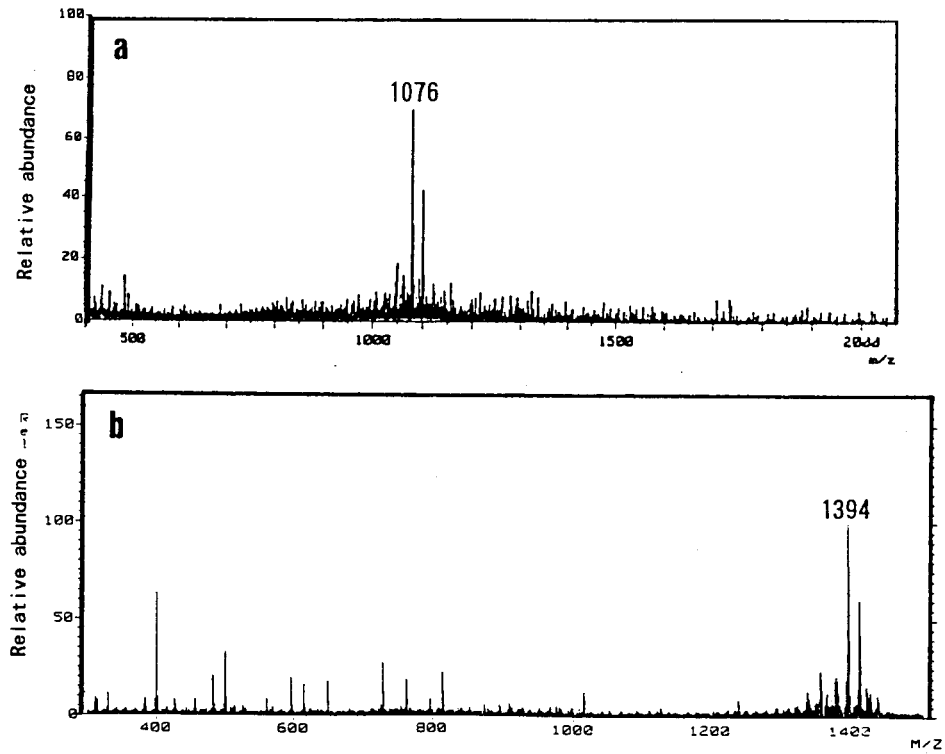


図２－６．サーファクチンおよびアルスロファクチン ラクトン環の開環.
a; ラクトン環の開いたサーファクチン l-SF; M+Na/Z=1076（Na が結合している)。
b; ラクトン環の開いたアルスロファクチン l-AF; M+Na/Z=1394（　〃　）。

2.3.5. 化学修飾サーファクチンの活性測定

アミド化およびメチル化サーファクチンは極性の低下が原因で水に不溶性であったためCMC の測定はできなかった。そこで 70% アセトニトリル溶液として油膜排除活性で評価した（図２－７）。2A-SF, 1M-SF, 2M-SF はいずれも油膜排除活性において 1.2 倍程度活性の上昇が認められた。一方、40% メタノール溶液として測定したところ、L-SF はサーファクチンに比べて油膜排除活性が 30% にまで減少していた。

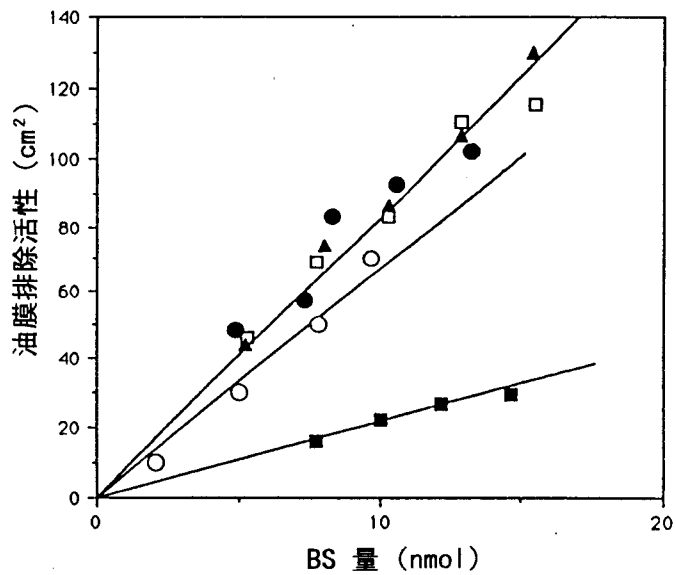


図２－７．化学修飾サーファクチンの油膜排除活性.
○, SF; □, 2A-SF, ●, 2M-SF, ▲, 1M-SF; ■, L-SF。

L-AF について同様に油膜排除活性を測定したところ、アルスロファクチンに比べて34% であった。 また表面張力低下活性について L-AF を評価した結果、CMC は 7×10^{5} (M)、最小表面張力は 36 mN/m 程度であり活性の低下が認められた（図２－８）。これらの結果からサーファクチン、アルスロファクチンなどの環状リポペプチド型バイオサーファクタントはその環状構造が高い活性発現（表面張力低下活性、油膜排除活性）に重要であると結論される。また、ペプチド部分の酸性アミノ酸残基に由来する負電荷は高い界面活性を保ちながら水溶性を維持するために重要であることが判明した。

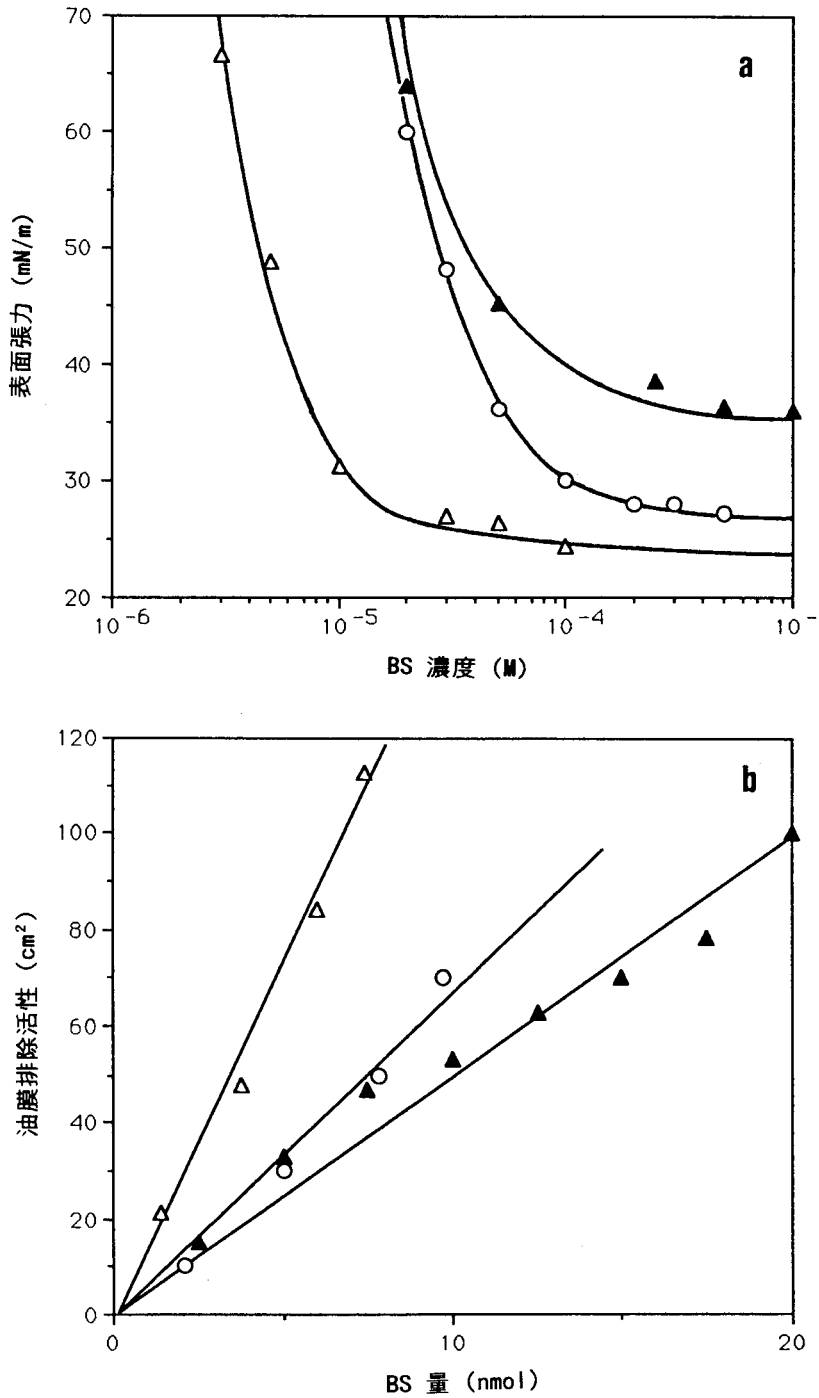


図２－８．線状アルスロファクチン(L-AF)の界面活性および油膜排除活性.
a; 界面活性。b; 油膜排除活性。いずれも △, AF; ▲, L-AF ; ○, SF。

2.3.6. 油膜排除活性に関する pH の影響

2A-SF, 1M-SF, 2M-SF を それぞれ pH 0.8 (with 1N HCl)、pH 11.0 (with 1N NaOH) および pH 7.0 の場合における油膜排除活性を比較した（表２－１）。メチル化あるいはアミド化された試料の活性に対する pH の影響は少なかったが pH 0.8（酸性条件下）において活性がわずかに高かった。カルボキシル基を有するサーファクチン、アルスロファクチンおよび 1M-SF においてはアルカリ性条件下において活性が高かった。ただし、高 pH 条件下（pH > 9）では一部ラクトン環が開き始める(データ示さず)。

表２－１．油膜排除活性に対する pH の影響.

pH \ BS	AF	SF	1M-SF	2M-SF	2A-SF
0.8	6.1	1.1	11.3	11.1	11.5
7.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
11.0	12.6	13.6	11.4	10.1	9.8

活性は排除された油膜の面積(cm^2)で表した。

第４節　考察

これまでに多数のバイオサーファクタント生産菌が報告されているが、その生産物の化学構造を明らかにした例はそれほど多くはない。新規土壌細菌 Arthrobacter sp. MIS38 により生産される アルスロファクチンはその中でも最も分子量の大きなもののひとつ(M.W.=1354)であった(59)。構造が明らかとなっているリポペプチド型バイオサーファクタントとしてサーファクチン(42)、イチュリン(71)、バシロマイシン(72)、ビスコシン(43)およびセラウェッチン(58)などが既に報告されている。このなかで、サーファクチンとイチュリンは共に Bacillus属細菌により生産され、脂肪酸部分（特にアルキル鎖）の構造は同じであるにもかかわらず、その界面活性は サーファクチンが 27 mN/m に対してイチュリンは 37.5 mN/m とかなり違う。これはその親水基（ペプチド）部分の構造の違いに由来すると考えられる。すなわち、いずれも 7 アミノ酸から構成されているがサー

ファクチンの場合は 4 Leu, 1 Val, 1 Asp, 1 Glu、イチュリンは 1 Tyr, 3 Asn, 1 Gln, 1 Ser, 1 Pro である。これらの相違点をアミノ酸の特性でまとめると、前者は脂肪族系の疎水性アミノ酸に富み、負電荷をもったアミノ酸が 2 残基ある。これらの特徴の違いは活性の高いアルスロファクチンと活性の低いセラウェッチンの比較でも共通する点であった。 そこで本研究では、活性の高いリポペプチド型バイオサーファクタントのモデル物質としてサーファクチンを材料とし、その分子に負電荷を供与するカルボキシル基（2 ケ所）をメチル化およびアミド化（負電荷を消去）することにより油膜排除活性が 2 割程度上昇することが判明した。これまでの膨大な合成界面活性剤の研究からは界面活性を大きくする要因として、①疎水基および親水基がかさ高くないこと ②疎水基の鎖長が長い ③電荷の反発がないことの 3 点が指摘されている(12)。これらは、いずれも低濃度で分子がミセルを形成しやすくなる傾向と考えれば理解しやすい。今回 負電荷を消去する効果は上記の③により説明される。しかしながら、サーファクチンの負電荷を消去することにより界面活性（油膜排除活性）は高くなったが、水溶性は極端に低下した(CMC が測定できなかった)。つまり、サーファクチンは界面活性が高く維持し、かつ水溶性であるために疎水性アミノ酸と少ない分子で効率良く親水性を与える酸性アミノ酸（Ser, Asn, Gln などでは不十分、イチュリンの構造を参照）を選んだのであろうと思われる。不思議なことにこれまでに報告された、リポペプチド型バイオサーファクタントで塩基性アミノ酸を含むものはない。これは、細胞外に分泌される際に、リン脂質の負電荷との相互作用が不都合なためかも知れない。一方、電荷の反発のないイチュリンの活性が低いのは疎水性アミノ酸が少ない（1 分子存在する Tyr もかさ高く不利である）ことが原因であると思われる。すなわち、リポペプチド型バイオサーファクタントにおいてペプチド内の疎水性アミノ酸は親水基としてではなくむしろ疎水基として機能していることが予想される。高次構造形成時においていかに親水基と疎水基が分極しているのかについては非常に興味のある点であり、今後の課題であろう。

本研究により新たに分離された、アルスロファクチンはサーファクチンのさらに 5 ~ 7 倍の高い活性を有していた。これは、現在のところリポペプチド型バイオサーファクタントとしては最も強力なものである。両者の構造で異なる点は、アルスロファクチンが短いながらも直鎖状のアルキル鎖部分を有することと疎水性アミノ酸残基 Leu, Ile の多さ（合

計 6 残基)および親水性アミノ酸残基 Ser, Thr を合計 3 残基含んでいることが挙げられる。上に示した①～③の理論に従って考察すると、アルキル鎖の直鎖構造と疎水性アミノ酸の多さがアルスロファクチンの高い活性に寄与していると推定される。後者の点については、同じ脂肪酸構造を持つセラウェッチンのアミノ酸組成と比較することによっても明らかである。今回、ラクトン環を開いたサーファクチンおよびアルスロファクチンの活性をもとのものと比較することにより、その環状構造が界面活性剤としての高い活性発現に重要であることが明らかとなった。バイオサーファクタントの構造、特に環状構造の果たす役割の多様性が予想される。 活性に及ぼす pH の影響に関しては、イオンの効果で説明できる。すなわち、野生型のサーファクチン、アルスロファクチンの場合はアルカリ性領域において Na^+ がカルボキシル基に対イオンとして働き電荷の反発を低減させた結果活性が上昇したと考えられる。これに対してアミド化およびメチル化したサーファクチンは荷電を失ったまたは減少したために pH に対して感受性が低くなっている。1M-SF がアルカリ性領域でもわずかに活性が上昇するのはカルボキシル基が 1 つ残っているためである。酸性領域においていずれも活性が 1 割程度上昇しているのはイオン（H^+）が大量に存在するため、ＢＳの疎水性相互作用が強化されてミセル形成を促進するためであろう。一方、サーファクチンが酸性領域でほとんど活性を失ってしまうのは沈殿を生じやすいためである。

リポペプチド型ＢＳを構成するアミノ酸の光学異性（D 体、L 体）の機能上での意義についても興味が持たれる点である。生物的な意義として、ＢＳ生産菌自身あるいは共存する細菌が細胞外に分泌するプロテアーゼによる分解を受けないように D 体を使ったものが選別されたとも考えられるが、D 体 と L 体 では側鎖の方向がペプチド平面に対して全く反対になることから機能(活性)の点においても必然性があるのかも知れない。以上の点については溶液状態での高次構造および会合状態が明らかになれば証明されるに違いない。

第5節　要約

1．界面活性剤の活性測定法として、極微量な試料の活性を評価できる油膜排除活性測定法を提案し、その定量性と従来法(CMC値)との相関性を示した。

2．1章で得られた新規バイオサーファクタント、アルスロファクチンの活性を調べたところ従来最も活性の高かったサーファクチンのさらに 5 ~ 7 倍（CMC）あるいは 2 倍（油膜排除活性）の活性を有していることが分かった。

3．活性が高く代表的なリポペプチド型バイオサーファクタントであるサーファクチンを対象として化学修飾を行うことにより構造類似体を作製し、構造－活性相関について調べた。環状構造はサーファクチン、アルスロファクチンいずれにとっても高い活性維持のために必須であった。サーファクチンを構成するペプチドに含まれる酸性アミノ酸由来の負荷電を消去（アミド化、メチル化）することにより油膜排除活性は 2 割程度上昇したが、水溶性が低下したため表面張力は測定できなかった。すなわち、サーファクチンが水溶性を保ちながら高い界面活性を発現するために 2 残基の酸性アミノ酸残基は重要であった。

第3章　バイオサーファクタント生産に関する遺伝子のクローニングおよびその解析

第1節　緒言

バイオサーファクタントが生物由来の界面活性剤であり、合成界面活性剤と同等の活性を持つにも拘わらず、これまで実用化されなかった最大の理由は生産性コストが桁違いに大きいことであろう。生産性を向上させる手段としてはランダムな突然変異処理により高生産株を取得する方法が最も簡便で現実的であるが、それ以外にも、生合成経路を理解した上でその律速段階を遺伝子組換え技術により解除することが考えられる。従来、生合成経路を解明する方法は蓄積された前駆体の構造決定を中心とした生化学的手法が使われていたが、１９７０年代に入って遺伝子操作技術が一般化してからは、非生産性突然変異株（ブロックミュータント）の表現型を相補する遺伝子をクローニングする方法が主流となってきている(73)。この方法は簡便であり、かつその経路を増強する場合においても非常に強力な手段となり得る。しかしながら、この方法の前提となるのは生産菌の宿主－ベクター系の構築である。幸い、我々が分離したサーファクチン生産菌 A-1 株、および B-1 株は Bacillus属細菌であった。当研究室においては、Bacillus属細菌の遺伝子組換えに関する研究の歴史は長く、有効なクローニングベクターも多数構築している(74,75)。B. subtilis に関するサーファクチン生産遺伝子のいくつかは既にクローニングされていたので(76,77,78)、まず B. pumilus A-1 株について解析するため、その形質転換系を確立した。さらに、A-1 株由来サーファクチン非生産性突然変異株を取得した後、ショットガンクローニングにより相補遺伝子をクローン化することを試みた。また、Arthrobacter属細菌の宿主－ベクター系についてはいまだ報告がなかったので、Arthrobacter sp. MIS38 株についても、本章においてその形質転換系の構築ならびに最適条件の検討を行った。

第２節　実験材料および方法

菌株

B. pumilus A-1 （サーファクチン生産性；ＳＦ$^{+}$(79))

B. subtilis B-1 (ＳＦ$^{+}$(79))

B. pumilus N11, N12, N41, N42, N43, N44 (A-1株由来サーファクチン非生産性突然変異株；ＳＦ (79))

B. subtilis MI113 (arg-15 trpC2 hsrM hsmM, ＳＦ)

Arthrobacter sp. MIS38 (アルスロファクチン生産性；ＡＦ$^{+}$)

Brevibacterium lactofermentum R31 (Aec^{r}, Mly^{r})(80)

Escherichia coli JM109 (recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi hsdR17 Δ(lac-proAB)/ F'[traD36 proAB^{+} lacI^{q}, lacZΔM15](81)

Aec, S-aminoethylcysteine; Mly, methyllysine

プラスミド

pC194 (Cm^{r})(82)

pTB522 (Tc^{r})(83)

pUB110 (Km^{r})(84)

pULRS8 (Cm^{r}, Km^{r})(85)

pUC18 (Amp^{r})(86)

Cm, chloramphenicol; Tc, tetracycline

; Km, kanamycin, Amp, ampicillin

プラスミドＤＮＡの抽出（アルカリ抽出法)(86)

[少量調製]

薬剤を含む 5 ml Ｌ培地で培養した培養液をエッペンドルチューブにて集菌し（10,000 rpm, 1 min）、菌体を 100 μl の Soln. I に懸濁後放置した（E. coli の場合には室温

で 5 min、Bacillus属、Arthrobacter属、Brevibacterium属細菌の場合には 37℃ で 30 min)。200 μl の Soln. Ⅱ を加えて室温で 5 分間静置した後、さらに 150 μl の Soln. Ⅲ を添加して氷中に 5 分間静置した。遠心分離 (14,500 rpm, 5 min) 後、上澄液を別のエッペンドルフチューブに移し、400 μl のフェノール/クロロホルム (1:1) 溶液を加えて混合した。遠心 (12,000 rpm, 2 min) 後、水層を別のエッペンドルフチューブに移し 800 μl の 100% エタノールを加えて遠心分離 (14,500 rpm, 5 min) し、沈殿を 70% エタノールでリンスして減圧乾燥した。

[大量調製]

薬剤を含む 100 ml L培地培養液を SS34 遠心管で遠心 (8,000 rpm, 5 min, 4℃) 集菌して 5 ml Soln. Ⅰ に懸濁後、静置した (E. coli の場合には室温 5 min, Bacillus属、Arthrobacter属, Brevibacterium属細菌の場合には 37℃ 30 min) 。10 ml の Soln. Ⅱ を加えて室温で 5 分間静置した後、7.5 ml の Soln. Ⅲを加えて氷中に 5 分間静置した。遠心分離 (15,000 rpm, 20 min) 後、上澄液を別の SS34 遠心管に移し、12 ml のイソプロパノールを加え 15 分間室温で静置した。遠心分離 (12,000 rpm, 30 min, 20℃) 後、70% エタノールでリンスし減圧乾燥した。6 ml の 50/50TE緩衝液 (50 mM Tris-Cl, 50 mM EDTA, pH 8.0) に溶解し、塩化セシウム－臭化エチヂウム平衡密度勾配超遠心分離により精製した。イソアミルアルコール(あるいは水飽和 1-ブタノール)抽出により臭化エチヂウムを除去した後、透析により最終的にTE緩衝溶液 (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0)とした。

各溶液の組成

Soln. Ⅰ (for E. coli)

Glucose	50 mM
Tris-Cl	10 mM
EDTA	10 mM
	pH 8.0

Soln. Ⅰ (for other bacteria)

Sucrose	10.3 %
Tris-Cl	25 mM
EDTA	10 mM
Lysozyme	5 mg/ml
	pH 8.0

Soln. Ⅱ	
NaOH	0.2 N
SDS	1 %

Soln. Ⅲ	
K-acetate	3 M
	pH 4.8

大腸菌からのプラスミド大量調製の場合、必要に応じて QIAGEN plasmid kit（フナコシ製)も使用した。方法は、添付のプロトコールに従った。

染色体ＤＮＡの調製

100 ml の培養液を遠心集菌後、ＴＥ緩衝液で洗浄し、再び集菌した。50/50ＴＥ緩衝液に 15 % sucrose, 5 mg/ml の lysozyme を溶解したもの 3 ml にこの菌体を懸濁し、37℃ 30 分間静置した。これに、1 % N-lauroylsarcosine sodium salt 50/50ＴＥ溶液 3 ml を加え、塩化セシウム－臭化エチヂウム平衡密度勾配超遠心分離により精製した。イソアミルアルコール抽出により臭化エチヂウムを除去した後、透析により最終的にＴＥ緩衝溶液（10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0)とした。

ＤＮＡの各種酵素処理

DNA の制限酵素、bacterial alkaline phosphatase、T4 DNA ligase による処理はそれぞれ添付のプロトコールに従って行った。 末端平滑化は TAKARA blunting kit を用いて行った。

ＤＮＡの電気泳動(86)

アガロースゲル電気泳動

おもに 300 bp 以上の長さの DNA を検出あるいは分離回収する場合に 1% アガロースゲル（Agarose 1600, Wako製）を用いた。DNA 溶液に BPB Soln.（100 mM, EDTA; 60 g, sucrose; 10 mg, bromophenol blue/ 100 ml)を 1/5 量加えたものをサンプルとした。泳動用緩衝液として TAE buffer（40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA）、電気泳動装置として、Mupid 2(コスモバイオ製）を用いた。泳動後ゲルを臭化エチヂウム溶液に浸してＤＮＡを染色し紫外線を照射して観察した。

臭化エチヂウム溶液(/l)

Ethidium Bromide	100 mg
Dimethyl Sulfoxide	0.5 ml
MilliQ water	9.5 ml

working conc.; 50 μl/ml

アガロースゲルからの DNA 断片回収

GENECLEAN Ⅱ kit (BIO-101 Inc.製) を用い、そのプロトコールに従って行った。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(86)

おもに 300 bp 以下の長さの DNA を検出あるいは分離回収する場合に 8% アクリルアミドゲル (第一化学製) を用いた。泳動用緩衝液として TBE buffer (90 mM Tris-borate, 20 mM EDTA) 、電気泳動装置として、日本エイドー製のものを用いた。その他の操作はアガロースゲル電気泳動の場合と同じである。

ポリアクリルアミドゲルからの DNA 断片回収

マックスイールド-NP核酸蛋白回収器 (アトー製) を用い、そのプロトコールに従って行った。

形質転換

[E. coli の形質転換]

Lederberg と Cohen の方法に従った(88)。L培地で対数増殖中期まで培養した培養液 40 ml を遠心集菌し、20 ml の 50 mM $CaCl_2$ 溶液に懸濁後、0℃ 30 分間静置した。これを再度集菌し、4 ml の 50 mM $CaCl_2$, 15% glycerol 溶液に懸濁してこれを competent cell とした。Competent cell 懸濁液 200 μl と DNA を混合して 0℃ 30 分間静置後、42℃ 90 秒間の熱ショックを与えた。これに 1 ml L培地を加えて 37℃ で 1 時間培養後、薬剤を含む選択培地に広げ 37℃ で一晩培養後形質転換体を得た。

[B. subtilis MI113 の形質転換]

Anagnostopoulos と Spizizen の方法(89)に従って、competent cell を調製した。5 ml のL培地で 37℃ 一晩培養した培養液 1 ml を TFI培地 (14 g, K_2HPO_4; 6 g, KH_2PO_4; 2g, $(NH_4)_2SO_4$; 1 g, sodium citrate; 5 g, glucose; 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 50 mg L-arginine; 50 mg, L-tryptophan; 200 mg, casamino acids /l) 20 ml に植菌し、37℃ で培養した。対数増殖期をはずれてから 1 時間後 (通常植菌後、3.5 - 4 時間後) に、その 4 ml を TF II 培地 (14 g, K_2HPO_4; 6 g, KH_2PO_4; 2 g, $(NH_4)_2SO_4$; 1 g, sodium citrate; 5 g, glucose; 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 mg, L-arginine; 5 mg, L-tryptophan; 0.1 g, casamino acids /l) 36 ml に植菌し、1.5 時間培養することにより competent cell を得た。Competent cell 懸濁液 1 ml と DNA (約 1 μg)を混合し、30 分間培養した後、5,000×g, 5 分間遠心集菌した。これに 3 ml のL培地を加え、37℃ で 2 時間さらに培養した。この培養液を薬剤を含む選択培地に塗布して 37℃ 一晩培養することにより形質転換体を得た。

[B. pumilus A-1 の形質転換 (エレクトロポレーション法)(90,91)]

5 ml L培地で 37℃ 一晩培養し、L培地 100 ml/ 500 ml マイヤーフラスコに 1% 植菌後、OD_{600} が 1.0 (OD_{660} = 0.6) になるまで (37℃ 約 3 時間)培養した。遠心集菌 (10,000×g, 5 min, 4℃) 後、1 mM HEPES buffer (pH 7.0) で 2 回洗浄した後、PM溶液 (10% PEG 6,000, 0.1 M mannitol) で 1 回洗浄した。細胞を 10^{10} cells/ml 程度に懸濁した後、DNA 溶液 (~10 μl 程度) および細胞懸濁液と等量 (0.5 ml) の 40% PEG 6,000 溶液を添加した。この細胞－DNA 懸濁液を氷中で 5 分間静置した後、電極間距離 2 mm のキュベットに気泡を作らないように注意しながら移して方形波の電気パルス (通常、14 kV/cm, 1 msec) を 1 回与えた。2 ml L培地に懸濁し、37℃ で 3 時間振とう培養後、選択培地に広げて形質転換体を得た。方形波電気パルス発生装置は ＳＳＨ－１０ (島津製作所製) を用いた。

[Arthrobacter sp. MIS38 の形質転換 (エレクトロポレーション法)(92)]

5 ml L培地で 30℃一晩培養し、L培地 100 ml/ 500 ml マイヤーフラスコに 1% 植菌

して対数増殖中期（OD_{660} が 0.6 程度、通常 30℃ 3 時間）まで培養した。培養液を遠心集菌（10,000×g, 5 min, 4℃）後、菌体 20 ml の 1 mM HEPES buffer（pH 7.0）で 1 回、20 ml の 10% glycerol 溶液で 2 回洗浄後、0.5 ml の同溶液に懸濁した。細胞懸濁液 50 μl と DNA（特に断らない限り 0.1 μg）をエッペンドルフチューブ内で接触させ、氷上で 5 分間静置した。全量をキュベットに気泡を作らないように移して、方形波の電気パルスを 1 回与えた。2 ml L培地に懸濁し、30℃ で 1.5 時間振とう培養後、選択培地に広げて形質転換体を得た。形質転換頻度は Km 耐性株数の 全生菌数に対する割合で計算した。形質転換効率は 1 μg DNA 当たりで得られた Km 耐性株数とした。

ＢＳ非生産株の取得（化学突然変異剤処理）

5 ml L培地で一晩培養し、L培地 5 ml/ 100 ml マイヤーフラスコに 2% 植菌して、OD_{660} が 0.5 および 1.0 になるまで培養した。NTG（N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine）溶液を加えて（終濃度 100 μg/ ml）更に 30 分間培養を続けた。L培地で洗浄後、Lオイルプレートに広げて、ハローを形成しない株を収集した。

塩基配列の決定

一本鎖 DNA を 調製した後、Sanger らの方法（dideoxy-chain termination 法,(93)）により、修飾 T4 DNA ポリメラーゼ（Sequenase™, United States Biochemical Corp. 製）を用いて行った。塩基配列は両方の鎖について一部が重複する部分配列を逐次決定した後、それらを連結して全塩基配列を決定した。決定された塩基配列は ＤＮＡＳＩＳ™ プログラム（日立ソフトウェア製)により解析した。

細胞質および細胞膜蛋白質の調製

細胞質画分はプロトプラスト化およびその浸透圧ショックによる膜破砕により行った(94)。すなわち、37℃ 一晩培養した培養液 20 ml を遠心分離（10000×g, 5 min, 4℃）により菌体を回収した。2 ml SMM buffer + 2 ml 2L培地に懸濁した後、リゾチーム（2 mg /ml）を加えて 37℃ で 一時間静置しプロトプラストを得た。プロトプラストは顕微鏡観察により確認した。遠心分離（4000×g, 10 min, 4℃; HB-4 スイングローター）により細

胞を回収後、2 ml SMM buffer + 2 ml 2L培地で洗浄した。氷中で、2 ml 2 mM EDTA/ 0.1 M K-PO_4 buffer (pH 7.0) に懸濁することでプロトプラストは破壊された。

SMM buffer	
Sucrose	0.5 M
Maleate	0.02 M
*$MgCl_2$	0.02 M
pH 6.5 with 1 N NaOH	

2L培地 (/l)	
Bactotryptone	20 g
Yeast extract	10 g
NaCl	5 g
pH 7.2 with 1N NaOH	

*$MgCl_2$ は別殺菌

細胞膜画分は以下のように調製した(95)。上と同様の条件で回収した菌体を A buffer に懸濁して遠心分離による洗浄を行った。菌体を再び A buffer に懸濁し、リゾチームを 1 mg/ml になるように加えて、37℃ 1時間放置した。遠心分離 (20000×g, 30 min, 4℃) 後、B buffer に懸濁して氷中で 1時間静置した。同条件で遠心分離を行った後、蒸留水で 3 回洗浄した後これを細胞膜画分とした。

A buffer	
Tris-Cl	10 mM
Magnesium acetate	10 mM
KCl	100 mM
Sucrose	20 %
PMSF	0.3 mM
pH 7.0 with 1N HCl	

B buffer	
Tris-Cl	50 mM
$MgCl_2$	10 mM
PMSF	0.3 mM
RNaseA	10 μg/ml
DNaseI	10 μg/ml
pH 7.2 with 1N HCl	

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

蛋白質の SDS-PAGE は Laemmli の方法(96)に準じて行った。電気泳動後、ゲルは銀染色キット(Wako製)により染色を行った。

サザンハイブリダイゼーション分析(非RI法)

①ゲルからメンブレンへの DNA の転写

DNA を泳動したアガロースゲルをアルカリ変成溶液に少なくとも 30 分間浸した後、ゲルを蒸留水ですすぎ、中和溶液に交換する。この洗浄操作を 2 回繰り返し、最後に蒸留水で濯いだ。ブロッティング装置は、Bio-Rad 社製のエレクトロブロティング装置を用い、そのプロトコールに従った。メンブレンは Amersham 社製の Hybond N^+ を用いた。ブロッティング終了後、0.4 M NaOH を染み込ませた 2 ~ 3 枚の濾紙の上にブロティング面を上にしてメンブレンを乗せ、20 分間以上静置しアルカリ固定した。5 × SSC で洗浄後、ハイブリダイゼーションを行った。

②ハイブリダイゼーション

DNA を固定したメンブレンをハイブリダイゼーション溶液に浸して、65℃ で 1 時間プレハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーション溶液にあらかじめ標識したプローブ DNA を加え、65℃ で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

③ジゴキシゲニン標識プローブの作製およびシグナルの検出

DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim 社製)を用い、そのプロトコールに従った。

第3節　結果

3.3.1. 形質転換系の確立

[B. pumilus A-1] Spizizen らの方法により competent cell の調製ならびに、B. subtilis用の低コピー数ベクター pTB522(Tc^r), 中コピー数ベクター pC194(Cm^r), 高コピー数ベクター pUB110(Km^r)を使ってそれぞれの薬剤の最少生育阻止濃度 (MIC) を決定した後、形質転換を試みたが薬剤耐性株は取得できなかった。 そこで、エレクトロポレーション法により形質転換を行うことにした。方法は、第2節で述べた通りであるが本条件において 1×10^3 transformants/μg DNA 程度の頻度で薬剤耐性株が取得された。DNA の少量調製法によりプラスミドの存在も確認された。ただし、pTB522 を使った場合には

形質転換体は得られなかった。

［ B. subtilis B-1 ］Spizizen らの方法および エレクトロポレーション法のいずれにおいても形質転換株は得られなかった。

［ Arthrobacter sp. MIS38 ］工業的なリジン生産菌である Brevibacterium lactofermentum から分離された プラスミド pBL1 を基本として構築されたシャトルベクター（E. coli-Brevibacterium 間）pULRS8 が Corynebacterium glutamicum においても複製可能であるということが L. K. Dunican と E. Shivnan により報告されていた(97)。Arthrobacter属は Brevibacterium属、Corynebacterium属と同じ、コリネ型細菌に分類され系統樹的にも近縁であったことから、この pULRS8（図３－１,(85)）を利用することにした。 MIS38 のカナマイシンに関する MIC は 15 μg/ml であったため、形質転換体の選択は Km 20 μg/ml で行うことにした。プラスミドの移入はエレクトロポレーション法により行った。 電気パルスの最適条件検討の結果を（図３－２）に示した。 この結果、電界強度 10 kV/cm, 1 ミリ秒間の方形波を与えた場合が最も形質転換頻度が高く、2.5 × 10^4（Km' cells/ total viable cells）であった。 この条件下において、形質転換効率について調べたところ、0.01 μg DNA を用いた場合に 3 × 10^5（Km' cells/ μg DNA）であった（図３－３)。取得された Km 耐性株からアルカリ抽出により DNA を回収した後、アガロースゲル電気泳動および臭化エチヂウム染色を行ったがプラスミドバンドを検出することができなかった。そこで、ジゴキシゲニンでラベルした pULRS8 をプローブとし、サザンハイブリダイゼーション法によりプラスミドの確認を行った。その結果、すべての Km 耐性株で正常な位置（5.8 kb）にバンドが確認され、エレクトロポレーション法により Arthrobacter sp. MIS38 に pULRS8 が効率良く移入されて染色体に組み込まれることなく複製していることが確認された（図３－４)。また、E. coli 用ベクター pBR322 や Bacillus 属細菌用ベクター pC194 あるいは pUB110 による形質転換は不可能であった。

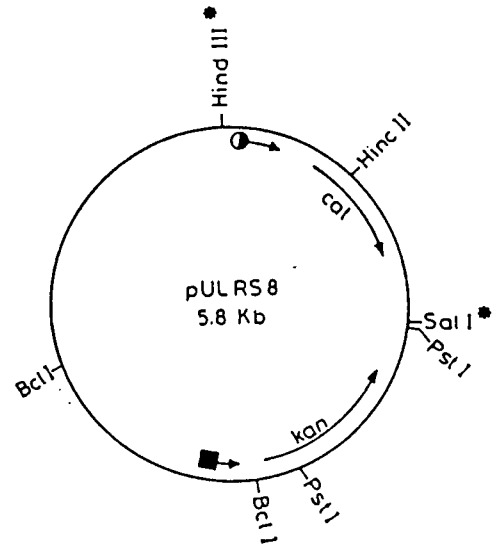


図３－１．pULRS8 の制限酵素地図（58）.
クローニング部位として利用できる制限酵素の位置を＊で示した。
○→、■→はそれぞれ tet プロモーターおよび P1 プロモーター。
cat, chloramphenicol acetyltransferase gene, (Cm 耐性遺伝子)。
kan, kanamycin nucleotidyltransferase gene, (Km 耐性遺伝子)。

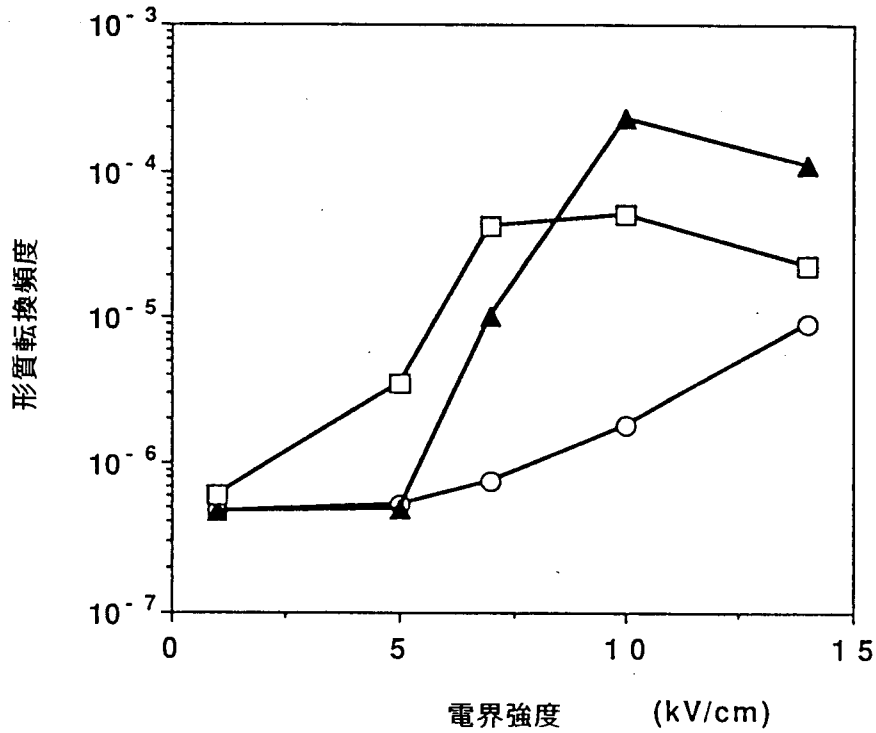


図３－２．電界強度および付加時間が形質転換頻度に及ぼす影響.
付加時間はそれぞれ、○, 0.1 msec; ▲, 0.5 msec; □, 1.0 msec。

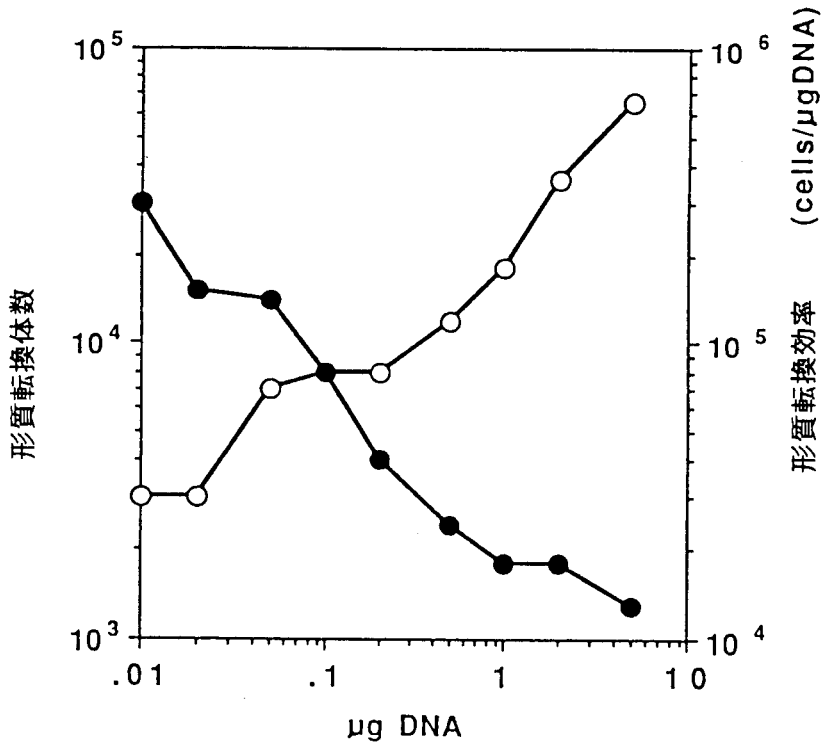


図３－３．DNA 濃度が形質転換体総数（○）および形質転換頻度（●）に及ぼす影響.

電気パルス条件は、10 kV/cm　0.5 msec で行った。

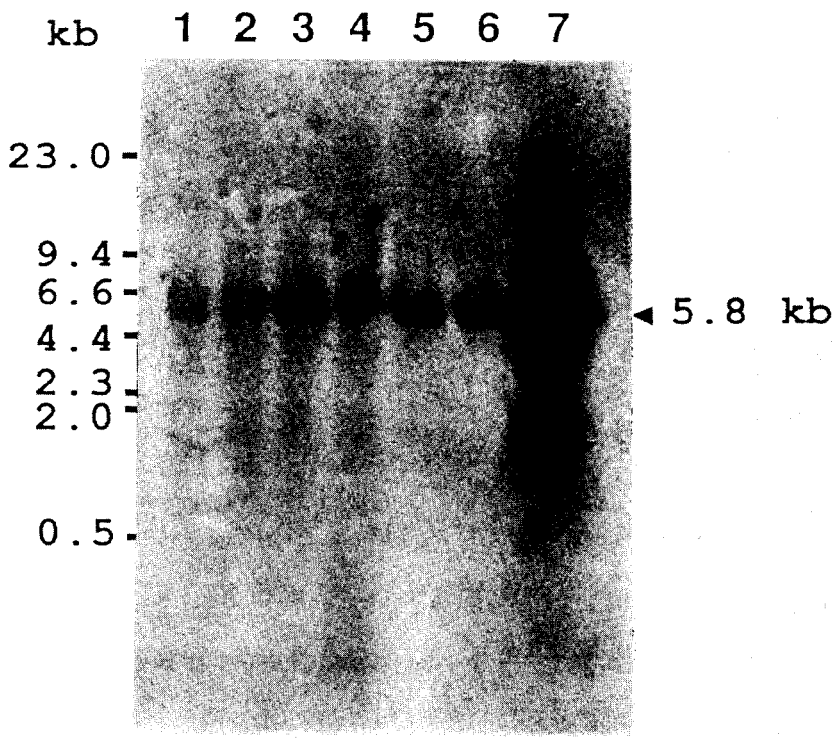


図３－４．形質転換体（Km^{r}株）保持プラスミドのサザンハイブリダイゼーション解析.

ラベルされた pULRS8 をプローブとして用いた。レーン 1 ~ 6 までが、Km^r 株から調製した試料、レーン 7 は pULRS8（ポジティブコントロール）。いずれも HindⅢ で処理したものを 1 % アガロースゲルで分離した。

3.3.2. ショットガン法によるサーファクチン生産に関する遺伝子のクローニング

A-1 株がサーファクチン（SF）の新規生産株であり、かつ形質転換可能であったことから、A-1 株についてＳＦ生産に関する遺伝子の取得を目的とした。まず、ＮＴＧ処理により、A-1 株由来ＳＦ非生産性突然変異株（SF ）を多数取得した。このうち、生育の良かった 6 株（N11, N12, N41, N42, N43, N44）を選びクローニングの宿主とした。ランダムなＡ－１株染色体遺伝子断片（HindⅢ 消化物）とクローニングベクター pC194 との連結物をエレクトロポレーション法により上記 6 株（SF ）に移入したところ、Cm 含有Ｌ-オイルプレート上でハロー形成能を回復したもの（Cm^r/SF^+）が４株（P11, P42, P43, P44）取得された。なおここで示す番号は宿主菌の番号に対応して得られた形質転換株である。それぞれの保持する組換えプラスミドのうち（pNP11, pNP42, pNP43）により、相互形質転換を行ったところ、pNP11 と pNP42 は同じ機能領域を含むことが判明した（表３－１）。

表３－１．取得された組換えプラスミドの相互形質転換

宿主	プラスミド		
	pNP11	pNP42	pNP43
N11	5/5	5/5	0/5
N42	5/5	5/5	0/5
N43	0/5	0/5	5/5
MI113	0/5	0/5	5/5

N11, N42, N43 ; B. pumilus A-1 由来 SF^- 株
MI113; B. subtilis MI113 (SF^-)
数値はコロニー数（SF^+/Cm^r）で表示した。

また、ＳＦ非生産株である B. subtilis MI113 も pNP43 によりＳＦ生産性に形質転換された（図３－５）。これは、ＳＦ生産において、B. subtilis と B. pumilus の間で共通する機構が存在し、その一部を担うタンパク質をコードする遺伝子領域が pNP43 挿入断片内に含まれていると予想された。

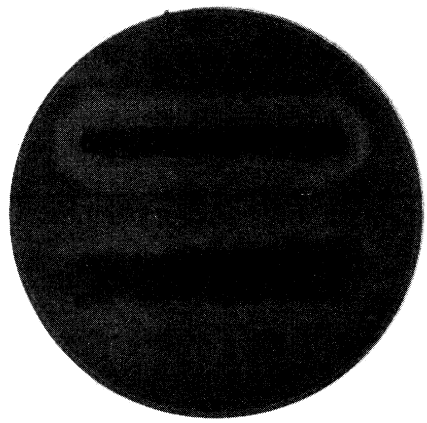


図３－５．B. subtilis MI113 (pC194) および B. subtilis MI113 (pNP43) のＳＦ生産性比較．　Ｌ－オイルプレート (Cm 15 μg/ml)。

3.3.3. サーファクチン生産遺伝子 psf-1 の塩基配列決定

pNP43 には 6 kb の DNA断片が挿入されていた。 B. subtilis MI113 (SF) を宿主としたサブクローニングにより機能領域を限定を目指して 6 kb 断片の小型化したところ、HindⅢ 2 kb 断片が MI113 株にＳＦ生産性を付与できることが判明した。この 断片は pC194 に再クローン化することにより N43 株をもＳＦ生産性に復帰させることができた。

2 kb 断片の制限酵素地図を（図３－６）、全塩基配列を（図３－７）にそれぞれ示した。塩基配列から、３つの大きな遺伝子読み取り枠 (ORF1~3) が確認された（図３－６）。次に、B. subtilis MI113 (SF) を宿主として各断片の活性をＳＦ生産性で評価した。ORF1内に存在する NspV 部位にフレームシフト変異を起こした際には MI113 株をＳＦ生産性にしたが、ORF 2, 3 内の Eco47Ⅲ 部位にフレームシフト変異を導入した場合にＳＦ生産能力が失われた。さらに SspI-HindⅢ断片だけをサブクローニングした場合においても

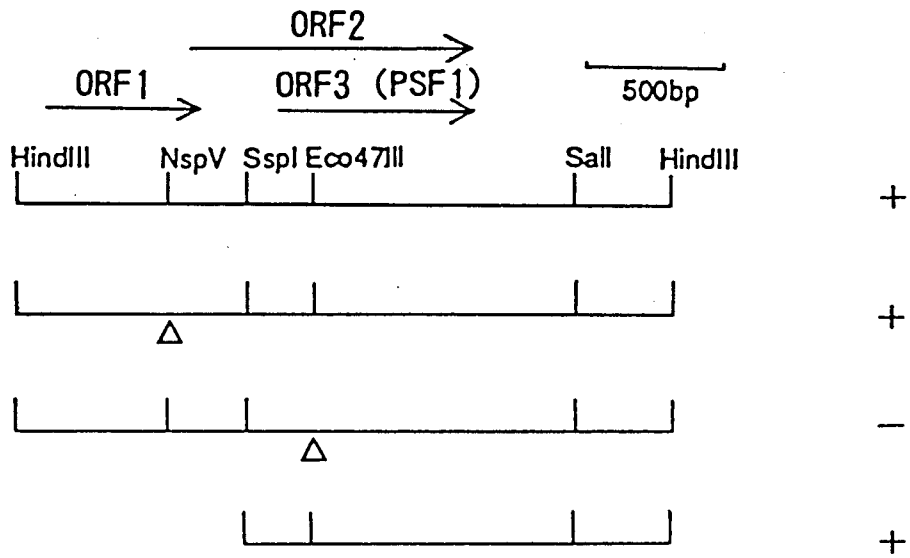


図３－６．HindⅢ 2 kb 断片の制限酵素地図.
可能性のある ORF 1 ~ 3 および各遺伝子断片のＳＦ生産性を示した。
＋，ＳＦ生産性；－，ＳＦ非生産性。△は Klenow ポリメラーゼ処理
あるいはリンカー挿入によるフレームシフト変異を示す。

MI113 株をＳＦ生産性にした。SspI部位の直上流には 3 ケ所の ATG コドンと 1 つの GTG コドンがインフレームで存在した。典型的なプロモーター配列は見いだされなかったが、785番目にリボソーム結合配列 GAGG が存在したことから ORF 3（795 番目の ATG から 1493 番目の GTG まで 223 アミノ酸、分子量 26,509）がＳＦ生産に関する遺伝子産物（PSF-1）をコードしていると予想された。NBF-PIR データベースで検索したところ、B. brevis が生産する環状ペプチド グラミシジン S 合成遺伝子群の上流に存在する ORFX および B. subtilis よりクローン化されたサーファクチン生産制御遺伝子産物 SFP とそれぞれ 33%、45% の相同性が認められ、これらが同種の機能タンパク質であると予想された。しかしながらその機能については現在のところいずれも解明されていない。

```
   1   AA GCT TTT GAA GCG GGA ACA TCT TTT ACG TTG GTT TTT TTA TTT TGT TGG ATT GAT TGT
  60   ACT TGC TTT TGG ACT TTC GCT GAC AGT GAA AGG AAA GAT CCT TGG CAT TGG TCC TTG GGA
 120   CGC TTT TCA TTA TGG ACT GTT TCA GCA TTT TGG TTT AAC TAT TGG ACA ATG GTC CAT CAT
 180   TAT TGG TGC ACT CAT TGT GAC ACT GAC ATC TGT TTT CAC GAA ATC TTT TCC AAA GAT TGG
 240   CGC ATT ACT GAA CAT GGT GCT GAT TGG TAT GTT TAT AGA TTT CTT TAA TGC GGT ATT GCC
 300   TGC ACC ACA TGG GTA TTT ACC CGC TTT ATA TGT GTT TAT TAC GGG CGT TGT GGT TTC AGG
 360   GTA TGG CGT TGG CAT TTA TGT CTC AGC TAA TCT TGG CGC TGG GCC AAG GGA TTC ATT AAT
 420   GCT GCT CAT CTC AGC AAA AAC GGG GCT GAA CGT ACA GTG GGT TCG AAA TGG TAT TGA GTT
 480   AAC CGT GCT TCT ATT TGC ATG GAT GCT CGG CGG ACC GAT TGG CAT TGG AAC GAT TCT GAC
 540   CGC CAT CTT TAC AGG ACT CGT CCT TCG CTT CTC ATT GCC ACA ATC GAC ACG GCT CTT GCA
 600   GCT GCT CAT TAC AAA AAC AGC GGA GAA ACC TGT TCA AAC CCT TAC CCG ATA AGA ACA AGC
 660   CAT TCT ATG AAA AGA ATG GCT TTT CTT GTG CAA CAT TCA CGA ATA TTT CAG ACC AAC TTT
                                   -35                          -10
 720   ATG CTT CTA TTG AAA AGG ATG CTT CGC AAG GTG TTC ATC CAA TGG TAC AAT AAA TGT AAA
 780   AAA TTG AGG TCC GTT ATG AAG ATT TTC GCT ATT CAA TTA CAA CCT TTA GAT GAT AAA AAT
   1          SD              M   K   I   F   A   I   Q   L   Q   P   L   D   D   K   N
 840   GCA CGA AAA CAA ATA GAA CAG CTG AAG CCT TTT GTG TCA TTT GAA AAA CGC GCC GCC GCT
  16    A   R   K   Q   I   E   Q   L   K   P   F   V   S   F   E   K   R   A   A   A
 900   GAG CGC TTT CGT TTT TTG ATC GAT GCA AGA AGA ACG CTG TTA GGT GAG GTA CTG ATT CGT
  36    E   R   F   R   F   L   I   D   A   R   R   T   L   L   G   E   V   L   I   R
 960   CAC ATC ATT CAT GAG ATG TAC GCA CTG CCA ATG GAA CAG ATC ATT TTT GAA ACA GAA GGG
  56    H   I   I   H   E   M   Y   A   L   P   M   E   Q   I   I   F   E   T   E   G
1020   AAC GGA AAG CCT GTT GTC CGG CAA ATT CCT TCT TTT CAT TTT AAT CTT TCT CAC TCT GGT
  76    N   G   K   P   V   V   R   Q   I   P   S   F   H   F   N   L   S   H   S   G
1080   GAT TGG GTC GTG GGC GCA GTA GAT GAT GCG CCT GTT GGT ATT GAT ATT GAA GAG ATT AAA
  96    D   W   V   V   G   A   V   D   D   A   P   V   G   I   D   I   E   E   I   K
1140   CCG ATT GAT TTA GCC ATT GCC GAG CGA TTT TTT TCA GCT GAC GAA TAT CAA GAT TTA CTC
 116    P   I   D   L   A   I   A   E   R   F   F   S   A   D   E   Y   Q   D   L   L
1200   TCA CAG CCG GCA GAA CGG CAG GAA GCC TAT TTC TTT CAT TTA TGG TCC ATG AAG GAG GCT
 136    S   Q   P   A   E   R   Q   E   A   Y   F   F   H   L   W   S   M   K   E   A
1260   TTT ATC AAG CTG ACA GGG AAG GGA ATA TCC TAT GGT CTT TCA TCC TTT ACC GCT CGC TTG
 156    F   I   K   L   T   G   K   G   I   S   Y   G   L   S   S   F   T   A   R   L
1320   TCA GAG GAT GGA CAG GCT ACT TTG AGA TTA CCT GAT CAC GAA GCC CCT TGC GTT GTC CAA
 176    S   E   D   G   Q   A   T   L   R   L   P   D   H   E   A   P   C   V   V   Q
1380   ACA TAT TCA CTT GAT CCT GCC TAC CAA ATG GCA GTT TGT ACA AGA AAA CCC GCT GCG GCT
 196    T   Y   S   L   D   P   A   Y   Q   M   A   V   C   T   R   K   P   A   A   A
1440   GAG CAC GTC GAG ATA CTC ACT TGT GAG AAC ATG CTG TCT CGC CTT AAT AAC GTG TGA TTT
 216    E   H   V   E   I   L   T   C   E   N   M   L   S   R   L   N   N   V   *
1500   GTT GAA GTG ATG ACT TTA GCA AAT CGA CGC CTC GTG CGA TTT CCT CTT CTT TTA CAT GCC
1560   AAA TGT TCA GCT GAA GTA TAG GCT CCT TTT GAT AAG TAG AAA TGA AAT GGC GGT CAA TCG
1620   GCT GAA CCA TCA CAG AAG CCT TTT TTA GCT GCT GAA TAA GCT GAT TCA TCG GAA TGG ACC
1680   GGT CGA CAC GAA CGT GGG TAT GGG TAG CTG GCT CCT CTT CTC CCA GCT CAT AAG CGC CTT
1740   GAT CAT TTT TCA AAC AGG CAC AAG TTG TTT GGA TCG AGC TCT ATA GGT CGC CTG CAT CCT
1800   TTC TCT ATG ACG CTC AAA CAT CCC GCT TTT CAA ATA TAT TTC TAA AGC AGC CTG CGA CAG
1860   CAT CGA GCT GTC GAT ATC AAT CAG CCG TTT ATG TTC ACT GAA GGG GCC AAT CAG CTC GTT
       terminator
1920   TGG TAA GAC GAC AGC ACC TGT TCT AAG CCC TGG AAA AAT GAT TTT TGA GAA GCT T
```

図３－７．HindⅢ 2 kb 断片の全塩基配列および ORF 3 (PSF-1) の推定アミノ酸配列．プロモーター様配列（-10, -35）リボソーム結合領域（SD）およびターミネーターを示した。＊は終止コドン。

3.3.4. PSF-1 蛋白質の発現ならびにその局在

PSF-1 蛋白質が実際に細胞内で発現していることを確認する目的で、プラスミド pC194-2kb を保持する B. subtilis MI113 組換え体から調製した細胞質画分および細胞膜画分を SDS-PAGE により解析した（図３－８）。

クローン株においてのみ存在する蛋白質が 25 kDa 付近に確認された。このバンドは細胞質画分および細胞膜画分の両方において存在したことから PSF-1 蛋白質はゆるく細胞膜に結合していることが予想された。

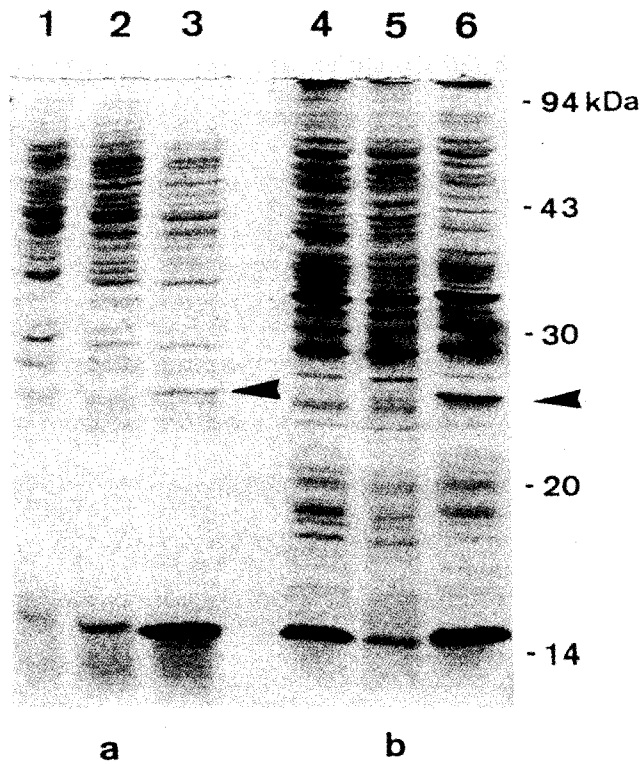
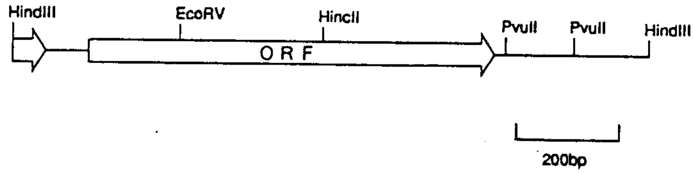


図３－８．PSF-1タンパク質発現の確認.
a, 細胞内画分; b, 細胞膜画分。レーン 1, 4 は B. subtilis MI113、レーン 2, 5 は B. subtilis MI113 (pC194)、レーン 3, 6 は B. subtilis MI113 (pC194-2kb =pNP43)。矢印で示したところに 25 kDa のタンパク質（PSF-1）が確認される。

3.3.5. サーファクチン生産制御遺伝子 comP' および comA' のクローニングと塩基配列決定

pNP11 と pNP42 の HindⅢ による切断パターンをそれぞれ調べたところ、pNP11 には 3 kb と 6 kb の 2 断片、pNP42 には 1 kb の 1 断片のみが挿入されていた。そこでサイズが小さい HindⅢ 1 kb 断片の塩基配列を決定した（図３－９）。144 番目の Met から 780 番目の Leu にわたる ORF が推定された。また、Met 上流にはプロモーター様配列（-35, TTGGCA; -10, TATATAAA）が存在し、Met 直上流にはリボソーム結合配列（SD）GGAGG も確認されたことから本遺伝子の発現が予想された。決定された塩基配列を GenBank に登録されている配列に対してホモロジー検索を行ったところ、B. subtilis 由来 comA 遺伝子(98,99)と DNA レベルで 67.7% アミノ酸配列レベルで 71.5%（図３－１０）の相同性を有することが判明した。comA 遺伝子産物である ComA タンパク質はその上流域にコードされている comP 遺伝子(100)産物 ComP と共にいわゆる、Tow-component regulatory システム(101,102)を構成しており、ComA はリン酸基を ComP から受け取って活性化される regulatory protein である。その制御支配下には、B. subtilis の DNA 取り込み能（competency）にかかわる遺伝子群がある(101)。すなわち、今回クローニングされた遺伝子は comA のホモログであると思われたため、comA' と名付けた。実際、ComA がリン酸化を受けると考えられている Asp 56 残基も保存されており、その近傍アミノ酸配列もよく保存されていた（図３－１０）。

次に、この comA' 上流に comP'（comP の相同性遺伝子）が同様に存在するかどうかを調べた。今回決定した遺伝子領域内に含まれていた ComP' C末端領域と思われる部分（図３－９）をプローブとし、サザンハイブリダイゼーション法およびコロニーハイブリダイゼーション法により comA' のさらに上流域のクローニングを行った。その結果、3.1 kb の XbaI 断片が取得された。制限酵素地図作製の後、その全塩基配列を決定したところ、368 番目の ATG から 2375 番目の TTG にわたって長い ORF が確認された(図３－１１)。



1	AA GCT TCA AAT TCA CAC AGC ACC TGA AAA AGG GCT CAA GGT GAA AAT	47
48	TGA AAT GGA ATT GTA ACG ATT TCT TAA GGA ATA AGA CTT GGC ATC TGC	95
	comP' * ter	
96	CAA GTC TTT TAT ATA AAA TGG AAG TGA GTG ATT TAA AGG GAG GAA GAC	143
144	ATG AAG AAG ATA TTG GTC ATT GAT GAT CAT CCG GCT GTC ATG GAA GGG	191
1	M K K I L V I D D H P A V M E G	16
192	ACA AAA AGC ATA TTA GAA TCA GAT CAG CAG CTA TCA GTC GAT TGT TTA	239
17	T K S I L E S D Q Q L S V D C L	32
240	AGT CCT GAT GCA GAA GGC GCC TTT TTA AAG ACG CAT GAC TTT TCC ATC	287
33	S P D A E G A F L K T H D F S I	48
288	TAT GAT GTG ATC TTG ATG GAT TTA AAT CTC GGG GAT ATC AAT GGA ATG	335
49	Y D V I L M D L N L G D I N G M	64
336	GAC ATT GCC AAA CAA ATT CTA GAA ACG AAT CAA CAA GTG AAA ATT ATC	383
65	D I A K Q I L E T N Q Q V K I I	80
384	ATT TAT ACA GGA TAT GAA GTA GAT GAT TAT TTC GAA GAG GCC ATT CGA	431
81	I Y T G Y E V D D Y F E E A I R	96
432	GCT GGA TTG CAT GGT GCA ATA AGT AAA ACA GAG ACA AAA GAC AAA ATT	479
97	A G L H G A I S K T E T K D K I	112
480	ATT GAA TAC ATA CAC CGC ACA TTG CAA GGA GAA GTT GTC ATT CAG CTA	527
113	I E Y I H R T L Q G E V V I Q L	128
528	TCC TAT TTA AAG AAA TTA ATT TCA CAG CAG CAA GAG AAG CCA GAA CAG	575
129	S Y L K K L I S Q Q Q E K P E Q	144
576	GCG CAG CAG ACG GAT CAT GAG CTG TTA ACA GAG CGT GAA TGC TTA ATC	623
145	A Q Q T D H E L L T E R E C L I	160
624	TTA AGA GAA GTG GAA AAA GGG TAC ACA AAC CAA GAG ATC GCC GAT GTG	671
161	L R E V E K G Y T N Q E I A D V	176
672	CTT CAT TTG AGC AAA CGC TCA ATT GAA TAC AGT TTG ACC TCC ATC TTT	719
177	L H L S K R S I E Y S L T S I F	192
720	AAT AAG CTG AAT GTT GGA TCT CGA ACA GAA GCG GTG TTA ATT GCA AAA	767
193	N K L N V G S R T E A V L I A K	208
768	TCG GAA AGT GTG CTG TAA ACG TGT GAA GGG AGA GGG CCT TGA TGG ATG	815
209	S E S V L *	214
816	TGA GTG GTT CAA ATA CAC TGC TTG AGG CAC TGG GGA TTG AGA TTG TGG	863
864	AAT GCA ATA AGT CAC GAT GCG TGG CGA CAA TGC CAG TCG ATC ACC GAA	911
912	CAA AAC AGC CAT TTG GAT TAC TGC ACG GAG GAG CAT CAG CTG CTC TAG	959
960	CAG AAA CAG TGG CAA GCA TGG GTG CTG CTG CTC ATT TGG ACT TAA CTC	1007
1008	AGC AGG TTT GTT CAG GTA TTG AAA TCA ATG CCA ATC ATT TAA AAT CTG	1055
1056	TAC GTG ATG GAG TGG TGA CAG CTA CAG CTG TTC CTG TAC ATG TAG GAC	1103
1104	GGC GTA CAA TGG TAT TCC AAA TCG ATA TAA AAG ATG ATC GAG ACC GTC	1151
1152	ATA TCT GTA CGT CAA GAT GTA CAC TCG CTG TCA TTG ATC GCA TAT AAA	1199
1200	AAA GCT CCC GGT GCA GCG GAA GCT T	1224
	ter	

図３－９．Hind III 1 kb 断片の制限酵素地図と全塩基配列および ORF（ComA'）の推定アミノ酸配列.

プロモーター領域（-35, TTGGCA; -10, TATATAAA）は四角で囲った。リボソーム結合領域（SD）およびターミネーター（ter）を示した。＊は終止コドン。 comA' 上流に存在する comP' C 末端部分（下線部分）および ターミネーター（ter）も示した。

相同性を比較した結果、N末端側において comP よりも約 318 b.p.（106 アミノ酸相当分）短いことが判明した。また、その部分を除いた ComP タンパク質とのアミノ酸配列レベルでの相同性は、74% であった（図３－１２）。アミノ酸の疎水度を調べた結果を図３－１３ に示した。隣り合う 19 残基の平均疎水度が 1.6 を越える部分は膜貫通領域と推定されており(100)、ComP とのアナロジーから、領域Ⅰ～Ⅷが膜を貫通するのに十分な疎水度を有すると思われた。

```
                10         20         30         40         50    ☆
ComA'  MKKILVIDDHPAVMEGTKSILESDQQLSVDCLSPDAEGAFLKTHDFSIYDVILMDLNL-G
       :::::::::::::::::::.::::.: .::::::::::.....:.: :::: ::.::::::: :
ComA   MKKILVIDDHPAVMEGTKTILETDSNLSVDCLSPEPSEQFIKQHDFSSYDLILMDLNLGG
                10         20         30         40         50         60
     60         70         80         90        100        110
       DINGMDIAKQILETNQQVKIIIYTGYEVDDYFEEAIRAGLHGAISKTETKDKIIEYIHRT
       ..::::..::::::..:.. :::.::::::.::::::::::::::::::::::.:.::..::...
       EVNGMELSKQILQENPHCKIIVYTGYEVEDYFEEAIRAGLHGAISKTESKEKITQYIYHV
                70         80         90        100        110        120
   120         130        140        150        160        170
       LQGEVVIQLSYLKKLISQQQEKPEQAQQTDHELLTERECLILREVEKGYTNQEIADVLHL
       :.::.....:.:.:..::..:... :.....:: :::::::::::::::::::::.:::
       LNGEILVDFAYFKQLMTQQKTKPAPSSQKEQDVLTPRECLILQEVEKGFTNQEIADALHL
               130        140        150        160        170        180
   180         190        200        210
       SKRSIEYSLTSIFNKLNVGSRTEAVLIAKSESVL
       :::::::::::::::::::::::::::::..::
       SKRSIEYSLTSIFNKLNVGSRTEAVLIAKSDGVL
               190        200        210
```

図３－１０．ComA' と ComA の相同性比較.

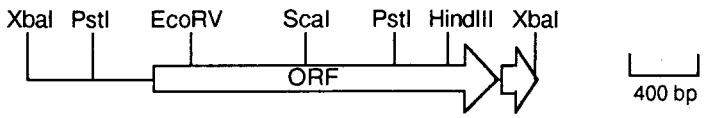
☆を付したアミノ酸残基が、リン酸化される Asp 残基。

```
1439  AAT GAT AGT AAG TTA TGG AAA GAA TAC GTG GAT CAA TTT CAA GAT ATT TTA GGT GAA GTT
 358   N   D   S   K   L   W   K   E   Y   V   D   Q   F   Q   D   I   L   G   E   V

1499  GGG AAA ATC ATC GAG CTT GAT AAA GGG TTT ATG ATG AAA ATT GGA GAG CGG GGC GGT CAC
 378   G   K   I   I   E   L   D   K   G   F   M   M   K   I   G   E   R   G   G   H

1559  TCG TTT ATG ATT TGC TGC TTA TCC AAT ATA CAG ACG CCG AAA TTG ACC CGC GAT GAA ATT
 398   S   F   M   I   C   C   L   S   N   I   Q   T   P   K   L   T   R   D   E   I

1619  TCA TGG CTG AAA ACA TTG GCA TTT TAC ACA AGT GTC AGT TTA GAA AAT GTC GTT AAG ATC
 418   S   W   L   K   T   L   A   F   Y   T   S   V   S   L   E   N   V   V   K   I

1679  GAA GAA CTG ATG GAG CAT CTT GAG GAT TTG AAA CAG CGG GAA GCC AAT CCC GCC TGG CTG
 438   E   E   L   M   E   H   L   E   D   L   K   Q   R   E   A   N   P   A   W   L

1739  AAG AAA GTC ATG TTC GCC ATG GAA GAA AAG CAG CGC TCA GAT TTA GCG AGG GAT CTT CAT
 458   K   K   V   M   F   A   M   E   E   K   Q   R   S   D   L   A   R   D   L   H

1799  GAT TCT GTG CTG CAG GAT TTG ATT TCA CTG AAG AGA CAG TCC GAG ATG TTC TTA ACC AAT
 478   D   S   V   L   Q   D   L   I   S   L   K   R   Q   S   E   M   F   L   T   N

1859  TTC CAA AAC AAC CAA TGC CCA ACA TCT ATT GAA AAT TCA TTG ATC TCA TGG AAT GAA CAA
 498   F   Q   N   N   Q   C   P   T   S   I   E   N   S   L   I   S   W   N   E   Q

1919  ATG TCT AAG GTG ATT CAA ACC ACG AGA GAA ACA TGT CAT GAA CTT CGG CCG CAG CTC CTC
 518   M   S   K   V   I   Q   T   T   R   E   T   C   H   E   L   R   P   Q   L   L

1979  TAT GAT TTG GGG TTA GTG AAG GCA ATT TCG AAG CTG ACT TCG CAA ATT CAA GAG GAA GCG
 538   Y   D   L   G   L   V   K   A   I   S   K   L   T   S   Q   I   Q   E   E   A

2039  CCA TTT CAT ATT AGG CTG AAT ACA ACC CGC TTT GAT AAA GAA CTG GAC ATT GAT ATT GAC
 558   P   F   H   I   R   L   N   T   T   R   F   D   K   E   L   D   I   D   I   D

2099  TCA CAG CTG AAT ATT TAC CGG ATT GTG CAG GAG CTG TTA TCC AAT GCG TTG AAG CAT TCT
 578   S   Q   L   N   I   Y   R   I   V   Q   E   L   L   S   N   A   L   K   H   S

2159  AAG GCC AGC CAA GTC TTA GTG ATG CTC ATT TGT ATT AAA GAT CAA GTT GTT CTC CAT TAT
 598   K   A   S   Q   V   L   V   M   L   I   C   I   K   D   Q   V   V   L   H   Y

2219  GAG GAC GAT GGA GTC GGA TTT GAT GCA AGC CAG CTT GAT CAG CAC ACG ATG AGC ATG GGT
 618   E   D   D   G   V   G   F   D   A   S   Q   L   D   Q   H   T   M   S   M   G

2279  CTT TCT GGC ATA AGG GAA CGA GTC AAA GCT CTA AAT GGA AAG CTT CAA ATT CAC ACA GCA
 638   L   S   G   I   R   E   R   V   K   A   L   N   G   K   L   Q   I   H   T   A

2339  CCT GAA AAA GGG CTC AAG GTG AAA ATT GAA ATG GAA TTG TAA CGA TTT CTT AAG GAA TAA
 658   P   E   K   G   L   K   V   K   I   E   M   E   L   *

2399  GAC TTG GCA TCT GCC AAG TCT TTT ATA TAA AAT GGA AGT GAG TGA TTT AAA GGG AGG AAG
                 terminator
2459  ACA TGA AGA AGA TAT TGG TCA TTG ATG ATC ATC CGG CTG TCA TGG AAG GGA CAA AAA GCA
                          ComA'
2519  TAT TAG AAT CAG ATC AGC AGC TAT CAG TCG ATT GTT TAA GTC CTG ATG CAG AAG GCG CCT

2579  TTT TAA AGA CGC ATG ACT TTT CCA TCT ATG ATG TGA TCT TGA TGG ATT TAA ATC TCG GGG

2639  ATA TCA ATG GAA TGG ACA TTG CCA AAC AAA TTC TAG A
```

図３－１１．XbaI - XbaI 3.1 kb の制限酵素地図と PstI - XbaI 2.7 kb 部分の塩基配列 および推定される ComP' アミノ酸配列.

リボソーム結合領域（SD）およびターミネーターを示した。＊は終止コドン。

下流に存在する ComA' の位置も矢印で示した。




```
   1    C TGC AGA TTA TAT ATG GTA CTA TAA ATG ATA CTT GAT TTA AAA GTT CTC CAG TTA AGG

  59  ATG TTT TAT ACA TGA AGA TAA CTT ATA CGA AAC TAT CTG CTT TTT TTG TTT TTC TGT CTT

 119  TTT TAT TTG TGA TCT ATG TTT CAT ATA TTT ATG TAT TTG ATA TTT TTA ATG GAG CAC GTG

 179  TTG AGG AGA ACA AGA ATG GTC AAG CAG AAG TTG TCA AAG TCG AAT ATC TTT CTT TAG CCT

 239  ACA CAT CAG GAT TAG AAG AAG GAG ATA TTA TAC TTA AAA TCA ATG GAG AAT CTG CTA ACA

 299  ACA AAG ATC ATT TGA TCA ATG GTG AGC TTA GGA ATG TGC AAA GAA TTG AAT ATT CAA AGA

 359  GGC AAC CAA ATG ATC ACC CTA AAA AAT AAG ACA TTG ATT GGT CAA GAA AGT TTA TTT GTC
   1  SD          M   I   T   L   K   N   K   T   L   I   G   Q   E   S   L   F   V

 419  TAT ATA ATT CCT CTC CTG TAT TCA ATA TGT TTA TTT TGT ATC TTC TTT ATC ATT CGT ATT
  18   Y   I   I   P   L   L   Y   S   I   C   L   F   C   I   F   F   I   I   R   I

 479  AAC AAA GAG ATC CAA CGA AAA TCA GCA TTT CTT TTA GTT TTA TTT TTA TTA ACG ATT TGT
  38   N   K   E   I   Q   R   K   S   A   F   L   L   V   L   F   L   L   T   I   C

 539  ATC GGA TAT CTT AGT GCA GGT ACT TCG GGT ATT GGT GAT AGA TTT AGC CAT TAT GTC ATC
  58   I   G   Y   L   S   A   G   T   S   G   I   G   D   R   F   S   H   Y   V   I

 599  ACA TTT TGT TTA TCA AGT GTA TTT ATC TTT TAT ATT CAT TTC ATT TAT CAA TAT TTC AAA
  78   T   F   C   L   S   S   V   F   I   F   Y   I   H   F   I   Y   Q   Y   F   K

 659  GAG TTT GAC CTG CAT ATA ACG ACT CGA AAA ACA ATT TAT ATT TTA TAT AGT CTT CCT ATA
  98   E   F   D   L   H   I   T   T   R   K   T   I   Y   I   L   Y   S   L   P   I

 719  ACT AAT CTA GTA ATA GAG CTG TTT GTT CCA ATT GAT TCG GCG ATA GCC AGA TAC ATG CCG
 118   T   N   L   V   I   E   L   F   V   P   I   D   S   A   I   A   R   Y   M   P

 779  AGT TTA AAT CTT TTA TTC TTT TTT GCT TCT ATT ATC ATG TCA TTC AAA GTC ATT ATT TAT
 138   S   L   N   L   L   F   F   F   A   S   I   I   M   S   F   K   V   I   I   Y

 839  GGA ATG CAG AAA TAT AAA GAG ACA GTG CAG GGG TCT GTT TTA AAG TTT TTT GTC ATG ATT
 158   G   M   Q   K   Y   K   E   T   V   Q   G   S   V   L   K   F   F   V   M   I

 899  AAT ATC ATA GCA TTT TGT CCG TTT ATC TTT TTA TTT GCA ATT CCA TAT GTT TTG TTT CGT
 178   N   I   I   A   F   C   P   F   I   F   L   F   A   I   P   Y   V   L   F   R

 959  ATT TAT GTT GTA GAT CCC TTT TTC TTA ACT TCT TTT GTA TTG CTC ATT CCT TTT TCA CTC
 198   I   Y   V   V   D   P   F   F   L   T   S   F   V   L   L   I   P   F   S   L

1019  GTG TAT CAA TTC ATG ACG AAC AAA CTT TAC AAT ATG GAT TTC TTG ATT AGT AGA CTT AAA
 218   V   Y   Q   F   M   T   N   K   L   Y   N   M   D   F   L   I   S   R   L   K

1079  TAC TAT GGA TTT ATT GCC ATT ACA CCG ACC ATT TTA GTT GTT GTC ACG TTT TAT ATT CTG
 238   Y   Y   G   F   I   A   I   T   P   T   I   L   V   V   V   T   F   Y   I   L

1139  CAA AAA CCA GAA GAT TTA AAG TAC ACA CTG AAG CTC GCA TTC ATC ACA TAT ACA CTC ATG
 258   Q   K   P   E   D   L   K   Y   T   L   K   L   A   F   I   T   Y   T   L   M

1199  TTG GCT GTT TTC TAT TTT AAA GAA ATT TTA GAT TTC CGT TTT CGT TTG AAA CGT TTT TCA
 278   L   A   V   F   Y   F   K   E   I   L   D   F   R   F   R   L   K   R   F   S

1259  GAG AAG TAT AAT TAC CAG GAC AGC GTG TTT AAA TTT ACG CAG CTT ATT CGT GAG GCG TCA
 298   E   K   Y   N   Y   Q   D   S   V   F   K   F   T   Q   L   I   R   E   A   S

1319  TCA CTT CAT CAA GTA CTG TAT CAT TTG AAA TAC ACC ATT TTA GAA GTG CTC GTT GTG AAT
 318   S   L   H   Q   V   L   Y   H   L   K   Y   T   I   L   E   V   L   V   V   N

1379  AAA GCC TTT GTG CTA GAG GTG AAG GCT AAT GGA GAA ATG ATT GAA ATT GAT GAA TCA ACA
 338   K   A   F   V   L   E   V   K   A   N   G   E   M   I   E   I   D   E   S   T
```

```
              10        20        30        40        50
ComP'  MITLKNKTLIGQESLFVYIIPL-LYSICLFCIFFIIRINKEIQRKSAFLLVLFLLTICIG
                     :.:....:: .: ...::::.:..::. .. .:..:.:.::.:.:.
ComP   LKDFDLVTLNRPYSFFLFVLPLFFYFLSIICIFYILKVNKKRRSFAAYILILLLLDISIA
             110       120       130       140       150       160

        60        70        80        90       100       110
       YLSAGTSGIGDRFSHYVITFCLSSVFIFYIHFIYQYFKEFDLHITTRKTIYILYSLPITN
       :.:::..  :. ...:.  : . :  :.:..:: .:. :..   . .:  : .:: .:: :
       YISAGGPFRGHIINRYINLFTFISSPILYLQFIQRYLGEIGKTFLNR--ISFLYIIPIFN
             170       180       190       200       210

       120       130       140       150       160       170
       LVIELFVPIDSAIARYMPSLNLLFFFASIIMSFKVIIYGMQKYKETVQGSVLKFFVMINI
       : ::.:        .    ....:::. : . ...::..:    ..::: . .. .::.....:.
       LGIEFFQDYLQVDIDFLATLNLVSFATLTLFSFSAIYLHLNKYKYAEHSFILKLLILTNT
       220       230       240       250       260       270

       180       190       200       210       220       230
       IAFCPFIFLFAIPYVLFRIYVVDPFFLTSFVLLIPFSLVYQFMTNKLYNMDFLISRLKYY
       ..: ::....:..: ..   :.  ..   .:...::::.:::::..::.....:...:..::
       LSFAPFLIFFVLPIIFTGNYIFPALASASLLVLIPFGLVYQFVANKMFDIEFILGRMRYY
       280       290       300       310       320       330

       240       250       260       270       280       290
       GFIAITPTILVVVTFYILQKPEDLKYTLKLAFITYTLMLAVFYFKEILDFRFRLKRFSEK
       ...:..::.:.: .. ...  .  . ... . . ...:.:::::::::..::.:::::::::
       ALLAMIPTLLIVGALVLFDVMDIQMNPVRQTVFFFVVMFAVFYFKEVMDFKFRLKRFSEK
       340       350       360       370       380       390

       300       310       320       330       340       350
       YNYQDSVFKFTQLIREASSLHQVLYHLKYTILEVLVVNKAFVLEVKANGEMIEIDESTND
       .:::::.::.:::.:...::.::. .:: :::.:::.:.::....::...  ..: .:.  . .
       FNYQDSIFKYTQLMRGVTSLQQVFKELKNTILDVLLVSKAYTFEVTPDHKVIFLDKHEVG
       400       410       420       430       440       450

       360       370       380       390       400       410
       SKLWKEYVDQFQDILGEVGKIIELDKGFMMKIGERGGHSFMICCLSNIQTPKLTRDEISW
       .. :. : ..:... .:.:::::...:.::.::::: :... :::::.::.::::::::
       PD-WNFYQEEFENVTSEIGKIIEVNQGFLMKVGERGGSSYVLLCLSNINTPRLTRDEISW
       460        470       480       490       500       510

       420       430       440       450       460       470     ★
       LKTLAFYTSVSLENVVKIEELMEHLEDLKQREANPAWLKKVMFAMEEKQRSDLARDLHDS
       ::::.:::::::.:::..:::::::::.::::: ..:: ::::.:::.::::::.::::::::
       LKTLSFYTSVSMENVLHIEELMEHLKDLKQEGTNPIWLKKLMFAIEEKQRSGLARDLHDS
        520       530       540       550       560       570

       480       490        500       510       520       530
       VLQDLISLKRQSEMFLTNF--QNNQCPTSIENSLISWNEQMSKVIQTTRETCHELRPQLL
       :::::::::::.:.::..:  ..:.:..... .:.  ::::.::  ::.:::::::::...:
       VLQDLISLKRQCELFLGDFKKDDNPCREEVQYKLVQMNEQMSDVISMTRGTCHELRPPVL
        580       590       600       610       620       630

        540       550       560       570       580       590
       YDLGLVKAISKLTSQIQEEAPFHIRLNTTRFDKELDIDIDSQLNIYRIVQELLSNALKHS
       ::::::::.:::... :: .::::::::.::. .:  :.:::::.:::.::.::::.:::
       YDLGLVKALSKLVAHEQERVPFHIRLNTGRFTASL--DLDSQLNLYRIIQEFLSNAVKHS
       640       650       660       670        680       690

        600       610       620       630       640       650
       KASQVLVMLICIKDQVVLHYEDDGVGFDASQLDQHTMSMGLSGIRERVKALNGKLQIHTA
       .:..::.:::.:...:::::::::::... ..:.:::::::::.:::.::.:.:.:.:.:.
       QATDVLIMLISIQNKIVLHYEDDGVGFDQEKNTEHSMSMGLSGIKERVRALDGRLRIETS
        700       710       720       730       740       750

       660       670
       PEKGLKVKIEMEL
        .::.:..::.::
       EGKGFKADIEIEL
        760
```

図３－１２．ComP' と ComP の相同性比較.

★を付したアミノ酸残基が、センサータンパク質(74,75)に保存性の高い His 残基。

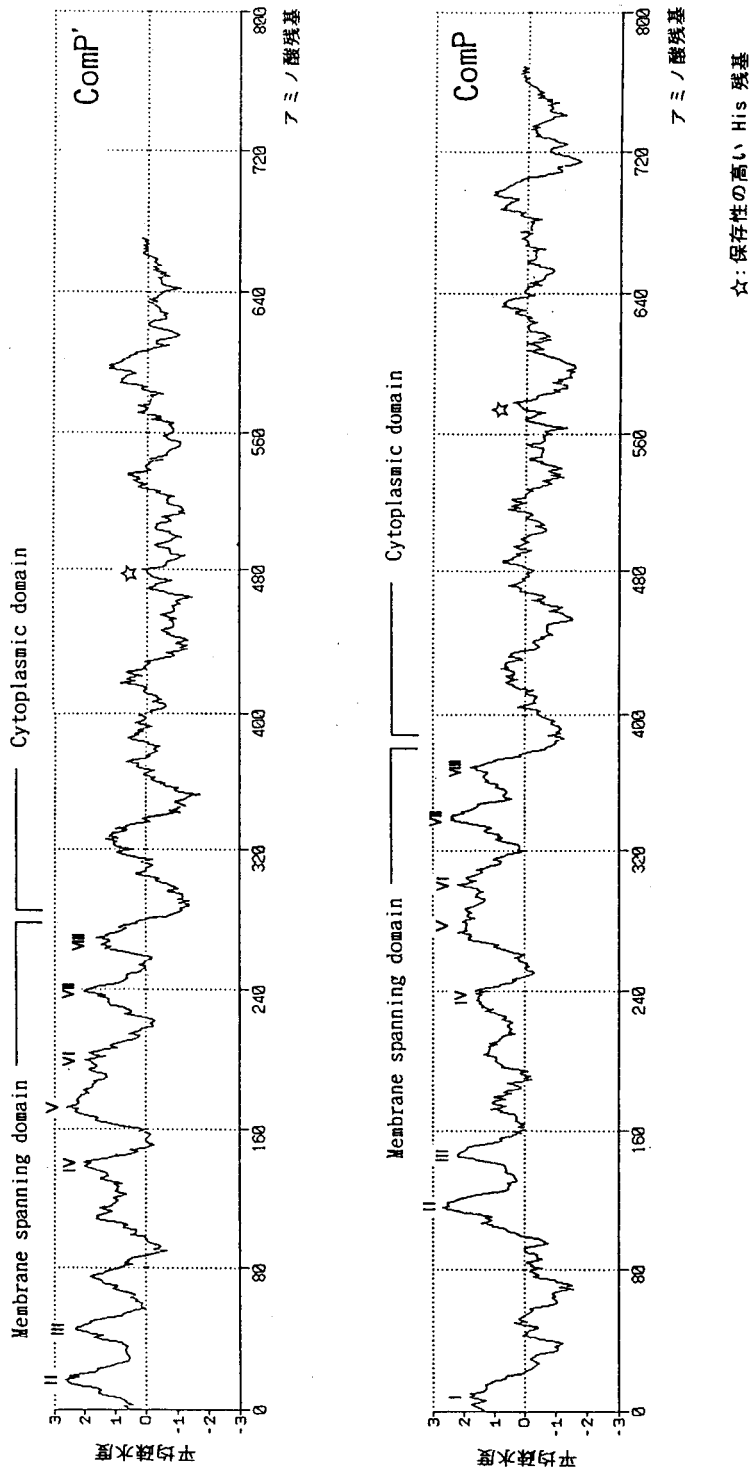


図３－１３．ComP' および ComP の疎水度と、その結果に基づいて予想されるトポロジー.

平均疎水度から予想される膜貫通領域（I ～ Ⅷ）を示した。

19 アミノ酸残基をウィンドウサイズとして調べた(100)。

第4節　考察

B. pumilus A-1 から、サーファクチン生産に関与する遺伝子、psf-1 と comA' および comP' がクローニングされた。PSF-1 の機能については、現在のところ推定の域を越えないが、B. subtilis OKB105 細胞抽出画分を分画後、サーファクチン合成系を再構築した実験では(103)、その成分として PSF-1 に相当するタンパク質が含まれていないことから、PSF-1 はサーファクチン合成系の酵素タンパク質よりもむしろそれらをコードする遺伝子の発現制御に関する因子の可能性が高いと思われる。また、最近になって E. coli entD 遺伝子欠損株の表現型（シデロフォア分泌欠損）を sfp が相補し得ることが報告されており(104)、sfp (B. subtilis) 及び psf-1 (B. pumilus) の遺伝子産物はサーファクチンの分泌に関与している可能性も示唆されている。PSF-1 は pET8c（大腸菌用発現ベクター）を用いた場合には全く発現されなかった（データ示さず)。 これはPSF-1が制御タンパク質あるいは膜タンパク質であり、その大量発現が宿主菌に過大なストレスを与えるためと思われる。一方、サーファクチン生産遺伝子としてクローニングされた comA' の上流域には comP' が存在した。 ComP' には数個の膜貫通領域および自己リン酸化反応に必要なアミノ酸配列が、ComA' にはリン酸基を受け取るアミノ酸がそれぞれ保存されていることから、明らかに制御因子のひとつである。最近、Pseudomonas aeruginosa においてもＢＳ（ラムノリピド）生産制御遺伝子として comA およびその他の two-component regulatory system 遺伝子群と相同性がある rhlR がクローニングされた(105)。すなわち、これらは Bacillus属細菌に限らずＢＳ生産一般に共通の制御機構であると予想される。また、サーファクチン生産性の B. subtilis B-1 は、Ｌ固体培地とＬ液体培地の両方でサーファクチンを旺盛に生産するのに比べて、B. pumilus A-1 は、Ｌ液体培地ではサーファクチンをほとんど生産しない特徴があった。今回、塩基配列から予想された ComP' (B. pumilus) アミノ酸配列は ComP (B. subtilis)に比べて Ｎ末端領域　106 アミノ酸残基が欠失していた。 ComP'(ComP) が培地栄養分（特に窒素源と思われる）の枯渇をセンシングする機能を有すると推定されていることから考える、と外界のシグナルを高感度で認識するためには 106 アミノ酸部分に含まれる細胞外露出領域 (A) が重要な役割を果たしていることが予想される。また、comA' プロモーターの -35 領域とオーバーラップ

する形で comP' のターミネーターが存在した（図３－９）ことから comA' の転写は comP' の転写に依存していることが予想される。すなわち、通常は 二次構造のために comA' の -35 領域は機能しないが、comP' の転写終結（RNA ポリメラーゼがターミネーター部分に達する）と同時に二次構造が解除されて引き続き comA' の転写が開始する。この方法により comP' と comA' の mRNA 転写量比は正確に 1:1 に保たれているはずである。 comP' ターミネーターの直前に存在する短い逆向き繰り返し配列(ステムループ)の意義については現在のところ不明である。大腸菌の外膜タンパク質であるポーリン(106)や光合成細菌の光合成活性中心タンパク質(107)など、いくつかの例を除いて膜タンパク質のＸ線結晶解析などによる構造解析の例は少ない。 膜タンパク質はその機能環境が疎水性と言う点において石油分解酵素とも相通じるところがあり、序論でもふれたようにこれらの研究は遅れている。遺伝子組換え技術を使った ComP と ComP' の機能解析に関する研究と共に ComP' と ComP の活性構造（細胞膜内での構造）が決定されればシグナル伝達に関する研究分野で最も遅れている第一段階（センサータンパク質細胞外露出領域のシグナルセンシング機構）の解明につながるものと期待される。

第５節　要約

１．バイオサーファクタント生産に関する遺伝子をクローニングする目的で、B. pumilus A-1 および、Arthrobacter sp. MIS38 の形質転換系を構築した。その結果、A-1株 では 1×10^3 transformants/ μgDNA、MIS38株では 3×10^5 transformants/ μgDNA 程度の効率であった。一方、B. subtilis B-1 はコンピテントセル法およびエレクトロポレーション法いずれでも形質転換されなかった。

２．サーファクチン非生産株を B. pumilus A-1 から突然変異処理により数株取得した後、サーファクチン生産に関与する遺伝子をショットガン法によりセルフクローニングした。その結果、宿主のサーファクチン非生産性を回復させると同時に、単独で B. subtilis MI113 にサーファクチン生産性を付与する遺伝子 psf-1 (production of surfactin) が

取得された。

3．psf-1 の塩基配列を決定したところ、233 アミノ酸からなる ORF（PSF-1）が確認された。ホモロジー検索の結果、B. brevis 由来 グラミシジンS 合成遺伝子群の上流に存在する機能不明の ORFX および B. subtilis でクローン化されたサーファクチン生産遺伝子産物 SFP と PSF-1 はそれぞれ 33%、45% の相同性を示した。

4．psf-1 保持株と非保持株の細胞内タンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、前者においてのみ psf-1 遺伝子産物（PSF-1）の推定分子量（26.5 kDa）とほぼ同じ位置（25 kDa）にタンパク質バンドが確認された。このバンドは細胞膜画分でも確認されたことから、PSF-1 はゆるく膜に結合していることが示唆された。

5．先のショットガンクローニングで、サーファクチン生産に関与するもうひとつの遺伝子 HindⅢ 1kb 断片が取得された。その塩基配列を決定したところ、B. subtilis 由来 comA と 67.7% の相同性を有する ORF が含まれていた。アミノ酸レベルでも 71.5% の相同性がありリン酸化部位近傍も保存されていたためこの遺伝子を comA' と命名した。さらに、この遺伝子上流に ORF の C末端と思われる配列が確認されたためクローニングして塩基配列を決定したところ、B. subitilis 由来 ComP と アミノ酸レベルで 72 % の相同性を有する ORF（ComP'）が確認された。しかしながら、ComP と比べてN末端の膜貫通領域内の膜外第一露出部分が欠失しており、B. pumilus A-1 と B. subtilis B-1 のサーファクチン生産様式の相違からこの領域が培地の栄養分(おそらく窒素源)枯渇シグナルを敏感に検出するために重要であることが予想された。

第４章　嫌気的石油分解細菌の分離

第１節　緒言

序論でも述べた通り、石油(炭化水素)分解細菌のほとんどは好気性菌であり、分子状酸素を電子受容体として利用する。本章で目的とするのは無酸素(嫌気的)条件下において脂肪族炭化水素を分解する細菌の分離である。脂肪族炭化水素の中でもn-アルカン資化菌の報告例がこれまでで最も多く、iso-アルカンは側鎖が長くなるほど資化されにくい。現在までに細菌により利用されたという報告のある炭化水素の鎖長は C1 から C34 までにわたるが、その中でも特によく資化されるのは C10 から C16 までの中鎖のn-パラフィンである(下図参照,13)。そこで、本章では細菌により最も分解され易い飽和脂肪族炭化水素のひとつであるn-テトラデカンをモデル基質として用いた。

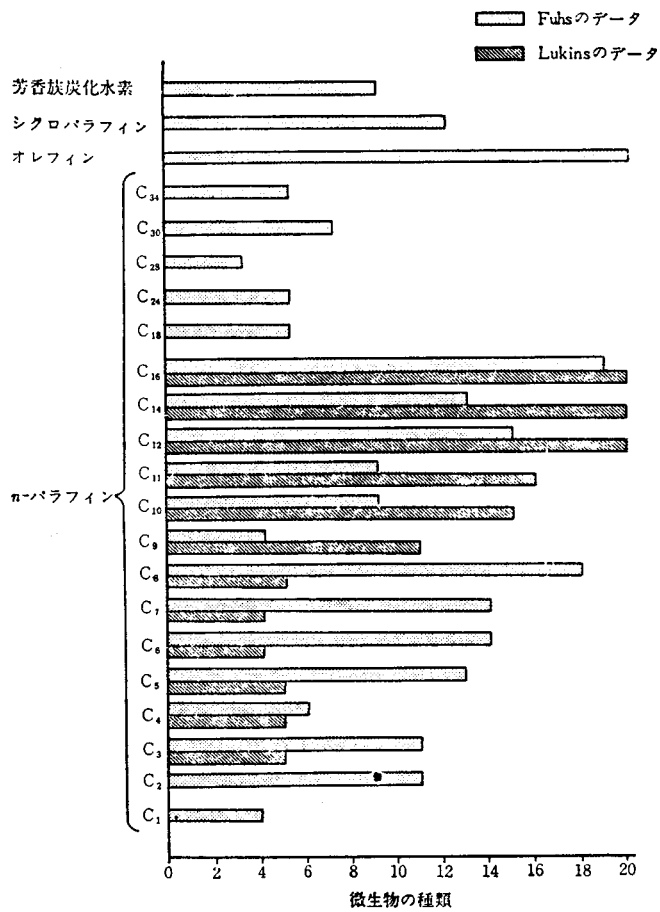


図. 微生物による炭化水素の資化性(13).

第2節　実験材料および方法

培地

基本無機培地（BM）として以下の培地を使用した。嫌気培養の際には以下の混合ガスを通気して培養を行った。n-テトラデカン（n-TD）分解経路を調べるために使用する菌体には、n-TD を 1%添加して培養した。BM+ 1%n-TD 培地にさらに原油（相良油)を添加すると増殖が良くなることから、必要に応じて 0.2 μm フィルターにて除菌した原油を 50 ppm の濃度で添加して使用した。また固形培地として使用する際にはアガロース 1600（和光純薬）を 1.5%添加した。

基本無機培地（BM）	(g/l)
$(NH_4)_2SO_4$	5.0
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.5
KH_2PO_4	1.0

pH 7.0 with NaOH

混合ガス	(%)
N_2	90
H_2	5
CO_2	5

嫌気条件下における脂肪族炭化水素分解細菌の分離

先ず、一次スクリーニングとして嫌気的に原油を資化する細菌を分離した。培地は炭素源を全く含まない上記の無機塩培地（BM）を用いた。固形培地の表面に原油を 30 μl 塗布したものを主に使用し、これをオイルプレートとした。オイルプレートはあらかじめ嫌気チャンバー（内部は嫌気性 3 種混合ガス $CO_2:H_2:N_2$= 5:5:90 で満たされ、Pd-Al 触媒を使って常時 O_2 を H_2O としてトラップできるように設計してある; EAN-140 TABAI製）に一晩放置したものを使用した。油田土壌を無菌水に懸濁した後、嫌気チャンバー内にてオイルプレート上に 0.1 ml 程度ずつ塗布して 28℃ あるいは 37℃ で 2 週間培養した。次いで、原油の代りに n-TD を唯一炭素源として同様の培養を行い、脂肪族炭化水素分解菌（HD-1 株）を得た。

通気撹拌槽による液体培養

炭化水素資化を確認するために、分離された HD-1 株を 1% n-テトラデカン（以後、

n-TD)(純度 99.8% 以上）あるいは 0.1% トルエン（純度 99.9% 以上）を加えた BM にて培養した。n-TD は蒸気殺菌、トルエンは濾過除菌して用いた。トルエンは揮発性のため、0.1% ずつ 24 時間ごとに添加した。完全培地として、L 培も必要に応じて用いた。培養装置は直径 60 mm 高さ 300 mm の平底大型試験管を利用した通気撹拌槽を設計した（図４－１）。これに、嫌気性混合ガスを供給して常時陽圧を保つことにより酸素の混入を防いだ。通気量は 1 vvm 程度で十分であった。また、配管からの酸素の混入を防ぐためにステンレスパイプを用いた。

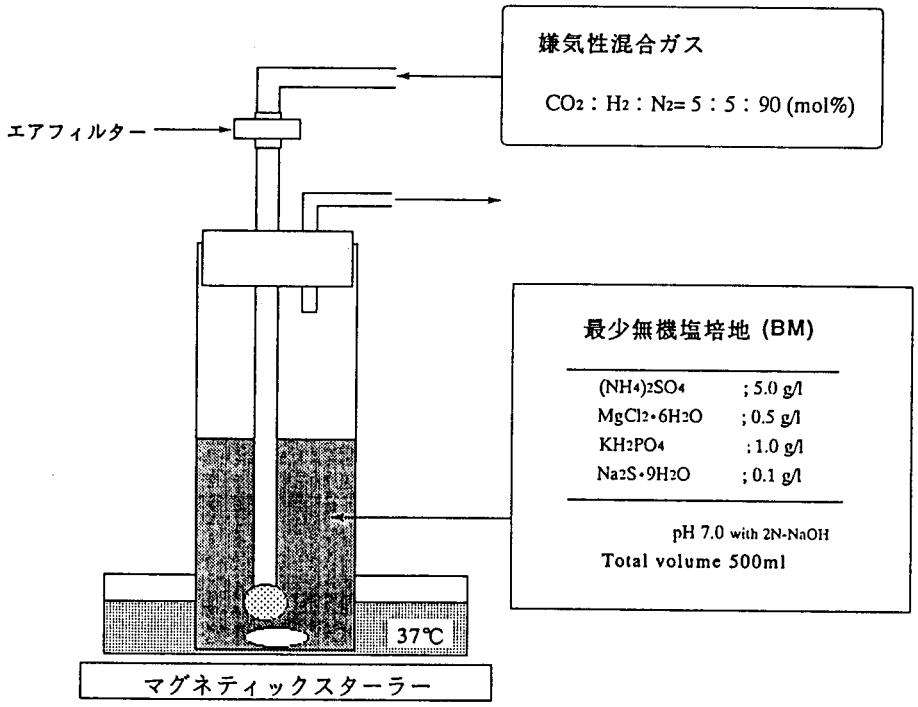


図４－１．HD-1 株 の培養装置.
大量培養はこの装置を複数用いて行った。

炭化水素培地での細胞増殖

顕微鏡観察の結果、n-TD 油滴上で細胞数が増加していることが確認されたが全細胞数を計算することは培養の不均一性から困難であった。培養に伴う油滴の乳化が激しいために分光学的方法も利用できなかった。そこで、我々は細胞が嫌気的に増殖しており、n-TD やトルエンを添加した場合にどれくらい増殖が促進されるかを液体培養を行った後の菌体重量を比較することにより計測することにした。15 日間の培養の後、遠心分離による集菌後、菌体を蒸留水で洗浄（10000×g, 20 min）した。BM+n-TD 培地で行った培養の際には、ヘキサンによる洗浄も行った。ヘキサンによって細胞が破壊されていないことは顕微鏡で確認した。凍結乾燥の後、乾燥菌体重量を測定した。乾燥菌体からクロロホルム/メタノール混合溶媒(108)により抽出されてくる画分を疎水性画分（LPF; 膜脂質、炭化水素など）とした。乾燥菌体重量から LPF を減じた値は親水性画分（HPF; タンパク質、核酸、炭水化物など）と考えられる。

その他の炭化水素の利用

いくつかの炭化水素について、BM に 0.2% 添加した場合（トルエンは 0.1%）の増殖の促進効果を観察することによりその利用性を調べた。培養はそれぞれ好気条件下および嫌気条件下にて 37℃ で 1 週間行った。菌体の増殖は顕微鏡観察により確認した。

電子顕微鏡観察

細胞を Sörensen buffer（pH 7.3）中で 1% グルタルアルデヒドにより 2 時間固定した。その後、さらに、オスミウム酸で固定した後、エタノールで脱水した。

［透過型電子顕微鏡観察］ 超薄切片を定法に従い酢酸ウラニウムとクエン酸鉛で染色した後、JEM1200 EX 透過型電子顕微鏡（日本電子)にて観察した。

［走査型電子顕微鏡観察］ 臨界点乾燥の後、標本を白金パラジウムを蒸着して Hitachi S-570 走査型電子顕微鏡（日立製作所）により観察した。

HD-1株の同定

HD-1 株の同定は 主に Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(109) に従って

進めた。また、API 20NE システム（API System, France）も併用した。APIシステムを使って得られた HD-1 株の固有値（profile number）はAPI identification program（シンテック社）により検索した。

第3節　結果

4.3.1. 嫌気的石油分解細菌の分離

初期には多数のコロニーがオイルプレート上に出現したが、継続的に同じ培地で植え継いだところそのほとんどのものは生育しなくなった。再現性良く生育した 3 株は形態学的に同じであったため、そのうちの一株を HD-1 株と命名した。培養を続けていくうちに、HD-1 株はオイルがなくても BM プレートで生育することが分かった。同培地において CO_2 あるいは H_2 を含まない嫌気ガスで培養を行ったが、HD-1 株は全く生育しなかった（図４－２）。HD-1 株の増殖に光の照射は影響なかった。このことから、HD-1 株は H_2 エネルギーを利用して CO_2 固定することにより生育できることが示唆された。またその世代時間は約 40 時間と非常に生育が遅かった。CO_2 は重炭酸イオンでは代替できず、分子状 CO_2 がその生育に必須であった。また、培地に原油あるいは n-TD を添加した場合、HD-1 株の増殖は主に油滴表面でおこっていることが観察された（図４－３）。HD-1 株はＬ培地において好気条件下、嫌気条件下の両方で生育することから、独立栄養細菌ではなく混合栄養細菌（Mixotrophs）に属することが判明した。

4.3.2. HD-1株の電子顕微鏡観察

n-TD を含まないＬ培地で生育した HD-1株において LPF は 16-23% であり、この値は大腸菌（7%）や 枯草菌（3.5-4%）に比べてかなり高かった。大腸菌は二重膜、枯草菌は一重膜構造であることから考えると、HD-1株は多重膜構造をもつか非常に分厚い膜を有することが予想された。実際、顕微鏡により細胞を観察したところ、HD-1株の細胞膜は厚く（0.02~0.08 μm）、波打った構造を有していた。輪切りの細胞では多重膜構造にも見える（図４－４）。HD-1株を BM+n-TD 培地で培養した場合、Ｌ培地での培養に比べてさらに

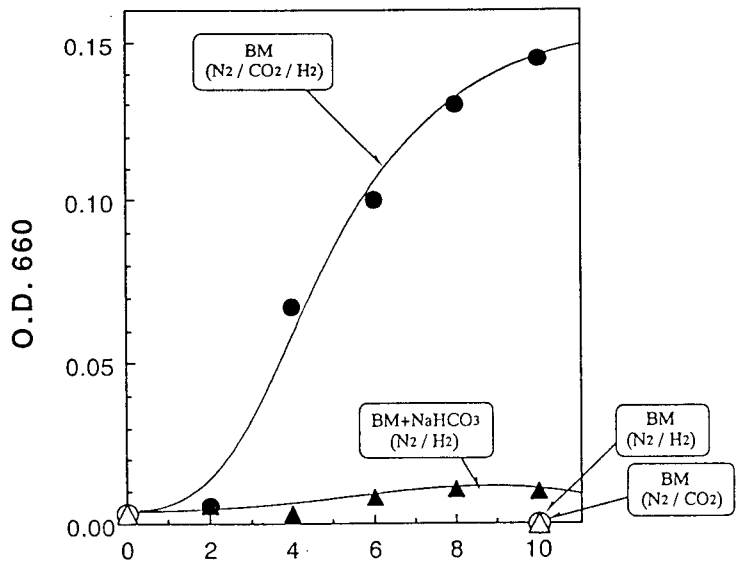


図４－２．嫌気条件下における HD-1 株の増殖.

●；嫌気性３種混合ガス(N_2, CO_2, N_2)。▲；２種混合ガス(N_2, H_2) に $NaHCO_3$ を CO_2 の代わりに供給した場合。○, △；それぞれ、２種混合ガス (N_2, H_2) および (N_2, CO_2)。

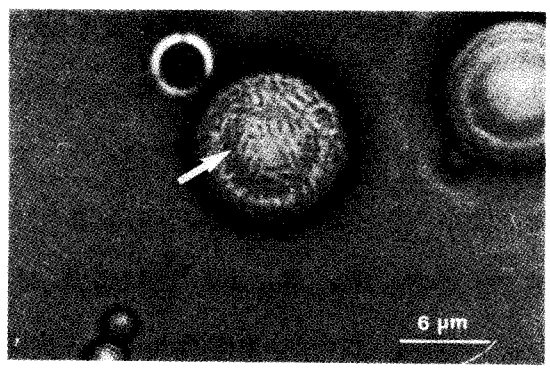


図４－３．HD-1 株 の顕微鏡観察.

BM 液体培地 に n-TD を 1 % 添加し、嫌気条件下で 1 週間培養した。

膜は大きく波打ち、細胞内には油滴と思われる電子密度の低い部分が多数確認された（図４　４ｂ）。細胞形態は桿菌（rod shape）であり（図４－５）、その大きさは 0.5×1.2~1.5 μm であった。

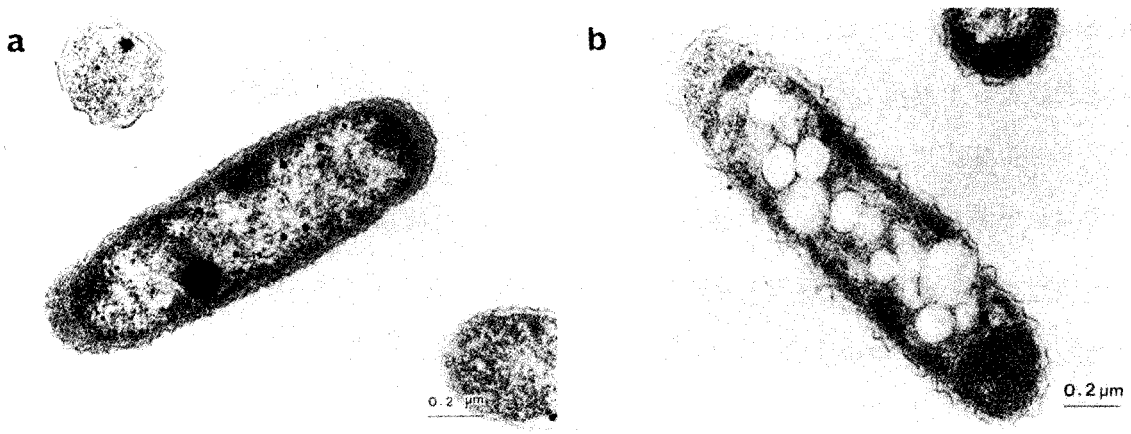


図４－４．HD-1 株 の透過型電子顕微鏡観察.
a; Ｌ培地で１週間培養した菌体の超薄切片。
b; 図4-3 と同じ培養から回収した菌体の超薄切片。

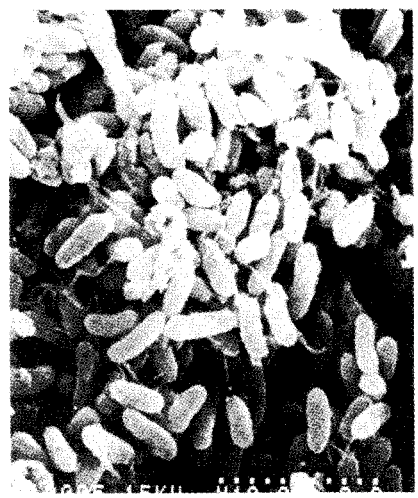


図４－５．HD-1 株 の走査型電子顕微鏡観察.

4.3.3. HD-1株の同定

本菌の生理学的な特徴を調べた（表４－１）。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology に従って検索を進めたところ、Section 4 (Gram-negative aerobic rods and cocci) に属すると判断された。HD-1株は通性嫌気性であり、anaerobe ではなく、aerobe の項に含まれた。運動性を有し GC含量が 67%と高いこと、グルコースなどの糖類を炭素源として利用しないことなどから Pseudomonas属細菌の一種であると予想された。エタノールを炭素源として最もよく利用した。APIシステムにおいて、HD-1 株の固有値は 0200044 であり、API identification program により検索した結果、Pseudomonas mesophilica が最も近い種として抽出された（表４－２）。しかしながら、その同定率 (id %)は 76.3% であることと、形態学的特徴および炭化水素資化能などは HD-1株に特有であると思われたため、本菌を Pseudomonas anaerooleophila strain HD-1 と命名した (110,111)。

表４－１. HD-1 株 の生理学的な特徴とGC含量.

細胞形態	桿菌（rods）
大きさ	0.5 × 1.5 μm
酸素要求性	通性嫌気性
グラム染色	陰性
運動性	あり
胞子形成	なし
メタン生成	なし
カタラーゼ	あり
オキシダーゼ	あり
リパーゼ;	
Tween 20 分解活性	あり
Tween 80 分解活性	なし
トリプチリン分解活性	あり
アミラーゼ;	
デンプン分解活性	なし
Na 要求性	なし
生育温度	
30 ℃	+
37 ℃	+
48 ℃	−
GC 含量（モル%）	67

表４－２．APIシステムによる HD-1 株 の同定.

候補	同定確率(%)
Pseudomonas mesophilica	76.3
Moraxella phenylpyruvica	9.3
Oligella ureolytica	8.5
CDC gr. Ⅳ C-2	2.2
Bordetella bronchiseptica	1.1

同定確率が 100 % の場合同一種と判定される。

4.3.4. n-TD 及びトルエンの資化

HD-1株は嫌気的に生育し、その増殖は原油以外にいくつかの純粋な炭化水素（n-デカン、n-ドデカン、n-テトラデカン、n-ヘキサデカン、シクロヘキサンなど）により促進された（表４－３）。パラフィン類以外にもトルエンやベンゼンなどの芳香族炭化水素によってもその生育は促進された。そこで炭化水素の増殖に及ぼす効果を定量的に評価し、単なる取り込みだけではなく細胞構築成分として資化していることを液体培養により確認した。

表４－３．HD-1 株 が利用する炭化水素.

炭化水素	好気条件下	嫌気条件下
n-デカン	+	+
n-ドデカン	+	+
n-テトラデカン	+	+
n-ヘキサデカン	+	+
ベンゼン	+	+
トルエン	+	+
シクロヘキサン	+	+
ジメチルシクロヘキサン	+	−
メチルシクロヘキサン	+	−
原油	+	+

すなわち、炭化水素は典型的な疎水性物質であり菌体内に取り込まれた場合には培養液から回収される菌体重量当たりの疎水性画分（LPF%）のみが増加し、さらに取り込まれた n-TD やトルエンを HD-1株が嫌気的に資化した場合には培養液当たりの親水性画分（HPF）が増加する(細胞数が増加する)はずである。

培養は 200 ml の BM に 1% n-TD あるいは 0.1% トルエンを添加した場合としない場合で比較した（表４－４）。 測定の結果、LPF%はそれほど変わらなかった(42 ~ 54%)が、それぞれの培養における HPF は、15（n-TD添加)、10（トルエン添加)、4.3（BMのみ）であり、炭化水素を添加した場合の方がその値は大きかった。前 2 者における HPF の増分(15-4.3、10-4.3 mg/l)がそれぞれ n-TD および トルエンに由来する量であり、この結果から HD-1株は嫌気条件下において確かに石油成分（n-TD, トルエン）を分解利用していることが証明された。

表４－４. HD-1 株 による n-TD および トルエンの資化（嫌気条件下).

培地	BM	BM + n-TD	BM + toluene
乾燥菌体重量(mg/l)	7.5	30	22
LPF (mg/l)	3.2	15	12
HPF (mg/l)	4.3	15	10
LPF/乾燥菌体重量(%)	42	50	54

LPF; 疎水性画分。HPF; 親水性画分。植菌量は 0.2 mg/l で 37 ℃ 2 週間培養した。

4.3.5. HD-1株のバイオサーファクタント生産性

第 1 章でも述べた通り、石油を資化する細菌の多くは細胞外にバイオサーファクタントを分泌する。これは疎水性物質（炭化水素類）の細胞内取り込みを促進させるために非常に効果がある。HD-1株においてもオイルプレート上でコロニーが小さいにも拘わらずかなり大きなハロー(油膜排除円）を形成することから、活性の高いバイオサーファクタントを生産していることが示唆された（図４－６）。

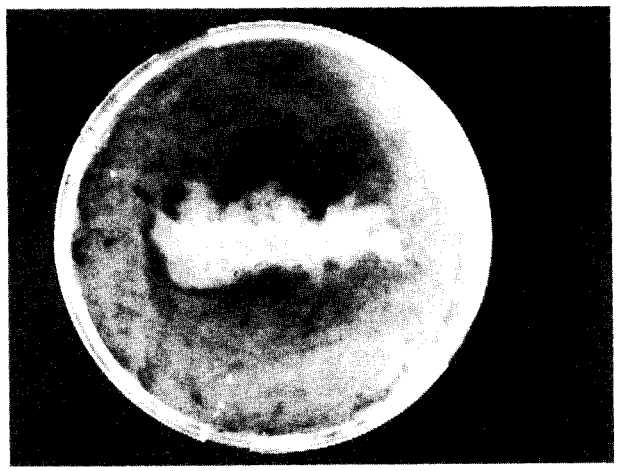


図４－６．HD-1 株 の ＢＳ生産性.

第４節　考察

本章において油田から分離された Pseudomonas anaerooleophila HD-1 は好気的にも嫌気的にも炭化水素を分解する特徴を有する。これまでに、嫌気条件下で炭化水素を分解する菌は芳香族炭化水素（これも側鎖 $-CH_3$［トルエン］や $-OH$［フェノール］がその分解に必須であり、ベンゼンを嫌気的に分解したという報告はいまだない）を中心にいくつか報告されているが、それが好気条件下でも分解したと言う報告はない（その逆もない）。これは本菌の代謝経路が既知のものと異なっている可能性があり、非常に興味が持たれる点である。特に、細菌による飽和脂肪族炭化水素の嫌気的分解に関しては報告が極めて少なく、信頼性の高いものはいまのところ一例、硫酸還元菌（Hex1株）だけであり、3年前にドイツのグループにより報告された(33)。Hex1株は絶対嫌気性細菌であり、酸素に対する耐性が低く取り扱い及び実用面で問題が多いと思われる(その後の報告はまだ発表されていない)。また、本菌は生育が遅いものの嫌気条件下においてベンゼンによってもその増殖が促進されることが確認されている。

序論でも触れたように、極度に還元された物質である炭化水素を生物が資化利用するた

めには強力な酸化剤が必要である。分子状酸素は高い酸化還元電位を有する（E_0'=0.82 V）ために、炭化水素は多くの場合好気的に分解される。HD-1株が何を電子受容体として利用しているかについては現在のところ不明であり、その解明が今後の重要課題のひとつである。Hex1株は硫酸還元菌であり、硫酸イオン（SO_4^{2-}）の酸化力を利用している。この場合には硫化物（H_2S など）の生成を伴う。HD-1株の培地組成中にも硫酸アンモニウムが含まれており、これを電子受容体としていることが考えられたが、培養終了時の硫化物を定量したところ(112)、わずか 3 ~ 4 μM しか検出されなかった。採用している培養方法が通気撹拌槽形式を用いているために、発生した硫化物が大気中に放出された可能性もあるが硫化物の高い水溶性（258 ml/ 100 g water, 20℃ 1 atm）を考慮に入れると電子受容体として硫酸イオンだけでは説明がつかない。HD-1株が炭化水素の存在しない培地においても、CO_2 と H_2 を使って独立栄養的に生育することが既に確認されている。以上の状況から、HD-1株は CO_2 を電子受容体として主に利用していることが推測される。

第５節　要約

油田土壌から、グラム陰性混合栄養細菌 Pseudomonas属 HD-1 株を分離した。HD-1 株は通性嫌気性菌であり、H_2 存在下において CO_2 を唯一炭素源として生育可能であった。嫌気条件下における生育は脂肪族炭化水素あるいは芳香族炭化水素の添加により促進された。炭化水素類（n-テトラデカンやトルエン、疎水性物質）を含む培地で増殖した細胞において親水性画分が増加していたことから、HD-1 株が脂肪族および芳香族炭化水素を嫌気的に分解利用することが示唆された。嫌気条件下、n-テトラデカン培地で生育した細胞内には乾燥菌体重量あたり 40 ~ 50% におよぶ油滴の取り込みが観察された。電子顕微鏡観察の結果からは培地中に炭化水素があってもなくても、HD-1 株の細胞表層は高度に波打っており、多重膜構造を有していることが観察された。

第5章　HD-1 株による嫌気的石油代謝経路の解析および CO_2 からの石油生産

第1節　緒言

第4章において、油田より分離した Pseudomonas anaerooleophila HD-1 が嫌気条件下において、脂肪族および芳香族炭化水素を資化することを証明した。そこで次の疑問はどのような経路で HD-1 株が炭化水素を代謝するのかということである。本章においては、この点について研究を進めた。すなわち、典型的な脂肪族炭化水素である n-テトラデカン（n-TD）を HD-1株に無酸素条件下にて代謝させた場合に極少量蓄積される代謝中間体を検出および分離し、その構造を決定した。これまでにも、酵母(Candida rugosa)や Pseudomonas aeruginosa を使って、脂肪族炭化水素の末端部分が不飽和化されることを赤外分光法（IR）により示唆した報告はいくつかある(113,114)が、産物を分離してその構造を直接決定した例はない。

一方、本菌は H_2 存在下において CO_2 を単一炭素源として独立栄養体としても生育できる。本菌が油田より分離されたことと、菌体当たりの疎水性物質含量（LPF）が大腸菌や枯草菌の数倍以上におよぶことから CO_2 から炭化水素類を合成しエネルギー源および炭素源として備蓄している可能性も示唆された。そこで、LPF に含まれる成分についても本章でさらに詳しく解析した。

第2節　実験材料及び方法

菌株

Pseudomonas anaerooleophila HD-1(110)

n-TD 分解反応

HD-1 株を BM+n-TD 培地で培養後、集菌し 50 mM pH 7.0 Na-phosphate buffer で洗浄

して凍結乾燥した。ネジ口試験管で乾燥菌体重量 0.2 g あたり 2.5 ml の同 buffer に懸濁し、混合ガスで置換後 n-TD 40 μl を添加して密栓した。37℃で振とうして一定時間後、四塩化炭素 4 ml を加えよく振り混ぜることにより反応を停止した。3,000 rpm で 10 分間遠心分離することで四塩化炭素層（下層）に炭化水素が抽出された。

n-TD 代謝中間体の取得

反応は一つの反応系に対し約 100 mg の乾燥菌体を用いて行った。反応時間は 15 分、30 分、60 分（以下 R-15、R-30、R-60）で行い、時間経過に伴った代謝中間体の生成を調べた。

塩化ヨウ素誘導体の調製(115)

炭化水素が溶解している四塩化炭素溶液 1 ml に対し 2.5 ml Wijs 液を添加する。1 時間常温、暗所に置き、時々振り混ぜる。この操作で塩化ヨウ素誘導体ができるが、後で行う分析のことを考慮し反応溶液を減圧乾燥させる。完全にヨウ素の褐色が消失するまで減圧乾燥させた後、1 ml の四塩化炭素に再溶解する。

Wijs 液；三塩化ヨウ素 7.9 g とヨウ素 8.9 g を氷酢酸に温めながら別々に溶かす。冷却後混合して氷酢酸で 1 ℓ にする。調製後は冷蔵庫で保存し、必要なときに湯浴中で溶かして使用する。

※：遠心式濃縮機を酢酸により痛める可能性があるので、ロータリーエバポレーターの使用が望ましい。

トリメチルシリロキシ（OTMS）誘導体の調製(116)

誘導体の調製は下図に示したように、不飽和結合のオスミウム酸による酸化と生成した水酸基のトリメチルシリル化の 2 つのステップで行われる。

ステップⅠ：オスミウム酸による酸化

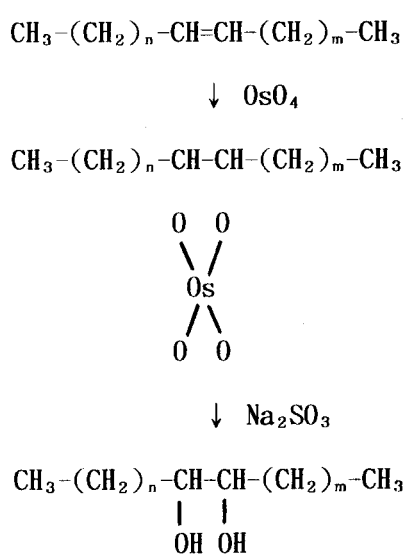
不飽和炭化水素 1mg に対しピリジン-ジオキサン（1:8）0.2ml を加え溶解する。2mg のオスミウム酸（OsO_4）をジオキサンの 2%溶液にして（20mg/mlを 100μl）添加し、室温

で約 2 時間放置する。16%Na_2SO_3 水溶液とメタノールを 17:5 で混合し、この混合溶液を 6ml 加え、ときどき振り混ぜながら約 1.5 時間さらに放置する。遠心後、上清を回収し凍結乾燥を行う。凍結乾燥して残った白い残渣を適量のエチルエーテルで三回抽出し、無水 Na_2SO_4 を適量加えて一晩かけて脱水を行う。遠心して Na_2SO_4 を除いた後減圧乾燥してステップⅡに移る。なお凍結乾燥後は溶液中に有毒なピリジンや酸化力の強いオスミウム酸が含まれることから、凍結乾燥器の洗浄やポンプのオイル交換等を行う必要がある。

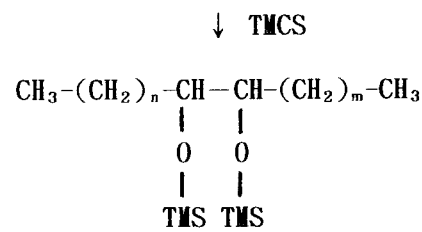
ステップⅡ: OTMS 誘導体への変換

ピリジン-ヘキサメチルジシラザン-トリメチルクロロシラン（10:2:1）に溶解し、5分間放置する。減圧乾燥後、クロロホルムに再溶解する。

ステップⅠ

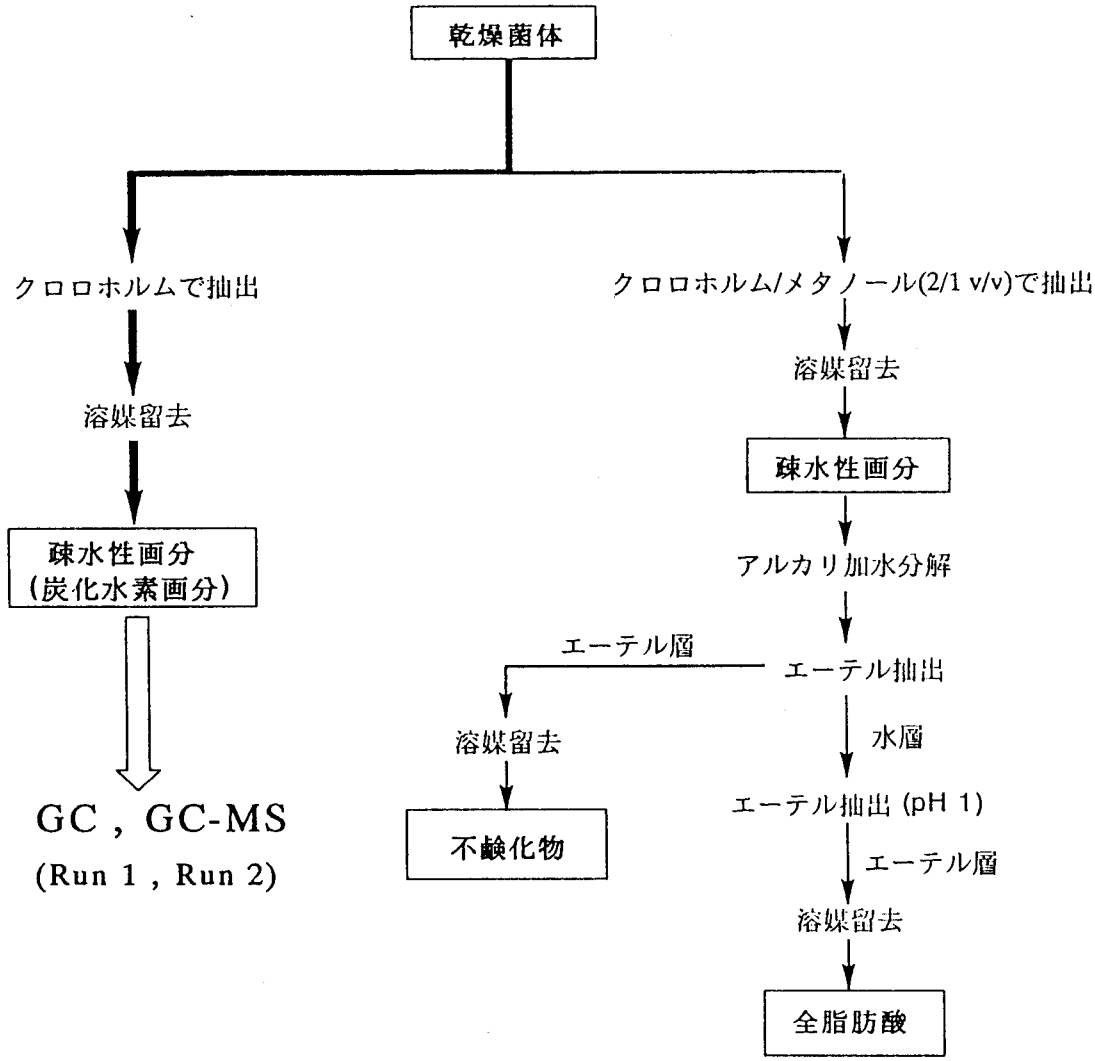


ステップⅡ



CO_2 を単一炭素源として生育した HD-1 株からの疎水性画分の調製

培養は BM と 嫌気性混合ガスを用いて行った。培養液から遠心分離（10000×g, 20 min）により菌体を回収した。蒸留水で遠心洗浄後、クロロホルム抽出（炭化水素分析）あるいはクロロホルム/メタノール抽出（脂肪酸分析）を行った。クロロホルム抽出によるサンプル調製は培養の異なるロットについて二回行なった（Run 1, Run 2)。



脂肪酸メチルエステルの調製

クロロホルム/メタノール混合溶媒により抽出された画分について、定法に従い鹸化分解および不鹸化物をエーテル抽出により除去した後、メタノール塩酸にてメチルエステル化した。

炭化水素の分析

炭化水素およびその誘導体の分析は、GC および GC-MS により分析した。

ガスクロマトグラフ（GC）

島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-14A を用い、キャピラリーカラムにより分析を行った。キャリアーガスにはヘリウムを用い 40ml/min の流量で測定した。また検出器は Flame ionization detector（FID）を用いて行った。各試料物質にあわせた分析条件を下に示す。

・脂肪族炭化水素

カラム：島津製作所製　HiCap-CBP1 無極性 メチルシリコン

HiCap-CBP20 強極性 ポリエチレングリコール

分析条件 1

Injector, Detector 温度 250℃

カラム温度 110℃

分析条件 2

Injector, Detector 温度 250℃

カラム温度 80～110℃

昇温速度 2℃/min（80℃ 1 min 保持）

分析条件 3

Injector, Detector 温度 250℃

カラム温度 80～250℃

昇温速度 10℃/min（80℃ 1 min 保持）

・塩化ヨウ素誘導体

カラム：HiCap-CBP1

分析条件

Injector, Detector 温度 250℃

カラム温度 80～110～230℃

昇温速度 2℃/min (80℃～110℃) 8℃/min (110～230℃)

(80℃ 1min, 110℃ 5min, 230℃ 10min 保持)

・トリメチルシリロキシ誘導体

カラム：HiCap-CBP1

分析条件

Injector, Detector 温度 250℃

カラム温度 100～250℃

昇温速度 5℃/min (100℃ 1 min 保持)

ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS)

GC により分離されたピークについてその質量分析を行った。塩化ヨウ素誘導体を EI 法で分析した際には、大阪大学工学部プロセス工学科柳田研究室の GCMS-QP2000A (島津製作所製)にて分析を行った。またそれ以外の場合 (特に、高い検出感度を必要とする場合) には、大阪大学工学部分析センターJMS-DX303 (日本電子製) も併用した。各分析試料の分析条件は上に示した GC条件と同じである。

フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)

大阪大学工学部分析センターに分析を依頼し、四塩化炭素を溶媒とし 1.0 mm KBr セルによる溶液法で行った。

プロトン核磁気共鳴法 (^{1}H-NMR)

大阪大学工学部分析センターに分析を依頼し、内部標準としてテトラメチルシランを添加した $CDCl_3$ を溶媒として用い 400 MHz の周波数で走査した。

第3節 結果

5.3.1. 嫌気条件下における石油分解中間体の検出ならびにその構造決定

5.3.1.1. フーリエ変換赤外分光装置（FT-IR）による分析

HD-1 株と n-TD を適当時間接触させた後の各四塩化炭素抽出液を用いて分析を行った。その結果を図５－１に示した。脂肪族炭化水素鎖中に不飽和結合が存在すると 910 cm^{-1}, 990 cm^{-1}, 1,645 cm^{-1}, 1,825 cm^{-1}に特徴的な吸収が検出される(117)。反応抽出液の場合には図５－１(a),(b),(c) に示したようにいずれにおいても 1,000 cm^{-1}に特徴的な吸収が検出された。この吸収はアルケンに特異的な位置 990 cm^{-1}に近かったが、その他の吸収は検出できなかった。また、コントロール A（図５－１(d))にはこれらの吸収は検出されなかった。以上のことから、菌体の作用により n-TD は何らかの構造変化を起こしていることが示唆された。

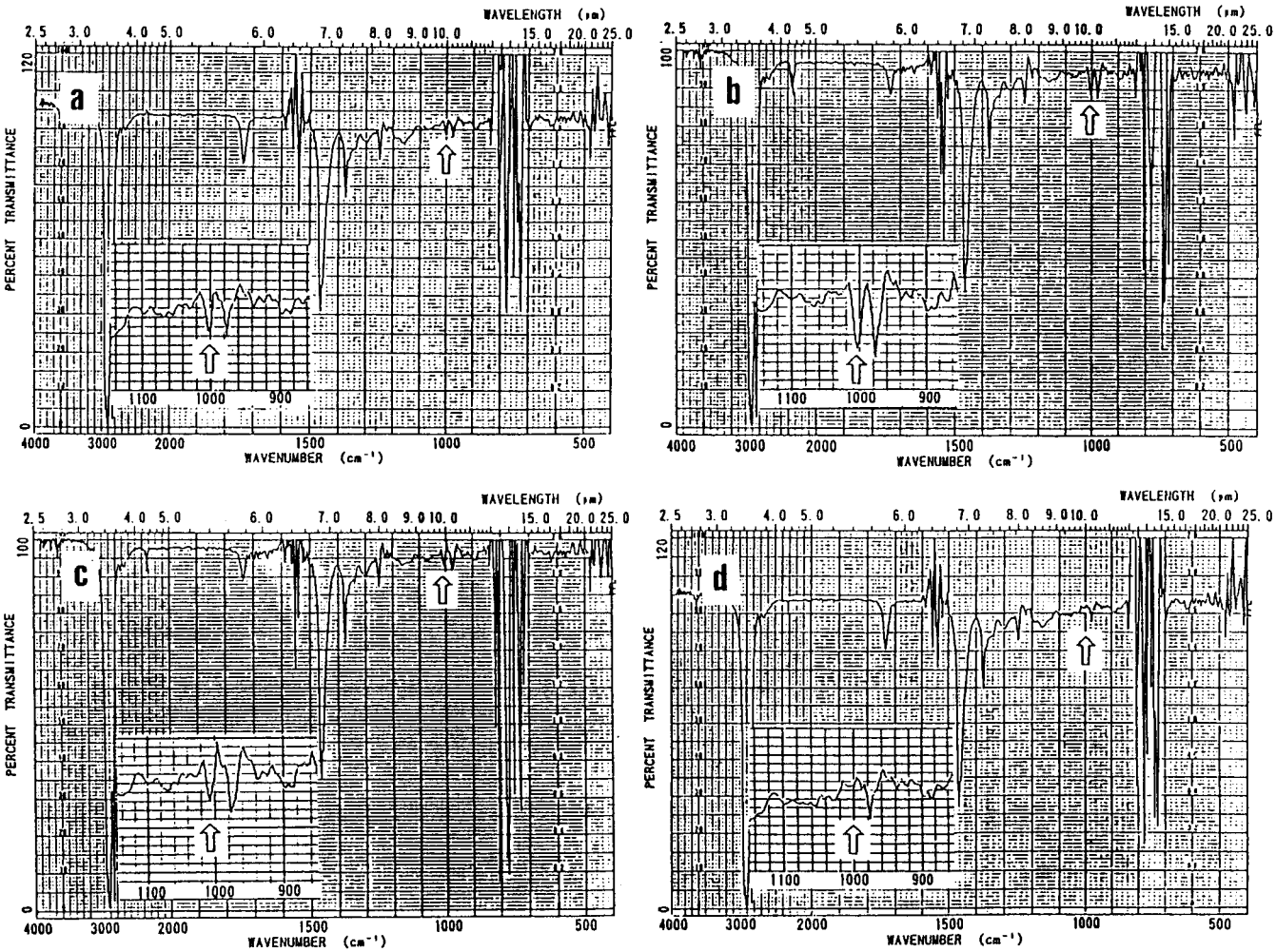


図５－１．各反応時間後における四塩化炭素抽出物の FT-IR.
a; 15分後の試料（R-15)。b; 30分後の試料（R-30)。c; 60分後の試料（R-60)。
d; 反応の対照実験として菌体を加えずにリン酸緩衝液中で n-TD を 60 分間処理したもの（コントロール A)。

5.3.1.2. 反応抽出液のガスクロマトグラフ法（GC）による分析

FT-IR で反応抽出液中に n-TD 以外の成分が存在することが示唆されたのでガスクロマトグラフィーで検出することを試みた。不飽和結合が導入されている可能性が高かったので n-TD と 1-テトラデセンの標準品を用いてこれらの分離条件を調べた。その結果、HiCap-CBP1 カラムで分析条件 2 の場合に保持時間で最大 1 分の差が生じた。この分析条件で反応抽出液について分析を行ったが、基質である n-TD 以外の特徴的なピークを検出することはできなかった。しかし、反応抽出液中に含まれる不飽和炭化水素はその量が極めて少ないか保持時間が n-TD と接近しているために検出できなかったという可能性がある。 そこでガスクロマトグラフ上での検出を容易にするために誘導化反応を行うことにした。まず、不飽和結合に特異的に反応して分子量と極性の増加が期待される塩化ヨウ素（ICl)誘導体を調製することにした。

5.3.1.3. 塩化ヨウ素誘導体の調製および GC による分析

誘導体の調製後に行う各分析の条件決定のために、1-テトラデセン及びトランス-7-テトラデセンの標準品を誘導体化した（図５－２（a,b))。また、誘導化剤が飽和炭化水素と全く反応しないことを確認するため、n-TD 標準品の誘導体化処理も行った（図５－２（c))。また、脂肪酸など菌体由来のものと区別するため菌体のみの抽出液を誘導体化し、これをコントロール B とした（図５－２（d))。GC 分析の際には内部標準物質として n-TD を試料中に添加して保持時間の補正を行った。これらの結果から 1-テトラデセンの場合、誘導体にすることによって約 13.6 分、トランス-7-テトラデセンの場合約 14.1 分の保持時間の遅れを生じた。また n-テトラデカンと比較するとそれぞれ約 13.1 分と 11.9 分の遅れであった。一方,、誘導体化処理することによる飽和炭化水素への影響もないことも確認された（c)。次に反応産物誘導体の分析を同じ条件で行った。その結果 R-30 の抽出液の場合に基質の n-TD 以外のピークがいくつか検出された（図５－２（f))。また、ここには示さないが他の抽出液（R-15, R-60）の場合には、R-30 と同じ位置にピークを検出したがその強度は弱かった（GCピーク面積値で R-30 の 5.7%以下)。さらに n-TD および 菌体を誘導体化したもの（c,d）にはこれらのピークが存在しないことから、HD-1株の n-TD 代謝に由来する不飽和化合物が抽出液中に存在し、反応後 30 分でその生

成量が最大となることが判った。よって以後の実験では反応時間 30 分の抽出液 R-30 を用いることにした。

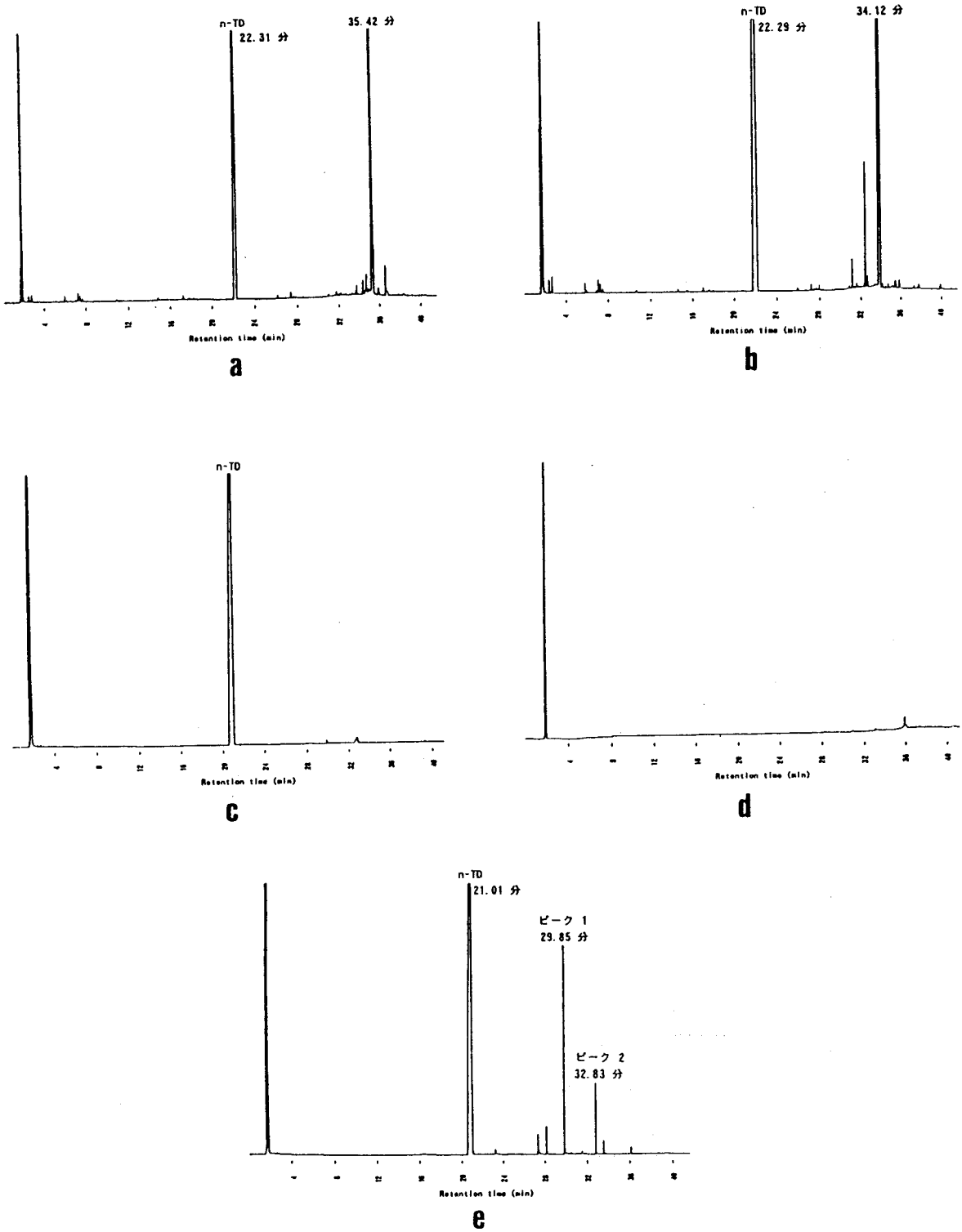


図5－2．塩化ヨウ素(ICl)誘導体の GC による分析.
a; 1 テトラデセン ICl誘導体。b; トランス 7 テトラデセン ICl誘導体。c; n-テトラデカン ICl誘導体。d; HD-1菌体を ICl誘導体化したもの（コントロール B)。
e; R-30 ICl誘導体。

5.3.1.4. 塩化ヨウ素誘導体のガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) による分析

GC により検出された R-30 サンプルの四塩化炭素抽出液のピークについて、電子衝撃イオン化法 (EI)および 化学イオン化法 (CI) により質量分析を行った。まず 1-テトラデセン及びトランス-7-テトラデセンの標準品の誘導体と n-TD 標準品を用いて分析を行った。

[EI 法による分析]

二つの標準品の誘導体の分析結果 (図5－3(a,b)) から、塩化ヨウ素誘導体は EI 法による分析に対して非常に不安定で、分子イオンピークの検出が難しいことが分かった。しかし、これらのフラグメントピークを n-TD を処理した場合 図5－3(c) のものと比較すると、フラグメントピークはそれぞれ 2 ずつ小さくなることがわかった。これは付加したハロゲンが熱電子線により脱離することに起因すると考えられ、結果として飽和炭化水素より水素原子二つ分少ないフラグメントが出現することになったものと思われる。これらの分析結果を参考にして R-30 の誘導体を解析した (図5－3 (d,e))。標準品の場合と同様に分子イオンピークが存在しなかったが、上で述べたフラグメントイオンの特徴から GC のチャート 図5－2(e) におけるピーク 1 およびピーク 2 は不飽和炭化水素の誘導体であることが示唆された。

[CI 法による分析]

分析センターの GC-MS により分析を行った。条件は EI 法と同様である。標準品の誘導体の分析結果から、炭化水素－塩化ヨウ素誘導体が GC 分析時に加わる熱に対して不安定であることが分かった。また -I あるいは -Cl のいずれか一方が脱離したフラグメントがかなりの強度で検出されることがわかった。図5－4には R-30 の誘導体の分析結果を示した。トータルイオンクロマトグラム (TIC) のピーク 1 およびピーク 2 は 図5－2 (e) の GC のピークと対応している。この二つのピークのマススペクトルを解析すると、分子イオンピークはやはり検出されなかったが、275 と 241 のマスピークにハロゲン存在を示す特徴が見出された。すなわち、275 には塩素の存在を示す +2 の同位体ピークを伴っており、さらにそこから塩素が脱離したピークが 241 と考えられた。しかしこれらのフラグメントピークからの情報では構造決定は困難であった。

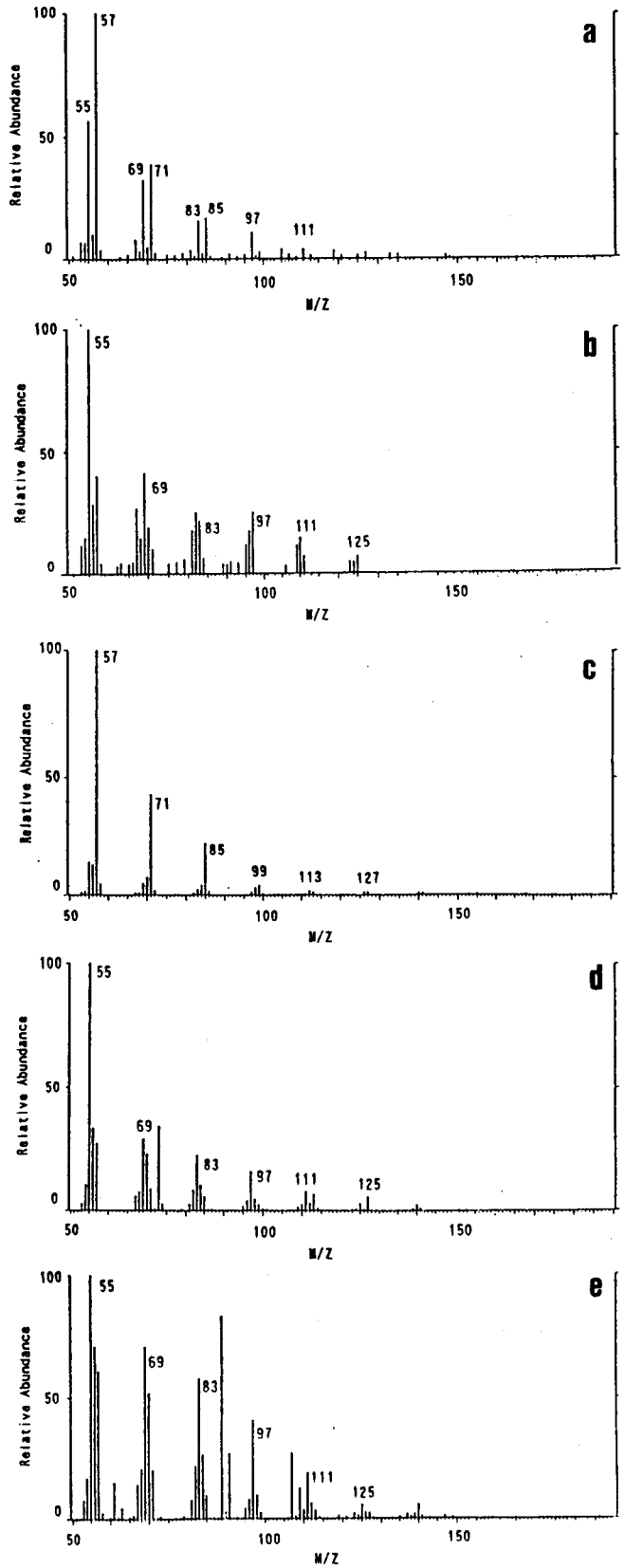


図５－３．ICl誘導体の GC-MS (EI) による分析.

a; 1-テトラデセン ICl誘導体。b; トランス-7-テトラデセン ICl誘導体。c; n-テトラデカン ICl誘導体。d; R-30 ICl誘導体（ピーク1)。e; R-30 ICl誘導体（ピーク2)。

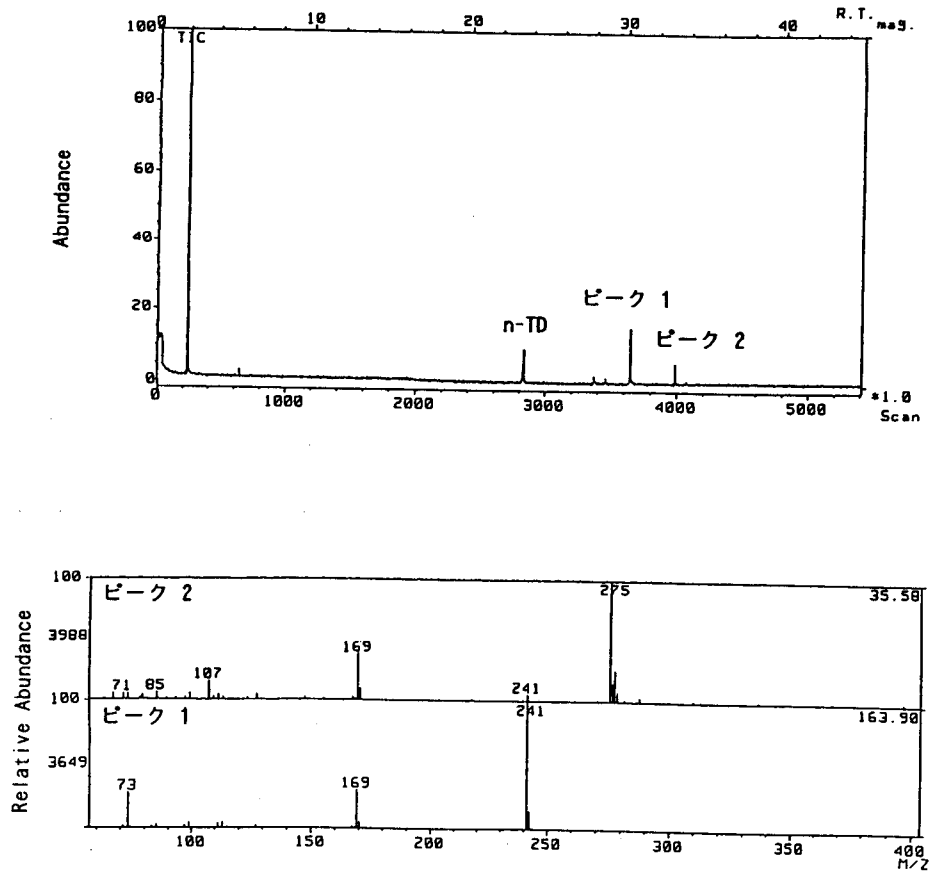


図５－４．R-30 ICl誘導体の GC-MS (CI) による分析.
上段はトータルイオンクロマトグラム(TIC)、下段は各ピークのマススペクトル。

5.3.1.5. プロトン核磁気共鳴法（^{1}H-NMR）による塩化ヨウ素誘導体の分析

R-30 塩化ヨウ素誘導体の分析結果を示したのが（図５－５）である。各々のピークの化学シフト(117)から -I のメチレンプロトン（3.1~3.2 ppm）と -I のメチンプロトン（4.2~4.3 ppm）および -Cl のメチレンプロトン（3.4~3.5 ppm）が存在した。-I および -Cl のメチレンプロトンの存在から 1 位に不飽和結合が存在することが予想された。また 5 ppm 付近にもピークが存在していることから、-I 及び -Cl が付加した炭素は隣合うものであることもわかった。以上のことから R-30 の抽出液中に 1 位に不飽和結合を有する不飽和炭化水素が存在していることが判った。

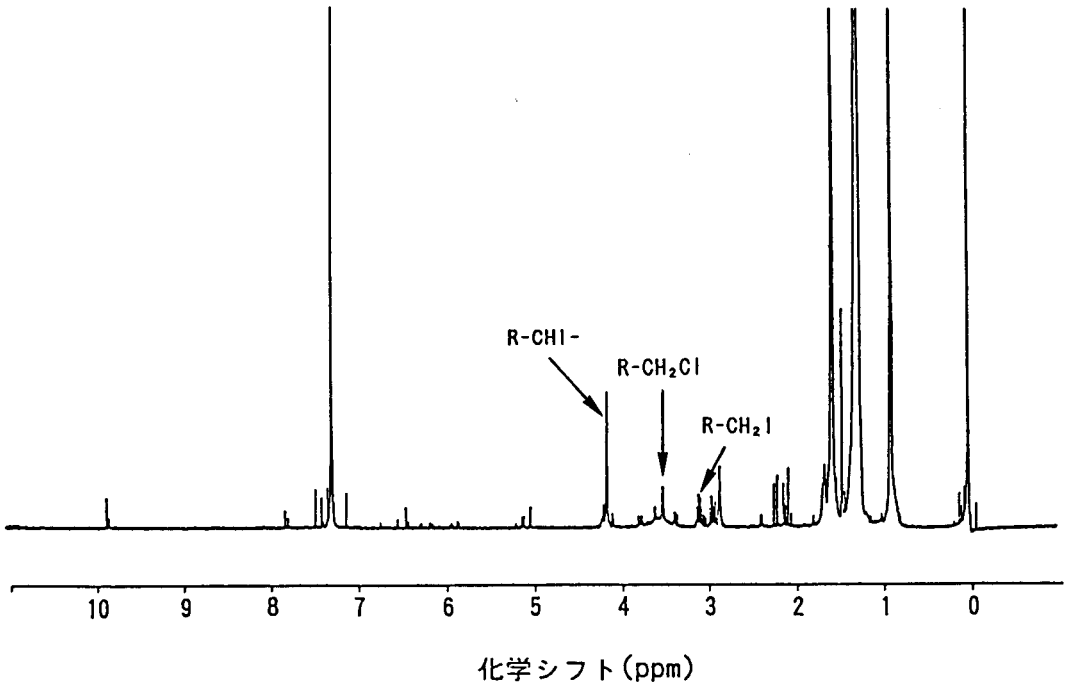


図５－５．R-30 ICl誘導体の ^{1}H-NMR による分析.
化学シフトの帰属を図中に示した。

5.3.1.6. トリメチルシリロキシ（OTMS）誘導体による構造解析

反応抽出液を塩化ヨウ素誘導体にすることにより末端不飽和炭化水素の存在まで明らかとなった。次に不飽和結合を OTMS 化することにより、さらに詳細な構造解析を進めた。炭化水素の OTMS 誘導体は GC-MS, EI 法で分析を行うと OTMS 化した炭素間で主に開裂が起こりフラグメント化する。この性質を利用して得られたフラグメントイオンの質量数から不飽和結合の位置と全体の分子量を推定することができる(116)。

[GC-MS, EI 法による分析]

マススペクトルの結果を 図５－６ に示した。OTMS を含むフラグメントピーク M/Z=103 および 243 が確認され、対象物質の構造は 1-ドデセン であることが強く示唆された。しかしこのマススペクトルの結果だけからでは 1-ウンデカノールの可能性も残される。これらを結論付けるためにこの誘導体の分子量を検出することが有効と思われた。そ

こで、GC-MS, CI 法による測定を行ったが試料が少ないためか、分子イオンピークは検出できなかった。一方、1-ドデセンを OTMS 誘導体にしたものについて行った分析結果（GC-MS, EI法）が 図５－６ と類似のものであることは別途確認した（図５－７）。

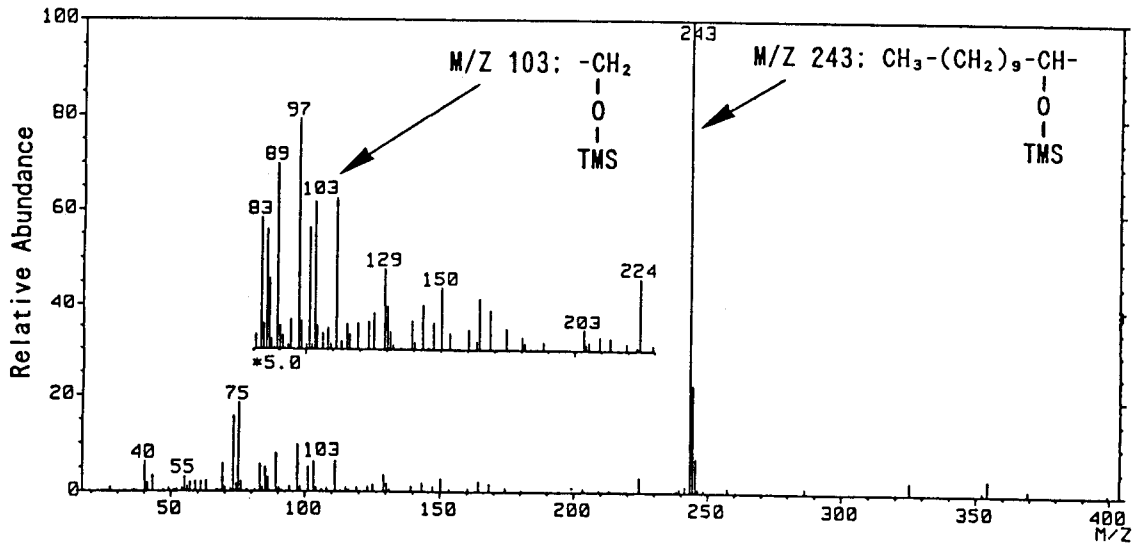


図５－６．R-30 OTMS誘導体の GC-MS（EI）による分析.

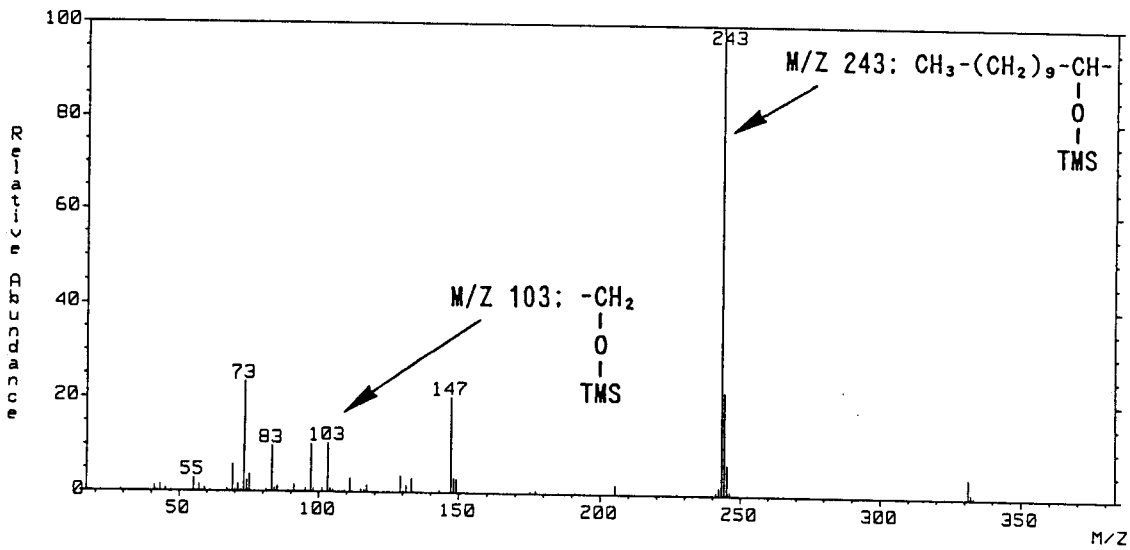


図５－７．1-ドデセン OTMS誘導体の GC-MS（EI）による分析.

5.3.1.7. 1-ドデセン標準品との比較による n-TD 由来代謝中間体の同定

最終的に、1-ドデセン標準品を塩化ヨウ素誘導体とし GC 分析における保持時間を R-30の誘導体と比較することで R-30 抽出液に認められた中間体の同定を行うことにした。結果を 図5－8 に示した。R-30 抽出液の場合、内部標準の n-TD との差がピーク 1 で 8.84 分、ピーク 2 で 11.82 分であった（図5－2（e））。1-ドデセンの場合は 8.88 分であることから R-30 の誘導体のピーク 1 は 1-ドデセンの誘導体であると考えられる。よって R-30 の抽出液中に存在する n-TD 由来代謝中間体の一方（ピーク 1）は 1-ドデセンであると決定された。

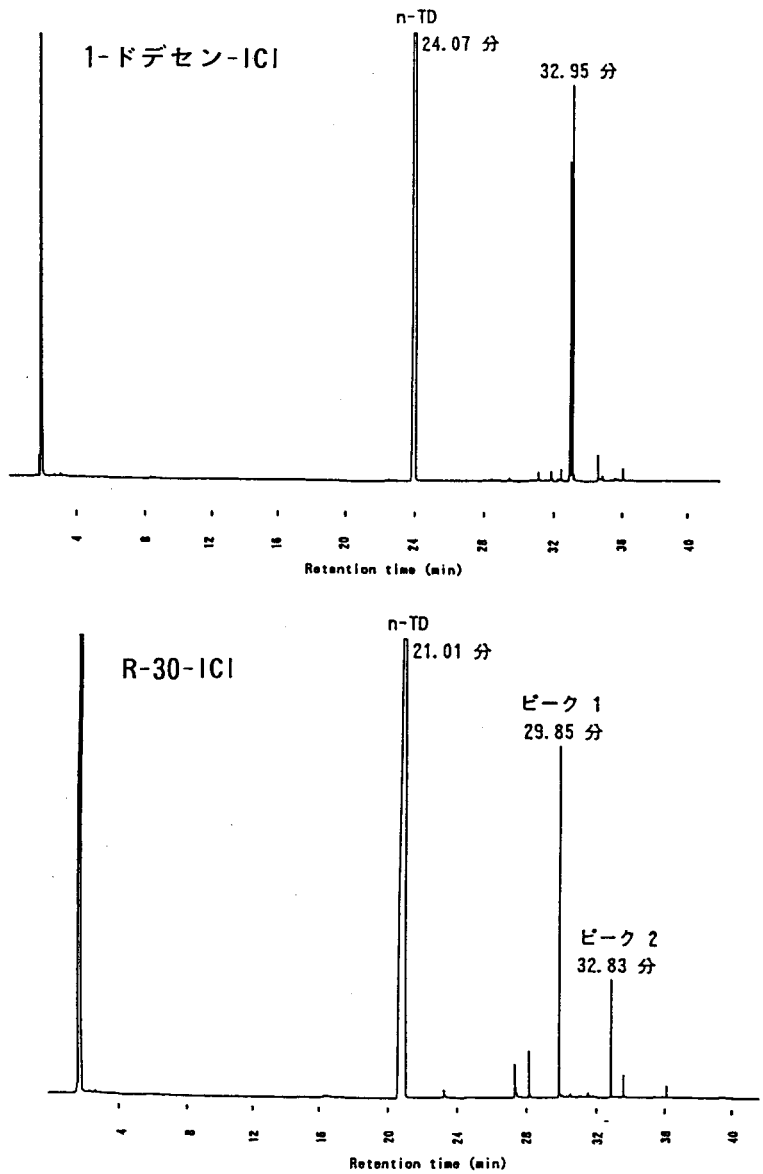


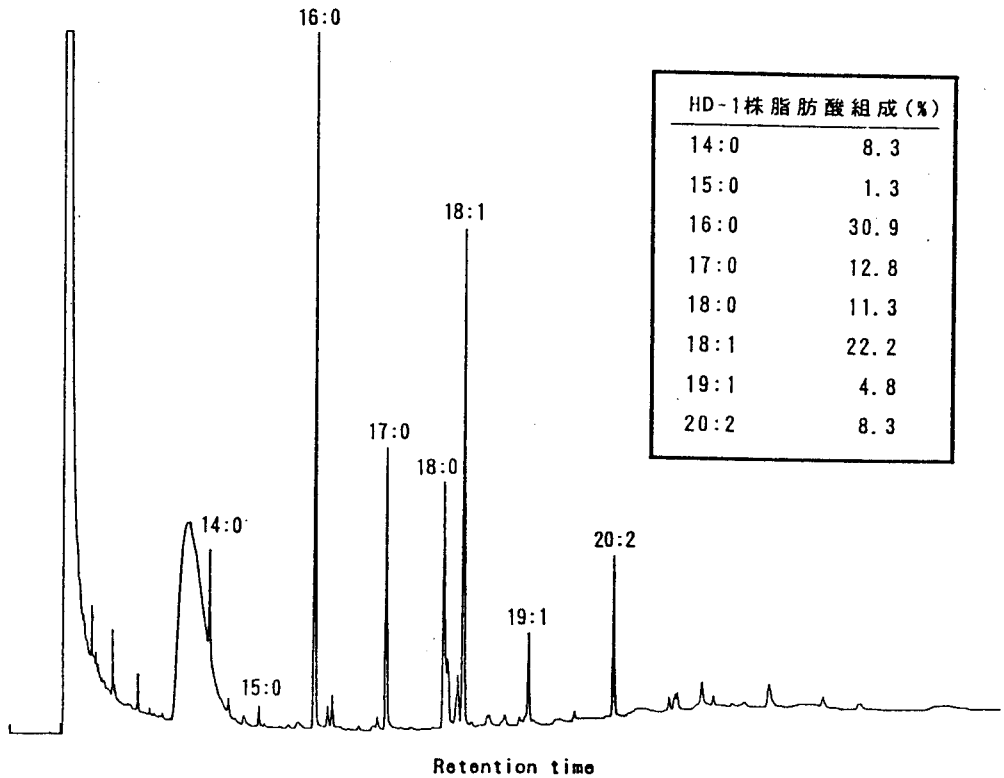
図5－8. R-30 ICl誘導体と 1-ドデセン ICl誘導体の GC 分析比較.
内部標準として、n-TD を添加した。

5.3.2. HD-1 株による CO_2 固定と石油生産

CO_2 を単一炭素源として培養した HD-1 株由来疎水性画分の分析を以下のように行った。

5.3.2.1 脂肪酸組成分析（GC）

脂肪酸メチルエステルについて、GC 分析を行った（図５－９）。おのおの、溶出時間を標準品（スタンダード）と比較してそれぞれのピークを同定した。その結果、パルミチン酸（C16）と ステアリン酸（C18）が比較的多く含まれていることが分かった。これは、細菌の一般的な傾向と一致した(118)。

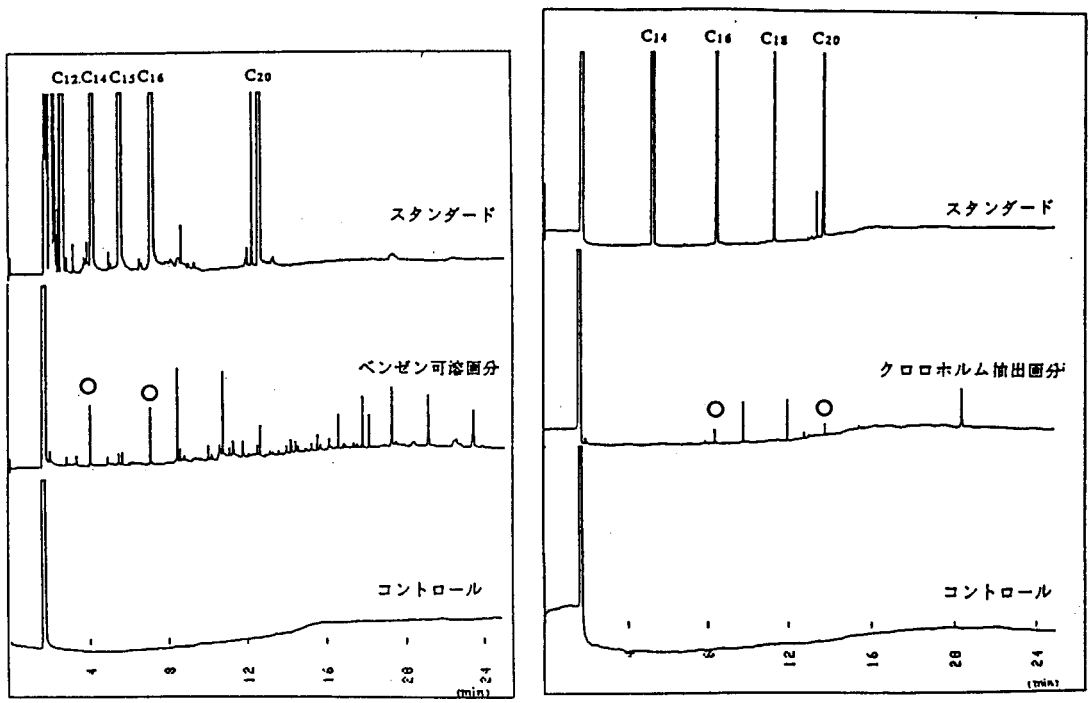


HD-1株脂肪酸組成(%)	
14:0	8.3
15:0	1.3
16:0	30.9
17:0	12.8
18:0	11.3
18:1	22.2
19:1	4.8
20:2	8.3

図５－９．HD-1株脂肪酸メチルエステルの GC 分析と脂肪酸組成.

5.3.2.2 炭化水素の分析（GC および GC-MS）

クロロホルムで抽出された成分を GC により分析した結果を 図５－１０ に示した。Run 1 では、さらにベンゼンによる分画を行い、ベンゼン可溶性および不溶性のものに分けて分析をおこなった。スタンダードとの比較からピーク 1 ~ 3 がパラフィン類の可能性が示唆された。



Run 1　　Run 2

図５－１０．クロロホルム抽出画分の GC 分析.
Run 1 では クロロホルム抽出の後、ベンゼンによる分画を行った。
Run 2 では クロロホルム抽出のみ行った。
スタンダードは C12; ドデカン、C14; テトラデカン、C15; ペンタデカン、C16; ヘキサデカン、C20; エイコサンを用いた。コントロールは抽出に用いたクロロホルムを同量濃縮したもの。

それぞれ GC-MS により構造を解析した結果、パルミチン酸（Scan no. 1477）以外にヘキサデカン（Scan no. 907）およびテトラデカン（Scan no. 502）が検出された（図５－１１)。また、そのフラグメントピークの分布が滑らかであることから直鎖アルカンと予想した。

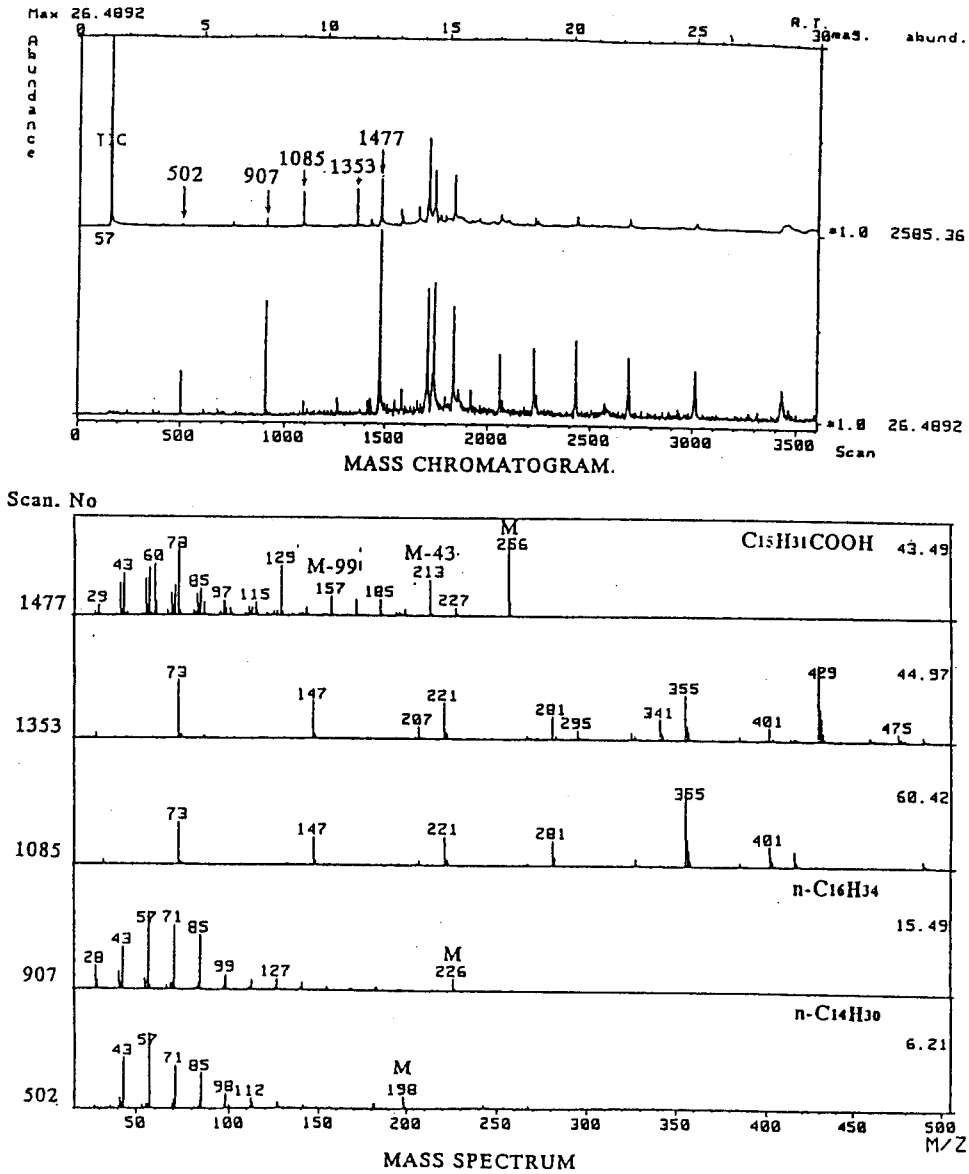


図５－１１．クロロホルム抽出画分（Ｒｕｎ１）の GC-MS（EI）分析.
クロロホルム抽出画分のうちベンゼン可溶性成分を分析した。上段に TIC と マスクロマトグラムによるブチル基(M/Z=57)の抽出、下段にはいくつかの成分(マスクロマトグラム)のマススペクトル分析結果を示した。

Run. 2 の場合、ステアリン酸（Scan no. 1730）パルミチン酸（Scan no. 1470）以外にヘキサデカン（Scan no. 910）や エイコサジエン（Scan no. 1833）が検出された（図５－１２）。これらはいずれも溶媒（クロロホルム）中の不純物ではなく（図５－１０ コントロールではピークなし）HD-1 菌体由来であることは明らかである。

以上の結果、Pseudomonas anaerooleophila HD-1 は CO_2 を 石油成分である直鎖アルカンおよびアルケンを細胞内に固定する能力があることが確認された。

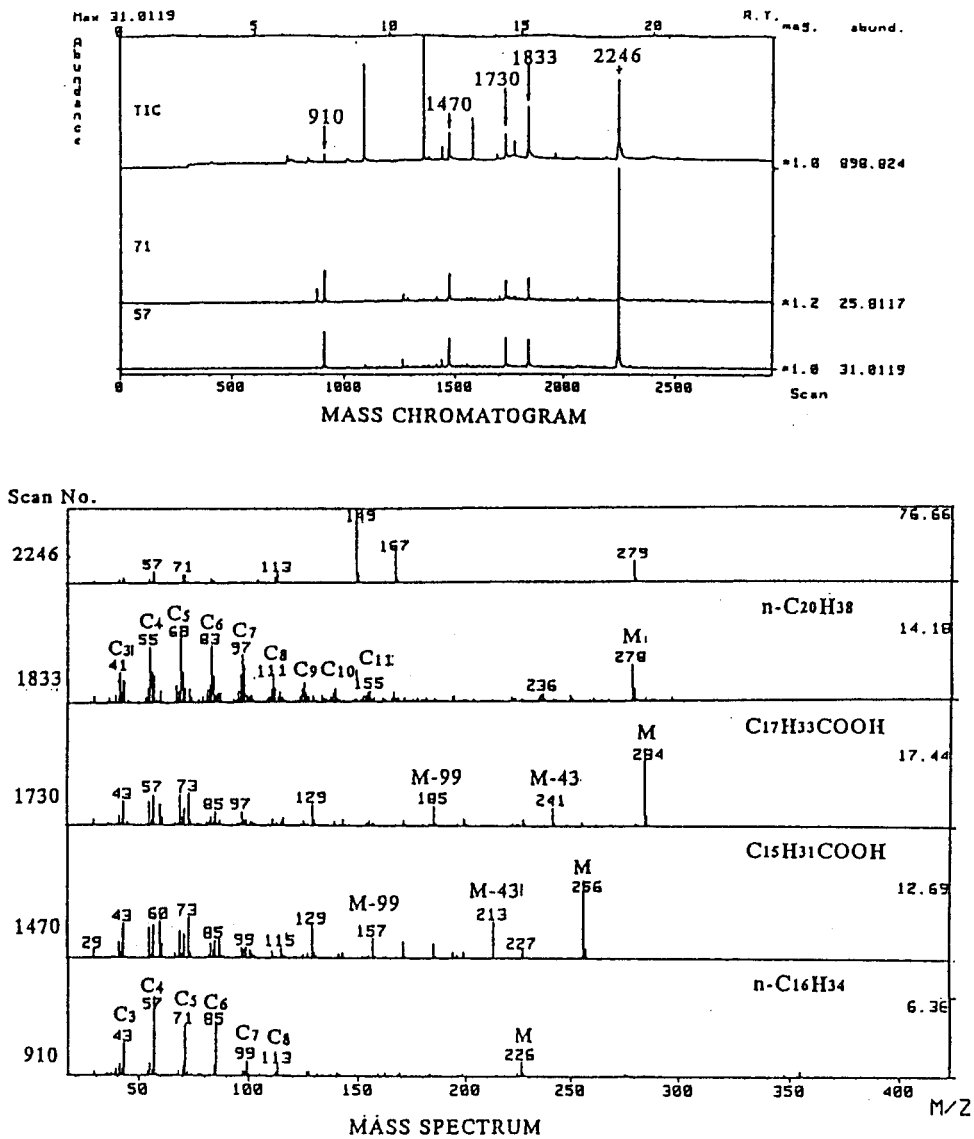


図５－１２．クロロホルム抽出画分（Ｒｕｎ２）の GC-MS（EI）分析.
上段に TIC と マスクロマトグラムによるブチル基(M/Z 57)およびペンチル基(M/Z=71)の抽出、下段にはいくつかの成分(マスクロマトグラム)のマススペクトル分析結果を示した。

第4節　考察

1. FT-IR 分析について

反応抽出液で特徴的であった 1,000cm^{-1}の吸収は、不飽和炭化水素においてもっとも特徴的に得られるものであり、強い強度で検出される。その他の吸収が検出できなかったのは、反応抽出液に占める生成物の量が少なかった事が原因であると考えられ、その結果 1,000cm^{-1}の強い吸収しか検出できなかったものと考えられる。

2. 反応抽出液の GC 分析について

n-TD 由来代謝中間体として 1-ドデセンを同定したが、その標準品について GC 分析を行うと n-TD と明らかに異なった位置（11分付近）にピークが検出される（データ示さず）。

反応抽出液 R-30 の GC 分析 では、11分付近にピークは全く検出されなかった（データ示さず）。 抽出液を希釈せずに分析したときには小さなピークが無数に検出されていたことから生成物のピークがノイズピークと重なっていた可能性が高い。すなわち、生成量が少ないためにピークが小さく GC により直接確認できなかったと考えられる。

3. 塩化ヨウ素誘導体について

炭化水素の塩化ヨウ素誘導体は、炭素鎖長の増加と不飽和結合の内部から末端への移行の 2 つの要因により保持時間が長くなることが 3 つの不飽和炭化水素標準品の誘導体の分析から確認された。最終的に図５－２(e) ピーク 1 は 1-ドデセンと同定された。一方、ピーク 2 は不飽和炭化水素であることはわかっている（図５－３(e))。今回ピーク 1 として検出された 1-ドデセンは基質として用いた n-TD に比べてメチレン鎖が 2 つ短くなっている。代謝経路を推定した場合、この前段階と思われるメチレン鎖が 1 つ短いトリデセンの存在が考えられるが、トリデセン塩化ヨウ素誘導体の GC 溶出位置は ピーク 2 と異なっており、むしろトランス-7-テトラデセンと一致した。また結果には示さなかったが、R-15 の抽出液の誘導体中にもピーク 1, 2 に相当するピークがそれぞれ存在していた。その GC ピーク面積を 表５－１ に示した。R-15 の場合には相対的にピーク 2 の生成量が多かった。また、ピーク 2 の溶出位置は ピーク 1 よりも後（炭素鎖長が長いと

予想される）であることからも、1-ドデセンよりも n-TD に近い（代謝初期）物質であることを強く示唆している。残念ながら塩化ヨウ素誘導体が GC や GC-MS の分析に対し不安定であるため、量的に少なかったピーク 2 の炭素鎖長の決定までは到らなかった。

表５－１．R-15 と R-30 の誘導体の GC 分析におけるピーク 1，2 の占める面積値

	ピーク 1	ピーク 2
R-15-ICl	209	248
R-30-ICl	13917	4342

4. OTMS 誘導体について

不飽和結合の位置を決定する際、OTMS 誘導体の GC-MS, EI 法による分析が実際に有効な手段であった。R-30 誘導体の分析において、M/Z 103 のフラグメントはかなり小さかった。この傾向は 1-ドデセンでも同じであり、M/Z 243 の同位体ピークと 103 のピークの強度比から考えても M/Z 103 をフラグメントの一方と考えることは妥当である。

5. HD-1 株クロロホルム抽出画分の構造解析

多くの微生物が微量のn-アルカンを生産する能力を有することが既に報告されている(118)。しかしながら HD-1 株は油田より分離した細菌であり、しかも CO_2 を単一炭素源として生育可能である。今回 HD-1 株のクロロホルム抽出画分中にも n-アルカン（n-テトラデカン、n-ヘキサデカンなど）が検出されたことは極めて興味深い。HD-1 株の代謝経路については【総括と展望】の中で詳細に議論する。

第５節　要約

前章で分離された嫌気的炭化水素分解菌 Pseudomonas anaerooleophila HD-1 の代謝経路を明らかにする目的で、典型的な脂肪族炭化水素のひとつである n-TD を基質として選び HD-1 菌体と 37℃ 無酸素条件下（$CO_2/H_2/N_2$=5:5:90）で一時間接触させた。反応開始後、15 分、30 分、60 分の試料を IR 分析したところ、不飽和結合の存在が示唆された。

そこで、塩化ヨウ素誘導化反応を行った後 GC において n-TD 以外に 2 つのピーク(成分)が検出された。また GC-MS 分析の結果からはこれらはいずれも不飽和炭化水素であることが予想された。さらに ^{1}H-NMR 分析したところ、末端(一位の位置)に不飽和結合を有する炭化水素の存在が確認されたがその鎖長は不明であった。そこで、トリメチルシリロキシ誘導体を調製して GC-MS 分析を行ったところ n-TD 代謝中間体のひとつは 1-ドデセンであることが判明した。以上の結果、HD-1 株は確かに嫌気条件下において脂肪族炭化水素を分解代謝していることが確認され、その代謝中間体の構造が決定できた。

一方、油田より分離された HD-1 株は基本的に CO_2 を単一炭素源として生育することができる。また、細胞中に疎水性物質を著量蓄積することが既に確認されている(前章)。そこで、CO_2 を単一炭素源として生育した HD-1 株からクロロホルムで抽出される成分を GC-MS で分析したところ、脂肪酸以外に テトラデカン、ヘキサデカン、エイコサジエンなどの脂肪族炭化水素が検出された。このことから HD-1 株は石油を分解するだけではなく、CO_2 から石油成分である炭化水素を生産する能力を有することが判明した。

総括と展望

本論文では、静岡県の油田に分布する細菌による石油代謝に関する研究を進めた。その中で得られた主な成果は次の通りに要約される。先ず石油を代謝する細菌がその取り込みを効率よく行う目的で細胞外に生産するバイオサーファクタント(ＢＳ)を研究対象とし、特に活性の高いＢＳを生産する細菌を油田土壌からスクリーニングしてその産物の化学構造を決定した。またＢＳの構造-活性相関および生合成遺伝子の一部についても検討を加えた。その中でアミノ酸発酵などの分野でも有用な菌群である Arthrobacter属細菌の宿主-ベクター系を構築した。続いて、細菌による石油分解のうち、極めて報告例の少ない嫌気条件下における脂肪族炭化水素分解について検討した。その結果、嫌気(無酸素)条件下で脂肪族および芳香族炭化水素を分解する Pseudomonas属細菌 HD-1 を分離してその代謝中間体の構造を決定した。さらに HD-1 株が炭化水素を分解するばかりではなく CO_2 を固定して脂肪族炭化水素を生成する能力を持っていることを明らかにした。以下、各章ごとにその総括を述べる。

【第１章】は、石油を代謝する微生物の多くが疎水性物質(石油成分など)の分散および乳化を促進して細胞内への取り込みを容易にする目的で菌体外あるいは菌体表面に生産する界面活性剤すなわちバイオサーファクタント(ＢＳ)に関する研究であり、まず油田土壌からＢＳ生産菌を分離し（3種）その同定を行った。その結果、それぞれ Bacillus pumilus A-1、B. subtilis B-1、および Arthrobacter sp. MIS38 と同定された。次にＢＳがミセルを形成する特性を利用して限外濾過膜で濃縮後、薄層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィーを用いてそれぞれの菌が生産するＢＳを分離・精製した。さらに、ＢＳの構造解析を種々の分析装置を用いて行った。A-1 株と B-1 株の生産するＢＳはいずれも既に有馬、柿沼らにより報告された、サーファクチン（ＳＦ）と同じ構造であることが判明した。一方、MIS38 株が生産するＢＳは新規の構造を有していたためこれをアルスロファクチン（ＡＦ）と命名した。ＡＦは環状リポペプチドであり、直接エドマン分解法では構成アミノ酸配列の決定や環状構造の位置決定は不可能であったが、この問題については質量分析法を駆使することにより解決できた。また、ＦＬＥＣ試薬による誘導化反応とカラ

ムクロマトグラフィーにより構成アミノ酸の光学異性についても全て決定した。

【第２章】では、ＢＳの構造－活性相関を解明する目的で構造の類似した ＡＦとＳＦの活性を比較した。まず、界面活性を従来法に基づき表面張力測定により評価した。その結果、ＡＦの限界ミセル濃度（ＣＭＣ）は1×10^{-5}（M）であり、これまでリポペプチド形ＢＳでは最も強力と言われているＳＦ（ＣＭＣ＝7×10^{-5}（M））のさらに約７倍の比活性を有することが判明した。次に、ＢＳ活性のひとつである油膜排除活性を極微量で評価できる系を開発した。この方法により評価したＡＦの活性はＳＦに比べて約２倍高かった。次に、化学修飾法によりＳＦのアミノ酸の側鎖を変化させた。ＡＦとＳＦに共通して２残基存在するアスパラギン酸あるいはグルタミン酸の負荷電を消去（カルボキシル基のメチル化あるいはアミド化）したところ、水溶性は低下したものの、油膜排除活性はそれぞれ１．２倍程度（オイル排除活性）に上昇した。これは電荷の反発が解除されたためにミセル形成が容易になったためと説明された。一方、ラクトン環を開いて線状にしたＡＦおよびＳＦはいずれも、元の活性に比べて 1/3 程度まで低下していた。このことから環状構造がリポペプチド型ＢＳの高い界面活性に重要であることが明らかとなった。

【第３章】では、ＢＳ生産菌の形質転換系構築ならびにＢＳ生産に関わる遺伝子のクローニングを試みた。当研究室では幸い Bacillus 属細菌に関する研究の歴史は長く、好熱菌 B. stearothermophilus の形質転換系を世界に先駆けて構築するなど、Bacillus 属細菌の宿主-ベクター系も充実している。そこで先ず、B. pumilus A-1 株について宿主-ベクター系を検討したところ、ベクター（pC194, Cm^r）を用いたエレクトロポレーション法により形質転換可能であることを確認した。そこで、化学突然変異剤（NTG）処理により数株のＳＦ非生産株（SF^-）を取得した後、これらを宿主として、A-1 株染色体からサーファクチン生産に必須の遺伝子 psf-1 をセルフクローニングした。興味深いことに、psf-1 を B. subtilis 標準株 MI113 株（SF^-）に導入したところＳＦ生産性が付与された。一方、別の SF^- 突然変異株を宿主としたショットガンクローニングによりＳＦ生産に関与する遺伝子として comA' が関与していることが確認された。塩基配列を比較した結果、comA' は B. subtilis において DNA 取り込み能に関する遺伝子の一つとして知られているレギュレーター遺伝子 comA のホモログ（67.7%の相同性を有する）であると考えられた。別のグループにより comA が B. subtilis のＳＦ生産に関与していることが

報告されていることから、B. subtilis と B. pumilus のＳＦ生産制御系は同様であることが示唆された。しかしながら、comA' 上流に存在するセンサータンパク質をコードする comP' 遺伝子領域をクローニングしてその塩基配列を B. subtilis 由来の comP と比較した結果、Ｎ末端（細胞膜貫通領域）の一部分が欠失していることが判明した。

B. pumilus A-1 は栄養源の豊富な培地（Ｌ）において、固形培地を使った場合はＳＦを生産するが、液体培地を使った場合はＳＦを生産しなかった。ComP タンパク質が培地（特に窒素源）の枯渇をセンシングして自己リン酸化後、そのリン酸基を受け取って活性型となった ComA タンパク質が種々の遺伝子発現を制御していると予想されていることとも考え合わせると、B. pumilus A-1 で欠落している ComP Ｎ末端領域部分が外界のシグナルを高感度でセンシングする際に重要であることが推定された。この点に関する生化学的な研究は今後の課題である。一方、ＡＦ生産株（MIS38）が属する Arthrobacter 属細菌においては、アミノ酸発酵など工業的に利用されているにも拘わらずこれまでに有効な宿主－ベクター系がなかった。そこで、 Arthrobacter の近縁種である Brevibacterium 属細菌の形質転換系の応用を試みたところ、エレクトロポレーション法により形質転換可能であることを見い出し、その最適条件を決定した。

【第４章】においては、細菌により嫌気条件下における石油分解が可能なことを明らかにした。まず、油田土壌から嫌気条件($CO_2/H_2/N_2$=5:5:90)で石油を唯一炭素源とした環境下で生育する細菌 Pseudomonas anaerooleophila HD-1 を分離した。本菌の増殖は極めて遅かったが（世代時間約４０時間）好気条件下及び嫌気条件下いずれにおいても石油成分（脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素）を代謝(親水性物質に変換）することが証明された。無酸素条件下における芳香族炭化水素分解に関してはこれまでにいくつか報告があるが脂肪族炭化水素も分解できる菌はこれが初めてである。

【第５章】では、HD-1 株の嫌気的石油分解反応についてさらに詳しく調べた。すなわち、n-TD 由来の嫌気的代謝中間体として不飽和炭化水素が 2 種類存在することを明らかとした。この内の主成分について各種誘導体（-ICl, -OTMS)を調製することにより機器分析を容易にし、その構造を 1-ドデセンと決定した。このことから石油を嫌気的に酸化分解する代謝経路の存在が改めて確認された。すなわち第４章で、炭化水素による増殖促進効果や電子顕微鏡観察による炭化水素の細胞内への取り込みおよび親水性画分の増加など、

いわゆる状況証拠により HD-1 株の炭化水素資化能力が確認されていたところに、具体的な証拠が加えられたことになる。このことは細菌による炭化水素の嫌気的酸化分解経路を解明するうえで非常に重要な意味をもつものであり、代謝中間体である不飽和炭化水素の存在は示唆することが多い。第５章の緒言でも述べたがこれまでに n-アルカンの嫌気的分解で代謝中間体の構造決定まで行った例はない。

一方、HD-1 株が CO_2 を単一炭素源（H_2 存在下）として生育することができ、その細胞内疎水性物質含量が高いことが既に確認されていた。そこで、細胞内疎水性物質の中に炭化水素（石油成分）が含まれているかについて分析した。その結果、実際石油成分であるn-アルカン（テトラデカン、ヘキサデカン、エイコサジエンなど）の蓄積が確認された。これは HD-1 株が CO_2 を炭化水素として細胞内に固定できることを示している。

以上の結果をまとめると、本菌は基本的には炭素源として CO_2 のみで生育可能であるが石油が大量に存在する場合には酸素条件下および無酸素条件下いずれの環境下においてもこれを分解利用し、石油が枯渇した条件下では、逆に CO_2 から石油を生産する能力を有する菌であることが判明した。

次に本研究で得られた成果と関連する情報をもとに、HD-1 株による脂肪族炭化水素の嫌気的酸化分解経路を考察した後、今後の展望について触れたい。

通常、好気条件であれ嫌気条件であれ炭化水素の分解過程ではアルコール、アルデヒド(例外的にケトン)から脂肪酸の生成を経た後、それに続くβ酸化経路の関与が予想される(17)。HD-1 株においても炭化水素の一部はこの経路で代謝されている可能性がある。しかしβ酸化で分解された場合、テトラデカン（n-TD）代謝中間体として 1-ドデセン の存在はあり得ない。そこでアルデヒドからアルケンへ至る経路として脱カルボニル化反応をここでは想定した。HD-1 株が CO_2 固定により一部の産物として炭化水素を合成していることを既に明らかにした。緑藻類（Botryococcus属）による炭化水素合成の最終段階はアルデヒドの脱カルボニル化反応であることが示されており、その反応に関与するデカルボニラーゼも部分精製されその活性中心にはコバルトポルフィリンが存在することまで明らかとなっている(119,120)。HD-1 株においても CO_2 から脂肪酸およびアルデヒドを経て炭化水素が合成されているものと予想され、このデカルボニラーゼが HD-1 株においても

存在することはほぼ間違いない。よってこのデカルボニラーゼがアルカンからアルケンへの脱水素反応を触媒するデヒドロゲナーゼと代謝経路で連携しており、この炭化水素分解経路での重要な酵素となっていると考えれば、アルカンがこの分解サイクルを一回転するごとに炭素数が 1 つずつ短くなっていくことが説明される（図 1 参照）。

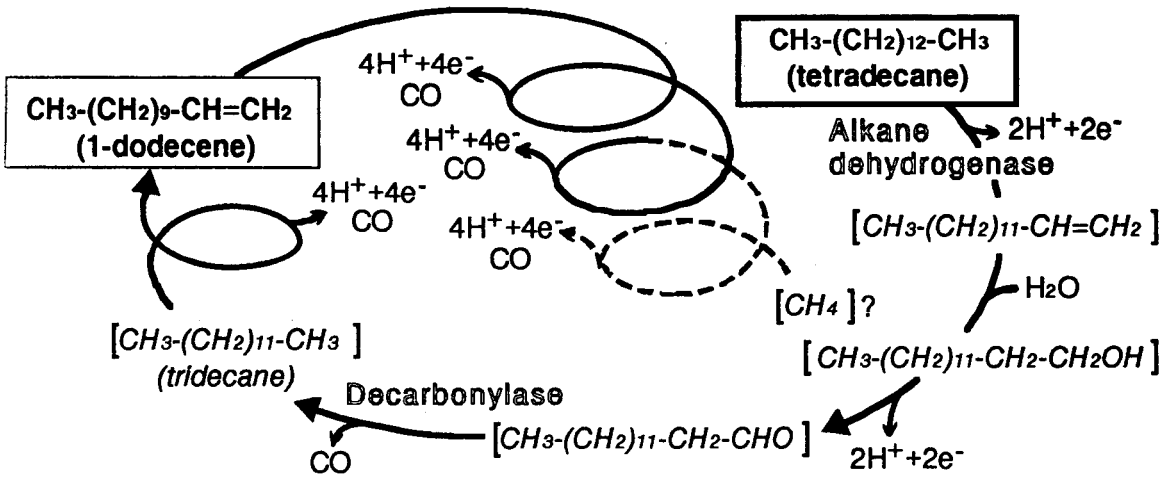


図 1. HD-1 株で予想される嫌気的アルカン代謝経路.
[ ]内は未同定化合物

しかしこの分解サイクルでは TCA サイクル等は回転せず ATP 等の生成は考えられない。HD-1 の石油分解培養では炭素源としては CO_2 と n-TD が存在していることになるが、CO_2 が HD-1 株の生育に必須であることを考えると基本的に生育に必要な因子は n-TD の分解サイクルにより供給されてはいないと考えるのが自然である。ではこの分解サイクルの存在意義は何であろうか。1 回転の分解サイクルにつき 4 分子の H と 1 分子の CO が生成し、1 分子の H_2O が消費される。ここで H^+ に注目すると HD-1 株がその生育に H_2 を要求することが浮かび上がってくる。n-TD を添加することで増殖が促進されたことから、ガス状の H_2 に比べてこの分解サイクルを利用して H ($H^+ + e^-$)を獲得するほうが細胞にとって有利であることが予想される。よってこの分解サイクルの存在意義は還元力の供給と考えることができる。このことを実証するためには今後、水素を含まない混合ガ

ス（ N_2 と CO_2 ）通気下で BM + n-TD において HD-1 株が増殖するかなどさらに研究を進める必要がある。またこの分解サイクルが進むと最終的にはメタンが生成すると考えられるが、以前混合ガス通気下で培養中に発生するガスを集めて分析したところメタンは検出されなかった。この培養系では n-TD が過剰に存在していることから、完全分解する必要がないためにメタンが発生しなかったのかも知れない。今後ピーク 2 の不飽和炭化水素の同定を含め、さらに多くの代謝中間体の構造決定すること以外に、本代謝経路に特徴的なデヒドロゲナーゼとデカルボニラーゼを精製してその特性を明らかにすれば、細菌の嫌気的石油代謝経路がより明解になるであろう。

最近、地球環境の維持改善が人類の最重要課題のひとつとして各方面で取り上げられている。そのひとつに石油による海洋汚染の問題がある。石油は地球の極めて偏った地域に埋蔵されているため、非産油国はタンカーを使って輸入に頼るしか方法がない。そのため座礁などによって毎年その 0.1 % もの石油が海洋に流出していると言われている。実際、タンカー事故や恣意的に海洋へ投棄された原油により油まみれになって死滅した海鳥などの映像が報道される機会が最近特に多い。これは油による海洋汚染がひとつの大きな地球環境問題として認識されるようになったためと思われる。もうひとつの重要な環境問題は人工的な CO_2 排出(火力発電、自動車、各種産業活動)による地球温暖化現象である。現在人間活動により排出される CO_2 の約 3 割が火力発電所から放出されている。全ての火力発電が原子力発電に転換されればこの問題は一挙に解決される。しかし、原子力発電は実用化に際してはいまだ検討事項が数多く残されているのが現状であり、日本ではつい最近、『もんじゅ』が稼働し始めたものの欧米では安全性の問題からプルトニウムを燃料とする高速増殖炉の実用化は現在のところ見送られている。発電方法がすべて原子力に依存するまでには当初の予想を大幅に上回る時間を要するものと思われる。そこで現在、CO_2 を大気中から回収固定する方法が、物理(ドライアイスにして海底に沈める,121)、化学(触媒により還元する,122)、生物(光合成反応により還元する,123)などそれぞれの立場から研究が進められている。

本研究で油田から分離された嫌気的石油分解能力を有する HD-1 株は、嫌気条件下において、地球温暖化現象の主要因である CO_2 を大気中から回収固定し、さらに都合の良い

ことにエネルギー資源として再利用可能な石油成分を生産する能力を有することが明らかとなった。これは上記 2 つの環境問題に大きく貢献できる可能性があると共にいまだ結論の出ていない石油成因説に新たな視点を加えることができる。本菌は光エネルギーを必要としない（H_2 を利用する）で CO_2 を固定するため膨大な表面積も必要とせず、培養装置のスケールアップが比較的容易であると予想される。石油成分の生産能力はいまのところ乾燥菌体重量当たりわずか 0.5 % 程度であるがさらに活性の高い菌をスクリーニングするかあるいは遺伝的手法など種々の育種法により HD-1 株の石油代謝能力(分解・生成)を目的に応じて強化しかつ、水素が安価に供給されれば実際に人類に貢献できることも夢ではないと期待される(121, 124)。

参考文献

1. Ulmer, K. M. Protein engineering. Science 219, 666-671 (1983).
2. Imanaka, T., M. Shibazaki, and M. Takagi. New way of enhancing the thermostability of proteases. Nature 324, 695-697 (1986).
3. Muraki, M., M. Morikawa, Y. Jigami, H. Tanaka. Engineering of human lysozyme as a polyelectrolyte by the alteration of molecular surface charge. Protein Engineering 2, 49-54 (1988).
4. Pollack, S. J., J. W. Jacobs, and P. G. Shultz. Selective chemical catalysis by an antibody. Science 234, 1570-1573 (1986).
5. Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly, and R. L. Weiss. Sulfolobus: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Arch. Microbiol. 84, 54-68 (1972).
6. Stetter, K. O., H. König, and E. Stackebrandt. Pyrodictium gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaebacteria growing optimally at 105℃. System. Appl. Microbiol. 4, 535-551 (1983).
7. Fiala, G and K. O. Stetter. Pyrococcus furiosus sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaebacteria growing optimally at 100℃. Arch. Microbiol. 145, 56-61 (1986).
8. Morikawa, M., Y. Izawa, N. Rashid, T. Hoaki, and T. Imanaka. Purification and characterization of thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophile Pyrococcus sp. ~~submitted~~. Appl. Environ. Microbiol. 60, Dec issue (1994).
9. Charlebois, R. L., L. C. Schalkwyk, J. D. Hofman, W. F. Doolittle. Detailed physical map and set of overlapping clones covering the genome of archaebacterium Haloferax volcanii DS2. J. Mol. Biol. 222, 509-524 (1991).
10. Stettler, R. and T. Leisinger. Physical map of the Methanobacterium thermoautotrophicum Marburg chromosome. J. Bacteriol. 174, 7227-7234 (1992).
11. Woese, C. R. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, 221-271 (1987).
12. 森川正章、今中忠行．真核生物のすぐ隣は超好熱菌．バイオサイエンスとインダストリー 51, 399-403 (1993).
13. 山田浩一．石油発酵．幸書房 (1970).

14. Stock, J. B., A. J. Ninfa, A. M. Stock. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol Rev. 53, 450-490 (1989).

15. Ronson, C. W., B. T. Nixon, and F. M. Ansubel. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. Cell, 49, 579-581 (1987).

16. Stainer, R. Y. Problems of bacterial oxidative metabolism. Bacteriol. Rev. 14, 179-191 (1950).

17. Atlas, R. M. (ed.) Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Co., USA (1984).

18. Leahy, J. G. and R. R. Colwell. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54, 305-315 (1990).

19. Bonin, P., M. Gilewicz, and J. C. Bertrand. Effects of oxygen on Pseudomonas nautica growth on n-alkane with or without nitrate. Arch. Microbiol. 157, 538-545 (1992).

20. Skryabin, G. K. and L. A. M. Golovleva. Microorganisms in Organic Chemistry. Nauka, Moscow, USSR (1976).

21. Ward, D. M., R. M. Atlas, P. D. Boehm, and J. A. Calder. Microbial biodegradation and chemical evolution of oil from the Amoco spill. AMBIO, J. Human Environ. Res. Manag., Royal Swedish Acad. Sci. 9, 277-283 (1980).

22. Grbic-Galic, D. Microbial degradation of homocyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions. Vol. 3 pp. 237-253 In J. Cooney and O. Sebek (eds.) Developments in Industrial Microbiology. Society for Industrial Microbiology (1989).

23. Schink, B. Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. pp. 771-846. In A. J. B. Zhender (ed.) Biology of Anaerobic Microorganisms. John Wiley & Sons, New York, USA (1988).

24. Lovley, D. R. and D. J. Lonergan. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory ion-reducing organism, GS-15. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1858-1864 (1990).

25. Evans, P. J., D. T. Mang, K. S. Kim, and L. Y. Young. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. Appl. Environ.

Microbiol. 57, 1139-1145 (1991).

26. Dolfing, J., J. Zeyer, P. Binder-Eicher, and R. P. Schwarzenbach. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. Arch. Microbiol. 154, 336-341 (1990).
27. Grbic-Galic, D. and T. M. Vogel. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. Appl. Environ. Microbiol. 53, 254-260 (1987).
28. Novelli, G. D. and C. E. Zobell. Assimilation of petroleum hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. J. Bacteriol. 47, 447-448 (1944).
29. Rosenfeld, W. D. Anaerobic oxidation of bydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. J. Bacteriol. 54, 664-665 (1947).
30. Sorokin, Y. I. Ability of sulfate reducing bacteria to utilize methane for reduction of sulfates to hydrogen sulfide. Dokl. Akad. Nauk. USSR. 115, 816-818 (1954).
31. Atlas, R. M. Micorbial degradation of petroleum hydrocarbons: and environmental perspective. Microbiol. Rev. 45, 180-209 (1981).
32. Parekh, V. R., R. W. Traxler, and J. M. Sobek. n-Alkane oxidation enzymes of a Pseudomonad. Appl. Environ. Microbiol. 33, 881-884 (1977).
33. Aeckersberg, F., F. Bak., and F. Widdel. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO_2 by a new type of sulfate-reducing bacterium. Arch. Microbiol. 156, 5-14 (1991).
34. Schink, B. Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. FEMS Microbiol. Ecol. 31, 69-77 (1985).
35. Fiechter, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends Biotechnol. 10, 208-217 (1992).
36. Cooper, D. G. and J. E. Zajic. Surface-active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26, 229-253 (1980).
37. Rosen, M. J. Surfactants and Interfacial Phenomena. John Wiley & Sons. (1989).
38. Shaw, N. Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. Adv. Appl. Microbiol. 17, 63-108 (1974).

39. Inoue, S. and S. Ito. Sophololipids from Torulopsis bombicola as microbial surfactants in alkane fermentations. Biotechnol. Lett. 4, 3-8 (1982).

40. Pines, O. and D. Gutnick. Role for emulsan in growth of Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 on crude oil. Appl. Environ. Microbiol. 51, 661-663 (1986).

41. Shabtai, Y. and D. L. Guntnick. Enhanced emulsan production in mutants of Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 selected for resistance to cetyltrimethylammonium bromide. Appl. Environ. Microbiol. 52, 146-151 (1986).

42. Arima, K., A. Kakinuma, and G. Tamura. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by Bacillus subtilis: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31: 488-494 (1968).

43. Laycock, M. V., P. D. Hildebrand, P. Thibault, J. A. Walter, and J. L. C. Wright. Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of Pseudomonas fluorescens. J. Agric. Food Chem. 39, 483-489 (1991).

44. Jenny, K., O. Käppeli, and A. Fiechter. Biosurfactants from Bacillus licheniformis: structural analysis and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 5-13 (1991).

45. Cooper, D. G., J. E. Zajic, and D. F. Gerson. Production of surface-active lipids by Corynebacterium lepus. Appl. Environ. Microbiol. 37, 4-10 (1979).

46. Mallee, F. M. and H. W. Blanch. Mechanistic model for microbial growth on hydrocarbons. Biotechnol. Bioeng. 19, 1793-1816 (1977).

47. Vater, J. Lipopeptides, an interesting class of microbial secondary metabolites. Biologically Active Molecules. Springer-Verlag, Berlin, Germany (1989).

48. Kameda, Y., S. Ohira, K. Matsui, S. Kanamoto, T. Hase, and T. Atsusaka. Antitumor activity of Bacillus natto. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of Bacillus natto KMD2311. Chem. Pharm. Bull. 22, 938-944 (1974).

49. Altman, A. and F. Dixon. Immunomodifiers in vaccines. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. Vol. 33, in B. James

(ed.) , Vaccine Biotechnology. Academic Press, New York, USA (1989)

50. Gustafson, G. L. and M. J. Rhodes. Bacterial cell wall products as adjuvants: early interferon gamma as a marker for adjuvants that enhance protective immunity. Research Immunology 143, 483-488 (1992).

51. Redwood, W. R. et al. Biochem. Biophys. Acta 233, 3-6 (1971).

52. Kachholz, T. and M. Schlingmann. Possiblee food and agricultural application of microbial surfactants. pp. 183-210 In N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray. (eds) Biosurfactants and Biotechnology. Marcel Dekker, New York, USA (1987).

53. 手塚真知子 素顔の石油 裳華房 (1990).

54. Coul. J. M., J. C. Pappin, J. Mark, R. H. Aebersold, and H. Koester. Covalent sequence analysis of proteins and peptides from membrane-based supports. MilliGen/Biosearch Report. Technical Note 4 (1989).

55. Takao, T., H. Hori, K. Okamoto, A. Harada, M. Kamachi, and Y. Shimonishi. Facile assignment of sequence ions of a peptide labelled with ^{18}O at the carboxyl terminus. Rapid Commun. Mass Spectrom. 5, 312-315 (1991).

56. Einarsson, S., B. Josefsson, P. Möller, and D. Sanchez. Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumm derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography. Anal. Chem. 59, 1191-1195 (1987).

57. Johnson, R. S., S. A. Martin, K. Biemann, J. T. Stults, and T. Watson. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. Anal. Chem. 59, 2621-2625 (1987).

58. Matsuyama, T. K. Kaneda, Y. Nakagawa, K. Isa, H. Hara-Hotta, and I. Yano. A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of Serratia marcescens. J. Bacteriol. 174, 1769-1776 (1992).

59. Morikawa, M. H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, and T. Imanaka. A new lipopeptide biosurfactant produced by Arthrobacter sp. strain MIS38. J. Bacteriol. 175, 6459-6466 (1993).

60. Suzuki, T., K. Tanaka, I. Matsubara, and S. Kinoshita. Trehalose

lipid and α-branched-β-hydroxy fatty acid formed by bacteria grown on n-alkanes. Agric. Biol. Chem. 33, 1619-1627 (1969).

61. Fukada, Y., T. Takao, H. Ohguro, H. Yoshizawa, T. Akino, and Y. Shimonishi. Farnesylated γ-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. Nature 346, 658-660 (1990).

62. Noggle, J. H., and R. E. Schirmer. The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Applications. Academic Press, New York, USA. (1971).

63. Syldatk, C. and F. Wagner. Production of biosurfactants. pp. 89-120 In N. Kosaric, W. L. Cairns, N. C. C. Gray (eds) Biosurfactants and Biotechnology. Marcel Dekker, New York, USA (1987).

64. Cooper, D. G., C. R. Macdonald, S. J. B. Duff, and Kosaric. Enhanced production of surfactin from Bacillus subtilis by continuous product removal and metal cation additions. Appl. Environ. Microbiol. 42, 408-412 (1981).

65. Suzuki, T., H. Tanaka, and S. Itoh. Sucrose lipids of Arthrobacteria, Corynebacteria and Nocardia grown on sucrose. Agric. Biol. Chem. 38, 557-563 (1974).

66. Guerra-Santos, L. H., O. Käppeli, and A. Fiechter. Dependence of Pseudomonas aeruginosa continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24, 443-448 (1986).

67. Ristau, E. and F. Wagner. Formation of novel anionic trehalosetetraesters from Rhodococcus erythropolis under growth limiting conditions. Biotechnol. Lett. 5, 95-100 (1983).

68. Carraway, K. L. and D. E. Koshland Jr. Carbodiimide modification of proteins. Methods in Enzymol. 25, 616-623 (1972).

69. Broomfield, C. A., J. P. Riehm, H. A. Scheraga. Structural studies of ribonuclease. XV. The abnormal carboxyl groups of ribonuclease. 1. Preparation and properties of methylated ribonuclease. Biochemistry, 4, 751-759 (1965).

70. Isogai, A. N. Fukuchi, S. Yamashita, K. Suyama, and A. Suzuki. Structures of syringostatins A and B, novel phytotoxins produced by Pseudomonas syringae pv. syringae isolated from lilac blights. Tetrahedron Lett. 31, 695-698 (1990).

71. Peypoux, F., M. Guinand, G. Michel, L. Delcambe, B. C. Das, and E. Lederer. Structure of iturin A, a peptidelipid antibiotic from Bacillus subtilis. Biochemistry 17, 3992-3996 (1978).

72. Peypoux, F., F. Besson, G. Michel, and L. Delcambe. Structure of Bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. Eur. J. Biochem. 118, 323-327 (1981).

73. Ohnuki, T., T. Imanaka, and S. Aiba. Self-cloning in Streptomyces griseus of an str gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance. J. Bacteriol. 164, 85-94 (1985).

74. Imanaka. T., M. Fujii, and S. Aiba. Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. J. Bacteriol. 146, 1091-1097 (1981).

75. Imanaka, T., M. Fujii, I. Aramori, and S. Aiba. Transformation of Bacillus stearothermophilus with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 149, 824-830 (1982).

76. Nakano, M. M., M. A. Marahiel, and P. Zuber. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 170, 5662-5668 (1988).

77. Nakano, M. M. and P. Zuber. Cloning and characterization of srfB, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 171, 5347-5353 (1989).

78. Cosmina, P., F. Rodriguez, F. de Ferra, G. Grandi, M. Perego, G. Venema, and D. van Sinderen. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in Bacillus subtilis. Mol. Microbiol. 8, 821-831 (1993).

79. Morikawa, M., M. Ito, and T. Imanaka. Isolation of a new surfactin producer Bacillus pumilus A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. J. Ferment. Bioeng. 74, 255-261 (1993).

80. Santamaría, R., J. A. Gil, and J. F. Martín. High-frequency transformation of Brevibacterium lactofermentum by plasmid DNA. J. Bacteriol. 162, 463-467 (1985).

81. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119 (1985).

82. Horinouch, S. and B. Weisblum. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphinicol resistance. J. Bacteriol. 150, 815-825 (1979).

83. Imanaka, T., T. Himeno, and S. Aiba. Effect of in vitro DNA rearrangement in the NH_2-terminal region of the penicillinase gene from Bacillus licheniformis on the mode of expression in Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol. 131, 1753-1763 (1985).

84. Jalanko, A., I. Palva, and H. Soderlund. Restriction maps of plasmids pUB110 and pBD9. Gene 14, 325-328 (1981).

85. Santamaría, R. I., J. F. Martín, and J. A. Gil. Identification of a promoter sequence in the plasmid pUL340 of Brevibacterium lactofermentum and construction of new cloning vectors for corynebacteria containing two selectable markers. Gene 56, 199-208 (1987).

86. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

87. Clewell, D. B. Nature of ColE1 plasmid replication in Escherichia coli in the presence of chloramphenicol. J. Bacteriol. 110, 667-676 (1972)

88. Lederberg, E. M. and S. N. Cohen. Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 119, 1072-1074 (1974).

89. Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen. Requirements for transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 81, 741-746 (1961).

90. Dower, W. J., J. F. Miller, and C. R. Ragsdale. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acid Res. 16, 6127-6145 (1988).

91. Matsuno, Y., T. Ano, and M. Shoda. High-efficiency transformation of Bacillus subtilis NB22, an antifungal antibiotic iturin producer, by electroporation. J. Ferment. Bioeng. 73, 261-264 (1992).

92. Morikawa, M., H. Daido, S. Pongpobpibool, and T. Imanaka. Construction of new host-vector system in Arthrobacter sp. and cloning of the lipase gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. in press (1994).

93. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467 (1977).

94. Chang, S. and S. N. Cohen. High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA. Molec. Gen. Genet. 168, 111-115 (1979).

95. Matsuzaki, S. and Y. Kobayashi. New mutaion affecting the synthesis of some membrane proteins and sporulation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 159, 228-232 (1984).

96. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).

97. Dunican, L. K. and E. Shivnan. High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. Bio/Technol. 7, 1067-1070 (1989).

98. Guillen, N., Y. Weinrauch, and D. A. Dubnau. Cloning and characterization of the regulatory Bacillus subtilis competence genes comA and comB. J. Bacteriol. 171, 5354-5361 (1989).

99. Roggiani, M. and D. Dubnau. ComA, a phosphorylated response regulator protein of Bacillus subtilis, binds to the promoter region of srfA. J. Bacteriol. 175, 3182-3187 (1993).

100. Weinrauch, Y., R. Penchev, E. Dubnau, I. Smith, and D. Dubnau. A Bacillus subtilis regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. Genes Dev. 4, 860-872 (1990).

101. Dubnau, D. Genetic competence in Bacillus subtilis. Microbiol. Rev. 55, 395-424 (1991).

102. Klier, A., T. Msadek, and G. Rapoport. Positive regulation in the Gram-positive bacterium: Bacillus subtilis. Annu. Rev. Microbiol. 46, 429-459 (1992).

103. Menkhaus, M., C. Ullrich, B. Kluge, J. Vater, D. Vollenbroich, and

R. M. Kamp. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. J. Biol. Chem. 268, 7678-7684 (1993).

104. Grossman, T. H., M. Tuckman, S. Ellestad, and M. S. Osburne. Isolation and characterization of Bacillus subtilis genes involved in siderophre biosyntehsis: relationship between B. subtilis sfp^0 and Escherichia coli entD genes. J. Bacteriol. 175, 6203-6211 (1993).

105. Ochsner, U. A., A. K. Koch, A. Fiechter, and J. Reiser. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 176, 2044-2054 (1994).

106. Garavito, R. M., J. Jenkins, J. N. Jansonius, R. Karlsson, and J. P. Rosenbusch. X-ray diffraction analysis of matrix porin, and integral membrane protein from Escherichia coli outer membranes. J. Mol. Biol. 164, 313-327 (1983).

107. Michel, H. Three-dimentional crystals of a membrane protein complex. J. Mol. Biol. 158, 567-572 (1982).

108. Kates, M. Lipid extraction procedures. pp. 347-353. In T. S. Work and Work, E. (eds.) Techniques of lipidology. North-Holland (1974).

109. Krieg, N. R. and J. G. Holt. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1984).

110. Morikawa, M. and T. Imanaka. Isolation of a new mixotrophic bacterium which can fix CO_2 and assimilate aliphatic and aromatic hydrocarbons anaerobically. J. Ferment. Bioeng. 76, 280-283 (1993).

111. 森川正章、今中忠行. 石油を分解する細菌. 化学 48, 692-693 (1993).

112. Cline, J. D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. Limnol. Oceanogr. 14, 454-458 (1969).

113. Iizuka, H., M. Iida, and S. Fujita. Formation of n-decene-1 from n-decane by resting cells of Candida rugosa. Z. Allg. Mikrobiol. 9, 223-226 (1969).

114. Chouteau, J., E. Azoulay, J. C. Senez. Anaerobic formation of hept-1-ene from n-heptane by resting cells of Pseudomonas aeruginosa. Naturte 194, 576-578 (1962).

115. 藤野安彦 生化学実験法 9 :脂質分析法入門 pp. 52-54. 学会出版センター (1962).

116. Capella, P. and M. Zorzut. Determination of double bond position in monounsaturated fatty acid esters by mass spectrometry of their trimethylsilyloxy derivatives. Anal. Chem. 40, 1458-1463 (1968).

117. Silverstein, R. M., G. C. Bassler, T. C. Morrill. (eds.) Spectrometric Identification of Organic Compounds. Fourth edition. John Wiley & Sons, New York, USA (1981).

118. Ratledge, C., S. G. Wilkinson. (eds.) Microbial Lipids. vol. 1 & 2. Academic Press, London, U.K.

119. Dennis, M. W. and P. E. Kolattukudy. Alkane biosynthesis by decarbonylation of aldehyde catalyzed by a microsomal preparation from Botryococcus braunii. Arch. Biochem. Biophys. 287, 268-275 (1991).

120. Dennis, M. and P. E. Kolattukudy. A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 5306-5310 (1992).

121. 堀 憲昭(編集). クォーク vol.117. 講談社 (1992).

122. Matsuoka, S., K. Yamamoto, T. Ogata, M. Kusuba, N. Nakashima, E. Fujita, and S. Yanagida. Efficient and selective electron mediation of cobalt complexes with cyclam and related macrocycles in the p-terphenyl-catalyzed photoreduction of CO_2. J. Am. Chem. Soc. 115, 601- 609 (1993).

123. Benemann, J. R., D. M. Tillett, and J. C. Weissman. Microalgae biotechnology. TIBTECH 5, 47-53 (1987).

124. 森川正章、 今中忠行. 微生物による石油生産. 蛋白質 核酸 酵素 39, 印刷中.

本論文に関連する報告

1. Isolation of a new surfactin producer Bacillus pumilus A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. J. Ferment. Bioeng. 74, 255-261 (1992).
   Morikawa, M., M. Ito, and T. Imanaka.

2. A new lipopeptide biosurfactant produced by Arthrobacter sp. strain MIS38. J. Bacteriol. 175, 6459-6466 (1993).
   Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, and T. Imanaka.

3. Isolation of a new mixotrophic bacterium which can fix CO_2 and assimilate aliphatic and aromatic hydrocarbons anaerobically. J. Ferment. Bioeng. 76, 280-283 (1993).
   Morikawa, M. and T. Imanaka.

4. Construction of a new host-vector system in Arthrobacter sp. and cloning of the lipase gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1994) ~~in press~~. 42, 300-303
   Morikawa, M., H. Daido, S. Pongpobpibool, and T. Imanaka.

5. 石油を分解する細菌. 化学 48, 692-693 (1993).
   森川正章、今中忠行

6. 微生物による石油生産. 蛋白質 核酸 酵素 (1994) 印刷中.
   森川正章、今中忠行

7. 細菌による CO_2 固定と石油生成. 化学と生物 (1994) 印刷中.
   森川正章、今中忠行

謝辞

この研究は、大阪大学工学部応用生物工学科教授 今中忠行先生の下において行われたものであり、先生から常に暖かい激励とご教示を賜ったことを心より感謝致します。

本論文をまとめるにあたり、有益なご助言を戴きました大阪大学工学部応用生物工学科大嶋泰治教授、山田靖宙教授、菅　健一教授、新名惇彦教授、卜部　格教授、塩谷捨明教授、大阪大学工学部生物工学国際交流センター 吉田敏臣教授ならびに大阪大学産業科学研究所 二井将光教授に感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実りある討論および数々の実験手法をご指導下さいました元大阪大学助手(現熊本工業大学講師)松岡正佳先生、大阪大学工学部応用生物工学科助教授 高木昌宏先生、同助手 藤原伸介先生、大阪大学蛋白質研究所蛋白質有機化学部門助手 高尾敏文先生、大阪大学工学部応用化学科助手 村田　聡先生、同助教授 中辻洋司先生、同講師 益山新樹先生、大阪大学工学部プロセス工学専攻教授 柳田祥三先生、同助教授和田雄二先生、元大阪大学蛋白質研究所蛋白質化学構造部門助教授(現宝酒造(株)研究副所長)綱澤　進先生、日東電工(株)技術研究所 福崎英一郎博士、さらに、日頃様々な便宜を図って戴きました大阪大学応用生物工学科技官 西田佐知子女史に感謝致します。

本研究に協力下さいました 倉村昭子女史、伊東幹人氏、大同広美女史、戸田幸子女史、金本充英氏、後藤慎也氏、佐藤栄哲氏、Sutee Pongpobpibool氏、岩佐　毅氏、平田善彦氏、船越政男氏、東燃(株)研究所 鈴木正則博士、建国大学校工科大学助教授 姜相模博士、日興バイオ技研(株)会長 櫻井尚爾氏、研究員 真鍋洋平氏、並びに大阪大学工学部応用生物工学科 今中研究室全員の皆様に深くお礼申し上げます。

最後に、妻 公子と両親の長年にわたる協力なくしてこの研究は成し得なかったことを付記させて戴きます。