



Title	親油性細菌Rhodococcus opacus B-4を用いた難水溶性物質の水酸化反応に関する基礎研究
Author(s)	濱田, 崇宏
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57540
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【4】

氏 名	はま たく たか ひろ 濱 田 崇 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 2 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 6 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	親油性細菌Rhodococcus opacus B-4を用いた難水溶性物質の水酸化反応 に関する基礎研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 大竹 久夫 (副査) 教 授 福崎英一郎 教 授 清水 浩 教 授 福井 希一 教 授 原島 俊 教 授 仁平 卓也 教 授 藤山 和仁

論 文 内 容 の 要 旨

現在、難水溶性物質をエネルギー源の消費や補酵素の再生系と共役した酵素反応により変換しようとした場合、有機溶媒耐性細菌を宿主とした水/有機溶媒二相培養系が用いられる。近年、有機溶媒耐性細菌として単離された*Rhodococcus opacus* B-4は、二相培養系において有機溶媒相へ強く吸着するため、有機溶媒中の基質に対して高い接触能を持つ事が期待される。しかし、このような親油性細菌を用いた難水溶性物質の変換反応に関してはほとんど研究級報告がなされていない。本論文では親油性細菌のモデル生物として期待される*R. opacus* B-4についての基礎的知見をまとめ、物質生産の分野における菌体表面の親油性の定量方法について考察した。また、実際の難水溶性物質の変換反応において親水性細菌と比較して親油性細菌の優位性を実証した。

第一章では*R. opacus* B-4についての基礎的知見をまとめた。*R. opacus* B-4は*Rhodococcus*属としては珍しい全ゲノム配列が解明されている菌であり、分子生物学的アプローチに必要な各種遺伝子工学技術も充実しているため、親油性や有機溶媒耐性のモデル生物として期待されている。

第二章では物質生産への利用が期待されている各種細菌を用いて、有機溶媒存在下における各菌体の挙動を定量化しうる疎水度評価方法を検討した。水のほとんど存在しない非水的环境下において均一に懸濁できるかどうかについては接触角測定が、水/有機溶媒二相培養系において有機溶媒相へ吸着するかについてはBacterial adhesion to hydrocarbonアッセイなどが、それぞれ実際の反応溶液中における菌体の局在と一致していた。さらに、親油性細菌が有機溶媒中の物質に接触しやすいという事も確かめた。

第三章では実際のwhole-cell catalystを利用した変換反応に細菌の親油性がどう寄与するのかを解析した。親油性細菌として*R. opacus* B-4、親水性細菌として*Escherichia coli* JM109を用いて、各株にトルエンジオキシゲナーゼ遺伝子群をプラスミドベクターより発現させた。組換え*E. coli* JM109を触媒として用いた場合、基質の水溶性が低下するにつれて水酸化物の収量は減少した。一方、組換え*R. opacus* B-4を触媒として用いた場合、基質に関わらず同程度の生産物収量を示した。また、二相培養系における反応速度と水一相系における反応速度を水相における基質濃度を基準にして比較した。*E. coli* JM109を用いた反応では両者は同程度の値を示した。一方、*R. opacus* B-4を用いた反応では二相培養系の反応速度は水相一相系の反応速度比べ有意に高い値を示した。このことから、*R. opacus* B-4は二相培養系において主に有機溶媒相から基質を取り込んでいる事が示唆された。これらの結果は*R. opacus* B-4のような親油性の細菌の水/有機溶媒二相培養系における難水溶性基質の変換反応についての優位性を示している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

難水溶性物質を微生物の異化代謝と共役した酵素反応により変換する場合、有機溶媒耐性細菌を宿主とする水/有機溶媒二相培養系が用いられる。有機溶媒耐性細菌として単離された *Rhodococcus opacus* B-4 は、二相培養

系において有機溶媒相に強く吸着するため、有機溶媒中の基質に対して高い接触能を持つと期待される。しかし、このような親油性の有機溶媒耐性細菌を用いた難水溶性物質の変換反応については、まだほとんど研究報告がなされていない。本論文では、親油性細菌のモデル生物として期待される *R. opacus* B-4 について、基礎生物学的知見をまとめ、とくに菌体表面の親油性の定量方法について比較検討を行っている。加えて、難水溶物質の変換反応において親油性細菌が親水性細菌と較べて生体触媒としてより有利であることを実証している。第一章では、*R. opacus* B-4 についての基礎生物学的知見をまとめている。*R. opacus* B-4 は *Rhodococcus* 属としては珍しい全ゲノム配列が解明されている菌であり、分子生物学的アプローチに必要な各種遺伝子工学技術も充実しており、親油性や有機溶媒耐性研究のモデル微生物として期待されている。第二章では、物質生産への利用が期待されている各種細菌を用いて、有機溶媒存在下における各菌体の挙動を定量化しうる疎水度評価方法の有効性を比較検討している。その結果、水のほとんど存在しない非水環境下において細胞を均一に懸濁できるかどうかについては接触角測定が、水/有機溶媒二相培養系において有機溶媒相へ吸着するかについては Bacterial adhesion to hydrocarbon アッセイが、それぞれ最も有効であることを明らかにしている。また、水/有機溶媒二相培養系において有機溶媒相へ吸着できる油性細菌が、有機溶媒中の物質に接触しやすい事についても実験的に明らかにしている。第三章では、whole-cell catalyst を利用した化学物質の変換反応に、細菌の親油性がどう寄与するかを解析している。親油性細菌として *R. opacus* B-4、親水性細菌として *Escherichia coli* JM109 を用いて、各株にトルエンジオキシゲナーゼ遺伝子群をプラスミドベクターにより発現させ、芳香族化合物の水酸化反応の収率により、両者の生体触媒としての能力を比較している。組換え *E. coli* JM109 を生体触媒として用いた場合、基質の水溶性が低下するにつれて水酸化物の収量は減少したが、組換え *R. opacus* B-4 を触媒として用いた場合には、基質の疎水度の違いに関わらず同程度の生産物収量を示すことを明らかにしている。また、二相培養系における反応速度と水一相系における反応速度を、水相における基質濃度を基準にして比較したところ、*E. coli* JM109 を用いた反応では両者は同程度の値を示すことが明らかになった。一方、*R. opacus* B-4 を用いた反応では、二相培養系の反応速度は水相一相系の反応速度と比べ有意に高い値を示していた。この結果から、*R. opacus* B-4 は二相培養系において主に有機溶媒相から基質を取り込んでいることを示唆している。以上のように、本論文は、生体触媒を用いた難水溶性基質の変換反応に関して、親油性細菌を活用することの有効性を提唱している。本論文は、難水溶性物質の変換反応に新規かつ重要な知見を与えるものであり、博士論文として価値あるものと認める。