

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19510082
 研究課題名（和文） 単独で重油，工業油，食用油を分解できる新規細菌のキャラクタリゼーションと利用
 研究課題名（英文） Characterization and utilization of a novel bacterial strain capable of degrading heavy oil, lubricating oil, and edible oil
 研究代表者
 田中 大祐（TANAKA DAISUKE）
 富山大学・大学院理工学研究部（理学）・准教授
 研究者番号：40360804

研究成果の概要（和文）：富山湾の漁港海水から，油分解菌 Ud-4 を新規に単離し，*Acinetobacter* 属と同定した。本菌は，重油，工業油，食用油を効率よく分解でき，重油中の *n*-アルカンと食用油中の油脂を分解するために，それぞれの分解酵素遺伝子である *alkM* と *lipA* を持っていた。鉱物油と食用油を効率よく分解できる細菌に関する研究報告は初めてであり，本菌は様々な油汚染環境の修復に利用できる有用な微生物であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A novel oil-degrading bacterial strain Ud-4 was isolated from seawater in a fishing port located in Toyama Bay and identified as the genus *Acinetobacter*. This strain efficiently degraded heavy oil, lubricating oil, and edible oil, and possessed two catabolic genes involved in the degradation of *n*-alkanes (*alkM*) and triglyceride (*lipA*). To our knowledge, this is the first study on the isolation of a bacterium that can efficiently degrade both mineral and edible oils. Therefore, this strain could be useful for application to bioremediation technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：環境修復技術

1. 研究開始当初の背景

国内外において，海洋や河川における石油流出事故とそれに続く深刻な環境汚染がしばしば発生している。また，食品工場や大型厨房の浄化槽では廃食用油の処理が大きな問題となっている。近年，これらを解決する手段として微生物を利用した環境修復・浄化

(バイオレメディエーション)に関する研究が進められてきている。バイオレメディエーションは，効果がでるまでに時間を要するものの，環境に優しく低コストという大きな利点があり，近年大きな関心を集めている。

1997年，ロシアのナホトカ号から大量の重油が流出する事故が福井県と石川県を中心

に大きな問題となった。そこで、我々の研究室では、ナホトカ号の流出重油から *Alcanivorax* sp., *Caulobacter* sp., *Halomonas* sp. など数種の重油分解菌を単離し、それらの菌の油分解能等の特徴を解析した上で、微生物製剤としての利用を目指した研究を進めてきた。さらに、河川水や大型厨房廃水から食用油分解菌の単離を、また、工場跡地における工業油で汚染された土壌や廃水等からも分解菌の単離を行い、それらの特徴を調べ、バイオレメディエーションへの活用を目指している。そのような研究を進めてきた中で、我々が新規に単離した細菌が、単独で重油、工業油、食用油を分解するというマルチ分解能を持っていることが予備的研究で明らかとなった。

2. 研究の目的

単独で重油、工業油、食用油を分解できる新規細菌の性格、各種油分解能、分解機構を明らかにすることを本研究の目的とした。これまでに、単独で重油、食用油、工業油などの複数種の油を分解できる細菌についての研究は国内外で報告されていない。このような能力を有する菌は希少であると思われたので、本研究では当該菌の油分解能に関する特徴を詳細に検討した。一方、市販の微生物製剤を用いた環境修復が実際に行われてきているが、汚染現場の温度や塩分濃度などの環境条件は様々であることから、その効果が充分でない場合もある。そこで、本研究では、我々が見つけた新規細菌の同定を行い、生育可能な温度、塩分濃度の範囲と最適値を調べることにした。また、予備的な研究では、当該菌は重油、潤滑油や切削油などの工業油、食用油のいずれに対しても高い分解能を示したので、それぞれの油をどの程度分解するかを詳細に測定することにもした。さらに、食用油分解に関与するリパーゼ遺伝子や、重油分解に関わる遺伝子 (*n*-アルカン、キシレン、トルエン、多環芳香族炭化水素 (PAH) などの異化遺伝子) の保有の有無等について検討することも目的とした。

3. 研究の方法

細菌の培地として、Luria-Bertani (LB) 培地、M9 培地、人工海水培地 (ASW 培地) を使用した。菌の形態観察は、位相差顕微鏡 (Olympus BH-2) と透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX II, JEOL) を使用した。細菌の生化学的特徴は、市販キット API 20NE を使用して調べた。また、16S rDNA のほぼ全長の塩基配列をダイレクトシーケンス法にて決定 (プライマー-27f と 1525r を使用) した後、系統解析を行った。重油、工業油、食用

油 (キャノーラ油、オリーブ油、ごま油、大豆油、ラード) の分解率は、菌をそれぞれの油を含む培地中で 25°C で 7 日間培養した後に、重油はクロロホルムで、工業油と食用油は *n*-ヘキサンでそれぞれ抽出し、その乾燥重量の変化から算出した。さらに、重油中の *n*-アルカン成分の分解はガスクロマトグラフィーで検出した。

重油分解に関わる遺伝子 (*n*-アルカン分解: *alkB*, *alkB1*, *alkB2*, *alkM*, キシレンとトルエン分解: *xylE*, PAH (ナフタレン) 分解: *ndoB*, PAH (ピレン) 分解: *nidA*) の保有の有無は PCR 法にて検出した。また、食用油中のトリグリセリド (油脂) 分解に関わるリパーゼ遺伝子 (*lipA*) を特異的に検出できるプライマーを、既知の *Acinetobacter* sp. の *lipA* の塩基配列情報を基に設計して、検出を試みた。さらに、*lipA* の単離は、インバース PCR 法を用いて行い、この遺伝子と隣接領域の塩基配列を決定した。

4. 研究成果

我々は、重油、工業油、食用油に分解活性を示す細菌 Ud-4 株を富山湾の漁港海水から単離した。本菌は、様々な油汚染環境のバイオレメディエーションに利用できる可能性が考えられた。これを明らかにする目的で、2007 年度は、菌種の同定や、組成の異なる 3 種類の培地を用いて各種油の分解率などを調べた。光学顕微鏡を用いた観察から、本菌はグラム陰性桿菌で、芽胞を形成せず、非運動性であることが分かった。また、透過型電子顕微鏡により、細胞は長さ 1.0~2.0 μm で幅 0.8~1.0 μm であることや、細胞表面に周毛性繊維が観察された (図 1)。また、本菌は、塩分濃度 0~3% でよく増殖し、5% では増殖しなかった。生育温度に関しては、5~35°C で増殖し、25°C が至適温度であった。さらに、生化学性状試験及び 16S rDNA 塩基配列解析の結果から、本菌は *Acinetobacter* sp. に分類されることが判明した。



図 1 *Acinetobacter* sp. Ud-4 の透過型電子顕微鏡像。魚津漁港の海水より単離された。

次に、5種類の食用油（キャノーラ油、オリーブ油、ごま油、大豆油、ラード）、鉱物油である工業油と重油の分解率を、栄養価の高いLB培地、炭素源を含まないM9培地、そして海洋細菌用のASW培地を用いて調べた（表1）。その結果、本菌は全ての食用油をいずれの培地においても分解し、3.2～96.3%の範囲の分解率を示した。また、本菌は工業油を各培地で31.7～67.6%分解し、C重油を各培地で6.5～9.6%分解した。以上の結果より、Ud-4は5種類の食用油と、鉱物油である工業油と重油など、多様な油を分解できる能力を有することが分かった。特に、LB培地では他の培地に比べて菌がよく増殖し、多くの油種で分解率が高くなる傾向が見られた。また、M9培地を用いた実験から、本菌は各油をそれぞれ唯一の炭素源として利用し、増殖できることも分かった。一方、ASW培地を用いた実験から、本菌は海洋など高塩分濃度下の油汚染環境の修復にも利用できることが示唆された。

表1 Ud-4による各種油の分解率

Type of Oil	Oil degradation (%) in three media		
	LB medium	M9 medium	ASW medium
Edible oil			
Canola oil	96.3 ± 1.2	16.9 ± 3.5	18.7 ± 6.7
Olive oil	48.5 ± 2.0	34.4 ± 4.2	10.9 ± 9.1
Sesame oil	60.3 ± 8.2	10.9 ± 1.5	15.5 ± 5.4
Soybean oil	60.2 ± 4.3	14.6 ± 4.2	3.2 ± 0.2
Lard	67.4 ± 1.0	63.0 ± 8.9	13.2 ± 1.3
Mineral oil			
Lubricating oil	67.6 ± 7.0	34.7 ± 9.6	31.7 ± 11.8
C-heavy oil	6.5 ± 1.6	9.6 ± 3.2	6.9 ± 2.7

2008年度は、食用油の分解に関わるリパーゼ遺伝子の解析を試みた。まず、ザイモグラムなどの予備実験の結果や過去の論文報告から、*Acinetobacter* sp.のリパーゼは特異的分子シャペロンが存在しないと不活性になる為に、ゲノムDNAライブラリーを構築後にハローアッセイでリパーゼ遺伝子を持つ大腸菌クローンをスクリーニングすることは困難であると考えられた。そこで、既知の*Acinetobacter* sp.のリパーゼ遺伝子の塩基配列情報を基に、インバースPCR法を利用してリパーゼ遺伝子及びその隣接したDNA領域を取得し、塩基配列を決定した。Ud-4のリパーゼ遺伝子は1017bpの塩基配列で、339アミノ酸をコードしており、推定分子量35.5KDaで、アミノ酸配列の中にリパーゼのコンセンサス配列であるG-X-S-X-Gの存在も確認された。さらに、リパーゼ遺伝子の下流には、リパーゼシャペロンの遺伝子と考えられる1032bpのORFが認められ、344アミノ酸をコ

ードしており、推定分子量39.1KDaであった。Ud-4のリパーゼとリパーゼシャペロンの予想アミノ酸配列は、*Acinetobacter* sp. SY-01のそれらと高い相同性（83%および69%）を示した。また、本研究の新規リパーゼは、プロテオバクテリアのリパーゼファミリーでGroup Iと定義されているものであった。

2009年度は、本菌について油分解能のキャラクタリゼーションをさらに進めた。まず、Ud-4の生育によるC重油中のn-アルカン成分の分解をガスクロマトグラフィーにより検出した（図2）。C重油を含むASW培地にUd-4を接種したものと接種しないもの（コントロール）を準備し、25°Cで4週間培養後に、培地中に残ったn-アルカン成分を調べた。その結果、C10-C25のn-アルカン成分がUd-4によりほぼ完全に分解されていた。これは、後述するように、本菌がアルカンモノオキシゲナーゼ遺伝子（*alkM*）を保有していたことと一致している。

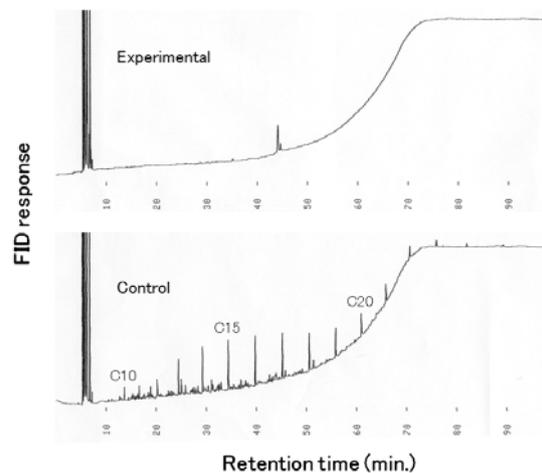


図2 UD-4によるC重油中のn-アルカン分解をガスクロマトグラフィーによって検出した図。

また、鉱物油と食用油を分解する細菌Ud-4について、それぞれの成分の異化経路を調べるために、異化遺伝子の保有の有無をPCR法で調べた（図3）。その結果、本菌はn-アルカンの分解に関わる*alkM*とトリグリセリドの分解に関わる*lipA*でPCR陽性を示した。一方、*alkB*、*alkB1*、*alkB2*、*xylE*、*ndoB*、*nidA*についてはPCR陰性であった。シークエンス解析を行ったところ、*alkM*の増幅断片は*Acinetobacter* sp. M-1の*alkM*の塩基配列と85%の相同性を示し、*lipA*の増幅断片は*Acinetobacter* sp. SY-01の*lipA*の塩基配列と77%の相同性を示した。

以上の結果から、Ud-4は様々な油汚染環境の修復に利用できる有用な微生物であることが示唆された。今後は、実際の油汚染土壌

の修復・浄化に本菌の適用を検討する予定である。

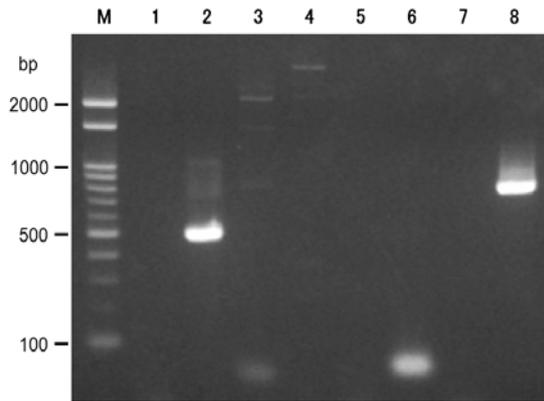


図 3 Ud-4 が持つ分解酵素遺伝子の PCR 法による検出像。以下の遺伝子を検出するためのプライマーを用いた。1: *alkB*, 2: *alkM*, 3: *alkB1*, 4: *alkB2*, 5: *xylE*, 6: *ndoB*, 7: *nidA*, 8: *lipA*。M(マーカー) : 100bp DNA ラダー。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tanaka, D., Takashima, M., Mizuta, A., Tanaka, S., Sakatoku, A., Nishikawa, A., Osawa, T., Noguchi, M., Aizawa, S., and Nakamura, S., *Acinetobacter* sp. Ud-4 efficiently degrades both edible and mineral oils: isolation and characterization. *Current Microbiology*, 査読有, Vol.60, 2010, 203-209.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 田中大祐, 高嶋美雪, 水田阿沙子, 中村省吾 (2008 年 3 月)
複数種の油を分解する細菌 Ud-4 のキャラクター化
第 42 回日本水環境学会年会, 名古屋大学 (愛知)
- ② 田中大祐, 高嶋美雪, 水田阿沙子, 酒徳昭宏, 中村省吾 (2010 年 3 月)
鉱物油と食用油を分解する *Acinetobacter* sp. Ud-4 のキャラクター化
第 44 回日本水環境学会年会, 福岡大学 (福岡)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 多様な油分解微生物とその用法
発明者: 中村省吾, 田中大祐, 近藤武志,
安井幸平, 久志本眞夫

権利者: 富山大学他

種類: 特許

番号: 特開 2010-22214

出願年月日: 平成 20 年 7 月 15 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 大祐 (TANAKA DAISUKE)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・
准教授

研究者番号: 40360804

(2) 研究分担者

中村 省吾 (NAKAMURA SHOGO)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・
教授

研究者番号: 60134996