

# CO<sub>2</sub> 固定細菌を利用した 地球環境修復システムの構築

特集 プロジェクト研究

森 川 正 章\*

## Remediation System of Global Environment by Utilizing CO<sub>2</sub> Fixing Bacteria

**Key Words** : Bioremediation, CO<sub>2</sub> Fixation, Oil Production,  
Oil Degradation, Biosurfactant

題記プロジェクトは平成8年度に発足した生物機能の高度利用等を促進するための基礎的研究を対象とした提案公募型の事業です。事業の実施主体は、大蔵省と農林水産省の特別認可法人である生研機構で、政府からの出資金を活用し、採択された研究テーマについて各研究機関との間での委託研究(大学等)あるいは共同研究(国立研究機関)により進めるものです。

研究期間は原則3～5年で、その成果は委託研究機関と生研機構との共有になります。研究対象分野は①生物機能解明・生産能力向上分野②高機能・高品質食品分野③生物系素材分野④生物機能利用による環境改善分野⑤共通基盤研究その他の研究分野とされており、平成8年度には応募のあった387課題の中から21課題が採択されました。

本事業の特徴は、研究費の規模が年間1億円程度を上限とした大型の研究事業であること、中間年度(通常3年目)にはピアレビュー方式による精度の高い評価が実施され、評価結果によっては研究の打ち切りや研究計画の変更が要求される点等です。

以下では8年度に採択された私達の研究課題についてその提案の概要と現状について紹介いたします。

### 【研究の背景と目標】

近年、深刻化しつつある地球規模の人為的環境汚

染(たとえば産業CO<sub>2</sub>排出、重油流出事故など)に対して、自然浄化にたよるだけでなく積極的に微生物の力を利用することにより、滞っている物質循環を潤滑に回転させて地球環境を修復しようという機運が高まっています。これらの技術はバイオレメディエーション技術と呼ばれ、活性汚泥による下水処理などは既に今日の快適な生活に不可欠なものとなっています。すなわち微生物の持つ様々な能力をうまく利用すれば地球に大きな負担をかけることなく環境を修復・維持して行くことができます。

本研究課題ではバイオレメディエーション技術のうち微生物機能を利用したCO<sub>2</sub>の再資源化を骨子として地球環境(空・海・陸)の同時修復ならびに保全を狙いとしています。大気中のCO<sub>2</sub>濃度は産業革命以前の1000年間はおよそ280ppmvで安定していました。しかしながら1800年頃を境に急激に上昇をはじめ、1994年の時点ではCO<sub>2</sub>濃度は358ppmvに、メタンガスについては以前の700ppbvから1720ppbvに達しています。特にここ20～30年での上昇率は激しく、わが国においても1994年度のCO<sub>2</sub>排出量は前年度にくらべて5.9%も上昇し3億4千万トン(炭素換算)を超えたことが最近の環境庁の調査で明らかになり、問題の重大さが再認識されています。もちろんCO<sub>2</sub>固定に関するさまざまな実験的取り組みは既に始まっています。なかでも有力な方法のひとつと言われているのが化学的固定化法ですがその規模は実用的である反面、高温高压で反応が行われる場合が多くさらに化学触媒の製造も含めると多大なエネルギーが必要です。これに対して生物学的CO<sub>2</sub>固定法では環境に対する負荷が非常に小さい点が注目されています。この分野においては光合成に関する研究がその質・量ともに第一です。しかし藻類や植物による光合成には光エネルギー



\*Masaaki MORIKAWA  
1960年10月13日生  
1985年大阪大学大学院工学研究科醸  
酵工学専攻修士課程修了  
現在、大阪大学大学院工学研究科、  
物質・生命工学専攻、助教授、工学  
博士、極限生命工学  
TEL 06-6879-7443  
FAX 06-6879-7443  
E-Mail morikawa@chem.eng.  
osaka-u.ac.jp

ギーの供給が必須でありスケールアップには広大な面積が必要となるなどいくつかの問題があります。またその生物固体もいずれは微生物などによる酸化分解を受けてCO<sub>2</sub>を発生することになり、長期の時間軸における抜本的解決にはなりにくいと考えられます。

これに対して私たちは油田に分布している光を必要としないCO<sub>2</sub>固定細菌および石油代謝細菌に着目し、代謝経路を理解した上で、その能力を遺伝子工学技術、タンパク工学技術、機能性抗体技術などによって強化し、これを最大限活用することで長期的視野に立ったCO<sub>2</sub>の再資源化および環境浄化を目指しています。研究の発端は6年程前に静岡県

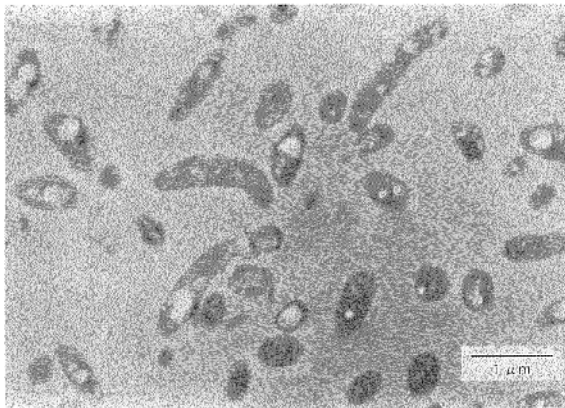


図1 HD-1の透過型電子顕微鏡写真  
細胞内に疎水性顆粒の蓄積が見られる

油田から石油の分解と合成を行う細菌(HD-1)を発見したことに始まります(図1)。HD-1の興味深い点は従来は不可能だと信じられてきた無酸素(嫌気)条件下において石油を分解することと、逆に外部環境に石油がないときには二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)と水素(H<sub>2</sub>)を使って石油主成分であるアルカン類(C<sub>n</sub>H<sub>2n+2</sub>)を微量ながら(菌体乾燥重量あたり0.1%弱)細胞内に蓄積する能力を有している点です。またHD-1はCO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>をそれぞれ単一の炭素源、エネルギー源、窒素源として利用することができます。そこで私たちはひょっとしたらHD-1と同様の能力を持った微生物が他にも油田に分布しており、これらの祖先が原始地球で石油生成に関与していた(あるいは現在もしている)可能性があるのではないかと考えて研究を開始しました。

現在、有用微生物のフィールドでの利用における問題点のひとつは栄養源の供給方法ですが、本菌の

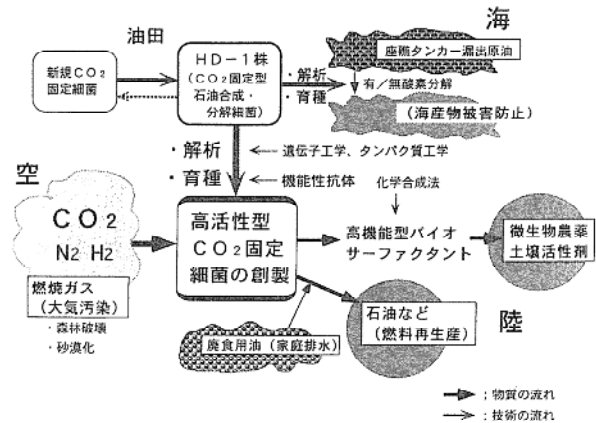


図2 研究実施イメージ

生育条件のうち炭素源、窒素源がCO<sub>2</sub>およびN<sub>2</sub>であることは実用化を考えた場合に大きな利点となります。またエネルギー源のH<sub>2</sub>についても別途供給する必要がある場合は光エネルギーに比べてコストが高くなりますが、CO<sub>2</sub>を多量に排出する製鉄所高炉の排気ガスには数%のH<sub>2</sub>が含まれている場合(CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O=10/70/3/5/12)があり、これを利用すれば特に炭素源、窒素源、エネルギー源を与えなくてもそのままの組成でHD-1が増殖可能と考えられます。すなわち、アルカンの生産収率を十分に上げることさえできれば実用化も夢ではないと考えています。本研究課題の実施イメージを図2に示しています。

【研究項目及び実施体制(研究担当者)】

本研究課題は以下(①～⑤)の5研究項目より構成されています。

① 新規微生物のスクリーニングと評価, 培養条件の検討

(大阪大学大学院工学研究科 森川正章, 生研機構派遣研究員 金沙)

本項目ではHD-1と同等あるいはそれ以上のCO<sub>2</sub>固定能力や石油合成・分解能力を有する油田細菌の分離を目指します。本項目は③以降の研究項目への材料提供の意味を持ち、CO<sub>2</sub>からの石油成分(アルカン)合成経路の解析を加速する効果が期待できます。同時に新規石油分解菌やバイオサーファクタント生産菌なども収集し、流出原油汚染に対する浄化法や微生物農薬生産法の構築に役立つものがないかを探索します。

一方、HD-1は細胞の増殖が遅く、この点が研究の進展を遅らせるだけでなく実用化の際にも障壁になることが予想されます。そこで培地組成など培養条件の最適化のみならず培養装置の詳細検討も本項目で計画します。

## ② バイオサーファクタント化学合成法の確立

(大阪大学大学院工学研究科 森川正章)

本項目では石油分解菌の多くが生産する界面活性剤バイオサーファクタント(例えば私たちが発見したアルスロファクチン)が抗菌活性を有し、一部の植物病害菌の生育を阻止できる点に着目しています。すなわち、最終的にはCO<sub>2</sub>からの微生物農薬生産を目指した研究ですが、当面は先ずアルスロファクチンの化学合成法を構築することを目指します。続いて構造を様々に変化させた同族化合物を合成し、それぞれの構造と抗菌活性との相関を調べることによって高機能型バイオサーファクタントの構造を策定します。さらにその生合成に必要な遺伝子群を同時並行にて別途準備しておき、HD-1など形質転換可能なCO<sub>2</sub>固定細菌に導入し遺伝子発現させることによって、CO<sub>2</sub>からの高機能型バイオサーファクタント(微生物農薬)生産法の確立を目指します。

## ③ CO<sub>2</sub>固定及び石油合成・分解酵素群に関する遺伝子工学・タンパク工学的研究

(大阪大学大学院工学研究科 春木 満, 金谷茂則, 生研機構派遣研究員 天田 啓)

本項目では既に取得しているCO<sub>2</sub>固定型石油合成・分解細菌HD-1のCO<sub>2</sub>固定経路及びアルカン合成・分解経路の解明とその改良を目指します。さらに項目①において性能の優れた菌が取得できた場合にはその代謝経路の解析も本研究項目で行います。具体的な実験手法としては二次元電気泳動法による全細胞タンパク質の解析を異なる培養条件下で行い、CO<sub>2</sub>固定あるいは石油合成・分解に関与するタンパク質を選び出します。さらにそのアミノ酸配列を決定した後、定法にしたがって遺伝子クローニングを目指します。取得できた遺伝子は大腸菌などを用いて発現させ、その産物の酵素学的特性を調べます。機能が同定できた酵素については遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで改良を加えた上で、もとの菌に遺伝子を戻します。このようにして細胞内で重要な役割を果たしている個々の酵素の活性を高

めることによって高活性型CO<sub>2</sub>固定型石油合成・分解細菌の創成を目指します。またランダム突然変異法による菌の育種も計画します。

## ④ 機能性抗体を用いたCO<sub>2</sub>固定及び石油合成反応システムの改良

(大阪大学大学院工学研究科 高木昌宏)

生物では唯一、緑藻類で検討されているアルカン生合成経路のうち最終反応(アルデヒドからのCOの脱離)を触媒する酵素であるデカルボニラーゼはコバルトを配位したポルフィリンが活性中心を形成していることが示唆されています。一方、本項目の研究担当者は鉄ポルフィリンと結合する抗体のL鎖単独で高いペルオキシダーゼ活性を発現させることに成功しています。そこで本項目ではコバルトポルフィリンに結合する抗体を作製してアルカン合成反応への効果を調べます。プラスの効果認められた場合には抗体遺伝子をHD-1に導入し、その発現を試みます。一方において亜鉛ポルフィリンと抗体L鎖の複合体を、光増感剤として利用した、人工光合成とも言える光水素発生システムを構築することも計画します。これはHD-1がCO<sub>2</sub>固定の際にエネルギー源として要求する水素を供給することにも貢献できる可能性があります。

## ⑤ CO<sub>2</sub>再資源化に関する総括試験研究

(グループ全員)

ここでは前項までの研究成果を総合して、最適な地球環境修復システムを策定します。最終年度にはCO<sub>2</sub>を多量に排出する火力発電所や製鉄所高炉での本システムのフィールド試験を通して、その効率等も試算してみたいと考えています。

### 【現在までの成果概要】

① 福井県の原油備蓄タンクからHD-1に比べて増殖速度が約3倍、しかも低CO<sub>2</sub>濃度(5%)条件下において同程度のCO<sub>2</sub>固定(アルカン生産)能力を有する菌TK-122の分離に成功しました(特許出願中、図3)。さらに本菌には優れた石油分解活性も確認され、嫌気条件下における分解速度はHD-1をはるかにしのぐことが判っています。TK-122を用いた<sup>14</sup>C-Hexadecane分解実験において<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>(H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>)が検出されたことから、本菌は嫌気条件下においてアルカンを完全分解していることを確認

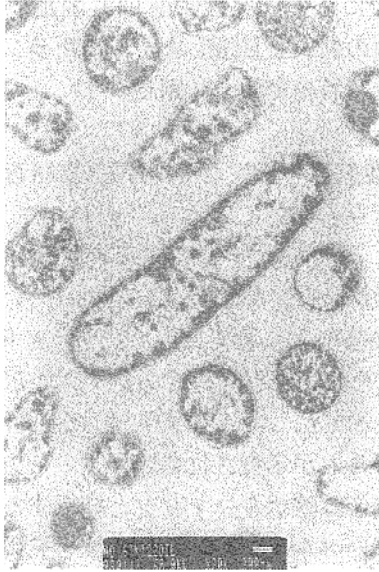


図3 TK-122の透過型電子顕微鏡写真  
石油を含む培地で培養したもの。細胞膜の内面に黒い顆粒が凝集し、細胞内部には取り込んだと思われる油滴が見える。  
(三菱化学生命科学研究所 近藤俊三博士撮影)

しました。また本菌は酸素が存在しない環境では代わりにモリブデン酸を電子受容体として利用している珍しい菌であることが示唆されており、その詳細な石油分解機構については現在解析中です。一方、HD-1のアルカン生産性にはCO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>濃度が大きく影響するのですがTK-122の場合はほとんど影響しないことも分かっています。このことから低CO<sub>2</sub>濃度環境においてはTK-122, 高CO<sub>2</sub>濃度環境においてはHD-1を使い分けることが効率の良いCO<sub>2</sub>固定化法の一つと考えられます。

秋田県の八橋油田(地下1,000m, 温度68℃)やマ

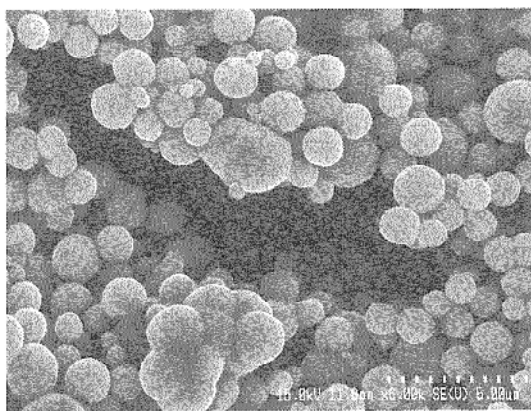


図4 K-76の走査型電子顕微鏡写真  
*Lactobacillus*属細菌は桿菌であるのに対して、本菌は生育最適温度が85℃の超好熱性の球菌。

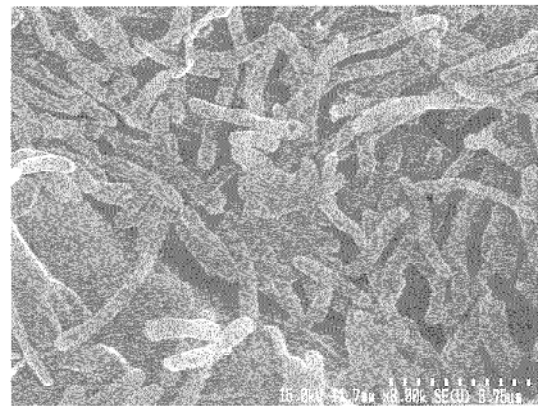


図5 PM9-2の走査型電子顕微鏡写真  
枝豆のような凹凸のある高度好熱性の長桿菌

レーシアの海底油田(海底下500m, 温度70~80℃)からは全く新しい超好熱菌K-76(図4)および高度好熱菌PM9-2(図5)などを分離しました。16S rRNA遺伝子の系統解析の結果、それぞれ *Lactobacillus* 属と *Thermobacteroides* 属に比較的近い細菌であることが分かりました。残念ながら今のところこれらの菌にはCO<sub>2</sub>固定能力や石油分解活性は認められていませんが、地下油田環境での微生物生態系の解明に役立つことが期待できます。またCO<sub>2</sub>固定能力を有する好熱菌S-114も分離することができましたがHD-1同様に細胞増殖速度が遅く、今後最適培養条件の検討が必要です。

さらにベトナムホーチミン市河口の流出原油汚染土壌からは貧栄養な環境においても旺盛に原油を分解する能力のある菌2TN-NBを分離しました。本菌は *Acinetobacter* 属細菌の一種であり、栄養源の少ない実際の原油汚染現場での好氣的原油分解が期待できるかも知れません。

②新規微生物農薬原料としての利用が期待されるバイオサーファクタントに関する研究については、これまでに天然型バイオサーファクタント(具体的にはアルストロファクチン)の化学合成法を確立することができました。現在、天然型とは構造の異なる変異体をいくつか合成しており、今後その抗菌活性などを評価する予定です。さらに、最適化された構造をもつアルストロファクチン変異体をHD-1などバイオサーファクタント生産能のあるCO<sub>2</sub>固定細菌を用いて生産するための準備として、アルストロファクチン合成遺伝子の部分クローニングにも成功しま

した。現在、遺伝子全長(約40~100kb程度と予想される)のクローニングを進めています。またタイの土壌から分離した耐塩性の *Bacillus* 属細菌は構造の異なるバイオサーファクタントを3種類も同時に生産する能力を有していることが判りました。今後、これらの化合物の抗菌活性などについても検討する予定です。

③HD-1のCO<sub>2</sub>からアルカンへの代謝経路解明に関しては、菌体破砕物を用いて可能性のあるCO<sub>2</sub>固定経路の鍵酵素の活性測定を試みましたが、いずれも活性が認められませんでした。これは全く新しいCO<sub>2</sub>固定経路の発見の可能性があります。そこで現在、CO<sub>2</sub>固定条件下で特異的に発現するタンパク質を二次元電気泳動法を用いて解析しています。また昨年度の半ばからHD-1ゲノム解析を開始しており(京都大学大学院工学研究科今中忠行教授グループ)、新たな展開が見られ始めています。例えば嫌気・好気条件下での多面的な代謝調節に関するRegA, RegB 遺伝子(これは新しいCO<sub>2</sub>固定経路に関与している可能性もある)、脂肪酸合成経路やCO<sub>2</sub>固定の経路に関わっていると考えられるBiotin Carboxylase 遺伝子などをクローニングしました。一方、石油分解経路関連では芳香属炭化水素化合物の酸化分解系遺伝子オペロンの全長クローニングにも成功し、遺伝子の構成が既報のものとは異なることを見出しています。さらにβ酸化系酵素のひとつで、アルカン合成経路(予想)において脂肪酸からアルデヒドへの変換反応に関連する可能性のあるAidB 遺伝子の一部と思われる遺伝子領域も見つかっています。アルデヒド脱水素酵素遺伝子とリパーゼ(エステラーゼ)遺伝子については遺伝子クローニングの他に、大腸菌を用いた遺伝子発現系を構築し、その酵素学的特性を明らかにしました。その結果、いずれの酵素もアルキル鎖長の長い基質に対して高い活性を示すなど疎水性の炭素源を好むHD-1の生理学的特徴を裏付ける特性が判明しました。現在、HD-1でのセルフクローニングによる遺伝子量増幅効果や逆に遺伝子破壊による代謝への影響を調べることを計画中です。一方、生物のアルカン合成経路についてはいまのところまだよく分かっていませんが、

一昨年シロイヌナズナという植物のゲノム遺伝子の中からこのアルカン合成に重要な役割を果たしている可能性のある遺伝子が見つかりました。現在、これをもとにHD-1で同様の機能を持った遺伝子を探索することも試みています。

④機能性抗体L-zymeを用いたCO<sub>2</sub>固定法の開発に関しては、まずコバルトポリフィリン単独でアルカン合成反応(最終段階; デカルボニレーション)がわずかですが進行することを確認しました。その後、L-zymeの添加効果を調べましたが、結果に再現性がなく現在コバルトのポリフィリンへの配位など各ステップの反応条件の検討を行っています。一方、鉄ポリフィリンと結合することによりペルオキシダーゼ活性を有する抗ポリフィリン抗体L鎖がポリフィリン亜鉛錯体(TCPPZn(II))を認識し結合することが認められ、光照射によってメチルピオロゲンが還元されて生じる605nmでの特異的な発色から、TCPPZn(II)+13-1L鎖複合体は約2倍の還元型メチルピオロゲンを生成し、光増感能が向上すること、ヒドロゲナーゼを加え光水素発生反応を行った結果、TCPPZn(II)+13-1L鎖複合体はTCPPZn(II)単独の場合に比べて30℃において2倍以上の水素を発生することが確認できました。さらに、励起三重項状態の平均寿命が増大していることが認められました。すなわちL-zymeを用いることにより水素発生に関する光増感現象が確認されたわけで機能性抗体触媒を用いたCO<sub>2</sub>固定にも一歩近づいたといえます。L-zyme 遺伝子は現在、大腸菌組換え体を使って生産しており、HD-1などの形質転換可能なCO<sub>2</sub>固定細菌にも同様に移入することができるため、個々の細胞活性を改変できることが期待できます。

#### 【おわりに】

現在のところ油田細菌を用いたCO<sub>2</sub>からの石油(アルカン)合成については生産収率の低さ、高コストなど克服すべき問題がまだまだありますが、近い将来、本研究課題の中で得られた成果を通して地球環境の維持改善にわずかでも役立つことができればと願っています。