

氏名(本籍)	井上明 (神奈川県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1,140号
学位授与年月日	平成7年12月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	超有機溶媒耐性細菌 <i>Pseudomonas Putida</i> IH-2000株の性質と溶媒耐性能評価方法の確立に関する研究
主査	筑波大学教授 工学博士 田中秀夫
副査	筑波大学教授 農学博士 祥雲弘文
副査	筑波大学教授 農学博士 中原忠篤
副査	筑波大学助教授 農学博士 柿蔭眞

論文の要旨

有機溶媒耐性微生物は、過酷な高濃度の有機溶媒存在下で生育出来る微生物の総称であるが、未だ該微生物の存在、菌学的性質及び培養特性等は殆ど明らかにされていない。有機溶媒耐性微生物は学問的にも応用の面からも大変注目されている微生物である。本研究は、未知微生物である有機溶媒耐性微生物の分離と菌学的性質、培養特性、溶媒耐性遺伝子の存在および溶媒耐性の定量化等の基礎的知見を得ることを目的に実施したものである。

超有機溶媒耐性細菌に関する検討：自然界に於ける有機溶媒耐性微生物の存在を検討した結果、30%以上の有機溶媒（シクロヘキサン／ヘキサン）存在条件下でも生育可能な有機溶媒耐性微生物の存在を明らかにした。この知見を基に溶媒耐性微生物のスクリーニング法を確立し、有機溶媒の中で毒性の強いトルエンを対象に検索した結果、世界で初めて *Pseudomonas* 属の超有機溶媒耐性細菌 IH-2000株を分離した。本菌はトルエンを始めとして n-ヘキサン、n-デカン等の飽和脂肪族炭化水素類、1-ヘキセン、1,5-ヘキサジエン等の不飽和炭化水素類、脂環式炭化水素類のシクロペタン、メチルシクロヘキサン等、更にキシレン、ヘチルベンゼン等の芳香族炭化水素類、ヘプタノール等のアルコール類及び n-ヘキシルエーテル等のエーテル類に幅広い溶媒耐性を有し、しかも50%以上の高濃度の有機溶媒存在下でも旺盛に生育し、非水培養系への応用可能性が高い細菌であることが示唆された。溶媒耐性の安定化は、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} の添加により向上した。

溶媒耐性遺伝子に関する検討：溶媒耐性機構を遺伝子レベルから解析する為に、溶媒耐性変異株の取得及び溶媒耐性遺伝子のクローニングを行った。変異剤（NTG）を用いて、各種の溶媒感受性変異性（トルエン感受性、キシレン感受性、シクロヘキサン感受性）を得ることが出来た。トルエン感受性変異株を宿主として溶媒耐性遺伝子のクローニングを行い、トルエン耐性遺伝子領域を含む約8.7 KbpDNA フラグメントを得た。サブクローンの結果、トルエン耐性発現には2カ所の遺伝子領域が関与していた。溶媒感受性変異株の取得及びトルエン耐性遺伝子のクローニングにより、溶媒耐性に耐性遺伝子の関与を初めて明らかにした。

溶媒耐性の定量化に関する検討：超有機溶媒耐性細菌 IH-2000株の生育パターンから、生育度と有機溶媒の化学構造（母核の炭素数、分岐構造、不飽和結合数、置換基の数及び種類等）に高い相関性があることを見いだした。有機溶媒の物性定数の内、生体への影響が強い極性因子（溶解度、溶解パラメーター、誘電率、双極子モーメント及び log P 値）について検討した結果、相関性の高い log P 値を溶媒毒性指標とするという新提案を行った。その結果、初めて有機溶媒の毒性及び微生物の溶媒耐性を定量化することが出来た。この方法により、微生物に

対する溶媒毒性はデカン<ヘキサン<キレシン<トルエン<ベンゼンの順に強いことが明らかとなった。また、本指標を用いて超有機溶媒耐性細菌 IH-2000株の有機溶媒に対する培養挙動を解析することができた。これらの結果から、最も毒性の強い有機溶媒は log P 値1.9~2.1の範囲にあるクロロホルム及びベンゼンであることを指摘した。

溶媒毒性指標 log P 値の利用：本研究で考案した有機溶媒重層寒天平板法及び毒性指標を用いて、各種微生物（グラム陰性細菌37株，グラム陽性細菌34株，酵母菌41株）の溶媒耐性の相違を明らかにした。最も溶媒耐性の強い属は，グラム陰性細菌で *Pseudomonas* 属（log P 値3.1），グラム陽性細菌で *Bacillus* 属（log P 値4.5），酵母菌で *Hansenula* 属，*Candida* 属及び *Torulopsis* 属（log P 値3.9）であった。同属，同種でも菌株の違いにより溶媒耐性能が異なり，微生物の表層物性の多様性が示唆された。また，一定の生育限界 log P 値を有する微生物を指標に用いることにより，測定が困難な多成分系混合溶媒の log P 値が安易に決定でき，更に任意の混合比の log P 値の推定或は任意の log P 値による溶媒成分及び混合比の決定が可能となった。

ここで得られた結果は有機溶媒耐性微生物の研究，非水系バイオリアクターへの応用，溶媒耐性微生物の育種等の応用微生物分野へ基礎的新知見を提供するものである。

審 査 の 要 旨

本研究は，未知の微生物である有機溶媒耐性微生物の分離及び菌学的性質，培養特性，溶媒耐性遺伝子の存在，溶媒耐性の定量化などの基礎的な知見を得ることを目的として行われたものである。これまでに過酷な有機溶媒存在下で生育できる微生物の存在，菌学的性質及び培養特性などはほとんど明らかにされていなかった。

申請者は高毒性有機溶媒のトルエンに耐性を持つ，*Pseudomonas* 属の超有機溶媒耐性細菌 IH-2000株を世界ではじめて分離した。本菌は，トルエン以外の幅広い溶媒耐性を有すること，その耐性の安定化は Mg^{2+} 及び Ca^{2+} の添加により向上することを明らかにした。また，この溶媒耐性機構を遺伝子レベルから解析を行い，溶媒耐性に耐性遺伝子が関与することを初めて明らかにした。さらに，細菌 IH-2000株の生育パターンによる生育と有機溶媒の化学構成との相関関係から，log P 値を溶媒毒性指標とする新提案を行い，有機溶媒の毒性及び微生物の溶媒耐性の定量化に成功した。

本研究は，これまでにほとんど行われていなかった有機溶媒耐性微生物の全体像を初めて明らかにした研究として独創性があり，高く評価できる。また，本研究は，溶媒耐性微生物の育種培養法及び有機溶媒系の利用，さらに非水系バイオリアクターの開発への道を開くなど，応用性が広い研究であるといえる。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。