

学 位 論 文 題 名

Microdial Demetallization of Crude Oli :
Nickel Protoporphyrin Disodium
as a Model Organo-Metallic Substrate

（微生物による原油からの金属除去－ニッケル・プロトポルフィリン・
ナトリウムを有機金属のモデル化合物として－）

学位論文内容の要旨

ニッケルとバナジウムは原油中に最も多く含まれる重金属で、ポルフィリン及びその類縁の有機物と結合した形で存在する。これらの重金属は石油の起源や石油形成過程のバイオマーカーとして使われたり、油井探索時の重要なマーカーとして使われたりもしている。

メタロポルフィリンに対する注目が集まってきたのは、最近石油精製産業においてより重い、ニッケルとバナジウムを高い濃度で含有した原油を取り扱わねばならなくなったからである。これらの重金属は原油中に少量存在しても、精製過程つまり水素化工程などにおいて触媒上に不可逆的に吸着し、活性部位への接触を妨害することにより触媒の寿命を短くする。それ故に原油からのこれらの重金属の除去は経済的、環境的理由からも重要な精製過程の一つと言えよう。

現在、環境中の重金属や他の有機汚染物質を処理するのに微生物を利用することが様々な領域で重要な処理法の一つとして認知されるようになってきた。微生物は広範囲の有機汚染物質を分解することのできる数々の代謝経路をもっており、それらの代謝経路に関する生物化学的・分子生物学的要素が複雑に絡んでいて未だに解明されていないものが多い。それに加えて現在、微生物と重金属間の相互作用の研究も広く行われている。環境的にも経済的にも重要な焦点となる重金属を効率的に除去する能力をもつ微生物の探索及びその利用に関する研究は、実用面からも重要な課題である。

石油中に検出できるメタロポルフィリンを特定し、石油の精製過程における影響を検討することは重要な課題である。しかしながらこれらのメタロポルフィリンには骨格の違いや側鎖の違いにより多数の誘導体が存在していることが知られており、それらを相互に分離することは容易ではない。そこで本研究では容易に市販のプロトポルフィリンとニッケルから合成できるニッケルプロトポルフィリン二ナトリウム(NiPPDS)をモデル化合物として、これを分解可能な微生物の取得とその分解機構の解析を目的として研究を行った。

1. NiPPDS 分解微生物のスクリーニングとその分解特性

北海道の石油備蓄基地周辺の土壌から、NiPPDS を単一炭素源として生育できる約 100 菌株を得た。NiPPDS の特徴的な紫外外部吸収 (398 nm) の減少を指標に、最も優れた

NiPPDS 分解能を持つ株 YA-1 を選択した。YA-1 株は、グラム陰性、好気性、桿菌で、16S rRNA 塩基配列解析の結果に基づき *Pseudomonas azelaica* YA-1 と名付けた。YA-1 株は唯一の炭素源、窒素源として NiPPDS を利用でき、最大で 77% の NiPPDS を分解することができた。HPLC 分析の結果、YA-1 は、NiPPDS を紫外吸収ピークの異なる少なくとも 5 つの化合物に分解することが示された。さらに YA-1 はバナジウムオクタエチルポルフィリンに関しては 79% の分解が可能であるが、一方でバナジウムテトラエチルポルフィリンに対しては全く分解能を示さなかった。

2. NiPPDS 分解酵素の精製

YA-1 株の細胞そのままを用いた NiPPDS の分解条件の検討を種々行ったが分解率を 80% 以上にする条件は見つからなかった。そこで分解酵素の精製を試みた。その結果、硫酸沈殿分画、DEAE Toyopearl 650M、CM Toyopearl 650M、Biogel P-60 クロマトグラフィーによって、単一タンパク質にまで精製できた。本酵素には新規の特性があり、これをプロトポルフィリナーゼ(protoporphyrinase)と命名した。本酵素は 1 本のポリペプチド鎖からなり、その分子量は SDS-PAGE では、39,000Da であり、ゲルろ過法では 34,000Da であった。酵素の精製収率は 11.3% であり、発酵上清から 498 倍の精製率の向上が見られた。精製した酵素 (19 U/ml) を用いた場合、NiPPDS を 1 時間以内に 95% 以上分解することができた。

本酵素の至適 pH は pH 7.0、至適温度は 30℃ であった。また pH 2.0 – 11、50℃ までは安定に活性を維持していた。酵素活性は、FeCl₃、K₃Fe(CN)₆、ZnCl₂、CdCl₂ の添加によって失われた。

本酵素のアミノ末端のアミノ酸配列は、DINGGGATLPQKLYQTSGVLTAGFAAYYGG で、*Desulfovibrio desulfuricans* のペリプラズム酵素の(Fe)hydrogenase と 75% の類似性があった。なおこの酵素はさまざまな重金属汚染土壌の浄化に重要な役割を果たしていると言われている。また 3 種の内部アミノ酸配列 DDKVLHVYNMSDYIAPDVTVDKFTKEE GGKV, ITAWRERAEIRLESTDFAAALSQLTADLLG, AYQTEFPYFTDMGMSYIVYXD HMMVVWHTS を決定した。

3. プロトポルフィリナーゼ遺伝子クローニングの試み

アミノ酸の配列をもとに、本酵素の遺伝子のクローニングを試みた。N 末端配列、また内部アミノ酸配列からオリゴヌクレオチドを合成し、PCR 法による本酵素の遺伝子の増幅を試みたが、目的のサイズの増幅は見られなかった。これらのオリゴヌクレオチドをプローブとしたゲノミックサザン解析では、明確なシグナルが見られた。

本研究では、土壌より単離された細菌 YA-1 株が、ニッケルプロトポルフィリンニナトリウム(NiPPDS)を効率よく分解することをはじめて見いだした。これまでに HPLC によるポルフィリンの分離検出に関する多くの報告があるが、原油中のニッケルとバナジウムとポルフィリン複合体に関しては全く調べられていない。また重金属廃棄物の微生物処理に関する報告も散見されるが、ニッケルプロトポルフィリンの微生物学的分解に関する研究は未だに報告されていない。そういった意味で、本研究においてプロトポルフィリナーゼの精製を行ったことは、今後の微生物分解に関する詳細な研究を行っていく上で重要

な知見をもたらしたといえる。本研究ではその遺伝子の単離までには至らなかったが、本遺伝子が取得できれば、原菌株での酵素の生産量の向上に加え、原油中でも全く生育阻害を受けない微生物への導入による更に効率のよい脱重金属のプロセスの構築に応用できるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 助 教 授 浅 野 行 蔵

学 位 論 文 題 名

Microdial Demetallization of Crude Oli : Nickel Protoporphyrin Disodium as a Model Organo-Metallic Substrate

(微生物による原油からの金属除去－ニッケル・プロトポルフィリン・
ナトリウムを有機金属のモデル化合物として－)

本論文は、4章からなり、図 25、表 16、文献 71を含む総頁数140の英語論文である。
ほかに参考論文3編が付されている。

ニッケルとバナジウムは原油中に最も多く含まれる重金属で、ポルフィリン及びその類縁の有機物と結合した形で存在する。これらの重金属は石油の起源や石油形成過程のバイオマーカーとして使われたり、油井探索時の重要なマーカーとして使われたりもしている。近年、石油精製産業においてニッケルやバナジウムなどの重金属の存在による原油精製過程つまり水素化工程などにおける触媒上への重金属の沈着とその結果生じる触媒の寿命低下が問題となっている。一方現在、環境中の重金属や他の有機汚染物質を処理するのに微生物を利用することが様々の領域で重要な処理法の一つとして認知されるようになってきた。環境的にも経済的にも重要な課題となる重金属を効率的に利用可能な資源から除去する能力をもつ微生物の探索と研究解明は、実用面からも重要な研究課題である。

以上の背景から、本研究では原油中からの重金属の微生物除去としてニッケルプロトポルフィリン二ナトリウム(NiPPDS)を有機金属化合物のモデル化合物として用い、NiPPDS分解菌の探索とその実用化を目指した研究を行った。

北海道の石油備蓄基地周辺の土壌を微生物源としたスクリーニングの結果、NiPPDSを分解する細菌YA-1株を単離した。本菌は、NiPPDSをすくなくとも5つの化合物に分解

した。これらの化合物は、NiPPDS の特徴的な紫外外部吸収（398 nm）を示さず、NiPPDSの分解産物と推定された。また、この分解反応の過程に於いてNi²⁺がそれらの分解に従い徐々に水に移行され、YA-1によって分解されて行くことが示された。つまり、水層のNi²⁺の量は増加し、逆に有機層のNi²⁺の量は減少したことを示していた。しかしながら、未分解NiPPDSとそのリガンドであるPPDSは非極性物質であり、有機層に残存していた。これより金属複合体から解離されたNi²⁺の量は酵素反応前後の間では明らかに違いがあった。なお有機層中の未分解NiPPDSの量は398nmで検出できた。

YA-1株はグラム陰性、好気性、桿菌で、16S rRNA塩基配列解析の結果に基づき *Pseudomonas azelaica* と同定され、それに従いこの菌株を *Pseudomonas azelaica* YA-1 と名付けた。加えて本菌は唯一の炭素源、窒素源としてNiPPDSを利用することも見いだした。

YA-1株の細胞をそのまま用いるNiPPDSの分解条件の検討を種々行ったが分解率を80%以上にする条件は見つからなかった。そこで分解率の向上を目指し本酵素の精製を試みた。その結果、一連の操作により単一タンパク質にまで精製できた。本酵素は、これまでに見つかっていない特性を有する新規酵素であり、本酵素をprotoporphyrinaseと命名した。本酵素の分子量は、SDS-PAGEでは39,000Da、ゲルろ過法では34,000Daであり、単量体タンパクであると考えられた。酵素の精製収率は11.3%であり、培養上清から498倍の精製率の向上が見られた。精製した酵素（19 U/ml）を用いた場合、NiPPDSを1時間以内に95%以上分解することができた。本酵素の最適活性pH 7.0、最適温度は30℃であり、pH 2.0 – 11の間と50℃までは安定に活性を維持していた。酵素活性は、FeCl₃、K₃Fe(CN)₆、ZnCl₂、CdCl₂の添加によって失われた。本酵素のアミノ末端のアミノ酸配列は、*Desulfovibrio desulfuricans* のペリズマ酵素の(Fe)hydrogenaseと75%の類似性があった。

現在アミノ酸の配列をもとにした、本酵素の遺伝子のクローニングを試みており、遺伝子が取得できれば少なくとも原菌株での酵素の生産量の向上が期待できる。また原油中でも全く生育阻害を受けない微生物にこの遺伝子を導入できれば、更に効率のよい脱重金属のプロセスを構築できる。いずれの場合においても備蓄原油タンク内での処理が可能であり、本プロセスは十分に実用可能なものと考えられる。

以上の申請者の研究による、*Pseudomonas azelaica* YA-1株によるNiPPDSの分解は、NiPPDSの微生物分解に関する初めての報告であり、YA-1株由来のNiPPDS分解酵素とともに学術的に意義ある成果である。また、原油中の重金属除去への実用的、応用的な寄与も大きく価値ある研究であるといえる。

よって、審査員一同は、ジーナ リオ デデレス (Gina Rio Dedeles) が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。