

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

Characterization of Novel Desulfurizing Bacteria as Biocatalysts  
Applicable to Deep Desulfurization of Light Gas Oils

新規脱硫細菌の機能解析と軽油の超深度脱硫への応用

申請者

古屋 俊樹

Toshiki Furuya

応用化学専攻 応用生物化学研究

2003年 11月

ディーゼル車の燃料として使用されている軽油は、硫黄分を除去するために金属触媒を用いた水素化脱硫によって処理されているが、アルキルジベンゾチオフェン類などの有機硫黄化合物は脱硫が困難であるため軽油中に残存している。これらの難脱硫性化合物は燃焼により硫黄酸化物を生成し、さらに窒素酸化物や粒子状物質の生成を促すことから酸性雨や大気汚染の原因となっている。したがって、軽油中の硫黄分をさらに低減することが求められている。

微生物を生体触媒として利用するバイオ脱硫は、これらの難脱硫性化合物を除去するための有効な手段の1つと考えられる。すなわち、金属触媒は多種多様な有機硫黄化合物を脱硫可能であるが、アルキルジベンゾチオフェン類などの脱硫はそのアルキル基が立体障害となるために困難である。これに対して、生体触媒は基質に対する特異性が非常に高く、これらの難脱硫性化合物を選択的に脱硫することが可能と考えられる。さらに、生体触媒は常温常圧条件下での反応を可能とすることから環境負荷を低減することも可能である。したがって、アルキルジベンゾチオフェン類などを脱硫可能な微生物を探索し、取得した微生物の脱硫機能を遺伝子レベルで解明して、軽油の超深度脱硫への応用を図ることは、生物化学の分野に有用な基礎的知見をもたらすばかりでなくバイオプロセスの実用へ向けた応用的側面からも極めて重要である。

本論文では、新規脱硫微生物の取得および機能解析と軽油の超深度脱硫への応用を目的として研究を行い、その成果をまとめた。実際のプロセスを想定して高温条件下でジベンゾチオフェンを脱硫可能な微生物を探索し、新規な好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌2株を取得することに成功した。水素化脱硫処理後の軽油中にはアルキルジベンゾチオフェン類以外にもアルキルナフトチオフェン類が残存しているが、ナフトチオフェンを特異的に脱硫可能な細菌を初めて取得することにも成功した。また、2株の好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌から脱硫に関わる全遺伝子をクローニングし、塩基配列の解析および大腸菌における発現試験を通して当該細菌の脱硫機能を遺伝子レベルで解明した。さらに、当該細菌を実際の軽油の脱硫に応用し、その有効性を評価した。

本論文は10章より構成されている。

第1章では、微生物を生体触媒として利用するバイオ脱硫について概説した。微生物の脱硫機能についてまとめ、さらにバイオ脱硫を金属触媒を用いた水素化脱硫と比較し、その予想される有効性について述べた。これらを背景として、本研究の意義と目的を明らかにした。

第2章では、本研究で用いた主な実験方法について説明した。すなわち、各種細菌の培養方法、有機硫黄化合物および軽油の脱硫方法、遺伝子工学的手法、ならびに脱硫代謝産物の分析方法などについて述べた。

第3章では、新規な好熱性ジベンゾチオフェン(DBT)脱硫微生物を探索し、取得した細菌2株の機能を解析した。高温条件下で行われている金属触媒を用い

た水素化脱硫を補完する技術としてバイオ脱硫を適用する場合、水素化脱硫後の高温状態にある軽油を処理することが可能であれば冷却に要するコストを削減できるため経済的に有利である。そこで 50 の高温条件下で DBT を唯一の硫黄源として増殖可能な微生物を探索し、新規な好熱性 DBT 脱硫細菌 *Bacillus subtilis* WU-S2B および *Mycobacterium phlei* WU-F1 の 2 株を取得することに成功した。これらの細菌は炭素、硫黄原子間の結合を選択的に切断して DBT 分子から硫黄原子のみを除去する代謝経路で DBT を脱硫することを明らかにした。また DBT 脱硫の温度依存性について検討し、両株とも 50 の高温域を含む広範な温度条件下で DBT を効率的に脱硫した。さらに DBT 誘導体に対する脱硫活性についても検討し、50 の高温条件下で DBT のみならず水素化脱硫では除去が困難な 4,6-ジメチル DBT などのアルキル DBT 類も効率的に脱硫可能なことを明らかにした。とくに、WU-F1 は 0.8 mM の DBT および 4,6-ジメチル DBT をそれぞれ 90 分、8 時間で完全に分解した。

第 4 章では、*M. phlei* WU-F1 を用いてナフトチオフェン (NTH) および 2-エチル NTH の脱硫について検討した。水素化脱硫処理後の軽油中にはアルキル DBT 類以外にも微量ではあるがアルキル NTH 類が残存しており、超深度脱硫を実現するためにはこれらの難脱硫性化合物も除去できることが望ましい。そこで NTH 誘導体に対する脱硫活性について検討した結果、WU-F1 は 50 の高温条件下で 0.8 mM の NTH および 2-エチル NTH を 8 時間でそれぞれ 67%、83% 分解し、これらの有機硫黄化合物も効率的に脱硫可能なことを明らかにした。

第 5 章では、新規な NTH 脱硫微生物を探索し、取得した細菌の機能を解析した。NTH を唯一の硫黄源として増殖可能な微生物を探索し、NTH を特異的に脱硫可能な細菌 *Rhodococcus* sp. WU-K2R を初めて取得することに成功した。NTH 脱硫代謝産物を同定して代謝経路を推定し、WU-K2R は炭素、硫黄原子間の結合を選択的に切断する経路で NTH を脱硫することを明らかにした。さらに有機硫黄化合物に対する脱硫活性について検討した結果、WU-K2R は対称構造の DBT を脱硫しないが NTH やベンゾチオフェンなどの非対称構造の有機硫黄化合物を効率的に脱硫し、DBT 脱硫細菌とは異なる新規な性質を有することを明らかにした。

第 6 章では、*B. subtilis* WU-S2B および *M. phlei* WU-F1 から DBT 脱硫遺伝子をクローニングし、その機能を解析した。ブランクハイブリダイゼーション法により、WU-S2B および WU-F1 から DBT 脱硫遺伝子を取得することに成功した。塩基配列を解析した結果、WU-S2B と WU-F1 は細菌の属種が異なり系統的に離れているにも関わらず DBT 脱硫遺伝子の塩基配列は同一であることを明らかにし、これを *bdsABC* と命名した。*bdsABC* は既報の常温性 DBT 脱硫細菌 *Rhodococcus* sp. IGTS8 の DBT 脱硫遺伝子 (*dszABC*) と 61.0% の相同性を示した。さらに、大腸菌における発現試験を行った結果、*bdsABC* を保持する組換え大腸菌は原株 WU-S2B および WU-F1 と同様に 50 の高温域を含む広範な温度条件下で DBT を

効率的に脱硫し、WU-S2B および WU-F1 の広範な温度条件下で脱硫可能な性質は *bdsABC* に依存していることを明らかにした。このように、当該細菌の優位性を遺伝子レベルで明らかにした。

第 7 章では、*B. subtilis* WU-S2B から DBT 脱硫に関わるフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を解析した。DBT 脱硫代謝経路において DBT の酸化反応を触媒するモノオキシゲナーゼの活性発現には、酸化反応に必要な還元型フラビンを供給するフラビンレダクターゼが不可欠である。そこで、インドール酸化活性を指標にした共発現スクリーニング法により、WU-S2B からフラビンレダクターゼ遺伝子 *frb* を取得することに成功した。*frb* の発現産物は高温条件下で高いフラビンレダクターゼ活性を示した。さらに、大腸菌内で *frb* を DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* と共発現させたところ、*bdsABC* のみを保持する大腸菌（大腸菌保有のフラビンレダクターゼにより活性を発現）と比較して 40 における脱硫活性が 27 倍に向上した。また、当該遺伝子をクローニングするために考案した共発現スクリーニング法は、種々のフラビンレダクターゼ遺伝子やモノオキシゲナーゼ遺伝子のクローニングに広く応用可能なことを示した。

第 8 章では、*M. phlei* WU-F1 から DBT 脱硫に関わるフラビンレダクターゼ遺伝子をクローニングし、その機能を解析した。コロニーハイブリダイゼーション法により、WU-F1 からフラビンレダクターゼ遺伝子 *frm* を取得することに成功した。塩基配列を解析し、*frm* は前述の *frb* と推定アミノ酸配列でほとんど相同性を示さず、異なるファミリーに属する酵素遺伝子と考えられた。*frm* の発現産物は 60 の高温域を含む広範な温度条件下で高いフラビンレダクターゼ活性を示し、60、30 分の熱処理後も 80% 以上の活性を維持していた。さらに、大腸菌内で *frm* を DBT 脱硫遺伝子 *bdsABC* と共発現させたところ、*bdsABC* のみを保持する大腸菌と比較して 40 における脱硫活性が 28 倍に向上した。また、大腸菌高発現株から当該酵素 Frm を精製し、その酵素的諸性質を解明した。

第 9 章では、*M. phlei* WU-F1 を用いて実際の水素化脱硫処理された軽油の脱硫について検討した。WU-F1 の菌体を 45 の高温条件下、50% の軽油存在下で水素化脱硫処理された軽油に作用させたところ、120 ppm の硫黄分を含む市販の軽油を 50 ppm に、さらに 34 ppm の硫黄分を含む試験用の低硫黄濃度軽油を 15 ppm にまで脱硫した。バイオ脱硫処理した軽油をガスクロマトグラフィー - 原子発光検出器で分析し、4,6-ジメチル DBT などのアルキル DBT 類に相当するピークが消失していることを確認した。このように、当該細菌は高温条件下で DBT のみならず実際の軽油も効率的に脱硫可能であり、優れた脱硫生体触媒であることを明らかにした。

第 10 章では、本研究を総括した。本研究によって得られた知見をもとに微生物を生体触媒として利用したバイオ脱硫の有効性を評価し、実用化へ向けてさらに解決すべき点などについて述べた。