# 微生物によるリン酸ポリマー蓄積機構の解明と利用

「変換と制御」領域　　黒田　章夫

## 要　旨

食料生産に欠かせないリンは、有限の資源であるリン鉱石から精製される。しかし今、人類の未来を支える高品質のリン鉱石の枯渇が予測されている。限りあるリン資源を管理することは、持続可能な社会を築く上で欠かせないと考え始められている。一方で日本はこの憂うべき資源を世界中から集めては環境に垂れ流し、富栄養化問題を引き起こしている。微生物はリン酸のポリマーであるポリリン酸を合成する能力がある。微生物のポリリン酸は環境中のリンを濃縮して、除去回収するのに役立つ。生物を使ってリンの問題を解決することを考えた場合、微生物の作るポリリン酸は極めて重要な物質である。本研究者は微生物のポリリン酸蓄積機構を分子レベルで解明し、変異育種によって微生物の菌体内ポリリン酸含量を増加させる方法を開発した。また、ポリリン酸を利用する技術の開発を行った。

## １. 研究のねらい

リン、窒素、カリウムは植物の三大栄養素であり、肥料として使われている。窒素は空気中から固定することができ、カリウムは海水中に存在するので両者はほぼ無限にあると考えて良い。しかし、リンは有限の資源であるリン鉱石から精製される。世界のリン鉱石の埋蔵量は約 140 億トンと見積もられ、現在年間約 1 億 4000 万トン採掘されているので、単純に考えても 100 年程で枯渇する（図１）。

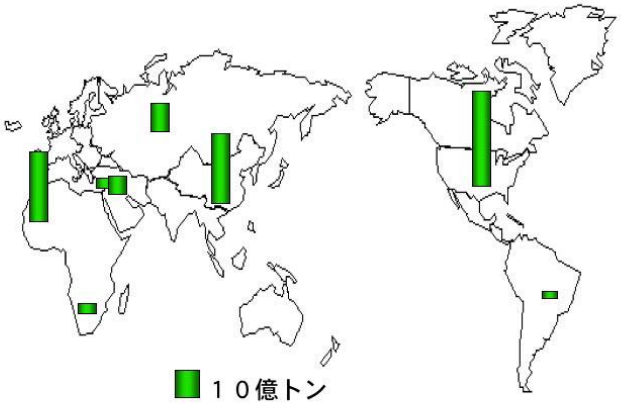
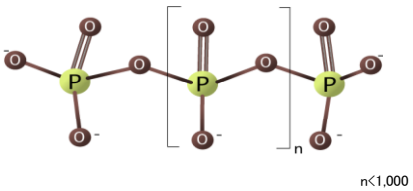



図１、世界のリン鉱石の生産量。2004 年度アメリカ地質調査統計による。

今後の人口増加や発展途上国のリン肥料の利用量の増大を考えると、数十年で半減するのではないかと言われている。リンは人類の食料生産にとって最も憂うべき必須な資源である。持続的社会形成のため、世界的規模で、リンをリサイクルしたり、効率よく使う技術の開発が重要である。特に日本は毎年 100 万トンものリン鉱石を 100%輸入に依存しており、リンの有効利用技術の開発は急務である。

一方我々の利用したリンが環境に垂れ流されると、富栄養化という現象を引き起こして、赤潮やアオコの発生を引き起こす。平成 15 年度の「環境白書」では、依然として赤潮やアオコの発生が後を絶たないことが報告されている。日本はこの憂うべき資源を世界中から集めては環境に垂れ流し、自国の環境を損ねる行為を続けているのである。

環境中で活躍するのは微生物である。生活排水や工場廃水から有機物を除き、浄化する主役は活性汚泥と呼ばれる微生物の集団である。微生物はリン酸のポリマーであるポリリン酸を蓄積する能力がある（図２）。微生物に如何に多くのポリリン酸を蓄積させるかが、排水から効率よくリンを除去するポイントであることが知られている。我々は世界的にもあまり研究が進んでいないポリリン酸の分子生物学的な解析を行い、ポリリン酸の蓄積機構を明らかにしてきた（Kuroda, A. et al., Science, [2001] 293, 705-708 など）。また、ポリリン酸はリンの塊であると同時に、生命エネルギーの塊でもある。ポリリン酸をリン源としてだけではなく、生命を動かすエネルギーとしても利用するために、ポリリン酸を利用する酵素の研究は重要である。本さきがけ研究では貴重リン資源の有効利用のために、環境に流出するリンをポリリン酸として回収し、なおかつ回収後に利用するための技術開発を行った。具体的研究内容は、(1)微生物のポリリン酸蓄積機構を分子レベルで解明すること、(2)変異によりポリリン酸蓄積微生物を育種する技術を開発すること、(3)ポリリン酸を生化学的に利用する技術を開発することである。




(1) 機能不明の無機ポリマー
(2) リンの問題を解決するために重要な物質
(3) 生命エネルギーを利用してものつくりに応用

**図２，ポリリン酸の構造と特徴。**

## ２. 研究成果

### （１）微生物のポリリン酸蓄積機構の解明

大腸菌を含め多くの微生物は、ATP（アデノシン三リン酸）を利用してポリリン酸を合成する酵素（ポリリン酸キナーゼ PPK）を持つ。大腸菌が合成するポリリン酸は、リン酸が直鎖状に最大750個結合したものである（総説として、Kornberg, A., J. Bacteriol., [1995] 177, 491-496など）。しかし、細胞内ポリリン酸の調節機構はほとんど不明であった。本研究者は、大腸菌のポリリン酸蓄積機構を解明し、微生物のポリリン酸蓄積能力の向上を行った（図３）。幸運にも大腸菌のポリリン酸の含量が1,000倍も上昇した変異株（遺伝子が変化した大腸菌）を取得することに成功した。その遺伝子を解析した結果、*phoU*遺伝子の86番目のＧがＡに変化しているだけであることがわかった。驚くべきことに一つの遺伝子が変化するだけで、野生株の 1000 倍ものポリリン酸が蓄積するのである。微生物がリン酸飢餓に陥ったとき、生き残りをかけて様々なリン酸制御遺伝子*1が発現する。PhoU はこれらのリン酸制御遺伝子を負に制御することが知られていた。どのリン酸制御遺伝子がポリリン酸を常に蓄積させるために重要であるかを調べた結果、*phoU* 遺伝子の一塩基の変異によって発現するリン酸輸送タンパク質 PstSCAB が重要であることがわかった。以前より、リン酸輸送に関わるタンパク質として PstSCAB 以外に PitA, PitB が知られていたが、それ以外にも大腸菌はリン酸輸送タンパク質を持つことが予想されていた。そこで、本研究者らはポリリン酸の蓄積に重要なリン酸輸送タンパク質のクローニングを行い、大腸菌の新たなリン酸輸送タンパク質 PhnCDE を明らかにすることに成功した（図３）。このことにより大腸菌のすべてのリン酸輸送タンパク質を明らかにすることができた。その過程で同じリン酸輸送タンパク質でも PitA に関してはポリリン酸を減少させる方向に働くことがわかった。これは PitA が細胞内へのリン酸

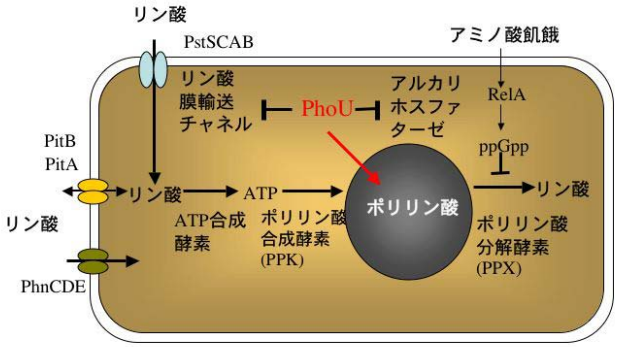



図３，大腸菌のポリリン酸蓄積機構。
リン酸輸送系(PstSCAB, PitA, PitB, PhnCDE)によって細胞の中に取り込まれまたリン酸は、ATP を経由してポリリン酸に変換される。PPK はポリリン酸を合成するポリリン酸キナーゼである。*phoU*が変異するとポリリン酸が蓄積する。PitA は細胞内からリン酸を排出する機能も持つ。アミノ酸飢餓で活性化する RelA はポリリン酸の分解を抑制する ppGpp（グアノシン 4-リン酸）を生産する。

の輸送だけでなく、細胞内のリン酸濃度が高くなりすぎた際には細胞の外へリン酸を排出することが原因であった。

*[1] リン酸制御遺伝子

微生物がリン酸飢餓に陥ったとき、生き残りをかけて様々な遺伝子が発現する。例えば、リン酸飢餓状態では有機リン酸化合物を分解し、リン酸を供給するアルカリホスファターゼという酵素が発現する。また、希薄なリン酸を効率よく細胞内に取り込むリン酸輸送タンパク質が発現したり、次亜リン酸(+1 価)や亜リン酸(+3 価)を取り込んでリン酸まで酸化する酵素が発現したりする。PhoU はこれらリン酸制御遺伝子の負の制御因子であることが知られていた。すなわち、PhoU はリン酸が十分存在するとき、これらの遺伝子が発現しないように抑制している。そしてリン酸が少なくなった時、PhoU による負の制御が解除されて、リン酸制御遺伝子が発現する。*phoU* 遺伝子の変異によって、構成的にポリリン酸の蓄積が起こることから、これらのリン酸制御遺伝子の中のいずれかがポリリン酸を制御すると考えられた。

## （２）ポリリン酸蓄積微生物の育種–変異によってポリリン酸を蓄積させる画期的技術–

*phoU* 遺伝子の中の一つの塩基が変化するだけで、細胞内のポリリン酸含量が 1,000 倍も上昇することを見いだした。これを利用してポリリン酸蓄積微生物の開発を行った。*phoU* 遺伝子の変異株は、リン酸制御遺伝子の一つであるアルカリホスファターゼも発現する。このアルカリホスファターゼはＸ－リン酸(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)を分解して青色の物質を作る。*phoU* 遺伝子の変異株、すなわちポリリン酸を蓄積する

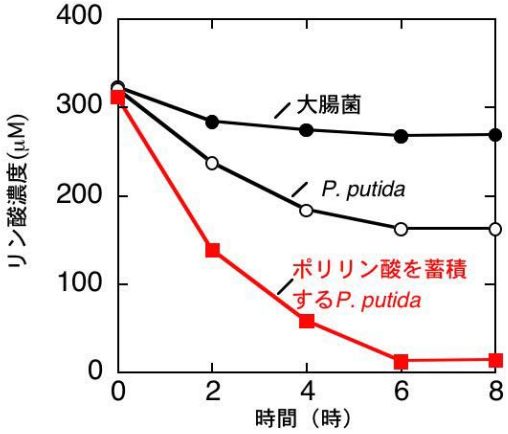



図４、ポリリン酸を蓄積する微生物による排水からのリンの除去。
縦軸は排水中のリン酸濃度を示す。

変異株はXーリン酸含有培地で青色を示すコロニーとして極めて簡単に選抜できる。*phoU* 遺伝子はほとんどの微生物で保存されていることから、種々の微生物において極めて簡単にポリリン酸蓄積変異株を作り出すことができた。その中で、活性汚泥微生物から増殖の早い *Pseudomonas putida* を選びだし、Xーリン酸法によってポリリン酸を蓄積するように改良した。得られたポリリン酸を蓄積する *P. putida* は排水からリン酸を効率よく除去した（図４）。また、驚くべきことに菌体内のポリリン酸含量が全菌体成分の約 30%に及ぶことがわかった（図５）。このポリリン酸蓄積 *P. putida* を肥料として使った場合、黒ボク土などのリン酸を固定しやすい土壌においてもリン肥料として有効であることがわかった（特許 2 件申請）。

### （３）ポリリン酸を生化学的に利用する技術Ｉ—ポリリン酸グルコキナーゼの解析—

ポリリン酸は、リン酸を加熱すると生じることから、最も原始的な生命エネルギー物質ではないかとも言われている。微生物の一部には，ポリリン酸を ATP の代わりにリン酸化の基質にする酵素を持つ。*Microlunatus phosphovorus* は，産総研の中村らによって分離された細菌で，生物脱リン法の現場で活躍することが確認されている。この細菌は嫌気条件でグルコースに出会うと，ポリリン酸のエネルギーを使ってグリコーゲンとして蓄積する。本研究者はこの細菌からポリリン酸のみをリン酸供与体として利用するグルコキナーゼを発見した。この細菌は ATP を使うグルコキナーゼも持っているが，ATP より遙かにポリリン酸が多いので，グルコースのリン酸化には直接ポリリン酸を使っていると考えられた。

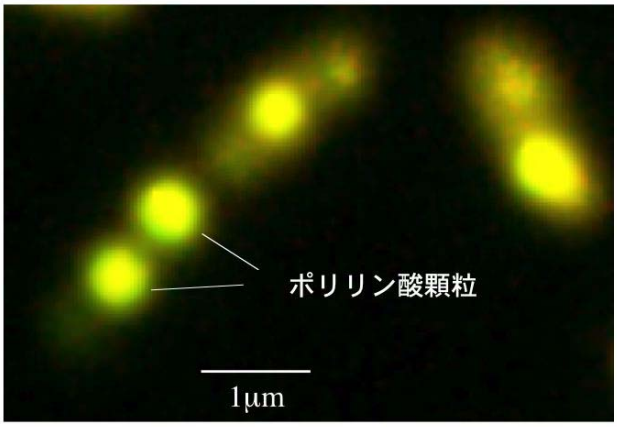



図５、改良したポリリン酸蓄積 *P. putida* の蛍光顕微鏡写真。DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)とポリリン酸の複合体は紫外線照射下で黄緑の蛍光を発する。

このポリリン酸グルコキナーゼの一次構造を決定し, ATP グルコキナーゼと比べてみると, 活性中心付近に位置すると考えられる領域はよく保存されていた。しかし，ATP グルコキナーゼの IIB という領域は, ATP グルコキナーゼだけに存在した。真核生物も含め多くの生物でみられる ATP グルコキナーゼは，この IIB 領域を獲得してポリリン酸グルコキナーゼから進化したのではないかと考えられた。人の ATP 依存性ヘキソキナーゼの構造はすでに決定されている。大胆にもこの構造をもとに ATP グルコキナーゼとポリリン酸グルコキナーゼの構造を推定し、重ね合わせてみた（図６）。すると ATP のアデノシンの認識に関与しそうな領域がポリリン酸グルコキナーゼでは存在しないように見える。まだまだ想像に過ぎないが、その空洞を利用して巨大なポリリン酸が酵素の活性中心にアクセスできるのではないかと思われた。うまくすれば世の中の ATP 利用酵素をポリリン酸利用酵素に変えることも不可能ではないような気がしている。まだまだ技術と呼べる段階ではないが、将来高価な ATP の代わりにポリリン酸を使ったバイオプロセスが構築できるのではないかと考えている（特許出願中）。

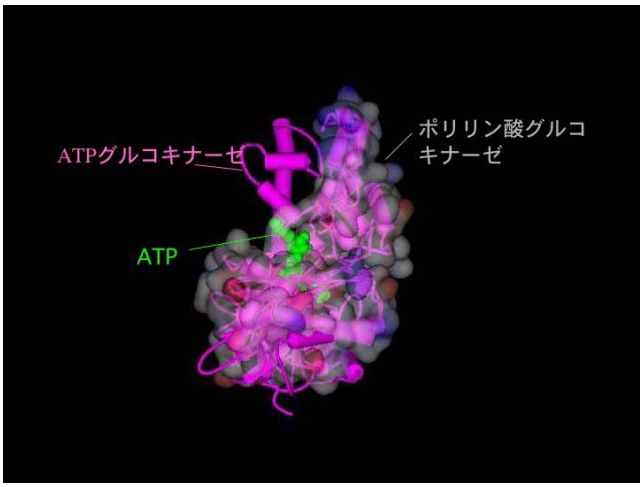



図６，ポリリン酸グルコキナーゼと ATP グルコキナーゼの構造比較。ポリリン酸グルコキナーゼは静電ポテンシャルを加えたモデル（灰色）、ATP グルコキナーゼはリボンモデル（赤色）、ATP は緑色で示した。

### （４）ポリリン酸を生化学的に利用する技術Ⅱ—ATP 増幅反応の開発と応用—

ATP は、全ての動物、植物、微生物などの生命体に存在する物質である。ポリリン酸のエネルギーを使って ATP を作り出すことも可能である。本研究者はそのことを利用し、超微量の ATP を増幅させる反応を考案していた（図７）。最初にポリリン酸(polyP)とアデノシン一リン酸(AMP)とアデニル酸キナーゼ(ADK)、ポリリン酸キナーゼ(PPK)を混合しておく。その状態では ATP ができないが、反応系に少量の ATP を加えると、即座にアデニル酸キナーゼによって、二分子のアデノシン二リン酸(ADP)が生じる。できた ADP はポリリン酸とポリリン酸キナーゼによって、二分子の ATP に変換される。この反応が繰り返されて、多量の ATP が数分のうちに作られる。さ

きがけ研究ではADKとPPKの融合タンパク質を開発し、この技術をほぼ完成させるに至った。これにより生物発光による ATP の検出感度を約 10,000 倍上昇させ、一匹の大腸菌でも検出することに成功した（特許出願中）。

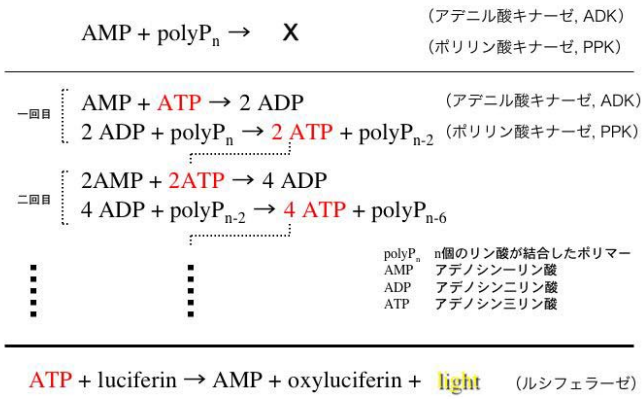



図７，ATP 増幅法の原理。ATP を加えると、即座にアデニル酸キナーゼによって、二分子のアデノシンニリン酸(ADP)が生じる。できた ADP はポリリン酸とポリリン酸キナーゼによって、二分子の ATP に変換される。これが繰り返されて ATP が増幅する。

## ３. 今後の展望

従来微生物のリン含量を高める技術としては、活性汚泥を嫌気と好気に晒すことを繰り返すことでポリリン酸の含量を高める技術がある。しかし、この場合のポリリン酸蓄積菌の増殖速度は遅く、しかも活性汚泥全体でいえば、ポリリン酸の含量が通常 20%に満たない程度が限界であった。本さきがけ研究ではポリリン酸蓄積機構を分子レベルで解明し、それをもとにしてポリリン酸含量が 30%を超えるポリリン酸蓄積菌を育種する技術を開発した。微生物を変異によって改良してポリリン酸を蓄積させる技術は、我々のオリジナルな技術で、世界で類を見ない。本研究者の方法は微生物のリン含量の限界を打ち破るだけでなく、増殖速度が速い好気性の微生物を利用するので嫌気と好気を繰り返す必要もないので有利になる。しかし環境で働く微生物は多種多様である。さきがけ研究で作り出したポリリン酸蓄積微生物が有効に働くかどうかを詳しく調べることが次のステップである。この研究は継続研究課題(SORST)に採択され、今後現場に適した細菌をもとにポリリン酸蓄積菌を作り上げて実用化していきたいと考えている。また、ポリリン酸の生命エネルギーを使って ATP を増幅する技術は広島県知的クラスター創生事業に採択され、超微量 ATP 検出技術として医療環境分野で応用することを進めている。

## 謝　辞

本研究は科学技術振興機構さきがけ研究「変換と制御」領域の支援のもとで行われた研究です。領域会議にて貴重なご意見を頂いた合志先生ならびにアドバイザーの先生方にお礼申しあげます。また、サポートして頂いた領域事務所の方々にお礼申しあげます。この研究はグループメンバーである李宣沃博士や田中正太郎君、諸星知宏君、下村耕平君、山下智裕君、濱岡一弘君、佐藤哲也君らと共に行ったものです。ここに厚く感謝します。またご助言、ご協力を頂いた大阪大学大竹久夫先生、広島大学加藤純一先生、片柳克夫先生、河野憲治先生、スタンフォード大学Arthur Kornberg 先生に厚くお礼申しあげます。

## 研究成果リスト

### 発表論文

(1) K. Nomura, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda, Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 279, 34406-34410 (2004).

(2) T. Satoh, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda, ATP amplification for ultrasensitive bioluminescence assay: detection of a single bacterial cell, Biosci. Biotech. Biochem., 68, 1216-1220 (2004).

(3) 黒田章夫：微生物のポリリン酸研究の新展開、日本農芸化学会誌、78, 738-743 (2004).

(4) 野村和孝、大竹久夫、黒田章夫：Lon によるリボソーム蛋白質のリサイクリングシステム、蛋白質核酸酵素、49, 1069-1070 (2004).

(5) A. Kuroda, H. Ohtake, Applications of polyphosphate and other biopolmers in wastewater treatment, Biopolymers (Wiley-VCH), A. Steinbuchel [ed.], 10, 139-157 (2003).

(6) S. Tanaka, S.-O. Lee, K. Hamaoka, J. Kato, N. Takiguchi1, K. Nakamura, H. Ohtake, A. Kuroda, Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium *Microlunatus phosphovorus*, J. Bacteriol. 185, 5654-5656 (2003).

(7) T. Morohoshi, T. Yamashita, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda, A method for screening polyphosphate-accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater, J. Biosci. Bioeng. 95, 637-640 (2003).

(8) 黒田章夫：微生物におけるポリリン酸代謝制御機構の解明と利用、生物工学会誌、81, 104-111 (2003).

(9) T. Morohoshi, T. Maruo, Y. Shirai, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda, Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp., Appl. Environ. Microbiol., 68, 4107-4110 (2002).

(10) 黒田章夫、加藤純一、池田宰、滝口昇、大竹久夫：微生物が作る長鎖リン酸ポリマーの特性と利用、日本農芸化学会誌、76, 727-729 (2002).

(11) A. Kuroda, N. Takiguchi, T. Gotanda, K. Nomura, J. Kato, T. Ikeda, H. Ohtake, A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling, Biotech. Bioeng., 78, 333-338 (2002).

(12) 黒田章夫、大竹久夫：微生物によるリン酸ポリマー蓄積機構の解明と利用、ケミカルエンジンヤリング、47, 517-522 (2002).

## 学会発表

### 国際会議招待講演

(1) Inorganic polyphosphate in bacteria: some basic and applied aspects, Annual meeting of Korea Society for Biotechnology and Bioengineering, Oct. 11, 2002, Cheongju (Korea).

招待を受けて行った外国でのセミナー

(2) Science and technology of inorganic polyphosphate, Aug. 20, 2003, Stanford University (USA).

(3) Inorganic polyphosphate in bacteria: some basic and applied aspects, Aug. 19, 2002, Genencour international (USA).

(4) Interaction of inorganic polyphosphate with Lon protease to stimulate essential ribosomal protein degradation, Aug. 15, 2002, Stanford University (USA).

その他の国際会議での口頭発表

(5) Interaction of inorganic polyphosphate with Lon protease to stimulate essential ribosomal protein degradation, Xth international congress of bacteriology and applied microbiology, Jul. 29, 2002, Paris (France).

国内の招待講演

(6) 「微生物ポリリン酸研究の新展開」、日本農芸化学会、平成 16 年 3 月

(7) 「環境バイオテクノロジー」、第３回中国技術振興センター・ニューバイオ技術交流会、平成 15 年 11 月

(8) 「リン酸バイオポリマーの生化学と応用」、高分子学会　バイオ・高分子研究会、平成 15 年 9 月

(9) 「環境とバイオ」、バイオ講習会（山口大学、バイオインダストリー協会、中国技術振興センター）、平成 15 年 8 月

(10) 「ポリリン酸の基礎と応用」、酒類総合研究所、平成 14 年 12 月

(11) 「無機ポリリン酸による Lon プロテアーゼの活性調節」、日本分子生物学会、平成 14 年 12 月

(12) 「超微量の生命体の検出を目的とした連鎖的 ATP 増幅反応」、日本応用酵素協会、平成 14 年 11 月

(13) 「微生物におけるポリリン酸代謝制御機構の解明と利用」、日本生物工学会、平成 14 年 10 月

(14) 「微生物が作る長鎖リン酸ポリマーの特性と利用」、日本農芸化学会、平成 14 年 4 月

出願特許

(1) ポリリン酸高蓄積細菌の改良およびその利用、出願人：広島大学、発明者：黒田章夫、大竹久夫、特願 2004-216463.

(2) 改良された ATP の増幅方法およびその利用、出願人：科学技術振興事業団、発明者：黒田章夫、特願 2003-202992

(3) ポリリン酸を蓄積する変異種の取得方法、及び取得した変異種の利用、出願人：科学技術振興事業団、発明者：黒田章夫、大竹久夫、特願 2002-111281.

(4) ATP 依存性酵素をポリリン酸依存性酵素に変換する変換方法、出願人：科学技術振興事業団、発明者：黒田章夫、大竹久夫、特願 2002-56634.

受賞

(1) 2004 年 3 月、「微生物のポリリン酸研究の新展開」日本農芸化学会奨励賞受賞

(2) 2002 年 10 月、「微生物におけるポリリン酸代謝制御機構の解明」日本生物工学会斉藤賞