

戦略的創造研究推進事業
発展研究 (SORST)

研究終了報告書

研究課題「バイオリン鉱石の生産技術開発」

研究期間：平成 16 年 12 月 1 日～
平成 20 年 3 月 31 日

黒田章夫
(広島大学大学院先端物質科学研究
科、教授)

1. 研究課題名

バイオリン鉱石の生産技術開発

2. 研究実施の概要

【基本構想の背景】

人類の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、今後の人口増加や発展途上国のリン肥料の利用量の増加を考えると、数十年で枯渇するのではないかとされている。一方わが国は、リン鉱石を100%輸入に依存し、年間約100万トンものリン鉱石とリンを含む膨大な食料や家畜飼料を輸入している。しかし、国際情勢は刻々と変化し、もはやリンは人類の食糧資源やバイオエタノール生産の鍵を握る国防資源と位置付けられ、一部の国では輸出禁止となっている。リン鉱石のほとんどはリンを含む肥料として加工されている。リンは植物に吸収され、人体や家畜などを經由して、最終的には下水に含まれるようになる。これが湖沼内湾に流れ込むことが原因となり、富栄養化問題を引き起こしている。言ってみれば、日本は憂うべきリン資源を世界中から集めては環境に垂れ流し、富栄養化問題という自国の環境を損ねる行為を続けているのである。

【研究のねらい・着眼点・コンセプト】

環境中で活躍するのは微生物である。例えば、生活排水や工場廃水から有機物を除き、綺麗な水を作る主役は活性汚泥と呼ばれる微生物の集団である。微生物を利用する環境技術が安価で合理的な技術の一つである。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。排水から微生物によってリンを取り除き、リン鉱石としてリサイクルすることが持続可能な社会を形成するために重要である。そのために、ポリリン酸がどのようにして微生物内で蓄積されるのかを解明することは非常に重要である。また、微生物のリン蓄積は天然のリン鉱石の生成にも重要な役割を果たしていると言われており、地球上のリンの循環を理解する上でも重要な知見である。本研究の前身である「さきがけ研究」では、ポリリン酸の代謝機構に関する研究を行い、*phoI*、*pi tA*等の遺伝子が関与するポリリン酸蓄積機構を明らかにした。そして、創成したポリリン酸蓄積変異株のポリリン酸蓄積含量は全菌体重量の約30%に及ぶことがわかった。この微生物のリン含量はリン鉱石のものにやや劣るものの、もはや生きたリン鉱石（バイオリン鉱石）と呼んでも良い。このコンセプトは世界で類を見ないユニークな研究である。発展研究では、さらにポリリン酸の代謝機構を解明して変異による改良を推し進め、リン含量をさらに高めたバイオリン鉱石を開発し、排水からのバイオリン鉱石の生産に役立てる研究を行った。

【実施・研究成果】

ポリリン酸はバクテリアからヒトに至る多くの生物から検出されており、その合成・分解にかかわる酵素も多数発見されている。しかし、細胞内のポリリン酸蓄積量は様々な因子による制御を受けていることが明らかとなっており、その機構については完全な解明には至っていなかった。本研究では、フローサイトメトリーを用いたポリリン酸蓄積菌の分離法を応用し、大腸菌ポリリン酸蓄積変異株を分離した。変異した遺伝子を同定した結果、*gltA*遺伝子、*yjbB*遺伝子がポリリン酸蓄積に関与する新たな遺伝子であることが分かった。*gltA*の変異は最少培地でアミノ酸飢餓を引き起こし、ポリリン酸蓄積を誘発すると考えられた。*yjbB*遺伝子産物はリン酸を取り込むのではなく、排出を専門に行うエクスポーターである可能性が考えられた。すなわち、細胞内のリン酸濃度が上昇したときにYjbBが機能せずリン酸が排出できないため異常に細胞内リン酸濃度が高まり、ポリリン酸が過剰に蓄積すると考えられた。また、ポリリン酸に結合する分子を解析することにより、ポリアミンがポリリン酸を安定に細胞内に存在させることを明らかにした。実際細胞内ポリアミン量を変化させる *speG* 遺伝子変異により、ポリリン酸が蓄積することが分かった。今までの

研究を統合して、*phoU*, *pita*, *relA*, *gltA*, *yjbB*, *speG*が関与するポリリン酸代謝制御機構を明らかにした。また、その情報をもとに、ポリリン酸蓄積変異株を創成し、高リン含量のバイオリン鉱石の生産技術を確立した。

バイオリン鉱石技術を排水で活躍する微生物に適応できれば、排水中のリンを効率よく微生物に蓄積させることが可能となる。さらに微生物からリンを回収する技術が必要となっていた。リン蓄積菌を加熱し、リン酸を放出させた後にカルシウム等で、リンを沈殿させて回収するなどを検討したが、この方法ではリンを沈殿させるのに膨大なカルシウムを必要とし、さらにカルシウムが不純物を多く巻き込む等の問題を含んでいた。そこで微生物からのリン回収技術を開発するために、ジルコニウムとポリビニルアルコールからなる再生利用可能なリン捕集剤を利用し、微生物からの純度の高いリンの回収を行った。パイロットプラントによるリン回収を行った結果、微生物からの熱処理によって放出したリン酸の61%が回収できた。

【新展開から生まれた研究】

当初の研究を進める中で、無機ポリリン酸に結合するタンパク質を発見した。そのタンパク質はリボソームタンパク質であることが分かった。さらにそのタンパク質はシリカ（ポリケイ酸）にも結合することが分かった。シリカへの結合力（解離定数）を調べてみると、nM オーダーを下回る強固な結合であることが分かった。シリコンデバイスの特定の場所に活性を保ったままタンパク質を固定化する技術は新たなバイオセンサーや超分子構造体の開発において非常に重要な技術である。このシリコン結合タンパク質と目的タンパク質との融合タンパク質を作製することによって、任意のタンパク質を、活性を保ったままシリコン基板上に固定化することが可能になった。この研究は、平成18年度より科学技術振興調整費先端融合領域イノベーション創出拠点の形成（広島大学半導体バイオ融合集積化技術拠点形成）の採択に大きく貢献した。現在半導体バイオセンサー作成の道具として利用されている。

さらにその発展型として、アスベストもシリカの化合物であることから、アスベスト結合タンパク質のようなものが世の中にあるのではないかと考えた。発見したアスベスト（クリソタイル）繊維と強く結合するDksAとレポータータンパク質とを遺伝子操作により融合させ、「アスベスト検出酵素」を作製した。この検出酵素が試料中のアスベストと接触することにより、アスベストに結合し、レポータータンパク質の反応を利用してアスベストを検出することができる。本方法は簡易検査法として応用できる可能性を秘めている。この研究を実用化したキット開発のため、現在先端計測分析技術・機器開発事業で、研究を継続している。

3. 研究構想

人類の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、今後の人口増加や発展途上国のリン肥料の利用量の増加を考えると、数十年で枯渇するのではないかとされている。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、富栄養化問題という自国の環境を損ねる行為を続けている。本研究者は本実施研究の前進である「さきがけ研究」において、微生物のポリリン酸の研究を行い、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。驚くべきことに、改良した微生物の菌体内ポリリン酸量は全菌体重量の約30%に及ぶことがわかった。本実施研究では、さらにポリリン酸蓄積機構を分子レベルで解明し、改良してリン鉱石のリン含量を凌ぐ微生物（バイオリン鉱石）を開発し、地球的規模でのリン資源枯渇の危機回避と富栄養化による環境破壊の防止に貢献したいと考えた。

3.1. 設定した目標、研究計画と進め方の概要

【ポリリン酸蓄積変異株の取得と解析】

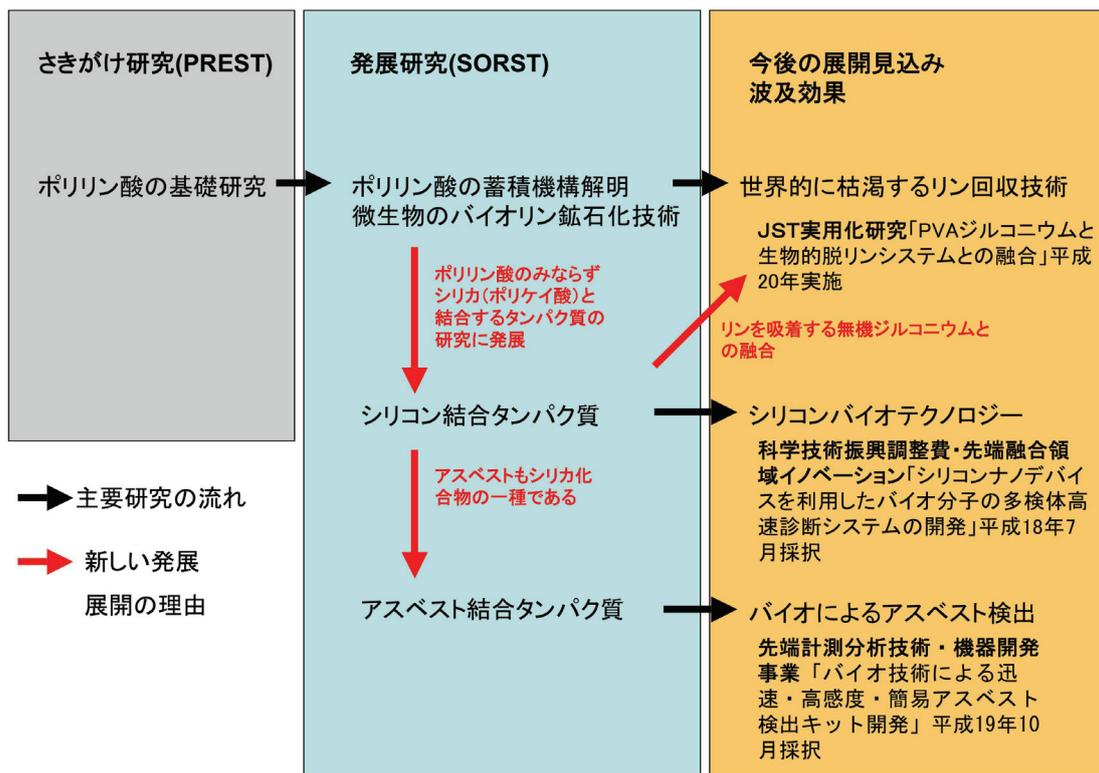
ポリリン酸蓄積変異株の取得と解析を通してポリリン酸蓄積機構を分子レベルで解明する。フローサイトメトリーを用いたポリリン酸蓄積菌の分離法を応用し、ポリリン酸蓄積変異株を分離する。そして、この変異株の変異した遺伝子を同定することにより、ポリリン酸蓄積機構を解明する。また、ポリリン酸に結合する分子を解析することにより、ポリリン酸を安定に細胞内に存在させる機構を解明する。

【バイオリン鉱石化技術】

ポリリン酸蓄積変異株を創成し、バイオリン鉱石生産技術を確立する。明らかになったポリリン酸蓄積機構をもとに、ポリリン酸蓄積変異株を創成する。この過程で研究が進展し、あらたな目標が設定できた。すなわち、排水中のリンを菌体内に濃縮し、リンを分離することが出来るが、さらにそこからリンを回収する技術が必要となった。

【無機バイオハイブリッドシステムによるリン除去システムの開発】

これまでにリン蓄積菌を加熱し、リン酸を放出させた後にカルシウム等で、リンを沈殿させて回収するなどを検討した。しかし、この方法ではリンを沈殿させるのに膨大なカルシウムを必要とし、さらにカルシウムが不純物を多く巻き込む等の問題を含んでいた。一



方広島大学の山中研究室ではリン捕集機能を有するジルコニウム(Zr)をポリビニルアルコール (PVA) 等の水溶性高分子化合物と混合して架橋反応により不溶化し、再生利用可能なリン捕集剤の開発に成功していた。Zr-PVA は中性から酸性でリンを捕集し、アルカリ洗浄することによって、不純物を含まないリン酸が回収でき、再使用可能な状態に戻る。しかしこの方法はリン酸の濃度が高い状態では有効であるが、排水中のように低濃度のリン酸溶液から直接リンを効率よく捕集するには性能が不十分であった。そこで我々のバイオの方法と、この Zr-PVA を結びつけ、お互いの欠点を補完できるかどうかを検討した結果、純度の高いリン酸が微生物から再生できることが分かった。

3.2. その後の新展開から生まれた目標と概要

【シリコン結合タンパク質による半導体バイオ融合プロジェクトへの展開】

研究者は当初の研究を進める中で、無機ポリリン酸に結合するタンパク質を発見した。そのタンパク質はリボソームタンパク質であることが分かった。さらにそのタンパク質はシリカ（ポリケイ酸）にも結合することが分かった。シリカへの結合力（解離定数）を調べてみると、nM オーダーを下回る強固な結合であることが分かった。シリコンデバイスの特定の場所に活性を保ったままタンパク質を固定化する技術は新たなバイオセンサーや超分子構造体の開発において非常に重要な技術である。これまでシリカ表面上にタンパク質を固定化するために、シリカ表面を化学的に修飾して固定化するという方法が主に用いられてきた。しかしながら、これらの方法ではタンパク質の結合方向性がコントロールできないためタンパク質の活性が減少する。また、吸着力が強すぎる場合、失活する場合もある。このシリコン結合タンパク質と目的タンパク質との融合タンパク質を作製することによって、任意のタンパク質を、活性を保ったままシリコン基板上に固定化することが可能になった。この研究は、平成 18 年度より科学技術振興調整費先端融合領域イノベーション創出拠点の形成（広島大学半導体バイオ融合集積化技術拠点形成）の採択に大きく貢献した。現在半導体バイオセンサー作製の道具として利用されている。

【アスベスト簡易検査への応用】

アスベストもシリカの化合物であることから、アスベスト結合タンパク質のようなものが世の中にあるのではないかと考えた。特にアスベストは病気を引き起こす物質なので、細胞の中の何らかのタンパク質とアスベストに相互作用があってもおかしくない。そこで、マウスの肺細胞をすりつぶし、そこに含まれるタンパク質とクリソタイル繊維を混合し、クリソタイル繊維を遠心によって沈殿させた。界面活性剤や塩を含む緩衝液で洗浄後、なおもクリソタイル繊維に結合しているタンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) と質量分析により分析した。アクチンを含めいくつかのタンパク質と結合することがわかった。クリソタイル繊維と強く結合する DksA とレポータータンパク質とを遺伝子操作により融合させ、「アスベスト検出酵素」を作製した。この検出酵素が試料中のアスベストと接触することにより、アスベストに結合し、レポータータンパク質の反応を利用してアスベストを検出することができる。可能な限り高価な機器に依存しない簡便な検出モデルとするために、レポータータンパク質としてはアルカリホスファターゼと発色基質である BCIP/NBT を用いた。発色を肉眼で観察して、アスベストの有無を判定する方法を試みた。フィルターを介して大気を吸引し、アスベストを捕集した後に、アスベスト検出酵素を添加し、洗浄後、基質を添加するという単純な操作でアスベストの検出が可能となった。本方法は簡易検査法として応用できる可能性を秘めている。この研究を実用化したキット開発のため、現在先端計測分析技術・機器開発事業に採択され、研究を受け継いでいる。

4. 研究実施内容

(1)実施の内容

1. ポリリン酸蓄積変異株の取得と解析、バイオリン鉱石化技術

【これまでの研究】

微生物のリン蓄積は天然のリン鉱石の生成にも重要な役割を果たしていると言われており、地球上のリンの循環にも重要な役割を担う。アフリカ南西部のナミビアの大陸棚では比較的最近形成されたと考えられているリン鉱石の鉱床が存在する。そこでは多量の有機物とリン酸が存在し、ポリリン酸を蓄積する微生物が存在する。微生物のポリリン酸蓄積機構の解明は地球上のリン循環を考える上で非常に重要な知見となる。

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(図1)。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「さきがけ研究」からこの謎に挑み、その制御を改変することによって人工的なリン蓄積菌を育種することに成功していた。すなわち、リン酸輸送系(PstSCAB, PitA, PitB, PhnCDE)によって細胞の中に取り込まれたリン酸は、ATPを経由してポリリン酸キナーゼによって、ポリリン酸に変換される。ポリリン酸合成の負の制御因子であるPhoUは、リン酸膜輸送チャネルの発現を抑制することによってポリリン酸の合成を抑制していた。また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。このppGppがポリリン酸分解酵素を拮抗的に阻害する。ストリンジェント応答を起こしているときのppGppの濃度では、ポリリン酸分解酵素の活性は10%以下に落ち込んだ。すなわち、ポリリン酸は常に合成と分解を繰り返しているが、アミノ酸飢餓状態に晒されるとppGppがポリリン酸の分解のみを阻止するのでポリリン酸が蓄積することがわかった。人工的なリン蓄積菌の育種法として、*phoU*の変異株をXリン酸法という簡単な培地で選別し、さらにそれをアミノ酸飢餓に晒すことによって、細胞内の約30%に及ぶリンを蓄積させることに成功していた。

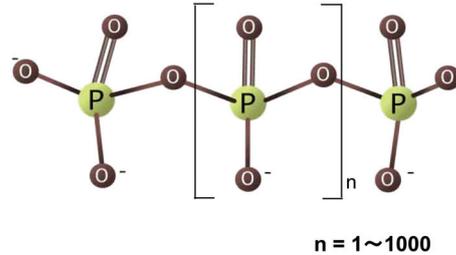


図1. ポリリン酸の構造

【フローサイトメトリーを用いたポリリン酸蓄積菌の分離方法】

細胞内のポリリン酸蓄積量は上述した以外の要因による制御を受けていることが明らかとなっており、その機構については完全な解明には至っていなかった。本研究ではさらに微生物のポリリン酸蓄積機構の解明を行い、改良法を完成させることを行った。

ポリリン酸と4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)の複合体は、紫外線で励起した場合、黄緑色の蛍光を示す。またDNAとDAPI複合体は青色の蛍光を示す。この性質を利用して、ポリリン酸蓄積細菌がフローサイトメトリー*で分離できると報告された。これを利用すれば、大腸菌のポリリン酸蓄積変異株が分離できると考えられた。

*フローサイトメトリーは細胞などの粒子 1 個ずつにレーザー光を当て、そこから生じる散乱光や蛍光などを測定することで、大きさや形態の情報、ならびにDNA/RNA蛍光染色や、タンパク質などを蛍光抗体で染色した蛍光の情報を取得することができる装置である。さらに、それらの相関を解析するヒストグラムとして作成し、細胞集団などを分取することが可能である。これはレーザー光照射部で細胞検出し、ある分取条件に適合する細胞のみ(DROP = 細胞 + シース液滴)にプラスまたはマイナスの荷電をし、それを偏向板によって選別するという原理である。フローサイトメトリーは生命工学の分野で重要な役割を果たしている。

最初に予備実験として、大腸菌野生株と、すでに分離されていた大腸菌ポリリン酸蓄積変異株である *phoU* 変異株 を培養し、終濃度 50 μ g/ml になるように DAPI を添加した。フローサイトメトリーによって野生株、*phoU* 変異株のヒストグラムを得た (図 2)。 *phoU* 変異株の方が、野生株よりも黄色の蛍光強度が強く、分離できることが分かった。実際に *phoU* 変異株と野生株が 1 : 100 になるよう混合した菌液をフローサイトメトリーにて検出し、

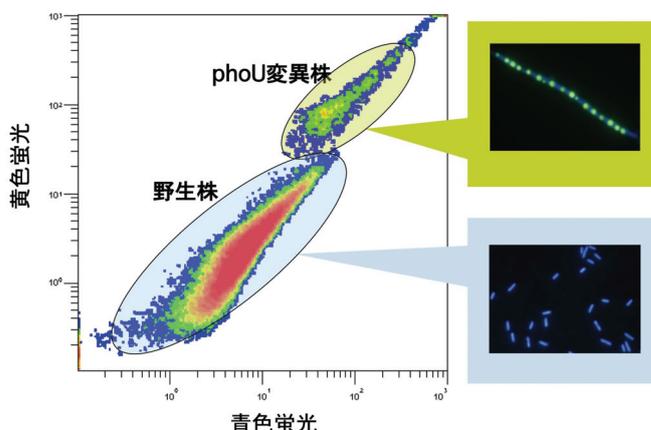


図 2. 野生株とポリリン酸蓄積株 (*phoU* 変異株) のフローサイトメトリー解析。DAPI ポリリン酸複合体の黄色蛍光の違いで分離できる。

phoU 変異株のヒストグラムに分離される細胞を分取し、確かに *phoU* 変異株が分離できることを確かめた。フローサイトメトリーを用いた分離方法は、ポリリン酸蓄積菌のスクリーニングにおいて非常に有効な手段であることが分かった。

【新しいポリリン酸蓄積菌の分離】

大腸菌 MG1655 株を DNA に変異を起こさせる薬剤 NTG で処理して培養後、DAPI 染色して、フローサイトメトリーに供した。黄緑蛍光を強く示す領域から細胞を分取した。得られた細胞のポリリン酸蓄積量を測定した結果、野生株の 1,000 倍以上のポリリン酸 (1,000 nmol/mg protein 以上) を蓄積する変異株を取得でき、MT8 と命名した (図 3)。この MT8 は以前からポリリン酸蓄積に関わる遺伝子として知られていた *phoU* を相補した場合でもポリリン酸を過剰に蓄積することが明らかとなり、MT8 は *phoU* 以外の遺伝子の変異であることが分かった。



図 3. 新しいポリリン酸蓄積変異株 MT8 の蛍光顕微鏡写真

MT8 は MOPS 最少培地で培養した場合に、生育が悪く、ポリリン酸を蓄積していた。そこで、アミノ酸要求性がポリリン酸蓄積の鍵になっていると考え、MT8 のアミノ酸要求性について調べた。その結果、プロリン、グルタミン、グルタミン酸のいずれかを加えると、生育が回復し、ポリリン酸蓄積量も減少することが示された。プロリン、グルタミン、グルタミン酸は TCA サイクルの中間代謝物の 1 つである α -ケトグルタル酸から合成される。そこで、MOPS 最少培地に α -ケトグルタル酸を加えたところ、MT8 の生育は回復し、ポリリン酸蓄積量も減少した。この結果と、クエン酸合成酵素をコードする *gltA* 欠損株が α -ケトグルタル酸要求性になるという知見から、MT8 は *gltA* に変異があるのではないかと考え、正常な *gltA* を MT8 に相補したところ、ポリリン酸蓄積量も減少した。アミノ酸飢餓はポリリン酸蓄積の引き金の一つであるので *gltA* の変異は最少培地でアミノ酸飢餓を引き起こし、ポリリン酸蓄積を誘発すると考えられた。しかし MT8 では、正常 *gltA* を相補しても、量は減少するものの、依然としてポリリン酸蓄積量が高いことから *gltA* 遺伝

子以外の遺伝子変異も関係することが分かった。

【ポリリン酸蓄積に関与する新発見の遺伝子】

gltA 遺伝子以外の MT8 の変異遺伝子特定のために *gltA* 遺伝子破壊株の染色体を用いてコスミドライブラリーを作製し、MT8 を形質転換した。その形質転換ライブラリーの中から核酸合成を阻害した条件で、ポリリン酸の蓄積量が大幅に減少する形質転換体を取得した。その形質転換体は約 30 kb の染色体断片を含むプラスミドであるわかった。さらに相補に必要な領域を絞り込んでいったところ約 8 kbp の *EcoR* I 断片のみで MT8 のポリリン酸蓄積量は低下していることが明らかとなった。ポリリン酸の蓄積を相補する断片の両末端の塩基配列を決定し相同性検索を行なった結果、この約 8 kb の

DNA 断片は、*iclR*、*metH*、*yjbB*、*pepE* の四つの遺伝子を含む領域であることがわかった。さらに約 8 kb の DNA 断片の中から、ポリリン酸蓄積を相補する断片をサブクローニングした結果、*yjbB* 遺伝子のみを含む約 2 kb の *Ssp* I *Hind* III 消化断片のみで MT8 のポリリン酸蓄積が相補されることがわかった。MT8 のポリリン酸過剰蓄積は *yjbB* の機能不全によるものか、機能が強まったことによるものか明らかにするために、*yjbB* 遺伝子破壊株の核酸合成阻害時のポリリン酸蓄積量を測定した。その結果、*yjbB* 遺伝子破壊株はポリリン酸を過剰に蓄積していることがわかった。

大腸菌の *yjbB* はどのような機能を持つかをアミノ酸配列の相同性をもとに調べた結果、リン酸ナトリウム共輸送トランスポーターの可能性があったことがわかった。大腸菌には *PitA*、*PitB*、*PstSCAB*、*PhnCDE* の 4 種類のリン酸トランスポーターが存在する。これら全てを破壊した株ではリン源がリン酸のみの培地で増殖できないことから、培地からリン酸を細胞内へ輸送することに関与しているのは、これら 4 種類のリン酸トランスポーターということが明らかとなっている。このことから *yjbB* 遺伝子産物がリン酸トランスポーターならば、リン酸を取り込むのではなく、排出を専門に行うエキスポーターである可能性が考えられた。すなわち、MT8 は核酸合成が阻害されるなど、細胞内のリン酸濃度が上昇したときに *YjbB* が機能せずリン酸が排出できないため異常に細胞内リン酸濃度が高まり、ポリリン酸が過剰に蓄積すると考えられた (図 4)。

細胞内のリン酸濃度は常にほぼ一定に保たれていることが知られている。もしリン酸濃度が異常に高まると、細胞は浸透圧に耐えかねて破裂する。しかし、微生物を取り巻く環境は移ろいやすく、細胞内のリン酸の代謝を取り巻く状況は激変する。例えば、核酸合成が停止すると、リン酸の行き場がなくなり、細胞内のリン酸濃度が上昇する。ポリリン酸の蓄積はリン酸濃度が異常に高まった際に浸透圧の問題から逃れるために重要であると考えられる。実際ポリリン酸が出来ない変異株にリン酸を過剰に流入するように工夫すると、死滅することが分かった。*YjbB* は通常細胞内のリン酸濃度を監視し、核酸合成の阻害などで細胞内のリン酸濃度が上昇したときにリン酸を排出しリン酸濃度の恒常性維持に関与している可能性が考えられた。従ってその遺伝子の破壊株では、核酸合成の阻害などで細胞内のリン酸濃度が上昇したときにリン酸を排出できないため、ポリリン酸を過剰に蓄積することで、死滅から回避できているのではないかと考えている。

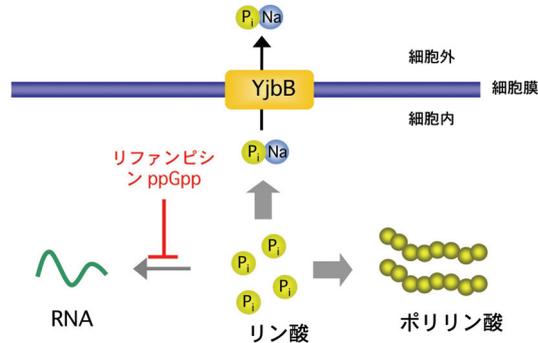


図 4. ポリリン酸蓄積に関与する *YjbB* の役割。核酸合成の阻害などにより増加する細胞内のリン酸を排出してリン酸の恒常性を維持すると考えられる。

【ポリリン酸安定化因子ポリアミン】

ポリリン酸は、トルイジンブルーで桃色に染色される顆粒状の構造体として、バクテリアだけでなく細胞性粘菌やトリパノゾーマ、ヒトの血小板など多くの生物・組織で観察される。このポリリン酸顆粒は古くはボルチン顆粒とも呼ばれ、20世紀の初めにはその存在が確認されていた。しかし、通常わずかな量しかポリリン酸を蓄積していない大腸菌ではポリリン酸を顆粒の状態のまま単離することが困難であったため、顆粒としての性質に関する解析は行われていなかった。大腸

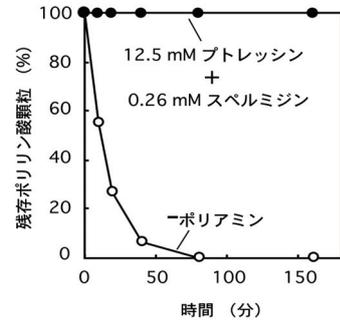
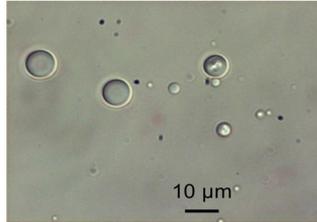


図5. ポリアミンによるポリリン酸顆粒安定化効果。ポリアミンが存在しない条件下ではポリリン酸顆粒が直ぐに溶解するが、生体内の濃度に調整したポリアミン（プトレッシン、スペルミジン）存在下では安定に存在できる。

菌ポリリン酸蓄積変異株はポリリン酸を顆粒として蓄積した。その変異株を用いてポリリン酸顆粒の単離を試みたところ、マグネシウムとカリウムを多く含む顆粒が得られた。その詳細な性質を調べるため、単離した顆粒と同様の組成（ポリリン酸、マグネシウム、カリウム）の人工顆粒を試験管内で調製したところ、最初顆粒として安定に存在するものの、短時間で溶解して可溶性のポリリン酸になった（図5）。大腸菌の細胞内では安定して顆粒が保持されることから、細胞内で顆粒を安定化させる何らかの因子の存在が予想された。その安定化因子として、リン酸基と強い相互作用があることが知られているポリアミンに着目した。ポリアミンはすべての生物に普遍的に存在する一群の生体アミンで、細胞内ではDNAやRNAと結合することで核酸合成やタンパク質合成など多くの生体反応に関与するといわれている。そこで、調製した人工顆粒を用いてポリアミンによる安定化効果を検討した結果、大腸菌の細胞内で存在が確認されているプトレッシン、スペルミジン、カダベリンのいずれでも強い安定化効果が見られた。また、大腸菌内にフリーな形で存在しているといわれているポリアミンの濃度（12.5 mM プトレッシン+0.26 mM スペルミジン）でも強力に顆粒が安定化されたことから、ポリアミンが大腸菌内におけるポリリン酸顆粒の安定化因子であることが示唆された（図5）。

実際の細胞内でもポリアミンによるポリリン酸顆粒の安定化が起きているのであれば、細胞内ポリアミン量によってポリリン酸蓄積量が増加すると思われる。そこで、ポリアミンの代謝系変異株を構築してそのポリリン酸蓄積量を調べたところ、予測どおり細胞内ポリアミン量に比例してポリリン酸蓄積量が増加することがわかった。大腸菌はプトレッシン、スペルミジン、カダベリンという三種類のポ

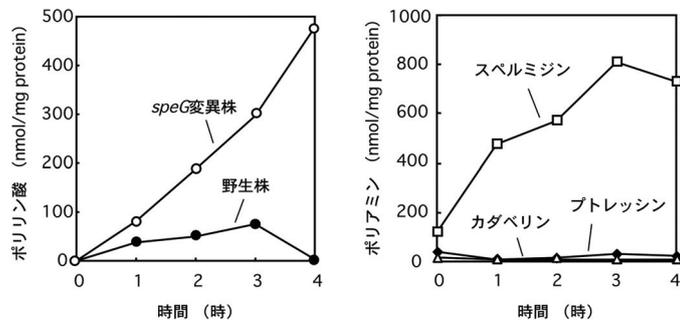


図6. ポリアミン代謝変異株におけるポリリン酸の蓄積。speG変異株ではスペルミジンの量が増大し（右）、それと共にポリリン酸の蓄積が見られる（左）。

リアミンを合成するが、中でもスペルミジンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*speG*) を破壊してスペルミジンを高蓄積させた変異株は特に多量のポリリン酸を蓄積した (図 6)。また、試験管内において PPK やポリリン酸分解酵素 (PPX) によるポリリン酸分解反応に対するポリアミンの影響を調べた結果、スペルミジンにのみではあるがポリリン酸分解を強力に阻害する効果が見られた。

この阻害作用を反応速度論的に解析したところ拮抗型の阻害様式がみられた。スペルミジンは酵素である PPK や PPX に対して結合しなかった。その一方で基質であるポリリン酸に対しては非常に強く結合し、その結合力は細胞内のスペルミジンの多くが結合していると考えられている RNA に対するよりも強いことがわかった。基質に対して他の物質が結合して酵素反応を完全に阻害した場合、その阻害様式は拮抗的になることが知られており、今回の場合もそれと同様の変則的な拮抗阻害であると思われた。これらの結果から、ポリアミン (特にスペルミジン) はポリリン酸と相互作用することでその反応性を低下させ、蓄積を促進する効果があることが明らかとなった (図 7)。

ポリアミンによる効果は他のポリリン酸高蓄積株でも見られた。薬剤耐性遺伝子挿入による *phoU* 欠損株は一般的に遺伝的な安定性が悪く、数回継代培養するとポリリン酸蓄積量が大きく低下する。しかし、ポリアミン存在下で培養すると安定になり、ポリリン酸蓄積量が最大で 5 倍程度増加した。さらに、化学的な変異剤処理で取得した *phoU* 変異株は安定にポリリン酸を蓄積した。調べてみると、この変異株は通常より 5 倍程度多くポリアミンを蓄積していることがわかった。おそらく *phoU* 変異以外にポリアミン蓄積量が増加する何らかの変異が起こって安定化したと考えている。ポリリン酸は細胞内に高蓄積すると深刻な増殖阻害を引き起こすことが知られているが、ポリアミンがカウンターイオンとして

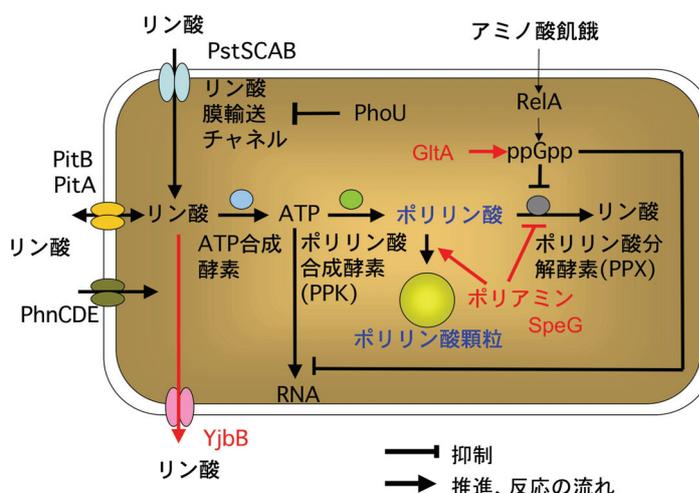


図 7. 大腸菌のポリリン酸蓄積機構。リン酸輸送系 (PstSCAB, PitA, PitB, PhnCDE) によって細胞の中に取り込まれまたリン酸は、ATP を経由してポリリン酸に変換される。PhoU はリン酸の取り込みを抑制している。アミノ酸飢餓時の転写阻害により余分になったリン酸は、YjbB により排出される。YjbB 変異株ではリン酸の放出が起こらないので、ポリリン酸が蓄積すると考えられた。ポリアミンはポリリン酸の分解を阻害し、より安定なポリリン酸顆粒の形成を促進する。赤字は今回明らかになったポリリン酸蓄積に関与する因子。

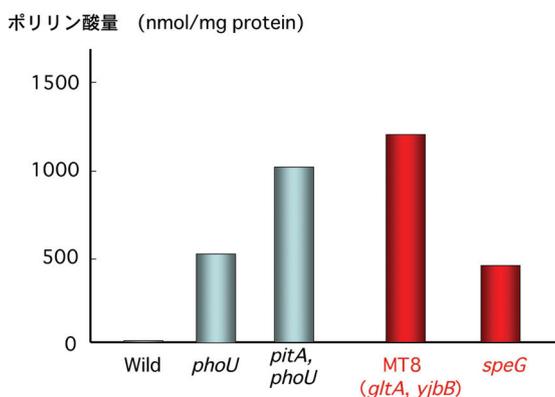


図 8. 大腸菌のポリリン酸蓄積変異株のポリリン酸含量。MT8 はアミノ酸飢餓条件でのポリリン酸含量を示す。また、*speG* 変異株は培地にポリアミンを添加した場合のポリリン酸含量を示す。

ポリリン酸と相互作用することで、その毒性を弱めて蓄積可能な許容量を増加させていると考えられた。

【ポリリン酸蓄積機構とバイオリン鉱石生産技術】

以上の結果を総合し、まとまったポリリン酸蓄積機構を図 7 に示す。また、今回創成したポリリン酸蓄積変異株 *gltA*, *yjbB* 変異株は *phoU*, *pitA* 変異株(リン蓄積量全体の約 30%) を凌駕することが分かった(図 8)。これはほぼリン鉱石と同等のリン含量であり、いわば生きたリン鉱石(バイオリン鉱石)化させる一手法と言える。

【無機ジルコニウム-PVA 複合体によるリン回収実験】

バイオリン鉱石技術を排水で活躍する微生物に適応できれば、排水中のリンを効率よく微生物に蓄積させることが可能となる。実際我々は前身の研究で活性汚泥微生物から増殖の早い *Pseudomonas putida* を選びだし、X-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。本研究では、リン蓄積菌から如何にリンを精製するかを検討した。これまでにリン蓄積菌を加熱することにより、リン酸を効率よく放出させることが出来ることを見つけていた(Kuroda et al., Biotech. Bioeng., 78, 333-338, 2002)。

一方広島大学の山中研究室ではリン捕集機能を有するジルコニウム(Zr)をポリビニルアルコール(PVA)等の水溶性高分子化合物と混合して架橋反応により不溶化し、再生利用可能なリン捕集剤の開発に成功していた。Zr-PVA は中性から酸性でリンを捕集し、アルカリで溶出することによって、不純物を含まないリン酸が回収でき、再使用可能な状態に戻る。そこで、微生物からリン酸を放出させた後 Zr-PVA で吸着、回収することにより、高純度のリン酸を排水から回収することを検討した(図 9)。

ZrOCl₂ 溶液を湯浴で完全に溶解したポリビニルアルコール(PVA)(重合度 2000)と混合し、ビニロン紙に塗布して乾燥させた(Zr-PVA)。微生物を含む汚泥 40 ml を 50 ml チューブに入れ、90℃の湯浴に入れ、1 時間保温してリン酸を放出させた。50 ml チューブに Zr-PVA を入れ、3 時間転倒混和させた。溶液を回収し、Zr-PVA をイオン交換水で 3 回洗浄した。0.05N NaOH 溶液 40ml を Zr-PVA 膜が入ったチューブに入れ、室温で 1 時間転倒混和させた。処理前溶液、処理後溶液、回収液のリン酸濃度は、それぞれ 69 μM, 4.4 μM, 64 μM となり、回収率は 93% となった。この結果より、

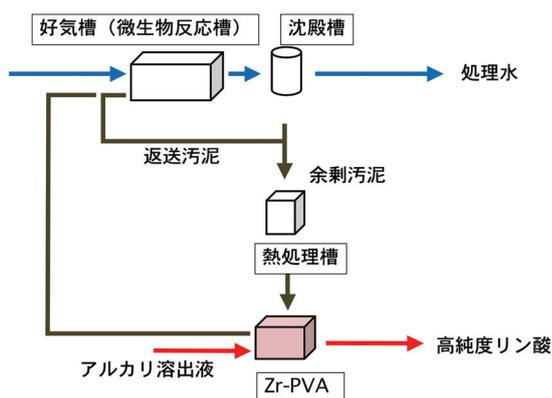


図 9. ジルコニアポリビニル複合体(Zr-PVA)とバイオによるリン回収パイロットプラント実験の概要。微生物汚泥を加熱することによってリン酸が放出され、Zr-PVA に吸着させる。アルカリ溶出液で高純度リン酸を回収する。



図 10. ビーズ型リン回収装置の外観。Zr-PVA が塗り込まれたビーズ(茶褐色)が外枠(黒色)に収められている。

排水などの希薄溶液から微生物を利用してリンを補足し、さらに加熱により高濃度の状態で放出させたリン酸を Zr-PVA で回収できることがわかった。この際リン酸をカルシウムで沈殿させて回収したものと不純物を比べると、アルミニウムに関しては 1/5、鉄 1/20、マグネシウム 1/100 以下に減少することが分かった。

次にバイオと無機のハイブリッドリン回収システムを組み立て、パイロットプラントレベルで実証することにより、実用化に弾みをつけたいと考えた(図 9)。微生物によって濃縮したリン酸を 80°C 程度の加熱によりリン酸を放出させ、ジルコニウムを固定化した PVA 担体がリン酸を水中から分離回収するパイロットシステムを組み立てた。エコラビー社は、Zr-PVA シート (サイズ 134 x 805mm を波状に形成し、134 x 403mm のシートに積層し、接点を接着剤で固定したもの) を、合計で 48 枚を集積したもの、あるいはビーズ型に組み立てたものをリン回収装置として用いた(図 10)。シート型の場合、表面積は 15.5m² となり、計算上の最大リン吸着量は 11.8 g となる。汚泥 (総リン量 7.8 g) を用い、パイロットプラントによるリン回収を行った。その結果、汚泥からの熱処理によって放出したリン酸の 61% が回収できた。

排水中のリンを菌体内に濃縮し、リンを分離することが出来るが、さらにそこからリンを回収する技術が必要となっていた。リン蓄積菌を加熱し、リン酸を放出させた後にカルシウム等で、リンを沈殿させて回収するなどを検討したが、この方法ではリンを沈殿させるのに膨大なカルシウムを必要とし、さらにカルシウムが不純物を多く巻き込む等の問題を含んでいた。今回 Zr-PVA を利用することによって、不純物を含まないリン酸が回収できた。本来 Zr-PVA はリン酸の濃度が高い状態では有効であるが、排水中のように低濃度のリン酸溶液から直接リンを効率よく捕集するには性能が不十分であった。そこで我々のバイオの方法と、この Zr-PVA を結びつけ、お互いの欠点を補完することができた。今後パイロットプラントレベルからさらなるスケールアップを考えた場合、加熱のエネルギーをどうするか等の問題が想定される。現在考えているのは、余剰汚泥から得られるメタンガスの廃熱を利用することにより、加熱のエネルギーの一部がまかなえるのではないかと考えている。

2. 新展開から生まれた研究

【シリコン結合タンパク質の発見とその後の展開】

ポリリン酸はタンパク質とも結合する。ポリリン酸を固定したカラムを作製し、細胞抽出液を通すと、ポリリン酸結合タンパク質がカラムに吸着し、その後溶出させることによって、ポリリン酸結合タンパク質を同定できる。その結果、主にリボソームタンパク質、Lon プロテアーゼ、エネルギー代謝に関連するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のサブユニット等が結合した。それらの相互作用の生理的意味づけの研究は以前から行っている (Kuroda et al., Science, 293, 705-708, 2001) ので割愛するが、こ

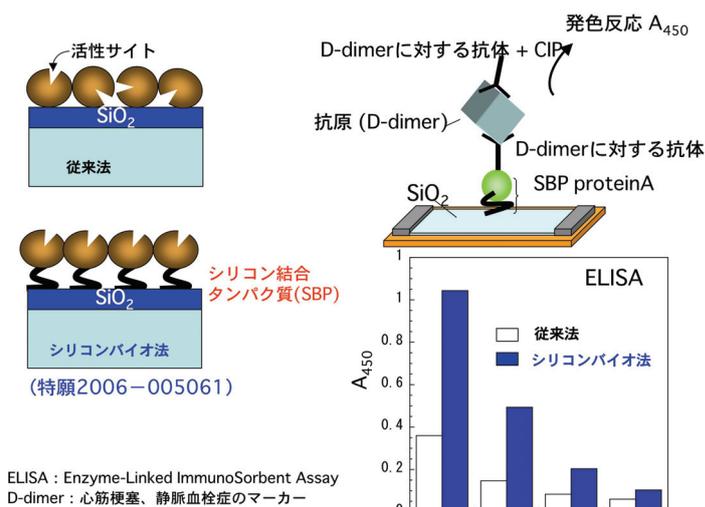


図 11. シリコン結合タンパク質 (SBP) を用いた半導体バイオセンサー開発。半導体基板上にランダムに固定化させる従来法に比べ、SBP を用いた方法は固定化が容易なだけでなく、タンパク質の方向性が揃い、センサーの能力が向上する。右は心筋梗塞マーカーを ELISA 法で検出した際の感度向上を示す。

の無機ポリリン酸に結合するリボソームタンパク質は実はガラスやシリカと強力に結合することが判明した。

広島大学では、シリコンナノワイヤーバイオセンサーの開発など半導体バイオ融合を目指していた。半導体シリコン表面は酸化され、シリカとなっている。シリコン基板にタンパク質を結合させる道具として、このポリリン酸結合タンパク質（シリカ結合タンパク質）でもあるリボソームタンパク質が利用できると考えた。このポリリン酸結合タンパク質はシリコン表面との解離定数が 0.5nM 前後であることがわかり、一旦結合するとほとんどシリコン基板から剥がれなかった。そこでこのタンパク質をシリコン結合タンパク質（SBP）と名付けた。しかもそれまで知られていたシリコン基板結合ペプチドであるポリアルギニン(R9)ペプチドより 100 倍前後強い結合であることがわかり、有効に利用できることが分かった。この SBP と目的タンパク質との融合タンパク質を作製することによって、任意のタンパク質を、活性を保ったままシリコン基板上に固定化することが可能になった(図 11)。

【アスベスト結合タンパク質の発見と展開】

アスベストもシリカの化合物であることから、シリカ結合タンパク質同様、アスベスト結合タンパク質のようなものが世の中にあるのではないかと考えた。特にアスベストは病気を引き起こす物質なので、細胞の中の何らかのタンパク質とアスベストに相互作用があってもおかしくない。そこで、マウスの肺細胞をすりつぶし、そこに含まれるタンパク質とクリソタイル繊維を混合し、クリソタイル繊維を遠心によって沈殿させた。クリソタイル繊維に結合しているタンパク質を質量分析により分析した。アクチンを含めいくつかのタンパク質と結合することがわかった。同時に細菌の細胞内タンパク質にもクリソタイル繊維と強く結合するものがあることが分かった。大腸菌 DksA は、アミノ酸飢餓への緊縮応答として ppGpp と協働し RNA ポリメラーゼに結合することで、転写活性を制御するタンパク質である。なぜアスベストと強く結合するのか、まだ正確なところはよく分かっていない。ただ、DksA はマグネシウムイオンを認識して結合する。クリソタイルの最表面にはマグネシウムがあること、また高濃度のマグネシウム存在下では DksA はクリソタイルから遊離してくることからこのマグネシウムイオン認識能力がクリソタイルとの結合に関係しているのかもしれないと考えている。

クリソタイル繊維と強く結合する DksA とレポータータンパク質であるアルカリホスファターゼと遺伝子操作により融合させ、「アスベスト検出酵素」を作製した(図 12)。この検出酵素が試料中のアスベストと接触することにより、アスベストに結合し、アルカリホスファターゼの反応を利用してアスベストを検出することができる。フィルターを介して大気を吸引し、アスベストを捕集した後、アスベスト検出酵素を添加し、洗浄後、基質を添加するという単純な操作でアスベストの検出が可能となる。大気中のアスベスト検出にとどまらず、アスベスト検出酵素を用いた方法は、潜在的な飛散の危険性を持つ建材中の

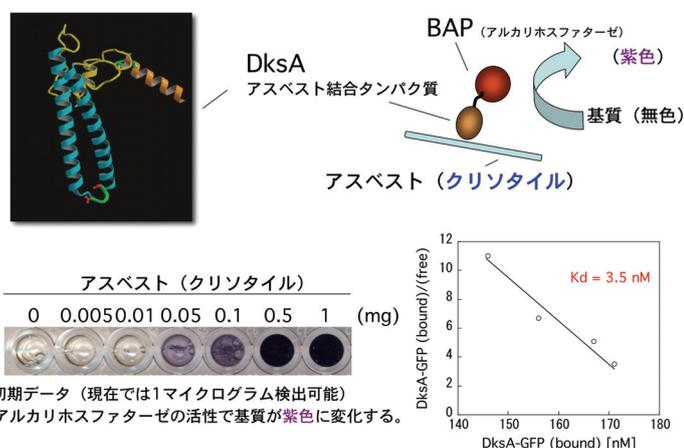


図 12. アスベスト結合タンパク質(DksA)を用いたアスベスト検出。DksA とアルカリホスファターゼ(BAP)の融合酵素を利用すればアスベストの量に応じて発色する。DksA とアスベストの解離定数は 3.5nM で強力な結合である。

アスベストの検出にも適用することができる。反応時間を伸ばせば建材中のクリソタイル0.1%（重量比）を見分けられた。これはX線回折装置を使った分析と同等レベルの検出能力である。また本方法に必要な機材は卓上型の簡素な遠心機程度であり、現場でも実施可能な簡便な検出方法となりうると考えられる。

現在、アスベストの検出法として普及している位相差顕微鏡による観察は、分析者による測定誤差の問題が指摘されることもあるように、アスベストを識別するために熟練した技能が要求される。また電子顕微鏡、X線回折装置などは大型で非常に高価な機材であり、それらを扱うための専門的知識も要求される。過去に使用されてしまったアスベストの量は莫大であり、アスベストの含有が疑われる試料全てにこれらの方法を適用することは経費と時間を考慮すると現実的であるとは言えない。本方法は簡易検査法として応用できる可能性を秘めている。これまでの成果と我々の持つ技術の特徴を生かしつつ、今後はさらに実用性の観点から改良を進めたいと考えている。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

人類の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、今後の人口増加や発展途上国のリン肥料の利用量の増加を考えると、数十年で枯渇するのではないかとされている。国際情勢は刻々と変化し、もはやリンは人類の食糧資源やバイオエタノール生産の鍵を握る国防資源と位置付けられ、一部の国では輸出禁止となっている。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、富栄養化問題という自国の環境を損ねる行為を続けている。環境中で活躍するのは微生物である。微生物を利用する環境技術が安価で合理的な技術の一つである。微生物はポリリン酸を蓄積する能力がある。排水から微生物によってリンを取り除き、リン鉱石としてリサイクルすることが持続可能な社会を形成するために重要である。そのために、ポリリン酸がどのようにして微生物内で蓄積されるのかを解明することは非常に重要である。

アフリカ南西部のナミビアの大陸棚では比較的最近形成されたと考えられているリン鉱石の鉱床が存在する。そこでは多量の有機物とリン酸が存在し、ポリリン酸を蓄積する微生物が存在する。国際的な動向として、リンを蓄積する微生物が分離され、基礎研究が始められている (Science, 307, 416-418, 2005)。また、活性汚泥サンプルのメタゲノム解析から *Accumulibacter phosphatis* のほぼ完全長のゲノム配列の解読に成功した (Nature Biotechnology, 24: 1263-1269, 2006)。しかし、ゲノムの情報からだけでは、ポリリン酸蓄積機構は分からない。本研究では、変異株の解析や生化学的解析を通して *phoU*, *pilA*, *relA*, *gltA*, *yjbB*, *speG* が関与するポリリン酸代謝制御を解明した。微生物のリン蓄積は天然のリン鉱石の生成にも重要な役割を果たしていると言われており、地球上のリンの循環にも重要な役割を担う。微生物のポリリン酸蓄積機構の解明は地球上のリン循環を考える上で非常に重要な知見となる。また、その情報をもとに、ポリリン酸蓄積変異株の創成し、リン鉱石とほぼ同等のリン含量を示すバイオリン鉱石の生産技術を確立した。本研究の成果は地球的規模でのリン資源枯渇の危機回避と富栄養化による環境破壊の防止に貢献出来る。

最近シリコンナノワイヤやカンチレバーを利用した新たな半導体バイオセンサーが続々と発表されている (Nat Biotechnol 23:1294-1301, 2005, Science 311:1592-1595, 2006)。これらシリコンデバイスの特定の場所に活性を保ったままタンパク質を固定化する技術は新たなバイオセンサーや超分子構造体の開発において非常に重要な技術である。これまでシリカ表面上にタンパク質を固定化するために、シリカ表面を化学的に修飾して固定化するという方法が主に用いられてきた。しかしながら、これらの方法ではタンパク質の結合方向性がコントロールできないためタンパク質の活性が減少する。また、吸着力が強すぎる場合、失活する場合もある。ポリリン酸結合タンパク質の解析から派生したシリコン結合タンパク質の発見はユニークであり、このシリコン粒子結合タンパク質と目的タンパク質との融合タンパク質を作製することによって、任意のタンパク質を、活性を保ったまま

シリコン基板上に固定化することが可能になった。現在半導体バイオセンサー作成の道具として利用されている。この研究は、平成 18 年度より科学技術振興調整費先端融合領域イノベーション創出拠点の形成（広島大学半導体バイオ融合集積化技術拠点形成）の採択に大きく貢献した。

さらに発展したアスベスト結合タンパク質を用いたアスベスト検出技術は昨今の社会問題の背景もあり、非常に期待されている。現在、アスベストの検出法として普及している位相差顕微鏡による観察は、分析者による測定誤差の問題が指摘されることもあるように、アスベストを識別するために熟練した技能が要求される。また、アスベスト、非アスベスト繊維の判定が難しい問題や、光学的な限界により超微細アスベストは検出できない問題がある。一方電子顕微鏡、X線回折装置などは大型で非常に高価な機材であり、それらを扱うための専門的知識も要求される。過去に使用されてしまったアスベストの量は莫大であり、アスベストの含有が疑われる試料全てにこれらの方法を適用することは経費と時間を考慮すると現実的であるとは言えない。本方法は高感度な簡易検査法として応用できる可能性を秘めている。この研究を実用化したキット開発のため、平成 19 年 10 月先端計測分析技術・機器開発事業に採択され、研究を実施している。これまでの成果と我々の持つ技術の特徴を生かしつつ、今後はさらに実用性の観点から改良を進めたい。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

微生物による排水からのリン除去・回収技術に関わるリン除去菌のゲノム解析が行われており、この分野が注目されている。しかし、本研究のようにリン蓄積の変異株を分離し、その遺伝子解析と生化学的な解析を通してリン蓄積機構解明を行っている研究は類がなく、本研究者の研究が世界をリードしているといえる。ポリリン酸の合成酵素を発見したスタンフォード大学のアーサーコーンバーク博士（ノーベル賞受賞者）は、ポリリン酸の生化学的な解析を行う研究でリードされていたが、2007 年他界され、実質上研究が停止している状況にある。また、本研究者が提案する遺伝子変異による微生物のバイオリン鉱石化のコンセプトは、大阪大学の久保久夫博士の組み換えによるポリリン酸蓄積細菌の育種から発展したものであり、日本独自の大変ユニークな研究である。

シリコンデバイスの特定の場所に活性を保ったままタンパク質を固定化する技術は新たなバイオセンサーや超分子構造体の開発において非常に重要な技術である。ポリアルギニンタグは活性を保ったままガラス表面上やシリカに直接吸着させる技術として開発されている(Protein Sci 14:1538-1544, 2005)。シリコン粒子結合タンパク質はポリアルギニンタグと比較してシリカに対して約 30 倍から 200 倍の強い結合力を示す事が明らかとなった。この方法は大腸菌組み換え体破砕液から融合タンパク質の精製ステップを経ずに直接固定に利用でき、かつシリコンまたはシリカ表面を化学的に修飾する必要がないことから、タンパク質の半導体基板上への固定化技術として非常に有用な方法であると考えられた。

アスベストとは、天然に産する蛇紋石系および角閃石系の繊維状けい酸塩鉱物である。アスベストにはいくつかの種類が存在するが、産業用で使用される主なアスベストとしてはクリソタイル ($Mg_6Si_4O_{10}(OH)_8$)、アモサイト ($(Mg, Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$)、クロシドライト ($NaFe^{+3}Fe^{+2}_3Si_8O_{22}(OH)_2$) が挙げられる。これらは耐久性や耐熱性などの特性が非常に優れており、しかも安価であるため、建設資材、電気製品、自動車、家庭用品等、様々な用途に広く使用されてきた。しかし、その繊維は、肺線維症（じん肺）、悪性中皮腫、肺がんを起す危険性があることがわかり、現在ではほとんどの先進国で使用が禁止されている。日本においては、2004 年アスベスト使用がほぼ全面禁止になったものの、重大なアスベストのリスクはまだ残されていると言われている。すなわち、アスベストを含む建物の解体が 2010 年から 2035 年頃ピークを迎えると考えられており、その際アスベストが飛散していないかどうかを現場で迅速に知る必要があるとされている。本研究者はシリコン結合タンパク質の研究の発展として、世の中で問題となっているアスベストにも結合するタンパク質

があるのではないかと発想し、研究を開始した。そもそもアスベスト検出にバイオ技術を使うという発想がなく、独創性、新規性が非常に高く、類似研究は存在しない。アスベスト結合タンパク質を利用したアスベスト検出法は世界で始めてである。

6. 研究実施体制

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
向井貴子	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	JST 研究員	ポリリン酸蓄積機構の解析	平成 17 年 4 月～ 平成 17 年 5 月
浦田雅章	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	JST 研究員	ポリリン酸蓄積機構の解析	平成 17 年 9 月～ 平成 19 年 1 月
金田晃一	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	JST 研究員	シリコン結合タンパク質の解析と応用	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
池田丈	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	JST 研究員	ポリリン酸蓄積機構の解析とシリコン結合タンパク質の解析	平成 19 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
石田丈典	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	JST 研究員	アスベスト検出酵素の開発	平成 19 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
廣田隆一	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学助教	ポリリン酸蓄積機構の解析	平成 19 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
野村和孝	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学博士課程学生、 広島大学研究員、 広島県研究員	ポリリン酸利用酵素の研究、 アスベスト結合タンパク質の解析	平成 16 年 12 月～ 平成 19 年 3 月
麻見安雄	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学研究員	ポリリン酸利用酵素の研究	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
佐藤哲也	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学博士課程学生	ポリリン酸利用酵素の研究	平成 18 年 10 月～ 平成 19 年 3 月
西村智基	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学研究員	アスベスト検出酵素の開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 9 月
本村圭	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学博士課程学生	ポリリン酸蓄積機構の解析	平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 3 月

岩本征士	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学修士課程学生	ポリリン酸利用酵素の研究	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
篠田康晴	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学修士課程学生	ポリリン酸利用酵素の研究	平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
谷口弘慈	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学修士課程学生	シリコン結合タンパク質の解析	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
畑 夢博	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学修士課程学生	シリコン結合タンパク質の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
大中信輝	広島大学大学院先端物質科学研究科黒田研究室	広島大学修士課程学生	ポリリン酸蓄積機構の解析	平成 19 年 4 月～ 平成 20 年 3 月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 17 年 6 月 27 日	環境バイオテクノロジー学会リン研究部会ワークショップ「リン資源の有効利用をめぐって」	東京大学 弥生講堂	30 名	農業環境技術研究所の斎藤雅典博士、神戸大学の阿江教治教授を、日本土壌協会の古畑哲氏を招いてリン資源に関わるワークショップを行った。
平成 18 年 6 月 28 日	環境バイオテクノロジー学会リン研究部会ワークショップ「リン資源の有効利用をめぐって」	東京大学 弥生講堂	30 名	関西ピージーエス社の鈴木寛氏、九州大学竹内あかり博士を招いてリン酸アパタイトに関わるワークショップを行った。
平成 19 年 6 月 26 日	環境バイオテクノロジー学会リン研究部会ワークショップ「リン資源の有効利用をめぐって」	大阪大学 銀杏会館	40 名	東北大学長坂徹也先生を招いて鉄工業とリン資源に関わるワークショップを行った。

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

8. 発展研究による主な研究成果

(1) 論文発表 (英文論文 10 件 邦文論文 3 件)

○A. Kuroda, T. Nishimura, T. Ishida, R. Hirota, K. Nomura, Detection of chrysotile asbestos by using a chrysotile-binding protein, *Biotech. Bioeng.*, 99, 285-289 (2008).

○S. Iwamoto, K. Motomura, Y. Shinoda, M. Urata, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, R. Hirota, A. Kuroda, Use of an *Escherichia coli* recombinant producing thermostable polyphosphate kinase as an ATP regenerator to produce fructose 1,6-diphosphate, *App. Environ. Microbiol.*, 73, 5676-5678 (2007).

N. Takiguchi, M. Kishino, A. Kuroda, J. Kato, H. Ohtake, Effect of mineral elements on phosphorus release from heated sewage sludge, *Bioresource Tech.*, 98, 2533-2537 (2007).

A. B. F. Ahmed, K. Noguchi, Y. Asami, K. Nomura, H. Fujii, M. Sakata, A. Tokita, K. Noda, A. Kuroda, Evaluation of cell wall binding domain of *Staphylococcus aureus* autolysin as affinity reagent for bacteria and its application to bacterial detection, *J. Biosci. Bioeng.* 104, 55-61 (2007).

H. Fujii, K. Noda, Y. Asami, A. Kuroda, M. Sakata, A. Tokida, Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification, *Anal. Biochem.*, 366, 131-136 (2007).

○K. Taniguchi, K. Nomura, Y. Hata, T. Nishimura, Y. Asami, A. Kuroda, The Si-tag for immobilizing proteins on a silica surface, *Biotech. Bioeng.*, 96, 1023-1029 (2007).

Y. Asami, T. Satoh, A. Kuroda, Polyphosphate-ATP amplification technology: Principle and its application to specific bacteria detection, *J. Environ. Biotech.*, 6, 105-108 (2006).

○K. Motomura, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda. Polyamines affect polyphosphate accumulation in *Escherichia coli*, *J. Environ. Biotech.*, 6, 41-46 (2006).

K. Nomura, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda, Inorganic polyphosphate stimulates Lon-mediated proteolysis of nucleoid proteins in *Escherichia coli*, *Cell. Mol. Biol.*, 52, 23-29 (2006).

N. Takiguchi, M. Kishino, A. Kuroda, J. Kato, H. Ohtake, A laboratory-scale test of anaerobic digestion and methane production after phosphorus recovery from waste activated sludge, J. Biosci. Bioeng., 97, 365-368 (2004).

○本村圭、黒田章夫、解明進む大腸菌ポリリン酸代謝調節機構、化学と生物、46、173-179 (2008).

黒田章夫、西村智基、バイオによるアスベスト簡易検出技術開発、バイオサイエンスとインダストリー、66、65-69 (2008) .

黒田章夫、谷口弘慈、西村智基、麻美安雄、野村和孝：シリカ結合タンパク質を用いた任意タンパク質の Si 基盤固定技術、バイオマイクロシステム研究会・電気学会 2006、31-35 (2006).

(2) 口頭発表

①学会

国内 24 件, 海外 4 件

②その他

国内 件, 海外 件

(3) 特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	9
海外出願	2
計	11

(4) その他特記事項

平成 20 年 2 月 9 日 サイエンスチャンネル「Message from Scientists」にて発展研究の成果が放映。

平成 19 年 10 月 25 日 日経 BP 10 月号「さきがけ CloseUp」で紹介。

平成 19 年 9 月 20 日 環境新聞「アスベストタンパク質使い簡単検出」で紹介。

平成 19 年 2 月 28 日 環境新聞「アスベスト問題の波紋」で紹介。

平成 18 年 8 月 16 日 日経新聞「石綿検査手軽に」で報道。

平成 18 年 7 月 19 日 日経産業新聞の「下水中のリン効率回収」で報道。

平成 18 年 2 月 22 日 日経産業新聞の「ポリリン酸利用酵素で大腸菌検出感度 100 倍に」で報道。

平成 17 年 11 月 28 日 日経新聞「石綿一時間で検出、タンパク質発見」で報道。

平成 17 年 11 月 27 日 朝日新聞「石綿新検出法開発」で報道。

平成 16 年 12 月 15 日 テレビ新広島知恵の輪ニッポンで放送。

9. 結び

目標であるポリリン酸蓄積機構解明は満足できる成果であったと思います。その機構は思った以上に複雑で、解明には時間がかかりましたが、リン酸の排出系に関わる遺伝子等が取得でき、面白い成果になったと思います。さらに僅かではありますが、本研究以前に取得できていた *phoU* 変異株よりリン含量の高い変異微生物は取得できました。変異を重複

させてさらに高含量の変異菌を作るところまでは至らなかった点が残念ではあります。しかし遺伝子解析と生化学的な解析を通してリン蓄積機構解明を行っている研究は世界で類がなく、本研究者の研究が世界をリードしていると自負できます。さらに工夫は必要ですが、本研究の成果は地球的規模でのリン資源枯渇の危機回避と富栄養化による環境破壊の防止にいつか貢献出来ると考えています。粘り強く支援続けて頂いた戦略的創造研究推進事業発展研究に心から感謝致します。

また、ポリリン酸の研究から派生したシリコン結合タンパク質が、半導体バイオセンサー開発に使われるなど、意外な発展が出来て良かったと思います。これは科学技術振興調整費「先端融合領域イノベーション創出拠点の形成」につながった点は大変満足しています。アスベスト結合タンパク質は、今までにないバイオ技術によるアスベスト検出に発展し、先端計測分析技術・機器開発事業に採択され、現在研究を続けています。このような意外な展開・発展に対しても寛容に応援して頂いた戦略的創造研究推進事業発展研究に本当に心から感謝致します。研究費の使い方等世間の状況は厳しくなっています。もちろんそれは当たり前のことですが、結果の方向性に関しては出来るだけ自由度がある方が、思っても見なかった意外な展開が期待でき、それこそが次の新しいサイエンス・技術の種になると信じております。科学技術振興機構様には研究者に対してこれまで同様、高所からご支援賜りますようお願い致します。



研究室の皆様でお礼！