

研究課題別評価

1 研究課題名: 微生物によるリン酸ポリマー蓄積機構の解明と利用

2 研究者氏名: 黒田章夫

グループメンバー: 李 宣沃(研究期間 平成 14 年 4 月 ~ 平成 16 年 11 月)

3 研究の狙い:

リンは食料生産に必須な資源であるが、数十年で枯渇すると言われている。持続的社會形成のため、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。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。微生物に如何に多くのポリリン酸を蓄積させるかが、排水からリンを除去して回収するポイントである。本さきがけ研究では貴重リン資源の有効利用のために、微生物のポリリン酸蓄積機構を分子レベルで解明する、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、ポリリン酸を生化学的に利用する技術を開発する。

4 研究成果:

微生物のポリリン酸蓄積機構の解明

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。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 1,000 倍ものポリリン酸が蓄積するのである。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。また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。

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、ポリリン酸を蓄積するように改良した。ポリリン酸を蓄積する改良型 *P. putida* は排水からリン酸を効率よく除去した。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。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。

ポリリン酸を生化学的に利用する技術

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。本研究者は *Microlunatus phosphovorus* という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。ポリリン酸グルコキナーゼはグルコースをリン酸化するために利用できる。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。ATP グルコキナーゼは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。

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。さきがけ研究では ATP を増幅させる酵素を人工的に開発し、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。

5 自己評価:

来る資源枯渇時代において、希薄な資源を濃縮する微生物を開発して利用する技術は世界的に益々重要になる。本研究は微生物がどのようにしてポリリン酸を蓄積するかについて調べ、その制御機構を改変することによってポリリン酸蓄積能力を飛躍的に向上させた。微生物はポリリン酸を常に作るわけではなく、phoU という遺伝子でポリリン酸の作りすぎが抑制されていることが分かった。これらのメカニズムは他の環境で生育する微生物でも共通であり、phoU を変異させることによって多くの微生物にポリリン酸を蓄積させることができた。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。日本発の貴重リン資源リサイクル技術の開発に前進したと考えている。今後さらに改良してリン回収用のスーパー微生物の開発に繋げていきたいと考えている。また、3 年間では及ばなかったが、改良した微生物の安全性試験という問題に今後着手していく必要があると考えている。またポリリン酸の利用について検討した結果、ポリリン酸を蓄積した微生物が直接リン肥料として利用できることを明らかにできた他、ポリリン酸自体が生化学反応に使えることが分かった。特に超微量 ATP 検出技術は医療環境分野で微生物検査に応用することが期待されており、自身ではこの開発に対しても満足している。

6 研究総括の見解:

大腸菌のポリリン酸蓄積機構を解明し、通常の 1000 倍の能力を持つものを見出し、遺伝子解析により本質を明らかにした。その成果は非常に大きい。得られた情報をもとに微生物によるポリリン酸蓄積および制御技術を発展させており、有望な展開となっている。リン資源の循環の点で資源保護、汚染防止に極めて有効であろう。

また予期せざる方向としてポリリン酸の生化学反応を見出し、微量 ATP 検出法を実現している点は応用の広さから見て重要な成果である。大腸菌一匹の検出も可能にするなど有望な技術である。

今後現実の社会で実用化するために安全面を含めて大胆かつ慎重に研究を展開していくことを期待したい。

7 主な論文等:

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 biopolymers in wastewater treatment, *Biopolymers (Wiley-VCH)*, A. Steinbuechel [ed.], 10, 139-157 (2003).
6. S. Tanaka, S.-O. Lee, K. Hamaoka, J. Kato, N. Takiguchi, 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、*ケミカルエンジニアリング*、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
その他の国内会議での口頭発表 10 件

出願特許

(国内)

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.

(外国)

5. 改良された ATP の増幅方法およびその利用、出願人:科学技術振興機構、発明者:黒田章夫、PCT/JP2004/011186

受賞

1. 2005 年 3 月、「ATP amplification for ultrasensitive bioluminescence assay: detection of a single bacterial cell, Biosci. Biotech. Biochem」B B B 論文賞
2. 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
3. 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