

細菌のポリリン酸代謝と有機リン酸エステル生産への応用

宇都宮大学工学部基盤工学科 准教授・諸星知広

1) はじめに

リンは全ての生物にとって必須な元素であり、リン肥料の原料として、農業や化学工業の分野でも貴重な資源の一つである。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、あと数十年で枯渇するのではないかと言われてきた。一方で、リンを大量に含む廃液が湖や内湾といった閉鎖性水域に流れ込むと、アオコや赤潮といった環境汚染を引き起こし、ノリ養殖業や漁業に深刻な被害を引き起こすことも知られている。そのため、廃水中からリンを取り除き、新たなリン資源として再利用することが可能となれば、一石二鳥の革新的な技術になると考えられる。現在、工場や家庭から排出される下水を浄化するために用いられているのが活性汚泥法である。活性汚泥とは、細菌から原生生物まで様々な微生物により構成される集合体である。この活性汚泥の中には、排水中に存在する無機リン酸を細胞内に取り込み、リン酸のポリマーであるポリリン酸として蓄積する細菌が存在することが知られており、廃水中のリン除去に大きな役割を果たすことが明らかとなってきた。ポリリン酸とは、数十から数百の無機リン酸が高エネルギーリン酸結合で直鎖状につながった物質であり、生物がエネルギーを使って合成する数少ない無機ポリマーである（図1）。その一方で、細菌がなぜ細胞内でポリリン酸を蓄積するのか、その理由については長らく不明のままであり、様々な研究者により解明が試みられてきた。また、ポリリン酸は生物が行う様々なリン酸化反応の基質として用いられるだけでなく、生物のエネルギー物質であるATPを、ポリリン酸とADPから再生することも可能である。そのため、安価なポリリン酸を用いた様々なバイオプロセスへの応用が期待されている。本セミナーでは、前半は細菌のポリリン酸代謝メカニズムと、それを用いた排水中のリン除去技術について基礎的な部分から解説を行うとともに、後半はポリリン酸を用いた新しいバイオプロセスによる有機リン酸エステル生産技術について、これまでの研究成果を報告したい。

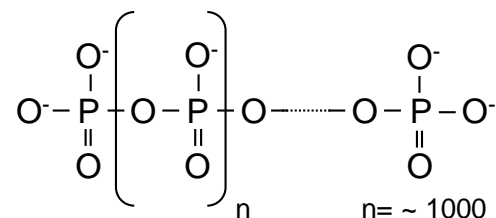


図1. ポリリン酸の構造

2) 細菌のポリリン酸代謝酵素と蓄積現象

細菌の中でも特に大腸菌を例に挙げると、ポリリン酸代謝に関わる主要な酵素は二種類存在する。まず、ポリリン酸合成はポリリン酸キナーゼ（PPK: polyphosphate kinase）により行われる。PPKは、ポリリン酸の末端のリン酸基にATP由来のリン酸基をエステル結合により重合させ、リン酸1分子鎖長が長くなったポリリン酸とADPが生成する（図2）。この反応は平衡反応であり、ADP濃度が高い場合は逆反応が進行し、ポリリン酸の末端のリン酸基がADPに転移し、リン酸1分子鎖長が短くなったポリリン酸とATPが合成される。ポリリン酸の分解は、PPKの逆反応以外にもポリリン酸分解酵素（PPX: exopolyphosphatase）

によっても行われる。PPX はポリリン酸の末端からリン酸基を 1 分子ずつ加水分解するエキソ型酵素であるが、PPK とは違い ATP や ADP は反応には関与しない。大腸菌は、アミノ酸飢餓、リン酸飢餓、核酸合成系抗生物質の添加など、ある種のストレスを与えた場合に細胞内にポリリン酸が蓄積する現象が明らかになっているが、この詳しいメカニズムについては不明な部分が多い。

PPK (Polyphosphate kinase)



PPX (exopolyphosphatase)



図 2. 大腸菌のポリリン酸代謝酵素

3) ポリリン酸過剰蓄積変異株の構築と機能解析

大腸菌においてポリリン酸を過剰蓄積する変異株を取得するため、突然変異誘発剤で処理した数千種類の大腸菌変異株の中から、細胞内に過剰にポリリン酸を蓄積した変異株を探索したところ、親株の数百倍のポリリン酸を蓄積する変異株 (MT4 株) を取得することに成功した。MT4 株の細胞をポリリン酸の染色試薬である DAPI で処理し、蛍光顕微鏡で観察を行ったところ、細胞内に黄色く染色されたポリリン酸の顆粒が蓄積していることが明らかになった (図 3)。

次に、MT4 株染色体のどの部分に変異を起こしたかを調査したところ、リン酸輸送系遺伝子群の一つである *phoU* 遺伝子の 1 塩基だけが変異していることが明らかとなった。大腸菌は、周囲のリン酸濃度が低下してリン酸飢餓状態になると、わずかなリン酸を効率よく取り込むための PST と呼ばれるリン酸輸送系の遺伝子発現を活性化するが、PhoU はリン酸十分条件下で PST 系遺伝子の発現を抑制するリプレッサーとして機能する。すなわち、*phoU* 遺伝子に変異すると、周囲にリン酸が十分に存在しても PST 系が発現し続け、細胞内に大量のリン酸が流入することでポリリン酸が蓄積することが明らかとなった。

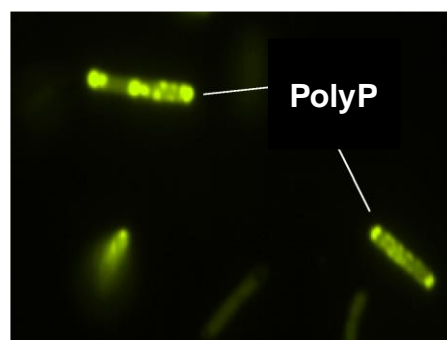


図 3. ポリリン酸を過剰蓄積する MT4 株の蛍光顕微鏡写真。黄色の蛍光はポリリン酸顆粒を示す。

4) ポリリン酸高蓄積株の育種方法の開発

大腸菌細胞がリン酸飢餓状態に陥ると、細胞周囲に存在する微量のリン酸を効率よく取り込むために必要な様々な遺伝子の発現を活性化するが、このようなリン酸飢餓時に活性化する遺伝子制御機構を Pho レギュロンと呼んでいる。前述のリン酸輸送系 PST の遺伝子群も Pho レギュロンの制御下にあるが、リン酸エステル化合物を加水分解する酵素であるアルカリホスファターゼも Pho レギュロンに制御されているため、*phoU* 遺伝子に変異するとアルカリホスファターゼの活性も上昇する。X-リン酸と呼ばれる化合物は、アルカリホスファターゼによりリン酸基が加水分解されると青色を呈する。そのため、X-リン酸を含む培地で *phoU* 変異株のコロニーを形成させると、コロニーの色が青色を呈することから、視覚的にポリリン酸高蓄積変異株を選別することが可能である。この原理 (X-リン酸法) を利用して、大腸菌変異株の中から青色コロニーだけを選択してポリリン酸蓄積量を測定したと

ころ、いとも簡単にポリリン酸高蓄積変異株である MT29 株を単離することに成功したことから、X-リン酸法がポリリン酸高蓄積株の育種に効果的であることが明らかになった。

X-リン酸法が大腸菌以外の細菌についても適用可能であるか調べるため、様々な環境サンプルから単離した細菌を対象として、X-リン酸法によるポリリン酸高蓄積株の育種を検討した。まず、東広島市の土壌から単離した *Pseudomonas putida* MY11 株を対象として、X-リン酸法によるポリリン酸高蓄積変異株の取得を試みたところ、青色コロニーの半数以上が親株よりも高いポリリン酸蓄積量を示しており、最もポリリン酸蓄積量が高かった MY11-41 株については、ポリリン酸蓄積量が親株の 10 倍以上、大腸菌の数万倍以上にも向上する

ことが明らかとなった(図4)。X-リン酸法によるポリリン酸高蓄積変異株の育種は、*Acinetobacter* 属細菌や *Ralstonia* 属細菌等、数多くの環境細菌において成功実績がある。また、作製したポリリン酸高蓄積変異株を人工廃水に接種すると、親株の数倍の速度で培地中のリン酸を除去できることも明らかにしている。以上より、X-リン酸法により作製したポリリン酸高蓄積株を用いることにより、廃水中のリン除去効率を大幅に向上させる可能性があることが示された。

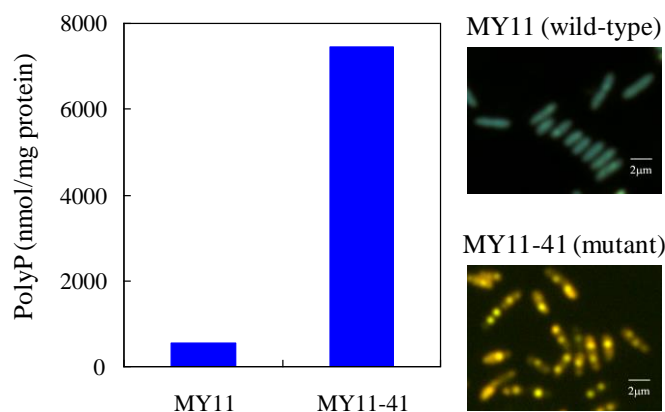


図4. X-リン酸法により作製した MY11 株のポリリン酸高蓄積変異株のポリリン酸蓄積量と蛍光顕微鏡写真

5) ポリリン酸代謝酵素を用いた有機リン酸エステル生産技術の開発

プラスチックによる環境問題が世界的に深刻となっており、石油から合成されるプラスチックに代えて、バイオプラスチックや国産木材を積極的に利用することに期待が寄せられている。しかし、いずれの材料もそのままでは燃えやすいため、安全性の面から難燃性を高める必要がある。これまでも、プラスチックや木材に難燃性を付与し、火災などの場合でも有毒なハロゲンガスを発生させないようにするために、有機リン酸エステルに代表されるリン系難燃剤が多く使用されるようになってきた。しかしながら、有機リン酸エステルを合成するためのアルコールとリン酸のエステル化は化学的に進行しづらいため、黄リンから製造されるオキシ塩化リンをアルコールと反応させるなど、エネルギーと環境の両面からみて負担の大きい製造方法が用いられている。

生物は、細胞内で様々な有機リン酸エステルを酵素反応により合成し、生命活動に利用することが良く知られている。このエステル化反応は、基質として黄リンを用いず、常温、常圧の温和な条件下で進行するため、有機リン酸エステルの合成を酵素を用いたバイオプロセスに変換することで、省エネルギー化や環境負荷を低減する技術開発に繋がることが期待される。その一方で、タンパク質である酵素は化学触媒と比べて安定性が低いため、長期間の使用が難しいことや繰り返し添加を行う必要がある。また、基質のリン酸エステル化には、多くの場合で ATP がリン源として使用されるため、バイオプロセスに用いる場合には高価な ATP を大量に投与する必要が生じ、コストが膨大になるといったデメリットが存在する。本研究では、これらのデメリットを解消するために、超好熱菌由来で安定性が高い耐

熱性酵素を使用し、安価なポリリン酸をリン源とした ATP 再生系を組み合わせることで、実用的なバイオプロセスによるリン酸エステル合成系の構築を試みた。

本研究では、バイオプロセスによるリン酸エステル合成のモデル化合物として、グリセロール 3-リン酸 (G3P) を対象とした。本研究で考案したバイオプロセスによる G3P 生産反応を図 5 に示す。G3P は *Thermococcus kodakarensis* 由来耐熱性グリセロールキナーゼ (TkGK) によりグリセロールと ATP から合成される。生じた ADP は、*Rhodothermus marinus* 由来耐熱性ポリリン酸キナーゼ (RmPPK) により、ポリリン酸を用いて ATP に再生される。この反応系を G3P 合成反応とカップリングさせることにより、高価な ATP を投与することなく、安価なポリリン酸をリン源とした G3P 生産系が構築できる。また、耐熱性酵素を発現させた大腸菌株を 70°C 程度の高温条件にさらすことにより、宿主である大腸菌由来の酵素は変性して活性を失うため、結果的に耐熱性酵素のみが機能する。さらに、高温で処理することにより細胞膜浸透性が上昇するため、熱処理した菌体がそのまま生体触媒として利用可能である。

TkGK と RmPPK を発現させて熱処理した大腸菌細胞を用い、G3P 合成系と ATP 再生系をカップリングさせたバイオプロセスでは、至適反応温度が 70~80°C、至適 pH 7.0 で高い G3P 生産効率が得られた。この最適反応条件下で、10 mL スケールでのモデル系を構築したところ、反応開始 20 分ほどで初期濃度 100 mM のグリセロールから約 60 mM の G3P を生産することに成功した (図 6)。以上のように、ポリリン酸をリン源としたバイオプロセスによるリン酸エステル合成は、低コストかつ低環境負荷を実現した新しい技術として応用可能である可能性が示された。

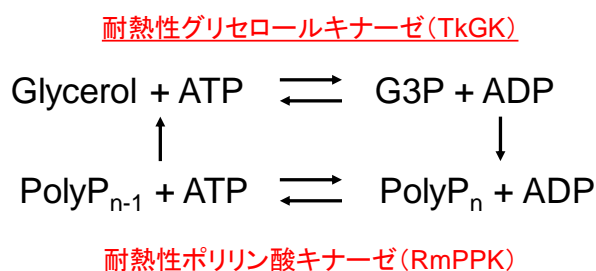


図 5. バイオプロセスによる G3P 生産反応

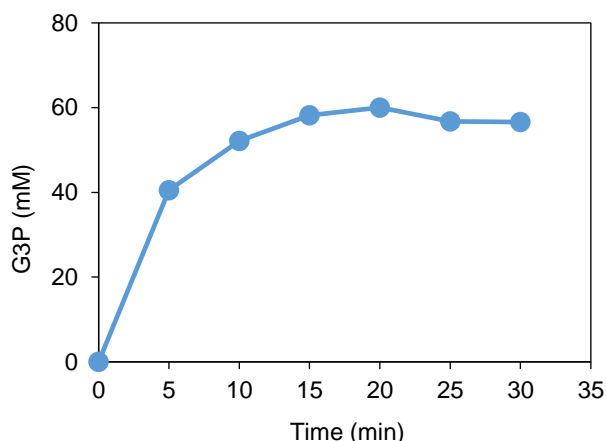


図 6. 本研究で構築したバイオプロセスにより合成された G3P 濃度の経時変化

6) おわりに

本発表では、細菌のポリリン酸代謝に関する基礎的な知見と、ポリリン酸高蓄積細菌を利用した廃水処理技術、有機リン酸エステル生産へのポリリン酸の応用例について紹介した。今後は、さらに幅広い分野にポリリン酸を活用した新技術が波及することを期待したい。

本研究を実施するに当たり、多大なる御支援を頂いた長瀬科学技術財団に心より感謝申し上げます。また、本研究に関して貴重な御助言を頂いた大竹久夫先生 (リン循環産業振興機構)、本田孝祐先生 (大阪大学)、黒田章夫先生 (広島大学)、廣田隆一先生 (広島大学) にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。