微生物が作る長鎖リン酸ポリマーの特性と利用

Characterization and application of a long-chain polyphosphate in bacteria

広島大学大学院先端物質科学研究科

黒田 章夫 Akio KURODA

加藤 純一 Junichi KATO

池田 宰 Tsukasa IKEDA

滝口 昇 Noboru TAKIGUCHI

大竹 久夫 Hisao OHTAKE

Key words: inorganic polyphosphate; ATP; evolution; glucokinase; Lon protease

はじめに

ポリリン酸は、リン酸が高エネルギーリン酸結合によって縮合したリン酸ポリマーである。この物質は、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の形ではないかとも言われている。最近、ポリリン酸の微量検出技術が開発され、その機能が少しずつ明らかになってきた。本稿では、ポリリン酸に関する三つの話題として、(1) 生命エネルギー物質として機能するポリリン酸、(2) タンパク質分解に関連する長鎖ポリリン酸の意外な機能、(3) ポリリン酸を蓄積する微生物を利用したリン回収技術について述べる。限られた誌面であるので、概説になることをお許しいただきたい。また、より詳しいポリリン酸の総説としてはいくつか挙げさせていただくので、興味がある方は参考にされたい^{1), 2)}。

(1) 微生物のポリリン酸ワールド—生命エネルギー物質として機能するポリリン酸—

地球上の大部分のリンは、リン酸イオンとして存在するのではなく、カルシウムフルオロアパタイトなどの形で不溶性のものとして存在する。地殻に存在するカルシウムフルオロアパタイトが火山の熱水で溶け出すときには、リン酸のほか、ピロリン酸、トリポリリン酸、さらに重合の進んだポリリン酸や環状のトリメタリン酸の形で溶け出すことが報告されている³⁾。微生物の中には ATP の代わりにポリリン酸をエネルギー源として利用する酵素が存在する¹⁾。ひょっとしたら原始生命体は熱水に存在するポリリン酸をエネルギーとして利用したのかもしれないと考えられている所以である。

排水処理の現場では、ATP よりもはるかに多くのポリリン酸 (100 程度のリン酸が重合したものが多い) を含み、

ポリリン酸を利用する微生物が存在する。嫌気槽と好気槽からなる生物脱リン法では、ポリリン酸を多量に含む微生物を優勢にさせることによって、排水からのリン除去が行われている。有機物を含む排水と微生物が最初に出会う嫌気槽では、リン酸が微生物から放出される。リン除去が行われるところか、排水のリン酸濃度が上昇する。しかし、好気槽に運ばれると、微生物が吐き出した以上のリン酸が吸収され、リン除去が行われることが知られている⁴⁾。この一見奇妙なリン酸の出し入れは、嫌気槽で排水に含まれる有機物の獲得のエネルギーにポリリン酸の高エネルギーリン酸結合が使われ、その結果生じる多量のリン酸が菌体から放出されて起こる現象である。取り込まれた有機物はポリハイドロキシブチル酸や、グリコーゲンとして蓄積される。好気槽に移ると、今度は獲得した有機物を一気に酸化して、得られたエネルギーで再びリン酸を吸収し、ポリリン酸を作り直す。このときにポリリン酸を多く含む菌体の増殖が起こることによってリン除去が成立する⁴⁾。

好気槽の微生物では ATP の 100 倍以上のポリリン酸 (高エネルギーリン酸結合の数として) が存在する。嫌気条件で酢酸を取り込むとき、ポリリン酸がどう使われるかを調べた結果、最初にピロリン酸にまで分解されることがわかった。その後、リン酸にまで分解されて菌体外へ放出されていると考えられた。酢酸からアセチル CoA に変換される場合、通常の生物では ATP が使われるが、生物脱リン法の微生物では直接ポリリン酸が使われるようである。しかし今のところ、酢酸を利用する生物脱リン法の微生物の単離が難しいために、その酵素の正体は不明である。

Microlunatus phosphovorius は、グルコースを利用し、生物脱リン法の現場で活躍することが確認されている細菌である⁵⁾。この細菌はポリリン酸を多量に菌体の中に貯める。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。その際、活性汚泥と同様にリン酸を放出する。グルコースをリン酸化

する酵素を精製すると、この細菌はATPではなく、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もつことを発見した⁶⁾。この細菌はATPを使うグルコキナーゼも持っているが、ATPよりはるかにポリリン酸が多いので、直接基質の同化にポリリン酸を使っていると考えられた⁶⁾。

このポリリン酸依存性グルコキナーゼの一次構造を決定し、ATP依存性の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依存性グルコキナーゼのIIBという領域は、ATP依存性グルコキナーゼだけに存在した。真核生物も含め、多くの生物で見られるATP依存性グルコキナーゼは、このIIB領域を獲得して、ポリリン酸依存性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(図1)。言い過ぎだと批判されるかもしれないが、生物脱リン法で活躍する微生物は、ひょっとしたら原始生命体の「ポリリン酸ワールド」の名残りのかもしれない。

(2) ポリリン酸が細胞の危機を救う—大腸菌が作る長鎖ポリリン酸の新しい機能—

微生物の環境は移ろいやすく、突然過酷な環境へと変化する。大腸菌は通常ほとんどポリリン酸を蓄積しないが、アミノ酸飢餓でストリンジェント応答(緊縮応答)を起こすと、(1)で述べたものよりもさらに長鎖のポリリン酸

図1 グルコキナーゼのドメインの変化に伴うリン酸供与体の変化

ポリリン酸とATPの両方をリン酸の供与体に使うことができるグルコキナーゼ(ポリリン酸・ATP依存性グルコキナーゼ)は、一部の *Actinomyces* 属に存在し、ポリリン酸依存性グルコキナーゼと約50%のアミノ酸配列の相同性があった。ドメインIIBの追加によって、ATP依存性グルコキナーゼに変化したのではないかと考えられた。

(700個のリン酸が直鎖上に結合したものを)蓄積することを発見した⁷⁾。なぜ長鎖ポリリン酸がアミノ酸飢餓で合成されるのか? それは(1)で述べたようにATPの代わりとして使われるのではなく、未知の機能が存在した。アミノ酸が培地にたくさんある状態から、枯渇して、自分で作らなければならなくなったとき、大腸菌では、アミノ酸生合成の酵素群が新しく作られて適応が起こり、再び増殖するようになる。アミノ酸飢餓の際、古いタンパク質の一部が積極的に分解されて、適応に必要な酵素に作り替えられることが昔から知られていた。筆者らは、ポリリン酸が蓄積しないと、古いタンパク質の分解がうまく行われなことを発見した⁸⁾。どのプロテアーゼがアミノ酸飢餓状態でのタンパク質の分解にかかわるかを調べたところ、LonプロテアーゼというATP依存性のプロテアーゼが少なくとも必要であることがわかってきた⁹⁾。ポリリン酸はLonプロテアーゼと結合し(平衡定数0.5 nM)、1分子のLonプロテアーゼに1分子のポリリン酸が結合することがわかった⁹⁾。面白いことにポリリン酸が結合すると、分子量が200万以上の巨大な複合体になることがわかった。分子量から考えると、通常4量体である酵素が20量体以上の巨大な複合体になる。これはポリリン酸がたくさん結合してこのような分子量を示すのではなく、プロテアーゼ自体が重合するためである。実はこの複合体を作ると、通常分解しないタンパク質を分解できるようになることを見つけた。それらはすべて、リボソームタンパク質であった⁹⁾。ここでは700個のリン酸が結合した長鎖のポリリン酸が有効であり、数十の短いものは機能しなかった。また、ポリリン酸はLonプロテアーゼによる基質の分解反応の前で変化しなかった⁹⁾。長鎖ポリリン酸が存在すると、なぜリボソームタンパク質が分解するか? リボソームタンパク質はポリリン酸が存在するときだけ、Lonプロテアーゼ

図2 大腸菌が作る長鎖ポリリン酸の新しい機能

Lonプロテアーゼは長鎖ポリリン酸と結合し、巨大な複合体を形成する。その複合体は、効率よくリボソームタンパク質を分解する。短いポリリン酸にはその機能がない。

人工リン鉱石

図3 微生物のポリリン酸を利用したリン資源の回収

生物脱リン法の余剰汚泥を70℃で加熱した後に汚泥を分離すると、上清にポリリン酸が得られる。その上清にカルシウムを添加すると、リン鉱石が得られる。左は神戸市の下水処理場に設置されたパイロットプラントの概略図、右は人工リン鉱石の写真。広島大学と神鋼パンテック株式会社が新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)と日本学術振興会による平成11年度マッチングファンド方式による産学連携研究開発事業の委託を受け共同で行った研究である。

に結合することがわかった。すなわち、ポリリン酸は基質タンパク質の分解のエネルギーとして使われるのではなく、基質の認識に使われていた(図2)⁹⁾。極度のアミノ酸飢餓時には、Lonプロテアーゼ・長鎖ポリリン酸複合体ができて、リボソームタンパク質が認識、分解され、細胞が適応するために必要なアミノ酸が供給されるのだろう。

(3) ポリリン酸がリン資源枯渇の危機を救う—活性汚泥からのリン回収技術への応用—

リンは人類にとって必須な資源である。しかし、グアノと呼ばれる非常に良質のリン鉱石はすでに掘り尽くされており、その枯渇が懸念されている¹⁰⁾。日本は、リンを100%輸入に依存している。輸入したリン鉱石の80%以上は、リン肥料として使われている。肥料としてまかれたリンは植物へと移行し、われわれの体や、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。生物脱リン法の微生物は、この希薄なリンをポリリン酸として濃縮している。そこからリンを回収することができればリサイクルに貢献できる。菌体を加熱すると、染色体DNAやタンパク質などの高分子は変性沈殿するので、その上清からプラスミドが回収できることは分子生物学者ならよく知っている。実は、ポリリン酸もプラスミドと同じような挙動を示す。すなわち、菌体に70℃程度の熱をかけることによって、その上清にポリリン酸が得られる。その上清を分離した後にカルシウムを加えると簡単に沈殿する¹¹⁾。(1)で述べた活性汚泥を使うと、最大で100個程度のリン酸が

結合したポリリン酸をうまく回収することができた¹¹⁾。この技術を使えば、活性汚泥から天然リン鉱石の品質を凌ぐリン鉱石を人工的に生産できることがわかった(図3)。神戸市の下水処理場に設置したリン回収パイロットプラントでは、下水に含まれる約半分のリンが回収できることがわかった(図3)。活性汚泥は希薄なリン資源をポリリン酸として濃縮してくれるので、ここからリンを回収することで循環型社会形成に貢献できるだろう。

- 1) A. Kornberg: *J. Bacteriol.*, **177**, 491-496 (1995).
- 2) I. Kulaev, V. Vagabov, and T. Kulakovskaya: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 111-129 (1999).
- 3) Y. Yamagata, H. Watanabe, M. Saitoh, and T. Namba: *Nature*, **352**, 516-520 (1991).
- 4) 味楚 俊, 佐藤弘泰, 松尾友矩: 環境微生物工学研究法, 技術堂出版(1993), pp. 67-70.
- 5) K. Nakamura, A. Hiraishi, Y. Yoshimi, M. Kawaharasaki, K. Masuda, and Y. Kamagata: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 17-22 (1995).
- 6) S. Tanaka, T. Ikeda, J. Kato, N. Takiguchi, K. Nakamura, H. Ohtake, and A. Kuroda: 準備中
- 7) A. Kuroda, H. Murphy, M. Cashel, and A. Kornberg: *J. Biol. Chem.*, **272**, 21240-21243 (1997).
- 8) A. Kuroda, S. Tanaka, T. Ikeda, J. Kato, N. Takiguchi, and H. Ohtake: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 14264-14269 (1999).
- 9) A. Kuroda, K. Nomura, R. Ohtomo, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kornberg: *Science*, **293**, 705-708 (2001).
- 10) P. H. Abelson: *Science*, **283**, 2015 (1999).
- 11) A. Kuroda, N. Takiguchi, T. Gotanda, K. Nomura, J. Kato, T. Ikeda, and H. Ohtake: *Biotech. Bioeng.*, **78**, 333-338 (2002).