

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05770

研究課題名(和文) 粘液細菌を用いた飢餓時でのポリリン酸を介したエネルギー生成の解明

研究課題名(英文) Energy production from polyphosphate during starvation in myxobacterium

研究代表者

木村 義雄 (Kimura, Yoshio)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：10243750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、粘液細菌である *Myxococcus xanthus* を用いて、アミノ酸飢餓時でのポリリン酸合成機構と生成されたポリリン酸の役割について主に研究を行った。その結果、本菌はポリリン酸合成酵素(Ppk1)によって主に細胞内に多く存在しているリン酸及び2リン酸を初発基質としてこれにATPの 位のリン酸を付加してポリリン酸を生成され、孢子形成期にはポリリン酸はAMPやADP、NAD<sup>+</sup>へのリン酸の付加に利用されていると推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリリン酸の合成は幾つかの細菌で報告されているが、初発の基質については報告されておらず、また、分解酵素の役割も不明確であった。我々は詳細に粘液細菌におけるポリリン酸合成過程を研究し、その過程を明らかにすることができたこと、また、飢餓時に孢子形成を行う本菌においてポリリン酸の役割(エネルギー生成)を明らかにすることができたことに学術的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we mainly investigated the mechanism of polyphosphate synthesis and the role of polyphosphate produced during amino acid starvation using *Myxococcus xanthus*. The results suggest that polyphosphate is produced by polyphosphate synthase (Ppk1) using intracellularly abundant phosphate and diphosphate as primary substrates and adding phosphate at the -position of ATP to these substrates. It was presumed that during sporulation, polyphosphate is used to transfer phosphate to AMP, ADP, and NAD<sup>+</sup>.

研究分野：微生物生理学

キーワード：ポリリン酸 粘液細菌 ATP

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一部の細菌は、アミノ酸飢餓になるとリン酸が数個から 1,000 個程度結合したポリリン酸を合成する。細菌のポリリン酸合成酵素には Ppk1 と Ppk2 が知られ、前者は ATP を用いてポリリン酸を合成する反応を主とするが、後者は前者の反応よりも ADP や GDP にポリリン酸のリン酸基を転移して ATP や GTP を生成する逆反応を進めやすいことが報告されている。

一方、細菌でのポリリン酸の役割は、エネルギーやリン酸の保存、金属塩のキレート、バイオフィーム形成、ストレス応答の誘導、病原性などに関与するとされている。

### 2. 研究の目的

粘液細菌は、土壤中に生息するグラム陰性細菌で、他の微生物を種々の分解酵素により、分解しその分解物を代謝してエネルギーを生成している。また、飢餓状態になると約 10 万個の細胞が一处に集合し、孢子からなる子実体を形成する。本菌のポリリン酸合成機構を明らかにすることと本菌におけるアミノ酸飢餓による子実体及び孢子形成期にポリリン酸はエネルギー生成に利用されているのかを明らかにすることを目的とした。また、ポリリン酸を用いて AMP や NAD<sup>+</sup> をリン酸化する酵素が知られており、それらの酵素学的諸性質とその機能についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

*M. xanthus* のポリリン酸合成酵素 (Ppk1)、ポリリン酸分解酵素 (Ppx1 と Ppx2)、polyP:ATP-NAD キナーゼ (PanK) 及び polyP:AMP リン酸転移酵素 (Pap) は発現ベクター (pCold) に連結し、大腸菌で発現させた。

ポリリン酸合成活性は種々のポリリン酸の鎖長と ATP を用い、ADP 生成量から測定した。また、本菌のポリリン酸合成活性を測定する際は、合成反応後、生成されたポリリン酸をポリリン酸分解酵素を用いて分解し、生じた遊離リン酸量を測定することで行った。実際にポリリン酸が生成されているかは、Urea-Native page 法による電気泳動で確認した。

ポリリン酸分解酵素 (Ppx) 活性は種々のポリリン酸を用いて分解後、遊離したリン酸量を測定した。

粘液細菌におけるポリリン酸の合成及び機能解析は Ppk1, Ppx 1 及び Ppx2 欠損株を作製後、これらを用いてポリリン酸合成量及び表現型の比較を行った。

### 4. 研究成果

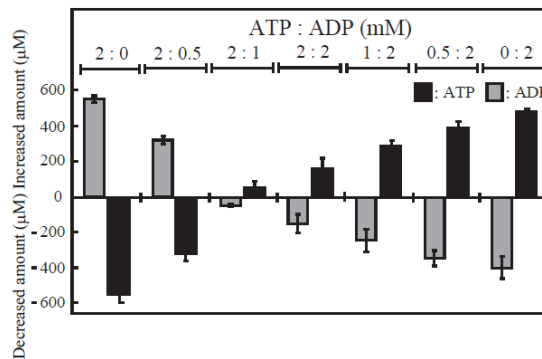
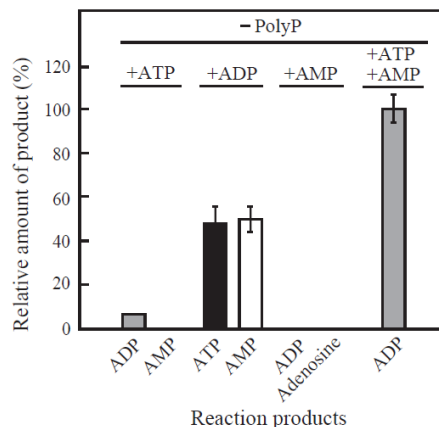
#### 1). ポリリン酸合成酵素

粘液細菌においてポリリン酸を合成する主要酵素と考えられるポリリン酸キナーゼ 1 (Ppk1) は、ATP を用いてポリリン酸にリン酸基を転移することでポリリン酸の伸長が行われていること、本酵素はポリリン酸非存在下あるいは低濃度下では、アデニル酸キナーゼ活性を有することを明らかにした。これは Ppk1 がアデニル酸キナーゼ活性を有することの初めての報告となった (右図上参照)。

また、本酵素は ATP と ADP の比において ATP の比が 2/3 以上であればポリリン酸の合成反応が進むが、2/3 以下になると逆反応が進み、ADP にポリリン酸のリン酸基を転移させ、ATP を合成することを明らかにした (右図下参照)。本酵素は基質として polyP<sub>60-70</sub> を最もよい基質とするが、polyP<sub>700-1000</sub> はあまりよい基質としないこと、また、リン酸及び 2 リン酸もよい基質とすることを明らかにした。Ppk1 がリン酸や 2 リン酸を基質にすることを報告はなされていない。

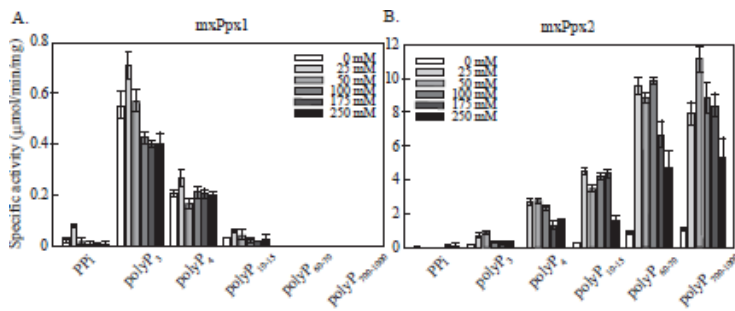
また、ポリリン酸合成関連酵素であるポリリン酸キナーゼ 2 (Ppk2) と相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子を本菌は有していることから、このタンパク質を大腸菌で発現させ、その酵素的諸性質を明らかにした。本酵素は他の Ppk2 が有する中央領域を 100 アミノ酸ほど欠いており、Ppk2 活性 (ATP 合成活性) は有していないものの、アデニル酸キナーゼ活性が見られたことから、粘液細菌の Ppk2 ホモログタンパク質はアデニル酸キナーゼとして機能していることを明らかにした。

本菌における Ppk1 活性を測定したところ、飢餓 6 時間で最も活性が高く、その後、活性は低下していった。



## 2). ポリリン酸分解酵素

本菌は2つのポリリン酸分解酵素 Ppx1 と Ppx2 を有している。Ppx1 と Ppx2 はそれぞれ短鎖と長鎖のポリリン酸を分解する酵素であること（下図参照）、また、それぞれの分解活性は長鎖ポリリン酸とピロリン酸によって阻害されていることを明らかにした。本菌の Ppx2 は、栄養細胞と飢餓細胞の両方で発現していることから、飢餓時にポリリン酸が合成される際は、細胞内の2リン酸により Ppx2 活性が阻害され、2リン酸がポリリン酸合成酵素により、ポリリン酸に変換された後は、分解活性を有するようになると推定した。

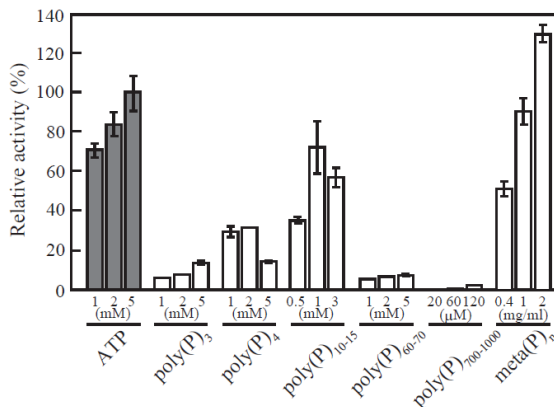


両酵素はポリリン酸分解活性に比べて低いものの、ATP、GTP や pppGpp の分解活性も有していた。また、Ppx1 と Ppx2 は N 末端領域において相同性があり、Ppx2 はさらに Ppx1 より 200 アミノ酸程度長い C 末端領域を有している。Ppx2 の C 末端領域に KCl が作用し、本酵素を活性化するとともに、この C 末端領域は長鎖のポリリン酸の結合に関与していることを明らかにした。

## 3). ポリリン酸関連酵素

### (1) polyP:ATP-NAD kinase

本菌はポリリン酸関連酵素として polyP:ATP-NAD kinase (PanK) を有している。この酵素は  $\text{NAD}^+$  をリン酸化して  $\text{NADP}^+$  を生成する酵素であるが、その際、リン酸供与体として ATP 以外にポリリン酸を利用することができる酵素である。本酵素は、10-15 程度のリン酸からなる短鎖のポリリン酸を供与体として好み（右図参照）、また、他の細菌由来の PanK と異なり、NADH のリン酸化活性は見られないなどの酵素学的諸性質を有していた。

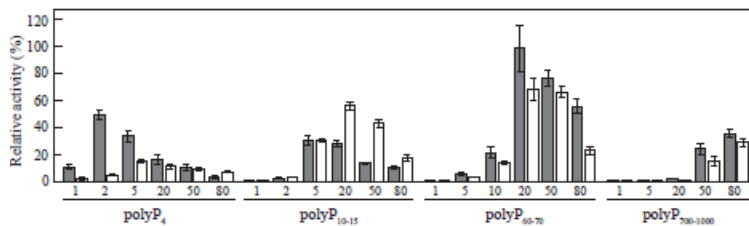


本菌の飢餓時にはポリリン酸を用いて  $\text{NADP}^+$  を生成していることが推察され、これを種々の脱水素酵素によって還元化され、生成された NADPH は飢餓時の酸化ストレスの適応や細胞内の還元利用されていると考えられた。

### (2) polyP:AMP phosphotransferase

ポリリン酸のリン酸を AMP に付加して ADP を生成する酵素である polyP:AMP phosphotransferase (Pap) の酵素学的諸性質の検討を行った。Pap は、AMP のほか dAMP も基質とし、また、活性は低いですが ADP も基質とし、それぞれ dADP と ATP が生成された。

リン酸転移供与体として polyP<sub>60-70</sub> を用いた時に最も活性が高かった（下図参照）が、 $K_m$  は polyP<sub>700-1000</sub> において最も低く、触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は polyP<sub>700-1000</sub> において polyP<sub>60-70</sub> のそれよりも 4 倍ほど高かったことから、本酵素は長鎖のポリリン酸を用いて AMP を ADP に生成しやすいことがわかった。



本酵素の活性は粘液細菌の飢餓時 1-2 日において約 2 倍上昇した。また、リコンビナントの Pap と Ppk1 の両酵素を用いることでポリリン酸と AMP から ADP、さらに ATP が生成されたことから、粘液細菌の細胞においても飢餓時には生成したポリリン酸を用いて AMP から ATP が生成されていると推定された。

ポリリン酸関連酵素ではないが、生物全般に見られる本菌のアデニル酸キナーゼ (AdkA) の酵素学的諸性質も明らかにした。AMP を ADP にすることができるアデニル酸キナーゼは生物にとってエネルギーの恒常性に不可欠な酵素であるが、本菌は他の生物で見られる AdkA のほかに、Ppk1 と Ppk2 を補足的に利用してエネルギーの恒常性を維持していると推察された。現在、本菌におけるポリリン酸の役割について引き続き研究を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura, Y., and Kamatani, S.	4. 巻 131
2. 論文標題 Catalytic activity profile of polyP:AMP phosphotransferase from <i>Myxococcus xanthus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 147-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.09.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Harita, D., Kanie, K., and Kimura, Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Enzymatic properties of <i>Myxococcus xanthus</i> exopolyphosphatases mxPpx1 and mxPpx2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2021.140660	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Y, Yamamoto H, Kamatani S.	4. 巻 165
2. 論文標題 Enzymatic characteristics of two adenylate kinases, AdkA and AdkB, from <i>Myxococcus xanthus</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 379-385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Y., Kamimoto T., Tanaka N.	4. 巻 77
2. 論文標題 Enzymatic characteristics of a polyphosphate/ATP-NAD kinase, PanK, from <i>Myxococcus xanthus</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 173-178.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00284-019-01810-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村義雄、紙本拓也
2. 発表標題 粘液細菌が有するポリリン酸/ATP-NADキナーゼ(PanK)の酵素学的諸性質
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張田大樹、蟹江航晴、木村義雄
2. 発表標題 粘液細菌Myxococcus xanthusが有するポリリン酸分解酵素の酵素学的諸性質の検討
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張田大樹、木村義雄
2. 発表標題 粘液細菌Myxococcus xanthusが有するポリリン酸分解酵素の機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------