

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780083

研究課題名（和文）ポリリン酸蓄積変異株の復帰変異メカニズム解明ーリン回収微生物の創成にむけてー

研究課題名（英文）Characterization of the reversion mechanisms of polyphosphate-accumulating mutants

研究代表者

廣田 隆一（HIROTA RYUICHI）

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教

研究者番号：90452614

研究成果の概要（和文）：

申請者らは、これまでにバクテリアのリン酸レギュロンの制御因子である *phoU* に変異を導入することで、ポリリン酸が高蓄積することを明らかにした。しかし、*phoU* 変異株は継代するとポリリン酸を蓄積しないリバータントを急速に生じる。本研究ではこの原因の究明を行い、安定性の高い *phoU* 変異株を取得するための方法論を確立した。これにより *phoU* 変異株を利用したリン資源のリサイクル技術開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We previously revealed that a mutation in PhoU, a negative regulator of bacterial phosphate regulon, results in the elevated levels of polyphosphate (polyP) in cell. However, PhoU mutants were rapidly outgrown by revertant(s) that lost the ability to accumulate polyP. In this study, we analyzed the mechanisms that the revertants lost polyP-accumulating ability, and established a method to screen stable PhoU mutants. The discovery in this study would be applicable to the development of a phosphorus-recovering technology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ポリリン酸、PhoU、リン酸レギュロン

1. 研究開始当初の背景

リンはすべての生物にとって欠くことのできない必須元素である。リンがなければ、食糧はもとより再生可能資源と言われるバイオマスも、地球温暖化ガス排出量削減への貢献が期待されるバイオ燃料も生産することができない。今日、リンのほとんどは、有限の天然資源であるリン鉱石から得られている。しかし、地球上のリン鉱石の埋蔵量は限られており、すでに品質の良いものから枯渇が始まっている。加えて BRICs 等経済成長が著しい国の需要増加やバイオ燃料の原料生産増加によって、この寿命はさらに短く

なる可能性があり、資源小国である我が国は特に早い対策が必要であると考えられている。バクテリアは高いリン濃縮能力を有することから、これを活用することでリンのリサイクル技術開発に貢献できる可能性がある。

2. 研究の目的

環境におけるリン濃縮にはポリリン酸蓄積菌が大きく貢献していることが知られている。申請者らはバクテリアのポリリン酸蓄積メカニズムを解明してきた過程で、驚異的なポリリン酸蓄積を示す変異株の作製に成功した。リンは現在枯渇することが懸念されている資源であるが、この変異株作製技術は

リン資源問題に対処するためのリサイクル技術へ応用できる可能性がある。

申請者らの研究グループでは、これまでにバクテリアのリン酸レギュロンの抑制因子である *phoU* が不活性化すると大量のポリリン酸が蓄積することを発見した。この原理に基づいて作製した *phoU* 変異株は排水中からのリンのリサイクルにおいて有効であると考えられており、実際に国内の他のグループによって、汚泥中から単離された酵母の *phoU* ホモログ(*pho8I*)変異株を用いて排水中のリン除去試験が行われ、その有効性が確認されている。しかしながら、*phoU* 変異株の多くは不安定であり、増殖の経過と共にポリリン酸を蓄積しなくなる復帰変異株(リバータント)を生じやすいという問題があった。今後、実用化に向けて本格的にこの手法をリンのリサイクルへ応用するためには、この問題を解決する必要がある。

本研究では、*phoU* 変異株から出現するリバータントの解析を行い、リバータントがポリリン酸を蓄積しなくなる原因を明らかにした。また、その解析の過程で安定な *phoU* 変異株を発見し、その単離方法を確立した。

3. 研究の方法

3.1. 大腸菌 *phoU* 破壊株の作製

phoU 変異株の解析には遺伝子破壊後、リバータントができるだけ含まれていない状態の培養系で解析を行う必要がある。そこで、大腸菌 *phoU* 破壊株の作製は P1 ファージを用いた方法により行った。*Escherichia coli* K12 MG1655 (以下 MG1655) の前培養を 1.5 ml チューブに 500 μ l とり、遠心分離後、上清を捨てて菌体ペレットを得た。このペレットを 500 μ l LB (+100 mM MgSO₄ +5 mM CaCl₂) で懸濁した後、P1 ファージ (MG1655 *phoU*: :Km^r) 10 μ l と 90 μ l LB (+100 mM MgSO₄ +5 mM CaCl₂) を添加した。37°C で 30 分間静置し、1M クエン酸ナトリウム (pH5.5) 200 μ l と 1 ml LB を添加した。37°C で 1 時間静置培養した後、遠心分離し、上清を捨ててペレットのみ残した。このペレットを 200 μ l LB (+100 mM クエン酸ナトリウム (pH5.5)) で懸濁した。この懸濁液を LB 寒天培地 (+50 μ g/ml Km + 50 μ g/ml X-リン酸) に塗布した。37°C で一晩培養し、生じた青色コロニーを *phoU* 破壊株として実験に用いた。

3.2. 大腸菌 *phoU* 破壊株の継代培養

phoU 破壊株のシングルコロニーを 10 株選択し、2 \times YT 液体培地に植菌して、37°C で一晩振とう培養した。24 時間後、この菌体培養液 200 μ l をポリリン酸抽出用のサンプルとして分注した。また、この菌体培養液を継代培養の 1 代目 (n=1) として、新たな 2 \times YT 液体培地に 40 μ l ずつ植菌して 2 代目 (n=2)、3 代目 (n=3) と継代を行った。

3.3. 菌体からのポリリン酸の抽出

菌体培養液 200 μ l を遠心分離 (12,000 rpm \times 3 min) して菌体を集菌した。集菌後、50 μ l の GITC 溶液 (4 M guanidine isothiocyanate, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) を加えて、90°C、2 分間保温した。さらに超音波処理を 3 分間行って菌体破碎した。この溶解液 50 μ l をタンパク質定量用に別のチューブに移した。残りの 300 μ l を 90°C で 2 分間保温し、30 μ l の 10% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) と 300 μ l の 99.5% エタノールを加え、よく混合した後、90°C で 2 分間保温した。この溶液に 3 μ l のグラスミルク (Gene Clean III KIT) を加え、良く混合した後、氷中で 5 分間静置した。5 分間の静置後、遠心分離 (14,000 rpm \times 30sec) にてグラスミルクを沈殿させ、300 μ l の NEW WASH 液 (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH7.4) で 2 回洗浄を行った。洗浄後、完全に NEW WASH 液を取り除き、50 μ l の nuclease 溶液 (50 mM Tris pH7.4, 10 mM MgCl₂, 20 μ g/ml DNase / RNase) を加えて混合し、37°C で 30 分間保温して核酸を完全に分解した。保温後、サンプルに 150 μ l GITC 溶液と 150 μ l 99.5% エタノールを加えて懸濁し、遠心分離 (14,000 rpm \times 30 sec) にてグラスミルクを沈殿させた後、200 μ l NEW WASH 液で 2 回洗浄を行った。洗浄後、NEW WASH 液を取り除き、アスピレーターを用いて 10 分間減圧乾燥させた。減圧乾燥後、沈殿に 100 μ l の蒸留水を加えて混合し、90°C で 2 分間保温した。その後、遠心分離 (14,000rpm \times 3 min) を行い、上清 50 μ l をポリリン酸溶液として分取して後の測定に用いた。ポリリン酸の定量はポリリン酸キナーゼ (PPK) を用いて ATP に変換し、ATP 量として測定した。

菌体から調製したポリリン酸溶液 4 μ l に 3.3 \times PPK 緩衝液 (50 mM HEPES-KOH, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, pH 7.2) 3 μ l、0.5 mM ADP 水溶液 2 μ l、および PPK (15 μ g/ml) 1 μ l を加えて、37°C で 1 時間保温し、ポリリン酸を ATP に変換した。またブランクとして、ポリリン酸溶液の代わりに滅菌水を用意し、3.3 \times PPK 緩衝液、0.5 mM ADP 水溶液、PPK を加えたものも用意した。1 時間反応後のサンプル 5 μ l にルシフェラーゼ溶液 (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Luciferase reagent, lyoph., Roche, Cat#. 1699695) 40 μ l を加え、直ちにマイクロプレートリーダーを用いて蛍光値として測定した。

3.4. アルカリホスファターゼ活性測定

前培養した菌体を OD₆₀₀=0.1 程度になるように希釈した。希釈した菌体培養液 100 μ l に、1M Tris-HCl (pH=8.0) 0.9 ml, Chloroform 10 μ l, 0.1% SDS 10 μ l を添加した。添加してよく混合した後、3 mg/ml pNPP (*p*-Nitrophenylphosphate Disodium Salt Hexahydrate, 関東化学株式会社,

Cat. No. 28274-30) (0.02 N NaOH で溶解) を加えた。pNPP 添加後は、30°C インキュベータで保温して、30 分おきに 100 μ l ずつ採取して OD₄₁₀ を測定した。1 unit AP activity = 1.0 μ mol pNPP / min / OD₆₀₀ として、アルカリホスファターゼ活性を求めた。

3.5. リアルタイム RT-PCR

OD600 が約 0.5 の培養液から、RNeasy purification kit (Qiagen) を用いて total RNA を取得した。RT-PCR は One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用い、ABI PRISM 7700 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) で反応と検出を行った。データは $\Delta\Delta$ CT 法を用いて行った。

4. 研究成果

4.1. *phoU* 破壊株におけるポリリン酸蓄積と安定性

X-リン酸法で得られる青コロニーの変異株の一部 (5%以下) は、多くは、取得直後はポリリン酸蓄積を示すものの、継代して培養するとポリリン酸を蓄積しなくなる復帰変異株 (リバータント) が出現するという減少が確認されていた。そこで、独立した 10 個の *phoU* 変異株のコロニーを 2xYT 培地で継代培養し、具体的にどの程度の頻度でリバータントが生じるかを調べた。全てのクローンにおいて、継代数 (PN) が増加するにつれてポリリン酸の蓄積量は減少した (図 1)。特に 2 つのクローンについては PN=1 の時点で既にほとんどポリリン酸を蓄積しなかった。これらの結果は、リバータントが出現して支配的になった結果を反映していると考えられた。

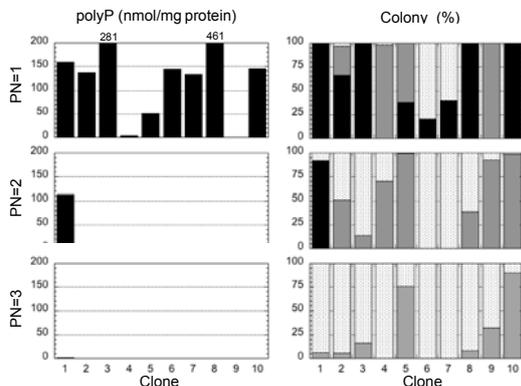


図1: *phoU*破壊株の継代によるポリリン酸蓄積量の変化(左)とコロニー割合の変化(黒: Δ phoU, グレー: HAP[-], ドット: LAP[-])

4.2. リバータントの増殖とポリリン酸蓄積能力喪失の原因解析

X-リン酸プレートでの表現形質から、リバータントには大きく分けて 2 種類が存在することが確認された。ひとつはコロニーの色が青く直径が 3mm 以下のもの、もう一つは白色でサイズが 5mm 以上のものである (図 2)。アルカリホスファターゼの活性から、前者を High-AP polyP[-] (HAP[-])、後者を Low-AP

polyP[-] (LAP[-]) と名付けた。次世代シークエンسを用いたゲノム解析の結果、HAP[-] リバータントは PstSCAB、LAP[-] リバータントは PhoB に変異がそれぞれ生じていることが明らかとなった。野生型 PhoU、PstSCAB をそれぞれに発現させることでポリリン酸の蓄積が回復したことから、これらの変異がポリリン酸を蓄積しなくなった直接的要因である事が明らかになった。これら両者の変異とも PstSCAB の高発現を抑制するものであると考えられるが、これは、PhoU 変異によるリン酸レギュロンの恒常的な発現によってもたらされる、リン酸の過剰取り込みのストレスを遮断するための変異であると考えられた。

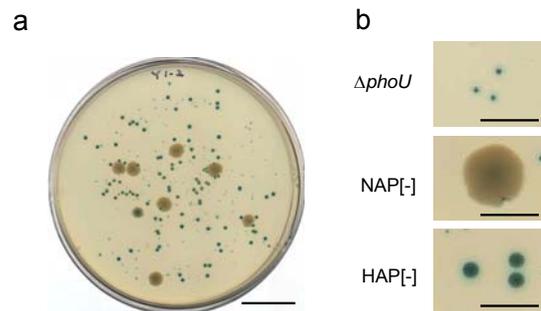


図2: (a) *phoU*破壊株 (継代数1) のプレート, (b) Δ phoU, NAP[-], HAP[-]コロニーの形状

4.3. 安定してポリリン酸を蓄積する二次変異株 LAP の発見

出現コロニーをよく観察すると、HAP[-]、NAP[-]とも異なる薄い青色を示すコロニーの出現が時折認められた (図 3a)。この微弱的な呈色は、わずかな PhoA の活性を意味していると考えられた。実際に AP 活性を測定した結果、NAP[-]は検出限界値以下 (<0.1 unit) であったのに対し、LAP[+]は 0.4-0.5 unit であり、有意に高い活性が検出された。このことから、LAP[+]ではリン酸レギュロンがわずかに活性化している可能性が示唆された。そこで、この株のポリリン酸を測定したところ、PhoU 変異株の直後の 50%程度のポリリン酸蓄積量ではあるものの、継代してもその蓄積能力を失わないことが明らかとなった (図 3b)。この株を Low-AP polyP[+] (LAP[+]) と名付けた。LAP[+]の変異箇所を解析した結果、PhoB の 175 番目に変異が生じていることが分かった。

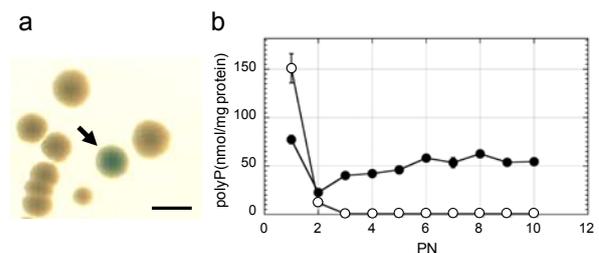


図3: (a) LAP[+]のコロニー, (b) LAP[+](●)と Δ phoU破壊株(○)のポリリン酸蓄積

PhoA 以外のリン酸レギュロン遺伝子 (*pstCAB*) の転写をリアルタイム RT-PCR で調べた結果、PhoU 変異直後に比べると明らかに低い、ポリリン酸を蓄積しなくなったリバータントよりは有意に高い転写活性が認められた (図 4)。これは、PhoB175 の変異が、完全な機能欠損変異では無く、機能を減弱させる点変異である事が推察された。つまり、LAP[+]は、ストレスを生じさせない程度にリン酸レギュロンを活性化する変異体であると考えられる。

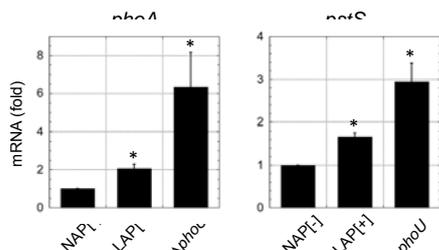


図4: NAP[-], LAP[+], ΔphoUにおけるphoA, pstS mRNA量の変化

4. 4. X-リン酸法の改良と今後の展望

X-リン酸法で得られるポリリン酸蓄積変異株のほとんどは不安定であるが、LAP[+]を取得することにより、この不安定性を克服できることが分かった。今後この「改変」X-リン酸法が、大腸菌以外の微生物においても有用であるかを調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. R. Hirota, K. Motomura, S. Nakai, T. Handa, T. Ikeda, A. Kuroda. Stable polyphosphate accumulation by a pseudorevertant of an *Escherichia coli phoU* mutant. *Biotechnol. Lett.*, 35(5), 695-701 (2013). (査読有り)
2. X. Ye, K. Honda, T. Sakai, K. Okano, T. Omasa, R. Hirota, A. Kuroda, H. Ohtake Synthetic metabolic engineering—a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. *Microbial Cell Factories* 11, 120 (2012). (査読有り)
3. R. Hirota, S. Yamane, T. Fujibuchi, K. Motomura, T. Ishida, T. Ikeda, A. Kuroda. Isolation and characterization of a soluble and thermostable phosphite dehydrogenase from *Ralstonia* sp. strain 4506 *J. Biosci. Bioeng.*, 113, 445-450 (2012). (査読有り)
4. E. Restiawaty, K. Honda, K. Okano, R. Hirota, T. Omasa, A. Kuroda, H. Ohtake Construction of membrane-anchoring

fusion protein of *Thermococcus kodakaraensis* glycerol kinase and its application to repetitive batchwise reactions *J. Biosci. Bioeng.*, 113, 521-525 (2012). (査読有り)

5. E. Restiawaty, Y. Iwasa, S. Maya, K. Honda, T. Omasa, R. Hirota, A. Kuroda, H. Ohtake, Feasibility of thermophilic ATP regeneration system using *Thermus thermophilus* polyphosphate kinase. *Process Biochem.*, 46:1747-1752 (2011). (査読有り)
6. K. Motomura, R. Hirota, N. Ohnaka, M. Okada, T. Ikeda, T. Morohoshi, H. Ohtake, A. Kuroda, Overproduction of YjbB reduces the level of polyphosphate in *Escherichia coli*: a hypothetical role of YjbB in phosphate export and polyphosphate accumulation *FEMS Microbiol. Lett.*, 320, 25-32 (2011). (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

1. 亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を選択マーカーとした微生物大量培養法の開発、小野敏志、廣田隆一、池田丈、黒田章夫、日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台)、2013. 3. 25
2. 亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いた NADPH 再生系とシキミ酸デヒドロゲナーゼとの共役反応による高効率シキミ酸合成、児玉洋輔、廣田隆一、池田丈、黒田章夫、日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台)、2013. 3. 25.
3. 亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた抗生物質に依存しないバクテリアの選択的培養法、廣田隆一、石田丈典、池田丈、黒田章夫、第 64 回日本生物工学会大会(2012) (神戸)、2012. 10. 25.
4. 亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いた亜リン酸の高感度測定法の開発 廣田隆一、石田丈典、池田丈、黒田章夫 環境バイオテクノロジー学会(2012) (京都大学)、2012. 6. 25.
5. ポリリン酸蓄積を安定化する復帰変異株の解析 廣田隆一、中井茂人、本村圭、池田丈、黒田章夫 日本農芸化学会(2012) (京都女子大学)、2012. 3. 24
6. 還元型リン酸を利用するバクテリアの単離とその生理学的特性の解析 廣田隆一、藤淵達也、池田丈、黒田章夫 第 27 回日本微生物生態学会(2011) (京都大学)、2011. 10. 8
7. 亜リン酸デヒドロゲナーゼの取得と解析 藤淵達也、廣田隆一、池田丈、黒田章夫 第 63 回日本生物工学会大会(2011) (東京農工大学)、2011. 9. 27

8. 亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いた NADH 再生系の構築 廣田 隆一、山根 章太郎、藤渕 達也、池田 丈、黒田 章夫 第 63 回日本生物工学会大会(2011) (東京農工大学)、2011. 9. 27.

〔図書〕(計 3 件)

1. 黒田章夫、廣田隆一、リン酸の無機化学とバイオテクノロジー、生物工学会誌(特集)、90(8)、473-476 (2012).
2. 廣田隆一、黒田章夫、排水からのリン資源の回収-基礎-微生物によるリン資源の効率的回収に関わる遺伝子 バイオ活用による汚染・廃水の新処理法 (倉根隆一郎監修)、CMC 出版、第 8 章、66-75(2012)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ATP の製造方法およびその利用
発明者：黒田章夫、廣田隆一、本村圭、
権利者：国立大学法人広島大学
種類：特許
番号：特願 2011-159349
出願年月日：平成 23 年 7 月 20 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/akbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 隆一 (Ryuichi HIROTA)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教
研究者番号：90452614

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：