

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630382

研究課題名(和文) 亜リン酸酸化能力を持つ植物の創成と革新的省リン技術への応用

研究課題名(英文) Application of a transgenic plant conferred with phosphite-oxidizing ability to efficient utilization of phosphite waste

研究代表者

黒田 章夫 (Kuroda, Akio)

広島大学・先端物質科学研究科・教授

研究者番号：50205241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リンは農業生産にとって必須な肥料である。リン資源を確保して、長年に利用できることが人類にとって重要な課題となっている。多量の亜リン酸(リンの酸化数が+3価のリン酸)が化学工場、車産業界から廃棄されている。亜リン酸を直接リン肥料にできれば、亜リン酸廃棄物を効率よく利用する技術として有望である。しかしながら、植物が利用できるのは、+5価のリン酸だけである。亜リン酸デヒドロゲナーゼ(PtxD)は、亜リン酸をリン酸に酸化する酵素で、亜リン酸廃棄物を効率よく利用するための鍵となる。野生型シロイヌナズナは亜リン酸を資化できないが、ptxDを導入したシロイヌナズナは亜リン酸をリン源とする培地で増殖できた。

研究成果の概要(英文)：Phosphorus is an essential agricultural fertilizer. Ensuring long-term availability and accessibility of phosphorus resources is critical to the future of humanity. A large amount of phosphite (oxidation state of +3) is produced as a waste in chemical and automotive industry. Direct utilization of phosphite (Pt) as a fertilizer would be very beneficial for the recycling of the Pt waste. However, phosphate (Pi) is the only chemical form of phosphorus that can be assimilated by plants. Pt dehydrogenase (PtxD), catalyzing oxidation of Pt to Pi, is a key enzyme for the efficient utilization of industrial Pt waste. An Arabidopsis thaliana recombinant carrying ptxD could grow on a medium containing Pt as a phosphorus source, while the wild type was unable to assimilate Pt.

研究分野：応用生物学

キーワード：亜リン酸 亜リン酸デヒドロゲナーゼ リン資源 植物

1. 研究開始当初の背景

リンは食料生産に欠かせない肥料である。リンは主にリン鉱石から生成されるが、近年高品質のリン鉱石の枯渇が懸念されている。リン資源を確保して、長期に利用できることが人類にとって重要な課題となっている。そのために、使ったリンをリサイクルする技術や未利用リン資源を有効利用する技術開発が求められている。

亜リン酸は、リンの酸化数が+3 価のリン酸である (図 1)。亜リン酸は、次亜リン酸を用いた無電解ニッケルメッキ法の副産物として生じる。

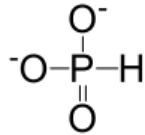


図 1、亜リン酸

国内のメッキ工場だけでも年間約 3 万トンの亜リン酸を含む廃棄物が処理されている。また、三塩化リンを利用する反応の副産物としても亜リン酸が排出される。三塩化リンは世界中で約 30 万トンも利用されており、多くの亜リン酸が廃棄されている。亜リン酸はほとんど利用用途がないため、未利用リン資源と言える。

生体反応に関わるリンのほとんどが+5 価のリン酸とそのエステル化合物であることから、生物は通常+5 価のリン酸しか利用できない。しかし、*Pseudomonas fluorescense* が亜リン酸を酸化する活性を持っていることが報告された。また近年、*Pseudomonas stutzeri* WM88 株から亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PsPtxD) の遺伝子が単離された。我々は亜リン酸を唯一のリン源とする最少培地を用い、旺盛に生育する *Ralstonia* sp. 4506 株を分離した。*Ralstonia* sp. 4506 株から得られた亜リン酸デヒドロゲナーゼ (RsPtxD) は、PsPtxD に比べて安定で、比活性の高い酵素であることが分かった。

2. 研究の目的

亜リン酸は未利用リン資源である。亜リン酸を直接リン肥料にできれば、亜リン酸廃棄物を効率よく利用する技術として有望である。しかしながら、植物が利用できるのは、リンの酸化数が+5 価のリン酸だけである。亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) は亜リン酸廃棄物を効率よく利用するための鍵となる。植物へ *ptxD* 遺伝子を導入すれば、亜リン酸を直接利用できる植物が創成でき、亜リン酸の有効利用につながると考えられた。また、亜リン酸を肥料にする技術は以下に示す通り、画期的な省リン技術になる可能性があると考えられた。

我が国では農業に毎年 39.5 万トンのリンが投入されているが、作物の中の成分として回収されるリンは僅かに 4.2 万トンしかない。実に 90% 近くのリンが土壤に蓄積されている (図 2)。リン酸のほとんどが、土壤中の鉄やアルミと結びつき、不溶性のリンとなっ

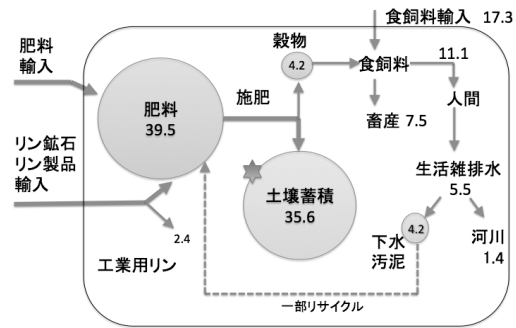


図 2、我が国のリンのフロー。横山一代ら、鉄と鋼、92 (2006), pp.683 を改変。単位は万トン P。

て植物が利用できない形態となるのが主な原因といわれている ($\text{Fe}^{3+} + \text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{FePO}_4$ 、溶解度積 10^{-22} で不溶化する)。日本のような火山性の土壤では鉄やアルミの成分が多く、リン酸は不溶性の塩を作り易い。従って過剰にリンを施肥する傾向が定着している。リン資源の持続的利用の観点から考えると、リンの土壤固定をどうするかは大きな問題である。亜リン酸の金属塩は溶解度が高い。例えば、亜リン酸のカルシウム塩はリン酸のカルシウム塩に比べて、1,000 倍水に溶け易い。亜リン酸は鉄に対しても不溶性の塩を作りにくいことから、亜リン酸を肥料とすることで土壤固定の問題解決 (省リン技術) につながるのではないかと発想した。

本研究では、植物へ *ptxD* 遺伝子を導入して、未利用リン資源の亜リン酸を資化できる植物の創成と将来の省リン技術の可能性を模索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 亜リン酸測定方法

50 mM MOPS-KOH (pH7.3)、0.5 mM NAD^+ 、5 μM 1-Methoxy PMS (フェナジンメトサルフェート)、0.1 mM WST-3 (ホルマゼンを生成するテトラゾリウム塩、同仁化学)、4 mg/ml RsPtxD を含む反応液を作製し、4~500 μM の亜リン酸を含むサンプル 100 μl に対して 900 μl の反応液を添加した。酵素反応に影響を及ぼす夾雑物の濃度に応じてサンプルの量を調製した。室温で反応を行い、20 分後に吸光度計で吸光度 (433 nm) を測定した。

(2) 土壤の亜リン酸測定

土壤サンプルとして黒ボク土、バーミキュライト、腐葉土、鹿沼土、赤玉土を使用した。亜リン酸溶出液として超純水、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.3)、あるいは 0.5 M NaHCO_3 を使用した。15 ml ファルコンチューブに土壤サンプルを 1.0 g 入れ、亜リン酸を 1 μmol (10 mM, 100 μl) 添加し 16 時間、常温で静置した (吸着、固定)。その後、リンを固定した土壤に溶出液を 9.9 ml 添加後 (完全に溶出できれば亜リン酸の終濃度 100 μM となる)、1 時間攪拌した。攪拌後の上清をサンプルチューブに 1 ml 移し、遠心分離 (15,300 \times g, 10

min, 4)した。上清を別のサンプルチューブに移した。100 μ l の土壌溶出サンプルに対して、100 mM MOPS-KOH (pH7.3)、0.5 mM NAD⁺、5 μ M 1-Methoxy PMS、0.1 mM WST-3、4 μ g/ml RsPtxD を含む反応液 900 μ l を添加し、反応を開始した。この際、RsPtxD が入っている RsPtxD(+) と RsPtxD が入っていない RsPtxD(-) を用意し、反応を開始させた。30 で 20 分間静置後、分光光度計で吸光度(433 nm)を測定した。RsPtxD(+) と RsPtxD(-) の吸光度の差から亜リン酸濃度を測定した。

(3) シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) への *ptxD* 遺伝子の導入

ptxD 遺伝子断片を pDONR207 (インビトロジェン社) に導入した。*ptxD* が組み込まれた pBI-OX-GW ベクターを *Agrobacterium* sp. GV3101 株に導入した。形質転換した *Agrobacterium* sp. GV3101 株をカナマイシン (50 μ g/ml) を含む LB 培地で培養し、吸光度(600 nm)が 0.8 ~1.2 になるよう浸潤用懸濁培地に懸濁した。50 ml のチューブに 40 ml の *Agrobacterium* sp. GV3101 株の懸濁液を分取し、シロイヌナズナの花茎部分 (特に先端の花序部分) を浸した。その後、保湿のために透明の袋をかぶせ、一日置いた。約 3 週間生育させた後、通気性のよい袋で袋掛けし落ちてくる種子を回収した。得られた T1 種子を 50 μ g/ml カナマイシンを含む MS (ムラシゲ・スコーグ) 培地で生育させて選抜を行った。2 週間程度生育させ、育ってきたサンプルを植え継いで生育させ、再び種子を回収して T2 種子を得た。

4. 研究成果

(1) 亜リン酸測定方法の確立

従来、亜リン酸の測定は高速液体クロマトグラフィーを用いた方法で行われているが、カラムの洗浄やセットアップに時間がかかる。亜リン酸を特異的に酸化する RsPtxD を用いれば、迅速に亜リン酸が測定できると考えられた。

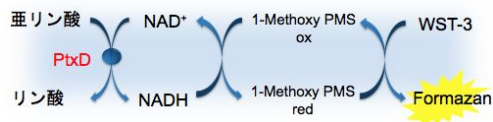


図 3、RsPtxD を用いた亜リン酸測定原理

RsPtxD の共役反応により亜リン酸がリン酸に酸化する際に NAD⁺ から NADH が生成する。この NADH と電子キャリアーである 1-Methoxy phenazinium methylsulfate (PMS) と WST-3 を 10 分間反応させ、亜リン酸依存的に生成するホルマザンの吸光度(433nm)を分光光度計で測定することにより亜リン酸の濃度測定を行った (図 3)。本手法での測定限界はサブ μ M であり、従来法と較べて十分高感度

であることが分かった (図 4)。

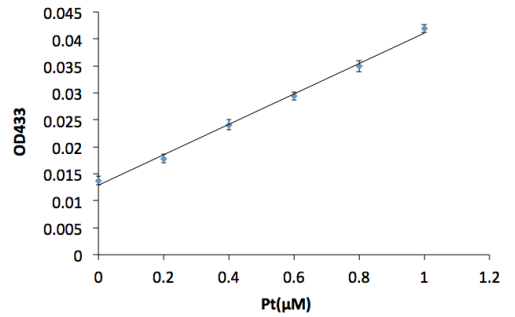


図 4、RsPtxD を用いた亜リン酸(Pt)測定

また、亜リン酸を肥料として使用したモデル実験系として、亜リン酸を黒ボク土などの土壌に吸着させた後、溶出液により溶出を行い、環境中における土壌中の亜リン酸の測定を行った。土壌中の亜リン酸測定では、土壌の種類により効果が異なるものの、溶出液として 0.1M リン酸緩衝液を使用することで吸着した亜リン酸の 60-90% が溶出できることが明らかになった。

島根県のクロボク土 (火山性の土で鉄やアルミニウムの含量が多い) で試してみたところ、亜リン酸イオンは吸着するものの、不溶性にはならないことが分かった。最終的に土壌に固定された量は、リン酸は約 70% であるのに対し、亜リン酸は約 10% にとどまった。亜リン酸を肥料として利用できれば、土壌に固定されず効率よく植物にリンを有効利用させる革新的な省リン技術ができると考えられた。

(2) 亜リン酸酸化酵素を導入した植物の創成

亜リン酸資化植物作製のため *Ralstonia* sp. 4506 株の *ptxD* (*RsptxD*) および *P. stutzeri* 由来の *ptxD* (*PsptxD*) を導入したプラスミドを作製し、アグロバクテリウムを用いて *A. thaliana* を形質転換した。シロイヌナズナの *ptxD* 組換え株の生育試験の結果、*RsptxD* を導入した種子では亜リン酸をリン源とする MS 培地では生育は見られなかった。しかし、同様に行った *P. stutzeri* 由来の *PsptxD* を導入した種子では亜リン酸をリン源とする MS 培地での生育が確認できた (図 5)。*RsptxD*

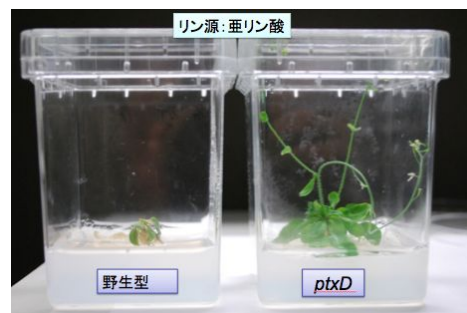


図 5、*ptxD* 導入シロイヌナズナの亜リン酸培地での増殖

組換え株が亜リン酸培地で生育できなかった原因は、コドンの偏りの違いが考えられた。

次にクロボク土を用いて亜リン酸施肥について検討した結果、亜リン酸では野生株と比べると有意な生育が見られるものの、リン酸での生育には及ばなかった。今後革新的な省リン技術を確立して行くには、植物内で *ptxD* の発現を最適化させることが必要であると考えられた。

また、発芽試験を行ったところ、リン酸培地では野生株、組換え株ともに発芽が見られるが、亜リン酸培地では野生株の発芽は見られず、組換え株は亜リン酸 300 μ M, 1.5 mM, 3 mM での発芽が確認できた（高濃度の亜リン酸 15 mM, 30 mM では発芽は見られなかった）。亜リン酸を *ptxD* 組換え株の選択マーカーとして利用可能であることが示唆された。また、亜リン酸が多くの植物の発芽を抑制するとすれば、亜リン酸は *ptxD* 組換え株を優先的に発芽させる薬剤としての利用が考えられる。

約 80% のサイズは除草剤耐性の組換え技術を利用して作られている（2010 年の統計）。多量の除草剤の利用は、スーパー雑草と言われる耐性を持った雑草の出現を引き起こしている。また、除草剤そのものによる環境影響も懸念されている。亜リン酸は健康被害を与えるものではないとされており（アメリカ環境保護庁、EPA）、亜リン酸肥料による選択栽培技術は安全な栽培技術になり得ると考えられた。また、バイオエタノール生産用の植物生産が増加しており、肥料用リンの枯渇を促進するのではないかと懸念されている。亜リン酸肥料による選択栽培技術は、まずはバイオエタノール生産用のリン源として有望ではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) A. Kuroda and R. Hirota, Environmental biotechnology for efficient utilization of industrial phosphite waste, *Global Environmental Research*, 19:77-82 (2015) 査読あり

www.airies.or.jp/journal_GlobalEnvironmentalResearch.html

(2) K. Kanda, T. Ishida, R. Hirota, S. Ono, K. Motomura, T. Ikeda, K. Kitamura, and A. Kuroda, Application of a phosphite dehydrogenase gene as a novel dominant selection marker for yeasts, *J. Biotechnol.* 182-183:68-73 (2014) 査読あり

doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.012.

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 神田圭輔、廣田隆一、石田文典、北村憲二、池田丈、黒田章夫、亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた酵母の選択的培養法の開発、日本生物工学会大会（札幌コンベンションセンター）2014 年 9 月 9 日

(2) 黒田章夫、亜リン酸をリン源とした選択

的無蒸煮発酵技術、JST 新技術説明会（東京、JST 本部）2014 年 5 月 16 日

(3) 黒田章夫、無機リン酸化合物のバイオサイエンスとテクノロジー、日本農芸化学会（東京、明治大学）2014 年 3 月 30 日

(4) 作田敦士、廣田隆一、池田丈、黒田章夫、環境中の亜リン酸動態モニタリングのための簡便な亜リン酸検出法の開発、日本農芸化学会（東京、明治大学）2014 年 3 月 28 日

(5) 黒田章夫、廣田隆一、抗生物質を用いない実規模レベルの選択マーカーの開発：亜リン酸をリン源とする選択的培養方法、新技術説明会（大阪商工会議所）2013 年 9 月 10 日
〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 章夫 (Akio Kuroda)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：50205241