

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780075

研究課題名（和文） ポリリン酸による代謝経路の調節機構解明と発酵プロセス制御への応用

研究課題名（英文） The regulation of metabolic pathways by polyphosphate accumulation and its application to fermentation technology

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）：ポリリン酸は高エネルギーリン酸結合を持つ無機リン酸のポリマーである。バクテリアにおいてポリリン酸はATPを基質として合成されるため、細胞内の代謝と密接に関係していると考えられる。本研究課題では申請者がポリリン酸蓄積株（*phoU*変異株）において新規に見出したポリリン酸蓄積時に起こる代謝経路の変化について、生理学的な意味を明らかにするとともに、ポリリン酸蓄積機構との関係を解析した。その結果、*phoU*がPhoレギュロン支配下にあるポリリン酸蓄積経路の制御以外に、硝酸呼吸経路を支配している可能性が示唆された。また、ポリリン酸合成酵素（PPK）の相互作用因子を解析した結果、TCA回路、NADH生成などのエネルギー合成に関与する多数のタンパク質と相互作用していることが明らかになった。これらの結果は、ポリリン酸合成が代謝活性と直接関係していることを示唆しており、PPKによるポリリン酸の合成の制御機構を明らかにする上においても重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Inorganic polyphosphate (polyP) is a linear polymer of hundreds of phosphates linked by high-energy phosphoanhydride bonds. Since polyP is synthesized from ATP by polyP kinase (PPK), the regulation of polyP synthesis is thought to be closely related to the cellular metabolism and the energy status. Previously, we found that polyP accumulation stimulated by *phoU* mutation in *Escherichia coli* results in the changes in the expression of the genes involved in the several metabolic pathways. In this study, we analyzed the relationship between polyP accumulation and nitrate respiration (NR), one of the pathways found in the altered gene expression caused by *phoU* disruption in *E. coli*. The presence of a novel repression function of PhoU that regulates NR pathway besides Pho regulon was suggested from the analysis using a $\Delta phoU$ strain. The interaction of PPK to the proteins involved in TCA cycle and NADH production was revealed by pull-down analysis using PPK. These results suggest the direct relationship between polyP synthesis and the regulation of central metabolic pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：リン酸、ポリリン酸、ポリリン酸キナーゼ、代謝、ATP、*phoU*、Phoレギュロン、発酵

1. 研究開始当初の背景

ポリリン酸は微生物から高等生物にまで広く存在するリン酸の無機ポリマー分子であり、微生物においてはその含量が高く、鎖長は長いもので700以上にものぼる。ポリリン酸の生理機能はこれまでバクテリアを中心に解析が進められており、それ自身がリン酸の貯蓄源であるほかに、定常期における細胞の生存、タンパク質分解系の活性化などの生理機能と関係があることが明らかにされている。しかしながら、ポリリン酸の蓄積メカニズムはほとんど明らかになっていない。申請者らはこれまでに、ポリリン酸を野生株の1,000倍以上蓄積する大腸菌の変異株(*phoU*変異株)を取得した。この株のマイクロアレイ解析を行った結果、非常に興味深いことに *phoU* 変異株において一部の代謝・呼吸系の遺伝子発現が大きく変化していることが明らかとなった。特に顕著な特徴として、*phoU*変異株は、好気的な培養条件にもかかわらず硝酸呼吸経路を活性化しており、さらにそれに付随した混合酸発酵経路の一部も活性化している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究課題では、*phoU*変異株のポリリン酸蓄積時に起こる代謝経路の変化について、生理学的な意味を明らかにするとともに、ポリリン酸蓄積機構との関係を解析した。さらに、この原理を応用し、ポリリン酸蓄積のコントロールによって代謝制御が可能であるかどうか検討した。

3. 研究の方法

使用菌株およびプラスミド

菌株は大腸菌野生株MG1655株、大腸菌 *phoU* 破壊ポリリン酸高蓄積株 (*ΔphoU*)、*phoU* 破壊後に発生するリバータント、ポリリン酸を蓄積するリン酸トランスポーターPst 強制発現株 (*pst/pMW*) を用いた。また、*phoU* 破壊株は不安定であり、継代培養に伴って表現形質が変化してしまうため、P1 フェージによって *E. coli* MG1655 *ΔphoU::Km* (*ΔphoU*) から、*ΔphoU::Km* locus を野生株に形質導入し、得られた Km 耐性株を実験毎に作製した。

硝酸呼吸活性測定

硝酸呼吸活性の測定は、benzyl biogen を人工電子供与体として用いた硝酸還元活性測定法を参考に行った (Gunsalus RP. et al., Meth. for General and Mol. Microbiol. 2007)。2×YT 液体培地で終夜培養した菌体培養液 400 μl を 1.5 ml チューブにとり、集菌した。その後、ペレットを 25 μM リン酸緩衝液 (pH7.1) で 2 回洗浄した。これを、1 ml のリン酸緩衝液で懸濁させた後、超音波で菌体

を破碎した。破碎溶液 200 μl を別のチューブに移して、Reaction Mixture (1 M リン酸緩衝液 (pH7.1), 50 mM Benzyl viologen, 1 M KNO₃) を 500 μl 加えて 37 °C, 2 min 反応させた。続けて 20 mg/ml Na₂SO₄ を 75 μl 加えて 37 °C, 10 min 反応させた。10 分後 1 M NaOH 75 μl, 25% ZnSO₄ を 75 μl 加えて沈殿を形成させた。遠心分離 (10,000xg, 5 min, 4 °C) によって沈殿と上清を分離させて、上清 400 μl を別のチューブに移した。その上清に 1% sulfanilamide 300 μl, 0.02% N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride (NEDD) 300 μl を加えて 10 分以上呈色反応させた後、分光光度計を用いて 540 nm の吸光度を測定して硝酸呼吸活性 (nmol NO₂/mg protein/min) を調べた。

PPK 相互作用タンパク質の解析

MG1655 株を PPK 発現プラスミド *ppk-His/pCA24N* で形質転換した株を培養し、Sonication buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.0), 50 mM NaCl, 1% NP-40) を用いて超音波破碎により細胞抽出液を調製した。この抽出液を遠心分離し、その上清に Ni-NTA beads を加え、結合したタンパク質を SDS-PAGE (8% gel) にて分離した。検出されたバンドの中で、興味のある挙動を示したものを、MALDI-TOF MS/MS を用いて同定した。

PPK の細胞内局在の解析

ppk-GFP/pCA24N で MG1655 株を形質転換し、得られた株を、ダウンシフト (アミノ酸飢餓処理)、通常培養し、蛍光顕微鏡で *ppk-GFP* 融合タンパク質の細胞内局在を解析した。

4. 研究成果

(1) *phoU*破壊株における硝酸呼吸活性の変化: これまでに、*phoU*破壊株において硝酸呼吸経路の一連の遺伝子群の発現が上昇することが明らかになっていた。そこで、*phoU*破壊によって硝酸呼吸活性が実際に変化するかどうかを調べた。*phoU*破壊株は非常に不安定であり、培養を継続すると復帰変異株 (リバータント) を生じる。そこで、P1 フェージによって *E. coli* MG1655 *ΔphoU::Km* (*ΔphoU*) から、*phoU::Km* locus を野生株に形質導入し、得られた Km 耐性コロニーを実験に用いた。

その結果、*ΔphoU* では好気的な培養にもかかわらず、野生株の3倍以上の硝酸呼吸活性を示した (図1)。しかしながら、興味深いことに、リバータント BS 株においては硝酸呼吸活性がほとんど見られなかった。このことから *phoU* 破壊によって、硝酸呼吸が一時的に上昇するがリバータントになると硝酸呼吸活性が失われることが明らかになった。

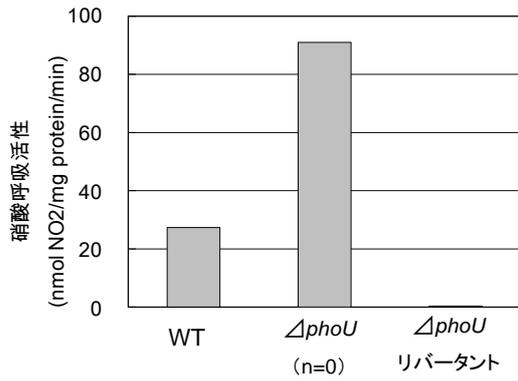


図1：野生株、 $\Delta phoU$ 、 $\Delta phoU$ リバータントの硝酸呼吸活性、nは継代数を表す。

(2) 硝酸呼吸活性とポリリン酸蓄積との関係

上記実験結果から、*phoU*破壊株では一時的にポリリン酸蓄積量と硝酸呼吸活性の上昇がみられるが、リバータントの発生とともにポリリン酸蓄積量と硝酸呼吸活性は減少することが分かった。続いて、これらの現象が相互に影響を及ぼすか調べた。

まず、ポリリン酸を強制的に蓄積させる *pst/pMW* を用いて、硝酸呼吸活性に変化が生じるか調べた。*pst/pMW* は大量のポリリン酸を蓄積した (図2左)。しかし、その時の硝酸呼吸活性はコントロールとほとんど差が生じなかった。このことから、ポリリン酸の蓄積より硝酸呼吸活性が変化することはないことがわかった。

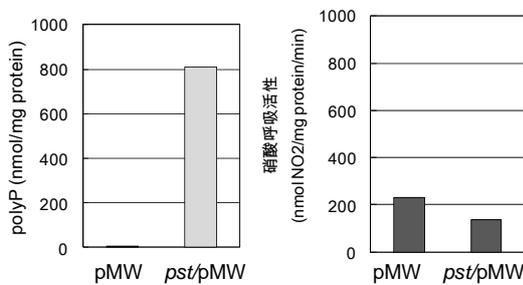


図2：ポリリン酸蓄積株のポリリン酸量 (左) と硝酸呼吸活性 (右)

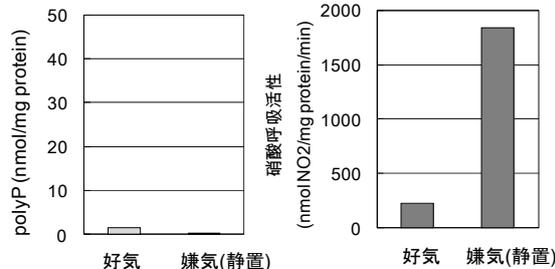


図3：静置培養した大腸菌の硝酸呼吸活性 (右) とポリリン酸蓄積 (左)

次に硝酸呼吸の活性化によるポリリン酸蓄積の影響を調べた。大腸菌野生株 MG1655 を振とう培養を行った株と、静置培養を行った株の硝酸呼吸活性を測定した。その結果静置培養で硝酸呼吸の活性化が確認された。しかしながら、この条件においてポリリン酸の蓄積は観察されなかった (図3)。

以上の結果から、硝酸呼吸の活性化とポリリン酸蓄積は、相互に影響しているのではなく、*PhoU* の破壊によって起こる独立した現象であることが明らかになった。

(3) ポリリン酸キナーゼ (PPK) の相互作用因子解析

ポリリン酸は ATP を基質として合成されるため、解糖系、TCA 回路など中央代謝系との何らかの関係があると推察される。そこで、ポリリン酸と代謝系との関係を調べるために、PPK と相互作用する因子の解析を行った (図4)。

PPK-His 発現大腸菌を 2xYT で対数増殖期中期まで培養後、菌体を洗浄し、MOPS 完全合成培地にシフトし、アミノ酸飢餓によるポリリン酸蓄積を誘導した。そして、ダウンシフト時、通常培養時で結合量が異なるタンパク質の同定を行った。その結果、PPK に結合している因子として、*sucA*、*lpdA*、*aceE*、*aceF* など TCA 回路の酵素、*nuoG*、*ndh* などの NADH 生成に関与するものなど、エネルギー代謝に関連するタンパク質が多数見出された。ポリリン酸蓄積時に結合量が増加している因子として、*gltB*、*htpG*、*ndh*、*metK*、*ribD* などが同定され、ポリリン酸の合成と関連している可能性が示唆された (タンパク質名は全て遺伝子名で記載)。

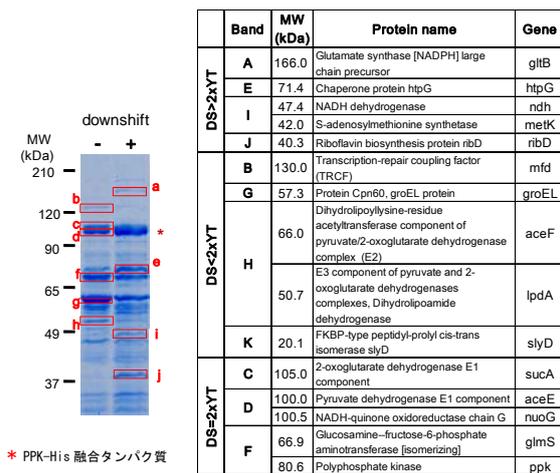


図4：PPKの相互作用因子解析 左：PPKに結合しているタンパク質のSDS-PAGEによる検出。右：質量分析計を用いたPPK結合タンパク質の同定。左の赤枠で印をつけたタンパク質を解析した。

(4) PPKの細胞内局在解析

PPKに相互作用するタンパク質が、アミノ酸飢餓後のポリリン酸蓄積時に変化する事が分かった。そこで、細胞内におけるPPKの局在がどのように変化するか調べた。PPK-GFPをMG1655菌体内で発現させ、通常時、ポリリン酸蓄積時におけるPPKの局在を、蛍光顕微鏡を用いて調べた。ポリリン酸の局在はDAPI染色によって調べた。その結果、PPKは通常培養時には細胞質内に散在していたが、ポリリン酸蓄積時は、ポリリン酸の周囲に集約している状態が観察された(図5)。このことから、PPKの細胞内局在の変化がポリリン酸合成活性の変化と関連している可能性が示唆された。

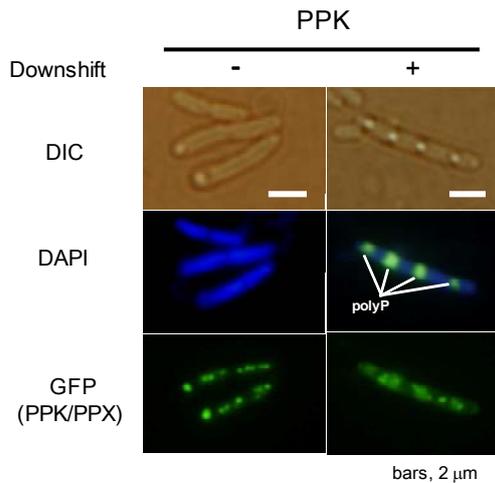


図5: PPKの細胞内局在変化 通常培養時(-) ダウンシフト時(+)の菌体の蛍光顕微鏡写真。DIC: 微分干渉(可視光) DAPI: 青色が核酸、黄色がポリリン酸顆粒 GFP: PPKの細胞内局在

研究成果のまとめ

本研究では、ポリリン酸を高蓄積する *phoU* 変異株において活性化する遺伝子群の中に見出されていた遺伝子の機能と、ポリリン酸の蓄積および代謝活性の変化との関連性を調べた。本研究において着目したのは、最も顕著な変化が確認されていた、硝酸呼吸経路とポリリン酸蓄積の関連であった。これを調べるために、ポリリン酸による硝酸呼吸系の活性化、またその逆に硝酸呼吸の活性化によるポリリン酸の蓄積を調べた。その結果、いずれかが活性化の要因になっているのではないことが明らかになった。このことから、

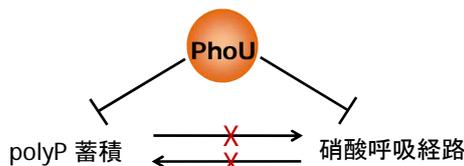


図6: *phoU*によるポリリン酸蓄積と硝酸呼吸経路制御の概念図

*phoU*はPhoレギュロンの制御以外に、硝酸呼吸経路を支配している可能性が示唆された。

当初、ポリリン酸が代謝経路の調節に関与していれば、ポリリン酸合成量を調節することで代謝状態をコントロールできる可能性があると考えていた。しかし、上記結果から、少なくとも硝酸呼吸経路の変動は独立した現象であることが分かった。

次に、PPKと代謝経路のタンパク質が直接影響を及ぼしている可能性を調べるため、PPKの相互作用タンパク質の解析を行った。その結果、PPKはTCA回路、NADH生成などのエネルギー合成に関与する多数のタンパク質と相互作用していることが明らかになった。さらに、PPKの細胞内局在解析の結果から、PPKはポリリン酸の合成時に大きく局在を変化させていることが明らかになった。

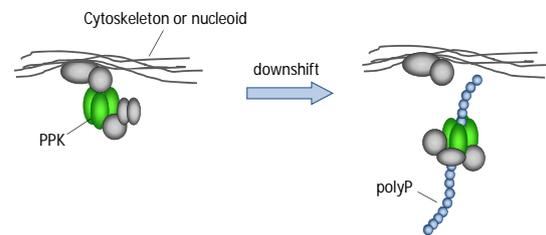


図7: ポリリン酸蓄積とPPKの細胞内局在変化 ダウンシフトにより相互作用因子の制御が外れ、ポリリン酸合成の活性化が起こると考えられる。

現在のところ、これらの生理的な意味は不明であるが、この結果はポリリン酸合成が中央代謝経路と直接関係していることを示唆する興味深いデータである。今後、結合タンパク質との結合の意義や、局在変化との関係を調べることで、PPKによるポリリン酸の合成の制御機構が明らかになると考えている。

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4件)

1. 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 Microbiology Letters., In press, 2011. (査読有)
2. R. Hirota, A. Kuroda, J. Kato, H. Ohtake. Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. J. Biosci. Bioeng., 109, 423-432, (2010). (査読有)
3. 黒田章夫, 廣田隆一、本村圭
微生物のポリリン酸蓄積機構解明と利用

Phosphorus Letter, 68, 7-18 (2010). (査読有)

4. 黒田章夫、廣田隆一、本村 圭

微生物のポリリン酸蓄積機構解明とリン濃縮への利用、リン資源の回収と有効利用、サイエンス&テクノロジー、63-75 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. 廣田 隆一、中井 茂人、半田 智大、本村 圭、黒田 章夫、大腸菌の PhoU 変異によるポリリン酸蓄積とゲノム不安定化機構の解析、第 33 回日本分子生物学会 (神戸ポートアイランド)、2010.12.7

2. 中井茂人、半田智大、本村圭、廣田隆一、黒田章夫、大腸菌ポリリン酸高蓄積 PhoU 変異株の不安定化機構の解明、第 62 回日本生物工学会 (宮崎シーガイア)、2010.10.28

3. 本村圭、廣田隆一、大中信輝、岡田真以、黒田章夫、大腸菌 YjbB はリン酸排出促進によりポリリン酸蓄積を抑制する、第 62 回日本生物工学会 (宮崎シーガイア)、2010.10.28

4. R. HIROTA, K. MOTOMURA, A. KURODA. Inorganic polyphosphate is involved in the genetic instability of the *phoU* mutant in *Escherichia coli*, American Society for Microbiology 110th General Meeting, 24 May, 2010, San Diego, USA.

5. 廣田隆一、本村圭、岡田真以、黒田章夫、大腸菌リン酸レギュロン制御因子 PhoU のポリリン酸蓄積における機能解析
日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京大学)、平成 22 年 3 月 29 日

6. 本村圭、大中信輝、廣田隆一、黒田章夫、The gene *yjbB*, encoding a protein with PhoU domains, reduces the levels of polyphosphate in *Escherichia coli*.
第 32 回日本分子生物学会 (パシフィコ横浜)、平成 21 年 12 月 12 日

7. 廣田隆一、黒田章夫、大腸菌のポリリン酸蓄積とストレス応答、第 25 回日本微生物生態学会 (広島大学)、平成 21 年 11 月 23 日

8. 眞矢翔平、岩朝義弘、本田孝祐、大政健史、廣田隆一、黒田章夫、大竹久夫
好熱性酵素による ATP 再生系を利用したグリセロールからのグリセロール 3-リン酸生産、第 61 回日本生物工学会 (名古屋大学)、平成 21 年 9 月 24 日

9. 廣田隆一、田畔麻司、本村圭、黒田章夫、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* におけるポリリン酸合成の生理機能解析、第 61 回日本生物工学会 (名古屋大学)、平成 21 年 9 月 24 日

10. 黒田章夫、廣田隆一、微生物によるリンの濃縮と資源化、水環境学会シンポジウム (東京御茶ノ水)、平成 21 年 9 月 15 日

[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

なし

(3) 連携研究者

なし