

で500以上の ABC タンパク質関連遺伝子が同定されており、生物のもつ遺伝子ファミリーとしては最も大きいものの一つである。

### アルカロイド排出ポンプ MDR1

ABC タンパク質は地球上の多くの生物にとって生理的に重要なタンパク質である。それぞれの生物がもつ ABC タンパク質の数は不思議なことに大腸菌からヒトまで類似しており、約50である (表1)。その中で、飛びぬけて多いのが植物であり、シロイヌナズナの染色体上には129の ABC タンパク質遺伝子がコードされている。最近我々は、オウレン細胞の MDR1タイプの ABC タンパク質である Cjmdr1 を単離同定し、ATP 依存的にアルカロイドのベルベリンを輸送することを明らかにした<sup>5)</sup>。Cjmdr1 はオウレンの根茎に特異的に過剰発現しており、植物体におけるアルカロイドの転流に関与していると考えられる。植物は、さまざまなアルカロイドを2次代謝産物として合成しており、植物は自身の合成するさまざまなアルカロイドを排出、転流するために多くの ABC タンパク質を発現していることが予想される。

### ヒト MDR1 の生理的役割

MDR1 はヒトの正常組織では、小腸、腎近位尿細管、肝臓の毛細胆管の管腔側、脳と

精巣の毛細血管内皮、副腎皮質、妊娠時の子宮および胎盤などで発現している。また、造血幹細胞など多くの幹細胞で発現している。MDR1 は有害な脂溶性物質が体内に吸収されるのを防ぐだけでなく、血流中に入ってしまった生体異物あるいは有害な代謝物を尿中、胆汁中へ排泄するとともに、脳、精子、胎児、幹細胞などを有害物質から護っている (図2)。実際、MDR1 遺伝子のノックアウトマウスや発現の異常なマウスでは脳内や胎児中の薬剤蓄積量の増大、薬剤の神経毒性の増加、奇形をもったマウスの出産が報告されている。

上記のように MDR1 は小腸上皮において、さまざまな脂溶性化合物を排出している。それゆえ、MDR1 は経口投与されたさまざまな薬剤の体内への吸収に大きな影響を与える。また、腎尿細管からの薬剤の排出は血中濃度の減少に関与する。強心配糖体ジゴキシン、カルシウムチャネル阻害剤ベラパミル、アジドピン、免疫抑制剤サイクロスポリン A、FK506 を含め多くの薬剤が MDR1 によって輸送されることが明らかになっている<sup>6)</sup>。

### ABC タンパク質と脂質ホメオスタシス

最近多くの ABC タンパク質が、コレステロールや脂肪酸の体内恒常性維持に関与していることが明らかになった。コレステロールの体内恒常性は代謝レベルだけでなく、小腸からの吸収、肝臓からそれぞれの組織への輸送、組織から肝臓への逆輸送などが統合されたネットワークによって保たれている。ABCA1 は血中の HDL コレステロールが欠損する Tangier 病の原因遺伝子として同定され、末梢細胞のコレステロールとリン脂質

表1 各生物の ABC タンパク質の数

大腸菌	44
酵母	31
線虫	56
ハエ	51
ヒト	48
植物	129

をアポ蛋白質へ受け渡し (HDL 形成)、コレステロールの肝臓への逆転送に関与していることが明らかになった<sup>7)</sup>。また、ABCG5 と ABCG8 の異常が植物ステロール排泄障害による先天性代謝異常症  $\beta$ -シトステロール症の原因であることが明らかになった。ABCG5、ABCG8 はヘテロ2量体を形成し、植物のステロール成分であるシトステロールの小腸からの吸収を防ぐとともに、胆汁中へのコレステロールの排出にも関与している。

#### アルカロイドによる ABC タンパク質の活性調節

以上のように、ABC タンパク質はがん細胞の多剤耐性だけでなく、脂質ホメオスタシスなど重要な生理機能に関与している。さまざまな植物アルカロイドの中には、ABC タンパク質の活性を抑制するだけでなく、活性化するものもあることが期待される。天然の化合物の中から、そのような活性を持った化合物をうまく探し出すことができれば、ABC タンパク質の活性をコントロールすることによって、肥満、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病や動脈硬化を予防し、安全で健

康な食生活を楽しむことが可能になると期待される。

#### 参考文献

- 1) Chen, C.-j., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., and Roninson, I. B. (1986) *Cell* **47**, 381-389
- 2) Ueda, K., Clark, D. P., Chen, C.-j., Roninson, I. B., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 505-508
- 3) Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3004-3008
- 4) Ueda, K., Matsuo, M., Tanabe, K., Morita, K., Kioka, N., and Amachi, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 305-313
- 5) Shitan, N., Bazin, I., Dan, K., Obata, K., Kigawa, K., Ueda, K., Sato, F., Forestier, C., and Yazaki, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 751-756
- 6) Ueda, K., Taguchi, Y., and Morishima, M. (1997) in *Seminars in Cancer Biology* (Borst, P., ed) Vol. 8, pp. 151-159, Academic Press, UK
- 7) Tanaka, A. R., Abe-Dohmae, S., Ohnishi, T., Aoki, R., Morinaga, G., Okuhira, K. I., Ikeda, Y., Kano, F., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Murata, M., Yokoyama, S., and Ueda, K. (2003) *J Biol Chem* **278**, 8815-8819

化学と生物 抜刷 第42巻 第1号 2004年（平成16年1月発行）

たは Asn であり、それ以外のアミノ酸として His, Glu (Gln), Gly, Ala, Leu, Lys が少量検出された。N 末端のアミノ酸 15 残基の配列は DDDDDDDDDAGDDDD であることが判明した。そこで、スケトウダラ骨格筋の cDNA ライブラリーのスクリーニングをアミノ酸配列 DDDDDD に相当するオリゴヌクレオチドをプローブとして行なった。

その結果、aspolin 1 と aspolin 2 と名づけた 2 つのクローンが得られ、両者から演繹されたタンパク質のアミノ酸配列は図 1 に示すように、少数の他のアミノ酸を含んでいるが Asp のポリマーであった。精製酵素タンパク質の N 末端アミノ酸配列は、aspolin 1 と 2 のタンパク質の Asp43 から Asp57 に一致している。このタンパク質のプロセッシングが Ala42 と Asp43 の間で起きるとすれば、aspolin 1 タンパク質の分子量は 21,383 であり、先に質量分析で得られた値とほとんど同じである。この結果から、aspolin 1 がスケトウダラの TMAOase 前駆体をコードしていると結論した。演繹されたアミノ酸配列はデータベースで知られているいかなるタンパク質とも相同性がなかったが、筋小胞体のカルシウム結合タンパク質である calsequestrin の C 末端のポリ Asp 配列と似ている。一方、aspolin 2 タンパク質の C 末端領域は、哺乳動物筋小胞体の HRC (histidine-rich カルシウム結合タンパク質) と高い相同性があることがわかった<sup>(3)</sup>。

さて、TMAOase タンパク質はまさにポリ Asp であることから、合成ポリ Asp の TMAOase 活性を調べたところ、驚いたことに Fe<sup>2+</sup> 存在下で顕著な活性を示したのである。活性は、Asp の重合度が高くなるにつれて増大することから、Asp ポリマー分子内の複数のカルボキシル基に Fe<sup>2+</sup> が配位して活性部位が形成され、重合度が増すことによってそのような配置を取る確率が増大すると推測される。ポリ Glu の活性は低いので、カルボキシル基の配置は活性に重要であることがわかる。

TMAOase の細胞内の存在部位は未定であるが、aspolin 1 と 2 の mRNA は骨格筋と腎臓に存在している。aspolin 1/TMAOase は、TMAOase 活性を示し鉄結合能もあるが、カルシウム結合タンパク質である可能性も生じたことから、その生理機能の解明は今後の課題となっている。と同時に、ポリ Asp の生理機能解明の糸口となるかもしれない。

- 1) M. Kimura, N. Seki & I. Kimura: *Fish. Sci.*, 66, 967 (2000).
- 2) M. Kimura, I. Kimura & N. Seki: *Fish. Sci.*, 69, 414 (2003).
- 3) K. Takeuchi, A. Hatanaka, M. Kimura, N. Seki, I. Kimura, S. Yamada & S. Yamashita: *J. Biol. Chem.*, 278, 47416 (2003).

(木村メイコ<sup>\*1</sup>, 竹内啓明<sup>\*2</sup>, 木村郁夫<sup>\*2</sup>, 関伸夫<sup>\*1</sup>,  
\*<sup>1</sup>北海道大学大学院水産科学研究科, \*<sup>2</sup>日本水産株式会社 中央研究所)



## 体内のコレステロールをコントロールする 脂質トランスポートに関する ABC 蛋白質

最近、世界中で肥満の増加が問題となっている。ヒトの遺伝子には、飢餓に対処するための設計図は書かれているが、飽食に対処する方法は書かれていないようだ。動物性コレステロールを大量に摂取する欧米型の食生活への急速な変化によって、日本人に高脂血症などの生活習慣病が急増している。体がコレステロールをどのように扱っているかを知ることによって、それに対処できないだろうか。

コレステロールは脂溶性が高いため、局所的な濃度勾配に従って受動的に細胞内や体内を移動しているとこれまで考えられてきた。しかし最近、ABC(ATP-binding cassette) 蛋白質の多くがコレステロールの体内恒常性

に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

コレステロール恒常性維持における ABC 蛋白質の重要性がはっきりと認識されたのは、血中の高密度リポ蛋白質(HDL)が消失する遺伝病であるタンジール病の原因が ABCA1 遺伝子の変異であることが明らかにされてからである<sup>(1)</sup>。ABCA1 遺伝子を欠失させたマウスでは、血中から HDL が消失する。また培養細胞に ABCA1 を高発現させ、培地中にリポ蛋白質 apoA-I を加えると、細胞内のコレステロールとリン脂質が HDL として排出される。タンジール病で見つかった変異を導入した ABCA1 を同じように発現させても、HDL は形成され

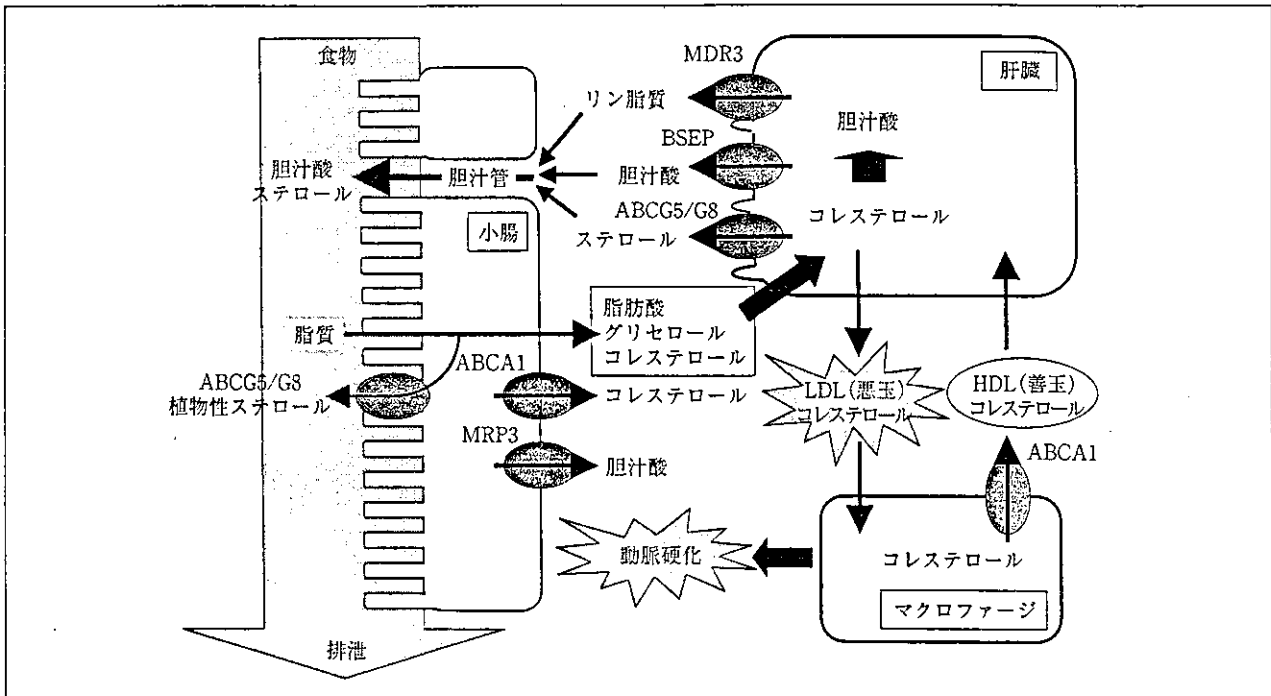


図 1 ■ コレステロールの体内輸送に関与する ABC 蛋白質

ない<sup>(2)</sup>。

HDL 形成は、マクロファージ内に蓄積したコレステロールを除去する唯一の経路である。アテローム性動脈硬化症は、コレステロールを蓄積しすぎた泡沫化マクロファージが動脈内膜に出現することから始まる。そして、血中 HDL 量と虚血性心疾患や脳梗塞の発生率が逆相関する。これらのことから HDL は、一般には善玉コレステロールと呼ばれている。実際に、*ABCA1* 遺伝子に変異をもつ人は血中 HDL 量が低く、加齢に伴う冠動脈壁の厚さの増加が正常人と比べて有意に大きい。従来、マクロファージからのコレステロール流出は、細胞膜と HDL 粒子の間に形成される濃度勾配によって非特異的に行なわれると考えられてきた。HDL 形成に ATP 依存トランスポーター型蛋白質である *ABCA1* が重要な役割を果たしているという発見は、コレステロールの体内輸送に関する考え方を大きく変えつつある。

*ABCA1* 以外にも、多くの ABC 蛋白質がコレステロールの体内恒常性に重要な役割を果たしている(図 1)。コレステロールは肝臓で胆汁酸に変換され、ABC 蛋白質の一つである *ABCB11*(*BSEP*) によって消化管中に分泌される。食物中の脂質を溶かすことによって、脂質を小腸から吸収しやすくしているのである。胆汁酸は非常に強い界面活性作用をもち、そのままでは毛細胆管細

胞を溶かしてしまう。そのため、*ABCB4*(*MDR3*) がホスファチジルコリンを胆汁中に分泌し、胆汁酸をミセル状態に保っている。

また我々は、毎日数百ミリグラムずつのコレステロールと非動物性ステロールを摂取しているが、摂取量の 50~60% が吸収されるコレステロールとは対照的に、シトステロールなどの植物性ステロールは摂取量の 5% 以下しか吸収されない。それは、小腸上皮と毛細胆管に発現している *ABCG5* と *ABCG8* が非動物性ステロールを体外へ排出しているからであると考えられている。また、*ABCA2* は神経軸策のミエリン鞘の形成過程における脂質輸送への関与が、*ABCA3* は肺胞細胞における脂質輸送への関与が示唆されている<sup>(3)</sup>。さらに筆者らは最近、脳や免疫系組織で発現している *ABCA7* がコレステロール輸送に関与していることを明らかにした<sup>(4,5)</sup>。また、代表的な ABC 蛋白質であり、生体異物排出ポンプとして重要な役割を果たしている *MDR1* も、コレステロールを基質とすることが示唆されている。

ABC 蛋白質のうち、*MDR1* や *ABCA1* は 12 の膜貫通領域と 2 つの ATP 結合ドメインをもつものに対して、*ABCG5* と *ABCG8* はちょうどそれらの半分の大きさであり、ヘテロ 2 量体として機能していることが示唆されている。*ABCG5* と *ABCG8* は、ヘテロ 2 量体を形成し

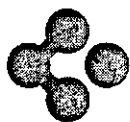
たものだけが小腸上皮細胞の頂端面(管腔側)に局在し、非動物性ステロールである植物や甲殻類のステロールを排出し体内に入るのを防いでいる。一方 ABCA1 は、側底面(血管側)に局在しコレステロールを吸収する方向で働いている<sup>6)</sup>。実際ニワトリにおいては、ABCA1 がコレステロールの小腸からの吸収に重要な役割を担っていることがわかっている。植物ステロールの代表であるシトステロールとコレステロールの違いはメチル基1つである。それぞれの ABC 蛋白質は組織特異的に必要な部位に極性発現し、いろいろなステロール分子の微妙な構造の違いを認識し、選択的に吸収したり排出したりしていると思われる。

ABC 蛋白質がコレステロールの恒常性に重要な役割を果たしているということは、この3、4年でわかってきたことであり、そのメカニズムの理解は未だきわめて不十分である。コレステロールの吸収と排出のメカニズムがさらに解明されることによって、コレステロールの取りすぎを無理なくコントロールするとともに、蓄積した病的なコレステロールの排出を促進し、健康な体を維持

できると期待される。

- 1) S.G. Young & C.J. Fielding : *Nat. Genet.*, 22, 316 (1999).
- 2) A.R. Tanaka, S. Abe-Dohmae, T. Ohnishi, R. Aoki, G. Morinaga, K.I. Okuhira, Y. Ikeda, F. Kano, M. Matsuo, N. Kioka, T. Amachi, M. Murata, S. Yokoyama & K. Ueda : *J. Biol. Chem.*, 278, 8815 (2003).
- 3) 稲垣暢也, 植田和光, 鈴木洋史: “ABC トランスポーター 生体防御の ABC 遺伝子から疾患まで”, 診断と治療社, 2002, p.60.
- 4) Y. Ikeda, S. Abe-Dohmae, Y. Munehira, R. Aoki, S. Kawamoto, A. Furuya, K. Shitara, T. Amachi, N. Kioka, M. Matsuo, S. Yokoyama & K. Ueda : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311, 313 (2003).
- 5) A.R. Tanaka, Y. Ikeda, S. Abe-Dohmae, R. Arakawa, K. Sadanami, A. Kidera, S. Nakagawa, T. Nagase, R. Aoki, N. Kioka, T. Amachi, S. Yokoyama & K. Ueda : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283, 1019 (2001).
- 6) T. Ohama, K. Hirano, Z. Zhang, R. Aoki, K. Tsujii, Y. Nakagawa-Toyama, K. Tsukamoto, C. Ikegami, A. Matsuyama, M. Ishigami, N. Sakai, H. Hiraoka, K. Ueda, S. Yamashita & Y. Matsuzawa : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 625 (2002).

(植田和光, 京都大学大学院農学研究科)



## パームオイルバイオマスの有効利用に向けて ヤシ空房を用いることで地球環境をも救う

バイオマス・ニッポン政策戦略プロジェクトの例からもわかるように、最近バイオマスに対する関心が再び高くなっている。今回のブームは、地球温暖化問題の対策として、正味の温暖化ガスが放出されないようバイオマスを戦略的に利用することがその要点である。この点において、前回のブームであったオイルショックに伴う石油代替資源としてのバイオマスと注目される理由が異なる。しかし、いくらバイオマス利用の目的が変わっても、バイオマスの特性そのものが変わるわけではない。バイオマスの問題点は、総量としては膨大にあるが分散して存在すること、特に農産バイオマスの場合は年に1回の収穫で1度に大量に排出されるため、バイオマスを集め、貯め、定常的に利用することが難しいという物流(ロジスティック)の点である。バイオマスを資源にして有用物質をつくるのに要するエネルギーも問題である。というのも、これを化石資源から大量に得ては温暖化問題の解決にはならないからである。我々大学の研究者は、ともすると特定のバイオマスから目的産物をつくる戦術

研究に集中することが多いが、その場合でもバイオマスの問題点を戦略的に解決する術を念頭に置かねばならない。このような戦略的問題が存在しないのがパームオイル産業である。

パームオイルは、マレーシアだけでも年に1,000万トン以上季節に関係なく定常的に生産されている食用油である。その生産に伴い、たとえば実を取った後のヤシ空房(EFB; empty fruit bunch)が年間1,400万トン以上ほとんど利用されることなくプランテーションに定常的に廃棄されている<sup>1)</sup>。しかもこれらバイオマスは、マレーシア全土でわずか350しかない大型搾油工場に通常業務として苦勞なく集められている<sup>2)</sup>。筆者らがマレーシアプトラ大学との共同研究の場として使用が許されている FELDA 社(マレーシア最大のパームオイル会社)の Seriting Hilir 工場では年間8万トン以上の EFB が毎日集まり、処理されて消えている。またパームオイル産業からは、EFB 以外にも繊維と種の殻といったバイオマスが年に1,000万トン以上排出されているが、これ

# 微生物のポリリン酸研究の新展開

黒田章夫

日本農芸化学会誌

第78巻第8号 2004年8月  
社団法人 日本農芸化学会

## 微生物のポリリン酸研究の新展開

(2004年度農芸化学奨励賞受賞)

黒田章夫

(広島大学大学院先端物質科学研究科, 科学技術振興機構さきがけ)

**Key words:** inorganic polyphosphate; ATP; environmental biotechnology; evolution; bioluminescence

はじめに

ポリリン酸は ATP と同様の高エネルギーリン酸結合によって結合した無機ポリマーである (図 1)<sup>1),2)</sup>。ポリリン酸は多くの生物から検出されるものの, 長い間分子生物学的な解析は行われてこなかった。しかし 1990 年代に入って, ポリリン酸合成酵素の遺伝子 (*ppk*) がスタンフォード大学の Arthur Kornberg 研究室でクローニングされ, 分子生物学的な解析が進み出した<sup>3)</sup>。その結果, ポリリン酸を作れない大腸菌変異株は定常期に死滅しやすかったり, また緑膿菌変異株では運動性が悪く感染力が低下することがわかってきた<sup>4)</sup>。ポリリン酸は, 特にバクテリアが過酷な環境になったときに必要であることがわかってきた。ようやく分子生物学的な研究が進み出したポリリン酸は, 当時筆者らにとって非常に謎に満ちた面白い分子に思われた。またポリリン酸蓄積菌は古くから環境技術 (排水からのリン除去法) の中で使われてきた<sup>5)</sup>。しかしポリリン酸蓄積菌の分離が難しいために, 詳しい分子レベルでのポリリン酸蓄積機構はよくわかっていなかった。この点に関してもポリリン酸の研究は非常に重要な意義を持つように思われた。またポリリン酸は生命エネルギーの塊でもあることから, うまくすれば非常に安価な ATP の代替として働かせることができる魅力的な分子でもある。筆者らにとってポリリン酸の研究は基礎的にも, また応用的にも十分に新しい展開が期待できる分子であると思われた。本稿では

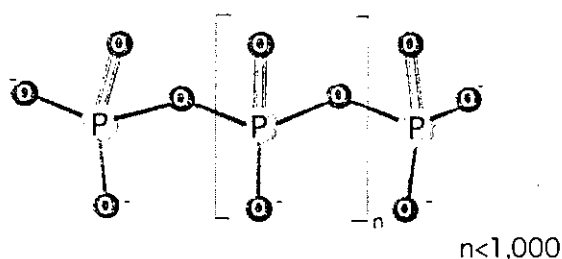


図 1 ポリリン酸の構造

ここ数年の筆者らのポリリン酸に関する研究を中心にまとめてみた。その内容は, (1) 大腸菌におけるポリリン酸蓄積機構と生理作用, (2) ポリリン酸の蓄積を制御する遺伝子を利用したポリリン酸蓄積菌の開発と利用, (3) ポリリン酸をリン酸化の基質として利用するグルコキナーゼの研究, (4) ポリリン酸のエネルギーを利用した ATP 増幅反応の開発と利用である。

## 1. 大腸菌におけるポリリン酸蓄積機構と生理作用

大腸菌のポリリン酸合成酵素は, ATP の末端のリン酸基をポリリン酸に転移して約 700 個のリン酸がつながったポリリン酸を合成する<sup>1)</sup>。ポリリン酸合成酵素はほとんどの細菌で見いだされている。不思議なことに多量のポリリン酸を液胞に蓄積する酵母では, *ppk* 相同遺伝子が存在しない。今のところ, ポリリン酸合成に関与する候補遺伝子が絞り込まれているが, 詳細は不明である<sup>6)</sup>。大腸菌のポリリン酸合成酵素はポリリン酸と ADP が存在すると, 逆反応で ATP を生産する。ポリリン酸合成酵素が簡単に精製できるようになってから, ポリリン酸の測定方法が飛躍的に進歩した。すなわち, この逆反応を使ってポリリン酸から ATP を生成させ, できた ATP を発光法で測定することによってポリリン酸の量を知ることができる<sup>7)</sup>。

大腸菌の増殖期には, 通常わずしかポリリン酸が検出されない。しかし, 栄養飢餓などのストレスを与えると,

New basic and applied aspects of polyphosphate in microorganisms

Akio KURODA (Department of Molecular Biotechnology, Hiroshima University, and PRESTO, Japan Science and Technology Corporation)



数十分で100倍近く増加する<sup>8)</sup>。このポリリン酸の蓄積にはストリンジェント応答(緊縮応答)が関係する。ストリンジェント応答とは、栄養飢餓などに応答してrRNAやtRNAの合成が抑制される現象として最初発見されたが、細胞分裂停止やDNA複製の阻害など、さまざまな生理活動の変化を伴う現象である<sup>9)</sup>。アミノ酸飢餓になると、ストリンジェント因子と呼ばれるグアノシン5リン酸(pppGpp)とグアノシン4リン酸(ppGpp)が合成される。このpppGppがポリリン酸分解酵素を拮抗的に阻害することを見つけた<sup>8)</sup>。すなわち、ポリリン酸は常に合成と分解を繰り返しているが、アミノ酸飢餓状態にさらされると、pppGppがポリリン酸の分解を阻止するので、ポリリン酸が蓄積するのではないかと考えている。アミノ酸飢餓で蓄積するポリリン酸の機能は何であろうか? ポリリン酸は大腸菌の中でATPに変換できる。しかしアミノ酸飢餓で蓄積するポリリン酸は、大腸菌が増殖中に消費するATP量を考えると、わずか2分間程度の供給量にしかない。以前から考えられていたエネルギーの貯蔵物質としては少ないと思われた。大腸菌において、ポリリン酸はその他の機能があるのではないかと考えられた。その一つとして筆者らはポリリン酸とATP依存性プロテアーゼであるLonプロテアーゼが結合することによって、リボソームタンパク質(ただしリボソームにアッセンブルされていないフリーのタンパク質)を分解できるようになることを発見した<sup>10), 11)</sup>。大腸菌はアミノ酸飢餓へ適応するために、古いタンパク質を分解することによって必要なアミノ酸を供給する。ポリリン酸の機能としてアミノ酸飢餓で起こるリボソームタンパク質のリサイクリングに関与すると考えられた(図2)。

ポリリン酸と結合したLonプロテアーゼはどのような機構でリボソームタンパク質を認識し、それらを分解する

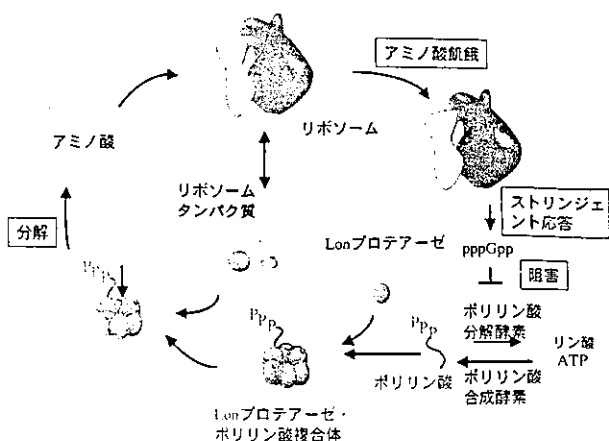


図2 リボソームタンパク質のリサイクリングにかかわるポリリン酸の機能

のであろうか? Lonプロテアーゼとリボソームタンパク質の共通する性質としてポリリン酸に結合するという点が挙げられる。したがって、Lonプロテアーゼはポリリン酸を介してリボソームタンパク質を認識するのではないかと考えられた。実際、Lonプロテアーゼとリボソームタンパク質を混合しただけでは結合しないが、ポリリン酸を添加すると両者が結合することがわかった。しかしその順番が重要で、最初にLonプロテアーゼとポリリン酸が複合体を形成することが重要であることがわかっている。その複合体の分子量は200万以上の巨大な複合体であることがわかった<sup>12)</sup>。ポリリン酸の詳しい分子機能が解明されつつある。

## 2. ポリリン酸の蓄積を制御する遺伝子を利用したポリリン酸蓄積菌の開発と利用

リンは、人類が食料を生産し生命活動を営むために、絶対に欠くことができない貴重な資源である。ところが、品質の良いリン鉱石は、あと数十年で枯渇するのではないかと懸念されている。一方でわれわれの使ったリンが富栄養化という環境汚染を引き起こしている。われわれの使ったリンを排水から回収してうまく再利用することが重要である。排水からのリン除去のポイントは、活性汚泥の微生物にいかにも量のポリリン酸を蓄積させることができるかにかかっている。大腸菌のポリリン酸合成酵素遺伝子(*ppk*)とリン酸輸送系遺伝子オペロン(*pstSCAB*)をコードするプラスミドを大腸菌に導入した結果、多量のポリリン酸の蓄積が見られることが示された<sup>13)</sup>。その後筆者らはポリリン酸蓄積機構を解明し、さらに変異によるポリリン酸蓄積菌の開発を行った。最初は大腸菌の変異株の中からポリリン酸を常に蓄積するものを選抜した。この株は従来の1,000倍近いポリリン酸を蓄積する。どの遺伝子が変異することによってポリリン酸が常に蓄積するようになったのかを調べた結果、変異が起こったのは*phoU*遺伝子であることがわかった<sup>14)</sup>。*PhoU*タンパク質のN末端から29番目のグリシンがアスパラギン酸に変わっただけで顕著にポリリン酸の蓄積量が増加した。*PhoU*タンパク質は細菌のリン酸レギュロンを抑制する遺伝子である。*PhoU*タンパク質が変化することによって、リン酸輸送系の遺伝子*PstSCAB*が構成的に発現する。このことによってリン酸の取り込みが向上し、ポリリン酸が蓄積したものと考えられた<sup>14)</sup>。*phoU*遺伝子の変異は、同時にアルカリホスファターゼの発現も向上させることから、この酵素を指標にしてポリリン酸蓄積変異株を選抜できる。X-リン酸(5-bromo-4-chloro-indolylphosphate)はアルカリホスファターゼによって、分解されて青色の色素へと変化する。

したがって、アルカリホスファターゼを常にする *phoU* 変異株は X-リン酸の入った培地で青色のコロニーとしてスクリーニングできる。これは、非常に簡単なポリリン酸蓄積変異株のスクリーニング法である<sup>15)</sup>。実際の排水処理の現場で活躍する *Pseudomonas putida* のような細菌を用いて、*phoU* 変異株を取得した。その結果、細胞一杯にポリリン酸を蓄積するものが得られた<sup>16)</sup>。*phoU* 遺伝子はほとんどの細菌がもつので、本技術は多量のポリリン酸を蓄積する微生物を簡単に作り出す技術として有効である。

ポリリン酸の蓄積にはリン酸輸送が重要である。リン酸輸送にかかわるタンパク質として PstSCAB のほかに PitA と PitB が知られている。これらの欠損株のポリリン酸蓄積能を調べた結果、予想どおり、*pstSCAB* 欠損株はポリリン酸を蓄積しなくなった。しかし *pitA* 欠損株に関しては予想に反し、ポリリン酸が増加した。すなわち PitA によるリン酸輸送はポリリン酸を減少させる方向に働くのである。これは PitA が細胞内へのリン酸の輸送だけでなく、細胞内のリン酸濃度が高くなりすぎた際には細胞の外へリン酸を排出するからであると考えられた。そこで、*phoU* 変異株に *pitA* 変異を導入した結果、ポリリン酸をさらに蓄積させることに成功した(図3)。この二重変異株のリン含量はリン鉱石のものに匹敵するリン含量を示し、遺伝子操作によらずとも変異による育種で十分に細菌のリン含量が上げられることがわかった。細菌にはリン酸に走化性を示すものが存在する<sup>17), 18)</sup>。このような性質も今後の育種の方向性として面白い。

最近ポリリン酸の解析から生まれてきた技術が実際の排水からのリン資源回収に使われようとしている。菌体を加

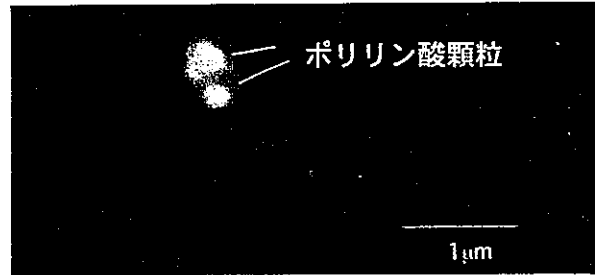


図3 *phoU, pitA* 二重変異株におけるポリリン酸の蓄積  
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色を行い蛍光観察した。ポリリン酸は黄色い蛍光の顆粒として観察できる。

熱して巨大な染色体 DNA やタンパク質などの高分子を変性沈殿させ、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ことがわかった。すなわち、菌体内にたまったポリリン酸は、70℃ 程度の熱をかけることによって約90%の効率で上清に溶出する。菌体を除いた後、その上清にカルシウムを加えるとポリリン酸が沈殿する。この技術をポリリン酸を蓄積する活性汚泥に応用すると、汚泥に含まれる全体のリンの約70%がうまく回収できた<sup>19)</sup>。この技術を使えば、活性汚泥から天然リン鉱石の品質をしのぐリン鉱石を人工的に生産できることがわかった。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ようになっている<sup>20)</sup>。

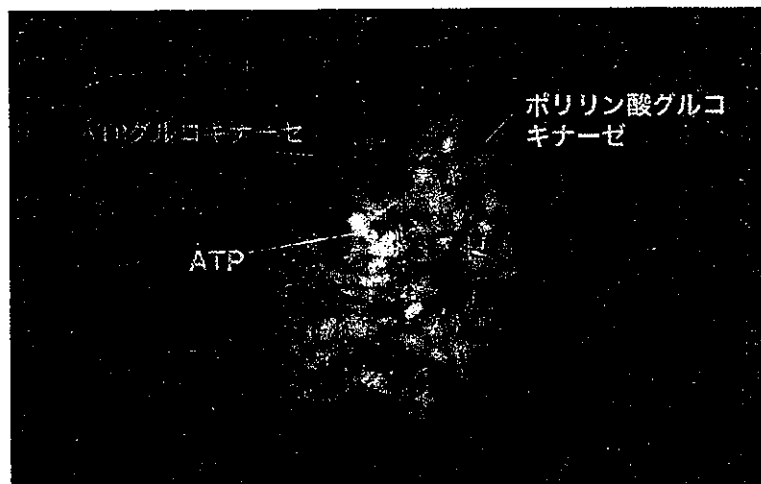


図4 ATP グルコキナーゼとポリリン酸グルコキナーゼの立体構造の比較

ATP グルコキナーゼとポリリン酸グルコキナーゼの立体構造をアクセルリス社製インサイトを使って推定した。ATP グルコキナーゼは赤の schematic モデルで、ポリリン酸グルコキナーゼは表面の静電ポテンシャルを加えたモデルで示し、両者を重ね合わせた。ATP は緑で示した。

### 3. ポリリン酸をリン酸化の基質として利用するグルコキナーゼの研究

ポリリン酸は、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物質ではないとも言われている<sup>11,2)</sup>。微生物の一部には、ポリリン酸をATPの代わりにリン酸化の基質にする酵素をもつ<sup>11,2)</sup>。*Micrococcus phosphovorus* は、産総研の中村らによって分離された細菌で、生物脱リン法の現場で活躍することが確認されている<sup>21)</sup>。この細菌は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。筆者らはこの細菌から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発見した<sup>22)</sup>。この細菌はATPを使うグルコキナーゼももっているが、ATPよりはるかにポリリン酸が多いので、グルコースのリン酸化には直接ポリリン酸を使っていると考えられた。

このポリリン酸グルコキナーゼの1次構造を決定し、ATP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グルコキナーゼのIIBという領域は、ATP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グルコキナーゼは、このIIB領域を獲得してポリリン酸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<sup>22)</sup>。ヒトのATP依存性ヘキソキナーゼの構造はすでに決定されている。大胆にもこの構造をもとにATPグルコキナーゼとポリリン酸グルコキナーゼの構造を推定し、重ね合わせてみた(図4)。するとATPのアデノシンの認識に関与しそうな領域がポリリン酸グルコキナーゼでは存在しないように見える。まだまだ想像に過ぎないが、その空洞を利用して巨大なポリリン酸がアクセスできるのではないかと思われた。うまくすれば世の中のATP利用酵素をポリリン酸利用酵素に変えることも不可能ではない

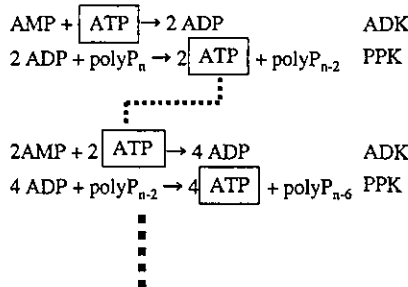


図5 ATP増幅反応の原理と実際の増幅反応

ADKはアデニル酸キナーゼ、PPKはポリリン酸キナーゼを示す。実際の増幅反応の経時変化(右)では、初期ATP添加量に応じて速くATPが増幅する。

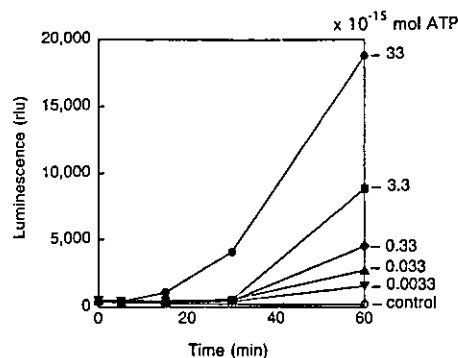
ような気がしている。そして安価なポリリン酸を使ってバイオプロセスを改良することが可能なのではないかと考えている。

### 4. ポリリン酸のエネルギーを利用したATP増幅反応の開発と利用

ATPは、すべての動物、植物、微生物などの生命体に存在する物質である。ホタル由来のルシフェラーゼはATPのエネルギーを使ってルシフェリンを酸化し、その際に一つの光子を発生(生物発光)ので、ATPの微量検出に使われている。この技術は衛生検査の現場で微量の微生物の迅速検出に使われている。しかし、その感度は十分ではなく、例えば、大腸菌を検出するには約1,000~10,000の細胞が必要であることが知られている。筆者らはその検出感度を上げるためにポリリン酸の生命エネルギーを使って、試験管の中で超微量のATPを増幅させる反応を考案した(図5)。最初にポリリン酸(polyP)とアデノシン二リン酸(AMP)とアデニル酸キナーゼ(ADK)、ポリリン酸キナーゼ(PPK)を混合しておく。その状態ではATPができないが、反応系に少量のATPを加えると、即座にアデニル酸キナーゼによって、二分子のアデノシン二リン酸(ADP)が生じる。できたADPはポリリン酸とポリリン酸キナーゼによって、二分子のATPに変換される。この反応が繰り返されて、多量のATPが数分のうちに作られる(図5)。筆者らはこの技術を利用して生物発光によるATPの検出感度を約10,000倍上昇させ、1匹の大腸菌でも検出することに成功した<sup>23)</sup>。この技術を衛生検査や医療の現場に応用したいと考えている。

おわりに

ポリリン酸は、生体エネルギーの貯蔵であると古くから考えられてきたが、大腸菌のポリリン酸合成酵素欠損株の



性質を調べることによって、そのほかにもさまざまな役割が存在することがわかってきた。アミノ酸飢餓で蓄積するポリリン酸の生理作用を分子レベルで突きつめていった結果、プロテアーゼの活性調節に行き着いた。このほかにもRNA degradosome 中のエネルギー供給系としての機能<sup>24)</sup>、GTPの再生系としての機能<sup>25), 26)</sup>、真核生物の中ではキナーゼの活性化<sup>27)</sup>や細胞増殖因子の安定性への寄与<sup>28)</sup>などいろいろな調節機構に関連することが示唆されている。また、ポリリン酸合成制御機構を利用することにより、自由にポリリン酸蓄積菌を作り出せるようになった。開発したポリリン酸抽出方法を応用することにより、活性汚泥からポリリン酸を回収するという新しい視点の技術開発ができた。大腸菌をモデルとしたポリリン酸蓄積機構の解明はかなり進んだが、生物脱リン法に関与する微生物のポリリン酸代謝機構はまだ未知である。また同様に真核生物におけるポリリン酸代謝機構もほとんどわかっていない。これらの中には未知のポリリン酸利用酵素が眠っていると考えられ今後の展開を期待したい。ポリリン酸利用酵素をうまく使えば面白い反応系を構築できる例を今回一つ示したが、そのほかにもいくつか示されている<sup>29), 30)</sup>。また、ポリリン酸利用酵素の原理解明ができればさらに酵素の利用が広がるかもしれないと考えている。

本研究を行うにあたり多大なご助言とご教示をいただきました広島大学大学院先端物質科学研究科教授 大竹久夫先生(現 大阪大学大学院工学研究科教授)に深甚なる感謝を表します。また Arthur Kornberg 博士には、1年間の留学の機会と毎年夏にお邪魔していろいろ指導していただきました。心より感謝いたします。本賞の受賞に際しまして、学会への推薦をしていただきました広島大学先端物質科学研究科の宮川都吉教授にお礼申し上げます。これらの研究を遂行するにあたり、研究室の共同研究者である広島大学加藤純一教授、宇都宮大学池田 宰教授、広島大学滝口昇助手に感謝いたします。一緒に楽しく、しかも多大な労力をいとわず研究を行ってくれた広島大学の学生さんに感謝いたします。最後に、恩師である京都大学大学院工学研究科 今中忠行先生、信州大学繊維学部教授 関口順一先生に感謝申し上げます。

- 1) A. Kornberg: *J. Bacteriol.*, **177**, 491-496 (1995).
- 2) I. S. Kulaev: "Biochemistry of Inorganic Polyphosphates," Wiley, Chichester, 1979.
- 3) M. Akiyama, E. Crooke, and A. Kornberg: *J. Biol. Chem.*, **267**, 22556-22561 (1992).
- 4) M. H. Rashid, K. Rumbaugh, L. Passador, D. G. Davies, A. N. Hamood, B. H. Iglewski, and A. Kornberg: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 9636-9641 (2000).
- 5) R. I. Sedlak: "Phosphorus and Nitrogen Removal from

Municipal Wastewater," 2nd Ed., Lewis Publishers, New York, 1991.

- 6) N. Ogawa, J. DeRisi, and P. O. Brown: *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 4309-4321 (2000).
- 7) D. Ault-Riche, C. D. Fraley, C.-M. Tzeng, and A. Kornberg: *J. Bacteriol.*, **180**, 1841-1847 (1998).
- 8) A. Kuroda, H. Murphy, M. Cashel, and A. Kornberg: *J. Biol. Chem.*, **272**, 21240-21243 (1997).
- 9) M. Cashel, D. R. Gentry, V. J. Hernandez, and D. Vinella: in "Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology," Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C., 1996, 1458-1496.
- 10) A. Kuroda, S. Tanaka, T. Ikeda, J. Kato, N. Takiguchi, and H. Ohtake: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 14264-14269 (1999).
- 11) A. Kuroda, K. Nomura, R. Ohtomo, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kornberg: *Science*, **293**: 705-708 (2001).
- 12) 野村和孝, 大竹久夫, 黒田章夫: 蛋白質・核酸・酵素, **49**, 1069-1070 (2004).
- 13) J. Kato, K. Yamada, A. Muramatsu, Hardoyo, and H. Ohtake: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3744-3749 (1993).
- 14) T. Morohoshi, T. Maruo, Y. Shirai, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kuroda: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4107-4110 (2002).
- 15) 黒田章夫, 大竹久夫: 特願 2002-111281 (2002).
- 16) T. Morohoshi, T. Yamashita, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kuroda: *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 637-640 (2003).
- 17) H. Wu, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake: *J. Bacteriol.*, **182**, 3400-3404 (2000).
- 18) J. Kato, C. Nagata, L. Yang, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 456-458 (2001).
- 19) A. Kuroda, N. Takiguchi, T. Gotanda, K. Nomura, J. Kato, T. Ikeda, and H. Ohtake: *Biotech. Bioeng.*, **78**, 333-338 (2002).
- 20) N. Takiguchi, A. Kuroda, J. Kato, K. Nukanobu, and H. Ohtake: *J. Chem. Eng.*, **36**, 1143-1146 (2003).
- 21) K. Nakamura, K. Masuda, and E. Mikami: *J. Ferment. Bioeng.*, **45**, 17-22 (1995).
- 22) S. Tanaka, S.-O. Lee, K. Hamaoka, J. Kato, N. Takiguchi, K. Nakamura, H. Ohtake, and A. Kuroda: *J. Bacteriol.*, **185**, 5654-5656 (2003).
- 23) T. Satoh, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kuroda: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1216-1220 (2004).
- 24) E. Blum, B. Py, A. J. Carpousis, and C. F. Higgins: *Mol. Microbiol.*, **26**, 387-398 (1997).
- 25) K. Ishige, H. Zhang, and A. Kornberg: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 16684-16688 (2002).
- 26) A. Kuroda and A. Kornberg: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 439-442 (1997).
- 27) L. Wang, C. D. Fraley, J. Faridi, A. Kornberg, and R. A. Roth: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 11249-11254 (2003).
- 28) T. Shiba, D. Nishimura, Y. Kawazoe, Y. Onodera, K. Tsutsumi, R. Nakamura, and M. Ohshiro: *J. Biol. Chem.*, **78**, 26788-26792 (2003).
- 29) S. Tanaka, A. Kuroda, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake: *Biochem. Eng. J.* **9**, 193-198 (2002).
- 30) T. Noguchi and T. Shiba: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1594-1596 (1998).

プロフィール



黒田章夫 くろだ・あきお

広島大学大学院先端物質科学研究科・助教授

〈略歴〉 1988年 大阪大学大学院工学研究科発酵工学専攻博士課程前期修了,  
同年信州大学繊維学部助手,  
1994年 広島大学工学部助手,  
1995～1996年 ヒューマンフロンティアサイエンスプログラムにてス  
タanford大学医学部へ留学  
1997年 広島大学工学部助教授,  
1998年 広島大学大学院先端物質科学研究科助教授  
2001年より科学技術振興機構さきがけ研究 21 (PREST) 兼任, 2004  
年より SORST, 広島県知的クラスタープロジェクト研究代表, 現在に  
至る.

〈研究テーマ〉 ポリリン酸の生命機能解明と応用展開研究, 環境資源バイオテク  
ノロジー, 生物が発する超微弱光バイオフォトンの研究

〈趣味〉 思いついたようにスキー, スノーボード, 読書, 音楽鑑賞, モミジの栽  
培

〈連絡先〉 〒739-8530 東広島市鏡山 1-3-1 (勤務先)

E-mail: akuroda@hiroshima-u.ac.jp