

学位論文

バクテリアのポリリン酸蓄積機構の解析と応用

2003 年

広島大学大学院先端物質科学研究科
分子生命機能科学専攻

諸星 知広

目次

1. 主論文

バクテリアのポリリン酸蓄積機構の解析と応用

諸星 知広

2. 公表論文

- (1) Tomohiro Morohoshi, Tatsuya Maruo, Yoko Shirai, Junichi Kato, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, Hisao Ohtake, and Akio Kuroda. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4107-4110, 2002.
- (2) Akio Kuroda, Hirokazu Kunimoto, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, Junichi Kato, Noboru Takiguchi, Akiko Miya, and Hisao Ohtake. Evaluation of phosphate removal from water by immobilized phosphate-binding protein PstS. *J. Biosci. Bioeng.*, 90: 688-690, 2000.

3. 参考論文

- (1) Tomohiro Morohoshi, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Junichi Kato, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake. Polyphosphate overplus in *Klebsiella aerogenes*. *Proceedings of ISEB2000, Kyoto, Japan*, p55-58.

主論文

主論文目次

第一章 緒言	1
第1節 はじめに	2
第2節 ポリリン酸とその代謝機構	2
第3節 バクテリアによるポリリン酸蓄積	4
第4節 本論文の概要	5
第二章 ポリリン酸を過剰に蓄積させる遺伝子変異 (<i>phoU</i>) の同定と解析	7
序論	9
第1節 ポリリン酸を過剰に蓄積する変異株の取得	9
第2節 ポリリン酸過剰蓄積株 MT4 の解析	11
第3節 考察	20
第三章 <i>Klebsiella aerogenes</i> のオーバープラスによる ポリリン酸蓄積機構の解明	22
序論	24
第1節 <i>K. aerogenes</i> ATCC9621 株の <i>ppk</i> , <i>ppx</i> 遺伝子の破壊と解析	24
第2節 <i>ppk-ppx</i> オペロンがオーバープラスに果たす役割の解析	27
第3節 <i>pstSCAB-phoU</i> オペロンがオーバープラスに果たす役割の解析	29
第4節 考察	31
第四章 新規リン酸トランスポーター遺伝子 <i>xasA</i> の解析	35
序論	37
第1節 新規リン酸トランスポーターの探索	37
第2節 <i>xasA</i> 遺伝子の機能解析	40
第3節 考察	44

第五章 迅速なポリリン酸高蓄積変異株の スクリーニング法の開発とその応用	47
序論	49
第1節 X-リン酸法によるポリリン酸高蓄積株スクリーニング法の検討	49
第2節 土壌バクテリアに対するポリリン酸高蓄積株の構築と応用	50
第3節 活性汚泥内バクテリアに対するポリリン酸高蓄積株の構築と応用	54
第4節 考察	57
第六章 リン酸結合タンパク質 PstS 固定化カラムによる リン除去法の開発と応用	61
序論	62
第1節 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> の PstS タンパク質の精製と解析	62
第2節 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> の PstS タンパク質固定化カラムの作製と評価	63
第3節 考察	68
第七章 総括	69
参考文献	74
謝辞	78

第一章

緒言

第1節 はじめに

リンはリン酸系肥料の原料として、農業や化学工業的に貴重な元素の一つである。現在、リンはリン鉱石としての埋蔵量が残り数十年とも言われ、枯渇が懸念されている資源の一つでもある。一方で、リンを大量に含む廃液が湖や内湾といった閉鎖性水域に流れ込むと、アオコや赤潮といった深刻な環境汚染を引き起こし、ノリ養殖業や漁業に深刻な被害を引き起こすことも知られている (34)。そのため、排水中のリンをリサイクルして再利用する技術の開発は、環境問題と資源問題の二つの問題を解決するために行われてきた (1, 21)。

現在、排水中のリンの効率的な除去方法として、活性汚泥などを用いた生物脱リン法が広く用いられている。生物脱リン法で用いられている微生物の中には、リンをポリリン酸と呼ばれるリン酸のポリマーとして体内に蓄積するバクテリアの存在が明らかにされており、これらのポリリン酸蓄積バクテリアが排水中からのリンの効率的な除去に大きく貢献していることがわかってきた (5)。また、活性汚泥法により生じる余剰汚泥中に蓄積した多量のポリリン酸は、汚泥を短時間加熱することで菌体外に溶出し、カルシウムを添加することにより沈殿させることで容易に分離できることがわかった (21)。このようにリンのリサイクル技術が確立されつつある現在、排水中のリンの除去効率を高めるためには、ポリリン酸蓄積バクテリアの持つポリリン酸蓄積能をさらに向上させる必要があると考えられる (34)。

第2節 ポリリン酸とその代謝機構

ポリリン酸とは、数十から数百の無機リン酸が高エネルギーリン酸結合で直鎖状につながった物質であり、唯一生物がエネルギーを使って合成する無機ポリマーである (7, 16, 18)。ポリリン酸は、バクテリア以外では酵母や高等生物においてもその存在が明らかとなっている (17)。ポリリン酸は、原始生命が誕生したと考えられる熱水中にも豊富に含まれる。ポリリン酸を ATP の代わりにリン酸共与体として利用できる生物も存在することから (16)、原始生命はポリリン酸を共通のエネルギー通貨として利用していたのではないかと考える研究者もいる。しかし、現在の生命体に対するポリリン酸の役割に関してはほとんど不明のままであるため、その存在は「分子化石」と呼ばれてきた。近年、ポリリン酸合成系に変異が起こった大腸菌 (*Escherichia coli*) では、

定常期における生存率が低下することや (29)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のポリリン酸合成系変異株では病原性が低下すること (31)、さらにポリリン酸が ATP 依存性プロテアーゼ Lon に結合して、リボソームタンパク質の分解を活性化していることなどが報告され (20)、その生体機能に関しても明らかになりつつある。

2-1 ポリリン酸キナーゼ

ポリリン酸合成酵素として唯一知られているのがポリリン酸キナーゼ (polyphosphate kinase, PPK) である。PPK は大腸菌において初めてその存在が明らかとなり、現在では、様々な微生物ゲノム上にポリリン酸合成酵素遺伝子のホモログが存在していることが明らかとなっている (36)。大腸菌で精製された PPK の解析から、PPK は内膜と結合した 80 kDa のタンパク質で、4 量体として存在していることが明らかになった (2)。PPK は ATP の末端のリン酸基からポリリン酸を合成する (i)。また、この反応は可逆的であり、ポリリン酸と ADP から ATP を合成をする反応も触媒する。大腸菌の PPK で合成されたポリリン酸は、700~800 リン酸残基とほぼ一定の鎖長を示すが、ポリリン酸合成反応の基点となる物質はこれまで全くわかっていない。



2-2 ポリリン酸分解酵素

ポリリン酸は PPK の逆反応により分解され、ADP から ATP を産生するが、もう一つの経路として、ポリリン酸分解酵素 (exopolyphosphatase, PPX) による分解経路も存在する。大腸菌の PPX は PPK と同様に膜結合型であり、56 kDa のサブユニットの 2 量体として存在している (3)。PPX は PPK と異なり、ポリリン酸の末端のリン酸基を一つずつ加水分解し、この時 ATP は産生しない (ii)。



2-3 PPK, PPX の遺伝的制御

大腸菌の PPK 遺伝子 (*ppk*) は、7 塩基下流の PPX 遺伝子 (*ppx*) とオペロンを形成している (3)。すなわち *ppk* の破壊はそのまま *ppx* の発現をも消失してしまう。*Acinetobacter* や *Klebsiella* では *ppk*

の上流にリン酸飢餓で発現が誘導される *pho box* とよばれるプロモーター配列が存在している (6, 15)。これらの菌株では、リン酸が希薄な培地中で PPK の酵素活性が 5~10 倍にも上昇することが知られている。しかし、大腸菌では *ppk* の上流に *pho box* が存在せず、リン酸欠乏に晒されても PPK 活性は上昇しない。これは、土壌などリン酸が希薄な環境で生育する *Acinetobacter* や *Klebsiella* と、比較的栄養状態の良い大腸内に生育する大腸菌の違いを表しているのかもしれない。

第3節 バクテリアによるポリリン酸蓄積

バクテリアのポリリン酸蓄積現象については 1966 年に Harold が発表した総説が最も良く知られている (7)。*Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella aerogenes*) を用いた研究により、Harold はバクテリアのポリリン酸蓄積には次の 2 種類があると述べている。(i) バクテリアの増殖が活発な時は、取り込まれたリン酸は ATP を経由して核酸の合成に利用されているが、何らかの理由で増殖が停止すると、核酸合成からポリリン酸合成に切り替わり、ポリリン酸が蓄積する。この現象をラグジュアリーアップテイク (過剰摂取) と呼ぶ。(ii) バクテリアが長時間リン酸欠乏状態に晒され、その後リン酸が存在する環境に戻されると急速なポリリン酸合成が行われる。この現象をオーバープラス (補償摂取) と呼ぶ。以下にこれらのポリリン酸蓄積現象に関して行われてきた研究について概説する。

3-1 栄養飢餓におけるポリリン酸蓄積機構

ラグジュアリーアップテイクの例として栄養飢餓によるポリリン酸蓄積が挙げられる。大腸菌では、通常わずかな量 (0.1~1 nmol polyP/mg protein) のポリリン酸しか蓄積していない。しかし、アミノ酸などの栄養が飢餓状態に陥ると、ポリリン酸蓄積量は 100 倍程度 (約 50 nmol polyP/mg protein) にまで増加する (19)。このポリリン酸の蓄積には、栄養飢餓に応答して合成されるグアノシン 5 リン酸 (pppGpp) とグアノシン 4 リン酸 (ppGpp) が関係している。栄養飢餓によりアミノアシル化されていない tRNA が増加すると、リボソームに結合して RelA タンパク質を活性化する。活性化した RelA は ATP と GTP から pppGpp と ppGpp を合成する。この pppGpp と ppGpp は PPK 活性を拮抗的に阻害することが明らかとなった (19)。pppGpp と ppGpp は PPK 活性を阻害しないため、ポリリン酸の分解系のみが阻害され、結果としてポリリン酸が蓄積するものと考

えられている。

3-2 オーバープラスによるポリリン酸蓄積機構

オーバープラスは *Acinetobacter* や *Klebsiella* では起こるが、大腸菌では起こらない。2-3で述べたように *Acinetobacter* や *Klebsiella* では *ppk* の上流に *pho box* が存在しているため、リン酸欠乏状態に陥ると急速に PPK 活性が上昇するが、大腸菌では *ppk* の上流に *pho box* が存在しないため、リン酸欠乏状態でも PPK の活性は上昇しない。オーバープラスでは、PPK 活性が上昇したところにリン酸が加えられるため、急速にポリリン酸が蓄積すると考えられている。しかし、*Klebsiella aerogenes* ではリン酸欠乏状態で PPK の活性は上昇するが、同一オペロン上に存在する PPX の活性は上昇しない (23)。この現象に関しては、PPX に対して何らかの翻訳後制御が行われていることがわかっているが (23)、その詳細に関してはまだ解明がなされていない。

3-3 これまでの研究の課題と展望

ポリリン酸蓄積機構に関しては数多くの研究がなされているが、不明な点が多いのも現状である。例えば、大腸菌ではリファンピシンの添加によってもポリリン酸が蓄積する。リファンピシンは RNA ポリメラーゼによる mRNA の鎖延長を阻害するが、この場合 *pppGpp* や *ppGpp* は合成されない。さらに、大腸菌では浸透圧ストレスによってもポリリン酸が合成すると報告されている (17)。Kornberg らは、ポリリン酸の蓄積には *pppGpp* や *ppGpp* 以外の不明なファクターが、PPX 活性の阻害、PPK 活性の刺激、あるいは直接ポリリン酸合成に影響を及ぼしていると述べている (17)。今後はこの因子がどのような役割を果たしているのかに関し、解明を行っていく必要があると考えられる。

第4節 本論文の概要

ポリリン酸の存在は古くから知られており、その生理的役割に関しては、ここ数十年で徐々に解明がなされてきた。しかし、ポリリン酸蓄積機構に関しては、その解明や有効利用がほとんどなされていないのが現状である。本研究では、これまでブラックボックスであったポリリン酸蓄積機構の解明を行うことを目的とした。第二章では、大腸菌でポリリン酸を過剰に蓄積する変異

株の取得を行い、その変異遺伝子を特定することで、ポリリン酸蓄積機構の解明を行った。第三章では、*Klebsiella aerogenes* が示すオーバープラスによるポリリン酸蓄積機構を、遺伝子レベルで解明を行った。第四章では、ポリリン酸を通常時に多量に蓄積する大腸菌のリン酸取り込み系変異株から新たなリン酸トランスポーターを特定し、その機能や性質に対する解析を行った。第五章では、土壌や活性汚泥に生息するバクテリアから、迅速かつ簡便にポリリン酸高蓄積変異株を単離する方法を開発し、人工排水からのリン酸の除去効率の向上に非常に有用であることを示した。第六章では、リン酸結合タンパク質 PstS の固定化カラムを用いて、環境中の希薄なリン酸の除去方法の開発を行った。

第二章

ポリリン酸を過剰に蓄積させる遺伝子変異 (*phoU*) の 同定と解析

TABLE 2-1 第二章における使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
MV1184	<i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> <i>thi</i> (Φ 80 <i>LacZ</i> Δ M15) Δ (<i>srl</i> <i>recA</i>)306::Tn10 (Tetr) F' [<i>traD</i> 36 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15]	(37)
MG1655	Wild-type strain	(30)
S17-1	<i>thi pro hsdR hsdM</i> ⁺ <i>recA</i> RP4 2Tc::Mu-Km::Tn7	(39)
BW17335	DE3(<i>lac</i>)74 Δ (<i>pstSCAB-phoU</i>)560::Kan ^r	(35)
MT4	MG1655 derivative, <i>phoU</i> mutant	This Study
MT5	MG1655 derivative, Δ <i>phoU</i> ::Kan ^r	This Study
MT6	MG1655 derivative, Δ (<i>pstSCAB-phoU</i>)560::Kan ^r	This Study
Plasmid		
pMW119	Cloning vector; Ap ^r	Takara
pGEM-T easy	Cloning vector; Ap ^r	Promega
SuperCos I	Cosmid vector; Ap ^r	Stratagene
pUC4K	pUC4 containing a 1.3-kb Kan ^r cassette; Ap ^r , Kan ^r	Pharmacia
pEU01	pGEM-T easy containing <i>phoU</i> from MG1655	This Study
pEU02	pGEM-T easy containing <i>phoU</i> from MT4	This Study
pEU01K	pEU01 containing a Kan ^r cassette into the <i>Clal</i> site	This Study
pGP704Sac38	pBR322 derivative with R6K <i>ori</i> , <i>mob</i> RP4, polylinker from M13 tg131 containing <i>sacB</i> ; Ap ^r	(32)
pGP704UK	pGP704Sac38 containing <i>phoU</i> ::Kan ^r from pEU01K	This Study

序論

大腸菌では、アミノ酸飢餓、窒素源飢餓、浸透圧ストレス、定常期移行期などにポリリン酸が蓄積することが知られている (17)。しかしながら、これらのポリリン酸蓄積がどのようにして引き起こされているかについてはいまだに解明されていない。*relA*, *rpoS*, *ntnC* など、ポリリン酸蓄積に関与している遺伝子の存在は明らかになりつつあるが (17)、これらの遺伝子がどのような経路でポリリン酸合成酵素 (PPK) の活性を制御しているかについてはまだ不明のままである。本章では大腸菌 MG1655 野生株の変異株ライブラリーの中からポリリン酸を過剰に蓄積させる株を単離し、ポリリン酸蓄積の原因遺伝子を特定することを試みた。さらに、この特定した遺伝子の変異が引き起こすどのような性質が、大腸菌のポリリン酸蓄積に関与しているかについても詳細な解析を行った。

第 1 節 ポリリン酸を過剰に蓄積する変異株の取得

1-1 大腸菌変異株ライブラリーの作製

大腸菌染色体上にランダムな変異を起こすために、MG1655 株に NTG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) 処理を行った。大腸菌 MG1655 野生株を 4 ml の 2×YT 培地 (33) で 37°C、一晩前培養し、新しい 4 ml の 2×YT 培地で 37°C、2 時間本培養を行った。培養液は遠心分離 (4,000 rpm×10 min) して上清を捨て、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄を行った。菌体はリン酸緩衝液で再懸濁し、リン酸緩衝液で 1 g/l に調製した NTG を最終濃度 20 mg/l になるように加え、37°C で 30 分間振とう培養を行った。菌懸濁液は遠心分離し、リン酸緩衝液で 2 度洗浄を行い、2 ml の 2×YT 培地に再懸濁して 37°C、4 時間振とう培養をおこなった。

1-2 ポリリン酸過剰蓄積株の単離

1-2-1 アルカリホスファターゼが構成的に発現する変異株の取得

MG1655 の変異株ライブラリーの中からポリリン酸過剰蓄積株の単離を行うにあたり、一次スクリーニング方法としてアルカリホスファターゼ活性が構成的になった株の取得を行った。MG1655 の変異株ライブラリーを適宜希釈し、50 µg/ml の 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (X-

リン酸)を含む2×YT寒天固形培地に塗布し、37°Cで一晩保温した。約1000個に1個の割合で青色を呈するコロニーが出現し、約150個の青色コロニーを単離することができた。

1-2-2 菌体内ポリリン酸蓄積量の測定

1-2-2-1 菌体内ポリリン酸の抽出

菌体は2×YT培地で28°C、一晩前培養し、培養液100 µlを遠心分離(15,000 rpm×5 min)して菌体を集菌した。沈殿に350 µlのGITC溶液(4 M guanidine isothiocyanate, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)を加えて菌体を溶解し、90°Cで2分間保温した。菌体溶解液は超音波処理(US-1, 井内盛栄堂)を3分間行って完全に破碎した後、50 µlを後のタンパク質濃度測定用に分取した。残りのサンプルは90°Cで2分間保温し、10 µlの10% SDSと300 µlの99.5%エタノールを加え、ボルテックスにてよく混合した後、90°Cで2分間保温した。サンプル溶液に3 µlのグラスミルク(Gene Clean KIT II, BIO101)を加え、良く混合した後、氷中に5分間置いた。遠心分離(12,000 rpm×10 s)してグラスミルクを沈殿させた後、300 µlのNEW WASH液(Gene Clean KIT II, BIO101)で2回洗浄を行い、50 µlのnuclease溶液(50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 20 µg/ml DNase, 20 µg/ml RNase, pH 7.4)に混合し、37°Cで15分間保温して核酸を完全に分解した。サンプル溶液に150 µlのGITC溶液と150 µlの99.5%エタノールを加えて混合し、遠心分離してグラスミルクを沈殿させた後、200 µlのNEW WASH液で2回洗浄を行った。沈殿に100 µlの蒸留水を加えて混合し、90°Cで2分間保温した後に遠心分離(15,000 rpm×1 min)を行い、上清をポリリン酸溶液として分取して後の測定に用いた。

1-2-2-2 ポリリン酸濃度の測定

PPKはATPからポリリン酸とADPを合成するが、その反応は可逆的である。抽出したポリリン酸に過剰のADPとPPKを加えるとポリリン酸はすべてATPに変換される。このATP濃度を測ることでポリリン酸濃度の測定を行った(4)。PPKは文献(2)を参考にして、前もって精製したものをを用いた。1-2-2-1で抽出したポリリン酸のサンプルを5 µl、1 µlの0.5 mM ADP、3 µlの3.3×PPK緩衝液(50 mM HEPES-KOH, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, pH 7.2)を混合し、精製PPKを1 µl加え、37°Cで30分間保温した後、ATPバイオルミネッセンスキットCLS II(ペーリンガーマンハイム)を使用してATP量を測定し、ポリリン酸量として換算した。

1-2-2-3 タンパク質濃度の測定

プロテインアッセイ (バイオラッド) 原液を5倍に希釈した溶液1 ml に対し、1-2-2-1でタンパク質量用に分取したサンプルを加えて混合し、波長 595 nm の吸光度を測定した。この値を標準タンパク質 (1 g/l BSA) 系列より換算して、タンパク質濃度とした。

1-2-3 ポリリン酸過剰蓄積株 MT4 の取得

本章1-2-1で取得した、アルカリホスファターゼが構成的に発現する変異株 150 個すべてのポリリン酸蓄積量を測定したところ、通常の MG1655 のポリリン酸蓄積量 (0.1~1 nmol polyP/mg protein) に比べて非常に高い濃度で (300 nmol polyP/mg protein) ポリリン酸を蓄積している株を発見した。この株を MT4 とした。MT4 をポリリン酸の存在下で黄色い蛍光を発する 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) により染色し、蛍光顕微鏡 (BX-40, オリンパス) を用いて UV 存在下で観察したところ、菌体内にポリリン酸の顆粒の存在が明らかになった (Fig. 2-1)。

第2節 ポリリン酸過剰蓄積株 MT4 の解析

2-1 MT4 におけるポリリン酸過剰蓄積の原因遺伝子の特定

MT4 の過剰なポリリン酸蓄積を引き起こす原因遺伝子を特定するために、大腸菌 MG1655 野生株の遺伝子ライブラリーを作製し、MT4 の変異形質が元に戻るような遺伝子の探索を行った。

2-1-1 大腸菌野生株の遺伝子ライブラリーの作製

大腸菌の遺伝子ライブラリーの作製には SuperCos I ベクター (ストラタジーン) を使用した。染色体やプラスミドの抽出などの基本的な遺伝子操作法に関しては Sambrook ら (34) の方法に従った。制限酵素の処理に用いる緩衝液は各制限酵素付属の緩衝液を使用した。

MG1655 染色体 DNA を 80 μ l、*Sau3AI* 緩衝液 10 μ l、滅菌水 10 μ l、20 mg/ml RNase 0.5 μ l をそれぞれ混合し、1 μ l の *Sau3AI* を添加後、37°C で1分から10分の間で反応させ、0.5 M EDTA (pH 8.0) を添加して反応を停止させた。各反応液はアガロースゲル電気泳動にてサイズを確認し、20~45 kb のサイズの断片が得られる条件を決定した。SuperCos I は *XbaI* により 37°C で2時間消化を行い、70°C で10分間保温して酵素を失活させた。SuperCos I の *XbaI* 消化物はエタノール沈殿によ

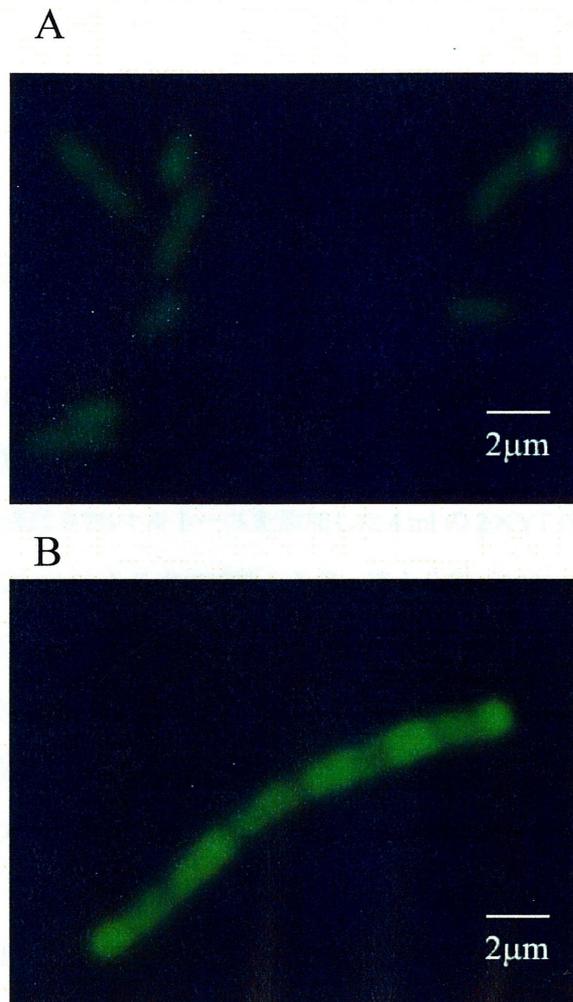


Fig. 2-1 DAPI染色後、紫外線照射下で検出された (A) MG1655と (B) MT4の菌体内ポリリン酸顆粒。

り精製し、滅菌水に溶解させた後、*Bam*HIにより37°Cで2時間消化を行った。反応物は70°Cで10分間保温して酵素を失活させた後、エタノール沈殿で精製し、最終的に20 µlの滅菌水に溶解した。精製したSuperCos Iと20~40 kbのMG1655染色体DNA断片(2 µg)をT4 DNAリガーゼ(タカラバイオ)で連結させた。巨大になったプラスミドベクターをMT4に導入するために、Packaging Extract(ストラタジーン)の内容物を素早く溶解し、コスミド溶液を泡立てないようにピペティングした後、22°Cで約1時間45分保温し、SM緩衝液(5.8 g/l NaCl, 2.0 g/l MgCl₂, 0.1 g/lゼラチン, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)を添加した。

2-1-2 MT4へのMG1655株遺伝子ライブラリーの形質転換

MT4を10 mM MgSO₄と0.2%マルトースを添加した2×YT培地に一白金耳植菌し、28°Cで一晩前培養を行った。培養液は0.2%マルトースを添加した4 mlの2×YT培地に100 µl植菌し、28°Cで波長600 nmの吸光度が0.9になるまで培養した後、遠心分離(6,000 rpm×10 min)して上清を完全に除いて沈殿を得た。沈殿は10 mM MgSO₄で再懸濁し、波長600 nmの吸光度が0.6になるように希釈した。菌液100 µlとパッケージング溶液100 µlを混合し、22°Cで30分間保温した後、800 µlの2×YT培地を加え、28°Cで1時間保温した。形質転換溶液は50 µg/mlのアンピシリンを添加した2×YT寒天プレートに塗布し、28°Cで保温してコロニーを形成させた。

2-1-3 MT4のポリリン酸蓄積を相補するDNA断片の取得

コスミドベクターをMT4に形質転換して形成された約200個のコロニーそれぞれを2×YT培地で28°C、一晩培養し、培養液100 µlを集菌し、菌体内ポリリン酸濃度を測定した。200個の形質転換体の中から、MT4のポリリン酸蓄積量を大幅に減少させる株を取得することができた。その株からアルカリ抽出法によりプラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動によりサイズを決定したところ、そのプラスミドは約30 kbのMG1655染色体断片を含む事がわかった。取得したプラスミドは様々な制限酵素で切断し、pMW119ベクターにサブクローニングし、MT4に形質転換してポリリン酸蓄積量の測定を行った。その結果、*Eco*RI消化によりサブクローニングした約11.5 kbのDNA断片のみでMT4のポリリン酸蓄積は完全に相補される事がわかった。

2-1-4 サブクローニングした DNA 断片の塩基配列の決定

前項でサブクローニングした約 11.5 kb の DNA 断片の両末端配列の塩基配列の決定を行い、大腸菌全ゲノム配列のデータベースと比較することで、この DNA 断片が大腸菌染色体上のどの部分であるかの特定を行った。サンプルの調製には DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (アマシャム) を、DNA 塩基配列の決定には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオンシステムズ) を用いた。DNA の解析には DNASIS ver. 2.0 (日立ソフトウェア) を使用し、相同性の検索には WEB 上の DDBJ サイト上 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) で FASTA プログラム (27) を用いて行った。

相同性検索結果から、この約 11.5 kb の DNA 断片は、*pstSCAB-phoU* および *bgl* オペロンを含む領域であることが明らかになった。さらに約 11.5 kb の DNA 断片の中から、ポリリン酸蓄積を相補する断片をサブクローニングした結果、*phoU* 遺伝子のみを含む約 1.9 kb の *EcoRV* 消化断片のみで MT4 のポリリン酸蓄積が完全に相補されることがわかった (Fig. 2-2)。

2-1-5 MT4 の *phoU* 遺伝子の変異点の解析

MT4 の *phoU* 遺伝子の変異点を調べるために、MT4 染色体上の *phoU* 遺伝子を PCR により増幅し、塩基配列の決定を行った。PCR に用いるプライマーには、データベースに登録されている大腸菌の *pstSCAB-phoU* オペロンの配列を基に、EU1 (5'-ATTGGGATTTGTCTGGTGAA-3') と EU2 (5'-AGAAGACTACATCACCGGTC-3') を設計した。MT4 染色体を鋳型とし、PCR 反応には Takara *Ex Taq* DNA polymerase (タカラバイオ) を使用した。反応は 98°C 5 min (1 サイクル), 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 3 min (27 サイクル) の条件で行い、サーマルサイクラーには GeneAmp9600 (アプライドバイオンシステムズ) を用いた。得られた約 0.8 kb の PCR 産物は pGEM-T Easy Vector System I (プロメガ) を使用してクローニングし、これを pEU02 とした。クローニングした *phoU* は、本章 2-1-4 で用いた方法と同様にして塩基配列を決定した。

決定した塩基配列をデータベース上の MG1655 野生株の *phoU* 遺伝子と比較した結果、MT4 の *phoU* 遺伝子は 86 番目の塩基がグアニンからアデニンに変異しており、その結果 29 番目のアミノ酸がグリシンからアスパラギン酸に変異していることがわかった (Fig. 2-3)。以上より MT4 の過剰なポリリン酸蓄積は *phoU* 遺伝子のミスセンス変異が原因であると考えられる。

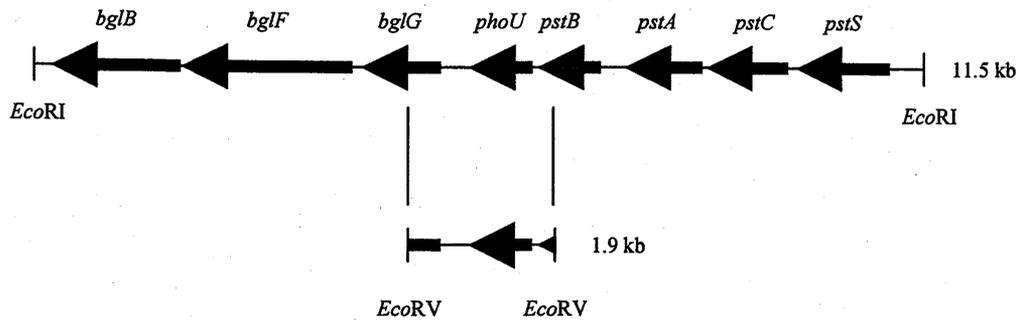


Fig. 2-2 MT4のポリリン酸蓄積量を野生株並に減少させるDNA断片の遺伝子構成。上の約11.5 kbの*EcoRI*消化断片は *pst*オペロンと *bgl*オペロンを含む。その中でも約1.9 kbの*phoU* 遺伝子を含む断片のみでMT4のポリリン酸蓄積は相補された。

```

MG1655 ATGGACAGTCTCAATCTTAATAAACATATTTCCGGCCAGTTCAACGCCGAAGTATCCGCACGCAGGTGATGACCATGGCCGGCATGGTGGAGC 100
MT4 ATGGACAGTCTCAATCTTAATAAACATATTTCCGGCCAGTTCAACGCCGAAGTATCCGCACGCAGGTGATGACCATGGCCGGCATGGTGGAGC 100

MG1655 AGCAGCTTTCTGATGCAATCACCGCGATGCATAACCAGGACAGCGATCTGGCGAAGCGCGTCATCGAAGGCGACAAGAAGCTCAACATGATGGAAGTGGC 200
MT4 AGCAGCTTTCTGATGCAATCACCGCGATGCATAACCAGGACAGCGATCTGGCGAAGCGCGTCATCGAAGGCGACAAGAAGCTCAACATGATGGAAGTGGC 200

MG1655 GATCGATGAAGCCTGCGTGCATATTATCGCCAAACGTCAGCCGACGCGAGCGACCTGCGACTGGTTATGGTGATCAGTAAAACCATGGCCGAGCTGGAG 300
MT4 GATCGATGAAGCCTGCGTGCATATTATCGCCAAACGTCAGCCGACGCGAGCGACCTGCGACTGGTTATGGTGATCAGTAAAACCATGGCCGAGCTGGAG 300

MG1655 CGTATTGGCGACGTGGCGGACAAAATCTGCCGTACTGCGCTGGAGAAATTCCTCCAGCAGCATCAGCCGTTGCTGGTAAGTCTGGAGTCGCTGGCCGCTC 400
MT4 CGTATTGGCGACGTGGCGGACAAAATCTGCCGTACTGCGCTGGAGAAATTCCTCCAGCAGCATCAGCCGTTGCTGGTAAGTCTGGAGTCGCTGGCCGCTC 400

MG1655 ATACCATCCAGATGCTGCACGACGTGCTGGACGCGTTCGCGCGGATGGACATTGACGAAGCGGTACGTATTTATCGTGAAGATAAAAAAGTCGATCAGGA 500
MT4 ATACCATCCAGATGCTGCACGACGTGCTGGACGCGTTCGCGCGGATGGACATTGACGAAGCGGTACGTATTTATCGTGAAGATAAAAAAGTCGATCAGGA 500

MG1655 ATACGAAGGTATTGTTCTGCAACTGATGACCTACATGATGGAAGATTGCGGTACCATTCGAGCGTACTTACTGCGTGTTCTGCGCGCGTTCATATCGAA 600
MT4 ATACGAAGGTATTGTTCTGCAACTGATGACCTACATGATGGAAGATTGCGGTACCATTCGAGCGTACTTACTGCGTGTTCTGCGCGCGTTCATATCGAA 600

MG1655 CGTATTGGCGACCGCTGCCAGAATATTTGTGAGTTTATCTTACTACTGTAAGGGGCAGGATTTCCGTCACGTCGGTGGCGATGAGCTGGATAAACTGC 700
MT4 CGTATTGGCGACCGCTGCCAGAATATTTGTGAGTTTATCTTACTACTGTAAGGGGCAGGATTTCCGTCACGTCGGTGGCGATGAGCTGGATAAACTGC 700

MG1655 TGGCGGGGAAAGATAGCGACAAATAA
MT4 TGGCGGGGAAAGATAGCGACAAATAA

```

Fig. 2-3 MG1655の*phoU*遺伝子とMT4の*phoU*遺伝子の塩基配列の比較。塩基が異なる部分を黒く示した。

2-1-6 *pstSCAB-phoU* オペロンの生理的役割

pstSCAB-phoU オペロンはリン酸特異的膜輸送系 (PST 系) をコードする遺伝子であり、細胞外の無機リン酸が欠乏状態 (約 4 μM 以下) になると発現が誘導されるリン酸レギュロンに属している。*pstSCAB* は内膜貫通型リン酸トランスポーターをコードし、*phoU* は内膜にわずかに結合するタンパク質をコードし、リン酸取り込みには関与していない (35)。*pstSCAB-phoU* オペロンはリン酸レギュロンの制御因子と考えられており、通常はリン酸レギュロンの発現抑制を行っている。これら5つの遺伝子のいずれが変異を受けてもリン酸レギュロンの抑制は解除され、構成的に発現するようになる。*phoU* に変異が起こるとリン酸レギュロンは構成的に発現するようになり、PST系によるリン酸の取り込みが活発になる (35)。そこでMT4も同様にPST系によるリン酸取り込みが構成的に行われている可能性が示唆された。

2-2 MT4のリン酸取り込み速度の解析

MT4とMG1655のリン酸取り込み速度をリン酸欠乏、リン酸十分の条件で測定した。リン酸取り込み速度の測定は文献(27)を参考にして行った。MT4とMG1655は、(a) 0.1 mM (リン酸欠乏条件) (b) 2 mM (リン酸十分条件) の K_2HPO_4 を含むMOPS-glucose培地(25)に一白金耳植菌し、28°Cで一晩前培養を行った。MOPS-glucose培地の組成はTABLE 2-2に示す。培養液は遠心分離(8,000 $\text{g} \times 5$ min)して集菌し、HEPES緩衝液(10 mM HEPES-KOH, pH 7.0)で2回洗浄し、HEPES緩衝液で再懸濁した。菌体懸濁液に放射性リン酸($^{32}\text{P-P}_i$)を終濃度2.5 μM になるように加え、混合液100 μl を、0, 30, 60, 90, 180秒後に孔径0.45 μm のメンブレンフィルター(ミリポア)で吸引ろ過し、10 mlのHEPES緩衝液で2回洗浄した。マイクロチューブに蒸留水1 mlとメンブレンフィルターを入れ、シンチレーションカウンター(パッカード)で放射活性をカウントした。 $^{32}\text{P-P}_i$ の比活性から取り込みリン酸量を算出し、菌対懸濁液の波長600 nmの吸光度の測定値から、菌体あたりのリン酸取り込み量(nmol $\text{P}_i/\text{OD}_{600}$)を算出した。リン酸取り込み速度の測定結果をFig. 2-4に示す。MG1655株に関しては、リン酸欠乏条件でのみリン酸取り込み速度の上昇が見られた。しかしMT4では、リン酸十分および欠乏の両条件下で、リン酸取り込み速度の上昇が見られた。このことは、PST系によるリン酸取り込みが構成的になっており、リン酸が十分な条件下でも過度のリン酸の取り込みが行われていることを示している。

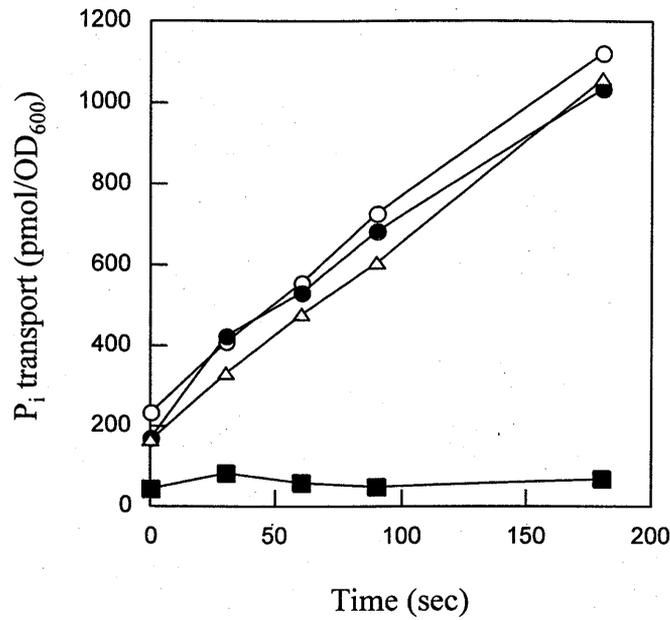


Fig. 2-4 リン酸十分条件のMG1655 (■)、リン酸欠乏条件のMG1655 (●)、リン酸十分条件のMT4 (△)、リン酸欠乏条件のMT4 (○) を使用したリン酸取り込み測定。

TABLE 2-2 MOPS-glucose培地の組成

A液	200 ml
B液	2 ml
0.276 M K_2SO_4	1 ml
20 mM ビタミンB ₁	1 ml
1 M D-グルコース	22.2 ml
56 mM K_2HPO_4	MOPS(2)の場合 35.7 ml
	MOPS(0.1)の場合 1.785 ml
H ₂ Oで1.0 lに調製	
※A液	※B液
MOPS-KOH (pH 7.4) 200 mM	CaCl ₂ 250 μM
Tricin 20 mM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 1.5 μM
NaCl 250 mM	H ₃ BO ₃ 200 μM
NH ₄ Cl 47.6 mM	CoCl ₂ 15 μM
MgCl ₂ 2.615 mM	CuSO ₄ 5 μM
	MnCl ₂ 40 μM
	ZnSO ₄ 5 μM
	FeSO ₄ 5 mM

2-3 MG1655 の *phoU* 遺伝子破壊株の作製

MT4 は NTG 処理により染色体上にランダムな変異を受けているため、*phoU* 遺伝子以外の変異がポリリン酸蓄積に影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで MT4 の過剰なポリリン酸蓄積が *phoU* の変異のみで引き起こされていることを確認するため、MG16655 の *phoU* 遺伝子破壊株を作製し、ポリリン酸蓄積量を調べた。

MG1655 株の *phoU* 遺伝子は、本章 2-1-5 で行った方法と同様に pGEM-T easy ベクターにクローニングし、これを pEU01 とした。pEU01 を *phoU* 内部にある *Cla*I サイトで消化し、Klenow Fragment (タカラバイオ) で切断面を平滑化した。pUC4K を *Hinc*II で消化し、約 1.3 kb のカナマイシン耐性遺伝子カセットを取り出し、pEU01 の *Cla*I 切断箇所に連結した。以上より *phoU* の内部にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されたプラスミド pEU01K を構築した。pEU01K の *phoU* 破壊部分を *Eco*RI 消化により切り出し、pGP704Sac38 の *Eco*RI サイトに挿入した。これを pGP704UK とした。このプラスミドを大腸菌 S17-1 に形質転換し、接合伝達により MG1655 に導入した。導入した株は 5% ショ糖を含む 2×YT 寒天プレートに塗布し、生えてきたコロニーを *phoU* 破壊株として選択し、サザン解析により破壊を確認した。この *phoU* 破壊株を MT5 とした。MT5 のポリリン酸蓄積量を調べた結果、非常に高い濃度 (400 nmol polyP/mg protein) でポリリン酸を蓄積していることがわかった (Fig. 2-5)。このことから MT4 のポリリン酸蓄積は *phoU* の変異のみで説明できることがわかった。

2-4 MG1655 株の *pstSCAB-phoU* オペロン破壊株の作製

MT5 のポリリン酸蓄積は、*phoU* を破壊することで起こる *pstSCAB* の構成的な発現が原因であること検証するために、*pstSCAB-phoU* オペロンをすべて破壊した株を作製し、菌体内ポリリン酸蓄積量を測定した。*pstSCAB-phoU* 破壊株の作製は、大腸菌 BW17335 から染色体上の $\Delta(pstSCAB-phoU)::Kan^r$ を P1 ファージを用いて MG1655 に転移させることで行った (33)。作製した株は MT6 とした。MT6 のポリリン酸蓄積量を調べた結果、MG1655 と同程度 (0.1~1 nmol polyP/mg protein) のポリリン酸しか蓄積していないことがわかった (Fig. 2-5)。すなわち、*phoU* の変異自体がポリリン酸を蓄積を引き起こしているのではなく、*phoU* の変異による *pstSCAB* の構成的な発現がポリリン酸蓄積を引き起こしていることがわかった。

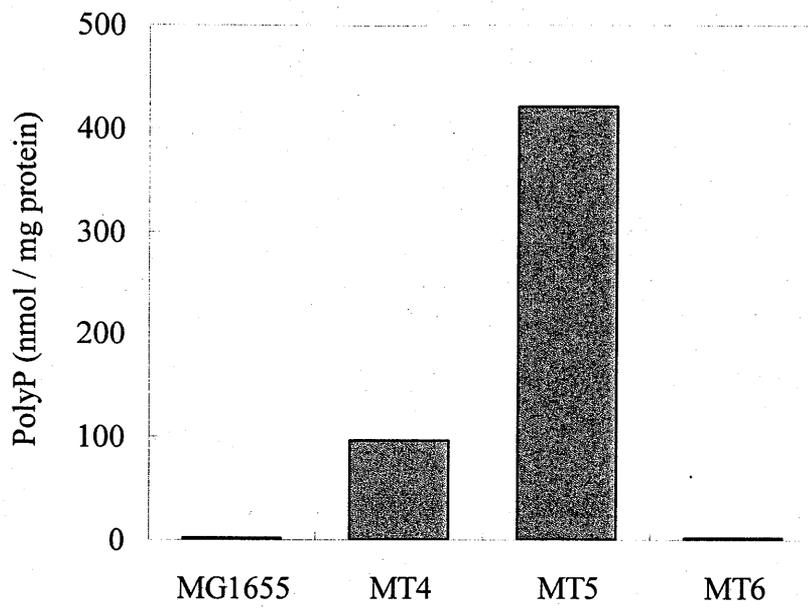


Fig. 2-5 MG1655、MT4 (*phoU*変異株)、MT5 (*phoU*破壊株)、MT6 (*pstSCAB-phoU*破壊株) によるポリリン酸蓄積量の測定。

第3節 考察

本章では、大腸菌 MG1655 野生株の変異株ライブラリーから、通常の 100 倍以上のポリリン酸を蓄積する変異株 MT4 を取得し、その変異点を決定したところ、リン酸特異的膜輸送系 *pstSCAB-phoU* オペロンを構成する *phoU* 遺伝子の点変異であることが明らかとなった。*phoU* 変異株の解析はこれまでも行われており、Wanner らは、*phoU* 遺伝子破壊株が増殖阻害を起こすことを指摘している (35)。本研究で作製した *phoU* 変異株では、MT4 ではわずかに、MT5 に関しては深刻な増殖阻害が観察された。Wanner らは、PST 系により細胞内に取り込まれたリン酸が蓄積し、細胞内で高濃度となったリン酸が増殖阻害を引き起こすのではないかと考察している。しかし、今回の研究から、細胞内に取り込まれた過剰なリン酸は速やかにポリリン酸として変換されており、リン酸の過剰な蓄積は起こっていないと考えられる。この増殖阻害に関しては、細胞内に蓄積したポリリン酸が原因であると推察される。ポリリン酸は細胞がなんらかのストレスを受けた場合に蓄積する報告されている (17)。例えば、大腸菌を複合培地からグルコース最小培地に移した場合、移行初期に大量のポリリン酸を蓄積するが、そのとき増殖は停止する。その後、ポリリン酸蓄積量は減少するが、その減少と同時に大腸菌は再び増殖をはじめ (17)。この時蓄積したポリリン酸は、リボソームタンパク質の分解を活性化していることがわかってきた (20)。*phoU* 変異株のようにポリリン酸が大量に蓄積している株では、リボソームタンパク質の分解が常に刺激される状況になり、増殖阻害が引き起こされるのかもしれない。

大腸菌の PPK はリン酸レギュロンの一員ではないので、大腸菌ではリン酸欠乏条件で PPK 活性は上昇しない。したがってリン酸レギュロンの発現が構成的になった MT4 においても野生株と同等の PPK 活性しか測定されなかった。このことから、PPK 活性と MT4 のポリリン酸蓄積には相関性がないことがわかった。PPK 活性が変化しないにも関わらず、PST 系によるリン酸の取り込みのみで、なぜポリリン酸が蓄積するかに関してはまだ不明な点が多い。現在、細胞内の ATP/ADP 濃度比の変化がポリリン酸蓄積の原因ではないかと考えている。細胞内に取り込まれたリン酸は、リン源として利用される前に一旦 ATP として取り込まれる。リン酸が過剰に取り込まれると、細胞内の ATP 濃度が上昇し、逆に ADP 濃度が減少するのではないかと考えられる。PPK によるポリリン酸合成は可逆反応で、通常は細胞内の ATP/ADP 濃度比が安定に保たれているため、ポリリン酸は一定の濃度で平衡状態に保たれている。しかし、MT4 のようにリン酸が過剰に

取り込まれると、細胞内 ATP/ADP 濃度比のバランスが崩れ、ATP 濃度の上昇（あるいは ADP 濃度の減少）が引き起こされ、PPK の平衡反応がポリリン酸合成側に傾くために、ポリリン酸の蓄積が起こるのではないかと考えている。この仮説を検証するためには、細胞内のフリーな ATP 濃度と ADP 濃度を厳密に測定する必要がある。しかし、細胞内では多くの ATP、ADP がタンパク質に結合していると考えられるので、非常に困難であると予想される。仮に今後このような実験系が確立されれば、新たな見解が得られるかもしれない。

第三章

Klebsiella aerogenes のオーバープラスによる ポリリン酸蓄積機構の解明

TABLE 3-1 第三章における使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
MV1184	<i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL thi</i> (Φ 80 <i>LacZ</i> Δ M15) Δ (<i>srl</i> <i>recA</i>)306::Tn10 (Tet) ^r F' ⁺ [<i>traD</i> 36 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15]	(37)
MG1655	Wild-type strain	(30)
CF5802	MG1655 derivative, Δ <i>ppk-ppx</i> ::Kan ^r	(19)
<i>K. aerogenes</i>		
ATCC9621	Wild-type strain	(15)
PPK1	ATCC9621 derivative, Δ <i>ppk</i> ::Kan ^r	This Study
PPX1	ATCC9621 derivative, Δ <i>ppx</i> ::Kan ^r	This Study
Plasmid		
pSTV29	Cloning vector; Cm ^r	Takara
pKP05.1	pUC119 containing <i>ppk-ppx</i> from <i>K. aerogenes</i>	(15)
pBC10	pUC18 containing <i>ppk-ppx</i> from <i>E. coli</i>	(3)
pUC4K	pUC4 containing a 1.3-kb Kan ^r cassette; Ap ^r , Kan ^r	Pharmacia
pKP05.1ppkKm	pKP05.1 containing a Kan ^r cassette into the <i>Sa</i> I site	This Study
pKP05.1ppxKm	pKP05.1 containing a Kan ^r cassette into the <i>Eco</i> RI site	This Study
pKpp2	pSTV29 containing <i>ppk-ppx</i> from pKP05.1	This Study
pEpp2	pSTV29 containing <i>ppk-ppx</i> from pBC10	This Study
pEPT20	pSTV28 containing <i>pstSCAB-phoU</i> from <i>Enterobacter cloacae</i>	(13)
pEP02.1	pKK223-3 containing <i>pstSCAB-phoU</i> from <i>E. coli</i>	(14)
pKpst1	pSTV29 containing <i>pstSCAB-phoU</i> from pEPT20	This Study
pEpst1	pSTV29 containing <i>pstSCAB-phoU</i> from pEP02.1	This Study

序論

バクテリアによるポリリン酸蓄積現象の一つに、オーバープラスと呼ばれる現象が知られている。オーバープラスとは、長時間リン酸欠乏状態に晒した菌体を、リン酸が存在する環境に移した場合、急速なポリリン酸蓄積が見られることをいう。オーバープラスは、*Acinetobacter* や *Klebsiella* など、多くのバクテリアで見られる現象であるが、大腸菌ではオーバープラスは観察されない。大腸菌がオーバープラスを示さない理由に関しては様々な考察がなされている。*Klebsiella aerogenes* はリン酸欠乏条件下で PPK 活性が急激に上昇する。これは、*K. aerogenes* では *ppk* の上流にリン酸欠乏で転写が誘導されるプロモーター、*pho box* が存在するためであり、*ppk* の上流に *pho box* が存在しない大腸菌では PPK 活性は上昇しない。また、*K. aerogenes* では *ppk* と同一オペロン上に *ppx* が存在するにもかかわらず、PPX 活性は何らかの翻訳後制御によりリン酸欠乏条件下でも上昇しないことがわかった (23)。これらの背景から、*K. aerogenes* のオーバープラスの原因は、PPK 活性の特異的な上昇にあると考えられてきた。本章では、大腸菌と *K. aerogenes* の *ppk-ppx* オペロンとオーバープラスとの関連性について解析を行うとともに、*pstSCAB-phoU* オペロンがオーバープラスに及ぼす影響について調べることで、ポリリン酸蓄積機構の解明を行うことを目的とした。

第1節 *K. aerogenes* ATCC9621 の *ppk, ppx* 遺伝子の破壊と解析1-1 *K. aerogenes* の *ppk, ppx* 遺伝子破壊用プラスミドの構築

K. aerogenes ATCC9621 野生株の *ppk, ppx* 遺伝子の破壊は、相同性組み換えによるカナマイシン耐性遺伝子の導入によって行った。破壊用プラスミドの構築は以下のようにして行った。*ppk* 遺伝子破壊用プラスミドは、pKP05.1 にクローニングされた *ppk* 遺伝子を Fig. 3-1 で示した箇所の *SalI* サイトで部分消化し、同じく *SalI* 消化により切り出した pUC4K のカナマイシン耐性遺伝子を連結させて構築した。このプラスミドを pKP05.1ppkKm とした。*ppx* 遺伝子破壊用プラスミドは、pKP05.1 にクローニングされた *ppx* 遺伝子を Fig. 3-2 で示した箇所の *EcoRI* サイトで部分消化し、同じく *EcoRI* 消化により切り出した pUC4K のカナマイシン耐性遺伝子を連結させて構築した。このプラスミドを pKP05.1ppxKm とした。

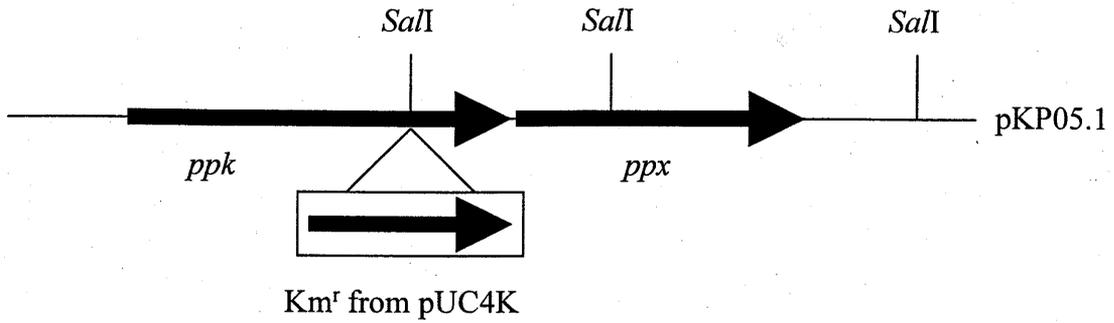


Fig. 3-1 *K. aerogenes* の*ppk*遺伝子破壊用プラスミド構築図。カナマイシン耐性遺伝子カセットは図に示すpKP05.1の*SalI*サイトに挿入した。

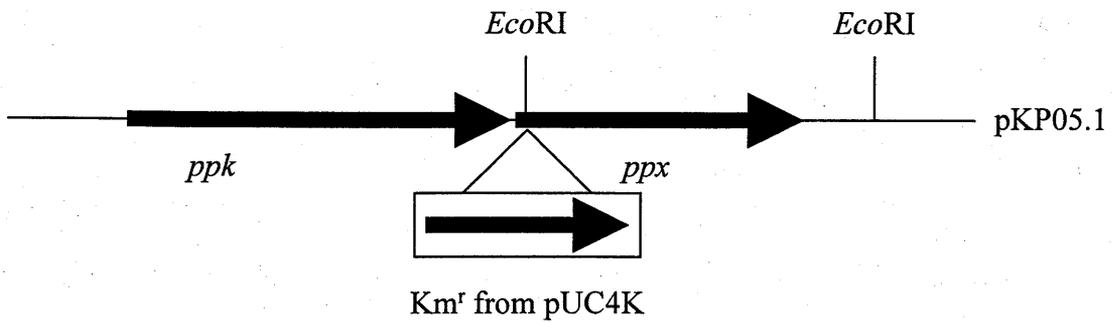


Fig. 3-2 *K. aerogenes* の*ppx*遺伝子破壊用プラスミド構築図。カナマイシン耐性遺伝子カセットは図に示すpKP05.1の*EcoRI*サイトに挿入した。

1-2 エレクトロポレーションによる破壊用プラスミドの形質転換

K. aerogenes ATCC9621 を2×YT 培地で37°C、一晩前培養し、新しい12 mlの2×YT 培地に前培養液を1%植菌し、37°Cで3時間本培養を行った。この培養液は遠心分離(15,000 rpm×5 min, 4°C)して菌体を集菌し、エレクトロポレーション緩衝液(8 mM HEPES-KOH, 272 mM glucose, pH 7.4)に再懸濁して遠心分離を行った。この洗浄操作は3回行い、最終的に1 mlのエレクトロポレーション緩衝液に再懸濁した。菌懸濁液390 µlをキュベット(BTX200, 2 mm gap)に加え、破壊用プラスミド溶液を10 µl加えてよく混合した。キュベットはエレクトロポレーションキット(BTX ECM6000)にセットし、電圧2.5 kV、電気容量50 µF、抵抗720 Ωの条件でパルス波をかけた。菌懸濁液は4 mlの2×YT 試験管培地に移し、37°Cで4時間培養し、50 µg/mlのカナマイシンを加えた2×YT 寒天固形培地に塗布し、37°Cで一晩保温してコロニーを形成させた。

1-3 *ppk*, *ppx* 遺伝子破壊株の選択

1-2で形成したコロニーを、抗生物質を加えていない4 mlの2×YT 培地に一白金耳植菌し、37°Cで一晩以上振とう培養を行い、プラスミドを欠落させた。培養液は適当に希釈し、50 µg/mlのカナマイシンを加えた2×YT 寒天固形培地に塗布し、37°Cで一晩保温して単一のコロニーを形成させた。これらのコロニーがベクターを巻き込まずに組み換えが行われたかどうかを調べるため、150 µg/mlのカナマイシンを加えた2×YT 寒天固形培地と、150 µg/mlのアmpiシリンを加えた2×YT 寒天固形培地にコロニーをそれぞれ移し、カナマイシン耐性のみを持つ株を取得した。*ppk* 破壊株のPPK, PPX 酵素活性を測定したところ、極性効果によりPPK 活性だけでなくPPX 活性も存在しなかった。作製した*ppk* 破壊株はPPK1、*ppx* 破壊株はPPX1とそれぞれ命名した。

1-4 オーバープラスによるPPK1, PPX1のポリリン酸蓄積

オーバープラスによるPPK1, PPX1のポリリン酸蓄積量を野生株と比較した。オーバープラスを起こさせる培養条件は以下の通りである。*K. aerogenes* ATCC9621、PPK1、PPX1はそれぞれ2×YT 培地で37°C、一晩前培養した。前培養液は0.1 mM K₂HPO₄を含む100 mlのMOPS-glucose 培地に1 ml 植菌し、37°Cで6時間振とう培養を行い、リン酸欠乏状態にした。その後、K₂HPO₄を最終濃度0.5 mMになるように加え、一定時間毎に3時間サンプリングを行った。サンプル溶液は遠心分離して上清を完全に除き、沈殿から菌体内ポリリン酸蓄積量を測定した。ポリリン酸

蓄積量の測定方法は第二章 1-2-2 と同様の方法で行った。各株のポリリン酸蓄積量のグラフを Fig. 3-3 に示す。ATCC9621 では、最大で 700 nmol polyP/mg protein もの多量のポリリン酸を蓄積し、その後ポリリン酸蓄積量は減少に転じた。PPK1 ではオーバープラスによるポリリン酸蓄積は観察されなかった。PPX1 ではポリリン酸の蓄積は見られたが、最大蓄積量は 300 nmol polyP/mg protein 程度にとどまり、ATCC9621 よりもポリリン酸蓄積量は減少した。ただし、ポリリン酸蓄積量の減少は抑えられていた。

第2節 *ppk-ppx* オペロンがオーバープラスに果たす役割の解析

2-1 大腸菌と *K. aerogenes* の *ppk-ppx* オペロンの解析

2-1-1 *K. aerogenes* の *ppk-ppx* オペロンの低コピーベクターへの導入

pKP05.1 プラスミドを *Xba*I で消化し、エタノール沈殿により緩衝液を交換した後、*Eco*RI で部分消化を行った。アガロースゲル電気泳動により約 4.8 kb の DNA 断片を切り出した。DNA 断片は、Gene Clean Kit II を使用してゲルから抽出した。この DNA 断片は、*Xba*I と *Eco*RI で消化した pSTV29 ベクターに挿入した。このプラスミドを pKpp2 とした。

2-1-2 大腸菌の *ppk-ppx* オペロンの低コピーベクターへの導入

pBC10 プラスミドを *Hind*III で消化し、エタノール沈殿により緩衝液を交換した後、*Eco*RI で部分消化を行った。アガロースゲル電気泳動により約 4.7 kb の DNA 断片を切り出した。DNA 断片はゲルから抽出し、*Hind*III と *Eco*RI で消化した pSTV29 ベクターに挿入した。このプラスミドを pEpp2 とした。

2-2 pKpp2, pEpp2 を導入した大腸菌のオーバープラス

大腸菌に *K. aerogenes* の *ppk-ppx* を導入することでオーバープラスを示すかどうか検証するために、大腸菌 MG1655 野生株に、pKpp2 と pEpp2 を形質転換した。形質転換体は 50 µg/ml のクロラムフェニコールを含む 2×YT 培地で 37°C、一晩前培養した。オーバープラスは本章 1-4 と同様にして行った。リン酸添加後、0, 30, 60, 90 分後にサンプリングを行い、ポリリン酸蓄積量を測定した。各株のポリリン酸蓄積量のグラフを Fig. 3-4 に示す。pKpp2 と pEpp2 を形質転換した

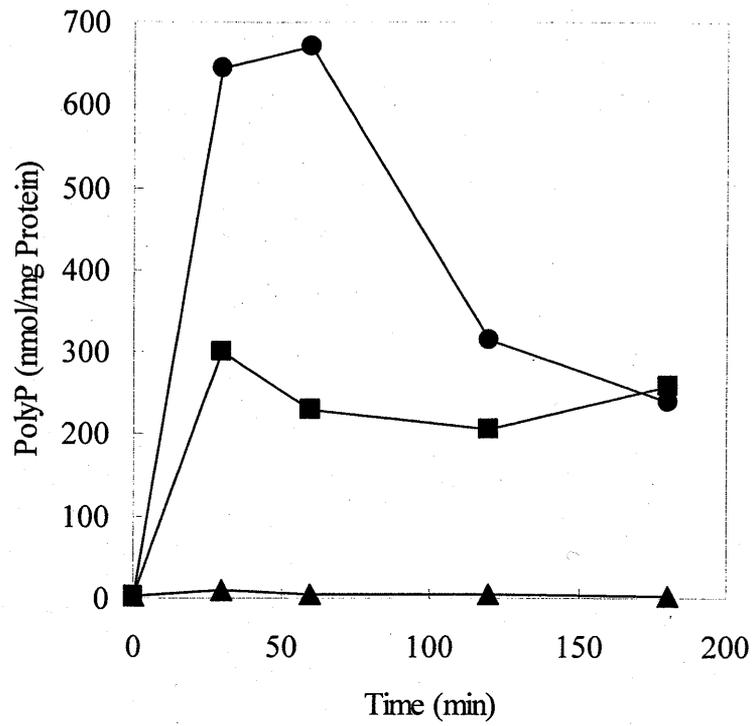


Fig. 3-3 *K. aerogenes*野生株ATCC9621 (●)、PPK1株 (▲)、PPX1株 (■) が示すオーバープラスによるポリリン酸蓄積量の変化。

どちらの株においても、若干のポリリン酸蓄積が見られた。

2-3 pKpp2, pEpp2 を導入した *K. aerogenes* PPK1 のオーバープラス

ppk を破壊した *K. aerogenes* PPK1 に、大腸菌および *K. aerogenes* の *ppk-ppx* を導入することでオーバープラスを示すかどうか検証するために、PPK1 に pKpp2 と pEpp2 を形質転換した。オーバープラスは本章 2-2 と同様にして行った。各株のポリリン酸蓄積量のグラフを Fig. 3-5 に示す。大腸菌の場合と同様に、pKpp2 と pEpp2 を形質転換したどちらの株においても、若干のポリリン酸蓄積が見られたが、両者に大きな差は見られなかった。

第3節 *pstSCAB-phoU* オペロンがオーバープラスに果たす役割の解析

リン酸飢餓で誘導される遺伝子は、*ppk-ppx* オペロンのみではなく、*pstSCAB-phoU* オペロンも誘導される。第一章で *PstSCAB* による過剰なリン酸の取り込みがポリリン酸蓄積を引き起こすことを示した。*K. aerogenes* と大腸菌の両者とも *pstSCAB-phoU* オペロンが存在し、リン酸欠乏状態で発現が誘導される。本節では *pstSCAB-phoU* の機能の違いがオーバープラスの原因ではないかと考え、解析を行った。

3-1 大腸菌と *K. aerogenes* の *pstSCAB-phoU* オペロンのクローニング

K. aerogenes の *pstSCAB-phoU* オペロンについては、我々がすでにクローニングを完了し、相同性を検索したところ、*Enterobacter cloacae* の *pstSCAB-phoU* オペロンと 100% の相同性があることがわかった。そこで本解析には、*E. cloacae* の *pstSCAB-phoU* オペロンをクローニングした pEPT20 プラスミドを使用した (13)。pEPT20 プラスミドを *Hind*III と *Eco*RI で消化し、同じく *Hind*III と *Eco*RI で消化した pSTV29 ベクターと連結させた。このプラスミドを pKpst1 とした。大腸菌の *pstSCAB-phoU* オペロンについては、pEP02.1 プラスミドを *Hind*III と *Eco*RI で消化し、同じく *Hind*III と *Eco*RI で消化した pSTV29 ベクターと連結させた。このプラスミドを pEpst1 とした。

3-2 pKpst1, pEpst1 を導入した大腸菌のオーバープラス

大腸菌に、大腸菌および *K. aerogenes* の *pstSCAB-phoU* を導入することでオーバープラスを示

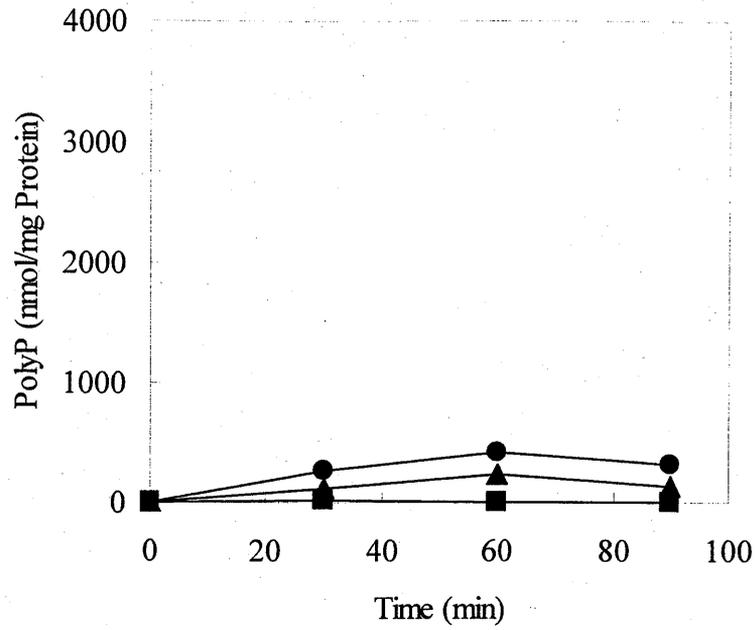


Fig. 3-4 pKpp2 (●)、pEpp2 (▲)、pSTV29 (■) を形質転換した大腸菌MG1655 が示すオーバープラスによるポリリン酸蓄積量の変化。

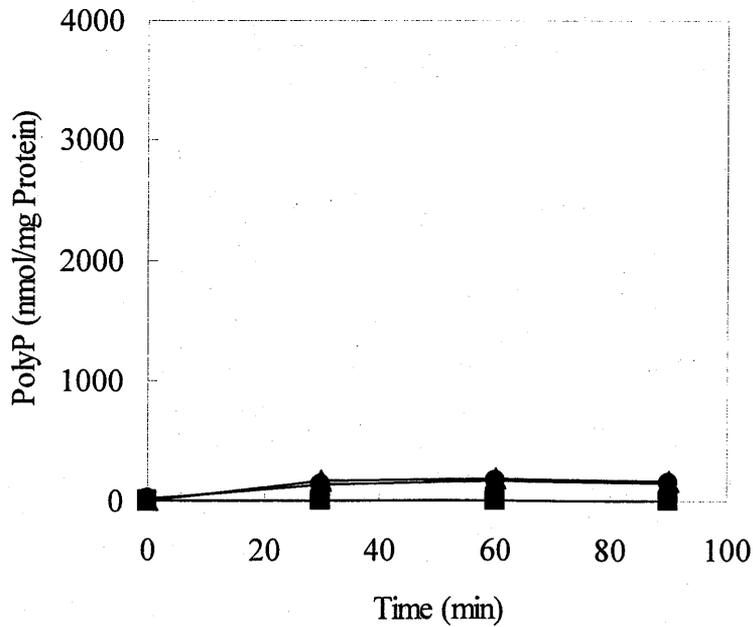


Fig. 3-5 pKpp2 (●)、pEpp2 (▲)、pSTV29 (■) を形質転換した*K. aerogenes* PPK1株が示すオーバープラスによるポリリン酸蓄積量の変化。

すかどうか検証するために、大腸菌 MG1655 株に pKpst1 と pEpst1 を形質転換した。オーバープラスは本章 2-2 と同様にして行った。各株のポリリン酸蓄積量のグラフを Fig. 3-6 に示す。pKpst1 を導入した MG1655 では、リン酸添加後に急速なポリリン酸の蓄積が見られた。pEpst1 を導入した MG1655 でも若干のポリリン酸の蓄積は見られたが、*ppk-ppx* オペロンを導入した場合とほぼ同等の量にとどまった。これらの結果から、*K. aerogenes* の *pstSCAB-phoU* オペロンがオーバープラスに影響を及ぼしているものと考えられる。

3-3 pKpst1, pEpst1 を導入した大腸菌によるリン酸の吸収

K. aerogenes と大腸菌の *pstSCAB-phoU* オペロンの性質の違いを調べるために、大腸菌 MG1655 野生株に導入した *pstSCAB-phoU* によるリン酸の吸収を測定した。オーバープラスは前項と同様にして行い、サンプリングした培養液は遠心分離 (15,000 rpm×5 min) して上清を取得した。上清は、リン酸濃度が 25 μM 以下になるように適宜希釈し、希釈液 1 ml に対して 200 μl のリン酸定量試薬を加え、15 分ほど静置した後、波長 880 nm の吸光度を測定した。リン酸定量試薬の組成は TABLE 3-2 に示す。リン酸濃度は 25 μM のリン酸標準液の吸光度から換算した。培地中のリン酸濃度のグラフを Fig. 3-7 に示す。pEpst1 を導入した株に比べて、pKpst1 を導入した株は急速なリン酸の吸収を示した。以上より、*K. aerogenes* の *pstSCAB-phoU* は大腸菌の *pstSCAB-phoU* よりもリン酸吸収能力が高いものと考えられる。

第4節 考察

本章では、*K. aerogenes* がオーバープラスを示し、大腸菌が示さない原因の特定を試みた。これまで、*K. aerogenes* がオーバープラスを示すのは、*ppk* の上流に *pho box* が存在し、リン酸欠乏条件下で PPK 活性が上昇することが原因であると考えられてきた。また、*K. aerogenes* では *ppk* と同一オペロン上にある *ppx* は、翻訳後制御により活性が阻害されることがわかっている (23)。これらの結果から、*K. aerogenes* ではオーバープラスで PPK 活性が上昇し、PPX 活性は抑えられるため、ポリリン酸が蓄積すると考えられていた。しかし、*K. aerogenes* の *ppx* を破壊してもポリリン酸は蓄積しない。オーバープラスでも *ppx* 破壊株の方がポリリン酸蓄積量は低下していた。ポリリン酸の分解は PPX 以外にも、PPK の逆反応によっても行われる。これらの結果から、PPX に

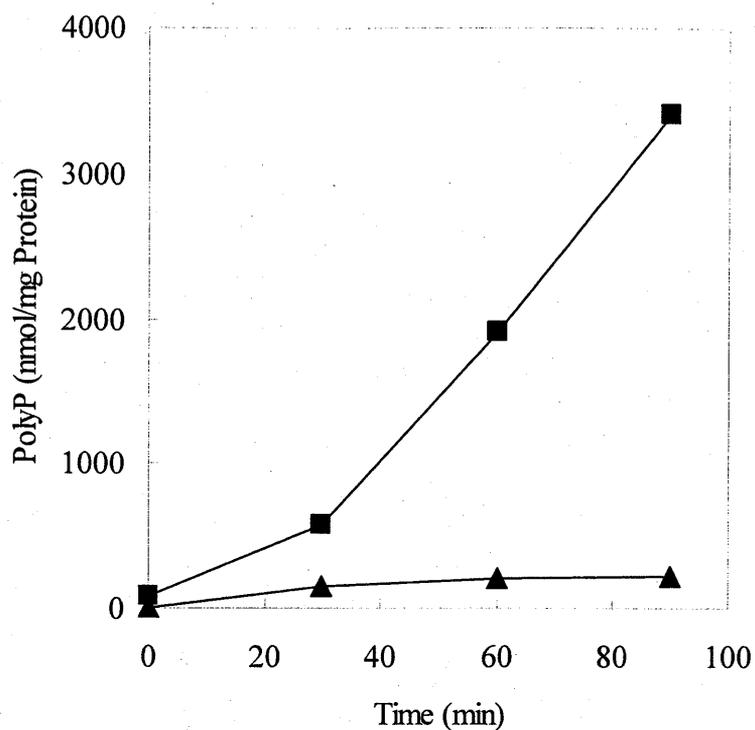


Fig. 3-6 pKpst1 (■)、pEpst1 (▲) を形質転換した大腸菌MG1655が示すオーバープラスによるポリリン酸蓄積量の変化。

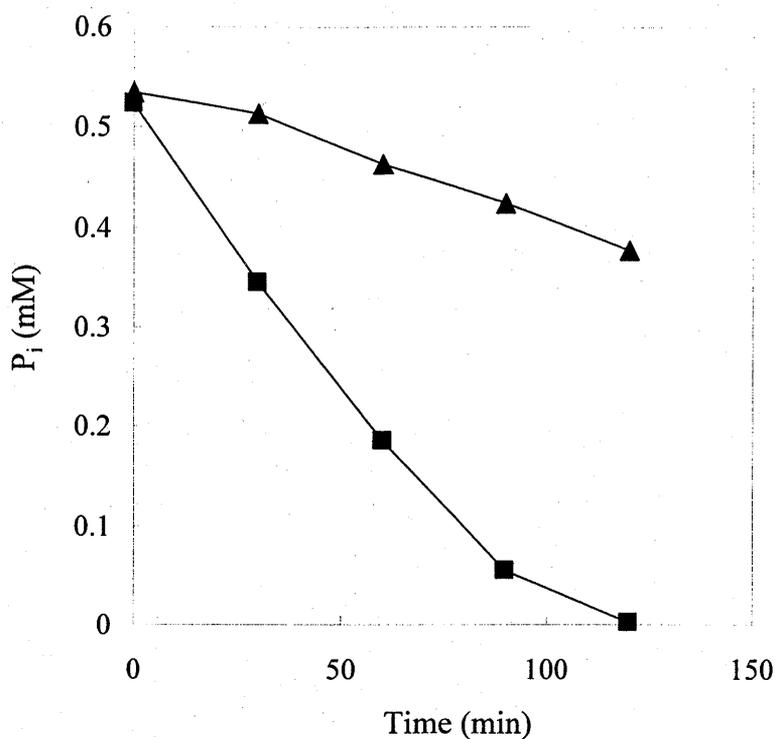


Fig. 3-7 pKpst1 (■)、pEpst1 (▲) を形質転換した大腸菌MG1655のオーバープラスによる培地中からのリン酸取り込み。

TABLE 3-2 リン酸定量試薬の組成

L-アスコルビン酸	0.528 g
滅菌水	9.0 ml
5 N H ₂ SO ₄	15 ml
酒石酸アンチモニルカリウム (0.2743 g / 100 ml)	1.5 ml
モリブデン酸アンモニウム (20 g / 500 ml)	4.5 ml
	30 ml

よるポリリン酸の分解よりも、むしろ PPK の逆反応の方がポリリン酸蓄積量に影響を及ぼすのかもしれない。PPK によりポリリン酸が分解されると、ADP 濃度が減少し、ATP 濃度が増加する。しかし、PPX による分解ではポリリン酸がリン酸に分解されるため、ATP, ADP 濃度に影響を及ぼさない。そのため、PPX によるポリリン酸の分解は、リン酸のサイクルとしては、ATP/ADP 比の増加という点で、PPK によるポリリン酸合成反応にはほとんど影響がないものと考えられる。

大腸菌 MG1655 に *K. aerogenes* と大腸菌の *ppk-ppx* のどちらを導入した場合においても、若干ではあるがオーバープラスを起こさせる条件でポリリン酸を蓄積した。しかし、このポリリン酸蓄積は *pstSCAB-phoU* の導入に比べて非常に少ない。また、*K. aerogenes* PPK1 に *K. aerogenes* と大腸菌の *ppk-ppx* のどちらを導入した場合においてもオーバープラスを示した。pho box が存在しない大腸菌の *ppk* でもオーバープラスを示すことから、PPK 活性の上昇はオーバープラスのポリリン酸蓄積に関係していないと考えられる。

大腸菌 MG1655 に *K. aerogenes* の *pstSCAB-phoU* を導入した場合、オーバープラスによる多量のポリリン酸蓄積が見られた。大腸菌の *pstSCAB-phoU* ではこれほどの多量のポリリン酸蓄積は見られなかったことから、オーバープラスの原因は *K. aerogenes* の *pstSCAB-phoU* にあると考えられる。また、大腸菌の *pstSCAB-phoU* に比べて、*K. aerogenes* の *pstSCAB-phoU* は急速に培地中のリン酸を吸収した。前章で PstSCAB による過度のリン酸取り込みがポリリン酸蓄積を引き起こすことを示したが、この場合も同様に急速なリン酸の吸収がポリリン酸蓄積を引き起こしているものと考えられる。大腸菌と *K. aerogenes* の *pstSCAB-phoU* オペロンの上流には、ほぼ同じ位置に pho box が存在しており、その配列は完全に一致している。また、大腸菌と *K. aerogenes* それぞれの野生株において、*pstSCAB-phoU* オペロンの転写量をノーザン解析により調べたが、転写量にほとんど差は生じていなかったことから、pho box の認識の違いで *pstSCAB-phoU* の発現量が異なるという点は考えにくい。*K. aerogenes* の PST 系は、大腸菌に比べてリン酸取り込み能力が高いのかもしれない。緒言でも述べたが、*K. aerogenes* は土壤中、大腸菌は大腸内を本来の生育環境としているため、通常リン酸が希薄な土壤中で生存する *K. aerogenes* は、比較的栄養条件の良い大腸内で生息する大腸菌に比べて、リン酸を取り込む能力に長けているのかもしれない。

第四章

新規リン酸トランスポーター遺伝子 *xasA* の解析

TABLE 4-1 第四章における使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
MV1184	<i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL thi</i> (Φ80 <i>LacZ</i> ΔM15) Δ(<i>srl</i> <i>recA</i>)306::Tn10 (Tet ^r) F'[<i>traD36 proAB⁺lac^h lacZ</i> ΔM15]	(37)
MG1655	Wild-type strain	(30)
AN3902	<i>pitA1 pitB</i> ::Cat ^r Δ <i>pstC345</i>	(8)
AN4085	<i>pitA1 pitB</i> ::Cat ^r Δ <i>pstC345</i> Δ(<i>phoB-phoR</i>) Kan ^r	(8)
Plasmid		
pSTV28	Cloning vector; Cm ^r	Takara
pExal	pSTV28 containing <i>xasA</i> from MG1655	This Study

序論

大腸菌には、二つの主要なリン酸トランスポーターが存在する。PitA (PIT 系) は低親和性であるが高速な輸送系であり、PstSCAB (PST 系) は高リン酸親和性の低速輸送系である (38)。近年、PitA に高い相同性を持つ PitB の存在が明らかとなり、第三のリン酸トランスポーターとして様々な解析がなされている (8, 11)。しかし、これらすべてのリン酸トランスポーターを破壊した多重変異株は、リン源がリン酸のみの最少培地でも増殖することができることが報告されている (8)。そのため、PST 系、PIT 系以外のリン酸トランスポーターの存在が示唆されている。本章では、リン酸トランスポーター多重変異株の中に多量にポリリン酸を蓄積する株が存在することを発見し、その株で高発現する遺伝子を調べることで、新たなリン酸トランスポーター遺伝子の探索を行い、リン酸トランスポーターとしての可能性についての解析を行った。

第1節 新規リン酸トランスポーターの探索

1-1 リン酸輸送系多重変異株の解析

リン酸トランスポーター多重変異株が、通常時にポリリン酸を蓄積しているかどうかを検証するため、*pitA*, *pitB*, *pstC* 変異株 AN3902 と、*pitA*, *pitB*, *pstC*, *phoBR* 変異株 AN4085 を、2×YT 培地で 37°C、一晩前培養し、新しい 4 ml の 2×YT 培地に 1% 植菌し、37°C で 4 時間本培養を行った。培養液 200 μl を遠心分離 (15,000 rpm×5 min) して上清を除き、第二章 1-2-2 と同様の方法で菌体内ポリリン酸蓄積量を測定した。菌体内ポリリン酸蓄積量のグラフを Fig. 4-1 に示す。AN3902 は通常の大腸菌野生株とほぼ同等のポリリン酸蓄積量しか示さなかったが、AN4085 は菌体内に多量のポリリン酸を蓄積していることがわかった。

1-2 Gene Chip を用いた新規リン酸トランスポーター遺伝子の探索

AN4085 は PIT 系および PST 系のリン酸トランスポーターが機能しないにも関わらず、多量のポリリン酸を蓄積していた。第二章の結果からも、ポリリン酸の蓄積にはリン酸取り込みが大きく関与しているため、これまで知られていない新規のリン酸トランスポーターによるリン酸の取り込みが行われていると考えられる。そこで、Gene Chip を使用して AN3902 に比べて AN4085

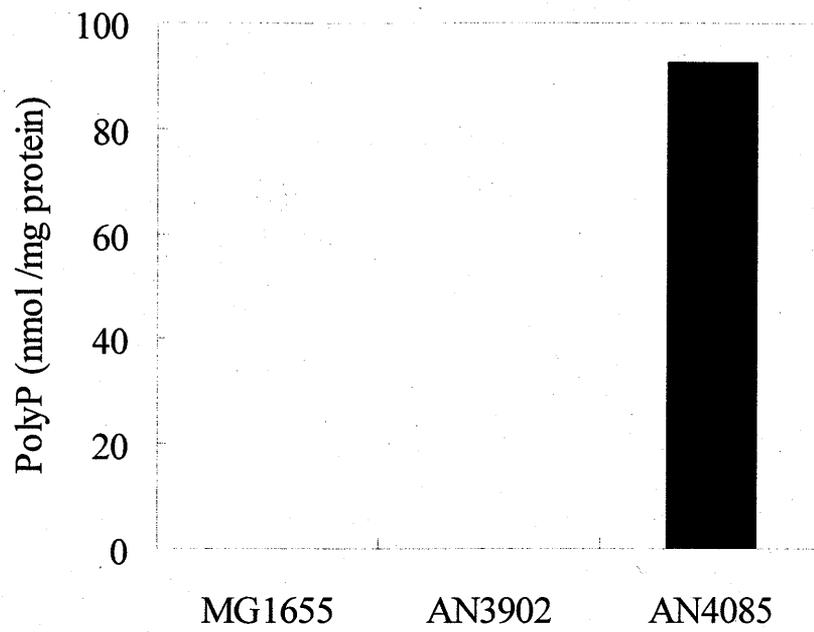


Fig. 4-1 大腸菌MG1655、AN3902 (*pitA*, Δ *pitB*, Δ *pstC*)、AN4085 (*pitA*, Δ *pitB*, Δ *pstC*, Δ *phoBR*) によるポリリン酸蓄積量の測定。

で発現量が高い遺伝子の探索を行った。

1-2-1 Total RNA の抽出

AN3902 と AN4085 は 2×YT 培地で 37°C、一晩前培養し、新しい 4 ml の 2×YT 培地に 1% 植菌し、37°C で 4 時間本培養を行った。500 μl の培養液と 1 ml の RNA プロテクトバクテリアリジェント (キアゲン) を混合し、5 秒間ボルテックスにて混合した後、室温で 5 分間保温した。遠心分離 (5,000 g×10 min) して上清を除去し、ペレットを 1 mg/ml のリゾチームを含んだ 100 μl の TE 緩衝液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) に再懸濁し、室温で 5 分間保温した。サンプルは RNeasy Mini Kit (キアゲン) を使用して全 RNA を抽出した。

1-2-2 cDNA の合成とラベリング

cDNA の合成とラベリングは、CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit (アマシャム) を使用して行った。テンプレートとして使用する AN3902 と AN4085 の全 RNA は 2 μg に揃え、ラベリングには Cy3-dUTP と Cy5-dUTP (アマシャム) を使用した。cDNA 合成反応はキット付属のプロトコールに従い、反応終了後、40 μl のラベリング反応液に 4 μl の 2.5 N NaOH を加え、37°C で 15 分間インキュベートして mRNA を分解した後、20 μl の 2 M HEPES を加えて中和した。cDNA は AutoSeq G-50 (アマシャム) を使用して精製した。

1-2-3 ハイブリダイゼーション

AN3902 と AN4085 のラベルした cDNA を、それぞれ 32 μl ずつ混合し、滅菌水を加えて 100 μl にメスアップした。100 μl のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加えて 10 秒間ボルテックスにて混合し、遠心分離 (15,000 rpm×1 min) して水層を別チューブに移した。1/10 量の 3 M CH₃COO·Na と 2.5 倍量の 99.5% エタノールを加えて室温で 10 分間静置し、遠心分離 (15,000 rpm×10 min) して上清を除き、70% エタノールで洗浄を行った。上清は完全に除き、沈殿を 30 μl のハイブリダイゼーション緩衝液 (6×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhardt's solution, 0.1 mg/ml サケ精子 DNA) に懸濁し、95°C で 2 分間加熱して変性させた。室温になるまで静置した後、遠心分離 (15,000 rpm×10 min) して不純物を除去した。IntelliGene *E. coli*CHIP Ver. 1.0 (タカラバイオ) に Spaced Cover Glass L (タカラバイオ) をかぶせ、チップとカバーとの隙間にプローブ溶液を 25 μl 程度展開さ

せた。チップは Hybridization Chamber (タカラバイオ) にセットし、65°Cの恒温水槽内で12~15時間ハイブリダイゼーションを行った。

1-2-4 洗浄とスキャニング

ハイブリダイゼーションさせたチップは、洗浄液 (2×SSC, 0.2% SDS) 内で、55°Cで振とうさせながら洗浄を5分間×2回行い、65°Cで再度洗浄した。チップは0.05×SSCで泡がなくなるまですぎ、低速遠心 (1,000 rpm×2 min) を行って表面上の水分を飛ばした。チップは Typhoon 9210 (アマシャム) でスキャニングを行い、データの解析は ArrayVision (イメージングリサーチ) を使用して行った。

1-3 AN3902 と AN4085 で発現量が異なる遺伝子の解析

AN4085 で特異的に発現量が増加している遺伝子を、ArrayVision による解析結果から探索した。発現量の差が5倍以上多い遺伝子をリストアップした。リストアップした遺伝子の機能および発現量の差を TABLE 4-2 に示す。この中で、内膜貫通型のトランスポーターと考えられる遺伝子は *xasA* と *ydhC* であるが、約20倍と高発現である *xasA* をターゲット遺伝子として絞り込んだ。Gene Chip 上の *xasA* の発現イメージを Fig. 4-2 に示す。*xasA* は511アミノ酸残基から構成されるグルタミン酸依存性酸耐性因子であると考えられている (10)。SWISS-PLOT による解析結果から、内膜貫通構造を持ち、グルタミン酸のアンチポーターとして機能している可能性が考えられている。高等生物の神経細胞では、リン酸トランスポーターがグルタミン酸トランスポーターとしても働く例が存在している (9)。そのため、*xasA* がリン酸トランスポーターとして働く可能性について解析を行った。

第2節 *xasA* 遺伝子の機能解析

2-1 *xasA* 遺伝子のクローニング

xasA 遺伝子は、大腸菌のゲノム情報データベースからプライマーを設計し、PCRによって増幅させることでクローニングした。PCRに用いるプライマーには、データベースに登録されている大腸菌の *xasA* の配列を基に、*EcoRI* サイトを付加した XA1 (5'-GAGAATTCCTGGCATTAGCAAC

TABLE 4-2 AN4085で特異的に高発現が見られる遺伝子リスト

Gene	Function	Intensity (AN4085)	Intensity (AN3902)
<i>slp</i>	outer membrane protein	25.98	0.50
<i>hdeD</i>	hypothetical protein	24.32	0.75
<i>xasA</i>	acid sensitivity protein, putative transporter	18.48	0.90
<i>hdeA</i>	hypothetical protein	15.68	0.01
<i>gadA</i>	glutamate decarboxylase isozyme	13.27	0.18
<i>uspA</i>	universal stress protein	12.82	0.95
<i>yfiD</i>	putative formate acetyltransferase	11.48	1.20
<i>hdeB</i>	hypothetical protein	10.27	0.08
<i>yhiE</i>	hypothetical protein	9.22	0.01
<i>pyrI</i>	aspartate carbamoyltransferase	8.70	0.01
<i>ansB</i>	periplasmic L-asparaginase II	7.72	0.88
<i>carA</i>	carbamoyl-phosphate synthetase	6.48	0.59
<i>yiaF</i>	hypothetical protein	5.62	0.76
<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	5.28	0.52
<i>tag</i>	3-methyl-adenine DNA glycosylase I	5.22	0.76
<i>yjgF</i>	hypothetical protein	5.46	1.22
<i>dnaK</i>	chaperone Hsp70	4.52	0.53
<i>ydhC</i>	putative transport protein	5.01	1.11
<i>tsf</i>	protein chain elongation factor EF-Ts	4.86	0.98

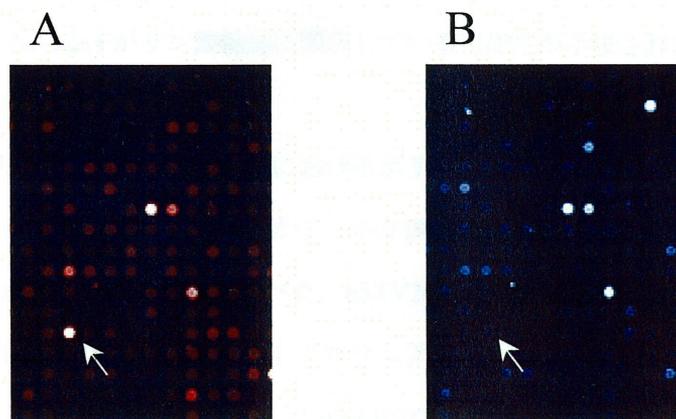


Fig. 4-2 (A) AN4085および(B) AN3902から調製したcDNAを用いたGene Chip解析による遺伝子発現イメージ。*xasA*の位置を矢印で示した。

GGAA-3') と、*Hind*III サイトを付加した XA2 (5'-GAAAGCTTCCCTTGTCTTATAACCAT-3') を設計した。PCR 反応サイクルは第二章と同様に用い、約 1.7 kb の増幅断片を得た。DNA 断片は *Eco*RI と *Hind*III で消化し、同じく *Eco*RI と *Hind*III で消化した pSTV28 ベクターに連結させた。このプラスミドを pExal とした。

2-2 *xasA* によるリン酸取り込み速度の測定

xasA の発現を誘導すると、リン酸取り込み速度にどのような影響が表れるかを検証するために、MG1655 に pExal を形質転換した。コントロール株として、MG1655 に pSTV28 ベクターのみを形質転換した株も作製した。両菌株は 1 mM IPTG と 25 µg/ml クロラムフェニコールを含んだ 4 ml の 2×YT 培地で 37°C、一晩前培養した。前培養液は新しい 1 mM IPTG と 25 µg/ml クロラムフェニコールを含んだ 4 ml の 2×YT 培地に 40 µl ずつ接種し、37°C で 2 時間培養した。3 ml の培養液を遠心分離 (15,000 rpm×10 min) し、沈殿を HEPES 緩衝液 (10 mM HEPES-KOH, pH 7.0) で 2 回洗浄し、最終的に 1 ml の HEPES 緩衝液に再懸濁した。サンプルはリン酸取り込み速度測定時まで氷上に置き、測定前に 37°C で 3 分間保温した。サンプルに ³²P-P_i でラベルした K₂HPO₄ を最終濃度 20 µM になるように加え、0, 60, 90, 120, 180, 240 秒後にリン酸取り込み量を測定した。測定方法は第二章 2-2 と同様の方法で行った。測定結果を Fig. 4-3 に示す。ベクターのみの株ではほとんどリン酸取り込みが見られなかったが、pExal を持つ株では急速なリン酸取り込みが見られた。この結果から、*xasA* がリン酸輸送に関係している可能性が示唆された。

2-3 *xasA* 発現誘導株のアミノ酸飢餓におけるポリリン酸蓄積量の解析

xasA がポリリン酸蓄積に関係しているかどうかを調べるために、*xasA* 発現誘導株をアミノ酸飢餓に晒した場合のポリリン酸蓄積量を調べた。pSTV28 を MG1655 に形質転換した株と、pExal を形質転換株は、1 mM IPTG と 25 µg/ml クロラムフェニコールを含んだ 4 ml の 2×YT 培地で 37°C、一晩前培養した。前培養液は新しい 1 mM IPTG と 25 µg/ml クロラムフェニコールを含んだ 30 ml の 2×YT 培地に 40 µl ずつ接種し、37°C で 2 時間培養した。培養液は室温で遠心分離し、菌体ペレットを 2 mM の K₂HPO₄ を含む MOPS-glucose 培地で洗浄し、30 ml の MOPS-glucose 培地に再懸濁した。菌懸濁液は 37°C で振とう培養を行い、30 分毎に 1 ml をサンプリングした。サンプルは遠心分離して上清を除き、菌体内ポリリン酸蓄積量の測定を行った。ポリリン酸抽出お

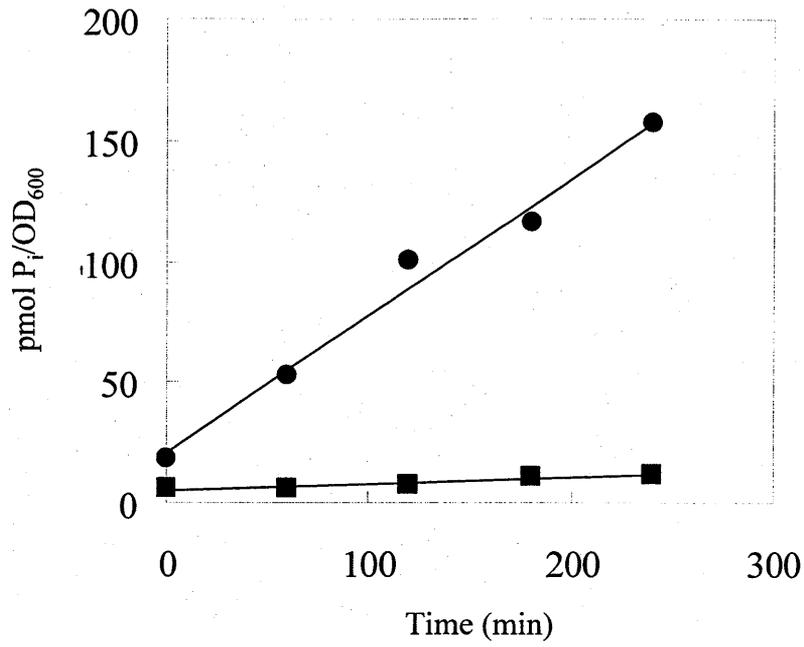


Fig. 4-3 大腸菌MG1655にpExa1を形質転換した株 (●) とベクターpSTV28を形質転換した株 (■) によるリン酸取り込み測定。

よびポリリン酸濃度測定は第二章 1-2-2 で記述した方法で行った。菌体内ポリリン酸濃度の変化は Fig. 4-4 に示す。ポリリン酸蓄積量は全体的に *xasA* 発現誘導株の方が高く、最大で3倍以上のポリリン酸蓄積量を示していた。

第3節 考察

本章では、リン酸トランスポーターの多重変異株である AN4085 が通常増殖時に菌体内に大量のポリリン酸を蓄積していることを見いだした。Gene Chip による解析結果から、AN4085 で特異的に発現が活性化する遺伝子が数十種類確認された。それらの中から、内膜貫通構造を持つトランスポーター様遺伝子は10数種類存在していたが、そのほとんどが他の菌株の多剤耐性エフラックスポンプと相同性があり、リン酸トランスポーターとして機能している可能性は低いと考えられた。中でも20倍以上の高発現を示した *xasA* 遺伝子は、グルタミン酸トランスポーターとして機能していると報告されているが、はっきりとした根拠は示されていない。高等生物ではリン酸とグルタミン酸の両トランスポーターとして働く遺伝子が存在していることが示されているが、*xasA* も同様の性質を持つことは非常に興味深いことである。

AN4085 は *pitA*, *pitB*, *pstC* の三重変異株である AN3902 の *phoBR* 遺伝子を破壊して作製した株である。*phoBR* はリン酸レギュロンを制御する遺伝子であり、*phoR* はリン酸センサーとして働き、*phoB* は *phoR* によりリン酸化され、*pho box* プロモーターの活性化を引き起こすと考えられているが、詳しい機能に関してはよくわかっていない (38)。*phoBR* を破壊するとリン酸レギュロンによる発現が消失する。しかし *pitB* に関しては *phoBR* を破壊すると発現が活性化すると報告されている (8)。今回報告した *xasA* も AN4085 で特異的に高発現を示していたことから、*pitB* と同様に *phoBR* により発現が抑制されている可能性が考えられる。しかし *pitB* が *phoBR* により発現が抑制されていると言う報告は、*pitA* のミスセンス変異株である K10 をベースとした解析に基づいている。K10 は本来 *pitA* の変異を目的として取られた変異株ではないため、遺伝的バックグラウンドに関して不明な点が多い (38)。そのため、*pitB* が *phoBR* の破壊のみで活性化されているとは直ちに考えにくく、K10 に存在する別の変異が大きく影響していることも考えられる。実際に、MG1655 と MG1655 の *phoBR* 破壊株の発現パターンを Gene Chip で解析したところ、*pitB*, *xasA* を含めて大きな発現パターンの変化は見られなかった。そのため、*xasA* および *pitB* が *phoBR* により抑制を

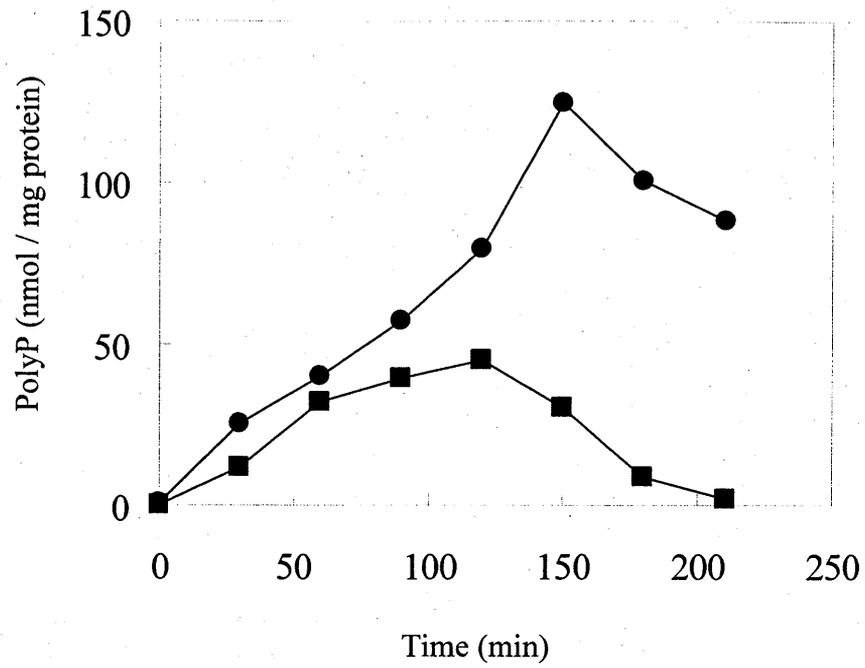


Fig. 4-4 大腸菌MG1655にpExa1を形質転換した株 (●) とベクターpSTV28を形質転換した株 (■) によるアミノ酸飢餓におけるポリリン酸蓄積量の測定。

受けているかに関しては、明確な証拠を得られていないのが現状である。

xasA はこれまでグルタミン酸のアンチポーター（あるいはトランスポーター）と考えられてきたが、今回の解析により、*xasA* を発現誘導させるとリン酸取り込み活性が上昇することが確認された。また、リン酸取り込み速度の測定の際に、1 mM のグルタミン酸を同時に添加したが、リン酸取り込みの阻害や促進は観察されなかった。このことから、*xasA* はグルタミン酸の輸送には関係ないか、独立して作用していると考えられる。*xasA* を発現誘導させると、アミノ酸飢餓によるポリリン酸蓄積量が増加したが、これも通常よりもリン酸取り込み活性が高いことを示していると考えられる。今後は、*xasA* が実際にリン酸トランスポーターとして機能しているかどうかを検証するため、*xasA* の破壊株を作製して解析する必要があると考えている。

第五章

迅速なポリリン酸高蓄積変異株の スクリーニング法の開発とその応用

TABLE 5-1 第五章における使用菌株

Strain	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
MG1655	Wild-type strain	(30)
MT29	MG1655 derivative, <i>phoU</i> mutant	This Study
<i>Pseudomonas putida</i>		
MY11	Strain isolated from soil	This Study
MY11-41	MY11 derivative, polyP-accumulating mutant	This Study
<i>Acinetobacter</i> sp.		
K3	Strain isolated from activated sludge	This Study
K3-6	K3 derivative, polyP-accumulating mutant	This Study
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
MY17	Strain isolated from soil	This Study
MY17-20	MY17 derivative, polyP-accumulating mutant	This Study

序論

現在、排水中のリンは活性汚泥などを用いた生物脱リン法により除去が行われている。活性汚泥中に存在する微生物の中には、多くのポリリン酸蓄積バクテリアが存在し、これらのポリリン酸蓄積バクテリアがリンの除去に大きく貢献していることがわかってきた (5)。現在の活性汚泥によるリン除去効率を改善しようと考えた場合、これらポリリン酸蓄積バクテリアのポリリン酸蓄積能を向上させる必要がある。大腸菌をモデルとしたポリリン酸高蓄積株の構築およびリン酸除去効率の改善はこれまでに行われてきた (14, 24)。しかし、大腸菌は炭素源として主に有機酸を含む排水では増殖が悪く、生物脱リン法に用いる対象菌株としては使用しづらい。活性汚泥や土壤中に生息するバクテリアは排水中でも良好な増殖を示すが、ゲノムレベルでの情報に乏しく、遺伝的改変を加えるのが困難なのが現状である。本章では、多様な微生物に対し、迅速かつ簡便にポリリン酸高蓄積変異株をスクリーニングする手法の開発を行い、取得した株が人工排水中のリン酸の除去に非常に有用であることを示す。

第1節 X-リン酸法によるポリリン酸高蓄積株スクリーニング法の検討

第二章において、大腸菌では *phoU* 遺伝子に変異が起こり、細胞内に大量のポリリン酸を蓄積している変異株は、アルカリホスファターゼ活性が構成的になっていることを示した。大腸菌の *phoU* 変異株は、リン酸が十分存在しても、X-リン酸を添加した寒天固形培地上で青色のコロニーを形成するため、変異ライブラリーの中から簡単に単離できる。本スクリーニング法を X-リン酸法と名付け、多様な菌株に対してポリリン酸高蓄積変異株のスクリーニングに応用できるかどうかの検証を行った。

1-1 活性汚泥および土壤に生息するバクテリアのスクリーニング

X-リン酸法によるポリリン酸高蓄積株の単離の対象となる菌株のスクリーニングを行った。土壤サンプルは約 10 ml のイオン交換水に懸濁し、数時間静置して上清を使用した。上清は $10 \sim 10^7$ 倍程度の希釈系列を作り、YG 培地に 2% の寒天を加えた固形培地に塗布した。YG 培地の組成は TABLE 5-2 に示した。活性汚泥サンプルは超音波処理を 3 分間行って凝集体を分解し、 $10 \sim 10^7$

倍程度の希釈系列を作り、人工排水 (21) に 1.5%の寒天を加えた固形培地に塗布した。人工排水の組成は TABLE 5-3 に示した。各培地は 28°C で 2 日間保温した後、土壌サンプルから 18 株、活性汚泥から 16 株の合計 34 株を単離した。

1-2 アルカリホスファターゼ活性を指標としたプレートアッセイ

X-リン酸法によるスクリーニングが可能となるためには、リン酸十分条件でアルカリホスファターゼ活性が抑制されており、リン酸欠乏条件でアルカリホスファターゼ活性が誘導されなければならない。リン酸十分条件として 2 mM のリン酸を含む MOPS-gulcose 培地に、1.5%の精製寒天末と 50 µg/ml の X-リン酸を加えた固形培地を使用した。リン酸欠乏条件としてリン酸を含まない MOPS-gulcose 培地に、1.5%の精製寒天末と 50 µg/ml の X-リン酸を加えた固形培地を使用した。固形培地試験の結果、土壌から単離したバクテリアでは 18 株中 5 株がリン酸欠乏条件でのみ青色のコロニーを形成した。10 株はリン酸十分条件でも青色のコロニーを形成し、残りの 3 株はグルコース最少培地では生育できなかった。活性汚泥から単離したバクテリアでは 16 株中 8 株がリン酸欠乏条件でのみ青色のコロニーを形成した。5 株はリン酸十分条件でも青色コロニーを形成し、残りの 3 株はグルコース最小培地では生育できなかった。

第2節 土壌バクテリアに対するポリリン酸高蓄積株の構築と応用

2-1 菌株の同定

前節で土壌から分離した菌株の中から、MY11 株についてポリリン酸高蓄積変異株の構築を行った。MY11 の菌種の同定は、染色体上の 16S rRNA をコードする塩基配列をデータベース上で比較することで行った。MY11 は 4 ml の YG 培地で 28°C、一晩振とう培養を行った。培養液は遠心分離 (15,000 rpm×5 min) して菌体ペレットを取得し、染色体の抽出を行った。この染色体を鋳型とし、PCR により 16S rRNA をコードする部分の増幅を行った。プライマーには 63f(5'-CAGG CCTAACACATGCAAGTC-3') と 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') を使用した (12)。DNA ポリメラーゼおよび反応条件などは第二章 2-1-5 と同様の条件で行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離し、約 1.3 kb の DNA 断片を Gene Clean Kit II により抽出した。断片の塩基配列の決定は第二章 2-1-4 と同様の方法・機器を用いて行った。決定された 606 bp

TABLE 5-2 YG培地の組成

酵母エキストラクト	1.0 g
D-グルコース	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
H ₂ Oで1.0 lに調製	

TABLE 5-3 人工排水の組成

CH ₃ COONa · H ₂ O	0.68 g
ペプトン	0.1 g
酵母エキストラクト	0.01 g
NaCl	0.05 g
K ₂ HPO ₄	0.0225 g
NaHCO ₃	0.075 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075 g
CaCl ₂	0.025 g
H ₂ Oで1.0 lに調製	

の塩基配列を、データベース上の様々なバクテリアの 16S rRNA 配列と比較した結果、*Pseudomonas putida* sp. の 16S rRNA と高い相同性があることがわかった (Accession No. AJ271219)。これらの結果から、本菌株を *Pseudomonas putida* MY11 と命名した。

2-2 *Pseudomonas putida* MY11 変異株ライブラリーの作製

MY11 染色体上にランダムな変異を起こすために、MY11 に NTG 処理を行った。MY11 を YG 培地で 28°C、一晩前培養し、新しい YG 培地に前培養液を 1% 植菌し、28°C で 2 時間本培養を行った。培養液は遠心分離 (4,000 rpm × 10 min) して上清を捨て、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄を行った。菌体はリン酸緩衝液で再懸濁し、リン酸緩衝液で 1g/l に調製した NTG を最終濃度 100 µg/ml になるように加え、28°C で 60 分間保温した。菌懸濁液は遠心分離し、リン酸緩衝液で 2 度洗浄を行い、YG 培地に再懸濁して 28°C で 2 時間保温した。

2-3 MY11 のポリリン酸高蓄積株の単離

MY11 変異株ライブラリーの中から、X-リン酸法を用いてポリリン酸高蓄積株の単離を行った。MY11 変異株ライブラリーを適宜希釈し、0.2 mM の K₂HPO₄ を含む MOPS-glucose 培地に、50 mg/l の X-リン酸添加した寒天固形培地に塗布し、28°C で 2 日間保温した。約 1000 個に 1 個の割合で青色を呈するコロニーが出現し、最終的に 43 個の青色コロニーを取得する事ができた。これらの変異株は、4 ml の YG 培地で 28°C、一晩培養し、遠心分離 (15,000 rpm × 5 min) して菌体を集菌した。菌体のポリリン酸蓄積量は第二章 1-2-2 で記述した方法で測定した。

43 個の変異株すべての細胞内ポリリン酸濃度を測定した結果、その半数以上が MY11 親株に比べて高いポリリン酸蓄積量を示していた。その中でも最も高いポリリン酸蓄積量を示していた株を MY11-41 と名付けた。MY11 と MY11-41 のポリリン酸蓄積量を Fig. 5-1 に示す。親株の MY11 は通常でも大腸菌に比べて非常に高い濃度で (500 nmol polyP/mg protein) ポリリン酸を蓄積しているが、MY11-41 はその約 15 倍ものポリリン酸 (7500 nmol polyP/mg protein) を常に蓄積している事がわかった。MY11 と MY11-41 を DAPI により染色し、蛍光顕微鏡 (BX-40, オリンパス) を用いて UV 存在下で観察したところ、MY11-41 でのみ、菌体内にポリリン酸の顆粒と思われる黄色い蛍光が観察された (Fig. 5-2)。

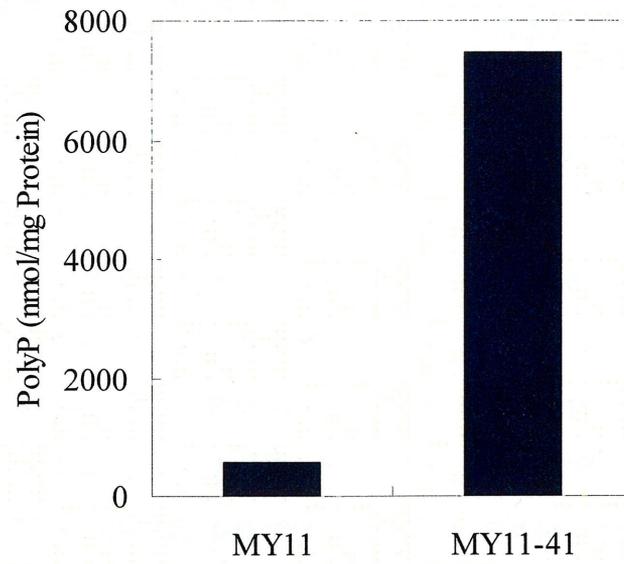


Fig. 5-1 *Pseudomonas putida* MY11およびMY11-41のポリリン酸蓄積量。

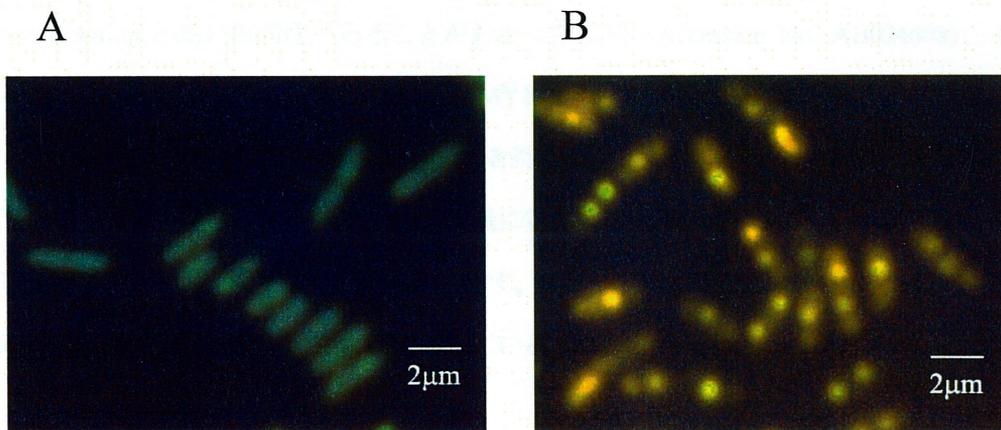


Fig. 5-2 DAPI染色後、紫外線照射下で検出された (A) *P. putida* MY11と (B) MY11-41の菌体内ポリリン酸顆粒。

2-3 MY11 および MY11-41 による人工排水からのリン酸の除去

X-リン酸法により単離した変異株を用いた応用例として、*P. putida* MY11, MY11-41 と大腸菌 MG1655, MT29 (*phoU* mutant) による人工排水からのリン酸除去を調べた。菌株は 2×YT 培地で 28°C、一晩前培養した。人工排水は最終リン酸濃度が 300 μM になるように K₂HPO₄ を加えて調製した。100 ml の人工排水に各菌株の前培養液を 1 ml 添加し、28°C で振とう培養を行った。培養液は 2 時間毎にサンプリングし、遠心分離 (15,000 rpm×5 min) して上清を取得し、第三章 3-3 と同様の方法でリン酸濃度の測定を行った。菌体濃度は波長 600 nm の吸光度を測定することで調べた。上清のリン酸濃度の変化と菌体の増殖曲線を Fig. 5-3 に示す。人工排水中では大腸菌および *phoU* 変異株の増殖は非常に悪かった。しかし、MY11 や MY11-41 では良好な増殖が観察された。また、大腸菌および *phoU* 変異株はほとんど人工排水中のリン酸を吸収しなかったが、MY11 親株では大腸菌の 2 倍、MY11-41 ではさらに MY11 の 4 倍の速度でリン酸を吸収し、約 6 時間後には人工排水中のリン酸をほぼすべて吸収していた。

2-4 *Ralstonia solanacearum* sp. MY17 に対するポリリン酸高蓄積株の構築

土壌細菌に関しては、さらに別の株に対してもポリリン酸高蓄積株の構築を行った。土壌から分離した MY17 株に対して MY11 と同様の方法で菌株の同定を行ったところ、*Ralstonia solanacearum* sp. と高い相同性があることがわかったため (Accession No. AB024608)、本菌株を *Ralstonia solanacearum* sp. MY17 と命名した。MY17 についても MY11 と同様に X-リン酸法によるポリリン酸高蓄積変異株株のスクリーニングを行ったところ、47 個の青コロニーを取得することができた。その中でも最もポリリン酸を多量に蓄積した株を MY17-20 と命名した。MY17 と MY17-20 のポリリン酸蓄積量を Fig. 5-4 に示す。MY17-20 は MY17 の 20 倍以上ものポリリン酸 (6600 nmol polyP/mg protein) を常に蓄積していることがわかった。

第 3 節 活性汚泥内細菌に対するポリリン酸高蓄積株の構築と応用

3-1 菌株の同定

第 1 節で活性汚泥から分離した菌株の中から、K3 株についてポリリン酸高蓄積変異株の構築を行った。K3 は 4 ml の 2×YT 培地で 28°C、一晩前培養を行い、培養液は遠心分離 (15,000 rpm×

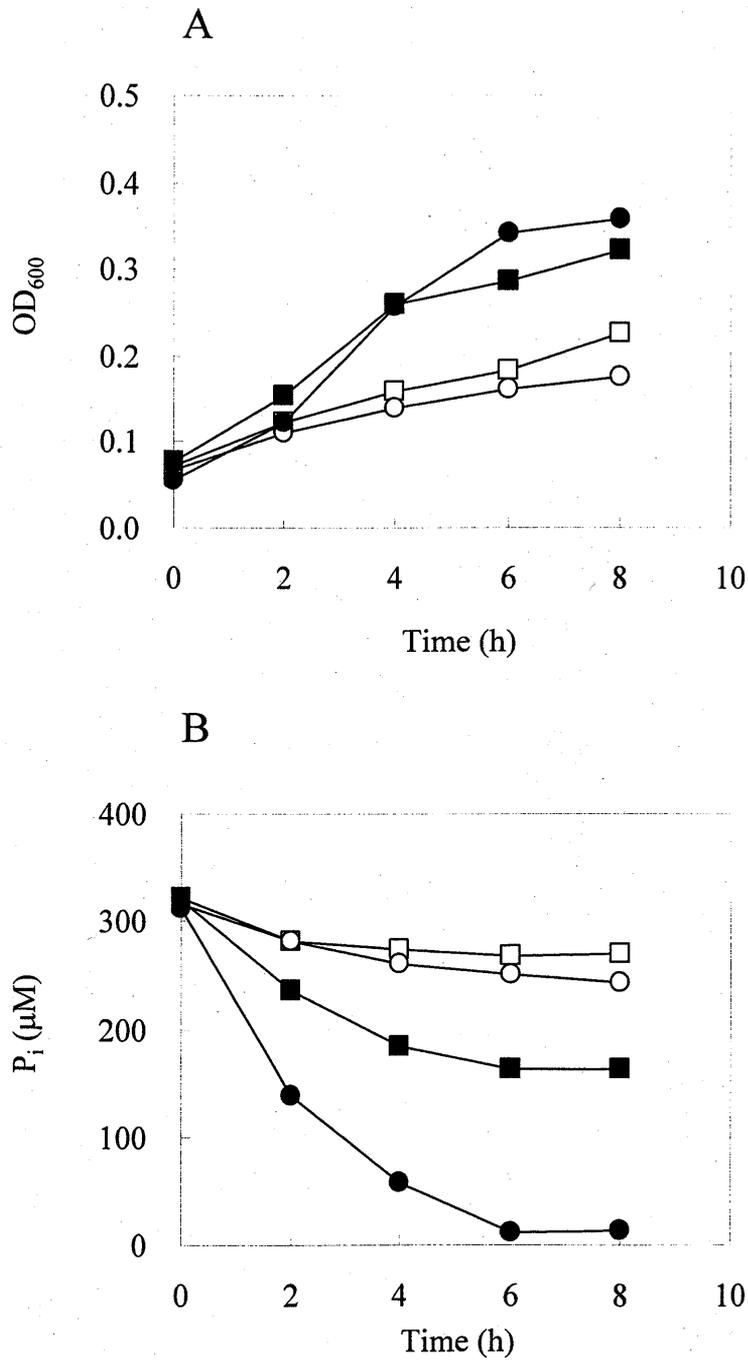


Fig. 5-3 大腸菌MG1655 (□)、大腸菌MT29 (○)、*P. putida* MY11 (■)、*P. putida* MY11-41 (●) を用いた人工排水での増殖 (A) およびリン酸除去 (B) の測定。

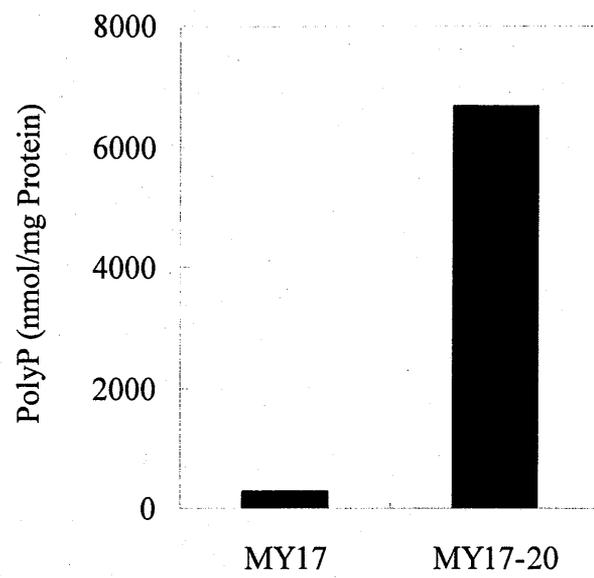


Fig. 5-4 *Ralstonia solanacearum* MY17およびMY17-20のポリリン酸蓄積量。

5 min) して菌体ペレットを取得し、染色体の抽出を行った。16S rRNA の塩基配列の決定およびデータベースによる比較は、本章 2-1 と同様の方法で行った。K3 から決定した 16S rRNA 断片の 213 bp の塩基配列の相同性を検索した結果、*Acinetobacter* sp. の 16S rRNA と高い相同性があることがわかったため (Accession No. AF467299)、本菌株を *Acinetobacter* sp. K3 と命名した。

3-2 K3 のポリリン酸高蓄積株の単離

K3 は 2×YT 培地で一晩前培養し、100 ml の新しい 2×YT 培地に 1% 植菌して 28°C、6 時間本培養を行った。以下、本章 2-2 と同様の方法で NTG 処理を行った。作製した変異株ライブラリーは適度に希釈し、50 µg/ml の X-リン酸と 0.5 mM の K₂HPO₄ を含む MOPS-glucose 寒天固形培地に塗布した。その結果、変異株ライブラリーの中から 23 個の青色コロニーを取得することができた。K3 で最もポリリン酸を蓄積した株を K3-6 と命名した。K3 および K3-6 のポリリン酸蓄積量を Fig. 5-5 に示す。K3-6 は K3 に比べて約 60 倍ものポリリン酸蓄積量を示していた。K3 と K3-6 を DAPI 染色により蛍光顕微鏡観察を行ったところ、K3-6 の菌体内からはポリリン酸と思われる黄色い蛍光が観察され、菌体は細長く変形していた (Fig. 5-6)。

3-3 K3 および K3-6 による人工排水からのリン酸の除去

MY11 と同様に、K3 と K3-6 においても人工排水からのリン酸除去を調べた。菌株は 2×YT 培地で 28°C、一晩前培養した。人工排水は最終リン酸濃度が 300 µM になるように K₂HPO₄ を加えて調製した。100 ml の人工排水に各菌株の前培養液を 1 ml 添加し、28°C で振とう培養を行った。培養液は 4 時間毎にサンプリングし、2-3 と同様の方法で上清のリン酸濃度と菌体濃度の測定を行った。上清のリン酸濃度の変化と菌体の増殖曲線を Fig. 5-7 に示す。K3、K3-6 ともに人工排水中で良好な増殖を示していた。さらに K3-6 は親株 K3 の約 3 倍の速度で培地中からリン酸を除去できることがわかった。

第 4 章 考察

本章では、X-リン酸法を用いることで、土壌や活性汚泥に生息するバクテリアから簡単かつ迅速にポリリン酸高蓄積変異株を単離できることを示した。本章で X-リン酸法によりポリリン酸を

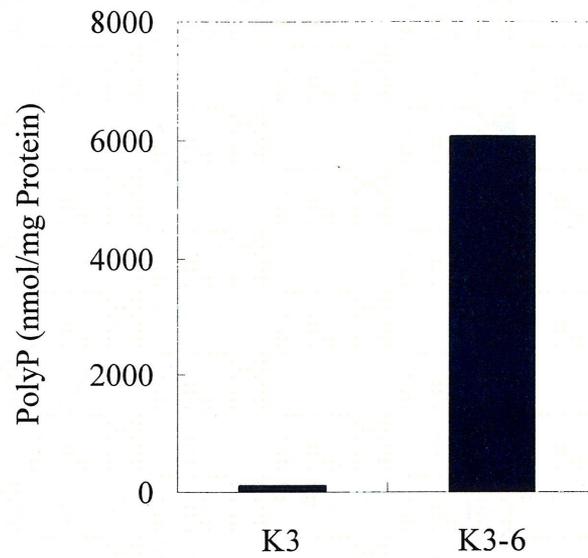


Fig. 5-5 *Acinetobacter* sp. K3およびK3-6のポリリン酸蓄積量の測定。

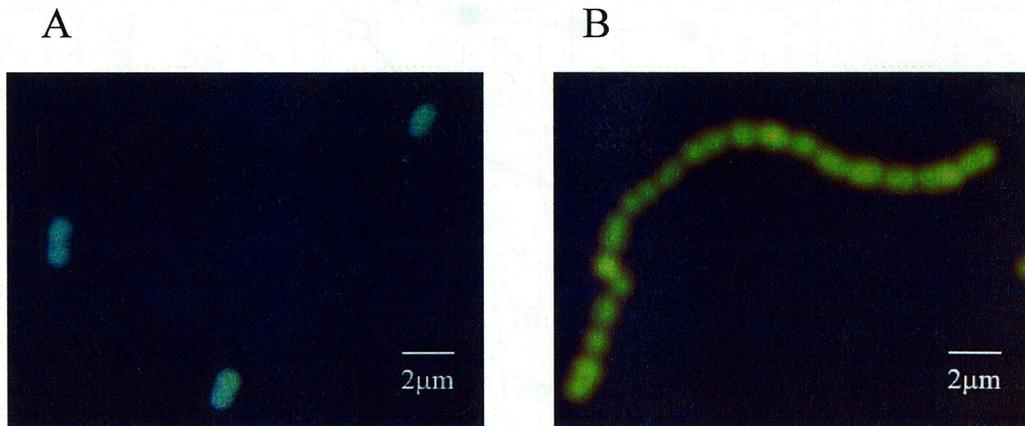


Fig. 5-6 DAPI染色後、紫外線照射下で検出した (A) *Acinetobacter* sp. K3と (B) K3-6。K3-6はポリリン酸の黄色い蛍光と共に変形した菌体が観察された。

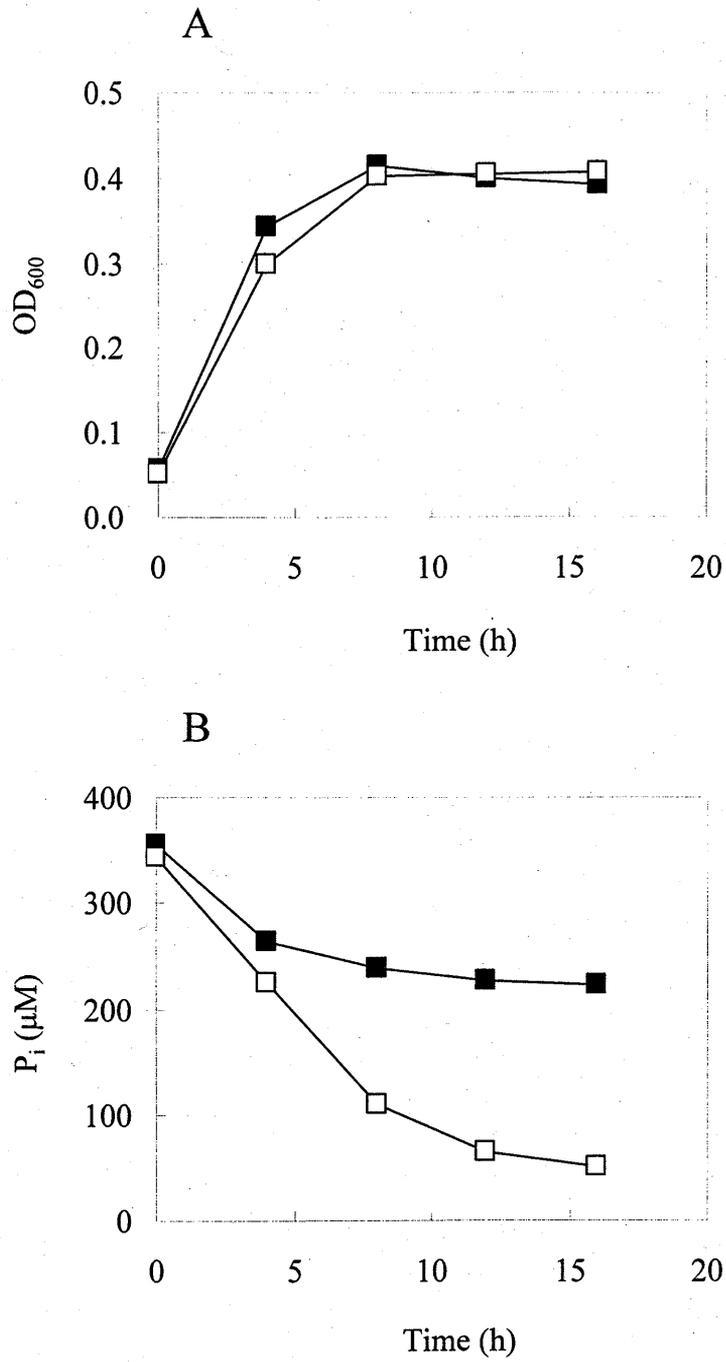


Fig. 5-7 *Acinetobacter* sp. K3 (■)、*Acinetobacter* sp. K3-6 (□) を用いた人工排水での増殖 (A) およびリン酸除去 (B) の測定。

構築した株は、*P. putida*、*Acinetobacter* sp.、*R. solanacearum* の3種類のみであるが、これ以外にも、*K. aerogenes*、*K. pneumoniae* などでも、青色コロニーの取得に成功している。X-リン酸法が適用できる菌株は、リン酸欠乏条件でアルカリホスファターゼ活性が活性化されなければならないが、今回、土壌と活性汚泥から単離した34株のうち、約40%にあたる13株がこの条件を満たしていた。判別が不可能であった株に関しても、MOPS-glucose培地のリン源として、 K_2HPO_4 の代わりに酵母エキストラクトを用いることで青コロニーの判別が可能になる場合があることがわかった。今後、これらの点を踏まえてX-リン酸法を改良することで、より多くの菌株に対するスクリーニングが可能になるものと思われる。

大腸菌では*phoU*遺伝子を破壊することで、ポリリン酸高蓄積株を構築することが可能である。大腸菌だけでなく、全塩基配列が決定された*Synechocystis* sp. PCC6803では、データベース上の塩基配列データから*phoU*破壊株を作製し、ポリリン酸高蓄積株を作製することに成功している(25)。*phoU*遺伝子は数多くの生物種間で塩基配列が高く保存されている遺伝子であるが、その破壊株の作製には非常に時間がかかる。さらに土壌や活性汚泥から単離した菌株のほとんどは、*phoU*遺伝子の塩基配列が決定していない株であり、リン酸レギュロンが*phoU*とは異なった形で抑制を受けている可能性も考えられる。X-リン酸法には、このような遺伝的バックグラウンドが存在しないような菌株に対しても、迅速かつ簡便にポリリン酸高蓄積変異株をスクリーニングできるという優れた特徴がある。

大腸菌では*phoU*変異により過剰なポリリン酸が蓄積すると、増殖に悪影響を及ぼすことがわかっている。しかし、今回取得した3種類のポリリン酸高蓄積変異株はいずれも増殖に影響は表れなかった。土壌や活性汚泥に生息するバクテリアでは、ポリリン酸を安定に菌体内に蓄積できる機構が存在しているのかもしれない。以上のように、排水からのリン除去に適した菌株を選択し、X-リン酸法を用いてポリリン酸高蓄積株の育種を行うことで、現在の生物脱リンシステムのリン除去効率を向上させることができると期待される。

第六章

リン酸結合タンパク質 PstS 固定化カラムによる リン除去法の開発と応用

序論

リンはあらゆる生物にとって必須な元素である。閉鎖性水域などにリンが流出すると、富栄養化を引き起こし、赤潮などの環境汚染を引き起こす。活性汚泥法などの生物脱リン法や、凝集剤添加によるリンの除去方法は確立されているが、その限界濃度は1 mg/l 程度のものである。しかし、微生物が増殖するために必要なリンの濃度は2-3 $\mu\text{g/l}$ (0.1 μM) と極めて低いことが報告されているため (22)、より希薄なリンも除去できる技術が必要となる。

Pseudomonas aeruginosa PAO1 は、リン酸欠乏状態に晒されると、リン酸結合タンパク質 PstS を発現する。PstS は特異的にリン酸と結合し、リン酸特異的膜輸送チャンネル (PST) を通じてリン酸を菌体内に取り込む役割を果たしている。PstS は約 37 kDa のサイズのタンパク質であり、1分子に対して1分子のリン酸が結合する。精製した PstS の解離定数は0.34 μM と極めて低い (28)。PstS はヒ素、ピロリン酸、鎖長 15 程度のポリリン酸を過剰に存在させると、リン酸との結合が阻害されるが、グルコース 3-リン酸、グリセロール 3-リン酸などの有機性リン化合物は全く結合を阻害しない (28)。本章ではこの PstS タンパク質を固定化したカラムを作製し、リン酸除去能を調べるとともに、環境中の水からのリン酸の除去についても検討を行った。

第1節 *Pseudomonas aeruginosa* の PstS タンパク質の精製と解析1-1 *Pseudomonas aeruginosa* の PstS タンパク質の精製

Pseudomonas aeruginosa の PstS の精製方法は、文献 (28) を参考にして行った。*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株は 2×YT 培地で 37°C、一晩前培養を行った。前培養液は 3.5 l の T0 培地に 1% 植菌し、37°C で 5 時間培養した。T0 培地の組成は TABLE 6-1 に示す。培養液は遠心分離 (10,000 $\text{g} \times 10 \text{ min}$, 4°C) して集菌し、菌体ペレットは緩衝液 1 (30 mM Tris-HCl, pH 8.0) に懸濁し、遠心分離して上清を除いた後、30 ml の緩衝液 2 (50 mM Tris-HCl, 0.2 M MgCl_2 , pH 7.2) に懸濁した。菌体液は 30°C で 30 分間インキュベートし、氷中に移して 15 分間静置し、室温で 15 分間放置した。菌体液は遠心分離 (10,000 $\text{g} \times 10 \text{ min}$, 4°C) し、上清を別容器に移した。ペレットは再度緩衝液 2 に懸濁して同様の操作を繰り返し、合計 60 ml の上清 (ペリプラズム画分) を得た。ペリプラズム画分は分子量 30,000 カットのメンブランフィルター (アドバンテック) で限外ろ過を行い、

最終的に 10 ml まで濃縮した。濃縮液は緩衝液 3 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で透析を行った。透析後、HPLC (SMART, アマシャム) を使用して精製を行った。陰イオン交換カラムには MonoQ (アマシャム) を使用し、移動相には緩衝液 3 を使用した。PstS のフラクションは素通り画分から得た。各サンプルは SDS-PAGE で電気泳動してバンドを確認した。分子量マーカにはタンパク質分子量マーカ「第一」・III (第一化学薬品) を使用した。SDS-PAGE の結果を Fig. 6-1 に示す。最終的に HPLC で精製したフラクションには単一のバンドしか現れず、ほぼ純粋な PstS が精製できたものと思われる。

1-2 PstS タンパク質のリン酸結合活性の測定

精製した PstS タンパク質をカラムに固定化する前に、リン酸結合活性の測定を行った。 $^{32}\text{P-P}_i$ の放射活性が 1 mCi/ μmol になるように調製した 0.2 nmol K_2HPO_4 と 1 nmol の精製した PstS タンパク質を 200 μl の Tris Buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4) 内で混合し、23°C で 5 分間インキュベートした。サンプル 100 μl を孔径 0.2 μm のメンブランフィルター (アドバンテック) にアプライし、アスピレーターにより吸引ろ過し、メンブランを 600 μl の 10 mM LiCl で一回洗浄した。メンブランは乾燥させ、シンチレーションカウンターで放射活性をカウントした。残りの 100 μl のサンプルも測定し、リン酸結合割合を算出した。比較として、PstS の代わりに BSA でも同様の測定を行った。リン酸結合活性測定結果を Fig. 6-2 に示す。PstS は全 $^{32}\text{P-P}_i$ の 30% を吸着していることがわかった。比較対照の BSA はほとんどリン酸を吸着してなかったため、このリン酸の吸着は PstS に特異的なものであることがわかった。

第 2 節 *Pseudomonas aeruginosa* の PstS タンパク質固定化カラムの作製と評価

2-1 PstS タンパク質固定化カラムの作製

Pseudomonas aeruginosa の PstS タンパク質がリン酸と結合してトラップできることを第 1 節で示した。ここでは精製 PstS 固定化カラムを作製し、リン酸除去能に対する評価を行った。第 1 節で精製した PstS 溶液は緩衝液 4 (200 mM Na_2CO_3 , 0.15 M NaCl, pH 8.0) に対して透析を行った。その後、350 μl の固定化担体ゲル (NHS-activated セファロース, ファルマシア) に対して 3.1 nmol の PstS を混合して 4°C で一晩ゆっくり固定化した。比較として 2.5 nmol の BSA の固定化も同時

TABLE 6-1 T0培地の組成

Tris-HCl	10 g
L-グルコース	2 g
NaCl	2 g
NH ₄ Cl	1 g
KCl	100 mg
Na ₂ SO ₄	100 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 mg
MgCl · 6H ₂ O	10 mg
FeCl ₃	1 mg

H₂Oで1.0 lに調製(pH 7.6)

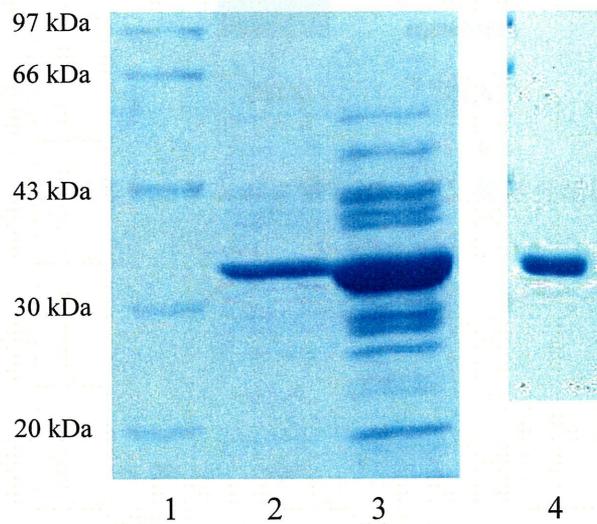


Fig. 6-1 SDS-PAGEによるPstSのバンドの確認。レーン1: 分子量マーカー, レーン2: PAO1のペリプラズム画分, レーン3: 限外ろ過を行ったペリプラズム画分, レーン4: MonoQカラムにより精製したPstS。

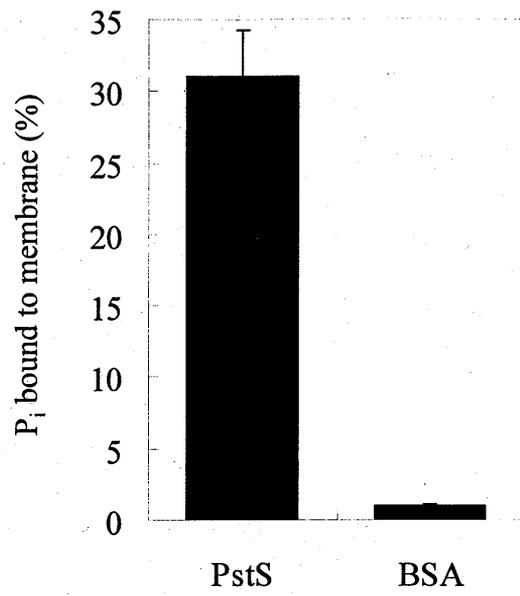


Fig. 6-2 精製PstSタンパク質とBSAリン酸結合活性の測定。

に行った。固定化の効率はどちらも 90%以上であった。未反応の担体の活性基をキャッピングするため、1 M Tris-HCl (pH7.4) を反応させた。PstS および BSA を固定化した担体は 5×70 mm のプラスチックカラムに充填した。

2-2 PstS タンパク質固定化カラムによるリン酸の吸着と溶離

固定化 PstS によるリン酸の除去を確認するために、 $^{32}\text{P-P}_i$ の放射活性が 1 mCi/ μmol になるように調製した 1 μM K_2HPO_4 を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) を調製し、PstS-セファロースカラムおよび BSA-セファロースカラムにそれぞれ 100 μl を注入した。カラムは 1 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で洗浄し、95 μl ずつのフラクションとして分取した。各フラクションはシンチレーションカウンターで放射活性を測定した。放射活性の変化のグラフを Fig.6-3A に示す。BSA-セファロースカラムはリン酸を吸着することができなかった。PstS-セファロースカラムはほぼすべてのリン酸を吸着し、各フラクションから放射活性を検出することができなかった。PstS-セファロースカラムに吸着したリン酸は、放射性ラベルをしていない 25 μM K_2HPO_4 を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で洗浄することで溶離させることができた。溶離後の各フラクションの放射活性のグラフを Fig. 6-3B に示す。さらにカラムの耐久性を調べるために、リン酸の除去を 4 回行った後に 1 mM の $^{32}\text{P-P}_i$ を 0.1 ml 流したところ、リン酸はすべて完全に除去できることがわかった。

2-3 PstS タンパク質固定化カラムの応用

PstS-Sepharose カラムを用いたリン酸除去の応用例として、実際の池の水を使用してリン酸を除去する実験を行った。広島大学内のため池の水に 0.5 μM K_2HPO_4 を加え、 $^{32}\text{P-P}_i$ の放射活性が 1 mCi/ μmol になるように調製した。250 μl の池の水を PstS-セファロースカラムに流し、1.5 mM の 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で洗浄し、95 μl ずつのフラクションとして分取し、シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。放射活性の変化のグラフを Fig.6-4 に示す。PstS-セファロースカラムを通すことで池の水に含まれるリン酸はほぼ完全に除去されていた。PstS に吸着したリン酸は pH 4.0 以上では解離しないが、それ以下では溶出することがわかっている。そこで、このカラムを 1.5 ml の 10 mM Tris-acetate (pH 3.0) で洗浄し、95 μl ずつのフラクションとして分取して放射活性を測定した。放射活性の変化は Fig.6-4 に示す。Tris-acetate で洗浄してすぐにリン酸の溶出が確認され、90%以上のリン酸をこの操作で溶出させることができた。

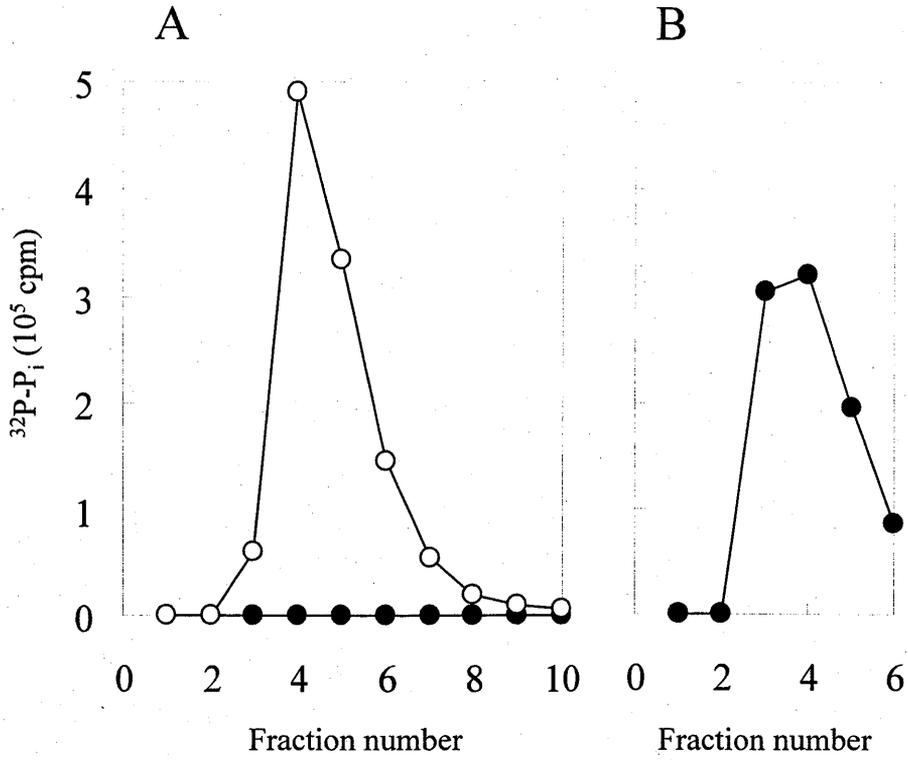


Fig. 6-3 (A) PstS (●) およびBSA (○) 固定化セファロースカラムによるリン酸の除去。
(B) PstS-セファロースカラムからのリン酸の溶出。

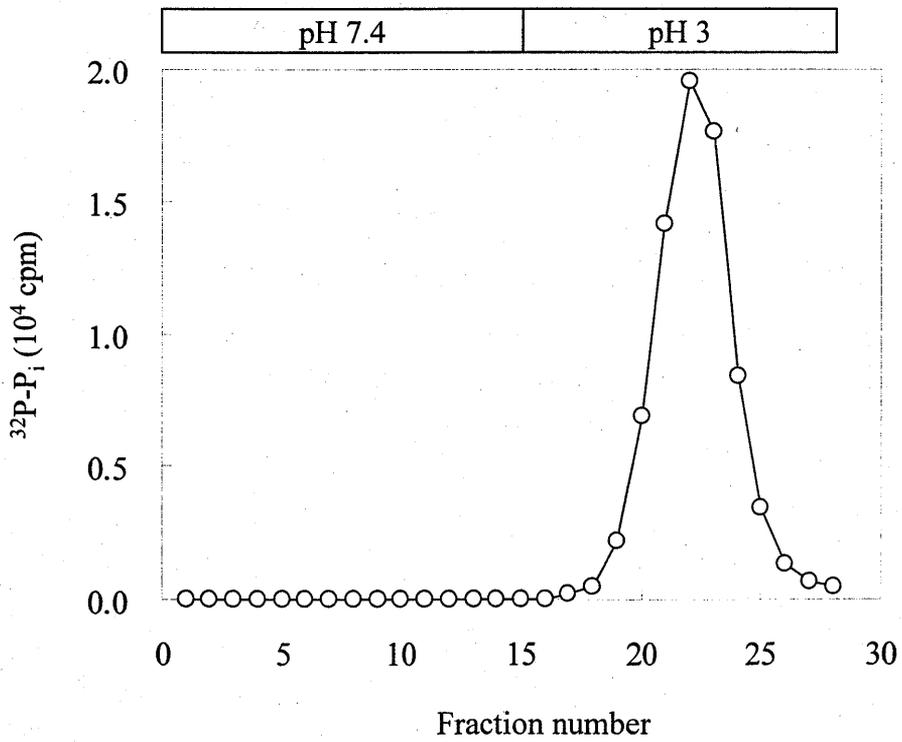


Fig. 6-4 PstS-セファロースカラムによる池の水からのリン酸の除去。

第3節 考察

本章では、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 由来の高いリン酸認識能を有する PstS タンパク質を利用して、希薄なリン酸を含む溶液からリン酸を除くことが可能であることを示した。従来のリン除去用の吸着剤と比較した場合、本システムで使用する PstS を用いることにより極めて低い濃度のリン酸に対しても適応できる点で優れているが、一方で、担体あたりのリンの吸着量が低いことも認められた。これは、1分子の PstS あたり 1分子のリン酸しか結合しないことが原因であろうと考えられる。また、PstS の分子量が約 37,000 であり、リン酸の分子量 (100) に比べて大きいことから、固定化した PstS に対するリン酸の割合が低くなってしまいうためでもある。また、カラムに固定化した PstS の何%がリン酸との結合に関与するのかを調べたところ、固定化した PstS のうち、モル数でわずか 5%しかこのカラムのリン酸除去に関与していないことがわかった。この原因として、PstS をカラムに固定化する際に、結合サイトを立体障害的にマスクしている可能性が考えられる。あるいは、固定化の際に PstS の三次構造を破壊してしまっているのかもしれない。いずれにせよ、活性型の PstS をより多く固定化できるような固定化担体の選択や、固定化条件の検討を行うことが、リン酸吸着量を高めるために必要であると考えられる。さらに別の問題点として、池の水の代わりに海水を使用した実験も同じく行ったが、Tris-acetate を流す前にリン酸が溶出してしまった。このことから、塩濃度が高い場合は PstS のリン酸結合が悪くなることがわかった。この現象を改善するためには、比較的高塩濃度でも高いリン酸吸着能を示すリン酸結合タンパク質を使用する必要があると考えられる。例として、海洋性のバクテリアから PstS タンパク質を精製して固定化すれば、海水からのリン酸の除去に効果的であるかもしれない。

以上より、今回開発した PstS 固定化カラムを利用したリン除去には、その特徴を活かすことができるような応用方法を考える必要がある。例えば、現在の上水処理では、微生物の生育を抑えるために、多量の塩素が投入されており、その塩素が有機物と結びついて発ガン性の物質ができることが報告されている。しかし、この PstS 固定化カラムを用いれば、微生物が生育することができるリン濃度 (約 100 nM 以下) を大幅に下回るような、希薄なリン濃度 (約 1 nM) にまでリンを取り除くことができる。このように、PstS 固定化カラムの特徴をうまく活用することができれば、塩素殺菌に代わる新しい上水処理のモデルとして発展する可能性があるのではないかと考えている。

第七章

総括

ポリリン酸は、バクテリアに代表される原核微生物から哺乳動物細胞などの高等生物に至るまで、数多くの生命体でその存在が確認されている。生体に対するポリリン酸の役割に関してはこれまでほとんど解明がなされていなかったため、その存在は「分子化石」と呼ばれてきた。一方でバクテリアのポリリン酸蓄積現象は、活性汚泥法などによるリン除去技術に応用されてきた。活性汚泥に存在するバクテリアの中には、好気条件でリン酸を取り込んで体内にポリリン酸を蓄積し、嫌気条件でポリリン酸を分解してリン酸として放出することが知られており、これらのバクテリア群が活性汚泥法によるリン除去に非常に大きな影響を与えていることがわかってきた。ただし、バクテリアのポリリン酸蓄積に関してはその現象のみが主に研究されており、実際にどのような機構でポリリン酸が蓄積するかに関してはほとんど解明がなされていなかった。バクテリアによるリン除去効率を向上させようと考え、これまでのようにポリリン酸を蓄積するという現象をブラックボックスとして利用するだけでなく、その蓄積機構の解明を行ったうえで、遺伝子レベルでの改良を加えていく必要があると考えられる。これらの背景から、本博士論文ではバクテリアのポリリン酸蓄積機構の解明を行い、その応用としてバクテリアによるリン除去技術の開発を行うことを目的としてきた。

第二章では、ポリリン酸蓄積に関係する遺伝子の取得を行うため、大腸菌のポリリン酸高蓄積変異株を取得し、そのポリリン酸蓄積が *phoU* 遺伝子の変異のみで引き起こされることを明らかにした。*phoU* の変異はリン酸特異的輸送系 (PST) の過剰発現を引き起こし、その結果として多量に取り込まれたリン酸がポリリン酸として蓄積していることを示した。第三章ではバクテリアのポリリン酸蓄積機構の一つであるオーバープラスの解析を行った。これまでオーバープラスでは、リン酸欠乏条件でポリリン酸合成酵素 PPK の活性が特異的に上昇し、そこにリン酸が加えられることによってポリリン酸が蓄積すると考えられてきたが、実際は、PPK の活性上昇はポリリン酸蓄積量にはあまり影響を与えず、PPK と同様にリン酸欠乏条件で発現が誘導される PST によるリン酸の取り込みがポリリン酸蓄積に大きな影響を及ぼしているということを明らかにした。以上の結果より、バクテリアのポリリン酸蓄積と PST によるリン酸取り込みは密接な関係を持っていることが明らかとなった。

第四章ではポリリン酸を常に蓄積しているリン酸トランスポーター多重変異株から、Gene Chipを用いて発現量が上昇している遺伝子を探索し、その中の *xasA* という遺伝子が新規のリン酸トランスポーターとして機能しているかもしれないことを示した。*xasA* はこれまでグルタミン酸輸送系遺伝子と考えられてきたが、*xasA* がリン酸トランスポーターとしても機能しているとなると、高等生物の神経細胞に存在するリン酸/グルタミン酸トランスポーターの原点である可能性も考えられ、非常に興味深い事実である。今後は、この *xasA* が PIT 系、PST 系以外の新規リン酸トランスポーターとして実際に機能しているかどうかを調べる必要があると考えている。

第五章では様々な環境中に存在する様々なバクテリアに対し、迅速かつ簡便にポリリン酸高蓄積変異株をスクリーニングできる手法の開発を行った。大腸菌では、ポリリン酸を高蓄積する *phoU* 変異株はアルカリホスファターゼ活性が構成的に発現していることがわかっている。この性質を利用して、バクテリアの変異株ライブラリーの中から、リン酸が十分に存在し、X-リン酸を添加したプレート培地上で青色コロニーを形成する株を選択することで、簡単にポリリン酸高蓄積変異株をスクリーニングできることを見いだした。本法を適用して、今回環境中から単離したバクテリアの中から3株に対してポリリン酸高蓄積変異株を取得することに成功した。さらに、本法で取得した *Pseudomonas putida* MY11 のポリリン酸高蓄積変異株は、親株の2倍の速度で人工排水からリン酸を除去することができた。また、大腸菌の *phoU* 変異株は深刻な増殖阻害を引き起こすが、本法で得られたバクテリアはいずれも親株と同等に生育することができる。これら自然環境中で生育するバクテリアは、細胞内に多量に蓄積したポリリン酸を、安定に保持できる機構が存在するのかもしれない。

第六章では、本論文で解析を行ってきたリン酸取り込み系 PST を構成するタンパク質の中でも、リン酸結合タンパク質である PstS に注目し、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 から精製した PstS を固定化したカラムを作製し、溶液中の希薄なリン酸も除去できることを示した。PstS はリン酸との親和性および結合力が強く、他の有機性リン化合物などによる阻害をほとんど受けなため、環境中の水からの希薄なリン酸の除去に非常に有効であると考えられる。実際に、自然の池から採取したサンプル中の希薄なリン酸も完全に除去することができた。今後はこの PstS 固定化カラムを上水における塩素処理の前段階に利用するなど、微生物が生育できないような低いリン酸濃

度が要求されるような場面での応用が期待される。

本研究により、これまでブラックボックスであったバクテリアのポリリン酸蓄積機構に関して様々な新しい知見を得ることができた。本研究全体を通じて、ポリリン酸の蓄積にはリン酸の取り込みが非常に大きな役割を担っていることが明らかになってきた。しかし、なぜリン酸が過剰に取り込まれるとポリリン酸として蓄積されるのであろうか。細胞内に取り込まれたリン酸は、酸化リン酸化やその他の経路を通じて ADP から速やかに ATP へと合成されると考えられる。本論文では、リン酸の蓄積によって引き起こされる ATP 濃度の上昇は、ADP 濃度の減少を引き起こし、PPK の平衡反応がポリリン酸合成側にシフトするため、結果的にポリリン酸が蓄積するのではないかと考察した。これまで考えられてきたポリリン酸の生体内での役割の一つに、エネルギー貯蔵物質として働くのではないかとという説がある。これを今回の考察内容に当てはめると、リン酸の蓄積によって合成された ATP が通常生命活動では消費しきれなくなり、細胞内に余剰のエネルギーとして蓄積してくると、PPK がそれを察知してポリリン酸としてエネルギーを蓄積していると考えられる。これとは別に、菌体内にリン酸が大量に蓄積すると浸透圧が上昇し、細胞に過度の負担がかかるとも考えられる。過剰に蓄積したリン酸をポリリン酸として蓄積することは、浸透圧ストレスを軽減させるための機構なのかもしれない。その考えを裏付けるように、細胞内のリン酸の濃度はほぼ一定 (約 10 mM) に保たれている (38)。ポリリン酸は細胞内リン酸濃度の変動を緩衝するための役割を有しているのかもしれない。いずれにせよ、バクテリアにとってのポリリン酸は、無機リン酸、ポリリン酸、および ADP、ATP などの関連代謝物の間でのエネルギーバランスを維持するために存在していると考えられ、細胞内の複雑なリン酸代謝システムを維持していくために重要な役割を果たしているのかもしれない。

Arthur Korenberg のグループがポリリン酸合成酵素遺伝子をクローニングして以来、古くから「生きた分子化石」と称されてきたポリリン酸の研究が急速に発展し、その代謝機構から生理的役割まで様々な解析が行われてきた。現在のポリリン酸に関する研究は、リンのリサイクル技術開発への応用からアミノ酸飢餓適応に関する研究、さらにはバイオフィーム形成や定常期における生存率への影響など、様々な分野に発展して広がりを見せている。しかし、それらの研究分野すべての根底に存在するのが、ポリリン酸がどのような機構で蓄積するかという問題である。生

命体によるリン酸の代謝機構は、様々な経路が非常に複雑に関係し合っ成り立っている。ポリリン酸代謝も例外ではなく、その完全な解明のためにはリン酸代謝機構全体を踏まえた上で解析する必要があり、非常に難解な研究であると予想される。本論文で展開したポリリン酸蓄積機構の解明が、今後のポリリン酸に関する研究の基礎として位置づけられ、さらなる発展を遂げることが期待したい。

参考文献

- (1) Abelson, P.H. 1999. A potential phosphate crisis. *Science*, **283**: 2015.
- (2) Ahn, K., and A. Kornberg. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.*, **265**: 11734-11739.
- (3) Akiyama, M., E. Crooke, and A. Kornberg. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. 1993. *J. Biol. Chem.*, **268**: 633-639.
- (4) Ault-Riché, D., C. D. Fraley, C.-M. Tzeng, and A. Kornberg. 1998. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**: 1841-1847.
- (5) Fuhs, G. W., and M. Chen. 1975. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb. Ecol.*, **2**: 119-138.
- (6) Geissdorfer, W., A. Ratajczak, and W. Hillen. 1998. Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:896-901.
- (7) Harold, F. M. 1966. Inorganic polyphosphate in biology: structure, metabolism, and function. *Biotechnol. Rev.*, **30**: 772-794.
- (8) Harris, R. M., D. C. Webb, S. M. Howitt, and G. B. Cox. 2001. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **183**: 5008-5014.
- (9) Hayashi, M., M. Otsuka, R. Morimoto, S. Hirota, S. Yatsushiro, J. Takeda, A. Yamamoto, and Y. Moriyama. 2001. Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J. Biol. Chem.*, **276**: 43400-43406.
- (10) Hersh, B. M., F. T. Farooq, D. N. Barstad, D. L. Blankenhorn, and J. L. Slonczewski. 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **178**: 3978-3981.
- (11) Hoffer, S. M., P. Schoondermark, H. W. van Veen, and J. Tommassen. 2001. Activation by gene amplification of *pitB*, encoding a third phosphate transporter of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **183**: 4659-4663.

- (12) Julian, R.M., S. Takuichi, J.W. Andrew, A.M. Tracey, C.F. John, J.H. Sarah, and G.W. William. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 795-799.
- (13) Kato, J., C. Nagata, L. Yang, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2001. Isolation and characterization of the *Enterobacter cloacae cheR* mutant defective in phosphate taxis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**: 456-458.
- (14) Kato, J., K. Yamada, A. Muramatsu, Hardoyo, and H. Ohtake. 1993. Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3744-3749.
- (15) Kato, J., T. Yamamoto, K. Yamada, and H. Ohtake H. 1993. Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (*ppk*) of *Klebsiella aerogenes*. *Gene*, **137**:237-242.
- (16) Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.*, **177**: 491-496.
- (17) Kornberg, A., N. N. Rao, and D. Ault-Riché. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**: 89-125.
- (18) Kulaev, I. S. 1979. The biochemistry of inorganic polyphosphates. Wiley, New York.
- (19) Kuroda, A., H. Murphy, M. Cashel, and A. Kornberg. 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 21240-21243.
- (20) Kuroda, A., K. Nomura, R. Ohtomo, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kornberg. 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the lon protease in *E. coli*. *Science*, **293**: 705-708.
- (21) Kuroda, A., N. Takiguchi, T. Gotanda, K. Nomura, J. Kato, T. Ikeda, and H. Ohtake. 2002. A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling. *Biotechnol. Bioeng.*, **78**: 333-338.
- (22) Miettinen, I. T., T. Vartiainen, and P. J. Martikainen. 1996. Contamination of drinking water. *Nature*, **381**: 654-655.
- (23) Morohoshi, T., A. Kuroda, T. Ikeda, J. Kato, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2001. Polyphosphate

- overplus in *Klebsiella aerogenes*. *Proceedings of ISEB2000, Kyoto, Japan*, p. 55-58.
- (24) Morohoshi, T., T. Maruo, Y. Shirai, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kuroda. 2002. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**:4107-4110.
- (25) Neidhardt, F. C., P. L. Bloch, and D. F. Smith. 1974. Culture media for enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**: 736-747.
- (26) Nikata, T., Y. Sakai, K. Shibata, J. Kato, A. Kuroda, and H. Ohtake. 1996. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (*pst*) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.*, **250**: 692-698.
- (27) Pearson, W. R., and D. J. Lipman. 1988. Imported tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2444-2448.
- (28) Poole, K., and R. E. Hancock. 1984. Phosphate transport in *Pseudomonas aeruginosa*. Involvement of a periplasmic phosphate-binding protein. *Eur. J. Biochem.*, **144**: 607-612.
- (29) Rao, N. N., and A. Kornberg. 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **178**:1394-1400.
- (30) Rao, N. N., S. Liu, and A. Kornberg. 1998. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.*, **180**: 2186-2193.
- (31) Rashid, M. H., K. Rumbaugh, L. Passador, D. G. Davies, A. N. Hamood, B. H. Iglewski, and A. Kornberg. 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 9636-9641.
- (32) Reytrat, J. M., V. Pelicic, B. Gicquel, and R. Rappuoli. 1998. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.*, **66**: 4011-4017.
- (33) Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- (34) Sedlak, R. I. 1991. *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N. Y.
- (35) Steed, P. M., and B. L. Wanner. 1993. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in

- the phosphate regulon. *J. Bacteriol.*, **175**: 6797-6809.
- (36) Tzeng, C.-M., and A. Kornberg. 1998. Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.*, **29**: 381-382.
- (37) Vieira, J., and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **153**: 3-11.
- (38) Wanner, B. L. 1996. Phosphate assimilation of control of the phosphate regulon, p. 1357-1381. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- (39) Young, G. M., M. J. Smith, S. A. Minnich, and V. L. Miller. 1999. The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J. Bacteriol.*, **181**: 2823-2833.

謝辞

本学位論文をまとめるにあたり、研究に対する貴重な御助言から研究者としての心構えまで、一人前の研究者として自立出来るように終始御指導いただいた大竹久夫教授に深く感謝します。修士課程在籍時より、実験方針から論文作成まで、あらゆる面で御指導をして頂いた黒田章夫助教授に深く感謝します。また、機器の取り扱いから実験方針に対する御助言など、本研究に関して数々のサポートをして頂いた加藤純一教授、池田宰助教授、滝口昇助手に深く感謝します。

本論文を作成するにあたり、適切な御指導・御助言を頂いた宮川都吉教授に深く感謝します。また、本研究で使用した菌株を提供して頂いた Robyn M. Harris 博士、菌株の分与ならびに論文作成に関し貴重な情報を提供して頂いた Barry L. Warner 博士に深く感謝します。

本研究に携わり協力して頂いた新居俊輔氏、圓尾竜哉氏、白井葉子氏、國本宏和氏、山下智宏氏に深く感謝します。また、様々な面でバックアップして頂いた広島大学先端物質科学研究科の各講座の先生方、ならびに細胞分子機能学研究室すべてのメンバーに深く感謝します。

最後に、私の 21 年間という長い学生生活において、あらゆる面で支えてくれた家族に心から感謝します。

平成15年3月 諸星 知広

公表論文

- (1) Tomohiro Morohoshi, Tatsuya Maruo, Yoko Shirai, Junichi Kato, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, Hisao Ohtake, and Akio Kuroda. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4107-4110, 2002.

- (2) Akio Kuroda, Hirokazu Kunimoto, Tomohiro Morohoshi, Tsukasa Ikeda, Junichi Kato, Noboru Takiguchi, Akiko Miya, and Hisao Ohtake. Evaluation of phosphate removal from water by immobilized phosphate-binding protein PstS. *J. Biosci. Bioeng.*, 90: 688-690, 2000.

参考論文

- (1) Tomohiro Morohoshi, Akio Kuroda, Tsukasa Ikeda, Junichi Kato, Noboru Takiguchi, and Hisao Ohtake.
Polyphosphate overplus in *Klebsiella aerogenes*. *Proceedings of ISEB2000, Kyoto, Japan*, p55-58.