

リン酸の無機化学とバイオテクノロジー

黒田 章夫*・廣田 隆一

ひとことで無機リン酸と言っても、その化学形態は多様である。リン酸が重合すれば「ポリリン酸」になり、また還元されれば「亜リン酸」になる(図1)。これらの重合型リン酸、還元型リン酸がリン酸に戻るとき、それぞれ生命のエネルギーであるATPと還元力であるNADHが生み出される。リン酸を回収して化学的に重合、還元することができれば、サステナブルな生命エネルギー再生系(再利用)ができ上がる。実はリン酸の重合と還元は、生命の起源に関わったかもしれないと考えられている。また、無機リン酸をめぐるバイオと化学の反応を見つめ直すと、そこには将来のグリーンテクノロジーの一つの形が見える。本稿では、これらの無機リン酸の化学変換を利用するためのリン酸のバイオテクノロジーについて述べたい。

生命の起源とリン

2009年、Nature誌にRNAワールド仮説を支えるヌクレオチド前駆体の非酵素的な合成経路が発表された¹⁾。グリセルアルデヒドやシアンアミドなどを含むいわゆる原子スープに、酸塩基触媒としてのリン酸が入ることによって、自然には困難と考えられていたnucleoside 2,3-cyclic phosphateの合成が示された。できたnucleoside 2,3-cyclic phosphateを高濃度で保温すると、重合

してRNAができあがる。リン酸は、生命発生の触媒としても、非常に重要な分子であったであろうとされた¹⁾。

しかし、生命発生の重要なリン酸がプレバイオティックな環境に、どのようにして供給されたのかが大きな疑問の一つとされている。なぜなら自然界のリン酸のほとんどは、不溶性のリン酸カルシウムアパタイトとして存在するからだ。そこで、リン酸供給経路として、リン酸よりもよく水に溶ける還元型リン酸が関与したシナリオが考えられている。

原始地球のような非常に還元的な環境で放電が起これば、リン酸カルシウムが亜リン酸カルシウムになることが示されている²⁾。実は、亜リン酸カルシウムは、リン酸カルシウムよりも約1000倍水に溶けやすい。もう一つの供給経路はリン鉄を豊富に含むシュレイバーサイトという隕石が考えられている。シュレイバーサイトは、やはり水中で還元型の亜リン酸を溶出する³⁾。いずれにしてもプレバイオティックな環境へのリン酸の供給には、還元型リン酸が役買った可能性が高い。また、還元型リン酸は次に述べる重合型リン酸などにも容易に変換される⁴⁾。

重合型リン酸であるポリリン酸はATPと同様の高エネルギーリン酸結合からなり、リン酸ナトリウムなどを単に数百℃で加熱するだけで縮合して合成されることから、原始地球環境で比較的豊富に供給された太古の生命エネルギーと考えられている⁵⁾。また、ポリリン酸の一種である環状の3リン酸(トリメタリン酸)は無生物的なATP合成に関与したかもしれないとされている⁶⁾。長鎖ポリリン酸をマグネシウムイオン存在下で加熱すると、トリメタリン酸が優先的に生成される⁷⁾。そのトリメタリン酸とアデノシンを混合すると、無生物的にATPがワンステップで合成できる。無生物的にアデノシンの5位にリン酸が一つ一つ結合してATPができた考えるのは難しいが、ワンステップなら合成経路として可能性が高い。生物がなぜ3つのリン酸が重合したATPを生命エネルギーとして選んだかは、ひょっとすると、ポリリン酸からのトリメタリン酸合成、さらにはATPのワンステップ合成に理由があるのかもしれない。

このように、還元型リン酸である亜リン酸、重合型リン酸であるポリリン酸の生成は、生命発生の鍵となるか

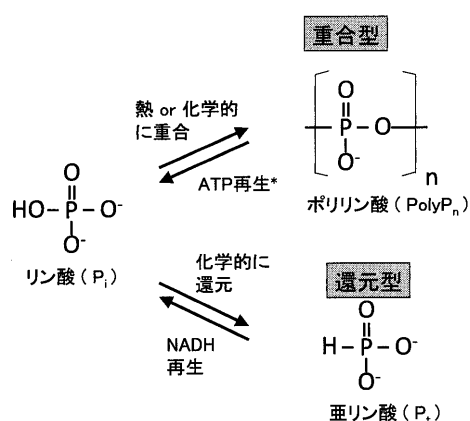


図1. 無機リン酸の化学変換とバイオ変換の融合テクノロジー。
*ポリリン酸とポリリン酸キナーゼによるATP再生系において、共役酵素(ATP利用酵素)がリン酸を放出する場合の関係式。

*著者紹介 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(教授) E-mail: akuroda@hiroshima-u.ac.jp

もしれない重要な化学変換と考えられる。次にこれらの無機リン酸化合物を利用するためのバイオテクノロジーについて述べたい。

ポリリン酸のバイオテクノロジー

ATPを利用したリン酸化反応は非常に多様で、その中には産業的にも有用なものが存在する。しかしながら、これらの反応を実際の物質生産プロセスに利用するには、ATPが高価であるということや、高濃度のATPをそのまま基質として用いると、キナーゼの反応が阻害されるというような問題があることから、多くのATP再生系が構築されてきた。これまでに、ホスホエノールピルビン酸/ピルビン酸キナーゼ、クレアチンリン酸/クレアチンキナーゼを用いたATP再生方法などが報告されている。しかし、いずれのリン酸ドナーもATPと同様に高価であるという問題がある。そこで、非常に安価に供給できるポリリン酸によるATP再生方法が開発されている⁸⁻¹⁰⁾。ポリリン酸は、リン酸を加熱することで合成できるため、その価格はATPと比較して1/1000程度である。また、食品添加物にも用いられているので人に対して安全である。ポリリン酸キナーゼ (PPK) は、ATPの γ 位のリン酸を可逆的にポリリン酸に転移させる酵素で、ポリリン酸とADPが十分に存在するときには、ATPを再生する(図2A)。ポリリン酸とPPKを使ったATP再生系は、他の再生系に取って代わるATP再生方法として期待されている^{9,10)}。

筆者らは安定性の高いATP再生系を構築するために、耐熱性酵素に着目し、耐熱性PPKを利用したATP再生

系の構築を行った。*Thermus thermophilus*由来PPK^Tは60~80°Cで高い活性を示し、きわめて安定な酵素であった¹⁰⁾。また、PPKには構造の違うI型、II型が存在する。筆者らは、好熱菌由来のII型のPPKもクローニングして調べた結果、I型はもっぱらADPからATPを再生させるが、II型はAMPからATPを再生させる(ADP合成とATP合成を同一酵素で行える)ことを明らかにした(図2B)¹¹⁾。ATPを利用する酵素の中には、アセチルCoAシンセターゼの様にAMPまで分解するものもあり、その再生系として有用であると考えられる。また、PPKはGTPやCTPなど、他のヌクレオチド三リン酸の再生も可能であることが分かっているので、さらに糖鎖合成などへの応用の可能性が広がると考えられる¹²⁾。

亜リン酸のバイオテクノロジー

NAD(P)⁺/NAD(P)Hは、ほぼすべての生物において共通して存在する酸化還元反応に関与する補酵素である。ATP再生系と同様、いくつかのNADH再生系が構築されている。たとえば、*Candida boidinii*由来ギ酸デヒドロゲナーゼ系はNADH再生系として工業的にも利用されており、ロイシンデヒドロゲナーゼと共役させて、医薬品合成の前駆体となるL-tert-ロイシンの合成に利用されている。

微生物の亜リン酸化酵素 (PtxD) は亜リン酸からリン酸への酸化を触媒し、同時にNADHを作り出す(図3A)。亜リン酸と共役したNADH再生系は、①亜リン

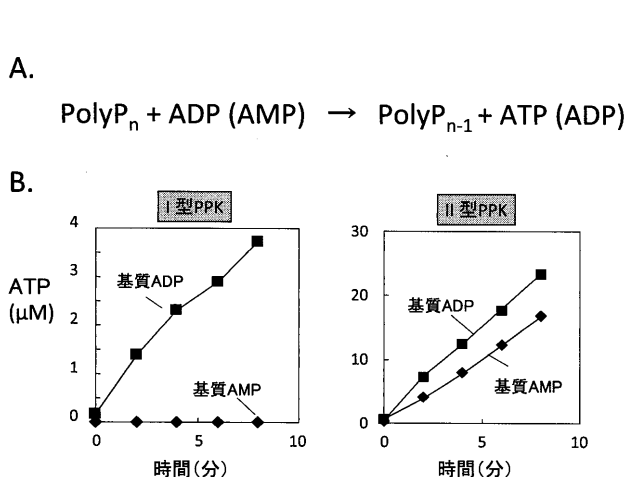


図2. ポリリン酸キナーゼ (PPK) によるATP合成。A: PPKの反応式。polyP_nはn個のリン酸からなるポリリン酸を示す。B: I型ポリリン酸キナーゼ (*Thermus thermophilus*のPPK) は、ADPからATPを合成、II型ポリリン酸キナーゼ (*Meiothermus ruber*のPPK) はAMPからADP、さらにADPからATPの合成できる。

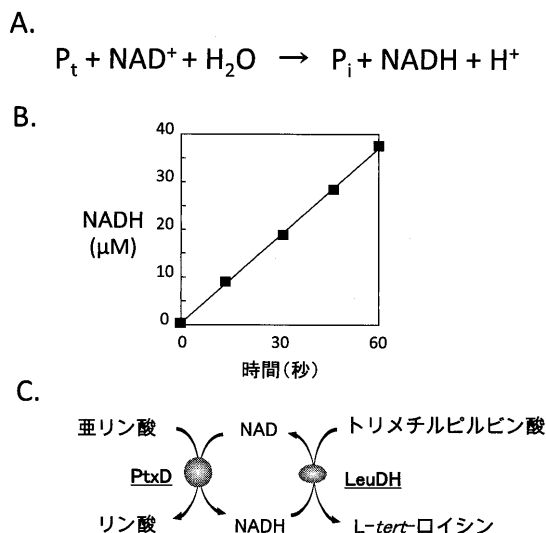


図3. 亜リン酸化酵素PtxDによるNADH合成反応。A: PtxDの反応式。P_tは亜リン酸、P_iはリン酸を示す。B: PtxDによるNADH合成。C: 亜リン酸-NADH再生系によるL-tert-ロイシンの合成。LeuDHはロイシンデヒドロゲナーゼ。

酸と共役した NAD^+ の還元酸化還元電位は $+0.335\text{ V}$ (自由エネルギーに換算すると -63 kJ/mol)であり、ほぼ不可逆的に NADH の合成にかたよっていること、②亜リン酸が安価であること、③亜リン酸の動物に対する毒性はほとんどないことから、従来の方法に比べて非常に有利な点がある。しかしながら、最初に発見された *Pseudomonas stutzeri* の PtxD は不安定であり、大腸菌で発現させた場合に不溶性になるなどの不都合があった。筆者らは、 45°C でも生育する亜リン酸酸化細菌を単離し、その中から安定性に優れ、高活性な PtxD を発見した^{13,14)}。この PtxD は組換えても不溶性にはならず、しかも従来の PtxD に比べて3000倍も安定 (45°C に於いて)であった。この PtxD と亜リン酸を用いて、 NADH 再生系を構築した(図3B)。また実際、筆者らはこの NADH 再生系を利用して、*L-tert*-ロイシンの合成ができることを示している(図3C)^{13,14)}。

“T. coli” 合成生物

これまで述べてきたように、重合型リン酸を使えば ATP が供給できる。また還元型リン酸を使えば、 NADH も供給できる。廃棄物のリン酸を回収して、化学的に重合型、あるいは還元型にして、もう一度バイオプロセスで再利用できれば、まったく廃棄物を出さないで済む。リン酸を中心とする化合物変換だけで、ATP と NADH という生物の二大補酵素を供給できるというのは、新しいグリーンテクノロジーへの一歩と考えている。

次に、この新しいバイオプロセスの基本アイデアを紹介したい。筆者らは、先ほどの耐熱性ポリリン酸キナーゼである PPK^T を発現させた大腸菌を、そのまま 70°C 、10分間加熱した。熱処理後の菌体は細胞外の ADP とポリリン酸を利用して ATP を合成できる¹⁰⁾ (図4)。 PPK^T

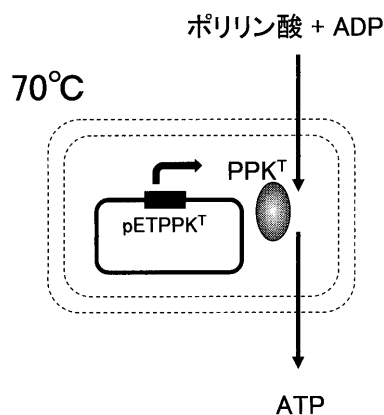


図4. ATPを合成し続ける大腸菌。耐熱性のポリリン酸キナーゼ (PPK^T) を導入した大腸菌を増殖後、 70°C で加熱した。

による ATP 合成活性は 70°C で少なくとも1週間にわたって活性が維持されていた。熱処理後の菌体溶液を遠心分離し、沈殿物 (菌体) と上清の活性を調べた結果、沈殿物には ATP 合成活性が確認されたが、遠心上清には確認されなかった¹⁰⁾。つまり、大腸菌内に発現させた PPK^T は、熱処理によって細胞外に漏出してはおらず、細胞内で機能していることが確認できた。 PPK^T が菌体外に漏出してこないのは、熱処理でも溶出しにくいような巨大な核酸や膜などに結合していることが原因であると考えている。いずれにしても重要なのは、加熱処理によって酵素が固定されるにも関わらず、自由に基質が入り出できるようになった点であろう。さらに、本来の大腸菌の持っている酵素はほとんど失活しているので、副反応がまったく起こらないことも期待できる。

そこで、 PPK^T 、耐熱性フルクトースキナーゼ (PFK)、耐熱性ホスホフルクトキナーゼ (FK) の3つのタンパク質を単一の大腸菌内で共発現させ、十分に増殖させた後、 70°C 10分間熱処理し、フルクトース、ポリリン酸を加え、フルクトース 1,6ニリン酸 (FDP) の合成を行った。その結果、期待通り、副産物のない FDP の合成が行えた¹⁰⁾ (図5)。すなわち、この大腸菌はデザインされた反応のみを行う触媒へと生まれ変わったのである。現在ではシンプルエコプロセスとして、さまざまな反応系へと応用されている¹⁵⁾。

さらに筆者らは最近、好熱菌の代謝系をまるごと導入した大腸菌を作り出そうとしている。この大腸菌は耐熱性の代謝系を発現するので、*T. coli* (thermostable metabolic pathway-expressing *Escherichia coli* の略称) と名付けている。導入する遺伝子の数が増えれば、もはや大腸菌と好熱菌の間の子の合成生物とも言える。合成生物 “T. coli” の面白みは、生産物の毒性が強く、たくさん作った場合に菌が死んでしまうような生産系に適応可能と考えられる点である。もともと大腸菌宿主は増殖

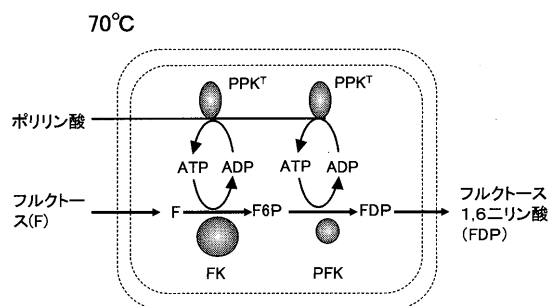


図5. 複数の酵素を導入したシンプルバイオ触媒。FKは耐熱性のフルクトキナーゼ、PFKは耐熱性のホスホフルクトキナーゼを示す。

後加熱により死んでいるので、毒性は関係ない。また、生命としては成り立たない様な人工代謝系をくみ上げることも考えられる。“T. coli”の課題の一つは、好熱菌の代謝系そのものをごっそり導入するための発現系である。この問題は、レアコドン補充により一部解決しつつある¹⁶⁾。またもう一つは、通常加熱後に補酵素再生系を共役させる必要があることである。この補酵素再生系として、これまで述べた無機リン酸のバイオテクノロジーを応用したいと考えている。

無機リン酸の化学変換とバイオ変換の 融合テクノロジーへの挑戦

リン酸ナトリウムを800°Cの炉の中にいれて加熱すると、平均鎖長60程度のポリリン酸を合成することができる。またこの条件で合成したポリリン酸をATP合成に利用できることは確認している。しかしながら、この投入エネルギーは遥かに縮合に必要なエネルギーを超えていることから、今後低温でも脱水縮合できる触媒を見つけておくことが必要であろう。また、リン酸から亜リン酸への変換は、水素環境下で、放電することで亜リン酸に部分的に変換することがわかっているが、これも化学的な触媒がありそうである。しかし調べてみても、まったくと言っていい程この反応に関するケミストリーが進歩していない。もちろん亜リン酸の合成は黄リンや三塩化リンなどを出発点とすれば、簡単にできる。リン酸から亜リン酸への変換、リン酸からポリリン酸への変換には、おそらく大きな研究のモチベーションがなかったため、ほとんど研究が行われて来なかったのかもしれない。しかし、ポリリン酸、亜リン酸から生命エネルギーが直接変換できるようになった今、そのケミストリーの進歩が望まれる。また、冒頭でも述べたように、これらの変換は、生命発生の鍵になる可能性もあり、無機リン酸をめぐるケミストリーは、生命と化学の境界領域の深遠な

テーマでもある。今後、無機リン酸の化学変換を研究する化学者と情報を共有しながら、バイオ変換の融合テクノロジーを確立したいと考えている。

現在、亜リン酸デヒドロゲナーゼの研究は、科学研究費補助金基盤研究(B)(代表)を受けて行っている。また、大腸菌への好熱菌の代謝系の導入は、JST先端的低炭素化技術開発事業(分担)の中で実施している。また、ポリリン酸を活用するバイオ技術の開発は、生研機構異分野融合研究支援事業(分担)で行ったものであり、その他の成果は戦略的創造研究推進事業(さがしけ21およびSORST)(代表)で行ったものである。またこれらの研究に関わった多くの学生、研究員の方々に感謝致します。本稿の機会を与えて頂いただけでなく、さまざまな研究のご指導を頂きました大阪大学の大竹久夫先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Powner, M. W. *et al.*: *Nature*, **459**, 239 (2009).
- 2) Glindemann, D. *et al.*: *Origins. Evo. Biosphe.*, **29**, 555, (1999).
- 3) Bryant, D. E. and Kee, T. P.: *Chem. Commun.*, 2344 (2006).
- 4) Pasek, M. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 853 (2008).
- 5) Yamagata, Y. *et al.*: *Nature*, **352**, 516 (1991).
- 6) Etaix, E. and Orgel, L. E.: *J. Carbo. Nucleosides Nucleotides*, **5**, 91 (1978).
- 7) Kuroda, A. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **78**, 333 (2002).
- 8) Hoffman R. C. Jr. *et al.*: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **10**, 107 (1988).
- 9) Sato M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 179 (2007).
- 10) Iwamoto, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5676 (2007).
- 11) 黒田章夫, 廣田隆一, 本村圭: 特願2011-159349 (2011).
- 12) Kuroda, A. and Kornberg, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 439 (1997).
- 13) Hirota, R. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 445 (2012).
- 14) 黒田章夫, 廣田隆一: 特願2011-98670 (2011).
- 15) 大竹久夫ら: 化学工学会要旨集, p.668 (2010).
- 16) Suthitar, S. ら: 日本農芸化学会要旨集, 2C22p11 (2012).