

リン資源枯渇の危機予測とそれに対応したリン有効利用技術開発

Development of Technologies to Save Phosphorus Resources in Response to Phosphate Crisis

黒田 章夫^{1*}, 滝口 昇¹, 加藤 純一¹, 大竹 久夫²

AKIO KURODA, NOBORU TAKIGUCHI, JUNICHI KATO and HISAO OHTAKE

¹ 広島大学大学院先端物質科学研究科 〒739-8530 広島県東広島市鏡山1-3-1

² 大阪大学大学院工学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

* TEL: 082-424-7758 FAX: 082-424-7047

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

¹ Department of Molecular Biotechnology, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama,
Higashihiroshima-shi, Hiroshima 739-8530, Japan

² Department of Biotechnology, Osaka University, 21 Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

キーワード: リン, 活性汚泥, フィチン酸, ポリリン酸, リン溶解菌

Key words: phosphorus, activated sludge, phytate, polyphosphate, phosphate-solubilizing bacteria

(原稿受付 2004年9月30日/原稿受理 2005年1月18日)

1. はじめに

現在, リン酸の年間生産量は P_2O_5 換算で約4000万トンである。これは, 約1億4000万トンのリン鉱石に由来する¹⁹⁾。リンは植物の必須元素とされた最初の元素であり, その機能は他の栄養素で補うことはできない。自然界では, リン酸は非常に溶解度の低い鉱石の風化や溶解によって供給される。従ってリン酸は生物生産の律速物質であり, 長い人類の農業の歴史において不足し続けてきたのである。リン酸肥料は, リン酸欠乏によって生じた食糧生産の問題を解決し, 全ての先進国の産業発展に繋がった。従って現在でもリン鉱石のリンの約80%は化学肥料に使われており, 数%が家畜飼料添加用, 残りの十数%が界面活性剤や金属処理などに使われている²⁰⁾。しかし今高品質のリン鉱石の枯渇が予想されており, 限りあるリン資源を管理することは, 持続可能な社会を築く上で欠かせないと考え始められている^{1,20)}。そこで本総説では予想されているリン鉱石の枯渇のシナリオについて述べ, 続いてリン資源の有効利用技術について述べたい。ここでは排水からのリン回収プロジェクトに関して述べると共に, 今後さらにリン有効活用のために期待されるシーズ技術について述べたい。

2. リン鉱石枯渇のシナリオと食糧危機

2.1. リン鉱石の埋蔵量と採掘量

リン鉱石中のリンのほとんどはカルシウムアパタイトとして存在する。リン酸成分として5%~40%の割合である。リン鉱石の埋蔵量の試算は, 主観的なものであり, その時の経済情勢を加味した基準に依存してしまうため

多少変動する。具体的に言えば, 米国地質調査所 (United States Geological Survey; USGS) は, リン鉱石とは \$35/トン以下のコストで採掘できるものと定義している。従ってこの基準が変動すれば, 当然推定埋蔵量も変化する。2004年に掲載された USGS による世界のリン鉱石採掘量と埋蔵量を表1に示す¹⁹⁾。この表によると, 現在, 30ヶ国以上が, リン鉱石を採掘しているが, 上位15ヶ国だけで全世界リン鉱石採掘量の約95%近くを占める。また, アメリカ, 中国, モロッコの上位3カ国のリン鉱石採掘量は全体の約2/3を占めることから, リン鉱石の埋蔵量には大きな偏りがあるといえる。表1に従って, 経済的に採掘できるリン鉱石の埋蔵量を単純に現在の採掘量で割ると, リン資源は130年で枯渇すると計算できる。しかしリン鉱石の採掘量は1950年から1995年にかけて約6倍に増加しており, リン鉱石採掘量の年間のび率は約4%となっている。従って, リン資源枯渇のシナリオとしては, 今後のリン消費量の伸びを考える必要がある。

2.2. リン鉱石枯渇のシナリオ

リン鉱石枯渇のシナリオは CEEP (ヨーロッパ化学工学評議会とリン酸工業協会の主催する団体) でまとめられているのでここに紹介する²⁰⁾。過去のリン消費量の伸び率に従い, リン酸肥料の消費が年間3%ずつ増加すると仮定すると, 2060年代には現在の約5倍の年間消費量2億トンを超えてしまい, 経済的に採掘できるリン鉱石はすべて枯渇する (図1)。しかしこの予想は以下の4つの理由により現実的ではないとされる。①西洋いわゆる先進国で行われる農業では, 1ヘクタール当たり70kgの P_2O_5 を供給していることになり, リン酸過多状態になる。リン酸過多状態では収穫農作物に取り込ま

表 1. 世界のリン鉱石生産量と埋蔵量 (USGS2004 の推定)。

	生産量 (百万トン) *1	埋蔵量 (百万トン)	埋蔵基礎量 (百万トン) *2
United States of America	33.3	1,000	4,000
Australia	2.2	77	1,200
Brazil	4.96	260	370
Canada	1.2	25	200
China	24.0	6,600	13,000
Egypt	1.5	100	760
India	1.25	90	160
Israel	4.0	180	800
Jordan	7.2	900	1,700
Morocco	24.0	5,700	21,000
Russia	11.0	200	1,000
Senegal	1.5	50	160
South Africa	2.5	1,500	2,500
Syria	2.4	100	800
Togo	2.1	30	60
Tunisia	7.7	100	600
Other countries	7.0	800	2,000
Total	138.0	18,000	50,000

*1 生産量は2003年度の数値

*2 将来技術の進歩があれば採掘可能なリン鉱石の量

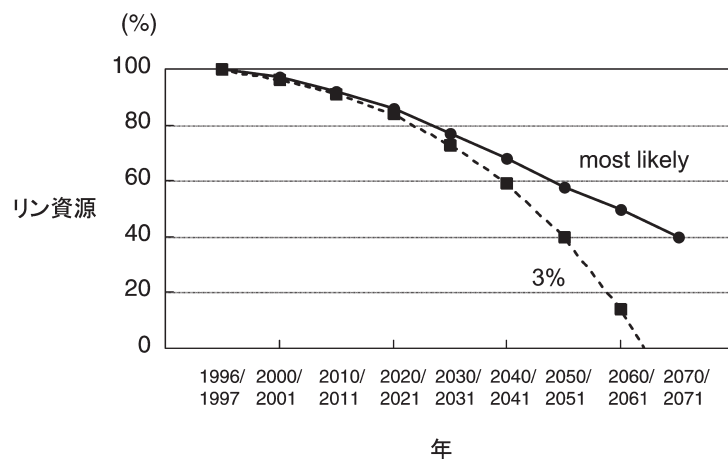


図 1. リン資源枯渇の予測。破線はリン利用量が年間 3% ずつ増加した場合の枯渇予測を示す。実線は地域別の事情を加味した場合の枯渇予測を示す。(British Sulphur Publishing から許可を得て掲載)

れるリン酸量以上のリン酸を供給する必要はない。②さらに先進国では、尿尿からの肥料のリサイクルが改善され、リン酸肥料添加の必要性が減少すると考えられる。③土壌肥沃度の改善が必要な発展途上国では、おそらく 30~50 年の間に、農作物が必要とするリン酸量の 30~50% 増しのリン酸を供給する必要がある。その後は、肥沃度が改善された土壌状態を維持する必要がある。④土壌中のリン酸濃度を維持しなければならないその他の国々では、農作物に取り込まれるリン酸量の 10~30% 増しのリン酸を添加する必要がある。これらの条件を加味して考えると、21 世紀初頭 (2010~2015 年) まで年間 2.8% ずつ増加し、その後の伸び率はゆっくりとなるのが現実的と考えられている²⁰⁾。これによると、60~70 年以内には現在世界で経済的に利用されているリン資源の半分が消費されることになる (図 1)²⁰⁾。しかしこの時点

でリン資源の半分が残ると言っても安心はできない。それはリン鉱石中のリン酸含有量が 10 年で約 1% ずつ低下すると言われているからである。60~70 年後には低下したリン含量とは裏腹にカドミウムや放射性化合物などの不純物の含量が上がり、その除去コストが増加する。また、副産物であるジブサムの処理コストもかさむ。これにより高品質のリン資源の価値が改めて再認識される。リン資源を保有しない国にとって大きな問題は、リン資源を保持する国々がリン資源の希少価値を意識し始め、リン鉱石を国防資源と位置づけ輸出規制をすることである。アメリカでは実質的にリン鉱石の輸出制限が始まっていると聞く⁹⁾。2001 年以降わが国へのアメリカからのリン鉱石輸出は全く行われておらず、実際 2004 年の財務省貿易統計でもアメリカ産のものは皆無である²¹⁾。枯渇に伴ってどんどん採掘コストは上昇し、リン酸肥料の高騰

を招くと考えられる。もちろんリン鉱石の採掘にかかるコストを大幅に上昇させ、将来採掘技術が発達した場合、リン資源の埋蔵量の評価は増加する（埋蔵基礎量）。コストを度外視した場合のリン埋蔵量は3倍程度とされているが、有史以降の人類の歴史の長さからすると、いずれにしても残された時間は短いと思える。

2.3. リン鉱石枯渇にともなう社会的問題

リン資源枯渇は食糧生産にとって危機的状況をもたらす。イリノイ大学のグループの研究によると、肥沃な土地でも肥料を施さなければすぐに1/3以下までに収穫量が低下するそうである¹⁷。現在、世界人口は63億人で、年間約1.5%増加している。UN 世界人口予測では、2020年頃には人口増加の減速が起こるとされるが、2050年で約94億人と予測されている²⁰。人口増加だけでなく、経済成長による生活水準の改善により、食生活が変化して食糧要求量が増大すると考えられる。特に発展途上国ではリン肥料の枯渇や高騰は食糧危機の大きな社会的問題を引き起こすと予想されている¹⁷。

3. リン資源有効利用技術

わが国はリン鉱石を生産せず、100%輸入に依存している。リン資源有効利用技術の開発はわが国にとって重要な問題である。わが国に持ち込まれるリンの総量はリンとして年間約70万トンとされている。その内訳はリン鉱石や肥料が約35万トン、農畜産物や海産物として持ち込まれるリンが約31万トン、その他工業原料として輸入されるリンが約4万トンである（図2）⁹。そして生活圏から排出されるリンは土壌蓄積に約53万トン、水域に流出するリンは約9万トン、汚泥等の廃棄物として出てくるリンが約5万トン、輸出に約1万トンとなっている（図2）⁹。わが国のリンの利用の問題点を整理してみると、まず水域に流出するリンは当然ながら富栄養化に直結するので、下水道等の排水処理施設のさらなる整備とこの施設におけるリン除去率の向上が求められる。廃棄物のほとんどは下水汚泥に含まれるリンである。しかし汚泥に取り込まれたリンがリサイクルされていないために再び排水に流れ込み水域に流出しているといわれている。リンを有効に利用するために、下水汚泥に取り込ま

れたリンを再利用する技術が必要であるとともに、多量のリンが土壌に固定されているので土壌に固定されたリンを溶解する技術などが重要であると考えられる。また、排水中に含まれるリンを減らすためにフィチン酸減少植物の創成や、あらたなポリリン酸蓄積微生物の創成などの技術が求められている。

3.1. 活性汚泥からのリンの回収と利用

3.1.1. リン回収の必要性

農産物中に取り込まれたリン酸は、人体や家畜などを經由して、最終的には排水に含まれるようになる。このままリンが環境に流出すると、富栄養化という現象を引き起こして、赤潮やアオコなどの環境問題を引き起こす。生活排水や工場廃水から有機物を分離、除去する主役は活性汚泥と呼ばれる微生物の集団である。活性汚泥を嫌気条件および好気条件に交互に繰り返し晒すことによって、そのリン含有率を6-8%にまで増加させることが可能である¹⁹。このリンを再利用できれば、リン資源の有効利用に貢献できる。また著者らの調査によれば、このリンを蓄積した余剰汚泥の処分が下水処理場で厄介な問題となっている。例えばリンを過剰に含んだ余剰汚泥は、濃縮・脱水工程でリンを再溶出したり、焼却時に内張り耐火物を劣化損傷したりする。また、リンを多く含む焼却灰は、水洗時にリンが溶け出して再び汚染源となるばかりか、セメント原料等への有効利用も難しいと聞く。さらに最近、余剰汚泥から再溶出したリンが、不溶性のマグネシウムアンモニウム塩 (MAP) を形成し、嫌気性汚泥消化槽の配管等を詰まらせるという障害が、全国の下水処理場において発生している。多くの下水処理場では嫌気性消化により汚泥の減量化とメタンガスの回収とを行っているが、配管の曲がり部などに MAP ができると、汚泥の輸送を妨げるばかりか、ひどい場合には嫌気性消化槽そのものが使い物にならなくなることさえある。これらの問題を解決するためにも、あらかじめ余剰汚泥からリンを引抜くことが必要である。

3.1.2. リン回収法 (heatphos 法)

筆者らは数年前に広島大学において、都市下水処理場の余剰汚泥が蓄積したリンを、70°C、1時間程度加熱するだけで簡単に取出すという Heatphos 法を開発した^{17,18}。加熱して取出したリンを、カルシウムにより沈

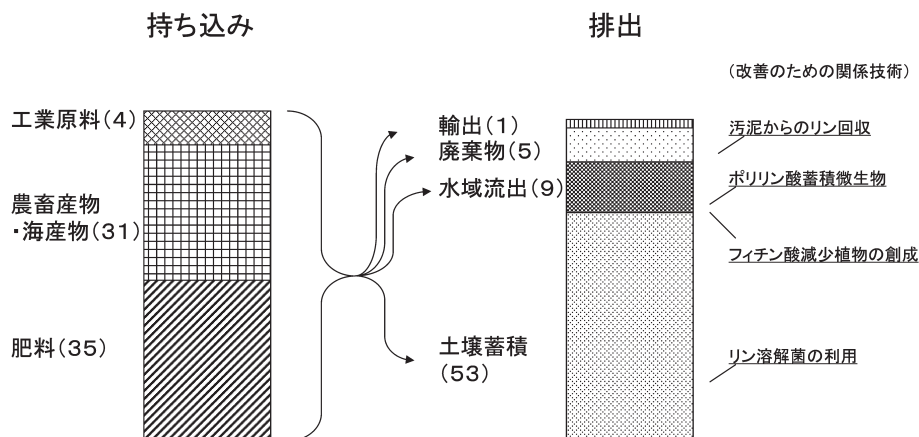


図2. わが国へのリンの持ち込みと排出。(括弧内の数字は万トン (P として))

殿させると、人工的にリン鉱石ができあがる。実機規模での実証試験は、広島県福山市の芦田川浄化センターにて現在もなお実施中である(図3)¹²⁾。テストプラントでは90 m³/日の余剰汚泥を取り扱っている。これは浄化センターの一系列(最大下水処理能力約11,000 m³/日)に発生する余剰汚泥の約半分の量である。テストプラントは、「浮上濃縮」、「加温」、「熱交換」、「汚泥分離」、「凝集沈殿」および「乾燥」の6設備から構成されている(図3)。このテストプラントがフル稼働すれば、1日当たり約10 kgのリン(リン酸として約30 kg, リン含有率14%のリン鉱石として約71 kg)がバイオリン鉱石として回収できる¹²⁾。現在のところ、嫌気好気活性汚泥法の余剰汚泥を連続的に濃縮、加熱、2次濃縮、熱回収、凝集沈殿することで、パイロット試験結果に比較して余剰汚泥の加熱エネルギー使用量を1/5程度に大幅低減し、かつ、リン回収率は流入下水中のリンの約50%となることを実証している。もしこの効率で活性汚泥からリンを回収できたなら、全国で約2.5万トンのリン(リン鉱石として約18万トン)を再利用できるようになる。今後リンの総量規制などにより活性汚泥のリン含量が上がれば、リン鉱石の輸入量の30%程度は削減可能である¹²⁾。回収したバイオリン鉱石はアモルファスのヒドロキシアパタイトであり、そのままクエン酸溶性のリン酸肥料になる可能性がある。実際バイオリン鉱石は水溶性ではないが、クエン酸溶性であった。また、マグネシウムが含まれているために、そのまま良質の複合肥料原料となる可能性がある。バイオリン鉱石を加工して肥料化するよりも、そのまま肥料として再利用されることが最も効率的であろう。そこで、実証プラントにて回収されたバイオリン鉱石のリン酸質肥料としての効果(肥効)を確認するために、小野田化学工業において、小松菜を用いた植栽試験が行われた。供試肥料及び対照区の標準施用

区・倍量区においては、作物の発芽、生育は順調であり、重金属等による生育障害は認められなかった。栽培29日後の地上部収量調査では、供試肥料(バイオリン鉱石)標準区及び倍量区のいずれも対照区を上回る収量があり、施用効果が認められた。実際地上部のリン酸吸収量は、供試肥料施用区において無リン酸区、無肥料区よりも、はるかに高い値を示し、対照区よりも指数118~123と20%程度高くなった。マグネシウムの吸収量においても、無肥料区及び他のマグネシウムを含まない肥料よりも上回り、マグネシウム含有量の高い対照区(ようりん施用区)とほぼ同等であった。以上の植栽試験の結果から、実証プラントで回収されたバイオリン鉱石は、それ自体でも植物の生育に効果があり、含有しているリン酸分及びマグネシウム分が有効に吸収されることが認められた。問題として、バイオリン鉱石を現在の法律で区分すると、有機物が含まれているので、汚泥肥料になる可能性がある。汚泥肥料に分類されると重金属が含まれていなくとも、どうしてもマイナスイメージがあり、流通を阻害しかねない。そのまま流通させるか、コストをかけて、膜分離等により有機物を取り除き、副産リン酸肥料として、付加価値をつけて流通させるかは今後の課題である。

3.2. 植物のフィチン酸含量を低下させる試み

3.2.1. 植物のフィチン酸の問題

イノシトール六リン酸(フィチン酸)は一般的に種子の全リンの75%に相当し、乾燥重量の1から数%にも達する¹³⁾。土壌から植物へ吸収されたリン酸の大部分は、色々な器官での再利用を経て最終的に種子に移動し、フィチン酸として蓄積される。毎年農業によって合成されるフィチン酸のリン量は、全世界で年間に使用された全肥料リンの50%以上に相当すると言われている¹³⁾。そ

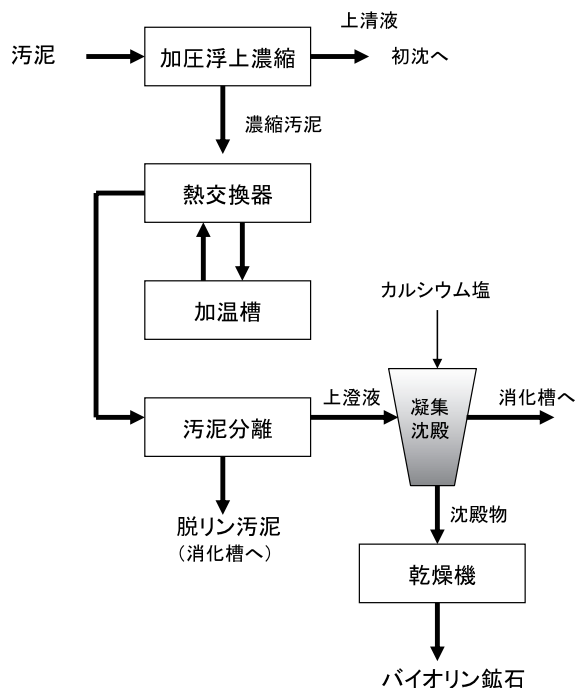


図3. リン回収実機規模のテストプラントの構成とバイオリン鉱石の外観。

のため、フィチン酸は生物生産の中で循環するリンの流れにおいて、大きなプールとあって過言ではない。牛などの反芻動物では細菌によってフィチン酸が分解され、動物に吸収される。しかし豚などの反芻動物ではない家畜はフィチン酸を分解できないためにリン源とならず、わざわざリン酸を栄養素として添加している。それどころか反芻動物ではない家畜から排出されたフィチン酸態リンは水質汚染の原因となっている。その解決策としてフィチン酸を分解する安定なフィターゼ酵素を、飼料に補充することが考えられている¹³⁾。飼料中のフィチン酸はフィターゼによって分解され、できたリン酸は動物に吸収される。こうして、もし飼料に添加するリン酸を減らすことができれば、全体でのリン消費を数%減らすことができる。結果的に排水中のフィチン酸が減少することによって水質汚染も防止できると考えられている。ロッシュ社の研究者によると、フィターゼの市場は500億円に上ると試算している¹⁴⁾。またフィチン酸はカルシウム、鉄、亜鉛などのミネラルの強いキレート化合物である。ミネラルと結合したフィチン酸塩の排出は、主食を穀物やマメに頼っている発展途上国においてミネラル不足の原因となっている¹⁵⁾。従って植物のリン含量を変えずにフィチン酸量を低下させることができれば、栄養学的にも一石二丁の効果が期待されている。

3.2.2. フィチン酸含量が低下した植物の育種

真核生物ではグルコース 6-リン酸からイノシトールリン酸を経てフィチン酸へと合成される。これらの経路においては、イノシトールリン酸からそのままリン酸化されていく経路と、脂質（ホスファチジルイノシトールリン酸）を経てリン酸化され、最終的にフィチン酸になる経路がある（図4）。1996年、Raboy らによってフィチン酸レベルが非常に低くなった植物が分離された（図4）¹⁴⁾。この変異株の分離方法とは、無機リン酸の含量の向上した種子を分離することである。基本的な考え方はフィチン酸合成と種子へのリン酸輸送は独立してお

り、フィチン酸が作れなくなることによって結果的に無機リン酸の濃度が上がるだろうということである。多くの変異トウモロコシ種子のリン酸含量を調べ、そのなかでリン酸含量が向上した変異株を分離すると、*lpa1-1* 種子では、野生型種子に比べてリン含量は変化ないものの、フィチン酸が67%減少していた（図4）¹⁴⁾。また *lpa2-1* 種子ではフィチン酸が50%減少する代わりにイノシトール (1, 2, 4, 5, 6) 五リン酸あるいはイノシトール (2, 3, 4, 5, 6) 五リン酸が増加していた²⁾。*lpa1-1* ではグルコース 6 リン酸からのイノシトールの合成と供給が欠損していると考えられた。*lpa2-1* ではイノシトールリン酸合成の後半の欠損、特にイノシトールリン酸 1-/3-kinase の活性に影響を及ぼす変異であると考えられた²⁾。大麦、米と大豆についても、同様の *lpa* 突然変異が分離された。飼料中のトウモロコシや大麦を‘低フィチン酸’型に置き換えると、家畜、豚、魚の排出リンが10から85%減少した¹³⁾。人を対象にした小規模な臨床研究では、*lpa1-1* トウモロコシから吸収される鉄分は、普通のトウモロコシに比べて50%増加し、亜鉛は76%増加した¹³⁾。しかしながら現時点では問題がある。種子フィチン酸を75%まで減らす *lpa* 変異株の収量は野生型に比べて5から15%低下する。種子フィチン酸を90から98%減らす変異株では、種子と植物の成長と機能に大きな影響を与え、より深刻な収量低下をもたらした。種子の乾燥重量の減少は、蓄積されたデンプンの減少によるものであり、*lpa* 種子での無機リン酸の増大によって生じると考えられている。その問題が克服されるような第二世代の低フィチン酸植物の開発が望まれている¹³⁾。

3.3. ポリリン酸蓄積微生物の開発

3.3.1. 微生物のポリリン酸

微生物はリン酸が数百結合したポリマーであるポリリン酸を蓄積する³⁾。効率よく排水からリンを除去するためには、細菌のリン含量を増大させることが重要であ

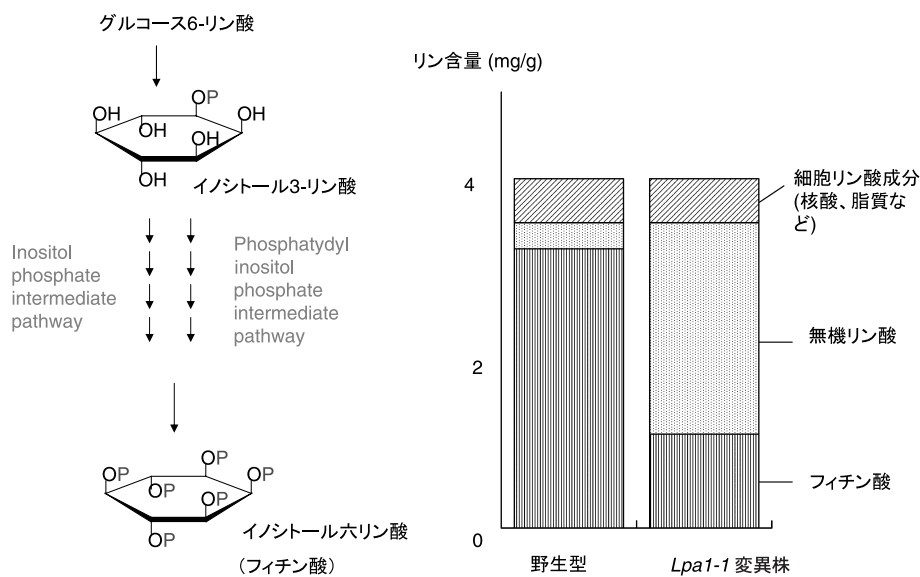


図4. フィチン酸合成経路と野生型および低フィチン酸植物のリン分布。グルコース 6-リン酸からイノシトール 3-リン酸が合成される。さらに種々のキナーゼによってリン酸化されてフィチン酸に変換される。*Lpa1-1* 変異株はグルコース 6-リン酸からイノシトール 3-リン酸の合成に異常が見られる変異株でフィチン酸含量が低下する。

る。微生物に取り込まれたリン酸は DNA, RNA, リン脂質など様々なリン化合物に変換されて細胞の構成成分となる。しかし、これらのリン化合物だけでは、せいぜい菌体乾燥重量の 1% 程度である。微生物のポリリン酸蓄積能力を高めることによって、リン含有率を高めることができる。大腸菌を含め多くの微生物は、ATP (アデニン三リン酸) を利用してポリリン酸を合成する酵素 (ポリリン酸キナーゼ) を持つ⁹⁾。大腸菌が合成するポリリン酸は、リン酸が直鎖状に最大 750 個結合したものである。

3.3.2. 遺伝子組換えによるポリリン酸蓄積菌の育種

遺伝子組換えによるポリリン酸蓄積菌の育種を目的として、ポリリン酸合成酵素遺伝子 (*ppk*) とリン酸輸送系の遺伝子である *pstSCAB* 遺伝子を多コピープラスミドにのせて大腸菌に導入した⁹⁾。その結果、多量のポリリン酸が蓄積し、リン含量は 10 倍以上に向上した。リン酸の取り込み実験を行ったところ、この組換え株の増殖速度は親株に比べて顕著に減少していたが、逆にリン酸の除去速度は数倍増加した。この組換え株は多量のポリリン酸を蓄積し、最大のリン含量は 16% (リン酸として 48%) にまで達した⁹⁾。良質のリン鉱石のリン含量は約 14% 程度であるとする、この菌のリン含量は天然リン鉱石を超えるリン含量を示したことになる。しかし、この組換え菌は培養条件によって著しく増殖が遅くなったり、プラスミドの保持が不安定になった。また、遺伝子組換え菌は、パブリックアクセプタンスを考えると、まだ利用しやすい状況ではないので、突然変異による改良が望まれた。

3.3.3. 突然変異によるポリリン酸蓄積菌の育種

幸運にも大腸菌のポリリン酸の含量が 1,000 倍も上昇した変異株 (遺伝子が変化した大腸菌) を取得することに成功した¹⁰⁾。その遺伝子を解析した結果、*phoU* 遺伝子の 86 番目の G が A に変化しているだけであった。一つの遺伝子が増えるだけで、野生株の 1,000 倍ものポリリン酸が蓄積していることを示している。微生物がリン酸飢餓に陥ったとき、生き残りをかけて様々なリン酸制御遺伝子が発現する。*PhoU* はこれらのリン酸制御遺伝子を負に制御することが知られていた。どのリン酸制御遺伝子がポリリン酸を常に蓄積させるために重要であるかを調べた結果、*phoU* 遺伝子の一塩基の変異によって

発現するリン酸輸送タンパク質 *PstSCAB* が特に重要であることがわかった¹⁰⁾。この遺伝子は前述のプラスミド上にのせて発現を向上させたものの一つである。*phoU* 変異株はアルカリホスファターゼも発現する。このアルカリホスファターゼは X-リン酸 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) を分解して青色の物質を作る。*phoU* 遺伝子の変異株、すなわちポリリン酸を蓄積する変異株は X-リン酸含有培地で青色を示すコロニーとして極めて簡単に選抜できる。また *phoU* 遺伝子はほとんどの微生物で保存されている。この性質はポリリン酸蓄積微生物を育種する上で極めて重要なことで、種々の微生物において極めて簡単にポリリン酸蓄積変異株を作り出せることを意味する。早速活性汚泥微生物から増殖の早い *Pseudomonas putida* を選びだし、X-リン酸法によってポリリン酸を蓄積するように改良した¹¹⁾。得られたポリリン酸を蓄積する *P. putida* は排水からリン酸を効率よく除去した (図 5)。また、驚くべきことに菌体内のポリリン酸含量が全菌体成分の約 30% (リン酸として) に及ぶことがわかった (図 5)。このリン含量はリン鉱石のものにやや劣るものの、排水中でも極めて安定に増殖すること、組換え菌ではないことから有用であると思われる。黒ボク土は非常にリンを固定しやすい土壌である。この菌を直接黒ボク土に混合した場合、リン酸肥料として有効であることが分かってきている。

ポリリン酸蓄積にとってリン酸輸送は極めて重要な因子である。大腸菌ではリン酸輸送に関わるタンパク質として *PstSCAB*, *PitA*, *PitB* が知られていた。これらのリン酸輸送系の遺伝子の変異の効果を調べた結果、*pstSCAB* 変異株では、予想通りポリリン酸を蓄積できなくなるが、意外にも *pitA* 変異株では野生株に比べてポリリン酸を沢山蓄積することが分かった。同じリン酸輸送タンパク質でも *PitA* に関してはポリリン酸を減少させる方向にも働くのである。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ことが原因であると考えられた。事実 *pitA* 変異がポリリン酸を蓄積させる際に有効なのは、リン酸が過剰に流入する時だけであった。*phoU* と *pitA* の二重変異をもつ大腸菌は *phoU* 変異株よりもさらに二倍程度ポリリン酸量が増えることが分かった。ポリリン酸は細胞内でポリリン酸

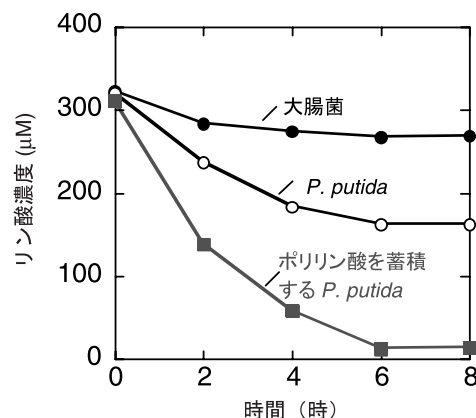
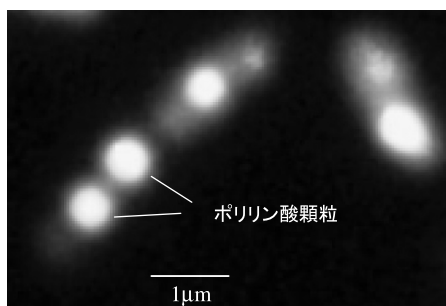


図 5. 改良したポリリン酸蓄積微生物の蛍光顕微鏡写真とそれを用いた排水からのリン除去。改良した微生物を DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) で染色し、蛍光観察を行った。右は改良した菌を使って人工排水からのリンの除去を調べたもの。

分解酵素によってリン酸にまで分解される。ポリリン酸分解酵素はアミノ酸飢餓で作られるストリンジント因子 (ppGpp) によって拮抗的に阻害されるので、アミノ酸の入っていない培地に移すことによって、ポリリン酸含量がさらに向上する。現在までに確立したポリリン酸蓄積微生物の改良方法は、まず *pitA* 変異を導入することによってリン酸の放出を抑制し、*phoU* 変異を導入することによって *pstSCAB* によるリン酸の細胞内流入を促進させ、さらにアミノ酸の入っていない排水に晒すことである。これによって大腸菌では約2,000倍以上のポリリン酸を蓄積させることができる。

3.3.4. 嫌気好気法との比較

従来微生物のリン含量を高める技術としては、活性汚泥を嫌気と好気に晒すことを繰り返すことでポリリン酸の含量を高める技術がある。この嫌気好気生物脱リンプロセスは、ポリリン酸を多く含む微生物を優先的に生育させる効果的な排水からのリン除去プロセスである¹⁰⁾。この方法は、従来の曝気槽の前に嫌気槽を設けるだけで、高い効率でのリン除去が可能になることから、普及している。なぜ嫌気好気生物脱リンプロセスでポリリン酸蓄積菌が優先になるのかについては総説が書かれており、本特集の常田氏らの論文でも紹介されているので参考にされたい。しかし、嫌気好気法で活躍するポリリン酸蓄積菌の増殖速度は遅いという欠点を持つ。われわれの方法は微生物のリン含量の限界を打ち破るだけでなく、増殖速度が速い好気性の微生物を利用するので嫌気と好気を繰り返す必要もない。さらに改良を加えることによって実際に排水からリンを効率よく除去する有効な菌を育種できる可能性もある。この菌をうまく使って水域へ流出するリンのすべてを回収し、そのまま畑に戻すことができれば、国内で約14万トンのリンの回収と富栄養化防止の両方を達成することができるかもしれない。

3.4. 不溶性リン溶解微生物の利用

畑地にまかれたリンの多くは土壤に固定される。酸性土壤中では、酸化アルミや水酸化アルミニウムに結合し、アルカリの土壤ではカルシウムに結合して固定される¹⁵⁾。固定されたリンはそのままでは植物に吸収されない。固定されるリンの量は膨大である (図2)。リン資源の有効利用という観点から言えば大きな問題であるにもかかわらず、環境問題が伴っていなかったこともあり、あまり重要視されてこなかったといえる。解決方法の一つとして、固定されたリンを溶解する生物を利用してリンの肥料効率を高めることが考えられている。今までに多くのバクテリア (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Flabobacterium*) がリン酸カルシウムやヒドロキシアパタイト、リン鉱石といった不溶性リンを溶解することが報告されている¹⁵⁾。これらは培地に不溶性リンを混合し、溶解する溶解剤の有無でスクリーニングされている。メカニズムとしては分泌する有機酸による不溶性リンの溶解である。特にグルコン酸はもっとも頻度の高い不溶性リン溶解剤のようである。それ以外にもプロトンの放出によるリン溶解機構も考えられている¹⁵⁾。*Burkholderia cepacia* は不溶性リンを溶解する活性があり、実際に農

場で使われて、トマト、タマネギ、ポテト、バナナなどの栽培で収率向上で実績を上げている。キューバではバイオファーティライザーとして販売されている¹⁵⁾。しかし、土壤のタイプや栽培品種に依存し、どこでも有効であるとは限らないようである。また土壤中には有機態リンとしての蓄積も多くある。それはほとんどがフィチン酸である。30–48%の培養可能な土壤細菌がフィチン酸を利用できる。これらのバクテリアは有機態リンを植物が利用可能なリン酸に変換する酵素を持つ。特異性の低い酸性ホスファターゼ、フィターゼなどが有効である¹⁵⁾。遺伝子改良技術としては *Erwinia herbicola* のヒドロキシアパタイトの溶解に関与する遺伝子がクローン化された⁹⁾。大腸菌でこの遺伝子を発現させると、グルコン酸の生産量の増加と不溶性リンの溶解活性の向上が見られた。この遺伝子はピロロキノリンキノン (PQQ) 合成酵素の合成に関与し、それを介して、グルコースからグルコン酸を合成する PQQ 結合型グルコースデヒドロゲナーゼの発現に関与していると考えられている⁹⁾。これらの問題は一度に解決するのは難しく、それぞれの畑地にあった微生物をうまく組み合わせて一つ一つ実績を積んでいくことが重要かもしれない。

4. おわりに

リンは食料生産など人間活動にとってなくてはならない物質である。そのリンのもとになるリン鉱石が今世紀後半には危機的状況になる予測について述べた。国内でのリンのリサイクル技術の開発はまだ始まったばかりであるが、下水汚泥からのリンのリサイクルは深刻な富栄養化問題の解決にもつながる重要技術であると大変期待されている。もし、わが国がリンのリサイクルシステムを逸早く確立すれば、地球的規模でのリン資源枯渇の危機を回避することに貢献できる。しかし、リンを有効利用する循環型社会形成を考えれば、下水汚泥からのリンのリサイクルだけでは不十分である。植物のフィチン酸含量を減らすことも重要であるし、ポリリン酸蓄積微生物の能力を強化して我々の使ったリンをすべて回収することも考えなくてはならない。さらに残された課題はリンの土壤への固定の問題である。これについては個々の土壤の性質によって解決方法が変わってくるため一気に解決することは難しいが、それぞれで対応することによって解決の糸口が見えてくるように思える。いずれにしてもこれらの技術を強力なものとするための研究が続けられることが重要であろう。

謝 辞

リン鉱石の枯渇のシナリオについてのデータのほとんどは Ingrid Steen. 1998. Phosphorus & Potassium, 217: 25–31 に掲載されたものであり、British Sulphur Publishing から許可を得て掲載している。また、活性汚泥からのリンの回収と利用は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の平成10年度即効型提案公募事業、日本学術振興会と NEDO による平成11年度マッチング・ファンド方式による産学連携研究開発事業、平成13–15年度の NEDO による産学連携実用化開発補助事業およ

び平成14年度補正予算による地域活性コンソーシアム研究開発事業により行われている。テストプラントの設置にあたり広島県都市局下水道室、広島県下水道公社および芦田川浄化センターの皆様にご協力を賜った。バイオリン鉱石の肥料効果のデータは小野田化学工業から資料を頂いた、心から感謝を申し上げたい。バイオリン鉱石のリサイクルシステムの開発に関しては平成16年度より生物系特定産業技術研究機構による生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業により実施している。また、本事業に関連する基礎研究の実施に当っては、科学技術振興機構さきがけ (JST-PREST), 地球環境産業技術研究機構 (RITE), トヨタ自動車株式会社や日立金属株式会社など、多くの企業や財団等からの御支援も頂戴した。

文 献

- 1) Abelson, P.H. 1999. A potential phosphate crisis. *Science* 283: 2015.
- 2) Dorsch, J.A., A. Cook, K.A. Young, J.M. Anderson, A.T. Bauman, C.J. Volkmann, P.P.N. Murthy, and V. Raboy. 2003. Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes. *Phytochemistry* 62: 691-706.
- 3) Goldstein, A.H., and S.T. Liu. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Bio/Technology* 5: 72-74.
- 4) 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.
- 5) Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177: 491-496.
- 6) 越野正義. 2003. リンの循環とその展望. 再生と利用. 26: 6-12.
- 7) 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.
- 8) Liu, S.T., L.Y. Lee, C.Y. Tai, C.H. Hung, Y.S. Chang, J.H. Wolfram, R. Rogers, and A.H. Goldstein. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J. Bacteriol.* 174: 5814-5819.
- 9) 三品文雄, 新保高之. 2003. 下水汚泥リン資源化の必要性. 再生と利用. 26: 13-18.
- 10) Morohoshi, T., T. Maruo, Y. Shirai, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda. 2002. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4107-4110.
- 11) Morohoshi, T., T. Yamashita, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda. 2003. A method for screening polyphosphate-accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 637-640.
- 12) 大竹久夫, 黒田章夫, 滝口 昇, 加藤純一. 2004. リンの回収と再資源化. *Phosphorus letter* 50: 9-17.
- 13) Raboy, V. 2001. Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *TRENDS in Plant Science* 6: 458-462.
- 14) Raboy, V., and P. Gerbasi. 1996. Genetics of *myo*-inositol phosphate synthesis and accumulation. In: Biswas, B.B., Biswas, S. (Eds.), *myo*-Inositol Phosphates, Phosphoinositides, and Signal Transduction. Plenum Press, New York, pp. 257-285.
- 15) Rodriguez, H., and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339.
- 16) Sedlak, R.I. 1991. Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater, 2nd ed., New York: Lewis publishers.
- 17) Takiguchi, N., M. Kishino, A. Kuroda, J. Kato, and H. Ohtake. 2004. A laboratory-scale test of anaerobic digestion and methane production after phosphorus recovery from waste activated sludge. *J. Biosci. Bioeng.* 97: 365-368.
- 18) Takiguchi, N., A. Kuroda, J. Kato, K. Nukanobu, and H. Ohtake. 2003. Pilot plant tests on the novel process for phosphorus recovery from municipal wastewater. *J. Chem. Eng.* 36: 1143-1146.
- 19) U. S. Geological survey. 2004. Mineral commodity summaries, January 2004.
- 20) Valsami-Jones, E. 2004. Phosphorus availability in the 21st century: <http://www.nhm.ac.uk/mineralogy/phos/p&k217/steen.htm>
- 21) 財務省貿易統計. 2004. 品別国別表: <http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm>.