
 総合論文：第 56 回大会シンポジウム(Ⅰ)

 「納豆の糸」の主成分，ポリ- γ -グルタミン酸の機能と生合成機構*

高知大学農学部生物資源科学科**

味園 春雄，芦内 誠

Vitamins(Japan), 79(2), 71-78(2005)

**Function and Biosynthetic Mechanism of Poly- γ -Glutamate,
a Main Component of *Natto* Mucilage**

Haruo MISONO, Makoto ASHIUCHI

Department of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

Poly- γ -glutamate (PGA) is an unusual polypeptide in which glutamate is polymerized via γ -amide linkages. PGA is produced by *Bacillus* strains, *Natrialba aegyptiaca*, and hydra. PGA, which is biodegradable and highly water-absorbent acidic polymer, is not attacked by proteases, evades mammalian immune defense mechanisms, binds Ca^{2+} , and serves as a cryoprotective material. PGA may physiologically function as an adaptation agent in various environments. Multifarious applications of PGA have been developed based on its function. PGA produced by *Bacillus subtilis* IFO 3336 contains a large amount of D-glutamate. D-Glutamate was formed from L-glutamate by glutamate racemase in this organism. Two kinds of glutamate racemase isozymes, Glr and YrpC, were found in *B. subtilis* IFO 3336, and Glr supplied D-glutamate for the PGA production. The *pgsBCA* genes encoding the membrane-associated PGA synthetase complex of *B. subtilis* IFO 3336 were isolated. The PgsBCA enzyme complex synthesized PGA in an amidoligation-like manner. The structure and function of the enzyme complex are also discussed.

Keywords: *Bacillus subtilis*, poly- γ -glutamate, D-glutamic acid, glutamate racemase,
poly- γ -glutamate synthetase complex

(Received July 9, 2004)

はじめに

最近、納豆が健康食品として注目されているが、「納豆の糸」の主成分はポリ- γ -グルタミン酸(PGA)であり、D-グルタミン酸を多く含んでいる。また、PGAには多彩な機能があり、その有用性にも注目が集まっている。しかしながら、納豆菌のPGA生合成機構は長い間不明であった。本稿では、PGAの色々な機能や生合成機構について紹介する。

1. ポリ- γ -グルタミン酸の構造と機能

PGAはグルタミン酸の γ -カルボキシル基と α -アミノ基がイソペプチド結合で連なったポリマーである。主として納豆菌(*Bacillus subtilis*)などの*Bacillus*属細菌によって生産されるが、好塩古細菌*Natrialba aegyptiaca*や腔腸動物であるヒドラもPGAを生産する。その分子質量は1万ぐらいのものから100万を越えるものもある(表1)。炭疽菌*Bacillus anthracis*の生産するPGAはD-グルタミン

* 本論文は日本ビタミン学会第56回大会(平成16.5.28~29, 長岡市)におけるシンポジウム講演をまとめたものである。
** 〒783-8502 南国市物部乙200

表 1. PGA の生産菌と構造的特徴.

生産菌	分子質量 (kDa)	含 量 (%)	
		L- グルタミン酸	D- グルタミン酸
<i>Bacillus subtilis</i> (納豆菌)	10-1000	20-50	50-80
<i>Bacillus subtilis</i> (戦国醤菌)	> 1000	30-40	60-70
<i>Bacillus licheniformis</i>	10-1000	10-50	50-90
<i>Bacillus megaterium</i>	> 200	70-80	20-30
<i>Bacillus anthracis</i> (炭疽菌)	未測定	0	100
<i>Bacillus halodurans</i> (好アルカリ性細菌)	10-15	100	0
<i>Natrialba aegyptiaca</i> (好塩古細菌)	> 1000	100	0
<i>Hydra</i>	3-25	100	0

酸のみから構成されているが、好アルカリ性細菌 *Bacillus halodurans* や *N. aegyptiaca*, ヒドらは L-グルタミン酸からなる PGA を生産する。しかし、納豆菌や戦国醤菌 (*Bacillus subtilis* var. *chungkookjang*), *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* は D-グルタミン酸と L-グルタミン酸からなる PGA を生産する。PGA 中の D-グルタミン酸含量は菌の種類や培養条件によって異なるが、納豆菌が生産する PGA には D-グルタミン酸が多く含まれている¹⁾²⁾。DL-グルタミン酸からなる PGA の場合、① D-グルタミン酸のみからなるポリマーと L-グルタミン酸のみからなるポリマーの混合物、② D-グルタミン酸と L-グルタミン酸がランダムに結合したポリマーの 2 つの可能性がある。納豆菌の生産するポリマーは D-グルタミン酸と L-グルタミン酸がランダムに連なったポリマーであることが、PGA の L-グルタミン酸残基にのみ作用するエンド型の L-depolymerase を用いて明らかにされている³⁾。

PGA は、酸性ポリマーとしての化学的特性と共に多彩

な機能を備えている。たとえば、① 生分解性である、② 保水性がある、③ プロテアーゼに耐性である、④ 抗原性がない、⑤ 不凍効果を示す、⑥ 環境中のアルカリ pH を中和できる、⑦ カルシウムなどの生理活性ミネラルと結合し、徐放できる、⑧ 汚染物質(特に、高分子物質)と会合、凝集し、沈降させる、などが挙げられる。このような PGA の機能をうまく利用し、炭疽菌は PGA を生産して哺乳動物の免疫網から逃れている⁴⁾。また、好アルカリ性細菌 *B. halodurans* はその細胞壁の構成成分として酸性ポリマーである PGA を生産して細胞表層の pH を中和し⁵⁾、好塩古細菌 *N. aegyptiaca* は高塩環境下での脱水現象から身を守るために高い保水性を備えた PGA を生産する⁶⁾など、環境適応因子として PGA を生産している。さらに、ヒドらは PGA を生産して浸透圧を調整している⁷⁾。

2. ポリ- γ -グルタミン酸の用途

上に述べた PGA の機能に基づき、PGA の多くの用途が

表 2. PGA とその誘導体の応用.

分野	応用面
生分解性ポリマー	プラスチック、繊維、フィルム 水分吸収剤(紙おむつ)、保水剤(砂漠の緑化)
環境修復	凝集剤(廃液処理剤) 金属吸収剤(重金属や放射性物質の除去)
その他	凍結防止剤 苦味除去剤(アミノ酸、ペプチド、キニーネ等の苦み除去) 食品の粘性増強、触感改善(ドリンク剤、パン、麺類、豆腐) カルシウム吸収促進剤 家畜試料添加剤(卵の殻の強化) 化粧品(保水剤) 薬剤デリバリー(抗ガン剤の薬効持続) フィブリンの代用(治療用) 分散剤(界面活性剤、化粧品、紙製造等) 固定化担体

開発されている。PGAは生分解性ポリマーとしてプラスチック、繊維、フィルムに利用でき、特に、 γ 線を照射してできたPGAの架橋体は、自重量の5,000倍もの水分を保持してヒドロゲルを形成するため、吸水性ポリマーの代替品として、あるいは、水分を保持したヒドロゲルを砂漠の緑化へ利用しようとする試みがなされている⁸⁾。環境修復の面では、排液処理の際の凝集剤として、また、重金属除去剤として利用できる。その他、凍結防止剤、苦み除去剤、食品の粘性増強、触感改善、カルシウム吸収促進剤、また、保水剤として化粧品にも利用されている(表2)。さらに、薬剤デリバリーやフィブリンの代用として医療に用いることができる¹⁰⁾。これら多くの用途が開発され、PGAの生産に関する研究が活発に行われているが、その生産性を高めるためにはPGAの生合成機構を明らかにする必要がある。

3. ポリ- γ -グルタミン酸の生合成機構

3-1. 納豆菌のグルタミン酸ラセマーゼ：基質供給酵素系の解析

納豆菌のPGAにはD-グルタミン酸が多く含まれている。そこで、D-グルタミン酸がD-アミノ酸トランスアミナーゼ反応で生合成されるのか、グルタミン酸ラセマー

ゼの作用で生合成されるのか、あるいは別の経路で生合成されるのかを明らかにするために、納豆菌のD-アミノ酸トランスアミナーゼとグルタミン酸ラセマーゼの両活性を測定した。その結果、PGA合成が始まる定常期の納豆菌 *B. subtilis* IFO 3336にはD-アミノ酸トランスアミナーゼ活性が検出されず、代わりにグルタミン酸ラセマーゼの高い活性が認められた。一般に、グルタミン酸ラセマーゼは、細胞壁ペプチドグリカンの合成に必要な限られた量のD-グルタミン酸の生成に関与し、そのため見かけ上活性は検出できないと考えられていた。例外的に、乳酸菌 *Lactobacillus fermentum* と *Pediococcus pentosaceus* でその活性が認められるのみであった。納豆菌はこれら乳酸菌よりも高いグルタミン酸ラセマーゼ活性を有していた。そこで、納豆菌よりグルタミン酸ラセマーゼを精製し、性質を明らかにして、Glrと名付けた¹⁰⁾。その遺伝子を大腸菌にクローニングして、酵素遺伝子の塩基配列を明らかにし、酵素の一次構造を推定した。さらに、納豆菌 *B. subtilis* IFO 3336には、Glrのほかに、YrpCと名付けたグルタミン酸ラセマーゼのアイソザイムが存在していることも明らかにした¹¹⁾。グルタミン酸ラセマーゼのアイソザイムの存在を示す初めての例である。両酵素は、単量体であり、最適pH、最適温度、補酵素を要求せず、システイン

表3. *Bacillus subtilis* のグルタミン酸ラセマーゼアイソザイム Glr と YrpC の性質。

性質	Glr	YrpC
分子質量 (kDa)		
SDS-PAGE	30	30
Gel filtration	30	30
	(monomer)	(monomer)
最適 pH	8.0	7.5-8.0
最適温度	37°C	30-37°C
熱安定性	60°C	30°C
補酵素要求性	No	No
UDP-MurNAc-L-Ala ^{a)} の影響	No	No
反応速度定数		
[D-Glutamate]		
<i>K_m</i> (mM)	2.5	1.2
<i>V_{max}</i> (μmol/min/mg)	56	0.33
<i>V_{max}/K_m</i>	22.4	0.275
[L-Glutamate]		
<i>K_m</i> (mM)	50	0.18
<i>V_{max}</i> (μmol/min/mg)	1150	0.05
<i>V_{max}/K_m</i>	23.0	0.278
[<i>K_{eq}</i> (D/L)]	0.974	0.989
菌体生育に与える遺伝子過剰発現の影響	No	Toxic

^{a)} UDP-MurNAc-L-Ala, *E. coli* のグルタミン酸ラセマーゼの活性化因子 UDP-N-acetylmuramyl-L-alanine.

残基が触媒作用に関係している点では似ているが、熱安定性、活性の強さが異なっている(表3)。YrpCの触媒活性、 V_{max} 値はGlrのそれと比較し顕著に小さい。一方、そのL-グルタミン酸に対する K_m 値は既知のグルタミン酸ラセマーゼの中で最も小さかった¹¹⁾。YrpCの存在はおそらくL-アミノ酸、特にL-グルタミン酸の存在が極端に制限された貧栄養ストレス環境下(天然の環境はこれに近いと考えられる)での生存、生育で有利に働いている可能性がある。YrpCの遺伝子を大腸菌で高発現させると、細胞分裂や様々なストレス環境下での遺伝子発現の制御に関わるDNAジャイレース(弛緩型DNAを超らせん型DNAに変換する酵素)を阻害し、大腸菌の生育を抑えた¹²⁾。これは大腸菌のグルタミン酸ラセマーゼ(MurI)¹³⁾と類似の性質である。一方、Glrの遺伝子を高発現させても大腸菌の生育を阻害しない¹¹⁾¹²⁾。GlrのL-グルタミン酸に対する K_m 値、 V_{max} 値は大きく¹⁰⁾、このことはL-グルタミン酸、あるいはその基となるアミノ酸類が豊富に存在する環境下(すなわち、PGA生合成に適した環境である)で、生理的にL-グルタミン酸の細胞内濃度が高まった後、これを大量のD-グルタミン酸へと変換するのに適している。このような富栄養環境下で、Glrは細胞壁ペプチドグリカンに加えPGAの生合成に要求される大量のD-グルタミン酸供給の中心的酵素である可能性が高い。GlrのPGA生合成への関与を明らかにするために、納豆菌のPGA合成酵素遺伝子の単離をショットガン法で試みた。

3-2. PGA合成酵素複合体遺伝子の同定

Makinoらは、炭疽菌の莢膜PGAの合成に関与する三つの遺伝子、*capB*、*capC*、*capA*を単離し、これらの遺伝子がPGAを生産する*B. subtilis*、*B. megaterium*、*B. licheniformis*などの他の*Bacillus*属細菌には存在しないと報告している¹⁴⁾。我々は、納豆菌*B. subtilis* IFO 3336

のゲノムライブラリーからPGA生産性を指標に一株の大腸菌クローン株を選択した。このクローン株は、約3 kbの挿入断片を有し、*pgsB*、*pgsC*、*pgsA*と名付けた三つの構造遺伝子(*pgsBCA*)を含み、*pgsB*は分子質量約44 kDa、*pgsC*は16 kDa、*pgsA*は42 kDaのタンパク質をコードしていた¹⁵⁾。これらの遺伝子産物は枯草菌(*B. subtilis* 168)の機能未知遺伝子、*ywsC*、*ywtA*、*ywtB*の産物の一次構造と同じであった。したがって、PGAを生産しない枯草菌(*B. subtilis* 168)にも、PGA合成酵素遺伝子は存在しているが、何らかの理由でその機能発現が抑えられている可能性が高い。また、納豆菌の*pgsBCA*遺伝子産物は、炭疽菌の*capBCA*遺伝子産物とも高い相同性(B, 66; C, 77; A, 50%の同一性)を示した。これらの遺伝子の下流には、共にPGA分解酵素(depolymerase)遺伝子が存在していた(図1)。炭疽菌の*dep*遺伝子はエキソ型のPGA分解酵素であり⁴⁾、納豆菌や戦国醬菌の*pgdS*遺伝子はD-グルタミン酸とD-グルタミン酸の間を切断するエンド型のPGA分解酵素であった¹⁶⁾。また、これらのPGA合成酵素遺伝子および分解酵素遺伝子は、炭疽菌ではプラスミドに存在するのに対し、納豆菌、戦国醬菌、枯草菌では染色体上に存在していた。

*pgsBCA*遺伝子の機能を明らかにするために、各遺伝子を大腸菌発現ベクターpTrc99Aに連結して、大腸菌JM109に導入し、クローン株のPGA生産性を調べた。*pgsB*、*pgsC*、*pgsA*の各単独の遺伝子を持つものはPGAを生産せず、三つの遺伝子*pgsBCA*を含む大腸菌クローン株のみが菌体外にPGAを生産した(表4)¹⁵⁾。また、Glrをコードするグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を共発現させると、PGA生産性とPGA中のD-グルタミン酸の含量が増加した。このことから、納豆菌においては、グルタミン酸ラセマーゼによってL-グルタミン酸からD-グルタミン酸

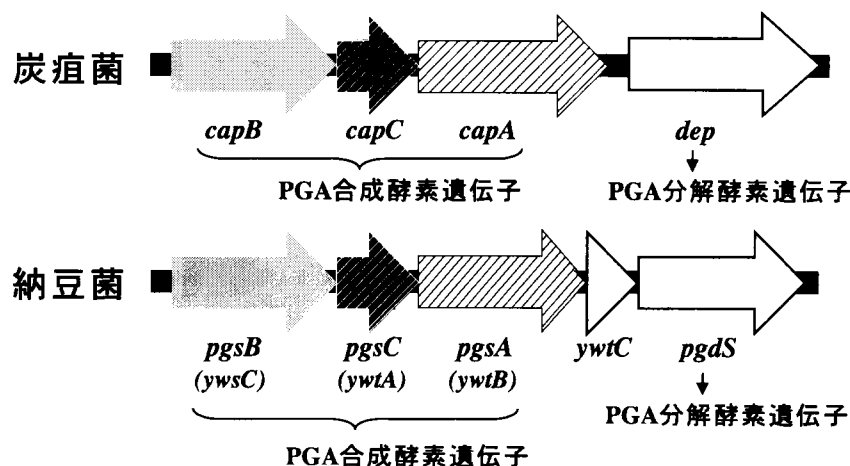


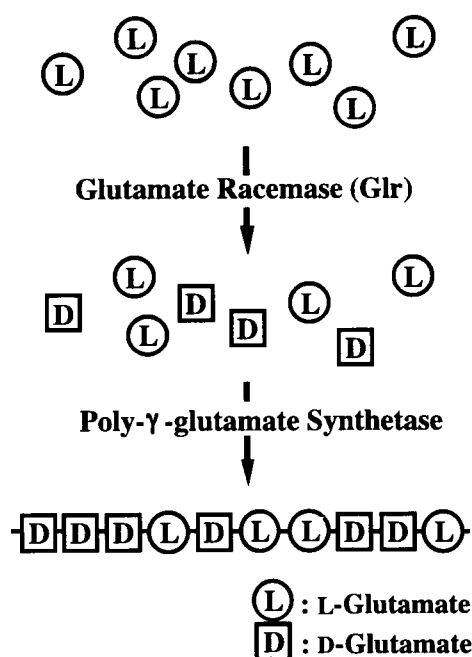
図1. PGA合成酵素複合体遺伝子と分解酵素遺伝子。ywsC, ywtA, ywtB, ywtC, 枯草菌(*Bacillus subtilis* 168)の機能未知遺伝子。

表4. 大腸菌クローン株によるPGAの生産.

大腸菌クローン株	PGAの生産量	D/L比
M109/pTrc99A	0	
JM109/ <i>pgsB</i>	0	
JM109/ <i>pgsC</i>	0	
JM109/ <i>pgsA</i>	0	
JM109/ <i>pgsBC</i>	0	
JM109/ <i>pgsBA</i>	0	
JM109/ <i>pgsCA</i>	0	
JM109/ <i>pgsBCA</i>	1.7	13/87
JM109/ <i>pgsBCA</i> + <i>glr</i> ^{a)}	2.6	64/36

a) *glr*, グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子.

が生成し、グルタミン酸の両異性体を基質とするPGA合成酵素複合体(PgsBCA)によって、D-グルタミン酸とL-グルタミン酸からなるPGAが合成されること(図2)、細胞内のD-グルタミン酸含量によってPGA中のD-グルタミン酸含量が変化することが示唆された¹³⁾。一方、PGAを生産する大腸菌クローン株の膜画分にはのみグルタミン酸依存性のATPアーゼ活性が存在し、L-グルタミン酸よりもD-グルタミン酸を良い基質とした(図3)。本反応でATPから生成してくる核酸種はAMPではなくADPであった。このことは、アミドリガーゼ様反応でPGAが合成されることを示している。すなわち、グルタミン酸の γ 位のカルボキシル基がリン酸化され、そこにグルタミン酸のアミノ基が攻撃して、グルタミン酸のポリマーPGAが生成する機構が考えられる(図4)¹⁷⁾。一般に、アミドリガーゼはや

図2. ポリ- γ -グルタミン酸生合成経路.

やアルカリ側で最大活性を示すのに対し、本PGA合成酵素複合体の最適pHは中性付近であった。次に、PgsBCAのどの成分がアミドリガーゼ様活性を示すのかを明らかにするために、*in vitro* 転写翻訳システムを用いてこれら各成分を合成し、アミドリガーゼ様活性を調べた。その結果、本活性はPgsBCAのほかにPgsBCでも認められ、L-グルタミン酸よりもD-グルタミン酸の方が良い基質であった(表5)。両グルタミン酸に対する K_m 値はPgsBCとPgsBCAでほぼ同じであったが、最大反応速度はPgsBCAの方がPgsBCよりも数倍高かった¹⁷⁾。興味深いことに、PgsBCAが可溶性酵素として合成される本系では、高分子のPGAは生産されなかった。PgsBとPgsBのN-末端部分が欠如したPgsB'に相当する44 kDaと33 kDaの可溶性タンパク質からなる酵素によりL-グルタミン酸のみを基質として高分子量PGAが生産されるとの報告¹⁸⁾があるが、我々が調べたところでは、PGAの生産は認められなかった¹⁹⁾。

韓国の調味料、戦国醬から単離された戦国醬菌は、超高分子量のPGA(平均分子量で1,000 kDaを大きく超える)を生産し、納豆菌と同じく、*pgsBCA* 遺伝子を有していた²⁰⁾。これまで知られている納豆菌とは異なり、プラスミドを保有していなかった。納豆菌数株について、その*pgsBCA* 遺伝子破壊株の調製を試みたが、いずれも不成功に終わった。そこで、戦国醬菌を用いて*pgsBCA* 遺伝子破壊株を調製した。本*pgsBCA* 遺伝子破壊株はPGAを生産しなかった。また、後に述べる膜結合性のPGA合成活性も存在せず、グルタミン酸依存ATPアーゼ活性も認めら

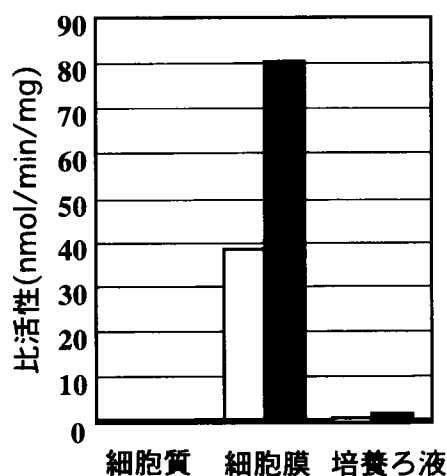


図3. PGA合成酵素複合体遺伝子(*pgsBCA*)を含む大腸菌クローン株のPGA合成酵素複合体の局在性。基質としてL-グルタミン酸(□), D-グルタミン酸(■)を用い、グルタミン酸依存性ATPアーゼ活性を測定。

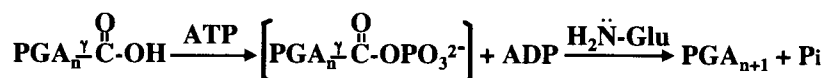


図4. PGA合成酵素複合体によるPGA合成の推定反応機構.

表5. PGA合成酵素複合体を形成する各成分タンパク質のグルタミン酸依存性ATPアーゼ活性.

タンパク質	比活性 (U/mg)	
	D-グルタミン酸	L-グルタミン酸
None	0	0
Control (Thioredoxin)	0	0
PgsB	0	0
PgsC	0	0
PgsA	0	0
PgsBC	148 ± 28 (3.6)	54 ± 19 (17)
PgsBA	0	0
PgsCA	0	0
PgsBCA	495 ± 95 (4.2)	113 ± 48 (15)

各成分タンパク質は *in vitro* 転写翻訳システムを利用して調製。
()内は見かけの K_m 値, mM.

れなかった。したがって、*B. subtilis*において、*PgsBCA*がPGA合成に関係している唯一の酵素複合体であることが立証された¹⁷⁾。

4. 膜画分を用いたポリ- γ -グルタミン酸の酵素合成

戦国醬菌の膜からPGA合成酵素複合体の可溶化を試みた。膜タンパク質の可溶化は、用いる界面活性剤に固有の臨界ミセル濃度(CMC)を指標にその3倍以上の濃度で行うのが一般的である。界面活性剤ChapsのCMCは24mMであるが、これを超える濃度ではPGA合成活性は完全に消失した。一方、可溶化が起こり得ない0.8mM、あるいはそれ以下の低濃度のChapsでPGA合成活性が認められた。Chapsは可溶化に用いられる界面活性剤の中でも最も温和な部類に入り、Chaps以外の界面活性剤を用いたときにはPGAは全く合成されなくなった。PGA合成酵素複合体は、本質的に極端に不安定な構造をしており、膜に局在した状態でのみPGA合成反応を触媒できる構造を取り得ることが示唆された²¹⁾。そこで、Chaps 0.8mMを用いて膜画分を均一にし、グルタミン酸のDL比を変えてPGAの酵素合成を行った。10mMのグルタミン酸を基質にしたときには、L-グルタミン酸よりもD-グルタミン酸でPGAの生産性が高く、見かけ上はDL-グルタミン酸を用いた場合に最大の生産性が得られた(図5)。しかし、より高い基質濃度(50mM)の条件下では、L、D、DL-グルタミン酸のいずれでもPGA生産性に差がなかった。そして、L-グルタミン酸を用いた場合、L-グルタミン酸からなる

PGA伸長鎖が、D-グルタミン酸を用いた場合にはD-グルタミン酸からなるPGA伸長鎖が合成され、DL-グルタミン酸を用いた場合にはD-グルタミン酸を多く含むPGA伸長鎖が合成された。PGAの酵素合成では、 Mg^{2+} は必須因子であり、 Zn^{2+} は活性化因子として要求された。一方、

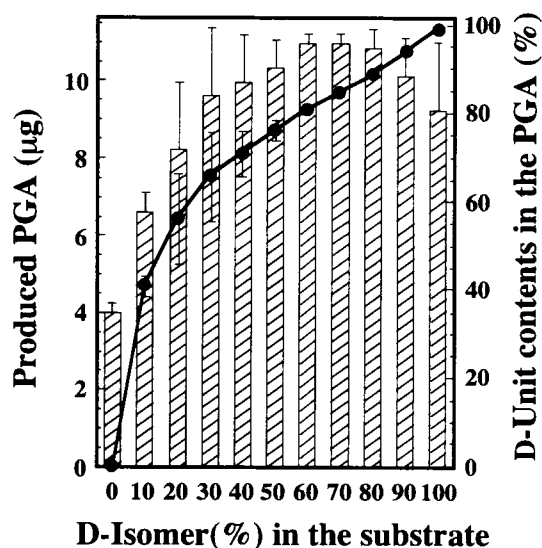


図5. 細胞膜画分によるPGAの合成。グルタミン酸(10mM)を用い、37°Cで2時間反応後、生成されたPGAの量(棒グラフ)と生成されたPGA中のD-グルタミン酸含量(●)。

これまで重要と考えられてきた Mn^{2+} には何の効果も認められなかった。また、各 *pgs* 遺伝子の発現制御実験により、*pgsBCA* の全ての遺伝子が菌体レベルでの PGA 生産能および膜画分の PGA 合成活性の発現に必要なことが確認された²¹⁾。以上のように、膜局在性 PGA 合成酵素複合体 PgsBCA によって高分子量 PGA が合成されることが明らかになった。PgsB, PgsC, PgsA は、いずれも膜と相互作用をすることができる疎水性領域を持っており、中でも PgsC は疎水性アミノ酸に富み、その大部分は膜中に存在していることが予想される¹⁵⁾。PgsB にはアミドリガーゼ群に共通の保存領域と疎水性に富む領域が N 末端付近に集約しており、ここには活性発現に必須の ATP 結合配列も存在する。この N 末端領域がアンカーとなって膜と一部結合した形をとるが、残りの大部分は細胞質側に存在していると考えられる。ちなみに、既知のアミドリガーゼ群は全て細胞質酵素である。PgsA は、N 末端及び内部領域に数カ所の高度な疎水領域を持ち、全体的には塩基性アミノ酸に富むことから、反応生成物を活性中心から効率良く移動させる PGA のトランスポーターとして機能している可能性が高く、図 6 に示すような酵素複合体を推定している。事実、PgsA 成分の C-末端アミノ酸は膜の外側にでており、PGA 合成酵素複合体(PgsBCA)は新しい細胞表面発現モチーフとして経口ワクチンの製造などに利用できる²²⁾。

おわりに

最近、*B. subtilis* の各グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子の変異株、ならびに PGA 合成酵素複合体の遺伝子との多重変異株の作製に成功し、これら特有の表現型を解析するこ

とで、細胞増殖や PGA 生合成と D-グルタミン酸供給酵素系との関係が浮き彫りになってきた²³⁾。納豆菌では、D-グルタミン酸は細胞壁ペプチドグリカンの構成成分としてだけでなく、納豆粘質物質の主要成分である PGA の生合成にも重要である。納豆菌は枯草菌と同じ *B. subtilis* に分類され、培地にグルタミン酸を加えることにより、PGA 合成が促進されるものと、されないものがある。前者に属する納豆菌 *B. subtilis* IFO 3336 や戦国醬菌では、L-グルタミン酸がグルタミン酸ラセマーゼによって DL-グルタミン酸に変えられ、その DL-グルタミン酸を基質として、膜局在性の PGA 合成酵素複合体によるアミドリガーゼ様反応でグルタミン酸が連結され、高分子量 PGA が合成される。この酵素複合体のグルタミン酸異性体に対する親和性は異なり、D-グルタミン酸の方が親和性が高く、菌体内 D-グルタミン酸含量によって、PGA の生産性や PGA 中のグルタミン酸の DL 比が変化することが明らかになった。一方、Troy らは、*B. licheniformis* による PGA 生合成においては L-グルタミン酸のみが基質であり、それがまずアデニル化され、次にアデニル-L-グルタミン酸がアデニル-D-グルタミン酸に異性化された後、D-グルタミン酸のみからなる PGA が生合成される、いわゆるチオテンプレート仮説を提唱している²⁴⁾。しかし、アデニル-グルタミン酸の異性化自体も未だ確認されず、Troy らが対象にしてきた *B. licheniformis* にも *pgsBCA* 遺伝子のホモログが存在している¹⁷⁾。*B. licheniformis* でも、*B. subtilis* と類似の反応機構で PGA が生合成されている可能性が高く、今後の研究が待たれる。

謝 辞

本研究は、京都大学名誉教授左右田健次先生、韓国バイオリーダーズの成文喜博士、高知大学農学部生物資源科学科の大学院生、学部学生らの協力の下に、高知大学遺伝子実験施設で行われたものであり、ここに厚く感謝の意を表します。

(平成 16.7.9 受付)

文 献

- 1) Ashiuchi M, Misono H (2002) "Biopolymers" Vol. 7, ed by Fahnestock SR, Steinbüchel A, pp. 123-173. Wiley-VCH, Weinheim
- 2) Ashiuchi M, Misono H (2002) Biochemistry and molecular genetics on poly- γ -glutamate synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 9-14
- 3) Tanaka T, Fujita K, Takenishi S, Taniguchi M (1997) Existence of an optically heterogeneous peptide unit in poly(γ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. *J Ferment Bioeng* **84**, 361-364
- 4) Uchida I, Makino S, Sawamura C, Yoshikawa M, Sugimoto C, Terakado M (1993) Identification of a novel gene, *dep*, associated with depolymerization of the capsular polymer in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **9**, 487-496

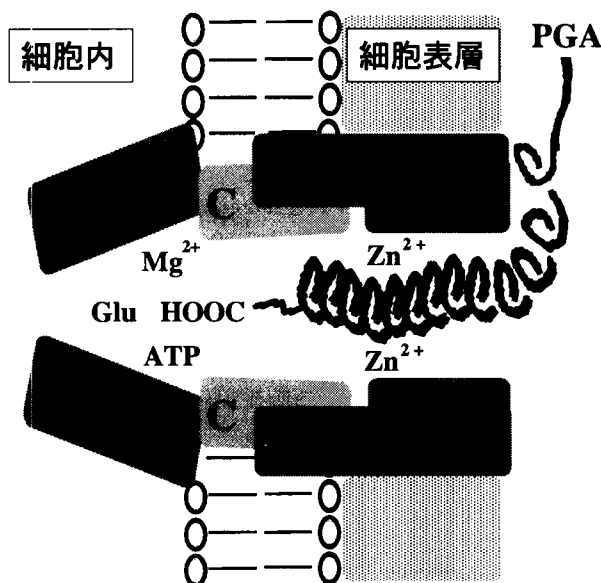


図 6. PGA 合成酵素複合体の推定構造。

- 5) Aono R, Ito M, Machida T (1999) Contribution of the cell wall component teichurono-peptide to pH homeostasis and alkaliphily in the alkaliphile *Bacillus lentus* C-125. *J Bacteriol* **181**, 6600-6606
- 6) Hezayen FF, Rehm BHA, Eberhardt R, Steinbüchel A (2000) Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 319-325
- 7) Weber J (1990) Poly(γ -glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in Hydra (Hydrozoa, Cnidaria). *J Biol Chem* **265**, 9664-9669
- 8) 原 敏夫 (2001) 微生物産生高分子を利用した生分解性吸水ポリマー。納豆菌の γ -グルタミン酸架橋体は自重の5,000倍の吸水率をもつ。化学と生物 **39**, 8-9
- 9) Shih IL, Van YT (2001) The production of poly(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour Technol* **79**, 207-225
- 10) Ashiuchi M, Tani K, Soda K, Misono H (1998) Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly- γ -glutamate. *J Biochem* (Tokyo) **123**, 1156-1163
- 11) Ashiuchi M, Soda K, Misono H (1999) Characterization of *yrcC* gene product of *Bacillus subtilis* IFO 3336 as glutamate racemase isozyme. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 792-798
- 12) Ashiuchi M, Kuwana E, Komatsu K, Soda K, Misono H (2003) Differences in effects on DNA gyrase activity between two glutamate racemases of *Bacillus subtilis*, the poly- γ -glutamate synthesis-linking Glr and the YrpC (Murl) isozyme. *FEMS Microbiol Lett* **223**, 221-225
- 13) Ashiuchi M, Kuwana E, Yamamoto T, Komatsu K, Soda K, Misono H (2002) Glutamate racemase is an endogenous DNA gyrase inhibitor. *J Biol Chem* **277**, 39070-39073
- 14) Makino S, Uchida I, Terakado N, Sasakawa C, Yoshikawa M (1989) Molecular characterization and protein analysis of the *cap* region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **171**, 722-730
- 15) Ashiuchi M, Soda K, Misono H (1999) A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem Biophys Res Commun* **263**, 6-12
- 16) Ashiuchi M, Nakamura H, Yamamoto T, Kamei T, Soda K, Park C, Sung M-H, Yagi T, Misono H (2003) Poly- γ -glutamate depolymerase of *Bacillus subtilis*: production, simple purification, and substrate specificity. *J Mol Catal B: Enzym* **23**, 249-255
- 17) Ashiuchi M, Nawa C, Kamei T, Song J-J, Hong SP, Sung M-H, Soda K, Yagi T, Misono H (2001) Physiological and biochemical characteristics of poly- γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **268**, 5321-5328
- 18) Urushibata Y, Tokuyama S, Tahara Y (2002) Characterization of the *Bacillus subtilis ywsC* gene, involved in γ -polyglutamic acid production. *J Bacteriol* **184**, 337-343
- 19) Ashiuchi M, Kamei T, Misono H (2003) Poly- γ -glutamate synthetase of *Bacillus subtilis*. *J Mol Catal B: Enzym* **23**, 101-106
- 20) Ashiuchi M, Kamei T, Baek D-H, Shin S-Y, Sung M-H, Soda K, Yagi T, Misono H (2001) Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**, 764-769
- 21) Ashiuchi M, Shimanouchi K, Nakamura H, Kamei T, Soda K, Park C, Sung M-H, Misono H (2004) Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly- γ -glutamate and regulation of its stereochemistry. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4249-4255
- 22) 成 文喜 (2003) *Bacillus subtilis chungkookjang* 由来のポリガンマグルタミン酸合成酵素系を用いた新しい微生物表層発現システム: 乳酸菌表層発現システムの応用。第55回(平成15年度)日本生物工学会大会講演要旨集 p. 23
- 23) Ashiuchi M, Horiuchi H, Yamamoto M, Shimanouchi K, Matsunaga K, Nakamura H, Misono H (2005) Genetically engineered poly- γ -glutamate producer of *Bacillus subtilis*. In preparation.
- 24) Gardner JM, Troy FA (1979) Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl)capsule in *Bacillus licheniformis*. *J Biol Chem* **254**, 6262-62