

# 納豆菌の粘質物生産機構

## 1. はじめに

微生物発酵は、チーズ、ヨーグルト、納豆、漬物、パンなどの発酵食品製造やビール、日本酒、ワイン、味噌、醤油などの醸造に不可欠である(伝統的発酵)。食品製造以外にも、酵素やアミノ酸、糖類、抗生物質、微生物農薬の生産や、エタノール、メタンなどの燃料生産に微生物発酵は利用されている(近代発酵)。更に、微生物作用による土壌中の有害物質分解・環境修復(バイオレメディエーション)や、価格が高騰している石油に代わって化学工業原料を微生物発酵で賄うバイオリファイナリーは現代発酵とも呼べる新興分野である。

いわゆるバイオテクノロジーや関連分析技術の発達は、元来この技術が微生物研究から興ったこともあり、発酵産業にも大きな変革をもたらした。伝統的発酵では、発酵過程で作られる代謝産物や素材の分解物、香り物質、味覚物質などの解析や改良が行われるようになり、近代発酵では代謝経路や遺伝子発現の最適化(代謝工学)が行われている。

また、PCR法を応用することにより、難培養性微生物の分析ができるようになった。遺伝資源として利用可能、あるいは研究可能な微生物群が増えたため、腸内細菌や休眠状態で長期間存在している有害微生物、土壌中の未同定微生物に関する研究需要が高まっている。課題山積であり、研究に携わるものとしてはうれしい悲鳴をあげるほかない。

微生物利用研究の対象は多岐にわたるが、本稿では、筆者が行っている「納豆菌粘質物の生産制御機構に関する研究」を一つの例として紹介したい。

## 2. 納豆菌の粘質物( $\gamma$ -ポリグルタミン酸)

### 2.1 納豆菌について

納豆菌(*Bacillus subtilis natto*)は学術的には枯草菌(*Bacillus subtilis*)に属し、粘質物(いわゆる納豆の糸、ねばねば)とタンパク質分解酵素の生産量が多い特徴を持つ。人生経験の長い方にはよく知られていることだが、昔は、煮豆を稲藁で包んで独特の仕様の納豆が日本各地(主に東日本)で家内工業的に作られていた。大量生産の確立した現在でも、山形の「ゴト納豆」などはそうした伝統が受け継がれている例である。大正時代(1911-1925年)、北海道帝国大学(現在の北海道大学)農学部の半沢先生が、稲藁から分離した種菌の純粋培養によって大豆を発酵させ「大学納豆」と称して売り出した。これが近代納豆の始まりである。「大学納豆」をいち早く取り入れてベンチャー企業を起こし、大正10年(1920年)に半沢式納豆製造の産業化を行ったのが宮城野納豆製造所(仙台市)の創設者で、後の初代全国納豆協同組合連合会会長の三浦二郎先生である。納豆種菌の系統名

## 納豆生成菌に関する研究 (第六報)

農學博士 半澤 洵・田村 芳祐

(昭和九年四月八日受理)

絲引納豆の生成に関する細菌學的研究は最初矢部氏によりて行はれ、3種の球菌と1種の桿菌が分離せられ、香氣の生成は黄色の球菌によるも粘質物形成に関する細菌種類の決定を見るに至らざりき。其の後門前氏は納豆より多數の細菌を分離し、強勢に粘質物を形成する Bacil-

### 図1 「大学納豆」に関する文献 半沢ら<sup>1)</sup>

「三浦株」として名前が残っている。

稲藁に枯草菌が多数生育しているとはいえ、今となつては種菌選択の判断基準ははっきりしない。文献には、寒天培地で集落(コロニー)を作らせ、香氣、粘質物、孢子形成能から納豆適正を判断したという記述があるのみである<sup>1)</sup>(図1)。

一方、枯草菌(*Bacillus subtilis*)は代表的なグラム陽性細菌であり、孢子形成や形質転換能の研究材料として古くから用いられてきた。多種多様な分解酵素を分泌するので、産業用酵素の生産菌としても使われている。枯草菌実験室株(*Bacillus subtilis* 168)の全ゲノム配列が1997年に公開され、プロテオーム解析などのポストゲノム研究が進んでいる。納豆菌と実験室株はゲノムの多くが共通しているが、一部に納豆菌特有の領域もあると考えられている。実験室株は粘質物( $\gamma$ -ポリグルタミン酸)を作ることは出来ない。後述するように、実験室株は粘質物を作るための遺伝子セットを持っているが、制御系の変異のため発現していない。一塩基変異やプロフェージ配列、挿入配列(Insertion sequence)の存在などによって遺伝子の発現制御に違いが生じ、それが表現型の差となって現れていると考えられる(後述)。ちなみに、土壤などからサンプリングしたフェージタイプの異なる枯草菌を調べると、約4割が寒天培地上で粘質物を作った<sup>2)</sup>。粘質物生産は納豆菌に特有の性質ではなく、枯草菌が持つ一般的特徴の一つなのである。

## 2.2 粘質物( $\gamma$ -ポリグルタミン酸)について

納豆の粘質物はアミノ酸の一つグルタミン酸が10000個以上直鎖状につながった高分子である。生体を構成するアミノ酸は通常L-型の鏡像体であるが、粘質物には50 - 80%の割合でD-型が含まれる<sup>3)</sup>。また、グルタミン酸同士の結合(ペプチド結合)に、タンパク質では $\alpha$ 位のカルボキシル基が使われているが、粘質物では $\gamma$ 位が使われている。このような特徴をもつ物質は自然界でも稀な存在で、*Bacillus* 属細菌の一部(*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*)において見られるだけである。グルタミン酸ナトリウムは言うまでもなく‘Umami’成分であるが、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸は無味無臭であ

る。

粘性以外にも  $\gamma$ -ポリグルタミン酸は吸水性・保湿性、凝集性、金属イオン結合性、生分解性などの性質を持ち、 $\gamma$ 線照射によってゲル化する。近年、側鎖のアルキル化修飾によって  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の化学的性質を改変する研究も行われている。化粧品や飲料、石鹸などに  $\gamma$ -ポリグルタミン酸を添加した製品が市販されている他、カルシウム結合能に注目したサプリメント錠剤も数年前に市場に出ている。動物細胞の培養基材としての活用報告もある。しかし、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の構造（鏡像体の構成やその並び方、鎖長）とこれら生理的・化学的性質との関係は不明である。

筆者が「納豆粘質物の生産制御機構に関する研究」を始めた端緒は、粘質物の生産機構がほとんど未解明であったことと、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の発酵生産現場で収量の不安定さや再現性のなさが問題になっていたことである。納豆を1週間くらい放置した場合でも、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸は消失し粘りもなくなる。こうした現象の微生物学的な背景、特に、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の合成と分解の仕組みとその制御機構の全容解明を目指している。以下、合成と分解に関わるグローバルな制御系である細胞密度応答機構（クオーラムセンシング）、合成酵素 CapBCA、2つの  $\gamma$ -ポリグルタミン酸分解酵素とその発現制御、最後に  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の酵素的加工について述べる。

### 3．細胞密度応答機構（クオーラムセンシング）

#### 3.1 *comQXPA* 遺伝子の働き

納豆の粘質物は発酵の後期に作られる。なぜなら細胞が活発に分裂している対数増殖期後、増殖が止まった定常期に  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の合成が開始されるからである（図2）。クオーラムセンシングと呼ばれる細胞密度応答機構がこの現象の背景にある<sup>4)</sup>。

クオーラムセンシングとは細菌が自己の密度（仲間が周りにたくさんいること）を感知する仕組みのことで、菌対外に分泌する低分子ペプチド（ComX）の濃度を細胞密度の指標として利用している（図3）。ComXの濃度が一定の閾値に達すると、細胞膜上の受容体型ヒスチジンリン酸化酵素（ComP）と結合して、リン酸化能を活性化する。活性化したComPは自己リン酸化してComP-Pi（Piはリン酸を示す）となり、次いで、リン酸基を応答転写制御因子であるComAに転移する。ComA-Piは活性型転写因子として働き、様々な遺伝子の発現を誘導する。このような受容体型リン酸化酵素とそのリン酸基を受け取る転写制御因子の組み合わせは2成分制御系（Two component system）と呼ばれる。ComQは疎水性の高い膜タンパク質でComXを菌体外へ分泌する機能とComXにイソプレノイド鎖修飾をする機能を持っている（図3）。クオーラムセンシングによって、細胞密度が高い定常期の多くの細胞生理機能が制御されている。DNAを取

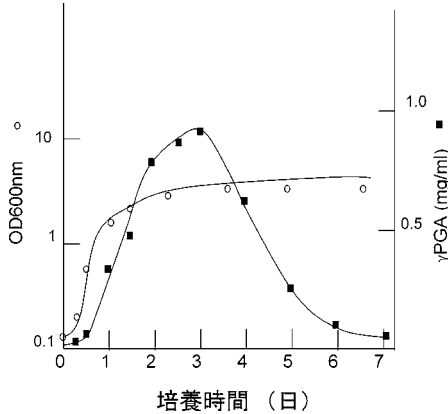


図2 納豆菌の $\gamma$ -ポリグルタミン酸生産

○ : 納豆菌の増殖（濁度）

■ :  $\gamma$ -ポリグルタミン酸（ $\gamma$ PGA）の量

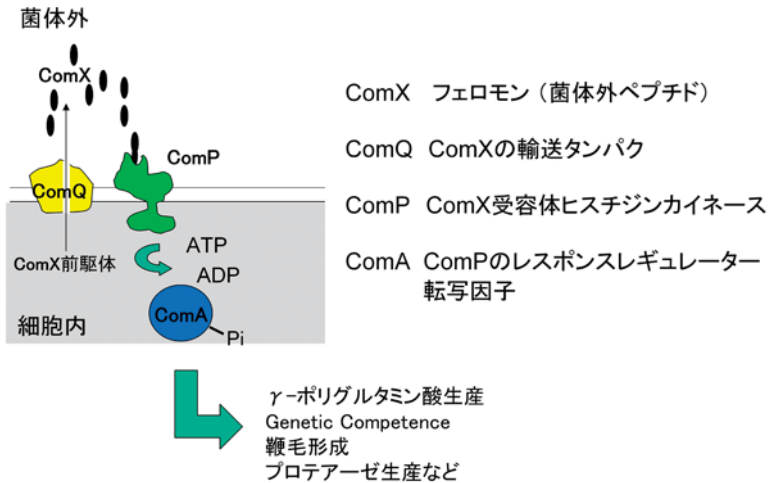


図3 細胞密度応答機構（クオラムセンシング）の概念図

り込んで自分のゲノムに組み込む形質転換能（コンピテンス）やプロテアーゼ，アミラーゼなどの菌対外分解酵素の生産，細菌の移動手段である鞭毛の発現などが ComP-ComA 2 成分制御系の支配下にあることがわかっている。

*comQXPA*（4つの遺伝子をまとめて表しています）それ自体は生育に必須ではなく，細胞密度が低く ComP が活性化していない対数増殖期には，遺伝子破



図4 納豆菌(A)と実験室株(B)のComX前駆体のアミノ酸配列の同源性  
赤字：同一のアミノ酸， ：イソプレノイド修飾されるトリプトファン

壊株の生育になんら問題はない。しかし、*comQXPA* いずれかの遺伝子の機能が失われると $\gamma$ -ポリグルタミン酸は生産されなくなる<sup>4)</sup>。ComAは転写因子であるが、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の合成酵素遺伝子 *capBCA* (*pgsBCA* あるいは *ywsCywTAB* とも呼ばれる)を直接には制御していないようである。

実験室株(168株)は $\gamma$ -ポリグルタミン酸を生産できないが、形質転換能、鞭毛発現に問題はない。つまりComP-ComA 2成分制御系は正常に働いていると考えられる。また、*capBCA*を破壊した納豆菌に実験室株の合成酵素遺伝子 *capBCA*<sub>168</sub>を導入すると $\gamma$ -ポリグルタミン酸の生産が回復するので(木村 未発表データ)、実験室株ではComAからCapBCAへ至る情報伝達系・発現制御系のどこかが変異して機能が失われていると考えられる。詳細は省略するが、これまでの研究から納豆菌の $\gamma$ -ポリグルタミン酸生産制御には*comQXPA*以外に*degS*、*degU*、*degQ*および*yvzD/swrA*の遺伝子産物が必要なことが明らかになった(文献5および木村未発表データ)。実験室株ではプロモーター中の1塩基変異によって*degQ*の発現が低下しているため、原因変異の少なくとも一つは*degQ*である。

### 3.2 ComX フェロモンの多様性

ComXは前駆体として合成された後、ComQによってプロセッシングとトリプトファン残基へイソプレノイド修飾が施され菌対外へ放出される。*Bacillus subtilis*の*comX*遺伝子と*comP*遺伝子のN末側(ComX結合領域)は非常に多様性に富んでいて、同じ種であるにも関わらず系統間の同源性が2割程度しかない場合もある<sup>4)</sup>。一例として実験室株と納豆菌のComXを並べてみた(図4)。このことは、ComXを調べれば種よりもっと狭い系統の検出が可能であることを示している。ComX遺伝子座の多様性の高さは疫学的調査・研究に応用できると考えられる。納豆菌の成熟型ComXの構造決定は今後取り組むべき研究課題のひとつである。

## 4. $\gamma$ -ポリグルタミン酸合成系

### 4.1 CapBCA

$\gamma$ -ポリグルタミン酸の合成に直接関わる合成酵素の機能解明は、鏡像体含有率や鎖長のコントロール、構成アミノ酸の改変(修飾されたグルタミン酸やアスパラギン酸などの導入)を可能にし、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の実用的用途の拡大

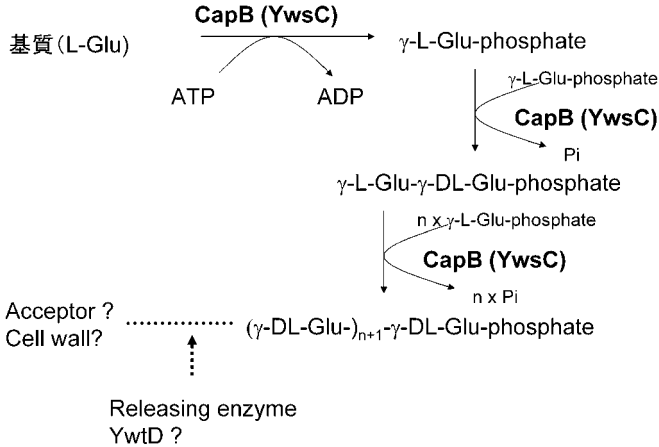


図5 γ-ポリグルタミン酸合成反応の模式図

に役立つと考えられる。

大腸菌に *capBCA* (*pgsBCA* あるいは *ywsCywtAB* と呼ばれる) を含むプラスミドを導入すると、少量ではあるが γ-ポリグルタミン酸を生産し、コロニーは mucoïd (粘液様) になる。このことから、合成には CapB, CapC, CapA の3つがあればよいと考えられている。尚、CapB については分子量の異なる2つの産物 (CapB, CapB') が報告されている。

実は、CapB 以外は機能がほとんど不明である。CapB は ADP-forming MurD and folyl-gamma-glutamate ligase family に属し、ATP をエネルギーとして基質 (L-グルタミン酸) を重合する反応中心を担っている<sup>6)</sup> (図5)。高エネルギー中間体 (リン酸化 L-グルタミン酸) が重合する際に反転反応によって D-グルタミン酸が作られると考えられているが、D 型生成の詳細な機構は謎のままで仮説の域を出ていない<sup>7)</sup>。培地にマンガン ( $\text{Mn}^{++}$ ) イオンが多く存在すると D-グルタミン酸の含有率が高くなるが、その理由も不明である<sup>3)</sup>。

CapA, CapC の機能は不明である。CapC は全体的に疎水性が非常に高いタンパク質で細胞質膜内あるいは細胞壁内で γ-ポリグルタミン酸が細胞外へ出るための孔 (pore) を作っている可能性がある。CapBCA が合成酵素複合体を形成しているのか? B, C, A が 1 : 1 : 1 の割合で存在して機能を発揮しているのか? などの基本的問題もいまだ未解決である。

納豆菌と異なり *Bacillus anthracis* の作る γ-ポリグルタミン酸は D-グルタミン酸のみを含み、細胞表層へ強固に(おそらく共有結合で)結合している。*B. anthracis* も納豆菌とよく似た CapBCA を持っている (図6)。最近、仏パスツール研究所の T. Candela らは、CapD (後述する GGT および YwrD と同一性がある)

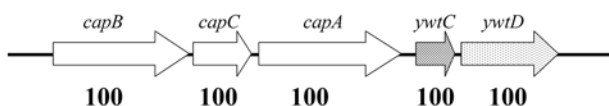
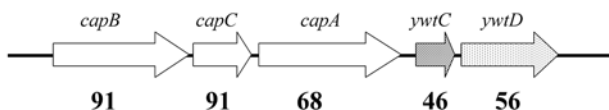
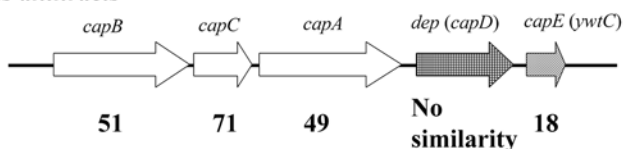
*Bacillus subtilis**Bacillus licheniformis**Bacillus anthracis*

図6 *cap* オペロンの相同性比較 数値はアミノ酸配列の相同性(%)を示す

が、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸を細胞表層に繋ぎとめる転移酵素であると報告した<sup>8)</sup>。*B. subtilis* および *B. licheniformis* の *cap* オペロンに CapD はないが、*B. anthracis* には存在しない *ywtD* が *cap* オペロンのすぐ後ろにある (図6)。*B. subtilis* および *B. licheniformis* の  $\gamma$ -ポリグルタミン酸は培養液中へ放出される。その為、多くの研究者が YwtD は  $\gamma$ -ポリグルタミン酸を細胞から遊離する機能を持っていると考えている。

*B. anthracis* の  $\gamma$ -ポリグルタミン酸は D-グルタミン酸だけで構成されている。*B. anthracis* と納豆菌の *cap* オペロンを入れ替えた株を作成し、生産される  $\gamma$ -ポリグルタミン酸を解析すれば、合成酵素と鏡像体構成に関する新たな知見が得られると期待される。また、高知大学の Ashiuchi らは、L-グルタミン酸だけからなる  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の生産菌 *Natrilba aegyptiaca* を報告している。この株の合成酵素の 1 次構造解析が待たれる。

#### 4.2 Troy の実験

$\gamma$ -ポリグルタミン酸の生合成に関する生化学的解析は、*B. licheniformis* の膜画分を用いて Troy によって最初に行われた<sup>9)</sup>。ATP を要求し、非リボゾーム型の膜タンパク質によって合成されること、リゾチーム処理で合成能が失われること、重合反応が transamidation (アミド転移反応) ではないことなどが明らかにされた。合成がリゾチーム感受性であることは、重合に細胞壁成分が必要なことを示唆している。前述の *B. anthracis* CapD の  $\gamma$ -ポリグルタミン酸転移能も重合反応と細胞壁構造の関係を窺わせる。重合されたグルタミン酸は一度ペプチドグリカンのジアミノピメリン酸に存在する遊離アミノ基に転移され、この転移反応に

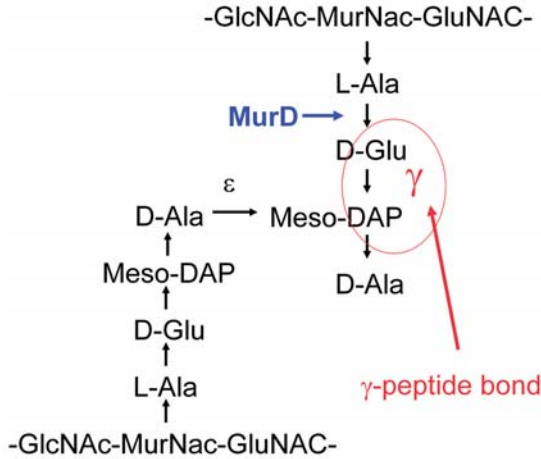


図7 *Bacillus subtilis* のペプチドグリカンの構造と推定上の $\gamma$ -ポリグルタミン酸転移箇所

よって逐次鎖長が延長されていくのかもしれない(図7)。この仮説は、CapBがペプチドグリカンのD-アラニンとD-グルタミン酸を繋げる酵素MurDと似たアミノ酸配列をもつこととも矛盾しないように思われる。

## 5. $\gamma$ -ポリグルタミン酸の分解系

### 5.1 分解酵素

$\gamma$ -ポリグルタミン酸は生産者である納豆菌自身によって分解される(図2)。研究の結果、この分解は2段階で行われていることがわかった<sup>10,11)</sup>(図8)。

$\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ( $\gamma$ -glutamyltransferase, GGT)は、グルタチオンなどの $\gamma$ -グルタミル化合物の $\gamma$ -グルタミル基を加水分解あるいは他のアミノ酸へ転移する酵素で、細菌から人を含めた高等動物まで生物界に広く分布している。健康診断で $\gamma$ -GTP値が使われるが、 $\gamma$ -GTPとは人のGGTのことである。動物ではグルタチオンの再生サイクルに必要とされているが、細菌では主に $\gamma$ -グルタミル化合物を栄養源として利用するときの分解酵素として働いている。

培養上清から精製した納豆菌GGTは、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸のN末側から1個ずつグルタミン酸を遊離させるエキソ型の分解活性を持ち、D-型、L-型両方のグルタミン酸に同等の効率で作用した<sup>10)</sup>。納豆菌GGTの特徴は、基質への親和性が非常に強いことである。合成基質 $\gamma$ -glutamyl *p*-nitroanilideに対するKm値は7.8 $\mu$ Mであった。大腸菌、牛(肝臓)のGGTではそれぞれ68 $\mu$ M、180 $\mu$ Mであったので、納豆菌GGTは約10~20倍の親和性を示したことになる<sup>10)</sup>。 $\gamma$



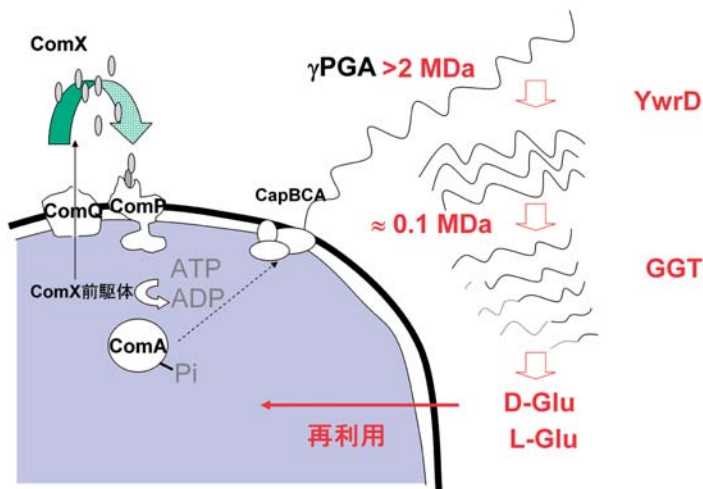


図8  $\gamma$ -ポリグルタミン酸分解の模式図

・ポリグルタミン酸は分子量が大きいため、重量濃度が大きくてもモル濃度は低くなる。最小培地で液体培養すると1 mg/mlほど作られるが、濃度は $0.5\mu\text{M}$ 程度しかない。納豆菌 GGT は $\gamma$ -ポリグルタミン酸に対しても親和性が高い ( $K_m = 9\mu\text{M}$ ) が、それでも基質濃度 ( $0.5\mu\text{M}$ ) の約20倍である。納豆菌はエンド型分解によって $\gamma$ -ポリグルタミン酸を断片化して、この問題を解決している<sup>10)</sup>(図8)。

YwrD は GGT と相同性を持つ GGT パラログである。合成される $\gamma$ -ポリグルタミン酸は約2 MDa の分子量を持つが、分子量約0.1MDa の分解中間体への断片化に YwrD が必要である<sup>10,11)</sup>。今のところ、大腸菌に生産させた YwrD だけでは $\gamma$ -ポリグルタミン酸分解活性は見られない。YwrD は細胞表層に存在しており(木村, 未発表データ)、活性の発現には他の因子あるいは局在そのものが必要なのかもしれない。

大腸菌あるいは牛肝臓の GGT は $\gamma$ -ポリグルタミン酸の分解活性がなかった。基質親和性が低すぎて反応が進まなかったと考えられる。基質の濃度を上げれば活性が見られる可能性があるが、実際には、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の分子量が大きすぎて、粘性が極度に高くなるのでそのような実験は不可能だった。

GGT, YwrD の機能は遺伝子破壊株の性質からも支持された<sup>10,11)</sup>。GGT の欠損株では0.1MDa の分解中間体が培地中に蓄積し、YwrD の欠損株では $\gamma$ -ポリグルタミン酸の分解が非常に遅くなり分解産物は広範な分子量分布を示した。GGT と YwrD の2重変異株は $\gamma$ -ポリグルタミン酸を全く分解することができず、未分解(分子量約2 MDa)の $\gamma$ -ポリグルタミン酸を培地中に蓄積した<sup>11)</sup>(図9)。相補試験 (complementation test) を行って、遺伝子破壊による近傍の遺

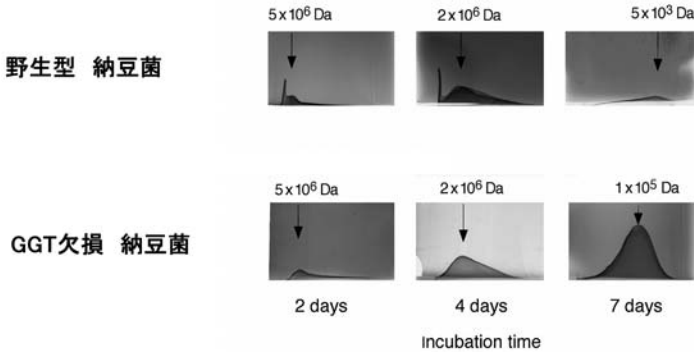


図9 GGT欠損納豆菌による $\gamma$ -ポリグルタミン酸の生産（2次元免疫電気泳動による解析）

伝子発現への極性効果（polar effects）を排除し、GGTあるいはYwrDそのものが機能的に必要十分であることを確認した<sup>10,11</sup>。

実は、遺伝子破壊株を最初に作成して機能を推定した後で、生化学実験など必要な検証を行っていったのである。説明の簡便さのため、順序を逆にした。

## 5.2 分解酵素の発現制御とD-グルタミン酸の代謝

人間は納豆菌を利用して‘おいしい’発酵大豆を食べている。一方、納豆菌にとっての $\gamma$ -ポリグルタミン酸の生産と分解の意義は、細胞過密で栄養源が不足する定常期に栄養貯蔵物質としてこの物質を利用することである<sup>10</sup>。 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の化学構造や特異性の高い分解系は、他の細菌・微生物などに貯蔵物質を横取りされないための工夫と考えることができる（人間に横取りされているのは興味深い）。実際、GGTを欠損した株は合成した $\gamma$ -ポリグルタミン酸を再利用できないため、定常期に栄養不足（窒素源枯渇）となり胞子化する<sup>10</sup>（図10）。野生型株は蓄えを少しずつ取り崩しながら栄養細胞として生き延びることができる。

分解酵素の発現も栄養貯蔵としての $\gamma$ -ポリグルタミン酸利用に適うよう絶妙に調節されている。分解酵素GGTは合成酵素と同様にクォラムセンシングの制御下にあり定常期に発現している<sup>10</sup>（図11）。更に、GGTは分解産物のグルタミン酸によって転写レベルで負に制御され（図11）、YwrDは窒素源の枯渇にตอบสนองして発現する<sup>10</sup>。このようなフィードバック制御によって過剰なグルタミン酸の供給が抑えられるため、定常期を通して培地中のグルタミン酸濃度は低く抑えられている<sup>7,10</sup>。貴重な蓄えは無駄に浪費しないのである。人間も見習うべきかも知れない（^\_^；）。

$\gamma$ -ポリグルタミン酸由来のL-グルタミン酸は、再利用するためにL-グルタミン酸脱水素酵素によって2-ケトグルタル酸へ代謝されるが、D-グルタミン酸

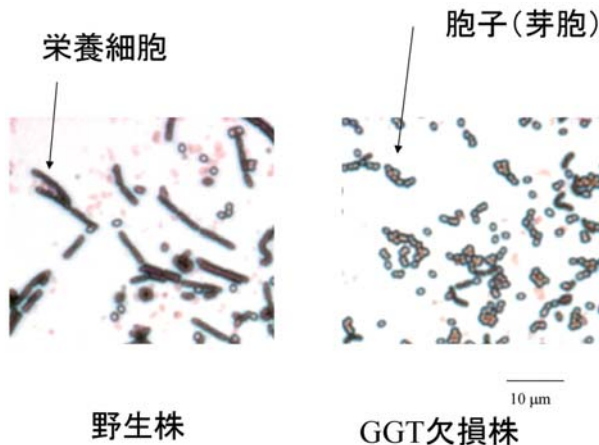


図10 培養5日目の納豆菌の細胞形態（グラム染色像）  
GGT欠損株（右）では孢子の形成が進んでいる

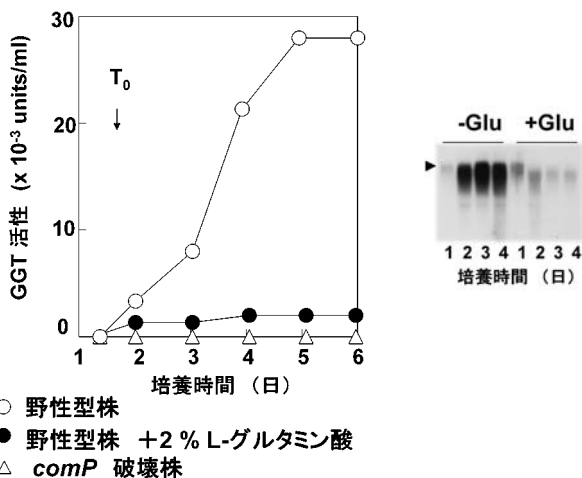


図11 GGTの発現プロファイル(左)とL-グルタミン酸による転写抑制(ノーザンプロット, 右)

はそのままでは代謝できない。D-体はグルタミン酸ラセマーゼによってL-グルタミン酸に変換されてから再資化される<sup>7)</sup>。これまでグルタミン酸ラセマーゼは、ペプチドグリカンにD-グルタミン酸を供給するアナボリックな酵素として捉えられてきた。事実、納豆菌が持つ2つのグルタミン酸ラセマーゼ (*racE*, *yrpC*)

の2重破壊株は細胞壁を合成できないため増殖できない<sup>7)</sup>。納豆菌の RacE と YrpC はカタボリックな働きもあわせ持ち、多くの代謝系酵素と同様に栄養が豊富な条件下で発現が抑えられている。代謝酵素としての性格も強いのである<sup>7)</sup>。

### 5.3 分解酵素欠損株の $\gamma$ -ポリグルタミン酸生産への利用

$\gamma$ -ポリグルタミン酸の発酵生産における収量不安定性の一番の原因は分解酵素 (GGT と YwrD) の存在である。GGT と YwrD の両方を欠損した株は、未分解の $\gamma$ -ポリグルタミン酸 (分子量約 2 MDa) を培地中に蓄積することができる。また、GGT だけを欠損した株は分子量約 0.1 MDa の $\gamma$ -ポリグルタミン酸を蓄積する。遺伝子組み換え株の使用は、規制や管理業務の煩雑さ、消費者の拒絶反応から敬遠されがちである。そこで、古典的なスクリーニングによって GGT、YwrD の2重欠損変異株、及び GGT 欠損変異株を取得した。 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の大量生産株として特許化している<sup>11)</sup>、産業界で実際に活用されることを願っている。

## 6. $\gamma$ -ポリグルタミン酸の加工

### 6.1 D-グルタミン酸

$\gamma$ -ポリグルタミン酸は D-グルタミン酸資源として最も安価で豊富なものであろう。しかし、今のところ哺乳類で知られている D-アラニン、D-セリン、D-アスパラギン酸のような生理作用は D-グルタミン酸には見つかっていない。一方、細菌のグルタミン酸ラセマーゼが新規抗生物質の標的酵素として研究されている。D-グルタミン酸はラセマーゼ阻害剤合成の原料物質として使えるかもしれない。

### 6.2 オリゴ $\gamma$ -グルタミン酸

ジペプチド、オリゴペプチドは抗酸化機能、味覚機能、生理機能をもつ分子として近年注目されている。筆者らは、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸を酵素的に分解してオリゴ $\gamma$ -グルタミン酸を作ることに成功した<sup>2)</sup>。納豆工場から分離された納豆菌ファージ  $\Phi$ NIT 1 は感染時に $\gamma$ -ポリグルタミン酸分解酵素 (PghP) を大量に生産する。PghP は $\gamma$ -ポリグルタミン酸をエンド型に分解し、最終的に 5、4、3 量体のオリゴ $\gamma$ -グルタミン酸を生産する<sup>2)</sup> (図12)。おそらく、酵素の基質認識部位が 6 量体を認識しているのであろう。この酵素 PghP (Poly-gamma-glutamate hydrolase P) を精製し、その一次構造を解明した。PghP のアミノ酸配列には既知の配列との相同性が見当たらず、新規な構造をもっていると推定している。現在、酵素の結晶化・構造解析に取り組んでいる。

バクテリオファージが PghP 遺伝子を持っている理由は、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸を分解することにより、より効率よく感染・増殖するためであった<sup>2)</sup>。また、Ackermann らが土壌より分離した枯草菌タイピングファージ10種中、4つは PghP 活性を示した。これらは自然界に PghP をもつファージが普遍的に存在す

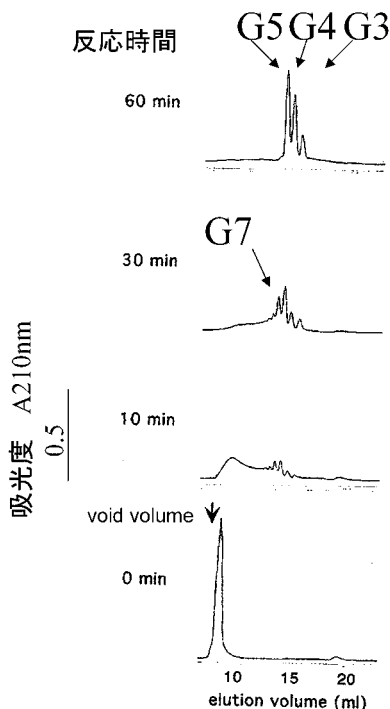


図12 PghP による  $\gamma$ -グルタミン酸分解産物のゲルろ過 HPLC による解析

ることを示している<sup>2)</sup>。予備的な実験だが、切断様式が異なるファージ PghP が存在することが示唆されている。重合度の異なるオリゴ $\gamma$ -グルタミン酸を用いて、金属イオン結合能などの性質と重合度の関係を明らかにすれば、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸の新たな用途開発に結びつくのではないかと考えている。

尚、PghP によって作られるオリゴ $\gamma$ -グルタミン酸の味は、まだ試したことがないので不明である。

## 7. おわりに

納豆菌は日本の伝統的発酵微生物であり、我が国には世界に先駆けて *Bacillus subtilis* のスターター株(納豆種菌)を確立した実績がある。事実、*Bacillus subtilis natto* は世界的に一般的安全性 (generally accepted as safe) が認められている菌株である。日本以外の東・東南アジア各国(韓国、中国、タイ、ネパール、ミャンマーなど)でも納豆と非常によく似た大豆発酵食品が見られるが<sup>12)</sup>、これらの国ではスターター株は使用されていない。産物の一部あるいは、昔の日本のようにイネやバナナの葉が直接使われている。ここでも発酵の主役は *Bacillus sub-*

*tilis* である<sup>12)</sup>。人口比で見れば、人類が最も口にしている細菌が納豆菌およびその仲間であると言っても過言ではない。乳酸菌の研究者人口は多く、企業でも熱心に研究開発が行われている一方で、納豆菌研究はやっと始まったばかりという印象が強い。欧米信仰というわけではないだろうが、納豆菌はあまりに当たり前な生活の一部として溶け込んでいたため、気付かれなかったのかも知れない。昨年来、筆者は納豆メーカーと一緒に農林水産省の助成金事業（産学官連携による食料産業等活性化のための新技術開発事業）に参画している。今後、産学を問わず関連研究が盛んになることを願っている。

本稿で紹介した研究は、筆者が所属する発酵細菌研究室（平成18年4月発酵細菌ユニットへ改組された）において、旧独立行政法人食品総合研究所が執り行ったプロジェクト研究費、農林水産省委託研究費、文部科学省科学研究費補助金などの支援を受けて行われた。試料を提供していただいたタカノフーズ株式会社および日東食品株式会社、共同研究者の伊藤義文博士、Tran Phan Lam-Son 博士に感謝の意を表したい。

納豆菌は $\gamma$ -ポリグルタミン酸以外に界面活性剤サーファクチンや多糖類、アルカリプロテアーゼやキシラナーゼなどの分解酵素、抗菌物質などを作るが、本稿ではまったく触れなかった。また、納豆菌と腸内細菌の関わりや $\gamma$ -ポリグルタミン酸の腸管での吸収に関する知見はほとんどない。微生物利用研究に終わりはないようである。

（微生物利用研究領域 発酵細菌ユニット 木村 啓太郎）

## 用語解説

### 枯草菌

*Bacillus subtilis* の和名。グラム陽性土壌細菌。大腸菌とともに細菌研究の代表的モデル生物である。1997年に日欧の研究者が中心となって全ゲノム塩基配列が決定された。実験室株として168株が有名。分類的には、納豆菌(*Bacillus subtilis natto*) は枯草菌の亜種である。

### クオラムセンシング

細菌が周囲に自分の仲間が増えたことを感知する仕組み。細胞密度応答機構ともいう。毒素生産やバイオフィーム形成など細菌が集団でおこなう活動を制御する。クオラム (Quorum) は議会の定足数の意味。

### 形質転換能

細胞内に外から DNA を取り込んで自らの遺伝的性質を変える能力。枯草菌の仲間は細胞表層に DNA を取り込む装置を持っていて、積極的に形質転換できる。クオラムセンシングの制御を受ける。

## リゾチーム

細菌の細胞壁を分解する酵素。N・アセチルムラミン酸とN・アセチルグルコサミンの間の $\beta$ -1,4結合を加水分解する。ニワトリ卵白由来のものがよく使われる。

### Km 値

酵素の基質との親和性を示す値、次元は濃度 (mol / L)。Km 値が小さいほど基質との親和性が強く、低濃度の基質にも作用できることを示す。酵素がその最大活性の半分の活性を示すときの基質濃度。

### 極性効果

ある遺伝子を破壊したときに、その前後の遺伝子の発現に及ぼす影響のこと。IS (挿入配列) やトランスポゾンによる遺伝子破壊では、その上流あるいは下流の遺伝子の発現量が変化する場合がある。

### グルタミン酸ラセマーゼ

L・グルタミン酸をD・型にあるいは逆にD・グルタミン酸をL・型に相互に変換する酵素。細菌の細胞壁ペプチドグリカンにはD・グルタミン酸があるので、グルタミン酸ラセマーゼは細菌の増殖に必須な酵素である。

### アナボリック (anabolic)

同化作用の、の意。細胞の生命維持活動に必要な物質を生合成する過程で働くこと。

### カタボリック (catabolic)

異化作用の、の意。細胞が生命維持活動に必要なエネルギーを得るために、栄養として取り込んだ物質の分解や異性化をする過程で働くこと。

### サーファクチン

土壌細菌である枯草菌とその類縁菌が生産する。炭素数10~12のアルキル基とペプチドからなる抗菌物質でペプチド部分はL・グルタミン酸-L・ロイシン-D・ロイシン-L・バリン-L・アスパラギン酸-D・ロイシン-L・ロイシン-L・バリン-L・イソロイシンの構造を持つ。界面活性剤なので土壌改良作用がある。

## 参考文献

- 1) 半澤 洵, 田村 芳祐, 納豆生成菌に関する研究 (第六報), 農化誌 第十巻, 520-521 (昭和9年)
- 2) Kimura, K. and Itoh, Y. Characterization of poly- $\gamma$ -glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of *Bacillus subtilis* encapsulated with poly- $\gamma$ -glutamate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2491-2497 (2003).
- 3) Nagai, T., Koguchi, K., and Itoh, Y., Chemical analysis of poly- $\gamma$ -glutamic acid produced by plasmid-free *Bacillus subtilis* (*natto*): evidence that plas-

- mids are not involved in poly- $\gamma$ -glutamic acid production. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43, 139-143 (1997).
- 4 ) Tran, L.-S. P., Nagai, T., and Itoh, Y., Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 37, 1159-1171 (2000).
  - 5 ) Stanley, N. R. and Lazazzera, B. A., Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- $\gamma$ -DL-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, 57, 1143-1158 (2005).
  - 6 ) Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y., Characterization of the *Bacillus subtilis* *ywsC* gene, involved in  $\gamma$ -polyglutamic acid production. *J. Bacteriol.*, 184, 337-343 (2002).
  - 7 ) Kimura, K., Tran, L.-S. P., and Itoh, Y., Roles and regulation of the glutamate racemase isogenes, *racE* and *yrcC*, in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 150, 2911-2920 (2004).
  - 8 ) Candela, T. and Fouet, A., *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol. Microbiol.*, 57, 717-726 (2005).
  - 9 ) Troy, F. A. Chemistry and biosynthesis of the poly( $\gamma$ -D-glutamyl)capsule in *Bacillus licheniformis*. I. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. *J. Biol. Chem.*, 248, 305-315 (1973).
  - 10 ) Kimura, K., Tran, L.-S. P., Uchida, I., and Itoh, Y., Characterization of *Bacillus subtilis*  $\gamma$ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- $\gamma$ -glutamate. *Microbiology*, 150, 4115-4123 (2004).
  - 11 ) 木村啓太郎, 伊藤義文,  $\gamma$ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株及び該変異株を用いた $\gamma$ -ポリグルタミン酸の製造法。特許第3682435号
  - 12 ) Kimura, K., Inatsu, Y., and Itoh, Y., Frequency of the insertion sequence IS4*Bsu*1 among *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in southeast Asia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1994-1996 (2002).