



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

γ -ポリグルタミン酸の生産とその利用に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小川, 善弘 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2258

氏 名 (本籍)	小 川 善 弘 (千 葉 県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博乙第13号
学 位 授 与 年 月 日	平成9年9月12日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目	γ -ポリグルタミン酸の生産とその利用に関する研究
審 査 委 員	主査 静岡大学 教授 田 原 康 孝 副査 岐阜大学 教授 河 合 啓 一 副査 信州大学 教授 寄 藤 高 光 副査 静岡大学 助教授 徳 山 真 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

γ -ポリグルタミン酸(γ -PGA)は、DおよびL-グルタミン酸が γ -グルタミル結合で連結した分子量20 - 50万の水溶性酸性高分子であり、本物質は納豆菌を含む *Bacillus subtilis*によって菌体外に著量生産され、日本の伝統食品である納豆の糸引き物質の主成分である。 γ -PGAは、このような性質に加えて、通常の蛋白質分解酵素では分解されず、遊離カルボキシル基が金属のキレート作用を有することなどから、食品、医薬、化粧品、繊維、プラスチックなどの分野において様々な利用方法が提案されている。しかしながら、 γ -PGA生産菌の培養において培養液の粘性が著しく上昇することなどから、 γ -PGAの製造に際して様々な問題が生じ、工業規模での γ -PGAの生産は現在のところ行われていない。本研究は γ -PGAの実用段階での生産と本物質の新しい用途開発を目指して行われたものであり、本論文は、 γ -PGAの微量、簡易検出法の確立、タンク培養による高生産条件の設定、 γ -PGA合成メカニズムの解析、および高流動性コンクリート用分離低減剤としての開発などについて論述したものである。

(第1章) γ -PGAの酸性高分子としての性質を利用して、SDS-ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)による γ -PGAの新規検出方法を開発した。SDS-PAGEで γ -PGAを他のきょう雑物質と分離した後、 γ -PGAを塩基性色素によって染色することにより微量の γ -PGAをバンドとして検出することができた。この方法では10 μ l以下の少量で複数のサンプルを同時に解析することが可能であることから、納豆製造や生産菌培養液の γ -PGAの定量および γ -PGAの分子量の測定などの迅速簡易測定法としての有用性が認められた。

(第2章) 納豆製造用の種菌から分離した納豆菌(*B. subtilis*)のなかで最も γ -PGA生産能が優れていたMR-141株を用いて、タンク培養における γ -PGAの生産条件を検討した。生産培地にグルタミン酸を添加してより好氣的な条件で培養することによって、MR-141株の γ -PGA生産量は35mg/mlに達した。MR-141株の培地に 14 C-グルタミン酸あるいは 14 C-グルコースを添加して γ -PGAへの放射能の取

り込みから γ -PGAの合成経路を推定しようとした。両者の放射能はともに γ -PGAに取り込まれ、MR-141株の γ -PGA合成にはデノボ合成系とサルベージ合成系の2つの経路の存在が示された。しかしながら、 γ -PGAは培養初期には両経路によって合成されるが、定常期の γ -PGAは培地に添加したグルタミン酸からサルベージ合成系によって合成されていることが示唆された。

(第3章) 納豆菌NR-1株から γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)を単一標品にまで精製し、その酵素的諸性質を明らかにするとともに、 γ -GTP遺伝子をクローニングし、その塩基配列を解析するなどして、本酵素と γ -PGA生産との関係について考察した。本菌の γ -GTPは他起源のそれと同様に大小2つのサブユニット(分子量: 45,000と22,000)から構成されるヘテロ2量体であった。本酵素の至適pHは8.5付近にあり、最適反応温度は60°Cにあった。基質特異性や反応メカニズムの解析結果より、本酵素は γ -グルタミルペプチドを合成することはできたが、粘性を有する高分子の γ -PGAを合成することはできなかった。本酵素の大小2つのサブユニットのN-末端アミノ酸配列からPCR法によって γ -GTP遺伝子の一部を増幅し、これをプローブにして染色体DNAから γ -GTP遺伝子をクローニングした。塩基配列の解析より本遺伝子は587アミノ酸残基からなる γ -GTPのタンパク質をコードしており、本酵素はプレプロ型として合成された後に大小2つのサブユニットにプロセスされることが示唆された。本酵素の反応メカニズムの解析結果などから、本酵素は γ -PGA合成への積極的な関与は認められず、むしろ高分子 γ -PGAを分解してグルタミン酸をエネルギー源として供給する役割を担っている可能性が考えられた。

(第4章) 次世代の新しいコンクリートとして注目されている高流動コンクリート用の分離低減剤として γ -PGAの利用性を検討した。その結果、 γ -PGAは従来の多糖類(メチルセルロース、 β -1,3-グルカン)に比較して極めて少量の添加量で、これら多糖類と同等の分離抵抗性が得られた。そのメカニズムについて検討したところ、従来の多糖類がセメントの自由水を増粘させてセメント成分と細骨材(砂)および粗骨材(砂利)の分離を抑制しているのに対して、 γ -PGAは自由水を増粘することなく、セメント粒子間を静電的に結合してコンクリート中に網目構造を構築することにより骨材分離を抑制する新しい分離低減剤であることが示された。

審 査 結 果 の 要 旨

γ -ポリグルタミン酸(γ -PGA)は、DおよびL-グルタミン酸が γ -グルタミル結合で連結した分子量20-50万の水溶性酸性高分子であり、本物質は納豆菌(*Bacillus subtilis*)によって菌体外に著量生産される。本研究は γ -PGAの実用段階での生産と新しい用途の開発を目指して行われたものであり、得られた結果の概要は次の通りである。

1) γ -PGAの酸性高分子としての性質を利用して、SDS-ポリアクリルアミドゲル法による γ -PGAの新規検出法を開発した。本方法で γ -PGAを他のきょう雑物質と分離した後、 γ -PGAを塩基性色素で染色することによって10 μ l以下の微量をバンドとして検出することができた。

2) 納豆製造用の種菌から分離した納豆菌のなかで最も γ -PGA生産能の優れてい

たMR-141株を用いて、タンク培養における γ -PGAの生産条件を検討した。グルタミン酸を添加した生産培地でより好氣的な条件で培養することによって、MR-141株の γ -PGAの生産量は35mg/mlに達した。 ^{14}C -グルタミン酸と ^{14}C -グルコースを用いた γ -PGAへの放射能の取り込み実験から、MR-141株の γ -PGA合成にはデノボ合成系とサルベージ合成系の2つの経路の存在が示されたが、定常期の γ -PGAは専らグルタミン酸からのサルベージ合成系によって合成されていることが示唆された。

3) 納豆菌NR-1株から γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)を単一標品にまで精製し、その酵素的諸性質を明らかにするとともに、 γ -GTP遺伝子をクローニングし、塩基配列を解析するなどして、本酵素と γ -PGA生産との関係を考察した。本菌の γ -GTPは他起源のそれと同様に大小2つのサブユニット(分子量: 45,000と22,000)から構成されるヘテロ2量体であった。基質特異性や反応メカニズムの解析結果より、本酵素は γ -グルタミルペプチドを合成することはできたが、粘性を有する高分子の γ -PGAを合成することはできなかった。 γ -GTP遺伝子の塩基配列の解析より、本遺伝子は587アミノ酸残基からなる γ -GTPのタンパク質をコードしており、本酵素はプレプロ型として合成された後に大小2つのサブユニットにプロセスされることが示された。

4) 新しいコンクリートとして注目されている高流動コンクリート用の分離低減剤として γ -PGAの利用性を検討した。その結果、 γ -PGAは従来の多糖類(メチルセルロース、 β -1,3-グルカン)に比較して極めて少量の添加量で、これら多糖類と同等の分離抵抗性が得られた。そのメカニズムについて検討したところ、 γ -PGAは、従来の多糖類のそれとは異なって、自由水を増粘することなく、セメント粒子間を静電的に結合してコンクリート中に網目構造を構築することによって骨材分離を抑制する新しい分離低減剤であることが示された。

このように本論文の内容は、 γ -ポリグルタミン酸の研究に新しい知見を与えるものであり、納豆菌の生産する γ -ポリグルタミン酸の基礎研究と応用開発の発展に大きく貢献するものと評価された。本審査委員会は論文の構成、内容ならびに下記に示す学位論文の基礎となる学術論文等について慎重に審議し、審査委員の全一致をもって本論文が博士の学位を授与されるに値すると判定した。

<学位論文の基礎となる学術論文>

- 1) Ogawa, Y., Hosoyama, H., Hamano, M., and Motai, H.: Purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* (natto). Agric. Biol. Chem., **55**, 2971-2977 (1991).
- 2) Yamaguchi, F., Ogawa, Y., Kikuchi, M., Yuasa, K., and Motai, H.: Detection of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) by SDS-PAGE. Biosci. Biotech. Biochem. **60**, 255-258 (1996).
- 3) Ogawa, Y., Sugiura, M., Motai, H., Yuasa, K., and Tahara, Y.: DNA Sequence of *Bacillus subtilis* (natto) NR-1 γ -glutamyltranspeptidase gene, *ggt*. Biosci. Biotech. Biochem. **61**, 1596-1600 (1997).
- 4) Ogawa, Y., Yamaguchi, F., Yuasa, K., and Tahara, Y.: Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. Biosci. Biotech. Biochem. **61**, (1997) in press.
- 5) 小川善弘、新藤竹文、横田和直、湯浅克己: 高流動コンクリートにおける γ -ポリグルタミン酸の分離抵抗性付与効果、コンクリート工学論文集, **8**, 79-87 (1997).

＜既発表学術論文＞

- 1) 小川善弘、田原康孝：酢酸菌表層膜のホスファチジル-N-モノメチルエタノールアミンN-メチル基転移酵素の精製と性質、脂質生化学研究、26, 204-207 (1984).
- 2) 田原康孝、小川善弘、榊原豊彦、山田雄三：*Zymomonas mobilis*表層膜のホスファチジルエタノールアミンN-メチル基転移酵素の精製と性質、脂質生化学研究、27, 395-398 (1985).
- 3) Tahara, Y., Ogawa, Y., Sakakibara, T., and Yamada, Y.: Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from *Zymomonas mobilis*: Purification and characterization. Agric. Biol. Chem. 50, 257-259 (1986).
- 4) Tahara, Y., Yuhara, H., Ogawa, Y., and Yamada, Y.: Tetrahydroxypentane-substituted pentacyclic triterpene isolated from *Zymomonas mobilis*. Agric. Biol. Chem. 50, 1345-1346 (1986).
- 5) Tahara, Y., Ogawa, Y., Sakakibara, T., and Yamada, Y.: Purification and characterization of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from *Zymomonas mobilis*. Agric. Biol. Chem. 51, 1425-1430 (1987).
- 6) Tahara, Y., Yamashita, T., Sogabe, A., Ogawa, Y., and Yamada, Y.: *Zymomonas mobilis* mutant defective in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. Agric. Biol. Chem. 51, 3179-3181 (1987).
- 7) Tahara, Y., Yamashita, T., Sogabe, A., Ogawa, Y.: Isolation and characterization of *Zymomonas mobilis* mutant defective in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. J. Gen. Appl. Microbiol. 40, 389-396 (1994).
- 8) Tatsumi, H., Ogawa, Y., Murakami, S., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E., and Motai, H.: A full length cDNA clone for the alkaline protease from *Aspergillus oryzae*: Structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 219, 33-38 (1989).
- 9) Ogawa, Y., Tatsumi, H., Murakami, S., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E., Motai, H., and Tohe, A.: Secretion of *Aspergillus oryzae* alkaline protease in an osmophilic yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*. Agric. Biol. Chem. 54, 2521-2529 (1990).
- 10) Tatsumi, H., Murakami, S., Ogawa, Y., Masaki, A., Ishida, Y., Murakami, K., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E., and Motai, H.: Autoproteolytic processing and processing-dependent secretion of *Aspergillus oryzae* alkaline protease in yeast. Agric. Biol. Chem. 55, 3099-3101 (1991).
- 11) Ikegaya, K., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Sugio, N., Takechi, K., Tatsumi, H., Ogawa, Y., Nakano, E., Motai, H., and Kawabe, H.: Enhancement of the thermostability of the alkaline protease from *Aspergillus oryzae* by introduction of a disulfide bond. Biosci. Biotech. Biochem. 56, 326-327 (1992).