



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

納豆菌 γ -ポリグルタミン酸の合成機構に関する研究

| | |
|-------|---|
| 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: 漆畑, 祐司 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12099/2613 |

| | |
|------------|---|
| 氏名(本国籍) | 漆畑 祐司 (静岡県) |
| 学位の種類 | 博士(農学) |
| 学位記番号 | 農博甲第272号 |
| 学位授与年月日 | 平成14年3月13日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科及び専攻 | 連合農学研究科 生物資源科学専攻 |
| 研究指導を受けた大学 | 静岡大学 |
| 学位論文題目 | 納豆菌 γ -ポリグルタミン酸の合成機構に関する研究 |
| 審査委員会 | 主査 静岡大学 教授 田原 康孝 副査 静岡大学 助教授 徳山 真治 副査 岐阜大学 教授 河合 啓一 副査 信州大学 教授 寄藤 高光 |

論文の内容の要旨

γ -ポリグルタミン酸(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高分子ホモポリマーであり、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)のきょう膜成分として、あるいは納豆菌(*B. subtilis*)の糸引き物質の主成分として分泌生産される。これまでに多くのPGA生産菌が知られているが、PGAの生合成機構はほとんど明らかにされていない。本研究では、納豆菌(*B. subtilis* IFO16449)の γ -ポリグルタミン酸合成機構の解明を目指して、(1) PGA合成遺伝子のクローニングと遺伝子破壊株の作製 (2) PGA合成酵素の精製と性質 (3) PGA合成遺伝子の発現メカニズムの解明を行った。

(第1章) *B. subtilis* IFO16449のPGA合成遺伝子のクローニングと機能解析

B. subtilis 168の*ywsC*の塩基配列をもとにプライマーを構築し、*B. subtilis* IFO16449のPGA合成遺伝子(*ywsC*-*ywtABC*)をクローニングした。*ywsC*、*ywtABC*はそれぞれ393、149、380、55のアミノ酸残基をコードしており、ノーザン解析からこれら遺伝子はオペロンを形成することを明らかにした。推定アミノ酸配列のヒドロパシープロット分析より、*YwsC*と*YwtB*は膜表在性、*YwtA*は膜内在性タンパクであると推定された。*ywsC*、*ywtABC*を保持する大腸菌は少量のPGAを菌体外に生産した。*ywsC*、*ywtA*、*ywtB*に*cat*遺伝子と*spac*プロモーターを挿入して3種類の遺伝子破壊株を作製し、これらの遺伝子破壊株のうち*ywsC*と*ywtA*破壊株はPGAを全く生産しなかったが、*ywtB*破壊株は少量のPGAを生産した。これらの結果から、本菌のPGAは*YwsC*、*YwtABC*によって合成され、*in vivo*のPGA合成には*ywsC*と*ywtA*の2つの遺伝子が必要であることが示された。

(第2章) γ -ポリグルタミン酸合成酵素(YwsC)の精製と性質

3'末端にヒスチジンコドンを融合したywsCと、ywtC下流の転写終結配列をPCR増幅し、これら断片をpHY300PLKに挿入してywsCの発現ベクターを構築した。これを上記のywsC破壊株に形質転換し、ヒスタグ付きYwsC(YwsC-H)をNi-NTAアガロースカラムクロマトグラフィーで精製した。精製したYwsC-Hはゲルろ過クロマトグラフィーで分子量150,000と推定され、SDS-PAGEで44kと33kの2つのサブユニットによって構成されることが明らかとなった。44kと33kはともにC末端にヒスチジンタグを持つことから、ywsC遺伝子にオーバーラップしてコードされていると考えられた。ywsC遺伝子内部の2塩基欠失によるフレームシフト実験の結果、両タンパクは独立して翻訳されることが明らかとなった。精製したYwsC-HはATPとMn²⁺の存在下で¹⁴C-L-グルタミン酸から高分子の¹⁴C-PGA(分子量2万から15万)を合成した。このPGA合成反応はATPとMn²⁺を必須に要求した。本酵素はL-グルタミン酸のみを基質として利用し、D-グルタミン酸からPGAは全く合成されなかった。YwsC-Hの44kと33kタンパクをそれぞれ別々に精製し、44kと33kタンパクの単独の反応系ではPGAを全く生産しなかった。このことから、PGA合成活性には両サブユニットが必要であることが示された。ATPの分解産物としてADPのみを検出した。これらの酵素的性質から、YwsCはL-グルタミン酸を重合して γ -ポリグルタミン酸を合成する γ -ポリグルタミン酸合成酵素(γ -polyglutamic acid synthetase [EC class 6.3.2])であり、本酵素はATP依存性のアミドリガーゼであることが明らかになった。さらに、ATPの分解産物としてADPのみを検出したことから、本酵素がアシルリン酸中間体型の合成酵素であることが示された。同じタイプのアシルリン酸中間体型のATP依存性リガーゼはfolyl-polyglutamate ligaseとmurein ligaseでよく研究され、両酵素はATP結合部位と触媒部位のアミノ酸配列の類似性が高く、この類似性の高いアミノ酸配列はYwsCにも見られることから、本酵素のPGA合成はこれらの酵素と同じ反応様式で合成されることが示された。

Troyらは*B. licheniformis*の膜調製画分を用いたPGA合成反応は、ATPの分解産物としてAMPを同定したことから、PGAの合成はAMP中間体型の合成反応で行われることを報告している。*B. subtilis* IF016449の γ -ポリグルタミン酸合成酵素(YwsC)はアシルリン酸中間体型のアミドリガーゼであり、Troyらの提唱したものは全く異なっている。PGAを合成する γ -ポリグルタミン酸合成酵素(YwsC)がアシルリン酸中間体型であることを示したのは本研究が最初である。

(第3章) PGA合成遺伝子の発現解析

納豆菌(*B. subtilis* IF016449)のywsC-lacZ融合株を作製して、PGA合成遺伝子の発現量を調べた。本遺伝子是对数増殖後期に最も強く発現し、L-グルタミン酸を添加したときに β -ガラクトシダーゼ活性が無添加に比べて約10倍増加した。この発現量の増加はノーザン解析によっても確認され、L-グルタミン酸によってPGA合成遺伝子の発現が促進されることが示された。一方、枯草菌*B. subtilis* 168のywsC-lacZ融合株を用いて同じ実験を行ったが、このような現象は全く見られなかった。しかし枯草菌のPGA合成遺伝子のプロモーターをIPTG誘導可能なspacプロモーターに置換した株はIPTGの添加によってPGAを菌体外に生産した。

これらの結果から、枯草菌がPGAを生産しないのは、枯草菌のPGA合成遺伝子の発現に何らかの障害のあることによると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、納豆菌(*B. subtilis* IFO16449)の γ -ポリグルタミン酸(PGA)合成機構の解明を目指して、(1) PGA合成遺伝子のクローニングと遺伝子破壊株の作製、(2) PGA合成酵素の精製と性質、(3) PGA合成遺伝子の発現メカニズムの解析を行ったものであり、得られた結果の概要は次の通りである。

(1) 本納豆菌のPGA合成遺伝子(*ywsC-ywtABC*)をクローニングし、ノーザン解析からこれら4つの遺伝子はオペロンを形成していることを明らかにした。*ywsC*、*ywtA*、*ywtB*の3つの遺伝子破壊株を作製し、本菌の*in vivo*PGA合成には*ywsC*と*ywtA*の2つの遺伝子が必要であることを示した。

(2) 3'末端にヒスチジンコドンを融合した*ywsC*をpHY300PLKに挿入して*ywsC*の発現ベクターを構築した。これを*ywsC*破壊株に形質転換して、ヒスタグ付きYwsC(YwsC-H)を精製した。YwsC-Hは44kと33kの2つのサブユニットによって構成され、精製したYwsC-HはATPとMn²⁺の存在下で¹⁴C-L-グルタミン酸から高分子の¹⁴C-PGA(分子量2万から15万)を合成した。このPGA合成の反応はATPとMn²⁺を必須に要求した。本酵素はL-グルタミン酸のみを基質とし、D-グルタミン酸からPGAは全く合成されなかった。YwsC-Hの44kと33kタンパクの単独の反応系ではPGAを全く生産しなかった。ATPの分解産物としてADPのみを検出した。これらの酵素的性質から、YwsCはL-グルタミン酸を重合して γ -ポリグルタミン酸を合成する γ -ポリグルタミン酸合成酵素(γ -polyglutamic acid synthetase [EC class 6.3.2])であり、本酵素はATP依存性のアシルリン酸中間体型を形成するADP-forming amide bond ligase familyに属することが示された。

(3) 納豆菌の*ywsC-lacZ*融合株を作製してPGAオペロンの発現量を調べた。本オペロンの発現はL-グルタミン酸を添加したとき、無添加に比べて約10倍増加した。枯草菌(*B. subtilis* 168)の*ywsC-lacZ*融合株を用いた同じ実験では、このような現象は全く見られなかった。しかしながら、枯草菌のPGAオペロンのプロモーターをIPTG誘導可能な*spac*プロモーターに置換した株はその誘導によって菌PGAを体外に生産した。これらの結果から、枯草菌がPGAを生産しないのは、枯草菌のPGAオペロンの発現に何らかの障害のあることが考えられた。

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、 γ -ポリグルタミン酸の合成機構および制御機構の基礎研究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、審査委員の全員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>

- Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y.: Characterization of the *Bacillus subtilis ywsC* gene, involved in γ -polyglutamic acid production. *J. Bacteriol.*, 184, 337-343 (2002).
- Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y.: Difference in transcription levels of *cap* genes required for γ -polyglutamic acid production between *Bacillus subtilis* IFO16449 and Marburg 168. *J. Biosci. Bioeng.*, 93(2), (2002), in press.