

特集：D-アミノ酸制御システムのニューバイオロジー：  
Frontier Science in Amino Acid and Protein Research

## D-グルタミン酸とポリ- $\gamma$ -グルタミン酸合成システム

芦 内 誠

ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸は「納豆の糸」の主成分として有名なバイオ高分子（繊維状物質）である。(1)アミノ酸ポリマーだが、その結合様式はタンパク質等とは異なり、むしろ化成ナイロンに似ていること、(2)巨大な平均分子サイズと広範な分子サイズ分布をあわせ持つこと、並びに(3)グルタミン酸の両光学異性体からなるが、事実上D/Lの並び方に規則性がないアタクティックポリマーであること等、その分子構造は特殊である。最近、結合型D-アミノ酸のバイオシステムに係る分子生物学的・触媒科学的な基礎研究に顕著な進展が見られる。ここでは、ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸の生合成と遊離D-グルタミン酸との分子生理学的な関連性を解説し、その実体にせまる。

### 1. はじめに

生体を構成するアミノ酸の主体がL型であることに異論を挟む余地はない。一方、細菌から動植物にいたる生物界全般にD-アミノ酸が広く分布することが分かり、既知のL-アミノ酸バイオシステムにはない特殊性まで見えてきた。遊離D-アミノ酸の供給にはアミノ酸ラセマーゼが関与するといわれている<sup>1)</sup>。微生物起源の多様なアミノ酸ラセマーゼ群に加え、脳D-セリンとセリンラセマーゼに代表される高等生物型のバイオシステムの発見<sup>2)</sup>はこの示唆を強く後押しするものとなっている。

他方、アミノ酸が重合してできるバイオポリマーにもD-アミノ酸を有するものがある。例えば、タンパク質はリボソーム装置によってL-アミノ酸のみから合成され、分子構造上 $\alpha$ -ペプチド結合（アミド結合の一種）で繋がったポリアミド種（ $\alpha$ -ポリペプチド）に含まれる。そのアミド結合を挟む両端の炭素はほぼ不斉性を有するため、ジアステレオ構造の集合体ともいえる（図1a）。タンパク質中

にもD-アミノ酸が見いだされるようになってきたが、その多くで機能や構造維持に係る不全化が引き起こされている<sup>3)</sup>。負の側面を持つD-アミノ酸種は、それ故、病態研究の新たなターゲットとなる<sup>3)</sup>。対して、D-アミノ酸を含むことではじめて機能発現や構造形成が可能になるバイオポリマーも存在する<sup>4,5)</sup>。さらに、 $\alpha$ -ペプチド結合ではない様式で繋がるポリアミド種（イソポリペプチド）も見つかっている（図1b）。これらはキラルポリマーではあるが、ジアステレオ構造部を持たないため、立体球状のタンパク質よりはむしろナイロン繊維（図1c）に似た性質を示すものと考えられている。D-アミノ酸を含む機能性バイオポリマーがリボソーム非依存的に合成されていることは想像に難くない<sup>6)</sup>。今日、その生合成に係る機構解明への関心も高まっている。

本稿では、納豆の糸の主成分として知られ、D-グルタミン酸を豊富に含むナイロン様構造のバイオポリマー・ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸<sup>7)</sup>（以後PGAと略す）に注目する。そのキラル特性、生理機能、生合成システム等について、最新の研究成果や情報も交えながら詳解する。

### 2. PGAのキラル特性と生理機能

グルタミン酸はDLの2種類の鏡像異性体を持つが、これらが連結してできるPGAの場合、D-グルタミン酸のみからなるD-PGA、L体のみで構成されるL-PGA、DLの両

高知大学農学部（〒783-8502 高知県南国市物部乙200番地）

D-Glutamate and a bio-system for the poly- $\gamma$ -glutamate synthesis

Makoto Ashiuchi (Department of Agriculture, Kochi University, 200 Monobe Otsu, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan)

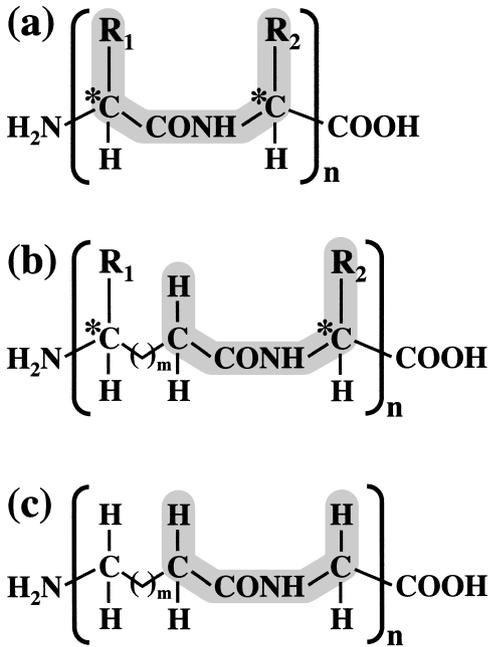


図1 ポリアミド分子種の基本骨格

(a)タンパク質等の $\alpha$ -ペプチド種, (b)バイオナイロンに代表されるイソペプチド種, (c)化成ナイロン繊維.  $R_1$ や $R_2$ は側鎖部を,  $n$ は任意のポリマー重合度を,  $m$ は任意の炭素鎖長を表す. アミド結合を挟む周辺構造部は影付きとし, 不斉炭素は星印で示した.

異性体が混成して連なるDL-PGAの3種が存在する(図2). PGAは基本的に安全性に優れ, しかも多様な材料機能まで備えている<sup>7)</sup>. 超好塩古細菌は極限的な環境に適応する目的からL-PGA(a)を生産するが<sup>7)</sup>, 図らずもその優れた立体規則性は「新素材の開発応用」に係る異種研究分野からの関心を集めることとなった<sup>8)</sup>. D-PGA(b)もまた立体規則性ポリマーであり, 炭疽菌の莢膜成分として知られている. 炭疽菌は免疫原性のないD-PGAを細胞に張り付けて「隠れ蓑」とし, 感染した動物の免疫網から逃れ増殖を続ける<sup>7,9)</sup>. このように, 立体規則性PGAに際立った生理機能が認められる一方, 立体規則性に乏しいDL-PGA(c)に関しては答えが見つからない. 納豆菌はDL-PGA生産種の代表であるが, 非生産株との生理学的な表現型に見かけ上変化がない<sup>10)</sup>. 栄養貯蔵説を唱える研究者もいるが<sup>11)</sup>, 細胞質の貯蔵顆粒<sup>12)</sup>や細胞表層にさえ留め置かれることもなく半ば積極的に培地中に放出される納豆菌PGAの姿は, 我々が知る栄養貯蔵体のそれとは明らかに乖離している. DL-PGAの真の生理機能を知るには, さらなる研究深化と深い洞察力が要求される. なかでも, 生合成システムの理解はその一助になるものと期待されてきた.

### 3. リボソームに依存しないアミノ酸の縮合メカニズム

リボソーム非依存のアミノ酸縮合システムとしては, 全

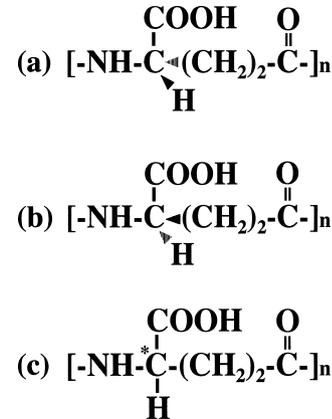


図2 ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸の分子構造

(a)超好塩古細菌が作るポリ- $\gamma$ -L-グルタミン酸(L-PGA), (b)炭疽菌が作るポリ- $\gamma$ -D-グルタミン酸(D-PGA), (c)納豆菌種が作るポリ- $\gamma$ -DL-グルタミン酸(DL-PGA).

く異なるメカニズムで進行する二つのバイオ触媒系が知られている(図3). チオテンプレート依存ペプチド合成酵素群(non-ribosomal peptide synthetase; NRPS<sup>6)</sup>やマルチエンザイムシステム<sup>4)</sup>とも呼ばれる)とアミド連結酵素群である. 前者では, 酵素触媒ユニットEのスルフィドリル(-SH)基とアミノ酸のカルボキシル基の間で形成されるチオエステル結合がもう一つのアミノ酸のアミノ基とのアミド結合に交換され, ペプチド鎖が作られる. この反応が繰り返された後, ペプチドの伸長(アミノ酸の重合)が完結する. また, 本反応の進行過程で, アミノ酸のカルボキシル基はアデニル化され活性中間体が形成される. そのため, 副反応的にATPのAMPとピロリン酸への加水分解が見られる. D-アミノ酸を含むペプチド性抗生物質<sup>4)</sup>や毒性物質<sup>13)</sup>が最終産物として有名である. 興味深いことに, 基質はほぼL-アミノ酸に限られる. 生合成システムの異性化ユニットにより特定の基質がD-アミノ酸に変換され, その後, ペプチドの形成に供される<sup>4)</sup>. 酸性アミノ酸, すなわちD-グルタミン酸とD-アスパラギン酸は例外であることが解ってきた. これらはアミノ酸ラセマーゼの働きで内合成された当該アミノ酸がそのまま導入されている<sup>13)</sup>. 本システムで合成されるペプチド鎖の長さや配列は厳密に規定され, D-アミノ酸の配置まで決まっている. 触媒性の観点から, リボソームに依存する現在のタンパク質合成システムのプロトタイプといわれている<sup>4)</sup>. また, 連結反応の終結とチオテンプレートからのペプチド放出のため, 伸長鎖の環状化や末端チオエステル結合の加水分解が発生すると考えられている.

もう一つは, 図3bに示したアミド連結機構である. グ

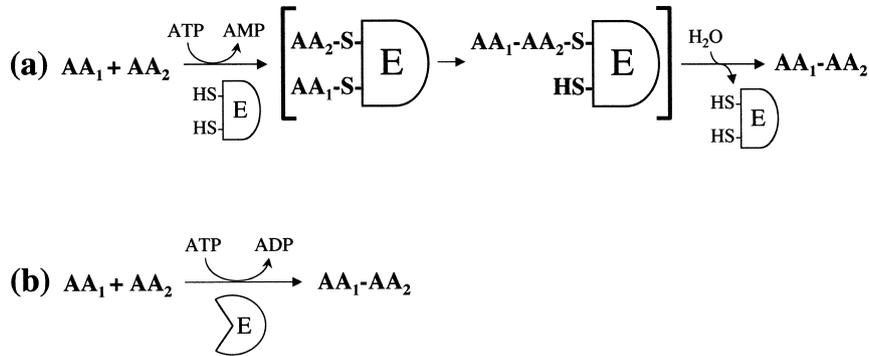


図3 リボソームの依存しないアミノ酸重合機構

(a) チオテンプレート依存ペプチド合成機構, (b) アミド連結機構. 基質アミノ酸は  $AA_1$  及び  $AA_2$ , 酵素分子は E で表した. チオテンプレート依存ペプチド合成酵素群の活性発現に必須のスルフヒドリル (-SH) 基は通常保存領域内のセリン残基が 4'-ホスホパンテテインで翻訳後修飾 (リン酸結合) されることによって形成される<sup>4,6)</sup>.

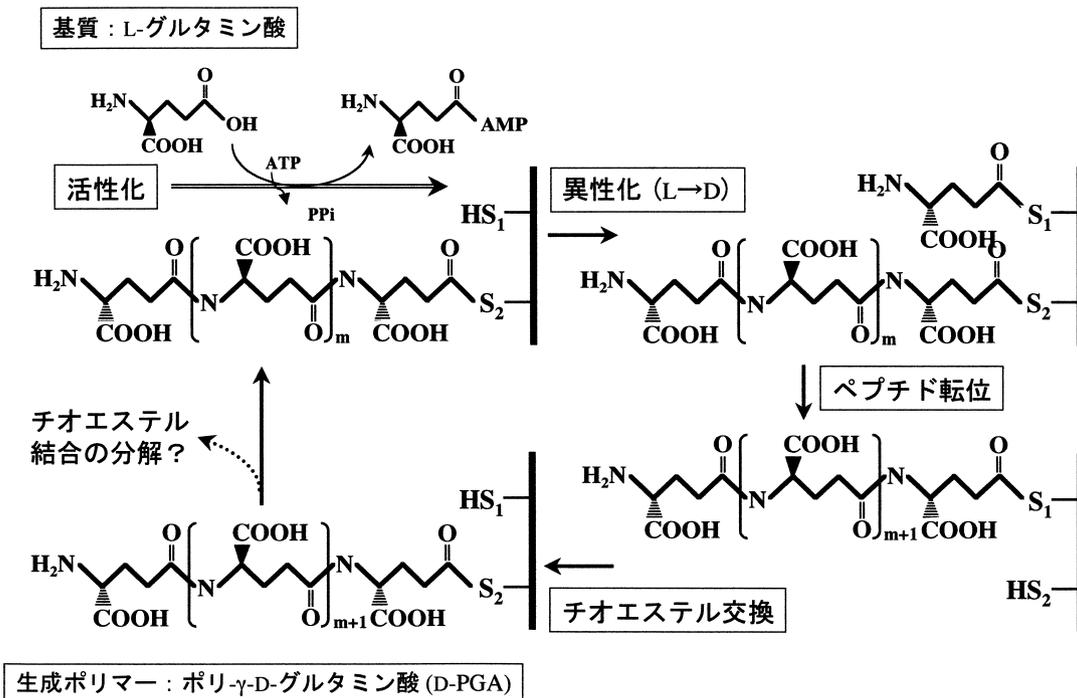


図4 ポリ-γ-D-グルタミン酸の生合成に係るチオテンプレート仮説

ルタチオン<sup>14)</sup>やペプチドグリカン<sup>15)</sup>等の生合成に係る酵素群はこの機構に基づき触媒機能を發揮している. 前者の機構 (図 3a) と比べて単純とされ, アミノ酸とアミノ酸 (またはペプチド鎖) の間にアミド結合を導入することが触媒の基本となる. 本酵素群全体を見渡せば, 基質アミノ酸の立体化学性 (DL) に対しファミリー普遍的差別化機構などは存在せず, 基質の立体化学性を反転させるような触媒性も持たない (前者の機構との最大の違いの一つ). 結合様式に関していえば, α-ペプチド結合に加え, 特殊なイソペプチド結合の形成導入も触媒する. 本反応の進行過程で, アミノ酸のカルボキシル基はリン酸化され活性中間体が形成される. そのため, 副反動的に ATP の ADP とリン

酸への加水分解が見られる. 前者とは異なり, 酵素分子と伸長ペプチド鎖の間で共有結合は形成されない. そのため, 最終生成物の自発的な解離をもって反応が終結するものと考えられている.

#### 4. PGA 合成遺伝子群とバイオ合成システムの解析

少し時代を遡るが, Troy らは, *Bacillus licheniformis* を L-グルタミン酸存在下で培養すると培地中に D-PGA が蓄積するという現象<sup>7)</sup>を重視し, チオテンプレート説をもって PGA の生合成を説明しようとした<sup>16)</sup> (図 4). チオテンプレート依存システムの触媒特性に照らせば, 確かに D-PGA のみを合成する系に限り「配列・配置の厳密性」が

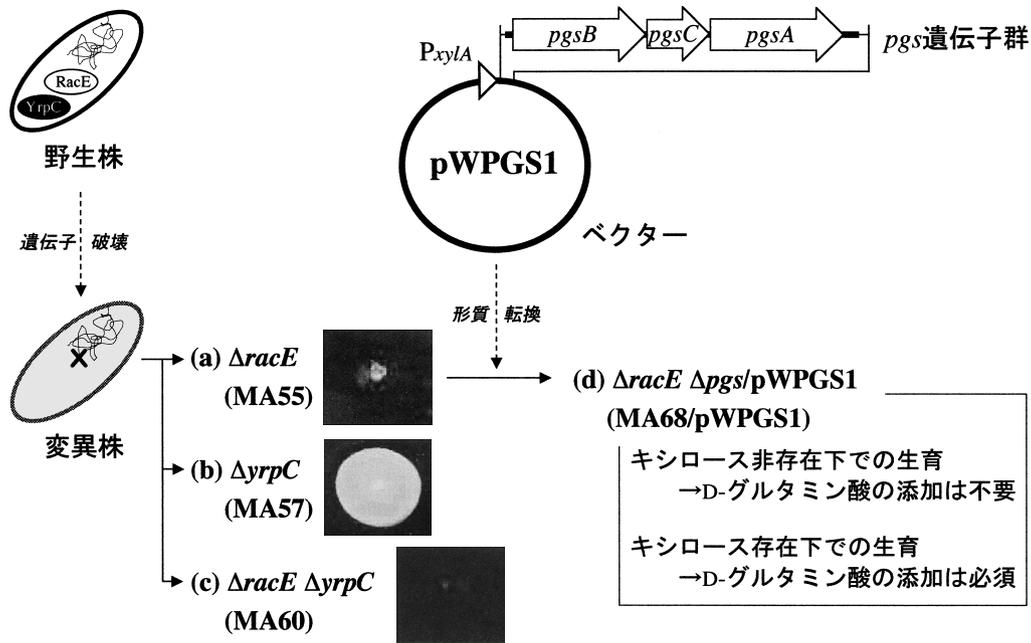


図5 *B. subtilis* の各種グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子破壊株の構築と表現型解析，並びにポリ- $\gamma$ -グルタミン酸合成システムを利用した新規な表現型“conditional D-glutamate auxotrophy”の創成遺伝子型： $\Delta racE$ ，高触媒性グルタミン酸ラセマーゼ<sup>7)</sup>をコードする *racE* (*glr*) 遺伝子の破壊； $\Delta yrpC$ ，低触媒性グルタミン酸ラセマーゼ<sup>7)</sup>をコードする *yrpC* 遺伝子の破壊； $\Delta pgs$ ，ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸合成システム<sup>7)</sup>をコードする *pgs* 遺伝子群の破壊．事実上， $\Delta pgs$  に起因する D-グルタミン酸要求性への顕著な影響は見いだせなかった<sup>29)</sup>．pWPGS1 ベクターは pWH1520 を基礎ベクターに *pgs* 遺伝子群を導入することで構築した．

保証され，仮説にも一定の妥当性が生まれる．ただし，伸長中の PGA 鎖が酵素テンプレートから切り離され，外環境に放出されるメカニズムの実体解明や，本質的に「PGA は長さの厳密性を欠くバイオポリマー」であるという事実とのギャップ解消等，問題点も多い．尤も，この仮想メカニズムはあまりにも魅力的なのか，配列・配置の厳密性を欠く納豆菌 DL-PGA の合成までもその基本原理に則って考察された例さえ見つかると<sup>17,18)</sup>．

「納豆の糸」の PGA の発見<sup>7)</sup>から数えて，約 1 世紀の長きにわたり謎に包まれてきたその生合成システムに，遂に科学のメスが入る時が来た；納豆菌のゲノムライブラリーから PGA を生産する大腸菌クローンが見つかったのである<sup>19)</sup>．本クローンに導入された DNA 断片には，少なくとも三つの遺伝子読み枠 (ORF) が含まれていた．配列相同性検索の結果，炭疽菌の莢膜 (capsule) 合成に関与する *cap-BCA* 遺伝子群との類似性が見いだされた．ただし，炭疽菌とは違い，納豆菌の PGA は莢膜の構成成分ではなく，厳密には菌体外ポリマーの一種である．事実，炭疽菌の *cap* 遺伝子クラスターには PGA と細胞壁を連結する莢膜形成必須酵素 CapD の構造遺伝子<sup>20)</sup>が見つかるが，納豆菌の *pgs* 遺伝子群にはこれに相当する遺伝子は存在しない．そのため，少なくとも納豆菌の PGA 合成遺伝子群についていえば，*cap* 遺伝子群<sup>21,22)</sup>と表すのは不適切で，機能の

本質を正確に捉えた遺伝子名が必要であった．結局，本遺伝子群が示す“poly- $\gamma$ -glutamate synthesis”機能を明確にする目的から *pgs* と名付けた<sup>19)</sup>．さらに，炭疽菌 *capBCA* 遺伝子群とはオペロン構成まで似ていること<sup>7)</sup>を考慮し，最後に *pgsBCA* 遺伝子群と定めた．納豆菌や枯草菌等の *Bacillus subtilis* では，*pgs* 遺伝子群が破壊されると PGA 生産能は完全に失われてしまう<sup>7,10,23)</sup>．本破壊株 *pgsBCA* の全てを導入すれば PGA 生産能は回復するが，一つでも欠くと PGA は生産されなくなる<sup>23)</sup>．異種生物への PGA 生産性賦与もまた *pgs* 遺伝子群の利用で実現できる．大腸菌の他，コリネ細菌<sup>24)</sup>や植物体<sup>25)</sup>でも成功例が報告されている．以上の結果は，*pgs* 遺伝子群にコードされる遺伝子産物から PGA 合成装置が形成されていることを意味する．

*pgs* 遺伝子群の機能解析研究を通じ，その発現がキシロースによって厳密に制御できる pWPGS1 ベクターの設計に成功した (図 5)；このベクターを持つ *B. subtilis* クローンは，PGA 生産の簡易制御が可能な分子育種株として有用とされている<sup>23)</sup>．

さて，納豆菌 PGA には比較的著量の D-グルタミン酸が含まれているが，そのインビボ供給経路については，不明瞭な部分が多く残されていた．ただし，前述の Troy らの仮説に習い，納豆菌 PGA でも L-グルタミン酸のみが合成基質であると予想する提案<sup>17,18)</sup>も見受けられる．遊離 D-グ

ルタミン酸の内合成について、*B. subtilis* ではグルタミン酸ラセマーゼの働きが重要視されている<sup>26)</sup>。例えば、2種の機能性グルタミン酸ラセマーゼがアイソザイムの形で存在することが*B. subtilis*の研究で初めて立証されている<sup>27)</sup>（大腸菌をはじめ、全ゲノム配列が判明している細菌類の大半で、グルタミン酸ラセマーゼは単一酵素 MurI として存在するという傾向が確認されていた）。*B. subtilis*のアイソザイムは、各々 RacE(Glr) と YrpC と呼ばれている<sup>7)</sup>。前者は例外的に高いレベルで生産される上、ラセミ化の反応性にも優れていた<sup>26)</sup>。これに対し、後者は酵素触媒能の点では劣るものの<sup>27)</sup>、MurI 酵素に特徴的な別の生理機能は保持していた<sup>28)</sup>。まず、*B. subtilis*の各種グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子破壊株を作製し、D-グルタミン酸要求性を中心に表現型解析を行った<sup>29)</sup>。図5の写眞は、Luria-Bertani (LB) 栄養培地上での増殖を観察した一例を示す。RacE(Glr)を欠く MA55 変異株(a)では顕著な生育遅延が見られ、D-グルタミン酸の添加で回復する。一方、YrpCを失った MA57 変異株(b)の生育は野生株と同等であった。さらに、RacE(Glr)と YrpCの二重欠損変異株 MA60(c)ではD-グルタミン酸の添加が生育に必須であった。MA55 変異株の増殖速度は液体培養や無機塩最小培地を利用することでやや回復する傾向が認められたが、MA60 変異株に関しては、試行した全ての培養条件で明確なD-グルタミン酸要求性が認められた<sup>29)</sup>。以上の結果より、*B. subtilis*の遊離D-グルタミン酸の内合成システムでは、RacE(Glr)が中心酵素、YrpCが補完酵素として機能していることが示唆された。

先の大腸菌 *pgs* クローン<sup>19)</sup>に係る表現型解析から、グルタミン酸ラセマーゼ活性の乏しい大腸菌細胞で *pgs* 遺伝子群を発現させると、PGAの生産とともに著しい生育抑制が導かれることが解っている（未発表）。また、PGAはL体に富むポリマーとして生産される<sup>19)</sup>。このクローン内で RacE(Glr)を共発現させると、生育抑制の緩和とともに、見かけ上納豆菌のPGAと同質のDL混成型ポリマーが作られるようになる<sup>19)</sup>。このような実験と観察を通じ、D-グルタミン酸とPGAの生合成経路の間に有意な相互関係が存在する可能性が高くなってきた。そこで、遊離D-グルタミン酸の内合成能が著しく低下した RacE(Glr) 欠損株から、重ねて *pgs* 遺伝子群も欠失させた二重破壊株 MA68<sup>29)</sup>を作製後、前述の pWPGS1 ベクターで形質転換しPGAの生産誘導がキシロースで確実に制御できる新規クローン MA68/pWPGS1 (図5, d)を開発した。さらに、コントロール宿主の *B. subtilis* MA70 変異株 [RacE(Glr) 保持] とコントロールベクターの pWH1520 [*pgs* 遺伝子群なし] との組み合わせから、最終的に4種のクローン株を作製した。その後、実際にキシロースを与えPGA合成活性を強制誘導したところ、MA68/pWPGS1に完全なD-グルタミ

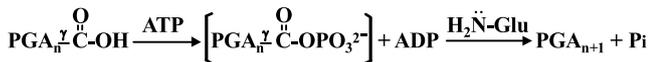
ン酸要求性が見いだされた<sup>29)</sup>。一方、他のコントロールクローン株では、いずれの条件でも完全な本要求性は認められなかった。MA68/pWPGS1 クローンに設計されたこの新奇な表現型は“conditional D-glutamate auxotrophy”と命名された。以上の観察結果は、先の提案<sup>17,18)</sup>に反し、遊離D-グルタミン酸もまたPGAの生合成基質として確実に利用されていることを意味していた。

## 5. PGAのインビトロ合成

*pgs* 遺伝子群にコードされる遺伝子産物の配列相同性解析から興味深い情報が得られた。PgsB成分は前述のアミド連結機構(図3b)に則ってアミノ酸の重合反応を触媒するアミドリガーゼ群<sup>30)</sup>と類似する構造特性を備えていることが判明した<sup>7)</sup>。一方、PgsBCAの全成分において、チオテンプレート依存システム(図3a)を示唆する構造的特徴は全く存在しなかった。*pgs* 遺伝子群にコードされるバイオシステムが唯一のPGA生合成装置である *B. subtilis* では<sup>7,10,23,31)</sup>、チオテンプレート説やL-グルタミン酸のみからのDL-PGA合成の提案<sup>17,18)</sup>が受け入れられていた環境はもはや過去のものとなった。

納豆菌種のPGA合成システムは極端に不安定で反応調査でさえ進まずにいた。最近、酵素反応で合成される微量のPGAでも精度よく回収できるマイクロ精製法<sup>32)</sup>を開発し、ここに至って反応特性解析も前進しはじめた。例えば、本合成活性は納豆菌種の膜酵素画分に局在し、これを用いることで高分子量PGAのインビトロ合成が初めて可能になった<sup>33)</sup>。ただし、膜酵素を界面活性剤等で可溶化すると本活性は完全に失われてしまう。この性質(膜結合状態でのみ活性発現されること)はPGA合成システムが極端に不安定であることの要因の一つと思われ、酵素が結合した膜画分の反応液内での分散を助ける目的で低濃度の界面活性剤(～1mM CHAPS)を添加するのがよい。PGA合成反応の最大の特徴は長大なポリアミド鎖を生み出す点にある。アミノ基とカルボキシル基の間で起こるアミド連結反応を基礎とするが、この反応は、化学量論上、水分子を放出する脱水反応の一つと見なすことができる。そのため、水溶媒系でPGA合成を再現するのは根本的に困難とされたが、ここでは膜成分を共存させ疎水的な反応環境を広範囲に提供したことでアミド連結反応の連続化が可能となり、その結果、グルタミン酸の高度重合まで実現できたと考えている。ちなみに、PgsB成分と構造上類似した可溶性酵素に、葉酸：ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸リガーゼ(FolC)がある<sup>30)</sup>。FolCは葉酸のグルタミン酸側鎖にさらにグルタミン酸を連結する酵素だが、その伸長度は平均で5～7残基、最大でも12残基に止まる。グルタミン酸が1万分子を超えて重合したポリアミド鎖を作り出すPGA合成システムとは触媒性の面で明らかに異なる。本合成反応の副反

応として「グルタミン酸依存 ATP 加水分解」が発生するが、これに伴って生成される核酸種は ADP であった (AMP ではない)<sup>10,31</sup>。基質選択性を調べたところ、グルタミン酸に特異的であったが、D 体/L 体に対する立体選択性は厳密ではなかった<sup>33</sup>。D-グルタミン酸を基質にすると D-PGA 伸長鎖が、L-グルタミン酸からは L-PGA 伸長鎖が、D 体/L 体の混合グルタミン酸からは DL-PGA 伸長鎖が形成された。この結果は、本合成活性を含む膜酵素画分には PGA 鎖の立体化学性を改変 (DL 反転) する活性は存在しないことを意味し、少なくとも、L-グルタミン酸のみ基質となって PGA が合成されるという提案<sup>17,18</sup>は本膜酵素システムのものとは異なる機構と考えられた。今日までに解った本システムの構造的特徴と触媒特性はともに、*B. subtilis* における PGA 生合成がアミド連結機構に則って進行していることを示唆している。予想される反応機構は以下の通りである。



最近、*B. licheniformis* の全ゲノム配列が決定され<sup>34</sup>、*B. subtilis* の *pgs* 遺伝子群とほぼ同一のクラスター構造が存在していることが明らかになった。一方、炭疽菌細胞が生産する PGA は D-グルタミン酸のみで構成され、*B. licheniformis* 細胞も条件によっては D 体含有率が 100% の PGA を生産することがある<sup>7</sup>。ところが、*B. subtilis* 細胞による微生物発酵法に限れば D-PGA 生産に成功した例はない。様々な可能性が考えられるが、各々の PGA 合成システムの基質特異性の違いもその候補の一つとして挙げられる。炭疽菌と *B. licheniformis* の PGA 合成システム間で高い相関性がある一方、*B. subtilis* のシステムとは類似性の乏しい配列を探索したところ、図 6 に示した領域が抽出されてきた。活性発現に必須の ATP を結合する配列が含まれる領域であり、触媒性に深く係ると予想される。ここで見いだされた「9 アミノ酸の伸長配列」は PGA 合成システムの触媒機能デザインに有力な洞察を与えるものとして注目し値すると考えている。

さらに、pH 依存性 (最適 pH は ~7.0) や金属イオンの効果 ( $\text{Mg}^{2+}$  の必須性) を調査解析し、PGA 合成反応の基

```

Bs-PgsB: 1 MWLLIIACAVILVI-GILEKRRHQKNID-----GIRGKSTVTRLTTG 41
Bl-PgsB: 1 MWVLLACVIVVGI-GIYEKRRHQQNIDALPVRVNINGIRGKSTVTRLTTG 50
Ba-CapB: 1 MIFIIGICTVFLIIYGIWEQRCHQKRLNSIPIRVNINGIRGKSTVTRLITG 51
  
```

図 6 各種ポリ-γ-グルタミン酸合成システムの B 成分の配列相同性比較

Bs-PgsB は納豆菌種の本システムの B 成分、Bl-PgsB は *B. licheniformis* の本システムの B 成分、Bs-CapB は炭疽菌の本システムの B 成分を指し、各々のアミノ基末端側のアライメント (一文字表記) を示す。推定 ATP 結合領域 (G-I-R-G-K-S) は太字で表した。また、Bl-PgsB と Bs-CapB に存在する高度に保存された伸長領域は影付きで示した。

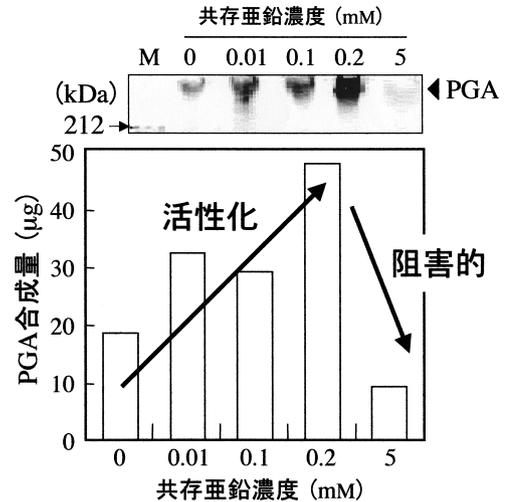


図 7 膜局在性ポリ-γ-グルタミン酸合成活性に及ぼす亜鉛イオンの効果

上部に酵素合成されたポリ-γ-グルタミン酸の SDS-PAGE プロファイル (メチレンブルーで視覚化) を、下部には 1 回の酵素合成反応<sup>33</sup>で得られるポリマー量を示した。

本特性を明らかにした<sup>33</sup>。ごく最近、亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) による特殊な反応制御を見いだした (図 7)。すなわち、低濃度域 (~0.2 mM) では活性化因子として、高濃度域 (~5 mM) では逆に阻害因子として作用する。このような特殊な金属イオン応答性を有する酵素種は、カルシニューリンに代表される “dimetallic hydrolase family” に多い<sup>35</sup>。そこで、納豆菌 PgsBCA の各成分のドメイン構造を CDART (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool)<sup>36</sup> で調査し、PgsA 成分に “metallophos” と呼ばれる前述のファミリーに特徴的なドメイン様構造を見いだした<sup>37</sup>。これまでに PgsA は細胞表層に局在する性質を持ち<sup>38</sup>、伸長した PGA 鎖の菌体外放出 (輸送系) への関与が示唆されている<sup>7,10</sup>。一方、納豆菌体による PGA 生産は複数の金属イオンが存在すると極めて複雑な挙動を示すことも知られている<sup>7</sup>。PGA 生産 (生合成) メカニズムの全容解明に向け、PgsA の機能解析のさらなる発展が待たれる。

## 6. おわりに

PGA を高分子材料という視点で捉えたと、図 8 に示すように、ナイロン繊維類似のキラルポリマーとなる。その

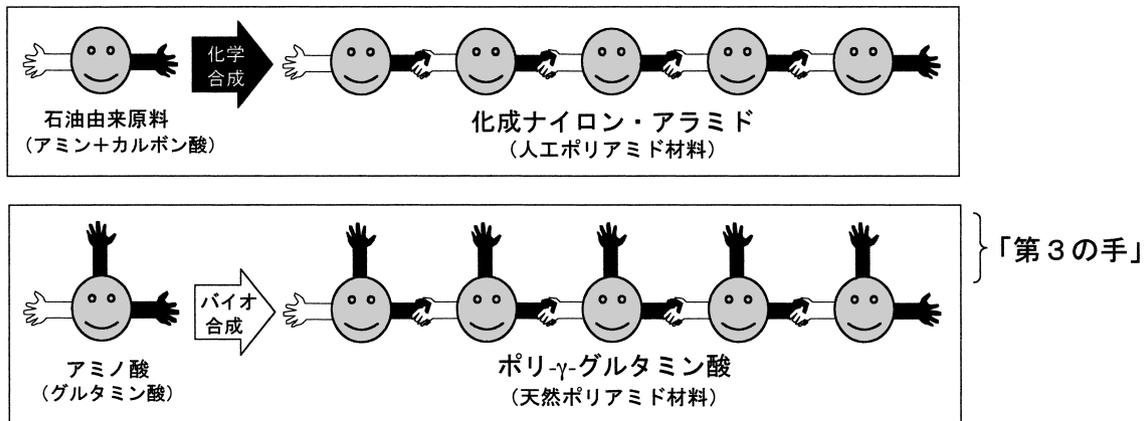


図8 ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸のキラルナイロン素材としての構造特性

顔の部分は基本骨格，手を繋いだ部分はアミド結合を見立てている．白抜きの手はアミノ基，黒塗りの手はカルボキシル基に相当する．

特殊な構造のため，化成ナイロンにはない反応性に富む官能基（カルボキシル基側鎖；「第3の手」<sup>39)</sup>と呼んでいる）が多数用意されている，この残基を起点にすれば，さらに多様で先端的な機能材料化まで望める．確かにPGAは単純な構造のように見える．ところが，グルタミン酸を $\gamma$ -アミド結合のみで重合（ポリマー化）するのは最新の高分子合成技術をもってしても容易ではなく<sup>7)</sup>，バイオ触媒（細胞や酵素）に頼らざるを得ないのが現状である．キラル材料ならば，立体規則性の制御は不可欠である<sup>40)</sup>．本著でも触れたように，この点に注目すれば，間違いなく酵素触媒の利用は有望である．一方，水溶液中での低レベルの合成効率<sup>32)</sup>と高価なATPを消費する点は汎用技術化への妨げとなる．PGA合成反応は（突き詰めれば）脱水反応の一種であり，発生した水分子がATPの加水分解を介して消費されることで反応駆動力が維持されていると考えられる．そのため，仮に基質グルタミン酸の溶解と本PGA合成システムの機能発現が望める非水溶媒（水分子が共存しにくい反応環境）が発見できれば，前述したこれまでの弱点も克服できるものと期待している．

今後，D-アミノ酸バイオシステムの基礎理解を新機能材料の開発に繋げるため，バイオとケモの技術融合まで視野に入れた新領域研究を推進したいと考えている．

## 文 献

- Yoshimura, T. & Esaki, N. (2003) *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 103–109.
- Wolosker, H., Sheth, K.N., Takahashi, M., Mothet, J.-P., Brady Jr., R.O., Ferris, C.D., & Snyder, S.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 721–725.
- Kinouchi, T., Nishio, H., Nishiuchi, Y., Tsunemi, M., Takada, K., Hamamoto, T., Kagawa, Y., & Fujii, N. (2007) *Amino Acids*, **32**, 79–85.
- Stein, T., Kluge, B., & Vater, J. (1995) *Biochemistry*, **34**, 4633–4642.
- Heck, S.D., Faraci, W.S., Kelbaugh, P.R., Saccomano, N.A., Thadeio, P.F., & Volkmann, R.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4036–4039.
- Kleinkauf, H. & von Döhren, H. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **236**, 335–351.
- Ashiuchi, M. & Misono, H. (2002) in *Biopolymers* (Fahnestock, S.R. & Steinbüchel, A. eds.) Vol. 7, pp. 123–174 (Chap. 6), Weinheim, Wiley-VCH.
- 経済産業省/NEDO技術戦略マップ2007，ものづくり分野（ファイバー分野），pp. 868–897.
- Mock, M. & Fouet, A. (2001) *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 647–671.
- Ashiuchi, M., Nawa, C., Kamei, T., Song, J.J., Hong, S.P., Sung, M.H., Soda, K., & Misono, H. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5321–5328.
- Kimura, K., Tran, L.-S. P., Uchida, I., & Itoh, Y. (2004) *Microbiology*, **150**, 4115–4123.
- Oppermann-Sanio, F.B. & Steinbüchel, A. (2002) *Naturwissenschaften*, **89**, 11–22.
- Sielaff, H., Dittann, E., de Marsac, N.T., Bouchier, C., von Dören, H., Börner, T., & Schwecke, T. (2003) *Biochem. J.*, **373**, 909–916.
- Galperin, M.Y. & Koonin, E.V. (1997) *Protein Sci.*, **6**, 2639–2643.
- Bertrand, J.A., Auger, G., Martin, L., Fanchon, E., Blanot, D., Le Beller, D., Van Heijenoort, J., & Dideberg, O. (1999) *J. Mol. Biol.*, **289**, 579–590.
- Gardner, J.M. & Troy, F.A. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 6262–6269.
- 伊藤義文 (1999) バイオサイエンスとインダストリー，**57**, 247–250.
- Kimura, K., Tran, L.-S., & Itoh, Y. (2004) *Microbiology*, **150**, 2911–2920.
- Ashiuchi, M., Soda, K., & Misono, H. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 6–12.
- Candela, T. & Fouet, A. (2005) *Mol. Microbiol.*, **57**, 717–726.
- Urushibata, Y., Tokuyama, S., & Tahara, Y. (2002) *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 252–254.
- Kimura, K. & Itoh, Y. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2491–2497.
- Ashiuchi, M., Shimanouchi, K., Horiuchi, T., Kamei, T., & Mi-

- sono, H. (2006) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1794–1797.
- 24) Sung, M.-H., Park, C., Kim, C.-J., Poo, H., Soda, K., & Ashiuchi, M. (2005) *Chem. Rec.*, **5**, 352–366.
- 25) Tarui, Y., Iida, H., Ono, E., Miki, W., Hirasawa, E., Fujita, K., Tanaka, T., & Taniguchi, M. (2005) *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 443–448.
- 26) Ashiuchi, M., Tani, K., Soda, K., & Misono, H. (1998) *J. Biochem.*, **123**, 1156–1163.
- 27) Ashiuchi, M., Soda, K., & Misono, H. (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 792–798.
- 28) Ashiuchi, M., Kuwana, E., Komatsu, K., Soda, K., & Misono, H. (2003) *FEMS Microbiol. Lett.*, **223**, 221–225.
- 29) Ashiuchi, M., Nishikawa, Y., Matsunaga, K., Yamamoto, M., Shimanouchi, K., & Misono, H. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 646–650.
- 30) Eveland, S.S., Pompliano, D.L., & Anderson, M.S. (1997) *Biochemistry*, **36**, 6223–6229.
- 31) Urushibata, Y., Tokuyama, S., & Tahara, Y. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 337–343.
- 32) Ashiuchi, M. & Misono, H. (2007) in *D-Amino Acids: A New Frontier in Amino Acid and Protein Research-Practical Methods and Protocol* (Konno, R., Brückner, H., D’Aniello, A., Fisher, G., Fujii, N., & Honma, H. eds.), pp. 403–407 (Chap. 5.7), Nova Science Publishers, NY.
- 33) Ashiuchi, M., Shimanouchi, K., Nakamura, H., Kamei, T., Soda, K., Park, C., Sung, M.-H., & Misono, H. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4249–4255.
- 34) Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., de Leon, A.L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jorgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., & Berka, R.M. (2004) *Genome Biol.*, **5**, R77.
- 35) Kimura, E. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 207–213.
- 36) Geer, L.Y., Domrachev, M., Lipman, D.J., & Bryant, S.H. (2002) *Genome Res.*, **12**, 1619–1623.
- 37) Ashiuchi, M. & Horiuchi, H. (2006) in 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 1P-B-201.
- 38) 成文喜, 瀬脇智満, 洪承杓, 李宗洙, 鄭昌敏, 夫夏玲, 金哲仲, 近藤昭彦, 芦内誠 (2004) コンビナトリアル・バイオエンジニアリングの最前線 (植田充美編), pp. 68–75, シーエムシー出版, 東京.
- 39) 漆原次郎 (2007) *化学と工業*, **60-4**, 427–431.
- 40) Engelberg, I. & Kohn, J. (1991) *Biomaterials*, **12**, 292–304.
-