

立体規則的なポリグルタミン酸生産法の開発

北海道大学大学院 工学研究院

小笠原 泰志

ポリ-γ-グルタミン酸 (PGA、図 1) は納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) に代表される *Bacillus* 属細菌によって生産される高分子化合物で、日本人には身近な納豆の糸の成分である。人体に無害で、高い保水力や金属吸着能を持つため、食品や化粧品の添加物、水質改善剤など様々な用途で利用されている^[1]。PGA は、グルタミン酸 (Glu) がα-アミノ基とγ-カルボン酸間でアミド結合することで重合した構造であるが、一般に *Bacillus* 属細菌が生産する PGA は Glu の 2 つの立体異性体 (L-Glu と D-Glu) を共に含む混合ポリマー (DL-PGA) である。例えば、納豆菌が生産する PGA は L-Glu と D-Glu を約 4:6 で含む。PGA は、L/D-Glu の比率により性質が大きく異なることが知られており、特に D-Glu のみからなる D-PGA は立体規則性があり、DL-PGA と比べて保水性が高く、また高塩濃度でも保水性を失わないことから化粧品添加剤の原料としての利用が期待されている。D-PGA については、ヒトの病原菌である炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) が生産することが知られているが、病原菌である炭疽菌の遺伝子を用いた D-PGA の実用生産は不可能である。そのため、納豆菌由来の PGA 生合成遺伝子の改変による D-PGA の生産系の確立が期待されている。

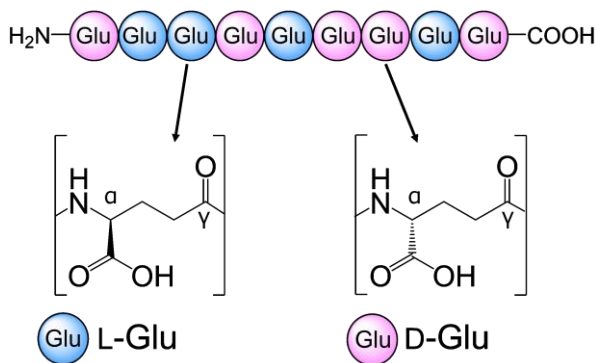


図 1 PGA の構造

PGA の生合成については、過去の知見から最低 3 つの遺伝子 (*pgsBCA*) の関与が示されている。PgsB はアミド結合形成酵素と相同性があり、Glu の重合反応を担うことが示されているが、PgsA および PgsC は既知の酵素との相同性がなく、また PgsBCA は何れも膜酵素であり、*in vitro* 実験が困難なことから、PGA 生合成機構の詳細は未解明であった。D-Glu は微生物の細胞壁のペプチドグリカンの成分として必須であり、*Bacillus* 属細菌も内在のグルタミン酸ラセマーゼにより D-Glu を生合成できることから、PGA は D,L-Glu の両者の重合反応により生合成されると考えられてきた (図 2 黒矢印の経路)。しかし、筆者らは最近ペプチド天然物の MS-271 の生合成に関わる新規ペプチドエピメラーゼ (ペプチド異性化酵素、MslH) を見出した。MslH はリボソームで生合成された MS-271 の前駆体ペプチドの C 末端の L-トリプトファン (Trp) を D 体へと異性化する^[2-4]。PgsA は

MslH と約 53%のアミノ酸配列相同性があることから、PgsA が PGA 生合成におけるエピメリ化 (異性化) を触媒する可能性が考えられた (図 2 赤矢印の経路、図 3)。

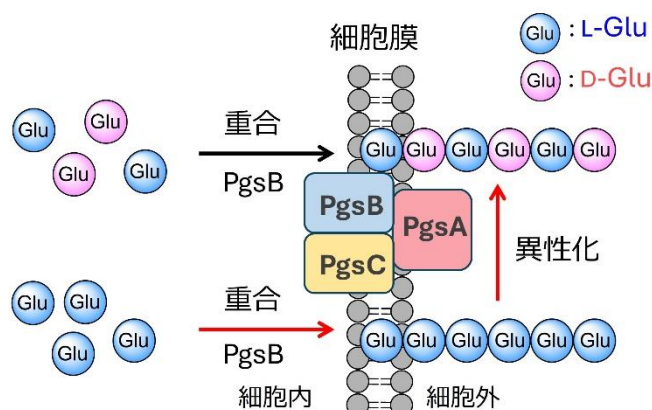


図 2 PGA 生合成: 従来は L-Glu と D-Glu の共重合で混合ポリマーが生合成されたと考えられてきた(黒矢印の経路)が、L-Glu のみが重合に用いられその後の異性化で PGA が生合成される可能性が考えられた (赤矢印の経路)

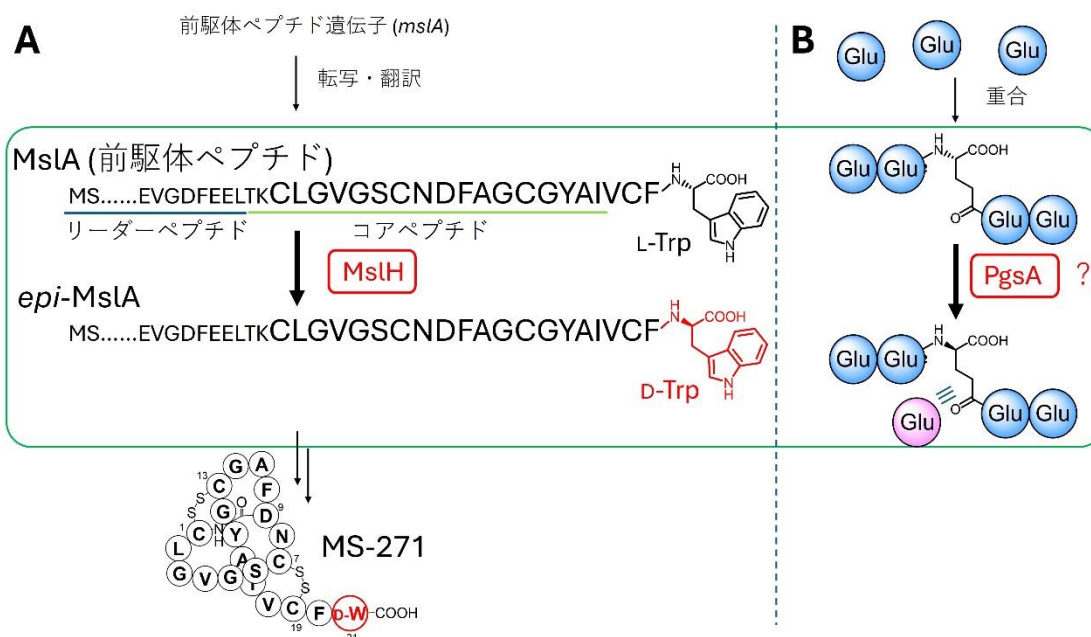


図 3 (A) MS-271 生合成に関わる異性化反応と (B) PGA 生合成における異性化反応

我々の仮説通り、異性化が生合成に関与する場合には、混合ポリマーは L-Glu のみから生合成される。そこで同位体標識した L-Glu、D-Glu の投与実験で検証した結果、予想通り PGA の D,L-Glu 残基は何れも L-Glu を前駆体とすることが示され、生合成に異性化反応が関与することが示された [5]。

本研究では、PgsA が異性化を触媒することの検証と、その知見を元に非病原性 *Bacillus* 属細菌の PGA 生合成遺伝子を改変し、D-PGA を生産する方法を確立することを目的とした。

実験方法

PGA 中の D-Glu 含有率は生産菌によって異なり、*B. megaterium* は D-Glu:L-Glu 比率が 60:40 の PGA、*Bacillus anthracis* は D 体 100% の PGA を生産する。PgsA が異性化酵素として働く場合、PgsA の由来によって生産される PGA の D-Glu 含有率が決まると考えられる。そこで、異なる菌由来の *pgsBCAE* を組み合わせて PGA を大腸菌で異種生産し、生産された PGA の D-Glu:L-Glu 比率を決定した。

PGA の異種生産方法と得られた PGA の D-Glu:L-Glu 比率の決定方法は次の通りである。形質転換体を、PGA 生産培地 (0.5% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を含む LB 培地、200 mL) で 37 °C で培養した。OD (600 nm) が約 1 に達したら、イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度 1 mM 添加してタンパク質発現を誘導し、28 °C でさらに 24 時間培養を継続した。培養終了後、培養液上清から PGA を精製した。初めに 6 M 硫酸で培養液上清の pH を 2.5 に調整して多糖類を沈殿させて除去した後、3 倍量の冷無水エタノールで PGA を沈殿させ、4000 x g で 20 分間遠心分離した。得られた沈殿を 2 mL の水に溶解し、プロテイナーゼ K 処理後、水で透析することで小分子およびタンパク質を除去した。得られた PGA はアガロースゲル電気泳動によってさらに精製した。

精製した PGA は、PGA 加水分解酵素として知られる YoqZ と GGT を使用して Glu モノマーに加水分解し、得られた Glu を *N* α -(5-フルオロ-2,4-ジニトロフェニル)-1-アラニンアミド (L-FDAA) で誘導体化した。さらに D/L 比を決定するための L-FDAA 誘導体を LC-ESI-MS 分析した。分析には Mightysil RP-18 GP Aqua カラム (150 mm \times 2.0 mm, 3 μ m) カラムを用い、流量 0.2 mL/分、温度 40°C、移動相 A: 0.05 vol % トリフルオロ酢酸を含む水、移動相 B: 0.05 vol % トリフルオロ酢酸を含むメタノールで、グラジエント条件、25% B (0 ~ 2 分) \rightarrow 25 ~ 80% B (2 ~ 20 分)で行った。検出は ESI マイナスイオンモードで誘導体化 Glu のイオンをモニターすることで行った。

実験結果および考察

初めに、*B. megaterium* と *B. anthracis* の 2 つの菌について *pgsB*, *pgsC*, *pgsA* 遺伝子をそれぞれ PCR し、*pgsB* と *pgsC* を pRSFDuet-1 ベクターに、*pgsA* を pETDuet-1 ベクターにクローニングした。次に、*pgs* 遺伝子がすべて *B. megaterium* の組み合わせ、すべて *B. anthracis* の組み合わせで大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、形質転換体を培養後、得られた PGA の D-Glu 含有率を分析した。その結果、*B. megaterium* の *pgsBCA* を使

用した場合に PGA の生産が確認されその D-Glu:L-Glu 比率は 30:70 であった。一方、*B. anthracis* 由来の *pgsBCA* を使用した場合に微量の PGA しか生産されなかった。これまで、*pgsBCA* の下流に存在する *pgsE* 遺伝子を共発現することで PGA の異種生産における生産量が向上することが知られている。PgsE は、50 アミノ酸残基程度のペプチドで PgsBCAE 複合体において構造的役割を果たすと考えられている。そこで、*B. megaterium* と *B. anthracis* の *pgsE* をそれぞれ pCDEEuet-1 ベクターにクローニングして PgsBCA とともに追加発現し、先と同様に PGA を生産し、D-Glu:L-Glu 比率を分析した。その結果、*B. megaterium* 由来の *pgsBCAE* および *B. anthracis* 由来の *pgsBCAE* のいずれにおいても PGA の生産性が改善され、PGA の D-Glu:L-Glu 比率は前者で 60:40、後者で 100:0 であることが確認された。そこで以下の遺伝子交換実験には、*B. megaterium* 由来の *pgsBCAE* および *B. anthracis* 由来の *pgsBCAE* を使用することにした。

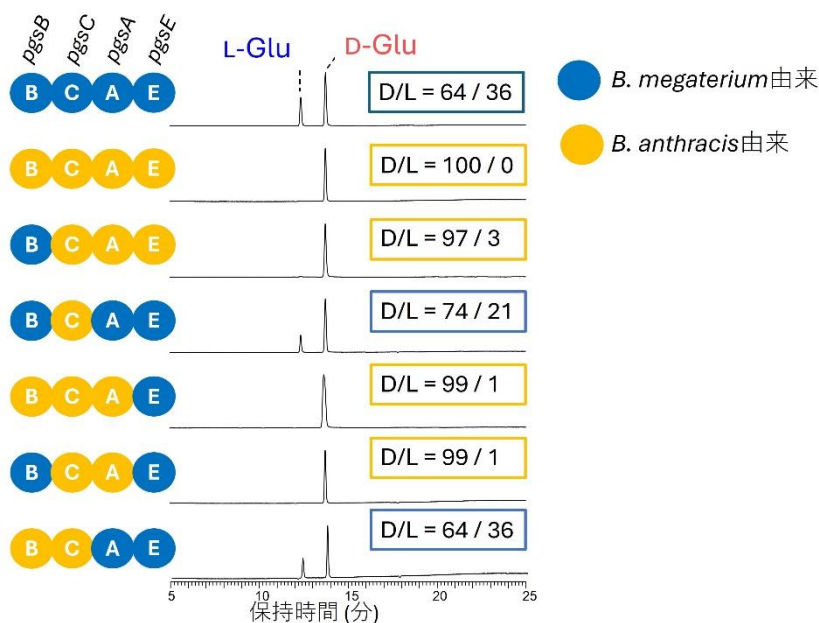


図 4 2つの由来の *pgsBCAE* 遺伝子を組み合わせて生産される PGA の D-Glu:L-Glu 比率の分析結果

2つの由来の4つの遺伝子を組み合わせによる残りの14通りについて検証するため、すべての組み合わせについてそれぞれ形質転換体を構築した。それぞれの形質転換体の培養液を分析した結果、いくつかの組み合わせではPGAが生産しなかったが、PGAの生産が確認できたものについてはD-Glu:L-Glu比率を分析した。その結果、*B. anthracis* 由来の *pgsBCAE* の *pgsB* または *pgsE* 遺伝子のいずれかを対応する *B. megaterium* 由来 *pgs* 遺伝子で置き換えた場合、PGA内のD-Glu含有量(100%)の変化は観察されず、「B」遺伝子と「E」遺伝子は比率決定に無関係であることが示された。同様に、*B. megaterium* 由来 *pgsBCAE* の *pgsC* 遺伝子を *B. anthracis* 由来の遺伝子で置換しても

PGA 中の D-Glu 含有量は変化しなかったため、「C」遺伝子も無関係であることが示された。一方、*B. megaterium* 由来 *pgsBAE* と *B. anthracis* 由来 *pgsC* の組み合わせから「A」遺伝子を変えた場合、*B. megaterium* 由来 *pgsE* と *B. anthracis* 由来 *pgsCBCA* の組み合わせから「A」遺伝子を変えた場合に PGA の D-Glu:L-Glu 比率が変化した。以上、*B. anthracis* 由来 PgsA を使用するとほぼ 100% の D-Glu を含む PGA が生成されるが、*B. megaterium* 由来 PgsA では D-Glu 含有量が 65 ~ 75% となる傾向が見られた。これらの結果から、「A」遺伝子が PGA 産物の D-Glu:L-Glu 比率を制御していることが示唆された。

異性化における PgsA の関与をさらに確認するために、次にアミノ酸置換実験を行った。実験開始当初、PgsA の構造情報はなかったが、異性化反応に酸塩基反応が関与すると考えられたことから、複数の PgsA 間で保存された酸性 (Asp および Glu) および塩基性 (His) アミノ酸残基にそれぞれアミノ酸置換を個別に導入し、PgsBCE との共発現によって PGA を生産させ、D-Glu 含有量を調べた。しかし、D-Glu 含有量が変化した変異体は得られず、100% D-Glu を含む PGA を生産したもの (D84N、D98N、D160N、D241N、E251A、D274A、および H380A) や PGA 生産が停止したもの (D67N、E105Q、H149A、D152N、E252N、D270N、H279A、H280A、および H282A) のみが得られた。

最近、我々は先に記した新規異性化酵素 MslH の結晶構造を解明し、その反応機構を明らかにした。そこで、MslH の結晶構造から PgsA のモデル構造を構築し、PgsA の活性部位を予測した。図 5 に示すように、MslH の活性部位残基は、PgsA でよく保存されていた。例えば *B. anthracis* 由来 PgsA で、D67、H149、D152、および H282 はプロトン移動の活性部位残基であり、E105、N148、H248、および H280 は金属結合に重要な残基である。次に、モデル構造に対して γ -グルタミン酸のモデル基質をドッキングシミュレーションした結果、基質結合ポケットに面した位置に *B. megaterium* 由来と *B. anthracis* 由来 PgsA 間でアミノ酸配列が異なるループ構造中の 2 つの領域 (領域 1、領域 2) を同定した。

これらの領域は PGA の D-Glu:L-Glu 比率を決定するのに重要であることが示唆されたため、これらの領域のアミノ酸配列を由来が異なる PgsA で対応する領域と交換することによって PgsA のキメラタンパク質を構築し、PGA 生産性と D-Glu:L-Glu 比率を評価した。領域 2 への変異では D-Glu:L-Glu 比率に変化はみられなかったが、*B. megaterium* 由来 PgsA の領域 1 を *B. anthracis* 由来のアミノ酸配列で置換すると、D-Glu 含有量が 64 % から 78% に増加し、領域 1 が PGA の D-Glu:L-Glu を決定するのに重要であることが示唆された。また、領域 1 の 6 つのアミノ酸残基のうち、PgsA の E124 および G126 の 2 つの残基をそれぞれ *B. anthracis* 由来のアミノ酸に置き換えた結果、G126N 置換で D-Glu が 75% に増加した。これらの結果は、「A」遺伝子が PGA の D-Glu:L-Glu

比率を制御し、領域 1、特にこの領域の最後のアミノ酸残基が D-Glu:L-Glu 比率の決定に重要であることを示す。

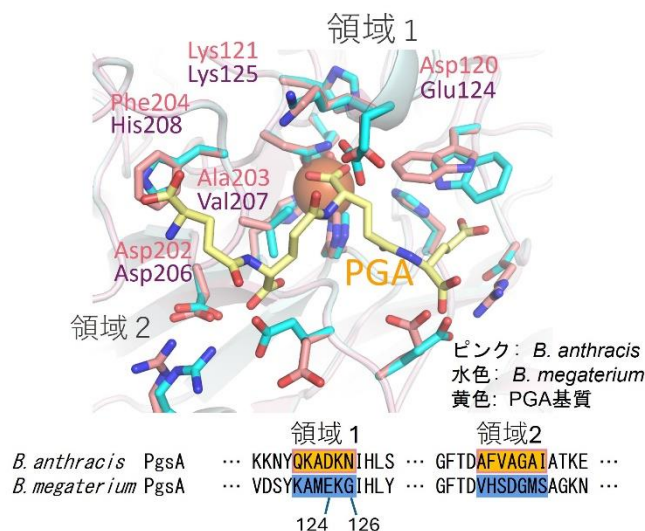


図5 *B. megaterium* 由来 (水色/青) と *B. anthracis* 由来 (ピンク/オレンジ) PgsA のモデル構造と PGA モデル基質のドッキングシミュレーション結果と配列アライメント

以上の結果から、*B. megaterium* 由来の PgsA に変異を入れることで D-Glu 含有量 78%の PGA の生産に成功した^[6]。今後追加の変異を入れることで D-Glu 含有量を 100%に向上することが可能であると考えている。

要約

ポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) は、主に納豆菌などが生産し、イソペプチド結合によって D- と L-グルタミン酸 (Glu) が重合した混合ポリマーである。筆者らはこれまで、PgsB、PgsC、PgsA、PgsE から構成される酵素複合体である PGA 合成酵素複合体 (PgsBCAE) が重合に L-Glu のみを使用し、D-Glu 残基がペプチド上の異性化によって導入されることを示していた。しかし、膜結合型 PgsBCAE 複合体の *in vitro* での機能解析は難しく、4つの酵素のうちどれが異性化に関与しているのかは不明だった。本研究では遺伝子交換実験を行い、PgsAが異性化に関与していることを示した。さらに、最近解明された MslH の結晶構造から PgsA のモデル構造を構築し、異性化活性を調節する PgsA 内の領域を同定した。また、D-Glu 含有量が約 60%の PGA を生産する *B. megaterium* 由来の PgsBCAE の PgsA の当該領域にアミノ酸置換を導入することによって D-Glu 含有量を 80%まで向上させることに成功した。

謝辞

本研究は科研費およびタカノ農芸化学研究助成財団の研究助成によって行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究は北海道大学大学院工学研究院応用生物化学研究室（大利研究室）で行われたものである。ご指導頂きました大利徹教授および実験に携わった研究室メンバーに厚くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] Z. Luo, Y. Guo, J. Liu, H. Qiu, M. Zhao, W. Zou, S. Li.
Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives.
Biotechnol. Biofuels **2016**, 9, 134,
- [2] Zhi Feng, Yasushi Ogasawara, and Tohru Daiiri.
Identification of the Peptide Epimerase MslH Responsible for D-amino Acid Introduction at the C-terminus of Ribosomal Peptides.
Chem. Sci. **2021**, 12, 2567.
- [3] Zhi Feng, Yasushi Ogasawara, Satoshi Nomura, and Tohru Daiiri
Biosynthetic Gene Cluster of a D-Tryptophan-Containing Lasso Peptide, MS-271.
ChemBioChem **2018**, 19, 2045.
- [4] Y. Nakashima, A. Kawakami, Y. Ogasawara, M. Maeki, M. Tokeshi, T. Daiiri, H. Morita
Structure of lasso peptide epimerase MslH reveals metal-dependent acid/base catalytic mechanism
Nat. Commun. **2023**, 14, 4752.
- [5] Hinata Kato, Moeka Sakuta, Takeshi Tsunoda, Yu Nakashima, Hiroyuki Morita, Yasushi Ogasawara, Tohru Daiiri
Peptide Epimerase Responsible for D-Amino Acid Introduction in Poly- γ -glutamic Acid Biosynthesis
Biomacromolecules **2024**, 25, 349.
- [6] Y. Ogasawara, M. Shigematsu, S. Sato, H. Kato, and T. Daiiri
Involvement of Peptide Epimerization in Poly- γ -glutamic Acid Biosynthesis.
Org. Lett. **2019**, 21, 3972.