

氏 名(本籍) き 木 村 けい た ろう
木 村 啓 太 郎

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 7 0 1 号

学位授与年月日 平 成 17 年 11 月 10 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 納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) 菌体外 DL- γ -ポリグルタミン酸の機能および合成・分解に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 神 尾 好 是
(副 査) 教 授 勝 亦 瞭 一
教 授 五 味 勝 也

論文内容要旨

第1章 序論

納豆の粘質物である γ -ポリグルタミン酸（以下 γ PGAとする）は、納豆に独特のテクスチャーをもたらす他、吸水性、保湿性、凝集性、金属イオン結合性に優れた生分解性高分子としての利用が注目されている。また、ガンマ線照射によるゲル化や側鎖のアルキル化修飾による溶解性の調節など化学的なアプローチによる性状改変も盛んに研究されている。

このような用途のための γ PGAは、納豆菌 (*Bacillus subtilis* (*natto*)) による発酵生産で作られるが、生産量の不安定さや再現性のないことが問題となっており、この現象の微生物学的な背景や原因、特に γ PGAの合成と分解の仕組みとその制御機構を明らかにすることが求められている。

微生物学的には、納豆菌以外にもグラム陽性細菌 *Bacillus* 属の *Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus anthracis*などがこのグルタミン酸が γ -ペプチド結合で直鎖状につながった高分子を菌体の最外層へ生産することが知られている。*Bacillus subtilis*と*Bacillus licheniformis*の作る γ PGAは、D-およびL-グルタミン酸の共重合体であり、分子量は2 MDaを超える。一方、*Bacillus anthracis*の γ PGAはD-鏡像体のグルタミン酸のみからなり、細胞表層に強固に結合している点で他の2つと異なる。 γ PGAは細胞の最外部へ作られることから、多様な環境変化への対応、栄養素の取り込み、外敵からの自己保護、細胞間情報伝達などの細胞機能と関係があると考えられる。

γ PGA合成酵素遺伝子 (*capBCA*: 3つ ORF からなるオペロン) は、Makinoらによって *Bacillus anthracis*の感染因子として同定され、その後、相同性を手がかりとして、Ashiuchiらが *Bacillus subtilis*からクローニングしている。近年蓄積したゲノム情報を調べると、*Bacillus licheniformis*も *capBCA*と相同性の高い遺伝子をもっているため、それぞれの γ PGA合成酵素遺伝子は、共通の祖先遺伝子に由来すると考えられる。

γ PGAの機能として、*Bacillus anthracis* (炭疽菌)の γ PGAが感染因子であることが知られている。実際、*Bacillus anthracis*の γ PGA非生産変異株は家畜用生ワクチンとして使われている。*Bacillus anthracis*の γ PGAは宿主進入シグナルであるCO₂分圧に応答して発現し、宿主免疫系(ファゴサイトーシス)から逃れるための防御カプセルとしての機能を持っている。

*Bacillus subtilis*の γ PGAは細胞密度に応答して定常期に生産される。主な生息

場所である土壌中では、定常期の細胞はコロニーを形成しており、栄養飢餓対応やバクテリオファージなどの外敵からの自己保護が生存戦略上重要である。*Bacillus subtilis* の γ PGA は、そうした定常期の細胞生理と関係があると推察されるが、その機能および合成制御系の詳細は不明である。研究が進展しなかった一因は、ゲノム解析に使用され多くの知見が蓄積している実験室株 (*Bacillus subtilis* 168 株) では γ PGA 合成酵素遺伝子(*capBCA* or *ywsC-ywtAB*)が発現していないことである。

納豆菌 (*Bacillus subtilis* (*natto*)) は、実験室株と非常に保存性の高いゲノムをもっていることが Itaya らの研究で明らかになっている。納豆菌を用いれば、実験室株ゲノム情報を利用した *Bacillus subtilis* の γ PGA 研究が可能である。

2000 年に (独) 食品総合研究所発酵細菌研究室の伊藤グループは、納豆菌 (*Bacillus subtilis* (*natto*)) の γ PGA 生産がクオラムセンシング(細胞密度応答)に依存することを報告した。クオラムセンシングは、毒素生産などの 2 次代謝や genetic competence の誘導、バイオフィーム形成など定常期の様々な細胞機能をグローバルに誘導・制御する仕組みである。クオラムセンシング遺伝子は、菌体外細胞密度指標物質であるクオルモン *comX* とその輸送タンパク質 *comQ*、ComX 受容体ヒスチジンリン酸化酵素 *comP*、そのレスポンスレギュレーター *comA* の *comQXPA* からなる。*Bacillus subtilis* の γ PGA 生産は、細胞密度センサー 2 成分制御系を成す受容体ヒスチジンリン酸化酵素—レスポンスレギュレーター(ComP-ComA)の制御下にあるが、そこから合成酵素 *capBCA* 発現へ至る下流の経路は不明である。

一方、生産された γ PGA は生産菌自身の分解・消化作用により定常期後期に培地中から消失することが知られており、これが γ PGA 発酵生産における不安定性の原因のひとつである。しかし、分解系に関しては現象論的研究に止まっており、分子レベルの究明は行われていない。

このような背景から、私は、実際に納豆製造に使用されている納豆菌(*Bacillus subtilis* (*natto*)) 「三浦株」(宮城野納豆製造所、仙台市)を用いて、 γ PGA の微生物学的意義と合成・分解機構の全容解明を目指して遺伝生化学的手法により研究を行った。本研究では、納豆工場で発酵不良を引き起こすファージの増殖が γ PGA 分解酵素生産を伴うこと、および納豆菌自身が γ PGA を分解することを手がかりとして、 γ PGA の生体防御機能(バクテリオファージに対する防御機能)と栄養貯蔵機能(分解産物グルタミン酸の定常期の細胞による再利用)を明ら

かにした。また、エンド型・エキソ型の2段階からなる γ PGAの分解機構を発見して、分解酵素欠損変異株による γ PGAの安定・大量発酵生産法を確立した。 γ PGAの合成制御機構については、細胞密度指標物質クオルモン ComX から γ PGA合成へ至る情報伝達経路が ComX \rightarrow ComP-ComA \rightarrow DegQ \rightarrow DegS-DegU \rightarrow CapBCA であり、細胞密度による制御がさらに栄養飢餓情報による調整を受けることを解明した。

第2章 ファージに対する防御機能

納豆工場（埼玉県）の発酵不良納豆から分離されたファージ（ Φ NIT1 と命名）を納豆菌（*Bacillus subtilis* (natto)）に感染させると、MOI (multiplicity of infection) 1/2000 から 1/6000 でよく増殖し、ホスト細胞を溶菌させた。培養上清から高い γ PGA分解活性が検出され、 γ PGAの粘性を急激に失わせた (Fig. 1 A, B)。みかけ上問題なく発酵した納豆の粘性を急激に低下させ、いまでも生産現場を悩ませている原因は、この酵素活性であった。この活性を精製したところ、25 kDaの単量体タンパク質を得ることができた (Fig. 2)。この酵素 (poly-gamma-glutamate hydrolase P=PghP) は γ PGAをエンド型に切断し、重合度3から5のオリゴ γ -グルタミン酸を生成した。

精製酵素のN末端アミノ酸配列をもとにファージゲノムから該遺伝子をクローニングしその一次構造を明らかにした (配列情報は DDBJ accession number AB091475 へ登録)。既知の配列との相同性は見あたらず、新規な酵素であると考えられた。クローニングした Φ NIT1の *pghP* 遺伝子産物を大腸菌で生産し、その活性を確認した。

PghPを生産するファージ (Φ NIT1) は、 γ PGA生産菌でも指数関数的に増殖できた (Fig. 3A)。PghPを生産しないファージ (BS5) は γ PGA生産菌では増殖できなかったが、精製したPghPによって γ PGAを分解すると増殖できた (Fig. 3B)。このことから γ PGAはファージ感染への防御壁機能を持ち、ファージは共進化の結果として分解酵素を獲得したと考えられる。

Ackermannらの *Bacillus subtilis* タイピングファージ10種とファージタイプが異なる49株の *B. subtilis* 系統を調べると、10種中4種のタイピングファージがPghPを生産し、49株中23株が γ PGAを生産した。土壌などの自然界から分離した *B. subtilis* ファージに広範囲にPghPが分布することは、 γ PGA生産株

での増殖に PghP が必要だとする実験結果を支持した。

PghP 生産ファージのゲノムを用いて、ΦNIT1 の *pghP* をプローブとしてサザン解析を行ったところ、*pghP* には構造上の多様性があることが示唆された。

以上の結果は原著論文 (1) に発表した。

第 3 章 分解機構と栄養貯蔵機能

生産された γ PGA が培養液中で徐々に消失することは、現象論的に知られていた。このことは、合成された γ PGA が分解され、定常期の細胞に栄養源として再利用されることを示唆した。

Abe らは、培地中に分泌される γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) に、*in vitro* で γ PGA から L-グルタミン酸を遊離する活性を報告している。しかしながら、D-グルタミン酸残基への作用など酵素機能の詳細や、*in vivo* での機能性、 γ PGA 分解への寄与については不明であった。そこで、精製した GGT と合成基質 (テトラ- γ -グルタミン酸) を用いた分解機構の解析と *ggt* 遺伝子破壊株の機能解析を行った。その結果、GGT は γ PGA の N 末端から D、L の鏡像体の区別なくグルタミン酸を遊離するエキソ型分解酵素であること (Fig. 4)、*ggt* 遺伝子破壊株は GGT 活性を完全に失い γ PGA の分解中間体 (分子量 0.1 MDa) を培地中へ蓄積すること (Fig. 5) が明らかになった。

ggt 遺伝子破壊株で分解中間体が蓄積したことは、GGT とは別に中間体を生み出すエンド型の分解系が存在することを示唆した。*Bacillus subtilis* 168 株のゲノム情報から、納豆菌 (*Bacillus subtilis* (natto)) が *ggt* と相同性の高い (アミノ酸相同性=27%) 機能未知遺伝子 *ywrD* をもつことが推定された。そこで、納豆菌から *ywrD* 遺伝子を含むゲノム断片をクローニングし (配列情報は DDBJ accession number AB196782 に登録)、破壊株を作製してその機能を解析した。*ggt* と *ywrD* の 2 重破壊株はまったく γ PGA を分解せず、培地中に合成直後と同じ分子量分布を示す γ PGA を蓄積した。すなわち、分解中間体の生成 (エンド型分解) に *ywrD* 遺伝子が必須であることを見いだした。この株は γ PGA 分解能が全くないため γ PGA の安定大量生産株として利用できた。

γ PGA のような高分子が、エンド型、エキソ型の 2 段階の分解によって消化されることは、他の多くの高分子 (タンパク質、核酸、デンプンなど) においても知られており、分解の効率性や制御のしやすさなどから、合理的な仕組みと

考えられた。実際、GGTは細胞密度に应答して発現し、分解産物によるフィードバック制御を受けていた (Fig. 6)。このような巧妙な分解制御系をもつことにより、納豆菌は定常期の細胞に過不足なく貴重なグルタミン酸を供給できると考えられた。

培地中に 1~10 mg/ml 生産される γ PGAは、グルタミン酸に換算すると 8~80 mMに相当し、定常期の細胞にとって十分な栄養源となりうる。GGT欠損変異株は培地中に蓄積した γ PGAをグルタミン酸として再利用できないため、エネルギー的に不利であることが予想された。実際、GGT欠損変異株は、定常期に栄養細胞として存在できなくなり、野生型 (1~2%) より高頻度 (40%以上) で孢子を形成した (Fig. 7)。窒素源が過剰に投与された場合、野生株、GGT欠損株ともに孢子形成率は、1~2%で差がなかった。これらの事実は、 γ PGAの細胞外栄養貯蔵物質としての生理的機能を明瞭に示したと言える。

以上の結果は原著論文 (2) に発表した。

第4章 D-グルタミン酸の代謝に関わるグルタミン酸ラセマーゼの機能

γ PGAの最終分解産物は、D-およびL-グルタミン酸モノマーである。定常期における γ PGAの再利用の際、D-グルタミン酸の資化にグルタミン酸ラセマーゼが必要であると考えた。グルタミン酸ラセマーゼはD体、L体のグルタミン酸を相互に変換する酵素で、通常はペプチドグリカンにD-グルタミン酸を供給する増殖に必須な酵素として働く。大腸菌など多くの細菌が、一つのグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子をもつのに対し、*Bacillus subtilis*は2種類のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子 (*racE* および *yprC* 遺伝子) をもっている。2つのグルタミン酸ラセマーゼに機能的分業、発現時期の違いなどがあるかどうかを明らかにするため、遺伝子破壊株およびLacZ融合遺伝子を作成し、増殖、 γ PGA合成、D-グルタミン酸資化能に及ぼす影響について解析した。

racE, *yprC*の2重破壊は0.3 mMのD-グルタミン酸を含む最小培地でのみ可能だった。また*racE*の破壊は最少培地でのみ可能であったが、*yprC*の発現が富栄養な培地で抑制されていることがその原因であった。

納豆菌 (*Bacillus subtilis* (*natto*)) は、D-グルタミン酸を唯一の窒素源として利用して増殖できる。しかし、グルタミン酸ラセマーゼの破壊はD-グルタミン酸の資化能を完全に失わせた (Fig. 8)。*B. subtilis*は*S. haemolyticus*のD-ア

ミノ酸代謝酵素 D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼと相同な（アミノ酸配列 65 % 相同）*yheM* 遺伝子を持っているが、D-グルタミン酸の代謝には関与していないことが示唆された。

γ PGA が D-鏡像体を多く含むことから、Ashiuchi らは、*RacE* が γ PGA 合成時の基質（D-グルタミン酸）供給酵素であり、*YrpC* がペプチドグリカンへの D-グルタミン酸供給酵素であるとしている。 γ PGA 生合成の基質に関しては議論があり、Urushibara らの *in vitro* 合成実験では、L-鏡像体のみが基質となりうるという結果が示されている。Troy らの *Bacillus licheniformis* 膜画分を用いた実験でも、L-グルタミン酸からのみ γ PGA 合成が進行したと報告されている。

racE、*yrpC* いずれのグルタミン酸ラセマーゼ破壊も γ PGA の生産量、その鏡像体比に影響はなく、 γ PGA の基質が L-グルタミン酸であるとする Urushibara らの結果を支持した。

以上の結果は原著論文（3）に発表した。

第5章 細胞密度による合成制御

クオーラムセンシング遺伝子 *comQXPA* の、*comQ*、*comX* と *comP* の ComX 結合ドメイン (*comQXP'*) は系統特異的で多様性に富んだ構造を持っている。実験室株と納豆菌では、近傍のゲノム配列がほぼ等しいにもかかわらず、この領域の相同性は、30%程度しかない。そこで、この領域に γ PGA 発現制御の手がかかり、実験室株が γ PGA を発現しない原因変異があるのではないかと考えた。

納豆菌 (*Bacillus subtilis (natto)*) の *comQXP'* を含むゲノム領域を実験室株タイプに変換したキメラ株 NAFM41 (Fig. 9) を作製したところ、 γ PGA を生産できなくなった。このことは、変換された領域に γ PGA 生産に必要な遺伝子があること示した。そこで、納豆菌ゲノム断片による相補試験をしたところ、納豆菌の *degQ* 遺伝子がキメラ株の γ PGA 生産を回復することが判明した (Fig. 10)。

納豆菌と実験室株の *degQ* 遺伝子を比べると、アミノ酸配列は完全に一致している。しかし、5'上流の制御領域中には、転写開始点から 10 bp 上流に一塩基の違い（実験室株では C、納豆菌では T）が見つかった。この変異は、実験室株においてプロモーター変異 *degQhy36* として Msadek らによって報告され、*degQ* の発現量を約 50 倍に上昇させる。このことから推察して、*degQ* の発現量が γ PGA の生産に重要だと考えた。そこで、納豆菌の *degQ* 遺伝子を破壊した

ところ予想通り γ PGAの生産能が失われ、逆に形質転換能は上昇した (Table 1)。

46アミノ酸からなる小さなタンパク質 DegQ は ComA によって正に転写が制御され、その名前 *deg* (*degradation*) が示すとおり、プロテアーゼ、アミラーゼ、キシラナーゼなど菌体外に生産される‘分解酵素’の発現に必要なことが知られているが、実験室株においても細胞内での具体的機能は不明である。

DegQ の機能を明らかにし、細胞密度応答 2 成分制御系 ComP-ComA から γ PGA 生産 (合成酵素 *capBCA* の発現) への情報の流れを解明するため、*degQ* 破壊株の γ PGA 生産を回復させる抑制変異の同定を試みた。

同定した 6 つの復帰変異は *degS* 遺伝子に見つかった。DegS は DegU と 2 成分制御系を構成し、DegS はレスポンスレギュレーターである DegU をリン酸化・脱リン酸化することが知られている。6 つの復帰変異 (N195I, R208Q, D245N, L248F, D249G, D250N) はすべて *degS* のカイネースドメインに起こっていた。DegQ と DegS に遺伝学的な関連があることが初めて明らかになり、DegQ の機能が DegS のリン酸化能の制御に関わることが示唆された。

degS および *degU* の γ PGA 生産への関与を確認するため、それぞれの遺伝子破壊株を作成したところ、いずれの破壊株も γ PGA を生産できなくなった。また、*degU* 破壊株での *cap* オペロンの発現を CapB-LacZ 融合遺伝子の発現量で調べたところ、定常期での発現を完全に失っていた (Fig. 11)。

DegQ が DegS から DegU へのリン酸リレーを活性化し、活性化型転写因子 DegU-P の量を調節していると考えたと (Fig. 12)、 DegU-P の増加が形質転換能を負に制御することが知られているので、この推察は、 γ PGA 生産性と形質転換能が反比例の関係にあること (Table 1) をよく説明できる。

DegU は転写因子であるので、DegU が直接 γ PGA 合成酵素遺伝子 *capBCA* を制御しているかどうかについてゲルシフト法により検討した。大腸菌生産 DegU タンパク質は、*capBCA* オペロン 5' 上流-497 (転写開始点を+1 とする) までの領域と結合することが確認された。

DegQ と DegS-DegU 2 成分制御系は、栄養飢餓に応答して発現し、分解酵素の発現を誘導することが知られている。 γ PGA 合成が細胞の稠密さによる制御 (ComP-ComA) と栄養条件による調整 (DegS-DegU) を受けていること、実験室株においても具体的機能が不明であった DegQ が 2 成分制御系 DegS-DegU のリン酸リレー系の制御に関わることを初めて遺伝学的に証明した。

結論

本博士論文では次のことを明らかにした。

1) γ PGA はファージの増殖を阻害する防御機能を持ち、 γ PGA 生産菌で増殖できるファージは γ PGA 分解酵素 (PghP) を生産する。納豆菌ファージ Φ NIT1 が生産する PghP の 1 次構造を決定した。

2) γ PGA は定常期の細胞にとって菌体外栄養貯蔵としての機能を持つ。

γ -glutamyltransferase (GGT) は、 γ PGA の N 末端から鏡像体の区別なくグルタミン酸を遊離し、定常期の細胞に窒素源として供給する。YwrD は γ PGA のエンド型分解に関与し、GGT の基質である γ PGA 分解中間体の生成に必須である。

3) D-グルタミン酸の資化にグルタミン酸ラセマーゼが必要である。

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であると同時に、D-グルタミン酸を代謝するためのカタボリックな酵素でもある。

4) 菌体外クオルモン ComX の細胞密度情報は、ComP-ComA 2 成分制御系を介して DegQ の発現を誘導し、DegQ は栄養応答性の 2 成分制御系 DegS-DegU のリン酸化状態を制御する。

5) DegU は直接 γ PGA 合成酵素遺伝子 *capBCA* のプロモーターに結合して発現を誘導する。

原著論文

- (1) **Kimura K. and Y. Itoh.** 2003. Characterization of poly- γ -glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: Possible roles in phage infection of *Bacillus subtilis* encapsulated with poly- γ -glutamate. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2491-2497.
- (2) **Kimura K., L-S. P. Tran, I. Uchida, and Y. Itoh.** 2004. Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- γ -glutamate. *Microbiology* **150**: 4115-4123.
- (3) **Kimura K., L-S. P., Tran, and Y. Itoh.** 2004. Roles and regulation of the glutamate racemase isogenes, *racE* and *yypC*, in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **150**: 2911-2920.
- (4) **Kimura K., Y. Inatsu, and Y. Itoh.** 2002. Frequency of the insertion sequence IS4B_{sul} among *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in Southeast Asia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1994-1996.

参考論文・著書など

- (1) **Kimura K., A. Nagasawa, M. Fujii, and Y. Itoh.** 2002. Cloning of the pepX gene of *Lactobacillus helveticus* IFO3809 encoding salt-tolerant X-proryl dipeptidyl aminopeptidase and characterization of the enzyme. *J. Biosci. Bioengi.* **93**: 589-594.
- (2) **Inatsu Y., Kimura K., and Y. Itoh.** 2002. Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in Southeast Asia: Comparison with *B. subtilis* (*natto*) starter strains. *JARQ* (Japan Agricultural Research quarterly). **36**: 169-175.
- (3) **Murakami A., K. Kimura, A. Nakano.** 1999. The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the *sec12* mutant:

Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **274**: 3804-3810.

- (4) **Arahira M., N. V. Hai, K. Kadokura, K. Kimura, K. Udaka, and C. Fukazawa.** 1998. Molecular cloning and expression pattern of Cu/Zn-superoxide dismutase in developing Soybean seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1018-1021.
- (5) **Saitoh Y., K. Kimura, T. Oka, and A. Nakano.** 1998. Activities of mutant Sar1 protein in guanine nucleotide binding, GTP hydrolysis, and Cell-free transport to the golgi apparatus. *J. Biochem.* **124**: 816-823.
- (6) **Nakano A., M. Yamagishi, E. Yamamoto, K. Kimura, S. Nishikawa, and T. Oka.** 1994. Mutational analysis of Sar1 protein, a small GTPase which is essential for vesicular transport from the endoplasmic reticulum. *J. Biochem.* **116**: 243-247.
- (7) **Kimura K., and Y. Itoh.** Physiological roles of capsule poly- γ -glutamate in *Bacillus subtilis*. *Current Trends in Microbiol.* In-press.
- (8) **Itoh Y., and K. Kimura.** 2003. Biosynthesis, degradation, physiological roles of capsular poly-gamma-glutamic acid in *Bacillus subtilis*. *Recent Research Dev. Bacteriol.* **1**: 301-309.
- (9) **Kimura K., T. Oka, and A. Nakano.** 1995. Purification and assay of yeast Sar1p. *Methods in Enzymology* **257**: 41-49.
- (10) **木村啓太郎、伊藤義文.** 2002. ポリグルタミン酸を介した納豆菌とファージの攻防. *バイオサイエンスとインダストリー* **60**: 107-108.
- (11) **伊藤義文、木村啓太郎.** 2002. 納豆の糸引き成分の合成開始物質の発見と今後の展望. *ブレインテクノニュース* **90**: 18-21.

- (12) 木村啓太郎、伊藤義文. 2002. γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株、その取得法及び該変異株を用いた γ -ポリグルタミン酸の製造法.
工業所有権 P2003-230384A

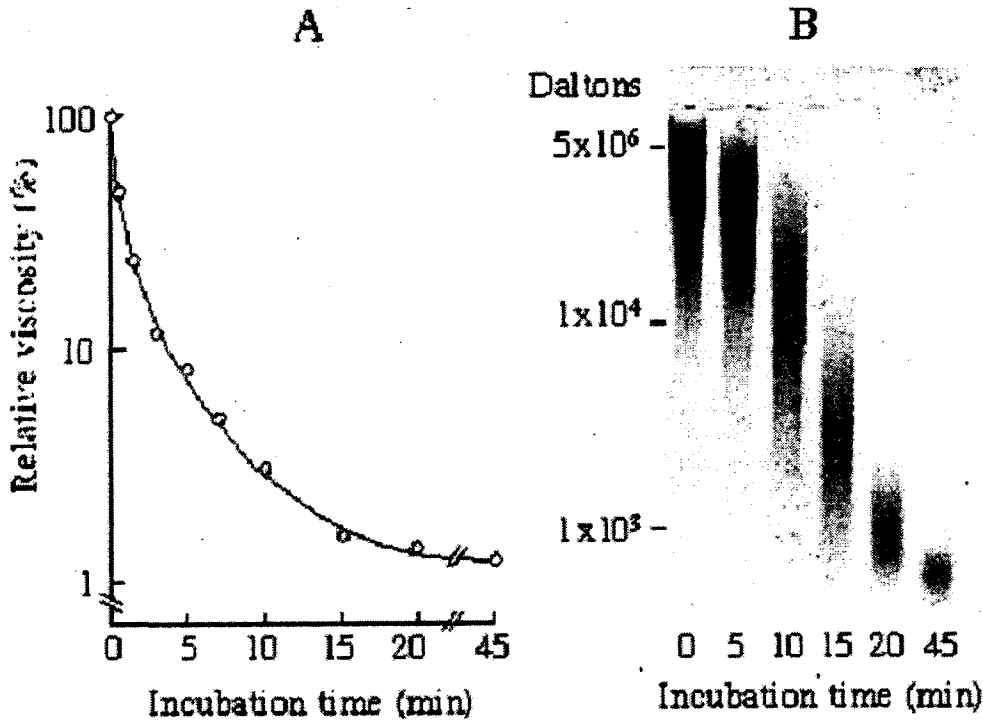


FIG. 1. Poly- γ -glutamate degradation activity in a *B. subtilis* NAFM5 culture infected with Φ NIT1 phage measured by a viscometer (A) and by agarose gel electrophoresis (B). Reaction was performed in a stander mixture as described in text and portion of the mixture was withdrawn at indicated time of incubation. (A) Viscosity was measured using a falling ball viscometer and expressed as relative viscosities (%) to the mixture at 0 time. (B) Ten μ l of each sample was resolved on a 1.0% agarose gel by electrophoresis and degradation products were visualized by staining with methylene blue. Molecular weights indicated to left correspond to the intact γ -PGA (5×10^6 daltons) and partial γ -PGA hydrolysates that were fractionated by passage through a gel filtration HPLC.

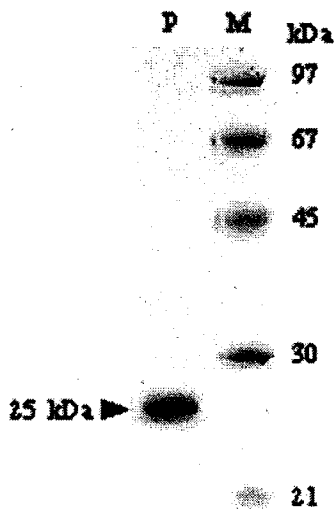


FIG. 2. SDS-PAGE of purified PghP. PghP (2 μ g, lane P) from Superose 12 column chromatography was analyzed along with molecular mass markers (each 1 μ g, lane M) by SDS-10% PAGE.

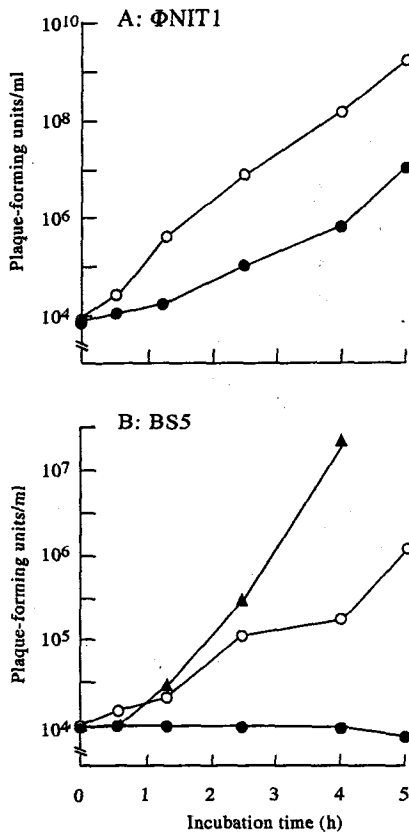


FIG. 3. Effects of γ -PGA capsule on growth of phages with or without PghP. *B. subtilis* NAFM5 was shaken in GSP medium at 37°C. When the optical density at 600 nm reached 0.3 (noncapsulated [open circle]) or after 24 h encapsulated stationary phase [closed circle], phages Φ NIT1 (PghP⁺) (A) and BS5 (PghP⁻) (B) were added at the concentration of 10^4 PFU/ml and incubation was continued at 37°C. Purified PghP (1 μ g/ml) was added to stationary phase cultures together with BS5 (closed triangle). After indicated periods, phages in culture were titrated against strain NAFM5 as the indicator.

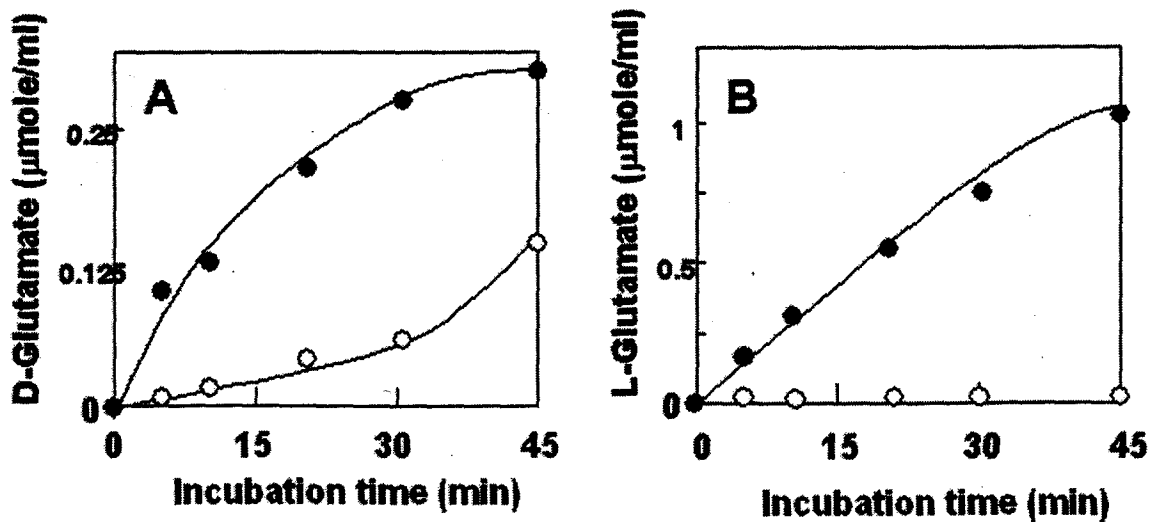


Fig. 4. Direction and specificity of γ -peptide hydrolysis by *B. subtilis* GGT. A. Synthetic γ -tetrapeptides, γ -D-Glu-(γ -L-Glu)₃ (●) and (γ -L-Glu)₃- γ -D-Glu (○), were incubated with *B. subtilis* GGT and amounts of generated D- and L-glutamate were quantified as in Fig. 1B. B. Tetrapeptides, (γ -L-Glu)₃- α -L-Glu (●) and α -L-Glu-(γ -L-Glu)₃ (○), were incubated with the GGT and amounts of liberated L-glutamate were determined by HPLC.

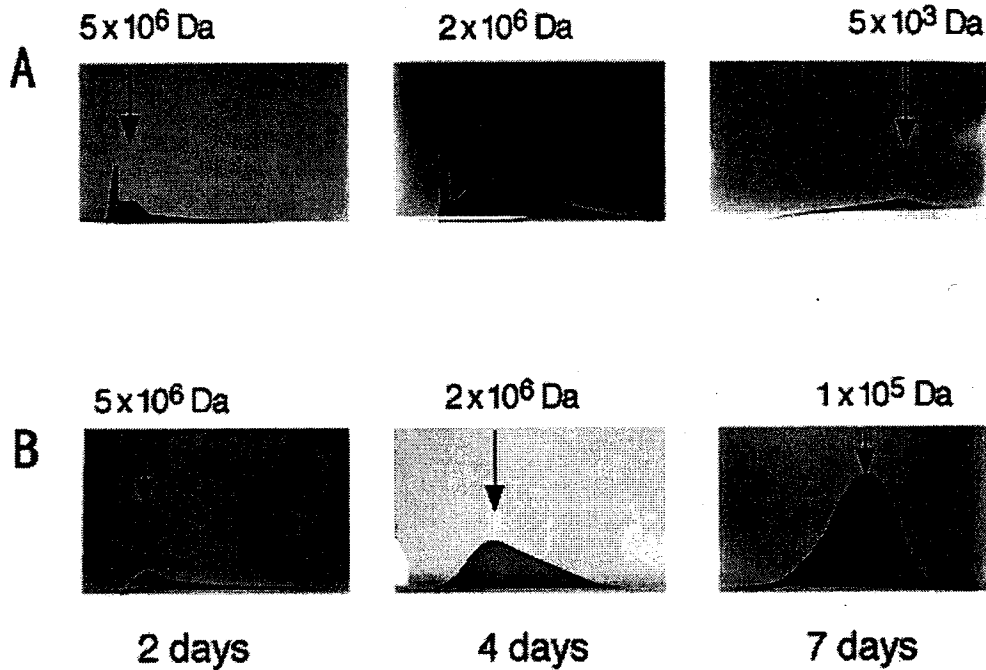


Fig. 5. Formation and degradation of γ PGA in wild type strain NAFM5 (A) and *ggt::spc* mutant NAFM90 (B) cultures. Poly- γ -glutamic acid extracted from the NAFM5 (wild type) and NAFM90 (*ggt::spc*) cultures after incubation for the indicated days was analyzed by two-dimensional immunoelectrophoresis. Molecular masses of the polypeptides were determined by gel permeation HPLC. Sizes of γ PGAs (2×10^6 Da) in 4-day cultures were slightly smaller than those (5×10^6 Da) in 2-day cultures, perhaps due to spontaneous fragmentation.

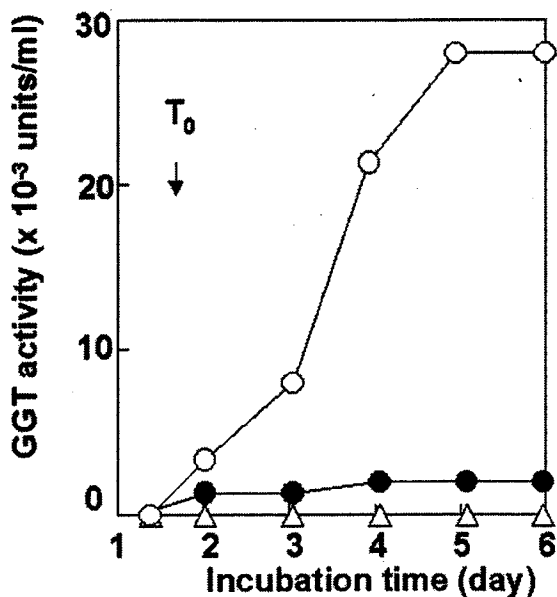


Fig. 6. Regulation of GGT synthesis by the quorum-sensing system and exogenous L-glutamate. *B. subtilis* NAFM5 (wild type) was cultured in E9 medium with (●) or without (○) 2 % L-glutamate and strain NAFM65 (*comP::spc*) (△) was incubated in E9 medium without L-glutamate. Activities of γ -glutamyltransferase in culture supernatants were determined after indicated incubation periods.

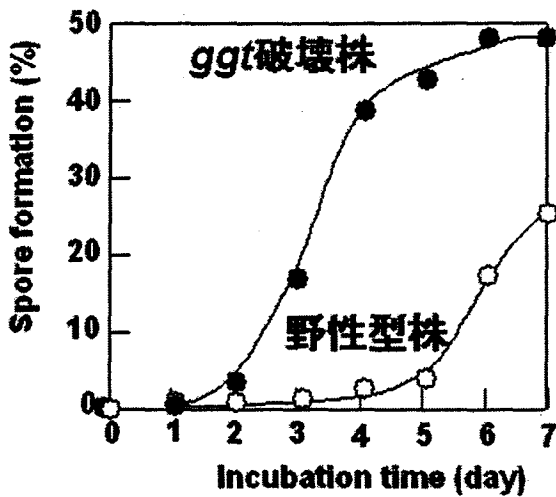


Fig. 7. Mutations in *ggt* enhance sporulation. *B. subtilis* NAFM5 (wild type; ○) and NAFM90 (*ggt::spc*; ●) cultured in E9 medium containing 8% (w/v) glycerol and 10 mM NH₄Cl as carbon and nitrogen sources, respectively. Aliquots of cultures taken at indicated times were divided into two portions. One was heated at 80° C for 30 min to kill vegetative cells and numbers of spores and total viable cells were determined on LB plates.

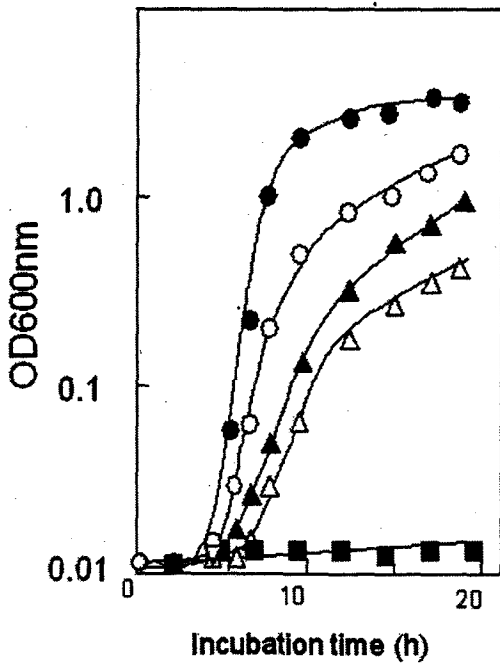


FIG. 8. Utilization of D-glutamate by *Bacillus subtilis* NAFM5 as nitrogen source. Strains NAFM5 was grown in E9 medium containing 2% (w/v) glucose and various concentrations of D- or L-glutamate as the sole nitrogen source: 8 mM L-glutamate (●); 1mM D-glutamate (△); 5 mM D-glutamate (▲); and 8 mM D-glutamate (○). Strain NAFM20 (*racE::Pspac-racE* Erm^r, *yrpC::Spc*^r) was grown in E9 medium containing 8 mM D-glutamate as the sole nitrogen source (■). Cell growth was measured at OD 600 nm.

図9 実験室株と納豆菌のcom遺伝子領域の交換

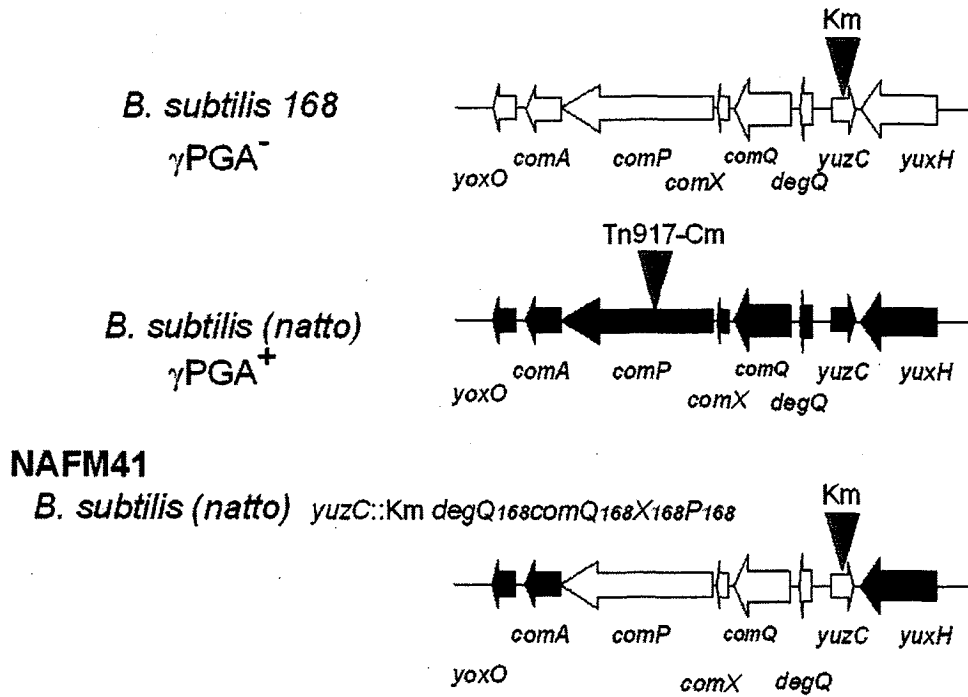


図10 γ PGA生産の相補試験

| | plasmid | γ PGA |
|---------------|--------------------|--------------|
| <p>NAFM41</p> | none | — |
| ↔ | <i>yuzCN-degQN</i> | + |
| ↔ | <i>yuzCN</i> | — |
| ↔ | <i>degQN</i> | + |

表1 *degQ*破壊株の表現型

| | <i>B. subtilis</i> (<i>natto</i>) | NAFM73 <i>degQ::Erm</i> |
|--|-------------------------------------|----------------------------|
| γ PGA (GSP培地mg/ml) | 11.2 | <0.1 |
| アルカリプロテアーゼ (U/ml) | 50.2 | 3.0 |
| GGT (mU/ml) | 0.5 | 0.1 |
| 形質転換能 (Frequency x 10 ⁻⁶ /μg DNA) | 0.4 | 5.0 |

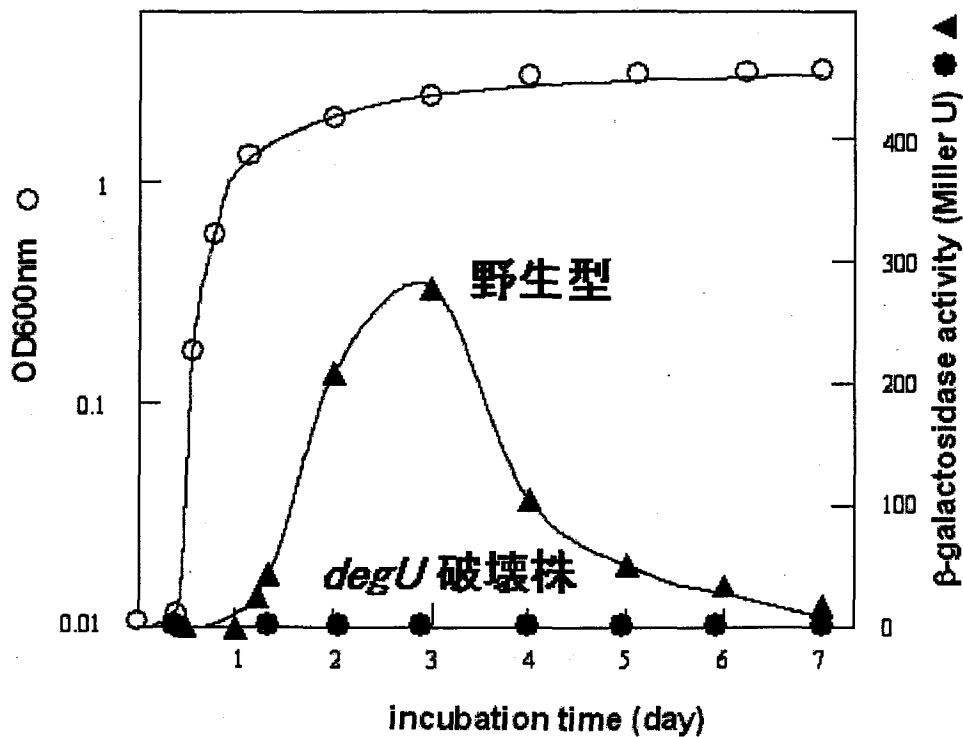
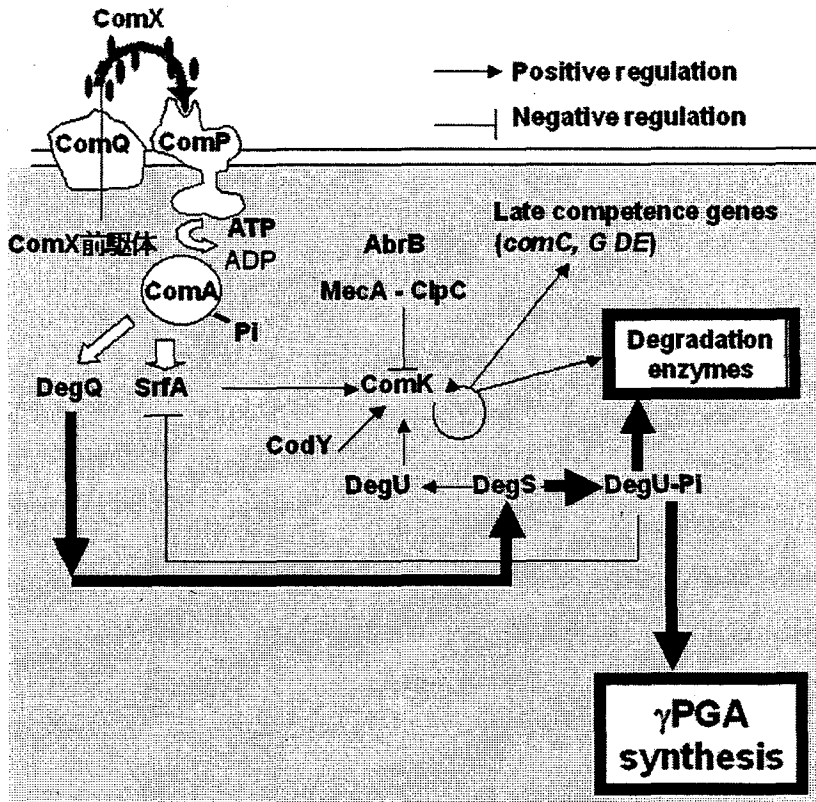


Fig. 11. CapB-LacZ fusion expression.

CapB-LacZ fusion expression was monitored by β-galactosidase activities (Miller U) in wild type (closed triangle) or in *degU* disrupted mutant (closed circle). Cell growth was followed by OD_{600nm} (open circle). *degU* mutant grew normally as wild type.

図12 γ PGA生産へ至る細胞密度情報の流れ(概念図)



論文審査結果要旨

DL- γ -ポリグルタミン酸 (γ PGA) は、グルタミン酸が γ ペプチド結合でつながった高分子で、*Bacillus* 属細菌の莢膜を構成している。納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) が作る γ PGA は分子量が 2MDa を超え、吸水性、保湿性、粘性、金属イオン結合性などの性質を持つことから、食品、化粧品などに応用されている。また、放射線照射によってゲル化するので、生分解性高分子材料としても注目されている。一方、 γ PGA は炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の感染因子であり、基礎微生物学的にも重要な機能をもっていると考えられている。納豆菌の γ PGA 生産は、培養条件に大きく影響され、且つ、再現性や生産量の安定性が低い。納豆菌による γ PGA 生産の微生物学的背景、とりわけ、 γ PGA 合成酵素の発現制御と生産菌自身による γ PGA 分解系には不明な点が多い。

本研究者の所属する研究室では、納豆菌の γ PGA 合成が細胞密度による制御(クォーラムセンシング)を受けることを明らかにし、遺伝学的手法による γ PGA 研究を可能にしてきた。このような背景から本研究者は、 γ PGA の合成および分解の仕組みとその制御機構の全容を解明し、その微生物学的意義を明らかにした。

本審査論文において本研究者は、以下の事実を明らかにした。すなわち、(1) γ PGA 合成酵素遺伝子 *capBCA* の発現制御系が、ComX-ComP-ComA-DegQ-DegS-DegU-CapBCA からなる情報伝達系を構成し、 γ PGA 合成が細胞密度と栄養条件によって精緻にコントロールされていること、(2) *degQ* 遺伝子のプロモーター変異が、実験室株 (*Bacillus subtilis* 168) の γ PGA 非生産性の理由のひとつであること、(3) 機能不明であった DegQ が、DegS のリン酸化能の制御に関わること、(4) γ PGA 生産量の不安定性の原因が、YwrD, GGT, RacE/YrpC が関与する定常期後期に起こる γ PGA の分解・再資化の作用であること、(5) GGT が γ PGA の N 末端から鏡像体の区別なくグルタミン酸を遊離する活性を持ち、ComP-ComA 二成分制御系による細胞密度による発現制御を受けること、(6) YwrD が GGT の基質となる分子量 0.1MDa の γ PGA 分解中間体の生成に必要なこと、(7) グルタミン酸ラセマーゼ (RacE および YrpC) が D-グルタミン酸の資化に必要なこと、(8) γ PGA がバクテリオファージに対する防御機能と栄養貯蔵物質としての機能を持つこと、(9) γ PGA 生産菌に感染し増殖できるバクテリオファージが γ PGA 分解酵素 (PghP) を生産すること、および (10) バクテリオファージ NIT1 の *pghP* 遺伝子の塩基配列の決定、である。

以上のように本研究は、細胞密度による γ PGA 合成制御系、定常期後期における分解系、および γ PGA の微生物学的機能を解明したものであり、審査員一同は、本研究者に博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。