[成果情報名]　納豆の粘質物の生産と分解を制御する機構

[要　　約] 納豆菌のγ-グルタミルトランスペプチダーゼがポリグルタミン酸をエキソ型に分解する活性を有すること及び当該酵素遺伝子の発現がグルタミン酸によって抑制されることを明らかにした。

[部　　署] 食品総合研究所・応用微生物部・発酵細菌研究室

[連 絡 先] 029-838-8075　yosifumi@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] 納豆菌、粘質物、ポリグルタミン酸、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ

[背景・ねらい]

ポリグルタミン酸は納豆の糸引き成分として品質に大きな影響を与える。ポリグルタミン酸は優れた保湿性やカルシウム吸収促進作用があり、肌荒れ防止や皮膚機能改善を目的とした化粧品への添加物や特定保健用食品として利用されている。ポリグルタミン酸の発酵生産では、分解による収量減少が重要な問題になっている。本研究は、γ-グルタミルトランスフェラーゼのポリグルタミン酸の分解活性を詳細に解析するとともに本酵素遺伝子の発現制御メカニズムを分子生物学的手法で究明した。

[成果の内容・特徴]

1．納豆種菌である宮城野株に由来するNAFM5株の培養液からγ-グルタミルトランスフェラーゼを均一に精製した。

2．精製酵素のポリグルタミン酸分解活性は極めて強く、大腸菌の当該酵素の100倍以上であった。従って、ポリグルタミン酸分解活性は納豆菌のγ-グルタミルトランスフェラーゼに特異的な機能であると推察される。

3．HPLCで反応生成物を経時的に分析した結果、分解反応はN-末端側からエキソ型に進行することとD-およびL-γ-グルタミル結合に対する選択性はないことが明らかになった(表１)。

4．当該酵素の遺伝子（*ggt*）の破壊株を用いて酵素が発酵中のポリグルタミン酸分解への関与を調べた結果、変異株ではポリグルタミン酸の分解が起こらないことが判明した。

5．当該酵素の生産は反応生成物であるグルタミン酸によって抑制されることを見出した(図１)。

6．プライマー伸張法で*ggt*の転写開始点を決定し、グルタミン酸は*ggt*遺伝子の転写を抑制することを明らかにした(図２)。

[成果の活用面・留意点]

ggt 遺伝子破壊株では、ポリグルタミン酸の分解が抑制されるのでポリグルタミン酸を高収量で安定に生産することが出来る。*ggt* 変異株を利用したポリグルタミン酸製造法の特許を申請している。

[具体的データ]

表1．納豆菌γ-グルタミルトランスフェラーゼのポリグルタミン酸及びγ-グルタミルテトラペプチド分解活性

γPGA[a]		γ-D-Glu-(γ-L-Glu)$_3$		(γ-L-Glu)$_3$-γ-D-Glu	
Sp. act[b]	Km(μM)	Sp. act[b]	Km(μM)	Sp. act[b]	Km(μM)
8.6	9.0	10.7	8.0	11.2	8.0

[a] γPGA, ポリグルタミン酸； [b] 比活性（μmol D-又はL-グルタミン酸／mg蛋白質／分）

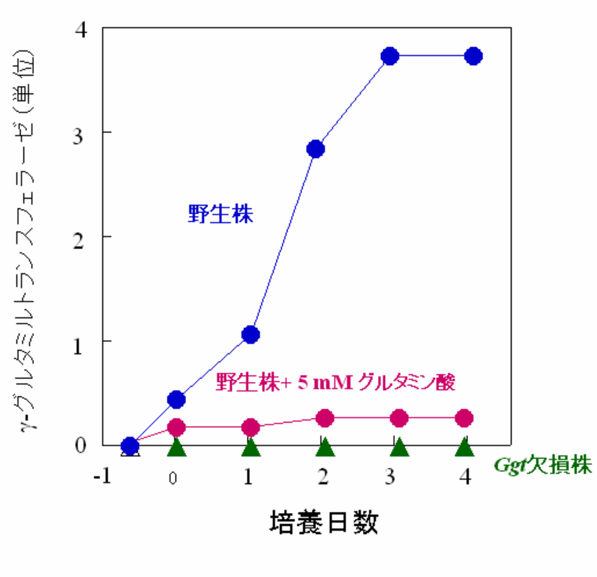

図1．グルタミン酸によるγ-グルタミルトランスペプチダーゼの生産阻害

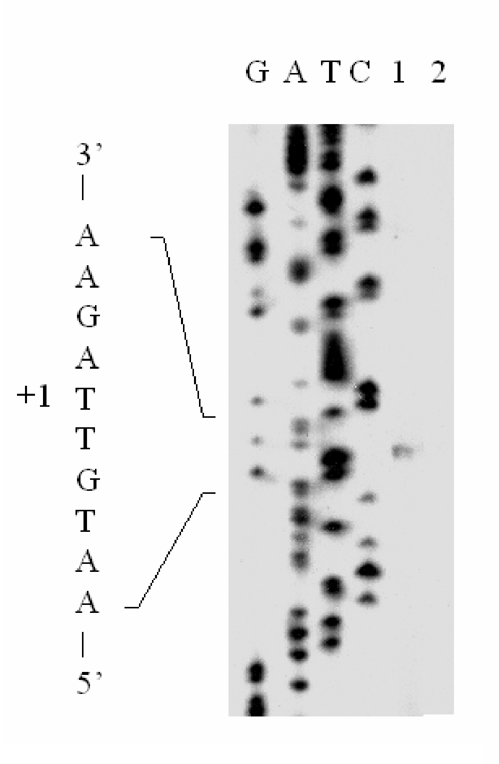

図2．*ggt* 遺伝子のプライマー伸長解析。 1，グルタミン酸無添加、2，グルタミン酸添加

[その他]

研究課題名：微生物の社会的機能を活用した物質生産系構築のための分子生物学的研究

予算区分：パイオニア

研究期間：2001～2003年度（2003年度）

研究担当者：木村啓太郎、伊藤義文

発表論文等：

1）木村啓太郎、伊藤義文：γ-ポリグルルタミン酸分解酵素欠損変異株、その取得法及び変異株を用いたγ-ポリグルルタミン酸の製造法、特許願２００２年、第０３０２３７号（平成１４年２月７日出願）

2）伊藤義文：納豆菌のバイオテクノロジー、微生物利用の大展開（今中忠行編、エヌ・テイー・エス）、p. 657-663（2002）

3）K. Kimura and Y. Itoh: Characterization of Poly-γ-glutamate Hydrolase Specified by a Bacteriophage Genome: Possible Role in Phage Infection of *Bacillus subtilis* Encapsulated by Poly-γ-glutamate, Appl. Environ. Microbiol., 69(5), 2491-2467 (2003)