

高次構造が異なるポリ- γ -グルタミン酸のリン酸化誘導体の特性評価

梅谷かおり*, 苔庵泰志*

Characterization of Phosphorylated Poly- γ -Glutamic Acid Derivatives from Different 3D Structure

Kaori UMETANI and Yasushi KOKEAN

Chemical and physical properties of the two kinds of phosphorylated Poly- γ -Glutamic acid (PGA) from different origins were studied. One PGA was prepared from *Bacillus subtilis natto* (N-PGA) and the other was a commercial product (C-PGA). Sodium tetra poly phosphate was used as a reagent for phosphorylation, and the ratios of phosphorylation (Pi (mol)/Glutamic acid (mol)) for N-PGA and C-PGA were obtained as 0.4 and 1.4, respectively. The molecular weight distribution of C-PGA analyzed by SEC showed two new peaks due to phosphorylation, indicating the occurrence of fragmentation. The viscosity of N-PGA decreased significantly when the shear rate was increased, but that of phosphorylated N-PGA remained almost constant. On the other hand, the viscosity of C-PGA and phosphorylated C-PGA appeared to be independent of shear rate. The fluorescence intensity around 460 nm was greatly reduced by phosphorylation in N-PGA, however any change by phosphorylation was not observed in C-PGA. The analysis of the 3D structure by a circular dichroism showed that β -sheets were increased by phosphorylation in N-PGA. On the other hand, the proportion of β -sheets was decreased by phosphorylation in C-PGA, while the proportion of random coils having a flexible structure was increased. These results showed that the chemical and physical properties of PGAs from different origins could be influenced individually by phosphorylation.

Key words: Poly- γ -glutamic acid (PGA), Phosphorylation, Viscosity, Circular Dichroism (CD), Molecular weight.

1. はじめに

ポリ- γ -グルタミン酸（以下 PGA と記す）は、納豆の製造過程で納豆菌により生産される高分子であり、特有の粘着性を示す¹⁾。この PGA はさまざまな分野で活用され²⁾、効率の良い生産方法についても開発が進められている³⁻⁶⁾。また、さらなる用途の拡大を図るため、誘導体化の研究^{7,8)}もあり、興味深い物質の一つである。これまでの我々の研究において、リン酸化試薬を添加した液体培地で納豆

菌を培養することで、簡単に PGA リン酸化誘導体を調製できること、および PGA リン酸化誘導体の構造と粘度の関連性を明らかにした^{9,10)}。その方法において、PGA とリン酸化試薬による PGA リン酸化誘導体調製は、化学反応で進行していることが明らかになっていた¹⁰⁾。これは菌体が存在する条件であったが、今回は菌体が存在しない状態で PGA のリン酸化を試み、その特性を評価した。なお、PGA は、工業研究所が納豆菌を液体培養することで調製したものの他に市販品を用いた。それぞれにリン酸化試薬を反応させて PGA リン酸化誘導体

* 食と医薬品研究課

を調製し、その2種について、リン酸化による物性および構造に及ぼす影響を検討した。これにより、PGAの素材化において、簡便に粘度制御できる技術としての有用な知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 PGA リン酸化誘導体の調製

納豆菌由来のPGAは、栗田らの方法⁹⁾に従い、培養液から調製した(以下、納豆菌由来PGAと記す)。市販のPGAは一丸ファルコス製バイオPGA Naパウダー(以下、市販PGAと記す)を用いた。

納豆菌由来PGAおよび市販PGAそれぞれを10 mg/mLとなるよう50 mMのリン酸緩衝液(pH 6.0)で溶解し、最終濃度0.5%(w/v)となるようにテトラポリリン酸ナトリウムを加え、80°Cで3時間加熱処理をすることでリン酸化した。これを透析により未反応のテトラポリリン酸塩を除去した後、真空凍結乾燥し、それぞれ納豆菌由来PGAリン酸化誘導体および市販PGAリン酸化誘導体とした。

2.2 リン酸化度の測定

前節で得られた納豆菌由来PGAおよび市販PGAリン酸化誘導体を6 N塩酸で110°C、24時間加水分解し、得られた加水分解物のグルタミン酸をポストカラム法による高速液体クロマトグラフ(High performance liquid chromatograph : HPLC, 島津製作所製 Prominence LC-VP)にて定量した¹⁰⁾。リンの定量は次のとおり行った⁹⁾。試料を1 mg/mLとなるよう25 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解した0.5 mLに、10 N硫酸0.25 mLを加え、110°Cで1時間加熱した。これに蒸留水2.45 mLを加えて室温に戻し、次いで、2.5%(w/v)モリブデン酸アンモニウム0.4 mLを加え、20 mg/mL硫酸ヒドラジン水溶液0.4 mLと、1 N硫酸に20 mg/mLとなるよう溶解したアスコルビン酸0.4 mLを加えて混和し、1時間保持した後、820 nmでの吸光度を測定し、リンを定量した。これらグルタミン酸濃度とリン濃度より求めたグルタミン酸あたりのリン分子の数をリン酸化度とした。

2.3 サイズ排除クロマトグラフィ (Size exclusion chromatography : SEC)

栗田らの方法⁹⁾に従い、試料を1 mg/mLとなるよう50 mM NaNO₃溶液に溶解し、SECカラム(Shodex OHpak SB-804HQ φ8 mm×300 mm)により分子量分布を測定した(溶出液: 50 mM

NaNO₃, 流速: 0.5 mL/min, カラム温度: 30°C)。分子量推定のための標準物質として、プルラン(分子量: 5.9, 11.8, 47.3, 212, 788 kDa)を用いた。

2.4 粘度測定

試料を1%となるよう25 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、動的粘弾性測定装置(AR-G2, TA Instruments 製)により粘度を測定した(40 mm コーンプレート(角度2°), 測定温度5°C, セン断速度: 1~100 (1/s))。

2.5 分子表面疎水度の評価

試料の10 mg/mL水溶液0.5 mLに50 mMリン酸緩衝液(pH 6.0) 4 mL, 500 μM 1,8-アニリノナフタレンスルホン酸(8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt : ANS) 0.5 mLを加え、25°Cで2時間反応させた。反応終了後、蛍光分光光度計(F-4500, 日立製作所製)を用い、励起波長350 nmで400-650 nmの蛍光強度を測定した。なお、蛍光強度が高いほど分子表面疎水度が大きいことを示す。

2.6 高次構造の解析

試料を1 mg/mLとなるよう25 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、25°Cで光路長1 mmの角形キュベットで円二色分散計(Circular dichroism : CD, J-820, 日本分光製)を用い、CDスペクトルを測定した。この紫外外部領域でのCDスペクトルパターンとCD強度の違いについて、標準となるα-ヘリックス、β-シート、β-ターン、ランダムコイルのCDスペクトルとの比較により、PGAの高次構造の分布を推定した。

3. 結果および考察

納豆菌由来PGAおよび市販PGAの各リン酸化誘導体試料のリン酸化度を比較すると、納豆菌由来PGAリン酸化誘導体のリン酸化度は0.4に対し、市販PGAリン酸化誘導体は1.4で、およそ3倍であった。市販PGAとそのリン酸化誘導体の分子量分布をSECにより分析した結果を図1に示す。市販PGAの分子量分布は、2つのピークが認められ(分子量: 773 kDa, 1.2 kDa, 溶出時間: 12分, 23.6分)、リン酸化により2本の新たなピークが出現した(分子量: 12 kDa, 9 kDa, 溶出時間: 19分, 20分)。これは、リン酸化により断片化が生じたことによると考えられる。次に、各PGAにつき未修飾体とリン酸化誘導体との粘度を測定した結果を

図2に示す。納豆菌由来PGAはせん断速度を上げると著しく粘度が低下するものの、このリン酸化誘導体は、せん断速度を上げて粘度の低下がほとんど見られなかった。一方、市販PGAは未修飾体、リン酸化誘導体ともに、せん断速度の違いによる粘度の変化はほとんど見られなかったが、リン酸化誘導体は未修飾体よりも若干粘度が低い傾向であった。

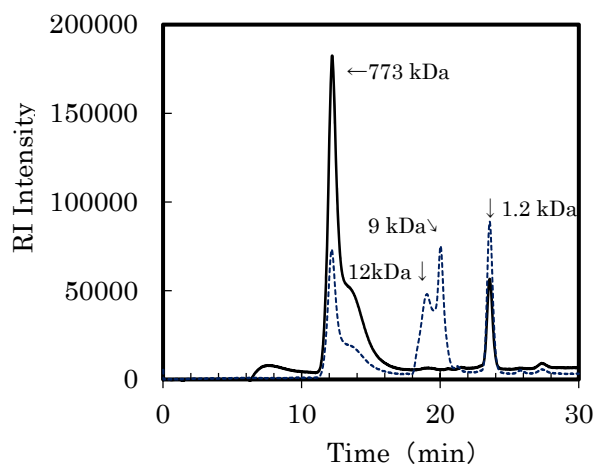
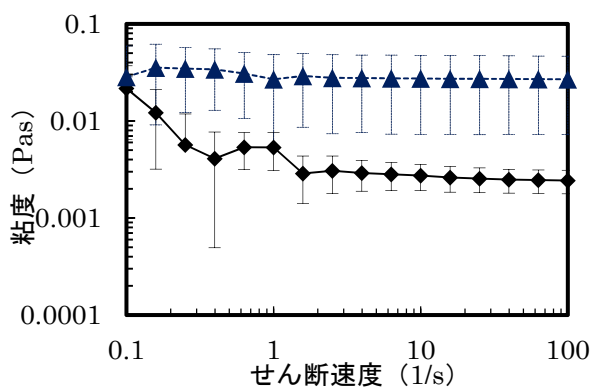


図1 市販PGAのサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)の分析結果

— 市販PGA：未修飾体市販PGA
 - - - テトラポリリン酸によるリン酸化誘導体市販PGA



—◆— 納豆菌由来PGA
 - - -▲- - - テトラポリリン酸によるリン酸化誘導体納豆菌由来PGA

a) 納豆菌由来PGA

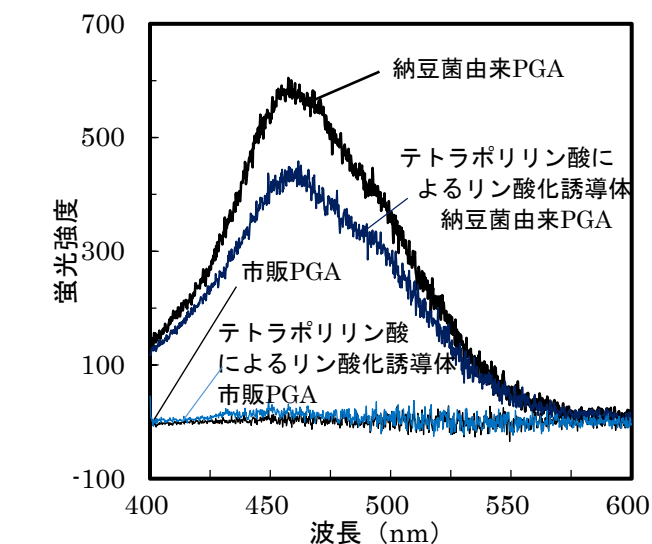
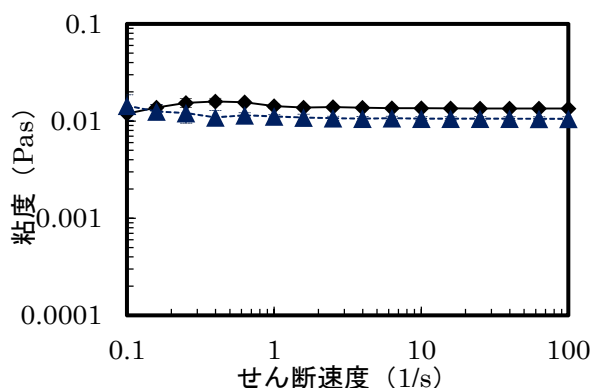


図3 PGAおよびPGAリン酸化誘導体の表面疎水度



—◆— 市販PGA
 - - -▲- - - テトラポリリン酸によるリン酸化誘導体市販PGA

b) 市販PGA

図2 PGAおよびリン酸化誘導体PGA溶液の粘度の比較

(エラーバーは標準誤差を表す。 a)はN=2, b)はN=4)

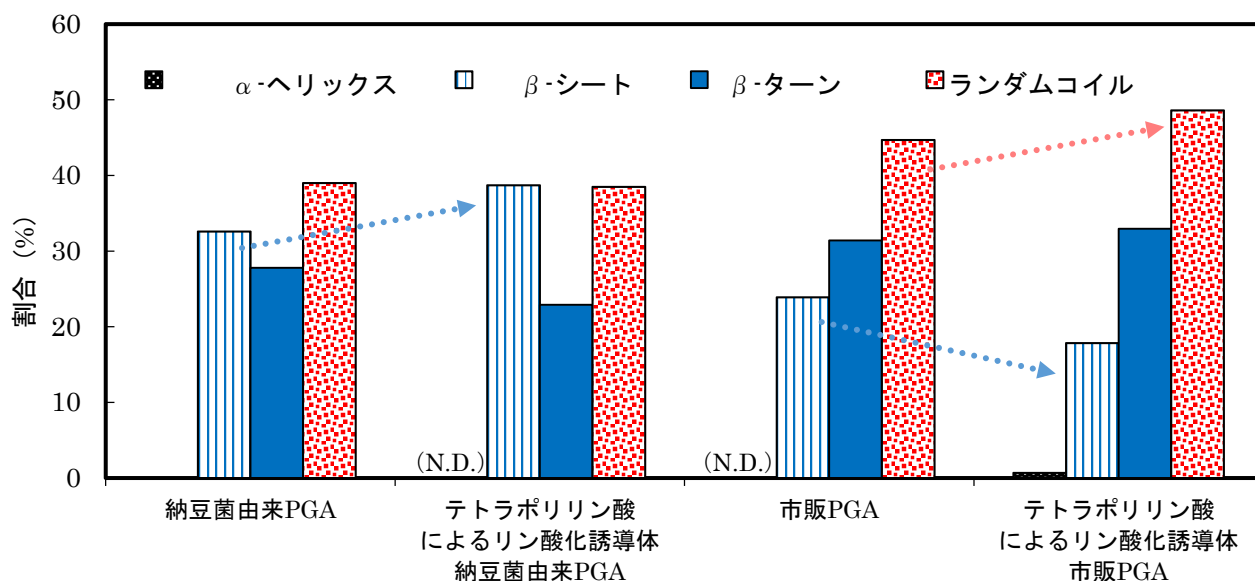


図4 PGAリン酸化誘導体の高次構造の割合

(N.D.: 検出限界以下)

る高次構造解析を行った結果を図4に示す。未修飾体の納豆菌由来PGAはβ-シートが、市販PGAはβ-シートとランダムコイルというように構造体の比率が異なり、それぞれ、リン酸化によっても構造体の比率が変化した。具体的には、標本数が1であるため統計的な有意差は確認できないが、納豆菌PGAでは、剛直な構造であるβ-シートの比率がリン酸化により増大する一方、市販PGAではβ-シートの割合が減るとともに柔軟な構造体であるランダムコイルの比率が増える傾向が認められた。以上の結果より、納豆菌PGAは疎水基が分子表面に多く出ており、リン酸化により疎水度が大きく低下し、剛直な構造体であるβ-シートの増加が生じるため(図4)、粘度が増加することが考えられた(図2a)。一方、市販PGAは元々分子表面に疎水基が少なく(図3)、リン酸化によって柔軟な構造体であるランダムコイルの増加が生じるため(図4)、粘度変化(図2b)に与える影響は少ないことが推察された。

4. 結論

納豆菌由来PGAおよび市販PGAにリン酸塩を添加してPGAリン酸化誘導体を調製し、これらリン酸化誘導体PGAおよび未修飾体PGAについて、リン酸化度、粘度、分子表面疎水度の測定、そして高分子構造の解析を行い、リン酸化の影響

を検討した。その結果、納豆菌PGAは疎水基が分子表面に多く出ており、リン酸化により疎水度が大きく低下し、剛直な構造体であるβ-シートの増加が生じるため、粘度が増加することが考えられた。一方、市販PGAは元々分子表面に疎水基が少なく、リン酸化によって柔軟な構造体であるランダムコイルの増加が生じるため、粘度変化に与える影響は少ないことが推察された。これらの結果より、PGAの由来が異なれば、リン酸化の影響も異なることを示している。今後は、納豆菌由来PGAの分子量分析等も実施し、さらに詳細にリン酸化の影響を調べるとともに、菌培養で得られたPGAについても検討していきたい。

謝辞

CDスペクトル測定に際し、装置を利用させていただきました三重大学生物資源学部 三島 隆准教授に感謝いたします。

参考文献

- 1) 袴田佳宏：“納豆と納豆菌の科学”. 美味技術研究会誌, 15, 15-48 (2010)
- 2) 味園春雄ほか：“「納豆の糸」の主成分, ポリ-γ-グルタミン酸の機能と生合成機構”. ビタミン, 79(2), 71-78 (2005)
- 3) Luana P. Moraes et al.: “The existing studies

- on biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) by fermentation”, *Food and Public Health*. 3(1), 28-36 (2013)
- 4) Zhiting Luo et al.: “Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives”, *Biotechnology for Biofuels*. 20169: 134 (2016)
 - 5) Ramzi A. Abd Alsaheb et al.: “Polyglutamic acid applications in pharmaceutical and biomedical industries” , *Der Pharmacia Letter*, 8(9), 217-225 (2016)
 - 6) 鈴木秀之ほか: “おからを原料とした納豆菌による生分解性プラスチック素材: ポリ γ -グルタミン酸の製造法の開発”, *大豆たんぱく質研究*, 13, 62-65 (2010)
 - 7) Christoph Hoennscheidt et al.: “Production of stable quinine nanodispersions using esterified γ -polyglutamic acid biopolymer”, *Biochemical Engineering Journal*, 79, 259-266 (2013)
 - 8) Sung et al.: “Poly-gamma-glutamic acid-vitamin complex and use thereof”, United States Patent Application Publication Pub. No.: US 2008/132440 A1 (2008)
 - 9) O. Kurita et al.: “Regulatory phosphorylation of poly- γ -glutamic acid with phosphate salts in the culture of *Bacillus subtilis (natto)*”, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34(4), 60 (2018)
 - 10) O. Kurita et al.: “Feasible protein aggregation of phosphorylated poly-glutamic acid derivative from *Bacillus subtilis (natto)*”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 484-492 (2017)
 - 11) 梅谷かおりほか: “カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の調製”. 三重県工業研究所研究報告, 42, p62-67 (2018)
- (本研究は、法人県民税の超過課税を財源としています。)