

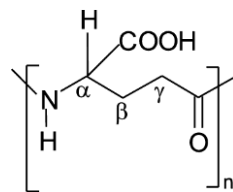
# 枯草菌による $\gamma$ -ポリ-L-グルタミン酸合成機構の解明

研究期間：2016～2023年

## 研究背景・目的

納豆にみられる粘性物質は、納豆菌（枯草菌の1種）が生産するD-とL-グルタミン酸からなる $\gamma$ -DL-ポリグルタミン酸（DL-PGA）である。一方、L-グルタミン酸のみからなるホモ $\gamma$ -L-ポリグルタミン酸（L-PGA）は、その高い立体規則性により強固なプラスチックを合成することができ、DL-PGAよりも高い保湿性を有することから化粧品の素材としても注目されている。しかし、以前は高分子のL-PGAを生産できる微生物は好塩古細菌 *Natrialba aegyptiaca*に限られており、培養には酵母抽出液などの高価な栄養源が必要であり、生産性も低いために、販売価格は極めて高く（50万円/kg）、低価格化が課題であった。

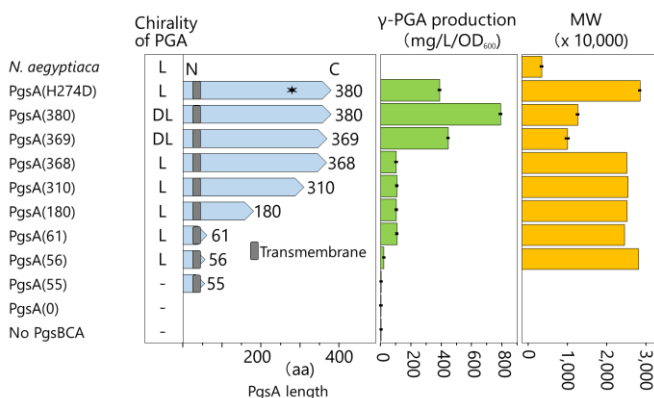
一方、実験室株を含めた多くの枯草菌は、グルコース・アンモニア塩を唯一の炭素源・窒素源とした安価な最少培地ではPGAを生産できないが、我々は安価な最少培地でも高分子DL-PGAを高生産できる技術を開発した。そこで、枯草菌においてL-PGAを高生産できる技術の開発の開発、および、PGA合成機構の解明を目的とした。



## 実験概要

DL-PGA合成は膜結合型のPgsBCA複合体により合成され、高分子DL-PGA生産株は粘性のある水滴状の光沢のあるコロニーを形成する。そこにPgdS（L-PGAを分解できないがDL-およびD-PGAを分解できる）を過剰発現させるとDL-PGA分解に伴い粘性の低い光沢を失った平坦なコロニーになる。しかし、PgdSで分解できない変異株（高分子L-PGA生産株）は水滴状の光沢のあるコロニーとなる。このような変異株は全てPgsAに変異を有していた。

これを利用したL-PGA生産変異株スクリーニング法により取得した100以上の変異株は全てPgsAエピメラーゼの酵素活性を失うような点変異・C末端領域欠損変異を有していた。さらに、詳細な解析の結果、L-PGA合成には、PgsAのN末端から近傍の膜貫通領域までが必須であり、PgsAの活性を消失させるようなC末端領域の欠損あるいは点変異が必要であることがわかった。生産性は、C末端の欠損では約1/8～1/40に激減したが、点変異では生産性の低下は限定的であった。



## 結果と考察

AlphaFold2によるPgsBCAの構造予測の結果、PgsAの細胞内N末端領域はPgsBと、膜貫通領域はPgsCと相互作用し、細胞外のC末端エピメラーゼドメインは広くPgsCと相互作用していた。これは、PgsAのN末端領域がPGA生産に必須であり、PgsAのC末端欠損が生産性を著しく減少させる理由を説明できる結果となっていた。L-PGAを生産するPgsA点変異株をスクリーニングした結果、従来の $\gamma$ -DL-PGA生産性よりも高い生産性を示す $\gamma$ -L-PGA生産株の取得にも成功した。また、DL-PGAは、①細胞内でPgsBがL-グルタミン酸を連結しL-PGAを合成、②PgsCに加えPgsBとPgsAの膜貫通領域で形成されるトランスポーターがL-PGAを細胞外へと輸送、③細胞外でPgsAがL-PGAの一部をD-グルタミン酸に変換、というプロセスで合成されること、L-PGAの生産は、点変異・C末端欠損によりPgsAのエピメラーゼ活性の失活が必要であることがわかった。

