

Bacillus subtilis TAM 4 の Poly glutamic acid 生産に 及ぼす栄養条件とその物性

熊谷 一・吉田 孝・大町 鉄雄・浅田 芳宏

細胞工学講座

(2002年10月21日受付)

(1) 緒 言

微生物による poly glutamic acid (PGA) の生成は 1937年 IVANOVICSらが *Bacillus anthracis* の莢膜成分として見出した(14)。

1942年 BOVARNICK(5)が *Bacillus subtilis* の培養液中に発酵生産物として,PGAが蓄積されることを認めた。その後,藤井は納豆の粘性物質がPGAであることを明らかにした(9)。微生物によるPGAの生産は数多く見い出されたが(6,7,8,11,14,15),主な生産菌は *Bacillus subtilis* かその類縁菌であった(12)。

近年,PGAは新素材 Biopolymerとしての利用が期待され(28,29),その構造についても明らかになりつつある(15,16,23,24)。更にPGA生成に関与すると考えられる遺伝子も明らかになって来た(2,18~21,26)。しかしながら,PGA生成機構に関する生化学的解明は不十分で遅れている(4,5,10,17)。

他方,PGA生産条件は主として,PGA生産量に視点がおかれ,培地として天然培地が多く用いられている。従って,PGA生成機構に関する栄養条件面の検討は殆んど行われていなかった。そこで,培地組成の明らかな化学合成培地を用いた検討には, L グルタミン酸非依存PGA生産菌を用いることが有効であると考えた。現在まで,この観点からの研究は唯一, L グルタミン酸依存PGA生産菌 *B. subtilis* IFO3335株で行われ,次の二点が明らかにされているにすぎない(16)。

(1)PGA生産は炭素源としてクエン酸塩が最適で,グルコースは不適である。

(2)与えた L グルタミン酸は殆んど資化されず,PGAの前駆体にならず,単にPGA生産のシグナル,あるいは,スターターとして働く。

本研究では,前述の観点から, L グルタミン酸非依存PGA生産菌を用いて,栄養条件がPGA生産並びにPGAの物性にどのように影響を与えるか検討し,PGA生成機構解明の手がかりを得ようとするものである。

() 実験材料と方法

(1) 供試菌株: *Bacillus subtilis* TAM 4(13)。

(2) 培養培地組成

M培地: Glucose 7.5%, NH₄Cl 1.8%, K₂HPO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.035%, MnSO₄·5H₂O 0.005%, CaCO₃ 3%, pH7.2

P培地: 炭素源 3% (NH₄)₂SO₄ 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, MnSO₄·5H₂O 0.002%, FeCl₃·6H₂O 0.005%, FeCl₃·6H₂O 0.005%, CaCl₂·2H₂O 0.02%, pH7.5

GB培地: Glucose 1%, Peptone 1%, NaCl 0.5%, Bouillon 1%, pH7.0

(3) 培養方法

a) 前培養: GB培地 5ml(18 × 180 mm 試験管)に保存スラントより1エーゼ接種し,30,16~18時間好氣的に培養した(300 rpm)。

b) 本培養: M,あるいは, P培地 100mlを含む500ml坂口フラスコに前培養液 1mlを接種し,30 好氣的条件下で3~4日培養した(150 rpm)。

(4) 生育度の測定

a) 生菌数の計測: 培養液を滅菌水に希釈し,TSB*プレートへ植菌後,30 で24時間平板培養した。その後,コロニー数を計数した。生育度はCFU/mlで表わした。

b) OD660nmでの計測: M培地の場合,0.5mlの培養液中のCaCO₃を0.5ml 1NHClで溶解した後,水で希釈し,20倍になるようにして,660nmの吸光度を測定した。

* Trypticase Soy Broth (TSB) 1.5%, Glucose 0.5%, KNO 30.25%, agar 1.2%, pH7.4

(5) 化学分析

a) Glucose は Hexokinase, Glucose 6 phosphate dehydrogenaseを含むFキット(ベーリンガー社)を用いて測定した。Citrate は Citrate lyase, malate

dehydrogenaseを含むFキット, L glutamic acidはGlutamate dehydrogenase, Dipholaseを含むFキットで測定した。

- b) PGAの分析: 培養液上澄(30,000 rpm × 4 hr)に3~4倍量のエタノール(99%)を加えてPGAを沈殿させ, 同エタノールで洗浄後, 更に, 5000 rpm, 20分遠心後, 水に溶解した。3日間水に透析した後, 凍結乾燥させ試料とした。PGAの生成量は培地1ml中のPGAのmg数で示した。
- c) HPLCによる分析
- (1) グルタミン酸のD/L: 試験管に2mg/mlのPGAを0.5mlと12NHCl 0.5mlを加えて減圧密封した後, 110℃, 24時間加水分解を行った。その後, エバポレーターでHClを除去, HClO₄/H₂O (pH2.0), 0.5mlに溶解し, D/L分析用サンプルとした。GLサイエンス製HPLCで, CROWNPAKCR(+)を用いて, 25℃, 移動相HClO₄/H₂O (pH2.0), 0.4ml/min, Atten4で分析した。
- (2) ゲルろ過による分子量の測定: 50mMリン酸緩衝液(pH6.86)に5mg/mlの精製PGAを溶かした。HPLC(島津LC-10AGPC), Asahipak GSM 700H, 40℃, 1ml/minで分析した。検出はRID-6A SPD 10A, 220nmを用いた。
- d) 相対粘度はOstwald粘度計を用いて20℃で測定した。培養液の場合は遠心上澄液を, 精製PGAの場合は, 5mg/ml, 1N NaOHでpH7.0に調整し用いた。
- e) Davis法に準じ, Native polyacrylamide Gel Electrophoresisを行った。5~15%ポリアクリルアミドのgradient Gelを作製して用いた。精製PGA 2mgを水1mlに溶解し, その5μlに40%サッカロース5μlを加え, 10mA, 6時間泳動した。その後, Coomassie Brilliant Blueで染色した。山口等の方法(27)に従い, 0.5% Methylene Blue溶液でPGAを染色した。脱色は水で洗った。
- f) アミノ酸の分析はHCl分解後, 4-dimethylaminobenzen-4-sulfonyl chlorideを用いて, その誘導体に変換後, 自動アミノ酸分析機で測定した。

() 結 果

1) *Bacillus subtilis* TAM 4株のPGA生産に及ぼす栄養条件

(1) M培地におけるPGA生成に及ぼす炭素源, 窒素源の影響

糖を主とする8種の炭素源のPGA生成に及ぼす影響を, NH₄Cl 1.8%存在下で検討した。生育度はGlucose, Maltose, Saccharose, Fructose, Xyloseの順に良好であった。これに対し, Galactose, Lactose, Glycerolの順に生育は抑制した。生育良好な炭素源を用いた場合, 一般にPGA生成も良好であって, Fructoseを用いたとき,

22.1mg/mlと最高値を示した(Table)。

他方7.5% Glucose存在下で, 窒素源の効果を検討した。無機窒素源のNH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄で, 11~13mg/mlのPGAが生成した。これに対し(NH₄)HPO₄, (NH₄)₂CO₃, Ureaではまったく生育しなかった。有機窒素源は一般に生育は良好であったが, PGA生産量は前者の1/2~1/3と抑制された(Table)。

以上の結果から, M培地においては, 窒素源はNH₄Cl, 炭素源はFructoseがPGA生成に最良であることが明らかになった。しかし, 以後の実験はFructoseが高価であることから次善の策として, Glucoseを炭素源として用いた。

(2) 有機酸を炭素源とするP培地におけるPGA生成

M培地では炭素源として用いた糖の分解により生じる酸で起るpH低下を防ぐために培地中にCaCO₃を添加する。しかしながら, 炭素源として有機酸を用いる時は, 有機酸とCaCO₃が反応して, そのCa塩を形成し不溶化を起す。従って, M培地を用いられない。一方, 国岡らはL-glutamate(L-Glu)依存PGA生産菌*B. subtilis* IFO 3335株の研究において, 化学合成培地Pを用いた(11)。しかし, 本培地は滅菌操作後, 培地が濁るため, 吸光度による生育測定が不可能である。そこで, 本実験では, 培地1mlあたりの生菌数を計測し生育度として表した。Glucoseを炭素源, NH₄Clを窒素源としたM培地での生育をCFU/mlとOD660nmで表示した(Fig. 1)。

測定法の違いで, 生育曲線のパターンが異なっていた。P培地での有機酸はNa塩で与えるので, 生育に伴いpHの低下はないが, Glucoseの場合, 分解により酸の生成が起り, 急激なpHの低下で, その後の生育は大きく抑制された。有機酸を用いた時のPGA生成はCitrateで3.6mg/ml, 2-oxoglutarateとMalateで, 0.3, 0.5と少なく, Succinateではまったく生成しなかった(Table)。また, PGA生成の為のCitrateの最適濃度は2~3%であった(Data略)。

他方, 有機酸と糖のPGA生育に及ぼす相乗効果を検討した。各有機酸とGlucoseの組合せで, 全て相乗効果が示された(Table)。

Glucose, あるいは, Succinate単独ではPGAを全く生成しないが, 両者を組み合わせると6.3mg/mlものPGAが生成された。この例が相乗効果の典型であるが, 他にも量的増加が認められた。CitrateとGlucoseの組合せでの窒素源濃度の作用を検討したが, 0.5%以上では殆んど同じ量のPGAが生成され大きい影響は認められなかった(Data略)。

(3) PGA生成に及ぼすアミノ酸の影響

B. subtilis TAM 4株はPGAの構成成分であるL-glutamateを外から与えなくてもPGAを生成する, 胃所, denovo生成菌である。本菌でのPGA生成に及ぼすL-glutamate(L-Glu)の影響を検討した。Citrateが炭素源の場合, L-Glu添加によって約2倍にPGA生成量が

Table I. Effects of carbon and nitrogen sources on growth and PGA production with *B. subtilis* TAM 4

| Carbon source ^{a)} | Cell growth (OD 660 nm) | PGA production (mg/ml) |
|--|-------------------------|------------------------|
| Glucose | 22.1 | 13.4 |
| Fructose | 11.6 | 22.1 |
| Galactose | 1.5 | 0 |
| Saccharose | 12.0 | 16.9 |
| Lactose | 0.2 | 0 |
| Maltose | 16.8 | 16.1 |
| Xylose | 10.4 | 2.0 |
| Glycerol | 2.7 | 0.6 |
| Nitrogen source ^{b)} | Cell growth (OD 660 nm) | PGA production (mg/ml) |
| NH ₄ Cl | 22.1 | 13.4 |
| NH ₄ NO ₃ | 18.2 | 10.9 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10.3 | 12.6 |
| NaNO ₃ | 16.5 | 2.5 |
| KNO ₃ | 16.5 | 2.1 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0 | 0 |
| (NH ₄) ₂ CO ₃ | 0 | 0 |
| Urea | 0 | 0 |
| Peptone | 6.8 | 5.4 |
| Casamino acid | 22.4 | 3.4 |
| L Glutamic acid | 20.8 | 8.0 |

Cells were grown in M-medium containing carbon and nitrogen sources as indicated.

a) NH₄Cl (1.8%) was used as a nitrogen source.

b) Glucose (7.5%) was used as a carbon source.

増大した。Malate で 6 倍, 2-oxoglutarate で 8 倍, Succinate では, L-Glu 無添加時に PGA 生成は認められないが, L-Glu 添加で 6.3 mg/ml の PGA が生成し質的变化を起した (Table)。L-Glu を単一炭素源とすると PGA 生成が認められないことから, L-Glu は先に示した有機酸と Glucose の組み合わせによる相乗効果と見かけ上類似のものであった。L-Glu (3%) 存在下での PGA 生成に及ぼす炭素源の量的影響を検討した。Citrate の場合, 1~2% 時で, 7.1~7.3 mg/ml と最高値を得た。これに対し, Glucose では 2% 以上でほぼ 5.7~5.8 mg/ml の PGA を生成したが, 生育は Citrate に比べ抑制されていた (Table)。他方, PGA 生育に及ぼす L-Glu 濃度の至適濃度は Citrate で 3~5% で, L-Glu を 7% に上げると生育は変わらないが, PGA 生成量は約 1/2 に抑制された。Glucose の場合, 3% 以上で, 7 mg/ml 程度の PGA が生成され変動はなかった。PGA 生成に及ぼす L-Glu の影響は, 炭素源 Glucose に比べて Citrate の方が大であった (Table)。

次に L-Glu 以外のアミノ酸の PGA 生成に及ぼす影響を検討した。L-Glu, L-Gln 単独で PGA は全く生成せず, D-Glu, L-Asp, D-Ala 単独でも 0.1~0.5 mg/ml 程度の生成であった (Table)。これに対し, Citrate が共存すると L-Gln を除いてすべての場合 PGA 生成が認め

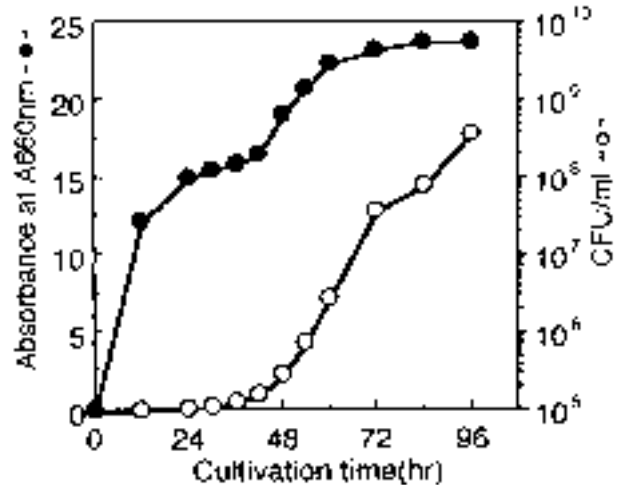


Fig. 1 Time course of growth with *B. subtilis* TAM 4 in M medium.

られ, 更に, Citrate 単独的の PGA 生成量に比べ増大した。Glucose 共存時も同様の促進効果が見られた。L-Glu, Citrate, Glucose の 3 者を共存させると, PGA 生成は飛躍的に促進した (Table)。L-Glu で見られた PGA 生成の促進作用は他のアミノ酸でも認められるが, しかし, アミノ酸の添加は PGA 生成に必須条件ではなく, 十分条件にすぎない。

(4) P 培地における炭素源とグルタミン酸の消費と生育並びに PGA 生産の経時的変動

Glucose, あるいは, L-Glu を単一炭素源の場合, 生育は認められるが PGA は生成されない。この場合の炭素源の消費は共に約 15% であった (Fig. 2 A, B)。一方, Citrate の消費は 50% と高く, 1.5 mg/ml の PGA の生成も認められた (Fig. 2 C)。Glucose と Citrate 共存下では, Citrate の消費は Citrate 単独時と同程度であるのに対し, Glucose の消費は 24 時間で 100% で, 生育も 10⁹ で PGA は約 8 mg/ml 生成された (Fig. 2 D)。Glucose と L-Glu の組合せでも同様の結果で, Glucose の急激な消費が特徴的であった。 (Fig. 2 E)。Citrate と L-Glu の組合せでも同様の結果が期待されたが, この場合は, 生育, PGA 生成共に増大したが, しかし, L-Glu, Citrate の消費はそれぞれ単独時の消費と同じで, Glucose の様な急激なパターンの変動は認められなかった (Fig. 2 F)。L-Glu, Citrate, Glucose 三者共存時にも, Glucose に関しては同様の変動が見られた (Fig. 2 G)。いずれにせよ, 注目すべきは L-Glu の資化がわずかで, PGA 生成の素材として直接的に利用されず, PGA 生成を促進する作用 (promoter) を担っていると推定される。

2) *B. subtilis* TAM 4 株の生成する PGA の物性

(1) M 培地で生成された PGA の物性

M 培地に供試菌が生育した場合の諸物質の経時変化を Fig. 3 に示した。生育は 84 時間で最大に達し, 炭素源の Glucose はその時点でほぼ 100% 消費された。窒素

Table . Enhancement of PGA production by coexisting glucose and organic acids with *B. subtilis* TAM 4

| Carbon source (2 %) | Cell growth (CFU/ml) | PGA production (mg/ml) |
|--------------------------|----------------------|------------------------|
| Glucose | 5.8×10^8 | 0 |
| Citrate | 2.4×10^9 | 3.6 |
| Citrate + glucose | 1.5×10^9 | 7.6 |
| 2-Oxoglutarate | 6.0×10^8 | 0.3 |
| 2-Oxoglutarate + glucose | 7.8×10^8 | 3.0 |
| Succinate | 2.2×10^8 | 0 |
| Succinate + glucose | 3.5×10^8 | 6.3 |
| Malate | 4.8×10^8 | 0.5 |
| Malate + glucose | 4.7×10^8 | 3.0 |

Table . Effect of L-glutamic acid on PGA production with *B. subtilis* TAM 4

| Carbon source (3 %) | with L glutamic acid | | without L glutamic acid | |
|-----------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| | Cell growth (CFU/ml) | PGA production (mg/ml) | Cell growth (CFU/ml) | PGA production (mg/ml) |
| None | 1.1×10^9 | 0 | - | - |
| Citrate | 6.1×10^8 | 7.3 | 2.4×10^9 | 3.6 |
| 2 Oxoglutarate | 2.2×10^9 | 2.5 | 6.0×10^8 | 0 |
| Succinate | 1.3×10^9 | 6.3 | 2.2×10^8 | 0 |
| Malate | 3.6×10^8 | 3.0 | 4.8×10^8 | 0.5 |

Cells were grown in P medium containing organic acid and L glutamate (3 %) for 3 days at 30 .

Table . Effect of concentration of citrate and glucose on PGA production in the presence of L glutamate

| Carbon source (%) | Cell growth (CFU/ml) | | PGA produced (mg/ml) | |
|---------------------|----------------------|-------------------|----------------------|---------|
| | Citrate | Glucose | Citrate | Glucose |
| 0.5 | 1.7×10^9 | 2.0×10^8 | 3.8 | 1.5 |
| 1.0 | 2.2×10^9 | 4.8×10^8 | 7.1 | 3.6 |
| 2.0 | 6.1×10^9 | 6.0×10^8 | 7.3 | 5.8 |
| 3.0 | 2.4×10^9 | 9.8×10^8 | 3.8 | 5.7 |
| 5.0 | 4.6×10^9 | 8.2×10^8 | 1.0 | 5.8 |

Cells were grown in P medium (100ml) containing L glutamate(3 %)

源の NH_4Cl は約 50 % の消費で、過剰に与えている。培養 48 時間をすぎると PGA の生産と同時に培養液の粘性も増加し始める。従って、粘性の測定で PGA 生成量の目安になる。培養に伴う pH の変化は最低で 6.5 で PGA も 84 時間で最大となり、約 15 mg/ml であった。

培養液の遠心上澄液量の 3 ~ 4 倍のエタノールを加え、PGA を沈殿させ分離精製するが、エタノール沈殿時の PGA 形態は初期でフレーク状、後期で繊維状になる (Data 略)。この形態の変動は成育時期に特異的なのか、あるいは、単に PGA の濃度の問題か検討した。既知の精製 PGA を用いて、1 ~ 10 mg/ml の各 PGA 溶液のエタノール沈殿を作製した。その結果、PGA 低濃度でフレー

ク状に、高濃度で繊維状になることから、エタノール沈殿形態の変動は PGA 濃度に起因することが明らかになった (Data 略)。

PGA の分子量は gradient ゲル電気泳動法で (27)、その分子分散から判別可能である。各生育時期の PGA を染色した結果を Fig. 4 に示した。培養初期の分子量は約 $10 \sim 70 \times 10^4$ の間に分散している。後期になると低分子の PGA は減少し、 170×10^4 以上の高分子側に収斂する。この結果は更に HPLC のゲル濾過法による、分子量の測定結果 (Table) と一致している。また、培養液の相対粘度が 3.1 から 13.8 と変化することから (Table) も支持される。これら PGA の構成アミノ酸の D/L 比は

Table . Effect of concentration of L glutamate on PGA production with citrate or glucose as a carbon source

| L glutamate (%) | Cell growth (CFU/ml) | | PGA produced (mg/ml) | |
|-----------------|----------------------|-------------------|----------------------|---------|
| | Citrate | Glucose | Citrate | Glucose |
| 0 | 2.4×10^9 | 5.4×10^6 | 3.6 | 0 |
| 0.5 | 1.7×10^9 | 1.0×10^7 | 5.4 | 1.3 |
| 1.0 | 2.8×10^9 | 5.0×10^7 | 6.7 | 2.4 |
| 3.0 | 4.3×10^9 | 6.0×10^8 | 7.9 | 5.2 |
| 5.0 | 2.0×10^9 | 4.4×10^8 | 6.5 | 4.3 |
| 7.0 | 1.4×10^9 | 3.6×10^8 | 4.7 | 5.0 |

Cells were grown in P medium (100 ml) containing citrate or glucose (2%) and L glutamate as indicated.

Table . Effects of amino acids on the PGA production in P medium containing various carbon sources

| Amino acids (3%) | PGA produced (mg/ml) | | | |
|------------------|----------------------|---------|---------|-------------------|
| | None | citrate | glucose | citrate + glucose |
| None | - | 3.6 | 0 | 7.6 |
| L Glutamate | 0 | 7.3 | 5.8 | 16.0 |
| D Glutamate | 0.5 | 6.5 | 3.7 | 14.2 |
| L Aspartate | 0.1 | 6.4 | 11.3 | 18.4 |
| L Alanine | 0.4 | 4.7 | 0.8 | 6.6 |
| D Alanine | 0.3 | 4.5 | 0.4 | 8.2 |
| L Glutamine | 0 | 0.7 | 2.3 | 11.7 |

Cells were grown in P medium containing various carbon sources (2%).

8 : 2 と い づ れ の PGA で も 同 じ 比 で 変 動 は な っ た 。 PGA の 全 ア ミ ノ 酸 の 分 析 の 結 果 を Table に 示 し た 。 PGA 全 体 の 93 ~ 94 % が Glu で , 4 ~ 5 % が Ala で , 他 に 微 量 の ア ミ ノ 酸 が 混 在 し た 。 生 育 時 期 で の 組 成 の 変 化 は な っ た 。

(2) P培地で生産されるPGAの物性

P培地で, L Glu, Citrate, の各組合わせた培地で生成されたPGAについて, その光学活性比を調べ, その結果を Table に示した。30 で培養した時, L Glu と Citrate 共存で生成したPGAのD/L比は8 : 2で, L Glu, Citrate, Glucose 共存時のPGAと同じ比であった。これに対し, Citrate 単独, Citrate と Glucose 共存, L Glu と Glucose 共存時のPGAのD/L比は6 : 4と異なっていた。他方, 同様の実験を37で行うと, L Glu, Citrate, Glucose 共存時のPGAのD/L比は8 : 2で他の全ては7 : 3であった。P培地で生成するPGAのD/L比は栄養条件により, また, 培養温度で変動することが明らかになった。

各種PGAの分子量をgradientゲル電気泳動法で測定した結果をFig. 5に示した。30でCitrateとGlucose共存時, あるいは, L GluとGlucose共存時に生成したPGAは低分子側に分子分散していた(Fig. 5 A)。これに対し, 他の条件下で生成したPGAは全て高分子側に収斂していた。同様の結果は37で培養時に生成した

PGAにおいても認められた(Fig. 5 B)。従って, PGAの分子量は栄養条件により調節されるが, 温度による制御はないことが示された。

(3) PGA生成に及ぼすDONの影響

6 diazo 5 oxo L leucin(DON)は glutamyltranspeptidase (GTP) の活性阻害剤として知られている(4)。一方, GTPの役割はPGAの分解に働くと考えられている(1)。M培地を用いて, PGA生成へのDONの作用を検討した。Table に示した様にDONはGTPの活性を阻害するが, PGAは生成し, そのD/L比も変動しない。生育, PGA生成量が若干抑制される。しかしながら, PGAの分子量はDONの濃度を増すにつれ, 分子分散が低分子側に分散していた(Fig. 6)。DONによるGTP活性阻害はPGAの分解を防ぐ効果が期待されるので, 高分子側への分散, つまり, 高分子の促進になると考えられた。結果は反対で, PGAの生成自体は阻害しないが, より高分子化を阻害していることが明らかになった。

() 考 察

L Glu非依存PGA生産菌 *Bacillus subtilis* TAM 4株は窒素源 NH_4Cl , 炭素源 Fructose や Glucose でPGAを生産する, また, 有機酸ではCitrateが有効であった。同じ

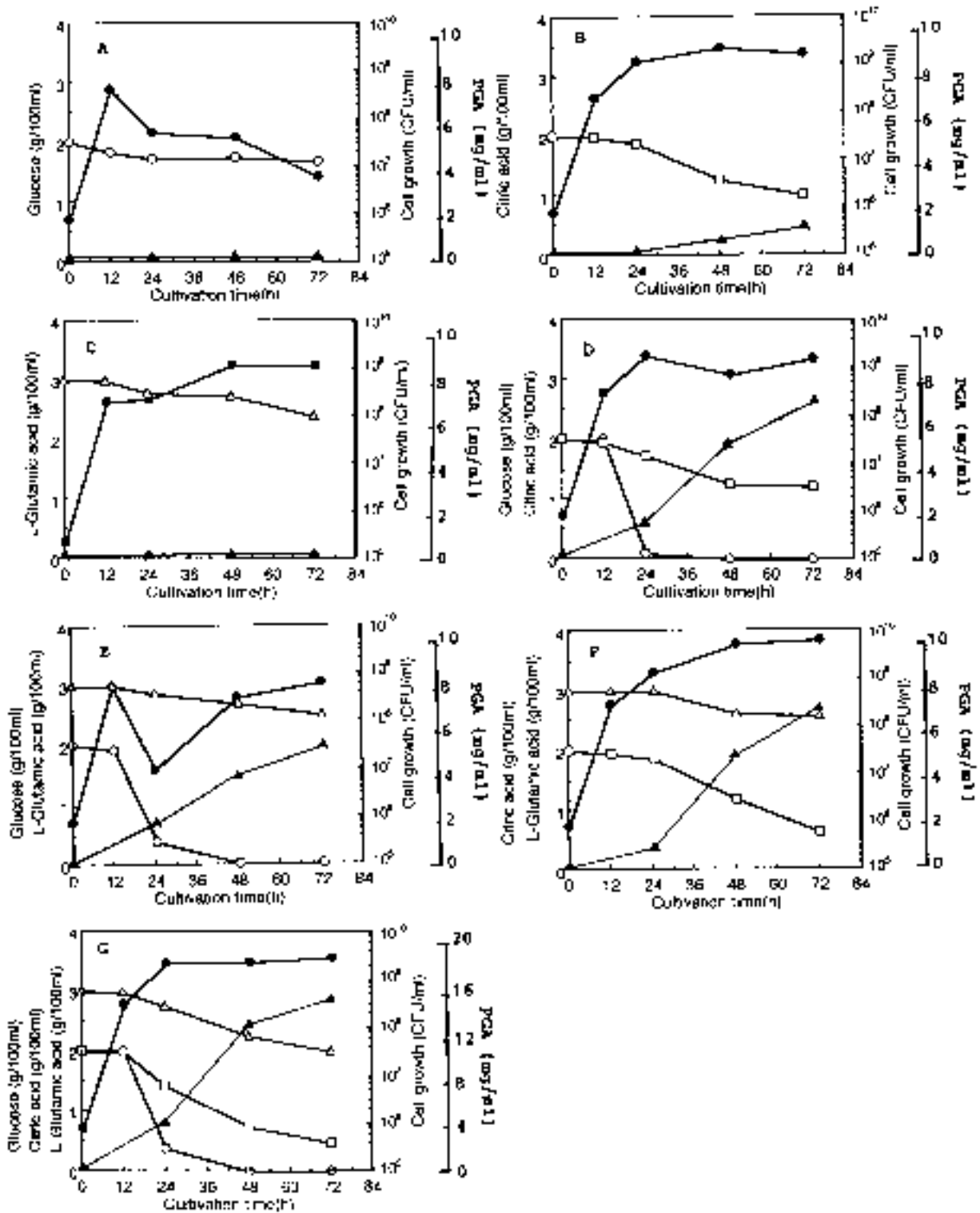


Fig. 2 Time courses of growth, assimilation of carbon sources, and PGA production in P-medium containing various carbon sources with *B. subtilis* TAM 4.
 ○ : growth, △ : L-glutamate, □ : PGA, ● : citrate, ▲ : glucose.

L-Glu非依存PGA生産菌でもPGA生産に有効な窒素源、炭素源はそれぞれ異なっている。供試菌でL-Gluを単独の炭素源とする時、生育は認められるもののPGAを生産しなかった。このような傾向は他の菌株でも認められる(4, 6, 11, 13, 22)。国岡らはL-Glu依存PGA生産

菌*B. subtilis* IFO 3335株における培地に与えたL-Gluの作用を化学合成培地で検討した。その結果、外から与えたL-GluはPGA合成の材料とならず、その消費はわずかであることから、L-Gluの役割は細胞内で新たにCitrateと(NH₄)₂SO₄からdenovo合成されるL-Glu生成系又は

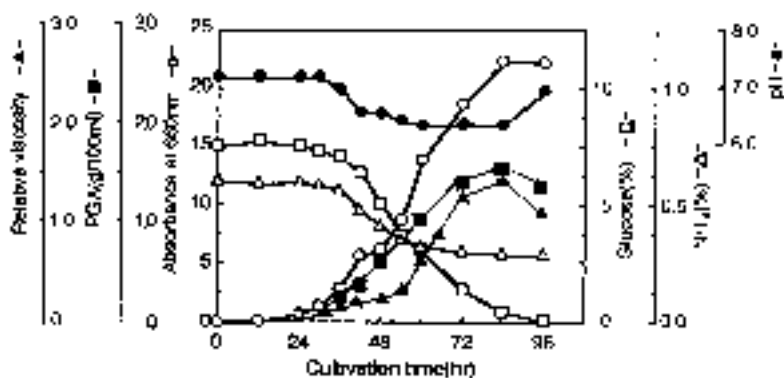


Fig. 3 Changes in cell growth, pH and concentration of glucose and ammonia with cultivation time in M medium by *B. subtilis* TAM 4.

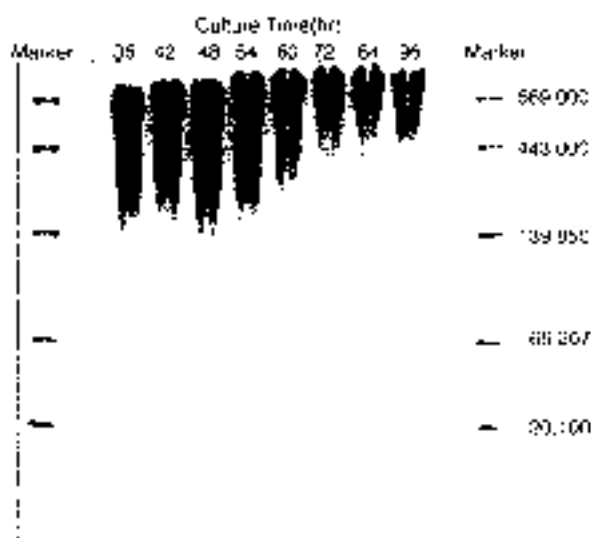


Fig. 4 SDS PAGE profiles of PGA obtained at different growth phases in M medium.

Table 1. Molecular weight, viscosity and composition of PGA produced at different growth phases

| Cultive time (hr) | Molecular weight ^{a)} | | Relative viscosity ^{b)} | Polymer composition (%) | |
|-------------------|--------------------------------|-------|----------------------------------|-------------------------|----------|
| | MW ($\times 10^5$) | MW/Mn | | D isomer | L isomer |
| 36 | 5.6 | 2.7 | 3.1 | 78.1 | 21.9 |
| 42 | - | - | 4.8 | 79.1 | 20.9 |
| 48 | 6.7 | 3.8 | 4.8 | 79.0 | 21.0 |
| 54 | - | - | 5.7 | 78.3 | 21.3 |
| 60 | 13.6 | 8.1 | 8.4 | 79.0 | 21.0 |
| 72 | - | - | 12.3 | 77.9 | 22.1 |
| 84 | 14.6 | 13.2 | 13.4 | 77.7 | 22.3 |
| 96 | 16.8 | 12.3 | 13.8 | 77.9 | 22.1 |

PGA 生成系を活性化する “ starter ” ではないかと推定した (14 , 16)。

供試菌 *B. subtilis* TAM 4 は NH_4Cl , Glucose から , また $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Citrate から PGA を denovo 合成した。更に , L Glu の添加は Glucose の消費を促進し , PGA の

生成を飛躍的に増大させた。Citrate の場合 , 急激な消費は見られないが , いずれにせよ , PGA 生成が促進された。添加した L Glu の消費はいずれの場合も少なく , 前述した様に単独では PGA を生成しない。従って 本菌の L Glu の作用は必須的でなく十分条件であり , PGA は生

Table . Amino acid compositions of PGA obtained at different growth phases

| Amino acids | Composition (%) | | | | | | | |
|-------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 36 hr | 42 hr | 48 hr | 54 hr | 60 hr | 72 hr | 84 hr | 96 hr |
| Asx | 0 | 0.1 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glx | 93.2 | 94.0 | 93.5 | 93.5 | 93.7 | 93.6 | 93.1 | 93.4 |
| Ser | 0.4 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 1.0 | 0.4 |
| Thr | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Arg | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Gly | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 |
| Ala | 4.0 | 4.2 | 4.4 | 4.5 | 4.2 | 4.2 | 4.6 | 4.7 |
| Pro | 0 | 0.1 | 0.3 | 0.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Val | 0.6 | 0 | 0.1 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.6 |
| Met | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ileu | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Leu | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Phe | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cys | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lys | 0.5 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 0.4 | 0.5 |
| His | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tyr | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Glx; Glu + Gln

Table . Effect of carbon sources on D/L ratio of PGA produced by *B. subtilis* TAM 4

| Medium | Carbon source (%) | | | Polymer composition (%) | | | |
|--------|---------------------|-------------|---------|---------------------------|----|----|----|
| | L Glutamic acid | Citric acid | Glucose | 37 | | 30 | |
| | | | | D | L | D | L |
| A | 0 | 0 | 2.0 | - | - | - | - |
| B | 0 | 2.0 | 0 | 72 | 28 | 64 | 36 |
| C | 3.0 | 0 | 0 | - | - | - | - |
| D | 0 | 2.0 | 2.0 | 72 | 28 | 57 | 43 |
| E | 3.0 | 0 | 2.0 | 79 | 21 | 57 | 43 |
| F | 3.0 | 2.0 | 0 | 73 | 27 | 76 | 24 |
| G | 3.0 | 2.0 | 2.0 | 83 | 17 | 79 | 21 |

Cells were grown in P medium containing various carbon sources as indicated for 3 days and then PGA was isolated.

成を促進する “ promoter ” であると推定した。このような促進効果は L Glu 以外に , D Glu , L Asp , L Gln で見られた。 L Glu 非依存 PGA 生産菌 *B. subtilis* NO. 5E 株の PGA 生産を L Pro , L Arg , L Asp , L Asn が促進する現象を見出ししているが , 詳細な検討がないので , TAM 4 株と同じ作用が不明である (22) 。 L Glu 依存 PGA 生産菌 *B. subtilis* F 2 01 株は L Glu , D Glu のみで PGA 生産を誘導するが , 他のアミノ酸にはその能力はなかった (15) 。しかし , 同じ L Glu 依存 PGA 生産菌株でも L Glu とその代謝類縁アミノ酸で誘導されるとの報告もあり (8) , その作用の統一的役割は明らかになっていない。TAM 4 株で 2-oxoglutarate , malate , succinate を炭素源として , (NH₄)₂SO₄ 共存下培養しても PGA は生成しなかった。この条件で Glucose 添加すると PGA

生成が起こった。また , Citrate の場合は Glucose の添加は一層の PGA 生成の促進が見られることから , Glucose の作用は inducer と promoter の二つの役割を有していると考えられる。

次に生成した PGA の物性から PGA 生成機作の手がかりを求めた。TAM 4 株の M 培地での生育初期に生成したエタノール沈殿形態はフレーク状で , 後期は繊維状塊であった。これは培養液中の PGA 濃度に依ることが明らかになった。しかし , 電気泳動ゲル上で , 初期の PGA は低分子側に広範囲に分布し , 後期のものは高分子側に移動し分子量 170 万以上に収斂し分布した。この結果は低分子の PGA が順次高分子化すると推定された。このような変動は本研究で初めて明らかになった。一方 , 低分子の PGA も高分子の PGA も , そのアミノ酸組成は

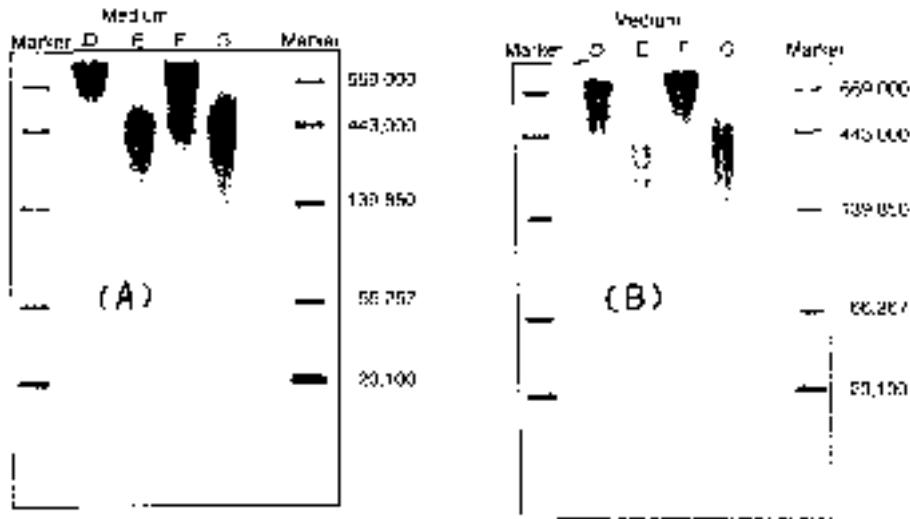


Fig. 5 SDS PAGE profiles of PGA obtained from different cultivation at 37 (A) or 30 (B). Cells were grown in P medium containing D, E, F, and G as a carbon source for 3 days, and then PGA produced was isolated.
 D: citrate + glucose
 E: glucose + L glutamate
 F: citrate + L glutamate
 G: citrate + glucose + L glutamate

Table . Effects of concentration of DON on PGA production, GTP and polymer composition

| DON (mM) | Cell growth (OD660 nm) | PGA produced (mg/ml) | GTP activity (U/ml) | Polymer composition (%) | |
|----------|------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|----------|
| | | | | D isomer | L isomer |
| 0 | 19.5 | 10.8 | 1.33 | 77.3 | 22.7 |
| 0.1 | 11.2 | 5.8 | 0.63 | 77.7 | 22.3 |
| 0.3 | 11.9 | 6.7 | 0.25 | 76.5 | 23.5 |
| 0.5 | 10.0 | 6.8 | 0.01 | 77.0 | 23.0 |

94 ~ 95 %がグルタミン酸で、残り4 ~ 5%はアラニンであった。これらの D/L 比は共に 4 : 1 で大きい変動はなかった。*B. subtilis* F 2 01 株の PGA は L Glu クラスターと D Glu クラスターに区別されるとの報告がある (15)。TAM 4 株の PGA がクラスターを形成しているか不明であるが、均一に近い低分子の PGA が生成され一定の比で重合化が進行するものと推定される。

TAM 4 株の PGA 中に 4 %前後のアラニンが検出された。L Glu 非依存 PGA 生産菌 *B. Licheniformis* A35 (6) や他の菌株の PGA 中にアラニンは見い出されておらず、特異的であり、PGA 構造上興味ある存在である。

GARDNER 等は PGA 構成成分の D Glu は L Ala が L Ala racemase で D Ala が形成され、次にそのアミノ基転移反応で生成すると推定し (10)、PGA 生成系にアラニンの関与を示唆した。しかし、PGA の一部としてペプチドを形成している報告はない。P 培地で栄養条件により PGA の分子量が変動すること、並びに D/L 比変ることを見出した。一方、*B. subtilis* F 2 01 株の PGA は培養後期になると D/L 比が変動し、D Glu が増大した (15)。PGA 生成に M^{2+} イオンは要求されるが、その濃度により D/L 比が変る報告もあり (7)、D/L 比の変動要因

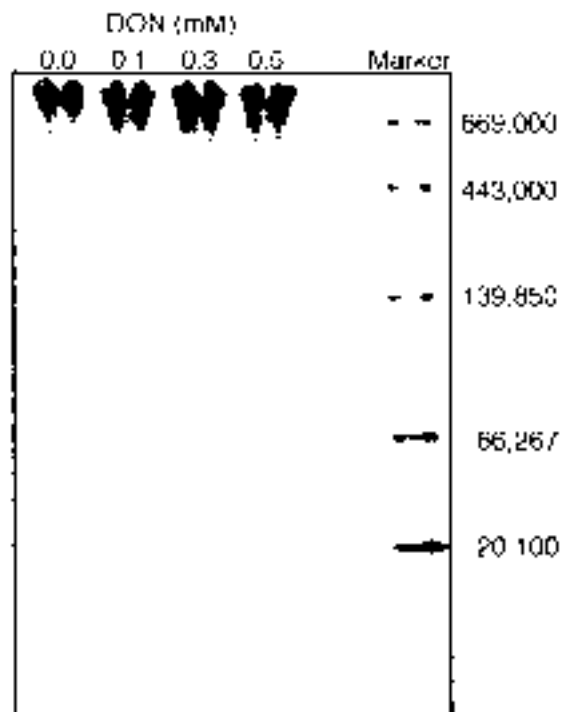


Fig. 6 SDS PAGE profiles PGA produced in M medium containing DON at different concentrations.

も少しずつ明らかになっている。他方、分子量の変動については、*B. subtilis* IFO 3335株を窒素源制限下で培養すると、培養後期にPGA分解酵素で生成したPGAは分解され低分化した(16)。PGAの分解酵素は*Bacillus*属細菌以外の微生物でも見いだされているが、生理的役割は現在のところ不明である(24, 25)。TAM 4株はglutamyltranspeptidase (GTP)を培養中期から後期にかけて細胞外に多量に分泌する。本酵素はPGAの分解を主たる役割で、栄養分の不足時にGluを供給すると考えられている(1, 13)。GTP生成とPGA生成の時期は一致するが、培養後期に行くにつれPGAは高分子側(分子量, 170万)に収斂することから、IFO 3335株とは異なり分解を防ぐ作用が働いていると想定される。

現在まで、PGAの生成機構に関して、生化学的、つまり、酵素レベルでの研究は行われて来たが解明されず、cell free系でのPGAの生成も不可能である(4, 10, 12, 17)。他方、遺伝子レベルの研究から、PGA生成に関係する遺伝子はかなり明らかになった(7, 3, 18 ~ 21, 26)。しかし、その遺伝子産物(酵素蛋白)が得られていない。今後、PGA生成条件を一層明らかにし、酵素レベルの研究と共にPGA生成機構とその調節を解明したいものである。

< 文 献 >

- 1) ABE, K., Y. ITO, T. OHMACHI and Y. ASADA : Purification and properties of two isozymes of glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* TAM 4. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 : 1621 1625. 1997
- 2) ASHIUCHI, M., K. SODA and H. MISONO : A poly glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* FFO3336 : gene cloning and biochemical analysis of poly glutamate produced by *Escherichia Coli* clone cells. *Biochemi. Biophys. Res. Commun.*, 263 : 6 12. 1999
- 3) ASHIUCHI, M., T. KAMEI, DH. BACK, SY. SHIN, MH. SUNG, K. SODA, T. YAGAI and H. MISONO : Isolation of *Bacillus subtilis*(Chung Kookjang) a polygamma glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 57 : 764 769. 2000.
- 4) BIRRER, G. A., A. CROWMICK. and R. A. GROSS : poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945A : physiological and biochemical studies. *Int. J. Biol. Micromol.*, 16 : 265 275. 1994
- 5) BOVARNICK, M. : The formation of extra cellular (α) glutamic acid poly peptide by *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 145 : 415 424. 1942
- 6) CHUNG, C., Y. ASADA and T. AIDA : Production of poly glutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under donitrifying conditions. *Agric. Biol. Chem.*, 53 : 2369 2375. 1989
- 7) CROMWIEK, A., and R. A. GROSS : Effect of manganese () on *Bacillus licheniformis* ATTC 9945A, physiology and poly (glutamic acid) formation. *Int. J. Biol. Macromol.*, 17 : 259 267. 1995
- 8) 藤井久雄 : 納豆菌による粘物質の生成に関する研究 (第1報), 粘物質生成条件の検討 (その1). 農化, 36 : 1000 1004 . 1962
- 9) 藤井久雄 : 納豆菌による粘物質の生成に関する研究 (第3報), 系引納豆の粘物質について (その1). 農化, 37 : 407 411 . 1963
- 10) GARDNER, J. M. and F. A. TROY : Chemistry and biosynthesis of the poly (α D glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis* : activation, racemization and poly meriation of glutamic acid by a membranous poly glutamate synthetase complex. *J. Biol. chem.*, 254 : 6262 6269. 1979
- 11) GOTO, A., and M. KUNIOKA : Biosynthesis and hydrolysis of poly (α glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 : 1. 31 1035. 1992
- 12) HOUSEWRIGHT, R. D. : The biosynthesis of homopolymeric peptide. I. C. GUNSALUS and R. Y. STANIER (editor) : *The Bacteria*, : pp.389 410. Academic press. New York.
- 13) ITOH, Y., T. TANAKA, T. OHMACHI and Y. ASADA : Glutamic acid independent production of poly (α glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM 4. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60 : 1239 1242. 1996
- 14) IVANOVIVS, G. and L. EROOS : Ein Beitrag zum Wesen der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus. *Z. Immunitätsforsch.*, 90 : 5 19. 1937
- 15) KUBOTA, H. T. MATSUNOBU, K. UOTANI, H. TAKEBE, A. SATOH, T. TANAKA and N. TANIGUCHI : Production of poly (α glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F 2 01. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 : 1212 1213. 1993.
- 16) KUNIOKA, M. and A. GOTO : Biosynthesis of poly (α glutamic acid) from L glutamic acid, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40 : 867 872. 1994
- 17) LEONARD, C. G. and R. D. HOUSEWRIGHT. : Poly glutamic acid synthesis by cell free extracts of *Bacillus licheniformis*. *Biochemi. Biophys. Acta.*, 73 : 530 532. 1963
- 18) MAKINO, S., I. UCHIDA, N. TERAKADO, C. SASAKAWA, and M. YOSHIKAWA : Molecular characterization and protein analysis of the Cap region, which is essential for capsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, 171 : 722 730. 1989
- 19) NAGAI, T. and Y. ITOH : characterization of a generalized transducing phage of poly glutamic acid producing *Bacillus subtilis* and its application for analysis of Tn917 LTV1 insertional mutant defective in poly glutamic acid-production. *appl. Environ. Microbiol.* 63 : 4087 4089. 1997
- 20) NAGAI, T., K. KOGUCHI, and Y. ITOH : Chemical analysis of poly glutamic acid produced by plasmid free *Bacillus subtilis* (natto) : evidence that plasmids are not involved in poly glutamic acid product. *J. Gel. Appl. Microbiol.*, 43 : 139 143. 1997
- 21) NAGAI, T., LSH. TRAN, Y. INATSU, and Y. ITOH : A new IS₄ family insertion sequences, ISO4Bsut, responsible for genetic instability of poly glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacterol.*, 182 : 2387 2392. 2000
- 22) 沢純彦, 村尾沢夫, 大亦正次郎 : ポリグルタミン酸発酵の生成機構に関する, 2 3の知見・農化, 16 : 119 125 . 1967
- 23) 窪田英俊, 南部洋子, 遠藤剛 : 生体触媒により生産されるポリグルタミン酸の性質と高分子反応, *Polym. Prep. Jap.*, 39 : 856. 1990
- 24) TANAKA, T., O. HIRUTA, T. FUTAMURA, K. UOTANI, A. SATOH, M. TANIGUCHI and S. OI : Purification and characterization of poly (α glutamic acid) hydrolase from a filamentous

- Fungus, *Myrothecium* sp. TM 4222. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 : 2148-2153. 1993
- 25) TANAKA, T., T. YAGUCHI, O. HIRUTA, T. FUTAMURA, K. UOTANI, A. SATOH, M. TANIGUCHI and S. OI : Screening for Microorganisms having poly (glutamic acid) endohydrolase by activity and the enzyme production by *Myrothecium* sp. TM 4222. 57 : 1809-1810. 1993
- 26) URUSHIBATA, Y., S. TOKUYAMA, and Y. TAHARA.: characterization of the *Bacillus subtilis* ywsC gene, involved in poly glutamic acid production. *J. Bacteriol.* 184 : 337-343. 2002.
- 27) YAMAGUCHI, F., Y. OGAWA, M. KIKUCHI, K. YUASA, and H. MOTAI : Detection of poly glutamic acid (PGA) by SDS PAGE. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60 : 255-258. 1996
- 28) 八幡一雄, 定延治郎, 遠藤剛 : ポリ グルタミン酸エステルの繊維化, *Polym. Prep. Jap.*, 41 : 1077. 1992
- 29) 八幡一雄, 生分解性の期待されるポリ グルタミン酸エステルの繊維化検討. *Teijn. Technol. Report.*, 4 4pp. 1993.

Effect of Nutrients used in Cultivation on Production of Poly glutamic acid and its Properties with *Bacillus subtilis* TAM 4

Hajime KUMAGAI, Takashi YOSHIDA, Tetuo OHMACI and Yoshihiro ASADA

Institute of Cell Biotechnology

SUMMARY

When *B. subtilis* TAM 4 was grown aerobically in M medium composed of glucose, NH_4Cl , inorganic salts and CaCO_3 , a large amount of poly (glutamic acid) (PGA) was produced. We found that PGA was elongated with no change in the diastereoisomer ratio and in the composition of amino acids in the molecule.

On the other hand, the bacterium was able to produce PGA from citrate, 2 oxoglutarate or malate as a carbon source in P medium which was composed of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, inorganic salts and without CaCO_3 . Although PGA was not produced by using only glucose or L glutamate (L Glu) as a carbon source, the addition of glucose or L Glu to the medium containing organic acids resulted in increasing synergistically in PGA production. D Glu, L Asp and D, L Ala also had a promoting effect. Furthermore, combination of various carbon sources and/or L Glu in media occurred change of ratio of D isomer in PGA and molecular weight of PGA. These results obtained suggested that nutrients used in cultivation regulated the productivity, D/L ratio and molecular weight of PGA in TAM 4 strain.

Bull. Fac. Agric. & Life Sci. Hirosaki Univ. No. 5 : 45-55, 2003