

納豆粘質物成分ポリ- γ -グルタミン酸の新規な機能性

— 2価鉄に起因する細胞障害の防御—

金松澄雄

Novel functionality of poly- γ -glutamic acid in slime from 'natto'
fermented soybeans

— Protection against oxidative damage from Fe^{2+} —

Sumio KANEMATSU

Abstract

The protective effect of poly- γ -glutamic acid (PGA) against oxidative damage derived from ferrous iron (Fe^{2+}) was investigated using a viability test of *Escherichia coli*. To establish the conditions for the viability test, the Fe^{2+} concentration which gives rise to cell death was determined. The critical concentration of Fe^{2+} depended upon the solution in which the cells were suspended. In an LB medium, a mM level of Fe^{2+} was required to bring about cell death, whereas in distilled water a μM level was required. In saline solution, a bactericidal effect was observed at a concentration in the order of mM. Thus, saline solution was employed as the cell dilution solution.

EDTA treatment completely prevented Fe^{2+} -derived cell death, with an equimolar concentration of each chelator and Fe^{2+} of 0.5 mM. DTPA treatment showed a similar effect. The protective effect of the chelators was attributable to the non-availability of Fe^{2+} , which was eliminated through accelerated autoxidation with the chelators.

PGA protected the cells from the bactericidal action of Fe^{2+} . When PGA was added to form a 1:1 complex with Fe^{2+} , cell viability was restored from 30% to 70%. Treatment with glutamic acid showed no effect. These results indicate that PGA has a novel function of protecting cells from Fe^{2+} toxicity.

キーワード: iron toxicity 鉄毒, Fenton reaction フェントン反応, poly- γ -glutamic acid
ポリ- γ -グルタミン酸, *E. coli* viability 大腸菌生存率, novel function 新規機能

要 約

ポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) の 2 価鉄 (Fe^{2+}) による細胞障害に対する抑制効果を、大腸菌の生存率を計測することで検討した。LB 液体培地、蒸留水および生理食塩水で希釈した菌体を用いて、 Fe^{2+} の殺菌効果を検討し

たところ、蒸留水で希釈した大腸菌は 10^{-6} M の Fe^{2+} で生育阻害がみられたが、LB 培地と生理食塩水で希釈した場合は、 10^{-3} M で殺菌効果が認められた。蒸留水を用いた場合、 Fe^{2+} が菌体表面に付着する影響が考えられたので生理食塩水を希釈溶液として用いた。

Fe^{2+} の殺菌作用に対するキレート試薬の影

響を検討した。EDTA, DTPA とともに、加えた Fe^{2+} と当モルの濃度でほぼ完全に殺菌作用を阻害した。このキレート試薬の効果は Fe^{2+} の自動酸化を促進させることにより Fe^{2+} の実効濃度が低下したためと考えられた。

Fe^{2+} の殺菌作用に対する PGA の影響を調べた結果、保護効果が認められた。PGA の鎖長に関係なく、生存率が約30%から約70%へ増加した。単量体のグルタミン酸は生存率に影響しなかった。以上の結果より、PGA は Fe^{2+} による殺菌作用を抑制することが示された。このことは PGA が鉄毒を抑制する機能を有していることを示唆している。

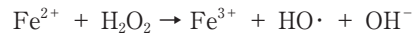
緒 言

納豆はダイズを納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. natto) で発酵させた発酵食品で、栄養価の高い食品として古くから日本人に親しまれている¹⁾。納豆は特に、良質のタンパク質を豊富に含み、また種々の機能性成分を含む²⁾ ことから生活習慣病の一次予防のための食品として注目を集めている。

納豆を特徴付けている粘質物の主成分は、納豆菌が産生するポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) で、天然のナイロン状のポリペプチドである。通常のポリ- α -グルタミン酸は α -ヘリックス構造を取るのに対して、PGA は混在する D 体と L 体のグルタミン酸の γ -カルボキシル基と α -アミノ基がペプチド結合を形成し、ランダムコイル構造をとる³⁾。PGA の α -カルボキシル基は中性 pH で解離し、ポリアニオンになる。このような構造的な特性から、PGA は、保水性や増粘性、親水性、凝集性、生分解性などの特性を持ち、食品や化粧品産業、污水处理、医薬品などの様々な分野で利用されている⁴⁻⁶⁾。食品分野ではカルシウム吸収を促進するサプリメントとしても利用されている²⁾。一方、PGA の生理的機能に関しては、納豆菌の莢膜に存在して、バクテリオファージに対する防御や宿主による免疫機構から逃れる役割を持つことが知ら

れている¹⁾。

我々は金属イオンによる PGA の解重合の研究をおこない、 Fe^{2+} が PGA の鎖切断を引き起こすことを見出した⁷⁾。この機構について検討した結果、PGA が Fe^{2+} に配位して穏やかに Fe^{2+} を空気酸化し、その結果生じる H_2O_2 はフエントン反応 (下式) で



反応性の高い $\text{HO}\cdot$ ラジカルを生成する。次にこの $\text{HO}\cdot$ ラジカルは PGA と反応をすることによって消去され、PGA は鎖の切断が生じるといふ反応モデルを示した (図1)。このモデルは、PGA が Fe^{2+} に配位することによって Fe^{2+} を安全に酸化し、 Fe^{2+} の害作用から細胞を防御する生理作用を有することを示唆している。そこで、今回は大腸菌を用い、*in vivo* で Fe^{2+} の殺菌作用に対する PGA の影響を検討した。その結果、PGA が生存率を増加させることから、PGA は鉄毒を抑制する機能を有していることが示された。

材料と方法

試薬および材料

ポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) は、和光純薬製の PGA150 (平均分子量150-250万) と PGA20 (平均分子量20万-50万) を用いた。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ とジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) は、それぞれ和光純薬とナカライテスクより購入した。大腸菌 XL1-Blue はストラタジーンより得た。超純水はミリポア製の超純水製造装置を用いて製造した。試薬類は全て超純水を用いて調製した。

大腸菌の培養とコロニー数の計測

大腸菌 XL1-Blue のシングルコロニーを 2 ml の LB 培地で、37℃、170rpm で一晩培養後、菌体を LB 培地、超純水または生理食塩水 (0.9 % NaCl) で連続希釈をおこなった。希釈菌体

を1.5%アガー濃度のLB固体培地に100 μ lずつ塗布し、37 $^{\circ}$ Cで16時間培養して出現したコロニー数を計測した。

大腸菌の Fe²⁺処理

100万倍に希釈した菌体1mlに終濃度が0.1 μ M~5mMになるようにFeSO₄を加え攪拌し、室温に10分間放置した後、100 μ lをLB固体培地に塗布し、培養してコロニー数を計測した。

結果と考察

Fe²⁺によるPGA鎖の切断と局所的HO・ラジカル生成・消去モデル

活性酸素(ROS)は酸素と水の間の酸化還元中間体であるスーパーオキシド(O₂^{•-})、過酸化水素(H₂O₂)、ヒドロキシルラジカル(HO[•])と酸素の励起分子である一重項酸素(¹O₂)の4種の分子種を含む⁸⁾。これらの中でHO・ラジカルは最も酸化力が強く、細胞成分を非特異的に酸化することから、ROSによる傷害の作用分子種と考えられている。細胞内ではHO・ラジカルはFe²⁺とH₂O₂によるフェントン反応で生成される⁹⁻¹²⁾。

Fe²⁺によるPGAの鎖切断と局所的HO・ラジカル生成・消去モデルを図1に示す。Fe²⁺

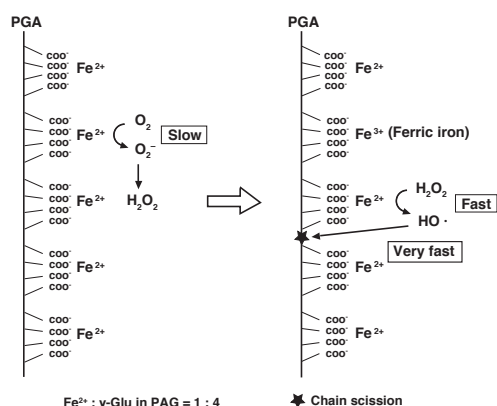


図1 Fe²⁺とPGAによる局所的HOラジカル生成・消去モデル

文献(7)の図9を改変して引用

がPGAに配位すると、Fe²⁺の自動酸化が促進されてH₂O₂が生成し、さらに、H₂O₂は近傍に存在するFe²⁺とのフェントン反応でHO・ラジカルを生成し、これがPGAの鎖切断をおこなう。その結果、HO・ラジカルは標的分子と反応する前に消去される。すなわちPGAは細胞にとって危険な2価鉄を安全な3価鉄に酸化する際、生じる活性酸素をPGA自身が反応することで消去することができ、2価鉄の安全な酸化をおこなうことができる。このモデルからPGAはFe²⁺の害作用から細胞を防御する新規な機能性を有することが示唆される。

Fe²⁺処理大腸菌の生存率に対する菌体希釈溶液の影響

大腸菌の生育に対するFe²⁺の影響を検討し、Fe²⁺処理の最適な濃度を決定した。LB培地で一晚培養した大腸菌XL-1 Blueを新しいLB液体培地で連続的に100万倍に希釈した菌体にFeSO₄を加えて、10分間静置後、LB固体培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C、16時間後の出現したコロニー数を計測した(図2)。Fe²⁺濃度が2mMで生存率が約50%、5mMで10%に減少した。

Fe²⁺はリガンドと配位すると速やかな自動酸化が生じる⁷⁾ことから、希釈溶液として用いたLB培地中にはFe²⁺のリガンドになりうる物質が存在し、Fe²⁺の実効濃度を低下させた可能性がある、そこで、蒸留水を希釈溶液として用いた結果、0.1 μ M Fe²⁺で生存率は20%になり、LB培地の場合の1万分の1の濃度で細胞障害が生じた。

低濃度のFe²⁺で致死効果が見られた理由として菌体表面へのFe²⁺の結合が考えられる。この場合は菌体の近傍でFe²⁺が酸化されO₂^{•-}が発生し、このO₂^{•-}の不均化反応でH₂O₂が生じ、さらにフェントン反応によりHO・ラジカルが生じ、細胞障害を引き起こしたと考えられる。イオン強度を高めてFe²⁺の菌体への直接的な結合を防ぐために、生理食塩水を希釈溶液に用いた。生理食塩水(0.9w/v% NaCl)

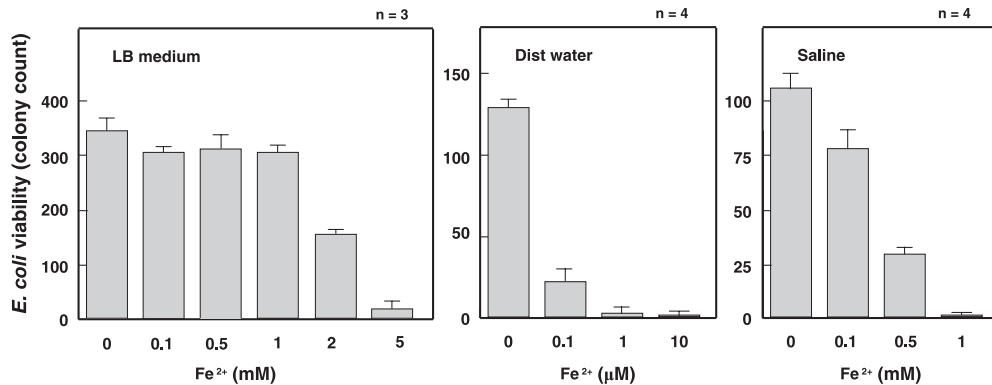


図2 大腸菌の Fe^{2+} 処理における反応液の影響

一夜培養した大腸菌をそれぞれ LB 液体培地 (左図), 蒸留水 (中央図), 生理食塩水 (右図) で連続的に 100 万倍に希釈した大腸菌懸濁液へ Fe^{2+} を加えて室温で 10 分間反応させ, コロニーカウント法で生存率を計測した。

で希釈した菌体を用いた場合, Fe^{2+} の効果は 0.5mM で生存率は約 40%, 1 mM 以上の濃度ではほぼ 0% となった。低濃度の Fe^{2+} は生存率に影響を与えないことから, イオン強度の増加により, Fe^{2+} と菌体との非特異的な結合がなくなり, 菌体近傍での HO・ラジカル生成が無くなったことによると考えられる。これらの結果より, PAG の影響を検討する *in vivo* 実験では, 生理食塩水で希釈した菌体を用いることとした。

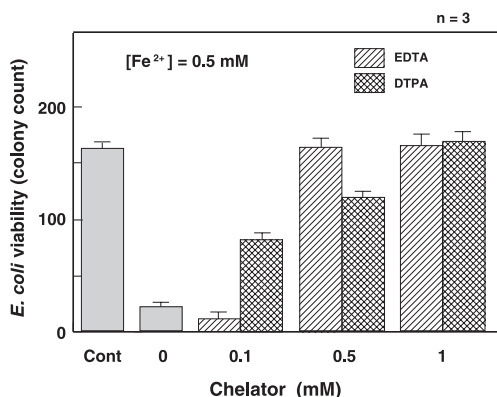


図3 Fe^{2+} の殺菌作用に対するキレート試薬の影響
生理食塩水で連続的に 100 万倍に希釈した大腸菌懸濁液に EDTA または DTPA を加え, 攪拌後, 0.5mM になるように Fe^{2+} を加えた。室温で 10 分間反応させ, 生存率を測定した。EDTA と DTPA そのものは大腸菌の生育に影響を与えなかった (データ未表示)。

Fe^{2+} 処理大腸菌の生存率に対するキレート試薬の影響

大腸菌に対する 0.5mM Fe^{2+} の殺菌効果はキレート試薬である EDTA および DTPA によって阻害された (図 3)。阻害の程度はキレート試薬の濃度に依存し, EDTA の場合, 処理に用いた 0.5mM Fe^{2+} と当モルの EDTA で完全に阻害された。ところで, Fe^{2+} -EDTA 錯体はフェントン反応で HO・ラジカルを発生することが知られている。しかしながら, 大腸菌と Fe^{2+} の系に EDTA を加えても大腸菌の致死効果が見られず, 逆に保護効果がみられることは興味深い。EDTA と Fe^{2+} イオンは 1:1 型のキレート化合物を作り, Fe^{2+} -EDTA 錯体の状態では Fe^{2+} の急速な自動酸化が生じる⁷⁾。したがって, Fe^{2+} と EDTA が当モル存在すれば遊離の Fe^{2+} イオンは無くなり, フェントン反応は生じず, Fe^{2+} の致死作用はなくなると考えられる。DTPA も EDTA と同様に保護効果がみられたが, 濃度依存性が EDTA と異なり, Fe^{2+} の 2 倍量ではほぼ完全に阻害した。

Fe^{2+} の殺菌作用に対する PGA の保護効果

Fe^{2+} の微生物に対する殺菌効果¹³⁾ はよく知られており, 殺菌機構はフェントン反応で生じた HO・ラジカルが細菌に致死作用をもたら

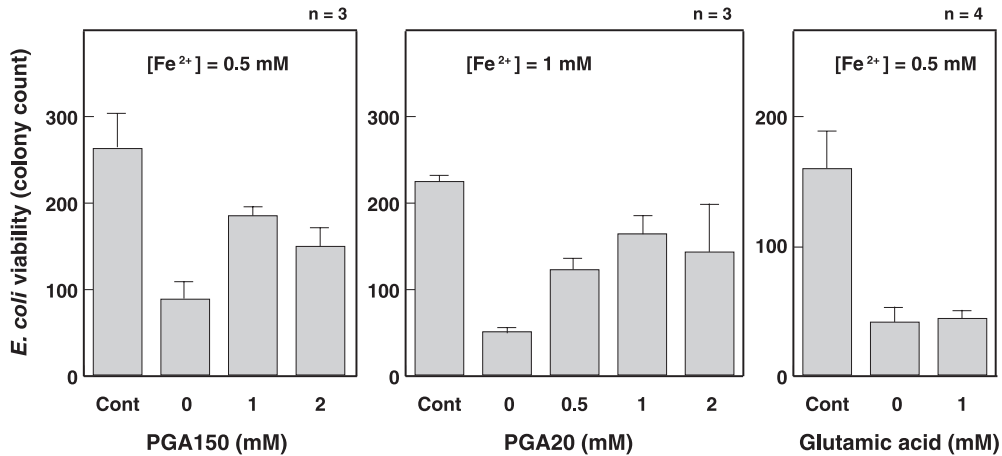


図4 Fe²⁺の殺菌作用に対するPGAの保護効果

生理食塩水で連続的に100万倍に希釈した大腸菌懸濁液にPGA（左図、中央図）またはグルタミン酸（右図）を加え、攪拌後、0.5mMまたは1mMになるようにFe²⁺を加えた。室温で10分間反応させ、生存率を測定した。PGA そのものは大腸菌の生育に影響を与えなかった（データ未表示）。PGAの濃度はPGA中の γ -グルタミン酸残基のモル濃度で表している。

すと考えられる。大腸菌を用いてFe²⁺の殺菌効果に対するPGAの保護効果を検討した結果を図4に示す。大腸菌を0.5mM Fe²⁺と10分間反応させ、LB寒天培地で16時間培養後の存在率は約30%であったが、1mM PGA150を添加すると70%に回復することから、PGAには保護効果があることが示された（図4左パネル）。2mMでの保護効果は1mMよりは少なかった。

次に、より重合数の少ないPGA20の効果を検討したところ、PGA150と同様な保護効果が示された（図4中央パネル）。1mM Fe²⁺存在下では、1mM PGAまで保護効果が増加し、その後2mMでは減少した。

PGAは γ グルタミン酸の重合体であるので、単量体のグルタミン酸の効果を検討した（図4右パネル）。その結果、0.5mM Fe²⁺存在下での大腸菌の生存率には影響を与えなかった。このことから、PGAの保護作用にはPGAとしてのポリマー構造が重要な働きをしていることが示された。

1原子のFe²⁺はPGA中の4分子のグルタミン酸残基の α -カルボキシル基に配位することが示されている⁷⁾。したがって、2mM PGA150

は0.5mM Fe²⁺と1:1の錯体をつくり、遊離のFe²⁺イオンはほぼ存在しないと考えられる。このことから、PGAはFe²⁺をトラップし、大腸菌近傍でのFe²⁺濃度を下げ、フェントン反応によるHO・ラジカルの生成を阻害することによって保護効果を有すると考えられる。トラップされたFe²⁺はゆっくりと自動酸化してFe³⁺になり、その結果生じたH₂O₂はフェントン反応で速やかにHO・ラジカルを発生させ、これが近傍のPGAから水素の抜き取り反応をおこない、HO・ラジカルを消去する。その結果、PGA鎖の断片化が生じる。結果としてPGAは反応性の高いHO・ラジカルをPGA以外の標的分子と反応させず、安全に消去していることになり、Fe²⁺に起因する細胞障害を防ぐ機能を有すると考えられる。

参考文献

- 1) 木村啓太郎 (2007) 「納豆菌の粘質物生産機構」食糧：その科学と技術 45：61-76.
- 2) 谷本浩之・野沢浩子・岡田享子・宮野玲子・秀崎百恵・常松基子・伊藤和子 (2003) 「ポリグルタミン酸配合カルシウムサプリメントのヒ

- トカルシウム吸収促進効果」日本農芸化学会誌 77: 504-507.
- 3) Ho, G.-H., Ho, T.-I., Hsieh, K.-H., Su, Y.-C., Lin, P.-Y., Yang, J., Yang, K.-H. and Yang S.-C. (2006) γ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural characteristics, chemical properties and biological functionalities. *J. Chinese Chem. Soc.* 53: 1363-1384.
- 4) Bajaj, I. and Singhai, R. (2011) Poly (glutamic acid)-An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technol.* 102: 5551-5561.
- 5) Shih, I. L., Van, Y. T. and Shen, M. H. (2004) Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly (glutamic acid) and poly (lysine). *Mini Rev. Med. Chem.* 4: 179-188.
- 6) Melancon, M. P., Wang, W., Wang, Y., Shao, R., Ji, X., Gelovani, J. G. and Li, C. (2007) A novel method for imaging in vivo degradation of poly (L-glutamic acid), a biodegradable drug carrier. *Pharm. Res.* 24: 1217-1224.
- 7) 金松澄雄・小西章尋 (2014) 「 Fe^{2+} によるポリ- γ -グルタミン酸の解重合機構」南九州大学研報 44A: 51-60.
- 8) 浅田浩二 (1976) 「酸素毒性」生化学 48: 226-257.
- 9) Fenton, H. J. H. (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65: 899-910.
- 10) Prousek, J. (2007) Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* 79: 2325-2338.
- 11) Barbusinski, K. (2009) Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng. S16*: 347-358.
- 12) Enami, S., Sakamoto, Y. and Colussi, A. J. (2013) Fenton chemistry at aqueous interfaces. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1314885111.
- 13) 村田晃・日高敏勝・神田康三・加藤富民雄 (2008) 「2価鉄の殺菌作用と作用機構」佐賀大農彙 93: 141-155.