

# ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸 (PGA) リン酸化誘導体による 胆汁酸吸着能の評価

苔庵泰志\*, 乾 良充\*, 佐合 徹\*

## Evaluation of the Bile Acid-Binding Ability for Phosphorylated Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid (PGA) Derivatives

Yasushi KOKEAN, Yoshimitsu INUI and Toru SAGO

Poly- $\gamma$ -glutamic acid (PGA), a native polymer produced by *Bacillus subtilis* (*natto*), has various sorption properties of metal ions and is expected to exhibit binding ability by combining other polymers. Thus, we investigated bile acid-binding ability of the PGA and phosphorylated PGA derivatives (Pi-PGAs). Relationship among bile acid-binding ability of Pi-PGAs, the degree of phosphorylation (DP), which is defined by the ratio, Pi-mol/Glutamate-mol, and a three-dimensional structure of the Pi-PGA molecule was evaluated. The Cholic acid (CA), taurocholic acid (TCA) and chenodeoxycholic acid (ChCA) as bile acids were used. At Pi-PGA with low DP, the three-dimensional structure of PGA was changed by phosphorylation. It was found from the observation on circular dichroism (CD) spectra that the  $\alpha$ -helix concerning to flexibility decreased and that the  $\beta$ -sheet concerning to rigidity increased. On the other hand, Pi-PGA with high DP contained high  $\alpha$ -helix but did not contain the  $\beta$ -sheet. The binding ability of Pi-PGAs to CA did not show remarkable increase in comparison with that of PGA, however those of Pi-PGAs to ChCA and TCA were increased by the phosphorylation of PGA. The results suggested that bile acid-binding ability of Pi-PGAs depended upon the DP and the three-dimensional structure of Pi-PGA molecule.

Key words: Phosphorylated Derivatives, Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid, Bile Acid, Binding Ability

### 1. はじめに

保水材や増粘剤として食品や工業的に用いられている PGA (ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸) は、主に納豆菌 (*Bacillus subtilis* (*natto*)) を用いて生産されている。この PGA は精製した後に、目的とする修飾剤を添加して化学修飾が行われて誘導体化され、吸着材等の用途で用いられている。一方、PGA の新しい用途として、排水や溶液中での金属イオンの吸着や<sup>1)</sup>、他の高分子材料と複合化<sup>2)</sup>することにより、新たな

ゲル化特性を有する素材開発も検討されている。当研究課では、納豆菌の培養中での化学修飾 (リン酸化) により、PGA リン酸化誘導体 (Pi-PGA) を、精製する必要がないという意味で簡易に調製する方法を開発した<sup>3)</sup>。これまでに調製した Pi-PGA の中では、メタリン酸ナトリウム及びメタリン酸カリウムを修飾剤としてリン酸化すると、その粘度が低くタンパク質の 2 次構造として $\beta$ -シート構造を取ることが分かった<sup>4)</sup>。トリポリリン酸ナトリウム及びテトラポリリン酸ナトリウムを用いた Pi-PGA は、リン酸化後に加熱することにより、分子内での架橋及び

\* 食と医薬品研究課

凝集が起こり、分子の表面疎水度が変化することが分かっている<sup>5)</sup>。また、納豆菌培養液へのリン酸の添加濃度の違いにより、分子構造の変化を示唆する粘度変化が認められている<sup>5)</sup>。タンパク質の折りたたみ（アンフォールディング）は、その物質の粘度と密接な関係にある<sup>6)</sup>。リン酸基のPGA分子内への導入及び加熱による分子の凝集は、タンパク質の高次構造に影響を与え表面疎水度の変化につながり<sup>7)</sup>、疎水性物質の吸着に影響を与える可能性がある。

食事由来のコレステロールは、栄養成分として必要な物質であるが、過剰摂取すると生体内に蓄積され、動脈硬化の原因物質となる。このコレステロールは消化管内ではそのままでは輸送・吸収されず、胆汁酸（コール酸、タウロコール酸）と結合し、胆汁酸ミセルとして輸送・吸収される<sup>8,9)</sup>。従って、胆汁酸を除去すればコレステロールとのミセル形成を抑制し、食事によるコレステロール吸収を阻害できる可能性がある。そこで本研究では、食事によるコレステロール吸収を阻害できる素材の開発を目的として、リン酸化度の異なるPi-PGAの胆汁酸吸着能について検討した結果を報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

リン酸化試薬は、太平化学産業製の食品添加物用ピロリン酸ナトリウム（以下2Pi-Naと略す）、トリポリリン酸ナトリウム（以下3Pi-Naと略す）及びテトラポリリン酸ナトリウム（以下4Pi-Naと略す）を用いた。納豆菌由来のPGA及びPi-PGAは、Kuritaらの方法<sup>3)</sup>に従い納豆菌培養液から調製し、凍結乾燥粉末とした。培地中へのリン酸塩の添加濃度が0.5%(w/v)で、リン酸塩として2Pi-Na、3Pi-Na及び4Pi-Naを添加し調製した試料を2Pi-PGA(0.5%)、3Pi-PGA(0.5%)及び4Pi-PGA(0.5%)、4Pi-Naを1.0%(w/v)添加し調製した試料を4Pi-PGA(1.0%)とした。

### 2.2 粘度の測定

試料を10 mg/mLとなるように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。試料0.58 mLを用い、60 mm コーンプレート(角度2°)により、測定温度5 °C、せん断速度0.1 1/sにて粘度を測定した。

### 2.3 リン酸化度の定量

試料中のリンの定量は、Kuritaらの方法<sup>5)</sup>に準じて測定した。試料中のアミノ酸含量は、以下の方法で分析した。試料を6 N塩酸で110 °C、24時間加水分解し、得られた加水分解物をポストカラム法により分析した<sup>6)</sup>(HPLC:島津製作所製LC-20AB, アミノ酸分析カラム:Shim-Pack Amino-Na(100 mm L.×6.0 mm I.D.))。試料に含まれるリン含量、グルタミン酸含量から、試料中のグルタミン酸1 mol当りに結合したリンのmol数(Pi-mol/Glutamate-mol)として、リン酸化度を算出した。

### 2.4 胆汁酸吸着試験

胆汁酸の吸着検討は、松本ら<sup>10)</sup>の方法に準じて評価した。胆汁酸としてコール酸、ケノデオキシコール酸(以上SIGMA)及びタウロコール酸ナトリウム(和光純薬)を用いた。コール酸とタウロコール酸は200 mM、ケノデオキシコール酸は100 mMとなるようにDMSO(dimethyl sulfoxide)に溶解し、phosphate buffer saline(PBS, ナカライ)で4 mMに希釈したものを胆汁酸溶液とした。PGA及びPGAリン酸化誘導体を1%(w/w)となるように胆汁酸溶液に懸濁し、室温にて10分間攪拌し保った後、15,000 rpmで10分間遠心分離し、胆汁酸測定キット(総胆汁酸ワコー, 和光純薬)を用いて上清の胆汁酸量を測定した。

### 2.5 高次構造の解析

凍結乾燥試料を1 mg/mLとなるように25 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、光路長1 mmの角形キュベットに入れ、測定温度25 °Cで、円二色分散計(CD: Circular Dichroism J-820, 日本分光(株)製)を用いて、紫外外部領域でのCDスペクトルパターン及びCD強度を測定した。これら測定値により、標準となる $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、 $\beta$ -ターン及びランダムコイルの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. 結果と考察

はじめに、PGAのリン酸化に用いた試薬及びPi-PGAの粘度、リン酸化度を表1に示す。粘度はリン酸化度が一定値までは大きくなり、その後低下した。この傾向は、我々のこれまでの結果と同様であった<sup>3)</sup>。

表 1 PGA 及び PGA リン酸化誘導体のリン酸化度及び粘度

試料	リン酸化試薬	リン酸化試薬 添加濃度(%(w/v))	粘度 (Pa · s)	リン酸化度 (Pi-mol/Glutamate-mol)
PGA	無し	-	0.59	0.14
2Pi-PGA(0.5%)	2Pi-Na	0.5	4.52	0.21
3Pi-PGA(0.5%)	3Pi-Na	0.5	5.23	0.65
4Pi-PGA(0.5%)	4Pi-Na	0.5	2.23	1.20
4Pi-PGA(1.0%)	4Pi-Na	1.0	0.02	5.76

PGA:Poly- $\gamma$ -glutamic acid Pi-PGA:PGA リン酸化誘導体

粘度測定条件：試料濃度 10 mg/ml in 25 mM リン酸緩衝液(pH6.0), せん断速度：0.1 (1/s), 5 °C

各胆汁酸の PGA 及び Pi-PGA への吸着について図 1 に示す。コール酸 (図 1a) では, PGA と各 Pi-PGA との吸着率の差は小さかった。ケノデオキシコール酸 (図 1b) では, Pi-PGA のうち 4Pi-PGA(0.5%) 及び 4Pi-PGA(1.0%) の吸着率は, PGA より大きかった。タウロコール酸 (図 1c) については, リン酸化度の低い Pi-PGA は PGA より吸着率が小さく, リン酸化度が大きくなるほど吸着率が大きくなり, 4Pi-PGA(1.0%) では, 吸着率は PGA より大きくなった。ここで, ヒトの胆汁酸には様々な分子種が含まれているが, 中でもコール酸, ケノデオキシコール酸は一次胆汁酸としてコレステロールから肝臓で生合成され, その後タウリンと結合して抱合胆汁酸であるタウロコール酸として肝臓に貯蔵されたのち, 腸肝循環に使われる<sup>11)</sup>。従って, 「胆汁酸を Pi-PGA に吸着することで, 食事からのコレステロール吸収を阻害する」との本研究の目的に照らせば, タウロコール酸次いでコール酸及びケノデオキシコール酸の吸着性能の高いことが求められる。リン酸化に関しては, 4Pi-PGA(1.0%) がタウロコール酸の吸着率を 10% 程度高めることが明らかとなり, 一定の効果が示せた。しかしながら, PGA 及び Pi-PGA はいずれの酸に対しても 20~30% の吸着率となり, 期待された結果は得られなかった。

図 2 に CD による吸収スペクトルを示す。リン酸化により PGA が元々有していた高次構造が以下のように変化した。リン酸化試薬 0.5% 添加による Pi-PGA は, 柔軟構造である  $\alpha$ -ヘリックスの割合が減り, 剛直構造である  $\beta$ -シートの割合が多くなった。4Pi-Na(1.0%) では分子の高次構造の大きな変化が認められ,  $\beta$ -シート構造はほぼ検出されなくなると共に  $\alpha$ -ヘリックスが多くなった。疎水度の高い物質

の PGA 及び Pi-PGA への吸着事例として, クロロフォルム可溶化リボフラビン酪酸エステルが, 化学修飾前の PGA よりも Pi-PGA の方がより吸着率が大きいことを報告している<sup>3)</sup>。前述のとおり, 各 Pi-PGA の高次構造はリン酸化により変化することが明らかとなった。このため, リン酸化により分子の高次構造の変化に伴い表面疎水度も変化していることが示唆され, 吸着率にも影響を与えたと考えられる。リン酸化度が一定の大きさまでは粘度が大きくなり, その後減少しており, この傾向は, 我々のこれまでの研究<sup>3)</sup>と一致した。このため, リン酸化度-高次構造変化-粘度が相互に影響していると考えられることから, 粘度が, 吸着率変化の指標となる可能性も示唆されるが, 本研究では詳細は明らかにできなかった。

各胆汁酸での吸着率の違いは, ケノデオキシコール酸ではコール酸に比べて分子内に水酸基が 1 つ少なく, またタウロコール酸ではコール酸のカルボキシル基がアミノ酸であるタウリンのアミノ基と結合してアミド化している等, 分子の特性の違いが影響していると思われる。各胆汁酸と PGA 及び Pi-PGA の結合の違いを明らかにするためには, 今後詳細な検討が必要と思われる。

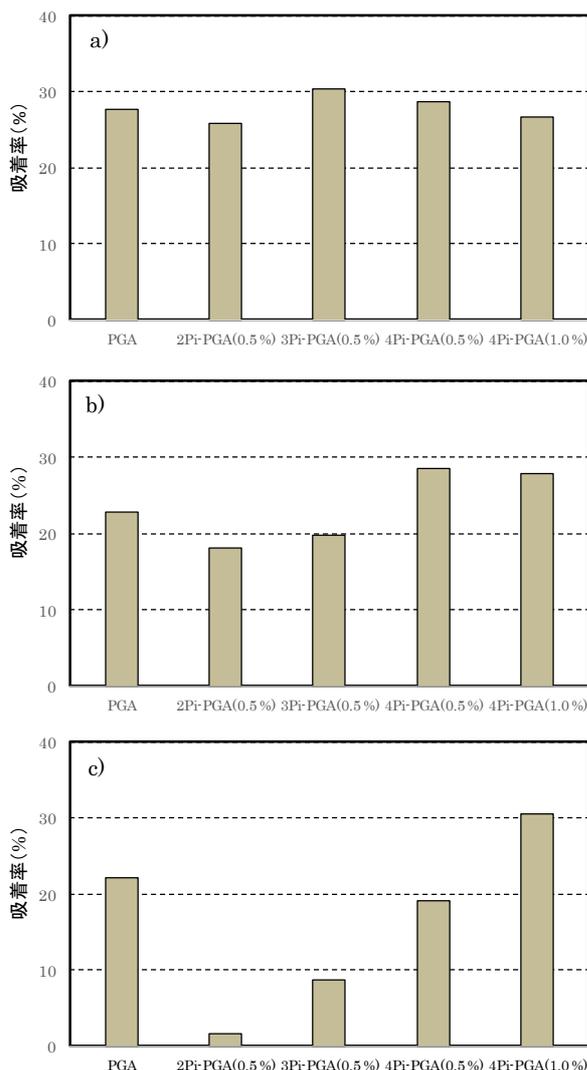


図1 PGA及びPGAリン酸化誘導体の胆汁酸吸着率

a) コール酸 b) ケノデオキシコール酸  
c) タウロコール酸

PGA: Poly- $\gamma$ -glutamic acid

Pi-PGA: PGA リン酸化誘導体

各胆汁酸濃度: 4 mM in PBS( phosphate buffer saline)

PGA及びPi-PGA: 1%(w/v)となるように胆汁酸溶液に懸濁

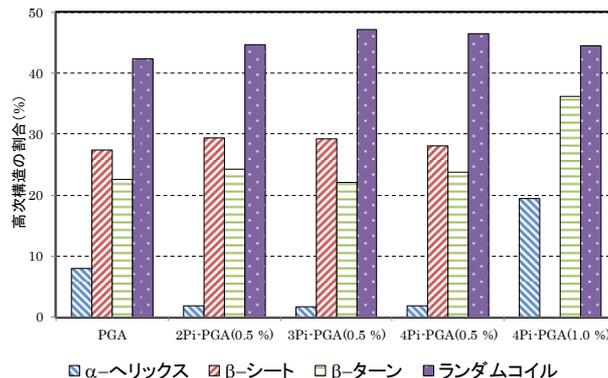


図2 CDによるPGA及びPGAリン酸化誘導体の分子構造解析

#### 4. まとめ

生体内で脂質の運搬吸収に重要な役割を果たす、胆汁酸のPGA及びPi-PGAへの吸着能についてリン酸化度、分子の高次構造との関連性を踏まえて評価した。胆汁酸は、コール酸、ケノデオキシコール酸及びタウロコール酸の3種類を用いた。CDスペクトルの結果から、リン酸化に伴いPi-PGAでは分子高次構造の変化が認められた。リン酸化によるCDスペクトル変化が大きかった4Pi-PGA(1.0%)は、分子構造の大きな変化が示唆された。吸着率は、コール酸では、PGA及び各Pi-PGAの間で大きな差は認められなかったが、ケノデオキシコール酸では、4Pi-PGA添加Pi-PGAでPGAより吸着率が大きくなった。タウロコール酸は、リン酸化度が大きくなるほど吸着率が大きくなり、4Pi-PGA(1.0%)の吸着率では、PGAより大きくなった。このように、Pi-PGAと胆汁酸の吸着率はリン酸化度の違い及びそれに伴う分子立体構造の変化に影響を受けることが示唆される結果となったが、各種胆汁酸への吸着の機作の違いも含めて詳細は不明である。

#### 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。三重大学大学院生物資源学研究科の三島隆准教授に感謝いたします。

#### 参考文献

- 田島武治ほか：“ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸のファイバーによる金属イオンの吸着特性”。繊維学会誌, 67(12), p266-272 (2011)
- 杉山信之ほか：“機能性ポリペプチド材料の開

- 発” . 愛知産業技術研究所研究報告, 4, p150-153(2005)
- 3) 佐合 徹ほか: “ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸のリン酸誘導体及びその製造方法”. 特開 2018-95601 号, (2018)
- 4) O.Kurita et al.: “Feasible protein aggregation of phosphorylated poly- $\gamma$ -glutamic acid derivative from *Bacillus subtilis (natto)*”. Int. J. Biological Macromolecules., 103, p484-492 (2017)
- 5) O.Kurita et al.: “Regulatory phosphorylation of poly- $\gamma$ -glutamic acid with phosphate salts in the culture of *Bacillus subtilis (natto)*”. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34(4), 60 (2018)
- 6) H. Frauenfelder, P.W., et al. : “Protein folding is slaved to solvent motions”. PNAS, 103, p15469-15472(2006)
- 7) H. Blanch : “The kinetic s of aggregation of poly-glutamic acid based polypeptides”. Biophys. Chem., 136, p74-86(2008)
- 8) 長岡 利: “大豆由来新規オリゴペプチドのコレステロール代謝改善作用”. 大豆タンパク質研究, 16, p53-56 (2013)
- 9) 本多裕之: “短鎖ペプチドの新機能発現に関する研究”. 生物工学会誌, 95, p64-70 (2017)
- 10) 松本健司ほか: “柿未成熟果実由来食物繊維の胆汁酸吸着能に対する加熱の影響とパン素材への応用”. 日本食品化学工学会誌, 61, p543-547 (2014)
- 11) 石塚 敏: “胆汁酸分子種の多様性 構造・代謝と生理作用”. 化学と生物, 52(5), p301-306(2014)
- (本研究は, 法人県民税の超過課税を財源としています. )