

耐塩性グルタミナーゼに対するリン酸イオンの阻害

日大生産工 ○大橋 颯斗 日大生産工 吉宗 一晃

【緒言】

グルタミナーゼは醤油の旨味成分であるグルタミン酸を生産する加水分解酵素であり、食品加工、醸造において非常に重要な役割を担っている。しかし、醤油醸造のような高濃度食塩存在下では、一般的に使用されている麹菌由来グルタミナーゼは失活してしまう。これにより、原料である大豆タンパク質から生産されたグルタミンはグルタミナーゼと反応できず長時間放置されることになる。その結果、グルタミンは非酵素的反応により環化し、無味または微酸味を伴うピログルタミン酸になってしまう。そのため、産業的にも耐塩性を有する酵素は非常に有用だといえる。

Micrococcus luteus K-3 株由来グルタミナーゼ(Mglu)は耐塩性を有する酵素である。

Mglu は食塩感受性の枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来酵素(Bglu)とアミノ酸レベルで 36%の相同性を有しており、活性残基は保存されているにもかかわらず、高濃度食塩存在下の環境でも失活しないことが知られている。

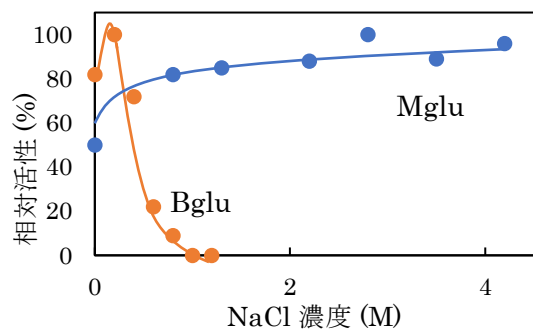


Fig. 1 食塩中でのMglu, Bgluの相対活性
塩濃度の上昇によるMglu, Bgluの活性変化を示している。

Bgluは塩濃度の上昇とともに失活する。しかし、耐塩性を有するMgluは塩濃度が上昇しても活性を維持する性質を有している。

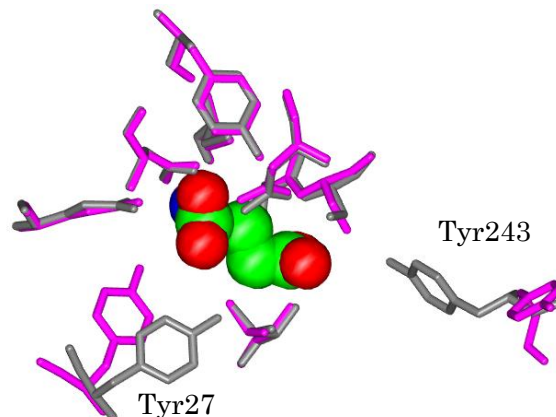


Fig. 2 Mgluの活性中心とグルタミン酸の複合体
グレーが食塩非存在下、マゼンタが食塩存在下の活性中心構造を示している。

また、Fig. 2に示したように塩存在下の環境でMgluは活性中心のTyr27, 243残基が大きく構造変化を起こすことが確認できていることから、この構造変化がMgluの耐塩化機構に係っている可能性が考えられている。

さらに、Mgluはリン酸イオン存在下で活性を失い、その耐塩性も低下することが分かっている。Fig. 3はリン酸イオン存在下で塩濃度を上昇させた時のMgluの比活性を表している。

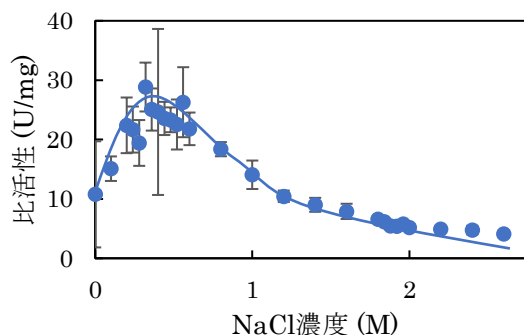


Fig. 3 リン酸緩衝液中でのMgluの耐塩性

Mglu は塩濃度がおよそ 0.4 M で最大の比

Inhibitory effect of inorganic phosphate on the activity of salt-tolerant glutaminase

Hayato OHASHI and Kazuaki YOSHIMUNE

活性をとり、その後は徐々に活性が低下していく。このことから、リン酸イオン有無での Mglu の性質を明らかにすることで耐塩化機構についての知見が得られる可能性が考えられた。

本報告ではグルタミンのアナログで、グルタミンを基質とする酵素を不可逆的に阻害する 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) 使用し、Mglu のリン酸イオン有無での機構について調査した。

【実験方法, 結果】

最初にリン酸イオンの Mglu に対する阻害形式を Lineweaver-Burk plot と Dixon plot により確認した。しかし、結果からは阻害形式を決定することができず、Mglu がリン酸イオン存在下で二相性をとっている可能性があげられた。そこで DON を用いた実験を行った²⁾。

緩衝液に Tris-HCl および KPB(共に pH7.5)を使用し、Mglu と DON を 30 °C で反応させた。Mglu-DON 溶液の組成は下の Table 1 に記載する。

Table 1

100 mM Tris-HCl or KPB pH7.5
Mglu 0.42 μg
1 mM DON

上記の DON 濃度を変えることで、各濃度での Mglu の残存活性を測定した。反応時間は、DON を入れた時点を反応の起点として 5, 10, 20 分後とした。

活性測定は、DON 処理後の Mglu とグルタミンを 100 mM Tris-HCl 中で 30 °C で 10 分間反応させ、生成したグルタミン酸をグルタミン酸脱水素存在下で NAD と 30 °C で反応させた。60 分間反応後、生成した NADH の吸光度を測定波長 340 nm で用いて測定した。

緩衝液に Tris-HCl を使用した場合、DON による影響を顕著に確認することができた。この結果を下の Fig. 3 に示した。

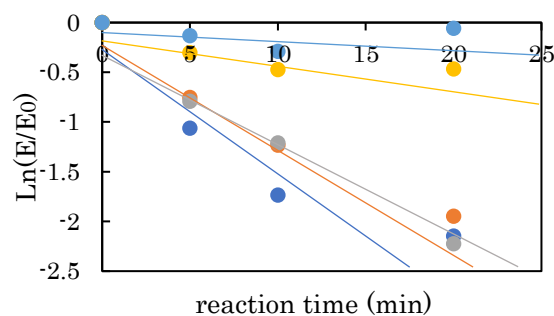


Fig. 3 Tris 緩衝液中での DON による阻害
DON 濃度 (mM)

●=1.0, ●=0.75, ●=0.50, ●=0.25, ●=0.10

E は DON 存在下における時間 t の残留活性であり、E₀ は t=0 における初期活性である。

これにより、DON が Mglu の活性中心と時間および濃度に応じて反応することで不活性化していることが確認できた。

次に緩衝液にリン酸イオンを含む KPB を使用した結果を Fig. 4 に示した。

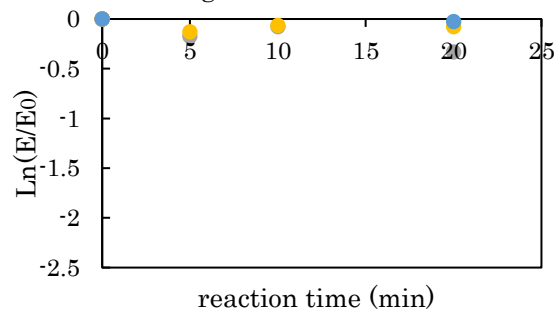


Fig. 4 リン酸緩衝液中での DON による阻害

上記の結果から DON による影響を確認することができなかった。このことから、緩衝液にリン酸イオンを含むことで Mglu の活性中心構造が変化していることが予想された。

【まとめ】

阻害剤に DON を使用したことで、Mglu がリン酸イオンにより構造変化を起こしている可能性を見出した。これにより、基質が活性中心に入り込めず失活を引き起こしていると考えられる。

今後は、KPB 中で Mglu の結晶化を行い、立体構造解析により Mglu に対するリン酸イオンの影響を確認する。

【参考文献】

- 1) Greg Brown, *et al.*, *Biochem.* 2008, 47, 5725-5735.
- 2) Shigekazu Yano, *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, 102, 4, 362-364.