

耐塩性グルタミナーゼの C 末端ドメインの機能解析

日大生産工(院) ○堀田 秀寿 吉宗 一晃

1. 緒言

グルタミナーゼは、L-グルタミンを旨味成分であるL-グルタミン酸へ加水分解する反応を触媒するため、旨味を増加させる。そのためグルタミナーゼは、醤油の発酵などの食品加工産業において重要な役割をはたしている。醤油の発酵では雑菌の増殖を防ぐ目的で高濃度の食塩を添加する。一般的な酵素は高塩濃度環境に晒されることによって活性が急激に低下あるいは失活してしまうことが知られている¹⁾。これによりグルタミンは非酵素的反応により、旨味成分でないピログルタミン酸へと変換されてしまうことから高塩濃度環境下でも活性を有する耐塩性酵素が必要とされている。しかし、耐塩性酵素の構造及び結晶構造は報告されている情報が少なく、その耐塩化機構の詳細は明らかになっていない。

耐塩性を有する酵素として *Micrococcus luteus* K-3 株由来グルタミナーゼ(Mglu)が知られている。Mgluは食塩感受性酵素である *Bacillus subtilis* 由来酵素(Bglu)と構造を比較すると、アミノ酸配列は約30%の相同性を有しており、どちらの酵素もN末端ドメインに活性部位を有している²⁾。その一方でMgluにはN末端ドメインに加えてC末端ドメインを有しているが、その役割は解明されていない。この構造の違いによりBgluは塩濃度が上昇していくにつれて、失活してしまうが、Mgluは塩濃度が上昇しても高い活性を維持することができていると考えられる。

Mgluには27番目のTyr(Y27)を含むlid領域と呼ばれる活性中心付近の領域(26~29アミノ酸残基)が存在している。Y27はリガンドの非存在下では活性中心から離れており、活性部位が開いた状態となっているが、小さな構造変化によりL-グルタミン酸と相互作用する³⁾。

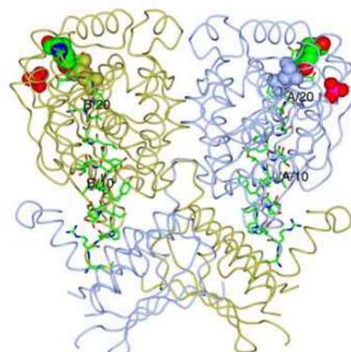


Fig. 1 Mgluの活性中心とグルタミン酸(青と黄色の球体)及びリン酸イオン(赤い球体)の結合位置

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。これは活性部位付近に遊離のリン酸イオンが結合することによってC末端ドメインの350~360番目のアミノ酸配列とサブユニットとの距離が近くなり、静電反発が起こることにより活性中心と蓋の空間が狭くなることで開閉運動が抑制されるためだと考えられる(Fig. 1)。このことからlid領域の開閉運動による小さい構造の変化が与える耐塩性への影響を調べる。

活性中心付近に存在するY27はlid領域を構成しているアミノ酸残基内で最も大きな構造変化を示している。Y27はC末端ドメインとつながっているためC末端ドメインの構造変化による影響を受け、lid領域の開閉運動を抑制している可能性がある。Tyrはベンゼン環にヒドロキシ基が結合しているためC末端ドメインの構造変化により、活性中心をより圧迫することで活性を制御している可能性もある。そのためY27をPheに置換することでY27の役割を解明する必要がある。

PheとTyrの構造と比較すると、Pheはベンゼン環にヒドロキシ基が結合していないため、TyrをPheに置換することでlid領域と活性中心付近の空間がより大きくなる。これにより、蓋の開閉運動が抑制されにくくなると考えられる。

TyrをPheに置換した変異型酵素は KOD-Plus- Mutagenesis Kitによって部位特異的変導入により作成する。

KOD-Plus-Mutagenesis Kitはプラスミド DNAを鋳型に変異を導入したプライマーを用いてPCRを行い、遺伝子を増幅させる。PCR産物に制限酵素Dpn Iを加え、メチル化した鋳型プラスミドを切断する。Dpn Iは認識サイト(GATC)中のアデニンがメチル化したときのみ切断する。PCR産物はメチル化されていないため切断はされない。Dpn I 処理済みPCR産物をself-ligation することにより直鎖状プラスミドを環状化し、大腸菌に形質転換することで部位特異的変異導入を行うことができる。

Mgluの精製はイオン交換クロマトグラフィーにより行った。陰イオン交換クロマトグラフィーは固定相にプラスの電荷のイオン交換基が修飾された充填剤に溶離液を連続的に流すことで溶液中の陰イオンが固定相のイオン交換基でイオン結合し、吸着と脱離を繰り返し平衡状態となる。この状態で試料をカラムに導入しイオン交換基と結合させた後、溶媒の塩濃度を上げていくことで結合力が弱い順に溶出することができる。

活性測定は生成するグルタミン酸をNAD存在下でグルタミン酸脱水素酵素の反応により生成するNADHを測定波長340nmで測定した。

2. 実験方法および測定方法

Mglu の発現プラスミド pKSGHE3-1 で大腸菌 *Escherichia.coli* TOP10 株を形質転換した。その後 37°C で拡大培養をした。拡大培養によって得られた培養液を遠心分離して集菌した。得られた菌体を氷上で超音波破碎をして、遠心分離により上澄み液を回収した。回収した上澄み液をセルロース透析膜に通し、10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)で透析を行った。

得られた上澄み液を陰イオン交換クロマトグラフィー用樹脂である DEAE-TOYOPEARL を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムに充填した樹脂に対して、5 倍量の 10 mM Tris-HCl

緩衝液を流し平衡化を行った。その後、無細胞抽出液を流し込み、Mglu を樹脂に吸着させた。吸着後、再度カラムに Tris-HCl 緩衝液を流し、樹脂に吸着していないタンパク質を除去した。カラムを Tris-HCl 緩衝液で洗浄後、濃度の薄い順に各濃度の NaCl を加えた Tris-HCl 緩衝液をカラムに流し、Mglu を溶出させた。Mglu の溶出は活性測定により確認を行った。

酵素の活性測定は分光光度計を用いて測定した。Mglu とグルタミンを終濃度 100 mM Tris-HCl 緩衝液中 30°C で 10 分反応させ、生成したグルタミン酸をグルタミン酸脱水素酵素(GLDH)存在下で NAD と 30°C で 60 分間反応させた。反応後、生成した NADH の吸光度を測定波長 340nm で測定を行った。

変異型グルタミナーゼの作製には、KOD-Plus-Mutagenesis Kit のプロトコルに従って部位特異的変異導入を行い、チロシンをフェニルアラニンに置換した。部位特異的変異を導入した発現プラスミドで大腸菌 *E. coli*/TOP10 を形質転換し、Y27F 変異型 Mglu の組換え生産と精製を行った。

3. 実験結果

精製の結果、組換えMgluは0.55 倍に精製され、比活性は74 U/mgとなった(表1)。従来の結果と比較して同程度に生成されていた。

表1. 組換えMgluの精製表

	全活性 U	全タンパク質 mg	比活性 U/mg	倍率
クルード	1.4×10^5	1.1×10^3	1.3×10^2	1
透析後	6.5×10^4	8.8×10^2	74	0.55

4. 参考文献

- 1) Yoshimune, K. *et al.* *Extremophiles*, 2004, 8, 441-446
- 2) Yoshimune, K. *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 8, 1118-1124
- 3) Yoshimune, K. *et al.* *FEBS journal*, 2010, 277, 738-748