

耐塩性グルタミナーゼのリン酸阻害による阻害に対する C末端ドメインの影響

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L-グルタミン酸に変換する酵素である。醤油や味噌の醸造においては、グルタミンをうまみ成分であるグルタミン酸に変換する役割を担っている。しかし醤油の醸造は雑菌の増殖を防ぐ目的で18%程度の塩濃度環境下で行われる。一般的に使われているグルタミナーゼは高濃度塩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。それにより、グルタミナーゼにより変換されなかったグルタミンが非酵素的反応によってうまみ成分ではないピログルタミン酸へと変換されてしまう。そのため、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。耐塩性酵素としていくつか報告されているがいずれも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、アミノ酸配列レベルで約36%の相同性を有し、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¹⁾。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(Fig. 1)。

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。

さらに、Mgluはリン酸イオン存在下で阻害され、Tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris)によって活性が上昇することが明らかになっている²⁾。このことからC末端領域が耐塩性及びリン酸イオンによる阻害を調節している可能性がある。



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

そのため本研究では、MgluのC末端領域を断片化することで活性調節の動きを抑制し、その影響を調べた。

Mgluの断片化はトリプシンを用いて行った。トリプシンはタンパク質をポリペプチドやアミノ酸に分解する酵素の中でも活性中心残基にセリン残基を持つものをセリンプロテアーゼという。そのためリジンもしくはアルギニンが形成するカルボキシ基側のペプチド結合を加水分解することで断片化を行うことができる。

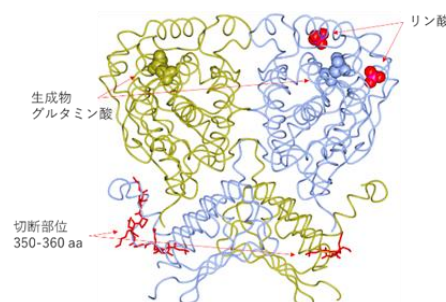


Fig. 2 断片化による切断位置

断片化後のMgluは断片化前のMgluのN末端ドメインは同じ構造であることから、C末端ドメインの350~360番目のアミノ酸残基が分解されていることが分かる(Fig.2)。これによりC末端領域の役割を解明することができると考えられる。

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 中 30℃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 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)と 30℃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 340 nm で測定を行った。

2. 実験方法及び測定方法

Mgluの断片化はトリプシン溶液、100 mM Tris (pH 7.5)、Mgluを混合し、30℃で 30分反応させた。その後 10 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)を加え、反応を停止させた。その後、活性測定により野生型Mgluとの比較を行った。

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緩衝液及びリン酸緩衝液(KPB)中30℃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℃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340 nmで測定を行った。

3. 実験結果

野生型Mgluと断片型Mgluの活性をKPB存在下で比較したところ野生型ではNaCl濃度0.5 Mで活性のピークをむかえているのに対し、断片型MgluではNaCl濃度が1 M付近でも活性の低下が見られなかった(Fig. 3)。

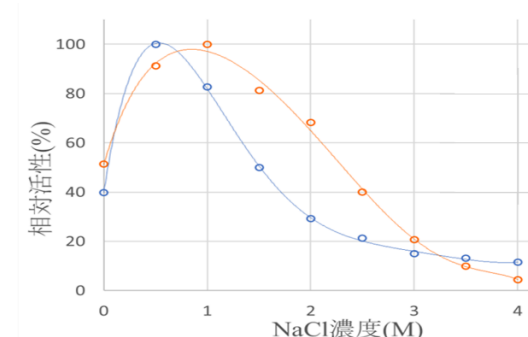


Fig. 3 断片化によるリン酸緩衝液中の活性
○=断片型、●=野生型を示しており、KPB存在下で様々なNaCl濃度で測定した。

このことから、断片化によってリン酸イオンの阻害が緩和されることで、通常のMgluより高

い塩濃度環境に適応できていることが示唆された。

次にNaCl非存在下でのリン酸イオンによる阻害を比較したところ野生型MgluはKPB濃度が5 mMの時点で阻害がされているのに対し、断片型MgluはKPB濃度が30 mMまでは活性に変化が見られず、30 mM以降の濃度から阻害がされ始める結果となった(Fig. 4)。

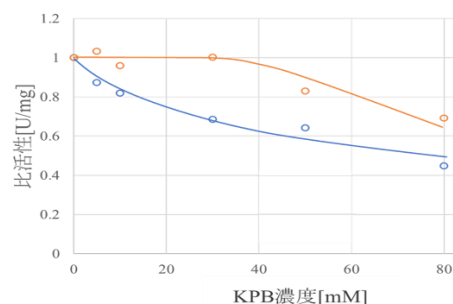


Fig. 4 リン酸イオンによる阻害

○=断片型、●=野生型を示しており、NaCl非存在下で様々なKPB濃度で測定した。

またNaCl非存在下でのTrisによる活性を比較したところTris濃度が50 mM以上の濃度ではどちらもほぼ変化がなかった。また、断片型の方が野生型に比べて活性が高い結果となった(Fig. 5)。

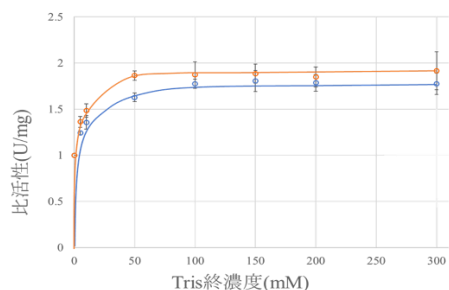


Fig. 5 Tris緩衝液による活性化の比較

○=断片型、●=野生型を示しており、NaCl非存在下で様々なTris濃度で測定した

このことから断片化の方がTrisによる活性化の影響を受けやすくなっていることが示唆された。

4. 参考文献

- 1) Brown, G. *et al.*, Biochemistry., 2008, 47, 5724 -5735.
- 2) Yoshimune, K. *et al.*, FEBS J., 2010, 277, 738-748