

耐塩性グルタミナーゼを阻害する無機リン酸と相互作用するアルギ

ニン 131 のアラニン残基への置換

日大生産工(院) ○木山 皓雄 吉宗 一晃

【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-グルタミン酸へと加水分解する反応を触媒する酵素である。そのため、食品加工及び製造において非常に重要な役割を担う。醤油醸造では雑菌を抑制するために高濃度の食塩が加えられる。一般的にグルタミナーゼは高濃度食塩存在下において活性が低下あるいは失活してしまう。これによりL-グルタミンは非酵素的反応により、うま味成分ではないピログルタミン酸へと変換されてしまう。このことから高濃度食塩存在下でも活性が失活しない耐塩性酵素の存在が必要とされる。

耐塩性酵素である海洋細菌 *Micrococcus luteus* K-3 由来グルタミナーゼ(Mglu)は高濃度食塩存在下でも活性を維持するが、枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来酵素(Bglu)は塩濃度上昇につれ、失活してしまう。Bglu は Mglu とアミノ酸配列で約 36%の相同性を有している食塩感受性酵素である。どちらの酵素も活性中心を持つN末端ドメインを有しているが、Mglu はC末端ドメインを有している。この構造の違いが耐塩性の有無に関わっていると考えられる。

Mglu の 131 番目の Arg (R131) は

lid 領域と呼ばれる活性中心付近の領域に隣接している。

Mglu の 26~29 アミノ酸残基は lid 領域と呼ばれ、基質結合によって構造変化する活性部位の蓋のようなものである。この蓋の開閉により基質の出入りと反応環境の制御が行われる。

Mglu は無機リン酸存在下では活性を失い、その耐塩性が低下することが知られている。これは活性部位付近に遊離するリン酸イオンが結合することで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って活性中心と蓋の空間が狭くなってしまうことで開閉運動が抑制されてしまうためだと考

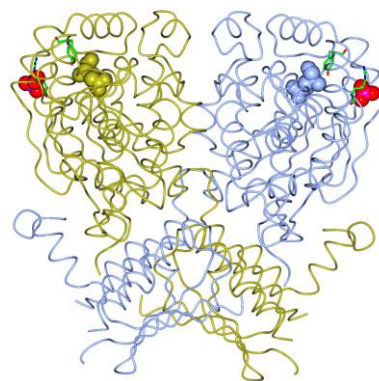


Fig. 1 Mglu の活性中心と L-グルタミン酸及び無機リン酸の結合位置

Replacement of the arginine131 residue of salt-tolerant glutaminase with alanine to prevent the inhibition by inorganic phosphate

Hiroataka KIYAMA and Kazuaki YOSHIMUNE

えられている (Fig. 1)。また、無機リンは負の電荷を持ち、活性中心付近に存在するアミノ酸残基である R131 は正の電荷を持つ。そのため、R131 を電荷の持たない別のアミノ酸残基を置換することで無機リン酸の阻害を防ぐことが出来るのではないかと考えた。そして、R131 を Ala (A) に置換した変異型 R131A 酵素を作製した。

【実験方法、測定方法】

変異型グルタミナーゼの作製には、KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用い、部位特異的変異導入を行った。そしてアルギニンをアラニンへと置換し、変異体酵素 R131A を作製した。

Mglu の R131A 変異型酵素を発現させる発現プラスミド pMgluR131A で大腸菌 *Escherichia. coli* TOP 10 株を形質転換した。その後、37 °C で拡大培養した。拡大培養により得られた培養液を遠心分離で集菌した。得られた菌体の質量の 5 倍量の 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を加え、氷上で冷却しながら超音波破碎した。Tris は酵素を 6 倍活性化させる活性化因子である。その後、遠心分離により上澄み液をセルロース透析膜に通し、10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)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を平衡化するため、樹脂の 5 倍量の 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を流した。その後、透析後の上澄み液をカラムへ流し、樹脂に Mglu を吸着させた。吸着後、カラムに 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を流し、夾雑なタンパクを洗い

流した。洗浄の確認はタンパク測定で行い、吸光度差が 0.05 以下になるまで行った。カラム洗浄後、カラムに流す 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)の NaCl 濃度を 25 mM ずつ上げていき、Mglu を溶出させた。Mglu の溶出の確認は活性測定で行い、吸光度差が 0.3~0.4 で活性ありと判断し、Mglu の溶出を確認し回収した。

酵素の活性測定およびタンパク測定は分光光度計を用いて測定を行った。Mglu と L-グルタミンを終濃度 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)中で 30 °C、10 分間反応させ、生成した L-グルタミン酸をグルタミン脱水素酵素である GLDH 存在下で NAD と 30 °C、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 の吸光度を測定した。

【実験結果】

酵素精製の結果、変異型酵素 R131A は約 57 倍に精製され、比活性 6.2×10^2 U/mg となった(Table 1)。野生型と比較して全活性が低いことが示された。

Table 1 : 変異酵素 R131A の精製表

	全活性 (U)	全タンパク(mg)	比活性	精製倍率	収率 (%)
クルード透析前	3.0×10^4	2.7×10^3	11	1	100
クルード透析後	3.0×10^4	2.2×10^3	13	1.2	99
DEAE透析前	1.4×10^4	23	6.1×10^2	55	47
DEAE透析後	1.3×10^4	20	6.2×10^2	57	41

【参考文献】

- 1) Yoshimune, K. *et al.* FEBS, 2010, 277(3), 738-748
- 2) Yoshimune, K. *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 2006, 346(4), 1118-1124
- 3) Yoshimune, K. *et al.* Extremophiles, 2004, 8(6), 441-446