

微生物の耐塩性 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ： 大豆たん白質のうまみ成分としての有効利用をめざして

鈴木秀之*

京都大学大学院生命科学研究所

Salt-tolerant γ -Glutamyltranspeptidase: To Utilize Soy Protein as a Source of Umami Taste

Hideyuki SUZUKI

Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) from *Bacillus subtilis* is an extracellular enzyme that exhibits glutaminase activity. As it is only produced during the mid-stationary phase, a strain overexpressing GGT was generated to obtain sufficient quantities of GGT. The level of GGT activity of this strain increased steadily after the exponential phase, becoming 13-fold higher than that in the parental strain. The recombinant GGT was purified by 107-fold. The enzyme was a heterodimer consisting of one large subunit (45 kDa) and one small subunit (21 kDa). The enzyme was highly salt-tolerant and converted glutamine to glutamic acid effectively even in the presence of 18% NaCl. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 31-35, 2002.

Key words: γ -glutamyltranspeptidase, *Bacillus subtilis*, glutaminase, taste, umami

醤油醸造過程で、大豆たん白質は麹菌のプロテアーゼ、次いでペプチダーゼによってアミノ酸にまで分解され、うまみ成分となる。特にグルタミン酸のうま味への寄与が大きい。グルタミンは麹菌のグルタミナーゼあるいは γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT, EC 2.3.2.2) の加水分解反応により γ 位のアミド結合が加水分解されてグルタミン酸となり、うま味に寄与するが、これらの酵素が不足すると化学的に無味あるいは微酸味のピログルタミン酸になってしまい、製品の品質が低下する。一方、GGTの転移反応に

よりグルタミンとアミノ酸から γ -グルタミルアミノ酸が生成すると考えられる (Fig. 1)。筆者らはアミノ酸を γ -グルタミル化すると呈味性が大きく変化すること、特に苦味アミノ酸が γ -グルタミル化されると苦味が低減し、嗜好性が向上することを見いだした¹⁾。したがって、 γ -グルタミルアミノ酸の生成は醤油の呈味性向上に役立ち、醤油のいわゆる複雑味に大きく寄与していると考えた。

ところが、麹菌のグルタミナーゼやGGTは耐塩性でなく、醤油醸造時の18%食塩存在下では、ごくわずかの活性しか持たない。そこで他の微生物起源の耐塩性GGTを醤油醸造時に添加することを考えた。タンク培

*〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

養により容易に酵素を生産できるという点から細菌について耐塩性GGTを検索したところ、少なくとも *Bacillus* 属細菌のいくつかは耐塩性のGGTを菌体外に生産していることを見いだした。ゲノムの全塩基配列が明らかになっていることならびに遺伝学的手法が確立していることから、*Bacillus subtilis* 168株を用いることにした。

方 法

微生物の培養

E. coli と *B. subtilis* はそれぞれ37℃、30℃で培養した。培地はLB培地またはSY培地²⁾を用いた。

B. subtilis の *ggt* 遺伝子のクローニングとGGT高発現株の作成

B. subtilis 168株のゲノムDNAを *Hinc*II および *Xba*I で切断して得た約2.5-kbのDNA断片を *Sma*I *Xba*I で切断したpMW119にライゲート後、*E. coli* DH5 α 株に導入し、ゲノムプロジェクトとXuら³⁾の研究から予想された *ggt* 遺伝子と相補的なプライマーBF1: 5'-ACAGCTTCATATAGGAGGGGAGAAC-3' と BR1: 5'-

TCCGAGCATCGTACAAATGTATGG-3'を用いて定法によりスクリーニングを行いクローンを得た。このプラスミドをpMH2279と命名した。次に *E. coli* と *B. subtilis* のシャトルベクターであるpHY300PLKを *Eco*RI と *Sma*I で切断し、*ggt* 遺伝子を含むpMH2279の *Eco*RI-*Ssp*I フラグメントとライゲーションしてpMH2285を得た。さらにこのプラスミドを *Hpa*I で切断してpPL623⁴⁾由来の *cam*⁺ 遺伝子を導入し、pMH2312を得た。このプラスミドによりSWV150株を形質転換することにより、GGT高発現株MH2308を得た。

GGT活性の測定

すでに報告した方法⁵⁾により行った。

たん白質濃度の測定

たん白質濃度はBCA Protein Assay Reagent Kitにより行った。標準たん白質としては牛血清アルブミンを用いた。

B. subtilis からのGGTの精製

MH2308株を3Lの30 μ g/mLのクロラムフェニコールを含むLB培地で30℃、72時間培養した。遠心により培養上澄を回収し、1 mMのPMSFで30分間処理した後、硫酸分画を行い、60~80%硫酸飽和分画を回収した。遠心して得られた沈澱を50 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 8に対して透析した後、同緩衝液で平衡化したQ-Sepharoseカラム (2.5 $\times$ 25 cm) に供した。NaClの濃度勾配0~0.5 Mにより溶出してきた活性画分を回収し、10 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 7に対して透析した。同緩衝液で平衡化したGigapiteカラム (3 $\times$ 15 cm) に供し、同緩衝液の濃度を0~0.6 Mに上昇させることにより溶出してきた活性画分を1.5 Mの硫酸を含む50 mMリン酸緩衝液 pH 7に対して透析した。次に、同緩衝液で平衡化したPhenyl Superose HR 5/5カラムに供し、硫酸の濃度を1.5~0 Mに下降させることにより溶出してきた活性画分を50 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 8に対して透析した。同緩衝液で平衡化したMini Q PE 4.6/50カラムに供し、NaCl濃度を0~0.5 Mに上昇させることにより溶出してきた活性画分を50 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 8に対して透析し、最終標品とした (Table 1)。

基質特異性の測定

γ -グルタミル供与体 転移反応は様々な γ -グルタミル供与体0.5 mM、受容体として60 mMのグリシルグリシン、50 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.73を含む反応液に酵素液を加え、37℃でインキュベートすることにより行った。加水分解反応はグリシルグリシンを添加せずに行った。塩酸を終濃度0.1 Nになるように加えて反応を停止後、 γ -グルタミルグリシルグリシンとグルタミ

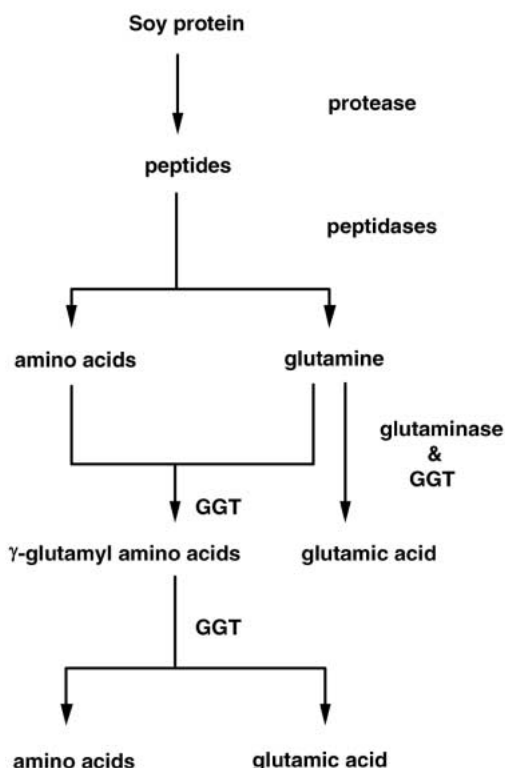


Fig. 1. Enzymes related to proteolysis of soy protein during soy sauce fermentation.

Table 1. Procedure for purification of GGT from *B. subtilis*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)		Sp. activity (U/mg)*		Recovery (%)
		T	H	T	H	
Supernatant	923	213	18.8	0.230	0.0203	100.0
Ammonium sulfate (60-80%)	80.7	25.9	1.97	0.321	0.0244	12.2
Q Sepharose	19.0	14.8	1.26	0.782	0.0663	7.0
Gigapite	2.31	7.75	0.552	3.36	0.239	3.6
Phenyl Superose	0.311	3.87	0.277	12.4	0.891	1.8
Mini Q	0.174	2.15	0.162	24.7	1.86	1.0

* specific activity

ン酸をShim-pack Amino-Naカラムを装着したHPLC（島津製作所製 model LC-9A）で分析した。アミノ酸の検出はポストカラム法により *o*-フタルアルデヒドによる修飾後、蛍光分析器により行った。グルタチオンを基質とした場合の転移反応は、TSK-Gel Amide-80 columnを装着したHPLCで紫外吸収検出器により、 γ -グルタミルグリシルグリシンを検出することにより行った。

γ -グルタミル受容体 転移反応は標準的な測定法⁵⁾により行った。ただし、受容体の濃度は10 mMとした。

結果と考察

親株と変異株の比較

*Bacillus*属細菌はたん白質や代謝産物をよく分泌生産することが知られているが、これらの多くは栄養増殖している時ではなく、胞子形成への過渡期に起こることが知られている。そこで、工業的には胞子形成能をなくした菌株が用いられることが多い。*Bacillus subtilis*のGGTは、対数増殖期後の遺伝子発現を調節する主な転写調節因子である*abrB*と*spoOA*⁶⁾によって発現が調節されていることが報告されていた³⁾。XuとStrauchは、GGT活性は対数増殖期後に現れ、数時間で消失してしまうが、*abrB spoOA*であるSWV150株が対数増殖期後も継続してGGTを生産すると報告した³⁾。

そこで、筆者は*B. subtilis*168株の*ggt*遺伝子をクローニングし、エレクトロポレーション法によりSWV150株を形質転換し、MH2308株を得た。親株と変異株を100 mLのSY培地に植え、30℃で培養した。各菌株とも増殖に違いは見られなかった。96時間後には菌が溶菌し始めたのでそれまでの菌体外のGGT活性をFig. 2に示した。親株では72時間後にはGGT活性の低下が見られたが、Xuらの結果とは異なり数時間で消失するという事はなかった。一方、SWV150株では上昇し続けた。筆者が得たMH2308株は最高で親株の13倍のGGT活性を示した。

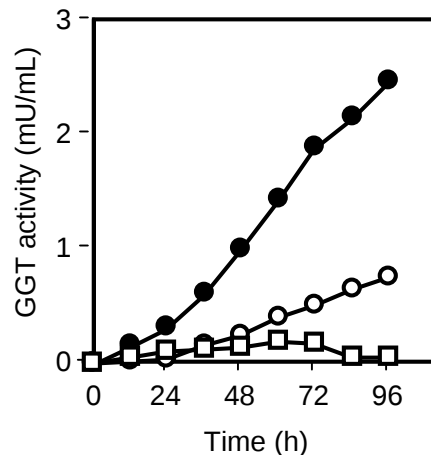


Fig. 2. GGT activity during bacterial growth. The graph shows the parental strain (open squares), SWV150 (open circles), and MH2308 (closed circles).

*Bacillus subtilis*のGGTの精製と性質

MH2308株の培養上澄から調製したGGTは分子量約4.5万の大サブユニット1個と約2.1万の小サブユニット1個からなるヘテロダイマー構造を取っていることが分かった。基質特異性はTable 2と3に示した。

*B. subtilis*168株と*E. coli* K-12株のGGTの耐塩性を醤油醸造時のpHである5.5でGGT活性により比較した(Fig. 3)。18%食塩存在下においても*B. subtilis*のGGTは49%の転移活性、86%の加水分解活性を示した。一方、*E. coli*のGGTの活性は約10%になっていた。次に、グルタミナーゼ活性を比較したところ18%食塩存在下においても*B. subtilis*のGGTは76%のグルタミナーゼ活性を示し、きわめて耐塩性の有用な酵素であることが示された。

Table 2. Substrate specificity of GGT for γ -glutamyl donors

Substrate	Relative activity (%)	
	Transpeptidation	Hydrolysis
γ -L-Glu-pNA	100	100
Glutathione (reduced)	98.8	74.5
γ -L-Glu-L-Trp	127	79.6
γ -L-Glu-L-Met	114	81.2
γ -L-Glu-L-Val	113	77.7
γ -L-Glu-L-His	106	107
γ -L-Glu-L-Phe	103	74.8
γ -L-Glu-L-Tyr	94.7	83.9
L-Gln	78.1	85.3

Transpeptidation and hydrolysis activities were measured as described in Materials and methods using the purified enzyme (18.6 mU/mL). The concentration of γ -glutamyl donors was 0.5 mM. The activity with γ -GpNA as a substrate was taken as 100%.

Table 3. Substrate specificity of GGT for γ -glutamyl acceptors

Substrate (acceptor)	Relative activity (%)
Gly-Gly	100
Taurine	68.8
L-Met	50.6
L-Phe	38.4
Gly	37.8
L-His	35.7
L-Thr	34.0
L-Trp	30.9
L-Val	30.5
L-Asn	24.5
L-Arg	21.4
L-Leu	21.1
L-Asp	20.4
L-Ile	19.5
L-Pro	12.8
L-Ser	12.5
L-Lys	11.2
L-Cys	11.1
L-Ala	9.1
L-Glu	8.1
L-Gln	5.4

Transpeptidation activity was measured as described in Materials and methods using the purified enzyme (13.4 mU/mL). The concentration of γ -glutamyl acceptors was 10 mM. The activity with Gly-Gly as substrate was taken as 100%.

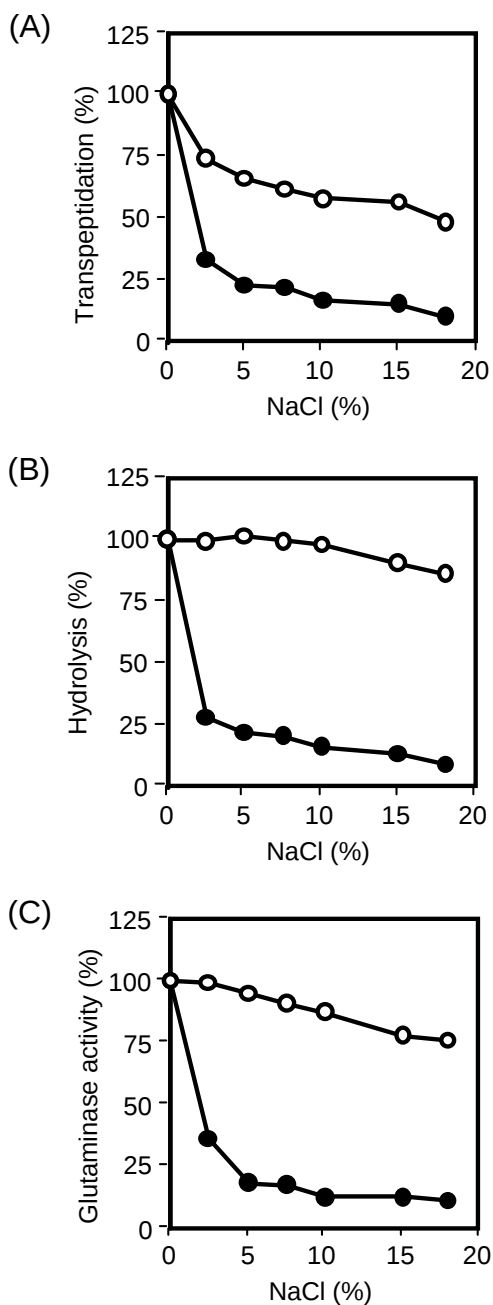


Fig. 3. Effects of NaCl concentration on the *B. subtilis* (open circles) and *E. coli* (closed circles) GGT activities. (A) The transpeptidation activity was measured using γ -GpNA and Gly-Gly as substrates. (B) The hydrolysis activity was measured using γ -GpNA as a substrate. (C) Glutaminase activity was measured using glutamine as a substrate. *B. subtilis* and *E. coli* GGT were used at 26.8 mU/mL and 21.1 mU/mL, respectively.

要 約

醤油醸造時にグルタミナーゼの不足により、呈味性に問題が起こることが報告されている。筆者は γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT, EC 2.3.2.2) に注目した。GGTはグルタミンを含む γ -グルタミル化合物の加水分解反応と、その γ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドへ転移する反応を触媒する。したがって、GGTはグルタミンをグルタミン酸に変えるとともに、新しい γ -グルタミル化合物を生成することができる。そこで、微生物由来のGGTを大量に調製し、醤油醸造工程に添加することにより、製品のうま味を増強できると考えた。本研究の成果は以下の通りである。1) *Bacillus*属に属するいくつかのバクテリアの培養上澄に耐塩性のGGTを見出した。2) *B. subtilis*のGGT遺伝子をゲノムからクローニングした。3) *B. subtilis*の*spoOA abrB*株を用いて菌体外に大量のGGTを生産した。4) *B. subtilis*のGGTを精製し、その性質を検討した。精製したGGTについても耐塩性を確認した。

文 献

- 1) Suzuki H, Kajimoto Y and Kumagai H (2002): Improvement of the bitter taste of amino acids through the transpeptidation reaction of bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *J Agric Food Chem*, **50**, 313-318.
- 2) Ogawa Y, Hosoyama H, Hamano M and Motai H (1991): Purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* (natto). *Agric Biol Chem*, **55**, 2971-2977.
- 3) Xu K and Strauch MA (1996): Identification, sequence, and expression of the gene encoding γ -glutamyltranspeptidase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **178**, 4319-4322.
- 4) Schoner RG, Williams DM and Lovett PS (1983): Enhanced expression of mouse dihydrofolate reductase in *Bacillus subtilis*. *Gene*, **22**, 47-57.
- 5) Suzuki H, Kumagai H and Tochikura T (1986): γ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: purification and properties. *J Bacteriol*, **168**, 1325-1331.
- 6) Strauch MA (1993): Regulation of *Bacillus subtilis* gene expression during the transition from exponential growth to stationary phase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **46**, 121-153.