

遺伝子組換えによる大豆乳凝集酵素の効率的生産技術開発

安田正昭*¹・久場奈緒子¹・高木博史²

¹琉球大学農学部 ²福井県立大学生物資源学部

Genetically Engineered *Bacillus subtilis* Produces Soybean-Milk-Coagulating Enzyme

Masaaki YASUDA¹, Naoko KUBA¹ and Hiroshi TAKAGI²

¹Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, Okinawa 903-0213

²Faculty of Biotechnology, Fukui Prefectural University, Fukui 910-1195

ABSTRACT

Soybean-milk-coagulating enzyme (SMCE) is important for coagulating soybean protein, and the technology for its effective production is needed. In this study, we investigated the expression of SMCE gene in genetically engineered *Bacillus subtilis*. The SMCE structural gene containing the putative promoter and terminator regions were isolated from *B. pumilus* by PCR using the primers, each of which contains the *Bam*HI or *Xba*I site. The unique amplified band was digested with *Bam*HI and *Xba*I, and then ligated to the *Bam*HI and *Xba*I sites of plasmid pHY300PLK. The resultant plasmid (pNK) was introduced into *Bacillus subtilis* DB 403 that was a protease-deficient strain by electroporation, and three transformants containing pNK were obtained. When the recombinant strains (*B. subtilis* DB 403 (pNK)) were cultured on a LB agar plate containing skimmed milk, all strains were shown to form haloes. The band corresponding to SMCE from *B. pumilus* and SMCE activities were observed in the culture fluid from the recombinant *B. subtilis* DB403 (pNK). These results showed that the SMCE gene was expressed and the active enzyme was produced in *B. subtilis*. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 43-47, 2003.

Key words : soybean-milk-coagulating enzyme, *Bacillus pumilus*, genetic engineering, *Bacillus subtilis*

大豆乳凝集活性を有する酵素は大豆たん白質の付加価値を高める重要な酵素として期待されている。これ

までに、植物起源プロテイナーゼであるプロメラインの大豆乳凝集性に関する研究が行われ^{1, 2)}、大豆チーズの試作例が報告されている^{3, 4)}。しかし、微生物由来の大豆乳凝集酵素 (SMCE; Soybean-milk-coagulating

*〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1番地

enzyme) に関する知見は少ない。一般に、微生物酵素は植物酵素に比べて大量調製が容易で、安価で安定供給が可能であり、産業化を図るために大きなメリットとなる。そこで、著者はSMCE生産菌 (*B. pumilus* TYO-67) を沖縄の伝統的発酵食品であるとうふよりの製造過程で分離し、その培養条件を明らかにした⁵⁾。また、本酵素の精製法を確立し、その酵素化学的特性から本酵素がセリンプロテアーゼ⁶⁾であること、および本酵素遺伝子の全塩基配列を明らかにした⁷⁾。さらに本酵素による大豆乳凝集機構の解析を行い、本酵素の食品加工への利用について検討してきた⁸⁾。本酵素の実用化を目指すにはその効率的な生産性の向上が不可欠である。

本研究では、遺伝子組換えによる本酵素の効率的な生産技術を開発することを目的とし、分離菌株 *B. pumilus* TYO-67 の生産する SMCE をコードする遺伝子をプラスミドに組み込み、枯草菌における活性型酵素の発現について検討した。

方 法

微生物およびプラスミド

SMCE および SMCE 遺伝子の供試菌株として *B. pumilus* TYO-67 を使用した。プラスミドは宝酒造株式会社製 pHY300PLK を用いた。プラスミド構築用に *E. coli* INV α F' を、プラスミドのダイマー形成用に *E. coli* C600 (*recA*⁺) を使用した。発現用宿主菌としては、プロテアーゼ欠損株である *B. subtilis* DB403 (*aprE*⁻ *eprE*⁻ *nprE*⁻) を使用した (California 大学 Davis 校, R. H. Doi 博士より供与)。また、高木により構築された *B. subtilis* 由来サチライシン E 遺伝子を組み込んだプラスミド pIOE⁹⁾ をプロテアーゼ遺伝子のポジティブコントロールとして使用した。

ゲノムDNAの抽出

B. pumilus TYO-67 を LB 培地に接種、37℃ で 4 時間振とう培養を行い、遠心分離により菌体を集めた。次に、菌体を 20% スクロース・トリス EDTA 緩衝液 (pH 8.0) で洗浄、懸濁し、Bagdasarian¹⁰⁾ の方法により、菌体内より全ゲノム DNA を抽出した。

PCRによるSMCE遺伝子の増幅および発現プラスミドの構築

B. pumilus の SMCE 遺伝子情報^{7, 11)} を基に、その推定プロモーター領域とオープンリーディングフレームの両端に *Bam*HI と *Xba*I 認識配列を付加するプライマーを設計し、*B. pumilus* TYO-67 のゲノム DNA を鋳型にした PCR を行った。PCR 条件は 94℃-1 min, 54℃-1 min,

72℃-1 min の 35 サイクルで行った。PCR により特異的に増幅した DNA 断片を制限酵素 (*Bam*HI, *Xba*I) で処理し、電気泳動後のアガロースゲルから回収後、同制限酵素にて切断したプラスミド pHY300PLK と連結し、*E. coli* INV α F' のコンピテントセルに導入した。アンピシリン含有 LB 寒天培地にて 37℃ で一夜培養し、得られたアンピシリン耐性コロニーからプラスミドをいくつか抽出し、DNA シークエンシングによって正しい塩基配列を有するプラスミドを pNK と名づけた。

プラスミドによる枯草菌の形質転換

枯草菌ではプラスミドがダイマー構造をとることで形質転換効率が高まることから、構築したプラスミド pNK を *E. coli* C600 に導入し、得られたアンピシリン耐性コロニーよりプラスミドを調製した。次に、プラスミドをエレクトロポレーション法により *B. subtilis* DB403 に導入後、テトラサイクリン含有 LB 寒天培地にて 37℃ で一夜培養し、テトラサイクリン耐性を示すコロニーを得た。

形質転換体のハロー形成

得られた *B. subtilis* DB403 の形質転換体コロニーを滅菌水に懸濁させ、そのものを 1% スkim ミルク、テトラサイクリン含有 LB 寒天プレートへスポットした。37℃ で静置培養し、プロテアーゼ活性により形成される菌体周囲のミルクカゼイン分解ハローを確認した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli ら¹²⁾ の方法に従い、ゲル濃度 12.5% で行った。電気泳動後、クマシーブリリアントブルー R-250 でたん白質の染色を行った。

大豆乳凝集活性の測定

大豆乳の調製は既報¹³⁾ の方法により行った。大豆乳凝集活性の測定は Arima ら¹⁴⁾ の方法に従った。大豆乳凝集活性の 1 ユニットは、大豆乳 1.0 mL を 1 分間で凝集させる酵素量とした。

結果と考察

発現プラスミドの構築と枯草菌への形質転換

B. pumilus TYO-67 のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、SMCE のオープンリーディングフレーム (ORF) を含む 1,484 bp の DNA 断片を増幅させた。この断片には、本酵素の ORF (1,152 bp) 以外に、上流側の 162 bp (推定上のプロモーター領域を含む)、下流側の 170 bp の塩基配列を含んでいる。また、この断片の 5' 末端側には *Bam*HI サイト、3' 末端側には *Xba*I サイトが付加されている。両制限酵素で処理した DNA 断片を同制限

酵素で切断したプラスミドpHY300PLKに組み込み、プラスミドpNKを構築した (Fig. 1). 得られたプラスミドを *B. subtilis* DB403へ形質転換したところ、pNKを有する形質転換体 *B. subtilis* DB403 (pNK) が3コロニー得られた。

形質転換体によるハロー形成

各形質転換体をテトラサイクリン含有LB培地に1% スキムミルクを添加した寒天プレート上にスポットし、ハロー形成を確認した (Fig. 2). ポジティブコントロールとしてサチライシンE遺伝子を発現する *B. subtilis* DB403 (pIOE) を、ネガティブコントロールとしてベクターのみを保持する *B. subtilis* DB403 (pHY300PLK) を同様にスポットした。その結果、*B. subtilis* DB403 (pNK) や *B. subtilis* DB403 (pIOE) の菌体周辺には、ミルクカゼインの分解によるハローが形成され、これらの形質転換体がプロテアーゼを生産していることが示された。

SMCE遺伝子発現株の培養上清のSDS-PAGE

本酵素遺伝子を組み込んだ形質転換体 (*B. subtilis* DB403 (pNK)) を、テトラサイクリンを含むLB液体培地にて37℃で24時間振とう培養し、その培養上清をSDS-PAGEに供した (Fig. 3). *B. subtilis* DB403 (pNK) は3コロニーともに野生株 *B. pumilus* TYO-67由来の精製SMCEと同一分子質量 (33 kDa) の位置にたん白質バンドの生成が見られた (レーン3, 4, 5). なお、比較としてSMCEを有さない *B. subtilis* DB403 (pHY300PLK) においては対応する位置にバンドは見られなかった (レーン2). サチライシンE遺伝子を組み込んだ *B. subtilis* DB403 (pIOE) においては、27.5 kDaに位置するたん白質バンドの生成 (レーン6) が見られ、本酵素遺伝子を組み込んだものに比べると発現量が高いことが電気泳動的に観察された。

SMCE遺伝子発現株の培養上清の大豆乳凝集活性

B. subtilis DB403 (pNK) をテトラサイクリンを含むLB培地にて37℃で24時間振とう培養し、培養上清中の大豆乳凝集活性を測定した (Table 1). SMCE遺伝子を発現する形質転換体の培養上清には大豆乳凝集活性がそれぞれ確認されたが、ベクターのみを保持し

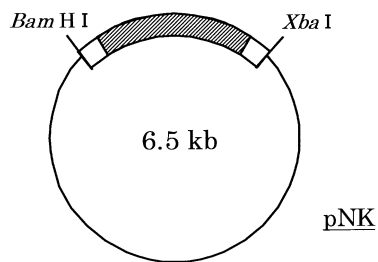


Fig. 1. Structure of expression plasmid pNK. The striped box represents the coding region for SMCE, and the open box represents the putative promoter and terminator regions.

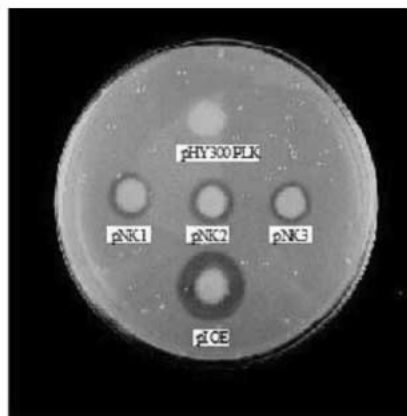


Fig. 2. Halo formation by the recombinant *B. subtilis* DB403 harboring various plasmids. Each strain was inoculated on a 1% skim milk agar plate, and the plate was incubated at 37℃ for 1 day.

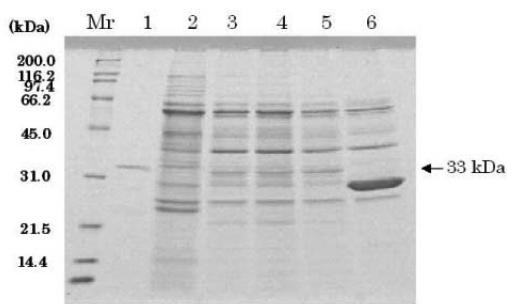


Fig. 3. SDS-PAGE of culture fluid from the recombinant *B. subtilis* DB403 harboring various plasmids. The expression of SMCE gene was shown in *B. subtilis* DB403 (pNK). Mr; Molecular mass standard, Lane 1; pure SMCE from *B. pumilus* TYO-67, Lane 2; *B. subtilis* DB403 (pHY300PLK), Lane 3; *B. subtilis* DB403 (pNK) #1, Lane 4; *B. subtilis* DB403 (pNK) #2, Lane 5; *B. subtilis* DB403 (pNK) #3, Lane 6; *B. subtilis* DB403 (pIOE).

Table 1. SMCE activity of the recombinant <i>B. subtilis</i>	
Sample	Activity (U/mg)
<i>B. subtilis</i> DB403 (pHY300PLK)	0
<i>B. subtilis</i> DB403 (pNK) #1	1.68
#2	1.74
#3	1.56
<i>B. subtilis</i> DB403 (pIOE)	2.83

た形質転換体*B. subtilis* DB403 (pHY300PLK) においては酵素活性がまったく見られなかった。以上の結果から、遺伝子組換え技術により枯草菌において本酵素の発現生産が可能であることが判明した。しかしながら、SMCE発現株 (*B. subtilis* DB403 (pNK)) の大豆乳凝集活性はサチライシンE発現株*B. subtilis* DB403 (pIOE) のそれに比べて61%にとどまった。

SMCEの大量発現系を構築するには、枯草菌内で機能する強力なプロモーター (例えばサチライシンEのプロモーター) 支配下での発現を試みる、または大腸菌の高発現系を試みるなどの検討が必要である。また、

野生株*B. pumilus*においては、培地中にSPIを0.5%～2%添加することによりSMCE活性が誘導される⁵⁾ことが明らかとなっていることから、SMCE遺伝子を組み込んだ形質転換体についても適切な誘導物質による遺伝子の誘導発現が可能であると思われる。今後は、本酵素の大量発現系を確立し、食品加工用の酵素生産に寄与することとともに、基礎的には酵素の構造と機能解析に供したい。また、プロテインエンジニアリングの手法により本酵素の基質特異性や安定性の改変を行いたい。

要 約

本研究においては、*B. pumilus* TYO-67の生産する大豆乳凝集酵素 (SMCE) の効率的生産技術を開発するためにSMCE遺伝子をプラスミドに組み込み、枯草菌における活性型酵素の発現について検討した。本酵素をコードする遺伝子と推定プロモーター領域を含むDNA断片をPCR法により増幅させた後、枯草菌用プラスミドpHY300PLKに組み込み、プラスミドpNKを構築した。プラスミドpNKをエレクトロポレーション法により*B. subtilis* DB403株に導入し、形質転換体*B. subtilis* DB403 (pNK) を得た。*B. subtilis* DB403 (pNK) をスキムミルク含有培地で培養したところ、コロニーの周辺にはプロテアーゼに由来するハローが形成した。本形質転換体の培養上清をSDS-PAGEに供したところ、野生株*B. pumilus*由来のSMCEと同一分子量を有するたん白質バンドが確認できた。また、同培養上清には大豆乳凝集活性も見られた。以上の結果から、枯草菌内においてSMCE遺伝子が発現し、活性型酵素が生産されることが示された。

文 献

- 1) Fuke Y, Sekiguchi M and Matsuoka H (1985): Nature of stem bromelain treatments on the aggregation and gelation of soybean proteins. *J Food Sci*, **50**, 1283-1288.
- 2) Mohri M and Matsushita S (1984): Improvement of water absorption of soybean protein by treatment with bromelain. *J Agr Food Chem*, **32**, 486-490.
- 3) Fuke Y and Matsuoka H (1984): Preparation of fermented soybean curd using stem bromelain. *J Food Sci*, **49**, 312-313.
- 4) Kamata Y, Ohta K, Yamauchi F and Yamada M (1991): Cheese analogs from soybeans or soymilk-curd by limited proteolysis. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, **38**, 1143-1148.
- 5) Yasuda M, Aoyama M, Sakaguchi K, Nakachi K and Kobamoto N (1999): Purification and characterization of a soybean-milk-coagulating enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 474-479.
- 6) Aoyama M, Yasuda M, Nakachi K, Kobamoto N, Oku H and Kato F (2000): Soybean-milk-coagulating activity of *Bacillus pumilus* derives from a serine proteinase. *Appl Microbiol Biotechnol*, **53**, 390-395.
- 7) Aoyama M, Toma C, Yasuda M and Iwanaga M (2000): Sequence of the gene encoding an alkaline serine proteinase of *Bacillus pumilus* TYO-67. *Microbiol Immunol*, **44** (5), 389-393.
- 8) 安田正昭, 久場恵美, 橘信二郎, 青山みさ子 (2002): 細菌プロテアーゼによる大豆乳凝集機構の解析とその食品加工への利用。大豆たん白質研究, **5**, 36-40.
- 9) Takagi H, Hirai K, Maeda Y, Matsuzawa H and Nakamori S (2000): Engineering subtilisin E for enhanced stability and activity in polar organic solvents. *J Biochem*, **127**, 617-625.
- 10) Bagdasarian M and Bagdasarian MM (1994): Gene cloning and expression. In Gerhardt p, Murray GRE, Wood WA and Grieg NR (eds), *Methods for*

General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington D.C., p. 409-412.

- 11) Sung-soo P, Sui-lam W, Liu-fa W and Roy HD (1989): *Bacillus subtilis* subtilisin gene (*aprE*) is expressed from a σ^A (σ^{43}) promoter in vitro and in vivo. *J Bacteriol*, **171**, 2657-2665.
- 12) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 13) 安田正昭, 外間郁夫 (1984): 豆腐よう製造に用いる原料豆腐の製造. 日食工誌, **31**, 19-23.
- 14) Arima K, Yu J, Iwasaki S and Tamura G (1968): Purification and crystallization of *Mucor* rennin from *Mucor pusillus* var. Lindt. *Appl Microbiol*, **16**, 1727-1733.