

Bacillus subtilis の γ -グルタミルトランスぺプチダーゼの耐塩機構の解明

鈴木秀之 (京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻)

醤油醸造過程で、大豆タンパク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、うま味成分となる。特にグルタミン酸のうま味への寄与が大きい。遊離されたグルタミンは麹菌のグルタミナーゼの働きによりグルタミン酸となり、うま味に寄与するが、グルタミナーゼが不足すると化学的に無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。ところが、麹菌のグルタミナーゼは耐塩性でなく醤油醸造時の18%(3M)食塩存在下では、その活性はごくわずかである。従って食品に使用可能な微生物、特に細菌由来の耐塩性グルタミナーゼを醤油醸造時に添加することは効果的である。 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)は大小各1つのサブユニットからなる酵素でグルタミナーゼ活性を持っている。報告者は、他の細菌(例えば大腸菌)由来のGGTと異なり、*Bacillus subtilis* のGGTが極めて耐塩性であることを見出した。そこで、大腸菌のGGTに変異を加えて耐塩性変異株を取得し、その変異の解析をとおして、*B. subtilis* のGGTが耐塩性であることの原因を解明することを最終目的として、研究を行った。

B. subtilis のGGTのアミノ酸配列で、他起源のGGTと大きく異なっている箇所は、大サブユニットC末付近に14コのアミノ酸残基の挿入がある点と、小サブユニット中央部N末よりに10コのアミノ酸残基の欠失がある点である。そこで、これらの違いがGGTの耐塩性にどのような影響を与えるか調べた。耐塩性でない大腸菌のGGTに上述の挿入・欠失およびその組み合わせを導入し、GGTの加水分解活性が耐塩性になるかどうかをペリプラズミックフラクションを用いて確認したところ、欠失型は活性が低すぎて実用的でなく、挿入型は耐塩性が野生型より低い結果となった。次に、エラープローンPCRで大腸菌のGGT遺伝子に変異を導入したプラスミドでDH5 α を形質転換し、ランダム変異GGTライブラリーを作成し、 γ -グルタミル- α -ナフチルアミドを基質とする活性染色法で染色することにより、耐塩性GGTを産生する変異型GGT遺伝子を得ることを試みた。候補として選んだ2株からGGTを精製して耐塩性を検査したところ、いずれの変異株も野生型GGTに比べて少し耐塩性になっていた。また、基質によっても違いがあり、グルタミンを基質としたグルタミナーゼ活性は野生型とそれほど変わらない結果となった。これは、 γ -グルタミル- α -ナフチルアミドの加水分解活性を指標にスクリーニングしたためと考えられた。

Bacillus subtilis の γ -グルタミルトランスぺプチダーゼの耐塩機構の解明

鈴木秀之 (京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻)

1. 研究目的

醤油醸造過程で、大豆タンパク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、うま味成分となる。特にグルタミン酸のうま味への寄与が大きい。遊離されたグルタミンは麹菌のグルタミナーゼの働きによりグルタミン酸となり、うま味に寄与するが、グルタミナーゼが不足すると化学的に無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。ところが、麹菌のグルタミナーゼは耐塩性でなく醤油醸造時の18% (3M) 食塩存在下では、その活性はごくわずかである。従って食品に使用可能な微生物、特に細菌由来の耐塩性グルタミナーゼを醤油醸造時に添加することは効果的である。 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) は大小各1つのサブユニットからなる酵素でグルタミナーゼ活性を持っている。報告者は、他の細菌 (例えば大腸菌) 由来のGGTと異なり、*Bacillus subtilis* のGGTが極めて耐塩性であることを見出した。そこで、*B. subtilis* と大腸菌のGGTのアミノ酸配列を比較して、大きく異なっている箇所を中心に大腸菌のGGTに変異を加えて耐塩性に影響が出ないか検討し、*B. subtilis* のGGTが耐塩性であることの原因を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 使用菌株およびプラスミド

本研究では表1に示す菌株およびプラスミドを使用した。

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain	Characteristics
<i>E. coli</i> K-12	
DH5 α	F ⁻ <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>
KY1	pSY43 / SH639
SH639	F ⁻ Δ <i>ggt-2</i>
SH641	F ⁻ Δ <i>ggt-2</i> <i>rpsL</i> <i>recA56</i> <i>srl300::Tn10</i>

SH642	pSH101 / SH641
SH773	HfrPO45 Δ ggt-2 <i>htp</i> ⁺ -Tn10 <i>thi-1 pheA97 relA1λ spoT1</i>
SH1557	pSY43 / SH773
SY43	pSY43 / DH5 α

Plasmid

pSY43 ColE1 *ori rop*⁺ *bla*⁺ *ggt*⁺

2.2 使用培地

通常の培地には Luria-Bertani (LB) を使用した。最少培地は、M9 glucose を使用し、必要に応じてアンピシリンを最終濃度が 100 μ g/ml になるよう添加した。プレート作製時には、寒天を最終濃度が 1.5% になるように添加した。

2.3 基本的な遺伝子操作

平滑末端化、ライゲーションは宝酒造のキットを、脱リン酸化は東洋紡のキットを用いた。多コピープラスミド上の GGT 遺伝子への挿入・欠失変異の作成には Kunkel 法を用いた。これらの組み合わせは制限酵素による切断とライゲーションにより作成した。ゲノム上の GGT 遺伝子を欠失した大腸菌をこれらのプラスミドで形質転換した。

2.4 ランダム変異の導入

ランダム変異導入は、エラープローン PCR 法による *in vitro* 法で行った¹⁾。 *ggt* 遺伝子上流に *SphI* サイトができるようにプライマーを設計し (1077-*SphI*-1099: 5'-CTGAGTCTGCATGCGGGTTTGC-3'; 3421-3402: 5'-CAGCCCAGTAGTAGGTTGAG-3')、pSY43 を鋳型として、エラープローン PCR を行って、ランダム変異を導入した *ggt* を増幅させたのち、*SphI* および *ggt* 遺伝子の下流にサイトがある *SalI* で処理した。これを *SphI* および *SalI* で処理した pBR322 とライゲーションし、ランダム変異プラスミドライブラリーとした。

2.5 活性染色

GGT 活性の測定法のひとつに、 γ -グルタミル- α -ナフチルアミドを用いる方法がある。これは、基質として用いる γ -グルタミル- α -ナフチルアミドから GGT の加水分解によって α -ナフチルアミンが遊離し、ジアゾニウム塩である Fast Garnet GBC salt とカップリングさせると、強い赤色の呈色が見られることを利用したものである。形質転換株の生えたプレートの上にメンブレン (Biodyne: Pall 社製 孔径 0.45 μ m) を密着させてプレートのレプリカを取り、反応液 (Table 2) をしみこませたる紙のうえにメンブレンを置き、室温に数分置いた。レプリカの菌体が赤く染色される速さ、赤色の濃さを比較することで GGT 活性を比較した。

Table 2 The reaction mixture of activity staining.

10 mg / ml Fast Garnet GBC	0.10	ml
1 mM γ -L-グルタミル- α -ナフチルアミド	0.20	ml
0.25 M Na-Succinate buffer (pH 5.5)	0.08	ml
5 M NaCl	1.62	ml
	2.00	ml

2.6 酵素活性測定法

γ -グルタミル基供与体として γ -グルタミル-*p*-ニトロアニリドを、受容体としてグリシルグリシンを用いて、すでに報告した方法²⁾に従って酵素活性を測定した。

2.7 酵素の調製

すでに報告した方法²⁾により、GGT 大量発現株のペリプラズミックフラクションから、硫酸分画とフロマトフォーカシング法により、GGT を精製した。

3. 研究結果および考察

3.1 大腸菌の GGT への挿入・欠失の導入

GGT の耐塩性のスクリーニングを行ったとき他の起源のものに比べて *B. subtilis* の GGT は極めて耐塩性であった³⁾。*B. subtilis* の GGT のアミノ酸配列で、他の起源の GGT と大きく異なっている箇所は、大サブユニット C 末付近に 14 コのアミノ酸残基の挿入がある点と、小サブユニット中央部 N 末よりに 10 コのアミノ酸残基の欠失がある点である (Fig. 1)。そこで、これらの違いが GGT の耐塩性にどのような影響を与えるか調べた。

耐塩性でない大腸菌の GGT に上述の挿入・欠失およびその組み合わせを導入し、GGT の加水分解活性が耐塩性になるかどうかをペリプラズミックフラクションを用いて確認した。pH 5.5、9%の食塩存在下で、野生型と挿入型の GGT は、それぞれ非存在下の 22%、16%の活性しかなかった。また、食塩非存在下で、挿入型 GGT は野生型の 24%しかなかった。一方、食塩非存在下で、欠失型変異の場合は、野生型の 0.9%以下しかなかった。また、両方を組み合わせた型では 0.5%以下であった。以上のことから、欠失型は活性が低すぎて実用的でなく、挿入型は耐塩性が野生型より低い結果となった。

3.2 大腸菌 GGT へのランダム変異の導入と耐塩性の選択

3.1 で述べたように耐塩性の *Bacillus* 属細菌の GGT のアミノ酸配列において、明らかに他のものと異なっている挿入・欠失を耐塩性でない大腸菌の GGT に導入すると耐塩性が逆に低下したり、活性が極端に低下することが明らかとなった。そこで、大腸菌の GGT 遺伝子にランダムに変異を導入し、耐塩性になった変異 GGT を取得することにした。

3.2.1 耐塩性変異株の選択法の開発

3.2.1.1 γ -グルタミルフェニルアラニンフェニルアラニン源とできるか否かで選択することの

試み

SH773 株はフェニルアラニン要求性で、かつ GGT 欠損である。したがって、 γ -グルタミルフェニルアラニンをフェニルアラニン源とした最少培地では生育できない。この株を pBR322 上に野生型の *ggt* 遺伝子をもつ pSY43 で形質転換した SH1557 は、 γ -グルタミルフェニルアラニンをフェニルアラニン源として最少培地で生育できる。そこで、pSY43 の GGT 遺伝子に 2.4 の方法でランダム変異を導入し、そのプラスミドで SH773 株を形質転換、NaCl 存在下で、 γ -グルタミルフェニルアラニンをフェニルアラニン源として生育できる菌株を選択できないか検討した。

その結果、大腸菌の GGT が γ -グルタミルフェニルアラニンを切断できなくなる食塩濃度よりさらに低い 2%食塩存在下で大腸菌の生育がほとんどできなくなることから、大腸菌の生育を指標に食塩耐性になった GGT を選択することはできないことが明らかとなった。

3.2.1.2 γ -グルタミル- α -ナフチルアミドを切断する活性を指標として、耐塩性 GGT をスクリーニングする方法の開発

γ -グルタミル- α -ナフチルアミドを基質として用いると、GGT の触媒する加水分解により α -ナフチルアミンが遊離し、ジアゾニウム塩である Fast Garnet GBC salt とカップリングさせると、強い赤色の呈色が見られることを利用した活性染色法が、スクリーニング法として適当かどうかを検討した。

1 mg / ml の Fast Garnet GBC salt を 25 mM の Na-succinate (pH 5.5) に溶かした液をしみこませたる紙に、 γ -グルタミル- α -ナフチルアミドおよび α -ナフチルアミンを滴下して、呈色を見た。Fig. 2 に示すように、 α -ナフチルアミンを滴下した部分のみが赤く呈色した。

次に実際に菌体を染色するのに用いることができるかを確認するために、SH641 (*ggt* 欠損株) および SH642 (*ggt* を含む多コピープラスミドを持つ株) を同一プレート上に生育させて、活性染色を行った。SH641 は変化がなかったが、SH642 は菌体が赤く染まった。

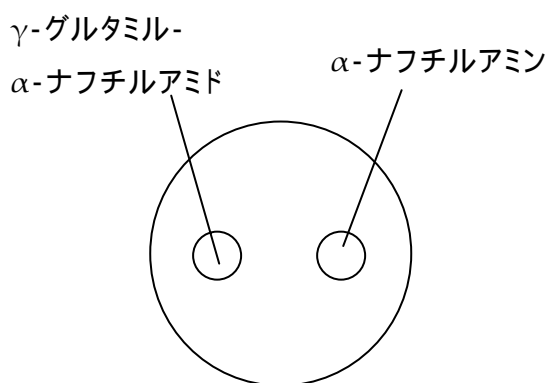


Fig. 2 Reaction of α -naphthylamine with Fast Garnet GBC.

このことから、菌体の GGT 活性を活性染色法で調べることができると判断し、実際のスクリーニングを行うことにした。

エラープローン PCR により得られた GGT 領域に変異が入ったプラスミド (2.4 参照) で DH5 α を形質転換し、ランダム変異 GGT ライブラリーとした。プレート上に生育したライブラリーの大腸菌をメンブレンでレプリカし、そのメンブレンを 18% NaCl を含む活性染色液で染色した。早くコロニーが染まったもの・最終的に濃く染まったものをつまようじで拾い、別のプレートに移植し 37°C で培養した。コントロールとして野生型 GGT 遺伝子をプラスミド上に持つ SY43 も並べて植えた。さらにそのプレートのレプリカを活性染色し、SY43 よりも染まりの良かったものを選び、SY43 とともに同一のプレートに画線し培養した。画線したプレートのレプリカをとって活性染色した。その結果 2 種類の有望な株 および が得られた。Fig. 3 に活性染色の結果を示した。

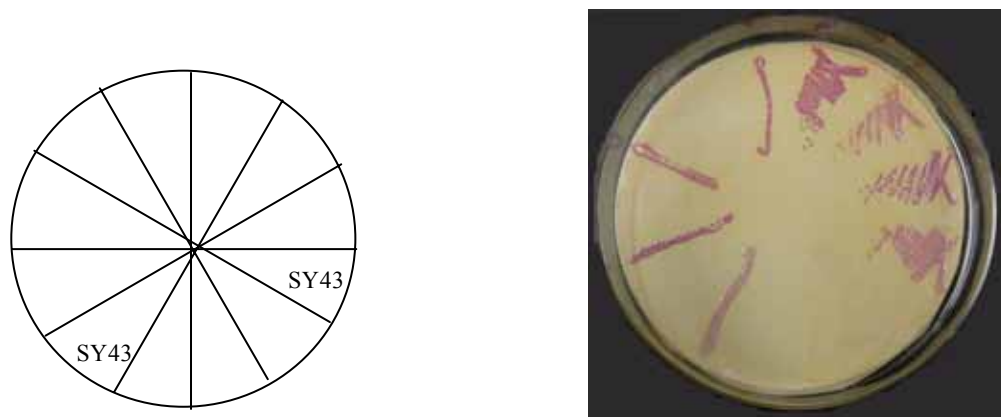


Fig. 3 Results of the screening experiment.

The strains with ; marks were judged as strains with weak GGT activity in the presence of NaCl.

および を LB 培地で 1 晩培養し、37°C で振とう培養したのち、以下の活性測定に用いた。

精製酵素を得るにあたって、DH5 α 株のゲノムの *ggt* 遺伝子から発現した GGT が混じってしまわないようにするために、プラスミドを *ggt* 欠損株である SH639 に移し替えた。SY43、

および の培養液から、プラスミドを抽出し、SH639 を形質転換した。SY43 由来のプラスミドを持つ株を KY1、 由来のプラスミドを持つ株を KY2、 由来のプラスミドを持つ株を KY3 とした。これら 3 株から GGT を精製し、耐塩性を検討した。

Table 3 Remaining hydrolysis activity against different substrates in the presence of 18% NaCl

Substrates	NaCl (%)	KY1, wt (%)	KY2, (%)	KY3, (%)
γ -GpNA	0	100	100	100
	18	17.7	21.3	22.5
Glutamine	0	100	100	100
	18	13.3	15.6	13.8
γ -Glu- α -naphthylamide	0	100	100	100
	18	15.2	21.5	18.5

Table 3 に示すようにいずれの変異株も野生型 GGT を発現する KY1 株に比べて少し耐塩性になっていた。また、基質によっても違いがあり、グルタミンを基質としたグルタミナーゼ活性は野生型とそれほど変わらない結果となった。これは、 γ -グルタミル- α -ナフチルアミドの加水分解活性を指標にスクリーニングしたためと考えられた。

4. 今後の課題

今回取得できた耐塩性 GGT より、さらに耐塩性を持った GGT を取得することを目指す。また、今回取得した耐塩性株とともに、GGT のどの残基に変異が起こっているかを明らかにし、GGT の構造との相関性を検討する必要がある。

文 献

- (1) Katayama, T., Suzuki, H., Koyanagi, T., and Kumagai, H. (2000). Cloning and random mutagenesis of the *Erwinia herbicola tyrR* gene for high-level expression of tyrosine phenol-lyase. **Applied and Environmental Microbiology** 66, 4764-4771.
- (2) Suzuki, H., Kumagai, H., and Tochikura, T. (1986). γ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: purification and properties. **Journal of Bacteriology** 168, 1325-1331.
- (3) Minami, H., Suzuki, H., and Kumagai, H. (2003). Salt-tolerant γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity. **Enzyme and Microbial Technology** 32, 431-438.

Salt-tolerant mechanism of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis*.

Hideyuki Suzuki

Division of Integrated Life Science,

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

If the substrate of the hydrolysis reaction of GGT is glutamine, the reaction is a “glutaminase” reaction. Soy sauce is a traditional Japanese seasoning and its umami taste depends mainly on the amount of glutamic acid. During its fermentation, soy proteins are digested into peptides by proteases from *Aspergillus oryzae* or *sojiae*, and then the peptides are cleaved into amino acids by their peptidases. Glutamine liberated is hydrolyzed to glutamic acid by glutaminase (Fig. 5). If glutaminase is insufficient, glutamine is converted spontaneously to tasteless or slightly sour pyroglutamic acid. Therefore, glutaminase is one of the most important enzymes for flavor enhancement in the manufacture of soy sauce. Soy sauce fermentation is performed in the presence of 18 % (~3 M) NaCl at pH 5.5 to prevent contamination. In the presence of such high concentration of NaCl, the activity of *Aspergillus* glutaminase is strongly inhibited. Therefore, salt-tolerant glutaminases were searched for in bacteria to apply to the fermentation mixture of soy sauce. We found that *Bacillus subtilis* synthesizes salt-tolerant GGTs. To elucidate the reason why *B. subtilis* GGT is salt-tolerant, salt-tolerant mutant of *Escherichia coli* GGT which is originally not salt-tolerant was isolated.

The large differences of *B. subtilis* GGT from *E. coli* GGT are the 14 amino acids insertion near the C-terminal of the large subunit and the 10 amino acids deletion at the center of the small subunit. The same insertion and deletion, and their combination were introduced in *E. coli* GGT. The activity of the deletion-type and the combination-type was severely reduced and the insertion-type was more salt-sensitive than the wild-type.

We developed an effective screening method employing the activity staining. Error-prone PCR was performed on the *E. coli ggt* gene and two salt-tolerant mutants were isolated using this screening method. We also found that the salt-tolerance depends on the substrates. The mutants we isolated were salt-tolerant using γ -glutamyl- α -naphthylamide as a substrate, but they were not salt-tolerant using glutamine.