

## 耐塩性ヌクレオチダーゼを用いた調味料の旨味成分増強に関する研究

三本木 至宏

広島大学大学院生物圏科学研究科

**概要** 自然界には様々な塩環境がある。例えば水域に限ると、淡水、汽水、海水、そして塩湖水があり、それぞれの環境の塩濃度に適応して微生物が生息している。海水や塩湖水に生息する微生物が作り出す酵素は、塩濃度が高くても活性を維持しているケース、すなわち酵素に耐塩性があることが知られており、それが産業利用する際のメリットとなることが期待されている。

本研究では、調味料の旨味成分増強に役立つ有用酵素を探索し、その特徴、特に酵素の耐塩性のメカニズムを知ることが目的とした。本研究で具体的にターゲットとする酵素は、核酸系の旨味成分であるイノシン酸やグアニル酸を合成し得る 5'-nucleotidase (NTase) である。NTase の由来は、海洋環境に生息する細菌、*Shewanella violacea* とした。本菌は、海洋環境でも低温で高圧を特徴とする深海環境(海底約 5,000 m)から単離されたものであり、ヒトが住めないという定義から「極限環境」微生物の一種である。さらに本研究では、*S. violacea* の 5'-nucleotidase (SVNTase) の対照として、同属の細菌であるが生息環境が全く異なる *Shewanella amazonensis* 由来の 5'-nucleotidase (SANTase) を取り上げ、二種の相同蛋白質を比較しながら研究を進めた。なお *S. amazonensis* は、アマゾン川河口の汽水域から単離された細菌であり、ヒトと同程度の常温・常圧でもっともよく生育するため、*S. violacea* とは異なり極限環境微生物ではない。一般に、微生物が生育する pH に応じて酵素蛋白質の発現量を変えることが報告されており、例えば、神経興奮抑制作用のある  $\gamma$ -aminobutylic acid (GABA) を合成する glutamate decarboxylase が酸性 pH で顕著に上昇する例が大腸菌と乳酸菌で知られている。そこでまず本研究では、*S. violacea* が pH 5~7 で生育することを見出し、さらに pH 5 と pH 7 で生育させた菌体から抽出した mRNA の配列を網羅的に解析した。その結果、pH 7 で生育させた菌体からは SVNTase の mRNA の量が、pH 5 で生育させた菌体の 6 倍以上となることを明らかにした。したがって、*S. violacea* を pH 7 で 8リットル培養し、得られた菌体から SVNTase を精製した。同様に *S. amazonensis* も pH 7 で培養し、得られた菌体から SANTase を精製し、以降の実験に供した。

精製した SVNTase 及び SANTase は、単一のポリペプチド鎖からなる分子量約 59 kDa の蛋白質であった。いずれも種々の 5'-nucleotide を基質とし、その触媒作用には 10 mM の  $MgCl_2$  を必要とした。さらに、活性に最適な pH は 8 であり、*S. violacea* の最適生育 pH 7 とほぼ一致した。しかし、SVNTase は 2.5 M の NaCl 存在下でも十分な活性を維持していたのだが、SANTase の活性は同じ濃度の NaCl 存在下では著しく低下した。この結果は、SVNTase は高塩濃度の環境でも活性を維持することを示唆し、塩濃度が高いことが想定される調味料の半製品に添加しても十分に利用できる可能性を示すものである。SVNTase 及び SANTase のアミノ酸配列は 7 割程度一致している。しかし、酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸残基の比と塩橋の数が異なっており、こうした蛋白質構造上の違いが、NaCl の濃度変化に対する活性の違いを生み出していると結論付けることができた。

### 1. 研究目的

本研究は、調味料の旨味成分増強に役立つ有用酵素を探索し、その特徴、特に酵素の耐塩性のメカニズムを知

ることを目的とする。

自然界には様々な塩環境がある。例えば水域に限ると、淡水、汽水、海水、そして塩湖水があり、それぞれの環境

の塩濃度に適応して微生物が生息している。海水や塩湖水に生息する微生物が作り出す酵素は、塩濃度が高くて活性を維持しているケース、すなわち酵素に耐塩性があることが知られており、それが産業利用する際のメリットとなることが期待されている。

本研究で具体的にターゲットとする酵素は、核酸系の旨味成分であるイノシン酸やグアニル酸を合成し得る 5'-nucleotidase (NTase) である。NTase の由来は、海洋環境に生息する細菌、*Shewanella violacea* として<sup>(1)</sup>(Table 1)。本菌は、海洋環境でも低温で高圧を特徴とする深海環境(海底約 5,000 m)から単離されたものであり、ヒトが住めないという定義から「極限環境」微生物の一種とされている。さらに本研究では、*S. violacea* の 5'-nucleotidase (SVNTase) の対照として、同属の細菌であるが生息環境が全く異なる *Shewanella amazonensis*<sup>(2)</sup>由来の 5'-nucleotidase (SANTase) を取り上げ、二種の相同蛋白質を比較しながら研究を進めた。なお、*S. amazonensis* はアマゾン川河口の汽水域から単離された細菌であり、ヒトと同程度の常温・常圧でもっともよく生育するため、*S. violacea* とは異なり極限環境微生物ではない(Table 1)。

## 2. 方法と結果, 考察

### 2.1 *S. violacea* の生育 pH

一般に、微生物が生育する pH に応じて酵素蛋白質の発現量を変えることが報告されており、例えば、神経興奮抑制作用のある  $\gamma$ -aminobutylic acid (GABA) を合成する glutamate decarboxylase が酸性 pH で顕著に上昇する例が大腸菌や乳酸菌で知られている。そこで本研究では、*S. violacea* が酸性から中性の pH で生育できるかどうか調べ

たところ、pH 5~7 で生育できるが、pH 4.5 では生育できないことが分かった。

### 2.2 *S. violacea* の網羅的 RNA 解析

前項の結果から、*S. violacea* は pH 5~7 で生育できることが分かった。そこで、有用酵素の発現が pH 5 と pH 7 の培養条件の違いで変わってくるのかどうかを調べるために、網羅的な RNA 解析を行った。

まず *S. violacea* を 4 mL スケール、pH 5 と pH 7 それぞれを三連で培養した。得られた培養液(計 6 本)から独立して菌体を回収し、さらにそれぞれから PureLink<sup>®</sup> RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) を使って独立して RNA を抽出した。得られた RNA 溶液を pH 5 で培養した菌体からのものと pH 7 で培養した菌体からのものでそれぞれ一つにまとめ、株式会社マクロジェン・ジャパン(マ社)に送付した。

マ社は、RNA の品質を Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システムによって確認した上で、次世代シーケンスにより網羅的に RNA 配列を解析した。その結果、pH 7 で培養した菌体からの SVNTase の mRNA の量が、pH 5 で培養した菌体の 6 倍以上となることが分かった。したがって、SVNTase の調製は pH 7 で培養した *S. violacea* 菌体から行うこととした。

### 2.3 SVNTase と SANTase の精製

*S. violacea* を pH 7 で 8 リットル培養し、得られた菌体から SVNTase を精製した。予備実験により、SVNTase は菌体の膜画分に局在することが分かっていたので、菌体から膜を調製し、界面活性剤 C12E8 によって可溶化後、各種カラムクロマトグラフィにより、SVNTase を精製した(Figure 1A)。さらに、マスペクトル分析により、SVNTase の分子量は

Table 1. *S. violacea* と *S. amazonensis* の比較

	<i>S. violacea</i>	<i>S. amazonensis</i>
・分離源	琉球海溝, -5000m	アマゾン河口, 0m
・0 M NaClでの生育	-	+
・生育至適NaCl濃度(M)	0.51	0.17
・分類	中度好塩菌	非好塩菌
・5'-ヌクレオチダーゼ	SVNTase	SANTase

59.2 kDa と見積もることができた (Figure 1B)。同様に *S. amazonensis* も pH 7 で培養し、得られた菌体から SANTase を精製した (結果非表示)。

## 2. 4 SVNTase と SANTase の配列

精製した SVNTase, 及び SANTase の N 末端アミノ酸残基は分からなかったが, 2 残基目以降は, それぞれ XGSDNDD, 及び XMDAD であることが分かった (Figure 2)。これらの配列は, *S. violacea*, 及び *S. amazonensis* のゲノムデータベース上に登録されており, いずれも 5'-nucleotidase (NTase) であることを確認した。

ゲノム情報から, いずれの NTase とも成熟蛋白質の N 末端は Cys であると推定された。さらに, 成熟型蛋白質の残基数は, SVNTase 及び SANTase, それぞれ 549 残基と 551 残基であり, マススペクトル分析の結果と一致した。また, 成熟部分には特に疎水性の高い領域はなかったため, 前駆体蛋白質がシグナルペプチドによりペリプラズムに輸送された後切断され, 成熟型の N 末の Cys が脂質等で修飾されて膜にアンカーしているものと推定できた。

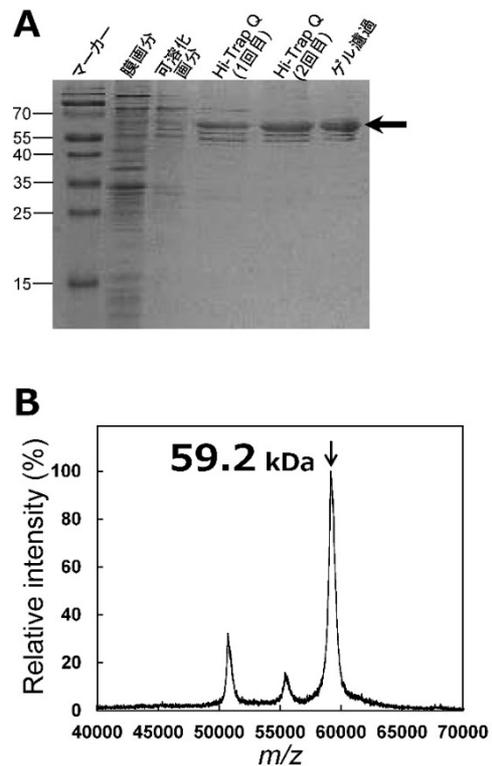


Figure 1. SVNTase の精製 (A) 精製過程の電気泳動写真。(B) 精製 SVNTase のマススペクトル分析。

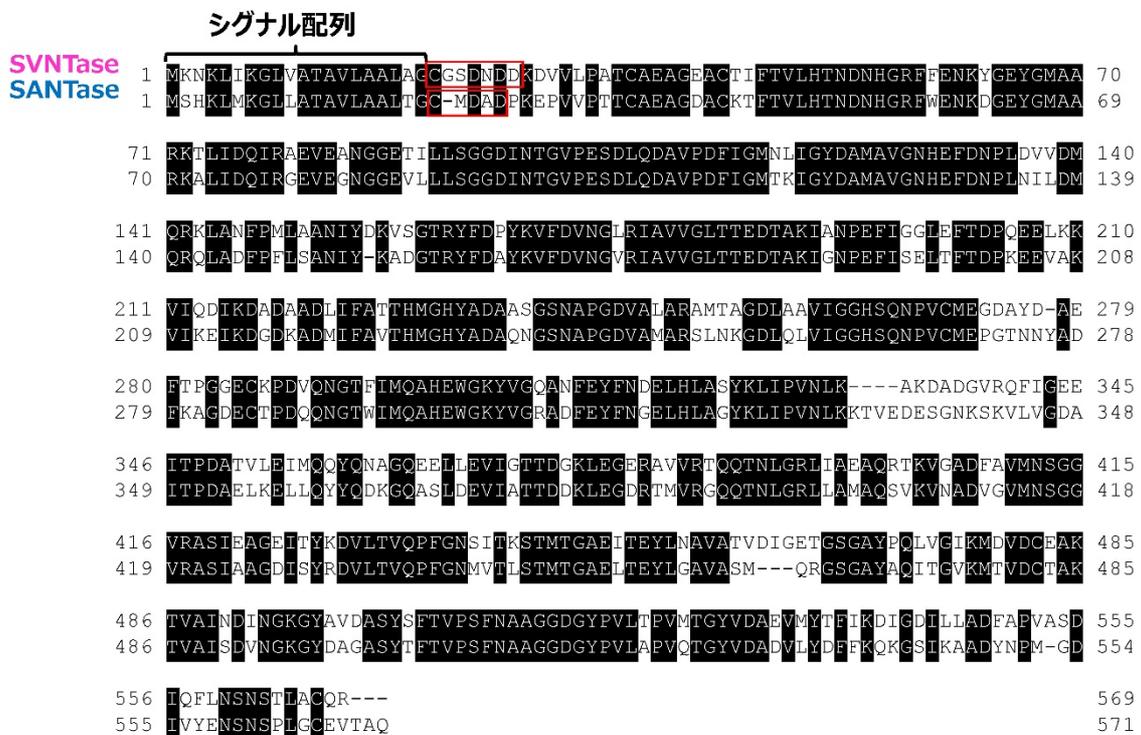


Figure 2. SVNTase と SANTase の一次配列。N 末端アミノ酸配列解析によって分かった配列を赤枠で示している。ゲノム情報からは, その上流にシグナル配列の存在が明らかになった。

## 2.5 SVNTase と SANTase の活性(共通点)

精製した SVNTase 及び SANTase の活性を 5'-nucleotide の一種であるアデノシン三リン酸(ATP)を基質に用いて 30°Cで測定したところ、いくつかの共通点が見出された。

### pH 依存性

SVNTase 及び SANTase の活性を pH 5 から 11 の範囲で測定したところ、いずれも pH 8 で最大活性を示すことが明らかになった (Figure 3)。

### 2 価カチオン依存性

SVNTase 及び SANTase の活性を各種2価カチオン存在下で測定したところ、いずれも 10 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下で最大活性を示すことが明らかになった (Figure 4)。

### 基質特異性

SVNTase 及び SANTase の活性を ATP 以外の基質を用いて測定したところ、いずれも広く 5'-nucleotide を基質とすることが分かった (Figure 5)。さらに、3'-nucleotide は基質としないことが明らかになり、一次配列のみならず酵素の活性面からも、両者が NTase であることを確認できた。

## 2.6 SVNTase と SANTase の活性(相違点)

精製した SVNTase 及び SANTase の活性を、ATP を基質に測定したところ、相違点も見出された。

### 温度依存性

SVNTase 及び SANTase の活性を 10 から 60°C の範囲で測定したところ、最大活性値を示す温度は、それぞれ 30°C 及び 50°C であり (Figure 6)、前者よりも後者の方が温度に対して安定であった。

SVNTase 及び SANTase が由来する *S. violacea* 及び *S. amazonensis* の生育最適温度は、それぞれ 8°C 及び 37°C であるので、それぞれの NTase の温度に対する安定性は、由来する細菌の生育温度に対応するものであると考察した。

### NaCl 濃度依存性

SVNTase 及び SANTase の活性を 30°C で NaCl 濃度を変えて測定したところ、SVNTase は 2.5 M の NaCl 存在下でも十分な活性があったが、SANTase の活性は同じ濃度の NaCl 存在下では著しく低下した (Figure 7)。この結果は、SVNTase が高塩濃度の環境でも活性を維持し耐塩性があることを示唆する。

## 2.7 SVNTase の耐塩性に関する一次構造上の特徴

前項の実験結果より、SVNTase には耐塩性があることが示唆された。この知見は、塩濃度が高いことが想定される調味料の半製品に SVNTase を添加しても十分に利用できる可能性を示すものである。そうすることで、半製品中の核酸系の旨味成分を調節できるはずである。

SVNTase の耐塩性のメカニズムを知ることは、他の有用酵素を耐塩化する際の学術的知見として価値があると考ええる。そこで、本項目では以下、SVNTase と対照とした SANTase との一次構造比較から分かった SVNTase の耐塩性について解説する。

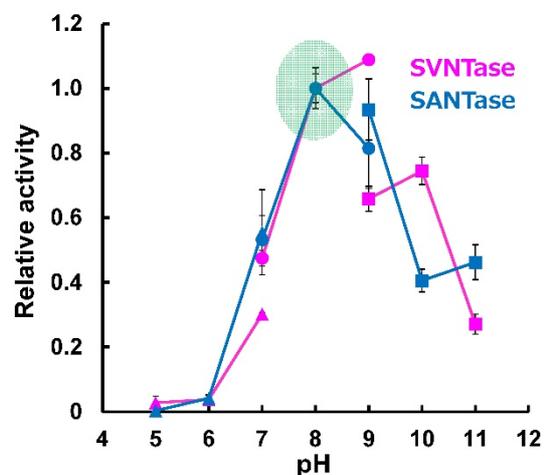


Figure 3. SVNTase 及び SANTase の pH 依存性。いずれも pH 8 で最大活性を示した。

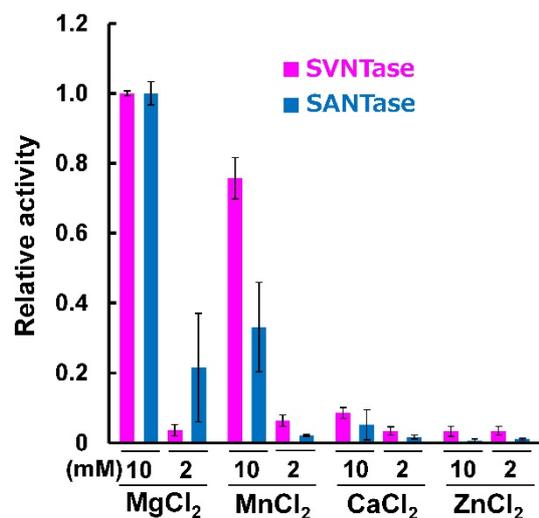


Figure 4. SVNTase 及び SANTase の 2 価カチオン依存性。いずれも 10 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下で最大活性を示した。

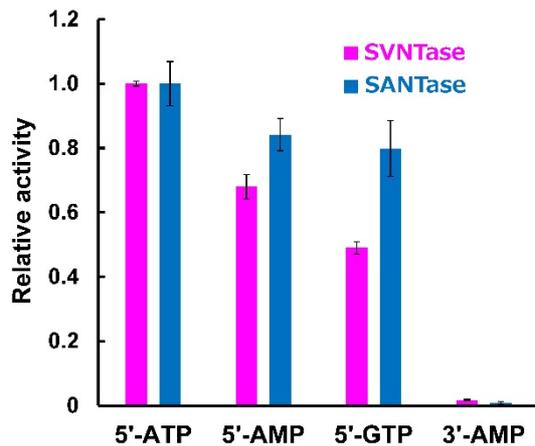


Figure 5. SVNTase 及び SANTase の基質特異性。いずれも広く 5'-nucleotide を基質とすることが分かった。

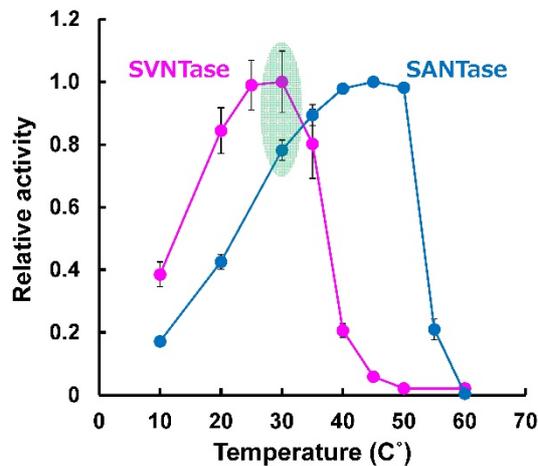


Figure 6. SVNTase 及び SANTase の温度依存性。SVNTase よりも SANTase の方が温度に対して安定であった。

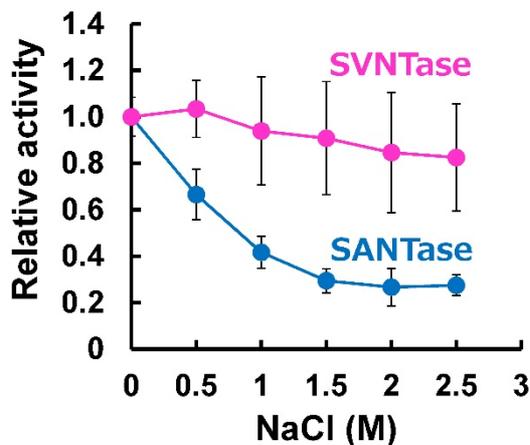


Figure 7. SVNTase 及び SANTase の NaCl 濃度依存性。SVNTase は耐塩性があった。

近年のプロテオミクス解析から、一般的に好塩菌由来の蛋白質は通常の生物から得られる相同蛋白質と比べて、酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸残基の数の比(酸性/塩基性アミノ酸比)が高い傾向、すなわち塩基性アミノ酸よりも酸性アミノ酸の数の方が多くなる<sup>(3)</sup>。そこで、SVNTase と SANTase の成熟部分の一次構造上の酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸を数え、その比を計算したところ、前者は 1.84、そして後者は 1.49 となった (Table 2)。この結果は、塩耐性を示す SVNTase の酸性/塩基性アミノ酸比が SANTase よりも高く、好塩菌由来の蛋白質で言われている一般論を本研究の生化学実験で実証できたことを意味する。

## 2. 8 三次構造から見た SVNTase の耐塩性メカニズム

大腸菌由来の NTase は、その三次構造が決定されている<sup>(4)</sup>。大腸菌 NTase の既知の構造を基に、SVNTase と SANTase 三次構造をシミュレーションすることができる (Figure 8)。

Table 2. SVNTase と SANTase の比較

<i>Shewanella</i> 属細菌	好塩性		分類	NTase 酸性/塩基性 アミノ酸比
	0 M NaCl 下での生育	生育至適NaCl 濃度(M)		
<i>S. violacea</i>	—	0.51	中度好塩菌	1.84
<i>S. amazonensis</i>	+	0.17	非好塩菌	1.49

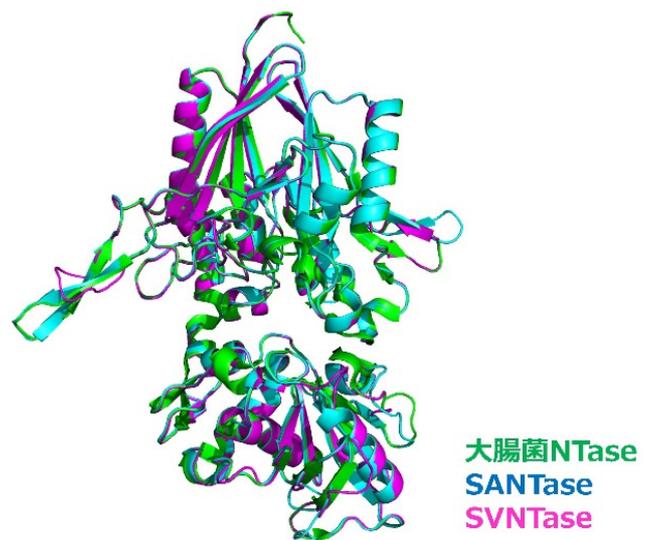


Figure 8. SVNTase 及び SANTase の三次構造シミュレーション。それぞれの主鎖の構造は大腸菌 NTase のそれとよく一致する。

以上の通りシミュレーションした SVNTase と SANTase の三次構造上で、酸性と塩基性のアミノ酸残基を色分けすると、前者の方が、酸性アミノ酸残基が多いことが可視化できた (Figure 9)。これは前項の考察を支持する。

三次構造上のアミノ酸側鎖間の相互作用に着目すると、耐塩性のある SVNTase の塩橋の数は、SANTase よりも少ないことが明らかになった (Figure 10)。具体的には、前者の塩橋数が 9 であるのに対して、後者は 14 であった。

塩橋とは、酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸残基との間に働くイオン性の相互作用である。蛋白質溶液中に  $\text{Na}^+$  や  $\text{Cl}^-$  などのイオンが存在すると蛋白質内に形成される塩橋の結合を弱めることになる (Figure 11)。SVNTase と SANTase との比較から、前者は塩橋数がより少ないことが明らかになった。したがって SVNTase が活性のある構造を維持するためには、SANTase と比べて溶液中のイオンの影響をより受けにくいと考えることができる。これが三次構造から見た SVNTase の耐塩性であると考察した (Figure 11)。

## 謝 辞

本研究は、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団研究助成の援助を受けて実施したものであり、この場を借りて深く御礼申し上げます。

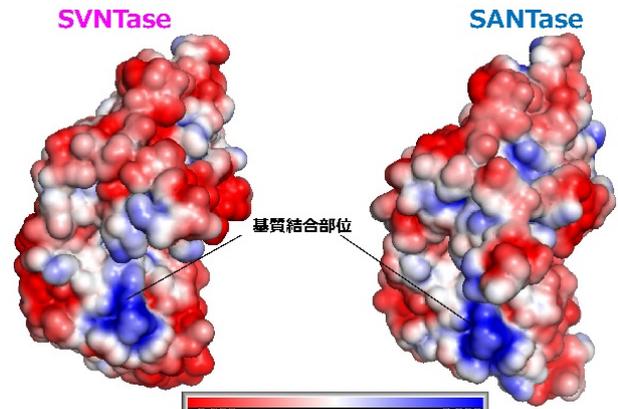


Figure 9. SVNTase と SANTase の酸性(赤)及び塩基性(青)アミノ酸残基分布。

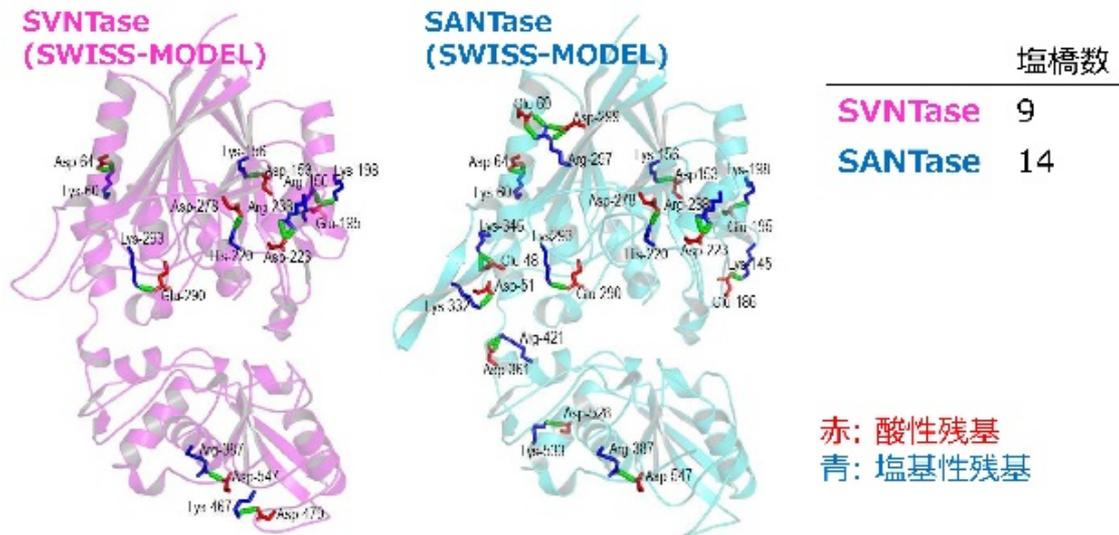


Figure 10. SVNTase と SANTase の塩橋数の違い。

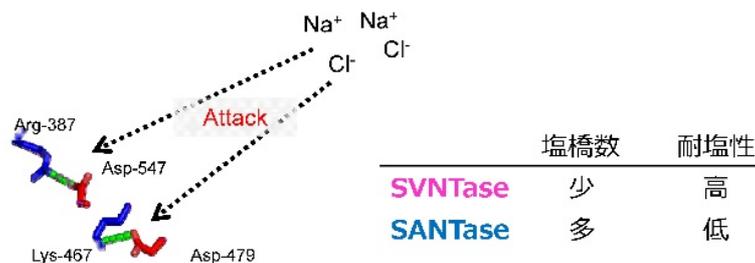


Figure 11. 溶液中のイオンが塩橋の結合を弱める。SVNTase と SANTase の塩橋数の違いと耐塩性の関係。

## 引用

- (1) Nogi Y, Kato C, Horikoshi K (1998) Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. Arch Microbiol 170:331–338
- (2) Venkateswaran K, Dollhopf ME, Aller R, Stackebrandt E, Nealson KH (1998) *Shewanella amazonensis* sp. nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds. Int J Syst Bacteriol 48:965–972
- (3) Rhodes ME, Fitz-Gibbon ST, Oren A, House CH (2010) Amino acid signatures of salinity on an environmental scale with a focus on the Dead Sea. Environ Microbiol 12:2613–2623
- (4) PDB ID: 1HPU

## Studies on Enhancement of Umami Compounds in Seasoning through Halotolerant Nucleotidases

Yoshihiro Sambongi

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

### Summary

*Shewanella* species are widely distributed in sea, brackish, and fresh water areas, growing psychrophilically or mesophilically, and piezophilically or piezo-sensitively. Here, membrane-bound 5'-nucleotidases (NTases) from deep-sea *Shewanella violacea* and brackish water *Shewanella amazonensis* were examined from the aspect of NaCl tolerance in order to gain an insight into protein stability against salt. Both NTases were single polypeptides with molecular masses of ~59 kDa, as determined on mass spectroscopy. They similarly required 10 mM MgCl<sub>2</sub> for their activities, and they exhibited the same pH dependency and substrate specificity for 5'-nucleotides. However, *S. violacea* 5'-nucleotidase (SVNTase) was active enough in the presence of 2.5 M NaCl, whereas *S. amazonensis* 5'-nucleotidase (SANTase) exhibited significantly reduced activity with the same concentration of the salt. Although SVNTase and SANTase exhibited high sequence identity (69.7%), differences in the ratio of acidic to basic amino acid residues and the number of potential salt bridges maybe being responsible for the difference in the protein stability against salt. 5'-Nucleotidases from these *Shewanella* species will provide useful information regarding NaCl tolerance, which may be fundamental for understanding bacterial adaptation to growth environments.