

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)公開特許公報(A)

(11)公開番号  
特開2024-6086  
(P2024-6086A)

(43)公開日 令和6年1月17日(2024.1.17)

## (51)国際特許分類

C 12 N	15/57 (2006.01)	F I	C 12 N	15/57
C 12 N	9/48 (2006.01)		C 12 N	9/48
C 12 P	13/14 (2006.01)		C 12 P	13/14
A 23 L	33/175 (2016.01)		A 23 L	33/175

テーマコード(参考)

Z N A	4 B 0 1 8
	4 B 0 5 0
Z	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全22頁)

(21)出願番号 特願2022-106652(P2022-106652)  
(22)出願日 令和4年6月30日(2022.6.30)

(71)出願人 000004477  
キッコーマン株式会社  
千葉県野田市野田 250 番地  
(74)代理人 100099759  
弁理士 青木 篤  
(74)代理人 100123582  
弁理士 三橋 真二  
(74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一  
(74)代理人 100141977  
弁理士 中島 勝  
(74)代理人 100138210  
弁理士 池田 達則  
(74)代理人 100166165  
弁理士 津田 英直

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L - ピログルタミン酸開環酵素

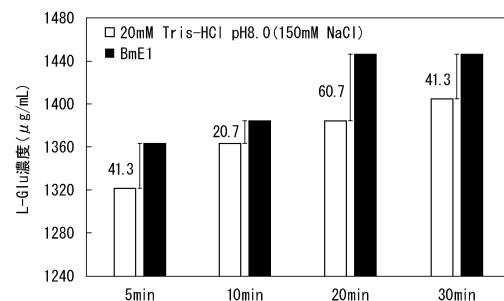
## (57)【要約】

【課題】調味料や保存食品の製造において使用可能な、ATP非依存性のL - ピログルタミン酸開環酵素の提供を目的とする。

【解決手段】以下の特性：至適pH：6.0 ~ 6.5、至適温度：45 ~ 65、温度安定性：50以下、分子量：58 ~ 62 kDaを有する、新規L - ピログルタミン酸開環酵素を提供する。さらにかかる新規L - ピログルタミン酸開環酵素は、配列番号3のアミノ酸配列、配列番号3のアミノ酸配列に、少なくとも90%同一性を有する配列、又は配列番号3のアミノ酸配列に、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加された配列からなるアミノ酸配列を有することを特徴とする。

【選択図】 図15

図15



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A T P 非依存性の L - ピログルタミン酸開環酵素であつて、以下の特徴：

至適 pH : 6.0 ~ 6.5

至適温度 : 45 ~ 65

温度安定性 : 50 以下で 10 分間で 80 % 以上の残存活性を有する

分子量 : 58 ~ 62 kDa

を有する、L - ピログルタミン酸開環酵素。

## 【請求項 2】

前記 L - ピログルタミン酸開環酵素が、バチルス属又はプリエスチア属由来である、請求項 1 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。 10

## 【請求項 3】

前記プリエスチア属細菌が、プリエスチア・メガテリウム (Priestia megaterium) 又はプリエスチア・アリヤバハッタイ (Priestia aryabhattai) からなる群から選ばれる、請求項 2 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

## 【請求項 4】

亜鉛要求性を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

## 【請求項 5】

アミドヒドロラーゼ 2 のモチーフを有さない、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。 20

## 【請求項 6】

前記 L - ピログルタミン酸開環酵素が、カルボキシルペプチダーゼモチーフを有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

## 【請求項 7】

カルボキシペプチダーゼモチーフが、ヒスチジン、グルタミン酸、及びヒスチジンから構成される活性中心を有する、請求項 6 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

## 【請求項 8】

亜鉛イオンが、前記活性中心のヒスチジン、グルタミン酸、及びヒスチジンにより配位される、請求項 7 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。 30

## 【請求項 9】

亜鉛イオンが、His 204、Glu 121、及び His 118 により配位される、請求項 8 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

## 【請求項 10】

さらに Gln 305、Tyr 267、及び Arg 165 が配位に関与する、請求項 9 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

## 【請求項 11】

以下の：

配列番号 3 のアミノ酸配列、

配列番号 3 のアミノ酸配列に少なくとも 90 % 同一性を有する配列、又は

配列番号 3 のアミノ酸配列に 1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加された配列からなり、A T P 非依存性の L - ピログルタミン酸開環活性を有する、L - ピログルタミン酸開環酵素。 40

## 【請求項 12】

His 204、Glu 121、His 118、Tyr 267、及び Arg 165 モチーフを含み、かつ配列番号 3 のアミノ酸配列に対し、少なくとも 70 % 同一性を有する配列からなり、A T P 非依存性の L - ピログルタミン酸開環活性を有する、L - ピログルタミン酸開環酵素。

## 【請求項 13】

以下の：

- (1) 配列番号3のアミノ酸配列をコードする塩基配列、
- (2) 配列番号2の塩基配列、
- (3) (1)又は(2)に記載の塩基配列に、少なくとも90%同一性を有する配列、  
からなり、L-ピログルタミン酸開環酵素をコードするDNA。

**【請求項14】**

請求項1～12のいずれか一項に記載のL-ピログルタミン酸開環酵素をL-ピログルタミン酸含有溶液に適用し、L-グルタミン酸濃度を増加させる方法。

**【請求項15】**

請求項1～12のいずれか一項に記載のL-ピログルタミン酸開環酵素をL-ピログルタミン酸含有食品に適用し、L-グルタミン酸濃度を増加させた食品を製造する方法。 10

**【請求項16】**

前記L-ピログルタミン酸含有食品が、トマト加工物又は醤油である、請求項15に記載の方法。

**【請求項17】**

L-ピログルタミン酸開環酵素が、pH4～10、15～65でL-ピログルタミン酸含有食品に適用される、請求項15又は16に記載の方法。

**【請求項18】**

請求項15～17のいずれか一項に記載の方法により製造された食品。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

20

**【0001】**

本発明は、L-ピログルタミン酸をL-グルタミン酸へと開環する酵素、および当該酵素をコードする遺伝子、並びに当該酵素の利用方法に関する。

**【背景技術】**

**【0002】**

L-ピログルタミン酸は、飲食品の製造及び保存過程で、L-グルタミン酸又はL-グルタミンの非酵素的な閉環反応により生じる無味の物質である。加熱処理や長期の保存により、飲食品中のL-ピログルタミン酸の含有量が増加する。飲食品の製造及び保存過程で無味であるL-ピログルタミン酸が生成すると、L-グルタミン酸含有量が低下し、本来L-グルタミン酸が呈するうま味が失われてしまう。長期の発酵過程を経る発酵飲食品の製造過程では、ペプチドの分解によりL-グルタミン酸が生成し、またペプチド分解により生じたL-グルタミンがさらにグルタミナーゼの作用を受けることによりL-グルタミン酸が生成する。こうして生成したL-グルタミン酸は、発酵飲食品のうま味を構成する。したがって、発酵過程においてL-ピログルタミン酸の生成を抑制することが必要になる。醤油の製造過程では、L-ピログルタミン酸開環酵素を適用させることにより、L-ピログルタミン酸をL-グルタミン酸へと変換することで、うま味に富んだ醤油を製造することが検討されている（特許文献1：WO2014/126186）。

30

**【0003】**

5-オキソプロリナーゼは、国際生化学連合の酵素委員会による分類基準においてEC 3.5.2.9に分類され、ピログルタマーゼ、L-ピログルタミン酸加水分解酵素とも称される酵素である。これまでにいくつかの生物種から、5-オキソプロリナーゼ活性が確認されている。ラット（非特許文献1：Scand. J. Clin. Lab. Invest. 32, 233-237, 1973；非特許文献2：Proc. Nat. Acad. Sci USA 68, 2982-2985, 1971）、シードモナス属（非特許文献3：Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 90-96, 1974）、アルカリゲネス属（非特許文献4：Plant Physiol. 62, 798-801, 1978）、酵母（特許文献2：特開平8-252075号公報）、及びアスペルギルス属（特許文献1：WO2014/126186）由来の5-オキソプロリナーゼが知られている。これらの5-オキソプロリナーゼは、Mg<sup>2+</sup>やK<sup>+</sup>等の金属イオン要求性であり、またATP依存性である。ATP依存性の酵素は、ATP再生に関する問題があり、飲食品の製造過程において生成したL-ピログルタミン酸を開環するのに適さない。

40

50

## 【0004】

また、5-オキソプロリナーゼ以外のL-ピログルタミン酸開環酵素として、アルカリゲネス・フェイカリス(*Alcaligenes faecalis*)属由来の約4万7千Daのタンパク質及び当該タンパク質をコードする遺伝子が特定されている(特許文献3及び4:特開平9-250号公報及び特開平11-221078号公報)。かかる酵素はATP非依存性ではあるが、至適pHが中性～アルカリ性にあるため、発酵飲食品、特に醤油中に生成したL-ピログルタミン酸の開環には適していない。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

10

【特許文献1】国際公開第2014/126186号

【特許文献2】特開平8-252075号公報

【特許文献3】特開平9-250号公報

【特許文献4】特開平11-221078号公報

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献1】Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1973) 32, 233-237

【非特許文献2】Proc. Nat. Acad. Sci USA (1971) 68, 2982-2985

【非特許文献3】Biochem. Biophys. Res. Commun. (1974) 56, 90-96

【非特許文献4】Plant Physiol. (1978) 62, 798-801

20

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

調味料や保存食品の製造において使用可能な、ATP非依存性のL-ピログルタミン酸開環酵素の提供を目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

30

本発明者らは、L-ピログルタミン酸開環活性を有する新規酵素を取得すべく鋭意研究を行ったところ、プリエスチア属の細菌がL-ピログルタミン酸開環活性を発揮することを見出した。次いで本発明者らは、このプリエスチア属の細菌から新規L-ピログルタミン酸開環酵素を単離し、特性解析をするとともに、そのアミノ酸配列及び遺伝子配列を特定し、本発明に至った。そこで、本発明は以下に関する:

## 【0009】

[1] ATP非依存性のL-ピログルタミン酸開環酵素であって、以下の特徴:

至適pH: 6.0～6.5

至適温度: 45～65

温度安定性: 50以下で10分間で80%以上の残存活性を有する

分子量: 58～62kDa

を有する、L-ピログルタミン酸開環酵素。

[2] 前記L-ピログルタミン酸開環酵素が、バチルス属又はプリエスチア属由来である、項目1に記載のL-ピログルタミン酸開環酵素。

40

[3] 前記プリエスチア属細菌が、プリエスチア・メガテリウム(*Priestia megaterium*)又はプリエスチア・アリヤバハッタイ(*Priestia aryabhattai*)からなる群から選ばれる、項目2に記載のL-ピログルタミン酸開環酵素。

[4] 亜鉛要求性を有する、項目1～3のいずれか一項に記載のL-ピログルタミン酸開環酵素。

[5] アミドヒドロラーゼ2のモチーフを有さない、項目1～4のいずれか一項に記載のL-ピログルタミン酸開環酵素。

[6] 前記L-ピログルタミン酸開環酵素が、カルボキシルペプチダーゼモチーフを有する、項目1～5のいずれか一項に記載のL-ピログルタミン酸開環酵素。

50

[ 7 ] カルボキシペプチダーゼモチーフが、ヒスチジン、グルタミン酸、及びヒスチジンから構成される活性中心を有する、項目 6 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

[ 8 ] 亜鉛イオンが、前記活性中心のヒスチジン、グルタミン酸、及びヒスチジンにより配位される、項目 7 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

[ 9 ] 亜鉛イオンが、His 204、Glu 121、及び His 118 により配位される、項目 8 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

[ 10 ] さらに Glu 305、Tyr 267、及び Arg 165 が配位に関与する、項目 9 に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素。

[ 11 ] 以下の：

配列番号 3 のアミノ酸配列、

10

配列番号 3 のアミノ酸配列に少なくとも 90 % 同一性を有する配列、又は

配列番号 3 のアミノ酸配列に 1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加された配列からなり、ATP 非依存性の L - ピログルタミン酸開環活性を有する、L - ピログルタミン酸開環酵素。

[ 12 ] His 204、Glu 121、His 118、Tyr 267、及び Arg 165 モチーフを含み、かつ配列番号 3 のアミノ酸配列に対し、少なくとも 70 % 同一性を有する配列からなり、ATP 非依存性の L - ピログルタミン酸開環活性を有する、L - ピログルタミン酸開環酵素。

[ 13 ] 以下の：

( 1 ) 配列番号 3 のアミノ酸配列をコードする塩基配列、

20

( 2 ) 配列番号 2 の塩基配列、

( 3 ) ( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の塩基配列に、少なくとも 90 % 同一性を有する配列、からなり、L - ピログルタミン酸開環酵素をコードする DNA。

[ 14 ] 項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素を L - ピログルタミン酸含有溶液に適用し、L - グルタミン酸濃度を増加させる方法。

[ 15 ] 項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の L - ピログルタミン酸開環酵素を L - ピログルタミン酸含有食品に適用し、L - グルタミン酸濃度を増加させた食品を製造する方法。

[ 16 ] 前記 L - ピログルタミン酸含有食品が、トマト加工物又は醤油である、項目 1 に記載の方法。

30

[ 17 ] L - ピログルタミン酸開環酵素が、pH 4 ~ 10、15 ~ 65 で L - ピログルタミン酸含有食品に適用される、項目 15 又は 16 に記載の方法。

[ 18 ] 項目 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法により製造された食品。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明において単離された L - ピログルタミン酸開環活性を有する酵素は、ATP 非依存性で作動し、かつ低い pH において活性を有した。これにより、低 pH となる食品又は調味料に用いることが可能になる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0011】

【図 1A - B】図 1 は、L - ピログルタミン酸開環酵素のアミノ酸配列 (B) 及び当該酵素の ORF についての塩基配列 (A) を示す。BME1 のアミノ酸配列中のドメインについて表示する (C)。

40

【図 1C】図 1 は、L - ピログルタミン酸開環酵素のアミノ酸配列 (B) 及び当該酵素の ORF についての塩基配列 (A) を示す。BME1 のアミノ酸配列中のドメインについて表示する (C)。

【図 2】図 2A は、pUC18 - BME1 のプラスミドマップを示す。図 2B は、pColD1 - His - BME1 のプラスミドマップを示す。

【図 3】図 3A は、pColD1 プラスミドの NdeI - BamHI 切断部位にクローニングされた BME1 の塩基配列を表す。

50

【図 3 B】図 3 B は、p C o l d I - H i s - B m E 1 プラスミドから発現される塩基配列を表す。

【図 3 C】図 3 C は、p C o l d I - H i s - B m E 1 プラスミドから発現されるタンパク質のアミノ酸配列を表す。

【図 4】図 4 は、大腸菌で発現誘導され、精製された H i s - B m E 1 について、S D S - P A G E で分離し、P V D F 膜に転写し、次いで C B C 染色を行った結果を示す。C E は細胞破碎後、N i は、N i - A f f i n i t y 精製後、G F はゲル濾過クロマトグラフィー精製後の結果を示す。

【図 5】図 5 は、各緩衝液を用いた B m E 1 酵素の比活性を示すグラフである。

【図 6】図 6 は、各緩衝液で 4 、 18 時間保存した後に残存する B m E 1 酵素の相対活性を示すグラフである。 10

【図 7】図 7 は、各温度における B m E 1 酵素の比活性を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、各温度で 10 分間処理した後の B m E 1 酵素の残存活性を示すグラフである。 20

【図 9】図 9 は、H i s - B m E 1 酵素を E D T A 処理し、透析により、E D T A を除去し、亜鉛の添加の有無による H i s - B m E 1 酵素の比活性を比較したグラフである。

【図 10】図 10 は、H i s - B m E 1 酵素による L - ポリグルタミン酸の分解により生じた L - グルタミン酸量を示すグラフである。 30

【図 11】図 11 A は、H i s - B m E 1 について結晶構造解析を用いて明らかにされた立体構造を示す。図 11 B は、H i s - B m E 1 の亜鉛配位箇所の拡大図を示す。

【図 12】図 12 はヒト由来カルボキシペプチダーゼ (P D B I D : 5 O M 9 ) の活性中心と、亜鉛が配位すると考えられる箇所を重ね合わせて比較した図である。

【図 13】図 13 は、H i s - B m E 1 の変異体の反応時間 10 分における酵素活性を比較したグラフである。

【図 14】図 14 は、H i s - B m E 1 の変異体の酵素反応時間の経時的な変化による酵素活性を比較したグラフである。

【図 15】図 15 は、トマト缶試料に対し、B m E 1 を適用した場合に、B l a n k に比較して L - G l u 濃度が増加したことを示すグラフである。 40

【図 16】図 16 は、しょうゆ試料に対して、B m E 1 を適用した場合に、B l a n k に比較して L - G l u 濃度が増加したことを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 2】

< L - ピログルタミン酸開環酵素 >

本発明は、新規 L - ピログルタミン酸開環酵素に関する。本発明の L - ピログルタミン酸開環酵素は、A T P 非依存的に L - ピログルタミン酸と水とから、L - グルタミン酸を生成する加水分解反応又はその逆反応を触媒する酵素である。本発明に係る L - ピログルタミン酸開環酵素は、下記の性質のいずれか 1 つ又はその任意の組み合わせにより特徴づけられる。下記の性質は、本技術分野に周知の方法により決定することができる。

【0 0 1 3】

(1) 至適 pH 及び安定 pH 範囲

本発明に係る L - ピログルタミン酸開環酵素の至適 pH は、6 . 0 ~ 6 . 5 である。本発明に係る L - ピログルタミン酸開環酵素は pH 4 . 0 ~ 1 0 . 5 で安定である。 40

【0 0 1 4】

(2) 至適温度及び安定温度範囲

本発明に係る L - ピログルタミン酸開環酵素の至適温度は、5 5 である。本発明に係る L - ピログルタミン酸開環酵素は 5 0 以下で安定である。

【0 0 1 5】

(3) 金属要求性

本発明に係る L - ピログルタミン酸開環酵素は、2 倍の金属イオン、特に亜鉛イオンを必要とする酵素である。 50

## 【0016】

## (4) カルボキシペプチダーゼ活性

本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素は、カルボキシペプチダーゼ活性を有する。カルボキシペプチダーゼ活性の比活性は、0.2U/mg以上であり、好ましくは0.3U/mg以上である。

## 【0017】

## (5) -ポリグルタミン酸分解活性

本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素は、-ポリグルタミン酸分解活性を有する。-ポリグルタミン酸は分解することで、L-グルタミン酸を生成する。

## 【0018】

## (6) 分子量

分子量は、アミノ酸配列からの推測値で60200Daである。由来元に応じて分子量は変動してもよく、50~70kDaである。分子量は、55kDa以上が好ましく、58kDa以上がより好ましく、65kDa以下が好ましく、62kDa以下がより好ましい。本発明のL-ピログルタミン酸開環酵素は、シグナルペプチドを含んでおり、シグナルペプチドを除去されてもよい。

## 【0019】

## (7) 由来元

本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素は、プリエスチア (Priestia) 属、バチルス (Bacillus) 属、メタバチルス (Metabacillus) 属、サイトバチルス (Cytobacillus) 属、ペリバチルス (Peribacillus) 属、パエニバチルス (Paenibacillus) 属、スプロサルシナ (Sporosarcina) 属、グロビスピロラ (globispora) 属、とベビバクテリウム (Brevibacterium) 属、フリゴリトレランス (frigoritolerans) 属からなる群から選ばれる少なくとも1の属に属する微生物に由来する。なかでも、BLAST解析により多くの種が挙げられたことから、プリエスチア属及びバチルス属が好ましい。より具体的に、プリエスチア・メガテリウム (Priestia megaterium) 又はプリエスチア・アリヤバハッタイ (Priestia aryabhattai) が当該酵素を発現しうる。

## 【0020】

## (8) モチーフ

本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素は、カルボキシルペプチターゼモチーフを有する。さらに、本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素は、アミドヒドロラーゼ2のモチーフを有さないことを特徴とする。カルボキシペプチターゼモチーフとは、ヒスチジン、グルタミン酸、及びヒスチジンから構成される活性中心を構成する保存されたモチーフである。好ましくは、かかる活性中心には亜鉛イオンが配位されうる。かかるカルボキシペプチターゼモチーフは、一例としてHis204、Glu121、及びHis118により配位される。さらにGlu305、Tyr267、及びArg165からなる群から選択される少なくとも1のアミノ酸残基が配位に関与してもよい。これらのカルボキシペプチダーゼのアミノ酸位置は例示であり、亜鉛イオンを配位する限りにおいて変動してもよい。

## 【0021】

## (9) アミノ酸配列

本発明に係るピログルタミン酸開環酵素は、以下の：

配列番号3のアミノ酸配列、

配列番号3のアミノ酸配列に少なくとも70%同一性を有する配列、又は

配列番号3のアミノ酸配列に1又は複数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加された配列

からなり、ATP非依存性のL-ピログルタミン酸開環活性を有する。配列同一性は、一例として、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性であってもよい。アミノ酸の置換、欠失又は付加は、一例として数個、例えば1~9の任意の数のアミノ酸が置換、欠失、

10

20

30

40

50

又は付加されうる。置換される場合には、任意のアミノ酸に置換されてもよいが、保存的置換であることが好ましい。さらに、別の態様では、His 204、Glu 121、His 118、Glu 305、Tyr 267、及びArg 165からなるカルボキシペプチダーゼモチーフを含むことが好ましい。

【0022】

(10) 塩基配列

本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素は、以下の：

(1) 配列番号3のアミノ酸配列をコードする塩基配列、

(2) 配列番号2の塩基配列、

(3) (1)又は(2)に記載の塩基配列に、少なくとも70%同一性を有する配列、  
からなるDNAによりコードされることを特徴とする。配列同一性は、一例として、少  
なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも  
98%、又は少なくとも99%の同一性であってもよい。本発明の別の態様では、本発明  
は、かかる塩基配列からなり、発現されたときにL-ピログルタミン酸開環活性を有する  
核酸、例えばDNAに関するもの。

10

【0023】

本発明に係るL-ピログルタミン酸開環活性を有する酵素をコードするDNAは、ベクターに組み込まれていてもよいし、ベクターに組み込まれて、宿主細胞、例えば大腸菌等に形質転換されていてもよい。本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素をコードするDNAを含むベクターを用いて宿主細胞に形質転換し、かかる宿主細胞を培養することで取得することができるが、かかる手法に限定されるものではない。プリエスチア属やバチルス属の細菌、例えばプリエスチア・メガテリウムを大量培養し、精製により取得してもよい。精製を容易にする観点から、タグ、例えばHisタグを附加して発現させてもよい。精製は、硫安分画、透析、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーなどを単独又は組み合わせて行うことができる。

20

【0024】

<L-ピログルタミン酸開環活性の測定方法>

L-ピログルタミン酸開環活性の測定方法は、ピログルタミン酸含有試料に対し、L-ピログルタミン酸開環酵素を適用し、適用前後の溶液中のピログルタミン酸量及び/又はL-ピログルタミン酸量を測定することで開環活性を測定することができる。測定系が確立している観点から、L-グルタミン酸量に基づいて、開環活性を決定することができる。

30

【0025】

<L-グルタミン酸濃度を増加させる方法>

本発明の別の態様では、本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素をL-ピログルタミン酸含有溶液に適用し、L-グルタミン酸濃度を増加させる方法に関する。本発明のさらに別の態様では、本発明に係るL-ピログルタミン酸開環酵素をL-ピログルタミン酸含有飲食品に適用し、L-グルタミン酸が富化された飲食品を製造する方法に関する。L-グルタミン酸を含む飲食品は、製造課程又は長期保存中にL-グルタミン酸が環化し、無味のL-ピログルタミン酸を精製することがある。このような環化反応は、加熱や長期保存により、非酵素的な反応として生じうる。このような場合に、L-ピログルタミン酸を本発明のL-ピログルタミン酸開環酵素により開環することで、うま味を回復又は増強することができる。この方法は、L-ピログルタミン酸開環酵素を食品に添加することにより行われる。L-グルタミン酸濃度を富化した後に、L-ピログルタミン酸開環酵素を失活させてもよいし、そのまま製品に含ませてもよい。

40

【0026】

L-グルタミン酸及び/又はL-ピログルタミン酸含有飲食品の例としては、調味料、茶飲料、酒飲料、又は保存食品が挙げられる。調味料の中でも、特にL-グルタミン酸を豊富に含む調味料、例えば発酵調味料が好ましい。調味料の一例として、醤油、味噌、魚醤、日本酒、オイスターソース、みりん、つゆ、白だし、トマトケチャップなどが挙げら

50

れる。特に発酵調味料、例えば醤油、味噌、魚醤、みりん等は、発酵過程において、L-ピログルタミン酸を蓄積しうる。茶飲料としては、緑茶、紅茶など挙げられる。茶飲料では、茶葉を熱湯で抽出する際に、うまみ成分のL-グルタミン酸がL-ピログルタミン酸に環化しうるし、缶やペットボトル入りの茶飲料の場合保存中にL-ピログルタミン酸が蓄積しうる。酒飲料のなかでも、特に長期熟成がされた酒、例えば焼酎、日本酒、ウイスキー等ではL-ピログルタミン酸が増加しうる。保存食品としては、缶詰、瓶詰、レトルトパウチ食品が挙げられる。食品の中でも特に、トマト製品は、L-グルタミン酸及び／又はL-ピログルタミン酸含量が高いことが知られており、一例としてトマト缶、トマトピューレ、トマトペースト、トマトケチャップなどが挙げられる。これらのL-グルタミン酸及び／又はL-ピログルタミン酸含有飲食品の製造にあたり、L-ピログルタミン酸開環酵素を添加する工程が含まれうる。

10

#### 【0027】

本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。

#### 【0028】

以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

#### 【実施例】

20

#### 【0029】

##### 実施例1：L-ピログルタミン酸開環酵素の遺伝子クローニング

土壤中から採取され、L-ピログルタミン酸開環活性を有する菌株を単離し、この菌株を全ゲノム解析に供した。ゲノム解析の結果、本菌株は、ブリエスチア・メガテリウム (Priestia Megaterium) であることを示す結果が得られた。なお、ブリエスチア・メガテリウムは、従前はバチルス・メガテリウム (Bacillus Megaterium) に分類されており、近年の再分類により変更された。

この菌株を終濃度10mMのビオチン添加PE培地 (ピログルタメート16g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/L、NaCl 0.5g/L、ビタミンB1 0.2mg/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 400mg/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg/L、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg/L (pH 6.0)) に播種し、135rpm、24時間、31.5で振盪培養した。培養液を、8,000rpm、10分間遠心して菌を除去し、得られた7.2Lの培養上清より酵素精製を試みた。具体的に、培養上清7.2Lに対して240mLの強陰イオン交換樹脂 (Toyopearl Super Q-650M 50% Slurry) を混合し、4で1時間攪拌して、レジンに吸着させた。吸着したレジンはバッチ式で、5%グリセロール含有20mM Tris-HCl溶液 (pH 8.0) 1000mLで洗浄した。続いて、150mM NaClおよび5%グリセロール含有20mM Tris-HCl溶液 (pH 8.0)、1000mLで洗浄後、1.0M NaClおよび5%グリセロール含有20mM Tris-HCl溶液 (pH 8.0) 500mLで溶出した。得られた溶出液は、Amicon Ultra 5 MWCO: 10Kで150mLまで濃縮した後、緩衝液A液 (5%グリセロール含有20mM Tris-HCl溶液 (pH 8.0)) に対して4で8時間透析した。回収した試料は、同緩衝液で平衡化したpH弱陰イオン交換カラム (Capto DEAE HP 5mL) に供し、ステップワイズ溶出で精製した。すなわち、まず15%緩衝液B液 (1M NaClおよび5%グリセロール含有20mM Tris-HCl溶液 (pH 8.0)) で溶出させた後に100%緩衝液B液で溶出した。15%緩衝液B液で溶出した活性画分40mLを回収し、緩衝液A液に対して、4で8時間透析した。回収した試料は、同緩衝液で平衡化した強陰イオン交換カラム (Capto Q HP 5mL) に供し、ステップワイズ溶出で精製した。すなわち、まず40%緩衝液B液で溶出させた後に100%緩衝液B液で溶出した。40%緩衝液B液で溶出した活性画分30mLを回収し、緩衝

30

40

50

液 A 液に対して 4 ℃ で 8 時間透析した。回収した試料は、同緩衝液で平衡化した強陰イオン交換カラム (Resource Q 6 mL) に供し、緩衝液 B 液の 0 - 100 % のグラジエント溶出で酵素を精製し、大量の L - ピログルタミン酸開環活性画分を得た。

### 【0030】

こうして得られた L - ピログルタミン酸開環活性を有する画分を取得し、SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写し、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色によって検出した。L - ピログルタミン酸開環活性を有する候補タンパク質のバンド領域 (65 kDa 付近) の膜を切り出して、膜切片に含まれるタンパク質の N 末端アミノ酸配列解析をアプロサイエンス社に依頼した。バンドに含まれるタンパク質の N 末端のアミノ酸配列の 11 アミノ酸残基は、EV PY G K D Y S Q P (配列番号 1) であった。

10

### 【0031】

決定された 11 残基分のアミノ酸配列をコードする ORF を、同株の全 5446 個の ORF 中から 1 つ見出した。こうして決定された候補タンパク質の ORF の配列は、1653 塩基対からなり、残基数 551 のタンパク質をコードしていた。具体的に、配列番号 2 の塩基配列であり、ORF によりコードされるアミノ酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸配列であった (図 1A 及び B)。全アミノ酸配列を分泌シグナル配列解析サイト SignalP で解析したところ、N 末端 27 残基の配列が分泌シグナル配列として検出された。また、EMBI - EBI のデータベースを基にドメインを検索したところ、N 末端側に Zn<sup>2+</sup> 要求性タンパク質のドメインがあることがわかった (図 1C)。かかる候補タンパク質を BmE1 と呼ぶものとする。全長 BmE1 は、551 残基で、61509 Da の分子量を有するタンパク質である一方、分泌型 BmE1 は 524 残基で、58708 Da のタンパク質である。

20

### 【0032】

菌株より抽出 / 精製したゲノム DNA を鋳型として、以下のエントリークローン構築用プライマーペアを用いた PCR で BmE1 遺伝子断片を増幅した。

### 【表 1】

表 1. エントリークローン構築用プライマーペア

F-primer	5' -AGAGGATCCATGAAAAAAACTGTAA-3' (配列番号 4)	25 mer
R-primer	5' -TACGAATTCTTATTTACGGGATTCT-3' (配列番号 5)	25 mer

30

増幅した DNA 断片をリコンビナーゼ反応を用いて pUC18 Vector の BamHI - EcoRI サイトに組み込んでエントリープラスミド pUC18 - BmE1 を構築した (図 2A)。pUC18 - BmE1 には、N 末端分泌シグナル配列コード領域を含んだ BmE1 全長遺伝子領域をクローニングしてある。次に、pUC18 - BmE1 を鋳型として、以下の発現プラスミド構築用プライマーペアを用いた PCR で、BmE1 遺伝子全長領域の 5' 末端に存在する 81 塩基の分泌シグナル配列コード領域を除いた遺伝子領域を増幅した。

40

### 【表 2】

表 2. 発現プラスミド構築用プライマーペア

F-primer	5' -catatcgaaaggtaggcatatgGAGGTGCCTTATTACGGAA-3' (配列番号 6)	40 mer
R-primer	5' -gacaagcttgaattcgatccTTATTTACGGGATTCTTT-3' (配列番号 7)	40 mer

上記 primer の小文字領域は pCold-I の配列に合わせて設計してある。

増幅した DNA 断片をリコンビナーゼ反応を用いて pCold-I の NdeI - Bam

50

H I サイトに組み込み、N 末端 H i s - t a g 融合型 B m E 1 発現プラスミド p C o l d I - H i s - B m E 1 を構築した(図 2 B)。p C o l d I - H i s - B m E 1 にクローニングされている塩基配列(配列番号 8)を図 3 A に示し、また p C o l d I - H i s - B m E 1 により発現される遺伝子の全長配列(配列番号 9)を図 3 B、並びに発現されるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号 10)を図 3 C に示す。全長アミノ酸配列からの推測分子量は、6 0 2 0 0 D a であった。

### 【 0 0 3 3 】

#### ( 1 ) B l a s t 解析

B m E 1 と類似した配列を探す為に、N C B I (National Center Biotechnology Information) のBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて実施した。検索パラメータはデフォルトを使用した。実施例 1 で明らかにされた B m E 1 の遺伝子及び/又はタンパク質の配列(配列番号 2 / 配列番号 3)を B l a s t 解析に供したところ、バチルス・メガテリウム( *Bacillus Megaterium* )以外にもプリエスチア( *Priestia* )属、メタバチルス( *Metabacillus* )属、サイトバチルス( *Cytobacillus* )属、ペリバチルス( *Peribacillus* )属、パエニバチルス( *Paenibacillus* )属、スプロサルシナ( *Sporosarcina* )属、グロビスピロラ( *globispora* )属、ベビバクテリウム( *Brevibacterium* )属、及びフリゴリトレランス( *frigoritolerans* )属にも B m E 1 遺伝子の相同遺伝子が存在することがわかった。

### 【 0 0 3 4 】

#### ( 2 ) モチーフ解析

E M B L \_ E B I の P f a m 3 5 . 0 を用いてモチーフ検索を行った。検索パラメータはデフォルトを使用した。その結果、ペプチダーゼ 1 4 ファミリーの Z i n c C a r b o x y p e p t i d a s e のモチーフをもつことが明らかになった。

### 【 0 0 3 5 】

#### 実施例 2 : B m E 1 の発現と精製

実施例 1 で調製された発現プラスミド p C o l d I - H i s - B m E 1 を大腸菌 B L 2 1 株に形質転換した。形質転換された菌株を、3 7 で 1 8 時間培養し、次いでコールドショック(氷冷 3 0 分)後に、I P T G (終濃度 0 . 2 m M) 及び Z n S O 4 (終濃度 1 . 0 m M) を添加し、候補タンパク質を発現させて 1 5 で 2 2 時間培養した。菌体を回収し、破碎後に、N i - A f f i n i t y 精製(カラム: H i s - t r a p H P 5 m l ) 及びゲルfiltration 精製(カラム: Superose 6 1 0 / 3 0 0 G L ) により、精製タンパク質を調製した(図 4)。尚、N i - A f f i n i t y 精製には、緩衝液 A (5 0 0 m M N a C l 、1 0 % グリセロール、4 0 m M イミダゾール含有 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液( p H 8 . 0 )) 緩衝液 B (5 0 0 m M N a C l 、1 0 % グリセロール、3 0 0 m M イミダゾール含有 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液( p H 8 . 0 )) を用いて、緩衝液 B の 0 % から 1 0 0 % のステップワイズ溶出で精製し、緩衝液 B の 1 0 0 % 溶出画分を回収した。ゲルfiltration 精製には 1 5 0 m M N a C l 含有 2 0 m M T r i s - H C l ( p H 8 . 0 ) を用いて、各フラクションのタンパク質を P r o t e i n a s s a y 試薬で検出し、S D S - P A G E できれいな溶出画分を回収した。

### 【 0 0 3 6 】

#### 実施例 3 : H i s - B m E 1 の特性解析

こうして調製された精製タンパク質について、生化学的実験を行い、下記の特性を調べた。標準的な酵素反応は、以下の通りに行った。酵素溶液 5 0 μ L 、0 . 5 M M E S - N a O H 緩衝液( p H 6 . 0 ) 2 0 0 μ L 、1 . 0 、2 . 0 、3 . 0 、5 . 0 、1 0 m g / m l ピログルタミン酸( p H 6 . 0 ) 6 0 0 μ L 、0 . 1 M Z n S O 4 1 0 μ L 、M i l l i Q 水 1 3 0 μ L を混合し、4 5 で 1 0 分間反応させた。その後、0 . 5 M E D T A を 1 0 μ L 添加後、9 5 、1 0 分間で酵素を失活させた。得られた反応液 5 0 μ L を用いて L - グルタミン酸測定キット(ヤマサ)を用いて生成したグルタミン酸量を測定し、反応速度を測定した。

10

20

30

40

50

【表3】

表3. L-Glu 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 算出結果

サンプル	反応時間 5 min	反応時間 10 min	反応時間 15 min
1.0 mg/mL	0.2530	0.4740	0.6841
2.0 mg/mL	0.4716	0.6866	1.0745
3.0 mg/mL	0.5258	0.9227	1.3521
5.0 mg/mL	0.5833	1.1673	1.7102
10 mg/mL	0.7476	1.4912	2.1830

10

20

30

【表4】

表4. 各基質濃度における反応速度

基質濃度	反応速度(mg/min)
1.0 mg/mL	0.0000418
2.0 mg/mL	0.0000666
3.0 mg/mL	0.0000821
5.0 mg/mL	0.0001025
10 mg/mL	0.0001349

40

1分間に  $1 \mu\text{mole}$  のピログルタミン酸を開環してグルタミン酸にする酵素活性を 1 U として、各条件で比活性 (U / mg) を算出した。

## 【0037】

## (1) 至適 pH と pH 安定性

標準的な酵素反応を用いて、至適 pH を調べた (図5)。使用した緩衝液を以下に示す。酢酸緩衝液: pH 3.5 ~ 6.0、MES-NaOH 緩衝液: pH 5.5 ~ 6.5、HEPES-NaOH 緩衝液: pH 6.5 ~ 8.0、Tris-HCl 緩衝液: pH 8.0 ~ 9.5、ホウ酸緩衝液: pH 9.5 ~ 10.5。反応に用いた基質の pH は各緩衝液の pH に調整して行った。

その結果、反応至適 pH は、6.0 ~ 6.5 であった。

各緩衝液の終濃度が 0.1 M となるように酵素液に添加後、4、18 時間静置した後に、標準的な測定法に準じて pH 安定性を調べた (図6)。その結果、pH 4.0 ~ 10.5 で安定性を示した。

## 【0038】

## (2) 至適温度及び安定性

標準的な活性測定法に基づき、反応温度のみ 30 ~ 80 の範囲で測定し、至適温度を調べた (図7)。反応至適温度は、約 55 であった。

50

**【 0 0 3 9 】**

酵素溶液のみを 30 ~ 80 の範囲で 10 分間インキュベートした後に、残存する酵素活性値を標準法で調べた。その結果、50 以下で 80 % 以上の残存活性を示し、安定性を保つことが分かった（図 8）。

**【 0 0 4 0 】****( 3 ) 金属要求性**

標準的な酵素反応条件下で、0.5 M EDTA を 10  $\mu$ L 添加して反応させた。その結果、著しく反応は阻害された。また、アフィニティー精製した BME1 に終濃度 5 mM となるように EDTA を添加し、氷上で 30 分間透析した後に、EDTA を含まない緩衝液で 4 、 18 時間透析した。透析した酵素溶液を用いて、亜鉛の添加の有無で酵素活性を測定した結果、亜鉛を添加すると比活性が向上したことから、亜鉛要求性であることが示された（図 8）。

**【 0 0 4 1 】****( 4 ) カルボキシペプチダーゼ活性**

酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット（キッコーマンバイオケミファ社製）を用いて、カルボキシペプチダーゼ活性を測定した。0.332 mg / mL の His-BME1 25  $\mu$ L を用いて、反応温度のみ 55 として、測定キットの手順通りに測定した。その結果、比活性は 0.318 U / mg であり、カルボキシペプチダーゼ活性を有すると考えられる。

**【 0 0 4 2 】****( 5 ) -ポリグルタミン酸分解活性**

実施例 2 で調製された BME1 をポリグルタミン酸（-PGA）含有試料に添加して、試料に含まれる -PGA に作用させることで、検出される L-Glu 濃度が変化するか分析した。20 mg / mL -PGA、MES-NaOH (pH 6.0) 200  $\mu$ L、試料 600  $\mu$ L、ZnSO<sub>4</sub> 10  $\mu$ L（終濃度 1.0 mM）、滅菌水 130  $\mu$ L、0.0332 mg / mL の BME1 50  $\mu$ L を混合し、55 で、5 分、10 分、20 分、30 分間、反応させた。0.5 M EDTA 10  $\mu$ L 添加して、85 5 分間インキュベートすることで、酵素を失活させた。得られた反応液 50  $\mu$ L を用いて L-グルタミン酸測定キット（ヤマサ）を用いて生成したグルタミン酸量を測定した（図 10）。

10

20

30

40

50

【表5】

表5. L-Glu 濃度変化 ( $\gamma$ -PGA)

反応時間	酵素	L-Glu 濃度
5 min	buffer のみ	3.89
	BmE1	4.95
10 min	buffer のみ	4.24
	BmE1	5.35
20 min	buffer のみ	4.44
	BmE1	5.66
30 min	buffer のみ	5.57
	BmE1	6.91

10

20

30

40

50

【0043】

実施例4：His-BmE1の構造解析結晶化条件のスクリーニング

実施例2で精製されたHis-BmE1についての結晶化条件を、Crystal Screen HR2-110及びCrystal Screen HR2-112 (Hampton Research社)を用いてスクリーニングし、結晶化条件として、Crystal Screen HR2-110の条件22を選択した。選択された結晶化条件を元に塩や沈殿剤の濃度、BufferのpHを変化させてより優れた結晶化条件を選択した。沈殿剤として、2000~8000でPEG分子量を変化させることで、PEG4000を用いることで優れた結晶化条件となった。こうして得られた結晶について高エネルギー加速器研究機構（KEK）のPhoton Factory供し、約2.0の回折データが得られた。

【0044】

セレノメチオニン置換His-BmE1結晶を用いたX線結晶構造解析

His-BmE1プラスミドを導入された大腸菌BL21株を用い、LeMaster培地を用いて生育させ、IPTGにより遺伝子発現を誘導することで、セレノメチオニン置換His-BmE1 (Se-His-BmE1) を発現させた。Ni-Affinity及びゲルfiltrationクロマトグラフィーを行い、Se-His-BmE1を精製した。上述の結晶化条件を参考にして、調整することでSe-His-BmE1結晶が得られた。結晶を、高エネルギー加速器研究機構（KEK）で回折データを取得した。

【0045】

SAD法による解析を進め、Se-His-BmE1結晶及びHis-BmE1結晶の両方の結晶構造モデルを精密化し、最大分解能を約1.7に設定し、精密化された3次元構造を取得した（図11（A））。亜鉛が配位すると考えられる箇所の拡大図を図11（B）に示す。また、ヒト由来カルボキシペプチダーゼ（PDBID: 5OM9）の活性中心と、亜鉛が配位すると考えられる箇所を重ね合わせて比較した図を図12に示す。H

i s - B m E 1 と S e - H i s - B m E 1 結晶の結晶化条件を及び結晶学的統計値を下記に示す：

【表 6】

表 6. 結晶構造解析

結晶学的統計値		
Crystal	His-BmE1	SeMet 置換 His-BmE1
X-ray source	KEK PF BL17A	KEK PF BL5A
Wavelength (Å)	1.0000	0.97856
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>
Unit cell	48.484 169.574 69.689 90.000 106.222 90.000	48.447 169.597 69.868 90.000 106.576 90.000
Resolution range (Å)	46.56—1.70 (1.73—1.70)	46.43—2.00 (2.05—2.00)
Total reflection	811004 (40538)	188281 (2351)
Unique reflection	118122 (5883)	59291 (1589)
Multiplicity	6.9 (6.9)	3.2 (1.5)
Completeness	99.9 (100.0)	81.8 (30.0)
Mean I/sigma(I)	13.0 (3.5)	21.4 (3.6)
<i>R</i> <sub>merge</sub>	0.103 (0.726)	0.037 (0.103)
結晶構造パラメーター		
<i>R</i> <sub>work</sub>	0.1814	0.1638
<i>R</i> <sub>free</sub>	0.2077	0.2186
RMS(bonds)	0.008	0.008
RMS(angles)	0.981	0.897
Ramachandran favored(%)	98.55	96.77
Ramachandran outliers(%)	0.19	0.20
Rotamer outliers(%)	0.00	0.00
Clashscore	4.13	3.32
C-beta outliers	0	0

## 【0046】

配列解析から N 末端側に Zn<sup>2+</sup>要求性タンパク質ドメインの存在が示唆されたが、かかる示唆に即し、亜鉛に基づくと考えられる Density が確認された。亜鉛が配位している周辺のアミノ酸残基には、His 204、Glu 121、Glu 305、His 18、Tyr 267、及び Arg 165 が存在しており、かかるモチーフは、カルボキシペプチダーゼモチーフであり、カルボキシペプチダーゼ活性を有することが推測された。

## 【0047】

His - BmE1 の立体構造において、基質結合部位と推測される Arg 165、Tyr 267、Glu 305 をアラニンに置換した pCold1 - BmE1 - R165A, Y267A, E305A の発現プラスミドを構築し、それらを用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、実施例 2 と同様に培養、精製を行った。各変異株の比活性を実施例 3 の標

10

20

30

40

50

準的な酵素活性測定法で比較した(図13)

【0048】

E305Aは、His-BmE1と比べて、ピログルタミン酸開環反応が著しく低下し、基質認識に関わると推測された。

305Aの酵素活性が著しく低かったことから、反応時間を20分、30分と延ばして酵素活性が見られるか比較した(図14)

His-BmE1や他の変異体においては、時間経過と共に活性が上昇されたが、E305Aは、酵素時間を長くしてもL-Gluへ変換されなかった。

【0049】

実施例5：食品製造工程における、L-ピログルタミン酸開環酵素の適用

(1) トマト缶試料を基質とした酵素反応

トマト缶試料に対して実施例2で調製されたBmE1を添加して試料に含まれるPEに作用させることで、検出されるL-Glu濃度が変化するか分析した。完熟ホールトマト(日本デルモンテ製)をフードプロセッサーで細かく粉碎し、6000rpm、10分間、遠心して上清を試料とした。MES-NaOH(pH6.0) 200μL、試料600μL、ZnSO<sub>4</sub> 10μL(終濃度1.0mM)、滅菌水130μL、0.0332mg/mLのBmE1 50μLを混合し、55°で、5分から30分間、反応させた。L-ピログルタミン酸含有水溶液(PE:終濃度15mg/mL)、トマト缶試料(De monte)を用いた。結果を下記に示す：

【表7】

表7. トマト缶におけるBmE1の適用

反応時間	酵素液	L-Glu濃度(μg/mL)
5分	滅菌水(Blank)	1322.3
	BmE1	1363.6
10分	滅菌水(Blank)	1363.6
	BmE1	1384.3
20分	滅菌水(Blank)	1384.3
	BmE1	1446.3
30分	滅菌水(Blank)	1405.0
	BmE1	1446.3

【0050】

いずれの反応時間においても、BmE1を添加することで、Blankに対しL-Glu濃度が増加し、酵素処理時間が長くなるほど増加量が多くなった(図15)。

【0051】

(2) しょうゆ試料を基質とした酵素反応

しょうゆ試料には、超減塩しょうゆ(食塩分6.6%カット)としづりたて生しょうゆ(共にキッコーマン社製)を用いた。しょうゆ600μLにZnSO<sub>4</sub>を10μL(終濃度1.0mM)、滅菌水130μL、0.0332mg/mLのBmE1 50μLを混合し、55°で、10分間反応させた。Blankは、酵素の代わりに150mM NaCl含有2.0mM Tris-HCl(pH8.0)を用いた。反応後、0.5M EDTAを添加して氷中に静置して反応を停止した。その後、反応液をMiliQ水で25倍希釈して、得られた反応液についてL-グルタミン酸測定キット(ヤマサ)を用いて生成したグルタミン酸量を測定した。

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表 8. しょうゆにおけるBmE1の適用

反応時間	酵素液	L-Glu濃度 (mg/m l)
減塩しょうゆ	緩衝液 (Blank)	5. 47
	BmE1	6. 15
生しょうゆ	緩衝液 (Blank)	6. 22
	BmE1	6. 67

## 【0052】

10

いずれの試料においても、BmE1を添加することで、Blankに対しL-Glu濃度が増加した(図16)。

## 【図面】

【図1A-B】

図1A-B

(A) >TDU-B\_1\_04819 TDU-B\_1\_04819 hypothetical protein 4623471:4625126 forward  
ATGAAAAAAACTGATAAACAGAACGGCGTGCCTCTTGTGATGGATTATTGCTGTCGCCGCTTGCGGTACAGCTGAGGTGCC  
TTATTACGGAAAAGACTATAGCCAGCGGAAAAAAATTAAAGCGTATTCGGAAATAAAGGTGAATGAAGCGACGCCCTGCACTTACG  
AAAGGACAAAGCCATTAGCAGCTAGAAAGAAATGATGAGCTATGCTCAAAGCTGTCTATAAAAGCTGAGCTGAAAGCTGAGAT  
TATCGTAAATCACAGCAAGGAGCAGACATTCCGGCTCTGTATTTTCAAGGAAAGGAAATTGGGGATGGAAAGAACATCCAAAAGC  
CAACGATTGGCTTCAAAGTCAAATTATGTAATGAACGGCAAGCGGTGAATCGTACTCGCGCTGCGACGCCGTTGACAGAAC  
TTTGGAAAAGATGTGCTAATAAAAGTGACATCGTCAATTGCGCCGCTTAAATCCAGACGGATCTTATGCTTAAACGCTGAGCTAGC  
AAATAATTAGTGGAAACCGCGACTACATAAAAGCGTGGAAAGCGTGGAGCTGAGCTGAGCTGAAATTAACCGTGTTCACCGG  
AAGTCGTCATTGATGCTCATGAATATCGCCTTACAGCGCAGTTAAAATATCGGTAAGAAGCGTGGAGCTGAAAGT  
TTACTCGAGTCGGTGAACACTTAAATTCCGGAGCGCATTCAGCGAGTGTCTGATGAGCTGTTGTAACAGTAGCTTACAGCATT  
TGAAGAACAGATATTAGGGAGAAGTATACTATAGCTCAAGTAAATAAAAGGGCAGCTGAAGTGGAAAGAGGCTAGTTGAC  
CGCGAATTGGCGAAACTCACTAGGGCTGTATCCTCGTTCTGTTAGTGGAAAGCAGGGATCGGCTTGGACGAGAAGATT  
CCGGCGGAGTGTGCAACAAATTGCTACCGCAAGAAAAGCTGATTACCCAAACAGCTGATCACGCCAACAAATTAAAGCGCTGATTG  
AAAAGAAAAGGGGAAAGGAAAATGCAAAATGCAAAATGCAAAATGCAAAATGCAAAATGCAAAATGCAAAATGCAAAATGCAAA  
ACTCGAGTACAAATGTCAGTGTGAAAGTGCCTGCTTAAAGAAATTCCGGTACGCTACTACAGTCGAAAAGAGCAACCCGAC  
CTTGTCCGTGACGTCGACTGCTTATCTTTAAACCGGACAGCAAGATGTAGCAGCAAACCTGCAGGGACAAGGCTAAAAGGCT  
CAAATTAAACGAAAGAACCGTCTTCACTGAGTAAAGGCTATAACCTCAGCAGCCGCTAGAAAATGAAGCCTACGAAAACAGC  
TAGATGTGCAAAACATGTCAGTCAAGTCAGTTCCAAAAGGAGCTACGTTCTTTAACCTCTAGCCGCAAAACATT  
TTGCTCTATCGCTTGAACCGGAATGGTGGACAGTTACAGCGTGGGGTATTGCTCTAGAAGTAGGACAAGAGCTGATGTT  
CCGGTTACCGCTTCAATTGAAAGATCCGTTCAAAAGGATCCGTTAA (配列番号2)

(B) >TDU-B\_1\_04819 - 4623471: 4625126 MW: 61510.477

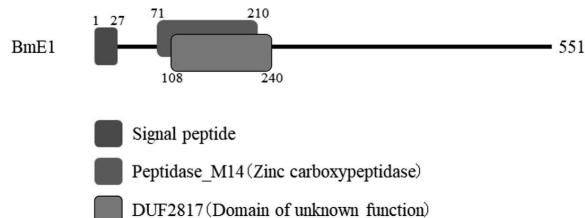
30

MKKTVKRTAPALLS1GLLLSPLAVQAEVYYYKDYDSPEKIKALYPEIKVNEATPAFTKGQDAFTTQEEMMSYVQKLAHKSPVVKL  
1GKQQGRDIPALYFSKEKKFADGKTSKPKT1WLSQ1HGNEPASGEVYLAVALTRLTEDFGKDVLNKVNIVIPRINPDGSYAFKROL  
NNLDGMRD1KLESPEVOSVRAEFNFSPEVVI1AHEYTPYSSGFKN1GKEGVWYHD1LLQSGRNLN1PQR1RDVSDELFVNSTLTA  
EKOGYSGEVYTSQVWKQGQLEVEEGSVEPR1GRNSLGLPSPFSFLVESRGIGIGREDFFRRVSQA1ATQEKL1TQADHAK1QKAL1A  
KEKAALVKKGNNDHDP1VNSNKK1PNSTLEMDVESASVKE1PVYVYSAKEATPTLVRERPTAYLLKGHEVEDA1KLQQGVKG  
KLTKETVLSEAYNVSSR1ENEAYENPKNVDQ1VKS1VTPKGSYVFLTSQPNLLSLSLEPEVSDSFTTGFYLPSEVGQELDVY  
RFTRSIKSPLOKESRK (配列番号3)

下線部(1~27残基): SignalPにより検出された分泌シグナル配列

太字部(28~39残基): N末端アミノ酸配列解析により決定された12残基の配列と一致した配列

【図1C】

図1C  
(C)

■ Signal peptide  
■ Peptidase\_M14 (Zinc carboxypeptidase)  
■ DUF2817 (Domain of unknown function)

20

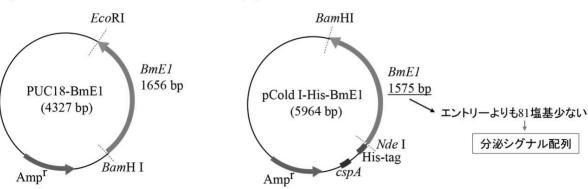
40

50

【 図 2 】

図2

(A)



【 図 3 A 】

3A

### pCold-I ベクターの *NdeI*-*BamHI* 部位にクローニングした塩基配列

小文字 / 下線部 (最初) = *NdeI* site

小文字 / 下線部 (最後) = *Bam*HI site

(配列番号 8)

【 図 3 B 】

3B

### pColdI-His-BmE1 上で発現する遺伝子の全長塩基配列

(下縁部緑文字は start codon および stop codon)

小文字 / 赤 / 下縁部 ≡  $NdeI$  site

小文字 / 苏 / 下綫部 = *Nael site*

小文字 / 有下划线 = *DnaB* site  
ATGAACTCACAAAGCTCATCATCATCATCATATCGAAGGGTAGGcatatGAGGTGCGCTTATTA  
CGGAAAGACTATAGCCAGCGGGAAAAAATTAAGCGCTTATCGGAAATAAGGTGAATG  
AAGCGACGCCGCTGATTTACAAAGGACAAGACGCATTTACGACTCAAGAAGAAATGATGAG  
CTATGCTTCAAAGGCTGCTCATAAAGCTGCTACGTAAGGCTGAAGATTTCGCTTAATCAC  
ACCAAGGACAGGACATTCGGCTCTGTATTTCTAACAGGAAAGAAATTGGCGATGAAA  
AACATCCTAAAAGCCAAACGATTTGGCTTCAAAGTCATTCGTTAATGAAACGGCAGGG  
GTGAACTCGTACTCGCGTTGCGACGGCTTGTGACAGAGACTTGGAAAGATGTCATAA  
TAAAGTGAACATCGTCAATGTGCCGCAATTACAGCGATCTTGTCAATTAAACGTC  
AGCTACAAATAATTAGTGAAGAACCGGCAACTCATAAAGCTTGAAGACCGGAAAGTGCAG  
AGCGTACAGGACTGAATTAAACGGTTTCCCGAAGTCGTCATGTGATCTCATGAATATAC  
GCCCTACAGCAGGGATTAAAAATTCGGAAGAAGGGCTGTGAAAGTATCAGCAGATT  
TACTGCACTCCGCTGAAACTTAATTCGCAAGCGCTTGTGAGCCTGTCATGAGCTG  
TTTGTGAACACTACGCCATTGAAAGCAAGGATATTCTGAGGAAGTATAC  
GTCTCAAGTGAATAAACAAAGGGCAGCTTGAAGTGAAGAAGGCTCAGTGAACCGGAAATT  
GGCGGAACACTCAAGGCTGTGATCTCCGTTTCTGTTTCTGTTTGTGAAGACGGGATCGG  
CATGGACGAGAAGATTTCGCGGCGAGTGGCAACAAATTCTGCAAGAAGACTG  
ATTACCCAAACAGCTGATCACGCCAAACAAATTAGCGCTGATTGCAAAAGAAAAGCG  
CGCTTGTAAAAAAAGAAAAAAATGCAATGATCATGACCCATTGTTGAAACAGTGA  
AAAAAAATACCAAACCTTCAACCGTTGAAATGTCGATGGAAGTGCCTGCTTTAAAGA  
TCCCGTGCAGTACACTAGTGCACAAAGGCAACCGCCAGCGCTTGTGCAAGACCG  
GCTTATCATTTAAACAGGAGACAGCAGAGATCTGAGCAGCAAATCTGAGGCAACGGCTA  
AAGGCTTCAAAATTAACGAAAGAACGGCTTCTTCTGACTAGAAGGCTATAACGTCAGCAG  
ATAGAAAATGAAGCTCAGGAAACAAAGCCTAAATGTAATGTCAGAACATCGTCAAGTCAA  
AACAGTAACTGTTTCAAAAGGAAAGCTGCTTCTTAACTCTCAGCGCCAAAACAAATT  
TGCTCTATTCGCGTGAACCGGAATCGTGGACAGCTGCAAGCTGGATTTCGCTTCA  
GAAGTGGACAGAAGCTGATCTTACCGGTTTACCGGTTACCGCTTCAATGAA  
AAAAGAATCCGCTAAATAGatcc 配列番号 9

### 配列番号 9

【図3C】

図3C

### pColdII-His-BmE1 で発現するタンパク質のアミノ酸配列

青文字 / 下線部 = Translation Enhancing E

綠文字 / 下線部 = His-tag

赤文字 / 下線部 = Factor Xa 認識 / 切断部位

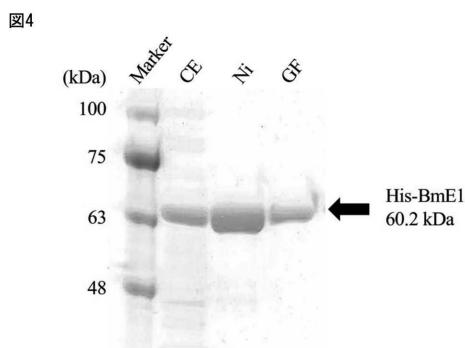
紫文字 = 分泌型 BmE1 のアミノ酸配列  
 MNHKVIIHHHHHEGRHMEEPVYYGKDYSQPEKIKALYPEIKVNEATPFTAFTKGQDAFTTQEEMMSYYVKLHKSPVVKLKIUGKSQGGRDIPALYFSKEKKFFADGKTSKPKTIIWLSQSQHNGEPASGESEFSLAVATRILTEDFGKDVLNKNVIVYVPRINPDRGDSYFQRKLQNLDGRRNDYTKLLESPEVQSVRAEENRFSPEVVIDAHEYTTPSQFNGKIGKEGVWKYIHDILLQSLGRNLNPQKIRIDVPSDELFVNNTLTAIEKQGYSGEVYVTSQVNKGQGLEVEEGSVEPRIGRNRSLGLYPSPFSFLVESRGIGREDFDPFRVSAQIATQEKLITQTADHAKQIKALIAKEKAALVKKGKNANDHDPIVVNSENKKIPNSTLEMDVVEASVKEIPVTVYYSAKEATPTFLVRERPTAYLKPGRHDEVAALKLQGQGVKCFKLTKETVLSVEAYNVSSRIENEYENPKVNDQVTIVKSFTVTPFKGSYVFLTSQCPQNNLSSLSLEPESDVSFTTPTGFLPESGVQGOLDYVFRTRSIKSPLQESRSK\* (配列番号 1.0)

(配列番号 10)

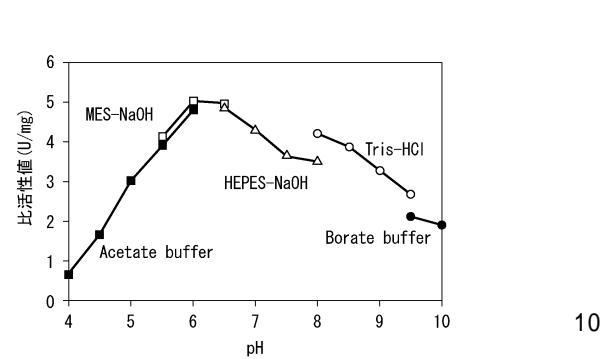
40

50

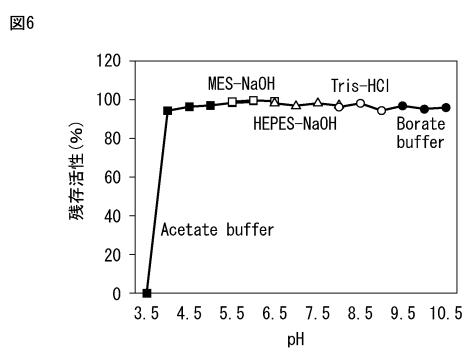
【図4】



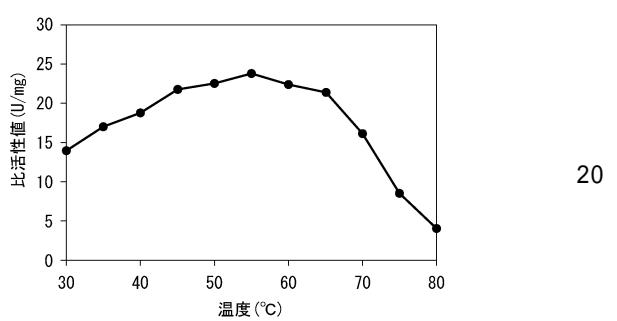
【図5】



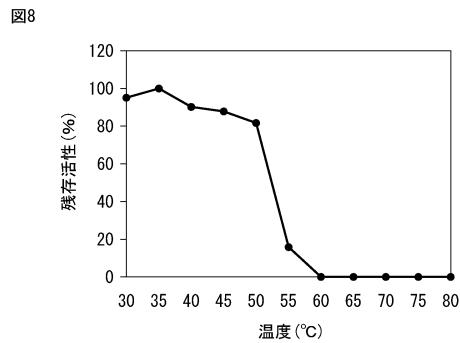
【図6】



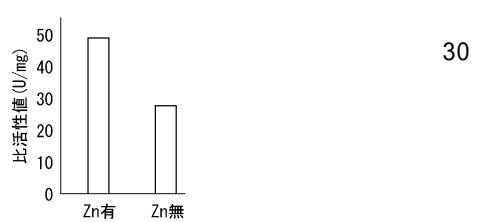
【図7】



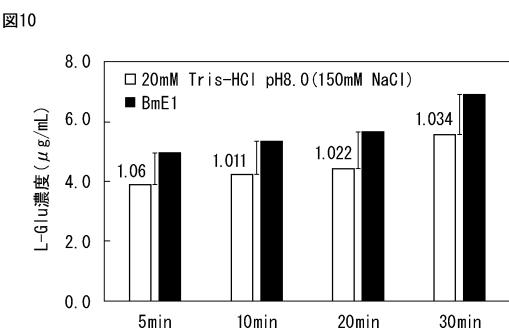
【図8】



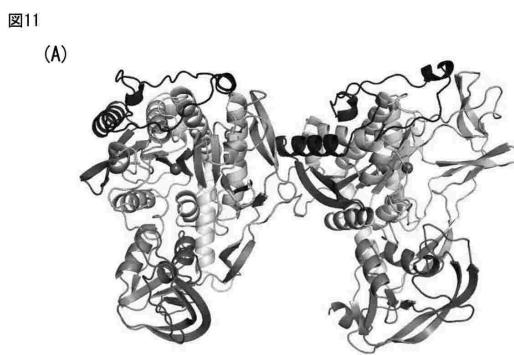
【図9】



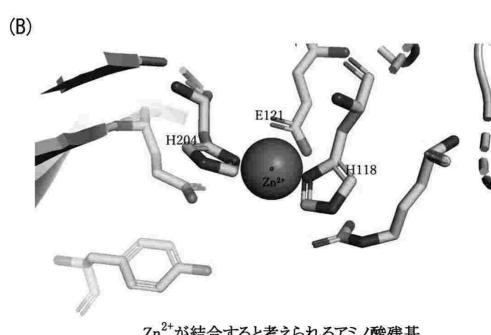
【図10】



【図11】

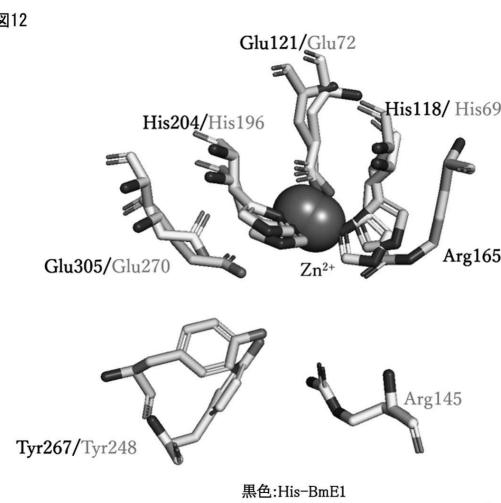


10



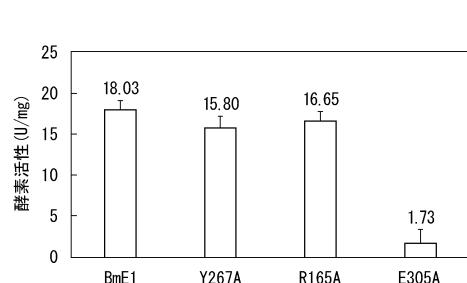
20

【図12】



30

【図13】

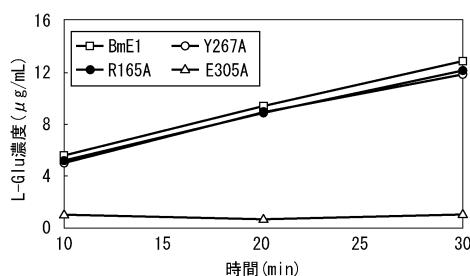


40

50

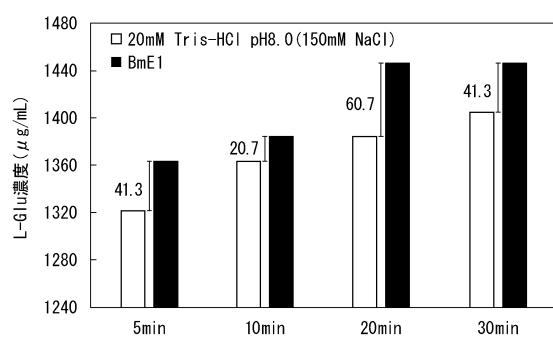
【図14】

図14



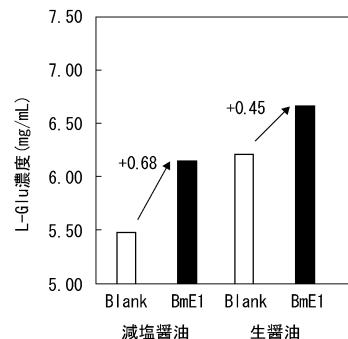
【図15】

図15



【図16】

図16



【配列表】

2024006086000001.app

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

(72)発明者 伊藤 考太郎  
千葉県野田市野田 250 番地 キッコーマン株式会社内

(72)発明者 夏目 亮  
東京都足立区千住旭町 5 番 学校法人東京電機大学内

(72)発明者 河合 広洋  
東京都足立区千住旭町 5 番 学校法人東京電機大学内

(72)発明者 加藤 雄己  
東京都足立区千住旭町 5 番 学校法人東京電機大学内

(72)発明者 玉井 海地  
東京都足立区千住旭町 5 番 学校法人東京電機大学内

(72)発明者 小笠原 大輔  
東京都足立区千住旭町 5 番 学校法人東京電機大学内

(72)発明者 川崎 寿  
東京都足立区千住旭町 5 番 学校法人東京電機大学内

F ターム (参考) 4B018 LB03 LB08 LB09 MD19 ME14  
4B050 CC01 DD02 FF11E LL02  
4B064 AE19 CA21 CB05 DA10