

研究成果報告書

作成年月日 2025 年 10 月 29 日

一般財団法人加藤育英基金 御中

研究機関(大学)名 京都大学

研究代表者 滝田 穎亮

貴財団から給付を受けた助成金を活用し、下記のとおり研究を行いましたのでその成果を報告します。

記

1 研究課題: *Streptomyces moharaensis* 由来トランスクルタミナーゼの機能
改变

2 研究期間: 自 2024年 4月 ~ 至 2025年 9月

3 助成金額: 100 万円

4 共同研究者:

- ・該当なし

5 研究報告:(研究内容(概要)を1,500~2,000文字程度で)

背景

トランスクルタミナーゼ(TG, EC 2.3.2.13)は、タンパク質中の Gln 残基と Lys 残基間で ϵ - $(\gamma$ -グルタミル)リジン結合を形成し、タンパク質を架橋してその構造や機能を変化させる酵素である。放線菌 *Streptomyces moharaensis* 由来の TG(SmTG)は、食品の食感・結着性・保

存性を向上させることから、食品産業で広く利用されている。SmTG は Cys64、His274、Asp301 からなる触媒三残基を有し、Cys64 が基質 Gln 残基を求核攻撃してチオエステル中間体を形成し、その後 Lys 残基へのアシル転移により反応が完結する。至適温度は 45~55°C であり、60°C 以上では失活する。食品加工では 4~10°C で長時間反応を行うことが多く、低温下でも高い活性を示す SmTG の開発が求められている。これまでの SmTG の改変研究は主に耐熱化を目的としており、低温活性化に関する報告はない。一般に、低温活性化には構造的柔軟性が必要だが、これは熱安定性の低下を伴う傾向があり、両者の両立は困難である。この「活性と安定性のトレードオフ」は、現在でも酵素改変における主要な課題の一つである。低温活性を有する SmTG が実現すれば、食品加工の効率化や品質保持、さらにはエネルギーコストの削減にも寄与すると期待される。本研究では、SmTG の低温活性向上を目的とした酵素改変を行った。

方法

SmTG の低温活性化を目的に、ランダム変異導入による変異ライブラリーを作製した。SmTG 遺伝子はシグナルペプチド、プロ配列、成熟体から構成されるが、スクリーニングを容易にするため、プロ配列と成熟体(C 末端 His タグ付き)をそれぞれ独立して発現するプラスミド(pET-42a-P/MATH6)を構築した。Asp237-Ser284 領域を標的とするオリゴスクレオチドをマイクロアレイ技術で合成し、Quikchange HT Protein Engineering System で PCR 増幅後、StrataPrep PCR Purification Kit で精製した。この部位飽和変異ライブラリーをプライマーとして pET-42a-P/MATH6 を鋳型に、QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit を用いてプラスミドライブラリーを構築した。*Dpn I* 処理後、変異プラスミドを *E. coli* SoloPack Gold Supercompetent Cells に形質転換し、カナマイシン含有 LB 培地で培養後、FastGene Plasmid Mini Kit で抽出した。得られたプラスミドを *E. coli* BL21(DE3) に導入し、-80°C で保存して変異ライブラリーとした。スクリーニングでは、コロニーを 96 穴プレートで培養し、培地量・培養温度・発現誘導条件を比較検討した。培養後、菌体を遠心回収・超音波破碎し、上清を粗酵素液として 4°C および 37°C で Z-Gln-Gly を基質とするヒドロキサメート法により酵素活性(pH 6.0)を測定した。

結果と考察

培養条件の最適化の結果、Overnight Express Autoinduction System を用い、培地量 1 mL、培養温度 28°C、培養時間 48 時間を採用した。この条件下で 5,000 クローンを解析し、4°C および 37°C における酵素活性を測定したところ、初速度比 $V_{37^\circ\text{C}}/V_{4^\circ\text{C}}$ が野生型の 22 に対し 15 以下を示すクローンを複数得た。これらのクローンが、低温で活性が上昇する「低温活性化型」か、高温で活性が低下する「熱感受性型」であるかは、今後の検証が必要である。さらに、57°C で 5 分間の熱処理後に残存活性を測定した結果、野生型が約 50% であったのに対し、70% 以上を維持する耐熱性クローンを複数確認した。これらのクローンの塩基配列解析により、標的領域内に置換変異が存在することを確認した。また、本研究では高純度かつ高収量で成熟体を得るための新規

プロ体発現プラスミドを作製した。これまでに、上記で確認された変異を本プラスミドに導入し、良好な発現を確認している。今後は各変異を有する成熟体を精製し、活性の再評価に加えて、速度論的および構造的解析を進める予定である。

6 具体的な成果:

- ① *Streptomyces mobaraensis* 由来トランスグルタミナーゼの成熟体の発現系を構築した。
- ② ①のプラスミドを鋳型にランダム変異ライブラリーを作製した。
- ③ ②の培養条件を最適化し、約5000クローンについて酵素活性を評価した。
- ④ 低温で高活性を示す可能性のあるクローンおよび耐熱性に優れたクローンを取得した。
- ⑤ ④の変異成熟体の精製に向け、新規プロ体発現系を構築し、対応する変異を導入した。

7 発表論文、著書、講演など:(予定を含む)

- (1) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 投稿予定

以上