京都工芸繊維大学

氏　　名	ほー　ばん　たお HO VAN THAO
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　６６１　号
学位授与の日付	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　生命物質科学専攻
学位論文題目	Studies on Bacterial γ-Glutamyltranspeptidase for Food Application and Its Heat Stability （細菌由来のγ-グルタミルトランスペプチダーゼの食品への応用とその熱安定性に関する研究）
審査委員	(主査)教授　鈴木秀之 教授　山口政光 教授　亀井加恵子

論文内容の要旨

γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（以下 GGT と省略）は、γ-グルタミル化合物の加水分解とその γ-グルタミル基をアミノ酸やペプチドに転移する反応を触媒する。木嶋と鈴木は耐塩性の枯草菌 GGT を醤油醪に添加することによって、醤油の呈味性を改善したことを報告している。本研究では、味噌の呈味性を改善する目的で、半固体発酵を行う味噌醪に精製した枯草菌 GGT を添加した。２～６ヶ月間の発酵の後、GGT を添加したものは、添加しなかったものに比べて、よりうま味が強くなっていることを醪中のグルタミン酸濃度の測定と呈味性試験により確認した。さらに、コク味ペプチドとして知られている γ-Glu-Val や γ-Glu-Val-Gly の溜中の濃度が GGT を添加したものでは、添加しなかったものに比べて顕著に高いことを確認した。これらの結果は、枯草菌 GGT の添加が高食塩濃度下において、発酵産物の呈味性改善に有効であることを示している。
GGT は不活性型前駆体として翻訳され、その後自己触媒的に大小２つのサブユニットにプロセスされ、活性を持った成熟型酵素になる。大腸菌 GGT と枯草菌 GGT はアミノ酸配列において非常に似ているが、構造において違っているところもある。例えば、枯草菌の GGT の大サブユニット C 末端にある１２アミノ酸からなる挿入や小サブユニット内にある１０アミノ酸からなる欠失があげられる。申請者は、熱処理した大腸菌 GGT を４℃に保つと酵素活性が復活することを見出した。この現象は枯草菌 GGT では見られなかった。蛍光スペクトル、CD スペクトル、ネイティブ SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果は､熱処理によって各サブユニットに分離した GGT が、４℃に保つことにより、２量体構造を再生し、活性が復帰することを示唆していた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、細菌の γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)に関する基礎的な研究の成果と応用研究の成果をまとめたものである。

基礎的な研究成果としてあげられるのは、大腸菌の GGT は熱失活させた後、低温においておく

と活性が復活することを発見したこと、それが大腸菌の GGT に特有で枯草菌の GGT では見られないこと、さらに様々な分析により、大腸菌の GGT が熱失活から復活するメカニズムについて、酵素タンパク質の単量体化と二量体構造への復帰の観点から考察を加えたことが評価に値する。

一方、GGT の応用研究としては、枯草菌の GGT が耐塩性である性質を利用して、仕込みの段階で高濃度の食塩を添加する味噌の醸造時に枯草菌の GGT を添加することにより、味噌の呈味性の改善に成功した点が評価に値する。醤油醪に枯草菌の GGT を添加することにより、醤油のうま味が増すことはすでに示されていたが、味噌の醸造は半固形醸造であることから、このような工夫は試みられていなかった。GGT は γ-グルタミル化合物の加水分解とその γ-グルタミル基をアミノ酸やペプチドに転移する反応を触媒するが、これらの至適 pH は大きく異なっている。味噌醪の pH は酸性側に偏ることから、もっぱら加水分解反応が進行すると考えられていた。実際、GGT の添加により、グルタミンの加水分解が増強され、うま味成分であるグルタミン酸が顕著に増加することが確認された。一方、CE-MS 分析の結果、転移反応の生成物である γ-Glu-Val や γ-Glu-Val-Gly が溜中に検出され、GGT を添加すると無添加の場合に比べてその濃度が 2 倍程度増加していた。これらのペプチドはコク味ペプチドとして知られており、呈味性試験の結果、GGT を添加したものの方が有意にコク味が強いことが明らかとなった。味噌に γ-グルタミルペプチドが含まれていること、さらに GGT の添加によりその量が増えることは、これまでに全く報告のなかった新規な発見である。

本論文の基礎となった論文を下記に示す。いずれも、審査制度の確立した学術誌(IJFS は web journal)に掲載済みおよび掲載の確定している学術論文で、申請者が筆頭著者である。

1. T. V. Ho, and H. Suzuki. Increase of “umami” and “kokumi” compounds in miso, fermented soybeans, by the addition of bacterial γ-glutamyltranspeptidase. **International Journal of Food Studies,** 2(April) *in press* (2013).
2. T. V. Ho, K. Kamei, K. Wada, K. Fukuyama, and H. Suzuki. Thermal denaturation and renaturation of γ-glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli.* **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** 77(2), 409-412 (2013).

以上の検討結果から、本論文の内容には十分な新規性と独創性ならびに高い学術的価値があると認められ、本論文を博士論文として十分な内容を備えていると判定した。