

Studies on Theanine Production by Coupled Fermentation with Energy Transfer (エネルギー共役発酵法によるテアニンの生産に関する研究)

山本 幸子

緑茶の旨み成分テアニン (γ -グルタミルエチルアミド) は、様々の好ましい生理作用を持つ。食品への添加利用など需要が増大しているが、その効果的な生産法は、細菌酵素の γ -グルタミル転移反応によって、グルタミンとエチルアミン (EA) から合成する方法だけである。しかし、本法にも幾つかの欠点があるので、チャのテアニン合成酵素 (グルタミン酸 (Glu)+EA+ATP \rightarrow テアニン+ADP+無機リン酸 (Pi)) と同じ反応を触媒する微生物酵素を用いる新規生産法を検討した。

第1章では、パン酵母菌体の解糖系をATP再生系として、GluとEAからテアニンを合成する酵素をメチルアミン資化性細菌に検索し、*Pseudomonas taetrolens* Y-30のグルタミン合成酵素 (GS : Glu+アンモニア+ATP \rightarrow グルタミン+ADP+Pi) を得た。本酵素は、一定条件下で、ある程度のテアニン生成能を持つ。

第2章では、上記GSが、設定した最適条件下で、酵母解糖系と共役して170 mMのテアニンを合成することを示した。本検討過程で、テアニン生産性の向上には、① GSまたは高性能酵素の大量使用、および② 酵母菌体中の何らかのATP浪費反応への対応が必要であり、EAの酵母発酵系に対する阻害効果の解析が有効な示唆を与えることを示した。

第3章では、上記GSの遺伝子を大腸菌内で過剰発現させ、本酵素の大量調製を可能にした。同時に、GS遺伝子の解析によって、*P. taetrolens* Y-30にテアニン生産に不都合なGSの修飾機構が存在することを示した。一方では、大腸菌発現系では修飾が起こらないことを明らかにした。

第4章では、上記GSに溶解限界があるため、高いテアニン生産能を持つと予想される、 γ -グルタミルメチルアミド合成酵素 (Glu+メチルアミン+ATP \rightarrow GMA+ADP+Pi) を探索し、これを偏性メタノール資化性 *Methylovorus mays* No. 9から得た。本酵素は、メチルアミンとEAに対して同程度の反応性を持ち、共役発酵系で400 mMのテアニンを、基質 (Gluおよびグルコース) に対して100%の収率で生成した。また過剰発現系による本酵素の簡易調製法を考案した。

第5章では、酵母解糖反応に対する高濃度EAの阻害効果を解析し、EAと適量のリン酸緩衝液を添加すると、酵母菌体中のATP浪費反応を効果的に抑制できることを示した。

以上により、テアニンの新生産法の原理を提示し、本法の実用利用の可能性を考察した。