

## L-アミノ酸リガーゼ (Lal) 改変による塩味増強ジペプチドの選択的合成に成功

Lal の立体構造情報に基づき改変し、目的とする塩味増強ジペプチドを選択的に合成することに成功しました。

機能性を有するジペプチドは多く報告されています。私たちは、無保護のアミノ酸を直接連結し任意のジペプチドを合成する Lal を用いてジペプチドライブラリーを構築し、塩味増強効果を有するジペプチドを探索しました。その結果、Met-Gly にその効果を見出し、N 末端基質として Met を強く認識する *Bacillus licheniformis* 由来の Lal : BL00235 によって Met-Gly の効率的合成が可能になりました。また、更に Met-Gly の選択的合成を目的に部位特異的変異導入による酵素の機能改変についても検討行いました。

この研究成果は 2015 年 3 月 26 日～29 日に開催された日本農芸化学会 2015 年度大会(岡山) で発表しました。また、本発表は日本農芸化学会 2015 年度大会トピックス賞を受賞しました。本研究は、早稲田大学先進理工学部応用化学科 木野邦器教授との共同研究です。

### 【研究内容の概要】

BL00235 は、Met と Gly が基質の時、Met-Gly が主生成物となる一方で Met-Met も生成します。Met-Gly の選択的合成を目的に、BL00235 の結晶構造情報から当該酵素の基質特異性の改変を試みました。*B. subtilis* 由来 Lal : YwfE の結晶構造との比較解析から、85 位の Pro 残基が C 末端アミノ酸基質との親和性に関与すると推測し、Pro 残基を側鎖の嵩高いアミノ酸に置換すると C 末端アミノ酸基質認識周辺のスペースが狭くなり、側鎖の大きな Met を認識せず、側鎖の小さい Gly が選択的に基質として認識されると考えました。部位特異的変異導入により 85 位の Pro 残基を嵩高い側鎖を有する芳香族アミノ酸に置換した結果、野生型で生成する Met-Met は生成せず、Met-Gly が選択的に合成されることを見出しました。特に、Phe に置換した変異酵素 P85F では野生型に匹敵するほど Met-Gly の合成量が高い結果となりました。これらの結果は、Lal の構造情報から推測した特定のアミノ酸残基の一置換変異により、C 末端アミノ酸の基質認識が予想通り改変したことを示すものであり、立体構造情報に基づく Lal の改変による目的ジペプチドの選択的合成が成功した初めての報告です。

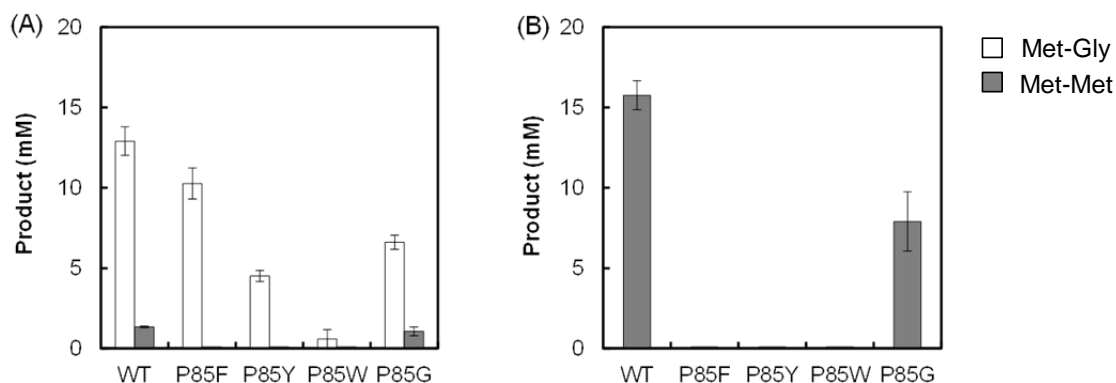


Fig. Synthesis of Met-Gly or Met-Met by wild-type BL00235 or mutants.  
Reaction mixtures contained 20 mM Met and Gly (A) or 40 mM Met (B).

私たちは、Lal を用いて構築したジペプチドライブラリーから、Met-Gly と同様に塩味増強効果を有するジペプチドの探索を継続しています。また、その知見から塩味増強効果を有するジペプチドを含有するタンパク分解物を有効成分とする塩味増強素材の開発を行っています。

【発表学会】 日本農芸化学会 2015 年度大会（岡山）

【発表タイトル】 立体構造に基づく L-アミノ酸リガーゼの改変と塩味増強作用を有する Met-Gly の選択的合成法の開発

【発表者】 木野はるか<sup>1,2</sup>、木野邦器<sup>2</sup>

<sup>1</sup>長谷川香料株式会社総合研究所 <sup>2</sup>早稲田大学先進理工学部応用化学科