

## ジペプチド合成酵素の改変により塩味増強ジペプチドの選択的合成に成功

ジペプチド合成酵素をその立体構造解析に基づいて改変し、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 L-アミノ酸リガーゼ (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<sup>1)</sup>により Met-Gly の効率的合成が可能になりました<sup>2)</sup>。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 7 月 26 日～30 日に開催された BIOTRANS 2015 (オーストリア、ウィーン) で発表しました。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<sup>3)</sup>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 残基を他のアミノ酸に置換した結果、嵩高い側鎖を有する Phe に置換した変異酵素 P85F では、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。この結果は、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。

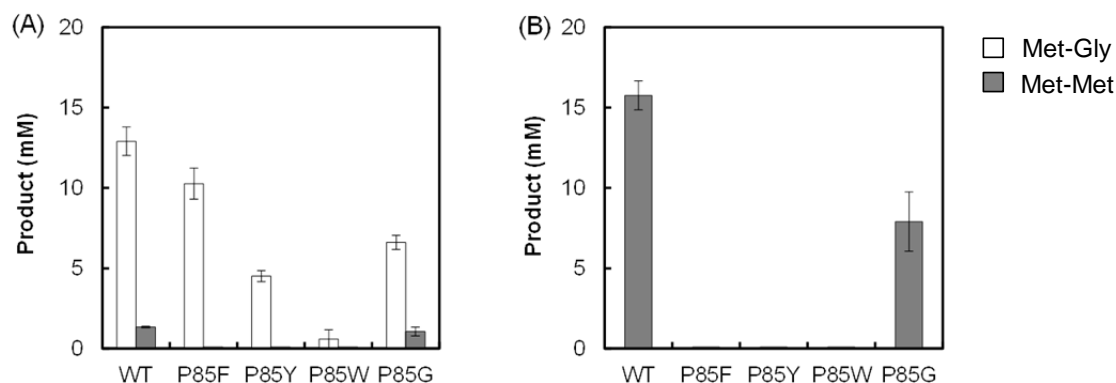


Fig. Synthesis of Met-Gly or Met-Met by wild-type BL00235 or mutants.  
Reaction mixtures contained 20 mM Met and Gly (A) or 40 mM Met (B).

私たちは、L-アミノ酸リガーゼ (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加水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】 BIOTRANS 2015 (オーストリア、ウィーン) 2015年

【発表タイトル】 ALTERATION OF THE SUBSTRATE SPECIFICITY OF L-AMINO ACID LIGASE AND SELECTIVE SYNTHESIS OF FUNCTIONAL DIPEPTIDE

【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

【参考文献】

1) A Novel L-Amino Acid Ligase from *Bacillus licheniformis*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, 106(3), p. 313-315.

2) L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索と効率的な生産法の開発, 第66回日本生物工学会大会講演要旨集, 2014, 1P-067, p. 34.

3) The Structure of L-Amino-acid Ligase from *Bacillus licheniformis*, *Acta Cryst.*, 2015, D68, p. 1535-1540.