

改変型ジペプチド合成酵素による塩味増強ジペプチドの効率的合成に成功

これまでに解明されているジペプチド合成酵素の立体構造と機能に関する知見を踏まえ研究を行い、目的とする塩味増強ジペプチドの効率的合成法の開発に成功しました。

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て塩味増強効果を有するジペプチドを探索した結果、Met-Gly¹⁾や Pro-Gly にその効果を見出しました。既に、Met-Gly を選択的に合成する *Bacillus licheniformis* 由来の Lal:BL00235 の改変型酵素作製に成功しています²⁾。今回は、Pro-Gly に関して Lal の特定のアミノ酸残基に着目した変異導入を行った改変型酵素を作製し、Pro-Gly の効率的合成に成功しました。

この研究成果は 2015 年 10 月 26 日～28 日に開催された第 67 回生物工学会（会場：鹿児島 城山観光ホテル）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】

Pseudomonas 属由来の Lal : TabS³⁾は、その基質特異性から Pro と Gly を基質にすると Pro-Gly を選択的に合成する特徴があります。そこで、本研究では TabS への変異導入を行い Pro-Gly の効率的合成法の開発検討を行いました。TabS の結晶構造は解明されていないため、結晶構造が解明されている BL00235 に関する知見を踏まえ検討しました。まず、BL00235 において変異を導入した C 末端基質アミノ酸の基質特異性に影響を与えるアミノ酸残基 Pro85 に相当する Ser85 に着目し、変異導入によって様々なアミノ酸に置換した変異酵素を作製しました。その結果、Ser と類似性の高い Thr に置換した S85T では、野生型に比べて Pro-Gly 合成量が 1.2 倍になりました。また、N 末端基質アミノ酸に近接し、酵素活性に影響を与えると予測されるアミノ酸残基 His294 についても同様の変異導入を行った結果、Asp に置換した H294D では野生型の 1.4 倍の合成量となりました。更に、これらを掛け合わせた 2 重変異酵素 S85T/H294D では野生型に比べて 1.6 倍の Pro-Gly 合成量となり、効率的合成法の開発に成功しました。

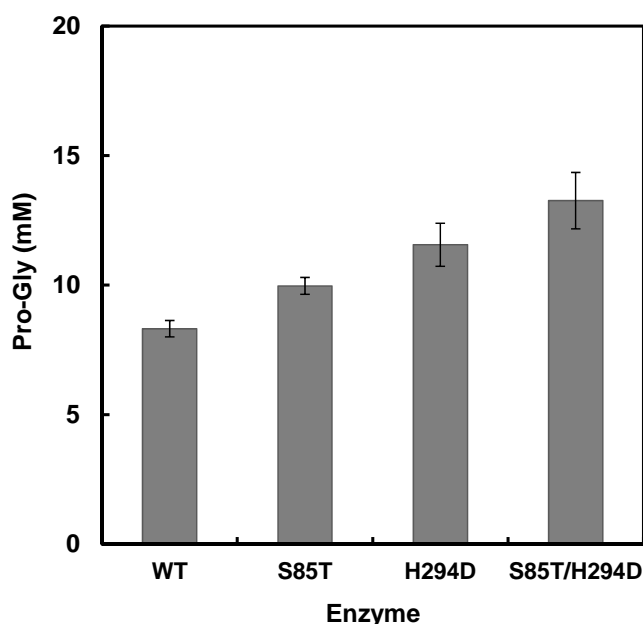


Fig. Synthesis of Pro-Gly by wild-type TabS (WT), S85T, H294D, and S85T/H294D mutants.

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、塩味増強効果を有するジペプチド Met-Gly、Pro-Gly を見出し、これらを選択的あるいは効率的に合成する改変型酵素の作製に成功しました。現在は、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進めています。

【発表学会】 第 67 回日本生物工学会（鹿児島）2015 年

【発表タイトル】L-アミノ酸リガーゼへの変異導入による塩味増強ジペプチド Pro-Gly の効率的合成法の開発

【発表者】 木野はるか^{1,2}、木野邦器²

¹長谷川香料株式会社総合研究所 ²早稲田大学先進理工学部応用化学科

【参考文献】

1) 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, 日本食品科学工学会誌, 2015, 62(6), p. 274-281.

2) Alteration of the Substrate Specificity of L-Amino Acid Ligase and Selective Synthesis of Met-Gly as a Salt Taste Enhancer, *Biosci. Bioeng. Biochem.*, 2015, 79(11), p.1827-1832.

3) L-Amino Acid Ligase from *Pseudomonas syringae* Producing Tabtoxin Can Be Used for Enzymatic Synthesis of Various Functional Peptides, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, 79(16), p. 5023-5029