

講演番号：3A34a10

講演日時、会場：3月28日 10:49～ A校舎34会場

立体構造解析に基づく L-アミノ酸リガーゼの改変と塩味増強効果を有する Met-Gly の選択的合成法の開発

Alteration of the substrate specificity of L-amino acid ligase and selective synthesis of Met-Gly as a salt taste enhancer

○木野 はるか^{1,2}、木野 邦器¹ (¹早大理工・応化、²長谷川香料(株))

○Haruka KINO^{1,2}, Kuniki KINO¹ (¹Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²T. Hasegawa Co., LTD.)

【目的】ジペプチドはそれを構成するアミノ酸単体には認められない機能を有することが多い。我々はこれまでに、無保護のアミノ酸を直接連結して任意のジペプチド合成を可能とする L-アミノ酸リガーゼ (Lal) の探索と新たな機能発掘に向けたジペプチドライブラリーの構築を行ってきた。実際に、当該ジペプチドライブラリーを利用して塩味増強効果を有するジペプチドの探索を行い、Met-Gly にその効果があることを見出している¹⁾。さらに、N末端基質として Met を強く認識する *Bacillus licheniformis* 由来の Lal : BL00235²⁾を用いると、Met-Gly を効率的に合成できることも報告している¹⁾。本発表では、Met-Gly のさらなる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を検討した。

【方法および結果】BL00235 は Met と Gly を基質としたとき、Met-Gly が主生成物となるが、同時に Met-Met も生成する。Met-Gly の選択的合成を目的に、既に明らかにしている BL00235 の結晶構造情報³⁾を踏まえて当該酵素の基質特異性の改変を検討した。*B. subtilis* 由来 Lal : YwfE の結晶構造 (PDB:3VMM) との比較解析を行い、85 位の Pro 残基が C 末端アミノ酸基質との親和性に関与していると推測した。そこで、85 位の Pro 残基を側鎖の嵩高いアミノ酸に置換することで、C 末端アミノ酸基質認識周辺のスペースが空間的に狭くなり、その結果、側鎖の大きな Met は認識されず、側鎖の小さい Gly のみが選択的に C 末端基質として認識されると考えた。実際に、部位特異的変異導入によって 85 位の Pro 残基を嵩高い側鎖を有する芳香族アミノ酸である Phe に置換したところ、その変異酵素 P85F を用いた反応では、Met と Gly を基質とした場合、野生型では 1.3 mM 生成した Met-Met の生成は認められず、Met-Gly が選択的に合成されることを見出した。さらに Met のみを基質とした場合、野生型では 15.8 mM の Met-Met が生成したが、変異酵素 P85F では生成しなかった。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って、C 末端アミノ酸の基質認識が予想したように変化したことを示すものである。立体構造情報に基づいて改変した Lal による目的ジペプチドの選択的合成の成功は初めての報告となる。

1) 木野ら, 日本生物工学会 2014 年度大会講演要旨集 p34, 1P-067.

2) Kino, K. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 313-315 (2008).

3) Suzuki, M. *et al.*, *Acta Cryst.*, **D68**, 1535-1540 (2012).

L-amino acid ligase, salt taste enhancer, dipeptide