

塩味増強ジペプチド Pro-Gly の効率的合成についての研究

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から酵素の機能改変を行うことにより、塩味増強効果を有するジペプチドである Pro-Gly の効率的合成に成功しました。

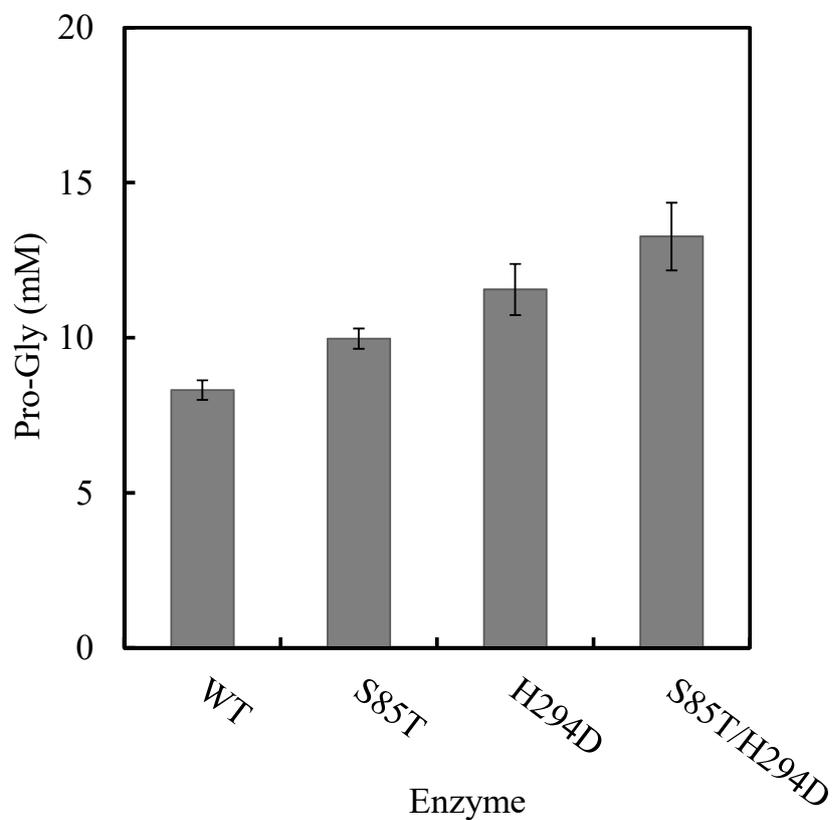


私たちはこれまでにジペプチドの機能性、特に呈味改善作用に着目し、塩味増強効果を有するジペプチドの探索を行ってきました。その際、ジペプチドの合成には無保護のアミノ酸同士を連結し、任意のジペプチドを合成する L-アミノ酸リガーゼ (Lal) を利用し、合成したライブラリーの中から、塩味増強効果を有するジペプチドとして Met-Gly¹⁾ や Pro-Gly を見出しました。そして Met-Gly については *Bacillus licheniformis* 由来の Lal である BL00235 の結晶構造情報から部位特異的変異導入による機能改変を行い、Met-Gly を選択的に合成する改変型酵素の作製に成功しています²⁾。今回はこの知見を基に、*Pseudomonas syringae* 由来の Lal である TabS³⁾ の機能改変を行い Pro-Gly を効率的に合成可能な改変型酵素の取得に成功しました。

この研究成果は *Effective production of Pro-Gly by mutagenesis of L-amino acid ligase*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 122(2), p. 155-159 に掲載されています。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で行いました。

【研究内容の概要】

TabS は Pro と Gly を基質とした場合、その基質特異性からほぼ Pro-Gly のみを選択的に合成します。しかし、その合成量は基質である 20 mM の Pro と Gly 対し 10 mM 以下と少ないのが現状です。TabS は立体構造情報が解かれていませんが、Lal の立体構造は微生物の由来によらず類似していることが知られているため、結晶構造が解明されており、かつその結晶構造情報を利用した機能改変により Met-Gly の選択的合成に成功している BL00235 の知見を基に検討しました。C 末端アミノ酸基質の親和性に関与するアミノ酸残基として BL00235 で親和性に関わる Pro85 に相当する Ser85 と、N 末端基質アミノ酸基質の親和性に関与するアミノ酸残基として His294 に着目し、それぞれに対しサチュレーション変異導入を行いました。その結果、Thr に置換した S85T と Asp に置換した H294D で Pro-Gly の合成量が野生型 TabS よりも増加し、BL00235 と同様に 85 位のアミノ酸残基が基質アミノ酸に関与することを確認しました。さらにこの 2 つの変異を掛け合わせた二重変異型酵素 S85T/H294D では Pro-Gly の合成量が一変異型よりもさらに増加し、Pro-Gly の合成に適した改変型 TabS の取得に成功しています。



【発表誌名】 Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 122(2), p. 155-9

【発表タイトル】 Effective production of Pro-Gly by mutagenesis of L-amino acid ligase

【発表者】 木野はるか¹、中島翔太²、新井利信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, 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. Biotechnol. Biochem, 2015,79, 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,p.5023-5029