

博士論文概要

論文題目

Screening of Salt Taste Enhancing
Dipeptides and Effective Production of the
Dipeptides by L-Amino Acid Ligase

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
効率的な合成法の開発

申請者

Haruka	KINO
木野	はるか

応用化学専攻 応用生物化学研究

2015年12月

ジペプチドはアミノ酸 2 個からなる単純な構造であるが、血圧降下作用を有する Ala-Phe や Ile-Trp、抗不安・ストレス緩和作用を有する Tyr-Leu などそれを構成するアミノ酸単体には認められない生理活性や機能性を有するものが知られている。スクロースの 200 倍の甘さを有するアスパルテーム (Asp-Phe-OMe) は良く知られている呈味性ジペプチドであり、カフェインなどの苦味に対しマスキング作用を有する Glu-Glu や、コク味を増強させる γ -Glu-Leu など、ジペプチド自体には呈味はないが呈味改善作用を有するジペプチドも存在する。そこで申請者は呈味の中でも「塩味」に着目した。食塩は人間にとって必要不可欠な成分であるが、一方、その過剰摂取は高血圧症や心臓疾患などの疾病を引き起こすことが知られている。我が国では 1 日当たりの食塩摂取量の目標値は 8.0 g と設定されているが、「減塩」への意識から年々減少傾向ではあるものの、平成 25 年の男女平均値は 10.2 g/day と目標値にはほど遠い現状にある。こうした社会的背景を踏まえ、塩味を呈する物質の開発研究が盛んに行われている。塩味増強効果を有するジペプチドとして Leu-Ser や Glu-Thr などの報告があるが、まだその効果が満足できるジペプチドはない。そこで、申請者はジペプチドの機能多様性に期待して、塩味増強効果を有する新たなジペプチドの探索を検討することにした。

これまで機能の知られているジペプチドの多くは天然のタンパク質を酵素や微生物で加水分解したものから調製している。具体的には、目的の機能を有する分解物の画分からその機能を担うジペプチドの配列を決定する方法で見出されている。この方法では、加水分解によって遊離しやすいアミノ酸を含むジペプチドは存在量が少ないため評価対象とならず、それらジペプチドの中には有用機能を有するものがまだ多く存在するのではないかと考えるに至った。つまり分解物を評価するのではなく、ターゲットとするジペプチドを直接合成して評価する新たな方法論を提唱した。そしてジペプチドの合成には、任意のジペプチドが合成可能でかつ合成したジペプチドを精製することなく反応液のまま迅速に評価できる L-アミノ酸リガーゼ (Lal) を用いることを考えた。

Lal は無保護のアミノ酸同士を ATP の加水分解反応と共役して直接連結することを特徴とする酵素であり、これまでに十数種類の Lal が報告されている。Lal により基質特異性は大きく異なるため、本検討では基質特異性の広い *Pseudomonas syringae* 由来の TabS を用いてジペプチドを合成した。また、ターゲットとするジペプチドは、各種タンパク質の加水分解で生じる遊離アミノ酸データよりアミノ酸を選抜し、これらアミノ酸を含むジペプチドを中心に合成し、評価を行った。本論文の第 1 章から第 3 章では、TabS によるジペプチドライブラリーの構築と塩味増強効果を有するジペプチドの探索方法の構築、そして本探索により見出した候補ジペプチドの評価について論じた。さらに、第 4 章から第 6 章では、塩味増強効果を有するジペプチドの効率的合成法の確立を目的として、Lal の結晶構造情報を利用した部位特異的変異導入と改変 Lal によるジペプチド

の選択的合成と生産性向上、ならびに ATP 再生系を導入した低コストプロセスについて論じた。Lal の改変によるジペプチドの選択的合成の成功は本研究が初めての報告であり、Lal の工業的利用と酵素学的知見について記述した。

本論文は 7 章で構成されている。

第 1 章では、ジペプチドの有する機能性と呈味改善素材の探索や評価方法及び Lal について概説した。さらに、本研究の戦略と意義についても述べた。

第 2 章では、Lal の一種である TabS 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の候補を選抜した。はじめに、従来の機能性ジペプチドの探索では対象とならなかったと予想されるジペプチドを中心に 111 種類の反応液を調製した。ここで、反応液をそのまま評価試料とするスクリーニング方法を構築し、迅速な評価を可能とした。評価試験により、Met-Gly と Pro-Gly を塩味増強効果を有するジペプチドの候補として選抜した。

第 3 章では、Met-Gly と Pro-Gly の標品を用いて、官能評価と塩味センサーによる塩味増強効果の評価を行った。官能評価では 0.5~0.8% (w/v) の食塩水と各ジペプチドを 0.1% (w/v) 添加した 0.6% (w/v) 食塩水 (試料溶液) をブラインドで塩味の強い順に並び替え、試料溶液の塩味の強さがどの食塩濃度に相当するかを熟練したパネルが評価した。いずれの試料溶液も 0.6~0.65% (w/v) の食塩濃度に相当し、両ジペプチドの塩味増強効果が確認できた。また、客観的評価として味覚センサー (アルファ・モス製) による評価も実施し、食塩水と試料溶液の塩味相対強度から、Met-Gly は 0.7% (w/v)、Pro-Gly は 0.64% (w/v) の食塩濃度に相当し、0.6% (w/v) 食塩水よりも高い食塩濃度に相当する結果を得た。両ジペプチドともこれまでに塩味増強効果に関する報告は無く、官能評価と味覚センサーの 2 つの異なる方法により両ジペプチドの塩味増強効果が確認されたことから、Met-Gly と Pro-Gly は塩味増強効果を有する新規なジペプチドであると判断した。

第 4 章では、塩味増強効果を有するジペプチドとして見出した Met-Gly の選択的合成を目的に、部位特異的変異導入による Lal の機能改変を行った。Met-Gly の工業的生産には、N 末端アミノ酸基質として Met と Leu のみを認識する *Bacillus licheniformis* 由来の Lal である BL00235 を用いることとしたが、Met と Gly を基質とする反応では Met-Gly が主生成物となるが Met-Met も同時に生成する。そこで、既に明らかになっている BL00235 の結晶構造情報から、85 位の Pro 残基が C 末端アミノ酸基質の親和性に関与していると推測し、Met-Met の合成を抑制するための方法を策定した。すなわち、85 位の Pro 残基を Pro よりも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、側鎖の大きい 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 Pro よりも嵩高い側鎖を持つ芳香族アミノ酸である Phe、Tyr、Trp に置換したところ、その変異酵素 P85F、P85Y、P85W は Met-Met 合成能力が消失し、P85F

と P85Y では Pro-Gly 合成活性を維持していた。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。結晶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。置換により C 末端アミノ酸基質認識周辺のスペースが狭くなっていることはホモロジーモデリングによる構造予測からも視覚的に確認することができた。また、Met-Gly の合成量は野生型 BL00235 よりも P85F の方が少ないが、動力学的解析からも基質との親和性が野生型 BL00235 よりも低いことが示唆され、合成量の違いを支持する結果を得た。

第 5 章では、第 4 章での知見が他の Lal にも適用可能であるかを検証するために、塩味増強ジペプチドとして Met-Gly とともに見出された Pro-Gly をターゲットとして TabS の機能改変を行った。TabS は基質特異性から Pro と Gly を基質としたときに選択的にほぼ Pro-Gly のみを合成するが、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。そこで、部位特異的変異導入による Pro-Gly の合成量向上を検討した。TabS は結晶構造が解かれていないため、第 4 章の BL00235 を含むこれまでの Lal の構造と機能に関する知見を踏まえ、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った。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 の取得に成功した。動力学的解析では二重変異型酵素 S85T/H294D は Pro と Gly に対する親和性が野生型 TabS よりも高まっており、Pro-Gly の合成量の増加を支持する結果を得た。

第 6 章では、Lal の反応に用いる ATP が高価であることから、ATP の安価かつ効率的な供給を目的として、ポリリン酸キナーゼとポリリン酸による ATP 再生系の利用可能性を検討した。ポリリン酸キナーゼとして Class III PPK2 の活性が報告されている *Deinococcus proteolyticus* 由来の Deipr_1912 を利用したところ、ATP の使用量を従来の 1/10 にした場合、再生系を導入していない系では顕著に Pro-Gly の合成量が減少するのに対し、再生系を導入した系では Pro-Gly の合成能力を維持した。この結果から、Lal を利用したジペプチド合成反応において ATP の使用量を大幅に削減できる低コストプロセス構築の可能性を示した。

第 7 章では、本研究を総括した。本研究では、Lal を用いた機能性ジペプチドの探索と結晶構造情報を利用した酵素のデザインと改変による目的ジペプチドの効率的合成法の開発に成功した。また、Lal 研究の今後の展望について述べた。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 木野 はるか 印

(2016年 2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
1. 論文 (報文)	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, 62 , 274-281 (2015) <u>木野はるか</u> , 角谷政尚, 服部宏一, 東條博昭, 駒井強, 南木昂, 木野邦器
(報文)	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, 79 , 1827-1832 (2015) <u>Haruka Kino</u> and Kuniki Kino
	3. Effective production of Pro-Gly by mutagenesis of L-amino acid ligase J. Biosci. Bioeng, in press <u>Haruka Kino</u> , Shota Nakajima, Toshinobu Arai, and Kuniki Kino
2. 総説	1. L-アミノ酸リガーゼを利用したジペプチドライブラリーの構築と塩味増強効果を有するジペプチドの探索法の開発 日本醸造協会誌, 111 , 79-85 (2016) 木野邦器, <u>木野はるか</u>
3. 講演	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 第68回日本栄養・食糧学会大会（江別），講演番号 3O-13p, 講演要旨集 p308, 2014年6月 <u>木野はるか</u> , 角谷政尚, 服部宏一, 東條博昭, 駒井強, 南木昂, 木野邦器
	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（札幌），講演番号 1P-067, 講演要旨集 p34, 2014年9月 <u>木野はるか</u> , 角谷政尚, 服部宏一, 東條博昭, 駒井強, 南木昂, 木野邦器
	3. 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 日本農芸化学会 2015年度大会（岡山），講演番号 3A34a10, 講演要旨集 p65, 2015年3月（日本農芸化学会 2015年度大会トピックス受賞発表） <u>木野はるか</u> , 木野邦器
	4. Alteration of the substrate specificity of L-amino acid ligase and selective synthesis of functional dipeptide BIOTRANS 2015 (Vienna/Austria), 講演番号 PO-264, 講演要旨集 p390, 2015年7月 <u>Haruka Kino</u> and Kuniki Kino

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
3. 講演	<p>5. L-アミノ酸リガーゼ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 第67回日本生物工学会大会（鹿児島），講演番号 3P-039，講演要旨集 p280， 2015年10月 <u>木野はるか</u>，木野邦器</p> <p>6. 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 第67回日本生物工学会大会（鹿児島），講演番号 3P-040，講演要旨集 p280， 2015年10月 梅澤覚，角谷政尚，服部宏一，東條博昭，駒井強，齊藤司，<u>木野はるか</u>，木野邦器</p>
4. その他	<p>1. 特許：特願 2014-061601 「塩味増強剤」 <u>木野はるか</u>，角谷政尚，服部宏一，木野邦器</p> <p>2. 特許：特願 2015-128323 「塩味増強剤」 <u>木野はるか</u>，角谷政尚，服部宏一，木野邦器</p> <p>3. 受賞：日本農芸化学会 2015 年度大会トピック賞</p> <p>4. 記事：学会見聞記，バイオサイエンスとインダストリー ，73, 54 (2015)</p> <p>5. 記事：「塩味増強効果のジペプチド 酵素合成法で迅速探索 長谷川香料 新食材開発に活用」 化学工業日報 2015 年 8 月 4 日掲載</p> <p>6. HP：長谷川香料（株）研究情報 L-アミノ酸リガーゼの機能改変による塩味増強ジペプチドの選択的合成に成功 http://www.t-hasegawa.co.jp/research/</p>