

## オリゴペプチド合成を触媒する新規アミノ酸リガーゼ

木野 邦器

## Novel L-Amino Acid Ligases Catalyzing Oligopeptide Synthesis

Kuniki KINO

Department of Applied Chemistry, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University,  
3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

(Received July 17, 2010)

L-Amino acid ligase (EC 6.3.2.28) is a microbial enzyme catalyzing formation of an alpha-peptide bond from un-protected L-amino acids in an ATP-dependent manner. The YwfE protein from *Bacillus subtilis* 168 was the first reported L-amino acid ligase, and it synthesizes various dipeptides. Thereafter, several L-amino acid ligases were newly obtained by *in silico* analysis using the ATP-grasp motif. But these L-amino acid ligases synthesize only dipeptide and no longer peptide. A novel L-amino acid ligase capable of catalyzing oligopeptide synthesis is required to increase the variety of peptides. We have previously found a new member of L-amino acid ligase, RizA, from *B. subtilis* NBRC3134, a microorganism that produces the peptide-antibiotic rhizocticin. We newly found that a gene at approximately 9 kbp upstream of rizA encoded a novel L-amino acid ligase RizB. Recombinant RizB synthesized homo-oligomers of branched-chain amino acids consisting of 2 to 5 amino acids, and also synthesized various heteropeptides. RizB is the first reported L-amino acid ligase that catalyzes oligopeptide synthesis. In addition, we obtained L-amino acid ligases showing oligopeptide synthesis activities by *in silico* analysis using BLAST, which is a set of similarity search programs. These L-amino acid ligases showed low similarity in amino acid sequence, but commonly used branched-chain amino acids, such as RizB, as substrates. Furthermore, the spr0969 protein of *Streptococcus pneumoniae* synthesized longer peptides than those synthesized by RizB, and the BAD\_1200 protein of *Bifidobacteria adolescentis* showed higher activity toward aromatic amino acids than toward branched-chain ones.

**Key words**—L-amino acid ligase; oligopeptide synthesis; *in silico* analysis; rhizocticin

## 1. はじめに

ペプチドはアミノ酸同士がペプチド結合（アミド結合）を介して複数個連結した化合物である。単体のアミノ酸そのものにも生理活性が報告されているが、これらが連結してペプチドとなることで、構成するアミノ酸単体にはみられない物性や生理活性を発現する場合が多い。アミノ酸が2分子連結したジペプチドでさえ、もとのアミノ酸の有用な生理機能を保持しながらも溶解性や安定性が向上し、またもとのアミノ酸よりもはるかに多様な生理機能を示すことがある。例えば、Val-Tyr, Val-Pro-Proなどは血圧降下作用、Leu-Ileは抗薬物依存作用、Tyr-Arg

は鎮痛作用、 $\beta$ -Ala-Hisや $\gamma$ -Glu-Cys-Glyは抗酸化作用を示す。また、味の素から販売されている人工甘味料 Asp-Phe-OMe（アスパルテーム）は砂糖の約200倍の甘味度を有している。さらに、輸液の成分として重要なGlnは、Ala-Glnとなることで、Gln単体と比較して、溶解度で16倍、酸に対する安定性も格段に向上することが報告されている。また、 $\alpha$ -スリー・ディー・マトリックスから販売されている Arg-Ala-Asp-Ala の4回繰り返し配列を持つペプチドは自己組織化を起こしてハイドロゲルになるため、再生医療用の骨組み素材としての利用が期待されている。このようにペプチドには様々な機能や用途が期待され、その研究分野並びに応用可能な分野は多岐に渡る。アミノ酸が2個連結したジペプチドだけでも400（=20×20、タンパク質構成性アミノ酸で考えた場合）種類の組み合わせが存在し、さらに鎖長が増す毎にその多様性も指数関数的

早稲田大学先進理工学部応用化学科（〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1）

e-mail: kkino@waseda.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS55で発表したものを中心に記述したものである。

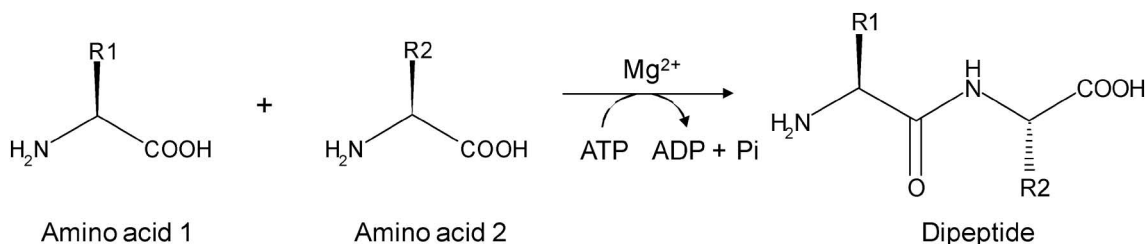


Fig. 1. Scheme of Dipeptide Synthesis Catalyzed by L-Amino Acid Ligase

L-Amino acid ligase (EC 6.3.2.28) catalyzes peptide synthesis from unprotected amino acids in an ATP-dependent manner.

に増していく。生体内においても短鎖ペプチドが重要な生理的役割を果たしていることが最近の分析技術の向上により明らかにされている。しかしながら、いまだ多くの短鎖ペプチドについては生理機能や物性面についての検討は行われておらず、その一因として、ペプチドの安価でかつ効率的な生産方法が確立されていないなどの供給面での問題点を挙げる事ができる。

## 2. L-アミノ酸リガーゼの発見とジペプチド合成

ペプチドの合成法については、i) 化学合成法と ii) 酵素法の2つに大きくは分類ができるが、現在最も一般的で広く利用されているのは固相合成法である。しかしながら、本合成法は反応に供するアミノ酸に保護基の導入が必要であることや反応時のラセミ化、大量の有機溶剤や縮合剤を使用するなどの化学合成法における共通の課題に加え、反応が煩雑であるため経済性、効率面での課題もあり、大量合成には不向きであると言える。一方、酵素法ではプロテアーゼやエステラーゼと呼ばれる加水分解酵素の逆反応を利用した方法が古くから検討されているが、本方法も基質となるアミノ酸に保護基が必要であることや、使用している酵素が元々は分解酵素であるために、生成したペプチドが再度分解されてしまうなど、収率の観点からも非効率的で課題が多い。

最近になって、L-アミノ酸リガーゼ (EC 6.3.2.28) と命名された新規酵素 YwfE が協和発酵工業(株) (現協和発酵バイオ(株)) の田畑らによって報告された。<sup>1)</sup> 本酵素は ATP の加水分解反応と共役して保護基を持たない遊離のアミノ酸同士を直接連結することが可能である (Fig. 1)。さらに、この L-アミノ酸リガーゼ遺伝子 *ywfE* を高発現させた組換え微生物を用いることで、輸液原料として需要のある Ala-Gln の発酵生産法を確立している。<sup>2)</sup> L-アミノ酸リガーゼを用いた手法は、基質に保護基が不要であること

や、反応が水系でかつ温和な条件で進行することから環境負荷低減型の生産プロセスを組むことができるため、モノ作りには最適な酵素であると言える。また、発酵法への応用も可能であることから大量合成にも適している。

田畑らは、目的とする酵素が、遊離のアミノ酸同士を  $\alpha$  位で結合してジペプチド生成反応を触媒する唯一の酵素 D-Ala-D-Ala リガーゼ (Ddl, EC 6.3.2.4) に類似していると予測して *in silico* スクリーニングを行い、機能未知タンパク質の中から YwfE を見出すことに成功している。筆者らは、L-アミノ酸リガーゼの基質特異性の拡張を目的として、ゲノム情報を利用して YwfE のホモログ酵素を探索し、新たに数種類の L-アミノ酸リガーゼの探索に成功している。<sup>3-5)</sup> それぞれに基質特異性の違いがあり、酵素の多様性に基づく基質特異性の拡張が可能であることを実証することができた。

しかしながら、この方法では合成可能なペプチドの種類は酵素の基質に対する特異性に依存してしまうため、限られた種類のペプチドしか合成できない欠点もある。しかも、既報の L-アミノ酸リガーゼはアミノ酸が2個連結したジペプチド合成反応を触媒するが、3個以上のアミノ酸が連結したオリゴペプチドを合成することはできなかった。

筆者らは、多種多様なペプチドの効率的な合成法の確立を目的として、新たな基質特異性を有する微



木野邦器

早稲田大学理工学術院教授、かずさ DNA 研究所特別客員研究員。早稲田大学工学部応用化学科卒業。同大学院理工学研究科博士前期課程修了。1981年協和発酵工業入社。1987年工学博士 (早稲田大学)。1999年早稲田大学理工学部教授。JST 研究開発戦略センターシニアフェロー歴任。専門分野：応用生物化学と酵素利用工学。

生物由来 L-アミノ酸リガーゼの探索を精力的に進めており、これまでに戦略の異なる方法でオリゴペプチドの合成も可能とする新規酵素の探索に成功している。

### 3. 植物病原ペプチド合成細菌からの L-アミノ酸リガーゼの探索

*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* はインゲンマメに対して「かさ枯病 (halo blight disease)」を起こす植物病原微生物である。この原因となる物質が Phaseolotoxin [ $N^{\delta}(N'$ -sulfodiaminophosphinyl)-ornithyl-alanyl-homoarginine] である。本物質はオルニチン (Orn), アラニン (Ala), ホモアルギニン (HomoArg) を骨格に有するトリペプチドである (Fig. 2).<sup>6)</sup> Phaseolotoxin は植物体内で分解酵素の作用により,  $N^{\delta}(N'$ -sulfodiaminophosphinyl)-ornithine (PSOrn) を生じ, これが尿素サイクルにおけるオルニチンカルバモイラーゼ (E.C. 2.1.3.3) の活性を阻害することで, 病原性を発揮するとされている。筆者らが Phaseolotoxin に着目した際には, 既に合成遺伝子クラスターが特定されていたが, 当該クラスター中に存在する各種遺伝子がコードするタンパク質がどのような機能を担っているかは明らかにされていなかった。そこで, Phaseolotoxin のペプチド結合形成を L-アミノ酸リガーゼが担っているものと推定し, リガーゼ酵素に特有な ATP-grasp モチーフの存在を判断基準とし

て, 当該合成遺伝子クラスター内における L-アミノ酸リガーゼ遺伝子の探索を実施した。その結果, 2つの候補遺伝子を見出し, 大腸菌を用いて発現を試みたところ, PSPPH\_4299 のみ可溶化タンパク質として取得することができた。この可溶化タンパク質について L-アミノ酸リガーゼ活性を検証した結果, ジペプチド Ala-Xaa (Xaa は任意のアミノ酸) の合成が可能であった。さらに, PSPPH\_4299 は Phaseolotoxin の骨格の一部である Ala-HomoArg の合成反応も触媒し, Phaseolotoxin 合成を担う酵素であることを強く示唆する結果を得た。<sup>7)</sup>

本成果は, 微生物の二次代謝産物に関する情報と既存の遺伝子配列並びに各種データベースを組み合わせることで, 新たな L-アミノ酸リガーゼを見出すことに成功した例である。また, この結果は新たな基質特異性を有する酵素の発見に留まらず, L-アミノ酸リガーゼの生体内での役割や Phaseolotoxin の生合成機構に係わる知見についても提供するものである。

### 4. ペプチド性抗生物質生産菌からの L-アミノ酸リガーゼの探索

YwfE は *in silico* スクリーニングによって初めて見出された L-アミノ酸リガーゼであるが, 結果的に *Bacillus subtilis* ATCC6633 が生産するペプチド性抗生物質 Bacilysin (Ala-Anticapsin) の合成遺伝子クラスター内の *ywfE* によってコードされるタンパク質であった。これまでに微生物が生産するペプチド性抗生物質は多く報告されており, その合成反応を触媒する酵素の中に新たな機能を有する L-アミノ酸リガーゼの存在を予測し, ペプチド性抗生物質 Rhizocticin の生産菌 *B. subtilis* NBRC3134 に着目した。

Rhizocticin は構成アミノ酸の種類によって, 4つの構造体が報告されている。Rhizocticin A は N 末端に Arg, C 末端に非タンパク質性アミノ酸 L-2-amino-5-phosphono-3-*cis*-pentenoic acid (APPA) を配したジペプチド (Arg-APPA) であり, Rhizocticin B, C, D は, さらにその N 末端に分岐鎖アミノ酸が結合したトリペプチド (R-Arg-APPA, R=Val, Ile, or Leu) である (Fig. 3)。しかし, Rhizocticin においては生合成に係わる酵素や遺伝子に関する情報や生産菌のゲノム DNA の情報などは皆無であったため, 培養菌体から目的の活性を有

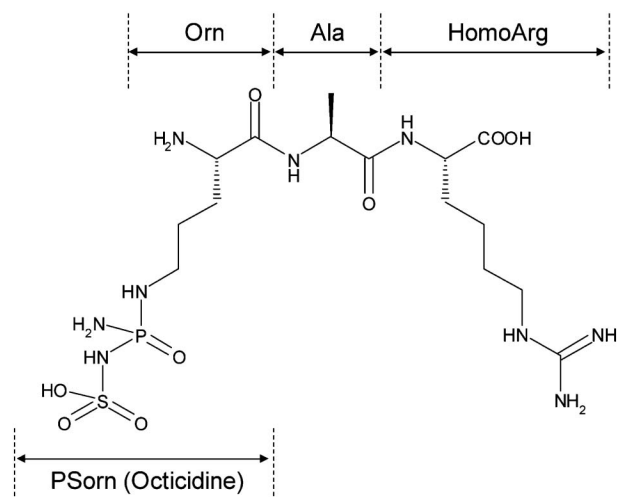


Fig. 2. Structure of Phaseolotoxin Peptide-phytotoxin Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Phaseolotoxin:  $N^{\delta}(N'$ -sulfodiaminophosphinyl)-ornithyl-alanyl-homoarginine. PSorn (Octicidine) causes halo blight disease on legumes by inhibition of ornithine carbamoyl transferase activity in the urea cycle.

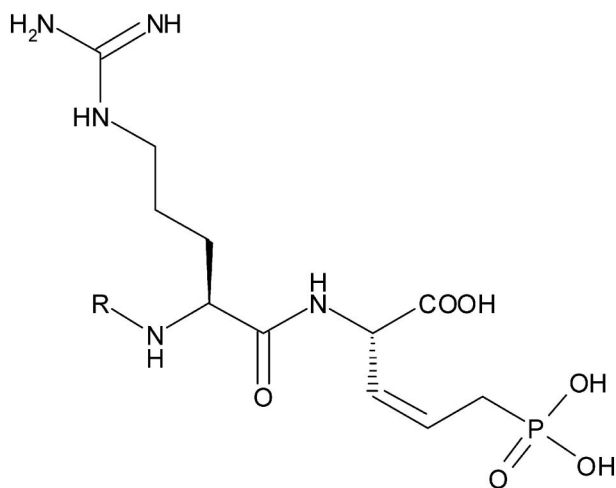


Fig. 3. Structure of Rhizocticin Produced by *Bacillus subtilis* NBRC3134

Rhizocticin A, R=H, Arg-APPA, Rhizocticin B, R=Val, Val-Arg-APPA, Rhizocticin C, R=Ile, Ile-Arg-APPA, Rhizocticin D, R=Leu, Leu-Arg-APPA, APPA: L-2-amino-5-phosphono-3-*cis*-pentenoic acid.

するタンパク質の単離精製を検討した。Rhizocticin A の構造に着目し、Arg 特異的にペプチド結合を形成するタンパク質を4段階の精製ステップにより、収率 0.8%、比活性として 1280 倍にまで精製した。目的活性が存在すれば Arg と NH<sub>2</sub>OH からペプチダーゼ分解を受けない Arg-NHOH が生成する。このヒドロキサム酸と FeCl<sub>3</sub> を反応させると赤色を呈するので、この活性を指標として目的のタンパク質の精製を実施した。さらに、当該精製タンパク質の N 末端アミノ酸配列情報から、PCR 法によって当該遺伝子 (*rizA* と命名) を取得し、組換え酵素を用いて活性の検証を行った。その結果、この組換え RizA は、Arg を N 末端に配する種々のヘテロジペプチドを合成する新たな L-アミノ酸リガーゼであることが明らかになった。なお、RizA 遺伝子は 1242 bp (RizA : 413 アミノ酸残基, 46.3 kDa) で ATP-結合モチーフを有していたが、これまでに取得している L-アミノ酸リガーゼ YwfE, RSp1486a, BL00235 との相同性はアミノ酸レベルで、それぞれ 21.3%, 19.8%, 19.6% と低いことがわかった。<sup>8)</sup>

### 5. オリゴペプチド合成酵素の発見

RizA にジペプチド合成活性のあることは確認できたが、トリペプチドの合成活性はみられなかったことから、筆者らはトリペプチドである Rhizocticin B, C, D の合成に係わる L-アミノ酸リガーゼが別に存在しているものと仮定し、*rizA* 遺伝子周辺

の配列解析を実施した。その結果、Rhizocticin 生合成への関与が推定される一連の ORF の中から *rizA* とは別に、リガーゼ酵素に特有な ATP-grasp モチーフを有するタンパク質をコードした遺伝子 (*rizB* と命名) を見出すことができた。この組換え RizB においては、Val と Arg-Ser (Arg-APPA が入手困難であることからその代替として使用) を基質として Val-Arg-Ser を合成するだけでなく、分岐鎖アミノ酸を基質として 2-5 量体のオリゴホモペプチドの合成活性を有していた (Table 1)。<sup>9)</sup> RizB の発見は、オリゴペプチド合成活性を有する L-アミノ酸リガーゼを取得した初めての例となる。これまで L-アミノ酸リガーゼではジペプチドしか合成することができなかったが、RizB によってさらに長鎖のペプチド合成が可能となり、合成可能なペプチドの種類を飛躍的に増大させる成果となった。

これら酵素遺伝子を含む推定 Rhizocticin 生合成遺伝子クラスターは約 14 kbp の DNA 断片上にあり、興味深いことに、Rhizocticin 非生産株 *B. subtilis*168 の *ybdK* と *ybdL* の間に挿入された形で存在していた。また、14 種類の ORF は BLAST 検索からそれぞれの酵素機能を推定することができ、Rhizocticin と同じく C-P 結合を有する phosphinothricin や fosfomycin 及び Bialaphos の生合成酵素の情報を踏まえ、Rhizocticin 生合成経路の推定も可能であった。これら成果は、新たな抗生物質合成への応用展開の可能性を示唆するものである。

以上より、RizA と RizB は Rhizocticin 合成に直接関与する酵素であることが強く支持された (Fig. 4)。

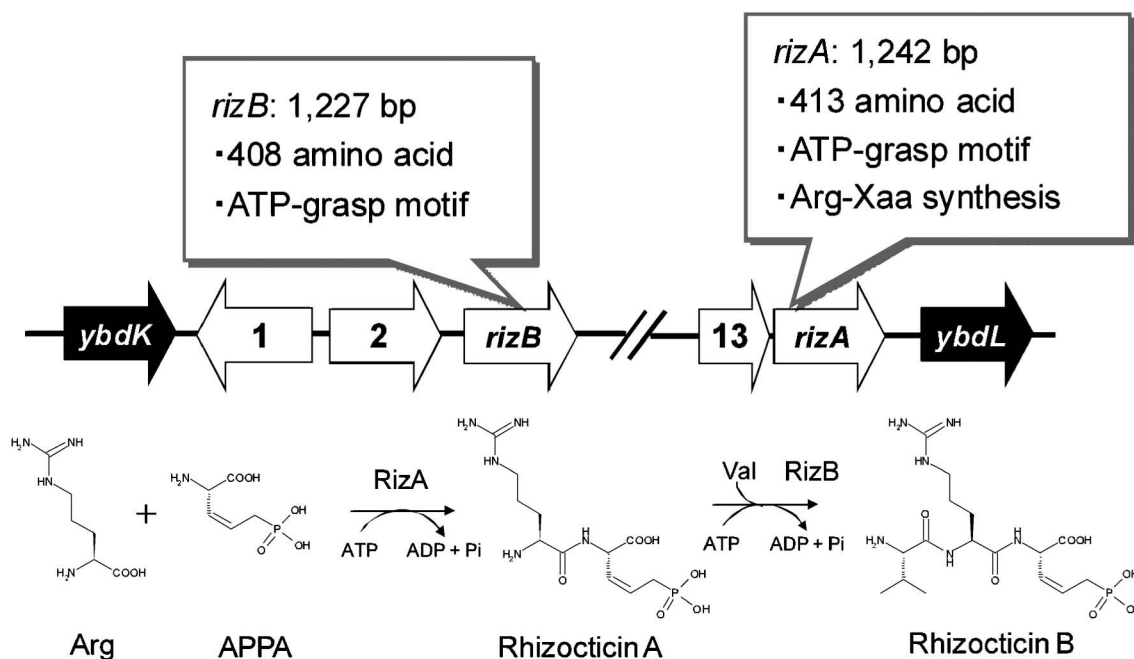
### 6. ゲノム情報を活用したオリゴペプチド合成酵素の探索

ペプチド性抗生物質に着目することで、オリゴペプチド合成反応を触媒する L-アミノ酸リガーゼ RizB を初めて発見することができた。これまでの研究実績から、リガーゼに特有な ATP-grasp モチーフを有する RizB のアミノ酸配列をクエリーとして *in silico* スクリーニングによる RizB ホモログ酵素の探索を行った (Table 2)。抗生物質 Nikkomycin の生合成に関与する NikS 以外はその機能は予測もつかない推定タンパク質であり、いずれも相同性が低く、RizB と最も相同性が高い *Bacillus licheniformis* NBRC 12200 由来の BL02410 でさえ

Table 1. LC-ESI-MS Analysis of Heteropeptide Synthesis Catalyzed by RizB

Substrate 1	Substrate 2	Product <sup>a</sup>	
		Homopeptide	Heteropeptide
Val	Arg	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V·R, V <sub>2</sub> ·R, V <sub>3</sub> ·R
	Lys	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·K
	His	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·H, V <sub>3</sub> ·H
	Gln	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·Q, V <sub>3</sub> ·Q
	Asn	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·N, V <sub>3</sub> ·N
	Ala	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·A
	Ser	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·S
	Thr	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·T
	Gly	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·G
	Leu	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , L <sub>2</sub> , L <sub>3</sub>	V <sub>2</sub> ·L, V·L <sub>2</sub>
	Ile	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , I <sub>2</sub> , I <sub>3</sub>	V <sub>2</sub> ·I, V·I <sub>2</sub>
	Met	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , M <sub>2</sub>	V <sub>2</sub> ·M, V·M <sub>2</sub>
	Phe	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·F, V <sub>3</sub> ·F
	Trp	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> ·W
	Tyr	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.
	Glu	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.
	Asp	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.
	Pro	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.
	Cys	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.

<sup>a</sup> Symbols: n.d., not detected. Homopeptides are shown as X<sub>n</sub> (X, amino acid; n, peptide length). Heteropeptides are shown as X<sub>n</sub>·Z<sub>n</sub> (X and Z, amino acids; n, peptide length [n>1]) because the sequences of them were not determined. For example, X<sub>2</sub>·Z means tripeptides of X-X-Z, X-Z-X, or Z-X-X.

Fig. 4. Putative Rhizoctin Biosynthesis and Rhizoctin Biosynthetic Gene Cluster from *B. subtilis* NBRC3134

The *rizB* gene was found to be located approximately 9000 bp upstream of *rizA*. The DNA fragment for putative rhizoctin biosynthetic gene cluster was located between *ybdK* and *ybdL* on the chromosome of *B. subtilis* 168, a non-producing strain of Rhizoctin.

Table 2. Candidates for L-Amino Acid Ligase Catalyzing Oligopeptide Synthesis

Gene name or locus tag	Source	Length (AA <sup>a</sup> )	Homology <sup>b</sup> (%)	
<i>rizB</i>	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC 3134	408	—	28
BL02410	<i>Bacillus licheniformis</i> NBRC 12200	405	62	29
Haur_2023	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779	408	39	30
spr0969	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC BAA-255	400	33	24
plu2197	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> DSM 15139	395	32	28
<i>nikS</i>	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 31160	424	28	—
BAD_1200	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM 1275	395	27	23
Ldb1692	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NBRC 13953	408	26	23
CV_0806	<i>Chromobacterium violaceum</i> NBRC 12614	392	23	26

<sup>a</sup> AA, amino acid. <sup>b</sup> Amino acid sequences of the candidates were compared with those of RizB (left column) and NikS (right column).

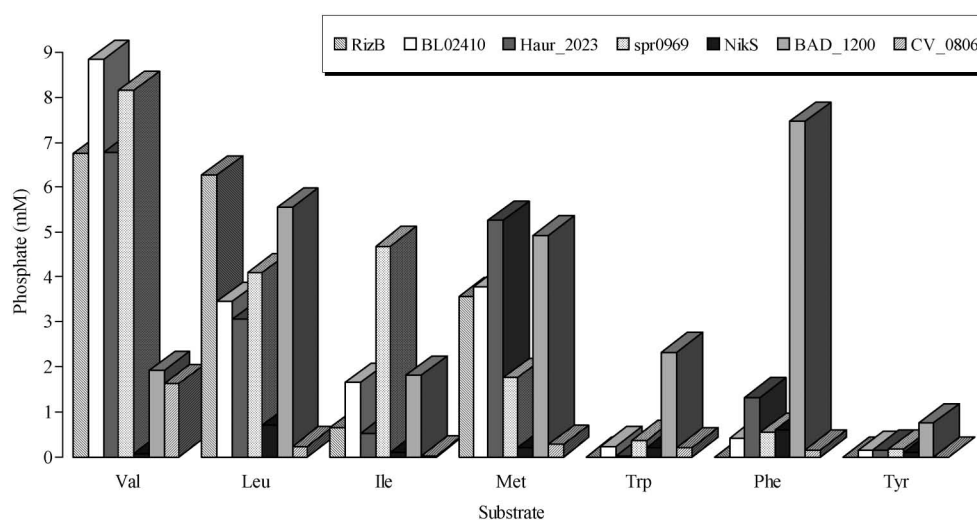


Fig. 5. Measurement of the Amounts of Phosphate Produced in the Reaction Mixtures

The negative control involved carrying out the reaction in the absence of an amino acid, and all data were adjusted using this blank value. Bars: left striped bar, RizB; white bar, the BL02410 protein; dark gray bar, the Haur\_2023 protein; dotted bar, the spr0969 protein; black bar, NikS; light gray bar, the BAD\_1200 protein; and right striped bar, the CV\_0806 protein.

62%しかなかった。大腸菌でこれら遺伝子を高発現させて得た組換えタンパク質のL-アミノ酸リガーゼ活性を評価した結果、新たに5種類のオリゴペプチド合成酵素を見出すことに成功した。<sup>10)</sup> 20種類のアミノ酸を基質にしたホモペプチドの合成活性を反応と同時に遊離するリン酸量と比較すると、脂肪族アミノ酸やMetを基質とするRizBと似た反応特性を示したが、*Bifidobacterium adolescentis* JCM 1275由来のBAD\_1200では芳香族アミノ酸に対する特有の活性の存在が示唆された (Fig. 5)。LC-ESI-MS解析の結果、NikSでは活性確認はできなかったが、他の候補タンパク質ではリン酸遊離量を反映して、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、Metのホモペプチド合成と最大6量体までのオリゴペプ

チド合成を確認することができた (Fig. 6)。ジペプチドあるいはトリペプチドを基質としたときも活性を有し、及び、ヘテロペプチド合成活性を有していることも確認している。オリゴペプチド合成では沈殿物の形成やペプチドの自己組織化による結晶析出などが観察され、例えば、Leuのホモペプチドでは反応直後に反応液のゲル化や、PheとLeuとの反応液では針状結晶の析出が観察できる。

## 7. おわりに

これまでに筆者らは種々の微生物からL-アミノ酸リガーゼを取得しており、それぞれに特徴的な特性を有した酵素であることを明らかとした。トリペプチド以上のオリゴペプチド合成を可能とする新規酵素も発見し、現在では、多くのオリゴペプチド合

Enzyme	Substrate	Product					Enzyme	Substrate	Product				
		2mer	3mer	4mer	5mer	6mer			2mer	3mer	4mer	5mer	6mer
RizB	Val	●	●	●	●		BL02410	Val	●	●	●	●	
	Leu	●	●	●	●			Leu	●	●	●	●	
	Ile	●	●	●				Ile	●	●	●		
	Met	●	●	●	●			Met	●	●	●	●	
	Trp	●						Trp	●	●			
	Phe							Phe	●	●			
	Tyr							Tyr					
Haur_2023	Val	●	●	●			spr0969	Val	●	●	●	●	●
	Leu	●	●	●				Leu	●	●	●	●	●
	Ile	●	●					Ile	●	●	●	●	
	Met	●	●	●				Met	●	●	●	●	●
	Trp	●						Trp	●				
	Phe	●	●					Phe	●				
	Tyr							Tyr					
BAD_1200	Val	●	●	●	●		CV_0806	Val	●	●	●		
	Leu	●	●	●	●	●		Leu	●	●	●		
	Ile	●	●	●				Ile	●				
	Met	●	●	●	●	●		Met	●	●			
	Trp	●	●	●	●			Trp	●				
	Phe	●	●	●	●			Phe					
	Tyr	●	●	●	●			Tyr					

Fig. 6. Product Spectrum of the Recombinant Proteins

Homopeptide synthesis was examined and the analysis was performed by LC-ESI-MS. Closed circles indicate that  $m/z$  peaks of the peptides detected. When the amino acids not listed in this matrix were used as the substrates, no peptides were detected. NikS did not show L-amino acid ligase activity.

成をカバーできるようになってきたが、いずれの酵素もアミノ酸レベルでは相同性が20%程度と低い。これらの生体内における役割とその起源に興味を持たれる。今後、詳細な酵素学的性質や立体構造が解明され、遺伝子工学的手法を応用することで、既存酵素の基質特異性の改変も期待できる。また、多様なL-アミノ酸リガーゼを組み合わせることで、任意ペプチドの画期的な合成プロセスの構築も可能であると考えている。実際に、YwfEとRizBを順次作用させることで、血圧降下活性を有するLeu-Ala-Tyr ( $IC_{50}$ :  $3.9 \mu M$ )も収率よく合成可能であることを確認している。こうした技術の確立により、様々なペプチドの安価な供給が可能となり、ペプチドの医薬品や食品、化粧品などの広い分野での用途開発の進展に貢献するものと確信している。

**謝辞** 本研究の一部は、協和発酵バイオ㈱との共同研究で得られたものであり、特に矢ヶ崎 誠博士からは貴重なアドバイスを受けました。ジペプチドのNMR及びMALDI-TOF MS分析に関しては、同社バイオフロンティア研究所にお世話になりました。

## REFERENCES

- 1) Tabata K., Ikeda H., Hashimoto S., *J. Bacteriol.*, **187**, 5195–5202 (2005).
- 2) Tabata K., Hashimoto S., *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6378–6385 (2007).
- 3) Kino K., Nakazawa Y., Yagasaki M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 536–540 (2008).
- 4) Kino K., Noguchi A., Yagasaki M., *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 313–315 (2008).
- 5) Kino K., Noguchi A., Arai T., Yagasaki M., *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 39–41 (2010).
- 6) Bender C. L., Alarcon-Chaidez F., Gross D. C., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 266–292 (1999).
- 7) Arai T., Kino K., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **72**, 3048–3050 (2008).
- 8) Kino K., Kotanaka Y., Arai T., Yagasaki M., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **73**, 901–907 (2009).
- 9) Kino K., Arai T., Tateiwa D., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **74**, 129–134 (2010).
- 10) Arai T., Kino K., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **74**, 1572–1577 (2010).