

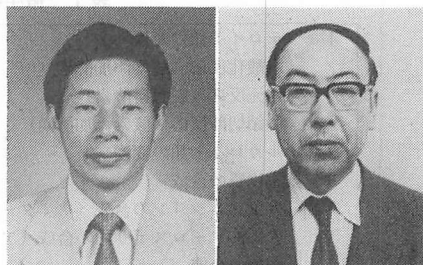
■ 解 説 ■

微生物による合成反応

Microbial Processes for the Synthesis of Useful Compounds

和 泉 好 計*・山 田 秀 明**

Yoshikazu Izumi Hideaki Yamada



1. はじめに

最近「バイオテクノロジー」という言葉が世の中で頻繁にかつ広範囲に使われているが、基本的には生体がもっている物質代謝の機能を物質生産などに合理的に利用する技術であり、その主役は何といっても微生物が中心であろう。その微生物を生産手段とするバイオテクノロジーは近年著しい進歩を遂げ、抗生物質、糖、有機酸、アミノ酸、核酸関連物質、その他種々の有用物質が微生物反応を巧みに利用して生産され、食品工業、医薬品工業、化学工業等さまざまな産業分野で発展している。

微生物反応を利用して物質を生産する手法は発酵法と酵素法とに大別される。伝統的な酒や食酢の醸造などに見られるように微生物の営む生命現象、すなわち一連の共役した酵素反応からなる複雑な物質代謝を利用した物質生産法を発酵法といい、微生物を機能面からのみ単純化してとらえて特定の反応を触媒する“酵素の袋”とみなし、微生物細胞あるいはその中からとり出された酵素そのものを化学的合成の場合の触媒と同様に用いて行う物質生産法を酵素法という。従って酵素法では微生物が生物であることを必ずしも必要とせず、目的とする化学反応の触媒としての機能のみが要求されると言っても過言ではない。

酵素法による合成反応を化学的反応と比較すると常温常圧、中性pH領域などの温和な条件下で高い触媒能を示し、生産工程でのエネルギーや資源の消費あるいは設備の点で有利である。また酵素反応のきわめて特長的な点は、特定の構造の特定の位置に立体選択的に反応が起こるので、種々の狭雑物質存在下でも目的の生成物のみが得られ、副生成物が少なく、収率の向上が可能であることから精製工程の簡略化や環境汚染物

質の低減の上で有利である。

一方酵素法に用いる酵素資源としての微生物は、増殖も速く、大量培養も容易であり、また自然界に多種多様な微生物が無数に存在するので適当な方法で目的とする酵素の活性の強い微生物を探索することができる。さらに変異株を造成したり、最近の遺伝子工学的手法により微生物の育種を行って酵素生産量を増大させることもできるなど多くの優れた点を有している。

微生物を直接触媒として有機合成に利用する酵素法は約30年前にステロイドの合成、変換に積極的に導入され大きな成功を収めて以来、特に化学的な合成法では困難な有機化合物の合成、変換にしばしばこの手法が試みられ、合成化学の一分野を形成する程に成長している。表1には最近報告されている酵素法による有用物質生産研究の中で特に工業の見地から興味ある成果を列記した。これらの研究は主としてわが国の研究者によって行われたものであり、この分野を含むわが国の応用微生物学の水準の高さを物語っている。

本稿ではこのような省エネルギー、省資源型の有機合成法の一つとしての酵素法を利用した有用物質生産について、筆者らの行ってきた研究のいくつかを例に挙げて述べる。

2. 酵素法によるアミノ酸の合成

アミノ酸は食品、医薬、飼料などの分野で、また種々の工業用原料としても広く大量に使用されており、その製造法としてはタンパク質加水分解液からの分離抽出、化学合成法、発酵法、酵素法あるいはこれらの組み合わせによる方法があるが、各アミノ酸に最も適合した方法が工業的に利用されている。化学合成法は大量生産には向いているが、光学活性アミノ酸の製造にあたってはラセミ体からの光学分割が必要となる。これに対し微生物を用いる発酵法や酵素法は光学活性アミノ酸を直接合成できる点で優れている。酵素法によるアミノ酸の合成は、冒頭でも述べたように生産工

* 京都大学農学部農芸化学科助教授

〒606 京都市左京区北白川追分町

** 京都大学農学部農芸化学科教授

表1 微生物酵素による有用物質の合成・変換¹⁾

1. ステロイド類の変換 水酸化反応 (酸素添加酵素) 還元反応 (脱水素酵素) 側鎖切断反応 (酸素添加酵素)	ひとインシュリンの合成 (プロテアーゼ)
2. アルカロイド類の変換	7. 核酸関連化合物の合成 N-リボシル化反応 (ホスホリラーゼ) N-アラビノシル化反応 (ホスホリラーゼ) ヌクレオシドのリン酸化反応 (リン酸転位反応) ヌクレオチドのピロリン酸化反応 (ピロリン酸転位酵素) 糖ヌクレオチドの合成 (ピロホスホリラーゼ) 補酵素類の合成
3. 抗生物質の合成 人工ペニシリンの合成 (アミダーゼ) 人工セファロスポリンの合成 (アミダーゼ)	8. アミノ酸の合成 (表2参照)
4. 有機酸の合成 フマル酸の水和反応 (酸素添加酵素) アルケンの両端酸化反応 (酸素添加酵素) エポキシコハク酸の水解反応 (水解酵素)	9. アミンの合成 (脱炭酸酵素)
5. 糖の変換 異性化糖 (グルコースイソメラーゼ)	10. 化学工業原料 オキサイド類の合成 (酸素添加酵素) ケトン類 (二級アルコール脱水素酵素) ピロガロールの合成 (没食子酸脱炭酸酵素) アミド類の合成 (ニトリルヒドラーゼ)
6. タンパク質の合成 プラスチンの合成 (プロテアーゼ)	

程が単純で、副反応が少なく、酵素の基質特異性の広さに応じて類縁化合物の合成が可能な場合があるため、発酵法では製造困難なアミノ酸を中心に最近著しい進歩を遂げ、表2に挙げたような興味ある成果が多数報告されている。この中でL-アミノアシルラーゼを用いる化学合成品DL-アシルアミノ酸からのL-アミノ酸の生産³⁾、アスパルターゼによるL-アスパラギン酸の生産⁶⁾、アスパラギン酸- β -デカルボキシラーゼによるL-アラニンの生産⁴⁾、ナイロン製造の副産物から化学的に誘導されるDL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム (DL-ACL) からのL-ACL加水分解酵素とACLラセマーゼの協同作用によるL-リジンの生産²⁰⁾、ジヒドロピリジナーゼ (ヒダントイナーゼ) によるDL-5- β -ヒドロキシフェニルヒダントインからのD- β -ヒドロキシフェニルグリシンの生産^{30,31)}(後述)などが現在工業化されている。

2.1 多機能ピリドキサル酵素を用いる芳香族アミノ酸および含硫アミノ酸の合成

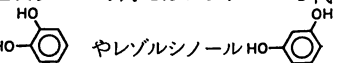
筆者らは微生物の多機能ピリドキサル酵素を利用するL-チロシン、L-ドーパ、L-トリプトファン(芳香族アミノ酸)およびL-システイン、D-システイン(含硫アミノ酸)等の新しいアミノ酸合成法を開発した。

β -チロシナーゼ、トリプトファナーゼ、システインデスルフヒドラーゼは生体内においてはそれぞれL-チロシン、L-トリプトファン、L-システインの分解反応を触媒する酵素であり、いずれもピリドキサルリン酸を補酵素として要求する。筆者らはこれらの酵素の高活性生成微生物を検索して、それぞれ*Citrobacter intermedius* (β -チロシナーゼ生成菌)、*Proteus rettgeri* (トリプトファナーゼ生成菌)、*Enterobacter*

cloacae (システインデスルフヒドラーゼ生成菌)を得た。ついでこれらの菌体よりそれぞれの酵素を精製して結晶状に単離した。酵素化学的性質について詳細に調べたところこれらの酵素は表3に示すように1) α , β -脱離反応, 2) β -置換反応, 3) 合成反応(α , β -脱離反応の逆反応)などの反応を触媒する多機能酵素であることを明らかにした。合成に利用できる反応は、表中の2)および3)の反応である。

(1) β -チロシナーゼによるL-チロシン, L-ドーパの合成³²⁾

β -チロシナーゼの場合置換反応ではL-チロシンまたはその誘導体が生成する³³⁾。例えばフェノールの代わりにピロカテコール



を用いると3, 4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン(L-ドーパ; パーキンソン病の治療薬)や2, 4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニンが合成でき、ピロガロール



を用いるとそれぞれ対応するトリヒドロキシー-L-フェニルアラニンを合成することができる。また合成反応によってハロゲンL-チロシンやアルキル化L-チロシン類も合成できる。





次にL-ドーパの合成能を指標として選択した高活性細菌*Erwinia herbicola*は最適条件下で培養すると菌体中の β -チロシナーゼは菌体の可溶性タンパク質の7~10%という高含量生成する。置換反応によって反応液100mlあたり4gのDL-セリンとフェノールあるいはピロカテコールからそれぞれ5.5gのL-チ

表2 酵素法によるアミノ酸の合成^{a)}

アミノ酸	反応	酵素	生産菌	文献	アミノ酸	反応	酵素	生産菌	文献
S-アデノシル-L-ホモシステイン	L-ホモシステイン+アデノシン →S-アデノシル-L-ホモシステイン+H ₂ O	S-アデノシルホモシステインヒドロリアーゼ	<i>Alcaligenes faecalis</i>	2)	5-ヒドロキシ-L-トリプトファン	5-ヒドロキシインドール+ビルビン酸+NH ₄ ⁺ →5-ヒドロキシ-L-トリプトファン+H ₂ O	トリプトファンナーゼ	<i>Proteus rettgeri</i>	19)
L-アミノ酸	N-アシル-L-アミノ酸+H ₂ O →L-アミノ酸+酢酸	アミノアシラーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>	3)	L-リジン	DL-α-アミノ-ε-カプロラクタム(ACL)+H ₂ O →L-リジン	ACLラセマーゼ, L-ACLヒドロラーゼ	<i>Achromobacter obae</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i>	20)
L-アラニン	L-アスパラギン酸+H ₂ O →L-アラニン+CO ₂	アスパラギン酸-β-デカルボキシラーゼ	<i>Pseudomonas dacunhae</i>	4)	L-フェニルアラニン	DL-5-ベンジルヒダントイン+2H ₂ O →L-フェニルアラニン+NH ₃ +CO ₂	L-5-ベンジルヒダントインヒドロラーゼ, N-カルバミル-L-フェニルアラニンヒドロラーゼ	<i>Flavobacterium aminogenes</i>	21)
L-アスパラギン酸	フマル酸+NH ₄ ⁺ →L-アスパラギン酸 マレイン酸+NH ₄ ⁺ →L-アスパラギン酸	アスパルターゼ マレイン酸イソメラーゼ, アスパルターゼ	<i>Escherichia coli</i> など <i>Alcaligenes faecalis</i>	6) 7)	SまたはSe-置換-L-ホモシステイン	L-メチオニン+RSH (または RSeH) →S (または Se) -置換-L-ホモシステイン+メタンチオール	メチオニナーゼ	<i>Pseudomonas ovalis</i>	22, 23)
L-シトルリン	L-アスパラギン+H ₂ O →L-シトルリン+NH ₂	アルギニンデイミナーゼ	<i>Pseudomonas putida</i>	8)	SまたはSe-L-システイン	L-システイン+RSH (または RSeH) →S (または Se) -置換-L-システイン+H ₂ S	メチオニナーゼ	<i>Pseudomonas ovalis</i>	22, 23)
L-シスタチオン	L-ホモセリン+L-システイン →L-シスタチオン+H ₂ O	シスタチオンアリアーゼ	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	9)	L-セリン	グリシン+ホルムアルデヒド(またはメタノール) →L-セリン	セリントランスヒドロキシメチラーゼ, メタノールデヒドロゲナーゼ	<i>Sarcina alba</i> <i>Pseudomonas</i> 3 ab <i>Hypomicrobium methylovorum</i>	24) 25) 26)
L-システイン	DL-2-アミノ-d ² -チアゾリン-4-カルボン酸(ATC)+2H ₂ O →L-システイン+NH ₃ +CO ₂	ATCラセマーゼ, L-ATCヒドロラーゼ, S-カルバミル-L-システインヒドロラーゼ	<i>Pseudomonas thiazolinophilum</i>	10)	L-トレオニン	グリシン+アセトアルデヒド →L-トレオニン	トレオニンアルドラーゼ	<i>Candida humicola</i>	27)
	β-クロロ-L-アラニン+H ₂ S →L-システイン+HCl	システインデスルフヒドラーゼ	<i>Enterobacter cloacae</i>	11)	L-トリプトファン	インドール+ビルビン酸+NH ₄ ⁺ →L-トリプトファン+H ₂ O	トリプトファンナーゼ	<i>Proteus rettgeri</i>	19)
	β-クロロ-L-アラニン+H ₂ S →L-システイン+HCl	O-アセチルセリンスルフヒドリラーゼ	<i>Bacillus sphaericus</i>	12)		インドール+L-セリン →L-トリプトファン+H ₂ O	トリプトファンシンターゼ	<i>Escherichia coli</i>	28)
D-システイン	β-クロロ-D-アラニン+H ₂ S →D-システイン+HCl	β-クロロアラニクロリドリアーゼ	<i>Pseudomonas putida</i>	13, 14)		DL-5-インドリルメチルヒダントイン(IMH) →L-トリプトファン+NH ₂ +CO ₂	L-IMHヒドロラーゼ, N-カルバミル-L-トリプトファンヒドロラーゼ	<i>Flavobacterium aminogenes</i>	29)
L-ドーバ	ピロカテコール+ビルビン酸+NH ₄ ⁺ →L-ドーバ+H ₂ O ピロカテコール+DL-セリン →L-ドーバ+H ₂ O L-チロシン+O ₂ →L-ドーバ+H ₂ O	β-チロシナーゼ β-チロシナーゼ チロシンヒドロキシラーゼ	<i>Erwinia herbicola</i> <i>Erwinia herbicola</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	15) 16) 17)	L-チロシン	フェノール+ビルビン酸+NH ₄ ⁺ →L-チロシン+H ₂ O	β-チロシナーゼ	<i>Erwinia herbicola</i>	15)
L-グルタミン酸	DL-5-カルボキシエチルヒダントイン+2H ₂ O →L-グルタミン酸+NH ₃ +CO ₂	L-ヒダントイン-5-プロピオン酸ヒドロラーゼ, N-カルバミル-L-グルタミン酸ヒドロラーゼ	<i>Bacillus brevis</i>	18)	D-α-ヒドロキシフェニルグリシン	DL-5-置換-ヒダントイン+H ₂ O →N-カルバミル-D-アミノ酸 DL-5-β-ヒドロキシフェニルヒダントイン+H ₂ O →N-カルバミル-β-ヒドロキシフェニルグリシン	ジヒドロピリミジナーゼ ジヒドロピリミジナーゼ	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas putida</i>	30, 31) 30, 31)

^{a)} 山田ら, 酵素工学, 福井三郎ら編, 東京化学同人, p.107 (1981). のデータに新たに付け加えたもの.

表3 多機能ピロドキサル酵素の触媒する諸反応

1) L (D) -RCH ₂ CHNH ₂ COOH + H ₂ O → RH + CH ₃ COCO ₂ H + NH ₃
2) L (D) -RCH ₂ CHNH ₂ COOH + R'·H → L (D) -R'CH ₂ CHNH ₂ COOH + RH
3) R'·H + CH ₃ COCO ₂ H + NH ₃ → L (D) -R'CH ₂ CHNH ₂ COOH + H ₂ O
β-チロシナーゼ: R=HO  , -OH, -SH, -Cl, R'=HO 
トリプトファナーゼ: R=  , -OH, -SH, -Cl, R'= 
システインデスルフヒドラーゼ: R = -SH, -OH, -Cl, R' =メルカプタンラジカル
β-クロロ-D-アラニンクロリドリアーゼ: R = -Cl, -SH, チオールラジカル, R' = -SH

ロシン (対セリン・モル収率, 80%) あるいは5.3 g のL-ドーパ (対セリン・モル収率, 71%) が合成される (図-1)¹⁶⁾。L-チロシンやL-ドーパはもちろんβ-チロシナーゼの合成反応 (表3の3) を用いても合成される。その場合反応12時間で4 gのピルビン酸からそれぞれ6 gのL-チロシンあるいはL-ドーパが合成される¹⁵⁾。このように合成されたL-チロシンおよびL-ドーパはいずれも水に対する溶解度がきわめて低いことから反応液中に結晶として析出するので分離・精製はきわめて簡単である。

(2) トリプトファナーゼによるL-トリプトファン の合成

L-トリプトファンの合成は*Proteus rettgeri*のトリプトファナーゼの合成反応 (表3の3) を利用する。この細菌の培養液中に直接ピルビン酸ナトリウム、インドール、酢酸アンモニウムおよびイノシンを添加して反応を行うと34°C, 48時間で約100g/lのL-トリプトファンが生成する。(対インドール・モル収率, 100%)¹⁹⁾。イノシンは生成したL-トリプトファンと不溶性の複合体を形成し、反応平衡を合成方向に傾ける。同様にして5-ヒドロキシインドール, 5-アミノインドールからそれぞれ5-ヒドロキシ-L-トリプトファン, 5-アミノ-L-トリプトファンの合成も可能である³⁵⁾。

(3) システインデスルフヒドラーゼによるL-シス テインの合成

L-システインの合成は*Enterobacter cloacae*のシステインデスルフヒドラーゼのβ-置換反応 (表3の2) でβ-クロロ-L-アラニンとH₂Sを基質として用いて行う。反応液に予めアセトンを添加しておくことにより生成したL-システインは化学的にチアゾリジン化合物を形成し反応系外に除去することで反応の円滑な進行が促進される。L-システインの収量は約50 g/l (対β-クロロ-L-アラニン・モル収率, 88%) である¹¹⁾。L-システイン以外にも各種のS-アルキル-L-システインなどの合成が可能である³⁶⁾。

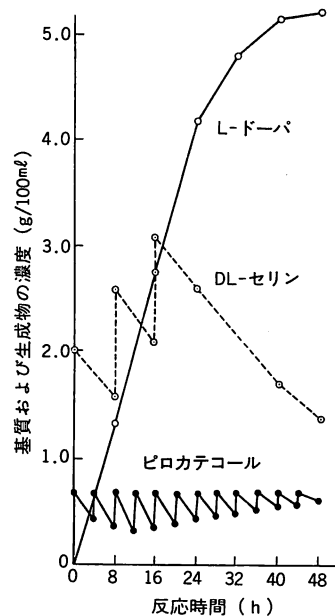


図-1 DL-セリンを基質とするL-ドーパの合成反応

ごく最近筆者らの研究室ではβ-クロロ-L-アラニンに耐性を示す細菌 *Bacillus sphaericus* を土壌より分離し、本菌が強力なO-アセチル-L-セリンデスルフヒドラーゼを生成することを見いだしたが、この酵素が上記のシステインデスルフヒドラーゼと同様にβ-クロロ-L-アラニンとNaHSとからL-システインを合成することをはじめて明らかにした³⁷⁾。本酵素はピロドキサル酵素ではあるがβ-置換反応のみ触媒しL-システインやβ-クロロ-L-アラニンのα, β-脱離反応を触媒しないので多機能ピロドキサル酵素の範疇には入らない。本菌の菌体を用いてアセトン存在下でNaHSとβ-クロロ-L-アラニンとから2時間の反応で70 g/lのL-システイン (モル収率, 80%) が生成する¹²⁾。

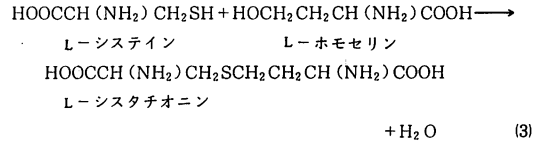
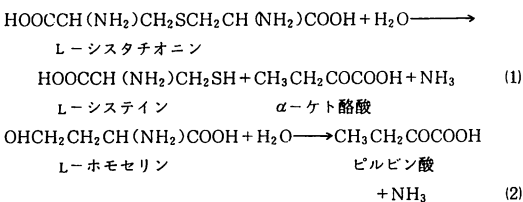
(4) β-クロロ-D-アラニンクロリドリアーゼによるD-シス テインの合成

筆者らの研究室では一般の微生物に対して強い毒性

を示すβ-クロロ-D-アラニンに耐性を有する *Pseudomonas putida* を見だし、本菌が、ピリドキサルリン酸を補酵素としてβ-クロロ-D-アラニンをピルビン酸、アンモニア、塩化水素に分解(表3の1)する新酵素β-クロロ-D-アラニクロリドリアーゼを有することを発見し本酵素を精製、結晶化した^{38, 39)}。次に本酵素は表3の2のようなβ-置換反応をも行う多機能性を見だしたので、β-クロロ-D-アラニンとNaHSとを基質として上記の菌体を用いてD-システインの合成を行った。この場合NaHSを過剰に加えてα, β-脱離反応を抑制しβ-置換反応を優先させ、また前述のL-システイン合成の場合と同様にアセトンを加えて収率を高めた。また基質のβ-クロロアラニンは一般には現在ラセミ型で供給されているので、これを出発基質として用いる場合には、菌体中に共存しているL型基質からL-システインを合成する酵素反応やL型基質を分解する酵素反応を抑制する必要がある。このためにあらかじめ菌体をフェニルヒドラジンで処理することによってその問題を解決した。残存するL型基質は反応後回収し前述のL-システインの合成に利用できる。D-システインの収量は22g/lである(対β-クロロ-D-アラニン・モル収率, 88%)⁴⁰⁾。D-システインはβ-ラクタム系抗生物質の中間原料として最近その利用が期待されているアミノ酸である。

(5) シスタチオンアーリアーゼによるL-シスタチオニンの合成

L-シスタチオンは生体のイオウ代謝のかなめと言える高価なアミノ酸であり、将来研究試薬や医薬品としての応用が期待されている。筆者らの研究室では従来真核細胞にのみその存在が知られていたシスタチオンアーリアーゼが原核細胞に属する放線菌にも広く分布することを見だし *Streptomyces phaeochromogenes* の菌体抽出液より本酵素を精製結晶化した⁴¹⁾。本酵素はL-シスタチオニンの加水分解(反応1)のみならずL-ホモセリンの加水分解(反応2)をも触媒する。またγ-置換反応を触媒し、L-ホモセリンとL-システインからL-シスタチオニンの合成(反応3)を触媒する。



筆者らは本酵素のγ-置換反応によるL-シスタチオン合成の諸条件を検討した。L-システインは本酵素のフィードバック阻害剤となるため分割フィードして添加したところ現在までに得られた結果では約3g/lのL-シスタチオニンの合成が可能である⁹⁾。

2.2 セリントランスヒドロキシメチラーゼを用いるL-セリンの合成

天然ガスなどから大規模に製造されているメタノールはきわめて経済的な合成用原料であるが、工業的な意味での将来の微生物培養原料としても有望視されている。そのような背景からこの約15年間にメタノールの微生物代謝の基礎と応用に関する研究が多くなされてきた。メタノールに生育する細胞の中にはメタノールをホルムアルデヒドに脱水素した後、このホルムアルデヒドとグリシンとからテトラヒドロ葉酸(THF)の存在下でL-セリンを合成し、資化するものが知られている(図-2)。前者の酵素はメタノールデヒドロゲナーゼで、後者の酵素はアルドール縮合反応を触媒するセリントランスヒドロキシメチラーゼでありピリドキサル酵素である。

この2つの酵素を利用することによってメタノールとグリシンとから今まで有機合成では困難であったL-セリンの合成が可能である。筆者らは土壌より分離した多数のメタノール資化性細菌の中でL-セリン合成活性の強い *Hyphomicrobium methylovorum* を得た。本菌株の菌体をメタノールとグリシンとともに2日間振とう反応させることによって約24g/l(対グ

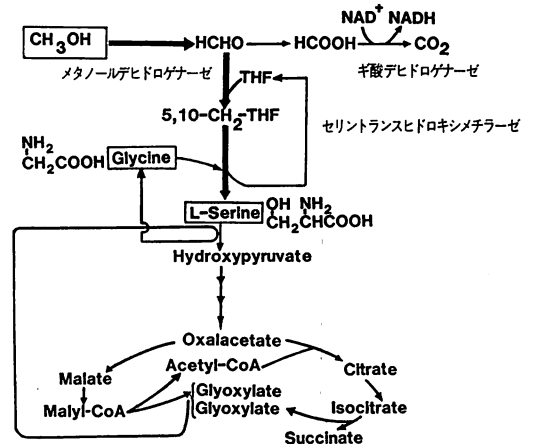


図-2 セリン経路によるメタノールの資化機構

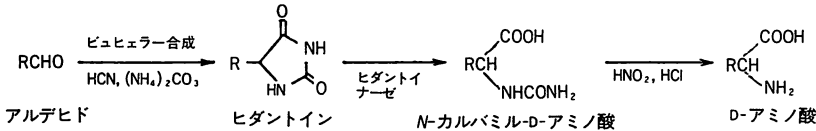


図-3 ヒダントイナーゼを用いるD-アミノ酸の合成

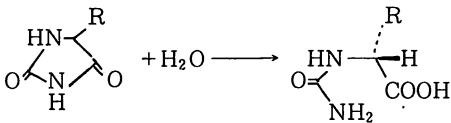
リシン・モル収率, 17%) のL-セリンが生成した²⁶⁾。さらに本菌株のグリシン耐性変異株を造成することによりL-セリンの生成量は増加し35 g/lとなった⁴²⁾。

2.3 ジヒドロピリミジナーゼ (ヒダントイナーゼ)

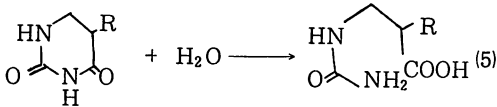
によるD-p-ヒドロキフェニルグリシンの合成

D-p-ヒドロキシフェニルグリシン (D-HPG) はペニシリンやセファロスポリンなどβ-ラクタム系抗生物質の中間原料として重要なアミノ酸である。現在有効な半合成ペニシリンの1つであるアモキシシリンや半合成セファロスポリンであるセファトリジン、セファドロキシルなどの製造に用いられているが、合成法は以下に述べる筆者らが開発したジヒドロピリミジナーゼを用いる酵素法が適用され工業化されている^{43, 44)}

反応(4)はアミノ酸の化学的合成の古典的方法として知られるビュヒェラー法の一部で、出発原料として5位置換ヒダントイン誘導体を用いる。筆者らはこのヒ



ダントイン誘導体の微生物代謝に関する研究の過程で多数の細菌や放線菌が5位置換ヒダントインに作用して開環加水分解しD-カルバモイルアミノ酸を生成することを見いだした³¹⁾。活性の強い *Pseudomonas putida* より反応に関与する酵素を精製結晶化し、本酵素が本来は反応(5)に示す6員環のジヒドロピリミジンの



開環加水分解を行うジヒドロピリミジナーゼであることを明らかにした⁴⁵⁾。すなわち本酵素は広い基質特異性を示しジヒドロラシルやジドロチミンのような天然の基質に対して作用するとともに人工基質である5員環のヒダントイン類に対しても作用する。特に5位にbulkyな置換基が存在する中性の天然型アミノ酸のヒダントイン、非天然型のフェニルヒダントイン類、チエニルヒダントイン類のD体に作用して対応するN-カルバモイル-D-アミノ酸が生成する^{31, 46)}。

上記の結果を基にして筆者らは図-3に示すようなD-アミノ酸の一般的合成法を確立した^{32, 48)}。このスキームでは不斉水解の基質となるDL-5位置換ヒダントイン類は通常ビュヒェラー法で合成しD-ヒダントイン類の水解を酵素的に行う。酵素反応は *P. putida* などの高活性菌体を直接触媒として用いる。この際反応のpHを8~9に保つと基質であるヒダントインの化学的ラセミ化反応が同時に進行するのでDL-ヒダントインから定量的にN-カルバモイル-D-アミノ酸への変換が可能となる。N-カルバモイル-D-アミノ酸の脱カルバモイル反応は酸性条件下亜硝酸で処理することによりD-体保持のまま定量的に行える。図-4においてRがフェニル基のDL-p-ヒドロキシフェニルヒダントイン (DL-HPH) を基質にすると前述のD-HPGが得られるわけであるが、DL-HPHは新しく開発したフェノールのアミドアルキル化反応によりフェノール、グリオキシル酸、尿素から合成する⁴⁸⁾。従来のビュヒェラー法と比較して高価なp-ヒドロキシベンズアルデヒドや危険なシアン化物を用いる必要がなくコストと安全性の面で有利である。

このD-HPGの合成プロセスは前述したように工業的製法として現在適用されているが、その成立の主要因は、ヒダントイナーゼの立体特異性に着目した酵素法の導入とともに、基質であるDL-HPHの新規化学的合成法の開発も大なるものがあつた。

2.4 S-アデノシルホモシステインヒドロリアーゼ

によるS-アデノシル-L-ホモシステインの合成

筆者らの研究室では従来S-アデノシル-L-ホモシステイン (L-Ado Hcy) 加水分解酵素の存在が否定されていた原核細胞 (細菌, 放線菌) にも本酵素の強い活性を見いだした⁴⁹⁾。本酵素を多量に含む細菌

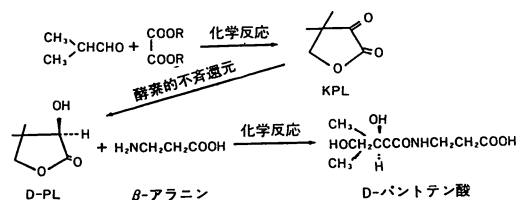


図-4 KPLの酵素的な不斉還元を含むD-パントテン酸の合成法

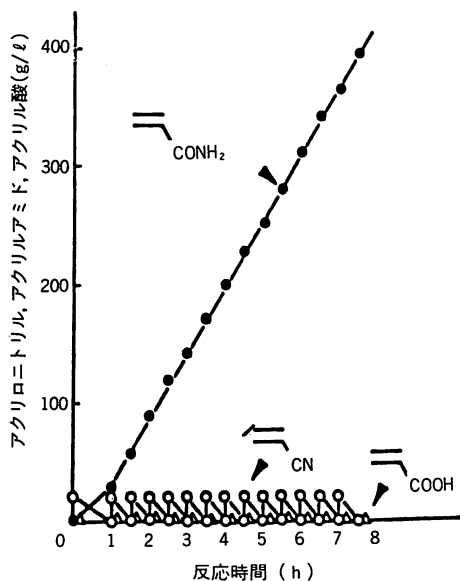


図-5 ニトリルヒドラーゼによるアクリルアミドの生産

や微生物で知られているニトリラーゼであるが、反応(8)の第1段階、すなわち水和反応を触媒する酵素は全く新しい酵素でニトリルヒドラーゼと命名した⁵⁸⁾。そこで筆者らはニトリルヒドラーゼを用いるアクリルアミドをはじめとする種々のアミド類の合成法を検討した。土壌から分離した *Pseudomonas chlororaphis* はアクリロニトリルには生育できないがイソブチロニトリルをよく資化し強力にニトリルヒドラーゼを生産する。本菌のニトリルヒドラーゼはアクリロニトリルによく作用しアクリルアミドを生成するが、反応(8)の第2段階の酵素アミダーゼはアクリルアミドには作用しない。すなわち菌体をアクリロニトリルとともに反応させるとアクリルアミドを生成し、アクリル酸を生成しない。このようにして本菌の菌体を直接触媒に用いて図-6に示すように400 g/l という大量のアクリルアミドが収率100%で生成する⁵⁹⁾。

6. おわりに

以上、筆者らの研究室で進めている研究の中から有機合成化学的に興味ある成果を例にとり微生物の合成反応について概説した。ここに紹介した例からでも理解されるように酵素法では natural な物質のみならず unnatural な物質をも生産しうる。また紙面の都合上多くを紹介できなかったが、一段階の反応のみならず多段階の複合反応(2.2のセリン合成は2段階)も酵素法で可能であり高価な補酵素コエンザイムAの合

成(5段階)^{60, 61)}などはその典型と言える。酵素法を用いる合成はその特長から比較的高付加価値のファインケミカルズ指向であるが、アクリルアミドの合成例で初めて示されたように大量生産型の化成品すなわちコモディティケミカルズの製造プロセスにも酵素という省エネルギー型の触媒の利用が可能であり、その例が将来増えることと思われる。

今後、化学合成の分野との連携を密にしつつ、また最近急速に進歩している酵素や微生物菌体の固定化技術等もとり入れつつ多くの独自の特長をもつ酵素法が化学工業など多方面に発展し貢献していくものと期待している。

参考文献

- 1) 山田秀明; 発酵と工業, 44, 926(1983).
- 2) S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Osiro, H. Yamada; Agric. Biol. Chem., 48, 1383(1984).
- 3) I. Chibata, T. Ishikawa, S. Yamada; Bull. Agric. Biol. Chem. Soc. Japan, 21, 300(1957).
- 4) I. Chibata, T. Kakimoto, J. Kato; Appl. Microbiol., 13, 638(1965).
- 5) 渡辺史郎, 一色貞夫, 大沢岳義, 山本外男; 醸工誌, 43, 95(1965).
- 6) 北原覚雄, 福井作蔵, 三沢正愛; 農化, 34, 44(1960).
- 7) Y. Takamura, I. Kitamura, M. Ikura, K. Kuno, A. Ozaki; Agric. Biol. Chem., 30, 345(1966).
- 8) T. Kakimoto, T. Shibatani, N. Nishimura, I. Chibata; Appl. Microbiol., 22, 992(1971).
- 9) H. Yamada, H. Kanzaki, T. Nagasawa; J. Biotechnol., in Press.
- 10) K. Sano, K. Yokozeki, F. Tamura, N. Yoshida, I. Noda, K. Misugi; Appl. Environ. Microbiol., 34, 806(1977).
- 11) H. Yamada, H. Kumagai; "Pure and Applied Chemistry; IUPAC Bulletin." Pergamon Press, Oxford, Vol. 50, p. 1117(1978).
- 12) T. Nagasawa, G. S. Dhillon, H. Yamada; J. Biotech., in press.
- 13) H. Ohkishi, D. Nishikawa, H. Kuwagai, H. Yamada; Agric. Biol. Chem., 45, 2937(1981).
- 14) T. Nagasawa, H. Yamano, H. Ohkishi, H. Hoshono, Y. Tani, H. Yamada; Agric. Biol. Chem., 46, 300(1982).
- 15) H. Enei, H. Nakazawa, H. Matsui, S. Okumura, H. Yamada; FEBS Lett., 21, 39(1972).
- 16) H. Enei, H. Matsui, H. Nakazawa, S. Okumura, H. Yamada; Agric. Biol. Chem., 37, 493(1973).
- 17) K. Haneda, S. Watanabe, I. Takeda; Appl. Microbiol., 22, 721(1971).

- 18) R. Tsugawa, S. Okumura, T. Ito, N. Katsuya; *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 27(1966).
- 19) H. Nakazawa, H. Enei, S. Okumura, H. Yoshida; H. Yamada; *FEBS Lett.*, **25**, 43(1972).
- 20) T. Fukumura; *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1687(1976); **41**, 1327(1977).
- 21) 横関健三, 佐野孝之輔, 江口新比古, 安田直彦, 野田一郎, 光木浩司; 日本農芸化学会講演要旨集, p.288(1976).
- 22) H. Tanaka, N. Esaki, K. Soda; *Biochemistry*, **16**, 100(1977).
- 23) N. Esaki, H. Tanaka, S. Uemura, T. Suzuki, K. Soda; *Biochemistry*, **18**, 407(1979).
- 24) K. Omori, T. Kakimoto, I. Chibata, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1722(1983).
- 25) H. Keune, H. Sahm, F. Wagner; *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **2**, 175(1976).
- 26) Y. Izumi, M. Takizawa, Y. Tai, H. Yamada; *J. Ferment. Technol.*, **60**, 269(1982).
- 27) H. Yamada, H. Kumagai, T. Nagate, H. Yoshida; *Agric., Biol. Chem.*, **35**, 1340(1971).
- 28) W. Marconi, F. Bartoli, F. Cecere, F. Morisi; *Agric. Boil. Chem.*, **38**, 1343(1974).
- 29) K. Sano, K. Yokozeki, C. Eguchi, T. Kagawa, I. Noda K. Mitsugi; *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 819(1977).
- 30) H. Yamada, S. Takahashi, Y. Kii, H. Kumagai; *J. Ferment. Technol.*, **56**, 484(1978).
- 31) S. Takahashi, T. Ohashi, Y. Kii, H. Kumagai, H. Yamada; *J. Ferment. Technol.*, **57**, 328(1979).
- 32) H. Yamada, H. Kumagai; *Adv. Appl. Microbiol.*, **19**, 249(1975).
- 33) H. Kumagai, H. Mastui, H. Ohkishi, K. Ogata, H. Yamada; T. Ueno, H. Fukami; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 266(1969).
- 34) T. Ueno, H. Fukami, H. Ohkishi, H. Kumagai, H. Yamada; *Biochim. Biophys. Acta*, **206**, 476(1970).
- 35) H. Yamada, H. Nakazawa, N. Ohkishi, H. Kumagai; *Proc. 1st. International Congress of IAMS*, **5**, 485, (1975).
- 36) H. Kumagai, H. Tanaka, S. Sejima, H. Yamada; *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2071(1977).
- 37) G. S. Dhillon, T. Nagasawa, H. Yamada; *J. Biotechnol.*, **1**, 47(1984).
- 38) H. Yamada, T. Nagasawa, H. Ohkishi, B. Kawakami, Y. Tani; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1104(1981).
- 39) T. Nagasawa, H. Ohkishi, B. Kawakami, H. Yamano, H. Hosono, Y. Tani, H. Yamada; *J. Biol. Chem.*, **257**, 13479(1982).
- 40) T. Nagasawa, H. Hosono, H. Yamano, H. Ohkishi, Y. Tani, H. Yamada; *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 861(1983).
- 41) T. Nagasawa, H. Kanzaki, H. Yamada; *J. Biol. Chem.*, **259**, in press.
- 42) 和泉好計, S. S. ミヤザキ, 山田秀明; 日本農芸化学会関西支部336回例会講演要旨(1984).
- 43) 山田秀明, 清水 昌, 米田耕司; *発酵と工業*, **38**, 937(1980).
- 44) 清水 昌, 山田秀明; *発酵と工業*, **40**, 715(1982).
- 45) S. Takahashi, Y. Kii, H. Kumagai, H. Yamada; *J. Ferment. Technol.*, **56**, 492(1978).
- 46) S. Shimizu, H. Shimada, S. Takahashi, T. Ohashi, Y. Tani, H. Yamada; *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2233(1980).
- 47) H. Yamada, S. Shimizu, H. Shimada, Y. Tani, S. Takahashi, T. Ohashi; *Biochimie*, **62**, 395(1980).
- 48) T. Ohashi, S. Takahashi, T. Nagamachi, K. Yoneda, H. Yamada; *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 831(1981).
- 49) S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Oshiro, H. Yamada; *Eur. J. Biochem.*, **149**, in press.
- 50) 森下剛志, 畑 啓之, 高橋正英, 安久洋成一, 河村昌男; 日本化学会大会講演要旨集, p. 376(1983).
- 51) 山田秀明, 清水 昌, 畑 啓之; 日本農芸化学会大会講演要旨, p.356(1983).
- 52) 畑 啓之, 清水 昌, 山田秀明; 日本農芸化学会大会講演要旨, p.357(1983).
- 53) 畑 啓之, 清水 昌, 山田秀明; 日本農芸化学会大会講演要旨, p.270(1984).
- 54) Y. Izumi, S. K. Mishra, B. S. Ghosh, Y. Tani, H. Yamada; *J. Ferment. Technol.*, **61**, 135(1983).
- 55) 和泉好計, 山本 博, 山田秀明; 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.595(1984).
- 56) 山田秀明, 浅野泰久, 谷 吉樹; *化学と工業*, **36**, 101(1983)
- 57) 谷 吉樹, 浅野泰久, 山田秀明; *発酵と工業*, **41**, 382(1938).
- 58) Y. Asano, K. Fujishiro, Y. Tani, H. Yamada; *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1175(1982).
- 59) Y. Asano, Y. Yasuda, Y. Tani, H. Yamada; *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1183(1982).
- 60) K. Ogata, S. Shimizu, Y. Tani; *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1757(1970).
- 61) S. Shimizu, R. Komaki, Y. Tani, H. Yamada; *FEBS Lett.*, **151**, 303(1983).