酵素法による L-リシンの製造法

福 村 隆

東レ株式会社基礎研究所（鎌倉市手広 1,111）

L-Lysine Production from DL-Aminocaprolactam using Two New Microbial Enzymes

Takashi FUKUMURA

TORAY Industries, Inc., Basic Research Laboratory (Tebiro, Kamakura)

1 はじめに

L-リシンは主として家畜飼料の栄養強化剤として使用されている。家畜にとっても L-リシンは必要アミノ酸の1つであって、飼料のタンパク源である穀類には L-リシンが一番不足しているため、L-リシンの添加が必要なのである。ところで世界的な肉の消費量の増大と従来からの添加剤である魚粉の生産量低下が、飼料添加剤としての L-リシンの必要性を高め、急速度で膨張する需要を招来している。L-リシンの生産量は年々増加しているが、莫大な量の需要を賄いきれていない。ちょうどその時機に東レが L-リシンの新製造法を開発しかつ協和醗酵工業と提携して生産に乗り出すことを発表したため、関係方面の注目を集めることになった^{1)~9)}。

東レの L-リシン製造法は有機合成化学と酵素化学の結合の成果である。有機合成化学とはシクロヘキセンから DL-α-アミノ-ε-カプロラクタム^{注)}を合成するプロセス、酵素化学とは DL-アミノカプロラクタムを L-リシンに転換する酵素反応のプロセスをいう。そしてこの2つのプロセスのうち新製造法のキープポイントを成すのは酵素反応プロセスである。

酵素反応が受け持つ DL-アミノカプロラクタムから L-リシンへの転換の中には光学分割が含まれている。光学分割は L-リシンに限らず L-アミノ酸合成における最大の難所であり、光学純度、収率および経済性の三拍子揃った方法を作り出すことは至難の業である。多くの L-アミノ酸合成法の研究はここで挫折している。L-リシンの合成も例外ではない。

著者は微生物酵素を触媒とする新しい光学分割法を見いだした。さらに一歩進めて DL-アミノカプロラクタムを一挙に L-リシンに変換する方法を開発して、L-リシン新製造法を実現性あるものに導いた。この酵素反応はプロセスが簡単なこと、菌体の酵素活性が著しく高いこと、転換率および製品 L-リシンの光学純度が事実上

100% であることなど、多くの長所を持っている。

学術的興味としては本酵素法で用いられる2種類の微生物酵素が新発見のもので、それらが自然界には存在しないと考えられる物質アミノカプロラクタムを基質にしてその変換を触媒することである。

以下、リシン酵素法について説明し、既知の微生物酵素反応と比較検討したい。

注) α-アミノ-ε-カプロラクタムをここではアミノカプロラクタムと略称する。次の構造式で表され、α位に不斉炭素原子を持つ。

2 L-リシン製造の現行法と研究例^{10)~13)}

L-リシンの大量生産は協和醗酵工業において木下、中山らの発明になるリシン発酵法^{14)~16)}が企業化されたことに始まる。1965年ころから生産量は増加の一途を辿り、その伸び方は指数関数的である¹⁷⁾。1973年のわが国の L-リシン生産量は約2万tに達し、世界の生産量のほとんど全部を占める。製品は90%以上が輸出されている。

発酵法の主原料は甘しょ廃糖みつである。これを含む培地に *Corynebacterium glutamicum* の人工栄養変異株を培養し、菌の生長と同時に L-リシンを菌体外へ分泌させる。60~70 hr の培養で、40~50 g/l の L-リシンを蓄積する。対糖収率は30~40%という。リシン発酵法は発酵工業ないし応用微生物学における数多い発明の中でも抜群に優れたものである。

L-リシンは工業製品として魅力があるので、その新製造法を目ざした研究報告と特許出願は枚挙にいとまがない程多い。時期としてはリシン発酵法が世に出た1958年前後から現在に至っている。発表された発明を分類すると(1)発酵法、(2)発酵法と酵素法の組み合わせ、(3)合成法、(4)合成法と酵素法の組み合わせ、になる。

これらについて主な例を挙げる。

1) 発酵法: リシナンalog耐性株を用いる発酵¹⁸⁾, 酢酸を炭素源とする発酵¹⁹⁾。

2) 発酵法と酵素法の組み合わせ: 発酵によるジアミノピメリン酸の生成と酵素法によるその L-リシンへの変換^{20), 21)}。

3) 合成法: カプロラクタム→DL-アミノカプロラクタム→L-アミノラクタム→L-リシン²²⁾, アクリロニトリルおよびアセトアルデヒド→DL-リシンヒダントイン→DL-リシン→L-リシン⁸⁾。

4) 合成法と酵素法の組み合わせ: ϵ -ベンゾイル- α -アセチル-DL-リシンをアシラーゼによって加水分解し, ϵ -ベンゾイル-L-リシンを得て, これを酸で加水分解して L-リシンを作る²³⁾, DL-リシンヒダントインに微生物を作用させて L-リシンを作る^{24), 25)}。

これらの中で合成法の例として挙げたオランダの Stamicarbon 社 (DSM 社) の開発した DL-アミノカプロラクタムを経る方法は著者が酵素法を研究する動機となったものであるので簡単に説明する。

カプロラクタムを原料として DL-アミノカプロラクタムを合成し, これを光学分割して L-アミノカプロラクタムを分け取り, これを酸で加水分解して L-リシンとする。一方光学分割に残る D-アミノカプロラクタムはラセミ化して再使用する。光学分割はジアステレオマー法と一般に呼ばれる方法で, L-ピロリドンカルボン酸を分割剤として用いている²⁶⁾。DL-アミノカプロラクタムまでの合成プロセスには無理がなさそうであるが, 光学分割にはいくつかの問題があるように思われる。それらを挙げる。DL-アミノカプロラクタムを L-ピロリドンカルボン酸を用いて分割するとき, 1回の操作で分割が完了しないので何回も操作を繰り返さなければならないこと, D-アミノカプロラクタムのラセミ化が必要なこと, L-ピロリドンカルボン酸はラセミ化しやすい物質であるのでその光学純度を維持することの問題, さらに L-アミノカプロラクタムの加水分解時にラセミ化を伴いやすく, 製品に D-リシンがかなり混入することなどである。スイスの Geigy 社からも DL-アミノカプロラクタムを L-ピロリドンカルボン酸を用いて光学分割する特許²⁷⁾が出されているが, 操作法が一寸違うだけで, 上述の欠点をやはり持っている。

著者は, DL-アミノカプロラクタムの光学分割におけるこれらの問題は光学分割を微生物酵素を用いる酵素法で行えば解決すると考えた。

3 リシン酵素法研究の前提

3.1 東レにおけるアミノカプロラクタム新合成法の開発

東レにおいてはシクロヘキセンが容易に得られるとい

う事情から, その利用研究の一つとしてアミノカプロラクタム經由 L-リシン合成がとり上げられた。シクロヘキセンからアミノカプロラクタムの合成が検討され, 新しい合成法が完成した。これと並行して光学分割法の検討がなされた。物理化学的手段により DL-アミノカプロラクタムの分割と DL-リシンの分割の両方について研究が行われたが有効な方法は見つからなかった。

そこで著者は微生物化学的光学分割をとりあげることになった。

3.2 カプロラクタムおよび環状オリゴマーの微生物分解

著者は以前に天然には存在しない環状アミド化合物であるカプロラクタムおよび環状オリゴマーが微生物によって分解される事を見だし, これを研究した。この経験がリシン酵素法の研究を導く原動力になった。これを簡単に説明する。

ナイロン工場の一部からカプロラクタムおよび環状オリゴマーを炭素, 窒素源として生育する数種の細菌が発見された^{28)~31)}。カプロラクタムは³²⁾菌体内に生成する 1つの酵素で加水分解されて ϵ -アミノカプロン酸に変わる。この酵素は菌体外に抽出することはできなかったが, 誘導酵素であることが証明された。環状オリゴマー (3,4,5...量体) は^{33), 34)} 1株の細菌の菌体内に生成する誘導酵素で加水分解されて開環する。この酵素は分離精製され, 環状オリゴマーの開環以外に鎖状オリゴマーを ϵ -アミノカプロン酸ダイマーの単位で切断することが明らかにされた。別に 1つの誘導酵素があり, それは鎖状オリゴマーの端から ϵ -アミノカプロン酸を切り離す作用を示した。このようにして生成する ϵ -アミノカプロン酸は α -ケトグルタル酸との間でトランスアミネーションを起こすことがわかった。すなわち特殊なトランスアミナーゼの存在が証明された³⁵⁾。

3.3 アミノカプロラクタムの微生物変換に関する知見

アミノカプロラクタムの微生物変換についての唯一の文献, Pfizer 社の T.A. Seto のアメリカ特許³⁶⁾がある。コウジカビの 1種 *Aspergillus ustus* を用いて DL-アミノカプロラクタムから L-リシンを生産することが述べられている。このカビの菌体を 0.5~3% の DL-アミノカプロラクタム水溶液に加えて 72 hr インキュベーションを行うと, DL-アミノカプロラクタムから 20~30% の収率で L-リシンが生成した。その L-リシンの光学純度は著者の計算によると 91% でかなり低い。反応後のアミノカプロラクタムについての記載はない。

この文献はアミノカプロラクタムが微生物作用を受け得ることを示している。

3.4 不斉炭素をもつ環状アミドの酵素的変換

L-アミノ酸, とくに L-グルタミン酸と L-リシンの合

成法として、それぞれに関連した環状アミド化合物を微生物酵素の不斉触媒作用を用いて処理する方法が報告されている。これらのいくつかは著者がリシン酵素法を考案する上で参考にしたものである。

1) DL-ピロリドンカルボン酸を生育中の細菌を用いて L-グルタミン酸に変換する反応がある^{37)~40)}。2種類の酵素が関与しているらしい。基質濃度は2%, 転換率は60~90% とどちらもかなり低い、興味のある反応である。

2) DL-グルタミン酸を細菌の菌体を用いて処理し、L-グルタミン酸だけを L-ピロリドンカルボン酸に変える反応がある^{41), 42)}。これは光学分割の1種である。L-ピロリドンカルボン酸合成酵素が作用している。

3) DL-グルタミン酸を L-ピロリドンカルボン酸合成酵素をもつ細菌体とグルタミン酸ラセマーゼをもつ別種の細菌体を同時に使って処理し、全量を L-ピロリドンカルボン酸に変換した⁴³⁾。転換率が98.5% と優れている。

4) DL-ヒダントインプロピオン酸を細菌体で処理し、L-グルタミン酸に変える反応がある^{44), 45)}。L-ヒダントインプロピオン酸加水分解酵素が関与している。ヒダントインのD体からL体へのラセミ化は自動的変化と考えられている。基質濃度は1% と低い、転換率は90% とかなり高い。同様な手法で各種アミノ酸のヒダントインをL-アミノ酸に変換することができる⁴⁶⁾。

5) DL-4-アミノプテルヒダントインを細菌体で処理し、L-リシンに変える反応がある⁴⁷⁾。原理は上述の反応と同じと思われる。

4 リシン酵素法の構想

DL-アミノカプロラクタムを L-リシンに変換する経路は、光学分割をアミノカプロラクタムで行うか、リシンで行うかによって2通りに分けることができる。著者はアミノカプロラクタムで光学分割をする方を採った。酵素を用いてアミノカプロラクタムの光学分割を行うということは、酵素の不斉触媒活性を利用してアミノカプロラクタムに不斉的に化学変化を起こさせることであり、具体的には酵素によるアミノカプロラクタムの不斉加水分解を行うことである。もし L-アミノカプロラクタム加水分解酵素が存在し、それが利用できれば、分割は下図のようになるであろう。

しかし実際的には、L-アミノカプロラクタム加水分解酵素によって光学分割の反応が完全に行われたとしても、その後、L-リシンと D-アミノカプロラクタムの分離、および D-アミノカプロラクタムのラセミ化が必要で

そのためプロセス全体としては妙味のないものになってしまうであろう。そこで酵素法の利点をフルに発揮させるためにはどうしても、D-アミノカプロラクタムをラセミ化する酵素が出現して、それが L-アミノカプロラクタム加水分解酵素と協同して働くことが要請される。この2つの酵素の協同作業によって基質 DL-アミノカプロラクタムは一挙に L-リシンに変換することが期待される。この考えを模式的に示したものが図-1 である。

図-1 リシン酵素法の設計

L-アミノカプロラクタム加水分解酵素とアミノカプロラクタムラセマーゼは共に未知の酵素であるが、それらの出現を期待して、土壤微生物にそれらを求めてスクリーニングを行った。

5 リシン酵素法の実現

5.1 L-アミノカプロラクタム加水分解酵母菌⁴⁸⁾の出現

DL-アミノカプロラクタムとグルコースを主栄養源とする寒天培地上に土壤懸濁水を拡げて培養したところ、白っぽいコロニーが多数とれた。これらは酵母菌であった。それぞれの株をDL-アミノカプロラクタムを含む液体培地に培養すると、培地中のアミノカプロラクタムは代謝されて減少するが、半分量はいつまでも残ることがわかった。このアミノカプロラクタムを塩酸塩として単離したところD体であった。次に酵母菌株のどれか1つを培養して菌体を作り、これを5% DL-アミノカプロラクタム水溶液に懸濁し、40°C で保温すると、数時間後にはアミノカプロラクタムの半分量がリシンに変換され、半分量が残ることが判明した。反応液からそれぞれ塩酸塩として分離されたリシンとアミノカプロラクタムは、旋光度からL-リシンとD-アミノカプロラクタムであることが証明された。5% L-アミノカプロラクタム水溶液が用いられると全量がL-リシンに変換されること、5% D-アミノカプロラクタム水溶液では事実上反応は進まないことも確かめられた。なおこれらの酵母菌にはアミノカプロラクタムラセミ化能とリシンラセミ化能は存

表-1 L-アミノカプロラクタム加水分解酵母菌の種類

<i>Cryptococcus laurentii</i>
<i>Candida humicola</i>
<i>Trichosporon cutaneum</i>

図-2 L-アミノカプロラクタム加水分解酵母菌 *Cryptococcus laurentii* の走査型電顕写真

在しない。

酵母菌の分類をして、表-1 に示した種 (Species) に同定した。図-2 は代表的な L-アミノカプロラクタム加水分解酵母菌の走査型電顕写真である(乾燥標本のため、細胞が幾分収縮し、膜が凹んだり、破れているものがある)。

5・2 アミノカプロラクタムラセミ化細菌^{(49), (50)} の出現

DL-アミノカプロラクタムとグルコースを含む寒天培地上に土壌懸濁水を広げて培養し、生じるコロニーをひろ上げた。このときは主として細菌がとれた。これらの細菌はアミノカプロラクタムを資化する能力によって2つのグループに分けられた。即ち液体培地に加えたDL-アミノカプロラクタムの全量を消費するグループ、他はアミノカプロラクタムの半分量を消費し、半分を残すグループである。両グループとも培地に加えたL-リシンは消費するが、D-リシンは消費しないことがわかった。以上のことから第1のグループの細菌にはアミノカプロラクタム不斉加水分解能のほかにラセミ化能が存在することを推定した。このグループの細菌を培養して得た生菌体を5% D-アミノカプロラクタム水溶液に懸濁して40°Cに保温してもリシンの生成は無視できる程度にしか起こらないが、一定時間後L-アミノカプロラクタム加水分解酵母菌体をここに添加してさらに反応を続けると、リシンが生成することが判明した。この実験はこれらの細菌にはアミノカプロラクタムラセミ化能があることを示している。細菌株のラセミ化活性の強さはこ

表-2 アミノカプロラクタムラセミ化細菌の種類

<i>Achromobacter obae</i> nov. sp. Fukumura, 1971
<i>Achromobacter cycloclastes</i>
<i>Flavobacterium arborescens</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>

図-3 アミノカプロラクタムラセミ化細菌 *Achromobacter obae* nov. sp. Fukumura の電顕写真

のようにL-アミノカプロラクタム加水分解酵母菌体を使用して簡単に測ることができた。このような結果からこれらの細菌をアミノカプロラクタムラセミ化触媒として用いることにした。なおこれらの細菌にはリシンラセミ化能は存在しない。

細菌の分類をして表-2 に示したように種名を決定した。最もラセミ化活性の強い菌株は菌学的性質から新種と判定し、この菌の発見者大場信義の名に因んで *obaе* と命名した。他は既知の種に同定した。図-3 はこの新種の電顕写真である。

5・3 両酵素の協同作業による DL-アミノカプロラクタムの L-リシンへの転換^{(51), (52)}

DL-アミノカプロラクタムの数%~10% 水溶液(塩酸で pH を調節する)にL-アミノカプロラクタム加水分解酵母菌とアミノカプロラクタムラセミ化細菌のおのの生菌体または乾燥菌体の少量を添加して、ゆるやかなくはんをしながら30~50°Cに数~数十時間保温すると、アミノカプロラクタムの全量が定量的にL-リシンに転換することが判明した。基質アミノカプロラクタ

図-4 活性の pH 曲線

ムが DL 体, D 体あるいは L 体のいずれでも L-リシンに完全に変換されるのである。最適条件では転換率はほぼ 100% であった。

ところでこのように同一反応容器内で 2 つの酵素反応が進行するためには作用 pH が同じか、近い事が推測されるが、事実 図-4 に示したように両反応の pH 曲線はほぼ重なり合っている。図中 H は酵母菌による加水分解活性, R は細菌によるラセミ化活性, H+R は両者の協同作用を示す。pH を 8.0~8.5 に調節しておけば、両者による協同作業は都合よく進むのである。pH 調節は塩酸の添加で行うことができ、緩衝液の使用は不要である。図-5 に今まで述べて来た 反応経路を示した。酵母菌と細菌の共存時にはアミノカプロラクタムのラセミ化反応は見かけ上、D から L へ一方的に進むと考えられる。

高濃度アミノカプロラクタム溶液中における酵母菌体と細菌体はそれぞれ L-アミノカプロラクタム加水分解酵素とアミノカプロラクタムラセマーゼを包み込んだ半透性の小さい袋、すなわち“bag of enzyme”と見なすことができる。その働きを 図-6 に示す。

図-5 高濃度 DL-アミノカプロラクタムの変換経路

図-6 2 種の bag of enzyme の作用

6 酵素の性質

6.1 L-アミノカプロラクタム加水分解酵素

酵母菌の L-アミノカプロラクタム加水分解酵素の諸性質⁵³⁾を述べる。

1) 菌体内酵素である。

2) 誘導酵素である。菌をペプトン・イーストエキス・麦芽エキス培地で培養してもわずかの酵素活性が生じるが、L ないし DL-アミノカプロラクタムが培地に添加されていると酵素活性は著しく上昇する。

3) 菌体を凍結乾燥またはアセトン乾燥しても酵素活性は低下しない。乾燥菌体の状態で長期間活性を保持したまま保存できる。

4) 菌体を緩衝液の存在下でつぶし、遠沈して得られる上澄み液に酵素は移る。上澄み液を硫酸で段階的に塩析して活性区分を採る。これを DEAE セルロース、次にセファデックスなどのカラムクロマトグラフィーにかけて精製することができる。酵素は安定で、簡単には失活しない。

5) 精製酵素の基質特異性：本酵素の各種の環状アミド化合物に対する作用を試みたところ、表-3 に示すように L-アミノカプロラクタム以外の物質に対しては活性はなかった。

表-3 L-アミノカプロラクタム加水分解酵素の環状アミド化合物に対する活性

基 質	活 性 (%)
L-α-アミノ-ε-カプロラクタム	100
D-α-アミノ-ε-カプロラクタム	negligible
γ-ブチロラクタム (2-ピロリドン)	0
δ-バレロラクタム (2-ピロリドン)	0
ε-カプロラクタム	0
ε-カプロラクタム環状オリゴマー	0
α, α-ジクロロカプロラクタム	0
L-ピロリドンカルボン酸	0
D-ピロリドンカルボン酸	0

6) EDTA (エチレンジアミン四酢酸) の存在下で活性を失う。これを透析後、金属イオンを添加 (10⁻³ M) すると

イオンの種類によって活性の回復が起こる。表-4 に示したように、Mn²⁺と Mg²⁺ による復活が著しい。この事から本酵素は Mn²⁺ または Mg²⁺ を co-factor とする酵素と考えられる。

6.2 アミノカプロラクタムラセマーゼ

細菌のアミノカプロラクタムラセマーゼの諸性質⁵⁴⁾を述べる。

1) 菌体内酵素である。

表-4 金属イオンによる加水分解酵素の活性回復

添加剤 (10 ⁻³ M)	活性 (%)
水	0
MnCl ₂	100
MgCl ₂	98
ZnCl ₂	22
CoCl ₂	15
CaCl ₂	2
NiCl ₂	0
CuCl ₂	0
FeSO ₄	0
FeCl ₃	0
AgNO ₃	0
HgCl ₂	0
SnCl ₂	0

2) 誘導酵素である。

培地にアミノカプロラクタムを添加して培養した時にのみ酵素が生産される。

3) 菌体を凍結乾燥しても活性は落ちない。アセトン乾燥すると活性が保たれる菌種と失われる菌種がある。乾燥菌の活性は比較的長期間保存される。

4) 菌体を緩衝液の存在下でつぶして、酵素を溶出させることができる。これから硫酸塩析、TEAE セフアデックスクロマトグラフィーなどで精製を行うことができるが、酵素が不安定なために十分な精製をすることは難しい。

5) ヒドロキシルアミン ($10^{-3} M$) の存在下で活性を失う。これを透析後、あるいはそのままのところへピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) を $10^{-3} M$ 以上加えると活性が回復する。このことから本酵素は B_6 酵素と考えられ、その反応機作は PLP を補酵素とするアミノ酸ラセマーゼで想定されている反応機作⁵⁵⁾と同じと推定される。

7 リシン酵素法の特長

リシン酵素法の企業化見通しが得られた現時点で、この酵素法の特長を考察する。まず性質的な面から述べる。

1) L-アミノカプロラクタム加水分解反応および L-アミノカプロラクタムラセミ化反応が新発見のもので、それぞれの酵素も新規であることが特徴である。酵素源として前者は酵母菌、後者は細菌が使われているところがおもしろく、酵母菌が酵素剤として使われている反応は他に例を見ない。

2) 2つの酵素反応を同一容器内で協調させながら進行させるという形式が巧妙である。複数の酵素反応の研究例は少なく^{37)~40), 43), 56)~58)}、企業化されているものももちろんない。

3) 酵母菌も細菌も共に土壌から分離されたいわゆる野生株である。変異を起こし難く、安定である。培養に特別な栄養上の配慮が必要でなく、培地が簡単なもので済む。

4) 酵母菌、細菌共に菌体を酵素剤として用いることができ、高濃度基質溶液で用いる限り L-リシンの分解反応は起こらない。

5) 反応液に緩衝液が不要である。pH の調節はアミノカプロラクタムを塩酸で中和することによって実施できる。そしてこの塩酸は生成物 L-リシンと塩を作り、L-リシン塩酸塩となって製品化される。

6) 生菌体をそのまま酵素剤として用いても、アミノカプロラクタムおよびリシンの細胞膜透過性が良いので、界面活性剤を用いる必要がない。

次に量的な面の特長としては

1) 酵母菌と細菌のそれぞれの酵素活性が高く、かつ

安定性が良いために、酵素剤としての菌体の使用量は極端に少量で済む。

2) 2種の酵素がそれぞれ別種の微生物の菌体に入っているの、使用時に酵素量の割合を適宜調節することができる。

3) DL-アミノカプロラクタムの L-リシンへの転換率がほぼ 100% で、極めて高い。このような高い転換率は他に例を見ない。これに近い反応例は二、三知られている^{59)~62)}。

4) 基質の高濃度仕込みができる。反応終了時の生成 L-リシン濃度は 20% 以上に達する。(他に高濃度基質を用いる反応としては 50% フマル酸^{59), 60)}, 50% グルコース⁶³⁾, 50% L-アルギニン⁶¹⁾, 40% L-アスパラギン酸⁶²⁾が知られている。)

8 お わ り に

リシン酵素法は、すでに述べたように合成物質を微生物(酵素)によって変換する方式をとっている。合成物質と微生物作用の組み合わせによる物質の生産は従来から関心が持たれているところである⁶⁴⁾。著者はこの分野の研究を下記のように整理し、リシン酵素法がその中においても、いかに従来の研究例と違ったものであるかを示したいと思う。

発酵法: de novo 合成

1) 酢酸を原料とするグルタミン酸発酵

発酵法: salvage 合成

1) 前駆体としてアデニンを添加する 5'-イノシン酸の生合成

2) 前駆体としてアントラニル酸を添加する L-トリプトファンの生合成

酵素法: 既知酵素と本来の基質 (大多数の酵素法はこれに属する)

1) アスパルターゼによるフマル酸アンモニウムの L-アスパラギン酸への変換^{59), 60)}

2) トリプトファナーゼによるインドール、ピルビン酸およびアンモニアから L-トリプトファンの合成 (逆反応の発見)⁶⁵⁾

酵素法: 既知酵素と新規基質

1) β -チロシナーゼによるピロカテコール、ピルビン酸およびアンモニアから L-ドーパの合成 (逆反応の発見)^{65)~67)}

2) スクレオシドホスホトランスフェラーゼ (またはホスファターゼ) によるイノシンと p-ニトロフェニールから 5'-イノシン酸の合成^{68)~70)}

酵素法: 新規酵素と新規基質

1) “リシン酵素法”

2) ϵ -アミノカプロン酸トランスアミナーゼによ

る ϵ -アミノカプロン酸とフェニルピルビン
酸から L-フェニルアラニンの合成^{71), 72)}

著者は応用微生物学が将来のびる方向の1つは新規酵素と新規基質の組み合わせによる有用物質生産の分野であり、合成化学が微生物化学と協力の度合を深くすることができるのもやはりこの新しい分野であろうと思う。

(昭和49年6月6日受理)

文 献

- 1) 日経新聞, 昭 48.9.22; 朝日新聞, 昭 48.9.23; 毎日新聞, 昭 48.9.23
- 2) 日経新聞, 昭 48.10.22, 昭 48.11.12
- 3) 日経産業新聞, 昭 49.2.16, 昭 49.2.21
- 4) 日本工業新聞, 昭 49.3.28
- 5) 石油と石油化学, **18**, 33 (1974)
- 6) 飼料と飼料工業, **14**, 27 (1974)
- 7) ファインケミカル, **2**, 29 (1973)
- 8) *European Chemical News*, **25** [624], 19 (1974)
- 9) *Chemical Week*, **1973**, Oct. 3, 43
- 10) K. Nakayama, "The Microbial Production of Amino Acids", ed. by K. Yamada *et al.*, p. 369-397 (1972) Kodansha
- 11) 中山, "アミノ酸発酵", 下巻, アミノ酸核酸集談会編, p. 87~118 (1972), 共立出版
- 12) 相田, "近代工業化学 23, 生物工業化学" 小田ら編, p. 170-184 (1969), 朝倉書店
- 13) "アミノ酸シリーズ第1集リジン", 必須アミノ酸研究会編 (昭 33), 南江堂
- 14) S. Kinoshita, K. Nakayama, S. Kitada, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 128 (1958)
- 15) K. Nakayama, S. Kitada, S. Kinoshita, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 41 (1961)
- 16) 木下, 中山, 北田, 日本特許第 284339 号 (特公昭 36-6499 (昭 36.5.11))
- 17) 鮫島, "生命の基幹物質" (1973), 大日本図書
- 18) K. Sano, I. Shio, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 373 (1970)
- 19) 瀬戸, 原田, 農化大会講演要旨集 p. 172 (昭 44); 原田, 足立, 瀬戸, 特公昭 46-22548 (昭 46.6.26)
- 20) L.E. Cashida (Pfizer), *U.S.* 2,771,396 (1956)
- 21) R.C. Nubel (Pfizer), *U.S.* 2,968,594 (1961)
- 22) *European Chemical News*, **9** [228], 36 (1968)
- 23) I. Chibata, S. Yamada, S. Yamada, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 174 (1956); I. Chibata, A. Watanabe, S. Yamada, *ibid.*, **21**, 296 (1957); 山田, 千畑, 山田, 日本特許第 228086 号 (1956)
- 24) 中山, 萩野, 特公昭 45-8633 (昭 45.3.27); *Brit.* 1,147,229 (1969)
- 25) 都河, 奥村, 根来, 特公昭 42-13850 (昭 42.8.5)
- 26) J.E. Nelemans *et al.*, (Stamincarbox), *U.S.* 3,105,067 (1963)
- 27) C.M. Brenner *et al.*, (Geigy), *U.S.* 3,275,619 (1958)
- 28) 加藤, 福村, 科学, **32**, 430 (1962)
- 29) 加藤, 福村, 化学と生物, **2**, 242 (1964)
- 30) H. Iizuka, I. Tanabe, T. Fukumura, K. Kato, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 125 (1967)
- 31) T. Fukumura, *Plant & Cell Physiol.*, **7**, 93 (1966)
- 32) T. Fukumura, *Plant & Cell Physiol.*, **7**, 105 (1966)
- 33) T. Fukumura, *J. Biochem.*, **59**, 531 (1966)
- 34) T. Fukumura, *J. Biochem.*, **59**, 537 (1966)
- 35) 福村, 清水, 加藤, 第 16 回酵素化学シンポジウム, p. 307 (1964)
- 36) T.A. Seto (Pfizer), *U.S.* 3,056,729 (1962)
- 37) Y. Kawai, Y. Kawai, T. Uemura, *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 395 (1965)
- 38) Y. Kawai, T. Uemura, *Arg. Biol. Chem.*, **30**, 438 (1966)
- 39) Y. Kawai, K. Aida, T. Uemura, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 212 (1969)
- 40) 植村, 河合, 河合, 奥村, 特公昭 41-13134 (昭 41.7.25)
- 41) 田中, 長野, 木下, 日本農化誌, **34**, 737 (1960)
- 42) 木下, 田中, 長野, 貴志, 日本特許第 292960 号 (特公昭 36-17711)
- 43) 木下, 田中, 加藤, 日本特許第 301728 号 (特公昭 37-6811 (昭 37.7.2))
- 44) 都河, 奥村, 伊藤, 勝屋, *Amino Acid-Nucleic Acid*, **12**, 42 (1965)
- 45) R. Tsugawa, S. Okumura, T. Ito, N. Katsuya, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 27 (1966)
- 46) 都河, 奥村, 根来, 特公昭 42-13850 (昭 42.8.5)
- 47) 中山, 萩野, 特公昭 45-8633 (昭 45.3.27); *Brit.* 1,147,229 (1969)
- 48) 福村, 特開昭 49-25190 (昭 49.3.6); *U.S.* 3,770,585 (1973)
- 49) 福村, 特公昭 47-41554 (昭 47.10.20); *U.S.* 3,796,632 (1974)
- 50) 福村, 特開昭 48-5994 (昭 48.1.25)
- 51) 福村, 特公昭 48-28679 (昭 48.9.3)
- 52) 福村, 特開昭 49-25191 (昭 49.3.6); *U.S.* 3,796,632 (1974)
- 53) 福村, 特公昭 48-28678 (昭 48.9.3)
- 54) 福村, 特公昭 47-41555 (昭 47.10.20)
- 55) 左右田, 化学と生物, **7**, 28 (1969); 生化学, **46**, 203 (1974)
- 56) 北井, 喜多村, 宮地, *Amino Acid-Nucleic Acid*, **5**, 61 (1962)
- 57) 北井, 喜多村, 宮地, 尾崎, 特公昭 39-5011 (昭 49.4.20)
- 58) 千畑, 土佐, 佐野, *Amino Acid-Nucleic Acid*, **15**, 95 (1967)
- 59) 北原, 福井, 三沢, *Amino Acid-Nucleic Acid*, **1**, 98 (1959)
- 60) 北原, 福井, 三沢, 酵素化学シンポジウム第 14 集, p. 345 (1960)
- 61) 柿本, 柴谷, 西村, 千畑, *Amino Acid-Nucleic Acid*, **25**, 70 (1972); T. Kakimoto, T. Shibata, N. Nishimura, I. Chibata, *Appl. Microbiol.*, **22**, 992 (1971); 千畑, 柿本, 柴谷, 西村, 特公昭 48-5040 (昭 48.2.13)
- 62) 千畑, 柿本, 加藤, *Amino Acid-Nucleic Acid*, **11**, 155 (1965); 特公昭 46-7560 (昭 46.2.25)
- 63) Y. Takasaki, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1247 (1966), 高崎, 日化協月報 **24**, 31 (1971); 高崎, 田辺, 日本特許第 484472 号 (特公昭 41-7431 (昭 41.4.22))
- 64) 竹西, 杉田, 化学と工業, **21**, 197 (1968)
- 65) 山田, 微生物を利用する有機合成, "新しい有機合成化学", 有機合成化学協会編, p. 221-263 (1973), 技報堂
- 66) 熊谷, 山田, 化学と工業, **23**, 919 (1970)
- 67) 江井, 中沢, 松井, 奥村, 山田, 緒方, 特公昭 48-34237
- 68) H. Katagiri, H. Yamada, K. Mitsugi, T. Tsunoda, *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 577 (1964)
- 69) K. Mitsugi, K. Komagata, M. Takahashi, H. Iizuka, H. Katagiri, *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 586 (1964)
- 70) 岡田, 広瀬, 近藤, 角田, 特公昭 41-12678 (昭 41.7.19)
- 71) 福村, 清水, 加藤, 酵素化学シンポジウム (第 16 回) p. 307 (1964)
- 72) 加藤, 福村, 特公昭 44-17990 (昭 44.8.7); 特公昭 44-17991 (昭 44.8.7); 特公昭 44-17992 (昭 44.8.7)