酵素法による物質の合成と変換

清水 昌, 山田秀明*

微生物を生物として認識していなかった古代より, 人類は発酵という手段によって, これを物質生産の技術として巧みに利用してきた. 今や発酵の化学反応を触媒する酵素が主役となり, 微生物は酵素の“容れ物”あるいは生産工場として見られるまでになった. しかも酵素法による反応は, 単にその微生物が行なう反応を追従するだけでなく, “容れ物”がなし得なかった有用物質生産の技術として発展しつつある.

微生物や酵素が行なう反応を合成化学的な見地から評価し, これを有機合成プロセスの1ステップとして組み込み, 様々な合成・変換の場で利用しようとする試みが盛んになっている. この種の合成・変換に関する手法は, “微生物変換法 (microbial conversion)” と呼ばれ, 同じ微生物を用いる物質生産方式でも, いわゆる“発酵法 (fermentation)”とは発想を異にする物質生産方式として, ユニークな展開を遂げている.

微生物変換法とは, 一言でいえば, 合成・変換に際して, 微生物の細胞あるいはそれに由来する酵素を触媒として用いる有機合成法のことである. また, 酵素反応に基づく合成法ということから, 化学合成法 (chemosynthesis) や発酵法と対比して“酵素法 (enzymation)”という言葉もよく用いられる. 酵素法は, 後述するように, 発酵法と化学合成法の両方を基盤として生まれた物質生産方式であり, 物質生産の場で今日的意義を確立してからの歴史もまだ浅い. しかし, その後の発展は目覚ましく, 合成化学の一分野を形成するほどにまで成長している. 本稿では, 物質生産の立場からみととき, 酵素法がどのような場合にその独自性, 有利性を発揮しうるのであるかを発酵法や化学合成法と比較しながら展望してみたい.

酵素法と化学合成法, 発酵法の関係

後述するように, 酵素法は化学合成法と発酵法の両方から派生した一つの物質生産方式である.

表 1 酵素反応と化学反応の比較^(1,2)

	酵 素 反 応	化 学 反 応
反応条件	常温, 常圧	高温, 高圧
反応エネルギー	酵素分子の配座の変化に基づくエネルギー	熱エネルギー
溶 媒	水 (まれに水を含む有機溶媒)	水または有機溶媒
特 異 性		
反応特異性	高 い	低 い
基質特異性	高 い	低 い
位置特異性	高 い	低 い
立体特異性	高 い	低 い
基質または生成物濃度	低 い	高 い

したがって, 酵素法では, 両者の技術的特徴が巧みに生かされているが, 同時にそれぞれの欠点も引き継いでいる.

酵素法の有する技術的特徴を化学的合成法のそれと比較して要約すると, 表1のようになろう. 酵素法では, 酵素というタンパク質の触媒が用いられるが, 化学反応自体は通常の有機化学や無機化学のそれと本質的には同じである. 結果的にもたらされる両者の相違は, 触媒の性質の違いにはかならない. 酵素の触媒作用も通常の化学触媒と同様に, 化学変化の速度のみに影響を及ぼすが, その触媒機能は, 選択性と反応効率の高さにおいて最も特徴的である. 選択性が高いということは, ある化合物のある官能基または結合の特定の変化のみを加速するということであり, 反応生成物としてきわめて選択的に一つのものが与えられることを意味している. したがって, 酵素反応では, 1つの, あるいはそれに類似する構造を持ったごくわずかの化合物のみが基質となり, 鏡像異

* Sakayu Shimizu, Hideaki Yamada, 京都大学農学部農芸化学科

性体や位置異性体の区別が厳密に行なわれることになる。反応の効率が高いということは、触媒としての加速性に優れ、わずかのエネルギーと触媒量で多量の基質を処理できることであり、基質のとり込み、生成物の放出が円滑に進行することを意味している。その結果、酵素の触媒機能は、きわめて温和な条件、すなわち常温、常圧、中性に近い希薄な水溶液中で効率よく発揮される。

このような触媒として酵素が有するユニークさを巧みに利用することで、酵素法という物質生産方式は成り立っているのであるが、同時にこのことが酵素法の欠点を示していることにも注目したい。たとえば、“温和な条件で反応が進行する”という特徴は厳密に言えば、“温和な条件でしか反応が進行しない”というほうが正しい。これは、タンパク質としての酵素が van der Waals 力や水素結合力などによって支えられたゆるやかな三次元構造をとるゆえに、その構造が維持できる温和な条件でしか機能を発揮しえないことを意味しており、酵素がタンパク質であるがための弱さを露呈しているにすぎない。また酵素反応における高度な選択性は、それ自体酵素法が化学合成法に伍して成り立ちうる最も基盤的な特徴の一つであるが、一方において酵素という触媒を著しく汎用性のないものにしてしているのも事実である。たとえば、白金は広範な化合物の還元に利用できるという点においては、レダクターゼよりもはるかに優れた触媒といえる。実際、反応の速さ、スケール、温度や溶媒の選択範囲、応用性など多くの面で酵素反応は、いわゆる化学反応に及ばないことが多い。したがって、触媒あるいは反応の選択は、合成プロセスの全体像をよく理解した上で総合的な判断の下になされねばならない。

表 2 および図 1 に酵素法と発酵法の特徴を比較した。発酵法は、微生物の生育という生命現

表 2 酵素法と発酵法の比較⁽²⁾

	酵 素 法	発 酵 法
微 生 物	生育菌体、休止菌体、処理菌体、胞子など	生育菌体
反 応	触媒反応 (1~数段反応)	生命現象 (多段階反応)
反応時間	短 い	長 い
原 料	基質 (高価)	炭素源、窒素源など (安価)
生 成 物	天然物、非天然物	天然物
生成物濃度	高 い	低 い
生成物の単離	容 易	困 難

象を伴う物質生産方式であり、古来のアルコール発酵などに見られるように、安価な炭素源、窒素源が連続した複雑な酵素反応を経て目的とする生産物に変換される。この場合、微生物の生命活動と目的とする物質の生成とは密接に関連しており、微生物の細胞はいわば高度に組織化された組み立て工場のごとくにみなすことができる。したがって、発酵法の場合には、微生物が本来生成する天然物、たとえばアミノ酸やヌクレオチドのようなものは生産することができるが、生命の営みにとって関係のない物質を生産することはできない。

一方、酵素法では、微生物はより機能的にとらえられ、単に特定の反応を触媒する酵素、あるい

図 1 酵 素 法 と 発 酵 法

は酵素の袋とみなされる。このことは、微生物の生命現象は酵素を得るためには必須であっても、実際の反応とは無関係であることを意味しており、酵素法がきわめて有機化学的な発想に基づいた物質生産方式であることを示している。酵素法では、発酵法という原料（炭素源、窒素源など）に相当するものとして反応のための基質が必要である。基質は1段または数段の酵素反応によって目的の産物に変換されるにすぎないので、生産物に近い構造を有することが多く、その供給は比較的高価につくことが多い。また、基質は酵素の作用を受けて変換されるものであれば、天然物でも人工の化合物でもよい。したがって、酵素法では微生物が通常の代謝で生成する物はもちろんのこと、非天然物の生産も可能である。

このように、同じ微生物を用いても酵素法と発酵法は明確に異なる物質生産方式なのであるが、実際の物質生産では両者が同時に複合的に用いられる例も多い。

酵 素 法 の 歴 史

酵素法に類似した物質生産技術は、発酵という微生物生産技術の中で古くから育まれてきた。たとえば、酢の製造は、古来の発酵技術の一つであるが、エタノールが連続した2つの脱水素反応により酢酸に変換されるプロセスであるという点で

はきわめて酵素法的といえる。また、グルコースからグルコン酸、ソルビトールからソルボースを造る技術も一種の酵素法とみなせる。1921年には、酵母がアルコール発酵を行なう際に、培養液にベンズアルデヒドを添加すると、発酵の過程で生成したアセトアルデヒドとの間で酵素的な縮合が起こり、光学活性な *l*-フェニル-1-ヒドロキシ-2-プロパノンが生成し、これは、化学的な手法で容易に *D*-(*-*)-エフェドリンに転換できることが示されている⁽³⁾。これは、酵素法と化学合成法の組合せから生まれた最初の注目すべき成果といえる。

しかし、一つの物質生産方式として酵素法の有する高い可能性が認識されたのはずっと後のことで、ステロイドの合成・変換に、微生物菌体を触媒として用いるという奇抜なアイデアが劇的な成功を収めてからである。カビ、酵母、細菌の多くがステロイドやステロールに作用して、水酸化、エポキシ化、脱水素、異性化、側鎖の切断など多彩な反応を触媒することが判明し、これらのうちのいくつかはすでに工業的製法として利用されている。また、微生物、あるいは酵素を化学合成反応の触媒として利用するための普遍的な原理を示した点でも、これらの反応は重要なものといえる。同じ時期に微生物の培養法、生化学、遺伝学、酵素化学などが飛躍的に発展したことも、以

表 3 酵 素 法 に よ る 有 用 物 質 の 合 成 ・ 変 換^(2,4)

1	ステロイドおよびステロールの変換 水酸化（酸素添加酵素）、酸化・還元（脱水素酵素）、側鎖の切断（酸素添加酵素）	糖ヌクレオチドの合成（ピロホスホリラーゼ）、ホモシステインのヌクレオシド化（水解酵素）、補酵素類の合成
2.	アルカロイドの変換	8. アミノ酸の合成
3	抗生物質の合成 人工ペニシリン・セファロスポリンの合成（アミダーゼ）	α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸、5位置換ヒダントインの不斉水解（水解酵素）、フマル酸のアミノ化（アスパルターゼ）、チロシン関連アミノ酸の合成（ β -チロシナーゼ）、トリプトファン関連アミノ酸の合成（トリプトファナーゼ、トリプトファン合成酵素）、システイン関連アミノ酸の合成（システインデスルフィドラーゼ、 β -クロロ-D-アラニンリアーゼ）、セリンの合成（セリントランスヒドロキシメチラーゼ）、アラニンの合成（アスパラギン酸脱炭酸酵素）
4	有機酸の合成 フマル酸の水和（フマルラーゼ）、アルカンの両端酸化（酸素添加酵素）、エポキシコハク酸の不斉水解（水解酵素）、脂肪酸の水酸化（脱水素酵素）、ケトパントイルラクトンの不斉還元（レダクターゼ）	9. アミンの合成 アミノ酸の脱炭酸（脱炭酸酵素）
5	糖の変換 グルコースの異性化（グルコースイソメラーゼ）	10. 化学工業原料の生産 アルケンオキシドの合成（酸素添加酵素）、ケトンの合成（二級アルコール脱水素酵素）、ピロガロールの合成（脱炭酸酵素）、アミドの合成（ニトリルヒドラーゼ）
6.	タンパク質の合成 プラスティンの合成（プロテアーゼ）、ヒトインスリンの合成（プロテアーゼ）	
7.	ヌクレオチド、ヌクレオシドの合成 塩基のN-リボシル化・N-アラビノシル化（ホスホリラーゼ）、ヌクレオシドのリン酸化（リン酸基転移酵素）、ヌクレオチドのピロリン酸化（ピロリン酸基転移酵素）、	

後の酵素法の展開の要因となっていることにも注目したい。表3に、工業的な意味で重要と思われる酵素法の成果を列挙した。

新しい酵素法の設計

酵素法の設計にあたっては、目標となる生成物の設定、利用し得る基質、反応、合成ルートの選定など留意すべき点も多い。ここでは、そのうちのいくつかについて述べる。

1. 酵素の潜在機能の評価

従来知られていなかった反応や酵素の発見が、新しい合成スキームの設計のヒントとなることは多い。たとえば、*Achromobacter* プロテアーゼ I は、リジンのカルボキシル基側のペプチド結合のみを認識して切断する特性が注目されて、ブティンスリンをヒトインスリンに変換するプロセス(図2)の最も重要な機能素子として利用されている⁽⁵⁾。L-チロシンをフェノール、ピルビン酸、アンモニアに分解する反応(1)を触媒する酵素として知られていたβ-チロシナーゼが、補酵素であるピリドキサル 5'-リン酸を介して置換反応(2)や合成反応(3)をも触媒することが明らかにされると、直ちにこれらの反応を利用したL-チロシンやL-ドーパの合成スキームが考案されたのも、新しい反応の発見を巧みに応用面への活用に変化した例として挙げられる^(6,7)。また、この

図2 プロテアーゼによるブティンスリンのヒトインスリンへの変換⁽⁵⁾

合成法は、同種の反応機構を有すると考えられる多くの酵素反応を、種々の光学活性アミノ酸の合成に利用し得るという普遍的な原理を示した点でも画期的であった。これらの例は、酵素の有する潜在機能を引き出すことの重要性をよく示しているといえる。

2. 新しい酵素反応の探索

合成に関する企画やスキームのデザインが描けても、適当な酵素や反応が知られていないこともよくある。このような場合、目的の反応を触媒する酵素の探索が必要となる。DL-α-アミノ-ε-カプロラクタム (DL-ACL) をL-リジンに変換するプロセス(図3)は、ナイロンの製造工程で大量に副生するシクロヘキセンの有効利用に関する企画の一つから出発している。DL-ACLの1位の炭素と7位の窒素間のアミド結合を加水分解する反応、あるいは菌株の探索を通じて、DL-ACLを不斉加水分解してL-リジンを与える反応と、残存するD-ACLをラセミ化する反応が発見され、両者を組合せることでラセミ型基質が最終的にはすべてL-リジンへ転換するプロセスが完成している⁽⁸⁾。

図3 酵素法によるL-リジンの生産⁽⁸⁾

図 4 酵素法による L-システインの生産⁽⁹⁾

も、アミノ酸の有機合成を手本にしている。この研究は最初 L 型アミノ酸の合成を目的として行なわれた。ところが、不斉加水分解を触媒する酵素が予想に反して D 型基質にのみ反応したため、D 型アミノ酸を合成するスキームへと、企画そのものが変更された。この例では、L 型

5 位置換ヒダントインを加水分解する酵素の探索、D 型 5 位置換ヒダントインに作用する新しい微生物酵素の発見、半合成ペニシリンやセファロsporin の中間原料である D-フェニルグリシン類をターゲットとした D 型アミノ酸の合成法の開発へと研究が展開されている^(10,11)。

以上 3 つの合成例では、従来の光学分割法では不可欠であった独立したラセミ化工程が巧みに省略されている。すなわち、ラセマーゼによる酵素的ラセミ化、あるいは塩基触媒による自動的ラセミ化と不斉加水分解反応が同じ反応槽で同時に進行することで、ラセミ型の基質を一挙に目的の光学活性アミノ酸へと転換することに成功している。このようなプロセスは、それ自体できわめて独創的なものといえるが、新しい反応を探索する努力なしには成り立ち得ないことである。

それでは、新しい反応はどのようにして探すのであろうか。特に、上記のような非天然型の基質の変換に関しては、目的とする反応が実際に起こり得るかという最も基本的な点が定かではない。最もよく行なう探索法は、転換したい基質を加えた培地に菌を生育させたり、菌体と基質を反応液中で接触させて、目的の変換が起こるかどうかを調べる方法である。これをできる限り多くのかつ広範な微生物について行なえばよいとするものである。このような一見非論理的な手法が採用されるのは、多分、我々が次のようなことをこれまでの経験や知識として知っているからと思われる。

① 通常の化学反応に対応するほとんどすべての反応を酵素で行なうことができる。

② テストし得る微生物の数は無限であり、それはきわめて多様性に富んでいる。

図 5 酵素法による D-p-ヒドロキシフェニルグリシン (D-HPG) の生産^(10,11,47)

DL-2-アミノ-4-チアゾリン-4-カルボン酸を不斉加水分解し、L-システインを得るプロセス (図 4) は、有機合成による DL-システインの合成法をそのまま酵素反応でなぞらえたのではないと思われるほどよく似た合成スキームになっている。予め合成スキームを想定しながらこのような反応を行なう菌株の探索が行なわれたものと思われる。ここでも、酵素の示す高い鏡像選択性が発揮され、高収量で L-システインを得ることに成功している⁽⁹⁾。

5 位に置換基を有するヒダントイン類を不斉加水分解して D 型アミノ酸を得るスキーム (図 5)

①については、現在知られている酵素だけでも 8,000 種以上に達すること⁽¹²⁾、図 2～4 の例にみたように実際に酵素は化学触媒に代わって、あるいはそれ以上に効率よく反応を触媒したことで明らかであろう。ここでは、②に関する例として、ケトパントイルラクトン(KPL)を不斉還元して D 型のパントイルラクトン (D-PL) を与える反応について述べてみる^(4,12)。

D-PL は D-パントテン酸の合成原料であり、全体的には図 6 に示すプロセスが可能となる。まずグルコースを炭素源として生育した菌体培養液中に終濃度が 1% になるように KPL を加えて、D-PL およびその鏡像異性体である L 型のパントイルラクトン (L-PL) の生成能を調べると、この活性の分布はきわめて広く、テストしたカビ、酵母、細菌、放線菌、担子菌の約 10% に当る 100 株が 30% 以上の転換率でパントイルラクトンを生成した。しかし、この還元立体選択性は、図 7 に示したように微生物の属や種とはまったく無関係で、高い光学収率で D-PL を与えるもの、逆に L-PL を選択的に生成するもの、ラセミ型の生成物を与えるもの、両者を様々な比率で与えるものなど、驚くほど多様である。この探索を通じて選択された酵母の一種である *Candida parapsilosis* は、基質として加えた KPL (100 g/l) をほぼ定量的に D-PL に変換することができる。図 7 に示された多様性は、KPL の還元に関する酵素が 2 種類以上存在し、しかもその活性および量的な関係が個々の微生物でまったくまちまちであるということと説明できると思うが、実際にこのような結果が得られると、改めて微生物の示す多様性に注目しないではおれない。

結局、有効な菌株を得るには、多くの菌株を迅速に処理でき、かつ目的とする菌株を確実に選択できる探索法の設計が要求される。設計は、考えているスキームとの適合性を考慮してなされねばならないし、企画したスキームにスムーズに移行

図 6 ケトパントイルラクトンの不斉還元を含む D-パントテン酸の合成⁽⁴⁾
IBA: イソブチルアルデヒド, OA: シュウ酸, KPL: ケトパントイルラクトン,
D-PL: D-パントイルラクトン, β -Ala: β -アラニン, D-PaA: D-パントテン酸

図 7 微生物によるケトパントイルラクトンの還元⁽¹³⁾
○: カビ, △: 酵母, □: 細菌, ×: 担子菌, ⊗: 放線菌

できることが望ましい。探索法あるいはスキームそのものの良否が、目的を達成するための一つの重要な鍵であり、それは組織的かつ綿密な計画の下に、できる限り広範な微生物について行なうことが望ましい。また、時には、たった 1 株の優良菌株を求めて多数の微生物をテストするねばり強さも必要であろう。このようにして選択された優良菌株が実際の場で活躍することは多い。

3. 基 質

基質と酵素の接触が可能なら、原理的にはどのような性状のものも基質として利用できる。ガス

図 8 パン酵母による 4-クロロアセト酢酸エステルの不斉還元⁽¹⁴⁾

でさえ変換の対象として多くの研究が行なわれている。微視的に見れば、基質あるいはその一部は反応媒体中で溶けて存在しなければならないし、無細胞系の触媒を用いない限り、それは細胞膜を通過して酵素に到達する必要がある。しかし、実際には、基質と菌体とを適当な媒体中で混合すれば反応は進行する。透過性が問題になるときは、菌体を処理（乾燥、表面活性剤や酵素による処理、自己消化、凍結・融解、浸透圧処理など）するか、基質を修飾して透過性を高めることもある。基質の修飾は酵素との相互作用を高め、反応効率を高めたり、不必要な副反応、分解を抑制するのに役立つこともしばしばある。4-クロロアセト酢酸エステルを不斉還元して L 型の 4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸（L-カルニチンの合成中間体）に変換する反応（4）は、この種の試みの典型的な成功例といえる⁽¹⁴⁾。図 8 に示したグラフは、パ

ン酵母とエステルを反応させるとき、エステル鎖が長いほど L 体の生成割合が高まるというものである。この場合も、図 7 の場合と同様に 2 種以上の基質特異性の異なる酵素が共存し、そのうちの 1 つが長いエステル鎖の基質にも作用するということで理解できる。また、単一の酵素の場合でも反応（5）、（6）のように立体配置の逆転が可能なることもある⁽¹⁵⁾。このように、基質を飾ることで反応の選択性を調節しようとする試みは、前述した基質に合った酵素を探索する方法とは発想がまったく逆転している点に注目してほしい。

4. 反応の方式と触媒の形態

合成プロセスに適合した触媒あるいは反応の方式を決定することは、プロセスの単純化、収量増大、副反応の制御、経済性の向上などの観点から重要となる。表 4 に酵素法でよく用いられる反応方式と触媒の形態を要約した。これらの触媒は、単独で、あるいは様々に組合せて多段階の反応にも使用できる。特に多段階反応を同時に、あるいは連続して行なう場合には、この組合せは重要となる。現時点では、多段反応は同じ形態の触媒の組合せがほとんどである^(8,17-19)。これは、主に経済性の理由からと思われる。

一方、多段階の反応を 1 つの触媒で行なうこともできる。たとえば、パントテン酸、L-システイ

表 4 反応の方式と生体触媒の形態^(2,10)

生育菌体による変換：菌の移植時または生育の適当な時期に基質を添加する。植菌，基質添加（反応），培養を 1 つのフラスコ中で行なう。操作は単純であるが高濃度の菌体が必要な反応には不適。
生育済菌体による変換：集菌した菌体を新たな反応液に添加して反応を行なう。生育と反応を別個に行なうので、反応の条件設定が容易。洗浄菌体，処理菌体が触媒として用いられる。
胞子による変換：カビなどの胞子を菌糸から分離して、洗浄菌体や乾燥菌体と同様に用いる。通常、胞子は細胞より安定であり、長期の保存に耐え得る。
固定化菌体による変換：反応液からの触媒分離が容易。触媒の再使用が容易。連続反応が可能。通常、触媒活性は固定化前の菌体に比べて低下するが、安定性は増大することが多い。透過性は低下する。固定化のための試薬、装置などが必要。
無細胞抽出液および精製酵素による変換：基質、生成物の透過性が反応の効率に影響を与える場合、副反応の抑制が困難な場合、酵素が菌体外酵素である場合、あるいは適当な価格で市販されている場合に有効である。一般に、触媒としての安定性は低い。固定化酵素としても使用できる。

ン、ATP (AMP またはアデニン) からコエンザイム A (CoA) を合成するプロセスでは、連続した5段階の反応 (7)～(11) が、*Brevibacterium ammoniagenes* の菌体を触媒として、1つの反応槽で一挙に進行する^(20,21)。これは、*B. ammoniagenes* の細胞中に CoA の生合成に必要な酵素のすべてがたまたま高い活性でバランスよく存在しているために可能となった方式である。同一の菌体中に人為的に必要な酵素系を組込んで効率的に多段階反応を行なおうとする試みも、遺伝子の組換えや細胞融合などの細胞工学的技術の進歩により活発化している。ビタミンCの製造プロセスの改良⁽²²⁾などはこの種の試みの成果の一つといえる。

5. 副 反 応

酵素反応の特徴の一つが高度な選択性にあることは先に述べた。これは、単一の酵素を用いれば原則的には単一の生成物が与えられること、すなわち、不必要な副反応が起こらないことを意味している。しかし、単一の酵素を触媒として用いることは、酵素の安定性や経済性の観点から限界がある。したがって、実際には、複合した酵素系の中で特定の反応のみを引き出し、不都合な反応はできるだけ回避する手続きが必要となる。図7や図8でそれぞれ示した有効菌株の探索や基質の修飾は、ある意味ではこのような手続きのための一つの方法と考えることもできる。副反応の抑制も含めて、目的とする反応の効率を最大限に発揮させるためには、このほかにも、選択した菌株の育種、培養条件 (酵素の生成条件)、温度や pH などの反応条

件。反応自体はスクレオシドの塩基部分を交換するグリコシル基転移反応であり、2種類のホスホリラーゼの共役の下に反応は進行する。このときの反応温度は 60℃ であり、50℃ 以下では反応はほとんど進行しない。基質のアデニンがヒポキサンチンへと脱アミノされる反応が優先的に起こるからである⁽²³⁾。興味深く思うのは、この反応の発見にあたって、60℃ という高温での探索法が最初から採用されていたかという点である。恐らく

図 9 アラビノシルアデニンの合成と副反応の除去法⁽²³⁾

表 5 様々な副反応抑制法⁽²⁾

主 反 応	副 反 応	抑 制 法
フマル酸アンモニウム→L-アスパラギン酸 (<i>Escherichia coli</i> /アスパルターゼ)	フマル酸→ L-リンゴ酸	培養液を pH 5、45℃ で1時間処理
フマル酸→L-リンゴ酸 (<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> /フマラーゼ)	フマル酸→ コハク酸	固定化菌体を 0.6% 胆 汁酸で処理
L-アスパラギン酸→L-アラニン (<i>Pseudomonas dacinhae</i> /アスパラギン酸 β-デカルボキシラーゼ)	L-アラニン→ D-アラニン	培養液を pH 4.75、30 ℃で1時間処理
コレステロール→1,4-アンドロスタジエン- 1,17-ジオン (<i>Arthrobacter simplex</i> /多 段階反応)	ステロール骨 格の分解	反応液に α, α'-ジピリ ジル (1mm) を加える
β-シトステロール→17-ケトステロイド (<i>Nocardia sp.</i> /多段階反応)	ステロイド環 の分解	反応液に α, α'-ジピリ ジル (0.3mm) を加える
D,L-2-アミノ- <i>D</i> -チアゾリン-4-カルボン 酸→L-システイン (<i>Pseudomonas thia- zolinophilum</i> /多段階反応)	L-システイン の分解	反応液にヒドロキシル アミンまたはセミカル バジドを加える

注意深い観察の結果から、50℃ 以下では潜在化していた反応が見いだされたのではないだろうか。その他の副反応の抑制法については、表5にまとめた。

6. 新しい技術との関連

上述の探索法に代わって、最近では遺伝子組換えの技法をとり入れて、積極的に目的とする新しい微生物を造成しようとする動きが進展しつつある。酵素の力価上昇をはじめとして、基質特異性や安定性などの酵素自体の特性を改善する手法としては、この手法は、きわめて魅力的なものといえる。しかし、この手法がさらに実り多いものとなるためには、様々な工夫、解決すべき問題があるとも聞いている。たとえば、情報量の多い大腸菌や枯草菌に比して、現実使用されている有用菌株、未知の潜在能力を秘めた多くの未開発の微生物群についての基礎的情報量の不足、新しい酵素反応を発見するには、この手法は本質的に無力なのではなかろうかという疑問などである。今後の進展、特に新しい宿主-ベクター系の開発が期待される。現時点では、この手法によって新しい酵素反応や合成のプロセスが開発された例は、筆者らの知る限り適当なものを挙げることは困難である。しかし、ビタミンCの合成プロセスの改良⁽²²⁾や大腸菌によるレスレオニンの発酵生産法などの例にみるように、遺伝子組換え技術の集積は、酵素法においてもこの技術が根幹技術の一つとなることを予想させる。

既製の酵素を加工改質することで、プロセスの簡略化、反応性の改良などを可能にしようとする試みも、最近著しい成果をあげている。特に固定化酵素または固定化微生物に関する成果の集積からは、固定化増殖微生物、非水系または水-有機溶媒系での酵素反応システムの開発など興味深い試みが進展しつつある。たとえば、これまで酵素反応は水系の媒体中で行なうのが普通であった。特殊な例を別にすれば、実際、酵素は有機溶媒中では無力な触媒であった。しかし、疎水性と親水性の比率を自由に変更できる担体の開発を機に、この種の担体に固定化した酵素あるいは菌体は、今

図10 リパーゼによるトリグリセリドのエステル交換反応

や有機溶媒中でも反応を行なえる触媒として変貌しつつある^(24,25)。このような技術は、水に難溶性で従来その転換が困難であった化合物、特に脂溶性化合物の合成変換のプロセスにも、酵素という触媒を効果的に利用し得ることを示した点で画期的であった。図10にリパーゼを用いるトリグリセリドのエステル交換反応による油脂の改良の例を示した。この場合、担体の有する特性と、反応媒体として水飽和 *n*-ヘキサンを用いることで、リパーゼ本来の反応であるトリグリセリドの加水分解を抑制する効果を巧みに組合せることに成功している⁽²⁵⁾。その他にも、酵素自身の化学修飾⁽²⁶⁾、ペプチド鎖の組換えなどタンパク質工学の技術も進歩しつつある。特にペプチド鎖の組換えやアミノ酸残基の差し換えなどの技術は、遺伝子組換え技術の進歩に伴って新しい局面を迎えつつある。

新しい生育環境、新しい基質に対する適応性、生育速度、取り扱いの容易さ、大量培養、生産コストなどの点で、現在のところ、酵素の供給源として微生物を超えるものはないであろう。しかし、植物や動物細胞の培養技術の進歩にも著しいものがあり、また、反応や生成物にもそれぞれに特有のものが存在する以上、これらに新しい可能性を求めようとするのも魅力あることといえる。また、酵素機能を有する人工触媒の創成への努力も盛んである。

酵素法による有用物質の生産

筆者らの研究室で行なった研究の中から最近のものについて以下に説明する。

図 12 *S*-アデノシルホモシステイン加水分解酵素による*S*-アデノシルホモシステインの合成(水解)の反応機構⁽³¹⁾

1. *S*-アデノシルホモシステインの合成^(27~29)

S-アデノシルホモシステイン (AdoHcy) は、活性メチルサイクル (図 11) において、*S*-アデノシルメチオニン (AdoMet) が関与するメチル基転移反応の生成物である。近年、AdoHcy はメチル基転移反応を調節する化合物としてその多彩な

生理作用、薬理作用が注目されている^(28,30)。しかし、AdoHcy およびその関連スクレオンドを生産する方法は今まで知られていなかった。

筆者らは、AdoHcy 加水分解酵素を多量に含む細菌の菌体を触媒とする AdoHcy の生産法を開発している。AdoHcy の加水分解反応は、本来生体内では AdoHcy 濃度の調節、あるいは L-ホモシステインの再生に関与し、活性メチルサイクルを円滑に回転させるための重要な反応である。しかし、この反応を触媒する酵素のみをとり出してその反応性を調べると、反応平衡は著しく合成方向、すなわちアデノシンと L-ホモシステイン間のチオエーテル結合を形成する方向に傾いており、容易に AdoHcy が生成する。このように、一挙にチオエーテルが形成されることは、有機化学的な観点からみると不思議な反応である。最近までこの反応のからくりは明らかでなかったが、酵素化学と有機化学の両面から検討が加えられ、この反応は通常の加水分解反応とは異なって、酵素に結合した NAD^+ の酸化還元を伴うユニークな反応であることが明らかにされた (図 12)⁽³¹⁾。

この反応を用いて AdoHcy を合成するにあたって、筆者らは、まず先述したような優良菌株の探索を行なった。これまで、この反応は真核細胞に特有のものであり、原核細胞では別の経路 (図 11 の点線で示した経路) で AdoHcy が分解されるという説が広く認められていた。ところが、細菌についてもこの反応による

図 13 DL-ホモシステインとアデノシンからの S-アデノシル-L-ホモシステインの合成⁽²⁸⁾

AdoHcy の合成能を調べると、酵素活性は微生物を扱う研究者にとってはごくありふれた *Pseudomonas* や *Corynebacterium* 属の細菌、放線菌などに広く分布しており、むしろ、この酵素を持たない大腸菌のほうが特殊な細菌であることが判明した⁽³²⁻³⁴⁾。しかも、細菌の AdoHcy 合成活性は強力で、動物や植物で報告されているものの 10~100 倍の活性を示した。特に、*Alcaligenes faecalis* の一株は、この酵素を総可溶性タンパク質の 2~3% にも達する高レベルで生産し、菌体はそのまま酵素の袋として使用できるほどであった^(34,35)。

この反応の原料となるアデノシンはわが国では入手が容易であるが、ホモシステインについては化学合成法で調製した安価なラセミ体を利用する必要がある。一方、この酵素反応では L 型だけが反応するので、D 型は未利用のまま反応液中に残存する。そこで、D 型も利用できる菌を探すと、*Pseudomonas putida* の 1 株が効率よく D-ホモシステインを利用することが判明した。最終的に確立された合成スキームは図 13 のようであり、*A. faecalis* と *P. putida* の菌体を同時に使うと、ラセミ型のホモシステインが定量的に AdoHcy に変換される（収量、約 80 g/l）⁽¹⁹⁾。このような高収量が達成できるのは、*A. faecalis* の菌体が触媒として優れた特性を有していることに加えて、AdoHcy の水に対する溶解度が低いことにも原因があるかも知れない。この反応では、生成した AdoHcy は容易に結晶として析出し、反応系外に除かれる。したがって、反応平衡は常に合成方向に保たれることになる。また、アデノシンの代わりに各種のアデノシン類縁体を基質として用いてもこの反応は効率よく進行するので、多様なヌク

レオシド化ホモシステインの合成も可能である。なお、ここで述べた合成用触媒としてのこの酵素の機能は、この酵素の有している多彩な機能のごく一部であり、抗ウイルス剤のドラッグデザインやホモシスチン尿症の新生児スクリーニングへの利用など別の観点からも検討が加えられている^(29,30,35,36)。

2. アクリルアミドの合成^(37,38)

筆者らの研究室では、種々のニトリル化合物を用いて、これらの化合物が微生物によってどのような分解を受けるかを明らかにしてきた。その結果、ニトリルが酸にまで酸化される経路は反応(12)か(13)のいずれかに従うことが判明し

た⁽³⁹⁻⁴²⁾。反応(12)を触媒する酵素は、ニトリラーゼとして知られ、諸性質も明らかにされている。しかし、反応(13)に従ってアミドを経由する2段階の反応に関与する酵素系については、まったく知られていなかった。そこで、アセトニトリルからアセトアミドを生成する *Arthrobacter* sp. J-1 の菌体抽出液から、この反応を触媒する酵素を精製・単離した。酵素の諸性質を調べると、この酵素はニトリルの水和反応を触媒する新しい酵素であることが判明し、ニトリルヒドラターゼと

図 14 ニトリルヒドラターゼの反応機構⁽⁴⁴⁾

図 15 ニトリルヒドラターゼによるアクリルアミドの生産⁽⁴⁵⁾

○：アクリロニトリル，●：アクリルアミド，▲：アクリル酸

命名された^(43,44)。

ニトリルヒドラターゼの反応機構を従来知られているニトリラーゼのそれと比較して考察すると、図 14 のようになる。まず酵素の SH 基を介して、基質ニトリル化合物と酵素の間に基質-酵素複合体 [I] が形成される。このプロセスはニトリラーゼもニトリルヒドラターゼも同じ機構で進行すると思われる。[I] の生成後、ニトリラーゼでは [I] からアンモニアが脱離し、アシル酵素を生成する。一方、ニトリルヒドラターゼでは [I] から脱離するのは酵素のほうであり、アミドが生成すると考えられる。したがって、両酵素の反応機構の違いは、[I] から脱離するグループの違いによると理解できる。

ニトリルヒドラターゼの触媒する反応は、基質であるアセトニトリルをアクリロニトリルに置き換えれば、アクリルアミドの生産へ適用できるはずである。ところが、アセトニトリルを誘導基質として生育した *Arthrobacter* sp. J-1 の菌体とアクリロニトリルを接触させると、反応性は低いが確かに基質の減少は起こる。しかし、生成するのはアクリル酸である。これはニトリルヒドラターゼの誘導時にアミダーゼが誘導され、しかもこのアミダーゼがアクリルアミドにも作用するためである⁽⁴⁵⁾。したがって、アクリルアミドを生産する場合には、アクリロニトリルを良好な基質とするようなニトリルヒドラターゼを生産する菌株（た

とえばアクリロニトリル資化性菌など）を得、反応系にアミダーゼ阻害剤を添加するか、あるいはニトリルヒドラターゼを構成化し、アミダーゼが欠損した菌株を造成する方法などが考えられる。しかし、アクリロニトリルを分解する菌の分離・培養は容易でなく、さらにこの場合にはニトリラーゼが生成するので、アクリルアミドの蓄積は期待できない。

そこで、対象となる菌の母集団をもう少し広げて、種々の低分子ニトリル化合物に生育する菌株の中から、アクリロニトリルからアクリルアミドを生成する活性が強く、かつアクリルアミドの分解活性が微弱な菌株を探索することにした。有効菌株として分離した *Pseudomonas chlororaphis* は、アクリロニトリルには生育しないが、イソブチロニトリルによく生育し、強力にニトリルヒドラターゼを生成した。この菌体を直接触媒的に用いて、基質をアクリロニトリルにすり変えると、図 15 に示すような高収量のアクリルアミドの生産が可能となる。*P. chlororaphis* ではニトリルヒドラターゼはアクリロニトリルを良い基質とするが、アミダーゼはアクリルアミドにほとんど作用しないことがこのような高収量の原因の 1 つと考えられる。

酵素法によるアクリルアミドの生産法の確立は、大量生産型の原料素材の生産にも省エネルギー型の酵素反応が利用できることを示した点で画期的であった。この成果は、将来微生物や酵素がファインケミカルズの合成にとどまらず広く化学工業原料製造の分野でも使われるであろうことを予測させるに十分なものがある。

*

酵素法は、一面において化学合成法や発酵法と競合する物質生産技術といえる。しかし、これらはいつも敵対関係にあるわけではない。それぞれが互いにその長所を認め合ったときに大きな成果がもたらされることは、上に述べたとおりである。

微生物は生育環境に対する高い適応力を有しており、新しい基質に適応した酵素系をつくる能力

にも富んでいる。さらに、関連する技術分野の進歩にも著しいものがある。このような状況の下で、現在我々が知っている以上に微生物や酵素を利用できる局面は多いのかも知れない。

本稿では、酵素法のアウトラインを示すことに重点を置いた。不足の分は他の総説^(1,2,46-53)を参考にいただければ幸いである。

文 献

- 1) 清水 昌, 山田秀明: 現代化学, 12 月号, 22 (1980).
- 2) H. Yamada & S. Shimizu: "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Vol. A.4, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1985, p. 150.
- 3) C. Neuberg & J. Hirsch: *Biochem. Z.*, 115, 282 (1921).
- 4) H. Yamada & S. Shimizu: "Biocatalysts in Organic Synthesis", ed. by J. Tramper, H. C. van der Plas and P. Linko, Elsevier, Amsterdam, 1986, p. 19.
- 5) 森原和之: 発酵と工業, 38, 1052 (1980).
- 6) H. Yamada & H. Kumagai: *Adv. Appl. Microbiol.*, 19, 249 (1975).
- 7) H. Yamada & H. Kumagai: *Pure Appl. Chem.*, 50, 1117 (1978).
- 8) 福村 隆, 加藤嵩一: 農化誌, 54, 647 (1980).
- 9) 佐野孝之輔, 山本 泰, 楠本勇夫, 横関健三: 農化誌, 59, 823 (1985).
- 10) 山田秀明, 清水 昌, 米田耕司: 発酵と工業, 38, 937 (1980).
- 11) 高橋里美: 発酵工学, 61, 139 (1983).
- 12) "Enzyme 'Nomenclature, 1984", Academic Press, New York, 1984.
- 13) S. Shimizu, H. Hata & H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2285 (1984).
- 14) B. Zhou, A. S. Gopalan, F. van Middlesworth, W.-R. Shieh & C. J. Sih: *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 5925 (1983).
- 15) M. Ohno, S. Kobayashi, T. Iimori, Y. E. Wang & T. Izawa: *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 2405 (1981).
- 16) 清水 昌: "有機合成実験ハンドブック", 有機合成化学協会編, 丸善, 1986, 印刷中.
- 17) S. Takamatsu, I. Uemura, K. Yamamoto, T. Sato, T. Tosa & I. Chibata: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 147 (1982).
- 18) C. Wandrey, R. Wichmann, W. Berke, M. Morr & M. R. Kula: "Third European Congress on Biotechnology", Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, p. 239.
- 19) S. Shimizu, T. Ohshiro, S. Shiozaki & H. Yamada: *J. Biotechnol.*, 4, in press (1986).
- 20) S. Shimizu, A. Esumi, R. Komaki & H. Yamada: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 1118 (1984).
- 21) S. Shimizu, Y. Tani & H. Yamada: "Immobilized Microbial Cells", ed. by K. ven Katsubramanian, American Chemical Society, Washington, D. C., 1979, p. 87.
- 22) *Newsweek*, 2, 17 (1986).
- 23) 宇多川隆, 山中 茂: 発酵と工業, 43, 2 (1985).
- 24) 園元謙二, 田中渥夫: 発酵工学, 61, 153 (1983).
- 25) K. Yokozeki, S. Yamanaka, K. Takinami, Y. Hirose, A. Tanaka, K. Sonomoto & S. Fukui: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 1 (1982).
- 26) Y. Inada, T. Yoshimoto, A. Matsushima & Y. Saito: *Trends Biotechnol.*, 4, 68 (1986).
- 27) H. Yamada, S. Shimizu, S. Shiozaki & T. Ohshiro: "Third European Congress on Biotechnology", Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, p. 249.
- 28) S. Shimizu & H. Yamada: *Trends Biotechnol.*, 2, 137 (1984).
- 29) 清水 昌, 山田秀明: 発酵と工業, 42, 748 (1984).
- 30) P. M. Ueland: *Pharmacol. Rev.*, 34, 223 (1982).
- 31) J. L. Palmer & R. H. Abeles: *J. Biol. Chem.*, 254, 1217 (1979).
- 32) S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Ohshiro & H. Yamada: *Eur. J. Biochem.*, 141, 385 (1984).
- 33) S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Ohshiro & H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 1383 (1984).
- 34) S. Shimizu, S. Shiozaki & H. Yamada: *J. Biotechnol.*, 4, in press (1986).
- 35) R. T. Borchardt, B. T. Keller & U. Patel-Thombre: *J. Biol. Chem.*, 259, 4353 (1984).
- 36) S. Shimizu, T. Ohshiro, H. Yamada, M. Totani & T. Murachi: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 8, in press (1986).
- 37) 山田秀明, 浅野泰久, 谷 吉樹: 化学と工業, 36, 101 (1983).
- 38) 谷 吉樹, 浅野泰久, 山田秀明: 発酵と工業, 41, 382 (1983).
- 39) H. Yamada, Y. Asano, T. Hino & Y. Tani: *J. Ferment. Technol.*, 57, 8 (1979).
- 40) Y. Asano, S. Ando, Y. Tani & H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2497 (1980).
- 41) H. Yamada, Y. Asano & Y. Tani: *J. Ferment. Technol.*, 58, 495 (1980).
- 42) Y. Asano, S. Ando, Y. Tani, H. Yamada & T. Ueno: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 57 (1981).
- 43) Y. Asano, Y. Tani & H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2251 (1980).
- 44) Y. Asano, K. Fujishiro, Y. Tani & H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1165 (1982).
- 45) Y. Asano, T. Yasuda, Y. Tani & H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1183 (1982).
- 46) 清水 昌, 山田秀明: 有機合成化学, 39, 467 (1981).
- 47) 清水 昌, 山田秀明: 化学の領域, 36, 487 (1982).
- 48) 清水 昌, 山田秀明: 発酵と工業, 41, 460 (1983).
- 49) 清水 昌, 山田秀明: 有機合成化学, 41, 1064 (1983).
- 50) 清水 昌, 山田秀明: *BioIndustry*, 1 (6), 36 (1984); 2, 139, 217 (1985).
- 51) 清水 昌: 農化誌, 59, 1273 (1985).
- 52) S. Shimizu & H. Yamada: "Biotechnology", Vol. 4, ed by H. J. Rehm, G. Reed and H. Pape, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1986, in press.
- 53) 山田秀明: "日本の先端技術", 長崎先端技術開発協議会 著, 三田出版会編, 日経サイエンス社, 1985, p. 178.

訂 正

先月号 (Vol. 24, No. 6) 掲載の解説 "フィトクロムとその調節作用" (古谷雅樹先生御執筆) 中, 図 5 (p. 369) の説明に, (原図 徳富 哲, 村田純夫, 古谷雅樹) とありますのは, (原図 徳富 哲, 村田紀夫, 古谷雅樹) の誤りでした。訂正いたしますとともに, お詫び申し上げます。 編集部