微生物の新しいアミノ酸代謝酵素の特性とその応用[†]

(昭和 61 年度農芸化学奨励賞受賞)

長 沢 透

(京都大学農学部)

はじめに

微生物反応を利用して有用物質を生産する手法は、いわゆる醗酵法 (fermentation) と酵素法 (enzymation) に大別される。従来、微生物醗酵は、微生物の営む生命現象すなわち複雑な物質代謝を利用して、安価な炭素源、窒素源から物質を生産する手法として発展してきた。したがって生育過程の細胞を生産工場とし、その場においてエネルギー変換の複雑な生命現象が物質変換と共役する“生命”の存在が不可欠であった。従来のアルコール醗酵、アミノ酸醗酵、核酸醗酵、有機酸醗酵などがこの例である。一方、微生物生理学の進歩とともに、この微生物による物質生産系は次第にそれを触媒する酵素あるいは酵素系で解析され、微生物を酵素、あるいは酵素の袋とみなして直接触媒的に用いる有用物質生産の新しい手法 (酵素法) が重要視されるようになってきた。すなわち、微生物によって自然な栄養源から有用物質を生産する従来の醗酵法から発展して、酵素または酵素系のみで非天然の人工基質から意図した有用物質を生産する酵素法へと微生物生産は拡大され、その将来がさらに期待できる状況になっている。

筆者は、数年来この酵素的手法による新しい微生物反応の応用開発に取り組んできた。本研究は、微生物の代謝生理の研究を通して見出した新しいアミノ酸代謝反応を酵素分子のレベルで究明して物質変換系の酵素的メカニズムを解析するとともに、酵素の機能特性を明らかにし、これを応用して種々の生理活性アミノ酸の新しい製法の確立を図ったものである。

I. β -クロロアラニン耐性菌の新しいアミノ酸代謝酵素の特性の解析とその応用

ピリドキサル酵素 (B_6 酵素) は生体におけるアミノ酸の合成、分解などの反応を触媒し、その反応様式はきわめて多岐にわたる。これらのうち基質アミノ酸の α 位水素の引き抜きを必須の反応段階として持つものは、アミノ基転移、ラセミ化、 α 、 β -脱離、 α 、 γ -脱離の 4 つの反応である。

人工のアミノ酸である β -クロロアラニンのような基質アナログは、ピリドキサル酵素によって α 水素が引き抜かれると β 位の電気陰性基クロルの脱離が誘起され、 α 、 β -脱離反応を受けて分解を受ける。たとえば、 β -クロロ-L-アラニンは GOT (グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ; EC 2.6.1.1)⁽¹⁾、GPT (グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ; EC 2.6.1.2)⁽²⁾、アミノ酸ラセマーゼ⁽³⁾ などのピリドキサル酵素の触媒作用により α 、 β -脱離反応を受け、ピルビン酸、アンモニア、塩化水素に分解される。ところがこの反応の過程でこれらの酵素が徐々に不活性化されることが見出された。これが酵素の自殺現象である。 β -クロロアラニンがピリドキサル酵素によって α 、 β -脱離反応を受ける途中、何回かに 1 回の割で反応中間体が酵素タンパク質の活性中心のアミノ酸残基に共有結合して酵素を失活させるのである (Fig. 1)。このとき、 β -クロロアラニンは活性発現に欠かせない主要なアミノ酸残基に特異的に結合するので、この自殺基質は酵素の活性中心の同定、活性中心近傍のアミノ酸配列の決定、あるいは酵素反応機作の解析に用いられてきた。

一方、ピリドキサル酵素の中でも反応に際し酵素の自殺は起こらず、 β -クロロアラニンが大変良い基質となる酵素群もある。基質の β -クロロアラニンはセリンから化学的に合成する方法⁽⁴⁾が知られていたが、この方法では安価に得られなかった。ところが最近になって、化学

[†] Characterization of New Microbial Metabolisms of Amino Acids and Their Application. Toru NAGASAWA (Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606)

Fig. 1 Reaction Mechanism of β -Chloroalanine. Fig. 2 Crystals of β -Chloro-D-Alanine Dehydrochlorinase from *P. putida* CR 1-1 (left), *O*-Acetylserine Sulfhydrylase from *B. sphaericus* L-118 (center) and Cystathionine γ -Lyase from *S. phaeochromogenes*.

合成技術の改良により β -クロロアラニンの工業的レベルでの安価な生産が可能となりつつある^(5,6)。そこで β -クロロアラニンは置換反応による種々の生理活性アミノ酸を酵素合成する際のきわめて良い出発物質として期待されている。

筆者は β -クロロアラニン耐性菌の耐性機構を追究する過程で見出した新しい代謝反応や制御機構の特性を明らかにし、酵素法によるアミノ酸合成への応用を試みた。

1. β -クロロ-D-アラニクロリドリアーゼを用いた D-システインおよびその関連アミノ酸の合成

β -クロロ-D-アラニンは、その L-異性体と比べ顕著に

強い抗菌活性を示し、15mM 濃度下ではほとんどの細菌は生育することができない⁽⁷⁾。その抗菌作用は β -クロロ-D-アラニンがアラニンラセマーゼや D-アミノ酸トランスアミナーゼの自殺基質となるために細菌の D-アミノ酸代謝に異常をきたし細胞壁のペプチドグリカン層の合成が阻害されるため⁽⁸⁾、あるいは膜結合性の D-アミノ酸脱水素酵素によって β -クロロ-D-アラニンから生じるクロロビルビン酸が膜の能動輸送系の不活性化をひき起こすため⁽⁹⁾と考えられている。

筆者らは土壌より β -クロロ-D-アラニン耐性菌 *Pseudomonas putida* CR 1-1 を分離し^(10,11)、本菌が β -クロロ-D-アラニンの分解反応 [Table I eq. (1)] を触媒する

Table I Reactions Catalyzed by β -Chloro-D-Alanine Dehydrochlorinase

Reactions	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
α, β -Elimination reaction	
(1) $\text{D-ClCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COCOOH} + \text{NH}_3 + \text{HCl}$	311
(2) $\text{D-HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COCOOH} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{S}$	106
β -Replacement reaction	
(3) $\text{D-ClCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{NaHS} \longrightarrow \text{D-HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{NaCl}$	1620
Reverse α, β -elimination reaction	
(4) $\text{CH}_3\text{COCOOH} + \text{NH}_3 + \text{NaHS} \longrightarrow \text{D-HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{NaOH}$	0.2

Table II General Properties of β -Chloro-D-Alanine Dehydrochlorinase

Molecular weight	
Sedimentation equilibrium	76,000
Gel filtration	73,000
Subunit molecular weight	
SDS-gel electrophoresis	38,000
Number of subunits	2
PLP content (mol/mol)	2
K_m for PLP (M)	2.3×10^{-8}
Absorption maxima (nm)	278, 418
E_{278nm}/E_{418nm}	3.44
$E_{1\%}^{1cm}$ at 280 nm	4.89
Isoelectric point	4.8
$s_{20,w}^0$ (S)	6.6

新しいピリドキサル酵素を生成することを見出し、 β -クロロ-D-アラニンクロリドリアーゼ (EC 4.5.1.2) と名づけた⁽⁷⁾。本酵素の精製を行い結晶状に単離し (Fig. 2), 物理化学的諸性質を明らかにした (Table II)。 β -クロロ-D-アラニンが α , β -脱離反応の最良の基質となり、反応速度は遅いが D-システイン、D-シスチンも α , β -脱離反応の基質となる⁽⁷⁾。

本酵素は β -クロロ-D-アラニンによって強く誘導生成される。 β -クロロ-L-アラニンや D-システインはインデューサーとならない。本菌の栄養培地での生育は、培地中の β -クロロ-D-アラニンが減少した後で、顕著な増加が見られ、それと同時に急激に本酵素活性も消失していく。また本酵素の生成能を欠損した β -クロロ-D-アラニン感受性変異株が得られることは、本酵素が、生理的には β -クロロ-D-アラニンの分解解毒に強く関与していることを示唆している⁽¹²⁾。リゾチーム-EDTA 処理によってスフェロプラストを調製し、本酵素の細胞内局在性を細胞質およびペリプラズムのマーカー酵素の分画を指標に検討したところ、細胞質に局在することが明らかとなった。また β -クロロ-D-アラニン存在下で生育した本菌のアラニンラセマーゼや D-アミノ酸トランスアミナーゼ活性は強い阻害を受けており、 β -クロロ-D-アラニンの分解解毒の場は細胞表層ではなく細胞質であると考えられた⁽¹³⁾。

本酵素はスルフィド存在下では β -置換反応をも触媒し D-システインを生成する [Table I eq. (3)]。Fig. 3 は、スルフィド濃度に依存して α , β -脱離反応から β -置換反応に主反応が変化していく様子を示しており、スルフィドが β -クロロ-D-アラニンの 10 倍濃度の条件下

Fig. 3 α , β -Elimination and β -Replacement Reactions Catalyzed by β -Chloro-D-Alanine Dehydrochlorinase. **Fig. 4** Possible Mechanism of the Multifunctional Catalysis of β -Chloro-D-Alanine Dehydrochlorinase.

では β -置換反応が優先し、 α , β -脱離反応はほぼ完全に抑制された。 β -置換反応による D-システイン合成の最大反応速度は β -クロロ-D-アラニンの α , β -脱離反応の最大反応速度の 5 倍以上である (Table I)。スルフィドの代わりに種々のメルカプタン類を添加すると D-システイン関連アミノ酸を合成することができる (Table III)。これらの反応生成物を結晶状に単離し、各種物理化学的手法により同定した^(14,15)。本酵素の多機能性は Fig. 4 に示したアミノアクリル酸反応中間体の介在を想定することによって説明される。つまり、基質の α -プロトンが引き抜かれ、キノイド中間体を生じる。クロ

Table III Synthesis of D-Cysteine Related Amino Acids Catalyzed by β -Chloro-D-Alanine Dehydrochlorinase and D-Cysteine Desulfhydrase

Substrate		β -Chloro-D-alanine dehydrochlorinase	D-Cysteine desulfhydrase
α, β -Elimination reaction			
D-Cysteine	K_m	0.18 mM	0.15 mM
	V_{max}	106 μ mol/min/mg	13.0 μ mol/min/mg
3-Chloro-D-alanine	K_m	0.06 mM	0.91 mM
	V_{max}	311 μ mol/min/mg	54.8 μ mol/min/mg
β -Replacement reaction		Relative rate of synthesis	
Sodium hydrosulfide		100 ^a	100 ^b
Methylmercaptan		17.8	0
Ethyl mercaptan		21.4	0
<i>n</i> -Propyl mercaptan		14.5	0
Isopropyl mercaptan		4.6	0
<i>n</i> -Butyl mercaptan		21.6	0
Isobutyl mercaptan		2.0	0
<i>sec</i> -Butyl mercaptan		3.3	0
<i>tert</i> -Butyl mercaptan		0.4	0
Phenyl mercaptan		21.8	0
Benzyl mercaptan		4.5	0
<i>o</i> -Thiocresol		0.4	0
<i>m</i> -Thiocresol		14.1	0
<i>p</i> -Thiocresol		7.1	0
2-Mercaptoethanol		71.0	1569
1-Thioglycerol		34.4	1305
D-Cysteine		0	1234
DL-Homocysteine		0	916
Thioglycolic acid		0	3214

^a 1620 μ mol/min/mg. ^b 2.84 μ mol/min/mg.

ルアニオンがこの中間体から脱離し、アミノアクリル酸を生じる。これが加水分解を受けるとビルビン酸を生じる (α, β -脱離反応)。このとき、親核性の SH^- が反応系に存在すると、これがアミノアクリル酸の β 位に付加し D-システインを生成する⁽¹⁶⁾。

β -クロロ-D-アラニンクロリドリアーゼ活性の高い菌体を調製するための培養条件を検討し、精製酵素に代わって活性微生物菌体を直接触媒的に用いた D-システイン合成の反応条件の最適化を図った⁽¹⁷⁾。最適条件下、30℃、2時間の反応で 100 mM β -クロロ-L-アラニンを 100% の転換率で D-システインに転換できた。また 200 mM β -クロロ-D-アラニンを添加した場合は、88% の転換率で 22 g/l の D-システインの生産が可能であった。また β -クロロアラニンのラセミ体を基質として用いた場合、菌体中に弱いながら存在する O-アセチルセリンスルフヒドラーゼによって β -クロロ-L-アラニンが L-システインに転換され生成した D-システインに混入してくる問題があるが、これは B₆ 酵素のアポ化剤である

フェニルヒドラジンで菌体を処理することにより O-アセチルセリンスルフヒドラーゼ活性を抑制除去し解決できた⁽¹⁸⁾。

最近、筆者らは β -クロロ-D-アラニンに耐性を示す大腸菌変異株 (W 3110 Δ trp ED 102/F' Δ trp ED 102) の細胞抽出液に野生株の 10 倍以上の強い活性を示す D-システインデスルフヒドラーゼ活性を見出した⁽¹⁹⁾。従来、微生物由来の D 型異性体に特異的なシステインデスルフヒドラーゼ (EC 4.4.1.15) についての報告はなく、その微生物における分布を検討したところ *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* 属等の腸内細菌に集中的に認められた。大腸菌変異株の細胞抽出液から D-システインデスルフヒドラーゼの精製を試み、硫安分画と各種カラムクロマトグラフィーによって単一標品を得た。その物理化学的諸性質を明らかにした (Table IV)。基質特異性として、D-システイン、 β -クロロ-D-アラニンの他に各種 S 置換体 D-システイン類の α, β -脱離反応を触媒する⁽¹⁹⁾。本酵素は β -クロロ-D-アラニンデ

Table IV General Properties of D-Cysteine Desulfhydrase

Native molecular weight	
Sedimentation equilibrium	67,000
Gel filtration (Sephadex G-100)	70,000
Gel filtration (HPLC)	74,000
Subunit molecular weight(SDS PAGE)	36,500
Number of subunits	2
PLP content (mol/mol)	2
$D_{20,w}$ (cm ² /s)	2.10×10^{-7}
$s_{20,w}$ (S)	4.0
$E_{1\%}^{1cm}$ at 280 nm	5.99
pI	3.7
K_m for PLP (M)	1.6×10^{-7}
Absorption maxima (nm)	278, 418
E_{278nm}/E_{418nm}	2.99

ヒドロクロリナーゼと同様の反応を触媒するが高い耐熱性を示し、免疫学的性質は β -クロロ-D-アラニンクロリドリアーゼとは全く異なる。また β -クロロ-D-アラニンクロリドリアーゼが誘導酵素であるのに対し、本酵素は構成的であった⁽²⁰⁾。本酵素も β -置換反応を触媒し、各種チオール化合物と β -クロロ-D-アラニンからのおのおの対応する D-システイン関連アミノ酸類を生成した (Table III)。とりわけチオグリコール酸は最良の基質となり S-カルボキシ-D-システインを生成する。本酵素の β -置換反応の基質特異性は β -クロロ-D-アラニンデヒドロクロリナーゼとは全く異なり、直鎖もしくは分岐鎖アルキルメルカプタン類は全く基質とならず、水酸基やカルボキシル基を含むチオール化合物が良い基質となった。したがって β -クロロ-D-アラニンデヒドロクロリナーゼ、D-システインデスルフヒドラーゼの両酵素の β -置換反応を用いることによって、より幅広く種々の D-システイン関連アミノ酸を合成することができる。

最近、D-システインおよびその関連アミノ酸類はセファロsporin系抗生物質の側鎖としての利用が報告されている⁽²⁰⁾。半合成セファロsporin MT-141 (Fig. 5)は *in vivo* で強い抗菌活性を示し、その特徴的な強い溶菌力が D-システイン残基によることが明らかになるにつ

Fig. 5 Structure of MT-141.**Table V** Comparison of General Properties of L-Cysteine-Synthesizing Enzyme from *B. sphaericus* L-118 with *O*-Acetylserine Sulfhydrylase from *S. typhimurium*

	<i>Bacillus sphaericus</i> L-118	<i>Salmonella typhimurium</i>
Molecular weight		
Sedimentation-equilibrium	68,000	68,000
Gel filtration (Sephadex G-200)	67,000	—
Gel filtration (HPLC)	70,000	—
Subunit molecular weight		
SDS-gel electrophoresis	34,000	34,000
Number of subunits	2	2
PLP content (mol/mol)	2	2
K_m for PLP (M)	2.0×10^{-6}	—
Absorption maximum (nm)	412	412
E_{278nm}/E_{412nm}	2.92	8.14
$E_{1\%}^{1cm}$ at 280 nm	6.93	12.1
pI	4.5	—
$s_{20,w}$ (S)	4.5	4.5
K_m for <i>O</i> -acetyl-L-serine (M)	7.8×10^{-3}	5.0×10^{-3}

れて、D-システインの今後の用途に期待が持たれている。

2. β -クロロ-L-アラニンによる *O*-アセチルセリンスルフヒドリアーゼ生成の制御機構の解除と L-システイン合成への応用

β -クロロ-L-アラニンはその D 異性体に比べその抗菌力は弱いが高濃度条件下では細菌の生育を強く阻害する。筆者らは 50mM β -クロロ-L-アラニンに耐性を示す細菌 *Bacillus sphaericus* L-118 を土壌より分離し、本菌の細胞抽出液中に β -クロロ-L-アラニンとスルフィドから L-システインを合成する顕著な酵素活性 (Eq. 1) を見出した⁽²¹⁾。この反応を触媒する酵素系を明らかにするため酵素の精製を行い結晶状に単離した⁽²²⁾ (Fig. 2)。本酵素はシステインや β -クロロアラニンの α , β -脱離反応を触媒しないことから L-システインデスルフヒドラーゼではないと判断した⁽²¹⁾。本酵素は β -置換反応のみを触媒し、 β -クロロ-L-アラニンのほかに *O*-アセチル-L-セリンが良好な基質となる (Eq. 2) ことから、本酵素は *O*-アセチルセリンスルフヒドリアーゼ (EC 4.2.99.8) であると考えられ、Becker ら⁽²³⁾によって精製された *Salmonella typhimurium* 由来の *O*-アセチルセリンスルフヒドリアーゼとよく似た物理化学的性質を示した (Table V)。

耐性菌 *Bacillus sphaericus* L-118 の *O*-アセチルセリンスルフィドヒドラーゼ活性は培地中に β -クロロ-L-アラニン添加することによって数倍に増大生成された。本来 *O*-アセチルセリンスルフィドヒドラーゼは L-システインによって強いリプレッションを受けているが β -クロロ-L-アラニンが L-システインと拮抗して本酵素の生成を増大させることから、この増大生成現象は β -クロロ-L-アラニンがデリプレッション的に制御機構を解除しているためと考えられた⁽²⁴⁾。ほかに *Proteus* 属、*Agrobacterium* 属、*Bacillus* 属の細菌においても同様の現象が観察された⁽²⁴⁾。このように β -クロロ-L-アラニンが *O*-アセチルセリンスルフィドヒドラーゼの生成の制御機構を解除して酵素生成を顕著に増大させ、と同時にそれ自体が本酵素の基質となることは、細菌が毒物 β -クロロ-L-アラニンに対処する生理的現象と考えられ興味深い。

O-アセチルセリンスルフィドヒドラーゼの β -クロロ-L-アラニンを基質とした β -置換反応の至適 pH は 10.5 付近にあり、pH 7.0 における値の約 7.5 倍の活性を示す。一方、本来の基質 *O*-アセチル-L-セリンはアルカリ条件下では *N*-アセチル-L-セリンになってしまうため、アルカリ側でシステイン合成の基質として用いるのは不適当である。そこで *O*-アセチル-L-セリンの代りに β -クロロ-L-アラニンを基質とした L-システインの酵素合成を試みた。 β -クロロアラニン 0.5% を含む栄養培地で培養することにより高活性菌体を調製した。反応条件の最適化を検討し、30°C、pH 9.5、2 時間の反応で、80% の転換率で 70 g/l の L-システインが合成された⁽²⁴⁾。生成したシステインを反応系外に除くためのア

セトンの添加は生産性を高めた。以前、筆者らの研究室で L-システインデスルフィドラーゼの β -置換反応を用いたシステイン合成法が検討された⁽²⁵⁾が、これと異なり本酵素はスルフィドに特異的であり種々のメルカプタン類は基質とならなかった。本酵素は生成した L-システインの分解反応を触媒しないので反応条件のコントロールはより容易である。

以上述べたように、 β -クロロアラニンは置換反応によって種々の生理活性アミノ酸を酵素合成する際のきわめて良い基質となる。さらに β -チロニンナーゼ (EC 4.1.99.2)、トリプトファンシンターゼ (EC 4.2.1.20) を用い、 β -クロロアラニンを基質とした L-チロニン、L-トリプトファン、その類縁アミノ酸の酵素的合成法も報告されており⁽²⁶⁻²⁸⁾、今後の広い用途が考えられる。しかしながら化学合成法によって生産される β -クロロアラニンはラセミ体であり、 β -クロロアラニンがラセマーゼの自殺基質となってこれを失活させるため酵素的ラセミ化は困難であり、ここに β -クロロアラニンをを用いた酵素的アミノ酸合成法の問題点があるといえよう。またこの点を考えれば、D 型アミノ酸合成への β -クロロアラニン利用法の開発は重要である。すなわち、L 体のアミノ酸の合成に L 体の β -クロロアラニンをを用い残った D 体の β -クロロアラニンを D 体のアミノ酸合成に利用するといったことが考えられる⁽²⁹⁾。

II. 微生物のシスタチオニン γ -リアーゼ、シスタチオニン γ -シンターゼの特性の解析とその応用

L-シスタチオニンは 2 個の不整炭素原子とチオエーテル結合を有する特異なアミノ酸であり、生体内では L-システインと L-ホモシステイン間の硫黄の転移 (トランススルフィーション) のかなめとなる代謝中間体として働いている (Fig. 7)。また、最近、L-シスタチオニンが霊長類の脳中に遊離の形で比較的多量に存在することが明らかとなり、神経伝達において重要な役割を担っている可能性が予想されている⁽³⁰⁾。先天性代謝異常症の一種でシスタチオニン合成能欠損によって起こるホモシチン尿症患者の脳中には L-シスタチオニンが検出されず、L-シスタチオニン投与による治療法が期待されている。しかしながら、L-シスタチオニンは高価なアミノ酸であるため簡便で経済的な合成法の開発が望まれてきた。筆者らは微生物のトランススルフィーションを明ら

Fig. 6 Regulation Mechanisms of L-Cysteine Biosynthesis in *B. sphaericus* L-118.

Fig. 7 Transsulfuration Pathway.

かにすることを目的に、まだ精製が行われず不明な点が多い微生物由来のシスタチオン γ -リアーゼ (Fig. 7 d, EC 4.4.1.1) および *O*-アセチルホモセリンに特異的なシスタチオン γ -シンターゼ type 2 型 (Fig. 7 c, EC 4.2.99.9) に焦点を当て、両酵素の諸性質を明らかにし、これらを用いた *L*-シスタチオンの効率的な合成法を検討した。

1. 放線菌におけるシスタチオン γ -リアーゼの発見とシスタチオンの酵素的合成法への応用

L-シスタチオンの生分解に関与する酵素としてはシスタチオン γ -リアーゼとシスタチオン β -リアーゼ (Fig. 7 a, EC 4.4.1.8) の 2 種が知られている。従来細菌においてはシスタチオンはシステインからシスタチオン γ -シンターゼ (Fig. 7 c) によって生成され、そしてシスタチオン β -リアーゼ (Fig. 7 a) によってホモシステインへと代謝されることが知られている。そしてシスタチオン γ -リアーゼは真核生物には存在するが原核生物には存在しないとされてきた。放線菌は、抗生物質をはじめとする種々の含硫二次代謝産物を生産するが、その含硫アミノ酸代謝は明らかではなかった。筆者らは、放線菌 *Streptomyces phaeochromogenes* の含硫アミノ酸代謝を検討し、その細胞抽出液に強いシスタチオン γ -リアーゼ活性を見出した⁽³¹⁾。また本活性は *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Micropolyspora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Streptovorticillium* 属等の放線菌に広く分布することを明らかにした⁽³¹⁾。また *St. phaeochromogenes* には、シスタチオン β -リアーゼ活性は検出できず強いシスタチオン β -シンターゼ (Fig. 7 b, EC 4.2.1.22) が認められる

Table VI General Properties of Cystathionine γ -Lyase

Native molecular weight	
Sedimentation equilibrium	168,000
Sedimentation velocity	167,000
Gel filtration (HPLC)	162,000
Subunit molecular weight (SDS PAGE)	41,000
Number of subunits	4
PLP content (mol/mol)	4
$D_{20,w}$ (cm ² /s)	5.10×10^{-7}
$s_{20,w}^{0}$ (S)	9.47
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ at 280 nm	8.39
pI	4.2
K_m for PLP (M)	1.8×10^{-5}
Absorption maxima (nm)	278, 421
$E_{278\text{nm}}/E_{421\text{nm}}$	3.97

ことより、放線菌の含硫アミノ酸代謝は同じ原核生物でありながら細菌とは逆方向にホモシステイン→シスタチオン→システインへと流れていることを初めて明らかにした⁽³¹⁾。これは、放線菌による抗生物質をはじめとする含硫二次代謝産物の生合成を考えるうえできわめて重要な知見と考えられる。

Streptomyces phaeochromogenes の無細胞抽出液より硫安分画や各種クロマトグラフィーにより収率約 30% で約 3000 倍の精製によりシスタチオン γ -リアーゼの単一標品を得た⁽³²⁾。硫安添加により結晶化させ (Fig. 2), その物理化学的諸性質を明らかにした (Table VI)。本酵素はピリドキサルリン酸を補酵素とし *L*-シスタチオン・*L*-ホモセリン, *DL*-ビニルグリシンの α , γ -脱離反応および β -クロロ-*L*-アラニン, *DL*-ランチオン・*L*-システインの α , β -脱離反応を触媒する。*L*-シスタチオンを基質とすると, α , γ -脱離反応と同時に 7 回に 1 回の割合で α , β -脱離反応も起こっていることが明らかとなった⁽³¹⁾。

本酵素は *L*-ホモセリンと同時に *L*-システインを反応液中に存在させると γ -置換反応を触媒し *L*-シスタチオンを生成した⁽³³⁾ (Eq. 3)。

L-システイン以外に *D*-システイン, *L*, *D*-ホモシステインやカルボキシル基を含むチオール化合物が γ -置換反応の良い基質となり、それぞれの反応生成物を単離し、物理化学的手法により同定した⁽³⁴⁾。 γ -置換反応において *L*-システインは 10 mM 以上の濃度で顕著なアロステリ

ック阻害を示すのに対し、3-メルカプトプロピオン酸等のアミノ基を持たないチオール化合物ではこのような阻害は観察されなかった。すなわち本酵素は活性中心以外にL-システインに特異的なアロステリック部位を持っており、L-システイン濃度によって酵素活性が調節されていると考えられる⁽³³⁾。また D-ホモセリンが置換反応の基質とならないこと、D-アロシスタチオン、L-アロシスタチオンを基質とするとおのおの α 、 γ -脱離反応および α 、 β -脱離反応のみが進行し、D-システイン、D-ホモシステインをチオール化合物として生成することより、本酵素の活性中心は二つの部位で構成され、片方はピリドキサルリン酸が結合し、L-アミノ酸、とくに L-ホモセリンに特異的なのに対し、もう一方はカルボキシル基を持つチオール類全般に広い親和性を持っている部位と推測された⁽³⁵⁾ (Fig. 8)。

シスタチオン γ -リアーゼを用い、L-ホモセリンと L-システインを基質としたときの L-シスタチオン合成の反応条件を検討した⁽³³⁾。30°C, pH 7.0, リン酸カリウム緩衝液を用いた反応条件下で、L-システインを8回添加することにより、13時間の反応で 14 mM (3.1 g/l) の L-シスタチオンが合成されたが基質の転換率は低かった⁽³³⁾。そこで L-ホモセリンに代わる基質を検討したところ、O-スクシニル-L-ホモセリン、O-マロニル-L-ホモセリン、DL-ビニルグリシンが良好な基質であり、最も反応性の高かった O-スクシニル-L-ホモセリンを用いて L-システインを4回添加することにより転換率 100% で 50 mM (11 g/l) の L-シスタチオン合成が達成された⁽³⁶⁾。

2. 細菌のシスタチオン γ -シンターゼ type 2 型酵素の特性の解析と L-シスタチオン合成への応用

細菌のシスタチオン γ -シンターゼは O-スクシニル-L-ホモセリンを良好な基質とする type 1 型 (Eq. 4) と O-アセチル-L-ホモセリンを良好な基質とする type 2

型 (Eq. 5) が知られているが、その細菌における分布についての系統的な研究はなく、また type 2 型酵素についての研究報告は皆無であった。そこで 24 属にわたる細菌 75 株の type 1 型および type 2 型活性を測定した⁽³⁷⁾。一般的にグラム陰性細菌は type 1 活性を示し、とくに *Erwinia*, *Pseudomonas* 属細菌は強い活性を示した。一方 *Bacillus* 属細菌は顕著な type 2 型活性を示した。

強い type 2 型活性を示した *Bacillus sphaericus* (IFO 3526) の無細胞抽出液より硫酸分画、各種クロマトグラフィーにより収率 16% で約 1600 倍の精製によりシスタチオン γ -シンターゼの単一標品を得、本酵素の物理化学的諸性質を明らかにした⁽³⁸⁾ (Table VII)。

本酵素は L-システイン以外に遊離のチオール基を有するアミノ酸、脂肪族、芳香族アルキルメルカプタン、メルカプトカルボン酸等ほとんどすべてのチオール化合物を基質とし、おのおのに相当する S-置換-L-ホモシステイン類を生成した。一方ホモセリン誘導体に対する特異性を検討してみると O-アセチル-L-ホモセリンが最も高い反応性を示し、O-スクシニル-L-ホモセリンはその 47% の活性を示したが、L-ホモセリン、DL-ビニルグリシンはほとんど基質とならなかった。O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン、L-シスタチオン等に対する脱離反応活性は非常に低く (L-シスタチ

Fig. 8 Postulated Active Site of Cystathionine γ -Lyase of *S. phaeochromogenes*.

Table VII General Properties of Cystathionine γ -Synthase Type 2 from *B. sphaericus*

Native molecular weight	
Gel filtration (HPLC)	165,000
Subunit molecular weight (SDS PAGE)	43,000
Number of subunits	4
PLP content (mol/mol)	4
pI	4.6
K_m for PLP (M)	2.1×10^{-5}
Absorption maxima (nm)	278, 420
$E_{278\text{nm}}/E_{418\text{nm}}$	4.82

Fig.9 Crystals of L-Cystathionine Formed in the Course of Enzyme Synthesis. (A), standard reaction mixture ; (B), without enzyme

オニン合成活性の $1/200 \sim 1/10,000$), *O*-アセチルセリン スルフヒドリラーゼ活性はシスタチオン γ -シンターゼ活性の 0.6% の値を示した⁽³⁸⁾. これまで報告されている *Salmonella typhimurium* や大腸菌の type 1 型シスタチオン γ -シンターゼは *O*-スクシニル-L-ホモセリン, *O*-アセチル-L-ホモセリンの脱離反応を触媒するのに対し^(39,40), 本酵素は脱離反応活性を示さず, L-シスタチオンや L-ホモシステイン等の合成反応に高い特異性を示す酵素であった⁽³⁸⁾.

次に *Bacillus sphaericus* のシスタチオン γ -シンターゼ type 2 型を用い, L-シスタチオン合成の反応条件の最適化を検討した⁽⁴¹⁾. 200 mM *O*-アセチル-L-ホモセリンと 200 mM L-システインを基質とし, pH 7.5 のリン酸カリウム緩衝液中 40°C で反応を行ったところ, 7時間の反応で 184 mM (42 g/l) の L-シスタチオンを 92% の転換率で生成した. L-シスタチオンは水に対する溶解度が低いため, 反応液中に生成した L-シスタチオンが結晶として析出し反応系が合成方向へ傾くため, 高い収率が得られた⁽⁴¹⁾ (Fig. 9).

シスタチオン γ -リアーゼとシスタチオン γ -シンターゼを用いた L-シスタチオン合成を比較してみると, 後者には① L-シスタチオンの脱離反応を触媒しない, ② L-システインによる阻害が無視できる, ③比活性が高く反応性が高い, という利点があり, シスタチオ

ニン γ -シンターゼを用いる L-シスタチオン生産がより実用的と考えられた. また基質となる *O*-アセチル-L-ホモセリンは, すでに醗酵的生产法が確立されており⁽⁴²⁾, 安価な供給が可能と考えられる.

おわりに

本稿では微生物の代謝生理の研究を通して見出した新しいアミノ酸代謝反応やこれに関する新しいピリドキサル酵素類を見出し, その反応特性を究明することによって得られた新知見を応用して新しい生理活性アミノ酸類の合成法の開発を試みた. 化学合成品 β -クロロアラニンを経微生物酵素によって有用アミノ酸に変換する例で示したように, 酵素法は基質として化学的に合成した基質やその誘導体を用いることによって, 種々の類縁化合物, 多くの unnatural な物質を生産することができる. このように酵素法の展開は微生物を単純化してとらえながらも, 有機合成化学とたくみに結びつくことによって従来より広範囲な, しかも多彩な物質の生産に応用しうると考えられる. 今後さらに化学合成技術の発展により新しい基質が開発され, この新しい基質に作用する新しい酵素反応が明らかにされてくるとと思われる. そしてこのような微生物反応の利用が化学工業などの多方面で発展し, 有用物質の生産に貢献していくものと期待している.

本研究は京都大学農学部醗酵生理学研究室で行われたものであり, ご指導とご鞭撻をいただいた山田秀明教授, 谷吉樹教授, ならびにご協力いただいた共同研究者の方々に深く感謝いたします.

- (1) 森野能昌: 生化学, **45**, 993 (1973).
- (2) 森野能昌, 渡辺建彦: 生化学, **42**, 557(1970).
- (3) 棚瀬純男, 森野能昌, 大隅孝治, 左右田健次: 生化学, **45**, 443 (1973).
- (4) C. Walsh, A. Schonbrumm and R. T. Abelles: *J. Biol. Chem.*, **246**, 6855 (1971).
- (5) 特公告昭-58-22140.
- (6) 特公開昭-58-8049.
- (7) T. Nagasawa, H. Ohkishi, B. Kawakami, H. Yamano, H. Hosono, Y. Tani and H. Yamada: *J. Biol. Chem.*, **257**, 13749 (1982).
- (8) J. M. Manning, N. E. Merrifield, W. M. Jones and E. C. Gotschlich: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 417 (1975).
- (9) G. Kaczorowski and C. Walsh: *J. Biol. Chem.*, **250**, 8931 (1975).

- (10) H. Ohkishi, D. Nishikawa, H. Kumagai and H. Yamada : *Agric. Biol. Chem.*, **45** 2397 (1981).
- (11) H. Yamada, T. Nagasawa, H. Ohkishi, B. Kawakami and Y. Tani : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1104 (1981).
- (12) T. Nagasawa, H. Hosono, T. Ishii and H. Yamada : *J. Bacteriol.*, in press.
- (13) T. Nagasawa, T. Ishii, H. Hosono and H. Yamada : *Arch. Microbiol.*, in press.
- (14) T. Nagasawa, H. Hosono, H. Ohkishi, Y. Tani and H. Yamada : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 809 (1983).
- (15) T. Nagasawa, H. Hosono, H. Ohkishi and H. Yamada : *Appl. Biochem. Biotech.*, **8**, 481 (1983).
- (16) T. Nagasawa, H. Ohkishi and H. Yamada : "Chemical and Biological Aspects of Vitamin B₆ Catalysis," ed. by A. E. Evangelopoulos, Alan R-Liss, Inc., New York, 1984, p. 365.
- (17) T. Nagasawa, H. Yamano, H. Hosono, H. Ohkishi, Y. Tani and H. Yamada : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 13003 (1982).
- (18) T. Nagasawa, H. Hosono, H. Yamano, H. Ohkishi, Y. Tani and H. Yamada : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 861 (1983).
- (19) T. Nagasawa, T. Ishii, H. Kumagai and H. Yamada : *Eur. J. Biochem.*, **153**, 541 (1985).
- (20) K. Iwamatsu, H. Inouye, T. Tsuruoka, K. Mizutani, S. Omoto, H. Ogino, K. Miyachi, T. Watanabe and T. Niida : *J. Antibiot.* **36**, 229 (1983).
- (21) G. S. Dhillon, T. Nagasawa and H. Yamada : *J. Biotechnol.*, **1**, 47 (1984).
- (22) T. Nagasawa and H. Yamada : "Methods in Enzymol.," ed. by B. W. Jakoby and O. W. Griffith, Academic Press, Inc., Oriando, 1987, Vol. 143, p. 474.
- (23) M. A. Becker, N. M. Kredick and G. M. Tomkins : *J. Biol. Chem.*, **244**, 2418 (1969).
- (24) T. Nagasawa, G. S. Dhillon, T. Ishii and H. Yamada : *J. Biotechnol.*, **2**, 365 (1985).
- (25) H. Yamada and H. Kumagai : *Pure Appl. Chem.*, **50**, 1117 (1978).
- (26) 長沢 透, 山野裕律, 谷 吉樹, 山田秀明 : 生化学, **52**, 618 (1980).
- (27) H. Kumagai and H. E. W. Miles : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1271 (1971).
- (28) T. Nagasawa, T. Utagawa, J. Goto, C. J. Kim, Y. Tani, H. Kumagai and H. Yamada : *Eur. J. Biochem.*, **117**, 32 (1981).
- (29) T. Nagasawa and H. Yamada : *Appl. Biochem. Biotech.*, **13**, 147 (1986).
- (30) R. Wermon, R. A. Davidoff, M. H. Aprison : *Life Sci.*, **5**, 1431 (1966).
- (31) T. Nagasawa, H. Kanzaki and H. Yamada : *J. Biol. Chem.*, **259**, 10393 (1984).
- (32) T. Nagasawa, H. Kanzaki and H. Yamada, "Methods in Enzymology," ed. by B. W. Jacoby and O. W. Griffith, Academic Press, Inc., Oriando, 1987, Vol. 143, p. 486.
- (33) H. Yamada, T. Nagasawa and H. Kanzaki : *J. Biotechnol.*, **1**, 205 (1984).
- (34) H. Kanzaki, M. Kobayashi, T. Nagasawa and H. Yamada : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 391 (1986).
- (35) H. Kanzaki, T. Nagasawa and H. Yamada : *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- (36) H. Kanzaki, T. Nagasawa and H. Yamada : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 97 (1986).
- (37) H. Kanzaki, M. Kobayashi, T. Nagasawa and H. Yamada : *FEMS Microbiol. Lett.*, **33**, 65 (1986).
- (38) H. Kanzaki, M. Kobayashi, T. Nagasawa and H. Yamada : *Eur. J. Biochem.*, in press.
- (39) M. M. Kaplan and F. Flavin : *J. Biol. Chem.*, **241**, 4463 (1966).
- (40) M. M. Kaplan and M. Flavin : *J. Biol. Chem.*, **241**, 5781 (1966).
- (41) H. Kanzaki, M. Kobayashi, T. Nagasawa and H. Yamada : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press.
- (42) H. Kase, K. Nakayama : *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2021 (1974).