=シリーズテーマ=

最近における微生物変換法の展開

最近における微生物変換法の展開	山田 秀明	765
ニトリルヒドラーゼを用いる有用アミドの生産	長沢 透	768
光学活性エポキシドの微生物生産	古橋 敬三	772
5-置換ヒダトイン化合物より L-アミノ酸への微生物変換	横関 健三	775
ケト酸より L-アミノ酸の酵素的合成	浅野 泰久	779
リパーゼ反応による油脂およびエステル合成と変換	山根 恒夫	783

最近における微生物変換法の展開†

山 田 秀 明

(京都大学農学部)

最近の応用微生物学の進歩はめざましいものがあり、抗生物質、糖、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質、その他種々の生理活性物質が、微生物反応を利用することによって開発され、製造されている。微生物反応を利用して物質を生産する手法は、いわゆる発酵法 (fermentation) と微生物変換法 (microbial transformation) (酵素法; enzymation) に大別される (表1)。発酵法は従来のアルコール発酵や有機酸発酵に見られるように、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である。一方、微生物変換法は微生物を特定の反応を触媒する酵素、あるいは酵素の袋とみなしており、極言すれば、微生物が生物であることを必ずしも必要としない、より機能的な微生物のとらえ方といえよう。

微生物を直接触媒として利用するような手法が広く認められるようになったのは、微生物によるステロイドの合成・変換の試みが大きな成功を収めたからである。かび、細菌、酵母などはステロイドに作用して、水

酸化、脱水素、側鎖の切断など多彩な反応を触媒し、これらのうちいくつかはすでに工業的製法として利用されている。以来この手法は、とくに化学的方法では困難な有機化合物の合成にしばしば試みられ、今日では多種類の物質の合成に有力な手段として利用されている (表2)。

微生物変換法が、従来の発酵法に比して優れている点は、種々の類縁化合物の合成が可能であることである。筆者らの多機能ピリドキサル酵素を用いるアミノ酸の合成研究⁽¹⁾を例にあげると、 β -チロシナーゼ反応においてフェノールを基質とすると、natural な L-チロシンが合成されるが、フェノールに置き換えてピロカテコールやレゾルシノールを用いると、それぞれ unnatural な 3,4-L-ドーパや 2,4-L-ドーパが合成され、それらの反応速度も収率も L-チロシンの場合の約 30% で大差ない。さらにピロガロール、ヒドロキシヒドロキノン、あるいはハロゲン化フェノール類などを用いると、それぞれ対応する多種類の L-チロシン類縁アミノ酸が合成されてくる。発酵法では用いる微生物にとって natural な物質のみが生産されるのに対して、微生物変換法では、酵素の示す基質特異性のゆるすかぎり多種類の unnatural な物質の生産が可能である。

微生物変換法はおおむね一段階の合成・変換反応であ

† Recent Development in Microbial Transformation.

Hideaki YAMADA (Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606)

るので原料として生産物に近い構造を持つ“基質”を必要とする。したがって、安価な炭素源や窒素源を用いる発酵法に比べ、原料が一般に高価につくという欠点がある。それゆえ、物質の生産プロセスとして考える場合、

表 1

	発 酵 法	微生物変換法 (酵素法)
菌	生育菌体	静止菌体
反 応	多段階反応 (生命現象)	一段階反応 (触媒反応)
原 料	安 価 炭素化合物 窒素化合物	高 価 基 質
生 成 物	天然物	天然物 非天然物
濃 度	低	高
単 離	困 難	容 易

微生物変換法は常に“基質”を供給するためのプロセス、化学的合成法などと密接に関連してとらえてゆく必要がある。これに関して、筆者らは微生物のヒダントイナーゼ（ジヒドロピリミジナーゼ）を用いる D 型アミノ酸の合成法を研究開発した⁽²⁾。現在、この方法によって半合成ペニシリンの側鎖の *p*-ヒドロキシフェニル-D-グリシンは世界最大の規模で生産され、またフェニル-D-グリシン、D-バリンも生産されている。*p*-ヒドロキシフェニル-D-グリシンの合成法は、まず化学的方法によって 5-*p*-ヒドロキシフェニル-DL-ヒダントインを合成し、次いでヒダントイナーゼによってこのものを D-立体特異的に開環加水分解して *p*-ヒドロキシフェニル-D-グリシンの *N*-カルバモイル体とし、最後に HNO_2 を用いて化学的に脱カルバモイル化して、*p*-ヒドロキシフェニル-D-グリシンを得るものである。このようなプロセス

表 2 微生物変換法による有用物質類の合成

1. ステロイドの変換	FAD の合成 (合成酵素)
水酸化反応 (酸素添加酵素)	NAD の合成 (合成酵素)
還元反応 (脱水素酵素)	ニコチン酸の合成 (ニトリラーゼ)
側鎖切断反応 (酸素添加酵素)	ニコチン酸アミドの合成 (ニトリルヒドラターゼ)
2. アルカロイドの変換	
3. 半合成抗生物質の合成	10. アミンの合成
4. 有機酸の合成	アミノ酸の脱炭酸反応 (脱炭酸酵素)
フマル酸の水和反応 (フマラーゼ)	11. アミノ酸の合成
エポキシコハク酸の立体選択的加水分解反応 (水解酵素)	立体選択的加水分解反応 (水解酵素)
5. 糖の変換	<i>N</i> -アシル化アミノ酸
グルコースの異性化反応 (異性化酵素)	アミノカプロラクタム
6. 脂質の変換	アミノチアゾリンカルボン酸
油脂の加水分解反応 (リパーゼ)	5-置換ヒダントイン
油脂のエステル交換反応 (リパーゼ)	フマル酸のアミノ化反応 (アスパルターゼ)
7. ペプチドの合成	チロシン関連アミノ酸の合成 (β -チロシナーゼ)
プラスティンの合成 (プロテアーゼ)	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)
ヒトインシュリンの合成 (プロテアーゼ)	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)
アスパルテームの合成 (プロテアーゼ)	セリンの合成 (セリントランスヒドロキシメチラーゼ)
8. 核酸関連化合物の合成	シスタチオニンの合成 (合成酵素)
<i>N</i> -リボシル化反応 (ホスホリラーゼ)	フェニルアラニンの合成 (脱水素酵素, トランスアミナーゼ)
<i>N</i> -アラビノシル化反応 (ホスホリラーゼ)	ロイシンの合成 (脱水素酵素)
ヌクレオシドのリン酸化反応 (リン酸転位酵素)	アスパラギン酸の脱炭酸反応 (脱炭酸酵素)
ヌクレオチドのピロリン酸化反応 (ピロリン酸転位酵素)	12. 基礎化学品の合成
糖ヌクレオチドの合成 (ピロホスホリラーゼ)	アルケンオキシドの合成 (酸素添加酵素)
9. ビタミンおよび補酵素の合成	アルケンの両端酸化反応 (酸素添加酵素)
コエンザイム A の合成 (多段階酵素系)	ヒドロキシ酸の合成 (脱水素酵素, 水和酵素)
アデノシルメチオニンの合成 (合成酵素)	アミドの合成 (ニトリルヒドラターゼ)
アデノシルホモシステインの合成 (水解酵素)	
NAD および NADP の還元 (脱水素酵素)	
D-パントイルラクツトンの合成 (還元酵素)	

が工業的製造法として成立した背景には、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、同時にこの反応の“基質”である 5-*p*-ヒドロキシフェニル-DL-ヒダントインを容易に、しかも安価に供給しうるような新しい化学的合成法の開発研究があったのである。このように、それぞれユニークな微生物的手法と、化学的手法が巧みに結びついて開発されたところに、新しい化学工業プロセスの誕生が見られたものと考えている。

微生物変換法は、発酵法に比べ、一般的に反応の収率が高く、また反応生成物の濃度にも高めることも可能である。とくに最近では酵素の誘導技術や人工変異による大量生産の技術も発達しており、きわめて著量に酵素を含む微生物菌体の調製が可能となっている。またスクリーニング、とくに高温菌や好アルカリ菌などの特殊環境微生物を探索することによって、熱や pH、さらに反応生成物の濃度に対して耐性な酵素を得ることも可能である。筆者らは、ニトリルヒドラクターゼを用い、アクリロニトリルを水和してアクリルアミドを生産する研究を行ってきたが⁽³⁾、筆者らが京都の土壌から分離した細菌、*Pseudomonas chlororaphis* B 23、の生産するニトリルヒドラクターゼは、反応生成物に対して著しい耐性を示し、200~300 g/l のアクリルアミドの存在におい

ても全く衰えることなく直線的に水和反応を進めることができる。このような反応生成物に対する耐性は大量生産型のコモディティケミカルの生産にとっては、きわめて重要な不可欠な特性であると考えている。

さらに今後は、化学的方法や組換え DNA 技術によって酵素の安定性、特異性、あるいは触媒活性を改変する研究が進み、また固定化などの工学的研究の進展によって、微生物変換法による物質生産の研究技術はますます発展し、多方面の化学工業、医薬品工業などに貢献するものと期待している⁽⁴⁾。本ミニレビューでは、最近わが国において研究開発された新しい微生物変換法（酵素法）のなかから主なトピックスを選び、執筆をお願いした。

- (1) H. Yamada and H. Kumagai: *Adv. Appl. Microbiol.*, **19**, 249 (1975).
- (2) 山田秀明, 清水 昌, 米田耕司: 発酵と工業, **38**, 937 (1980).
- (3) 山田秀明: 細胞工学, **2**, 92 (1987).
- (4) H. Yamada and S. Shimizu: "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry," Vol. A 4, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1986, p. 150.