ケト酸より L-アミノ酸の酵素的合成†

浅 野 泰 久

(財団法人 相模中央化学研究所)

はじめに

アミノ酸代謝に重要な位置を占める α -ケト酸は、従来対応するアミノ酸から調製されていた。すなわち、一般に α -ケト酸は、アミノ酸よりも高価であった。ところが、近年フェニルピルビン酸をはじめとする α -ケト酸の効率よい合成法が開発されるにおよび、 α -ケト酸を出発原料とする L-アミノ酸の生産法が注目されている。D-アミノ酸の用途が徐々に開拓されつつある現在、DL 両アミノ酸に転換されうる α -ケト酸は、原料として重要である。一方、酵素反応を有機合成の手段として取り入れようとする盛んな動きは、新酵素や、既知酵素の未知の触媒作用の探索に拍車をかけている⁽¹⁾。

α -ケト酸からの L-アミノ酸の酵素的合成法としては、山田らによって行われたピルビン酸を基質とする L-チロシン、L-DOPA、L-トリプトファン、L-システイン等の合成や⁽²⁾、大島、左右田らによる α -ケトイソカプロン酸よりの L-ロイシンの合成についての研究がある^(3,4)。最近、話題を集めた例として L-フェニルアラニンの酵素的生産法が開発がある。この研究が集中的に行われてきた背景には、L-フェニルアラニンの需要が人工甘味料アスパルテームの原料として急増したことや、発酵法の収量がまだ不十分であり、酵素法が展開できる余地があったことを挙げることができる。本稿では、フェニルピルビン酸からの L-フェニルアラニン合成について紹介する。

1. フェニルピルビン酸へのアミノ基転位反応による L-フェニルアラニン合成

アミノ酸トランスアミナーゼは、 α -ケト酸とアミノ酸の間のアミノ基転位反応を触媒する酵素であって、研究の歴史は長い。フェニルピルビン酸とアミノ基供与体と

しての L-グルタミン酸や L-アスパラギン酸を原料として L-フェニルアラニン合成能の強力な菌株が多くの研究者によって探索されている。*Escherichia coli*⁽⁵⁾、*Citrobacter freundii*⁽⁶⁾、*Pseudomonas fluorescens*⁽⁷⁾ 等各種の微生物が強い芳香族アミノ酸トランスアミナーゼを有し、L-フェニルアラニン合成に応用されている。L-フェニルアラニンの収率は、アミノ基供与体として L-アスパラギン酸を用いるとき、とくに良好である。これは、生産物のオキザロ酢酸が酵素的あるいは非酵素的にピルビン酸となり系外に除去され、平衡が L-フェニルアラニン合成側に片寄るためである。米国では、この方法で、*E. coli* を用いて L-フェニルアラニンの生産が行われている⁽⁸⁾。さらに、最近では、フマル酸とアンモニアから L-アスパラギン酸を合成するアスパラギナーゼ活性を併せ持っている菌を用いてフェニルピルビン酸、フマル酸、およびアンモニアから L-フェニルアラニン、および副産物としてのピルビン酸を合成する方法が提案されている⁽⁹⁾。なお、アセトアミド桂皮酸を基質としてフェニルピルビン酸を中間体とする二段階の合成反応を微生物菌体を用いて行う方法も検討されている^(9,10)。

2. フェニルピルビン酸の合成

われわれの研究所では、フェニルピルビン酸の効率よい合成法が開発できた。すなわち、塩化ベンジルのコバルト触媒によるダブルカルボニル化反応は、従来高压の一酸化炭素下で反応を行うものであったが、反応試剤である水の量を調節することにより常圧の一酸化炭素雰囲気下においても収率よくフェニルピルビン酸が得られることを明らかにした。フェニルピルビン酸の触媒的還元アミノ化反応も低い水素圧下において進行し、高収率で DL-フェニルアラニンが合成できる⁽¹¹⁾。本法は総収率が 80~85% に達し、高压を必要とせず安全性の向上およびコスト低減ができる画期的な技術である (図 1)。

そこで、安価に供給されうるフェニルピルビン酸を基質とし、アミノ基供与体として他のアミノ酸を必要とせ

† Enzymatic Synthesis of L-Amino Acids from Keto Acids.

Yasuhisa ASANO (Sagami Chemical Research Center, Sagamihara 229)

図1 ダブルカルボニル化反応によるフェニルピルビン酸合成および還元アミノ化反応による DL-フェニルアラニン合成⁽¹¹⁾

ず、副産物を生成しない L-フェニルアラニン合成法を開発しようと考えた。この目的のためには、最近発見された新酵素フェニルアラニン脱水素酵素が有効である。本酵素は NAD^+ を補酵素とし L-フェニルアラニンの酸化的脱アミノ化反応とフェニルピルビン酸の還元的アミノ化反応の可逆反応を触媒する酸化還元酵素である。

3. フェニルアラニン脱水素酵素の分布と性質

Hummel⁽¹²⁾らが、1984年にこの新酵素フェニルアラニン脱水素酵素の存在を *Brevibacterium* sp. において報告して以来、わが国および西ドイツで本酵素のスクリーニングが急速に展開された。われわれは、微生物界において本酵素を広範に検索し、土壌より分離した *Bacillus sphaericus* SCRC-R 79 a, *Sporosarcina ureae* SCRC-RO 4^(13,14)、および保存菌株の *B.adius* IAM 11059⁽¹⁵⁾ に本酵素活性を認め、それらより本酵素を初めて、精製、あるいは結晶化し(図2)、酵素化学的諸性質を詳細に明らかにした。*B. sphaericus*, *S. ureae*、および *B.adius* の酵素はいずれも分子量 31~36 万で分子量 3万9千~4万2千の同等なサブユニット 8 個から成っている。これらの酵素は NAD^+ を補酵素として、L-アミノ酸と、対応する α -ケト酸との間の可逆的な酸化還元反応を触媒する。L-フェニルアラニンは最も良好な基質となる。*B. sphaericus* の本酵素は、L-チロシンにも高い活性を有することで他起源の酵素と大きく異なっており、「チロシン脱水素酵素」とさへ呼べそうである。その他、コリネ型細菌⁽¹⁶⁾、*Thermoactinomyces intermedius*⁽¹⁶⁾ および、*Rhodococcus* sp.⁽¹⁷⁾ においても本酵素の存在が報告されている。

4. フェニルピルビン酸の還元的アミノ化反応による L-フェニルアラニン合成

フェニルアラニン脱水素酵素反応の平衡定数 (K_{eq}) は、 10^{-14} ~ 10^{-15} の範囲にあり、著しくアミノ酸合成側に偏っているので α -ケト酸からの合成に好都合である^(14,18)。メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* No.

図2 *Sporosarcina ureae* SCRC-R 04 から単離したフェニルアラニン脱水素酵素の結晶⁽¹⁴⁾

図3 *Sporosarcina ureae* SCRC-R 04 のフェニルアラニン脱水素酵素と *Candida boidinii* No. 2201 の蟻酸脱水素酵素による L-フェニルアラニン合成⁽¹³⁾

2201 より精製した蟻酸脱水素酵素と本酵素を組み合わせると、蟻酸ナトリウム、アンモニウムイオン、および触媒量の NAD^+ の存在下、各種 α -ケト酸から対応する L-アミノ酸を収率よく合成することができる⁽¹⁸⁾。L-フェニルアラニン (116 mg/ml) (図3) をはじめ L-チロシン、L-メチオニン、L-ロイシンや、各種非天然型アミノ酸の合成も効率よく進行する。基質の蟻酸は比較的安価であり、反応後は二酸化炭素となって生産物の精

製を妨げない。 *B. sphaericus* の酵素は各種の置換基を持ったフェニルピルビン酸誘導体をはじめ、各種の α -ケト酸を基質とするので、種々の非天然型 L-アミノ酸の合成に利用することができる⁽¹⁹⁾。また、 *B. sphaericus* の酵素はかなり安定であって、蟻酸脱水素酵素とともに同時に透析膜に入れると、約 1 カ月間にわたって L-フェニルアラニンの合成が可能であった。本法は、トランスアミナーゼを用いる方法と比べて他のアミノ酸を必要としない点、反応系内に副産物が生成しない点で優れている。なお、本酵素のような NAD (P)⁺ を補酵素とする酸化還元酵素を連続的なアミノ酸合成に用いるために、水溶性高分子に固定化した NAD (P)⁺ を用いる膜リアクター等が工夫されている⁽¹⁷⁾。さらに、Evans らが示唆しているように、本酵素と NADH の生成酵素系とを遺伝子組換え技術により共存させ、L-フェニルアラニン合成を触媒する菌を人為的に造成することも今後の一つの方向であると思われる⁽¹⁰⁾。

われわれは、遺伝子組換え技術を用いて本酵素の生産性を増大させる目的で、本酵素遺伝子のクローニングを行った⁽²⁰⁾。 *B. sphaericus* の遺伝子は 381 アミノ酸をコードする 1143 塩基対から成り、 *S. ureae* の遺伝子は 376 アミノ酸をコードする 1128 塩基対から成っていた。両者の塩基配列から推定されるアミノ酸配列の比較では、全体で約 56% の相同性が認められた。とくに、N 末端付近には、80% 以上の相同性が認められ、この領域には基質結合部位と考えられるアミノ酸配列が確認された。 *B. sphaericus* の本酵素遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された大腸菌は、培養当り野生株の 120 倍の活性を示した。このようにして得られた大腸菌と蟻酸脱水素酵素を持つ酵母 *Candida boidinii* のアセトン処理菌体とを組み合わせて用いることにより、定量的に L-フェニルアラニンを合成した (40 mg/ml)⁽²¹⁾。なお、 *B.adius* から本酵素遺伝子をクローニングし、酵素の大量発現に成功している⁽¹⁵⁾。

これまでに紹介した方法とは、やや異なるアプローチとして NAD⁺ を NADH に還元するヒドロゲナーゼを含む *Nocardia* 菌体を用いて水素高圧化、フェニルピルビン酸とアンモニウムイオンから L-フェニルアラニンを合成する方法も報告されている⁽²²⁾。

おわりに

以上、ケト酸からの L-アミノ酸の酵素的合成法として L-フェニルアラニンの合成を例にとりわれわれの研

究を主体に紹介した。ハロゲン化アルキルと一酸化炭素を常圧で反応させるダブルカルボニル化反応は、現在のところフェニルピルビン酸とその誘導体の合成において有効である。今後、効率よい α -ケト酸の化学合成法が開発され基質価格の下落が起これば、他のアミノ酸においても同様の研究経過をたどって酵素的生産法が成立する可能性もある。一方、非天然型化合物を合成できるという酵素法の優れた特徴を、発酵法と競合しない場において発揮させ、新しい物質生産法へと結び付ける研究にも今後の発展が期待される。

- (1) 清水 昌, 山田秀明: 化学と生物, **24**, 452 (1986).
- (2) H. Yamada and H. Kumagai: *Pure Appl. Chem.*, **50**, 1117 (1978).
- (3) 大島敏久, 左右田健次: 発酵と工業, **43**, 919 (1985).
- (4) T. Ohshima, C. Wandrey, M.-R. Kula and K. Soda: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1616 (1985).
- (5) G. J. Calton, L. L. Wood, M. H. Updike, L. Lantz II and J. P. Hamman: *Bio/Technol.*, **4**, 317 (1986).
- (6) 穴澤秀治, 荒木和美, 伊藤幸良, 尾関紀嗣: 昭和 60 年度日本醸酵工学会大会講演要旨集, 1985, p. 94.
- (7) C. T. Evans, W. Peterson, C. Choma and M. Misawa: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 305 (1987).
- (8) 特開昭 61-21092, 特開昭 61-141893, 特開昭 61-202695.
- (9) Y. Nishida, K. Nakamichi, K. Nabe and T. Tosa: *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 479 (1987).
- (10) C. T. Evans, W. Bellamy, M. Gleeson, H. Aoki, K. Hanna, W. Peterson, D. Conrad and M. Misawa: *Bio/Technol.*, **5**, 818 (1987).
- (11) 平井憲次, 神長 尚, 藤田 誠, 洲上高正: 1985 年度炭素資源の有効利用に関する研究発表講演会要旨集, p. 3, 特開昭 60-61550.
- (12) W. Hummel, N. Weiss and M.-R. Kula: *Arch. Microbiol.*, **137**, 47 (1984).
- (13) Y. Asano and A. Nakazawa: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3631 (1985).
- (14) Y. Asano, A. Nakazawa and K. Endo: *J. Biol. Chem.*, **262**, 10346 (1987).
- (15) Y. Asano, A. Nakazawa, K. Endo, Y. Hibi-no, M. Ohmori, N. Numao and K. Kondo: *Eur. J. Biochem.*, **168**, 153 (1987).
- (16) 米沢淳一, 味園春雄, 永田信治, 長崎 亀: 大島敏久, 杉本浩子, 左右田健次: 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, 1987, p. 627.

- (17) W. Hummel, H. Shütte, E. Schmidt, C. Wandrey and M.-R. Kula: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 409 (1987).
- (18) Y. Asano and A. Nakazawa: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2035 (1987).
- (19) 特開昭 62-244386.
- (20) 日比野泰雄, 幾島規理子, 浅野泰久, 沼尾長
德, 近藤 聖: 日本農芸化学会講演要旨集, 1987, p. 41.
- (21) Y. Asano, K. Endo, A. Nakazawa, Y. Hibino, N. Okazaki, M. Ohmori, N. Numao and K. Kondo: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2621 (1987).
- (22) 特開昭 61-56088, 特開昭 62-151191.
-