新規微生物酵素を用いる有用アミドおよび アミノ酸の合成に関する研究[†]

(1991 年度農芸化学奨励賞受賞)

浅 野 泰 久

(富山県立大学工学部)

近年、酵素反応が示す優れた特性を生かし、これを有機合成化学のプロセスに組み込もうとする研究が活発に展開されつつある。筆者は、有機合成への利用を目的として新規微生物酵素の探索、酵素の単離、酵素化学的諸性質の解明、力価の向上を行い、酵素を用いるユニークな合成反応を確立した。これらの反応は、いずれも触媒効率や選択性に優れており、有用アミドおよびアミノ酸の合成に新しい手段を提供するとともに、基礎酵素学に重要な知見を与えるものである。

I. ニトリル化合物の微生物分解：ニトリルヒ ドラーゼの発見と有用アミド類の合成

本研究では、微生物によるニトリル化合物の分解メカニズムを明らかにするとともに、その成果を基礎化学品であるアクリルアミドの工業生産に発展させることに成功した。

1. ニトリル化合物の微生物分解⁽¹⁻³⁾

ニトリル化合物は、広く生物界に存在するにもかかわらず、その微生物代謝については不明な点が多かった。すなわち、研究対象として用いられるニトリル化合物やそれらを分解する微生物についての報告は少数に限られており、またその分解に関与する酵素に関する研究に至ってはごくわずかな知見しかなかった⁽³⁾。

筆者らは、当初微生物を用いる環境浄化の目的で、合成繊維として広く使われているポリアクリロニトリル等の微生物分解を広く検討した。まず、比較的重合度の低

いポリアクリロニトリル(分子量約 8,000)を乳化重合により調製し、微生物による分解について検討した⁽⁴⁾。さらにポリアクリルアミドやポリアクリル酸についても、土壌および活性汚泥を分離源とする集積培養や、長期間にわたる馴養培養⁽⁵⁾を行ったが、それらの分解は認められなかった。そこで、まず自然界から分離した各種の低分子ニトリル分解菌の菌体に、分解酵素系を誘導生成させた。それらを上述のポリマーに作用させることによりニトリル基等の官能基変換を期待したが、分解を認めることができなかった。しかしながら、多数の低分子ニトリル分解菌の分離に成功するとともに、それらの分解機構について有益な知見を得、後述のアミド生産菌のスクリーニング研究を展開する基礎を固めることができた。

自然界から分離した低分子ニトリルの分解菌は、いずれもニトリルを対応するカルボン酸とアンモニアに加水分解した。それらは中間体としてアミドを生成する株、しない株、両方の性質を示す株に大別できた(図1)。まず、土壌を分離源とする集積培養法によっては、猛毒であるアクリロニトリル分解菌の分離は困難であった。そこで、京都市の下水処理場から採取した活性汚泥を、アクリロニトリルを当初 0.0008% 含む人工下水を用いて馴養培養した。活性汚泥を静置により沈降させ、上清の半量を毎日新しい人工下水と交換した。人工下水中のアクリロニトリル濃度を1カ月にわたって 0.004% まで徐々に増加させ、さらにそれ以降はグルコースを除いた。馴養培養を3カ月間継続し、アクリロニトリルに適応した汚泥を得た。そこから、アクリロニトリルを単一炭・窒素源として良好に生育する細菌 *Arthrobacter* sp. I-9 を、はじめて分離することに成功した^(4,5)。本菌を培養すると、アクリロニトリルの減少に伴って培地中にアクリル酸とアンモニアが定量的に生成した。アクリロニトリ

[†] Studies on the Synthesis of Amides and Amino Acids by Novel Microbial Enzymes.

Yasuhisa ASANO (Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University, Imizu-gun, Toyama 939-03)

図1 微生物によるニトリル化合物の分解
 筆者は *Arthrobacter* sp. I-9 および J-1 を、いずれも
Rhodococcus rhodochrous と再同定した。

ルが消費されきった時点から、急激なアクリル酸の消費と菌体の生育が観察されたが、化学的な加水分解の中間体であるアクリルアミドを検出することはできなかった。一方、集積培養法を用いて土壌より分離したアセトニトリル分解菌、*Arthrobacter* sp. J-1⁽⁴⁾ は、アセトニトリルのみならず、芳香族ニトリルであるベンゾニトリルをも単一炭・窒素源として良好に生育した。本菌がアセトニトリルに生育する際には、培地中にまずアセトアミドが生成し、これが酢酸とアンモニアに逐次的に分解された。興味深いことに、本菌がベンゾニトリルに生育する場合には、中間体として想定されるベンズアミドの生成は認められなかった^(6,7)。

さらに、ポリアクリロニトリルのモデル化合物として、ジニトリルであるグルタロニトリル、およびトリアクリロニトリルに生育する、それぞれ、*Pseudomonas* sp. K-9⁽⁸⁾ や *Fusarium merismoides* および *F. solani*⁽⁹⁾ を土壌より分離し、分解産物を単離、同定した。*Pseudomonas* sp. K-9 は、グルタロニトリルを単一炭・窒素源として利用し、対応するアミド化合物、グルタル酸、アンモニアを経て完全分解した。*Fusarium* がトリアクリロニトリルを窒素源として生育する際には、3つのニトリル基のうち、末端の一級炭素についたニトリル基1つのみを加水分解し、培地中にジニトリルモノカルボン酸をほぼ定量的に生成した。これらの *Fusarium* を、ジニトリルを窒素源として含む培地に同様に生育させると、培地中にモノニトリルモノカルボン酸がほぼ定量的に蓄積した⁽¹⁰⁾。

図2 ニトリルの酵素的加水分解

2. ニトリル分解酵素系に関する研究：ニトリルヒドラーターゼの発見

ニトリルは酸やアルカリによってアミドを経て加水分解されるのに対して、酵素反応の機構は異なっているのであろうか。*Arthrobacter* sp. J-1 の培養時に観察された特異な知見に酵素化学的な検討を加え、ニトリルの微生物分解は、従来から知られていたニトリラーゼによるカルボン酸とアンモニアへの直接分解の他に、新酵素「ニトリルヒドラーターゼ」およびアミダーゼの関与により、中間代謝物として酸アミドを経て分解する、2種類の経路が存在することをはじめて証明した(図2)。すなわち、*Arthrobacter* sp. J-1 に着目し、本菌によるアセトニトリルとベンゾニトリルの加水分解機構を検討した。アセトニトリルに生育した本菌の無細胞抽出液には、ニトリラーゼ様の酵素活性が認められたが、これを2つの酵素に分離することができた(図3)⁽¹¹⁻¹³⁾。ニトリルを水和して、アミド生成のみを触媒する酵素の単離に成功するとともに、酵素化学的諸性質を詳細に調べた。本酵素は、ニトリラーゼ (EC 3.5.5.1, 3.5.5.2) とはまったく異なる生成物であるアミドを与えるので、新酵素「ニトリルヒドラーターゼ」と命名した⁽¹²⁾。本酵素は、分

図3 *Arthrobacter* sp. J-1 より精製したニトリルヒドラーゼと
アミダーゼによるアセトニトリルの加水分解

- (A) ニトリルヒドラーゼによるアセトニトリルの水和, ●, アセトニトリル; ○, アセトアミド。
(B) アミダーゼによるアセトアミドの加水分解, ●, アセトアミド; ○, 酢酸; □, アンモニア。

子量約 24,000 と 27,000 の2種類のサブユニットからなる分子量約 420,000 の酵素である。本酵素の基質特異性はアミダーゼと比較すると広く、炭素数が5までの低級脂肪酸ニトリルを水和して対応するアミドを与えた。さらに、ニトリラーゼ^(6,7)およびアミダーゼ⁽¹³⁾を単離し、上記2種類のニトリルの分解経路が存在することをはじめて酵素化学的に証明した。

3. ニトリルヒドラーゼを用いる有用アミド類の合成

アクリルアミドは土壌改良や製紙工業等において大量に使われている基礎化学品であり、アクリロニトリルを原料として、硫酸や銅触媒による水和法により製造されていた。そこで、新酵素ニトリルヒドラーゼをアクリルアミド製造の触媒として用いることを計画した。*Arthrobacter* sp. J-1 の休止菌体をアクリロニトリルに作用させると、ニトリルヒドラーゼの作用によりいったん生成したアクリルアミドは、条件によっては菌体に共存する強力なアミダーゼの作用により、アクリル酸とアンモニアまで速やかに分解されてしまう⁽⁴⁾。筆者らは、上述のごとくニトリルヒドラーゼおよびアミダーゼの双方の基質特異性を検討し、前者は後者より広い基質特異性を有すること、同じ置換基を有するニトリルおよびアミドが必ずしも同じ反応速度で加水分解されるのではないことを明らかにした(図4)^(12,13)。また、前述の低分子ニトリル分解菌の広範なスクリーニング結果より、中間体としてアミドを生成する菌株が比較的多く存

図4 *Arthrobacter* sp. J-1 のニトリルヒドラーゼとアミダーゼの基質特異性
いずれも図中の最良基質の反応速度を100%としている。

在することを認めていた。

微生物を用いてアクリロニトリルからアクリルアミドを合成するために考えられる手法は、まず、アクリロニトリル分解菌を分離し、阻害剤の添加によりアクリルアミド分解をブロックすることや、アミダーゼ欠損株を誘導することであろう。しかしながら、スクリーニングにおける知見から猛毒性のアクリロニトリル分解菌を容易には分離できないこと、またはじめて分離できた *Arthrobacter* sp. I-9 によって、アクリロニトリルはニトリラーゼの作用で、アクリルアミドを経ずにアクリル酸とアンモニアまで分解され^(3,14)、アクリルアミドの生成は期待できないことを認めていた。さらに、上述のニトリル代謝の酵素化学的な研究の結果から、多種類のニトリル分解菌のなかには、ニトリルヒドラーゼとアミダーゼの反応速度が符合しない菌株が存在し、スクリー

ニング(培養)基質と反応基質(アクリロニトリル)を違えれば、中間代謝物であるアクリルアミドを蓄積させることができ、さらにアクリル酸までの分解を行わない菌株が得られると考えた。そこで、多数の低分子ニトリル分解菌を培養し、反応基質をアクリロニトリルにすりかえる手法で、高いアクリルアミド蓄積能を有する菌株を検索した。イソブチロニトリル分解菌として土壌より分離した *Pseudomonas chlororaphis* B 23 株は、400 g/l もの高濃度のアクリルアミドの定量的な合成を効率よく触媒し、アクリル酸の副生を伴わない(図5)⁽¹⁵⁾。本菌は各種ニトリルからのアミドの定量的な合成にも有効であり、100~560 g/l のアミドが合成できた⁽³⁾。本菌は、予想どおりアクリロニトリルに良好に作用する高いニトリルヒドラーゼ活性を有し、そのアミダーゼはアクリルアミドにはほとんど作用しなかった。本菌は、その後、酵素誘導剤の検討、粘性物質の非生産株の取得による力価の向上を経て⁽¹⁶⁾、年産 6000 トンのスケールでのアクリルアミドの工業生産に触媒として用いられるまでに至った⁽³⁾。

ニトリルの微生物分解機構と有用アミドの合成に関する研究については、その後の進展にもめざましいものがある。文献を参照されたい^(17,18)。

II. フェニルアラニン脱水素酵素の開発と L-アミノ酸の酵素的合成

本研究は、基礎知見が皆無に等しかったフェニルアラ

図5 *Pseudomonas chlororaphis* B 23 菌体を用いるアクリロニトリルからのアクリルアミド合成

ニン脱水素酵素の酵素化学的諸性質および一次構造を明らかにするとともに、フェニルビルビン酸の L-フェニルアラニンへの変換をはじめとして、各種の L-アミノ酸の酵素的合成法を開発したものである^(3,19)。

1. 新酵素フェニルアラニン脱水素酵素のスクリーニングと酵素化学的性質の解明

従来、 α -ケト酸は対応する L-アミノ酸よりも高価であり、合成原料とするには現実的でなかった。(財)相模中央化学研究所において、フェニルビルビン酸の画期的な合成法が開発でき、酵素的転換の基質としての用途が、脚光を浴びた。すなわち、常圧の一酸化炭素雰囲気下、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きわめて良好に進行し、収率よく目的物を与えた⁽²⁰⁾。さて、従来から知られていたフェニルビルビン酸からの L-フェニルアラニンの酵素的合成方法は、微生物のアミノ基転移反応を利用してフェニルビルビン酸と L-アスパラギン酸などのアミノ基供与体間で、アミノ基を交換して L-フェニルアラニンとするものである。しかし、この方法では当量のアミノ酸が消費され、しかも副生成物として α -ケト酸が生ずる。もし、従来未知であったフェニルアラニン脱水素酵素を開発することができれば、本酵素の触媒する還元のアミノ化反応により、アミノ基供与体としてアンモニアが使用可能となる(図6)。本酵素は、1984 年にその存在が報告されたが、精製や諸性質の解明など、酵素化学的な検討はほとんどなされていなかった⁽²¹⁾。筆者らは、独自に本酵素を生産する微生物を土壌より探索し、細菌 *Sporosarcina ureae* や *Bacillus sphaericus* の分離に成功するとともに、本酵素をはじめて結晶状に単離し(図7)⁽²²⁾、酵素化学的諸性質を明らかにした⁽²³⁾。また、保存菌 *B. badius* IAM 11059 にも活性を認め、単離に成功した⁽²⁴⁾。これらの酵素は、いずれも分子量約 310,000~380,000 であり、分子量約 41,000 の同等のサブユニッ

図6 フェニルアラニン脱水素酵素と蟻酸脱水素酵素を用いるケト酸からの L-アミノ酸合成

図7 *Sporosarcina ureae* 由来のフェニルアラニン脱水素酵素の結晶

ト8個からなる。これらの3種類の酵素の酵素化学的諸性質をまとめて表1に示す。本酵素には酵素番号 [EC 1.4.1.20] が与えられることになった。

2. フェニルアラニン脱水素酵素を用いる α -ケト酸からの L-アミノ酸の合成への応用

本酵素と酵母 *Candida* の蟻酸脱水素酵素を組み合わせると、触媒量の NAD^+ の存在下、L-フェニルアラニンを収率よく合成することができる (120 g/l)⁽²⁵⁾。本酵素は、フェニルピルビン酸のみではなく、他の α -ケト酸の還元的アミノ化にも利用でき、天然型、非天然型を問わず、L-アミノ酸の立体特異的合成が可能になった。*B. sphaericus* の本酵素の基質特異性を、化学合成した各種の基質や基質アナログを用いてはじめて系統的

図8 フェニルアラニン脱水素酵素を用いる L-2-アミノ-5-フェニル吉草酸の合成

に解明した。その結果、 β -ケト酸、 α -ケトール、 α -ケトエステル、および β -ケトエステルには作用せず、基質として α -ケト酸の構造を必須とすることが判明した⁽²⁶⁾。また、 β 位に置換のある α -ケト酸をも基質としたがその不斉は識別しなかった。本酵素の基質特異性は比較的広く、 α -ケト酸の疎水性基部分にはかなり余裕があることがわかった (表2)。この性質を利用して各種の L-アミノ酸を収率よく合成した (図8)⁽²⁶⁾。たとえばアンジオテンシン変換酵素阻害剤エナラプリル等の合成原料と

表1 フェニルアラニン脱水素酵素の酵素化学的諸性質

Property	Value with enzyme from		
	<i>S. ureae</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. badius</i>
Specific activity (U/mg)	84.4	111	67.8
Molecular weight			
Sedimentation equilibrium	305,000	340,000	—
Gel filtration	310,000	340,000	310,000 ~380,000
Gene sequencing	334,136	332,608	—
Molecular weight of subunit			
SDS-polyacrylamide gel	39,000	39,000	41,000 ~42,000
Gene sequencing	41,767	41,576	—
Number of subunits	8	8	8
K_m (mM) value for			
L-Phenylalanine	0.096	0.22	0.88
L-Tyrosine	—	0.50	6.7
Phenylpyruvate	0.16	0.40	0.11
4-Hydroxyphenylpyruvate	—	0.34	4.0
NAD^+	0.14	0.17	0.15
NADH	0.072	0.025	0.21
Ammonia	85	78	127

表 2 *B. sphaericus* SCRC R 79 a 由来のフェニルアラニン脱水素酵素の基質特異性

100 (%)	4.8	1.1
136	5.0	5.5
52	1.5	2.9
39	1.0	7.8
3.4	8.8	6.2
1.9	0.1	0.73
0.46

図 9 フェニルアラニン脱水素酵素の反応機構

なりうる L-ホモフェニルアラニンも収率よく合成することができた。さらに、ポジトロン・エミッション・トモグラフィー (PET) の核医学研究に供するために、半減期のきわめて短い ^{13}N による L-チロシン、L-フェニルアラニン、L-DOPA 等の標識化に成功している⁽²⁷⁾。また、本酵素を用いる酵素サイクリングにより、体液中のフェニルピルビン酸、パラヒドロキシフェニルピルビン酸の微量定量や、L-フェニルアラニン、L-チロシン等の定量が可能となった⁽²⁸⁻³⁰⁾。

3. フェニルアラニン脱水素酵素遺伝子のクローニング

上記の 3 菌株から、本酵素遺伝子のクローニングに成功しており、酵素の大量供給が可能となっている。そのうち 2 種類については一次構造が決定されている^(24,31-33)。*B. sphaericus* の本酵素遺伝子は、381 アミノ酸をコード

する 1143 塩基対からなっていた。*B. sphaericus* の本酵素遺伝子の一次構造と *S. ureae* のそれとは約 56% の相同性が認められた。*B. sphaericus* の本酵素遺伝子を含む大腸菌形質転換株は、単位培養液当り野生株の約 120 倍の酵素活性を示した⁽³³⁾。大量生産が可能となった本酵素を用いることにより、反応速度が遅い非天然型基質からでも、高収率で容易に L-アミノ酸が合成できた⁽²⁶⁾。想定される本酵素の反応機構を図 9 に示す。その根拠は次のとおりである。すなわち、本酵素は NADH のビリジン環の 4 位の pro-S 水素を還元を用いること⁽²⁶⁾、sequential な機構で反応が進行すること⁽²³⁾、一次構造においてグルタミン酸脱水素酵素や、その他のアミノ酸脱水素酵素の活性中心と共通のアミノ酸配列が見出されたこと、活性中心の Lys 残基の Ser への置換によって活性が失われたこと⁽³⁴⁾、および反応が L 立体特異的であるこ

表 3 有機溶媒中で D-アミノペプチダーゼを用いる D-アミノ酸誘導体の合成

In Trichloroethane	Yield	In Butylacetate	Yield	In Toluene	Yield
	99%		99%	(D-Ala) ₂	58%
	98%		80%	(D-Ala) ₃	6%
	66%		44%		
	16%				

とである。

この他に、NADH の再生に用いる細菌由来の新しい
 蟻酸脱水素酵素を *Moraxella* 属細菌より単離した⁽³⁵⁾。
 また、フェニルアラニン脱水素酵素と反応機構上類似と
 考えられる新酵素オピン脱水素酵素を *Arthrobacter* 属
 細菌より単離している⁽³⁶⁾。本酵素を用いると、2 個の不
 斉点を有する 2 級アミンジカルボン酸を、保護基なしで
 立体選択的に合成できる。

III. D-アミノペプチダーゼの発見と、D-アミノ酸 および D-アミノ酸誘導体の酵素的合成

本研究は、D-アミノ酸のアミドに選択的に作用する加
 水分解酵素を発見するとともに、諸性質の解明、一次構
 造の決定、大量生産を行い、さらに D-アミノ酸および
 D-アミノ酸誘導体の酵素的合成法の開発に発展させた
 ものである⁽³⁷⁻⁴⁰⁾。

1. D-アミノペプチダーゼの発見と酵素化学的諸性 質の解明

D-アミノ酸の需要は、抗生物質、農薬、食品等の合成
 原料として増加しつつある。D-アミノ酸の合成法は、酵
 素法あるいは化学的光学分割法等によるものであるが、
 さらに新しい方法の開発が望まれている⁽³⁸⁾。従来、L-
 アミノ酸からなる通常のパепチドに作用する酵素につい
 ての知見は、きわめて多く蓄積されていたが、D-アミ
 ノ酸をアミノ末端に含むペプチドや、D-アミノ酸アミ
 ドに選択的に作用する加水分解酵素はまったく知られて
 いなかった。土壌より分離した細菌 *Ochrobactrum an-*
throphi より上記酵素を単離し、「D-アミノペプチダー

図 10 D-アミノペプチダーゼを用いるアラニンア
 ミドからの D-アラニン合成
 D-アラニンアミドからの収率を 100% とし
 ている。

ゼ」と命名するとともに、酵素化学的諸性質を解明し
 た^(41,43)。本酵素は、分子量が約 57,300 の同等なサブユ
 ニット 2 個からなる分子量約 114,500 の蛋白質である。
 本酵素の基質特異性を解明するために多数のアミノ酸誘
 導体を化学合成した。その詳細および酵素の諸性質につ
 いては、他を参照されたい⁽³⁸⁻⁴³⁾。

2. D-アミノ酸および D-アミノ酸誘導体合成への利 用

本酵素を用いると、たとえば、ラセミ体のアラニンア
 ミドのうち、D 体のみを立体選択的に加水分解して D-ア
 ラニンを与える。したがって、本酵素は、ストレッカー
 法により安価に合成できるアミノ酸アミドの、まったく
 新しい光学分割用触媒として有用である。図 10 にアミ
 ドの D 選択的な加水分解による D-アラニンの合成 (220
 g/l) について示した⁽⁴⁴⁾。さらに、本酵素の持つ未知の特

図 11 D-アミノペプチダーゼ (A), カルボキシピプチダーゼ DD (B) および β -ラクタマーゼ (C) が触媒する反応

性を検討し、酢酸ブチル中などの有機溶媒中で D-アミノ酸 *N*-アルキルアミド等の合成 ($k_{cat}=7700 \text{ min}^{-1}$) を効率よく触媒することを明らかにした (表 3)^(45,46)。本法は、アミノ基の保護が不要であり、従来の酵素や化学合成では不可能な高い D 立体選択性を達成している。

3. 遺伝子クローニングと新しい「ペニシリン認識酵素」としての再発見

本酵素遺伝子をクローニングし、一次構造を解明するとともに、単位培養液当りの酵素活性を、野生株の約 3600 倍に増大させることに成功した^(44,47)。きわめて好都合なことに、本酵素をきわめて大量に発現する大腸菌菌体を用いる合成反応では、菌体に含まれる L-アミノ酸アミダーゼや、アミノ酸ラセマーゼ活性による副反応を無視することができる⁽⁴⁴⁾。ところで、本酵素遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を既知蛋白質のそれと比較したところ、カルボキシピプチダーゼ DD や β -ラクタマーゼ等のペプチドグリカン生合成に関連するアミド加水分解酵素「ペニシリン認識酵素」類と相同性を示した^(39,40,47)。それらと相同性のある活性中心と想定される部位の変異体を数種作成した。Ser 61 および

表 4 活性中心近傍に部位特異的変異を導入した D-アミノペプチダーゼの精製酵素の比活性

Mutant	Sequence	Activity (U/mg)
Natural	55 60 65 70 LDTRMPICS VSKQFTCAVLL * ** *	470
Mutant 1	LDTRMPIS S VSKQFTCAVLL	61
Mutant 2	LDTRMPIGS VSKQFTCAVLL	460
Mutant 3	LDTRMPICQ VSKQFTCAVLL	1
Mutant 4	LDTRMPICG VSKQFTCAVLL	—
Mutant 5	LDTRF PICS VSKQFTCAVLL	550
Mutant 6	LDTRMPICS VSNQFTCAVLL	0.06
Mutant 7	LDTRMPICS VSKQFTS AVLL	410

Lys 64 を置換したのものにはほとんど活性が認められず、前記の酵素群における保存配列の Ser-X_{aa}-X_{aa}-Lys が本酵素においても必須であることが判明した (表 4)。このように、蛋白質工学的手法による活性中心付近の相同性の解析⁽⁴⁷⁾、水中や有機溶媒中で発現される著しく速いトランスペプチデーション活性⁽⁴⁵⁾、D-アミノ酸を含むペプチドに対する選択的な作用 (図 11)⁽⁴³⁾、および β -ラクタム化合物による阻害作用を受ける特徴から⁽⁴⁷⁾、

図 12 有機合成化学における酵素の利用

本酵素が「ペニシリン認識酵素」の新しい構成要員であることを提唱したい。第三の「ペニシリン認識酵素」D-アミノペプチダーゼの発見は、 β -ラクタマーゼがカルボキシペプチダーゼ DD から人為的な圧力によって進化したとする Ghuyssen の議論の根拠を薄くするものと考えられる⁽⁴⁸⁾。なお、本酵素は、筆者の知るかぎり、Ser を活性中心とするアミノペプチダーゼとしてはじめての例である。また、一本鎖とした本酵素遺伝子を変異処理し、一アミノ酸置換により温度安定性の向上した変異型酵素を得ている⁽⁴⁹⁾。

以上のように、筆者は、有機合成化学のプロセスに微生物や酵素反応を組み込むことを最終目的として、反応効率や立体選択性に優れた、いくつかの新規微生物酵素の開発に成功した。研究の発端となるスクリーニングは、微生物や酵素を利用しようとする人類が、自然にある微生物に対して最も能動的に働きかけうる手段の1つであると信ずる。さらに、研究のあらゆる局面において化学合成技術や遺伝子組換え技術を駆使することにより、従来の微生物利用技術と有機合成化学との境界領域に新風を吹き込むべく努力している(図 12)。

ニトリルヒドラターゼの発見および有用アミドの生産に関する研究は、京都大学農学部発酵生理学研究室において行われたものであり、御指導をいただいた山田秀明教授および谷 吉樹教授に厚く御礼申し上げます。また、フェニルアラニン脱水素酵素および D-アミノペプチダーゼの開発とその応用に関する研究は、(財)相模中央化学研究所において行われたものであり、御指導、御鞭撻を賜った近藤 聖所長に御礼申し上げます。これらの研究は、共同研究者の協力を得てはじめて達成できた成果であります。御助力をいただいた皆様に深く感謝

いたします。

- (1) 山田秀明, 浅野泰久, 谷 吉樹: 化学と工業, **36**, 101 (1983).
- (2) 谷 吉樹, 浅野泰久, 山田秀明: 発酵と工業, **41**, 382 (1983).
- (3) 浅野泰久: 有機合成化学協会誌, **47**, 749 (1989).
- (4) H. Yamada, Y. Asano, T. Hino and Y. Tani: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 8 (1979).
- (5) 浅野泰久: 有機合成化学協会誌, **49**, 350 (1991).
- (6) 藤代欣也: 京都大学農学部修士論文, 1981.
- (7) A. K. Bandyopadhyay, T. Nagasawa, Y. Asano, K. Fujishiro, Y. Tani and H. Yamada: *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 302 (1986).
- (8) H. Yamada, Y. Asano and Y. Tani: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 495 (1980).
- (9) Y. Asano, S. Ando, Y. Tani and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2497 (1980).
- (10) Y. Asano, S. Ando, Y. Tani and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 57 (1981).
- (11) Y. Asano, Y. Tani and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2251 (1980).
- (12) Y. Asano, K. Fujishiro, Y. Tani and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1165 (1982).
- (13) Y. Asano, M. Tachibana, Y. Tani and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1175 (1982).
- (14) A. K. Bandyopadhyay, Y. Asano, T. Nagasawa, Y. Tani and H. Yamada: *Annu. Rep. I. C. Biotech. Jpn.*, **5**, 123 (1982).
- (15) Y. Asano, T. Yasuda, Y. Tani and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1183 (1982).
- (16) K. Ryuno, T. Nagasawa and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1813 (1988).
- (17) T. Nagasawa and H. Yamada: In "Biocatalysis," ed. by D. A. Abranowicz, Van Nostrand Reinhold, New York, 1990, p. 277.
- (18) 渡辺一郎: バイオサイエンスとインダストリー, **49**, 635 (1991).
- (19) 浅野泰久: 日本農芸化学会誌, **62**, 779 (1988).
- (20) 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.
- (21) W. Hummel, N. Weiss and M.-R. Kula: *Arch. Microbiol.*, **137**, 47 (1984).
- (22) Y. Asano and A. Nakazawa: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3631 (1985).
- (23) Y. Asano, A. Nakazawa and K. Endo: *J. Biol. Chem.*, **262**, 10346 (1987).
- (24) Y. Asano, A. Nakazawa, Y. Hibino, M. Ohmori, N. Numao and K. Kondo: *Eur. J. Biochem.*, **168**, 153 (1987).
- (25) Y. Asano and A. Nakazawa: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2035 (1987).

- (26) Y. Asano, A. Yamada, Y. Kato, K. Yamaguchi, Y. Hibino, K. Hirai and K. Kondo : *J. Org. Chem.*, **55**, 5567 (1990).
- (27) A. S. Gelbard, A. J. L. Cooper, Y. Asano, E. Nieves, S. Filc-DeRico and K. C. Rosen-spire : *Appl. Radiol. Isotopes*, **41**, 229 (1990).
- (28) 浅野泰久, 仲澤章子, 沼尾長徳 : 特開昭 63-129996.
- (29) A. J. L. Cooper, L. K. H. Leung and Y. Asano : *Anal. Biochem.*, **183**, 210 (1989).
- (30) A. J. L. Cooper and Y. Asano : *Anal. Biochem.*, in press.
- (31) N. Okazaki, Y. Hibino, Y. Asano, M. Ohmori, N. Numao and K. Kondo : *Gene*, **63**, 337 (1988).
- (32) Y. Hibino, Y. Asano, N. Okazaki and N. Numao : EPC 87111696.8.
- (33) Y. Asano, K. Endo, A. Nakazawa, Y. Hibino, M. Ohmori, N. Numao and K. Kondo : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2621 (1987).
- (34) 日比野泰雄, 幾島規理子, 浅野泰久, 沼尾長徳, 近藤 聖 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, 1987, p.41.
- (35) Y. Asano, T. Sekigawa, M. Inukai and A. Nakazawa : *J. Bacteriol.*, **170**, 3189 (1988).
- (36) Y. Asano, K. Yamaguchi and K. Kondo : *J. Bacteriol.*, **171**, 4466 (1989).
- (37) 浅野泰久 : ペトロテック, **12**, 42 (1989).
- (38) 浅野泰久 : バイオサイエンスとインダストリー, **48**, 131 (1990).
- (39) 浅野泰久 : *Bioindustry*, **8**, 338 (1991).
- (40) 浅野泰久 : 有機合成化学協会誌, **49**, 314 (1991).
- (41) Y. Asano, A. Nakazawa, Y. Kato and K. Kondo : *Angew. Chem.*, **101**, 511 (1989).
- (42) Y. Asano, T. Mori, S. Hanamoto, Y. Kato and A. Nakazawa : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 470 (1989).
- (43) Y. Asano, A. Nakazawa, Y. Kato and K. Kondo : *J. Biol. Chem.*, **264**, 14233 (1989).
- (44) Y. Asano, K. Kishino, A. Yamada, S. Hanamoto and K. Kondo : *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **110**, 206 (1991).
- (45) Y. Kato, Y. Asano, A. Nakazawa and K. Kondo : *Tetrahedron*, **45**, 5743 (1989).
- (46) Y. Kato, Y. Asano, A. Nakazawa and K. Kondo : *Biocatalysis*, **3**, 207 (1990).
- (47) Y. Asano, Y. Kato, A. Yamada and K. Kondo : *Biochemistry*, in press.
- (48) R. A. Nicholas and J. L. Strominger : *Rev. Infect. Dis.*, **10**, 733 (1988).
- (49) Y. Asano, K. Yamaguchi and A. Yamada : in preparation.