微生物・酵素化学の展望

微生物を利用した有機合成

山 田 秀 明*

Microbiological Synthesis of Organic Compounds

Hideaki YAMADA*

はじめに

最近の応用微生物学の特色の1つとして、微生物を一つの触媒として直接有機化合物の合成、変換に利用する方法が進展しつつある。この手法は従来のアルコール発酵、アミノ酸・核酸発酵などに見られるような微生物の営む生命現象、すなわち複雑な物質代謝を巧みに利用して、安価な炭素源、窒素源から有用な物質を生産する手法とは全く異なって、微生物を単に特定の反応を触媒する酵素、あるいは酵素の袋“bag of enzyme”とみなし、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新しい微生物の捉えかたといえよう。

このような微生物を直接触媒として利用する手法が広く認められるようになったのは、過去に微生物によるステロイドの化学変換の試みが大きな成功を収めたからであろう。カビ、細菌、あるいは酵母はステロイドに作用して水酸化、脱水素、側鎖の切断、あるいは光学分割など多種多様な反応を触媒し、これらのうちいくつかはすでに工業的な意味で利用されている¹⁾。以来、この手法は、とくに化学的方法にとって困難であるような有機化合物の合成、変換にしばしば試みられ、今日では有機酸、アミノ酸、核酸、ビタミン、抗生物質、そのほか種々の生理活性物質の合成・変換に有力な手段として利用されている。これらの詳細については、すでに多くの総説、成書で紹介されており、また本書においてもほかの項で述べられることからここでは省略するが、微生物の基質、あるいは合成および変換反応の組合せはきわめて

多岐にわたり、今後ますます発展することが期待できる。また最近、微生物を固定化する技術が研究され、酵素を熱、pH、有機溶媒、タンパク質変性剤などに対してより安定に用いることが可能となることから、このような微生物を触媒として用いる新しい有機合成反応が、各方面で発展することが期待される。

本項では、微生物酵素を用いるアミノ酸の製法に焦点をしばり、とくに合成という立場から代表的なものとしてアスパルターゼを用いる L-アスパラギン酸の合成と、 β -チロシナーゼおよびトリプトファナーゼを用いる芳香族アミノ酸の合成について述べ、さらに合成法と比較して考察することにする。前者はすでに工業的意味で確立した合成法であり、後者は著者らが、最近約5年にわたって基礎より生産応用まで研究した新しい合成法である。

I. L-アスパラギン酸の合成

1. L-アスパラギン酸の化学的合成²⁾ L-アスパラギン酸は豆もやしなどの植物からの抽出、あるいはタンパク質の加水分解物からの分離などによって得ることができる。しかし大量を安価に得る工業的製造法としては、フマル酸を原料として、これを微生物のアスパルターゼの作用によりアミノ化する酵素的合成法が用いられている。化学的合成法によっても得ることができるが収率、収量ともに酵素法におよばず、しかも DL-体が得られることから光学分割を必要とし、D-アスパラギン酸を必要とする場合をのぞき、酵素法と競合しえない。

DL-アスパラギン酸の化学的合成法としてはフマル酸やマレイン酸を原料とする方法や、ほかのアミノ酸と同様にアミノマロン酸誘導体を用いる方法などがあるが、ここでは後に述べる酵素的合成法と比較する意味で

* 京都大学食糧科学研究所 ()

* The Research Institute for Food Science, Kyoto University ()

前者のフマル酸およびマレイン酸を用いる二、三の方法を紹介する。

i. フマル酸を直接アミノ化する方法³⁾ フマル酸 (1) をアンモニア および 塩化アンモニウムとともに 180°C, 10 気圧で反応して DL-アスパラギン酸 (2) を得る (収率 68%)。

またフマル酸アンモニウムと酢酸アンモニウムを融解することによって DL-アスパラギン酸を得る (収率 70%)。

ii. フマル酸エステルを用いる方法⁴⁾ フマル酸ジエチル (3) にエタノール中でアンモニアを作用させ、生成するアスパラギンのジケトピペラジン (4) を NaOH で加水分解して DL-アスパラギン酸 (2) を得る (収率 96%)

iii. マレイン酸を用いる方法⁵⁾ マレイン酸 (5) をベンジルアミン (6) と反応させ、生成する N-ベンジルアスパラギン酸 (7) をパラジウム触媒で還元すると収率よく DL-アスパラギン酸 (2) が得られる。

これらの化学的方法によって得られる DL-アスパラギン酸を光学分割する方法としては、ほかのアミノ酸の場合と同様にアシラーゼを用いる不斉加水分解法、あるいはギ酸アンモニウムや塩化アンモニウム溶液からの優先

晶析法などがある。

2. L-アスパラギン酸の酵素的合成 フマル酸をアミノ化して L-アスパラギン酸を合成する酵素アスパルターゼは、無機態のアンモニアを有機態のアミノ酸に変換する酵素の 1 つとして生化学的にもきわめて重要であり、植物、微生物に広く分布している。アスパルターゼを応用して、L-アスパラギン酸を合成する試みは、最初住木⁶⁾によって、酵母の静止菌を用いて行なわれた。その後、北原ら、木下ら、千畑ら、そして高橋らはそれぞれ独立に、アスパルターゼを用いる L-アスパラギン酸の工業的製法について検討し、多数の微生物からアスパルターゼ活性の高い菌株を選出し、これらの菌株を直接触媒的に利用してきわめて収率よく L-アスパラギン酸を合成することに成功している。

i. アスパルターゼの性質 アスパルターゼは 1926 年 Guastel⁷⁾ らによって *E. coli* に見いだされた。以後 Gale, Ellfolk, Williams ら、Rudolph ら、そのほか多数の研究者によって研究されてきた。Williams ら^{8,9)} は *Enterobacter aerogenes* (*Bacterium cadaveris*) の生菌体抽出液から本酵素を精製し、はじめてフマラーゼを含まない精製酵素標品を得、本酵素の性質を検討した。本酵素は分子量 180,000, 4 個のサブユニットからなることを報告している。Rudolph ら¹⁰⁾ は *E. coli* B から本酵素を精製し、さきの Williams らと同様に、分子量 170,000, 4 個のサブユニットからなることを報告している。最近徳重ら¹¹⁾ は、*E. coli* W から本酵素を高度に精製して物理化学的に均一な酵素標品を得、本酵素の分子的性質を詳細に研究している。徳重らは、*E. coli* W のアスパルターゼについて、分子量、193,000, SDS 処理によって分子量 48,500 の相等しいサブユニットに分離する 4 量体であることを明らかにしている。

アスパルターゼは EDTA によって阻害され、活性発現に Mg^{2+} , Mn^{2+} , あるいは K^{+} などの金属イオンを必要とする。アスパルターゼにおける金属イオンの役割については多数の研究があるが、いまだに明確でない。最近徳重ら¹¹⁾ は、*E. coli* W の精製酵素を用いて本酵素の金属要求について追求し、本酵素が反応条件、すなわち pH や基質濃度などによって異なった金属要求性を示すことを報告している。

ii. アスパルターゼの機能と触媒機構 アスパルターゼは次式に示す可逆反応を触媒する。本酵素は基質特異

性が高く、ヒドロキシルアミンとヒドラジンはアンモニヤにかわって基質となるが、フマル酸の立体異性体であるマレイン酸や、 β -メチルアスパルターゼの基質であるメサコン酸は基質となりえない¹¹⁾。このような基質特異性と関連して、本酵素によるアンモニヤの離脱、あるいは付加が、トランス型の立体化学的機構で進むことが明らかにされている¹²⁾。

アスパルターゼによる L-アスパラギン酸の合成、分解の平衡は著しく合成の方向に傾いている。Williams らによれば分解反応の平衡恒数は pH 7.2 において 39°C で 20 mM, 20°C で 10 mM とされている¹³⁾。これに対して同様の反応を触媒するフェニールアラニン・アンモニヤ・リアーゼやヒスチジン・アンモニヤ・リアーゼの平衡恒数は 3.0~4.0 M と大きく分解方向に傾いている¹⁴⁾ (表 1)。

表 1 アンモニヤ離脱の自由エネルギー¹⁴⁾

アミノ酸	温度 (°C)	pH	KL (M)	$\Delta G^{\circ}L$ (Kcal/mol)
L-フェニールアラニン	30	6.8	4.3	-0.88
	"	8.5	4.1	-0.83
L-ヒスチジン	25	8.0	3.0	-0.65
β -メチル-L-アスパラギン酸	"	7.9	0.19	0.99
	"	9.7	0.30	0.72
L-アスパラギン酸	"	7.0	4.6×10^{-8}	3.18
	"	8.5	4.9×10^{-8}	3.15

KL, 平衡恒数; $\Delta G^{\circ}L$, 自由エネルギー

アスパルターゼの反応機構について Williams ら¹⁵⁾は、重水素置換反応や重水素効果などの面から追求し、 β -プロトンの置換反応が起こらず、 α -プロトンの重水素効果が見られることから α -カルボニウム中間体の存在を推定しており、アンモニヤ離脱反応が律速段階であることを明らかにしているが、ここでは詳細は省略する。

iii. L-アスパラギン酸の合成

a. アスパルターゼの生成 アスパルターゼは誘導酵素であって、培地の組成あるいは培地条件によって、その生成が著しく影響される。グルコースは本酵素の生成を阻害し¹⁶⁾、この阻害が 3',5'-サイクリック AMP によって除かれることが知られており、またアミノ酸やそのほかの有機態窒素源の添加によって生成が促進されること、あるいは好氣的培養より嫌氣的培養によって高い活性が得られることなどが明らかにされている¹⁷⁾。北原ら¹⁷⁾は *E. coli* No. 2 を用いて本酵素の生成を検討し、かくはん培養によって最も高い活性が得られることを報告している。これらの酵素生成と関連して Williams ら¹⁸⁾は本酵素が 4 量体であり、高い pH 条件での基質の飽和曲線が S 字性を示すこと、また特定の条件下で AMP

や IMP によって活性化を受けることなどから、本酵素はアロステリック酵素であろうと推論している。

b. 酵素的合成 前述のように、北原ら、木下ら、千畑ら、高橋らはアスパルターゼを用いる L-アスパラギン酸の合成について検討し、工業的製造法を確立した。本項では主として北原らの方法¹⁷⁾を紹介する。

北原ら¹⁷⁾は、多数の細菌からアスパルターゼ活性の高い菌株をスクリーニングし、有効菌株として *E. coli* No. 2 を選出した。ついで本菌の乾燥菌体を用いて、L-アスパラギン酸の合成条件、すなわち用いる基質の濃度と種類、反応の pH と温度、さらに生成した L-アスパラギン酸の単離などを検討し、とくにフマル酸アンモニウムが溶解度も高く合成反応に有利であることを見いだした。北原ら¹⁹⁾が設定した酵素的合成法を模式的に示すと図 1 のようである。

図 1 半結晶変換

20% 以上のフマル酸アンモニウムは、反応液中で一部結晶のまま残在するが、アスパルターゼの作用によってしだいに溶液中に移行し、酸性アスパラギン酸アンモニウムに変わり、その高い溶解度のため結局はすべて溶解する。ここで反応液に塩酸を加えて pH を 2.8 とすると L-アスパラギン酸が遊離し、その低溶解度によって晶出する。北原らはこの合成法を半結晶変換 (semi-transcrystallization) と呼んでいる。

実例を示すと、反応液 100 ml にフマル酸アンモニウム (遊離酸として 20 g)、乾燥菌体 0.5 g を加え、37°C pH 7.2~7.4 で 18 時間反応することにより、22.2 g の L-アスパラギン酸が合成される (収率 99.3%)。また同様の反応条件下で、フマル酸アンモニウム (遊離酸として 50 g) と乾燥菌体 1 g から、3 日間の反応により、56.0 g の L-アスパラギン酸が合成される (収率 99.0%)

さらに北原らは、*E. coli* No. 2 の菌体培養液 (broth) を直接触媒的に用い、界面活性剤セチルピリジウムクロライドの存在下で 10 g のフマル酸をアンモニウム塩として加え、7.9 g の L-アスパラギン酸を合成している。

これらの北原らの研究と独立して、木下らは²⁰⁾ *Bacillus megaterium* を用い、千畑ら²¹⁾は *E. coli* を用い、

さらに高橋ら²³⁾は *Erwinia herbicola* を用い、それぞれきわめて高収量に L-アスパラギン酸を合成することに成功している。またマレイン酸は細菌の生成する誘導酵素シス・トランスイソメラーゼによってフマル酸に変換することが知られているが²³⁾、尾崎ら²⁴⁾は *Alkaligenes faecalis* の生成するシス・トランスイソメラーゼとアスパルターゼの協同作用により、マレイン酸から L-アスパラギン酸を合成する方法を報告している。これらについては省略する。

II. L-チロシン関連アミノ酸の合成

1. i L-チロシンの化学的合成²⁵⁾ L-チロシンの工業的製法としては化学的合成法や発酵法にともにすぐれた方法がなく、このものが水に難溶性であることから、現在は天然タンパク質の加水分解物からの分離によって製造されている。L-チロシンの合成法については、L-フェニルアラニンのそれと同じように、アミノマロン酸誘導体を用いる方法、ヒドロキシイミノ酸を経由する方法、アルデヒドと活性メチレンの縮合による方法、そのほかの方法があるが、水酸基があるためにより工程が多くなり、しかも DL-体として得られるため光学分割を必要とする。よって将来有効な合成法の開発が待たれている。

ii L-ドーパ (3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン) の化学的合成 最近 L-ドーパがパーキンソン氏病に対してすぐれた治療効果を示すことが明らかにされ、すでに医薬としての発売が許可されている。パーキンソン氏病は脳の中枢神経系における病変で、50才前後から発病する老人病である。わが国においては約 3~5 万人、欧米においては 50 万人以上の患者がいるといわれている。この治療に要する L-ドーパの投与量は、1 日 1 人 3~5 g であり、全患者に投与する場合、年間の必要量はきわめて多量である。

現在、L-ドーパの製造は化学的合成法で行なわれている。そのおもなものを述べると、3,4-ジヒドロキシベンツアルデヒド、およびその水酸基の保護された誘導体、すなわちピペロナール、パニリン、ベラトルムアルデヒドなどを出発物質とする方法が知られている²⁶⁾。

なお最近開発された新しい化学的合成法として、アクリロニトリル (8) を用いる方法²⁷⁾がある。この方法は原理的にはピロカテコール核を、合成されるドーパの β -位の炭素原子に直接縮合させるものであり、後述する酵素法と対比してみると興味深い。まずアクリロニトリルを塩素化して得られる 2,3-ジクロロプロピオニトリル (9) を、ピロカテコールまたはその *o*-置換体、ルイ

ス酸を触媒としてフリーデルクラフツ反応を行ない、 α -クロル- β -(3,4-ジオキシフェニル)-プロピオニトリルまたはその *o*-置換体 (10) を得る。このニトリル誘導体を加水分解およびアミノ化して DL-ドーパ (11) を得るものである。

このような方法によって合成されるドーパは DL-体であり、L-ドーパを得るために光学分割を必要とする。光学分割法としては通常用いられる酵素アシラーゼによる不斉加水分解法と、ジアステレオマー塩の溶解度の差を利用する化学的方法があり、さらに最近は優先晶析法による方法が報告されている。

3. L-チロシン関連アミノ酸の酵素的合成²⁸⁾ 著者らはフェノールを遊離する酵素として知られている β -チロシナーゼ (チロシン・フェノール・リアーゼ) がシステイン、セリンなどのアミノ酸、あるいはピルビン酸とアンモニヤ、とフェノールから L-チロシンを合成する反応を顕著に触媒することを見いだした。この β -チロシナーゼによる合成反応は一方の基質であるフェノールを種々換えることによって、対応する種々の L-チロシン関連アミノ酸を合成でき、また酸化的条件を必要としないため過酸化物の生成がないなど、とくに L-ドーパの合成に、利点を有している。以下 β -チロシナーゼの諸性質とそれを応用した L-チロシンおよび L-ドーパの酵素的合成法について述べる。

i. β -チロシナーゼの諸性質 1953 年柿原、市原²⁹⁾は人の腸内細菌の一種 *Bacterium coli phenologenes* が L-チロシンよりフェノールを遊離することを見だし、この反応を触媒する酵素を β -チロシナーゼと命名した。その後、Brot ら³⁰⁾は本酵素を *Clostridium tetanomorphum* に見だし、部分精製して性質を報告している。著者ら³¹⁾は本酵素が *Escherichia*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Proteus* などの通性嫌気性菌に属する多くの細菌が、L-チロシンを含む培地に生育するとき適応的に生成されることを見だし、これらの一菌株 *Escherichia intermedia* の菌体抽出液より本酵素をはじめて結晶状に単離することに成功した。その後著者

ら³²⁾は *Erwinia herbicola* の菌体からも本酵素を結晶化することに成功している (図2)。

A: *Escherichia intermedia* の酵素
B: *Erwinia herbicola* の酵素

図2 β -チロシナーゼの結晶写真

*E. intermedia*³³⁾ および *Erwinia herbicola*³²⁾ の β -チロシナーゼの物理化学的性質を表2に示した。 β -チロシナーゼはピリドキサルリン酸 (PLP) 酵素であり、活性発現には酵素1分子あたり2分子の PLP を必要とする。なお PLP はアポ酵素のリジン残基の ϵ -アミノ基とアルギニン結合してホロ酵素を構成することが明らかにされている。

表2 β -チロシナーゼの物理化学的性質

性 質	数 値	
	<i>Escherichia intermedia</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 m μ	8.37	8.08
$E_{280\text{m}\mu}^{0.5\%}/E_{280\text{m}\mu}^{1\%}$	0.54	0.55
$S_{20,w}^0$	7.77S	8.24S
$D_{20,w}$	4.42D	3.08D
分子量	170,000	259,000
PLP 結合数	2	2

ii. β -チロシナーゼの触媒機能³⁴⁻³⁶⁾ 結晶 β -チロシナーゼを用いて行なった著者らの研究から、 β -チロシナーゼはつぎの4種の異なった反応を触媒する多機能酵素 (multifunctional enzyme) であることが明らかにされている。

[1] 式はアミノ酸の分解反応 (α , β -elimination) であって L -チロシンのみならず β -位に置換基をもつアミノ酸、システイン、セリンなどにも作用してピルビン酸とアンモニアを遊離する。[2] 式は置換反応 (β -replacement) であり、種々のフェノール類の存在下で上記のアミノ酸と反応し、種々の新しい L -チロシン関連アミノ酸を合成する。この置換反応の一方の基質となるフェノール類と、それらから合成される L -チロシン関連アミノ酸を表3に示した。

表3 β -チロシナーゼの置換反応の基質フェノール類と合成されるアミノ酸

有 効 基 質	ア ミ ノ 酸
フェノール	L -チロシン
<i>o</i> -クレゾール	<i>o</i> -メチル- L -チロシン
<i>m</i> -クレゾール	<i>m</i> -メチル- L -チロシン
ピロカテコール	3,4- L -ドーパ
レゾルシノール	2,4- L -ドーパ
ピロガロール	2,3,4-トリヒドロキシフェニール- L -アラニン
ヒドロキシヒドロキノ	3,4,6-トリヒドロキシフェニール- L -アラニン

式 [3] はラセミ化反応 (racemization) であって、 L -または D -アラニン、セリン、システインなどから DL -体 (ラセミ体) を生成する。なおさきの分解反応、置換反応は D -体のアミノ酸を基質としても進み、しかも置換反応においては L -体のチロシン関連アミノ酸のみを合成する。この D -体のアミノ酸にも作用するという β -チロシナーゼの性質は、本酵素がラセミ化反応をも触媒することと関連するものであって、ほかのアミノ酸代謝に関与する酵素に見られないきわめて特異なものといえよう。

[4] 式は合成反応 (分解反応の逆反応 (reverse of α , β -elimination)) であり、比較的高濃度のアンモニアの

存在においてピルビン酸と種々のフェノール類から種々の新しい β -チロシン関連化合物を合成する。適当な反応条件下ではこの合成反応の速度は分解反応のそれよりむしろ大であり、また分解・合成の平衡も合成に寄っていることなどが明らかになっている。

なおこれらの4種の反応のうち分解反応、置換反応については同種の反応がトリプトファンゼで報告されており、またラセミ化反応はラセマーゼで知られているがピルビン酸とアンモニアからの β -チロシンの合成反応は著者らが β -チロシンナーゼの研究ではじめて見いだした特筆すべき反応であって、後述するように本酵素の作用によってピルビン酸とアンモニアから α -アミノアクリル酸が生成し、これにさらにもう一つの基質 ($R_{II}H$) が付加して対応するアミノ酸が合成されるものと考えられる。この種の合成反応はのちにトリプトファンゼやシステインデスルフィドラーゼでも証明させている。

iii. β -チロシンナーゼの反応機構^{34~39)} β -チロシンナーゼは前述のように4種の反応を触媒するが、著者らはこれらを発現する機構として図3および図4に示すような反応模式を提出した。この機構の詳細についてはすでに総説としても述べているので本項では省略し、模式の説明のみ述べる。

図4 β -チロシンナーゼの反応模式 (II)

図3においてEは β -チロシンナーゼのホロ酵素、ESはアルジミン転位によって基質アミノ酸と酵素(に結合したPLP)の間に生成したアルジミン中間体(酵素-基質複合体)、EXはESのアミノ酸の α -位のプロトンが脱離して生成したケチミン中間体を示している。またEAはEXのアミノ酸の β -置換基が脱離して生成した酵素- α -アミノアクリル酸複合体を示している。この模式において、 β -チロシンナーゼの触媒する分解反応は

図3 β -チロシンナーゼの反応模式 (I)

この反応経路で進み、また置換反応はさきの図において、

の経路で進むものと考えられる。すなわちフェノール類 (R'H) は式 [6] において EA のピルビン酸とアンモニヤへの分解を抑制し、これをトラップして新しい L-チロシン関連アミノ酸の合成へと反応を導くわけである。またラセミ化反応は

酵素- α -アミノアクリル酸複合体 (EA) の合成・分解は図 4 に示すような機構で進むものと推論される。E-NH₃ はアルジミン転位によってアンモニヤと酵素 (に結合する PLP) の間に生成したアルジミン中間体 (酵素-アンモニヤ複合体), EA' および EA は E-NH₃ とピルビン酸とが反応して生成する反応中間体および酵素- α -アミノアクリル酸複合体を示す。 β -チロシナーゼは EA' $\rightleftharpoons$ EA の脱水・加水反応を触媒し、とくに反応を重水中で行なうときピルビン酸の 3 位の水素を重水素と置換する。

図 4 および図 3 において、 β -チロシナーゼの触媒する合成反応 (分解反応の逆反応) は

この反応経路で進むものと考えられる。

IV. L-チロシン関連アミノ酸の合成 結晶 β -チロシナーゼを用いて得た前述の知見をもとにして、著者らは β -チロシナーゼを用いる L-チロシンおよび L-ドーパの合成について研究を進めているが、現在までに得られた結果について概略を記す。

a. β -チロシナーゼの生成⁽⁴⁰⁾ 著者らは L-チロシンを含む天然培地に生育し、また DL-セリンとフェノール、あるいはピロカテコールから、それぞれ L-チロシン、あるいは L-ドーパを合成する能力の高い菌株をスクリーニングし、有効菌株として *Erwinia herbicola* を選出した。*Erwinia herbicola* はグラム陰性、周鞭毛を有する桿菌で、通性嫌気性であり、稲や麦などの穂に広く分布している細菌である。

ついで著者らは *Erwinia herbicola* を用いて、本菌による β -チロシナーゼの生成に及ぼす培養諸因子の影響について検討した。*Erwinia herbicola* は本来その生

育に特別な生育因子 (growth factor) を要求しないが、ある種のビタミン-ビタミン B₆ (PN)-やアミノ酸-DL-メチオニン、DL-アラニン、グリシン-は菌の生育とは無関係に β -チロシナーゼの生成を促進する。

β -チロシナーゼは誘導酵素であり、培地に添加した L-チロシンによって誘導的に生成される。したがって β -チロシナーゼの生成には inducer として L-チロシンの添加が必須である。しかし培地に添加する L-チロシンの濃度が高くなると、L-チロシンから遊離するフェノールによって菌の生育が阻害され、 β -チロシナーゼの生成も阻害される。L-フェニールアラニンは、それ自身は inducer として作用しないが、L-チロシンと同時に添加すると L-チロシンによる誘導効果を synergistic に高める。すなわち coinducer として作用する。

一般に誘導酵素の誘導においてグルコースが阻害的に作用し (glucose effect), この阻害を 3',5'-サイクリック AMP が除去することが知られているが、 β -チロシナーゼの生成においてもグルコースは阻害的である。

このように著者らは β -チロシナーゼの生成のための培地の組成について検討し、表 4 に示す培地を最適培地

表 4 β -チロシナーゼ生成の最適培地

L-チロシン	0.2%
KH ₂ PO ₄	0.2 "
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 "
ピリドキシン・塩酸	0.01 "
グリセロール	0.6 "
コハク酸	0.5 "
大豆タンパク質加水分解物	12 ml/dl
DL-アラニン	0.2%
グリシン	0.05 "
DL-メチオニン	0.1 "
L-フェニールアラニン	0.1 "
Fe ⁺⁺	2 ppm
pH (KOH)	7.5

とした。*Erwinia herbicola* は表に示した培地に 28°C で 28 時間、pH 7.5 で通気培養するとき β -チロシナーゼを顕著に生成し、その量は実に全菌体タンパク質の十数パーセントに及ぶのであって、したがって得られる菌体、あるいは菌体培養液を直接触媒的に用いることが可能である。

b. 酵素の合成⁽⁴⁰⁾ L-チロシン および L-ドーパの合成は β -チロシナーゼの置換反応、あるいは合成反応 (分解反応の逆反応) によるものである。前者においては [2] 式に見られるように、基質として用いるアミノ酸の種類によって R_I と R_{II} の交換の結果 R_IH が遊離し、これが続いて起こる反応に阻害的に作用する。この意味

で L-チロシンおよび L-ドーパの合成には R_I が OH, SH, そのほか (*p*-Hydroxyphenyl 以外) のアミノ酸が基質として適している。とくにセリンはほかのアミノ酸に比べて反応速度は低い L-体と D-体に差がなく, したがって化学合成法によって比較的安価に得られる DL-体を用いることが可能であり適している。また後者の反応においてはピルビン酸を基質とするが, ピルビン酸はそれ自身が不安定であり重合して黄色物質をつくり易い。また後述するように L-ドーパと spontaneous に縮合して環状化合物を副生する。したがって L-チロシンおよび L-ドーパの合成には反応に必要な最低濃度を設定し, この濃度を保つよう反応中フィードする必要がある。ともあれピルビン酸は, ビタミン B_1 欠乏下で生育する *Mucor mandshuricus*, *Pseudomonas aeruginosa*, そのほか酵母などが培地中に著量生成蓄積することが知られ, 容易にしかも安価に供給されることから L-チロシンおよび L-ドーパの合成のため最も経済的に有利な基質と考えられる。

L-チロシンおよび L-ドーパの合成反応において, もう一方の基質であるフェノールおよびピロカテコール ($R_{II}H$) はいずれもタンパク質に作用して変性失活せしめる。 β -チロシナーゼにおいても, 著者らが結晶酵素を用いて行なった実験では, フェノールは 75 mM (約 0.7%), ピロカテコールは 50 mM (約 0.6%), これ以上の濃度で酵素タンパク質を変性, 沈殿せしめる結果が得られている。したがって菌体を用いる合成反応を行なうにあたってフェノール濃度を 1.0% に, またピロカテコール濃度を 0.6~0.8% に保ちつつ分割フィードして反応する必要がある。

(a) 置換反応による合成 *Erwinia herbicola* の生菌体を直接触媒的に用い, DL-セリンを基質とする L-チロシンおよび L-ドーパの合成の反応条件について述べる。

反応の最適 pH は 8.0~8.5, 最適温度は L-チロシンで 40°C, L-ドーパでは 20~25°C である。L-ドーパは空気酸素によって酸化され, 褐変することからあらかじめ反応液に Na_2SO_4 と EDTA を添加して酸化を防ぐ必要がある。著者らはそのほか合成反応条件について種々検討し, 図 5, 6 の“反応条件”に示したような条件を設定した。触媒として用いる *Erwinia herbicola* の生菌体量は, 反応液と等量の培養液から得られる菌体の全量とし, 添加して反応を行なった。このような反応条件下で L-チロシン合成はすみやかに進み 16 時間で完了し, 4.0 g の DL-セリンより約 5.5 g の L-チロシンが合成される (収率約 80%) (図 5)。また L-ドーパ合成

反応液 (100 mL), DL-セリン 4 g, 酢酸アンモニウム 1 g, フェノール 1 g (2 時間ごとに補充添加) 菌体: 反応温度 37°C : pH 8.0

図 5 DL-セリンを基質とする L-チロシンの合成反応

反応液 (100 mL), DL-セリン 2 g (8 時間後および 16 時間後に 1 g ずつ補充添加), 酢酸アンモニウム 1 g, ピロカテコール, Na_2SO_4 0.2 g, EDTA 0.1 g, 菌体: 反応温度 22°C : pH 8.0

図 6 DL-セリンを基質とする L-ドーパの合成反応

はゆるやかに進み約 48 時間を経て, 4.0 g の DL-セリンより約 5.3 g の L-ドーパが合成される (収率約 70%) (図 6)。このように合成された L-チロシンおよび L-ドーパはいずれも水に対する溶解度がきわめて低いことから反応液中に結晶として析出し, 容易に分離, 精製することができる。

(b) 合成反応 (分解反応の逆反応) による合成 前述

のようにピルビン酸は L-チロシンおよび L-ドーパの合成にとって良い基質であるが、それ自身不安定であるので、反応にさいしては過剰な添加をさけ必要な最低濃度を保つことが望ましい。とくに L-ドーパ合成において、基質のピルビン酸の濃度が高くなると環状化合物を著量に副生し、L-ドーパの収量を低下する。著者らはこの環状化合物の成因と構造について追求し、図 7 に示す反

図 7 副生物 X-I および X-II の生成機構

応機構を明らかにした。図に示すように酵素的に合成された L-ドーパは過剰に存在するピルビン酸と、いわゆる Pictet-Spengler 反応⁽⁴⁾によって spontaneous に縮合して X-I を生成し、X-I はさらに酸化と脱炭酸を受けて X-II を生成する。なお X-I は豆類の水抽出液中に存在することが報告されている。

著者らは種々検討して、図 8, 9 の“反応条件”に示すような条件を設定した。この条件下で L-チロシンの合成は約 12 時間で完了し、4.0 g のピルビン酸ソーダを

反応液 (100 mL), ピルビン酸ソーダ 0.8 g (2 時間ごとに補充添加), 酢酸アンモニウム 5 g, フェノール 1 g (2 時間ごとに補充添加), 菌体: 反応温度 37°C: pH 8.0

図 8 ピルビン酸を基質とする L-チロシンの合成反応

反応液 (100 mL), ピルビン酸ソーダ 0.5 g (2 時間ごとに補充添加), 酢酸アンモニウム 5 g, ピロカテコール 0.8 g (2 時間ごとに補充添加), Na_2SO_3 0.2 g, EDTA 0.1 g, 菌体: 反応温度 16°C: pH 8.0

図 9 ピルビン酸を基質とする L-ドーパの合成反応

消費して 6.0 g の L-チロシンが合成される (収率約 76%) (図 8, 10)。また L-ドーパの合成は約 48 時間を経て、4.0 g のピルビン酸を消費して 6.0 g の L-ドーパが合成される (収率約 74%) (図 9, 11)。なお *Erwinia herbicola* の生菌体量は DL-セリンからの合成と同量を用いている。このように合成された L-チロシンおよび L-ドーパは、置換反応による合成の場合と同様に、反応液中に結晶として析出する。

図 10 L-チロシンの酵素的合成

左, 反応後; 右, 反応前

図 11 L-ドーバの酵素的合成

III. L-トリプトファン関連アミノ酸の合成

1. i. L-トリプトファンの化学的合成⁴²⁾ L-トリプトファンの製法には抽出法, 発酵法および化学的合成法がある。抽出法はトリプトファンがタンパク質を加水分解したとき分解しやすく, またアルカリ加水分解したときにはラセミ化をおこすため実施しえない。また発酵法ではアントラニル酸, あるいはインドールを前駆体として添加する方法が研究されているが, 収量・収率ともに十分といえない。現在工業的には化学的合成法, すなわち DL-トリプトファンを合成し, 光学分割を行なって L-トリプトファンを製造する方法が実施されている。

DL-トリプトファンの合成法は, 大別して, インドールから出発する方法と, 合成の過程でインドール核を形成して行く方法とがある。現在インドールが比較的高価であるため, 工業的製造法としては後者が有利であり, とくに β -シアンプロピオアルデヒドを原料とする方法はすでに工業化され, 実施されている⁴³⁾。

本項では後に述べる酵素的合成法と対比する目的で, インドールを用いる化学的合成法の二, 三の例を紹介する。

a. アミドマロン酸誘導体と縮合する方法⁴⁴⁾ インドール (12) をピペリジルメチルホルムアミドマロン酸エチル (13) と直接縮合させる方法であり, 縮合は NaOH を含む沸騰キシレン中で行ない, 生成するスカチルホル

ムアミドマロン酸エチル (14) を加水分解して DL-トリプトファンを得る (収率 57%)。

b. アクリル酸誘導体と縮合する方法⁴⁵⁾ インドール (12) を酢酸, 無水酢酸の存在下で α -アセトアミドアクリル酸 (15) と縮合させ, アセチル-DL-トリプトファン (16) を合成する (収率 57%)。

c. メチレンオキサゾロン誘導体と縮合する方法⁴⁶⁾

インドール (12) に 2-フェニル-4-クロロメチレン-5-オキサゾロン (17) を縮合させ, 生成する 2-フェニル-4-[3'-インドリルメチレン]-5-オキサゾロン (18) をアルカリおよび酸で処理して α -ベンズアミド- β -(3'-インドリル) アクリル酸 (19) としたのち, Raney ニッケルによる水添および加水分解して DL-トリプトファンを得る。

上に述べた 3 種の化学的合成法は, いずれも原理的にインドール核を合成されるトリプトファンの β -位の炭素原子に直接縮合させるものであり, とくに b のアクリル酸誘導体と縮合させる方法は, 後述するトリプトファンナーゼによる酵素的合成法と同一の合成反応機構が推論され興味深い。

このような方法によって合成されるトリプトファンは DL-体であり, L-トリプトファンを得るために光学分割を必要とする。光学分割法としては, ほかのアミノ酸の場合と同様にアシラーゼによる不斉加水分解法, あるいは優先晶析法が工業的製造に用いられている。

ii. インドール関連化合物の化学的合成 インドー

ルの化学的合成法については古くから種々の方法が報告されているが、最近 *o*-ニトロトルエンを原料とする新しい方法⁽⁷⁾が報告されたので紹介する。すなわち *o*-ニトロトルエンおよびその各種誘導体 (20) を出発物質として、これを *N,N*-ジメチルフォルムアミドジメチルアセタールと縮合させ、スチレン化合物 (21) を得る。さらにこのスチレン化合物 (22) を還元的に閉環してインドールおよびその各種誘導体 (22) を得る。この方法は収率もよく、インドールの各種置換体が合成できることから、後に述べる酵素的合成法の基質を供給するという意味でも、将来工業的製造法として利用されるものと考ええる。

2. L-トリプトファン関連アミノ酸の酵素的合成⁽²⁸⁾

著者らは前述の β -チロシナーゼを用いる L-チロシン関連アミノ酸の合成研究で得た知見をもとにして、トリプトファナーゼ(トリプトファン・インドール・リアーゼ)を用い、ピルビン酸、アンモニアおよびインドール、あるいは 5-ヒドロキシインドールを基質とし、L-トリプトファン、あるいは 5-ヒドロキシ-L-トリプトファンを合成する研究を行なっている。以下その概要を記す。

i. トリプトファナーゼの諸性質 トリプトファナーゼは 1953 年 Happold ら⁽⁴⁸⁾によって *E. coli* に見いだされ、命名された。市原ら⁽⁴⁹⁾は、Happold らと独立に *E. coli* によるインドール生成について研究し、本酵素をタンパク質部分と補酵素に分離した。Wood ら⁽⁵⁰⁾はこの補酵素が PLP であることを証明した。その後、市原ら、DeMoss ら、Snell らは本酵素について、主として *E. coli* を用いて研究し、1964 年 Snell ら⁽⁵¹⁾は *E. coli* の L-トリプトファン要求株より得られる 1 変異株が本酵素を構成的に生成することを見だし、この菌の菌体抽出液よりはじめて結晶化することに成功した。その後、DeMoss ら、Goldberg らによって *E. coli* K12 から、また DeMoss らによって *Bacillus subtilis* から精製されている。著者らは、トリプトファナーゼの細菌における分布について調べ、*Proteus* に属する細菌が L-

トリプトファンを含む培地に生育するとき、適応的にしかも著量に本酵素を生成することを見だし、その 1 菌株 *P. rettgeri* の生菌体抽出液より結晶状 (図 12) に

図 12 トリプトファナーゼ (*Proteus rettgeri*) の結晶写真

単離した^(52,53)。 *E. coli* および *P. rettgeri* の結晶トリプトファナーゼの物理化学的性質を比較して表 5 に示す⁽⁵²⁻⁵⁴⁾。構成的に得られる *E. coli* の酵素も、また誘導的に得られる *P. rettgeri* の酵素も、性質はきわめて類似であり、いずれも 4 量体であって酵素 1 分子あたり

表 5 トリプトファナーゼの物理化学的性質

性 質	数 値	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus rettgeri</i>
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 $m\mu$		11.0
$E_{280\text{m}\mu}^0/E_{280\text{m}\mu}$		0.64
$S_{20,w}^0$	10.50 (K^+)	10.30
$D_{20,w}$		4.84
分子量	220,000	210,000
PLP 結合数	4	4
極大吸収(>280 $m\mu$)		
pH=7.0	425 $m\mu$	420 $m\mu$
pH=8.0	330 $m\mu$	420 $m\mu$

4 分子の PLP と結合して酵素活性を発現する。わずかにそれらの分光学的性質に差異が見られるが、詳細については省略する。

ii. トリプトファナーゼの触媒機能 Snell らは *E. coli* の結晶トリプトファナーゼを用い、本酵素の触媒機能について研究し、本酵素が L-トリプトファンのみならず、L-システイン、L-セリンなどのアミノ酸の分解反応 (α, β -elimination, 式〔9〕) および置換反応 (β -replacement, 式〔10〕) を触媒することを明らかにした。

これらの触媒機能の詳細については省略するが、トリプトファナーゼによって触媒される反応は、前述の β -チロシナーゼのそれと類似し、分解反応において前者は L-トリプトファンが最良基質であり、L-チロシンには作用しないのに対し、後者では L-チロシンが最良基質であって L-トリプトファンには作用しない。また置換反応では、前者はインドール類を一方の基質 (R_{II}H) とするが、後者はフェノール類を基質とする。両者の触媒機能の最も著しい相違は、 β -チロシナーゼはラセミ化反応を触媒し、D-体のアミノ酸をも基質とするが、トリプトファナーゼは L-体のアミノ酸のみに作用し、D-体には作用しない点である。

上に述べたようにトリプトファナーゼが β -チロシナーゼときわめて類似した触媒機能を示すことから、著者ら⁵⁵⁾はトリプトファナーゼも分解反応の逆反応、すなわちピルビン酸、アンモニアおよびインドールから L-トリプトファンを合成する反応を触媒するであろうと考え *P. rettgeri* の結晶酵素を用いて検討した。*P. rettgeri* の結晶トリプトファナーゼは、比較的高濃度のアンモニアの存在において、[11] 式にしたがって、ピルビン酸

$$\text{R}_{\text{II}}\text{H} + \text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H} + \text{NH}_3 \longrightarrow \text{L-R}_{\text{II}}\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \cdots \cdots [11]$$

とインドールより L-トリプトファンを合成する反応を触媒する。適当な反応条件下ではこの合成反応の速度は分解反応のそれとほとんど差がない。5-メチル-, 5-ヒドロキシインドールなどは、インドールにかわって基質となり、それぞれ 5-メチル-, 5-ヒドロキシ-L-トリプトファンなどを合成する。なおこのトリプトファナーゼによる合成反応は、著者らとほとんど同時に、Snell ら⁵⁶⁾によって *E. coli* の結晶酵素を用いて報告されている。

iii. トリプトファナーゼの反応機構 *E. coli* の結晶トリプトファナーゼを用いて、Snell らはトリプトファナーゼの反応機構を詳細に追求しているが、この機構については森野⁵⁴⁾によって総説されているのでここでは省略する。また合成反応の機構について、Snell ら⁵⁵⁾は、主として kinetics の面から追求し、さらに β -チロシナーゼを用いて著者らが提出したもの (図 4 参照) と同様な反応模式を提出している。

iv. L-トリプトファン関連アミノ酸の合成

a. トリプトファナーゼの生成 著者ら⁵⁷⁾は、L-トリプトファンを加えた天然培地に生育し、ピルビン酸、アンモニアおよびインドールから L-トリプトファンを

合成する活性の高い菌株をスクリーニングし、*P. rettgeri* を選出した。ついで著者ら⁵⁸⁾は *P. rettgeri* を用いて、本菌によるトリプトファナーゼ生成のための培養条件について検討した。

前述のように *P. rettgeri* のトリプトファナーゼは誘導酵素であり、酵素の生成には inducer として L-トリプトファンの培地への添加が必要である。しかし培地中の L-トリプトファン濃度が高くなると、遊離するインドールによって菌の生育が著しく阻害され、酵素の生成が停止する。よって著者らはこの阻害を除くため、種々の表面活性剤を培地に添加し、その効果を検討した。その結果、非イオン性表面活性剤の 1 つであるソルポール (ポリオキシエチレン・アルキルフェニール・エーテル) がきわめて有効であって、インドールとミセルを形成して除去し、菌の正常な発育と酵素の良好な生成が得られることが明らかになった (図 13)。そのほか種々検討し 表 6 に示す培地を最適培地とした。*P. rettgeri* は

酵素活性, L-トリプトファン合成量 (mg/ml)
(図中の数値は培地添加ソルポールの濃度 (%))

図 13 トリプトファナーゼの生成におよぼすソルポールの効果

表 6 トリプトファナーゼ生成の最適培地

L-トリプトファン	0.6 %
大豆タンパク質加水分解物	1.0 "
コーンスチープ液	6.0 "
ソルポール W-200	4.0 "
酵母エキス	0.3 "
L-シスチン	0.06 "
DL-メチオニン	0.03 "
L-プロリン	0.03 "
L-アルギニン	0.06 "
コハク酸	0.3 "
KH ₂ PO ₄	0.3 "
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 "
pH (KOH)	7.0

この培地で 28°C, 16 時間, pH 7.0 で振とう培養するとトリプトファナーゼを著量に生成し, 菌体, あるいは菌体培養液を直接触媒として合成反応に利用することが可能である。

b. 酵素的合成^{58,59)} 上記の *P. rettgeri* の菌体培養液を直接触媒とし, ピルビン酸, アンモニアおよびインドールを基質とする L-トリプトファン の合成の反応条件について述べる。

反応の至適 pH は 8.5~9.0, 至適温度は 33~35°C, インドールは不溶性のためあらかじめメタノールに溶かして反応液に加える。また著者らはイノシンがトリプトファンと不溶性複合体を形成することに着目し, あらかじめイノシンを反応液に添加する反応条件を設定した。このような条件下 (図 14, 反応条件参照) で L-トリプ

図 15 L-トリプトファンの酵素的合成

反応液 (120 ml), ピルビン酸ソーダ 8g, 酢酸アンモニウム 8g, インドール 6g, イノシン 14g, メタノール 10 ml, Na_2SO_4 0.1g, PLP 0.01g, 菌体培養液 100 ml: 反応温度 34°C : pH 8.8

図 14 ピルビン酸を基質とする L-トリプトファンの合成反応

あとがき

以上アミノ酸の合成を例にとり, 微生物を用いる有機合成反応について概説した。微生物酵素を用いるアミノ酸の製法としては, 上記の3種の製法のほかに, 脱炭酸酵素を用いる L-アラニンや L-リジンの製法, デイミナーゼを用いる L-シトルリンの製法, あるいはトランスアミナーゼや水酸化酵素を用いる L-ドーパの製法が報告されている。また最近 DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムに L-アミノラクタム加水分解酵素とアミノラクタム・ラセマーゼを同時に作用させ, きわめて高収量に L-リジンを製造する酵素的製法も開発されている⁶⁰⁾。これらについては合成という立場で, また紙面の都合もあり省略した。

トファンの合成はきわめて良好に進み, 反応 48 時間で 8.0g のピルビン酸ソーダと 6.0g のインドールから 10g の L-トリプトファンが合成される (収率; インドールに対して約 96%, ピルビン酸に対して約 67%)

(図 14, 15)。触媒としての菌体培養液は 100 ml を用いた。このようにして合成された L-トリプトファンはすべてイノシン複合体として反応液中に析出するため, 容易に単離, 精製することができる。

なお 5-ヒドロキシインドールを用いて, L-トリプトファンと同様に, 5-ヒドロキシ-L-トリプトファンを合成することができるが, 詳細は省略する。

前にも述べたように, 微生物酵素を用いる合成反応においては, 菌体, またはその培養液を直接酵素源として, 高濃度の基質の存在下で触媒的に用いるのが通例になっている。したがって菌体が良好に生育し, しかも菌体内に著量の酵素が生成蓄積するような菌株の選択, 育種と培養条件の設定が必要である。たとえば β -チロシナーゼやトリプトファナーゼにおいては, inducer のほかにある種のビタミンやアミノ酸が, 菌の生育とは無関係に酵素の生成を促進することが見いだされ, 最適条件下では, 生育する菌体の全タンパク質の十数パーセントが酵素であるような菌体を得ることが可能である。また L-チロシンや L-トリプトファンの合成においては, 培地に inducer としてそれらを添加する必要がある, 一

見矛盾しているように感ずるが、生育した菌体は培地に添加した L-チロシンや L-トリプトファンの数十倍におよぶこれらのアミノ酸を合成する触媒活性をもつのであって、このような微生物の非合目的とさえ思える酵素生成能が、微生物を用いる合成反応の成立の第一の要因となっていることが強調される。

また可逆反応を触媒する酵素を用いて合成反応を行なう場合には、反応生成物が不溶性であるか、あるいは不溶性複合体を形成するような試薬を共存せしめて生成物を不溶化することが、反応を合成方向へ導き、収率を高める主要な因子となっている。著者らが行なった L-チロシンや L-ドーパの合成は前者であり、また後者としては、L-トリプトファンの合成において、イノシンを添加する反応条件を設定し、生成する L-トリプトファンをイノシン複合体として反応液中に析出せしめることによって、収率を著しく高めることに成功している。このような手法は、すでに酵素を用いるステロイドの変換や、有機酸の製法にしばしば用いられ、結晶発酵として注目されている。

また最近、酵素、あるいはそれを含む菌体そのものを固定化する研究が進んでいる。酵素を固定化すると熱、pH、そのほかの条件に対してより安定性を増すことが知られており、したがって酵素を触媒として用いる有機合成反応には非常に有利と考えられる。前記のアミノ酸合成反応においても、千畑⁶¹⁾は *E. coli* を固定化してカラムに詰め、フマル酸アンモニウムから L-アスパラギン酸を連続的に、しかも収率よく合成することに成功している。また福井^{62, 63)}は、トリプトファナーゼや β -チロシナーゼの不溶化を行ない、これらの不溶性酵素を用いてアミノ酸を合成する条件を検討している。今後ますますこのような固定化の手法が進み、用いる材料についても改良が加えられ、活性の高い、しかも安定な固定化酵素を効率よく製造する技術が開発されるものと考えられる。このような固定化酵素は、酵素の新しい形態であって、ここにまた新しい酵素的有機合成反応が開発されるものと期待して筆をおく。

なお本稿の執筆にあたり、ご教示をいただいた京都大学理学部 徳重正信助教授、田辺製薬(株)応用生化学研究所 千畑一郎所長、味の素(株)中央研究所 岡田弘部長にお礼を申し上げます。また著者らの研究に関して、共同研究者の各位に心から謝意を表します。

(昭和48年12月18日受理)

文 献

- 1) 高橋健, 化学の領域 **26** 341 (1972)
- 2) 千畑一郎, アミノ酸工業 (金子, 千畑, 泉, 伊藤

- 編) 講談社, 83 (1973)
- 3) 牧司, 森威夫, 薬誌 **75** 604 (1955)
- 4) M.S. Dunn, S.W. Fox, *J. Biol. Chem.* **101** 493 (1933)
- 5) M. Frankel, Y. Liwischitz, Y. Amiel, *J. Amer. Chem. Soc.* **75** 330 (1953)
- 6) 住木論介, 醸協 **23** 33 (1928)
- 7) J.H. Quastel, B. Woolf, *Biochem. J.* **20** 545 (1926)
- 8) J.S. Wilkson, V.R. Williams, *Arch. Biochem. Biophys.* **93** 80 (1961)
- 9) V.R. Williams, D.J. Lartigue, *J. Biol. Chem.* **242** 2973 (1967)
- 10) F.B. Rudolph, H.J. Fromm, *Arch. Biochem. Biophys.* **147** 92 (1971)
- 11) S. Suzuki, J. Yamaguchi, M. Tokushige, *Biochim. Biophys. Acta.* **321** 369 (1973)
- 12) O. Gawron, T.P. Fondy, *J. Amer. Chem. Soc.* **81** 6333 (1959)
- 13) V.R. Williams, D.J. Lartigue, *Methods in Enzymology* (S.P. Colowich and N.O. Kaplan, editors) Vol. 13 Academic Press, 354 (1969)
- 14) K.R. Hanson, E.A. Havir, *The Enzyme* (P. D. Boyer, editor) Vol. 7 Academic Press 75 (1972)
- 15) T.B. Dougherty, V.R. Williams, E. S. Younathan, *Biochem.* **11** 2493 (1972)
- 16) E.F. Gale, *Biochem. J.* **32** 1583 (1938)
- 17) 北原覚雄, 福井作蔵, 三沢正愛, 農化 **34** 44 (1960)
- 18) V.R. Williams, D.J. Lartigue, *J. Biol. Chem.* **242** 2973 (1967)
- 19) 北原覚雄, アミノ酸醗酵 (山田, 角田, 木下, 相田編) 下巻 共立出版, 129 (1972)
- 20) 木下祝郎, 中山清, 北田宗平, 醸協 **16** 517 (1958)
- 21) 木住雅彦, 足利義太郎, 千畑一郎, アミノ酸 **1** 102 (1959)
- 22) 高橋雅弘, 日野哲雄, 奥村信二, 三浦八十治, 石田守良, アミノ酸 **7** 23 (1963)
- 23) K. Otsuka, *Agr. Biol. Chem.* **25** 726 (1961)
- 24) 高村義親, 喜多村巖, 飯倉ミノル, 河野景明, 尾崎浅一郎, *Agr. Biol. Chem.* **30** 345 (1966)
- 25) 千畑一郎, アミノ酸工業 (金子, 千畑, 泉, 伊藤編) 講談社, 229 (1973)
- 26) 戸井滋二, 同上, 94
- 27) 川島英輝, 尾崎正尚, 山田吉孝, 能代泉, 特公昭 46-15609, 15612 (1971)
- 28) 山田秀明, 新しい有機合成化学 技報堂, 221 (1972)
- 29) K. Kakihara, K. Ichihara, *Med. J. Osaka Univ. (Osaka)* **3** 487 (1953)
- 30) N. Brot, Z. Smit, H. Weissbach, *Arch. Biochem. Biophys.* **112** 1 (1965)
- 31) H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, K. Ogata, *J. Biol. Chem.* **245** 1767 (1970)

- 32) H. Kumagai, N. Kashima, H. Torii, H. Yamada, H. Enei, S. Okumura, *Agr. Biol. Chem.* **36** 472 (1972)
- 33) H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, K. Ogata, *J. Biol. Chem.* **245** 1773 (1970)
- 34) 山田秀明, 熊谷英彦, 蛋白質・核酸・酵素 **16** 425 (1971)
- 35) 熊谷英彦, 大岸治行, 鹿島信一, 山田秀明, アミノ・酸核酸 **27** 11 (1973)
- 36) H. Yamada, H. Kumagai, N. Kashima, H. Torii, H. Enei, S. Okumura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46** 370 (1972)
- 37) 熊谷英彦, 宇多川隆, 山田秀明, 生化学会大会 (1973)
- 38) 熊谷英彦, 宇多川隆, 山田秀明, 第24回タンパク質構造討論会予稿集, 41 (1973)
- 39) 熊谷英彦, 山田秀明, 沢田誠二, 生化学会大会講演 (1973)
- 40) H. Yamada, H. Kumagai, H. Enei, H. Matsui, S. Okumura, *Proc. IV. IFS : Ferment. Technol. Today* **1972** 445
- 41) J. Pictet, W. Spengler, *Ber.* **44** 2030 (1911)
- 42) 戸井滋二, アミノ酸工業 (金子, 千畑, 泉, 伊藤編) 講談社, 214 (1973)
- 43) 小町谷吉興, 鈴木清次, 山田 雅彦, 宮屋敷日出志, 桜井節二, 日化 **86** 856 (1965)
- 44) A. Butenandt, H. Hellman, E. Renz, *Z. Physiol. Chem.* **284** 175 (1949)
- 45) H.R. Snyder, J.A. MacDonald, *J. Amer. Chem. Soc.* **77** 1257 (1955)
- 46) H. Behringer, H. Taul, *Chem. Ber.* **90** 1398 (1957)
- 47) W. Leimgruber, A.D. Batcho, *Proc. 3rd Int. Congress Heterocyclic Chem. (Sendai)* 1971
- 48) F.C. Happold, L. Hoyle, *Biochem. J.* **29** 1218 (1935)
- 49) A. Oshima, K. Ichihara, *J. Osaka. Med. Assoc. (Japan)* **39** 1507 (1940)
- 50) W.A. Wood, I.C. Gunsalus, W.W. Umbreit, *J. Biol. Chem.* **170** 313 (1947)
- 51) W.A. Newton, E.E. Snell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **51** 381 (1964)
- 52) H. Yamada, H. Yoshida, T. Utagawa, H. Kumagai, *Agr. Biol. Chem.* 投稿中
- 53) H. Yoshida, H. Kumagai, H. Yamada, *Agr. Biol. Chem.* 投稿中
- 54) 森野能昌, 蛋白質・核酸・酵素 **13** 574 (1968)
- 55) H. Yoshida, H. Kumagai, H. Yamada, *Agr. Biol. Chem.* **38** 463 (1974)
- 56) T. Watanabe, E.E. Snell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **69** 1086 (1972)
- 57) H. Nakazawa, H. Enei, S. Okumura, H. Yamada, *Agr. Biol. Chem.* **36** 2523 (1972)
- 58) 中沢英次, 江井仁, 奥村信二, 山田秀明, アミノ酸・核酸集談会 (1972)
- 59) H. Nakazawa, H. Enei, S. Okumura, H. Yamada, *FEBS Letters* **25** 43 (1972)
- 60) 福村隆, 特公 昭 48-28678
- 61) 土佐哲也, 佐藤忠司, 千畑一郎, アミノ酸・核酸集談会 (1972)
- 62) S. Ikeda, S. Fukui, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52** 482 (1973)
- 63) 池田精一郎, 藤村元輝, 福井三郎, 山田秀明, 醗酵工学会大会 (1973)