総 合 論 文

新しい微生物酵素の開発とその利用

浅 野 泰 久*

Development of New Microbial Enzymes and Their Application to Organic Synthesis

Yasuhisa ASANO*

We screened microorganisms for various new enzymes, which were used in the synthesis of organic chemicals. A new hydro-lyase from *Arthrobacter* sp. catalyzed the synthesis of 87 grams/liter of D-malate from maleic acid in 72% yield. *A. denitrificans* produced 27 g of (S)-(+)-citramalate of 99.9 % ee in 69% yield. Phenylalanine dehydrogenase (PheDH) is used in the colorimetric micro-determination of L-Phe to detect phenylketonuria (PKU) in the blood of neonates in Japan. The structure of a new enzyme opine dehydrogenase (ODH) from *Arthrobacter* sp., has been solved to 1.8 Å resolution. Optically pure secondary amine carboxylic acids were synthesized by ODH. Picolinic acid derivatives were synthesized by *Pseudomonas* catechol 2,3-oxygenase. Nearly 20 grams/liter of theobromine was produced from caffeine in a yield of 92% by *P. putida* cells. A new enzyme alkaline D-peptidase from *B. cereus* was used for oligomerization of D-Phe methylester.

Key words: Enzymatic synthesis, Screening, Microbial enzymes, Maleate hydratase, Phenylalanine dehydrogenase, Opine dehydrogenase, Alkaline D-peptidase

はじめに

石油生産量は2010年にピークを迎え、2070年頃には枯渇すると言われている¹⁾。消費材を次々と作り替えることを目指した20世紀の科学者には、環境の保全や地球資源の再生が人類の緊急課題になることなどは、念頭になかった。微生物や酵素を用いる物質転換法は、有害な物質の使用や発生を抑制した化学、「グリーンケミストリー」²⁾の中でも最も重要な手法の1つといえよう。今世紀後半、それらは、いくつかの工業的製造法に適用されたのみならず、有機合成化学の一研究分野としても確固とした地位を占めるに至った。これらの反応は温和な条件下に行われ、化学産業が最も必要とする、環境に優しく省エネルギーである特長を備えており、従来の化学合成法の不得手な点を補いながら、すぐに迫っている21世紀においても極めて重要な実用化研究の課題であると

考える。例えば、我が国においてニトリルヒドラーターゼが発見され、細菌 *Rhodococcus rhodocrous* J-1 を用いるアクリルアミドやニコチンアミドの工業生産が開発されている。また、1998年からは、*Pseudomonas chlororaphis* B23 を用いる、5-シアノ吉草酸アミドの工業生産も開始されている³⁾。

酵素は生体物質の生合成や代謝に関与する触媒である。生体触媒には、Protein Enzyme(酵素蛋白質)の他に、Abzyme(Antibody Enzyme, 抗体触媒)およびRNA/DNA Enzyme(Ribozyme)があり、研究が加速度的に活発になっている。近年、一旦見いだされた酵素がより望ましい性質を示すようにチューニングする、進化分子工学と呼ばれる研究にも種々の進展がある。化学変異源を用いて遺伝子に変異を与え、スクリーニングの後、工業化のレベルにまで酵素の耐熱性を上げた研究例がある⁵⁾。また、培養不可能な微生物等の遺伝子ライブラリーをPCRを用いて作成し、目的に応じて検索する方法⁶⁾や、いくつかの類似の酵素遺伝子から、「DNA シャッフリング」法等を用いて、ランダム変異を与えたり、多数のキメラ蛋白質のライブラリーを作成し、耐熱性や改善された基質特異性をスクリーニングする方法も

* 富山県立大学工学部生物工学研究センター

()

* Biotechnology Research Center, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University ()

注目を集めている⁷⁾。しかし、これらの研究によっても、新しい反応を触媒する酵素が得られるわけではなく、既知酵素を逸脱できない。そのためには、それらより上流に位置づけられる、きめ細かな酵素探索・開発研究が必須である。このような状況下、新しいタイプの反応を触媒する酵素を開発する研究の重要性が、ますます増大している。また、単に新規酵素の酵素化学研究に止まるのではなく、有機合成への利用に踏み込む研究が一層重要であると考ええる。

微生物は、多様な化学反応の触媒能を有し、地球の物質循環に大きな寄与をしている。我々は、集積培養や馴養培養により自然界より分離した各種の「化学的極限微生物」に新反応を触媒する酵素を効率良く見いだし、酵素化学研究を行うと共に、合成等への応用を展開している。研究に対する考え方については、引用文献を参照されたい⁴⁾。なお、「化学的極限微生物」とは、毒性化合物や合成基質を転換する等、通常生物が利用しない基質を変換することができ、化学的に特徴ある能力を有する微生物をいう。温度、pH、圧力等の通常の生理条件を越える条件下で生育する微生物を「極限微生物」と呼ぶことに対して用いる。

ここでは、我々の最近の研究の一部について紹介する。まず、リアーゼ類として、マレート・ヒドラターゼの開発と利用について述べ、次に酸化還元酵素であるアミノ酸脱水素酵素の開発と利用として、フェニルアラニン脱水素酵素(PheDH)およびオピノン脱水素酵素(ODH)について紹介する。ODHは、土壌からのスクリーニングより開始して、最近X線構造解析に成功している。さらに、その他の酵素の利用例として、カテコールからのピリジン誘導体の合成、カフェインからのテオブロミンの合成およびD-アミノ酸含有ペプチド加水分解酵素のペプチド結合合成反応について紹介する。

1. リアーゼの開発と利用

1.1. マレート・ヒドラターゼ

リアーゼ類は、C-C、C-N、C-O等の化学結合に作用して、化学基の脱離を触媒し二重結合を生成する反応、および逆に二重結合に作用し化学基の付加反応を触媒する。これらの酵素は、補酵素を要求しない特徴を持ち、光学活性ではない二重結合の部位に立体選択的に作用して、100%の理論収率で光学活性物質を合成することができる。すでに、多数のリアーゼが有用物質の工業生産に用いられている⁸⁾。

n-ブタンよりバナジウム触媒の存在下、安価に製造されるマレイン酸はポリマー、THF、DL-リンゴ酸等の原

料である⁹⁾。D-リンゴ酸は抗生物質の合成原料などとしての用途があるが、DL-リンゴ酸から高価な分割剤を用いて生産されているのが現状である。マレイン酸の代謝系は、これまでフマル酸を異性化しフマルーゼによってL-リンゴ酸に至る系が知られているが、マレイン酸を直接水和しD-リンゴ酸を生成するマレート・ヒドラターゼについてはあまり知られていない(図1)。

Fig. 1 D-Malate producing microorganism without a maleate isomerase.

上田らは、強いマレート・ヒドラターゼ活性を有する細菌 *Arthrobacter* sp. を土壌から分離し、休止菌体反応によるマレイン酸からのD-リンゴ酸の製造を検討した。至適条件下、20時間の反応で87 g/literのD-リンゴ酸が72%の収率で得られた(図2)¹⁰⁾。さらに本酵素を精製

Fig. 2 Time course of conversion of maleate to D-malate.

しその諸性質を明らかにした。28,000 と 58,000 のサブユニットからなる精製酵素の分子量は、90,000 であることが判明した¹¹⁾。本酵素は、類似の水和反応を触媒するアコニターゼやシトラコナーゼ等の鉄-硫黄クラスターを含む酵素と同様に Fe^{2+} と L-システインの存在下で活性化された。精製酵素の至適 pH は 7.5、至適温度は 45 °C であった。本酵素の基質特異性について調べた結果、クロロマレイン酸、プロモマレイン酸、シトラコン酸を基質とした。生産物はそれぞれ (2S,3S)-3-クロロリンゴ酸、(2S,3S)-3-プロモリンゴ酸、(R)-(-)-シトラマル酸であった¹²⁾。

オランダの van der Werf および de Bont らは、我々と同時期にマレイン酸からの D-リンゴ酸の生産を検討し、スクリーニングにより *Pseudomonas pseudoalcaligenes* NCIMB9867 を得ている¹³⁾。本菌からマレート・ヒドラターゼが精製された。本酵素は、我々の酵素と分子量では類似しており、24,000 および 57,000 のサブユニットからなる構造をしているが、我々の酵素とは異なり、 Fe^{2+} や L-システインによる活性化は認められなかった。筑波大の中原らもマレイン酸から D-リンゴ酸を生産する微生物を得ている¹⁴⁾。

その他、マレイン酸の有効利用を図るため、強力なマレイン酸シス-トランスイソメラーゼ活性を有する菌を分離するとともに、酵素の諸性質を検討した。マレイン酸の異性化反応はフマル酸生成方向に片寄っておりマレイン酸に完全に転換されることを初めて見いだした¹⁵⁾。最近、熱に対して比較的安定な本酵素が見いだされている¹⁶⁾。

(S)-(+)-シトラマル酸は細菌のメサコナーゼの水和反応により高価なメサコン酸から生産することが可能であるが現実的ではない。そこで、微生物の発酵により比較的安価に製造されるイタコン酸に注目し、イタコン酸の二重結合への水和反応によるイタコン酸からの (S)-(+)-シトラマル酸の製造を検討した。土壌由来のイタコン酸資化菌中から得られた、シトラマル酸高生産性株を *Alcaligenes denitrificans* と同定した。培養条件の検討により得られた高活性菌体を反応に供したところ、30 °C、pH 8.5、イタコン酸逐次添加の条件下、30 時間で 28 g/liter の (S)-(+)-シトラマル酸が蓄積した。変換率は 80.0%、モル収率は 69.0%、光学純度は 99.9% であった¹⁷⁾。

2. アミノ酸脱水素酵素の開発と利用

2.1. フェニルアラニン脱水素酵素 (PheDH)

本酵素を、*Sporosarcina ureae*, *Bacillus sphaericus*,

B. badius, および *Microbacterium* sp. より、精製結晶化すると共に、酵素化学的諸性質および一次構造を明らかにしてきた^{3a,18)}。また、*B. cereus* にもその存在を認めた。これらの研究の結果、本酵素に酵素番号 EC 1.4.1.20 が与えられた¹⁹⁾。本酵素を用いて各種 α -ケト酸より各種の L-アミノ酸の合成が可能である^{3a,4a)}。一方、*B. badius* の本酵素は、血液中の L-Phe の定量に有効であり、新生児フェニルケトン尿症のマスクリーニングの素子として 1992 年に厚生省の認可を受け、全国的に使用されるに至っている (図 3)²⁰⁾。

Fig.3 Colorimetric determination of L-Phe using PheDH.

また、類似の反応機構を有するグルタミン脱水素酵素 (GluDH) の X 線構造解析の結果に基づいた本酵素の基質特異性の改変に成功している。すなわち、*B. sphaericus* 由来の PheDH から出発して、¹²⁴G と ³⁰⁷L を、それぞれロイシン脱水素酵素 (LeuDH) に対応するアミノ酸である A と V に、部位特異的変異により変換した。これらの部位は、GluDH の結晶構造解析の知見よりこれら酵素の基質特異性を決定していると想定された部位である。作成された PheDH の変異株は、予想通り Phe に対する活性が低下し、脂肪族アミノ酸に対する基質特異性が高くなった²¹⁾。

2.2. オピン脱水素酵素

オピンは、植物の腫瘍の 1 つであるクラウンゴールや海洋産の軟体動物の筋肉中に見いだされる。非天然型アミノ酸の 1 種である二級アミンジカルボン酸 (オピン) はエナブラリルやリジノプリルを代表とする、血圧降下剤としての ACE 阻害剤の合成中間体としても見いだされる。しかしながら、いずれも基質の保護や副生物として生ずる異性体の分離が必要である。NAD⁺ 等を補酵素とし、オピン型の二級アミンジカルボン酸に作用する脱水素酵素を発見することができれば、その反応の可逆性を利用して、不斉点を 2 個有するオピン型の二級アミンジカルボン酸が合成できると考えた。集積培養法により、N-[1-D-(carboxyl)ethyl]-L-phenylalanine を単一炭

素源として生育するオピンを単一炭素源として資化しうる細菌 1C 株を単離し、*Arthrobacter* sp. と同定した。本菌は NAD^+ 依存性の二級アミンジカルボン酸脱水素酵素活性を示し、酸化的脱アミノ化反応により L-アミノ酸と α -ケト酸を生成する反応と、その逆反応を触媒した。本酵素は、分子量約 36,000 のホモダイマーであり、 NAD^+ を補酵素として、オピンに作用して L-アミノ酸と α -ケト酸を生成する酸化還元酵素である。L-アミノ酸部分は、比較的疎水性の高い L-アミノ酸を基質とし、 α -ケト酸部分は、ピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、オキザロ酢酸、 α -ケト酪酸を基質とする。詳細な基質特異性の検討の結果、本酵素を *N*-[1-D-(carboxyl)ethyl]-L-norvaline: NAD^+ oxidoreductase(L-norvaline-forming: EC 1.5.1.28, オピン脱水素酵素(ODH)) と命名した²²⁾。

本菌のゲノム DNA より本酵素遺伝子のクローニングを行い、約 1.1 kbp のオピン脱水素酵素遺伝子(*odh*)を得た²³⁾。本酵素は従来知られていた海産の軟体動物や植物の腫瘍の 1 つであるクラウンゴール中に存在するオピン脱水素酵素とは分子量的にも基質特異性についても全く異なり、この種類の反応を触媒する酵素として微生物由来では初めて見いだされた酵素である。すなわち、ODH の一次構造は、いずれも *Agrobacterium tumefaciens* が植物に感染して、植物が合成する NADP^+ 関与の D-リゾピン脱水素酵素(DHLO, 357 アミノ酸にわたって 24.6% が同一) および D-ノバリン脱水素酵素(DHNO, 168 アミノ酸にわたって 20.8% が同一) と類似していた。リゾピン脱水素酵素は、塩基性 L-アミノ酸とピルビン酸を基質とし、ノバリン脱水素酵素は、L-アルギニンとピルビン酸を基質とする。一方、L,L の立体化学でオピン化合物合成を触媒するサッカロピン脱水素酵素等もあるが、一次構造上の類似性は認められない。オピン脱水素酵素は、植物と微生物相互作用に関与することが古くから知られ、以下に述べるように、酵素を用いるキラル合成の立場からも重要な酵素である。また、すでに構造解析が進んでいる各種のアミノ酸脱水素酵素との違いも興味を持たれる²⁴⁾。この一群の酵素スーパーファミリーで立体構造の解析に成功した例はいまだなかったが、我々は、英国 Sheffield 大学 Rice 教授らと、ODH スーパーファミリーとして初めての X 線結晶構造解析に成功した。*Arthrobacter* sp. 1C 由来の *odh* 遺伝子を大腸菌で発現させ、酵素を大量に精製した。ハンギング・ドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。硫酸 34–40%, 0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0), 17 °C の条件下、約 2 週間で $0.5 \times 0.3 \times 0.3$ mm 程度の結晶を得た。

結晶は斜方晶系に属し、空間群は $P2_12_12$, 格子定数(Å)は $a=104.9$, $b=80.0$, $c=45.5$ であった。非対称単位に酵素の 1 サブユニットが含まれていた²⁵⁾。 NAD^+ 存在下、非存在下において得られた結晶から、いずれも 1.8 Å の分解能のデータを得た。さらに金、水銀、プラチナを用いる多重重原子同形置換法により構造を解明した。

NAD^+ 存在下の本酵素のモノマーの結晶構造を示す(図 4)²⁶⁾。サブユニットは、2 つのドメインからなってお

Fig. 4 Structure of a single subunit of opine dehydrogenase.

り(residues 1–195, residues 196–359), 1 つの α -ヘリックスで連結されている。2 つのドメイン間には、大きな裂け目クレフトが存在する。ドメイン I (1–195 aa) は、8 個の平行および逆平行 β シートからなる。その中には、古典的なロスマン・フォールドに類似した 6 個の β ストランドがあり、 $\beta\alpha\beta$ の単位を有する GLGNNGG (コンセンサス, GXGXXG/A) の配列が見いだされた。ドメイン II (196–359 aa) は、12 個の α -ヘリックスからなる。乳酸脱水素酵素(LDH, 235–238 aa)やリンゴ酸脱水素酵素(MDH, 284–287 aa)に共通してみられる、D-Xaa-Xaa-R のモチーフに類似の働きをする残基を推定した(²⁹⁷D, ²⁹²R)。LDH や MDH において、R は α -ケト酸を安定化し、D は、²⁰²H と共に、プロトンリレーの働きをすると考えられている。3 種類のオピン脱水素酵素に共通してみられる残基は、35 個ある。これは、3 種類の酵素が触媒する化学反応に共通的に必須の残基と考えられる。そのうち、ドメインの内側に存在する残基は、¹⁹⁶N, ²⁰²H, ²⁹²R, ²⁹³Y, ²⁹⁶E, ²⁹⁷D であり、いずれもドメイン II 側に存在する。特に注目されるのは、²⁰²H, ²⁹²R, ²⁹⁷D の 3 種のアミノ酸であり、 α -ケト酸を基質とする LDH や MDH に共通の残基である。H とともにトライアッドを形成すると言われているが、本酵素でもそ

Fig. 5 One-pot synthesis of *N*-[1-D-(carboxyl)ethyl]-L-phenylalanine from phenylpyruvate and pyruvate by phenylalanine and opine dehydrogenases with NADH regeneration by formate dehydrogenase.

れらは立体的に近く存在していた。NAD⁺は、ヌクレオチド結合部位のN-末端の上のクレフトの上部に位置している。酵素のダイマーは、C-末端の3個の α -ヘリックスの相互作用によって形成されているPROTEP分析は、三次元構造の類似性をPDBデータから検索するソフトウェアである。1997年7月現在のデータをもとに検索すると、羊肝臓由来のNADP⁺依存性、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素がヌクレオチド結合部位のみならずドメインIIの3つのヘリックスを含めて類似していることが判明した。

二級アミンジカルボン酸の合成は、光学活性アミノ酸エステルと光学活性ヒドロキシ酸誘導体の反応による合成や、光学活性アミノ酸とケト酸誘導体の還元アミノ化反応による合成等が知られている。しかしながら、いずれも基質の官能基の保護/脱保護や副生物として生ずる異性体の分離が必要である。本酵素遺伝子の一次構造を解明すると共に、大量に調製した本酵素をNADH再生系のもとに用いて、L-アミノ酸およびケト酸から各種のオピン類を高選択的に合成した^{22b)}。NADHの再生のために、遺伝子組換え体から精製した*Moraxella* sp. C-1株由来ギ酸脱水素酵素(FDH)²⁷⁾を用いた。各種の疎水性アミノ酸と、ピルビン酸、2-ケト酪酸およびグリオキシル酸等の α -ケト酸を用いて還元縮合反応を行い、単離収率16–70% (収量3.5–14 g/l)で対応するオピン化合物を得た。得られたオピン類のジアステレオマー純度はすべて99.9%以上であった。また、新たに生成した不斉炭素原子の絶対立体配置はすべてDであった。次に、いずれも大腸菌で発現させたODH, PheDH^{3a)}、およびギ酸脱水素酵素を用いて、フェニルピルビン酸およびピルビン酸から、収率98% (収量23.2 g/l)でオピンのone-pot合成にも成功した(図5)。得られたオピンの立体化

学は99.9%以上の選択性でPhe部分がL, Ala部分がDであった。本反応は2種類のケト酸を基質にして2つの不斉点を一気に構築し、一段階で合成できることを示した点において画期的である。

3. その他

3.1. カテコールからのピリジン誘導体の合成

安価な芳香族炭化水素から、酵素を用いて含窒素ピリジン化合物を合成する方法は未開発である。そこで、芳香族化合物分解菌が有するカテコール2,3-ジオキシゲナーゼ(C23O)に着目した。C23Oは、カテコールの酸化に関与する酵素であり、メタ開裂により2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド(HMS)を生成する。各種の原料からこれを調製し、アンモニアにより閉環して、ピコリン酸を合成することを計画した(図6)。

Fig. 6 Synthesis of picolinic acid from catechol.

種々検討の結果、細菌*Pseudomonas putida*由来のC23Oを発現する*Escherichia coli*/pSLMK1を用いて、カテコールを原料とするHMSの合成条件を検討した。HMSの合成は、15℃において、好気的に行うことが良好な結果を与えた。さらに、HMSからのピコリン酸合成の諸条件を検討し、定量的な転換が可能になった。各種のカテコール誘導体を原料として、ピコリン酸、6-メチルピコリン酸、5-メチルピコリン酸、および5-クロロピコリン酸を単離収率47–68%で合成した(図7)²⁸⁾。

3.2. カフェインからのテオブロミンの合成

Fig.7 Synthesis of picolinic acids from catechols.

テオブロミンは、利尿剤としての用途があるが、化学的手法では、3つのメチル基を有するカフェインから選択的に1つのメチル基を脱メチル化する反応に難点があった(図8)。そこで、まずスクリーニングの方針を立てるために、カフェイン資化性菌 *Pseudomonas* sp. を土壌より単離し、各種金属イオンの添加によりカフェインからのテオブロミン蓄積を調べたところ、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 等の二価金属の添加により蓄積が増加することが認められた。この蓄積はテオブロミン分解酵素が金属で阻害されるためと考えられたので、一次スクリーニングでカフェイン資化性菌を多数分離し、次に二次スクリーニングとして1 mM の Zn^{2+} の存在下の菌体反応によりテオブロミン蓄積能の高い菌株を選択することにした。その結果、*P. putida* No.352 を得た。カフェインを原料とし、最適条件下で20 g/liter のテオブロミンを収率92%で合成できた(図9)²⁹⁾。

Fig.8 Proposed metabolic pathway of caffeine in *Pseudomonas putida*.

Fig.9 Time course of conversion of caffeine to theobromine by *P. putida* No.352.

この蓄積の原因を探るために、酵素的な検討を行った。カフェインからテオブロミン、さらにメチルキサンテンへと代謝が起こると想定されるが、それぞれの脱メチル化反応を触媒する3種類の酸化酵素を精製した。その結果、テオブロミンの脱メチル化反応を触媒する酵素のみが金属イオンによって阻害された。よって、 Zn^{2+} の添加によるテオブロミンの蓄積の理由が解明できた³⁰⁾。

3.3. D-アミノ酸含有ペプチド加水分解酵素

我々は、以前に細菌由来の新酵素「D-アミノペプチダーゼ」を、 β -ラクタマーゼやカルボキシペプチダーゼDDを含む「ペニシリン認識酵素」として性格付けし、D-アミノ酸誘導体の合成に利用した^{4b,31,32)}。では、細菌の細胞壁には、あまり存在しない(D-Phe)₄等に作用する酵素が存在すれば、どのような構造と機能を有するのだろうか。土壌を分離源とし、化学合成した(D-Phe)₄を含むLB培地を用いて集積培養を行い、*Bacillus cereus* DF4-B株を分離した。(D-Phe)₄加水分解酵素活性は培養液中に存在した。

本酵素の作用機作を明らかにするため、D-Tyr-(D-Phe)₂、(D-Phe)₂-D-Tyr、(Phe)₃の可能な8種類(DDD, DDL, DLD, DLL, LDD, LDL, LLD, LLL)等を合成した。これらのトリペプチドのN末端から2番目のD-アミノ酸の立体を厳密に認識し、N末端からジペプチド単位で切り出した(図10)。本酵素は、主として(D-Phe)₃および

Fig. 10 The mode of action of ADP toward (A) (D-Phe)₂-D-Tyr and (B) D-Tyr-(D-Phe)₂.

(D-Phe)₄, さらに(D-Phe)₆, Boc-(D-Phe)₄, Boc-(D-Phe)₄メチルエステル, Boc-(D-Phe)₃メチルエステル, Boc-(D-Phe)₂, (D-Phe)₂を基質とした。一方, L-Pheからなる対応するペプチド, (D-Ala)_n(n=2-5), (D-Val)₃, (D-Leu)₂は基質とならなかった。なお, D-PheメチルエステルおよびD-Pheアミドから, (D-Phe)₂の生成が認められた。一方, D-Alaからなるペプチド(D-Ala)₂₋₆や, (L-Phe)₄には作用しない。従って, 本酵素は比較的疎水性の高いD-アミノ酸ペプチドに特異的に作用するジペプチジルペプチダーゼ様エンドペプチダーゼであると考えられる。本酵素反応の至適pHは10.3周辺のアルカリ側にあったので, 本酵素を「アルカリD-ペプチダーゼ」(ADP, D-stereospecific peptide hydrolase (EC 3.4.11.-))と命名した。次に, 本酵素遺伝子の*E. coli*へのクローニングを行い, 質量分析法を併用して, 分子量約37,952のモノマー蛋白質であることを明らかにした。本酵素(350 aa)は, ペニシリン認識酵素と相同性を有し, 活性中心の配列(S-X-X-K)も保存されていた。D-アミノペプチダーゼとは対照的に, 本酵素は顕著なβ-ラクタマーゼ活性を示した³³⁾。

このように, 「D-アミノペプチダーゼ」および「アルカリD-ペプチダーゼ」の全く新しいタイプのD-アミノ酸含有ペプチド加水分解酵素を発見命名し, これらを「ペニシリン認識酵素」として位置付けた。自然界におけるD-アミノ酸含有ペプチド加水分解酵素の分布や, それらと他蛋白質との関係に興味を持たれる。また, これらの酵素の応用として, D-アミノ酸誘導体の合成のみならず, 抗がん剤プロドラッグを生体に投与し, 細胞表面で選択的加水分解を行うADEPT(antibody-directed enzyme prodrug therapy)に向けた検討も行った³⁴⁾。

続いて, 本酵素を用いたD-アミノ酸含有ペプチドの立体選択的合成を目的として, まずD-Pheオリゴマー合成への利用について検討した。本酵素遺伝子の発現プラスミドを導入した大腸菌は本酵素を菌体内に生産し, 無細胞抽出液から精製した酵素標品を用いてD-PheメチルエステルからのD-Pheオリゴマー合成を検討した。その結果, 100 mMのトリエチルアミン-塩酸(pH 11.5)の反応系で50 mMの基質存在下, 30℃で8時間反応させたところ, (D-Phe)₂(収率25.4%)および(D-Phe)₃(収率8.6%)の生成が認められた。また, 反応液中に添加した

各種水溶性有機溶媒により(D-Phe)₂および(D-Phe)₃の生成は著しく減少したが, 一方でDMSOの添加により(D-Phe)₄の顕著な生成が認められた³⁵⁾。

おわりに

以上, 酵素的変換法研究の第一歩として, 化学合成品を対象とした微生物酵素の開発と応用について紹介した。有機合成化学者にとっては極めて単純な合成基質であっても, それらが微生物と出会う時, 興味深い多様な生命現象が引き起こされることを, かいま見ることができた。また, 従来の有機合成では不得手な反応も種々見いだすことができた。このように, 今後, 変換を受ける基質は合成基質が主流となり, スクリーニング対象としての微生物の母集団は, 保存菌から「化学的極限微生物」へと拡大されるであろう。微生物酵素の多様性の一端を切り開く手法として, 「化学的極限微生物」の分離と利用は有望と考える。このようにして得られた酵素を遺伝子レベルで改変することにより, さらに優れた酵素利用技術へと発展させることができよう。

最後に, 本研究は, 文献に引用した多数の共同研究者のねばり強い研究によって初めて可能になったものであり, 深く感謝の意を表します。また, 本研究の一部は, ノボルディスク研究助成金, 化学素材研究開発振興財団, 熊谷科学技術振興財団, 内藤記念科学振興財団, チバ・ガイギー科学振興財団, 文部省科学研究費, 未来開拓学術研究推進事業研究費等の援助によるものであり, 記して感謝する。

(平成11年5月31日受理)

文 献

- 1) C. J. Campbell, J. H. Laherrere, 日経サイエンス **20**, 29 (1998)
- 2) (a) *Chem. and Eng. News*, **75** (31), August 4, 1997; (b) *ibid.*, **76** (33), August 17, 1998
- 3) (a) 浅野泰久, 農化, **65**, 1617 (1991); (b) H. Yamada, M. Kobayashi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1391 (1996); (c) *Chem. and Eng. News*, **76** (25), June 22, 1998
- 4) (a) 浅野泰久, 有合化, **47**, 749 (1989); (b) *idem*, *ibid.*, **49**, 314 (1991); (c) Y. Asano, "Studies in Organic Chemistry", **53**, ed. K. Kieslich, C. P. Van der Beek, J. A. M. de Bont, W. J. J. van den Tweel, Elsevier, Amsterdam, 19 (1998)
- 5) Y. Ikenaka, H. Nanba, K. Yajima, Y. Yamada, M. Takano, S. Takahashi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 1672 (1998)
- 6) J. M. Short, *Nature Biotechnol.*, **15**, 1322 (1997)
- 7) (a) W. P. C. Stemmer, *Nature*, **370**, 389 (1994); (b) A. Crameri, S.-A. Raillard, E. Bermudez, W. P. C. Stemmer, *ibid.*, **391**, 288 (1999)
- 8) M. J. van den Werf, W. J. J. van den Tweel, J. Kamphuis, S. Hartmans, J. A. M. de Bont, *Trends Biochem.*, **12**, 95 (1994)
- 9) F. Cavani, F. Trifiro, *Chemtech.*, **1994**, 18
- 10) Y. Asano, M. Ueda, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1110 (1993)
- 11) M. Ueda, Y. Asano, H. Yamada, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1545 (1993)
- 12) M. Ueda, H. Yamada, Y. Asano, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 215 (1994)
- 13) (a) M. J. van der Werf, W. J. J. van den Tweel, S. Hartmans, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2854 (1992); (b) *idem*, *ibid.*, **59**, 2823 (1993)
- 14) T. Nakajima, S. Manzen, T. Shigeno, T. Nakahara, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 490 (1993)
- 15) Y. Kato, J. Yamagishi, Y. Asano, *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 610 (1995)
- 16) 向山正治他, 農化, 1999 年度大会講演要旨集, 63 (1999)
- 17) M. Ueda, R. Sashida, H. Yamada, Y. Asano, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 466 (1993)
- 18) (a) X.-L. Huang, Y. Asano, *Bull. Toyama Pref. Univ.* (in Japanese), **4**, 211 (1994); (b) Y. Asano, M. Tanetani, N. Horita, *ibid.*, **6**, 101 (1996); (c) Y. Asano, M. Tanetani, *Arch. Microbiol.*, **169**, 220 (1998)
- 19) Y. Asano, "Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation", John Wiley & Sons, 1955 (1999)
- 20) (a) Y. Asano, A. Nakazawa, K. Endo, Y. Hibino, M. Ohmori, N. Numao, K. Kondo, *Eur. J. Biochem.*, **168**, 153 (1987); (b) H. Naruse, Y. Ohashi, A. Tsuji, M. Maeda, K. Nakamura, T. Fujii, A. Yamaguchi, M. Matsumoto, M. Shibata, *Screening*, **1**, 63 (1992); (c) A. Yamada, T. Daiiri, Y. Ohno, X.-L. Huang, Y. Asano, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1994 (1995); (d) K. Nakamura, T. Fujii, Y. Kato, Y. Asano, A. J. L. Cooper, *Anal. Biochem.*, **234**, 19 (1996); (e) 山口昭弘他, 医学と薬学, **37**, 1211 (1997)
- 21) (a) S. Y. K. Seah, K. L. Britton, P. J. Baker, D. W. Rice, Y. Asano, P. C. Engel, *FEBS Lett.*, **370**, 93 (1995); (b) S. Y. K. Seah, K. L. Britton, D. W. Rice, Y. Asano, P. C. Engel, *Protein Engineering*, in press.
- 22) (a) Y. Asano, K. Yamaguchi, K. Kondo, *J. Bacteriol.*, **171**, 4466 (1989); (b) Y. Kato, H. Yamada, Y. Asano, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1**, 151 (1996); (c) Y. Kato, Y. Asano, "Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation", John Wiley & Sons, 1851 (1999); (d) 浅野泰久, 加藤康夫, 生物工学雑誌, **76**, 426 (1998)
- 23) T. Daiiri, Y. Asano, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3196 (1995)
- 24) (a) T. J. Stillman, P. J. Baker, K. L. Britton, D. W. Rice, *J. Mol. Biol.*, **234**, 1131 (1993); (b) P. J. Baker, A. P. Turnbull, S. E. Sedelnikova, T. J. Stillman, D. W. Rice, *Structure*, **3**, 693 (1995); (c) G. Scapin, S. G. Reffy, J. S. Blanchard, *Biochemistry*, **35**, 13540 (1996); (d) A. P. Turnbull, P. J. Baker, D. W. Rice, *J. Biol. Chem.*, **272**, 25105 (1997); (e) P. J. Baker, Y. Sawa, H. Shibata, S. E. Sedelnikova, D. W. Rice, *Nature Structural Biology*, **5**, 561 (1998); (f) J. L. Vanhooke, J. B. Thoden, N. M. Brunhuber, J. S. Blanchard, H. M. Holden, *Biochemistry*, **38**, 2326 (1999)
- 25) K. L. Britton, H. F. Rogers, Y. Asano, T. Daiiri, Y. Kato, T. J. Stillman, D. W. Rice, *Acta Cryst. D.*, **54**, 124 (1998)
- 26) K. L. Britton, Y. Asano, D. W. Rice, *Nature Structural Biology*, **5**, 593 (1998)
- 27) Y. Asano, T. Sekigawa, M. Inukai, A. Nakazawa, *J. Bacteriol.*, **170**, 3189 (1988)
- 28) Y. Asano, Y. Yamamoto, H. Yamada, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2054 (1994)
- 29) Y. Asano, T. Komeda, H. Yamada, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1286 (1993)
- 30) Y. Asano, T. Komeda, H. Yamada, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2303 (1994)
- 31) Y. Asano, Y. Kato, A. Yamada, K. Kondo, *Biochemistry*, **31**, 2316 (1992)

- 32) (a) Y. Asano, "Handbook of Proteolytic Enzymes", Academic Press, 1998, 430; (b) *idem*, *ibid.*, 1998, 433; (c) Y. Asano, H. Komeda, "Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation", John Wiley & Sons, 111 (1999)
- 33) Y. Asano, H. Ito, T. Dairi, Y. Kato, *J. Biol. Chem.*, 271, 30256 (1996)
- 34) M.A. Smal, A. Cheung, Y. Asano, Z. Dong, L. Escoffier, M. Costello, H.N. Tattersall, *Biochem. Pharmacol.*, 49, 567 (1994)
- 35) H. Komeda, Y. Asano, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 6, 379 (1999)

書 評

バイオマテリアル

中林宣男・石原一彦・岩崎泰彦 共著

日本エム・イー学会 編/ME教科書シリーズ

コロナ社 B5判・178 ページ 定価 2,900 円(税別)

本書は、医用生体工学(医用電子工学=ME)分野の大学高学年・大学院向けの教科書シリーズの1冊である。MEは電気・電子工学と医療の境界領域を扱う学問・技術分野であり、実際に生体に何らかの作用を与えるにはインタフェース材料が必要となる。その意味でバイオマテリアル(生体材料)学はMEの1つの柱でもある。

有機合成化学と関連の深い「医薬」は生体の自己治癒能を高め、健康の回復を促す。一方、自己治癒の期待できない疾患とともに生活していく場合には、外科的手術やバイオマテリアルを用いる不具合な機能の補助や形態の回復によって障害を克服する必要が生じる。

バイオマテリアルも一般の構造材料と同様に、金属材料、無機材料、有機材料に分類できる。本書でも最近発展がめざましいセラミックスの、バイオアクティブガラス、骨置換型材料、ヒドロキシアパタイトなどが、金属材料と共に解説されているが、バイオマテリアルの大部分は生体とのインターフェイス機能を持つ有機ポリマー材料で、有機合成化学に直結した分野である。

バイオマテリアルには生体にストレスを与えないこと(生体適合性)が要求される。有機材料は本質的に生体物

質と相互作用しやすい物質で、実際の生体物質と接触した使用や材料設計には、極めて多様に複雑な生体物質系との関わり合いについての考慮が要求される。この点で反応が起きて初めて効果を表す医薬とは有機反応化学的視点が大きく違っていることになる。

本書は前半が基本的事項の解説、残りが各論という構成になっている。前半の一般的な材料科学の解説部分は、有機合成化学を専門とする学生にも分かりやすく簡潔な内容となっている。生体物質が関与する基本的な事項が解説されている部分から後は、有機化学とは違った視点を必要とするが、この部分は特に平易に書かれており、また、対象とする材料が広く扱われているのでバイオマテリアルの概要が把握できるようになっている。著者が期待するように、関連する他の(材料)分野に卓越した知識を持つ人に、バイオマテリアル分野へ加わることを勧めたいという目的が伝わる内容である。

有機合成化学の専門家・学生の皆さんには役に立ち、また違った視点からのヒントが期待できる本といえる。

(米澤宣行)