

アミノ酸ラセマーゼ

—その構造と機能, 応用—

*
中島伸佳 · 左右田健次

1. はじめに

自然界にはかつて非天然型異性体と考えられた各種のD-アミノ酸が、細菌の細胞壁ペプチドグリカン、細胞外粘質物、ペプチド性抗生物質、植物あるいは昆虫の組織や体液中に結合態、あるいは遊離の状態で存在している。^{1) 2)} またD-アミノ酸が動物や微生物の生育に利用されている現象も古くから知られており、^{3) ~ 6)} これに関連してD-アミノ酸の生合成あるいはL-アミノ酸との変換機構が注目されるようになった。

微生物に存在するアミノ酸ラセマーゼは、DあるいはL-アミノ酸の不斉 α -炭素に作用して、ラセミ体を、生成する反応を触媒する。アミノ酸エピメラーゼは複数のキラルセンターをもつアミノ酸の α -不斉炭素に働くが、本質的には同種の酵素である。アミノ酸ラセマーゼのほとんどは、補酵素としてピリドキサル5'-リン酸 (PLP) を要求する。現在、アラニンラセマーゼをはじめとして十数種の酵素が単離精製され、その酵素化学的性質が明らかにされている。^{7) ~ 10)} 特に、最近の遺伝子操作技術の革新的進歩によって、その遺伝子がクローニングされ、一次構造が明かにされるとともに酵素蛋白質の大量生産が可能になったアミノ酸ラセマーゼもある。なお、プロリンラセマーゼ (EC 5.1.1.4)¹¹⁾ など補酵素を必要としないアミノ酸ラセマーゼも報告されているが、酵素標品の純度などの問題で確実な証明は得られていなかった。本稿では、最近始めて均一状態に精製され、酵素化学的性質が明らかになったグルタミン酸ラセマーゼ (EC 5.1.1.3) に焦点をあて、他の補酵素非依存型アミノ酸ラセマーゼ並びにエピメラーゼの反応機構との比較を交えながら最近の問題を紹介する。また、これらのアミノ酸ラセマーゼの反応を利用する酵素的アミノ酸生産法についても言及する。なお、PLP依存型アミノ酸ラセマーゼ並びにエピメ

ラーゼの構造と機能についての詳細は紙面の都合上、本稿では割愛するが上述のようにすでに、多くの総説が出版されているので、それらを参照されたい。^{7) ~ 10)}

2. グルタミン酸ラセマーゼ

Lactobacillus arabinosus にグルタミン酸ラセマーゼが存在することは、比較的早くから示唆されていた。^{12) 13)} Glaser¹⁴⁾ は本菌からグルタミン酸ラセマーゼを部分精製したが、補酵素についての知見は得ていない。田中^{15) ~ 17)} らは同じく乳酸菌 L. Fermenti より本酵素を精製した。本酵素はヒドロキシルアミンなどでは影響を受けないが、SH阻害剤で阻害されるとともに、リボフラビン、FMNなどにより阻害をうける。リボフラビン阻害は比較的高濃度のFADの添加で回復する。精製酵素は可視部にフラビン補酵素様の吸収スペクトルをもつことなどから、本酵素の補酵素はPLPではなくFADであるとの報告も行なわれた。一方、Diven¹⁸⁾ は同じく L. Fermenti から本酵素を精製した。そして田中らの結果とは違って、ヒドロキシルアミンによる阻害を認め、さらにFMN、リボフラビン、FADによっても阻害されることを報告した。しかしFAD以外の補酵素の有無については言及されなかった。

グルタミン酸ラセマーゼの補酵素に関するこのような問題点を解決するために、最近、中島¹⁹⁾ は高いグルタミン酸ラセマーゼ活性をもつ Pediococcus pentosaceus IFO 3182 の本酵素遺伝子を Escherichia coli にクローニングし、高発現させることに成功し、さらに均一な精製酵素を容易に調製する方法を確立した。本酵素はグルタミン酸に特異的に作用し、分子量約40,000の単一ポリペプチド鎖からなるモノマー蛋白質である。本酵素の吸収スペクトルは280 nm付近にのみ吸収極大を示し、蛍光スペクトル解析においてもPLPやFAD由来の蛍光は観察

* 京都大学

されなかった。さらに本酵素活性はヒドロキシルアミン、フェニールヒドラジンなどのカルボニル試薬や水素化ホウ素ナトリウム、あるいは金属キレート剤により影響を受けず、PLPやFADの添加効果も認められなかった。以上の結果より、乳酸菌*P. pentosaceus*のグルタミン酸ラセマーゼは補酵素を含まないことが結論された。

3. 補酵素非依存性アミノ酸ラセマーゼ並びにエピメラーゼの反応機構

補酵素を含まないアミノ酸ラセマーゼ並びにエピメラーゼとしては、冒頭に述べたように4種類の酵素が知られている。^{11,19~23)} PLPを補酵素とするアミノ酸ラセマーゼの反応においては、基質がPLPとシッフ塩基を形成することにより活性化され、 α -水素が引き抜かれ易い状態となる。¹⁰⁾しかし、補酵素を含まない

これら4種類の酵素については、ラセミ化反応過程の最も重要なステップである α -炭素の活性化の機構が不明である。⁸⁾ プロリンラセマーゼ¹¹⁾とヒドロキシプロリンエピメラーゼ(EC 5.1.1.8)^{20,21)}では、それらの基質、イミノ酸はカルボニルとシッフ塩基を形成し得ないので、補酵素がPLPでないことは当然ともいえる。しかし、グルタミン酸ラセマーゼ¹⁹⁾やジアミノピメリン酸エピメラーゼ(EC 5.1.1.7)^{22,23)}の基質はともにアミノ基をもっており、PLPとシッフ塩基形成することなくどのような機構で α -炭素が活性化されるか興味が持たれる。PLPを含まないジアミノピメリン酸エピメラーゼの反応機構については、三重水素中での ^3H の生成物への取りこみにおける反応速度的解析により、本酵素反応は2塩基機構(Two-base mechanism)に従って進行すると考えられている(図-1)。

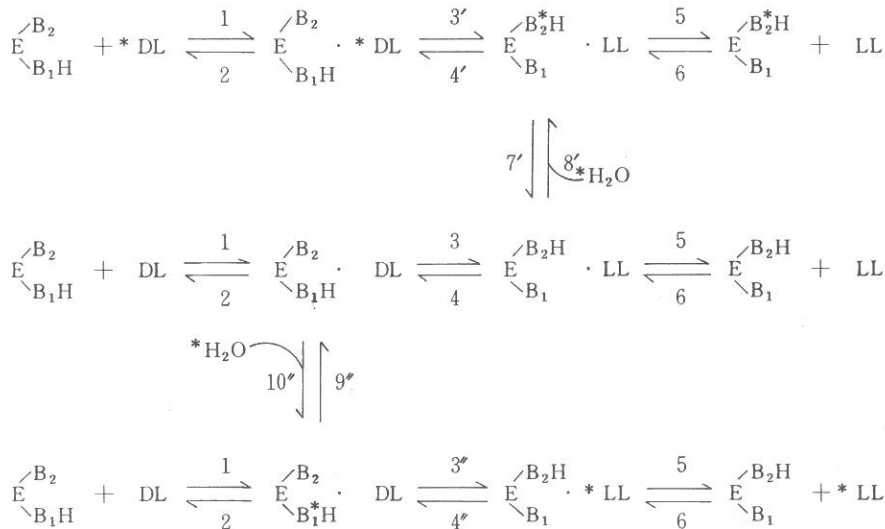


図1. ジアミノピメリン酸エピメラーゼの反応機構。²³⁾

DLおよびLLはそれぞれメゾおよびL-ジアミノピメリン酸、*印はトリチウム標識をあらわす。B₁とB₂は酵素活性中心の塩基性残基。

この機構において、 α -水素の授受に關与する2個の塩基のうち、少なくとも1つは本酵素に存在し、ヨード酢酸アミドとの反応性が高く活性に必須なシステイン残基のSH基であると結論された。²³⁾

最近、*E. coli*のジアミノピメリン酸エピメラーゼの構造遺伝子も単離されたので²⁴⁾近い内にそのDNA配列決定により本酵素の一次構造が解明されるものと期待される。

一方、グルタミン酸ラセマーゼ反応においては、基

質の α -水素転移の反応機構に關して、重水素標識基質や重水溶媒を用いるシングルターンオーバー条件下での反応生成物解析に基づいて考察が加えられた。その結果、上記のジアミノピメリン酸エピメラーゼ反応のそれとは異なり1塩基機構(one-base mechanism)に従って進行すると考えられる。²⁵⁾

現在、基質の α -水素転移の反応機構について、さまざまな酵素化学的研究手段により解析が加えられた酵素は上記のもの他に次の酵素が知られている。

補酵素非依存性プロリンラセマーゼ(二塩基機構,¹¹⁾並びにPLP依存性低基質アミノ酸ラセマーゼ(一塩基機構)。²⁶⁾

補酵素非依存性アミノ酸ラセマーゼ並びにエピメラーゼ反応における基質の α -水素転移に関するアミノ酸残基の官能基の種類や活性中心の構造などについてより詳細な知見の蓄積やそれに基づく機構の解明が待たれる。

4. 酵素的アミノ酸生産への応用

現在、多くの種類のL-アミノ酸が発酵法により生産される一方、工業的に安価に得られる原料を出発物質として、酵素法により生産されているアミノ酸も少なくない。²⁷⁾ 酵素法においては、通常、化学合成されたラセミ混合物を原料とするため、片一方の光学異性体のみ酵素合成反応に利用され、もう一方の光学異

性体は未変換のまま反応系に残存する。アミノ酸ラセマーゼはこの残存する光学異性体をラセミ化し、用いた原料をすべて生成物に転換するために、極めて重要な応用物的価値をもっている。

福村^{28~30)}は化学合成されたDL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムからL-リジンを生産する新しい酵素法を開発した。本法はL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムを水解してL-リジンを生成するL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムヒドラーゼ、並びに α -アミノ- ϵ -カプロラクタムラセマーゼの2つの酵素反応からなるシステムである(図-2)。両酵素をそれぞれ含有する*Cryptococcus laurentii*と*Achromobacter obae*の生菌体を酵素源として、1ℓあたり100gのDL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムからはほぼ100%に近い転換率でL-リジンが生産された。³⁰⁾

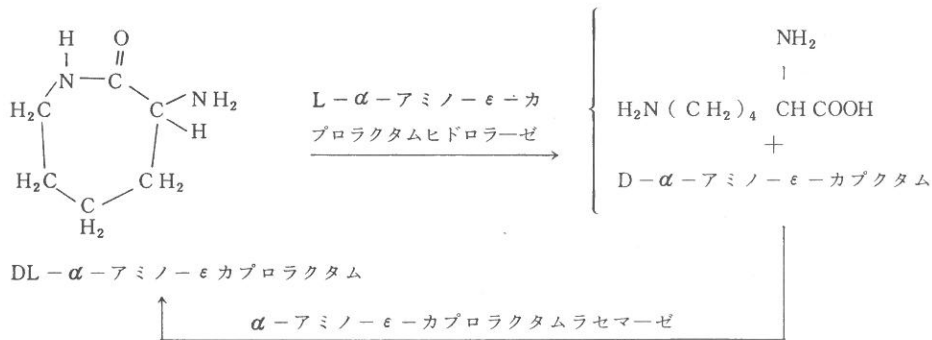


図2 DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムからのL-リジンの酵素的合成

L-トリプトファンはインドールとDL-セリンを原料として、*E. coli*のトリプトファン合成酵素と*Pseudomonas putida*の低基質アミノ酸ラセマーゼとの共役反応により、高収率で合成される。³²⁾ 低基質特異性アミノ酸ラセマーゼはセリンに対する反応性は低い、ラセミ化速度は十分大きく、生産物のL-トリプトファンに作用しない点が本法の特徴である(図-3)。

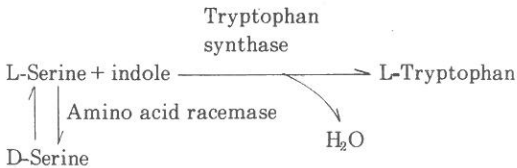


図3 トリプトファン合成酵素と低基質特異性アミノ酸ラセマーゼの共役反応によるL-トリプトファンの酵素的合成

佐野³³⁾はDL-システインの化学合成中間体であるDL-2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸をL-システインに変換しうる細菌を見いだした。このL-システイン合成系では、L-2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸ヒドラーゼとS-カルバモイル-L-システインヒドラーゼの2種類の加水分解酵素とともに、2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸ラセマーゼが関与している(図-4)。この新しいラセマーゼの酵素化学的性質は不明であるが、L-システインの分解活性を持たない*Pseudomonas thiazolinopilun*の変異株における酵素系を利用して、DL-2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸から95%の収率でL-システインが合成された。^{34,35)}

D-アミノ酸は、各種の抗生物質や農薬の合成原料などとして、最近その生産法が注目されている。中島

アミノ酸ラセマーゼ

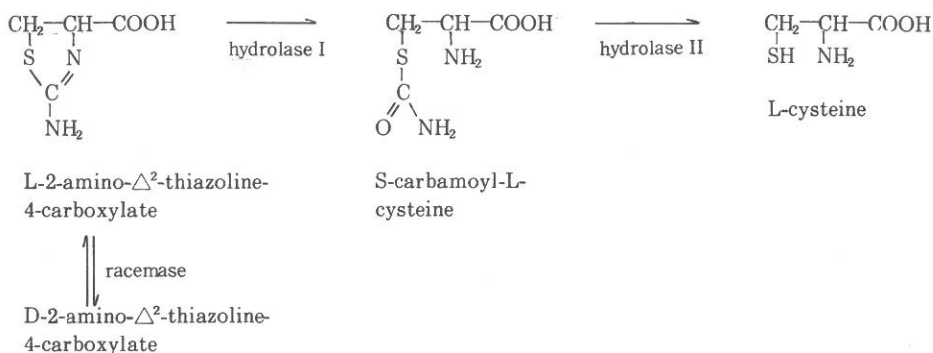


図4. DL-2-アミノ- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸を原料とするL-システインの酵素合成

らは³⁶⁾D-アミノ酸アミノ基転移酵素のもつ絶対的な立体特異性と構造特異性を利用して、各種のD-アミノ酸を酵素的に合成する方法を開発した(図-5)。この方法では、アミノ基供与体としてD-グルタミン酸を用い、生成する α -ケトグルタル酸をL-グルタミン酸にL-グルタミン酸脱水素酵素でNADHの存在下、還元的にアミノ化する、生じたL-グルタミン酸はグルタミン酸ラセマーゼにより再びD-体に変換される一方、グルタミン酸脱水素酵素反応でNADHは酸

化されるが、ギ酸脱水素酵素反応により還元的に再生される。本反応系において、グルタミン酸ラセマーゼの基質特異性が非常に高いために、生成したD-アミノ酸はラセミ化を受けないし、補酵素添加などの必要もない。本法によって、D-アラニン、D-ロイシン、D-バリン、D- α -アミノ酪酸、D-メチオニン、D-アスパラギン酸などが、95%以上の収率で合成された。³⁶⁾

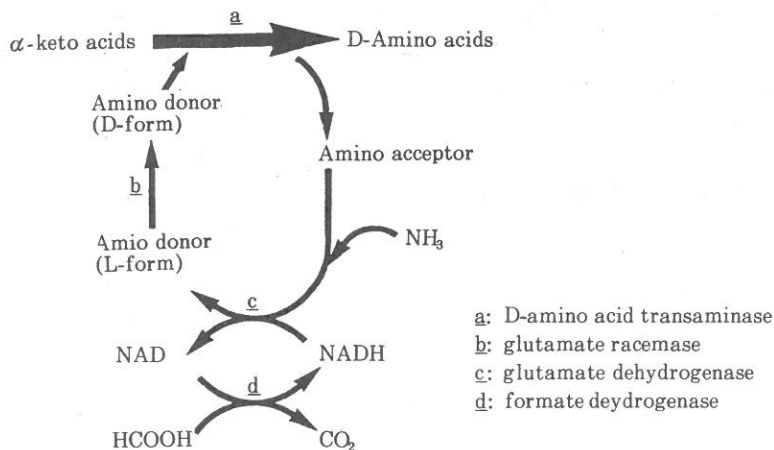


図5 グルタミン酸ラセマーゼを用いるD-アミノ酸の酵素的生産

5. おわりに

アミノ酸ラセマーゼ並びにエピメラーゼは長い間、厳密な吟味を受けることなくPLP酵素と考えられてきたが、以上のように補酵素を含まない酵素が次々証明されてきている。これらの酵素に金属イオンが補欠因子族として含まれている例もない。

補酵素非依存性のこれらの酵素のラセミ化機構の解明は緒についたばかりであるし、PLP依存性酵素との

触媒機構、融媒能などの比較も補酵素の作用機構の解明に鍵を与えるものといえよう。また補酵素非依存性酵素とPLP依存性酵素の蛋白質構造の比較研究もこれらの酵素の分子進化の面から重要な問題である。D-アミノ酸が動物、植物にも広く存在する事実から、微生物以外のアミノ酸ラセマーゼ、エピメラーゼが存在する可能性やそれらの性質の解明も持たれるところである。ラセミ化はある意味でアミノ酸の生体反応中、

最も簡単にして基本的な反応である。それだけにこの酵素反応の機構は根元的な問題を含んでおり、応用面の広がりと共に大きな進展が期待される。

本論文を執筆するにあたり数々の御援助を賜りました岡山県立短期大学教授、岡本賢一先生に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) A. Meister : in *Biochemistry of the Amino Acids*, 2nd Ed., Academic Press, New York, P.113 ('65)
- 2) J. J. Corrigan : *Science*, **164**, 142 ('96)
- 3) A. Meister : in *Biochemistry of the Amino Acids*, 2nd Ed., Academic Press, New York, p.220 ('65)
- 4) H. N. Rydon : *Biochem. Soc. Sympo. (Cavbridge Engl.)*, **1**, 40 ('48)
- 5) T. A. LaRue and J. F. T. Spencer : *Can. J. Microbiol.*, **13**, 777 ('67)
- 6) S. Cooper : *J. Bacteriol.*, **92**, 338 ('66)
- 7) 左右田健次 : *生化学*, **46**, 203 ('74)
- 8) E. Adams : in *The Enzymes*, ed by P. D. Boyer, 3rd Ed., Vol. 6, Academic Press, p478 ('72)
- 9) E. Adams : in *Advances in Enzymology*, ed by A. Meister, Vol. 44, John Wiley & Sons, New York, p.69 ('76)
- 10) K. Soda, H. Tanaka and K. Tanizawa : in *Pyridoxal Phosphate: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, ed by D. Dolphin, Vol 13, John Wiley & Sons, New York, p. 223 ('86)
- 11) G. J. Cardinale and R. H. Abeles : *Biochemistry*, **7**, 3970 ('68)
- 12) P. Ayengar and E. Roberts : *J. Biol. Chem.*, **197**, 453 ('52)
- 13) S. A. Narrod and W. A. Wood : *Arch. Biochem Biophys.*, **35**, 462 ('52)
- 14) L. Glaser : *J. Biol. Chem.*, **235**, 2095 ('69)
- 15) M. Tanaka, Y. Kato and S. Kinoshita : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 114 ('61)
- 16) 田中正生, 加藤 洋, 木下祝郎 : *日本農芸化学会誌*, **35**, 1378 ('61)
- 17) " " " " **35**, 1381 ('61)
- 18) W. F. Diven : *Biochem. Biophys. Acta*, **191**, 702 ('69)
- 19) N. Nakajima, K. Tanizawa, H. Tanaka and K. Soda : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2823 ('86)
- 20) T. H. Finlay and E. Adams : *J. Biol. Chem.*, **245**, 5248 ('70)
- 21) S. G. Ramaswamy : *J. Biol. Chem.*, **259**, 249 ('84)
- 22) P. J. White, B. Lejeune and E. Work : *Biochem. J.*, **113**, 589 ('69)
- 23) J. S. Wiseman and J. S. Nichols : *J. Biol. Chem.*, **259**, 8907 ('84)
- 24) C. Richand, W. Higgins, D. Mengin - Lecreulx and P. Stragier : *J. Bacteriol.*, **169**, 1454 ('87)
- 25) 中島伸佳, 中村 薫, 谷沢克行, 田中英彦, 左右田健次, 昭和61年度日本農芸化学会関西支部大会(鳥取)講演要旨集, ('86)
- 26) S. Shen, H. G. Hoss, H. Kumagai, H. Yamada, N. Esaki, K. Soda, A. Wasserman and C. Walsh : *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **82**, ('83)
- 27) K. Yonaha and K. Soda : *Adv. in Biochem. Eng./ Biotechnol.*, **33**, 95 ('86)
- 28) T. Fukumura : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1695 ('76)
- 29) T. Fukumura : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1321 ('77)
- 30) T. Fukumura : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1327 ('77)
- 31) T. Fukumura : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1509 ('77)
- 32) Y. Asai, M. Shimada and K. Soda : *U.S. Patent*, **4**, 335, 209 ('82)
- 33) K. Sano, K. Yokozeki, F. Tamura and N. Yasuda, I. Noda and K. Mitsugi : *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 806 ('77)
- 34) K. Sano and K. Mitsugi : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2315 ('78)
- 35) K. Sano, K. Matsuda, N. Yasuda and K. Mitsugi : *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 112 ('77)

- 36) 中島伸佳, 谷沢克行, 田中英彦, 左右田健次, 昭和61年度日本農芸化学会関西支部第344回例会(京都)要旨集('86)

昭和63年2月19日受理