

生体触媒の応用：酵素バイオリアクターを用いる各種の光学活性アミノ酸の新規な生物的合成・変換法の開発

中島 伸佳・赤木 玲子・鈴木 和彦・須見 洋行

ABSTRACT

Stereoselectivity is one of the most salient characteristics of enzymes. Thus, enzyme and microbial cells as enzyme bags have been widely used as effective biocatalysts for the industrial production of a variety of optically active useful compounds such as L- and D-amino acids.

We present here the recent results concerning the efficient methods for enantioselective synthesis of various optically active amino acids by means of biocatalysts; enzyme bioreactor.

はじめに：

酵素はタンパク質を主成分とする生体触媒で、生物の多彩な生命現象を演出する最も重要な担い手のひとつである。その触媒として比類のない特性は種類の多様性、高い触媒能と反応および基質（構造および立体）特異性にある。

今日までに2,000種を超える多数の酵素が見い出されており、近年、遺伝子操作法などのバイオテクノロジー領域の著しい技術進展にともなって、酵素を有用物質の工業生産、あるいは食品加工、分析、医療、環境浄化などへ利用する試みが盛んに行なわれるようになってきた。今後、さらに新たな応用面が広がる可能性も極めて大きい。

また、生体の基幹物質のひとつであるタンパク質を構成する各種の光学活性アミノ酸は、その光学異性体であるD-アミノ酸やアミン類、アミノ酸誘導体などと共に、医薬、食品、飼料、および各種の工業生産物の原材料として重要な化学成分である。現在、種々の光学活性アミノ酸やその類縁体は、発酵法に基づく微生物的手法、酵素および化学合成法、あるいは酵素の変換法などによって生産されており、今後、医療、健康、食糧問題などの緊急的課題に対して、その需要がますますのびるものと考えられる。

本稿では、著者の最近の研究結果から、酵素のプロセス、および微生物のプロセスによる各種の光学活性L-およびD-アミノ酸の生物的・不均一合成・変換法について論述する。

実験方法と結果・考察：

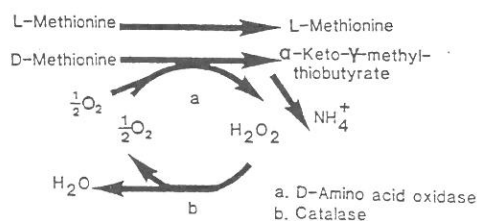
1. 固定化酵素及び補酵素・膜型バイオリアクターを用いる光学活性L-メチオニンの連続生産¹⁾

L-メチオニンは、食品や飼料添加物、点滴成分として、あるいは、医薬品や化学合成品の原料などとして、広く用いられている必須アミノ酸（生体タンパク質構成アミノ酸）である。

現在、L-メチオニンを製造するための、すぐれた発酵法は無く、化学合成法と酵素の変換法の組み合わせにより合成されている。ところが、アミノアシラーゼ法などによって合成された光学活性L-メチオニンには、しばしば、少量のD-異性体が混入し、特に医薬品や食品添加物などとして用いる際に問題となっている。

D-アミノ酸オキシダーゼは、FADを補酵素として、カタラーゼの存在下、D-アミノ酸を酸化的に脱アミノ化し、 α -ケト酸とアンモニアに変換する反応を触媒する(Scheme I)。

Scheme I



本研究では、L-メチオニン中に少量含まれるD-異性体を、固定化酵素・膜型バイオリアクター装置により連続的にD-異性体を分解除去し、高純度の光学

活性L-メチオニン合成する
酵素の変換法を開発する
ことに成功した。D-アミノ酸
オキシダーゼは豚の腎臓から、
オキシダーゼは牛の肝臓から、
それぞれ調製したものを、
これらの酵素を長期間連続的
に作用させるため、オキシラ
ン基を有するアクリルビース
に共有結合させた固定化酵素
を構築し、膜型リアクター中
で反応に供した。

さらに、補酵素FADも、
経済的効率を考慮して、陰イ
オン交換樹脂(Dowex 1×8)
に結合させた固定化型を開発
した。この連続反応膜型バイ
オリクターでは、Fig. 1に
示すように、反応中にD-体
より生成した α -ケト- γ -
メチルチオ酪酸を連続的にイ
オン交換樹脂カラムにより除
去し、また同時に本酵素反応
に必要な酸素を、シリコンコ
イルから送りこむことにより
L-メチオニン合成の効率を
計った。

限外口過膜を反応器の底部
に装填した固定化酵素および
補酵素・膜型バイオリクター
を用いるこの新技術は、0.5
mMのD-体が共存したL-
メチオニン(99.5 mM)調製
物を連続的に反応器中に送り
こむことにより、1日あたり
1 Lのリアクター容量におい
て、約100 gの高純度(100 %
e.e.) L-メチオニンを連続
的に合成することを可能にし
た。本リアクターは、固定化
酵素および補酵素を再添加す
ることなしに、7日間連続運
転することができた(Fig. 2)。

本法は、各種のL-アミノ酸
の効率の高純度変換に適用
することが可能であり、現在、
西ドイツにおいて、工業生産
レベルでのスケールアップ化
が検討されている。

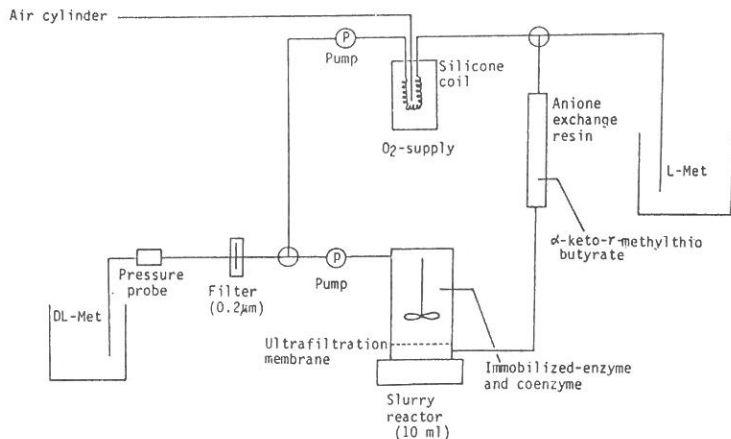


Fig. 1 Reaction scheme for the oxidative deamination of D-methionine by means of an immobilized enzyme reactor system.

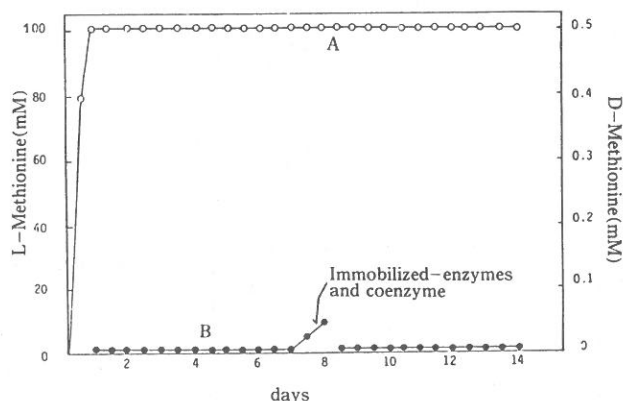


Fig. 2 Continuous Production of L-Methionine in the Slurry Reactor.

Half mM D- and 99.5 mM L-Enantiomers of methionine solution (pH 7.5) was feed continuously with a piston pump at a flowrate of 2.5 ml/hr through the slurry reactor (10ml) containing immobilized D-amino acid oxidase(20units), catalase(1,000units), and FAD(1mM) at 25°C with gentle stirring. After the 7 days operation, new immobilized enzymes and coenzyme were added into the slurry reactor;

(A) L-methionine, (B) D-methionine.

2. 酵素共役反応系によるラセミ型アミノ酸のL-アミノ酸への酵素的変換²⁾

前項でも述べたように、化学的に合成されたアミノ酸はラセミ体であり、酵素的あるいは化学的プロセスによりL-型、もしくはD-型アミノ酸への光学分割が必要である。

本法では、D-アミノ酸オキシダーゼとL-アミノ酸脱水素酵素(ロイシン脱水素酵素)の共役反応系を用いて、ラセミ型アミノ酸(たとえば、DL-メチオ

ニン)中に50%含有されているD-異性体の酸化的脱アミノ化反応と、L-異性体への立体特異的、還元的アミノ化反応を同時に行なわせることにより、100% L-メチオニンに酵素的に変換する方法を開発し、さらには、中間体である α -ケト- γ -メチルチオ酪酸を生成するためのD-アミノ酸オキシダーゼ反応の効率化を計るべく、カタラーゼを共役させ、ロイシン脱水素酵素反応によるL-メチオニン合成のために要求される補酵素NADHの再生のためにギ酸脱水素酵素を共役させた反応系の構築に成功した(Scheme II)。

本酵素共役反応系で用いた、ロイシン脱水素酵素は

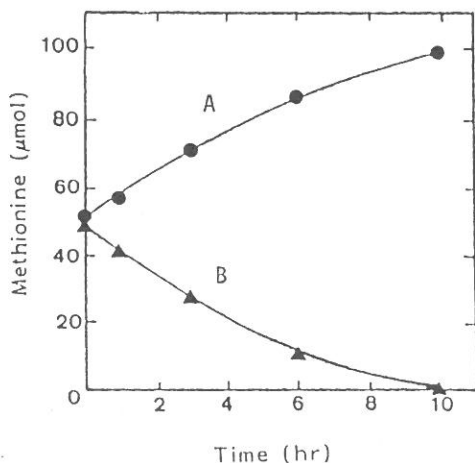
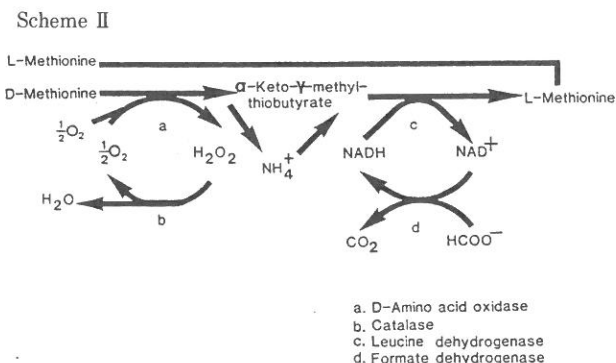


Fig. 3 Enzymatic Conversion of DL-Methionine to the L-Enantiomer.

The reaction mixture (1ml) contained DL-Methionine(100 μ mol), NADH(1 μ mol), FAD(0.1 μ mol), ammonium chloride(25 μ mol), sodium formate(500 μ mol), Tris-HCL buffer(pH8.5, 100 μ mol), D-amino acid oxidase(2units), catalase (5units), leucine dehydrogenase(10units), and formate dehydrogenase(1unit) at 37°C; (A) L-methionine, (B) D-methionine.

遺伝子操作法により、*Bacillus*属や*Clostridium*属の耐熱性細菌から、大腸菌を宿主として容易に調製することが可能である。本法は、50%L-異性体の存在するラセミ体を原料として、残りの50%のD-異性体を、一段階の酵素的プロセスにより、すべてをL-アミノ酸に変換することができる新規な酵素的変換法として注目されている。

すなわち、Fig. 3に示すように、100mMのDL-メチオニンを原料として、50mMのD-異性体を、効率的にL-異性体に変換し、100mMのL-メチオニンを合成することができた。

ロイシン脱水素酵素は、D-アミノ酸オキシダーゼと同様に、基質のアミノ酸に対して、立体特異性が高く、かつ構造特異性が低い酵素であるため、L-メチオニンをはじめとしてL-セレノメチオニン、L-ロイシン、L-バリンなどの各種のL-アミノ酸の、DL体を原料とする酵素的合成・変換法に用いることが可能であった。

3. α -ケト酸を原料とする各種のD-アミノ酸の酵素的合成³⁾

D-アミノ酸は、微生物や植物細胞中などにみだされるL-アミノ酸の光学異性体であり、抗生物質やさまざまな薬理作用を持つ化合物の合成原料として、近年、その生理作用が注目されている。

D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、D-アミノ酸をアミノ基供与体として、種々の α -ケト酸から、対応するD-アミノ酸を合成する反応を触媒するビタミンB₆酵素である。

本研究では、化学合成で比較的安価に得られる α -ケト酸とアンモニアから、各種のD-アミノ酸を合成する酵素的方法を開発した。本酵素反応の効率化を計るため、D-グルタミン酸をアミノ基供与体として用い、D-アミノ酸へのアミノ基転移反応によって生ずる α -ケトグルタル酸をグルタミン酸脱水素酵素と、グルタミン酸ラセマーゼの共役反応系によりD-グルタミン酸に再生させることが、本法の特長であり、さらにグルタミン酸脱水素酵素の補酵素NADHの再生のために、ギ酸脱水素酵素を共役させている(Scheme III)。

Fig. 4に示すように、 α -ケトイソ吉草酸を原料として、1Lの基質溶液あたり、約50gのD-バリンを効率的に合成することが可能であった。

さらに、本酵素変換法は、同様の条件下で、アラニン、 α -アミノ酪酸、アスパラギン酸、ロイシン、メ

Scheme III

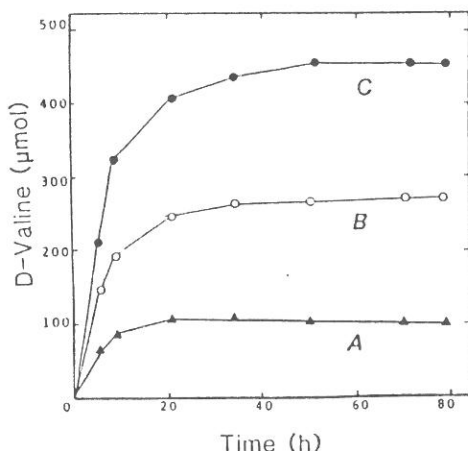
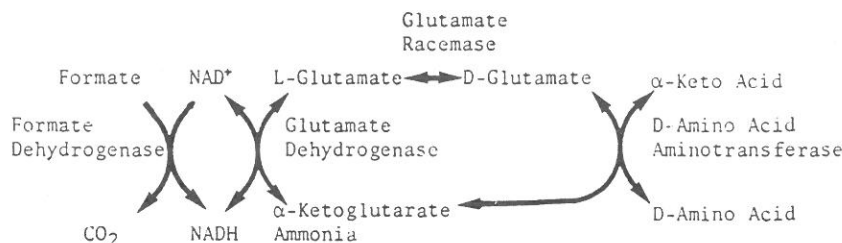


Fig. 4 Enzymatic Production of D-Valine from α -ketoisovalerate.

Various concentrations of α -ketoisovalerate and ammonium formate were incubated at 37°C with D-amino acid aminotransferase(5 units), glutamate racemase(1unit), glutamate dehydrogenase(10units), formate dehydrogenase (1unit), in the reaction mixture (1ml) containing 10mM L-glutamate, 50uM PLP, and 1mM NAD; α -ketoisovalerate : (A) 100, (B) 300, and (C) 500 μ mol. ammonium formate : (A) 300, (B) 600, and (C) 1,000 μ mol.

チオニン、バリン、セリン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシンなどの、D-異性体を合成することができる効率的な酵素的変換法である。

本法で用いたD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼとグルタミン酸ラセマーゼは、それぞれ、*Bacillus*属、および*Pediococcus*属細菌の生産する酵素を遺伝子組換え技術によって、大腸菌から容易に、大量精製することが可能である。また、グルタミン酸脱水素酵素とギ酸脱水素酵素は、本法では、それぞれ、牛肝、および*Candida*属の酵母から調製したものを用いている。

4. 微生物細胞を用いるアミノニトリルからD-バリンの生産⁴⁾

アミノニトリルは工業的に安価に合成できるラセミ化合物である。*Fusarium*属のカビ類の一種である*Fusarium oxysporum*は、各種のアミノニトリルのニトリル基を加水分解して、アミノカルボン酸を生成することを発見し、本菌体を用いて、一定の条件下で、DL- α -アミノイソバレロニトリルから、立体特異的にD-バリンのみを生産させることに成功した。

Fig. 5に示すように、菌体との10時間の反応により、基質に対し30%の収率で生産され、基質DL- α -アミノイソバレロニトリルは、約50%残存していることから、基質のD体のみが加水分解を受け、D-バリンが生成したものと考えられる。

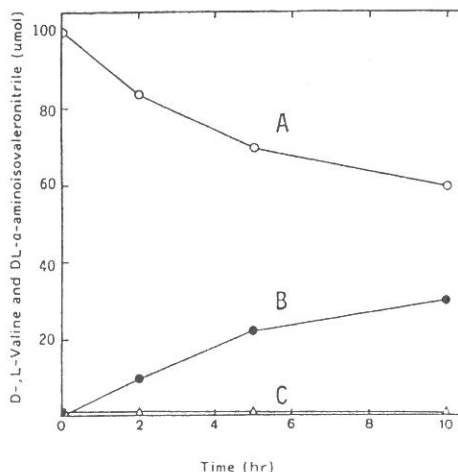


Fig. 5 Formation of D-Valine from DL-Aminoisovaleronitrile.

The reaction mixture (1ml) contained 50mg (wet weight) of the mycelia, 100 μ mol of DL- α -aminoisovaleronitrile, and 100 μ mol of potassium phosphate buffer (pH7.2). Incubation was carried out at 30°C; (A) DL- α -aminoisovaleronitrile, (B) D-Valine, (C) L-Valine.

本菌体より調製した無細胞抽出液中の、これらのニトリル分解に関与する酵素系は、非常に不安定であるため、いかなる酵素反応が進行しているか、今のところ不明瞭であるが、おそらく、アミノニトリルニトリラーゼ、もしくは、アミノニトリルアミドを中間体とするアミノニトリルヒドラーゼとアミダーゼの共役反応系が立体特異的に関与しているものと考えられる。本酵素反応系の作用機作の解明は、環境中のシアン化合物の分解除去といった問題とも関係が深く、非常に興味深い酵素反応のひとつである。

おわりに：

生体触媒・酵素を利用する各種のアミノ酸合成への酵素のプロセス、あるいは微生物のプロセスによる生物の変換法について、最近著者が開発した新規技術を紹介した。

現在、アミノ酸のみならず、各種の有用物質の合成・にさまざまな酵素が用いられており、化学、分析、医療、薬理、食品加工、工業生産などの多方面に、今後、ますます新たな応用面が広まると考えられる。

また、医薬品の生理作用は、その光学活性に基づいている場合が多く、酵素反応の構造、および立体特異性は非常に重要な鍵をにぎっていると言うことができる。バイオテクノロジー技術の発展にともない、遺伝

子操作法による酵素の一次構造の解析や改変も可能であり、基礎面では、酵素の分子レベルにおける構造と機能の解明など、また、応用面では、有用な新規酵素の創製、および、それらを用いる不斉合成・変換技術など、酵素に寄せられる期待は大きい。

本研究は、平成2年6月23日、食と健康懇話会、ライフサイエンス研究会、第一回設立シンポジウム（於、岡山市、三光荘県民プラザ）において発表した。

謝 辞

本研究の進展は、昭和62年度、第25回、山陽放送学術文化財団研究助成、昭和63年度、文部省科学研究費補助金、平成元年度、文部省在外研究員費補助金、同年度、日本農芸化学会研究奨励賞研究助成、平成二年度、文化省科学研究費補助金、さらには平成元年度、および二年度、両備狸園記念財団、生物学研究助成（第11、12回）、日本農芸化学会鈴木奨学金研究小集会開催補助金などの研究助成に依存するところが多大である。

なお、本研究を遂行するにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました、京都大学化学研究所、教授、左右田健次先生、並びに、岡山県立短期大学長、新見嘉兵衛先生に厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) N. Nakajima et. al., "Continuous Conversion to Optically Pure L-Methionine from D-Enantiomer Contaminated Preparations by an Immobilized Enzyme Membrane Reactor." *J. Ferment. Bioeng.*, 70 (5), 322-325, 1990.
- 2) N. Nakajima et. al., "Enzymatic Conversion of Racemic Methionine to the L-Enantiomer." *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 13, p.947-948, 1989.
- 3) N. Nakajima et. al., "Enantioselective Synthesis of Various D-Amino Acids by a Multi-enzyme System." *J. Biotechnol.*, 8, 243-248, 1988.
- 4) N. Nakajima et. al., "Microbial Production of D-Valine from Racemic α -Aminoisovaleronitrile." *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, 65 (3), 141-143, 1987.

平成2年5月7日受付

平成2年6月7日受理