

新たな酵素機能の探索と
有用D-アミノ酸の工業的生産方法の開発
に関する研究

矢ヶ崎 誠

新たな酵素機能の探索と
有用D-アミノ酸の工業的生産方法の開発
に関する研究

矢ヶ崎 誠

目次

第1章 序論	1
1-1 D-アミノ酸	1
1-1-1 不斉の発生	1
1-1-2 D-アミノ酸の存在と生理的意義	2
1-1-3 D-アミノ酸の用途	4
1-2 酵素法	6
1-2-1 酵素法の特徴	6
1-2-2 酵素法による有用物質の生産	8
1-2-3 酵素法の展開	9
1-3 L-アミノ酸の製造法	11
1-3-1 発酵法	11
1-3-2 合成法	12
1-3-3 酵素法	13
1-4 D-アミノ酸の製造法	16
1-4-1 発酵法	16
1-4-2 合成法	16
1-4-3 酵素法	16
1-5 本研究の目的	19
1-6 文献	20
第2章 D-アラニン生産法の開発	41
2-1 序論	41
2-1-1 D-アラニンの存在と生理的意義	41
2-1-2 D-アラニンの製造方法	42
2-1-3 D-アラニン製造の目的と方法	44
2-2 実験方法及び材料	46
2-2-1 菌株	46
2-2-2 使用培地	46
2-2-3 培養条件	46
2-2-4 D-体特異的アミダーゼのスクリーニング	47
2-2-5 L-体特異的アミダーゼのスクリーニング	47
2-2-6 D-体特異的アミダーゼ構成生産変異株の分離	47
2-2-7 D-アミダーゼ、L-アミダーゼ、アラニンラセマーゼの活性測定法	48
2-2-8 アラニン及びアラニンアミドの定量法	49
2-2-9 D-体特異的アミダーゼの精製	49
2-2-10 酵素蛋白質の分析	50
2-3 結果	52
2-3-1 D-体特異的アミダーゼのスクリーニング	52
2-3-2 D-体特異的アミダーゼの諸性質	53
2-3-3 <i>Arthrobacter</i> sp. NJ-26を用いたD-アラニンの製造	56

2-3-4	D-体特異的アミダーゼ構成生産変異株の分離	57
2-3-5	L-体特異的アミダーゼのスクリーニングと諸性質	58
2-3-6	<i>Rahnella</i> sp. L-5を用いたL-アラニンの製造	60
2-4	考察	62
2-4-1	本製造方法の評価	62
2-4-2	D-アミダーゼの酵素的性質	64
2-4-3	L-アミダーゼの酵素的性質	65
2-5	まとめ	67
2-6	文献	69

第3章 D-グルタミン酸生産方法の開発 79

3-1	序論	79
3-1-1	D-グルタミン酸の存在と生理的意義	79
3-1-2	D-グルタミン酸の製造方法	80
3-1-3	D-グルタミン酸の製造の目的と方法	81
3-2	実験方法及び材料	83
3-2-1	菌株	83
3-2-2	使用培地	83
3-2-3	培養条件	83
3-2-4	グルタミン酸ラセマーゼのスクリーニング	84
3-2-5	グルタミン酸ラセマーゼの活性測定法	84
3-2-6	グルタミン酸デカルボキシラーゼのスクリーニング及び活性測定法	85
3-2-7	グルタミン酸及びγ-アミノ酪酸の定量法	85
3-2-8	制限酵素及び遺伝子操作	85
3-2-9	グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子のクローニング	86
3-2-10	グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子のサブクローニング	86
3-2-11	DNA塩基配列の解析	86
3-2-12	グルタミン酸ラセマーゼの精製	86
3-2-13	SDS-PAGE	87
3-2-14	N-末アミノ酸配列分析	87
3-3	結果	88
3-3-1	グルタミン酸ラセマーゼのスクリーニング	88
3-3-2	乳酸菌を用いたD-グルタミン酸の製造	89
3-3-3	グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子のクローニング	92
3-3-4	組換え株の生産するグルタミン酸ラセマーゼの諸性質	95
3-3-5	グルタミン酸デカルボキシラーゼのスクリーニング	97
3-3-6	D-グルタミン酸生産方法の検討	98
3-4	考察	101
3-4-1	本製造方法の評価	101
3-4-2	グルタミン酸ラセマーゼの酵素的性質	102
3-4-3	グルタミン酸ラセマーゼの補因子	103
3-4-4	グルタミン酸ラセマーゼのアミノ酸配列	103
3-4-5	補酵素非依存性グルタミン酸ラセマーゼの反応機構	105
3-4-6	グルタミン酸ラセマーゼの生理的意義	107

3-5	まとめ	109
3-6	文献	111
第4章 D-プロリン生産方法の開発		122
4-1	序論	122
4-1-1	D-プロリンの存在と生理的意義	122
4-1-2	D-プロリンの製造方法	122
4-1-3	D-プロリンの製造の目的と方法	124
4-2	実験方法及び材料	126
4-2-1	菌株	126
4-2-2	使用培地	126
4-2-3	培養条件	126
4-2-4	プロリンラセマーゼのスクリーニング	127
4-2-5	プロリンラセマーゼの活性測定法	127
4-2-6	プロリン分解菌のスクリーニング及び活性測定法	128
4-2-7	プロリンの定量法	128
4-2-8	制限酵素及び遺伝子操作	128
4-2-9	プロリンラセマーゼ遺伝子のクローニング	128
4-2-10	プロリンラセマーゼ遺伝子のサブクローニング	128
4-2-11	DNA塩基配列の解析	129
4-2-12	プロリンラセマーゼの精製	129
4-2-13	SDS-PAGE	129
4-2-14	N-末アミノ酸配列分析	129
4-3	結果	130
4-3-1	プロリンラセマーゼのスクリーニング	130
4-3-2	プロリンラセマーゼ遺伝子のクローニング	132
4-3-3	プロリンラセマーゼの諸性質	136
4-3-4	L-プロリン分解菌のスクリーニング	139
4-3-5	D-プロリン生産方法の検討	141
4-4	考察	143
4-4-1	本製造方法の評価	143
4-4-2	プロリンラセマーゼの酵素的性質	144
4-4-3	プロリンラセマーゼのアミノ酸配列	145
4-4-4	プロリンラセマーゼの反応機構	146
4-4-5	プロリンラセマーゼの生理的意義	147
4-4-6	<i>E. coli</i> 組換え菌を用いたプロリンラセマーゼの生産	147
4-4-7	L-プロリンの分解	148
4-5	まとめ	149
4-6	文献	151
第5章 考察		157
5-1	D-体アミノ酸の工業的生産	157
5-1-1	出発基質	157
5-1-2	方法論の比較	159

5-1-3	本論の方法	161
5-1-4	他への応用の可能性	163
5-1-5	他の酵素法	164
5-2	立体特異的アミダーゼ	166
5-3	補酵素非依存性ラセマーゼ	168
5-4	酵素法一般	170
5-5	文献	172
第6章 まとめ		181
第7章 謝辞		184
第8章 文献リスト		185

Abbreviations

Ala	alanine
Asp	aspartic acid
DAP	diaminopimelic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
DO	dissolved oxygen
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	flavin adenine dinucleotide
FDAA	1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamide
FMN	flavin mononucleotide
GABA	γ -aminobutylic acid
Glu	glutamic acid
HPLC	high-performance liquid chromatography
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NTG	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
OD	optical density
OPA	<i>o</i> -phthalaldehyde
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCMB	<i>p</i> -chloromercuribenzoic acid
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethyleneglycol
PLP	Pyridoxal phosphate
Pro	proline
SDS	sodium laurylsulfate
TCA	trichloroacetic acid
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

Abbreviations

UDP	uridine 5'-diphosphate
%ee	% enantiomer excess

第1章 序論

1-1 D-アミノ酸

1-1-1 不斉の発生

有機化合物の多くは不斉炭素原子を持つため、光学異性体が存在する。光学異性体の物理化学的性質は、旋光性を除けばほとんどが等しいと考えられる。不斉中心を有する有機化合物の化学合成を行った場合、光学異性体が等量混合した形で得られる場合がほとんどである。しかし、多くの天然の有機化合物は、例えばアミノ酸についてはほとんどがL-体であるように、存在が一方の光学異性体に極端に偏っている。この天然の有機化合物における不斉の存在は、1815年、Biotの有機化合物の液体あるいは溶液による偏光の回転により予想され、1848年、Pasteurのラセミ体の酒石酸塩からの非対称な2つの結晶の取得により裏付けられた¹⁾。その後、多くの研究により、生体は非対称な有機化合物の一方、すなわち光学活性物質により構成されることが明らかになった。生体が光学活性物質から成り立つ必然性を考える場合、酵素蛋白質を考えると理解しやすい。例えば、100個のアミノ酸残基から成る酵素が、ラセミ体のアミノ酸を構成成分とした場合、理論的には $2^{100} \approx 10^{30}$ 種類の異性体の混合物となる。これでは、期待した機能を有する酵素蛋白質はほとんどできずに、生命を維持することが困難になる。したがって、生命を維持するためには生体成分を光学活性な物質から構成し続けることが必要であり、生命の誕生には不斉の発生が不可欠であると考えられる。

不斉の発生については、いくつかの説がある。例えば、(1) 水晶などの地表に大量に存在するキラルな結晶表面への不斉吸着や不斉化学反応、(2) キラルな物理力である円偏光による不斉分解や不斉合成、(3) ラセミ体中の1成分の偏りによる選択的結晶化による光学活性体の蓄積と残留などの偶然説である¹⁾。これらの説によれば、現在の地球上は、たまたまL-体のアミノ酸が大部分を占めているが、D-体のアミノ酸が大部分を占める環境が存在してもおかしくないことになる。Miltonらは、全てD-体のアミノ酸で合成したHIVプロテアーゼであるD-酵素が、本来の酵素であるL-酵素と鏡像の高次構造を取るだけでなく、基質の光学選択性、反応特異性、阻害特異性が全てL-酵素と鏡像関係になったことを報告した^{2,3)}。この結果は、現在の地球とは鏡像関係にある物質から成り立つ環境が存在する可能性を示唆すると思われる。一方で、(4) パリティ非保存による光学活性の発生などの必然説もあるが¹⁾、どの説も決定的ではない。

1-1-2 D-アミノ酸の存在と生理的意義

生体を構成するアミノ酸のほとんどはL-体でありD-体の存在はほとんど知られていなかったが、近年の分析技術の進歩に伴い⁴⁶⁾、広範囲の生物からD-アミノ酸の存在が見出されている (Table 1-1)。

微生物に存在するD-アミノ酸は、主に細菌細胞壁のペプチドグリカンや抗生物質の構成成分として見出されている。ペプチドグリカンは細菌細胞壁の基本構造であり、N-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸から成る2糖単位の鎖と、D-アラニン、L-アラニン、D-グルタミン酸、L-リジン (また

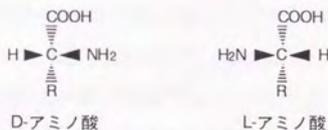


Fig. 1-1 D-アミノ酸とL-アミノ酸

Table 1-1 生物に存在するD-アミノ酸⁴⁹⁾

D-アミノ酸	所在		
	微生物	植物	動物
D-アラニン	細菌の細胞壁、胞子	エンドウ、ネギ、トウモロコシ、イネ科	ナガカメムシ、鱗翅類の幼虫、オクトピン(タコ)、ガチョウの筋肉、モルモットの血液
D-アスパラギン酸	細菌の細胞壁、バシトラシンA		
D-グルタミン酸	細菌の細胞壁、細胞外粘性物質、バシトラシン、エタマイシン		コフキコガネの筋肉
D-ロイシン	グラミシジン、ポリミキシン、チルリン、エタマイシン	トウモロコシ	
D-イソロイシン	モナマイシン		
D-オルニチン	グラミシジン、バシトラシン、細胞壁		
D-フェニルアラニン	グラミシジン、チロシジン、ポリミキシン、バシトラシン		
D-プロリン	麦角アルカロイド	アマ種子、ビワ種子	
D-セリン	ポリミキシンD、エチノマイシン		
D-トリプトファン	ロンジカテナマイシン	植物	
D-バリン	グラミシジンD、アクチマイシン	トウモロコシ、ライ	
D-リジン		トウモロコシ、ライ	
D-メチオニン		トウモロコシ、ライ	
D-システイン			ルシフェリン (ホタル)

は meso- α, ϵ -ジアミノピメリン酸) から成るペプチドにより強固な構造を形成している^{7,8)}。
Corynebacterium poinsettiae は、D-オルニチンも構造中に含む⁹⁾。多くの細菌では、ペプチドグリカンに含まれるD-アラニンとD-グルタミン酸に、遊離のD-アミノ酸を利用していると考えられる^{7,8)}。D-アラニンの生合成は、アラニンラセマーゼによりL-アラニンから生成する経路と、D-アミノ酸トランスアミナーゼによりピルビン酸から生成する経路が考えられる。実際、比較的多くの細菌からアラニンラセマーゼ活性が検出されていることから¹⁶⁻³⁹⁾、多くの細菌においてアラニンラセマーゼを用いるL-アラニンからのD-アラニン生合成経路が存在する可能性が考えられる。また、D-グルタミン酸の生合成は、*Bacillus* 属細菌に知られるD-アラニンと2-オキソグルタル酸からD-アミノ酸トランスアミナーゼを用いてD-グルタミン酸を生合成する経路と⁴⁰⁻⁴⁸⁾、*Escherichia coli* に見出されたグルタミン酸ラセマーゼによりL-グルタミン酸のラセミ化によるD-グルタミン酸の生成経路が考えられる⁴⁹⁻⁵⁶⁾。

微生物の生産するペプチド抗生物質にも多くの種類のD-アミノ酸が含まれる。例えば、セファロスポリンCにはD- α -アミノアジピン酸、バシトラシンAにはD-グルタミン酸、D-アスパラギン酸、D-オルニチン、D-フェニルアラニン、ポリミキシンBにはD-フェニルアラニン、グラミシジンSにはD-フェニルアラニン、アクチノマイシンにはD-バリンとD-アロイソロイシンが含まれる。ペプチド抗生物質に含まれるD-アミノ酸の種類は多いが、D-アルギニン、D-ヒスチジン、D-メチオニンが含まれる例はほとんどない^{11,12)}。ペプチド抗生物質に含まれるD-アミノ酸については、遊離のD-アミノ酸の利用の報告はなく、L-アミノ酸のD-体への変換とペプチドへの結合が同時に起こっていると考えられている^{9,13)}。例えば、*Bacillus brevis* におけるグラミシジンSの生合成では、ATP要求性の特殊なフェニルアラニンラセマーゼにより、L-フェニルアラニンが活性化とラセミ化を同時に起こしてペプチドに取り込まれてD-フェニルアラニンとなる^{14,15)}。

その他、*Claviceps purpurea* の生産する麦角アルカロイドの一種エルゴタミンにはD-プロリンが、*Bacillus subtilis* の生産する細胞外粘性物質にはD-グルタミン酸が重要な構成成分として含まれる⁹⁾。また、細菌によってはアミノ酸ラセマーゼを有するものもあり⁵⁷⁻⁵⁹⁾、遊離のD-アミノ酸が存在する可能性があるが、存在と生理的意義を示す報告はない。

微生物におけるD-アミノ酸の役割は、ペプチドグリカンや抗生物質の構成成分として、L-体に作用するペプチダーゼなどによる分解を回避している可能性も考えられるが、真の生理的意義は不明である。

高等植物からは、*N*-マロニル-D-トリプトファン⁶⁰⁾、エンドウ芽生え中の*N*-マロニル-D-アラニン、 γ -L-グルタミル-D-アラニン^{60,62)}、タバコ葉中のD-アラニル-D-アラニン⁶³⁾、イネ科植物のD-アラニルグリシン⁶⁰⁾、D-アラニル-D-アラニン⁶⁴⁾、アマ種子中のリナチン (1-[*N*-(γ -L-グルタミル)アミノ]-D-プロリ

ン)⁶⁵、ビワ種子中のトランス4-ヒドロキシメチル-D-プロリン⁶⁶など、いずれもジペプチドまたはそれに準じる比較的簡単な構造の化合物として見出される。植物におけるD-アミノ酸の生合成経路は不明であるが、エンドウ芽生え中のD-アラニンはD-アミノ酸トランスアミナーゼによりピルビン酸から生合成されると考えられている⁶⁰。植物におけるD-アミノ酸は、種子や芽生え中に見出されることが多いことから、出芽などに関与することが予想されるが、生理的意義は不明である。

動物については、タコやイカの筋肉中に見出されるオクトピン中のD-アラニン⁶⁹や、ホタルのD-ルシフェリン中のD-システイン⁷⁰、アフリカマイマイの神経ペプチド中のD-フェニルアラニンなどのD-体のアミノ酸が見出されている⁷⁰。他、多くの生物から遊離の状態のD-アミノ酸が見出されている。動物におけるD-アミノ酸の代謝は、D-アミノ酸オキシダーゼによると考えられている⁷⁰。D-アミノ酸オキシダーゼが広く存在することから、基質となるD-アミノ酸が何らかの生理的機能を有することが予想されるが、やはり生理的意義は不明である。

1-1-3 D-アミノ酸の用途

D-アミノ酸は、医薬品や農業の合成原料として有用な化合物であり、近年の盛んなD-アミノ酸の用途開発に伴い、重要性が増している有機化合物である。特に需要が多いD-アミノ酸は、ペニシリン系抗生物質やセフェム系抗生物質の合成原料として重要なD-*p*-ヒドロキシフェニルグリシンとD-フェニルグリシンである。D-*p*-ヒドロキシフェニルグリシンは、ペニシリン系抗生物質であるアモキシシリン、アスピキシリン、セフェム系抗生物質であるセファトリジン、セファドロキシル、セファペラゾン、セフペラゾン、セフピラミドなどの合成原料として用いられ、1990年の生産量は約1,000トン（国内約400トン、輸出約600トン）であった⁷¹。また、D-フェニルグリシンは、ペニシリン系抗生物質であるアンピシリン、ヘタシリンナトリウム、ソル酸スルタミシリン、塩化タランピシリン、塩化バカンピシリン、塩化レナンピシリン、ピペラシリンナトリウム、セフェム系抗生物質であるセファレキシン、セフラジン、セファクロール、セフロキサジン、セファログリニンなどの合成原料として用いられ、1991年の生産量は約600トン（国内約300トン、輸出約300トン）であった⁷¹。D-システイン⁷²やD-アスパラギン酸⁷³もβ-ラクタム系抗生物質の側鎖に重要である。D-バリンはピレスロイド系殺虫剤であるフルバリネートの合成に使用される^{74,75}。他のD-アミノ酸も抗生物質の構成成分として見出されていることから、抗生物質の合成原料としての用途が予想される。また、D-アミノ酸を合成生理活性ペプチドに導入することにより生理活性が向上する場合もあり、種々の生理活性ペプチドの合成に利用される⁷⁷。D-スレオ-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)セリンは低血圧の治療剤や抗うつ剤として用いられる⁷⁶。その他、Table 1-2に示すようにD-体のアミノ酸はプロリンを除いて甘味を呈することから甘味料への利用が考えられ、D-アラニンはアリテームなど

のL-アスパルチル-D-アラニンを基本構造とする人工甘味料⁷⁹⁾の製造原料としての用途がある。

D-体のアミノ酸の生理的役割はほとんどわかっていないが、D-アミノ酸を含む化合物には非常に有用な生理活性を有するものも多く、生理活性物質の製造に重要な化合物の1つであると考えられる。

D-アミノ酸を安価に生産できる技術が完成すれば、さらに用途と需要は拡大すると予想される。

Table 1-2 アミノ酸の立体構造と味⁷⁹⁾

アミノ酸	L-体	D-体
アラニン	甘	強甘
セリン	微甘	強甘
スレオニン	微甘	弱甘
バリン	苦	強甘
ロイシン	苦	強甘
イソロイシン	苦	甘
メチオニン	苦	甘
フェニルアラニン	微苦	甘
チロシン	無味	甘
トリプトファン	苦	強甘
ヒスチジン	苦	甘
オルニチン(HCl)	苦	弱甘
リジン(HCl)	苦	弱甘
アルギニン(HCl)	微苦	やや甘
アスパラギン酸(Na)	微苦	無味
グルタミン酸(Na)	旨	無味
アスパラギン	苦	弱甘
グルタミン	やや旨味	甘
プロリン	弱甘	微苦

1-2 酵素法

1-2-1 酵素法の特徴⁸⁰⁻⁹⁷⁾

人類は古代より、微生物を用いた発酵法によって種々の物質を生産してきた。発酵生産は酵素による物質変換反応が複雑に組み合わさったシステムであると考えられ、近年、この根本となる酵素による物質変換に注目した酵素法が展開した。一方、有機合成の見地からも、物質変換の触媒としての酵素の利用に注目し、酵素法が展開した。このように、酵素法は発酵法と化学合成法の両方から派生した物質生産方法である。したがって、酵素法は、発酵法と化学合成法の特徴が巧みに生かされているが、同時に両方法の欠点も有している。

酵素法と化学合成法の一般的な特徴をTable 1-3に示す。これらの特徴は、反応に関わる触媒の性質に起因する。酵素反応は加速性に優れ、温和な条件でも反応が進行する。しかし、酵素はファン・デル・ワールス力や水素結合によって高次構造や触媒活性を維持するため、温和な条件でしか反応が進行しないとみえる。酵素法は反応条件が限定されることから、実用性の面では化学合成法に及ばない部分も多い。しかし、酵素法の最大の特徴は、高い選択性である。化学合成法で高い選択性を実現するには、基質の持つ光学活性などの特殊な性質を維持し生成物に生かすか、特殊な触媒を用いたごく限られた場合以外は極めて困難である。実際、不斉合成を含む光学活性な化合物の合成に酵素法の成果が集中している。酵素法の利点はこの高い選択性であり、この特徴を生かせる場合に非常に有効な製造方法となる。

Table 1-3 酵素反応と化学反応の比較⁸²⁻⁸⁴⁾

	酵素反応	化学反応
反応条件	常温, 常圧	高温, 高圧
反応エネルギー	酵素分子の配座の変化に基づくエネルギー	熱エネルギー
溶媒	水(まれに含水溶媒)	水, 有機溶媒
反応特異性	高い	低い
基質特異性	高い	低い
位置特異性	高い	低い
立体特異性	高い	低い
基質, 生成物濃度	低い	高い

次に、酵素法と発酵法の一般的な特徴をTable 1-4に示す。発酵法は、微生物の生育という生命現象に伴う物質生産を利用し、比較的安価な原料から有用物質を生産する方法である。一方、酵素法は、微生物をより機能的にとらえ、単に特定の反応に関与する触媒として利用する生産方法である。したがって、酵素法は極めて有機化学的な発想に基づく生産方法である。発酵法は、安価な原料から複雑な構造の化合物を生産することが可能である。酵素法は、多くても数段の反応で目的の物質を生産するため、出発物質は生産物に近い構造を取る必要があり、原料が高価になる場合が多い。しかし、化学合成や発酵法などにより比較的安価に生産される物質を出発原料として利用できる場合には問題にならない。酵素法は、発酵法とは異なり、特定の反応のみを選び利用できるため、反応の特異性が高く副生物の生成は少ない。また、酵素法は、発酵法では多量の生成と蓄積が困難な化合物であっても、高濃度に生産が可能である。さらに、酵素法は、本来の反応生成物である天然物だけではなく、非天然物までも生産が可能である。

このように、酵素法は、化学合成法や発酵法とは異なる特徴を有し、この利点を生かせる場合には非常に有効な生産手段となる。実際には、これらの方法を組み合わせた複合的な生産例が多く報告されている。

Table 1-4 酵素法と発酵法の比較⁽³²⁻³⁴⁾

	酵素法	発酵法
微生物	生育菌体, 休止菌体, 処理菌体, 孢子, 細胞抽出液, 精製酵素など	生育菌体
反応	1~数段反応	生命現象(多段反応)
反応時間	短い	長い
反応温度	25~50 °C	常温付近
基質, 立体特異性	高い	高い
副生物	無い	有る
原料	反応前駆物質	炭素源, 窒素源(安価)
対原料収率	高い	低い
生成物	天然物, 非天然物	天然物
生成物濃度	高い	低い
生成物の単離	容易	困難

1-2-2 酵素法による有用物質の生産^{80,97)}

酵素法は、近年、物質生産に利用され始めた比較的新しい生産方法である。酵素法は、高い選択性を利用した不斉合成に用いられる場合がほとんどである (Table 1-5)。中でも、医薬品や農薬の製造への応用が多い。その理由は、医薬品や農薬は、製品の付加価値が比較的高いことと、高い光学純度が要求されるためである。医薬品に高い光学純度が要求される例は、サリドマイド事件が有名である。R体のサリドマイドは鎮痛作用を持ち、S体は非常に強い催奇性を持つが、ラセミ体として用いられたことにより事件が発生した。また、バルビツール酸誘導体のR体は麻酔性を有するが、S体はけいれんを引き起こす。このように、有機化合物は立体構造によって生理活性が大きく異なることから、特に医薬品や農薬に高い光学純度が要求される。

通常の化学反応について、対応する反応を触媒可能な酵素が必ず存在すると言われ、酵素法の反応の種類は非常に多い。以下に、酵素法の持つ高い選択性を生かした反応の例を示す。

(1) 還元反応の例の多くは、カルボニル基の還元である。プロキラルな分子内のカルボニル基をデヒドロゲナーゼで還元するとエナンチオ区別反応が起こり、光学活性のアルコールを生成する。この方法を用いたフェロモン類⁹⁹⁾やカルニチンの合成中間体の不斉合成の例がある。初期の研究では、大量に安定した性質の菌体が供給されるパン酵母を利用した報告も多いが、最近では、目的の反応に適した微生物をスクリーニングして用いる場合も多い。(2) 酸化反応は、化学反応では選択性が乏しいC-H結合の活性化によるアルコール、アルデヒド、カルボン酸等の生成や、二重結合の酸化によるエポキシドの生成に利

Table 1-5 酵素法による有用物質の生産^{80,83)}

1. ステロイド類の変換 水酸化反応 (酵素添加酵素) 酸化・還元反応 (脱水素酵素) 側鎖切断反応 (酵素添加酵素)	8. アミノ酸の合成 立体選択的加水分解 (加水分解酵素) α-アミノ-ε-カプロラクタム 2-アミノ-Δ ² -アゾリシム-カルボン酸 5置換ヒダントイン
2. アルカロイド類の変換	フェマル酸のアミノ化 (アスパルターゼ) チロシン関連アミノ酸合成 (β-チロシナーゼ) トリプトファン関連アミノ酸合成 (トリプトファンナーゼ)
3. 抗生物質の合成 入エペニシリン合成 (アミダーゼ) 入エセファスボリン合成 (アミダーゼ)	システイン関連アミノ酸合成 (システインデスルフィドラーゼ)
4. 有機酸の合成 フェマル酸の水和 (フマラーゼ) アルカンの両端酸化 (酵素添加酵素) エポキシコハク酸の不斉水解 (加水分解酵素) 脂肪酸の水酸化 (脱水素酵素) ケトバントイルラク톤の不斉還元 (レダクターゼ)	セリン合成 (セリントランスヒドロキシメチラーゼ) アラニン合成 (アスパラギン酸-β-脱炭酸酵素)
5. 糖の変換 環状糖 (グルコースイソメラーゼ)	9. アミンの合成 アミノ酸の脱炭酸 (脱炭酸酵素)
6. 蛋白質の合成 プラスチインの合成 (プロテアーゼ) ヒトインスリンの合成 (プロテアーゼ)	10. 化学工業原料 オキサイド類合成 (酵素添加酵素) ケトン類合成 (二級アルコール脱水素酵素) ピロガロール合成 (没食子酸脱炭酸酵素) アミド類合成 (ニトリルヒドラーゼ)
7. ナクレオチド、ナクレオシド N-リボシル化反応 (ホスホリラーゼ) N-アラビノシル化反応 (ホスホリラーゼ) ナクレオシドのリン酸化反応 (リン酸転移酵素) ナクレオチドのピロリン酸化反応 (ピロリン酸転移酵素) 糖ナクレオチド合成 (ピロホスホリラーゼ) 補酵素類の合成	

用される。光学活性なエポキシドは、液晶の製造原料として有用な物質である。(3) 加水分解反応は、比較的簡単な反応であり、光学活性体の創製に多く用いられる方法である。酵素の種類も多く、エステル、アミド、ヒダントイン、ニトリル、エポキシドなどを基質とした多くの報告がある。また、加水分解反応は、還元、酸化反応とは異なり、補因子が不要な場合が多く、反応系が単純になる利点もある。(4) 加水分解能の逆反応も、特殊な反応条件下では可能であり、エステラーゼ、リパーゼ、ペプチダーゼを用いた例が知られる。また、(5) 複数の酵素反応からなる生合成経路の一部を利用して、天然型化合物の誘導体やアナログを生成する方法も知られる。例えば、ヌクレオシドの合成経路を利用した抗ウイルス性ヌクレオシドの合成例がある⁹⁸⁾。

1-2-3 酵素法の展開

酵素反応は、温和な条件下で進行することが特徴であるが、このことは、反応条件が非常に限られていることにもなる。したがって、酵素法による反応系を完成させる場合、反応条件にほとんど制限を考える必要のない一般の有機合成法のように、種々の条件を検討して目的の反応を完成するという手法は取りにくい。多くの場合、反応及び基質に合う酵素を検索することにより解決している。しかし、反応条件を工夫することによって、反応性の改良や適応範囲の拡大の可能性がある。

酵素反応は通常水溶液中で行われるが、有機溶媒中でも活性を失わない酵素も存在する。エステラーゼ、リパーゼ、ペプチダーゼなどの加水分解酵素は、水溶液中では加水分解反応を触媒するが、有機溶媒中では逆に脱水反応を触媒する。この方法を用いて、エステル、ラクトン、ペプチドなどの合成が可能となる。また、水溶液中の反応であっても有機溶媒が混ざると、酵素の高次構造がわずかに変化するために、基質特異性が変化する場合もある。

酵素法では単一に精製された酵素を用いることはほとんどないことから、目的の酵素反応に、共存する酵素の影響が及ぶこともある。阻害剤などの添加や、pH、温度などの反応条件を変更するだけで、必要とする反応のみを選択することが可能な場合もある。また、酵素を生産する微生物の遺伝子組換えや変異による育種により、必要とする酵素を多量に生産させ、不要な酵素の生産を低下させることも可能である。

酵素法で用いる酵素は、反応のたびに微生物の培養により生産され、反応後に除去されるため、繰り返し使用できる化学合成における固相触媒と比較すると経済性に問題がある。この解決方法の一つとして、1960年代から酵素の固定化の研究が行われ、1970年代には工業的スケールで実用化された。固定化酵素法は、(1) 酵素の再利用が可能になるばかりでなく、(2) 酵素の安定性が向上する他、(3) 反応の連続化、(4) 反応装置の多様化、(5) 反応制御などが容易になり、(6) 反応生成物の純度及び収率が向上し、

(7) 資源エネルギー、環境問題などの点でも有利になる。触媒としての酵素及び菌体の固定化方法については種々の手法が考案されている。

以上のように、高い選択性などの特徴を有する酵素法は、化学合成法や発酵法とならぶ有効な物質生産方法である。また、酵素源となる微生物は、多様性に富み、無限に近く存在することから、酵素利用技術の発展が伴えば、酵素法はさらに多くの可能性がある物質生産方法であると考えられる。

1-3 L-アミノ酸の製造法

1-3-1 発酵法¹⁰²⁻¹⁰⁸⁾

アミノ酸は、食品、医薬品、化粧品飼料用などに広く使用されている。アミノ酸の製造方法は、アミノ酸の種類と使用目的により、発酵法、酵素法、化学合成法、DL-分割法、抽出法など多岐にわたっている (Table 1-6)。需要はL-体のアミノ酸が圧倒的に多いため、直接L-体のアミノ酸が得られる発酵法または酵素法が有利である。中でも、発酵法は、糖のような安価な原料から種々のL-アミノ酸を直接生産できることから、非常に有効な生産方法であり、多くのL-アミノ酸がこの方法で生産されている。

L-アミノ酸の発酵法による生産は、窒素を含む合成代謝 (生合成) に依存する発酵であり、アルコール、乳酸、酢酸などの分解代謝に依存する発酵とは異なる。アミノ酸は、蛋白質の構成要素として生体に重要な産物であるため、その生合成は無駄のないように厳密な代謝制御を受けている。したがって、生体にとって必要以上の量のアミノ酸を生産蓄積させるためには、代謝制御を解除する必要がある。これを可能にした重要な要因が、アミノ酸の生合成経路とそこに関わる因子に関する研究、代謝制御に関する研究、そして突然変異による代謝制御の解除に関する研究の成果である。この突然変異による育種は現在でも非常に重要な手段であるが、最近では遺伝子組換えによる育種も盛んに利用され、大きな成果を上げている。

Table 1-6 アミノ酸の生産方法

アミノ酸	推定生産量 (t/年)		主要な生産法				
	国内	世界	発酵法	酵素法	合成法	DL-分割法	抽出法
グリシン	3,500	6,000			○		
L-アラニン	150			○		○	
DL-アラニン	1,500				○		
L-アスパラギン酸	2,000	4,000		○			
L-アスパラギン	30			○			○
L-アルギニン類	700	1,000	○				○
L-システイン類	300	1,000		○	○		○
L-グルタミン酸ナトリウム	80,000	340,000	○				
L-グルタミン	850		○				
L-ヒスチジン類	250		○				
L-イソロイシン	200		○				
L-ロイシン	200						○
L-リジン塩酸塩	30,000	70,000	○	○			
L-メチオニン	150					○	
DL-メチオニン	30,000	250,000			○		
L-オルニチン類	70		○				
L-フェニルアラニン類	1,500	3,000	○			○	
L-プロリン	150		○				○
L-セリン	60		○				○
L,DL-スレオニン	200		○		○		
L,DL-トリプトファン	250		○	○	○	○	
L-チロシン	60						○
L-バリン	200		○			○	

(日本必須アミノ酸協会推定, 1975年)

発酵法によるL-アミノ酸の生産は、1957年、木下らによる *Corynebacterium glutamicum* によるL-グルタミン酸から始まったといえる¹¹⁸⁾。これ以降、L-グルタミン酸の生産は *Corynebacterium* 属や *Brevibacterium* 属のコリネ型細菌による糖質からの発酵生産が主力となっている。これらのコリネ型グルタミン酸生産菌の発酵の転換により、L-グルタミンやL-プロリンの発酵生産が実用化された。さらに、L-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、L-ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシンなどの芳香族アミノ酸やL-スレオニンの発酵法が開発された。また、発酵法の開発が遅れていた、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリンなどの分岐鎖アミノ酸の発酵生産も可能となった。これらのL-アミノ酸の発酵生産は、コリネ型細菌だけではなく、*Escherichia coli*、*Serratia marcescens* などによる生産法も開発され、近年、特に *E. coli* による発酵生産法の進展はめざましい。L-セリンはアミノ酸代謝の中央に位置し、多くの生体成分の生合成に関与するため代謝回転が速いため、発酵法による糖質からの生産、蓄積が困難であり、酵素法に近い、グリシンを利用する前駆体発酵法により生産されている。他のいくつかのアミノ酸については、未だ発酵法による生産が困難であるか、または他の方法が有利であるため、発酵法による生産は行われていない。

1-3-2 合成法¹⁰²⁻¹⁰⁸⁾

化学合成による有機化合物の製造では、光学活性物質を利用した不斉合成を除けば、ラセミ体として生成するため、光学活性な化合物を得るためには製造の過程で光学分割の工程が必要になる。したがって、合成法は、光学活性なアミノ酸を生産するのに適した方法ではない。唯一、不斉炭素を持たないグリシンは、合成法に適した化合物である。合成法によるグリシンの生産は、主にストレッカー法によりホルムアミドから合成されるが、 α -ハロゲン化法によるモノクロル酢酸のアミノ化による生産方法も可能である。また、栄養学的にD-体がL-体に近い性質を持つメチオニン、主にアクロレインを原料とする合成法にてDL-メチオニンとして生産される。DL-体として食品添加に利用可能なアラニンも、アセトアルデヒドを原料としたストレッカー法またはブッフユラー法にてDL-アラニンとして生産される。システインは、クロロアセトアルデヒドからクロロアラニンを経る方法、 α -クロロアクリル酸メチルとチオ尿素からDL-2-アミノチアゾリン-4-カルボン酸を経る方法、クロロアセトアルデヒド、硫化水素ナトリウム、アンモニア及びアセトンから2,2-ジメチルチアゾリンを経て合成する方法が知られるが、いずれの方法もDL-システインとして生産される。L-システインの生産は、人毛の加水分解物からの抽出により生産される。その他のアミノ酸については、合成法によりDL-体として生産が可能であっても、実際に生産していないか生産してもわずかな量である。

1-3-3 酵素法⁷¹⁻¹¹⁴⁾

比較的高価な原料を用いる酵素法は、安価な糖質を原料として直接L-アミノ酸を生産する発酵法と比べて製造コストの面で不利な場合が多く工業化された例は少ない。しかし、合成法とは異なり、光学活性なL-アミノ酸の製造が可能な酵素法は、安価な基質供給を目的とした有機合成と酵素利用技術の進歩に伴い、発酵法では生産が困難あるいは生産量の低いアミノ酸を中心に開発が進んでいる (Table 1-7)。

酵素法によるL-アミノ酸の製造方法は、利用する手段により4つに大別できる¹¹²⁾。(1) ラセミ体アミノ酸の酵素的光学分割は、主に合成法でラセミ体 (DL-体) として製造されたアミノ酸またはアミノ酸誘導体を酵素的に光学分割する方法である。L-アシラーゼを用いたN-アセチル-DL-アミノ酸の光学選択的加水分解によるL-アミノ酸の製造方法¹⁴⁹⁾は、L-バリン、L-メチオニン、L-フェニルアラニンなどの生産に利用が可能である。この方法は、残存するN-アセチル-D-アミノ酸を化学的にラセミ化して再利用できる。L-体選択的なアミダーゼまたはアミノペプチダーゼを用いたDL-アミノ酸アミドの光学選択的加水分解によるL-アミノ酸の製造法も開発されている¹⁵⁰⁻¹⁵³⁾。(2) アミノ酸生成前駆体の酵素的変換は、発酵法では前駆体からの転換が律速となり生産性が低い場合を中心に発展してきた。アスパルターゼを用いたフマル酸とアンモニアからのL-アスパラギン酸の生成反応は、平衡が合成側に著しく傾いているため工業的に有利な方法であり、L-アスパラギン酸の重要な製造方法となっている^{154,155)}。アスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼを用いたL-アスパラギン酸からのL-アラニンの製造方法も、工業的な製法として用いられている¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾。L-アラニンは、アスパルターゼとアスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼの両酵素を用いれば、フマル酸とアンモニアから直接生産が可能である。L-セリンは、グリシンを利用した前駆体添加発酵法にて生産されるが、グリシンがもう一つの基質であるホルムアミドの生成にも利用されるため、グリシンからのL-セリンの収率は理論的に50%を越えることはない¹⁵⁹⁾。これに対してメチロトローフのメタノールデヒドロラーゼによるメタノールからのホルムアルデヒドの生成と、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼによるグリシンとホルムアミドからのL-セリンの生成を組み合わせる酵素法は、L-セリンの対グリシンの理論収率が100%となる^{160,161)}。また、酵素法ではホルムアミドによる生育阻害の問題は生じないため、基質としてグリシンとホルムアミドを用いて高い収率でL-セリンを生成する方法も開発されている¹⁶²⁾。L-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いた α -ケト酸とアンモニアからのL-アミノ酸の製造方法は、NADHの再生のための基質と再生酵素との共役を利用して、L-ロイシン¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-メチオニン、L-バリンなど¹⁶⁶⁾の生産に応用されている。その他、転移酵素、脱離酵素、加水分解酵素、酸化還元酵素など幅広い酵素を利用した方法が開発されている。(3) アミノ酸代謝に関与する酵素の逆反応を利用する方法については、 β -チロシナーゼによるフェノールとピルビン酸からのL-チロシンの生産¹⁶⁷⁻¹⁷⁰⁾、トリプトファンナーゼによるインドール、ピルビン酸とアンモニアからのL-トリプトファン

Table 1-7 酵素法によるL-アミノ酸の製造⁽⁸⁴⁾

Amino acid	Reaction	Enzymes	Microorganisms
L-Amino acid	N-acetyl-L-amino acid + H ₂ O → L-amino acid + acetic acid	aminoacylase	<i>Aspergillus oryzae</i>
S-Adenosyl-L-homocysteine	L-homocysteine + adenosine → S-adenosyl-L-homocysteine + H ₂ O	S-adenosylhomocysteine hydrolase	<i>Alcaligenes faecalis</i>
L-Alanine	L-Aspartic acid → L-alanine + CO ₂	aspartate-β-decarboxylase	<i>Pseudomonas decumbae</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>
L-Aspartic acid	fumaric acid + NH ₃ → L-aspartic acid maleic acid + NH ₃ → L-aspartic acid	aspartase maleate isomerase, aspartase	<i>Escherichia coli</i> etc. <i>Alcaligenes faecalis</i>
L-Citrulline	L-arginine + H ₂ O → L-citrulline + NH ₃	arginine deiminase	<i>Pseudomonas putida</i>
L-Cysteine	DL-2-amino-Δ-thiazoline-4-carboxylic acid + 2H ₂ O → L-cysteine + NH ₃ + CO ₂	ATC racemase, L-ATC hydrolase, S-carbamyl-L-cysteine hydrolase	<i>Pseudomonas thiazolinophilum</i>
	β-chloro-L-alanine + H ₂ S → L-cysteine + HCl	cysteine desulhydrase	<i>Enterobacter cloacae</i>
L-DOPA	pyrocatechol + pyruvate + NH ₃ → L-DOPA + H ₂ O pyrocatechol + L-serine → L-DOPA + HCl	β-tyrosinase β-tyrosinase	<i>Erwinia herbicola</i> <i>Erwinia herbicola</i>
	L-tyrosine + O ₂ → L-DOPA + H ₂ O	tyrosine hydroxylase	<i>Aspergillus oryzae</i>
L-Glutamic acid	DL-5-carboxyethylhydantoin + 2H ₂ O → L-glutamic acid + NH ₃ + CO ₂	L-hydantoin-5-propionate hydrolase, N-carbamyl-L-glutamic acid hydrolase	<i>Bacillus brevis</i>
5-Hydroxy-L-tryptophan	5-hydroxyindole + pyruvate + NH ₃ → 5-hydroxy-L-tryptophan	tryptophanase	<i>Proteus rettgeri</i>
L-Lysine	DL-α-croglactam + H ₂ O → L-lysine	ACL racemase, L-ACL hydrolase	<i>Achromobacter obae</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i>
L-Phenylalanine	DL-benzylhydantoin + H ₂ O → L-phenylalanine + NH ₃ + CO ₂	L-S-benzylhydantoin hydrolase, N-carbamyl-L-phenylalanine hydrolase	<i>Flavobacterium aminogenes</i>
	trans-cinnamic acid + NH ₃ → L-phenylalanine	phenylalanine ammonialyase	<i>Rhodospirillum glutinis</i>
	cinnamate acetoamide + amino donor → L-phenylalanine	CAA acylase, transaminase	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Sor Se-Substituted-L-homocysteine	L-methionine + RSH or RSeH → S or Se-substituted-L-homocysteine + methanethiol	methioninase	<i>Pseudomonas ovalis</i>
Sor Se-Substituted-L-cysteine	L-cysteine + RSH or RSeH → S or Se-substituted-L-cysteine + H ₂ S	methioninase	<i>Pseudomonas ovalis</i>
L-Serine	glycine + formaldehyde or methanol → L-serine	serine hydroxylase or threonine aldolase	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Sarcina albidia</i> <i>Candida humicola</i> <i>Hyphomicrobium methylavorum</i>
L-Threonine	glycine + acetaldehyde → L-threonine	threonine aldolase	<i>Candida humicola</i>
L-Tryptophan	indole + pyruvate + NH ₃ → L-tryptophan + H ₂ O indole + L-serine → L-tryptophan + H ₂ O	tryptophanase tryptophan synthase	<i>Proteus rettgeri</i> <i>Achromobacter liquidum</i> <i>Escherichia coli</i>
	DL-5-indolylmethylhydantoin → L-tryptophan + NH ₃ + CO ₂	L-IMH hydrolase, N-carbamyl-L-tryptophan hydrolase	<i>Flavobacterium aminogenes</i>
L-Tyrosine	phenol + pyruvate + NH ₃ → L-tyrosine	β-tyrosinase	<i>Erwinia herbicola</i>

ンの生産¹⁷¹⁾、システインスルフィドラーゼによるβ-クロロ-L-アラニンと硫化ナトリウムからのL-システインの生産^{172,176)}、フェニルアラニンアンモニリアーゼによる桂皮酸とアンモニアからのフェニルアラニンの生産¹⁷⁷⁻¹⁷⁸⁾などの例が知られる。(4) 化学合成中間体の光学活性アミノ酸への変換は、安価に大量に合成できる化学合成と、光学活性体を得ることができる酵素反応を巧みに組み合わせた方法である。ナイロン製造原料であるカプロラクタムの誘導体DL-アミノ-ε-カプロラクタムの不斉加水分解は、収率がほぼ100%でL-リジンを生産可能な実用的な製造方法である^{179,180)}。DL-2-アミノチアゾリン-4-カルボン酸からのL-システインの製造方法も工業化されている^{181,182)}。DL-5-置換ヒダントインの不斉加水分解は、多くの種類のL-アミノ酸の製造に利用可能な方法である¹⁸³⁻¹⁹⁷⁾。

以上のように、多くの酵素法によるL-アミノ酸の製造方法が開発されている。光学選択性の高い酵素法は、安価な反応の基質と良好な性質を有する酵素の選択により、L-アミノ酸の製造のための有効な方法の一つとなると考えられる。

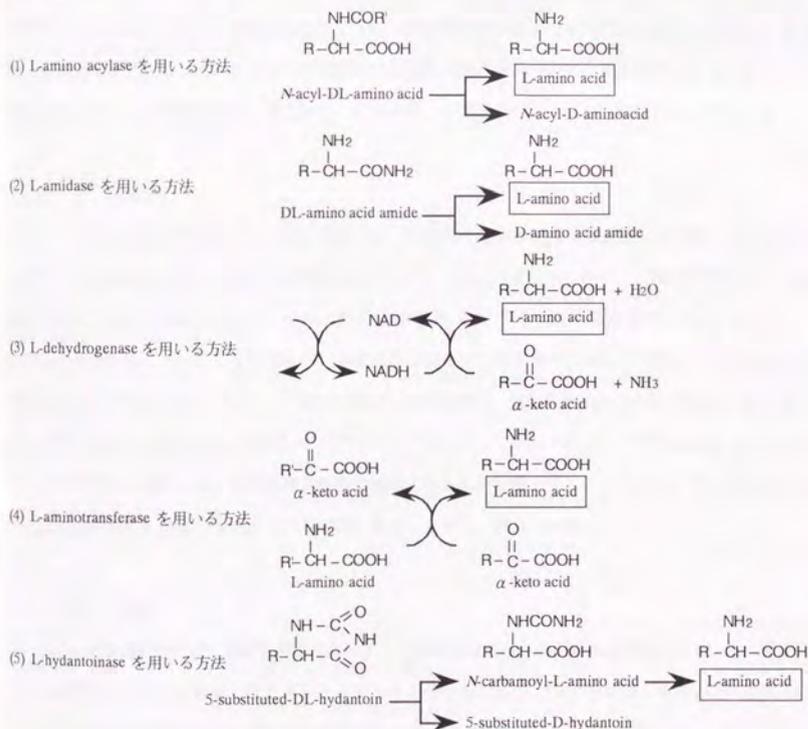


Fig. 1-2 酵素法によるL-アミノ酸の製造法

1-4 D-アミノ酸の製造法

1-4-1 発酵法

微生物の生体内のD-アミノ酸は、細菌細胞壁や抗生物質の構成成分などの限られた存在であり、量も少ない。一部の細菌について、D-アラニンやD-グルタミン酸が遊離の状態では生産された後に生体物質の構成要素として取り込まれることが知られているが、抗生物質中のD-アミノ酸などについては、遊離の状態を経ずに生体物質の構成要素となる可能性も示唆されている。したがって、遊離のD-アミノ酸を発酵法にて多量に生産することは極めて困難である。また、D-アミノ酸は医薬品や農薬の製造原料などに用いられるため、高い光学純度が要求される場合が多く、L-体の混入が起こりやすい発酵法は不利である。唯一の、実用的なD-アミノ酸の発酵生産の例として、D-アラニンの発酵法がある¹¹⁹⁻¹²⁴⁾。*Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 のD-サイクロセリン耐性変異株を用いた発酵生産は、培養液中に約50 g/lのD-アラニンを生産できるが、生産されるD-アラニンの光学純度が低いという欠点がある。これは、本方法が、生産菌のD-アラニンとL-アラニンの細胞膜の透過性の違いを利用して、菌体内ではラセミ体として生産されたアラニンのD-体のみを多量に排出しているが、わずかにL-アラニンも流出するためである。

1-4-2 合成法

化学合成によるD-アミノ酸の製造では、光学活性物質を利用した合成を除けば、ラセミ体として生成された化合物を光学分割する必要がある。L-アミノ酸とは異なり、D-アミノ酸は発酵法での生産が困難であり、製品の価格も高いことから、光学分割を用いたD-アミノ酸の製造も行われる。DL-アミノ酸の製造は化学合成によっても行われるが、発酵法などによって生産されたL-アミノ酸のラセミ化によっても生産される¹²⁵⁻¹⁴⁰⁾。また、DL-アミノ酸の化学的な光学分割は、優先品出法により光学分割する方法¹⁴¹⁻¹⁴³⁾や他の光学活性化合物との塩を形成してジアステレオマーとして分割する方法¹⁴⁴⁻¹⁴⁸⁾などが知られている。これらの光学分割法は、高い光学純度や収率を達成することが困難であり、ジアステレオマー形成法では別に光学活性物質を必要とし製造コストが高くなることから、酵素法に劣る。

1-4-3 酵素法

光学選択性の高い酵素を利用したD-アミノ酸の製造法は、最近盛んに開発されている。中でも、ジヒドロピリミジナーゼあるいはヒダントインヒドラーゼ（ヒダントイナーゼ）を用いた5-置換-DL-ヒダントインのD-体選択的加水分解は有効な手段であり、この方法によって多くのD-アミノ酸が生産される¹⁹⁷⁻²³⁴⁾。化学合成にて製造された5-置換-DL-ヒダントインをD-体選択的に加水分解するとN-カルバミル-

D-アミノ酸を生じる。このN-カルバミル-D-アミノ酸を化学的に、またはN-カルバミル-D-アミノ酸ヒドロラーゼにて酵素的に加水分解することによりD-アミノ酸を生成する。この方法で、D-p-ヒドロキシフェニルグリシンやD-パリンなどの製造が工業化されている。D-体特異的にヒダントインを開環加水分解する酵素は広く生物界に存在するが、*Actinoplanes* 属、*Aeromonas* 属、*Agrobacterium* 属、*Bacillus* 属、*Corynebacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Mycobacterium* 属、*Nocardia* 属、*Streptomyces* 属などに強い活性を生産する菌が見出されている。D-体特異的な開環加水分解後に残存する5-置換-L-ヒダントインは酵素反応条件のpH 8~9で自然に化学的ラセミ化してリサイクルされるため、基質のほぼ全量をD-アミノ酸に変換できる。また、*Pseudomonas* 属細菌の有するヒダントインラセマーゼを残存基質のリサイクルに利用することも考えられる^{237,238)}。

アシラーゼによるN-アシル-DL-アミノ酸の光学選択的加水分解により、D-アミノ酸を製造することもできる^{239,240)}。*Alcaligenes* 属細菌の酵素は、N-アシル-DL-メチオニンなどの疎水性アミノ酸誘導体を良好な基質とする。また、D-体選択的な加水分解後に残存するN-アシル-L-アミノ酸は、化学的ならセミ化や、*Streptomyces* 属細菌の有するアシルアミノ酸ラセマーゼを用いたラセミ化によりリサイクルすることも考えられる^{247,249)}。

アミダーゼによるDL-アミノ酸アミドの光学選択的加水分解により、D-アミノ酸を製造することも可能である^{250,263)}。DL-アミノ酸アミドはアルデヒドからアミノニトリルを経て2段階で容易に化学的に合成されるため、光学活性アミノ酸製造の原料として優れている。D-体特異的なアミダーゼは広く生物界に存在するが、*Achromobacter* 属、*Alcaligenes* 属、*Kurthia* 属、*Ochrobactrum* 属、*Pseudomonas* 属、*Rhodococcus* 属、*Serratia* 属などに強い活性を生産する菌が見出されている。加水分解反応後に残存するL-アミノ酸アミドは化学的ならセミ化によりリサイクルが可能である。また、最近、*Pseudomonas putida* NCIB 40042、*Rhodococcus* sp. NCIB 12569²⁶⁴⁾、*Arthrobacter* sp. ATCC 31652、*Corynebacterium* sp. ATCC 31662²⁶⁵⁾などにアミノ酸アミドラセマーゼが見出されたことから、アミノ酸アミドの種類によっては酵素的ならセミ化による効率的なリサイクルも可能と思われる。

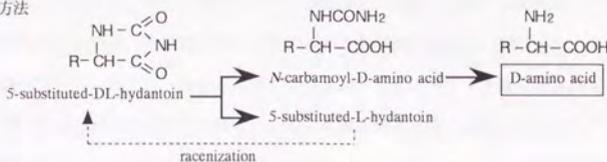
D-アミノ酸トランスアミナーゼを用いるD-アミノ酸の製造方法は、プロキラルな基質である α -ケト酸に対する光学選択的な反応により、定量的な転換が可能である。この方法は、基質の α -ケト酸の他にアミノ基供与体としてD-アミノ酸が必要である^{266,278)}。左右田らは*Bacillus* 属のD-アミノ酸トランスアミナーゼと、D-アミノ酸供給のためのアラニンラセマーゼとアラニンデヒドロゲナーゼおよびNADH再生のための磷酸デヒドロゲナーゼの計4種の酵素を組み合わせて、 α -ケト酸からのD-アミノ酸生産系を開発した^{266,276,278)}。アラニンラセマーゼとアラニンデヒドロゲナーゼのかわりにグルタミン酸ラセマーゼとグルタミン酸デヒドロゲナーゼを用いても、同様に α -ケト酸からのD-アミノ酸生産が可能である²⁷⁰⁾。

本方法は、原料である α -ケト酸が高価なことや、複数の酵素の共役などの困難な問題も含むが、D-アミノ酸トランスアミナーゼの広い基質特異性を利用して、各種のD-アミノ酸の製造に利用可能である。

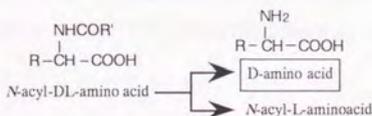
ラセミ化したDL-アミノ酸中のL-アミノ酸を選択的に分解除去することにより残存するD-アミノ酸を得る方法は、単純な方法であるが高い光学純度の生成物を比較的容易に得ることができ、D-アラニン、D-アスパラギン酸の製造の報告がある²⁷⁹⁾。D-システインは、*Pseudomonas putida*の3-クロロ-D-アラニンデヒドロゲナーゼを用いてラセミ体の3-クロロアラニンと各種イオウ供給体から生成される²⁸⁰⁾。

酵素法はD-アミノ酸の製造方法として有効な手段であり、酵素反応と基質供給のための化学合成の進歩に伴い、新たな進展が期待される。

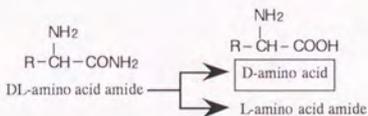
(1) D-hydantoinase を用いる方法



(2) D-amino acylase を用いる方法



(3) D-amidase を用いる方法



(4) D-aminotransferase を用いる方法

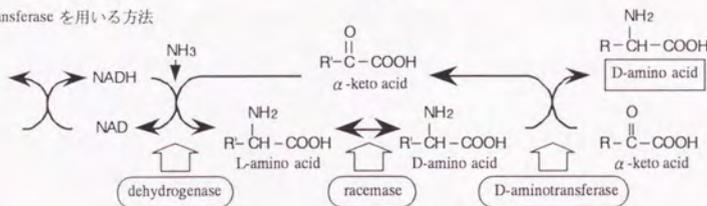


Fig. 1-3 酵素法によるD-アミノ酸の製造法

1-5 本研究の目的

本研究の目的はD-アミノ酸の工業的製造プロセスの構築にある。すでに述べたように、D-アミノ酸の製造は、発酵法または合成法では困難であり、酵素法が最も適した方法であると考えられる。プロセスの構築に当たり、「原料」「反応」「生成物」の3点について考えてみる。「生成物」は、医薬品や農業などの製造原料としての用途を考えるため、高い光学純度(99%ee以上)が要求される。このため、酵素を用いた「反応」では非常に高い光学選択性を達成する必要がある。また、「原料」は比較的安価で入手しやすい化合物である必要があり、これに適した「反応」を計画する必要がある。つまり、目的の「生成物」を得るための最適な「原料」と「反応」の選択が重要となる。そして、プロセス確立の成否は「反応」に用いる酵素に負うところが大きく、本研究の多くの時間を酵素(酵素を生産する微生物)のスクリーニングと諸性質の検討にかけている。本研究では、いくつかの新規酵素を取得し、製造プロセスに適した酵素生産のための検討も行った。最後に、構築した新プロセスが、目的のD-アミノ酸を工業的なスケールで生産可能な製造方法であるかを検証した。本研究により、産業上有用と考えられる3種のD-アミノ酸の製造プロセスを、酵素法を中心に合成法または発酵法と組み合わせて完成した。第2章ではD-アラニン、第3章ではD-グルタミン酸、第4章ではD-プロリンの製造方法を報告する。

1-6 文献

- 1) 原田馨 (1988) 不斉発生の謎. *化学* 43:792-795.
- 2) Milton, R.C.deL., Milton, S.C.F., and Kent, S.B.H. (1992) Total chemical synthesis of D-enzyme. The enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal substrate specificity. *Science* 256:1445-1448.
- 3) Jung, G. (1992) Proteins from the D-chiral world. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1457-1459.
- 4) 長田洋子, and 山本和彦 (1992) 高速液体クロマトグラフィーによるD, L-アミノ酸の分離, 定量. *生化学* 64:1451-1453.
- 5) 秋山知子, and 笹川立 (1995) D,Lアミノ酸の一斉分析法とその応用. *蛋白質 核酸 酵素* 40:76-83.
- 6) Marfey, P. (1984) Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* 49:591-596.
- 7) Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implication. *Bacteriol. Rev.* 36:407-477.
- 8) Walsh, C.T. (1989) Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J. Biol. Chem.* 264:2393-2396.
- 9) 左右田健次 (1977) D-アミノ酸の生化学(I). *化学* 32:517-526.
- 10) 左右田健次 (1977) D-アミノ酸の生化学(II). *化学* 32:627-635.
- 11) Bodanszky, M., and Perlman, D. (1969) Peptide antibiotics. *Science*. 163:352-358.
- 12) Bycroft, B.W. (ed.) (1988) Dictionary of antibiotics and related substrate. Chapman and Hall Ltd., New York.
- 13) Saxholm, H., Zimmer, T.-L., and Laland, S.G. (1972) The mechanism of the inhibition of gramicidin-S synthesis by D-leucine. *Eur. J. Biochem.* 30:138-144.
- 14) Yamada, M., and Kurahashi, K. (1968) Adenosine triphosphate and pyrophosphate dependent phenylalanine racemase of *Bacillus brevis* NAGANO. *J. Biochem.* 63:59-69.
- 15) Yamada, M., and Kurahashi, K. (1969) Further purification and properties of adenosine triphosphate-dependent phenylalanine racemase of *Bacillus brevis* NAGANO. *J. Biochem.*

- 66:529-540.
- 16) **Lynch, J.L., and Neuhaus, F.C.** (1966) On the mechanism of action of the antibiotic *o*-carbamyl-D-serine in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **91**:449-460.
 - 17) **Neuhaus, F.C.** (1968) Selective inhibition of enzymes utilizing alanine in the biosynthesis of peptidoglycan. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **1967**:304-313.
 - 18) **Roze, U., and Strominger, J.L.** (1966) Alanine racemase from *Staphylococcus aureus*. Conformation on its substrates and its inhibitor, D-cycloserine. *Mol. Pharmacol.* **2**:92-94.
 - 19) **Lambert, M.P., and Neuhaus, F.C.** (1972) Mechanism of D-cycloserine action. Alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J. Bacteriol.* **110**:978-987.
 - 20) **Free, C.A., Julius, M., Arnow, P., and Barry, G.T.** (1967) Inhibition of alanine racemase by aminoxyacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **146**:608-610.
 - 21) **Strominger, J.L., Ito, E., and Threnn, R.H.** (1960) Competitive inhibition of enzymatic reactions by oxamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **82**:998-999.
 - 22) **Stewart, B.T., and Halvorson, H.O.** (1954) Studies on the spores of aerobic bacteria. II. The properties of an extracted heat-stable enzyme. *J. Bacteriol.* **65**:18-178.
 - 23) **Rosso, G., Takashima, K., and Adams, U.** (1969) Coenzyme content of purified alanine racemase from *Pseudomonas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **34**:134-140.
 - 24) **Diven, W.F., Johnston, R.B., and Scholz, J.J.** (1962) Evidence for the participation of FAD in the alanine racemase (EC 5.1.1.1) reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **67**:161-163.
 - 25) **Forsberg, C.W., and Ward, J.B.** (1972) *N*-Acetylmuramyl-L-alanine amidase of *Bacillus licheniformis* and its L-form. *J. Bacteriol.* **110**:878-888.
 - 26) **Johnston, M.M., and Diven, W.F.** (1969) Studies on amino acid racemase. I. Partial purification and properties of the alanine racemase from *Lactobacillus fermenti*. *J. Biol. Chem.* **224**:5414-5420.
 - 27) **Stewart, B.T., and Halvorson, H.O.** (1954) Studies on the spores of aerobic bacteria. I. The occurrence of alanine racemase. *J. Bacteriol.* **65**:160-166.
 - 28) **Church, B.D., Halvorson, H., and Halvorson, H.O.** (1954) Studies on spore germination. Its independence from alanine racemase activity. *J. Bacteriol.* **68**:393-3699.
 - 29) **Wood, W.A.** (1955) Amino acid racemases. p. 212-217. In Colowick, S.P., and Kaplan,

- N.O. (ed.), *Methods in enzymology*, vol. 2, Academic Press Inc., New York.
- 30) Thornberry, N.A., Bull, H.G., Taub, D., Wilson, K.E., Gimenez-Gallego, G., Rosegay, A., Soderman, D.D., and Patchett, A.A. (1991) Mechanism-based inactivation of alanine racemase by 3-halovinylglycines. *J. Biol. Chem.* **266**:21657-21665.
- 31) 江崎信芳, and 左右田健次 (1986) アラニンラセマーゼとその酵素自殺基質反応. *化学* **41**:202-203.
- 32) 外山博英, and 左右田健次 (1992) 耐熱性アラニンラセマーゼ. 構造と機能の解析. *日本農芸化学会誌* **65**:1801-1805.
- 33) 江崎信芳 (1992) 耐熱性アラニンラセマーゼとの構造と機能. *化学と生物* **30**:70-71.
- 34) 外山博英, and 左右田健次 (1992) 耐熱性アラニンラセマーゼとの構造と機能. *化学* **47**:146-147.
- 35) Inagaki, K., Tanizawa, K., Badet, B., Walsh, C.T., Tanaka, H., and Soda, K. (1986) Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*. Molecular cloning of the gene, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry* **25**:3268-3274.
- 36) Toyama, H., Tanizawa, K., Wakayama, M., Lee, Q.-L., Yoshimura, T., Esaki, N., and Soda, K. (1991) Limited proteolysis of thermostable alanine racemase of *Bacillus stearothermophilus*. *Argic. Biol. Chem.* **55**:2881-2882.
- 37) Toyama, H., Esaki, N., Yoshimura, T., Tanizawa, K., and Soda, K. (1991) Thermostable alanine racemase of *Bacillus stearothermophilus*. Subunit dissociation and unfolding. *J. Biochem.* **110**:279-283.
- 38) Toyama, H., Tanizawa, K., Yoshimura, T., Asano, S., Lim, Y.-H., Esaki, N., and Soda, K. (1991) Thermostable alanine racemase of *Bacillus stearothermophilus*. Construction and expression of active fragmentary enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**:13634-13639.
- 39) Yokoigawa, K., Kawai, H., Endo, K., Lim, Y.-H., Esaki, N., and Soda, K. (1993) Thermostable alanine racemase from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens*. Purification and properties. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**:93-97.
- 40) Martinez-Carrion, M., and Jenkins, W.T. (1963) Some properties of a D-alanine D-glutamate aminotransferase purified from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**:365-368.

- 41) **Martinez-Carrion, M., and Jenkins, W.T.** (1965) D-Alanine-D-glutamate transaminase. I. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **240**:3538-3546.
- 42) **Martinez-Carrion, M., and Jenkins, W.T.** (1965) D-Alanine-D-glutamate transaminase. II. Inhibitors and the mechanism of transamination of D-amino acids. *J. Biol. Chem.* **240**:3547-3552.
- 43) **Soda, K., Yonaha, K., Misono, H., and M. Osugi.** (1975) Purification and crystallization of D-amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. *FEBS Lett.* **46**:359-363.
- 44) **Yonaha, K., Misono, H., Yamamoto, T., and Soda, K.** (1975) D-Amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. *J. Biol. Chem.* **250**:6983-6989.
- 45) **Yonaha, K., Misono, H., and Soda, K.** (1975) Reconstitution of D-amino acid aminotransferase. *FEBS Lett.* **55**:265-267.
- 46) **Tanizawa, K., Masu, Y., Asano, S., Tanaka, H., and Soda, K.** (1989) Thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. *J. Biol. Chem.* **264**:2445-2449.
- 47) **Tanizawa, K., Asano, S., Masu, Y., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Tanaka, H., and Soda, K.** (1989) The primary structure of thermostable D-amino acid aminotransferase from thermophilic *Bacillus* species and its correlation with L-amino acid aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **264**:2450-2454.
- 48) **Martinez del Pozo, A., Merola, M., Ueno, H., Manning, M.M., Tanizawa, K., Nishimura, K., and Soda, K.** (1989) Stereospecificity of reaction catalyzed by bacterial D-amino acid transaminase. *J. Biol. Chem.* **264**:17784-17789.
- 49) **Doublet, P., van Heijenoort, J., and Mengin-Lecreulx, D.** (1992) Identification of the *Escherichia coli murl* gene, which is required for the biosynthesis of D-glutamic acid, a specific component of bacterial peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **174**:5772-5779.
- 50) **Doublet, P., van Heijenoort, J., Bohin, J.-P., and Mengin-Lecreulx, D.** (1992) The *murl* gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity. *J. Bacteriol.* **175**:2970-2979.
- 51) **Doublet, P., van Heijenoort, J., and Mengin-Lecreulx, D.** (1993) Identification of the *murl* and *murB* genes coding for cytoplasmic peptidoglycan synthetases in the 90-min

- region of the *E. coli* chromosome. p. 139-146. In de Pedro, M.A., Holtje, J.V., and Löffelhardt (ed), Bacterial growth and lysis. Metabolism and structure of the bacterial sacculus. Plenum Publishing Company, London.
- 52) Doublet, P., van Heijenoort, J., and Mengin-Lecreulx, D. (1994) The glutamate racemase activity from *Escherichia coli* is regulated by peptidoglycan precursor UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine. *Biochemistry* 33:5285-5290.
- 53) Yoshimura, T., Ashiuchi, M., Esaki, N., Kobatake, C., Choi, S.-Y., and Soda, K. (1993) Expression of *glr* (*murl*, *dga*) gene encoding glutamate racemase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268:24242-24246.
- 54) Baliko, G., and Venetianer, P. (1993) An *Escherichia coli* gene in search of Function. Phenotypic effects of the gene recently identified as *murl*. *J. Bacteriol.* 175:6571-6577.
- 55) Pucci, M.J., Novotny, J., Discotto, L.F., and Dougherty, T.J. (1994) the *Escherichia coli* Dga (*Murl*) protein shares biological activity and structural domains with the *Pediococcus pentosaceus* glutamate racemase. *J. Bacteriol.* 176:528-530.
- 56) Blattner, F.R., Burland, V., Plunkett III, G., Sofia, H.J., and Daniels, D.L. (1993) Analysis of the *Escherichia coli* genome. IV. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes. *Nucleic Acid Res.* 21:5408-5417.
- 57) 谷沢克行, and 左右田健次 (1988) アミノ酸ラセマーゼ. その酵素化学と応用. 発酵と工業 46:166-178.
- 58) 左右田健次 (1974) アミノ酸ラセマーゼ. 生化学 46:203-222.
- 59) Adams, E. (1972) Amino acid racemases and epimerases. p. 479-507. In Boyer, P.D. (ed), The enzymes, vol. 6, Carboxylation and decarboxylation (Nonoxidative), Isomerization, 3rd edition, Academic Press, New York and London.
- 60) 小川正, and 佐々岡啓 (1976) 天然におけるD-アミノ酸. 植物性食品素材を中心として. 化学と生物 14:610-616.
- 61) Fukuda, M., Ogata, T., and Sasaoka, K. (1973) Optical configuration of γ -glutamylalanine in pea seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 304:363-366.
- 62) Fukuda, M., Tokumura, A., Ogawa, T., and Sasaoka, K. (1973) D-Alanine in germinating *Pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry* 12:2593-2595.
- 63) Noma, M., Noguchi, M., and Tamaki, E. (1973) Isolation and characterization of

- D-alanyl-D-alanine from tobacco leaves. *Agric. Biol. Chem.* **37**:2439-2440.
- 64) **Frahn, J.L., and Illman, R.J.** (1975) The occurrence of D-alanine and D-alanyl-D-alanine in *Phalaris tuberosa*. *Phytochemistry* **14**:1464-1465.
- 65) **Klosterman, H.J., Lamoureux, G.L., and Parsons, J.L.** (1967) Isolation, characterization, and synthesis of linatine. A vitamin B₆ antagonist from flaxseed (*Linum usitatissimum*). *Biochemistry* **6**:170-177.
- 66) **Gray, D.O.** (1972) Trans-4-hydroxymethyl-D-proline from *Eriobotrya japonica*. *Phytochemistry* **11**:751-756.
- 67) **Zenk, M.H., and Scherf, H.** (1963) D-Tryptophan in höheren pflanzen. *Biochim. Biophys. Acta* **71**:737-738.
- 68) **Corrigan, J.J.** (1969) D-Amino acid in animals. *Science* **164**:142-149.
- 69) **Izumiya, N., Wade, R., Winitz, M., Otey, M.C., Birnbaum, S.M., Koegel, R.J., and Greenstein, J.P.** (1957) Studies on diastereoisomeric α -amino acids and corresponding α -hydroxy acid. VIII. Configuration of the isomeric octopines. *J. Amer. Chem. Soc.* **79**:652-658.
- 70) **金野柳一, and 安村美博** (1991) D-アミノ酸酸化酵素の生理的役割. *蛋白質 核酸 酵素* **36**:54-62.
- 71) シーエムシー編集部 (ed.) (1992) 光学活性体の開発と事業化戦略. シーエムシー.
- 72) **Nagasawa, T., and Yamada, H.** (1986) Enzymatic transformation of 3-chloroalanine into useful amino acids. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **13**:147-165.
- 73) **Yoshioka, R., Ohtsuki, O., Senuma, M., and Tosa, T.** (1989) Efficient preparation of D-aspartic acid β -methyl ester as an aspoxicillin material by optical resolution, epimerization, and asymmetric transformation. *Chem. Pharm. Bull.* **37**:883-886.
- 74) **高橋里美** (1983) DL-5-置換ヒダントインを用いるD-アミノ酸の微生物的合成. *発酵工学* **61**:139-151.
- 75) シーエムシー編集部 (ed.) (1988) アミノ酸工業の全容. 技術と市場. シーエムシー.
- 76) **野本享資** (1991) D型アミノ酸を含むペプチドの発見. *化学* **46**:742-747.
- 77) **Stoineva, I.B., and Petkov, D.D.** (1985) Chemical-enzymatic incorporation of D-amino acids into peptides. Synthesis of diastereomeric (D-Ala², D-Leu⁵) enkephalinamides. *FEBS Lett.* **183**:103-106.

- 78) 大橋尚仁, 永田彰司, and 石墨紀久夫 (1983) 公開特許公報 昭58-121258.
3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)セリンの製造方法.
- 79) トーマス・モット・ブレナン, and マイケル・エゼル・ヘンドリック (1986)
特許公報 昭61-9320. L-アスパルチル-D-アミノ酸ジペプチドの枝鎖アミド類.
- 80) 山田秀明 (1983) 発酵プロセスへの化学製品の利用. *発酵と工業* **41**:926-933.
- 81) 浅野泰久 (1989) 新規微生物酵素の開発と有機合成への利用. *有機合成化学*
47:749-759.
- 82) 久留主泰朗, and 湯川英明 (1989) バイオプロセスは発酵法か酵素法かそれとも...
MOL **1989**(10):74-79.
- 83) 清水昌, and 山田秀明 (1986) 酵素法による物質の合成と変換. *化学と生物*
24:452-464.
- 84) 清水昌, and 山田秀明 (1984) 有機合成プロセスへの微生物酵素反応の利用. (その1)
Bio Industry **1**(6):36-48.
- 85) 清水昌, and 山田秀明 (1985) 有機合成プロセスへの微生物酵素反応の利用. (その2)
Bio Industry **2**:139-144.
- 86) 清水昌, and 山田秀明 (1985) 有機合成プロセスへの微生物酵素反応の利用. (その3)
Bio Industry **2**:217-224.
- 87) 泉好計, and 山田秀明 (1984) 微生物による合成反応. *バイオサイエンスとインダストリー* **46**:3262-3268.
- 88) 広瀬義夫 (1983) 酵素反応と化学合成の組み合わせによる有用物質の生産. *発酵と工業* **41**:665-671.
- 89) 太田博道 (1991) 酵素変換, 酵素法による有機合成. *Bio Industry* **8**:141-147.
- 90) 太田博道 (1988) 酵素および微生物による有機合成. *Bio Industry* **5**:579-591.
- 91) 太田博道 (1988) 微生物および酵素の有機合成への応用. *有機合成化学* **46**:726-741.
- 92) 太田博道 (1988) 微生物による有機化合物の高選択的変換と有機合成への応用. *染料と薬品* **33**:109-121.
- 93) 泉美治 (1980) 生物生産のアセスメント. *化学と生物* **18**:198-500.
- 94) 山田秀明, 別府輝彦, and 深沢俊夫 (ed.) (1992) 微生物の機能開発. 学会出版センター.
- 95) シーエムシー編集部 (ed.) (1985) 酵素製品の開発と応用. シーエムシー.

- 96) Skryabin, G. K., and Golovleva (福井三郎 監訳) (1980) 微生物による有機化合物の変換. 学会出版センター.
- 97) 鈴木周一 (監修), 前田英勝, 山崎幸苗, 大淵薫, and 梶原茂 (1988) 不斉合成バイオリアクター. 学会出版センター.
- 98) 横関健三, and 白江英之 (1989) 酵素法による抗ウイルス性ヌクレオシドの生産. *バイオサイエンスとインダストリー* 47:493-498.
- 99) 直島好伸 (1989) 固定化生体触媒によるフェロモン類の不斉合成. *Bio Industry* 6:127-133.
- 100) 長沢透, and 山田秀明 (1988) 酵素法によるニコチン酸, ニコチン酸アミドの生産. *バイオサイエンスとインダストリー* 46:35169-3518.
- 101) 千畑一郎, and 土佐哲也 (1989) 酵素・微生物細胞の固定化. *化学* 44:177-182.
- 102) 相田浩, 滝波弘一, 千畑一郎, 中山清, and 山田秀明 (ed.) (1986) アミノ酸発酵. 学会出版センター.
- 103) 金子武夫, 泉美治, 千畑一郎, and 伊藤民生 (ed.) (1973) アミノ酸工業. 講談社サイエンティフィク.
- 104) (1987) アミノ酸工業の現状と用途展望. (上) *ファインケミカル* 1987(2.1):14-22.
- 105) (1987) アミノ酸工業の現状と用途展望. (下) *ファインケミカル* 1987(2.15):14-21.
- 106) (1990) アミノ酸工業の展望. *Bio Industry* 7:409-414.
- 107) (1989) 生化学的製造法中心に技術研究. *化学経済* 1989(8):138-139.
- 108) 横関健三, and 川嶋伸樹 (1988) アミノ酸. *Bio Industry* 5:351-361.
- 109) 杉本慎一 (1989) 微生物系アミノ酸の開発と応用. *フレグランスジャーナル* 1989(6):76-81.
- 110) 山田秀明, and 熊谷英彦 (1978) 微生物酵素を用いるアミノ酸の合成. *Amino Acid, Nucleic Acid* 37:1-11.
- 111) 熊谷英彦 (1987) 酵素法によるアミノ酸合成. *Bio Industry* 4:535-547.
- 112) 横関健三 (1988) 酵素法による光学活性アミノ酸の生産. *醸造協会誌* 83:230-237.
- 113) Yonaha, K., and Soda, K. (1986) Application of stereoselectivities of enzymes. Synthesis of optically active amino acids and α -hydroxy acid, and stereospecific isotope-labeling of amino acids, amines and coenzymes. *Adv. Biochem. Engineering* 33:95-130.
- 114) Wandrey (1986) Synthesis of L-amino acids by isolated enzyme and microorganisms.

- p. 263-284. In Schneider, M.P. (ed.) Enzymes as catalysts in organic synthesis. D. Reidel Publishing Company.
- 115) (1993) D-アミノ酸. *Bio Industry* **10**:527-528.
- 116) 浅野泰久 (1989) D-アミノ酸の酵素的合成をめぐる最近の話題. *発酵工学* **67**:207-208.
- 117) 浅野泰久 (1990) D-アミノ酸及びその誘導体の酵素的製造法. *バイオサイエンスとインダストリー* **48**:131-136.
- 118) Kinoshita, S., Tanaka, K. Udaka, S., and Akita, S. (1957) Glutamic acid fermentation. *Proc. Intern. Symp. Enzyme. Chem.* **2**:464-468.
- 119) 米原徹, 武内正江, and 筒井浩巳 (1990) 発酵法によるD-アラニン生産. 膜透過変異株によるD-体選択蓄積. *日本農芸化学会誌* **64**:680.
- 120) 武内正江, and 米原徹 (1989) 公開特許公報 平1-187091. 発酵法によるD-アラニンの製造法.
- 121) 武内正江, and 米原徹 (1989) 公開特許公報 平1-309691. D-アラニンの製造法.
- 122) 武内正江, and 米原徹 (1990) 公開特許公報 平2-171194. 発酵法によるD-アラニンの製造法.
- 123) Takeuchi, M., and Yonchara, T. (1988) European Patent Application 0310949. Process for producing D-alanine.
- 124) 米原徹 (1995) バクテリアによるD-アラニン発酵. *バイオサイエンスとバイオインダストリー* **53**:37-39.
- 125) 崎谷幾雄, and 光野正樹 (1959) 低級脂肪酸によるアミノ酸のラセミ化. *日本化学雑誌* **80**:1035-1038.
- 126) Yamada, S., Hongo, C., Yoshioka, R., and Chibata, I. (1983) Method for racemization of optically active amino acids. *J. Org. Chem.* **48**:843-846.
- 127) 千畑一郎, 山田茂樹, 本郷主税, and 吉岡龍蔵 (1982) 公開特許公報 昭57-123150. アミノ酸のラセミ化方法.
- 128) 千畑一郎, 山田茂樹, 本郷主税, and 吉岡龍蔵 (1982) 公開特許公報 昭57-212146. アミノ酸のラセミ化方法.
- 129) 千畑一郎, 山田茂樹, 本郷主税, and 吉岡龍蔵 (1988) 公開特許公報 昭63-55505. アミノ酸のラセミ化方法.

- 130) Barry, L.G., Pugniere, M., Castro, B., and Previero, A. (1993) Racemization of α -amino acid esters by aliphatic ketones in the presence of carboxylic acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **41**:323-325.
- 131) 小笠原誉久, 立道秀麿, and 鈴木重成 (1967) 特許出願広告 昭42-13445. 光学活性アミノ酸またはその塩のラセミ化方法.
- 132) Toi, K., Izumi, Y., and Akabori, S. (1963) Synthetic resins catalyzing the racemization of amino acids. 1. The preparation of the resins. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **36**:734-738.
- 133) Toi, K., Izumi, Y., and Akabori, S. (1963) A synthetic resins catalyzing racemization of amino acids. 1. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **36**:1422-1423.
- 134) Chibata, I., Yamada, S., Hongo, C., and Yoshioka, R. (1982) European Patent 0057092. Process for racemizing an optically active alpha-amino acid or a salt thereof.
- 135) Tatsumi, S., Seki, K., and Akashi, T. (1965) United States Patent 3213106. Process of racemizing optically active alpha acids.
- 136) Kunieda, T., Koga, K., and Yamada, S. (1967) Studies on optically active amino acids. XIII. Racemization of *N*-benzoylanilides of optically active proline and pipercolic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **15**:350-351.
- 137) 石渡健一, 中村武史, 牧口信義, 宮原匠一郎, 松本俊男, and 新田一成 (1989) 公開特許公報 昭64-40453. 光学活性セリンのラセミ化法.
- 138) 大野孝衛, 森田正二, and 藤野年弘 (1989) 公開特許公報 昭64-45349. DL-リジンの製造法.
- 139) 松本俊男, 宮原匠一郎, 宮原徹, and 新田一成 (1989) 公開特許公報 昭64-63558. 光学活性リジンのラセミ化法.
- 140) 塩川豊 (1989) 公開特許公報 平1-165559. 光学活性アミノ酸エステルの選択的ラセミ化法.
- 141) 小川鉄雄, and 明石武和 (1956) 特許出願公報 昭31-422. グルタミン酸のラセミ体分割方法.
- 142) 小川鉄雄, 明石武和, 佐藤照子, and 山本敏 (1956) 特許出願公報 昭31-423. ラセミ・グルタミン酸の分割方法.
- 143) 小川鉄雄, and 明石武和 (1956) 特許出願公報 昭31-2972. ラセミ・グルタミン酸の

光学的分割方法.

- 144) 金尾清造, 堀信一, and 加藤二郎 (1957) 特許出願公報 昭32-5419. ラセミン・グルタミン酸からL(+)-グルタミン酸を製造する方法.
- 145) 伊藤謙吉, 溝口直正, 太宰美代治, and 佐藤孟弘 (1970) 特許出願広告 昭45-17663. グルタミン酸またはその塩の光学分割法.
- 146) 千畑一郎, 山田茂樹, 本郷主税, and 吉岡龍蔵 (1991) 特許公報 平3-12051. アミノ酸の光学分割方法.
- 147) 千畑一郎, 山田茂樹, 本郷主税, and 吉岡龍蔵 (1991) 特許公報 平3-12052. アミノ酸の光学分割方法.
- 148) 千畑一郎 (1975) 公開特許公報 昭50-101355. 光学活性プロリンの製造法.
- 149) Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., and Chibata, I. (1966) Studies of continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. *Enzymologia* 31:214-224.
- 150) Kieny-L'Homme, M.-P., Arnaud, A., and Galzy, P. (1981) Etude d'une L- α -aminoamidase particulaire de *Brevibacterium* sp. en vue de l'obtention d'acides α -amines optiquement actifs. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27:307-325.
- 151) van den Tweel, W.J.J., van Dooren, T.J.G.M., de Jonge, P.H., Kaptein, B., Duchateau, A.L.L., and Kamphuis, J. (1993) *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321. A new biocatalyst with broad-spectrum L-specific amidase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:296-300.
- 152) Boesten, W.H.J., Dassen, B.H.N., Kerkhoffs, P.L., Roberts, M.J.A., Cals, M.J.H., Peters, P.J.H., van Balken, J.A.M., Meijer, E.M., and Schoemaker, H.E. (1986) Efficient enzymic production of enantiomerically pure amino acids. p. 355-360. In Schneider, M.P. (ed.), *Enzymes as Catalysts in organic synthesis*. D. Reulel Publishing Company.
- 153) Klages, U., and Weber, A. (1989) PCT WO 89/10969. Process for producing L-amino acids and amino acid amides.
- 154) Chibata, I., Tosa, T., and Sato, T. (1974) Immobilized aspartase-containing microbial cells. Preparation and enzymatic properties. *Appl. Microbiol.* 27:878-885.
- 155) Nishimura, N., and Kisumi, M. (1984) Aspartase-hyperproducing mutants of

- Escherichia coli* B. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:1072-1075.
- 156) **Shibatani, T., Kakimoto, T., and Chibata, I.** (1979) Stimulation of L-aspartate β -decarboxylase formation by L-glutamate in *Pseudomonas dacunhae* and improved production of L-alanine. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:359-364.
- 157) **Takamatsu, S., Yamamoto, K., Tosa, T., and Chibata, I.** (1981) Stabilization of L-aspartate β -decarboxylase activity of *Pseudomonas dacunhae* immobilized with carrageenan. *J. Ferment. Technol.* **56**:489-493.
- 158) **Furui, M., and Yamashita, K.** (1983) pressurized reaction method for continuous production of L-alanine by immobilized *Pseudomonas dacunhae* cells. *J. Ferment. Technol.* **61**:587-591.
- 159) **Kubota, K.** (1985) Improved production of L-serine by mutants of *Corynebacterium glycinophilum* with less serine dehydratase activity. *Agric. Biol. Chem.* **49**:7-12.
- 160) **Izumi, Y., Takizawa, M., Tani, Y., and Yamada, H.** (1982) L-Serine production by resting cells of a methanol-utilizing bacterium. *J. Ferment. Technol.* **60**:269-276.
- 161) **Yamada, H., Miyazaki, S.S., and Izumi, Y.** (1986) L-Serine production by a glycine-resistant mutant of methylotrophic *Hyphomicrobium methylovorum*. *Agric. Biol. Chem.* **50**:17-21.
- 162) **Hsiao, H.-Y., and Wei, T.** (1986) Enzymatic production of L-serine with a feedback control system for formaldehyde addition. *Biotechnol. Bioeng.* **28**:1510-1518.
- 163) **Wichmann, R., and Wandrey, C.** (1981) Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:2789-2802.
- 164) **Ohshima, T., Wandrey, C., Kula, M.-R., and Soda, K.** (1985) Improvement for L-leucine production in a continuously operated enzyme membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:1616-1618.
- 165) **大島敏久, and 左右田健次** (1985) ロイシン脱水素酵素. *発酵と工業* **43**:919-929.
- 166) **Asano, Y. and Nakazawa, A.** (1987) High yield synthesis of L-amino acids by phenylalanine dehydrogenase from *Sporosarcina ureae*. *Agric. Biol. Chem.* **51**:2035-2036.
- 167) **Kumagai, H., Yamada, H., Matsui, H., Ohkishi, H., and Ogata, K.** (1970) Tyrosine phenol lyase. I. Purification, crystallization, and properties. *J. Biol. Chem.*

- 145:1767-1772.
- 168) Kumagai, H., Yamada, H., Matsui, H., Ohkishi, H., and Ogata, K. (1970) Tyrosine phenol lyase. II. Cofactor requirements. *J. Biol. Chem.* 145:1773-1777.
- 169) Kumagai, H., Kashima, N., Torii, H., Yamada, H., Enei, H., and Okumura, S. (1972) Purification, crystallization and properties of tyrosine phenol lyase from *Erwinia herbicola*. *Agric. Biol. Chem.* 36:472-482.
- 170) Enei, H., Nakazawa, H., Okumura, S., and Yamada, H. (1973) Synthesis of L-tyrosine or 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine from pyruvic acid, Ammonia and phenol or pyrocatechol. *Agric. Biol. Chem.* 37:725-735.
- 171) Yoshida, H., Utagawa, T., Kumagai, H., and Yamada, H. (1974) Purification, crystallization and properties of tryptophanase from *Proteus rettgeri*. *Agric. Biol. Chem.* 38:2065-2072.
- 172) Kumagai, H., Tanaka, H., Sejima, S., and Yamada, H. (1977) Elimination and replacement reactions of β -chloro-L-alanine by cysteine desulfhydrase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.* 41:2071-2075.
- 173) Ohkishi, H., Nishikawa, D., Kumagai, H., and Yamada, H. (1981) Distribution of cysteine desulfhydrase in microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 45:253-257.
- 174) Ohkishi, H., Nishikawa, D., Kumagai, H., and Yamada, H. (1981) Synthesis of L-cysteine and its analogues by intact cells containing cysteine desulfhydrase. *Agric. Biol. Chem.* 45:259-263.
- 175) Kumagai, H., Choi, Y.-J., Sejima, S., and Yamada, H. (1975) Formation of cysteine desulfhydrase by bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 39:387-392.
- 176) Nagasawa, T., and Yamada, H. (1987) O-Acetylserine sulphydrylase from *Bacillus sphaericus*. p. 474-478. In Jakoby, W.B., and Griffith, O.W. (ed.), *Methods in enzymology*, vol. 143, Academic Press Inc., New York.
- 177) Yamada, S., Nabe, K., Izumi, N., Nakamichi, K., and Chibata, I. (1981) Production of L-phenylalanine from *trans*-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:773-778.
- 178) Onishi, N., Yokozeki, K., Hirose, Y., and Kubota, K. (1987) Enzymatic production of L-phenylalanine from *trans*-cinnamic acid by *Endomyces lindneri*. *Agric. Biol.*

- Chem.* 51:291-292.
- 179) 福村隆, and 加藤嵩一 (1980) 酵素法によるL-リジン製造法の開発. *日本農芸化学会誌* 54:647-653.
- 180) Fukumura, T. (1977) Conversion of D- and DL- α -amino- ϵ -caprolactam into L-lysine using both yeast cells and bacterial cells. *Agric. Biol. Chem.* 41:1327-1330.
- 181) Sano, K., Yokozaki, K., Tamura, F., Yasuda, N., Noda, I., and Mitsugi, K. (1977) Microbial conversion of DL-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid to L-cysteine and L-cystine. Screening of microorganisms and identification of products. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:806-810.
- 182) 佐野孝之輔, 山本泰, 楠本勇夫, and 横関健三 (1985) L-システインの新製造法の開発と工業化. *日本農芸化学会誌* 59:823-829.
- 183) Sano, K., Yokozaki, K., Eguchi, C., Kagawa, T., Noda, I., and Mitsugi, L. (1977) Enzymatic production of L-tryptophan from L- and DL-5-indolylmethylhydantoin by newly isolated bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 41:819-825.
- 184) Yokozaki, K., Sano, K., Eguchi, C., Yamada, K., and Mitsugi, K. (1987) Enzymatic production of L-tryptophan from DL-5-indolylmethylhydantoin by mutants of *Flavobacterium* sp. T-523. *Agric. Biol. Chem.* 51:363-369.
- 185) Yokozaki, K., Sano, K., Eguchi, C., Iwagami, H., and Mitsugi, K. (1987) Optimal conditions for the enzymatic production of L-aromatic amino acids from the corresponding 5-substituted hydantoins. T-523. *Agric. Biol. Chem.* 51:729-736.
- 186) Yokozaki, K., Hirose, Y., and Kubota, K. (1987) Mechanism of asymmetric production of L-aromatic amino acids from the corresponding hydantoins by *Flavobacterium* sp. *Agric. Biol. Chem.* 51:737-746.
- 187) Yamada, H., Takahashi, S., Kii, Y., and Kumagai, H. (1978) Distribution of hydantoin hydrolyzing activity in microorganisms. *J. Ferment. Technol.* 56:484-491.
- 188) 横関健三 (1988) 5-置換ヒダントインよりL-アミノ酸への微生物変換. *日本農芸化学会誌* 62:775-778.
- 189) Sylđatk, C., and Wagner, F. (1990) Biotechnological production of D- or L-amino acids from 5-monosubstituted hydantoins. *Food Biotechnol.* 4:87-95.
- 190) Nishida, Y., Nakamichi, K., Nabe, K., and Tosa, T. (1987) Enzymatic

- production of L-tryptophan from DL-5-indolylmethylhydantoin by *Flavobacterium* sp. *Enzyme Microb. Technol.* **9**:721-725.
- 191) 佐野孝之輔, 横関健三, 山田和彦, 安田直彦, 江口新比古, 野田一郎, and 光木浩司 (1981) 特許公報 昭56-24516. L-アミノ酸の製造法.
- 192) 三好照三, 北川広道, 加藤正明, and 千葉晋 (1986) 公開特許公報 昭61-9292. L-アミノ酸の製造方法.
- 193) 三好照三, 北川広道, 加藤正明, and 千葉晋 (1986) 公開特許公報 昭61-9293. L-アミノ酸の製造方法.
- 194) 石川高広, 堀越弘毅, 小山祐一郎, and 木村均 (1987) 公開特許公報 昭62-275696. L-メチオニンの製造法.
- 195) 白井直規, 横関健三, 川嶋伸樹, and 江井仁 (1988) 公開特許公報 昭63-24894. アミノ酸の製造法及びアミノ酸生産菌.
- 196) 横関健三, 山城章宏, 久保田浩二, and 加納英雄 (1988) 公開特許公報 昭63-24895. L-アミノ酸あるいはN-カルバミル-L-アミノ酸の製造法.
- 197) 山田秀明, 清水昌, and 米田耕司 (1980) 微生物のヒダントイナーゼを用いるD-アミノ酸の合成. *発酵と工業* **38**:937-946.
- 198) 谷吉樹, 山田秀明, and 熊谷英彦 (1978) 加水分解酵素を利用する合成. II. ホスファターゼ, ヒダントイナーゼ, トリプトファンナーゼ. *化学と生物* **16**:449-460.
- 199) Olivieri, R., Fascetti, E., Angelini, L., and Degen, L. (1981) Microbial transformation of racemic hydantoin to D-amino acids. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:2173-2183.
- 200) Yokozeki, K., Nakamori, S., Yamanaka, S., and Yoshinaga, F. (1987) Optimal condition for the enzymatic production of D-amino acids from the corresponding D-substituted hydantoin. *Agric. Biol. Chem.* **51**:715-719.
- 201) Yokozaki, K., and Kubota, K. (1987) Mechanism of asymmetric production of D-amino acids from the corresponding hydantoins by *Pseudomonas* sp.. *Agric. Biol. Chem.* **51**:721-728.
- 202) Moller, A., Syltatk, C., Schulze, M., and Wagner, F. (1988) Stereo- and substrate-specificity of D-hydantoinase and a D-N-carbamyl-amino acid amidohydrolase of *Arthrobacter crystallopoietes* AM2. *Enzyme Microb. Technol.* **10**:618-625.
- 203) Morin, A. (1993) Use of D-hydantoinase extracted from legumes to produce N-carbamyl

- D-amino acids. *Enzyme Microb. Technol.* **15**:208-214.
- 204) Yamada, H., Takahashi, S., Kii, Y., and Kumagai, H. (1978) Distribution of hydantoin hydrolyzing activity in microorganisms. *J. Ferment. Technol.* **56**:484-491.
- 205) Takahashi, S., Kii, Y., Kumagai, H., and Yamada, H. (1978) Purification, crystallization and properties of hydantoinase from *Pseudomonas striata*. *J. Ferment. Technol.* **56**:492-498.
- 206) Morin, A., Hummel, W., and Kula, M.-R. (1986) Rapid detection of microbial hydantoinase on solid medium. *Biotechnol. Lett.* **8**:573-576.
- 207) Morin, A., Hummel, W., and Kula, M.-R. (1987) Enrichment and selection of hydantoinase-producing micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1201-1207.
- 208) Takahashi, S., Ohashi, T., Kii, Y., Kumagai, H., and Yamada, H. (1979) Microbial transformation of hydantoins to N-carbamyl-D-amino acids. *J. Ferment. Technol.* **57**:328-332.
- 209) Yokozeki, K., Nakamori, S., Eguchi, C., Yamada, K., and Mitsugi, K. (1987) Screening of microorganisms producing D-p-hydroxyphenylglycine from DL-5-(p-hydroxyphenyl)hydantoin. *Agric. Biol. Chem.* **51**:355-362.
- 210) 山田秀明, 高橋里美, and 米田耕司 (1978) 公開特許公報 昭53-91189. D-N-カルバモイル- α -アミノ酸類の製造法.
- 211) 横関健三, 中森茂, 山田和彦, 江口新比古, and 吉永文弘 (1979) 公開特許公報 昭54-89088. D- α -アミノ酸の製法.
- 212) 中森茂, 横関健三, 光木浩司, 江口新比古, and 岩上寿夫 (1979) 公開特許公報 昭54-89089. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 213) 横関健三, 中森茂, 山中茂, and 山田和彦 (1980) 公開特許公報 昭55-88697. D- α -アミノ酸の製造法.
- 214) 横関健三, 山中茂, 山田和彦, and 中森茂 (1980) 公開特許公報 昭55-114291. D- α -アミノ酸の製造法.
- 215) 高橋秀行 (1980) 公開特許公報 昭55-104890. D- α -アミノ酸類の製造方法.
- 216) 横関健三, 中森茂, 山中茂, and 山田和彦 (1980) 公開特許公報 昭55-114292. D- α -アミノ酸の製造法.
- 217) 横関健三, and 広瀬義輝 (1986) 公開特許公報 昭61-152291. D-N-カルバモイル- α -

- アミノ酸の製造法.
- 218) 田脇新一郎, 竹市守, 萩原尚, and 樽川仁 (1986) 公開特許公報 昭61-181391.
D- α -アミノ酸の製造方法.
- 219) 竹市守, 萩原尚, 樽川仁, 田脇新一郎, and 牧口信義 (1986) 公開特許公報
昭61-212292. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 220) 高橋秀行, 高橋里美, 大橋武久, 米田耕司, and 渡辺清 (1987) 公開特許公報
昭62-25990. D- α -アミノ酸類の製造方法.
- 221) ロベルト・オリビエ, アウレリオ・ビグリア, ルードウィグ・デーゼン, レ
オネツロ・アンジェリーニ, and エウジェニオ・ファステッチ (1988) 特許公
報 昭63-20520. D-アミノ酸の製造方法.
- 222) 石川高広, and 木村均 (1988) 公開特許公報 昭63-56278. シュウドモナス属NS214
菌株及びD-アミノ酸の製造方法.
- 223) 田脇新一郎, 樽川仁, 相川敏和, and 竹市守 (1988) 公開特許公報 昭63-71196.
D-N-カルバミル- α -アミノ酸の製造方法.
- 224) 田脇新一郎, 樽川仁, 相川敏和, and 竹市守 (1988) 公開特許公報 昭63-112990.
D- α -アミノ酸の製造方法.
- 225) 田脇新一郎, 樽川仁, 相川敏和, and 竹市守 (1988) 公開特許公報 昭63-173595.
D- α -アミノ酸の製造方法.
- 226) 高橋秀行, 高橋里美, 大橋武久, 米田耕司, and 渡辺清 (1989) 公開特許公報
平1-48758. D- α -アミノ酸類の製造方法.
- 227) 嶋田正雄, 浅井義之, 石渡健一, 田脇新一郎, and 中村照芳 (1986) 公開特許公
報 昭61-47194. N-カルバモイル-D-バリンまたはD-バリンの製造法.
- 228) 宮原匠一郎, 長原清輝, 坂口昭夫, and 新田一成 (1986) 公開特許公報
昭61-56094. イソプロピルヒダントインからD-バリンの製造方法.
- 229) 五井仁, 鶴岡崇士, 尾本捷二, 宮道慎二, and 井上重治 (1982) 公開特許公報
昭57-26596. D-システインの製造法.
- 230) クロード・ジロニエール, and マルセル・グイバルシュ (1988) 特許公報
昭63-19158. D- α -アミノ酸の製造法.
- 231) 山田秀明, 高橋里美, and 米田耕司 (1978) 公開特許公報 昭53-69884. D-(α)-N-カ
ルバモイル-2-(置換フェニル)グリシン類の製造法.

- 232) 山田秀明, 高橋里美, and 米田耕司 (1978) 公開特許公報 昭53-44690. D-N-カルバミルフェニルグリシン及びその置換誘導体の製造法.
- 233) 山田秀明, 高橋里美, and 米田耕司 (1978) 公開特許公報 昭53-133688. D-N-カルバミルフェニルグリシン及びその置換誘導体の製造法.
- 234) Nanba, H., Yamada, Y., Takano, M., Ikenaka, Y., Takahashi, S., and Yajima, K. (1992) European Patent Application 0515698. Process for producing D-amino acid.
- 235) 佐藤治代, 伊藤則子, and 今村伸三 (1989) 公開特許公報 昭64-55193. D-スバラギン酸の製造法.
- 236) 佐藤治代, 伊藤則子, and 今村伸三 (1989) 公開特許公報 昭64-55194. D-スバラギンの製造法.
- 237) Watanabe, K., Ishikawa, T., Mukohara, Y., and Nakamura, H. (1992) Identification and sequencing of a gene encoding a hydantoin racemase from the native plasmid of *Pseudomonas* sp. strain NS671. *J. Bacteriol.* **174**:3461-3466.
- 238) Watanabe, K., Ishikawa, T., Mukohara, Y., and Nakamura, H. (1992) Purification and characterization of the hydantoin racemase of *Pseudomonas* sp. strain NS671 expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:7989-7995.
- 239) Sugie, M., and Suzuki, H. (1980) Optical resolution of DL-amino acids with D-aminoacylase of *Streptomyces*. *Agric Biol. Chem.* **44**:1089-1095.
- 240) Tsai, Y.-C., Tseng, C.-P., Hsiao, K.-M., and Chen, L.-Y. (1988) Production and purification of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* and taxonomic study of the strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:984-989.
- 241) Moriguchi, M., and Ideta, K. (1988) Production of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* MI-4. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2767-2770.
- 242) Sakai, K., Obata, T., Ideta, K., and Moriguchi, M. (1991) Purification and properties of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* MI-4. *J. Ferment. Bioeng.* **71**:79-82.
- 243) Yang, Y.-B., Lin, C.-S., Tseng, C.-P., Wang, Y.-J., and Tsai, Y.-C. (1991) Purification and characterization of D-aminoacylase from *Alcaligenes faecalis* DA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1259-1260.

- 244) 千畑一郎, 土佐哲也, and 遠藤紀子 (1966) 特許公報 昭41-2238. 光学活性アミノ酸の製法.
- 245) 杉江牧子, 富塚登, and 佐藤昭雄 (1988) 公開特許公報 昭63-39598. D-アミノ酸の製造法.
- 246) 杉江牧子, 富塚登, 佐藤昭雄, 鈴木英雄, 後藤達乎, and 菅原邦雄 (1989) 公開特許公報 平1-29560. D-アミノ酸の製造法.
- 247) Tokuyama, S., Hatano, K., and Takahashi, T. (1994) Discovery of a novel enzyme, *N*-acylamino acid racemase in actinomycete. Screening, isolation, and identification. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:24-27.
- 248) 高橋健, and 波多野和徳 (1989) 公開特許公報 平1-137973. アシルアミノ酸ラセマーゼ、その製造法及び用途.
- 249) 徳山真治, 波多野和徳, and 高橋健 (1994) 公開特許公報 平6-205668. アシルアミノ酸ラセマーゼ生産菌.
- 250) Asano, Y., Mori, T. Hanamoto, S., Kato, Y., and Nakazawa, A. (1989) A new D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:470-474.
- 251) 浅野泰久 (1990) D-アミノ酸及びその誘導体の酵素的製造法. *バイオサイエンスとバイオインダストリー* 48:131-137.
- 252) Asano, Y. Nakazawa, A., Kato, Y., and Kondo, K. (1989) Properties of a novel D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*. *J. Biol. Chem.* 264:14233-14239.
- 253) 浅野泰久 (1989) 新規微生物酵素の開発と有機合成への利用. *有機合成化学* 47:749-759.
- 254) 浅野泰久 (1989) D-アミノ酸の酵素的合成法をめぐる最近の話題. *発酵工学* 67:207-208.
- 255) 浅野泰久 (1991) 新酵素D-アミノ酸ペプチダーゼの発見と応用. *Bio Industry* 8:338-345.
- 256) 浅野泰久, 仲沢章子, 加藤康夫, and 近藤聖 (1989) 公開特許公報 平1-225482. アミノペプチダーゼ及びその使用.
- 257) Asano, Y., Nakazawa, A., Kato, Y., and Kondo, K. (1989) Discovery of a

- D-stereospecific aminopeptidase and its use as a catalyst in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28:450-451.
- 258) 銅谷正晴, 近藤俊夫, 五十嵐秀雄, and 内山隆子 (1986) 公開特許公報 昭61-274690. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 259) 銅谷正晴, 五十嵐秀雄, and 浦上貞治 (1988) 公開特許公報 昭63-87998. D- α -アミノ酸の製造法.
- 260) 銅谷正晴, 五十嵐秀雄, 近藤俊夫, and 内山隆子 (1989) 公開特許公報 平1-262798. D- α -アミノ酸の製造法.
- 261) 銅谷正晴, 内山隆子, 近藤俊夫, and 五十嵐秀雄 (1989) 公開特許公報 平1-265896. D- α -アミノ酸の製造法.
- 262) 銅谷正晴, 近藤俊夫, 五十嵐秀雄, and 内山隆子 (1984) 公開特許公報 昭60-184392. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 263) ヴィルヘルム・フーベルトウス・ヨーゼフ・ベステン, and スタミカーボン・ベスローテン・ベンノートシャップ (1986) 公開特許公報 昭61-96989. D- α -アミノ酸アミドの対応するD- α -アミノ酸への酵素加水分解.
- 264) Godfredsen, S.E., Clausen, K., Hermes, H.F.M., van Balken, J.A.M., and Meijer, E.M. (1989) PCT WO 89/01525. Process for preparation of organic chemicals.
- 265) Klages, U., and Weber, A. (1989) PCT WO 89/10969. Process for producing L-amino acids and amino acid amides.
- 266) 西村克史, 谷沢克行, and 左右田健次 (1990) 耐熱性D-アミノ酸トランスアミナーゼ. *バイオサイエンスとインダストリー* 48:11-18.
- 267) Soda, K., Yonaha, K., and Misono, H. (1974) Purification and crystallization of D-amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. *FEBS Lett.* 46:359-363.
- 268) Yonaha, K., Misono, H., and Soda, K. (1975) Reconstitution of D-amino acid aminotransferase. *FEBS Lett.* 55:265-267.
- 269) Yonaha, K., Misono, H., Yamamoto, T., and Soda, K. (1975) D-Amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. *J. Biol. Chem.* 250:6983-6989.
- 270) Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K. (1988) Enantioselective synthesis of various D-amino acids by a multi-enzyme system. *J. Biotechnol.* 8:243-248.
- 271) Inoue, K., Kuramitsu, S., Aki, K., Watanabe, Y., Takagi, T., Nishigai,

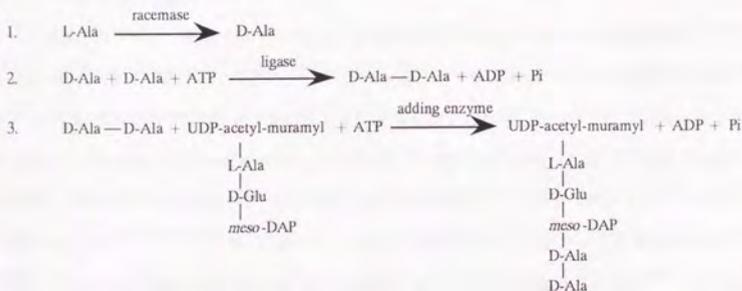
- M., Ikai, A., and Kagamiyama, H. (1988) Branched-chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*. Overproduction and properties. *J. Biochem.* **104**:777-784.
- 272) Tanizawa, K., Masu, Y., Asano, S., Tanaka, H., and Soda, K. (1989) Thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. *J. Biol. Chem.* **264**:2445-2449.
- 273) Martinez del Pozo, A., Merola, M., Ueno, H., Manning, J.M., Tanizawa, K., Nishimura, K., Soda, K., and Ringe, D. (1989) Stereospecificity of reactions catalyzed by bacterial D-amino acid transaminase. *J. Biol. Chem.* **264**:17784-17789.
- 274) Esaki, N., Shimoi, H., Tanaka, H., and Soda, K. (1989) Enantioselective synthesis of D-selenomethionine with D-amino acid aminotransferase. *Biotechnol. Bioeng.* **34**:1231-1233.
- 275) Futaki, S., Ueno, H., Martinez del Pozo, A., Pospischil, M.A., Manning, J.M., Ringe, D., Stoddard, B., Tanizawa, K., Yoshimura, T., and Soda, K. (1990) Substitution of glutamine for lysine at the pyridoxal phosphate binding site of bacterial D-amino acid transaminase. *J. Biol. Chem.* **265**:22306-22312.
- 276) 左右田健次, 田中英彦, 谷沢克行, and 山本浩明 (1987) 公開特許公報 昭62-205790. D-アミノ酸の製造方法.
- 277) 左右田健次, 田中英彦, 谷沢克行, and 山本浩明 (1987) 公開特許公報 昭63-112978. エシエリチア・コリ.
- 278) 左右田健次, and 田中英彦 (1987) 公開特許公報 昭63-207387. D-アミノ酸トランスアミナーゼをコードするDNA配列.
- 279) Senuma, M., Otsuki, O., Sakata, N., Furui, M., and Tosa, T. (1989) Industrial production of D-aspartic acid and L-alanine from DL-aspartic acid using pressurized column reactor containing immobilized *Pseudomonas dactynhae* cells. *J. Ferment. Bioeng.* **67**:233-237.
- 280) Nagasawa, T., and Yamada, H. (1986) Enzymatic transformations of 3-chloroalanine into useful amino acids. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **13**:147-165.

第2章 D-アラニン生産方法の開発

2-1 序論

2-1-1 D-アラニンの存在と生理的意義

微生物において、D-アミノ酸は主に細菌細胞壁のペプチドグリカンや抗生物質などの構成成分として見出される。D-アラニンは、細胞壁のペプチドグリカンの重要な構成成分として細菌に広く存在する。ペプチドグリカンは細菌細胞壁の基本構造であり、N-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸から成る2糖単位の鎖と、D-アラニン、L-アラニン、D-グルタミン酸、L-リジン（またはmeso- α , ϵ -ジアミノピペリン酸）から成るペプチドにより強固な構造を形成している。微生物におけるD-アラニンの生合成は、アラニンラセマーゼによりL-アラニンから生成する経路とD-アミノ酸トランスアミナーゼによりピルビン酸から生成する経路が考えられる。実際、比較的多くの細菌からアラニンラセマーゼ活性が検出されていることから^{1-4,34-48}、多くの細菌においてアラニンラセマーゼを用いるD-アラニン生合成経路が存在する可能性が考えられる。また、本研究を含むいくつかの研究において、アラニンラセマーゼの阻害剤であるD-サイクロセリンによる細菌の生育阻害がD-アラニンの存在により回復した結果は、アラニンラセマーゼがD-アラニンの生合成に重要であることを示唆する¹⁻⁴。さらに、*Escherichia coli* や *Salmonella typhimurium* について、遊離のD-アラニンをペプチドグリカンの生合成に利用する経路が知られる (Fig. 2-1)⁴⁹。

Fig. 2-1 細菌細胞壁のD-アラニン鎖部分の酵素的生合成⁴⁹⁾

高等植物では、エンドウ芽生え中のN-マロニルD-アラニン、 γ -L-グルタミルD-アラニン^{50,52}、タバコ葉中のD-アラニルD-アラニン⁵³、イネ科植物のD-アラニルグリシン⁵⁰、D-アラニルD-アラニン⁵⁴など、いずれもジペプチドまたはそれに準じる比較的簡単な構造の化合物として見出されるが、生理的役割はほとんど明らかになっていない。

動物では、タコやイカの筋肉中に存在するオクトピン (Fig. 2-2)⁵⁵やモルモットの血液、ガチョウの筋肉、ナガカメムシ、鱗翅類の幼虫から遊離のD-アラニン⁵⁶の存在が報告されているが、やはり生理的役割はほとんど明らかになっていない。

このように、D-アラニンは、生理的役割は良くわからないが、近年、医薬品、農業の製造原料やアリテームなどのL-アスパルチルD-アラニンを基本構造とする人工甘味料 (Fig. 2-2)^{57,120}などの食品添加物の製造原料としての用途があり、産業上有用な物質である。

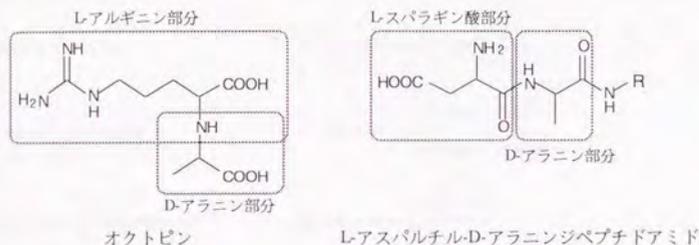


Fig. 2-2 D-アラニンを構成成分として持つ化合物^{56,57}

2-1-2 D-アラニンの製造方法

従来のD-アラニン製造方法としては、(1) 微生物を用いたD-アラニンの直接発酵法^{58-65,112-114}、(2) ピルビン酸にD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを作用させてD-アラニンを生成する方法¹⁰⁶⁻¹⁰⁹、(3) N-アシル-DL-アラニンにアシラーゼを作用させて光学分割する方法⁷⁰⁻⁷⁵、(4) 5-メチルヒダントインに光学選択性のあるヒダントイナーゼを作用させる方法⁷⁶⁻¹⁰³、(5) ラセミ体の2-アミノプロピオニトリルに光学選択的にニトリラーゼを作用させてD-アラニンを取得する方法¹⁰⁴、(6) D-アラニンアミドにアミダーゼを作用させる方法^{23,27,28,105}、(7) DL-アラニンアミドにD-体選択的なアミダーゼを作用させる方法¹⁵⁻²⁸、(8) DL-アラニンにL-体選択的分解菌を作用させて残存するD-アラニンを取得する方法⁶⁶⁻⁶⁹、(9) DL-アラニンを ρ -クロロベンゼンスルホン酸塩として優先品出する方法^{110,111}などが知られる (Fig. 2-3)。

これらのD-アラニン製造方法は、以下のような特徴を持つ。(1) 発酵法は、安価にD-アラニン

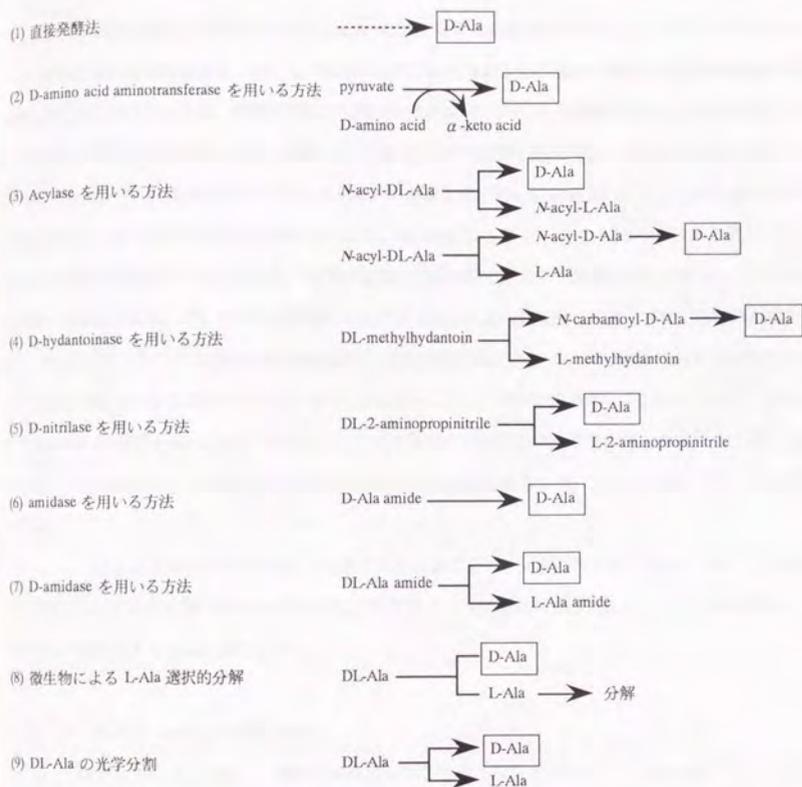


Fig. 2-3 D-アラニンの製造方法

を生産できる可能性があるが、*Corynebacterium fascians* FERM-P no.1511^{58,59,112)}や*Streptomyces zaomyceticus* SF-1836^{60,113)}を用いた直接発酵法は生産性が低く実用性は低い。*Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869のD-サイクロセリン耐性変異株を用いたD-アラニンの発酵生産は、培養液中への生産量が多く生産性は良好であるが、生産されるD-アラニンの光学純度が低いという欠点がある^{61-65,114)}。この生産菌では、D-アラニンとL-アラニンの細胞膜の透過性の違いにより、菌体内ではラセミ体として生産されたアラニンのD-体のみが多量に排出されるが、少量のL-体も排出されるため、光学純度が低下する。(2) D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いる方法は、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼとピルビン酸の他にアミノ基供与体となるD-アミノ酸を供給するための複数の酵素反応の共役が必要であり、安定した生産系を構築することは困難である。(3) N-アシル化-DL-アラニン、(4) 5-メチルヒダントインの光学選択的加水分解

は、高い光学純度を達成できる可能性があるが、原料が高価なため不利である。(5) 2-アミノプロピオニトリルの光学選択的加水分解も、高い光学純度を達成できる可能性があるが、毒性の高い原料を用いるため操作性に問題があり、また、既知の方法で生産されたD-アラニンの光学純度は低い。(6) D-アラニンアミドを出発物質とする方法は、生産が困難な光学活性な化合物を原料とするため、現実的な方法ではない。(7) DL-アラニンアミドを出発物質とする方法は、光学選択性の高い酵素を用いることにより高い光学純度のD-アラニンを取得できる可能性がある。また、基質のDL-アラニンアミドがDL-アラニンの化学合成法による生産の中間体であることから、原料が安価に供給可能である。D-体選択的にアラニンアミドを加水分解する酵素は知られているが、実用的な生産プロセスに利用可能な良好な性質を有する酵素の報告はない。(8) DL-アラニン中のL-体の選択的分解は、光学純度の高いD-アラニンを取得できる可能性があるが、既知の方法の生産性は低い。また、原料であるDL-アラニン中のL-アラニンを分解するため、原料の50%は有効に利用できない。(9) DL-アラニンの優先品出法は高い光学純度と収率を達成することは困難であり、ジアステレオマー形成法は別に光学活性化合物を必要とするためにコストが高くなることが予想される。

これらの方法を参考に、基質が安価に供給可能であり、比較的簡単なプロセスで高い光学純度のD-アラニンの生産が可能であると思われる、DL-アラニンアミドにD-体選択的なアミダーゼ作用させてD-アラニンを生産する方法を選択した。

2-1-3 D-アラニン製造の目的と方法

D-アラニンは、医薬品、農業の製造原料やアリテームなどのL-アスパルチル-D-アラニンを基本構造とする人工甘味料⁵⁷⁾などの食品添加物の製造原料として用いられる産業上有用な物質である。これらの用途の場合、製品には高い光学純度が要求されるため、製造方法としては化学合成法よりも光学選択性が高い酵素法が有利である。また、原料は安価に安定して供給される必要がある。そこで、光学選択性の高い微生物酵素を利用して、DL-アラニンの化学的合成の中間体であるDL-アラニンアミドからのD-アラニンの製造方法を考えた。

DL-アラニンアミド中のD-アラニンアミドを光学選択的に加水分解する酵素としては、*Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3^{15,16)}、*Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38^{16,22)}、*Rhodococcus erythropolis* JCM 3201²³⁾、NR-23、NR-28^{24,26)}、*Pseudomonas fluorescens* IFO 12055²³⁾、*Serratia marcescens* IAM 12143²³⁾、*Achromobacter cycloclax* IAM 1013²⁷⁾、*Alcaligenes faecalis* IAM 1420²⁷⁾、*Kurthia zophii* IFO1283²⁷⁾、*Rhodococcus erythropolis* NCIB 11538、11539、11540、12019²⁸⁾、などの細菌由来の酵素が報告されている。さらに、浅野は*Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38の部分精製酵素を用いた0.1 MのDL-アラニンアミドからのD-アラニ

ンの生産²¹⁾、銅谷らは *Achromobacter cycloclas* IAM 1013、*Alcaligenes faecalis* IAM 1420、*Kurthia zophii* IF01283の凍結菌体を用いた2.5% (wt./wt.)のDL-アラニンアミドからのD-アラニンの生産²⁷⁾を報告している。しかし、これらの報告は、比較的低い基質濃度での反応しているため、実用性の判断は困難である。また、他の報告の多くは、DL-アラニンアミドからのD-アラニンの生成は示しているが実用的な生産の可能性を裏付けるデータは示していない。そこで、本研究では最初に、高い光学選択性と高い基質濃度でも反応可能な良好な性質を有するD-アラニンアミドを加水分解する酵素(D-アミダーゼ)を多量に生産する菌株のスクリーニングから検討を開始することにした。また、DL-アラニンアミドからD-アラニンを生産した後に残存するL-アラニンアミドの有効利用を考え、高い光学選択性と高い基質濃度でも反応可能な良好な性質を有するL-アラニンアミドを加水分解する酵素(L-アミダーゼ)を多量に生産する菌株のスクリーニングも同時に検討することにした。

以上の酵素法によるDL-アラニンアミドからのD-アラニンの製造方法の概念図をFig. 2-4に示す。

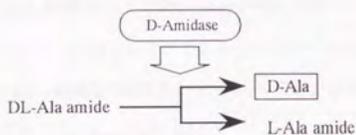


Fig. 2-4 酵素法によるDL-アラニンアミドからのD-アラニンの製造方法の概念図

2-2 実験方法及び材料

2-2-1 菌株

D-アミダーゼ及びL-アミダーゼのスクリーニングには、協和発酵工業（株）東京研究所の保存菌株、及び本研究で新たに土壌、活性汚泥から分離した菌株を用いた。

2-2-2 使用培地

本研究では、特に記載がない限り以下の培地を用いた。

- 培地-1 : グルコース 10 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, K_2HPO_4 3 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, ビオチン 30 $\mu\text{g/l}$, チアミン・HCl 1 mg/l, pH 7.0
- 培地-2 : 極東ブイヨン（極東製薬、東京）20 g/l, ポリペプトン（和光純薬、大阪）5 g/l, 酵母エキス（Difco Laboratories, USA）5 g/l, グルコース 2 g/l, pH 7.2
- 培地-3 : グルコース 20 g/l, コーンステープリカー 5 g/l, ペプトン（極東製薬、東京）5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, 塩化ナトリウム 2.5 g/l, pH 6.8
- 培地-4 : グルコース 30 g/l, コーンステープリカー 20 g/l, ペプトン 5 g/l, 硫酸アンモニウム 20 g/l, 塩化ナトリウム 10 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, pH 7.2

2-2-3 培養条件

D-アミダーゼのスクリーニングでは、1次選択にはDL-アラニンアミド・HCl 2 g/l、D-サイクロセリン 0.5 g/lと寒天18g/lを添加した培地-1寒天平板を用い、30℃で培養を行った。選択後の1次評価には、DL-アラニンアミド 2 g/lを添加した10 mlの培地-2を試験管（25×180 mm）にて30℃、16時間、振盪培養（200 rpm）を行った。

Arthrobacter sp. NJ-26の培養は、21三角フラスコ中に150 mlの培地-3を用い、30℃、24時間、振盪培養（300 rpm）行った後、培養液全量を21発酵槽中のDL-アラニンアミド 6 g/lを添加した培地-4 1 lに投入し、30℃、24時間、通気攪拌培養（1 vvm, 800 rpm）を行った。培養の間、14%アンモニア水にてpHを6.8に維持した。

D-アミダーゼ構成生産変異株の取得における、変異処理の前培養には培地-2を用い、10 ml

の培地を試験管(25×180 mm)にて30℃、6時間、振盪培養(200 rpm)を行った。変異処理後の選択には、培地-1に1 g/lのグリシンアミド、D-ロイシンアミド、D-フェニルアラニンアミド、または2-シアノアセトアミドと寒天18 g/lを添加した平板培地を用い、30℃で培養を行った。選択後の1次評価には、培地-2にDL-アラニンアミド 2 g/lを添加及び無添加の培地10 mlを試験管(25×180 mm)にて30℃、16時間、振盪培養(200 rpm)を行った。

レアマダーゼのスクリーニングでは、1次選択に培地-1にL-アラニンアミド・HCl 0.2 g/lと寒天18 g/lを添加した平板培地を用い、30℃で培養を行った。選択後の1次評価には、培地-2にDL-アラニンアミド 2 g/lを添加した培地を用い、10 mlの培地を試験管(25×180 mm)にて30℃、16時間、振盪培養(200 rpm)を行った。

Rahnella sp. L-5の培養方法は、*Arthrobacter* sp. NJ-26の培養方法と同じである。

2-2-4 D-体特異的アマダーゼのスクリーニング

土壌及び活性汚泥から、DL-アラニンアミドとD-サイクロセリンを添加した培地-1寒天平板上に生育する菌を分離し、DL-アラニンアミドを添加した培地-2にて試験管培養した。培養液10 mlを遠心分離して得た菌体を、2 mlのDL-アラニンアミド25 g/lを含む50 mMリン酸緩衝液 pH 8.0に懸濁して、30℃、2または3時間反応した後、50 μlの6 N塩酸添加により反応を停止した。菌体を遠心分離後、反応液上清中に生成したD-アラニン及びその光学純度を評価した。

$$\text{D-体光学純度 [\%ee]} = \frac{[(\text{D-体}) - (\text{L-体})]}{[(\text{D-体}) + (\text{L-体})]} \times 100$$

2-2-5 L-体特異的アマダーゼのスクリーニング

土壌及び活性汚泥から、L-アラニンアミドを添加した培地-1寒天平板上に生育する菌を分離し、DL-アラニンアミドを添加した培地-2にて試験管培養した。培養液10 mlを遠心分離して得た菌体を、2 mlのDL-アラニンアミド100 g/lを含む50 mMリン酸緩衝液 pH 8.0に懸濁して、30℃、4時間反応した後、50 μlの6 N塩酸を添加することにより反応を停止した。菌体を遠心分離後、反応液上清中に生成したL-アラニン及びその光学純度を評価した。

$$\text{L-体光学純度 [\%ee]} = \frac{[(\text{L-体}) - (\text{D-体})]}{[(\text{L-体}) + (\text{D-体})]} \times 100$$

2-2-6 D-体特異的アマダーゼ構成生産変異株の分離

Arthrobacter sp. NJ-26のNTGを用いた変異処理は、以下の手順に従って行った⁵⁾。NJ-26を培地-2にて、30℃、6時間培養し、遠心分離後、10 mlの50 mM Tris-マレイン酸緩衝液、pH 6.0に懸濁した。

NTGを終濃度 200 $\mu\text{g/l}$ となるように添加し、室温で30分間静置した後、遠心分離し上記Tris-マレイン酸緩衝液にて2回洗浄した。この菌体を培地-2にて30 $^{\circ}\text{C}$ 、3時間培養した。この変異処理菌体を、培地-1にグリシンアミド、D-ロイシンアミド、D-フェニルアラニンアミド、または2-シアノアセトアミドを唯一の窒素源として含む寒天平板上に塗布し、生育する菌を選択した。この菌株を、DL-アラニンアミド添加及び無添加の培地-2を用いて試験管培養を行った後、2-2-4記載の方法に従ってD-アラニン生成能を評価した。

2-2-7 D-アミダーゼ、L-アミダーゼ、アラニンラセマーゼの活性測定法

特に記載がない限り、以下の方法でD-アミダーゼ、L-アミダーゼ、アラニンラセマーゼの活性を測定した。

D-アミダーゼ活性の測定は、135 mMのD-アラニンアミドを含む50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5中に酵素または菌体を入れて、37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間反応した後、0.1 N塩酸を反応液と等量加えて反応を停止した。この反応液中に生成したD-アラニンを定量した。

L-アミダーゼの活性測定は、135 mMのL-アラニンアミドを基質として、反応液中に生成したL-アラニンを定量する以外はD-アミダーゼの活性測定法と同じである。

アラニンラセマーゼの活性測定は、135 mMのL-アラニンとPLP 75 μM を含む50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5中に酵素または菌体を入れて、37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間反応した後、0.1 N塩酸を反応液と等量加えて反応を停止した。この反応液中に生成したD-アラニンを定量した。

酵素活性の単位1 unitは、1分間に1 μmole の生成物を生成する能力と定義した。

D-アミダーゼの基質特異性の検討は以下の方法で行った。135 mMの基質を含む50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5中に*Arthrobacter* sp. NJ-26の精製酵素1 unitを入れて、37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間反応した後、0.1 N塩酸を反応液と等量加えて反応を停止した。加水分解により生成したアンモニアをWeatherbumの方法に従って定量した⁶⁾。すなわち、0.1 mlの反応液にフェノール10 g/lとニトロプルシドナトリウム50 mg/lを含む溶液を添加した後、水酸化ナトリウム5 g/lと次亜塩素酸ナトリウム8.4 ml/lを含む溶液3 mlを加え、室温で30分間静置した。反応液の625 nmの吸収を測定することによりアンモニアを定量した。

L-アミダーゼの基質特異性の検討は、150 mMの基質を含む50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5中に*Rahnella* sp. L-5の湿菌体を入れて、30 $^{\circ}\text{C}$ にて60分間反応した後、D-アミダーゼの基質特異性の検討と同じ方法で生成したアンモニアを定量することによりL-アミダーゼ活性を測定した。

2-2-8 アラニン及びアラニンアミドの定量法

総アラニンは、島津HPLCシステム（島津製作所、京都）とYMCカラム A-311 (ODS) (YMC、京都)を用いて定量した。移動相には、*n*-プロパノール 20% (vol./vol.)、SDS 0.2% (wt./vol.) を含む10 mM クエン酸緩衝液 pH 3.6を用いた。アラニンは、1 M ホウ酸緩衝液 pH 10.4 中で3 mM OPA (ナカライ・テスク、京都)と反応した後、蛍光を測定した（励起波長 344 nm, 検出波長 444 nm）⁷⁾。

D-アラニンの簡易測定は、D-アミノ酸オキシダーゼを用いた酵素法にて定量した⁸⁾。50 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.6中にブタ腎臓由来のD-アミノ酸オキシダーゼ (Sigma, USA) 2 mg/mlを含む溶液1 mlに希釈したサンプル0.1 mlを添加し、37 °Cで30 分間反応した。この反応液に50 μ lの2 N塩酸中に飽和した2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを添加し、50 °C、30 分間静置した。この溶液に5 mlの10 %の水酸化ナトリウム溶液を添加した後、480 nmの吸収を測定し、D-アラニンを用いた検量線によりD-アラニン量を算出した。

アラニンとアラニンアミドの光学純度は以下に示す2方法にて測定した。

方法-1は、Marfeyの方法に従って、FDAAを用いた化学修飾によりジアステレオマーを形成した後、HPLCにて測定する方法である⁹⁾。FDAAは、和光純薬工業（大阪）の製品または、Marfeyの方法に従って合成したものをを用いた。FDAAによる化学修飾は、10~250 mg/lのアラニンまたはアラニンアミドを含むサンプル100 μ lに、炭酸水素ナトリウム10 μ moleとFDAA 0.5 mgを添加し、40 °Cで1時間反応した後、0.4 N塩酸を25 μ l加えて反応を停止した。反応液を希釈した後、島津HPLCシステムとYMCカラム A-311 (ODS)を用いて定量した。移動相には、アセトニトリル27% (vol./vol.)を含む50 mM リン酸トリエチルアミン緩衝液 pH 3.0を用いた。ジアステレオマーの検出は、340 nmの吸収測定にて行った。

方法-2は、光学分割HPLC用カラム Chiralpac WE(-) (ダイセル化学工業)を用いて、HPLCにて測定する方法である。移動相には、0.25 mM CuSO₄を用いた。アラニン及びアラニンアミドの検出は、1 M ホウ酸緩衝液 pH 10.4 中で3 mM OPA (ナカライ・テスク、京都)と反応した後、蛍光を測定した（励起波長 344 nm, 検出波長 444 nm）。

2-2-9 D-体特異的アミダーゼの精製

Arthrobacter sp. NJ-26 からのD-アミダーゼの精製には、50 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.0を用い、5 °C以下で行った。

遠心集菌した*Arthrobacter* sp. NJ-26の培養菌体125 gをTris-HCl緩衝液に懸濁した。この菌体懸濁液をダイノミル (Willy A. Bachofen Manufacturing Engineers) にて菌体破砕処理し、4 °C、14,000 × g、20 分間遠心して無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液に、硫酸アンモニウムを25 %飽和となるように添加し、4

で一晚静置した後、4℃にて14,000×gで20分間遠心した。この上清に、硫酸アンモニウムを5%飽和となるように添加し、4℃で一晚静置した後、4℃にて14,000×gで20分間遠心した。沈殿をTris-HCl緩衝液に溶解した後、Tris-HCl緩衝液にて透析した。この粗酵素液をTris-HCl緩衝液で平衡化したDEAE-Toyopearl（トソー、東京）カラムに通塔し、0から3 M NaClの直線濃度勾配をつけたTris-HCl緩衝液で酵素を溶出した。活性画分を20%飽和硫酸アンモニウムを含むTris-HCl緩衝液にて透析した。この溶液をグリセロール25% (wt./vol.) と硫酸アンモニウム20%飽和のTris-HCl緩衝液で平衡化したButyl-Toyopearl（トソー、東京）カラムに通塔し、硫酸アンモニウム20から0%飽和の直線濃度勾配をつけた同緩衝液で酵素を溶出した。活性画分をTris-HCl緩衝液で透析した後、グリセロール25% (wt./vol.) と硫酸アンモニウム25%飽和のTris-HCl緩衝液で平衡化したButyl-Toyopearlカラムに通塔し、硫酸アンモニウム25から0%飽和の直線濃度勾配をつけた同緩衝液で酵素を溶出した。活性画分をグリセロール25% (wt./vol.) を含むTris-HCl緩衝液にて透析した後、メンブレンフィルター SIP-1013（旭化学工業）で膜濃縮後、精製酵素溶液とした。

2-2-10 酵素蛋白質の分析

蛋白の定量は、牛血清アルブミンを標準に、プロテインアッセイキットI（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ、東京）を用いて595 nmの吸収を測定するか、またはLowryらの方法に従って280 nmの吸収を測定した¹⁰⁾。

Native-PAGEはDavisの方法に従って、1 mm厚の7.5% (wt./vol.) ゲルを用い30 mAで泳動した¹¹⁾。Native-PAGEはD-アミダーゼが、どの蛋白バンドに存在するかを確認するために利用した。電気泳動後、ゲルを2 mm幅に切断し、50 mM Tris-HCl緩衝液 pH 7.5中で酵素を溶出した。この溶出液のアミダーゼ活性を測定した。

SDS-PAGEはLaemmliの方法に従って、1 mm厚の12.5% (wt./vol.) ゲルを用い30 mAで泳動した¹²⁾。蛋白のバンドは、Coomassie brilliant blue R-250にて染色した。分子量マーカーとして、 α -lactalbumin (M.W.=14,400), soybean trypsin inhibitor (M.W.=20,100), carbonic anhydrase (M.W.=30,000), obalbumin (M.W.=43,000), bovin serum albumin (M.W.=67,000), phosphorylase b (M.W.=94,000)を用いた。

酵素蛋白の分子量の測定には、島津HPLCシステムとTSK-Gel G4000 SWカラム (0.75×60 cm, トソー、東京)を用いた。移動相には0.2 M塩化ナトリウムを含む50 mMリン酸緩衝液 pH 7.0を用い、室温、0.9 ml/minで溶出した。蛋白質分子量の標準として、ribonuclease (M.W.=13,700), chymotrypsinogen A (M.W.=25,000), obalbumin (M.W.=43,000), bovin serum albumin (M.W.=67,000), aldolase (M.W.=158,000)を用いた。

等電点(pI)の測定には、両性担体としてBio-Lyteを使用したバイオ・ラッド等電点電気泳動装置(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ、東京)を用いた。12 W、1,200 V、10 mAで4時間泳動した後、各画分をSDS-PAGEにて電気泳動を行い、酵素の位置を決定した。

2-3 結果

2-3-1 D-体特異的アミダーゼのスクリーニング

DL-アラニンアミドからD-アラニンを工業的に生産するために、D-体選択的なアミダーゼのスクリーニングを行った。多くの細菌は、生育に必須な細胞壁構成成分であるD-アラニンをアラニンラセマーゼによりL-アラニンから生成するため、アラニンラセマーゼの阻害剤であるD-サイクロセリン¹⁴⁾存在下ではD-アラニン要求性となる。したがって、D-サイクロセリンとDL-アラニンアミド存在下で生育可能な細菌は、D-アラニンアミドを加水分解してD-アラニンを生成する能力を有すると考えられる。また、DL-アラニンアミドを唯一の窒素源として生育可能な微生物は、アラニンアミドを加水分解してアラニンとアンモニアを生成する能力を有する可能性がある。この考えに基づいて、1次選択方法としてD-サイクロセリン存在下¹⁴⁾、DL-アラニンアミドを唯一の窒素源とする寒天平板培地（培地-1）上で生育する微生物を取得した後、D-アミダーゼ（D-アラニンアミダーゼ）、L-アミダーゼ（L-アラニンアミダーゼ）、及びアラニンラセマーゼの活性を評価した。この結果、活性汚泥から、良好なD-アミダーゼ活性を有する菌株NJ-26を取得した。本菌株は孢子非形成性のグラム陽性桿菌で、分類学的検討の結果、*Arthrobacter* sp.と同定された。*Arthrobacter* sp. NJ-26は、0.25 g/lのD-サイクロセリンにより生育阻害を受けたが、0.25 g/lのD-アラニンまたはD-アラニンアミドの添加により生育は回復した。

本菌株のD-アミダーゼ活性は約 800 units/g wet cellsであった。D-アミダーゼは誘導酵素で、検討した32種類のアミド化合物の中で、D-、L-、及びDL-アラニンアミドによってのみ誘導生産された（Table 2-1）。D-アラニンアミドによる酵素の誘導は、L-アラニンアミドより弱かったが、これは、添加

Table 2-1 *Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アラニンアミダーゼ活性と誘導

Inducers	Cellular activity [units/g wet cells]		
	D-Amidase	L-Amidase	Alanin racemase
None	ND	2.0	3.9
D-Alaninamide	65.3	2.8	NT
L-Alaninamide	737	9.6	NT
DL-Alaninamide	793	10.7	3.7

ND, not detected; NT, not tested.

以下に示すアミド化合物によるD-アラニンアミダーゼの誘導生産は認められなかった。
Glycinamide, D-Leucinamide, DL-Leucinamide, L-Leucinamide, L-Valinamide, L-Threoninamide, L-Aspartic acid amide, L-Prolinamide, L-Methioninamide, L-Lysinamide, L-Argininamide, DL-Tryptophanamide, DL-Phenylalaninamide, L-Alanine- β -naphthylamide, N-Methylformamide, Acetamide, Thioacetamide, 2-Cyanoacetamide, N-Methylacetamide, N-Ethylacetamide, Phenylacetamide, Propionamide, N-Methylpropionamide, Lactamide, n-Valeramide, Malonamide, Acrylamide, Benzamide, Methylurethane.

したD-アラニンアミドがD-アミダーゼによって分解されるためと考えられた。また、加水分解反応の生成物であるD-、L-、及びDL-アラニンによる酵素の誘導生産は認められなかった。

本菌株のL-アミダーゼ活性は、D-アミダーゼ活性の1.3%であった。L-アミダーゼも、D-、L-、及びDL-アラニンアミドにより誘導生産されたが、誘導基質が無くても酵素は生産されることから、L-アミダーゼ活性は少なくとも2種類の酵素に由来することが示唆された。また、アラニンラセマーゼ活性は、D-アミダーゼ活性の0.5%であった。

2-3-2 D-体特異的アミダーゼの諸性質

Arthrobacter sp. NJ-26の培養菌体から、2-2-9記載の方法に従って、D-アミダーゼを精製した。無細胞抽出液から4段階、収率31%で精製し、比活性は約260倍になった (Table 2-2)。最終酵素標品はSDS-PAGEでほぼ単一に精製されたが、わずかに不純蛋白質が含まれていた (Fig. 2-5)。活性の本体がどこに存在するのか確認するため、Native-PAGEを行った後、細切断したゲルから蛋白質を回収し、D-アミダーゼ活性を検討した。この結果、SDS-PAGEのメインバンドがD-アミダーゼであると判断した。また、抽出した酵素標品は、微弱であるが、L-アミダーゼ活性も同時に有していた。

本酵素の分子量は、G4000 SWカラムを用いたゲル濾過により約67,000と計算された。また、SDS-PAGEにより、酵素サブユニットの分子量は約51,000と計算された。これらの結果から、本酵素はモノマー蛋白質で構成されると思われる。本酵素の等電点は、pH 5.2であった。本酵素の至適反応条件は45℃、pH 7.5であった (Fig. 2-6)。本酵素は、pH 6.5~10.0の範囲で安定であった (Fig. 2-7(A))。また、60℃、10分間の処理で完全に失活した (Fig. 2-7(B))。

Table 2-2 *Arthrobacter* sp. NJ-26からのD-アミダーゼの精製

Step	Total protein [mg]	Total activity [$\times 10^3$ units]	Specific activity [units/mg]	Yield [%]
Cell-free extract	27,000	143.0	5.3	100
Ammonium sulfate	7,380	114.8	15.5	80
DEAE-Sepharose	900	96.1	106	67
First Butyl-Toyopearl	87	84.2	968	59
Second Butyl-Toyopearl	32	44.3	1,384	31

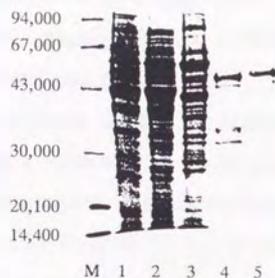


Fig. 2-5 *Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼのSDS-PAGE

Lane M, 分子量マーカー; Lane 1, 無細胞抽出液; Lane 2, 硫酸アンモニウム塩析画分;
Lane 3, DEAE-Sepharose画分; Lane 4, 1次Butyl-Toyopearl 650M画分;
Lane 5, 2次Butyl-Toyopearl 650M画分.

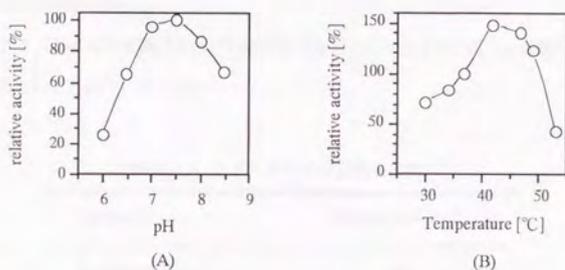


Fig. 2-6 D-アミダーゼに対するpHと温度の影響

反応条件: (A) 135 mM D-アラニンアミド, 37 °C, 30 分間反応.
(B) 135 mM D-アラニンアミド, pH 7.5, 30 分間反応.

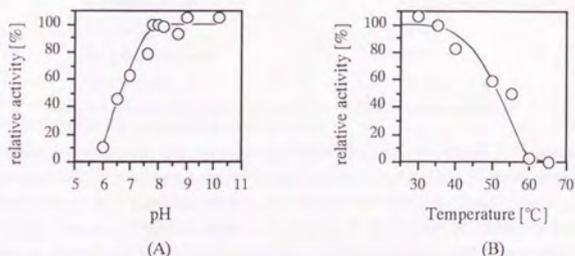


Fig. 2-7 D-アミダーゼの安定性に対するpHと温度の影響

処理条件: (A) 30 °C, 2 時間静置, (B) pH 7.5, 10 分間静置後氷冷.
反応条件: 135 mM D-アラニンアミド, 37 °C, pH 7.5, 30 分間反応.

D-アミダーゼのD-アラニンアミドに対する K_m は4.19 mM、 V_{max} は1,380 μ mole/mg/minであった。本酵素は、L-アラニンアミドに対しても活性を示したが、D-アラニンアミドに対する活性の0.67%であり、L-アラニンアミドに対する K_m は26.1 mMであった。

D-アミダーゼのアラニンアミド以外の42種類のアミド化合物に対する活性を調べた結果、8種類のアミド化合物を基質として反応した (Table 2-3)。D-アラニンアミド以外には、グリシンに対する活性が約97%と高かったが、他の基質に対する活性はおおむね1%以下で低かった。本酵素は、D-アラニン、L-アラニン、及びグリシンを含むジペプチド、及びD-アラニン、L-アラニンのO-メチルエステルとO-エチルエステルを加水分解しなかったことから、ペプチダーゼ活性とエステラーゼ活性は無いと思われる。

本酵素は、1 mMの Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、PCMBにより強く阻害され、活性は0~10%に低下した。10 mMの Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} によっても阻害を受け、活性は70~80%に低下した。1 mMのPCMB添加前に1 mMのシステインを添加することにより阻害を回避した。以上のことから、本酵素の活性部位にはシステイン残基が関与することが示唆された。

本酵素は、標準的な活性測定条件では補酵素を必要としなかった。また、金属も必要とせず、10 mMのEDTAを添加しても活性に変化はなかった。

Table 2-3 D-アミダーゼの基質特異性

Substrate	Relative activity [%]
D-Alaninamide	100
L-Alaninamide	0.67
Glycinamide	97.1
D-Leucinamide	0.37
D-Phenylalaninamide	0.64
L-Prolinamide	1.66
L-Histidinamide	0.12
DL-Lactamide	0.08
2-Cyanoacetamide	0.16
Malonamide	0.45

以下のアミド化合物に対しては活性を示さなかった。

L-Valinamide, L-Leucinamide, DL-Leucinamide, L-Isoleucinamide, L-Serinamide, L-Threoninamide, L-Methioninamide, L-Lysinamide, L-Argininamide, L-Aspartic acid amide, L-Glutamic acid amide, DL-Phenylalaninamide, L-Phenylalaninamide, DL-Tryptophanamide, L-Tryptophanamide, L-Tyrosinamide, DL-Phenylglycinamide, L-Phenylglycinamide, L-Alanine- β -naphthylamide, Acetamide, Propionamide, *n*-Valeramide, Thioacetamide, *N*-Methylformamide, *N*-Methylacetamide, *N*-Ethylacetamide, Benzamide, Phenylacetamide, Acrylamide, Urea, Oxamide, Rubeamic acid, Methylurethane.

2-3-3 *Arthrobacter* sp. NJ-26を用いたD-アラニンの製造

Arthrobacter sp. NJ-26を用いた菌体反応によるDL-アラニンアミドからのD-アラニン生産の至適反応条件を検討した。その結果、光学純度はpHが低いほど高く、また、活性は中性付近 (pH 7.5) で最大となった。pH 6.8では、D-アミダーゼ活性は低下したが、高い光学純度を得た (Fig. 2-8 (A))。これは、pH 8.5で最大となるアラニンラセマーゼ活性がpH 6.8では検出されなかったことから、生成したD-アラニンのラセミ化による純度低下が抑えられたためと推定される。菌体反応に対する温度の影響は、温度が高いほど光学純度が高いが、収率が低下した (Fig. 2-8 (B))。これらの結果から、菌体反応によるDL-アラニンアミドからのD-アラニン生産の至適条件として、38 °C、pH 6.8を選択した。

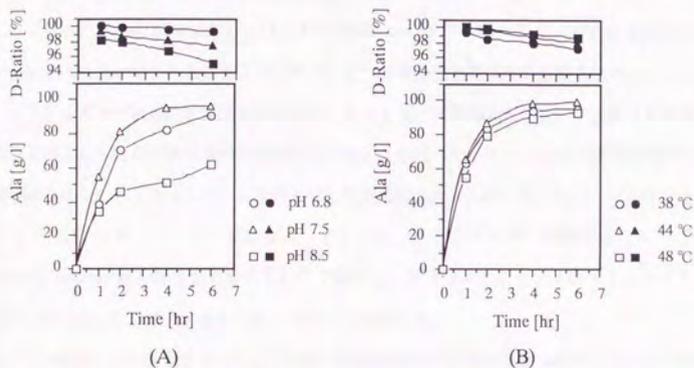


Fig. 2-8 *Arthrobacter* sp. NJ-26菌体反応によるD-アラニン生産に対するpHと温度の影響
 反応条件: (A) 湿菌体 20 g/l, DL-アラニンアミド 200 g/l, 38 °C, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液.
 (B) 湿菌体 20 g/l, DL-アラニンアミド 200 g/l, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.5.

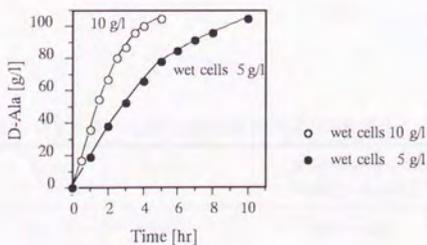


Fig. 2-9 *Arthrobacter* sp. NJ-26菌体反応によるD-アラニンの生産
 反応条件: 湿菌体10 g/lまたは5 g/l, DL-アラニンアミド 210 g/l (2.4 M), 38 °C, pH 6.8,
 3 l発酵槽にて、無通気、攪拌400 rpm, 6 N塩酸にてpHを6.8に維持。

この反応条件で、基質DL-アラニンアミド濃度 300 g/l (3.4 M)までは、D-アミダーゼに対する阻害はなかった。また、生成物D-アラニンによる生産阻害も認められなかった。

至適反応条件において、*Arthrobacter* sp. NJ-26の湿菌体 10 g/lを用いて、210 g/l (2.4 M)のDL-アラニンアミドからのD-アラニンの生産を試みた結果、5時間で105 g/l (1.2 M)を生成した (Fig. 2-9)。生成したD-アラニンの光学純度は99%以上であり、また、基質由来のL-アラニンアミドはすべて反応液中に残存した。湿菌体 5 g/lを用いた場合は、10時間で同等の反応生成物を得た。また、湿菌体 10 g/lを用いた場合、基質濃度 300 g/l (3.4 M)までは高い収率と光学純度でD-アラニンを生産可能であった。

2-3-4 D-体特異的アミダーゼ構成生産変異株の分離

工業的生産への利用のためには、*Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼを安定して高い活性で構成的に生産することが望まれる。そこで、D-アミダーゼ構成生産変異株の取得を試みた。

D-アミダーゼ構成生産変異株の分離は、D-アミダーゼ誘導活性はないが基質となり得るアミドを唯一の窒素源として生育する変異株を選択することにより行った。2-3-3の検討結果より、基質となるが誘導活性はないアミドとして、8種類の化合物を選択した。このうち、L-プロリンアミド、L-ヒスチジンアミド、DL-ラクタアミド、及びマロンアミドは、D-アミダーゼの誘導が起こらない条件でも*Arthrobacter* sp. NJ-26が寒天培地上で生育したので除外し、グリシンアミド、D-ロイシンアミド、D-フェニルアラニンアミド、2-シアノアセトアミドを用いて検討した。

この結果、2-シアノアセトアミドを唯一の窒素源とする寒天平板 (培地-1) 上に生育するコロニーから、D-アミダーゼ構成生産変異株CY-7-J2を取得した。CY-7-J2は、酵素の誘導を必要としないばかりではなく、NJ-26の約1.8倍のD-アミダーゼを生産した (Table 2-4)。CY-7-J2の生産するD-アミダーゼは、NJ-26の生産するD-アミダーゼと分子量、至適温度、至適pH、Km値、基質特異性などの諸性質はほぼ同じであった。

Table 2-4 D-アミダーゼ構成生産変異株CY-7-J2のD-アミダーゼ活性

Strain	Inducer	D-Amidase activity [units/g wet cells]
NJ-26	None	Not detected
	DL-Alaninamide	885
CY-7-J2	None	1,563

誘導基質としてのDL-アラニンアミドは培地に5 g/l添加。

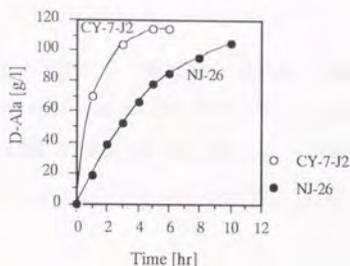


Fig. 2-10 CY-7-J2及びNJ-26を用いたD-アラニンの生産

反応条件：湿菌体 5 g/l, 38 °C, pH 6.8, 3 l 発酵槽、無通気、攪拌400 rpm, 6 N塩酸にてpHを6.8に維持、
基質DL-アラニンアミド、CY-7-J2は 228 g/l, NJ-26は 210 g/l.

CY-7-J2を用いた、DL-アラニンアミドからのD-アラニンの生産を試みた。培地-4にてDL-アラニンアミドを添加せずに培養したCY-7-J2の湿菌体 5 g/lを用いて反応を行った結果、5時間の反応でDL-アラニンアミド 228 g/lからD-アラニン 113 g/lが生成し、同様の条件で湿菌体 5 g/lを用いてDL-アラニンアミド 210 g/lからD-アラニン 105 g/lを10時間で生産したNJ-26よりも高い生産能力を確認した (Fig. 2-10)。

2-3-5 L-体特異的アミダーゼのスクリーニングと諸性質

DL-アラニンアミドからのL-アラニンの工業的な生産、及びDL-アラニンアミドからD-アラニンを生産した後に残存するL-アラニンアミドをL-アラニンに変換して有効に利用することを目的に、L-体特異的なアミダーゼのスクリーニングを行った。種々の土壌より、L-アラニンアミドを唯一の窒素源とする寒天平板培地 (培地-1) 上に生育するコロニーを選択し、L-アミダーゼ (L-アラニンアミダーゼ)、D-アミダーゼ (D-アラニンアミダーゼ)、及びアラニンラセマーゼの活性を評価した。この結果、良好なL-アミダーゼ活性を有する菌株 L-5を取得した。本菌株は孢子非形成のグラム陰性桿菌で、分類学的検討の結果、*Rahnella* sp.と同定された。

本菌株の生産するL-アミダーゼ活性は約 214 units/g wet cellsであった。同時に、D-アミダーゼ活性とアラニンラセマーゼ活性も生産していたが、各々の活性はL-アミダーゼの4.0%、0.7%であった。

菌株反応を用いて、基質特異性について検討した結果、L-アミダーゼは、検討した48種類のアミド化合物の中でL-アラニンアミドを含む18種類を基質とした (Table 2-5)。また、本酵素は、L-アラニンアミドのみにより強く誘導生産された。L-スレオニンアミドにより弱く誘導されたが (L-アラニンアミドの約18%)、D-アラニンアミドを含む他のアミドでは誘導基質無添加の場合と同程度の活性生産であっ

た。

菌体反応を用いて反応条件について検討を行った結果、本酵素の至適反応条件は55 °C、pH 7.0であった (Fig. 2-11)。 *Rahnella* sp. L-5を用いたL-アラニンアミドの加水分解反応は、L-アラニンアミド濃度 175 g/lまではほとんど基質による阻害は認められなかった。L-5の湿菌体 20 g/lを用いて反応を行った結果、24時間の反応でDL-アラニンアミド 300 g/lから光学純度 98%以上のL-アラニン150 g/lの生産が可能であった (Fig. 2-12)。

Table 2-5 *Rahnella* sp. L-5由来のL-アミダーゼの基質特異性

Substrates	Relative activity [%]
L-Alaninamide	100
D-Alaninamide	2.3
DL-Phenylglycinamide	16
D-Glutamine	1.9
Glycinamide	1.4
DL-Leucinamide	7.3
L-Leucinamide	8.3
L-Isoleucinamide	0.1
L-Serinamide	3.6
L-Threoninamide	1.1
L-Methioninamide	5.2
L-Prolinamide	6.2
DL-Phenylalaninamide	12
L-Phenylalaninamide	11
L-Tyrosinamide	7.5
DL-Tryptophanamide	2.6
L-Tryptophanamide	2.9
L-Valinamide	0.4

酵素誘導培養：培地-2，アミド0.1 M添加 30 °C，20 hr.

基質特異性：湿菌体 20 g/l，アミド化合物 0.15 M，pH 7.5，30 °C，60 min.

以下のアミド化合物に対しては活性を示さなかった。

D-Phenylglycinamide, Acetamide, Propionamide, *n*-Valeramide, Tioacetamide, Benzamide, Phenylacetamide, 2-Cyanoacetamide, Acrylamide monomer, Urea, Malonamide, Oxamide, Rubeamicamide, Methylcarbonate, N-Methylacetamide, N-Methylformamide, N-Methylpropionamide, N-Ethylacetamide, DL-Lactamide, L-Glutamine, D-Asparagine, L-Asparagine, D-Leucinamide, L-Glutamic acid amide, L-Histidinamide, D-Phenylalaninamide, L-Lysinamide, L-Algininamide, L-Aspartic acid amide, L-Alanine- β -naphthylamide.

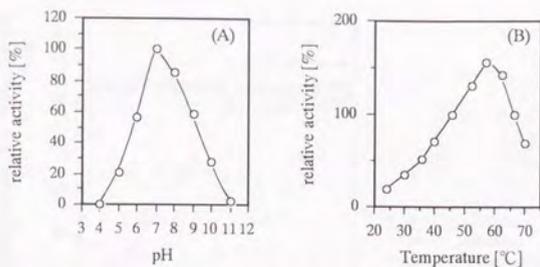


Fig. 2-11 *Rahnella* sp. L-5由来のL-アミダーゼに対するpHと温度の影響
 反応条件: (A) 湿菌体5 g/l, L-アラニンアミド 25 g/l, 50 mMリン酸緩衝液, 45 °C, 1 hr.
 (B) 湿菌体5 g/l, L-アラニンアミド 25 g/l, 50 mMリン酸緩衝液 pH 7.0, 1 hr.

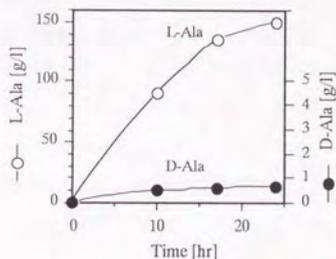


Fig. 2-12 *Rahnella* sp. L-5によるL-アラニン生成反応
 反応条件: 湿菌体20 g/l, DL-アラニンアミド300 g/l, pH 7.0~7.5, 37 °C.

2-3-6 *Rahnella* sp. L-5を用いたL-アラニンの製造

Rahnella sp. L-5の培地培養条件の最適化を行い、2-2-2記載の培地-4を用いた培養で、L-アミダーゼ活性 468 units/g wet cellsを有する菌体 18 g wet cells/lを得た。この菌体は、同時に6.8 units/g wet cellsのD-アミダーゼ活性と5.4 units/g wet cellsのアラニンラセマーゼ活性を有していた。この菌体培養液1 lに1 lのDL-アラニンアミド 400 g/lを加えてL-アラニンの生産を行い、20時間の反応で99.3 g/lのL-アラニンを得た (Fig. 2-13)。このとき、L-アラニンの光学純度は97.5 %eeであった。また、反応液中に、99.2 g/lのD-アラニンアミドが残存し、D-アラニンアミドの光学純度は98.8 %eeであった。

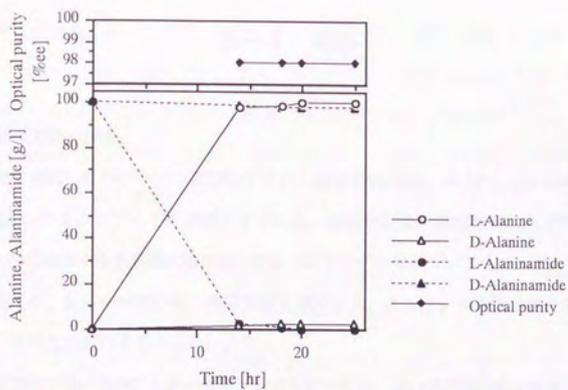


Fig. 2-13 *Rahnella* sp. L-5を用いたDL-アラニンアミドからのL-アラニン生産

反応条件: 湿菌体9 g/l (培養液1/2希釈), DL-アラニンアミド200 g/l, pH 7.0, 35 °C, 無通気, 攪拌350 rpm.

2-4 考察

2-4-1 本製造方法の評価

本研究で完成したD-アラニン及びL-アラニンの製造方法は、DL-アラニンの化学合成の中間体として生産されるDL-アラニンアミドを原料とするため、原料が安価に供給され、工業的に良好な方法である。また、微生物の生産する光学選択性の高い酵素（D-アミダーゼ及びL-アミダーゼ）を利用するため、化学合成法とは異なり、反応生成物の高い光学純度を達成した。さらに、本製造方法は常温常圧で反応が可能であるため、特殊な設備は必要としない。

本製造方法で用いるD-アミダーゼ及びL-アミダーゼは、高い光学選択性を有するだけでなく、DあるいはL-アラニンアミドを基質として良好に反応し、高い基質濃度（DL-アラニンアミド 300 g/l以上）でも阻害を受けないため、工業的な利用に適している。D-アミダーゼはわずかにL-アミダーゼ活性も有したが、L-アミダーゼ活性は弱く、D-アラニンアミドの存在により阻害されるため実質的な問題はなかった。D-アミダーゼ生産菌について、これとは別にL-アミダーゼを有する可能性とアラニンラセマーゼの存在を認めた。これらの酵素は、製品の光学純度低下の原因となるため好ましくないが、反応条件において、D-アミダーゼに対する活性が非常に低く実質的な問題はなかった。同様に、L-アミダーゼ生産菌からは、D-アミダーゼとアラニンラセマーゼ活性を検出したが、反応条件において、L-アミダーゼに対する活性が非常に低く実質的な問題はなかった。また、これらの酵素の生産菌は目的の酵素を比較的高い活性で生産するため、培養後に菌体の濃縮などを行わずに培養液を反応に用いることができるために操作性がよい。

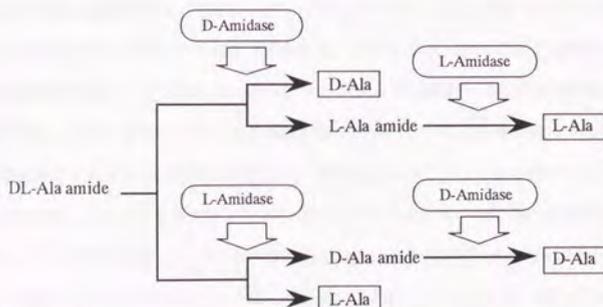


Fig. 2-14 D-アミダーゼ及びL-アミダーゼを用いたDL-アラニンアミドからのD-アラニン及びL-アラニンの生産

本製造方法では、DL-アラニンアミドから高い光学純度のD-アラニンまたはL-アラニンを生産できだけでなく、加水分解反応後に残存するL-アラニンアミドまたはD-アラニンアミドの光学純度も高く、種々の合成原料としての用途に有効に利用が可能である。また、加水分解反応後に残存するL-アラニンアミドまたはD-アラニンアミドにL-アミダーゼまたはD-アミダーゼを作用させることにより、光学純度の高いL-アラニンまたはD-アラニンを取得することが可能であり、出発物質をむだなく利用が可能である (Fig. 2-14)。

以上の検討の結果、D-アミダーゼ及びL-アミダーゼを用いることにより、高い光学純度のD-アラニン、L-アラニン (D-アラニンアミド、L-アラニンアミド) を効率的に生産することが可能になった。本製造方法は良好な方法であるが、いくつか改善することにより、さらに効率的な生産が可能になると思われる。

D-アミダーゼ及びL-アミダーゼは誘導酵素であるため、誘導基質としてDL-アラニンアミドを培地に添加する必要がある他、培養時期によって酵素生産量が変化するために培養の条件によっては生産される酵素活性が安定しない場合もある。D-アミダーゼ生産菌 *Arthrobacter* sp. NJ-26 からは、D-アミダーゼ構成生産変異株CY-7J2を取得し、酵素生産の高活性安定化を実現した。L-アミダーゼ生産菌 *Rahnella* sp. L5 についても、同様の手法でL-アミダーゼ構成生産変異株を取得できると思われる。したがって、L-アミダーゼ構成生産変異株の取得も望まれる。

D-アミダーゼ及びL-アミダーゼはエネルギー非要求性の酵素であると思われることから、固定化酵素法によりさらに効率的な生産の可能性がある。

D-アラニンまたはL-アラニンの一方の必要性が高い場合には、DL-アラニンアミドの加水分解後に残存するL-アラニンアミドまたはD-アラニンアミドをラセミ化することができれば、基質をさらに有効に目的の反応生成物に転換できる。アラニンアミドの化学的ラセミ化は可能であると予想されるが、酵素的なラセミ化と比較すると工程が多くなり効率が劣る。化学的ラセミ化は通常の酵素反応が進行しない反応条件下で行う場合が多く、化学的ラセミ化とアラニンアミドの酵素的加水分解と同時に行うことは困難であると思われる。一方、アラニンアミドの酵素的加水分解と同じ反応条件で機能するアラニンアミドのラセマーゼが取得できれば、この酵素をD-アミダーゼまたはL-アミダーゼと同時用いることにより、出発原料であるDL-アラニンアミドを全てD-アラニンまたはL-アラニンの一方のみに転換することが可能であると思われる。このような例として、*Pseudomonas putida* NCIB 40042 や *Rhodococcus* sp. NCIB 12569 の生産するアミノ酸アミドラセマーゼとD-アミダーゼを組み合わせたアミノ酸アミドからのD-アミノ酸の生産¹³⁾、*Arthrobacter* sp. ATCC 31652 や *Corynebacterium* sp. ATCC 31662 の生産するアミノ酸アミドラセマーゼとL-アミダーゼを組み合わせたアミノ酸アミドからのL-アミノ酸の生産¹⁴⁾の報告がある。アラニンアミ

Dを基質として良好に反応するラセマーゼは知られていないが、このような新規酵素の取得が望まれる。

2-4-2 D-アミダーゼの酵素的性質

アミダーゼ (3.5.1.4 アシルアミドアミドヒドロラーゼ) は、微生物から動物細胞まで広く存在が知られるが、D-アミノ酸アミドを光学選択的に加水分解する酵素の報告は少ない。

本研究で見出した *Arthrobacter* sp. NJ-26 の生産する D-アミダーゼは、高い光学選択性を示し、D-アラニンアミド及びグリシンアミドのみを良好な基質として反応し、既知酵素と比較して非常に狭い基質特異性を有した。本酵素は Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、PCMB により強く阻害されたことから活性に関与する SH 基を有することが示唆された。また、本酵素は分子量約 51,000 のモノマー酵素であり、補酵素比依存性であった。

浅野らは、D-アラニンアミドを基質とし得るアミダーゼを、*Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3^{15,16)} に見出した。このアミダーゼは、D-体選択性が高く、ペプチド、直鎖カルボン酸アミド及び N 末端が保護された D-アミノ酸アミドを基質としないことから、D-アミノ酸アミダーゼと呼ぶべき酵素である。この酵素は、D-アラニンアミド以外に多くのアミノ酸アミドを基質とし、特に D-フェニルアラニンアミド、D-チロシンアミド、D-トリプトファンアミドなどの芳香族アミノ酸アミドを良い基質として反応する。この酵素は、基質特異性の面で *Arthrobacter* sp. NJ-26 の D-アミダーゼとは異なる。この酵素は、PCMB などにより阻害を受けなかったことから、活性に関与する SH 基を持たないことが示唆され、*Arthrobacter* sp. NJ-26 の D-アミダーゼとは反応機構が異なることが予想される。また、この酵素の分子量は 38,000 (ゲル濾過法) と *Arthrobacter* sp. NJ-26 の D-アミダーゼとは大きく異なる。

浅野らは、D-アラニンアミドを基質とし得る別のアミダーゼを、*Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38¹⁸⁻²²⁾ に見出した。このアミダーゼも D-体選択性が高いが、D-アラニンアミド以外に D-アラニンを N 末端に含むペプチドに作用し、ペプチドの N 末端よりアミノ酸を順次遊離することから、D-アミノペプチダーゼと呼ぶべき酵素であり、*Arthrobacter* sp. NJ-26 の D-アミダーゼとは性質が異なる。この酵素は、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、PCMB により強く阻害されたことから、活性に関与する SH 基を持つことが予想される。分子量 59,000 のサブユニット 2 個からなる分子量 122,000 の酵素である点は、*Arthrobacter* sp. NJ-26 の D-アミダーゼとは大きく異なる。

銅谷らは *Rhodococcus erythropolis* JCM 3201²³⁾、NR-23、NR-28²⁴⁻²⁶⁾、*Pseudomonas fluorescens* IFO 12055²⁷⁾、*Serratia marcescens* IAM 12143²⁸⁾、*Achromobacter cyclocladus* IAM 1013²⁷⁾、*Alcaligenes faecalis* IAM 1420²⁷⁾、*Kurthia zophii* IFO1283²⁷⁾ から、バステンらは *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11538、11539、11540、12019²⁹⁾ から D-アラニンアミドを含む D-アミノ酸アミドを光学選択的に加水分解する酵素を報告している。

これらの酵素はいずれもD-アラニンアミド以外のいくつかのアミノ酸アミドを良好な基質とすることから、狭い基質特異性を持つ *Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼとは性質が異なる。これらの酵素については、精製酵素についての詳細な検討報告がないため、*Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼと酵素的性質の比較は困難である。また、Maestracciらの *Brevibacterium* sp. R 312^{29,30}の生産する分子量180,000のアミダーゼは、D-アラニンアミドも基質とするが、アミノ酸アミドを含むアシルアミドに対して広い基質特異性を持ち、光学選択性がないため、D-アミダーゼとは異なる。

以上のこれまでに報告されているD-アミダーゼとの酵素的性質の比較の結果、*Arthrobacter* sp. NJ-26の酵素は、特に、狭い基質特異性が他の酵素とは大きく異なり、これまでにない型の新規酵素であると考えられる。

D-アミダーゼを用いたDL-アラニンアミドからのD-アラニンの製造への応用については、浅野らの *Ochromobacter anthropi* SCRC C1-38の部分精製酵素を用いた0.1 MのDL-アラニンアミドからのD-アラニンの生産²¹、銅谷らの *Achromobacter cycloclax* IAM 1013、*Alcaligenes faecalis* IAM 1420、*Kurthia zophii* IF01283の凍結菌体を用いた2.5 % (wt./wt.)のDL-アラニンアミドからのD-アラニンの生産²⁷の報告があるが、他の報告は利用の可能性を示すのみで具体的な数値は示していない。これらの実施例は、部分精製酵素や分離菌体を用いて、比較的低い基質濃度での反応を行っており、実用性の判断は困難である。一方、本研究で検討した *Arthrobacter* sp. NJ-26またはその変異株CY-7J2の培養液を用いたDL-アラニンアミドからのD-アラニンの生産方法は、これらの実施例の10倍以上の基質濃度 (DL-アラニンアミド 200 g/l以上) でも生産が可能であり、操作性も良好であり、高い実用性を示した。

2-4-3 L-アミダーゼの酵素的性質

Rahnella sp. L-5の生産するL-アミダーゼは、高いL-体選択性を示し、L-アラニンアミド以外のアミノ酸アミドに対する活性は低く、狭い基質特異性を持つ。また、菌体反応を用いた検討で、D-アミダーゼ活性も検出したが、これがL-アミダーゼによるものか別の酵素によるものかについては酵素を精製しなければ判断できない。

既知のL-アミノ酸アミドを光学選択的に加水分解する酵素としては、*Brevibacterium* sp. 4A (R 312の変異株)の生産する分子量135,000のL-アミダーゼ³¹、*Ochromobacter anthropi* NCIMB 40321³²、*Pseudomonas putida* ATCC 12633³³、*Arthrobacter* sp. ATCC 31652¹⁴、*Corynebacterium* sp. ATCC 31662¹⁴の生産する酵素が知られが、*Brevibacterium* sp. 4Aの酵素以外は精製されていない。*Brevibacterium* sp. 4Aの酵素は、比較的基質特異性は広くL-アラニンアミド以外のアミドも基質とする。一方、*Rahnella* sp. L-5の生産するL-アミダーゼは、精製して詳細に検討する必要があるが、菌体反応による検討の結果、L-アラニア

ミドのみを良好な基質とする狭い基質特異性を持つことから、これまでにない型の新規酵素であることが予想される。

他のグループのL-アミダーゼを用いたDL-アラニンアミドからのL-アラニンの生産については、可能性を示す報告もあるが具体的な数値を示していないため、実用性の判断と、本研究との比較はできない。

2-5 まとめ

1. DL-アラニンアミドを原料に、D-アミダーゼを用いたD-体選択的な加水分解反応によるD-アラニンの製造法の検討をした。
2. D-アラニンアミドを光学選択的に加水分解する酵素（D-アミダーゼ）のスクリーニングを行い、*Arthrobacter* sp. NJ-26から光学選択性が高く、高基質濃度（DL-アラニンアミド 300 g/l）でも機能し、菌体当たりの活性が高い良好な酵素を取得した。
3. 本菌株の湿菌体 10 g/lを用いた反応で、210 g/lのDL-アラニンアミドから99%以上の光学純度で105 g/lのD-アラニンの製造に成功した。
4. *Arthrobacter* sp. NJ-26の生産するD-アミダーゼを電気泳動的にほぼ単一に精製し、諸性質を調べた。本酵素は、光学選択性が高く、D-アラニンアミドとグリシンアミドのみを良好な基質として反応する基質特異性が狭い、分子量約51,000のモノマー酵素であった。また、本酵素は、補酵素非依存性であり、活性に関与するSH基を有することが示唆された。これらの性質から、本酵素は、既知酵素とは性質が異なる新規なD-アミダーゼであると判断した。
5. *Arthrobacter* sp. NJ-26の生産するD-アミダーゼはアラニンアミドにより誘導生産される酵素であった。生産される酵素活性の安定化と効率的な生産を目的に、D-アミダーゼの構成生産変異株CY-7-J2を取得した。変異株CY-7-J2は誘導基質なしに安定してD-アミダーゼの生産が可能だけでなく、アミダーゼ活性が野生株NJ-26の約1.8倍に向上した。本菌株の湿菌体 5 g/lを用いた反応で、228 g/lのDL-アラニンアミドから99%以上の光学純度で113 g/lのD-アラニンの製造に成功した。
6. DL-アラニンアミドからD-アラニンを生産した後に残存するL-アラニンアミドを有効に利用するために、L-アラニンアミドを光学選択的に加水分解する酵素（L-アミダーゼ）のスクリーニングを行い、*Rahnella* sp. L-5から光学選択性が高く、高基質濃度（DL-アラニンアミド 300 g/l）でも機能し、菌体当たりの活性が高い良好な酵素を取得した。本菌株の生産するL-アミダーゼは、光学選択性が高く、L-アラニンアミドのみを良好な基質として反応する基質特異性が狭い酵素であった。本菌株は、D-アラニンの生産後に残存するL-アラニンアミドを加水分解してL-アラニンを生産できるほか

りではなく、湿菌体 20 g/lを用いた反応で、300 g/lのDL-アラニンアミドから約98 %の光学純度で150 g/lのL-アラニンの製造に成功した。

1. 以上の検討の結果、微生物の生産するD-アミダーゼとL-アミダーゼを用いた、DL-アラニンアミドから高い光学純度のD-アラニン、L-アラニン、D-アラニンアミド、及びL-アラニンアミドを生産する工業的なプロセスが完成した。

2-6 文献

- 1) **Lynch, J.L., and Neuhaus, F.C.** (1966) On the mechanism of action of the antibiotic *o*-carbamyl-D-serine in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **91**:449-460.
- 2) **Neuhaus, F.C.** (1968) Selective inhibition of enzymes utilizing alanine in the biosynthesis of peptidoglycan. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **1967**:304-313.
- 3) **Roze, U., and Strominger, J.L.** (1966) Alanine racemase from *Staphylococcus aureus*. Conformation on its substrates and its inhibitor, D-cycloserine. *Mol. Pharmacol.* **2**:92-94.
- 4) **Lambert, M.P., and Neuhaus, F.C.** (1972) Mechanism of D-cycloserine action. Alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J. Bacteriol.* **110**:978-987.
- 5) **荒木和美** (1986) 有用微生物のスクリーニング・変異株のスクリーニング. p.130-133. *In* 協和発酵東京研究所 (ed.) 微生物実験マニュアル. 講談社.
- 6) **Weatherburn, M.W.** (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **193**:971-974.
- 7) **Roth, M., and Hampa, A.** (1973) Column chromatography of amino acids with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **83**:353-356.
- 8) **Diven, W.F., Scholz, J.J., and Johnston, R.B.** (1964) Purification and properties of the alanine racemase from *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **85**:322-332.
- 9) **Marfey, P.** (1984) Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* **49**:591-596.
- 10) **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- 11) **Davis, B.J.** (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**:404-27.
- 12) **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- 13) **Godfredsen, S.E., Clausen, K., Hermes, H.F.M., van Balken, J.A.M., and Meijer, E.M.** (1989) PCT WO 89/01525. Process for preparation of organic chemicals.
- 14) **Klages, U., and Weber, A.** (1989) PCT WO 89/10969. Process for producing L-amino acids and amino acid amides.

- 15) Asano, Y., Mori, T. Hanamoto, S., Kato, Y., and Nakazawa, A. (1989) A new D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**:470-474.
- 16) 浅野泰久 (1990) D-アミノ酸及びその誘導体の酵素的製造法. *バイオサイエンスとバイオインダストリー* **48**:131-137.
- 17) Asano, Y. Nakazawa, A., Kato, Y., and Kondo, K. (1989) Properties of a novel D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*. *J. Biol. Chem.* **264**:14233-14239.
- 18) 浅野泰久 (1989) 新規微生物酵素の開発と有機合成への利用. *有機合成化学* **47**:749-759.
- 19) 浅野泰久 (1989) D-アミノ酸の酵素的合成法をめぐる最近の話題. *発酵工学* **67**:207-208.
- 20) 浅野泰久 (1991) 新酵素D-アミノ酸ペプチダーゼの発見と応用. *Bio Industry* **8**:338-345.
- 21) 浅野泰久, 仲沢章子, 加藤康夫, and 近藤聖 (1989) 公開特許公報 平1-225482. アミノペプチダーゼ及びその使用.
- 22) Asano, Y., Nakazawa, A., Kato, Y., and Kondo, K. (1989) Discovery of a D-stereospecific aminopeptidase and its use as a catalyst in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**:450-451.
- 23) 銅谷正晴, 近藤俊夫, 五十嵐秀雄, and 内山隆子 (1986) 公開特許公報 昭61-274690. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 24) 銅谷正晴, 五十嵐秀雄, and 浦上貞治 (1988) 公開特許公報 昭63-87998. D- α -アミノ酸の製造法.
- 25) 銅谷正晴, 五十嵐秀雄, 近藤俊夫, and 内山隆子 (1989) 公開特許公報 平1-262798. D- α -アミノ酸の製造法.
- 26) 銅谷正晴, 内山隆子, 近藤俊夫, and 五十嵐秀雄 (1989) 公開特許公報 平1-265896. D- α -アミノ酸の製造法.
- 27) 銅谷正晴, 近藤俊夫, 五十嵐秀雄, and 内山隆子 (1984) 公開特許公報 昭60-184392. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 28) ヴィルヘルム・フーベルトウス・ヨーゼフ・ベステン, and スタミカーボン・

- ベスローテン・ベンノートシャップ (1986) 公開特許公報 昭61-96989. D- α -アミノ酸アミドの対応するD- α -アミノ酸への酵素加水分解.
- 29) **Maestracci, M., Thiery, A., Bui, K., Arnaud, A., and Galzy, P.** (1984) Activity and regulation of an amidase (acylamide amidohydrolase, EC 3.5.1.4) with a wide substrate spectrum from a *Brevibacterium* sp. *Arch. Microbiol.* **138**:315-320.
- 30) **Thiery, A., Maestracci, M., Arnaud, A., Galzy, P., and Nicolas, M.** (1986) Purification and properties of an acylamide amidohydrolase (E.C. 3.5.1.4) with a wide activity spectrum from *Brevibacterium* sp. R 312. *J. Basic Microbiol.* **26**:299-311.
- 31) **Kieny-L'Homme, M.-P., Arnaud, A., and Galzy, P.** (1981) Etude d'une L- α -aminoamidase particulaire de *Brevibacterium* sp. en vue de l'obtention d'acides α -amines optiquement actifs. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **27**:307-325.
- 32) **van den Tweel, W.J.J., van Dooren, T.J.G.M., de Jonge, P.H., Kaptein, B., Duchateau, A.L.L., and Kamphuis, J.** (1993) *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321. A new biocatalyst with broad-spectrum L-specific amidase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**:296-300.
- 33) **Boesten, W.H.J., Dassen, B.H.N., Kerkhoffs, P.L., Roberts, M.J.A., Cals, M.J.H., Peters, P.J.H., van Balken, J.A.M., Meijer, E.M., and Schoemaker, H.E.** (1986) Efficient enzymic production of enantiomerically pure amino acids. p. 355-360. In Schneider, M.P. (ed), *Enzymes as Catalysts in organic synthesis*. D. Reulel Publishing Company.
- 34) **Forsberg, C.W., and Ward, J.B.** (1972) N-Acetylmuramyl-L-alanine amidase of *Bacillus licheniformis* and its L-form. *J. Bacteriol.* **110**:878-888.
- 35) **Johnston, M.M., and Diven, W.F.** (1969) Studies on amino acid racemase. I. Partial purification and properties of the alanine racemase from *Lactobacillus fermenti*. *J. Biol. Chem.* **224**:5414-5420.
- 36) **Stewart, B.T., and Halvorson, H.O.** (1954) Studies on the spores of aerobic bacteria. I. The occurrence of alanine racemase. *J. Bacteriol.* **65**:160-166.
- 37) **Church, B.D., Halvorson, H., and Halvorson, H.O.** (1954) Studies on spore germination. Its independence from alanine racemase activity. *J. Bacteriol.* **68**:393-3699.
- 38) **Wood, W.A.** (1955) Amino acid racemases. p. 212-217. In Colowick, S.P., and Kaplan,

- N.O. (ed.), *Methods in enzymology*, vol. 2, Academic Press Inc., New York.
- 39) Thornberry, N.A., Bull, H.G., Taub, D., Wilson, K.E., Gimenez-Gallego, G., Rosegay, A., Soderman, D.D., and Patchett, A.A. (1991) Mechanism-based inactivation of alanine racemase by 3-halovinylglycines. *J. Biol. Chem.* **266**:21657-21665.
 - 40) 江崎信芳, and 左右田健次 (1986) アラニンラセマーゼとその酵素自殺基質反応. *化学* **41**:202-203.
 - 41) 外山博英, and 左右田健次 (1992) 耐熱性アラニンラセマーゼ. 構造と機能の解析. *日本農芸化学会誌* **65**:1801-1805.
 - 42) 江崎信芳 (1992) 耐熱性アラニンラセマーゼとの構造と機能. *化学と生物* **30**:70-71.
 - 43) 外山博英, and 左右田健次 (1992) 耐熱性アラニンラセマーゼとの構造と機能. *化学* **47**:146-147.
 - 44) Inagaki, K., Tanizawa, K., Badet, B., Walsh, C.T., Tanaka, H., and Soda, K. (1986) Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*. Molecular cloning of the gene, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry* **25**:3268-3274.
 - 45) Toyama, H., Tanizawa, K., Wakayama, M., Lee, Q.-L., Yoshimura, T., Esaki, N., and Soda, K. (1991) Limited proteolysis of thermostable alanine racemase of *Bacillus stearothermophilus*. *Argic. Biol. Chem.* **55**:2881-2882.
 - 46) Toyama, H., Esaki, N., Yoshimura, T., Tanizawa, K., and Soda, K. (1991) Thermostable alanine racemase of *Bacillus stearothermophilus*. Subunit dissociation and unfolding. *J. Biochem.* **110**:279-283.
 - 47) Toyama, H., Tanizawa, K., Yoshimura, T., Asano, S., Lim, Y.-H., Esaki, N., and Soda, K. (1991) Thermostable alanine racemase of *Bacillus stearothermophilus*. Construction and expression of active fragmentary enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**:13634-13639.
 - 48) Yokoigawa, K., Kawai, H., Endo, K., Lim, Y.-H., Esaki, N., and Soda, K. (1993) Thermostable alanine racemase from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens*. Purification and properties. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**:93-97.
 - 49) Walsh, C.T. (1989) Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J. Biol. Chem.* **264**:2393-2396.
 - 50) 小川正, and 佐々岡啓 (1976) 天然におけるD-アミノ酸. 植物性食品素材を中心とし

- て. *化学と生物* 14:610-616.
- 51) Fukuda, M., Ogata, T., and Sasaoka, K. (1973) Optical configuration of γ -glutamylalanine in pea seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 304:363-366.
 - 52) Fukuda, M., Tokumura, A., Ogawa, T., and Sasaoka, K. (1973) D-Alanine in germinating *Pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry* 12:2593-2595.
 - 53) Noma, M., Noguchi, M., and Tamaki, E. (1973) Isolation and characterization of D-alanyl-D-alanine from tobacco leaves. *Agric. Biol. Chem.* 37:2439-2440.
 - 54) Frahn, J.L., and Illman, R.J. (1975) The occurrence of D-alanine and D-alanyl-D-alanine in *Phalaris tuberosa*. *Phytochemistry* 14:1464-1465.
 - 55) Izumiya, N., Wade, R., Winitz, M., Otey, M.C., Birnbaum, S.M., Koegel, R.J., and Greenstein, J.P. (1957) Studies on diastereoisomeric α -amino acids and corresponding α -hydroxy acid. VIII. Configuration of the isomeric octopines. *J. Amer. Chem. Soc.* 79:652-658.
 - 56) Corrigan, J.J. (1969) D-Amino acid in animals. *Science* 164:142-149.
 - 57) トーマス・モット・ブレンナン, and マイケル・エゼル・ヘンドリック (1986) 特許公報 昭61-9320. L-アスパルチル-D-アミノ酸ジペプチドの枝鎖アミド類.
 - 58) Yamada, S., Maeshima, H., Wada, M., and Chibata, I. (1973) Production of D-alanine by *Corynebacterium fascians*. *Appl. Microbiol.* 25:636-640.
 - 59) 千畑一郎, 山田茂樹, and 和田満 (1976) 公開特許公報 昭51-22881. 発酵法によるD-アラニンの製法.
 - 60) 岩田道顕, and 中川起 (1977) 公開特許公報 昭52-76482. 放線菌発酵法によるD-アラニンの製造法.
 - 61) 米原徹, 武内正江, and 筒井浩巳 (1990) 発酵法によるD-アラニン生産. 膜透過変異株によるD-体選択蓄積. *日本農芸化学会誌* 64:680.
 - 62) 武内正江, and 米原徹 (1989) 公開特許公報 平1-187091. 発酵法によるD-アラニンの製造法.
 - 63) 武内正江, and 米原徹 (1989) 公開特許公報 平1-309691. D-アラニンの製造法.
 - 64) 武内正江, and 米原徹 (1990) 公開特許公報 平2-171194. 発酵法によるD-アラニンの製造法.
 - 65) Takeuchi, M., and Yonehara, T. (1988) European Patent Application 0310949.

- Process for producing D-alanine.
- 66) 大嶋和雄, and 田中勝宣 (1966) 酵母によるDL-アラニンからの光学活性アラニンの調製法. *Amino Acid, Nucleic Acid* 15:89-94.
- 67) Umemura, I., Yanagiya, K., Komatsubara, S., Sato, T., and Tosa, T. (1992) D-Alanine production from DL-alanine by *Candida maltosa* with asymmetric degrading activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:722-726.
- 68) 佐藤忠司, 小松原三郎, 梅村勲, and 柳谷浩司 (1990) 公開特許公報 平2-49598. 微生物を用いるD-アラニンの製法.
- 69) Ito, N., Imamura, S., and Sato, H. (1988) European Patent Application 0310949. Process for preparing D-alanine.
- 70) 千畑一郎, 土佐哲也, and 遠藤紀子 (1966) 特許公報 昭41-2238. 光学活性アミノ酸の製法.
- 71) 杉江牧子, 富塚登, and 佐藤昭雄 (1988) 公開特許公報 昭63-39598. D-アミノ酸の製造法.
- 72) 杉江牧子, 富塚登, 佐藤昭雄, 鈴木英雄, 後藤達乎, and 菅原邦雄 (1989) 公開特許公報 平1-29560. D-アミノ酸の製造法.
- 73) Moriguchi, M., and Ideta, K. (1988) Production of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* MI-4. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2767-2770.
- 74) Sakai, K., Obata, T., Ideta, K., and Moriguchi, M. (1991) Purification and properties of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* MI-4. *J. Ferment. Bioeng.* 71:79-82.
- 75) Yang, Y.-B., Lin, C.-S., Tseng, C.-P., Wang, Y.-J., and Tsai, Y.-C. (1991) Purification and characterization of D-aminoacylase from *Alcaligenes faecalis* DA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1259-1260.
- 76) 山田秀明, 清水昌, and 米田耕司 (1980) 微生物のヒダントイナーゼを用いるD-アミノ酸の合成. *発酵と工業* 38:937-946.
- 77) 谷吉樹, 山田秀明, and 熊谷英彦 (1978) 加水分解酵素を利用する合成. II. ホスファターゼ, ヒダントイナーゼ, トリプトファナーゼ. *化学と生物* 16:449-460.
- 78) Olivieri, R., Fascetti, E., Angelini, L., and Degen, L. (1981) Microbial transformation of racemic hydantoin to D-amino acids. *Biotechnol. Bioeng.* 23:2173-2183.

- 79) Yokozeki, K., Nakamori, S., Yamanaka, S., and Yoshinaga, F. (1987) Optimal condition for the enzymatic production of D-amino acids from the corresponding D-substituted hydantoin. *Agric. Biol. Chem.* **51**:715-719.
- 80) Yokozaki, K., and Kubota, K. (1987) Mechanism of asymmetric production of D-amino acids from the corresponding hydantoins by *Pseudomonas* sp.. *Agric. Biol. Chem.* **51**:721-728.
- 81) Moller, A., Syldatk, C., Schulze, M., and Wagner, F. (1988) Stereo- and substrate-specificity of D-hydantoinase and a D-N-carbamyl-amino acid amidohydrolase of *Arthrobacter crystallopoietes* AM2. *Enzyme Microb. Technol.* **10**:618-625.
- 82) Morin, A. (1993) Use of D-hydantoinase extracted from legumes to produce N-carbamyl D-amino acids. *Enzyme Microb. Technol.* **15**:208-214.
- 83) Yamada, H., Takahashi, S., Kii, Y., and Kumagai, H. (1978) Distribution of hydantoin hydrolyzing activity in microorganisms. *J. Ferment. Technol.* **56**:484-491.
- 84) Takahashi, S., Kii, Y., Kumagai, H., and Yamada, H. (1978) Purification, crystallization and properties of hydantoinase from *Pseudomonas striata*. *J. Ferment. Technol.* **56**:492-498.
- 85) Morin, A., Hummel, W., and Kula, M.-R. (1986) Rapid detection of microbial hydantoinase on solid medium. *Biotechnol. Lett.* **8**:573-576.
- 86) Morin, A., Hummel, W., and Kula, M.-R. (1987) Enrichment and selection of hydantoinase-producing micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1201-1207.
- 87) 山田秀明, 高橋里美, and 米田耕司 (1978) 公開特許公報 昭53-91189. D-N-カルバモイル- α -アミノ酸類の製造法.
- 88) 横関健三, 中森茂, 山田和彦, 江口新比古, and 吉永文弘 (1979) 公開特許公報 昭54-89088. D- α -アミノ酸の製法.
- 89) 中森茂, 横関健三, 光木浩司, 江口新比古, and 岩上寿夫 (1979) 公開特許公報 昭54-89089. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 90) 横関健三, 中森茂, 山中茂, and 山田和彦 (1980) 公開特許公報 昭55-88697. D- α -アミノ酸の製造法.
- 91) 横関健三, 山中茂, 山田和彦, and 中森茂 (1980) 公開特許公報 昭55-114291. D- α -アミノ酸の製造法.

- 92) 高橋秀行 (1980) 公開特許公報 昭55-104890. D- α -アミノ酸類の製造方法.
- 93) 横関健三, 中森茂, 山中茂, and 山田和彦 (1980) 公開特許公報 昭55-114292. D- α -アミノ酸の製造法.
- 94) 横関健三, and 広瀬義輝 (1986) 公開特許公報 昭61-152291. D-N-カルバモイル- α -アミノ酸の製造法.
- 95) 田脇新一郎, 竹市守, 萩原尚, and 樽川仁 (1986) 公開特許公報 昭61-181391. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 96) 竹市守, 萩原尚, 樽川仁, 田脇新一郎, and 牧口信義 (1986) 公開特許公報 昭61-212292. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 97) 高橋秀行, 高橋里美, 大橋武久, 米田耕司, and 渡辺清 (1987) 公開特許公報 昭62-25990. D- α -アミノ酸類の製造方法.
- 98) ロベルト・オリビエ, アウレリオ・ビグリア, ルードウィグ・デーゼン, レオネツロ・アンジェリーニ, and エウジェニオ・ファステッチ (1988) 特許公報 昭63-20520. D-アミノ酸の製造方法.
- 99) 石川高広, and 木村均 (1988) 公開特許公報 昭63-56278. シュウドモナス属NS214菌株及びD-アミノ酸の製造方法.
- 100) 田脇新一郎, 樽川仁, 相川敏和, and 竹市守 (1988) 公開特許公報 昭63-71196. D-N-カルバミル- α -アミノ酸の製造方法.
- 101) 田脇新一郎, 樽川仁, 相川敏和, and 竹市守 (1988) 公開特許公報 昭63-112990. D- α -アミノ酸の製造方法.
- 102) 高橋秀行, 高橋里美, 大橋武久, 米田耕司, and 渡辺清 (1989) 公開特許公報 平1-48758. D- α -アミノ酸類の製造方法.
- 103) Nanba, H., Yamada, Y., Takano, M., Ikenaka, Y., Takahashi, S., and Yajima, K. (1992) European Patent Application 0515698. Process for producing D-amino acid.
- 104) 三浦彰, 岩本明子, and 古橋敬三 (1992) 公開特許公報 平4-79894. D-アラニンの製造法.
- 105) ジャラゲア・ジャンクロード, アルノー・アレン, and ガルジ・ピエール (1981) 公表特許公報 昭56-500319. ニトリルの生物学的加水分解による光学活性 α -アミノ酸の製造方法及びこの生成物.

- 106) 左右田健次, 田中英彦, 谷沢克行, and 山本浩明 (1987) 公開特許公報 昭62-205790. D-アミノ酸の製造方法.
- 107) 左右田健次, 田中英彦, 谷沢克行, and 山本浩明 (1988) 公開特許公報 昭63-260223. エシェリチア・コリ.
- 108) 左右田健次, and 田中英彦 (1988) 公開特許公報 昭63-207387. D-アミノ酸トランスアミナーゼをコードするDNA配列.
- 109) 左右田健次, and 蔭山貞夫 (1987) 公開特許公報 平1-285192. D-アラニンの製造方法.
- 110) 大内俊二, 渡辺テイ子, and 洪屋千征 (1972) 特許公報 昭47-14369. DL-アラニンの光学分割.
- 111) 千畑一郎, 山田茂樹, 山本正男, and 遠藤政広 (1973) 公開特許公報 昭48-57914. アラニンの光学活性体とDL-体.
- 112) Yamada, S., Wada, M., Izuo, N., and Chibata, I. (1976) Mechanism of D-alanine production by *Corynebacterium fascians*. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**:1-6.
- 113) Wood, W.A., and Gunsalus, I.C. (1951) D-Alanine formation. A racemase in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **189**:403-416.
- 114) 米原徹 (1995) バクテリアによるD-アラニン発酵. *バイオサイエンスとバイオインダストリー* **53**:37-39.
- 115) Free, C.A., Julius, M., Arnow, P., and Barry, G.T. (1967) Inhibition of alanine racemase by aminoxyacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **146**:608-610.
- 116) Strominger, J.L., Ito, E., and Threnn, R.H. (1960) Competitive inhibition of enzymatic reactions by oxamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **82**:998-999.
- 117) Stewart, B.T., and Halvorson, H.O. (1954) Studies on the spores of aerobic bacteria. II. The properties of an extracted heat-stable enzyme. *J. Bacteriol.* **65**:18-178.
- 118) Rosso, G., Takashima, K., and Adams, U. (1969) Coenzyme content of purified alanine racemase from *Pseudomonas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **34**:134-140.
- 119) Diven, W.F., Johnston, R.B., and Scholz, J.J. (1962) Evidence for the participation of FAD in the alanine racemase (EC 5.1.1.1) reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **67**:161-163.
- 120) Mazur, R.H., Reuter, J.A., Swiatek, K.A., and Schlatter, J.M. (1973)

Synthetic sweeteners. 3. Aspartyl dipeptide esters from L- and D-alkylglycines. *J. Med. Chem.*
16:1284-1286.