

第3章 D-グルタミン酸生産方法の開発

3-1 序論

3-1-1 D-グルタミン酸の存在と生理的意義

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などの構成成分として見出されている。D-グルタミン酸も存在は限られており、細胞壁ペプチドグリカンの構成成分として広く存在する (Fig. 3-1 (A)) ほか、*Bacillus* 属細菌の生産する細胞外粘質物や *Bacillus subtilis* の生産する抗生物質バシトラシンの構成成分として存在する (Fig. 3-1 (B))。これらの構造物は、構成成分としてD-グルタミン酸などのD-体のアミノ酸を有することにより、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。微生物において、遊離の状態を含むD-グルタミン酸のこれ以外の存在の報告はない。遊離のD-グルタミン酸は、L-体に作用する一般の酵素に対して拮抗的に阻害するため、多量の存在は微生物の生存に対して好ましくないとと思われる。

微生物体内におけるD-グルタミン酸の生成と利用の経路は良くわかっていない。遊離のD-アミノ酸は、抗生物質に取り込まれるどころか、抗生物質の生合成を阻害することが知られている⁸⁹⁾。したがって、抗生物質などに含まれるD-グルタミン酸は、ペプチドの合成とD-体への転換を同時に行う過程で生成すると予想される。ペプチドグリカンを構成するD-グルタミン酸の生合成は、2つの経路が予想されている。*Bacillus* 属細菌は、アラニンラセマーゼによりL-アラニンからD-アラニンを生成し、この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-グルタミン酸を生成する⁷¹⁻⁷⁹⁾。*Bacillus* 属細菌では、この経路で生成したD-グルタミン酸が細胞壁ペプチドグリカンの構成に用いられる

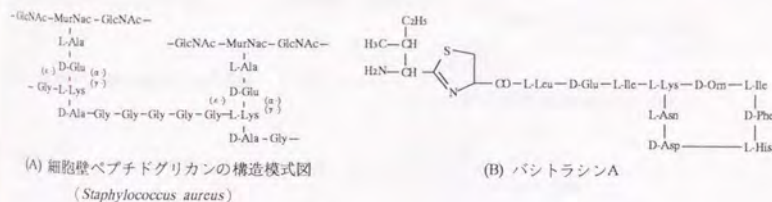


Fig. 3-1 ペプチドグリカン及びバシトラシンに存在するD-グルタミン酸

GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; MurNAc, N-アセチルムラミン酸

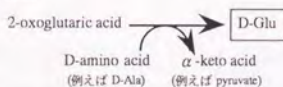
可能性が考えられる。また、最近、*Escherichia coli* のD-グルタミン酸要求性変異株の要求性を相補する遺伝子として *murI* が分離され、この遺伝子産物がグルタミン酸ラセマーゼ活性を持つことが示されている^{84,85}。*E. coli* では、グルタミン酸ラセマーゼにより生産された遊離のD-グルタミン酸がペプチドグリカンの生合成に利用されると考えられる⁶¹⁾。

植物、動物に存在するD-グルタミン酸としては、コフキコガネの筋肉中に遊離状態で存在することが知られているが、生理的意義は不明である⁹⁰⁾。哺乳類では、腎臓、肝臓などにおいて、遊離のD-グルタミン酸が光学選択的にD-ヒロリドンカルボン酸に転換され排出されるが^{91,127)}、やはり生理的意義は不明である。1950年代には、D-グルタミン酸と癌化の間に深い関係があると示唆されたが、現在では否定されている⁹²⁻⁹³⁾。

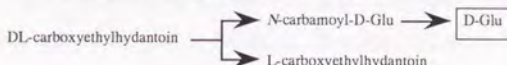
3-1-2 D-グルタミン酸の製造方法

従来のD-グルタミン酸の製造法としては、(1) 2-オキソグルタル酸にD-アミノ酸トランスアミナーゼを作用させてD-グルタミン酸を製造する方法^{75,77,79,93-96)}、(2) DL-5-カルボキシエチルヒダントインに微生物由来の加水分解酵素を作用させる方法^{77,106)}、(3) DL-グルタミン酸にL-グルタミン酸デヒドラゼを作用させ残存するD-グルタミン酸を取得する方法^{6,7)}、(4) DL-グルタミン酸にL-グルタミン酸を選択的に分解する菌を作用させ残存するD-グルタミン酸を取得する方法¹⁰⁷⁾、(5) DL-グルタミン酸を優先品出法により光学分割する方法¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾、(6) DL-グルタミン酸と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^{111,125)}などが知られている (Fig. 3-2)。

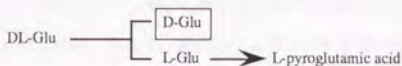
(1) D-amino acid aminotransferase を用いる方法



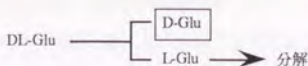
(2) D-hydantoinase を用いる方法



(3) L-glutamate dehydrase を用いる方法



(4) 微生物による L-Glu 選択的分解



(5,6) DL-Glu の光学分割

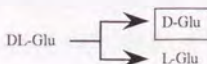


Fig. 3-2 D-グルタミン酸の製造方法

これらのD-グルタミン酸製造方法は、以下のような特徴を持つ。(1) トランスアミナーゼを用いる方法は、原料の2-オキソグルタル酸が高価なため製造コストが高い。また、D-トランスアミナーゼ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。(2) D-ヒダントイナーゼを用いる方法も、原料の5-置換ヒダントインが高価であり製造コストが高い。また、既知酵素についてはDL-カルボキシエチルヒダントインを基質とした反応性が悪く、多量の菌体を触媒として用いてもD-グルタミン酸の収率は悪い。DL-グルタミン酸を基質として、L-グルタミン酸のみを性質の異なる物質に転換する方法(3)、または分解する方法(4)は、比較的容易に高い収率で光学純度の高いD-グルタミン酸を得ることができると考えられる。しかし、(3) グルタミン酸デヒドラゼを用いる方法は、L-体を完全に除去することが困難であり、さらに良好な性質を持つ酵素の選択が必要である。また、(4) DL-グルタミン酸を含む培養液中でL-グルタミン酸分解菌を培養し、培養液中に残存するD-グルタミン酸を取得する方法は、操作性とD-グルタミン酸の収率が酵素法に劣る。(5) 優先品出法は、品出条件が微妙で収率も低い。(6) ジアステレオマー形成法は、ジアステレオマー形成のために別の光学活性な化合物が必要となり、コストが高くなる。

以上の従来方法を参考に、DL-グルタミン酸からL-体特異的な酵素を作用させてL-グルタミン酸を除去して残存するD-グルタミン酸を取得する酵素法が、反応系が単純で比較的稳定であり、反応収率、光学純度の点からもありと判断した。また、DL-グルタミン酸は、発酵法にて安価に生産されるL-グルタミン酸を出発原料にラセミ化して取得する方法が工業的に有利であると判断した。この結果、L-グルタミン酸のラセミ化と、ラセミ体からのL-体の選択的除去の2段階の反応によるD-グルタミン酸の製造法を計画した。

3-1-3 D-グルタミン酸製造の目的と方法

D-グルタミン酸は、医薬品、農薬などの合成原料として用いられる産業上有用な物質である。医薬品原料としての用途の場合は高い純度が要求されるため、これに適した方法を選択する必要がある。光学異性体を持つ物質を高い光学純度で取得するには、化学合成法よりも、酵素の持つ高い光学選択性を利用した酵素法が有利であることは一般的である。そこで、酵素法による高い光学選択性を利用した、2段階反応によるL-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の製造法を考えた。

第1段階のL-グルタミン酸のラセミ化には、化学的なラセミ化法と酵素的なラセミ化法が考えられる。グルタミン酸の化学的なラセミ化法は、低級脂肪酸(特に氷酢酸)中で加熱する方法¹¹²⁾、脂肪酸または芳香族アルデヒド存在下低級脂肪酸(特に氷酢酸)中で加熱する方法¹¹³⁻¹¹⁶⁾、アセトン・酢酸溶液中で加熱する方法¹¹⁷⁾、不飽和脂肪酸アルデヒドと銅またはクロムイオンを含む水溶液中で加熱する方

法¹⁸⁾、特殊なレジンをを用いる方法¹¹⁹⁻¹²⁰⁾、マイクロウェーブを用いた加熱によるラセミ化¹²¹⁾などが知られる。いずれの方法も特別な反応装置を必要とし、有機溶媒や触媒として用いたアルデヒド、金属イオンなどの廃液処理の問題も生じる。また、副反応による除去困難な副産物の生成と収率の低下の可能性も考えられる。さらに、第2段階の反応に酵素法を用いる場合、化学的なラセミ化反応液をそのまま用いると酵素反応に対する阻害が著しいため、ラセミ体のグルタミン酸を精製してから用いる必要があり、製造工程が複雑になり好ましくない。一方、酵素的なラセミ化方法としては、アラニンラセマーゼとD-及びL-アミノ酸トランスアミナーゼの共役による方法が知られる⁸⁾。この方法は複数の酵素の共役が必要であり、安定した実用的な反応系を構築することは困難である。この他に、乳酸菌に広く存在することが知られるグルタミン酸ラセマーゼの利用が考えられる^{8,21,30)}。ラセマーゼを用いたラセミ化は、反応液を処理せずに第2段階のL-体特異的除去の反応に用いることができると予想され、また、副反応による副産物の生成と収率の低下、溶媒・触媒の除去の問題もないと考えられる良好な方法である。そこで、第1段階のL-グルタミン酸のラセミ化には、グルタミン酸ラセマーゼを用いることとし、良好な性質を有する酵素のスクリーニングから検討を開始することにした。

第2段階のDL-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の取得方法については、高い光学純度と収率を得るためには、前述の優先品出法やジアステレオマー形成法などの化学的光学分割法は不利であると判断し(3-1-2)、L-体特異的な酵素を用いる方法を考えた。L-体に特異的に作用する酵素としては、グルタミン酸デカルボキシラーゼ^{44,57)}、グルタミン酸デヒドラーゼ^{6,7)}、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ¹²⁸⁾、グルタミン酸オキシダーゼ¹²⁴⁾が知られている。*E. coli* 由来のグルタミン酸デカルボキシラーゼによるL-グルタミン酸の脱炭酸反応はL-体選択性が高く、反応により生じるCO₂が反応系外に出るために、この反応は不可逆となる。また、L-グルタミン酸から転換したγ-アミノ酪酸はD-グルタミン酸と物性が異なるために分離が容易である。以上の理由から、第2段階のL-グルタミン酸選択的分解はL-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼを用いることとし、*E. coli* 由来の酵素を評価することから検討を開始することにした。

以上の2段階の酵素反応によるL-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の製造方法の概念図をFig. 3-3に示す。

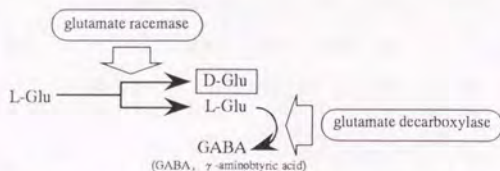


Fig. 3-3 酵素法によるL-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の製造方法の概念図

3-2 実験方法及び材料

3-2-1 菌株

グルタミン酸ラセマーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラ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を用いた。グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子クローニングの宿主には、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(EC 4.1.1.31) 遺伝子変異 (*ppc*)¹⁾によりL-グルタミン酸要求性となった*Escherichia coli* TM93を用いた。

3-2-2 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 20 g/l, ペプトン 20 g/l, 酵母エキス 30 g/l, 酢酸ナトリウム 20 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, L-グルタミン酸 1 g/l, pH 7.0
- 培地-2 : グルコース 20 g/l, CSL 20 g/l, 酢酸ナトリウム 200 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, K_2HPO_4 3 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1 mg/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/l, 微量金属溶液 1 ml/l, ビタミン溶液 1 ml/l, pH 7.0
- 培地-3 : (LB培地) バクトトリプトン 10 g/l, 酵母エキス 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7.2
- 培地-4 : (M9培地) グルコース 2 g/l, Na_2HPO_4 6 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, K_2HPO_4 3 g/l, NaCl 0.5 g/l, NH_4Cl 1 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l, $CaCl_2$ 0.01 g/l, チアミン・HCl 0.1 mg/l, 寒天 15 g/l, pH 7.2
- 培地-5 : グルコース 5 g/l, ペプトン 5 g/l, $Na_2HPO_4 \cdot 5H_2O$ 15.14 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 5 g/l, NH_4Cl 1 g/l, 微量金属溶液 1 ml/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2 g/l, チアミン・HCl 0.2 g/l, pH 7.2
- 微量金属溶液 : $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 37 mg/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 990 mg/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 880 mg/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 393 mg/l, $MnCl_2 \cdot 7H_2O$ 72 mg/l, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 88 mg/l
- ビタミン溶液 : リボフラビン 2 g/l, チアミン・HCl 1 g/l, *p*-アミノ安息香酸 1 g/l, ニコチン酸 1 g/l, パントテン酸 1 g/l, ビリドキシン 1 g/l, ビオチン 10 mg/l

3-2-3 培養条件

グルタミン酸ラセマーゼのスクリーニングには、培地-1を用いた。1 l三角フラスコ中 500

mlの培地を120℃、20分間滅菌後、乳酸菌を植菌し、30～37℃にて24～48時間、静置培養を行った。スラント培養は、同培地に寒天を15g/l添加したものを用いた。

Lactobacillus brevis ATCC 8287の培養には、培地-1の他、培地-2を用いた。培養は、500mlの培地を1l三角フラスコ中にて、37℃、24時間、静置、または1～20lの培地を2～30l発酵槽にて、37℃、24時間、微通気・微攪拌で行った。

*E. coli*の培養は、培地-3 (LB培地)を用い、30℃、20～24時間行った。培養は、8mlの培地を試験管(25×180mm)にて振盪(200rpm)、あるいは、40mlの培地を250ml三角フラスコにて振盪(300rpm)、あるいは、300mlの培地を1l三角フラスコにて振盪(300rpm)、あるいは、2lの培地を5l発酵槽にて培養を行った(700rpm, 1vvm)。必要に応じて、抗生物質としてアンピシリン(100mg/l)、あるいはテトラサイクリン(15mg/l)を添加した。スラントまたは平板培養には、同培地に寒天を15g/l添加したものを用いた。

組換え体の選択には、培地-4 (M9培地)にD-グルタミン酸 250mg/l、及びアンピシリン 100mg/lを添加したものを用いた。

また、菌体反応に用いるために多量の*E. coli*の菌体を得る場合は、2lの培地-5を用い、5l発酵槽にて培養を行った(30℃、700rpm, 1vvm)。培養の間、14%アンモニア水にてpHを6.8に調整し、またグルコース 167g/l及びペプトン 167g/lから成るフィード液を、培養液中のグルコース濃度が0～1g/lの範囲になるように連続的に添加した。

3-2-4 グルタミン酸ラセマーゼのスクリーニング

一次スクリーニングは以下のように行った。培養菌体を遠心分離により集菌した後、湿菌体として200g/lとなるように0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.5、に懸濁し反応に用いた。0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.5、中に、湿菌体 100g/l、L-グルタミン酸 50mM、及びトルエン 2%(vol./vol.)を加え、37℃、4時間反応を行った。100℃、10分間加熱により反応を停止した後、遠心上清中のD-グルタミン酸および総グルタミン酸量を測定した。二次評価では、更に高濃度の基質(L-グルタミン酸 150mMあるいは500mM)を用い反応を行った。ラセミ化率は以下の式により定義した。

$$\text{ラセミ化率} [\%] = \{(\text{生成D-グルタミン酸})/(\text{反応液中の総グルタミン酸量})\} \times 100 \times 2$$

3-2-5 グルタミン酸ラセマーゼ活性測定法

グルタミン酸ラセマーゼ活性の測定は、以下の反応液(0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.5、L-グルタミン酸 170mM または 860mM、及び菌体、粗酵素抽出液、あるいは精製酵素)を用いて

行った。菌体を反応に用いる場合は、トルエン 2% (vol./vol.) を添加した。標準的な活性測定反応は、37℃、30 分間または 60 分間とし、D-グルタミン酸生成速度が一定となるように菌体、粗酵素抽出液、精製酵素の量を調節した。100℃、10 分間加熱により反応停止した後、遠心上清中の生成 D-グルタミン酸およびグルタミン酸量を測定した。活性の単位 1 unit は 1 分間に 1 μ mole の D-グルタミン酸を生成する能力とした。

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

培養菌体を遠心分離により集菌した後、0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.2、湿菌体 5 g/l、L-グルタミン酸 10 g/l、トルエン 2% (vol./vol.)、37℃ の条件で、30~60 分間反応した。25 g/l TCA 水溶液を反応液に等量加え、100℃、10 分間加熱により反応停止し、遠心上清中に残存する L-グルタミン酸及び生成した γ -アミノ酪酸量を測定した。反応に使用する菌体量は、活性にあわせて変更した。活性の単位 1 unit は 1 分間に 1 μ mole の L-グルタミン酸を分解する能力とした。

3-2-7 グルタミン酸及び γ -アミノ酪酸の定量法

鏡グルタミン酸及び γ -アミノ酪酸は、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。グルタミン酸及び γ -アミノ酪酸は、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⁾。

グルタミン酸の光学純度は、MCI GEL CRS10W カラム（三菱化成工業、東京）または SUMICHIRAL OA-5000 カラム（住化分析センター、大阪）を用いて測定した。移動相には 2 mM CuSO₄ 水溶液を用い、254 nm の吸収により検出した。

3-2-8 制限酵素及び遺伝子操作

検討に用いた制限酵素、T4 DNA リガーゼ、及びその他の酵素類やプライマー等の DNA 類は、別に記載のない限りすべて宝酒造（京都）製を用いた。*Bam*HI は 10×K 緩衝液（200 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1000 mM KCl, pH 8.5）を、*Eco*RI と *Pst*II は 10×H 緩衝液（500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1000 mM NaCl, pH 7.5）を、*Hind*III は 10×M 緩衝液（100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 mM NaCl, pH 7.5）を用いて、37℃ で反応を行った。その他、必要に応じて 10×L 緩衝液（100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 7.5）、10×T 緩衝液（330 mM

T₄-HCl, 100 mM 酢酸マグネシウム, 5 mM DTT, 660 mM 酢酸カリウム, pH 7.9) も用いた。T4 DNAリガーゼによるライゲーションは、反応液に1/5容量の5×ライゲーション緩衝液 (250 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 5 % (wt./vol.) PEG-8000, pH 7.6) を添加して16 °Cで反応した。また、アガロース・ゲルからのDNA断片の回収は、BIO-RAD プレップ-A-ジーンDNA精製キット (日本バイオ・ラッパ・ラボラトリーズ、東京) を用いた。

3-2-9 グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子のクローニング

L. brevis ATCC 8287の対数増殖後期の菌体からSaito & Miuraの方法に従って染色体DNAを調製した³⁾。この染色体DNAをHindIIIで完全消化した後、プラスミドpBR322のHindIIIサイトにT4 DNAリガーゼを用いて結合し、*E. coli* TM93を形質転換した。*E. coli* TM93のコンピテントセルは、塩化カルシウム法にて調製した⁴⁾。D-グルタミン酸 250 mg/l とアンピシリン 100 mg/l を含む培地-4 (M9培地) 寒天平板上で生育した形質転換体コロニーを選び、保持するプラスミドとグルタミン酸ラセマーゼ活性を評価した。

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

pGAR1の挿入DNA断片をいくつかの制限酵素で切断した後、pUC18またはpUC19のマルチクローニングサイトに連結し、*E. coli* TM93を形質転換した。アンピシリン 100 mg/l を含む培地-3 (LB培地) 寒天平板上で生育した形質転換体コロニーを選び、保持するプラスミドと、グルタミン酸ラセマーゼ活性を評価した。

3-2-11 DNA塩基配列の解析

グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を含む1.4 kbのHindIII-EcoRI DNA断片について、Deletion Kit for Kilo-Sequence (宝酒造、京都) を用いて、種々の長さのDNA断片を有する欠失変異系列を作成した。これらの欠失変異系列を、M13プライマーとTaq DydeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., U.S.A.) を用いて、自動DNAシーケンサーABI 373A (Applied Biosystems Inc., U.S.A.) にて塩基配列を決定した。

3-2-12 グルタミン酸ラセマーゼの精製

培養菌体を遠心集菌後、緩衝液A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, グリセロール 10 % (wt./vol.), セルカプトエタノール 0.1 % (vol./vol.)) に懸濁した。この菌体懸濁液を超音波破碎 (Bronson Cell

(Disruptor) し、4℃、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30%飽和となるように添加し、4℃で一晩静置した後、4℃にて14,000×gで20分間、遠心した。上清を硫酸アンモニウム30%飽和の緩衝液Aで平衡化したButyl-Toyopearl (トーソー、東京) カラムに通塔し、4倍容量の硫酸アンモニウム30%飽和の緩衝液Aで洗浄後、12倍容量の硫酸アンモニウム30から0%飽和の直線濃度勾配をつけた緩衝液Aで酵素を溶出した。活性画分を緩衝液Aで透析した後、緩衝液Aで平衡化したDEAE-Toyopearl (トーソー、東京) カラムに通塔し、4倍容量の緩衝液Aで洗浄後、12倍容量の0から2.5 M NaClの直線濃度勾配をつけた緩衝液Aで酵素を溶出した。活性画分をUFP2LGC (日本ミリポア工業、米沢) で膜濃縮後、精製酵素溶液とした。

3-2-1 3 SDS-PAGE

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⁸⁾。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), ovalbumin (M.W.=43,000), bovin serum albumin (M.W.=67,000), phosphorylase b (M.W.=94,000)を用いた。

3-2-1 4 N-末アミノ酸配列分析

N-末アミノ酸配列分析は、Protein sequencer model 470A (Applied Biosystems Inc., U.S.A.) を用いて行った。

3-3 結果

3-3-1 グルタミン酸ラセマーゼのスクリーニング

工業的にL-グルタミン酸からD-グルタミン酸を生産するためのグルタミン酸ラセマーゼは、高い基質濃度でも機能する必要がある。*Lactobacillus fermenti* ATCC 9338などの既知菌株のグルタミン酸ラセマーゼは、菌体あたりの活性が低く、高基質濃度で基質阻害があるなど工業的利用には十分な性質ではない^(52),30)。そこで、高基質濃度においても十分な活性を示す優良な性質を有するグルタミン酸ラセマーゼのスクリーニングを実施した。グルタミン酸ラセマーゼは乳酸菌のみに報告されていることから、乳酸菌についてL-グルタミン酸からD-グルタミン酸を生成する能力を評価した。

乳酸菌70株 (*Lactobacillus* 属 43株, *Streptococcus* 属 8株, *Leuconostoc* 属 8株, *Pediococcus* 属 5株, *Propionibacterium* 属 3株, *Enterococcus* 属 2株, *Lactococcus* 属 1株) について検討した結果、64株 (*Lactobacillus* 属 42株, *Streptococcus* 属 6株, *Leuconostoc* 属 8株, *Pediococcus* 属 4株, *Propionibacterium* 属 1株, *Enterococcus* 属 2株, *Lactococcus* 属 1株) にD-グルタミン酸の生成が検出された。乳酸菌にはD-アミノ酸トランスアミナーゼの存在は知られていないことから、検出されたD-グルタミン酸は、グルタミン酸ラセマーゼの存在によりL-グルタミン酸から生成したものと考えられる。代表的な菌株についての結果をTable 3-1に示す。

Table 3-1 乳酸菌からのグルタミン酸ラセマーゼ生産菌のスクリーニング

Strain	D-Glu [mM] (Racemization ratio [%])		
	Concentration of L-Glu		
	50 mM	150 mM	500 mM
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 8287	22.9 (91.6)	54.4 (72.5)	165.8 (66.3)
<i>Lactobacillus brevis</i> T-263	16.4 (65.6)	13.9 (18.5)	17.3 (6.9)
<i>Lactobacillus brevis</i> T-264	20.3 (81.2)	21.7 (28.9)	23.5 (9.4)
<i>Lactobacillus batatas</i> IAM 10063	19.8 (79.2)	23.6 (31.5)	16.1 (6.4)
<i>Lactobacillus japonicus</i> IAM 10068	18.9 (75.6)	20.7 (27.6)	12.9 (5.2)
<i>Lactobacillus fermenti</i> ATCC 9338	14.8 (59.2)	15.2 (20.3)	21.4 (8.6)
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	14.7 (58.8)	14.8 (19.7)	8.0 (3.2)
<i>Lactobacillus</i> sp. KY 3663	16.0 (64.0)	19.9 (26.5)	21.5 (8.6)
<i>Leuconostoc citrovorum</i> IAM 1087	17.8 (71.2)	20.3 (27.1)	14.9 (6.0)
<i>Pediococcus parvulus</i> IFO 12233	19.3 (77.2)	17.3 (23.1)	19.7 (7.9)

反応条件: 湿菌体 100 g/l, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5, トルエン 2% (vol./vol.), 37 °C, 4 hr.

次いで、高濃度基質（150 mM, 500 mM）で評価を行った。その結果、*Lactobacillus brevis* ATCC 8287 の有するグルタミン酸ラセマーゼは、500 mM の L-グルタミン酸を基質とした場合でも、基質濃度にほぼ比例して D-グルタミン酸生成量が増大することが判明した（Table 3-1）。

以上のことから、*L. brevis* ATCC 8287 をグルタミン酸ラセマーゼ生産菌株として選択し、以後の検討を行った。

なお、*L. brevis* ATCC 8287 は、培地-1 または培地-2 に 15 g/l の D-, L-, または DL-グルタミン酸を添加、あるいは無添加での培養で、グルタミン酸ラセマーゼの菌体活性に差がなかったことから、グルタミン酸による本酵素の誘導生産はないと思われる。

3-3-2 乳酸菌を用いた D-グルタミン酸の製造

L. brevis ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼについて、菌体反応での反応条件検討をした。反応の至適 pH は 8.5、至適温度は 37 °C であった（Fig. 3-4）。至適反応条件における菌体活性は 2.3 units/g wet cells、無細胞抽出液での比活性は 0.035 units/mg protein で、既知菌株 *Pedococcus pentosaceus* IFO 3182^{20,21)}、*Lactobacillus fermenti* ATCC 9338^{8,14,30)} 由来のグルタミン酸ラセマーゼよりも数倍高い活性であった。菌体反応に対する基質 L-グルタミン酸濃度の影響を調べた結果、湿菌体 100 g/l を用いて L-グルタミン酸 100 g/l (0.68 M) までを 24 時間で完全にラセミ化することが可能であった（Fig. 3-5）。

検討の過程で本菌株が L-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼを同時に有することを見出した。本酵素の反応の至適 pH は 4.0 以下であり、pH 7.0 以上では活性は検出されなかった。一方、至適 pH が 8.5 であるグルタミン酸ラセマーゼ活性は、pH 4.0 では検出されなかった（Fig. 3-6）。このグルタミン酸デカルボキシラーゼは、D-グルタミン酸を基質とはせず、D-グルタミン酸による阻害も観察されなかつた。

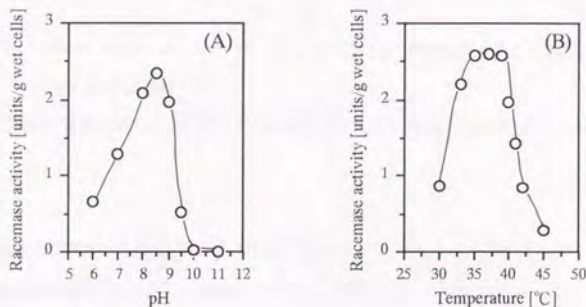


Fig. 3-4 *L. brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼ活性に対する pH (A) と温度 (B) の影響

反応条件：湿菌体 100 g/l, L-グルタミン酸 680 mM, トルエン 2 % (vol./vol.), 60 min

(A) 37 °C, (B) 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5.

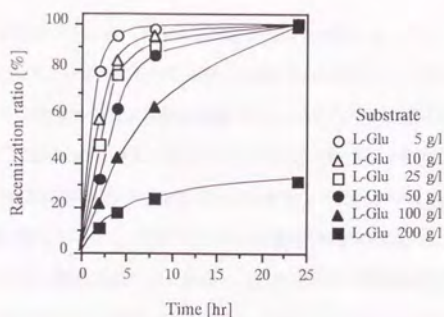


Fig. 3-5 *L.brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼ活性に対する基質L-グルタミン酸濃度の影響

反応条件: 湿菌体 100 g/l, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5, トルエン 2 % (vol./vol.), 37 °C.

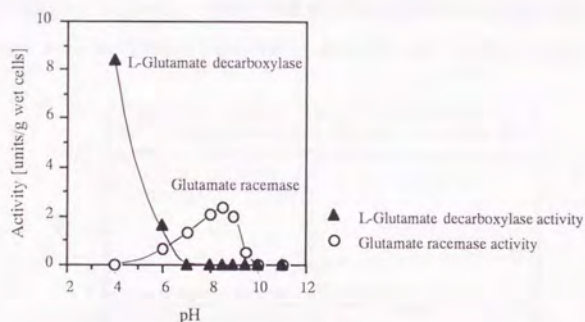


Fig. 3-6 *L.brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼ活性とグルタミン酸脱炭酸酵素

に対する pH の影響

反応条件: 湿菌体 100 g/l, L-グルタミン酸 680 mM, トルエン 2 % (vol./vol.), 37 °C, 60 min.

本菌株の湿菌体 100 g/l を用いて pH 4.0 で反応することにより、DL-グルタミン酸 100g/l 中の L-グルタミン酸 50g/l を完全に γ -アミノ酪酸 (GABA) に転換することが可能であった。

以上の結果をもとに、*L. brevis* ATCC 8287 の有する両酵素の反応至適 pH の違いを利用して、本菌株の菌体を用いた L-グルタミン酸からの D-グルタミン酸の生産を試みた。

まず反応液のpHを8.5として、グルタミン酸ラセマーゼによりL-グルタミン酸をラセミ化し、次いで反応液のpHを4.0として、L-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼによりラセミ化したDL-グルタミン酸中のL-グルタミン酸を γ -アミノ酪酸に転換する。pH 8.5ではL-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼは作用せず、従ってグルタミン酸ラセマーゼのみが働き、またpH 4.0ではグルタミン酸ラセマーゼは機能せず、L-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼのみが働く。

この方針に基づき、*L. brevis* ATCC 8287の湿菌体100 g/lを用いて、L-グルタミン酸100 g/l (0.68 M)からのD-グルタミン酸生産について検討した。pH 8.5、24時間の反応で、L-グルタミン酸100 g/lは完全にラセミ化されD-グルタミン酸50 g/lが生成した。次に、リン酸にて反応液pHを4.0に下げ、その後もリン酸にてpHを4.0~4.5に保って反応を続けた結果、24時間で、DL-グルタミン酸中のL-グルタミン酸は完全に γ -アミノ酪酸に転換され、反応液中にはD-グルタミン酸50 g/lが残存した (Fig. 3-7)。反応液中のD-グルタミン酸と γ -アミノ酪酸は、容易に分離精製可能であった。

本法により、発酵法で安価に生産されるL-グルタミン酸を出発物質として、D-グルタミン酸を生産することが可能になった。しかし、一般的に乳酸菌は多量の培養菌体を得ることは困難である。そこで、グルタミン酸ラセマーゼの効率的な生産を目的に、*Escherichia coli*での生産を試みた。

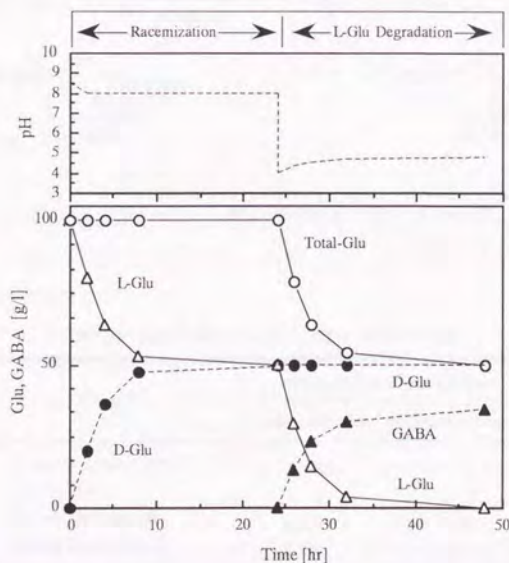


Fig. 3-7 *L. brevis* ATCC 8287培養菌体を用いたL-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の酵素的生産
反応条件: 湿菌体 100 g/l, 出発基質 L-グルタミン酸 680 mM, トルエン 2% (vol./vol.), 37 °C.

3-3-3 グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子のクローニング

E. coli TM93 (ppe)のL-グルタミン酸要求性が、ラセマーゼの導入によりD-グルタミン酸で代替されることを利用して、*L. brevis* ATCC8287 由来のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子の取得を試みた。

L. brevis ATCC8287 の染色体DNAをHindIII 切断後、pBR322のHindIII 切断部位に連結し、*E. coli* TM93に導入し、D-グルタミン酸を含む培地-4 (M9培地) 寒天平板上に生育する形質転換体を取得した。形質転換体に含まれるプラスミドについて検討した結果、形質転換体から2種類のプラスミド、pGAR1, pGAR2、を取得した。両プラスミドには、同一の制限酵素切断地図を有する2.8 kbのHindIII 切断DNA断片が、お互いに異なる方向で挿入されていた (Fig. 3-8)。

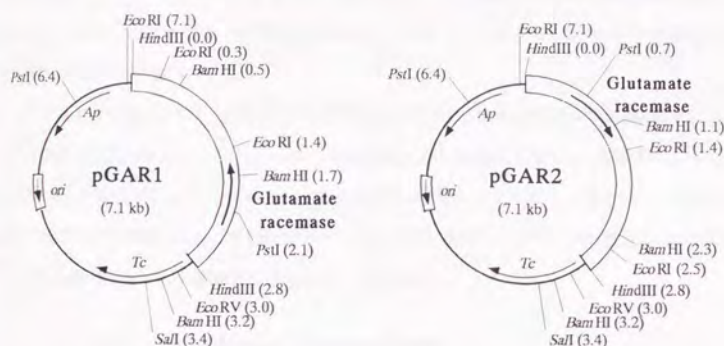


Fig. 3-8 グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を有するプラスミド pGAR1, pGAR2

Table 3-2 組換え菌のグルタミン酸ラセマーゼ活性

Strain	Glutamate racemase activity	
	[units/g wet cells]	(Relative activity)
<i>L. brevis</i> ATCC 8287	8.5	1
<i>E. coli</i> TM93	0	0
<i>E. coli</i> TM93/pGAR1	1,270	149
<i>E. coli</i> TM93/pGAR2	1,390	163

反応条件: 湿菌体 1 g/l, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5, L-グルタミン酸 680 mM, トルエン 2 % (vol./vol.), 37 °C, 60 min.

これらの形質転換体は、すべてグルタミン酸ラセマーゼ活性を示したことから、取得したDNA断片には *L. brevis* ATCC8287 由来のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子が含まれると判断された (Table 3-2)。培地-3 (LB培地) で20時間培養したTM93/pGAR1とTM93/pGAR2の培養菌体中のグルタミン酸ラセマーゼ活性はそれぞれ1,270 units/g wet cellsと1,390 units/g wet cellsで、*L. brevis* ATCC8287 の約150倍の菌体活性を示した。顕微鏡観察では顆粒 (inclusion body) の形成は認められず、また、菌体破砕後に遠心分離により未破壊菌体を含む不溶性画分を除いた無細胞抽出液中に活性の64%が存在することから、TM93/pGAR1とTM93/pGAR2で生産されたグルタミン酸ラセマーゼは、ほとんどが活性型酵素として可溶性画分に存在するものと考えられた。

2.8 kbのDNA断片をいくつかの制限酵素で切断した後、pUC18及びpUC19のマルチクローニングサイトに挿入し、サブクローニングを行った (Fig. 3-9)。その結果、1.4 kbの *Hind*III-*Eco*RI 断片を有する場合のみグルタミン酸ラセマーゼ活性が検出されたことから、グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子はこの断片上に存在するものと判断された。

グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子が存在すると考えられた1.4 kbの *Hind*III-*Eco*RI 断片について、両方向から全塩基配列を決定した (Fig. 3-10)。その結果、24 b 離れた位置の2ヶ所のATGコドンから始まる2つのORFが存在することが判明した。組換え菌から精製したグルタミン酸ラセマーゼのN末アミノ酸配列 (MONDPIGLMD) から、最初のATGコドンから始まる828 b (276アミノ酸残基) から成るORFが、グルタミン酸ラセマーゼの構造遺伝子であると判断された。

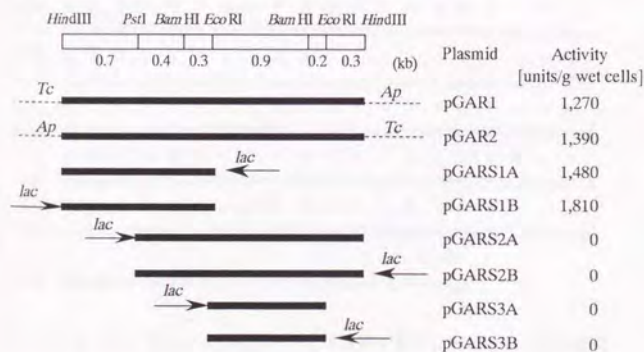


Fig. 3-9 挿入断片の制限酵素地図とグルタミン酸ラセマーゼ活性

反応条件：湿菌体 1 g/l, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5, L-グルタミン酸 680 mM, トルエン 2% (vol./vol.), 37 °C, 60 min.

HindIII

1 AAGCTTACTCCCCATCCCCGGGCAA

26 TAAGGGGCGTGCCTATCCACTTTTTGCGCGTCCATATTCACGGCTTCTTTGAGGAG

86 TTCAATTTCCATCGTTTTCTTGCCGAGCAGGCGCTGGAGTCTTTAATCTGCTTCATGGC

146 GGCAGCAAGTTCAGAGGCAGGAACAACCTGTTCTCCGGCGGCAGCAGTAAGACTTCC

206 TTCTTGGTATTGCTTACGCCAGAGAAATAACTGGCTGGCTGCTACCATGTTGCCGGGC

266 AACGAGGAGACCGCTATCCCCGGTTCAAAGCTCTGCTGAACAATTGCGATCTTTTCTG

326 TGTGGTACGCCGCTGCTGCTTTCTCCGGCCCTAAGACATCAATCATCTGTTCTCCAATGAC

386 TAGCTAAAACTAGTATTAAGACTATCACTTATTAAAGTATTTGGTTGCTGGAGAT

-35 -10 SD

446 TCAGGGGGCGAGTCTAGCGGATAATAGTTCAGTAAATCGAAGGAGCGTTGCTTC

1 M Q N D P I G L M D S G V G G L T V L K

506 ATGCAAAATGATCCGATTGGTCTAATGGATTACGGGGTGGTGGTTGACCGTCTTAAAG

21 E V Q R L L P T E N T V F L G D Q A R L

566 GAAGTTCAACGGTTGTTGCCACTGAAATACAGTATTTCTGGGCGATCAGGCGCGTTG

41 P Y G P R S V A E V T M F T K Q I A Q F

626 CCATATGGACCGCGCTCGGTGGCTGAGGTGACAATGTTTACCAACAAATTGCGCAATT

61 L R Q Q A R I K A L V I A C N T A T A A

686 TTACGCCAACAAGCAAGAATCAAAGCGTTAGTGATTGCGTGTAACACGGCAACTGCAGCG

81 A L T T M Q Q T L P I P V I G V I A P G

746 GCTCTAACACGATGACGACAAACATTGCCATTCCGGTAATCGGCGTTATTGCAACCGG

101 A Q A A V Q T T R N H R I G V I A T A G

806 GCGCAGGCGCGGTGACGACAACCGGTAATCACCAGAAATGGGGTGATTGCAACGGCGGA

121 T V K S D Q Y R R D I L A A P N S Q I

866 ACGGTTAAGAGTGACAGTATCGGCGAGATATTTAGCAGCAGCACCTAATAGTCAAAT

141 F S V A C P E M V T L A E Q N D L T T T

926 TTTAGTGTGGCTTGTCCGAAATGGTGACGCTGGCAGAGCAAAATGACTTAACGACCAG

161 S Q V T L V D P G L A T A E Q T V A I L

986 CATGCCCAGTCCGTAGTACGGGCAAACTTGGCGTCACTTATGGATAAGAAAATGATACG

181 H A Q S V V A A N L A S L M D K K I D T

1046 TTGGTGATGGGCTGTACGCATTTTCCATTATTGCGAAGCGCTATTACGACGCTGTGGGT

201 L V M G C T H F P L L R S A I Q H A V G

1106 TCACAGTGACCTTGTGGATCCCGGCTTAGCAACTGCGGAACAAACAGTGGCTATCCTA

221 K T R G L L N S A T T R G T A Q F F T T

1166 AAGACGCGGGGTTACTCAATTCTGCCAGCACGTTGGGACGGCTCAATCTTTTACCAGC

241 G E T D Q F D T L A S Q W L D Q Q P T P

1226 GGTGAGACAGACAGTTGATACGTGGCTAGTCAGTGGTTGGATCAGCAACCAACGCCA

261 A K H V A I A Q L T T P M E V N *

1286 GCGAAGCACGTGGCGATTGCGCAGCTGACAACCTCCGATGGAGGTTAACTAAGATGACAAA

EcoRI

1346 CACAATTGTAATTGCTACCAATAATGCGGGGAAGGCCGCTGAATTC

Fig. 3-10 グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を含む挿入断片の塩基配列

E. coli 組換え菌では、*lac* プロモーターの位置に関わらずほぼ同等のグルタミン酸ラセマーゼ活性が生産され (Fig. 3-9)、また、IPTG や D-及び L-グルタミン酸による誘導生産は観察されなかった。本酵素がグルタミン酸により誘導生産されなかったことは、*L. brevis* ATCC8287 においても観察された。

(3-3-1)。これらの結果は、*L. brevis* 由来のプロモーターが、*E. coli* において十分に機能することを示唆している。事実、ATGの上流配列に、*E. coli* の典型的な転写・翻訳開始構造に類似した配列、-10 (TATAGT) と-35 (TTCAG) が見だされた³³⁻⁴⁰⁾ (Fig. 3-10)。

E. coli C600, K294, HB101, JA194, JM109でのグルタミン酸ラセマーゼの発現について検討した結果、活性は*E. coli* TM93を宿主とした場合の1/2以下であった。

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

グルタミン酸ラセマーゼの諸性質の検討を目的に、3-2-1 2記載の方法に従って本酵素を*E. coli* TM93/pGAR1から精製した。Table 3-3に精製結果を示す。最終的に、無細胞抽出液から収率31%で精製し、比活性は24倍となった。精製酵素はSDS-PAGEにより電気泳動的に単一であることを確認した (Fig. 3-11)。SDS-PAGEでは本酵素の分子量は約29,000 と計算され、塩基配列から算出した分子量29,426とほぼ一致した。

Table. 3-3 *E. coli* TM93/pGAR1からのグルタミン酸ラセマーゼの精製

Purification procedure	Total protein [mg]	Total activity [units]	Specific activity [units/mg]	Yield [%]
Cell free extract	223	2,049	9.2	100
Ammonium sulfate	185	1,869	10.1	91.2
Butyl-Toyopearl	28.8	787	27.3	38.4
DEAE-Toyopearl	2.9	627	216	30.6

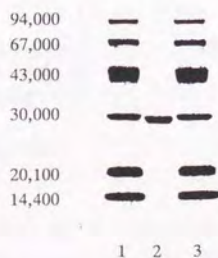


Fig. 3-11 精製グルタミン酸ラセマーゼのSDS-PAGE

Lane 1, 3; 分子量マーカー, Lane 2: グルタミン酸ラセマーゼ。

組換え菌の生産するグルタミン酸ラセマーゼの至適反応温度は37℃、pHは8.5であり、*L. brevis* ATCC8287の菌体及び無細胞抽出液を用いた検討結果と一致した (Fig. 3-12)。至適反応条件における本酵素の比活性は 216 units/mg、D-グルタミン酸及びL-グルタミン酸に対する K_m は各々5.94 mM、6.39 mM、 V_{max} は各々208 μ mole/mg/min, 206 μ mole/mg/minであった。(Fig. 3-13)。

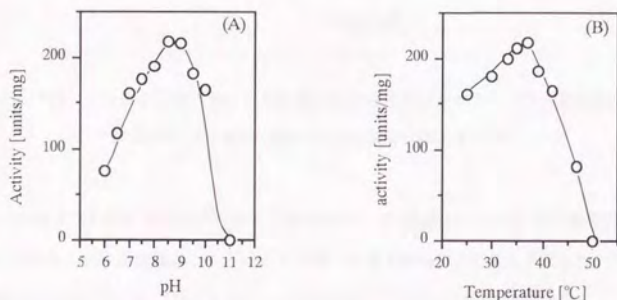


Fig. 3-12 グルタミン酸ラセマーゼに対するpHと温度の影響

反応条件：L-グルタミン酸 100 g/l, 30 min, (A) 37℃, (B) 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5.

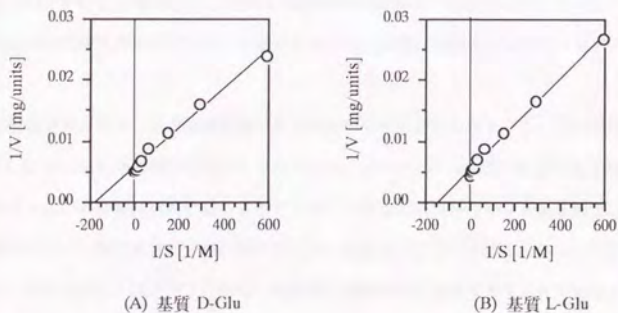


Fig. 3-13 グルタミン酸ラセマーゼのLineweaver-Burk プロット

反応条件：0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5, 37℃, 30 min.

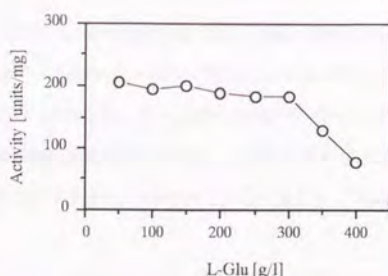


Fig. 3-14 グルタミン酸ラセマーゼ活性に対する基質L-グルタミン酸濃度の影響

反応条件: 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5, 37 °C

L. brevis ATCC8287 由来のグルタミン酸ラセマーゼの特徴の一つに、高い基質濃度でも活性を維持することがある。本酵素活性は、L-グルタミン酸 2.0 M (300 g/l)まで全く影響を受けず、2.7 M (400 g/l)でも40%の活性を有していた (Fig. 3-14)。この性質は、工業的な利用に重要である。

本酵素の基質特異性について、20種の蛋白質構成アミノ酸を基質として検討した結果、本酵素はグルタミン酸のみを基質として反応した。

さらに、本酵素の補酵素要求性について検討を行った。本酵素はTris-HCl緩衝液にて透析して活性を失わず、透析後に1 mMのPLP, FAD, FMN, NAD, NADPを添加しても活性に変化はなかった。また補酵素としてPLPを有する場合に生じる330と420 nmの吸収極大⁴³⁾は認められなかった。これらのことから、本酵素は他の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼと同様に補酵素非依存型ラセマーゼであることが示唆された。

本酵素をカルボキシル基修飾試薬である10 mMのヒドロキシルアミン、10 mMのフェニルヒドラジン、あるいは10 mMの水素化ホウ素ナトリウムにて、pH 8.5, 37 °C, 30分間処理後も活性に変化はなかった。このことは、本酵素は活性に関与するビルボイル基などのカルボキシル基を持たないことを示唆する。本酵素はキレート剤である10 mMのEDTAによって阻害されなかったことから、活性に関与する金属は持たないと考えられる。以上のことから、本酵素は補酵素非依存性ラセマーゼであると考えられた。

本酵素はSH酵素の阻害剤である1 mMのZnSO₄, 1 mMのCuSO₄, 1 mMのPCMBにより強く阻害され、2-メルカプトエタノールにより安定化したことから、活性中心にSH基を有することが示唆された。

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

L. brevis ATCC 8287 は、良好なL-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼを有していた

が、培養により多量の菌体を得ることは困難であるため、多量の菌体取得が容易であり、かつ比較的強い菌株特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼを有することが知られている *E. coli* について評価を行った⁴⁰⁾。その結果、*E. coli* ATCC 11246 のグルタミン酸デカルボキシラーゼの菌体活性が 91 units/g wet cells と高く、*L. brevis* ATCC 8287 の菌体活性の約 11 倍であった (Table 3-4)。*E. coli* ATCC 11246 のグルタミン酸デカルボキシラーゼの L-体選択性は高く、D-グルタミン酸を基質として反応しなかった。

Table 3-4 *E. coli* のグルタミン酸デカルボキシラーゼ

Strain	Glutamate decarboxylase activity	
	[units/g wet cells]	relative activity
<i>L. brevis</i> ATCC 8287	8	1
<i>E. coli</i> ATCC 11246	91	11.4
<i>E. coli</i> ATCC 13676	21	2.6
<i>E. coli</i> ATCC 21186	16	2
<i>E. coli</i> TM93	0	0

反応条件：湿菌体 5 g/l, 0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.2, L-グルタミン酸 10 g/l, トルエン 2 % (vol./vol.), 37 °C, 30 min.

3-3-6 D-グルタミン酸生産方法の検討

E. coli TM93/pGAR1 と *E. coli* ATCC 11246 を用いて、L-グルタミン酸から D-グルタミン酸生産の検討を行った。*E. coli* TM93/pGAR1 の菌体を用いた L-グルタミン酸のラセミ化反応の至適反応条件は、*L. brevis* ATCC 8287 と同様に pH 8.5、37 °C であった。至適反応条件下、*E. coli* TM93/pGAR1 の湿菌体 2.5 g/l で L-グルタミン酸 100 g/l を 10 時間で、200 g/l を 20 時間で完全にラセミ化することが可能であった (Fig. 3-15)。また、L-グルタミン酸 100 g/l を 24 時間でラセミ化するには、湿菌体 1 g/l で十分であった。

一方、*E. coli* ATCC 11246 を用いた L-グルタミン酸の脱炭酸反応の至適反応条件は、pH 4.2、37 °C であった。*E. coli* ATCC 11246 の湿菌体 5 g/l を用いて 10 時間反応を行ったところ、DL-グルタミン酸 100 g/l 中の L-グルタミン酸 50 g/l を完全に γ -アミノ酪酸に転換することが可能であった。

これらの結果に基づいて、L-グルタミン酸からの D-グルタミン酸の生産を試みた (Fig. 3-13)。*E. coli* TM93/pGAR1 を 3-2-3 記載の方法で 5 l 発酵槽で培養を行った。TM93/pGAR1 は、培地にアンピシリンを添加せずに培養終了時まで高いプラスミド保持率 (90 %) を維持し、安定して高いグルタミン酸ラセマーゼ活性を発現した (Fig. 3-16)。抗生物質を添加せずにグルタミン酸ラセマーゼを生産できることは、大スケールでの生産に有利である。第 1 段階の L-グルタミン酸ラセミ化反応は、この培養菌体

(湿重量) 3 g/l, L-グルタミン酸 100 g/l, トルエン 2 % (vol./vol.) から成る反応液で行い、水酸化ナトリウムにて pH を 8.5 に調整した。その結果、L-グルタミン酸は、37 °C, 5 時間の反応で完全にラセミ化された (Fig. 3-17)。この間の pH の変動はわずかであり、途中で pH 調整の必要はなかった。次に第 2 段階の L-グルタミン酸脱炭酸反応のために、塩酸にて pH を 4.2 に調整し、3-2-3 記載の方法で 5 l 発酵槽で培養した *E. coli* ATCC 11246 の湿菌体を 5 g/l となるように添加した。L-グルタミン酸は、37 °C, 10 時間の反

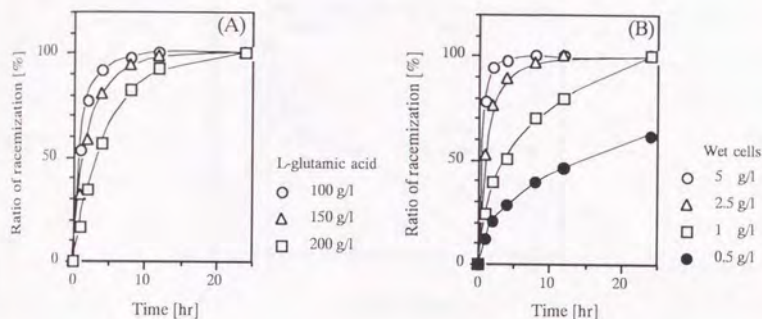


Fig. 3-15 組換え菌によるグルタミン酸のラセミ化に対する菌体量と基質濃度の影響

反応条件: (A) 湿菌体 2.5 g/l, 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5, 37 °C.

(B) L-グルタミン酸 680 mM, 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5, 37 °C.

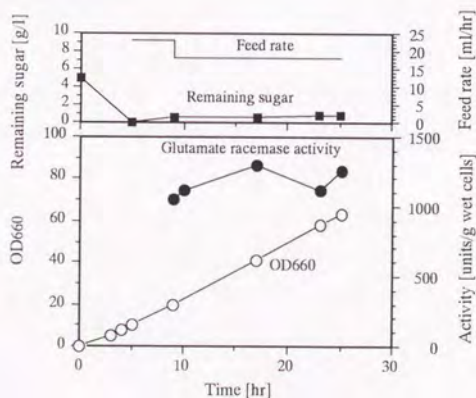


Fig. 3-16 *E. coli* TM93/pGAR-1 の培養

培養条件: 2 l の培地-5 を用い 5 l 発酵槽にて培養。30 °C、pH 6.8 (14 % アンモニア水)、700 rpm、1 vvm、フィード液流量はグルコース濃度が 0~1 g/l の範囲になるよう調節。

定量的に γ -アミノ酪酸に転換され、D-グルタミン酸 50 g/l が残存した (Fig. 3-17)。この反応の間、 CO_2 が反応液外に出て pH は絶えず上昇したため、塩酸により pH 4.2 を維持し続けた。この反応液から、一般的なグルタミン酸の精製法に従って、光学純度 99% 以上の D-グルタミン酸を得ることができた。

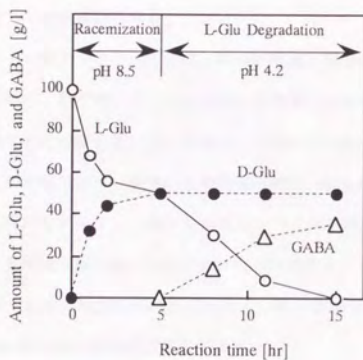


Fig. 3-17 組換え菌を用いたL-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の製造

反応条件: L-グルタミン酸 100 g/l, *E. coli* TM93/pGAR1 の湿菌体 3 g/l, トルエン 2% (vol./vol.), pH 8.5 (NaOH), 37 °C, 10 時間. 塩酸にて pH 4.2 に調整後、*E. coli* ATCC 11246 の湿菌体 5 g/l, 37 °C, 10 時間 (この間、塩酸にて pH を 4.2 に維持)。

3-4 考察

3-4-1 本製造方法の評価

本研究で完成したD-グルタミン酸の製造方法は、発酵法で生産されるL-グルタミン酸を原料とするため、原料は安価に安定して供給可能である。

第1段階のグルタミン酸のラセミ化反応は、*E. coli* 組換え菌の生産するグルタミン酸ラセマーゼを用いて常温常圧で行うために、化学的ラセミ化とは異なり特殊な設備を必要としない。また、化学的ラセミ化が必要となる重金属などの触媒を用いないために、精製などの処理せずにラセミ化反応液を第2段階の酵素反応に用いることが可能であり、廃液による環境汚染の心配もない。

第2段階のL-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼを用いたDL-グルタミン酸中のL-グルタミン酸の分解・除去は、光学選択性が高い酵素を用いた不可逆反応であるため反応収率及び生成物純度が高い。また、本酵素は第1段階の反応に用いるグルタミン酸ラセマーゼと反応pHが異なるために、第2段階の反応前に第1段階の酵素の失活処理が不要である。

以上のように、本研究で完成したD-グルタミン酸の製造方法は良好な方法であり、これまでに提案されている他の方法と比較しても多くの点で優れている。しかし、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と思われる。

本方法は2段階の反応で用いる酵素を得るために2回の培養を行う必要があり、さらに効率的な生産の可能性が残る。第1段階のグルタミン酸のラセミ化反応に用いるグルタミン酸ラセマーゼのクローニングに成功し、容易に多量の酵素の生産が可能になった。一方、第2段階のL-グルタミン酸の光学選択的分解反応に用いるL-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼのクローニングは行っていないが、遺伝子が取得できれば組換え菌にて両酵素を同時に生産することが可能になると考えられる。*E. coli* のグルタミン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の塩基配列はすでに明らかにされていることから⁸⁵⁾、遺伝子の取得は容易であると思われる。さらに、乳酸菌を用いたD-グルタミン酸の製造で示したように、グルタミン酸ラセマーゼとグルタミン酸デカルボキシラーゼの反応するpHが異なるため、両酵素が同時に存在してもpHの調整で一方の反応のみを選択することが可能である。また、両酵素はエネルギー非要求性であるため、固定化することによりさらに効率的な生産ができる可能性がある。

また、グルタミン酸をラセミ化した後に半分を占めるL-グルタミン酸を分解・除去するため、出発基質であるL-グルタミン酸からの収率が50%を上回ることではなく、この点についても改善の余地がある。L-グルタミン酸からの収率を改善するためには、ラセミ化したグルタミン酸中のL-グルタミン酸をリサイクルする必要がある。脱炭酸反応によるL-グルタミン酸の γ -アミノ酪酸への変換では、 γ -アミノ酪

酸を再びグルタミン酸に戻すことは困難である。たとえば、L-体特異的なアシルラーゼを用いてラセミ体中のL-グルタミン酸をアシル化してD-グルタミン酸と分割した後、L-グルタミン酸に戻すなどの方法が可能であれば、収率が50%を越えることも可能になると思われるが、現在までに好適な方法と酵素は見出されていない。

3-4-2 グルタミン酸ラセマーゼの酵素的性質

E. coli TM93/pGAR1 から精製した *L. brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼは、グルタミン酸のみを基質とし、他のアミノ酸は基質としなかった。また、本酵素のD-グルタミン酸及びL-グルタミン酸に対する K_m と V_{max} がそれぞれほぼ同じ値であったことは、本酵素のD-及びL-グルタミン酸に対する反応性が等しいことを示す。これらの性質は、他の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼの性質と同じである (Table 3-5)。一方、*E. coli* の *murI* 遺伝子産物は、D-及びL-グルタミン酸に対する K_m と V_{max} が大きく異なり、乳酸菌由来の酵素と性質が異なる⁶¹⁾。

Table 3-5 グルタミン酸ラセマーゼの酵素的性質の比較

strain	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 8287	<i>Pediococcus pentosaceus</i> IFO 3182	<i>Lactobacillus fermenti</i> ATCC 9338	<i>Lactobacillus arabinosus</i> ATCC 8014	<i>Escherichia coli</i> K-12 <i>murI</i> ⁵⁾	<i>Streptococcus thermophilus</i> IAM 10064
enzyme	Glu racemase ¹⁾		Glu racemase ²⁾	Glu racemase ³⁾	Glu racemase ⁴⁾	(Glu racemase) Asp racemase ⁶⁾
molecular weight	29,426	29,142	28,312	-	31,503	27,881
amino acid content	276	265	268	-	289	243
specific activity [units/mg]	216	121	161	92	-	29.8
K_m [mM] (D-Glu)	5.94	14	0.24 ⁸⁾	3.6	4	-
(L-Glu)	6.39	10	0.33 ⁸⁾	-	14	-
V_{max} [μ mole/mg/min] (D-Glu)	208	(40) ⁷⁾	-	-	5.9	-
(L-Glu)	206	(30) ⁷⁾	-	-	18.7	-
optimal pH	8.5	8.0	7.4	7.5	7.8	8.5

1) *E. coli* 組換え菌にて生産した酵素を利用, 37℃にて反応。

2) *E. coli* 組換え菌にて生産した酵素を利用²⁰⁾, 37℃にて反応。

3) *E. coli* 組換え菌にて生産した酵素を利用²⁰⁾, 30℃にて反応。

4) *L. arabinosus* の生産する酵素を利用¹⁶⁾, 37℃にて反応。

5) *E. coli* 組換え菌にて生産した酵素を利用⁶⁰⁾, 37℃にて反応。

6) *E. coli* 組換え菌にて生産した酵素を利用⁶²⁾, 30℃にて反応。

7) *P. pentosaceus* の生産する酵素を利用¹⁹⁾, 37℃にて反応。

8) *L. fermenti* の生産する酵素を利用した場合のD-グルタミン酸に対する K_m は 22 mM¹⁹⁾。

L. brevis ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼの比活性とKmは、Table 3-5に示すように他のグルタミン酸ラセマーゼとほぼ同等であったことから、活性測定条件におけるグルタミン酸をラセミ化する触媒としての能力に大差はないと考えられる。しかし、Table 3-5に示す他のグルタミン酸ラセマーゼは比較的低い基質濃度で用いているため、工業的な利用の可能性については判断し難い。一方、本研究で用いた *L. brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼは、高基質濃度 (L-グルタミン酸 300 g/l) でも基質阻害を受けないという工業的な利用に適した性質を持っていた。

3-4-3 グルタミン酸ラセマーゼの補因子

アミノ酸ラセマーゼの多くは補酵素としてPLPを要求するが⁸¹⁻⁸⁴⁾、プロリンラセマーゼ⁸⁰⁾、アスパラギン酸ラセマーゼ⁶⁸⁾のように補酵素を必要としない酵素も知られる。中島らは、*P. pentosaceus* IFO 3182のグルタミン酸ラセマーゼは補酵素を含まないことを示した²⁰⁾。田中らは、*L. fermenti* ATCC 9338のグルタミン酸ラセマーゼは補酵素としてFADを持つことを示唆した¹³⁻¹⁴⁾。一方、Divenらは、同じ *L. fermenti* ATCC 9338のグルタミン酸ラセマーゼの補酵素FADについて異なる結果を報告したが、補酵素の有無については調べていない¹⁵⁾。Galloらは、同じ *L. fermenti* ATCC 9338のグルタミン酸ラセマーゼについて補酵素の関与しない反応機構を提案している³⁰⁻³²⁾。

本研究で検討した *L. brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼは、補酵素類の添加による活性の変化はなく、補酵素としてPLPを有する場合に特徴的な吸収極大は認められなかったことから、補酵素非依存型ラセマーゼであると考えられる。また、本酵素はキレート剤によって阻害されなかったことから、活性に関与する金属は持たないと考えられる。以上のことから、本酵素は他の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼと同様に補因子を持たないと考えられる。

3-4-4 グルタミン酸ラセマーゼのアミノ酸配列

L. brevis ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼは、他の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼと同様に補酵素非依存性の酵素であると考えられる。そこで、本酵素のアミノ酸配列と、アミノ酸配列が明らかになっている *P. pentosaceus* IFO 3182⁸⁰⁾ と *L. fermenti* ATCC 9338³⁰⁾ の補酵素非依存性のグルタミン酸ラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼ活性を有する *E. coli* の *murl* 遺伝子産物⁶²⁾、乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* IAM 10064の補酵素非依存性のアスパラギン酸ラセマーゼ⁶⁷⁾、*Clostridium sticklandii* ATCC 13662の補酵素非依存性のプロリンラセマーゼ (後述、第4章)、*Pseudomonas* sp. NS671 のヒダントインラセマーゼ¹²⁶⁾ のアミノ酸配列との比較を行った。

アミノ酸配列の比較の結果、*L. brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼは、*P.*

Pentosaceus IFO 3182、*L. fermenti* ATCC 9338のグルタミン酸ラセマーゼと比較的高い相同性(46%, 42%)を示した(Fig. 3-18)。したがって、乳酸菌においてグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子が比較的良好に保存されており、酵素は類似した構造を有することが考えられる。

L. brevis ATCC 8287のグルタミン酸ラセマーゼと、*E. coli*の*murI*遺伝子産物、*S. thermophilus* IAM 10064のアスパラギン酸ラセマーゼ、*Pseudomonas* sp. NS671のヒダントインラセマーゼとアミノ酸配列の相同性は各々35%, 28%, 26%であったが、他の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼを含めて相

```

1 : MQNDPIGLMD SGVGGLTVLK EVQRLPTEN TVFLGDQARL PYGPRSAEV TMFTKQIAQF
  * * * * *
1 : MDNRPIGMD SGVGGLTVVK QLKNCYLMKK LSLLEMKQEM PYGPRPTAEV VEVSRQMASF
  * * * * *
1 : MDNRPIGMD SGLGGLSVLR VIQQLPNEE VIFVGDQGHF PYGTDQAEV RQLALSIGAF

61 : LRQQARIKAL VIACNTATAA ALTTMQQTLP IPVIGVIAPG AQAAVQTTRN HRIGVIATAG
  * * * * *
61 : LMTKN-IKAL VIACNTATNA ALAVLQAEPL IPVIGMILPG AIAANRQTKN QKIGVIATLG
  * * * * *
61 : L-LKHDVKMM VVACNTATAA ALPALQAALP IPVIGVIEPG ARAALAQDKK GPIGVIATTA

121 : TVKSDQYRRD ILAAAPNSQI FSVACPEMVT LAEQNDLTTT HAQSVVAANL ASLMDKKIDT
  * * * * *
120 : TIKSEAYPKA LAEINTKLR YPVACQEFVE IAEKNELHTT AAQKVHNEKL AEFQDQIDT
  * * * * *
120 : TTTAGAYPAT IERLAPGTPV IAKATQPMVE IVEHGQTGTA KAQEVVSEQL MTFKEHPVKT

181 : LVMGCTHFPL LRSAIQHAVG SQVTLVDPGL ATAEQTVAIL KTRGLLSNAT TRGTAQFFTT
  * * * * *
180 : LILGCTHFPL LEEGIQAAVG PDVTLVDPGV ETVHQLIEIL TKQALQHAEG PKAQDQYYST
  * * * * *
180 : LIMGCTHFPF LAPEISKAVG PTVALVDPK ETVATAKSWL EQHQAMGNRA HPNYHL-YST

241 : GETDQFDTLA SQWLDQQPT AKHVAIAQLT TPMEVN
  * * * * *
240 : GNIKNFEEIA RTFLNQDLRV EEVKID
  * * * *
239 : GNLPDLRAGV NKWLLSGHFD LGTAQIEEGD
  
```

Fig. 3-18 乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼのアミノ酸配列の比較
上段, *L. brevis* ATCC8287; 中段, *P. pentosaceus* IFO 3182²⁸; 下段, *L. fermenti* ATCC 9338³⁹.

同性の高い部分が2箇所存在した (Fig. 3-19)。この相同性の高い部分には、活性に重要と思われるシステイン残基が存在する。Tannerらは、*L. fermenti* ATCC 9338のグルタミン酸ラセマーゼについて、この2つのシステイン残基をアラニンに変換することにより活性を失ったことから、ラセミ化反応にはこの2つのシステイン残基が関与すると結論した³²⁾。また、Choiらは、*P. pentosaceus* IFO 3182のグルタミン酸ラセマーゼのシステイン残基を化学的に修飾することにより酵素が失活したことから、ラセミ化反応にはシステイン残基が関与すると結論した²⁵⁾。一方、本研究で精製した*L. brevis* ATCC 8287のグルタミン酸ラセマーゼは酸化に弱く、酵素を安定化するために2-メルカプトエタノールの添加が必要であった。また、本酵素はSH酵素の阻害剤であるPCMBなどにより強く阻害されたが、2-メルカプトエタノールにより阻害を回避することが可能であった。これらの結果から、本酵素も活性に関与するシステイン残基を持つと考えられる。以上のことから、システイン残基を含む2箇所の良く保存された領域は補酵素非依存性アミノ酸ラセマーゼの活性中心であり、これらの酵素のラセミ化反応の機構も類似しているものと思われる。

C. sticklandii ATCC 12662のプロリンラセマーゼについては、相同性の高い部分を見出せなかった。

乳酸菌が有する補酵素非依存性の乳酸ラセマーゼとの比較も興味を持たれるが、現在までにその一次構造は明らかにされていない^{87,88)}。

<i>L. brevis</i> Glu racemase	(67)	IKALVIACNTATAAALT	(180)	TLVMGCTHFPLLR
		*****		** *****
<i>P. pentosaceus</i> Glu racemase ⁸⁰⁾	(66)	IKALVIACNTATNAALA	(179)	TLILGCTHFPLLE
		* * *****		** ***** *
<i>L. fermenti</i> Glu racemase ³⁰⁾	(66)	VKMMVVACNTATAAALP	(179)	TLIMGCTHFPLLA
		* ***** *		* ***** *
<i>E. coli</i> mur 1 gene ⁶²⁾	(89)	LALAVVACNTASTVSLP	(203)	TVVLGCTHFPLLQ
		* *****		***
<i>S. thermophilus</i> Asp racemase ⁶⁷⁾	(77)	PNFIVLTCNTAHYFFEE	(192)	KVILGCTELSLMN
		* *****		**
<i>Pseudomonas</i> sp. hydantoin racemase ¹²⁶⁾	(69)	VDAFVIACWGDPLHAA	(176)	AILLGCAGMAEFA

Fig. 3-19 補酵素非依存性アミノ酸ラセマーゼの相同領域

L. brevis のグルタミン酸ラセマーゼを基準に一致するアミノ酸残基を*印で示す。

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

アミノ酸ラセマーゼはアミノ酸の不斉 α -炭素に作用してラセミ体を生成する反応を触媒する。

多くのアミノ酸ラセマーゼは補酵素としてPLPを有し、PLPと基質が Schiff 塩基を形成することにより基

質を活性化して α -水素を引き抜きやすい状態とする⁸¹⁻⁸⁴⁾。しかし、*L. brevis* ATCC 8287 を含む乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼはPLPなどの補酵素を持たないため、PLPと基質のシッフ塩基を形成せずに α -炭素を活性化することになる。この乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼの α -水素の引き抜き機構は解明されつつある。ラセミ化反応における α -水素の引き抜き機構には、1塩基性残基関与の反応と2塩基性残基関与の反応が考えられる(Fig. 3-20)。Choiらは、*P. pentosaceus* IFO 3182のグルタミン酸ラセマーゼについて重水、三重水中で反応を行い、旋光度変化におけるオーバーシュート現象、及び生成物のみが標識される現象を確認し、2塩基性残基が関与する反応を予測した²⁵⁾。Galloらも、*L. fermenti* ATCC 9338のグルタミン酸ラセマーゼについて同様の現象を確認し、さらに2つのシステイン残基が関与することを示した³¹⁾。同様に、Yamauchiらは、乳酸菌のグルタミン酸ラセマーゼと2つのシステイン残基付近のアミノ酸配列に相同性がある*S. thermophilus* IAM 10064のアスパラギン酸ラセマーゼについても、2塩基性残基が関与する反応を予測した⁶⁸⁾。

L. brevis ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼは、補酵素を持たず、活性に関与するSH基を有するなどの性質、及び活性に関与すると予想されるシステイン残基周辺のアミノ酸配列が他の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼと良く似ていることから、2つのシステイン残基が関与する2塩基性残基関与の反応機構が予想される。

L. brevis ATCC 8287 を含む乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼの結晶化はいまだに成功していないが、今後の研究の展開には三次構造の決定が必要であると思われる。

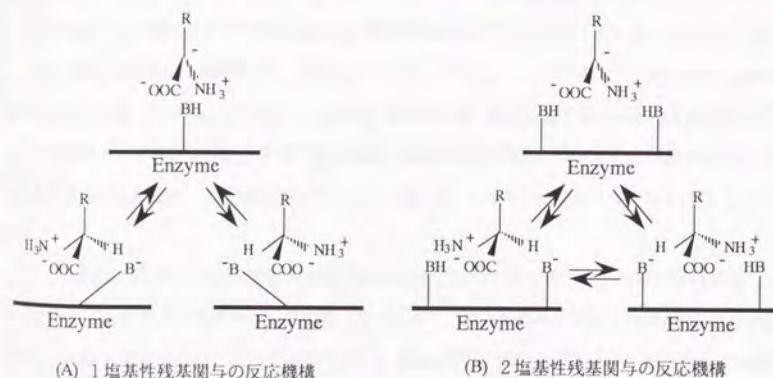


Fig. 3-20 アミノ酸のラセミ化における水素引き抜き機構

3-4-6 グルタミン酸ラセマーゼの生理的意義

グルタミン酸ラセマーゼは乳酸菌に分布が限られるとされている^{8,21,30}。本研究で多数の乳酸菌のグルタミン酸ラセマーゼ活性を評価し70株中64株に活性を検出した事実は、グルタミン酸ラセマーゼが乳酸菌に広く存在することを裏付けると考えられる。

乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼについては、本研究で明らかにした*Lactobacillus brevis* ATCC 8287 由来のグルタミン酸ラセマーゼ以外に、他のグループで *Pediococcus pentosaceus* IFO 3182^{20,21}, *Lactobacillus fermenti* ATCC 9338^{8-14,30} 由来の酵素の性質について詳細に検討されているが、生体内における本酵素の役割は明らかにされていない。グルタミン酸ラセマーゼは生体内に普遍的に存在するL-グルタミン酸に作用して存在が限られるD-グルタミン酸を生成することから、本酵素の役割として細菌の細胞壁ペプチドグリカンの必須構成成分であるD-グルタミン酸の生成が考えられる。

Bacillus 属細菌では、アラニンラセマーゼによりL-アラニンからD-アラニンを生成し、この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-グルタミン酸を生成することが知られている^{8,71,79}。*Bacillus* 属細菌では、この経路で生成したD-グルタミン酸が細胞壁ペプチドグリカンの構成に用いられる可能性が考えられる。したがって、ペプチドグリカン構成成分としてのD-グルタミン酸生合成経路は、細菌の種類によって異なる可能性が考えられる。

最近、*E. coli* WM335のD-グルタミン酸要求性を相補する遺伝子として *murf* 遺伝子が分離され、グルタミン酸ラセマーゼ活性を持つことが示された^{58,65}。*murf* 遺伝子産物は、*E. coli* においてペプチドグリカンの生合成に関与すると考えられている⁶¹ (Fig. 3-21)。*murf* 遺伝子産物と乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼのアミノ酸配列には、相同性が高い部分が存在する²⁹ (前述3-4-4)。さらに、吉村らは、この相同性が高いアミノ酸配列から設計したプライマーを用いたPCR法にて、*Pseudomonas putida* と *Staphylococcus aureus* にもグルタミン酸ラセマーゼと相同性が高い配列を持つ遺伝子の存在を確認した²⁹。これらの事実から、グルタミン酸ラセマーゼは細菌に比較的広く存在し、D-グルタミン酸の生合成に関与している可能性が示唆され、乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼもこのグループに含まれることが予想される。

しかし、*E. coli* の *murf* 遺伝子産物の活性発現にはペプチドグリカン構成成分前駆体であるUDP-N-アセチルムラモイル-L-アラニンを必要とすること⁶¹、*E. coli* の *murf* 遺伝子上流1 kb以内には明瞭なリボソーム結合配列が見出せないが⁶⁵ 少なくとも *L. brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子上流にはこの配列が存在することなどの相違点もある。また、PCR法にて存在を確認したグルタミン酸ラセマーゼと相同性が高い *P. putida*, *S. aureus* の遺伝子及び遺伝子産物の性質も明らかにされていない。このことから、乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼは、ペプチドグリカン構成成分としてのD-グルタ

ミン酸の生合成以外に特別な役割を持つ可能性も考えられる。

今後、乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼの諸性質と遺伝子発現制御の解析、本酵素の欠損変異株の取得とその諸性質の検討、ペプチドグリカン構成成分としてのD-グルタミン酸生合成経路の解明、そして他の細菌由来のグルタミン酸ラセマーゼ活性を有する酵素の諸性質との比較により、本酵素の役割が明らかにされると思われる。

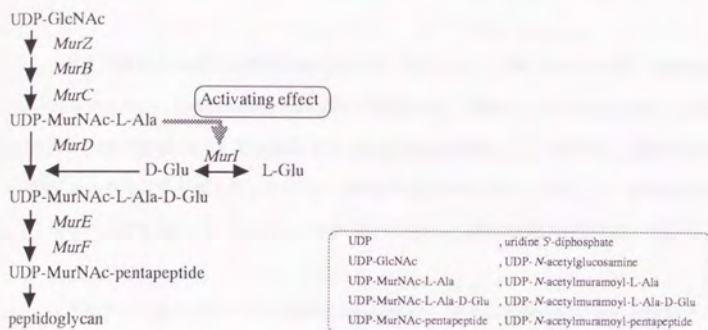


Fig. 3-21 *E. coli* におけるD-グルタミン酸の生合成とペプチドグリカン生合成への利用⁶¹⁾

3-5 まとめ

1 L-グルタミン酸を原料に、グルタミン酸ラセマーゼによるラセミ化とL-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼによるL-グルタミン酸の選択的分解の2段階の酵素反応によるD-グルタミン酸の製造法の検討をした。

2 第1段階のグルタミン酸のラセミ化に用いるグルタミン酸ラセマーゼを、乳酸菌についてスクリーニングを行い、*Lactobacillus brevis* ATCC 8287 から、菌体当たりの活性が高く、高基質濃度（L-グルタミン酸 200 g/l 以上）でも機能する良好な酵素を取得した。本菌株は、同時に良好なグルタミン酸デカルボキシラーゼも持っていた。両酵素の反応pHの違いを利用して、本菌株を用いて連続して2段階の反応を行い、L-グルタミン酸からD-グルタミン酸の生産が可能になった。

3 グルタミン酸ラセマーゼ生産菌 *L. brevis* ATCC 8287 の多量の菌体取得が困難であることを解決するために、グルタミン酸ラセマーゼの *E. coli* 組換え体での生産を検討した。*E. coli* のL-グルタミン酸要求性変異株の要求性相補を利用して本酵素の遺伝子を取得し、*L. brevis* ATCC 8287 の約150倍の菌体活性で本酵素の生産が可能になった。本酵素は、*E. coli* 組換え体において自己のプロモーターを用いて発現した。組換え体 *E. coli* TM93/pGAR1 が生産するグルタミン酸ラセマーゼを用いることにより、効率的な第1段階のL-グルタミン酸のラセミ化反応が可能になった。

4 *E. coli* 組換え体からグルタミン酸ラセマーゼを電気泳動的に単一に精製し、諸性質を調べた。本酵素は、補酵素非依存性のラセマーゼであり、活性に関与するSH基を有することが示唆された。これらの性質は、既知の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼと同じであった。また、本酵素は高い基質濃度（L-グルタミン酸 300 g/l）でも基質阻害による活性低下は認められず、工業的利用に適した特徴を持っていた。

5 *L. brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子の全塩基配列を明らかにした。本酵素のアミノ酸配列は、既知の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼと高い相同性を示した。また、本酵素と、既知の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼ、*E. coli* のグルタミン酸ラセマーゼ活性を有する *mufI* 遺伝子産物、及び乳酸菌由来のアスパラギン酸ラセマーゼとのアミノ酸配列の比較で、2

菌所の良く保存されたシステイン残基を含むアミノ酸配列を見出した。この部分が、ラセミ化活性に重要な部位であると予想される。

6. L-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼの高い活性生産菌を得るために、本酵素を生産することが知られる *E. coli* の評価を行い、*E. coli* ATCC 11246 を選択した。本菌株のL-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼは、*L. brevis* ATCC 8287 の約11倍の菌体活性であった。本菌株を用いることにより、効率的な第2段階のL-グルタミン酸の選択的分解反応が可能になった。

7. *E. coli* TM93/pGAR1によるL-グルタミン酸のラセミ化、及び *E. coli* ATCC 11246によるDL-グルタミン酸中のL-グルタミン酸の選択的分解により、100 g/lのL-グルタミン酸から光学純度99%以上のD-グルタミン酸50 g/lの生産に成功した。

8. 以上の検討の結果、L-グルタミン酸からD-グルタミン酸を効率的に生産する工業的なプロセスを完成した。

3-6 文献

- 1) **Bachmann, B.** (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
- 2) **Roth, M., and Hampa, A.** (1973) Column chromatography of amino acids with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **83**:353-356.
- 3) **Saito, H., and Miura, K.** (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **72**:619-629.
- 4) **Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.** (1989) Molecular cloning a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 5) **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.
- 6) **田中正生, 長野雄治, 木下祝郎** (1960) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第1報) グルタミン酸の酵素による新ラセミ分割法. *日本農芸化学会誌* **34**:737-740.
- 7) **田中正生, 加藤洋, 木下祝郎** (1960) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第2報) DL-グルタミン酸の酵素の光学活性化. *日本農芸化学会誌* **34**:740-745.
- 8) **田中正生, 加藤洋, 木下祝郎** (1960) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第3報) 細菌によるグルタミン酸のラセミ化. *日本農芸化学会誌* **34**:852-856.
- 9) **田中正生** (1960) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第4報) 乳酸菌の生産するアミノ酸ラセマーゼ. *日本農芸化学会誌* **34**:1022-1027.
- 10) **田中正生** (1961) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第5報) グルタミン酸ラセマーゼの阻害について. *日本農芸化学会誌* **35**:210-212.
- 11) **田中正生** (1961) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第6報) グルタミン酸ラセマーゼによるラセミ化反応について. *日本農芸化学会誌* **35**:557-561.
- 12) **田中正生, 加藤洋, 木下祝郎** (1961) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第7報) グルタミン酸ラセマーゼの精製とその性質. *日本農芸化学会誌* **35**:1378-1381.
- 13) **田中正生, 加藤洋, 木下祝郎** (1961) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第8報) グルタミン酸ラセマーゼの配合群について. *日本農芸化学会誌* **35**:1381-1385.
- 14) **Tanaka, M., Kato, Y., and Kinoshita, S.** (1961) Glutamic acid racemase from

- Lactobacillus fermenti* purification and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**:114-117.
- 15) **Diven, W.F.** (1969) Studies on the amino acid racemase. II. Purification and properties of glutamate racemase from *Lactobacillus fermenti*. *Biochim. Biophys. Acta* **191**:702-706.
- 16) **Ayengar, P., and Roberts, E.** (1952) Utilization of D-glutamic acid by *Lactobacillus arabinosus*. Glutamate racemase. *J. Biol. Chem.* **197**:453-460.
- 17) **Narrod, S.A., and Wood, W.A.** (1952) Evidence for glutamic acid racemase in *Lactobacillus arabinosus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **35**:462-465.
- 18) **Glaser, L.** (1960) Glutamic acid racemase from *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.* **235**:2095-2098.
- 19) **Glaser, L.** (1970) Glutamic acid racemase (*Lactobacillus plantarum*). p. 873-877. In Tabor, H., Tabor, C.W. (ed.), Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., *Methods in enzymology*, vol. **17**, part A. Academic Press Inc., New York.
- 20) **Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K.** (1986) Cloning and expression in *Escherichia coli* of glutamate racemase gene from *Pediococcus pentosaceus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**:2823-2830.
- 21) **Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K.** (1988) Distribution of glutamate racemase in lactic acid bacteria and further characterization of the enzyme from *Pediococcus pentosaceus*. *Agric. Biol. Chem.* **52**:3099-3104.
- 22) **Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K.** (1988) Enantioselective synthesis of various D-amino acids by multi-enzyme system. *J. Biotechnol.* **8**:243-248.
- 23) **Esaki, N., Nakajima, N., Nakamura, K., Yonaha, K., Tanaka, H., and Soda, K.** (1990) Preparation of stereoselectively-deuterated NADH and NADPH by coupling of glutamate racemase and glutamate dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.* **12**:105-110.
- 24) **Choi, S.Y., Esaki, N., Yoshimura, T., and Soda, K.** (1991) Overproduction of glutamate racemase of *Pediococcus pentosaceus* in *Escherichia coli* clone cells and its purification. *Protein Expression and Purification.* **2**:90-93.
- 25) **Choi, S.Y., Esaki, N., Yoshimura, T., and Soda, K.** (1992) Reaction mechanism of glutamate racemase, a pyridoxal phosphate-independent amino acid racemase. *J. Biochem.* **112**:139-142.

- 26) **Ashiuchi, M., Yoshimura, T., Esaki, N., Ueno, H., and Soda, K.** (1993) Inactivation of glutamate racemase of *Pediococcus pentosaceus* with L-serine *o*-sulfate. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**:1978-1979.
- 27) 中島伸佳, 谷沢克行, 田中英彦, 左右田健次 (1987) 乳酸菌のグルタミン酸ラセマーゼの酵素化学的研究とその応用. *発酵と工業* **45**:360-361.
- 28) 中島伸佳, 左右田健次 (1987) ピリドキサルリン酸比依存性アミノ酸ラセマーゼ. *化学* **43**:212-213.
- 29) 吉村徹, 左右田健次 (1994) グルタミン酸ラセマーゼの構造と機能. *バイオサイエンスとインダストリー* **52**:34-36.
- 30) **Gallo, K.A., and Knowles, J.R.** (1993) Purification, cloning, and cofactor independence of glutamate racemase from *Lactobacillus*. *Biochemistry* **32**:3981-3990.
- 31) **Gallo, K.A., Tanner, M.E., and Knowles, J.R.** (1993) Mechanism of the reaction catalyzed by glutamate racemase. *Biochemistry* **32**:3991-3997.
- 32) **Tanner, M.E., Gallo, K.A., and Knowles, J.R.** (1993) Isotope Effects and the identification of catalytic residues in the reaction catalyzed by glutamate racemase. *Biochemistry* **32**:3998-4006.
- 33) **Hoopes, B.C., and McClure, W.R.** (1987) Strategies in regulation of transcription initiation., p. 1231-1240. In Neidhardt, F., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- 34) **Gold, L., and Stormo, G.** (1987) Translational Initiation., p. 1302-1307. In Neidhardt, F., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- 35) **Galas, D.J., Eggert, M., and Waterman, M.S.** (1985) Rigorous pattern-recognition methods for DNA sequences. Analysis of promoter sequences from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **186**:117-128.
- 36) **Shine, J., and Dalgarno, L.** (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:1342-1346.

- 37) **Russell, D.R., and Bennett, G.N.** (1982) Construction and analysis of in vivo activity of *E. coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. *Gene* **20**:231-243.
- 38) **Cowing, D.W., Bardwell, J.C.A., Craig, E.A., Woolford, C., Hendrix, R.W., and Gross, C.A.** (1985) Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:2679-2683.
- 39) **Hawley, D.K., and McClure, W.R.** (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acid Res.* **11**:2237-2255.
- 40) **Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B.S., and Stormo, G.** (1981) Translational initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**:365-403.
- 41) **Shassy, B.M., and Murphy, C.M.** (1993) *Lactococcus* and *Lactobacillus*. p. 65-82. In Sonenshein, A.L., and Losick, R. (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- 42) **Matern, H.T., Klein, J.R., Henrich, B., and Plapp, R.** (1994) Determination and comparison of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM7290 promoter sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**:121-128.
- 43) **Johnson, R.J., and Metzler, D.E.** (1970) Analyzing spectra of vitamin B₆ derivatives. p. 433-471. In McCormick, D.B., Wright, L.D. (ed.), Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., *Methods in enzymology*, vol. **18**, part A. Academic Press Inc., New York.
- 44) **Najjar, V.A., and Fisher, J.** (1952) Glutamic acid decarboxylase from *E. coli*. *Fed. Proc.* **11**:264.
- 45) **Najjar, V.A., and Fisher, J.** (1954) Studies on L-glutamic acid decarboxylase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**:215-219.
- 46) **Gale, E.F.** (1945) Studies on bacterial amino-acid decarboxylase. 5. The use of specific decarboxylase preparation in the estimation of amino-acids and in protein analysis. *Biochem. J.* **39**:46-52.
- 47) **Taylor, E.S., and Gale, E.F.** (1945) Studies on bacterial amino-acid decarboxylase. 6. Codecarboxylase content and action of inhibitors. *Biochem. J.* **39**:52-58.
- 48) **Yo, C.M.** (1971) Quaternary structure of glutamate decarboxylase of *Escherichia coli* as

- revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **59**:215-217.
- 49) **Strausbuch, P.H., and Fischer, E.H.** (1967) Crystallization and properties of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli* strain W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**:525-530.
- 50) **Marcus, M., and Halpern, Y.S.** (1967) Genetic analysis of glutamate transport and glutamate decarboxylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**:1409-1415.
- 51) **Marcus, M., and Halpern, Y.S.** (1967) Genetic and physiological analysis of glutamate decarboxylase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **93**:1509-1510.
- 52) **Strausbuch, P.H., and Fischer, E.H.** (1970) Chemical and physical properties of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *Biochemistry* **9**:226-232.
- 53) **Shukuya, R., and Schwert, C.W.** (1960) Glutamic acid decarboxylase. 1. Isolation procedures and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **235**:1649-1652.
- 54) **Shukuya, R., and Schwert, C.W.** (1960) Glutamic acid decarboxylase. 2. The spectrum of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **235**:1653-1657.
- 55) **Shukuya, R., and Schwert, C.W.** (1960) Glutamic acid decarboxylase. 3. The inactivation of the enzyme at low temperatures. *J. Biol. Chem.* **235**:1658-1661.
- 56) **Roberts, E.** (1957) Inhibition of bacterial glutamic decarboxylase by hydroxylamine. *J. Biol. Chem.* **198**:495-500.
- 57) **Umbert, W.W., and Gunsalus, I.C.** (1945) The function of pyridoxine derivatives. Arginine and glutamic acid decarboxylases. *J. Biol. Chem.* **159**:333-341.
- 58) **Doublet, P., van Heijenoort, J., and Mengin-Lecreulx, D.** (1992) Identification of the *Escherichia coli* *murI* gene, which is required for the biosynthesis of D-glutamic acid, a specific component of bacterial peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **174**:5772-5779.
- 59) **Doublet, P., van Heijenoort, J., Bohin, J.-P., and Mengin-Lecreulx, D.** (1992) The *murI* gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity. *J. Bacteriol.* **175**:2970-2979.
- 60) **Doublet, P., van Heijenoort, J., and Mengin-Lecreulx, D.** (1993) Identification of the *murI* 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.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) 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.
- 64) 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.
- 65) 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.
- 66) Okada, H., Yohda, M., Giga-Hama, Y., Ueno, Y., Ohdo, S., and Kumagai, H. (1991) Distribution and purification of aspartate racemase in lactic acid bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1078:377-382.
- 67) Yohda, M., Okada, H., and Kumagai, H. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the aspartate racemase gene from lactic acid bacteria *Streptococcus thermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1089:234-240.
- 68) Yamauchi, T., Choi, S.-Y., Okada, H., Yohda, M., Kumagai, H., Esaki, N., and Soda, K. (1992) Properties of aspartate racemase, a pyridoxal 5'-phosphate-independent amino acid racemase. *J. Biol. Chem.* 267:18361-18364.
- 69) 田中博己, 岡田宏文, and 王堂哲 (1990) 公開特許公報 平2-171195. アスパラギン酸のラセミ化法.
- 70) Lamont, H.C., Staudenbauer, W.L., and Strominger, J.L. (1972) Partial purification and characterization of an aspartate racemase from *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 247:5103-5106.
- 71) 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.
- 72) Martinez-Carrion, M., and Jenkins, W.T. (1965) D-Alanine-D-glutamate transaminase. I. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **240**:3538-3546.
- 73) 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.
- 74) 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.
- 75) Yonaha, K., Misono, H., Yamamoto, T., and Soda, K. (1975) D-Amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. *J. Biol. Chem.* **250**:6983-6989.
- 76) Yonaha, K., Misono, H., and Soda, K. (1975) Reconstitution of D-amino acid aminotransferase. *FEBS Lett.* **55**:265-267.
- 77) 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.
- 78) 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.
- 79) 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.
- 80) Cardinale, G.J., and Abeles, R.H. (1968) Purification and mechanism of action of proline racemase. *Biochemistry* **7**:3970-3978.
- 81) 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.
- 82) 左右田健次 (1976) アミノ酸ラセマーゼとアミノ酸エピメラーゼ. p. 433-471. In 山川民夫, 今堀和友, 西塚泰美, 早石修, 和田博 (ed.), 生化学実験講座, **11**, アミノ酸代謝

- と生体アミン(上), 東京化学同人, 東京.
- 83) 左右田健次 (1974) アミノ酸ラセマーゼ. 生化学 46:203-222.
 - 84) 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.
 - 85) Smith, D.K., Kassam, T., Aingh, B., and Elliott, J.F. (1992) *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes the map to distinct loci. *J. Bacteriol.* 174:5820-5826.
 - 86) Choi, S.-Y., Esaki, N., Ashiuchi, N., Yoshimura, T., and Soda, K. (1994) Bacterial glutamate racemase has high sequence similarity with myoglobin and forms an equimolar inactive complex with hemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10144-10147.
 - 87) Hiyama, T., Fukui, S., and Kitahara, K. (1968) Purification and properties of lactate racemase from *Lactobacillus sake*. *J. Biochem.* 64:99-107.
 - 88) Stetter, K.O., and Kandler, O. (1973) Untersuchungen zur entstehung von DL-milchsäure bei *Lactobacillen* und charakterisierung einer milchsäureracemase bei einigen arten der untergattung *Streptobacterium*. *Arch. Mikrobiol.* 94:221-241.
 - 89) 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.
 - 90) Corrigan, J.J. (1969) D-Amino acid in animals. *Science* 164:142-149.
 - 91) Orlowski, M., and Meister, A. (1971) Enzymic formation of pyrrolidone carboxylic acid from glutamic acid. p. 133-136. In Boyer, P.D. (ed.), The enzymes, vol. 4, 3rd ed., Academic Press Inc., New York and London.
 - 92) 左右田健次 (1977) D-アミノ酸の生化学 (I). 化学 32:517-526.
 - 92) 左右田健次 (1977) D-アミノ酸の生化学 (II). 化学 32:627-635.
 - 93) 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.
 - 94) 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-アミノ酸の製造法.
 - 95) 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63-112978. D-アミノ酸の製造法.

- 96) 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.
- 97) Yokozeki, K., Nakamori, S., Yamanaka, S., Eguchi, C., Mitsugi, K., and Yoshinaga, F. (1987) Optimal conditions for the enzymatic production of D-amino acids from the corresponding 5-substituted hydantoins. *Agric Biol. Chem.* **51**:715-719.
- 98) Yokozeki, 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.
- 99) 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.
- 100) 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.
- 101) 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.
- 102) 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.
- 103) 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.
- 104) 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.
- 105) 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.
- 106) 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.
- 107) 佐藤治代, 伊藤則子, and 今村伸三 (1989) 公開特許公報 昭64-2595. D-グルタミン酸の製造法.
- 108) 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.
- 109) 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.

- 110) 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.
- 111) 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・グルタミン酸からL(+)-グルタミン酸を製造する方法.
- 112) 崎浴幾雄, 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.
- 113) Yamada, S., Hongo, C., Yoshioka, R., and Chibata, I. (1983) Method for racemization of optically active amino acids. *J. Org. Chem.* 48:843-846.
- 114) 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.
- 115) 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.
- 116) 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.
- 117) 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.
- 118) 小笠原善久, 立道秀磨, 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.
- 119) 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.
- 120) Toi, K., Izumi, Y., and Akabori, S. (1963) A synthetic resins catalyzing racemization of amino acids. 1. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 36:1422-1423.
- 121) Chen, S.-T., Wu, S.-H., and Wang, K.-T. (1989) Rapid racemization of optically active amino acids by microwave oven-based heating treatment. *Int. J. Peptide Protein Res.* 33:73-75.
- 122) Dougherty, H.J., Thanassi, J.A., and Pucci, M.J. (1993) The *Escherichia coli* mutant requiring D-glutamic acid is the result of mutation in two distinct genetic loci. *J. Bacteriol.* 175:111-116.

- 123) Yamamoto, I., Abe, A., and Ishimoto, M. (1987) Properties of glutamate dehydrogenase purified from *Bacteroides fragilis*. *J. Biochem.* **101**:1391-1397.
- 124) Kusakabe, H., Midirikawa, Y., Fujishima, T., Kuninaka, A., and Yoshino, H. (1983) Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran. *Agric. Biol. Chem.* **47**:1323-1328.
- 125) 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.
- 126) Watanabe, K., Ishikawa, T., Mukohara, Y., and Nakamura, H. (1992) Identification and sequencing of gene encoding a hydantoin racemase from the native plasmid of *Pseudomonas* sp. strain NS671. *J. Bacteriol.* **174**:3461-3466.
- 127) Meister, A., Bukenberger, M.W., and Strassburger, M. (1963) The optically-specific cyclization of D-glutamate. *Biochem. Z.* **338**:217-229.

第4章 D-プロリン生産方法の開発

4-1 序論

4-1-1 D-プロリンの存在と生理的意義

微生物におけるD-プロリンの存在は限られており、麦角菌 (*Claviceps purpurea*) の生産するアルカロイドの一種のエルゴタミン (Fig. 4-1) に存在が知られる³⁹⁾。高等植物においては、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) (Fig. 4-1)⁴¹⁾やビワ種子中のトランス-4-ヒドロキシメチル-D-プロリン⁴²⁾などの存在が知られるが、動物におけるD-プロリンの存在の報告はない。これらの化合物の部分的な生理的作用は知られているが、実際の生理的役割はほとんどわかっていない。また、これらの化合物に含まれるD-プロリン構造の生合成経路もわかっていない。これらの生物については、遊離のD-プロリンやプロリンラセマーゼの存在は知られていないことから、化合物の生合成とD-プロリン構造の形成が同時に行われている可能性も予想される。

D-プロリンの生理的役割はほとんどわからないが、D-プロリンを用いて合成される化合物には有用な生理活性を持つものが存在する。したがって、D-プロリンは医薬品、農薬の製造原料としての用途がある有用な化合物である。

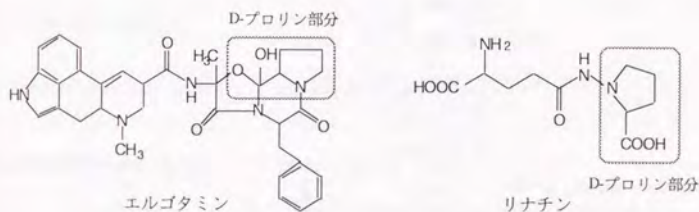


Fig. 4-1 植物由来のD-プロリンを含む化合物

4-1-2 D-プロリンの製造方法

従来のD-プロリンの製造方法としては、(1) L-オルニチンに *Proteus mirabilis* ATCC21136 の培養菌体を作用させてD-プロリンを生産する方法が知られる⁴³⁾。その他のD-プロリンの製造方法としては、(2) アセチル-DL-プロリンにD-アシラーゼを作用させる方法、(3) DL-オルニチンにD-オルニチンサイクラー

を作用させる方法、(4) DL-プロリンにL-プロリンオキシダーゼを作用させて残存するD-プロリンを取得する方法、(5) DL-プロリンにL-プロリンを選択的に分解する微生物を作用させて残存するD-プロリンを取得する方法、(6) DL-プロリンの優先品出やジアステレオマー形成法による光学分割⁴⁴⁻⁴⁶⁾などが考えられる (Fig. 4-2)。

これらのD-プロリン製造方法は、以下のような特徴を持つ。(1) L-オルニチンからD-プロリンを取得する方法は、原料が安価であるが反応率が低い⁴³⁾。また、この方法を追試した結果、物性がD-プロリンに非常に近い物質の生成を認めたがD-プロリンの生成は確認できなかった。(2) D-アシラーゼを作用させる方法は、比較的高い光学純度のD-プロリンを得ることができると考えられるが、アセチル-DL-プロリンは高価であり製造コストが高くなる。また、アセチル-D-プロリンを加水分解する酵素は知られていない。(3) D-オルニチンサイクラーゼを用いる方法は、原料となるDL-またはD-オルニチンを生産する必要があり、工程が複雑になる。また、L-オルニチンからL-プロリンを生成するL-オルニチンサイクラーゼは*Clostridium* 属に存在が知られるが²²⁻²⁵⁾、D-オルニチンを基質として反応する酵素は知られていない。(4) L-プロリンオキシダーゼを用いる方法も、比較的高い光学純度のD-プロリンを得ることができると考えられる。また、反応生成物の Δ^1 -ピロリン-2-カルボン酸を水素化ホウ素ナトリウムにてDL-プロリンにリサイクルできる利点がある⁶⁰⁾。プロリンオキシダーゼは*Bacillus subtilis* に存在が知られているが、光学選択性及びDL-プロリンの光学分割への利用についての報告はない⁴⁷⁾。(5) L-プロリン分解菌を用いる

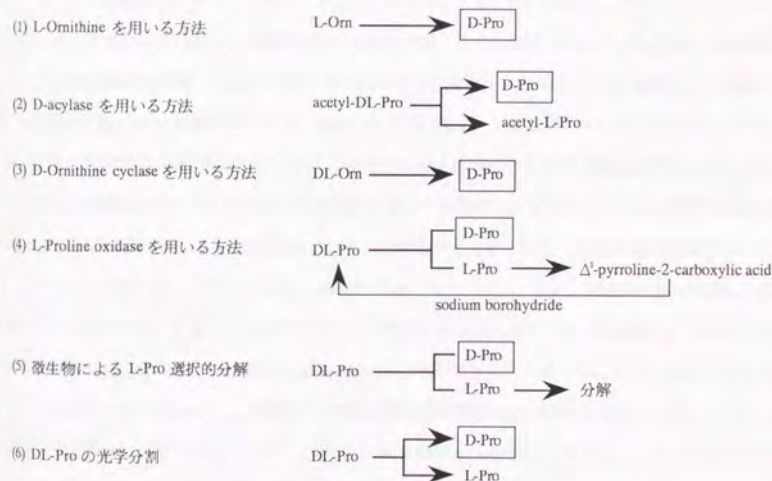


Fig. 4-2 D-プロリンの製造方法

DL-プロリンの光学分割法は、L-プロリンの分解生成物を有効に利用できないが、比較的高い光学純度のD-プロリンを得ることができると考えられる。また、L-プロリン分解能を持つ微生物は比較的容易に取得できることが予想される。(6) DL-プロリ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^{44,46)}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。

以上の製造方法から、プロセスの構築が比較的容易であり、反応系が簡単で、高い光学純度と反応収率を達成することが可能であると予想される、DL-プロリンにL-プロリン分解菌を作用させて残存するD-プロリンを取得する方法を選択した。また、DL-プロリンは、発酵法にて安価に生産されるL-プロリンをラセミ化して取得する方法が工業的に有利であると判断した。この結果、L-プロリンのラセミ化と、ラセミ体からのL-体の選択的除去の2段階反応によるD-プロリンの製造法を計画した。

4-1-3 D-プロリン製造の目的と方法

D-プロリンは、医薬品、農業などの合成原料として用いられる産業上有用な物質である。この用途の場合、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。そこで、光学選択性の高い微生物酵素を利用した2段階反応によるL-プロリンからのD-プロリンの製造法を考えた。

第1段階のL-プロリンのラセミ化には、化学的なラセミ化と酵素的なラセミ化が考えられる。プロリンの化学的ラセミ化法は、低級脂肪酸（特に氷酢酸）中で加熱する方法⁴⁸⁾、脂肪酸または芳香族アルデヒド存在下低級脂肪酸（特に氷酢酸）中で加熱する方法^{49,53)}、アセトン・酢酸溶液中で加熱する方法⁵⁰⁾、塩酸水溶液または水酸化ナトリウム水溶液中で加圧加熱する方法⁵²⁾、N-ベンゾイルアニリドとして有機溶媒中で加熱する方法⁵⁰⁾などが知られる。化学的ラセミ化液に含まれる有機溶媒やアルデヒドは、第2段階の微生物酵素を用いたL-体特異的除去反応を著しく阻害する。したがって、第2段階のL-体特異的除去反応の前に化学的ラセミ化液からDL-プロリンを精製する必要があり、製造工程が複雑になるため、化学的ラセミ化は好ましくない。一方、酵素的ラセミ化方法としては、*Clostridium sticklandii* ATCC 12662に唯一存在が知られるプロリンラセマーゼの利用が考えられる^{1-10,16)}。酵素的ラセミ化は、反応液を精製せずに第2段階のL-体特異的除去反応に用いることができると予想され、また、副反応による副産物の生成と収率の低下が少なく、有機溶媒、触媒の廃液処理問題もない良好な方法である。そこで、第1段階のL-プロリンのラセミ化は、プロリンラセマーゼを用いることとし、既知酵素の評価と新規酵素のスクリーニングから検討を開始することにした。

第2段階のDL-プロリンからのD-プロリンの取得には、高い光学純度と収率を達成するために、

立体特異的な微生物酵素を用いる方法を考えた。この目的に利用できると予想される既知酵素がないことから、光学選択的にL-プロリンを分解する微生物のスクリーニングから検討を開始することにした。

以上の2段階の酵素反応によるL-プロリンからのD-プロリンの製造方法の概念図をFig. 4-3に示す。

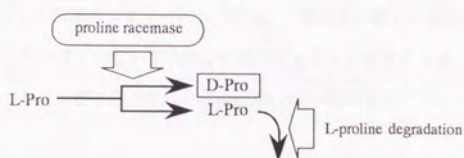


Fig. 4-3 酵素法によるL-プロリンからのD-プロリンの製造方法の概念図

4-2 実験方法及び材料

4-2-1 菌株

プロリンラセマ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 *Clostridium* 属菌株を用いた。プロリン分解菌のスクリーニングには、土壌から分離した菌株を用いた。プロリンラセマーゼ遺伝子クローニングの宿主には γ -グルタミルホスフェイリダクターゼ (EC 1.2.1.41) 遺伝子変異 (*proA2*)¹³⁾ により L-プロリン要求性となった *Escherichia coli* HB101 を用いた。

4-2-2 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-3 : (LB培地) 3-2-2 記載の培地-3 と同一

培地-4 : (M9培地) 3-2-2 記載の培地-4 と同一

培地-5 : グルコース 5 g/l, ペプトン 5 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 15.14 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 5 g/l, NH_4Cl 1 g/l, 微量金属溶液 1 ml/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g/l, チアミン-HCl 0.2 g/l, pH 7.2

培地-6 : GAMブイヨン培地 (日水製薬)

培地-7 : グルコース 10 g/l, ペプトン 10 g/l, 肉エキス 5 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, L-プロリン 10 g/l, pH 7.0

微量金属溶液 : 3-2-2 記載の微量金属溶液と同一

ビタミン溶液 : 3-2-2 記載のビタミン溶液と同一

4-2-3 培養条件

プロリンラセマーゼのスクリーニングには、培地-6を用いた。1 l 三角フラスコ中 500 ml の培地を 120 °C, 20 分間滅菌後、*Clostridium* 属細菌を植菌し、30~37 °C にて 24~48 時間、嫌気ポット内で BBL ガスパック嫌気システム $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ タイプ (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) を用いて嫌気的に静置培養を行った。スラント培養は、同培地に寒天を 15 g/l 添加したものをを用い、嫌気ポット内で BBL ガスパック嫌気システム $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ タイプを用いて嫌気的に穿刺培養を行った。

E. coli の培養は、培地-3 (LB培地) を用い、30 °C, 20~24 時間行った。培養は、8 ml の培地を試験管 (25 × 180 mm) にて振盪 (200 rpm)、あるいは、40 ml の培地を 250 ml 三角フラスコにて振盪

(300 rpm)、あるいは、300 mlの培地を1 l三角フラスコにて振盪(300 rpm)、あるいは、2 lの培地を5 l発酵槽にて培養を行った(700 rpm, 1 vvm)。必要に応じて、抗生物質としてアンピシリン(100 mg/l)、あるいはテトラサイクリン(15 mg/l)を添加した。スラントまたは平板培養には、同培地に寒天を15 g/l添加したものをを用いた。

組換え体の選択には、培地-4(M9培地)にD-プロリン 50 mg/l、及びアンピシリン 100 mg/lを添加したものをを用いた。

また、菌体反応に用いるために多量の*E. coli*を得る場合は、2 lの培地-5を用い、5 l発酵槽にて培養を行った(30 °C, 700 rpm, 1 vvm)。培養の間、14 %アンモニア水にてpHを6.8に調整し、またグルコース 167 g/l及びペプトン 167 g/lから成るフィード液を、培養液中のグルコース濃度が0~1 g/lの範囲になるように連続的に添加した。

プロリン分解菌の培養は、培地-7を用い、30 °C, 24時間行った。培養は、8 mlの培地を試験管(25×180 mm)にて振盪(200 rpm)、あるいは、40 mlの培地を250 ml三角フラスコにて振盪(300 rpm)、あるいは、300 mlの培地を1 l三角フラスコにて振盪(300 rpm)、あるいは、2 lの培地を5 l発酵槽にて培養を行った(700 rpm, 1 vvm, 培養の間4N-アンモニア水にてpHを7.0にコントロール)。

4-2-4 プロリンラセマーゼのスクリーニング

培養菌体を遠心分離により集菌した後、湿菌体として100 g/lとなるように50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.0に懸濁し反応に用いた。50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.0中に、湿菌体 50 g/l、L-プロリン 20 g/l、及びトルエン 2 % (vol./vol.)を加え、30 °C, 4時間反応を行った。100 °C, 10分間加熱により反応を停止した後、遠心上清中のD-プロリンおよび総プロリン量を測定した。二次評価では、各々の菌体を用いたラセミ化反応の至適pHにおいて、更に高濃度の基質(プロリン 50 g/l)を用い反応を行った。ラセミ化率は以下の式により定義した。

$$\text{ラセミ化率} [\%] = \{(\text{生成D-プロリン})/(\text{反応液中の総プロリン量})\} \times 100 \times 2$$

4-2-5 プロリンラセマーゼの活性測定法

プロリンラセマーゼ活性の測定は、L-プロリン 100 g/lを基質として、37 °C, 60分間反応した。菌体反応の場合は50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.2中で、粗酵素抽出液、あるいは精製酵素を用いる場合は50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.0中で反応を行った。菌体を反応に用いる場合は、トルエン 2 % (vol./vol.)を添加した。反応の間のD-プロリン生成速度が一定となるように菌体、粗酵素抽出液、精製酵素の量を調節した。100 °C, 10分間加熱により反応停止した後、遠心上清中の生成D-プロリンおよび総

プロリン量を測定した。活性の単位 1 unitは1 分間に1 μ moleのD-プロリンを生成する能力とした。

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

一次評価では、菌体培養液10 mlを遠心分離して得た菌体を2 mlの0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5に懸濁した後、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5中にDL-プロリン 50 g/l (終濃度25 g/l)を含む基質溶液2 mlを加え、トルエン 80 μ l (終濃度2 % (vol./vol.))を添加及び無添加で、37 °C、220 rpm で震盪し、20 時間反応した。25 g/l TCA 水溶液を反応液に等量加えて反応を停止し、遠心上清中に残存するL-プロリン及びD-プロリン量を測定した。詳細な検討を行う場合は、反応に使用する菌体量を活性にあわせて変更した。活性の単位 1 unitは1 分間に1 μ moleのL-プロリンを分解する能力とした。

4-2-7 プロリンの定量法

D-プロリン及びL-プロリンの定量は、島津HPLCシステム (島津製作所、京都) とTSK GEL Enantio L1 (トソー、東京) カラムを用いて測定した。移動相には2 mM CuSO_4 水溶液を用い、254 nmの吸収により検出した。

4-2-8 制限酵素及び遺伝子操作

3-2-8記載の方法と同様に実施した。

4-2-9 プロリンラセマーゼ遺伝子のクローニング

Clostridium sticklandii ATCC 12662の対数増殖後期の菌体からSaito & Miuraの方法に従って染色体DNAを調製した¹⁴⁾。この染色体DNAをHindIIIで消化した後、プラスミドpBR322のHindIIIサイトにT4 DNAリガーゼを用いて結合した。このライゲーション液を用いて*E. coli* HB101を形質転換した。*E. coli* HB101のコンピテントセルは、塩化カルシウム法にて調製した¹⁵⁾。D-プロリン 50 mg/lとアンピシリン 100 mg/lを含む培地-4 (M9培地) 寒天平板上で生育した形質転換体コロニーを選び、保持するプラスミドとプロリンラセマーゼ活性を評価した。

4-2-10 プロリンラセマーゼ遺伝子のサブクローニング

pPR1の挿入DNA断片をいくつかの制限酵素で切断した後、セルフライゲーションまたはpUC18、pUC19のマルチクローニングサイトに連結し、*E. coli* HB101を形質転換した。アンピシリン 100 mg/lを含む培地-3 (LB培地) 寒天平板上で生育した形質転換体コロニーを選び、保持するプラスミド

とプロリンセマーゼ活性を評価した。

4-2-1 1 DNA塩基配列の解析

pPR3のプロリンセマーゼ遺伝子を含む1.4 kb のHindIII-EcoRI DNA断片と、高発現に関与する1 kbのHindIII-EcoRI DNA断片について、3-2-1 1記載の方法に従って塩基配列を決定した。

4-2-1 2 プロリンセマーゼの精製

プロリンセマーゼの精製は、Cardinaleらの方法を参考に行った¹⁾。培養菌体を遠心集菌後、緩衝液B (50 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.5) に懸濁した。この菌体懸濁液を超音波破砕 (Bronson Cell Disruptor) 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50 %飽和となるように添加し、4 °Cで一晩静置した後、4 °C、14,000 × g, 20 分間遠心した。さらにこの上清に、硫酸アンモニウムを75 %飽和となるように添加し、4 °Cで一晩静置した後、4 °C、14,000 × g, 20 分間遠心した。沈殿を、緩衝液Bに溶解した後、70 °C、10 分間熱処理し、放冷してから4 °Cにて14,000 × gで20 分間、遠心した。上清を緩衝液C (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) に透析した後、緩衝液Cで平衡化したDEAE-Toyopearl (トーソー、東京) カラムに通塔し、3倍容量の緩衝液Cで洗浄後、25倍容量の50から300 mM Tris-HCl緩衝液、pH 7.5の直線濃度勾配で酵素を溶出した。活性画分をUFP2LGC (日本ミリポア工業、米沢) で膜濃縮後、精製酵素溶液とした。

4-2-1 3 SDS-PAGE

3-2-1 3記載の方法に従って、SDS-PAGEを実施した。

4-2-1 4 N-末アミノ酸配列分析

3-2-1 4記載の方法に従って、酵素蛋白のN-末アミノ酸配列分析を行った。

4-3 結果

4-3-1 プロリンラセマーゼのスクリーニング

工業的にL-プロリンからD-プロリンを生産するためのプロリンラセマーゼは、D-グルタミン酸生産の場合と同様に、高い基質濃度でも機能する必要がある。微生物由来のプロリンラセマーゼは、*Clostridium sticklandii* ATCC 12662 (NCIB 10654)に唯一存在が知られている^{1-10,16)}。そこで、工業的な利用に適したプロリンラセマーゼを取得するために、*C. sticklandii* ATCC 12662を含む*Clostridium*属細菌についてL-プロリンからD-プロリンを生産する能力を評価した。

*Clostridium*属細菌20株について評価した結果、*Clostridium sticklandii* ATCC 12662, *Clostridium scatologenes* KY 20022, *Clostridium* sp. KY 20005の3株にD-プロリンの生成を検出した (Table 4-1)。反応液中のL-プロリンは定量的にD-プロリンに変換され、中間体の存在も検出されなかったことから、検出されたD-プロリンはプロリンラセマーゼによりL-プロリンから生成したと考えられる。

Table 4-1 *Clostridium* 属細菌からのプロリンラセマーゼ生産菌のスクリーニング

Strain	Activity [units/g wet cells] (Racemization ratio [%])
<i>Clostridium sticklandii</i> ATCC 12662	4.84 (66.9)
<i>Clostridium scatologenes</i> KY 20022	2.99 (46.1)
<i>Clostridium</i> sp. KY 20005	2.35 (32.4)

反応条件：湿菌体 50 g/l, L-プロリン 20 g/l, 50 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.0, トルエン 2% (vol./vol.), 30 °C, 4 hr.

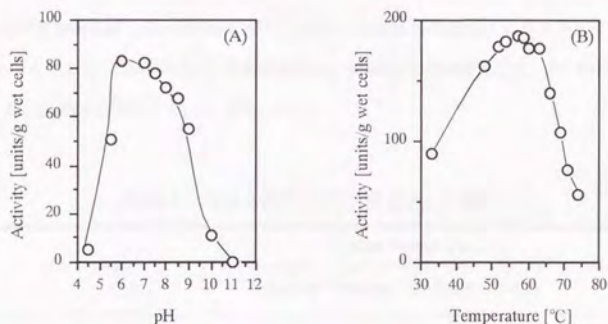
C. sticklandii ATCC 12662, *C. scatologenes* KY 20022, *Clostridium* sp. KY 20005の生産するプロリンラセマーゼの至適 pH は、各々 6.2、6.8、7.8 であった。プロリンラセマーゼ活性を検出した *Clostridium* 属細菌の 30 °C での至適 pH における活性は、*C. sticklandii* ATCC 12662 が他 2 菌株の 4~20 倍高かった (Table 4-2)。*C. sticklandii* ATCC 12662 由来のプロリンラセマーゼの至適 pH は 6.2、至適温度は 57 °C であった (Fig. 4-4)。至適条件下での比活性は、187 units/g wet cells であった。本酵素は他の酵素と比較して、高温から常温までの安定性が高く、また、本酵素は高い基質濃度 (L-プロリン 400 g/l) でも活性が低下せず、工業的な利用に適した酵素である (Fig. 4-5)。

以上のことから、D-プロリン生産のためのプロリンラセマーゼとして、*C. sticklandii* ATCC 12662 由来の酵素を選択した。

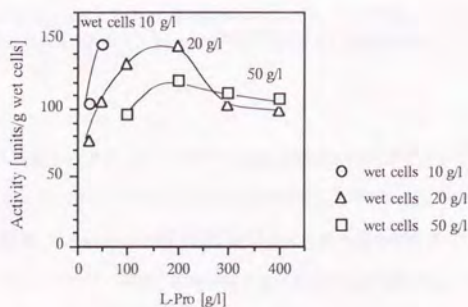
Table 4-2 *Clostridium* 属細菌のプロリンラセマーゼ

Strain	Optimum pH	Racemization activity [units/g wet cells]
<i>C. sticklandii</i> ATCC 12662	6.2	83
<i>C. scatologenes</i> KY 20022	7.0	20
<i>Clostridium</i> sp. KY 20005	7.5	4

反応条件: 50mMリン酸ナトリウム緩衝液, 湿菌体 20 g/l, L-プロリン 50 g/l, 2-メルカプトエタノール 0.2 % (wt./vol.), トルエン 2 % (vol./vol.), 30 °C, 1 hr.

Fig. 4-4 *C. sticklandii* ATCC 12662のプロリンラセマーゼに対するpHと温度の影響

反応条件: 湿菌体 20 g/l, L-プロリン 0.43 M (50 g/l), 2-メルカプトエタノール 0.2 % (wt./vol.), トルエン 2 % (vol./vol.), 1 hr, (A) 30 °C, (B) pH 6.2.

Fig. 4-5 *C. sticklandii* ATCC 12662のプロリンラセマーゼに対する基質濃度の影響

反応条件: 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH6.2, 2-メルカプトエタノール 0.2 % (wt./vol.), トルエン 2 % (vol./vol.), 30 °C, 1 hr.

4-3-2 プロリンラセマーゼ遺伝子のクローニング

C. sticklandii ATCC 12662のプロリンラセマーゼは、酵素的性質が良好で菌体あたりの活性も高かったが、嫌気性菌は多量の培養菌体を得ることが困難である。そこで、酵素の大量生産を目的に*C. sticklandii* ATCC 12662由来のプロリンラセマーゼの*Escherichia coli*での生産を試みた。

E. coli HB101 (*proA2*)⁽¹⁾のL-プロリン要求性が、ラセマーゼの導入によりD-プロリンで代替されることを利用して、*C. sticklandii* ATCC 12662由来のプロリンラセマーゼ遺伝子の取得を計画した。

C. sticklandii ATCC 12662の染色体DNAをHindIII切断後、pBR322のHindIII切断部位に連結し、*E. coli* HB101に導入し、D-プロリンを含む培地-4 (M9培地) 寒天平板上に生育する形質転換体を取得した。得られた形質転換体は、*C. sticklandii* ATCC 12662とほぼ同等の菌体プロリンラセマーゼ活性 (114 units/g wet cells) を示した (Table 4-3)。形質転換株は、pBR322のHindIII部位に、9.8 kbのDNA断片が挿入されたプラスミドpPR1を保持していた (Fig. 4-6)。

Table 4-3 組換え菌のプロリンラセマーゼ活性

Strain	Proline racemase activity	
	[units/g wet cells]	(Relative activity)
<i>C. sticklandii</i> ATCC 12662	144	1
<i>E. coli</i> HB101	0	0
<i>E. coli</i> HB101/pPR1	114	0.8
<i>E. coli</i> HB101/pPR2	157	1.1
<i>E. coli</i> HB101/pPR3	3,306	23.0

反応条件：50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH6.2, L-プロリン 100 g/l, 2-メルカプトエタノール 0.2 % (wt./vol.), トルエン 2 % (vol./vol.), 37 °C, 1 hr. 湿菌体 10 g/l, ただし HB101/pPR3 は 1 g/l.

9.8 kbの挿入断片上のプロリンラセマーゼ遺伝子部位を特定するために、pPR1をいくつかの制限酵素で切断した後、セルフ・ライゲーションあるいはpBR322、pUC18、及びpUC19を用いてサブクローニングを行った。その結果、1.4 kbのHindIII-EcoRI DNA断片を持つ場合のみプロリンラセマーゼ活性が検出されたことから、プロリンラセマーゼはこのDNA断片上に存在すると判断された (Fig. 4-6, Table 4-3)。

サブクローニングの過程で、*C. sticklandii* ATCC 12662の23 倍の菌体活性を有する*E. coli* HB101/pPR3を得た (Fig. 4-6)。pPR3は、プロリンラセマーゼ遺伝子が存在すると考えられる1.4 kbのHindIII-EcoRI DNA断片と、別の離れた位置に存在した1 kbのHindIII-EcoRI DNA断片が逆向きに挿入された

産物を有していた (Fig. 4-7)。このDNA断片を、pPR3と同じく本来の方向とは逆向きに挿入したpPR4も、同様にプロリンラセマーゼ活性が高発現した (Fig. 4-7)。このことから、この1 kbの *Hind*III-*Eco*RI DNA断片上に、プロリンラセマーゼ高発現に関与する因子の存在が予想された。

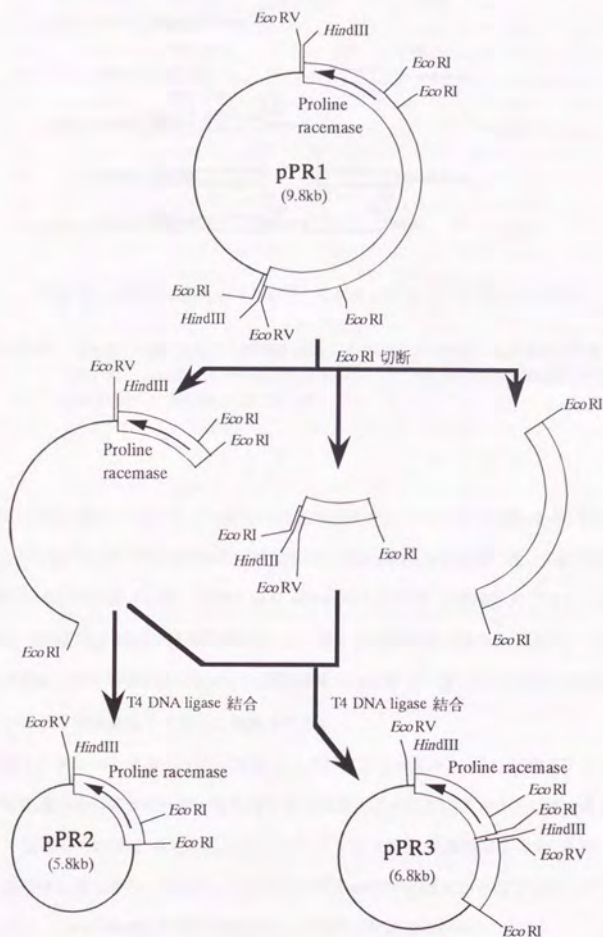


Fig. 4-6 pPR1, pPR2, pPR3 の構造と構築過程

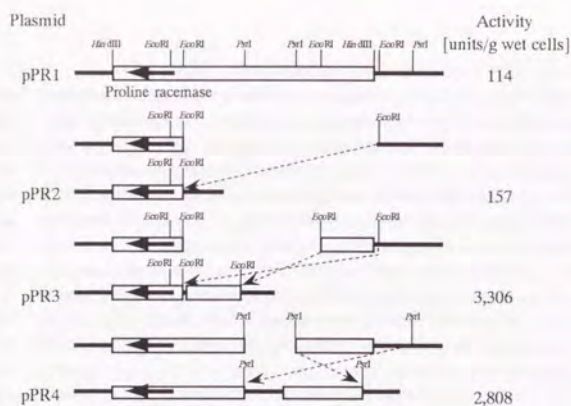


Fig. 4-7 pPR1, pPR2, pPR3, pPR4 の構造とプロリンラセマーゼ活性

反応条件: 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH6.2, L-プロリン 100 g/l, 2-メルカプトエタノール 0.2 % (wt./vol.), トルエン 2 % (vol./vol.), 37 °C, 1 hr. HB101/pPR1 と HB101/pPR2 は湿菌体 10 g/l, HB101/pPR3 と HB101/pPR4 は 1 g/l.

pPR3の挿入断片（プロリンラセマーゼ遺伝子を含む1.4 kbのHindIII-EcoRI DNA断片と、高発現に関与すると思われる1 kbのHindIII-EcoRI DNA断片）の全塩基配列を決定した（Fig. 4-8）。その結果、1.4 kbのHindIII-EcoRI DNA断片には、組換え体*E. coli* HB101/pPR3から精製したプロリンラセマーゼのN末アミノ酸配列（MKFSKGIHAIDSHTMGEPTR）と一致するORFが見出された。また、このORFから算出した分子量36,825は、SDS-PAGEから推定した精製酵素の分子量と一致した。このことから、このORFがプロリンラセマーゼの構造遺伝子であると判断された。

プロリンラセマーゼ遺伝子は、プラスミドベクターpBR322上に存在するアンピシリンやテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターを利用できる位置・方向にないことから、*E. coli*において自己のプロモーターで発現していると考えられたが、プロリンラセマーゼ遺伝子を含む1.4 kbのHindIII-EcoRI DNA断片と、高発現に関与すると思われる1 kbのHindIII-EcoRI DNA断片からはプロモーター配列は見いだせなかった。また、1 kbのHindIII-EcoRI DNA断片上にORFは見出せなかった。

プロリンラセマーゼ遺伝子の発現に適した宿主菌株を選択するため、*E. coli* C600, K294, JA194, JM109, TM93にpPR3を導入した結果、プロリンラセマーゼ活性は*E. coli* HB101を宿主とした場合が最も高く、他の菌株はすべて1/2以下の活性であった。

EcoRI

1 GAATTCCTCTCATACCAACTTGTCTATGGTGGCTAGCAAAGTCTA

46 TATGGTTGTTTCCGAAACCTTCAGTTGTGATGAAAGCTCCCTCTACATCCATAGTTTCAA

106 CTAACTACCTAGTCTTTCTGATACGTAGAATCTCTCAGCGTTAACTCGAGGAGAACCAA

166 CAAATACACACCTGCTAAGTCAAATCTTCGTCTATCAACTTCAATTACTAGAGGCT

226 CTCTCCAGTAATGCTAGAGTTCTCTTTGATGCAGGTCCTATACAAGTAAGTGCATGGA

286 TTCTCCATCAAGTACCTCAAGAGGTGAAGAACAACCTGGAACGTTTCCAAGGTCAACGT

346 TTGGCTTTGCACCTATTACTCTACTGGCTCTACAGGAAGGATTAGTTATCATGCAATTG

406 CGCCTTGTCCCATGATTCTTTGATGATTACAACCTTCTCTTCCAGGCTCTCTGTACT

466 GAGCTAACTCTTCAGTTTCACTACTTCAGAAATCATCAAGCTTCTTAAGAGCTTCTCTGA

526 TTTCTTGAGTGATGAAATCAGTTGCTTTATGAGCAGCAAGTGGTCTGGTCTTTCCATGT

586 TAGTACCAGCTTTTATAGTAACCTTGAGTCTTGATAAGGATTTCTCCTTTATCAGGAGCTC

646 CAGGTCCTCCCCACATGATGTTTGCATCAAGTTCACCTTCAGATGAACCAAACTCACCGA

706 TTTGAATCCACTCTTCGTGAGTCTCTGTAACCAATTATTATAGCTCCATCGATAACACGAG

766 TAACACCTTGTCTATTTTTCGTCGCTTCTTTAGTAGCTATAGGCTGAACGTCCATAAGT

826 TAGTTTCGCTGACTTTCGCGTAATCAGCTGGAGTAATGATTTCTACTTTGATATCTGTAA

886 CTAGGTTGCTTACTTTTACAGCATCTTCGCAGATATTTTCTCTAATGTAATAGTGTTAT

946 TTTCAATTTTGTCTCAGGTCCAAATTCACCTTCTCAATTTTGAAATGCTTCTTTTGAA

HindIII (pBR322由来のDNA断片) EcoRI

1006 GTGTTCTTCAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACTGGAATTCCTGTTGATAGGCT

1066 TAGCTTTATAGGAATCAAGCAAAATTCGTAGTGGAAATCAATATATGGATACTATAGT

1126 AGACTTTAATAAGTCGAAGGCAGGTATAGAAACCCAACTGTGGGAGAAAAACAGTGGAA

1186 AAAATTAGATGCTAAGAAAGCCTTAGCGTTTTTGAATCAAAATGAAGGGAGCAAGGAG

1 M K F S K G I H A I D S H T M G E P T R

1246 ATGAAGTTTCTAAAGGAATTCACGCTATAGATTACATACCTATGGGAGAACCTACTAGA

21 I V V G G I P Q I N G E T M A D K K K Y

1306 ATAGTTGATGAGGATTATCCGAGATTAATGGAGAACTATGGCTGACAGAAAAAATAT

41 L E D N L D Y V R T A L M H E P R G H N

1366 CTTGAAGATAACCTAGACTACGTTAGAAGTGTCTTAATGCATGAGCCAAGAGGACATAAT

61 D M F G S I I T S S N N K E A D F G I I

1426 GATATGTTTGGTTCTATTATAACTAGCTCGAATAATAAAGAAAGCTGATTTTGGAAATTATA

81 F M D G G G Y L N M C G H G S I G A A T

1486 TTTATGATGGCGGGGATCTTAAATATGTGCGGCCATGGTTCAATTGGAGCTGCAACT

101 V A V E T G M V E M V E F V T N I N M E

1546 GTAGCAGTAGAAACAGGAATGGTAGAAATGGTAGAGCCTGTACTAATATCAACATGGAA

121 A P A G L I K A K V M V E N E K V K E V

1606 GCACCTGCTGGACTTATCAAAGCTAAGGTTATGGTAGAAAAATGAAAAAGTAAAAAGATA

141 S I T N V P S F L Y M E D A K L E V P S

1666 TCTATACTAACGTTCCCTCATTTTTATATATGGAAGATGCTAAATTAGAAGTACCTTCT

161 L N K T I T F D I S F G G S F F A I I H

1726 TTAACAAGACTATTACATTGATATTTCTTTTGGCGGAAGCTTCTTTGCTATTATACAT

181 A K E L G V K V E T S Q V D V L K K L G

1786 GCAAAAGAGCTAGGAGTTAAAGTAGAACTAGCCAGGTTGATGTACTTAAGAAATAGGT

1 kb の
HindIII-EcoRI
DNA断片

1.4 kb の
HindIII-EcoRI
DNA断片


```

201 I E I R D L I N E K I K V Q H P E L E H
1846 ATAGAAATCAGAGATTTAATAATGAAAAATCAAAGTTCAACATCCAGAGTTAGAGCAT
221 I K T V D L V E I Y D E P S N P E A T Y
1906 ATCAAAATGTTGATTAGTAGAAATCTACGATGAGCCATCTAATCCTGAAGCTACATAC
241 K N V V I F G Q G Q V D R S P C G T G T
1966 AAAAACGTTGTTATCTTTGGACAAGGGCAAGTAGACCGTCTCCTTGTTGGAAGTGAAC
261 S A K L A T L Y K K G H L K I D E K F V
2026 AGTGCTAAGCTTGAACACTTTACAAAAAGGACATCTTAAGATAGATGAAAAATTGTGA
281 Y E S I T G T M F K G R V L E E T K V G
2086 TACGAAAGCATCACTGGAACAATGTTCAAAGGAAGAGTTTGAAGAACTAAAGTTGGA
301 E F D A I I P E I T G G A Y I T G F N H
2146 GAAITGATGCTATAATCCAGAAATTACAGGGGAGCATATATACTGGATTCAATCAT
321 F V I D P E D P L K Y G F T V *
2206 TTCGTAATGATCCAGAAGATCCACTTAAGTATGGATTACAGTATAAAATAGTGATATA
2266 TCGITAAAATATGATTAAACAATCAAATTAATAATTGAGGAGGCTACTATGATTACA
2326 GGGATATTAGGAGTTTATAGGCGCACTGACGGCATGGTTCAGCTTTGAGTTTGTAAAGGAT
2386 GTCGAAAACAAAGACAATCTAGAACTGAGACTAATTTTTAACAGCAGGTATTATC
HindIII
2446 GGATTATAACAAACTTTTTTGATACACTAGGTATAGGAGCTT

```

1.4 kb の
HindIII-EcoRI
DNA断片

Fig. 4-8 pPR3の挿入断片の塩基配列

.....(下線)..... 部分の配列はpBR322由来.

4-3-3 プロリンラセマーゼの諸性質

プロリンラセマーゼの諸性質の検討を目的に、4-2-1 2記載の方法に従って本酵素を *E. coli* HB101/pPR3 から精製した。Table 4-4に精製結果を示す。無細胞抽出液から収率26%で精製し、比活性は約13倍になった。SDS-PAGEにより、精製酵素は電気泳動的に単一であることを確認した (Fig. 4-9)。SDS-PAGEからは本酵素の分子量は約40,000と推定され、塩基配列から算出した分子量36,825とはほぼ一致した。

Table 4-4 *E. coli* HB101/pPR3からのプロリンラセマーゼの精製

Purification procedure	Total protein [mg]	Total activity [units]	Specific activity [units/mg]	Yield [%]
Cell free extract	786	52,350	66.6	100
Ammonium sulfate	186	36,600	196	70
70 °C heating	58.5	30,150	516	58
DEAE-Toyopearl	15.7	13,734	875	26

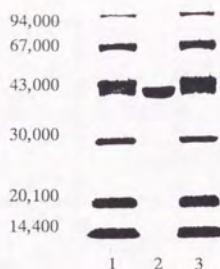


Fig. 4-9 精製プロリンラセマーゼのSDS-PAGE

Lane 1, 3: 分子量マーカー, Lane 2: プロリンラセマーゼ.

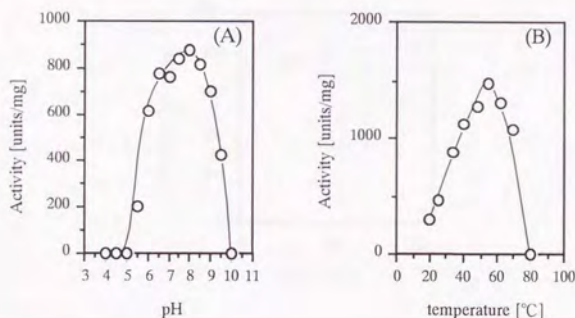


Fig. 4-10 プロリンラセマーゼに対するpHと温度の影響

反応条件: L-プロリン 100 g/l, 60 min, (A) 37 °C, (B) 50 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.0.

本酵素の反応の至適温度は55 °C、至適pHは8.0であり、*C. sticklandii* ATCC 12662の菌体を用いた検討結果と異なったが、至適pH領域はほぼ一致した (Fig. 4-10)。至適条件における本酵素の活性は875 units/mgであり、D-プロリン及びL-プロリンに対する K_m は各々10.6 mM、17.4 mM、 V_{max} は各々1,248 μ mole/mg/min, 1,448 μ mole/mg/minであった (Fig. 4-11)。

C. sticklandii ATCC 12662由来のプロリンラセマーゼの特徴の一つに、高い基質濃度でも活性を維持することがあるが、組換え体から精製した酵素も、L-プロリン200 g/lまでは全く影響を受けなかった (Fig. 4-12)。この性質は、本酵素の高い安定性ととも工業的に重要な性質である。

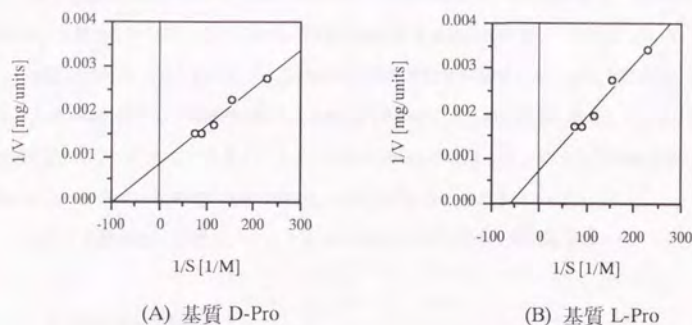


Fig. 4-11 プロリンラセマーゼのLineweaver-Burk プロット

反応条件: 50 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.0, 37 °C, 30 min.

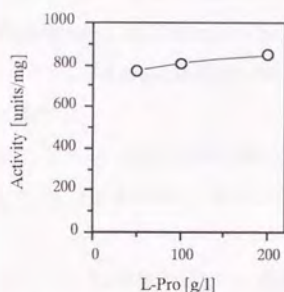


Fig. 4-12 プロリンラセマーゼ活性に対する基質L-プロリン濃度の影響

反応条件: 50 mM Tris HCl緩衝液 pH 8.0, 37 °C.

本酵素の基質特異性について、蛋白構成アミノ酸20種とオルニチンについて検討した結果、プロリンのみを基質として反応した。

さらに、本酵素の補酵素要求性について検討を行った。本酵素はTris-HCl緩衝液に透析しても活性を失わず、透析後に1 mMのPLP, FAD, FMN, NAD, NADPを添加しても活性に変化はなかった。また、補酵素としてPLPを有する場合に生じる330と420 nmの吸収極大も認められなかった¹²⁾。これらの結果から、本酵素は補酵素非依存型ラセマーゼであることが示唆された。更に、本酵素をカルボキシル基修飾試薬である10 mMのヒドロキシルアミン、10 mMのフェニルヒドラジン、あるいは10 mMの水素化ホウ素ナトリウムにて、pH 8.0, 37 °C, 30分間処理後も活性に変化はなかった。このことは、本酵素は、活性に関

与するビルボイル基などのカルボキシル基を持たないことを示唆する。本酵素はキレート剤である10 mMのEDTAによって阻害されなかったことから、活性に関与する金属は持たないと考えられる。

本酵素は2-メルカプトエタノール非存在下では安定性が低下した。また本酵素は、SH酵素の阻害剤である10 mMのZnSO₄, 5 mMのCuSO₄, 1 mMのPCMB等により強く阻害された。これらのSH酵素の阻害剤の添加前に、2-メルカプトエタノール0.5 % (vol.vol.)を添加することにより阻害を回避した。これらの結果から、本酵素は活性発現に重要な部位にSH基を有することが予想された。

また、本酵素は37 °Cにおいて10 mMのSDS存在下でも活性に変化はなかった。

4-3-4 L-プロリン分解菌のスクリーニング

DL-プロリン中のL-プロリンを光学選択的に分解する微生物を取得するために、土壌からL-プロリンを唯一の炭素源及び窒素源として生育する菌株を選択し、L-プロリン及びD-プロリン分解能を評価した。その結果、土壌から分離した酵母4株に、特に良好なL-プロリン分解能を見出した (Table 4-5)。分類学的検討の結果、これらの菌株は*Candida* sp. 及び*Trichosporon* sp. と同定された。これらの菌株について培養・反応条件の検討を行い、プロリン分解能とL-体選択性が高く、しかも培養が容易な*Candida* sp. PRD-234をL-プロリン分解菌として選択した。

Candida sp. PRD-234によるL-プロリン分解の至適温度は35 °Cであったが、長時間安定してL-プロリンを分解するには30 °Cが適していた (Fig. 4-13 (A))。また、L-プロリン分解の至適pHは5.5と7.5の2ヶ所に存在した (Fig. 4-13 (B))。

Candida sp. PRD-234によるL-プロリン分解の過程で、一時的なグルタミン酸の蓄積を検出したが、その他の分解過程の中間体の蓄積は見出せなかった。

L-プロリン分解反応は、基質L-プロリン 50 g/lまでは基質阻害による活性の低下はなかったが、75 g/lでは分解能が約50 %に低下した (Fig. 4-14 (A))。また、L-プロリン分解はD-プロリンによる阻害を受け、D-プロリン 100 g/l存在下では分解能が約60 %に低下した (Fig. 4-14 (B))。一方、本菌株はD-プロ

Table 4-5 L-プロリン分解菌のL-及びD-プロリン分解能評価

Strain	Cells [g wet cells/l]	Remaining L-Pro [g/l]	Remaining D-Pro [g/l]
<i>Candida</i> sp. PRD-234	80	0.03	10.9
<i>Candida</i> sp. PRD-238	30	0.3	10.8
<i>Trichosporon</i> sp. PRD-273	90	0	3.4
<i>Trichosporon</i> sp. PRD-317	70	0	7.1

反応条件: DL-プロリン 25 g/l, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5, 30 °C, 20 時間, 震盪 220 rpm.

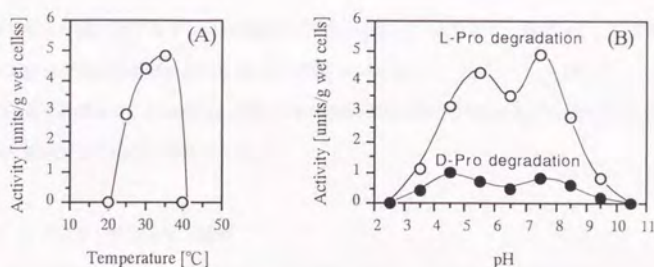


Fig. 4-13 *Candida* sp. PRD-234によるL-プロリンの分解に対する温度とpHの影響

反応条件: (A) 湿菌体 50 g/l, L-プロリン 25 g/l, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液pH 6.0, 2時間, 震盪 220 rpm.
(B) 湿菌体 50 g/l, L-またはD-プロリン 25 g/l, 30 °C, 2時間, 震盪 220 rpm.

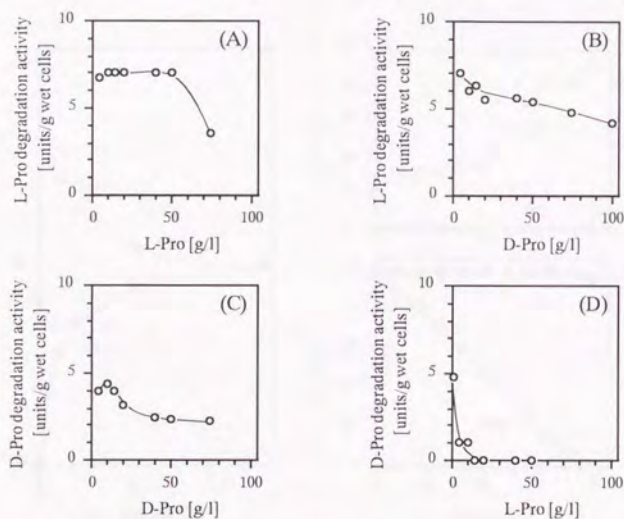


Fig. 4-14 *Candida* sp. PRD-234によるL-プロリンの分解に対するL-及びD-プロリン濃度の影響

反応条件: 湿菌体 30 g/l, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液pH 6.0, 30 °C, 2時間, 震盪 220 rpm.

(A) 基質L-プロリン 5-75 g/l, (B) 基質L-プロリン 10 g/l,
(C) 基質D-プロリン 5-75 g/l, (D) 基質D-プロリン 10 g/l.

リン分解能も有したが、D-プロリンの分解はL-プロリンの存在により著しく阻害され、L-プロリン 15 g/l 以上ではD-プロリンの分解は認められなかった (Fig. 4-14 (D))。

以上の結果より、*Candida* sp. PRD-234の培養菌体を用いてDL-プロリン 100 g/l中のL-プロリンの選択的な分解が可能であると判断された。

4-3-5 D-プロリン生産方法の検討

以上の結果をもとに、L-プロリンからのD-プロリンの生産について検討した。*C. sticklandii* ATCC 12662由来のプロリンラセマーゼ遺伝子を発現する*E. coli* HB101/pPR3の菌体 1 g wet cells/lを用いて、L-プロリン 100 g/lをpH 6.2, 37 °C, 24 時間の反応で完全にラセミ化した後、120 °C, 20 分間処理により、プロリンラセマーゼを失活させた (Fig. 4-15 (A))。この反応液に*Candida* sp. PRD-234の菌体を 40 g wet cells/lとなるように添加し、DL-プロリン中のL-プロリン 50 g/lをpH 6.0, 30 °C, 40 時間の反応で完全に分解した (Fig. 4-15 (B))。L-プロリン分解反応ではpHが上昇するため、12 N硫酸にてpH 6.0を維持した。

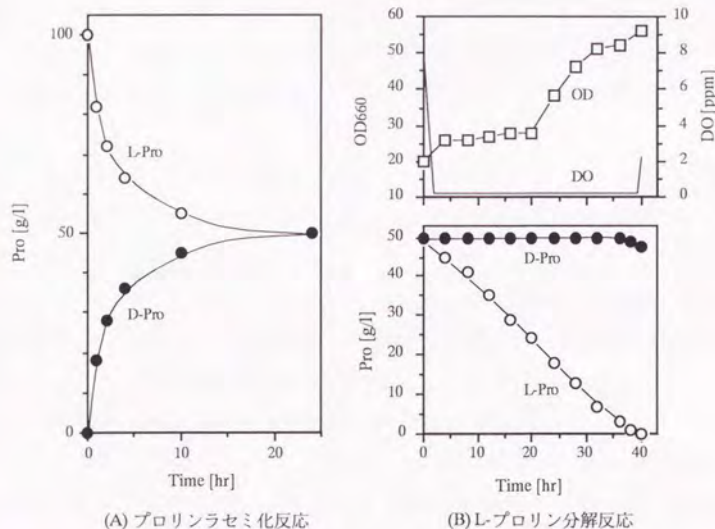


Fig. 4-15 組換え菌を用いたL-プロリンからのD-プロリンの製造

反応条件: (A) L-プロリン 100 g/l, *E. coli* HB101/pPR3の湿菌体 1 g/l, トルエン 1 % (vol./vol.), pH 6.2, 37 °C, 24 時間反応, 熱失活

(B) 硫酸にてpH 6.0に調整後、*Candida* sp. PRD-234の湿菌体 40 g/lを添加して、30 °C, 40 時間好氣的に反応 (この間、硫酸にてpHを6.0に維持)。

L-プロリン分解反応終了前に、L-プロリンの濃度低下にともないD-プロリンの分解が生じたが、L-プロリンの分解が終わると同時に反応液中の溶存酸素濃度(DO)が急激に上昇することを指標に反応を停止した。その結果、D-プロリン収率94%で反応を終了することができた。この反応液から、一般的なL-プロリン精製法に従って99.5%ee以上の光学純度のD-プロリンを取得した。

4-4 考察

4-4-1 本製造方法の評価

本研究で完成したD-プロリンの製造方法は、発酵法で生産されるL-プロリンを原料とするため、原料は安価に安定して供給可能である。

プロリンのラセミ化反応は、*E. coli* 組換え菌の生産するプロリンラセマーゼを用いて水溶液中で常温常圧で行うため、化学的ラセミ化とは異なり特殊な設備を必要とせず、廃液による環境汚染の心配もない。また、酵素的ラセミ化法は、化学的ラセミ化法とは異なり微生物によるL-プロリン分解反応を阻害する物質を含まないため、精製などの前処理をせずにラセミ化反応液を第2段階の微生物を用いた光学分割反応に用いることが可能である。

E. coli 組換え菌の生産するプロリンラセマーゼを用いる利点は、多量の酵素を用いて効率的に生産を行えることだけではなく、*C. sticklandii* ATCC 12662が有するD-プロリンレダクターゼ^(16,20)などによるD-プロリンの分解による収率低下の防止も考えられる。

第2段階の酵母を用いたDL-プロリン中のL-プロリンの分解・除去は、光学選択性が高く、D-プロリンと似た物性を持つ分解生成物を生じないため、精製により容易に純度の高いD-プロリンが得られる。

以上のように、本研究で完成したD-プロリンの製造方法は良好であり、これまでに提案されている他の方法と比較しても多くの点で優れている。しかし、本方法は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。

第1段階に用いるプロリンラセマーゼは、反応のたびに生産菌の培養が必要であるが、本酵素は比較的安定性が高いことから、固定化酵素として長時間の反応と保存ができることが予想される。固定化酵素法が可能であれば、培養の回数を減らすことが可能であり、ラセミ化反応後のラセマーゼの熱失活の操作も不要となり、さらに効率的な生産の可能性がある。

第2段階のL-プロリンの光学選択的分解反応は、反応停止の明瞭な指標はあるものの、反応停止時期がずれれば収率または光学純度が低下するため、改善が望まれる。このためには、新たに光学選択性がさらに厳密なL-プロリン分解酵素を取得する必要がある。

本方法は、L-プロリンの分解によりDL-プロリンを光学分割するため、出発原料のL-プロリンからの収率が50%を超えることはない。DL-プロリンの光学分割に、L-プロリンオキシダーゼによるL-プロリンの Δ^1 -ピロリン-2-カルボン酸への変換、L-体選択的アシラーゼによるL-プロリンのアシル化などが可能であれば、光学分割後のリサイクルが可能となり、出発原料のL-プロリンからの収率が50%を超える

ことも可能であると予想される。しかし、これらの目的に利用可能な良好な酵素は見出されていない。

4-4-2 プロリンラセマーゼの酵素的性質

E. coli HB101/pPR3から精製した*C. sticklandii* ATCC 12662のプロリンラセマーゼは、プロリンのみを基質として反応した。Cardinaleらは、*C. sticklandii* ATCC 12662から精製したプロリンラセマーゼがヒドロキシプロリン、アロヒドロキシプロリンに対して各々プロリンの2%、5%の活性を示すことを報告しているが¹⁾、本研究では、*E. coli* HB101/pPR3から精製した本酵素についてこのことは確認していない。また、*C. sticklandii* ATCC 12662の菌体を用いた反応では、オルニチンに対してプロリンの104%のラセミ化活性を示したが、これはプロリンラセマーゼによるものではなく、本菌株が持つことが知られるオルニチンラセマーゼ²⁾によるものであると考えられる。

E. coli HB101/pPR3から精製したプロリンラセマーゼのD-プロリン及びL-プロリンに対するKmとVmaxが各々ほぼ同じ値であったことは、本酵素のD-及びL-プロリンに対する反応性が等しいことを示す。このことは、*C. sticklandii* ATCC 12662から精製したプロリンラセマーゼの性質と一致するが、Km値はCardinaleらの報告と多少異なった¹⁾ (Table 4-6)。これは、酵素の性質の違いによるものではなく、活性測定方法の違いによるものと思われる。

本酵素は、2-メルカプトエタノール非存在下では安定性が低下すること、PCMBなどのSH酵素の阻害剤による阻害が2-メルカプトエタノールにより回避できることなどから、活性に重要なSH基を有することが予想される。このことは、Rudnickらの*C. sticklandii* ATCC 12662から精製したプロリンラセマーゼの活性中心にシステイン残基が存在することを示唆する報告と一致する²⁾。

プロリンラセマーゼは高い熱安定性を有したが、本菌株は好熱性・耐熱性細菌ではない。また、本酵素は10 mMのSDS存在下でも活性に変化がなかった。これらのことは、本酵素の立体構造が比較的強

Table 4-6 *C. sticklandii* 由来のプロリンラセマーゼの諸性質の比較

Strain	<i>E. coli</i> HB101/pPR3	<i>C. sticklandii</i> ATCC 12662 ¹⁾
molecular weight	36,825	38,000
specific activity [units/mg]	875	600
Km [mM] (D-Pro)	10.6	3.8
(L-Pro)	17.4	2.3
Vmax [μ mole/mg/min] (D-Pro)	1,248	1,054
(L-Pro)	1,448	800
optimal pH	8.0	7.5

固であることを示唆すると思われるが、この性質の生理的意義は不明である。

プロリンラセマーゼは補酵素非依存性ラセマーゼであることが報告されている^{1,10,16,29)}。イミノ酸とカルボニル基が Schiff 塩基を形成し得ないので、プロリンラセマーゼは PLP を補酵素をしないことは当然と思われる。実際、本酵素は補酵素として PLP を有する場合に特徴的な吸収極大は認められなかったことから、PLP を持たないと思われる。また、補酵素類の添加による活性の変化はなく、金属の関与も否定されたことから、本酵素は補因子を持たないと考えらる。これらの性質は、既報²⁹⁾と一致した。

4-4-3 プロリンラセマーゼのアミノ酸配列

C. sticklandii ATCC 12662 のプロリンラセマーゼのアミノ酸配列は、酵素蛋白のトリプシン加水分解物についてエドマン分解法で決定した一部の配列 (5 アミノ酸残基) が知られるのみであったが²⁾、本研究でプロリンラセマーゼの遺伝子をクローニングし全塩基配列を決定することにより、初めて一次構造が明らかになった。そこで、本酵素とアミノ酸配列が報告されている他の補酵素非依存性ラセマーゼ及びエピメラーゼとアミノ酸配列の比較を行った。ラセミ化機構が類似していることが予想される *Pseudomonas putida* ATCC 15070 のヒドロキシプロリン 2-エピメラーゼは活性中心の部分的なアミノ酸配列のみが明らかになっているが³³⁾、*C. sticklandii* ATCC 12662 のプロリンラセマーゼのアミノ酸配列との比較の結果、システイン残基を含む部分に比較的高い相同性を示した (Fig. 4-16)。この相同性が高い部分は、Rudnick らがプロリンラセマーゼの活性中心であると予想した部分に一致する²⁾。また、プロリンラセマーゼは、活性中心の部分的なアミノ酸配列が明らかになっている *Escherichia coli* K-12 のジアミノピメリン酸エピメラーゼ³⁷⁾とわずかに相同性を有していたが (Fig. 4-16)、*Lactobacillus brevis* ATCC 8287 (第3章)、*Pedococcus pentosaceus* IFO 3182⁶¹⁾、および *L. fermenti* ATCC 9338⁶²⁾ の補酵素非依存性のグルタミン酸ラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼ活性を有する *E. coli* の *murI* 遺伝子産物⁶³⁾、*Streptococcus thermophilus* IAM 10064 の補酵素非依存性のアスパラギン酸ラセマーゼ⁶⁴⁾ とのアミノ酸配列の相同性は低かった。また、補酵素の関与についての報告はないが、基質の構造から類似したラセミ化機構が予想された *Pseudomonas* sp. NS671 のヒダントインラセマーゼ⁶⁵⁾ とのアミノ酸配列との相同性も低かった。

<i>C. sticklandii</i> Pro racemase	(243) VVIFGQGQVDRSPCGTGTSAKLATLY
	* * * * *
<i>P. putida</i> Hydroxyproline 2-epimerase ³⁹⁾	STCGTSGSGADPVAK
	** * *
<i>E. coli</i> DAP epimerase ³⁷⁾	YRIFNADGSEVAQCNGARGCF

Fig. 4-16 プロリンラセマーゼと他のアミノ酸ラセマーゼのアミノ酸配列の相同領域

C. sticklandii ATCC 12662 のプロリンラセマーゼを基準に一致するアミノ酸残基を*印で示す。

C. sticklandii ATCC 12662のプロリンラセマーゼと*P. putida* ATCC 15070のヒドロキシプロリン2-エピメラーゼの活性中心付近のアミノ酸配列は良く似ていることから、両酵素の反応機構が類似している可能性が考えられる。さらに詳細に比較するためには、ヒドロキシプロリン2-エピメラーゼの全アミノ酸配列が決定されることが望まれる。

4-4-4 プロリンラセマーゼの反応機構

C. sticklandii ATCC 12662のプロリンラセマーゼについては、詳細に検討されている^{1,10,29)}。システイン残基の修飾による失活の検討から、本酵素に含まれる2つのシステイン残基のうちの一方のみがラセミ化に関与しているとされ²⁾、これは256番目のシステイン残基にあたる。本酵素のプロリンラセミ化機構はシステイン2残基が関与する2塩基関与の水素原子引き抜き機構であるとされていることから^{2,10,29)}、ホモダイマー構造を有する両サブユニットの256番目のシステイン残基が関与すると考えられる (Fig. 4-17)。このようなホモダイマーの両サブユニットのシステイン残基が関与するラセミ化機構は、*E. coli* K-12のジアミノピメリン酸エピメラーゼについても予想されている²⁷⁾。プロリンラセマーゼとジアミノピメリン酸エピメラーゼのシステイン残基を含む活性中心付近のアミノ酸配列にわずかではあるが相同性があったこと (4-4-3) から、反応機構が類似している可能性が考えられる。プロリンラセマーゼのもう1つの91番目のシステイン残基は、修飾により緩やかに失活したことから²⁾、両サブユニットの結合などの高次構造維持に関与している可能性が考えられる。

P. putida ATCC 15070のヒドロキシプロリン2-エピメラーゼも、同様にシステイン2残基が関与する2塩基関与の水素原子引き抜きによるラセミ化機構が考えられており^{29,33)}、活性中心付近のアミノ酸配列はプロリンラセマーゼと良く似ている (4-4-3)。したがって、プロリンラセマーゼとヒドロキシプロリン2-エピメラーゼの反応機構は良く似ている可能性が考えられる。ただし、ヒドロキシプロリン2-エピメラーゼはモノマー酵素であることから、明らかにされていないが、分子内にもう1つ活性に関与するシステイン残基を持つと予想される。

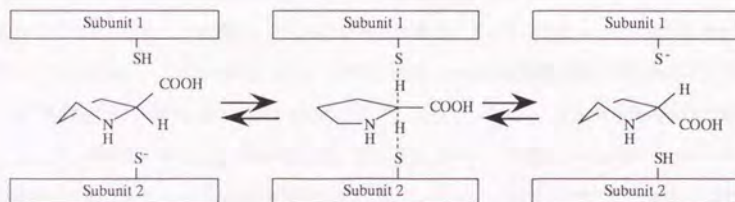


Fig. 4-17 プロリンラセマーゼの予想反応機構

4-4-5 プロリンラセマーゼの生理的意義

プロリンラセマーゼの存在は、*C. sticklandii* ATCC 12662 にのみ存在が知られていたが^(1-10,16,29)、本研究により新たに*Clostridium* 属細菌2株にも本酵素が存在することが明らかになった。この結果から、プロリンラセマーゼは、*Clostridium* 属細菌に特徴的な酵素である可能性がある。しかし、基質の構造及びラセミ化の反応機構が類似していることが予想されるヒドロキシプロリン 2-エピメラーゼが *Pseudomonas putida* ATCC 15070に存在することから^(29,31-33,57,58)、プロリンラセマーゼが*Clostridium* 属以外の細菌に存在する可能性もあり、分布についてはさらに広範囲に調べる必要がある。

Cardinaleらは*C. sticklandii* ATCC 12662から精製したプロリンラセマーゼの反応機構について詳細に検討しているが^(2-10,29)、本酵素の役割については明らかにされていない。*Clostridium* 属細菌において、本酵素はL-プロリンからのD-プロリンの生成に利用されている可能性が考えられるが、微生物におけるD-プロリンの存在と機能は明らかにされていない。*C. sticklandii* ATCC 12662は、D-プロリンから5-アミノ吉草酸を生成するD-プロリンレダクターゼを持つことが知られていることから^(16,20)、プロリンラセマーゼがL-プロリンの代謝あるいは5-アミノ吉草酸の生成に関与する可能性も考えられる。

本研究で検討した *Clostridium* 属細菌3株のプロリンラセマーゼ活性は、菌体内の遊離のプロリンをすべてラセミ化するのに十分であると予想される。これらの菌株の高い活性を持つプロリンラセマーゼの生理的意義を明らかにするためには、D-プロリンの存在と機能も調べる必要があると思われる。

4-4-6 *E. coli* 組換え菌を用いたプロリンラセマーゼの生産

E. coli 組換え菌における*C. sticklandii* ATCC 12662 由来のプロリンラセマーゼ遺伝子は、プラスミドベクターpBR322上に存在するアンピシリンやテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターを利用できる位置・方向にないことから、*E. coli* において自己のプロモーターで発現していると考えられた。しかし、プロリンラセマーゼ遺伝子を含む1.4 kb の*HindIII*-*EcoRI* DNA断片に、典型的な*E. coli* のプロモーター配列は見出せなかった。

プロリンラセマーゼ遺伝子を含むDNA断片とは別の離れた位置に存在した1 kbの*HindIII*-*EcoRI* DNA断片をプロリンラセマーゼ遺伝子の上流に連結した場合、プロリンラセマーゼの菌体活性が20倍以上に向上したことから、このDNA断片上にはプロリンラセマーゼの高発現化因子が存在すると予想される。このDNA断片上にORFは見出せなかったことから、プロリンラセマーゼ以外の別の蛋白が関与するのではないと思われる。また、このDNA断片は、プロリンラセマーゼ遺伝子の上流に一方方向に挿入された場合のみにプロリンラセマーゼの菌体活性が向上したことから、プロリンラセマーゼ遺伝子の発現に関与すると予想される。さらに、この断片の有無によらず生産されたプロリンラセマーゼのSDS-PAGEでの

位置に変化は無かったことから、酵素蛋白の一次構造上に変化は起らないと予想される。これらの結果から、このDNA断片には*E. coli*で機能する比較的強力なプロモーターが存在すると予想したが、典型的な*E. coli*のプロモーター配列は見出せなかった。

これらのプロリンラセマーゼの発現に関する疑問を明らかにするためには、転写レベルでの詳細な検討が必要である。

4-4-7 L-プロリンの分解

L-プロリンの分解の過程で分解生成物や中間物質の顕著な蓄積は認められなかったことから、L-プロリンの分解経路は不明である。L-プロリン分解反応は好氣的条件下で起こり、反応中に一時的にグルタミン酸の生成を検出したことから、L-プロリンはプロリンオキシダーゼにより Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸に変換された後、グルタミン酸を経る経路で代謝された可能性が考えられる。また、L-プロリンの分解の過程で菌体量が増大したことから、L-プロリンは生育に利用されたと考えられる。L-プロリン 50 g/lの分解の後に*Candida* sp. PRD-234の乾燥菌体重量が16 g/l増加したことから、L-プロリンの約32%が菌体成分に転換されたと計算される。

プロリンの分解について、至適pHに2つのピークが存在したが、これは、分解に2つの経路(酵素)が存在するためか、あるいは、分解に複数の酵素が関与するために複雑なpH特性になった可能性が考えられる。また、本菌株は、弱いD-プロリンの分解能も有したが、本菌株からプロリンラセマーゼは検出されなかったこと、D-プロリンの分解がL-プロリンにより阻害されたことから、L-プロリンの分解に関与する酵素の光学選択性の甘さに起因するものと予想される。これらのことを明らかにするためには、分解に関与する酵素の諸性質を明らかにする必要がある。

4-5 まとめ

1. L-プロリンを原料に、プロリンラセマーゼによるラセミ化とL-プロリン分解菌によるL-プロリンの選択的分解の2段階の酵素反応によるD-プロリンの製造法の検討をした。

2. 第1段階のプロリンのラセミ化に用いるプロリンラセマーゼを、*Clostridium* 属細菌についてスクリーニングを行い、菌体当たりの活性が高く、高基質濃度（L-プロリン 400 g/l 以上）でも機能する良好な酵素を生産する既知菌株 *Clostridium sticklandii* ATCC 12662 を選択した。この他、プロリンラセマーゼを生産する新規菌株2株も見出した。

3. プロリンラセマーゼ生産菌 *C. sticklandii* ATCC 12662 の多量の菌体取得が困難であることを解決するために、プロリンラセマーゼの *E. coli* 組換え体での生産を検討した。*E. coli* のL-プロリン要求性変異株の要求性相補を利用して本酵素の遺伝子を取得し、*C. sticklandii* ATCC 12662 の約23倍の菌体活性で本酵素の生産が可能になった。本酵素は、*E. coli* 組換え体において自己のプロモーターを用いて発現したが、高活性発現にはプロリンラセマーゼ遺伝子とは別のDNA断片を必要とした。組換え体 *E. coli* HB101/pPR3 が生産するプロリンラセマーゼを用いることにより、効率的な第1段階のL-プロリンのラセミ化反応が可能になった。

4. *E. coli* 組換え体からプロリンラセマーゼを電気泳動的に単一に精製し、諸性質を調べた。本酵素は、補酵素非依存性のラセマーゼであり、活性に関与するSH基を有することが示唆された。これらの性質は、元株である *C. sticklandii* ATCC 12662 由来のプロリンラセマーゼと同じであった。また、本酵素は高い基質濃度（L-プロリン 200 g/l）でも基質阻害による活性低下は認められず、工業的利用に適した特徴を持っていた。

5. *C. sticklandii* ATCC 12662 のプロリンラセマーゼ遺伝子の全塩基配列を明らかにした。本酵素のアミノ酸配列の一部は、*Pseudomonas putida* のヒドロキシプロリン2-エピメラーゼの活性中心付近の配列と相同性を示した。この部分が、ラセミ化活性に重要な部位であると予想される。また、本酵素は *E. coli* のジアミノピメリン酸エピメラーゼの活性中心付近の配列ともわずかに相同性を示したが、補酵素非依存性の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼ及びアスパラギン酸ラセマーゼとのア

ミノ酸配列の相同性は見出せなかった。

6. 高いL-プロリン分解能を有する微生物を得るために、土壌からスクリーニングを実施し、*Candida* sp. PRD-234を取得した。本菌株のプロリン分解におけるL-体選択性と分解能は十分に高かった。本菌株を用いることにより、効率的な第2段階のL-プロリンの選択的分解反応が可能になった。

7. *E. coli* HB101/pPR3によるL-プロリンのラセミ化、及び *Candida* sp. PRD-234によるDL-プロリン中のL-プロリンの選択的分解により、100 g/lのL-プロリンから光学純度 99 %以上のD-プロリン 47 g/lの生産に成功した。

8. 以上の検討の結果、L-プロリンからD-プロリンを効率的に生産する工業的なプロセスを完成した。

4-6 文献

- 1) **Cardinale, G.J., and Abeles, R.H.** (1968) Purification and mechanism of action of proline racemase. *Biochemistry* 7:3970-3978.
- 2) **Rudnick, G., and Abeles, R.H.** (1975) Reaction mechanism and structure of the active site of proline racemase. *Biochemistry* 14:4515-4522.
- 3) **Fisher, L.M., Alberly, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Racemization of unlabeled proline in the unsaturated, saturated, and oversaturated regimes. *Biochemistry* 25:2529-2537.
- 4) **Fisher, L.M., Alberly, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Tracer perturbation experiments using [^{14}C] proline that measure the interconversion rate of the two forms of free enzyme. *Biochemistry* 25:2538-2542.
- 5) **Fisher, L.M., Belasco, J.G., Bruice, T.W., Alberly, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Transition-state fractionation factors for the two protons involved in the catalytic steps. *Biochemistry* 25:2543-2551.
- 6) **Belasco, J.G., Alberly, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Double fractionation experiment, a test for concertedness and for transition-state dominance. *Biochemistry* 25:2552-2558.
- 7) **Belasco, J.G., Bruice, T.W., Alberly, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Fractionation factors for the essential catalytic groups in the enzyme-substrate complexes. *Biochemistry* 25:2558-2564.
- 8) **Belasco, J.G., Bruice, T.W., Fisher, L.M., Alberly, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Rates, fractionation factors, and buffer catalysis in the oversaturated region. Nature of the interconversion of the two forms of free enzyme. *Biochemistry* 25:2564-2571.
- 9) **Alberly, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetic and mechanism of proline racemase. *Biochemistry* 25:2572-2577.
- 10) **Keenan, M.V., and Alworth, W.** (1974) The inhibition of proline racemase by a transition state analogue: Δ -1-pyrroline-2-carboxylate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

57:500-504.

- 11) **Bachmann, B.** (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
- 12) **Johnson, R.J., and Metzler, D.E.** (1970) Analyzing spectra of vitamin B₆ derivatives. p. 433-471. In McCormick, D.B., Wright, L.D. (ed.), Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., *Methods in enzymology*, vol. 18, part A. Academic Press Inc., New York.
- 13) **Bachmann, B.** (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
- 14) **Saito, H., and Miura, K.** (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **72**:619-629.
- 15) **Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.** (1989) Molecular cloning a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 16) **Stadtman, T.C., and Elliott, P.** (1957) Study on the enzymic reduction of amino acids. II. Purification and properties of a D-proline reductase and a proline racemase from *Clostridium sticklandii*. *J. Biol. Chem.* **228**:983-997.
- 17) **Stadtman, T.C., and McClung, L.S.** (1957) *Clostridium sticklandii* nov. spec. *J. Bacteriol.* **73**:218-219.
- 18) **Seto, B., Stadtman, T.C.** (1976) Purification and properties of proline reductase from *Clostridium sticklandii*. *J. Biol. Chem.* **251**:2435-2439.
- 19) **Seto, B.** (1978) A pyruvate-containing peptide of proline reductase in *Clostridium sticklandii*. *J. Biol. Chem.* **253**:4525-4529.
- 20) **Schwartz, A.C., and Reinsberg, J.** (1980) D-Proline reductase from *Clostridium sticklandii*. Activation by monovalent and divalent cations, and inhibition by anions. *FEMS Microbiol. Lett.* **7**:153-156.
- 21) **Somack, R., and Costilow, R.N.** (1973) Purification and properties of a pyridoxal phosphate and coenzyme B₁₂ dependent D- α -ornithine-5,4-aminomutase. *Biochemistry* **12**:2597-2604.
- 22) **Costilow, R.N., and Laycock, L.** (1969) Reactions involved in the conversion of ornithine to proline in *Clostridia*. *J. Bacteriol.* **100**:662-667.
- 23) **Costilow, R.N., and Laycock, L.** (1971) Ornithine cyclase (deaminating). Purification

- of a protein that converts ornithine to proline and definition of the optimal assay conditions. *J. Biol. Chem.* **246**:6655-6660.
- 24) **Muth, W.L. and Costilow, R.N.** (1974) Ornithine cyclase (deaminating). II. Properties of the homogeneous enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**:7457-7462.
- 25) **Muth, W.L. and Costilow, R.N.** (1974) Ornithine cyclase (deaminating). III. Mechanism of the conversion of ornithine to proline. *J. Biol. Chem.* **249**:7463-7467.
- 26) **Ishida, A., Kawatake, Y., and Ono, N.** (1994) Osmotic stress conditioning for induction of acquired osmotolerance in *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**:34-42.
- 27) **Kawahara, Y., Ohsumi, T., Yoshihara, Y. and Ikeda, S.** (1989) Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric Biol. Chem.* **53**:2475-2479.
- 28) **Boch, J., Kempf, B., and Bgerner, E.** (1994) Osmoregulation in *Bacillus subtilis*. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J. Bacteriol.* **176**:5364-6371.
- 29) **Adams, E.** (1976) Catalytic aspects of enzymatic racemization. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **44**:69-138.
- 30) **中島伸佳, 左右田健次** (1987) ピリドキサルリン酸比依存性アミノ酸ラセマーゼ. *化学* **43**:212-213.
- 31) **Finlay, T.H., and Adams, E.** (1970) Kinetic and structural studies of hydroxyproline 2-epimerase. *J. Biol. Chem.* **245**:5248-5260.
- 32) **Ramaswamy, S., and Adams, E.** (1979) Active site peptide from hydroxyproline 2-epimerase. *Fed. Proc.* **38**:725.
- 33) **Ramaswamy, S.G.** (1984) Hydroxyproline 2-epimerase of *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **259**:249-254.
- 34) **White, P.J., Lejeune, B., and Work, E.** (1969) Assay and properties of diaminopimelate epimerase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* **113**:589-601.
- 35) **Wiseman, J.S., and Nichols, J.S.** (1984) Purification and properties of diaminopimelate acid epimerase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**:8907-8914.
- 36) **Richaud, C., Higgins, W., Mengin-Lecreulx, D., and Stragier, P.** (1987) Molecular cloning, Characterization, and chromosomal localization of *dapF*, the *Escherichia coli* gene for diaminopimelate epimerase. *J. Bacteriol.* **169**:1454-1459.

- 37) Higgins, W., Tardif, C., Richaud, C., Krivanek, M.A., and Cardin, A. (1989) Expression of recombinant diaminopimelate epimerase in *Escherichia coli*. Isolation and inhibition with an irreversible inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **186**:137-143.
- 38) Watanabe, K., Ishikawa, T., Mukohara, Y., and Nakamura, H. (1992) Identification and sequencing of gene encoding a hydantoin racemase from the native plasmid of *Pseudomonas* sp. strain NS671. *J. Bacteriol.* **174**:3461-3466.
- 39) 左右田健次 (1977) D-アミノ酸の生化学 (I). 化学 **32**:517-526.
- 40) 左右田健次 (1977) D-アミノ酸の生化学 (II). 化学 **32**:627-635.
- 41) 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.
- 42) Gray, D.O. (1972) Trans-4-hydroxymethyl-D-proline from *Eriobotrya japonica*. *Phytochemistry* **11**:751-756.
- 43) 野口祐一, 明山勝美, and 細田拓 (1971) 特許公報 昭46-27354. 微生物によるD-プロリンの製造法.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) Atkinson, M.R., Wray, L.V., Jr., and Fisher, S.H. (1990) Regulation of histidine and proline degradation enzymes by amino acid availability in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**:4758-4765.
- 48) 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.
- 49) Yamada, S., Hongo, C., Yoshioka, R., and Chibata, I. (1983) Method for racemization of optically active amino acids. *J. Org. Chem.* **48**:843-846.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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.
- 55) Tatsumi, S., Seki, K., and Akashi, T. (1965) United States Patent 3213106.
Process of racemizing optically active alpha acids.
- 56) 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.
- 57) Adams, E. and Norton, I.L. (1964) Purification and properties of inducible
hydroxyproline 2-epimerase for *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **239**:1525-1535.
- 58) Adams, E. (1963) Freedom of hydroxyproline-2-epimerase from pyridoxal phosphate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **10**:327-332.
- 59) Antia, M., Hoare, D.S., and Work, E. (1957) The stereoisomers of
 α ϵ -diaminopimelic acid. 3. Properties and distribution of diaminopimelic acid racemase, an
enzyme causing interconversion of the LL and *meso* isomers. *Biochem. J.* **65**:448-459.
- 60) Hun, J.W., Yokoigawa, K., Esaki, N., and Soda, K. (1992) Synthesis of
L-proline from the racemate by coupling of enzymatic enantiospecific oxidation and chemical
non-enantiospecific reduction. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:189-190.
- 61) Choi, S.-Y., Esaki, N., Ashiuchi, N., Yoshimura, T., and Soda, K. (1994)
Bacterial glutamate racemase has high sequence similarity with myoglobin and forms an
equimolar inactive complex with hemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10144-10147.
- 62) Gallo, K.A., and Knowles, J.R. (1993) Purification, cloning, and cofactor independence
of glutamate racemase from *Lactobacillus*. *Biochemistry* **32**:3981-3990.
- 63) Yoshimura, T., Ashiuchi, M., Esaki, N., Kobatake, C., Choi, S.-Y., and
Soda, K. (1993) Expression of *glr* (*murI*, *dga*) gene encoding glutamate racemase in

Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **268**:24242-24246.

- 64) **Yohda, M., Okada, H., and Kumagai, H.** (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the aspartate racemase gene from lactic acid bacteria *Streptococcus thermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**:234-240.
- 65) **Watanabe, K., Ishikawa, T., Mukohara, Y., and Nakamura, H.** (1992) Identification and sequencing of gene encoding a hydantoin racemase from the native plasmid of *Pseudomonas* sp. strain NS671. *J. Bacteriol.* **174**:3461-3466.

第5章 考察

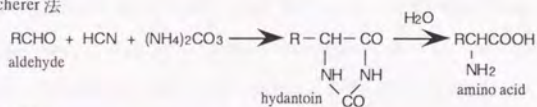
5-1 D-アミノ酸の工業的生産

5-1-1 出発基質

D-アミノ酸の製造法としては、酵素法が最も適していると考えられ、多くの研究がなされている。酵素法によるD-アミノ酸の出発基質としては、天然に存在する化合物を利用するか、合成法または発酵法にて生産された化合物を用いることになる。天然の化合物を利用した報告はなく、多くの場合は有機合成にて生産される化合物を出発基質として利用する。中でも、アミノ酸の合成法における合成中間体を利用する方法が多く用いられる。これは、比較的安価で安定した出発基質の供給が可能な場合が多く、簡単な酵素反応で光学活性なD-アミノ酸が得られるからである。

例えば、酵素法によるD-アミノ酸の出発基質として多くの適用例が報告されている5-置換ヒダントインは、代表的なアミノ酸合成法であるブッフュラー法の合成中間体である (Fig. 5-1)。5-置換-DL-ヒダントインは、置換基を変更することにより多くのD-アミノ酸の製造の基質となり得る優れた化合物である¹⁻¹⁴⁾。また、5-置換-DL-ヒダントインを加水分解できる比較的基質特異性の広い酵素が存在することも有利である。したがって、ブッフュラー法によるアミノ酸合成設備などの5-置換-DL-ヒダントインの製造に関連した有機合成の設備が整っている場合は、5-置換-DL-ヒダントインは安価に安定に供給できる優れた出発基質となる。例えば、DL-メチオニンのように、現在でもブッフュラー法で生産されているアミノ酸の場合は、5-置換-DL-ヒダントインは酵素法の有効な出発基質となり得る。しかし、発酵法による光学

(1) Bucherer 法



(2) Strecker 法

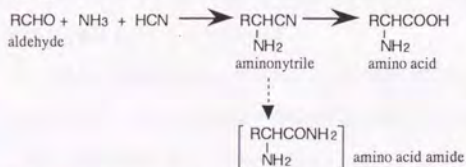


Fig. 5-1 合成法によるアミノ酸の製造法と酵素法の出発基質への利用

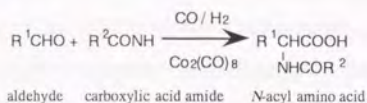


Fig. 5-2 合成法によるN-アシルアミノ酸の製造法

活性なL-アミノ酸の製造が主流である現在、合成法によるアミノ酸の製造は限られたものであり、安定した基質の供給が望めない場合も多いと予想される。また、プロリンのようなα位のアミノ基を側鎖複素環構造に含む特殊な構造をしたアミノ酸の原料となる5-置換-DL-ヒダントインの製造は困難であると思われる。

ブッフュラー法と並ぶ代表的なアミノ酸合成法であるストレッカー法の合成中間体であるアミノニトリルからの誘導体も酵素法によるD-アミノ酸の出発基質として利用される。アミノ酸アミドは、アミノニトリルからは1段の反応で、また、アルデヒドを合成原料と考えた場合でも2段の反応で容易に合成される (Fig. 5-1)。DL-アラニンのように、現在でもストレッカー法で生産されているアミノ酸の場合は、アミノ酸アミドは、有効な出発基質となり得る。しかし、ヒダントインの場合と同様に、合成法によるアミノ酸の製造は限られたものであり、安定した基質の供給が望めない場合も多いと予想される。

出発基質としてN-アシルアミノ酸を用いる方法も知られる。通常、N-アシルアミノ酸はアミノ酸から調製されるが、製造コストが高く、基質としては不利である。しかし、コバルト触媒を用いて、アルデヒドとカルボン酸アミド及び一酸化炭素から、1段の反応でN-アシルアミノ酸の合成が可能であり、比較的多くの種類のN-アシルアミノ酸の合成に利用できることが報告されている¹⁵⁾ (Fig. 5-2)。新たなN-アシルアミノ酸の合成法が確立すれば、酵素法による有効なD-アミノ酸の出発基質となる可能性もある。

α-ケト酸を出発原料とする酵素法も、各種のアミノ酸の製造に利用が可能である。この方法は、反応に多くの酵素や化合物を必要とする他、出発基質であるα-ケト酸が高価であるために製造コストが高くなるという欠点がある。フェニルピルビン酸及びその誘導体については、コバルト触媒を用いて、常圧の一酸化炭素雰囲気下での塩化ベンジルのダブルカルボニル化反応により安価に合成できる方法が開発されている¹⁶⁾。このような新たなα-ケト酸の生産方法が確立すれば、α-ケト酸を出発基質とする酵素法によるD-アミノ酸の製造の可能性もでてくると思われる。

合成法は、様々な有機合成技術を駆使して目的に合った多様な化合物の生産が可能であり、出発基質の供給方法として優れている。また、出発基質が安価な有機合成原料から比較的簡単なステップで生成される場合には、工業的な基質供給方法として有利である。しかし、合成のステップが多い場合や、発酵法などにより供給される化合物を原料に合成する場合は、出発基質の製造コストが高くなり不利であ

る。また、合成法による基質供給のためには、有機合成の設備と技術が必要である。したがって、基質供給の条件によっては、合成法で製造される化合物を利用する方法は必ずしも有利とはいえない。

一方、発酵法にて生産される化合物は、合成法と比較して、種類が限られることから、酵素法の出発基質としての選択の範囲は狭い。このため、発酵法にて安価に生産されるL-アミノ酸などの化合物は、合成法によりN-アシル体などの誘導体としてから酵素法に利用される場合も多い。L-アミノ酸そのものは、酵素法によるD-アミノ酸の製造原料として注目されない場合もあるが、1段のラセミ化反応により50%のL-アミノ酸がD-アミノ酸に転換され、さらに1段の光学分割でD-アミノ酸が得られるため、有効な出発基質の一つであると考えられる。ラセミ化とその後の光学分割も、酵素法を利用すれば比較的容易である。また、L-グルタミン酸をはじめとする多くのL-アミノ酸が非常に安価に、大量に製造、供給されることも大きなメリットである。発酵法にて生産される化合物を出発基質として用いる場合は、発酵生産の設備と技術が必要になるが、酵素の生産にも発酵関連設備は必要となることから、酵素の供給も同時に行う場合には基質供給のための設備は問題にならない場合が多い。

このように、出発基質の供給は、酵素法によるD-アミノ酸の工業的生産が成立するための重要な要素である。合成法と発酵法、場合によっては酵素法も組み合わせて、安価に安定して出発基質を供給する方法を開発することが重要である。

5-1-2 方法論の比較

光学活性なD-アミノ酸を合成法や発酵法で生産することは困難であることから、D-アミノ酸の生産方法として酵素法を用いることが一般的である。

特に報告が多い製造法は、5-置換-DL-ヒダントインを用いる方法である。ジヒドロピリミニジンナーゼあるいはヒダントイナーゼによる5-置換-DL-ヒダントインの光学選択的な加水分解は、比較的多くのD-アミノ酸の製造に利用できる¹⁻¹⁴⁾。この方法は、加水分解されずに残存する5-置換-L-ヒダントインが光学選択的な加水分解の反応条件下で自然に化学的ラセミ化するため、出発基質のほとんど全てがD-アミノ酸に転換できる優れた方法である。しかし、基質合成の面から、 α -位のアミノ基を側鎖環状構造内に持つD-プロリンのような特殊な構造のアミノ酸の製造には適していない。また、既知酵素の基質特異性は広く、特に疎水性の置換基を持つヒダントインを良好に加水分解するが、酸性の置換基を有するヒダントインは基質としないか、基質としても反応性は悪い。したがって、この方法は、少なくとも既知酵素を利用する場合は、D-グルタミン酸やD-アスパラギン酸のような酸性アミノ酸の製造には適当ではない。

アシラーゼを用いたN-アシル-DL-アミノ酸の光学選択的な加水分解も、いくつかのD-アミノ酸の製造に利用できる¹⁷⁻²¹⁾。しかし、原料となるN-アシル-DL-アミノ酸が高価であり、基質の供給を考える

と実用的ではない場合が多い。また、既知酵素は、疎水性アミノ酸のN-アシル体は良好に加水分解するが、酸性、塩基性のアミノ酸のN-アシル体は基質としないか、基質としても反応性は悪い。したがって、この方法の場合も、D-グルタミン酸のような酸性アミノ酸の製造には適当ではない。また、特殊な構造のプロリンのN-アシル体を光学選択的に加水分解する酵素の報告もない。

アミダーゼを用いたDL-アミノ酸アミドの光学選択的な加水分解も、いくつかのD-アミノ酸の製造に利用できる²²⁻²⁸⁾。原料がアミノニトリルを経て安価に製造できるため、基質供給の面から有利である。特に、ストレッカー法で生産されているDL-アラニンの合成中間体から容易に生産されるアラニンアミドのような化合物を出発基質とする場合は、基質の供給も安定している。しかし、グルタミン酸のような酸性アミノ酸のアミドを基質として良好に反応する酵素は知られていない。

D-アミノ酸トランスアミナーゼを用いて α -ケト酸をD-アミノ酸に転換する方法は、酵素の基質特異性が広いことから、多くのD-アミノ酸の製造に応用できる可能性がある²⁹⁻³⁸⁾。しかし、原料となる α -ケト酸が高価であり、基質の供給を考えると実用的ではない。また、アミノ基供与体として別のD-アミノ酸が必要であり、その供給のために複数の酵素の共役が必要となる。このため、ラボスケールでの生産ならばともかく、工業的な大スケールでの生産のためには多くの工夫が必要であり、現状では現実的な製造方法とは言えない。

L-アミノ酸のラセミ化と光学分割によるD-アミノ酸の製造方法は、単純な方法であるが応用範囲は広く、ほとんど全てのD-アミノ酸の製造に利用可能であると思われる³⁹⁾。ほとんどのL-アミノ酸は発酵法により大量に、安価に生産されているため、出発基質としての条件は良好である。この方法は、原料のL-アミノ酸からのD-アミノ酸の収率が50%を超えることはないが、安価な原料を用いる場合は大きな問題とはならない。L-アミノ酸のラセミ化は、化学的にも酵素的にも可能である。アミノ酸ラセマーゼの種類は多く、ほとんど全てのアミノ酸の酵素的ラセミ化が可能である⁴⁰⁻⁴²⁾。また、酵素法によるラセミ化は特殊な装置を必要としない。いくつかのアミノ酸について、既知の酵素的ラセミ化反応と化学的ラセミ化反応を比較検討した結果、反応速度には大きな差はなく、反応収率は副反応のない酵素的ラセミ化反応の方が良好であった。ラセミ体からの光学分割は、酵素の持つ高い光学選択性を利用する必要がある。多くの微生物は、ほとんどの全てのL-アミノ酸を代謝できることから、L-アミノ酸に作用する酵素は必ず存在するはずである。スクリーニングにて、目的のL-アミノ酸に対する活性が高く、しかも光学選択性が高い酵素が取得できれば、酵素的な光学分割は可能である。光学分割は、必ずしも単一の酵素による必要はなく、複数の酵素が関与する微生物による代謝を利用しても良い。

以上のように、多くのD-アミノ酸の製造方法が知られるが、全てのD-アミノ酸の製造法として使われているという方法はなく、目的のD-アミノ酸によって適した製造方法は異なる。出発基質とともに、

反応に用いる酵素の選択も重要である。酵素の性質として、高い光学選択性と、目的の基質に対する高い触媒活性を有することが重要である。さらに、工業的生産を目的とする場合には、使用する酵素は高い基質濃度で反応が可能であり、高い生成物濃度を達成できる酵素であることも必要である。

5-1-3 本論の方法

本研究では、既存のD-アミノ酸の製造法を参考に、D-アラニン、D-グルタミン酸、およびD-プロリンの工業的生産を目的に、基質の供給、反応経路及び生成物の品質が現実的であり、目的に適した酵素の取得が可能な生産プロセスを選択した。その結果、アミノ酸アミドの光学特異的な加水分解によりD-アラニンの製造法を、L-アミノ酸の酵素的ラセミ化と光学分割によりD-グルタミン酸とD-プロリンの製造法を完成した。各方法について、出発基質、反応経路、酵素、酵素生産菌、生成物について、工業的生産方法としての妥当性を以下に確認する。

本研究で開発したD-アラニンの製造方法は、出発基質にストレッカー法で生産されるDL-アラニンの合成中間体から容易に生産されるDL-アラニンアミドを利用するため、安価で安定した基質の供給が期待できる。このため、DL-アラニンアミドを出発基質とした方法は、他の出発基質を利用した方法と比較して非常に有利である。また、D-アミダーゼを用いたDL-アラニンアミドの加水分解反応は、出発基質から1段の反応でD-アラニンを取得できるため、妥当な反応経路であると考えられる。本研究で取得した新規D-アミダーゼの光学選択性は非常に高く、菌体当たりの活性も十分高かった。さらに、本酵素は、300 g/lのDL-アラニンアミドを基質としても良好に反応し、高い収率でD-アラニンを生成したことから、工業的利用に適した酵素である。本研究で取得したD-アミダーゼは誘導酵素であるため、酵素生産量の培養時期による変動と、酵素誘導基質の必要性の問題があったが、D-アミダーゼの構成生産変異株の取得によりこれを解決した。したがって、使用する酵素と酵素生産菌の性質も十分であると考えられる。生成物であるD-アラニンの光学純度は99%以上であり、医薬品や農薬の製造原料として利用可能な高い品質であった。出発基質であるDL-アラニンアミドからのD-アラニンの収率は、理論的にも50%を超えることはない。本研究では、新規L-アミダーゼを取得し、残存するL-アラニンアミドから光学純度99%以上のL-アラニンを取得することにより、出発基質をむだなく利用した。ただし、生成物の必要性が、D-アラニンまたはL-アラニンの一方に偏る場合には残存するアラニンアミドの化学的または酵素的なラセミ化によるリサイクルが必要になると思われる。以上のように、本方法は、改良によりさらに優れたプロセスとなる余地はあるが、D-アラニンの工業的な生産方法として良好かつ妥当な方法であると判断した。

本研究で開発したD-グルタミン酸の製造方法は、出発基質に発酵法で生産されるL-グルタミン酸を選択したが、L-グルタミン酸は非常に安価に安定して供給されることから、出発基質として良好であ

る。D-グルタミン酸の生産方法は、L-グルタミン酸の酵素的ラセミ化と酵素的光学分割の2段階反応による。この方法は、容易に高い光学純度のD-グルタミン酸を取得できることから、反応経路としては妥当であると考えられる。第1段階の反応に用いる新規グルタミン酸ラセマーゼは、300 g/lのグルタミン酸を基質としても良好に反応したことから、工業的利用に適した酵素である。本酵素の生産菌は乳酸菌であることから、培養による酵素の大量生産が困難であり、菌体当たりの活性も十分高くはなかったが、*Escherichia coli* 組換え菌による酵素の生産によりこれらを解決した。また、第2段階の反応に用いる*E. coli*の生産するグルタミン酸デカルボキシラーゼは、菌体あたりの酵素活性が十分に高く、L-体選択性が高く、不可逆反応であることから、100 g/lのDL-グルタミン酸中のL-グルタミン酸を完全に分解することができ、工業的利用に適した酵素であると判断した。したがって、2段階の反応で使用する酵素と酵素生産菌の性質は十分であると考えられる。生成物であるD-グルタミン酸の光学純度は99%以上であり、医薬品や農薬の製造原料として利用可能な高い品質であった。出発基質であるL-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の収率は、理論的に50%を越えることはないが、出発基質が非常に安価なため大きな問題とはならない。DL-グルタミン酸の光学分割においてL-グルタミン酸をリサイクル可能な化合物に転換できる可能性はあるが、製造工程が複雑になる可能性が考えられる。以上のように、本方法は、改良によりさらに優れたプロセスとなる余地はあるが、D-グルタミン酸の工業的な生産方法として良好かつ妥当な方法であると判断した。

本研究で開発したD-プロリンの製造方法は、出発基質に発酵法で生産されるL-プロリンを選択したが、L-プロリンは非常に安価に安定して供給されることから、出発基質として良好である。D-グルタミン酸の製造法と同様に、D-プロリンの生産方法は、L-プロリンの酵素的ラセミ化と酵素的光学分割の2段階反応による。この方法は、容易に高い光学純度のD-プロリンを取得できることから、反応経路としては妥当であると考えられる。第1段階の反応に用いるプロリンラセマーゼは、400 g/lのプロリンを基質としても良好に反応したことから、工業的利用に適した酵素である。本酵素の菌体当たりの活性は比較的高かったが、生産菌が*Clostridium* 属の嫌気性細菌であることから、培養による酵素の大量生産が困難であった。この問題は、*E. coli* 組換え菌によるプロリンラセマーゼの生産により解決した。また、第2段階の反応に用いるプロリン分解菌は、L-体選択性とL-プロリン分解能が十分に高く、100 g/lのDL-プロリン中のL-プロリンを完全に分解することができ、工業的利用に適した菌株であると判断した。したがって、2段階の反応で使用する酵素と酵素生産菌の性質は十分であると考えられる。生成物であるD-プロリンの光学純度は99%以上であり、医薬品や農薬の製造原料として利用可能な高い品質であった。出発基質であるL-プロリンからのD-プロリンの収率は、理論的に50%を越えることはないが、出発基質が非常に安価なため大きな問題とはならない。DL-プロリンの光学分割においてL-プロリンをリサイクル可能な化合物

に転換できる可能性はあるが、製造工程が複雑になる可能性が考えられる。本方法は、改良によりさらに優れたプロセスとなる余地はあるが、D-プロリンの工業的な生産方法として良好かつ妥当な方法であると判断した。

これらの製造方法は、5 l または 30 l の発酵槽を用いて、スケールアップの可能性を確認している。さらに、いくつかの製造方法については 2 kl の発酵槽を用いた試作に成功している。

3 種類の D-アミノ酸の製造に用いる酵素（L-プロリンの分解を除く）、すなわち、D-アミダーゼ、グルタミン酸ラセマーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、プロリンラセマーゼはエネルギー非依存性である。確認はしていないが、L-アミダーゼもエネルギー非依存性であると予想される。したがって、これらの酵素にはエネルギー供給系の共役は必要ないことから、固定化酵素としてさらに効率的な生産の可能性が考えられる。

以上のように、本研究で完成した 3 種類の D-アミノ酸の製造方法は、いずれも、安価な出発基質から優れた性質を持つ酵素を用いて、比較的簡単な反応経路で高い光学純度の生産物を理論収率に近い高い収率で生産できたことから、良好かつ妥当な生産プロセスであると考えられる。

5-1-4 他への応用の可能性

本論の方法の他への応用の可能性を、手法と取得した酵素の両方について考察する。

D-体特異的アミダーゼを用いる DL-アミノ酸アミドからの D-アミノ酸の製造方法は、比較的基質特異性が広い D-アミダーゼも知られていることから、良好な性質を持つ酵素が取得できれば、他への応用も可能であると思われる。しかし、出発基質の DL-アミノ酸アミドが安価に供給できない場合は、工業的生産方法としては成立しないと思われる。DL-アラニンアミド以外の DL-アミノ酸アミドの供給の可能性については不明である。

一方、L-アミノ酸を出発基質としたラセマーゼによるラセミ化、及び酵素的光学分割による D-アミノ酸の製造方法は、応用範囲が広く、ほとんど全てのアミノ酸に適用できると予想される。その理由は、一部を除きほとんどの L-アミノ酸が発酵法にて安価に供給可能なこと、ほとんどのアミノ酸に対してラセミ化可能な酵素の存在が知られること⁴⁰⁻⁴²⁾、そして、全ての L-アミノ酸に対して代謝可能な微生物が必ず存在することである。

次に、本研究で取得した酵素の他への利用の可能性であるが、どの酵素も基質特異性が非常に狭いことから、他への利用の可能性は低いと考えられる。D-アミダーゼは、基質特異性が狭いため、他の D-アミノ酸アミドの光学選択的な加水分解にはほとんど利用できない。また、D-アミダーゼは D-アミノベプチダーゼ活性は持たないことから、加水分解の逆反応を利用した D-アミノ酸を含むペプチドの合成には

利用できないと思われる。L-アミダーゼについても同様である。グルタミン酸ラセマーゼとプロリンラセマーゼについても、基質特異性が非常に狭いことから、グルタミン酸及びプロリンのラセミ化以外の目的には利用できないと考えられる。

5-1-5 他の酵素法

本研究のD-アラニン、D-グルタミン酸、D-プロリンの製造方法は、他の酵素法によるD-アミノ酸の方法と比較検討した上で完成した方法であり、現状では、他の優れた実用的な生産方法を見出すことは困難である。しかし、他の有効な基質の供給の可能性があれば、他の酵素法によるこれらのD-アミノ酸の生産の可能性はある。また、いくつかの改善の余地がある部分については、他の酵素法に変更することにより、より効率的な生産に改良できる可能性は残っている。

D-アラニンの生産については、酵素法の出発基質であるDL-アラニンアミドをDL-2-アミノプロピオニトリルから合成法にて生成しているが、DL-2-アミノプロピオニトリルから直接、酵素的にD-アラニンを生成する方法も考えられる。このような酵素としては、ニトリルからカルボン酸を生成するニトリラーゼと、アミドを生成するニトリルヒドラターゼが知られる⁴³⁻⁴⁶⁾。ニトリルヒドラターゼとアミダーゼを用いた2段階の酵素反応でニトリルからアミドを経由してD-アミノ酸を得る方法は、ニトリルからアミドの化学的な合成反応とアミダーゼを組み合わせた方法と比較して、必ずしも有利とは言えない。一方、ニトリラーゼによるニトリルから直接光学純度の高いD-アミノ酸の生産が可能であれば、合成反応が1段階減ることから工業的に有利になる可能性はある。

D-グルタミン酸とD-プロリンの生産方法は、安価に発酵生産されるL-アミノ酸を出発基質とするが、出発基質の供給を考えると、グルタミン酸やプロリンに対応する5-置換ヒダントイン、N-アシルアミノ酸、アミノ酸アミドなどを出発基質として利用できる可能性は少ない。別の可能性として、発酵法と酵素法を組み合わせ、L-アミノ酸の発酵をDL-アミノ酸の発酵に変更する可能性が考えられる。グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子及びプロリンラセマーゼ遺伝子はすでに取得しており、L-グルタミン酸生産菌及びL-プロリン生産菌の遺伝子組換え系も確立していることから、L-グルタミン酸またはL-プロリン生産菌にラセマーゼも同時に生産させ、DL-アミノ酸の発酵生産の可能性はある。ただし、D-アミノ酸のアミノ酸発酵生産に対する影響は不明であり、悪影響がある場合には、ラセマーゼの時期特異的な発現、例えば、L-アミノ酸の発酵生産後にラセマーゼを生産させることによりL-アミノ酸をラセミ化する方法が考えられる。さらに、L-体の発酵生産及びラセミ化が進行する的中性付近のpHでは作用せずに酸性域で作用するグルタミン酸デカルボキシラーゼのようなL-体除去用の酵素も、L-アミノ酸生産菌に同時に生産させれば、L-体の発酵生産、ラセミ化、L-体の光学選択的除去が全て単一の菌で行える可能性も考えられる。

また、D-グルタミン酸とD-プロリンの製造方法では、ラセミ体からの光学分割においてL-体を再利用が困難な化合物に変換しているが、他の酵素を用いることにより再利用の可能性はある。例えば、DL-プロリン中のL-体の光学選択的除去に、L-プロリンオキシダーゼを用いた酸化による Δ^1 -ピロリン-2-カルボン酸への変換が考えられる。この場合、 Δ^1 -ピロリン-2-カルボン酸の水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元によるDL-プロリンへのリサイクルを繰り返せば、全てをD-プロリンに変換可能である。Hunらは、D-体特異的オキシダーゼを用いたこの手法で、DL-プロリンをL-プロリンに変換している⁴⁷⁾。L-プロリンのオキシダーゼは*Bacillus subtilis*に存在が知られるが、光学選択性についての記述はない⁴⁸⁾。L-プロリンオキシダーゼと水素化ホウ素ナトリウムの組み合わせは、 Δ^1 -ピロリン-2-カルボン酸のプロリンへの還元においてラセミ化が起るため、プロリンラセマーゼによるプロリンのラセミ化の必要はなくなり、L-プロリンを直接利用できる。その他、L-アミノ酸のリサイクル可能な化合物への変換の可能性はあるが、出発原料であるL-体が非常に安価なため、リサイクルは製造工程が複雑になり工業的に不利になる場合も予想される。

D-トランスアミナーゼを用いた α -ケト酸からのD-アミノ酸の生産は、高価な α -ケト酸の供給と複数の酵素の共役の問題から現実的な酵素法ではないと判断したが、発酵法との組み合わせで実現の可能性も考えられる。いくつかのアミノ酸発酵では、アミノ酸の前駆体として α -ケト酸を経由する。このアミノ酸生産菌の α -ケト酸に続く酵素反応を弱めて、かわりに α -ケト酸に作用するD-トランスアミナーゼと関連する複数の酵素を導入し、これらの共役が成立すれば、休止菌体または生育菌体によるD-アミノ酸の発酵・酵素法による生産の可能性も考えられる。

D-アラニン、D-グルタミン酸、D-プロリンの3種類のD-アミノ酸の製造法だけでも、新たな出発基質と酵素の開発により、新たな製造法の可能性は残っている。ほとんど全ての化学反応を触媒する酵素が存在するとされており、自然界には非常に多様な酵素が存在し、未知の機能を持つ酵素の存在も期待できることから、アミノ酸に変換可能な出発基質の供給が可能になれば、それに対応する酵素を取って、新たなD-アミノ酸の製造法が確立する可能性があると考えられる。

5-2 立体特異的アミダーゼ

アミダーゼは、微生物から動物細胞まで広く存在が知られるが、アミノ酸アミドを加水分解する立体特異性の高い酵素の報告は少ない。アミノ酸アミドを加水分解するアミダーゼの生体内における役割としては、アミノ酸アミドの代謝やアミドを経由する生合成に関与することが考えられる。しかし、D-アミダーゼが基質とするD-アミノ酸アミドの生体内での存在量はわずかであると思われることから、D-アミダーゼの生体内における役割は不明である。一つの可能性として、D-アミダーゼの本来の機能がD-ペプチダーゼである可能性が考えられる。D-ペプチダーゼは、細菌細胞壁のペプチドグリカン中のD-アラニンなどのD-アミノ酸の連結に必要であり、また、一部の微生物の生産するD-アミノ酸を含む抗生物質の生合成あるいは分解に関与する可能性も考えられる。このような酵素としては、浅野らが見出した *Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38のD-アミノペプチダーゼがある^{49,54)}。この酵素は、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て加水分解を触媒する他、逆反応によるD-アラニンを含むペプチドの合成も可能なことから、D-アミノペプチダーゼであると考えられる。ただし、浅野らは、この酵素の構造と諸性質から、第3のペニシリン認識酵素であると推定している⁵³⁾。この酵素とは異なり、本研究で見出した *Arthrobacter* sp. NJ-26の新規D-アミダーゼは、D-アラニンアミドとグリシンアミドを加水分解する非常に狭い基質特異性を有し、D-アミノペプチダーゼ活性は持たなかった。また、浅野らが見出した、*Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3のD-アミダーゼ^{49,55)}も、D-アミノペプチダーゼ活性は持たない。したがって、D-アミノペプチダーゼとは異なるD-アミダーゼも存在することは明らかだが、その生体内における役割は不明である。その他、銅谷らは *Rhodococcus erythropolis* JCM 3201⁵⁶⁾、NR-23, NR-28^{57,59)}、*Pseudomonas fluorescens* IFO 12055⁵⁶⁾、*Serratia marcescens* IAM 12143⁵⁶⁾、*Achromobacter cycloclac* IAM 1013⁶⁰⁾、*Alcaligenes faecalis* IAM 1420⁶⁰⁾、*Kurtzia zophii* IFO1283⁶⁰⁾から、ベステンらは *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11538, 11539, 11540, 12019⁶¹⁾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が、これらの酵素のD-アミノペプチダーゼ活性の有無についての報告ない。

一方、L-アミノ酸アミドを光学選択的に加水分解するL-アミダーゼの生体内における役割としては、アミノ酸アミドの代謝やアミドを経由する生合成への関与と、L-アミノペプチダーゼの機能の一つなどの可能性が考えられる。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. 4A⁶²⁾、*Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321⁶³⁾、*Pseudomonas putida* ATCC 12633⁶⁴⁾、*Arthrobacter* sp. ATCC 31652⁶⁵⁾、*Corynebacterium* sp. ATCC 31662⁶⁵⁾の生産する酵素が知られる。これらの酵素は比較的基質特異性は広いが、ペプチダーゼとしての活性の有無については報告されていない。また、本研究で取得した、*Rahnella* sp. L-5のL-アミダーゼはL-アラニンアミド以外のアミノ酸アミドの加水分解活性は低く、狭い基

質特異性を有するが、ペプチダーゼとしての活性の有無については確認していない。これらのL-アミダーゼの生体内における役割も不明である。

詳細な酵素的性質が明らかになっているD-体特異的なアミダーゼは、本研究で見出した *Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼ、及び浅野らの *Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38のD-アミノペプチダーゼと *Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3のD-アミダーゼだけである。*Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼは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する非常に狭い基質特異性を有するが、他のD-アミダーゼはD-アラニンアミドを含むいくつかのアミノ酸アミドを良好な基質とし、基質特異性は広い。また、*Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼの反応はPCMBなどのSH酵素の阻害剤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た。*Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38のD-アミダーゼの性質も持つD-アミノペプチダーゼも同様に、活性に関与するSH基を持つことが予想された³⁰⁾。これらとは異なり、*Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3のD-アミダーゼは、SH酵素の阻害剤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た³⁵⁾。したがって、D-アミダーゼには、アミノ酸アミドの加水分解反応の触媒機構に複数の型が存在することが予想される。また、酵素蛋白の分子量についても、*Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼが分子量約 51,000のモノマー酵素であるのに対して、*Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38の酵素は分子量約 59,000のサブユニット2個からなる分子量約 122,000の酵素、*Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3の酵素は分子量約 38,000の酵素と様々であった。これらの酵素の触媒機構を明らかにするためには、酵素の一次構造や高次構造の解析も必要である。

一方、L-体特異的なアミダーゼで酵素的性質が詳細に検討されている酵素は、*Brevibacterium* sp. 4Aの生産する分子量135,000のL-アミダーゼのみである⁶²⁾。*Brevibacterium* sp. 4AのL-アミダーゼはL-アラニンアミド以外のアミドも基質とする比較的広い基質特異性を有したのに対して、本研究で取得した *Rahnella* sp. L-5のL-アミダーゼ（未精製）はL-アラニンアミド以外のアミノ酸アミドの加水分解活性は低く、狭い基質特異性を有した。また、*Brevibacterium* sp. 4AのL-アミダーゼは、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 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。この性質は*Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼ及び*Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38のD-アミノペプチダーゼと同じであり、類似したアミノ酸アミドの加水分解反応の触媒機構を持つ可能性が考えられる。*Rahnella* sp. L-5のL-アミダーゼについては未精製のため、酵素的性質は不明である。

本研究で取得した、*Arthrobacter* sp. NJ-26のD-アミダーゼと*Rahnella* sp. L-5のL-アミダーゼは、厳密な立体選択性がD-体とL-体と全く異なるが、どちらもアラニンアミドに対する狭い基質特異性を有する共通点もある。両酵素の詳細な酵素的性質と構造に関する検討による触媒機構と立体選択性の機構の解明と、それらを利用した酵素改良の可能性が期待される。

5-3 補酵素非依存性ラセマーゼ

アミノ酸ラセマーゼはアミノ酸の不斉 α -炭素に作用してラセミ体を生成する反応を触媒する。アミノ酸エピメラーゼは複数の不斉炭素に作用するが、本質的には同種の酵素である。多くのアミノ酸ラセマーゼは補酵素としてPLPを有し、PLPと基質が Schiff 塩基を形成することにより基質を活性化して α -水素を引き抜きやすい状態とする⁽⁴⁰⁻⁴²⁾。

しかし、補酵素を持たないラセマーゼも知られる。本研究で諸性質を明らかにした *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 や既知の *Pediococcus pentosaceus* IFO 3182^(66,71)、*Lactobacillus fermenti* ATCC 9338⁽⁷²⁻⁷⁷⁾ のグルタミン酸ラセマーゼ、*Streptococcus thermophilus* IAM 10064 のアスパラギン酸ラセマーゼ^(78,80)、本研究で一次構造を明らかにした既知の *Clostridium sticklandii* ATCC 12662 のプロリンラセマーゼ^(81,90)、*Pseudomonas putida* ATCC 15070 のヒドロキシプロリン 2-エピメラーゼ^(91,93)、*Escherichia coli* K-12 のジアミノピメリン酸エピメラーゼ^(94,96)などが、補酵素非依存性が明らかになっているラセマーゼである。これらの補酵素非依存性ラセマーゼは、補欠分子族としての金属イオンも持たない。これらの酵素の中で、プロリンラセマーゼとヒドロキシプロリンエピメラーゼは、基質のイミノ酸がカルボニル基と Schiff 塩基を形成し得ないので、補酵素としてPLPを利用しないことは当然と思われる。各酵素のラセミ化の反応機構については比較的詳しく検討されている。どの酵素も、基質の α -水素の引き抜きと水素の供与によるラセミ化には、酵素蛋白中のシステイン残基2個が関与することが示唆されている。

ラセミ化におけるシステイン残基関与の類似性は示唆されたが、基質であるプロリンとヒドロキシプロリンは、グルタミン酸、アスパラギン酸、ジアミノピメリン酸とは構造が異なることから、酵素の活性中心付近の構造も異なることが予想される。酵素のアミノ酸配列の比較の結果、プロリンラセマーゼとヒドロキシプロリンエピメラーゼの活性中心付近の配列に相同性が認められた他、ジアミノピメリン酸エピメラーゼもこれらとわずかに相同性を示した。また、乳酸菌由来の3種のグルタミン酸ラセマーゼ間の相同性は高く、グルタミン酸ラセマーゼとアスパラギン酸ラセマーゼの活性中心付近の配列にも相同性が認められた。さらに、補酵素の関与についての報告はないが、グルタミン酸ラセマーゼ活性を有する *Escherichia coli* 由来の *murI* 産物⁽⁹⁷⁾もグルタミン酸ラセマーゼの活性中心付近の配列に相同性を認めた。

これらの比較検討の結果から、補酵素非依存性ラセマーゼの活性中心付近の構造には少なくとも2つの型、すなわち、プロリンラセマーゼやヒドロキシプロリンエピメラーゼなどのイミノ酸のラセマーゼと、グルタミン酸ラセマーゼやアスパラギン酸ラセマーゼなどの酸性アミノ酸のラセマーゼが存在することが予想される。ジアミノピメリン酸エピメラーゼはイミノ酸のラセマーゼとわずかに相同性を示したが、基質の構造が異なるため別の型の酵素であることも考えられる。補酵素非依存性のラセマーゼとして

は、乳酸菌の乳酸ラセマーゼも知られるが^{98,99)}、これらの酵素の詳細な検討はされていない。また、*Pseudomonas* sp. NS671 のヒダントインラセマーゼ¹⁰⁰⁾も基質の構造から、PLPは関与していないと予想される。これらの、詳細な性質が明らかになっていない酵素も含めて、補酵素非依存性のラセマーゼの反応機構の解明と、新たな応用、利用方法の開発が期待される。

5-4 酵素法一般

酵素法は、合成法では困難な高い立体・位置選択的な反応が可能である。また、酵素法は、発酵法では生産または多量の蓄積が困難な非天然あるいは希少物質の生産が可能である。このような特徴を発揮できる場合、酵素法は優れた物質生産方法として評価される。本研究では、酵素法による3種類のD-アミノ酸の製造法を検討したが、酵素法の利用範囲は非常に広く、アミノ酸、核酸関連物質や有機酸、その他の化学工業原料の生産、糖や油脂の変換、ステロイド、アルカロイド、抗生物質の合成や変換など、多くの物質生産に利用が可能である。実際、抗生物質、ステロイド、アルカロイドその他の生理活性物質や抗ウイルス剤等の核酸関連物質などの、比較的付加価値の高い物質またはその製造原料の生産で実用化された例が多い^[101,102]。しかし、付加価値の低い物質に関しては、製造が可能であっても実生産されていない場合も多い。これは、基質と酵素の供給や性質などの問題によると思われる。

酵素の供給については、遺伝子組換え技術などによる酵素の安価な大量供給と固定化酵素法の開発によってかなり改善されると思われる。また、別の問題として、基質の供給がある。基質の供給は、主に合成法、場合によっては発酵法によって行われる。これらの技術は酵素法よりかなり前から存在し独立して発展してきたが、合成法や発酵法と酵素法の研究の融合により、さらに優れた基質供給経路が開発されることが望まれる。また、発酵法から発展した酵素法と、合成法から発展した酵素法の融合により、さらに優れた反応経路が開発されることが期待される。

酵素の触媒としての性質についてのいくつかの欠点も指摘されている^[103]。そのひとつが、酵素の不安定な物理化学的性質である。この安定性の低さのため、触媒として利用できる反応条件が非常に限られたものとなる。酵素の安定性については、耐熱性菌の生産する酵素の利用などにより徐々に改善されているほか、まだ手探りの状態ではあるが、蛋白質工学・酵素工学の研究により、人工的に物理化学的に強い性質を有する酵素の造成も行われている。もう一つの大きな問題が、反応系へのエネルギーの供給である。合成法ではほとんどの場合は安価な熱によりエネルギーが供給されるが、酵素法では高価な高エネルギー化合物を利用する必要がある。このため、実用化されている多くの酵素反応はエネルギー非依存性の反応であり、利用できる酵素反応の範囲が限られる。しかし、休止菌体によるエネルギーや他の反応に必要な要素の供給系を利用した方法も開発されている。酵素反応におけるエネルギー供給の問題は、休止菌体の利用や酵素法と発酵法の融合により解決は可能であると考えられる。

また、酵素が触媒する反応の種類に関しては、スクリーニングにて目的の反応に適した酵素を偶然に手に入れることが従来の方法であった。将来、酵素の基礎的な研究と酵素工学などの研究の蓄積と発展により、酵素の人工的な改変や新しい酵素の工的な生産が可能になることも期待される。

今のところ、触媒としての酵素は、天然の酵素、あるいは変異により偶然に得た性質が変化した酵素の利用に限られる。しかし、天然に存在する酵素だけを考えても、ほとんどあらゆる有機合成反応を触媒可能な何らかの酵素が存在するとされており、酵素を生産する生物（主に微生物）はほぼ無限に存在することから、酵素は万能ではないが無限に近い可能性を持つと期待される。

酵素法の利点を生かした物質生産であっても、基質の供給や反応経路を考えると、酵素法単独で最良の生産方法が成立することはない。酵素法が単独の技術としてではなく、合成法や発酵法などとともに、必要に応じて融合しながら発展することが望まれる。

5-5 文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Olivieri, R., Fascetti, E., Angelini, L., and Degen, L. (1981) Microbial transformation of racemic hydantoin to D-amino acids. *Biotechnol. Bioeng.* 23:2173-2183.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Morin, A. (1993) Use of D-hydantoinase extracted from legumes to produce N-carbamyl D-amino acids. *Enzyme Microb. Technol.* 15:208-214.
- 8) Yamada, H., Takahashi, S., Kii, Y., and Kumagai, H. (1978) Distribution of hydantoin hydrolyzing activity in microorganisms. *J. Ferment. Technol.* 56:484-491.
- 9) 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.
- 10) Morin, A., Hummel, W., and Kula, M.-R. (1986) Rapid detection of microbial hydantoinase on solid medium. *Biotechnol. Lett.* 8:573-576.
- 11) Morin, A., Hummel, W., and Kula, M.-R. (1987) Enrichment and selection of hydantoinase-producing micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* 133:1201-1207.
- 12) 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.

- 13) 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.
- 14) 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ック.
- 15) 井沢邦輔 (1988) アミドカルボニル化反応を用いる *N*-アシル- α -アミノ酸の合成. *有機合成化学* **46**:218-231.
- 16) 浅野泰久 (1988) ケト酸よりL-アミノ酸の酵素的合成. *日本農芸化学会誌* **62**:779-782.
- 17) Sugie, M., and Suzuki, H. (1980) Optical resolution of DL-amino acids with D-aminoacylase of *Streptomyces*. *Agric Biol. Chem.* **44**:1089-1095.
- 18) 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.
- 19) Moriguchi, M., and Ideta, K. (1988) Production of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* MI-4. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2767-2770.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Soda, K., Yonaha, K., and Misono, H. (1974) Purification and crystallization of D-amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. *FEBS Lett.* 46:359-363.
- 31) Yonaha, K., Misono, H., and Soda, K. (1975) Reconstitution of D-amino acid aminotransferase. *FEBS Lett.* 55:265-267.
- 32) Yonaha, K., Misono, H., Yamamoto, T., and Soda, K. (1975) D-Amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. *J. Biol. Chem.* 250:6983-6989.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.

- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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 dacunhae* cells. *J. Ferment. Bioeng.* **67**:233-237.
- 40) 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.
- 41) 左右田健次 (1974) アミノ酸ラセマーゼ. 生化学 **46**:203-222.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) Klages, U., and Weber, A. (1989) PCT WO 89/10969. Process for producing L-amino acids and amino acid amides.
- 47) Hun, J.W., Yokoigawa, K., Esaki, N., and Soda, K. (1992) Synthesis of L-proline from the racemate by coupling of enzymatic enantiospecific oxidation and chemical non-enantiospecific reduction. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:189-190.
- 48) Atkinson, M.R., Wray, L.V., Jr., and Fisher, S.H. (1990) Regulation of histidine and proline degradation enzymes by amino acid availability in *Bacillus subtilis*. *J.*

- Bacteriol.* 172:4758-4765.
- 49) 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.
 - 50) 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.
 - 51) 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.
 - 52) 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.
 - 53) 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.
 - 54) 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.
 - 55) 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.
 - 56) 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.
 - 57) 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.
 - 58) 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.
 - 59) 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.
 - 60) 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.
 - 61) 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.
- 62) 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.
 - 63) 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.
 - 64) 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.
 - 65) Klages, U., and Weber, A. (1989) PCT WO 89/10969. Process for producing L-amino acids and amino acid amides.
 - 66) Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K. (1986) Cloning and expression in *Escherichia coli* of glutamate racemase gene from *Pediococcus pentosaceus*. *Agric. Biol. Chem.* 50:2823-2830.
 - 67) Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K. (1988) Distribution of glutamate racemase in lactic acid bacteria and further characterization of the enzyme from *Pediococcus pentosaceus*. *Agric. Biol. Chem.* 52:3099-3104.
 - 68) Choi, S.Y., Esaki, N., Yoshimura, T., and Soda, K. (1992) Reaction mechanism of glutamate racemase, a pyridoxal phosphate-independent amino acid racemase. *J. Biochem.* 112:139-142.
 - 69) 中島伸佳, 谷沢克行, 田中英彦, 左右田健次 (1987) 乳酸菌のグルタミン酸ラセマーゼの酵素化学的研究とその応用. *発酵と工業* 45:360-361.
 - 70) 中島伸佳, 左右田健次 (1987) ピリドキサルリン酸比依存性アミノ酸ラセマーゼ. *化学* 43:212-213.
 - 71) 吉村徹, 左右田健次 (1994) グルタミン酸ラセマーゼの構造と機能. *バイオサイエンスとインダストリー* 52:34-36.

- 72) 田中正生, 加藤洋, 木下祝郎 (1961) アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第 8 報) グルタミン酸ラセマーゼの配合群について. *日本農芸化学会誌* **35**:1381-1385.
- 73) Tanaka, M., Kato, Y., and Kinoshita, S. (1961) Glutamic acid racemase from *Lactobacillus fermenti* purification and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**:114-117.
- 74) Diven, W.F. (1969) Studies on the amino acid racemase. II. Purification and properties of glutamate racemase from *Lactobacillus fermenti*. *Biochim. Biophys. Acta* **191**:702-706.
- 75) Gallo, K.A., and Knowles, J.R. (1993) Purification, cloning, and cofactor independence of glutamate racemase from *Lactobacillus*. *Biochemistry* **32**:3981-3990.
- 76) Gallo, K.A., Tanner, M.E., and Knowles, J.R. (1993) Mechanism of the reaction catalyzed by glutamate racemase. *Biochemistry* **32**:3991-3997.
- 77) Tanner, M.E., Gallo, K.A., and Knowles, J.R. (1993) Isotope Effects and the identification of catalytic residues in the reaction catalyzed by glutamate racemase. *Biochemistry* **32**:3998-4006.
- 78) Okada, H., Yohda, M., Giga-Hama, Y., Ueno, Y., Ohdo, S., and Kumagai, H. (1991) Distribution and purification of aspartate racemase in lactic acid bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1078**:377-382.
- 79) Yohda, M., Okada, H., and Kumagai, H. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the aspartate racemase gene from lactic acid bacteria *Streptococcus thermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**:234-240.
- 80) Yamauchi, T., Choi, S.-Y., Okada, H., Yohda, M., Kumagai, H., Esaki, N., and Soda, K. (1992) Properties of aspartate racemase, a pyridoxal 5'-phosphate-independent amino acid racemase. *J. Biol. Chem.* **267**:18361-18364.
- 81) Cardinale, G.J., and Abeles, R.H. (1968) Purification and mechanism of action of proline racemase. *Biochemistry* **7**:3970-3978.
- 82) Rudnick, G., and Abeles, R.H. (1975) Reaction mechanism and structure of the active site of proline racemase. *Biochemistry* **14**:4515-4522.
- 83) Fisher, L.M., Alberly, W.J., and Knowles, J.R. (1986) Energetics of proline racemase. Racemization of unlabeled proline in the unsaturated, saturated, and oversaturated regimes. *Biochemistry* **25**:2529-2537.

- 84) **Fisher, L.M., Albery, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Tracer perturbation experiments using [^{14}C] proline that measure the interconversion rate of the two forms of free enzyme. *Biochemistry* 25:2538-2542.
- 85) **Fisher, L.M., Belasco, J.G., Bruice, T.W., Albery, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Transition-state fractionation factors for the two protons involved in the catalytic steps. *Biochemistry* 25:2543-2551.
- 86) **Belasco, J.G., Albery, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Double fractionation experiment, a test for concertedness and for transition-state dominance. *Biochemistry* 25:2552-2558.
- 87) **Belasco, J.G., Bruice, T.W., Albery, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Fractionation factors for the essential catalytic groups in the enzyme-substrate complexes. *Biochemistry* 25:2558-2564.
- 88) **Belasco, J.G., Bruice, T.W., Fisher, L.M., Albery, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetics of proline racemase. Rates, fractionation factors, and buffer catalysis in the oversaturated region. Nature of the interconversion of the two forms of free enzyme. *Biochemistry* 25:2564-2571.
- 89) **Albery, W.J., and Knowles, J.R.** (1986) Energetic and mechanism of proline racemase. *Biochemistry* 25:2572-2577.
- 90) **Keenan, M.V., and Alworth, W.** (1974) The inhibition of proline racemase by a transition state analogue: Δ -1-pyrroline-2-carboxylate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57:500-504.
- 91) **Finlay, T.H., and Adams, E.** (1970) Kinetic and structural studies of hydroxyproline 2-epimerase. *J. Biol. Chem.* 245:5248-5260.
- 92) **Ramaswamy, S., and Adams, E.** (1979) Active site peptide from hydroxyproline 2-epimerase. *Fed. Proc.* 38:725.
- 93) **Ramaswamy, S.G.** (1984) Hydroxyproline 2-epimerase of *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 259:249-254.
- 94) **Wiseman, J.S., and Nichols, J.S.** (1984) Purification and properties of diaminopimelic acid epimerase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259:8907-8914.
- 95) **Richaud, C., Higgins, W., Mengin-Lecreulx, D., and Stragier, P.** (1987)

- Molecular cloning, Characterization, and chromosomal localization of *dapF*, the *Escherichia coli* gene for diaminopimelate epimerase. *J. Bacteriol.* **169**:1454-1459.
- 96) Higgins, W., Tardif, C., Richaud, C., Krivanek, M.A., and Cardin, A. (1989) Expression of recombinant diaminopimelate epimerase in *Escherichia coli*: Isolation and inhibition with an irreversible inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **186**:137-143.
- 97) Yoshimura, T., Ashiuchi, M., Esaki, N., Kobatake, C., Choi, S.-Y., and Soda, K. (1993) Expression of *glr* (*murI*, *dga*) gene encoding glutamate racemase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**:24242-24246.
- 98) Hiyama, T., Fukui, S., and Kitahara, K. (1968) Purification and properties of lactate racemase from *Lactobacillus sake*. *J. Biochem.* **64**:99-107.
- 99) Stetter, K.O., and Kandler, O. (1973) Untersuchungen zur entstehung von DL-milchsaure bei *Lactobacillen* und charakterisierung einer milchsaureracemase bei einigen arten der untergattung *Streptobacterium*. *Arch. Mikrobiol.* **94**:221-241.
- 100) Watanabe, K., Ishikawa, T., Mukohara, Y., and Nakamura, H. (1992) Identification and sequencing of gene encoding a hydantoin racemase from the native plasmid of *Pseudomonas* sp. strain NS671. *J. Bacteriol.* **174**:3461-3466.
- 101) 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.
- 102) 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.
- 103) 泉美治 (1980) 生物生産のアセスメント. 化学と生物 **18**:498-500.

第6章 まとめ

本研究では、有用なD-アミノ酸の工業的な生産方法の確立を目的に、D-アラニン、D-グルタミン酸及びD-プロリンを対象として、工業的に有利な出発基質の選定、出発基質に適合した新規酵素機能の探索、及びそれらを用いた生産システムの構築、に関する研究を行った。

(1) D-アラニン生産方法の開発

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、菌体あたりの活性が高い良好な酵素を取得した。このD-アミダーゼは、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。
3. *Arthrobacter* sp. NJ-26の生産するD-アミダーゼは誘導酵素であったが、生産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D-アミダーゼを構成的に生産するだけでなく、アミダーゼ活性が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。
5. D-アラニンを生産後に残存する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、菌体あたりの活性が高い良好な酵素を取得した。この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ばかりでなく、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。
6. 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-アラニンを生産する工業的なプロセスを完成した。

(2) D-グルタミン酸生産方法の開発

1. L-グルタミン酸を原料に、グルタミン酸ラセマーゼによるラセミ化とグルタミン酸デカルボキシラーゼによるL-グルタミン酸の選択的分解の2段階の酵素反応によるD-グルタミン酸の製造法の検討をした。
2. 第1段階のグルタミン酸のラセミ化に用いるグルタミン酸ラセマーゼのスクリーニングを行い、*Lactobacillus brevis* ATCC 8287 から、菌体あたりの活性が高く、高基質濃度（L-グルタミン酸 200 g/l 以上）でも機能する良好な酵素を取得した。このグルタミン酸ラセマーゼは、補酵素非依存性のラセマーゼであり、活性に関与するSH基を有することが示唆された。また、本酵素は高い基質濃度でも基質阻害による活性低下は認められず、工業利用に適した特徴を持っていた。
3. グルタミン酸ラセマーゼ生産菌 *L. brevis* ATCC 8287 の多量の菌体取得が困難であることを解決するために、グルタミン酸ラセマーゼの *E. coli* 組換え体での生産を検討した。本酵素の遺伝子を取得し、*E. coli* 組換え体で生産することにより、*L. brevis* ATCC 8287 の約150倍の菌体活性で本酵素の生産が可能になった。この組換え体 *E. coli* TM93/pGAR1 が生産するグルタミン酸ラセマーゼを用いることにより、効率的な第1段階のL-グルタミン酸のラセミ化反応が可能になった。
4. *L. brevis* ATCC 8287 のグルタミン酸ラセマーゼのアミノ酸配列と、既知の乳酸菌由来のグルタミン酸ラセマーゼ、*E. coli* のグルタミン酸ラセマーゼ活性を有する *murI* 遺伝子産物、及び乳酸菌由来のアスパラギン酸ラセマーゼとのアミノ酸配列の比較で、ラセミ化活性に重要な部位であると予想される2箇所の良く保存されたアミノ酸配列を見出した。
5. L-体特異的なグルタミン酸デカルボキシラーゼの高い活性生産菌を得るために、既知菌株の評価を行い、*E. coli* ATCC 11246 を選択した。本菌株を用いることにより、効率的な第2段階のL-グルタミン酸の選択的分解反応が可能になった。
7. *E. coli* TM93/pGAR1 によるL-グルタミン酸のラセミ化、及び *E. coli* ATCC 11246 によるDL-グルタミン酸中のL-グルタミン酸の選択的分解により、100 g/l のL-グルタミン酸から光学純度 99 % 以上のD-グルタミン酸 50 g/l の生産に成功した。
8. 以上の検討の結果、L-グルタミン酸からD-グルタミン酸を効率的に生産する工業的なプロセスを完成した。

(3) D-プロリン生産方法の開発

1. L-プロリンを原料に、プロリンラセマーゼによるラセミ化とL-プロリン分解菌によるL-プロリンの選択的分解の2段階の酵素反応によるD-プロリンの製造法の検討をした。

2. 第1段階のプロリンのラセミ化に用いるプロリンラセマーゼのスクリーニングを行い、菌体あたりの活性が高く、高基質濃度（L-プロリン 400 g/l 以上）でも機能する良好な酵素を生産する既知菌株 *Clostridium sticklandii* ATCC 12662 を選択した。このプロリンラセマーゼは、補酵素非依存性のラセマーゼであり、活性に関与するSH基を有することが示唆された。また、本酵素は高い基質濃度でも基質阻害による活性低下は認められず、工業的利用に適した特徴を持っていた。
3. プロリンラセマーゼ生産菌 *C. sticklandii* ATCC 12662 の多量の菌体取得が困難であることを解決するために、プロリンラセマーゼの *E. coli* 組換え体での生産を検討した。本酵素の遺伝子を取得し、*E. coli* 組換え体で生産することにより、*C. sticklandii* ATCC 12662 の約23倍の菌体活性で本酵素の生産が可能になった。組換え体 *E. coli* HB101/pPR3 が生産するプロリンラセマーゼを用いることにより、効率的な第1段階のL-プロリンのラセミ化反応が可能になった。
4. *C. sticklandii* ATCC 12662 のプロリンラセマーゼのアミノ酸配列の一部は、*Pseudomonas putida* のヒドロキシプロリン 2-エピメラーゼの活性中心付近の配列と相同性を示した。
5. 高いL-プロリン分解能を有する微生物を得るためにスクリーニングを行い、*Candida* sp. PRD-234を取得した。本菌株のプロリン分解におけるL-体選択性と分解能は十分に高かった。本菌株を用いることにより、効率的な第2段階のL-プロリンの選択的分解反応が可能になった。
6. *E. coli* HB101/pPR3 によるL-プロリンのラセミ化、及び *Candida* sp. PRD-234 によるDL-プロリン中のL-プロリンの選択的分解により、100 g/lのL-プロリンから光学純度 99 %以上のD-プロリン 47 g/lの生産に成功した。
7. 以上の検討の結果、L-プロリンからD-プロリンを効率的に生産する工業的なプロセスを完成した。

以上の検討の結果、D-アラニン、D-グルタミン酸及びD-プロリンの実用的な工業的生産システムを完成した。

謝辞

本論文の作成にあたり、貴重な御助言を頂きました東京大学・農学部教授、児玉徹先生に深く感謝致します。

本研究の完成に際し、アミノ酸ラセマーゼの研究について、貴重な御助言、御指導を頂きました京都大学・化学研究所教授、左右田健次先生、京都大学・化学研究所助教授、江崎信芳先生、京都大学・化学研究所助手、吉村徹博士に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、御助言を頂き、本論文を提出するに際し、御許可を頂きました協和発酵工業・常務取締役・研究開発本部長、岡徹夫博士、同社・常務取締役、野口貞夫防府工場長、同社・研究開発本部、藤尾達郎部長、同社・技術研究所長、中西俊秀博士に深く感謝致します。

本論文の完成に際し、御懇切な御助言を頂きました協和発酵工業・取締役、細田拓経営計画室長に深く感謝致します。

本研究の完成に際し、終始御懇切な御指導、御助言を頂きました協和発酵工業・経営計画室、橋本幸生次長に心から感謝致します。

本論文の作成にあたり、御懇切な御助言を頂きました協和発酵工業・企画開発センター次長、手柴貞夫博士に深く感謝致します。

本研究の完成と本論文の作成にあたり、終始御懇切な御指導、御助言を頂きました協和発酵工業・東京研究所主任研究員、尾崎明夫博士に心から感謝致します。

本研究の遂行に際し、有益な御助言を頂き、終始激励して下さいました、協和発酵工業・技術研究所、東眞幸主任研究員、同社・技術研究所・主任研究員、石野修一博士、同社・技術研究所、柴田進主任研究員に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、適切な御助言を頂き、実験に協力して下さいました、協和発酵工業・東京研究所、川崎秀紀研究員、同社・技術研究所・高田秀由氏に心から感謝致します。本研究の遂行に際し、実験に協力して下さいました、協和発酵工業・品質管理部、福田直之氏、同社・技術研究所、岩田和久研究員、同社・製造第3課、坂田みゆきさんに深く感謝致します。本研究において、貴重な菌学のデータを提供して下さいました、協和発酵工業・筑波研究所長、川本勲博士、同社・東京研究所、落合恵子研究員、同社・東京研究所、降旗育子さんに深く感謝致します。本研究において、丁寧な技術的指導を頂きました、協和発酵工業・東京研究所、牧和俊氏、協和発酵工業・東京研究所、米谷良之研究員に深く感謝致します。本研究において、酵素蛋白に関する貴重なデータを提供して下さいました、協和発酵工業・東京研究所、矢野敏一研究員に深く感謝致します。

文献リスト

- (1) **Akio Ozaki, Hideki Kawasaki, Makoto Yagasaki, and Yukio Hashimoto**
Enzymatic production of D-alanine from DL-alaninamide by novel D-alaninamide specific amide hydrolase.
Biosci. Biotech. Biochem. 56:1980-1984. (1992)
- (2) **Akio Ozaki, Hideki Kawasaki, Makoto Yagasaki, and Yukio Hashimoto**
A D-amidase constitutive mutant from *Arthrobacter* sp. NJ-26.
Biosci. Biotech. Biochem. 57:520-521. (1993)
- (3) **Makoto Yagasaki, Akio Ozaki, and Yukio Hashimoto**
Enzymatic production of D-Glu from L-Glu by *Lactobacillus brevis* ATCC 8287.
Biosci. Biotech. Biochem. 57:1449-1502. (1993)
- (4) **Makoto Yagasaki, Kazuhisa Iwata, Shuichi Ishino, Masaki Azuma, and Akio Ozaki**
Cloning, purification and properties of cofactor independent glutamate racemase from *Lactobacillus brevis* ATCC 8287.
Biosci. Biotech. Biochem. (1995) (accepted)
- (5) **Makoto Yagasaki, Masaki Azuma, Shuichi Ishino, and Akio Ozaki**
Enzymatic production of D-glutamate from L-glutamate by a glutamate racemase.
J. Ferment. Bioeng. 79:70-72. (1995)

Manuscripts in preparation

- (6) **Makoto Yagasaki, Kazuhisa Iwata, Shuichi Ishino, Masaki Azuma, and Akio Ozaki**
Cloning, purification and properties of a cofactor independent proline racemase form *Clostridium ticklandii* ATCC 12662.
Biosci. Biotech. Biochem. (1995)

- (7) Makoto Yagasaki, Masaki Azuma, Shuichi Ishino, and Akio Ozaki

Enzymatic production of D-proline by a recombinant proline racemase.

Biosci. Biotech. Biochem. (1995)

- (8) Akio Ozaki, Hideki Kawasaki, Hideyoshi Takada, Makoto Yagasaki, and Yukio Hashimoto

Enzymatic production of L-alanine from DL-alaninamide by novel L-alaninamide specific amide hydrolase.

Biosci. Biotech. Biochem. (1995)

