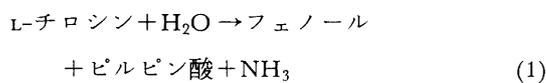


チロシンフェノールリアーゼによる L-DOPA の 酵素的合成法の開発と実用化

熊谷 英彦

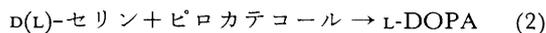
1. チロシンフェノールリアーゼの触媒機能の解明¹⁾

チロシンフェノールリアーゼ (TPL) は1953年, *Bacterium coli phenologenes* と名付けられた腸内分離細菌に大阪大学医学部市原らにより見つけられた酵素であり, ピリドキサルリン酸 (PLP) を補酵素として L-チロシンをフェノール, ピルビン酸およびアンモニアに一段階で分解する (反応1).

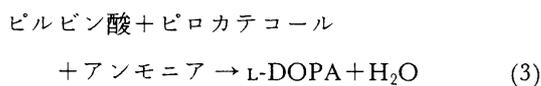


その後, 本酵素に関する報告はしばらくなかったが, 1967年に, 京都大学食糧科学研究所の山田秀明先生は本酵素の機能解明に興味を持ち, その研究に着手した. 腸内細菌を中心に新たにスクリーニングを行い, もっとも高い酵素活性を示した *Escherichia intermedia* を用いて, 酵素誘導や精製条件を検討した. そして, TPL を単タンパク質にまで精製し, 初めて結晶化することに成功した.

さらに, 本精製酵素が L-チロシンを分解する反応のほかに, L-または D-チロシン, あるいは L-または D-セリンとピロカテコールから L-DOPA を生成する置換反応を触媒することを新たに見いだした (反応2).



そこで DL-セリンとピロカテコールからの L-DOPA の酵素的合成法の開発を目指して味の素(株)中央研究所との協同研究が始められた. その研究の中で, 副生物の低減のために, 種々の基質および反応生成物の組合せが検討され, その過程で分解反応が可逆的であることが発見された. すなわち, ピロカテコール, ピルビン酸およびアンモニアから L-DOPA を不斉合成できること (反応3) が明らかになった.



この反応では, 三つの基質を同時に脱水縮合して, C-C 結合を新たに生成し, 光学活性体を作り出す.

この逆反応 (合成反応) の発見はこの種のリアーゼの反応機構の解明の大きな糸口となった. それまで明らかでなかった, 酵素质質中間体からのピルビン酸やアンモニアの生成機構, および本酵素が触媒する反応の立体化学的解明を行うことができた.

さらに, TPL 以外の, PLP を補酵素とする L-アミノ酸リアーゼ, すなわちトリプトファンナーゼやシステインデスルフヒドラーゼの反応も可逆的であることが推定され, その証明や反応機構の解明が行われた. またこれらの酵素の合成反応により, L-トリプトファンやその誘導体および L-システイン誘導体の酵素合成が可能となった. そして, これらはすべて一つの反応機構に従い, 統一的に説明できることが明らかになった.

一方, 合成反応の発見はセリンよりも安価なピルビン酸とアンモニアを L-DOPA 合成の原料として使用できるという点で, L-DOPA の実用生産をはかるうえでも大きなインパクトを与えるものであった.

2. L-DOPA の実用生産のための開発研究と 工業化技術の確立^{1,2)}

パーキンソン病は振戦麻痺とも言われ, 1817年に J. Parkinson により初めて報告された. この疾患では, 脳内ドーパミンニューロンのドーパミンが欠乏している. L-DOPA は脳内でドーパミン生合成の前駆体であり, 生合成系の異常により L-DOPA の生合成が不完全になると, L-DOPA から生成される神経伝達物質のドーパミンの量が著しく低下し, そのために運動神経が働かなくなる. L-DOPA はこれを補うための合理的で, かつ有効な対症療法上の特効薬として1960年代後半に登場した.

現在, パーキンソン病患者は1700人に1人の割合で存在し, 世界でその数は約340万人と推定されており, 年間約250tのL-DOPAが生産供給されている. この原末をまかなう製法は当初より化学合成法が唯一の製法として用いられてきた. そこで, 新しく見つかった TPL の酵素触媒機能を利用することにより, ピロカテコール, ピルビン酸およびアンモニアを常温常圧下, 短時間に同時に縮合して, L-DOPA を直接不斉合成する新しい製造法の開発研究が始まった.

著者紹介 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (教授)

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 TEL. 075-753-6276 FAX. 075-753-6275 E-mail: hidekuma@kais.kyoto-u.ac.jp

Table 1. Comparison of chemical and enzymatic methods of L-DOPA production.

	Chemical method	Enzymatic method
Starting materials	Vanillin, Hydantoin, Acetic anhydride, Hydrogen	Pyrocatechol, Pyruvate, Ammonia
Total number of unit-reaction	8	1
By-products	Ammonia, CO ₂ , Acetate	H ₂ O
Necessity of optical resolution	Yes	No
Equipment	Specific plant	Commonly usable fermenter
Period (d)	15	3
Contaminative amino acids	L-Tyrosine, 3-Methoxytyrosine, Trihydroxy-phenylalanine	L-Tyrosine

TPL を含有する微生物菌体そのものを酵素触媒として、合成反応による L-DOPA 高生産株のスクリーニングが行われ、新たに数種の菌株が取得された。この中から L-DOPA の高生産株として *Erwinia herbicola* が選ばれた。面白いことにこの酵素はカビや放線菌にはまったく見つからなかった。

反応液中に副生物の生成がない高純度な L-DOPA を著量、短時間で取得する L-DOPA の実用生産プロセスを構築するためには、まず L-DOPA の類似物質で、TPL の誘導に必須である L-チロシンを極力低減した中で、本酵素を著量発現できる培地培養条件を開発する必要があった。そこで本酵素生成を著しく促進し、しかも本酵素の拮抗阻害物質でもある L-フェニルアラニンが添加された L-チロシン低減化培地で、最適な通気攪拌、温度および pH 制御条件下で培養することにより、本酵素を菌体全タンパク質あたり約15%と著量発現させることができた。

つぎに遠心分離により菌体を集め、L-チロシンの分解により生成したフェノールなどの培養液中の不純物を除いた後、本酵素含有菌体を酵素触媒として、ピロカテコール、ピルピン酸およびアンモニアからの L-DOPA の合成および単離精製プロセス条件の検討が行なわれた。L-DOPA の生産性をより高めるためには、L-DOPA とピルピン酸との非酵素的縮合物であるイソキノリン誘導体などの副生物の生成がなく、しかもピロカテコールによる本酵素の失活と L-DOPA の酸化褐変反応を抑制する反応プロセスを開発する必要があった。

L-DOPA はフェニル基の3および4位に OH 基を有するため、きわめて酸化褐変反応を受けやすく、アルカリ水溶液中では特に不安定なアミノ酸である。L-DOPA の酸化褐変防止剤として見いだした少量の亜硫酸ナトリウム、キレート剤 (EDTA)、補酵素ピリドキサールリン酸および原料の一つであるアンモニア源 (NH₄Cl) の存在のもとに、L-DOPA の生成速度にバランスさせたピロ

カテコールおよびピルピン酸の精密なフィード方法を開発した。この結果、TPL の酵素活性は維持され、また副生物の生成および L-DOPA 褐変反応は抑止された。

この反応系では、反応生成物の L-DOPA の溶解度が低く、結晶として多量に析出する。このため、反応平衡がより L-DOPA の合成に傾き、pH 8.0, 15°C での最適反応条件下、約12時間の反応で、対ピロカテコールモル収率約98%、対ピルピン酸モル収率約90%という高収率で L-DOPA が生成する。その結果、1 l あたり 110 g の L-DOPA が蓄積する。また生成した L-DOPA はほとんどが純度が高い板状の無水物結晶として蓄積するため、酵素含有菌体と分離しやすく、かつ酵素反応液中に溶存している L-DOPA をわざわざ有機溶媒などを使用して回収する必要がない。得られた粗結晶の精製は微量の亜硫酸ナトリウムおよび EDTA を添加した常温以下での塩素水溶液系で、簡単なフィルター過、脱色ろ過の後、再結晶化を行うだけのワンパスフローで行え、これにより高収率かつ高純度な医薬用 L-DOPA を単離精製することができる。その後、取得した L-DOPA 無水物結晶は乾燥、粉碎を行い、製品とする。

Table 1 に示したように、化学的合成法に比べ単位反応および単位操作の少ない単純な酵素的合成法が開発できた。これにより、酵素反応開始から製品の取り上げまでの製造日数は短くなり、その生産性は化学的合成法の約5倍である。

このように、味の素株式会社では 60 kl スケールでの工業化技術を完成させ、酵素的合成法による医薬用 L-DOPA 生産を初めて実用化した。さらに医薬用 L-DOPA としての原料調達、工程管理、製品品質管理および安全性確認を行い、この方法で製造した L-DOPA は原末および製剤レベルで各国の規格に照らし、ユーザーによって慎重に評価された後、製造承認された。社内にて建造された生産工場も製造許可を得て、現在、酵素的合成法による L-DOPA が商品化され、製造販売されている。

3. チロシンフェノールリアーゼの遺伝子および 発現調節機構の解析

近年, *Escherichia intermedia* や *E. herbicola* の TPL 遺伝子が *E. coli* にクローン化され, 塩基配列の解析が行われ, TPL の一次構造が明らかになった.³⁻⁶⁾ また, 本酵素の発現調節機構の解明が行われている. 鈴木らは *E. herbicola* TPL の誘導的生合成が転写レベルで調節されていることを明らかにし, カタボライトリプレッションによる調節機構をも解明した. さらに, 構造遺伝子上流域を解析することにより, 芳香族アミノ酸の生合成の調節因子である TyrR の結合サイトの存在を明らかにした. この結果, 芳香族アミノ酸生合成に関与する DNA 結合調節タンパク質 TyrR が, TPL という分解系酵素の生合成をも調節している可能性を示した.⁷⁾ この推察は, 最近 *Citrobacter freundii* の TPL プロモーターの TyrR による活性化として証明されている.⁸⁾ また, 片山らは *E. herbicola* での同様の調節機構を証明するとともに, 同菌の TyrR 遺伝子のクローン化に成功している.⁹⁾

文 献

- 1) Yamada, H. and Kumagai, H.: *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 19 (D. Perlman, ed.), 249-288, Academic Press, Inc., New York (1975).
- 2) 江井 仁, 中沢英次, 土田隆康, 滑川俊雄, 熊谷英彦: バイオサイエンスとインダストリー, **54**, 11-15 (1996).
- 3) Iwamori, S., Yoshino, S., Ishiwata, K., and Makiguchi, N.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 147-151 (1991).
- 4) Kurusu, Y., Fukusima, M., Kohama, K., Kobayashi, M., Terasawa, M., Kumagai, H., and Yukawa, H.: *Biotechnol. Letts.*, **13**, 762-772 (1991).
- 5) Iwamori, S., Oikawa, T., Ishiwata, K., and Makiguchi, N.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **16**, 77-85 (1992).
- 6) Suzuki, H., Nishihara, K., Usui, N., Matsui, H., and Kumagai, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 145-148 (1993).
- 7) Suzuki, H., Katayama, T., Yamamoto, K., and Kumagai, H.: *Biosc. Biotech. Biochim.*, **59**, 2028-2032 (1995).
- 8) Smith, H. and Somerville, R. L.: *J. Bacteriol.*, **179**, 5914-5921 (1997).
- 9) 片山高嶺, 鈴木秀之, 山本憲二, 熊谷英彦: 農化 (大会講演要旨), **72**, 244 (1998).

ポリプレニルニリン酸合成酵素の構造と機能

—はじめて明らかにされた Z 型プレニル鎖延長酵素の構造—

古山 種俊

自然界に著しい構造の多様性を示して存在する化合物群, イソプレノイドはその炭素骨格構造が示すように, すべて C₅ のイソプレノ単位が直列に連なったプレニルニリン酸が生合成の基本となっており, 分子量数百万にも及ぶ天然ゴムに至るまで, 多種多様なイソプレノイドが生合成されている.

このプレニルニリン酸の合成反応を触媒するプレニル鎖延長酵素は一般に「プレニルトランスフェラーゼ」と総称されるが, その触媒する反応は有機化学的に見てもユニークで興味深い.^{1,2)}

Fig. 1 に示すように, プレニルトランスフェラーゼ反応はアリル性プレニルニリン酸のニリン酸基が脱離して生じるプレニルカチオンに「活性イソプレノ単位」と称されるイソペンテニルニリン酸 (IPP) が二重結合の移動を伴って縮合することで C-C 結合が形成され, イソプレノ単位 1 個の鎖延長がなされ, アリル性プレニルニリン酸が合成される. この生成物に IPP の立体特異的縮合反応が繰り返され, 個々の酵素に定められたプレニル

鎖長になると反応が停止する. IPP が縮合する度に形成される二重結合が E 型 (トランス) になるか Z 型 (シス) になるかによってプレニルトランスフェラーゼは二種類に大別される. 現在までに E 型プレニル鎖延長酵素は 10 種, Z 型プレニル鎖延長酵素は 5 種程がいろいろな生物より分離同定され, キャラクタライズされている.

プレニルトランスフェラーゼの遺伝子クローニングは 1987 年にラット肝臓の (E,E)-フェルネシルニリン酸 (FPP, C₁₅) 合成酵素について Edwards³⁾ らにより行われて以来, 現在までに 7 種類の E 型プレニル鎖延長酵素について報告されている. われわれは中等度好熱性細菌, *Bacillus stearothermophilus* の FPP 合成酵素⁴⁾ を皮切りに, C₃₀ のヘキサプレニルニリン酸合成酵素,⁵⁾ C₃₅ のヘプタプレニルニリン酸 (HepPP) 合成酵素^{6,7)} および C₅₀ のデカプレニルニリン酸合成酵素⁸⁾ 遺伝子を各種の細菌よりクローン化しているが, これらはいずれも E 型鎖延長反応を触媒するプレニルトランスフェラーゼである.

B. stearothermophilus の FPP 合成酵素遺伝子のクローン

著者紹介 東北大学反応化学研究所 (教授)

〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1 TEL. 022-217-5621 FAX. 022-217-5620 E-mail: koyama@icrs.tohoku.ac.jp