

〔醸酵工学 第61巻 第3号 139-151, 1983〕

総 合 論 文

DL-5-置換ヒダントインを用いる D-アミノ酸の 微生物的合成

(昭和57年度 日本醸酵工学会斎藤賞受賞)

高 橋 里 美

鐘淵化学工業(株)生物化学研究所

Microbial synthesis of D-amino acids from DL-5-substituted hydantoins. SATOMI TAKAHASHI (Biochemical Research Laboratories, Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd., Takasago-shi, Hyogo 676, Japan) Hakkokogaku **61**: 139-151. 1983.

A new process for the production of D-amino acids was investigated using microbial transformation of DL-5-substituted hydantoins.

Hydantoin-hydrolyzing activity was found in widely distributed microorganisms, particularly in bacteria and actinomycetes. The enzyme hydantoinase was purified and crystallized from a cell-free extract of *Pseudomonas striata* and its properties were established in some detail. This enzyme hydrolyzed D-isomers of various 5-substituted hydantoins to provide the corresponding N-carbamyl-D-amino acids. The advantage in using hydantoin was that enzymatic hydrolysis and chemical racemization of the substrate occurred simultaneously, so that DL-hydantoin could be completely transformed into N-carbamyl-D-amino acid.

Based on these results, a new and convenient enzymatic process was developed for producing various D-amino acids.

Step 1. Hydantoin synthesis

Step 2. Asymmetric hydrolysis (microbial hydantoinase)

Step 3. Chemical decarbamylation (nitrite oxidation)

Furthermore, instead of using the Bucherer method (Step 1), a new method for 5-(*p*-hydroxyphenyl)hydantoin production was developed by employing amidoalkylation of phenol, in which glyoxylic acid, urea, and phenol were condensed under acidic conditions.

1. は じ め に

さまざまな生体の営みを巧みに触媒している多様な酵素の中には、非天然化合物をも基質とする意外に広い特異性を示す酵素のあることが知られるようになり、こうした酵素の有機合成への利用研究が、特に光学活性化合物を対象に多方面で検討されている。筆者らは、酵素のもつ優れた触媒作用に注目し、アミノ酸の化学合成中間体である DL-5-置換ヒダントインを、直接、基質として用いる光学活性アミノ酸の酵素的合成の可

能性について検討した。「Bag of Enzymes」としての微生物に酵素源を求め、ヒダントイン環の開環加水分解反応について研究したところ、自然界では稀な D 型基質に特異的な微生物ヒダントイナーゼ反応を見いだした。この反応は、基質も生成物ともに、本来の生体反応とは関係のない人工的な物質であるという点で、酵素の持つ潜在的能力の開発と利用という面から興味深い反応である。筆者らは、この反応の特異性に着目し、効率的な光学分割手段として、この微生物ヒダントイナーゼ反応を利用した D-アミノ酸の新しい合成

法の開発を試みた。

この生物界では特殊な存在といえる D-アミノ酸は、希少な存在故にそのアミド結合は酵素による加水分解を受けにくいなど、L-アミノ酸にない特異な性質をもつことが知られている。生体における、これら D-アミノ酸の生理的役割が注目される¹⁾ 一方、そのユニークな性質を、各種の生理活性物質の合成に利用する研究も活発に行われている。特に、 β -ラクタム抗生物質や生理活性ペプチドなどの合成原料として、D-アミノ酸の有用性が認識されてきている。多くの L-アミノ酸が微生物の物質代謝を巧みに制御した発酵法などにより効率的に生産されるのに対して、一般の生体反応に馴染まない D-アミノ酸は、化学的方法で合成されるラセミ型アミノ酸を分別晶析するなど、複雑な工程により光学分割して生産されている。このため、D-アミノ酸は比較的高価で、それらの用途も限られたものとなっているが、より広範な D-アミノ酸の利用といった面からも、効率的な生産法の開発が望まれていた。

本稿では、微生物ヒダントイナーゼの諸性質およびこれらを用いる D-アミノ酸の合成とともに、基質 DL-5-置換ヒダントインの新しい合成法などについて、筆者らの研究を中心に最近の知見を交えながら概説してみたい。

2. 5-置換ヒダントインとアミノ酸合成

5-置換ヒダントインは、Strecker 法と並ぶ代表的なアミノ酸の化学合成法の 1 つである Bucherer 法の合成中間体として良く知られた化合物である。アルデヒド類から高収率で誘導でき、アルカリ性高温条件下で加水分解することにより収率よくアミノ酸に転換するため、この中間体はこれまで種々のアミノ酸合成に利用されてきた。²⁾ また逆に、アミノ酸から N-カルバミルアミノ酸を経て容易に合成できるという意味から、この 5-置換ヒダントインはアミノ酸の誘導体の 1 つとも考えられる³⁾ (反応(1)参照)。Strecker 法の間体のアミノニトリルが一般に不安定な化合物であるのに対して、5-置換ヒダントインは安定で結晶化しやすい固体であるなど、取り扱いが容易な性質を示すものが多い。また、光学活性な 5-置換ヒダントインは、微量のアルカリの存在により極めてラセミ化を受けやすい性質を持つ⁴⁾ が、これは反面、後に述べるヒダントイナーゼ反応による光学分割を効率良く行いうる重要な要因となっている。

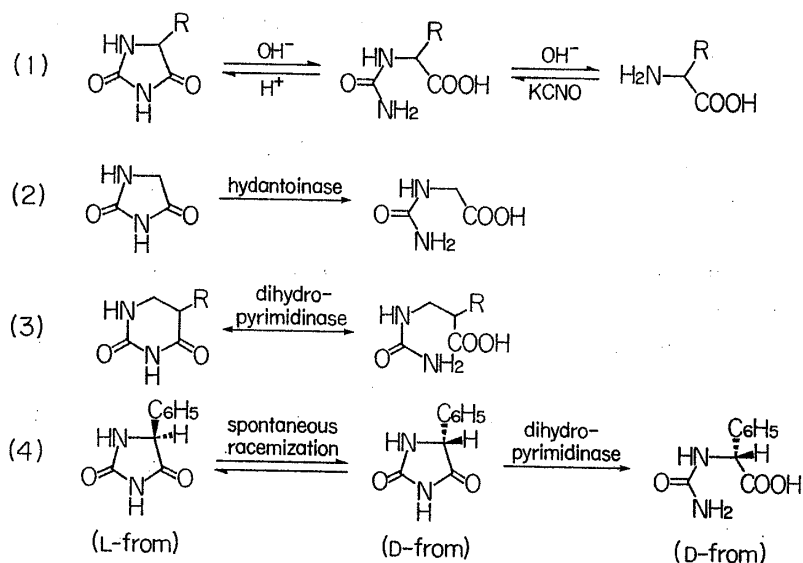
このような性質に着目して、この合成中間体から直

接に光学活性なアミノ酸を得ようとする試みが、L-アミノ酸の効率的な生産法の開発を目的に、比較的古くから検討されている。すでに、1966年には、Tsugawara⁵⁾ により、L-グルタミン酸を対象に 5-カルボキシエチルヒダントインの微生物変換に関する研究が行われており、その後、多方面で L-リジン、⁶⁾ L-メチオニン⁷⁾ などについても検討されている。また、最近では、L-フェニルアラニン、⁸⁾ L-トリプトファン⁹⁾ についても研究され、*Flavobacterium* などの微生物の作用のもとに、対応するヒダントインから直接 L-アミノ酸が良好な変換率で生成することが報告されている。一方、D-アミノ酸についてはほとんど注目されることはなかったが、D-アミノ酸に対する需要の高まりとともに、また、ヒダントイン加水分解酵素に関する知見の深まりを背景に、この合成中間体を用いる酵素的合成法の開発が各方面で検討されるようになってきた。

3. ヒダントイン加水分解酵素

ヒダントイン環を開環加水分解する酵素、ヒダントイナーゼの存在は古くから知られ、¹⁰⁾ すでに 1949年には、この酵素が動物、植物から部分精製され、ヒダントインを N-カルバミルグリシンに変換する反応 (反応(2)) を触媒することが明らかにされている。¹¹⁾ その後、ピリミジン塩基の代謝研究において、仔牛の肝臓からジヒドロピリミジン類を N-カルバミル- β -アミノ酸に分解する酵素 (反応(3))、ジヒドロピリミジナーゼ (EC 3.5.2.2) を精製していた Wallach と Grisolia¹²⁾ は、この酵素がヒダントインをも基質とすることを見だし、前述のヒダントイナーゼと同一酵素であることを明らかにした。また、微生物界にも 5-カルボキシエチルヒダントインなどを開環加水分解する酵素の存在することが、Hassal ら¹³⁾ により明らかにされるにつれ、いわゆるヒダントイナーゼと総称される酵素が広く生物界に存在することが知られるようになった。DL-5-置換ヒダントインの L-アミノ酸への直接的な微生物変換の研究は、こうした知見を背景に、ヒダントイナーゼによる不斉加水分解を期待して、L-型基質に特異的に作用する L-ヒダントイナーゼを探索し、利用しようとしたものと考えられる。

一方、これとは逆に D 型の 5-置換ヒダントインにのみ作用する D-特異的なヒダントイナーゼの存在が明らかにされたのは、比較的最近になってからのことである。Dudley¹⁴⁻¹⁷⁾ らは、動物における抗けいれん剤、エトトイン (Ethotoin) などの代謝に関する研究



Reaction (1)~(4)

において、この薬剤の分解過程で生ずる 5-フェニルヒダントインが、*N*-カルバミル-D-フェニルグリシンとして尿中に排泄されることに注目し、代謝に関与するジヒドロピリミジナーゼが D 型の 5-フェニルヒダントインのみを開環加水分解することを明らかにした。また、この際、L 型エナンチオマーは、いわゆる塩基触媒反応により自動的に化学的なラセミ化を受け、D 型エナンチオマーを経て *N*-カルバミル-D-フェニルグリシンに加水分解されることを示している (反応(4))。すなわち、ジヒドロピリミジナーゼが 5-置換ヒダントインをも基質とすることを初めて明らかにするとともに、その反応が D 型ヒダントインに対してのみ特異的に進行することを見いだしている。その後、この動物酵素は、脂肪族、芳香族の各種 5-置換ヒダントインをも基質として対応する *N*-カルバミル-D-アミノ酸に変換することが Cecere ら^{18,19)} により確認されている。さらに、微生物界においても、筆者らは以下に述べるように、広範な微生物種に D 型基質に特異的なヒダントイナーゼが広く分布していることを明らかにした。

現在では、非天然化合物、5-置換ヒダントインを良好な基質とする L-特異的なヒダントイナーゼとともに、D-特異的なヒダントイナーゼも広く生物界に存在していることが知られるようになり、これらエナンチオマー間の立体選択性を厳密に異にする酵素を用いる反応の効率性が注目され、光学活性アミノ酸の合成に広く利用され始めている。

4. 微生物ヒダントイナーゼ、その探索と諸性質の解明

筆者らは、まず、基質としてメチオニンの合成中間体である 5-(2-メチルチオエチル)ヒダントイン (MTH) を選び、このヒダントインを *N*-カルバミルメチオニン (CMT) に開環加水分解する活性を微生物に探索した。^{20,21)} MTH を含む培地に生育する細菌、放線菌、かび、酵母など約400種の保存菌株の生菌体を用いて、MTH から CMT を生成・蓄積する菌株をスクリーニングした結果、38菌株に CMT の生成が認められ、ヒダントイナーゼ活性は広く、しかも広範な微生物に分布していることが明らかとなった。なかでも、*Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium* などの細菌、あるいは *Streptomyces*, *Actinoplanes* などの放線菌に特に強い活性が認められた (Table 1)。ついで、反応の特異性を検討する意味から、Table 2 に示した 8 菌株について、生成した CMT および未反応の MTH を単離し立体構造を調べると、前者はすべて D 型であり、後者は L 型の含量が高いことが判明した。すなわち、これら CMT の生成・蓄積能の大きい微生物のヒダントイナーゼによる加水分解は、D 型の基質に特異的に進行することが示唆された。

この非天然化合物、MTH を基質とする酵素の本体、および本来の機能を明らかにすることは、ヒダントイナーゼの培養生産を考える上でも興味あることである。筆者らは、先のスクリーニングで最も高活性を示した

Table 1. Distribution of hydantoinase activity in microorganisms.²⁰⁾

Microorganism	Activity ^{a)}	Microorganism	Activity ^{a)}
Bacteria		Actinomycetes	
<i>Aerobacter cloacae</i>	###	<i>Streptomyces albus</i>	++
<i>Achromobacter delmarvae</i>	+	<i>Streptomyces almquistii</i>	###
<i>Achromobacter parvulus</i>	+	<i>Streptomyces aureus</i>	++
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	##	<i>Streptomyces flaveolus</i>	+
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	##	<i>Streptomyces griseus</i>	##
<i>Arthrobacter simplex</i>	+	<i>Streptomyces griseoruber</i>	++
<i>Bacillus sphaericus</i>	+	<i>Streptomyces griseolus</i>	+
<i>Brevibacterium incertum</i>	++	<i>Streptomyces mitakaensis</i>	###
<i>Corynebacterium sepedonicum</i>	##	<i>Actinoplanes philippinensis</i>	###
<i>Flavobacterium flavescens</i>	+		
<i>Microbacterium flavum</i>	++	Yeasts	
<i>Micrococcus roseus</i>	+	<i>Candida pelliculosa</i>	+
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	###	<i>Candida utilis</i>	+
<i>Nocardia corallina</i>	##	<i>Rhodotorula gracilis</i>	+
<i>Protaminobacter albobiflavus</i>	+	<i>Rhodotorula glutinis</i>	+
<i>Proteus morgani</i>	+	<i>Torulopsis utilis</i>	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	<i>Pichia vini</i>	+
<i>Pseudomonas desmolytica</i>	##		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	###	Molds	
<i>Pseudomonas striata</i>	###	<i>Paecilomyces varioti</i>	+
<i>Pseudomonas xanthae</i>	++	<i>Aspergillus niger</i>	+
<i>Sarcina marginata</i>	+		
<i>Serratia plymuthica</i>	+		

a) Activities were expressed as the amount of CMT formed under the reaction of 10 mg/ml MTH conc. (33°C for 40 h). One plus sign showed the conc. of 1 mg/ml CMT.

Table 2. Properties of *N*-carbamyl-methionine isolated.²⁰⁾

Microorganism	<i>N</i> -Carbamyl-methionine isolated (mg)	Melting point (°C)	$[\alpha]_D^{25}$	Optical purity (%)
<i>Aerobacter cloacae</i>	305	159-162	+23.4	97.5
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	95	159-161	+23.1	96.3
<i>Corynebacterium sepedonicum</i>	137	158-162	+20.4	85.0
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	215	160-162	+23.6	98.3
<i>Pseudomonas striata</i>	330	160-162	+24.2	101
<i>Actinoplanes philippinensis</i>	280		+23.7	98.7
<i>Streptomyces almquistii</i>	205		+24.0	100
<i>Streptomyces mitakaensis</i>	280		+23.1	96.3
(Authentic sample)		161-162	+24.0	

* C=1-1.5 in 1N-HCl

Table 3. Some properties of hydantoinase isolated from *Pseudomonas striata*.²²⁾

$S_{20,w}^0$ (s)	9.33
Molecular weight	
Sephadex G-200 filtration	190,000
Molecular weight of subunit	
SDS-disk electrophoresis	48,000
$E_{cm}^{1\%}$ at 280 nm	10.8
Specificity	
Substrate	Dihydropyrimidine
	D-5-substituted hydantoin
Steric	D-form
K_m value, Optimal pH and temperature	

Substrate	$K_m (\times 10^{-2} M)$	pH	Temp. (°C)
Dihydrouracil	0.17	8.8-9.0	55
DL-5-(2-Methylthioethyl)-hydantoin	3.4	8.3-8.5	55
DL-5-Phenylhydantoin	5.0	8.0-8.3	45
Hydantoin	35	8.0-8.3	45

Inhibitor	<i>o</i> -Phenanthroline
	α, α' -Dipyridyl
	<i>p</i> -Chloromercuric benzoate

Pseudomonas striata を用いて、酵素の生成条件および酵素の諸性質の解明について検討した。²⁰⁻²²⁾

本酵素は誘導酵素であり、ヒダントインおよび DL-5-メチルヒダントインが著しい誘導効果を示す。また、有機栄養源としては肉エキスが最も有効であり、ヒダントインを含む肉エキス-グリセロール培地 (pH 5.5) で 30°C に通気培養することにより、容易に高活性菌体を得ることができる。

この高活性菌体から調製した粗酵素抽出液より、プロタミン処理、硫酸分画、DEAE-セルロース、ヒドロキシアパタイト、セファデックス G-200 の各カラムクロマトグラフィーによりヒダントイナーゼを精製

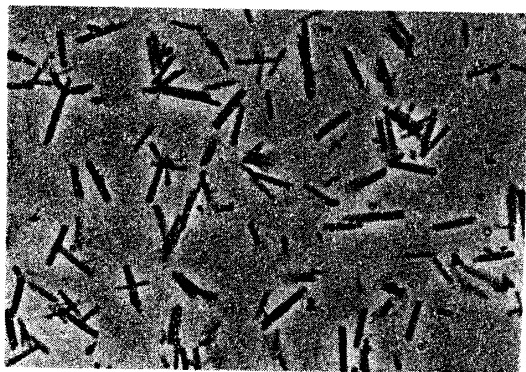


Fig. 1. Photomicrograph of crystalline hydantoinase of *Pseudomonas striata*.²²⁾

Table 4. Substrate specificity of hydantoinase from *Pseudomonas striata*.²²⁾

Substrate	Relative rate
5- H- hydantoin	13
// CH ₃ -	45
// (CH ₃) ₂ CH-	15
// (CH ₃) ₂ CHCH ₂ -	48
// CH ₃ SCH ₂ CH ₂ -	48
// H- 	25
// HO- 	16
// HO- 	5
// Cl- 	19
// Cl- 	10
// Cl- 	7
// CH ₃ O- 	4
5, 5- () ₂	0
// (CH ₃) ₂	0
Dihydrouracil	100

し、初めて結晶状に単離した (Fig. 1).

本酵素の分子量は約 190,000 と推定され、同一のサブユニット 4 個からなるテトラマー構造を有すると考えられる。各種の脂肪族および芳香族の 5-置換ヒダントインを良好な基質とするほか、ヒダントインよりメチレン基のひとつ多い 6 員環であるジヒドロウラシルに対して最も高い活性と親和性を示して作用する。酵素反応は D 型基質に対して特異的に進行し、反応の至適 pH および温度は、用いる基質によって多少異なるが、pH 8~9、および 40°C 付近にある。この酵素は、各種の SH 試薬、*o*-フェナンスロリンや α, α' -ジピリジルにより強い阻害を受ける。従って、SH 基や二価の金属イオン (Fe^{2+} , Co^{2+}) が酵素活性の発現に関与しているものと思われる (Table 3, 4 参照)。

これらの検討を通じて、人工基質である 5-置換ヒダントインの D 型エナンチオマーのみを開環加水分解する酵素が微生物にも存在することが初めて明らかになったわけであるが、上記結果を総合すると、この酵素は恐らく動物でもその存在が報告されているジヒドロピリミジン類を本来の基質とするジヒドロピリミジンナーゼ (EC 3.5.2.2) と考えられる。

5. D-アミノ酸の微生物的合成

微生物菌体を用いるヒダントイナーゼ反応 微生物

物酵素の利用において、酵素含有菌体を直接酵素として使用できれば、工業的な意味での操作性などメリットは極めて大きいものとなる。しかし、一般的に、抽出酵素と菌体の間には、細胞膜の透過性や共存する他酵素による副反応など、問題となる相違点も予想される。ヒダントイナーゼ反応においても、結晶酵素で得られたような広範囲な基質特異性が菌体を直接用いてもそのまま再現できるかどうか、あるいは、酵素の安定性はどうか、特に L 型基質のラセミ化を伴うようなアルカリ条件下での反応に耐えられるか、また、副反応は起こらないかなど検討する必要がある。

筆者らは、^{21, 23, 24)} 菌体を直接酵素として使用することを前提に、まず先のスクリーニングで高活性を示した *Pseudomonas striata*, *Aerobacter cloacae*, *Corynebacterium sepedonicum*, *Streptomyces griseus* の生菌体を用いて、各種 5-置換ヒダントインに対する加水分解活性を比較検討した。Table 5 に示すように、天然アミノ酸に由来するヒダントインを基質とした場合、いずれの菌体を用いても、中性アミノ酸のヒダントインは速やかに分解され、高収量で *N*-カルバミルアミノ酸に変換された。しかし、酸、塩基性アミノ酸などイオン性置換基を有するヒダントインは基質となりにくい結果となった。また、同様にして、半合成 β -ラクタム抗生物質の側鎖アミノ酸として多用される非天然アミノ酸、フェニル

Table 5. Hydrolytic activity of intact cells towards various DL-5-substituted hydantoins.²³⁾

DL-5-Substituted hydantoins	<i>P. striata</i>		<i>C. sepedonicum</i>		<i>A. cloacae</i>	
	Reaction rate ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Yield (%)	Reaction rate ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Yield (%)	Reaction rate ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Yield (%)
R*-CH ₃	0.27	46	0.08	40	0.09	55
R*-CH ₂ -CH ₃	0.25	73	0.01	10	0.03	41
R*-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	0.11	28	0.01	16	0.03	28
R*-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃	0.31	66	0.02	27	0.05	60
R*-CH ₂ - 	0.02	12	0.02	21	0.02	20
R*-CH ₂ -OH	0.08	62	0.02	34	0.01	27
R*-CH ₂ -COOH	0.00	0	0.00	0	0.00	0
R*-CH ₂ -CH ₂ -COOH	0.01	2	0.00	0	0.00	0
R*-(CH ₂) ₃ -CH ₂ -NH ₂	0.00	0	0.00	0	0.00	0

* R represents hydantoin moiety.

The reactions were carried out at 30°C for 90 min (to determine the reaction rate) and for 20 h (to determine the conversion yield).

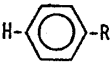
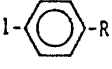
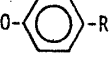
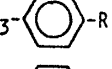
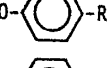
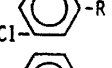
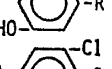
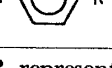
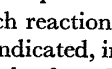
The reaction mixture contained 100 μmol of DL-5-substituted-hydantoins, 100 μmol of NaHCO_3 - Na_2CO_3 buffer, and intact cells harvested from 2.0 ml of the cultured broth in a total volume of 2.0 ml (pH 8.7).

グリシン類に対応する5-フェニルヒダントイン化合物に対する作用を調べると、いずれも良好な基質となり、短時間の反応にもかかわらず高収量で *N*-カルバミルフェニルグリシン類に変換した (Table 6)。いずれにしろ、活性の大小はあるものの、この結果は、結晶酵素で得られた結果と同じように、菌体を用いても広範囲の5-置換ヒダントインの加水分解が可能なことを示したものとえよう。

生成した *N*-カルバミルアミノ酸は、多くの場合、除菌後の反応液の pH を 3~4 に調整し、等電点沈殿法で容易に単離できる。これらの比旋光度を測定すると、予想どおり全て高い光学純度を示して D 型の立体配置をもつことが確認され、MTH の場合同様、種々のヒダントイン基質においても、反応は D 型エナンチオマーに特異的に進行することが明らかとなった (Table 7, 8)。

24時間反応後の DL 型基質の *N*-カルバミルアミノ酸

Table 6. Hydrolytic activity of intact cells towards various DL-5-phenyl hydantoins.²³⁾

DL-5-Phenyl hydantoins	Conversion rate (%) with		
	<i>A. cloacae</i>	<i>P. striata</i>	<i>S. griseus</i>
	1 h	2 h	3 h
H-  -R *	43.9	88.0	6.5
Cl-  -R	50.0	53.7	37.1
HO-  -R	20.7	62.2	19.4
CH ₃ -  -R	26.2	25.0	13.0
CH ₃ O-  -R	31.1	13.4	10.8
 -R	53.7	36.0	23.7
Cl-  -R	29.3	18.9	20.1
HO-  -R	28.0	15.2	21.6
Cl-  -R			

* R represents hydantoin moiety.

Each reaction was carried out at 30°C for 1-3 h as indicated, in a reaction mixture containing 33.6 μmol of DL-5-phenyl hydantoins, 160 μmol of NH₄Cl-NH₄OH buffer, and intact cells harvested from 2.0 ml of the cultured broth in a total volume of 2.0 ml (pH 9.0).

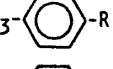
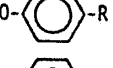
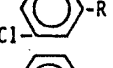
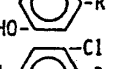
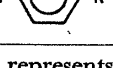
Table 7. Optical properties of isolated *N*-carbamyl-amino acids of natural type.²³⁾

Microorganism	<i>N</i> -Carbamyl-amino acid isolated	$[\alpha]_D^{25}$	Optical purity (%)
<i>C. sepedonicum</i>	Alanine	-19.6	101
	Phenylalanine	-37.5	100
<i>P. striata</i>	Alanine	-20.5	107
	Serine	-33.4	113
<i>A. cloacae</i>	Alanine	-17.8	93
	Valine	-14.0	95

への変換率は、多くの場合50%を超えており、特にフェニルヒダントイン基質では、pH を 9.0 に調整するとほぼ定量的に *N*-カルバミル-D-フェニルグリシン類に変換するものが見られた。この理論量を超えて反応する機構は、次のように説明される。

ヒダントイン化合物のなかでも 5 位置換基が芳香族の場合、とくにアルカリによる化学的なラセミ化を受けやすく (Fig. 2)、酵素反応至適条件 (pH 8~9, 温度 35~45°C) のような穏和なアルカリ性においても極めて大きいラセミ化速度を示し、D 型と L 型の間に

Table 8. Properties of *N*-carbamyl-phenylglycines isolated.²³⁾

<i>N</i> -Carbamyl-phenylglycine derivative	Melting point °C	Optical rotation $[\alpha]_D^{25}$
H-  -R *	174-176	-136.3
Cl-  -R	193-195	-126.0
HO-  -R	178-181	-145.5
CH ₃ -  -R	218-223	-136.7
CH ₃ O-  -R	213-217	-141.7
 -R	178-180	-123.5
Cl-  -R	—	-86.6
HO-  -R	210-213	-110.2
Cl-  -R		

* R represents *N*-carbamyl-glycine moiety.

速やかなラセミ化平衡が成り立ち得る。このため、酵素反応の進行に伴って消費されるD型エナンチオマーは、基質とならない過剰のL型エナンチオマーのラセミ化を通じて反応系に常に供給されつづける。一方、好都合なことに、生成物であるN-カルバミル-D-アミノ酸は、この条件では全くラセミ化されることはない。このように、D型基質に特異的な酵素反応と基質の化学的なラセミ化反応が同時に進行するため、見掛け上はD型もL型も基質となって、未利用対掌体(L型)を残すことなく全てD型のN-カルバミルアミノ酸に変換されるという特色ある機構が働いていると考えられる (Fig. 3)。この現象は、ヒダントイナーゼ反応が、従来の光学分割法の難点である未利用対掌体の回収、ラセミ化といった複雑な「再利用工程」をまったく必要としない、簡潔で効率的な光学分割手段となりうることを示唆するものである。

このアルカリ性領域での本微生物反応の効率性をさらに高める意図のもとに、pH 10~11において良好な生育を示す好アルカリ性細菌、*Bacillus* sp. 121-3が高活性菌として新たに分離され、先の *Pseudomonas striata* などと比較検討されている。^{24, 25)} 反応液のpHを高くした場合や、基質濃度を高くして長時間反応させた場合は、この *Bacillus* sp. の使用が有利であり、

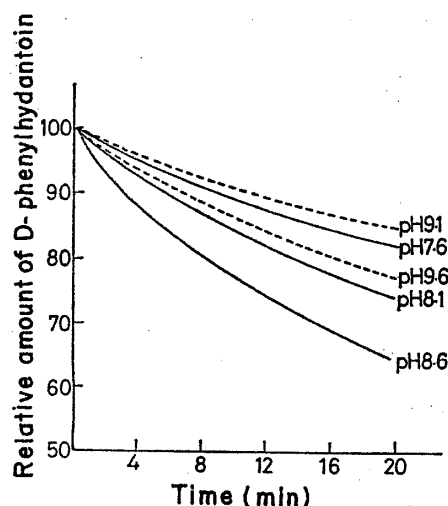


Fig. 2. Chemical racemization of D-5-phenylhydantoin in alkaline solution.²³⁾

The reaction mixture containing 20 μ mol of D-5-phenylhydantoin and 100 μ mol of tris-maleate (—) or NaHCO_3 - Na_2CO_3 (---) buffer in a total volume of 1.0 ml, was incubated at 30°C. Relative amount of D-5-phenylhydantoin was calculated from the decrease in $[\alpha]_D^{30}$ of the reaction mixture.

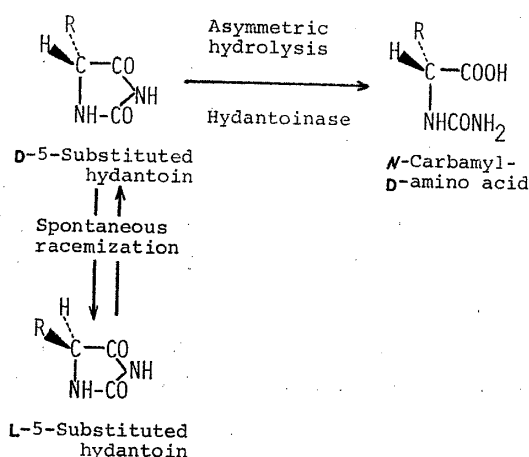
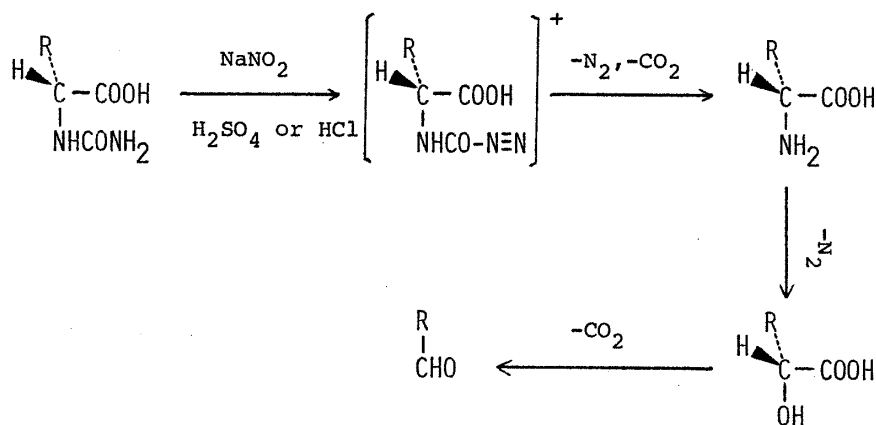


Fig. 3. Enzymatic reaction mechanism of DL-5-substituted hydantoin.

よりアルカリ側での至適 pH や菌体 (酵素) の安定性など、特にアルカリに対する耐性との関連で、好アルカリ性微生物の有利性を示唆している。また、菌体をゲル包括固定化することによっても安定性を高めることが可能であり、*Bacillus* sp. のアクリルアミドゲル固定化菌体を用いた繰り返し使用も試みられている。²⁴⁾

また、高温における本反応の有利性が認識され、耐熱性微生物の高活性菌を分離し、有効に利用しようとする試みもなされている。このような、高い pH 域や、高い温度でのヒダントイナーゼ反応は、比較的ラセミ化しにくいアルキルヒダントインなどを基質とする場合、とくに有効な方法と思われる。

脱カルバミル反応 一般に、N-カルバミルアミノ酸は、苛性ソーダなどアルカリの存在下に加熱すると容易に脱カルバミル化して、アミノ酸に転換できることが知られている。しかし、この反応は、生成物のラセミ化を伴うため、光学活性アミノ酸の合成には適さない。また、酸加水分解による脱カルバミル化は困難で、実際、大部分がヒダントインに閉環し、加圧条件においてもアミノ酸の生成はごくわずかである。筆者らは、ヒダントイナーゼ反応で生成する N-カルバミル-D-アミノ酸の脱カルバミル条件を種々検討した結果、亜硝酸酸化による方法が最も有効であることを見いだした。カルバミル-L-バリンなど天然アミノ酸のカルバミル誘導体に、酸の存在下に亜硝酸ソーダを添加して脱カルバミル化し、L-アミノ酸に転換する方法が既に報告されている。²⁸⁾ 原理的には、アミノ態窒素の定量法として知られている Vanslyke 法の応用と考えられるこの方法は、Fig. 4 に示すように、ジアゾニウム中間体を経由してウレイドのアミノ基を窒素ガス

Fig. 4. Decarbamylation of *N*-carbamyl-D-amino acid.

として脱離し、脱炭酸を導き、脱カルバミル化する方法である。しかし、この際、生成するアミノ酸のアミノ基も、さらに酸化されてオキシ酸へと分解される継起的な副反応を伴うものと考えられる。D-アミノ酸合成への本反応の適用を考える場合、実用的な *N*-カルバミルアミノ酸濃度においても、副反応が抑制できD-アミノ酸の生成率を高いものとするところができるかどうか、また、 α 位炭素上に直接芳香族置換基をもちラセミ化を受けやすい *N*-カルバミルフェニルグリシン類などが、立体配置を保持したまま反応が進行するかどうか、などが検討を要する点であろう。

筆者らは、種々の実験を通じて、反応を低温 (5~10°C) で行い、さらに反応系の酸濃度を高く保つことにより、主反応速度 (*N*-カルバミルアミノ酸→アミノ酸) を選択的に増大させると副反応が抑制できることを明らかにした。²⁹⁾ こうした場合の D-アミノ酸の生成率は、ほぼ定量的である。*N*-カルバミル-D-フェニルグリシン類を用いた反応においても、文献値に合致

した比旋光度を示す D-フェニルグリシン、D-*p*-ヒドロキシフェニルグリシンなどが得られ、これらカルバミル体を用いた反応においても、立体配置を保持したまま反応が進行し、高収量に D-アミノ酸が生成することを確認した (Table 9)。このことは、先の微生物ヒダントイナーゼ反応と、この化学的な脱カルバミル反応を組み合わせることにより、D-アミノ酸の新しい合成ルートの開発が可能となることを示唆するものである。

最近、この脱カルバミル反応を酵素的に行う方法が提案されている。Olivier らは、*Agrobacterium* 属の細菌に *N*-カルバミル-D-アミノ酸を特異的に D-アミノ酸に変換する酵素 (カルバミラーゼ) の存在することを明らかにし、至適条件を種々検討している。また、L-アミノ酸の場合と同様、5-置換ヒダントインを直接 D-アミノ酸に微生物変換しようとする試みが多方面で検討されているが、³¹⁻³³⁾ これらは D 型基質に特異的なヒダントイナーゼと上述のカルバミラーゼを併せも

Table 9. Optical rotation of D-amino acids obtained by the decarbamylation of *N*-carbamyl-D-amino acids.

Microorganism	DL-Hydantoin	<i>N</i> -Carbamyl-D-amino acid		D-Amino acid
		rate of conversion	$[\alpha]_{\text{D}}^{25*}$	$[\alpha]_{\text{D}}^{25**}$
<i>Pseudomonas striata</i>	5-Phenyl-	87%	-132	-153
	5-(<i>p</i> -Hydroxyphenyl)-	82	-146	-159
	5-(2-Thienyl)-	93	-97	-106
alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	5-Phenyl-	91	-127	-154
	5-(<i>p</i> -Hydroxyphenyl)-	74	-140	-161
	5-(2-Thienyl)-	95	-95	-105

* C=0.5-1.0 (0.1 N NH₄OH), ** C=1.0 (1-2 N HCl).

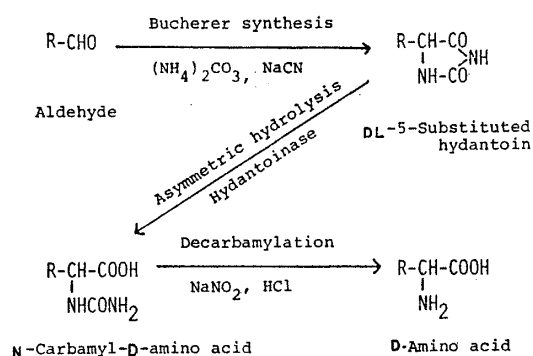


Fig. 5. Possible synthetic scheme for D-amino acid production.

った微生物の作用を利用したものと思われる。

D-アミノ酸の合成スキーム DL-5-置換ヒダントインを用いる D-アミノ酸の新しい合成法として、Fig. 5 に示すような 3 ステップからなる合成スキームが可能となった。

ヒダントイナーゼの基質となる DL-5-置換ヒダントインは Bucherer 法により、アルデヒドから容易に合成できる。Bucherer 法は、現在でも多くのアミノ酸の合成に適用されており、技術的に確立された方法である。この合成の出発原料となるアルデヒド類についても、Reppe 合成やオキソ合成の発展に伴って多様なものが供給されるようになってきていることから、広範囲の 5-置換ヒダントインの合成が可能である。

このスキーム中、もう 1 つの化学反応ステップである脱カルバミル反応は、亜硝酸によって酸化を受けやすい官能基（例えば $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ etc.）などの置換基さえなければ、先に述べたように基本的には問題なく、種々の N-カルバミル-D-アミノ酸に適用できる。

微生物ヒダントイナーゼの広範囲な基質特異性と、これら化学的反応ステップの柔軟な適応性から考えて、本スキームは D-アミノ酸の一般的な合成法となるものと思われる。この酵素的合成法の特徴は次のように要約できる。

1) 1 回の酵素反応で DL 型基質すべてを D 型のカルバミルアミノ酸に変換できるため、従来法では必須の L 型再利用工程が不要となり、製造プロセスが簡潔となる。

2) 酵素が広い基質特異性を有するため、同一プロセスが広範囲の D-アミノ酸の生産に適用できる。

3) 厳密な立体選択性を示す酵素反応を利用するため、光学純度の高い D-アミノ酸が容易に取得できる。

4) アミノ酸の合成中間体を、直接、基質として使

用できる。

5) 安価な微生物菌体を酵素として使用できる。

6. 5-置換ヒダントインの新しい合成法

D-アミノ酸の微生物的合成法の具体的な展開として、アモキシシリンなど β -ラクタム抗生物質の側鎖アミノ酸として重用視されている D-*p*-ヒドロキシフェニルグリシン (D-HPG) をターゲットに選び、その効率的な合成法の開発を試みた。酵素反応の基質となる 5-(*p*-ヒドロキシフェニル) ヒダントイン (*p*-HPH) は、基本的には *p*-ヒドロキシベンズアルデヒドを用いて Bucherer 法により合成することは可能であるが、高価なアルデヒドや危険なシアン化合物を使用するうえに、フェノール核の酸化に伴う副生物のため純度が低いことなど、工業的な *p*-HPH の製法としては、この反応は必ずしも有効な方法とはいえない側面をもっている。一般に、合成化合物を基質とする酵素反応の実際的な生産プロセスへの応用においては、基質をいかに効率的に供給できるかということも、トータルな生産性を考える上で重要なポイントの 1 つになる。

筆者ら³⁴⁾ は、*p*-HPH の有利な合成法の探索にあたって、DL-HPG がグリオキシル酸とフェノールをアンモニアの存在下に反応させて合成されていることに注目した。Ben-Ishai ら³⁵⁾ によるアミドアルキル化反応の知見を背景に、グリオキシル酸、フェノール、尿素を用いる反応を種々検討したところ、この 3 種の化合物を強鉱酸の水性媒体中で加熱下、反応させると一挙に *p*-HPH が沈殿結晶として生成することを見いだした。この反応は、Fig. 6 に示すように、数種の反応の複雑な組み合わせで成りたっているものと考えられるが、設定した反応条件下では、アラントイン (II) とフェノールの反応速度は遅く、また *p*-ヒドロキシマンデル酸 (III) の生成は比較的少ないことなどから、(II) および (III) からの *p*-HPH の生成への寄与は小さく、(Ia, Ib, Ic) とフェノールとの反応が中心と考えられる。これら中間体のカルボニウムカチオンのフェノール核への親電子的な攻撃は、オルト位も対象となるためパラ体の *p*-HPH とともに、少量のオルト体 (*o*-HPH) の副生が認められる。しかし、反応温度など反応条件を選べば、*p/o* 比をかなり高くすることができ (Fig. 7)、*p*-HPH の反応収率もグリオキシル酸に対して相当高収率にすることも可能である。適当な条件を設定すれば、反応後、沈殿結晶をろ過・水洗するだけで極めて高純度の *p*-HPH を容易に単離することがで



この基質の新しい合成法を用いることにより、D-HPGの微生物的合成法は一層効率化され、経済的に有利な基本合成スキームが確立した。

また、フェノールをチオフェンに置き換えるだけで DL-5-(2-チエニル) ヒダントインが合成できる³⁶⁾ ことなどから、このヒダントインの新しい合成法はかなり広い汎用性を有しているものと思われる。最近、二段反応方法によるグリオキシル酸からの5-アリアルヒダントインの合成法が報告されている。³⁷⁾ この方法では、まずアルカリ性下にグリオキシル酸とフェニル誘導体を反応させ、いったんマンデル酸誘導体を合成し、ついで、これを酸性下に尿素と反応させる方法で、各種の5-アリアルヒダントインの合成が試みられている。今後、このようなグリオキシル酸、尿素などを用いる5-置換ヒダントインの新しい合成法は、特にβ-ラクタム抗生物質の側鎖アミノ酸として有用な各種非天然型のD-アミノ酸の合成に、有効に利用できるものと思われる。

7. D-アミノ酸の利用

現在、D-アミノ酸で最も需要の多いのは、何と言っても、 β -ラクタム抗生物質の側鎖成分としての利用で、

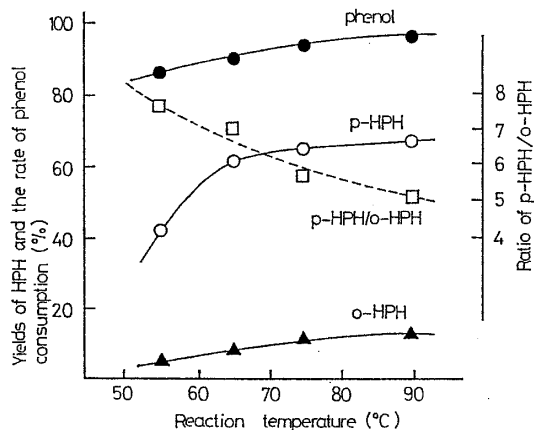


Fig. 7. Effect of reaction temperature on the yields of HPH and the ratio of *p*-HPH/*o*-HPH.³⁴⁾

To a mixture of urea (36.0 g), 90% (w/w) aqueous solution of phenol (33.0 g), 36% HCl (93.0 g) and H₂O (126 g) was added 40% aqueous solution of glyoxylic acid (55.6 g) over 5 h at several temperature, and after the completion of addition, the reaction was further carried out for 15 h with stirring. Yields of HPH and the rate of phenol consumption were calculated on the basis of glyoxylic acid used.

D-HPG のほかに D-フェニルグリシンが良く知られている。最近では、D-システイン (MT-141), D-スレオニン (セフペラゾン), D-アスパラギン酸³⁸⁾ などのような天然型アミノ酸の D-アミノ酸を利用した例もみられるなど、種々の D-アミノ酸が用いられようとしている。また、新薬開発の過程では各種の D-アミノ酸について膨大な検討がなされており、今後幾種類もの D-アミノ酸が実用化される可能性が高いものと思われる。β-ラクタム抗生物質以外の分野でも、ペプチドホルモン (LH-RF, TRF, MIF, エンケファリンなど) の新薬開発において、活性の持続性の改善などを目的にしたアナログ体の合成に、各種の D-アミノ酸を用いる研究が活発に行われている。また、D-アミノ酸そのものも医薬としての利用が検討されており、抗うつ剤あるいは鎮痛剤として D-フェニルアラニン^{39,40)} が、抗リウマチ剤として D-ペニシラミン⁴¹⁾ が、さらに、新しいタイプの抗生物質として D-フルオロアラニン⁴²⁾ などが研究されている。細胞免疫物質やペプチド抗生物質も医薬として興味をもたれているが、これらにも D-グルタミン酸など D-アミノ酸を含んだものが多い。最近では、医薬のみならず農薬合成への利用も検討され、D-バリンの特異な立体配置をピレスロイド系殺虫剤の合成に利用しようとする試みがなされている。⁴³⁾ このように、近年、D-アミノ酸の利用範囲が急速に拡大していることから、今後、D-アミノ酸に対する需要は増大するものと考えられる。

8. おわりに

5-置換ヒダントインという非天然化合物を基質とした微生物変換の研究を通じて、D型基質に特異的なヒダントイナーゼを見だし、D-アミノ酸の新しい合成法の開発へと研究を展開してきた。以上の研究は、京都大学食糧科学研究所および農学部発酵生理学研究室と鐘淵化学工業(株)生物化学研究所との密接な共同研究によって行われたものである。本微生物的合成法は、鐘淵化学工業(株)の技術陣によって、D-HPG の合成法として開発され、現在、シンガポールのジュロン工業地帯に建設されたプラント (カネカシンガポール社) によって 500 t/year の規模での生産をみるに至っている。また、ピレスロイド系殺虫剤の合成原料としての D-バリンの生産も、本法を適用して開始されている。

以上の基礎研究を通じて、通常、代謝マップなどでもすれば画一的にとらえがちな酵素の中にも、潜在的な能力として、非天然化合物をも良好な基質とする

柔軟な特異性を示すなど、幅広い利用の可能性を持つ酵素のあることを実感している。今後、ますます多様化、複雑化してくる生理活性物質などの有用物質の生産に、従来の合成触媒にない、こうした酵素の優れた性質を効率的に利用しようとする研究が、さらに活発になることであろう。こうした意味において、微生物酵素利用のひとつのモデルとして、本研究が少しでも参考になれば幸いである。

最後に、本研究の開始当時より終始変わらぬ、ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を賜りました京都大学農学部教授、山田秀明先生に厚く感謝の意を表します。また、本研究の推進にあたり、絶大なご支援とご指導をいただいた鐘淵化学工業(株)常務取締役、生物化学研究所長渡辺清博士、常務取締役金沢守成医薬品事業部長ならびに米田耕司技術調査部長に衷心より感謝いたします。また、京都大学食糧科学研究所および農学部そして鐘淵化学工業(株)生物化学研究所の多くの共同研究者の方々に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 左右田：化学, **32**, 517 (1977).
- 2) Bucherer, T. H., Steiner, W.: *J. Prakt. Chem.* **140**, 291 (1934).
- 3) Suzuki, T., Igarashi K., Hase, K., Tsujimura, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 411 (q973).
- 4) Dakin, H. D.: *J. Biol. Chem.*, **29**, 357 (1912).
- 5) Tsugawa, R., Okumura, S., Ito, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 27 (1966).
- 6) 特許公報 昭45-8633.
- 7) 山田, 大石, 相田, 植村：農化, **43**, 528 (1969).
- 8) 公開特許公報 昭-52, 18887.
- 9) Sano, K., Yokozeki, K., Eguchi C., Kagawa, T., Nada, I., Mitsugi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 819 (1977).
- 10) Bernheim, F., Bernheim, M. L. C.: *J. Biol. Chem.*, **163**, 688 (1946).
- 11) Eadie, G. S., Bernheim, F., Bernheim M. L. C.: *J. Biol. Chem.*, **181**, 449 (1949).
- 12) Wallach, D. P., Grisolia, S.: *J. Biol. Chem.*, **226**, 277 (1957).
- 13) Hassall, H., Greenberg, D. M.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 3325 (1963).
- 14) Dudley, K. H., Bius, D. L., Butler, T. C.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **175**, 27 (1970).
- 15) Dudley, K. H., Butler, T. C., Bius, D. L.: *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 103 (1974).
- 16) Dudley, K. H., Bius, D. L., Waldrop, C. D.: *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 113 (1974).
- 17) Dudley, K. H., Bius, D. L.: *Drug Metab. Dispos.*, **4**, 340 (1976).
- 18) Cecere, F., Galli, G., Morisi, F.: *FEBS Lett.*, **57**, 192 (1975).
- 19) Dinelli, D., Marconi, W., Cecere, F., Galli, G., Morisi, F.: *Enzyme Engineering*, Vol. 3, p. 477. Plenum Press New York (1978).

- 20) Yamada, H., Takahashi, S., Kii, Y., Kumagai, H.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 484 (1978).
- 21) Takahashi, S., Kii, Y., Kumagai, H., Yamada, H.: *Amino Acid Nucleic Acid*, **37**, 110 (1978).
- 22) Takahashi, S., Kii, Y., Kumagai, H., Yamada, H.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 492 (1978).
- 23) Takahashi, S., Ohashi, T., Kii, Y., Kumagai, H., Yamada, H.: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 328 (1979).
- 24) Yamada, H., Shimizu, S., Shimada, H., Tani, Y., Takahashi, S., Ohashi, T.: *Biochimie*, **62**, 395 (1980).
- 25) Shimizu, S., Shimada H., Takahashi, S., Ohashi, T., Tani, Y., Yamada H.: *Agric. Biol. Chim.*, **44**, 2233 (1980).
- 26) 公開特許公報 昭53-115890.
- 27) 公開特許公報 昭57-58887.
- 28) 特許公報 昭40-4808.
- 29) 公開特許公報 昭53-103441.
- 30) Olivier, R., Fascetti E., Angelini, L., Degen, L.: *Enzyme Microb. Technol.*, **1**, 201 (1979).
- 31) 公開特許公報 昭54-89088.
- 32) 公開特許公報 昭55-11569.
- 33) 公開特許公報 昭55-153595.
- 34) Ohashi, T., Takahashi, S., Nagamachi, T., Yoneda, K., Yamada, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **831** (1981).
- 35) Zoller, U., Ben-Ishai, D.: *Tetrahedron.*, **31**, 863 (1975).
- 36) 公開特許公報 昭54-122276.
- 37) 公開特許公報 昭54-106470.
- 38) 公開特許公報 昭55-149238.
- 39) Spatz, H., Heller, B., Nachon, M., Fisher, E.: *Biological Psychiatry*, **10**, 235 (1975).
- 40) 公開特許公報 昭54-122709.
- 41) 塩川, 堀内, 本間, 景山, 岡田, 東, 中島, 小川: *医学のあゆみ*, **101**, 216 (1977).
- 42) 公開特許公報 昭52-106814.
- 43) Hendric, C. A., Garcia, B. A., Staal, G. B.: *Pestic. Sci.*, **11**, 224 (1980).

(昭58. 3. 4受付)