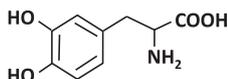


熊谷英彦

石川県立大学生物資源工学研究所

L-ドーパは、神経伝達物質であるドーパミンや、ホルモンであるアドレナリンなどの前駆体として重要なアミノ酸である。特にパーキンソン病患者の特効薬として利用され、全世界で年間約250トンが生産され、そのうちの約半量は酵素を使う方法で、他は化学合成法で生産されている。L-ドーパの酵素生産法は、日本で生まれ、日本で育ち、いまだに日本でしか実施されていない。



L-ドーパ (L-DOPA, L-Dihydroxyphenylalanine)

本稿では、L-ドーパの酵素生産に関する基礎的研究とその生産法の開発研究について筆者が関わった事柄を中心に、エピソードを交えながら記してみる。産学連携が叫ばれている現在、参考になればと思う。

パーキンソン病は、脳の黒質-線条体系でドーパミン神経細胞が減少し、神経伝達物質であるドーパミンが欠乏することによる難病である。人口1,000人に一人の割合で高齢者に多く発症し、全世界で350万人、わが国では10万人強の患者がいるとされている。パーキンソン病の患者にドーパミンを投与しても効果はない。脳にはカテコールアミン類の侵入を阻止する血液脳関門があり、ドーパミンはそれを通過できないからである。しかし、L-ドーパは、それを通過して脳内へ入ることができる。脳内でL-ドーパは脱炭酸酵素の作用でドーパミンになり、これが神経伝達物質として働き、症状は劇的に軽減する。このようなパーキンソン病での脳のドーパミンの減少とL-ドーパによる治療の発見は、20世紀における神経生物学、神経病理学の最も重要な発見の一つであり、大阪大学医学部の佐野勇教授（故人）が多大な貢献をした。また、脳内でのドーパミンの減少が、L-チロシンからL-ドーパを合成するチロシン水酸化酵素の減少によるものであることは、名古屋大学医学部におられた永津俊治教授らが明らかにしている⁽¹⁾。これらの発見は1960年代から1970年代にかけてのことである。

このように、L-ドーパの効果が明らかになり、パーキンソ

ン病の治療薬として使われ始めた。当初、その生産は化学合成法によるものであったが、多くの反応基の修飾と脱離の工程が必要であり、なおかつ、DL-体の光学分割が必要であった。D-体は効果がないだけでなく、副作用を有するからである。したがって大変高価なものであった。当時、わが国のアミノ酸発酵工業はまさに隆盛期であり、L-グルタミン酸やL-リジンなどのタンパク質構成アミノ酸はすでに生産方法が確立しており、それに次ぐ新しいターゲットの一つとしてL-ドーパは注目されていた。

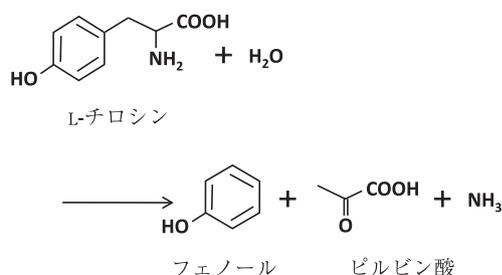


少し時をさかのぼって、1966年春、京都大学農学部キャンパスにあった食糧科学研究所の2号館三階の小さな実験室で、恩師山田秀明先生（京都大学名誉教授、当時助教授）は、「何か良い研究テーマはありませんか」と研究室の大学院学生たちに尋ねていた。山田先生は折々にこのような質問を学生たちに向けてなされた。当時の山田研の大学院生には、足立取生山口大学名誉教授、川崎東彦大阪府立大学名誉教授、松井裕京都府立大学名誉教授（以後松井さん）や筆者（当時博士課程1回生）などがいた。山田先生の提案は、松井さんの修士論文テーマの相談であったが、結局、β-チロシナーゼをやるということになった。

β-チロシナーゼは、1953年、大阪大学医学部生化学教室の市原硬先生の研究室で、フェノール生成に関与する細菌としてヒトから分離された*Escherichia coli phenologenes*に見されていた。市原研究室では、部分精製標品でピリドキサリリン酸 (PLP) を補酵素とすることなどの酵素学的解析がすでになされていたが、単離標品での詳細な性質解明は行なわれていなかった。ちなみに、この酵素の名前は、市原先生らによってつけられたものであるが、同じくL-チロシンを基質として酸化反応によりL-ドーパを生成するチロシナーゼという酸化酵素がすでに知られていたため、それとの区別でβ-チロシナーゼとしたと聞いている。β-チロシナーゼが後にL-ドーパ合成に役立つとは当時はまったく予想していなかったわけだが、この酵素の研究をした結果、どちらのチロシナーゼも偶然L-ドーパ合成を触媒するという事になった。しかし、酵素学的には構造も機能もまったく違う酵素である。そ

れでは、 β -チロシナーゼによるL-ドーパ生産にいたる経緯を以下に記していく。

β -チロシナーゼは、下に記した反応のように、L-チロシンをフェノールとピルビン酸とアンモニアに分解する。

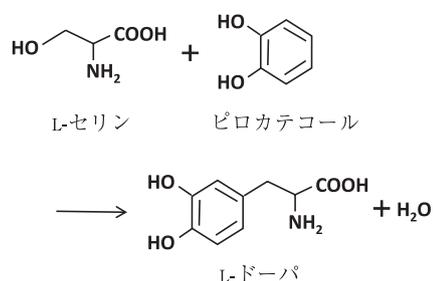


山田研で、筆者たちが研究にとりかかった当時、大阪大学で分離した菌は保存されていなかったで、新しく菌株のスクリーニングから始めた。京都大学農学部の発酵生理および醸造学研究室の保存菌株から腸内細菌を中心に、チロシンからのフェノール生成菌を選び、さらにピルビン酸生成量の分析により、*Escherichia intermedia* を選抜した。チロシンによる酵素の誘導生成など、この菌の培養条件を検討した後、ジャーファーマンターによる大量培養により菌体を集め、無細胞抽出液から硫酸分割、DEAE-セルローズ、セファデックス、ヒドロキシアパタイトなどのカラムクロマトグラフィーにより精製し、結晶標品を得た。今のように遺伝子の増幅で酵素量を増やすとか、His-Tagにより精製を一段階でやれるというようなことはなかった。軽油でポイラーを炊いて40 lジャー2基を殺菌し、培養のあと連続遠心機で集菌、超音波で細胞破壊、硫酸分割してやっとひと段落、菌まみれになって取り組んだ。幸い、京大食糧科学研究所には大変良い機器が揃っていた。最後は、山田先生が結晶化をした。結晶は色がなく、アポ酵素であった。酵素の立体構造解析がされたあとでわかったが、結晶化には硫酸が用いられたので、補酵素PLPのリン酸残基結合サイトに硫酸根が入り込んで、PLPの結合を阻害していた。

解明された結晶酵素の性質は、後に*J. Biol. Chem.* 誌に2報に分けて掲載された^(2,3)。これにより本酵素のECナンバー、EC 4.1.99.2、が決められ、システムチックな酵素名としてチロシンフェノールリアーゼ (Tyrosine phenol-lyase (deaminating)) が与えられた。以下、この酵素をTPLと略称する。



TPLによってL-ドーパの合成ができることは、いわゆる置換反応によって発見された。L-チロシンにピロカテコールを共存させて酵素反応を行なうことで、フェノールとピロカテコールの置換が触媒され、L-ドーパが生成する⁽⁴⁾。L-チロシンの代わりにL-セリンを用いてもL-ドーパの合成は進行する(下の反応式)。



松井さんは修士課程終了後、味の素(株)に就職した。その際、会社での自身の修士論文の紹介でL-ドーパの酵素合成の話をした。会社側は大いに興味を示し、ただちに共同研究が始まった。山田先生がしばしば会社へ出かけて打ち合わせをしながら開発研究が進められた。

会社の研究所における研究の徹底ぶりは凄いの一語に尽きるものであった。まずスクリーニングが初めからやり直された。バクテリアだけでなく、カビ、酵母、放線菌など研究所保存菌と自然界からの分離菌、1,000株以上について、上記の反応でL-ドーパ生産能が調べられた。その結果、この酵素の活性は、バクテリアのみで見つかり、特にEnterobacteriaceae (腸内細菌科) に属する菌株に存在することが明らかになった。その中でも最も高い活性を示したのは、*Erwinia herbicola*であった。*Erwinia*属は、野菜や穀物などによく付着している腸内細菌科に属するバクテリアである。マメ科の植物の中には、L-ドーパを生産するものがあり、その関連で本酵素活性がこの属に高い活性で存在するのは興味深い。

菌株が選定されると、引き続き培養条件が検討された。誘導基質のL-チロシンだけではなく、炭素源、窒素源、アミノ酸、ビタミン、ミネラルなど多くの培地成分、温度、pH、酸素濃度など、大量培養を前提に、ジャーファーマンターを使って詳細な検討がなされた。その中で特に高い効果が見つかったのはL-フェニルアラニンの培地への添加であった。その効果は無添加の数倍に及んだ。L-フェニルアラニンはTPLの拮抗阻害剤であり、生成した酵素が誘導基質のL-チロシンを分解するのを阻害してL-チロシンが長時間培地中に存在するため、誘導効果が高められると考えられた。これだけではなく、後にTPL生合成の調節機構(後述)が明らかになると、L-フェニルアラニンは転写調節因子TyrRのリガンドとして機能し、生合成を促進する効果もあると考えられた。

培養条件に次いで、L-ドーパ合成の反応条件、すなわち温度、pH、基質濃度、還元剤添加などの検討が大規模に行なわれた。これも実際の生産システムに近い、培養後のジャーファーマンターに基質を添加する方法で検討された。まだ反応が可逆的とはわかっていなかったで、置換反応での合成が行なわれ、DL-セリンが基質として使われた。DL-セリンは、L-ドーパに変換されるが、同時にTPLによって分解されてピルビン酸を生じ、このピルビン酸がL-ドーパと反応してイソキノリン化合物を形成し、収量を下げる原因となった。この副産物の生成を防ぐための条件検討が行なわれたときに、ピルビン酸とアンモニアとピロカテコールだけを基質と

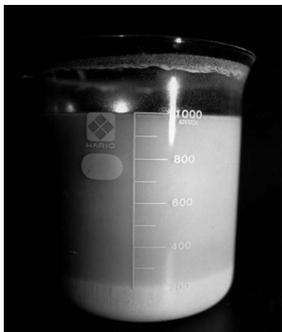


図1 ■ 反応容器中に晶出したL-ドーパ

する反応系が検討され、その酵素反応液中にL-ドーパの生成が認められたのである。高濃度の分解生成物を与えることで分解反応の逆反応が進み、反応生成物のL-ドーパが水に溶けにくく、反応液中に晶出するので、その合成がどんどん進むのである(図1)。

当時、この系統のPLP酵素としてトリプトファンナーゼなどがよく研究されていたが、その反応は非可逆的だと信じられていた。したがって、この逆反応の発見⁽⁵⁾は、PLP酵素の基礎研究の上でまず非常に大きなインパクトを与えるものであった。逆反応の解析を基に、反応機構の解析が進んだ⁽⁶⁾。一方、応用面では、トリプトファンナーゼによるL-トリプトファンとその誘導体の酵素生産研究などが進んだ。

さて、逆反応の発見は、L-ドーパの酵素合成にも大きなインパクトを与え、以後はピルビン酸を原料とする生産法の研究が行なわれ、1975年にはその技術は確立された。その後、やや時間を要したが、原料などの経済的な調達が可能となった1992年、ついに実用的な生産が味の素(株)で始まった⁽⁷⁾。本酵素合成法は、従来の化学合成法に比べ、単位反応数や反応副産物が少なく、工学分割を要せず、製造設備が汎用設備で間に合い、製造日数が5分の1(3日間)になり、大きく生産性が上がった。



L-ドーパの酵素合成技術の確立以後も、TPLに関連する研究は継続して行なわれ、他の研究者に後れをとったが、TPL遺伝子の解析⁽⁸⁾、TPLの3次元構造解析⁽⁹⁾などの成果があっ

た(図2)。中でも遺伝子解析の結果、TPL生合成の調節機構の解明が行なわれ、それはTPLの構成的生産株の分子育種へと発展した。これは、L-ドーパの生産上においても、さらには微生物バイオテクノロジーへの新展開の観点からも、大変意義のあることと考えられるので、以下に記しておくたい。

TPLが、L-チロシンによる誘導で生合成されることはすでに記した。現石川県立大学片山高嶺准教授(当時、京都大学リサーチアソシエート)は、TPLの構造遺伝子の300 bp以上上流に3箇所 TyrR 結合サイトを発見した。TyrRは大腸菌では芳香族アミノ酸の生合成関連遺伝子を主として負に制御する転写調節因子として知られていたが、このDNA結合タンパク質が芳香族アミノ酸分解酵素の転写調節に関与していることは、新しい知見であった⁽¹⁰⁾。しかも、この場合、TyrRは、リガンドL-チロシンの結合によってTPL遺伝子の転写を正に制御していることが明らかになった。さらに片山准教授らは、このTyrR遺伝子へのランダム変異の導入、さらには変異復帰株の取得の二重の方法を適用し、L-チロシンなしに構成的にTPLを大量に生合成する分子育種株を*Erwinia herbicola*株において構築した。この株は、全菌体タンパク質の15%に及ぶTPLを生産し、現在生産に用いられている野生株の約50倍のL-ドーパ生産効率を有することが、味の素(株)の研究所において確認されている⁽¹¹⁾。この研究成果は、転写調節因子を直接の分子標的とする育種の成功例であり、広く他の有用微生物の育種への適用が考えられる。

パーキンソン病は、白人に多く発症する疾病である。L-チロシンからL-ドーパを経て、メラニンに至る経路の強弱が関連しているのではないかと考えられている。いずれにせよ、L-ドーパは室温条件で容易に酸化し、重合が進み褐色を経て最後は黒く変色する。しかし、酵素法でつくった最終製品のL-ドーパは真っ白な粉末である(図3)。合成反応のあとの最終産物の精製は、筆者ら大学にいるものはあまり重要視しないが、L-ドーパに限らず、いずれの化学工業製品においても非常に重要な工程のようである。そのため、反応工程も精製工程を視野に入れながら開発するということが行なわれている。L-ドーパは水に溶けにくいために、反応中(図4)に結

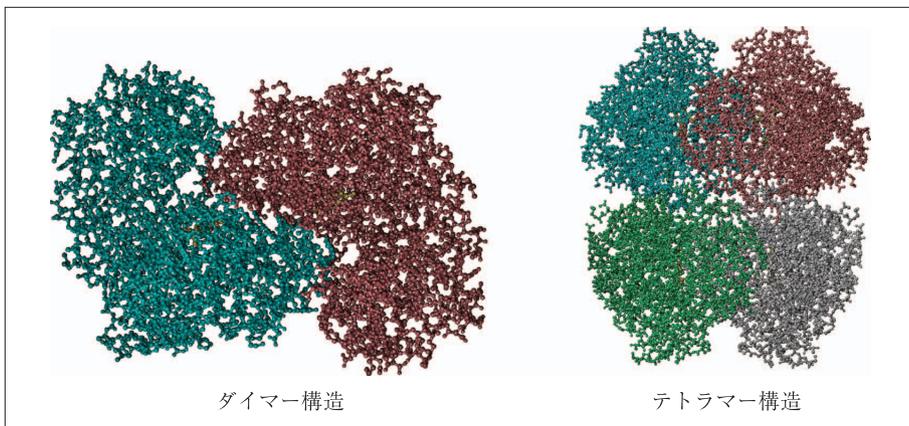


図2 ■ *Erwinia herbicola* チロシンフェノールリアーゼの立体構造



図3 ■ L-ドーパの粉末



図4 ■ L-ドーパ合成反応に使われたタンク

晶として析出し反応液中に貯まる (図5)。この結晶の大きさや形が後の精製工程に影響すると聞いた。



TPLがL-ドーパの生産に有効であるという知見が出てから、大腸菌を使うなどして、国の内外でこの方法を利用しようという動きが少なからずあった。しかし、いずれも成功したということは聞いていない。アミノ酸の生産は、微生物や酵素を使ってそれをつくるところだけではなく、その下流の工程、さらには原料の調達や、最終製品の売り方も含めた総合的な一大事業であり、表面には現われないところで多くの人たちの苦労や努力があったと聞いている。幸い、共同開発した会社がアミノ酸の生産会社として非常に多くのノウハウを蓄積しており、さらにその上の技術開発に努力し成功したから産業化まで漕ぎ着けたことと理解している。恩師の山田秀明先生は、会社との共同研究においては、お互いの利益供与ではなく、お互いの尊敬が一番重要であるとかねがね言っておられる。

この共同研究開発は、大学と企業の非常に多くの人たちのチームワークの上に成り立ったものである。会社で研究開発に関わった方々について本文中には名前をあげなかった。全



図5 ■ 晶出したL-ドーパの顕微鏡写真

部の方々を網羅できないが、奥村信二博士、江井仁博士 (故人)、中沢英次博士、土田隆康博士、滑川俊雄氏などの方々が共同研究開発者である。大学関係でも、本文にあげた以外にも、鈴木秀之京都工繊大学教授、小柳喬石川県立大学助教が遺伝子解析や酵素の結晶構造解析、L-ドーパ生産菌の分子育種などの研究で成果を上げた。また、このほか多くの大学院学生の貢献があった。大いなる感謝の意を表する。

文献

- 1) 永津俊治, 永津郁子: “パーキンソン病—病理化学の進歩”, 共立出版, 1981.
- 2) H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi & K. Ogata: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1767 (1970).
- 3) H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi & K. Ogata: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1773 (1970).
- 4) H. Kumagai, H. Matsui, H. Ohgishi, K. Ogata, H. Yamada, T. Ueno & H. Fukami: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 266 (1969).
- 5) H. Yamada, H. Kumagai, N. Kashima & H. Torii: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 370 (1972).
- 6) H. Yamada & H. Kumagai: in “Advances in Applied Microbiology”, Vol. 19, ed. by D. Perlman, Academic Press, New York, 1975, p. 249.
- 7) 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**, (1), 11 (1996).
- 8) H. Suzuki, K. Nishihara, N. Usui, H. Matsui & H. Kumagai: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 145 (1993).
- 9) A. A. Antoson, T. V. Demidkina, P. Gollnick, Z. Dauter, R. L. Tersch, J. Long, S. N. Berezchnoy, R. S. Philips, E. H. Harutyunyan & K. S. Wilson: *Biochemistry*, **32**, 4195 (1993).
- 10) T. Katayama, H. Suzuki, T. Koyanagi & H. Kumagai: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4764 (2000).
- 11) T. Koyanagi, T. Katayama, H. Suzuki, H. Nakazawa, K. Yokozeki & H. Kumagai: *J. Biotechnol.*, **115**, 303 (2005).