

氏 名	長 崎 俱 久 なが さき とも ひさ
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	論 工 博 第 1049 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Studies on microbial production of 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) by transamination reaction (微生物を用いるアミノ基転移反応による 3, 4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン (L-DOPA) 生産に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教 授 福 井 三 郎 教 授 河 西 三 省 教 授 松 浦 輝 男

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、微生物の持つアミノ基転位反応活性を利用して、医薬品として重要な3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン (L-DOPA) を合成することを目的とした基礎面および応用面での研究をまとめたものである。

論文は3部よりなっているが、第1部ではL-グルタミン酸とL-アスパラギン酸をアミノ基供与体として、化学合成によって得られる3,4-ジヒドロキシフェニルビルビン酸 (DOPP), 3,4-ジメトキシフェニルビルビン酸 (DMPP) をそれぞれ L-DOPA, 3,4-ジメトキシフェニル-L-アラニン (L-DMPA) に変換する能力を有する微生物を検索し、この能力が細菌、酵母、糸状菌にわたって広く分布していることをはじめて明らかにした。これらの微生物のうち、変換能の高かった細菌 *Alcaligenes faecalis* を用い、変換生成物である L-DOPA の単離同定を行なうとともに、L-DMPA を臭化水素酸で処理することにより効率よく L-DOPA に変えることに成功した。

第2部では、まず第1部で選択した *A. faecalis* を用いて、L-DOPA, L-DMPA に関するアミノ基転移酵素の性質をしらべている。本菌の粗酵素液にはL-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニンをそれぞれアミノ基供与体として DOPP を L-DOPA に変換する少なくとも3種の酵素の存在が証明された。これらの酵素は比較的高いアルカリ域で安定であり、かつ最高の活性を示した。*A. faecalis* は特にL-アスパラギン酸をアミノ基供与体とする酵素の生産能がすぐれていた。ついで、*A. faecalis* の休止菌体を用い、L-DOPA, L-DMPA 生産に適した反応条件の設定を行っている。最適条件下ではL-DOPAが80%の、L-DMPA が90%の変換率で得られている。基質である DOPP の濃度を上げると変換反応が阻害されるが、高濃度の DMPP による阻害効果は小さい。また、DOPP や L-DOPA にくらべて DMPP, L-DMPA は空気酸化に対して安定であり、しかも DMPP の合成は DOPP よりも容易であることから、アミノ基転移反応による L-DOPA の生産には、DMPP を基質とし L-DMPA を得たのち、これを L-DOPA に加水分解する方法が実用的であることを明らかにしている。

A. faecalis による L-DOPA 生産には L-アスパラギン酸がすぐれたアミノ基供与体として用いられたが、より安価なアミノ酸である L-グルタミン酸を効率よく変換反応に利用する細菌の検索が第3部で行なわれている。L-グルタミン酸を最もよいアミノ基供与体として利用しうる細菌が土壌より分離され、*Enterobacter cloacae* と同定された。本菌におけるアミノ基転位酵素合成を高めるための条件が検討され、培養液中の窒素源、アミノ酸、ビタミン、溶存酸素などの存在量が酵素合成に大きく影響することが明らかにされた。最適条件下で得られた高いアミノ基転位酵素活性をもつ *E. cloacae* 菌体を用いて、界面活性剤の存在下 DOPP と L-グルタミン酸を反応させることにより効率よく L-DOPA が生産される。以上のように、微生物のもつアミノ基転位反応活性は L-DOPA の新しい製造法として注目に値するものであることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、微生物の持つ立体特異的なアミノ基転移反応活性を利用して、パーキンソン病の治療薬などとして需要の大きい 3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン (L-DOPA) を生産することを目的とした基礎的ならびに実際の研究をまとめたものである。得られた主な成果を以下に示す。

- (1) L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸をアミノ基供与体として、化学合成によって得られる 3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (DOPP)、3,4-ジメトキシフェニルピルビン酸 (DMPP) をそれぞれ L-DOPA、3,4-ジメトキシフェニル-L-アラニン (L-DMPA) に変換する能力のある微生物を細菌、酵母、糸状菌にわたって広く検索し、変換能の高い細菌を分離し *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* と同定した。
- (2) *A. faecalis* は L-アスパラギン酸をアミノ基供与体として L-DOPA、L-DMPA を生成するアミノ基転移酵素の生産能が優れているが、本酵素の含有量を高めた休止菌体を用いる L-DOPA、L-DMPA 生産の最適条件を設定し、L-DOPA を DOPP から80%の、L-DMPA を DMPP から90%の変換率で得ている。この場合、DMPP を原料として L-DMPA を作った後、加水分解により L-DOPA へ導く方が、種々の見地から有利であることを結論している。
- (3) *E. cloacae* ではアミノ基供与体として L-アスパラギン酸よりも安価な L-グルタミン酸を用いることができるので、本菌を用いる L-DOPA、L-DMPA を好収率で生産する実際の方式を設定した。

以上を要するに、本論文は医薬品として需要のある L-DOPA 及びその類縁体を、合成化学的に得られる前駆体から微生物を用いる立体特異的なアミノ基転移反応によって容易かつ有利に生産する方式を取り扱ったものであり、学術上・實際上寄与するところが少なくない。

よって、本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。