

# 人工甘味料の原料となる有用アミノ酸類の酵素的合成

## — 2-ケト酸からのL-アミノ酸の合成を中心に—

浅野 泰久(富山県立大学工学部助教授)

### 1. はじめに

近年、肥満防止に対する社会的関心は高く、食品の低カロリー化がはかられつつある。そのなかで、様々な化学構造を持つ新しい人工甘味料の開発が盛んに行なわれている。例えばアスパルテームは最近商業化された人工甘味料として代表的なものであり、さらに最近、アスパルテームを超えるといわれる優れた特性を有する人工甘味料アリテームが、ファイザー社により開発されている。これらの化合物は、いずれもオリゴペプチドであるが、それらを構成するL-またはD-アミノ酸や、それらの間のペプチド結合の効率的な合成法に関する研究は従来十分とはいいがたかった。

アスパルテームの合成原料であるL-フェニルアラニンの酵素的製造法としては、ベンジルヒダントインのL立体特異的加水分解、トランス桂皮酸のアミノ化、フェニルピルビン酸へのアミノ基転移反応、アセトアミド桂皮酸からフェニルピルビン酸を経由する二段階反応等が知られている<sup>1)</sup>。最近、安価な塩化ベンジルのコバルト触媒を用いるダブルカルボニル化反応によるフェニルピルビン酸の効率的な合成法が開発されたことを契機にフェニルピルビン酸を原料とするL-フェニルアラニンの合成法がにわかに注目された<sup>1)</sup>。このような背景から、我々はフェニルピルビン酸とL-フェニルアラニンの相互転換を触媒するフェニルアラニン脱水素酵素に着目した。本酵素は、1984年にその存在が報告されたが、その分布や酵素化学的諸性質は全く知られていなかった。我々は、

土壌より本酵素活性を示す *Sporosarcina ureae* SCRC-R04 や *Bacillus sphaericus* SCRC-R79a の分離に成功し<sup>2,3)</sup>、また保存菌中からのスクリーニングにより *B. badius* IAM 11059 が活性を有することを見いだした<sup>4)</sup>。それらより本酵素を結晶として単離し、酸素化学的諸性質を初めて明らかにすると共に、本酵素遺伝子 (*pdlh*) のクローニングに成功し、その構造を明らかにした<sup>5)</sup>。本酵素遺伝子を含む大腸菌形質転換株 *E. coli* JM 109/pBPDH1-DBL は、野生株に比べて単位培養当たり120倍の酵素活性を発現した<sup>6)</sup>。

本稿では、新規微生物酵素フェニルアラニン脱水素酵素の示す優れた特性を、光学活性なL-アミノ酸の合成に利用した結果についてまとめた。すなわち、*B. sphaericus* SCRC-R79a のフェニルアラニン脱水素酵素の基質特異性について、化学合成した2-ケト酸とそれらのアナログを用いて詳細に検討した。次に、反応系内で酸脱水素酵素(FDH)によるNADHの再生系を働かせ(Fig. 1)、フェニルアラニン脱水素酵素による各種のL-アミノ酸の合成について検討した。

### 2. 材料および方法

(1) 微生物の培養、アセトン乾燥菌体の調製  
フェニルアラニン脱水素酵素源としての *B. sphaericus* SCRC-R79a は2-リッターフラスコ中に1.0% L-フェニルアラニン、1.0% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.2%  $K_2HPO_4$ 、0.1% NaCl、0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  を水道水で調製した培地(pH 7.0)を500ml/加えて30℃で20時間振とう培養

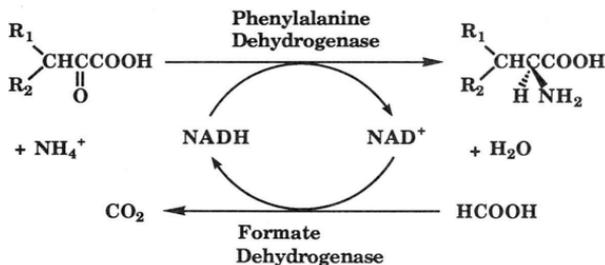


Fig.1 Synthesis of L-Amino Acids from Their 2-Keto Analogs by Phenylalanine Dehydrogenase with a Regeneration of NADH by Formate Dehydrogenase.

した。き酸脱水素酵素源としての *C. boidinii* No. 2201 は、既知の方法により培養した<sup>9)</sup>。 *B. sphaericus* 由来のプロモーターおよびリボゾーム認識配列を含む1.3 Kb の *pdh* 遺伝子を pUC9 に組み込み pBPDH1-DBL を作成した<sup>4)</sup>。 *E. coli* JM109/pBPDH1-DBL は37°C で12時間、50 μg/ml のアンピシリンを含む LB 培地 (pH 7.5) で培養した。

### (2) フェニルアラニン脱水素酵素の精製

フェニルアラニン脱水素酵素は *B. sphaericus* SCRCR-79a より結晶として、あるいは *E. coli* JM109/pBPDH1-DBL より、硫酸分画、DEAE-トヨパール、ブチル-トヨパール、セファデックス G-200カラムを用いて精製した<sup>5)</sup>。

### (3) 2-ケト-4-フェニル酪酸, 2-ケト-5-フェニル吉草酸, 2-ケトノナン酸および他の基質アナログの合成<sup>7)</sup>

プロモエチルベンゼン, 1-プロモ-3-フェニルプロパンおよび1-プロモヘプタンより調製したグリニヤール試薬を、乾燥 THF 中のジエチルオキザル酸に作用させ、それぞれ2-ケト-4-フェニル酪酸エチルエステル (<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm, 1.2 (t, 3H), 1.6 (s, 2H), 1.9 (m, 2H), 2.7 (t, 2H)(収率73%), 3.4 (m, 1H), 4.2 (q, 2H), 7.1-7.4 (m, 5H), 2-ケト-5-フェニル吉草酸エチルエステル (<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm, 1.3 (t, 3H), 1.9

(m, 2H), 2.6 (t, 2H), 2.8 (t, 2H), 4.3 (q, 2H), 7.0-7.4 (m, 5H)(収率73%), および2-ケトノナン酸エチルエステル (<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm, 0.9 (t, 3H), 1.3-1.5 (br, 8H), 1.4 (t, 3H), 1.6 (br, 2H), 2.8 (t, 2H), 4.3 (q, 2H)(収率68%) を合成した。これらのエステル類は、10%塩酸を加えた酢酸中、50°C で3時間保温することにより加水分解した。生成したケト酸はn-ヘキサンに添加により結晶化した。2-ケト-4-フェニル酪酸, 2-ケト-5-フェニル吉草酸および2-ケトノナン酸は対応するエステルからそれぞれ58, 93および89%の収率で得た。

3-ケト-4-フェニル酪酸エチルエステルをモノエチルマロン酸とフェニルアセチルクロライドから収率75%で合成した。上記の加水分解法により3-ケト-4-フェニル酪酸を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 3.5 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 7.1-7.5 (m, 5H), 8.8 (s, 1H)。1-ジアゾ-2-ケト-3-フェニルプロパンは64%の収率で、フェニルアセチルクロライドとジアゾメタンより合成した。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 3.6 (s, 2H), 5.1 (s, 1H), 7.1-7.4 (m, 5H)。本ジアゾ化合物をジオキサン中、硫酸と加熱し、2-ケト-3-フェニルプロパノールを得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 3.6 (s, 2H), 3.6-3.8 (br, 1H), 4.2 (s, 2H), 7.1-7.4 (m, 5H)。2-

ケト-3-(2-ナフタレン)プロピオン酸は2-ナフタレン酢酸およびジエチルオキザロ酢酸より合成した。

(4) 2-ケト-5-フェニル吉草酸の還元的アミノ化反応

4 mmolの2-ケト-5-フェニル吉草酸を含む100mlの反応液に20mmolのギ酸アンモニウム、8 mmolのNH<sub>4</sub>OH-NH<sub>4</sub>Cl緩衝液(pH 8.5)、0.1 mmolのNAD<sup>+</sup>、5,760単位のフェニルアラニン脱水素酵素、240単位のギ酸脱水素酵素を30℃で60時間保温した。ケト酸(3 mmol)を10時間おきに5回加えた。40時間目に20mmolのギ酸アンモニウムを加えた。

(5) L-フェニルアラニンの連続的合成

*B. sphaericus* SCRC R-79aからのフェニルアラニン脱水素酵素(45mg, 5単位)およびギ酸脱水素酵素(7.5mg, 15単位)は透析チューブ中(18/32, Viskase Sales Corp., U.S.A.)に入れ、4 mmol フェニルピルビン酸, 50mmol NAD<sup>+</sup>, 12mmol ギ酸アンモニウム, 2.5mmol Tris-HCl (pH 8.5)を含む50mlの反応液に浸した。酵素を含むチューブは30℃において保温し、さらに一定時間おきに同じ組成の新しい反応液に移した。L-フェニルアラニンは、乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* を用いて定量した。

(6) アセトン乾燥菌体によるL-フェニルアラニンの合成

*B. sphaericus* SCRC-R79a および *C. boidinii* No. 2201 のアセトン乾燥菌体は、既知の方法により調製した<sup>7)</sup>。典型的な調製法は以下の通りである。6リッターの培養液から得た *C. boidinii* No. 2201 を80mlの0.01Mのりん酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁した。そこへ、-20℃に冷却した400mlのアセトンを加えた。菌体を濾過により集め、等量の冷却したアセトンで洗浄の後30分間減圧下に置き溶媒を除去した。使用するまで-20℃で保存した。

通常、1リッター当たり2.0 gの *B. sphaericus* SCRC-R79a および1.3 gの *C. boidinii* No. 2201 が得られた。1.85mmolのフェニルピルビン酸ナトリウム, 15mmolのNAD<sup>+</sup>, 12mmolのギ酸アンモニウム, 1.5mmolのTris-HCl (pH 8.5), それぞれ300 mgの *C. boidinii* No. 2201 および *B. sphaericus* SCRC-R79a の菌体を含む反応液30mlを30℃で48時間保温した。反応開始後3, 7, 12, 25, 30時間において、1.85mmolのフェニルピルビン酸ナトリウムを添加した。12時間後、5.6mmolのギ酸アンモニウムを加えた。

### 3. 結 果

(1) *B. sphaericus* 由来のフェニルアラニン脱水素酵素の基質特異性

*B. subtilis* SCRC-R79a 由来のフェニルアラニ

Table 1 Substrate Specificity of Phenylalanine Dehydrogenase from *Bacillus sphaericus* SCRC-R79a.

Substrate (10mM)	Relative* activity (%)
4-Hydroxyphenylpyruvate	100
Phenylpyruvate	74
4-Vinylphenylpyruvate	38
4-Fluorophenylpyruvate	29
2-Keto-4-methylthiobutyrate	8.1
2-Keto-3-DL-phenylvalerate	6.5
2-Keto-isovalerate	5.7
2-Keto-butyrate	4.6
2-Keto-isovalerate	4.0
2-Keto-3-DL-(4-fluorophenyl)butyrate	3.7
2-Keto-3-DL-phenylbutyrate	3.5
2-Keto-4-phenylbutyrate	2.5
2-Keto-3-DL-methylvalerate	2.1
2-Keto-5-phenylvalerate	2.0
2-Keto-3-DL-(3-methylphenyl)butyrate	0.74
2-Keto-nonanoate	0.54
2-Keto-3-(2-naphthalene)propionate	0.34
2-Keto-3-DL-phenyl-4-methylvalerate	0.07

\* The following compounds were inert as a substrate: benzoylformate, ethyl phenylpyruvate, ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate, ethyl 3-oxo-4-phenylbutyrate, 3-oxo-4-phenylbutyrate, 2-oxo-phenylpropanol, 2-oxo-3-phenylnonanoate, and 2-oxo-3-methyl-3-(4-propylphenyl)propionate.

ン脱水素酵素による2-ケト酸およびそれらのアナログの還元のアミノ化反応の基質特異性をTable 1に示す。なお、ベンゾイルギ酸、フェニルピルビン酸エチル、2-ケト-4-フェニル酪酸エチル、3-ケト-4-フェニル酪酸エチル、ケト-4-フェニル酪酸、そして2-ケト-3-フェニルプロパノールは基質とならなかった。一方、ベンゼン環に置換基を持った構造類似体は、いずれも比較的良好な基質となった。本酵素は、3位に置換基を有するピルビン酸誘導体に対しても作用したが、その反応速度は比較的遅かった。ヘキシル基などのかさ高い置換基を有するピルビン酸誘導体では、反応速度は著しく低下した(4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の0.54%)。このように本酵素の基質特異性は比較的広く、2-ケト酸の疎水性基部分にはかなり余裕があることがわかった。

#### (2) 2-ケト酸からのL-アミノ酸の合成

本酵素の広い基質特異性を利用し、2-ケト酸を基質として各種のL-アミノ酸を収率良く合成した。本酵素を用いて、人工甘味料アスパルテームの原料としてのL-フェニルアラニンのみならず、アンジオテンシン変換酵素阻害剤エナブラプリル等の合成原料となりうるL-ホモフェニルアラニンも収率良く合成することができた。Table 2に、合成した各種のL-アミノ酸の収率を示した。2-ケト-3-DL-メチル酪酸および2-ケト-3-DL-メチル-3-フェニルピルビン酸を基質として合成した生産物は、それぞれL-イソロイシンおよびL-アロイソロイシン、そしてL-2-アミノ-3-DL-メチル-3-フェニルプロピオン酸の混合物であることが明らかとなった。

NADH再生系として用いるギ酸脱水素酵素を共存させると、各種の置換ピルビン酸アナログを基質として、対応するL-アミノ酸を合成することができた。フェニルアラニン脱水素酵素の基質特異性について、合成基質を用いて系統的に調べた

のは初めてである。本酵素は2-および3-ケト酸エチルならびに2-ケトールを基質とせず、遊離のカルボキシル基が基質として必要であることが判明した。2-ケト-4-フェニル酪酸が基質となるにもかかわらず、2-ケト-5-フェニル吉草酸がそうならなかったのは、カルボニル炭素とカルボキシル基に間にある程度の距離が必要であることを示している。

#### (3) アセトン乾燥菌体によるL-フェニルアラニンの合成

*B. sphaericus* SCRC-R79aと*Candida boidinii* No. 2201のアセトン乾燥菌体を用いるL-フェニルアラニンの合成例では、L-フェニルアラニンの濃度が61.5mg/ml(収率99%)に達した(Fig. 2)。

(4) フェニルアラニン脱水素酵素の反応機構  
想定される本酵素の反応機構をFig. 3に示す。その根拠は次の通りである。すなわち、本酵素はNADHのピリジン環の4位のpro-S水素を還元を用いること、Sequentialな機構で反応が進行すること、一次構造においてグルタミン酸脱水素酵素や、その他のアミノ酸脱水素酵素の活性中心と共通のアミノ酸配列が見出されたこと、活性中心のLys残基のSerへの置換によって活性が失われたこと、および反応がL立体特異的であることである。

#### 4. おわりに

本研究は、フェニルアラニン脱水素酵素とギ酸脱水素酵素の利用の限界を拡張するものである。L-2-アミノ-4-フェニル酪酸(L-ホモフェニルアラニン)と他の非天然型L-アミノ酸が効率良く合成することが可能であった。L-チロシン、L-2-アミノ-4-フェニル酪酸、L-2-アミノ-5-フェニル吉草酸等のL-フェニルアラニン類縁体の溶解度は低いので、反応液から結晶として容易に取り出すことが可能であり、反応液はさらに継続し

**Table 2** Synthesis of L-Amino Acids from 2-Keto Acids by Using Phenylalanine Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase<sup>a</sup>. To prevent substrate inhibition, 2-oxo acids have been divided into portions and added to the reaction mixture not to exceed 50 mM.

Substrate	Product	Yield (%)
Phenylpyruvate	L-Phenylalanine	>99 <sup>b</sup>
4-Hydroxyphenylpyruvate	L-Tyrosine	>99 <sup>c</sup>
4-Fluorophenylpyruvate	L-4-Fluorophenylalanine	>99 <sup>d</sup>
2-Keto-4-phenylbutyrate	L-2-Amino-4-phenylbutyric acid	99 <sup>e</sup>
2-Keto-5-phenylvalerate	L-2-Amino-5-phenylvaleric acid	98 <sup>f</sup>
2-Keto-3-methyl-3-phenylpropionate	L-2-Amino-3-DL-methyl-phenylpropionate	98 <sup>g</sup>
2-Keto-nonanoate	L-2-Aminononanoic acid	99 <sup>h</sup>

a: The optical purity of the amino acids were determined to be 100% e.e. by HPLC (Waters Assoc., equipped with a chiral column, Crownpak CR (+) (Daicel Co. Ltd, Osaka, Japan) with a solvent system of 0.01 M perchloric acid, L-Methionine, L-valine, and L-leucine were stoichiometrically synthesized in 0.1 mmol scale from 2-keto-4-methylthiobutyrate, 2-ketoisovalerate, and 2-keto-isocaproate, respectively. A mixture of L-isoleucine and L-*allo*-isoleucine was from 2-keto-3-DL-methylvalerate, as determined by an amino acid analyzer (Kyowa Seimitsu, model K-101).

b: Synthesized in 8 mmol scale and the yield determined microbiologically. Anal. Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>: C, 65.44; H, 6.71; N, 8.48%. Found: C, 65.48; H, 6.71; N, 8.47%.  $[\alpha]^{20} = -34.1$  (c = 1.72, H<sub>2</sub>O).

c: Synthesized in 6 mmol scale and the yield determined by HPLC. Anal. Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>: C, 59.66; H, 6.12; N, 7.73%. Found: C, 59.45; H, 6.11; N, 7.69%.  $[\alpha]^{20} = -7.33$  (c = 4.6 N HCl).

d: Synthesized in 2 mmol scale and the yield was determined by HPLC.

e: Synthesized in 39 mmol scale. IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3050, 2950, 2170, 1580, 1520, 1410, 1355, 1320, 1200, 1140, 990, 870, 745, 695, 545, 490 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of its methyl ester: (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.7 (s, 2H), 1.6-2.2 (m, 2H); 2.7 (t, 2H), 3.4 (dd, 1H), 3.7 (s, 3H), 7.0-7.3 (m, 5H). MS m/z: 179 (relative intensity 4%), 162 (12), 134 (36), 117 (20), 105 (8), 91 (100), 75 (14), 74 (13), 65 (13), 57 (7), 51 (7), 43 (5). Anal. Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: C, 67.02; H, 7.27; N, 7.80%. Found: C, 67.02; H, 7.31; N, 7.82%.  $[\alpha]^{20} = +44.7$  (c = 1.04, 1N HCl).

f: Synthesized in 19 mmol scale. IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3050, 2950, 2600, 2150, 1610, 1590, 1515, 1410, 1330, 750, 710, 700, 660, 530 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of its methyl ester: (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.7 (s, 2H), 1.5-1.9 (m, 2H), 1.5-1.9 (m, 2H), 2.6 (m, 2H), 3.4 (m, 1H), 3.7 (s, 3H), 7.0-7.3 (m, 5H). MS m/z: 193 (relative intensity 92%), 148 (100), 131 (93), 105 (45), 104 (35), 91 (92), 74 (58), 56 (65). Anal. Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>: C, 68.37; H, 7.82; N, 7.25%. Found: C, 68.12; H, 7.94; N, 7.29%.  $[\alpha]^{20} = +39.2$  (c = 1.16, 5NHCl-DMF)

g: Synthesized in 2 mmol scale. The amino acid formed was purified by a column of Dowex X-8 (Cl<sup>-</sup>), 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum (acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 1.3 and 1.47 (dd (mixture of diastereomeric proton of 3-methyl group), 3H, J = 8Hz), 3.18-3.3 (m, 1H), 4.01, 4.09 (m, 1H), 7.1-7.45 (m, 5H).

h: Synthesized in 20 mmol scale and the yield was determined by HPLC. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3100, 2970, 2950, 2880, 1700, 1580, 1510, 1490, 1470, 1130, 860, 825, 590 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of its methyl ester: (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 0.9 (t, 3H), 1.3-1.5 (br, 12H), 1.7 (s, 2H), 3.4-3.6 (m, 1H), 3.7 (s, 3H).

Anal. Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: C, 62.39; H, 11.05; N, 8.09%. Found: C, 62.34; H, 11.38; N, 8.09%.  $[\alpha]^{20} = +32.2$  (c = 1.02, acetic acid)

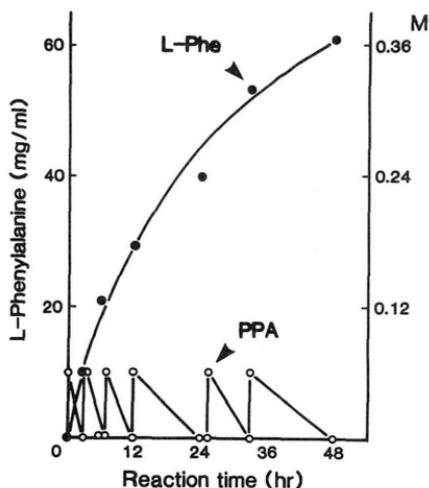


Fig. 2 Synthesis of L-Phenylalanine by Acetone-Dried Cells of *B. sphaericus* SCRCR-79a and *C. bovidini* No. 2201. Details of the conditions are described in the Experimental Section. -●- : L-phenylalanine; -○- : sodium phenylruvate (PPA).

て反応に用いることが出来た。L-フェニルアラニンは精製酵素、透析膜中における精製酵素、アセトン乾燥菌体の様々な反応形態を用いても合成することが出来た。精製の煩雑さを考慮すると、菌体として使用することが優れている。今回の合成では、幸いに副反応が起こらず、高い光学純度のL-フェニルアラニンが合成出来た。フェニルアラニンのラセミ化酵素や、フェニルピルビン酸分解酵素活性は認められなかった。アセトン乾燥菌体は、取り扱いや保存が容易である。

遺伝子組換え技術により大量に生産されたフェニルアラニン脱水素酵素を用いると、基質となくにくい2-ケト酸からも短時間に各種のL-アミノ酸を合成することが出来た。例えば、3.6gのL-2-アミノ-5-フェニル吉草酸の合成実験には5,760単位のフェニルアラニン脱水素酵素を用いた。この酵素を得るには、野生株の*B. sphaericus* SCRC-R79aでは100リッターの規模で培養する必要があるが、形質転換株*E. coli* JM109/pBPDH1-DBLでは、わずかに0.8リッター程度の培養で済む計算になる。

以上、我々が開発したフェニルアラニン脱水素

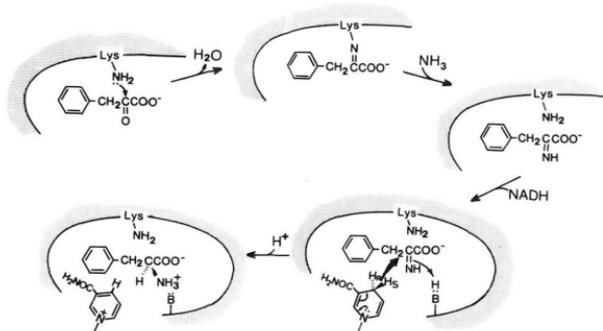


Fig. 3 Proposed Reaction Mechanism of Phenylalanine Dehydrogenase.

酵素が示す多彩な応用の可能性の内、本酵素と蟻酸脱水素酵素の組み合わせにより、安価な $\alpha$ -ケト酸を原料とするL-アミノ酸類の合成法について報告した。本酵素の他の利用法としては、ポジトロン・エミッション・トモグラフィ（PET）の核医学研究に供するために、半減期の極めて短い $^{13}\text{N}$ によるL-チロシン、L-フェニルアラニン、L-DOPA等の標識化に成功している<sup>8)</sup>。また、本酵素を用いる酵素サイクリングにより、体液中のフェニルピルビン酸、パラヒドロキシフェニルピルビン酸の微量定量や、L-フェニルアラニン、L-チロシン等の定量が可能となり、フェニルケトン尿症の診断薬としての利用法の開発が期待されている<sup>9)</sup>。

新規微生物酵素D-アミノペプチダーゼの開発と人工甘味料の原料となるD-アミノ酸類や、D-アミノ酸アミド類の合成法に関する研究については、他を照されたい<sup>10, 11)</sup>。

本研究をまとめるにあたり、御援助を頂いた浦

上財団に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 浅野泰久, 日本農芸化学会誌, **62**, 779-782 (1988).
- 2) Asano, Y., Nakazawa, A., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3631-3632 (1985).
- 3) Asano, Y., Nakazawa, A., Endo, K., *J. Biol. Chem.*, **262**, 10346-10354 (1987).
- 4) Asano, Y., Nakazawa, A., Endo, K., Hibino, Y., Ohmori, M., Numao, N., Kondo, K., *Eur. J. Biochem.*, **168**, 153-159 (1987).
- 5) Okazaki, K., Hibino, Y., Asano, Y., Ohmori, M., Numao, N., Kondo, K., *Gene*, **63**, 337-341 (1988).
- 6) Asano, Y., Endo, K., Nakazawa, A., Hibino, Y., Ohmori, M., Numao, N., Kondo, K., *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2621-2623 (1987).
- 7) Asano, Y., Yamada, A., Kato, Y., Yamaguchi, K., Hibino, Y., Hirai, K., Kondo, K., *J. Org. Chem.*, **55**, 5567-5571 (1990).
- 8) Gelbard, A. S., Cooper, A. J. L., Asano, Y., Nieves, E., Filc-DeRico, S., Rosenspire, K.C., *Appl. Rad. Isotopes*, **41**, 229-233 (1990).
- 9) Cooper, A. J. L., Leung, L. K. H., Asano, Y., *Anal. Biochem.*, **183**, 210-214 (1989).
- 10) 浅野泰久, バイオサイエンスとインダストリー, **48**, 131-137 (1990).
- 11) 浅野泰久, 有機合成化学協会誌, **49**, 314-326 (1991).

Enzymatic Synthesis of L-Amino Acids from  $\alpha$ -Keto Acids

Yasuhisa Asano (Toyama Prefectural University)

The substrate specificity of phenylalanine dehydrogenase (L-phenylalanine: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, deaminating (EC 1.4.1.20)) from *Bacillus sphaericus* SCRC-R79a in the reductive amination reaction was examined with various natural and synthetic 2- and 3-oxo acids and their analogs. The enzyme was active toward 3-substituted pyruvic acids with bulky substituents. Optically pure L-phenylalanine and other L-amino acids were quantitatively synthesized from their oxo-analogs using phenylalanine dehydrogenase, with a regeneration of NADH by formate dehydrogenase from *Candida boidinii* No. 2201. Recombinant phenylalanine dehydrogenase overproduced in *Escherichia coli* JM109/pBPDH1-DBL was effectively used for the syntheses of L-amino acids from unnatural substrates. L-Phenylalanine could be continuously synthesized for about one month with the enzymes, packed in a dialysis tube. It is calculated that one mol of phenylalanine dehydrogenase catalyzed the synthesis of  $4.8 \times 10^8$  mol of L-phenylalanine, and  $2.4 \times 10^5$  times the weight of L-phenylalanine than that of the enzyme. Acetone-dried cells of *B. sphaericus* SCRC-R79a and *C. boidinii* No. 2201 were also effective for L-phenylalanine synthesis, providing a simple microbial method of synthesis.