微生物の生産するカルボニル還元酵素

—その多様性と光学活性アルコール類の合成への利用—

清 水 昌*・山 田 秀 明*

Microbial Carbonyl Reductases

—Their Diversity and Application to the Synthesis of Optically Active Alcohols—

Sakayu SHIMIZU* and Hideaki YAMADA*

New NADPH-dependent carbonyl reductases which catalyze stereospecific reductions of carbonyl compounds have been purified from various microorganisms and characterized. The enzymes “polyketone reductase” from *Candida parapsilosis* and *Mucor ambiguous* specifically catalyze reduction of various prochiral cyclic diketones, yielding the corresponding (*R*)- and (*S*)-hydroxyketones, respectively. Aldehyde reductase from *Sporobolomyces salmonicolor* and carbonyl reductase from *C. macedoniensis* catalyze stereospecific reduction of various aliphatic and aromatic ketones and aldehyds. Ketopantoic acid reductase from *Pseudomonas maltophilia* and an FMN-dependent alcohol dehydrogenase from *Nocardia asteroides*, catalyze reduction of ketopantoic acid to D-pantoic acid and oxidation of L-pantoyl lactone to ketopantoyl lactone. These enzymes were successfully applied to the synthesis of chiral intermediates for the synthesis of D-pantothenic acid and L-carnitine.

Key words : asymmetric reduction ; enzymatic synthesis ; carbonyl reductase ; D-pantothenic acid ; L-carnitine enzymatic synthesis.

1. はじめに

微生物や酵素が行う生化学反応を合成化学的な観点から評価し、様々な合成・変換の場で利用しようとする研究は、応用微生物学、有機合成化学それぞれにおいて主要な研究分野のひとつである。この種の合成方式は、合成の主要部分が酵素反応によっていることから、あるいは、酵素反応と化学反応とが組み合されていることから、“酵素法”とか“ハイブリッドプロセス”とか呼ばれる¹⁾。例えば、グルコースやシュクロースなどの糖を含む反応液にパン酵母やビール酵母を混ぜると、基質として加えたカルボニル化合物が対応するアルコール化合物に還元される現象は古くから知られているひとつの酵素法である。この現象は、ケトン還元して光学活性アルコール

を得るためのひとつの有効な手法として有機合成化学の分野ではしばしば利用されてきた。しかし、この現象の基となる生化学や酵素化学についてはほとんど知られておらず、酵母はひたすら便利なブラックボックスとして使われてきた。筆者らは、酵素法による有用化合物の合成と変換に関する一連の研究¹⁾において、この種の還元反応の利用についても検討を加え、D-パントテン酸やL-カルニチンの製造や種々の光学活性アルコールの合成に利用できることを示してきた。また、関与する酵素反応についても究明し、これまで知られていなかった新しいタイプの一群のカルボニル還元酵素が酵母を中心に広く微生物に存在すること、糖のエネルギーに基づくNAD(P)Hの再生系がこの反応に効率よく共役するとき初めて効果的な還元が起こることを明らかにした。本稿では、微生物の還元反応の多様性が生産される酵素の多様性に基いていること、さらに、それぞれが多様な基質に作用することから成り立っていることを示すとともに、筆者らの行った実際的な応用例についても紹介したい。

* 京都大学農学部農芸化学教室 ()

* Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University ()

2. 微生物にみられるカルボニル化合物の 不斉還元反応の多様性

D-パントテン酸やL-カルニチンの合成の出発原料となりうる数種のプロキラルなカルボニル化合物を選んで各種微生物の還元能を調べた。グルコースを炭素源とする培地に菌株を生育させ、テスト化合物(1%~5%)を加えて反応を行うと、細菌、放線菌、酵母、カビ、担子菌など様々な微生物に還元能が見いだされた。

ケトパントラクトン(KPL)を還元してパントラクトン(PL)を与える活性の分布は広く、テストした微生物の約10%に当たる100株が30%以上のモル転換率でPLを生成した(基質濃度1%, pH 6.0)。この還元立体選択性は、微生物の属や種とはほとんど無関係で、高い選択率でR体(D-PL)を与えるもの、逆に、S体(L-PL)を生成するもの、ラセミ体を与えるもの、両者を様々な比率で与えるものなど多様である(図1a)。例えば、*Mucor racemosus* はL-PL(93% ee, モル転換率85%)を与えるが、*M. javanicus* では生成物はラセミ体である(モル転換率59%)。*Rhodotorula glutinis* ではテストした9株中5株がラセミ体、2株が主にL-PL、2株がD-PL(>90% ee)をそれぞれモル転換率90%以上で与える²⁻⁴⁾。逆反応、即ちD-PLまたはL-PLからKPLへの酸化は*Nocardia*、*Rhodococcus*、*Corynebacterium*などの細菌にみられる。いずれの場合も反応は立体選択的であり、L-PLのみが酸化される⁵⁾。

上記のテストをpH 7~7.5付近で行うと図1とは対照的な結果が得られる。これは、KPLが微アルカリ条件

下では速かに開環加水分解されてケトパント酸(KPA)となるためであり、結果的にKPAを基質とした反応を調べることになるからである。この場合の生成物はパント酸(PA)であるが、生成物の光学純度を測定した菌株(約100株)のほとんどは高純度のD-PA(>95% ee)を与えた。また、30%以上のモル転換率を示す菌株は*Pseudomonas* および*Agrobacterium*属細菌に偏在していた⁶⁾。

ケトパントテン酸エチルエステル(KPaOEt)の還元能はKPLの場合と同じく様々な微生物に検出できる(図1b)。モル転換率が30%以上のものでは、*Hansenula*、*Candida*、*Sporobolomyces*属に属するものは主にD-パントテン酸エチルエステル(D-PaOEt)(>55% ee)を与えるが、*Saccharomyces*、*Pichia*、*Rhodotorula*属ではL-PaOEtを主産物として与えるものもある。細菌では*Pseudomonas putida*や*P. aureofaciens*がL-PaOEt(>55% ee)を高転換率で与える⁷⁾。

ケトパントテノニトリル(KPaCN)の還元も様々な微生物にみられる。*Sporobolomyces*、*Sporidiobolus*、*Mortierella*の数株はD-パントテノニトリル(D-PaCN、40~98% ee)を、*Rhodotorula*および*Paecilomyces*のあるものはL-PaCN(それぞれ76.2および98% ee)を高転換率で与える⁸⁾。

4-クロロアセト酢酸(CCA)エステルを還元して4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸(CHB)エステルを与える活性も広く微生物界に認められる。高いモル転換率を示す菌株はカビ、酵母に多いが、S体(40~98% ee)を与えるものがほとんどであり、R体を優先的に与える菌株の

Fig.1 Diversity of microbial reduction of ketopantoyl lactone (a) and ethyl 2'-ketopantothenate (b).
△, yeasts; ○, molds; □, bacteria; ■, actinomycetes; ●, basidiomycetes.

出現頻度は低く、*Sporobolomyces salmonicolor* と *Micrococcus luteus* および *Cellulomonas* sp. に 10% ee 程度の選択性が認められた⁹⁾。

3. カルボニル還元酵素類の諸性質

上記のスクリーニングを通じて得られた高活性菌の中から興味深いものについて、酸化または還元反応に関与する酵素の単離・精製および諸性質の解明を行った。表 1 に得られた結果を要約した。

C. parapsilosis から結晶状に単離した酵素は、NADPH 依存性の新しいタイプのカルボニル還元酵素で、共役した環状ポリケトンのみに作用することから「共役ポリケトン還元酵素」と命名した¹⁰⁾。本酵素の基質特異性は広く、各種 KPL 誘導体、イサチン類、カンファーキノンなどのジケトン類に作用し対応する (R)-アルコール (100% ee) を与える。いずれの場合も還元されるカルボニル基は 1 つだけである (図 2)。KPL 類の還元では、ラクトン環の 4 または 5 位の置換基が大きくなると酵素に

対する親和性は増大するが、反応速度は低下する (図 3a)。イサチン類の還元では、5 位の置換基が電子吸引的になると反応速度は低下するが ($\text{CH}_3 > \text{H} > \text{Br} > \text{NO}_2$)、 K_m はほとんど変化しない。カンファーキノンの場合 (S),(R) いずれの基質からでも (R)-アルコールが生成する¹¹⁾。一方、NADPH のモデル化合物 ((4R)-N-[(R)- α -メチルベンジル]-1-プロピル-2,4-ジメチル-1,4-ジヒドロニコチンアミド) による還元では、前者からは主産物として (R)-アルコールが、後者からは (S)-アルコールが生成する。即ち、モデル化合物では基質の *endo* または *exo-site* の認識しかできないが、酵素の場合には基質分子全体が認識されて (R)-アルコールが与えられることが理解できる。

M. ambiguus から得た酵素は KPL を L-PL に還元する (100% ee)。本酵素も *Candida* の酵素同様 NADPH 依存性の共役ポリケトン還元酵素である。本酵素は *Candida* の酵素が還元できる基質はすべて基質とするが、反応の立体選択性は逆転している (表 1, 図 3b)¹²⁾。このように、

Table 1 Properties of the carbonyl reductases and alcohol dehydrogenase purified from various microorganisms.

	Polyketone reductase (<i>C. parapsilosis</i>)	Polyketone reductase (<i>M. ambiguus</i>)	L-PL dehydrogenase (<i>N. asteroides</i>)	KPA reductase (<i>P. maltophilia</i>)	K-PaOEt reductase (<i>C. macedoniensis</i>)	Aldehyde reductase (<i>S. salmonicolor</i>)
Native Mr	37,000	56,000	600,000	116,000	45,000	37,000
Subunit Mr	41,600	27,000	42,000	30,500	42,000	37,000
$s_{20,w}$ (S)	4.8			7.75	—	2.85
pI	6.3	6.4	4.3	3.5	5.5	4.7
Absorption maxima (nm)	278	276	276,370,456	276	278	278
E (1%)	8.3			20.0	—	12.2
CCOH amino acid				Phe	Thr	Lys
K_m (mM)	0.33(KPL)	0.71(KPL)	26.8(L-PL)	0.40(KPA)	2.50(K-PaOEt)	0.36(CAAE)
V_m (μ mol/min/mg)	481(KPL)	541(KPL)		1,310 (KPA)	120(K-PaOEt)	144(CAAE)
Cofactor	NADPH	NADPH	FMN	NADPH	NADPH	NADPH
Optimum pH	7.0	6.0	9.0–9.5	6.0	6.5	7.0
Optimum temp. (°C)	40	40	40	37	40	60
pH stability	6.0–7.5	5.5–7.0	9.0–10	6.0–10	4.5–10.5	6.5–8.5
Thermal stability	42% (40°C, 10 min)	75% (45°C, 10 min)	60% (45°C, 10 min)	90% (60°C, 10 min)	100% (55°C, 10 min)	100% (45°C, 10 min)
Inhibitor	quercetin	quercetin			—	dicoumarol
Reaction mechanism	ping-pong	ping-pong		ordered Bi-Bi	—	ordered Bi-Bi
Enzyme formation	constitutive	constitutive	inducible	constitutive	constitutive	constitutive
Reaction in Fig. 6	1	2	3	5	7	
Reference	10	12	16	13	14	15

Fig. 2 Stereoselective reduction of several diketones by *Candida* polyketone reductase. See ref. 11) for details.

従来その存在が知られていなかった互に立体選択性が異なる新しいタイプのカルボニル還元酵素が微生物界に存在することが明らかとなった。図 1a にみられる立体選択性の多様性は、上記のごとく立体選択性の異なる 2 種以上の酵素が存在し、それらの活性および量的関係が個々の微生物でまちまちであるということで一応の説明が可能である。

KPA の還元を触媒する酵素は *P. maltophilia* から結晶状に単離され諸性質が解明された。本酵素も NADPH 依存性のカルボニル還元酵素であるが基質特異性は厳密である。KPA 以外には 2-ケト-3-ヒドロキシイソ吉草酸が KPA の 1.35% の反応速度で反応する。KPA からの生成物は D-PA (100% ee) である。D-PA は D-パントテン酸生成体の中間体とされているが、実際、*P. maltophilia*

Fig. 3 Comparison of substrate specificities of polyketone reductases from *C. parapsilosis* (a) and *M. ambigua* (b) for various ketopantoyl lactone analogs. See ref. 10-12) for details.

の本酵素欠損変異株は D-パントテン酸の要求性を示す。また、復帰変異株は D-パントテン酸の要求性を示さない。よって本酵素は生体内では D-パントテン酸の生成に関与する KPA 還元酵素 (EC 1.1.1.169) であることが明らかとなった¹³⁾。本酵素の厳密な基質特異性や KPA を L-PA に還元する活性が微生物に見出されないのは、このビタミンの生合成を混乱なく行う上で必須であることを示唆している。

KPaOEt の還元に関与する酵素は *C. macedoniensis* から精製された。本酵素も NADPH 依存性で還元生成物として D-PaOEt (100% ee) を与える。表 1 に示した酵素の中では本酵素は最も広い基質特異性を示す。即ち、エステル鎖長の異なるケトパントテン酸エステル類、KPaCN、KPL やイサチンなどの共役ジケトン類、CAA エステル類、*o*-ニトロベンズアルデヒド (*p* 体および *m* 体には作用しない) などが良い基質となる (表 2)。生成するアルコールは、ケトパントテン酸類は (R) 体 (D 型, 100% ee)、CAA エステル類は (S) 体 (100% ee) である。KPL に関しては選択性が甘く、(R) 体 (D 型) と (S) 体 (L 型) が 4 : 1 の割合で生成する¹⁴⁾。

S. salmonicolor より結晶状に単離した酵素は CAA エステル類に作用して対応する (R)-アルコール (100% ee) を与える。本酵素も NADPH 依存性である。基質特異性は

Table 2 *V* and *K_m* values of *S. salmonicolor* and *C. macedoniensis* (underlined) carbonyl reductases for various carbonyl compounds.

Substrate	Relative activity	(<i>K_m</i>)	Substrate	Relative activity	(<i>K_m</i>)	Substrate	Relative activity	(<i>K_m</i>)
$\text{Cl}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_3$	25	(1.8)	$\text{C}_6\text{H}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	14	<u>0</u>	Cyclohexanone	0	<u>222</u> (2.5)
$\text{Cl}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$	100	(0.36)	$\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	52	(6.7)	Cyclohexanone	0	<u>496</u> (1.7)
$\text{Cl}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{C}_8\text{H}_{17}$	240	(0.10)	$\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	56	(8.9)	Cyclohexanone	0	<u>204</u> (2.9)
$\text{N}_3-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$	65	(0.35)	$\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	58	(5.7)	Cyclohexanone	0	<u>633</u> (1.9)
$\text{Br}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$	75	(0.091)	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	176	(0.53)	Cyclohexanone	0	<u>827</u>
$\text{F}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{C}_2\text{H}_5$	153	(0.13)	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	468	(0.80)	Cyclohexanone	0	<u>4156</u> (0.03)
$\text{HC}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	74	(6.9)	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	63	(4.4)	Cyclohexanone	0	<u>1760</u> (0.17)
$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_3$	219	(3.0)	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	14	(1.3)	Cyclohexanone	0	<u>827</u>
$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3$	75	(7.3)	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	197	(6.7)	Cyclohexanone	0	<u>4156</u> (0.03)
$\text{OH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{OH}$	64	<u>0</u>	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	228	(2.4)	Cyclohexanone	0	<u>1760</u> (0.17)
$\text{Cl}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	17	<u>0</u>	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$	54	(4.9)	Cyclohexanone	0	<u>1760</u> (0.17)

K_m values are given in mM.

Table 3 Comparison of substrate specificities of the carbonyl reductases from various microorganisms^a.

	$\text{R}-\text{CHO}$	$\text{C}_6\text{H}_4-\text{CHO}$	Ha	OR	$\text{HOX}-\text{CHO}$
Polyketone reductase (<i>C. parapsilosis</i>)	○				
(<i>M. ambiguous</i>)	○				
K-PaOEt reductase (<i>C. macedoniensis</i>)	○	○			○
Aldehyde reductase (<i>S. salmonicolor</i>)	○	○	○	○	○
KPA reductase (<i>P. maltophilia</i>)					○

^a Open circles indicate that enzymes can reduce the substrates indicated in the table. Ha = Cl, Br, F or N₃.

広く、種々の芳香族アルデヒドおよび脂肪族アルデヒドにも作用する(表2)。特に *p*-ニトロベンズアルデヒドや *D*-グリセルアルデヒドが良好な基質となることから、本酵素は肝臓などにその存在が報告されているアルデヒド還元酵素に類似した酵素と考えられる。*S. salmonicolor* のアルデヒド還元酵素の含量は、本酵素が構成酵素であるにもかかわらず、全可溶性タンパク質の1~2%に達する¹⁵⁾。本菌が他の菌に比して(*R*)体の生成割合が高いのは、本酵素の含量が高いためと考えられる。

表3および図4にこれら5種のNADPH依存性カルボニル還元酵素の基質特異性と反応の立体選択性をまとめ

Fig. 4 Comparison of stereospecificities and substrate specificities of four fungal carbonyl reductases.

た。KPA 還元酵素を除いて、これらの酵素の生理的な基質(天然基質)は明らかにされていない。従って、それぞれの酵素が担う生理的役割は不明であり、今後検討すべき課題である。

l-PL から KPL への立体選択的酸化反応に関与する酵素は *N.asteroides* から精製された。本酵素は FMN を補欠分子族として含むアルコール脱水素酵素の一種と考えられる。本酵素は *N.asteroides* の膜画分に存在すること、1,2-プロパンジオールが酵素生成の誘導基質になることが判明している。l-PL に対する K_m 値(26.8 mM)が大きいこと、l-PL 自体は酵素生成の誘導基質とはならないことなどを考慮に入れると、本酵素は、1,2-プロパンジオールの代謝経路上のカルボニル化合物(例えばラクトアルデヒド、アセトール、ビルビン酸など)の酸化に関与していると推測される¹⁶⁾。

4. 不斉還元反応と共役する NADPH 再生に関与する酵素系

上記の各種カルボニル化合物の還元に関与する酵素はいずれも NADPH を水素供与体として要求する。従って、還元反応を効率よく進行させるためには、効率よい NADPH の再生系の共役が必須となる。表 4 は、*C. parapsilosis*, *M. ambiguus* および *Saccharomyces cerevisiae* (パン酵母)の粗抽出液を用いて各種の糖が共存するときの NADP^+ の還元活性を比較したものである。グルコースをエネルギー源とする系では NADPH の生成に ATP が心須なこと、グルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン

酸(G-6-P)、フルクトース 6-リン酸、6-ホスホグルコン酸(6-PG)を添加した場合には ATP の添加の有無にかかわらず NADPH の生成が認められること、この系に KPL または CAA エチルエステルを加えると速やかな NADPH の消費が認められること、フルクトース 1,6-ジリン酸の系では NADPH の生成が認められないこと、表 4 の糖の中では、G-6-P と 6-PG が最も有効な NADPH 生成源であること、いずれの菌株の粗抽出液にもヘキソキナーゼ、ホスホグルコムターゼ、グルコースリン酸イソメラーゼなど G-6-P の生成に関与するすべての酵素活性が検出されることなどの結果を総合すると、これらの菌株における NADPH の供給に関与する主酵素は G-6-P 脱水素酵素と 6-PG 脱水素酵素であると結論づけられる(図 5)。*C.parapsilosis* や *M.ambiguus* の NADPH 生成能は *S.cerevisiae* に比して特に高くはなく、これら菌株の示す高い PL 生産能はもっぱら高いポリケトン還

Fig. 5 The proposed mechanism for the reduction of ketopantoyl lactone to D-(-)-pantoyl lactone coupled with the regeneration of NADPH.

Table 4 Reduction of NADP^+ by cell-free extracts of some fungi in the presence of sugars.

Sugar	NADPH production with					
	<i>C. parapsilosis</i>		<i>M. ambiguus</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP
None	9	9	0	0	0	0
Glucose	10	51	0	17	0	15
Fructose	8	33	0	13	0	7
G-1-P	20	23	11	8	7	10
G-6-P	373	384	95	113	235	211
F-6-P	105	93	58	65	97	85
6-PG	153	167	77	65	113	101
FDP	10	10	0	0	0	0
Sorbitol	125	125	0	0	0	0
Sorbose	10	10	0	0	0	0
Mannitol	150	133	0	0	0	0

All values are given in nmol NADPH formed/min/mg protein.

元酵素活性に帰因することも判明した¹⁷⁾。

5. カルボニル還元酵素類を用いる光学活性アルコール類の生産¹⁸⁾

上記の結果に基づいて、D-パントテン酸とL-カルニチンの実用的合成法の開発について検討した。現在、これらの工業生産はラセミ体を適当な分割剤で光学分割することにより行われているが、工程が煩雑で改良が期待されている。

5.1. D-パントテン酸の生産^{19,20)} 現在安価に入手できる出発原料は、現行の工業生産工程の出発原料でもあるDL-PLかKPLになる。KPLについてはイソブチルアルデヒド、シュウ酸ジエチル、ホルマリンを一挙に縮合させるきわめて効率的な合成法を新たに開発した²¹⁾。これらの基質と先に述べた酵素反応を組み合わせると図6に示すような幾通りかの合成ルートが考えられる。いずれの場合も現行法では回避できないL-PLの再ラセミ化工程の省略が可能となる。

5.1.1. KPLが出発基質となる場合

a) KPLの不斉還元(図6, 反応①) 図1aのスクリーニングで選択した*C. parapsilosis*または*R. minuta*を5% グルコース, 5% コーンステープリカーを含む培地で培養し, 得られた菌体を5% グルコース液(pH 3~4)に懸濁して反応を行う。基質のKPLは高濃度では反応阻害を起こすため, 分割添加する。図7に示すように, *C. parapsilosis*では85 g/l(モル転換率94%, 光学純度93% ee), *R. minuta*では49.6 g/l(モル転換率99%, 光

学純度95% ee)のD-PLが得られる^{21,22)}。

b) KPAの不斉還元(図6, 反応⑤) 前述したようにKPLは微アルカリ条件下で自動的に加水分解されKPAとなる(図6, 反応④)。土壌分離菌*Agrobacterium* sp.の菌体, フルクトース(15%), KPA(KPLとして13.2%)を含むリン酸緩衝液(pH 7)中で反応させると, D-PL換算で119 g/lのD-PAが得られる(モル転換率90%, 光学純度>98% ee⁶⁾。D-PAは酸処理により容易にラクトン化できる。KPAを基質とする方法はKPLを基質とする方法に比して基質の分割添加が不要なこと, 生成物濃度および光学純度が高いなど利点が多い。

c) KPAOEtの不斉還元(図6, 反応⑦) KPL(また

Fig. 7 Stereoselective conversion of ketopantoyl lactone to D-(-)-pantoyl lactone by *Candida parapsilosis* (left) and *Rhodotorula minuta* (right).

Fig. 6 Reactions involved in the enzymatic transformation to D-(-)-pantoyl lactone or D-(+)-pantothenate.

は KPA) 分子中のカルボニル基の還元は、 β -アラニンとの縮合の後に行うこともできる。KPL と β -アラニンとの縮合は D-PL と β -アラニンの縮合に比較して著しく速く、反応の完結性も高いことがこの場合の利点となる。*C. macedoniensis* の菌体を 5% グルコース、8% KPaOEt を含む反応液 (pH5) 中で反応させると 78 g/l の D-PaOEt が得られる (モル転換率 98%, 光学純度 >98% ee)。同様の手法でケトパントテン酸メチル、ケトパントテン酸イソプロピル、ケトパントテン酸、KPaCN などの不斉還元も可能である (表 5)⁷⁾。また、*Spiridiobolus salmonicolor* を用いると 5% の KPaCN をほぼ定量的に D-PaCN に変換できる (光学純度 93.6% ee)⁸⁾。

Table 5 Reduction of possible prochiral ketones for D-(+)-pantothenate synthesis by *C. macedoniensis*^a.

Substrate	Molar yield of product (%)	%ee for D-isomer
Ethyl 2'-ketopantothenate	100	>98
Methyl 2'-ketopantothenate	100	>98
Iso-propyl 2'-ketopantothenate	99.2	>98
2'-Ketopantothenate	93.5	>98
2'-Ketopantothenonitrile	76.5	>98
Ketopantoyl lactone	92.5	62.3
Ketopantoic acid	0	

^aSee ref. 7) for details.

5.1.2. DL-PL が出発基質となる場合

a) L-PL に特異的な酸化反応と KPL の還元反応を組み合わせる方法 (図 6, 反応③→①または③→④→⑤) DL-PL は現時点では最も安価な出発原料と考えられる。従って、DL-PL 中の L-PL のみを立体特異的に酸化して KPL とし、これを 5.1.1. 項の a) または b) の方法で再還元して D-PL とする合成ルートも経済性を有している。この場合変換を受けるのは L-PL のみであり共存する D-PL は変化を受けないことが必須となる。前述の *N. asteroides* の FMN 依存性のアルコール脱水素酵素はこの反応に利用できる⁵⁾。本酵素による L-PL の酸化反応は中性付近の pH 域で効率よく進行するが、反応生成物である KPL はこの pH 域では自動水解されて KPA として反応液中に蓄積する。このため反応液の pH は低下し反応は停止する。一方、pH を 7 付近に調節しながら反応を行うと、生成した KPL は常に KPA として自動的に除去されるため反応液中の KPL 濃度を低く保つことができ、

酸化反応自体は生成物阻害を受けなくなる。この結果、反応は停止するどころかさらにスムーズに進行することになる (図 6 参照)。このような条件下で *N. asteroides* の菌体を触媒として用いると、50~80 g/l の DL-PL から 90% 以上のモル転換率で KPA と D-PL の混合物が得られる。反応液に *Agrobacterium* sp. または *A. rodriobacter* の菌体を加えると KPA は定量的に D-PA に変換される (光学純度 83~95% ee) (図 6, 反応③→④→⑤)²³⁾。また、*N. asteroides* の反応液上清を環化処理し、pH 4~5 の条件で *C. parapsilosis* による還元反応を行うこともできる (収量 80 g/l, モル転換率 99%, 光学純度 82% ee)⁵⁾。

b) L-PL の酸化と KPL の還元を同時に進行させる方法 (図 6, 反応③→④→⑤) *Rhodococcus erythropolis* を *N. asteroides* と同様に培養して反応に供すると、L-PL は一挙に D-PA に変換される。反応液中には KPL と KPA が副生すること、pH を中性付近に保たないと反応が停止することなどから、この場合も a) の *Nocardia-Agrobacterium* による反応と同様に立体選択的な酸化反応と還元反応の組み合わせによって進行する。この方法では 20 g/l の DL-PL をほぼ定量的に D-PA に変換できる (光学純度 95% ee)⁴⁾。

5.2. 光学活性な 4-ハロ-3-ヒドロキシブタン酸エステル類の生産²⁴⁾

5.2.1. (R)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エステル カルニチンは光学分割後の D 体の再ラセミ化が容易でないため、酵素反応を取り入れた様々な合成プロセスが提案されている。CAA エステルを不斉還元して (R)-CHB エステルを得、これをトリメチルアミン化して L-カルニチンを得る試み (図 8) は、最初 Sih ら²⁵⁾ によって行われた。彼らは、パン酵母と CAA エステルを反応させるとき、エステル鎖が短いと (S)-CHB エステルが、長いと (R)-CHB エステルが優先的に生成することを認めている。この反応は図 1 に示した KPL や KPaOEt の還元の場合と同様に 2 種以上の立体選択性の異なる酵素が存在し、そのうちのひとつが長いエステル鎖の基質にも作用するというで理解できる。一方、3. の項で述べた *S. salmonicolor* のアルデヒド還元酵素は CAA エステルにもよく作用し (R)-CHB エステルを与えるので図 8

Fig. 8 Chemicoenzymatic route for the synthesis of L-(+)-carnitine.

の反応に利用できる¹⁵⁾。筆者らは、本酵素を用いて、水-有機溶媒二相系バイオリアクターによる(R)-CHB エステルの新しい生産法を開発した²⁶⁾。

S. salmonicolor の菌体をそのまま触媒的に用いても CAA エステルの還元は図 5 と同様に NADPH の再生系が共役する機構で進行するが、生成物の光学純度は低い。菌体の加熱処理やアセトン処理で(S)-CHB エステルを与える酵素を部分失活させて生成物の光学純度を上昇させることができるが(74% ee), いずれの場合も NADPH の再生系が劣化し、高濃度生産ができない。筆者らは、*S. salmonicolor* の粗抽出液に簡単な熱処理とアセトン処理を加えることで(S)-CHB エステルを与える酵素活性を除去できること、NADPH 再生のための共役酵素として市販のグルコース脱水素酵素の使用が有効であることを認めた。この共役系に基づく水系反応では 30~50 g/l の(R)-CHB エチルエステル(CHBE)が得られる(モル転換率 50~75%, 光学純度 85~86% ee)⁹⁾。水系反応における問題点は、次の 3 点である。1) 基質の不安定性(25°C, pH 7.0, 18 時間の処理で 50 mM CAA エチルエステル(CAAE)の約 50% は非酵素的に分解される), 2) 基質による酵素の不活化(30°C, pH 6.5 の条件で両酵素を 30 mM CAAE と 3 時間処理すると、アルデヒド還元酵素は 28%, グルコース脱水素酵素は 21% 失活する), 3) 基質および生成物による反応阻害(アルデヒド還元酵素の反応速度は 30 mM CAAE または 100 mM CHBE 存在下ではそれぞれ 30% および 40% 低下する)。

上記の問題点を解決するため図 9 に示すような水-有

Fig. 9 Outline of the stereospecific reduction of ethyl 4-chloroacetoacetate (CAAE) by *Sporobolomyces* aldehyde reductase (AR) with glucose dehydrogenase (GDH) as a cofactor regenerator in a water-organic solvent two phase system. CHBE, ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate.

機溶媒二相系での反応を試みた²⁶⁾。二相系では酵素反応の場である水相における基質および生成物濃度が低く保たれることから、基質や生成物による酵素の失活や反応阻害も、水相における基質の非酵素的分解も回避できると考えられる。二相系に使用できる有機溶媒を探索すると、酢酸エチル、酢酸-*n*-ブチル、クロロホルム、ジクロロメタン、ジクロロエタンなどが CAAE, CHBE に対して高い分配を示すこと、アルデヒド還元酵素は酢酸エチルとイソプロピルエーテル以外の有機溶媒系に対して安定であるが、グルコース脱水素酵素は酢酸-*n*-ブチルと 1-オクタノール系でのみ安定性を示すことが判明した(表 6)。表 7 に水系反応と二相系反応の結果を比較し

Table 6 Partition efficiencies of organic solvents for ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate (CAAE) and ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate (CHBE), and stabilities of aldehyde reductase and glucose dehydrogenase in various organic solvent-water two phase system.

Organic solvent	Partition efficiency ^b		Remaining activity(%)	
	COBE	CHBE	AR	GDH
None			50.0	78.3
Ethyl acetate	16.2	23.5	0	0
<i>n</i> -Butyl acetate	10.6	15.8	42.1	73.3
1-Octanol	5.3	4.0	50.0	74.4
Chloroform	17.2	7.7	35.0	0
Dichloromethane	17.4	9.5	21.3	0
Carbon tetrachloride	1.1	2.3	64.6	27.5
1,2-Dichloroethane	9.5	10.7	39.2	0
Benzyl chloride	3.0	8.9	33.8	0
Isopropyl ether	2.2	3.9	0	26.5

^a See ref. 26) for details. ^b Partition efficiency is given as the molar ratio of each compound found in the organic phase to that in the aqueous phase.

Table 7 Comparison of reduction efficiencies in water-organic solvent two phase system to those in an aqueous system^a.

Conditions and results		Monophase water	Biphase	
			ethyl acetate	<i>n</i> -butyl acetate
AR	(units)	800	800	156
GDH	(units)	1070	1070	536
NADP ⁺	(mmol)	0.0084	0.0084	0.0084
CAAE	(mmol)	38.8	38.8	38.8
Glucose	(mmol)	40	40	40
NaCl	(mmol)	14	14	12
H ₂ O	(ml)	70	70	60
Organic solvent	(ml)	0	100	50
Temperature	(°C)	25	25	26
Time	(h)	48	48	99
pH		7.0	7.0	6.5~7.0
pH controller		NaOH	NaOH	Na ₂ CO ₃
CAAE remained	(mmol)	3.76	0.04	0.12
CHBE formed	(mmol)	20.2	37.0	36.7
	(mol%)	52.1	95.3	94.5
	(g/l H ₂ O)	48.1	88.0	102
Optical purity	(% ee)	86	86	86
Efficiency				
CHBE/NADP ⁺	(mol/mol)	2406	4402	7640
CHBE/AR	(mg/unit)	4.2	7.7	39.2
CHBE/GDH	(mg/unit)	3.2	5.8	11.4
Remaining activity				
AR	(%)	0	0	80
GDH	(%)	0	0	38

^aSee ref. 9), 24), 26) for details. AR, aldehyde reductase ; GDH, glucose dehydrogenase.

た。NADPH の再生に対応して生成するグルコン酸による pH の低下をアルカリの自動添加で補正し、有機相の一部が水相に分散するようなゆるやかな攪拌を行うと、水系反応で観察された CAAE の非酵素的分解が抑制され、モル転換率が著しく上昇する。有機相に酢酸-*n*-ブチルを用いると有機相 1 l 当たり 120 g の (*R*)-CHBE が得られる (モル転換率 94.5%, 光学純度 86% ee)。生成物に対する NADP⁺ の回転数は 7000 モル/モル以上で実用的にも満足できる値である。また反応終了時の両酵素の残存活性も高く、水相は再使用が可能である。

5.2.2. (*S*)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エステル CAA エステルから (*S*)-CHB エステルを与える微生物は多い。*R. minuta*, *T. cutancum*, *C. acremonium*, *P. marginandii* などは光学純度の高い (*S*)-CHB エステルを与え

Fig. 10 Synthesis of (*S*)-1-benzyl-3-hydroxypyrrolidine from ethyl 4-chloroacetoacetate.

る⁹⁾。(*S*)-CHBE は (*S*)-1-ベンジル-3-ヒドロキシピロリジンの合成の出発原料として利用できる (図 10)²⁷⁾。

6. おわりに

以上、微生物の生産するカルボニル還元酵素の多様性と、それぞれの酵素が様々な光学活性アルコールの合成に利用できることを筆者らの最近の研究を例にとり示した。この種の還元反応を大スケールの実用生産の場に

適した形で利用するには補酵素の再生系に対する工夫も含めて考える必要があり、今後の展開が期待されるところでもある。

本稿で引用した筆者らの研究の一部は文部省科学研究費の援助によるものであり、記して感謝する。

(平成2年9月25日受理)

文 献

- 1) 清水 昌, 山田秀明, 現代化学, No.12, 201 (1980), 有合化, 39, 467 (1981), 醸酵と工業, 41, 460 (1982), 有合化, 41, 1064 (1983), BIO INDUSTRY, 1, 36 (1984), 2, 139, 217 (1985), 化学と生物, 24, 452 (1986), 微生物, 2, 680 (1986), 化学総説, 6, 82 (1989), 山田秀明, 清水 昌, 化学臨時増刊, 119, 印刷中; H. Yamada, S. Shimizu, in "Biocatalysts in Organic Syntheses" (J. Tramper, H.C. van der Plas, P. Linko, Eds.) p.19, Elsevier, Amsterdam (1985), in "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Vol. A4, p.150, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1985), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 27, 622 (1988); 山田秀明編著, 酵素の新機能開発, 講談社 (1987)
- 2) S. Shimizu, H. Hata, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2285 (1984)
- 3) S. Shimizu, S. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 519 (1987)
- 4) H. Hata, S. Shimizu, S. Hattori, H. Yamada, *FEMS Microbiol. Lett.*, 58, 87 (1989)
- 5) S. Shimizu, S. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 411 (1987)
- 6) M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 177 (1990)
- 7) M. Kataoka, S. Shimizu, Y. Doi, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, (1990) in press
- 8) M. Kataoka, S. Shimizu, Y. Doi, S. Sakamoto, H. Yamada, *Biotechnol. Lett.*, 12, 357 (1990)
- 9) S. Shimizu, M. Kataoka, A. Morishita, M. Katoh, T. Morikawa, T. Miyoshi, H. Yamada, *ibid.*, 12, 593 (1990)
- 10) H. Hata, S. Shimizu, S. Hattori, H. Yamada, *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 175 (1989)
- 11) *idem*, *J. Org. Chem.*, 55, 4377 (1990)
- 12) S. Shimizu, S. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.*, 174, 37 (1988)
- 13) S. Shimizu, M. Kataoka, M.C.M. Chung, H. Yamada, *J. Biol. Chem.*, 263, 12077 (1988)
- 14) 片岡道彦, 土井雪子, 清水 昌, 山田秀明, 日本発酵工学会講演要旨集, 1989, p.237
- 15) H. Yamada, S. Shimizu, M. Kataoka, H. Sakai, T. Miyoshi, *FEMS Microbiol. Lett.*, 70, 45 (1990)
- 16) 清水 昌, 片岡道彦, 服部静夫, 山田秀明, 日本農芸化学会講演要旨集, 1987, p.699
- 17) 清水 昌, 野村佳子, 畑 啓之, 服部静夫, 山田秀明, 日本農芸化学会講演要旨集, 1985, p.453
- 18) S. Shimizu, H. Yamada, in "Chemical Aspects of Enzyme Biotechnology: Fundamentals", (A. Martell, Ed.) Plenum Publishing, New York, in press
- 19) S. Shimizu, H. Yamada, in "Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors", (E.J. Vandamme, Ed.) p.199, Elsevier Science Publishing, London (1989)
- 20) 清水 昌, 山田秀明, 「ビタミンハンドブック 2, 水溶性ビタミン」(日本ビタミン学会編) p.101, 代学同人, (1989)
- 21) S. Shimizu, H. Yamada, H. Hata, T. Morishita, S. Akutsu, M. Kawamura, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 289 (1987)
- 22) H. Hata, S. Shimizu, H. Yamada, *ibid.*, 51, 3011 (1987)
- 23) 片岡道彦, 清水 昌, 山田秀明, 日本農芸化学会講演要旨集, 1989, p.675
- 24) S. Shimizu, H. Yamada, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1990) in press
- 25) B. Zhou, A.S. Gopalan, F. Van Middlesworth, W.-R. Shieh, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 5925 (1983)
- 26) S. Shimizu, M. Kataoka, M. Katoh, T. Morikawa, T. Miyoshi, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2374 (1990)
- 27) 増田隆仁, 入内島忍, 守川忠志, 三好照三, 清水 昌, 山田秀明, 日本農芸化学会講演要旨集, 1990, p.647