総合論文

単離酵素の特性を活かした不斉還元

河合 靖*・大野 惇 吉*

Highly Efficient Asymmetric Reduction with a Novel Enzyme

Yasushi KAWAI* and Atsuyoshi OHNO*

The asymmetric reduction of keto esters accompanied by simultaneous dynamic and static resolution of chiral centers can be achieved by using a novel enzyme, YKER-I (Yeast Keto Ester Reductase-I). This reaction affords the corresponding hydroxy esters having three chiral centers. In the reduction of *sec*-alkyl 2-methyl-3-oxobutanoates, YKER-I affords the corresponding (2*R*,3*S*,1'*R*)-hydroxy esters selectively. Particularly, the reduction of 1,3-dithianyl derivative affords the (2*R*,3*S*,1'*R*)-hydroxy ester in more than 95% purity out of possible eight stereoisomers. The reduction of dimethyl 2-acetyl-3-methylglutarate with this enzyme gives the corresponding (2*R*,3*R*,1'*S*)-hydroxy ester in more than 98% purity out of possible eight stereoisomers. This enzyme can introduce the three consecutive chiral centers in one stage of the reaction. No enzyme has been reported on the discrimination of remote and multichiral centers in acyclic compounds that have flexible skeletons.

Key words: Reductase, Baker's yeast, β -Hydroxy ester, Three consecutive chiral centers, Multichiral centers

はじめに

生体触媒(微生物, 酵素, 抗体触媒など)が, 有機合成化学における不斉触媒として認知されるようになって久しい。この分野において, ここ 20 年ほどの間に報告された膨大な数の研究成果が, 少なくとも実験室レベルでは生体触媒が実用的な不斉触媒であることを物語っている。これは, 触媒として実際に働いているタンパク質が光学的に純粋なアミノ酸を構成単位としていて, そこが不斉合成を行うには大変都合の良い反応場であることに起因している。実際, 生体内においてすべての酵素は立体特異的に本来の反応を触媒している。しかしながら, 有機合成で用いられる人工基質(あるいは合成基質, 酵素本来の基質ではない化合物)を変換する場合は, 立体選択性や官能基選択性に問題のある場合がしばしば見受けられる。特にこれは, 微生物を用いた場合に顕著である。微生物の細胞中には無数の酵素が存在しており, 人工基質を変換しようとした場合に, 我々が望んでいる反

応を触媒する酵素だけが働くとは限らないからである。また, たとえそれが望んでいるタイプの反応であったとしても, 互いに逆の立体化学の酵素が同時に働いてしまう場合もある。

これらの問題を解決する最も単純明快で確実な方法は, 望む反応を触媒する酵素だけを微生物中から単離して, 変換反応を行うことである。微生物, 特にパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は, 合成用の試薬として考えた場合には大変便利なものである。スーパーマーケットで購入し, フラスコ中で水と混ぜるだけで不斉反応を行うことができる。しかし, 単に微生物を用いていただだけでは, そこで働いている酵素が持っている潜在的な能力を見過ごしているかもしれない。有機合成化学にとって有用な新しい酵素を探索・単離し, それを用いることで, 市販酵素や微生物では到底達成できないような立体, 官能基および位置選択的な合成反応系が実現可能になる。また, 最近の分子生物学や遺伝子工学のめざましい進歩によって, 有用酵素の大量発現系の構築が可能になってきた。言い換えれば不斉触媒の大量合成が可能になったわけである。そうしてみると有機合成化学にとって有用な新しい酵素の探索がますます重要になってくる。

* 京都大学化学研究所 ()

* Institute for Chemical Research, Kyoto University ()

筆者らはこのような方針で幾つかの還元酵素を微生物より単離してきた。本総合論文では、それら単離酵素を用いた不斉還元反応の実例を紹介する。特に、単離酵素の有用性を示すために、複数の不斉炭素が一度に導入できる酵素反応を中心に紹介する。なお、単離酵素を用いた物質変換反応に関しては今までも数多くの報告があり、成書も刊行されているので参照されたい¹⁾。

1. *Saccharomyces cerevisiae* 由来のケトエステル還元酵素

パン酵母によるケトエステル類の不斉還元は数多くの報告例がある²⁾。また、酵母中より反応に関わる幾つかの酵素が単離されている³⁾。筆者らはこれまでに、この酵母による還元反応の立体選択性を向上させる様々な手法を開発してきた。培養条件の変化⁴⁾、固定化剤の選択⁵⁾、阻害剤の添加⁶⁾、無機塩の添加⁷⁾、有機溶媒の使用⁸⁾、基質濃度の変化⁹⁾、熱処理¹⁰⁾などである。筆者らは、これら一連の手法が立体選択性を向上させる詳細な機構を酵素レベルで解明するために、酵母からのケトエステ

ル還元酵素の精製に着手し、有機合成的に有用な酵素をいくつか見いだすことができた。

1.1. α -ケトエステル還元酵素

ビルビン酸エチル(1a)と3-メチル-2-オキソブタン酸エチル(1f)を基質として、パン酵母中から α -ケトエステルに還元活性のある酵素を単離精製したところ、実に7種類の α -ケトエステル還元酵素(Yeast Keto Ester Reductase, YKER-I~VII)が見つかった¹¹⁾。それぞれの酵素の補酵素および分子量を表1に示した。これらの酵素のうちの幾つかは酵母内での機能が明らかにされているが、ほとんどの酵素についてはまだ分っていない。得られた7種類の酵素を用いて様々な長さのアルキル基を有する α -ケトエステル1a-fを還元し、立体選択性および立体化学を調べてみた(表2)¹²⁾。これらの中には立体選択性の良くない酵素と基質の組み合わせもあるが、おおむねそれぞれの酵素反応の立体選択性は高い。様々な置換基(R)を有する α -ケトエステルの不斉還元において、適当な酵素を選択することによりR体とS体の α -ヒドロキシエステル2の作り分けが可能になった。特にYKER-IVはすべての基質において高い立体選択性でR体の α -ヒドロキシエステル2a-fを合成することができ、酵素活性も他の酵素と比べるとかなり高く、有機合成的に有用な酵素である。

1.2. β -ケトエステル還元酵素

β -ケトエステルのパン酵母による還元は古くから研究されており、酵素レベルでの研究も幾つかのグループによって行われてきた³⁾。筆者らも4-クロロアセト酢酸エチル(3)を基質として、パン酵母中から4種類の β -ケトエステル還元酵素を単離した(表3)¹³⁾。これらの内の2種類の酵素はR体、残りの2種類の酵素はS体の β -ヒドロキシエステル4を立体選択的に生成する。また、これら4種類の酵素の内の3種類は α -ケトエステルにも還元活性を有しており、L-enzyme-1, L-enzyme-2, D-enzyme-2がそれぞれ前述のYKER-I, VI, VIIと同じ酵素であることが、後になってわかった^{11a)}。以後これらの酵素もYKERに統一して表すことにする。

中でもYKER-Iは、他の酵素と比べて精製が容易で、熱的にも安定な酵素である。これはこの酵素がモノマー酵素であり、疎水性

Table 1 Properties of purified enzymes.

Enzyme	Coenzyme	Mw(kDa) ^a	Mw(kDa) ^b	
YKER-I	NADPH	39	36	AKRS ^c
YKER-II	NADPH	58	29	
YKER-III	NADH	nd ^d	nd ^d	YADH ^e
YKER-IV	NADPH	31	39	
YKER-V	NADPH	83	41	
YKER-VI	NADPH	39	36	
YKER-VII	NADPH	>1600	nd ^d	FAS ^f

^a Determined by gel-filtration. ^b Determined by SDS-PAGE.

^c Aldo-keto reductase superfamily. ^d Not determined.

^e Yeast alcohol dehydrogenase. ^f Fatty acid synthetase.

Table 2 Enantioselectivities of YKERs for the reduction of α -keto esters.

Enzyme	%E.e. (Config.)					
	R = Me (a)	Et (b)	Pr (c)	Bu (d)	Pentyl (e)	i-Pr (f)
YKER-I	98.2 (S)	71.0 (S)	90.3 (R)	90.1 (R)	99.1 (R)	—
YKER-II	98.2 (S)	—	—	—	—	—
YKER-III	97.9 (S)	—	—	—	—	—
YKER-IV	>99.0 (R)	>99.0 (R)	96.5 (R)	88.3 (R)	>99.0 (R)	>99.0 (R)
YKER-V	93.5 (S)	83.0 (S)	59.7 (S)	31.4 (S)	8.3 (S)	76.8 (S)
YKER-VI	94.5 (S)	17.6 (S)	87.8 (R)	93.6 (R)	94.9 (R)	91.8 (S)
YKER-VII	—	94.5 (S)	43.8 (S)	83.9 (S)	94.4 (S)	67.8 (R)

Table 3 Properties of purified enzymes.

Enzyme	Coenzyme	Mw(kDa) ^a	E.e. (%)	Config.
D-enzyme-1	NADPH	25	>99	S
D-enzyme-2	YKER-VII	>1600	>99	S
L-enzyme-1	YKER-I	32	>99	R
L-enzyme-2	YKER-VI	32	>99	R

^a Determined by gel-filtration.

が低いことに起因していると考えられる。溶液状態でも冷蔵庫で保存すると、半年程度ではほとんど活性を失うことはなく、冷凍庫に入れておけば何年でも保存が可能である。また、50℃と酵素にとってはかなりの高温にしても半減期は約40分で、他の酵素に比べると圧倒的に長い時間活性を保持している^{10b)}。その上、この酵素は基質特異性が比較的広く、立体選択性も高いので、不斉合成の触媒としては最適の酵素である。従って、この酵素を用いた不斉変換反応を重点的に検討することにした。以下にその詳細について述べる。

2. YKER-Iを用いた不斉還元

YKER-Iは本来ケトエステル還元酵素として見いだされた酵素であるが、その基質特異性は比較的広く、 α や β -ケトエステル以外にも、 α -ジケトンや、脂肪族と芳香族のアルデヒドやケトンの還元反応を触媒することができる^{11b)}。

2.1. ジケトン類の不斉還元

非対称な α -ジケトンは還元できるカルボニル基が分

Table 4 Reduction of α -diketones with YKER-I.

	R ¹	R ²	Yield(%)	E.e. (%)	Config.
a	Me	Pr	92	>99	S
b	Me	Pentyl	90	>99	S
d	Me	2-Me-C ₆ H ₄	67	97	S
e	Me	4-Me-C ₆ H ₄	39	>98	S
f	Me	4-MeO-C ₆ H ₄	36	>99	S
g	Et	Ph	26 ^a	96	nd ^b
h	Pr	Ph	10 ^c	30	nd ^b

^a 1-Hydroxy isomer was obtained in 15% yield. ^b Not determined.

^c 1-Hydroxy isomer was obtained in 7% yield.

子内に2つあり、パン酵母で還元すると片方のカルボニル基が還元されたケトールが2種類と両方のカルボニル基が還元されたジオールの混合物として得られる¹⁴⁾。YKER-Iを用いて脂肪族および芳香族置換基を有する α -ジケトン5を還元すると、アセチル基側のカルボニル基だけを立体および位置特異的に還元し(S)-体のケトール6を高収率で与えることができる(表4)¹⁵⁾。アセチル基以外のケトンになると残念ながら立体選択性、位置選択性および反応性が低下してしまう。また β -ジケトンはこの酵素の基質にはならない。

2.2. ケトエステル類の不斉還元

YKER-Iによる α -ケトエステル1の不斉還元は表2にまとめてあるので、ここでは詳しく述べないが、単離スケールの反応でも生成物を得ることができる¹⁵⁾。しかしながら、収率は30%程度と低い。これは基質である α -ケトエステル1が水中で自発的に加水分解しやすいため、酵素反応条件下での半減期は約5時間程度である。加水分解されたケト酸は、もはや酵素の基質にはならないので、収率が低くなってしまう。

β -ケトエステル7の還元では、 α -ケトエステルの場合とは異なり反応は立体特異的で、すべての化合物で光学的に純粋な β -ヒドロキシエステル8が得られた(表5)¹⁶⁾。

Table 5 Reduction of β -keto esters with YKER-I.

	R ¹	R ²	Yield(%)	E.e. (%)	Config.
a	Me	Me	13	>99	S
b	Me	Et	44	>99	S
c	Et	Et	30	>99	S
d	ClCH ₂	Et	99	>99	R

α 位にアルキル基を有する β -ケトエステル9は、エノール化しやすいために水中ではラセミ化が素早く進行している。YKER-Iでこのようなケトエステルを還元すると、動的速度論的光学分割(dynamic kinetic resolution)が起こり(2R)-体のみが基質となり(2R,3S)-体のヒドロキシエステル10だけを選択的に与えることができる(図1)¹⁷⁾。

この反応では生成物に2つの不斉炭素があるので、普通に還元すると4種類の立体異性体の混合物が得られることになる。ところが本酵素を用いると、置換基Rの種

Fig.1 Asymmetric reduction and dynamic kinetic resolution of **9** with YKER-I.

類によらず、エナンチオかつジアステレオ特異的に反応が進行し、ただ1種類の立体異性体しか生成しない(表6)¹⁶⁾。

Table 6 Reduction of α -alkyl- β -keto esters with YKER-I.

	R	Yield(%)	E.e.(%)	D.e.(%)	Config.
a	Me	54	>99	>99	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
b	Et	31	>99	>99	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
c	Pr	54	>99	>99	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
d	Allyl	60	>99	>99	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
e	Propargyl	72	>99	>99	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>

α -ホルミルエステル **11** を用いても同じ形式で反応が進行し、*R* 体のヒドロキシエステル **12** が選択的に得られる(表7)¹⁶⁾。置換基 R を長くしていくと収率が低下してくるが、これは基質の水への溶解度が低下して反応速

Table 7 Reduction of α -formyl esters with YKER-I.

	R	Yield(%)	E.e.(%)	Config.
a	Et	69	>99	<i>R</i>
b	Pr	66	>99	<i>R</i>
c	Allyl	66	>99	<i>R</i>
d	Bu	24	>99	<i>R</i>
e	Hexyl	14	>99	<i>R</i>
f	Octyl	4	>99	<i>R</i>
g	Ph	20	>99	<i>R</i>

度が極端に遅くなったためである。表6と7の結果から、YKER-I は β -ケトエステル構造の基質に対しては、反応部位だけでなくその隣の炭素のキラリティーも厳密に認識していることが分かる。

この種の反応を利用して、さらにもう1箇所不斉中心を導入した基質で反応を行うと、生成する8種類の立体異性体の内の1種類のみを理論収率50%で合成することが可能になる。次にこの3箇所目の不斉中心を反応中心から遠く離れた位置に導入した場合と、連続する位置に導入した場合について詳細に検討した。

2.3. 酵素反応における遠隔不斉誘導

不斉反応において、化学触媒と生体触媒に拘わらず反応中心から遠く離れた位置での不斉認識は難しいとされている。特に鎖状の化合物では反応中心から離れば離れるほどその立体化学の識別は困難になる。そこで反応中心のカルボニル基から四結合離れた位置に不斉炭素を導入した β -ケトエステル **13** をデザインし、YKER-I による還元反応の基質として用いた。結果の一部を表8に示す¹⁸⁾。YKER-I による α -アルキル- β -ケトエステルのケト酸部分の不斉識別はこの化合物でもやはり完全なものであり、得られた生成物は(2*R*,3*S*)体のみであった。アルコール部位での光学分割における不斉識別能は置換基 R によって大きく異なるので、光学分割の指標として一般的に用いられている *E* 値で評価した^{*1)}。

Table 8 Reduction of α -methyl- β -keto esters with YKER-I.

	R	Yield(%)	E.e.(%) ^a	D.e.(%) ^b	E.e.(%) ^c	<i>E</i>
a	Hex	33	>98	>98	66	6.5
b	Ph	48	>98	>98	74	13.3
c	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	36	>98	>98	80	15.9
d	2-Py	38	>98	98	80	15.9
e	3-Py	43	>98	>98	86	29.0
f	4-Py	36	>98	87	91	35.8
g	1,3-Dithianyl	42	>98	98	91	41.4

^a Excess of (2*R*,3*S*) over (2*S*,3*R*). ^b Excess of (2*R*,3*S*) over (2*S*,3*S*). ^c Excess of 1'*R* over 1'*S*.

*1) *E* 値とは酵素反応における光学分割の選択性の指標として定義されているもので、エナンチオマー(AとB)間の速度定数の比と考えることができる。

$$E = (V_{\max}^A/K_M^A) / (V_{\max}^B/K_M^B)$$

ここで $V_{\max}$ は酵素反応の最大速度定数、 K_M はミカエリス定数である^{*2)}。実際には反応後の生成物と回収原料の鏡像体過剰率(% ee)や変換率から計算することができる。詳しくは下記の参考文献を参照されたい。
参考文献: C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294 (1982)

表 8 から YKER-I によるアルコール部位の不斉識別能は置換基 R が環状で、特定の位置にヘテロ原子を有する化合物で非常に高いことが分かる。特に 1,3-dithi-anyl 基を有する化合物では、全くのラセミ体の化合物から 42% の収率で (2*R*,3*S*,1'*R*) 体のヒドロキシエステル 14 を 95% 以上の純度で合成することができる。

この高選択的な遠隔不斉誘導が何に起因するものなのかを明らかにするために、置換基 R が pyridyl 基の化合物について、光学的に純粋な *R* および *S* 体の 2,3, および 4-pyridyl ethanol から合計 6 種類の光学活性な基質である β -ケトエステルの異性体 13d-f を合成し、これらすべての化合物について YKER-I を用いた動力学測定を行い、 K_m および k_{cat} を求めた^{※2}(表 9)。この動力学測定の結果から、高選択的な遠隔不斉誘導は k_{cat} よりむしろ K_m に起因しており、選択性の高い位置異性体 (4-Py) の速く反応する方の立体異性体 (1'*R*)-13f の K_m が顕著に小さくなっていた。そしてその K_m の差を自由エネルギーに換算するとちょうど水素結合 1 つ分の大きさであることが分かった。つまりこのことは、高選択的な遠隔不斉誘導は基質が酵素と結合する段階で (ES-complex が生成する段階で) 制御されており、それが酵素の基質認識部位にある特定のアミノ酸残基と基質との間の特異的な水素結合によって識別されていることを示唆している。

Table 9 Kinetic parameters of YKER-I for 1'-optically pure esters.

Substrate	R ¹	R ²	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)
(<i>R</i>)-13d	2-Py	Me	1.4 ± 0.1	3.5 ± 0.5
(<i>S</i>)-13d	Me	2-Py	10.3 ± 0.8	1.3 ± 0.04
(<i>R</i>)-13e	3-Py	Me	0.89 ± 0.1	3.7 ± 0.2
(<i>S</i>)-13e	Me	3-Py	9.6 ± 0.9	1.3 ± 0.1
(<i>R</i>)-13f	4-Py	Me	0.56 ± 0.1	3.8 ± 0.1
(<i>S</i>)-13f	Me	4-Py	8.8 ± 1.1	1.3 ± 0.09

※2 K_m とはミカエリス定数と呼ばれ、酵素と基質の親和性の目安となる。 k_{cat} とは触媒定数や代謝回転数とよばれ、触媒効率の目安となる。最も単純な酵素反応として下記のスキームを定義した場合、それぞれ以下の式で定義されている。

2.4. 三連続不斉中心の導入

三連続不斉中心を一段階で選択的に導入する反応も遠隔不斉誘導と同様に、化学触媒・生体触媒に拘わらず難しい反応である。特に鎖状の化合物ではほとんど報告例がない。そこで β -ケトエステルの α 位に非対称な二級の置換基を導入した化合物 15 を設計・合成し、YKER-I を用いて還元しその立体選択性を検討した¹⁹⁾。いずれの場合もケト酸部分の不斉識別は完全で、生成物は (2*R*,3*S*) 体のみであった。置換基 R がフェニル基および置換フェニル誘導体ではジアステレオ選択性 (A : B) はあまり良くないが、得られたジアステレオマーはシリカゲルカラムで容易に分離精製ができるので、三連続不斉炭素を有する β -ヒドロキシエステルを容易に合成することができる。また、置換基 R が CH₂CO₂Me の化合物 15e ではジアステレオ選択性 (A : B) も非常に高く、生成物は単一の立体異性体だけであった。このことは、上手く基質をデザインすることで、本酵素が反応点およびその近傍の 3 つの連続する不斉炭素の立体化学を厳密に認識し、全くのラセミ体の化合物から一段階で三連続不斉炭素を有する化合物に変換できることを示している。

Table 10 Reduction of α -*sec*-alkyl- β -keto esters with YKER-I.

	R	Conversion(%)	A	B
a	Et	36	71	29
b	Ph	46	55	45
c	4-Me-C ₆ H ₄	28	51	49
d	4-Br-C ₆ H ₄	22	70	30
e	CH ₂ CO ₂ Me	30	>99	1

生成物の絶対立体配置は 4-Br-Ph 誘導体 16d のヒドロキシエステルを 3,5-ジニトロ安息香酸エステルに誘導して結晶化し、臭素原子の異常分散を用いた X 線結晶構造解析により決定した。また、最も選択性が良かった化合物 (R = CH₂CO₂Me) の立体配置は、生成物のヒドロキシエステルを酸触媒を用いてラクトン化し NOESY スペクトルにより決定した。両者の結果から優先的に反応する異性体は同じ立体配置 (A 型) を有していることが分かった。

3. *Geotrichum candidum* 由来の β -ケトエステル還元酵素

2-メチル-3-オキソブタン酸エチル **9a** をチチカビの1種である *Geotrichum candidum* で還元するとS体のヒドロキシエステル **10a** がエナンチオ選択的に得られるが、そのジアステレオ選択性は低く、(2*R*,3*S*)体と(2*S*,3*S*)体がほぼ1対1の比で得られる。そこでこの微生物中から **9a** に還元活性のある酵素を単離精製したところ3種類の酵素が得られた(*Geotrichum candidum* Keto Ester Reductase, GKER-I~III)(表11)²⁰⁾。これらの酵素の内の2種類はNADHを補酵素としシン体(2*R*,3*S*)のヒドロキシエステルを与える酵素で、もう1種類はNADPHを補酵素としてアンチ体(2*S*,3*S*)のヒドロキシエステルを与える酵素である。これらの酵素を使い分けることで、(2*R*,3*S*)体と(2*S*,3*S*)体のヒドロキシエステルの作り分けが可能になる。

Table 11 Properties of purified enzymes.

Enzyme	Coenzyme	E.e.(%)	D.e.(%)	Config.
GKER-I	NADH	>99	88	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
GKER-II	NADH	>99	84	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
GKER-III	NADPH	95	>99	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>

4. *Saccharomyces cerevisiae* 由来の α,β -不飽和ケトン還元酵素

α,β -不飽和ケトンは分子内にカルボニル基と炭素-炭素二重結合の2つの異なる不飽和結合を有している。パン酵母を用いて4-アリル-3-メチル-3-ブテン-2-オン **17** を還元すると、炭素-炭素二重結合が還元された飽和ケトンとカルボニル基が還元された不飽和アルコールと両者が還元された飽和アルコールの混合物が得られる。

そこでパン酵母中から **17b** を基質として、炭素-炭素二重結合に還元活性のある酵素を単離精製したところ、1種類の還元酵素を見いだした(Yeast Enone Reductase, YER)²¹⁾。本酵素はNADPH以外には金属イオンやフラビン補酵素のような補因子を必要としない炭素-炭素二重結合還元酵素である。このYERを用いて **17a-e** を還元すると炭素-炭素二重結合が還元された飽和ケト

ンだけを生成する。反応の立体選択性は基質の置換基Rの位置に依存しており。置換基がメタ位にある場合に、官能基および立体選択的に還元反応が進行し光学活性なS体のカルボニル化合物 **18** が得られる。

Table 12 Reduction of enones with YER.

	R	E.e.(%)	Config.
a	H	80	S
b	3-Cl	>99	S
c	3-NO ₂	>99	S
d	3-MeO	>99	S
e	4-MeO	68	S

5. 酵素の精製・単離方法

酵素の精製・単離は細胞から粗酵素液を抽出し、各種カラムクロマトグラフィーを用いて行う。操作自体は有機化学で行う精製方法と変わるところはないが、すべての操作を低温(4℃)で行わなければならない。また精製した酵素は冷凍保存しておく。

粗酵素液の抽出には一般的に細胞膜を破碎するための装置(ブレンダー、ホモジナイザー、ボールミル、超音波破碎機など)が必要であるが、これらの装置は有機化学の研究室にはないものばかりで、特に大量に粗酵素液を抽出したい場合に、かなり高価な装置が必要になる。筆者らの研究室では特別な装置を使わずに、有機化学の実験室にあるものを利用して細胞膜の破碎を行っている。容器に細胞と同体積のガラスビーズ(酵母で0.5 mm, カビ類で0.2 mm)を入れ、緩衝液に懸濁させた細胞とともに攪拌棒でかき混ぜるだけである。少々トルクの大きいモーターを使い攪拌棒を工夫することで(特注品)、毎分1300回転・30分程度で500グラムの菌体を一度に処理することができる。

カラムクロマトグラフィーは相互作用の違う各種のカラムを用いて行う。筆者らの研究室では陰イオン交換樹脂(DEAE-Toyopearl, 東ソー社製)、陽イオン交換樹脂(CM-Toyopearl, 東ソー社製)、疎水性樹脂(Butyl-Toyopearl, 東ソー社製)などを主に使用している。これらのカラムを酵素の性質に合わせて幾つか組み合わせて精製を行う。

おわりに

以上、微生物をそのまま用いたのでは立体、位置および官能基選択性等に問題のあった反応が、単離酵素によって解決できることを述べてきた。また、基質を上手くデザインすることで人工(合成)基質の反応でも遠隔不斉誘導や三連続不斉中心の導入が可能であることを明らかにした。ここで紹介した反応の中には、合成化学的には意味のない反応も含まれているが、有機化学における酵素反応の可能性を明らかにするという点で意義のある反応であると筆者らは考えている。今後も有機合成的に有用な酵素を数多く見いだしてゆきたい。

最後に、本研究を行うにあたりご指導、ご協力をいただいた京都大学化学研究所中村薫助教授、岡山県立大学中島伸佳博士に厚くお礼申し上げます。また、本稿で紹介させていただいた研究成果は、文献中に引用した京都大学化学研究所の多くの共同実験者の努力の賜物であり、ここに感謝の意を表します。本研究の一部は文部省科学研究費の援助のもとで行われたものであり、併せて感謝いたします。

(平成 11 年 4 月 21 日受理)

文 献

- 1) C.-H. Wong, G.M. Whitesides, "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", Pergamon, Oxford, 1994
- 2) (a) S. Servi, *Synthesis*, **1990**, 1; (b) R. Csuk, B. I. Glänzer, *Chem. Rev.*, **91**, 49 (1991)
- 3) (a) W. Shieh, A.S. Gopalan, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2993 (1985); (b) J. Heidlas, K.-H. Engel, R. Tressl, *Eur. J. Biochem.*, **172**, 633 (1988); (c) A. Furuichi, H. Akita, M. Matsukura, T. Oishi, K. Horikoshi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2563 (1985)
- 4) (a) K. Ushio, K. Inoue, K. Nakamura, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2657 (1986); (b) K. Nakamura, T. Miyai, K. Fukushima, Y. Kawai, B.R. Babu, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 1713 (1990)
- 5) (a) K. Nakamura, M. Higaki, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4213 (1985); (b) K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *J. Org. Chem.*, **53**, 2589 (1988); (c) K. Nakamura, T. Miyai, K. Inoue, S. Kawasaki, S. Oka, A. Ohno, *Biocatalysis*, **3**, 17 (1990)
- 6) (a) K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Chem. Lett.*, **1987**, 679; (b) K. Nakamura, Y. Kawai, S. Oka, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 875 (1989); (c) K. Nakamura, Y. Kawai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 267 (1990); (d) K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, A. Ohno, *ibid.*, **31**, 3631 (1990)
- 7) K. Nakamura, Y. Kawai, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2245 (1989)
- 8) (a) K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 7075 (1991); (b) *idem*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 2738 (1993)
- 9) (a) K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, A. Ohno, *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 1253 (1993); (b) K. Nakamura, S. Kondo, A. Ohno, *Bioorg. Med. Chem.*, **2**, 433 (1994)
- 10) (a) K. Nakamura, Y. Kawai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 2927 (1991); (b) Y. Kawai, S. Kondo, M. Tsujimoto, K. Nakamura, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 2244 (1994)
- 11) (a) K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, N. Nakajima, A. Ohno, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2236 (1994); (b) *idem*, *ibid.*, **61**, 375 (1997); (c) N. Nakajima, K. Ishihara, S. Kondo, S. Tsuboi, M. Utaka, K. Nakamura, *ibid.*, **58**, 2080 (1994)
- 12) K. Nakamura, S. Kondo, N. Nakajima, A. Ohno, *Tetrahedron*, **51**, 687 (1995)
- 13) K. Nakamura, Y. Kawai, N. Nakajima, A. Ohno, *J. Org. Chem.*, **56**, 4778 (1991)
- 14) K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, K. Hida, K. Kitano, A. Ohno, *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, 409 (1996)
- 15) Y. Kawai, K. Hida, M. Tsujimoto, S. Kondo, K. Kitano, K. Nakamura, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 99 (1999)
- 16) Y. Kawai, M. Tsujimoto, S. Kondo, K. Takanobe, K. Nakamura, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 524 (1994)
- 17) (a) K. Nakamura, T. Miyai, Y. Kawai, N. Nakajima, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 1159 (1990); (b) K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakajima, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 1467 (1991)
- 18) (a) Y. Kawai, K. Hida, K. Nakamura, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 591 (1995); (b) Y. Kawai, K. Hida, A. Ohno, *Bioorg. Chem.*, **27**, 3 (1999)
- 19) Y. Kawai, K. Hida, D. H. Hai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 9219 (1998)
- 20) Y. Kawai, K. Takanobe, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 1683 (1997)
- 21) Y. Kawai, M. Hayashi, Y. Inaba, K. Saitou, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5225 (1998)