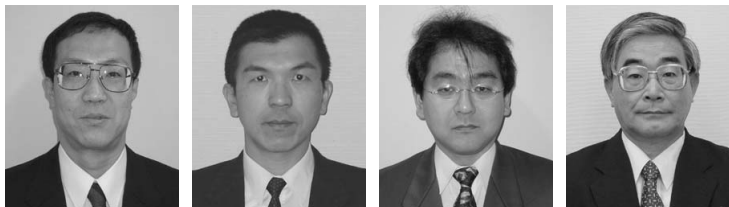


## 《農芸化学技術賞》

## 高効率バイオ不斉還元システムの開発と工業化



①

②

③

④

(株)カネカ 精密化学品事業部 精密化学品研究グループ 基幹研究員 八十原 良彦①

(株)カネカ 精密化学品事業部 精密化学品研究グループ 研究員 木崎 憲之②

(株)カネカ 精密化学品事業部 精密化学品研究グループ 研究員 川野 茂③

(株)カネカ 研究開発本部 上席幹部 長谷川 淳三④

酵素や微生物を用いるバイオ技術は、有機合成化学技術では比較的困難とされる位置特異的あるいは立体特異的な反応を比較的容易に実現することができる。このバイオ反応産物である光学活性化合物は、精密かつ高機能化する医薬品の原料を中心に盛んに利用されてきており、その製造技術は有機合成化学や分析技術と結びついてキラルテクノロジーという重要な技術分野を形成している。遺伝子操作技術の日常化、ポストゲノム時代の到来といったバイオテクノロジーの急速な発展、さらに有機合成化学における金属錯体触媒技術の発達など、この分野における技術環境もダイナミックに変化し、進展してきている。さらに、バイオ反応は生産物の高付加価値化を目的とするにとどまらず、低エネルギー、安全性などの環境配慮型プロセスという地球の視点からも注目されつつある。したがって、この両面を満足させるためにもバイオプロセスの高生産性への要求が高まることが想定され、今までももまして高性能な酵素の獲得と遺伝子操作技術などによる経済的生産とその活用法の開発がポイントとなるであろう。

カルボニル化合物の光学活性アルコールへの還元反応は、光学分割反応とは異なり、原料から1ステップで化学量論的な収率が見込める理想的な不斉合成反応であることから、種々の光学活性アルコール類の合成やキラル化合物合成の鍵反応としての有用性は高い。近年では不斉金属錯体触媒反応が脚光を浴びているが、歴史的にはバイオ法の方が古くから知られているにもかかわらず、その能力の低さから経済性を議論するまでの工業化技術に達していなかった。演者らは、バイオ法による工業化技術確立を最終目標に、還元酵素反応の原点に立ち戻り、さらに遺伝子操作技術の導入も視野に入れつつ、有用還元酵素の探索研究から取り組んだ。

## 1. 実用的不斉還元酵素の探索

## ① クロロアセト酢酸エチルの還元酵素

光学活性な4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(CHBE)は、反応性に富む代表的なキラルビルディングブロックであり、4-クロロアセト酢酸エチル(COBE)を不斉還元する方法が最も経済的な製法とされている。(R)体のCHBEは、L-カルニチンの合成原料となるため、COBEを(R)体CHBEに還元するバイオ反応についての研究は非常に多い。一方、(S)体のCHBEは、高脂血症薬などの合成原料として注目されている。演者らは、COBEをCHBEに還元する微生物を広くスクリーニングし、さらに有機溶剤耐性、熱安定性などの選択圧をかけて微生物の選別を行った結果、(S)体のCHBEを与える高活性菌として酵母菌 *Candida magnoliae* IFO705を見いだした。本菌から調製

した粗酵素液、市販のグルコース脱水素酵素(GDH)による還元型補酵素再生系、および酢酸ブチルを混合して、COBEの不斉還元反応を行うと、光学純度96.6%*e.e.*の(S)-CHBEが約90g/L蓄積した。この際、酢酸ブチルは、酵素に悪影響を及ぼすCOBEやCHBEの抽出除去や安定化剤として効果があったと考えられる。本菌の生産するCOBE還元酵素のうち、高光学純度の(S)体を与える還元酵素S1はNADPH依存性のカルボニル還元酵素であり、ニトロベンズアルデヒドなどのアルドケト還元酵素の典型的な基質には作用しない。しかし、脂肪族のβ-ケトエステル類は良好な基質となり、立体選択性よく対応するアルコール体を生成した。次に、本酵素遺伝子を取得し、大腸菌で高生産させることに成功した。上記と同様に、その粗酵素液と補酵素再生系を混合し、酢酸ブチルによる有機溶媒2相系でCOBEの還元反応を行わせると、(S)-CHBEがほぼ定量的に125g/L蓄積し、その光学純度は99%*e.e.*以上であった。

## ② アセチルピリジン類の還元酵素

光学活性なピリジンエタノールは、医薬品や不斉合成用のリガンドとして有用な化合物群である。アセチルピリジン誘導体(AFP)を還元する微生物を探索したところ、還元活性を有したほとんどの微生物が(S)体のピリジンエタノール誘導体(FPH)を与える活性を有するものであったが、抗エイズ薬の中間体として利用可能な(R)体を与える微生物として、*Candida maris* IFO10003を見いだした。本菌から調製した粗酵素液を用いて、GDHによる補酵素再生系の存在下でアセチルピリジン誘導体を還元したところ、光学純度97%*e.e.*のFPHが90g/L蓄積した。本菌のもつNADH依存性アルコール脱水素酵素は、上記還元酵素S1と同様に高光学純度の(S)-CHBEも与えるが、他のカルボニル化合物にも広く作用し、対応する光学活性アルコールを高光学純度で得ることができる。また、本酵素は可逆的にアルコール体の酸化反応も触媒するため、イソプロパノールの添加によって、GDHを用いることなくNADHの再生を伴いながらの不斉還元反応が可能である。さらに、立体選択的酸化によるラセミ体アルコールの光学分割反応にも応用できる。本酵素遺伝子を発現する組換え大腸菌を用いた場合、有機溶媒との2相系反応で、99%*e.e.*以上の(R)体FPHを200g/L蓄積させることができる。

## ③ フェナシルハライド類の還元酵素

フェナシルハライド類を不斉還元して得られる光学活性なハロヒドリン類は、アルカリで処理することにより容易に光学活性なスチレンオキサイド類に誘導することができ、このものも医薬品合成原料として多用されている。バイオ法によるフェナ

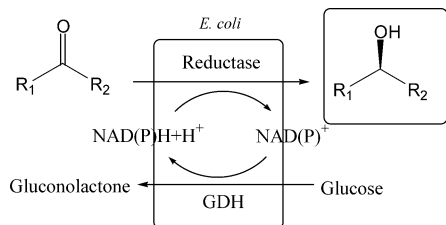


図 1 システムの原理

シルハライド類の不斉還元については数例知られているが、その強い毒性によって微生物や酵素がダメージを受けるためか、概して変換能力の低いものであった。そこで、広範な微生物スクリーニングを実施した結果、*Rhodotorula* 属酵母が有力な酵素源となることがわかった。このうち、*Rhodotorula glutinis* var. *dairenensis* IFO415 の粗酵素液を用いた場合、補酵素再生系の存在下で、130 g/L の (R)-(2-クロロフェニル)-1-エタノールを蓄積した。本菌のフェナシルハライド還元酵素は NADPH 依存性のカルボニル還元酵素であり、さまざまなカルボニル化合物に広く作用したが、特にフェナシルハライド類には高い (R) 体選択性を有しており、光学活性スチレンオキサイド類の合成のための有用な触媒となる。

2. 補酵素再生系との共役システム化

酸化還元酵素による不斉還元反応では、NADPH もしくは NADH といった還元型補酵素が基質と等モル量必要となる。これらは非常に高価で大量入手も困難であることから、酵素を利用して触媒量の酸化型補酵素を還元型に再生する試みが種々されてきた。演者らは、上述の還元酵素 S1 と GDH を同時に高生産する大腸菌を育種した。本菌を用いた場合、約 18 時間の反応で 300 g/L 程度の (S) 体 CHBE を蓄積した。次に、遺伝子発現系、培養条件など組換え微生物の工業化に必要な要素を詳細に検討し、(S)-CHBE 生産の実用化プロセスの確立に至った。本プロセスにおいては、補酵素 NADP のターンオーバー数は 20,000 以上に達し、製造コストに与える影響は小さく、反応後は、溶剤抽出、蒸留といった簡単な方法で製品を得ることができる。この組換え微生物を用いる補酵素共役還元システムにおいては、所望する立体選択性を有する酵素のみの大量生産と、両酵素間の補酵素のスムーズな授受および還元型補酵素の再生が十分に満たされたことが、高効率反応の達成の要因と考えられる。また、二つの酵素が一つの微生物で生産できることは、工業プロセス上も有利となり、経済的にも品質的にも光学活性アルコール類の生産プロセスとして合理的な形態とする

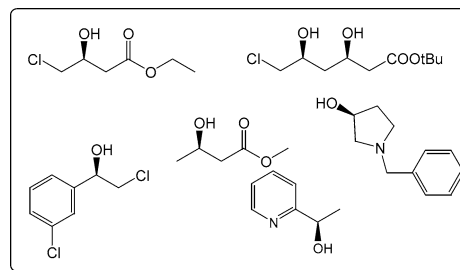


図 2 製品例

ことができた。

この遺伝子操作技術を応用した補酵素再生系システムでは、還元酵素遺伝子をカセット交換することによって、さまざまな基質に対応できるバイオ触媒を容易に構築することができる。演者らは上述の酵素以外にも有用酵素のライブラリー化を進めており、これらを共役システムとしてモジュール化し、さまざまな光学活性アルコールの工業生産に対応できる製造プロセスを確立している。

3. おわりに

冒頭にも述べたように、バイオ還元反応は長い歴史をもつ有用な立体選択性反応であるが、基質、生成物、微生物の 3 者の相性がよかった場合のみ実用的な反応となっていたといえる。演者らは、確立したバイオ不斉還元システムが良好に機能し、所望する光学活性アルコールを自由に合成できる技術環境が整ってきたことを実感している。今後は、環境面をさらに意識した蟻酸脱水素酵素の導入などが課題となるであろう。また、本技術については日本のみならず欧米の企業も取り組みを見せており、その有効性が多方面から評価されつつある。ポストゲノム時代の到来、サステイナブルケミストリーの観点からも、還元反応をはじめとしてスーパーエンザイムを用いる物質生産プロセスのさらなる進展が期待される。

最後に、終始懇切なご指導と有益なご助言を賜りました京都大学大学院農学研究科・清水 昌教授に深く感謝申し上げます。また、片岡道彦助教授をはじめとする多くの方々にも厚く御礼申し上げます。さらに、グルコース脱水素酵素に関してご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科・ト部 格教授に感謝申し上げます。

また、本研究には、経済産業省の産業科学技術プロジェクトの一環として、NEDO から委託を受けて実施した成果も一部含まれており、関係各位に重ねて感謝申し上げます。