

35年前の研究 懐かしいD-パントラク톤の合成を再発見しました

30歳になると同時に手掛けた仕事である。化学合成と微生物酵素変換を利用して有用物質を作り出そうとする試みである。ケトパントラク톤 (KPL) を微生物酵素を用いて不斉還元し、光学活性の目的化合物 D-パントラク톤 (D-PL) を得る。出発物質となる KPL の合成方法は新規合成ルートによるものであるが、1カ月弱でこの合成に成功したのも思い出深い。KPL の合成方法は特開昭 58-198480 として出願した。有機合成と微生物変換を用いるハイブリッド手法による有用物質の生産に関する技術を十分につかみ取ることができた。

書籍 ハイブリッドプロセスによる有用物質生産 生化学反応と有機合成反応の組み合わせ 化学増刊 119 山田秀明ら (1991)、pp.11-14

3.2.1 D-パントテン酸の生産

D-パントテン酸合成の出発原料となるもので現在安価に入手できるものは、現行の工業生産工程の原料でもある DL-パントラク톤 (DL-PL) かケトパントラク톤 (KPL) にな

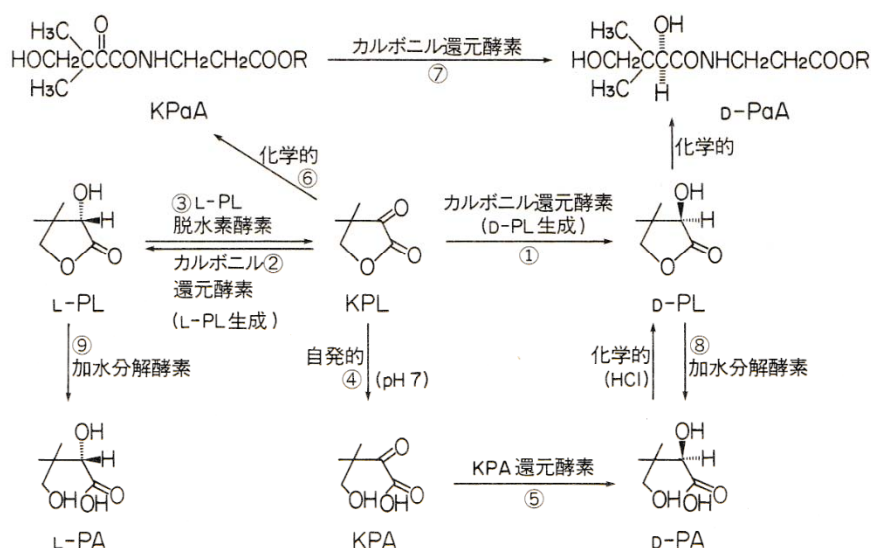


図6 D-パントテン酸の合成に有用な酵素反応

KPaA: ケトパントテン酸, D-PaA: D-パントテン酸, 他の略号は本文参照.

る。これらを用いると、図6に示す幾通りかの合成ルートが考えられる。反応⑧、⑨以外は、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。

微生物におけるKPL→PLの還元活性(図6反応①または②)の分布は広い。還元反応の立体選択性は属や種とまったく無関係で高選択率でD-PLを与えるもの、逆にL-PLを与えるもの、ラセミ体を与えるもの、両者をさまざまな比率で与えるものなど多様である(図7)。高活性菌として選択した *Candida parapsilosis* の菌体を5%グルコース液に懸濁

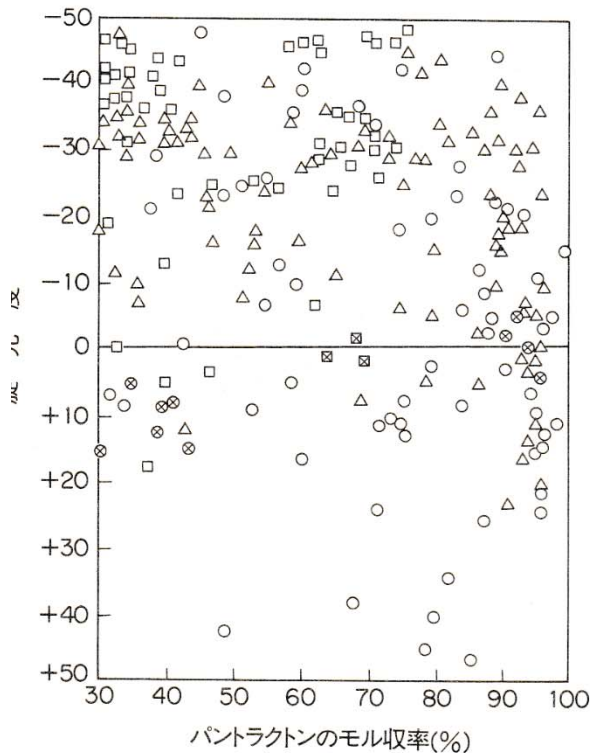


図7 微生物によるケトパントラク톤の還元反応における多様性

微生物を生育させた培養液に1%(w/v)になるようにKPLを加えて反応を行うと、KPLは還元されて、この図のようにD-PLとL-PLがさまざまな比率でまじった生成物を与える。△ 酵母、○ カビ、□ 細菌、⊠ 放線菌、⊗ 担子菌。

し、KPLを分割添加して反応を行うと80g/lのD-PLが得られる(モル収率94%、光学純度93% ee)。 *C. parapsilosis* より結晶状に単離した還元反応に関与する酵素は、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類にのみ作用することから「共役ポリケトン還元酵素」と命名した。本酵素の基質特異性は広く、KPL誘導体のみならず、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(R)-アルコール(100% ee)を与える。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 K_m は増すが V_m は減少すること、イサチン類では5位の置換基が電子吸引的になると K_m に変化を与えることなく V_m は減少する。カンファーキノンの場合(S)体基質、(R)体基質いずれからでも(R)-アルコールが生成するが、これはNADPHのモデル化合物による化学還元では前者からは主として(R)-アルコールが、後者からは(S)-アルコールが与えられるのに比して興味深い。すなわち、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と理解できる。

Mucor ambiguus は KPL を L-PL(100% ee)に還元できる(図6反応②)。この反応に関与する酵素も共役ポリケトンに特異的な NADPH 依存性カルボニル還元酵素であり、*C. parapsilosis* の酵素とよく似た基質特異性を示す。図7に示された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、しかも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説明がつくが、実際にこのような多様な結果が得られると、改めて微生物の示す多様性に驚かされる。

KPL の不斉還元には、上記酵素の関与以外に図8のようにグルコース-6-リン酸脱水

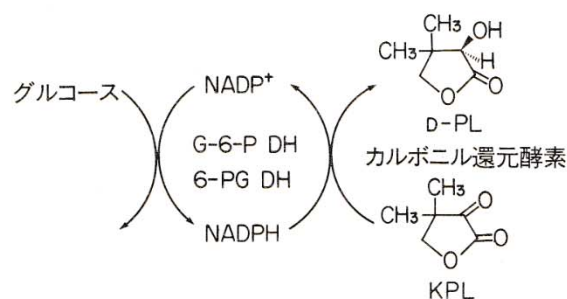


図8 NADPH の再生反応と共役したケトパントラク톤の不斉還元反応

有機合成でよく行うパン酵母を用いるケトンの還元もおおむねこのような NADPH の再生系が共役していると考えられる。G-6-P DH: グルコース-6-リン酸脱水素酵素, 6-PG DH: 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素。

素酵素と6-ホスホグルコン酸脱水素酵素が NADPH の再生に関与している。*C. parapsilosis*にみられる高いD-PL生産能は、これらの酵素が効率よく共役した結果と推測される。

KPLは微アルカリ条件下ですみやかに開環加水分解されてケトパント酸(KPA)となる(図6反応④)。したがって、KPAもKPL同様有効な出発基質となる。この場合の還元生成物はパント酸(PA)であり(図6反応⑤)、PAは酸処理で容易にラクトン化できる。高いKPA還元活性を示すものは *Agrobacterium* と *Pseudomonas* 属細菌に偏在し、いずれの場合も高い光学純度のD-PAを与える。*A. radiobacter* の菌体を直接触媒的に用いるとD-PL換算で120 g/lのD-PAが得られる(モル収率91%、光学純度98% ee)。この還元に関与する酵素は *P. maltophilia* から結晶状に単離され諸性質が解明されている。本酵素の基質特異性は厳密で、KPA以外のカルボニル化合物には作用しない。本酵素を欠損した変異株がD-パント酸を生合成できないことから、生体内ではD-パント酸の生合成に関与するKPA還元酵素であることが証明されている。

KPL(または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(図6反応⑥⑦)。KPLと β -アラニンとの縮合はD-PLと β -アラニンの縮合に

比して速く、反応の完結性も高いことがこの場合の利点となる。*C. macedoniensis* の菌体を直接触媒として用いると 79 g/l の D-パントテン酸エチルエステルが得られる(モル転換率 97%, 光学純度 > 98% ee)。本菌の酵素も NADPH 依存性カルボニル還元酵素であるが、上記のポリケトン以外にもアルデヒドや β -ケト酸エステル類にも作用するさらに幅広い基質特異性を示すことが判明している。

DL-PL は現時点では最も安価な出発原料と思われる。したがって、DL-PL より L-PL のみを選択的に酸化して KPL とし、これを上記の方法で再還元する方法(図 6 反応③①)または、③④⑤)も経済的に成り立ちうる。L-PL の酸化を触媒する酵素は *Nocardia* や *Rhodococcus* 属細菌に発見され、FMN 依存性の脱水素酵素であることが明らかにされた。*N. asteroides* を酸化菌、*C. tropicalis* を還元菌として用いると 80 g/l の DL-PL から約 90% のモル収率で D-PL を得る(図 6 反応③①)。同様にして *A. radiobacter* を還元菌とすると D-PA を得る(図 6 反応③④⑤)。また、*R. erythropolis* は酸化と還元を同時に行うことができる(図 6 反応③④⑤、収量 18 g/l、モル転換率 90%)。

図 6 の反応⑧および⑨は DL-PL の光学分割に使用できる。反応⑧は、加水分解率が理論値(DL-PL が基質の場合には 50%)に達しなくても常に光学純度の高い D 体が得られるので反応⑨より実用的に有利である。この反応を行う酵素は *Fusarium* 属のカビに高頻度で見いだされる。*F. oxysporum* の菌体を用いると、700 g/l の DL-PL から 340 g/l の D-PA (加水分解率 48%, 光学純度 96% ee)が得られる。この方法は、高価な分割剤の使用や工程の複雑さで問題の多い現行法に比して利点も多く、今後の展開が期待される。