

# 有用物質生産のための生体触媒 (不斉還元酵素)の開発

住友化学株式会社

有機合成研究所

朝子 弘之

## Development of Biocatalysts for Production of Fine Chemicals (Asymmetric Bioreduction Systems)

Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Organic Synthesis Research Laboratory

Hiroyuki ASAKO

Biocatalysis has matured into the standard technology for synthesizing industrially-important chemicals such as pharmaceuticals and agrochemicals. The principal advantage of biocatalysts is their ability to catalyze reactions with high specificity (often enantio- or regio-selectively). Furthermore, biocatalysts have the advantage of operating under mild conditions, typically at ambient temperature and pressure. Here, I present recent industrial applications of biocatalysts to perform asymmetric reduction synthesis.

### はじめに

近年、化学品製造メーカーには環境への負荷が少なく効率のよい生産が求められている。これら環境にやさしいグリーンなプロセスは当社でも「気相ベックマン転位プロセス」<sup>1)</sup>や「塩酸酸化プロセス」<sup>2)</sup>などが開発されている。また、2002年にOECDの検証により、「バイオテクノロジーを応用すると以前よりも環境にやさしいプロセスになった」ことが報告されている。環境負荷を低減する方法としてのバイオテクノロジーとは、酵素や微生物、いわゆる生体触媒を利用した物質生産技術である。生体内では、常温、常圧、水溶媒という極めて穏やかな反応条件下で、高い反応性、厳密な立体認識による物質変換を実践している。このような生体内での反応を触媒するものが酵素と呼ばれる蛋白質である。これら酵素（または、酵素を含む微生物）を利用した化学工業製品の生産は持続可能な将来に貢献する可能性を秘めたテクノロジーとして注目されている。

当社では生体触媒を利用した有用物質生産法として、これまでに、生体触媒法による不斉加水分解技術を用いた合成ピレスロイドの中間体製造法などを開発している<sup>3)</sup>。

本稿においては、医薬や農薬などの中間体として重要な鍵化合物である光学活性アルコールの合成に利用

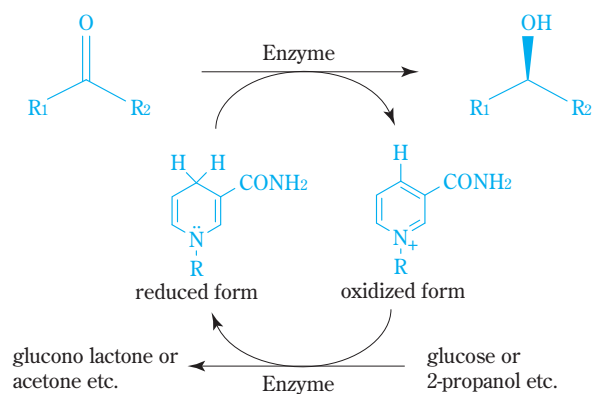
可能な生体触媒、とくに不斉還元酵素触媒の技術開発について紹介する。また、酵素の工業的利用を可能にするための、酵素の機能改良などの取り組みについても紹介する。

### 当社の不斉還元生体触媒

光学活性アルコールは医薬や農薬など、有用物質の中間体として重要な化合物の一つである。通常の有機合成化学的手法を用いたケトン還元の場合、光学純度が低い、いわゆる混合物として、ラセミ体のアルコールが合成されてしまうことが多い。純度の高い光学活性アルコールを得る方法としては、得られたラセミ体アルコールの光学分割、BINAPなどの不斉触媒を用いた不斉合成法<sup>4)</sup>などが報告されている。生体触媒を用いた不斉還元法も古くから知られており、パン酵母を用いた $\beta$ -ケトエステルの不斉還元法などが報告されている<sup>5)</sup>。

多くの酵素は触媒能を発揮するために、補酵素と呼ばれる酵素の働きを補うための有機分子の捕因子を必要とする。生体内の酸化還元反応では、補酵素が酸化剤あるいは還元剤として機能し、一般的にNADH（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）またはNADPH（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸）などが使用される。これら補酵素は、酵素が補酵素として

見分けることが可能なように複雑な構造を有している。このように生体触媒を用いた不斉還元反応では、高価な補酵素が原料と等モル量必要となり、これまで工業的利用を困難なものにしていた。そこで、還元反応に使用された酸化型補酵素（ $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ ）を還元型に戻すリサイクル反応を共役させることによって、安価でかつ高濃度に目的の光学活性アルコールを合成できるようになった（Fig. 1）。Table 1には当社にて開発した不斉還元酵素の一部とその代表的な還元基質化合物および選択性を示した。全て自然界の微生物からスクリーニングしてきたものであり、SCR-1は $\beta$ -ケトエステルを選択的に不斉還元する酵素である。また、SCR-2~4は $\alpha$ -ケトエステルを選択的に不斉還元可能な酵素であり、SCR-3、4はオルト位（ $R_2$ ）に大きな置換基を有する化合物であっても不斉還元可能である。SCR-5、6はアセトフェノタイプ化合物を不斉還元可能であるが、 $\beta$ -ケトエステルなども不斉還元可能であり、汎用性の高い酵素である。いずれも工業的に利用可能な触媒能を有し、さまざまな基質に対応するた



**Fig. 1** Asymmetric reduction and recycling of the coenzyme

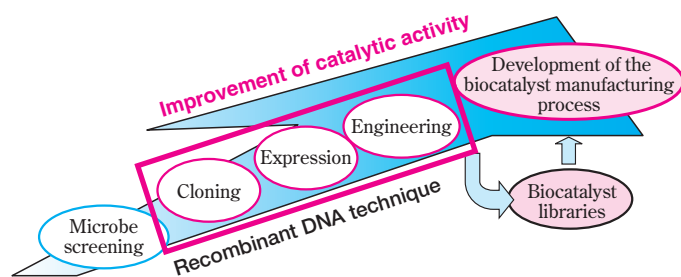
**Table 1** Reductase libraries

Enzyme	Substrate	
SCR-1		99%e.e. (S)
SCR-2		99%e.e. (R)
SCR-3		> 99%e.e. (R)
SCR-4		> 99%e.e. (R)
SCR-5		> 99%e.e. (R)
SCR-6		> 99%e.e. (S)

めに、当社の生体触媒ライブラリーとして活用している。また、これらの野生型酵素の耐熱性や、耐溶媒性などを向上させた機能改良酵素も構築し、活用している。紙面の都合上、本稿においては、SCR-1を中心に、開発の経緯を紹介する。

## 生体触媒開発の進め方

生体触媒開発ストラテジーをFig. 2に示した。まず、目的の反応を触媒する微生物を自然界の微生物から探索し、最も選択性および反応性が高い微生物を見出した後、目的の反応を触媒する酵素（蛋白質）の設計図である遺伝子をクローニングする。目的の酵素遺伝子を大腸菌などの受け手となる生物（宿主）に導入することにより、目的の酵素を高生産する組換え微生物を構築する。さらに、必要であれば、酵素の機能改良を行い、最終的に組換え微生物の培養検討を行い、大量に生体触媒を生産する方法を確立する。このように生体触媒開発のためには遺伝子組換え技術が欠かせないが、このように遺伝子組換え技術を利用しなければならない理由は、目的の反応を触媒する微生物を見出しても、その微生物中の目的酵素の量は一般的に少なく活性が低いため、工業化するのが困難であることが多いためである。組換え微生物を構築することにより、大量に目的酵素を生産させることができ、また、自在に酵素機能を改良することも可能となる。特に、宿主として利用されることが多い大腸菌は、遺伝子組換え技術が確立しており、培養に関しても多くの技術蓄積があることから、比較的容易に工業的に利用可能な生体触媒の開発を可能としている。現在、世界中で使用されている約9割の酵素が、こうした組換え技術を利用して生産されている。



**Fig. 2** Strategy for biocatalyst development

## 生体触媒SCR-1の開発

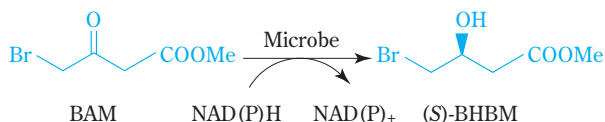
### 1. SCR-1生産微生物スクリーニング

SCR-1のターゲット化合物である4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルは高脂血症剤などの医薬品の鍵中間

**Table 2** Biotransformation of BAM by acetone-dried microorganisms

Microorganisms	Coenzyme availability					
	NADPH			NADH		
	Molar yield (%)	Stereo-selectivity	<i>e.e.</i> (%)	Molar yield (%)	Stereo-selectivity	<i>e.e.</i> (%)
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	4.2	S	54.7	4.1	S	27.7
<i>Bacillus alvei</i>	44.1	R	71.6	30.0	R	95.5
<i>Rhodotorula minuta</i>	10.1	S	82.1	1.0	N.T. <sup>1)</sup>	N.T.
<i>Cryptococcus humicola</i>	12.9	S	88.0	0.4	N.T.	N.T.
<i>Penicillium citrinum</i>	36.0	S	98.1	N.D. <sup>2)</sup>	N.T.	N.T.

1) N.T.: not tested, 2) N.D.: not detected.

**Fig. 3** Asymmetric reduction of BAM to BHBM

体として重要な化合物である。これまでに生体触媒を用いた4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの合成法は多く報告されていたが、当社では、より反応性が高く次工程の化学法に適用が容易な4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを合成可能な生体触媒の開発を試みた。

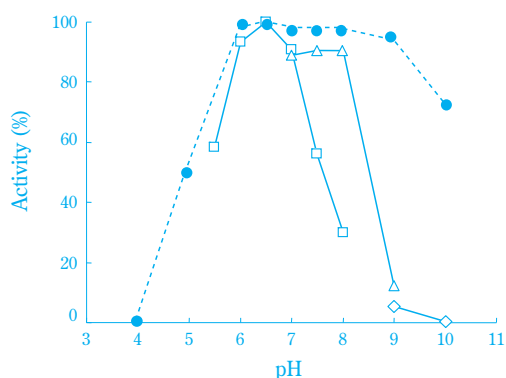
4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチル (BAM) を用い、高い光学純度の4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチル (BHBM) を合成可能な生体触媒法は報告例がなかったことから、まず、天然の微生物を用いてスクリーニングを実施した (Fig. 3)。その結果、S体選択的に不斉還元可能な微生物としてペニシリウム属微生物 (*Penicillium citrinum*) を見出した。また、R体選択的に不斉還元可能なバシラス属微生物 (*Bacillus alvei*) を見出した (Table 2)。それぞれ、得られたBHBMの鏡像体過剰率は98.1% *e.e.*、95.5% *e.e.*と高い光学選択性を示した。また、補酵素要求性はそれぞれNADPH、NADHと異なっていた。

## 2. SCR-1遺伝子クローニング

続いて、ペニシリウム属微生物からS体選択的BAM不斉還元酵素 (SCR-1) の単離精製を行い、内部アミノ酸配列情報を基に、SCR-1遺伝子をクローニングした<sup>6)</sup>。遺伝子配列情報からの推定アミノ酸配列を用いた相同性検索では、アスペルギルス属微生物由来のグリセロール脱水素酵素ともっとも高い85%の相同性を示したが、本酵素はグリセロールの脱水素活性は有しておらず、新規な還元酵素と考えられた。また、多くのアルドケト還元酵素 (AKR) スーパーファミリーと相同性を有しており、また、触媒活性に寄与するアミノ酸残基も保存されていたことから、本酵素はAKRスーパーファミリー (AKR3E1) に属する新規酵素と考えられた。

## 3. SCR-1遺伝子を導入した大腸菌組換え体の構築および組換えSCR-1の諸性質検討

クローニングしたSCR-1遺伝子を大腸菌に導入し、SCR-1を高生産する大腸菌組換え体を構築した。得られた大腸菌組換え体からSCR-1を単離精製し、種々検討を行った結果、組換えSCR-1はペニシリウム属微生物から単離精製した野生型SCR-1と同じ約37kDaの分子量を有しており、BAMをS体選択的に不斉還元可能なことを確認した。また、補酵素要求性はNADPHであった。至適pHは6.5付近で、pH6~10の間では酵素は安定であり (Fig. 4)、40°C、20分間の熱処理にて、初期活性の75%は残存していたが、50°C、20分間の熱処理では失活した<sup>7)</sup>。また、本酵素の基質特異性の検討を行った結果、4-ハロ-3-オキソ酪酸エステルに対する還元活性が高く、その他、ジヒドロキシアセトン、1,1-ジクロロアセトンや1-ブロモ-1-インダノンなどに対する還元活性も認められた (Table 3)。



SCR-1 activity (solid lines) and stability (dashed lines) as a function of pH. The activity was measured in the following buffers (0.1 M): KPB (pH 5.5–8.0; open squares), Tris-HCl buffer (pH 7.0–9.0; open triangles), and Tris-glycine buffer (pH 9.0–10.0; open diamonds). The remaining activity of SCR-1 (filled circles) was also measured after incubation in the following buffers at 20°C for 1 h: citrate-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 4.0–5.0), KPB (pH 6.0–8.0), Tris-HCl buffer (pH 8.0–9.0) and Tris-glycine buffer (pH 10.0).

**Fig. 4** Optimum pH and pH stability of SCR-1

**Table 3** Substrate specificity of SCR-1

Substrate	Relative activity (%)
Aldehydes	
Acetaldehyde	2.2
<i>n</i> -Butylaldehyde	3.4
<i>n</i> -Valeraldehyde	2.8
DL-glyceraldehyde	3.2
Pyridine-3-aldehyde	2.0
Ketones	
Ethyl 4-Chloro-3-oxobutyrate	100
BAM	139
Ethyl 4-bromo-3-oxobutyrate	667
Isopropyl 4-bromo-3-oxobutyrate	125
Octyl 4-bromo-3-oxobutyrate	24
1,1-Dichloroacetone	42
Chloroacetone	2.5
3-Chloro-2-butanone	2.4
Methyl 3-oxopentanoate	1.2
2-Bromo-1-indanone	20
Dihydroxyacetone	56

#### 4. SCR-1および補酵素再生用酵素を生産する大腸菌組換え体の構築

次に、SCR-1遺伝子に加え、補酵素リサイクル用酵素としてグルコース脱水素酵素（GDH）遺伝子は大腸菌に導入し、SCR-1とGDHを共発現する大腸菌組換え体を構築した。まず、SCR-1とGDH遺伝子は大腸菌に導入し、酵素として生産させるための環状のDNA（プラスミドDNA）の構築を行った。遺伝子の発現を調節するためのDNA領域（プロモーター）の下流にGDH遺伝子、SCR-1遺伝子の順で配置したプラスミドDNA（Table 4 a）、SCR-1遺伝子、GDH遺伝子の順で配置したプラスミドDNA（Table 4 b）、GDH遺伝子、SCR-1遺伝子の順で配置し、GDH遺伝子の最後の塩基（A）とSCR-1遺伝子の最初の塩基（A）とをカップリングさせたプラスミドDNA（Table 4 c）をそれぞれ構築し、

**Table 4** Activities of SCR-1 and GDH of recombinant *E. coli* cells

Plasmid	SCR-1 activity (units/mL of culture)	GDH activity (units/mL of culture)
a)	2.5	26.1
b)	11.7	0.8
c)	6.6	29.0

P: Promoter, SD: Shine-Dalgarno sequence

大腸菌組換え体とした後、BAM還元活性とGDH活性を評価した。その結果、最もバランスよく活性発現が認められた大腸菌組換え体はTable 4 c)のプラスミドDNAを導入した大腸菌組換え体であった（Table 4）。

Table 4 c)のプラスミドDNAを大腸菌に導入した大腸菌組換え体を用い、BAMの不斉還元反応を行った。反応は酢酸ブチルとリン酸緩衝液（pH6.5）との2相系で行い、NADP<sup>+</sup>とグルコースを添加し、30℃で、pHを6.5に制御しながら反応を行った。その結果、反応2時間で(S)-BHBMを化学収率100%、光学純度97.9% *e.e.*で得ることができた。

#### 5. SCR-1の機能改良（耐熱性の向上）

生体触媒を工業的に利用するためには、その安定性が重要となる。そこで、SCR-1の耐熱性の向上を試みた。酵素の機能改良については様々な方法が報告されているが、その一つに酵素の構成要素であるアミノ酸の配列を人工的に変更（置換、欠失、付加など）する方法が知られている。酵素の立体構造が明らかになっている場合は、その立体情報に基づいて蛋白質の機能や特性に関わるアミノ酸残基を特定し、その部分のアミノ酸を特異的に他のアミノ酸に置換などすることによって改良酵素を作製する方法が知られている。しかしながら、SCR-1は新規酵素であり、立体構造が決定できていなかったため、酵素にランダムにアミノ酸置換を導入し、得られたミュータントライブラリーの中から目的とする機能や特性を指標に選抜する手法を用いて改良を行うことにした。

約4000のミュータントライブラリーの中から、40℃、2時間の熱処理でも還元活性が残存している耐熱性の向上したSCR-1改良酵素をスクリーニングした結果、A3-49、A8-39、T1-99の3種類の改良酵素を見出した（Table 5）。A3-49は245番目のアミノ酸がリジンからアルギニンに置換しており（K245R）、A8-39は271番目のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に置換しており（N271D）、T1-99は54番目のアミノ酸がロイシンからグルタミンに（L54Q）、そして、104番目のアミ

**Table 5** Thermostability and enantioselectivity of SCR-1 mutants generated by random mutagenesis

Clone	Mutation site(s)	Remaining activity at 40°C for 2 h (%)	(S)-BHBM <i>e.e.</i> (%)
SCR-1	None	1.7	97.1
A3-49	K245R	3.8	97.0
A8-39	N271D	10.1	96.8
T1-99	L54Q/R104C	74.9	99.0



ノ酸がアルギニンからシステインへの (R104C)、2つのアミノ酸置換が起きていたことが明らかとなった。T1-99は最も耐熱性が向上していただけでなく、BAMに対する光学選択性も向上していた。次に、耐熱性をさらに向上させるため、明らかになった耐熱性に寄与する4つのアミノ酸置換を組み合わせた改良酵素を構築した。その結果、最も耐熱性が向上したのが、野生型のSCR-1に3つのアミノ酸置換を導入した改良酵素 (L54Q/K245R/N271D) であった (Table 6)。また、

**Table 6** Thermostability and enantioselectivity of SCR-1 mutants generated by site-directed mutagenesis

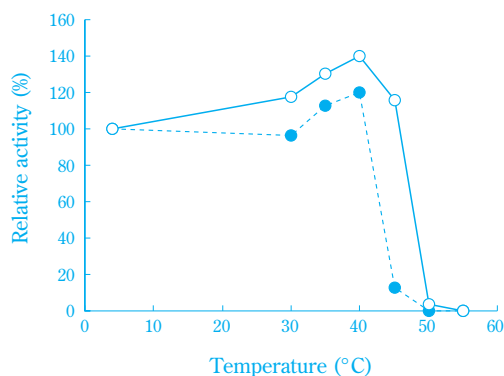
Mutation site(s)	Remaining activity at 45°C for 7 h (%)	(S)-BHBM <i>e.e.</i> (%)
None (wild-type)	0	97.1
L54Q	54.1	98.7
R104C	0	97.7
L54Q/R104C	9.6	99.0
N271D	0	96.8
L54Q/N271D	53.1	98.6
L54Q/R104C/N271D	41.7	98.8
K245R	0	97.0
L54Q/K245R	42.3	98.6
L54Q/K245R/N271D	69.9	98.3
L54Q/R104C/K245R/N271D	18.1	98.7

L54Q置換を含む改良酵素は全て耐熱性および光学選択性が向上していることが明らかとなった。そこで、次に、54番目のロイシンを他の19種類のアミノ酸に置換し、耐熱性と光学選択性に与える影響を調べた。その結果、54番目のアミノ酸をロイシンから正電荷や負電荷を有するアミノ酸 (リジン (K)、アルギニン (R)、ヒスチジン (H)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)) に置換したときに耐熱性が向上したことから、アミノ酸置換により電気的相互作用や水素結合ネットワークが酵素中で形成され、耐熱性が向上した可能性が考えられた。また、BAMに対する光学選択性が野生型 (97.1% *e.e.*) から98% *e.e.*以上にまで向上するアミノ酸置換体が多く認められ、4-クロロ-3-オキソ酪酸エチル (CAE) に対しても、野生型 (63.1% *e.e.*) から90% *e.e.*以上にまで向上するアミノ酸置換体 (L54S、L54A、L54D、L54E) が認められた (Table 7)。

改良酵素 (SCR-1 (L54Q)) を単離精製し、諸性質検討を行った結果、基質との親和性を表す指標である  $K_m$  値は同等であった。また、45°C、30分間の熱処理にて、野生型はほぼ失活したのに対し、SCR-1 (L54Q) は、活性が残存しており、耐熱性の向上を確認できた (Fig. 5)。SCR-1の54番目のアミノ酸はホモロジーモデリングの結果から (Fig. 6)、活性中心付近に位置することから、54番目のアミノ酸置換は耐熱性の向上だけでなく、光学選択性の向上にも寄与した可能性が考えられた。

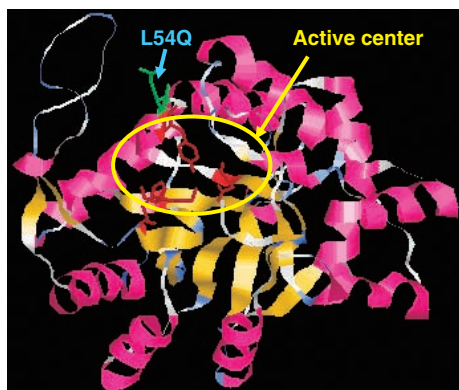
**Table 7** Thermostability and enantioselectivity for BAM and CAE of SCR-1(L54) mutants generated by saturation mutagenesis

Mutation	Remaining activity at 45°C for 2 h (%)	BAM		CAE	
		Relative activity (%)	(S)-BHBM <i>e.e.</i> (%)	Relative activity (%)	(S)-CHBE <i>e.e.</i> (%)
None (wild-type)	0	100	97.1	100	63.1
L54G	64.0	113	98.3	127	89.1
L54S	7.7	101	98.8	151	91.2
L54T	2.2	122	97.7	131	70.4
L54C	5.0	67	97.5	123	76.9
L54Y	0	114	98.4	285	86.7
L54N	49.6	90	98.3	102	88.7
L54Q	53.8	153	98.8	245	89.7
L54A	23.5	125	98.7	175	92.6
L54V	0	69	98.8	59	84.8
L54I	0	84	98.6	128	78.1
L54M	9.9	107	98.2	138	83.7
L54P	0	119	97.4	190	80.9
L54F	0	152	95.5	206	67.2
L54W	0	52	96.9	128	74.8
L54K	49.2	100	98.1	74	82.8
L54R	41.3	147	98.6	123	88.6
L54H	51.4	121	97.4	173	82.2
L54D	38.3	97	98.4	124	90.4
L54E	12.9	110	98.9	97	90.3



Purified enzyme was incubated for 30 min at the indicated temperature, and activity was determined

**Fig. 5** Effect of temperature on the stability of SCR-1 (L54Q) (open circle) and wild-type SCR-1 (filled circle)



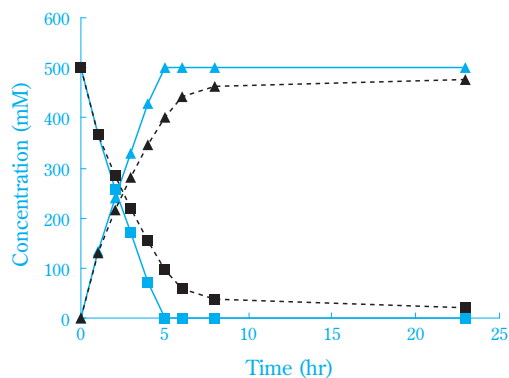
This model based on the crystal structure of AKR4C9 from *Arabidopsis thaliana* (PDB code: 3h7u)

**Fig. 6** Homology modeling of SCR-1

## 6. 改良酵素SCR-1 (L54Q) および補酵素再生用酵素を生産する大腸菌組換え体の構築

Table 4 c)で示したプラスミドDNAのSCR-1遺伝子部分を、耐熱性および光学選択性の向上したSCR-1 (L54Q) 遺伝子に置き換えたプラスミドDNAを大腸菌に導入し、大腸菌組換え体を構築した。得られた組換え体を用い、野生型SCR-1とGDHを共発現する大腸菌組換え体と比較した結果、BAM還元活性（初期反応速

度）、GDH活性（初期反応速度）はほぼ同じであった。BAM不斉還元反応を行ったところ、SCR-1 (L54Q) は反応5時間で化学収率100%、光学純度98%*e.e.*で(S)-BHBMを合成できたのに対し、野生型SCR-1では反応8時間目でBAMの変換反応はほぼ停止し、化学収率は93%、光学純度は97%*e.e.*であった (Fig. 7)。SCR-1 (L54Q) は野生型SCR-1よりも耐熱性が向上し、安定化したことから、生産性が向上したと考えられた<sup>8)</sup>。

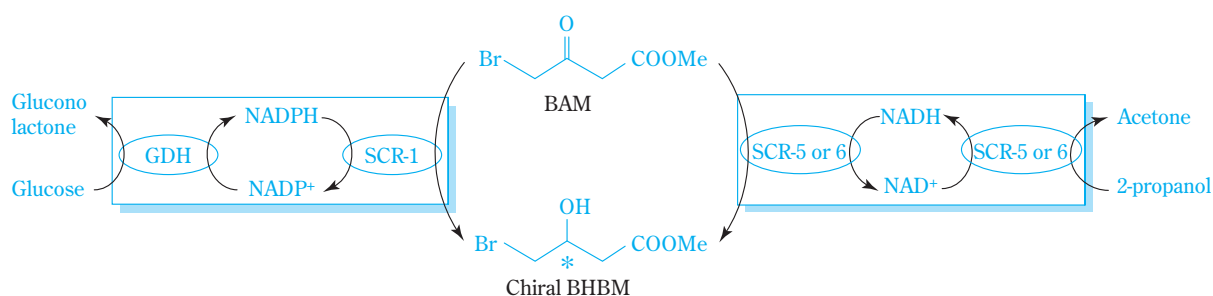


BAM (filled square), (S)-BHBM (filled triangle)

**Fig. 7** Time-course of BAM reduction to (S)-BHBM by recombinant *E. coli* expressing wild-type SCR-1 (dashed line) and SCR-1 (L54Q) (solid line)

## 7. SCR-5またはSCR-6を用いたBAM不斉還元反応との比較

SCR-1以外に、Table 1に示したSCR-5もBAMをS体選択的に不斉還元することが可能である。SCR-5はさまざまなケトン化合物に作用し、SCR-5自身が有する2-プロパノール脱水素活性を補酵素の再生系に用いることが可能であること、NADPHよりも比較的安価なNADH要求性である特徴を有する (Fig. 8)<sup>9)</sup>。また、SCR-6はBAMをR体選択的に不斉還元することが可能であり、SCR-5と同様に基質特異性が幅広く、自身が有する2-プロパノール脱水素活性を補酵素の再生系に用いることが可能であり、NADH要求性である特徴を有する (Fig. 8)<sup>10)</sup>。



**Fig. 8** Asymmetric reduction of BAM and recycling of the coenzyme

**Table 8** Biocatalytic reduction of BAM

Enzyme	Coenzyme	Wet cells (w/w-BAM)	Reaction time (h)	Final concn. of BHBM (mM)	Yield (%)	<i>e.e.</i> (%)
SCR-1(L54Q)+GDH	NADPH	0.23	4	589	86	> 99 (S)
SCR-5	NADH	0.55	53	413	97	> 99 (S)
SCR-6(HAR1)	NADH	6.6	10	176	80	> 99 (R)

そこで、これらの生体触媒を用い、SCR-1とのBAM不斉還元反応の比較検討を行った。なお、SCR-1は耐熱性を向上させた改良酵素（SCR-1 (L54Q)）を用い、SCR-6も改良酵素（SCR-6 (HAR1)）<sup>11)</sup>を使用した。反応はすべて、酢酸ブチルと緩衝液を1:1の割合で添加した2相系で実施し、SCR-1 (L54Q) には補酵素リサイクルのため、グルコースを添加し、pHを6.5に制御しながら反応を行った。また、SCR-5とSCR-6 (HAR1) には補酵素リサイクルのため、2-プロパノールを添加し反応を行った。その結果、SCR-1 (L54Q) とGDHを共発現する大腸菌組換え体を用いた場合、反応4時間で化学収率86% (589mM)、光学純度99%*e.e.*以上で(S)-BHBMを合成できた (Table 8)。SCR-5を用いた場合、化学収率97% (413mM)、光学純度99%*e.e.*以上で(S)-BHBMを合成できたが、BAMの変換反応終了までに、53時間を要した。また、SCR-6 (HAR1) を用いた場合、10時間でBAMはほぼ100%変換され、化学収率80% (176mM)、光学純度99%*e.e.*以上で(R)-BHBMを合成できたが、生産性が低く、生体触媒も多く必要であった。以上の結果から、BAM不斉還元反応においては、SCR-1 (L54Q) を用いた系が最も適しており、工業的にも実施可能と考えられた。SCR-1 (L54Q) はSCR-5、SCR-6 (HAR1) と比較し、BAMに対する比活性や、酢酸ブチルと緩衝液の2相系での安定性が高かったため、BHBM生産性が高かったと考えられた (Table 9)<sup>12)</sup>。しかし、SCR-5、SCR-6 (HAR1) は前述のとおり、補酵素再生の際の副生物がアセトンであり、反応中のpH制御が不要であること、NADPHよりも安定で、安価なNADHを補酵素として使用することなどから、プロセス、コストの面から有利であり、反応条件のさらなる検討により、BAM不斉還元反応に適したプロセスを確

立できる可能性がある。また、他の有用物質生産への今後の適用が期待される。

## おわりに

産業上有用な化学製品は安価な出発化合物から複数の工程を経て合成する必要があり、次工程への繋ぎなども考えた生産プロセスの構築が重要となる。当所では有機合成とバイオプロセスとを組み合わせたハイブリッドプロセスの開発を行い、環境にやさしいトータルプロセス開発を行っている。これまで紹介してきた不斉還元酵素触媒を用いた生産法は1工程のユニットバイオプロセスであるが、本来、生物の多くは温和な反応条件下で厳密な反応制御を行い、生きていくためのエネルギー生産や物質生産を、多段階のケミカルプロセスにも関わらず、見事に生物体内（ワンポット）で行っている。醗酵法はこれらの生物の営む物質代謝機能を巧みに利用し、人類が必要とする有用化合物を安価な原料からワンポットで生産する技術である。また、酵素の中には有機溶媒中でも触媒可能な酵素もあり、さらには、金属触媒との併用で目的産物を効率よく生産する技術も報告されている<sup>13)</sup>。このような技術を組み合わせれば、バイオプロセスによって多くの有用物質を効率的に生産できると考えられる。

一方、生体触媒探索については、未だ自然界の微生物から、スクリーニングにより目的の反応を触媒する酵素を見出すことが多いのが現状である。この微生物スクリーニング法は有用であるが、人類が培養可能な微生物は微生物全体の0.1~数%程度<sup>14)</sup>と言われていることから限界があり、時間と技術（スクリーニングセンス）も要する。これらの問題は、充実した遺伝子、蛋白質データベースからの解析、検索技術、微生物を培養せずに直接DNAを取得、増幅する技術、次世代シーケンサーを用いたゲノムDNAの高速解析技術など、最近の著しいバイオ技術の進展によって、克服できるようになってきている。また、本稿で紹介したように自然界から得た酵素を人工的に改良することにより、性能の向上した酵素の開発も進んでいる。人類が目的酵素を自在に構築するにはまだまだ時間を要すると思われるが、様々な酵素の立体構造と反応作用機構が明らかになっていけば、より精度高く酵素の改良が可能

**Table 9** Properties of BAM reduction enzymes

Enzyme	Specific activity for BAM (units/mg protein)	Activity in <i>E. coli</i> cells (units/g wet cells)	Half-life in the two-phase system (h)
SCR-1(L54Q) +GDH	144	179	17
SCR-5	9.1	13	3
SCR-6(HAR1)	0.5	0.4	0.5

になると考えられる。今後、これら生体触媒を用い、環境にやさしい有用物質生産法を確立していきたいと考えている。

## 謝辞

本研究を実施するに当たり、多大なるご協力、ご指導を賜りました、富山県立大学 伊藤伸哉教授に深く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 市橋 宏, 深尾 正美, 杉田 啓介, 鈴木 達也, 住友化学, **2001-II**, 4 (2001).
- 2) 岩永 清司, 関 航平, 日比 卓男, 磯尾 公太郎, 鈴田 哲也, 中田 幹俊, 森 康彦, 阿部 忠, 住友化学, **2004-I**, 4 (2004).
- 3) S. Mitsuda, T. Umemura and H. Hirohara, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 310 (1988).
- 4) M. Mikami, T. Korenaga, T. Ohkuma and R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 3707 (2000).
- 5) S. Servi, *Synthesis*, **1**, 1 (1990).
- 6) H. Asako, R. Wakita, K. Matsumura, M. Shimizu, J. Sakai and N. Itoh, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1101 (2005).
- 7) N. Itoh, H. Asako, K. Banno, Y. Makino, M. Shinohara, T. Dairi, R. Wakita and M. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 53 (2004).
- 8) H. Asako, M. Shimizu and N. Itoh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 805 (2008).
- 9) H. Asako, M. Shimizu and N. Itoh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 397 (2009).
- 10) N. Itoh, M. Matsuda, M. Mabuchi, T. Dairi and J. Wang, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2394 (2002).
- 11) Y. Makino, T. Dairi and N. Itoh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 833 (2007).
- 12) H. Asako, M. Shimizu, Y. Makino and N. Itoh, *Tetrahedron Lett.*, **51**, 2664 (2010).
- 13) B. M. Matute, M. Edin, K. Bogár, F. B. Kaynak and J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (24), 8817 (2005).
- 14) 渡辺 一哉, 二又 裕之, 化学と生物, **38** (4), 230 (2000).

## PROFILE



朝子 弘之  
*Hiroyuki ASAKO*

住友化学株式会社  
有機合成研究所  
主席研究員 博士 (工学)