P-44

株式会社 耐熱性酵素研究所
Thermostable Enzyme Laboratory Co.,Ltd.

# 耐熱性酵素を利用した物質生産

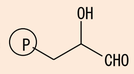
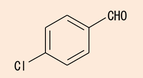
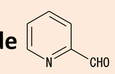
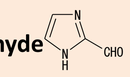
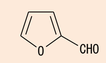
（株式会社耐熱性酵素研究所） 岩田英之，塚本悟郎，○鹿島康浩

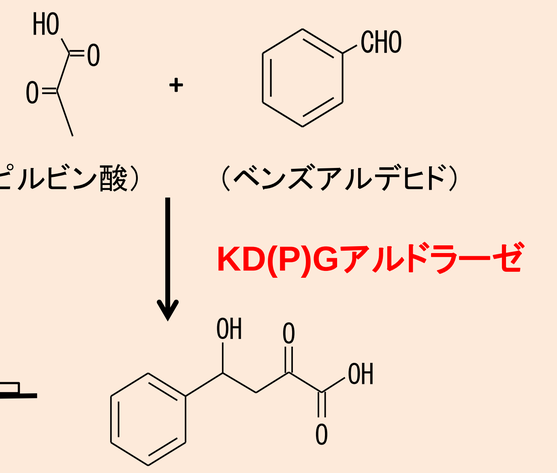
（要旨） これまで、様々な医薬中間体が化学反応により合成され、医薬品の生産に利用されている。医薬品としてラセミ体を用いる場合、想定される光学異性体全てにおいて安全性試験を行わなければならないことから、光学純度の高い生産法の確立が必須である。また、有機化学反応によってアルドール縮合反応を介した化学物質の生産を行う場合、反応工程の煩雑さから反応効率も低いという問題がある。酵素反応は、その特異性の高さゆえ、反応によって得られる生成物の多くは光学活性体である。デオキシリボースアルドラーゼを用いたクロロアセトアルデヒドとアセトアルデヒドから（3R, 5S）-6-chloro -2,4,6-trideoxy-erythro-hexose（コレステロール低下剤）の生産方法が報告されているが1)、これらの方法は基質として使用する物質の両者がアルデヒドであるため、反応が連鎖的に引き起こされる傾向があり、反応の制御が困難であった。

そこで、我々は高効率なアルドール縮合反応を行うために、耐熱性KDPGアルドラーゼを用いた酵素反応を利用して、ベンズアルデヒドとピルビン酸から温和な条件でアルドール縮合反応物（4-ヒドロキシ-4-フェニル 2-オキソ酪酸）を生成する反応を開発した。C型肝炎ウィルスのRNAポリメラーゼ阻害剤（抗C型肝炎ウィルス薬）として用いられる4-フェニル2, 4-ジオキソ酪酸製造は有機化学的に合成されているが、本法によって本物質製造の中間体となる4-ヒドロキシ4-フェニル2 –オキソ酪酸を製造し、酸化することにより簡便に製造することが可能となる。さらに、耐熱性KD(P)Gアルドラーゼを用いて、抗真菌剤合成中間体を合成する反応も合わせて開発した。

1)J S Griffiths et al. Bioorganic &Medical Chemistry(2002) 545-550.

**KDGアルドラーゼの基質特異性**

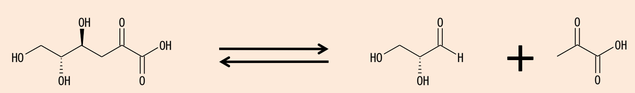
| Aldehyde | Structure | Relative Activity (%) | Aldehyde | Structure | Relative Activity (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Glyceraldehyde |  | 100 | Benzaldehyde |  | 35 |
| Glyceraldehyde-3P |  | 308 | 3-Chlorobenzaldehyde |  | 41 |
| Acetaldehyde | $CH_3CHO$ | 166 | 2-Pyridinecarboxaldehyde |  | 475 |
| Propionaldehyde | $CH_3CH_2CHO$ | 142 | | | |
| Butylaldehyde | $CH_3(CH_2)_2CHO$ | 60 | 2-Imidazolecarboxaldehyde |  | 36 |
| Valeraldehyde | $CH_3(CH_2)_3CHO$ | 32 | 2-Furaldehyde |  | 72 |
| Hexylaldehyde | $CH_3(CH_2)_4CHO$ | 29 | | | |




## 耐熱性KD(P)G アルドラーゼ

・Entner-Doudoroff経路に存在する酵素。

・2-ケト-3-デオキシグルコン酸 (KDG)をグリセルアルデヒドとピルビン酸に分解する。
（可逆反応）



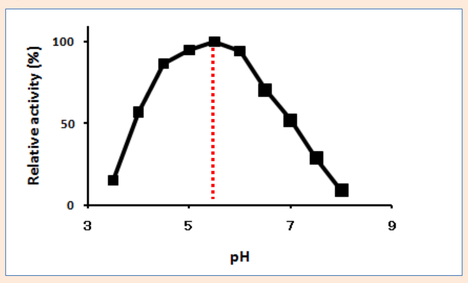
2-keto-3-deoxygluconate (KDG)　Glyceraldehyde　Pyruvic acid

## KD(P)Gアルドラーゼの諸性質解析

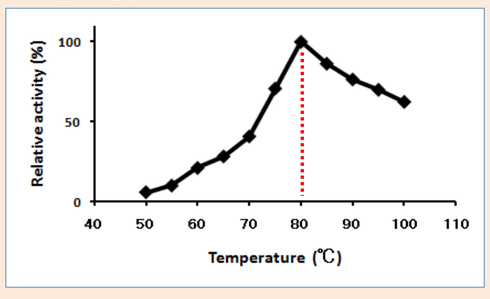
基本酵素反応

10 mM ピルビン酸
10 mM グリセルアルデヒド
0.01~0.05 unit/ml KDGアルドラーゼ
Buffer (MES, pH5.5)
↓50~100℃、30min反応
産生されるKDGをTBA法により検出

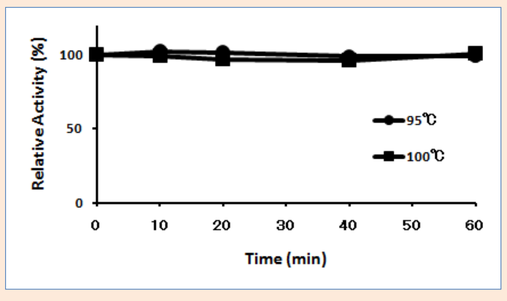
**pH依存性**




**至適温度**




**熱安定性**




## 反応収率 etc.

ベンズアルデヒド　ピルビン酸　→ KD(P)Gアルドラーゼ → 4-フェニル-4-ヒドロキシ-2-オキソ-酪酸 (抗鬱剤原料)

収率 :50%
*e.e.* : ―

2-ピリジンカルボキシアルデヒド + ピルビン酸 → KD(P)Gアルドラーゼ → 4-(2'ピリジル)-4-ヒドロキシ-2-オキソ-酪酸 (抗真菌剤原料)

収率 :95%
*e.e.* : 85%