

微生物変換反応

山 田 靖 宙*

はじめに

微生物のもっている強い反応性を触媒あるいは一種の試薬として利用し、天然物または合成有機化合物の変換に応用することを微生物変換 (Biotransformation) とよぶ。微生物変換反応の歴史は比較的長く、特にステロイドに関しては1950年代から多くの研究報告があり、色々な知見が蓄積されている。微生物変換反応はステロイド以外の多くの天然物の分野 (テルペン、アルカルド、抗生物質など) でも研究、利用されている。微生物を利用する反応の主な利点は一般化学反応と比較すると1) 光学活性物質が簡単に合成出来ると、2) 分子上の特定位置に選択的に官能基を導入できること、3) 複数の同一の官能基の内の特定のものだけ反応させること、4) 穏和な条件で不安定な物質を得ることが出来こと等である。逆に不利な点は1) 反応によっては試薬となる微生物の選択に手数がかかること、2) 反応の種類が限定されていること、3) 一般的に高濃度での反応がむずかしいこと等であろう。微生物変換を試みる場合、微生物の選択に関しては、種類、属、種に関して大まかな特徴があるにしても、自分でこれから行う反応にどの微生物を使用するかは、多数の菌株を集めて試行錯誤を繰り返してから決定する他はない。

微生物変換の反応方法の基本は比較的簡単で、出発原料を培地に加えて微生物の培養を行うか、あらかじめ培養して調製した休止菌体またはそれを何らかの方法で処理した活性のある菌体と出発原料を適当な緩衝液や稀には有機溶媒中で攪拌して反応させる。菌体内の酵素を利

用するのであるから、当然反応条件は一般の生化学反応と同様に穏和であり、低い温度で、中性附近の pH で行う。反面、反応条件に関しては培地組成、通気状態、緩衝液の組成等多数のパラメーターがあり、これらが変化すると生成物の組成、収率が大きく変動する場合がよくある。また菌株の保存状態が変わったり、長期にわたる保存の結果、菌株自体が変異して反応性が低下することがある。

われわれの研究室では合成有機化合物の微生物による分解を手がけて来たが、数年前から直鎖状テルペン系化合物の分解反応を試み、興味ある結果を得たので以下に述べる¹⁾²⁾。

スクワレンの微生物変換

直鎖状のテルペン化合物としてスクワレンを主な反応原料として用いた。スクワレン (1) は図 1 に示した C_{30} のトリテルペンで C_{15} のセスキテルペン (ファルネシル基) が2 $\times$ 12C と13Cの位地で対称的に結合した構造をもつ。スクワレンを基質として選んだ理由は1) この物質がステロイドの前駆物質として天然に広く分布していること、2) 反応性の等しい二重結合が一分子上に6 $\times$ あり、微生物変換で選択的反応が期待出来ること、3) メチル側鎖のある

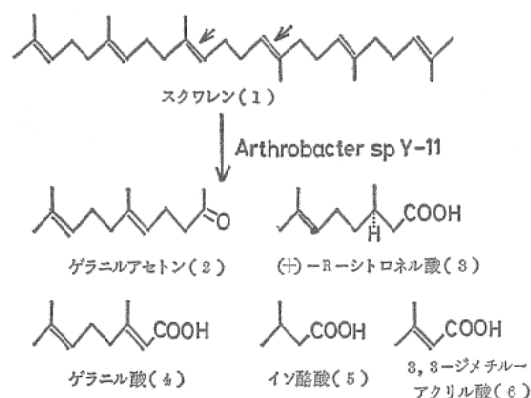


図1

* 山田靖宙 (Yasuhiro YAMADA), 大阪大学工学部, 醸酵工学科, 助教授, 農学博士, 生物有機化学

ハイドロカーボンの微生物による分解反応経路のよいモデル物質になることである。使用する菌株は土壌から単離した。属、種が同定されているカルチャーコレクションの菌株を集めて試みる場合も多いが、土壌中に無限に存在する微生物中よりスクワレンを炭素源として資化するものを選択する方が、スクリーニングが容易であるし、メチル側鎖をもつハイドロカーボンの土壌中での分解経路の研究にもなると考えたからである。さて、スクワレンを炭素源として、生成物を薄層クロマトグラフィーで分析しつつ土壌細菌をスクリーニングすると、*Arthrobacter* に属する新種らしい微生物が単離されたのでこの菌株 (*Arthrobacter* sp. Y-11) のスクワレンに対する反応性をしらべて見た。

Arth sp. Y-11はスクワレンを炭素源として増殖するが、脂肪酸あるいはトリグリセリドでも非常によく増殖する。2%コーンステープリカーと0.5%のスクワレンを含有する培地で、*Arth* sp. Y-11株を40時間培養し、生成物をしらべると50%がゲラニルアセトン(2)であり、30%が未反応のスクワレンであった。

図. 1 に示した様にスクワレン分子上に矢印で示された10C=11Cと14C=15Cの2点で酸

化的に切断が起こり、ゲラニルアセトンが生成したと考えられる。消費されたスクワレンを基準にしてゲラニルアセトンの収率を計算すると、1分子のスクワレンから2分子のゲラニルアセトンが生成したことになり、その収率は56%であった。Y-11株は増殖にともないスクワレンを消費し、ゲラニルアセトンを蓄積する。このときスクワレン分子中の増殖に利用される部分は11C~14Cの炭素4コ分のみである。

微生物変換反応における培地組成の影響を示す一例ともなるが、上記のスクワレンとコーンステープリカーから成る培地に1%のリン酸を加えて培養するとゲラニルアセトンの収率は低下し、10%の収率で種々のカルボン酸が生成した。これらを分離精製して構造をしらべると主なものは(+)-(R)-シトロネル酸(3)、ゲラニル酸(4)、イソ酪酸(5)、3,3-ジメチルアクリル酸(6)であった。いずれもC₁₀またはC₅のカルボン酸でC₅のイソブレンユニットを基準にして分解、蓄積されている点が興味を引く。

それではスクワレンの誘導体に対するY-11株の反応性はどうか。この場合は休止菌体を用いて反応を行った。まずスクワレンの2重結合が還元されてなくなったスクワランと

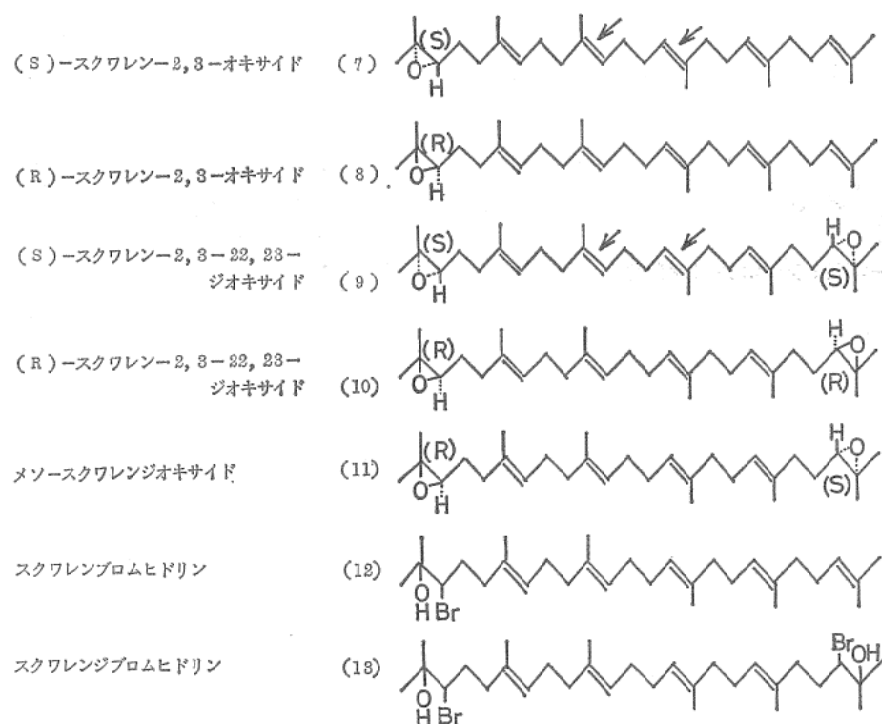


図2

は反応しない。すなわち、Y-11は酸化反応の手がかりとして2重結合を必要とする。次にスクワレン分子の片端が1イソプレンユニット短いゲラニルファルネミル(C_{25})と両端から1イソプレンユニットずつ短くなったジゲラニル(C_{20})を試みたがこれも反応しなかった。このことはY-11株の酸化酵素系がスクワレン分子の長さをかなり厳密にとらえていることを示す。スクワレン分子の片端にブrom原子がはいったスクワレンブromヒドリン(12)と両端にブromがはいったスクワレンジブromヒドリン(13)を反応するといずれも反応生成物を与えなかった。ブromの様に大きな原子が末端にあると、おそらくY-11の酵素系はスクワレン分子の中央部を活性中心に取込めないであろう。次にラセミ体のスクワレン-2, 3-ジオキサイド((7)と(8)の1:1混合物)とY-11を反応させるとゲラニルアセトンと光学純度18%の(s)-2, 3-エポキシゲラニルアセトン14が等量ずつ得られた。ラセミ体のスクワレン-2, 3-22, 23-ジオキサイド((9):(10):(11)=1:1:2)を反応すると光学純度40%の(s)-2, 3-エポキシゲラニルアセトンを約22%の収率で得た。したがってエポキシ誘導体のY-11株による切断は主として図. 2の矢印で示した分子上の点でおこっていることになる。このことはY-11の酵素系がスクワレン分子末端のエポキシ環の立体

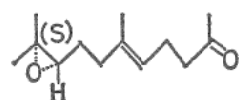
構造をある程度識別して基質と結合し、分子中央部の2重結合を特異的に切断していることを示す。注目すべき点は両末端がエポキシ化された基質ジオキサイドにはモノオキサイドより更に立体選択性が増し、生成物の光学純度がモノオキサイドからの生成物の2倍になるという点である。このようにY-11株はスクワレンから純度の高いtrans-ゲラニルアセトンの合成に利用出来るし、スクワレンの誘導体を適当にえらべば光学純度の高いエポキシゲラニルアセトンの合成に応用出来る。

むすび

最近われわれはスクワレンを炭素源として、スクワレンの2重結合に加水反応を行なう細菌(S-401)を土壌より分離した。このS-401菌株もn-パラフィン、脂肪、脂肪酸を炭素源として増殖する。S-401株休止菌体は不飽和脂肪酸であるオレイン酸の2重結合への立体特異的な加水反応を行い、また種々の脂肪酸とアルコールからエステル(ワックス)を合成することが明らかになった。このようにスクリーニングに使用する基質となる物質の選定と単離した菌体の広範囲の合成誘導体、類縁体への応用を試み、有用な天然物の合成や代謝経路を考察するのが微生物変換の興味ある一面である。

参考文献

- 1) Y. Yamada, H. Motoi, S. Kinoshita, N. Takada, H. Okada, *Applied Microbiology*, **29**, 400 (1975)
- 2) Y. Yamada, N. Kusuhara, H. Okada, *Applied and Environmental Microbiology*, **33**, 771 (1977)



(s)-エポキシゲラニルアセトン(14)

図3