

微生物を用いた α -置換カルボン酸のデラセミ化反応

平成 16 年度

加藤 太一郎

はじめに

世界の化学の流れは現在、Green Chemistry, Sustainable Chemistry, Renewable Chemistry という環境に優しい方向に進んでいる。つまり、どれだけ不要なものを環境中に放出しないかということが重要視されつつあると言える。21 世紀の化学において大切なこと、それは何を作るかに加えて、どのような方法で創るかということだと著者は考える。その中でも特に「光学活性体の調製法-化合物の不斉中心をどのようにして構築するか？」という問いかけは、現在の有機化学の分野において最も注目を集めている分野である。現在でも世界中で新しい光学活性体調製法の開発が続いている。著者の所属する太田研究室においても、これまで生体触媒を利用した不斉中心導入法を世界に先駆けて提供してきた。

同一の化学組成を持ち、分子の平面構造、物理的および化学的性質は全く差異がないにも関わらず、光学的な性質が違っている 2 つの分子を鏡像異性体と呼ぶ。有機化学の解説書をみると 2 つの異性体はよく右手・左手に喩えられる。つまり鏡像異性体の一方を鏡に映し、その像をもとの異性体と重ねあわせようとしても両者は重ね合わせることはできない関係にある。このような鏡像異性体は、有機化合物の骨格を構成する炭素原子に 4 つの違った原子あるいは官能基が結合している場合に生じる。不斉を有する分子は、互いに鏡像関係にある 2 つの形で存在する可能性があるが自然界に存在する有機化合物のほとんどは一方の鏡像体だけ、つまり光学活性体で存在している。これは鏡像異性体が生体に対しては単に光学的性質が違っているということだけにとどまらないからである。例えば、うまみの成分として知られるグルタミン酸ナトリウムを例に取ってみると、本化合物はその分子中にただ 1 つの不斉点を有するアミノ酸であるが、その(S)-体はうまみを感じさせるにも関わらず、鏡像体である(R)-体がうまみを感じさせることはない。またマツタケオールのように両鏡像体のうち(S)-体はマツタケの香りだが、(R)-体は草の香りを感じさせるなどの例も知られている。鏡像体の混ざり物では香料として成り立たない。このようなことから光学的に純粋な化合物を作ることが必要不可欠なのである。これは学問的な観点からだけでなく、工業的な視点から見た場合にも重要な課題のひとつとなっている。

光学活性体の調製法としては大きく分けて分子性触媒を利用する方法と生体触媒を利用する方法に分けられる。生体触媒を用いた場合、反応を触媒する酵素自体がもとより光学的に純粋なアミノ酸より構成されているため、その反応活性部位もキラルな場を構成している。よって反応もエナントチオ選択的に進行する可能性があり、実際これまでも多くの生体触媒を利用した効率の良い不斉中心導入法が報告されている。

ところでラセミ体を出発物質とした光学活性体調製法の場合、その構造は反応の前後で違っている場合がほとんどである。もし構造を全く変化させずに光学活性体へと変換することができれば、原子効率は 100% というこれまでにはない全く新しい手法を確立できることとなる。

著者は、本論文においてこれまでの常識を覆す新奇な光学活性体調製法を報告する。放線菌の一種 *Nocardia diaphanozonaria* JCM3208 株をはじめいくつかの微生物はラセミ体の α -置換カルボン酸

に対し、反応の前後にて構造を全く変化させることなく光学活性へと変換する活性、デラセミ化活性を有している。本反応はラセミ体を出発物質とした場合の光学活性体調製法においてこれまでの限界を乗り越える手法を我々に提供している。

序論では生体触媒を利用したラセミ体からの光学活性体調製法に関するこれまでの発展の歴史振り返り、デラセミ化反応の有用性について紹介する。本論第 1 部では α -メチルカルボン酸に対するデラセミ化反応、第 2 部では α -アミノ酸に対するデラセミ化反応についてまとめることとした。これら二種類の基質に対する反応機構は本質的に違っており、デラセミ化プロセスの開発という点から大変興味深いものとなった。これら二つのアプローチによるデラセミ化反応を検討する過程で見出したさまざまな知見を報告する。

目次

はじめに	iii
目次	v
序論	
光学活性体調製の意義とその方法	1
本論	
第1部 微生物を用いた α -メチルカルボン酸のデラセミ化反応	
1章 <i>Nocardia diaphanozonaria</i> JCM 3208 株を利用した光学活性 α -置換カルボン酸調製法の開発	14
1.1 反応条件最適化	
1.2 基質特異性の検討	
1.3 代謝反応抑制法の確立	
2章 <i>Nocardia diaphanozonaria</i> JCM 3208 株による反応機構の解析	38
2.1 全菌体を用いた検討	
2.2 破砕菌体を用いた検討	
3章 <i>Brevibacterium ketoglutamicum</i> KU 1073 株を利用したデラセミ化反応	57
3.1 スクリーニングとデラセミ化能を有する新規微生物の取得	
3.2 破砕上清中の酵素の安定性	
3.3 酵素精製の試み	
3.4 MCAD1 の N-末端解析	
4章 結論	71
第2部 微生物を用いた α -アミノ酸のデラセミ化反応	
1章 デラセミ化活性を有する微生物の探索	74
2章 反応機構の解析	81
2.1 全菌体を用いた検討	
2.2 破砕菌体を用いた検討	
3章 <i>Sinorhizobium meliloti</i> ATCC 51124 株由来遺伝子を用いたデラセミ化関連酵素の大腸菌による大量発現とデラセミ化反応系の構築	91
3.1 関連遺伝子の推定とベクターの構築	
3.2 発現検討	
3.3 デラセミ化反応実現のための検討	

3.4 BCAAT 遺伝子導入大腸菌によるデラセミ化反応の実現

4章 結論	101
実験の部	103
参考文献 & 補足	151
おわりに	159

光学活性体調製の意義とその方法

1. 光学活性(キラル)とは何か

キラル(chiral)という言葉はギリシャ語の「手」を意味する「cheir」という言葉に由来する。語源的にも関係があり、また最も身近な例であることから、有機化学の解説書には右手と左手を例に挙げて説明していることが多い。

原子と原子が sp^3 混成によって結合をつくる時、化合物は三次元的な構造を持つために、化合物の中にはそれ自身と、それを鏡に映した形の分子(鏡像体)とが重ね合わせることができない構造を有するものがある。このような化合物をキラルであるという。例えば、炭素原子に W, X, Y, Z という四つの異なる原子あるいは原子団が結合したものはキラルである。このようなキラル分子には対称性がない。化合物 A と B は互いに鏡像体であり、どうしても重ね合わせることができないので、これらの分子はキラルである。このような分子のことをお互いに鏡像異性体(エナンチオマー)という。

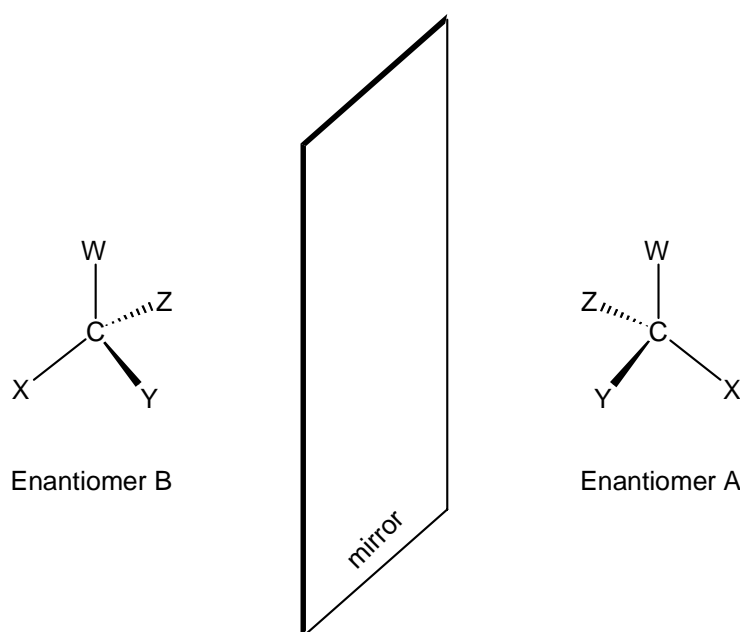


Figure 1. Concept of chirality

互いにエナンチオマーである分子は、融点やスペクトルなどの物理的性質は同じである。違っていているのは平面偏光の偏光面をどちらに回転させるかということ、つまり旋光度の符号だけである。化学的な反応性も同じであるため、両エナンチオマーを分離することは容易ではない。ところが他のキラルな化合物に対する反応性は必ずしも同じとは限らない。このことが、本異性体の最も重要

な特徴であり現在の不斉触媒化学の基礎となっている。

生物は分子レベルで見た場合でもキラルである。タンパク質を構成するアミノ酸や DNA, RNA の構成単位である核酸など、生体を構成する分子はそのほとんどがキラルである。生命は生体内の様々な化学反応によって維持されているが、それらの反応の多くはキラル化合物同士の反応ということになる。タンパク質自体がキラルであり、他の不斉分子の両鏡像体を全く別のものとして厳密に区別するため、生理活性物質や医薬品においてその効き目が鏡像体間で異なることが多いのもうなづける。このようなことから、両鏡像体を作る分けることが現在の有機化学の大きな目標であり、世界中の研究者によって盛んに研究されている分野のひとつである。

ところで、キラルになりうる化合物を化学的に合成すると、ほとんどの場合は鏡像体の等量混合物(ラセミ体)として得られる。ここから望みの一方だけを得るには複雑な分離操作が必要となる。望みとする一方のエナンチオマーだけを得る合成法を不斉合成と呼び、分子性触媒を利用する方法や生体触媒を利用する方法などいくつかのアプローチ法がある。2001年のノーベル化学賞を受賞した W.S. Knowles 博士^{1a}、野依良治教授^{1b}、および K.B. Sharpless 教授^{1c}の業績も分子性触媒を利用して一方の化合物だけを選択的に作り出す手法、触媒的不斉反応に関するものであった。

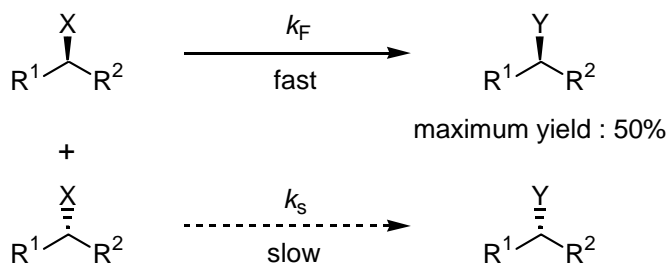
光学的な純粋さの度合は鏡像体過剰率(enantiomeric excess, ee)という尺度にてあらわされる。ラセミ体は両鏡像体の当量混合物であるため ee は $50\%-50\%=0\%$ となる。これに対し、A と B が 90:10 の割合で存在する場合には $90\%-10\%=80\%$ ee と表される。

本論文において私は、生体触媒を利用した新規な光学活性体調製法の開発について報告する。次章より生体触媒を用いた光学活性体調製のための手法について詳しく述べる。

2. 生体触媒を利用したラセミ体からの光学活性体調製法

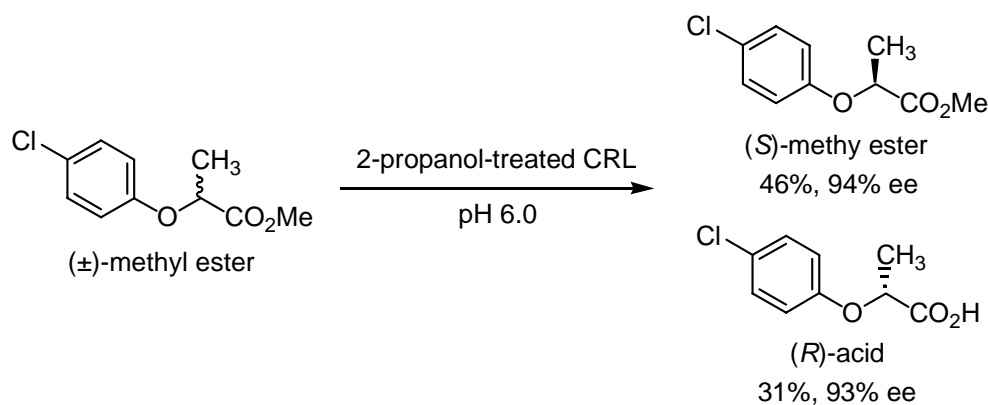
光学活性体を調製する方法には大きく分けて二つの手法が存在する。ラセミ体を光学分割する方法とプロキラル化合物に対する非対称化である。生体触媒はどちらにも利用されている²が、それぞれには長所・短所が存在する。本章ではラセミ体からの光学活性体調製法について焦点をあてる。

2.1 速度論的光学分割 (Kinetic Resolution)



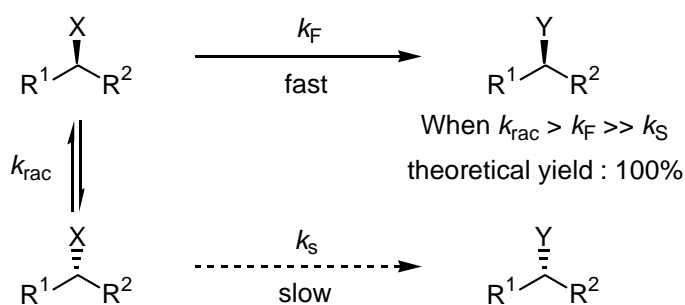
Scheme 1. Concept of kinetic resolution

ラセミ体を出発物質とし、酵素を利用して光学活性体を調製する最も一般的な方法は、速度論的光学分割³である(Scheme 1)。本法は両鏡像体を純粋な異性体として分離する技術であり、両鏡像体間に対する酵素反応の速度差を利用している。これまでに様々な構造の化合物に対する分割例が報告されている。例えば、エステル基質において、一方の鏡像体をカルボン酸へと加水分解するが、他方の鏡像体に対しては何の作用も及ぼさないといった具合である。反応条件を最適化することにより非常に高い選択性で反応を進行させる事ができれば、ほぼ光学的に純粋な両鏡像体を一挙に調製することができるという利点を有している(Scheme 2^{3d})。しかし一方の鏡像体に限って言えば、その収率は最大でも50%にとどまってしまう。もし、目的とする鏡像体がどちらか一方のエナンチオマーのみであれば、出発物質のうち半分は不必要な化合物ということとなる。また、反応の結果、出発物質がもとは違った構造の化合物へと変換されるため、反応後に生成物と未反応基質とを分離する必要性が生じる。本操作は光学分割の中で最も手間のかかる段階であるといえる。不必要な鏡像体を反応終了後単離し、化学的手法を用いてラセミ化した後再び酵素反応を行うということも行われているが、効率の良い方法とは言いがたい。そこでこれらの欠点を克服する方法として動的速度論的光学分割が登場した。



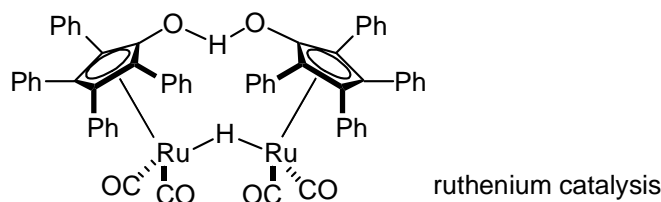
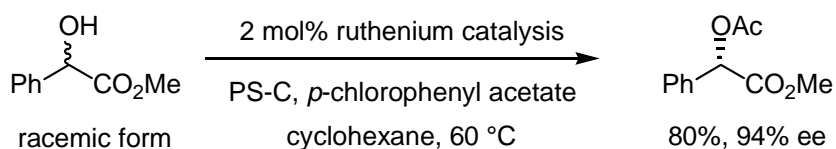
Scheme 2. Kinetic resolution of methyl 2-(4-chlorophenoxy)propanoate

2.2 動的速度論的光学分割 (Dynamic Kinetic Resolution(DKR))



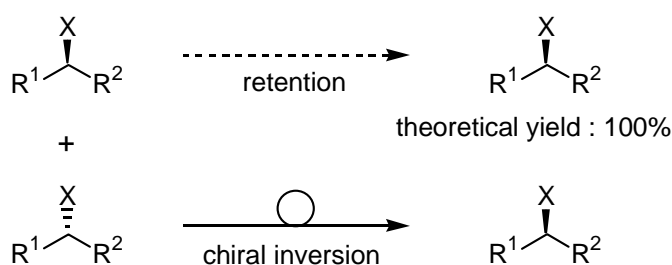
Scheme 3. Concept of dynamic resolution

動的速度論的光学分割⁴は、出発物質を反応系中にてラセミ化させながら速度論的光学分割を行なう手法である(Scheme 3)。そのため目的とする鏡像体の最大理論収率が50%を超えることがないという速度論的光学分割の欠点を克服する方法である。この場合、出発物質は反応系中にてラセミ化するが生成物はしないということが最も重要であり、反応条件および基質に対する巧妙なデザインが要求される。最も有名な例としては *Pseudomonas putida* を用いた DL-5-フェニルヒダントインからの D-フェニルグリシンの製法⁵ があげられる(Scheme 4)。しかし本法を利用することのできる基質の構造はある程度制限を受けることとなる。



Scheme 6. DKR of the α -hydroxy ester

2.3 デラセミ化反応 (Deracemization Reaction)



Scheme 7. Concept of deracemization reaction

光学分割法は非常に強力な確立された光学活性体調製法である。しかしどの方法を用いた場合にも反応の後処理段階において未反応基質と生成物の分離操作が必要となる。本段階が光学分割の中で最も煩雑な操作を必要とする。また何らかの化学的手法を利用して系中でのラセミ化を行なう必要があるため、基質と生成物の構造は必ず違っている。もしラセミ体を酵素反応に付し、その結果回収される化合物が出発物質と同様の構造を有した光学活性体であるという手法を確立できれば、出発物質と生成物の構造が同じであるため、反応後の分離操作も必要ない。原子効率も 100%である。もちろん目的とする鏡像体の理論収率も 100%である。つまりラセミ体を合成することと光学活性体を調製することが同義になる。いわば光学分割法の限界を乗り越える、究極の光学活性体調製法であるといえる。このような反応が成り立つためには、何らかの方法でラセミ体基質の一方の鏡像体の立体配置を反転させなければならない。本手法をデラセミ化反応と呼ぶ(Scheme 7)。デラセミ化反応実現のための経路として、2 種類の方法が報告されている。著者はこれらの経路を立体選択的ラセミ化反応(enantioselective racemization)と立体選択的立体反転反応(enantioselective inversion of configuration)と呼ぶ。近年デラセミ化という言葉をよく耳にするようになってきたが、本論文では、出発物質と生成物の構造が反応の前後にて全く変化しておらず、かつ反応系にて一方の鏡像体の立体が反転し他方の鏡像体へと変換される(立体反転)過程を有するものを指すこととする。生体触媒を用いたデラセミ化反応は 2 級アルコールやアミン、さらには α -置換カルボン酸などに対して適用できることが報告されている⁹。動的速度論的光学分割(DKR)では基質となりえな

かった構造の化合物に対しても反応が進行することが明らかとなっており、今後さらなる発展が予想される。

デラセミ化の特徴

反応の前後で化合物の構造が同じ

原子効率 :100%

化学収率 :100%

反応後の分離操作が必要ない

実現方法は2種類

立体選択的ラセミ化反応 (enantioselective racemization)

立体選択的立体反転反応 (enantioselective inversion of configuration)

光学分割法の欠点

収率は最大50%

出発物質と生成物の構造が違っている

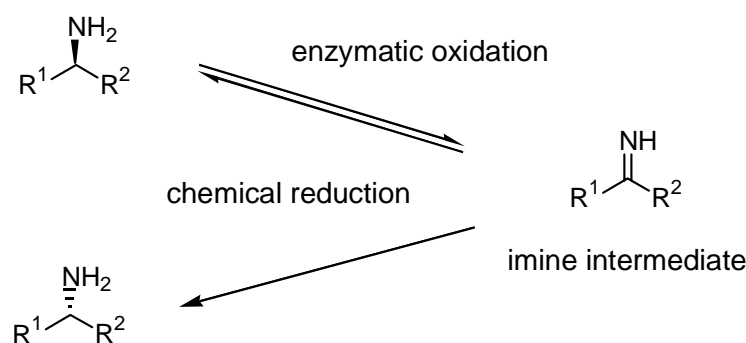
原子効率 : <100%

反応後の分離操作が必要

3. これまでに報告されている酵素的デラセミ化反応

3.1 酵素-化学的手法を用いたデラセミ化反応

酵素-化学的手法を用いたデラセミ化反応はこれまでにいくつかの報告例があり、アミン^{9,10}やアミノ酸^{9,11}に対するものが有名である。本反応では、酵素によって立体選択的に酸化され、イミンとなった中間体に対し化学的な還元剤が作用、ラセミ体の出発物質へと変換されるというものである。本過程が繰り返されることによって、最終的に光学活性体へと平衡が偏っていくこととなる (Scheme 8)。

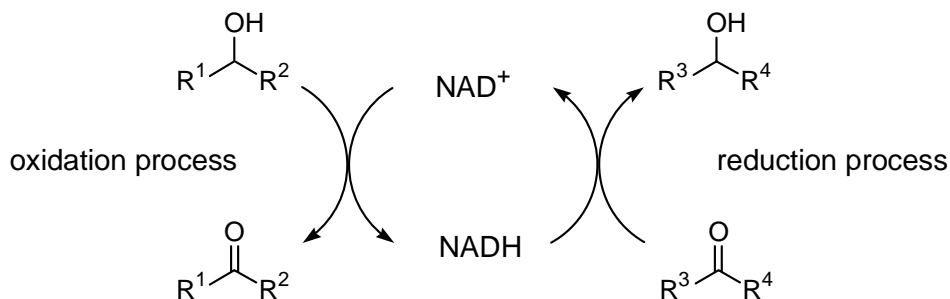


Scheme 8. Deracemization of amine by the chemo-enzymatic method

3.2 第2級アルコールに対するデラセミ化反応

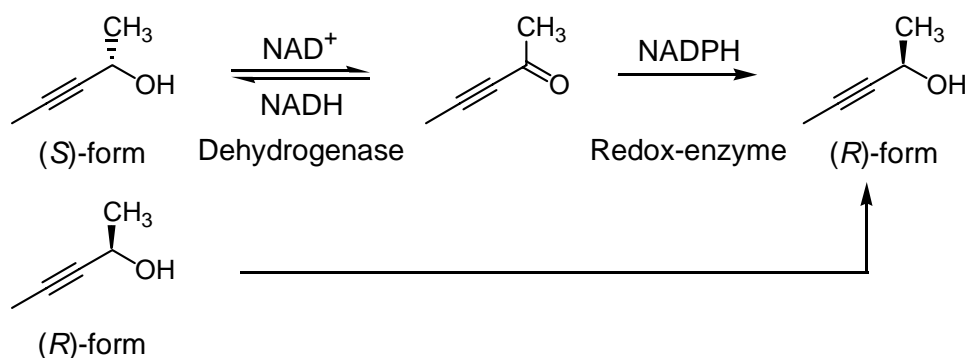
これまでに報告されている酵素的なデラセミ化反応は、すべて全菌体を利用したものである。これは菌体内における代謝経路の一部を利用した反応であることがわかっており、単一の酵素のみでは本反応が進行しないと考えられているからである。なかでも2級アルコールに対する酸化還元過程を利用した例¹²が有名である。

生体触媒を利用したプロキラルケトンに対する不斉還元はこれまでに多くの例¹³が知られている。また、ラセミ体2級アルコールに対する酸化反応を利用した分割例¹⁴も報告されている。還元反応の進行と共に還元型の補酵素は酸化型へと変換される。また酸化反応の進行にしたがい酸化型補酵素は還元型となる。各反応が効率よく進行するためには補酵素の再生を行う必要があるが、全菌体を利用した場合には再生系は自力にて構築されることとなる。つまり菌体内では酸化反応と還元反応は同時に進行するのである (Scheme 9)。



Scheme 9. Cofactor recycling system of dehydrogenase

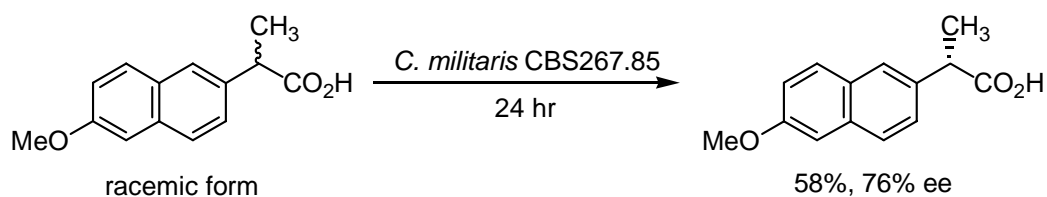
もしラセミ体基質の一方の鏡像体が選択的に酸化され、かつ得られたケトンに対しエナンチオ面選択的な還元反応が進行すると、結果的に一方の鏡像体へと偏ることとなる。本反応は立体選択的立体反転反応と表現できる。近年、Xie らはラセミ体 3-pentyn-2-ol(PYOH)に対するデラセミ化反応を報告している^{12c}(Scheme 10)。



Scheme 10. Deracemization of (±)-PYOH to (R)-PYOH catalyzed by *Nocardia fusca*

3.3 α-置換カルボン酸に対するデラセミ化反応

2級アルコールに対する酸化-還元反応を利用した例のほかに、α-アルキル置換カルボン酸に対する報告も近年なされている。*Cordyceps militaris*^{15,16}は菌類の一種であり、増殖菌体反応条件下(R)-体の2-(6-methoxy-2-naphtyl)propanoic acidを(S)-体へと立体反転する活性を有するとして1988年特許出願¹⁷された(Scheme 11)。その後、本菌株だけでなく *Verticillium lecanii* IMI32287¹⁸ およびラットの肝臓¹⁹⁻²²についても同様に立体反転活性を有することが明らかとなった。これらの場合には2-アリーールプロピオン酸誘導体の(R)-体を(S)-体へと立体反転するが、(S)-体は非ステロイド系抗炎症剤としての活性を有しているため生化学的側面からの検討が数多い。



Scheme 11.

基質特異性については Rhys-Williams らが報告¹⁵している(Table 1)。彼らは休止菌体反応条件下での検討を行っており、各種の構造を有する 2-arylpropanoic acid を(S)-体へと立体反転することを明らかにした。

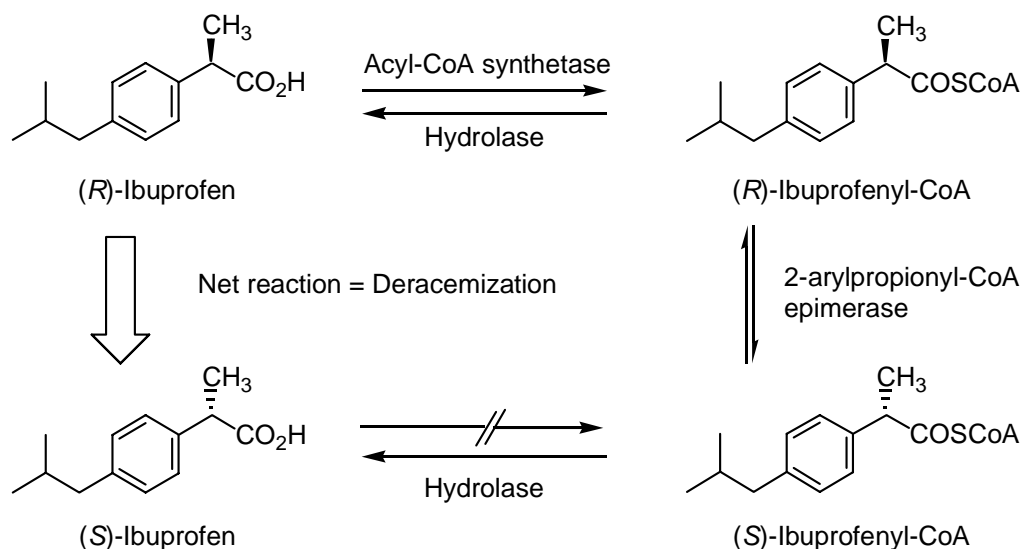
Table 1. Substrate specificity of *C. militaris* ATCC 34164

racemic form substrate concentration : 12.5 μg/mL

substrate	yield (%)	ee (%)	confg.
2-Phenylpropanoic acid	85	84	S
2-Phenylbutyric acid	quant.	28	S
Ibuprofen	66	40	S
Flurbiprofen	62	20	S
2-Phenoxypropanoic acid	quant.	100	R

反応機構についても光学活性体や重水素置換された化合物を利用した検討によってすでに明らかにされている^{16,19-22}(Scheme 12)。生体は補酵素を利用した基質の活性化を巧妙に利用し反応を実現している。具体的にはカルボン酸部分が補酵素 A にてチオエステル化され基質が活性化された後、エピメラーゼによって立体反転反応が進行、その後チオエステル部分が加水分解されるという経路である。よってデラセミ化の過程には 3 種の酵素が関与することとなる。これらの酵素中、立体反転を行う酵素エピメラーゼは可逆反応であり、またチオエステラーゼは非立体選択的に反応が進行する。ただひとつ、補酵素 A とのチオエステル化反応を触媒する酵素、アシル-CoA シンセターゼが基質の(*R*)-体のみを認識し選択的にチオエステル化するために反応の進行と共に一方の鏡像体、つまり(*S*)-体へと平衡が偏っていくこととなる。

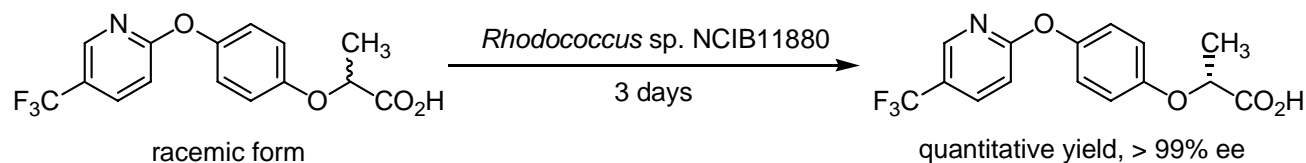
本反応は先のアルコールに対する場合とは全く違った方法にてデラセミ化が実現されている。つまりラセミ体基質のうち一方の鏡像体を活性化し、その活性化された基質がラセミ化されるというプロセスである。本手法を立体選択的ラセミ化反応と定義する。



Scheme 12. Proposed mechanism of deracemization of 2-arylpropanoic acid in rat liver

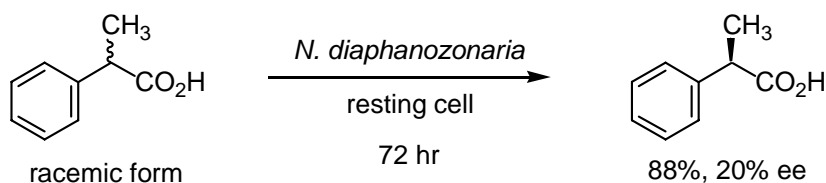
酵母を用いた(*S*)-体の 2-アリアルプロピオン酸のデラセミ化反応については、鐘淵化学工業の八十原らによって報告されている^{23a}。しかし詳細な反応機構の検討は行われていない。

また Bewick は、放線菌の一種 *Rhodococcus* sp. NCIB11880 が有するデラセミ化活性を利用した光学活性 2-アリアルオキシプロピオン酸の製法について特許出願を行った^{23b,c}。増殖菌体反応条件下、2-[4-(5-trifluoromethylpyridyl-2-oxo)phenoxy]propanoic acid の(*S*)-体が(*R*)-体へと効率よく立体反転される。*(R)*-体は除草剤や殺虫剤としての活性を示す。しかし本反応の実現経路についても明らかにされていない。



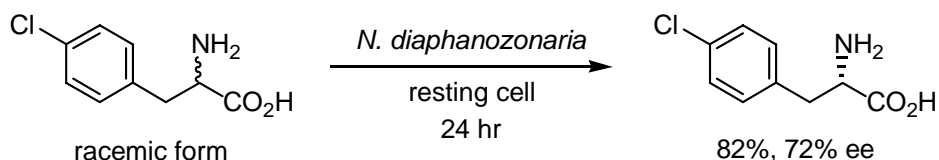
Scheme 13.

住友化学の高島らは、放線菌の一種 *Nocardia diaphanozonaria* JCM3208 株が 2-phenylpropanoic acid 誘導体に対してデラセミ化活性を有し、(*S*)-体を(*R*)-体へと立体反転することを報告した²⁴。2-phenylpropanoic acid 誘導体に関するデラセミ化反応についてはすでに上述したように菌類の一種である *C. militaris* 等を用いた例が報告されているが、これらの例ではいずれも(*R*)-体を(*S*)-体へと立体反転する活性を示すものが見出されているにとどまっており、(*R*)-体の 2-phenylpropanoic acid を効率よく調製する手法として本菌株は注目すべきものである。特許出願された反応条件では休止菌体を用いている(Scheme 14)。具体的には 100 mL の培地で 3 日間培養した菌株を集菌し、pH 7.0, 100 mM リン酸カリウム緩衝液(10 mL)に懸濁した。緩衝液にラセミ体 2-phenylpropanoic acid を 7.4 mM となるように溶解して調製した基質液(2.7 mL)に先の菌体懸濁液(0.3 mL)を加え、30 °C にて 72 時間振とう培養を行った。その結果 2-phenylpropanoic acid を収率 88%、鏡像体過剰率 20% にて回収した。



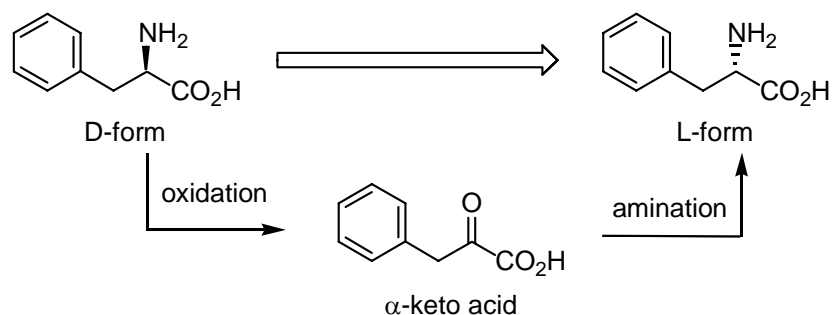
Scheme 14.

本菌株はまた、2-phenylpropanoic acid に対してだけでなく、 α -アミノ酸に対してもデラセミ化活性を示す。4-Chlorophenylalanine の(*R*)-体を(*S*)-体へと立体反転する活性を有するとして 1999 年に特許出願されている²⁵(Scheme 15)。本菌株の有するデラセミ化酵素はアミノトランスフェラーゼ阻害剤である β -chloro-D-alanine, β -chloro-L-alanine あるいはガバクリンによって阻害を受けないことより、新規な機構で反応が進行することが予想されているが、詳細な反応経路については、報告されていない。



Scheme 15.

田辺製薬の千畑らは 1965 年に phenylalanine に対してデラセミ化活性を有する微生物の探索を行い、複数の株を得たと報告している^{26a}。また、反応機構の解析からデラセミ化反応は 2 種類の酵素が関与する複合反応機構にて成立していることを明らかとした(Scheme 16)。つまり、D-アミノ酸オキシダーゼによってアミノ基が酸化されケト酸となった中間体に対して、アミノ基転位反応と還元的アミノ化反応が進行し、L-体へと立体変換されるというものである。ただし代謝反応との競合であり、収率の問題から効率的な反応とは言いがたい。



Scheme 16.

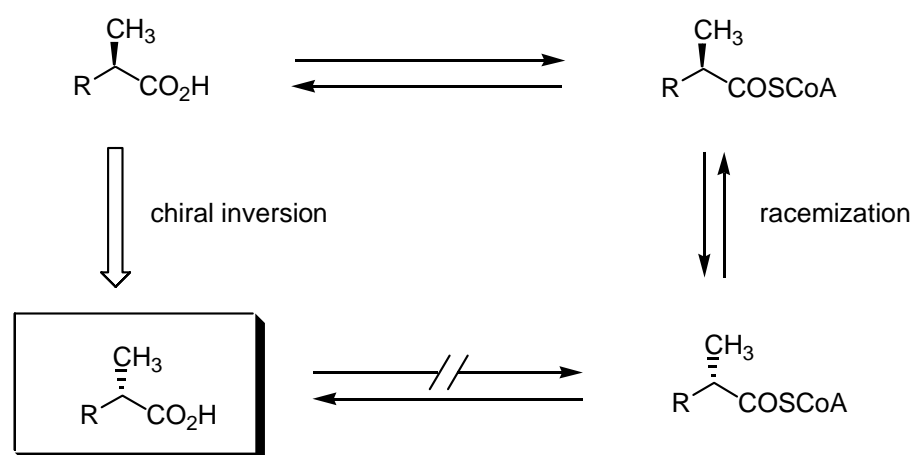
また、長谷川らはラットを用いた D-Leucine の L-体への立体反転反応について検討を行い、血液中に立体反転が進行したと考えられる L-体が蓄積することを確認した^{26b}。

単離酵素を利用した L-methionine の生産方法に関しては、1990 年に中島らが報告を行なっている²⁷。彼らは種々の微生物由来の酵素を組み合わせることによってデラセミ化反応系を構築した。具体的には、D-アミノ酸オキシダーゼとロイシンデヒドロゲナーゼ、カタラーゼおよびギ酸デヒドロゲナーゼを用いている。大変効率の良い方法であるが、基質であるアミノ酸の量が 100 μmol と小さいのが難点であった。

本論

第 1 部

微生物を用いた α -メチルカルボン酸の デラセミ化反応



Chemical yield : 100%

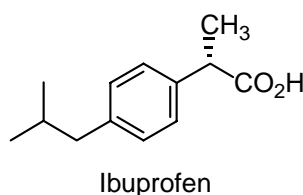
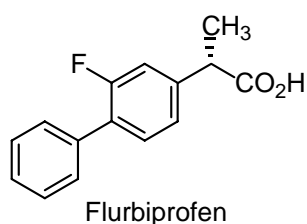
Optical yield : 100%

Enantioselective Racemization Pathway

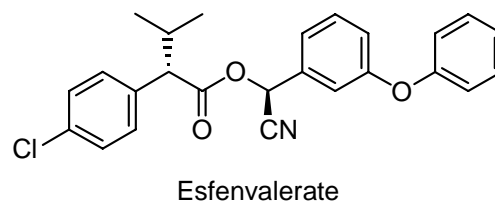
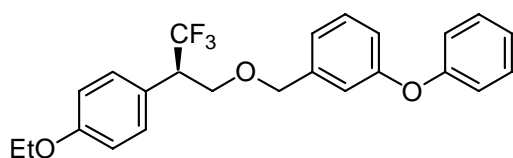
1 章

Nocardia diaphanozonaria JCM 3208 株を利用した 光学活性 α -置換カルボン酸調製法の開発

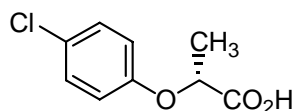
a) Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID)



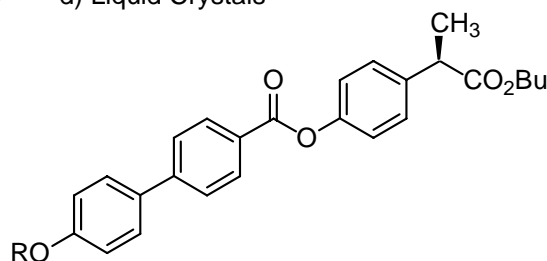
b) Pyrethroid Molecule - Insecticidal Activity



c) Herbicides or Pharmacological Activity



d) Liquid Crystals



e) Chiral Building Blocks

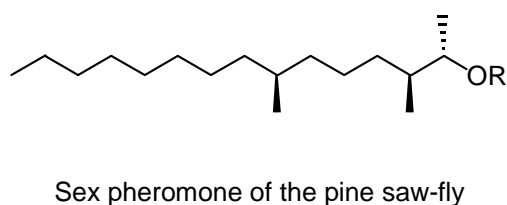
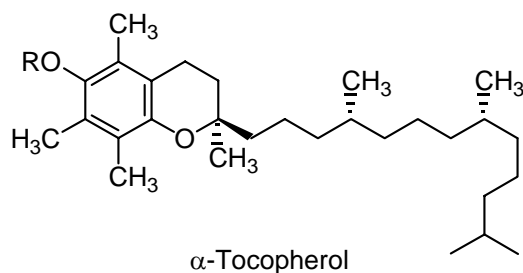
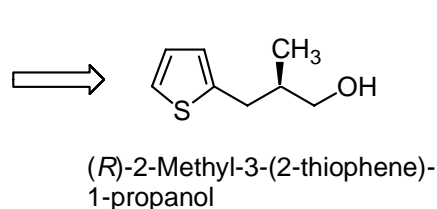
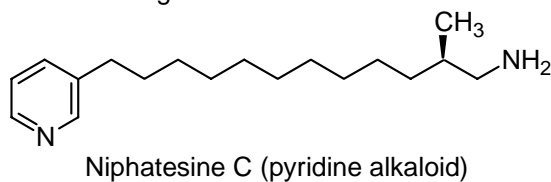


Figure 2. The synthetic application of the optically active α -methyl carboxylic acids

光学活性な α -置換カルボン酸の中には、有用な化合物が数多く存在し医薬、農薬の分野における合成原料として広く使用されている(Figure 2)。例えば光学活性な 2-arylpropanoic acid およびその誘導体は、非ステロイド系抗炎症剤²⁸やピレスロイド系殺虫剤²⁹として高い活性を有し、またカラー液晶の原料³⁰として使用されており、今後更なる需要の拡大が見込まれている。また光学活性な 2-phenoxypropanoic acid およびその誘導体は除草剤^{3d}として利用されている。ところで(R)-体 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid は血清中のコレステロール濃度を低下させ、血小板の凝集を防ぐなどの生理活性を示し、医薬品への応用も試みられている。更にカルボン酸部分をアルコールへと還元した thienylalcohol はピリジンアルカロイドなど天然物合成におけるキラルビルディングブロックとして有用である³¹。同様に 2-methylalkanoic acid は天然物合成において有用なキラルビルディングブロックとなりうる。例えば松葉蜂の性フェロモンや α -tocopherol (Vitamine E)中にその構造を見出すことができる³²。

以上のように α -置換カルボン酸の両鏡像体を作り分けることは有機合成的見地から見た場合非常に有用であることが分かる。(S)-体の 2-phenylpropanoic acid 誘導体の調製については *C. militaris* 等を用いたデラセミ化反応を利用することができるが、(R)-体の調製については有用なデラセミ化反応は見つかっていない。もし、(R)-体へと立体反転する菌体を得ることができれば、目的に応じて両鏡像体を作り分けることができるようになり、酵素学的な新規性を有するだけでなく有機合成的な観点からも意義のあるものとなる。序論において *N. diaphanizonaria* JCM 3208 株が 2-phenylpropanoic acid を(R)-体へとデラセミ化する活性を有することを述べたが、得られる生成物の鏡像体過剰率は十分とはいえない。そこで本菌株を用いたデラセミ化反応の最適条件検討を行い、新たな光学活性体調製法の確立を試みることにした。

1.1 反応条件最適化

N. diaphanozonaria の生育を濁度によって測定した曲線が Figure 3 である。遅滞期が長いのが特徴である(condition 1)。そのためにあらかじめ 48 時間培養し、すでに定常期にある菌体に培地を加え 10 倍希釈したものを用いた場合の測定を行った(condition 2)。その結果培養開始後 2 時間後には対数増殖期に入り 15 時間後に最も菌体数が多くなることが観察された。その後ゆっくりと定常期、死滅期を迎えた。また、100 mL の培地にて 48 時間培養した際の菌体量および菌体数はそれぞれ 26 g/L および 1.3×10^{10} / mL であった。

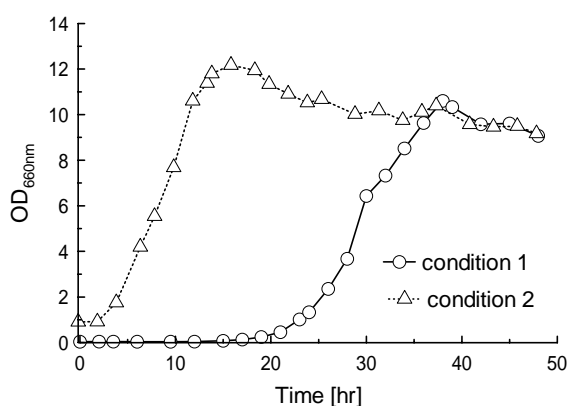


Figure 3. The change of OD value

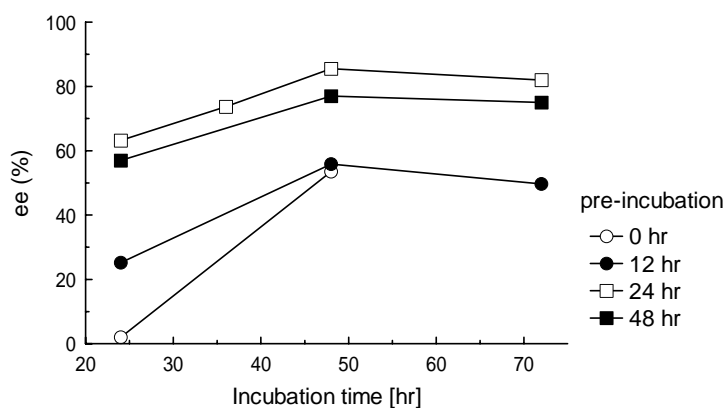


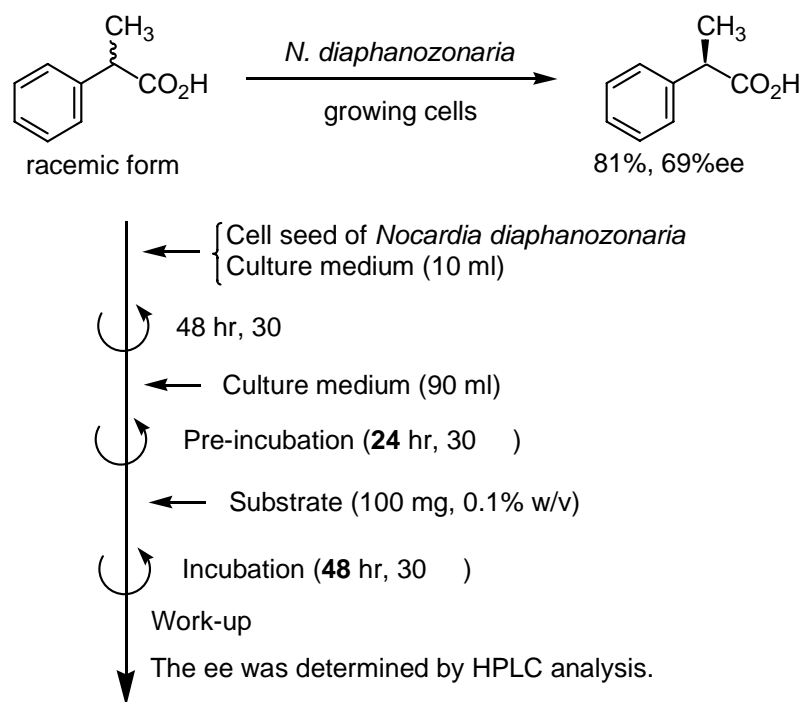
Figure 4. Optimization of the reaction conditions

菌体がどのような様相の際に最も効率の良いデラセミ化が進行するかについての検討を行った。基質としては 2-phenylpropanoic acid を用いている。基質を加える前後の培養時間を様々に変化させたグラフが Figure 4 である。

48 時間培養を行い定常期にある菌体に培地を加え 10 倍希釈したものに対しある時間培養を行い (前培養)、基質であるラセミ体 2-phenylpropanoic acid を濃度が 0.1% となるように加えた後、さらに

振とう培養(本培養)を行った。その結果、前培養時間に関係なく、本培養時間が 48 時間を経過するまでは生成物の鏡像体過剰率(ee)は上昇した。しかし、その後 ee は低下することが観察された。前培養時間としては 24 時間が最も良い結果を与えた。

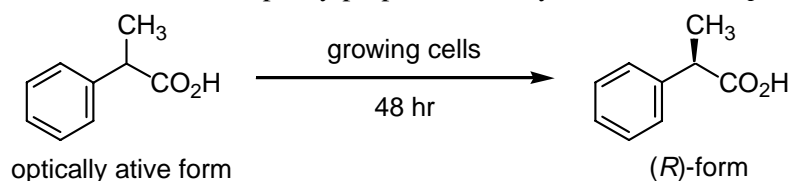
以上の検討より、ラセミ体の 2-phenylpropanoic acid を基質とし、増殖菌体を用いた場合の最適反応条件を以下のように決定した(Scheme 17)。つまり、前培養時間 24 時間、本培養時間 48 時間である。最適反応条件下 2-phenylpropanoic acid は収率 81%、鏡像体過剰率 69%にて(*R*)-体($[\alpha]_D^{24} -71.3$ (*c* 1.03, EtOH), lit.³³ $[\alpha]_D -96$ (*c* 1.1, EtOH); (*R*))が得られることを確認した。ところで、デラセミ化反応では出発物質と生成物の構造が同じである。そのため本論文にて用いる収率とは、反応の結果どの程度化合物を回収できたかという度合い、つまり回収率のことを示している。



Scheme 17.

先に本培養時間を 48 時間以上とすると生成物の鏡像体過剰率が低下することは述べた。このようなことが観察される理由として培養時間を延長することによる副反応の進行が考えられる。つまり増殖菌体を利用するため望むデラセミ化反応以外にも様々な反応が進行し、その結果、生成した (*R*)-体 2-phenylpropanoic acid が選択的に代謝分解されるということである。実際反応時間の延長によって生成物の収率も著しく低下することが確認された。そこで更なる生成物の鏡像体過剰率の上昇を狙い、本培養時間 48 時間にていったん反応を停止し、単離した生成物に対し再び同じ培養条件下反応を試みた(Table 2, entry 1 to 2)。しかし予想に反し 2 段階目の鏡像体過剰率は 1 段階目のそれと大きな差がなかった。さらに、光学活性な 2-phenylpropanoic acid を調製し、両鏡像体による反応の進行の違いを検討した。93%ee の(*S*)-体から出発した場合、48 時間培養後には生成物の鏡像体過剰率は 50%、(*R*)-体にまで上昇した(entry 3)。興味深いことに 88%ee、(*R*)-体から出発した場合にも生成物の鏡像体過剰率は出発物質のそれよりも低下し 70%、(*R*)-体を得ることが判明した(entry 4)。

Table 2. Deracemization of 2-phenylpropanoic acid by the aid of *N. diaphanozonaria*^a



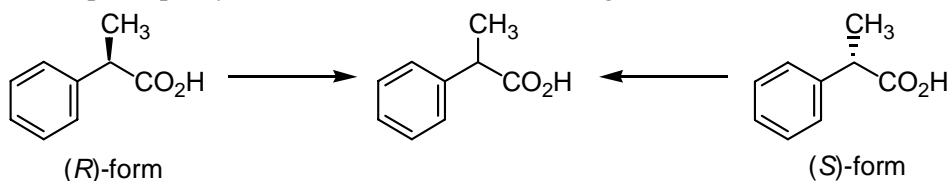
entry	ee of substrate (%) ^b	yield (%) ^c	ee (%) ^b
1	racemic	81	69
2	69 (<i>R</i>)	52	62
3	88 (<i>R</i>)	58	72
4	93 (<i>S</i>)	48	52

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C.

^b Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester.

以上の結果より、本菌株を用いたデラセミ化反応は可逆反応、平衡反応であることが考えられる。もし平衡反応であるとする、基質の濃度によって反応は影響を受けるものと予想される。そこで、基質の濃度を変化させた検討を行った(Table 3)。

Table 3. Effect on optical purity and concentration of the starting material on the deracemization reaction^a



entry	ee of substrate (%) ^b	conc. (mM)	yield (%) ^c	ee (%) ^b	config.
1	racemic	6.7	81	69	<i>R</i>
2		13.3	79	65	<i>R</i>
3	88 (<i>R</i>)-form	3.3	59	50	<i>R</i>
4		6.7	58	72	<i>R</i>
5		13.3	72	90	<i>R</i>
6	93 (<i>S</i>)-form	3.3	68	47	<i>R</i>
7		6.7	48	52	<i>R</i>
8		13.3	74	19	<i>S</i>

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C.

^b Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester.

具体的には反応を最適化した際の基質の濃度(6.7 mM)に対し 2 倍(13.3 mM)および 0.5 倍(3.3 mM)にて検討を行った。その結果を Table 3 に示す。基質としてはラセミ体のほか、両鏡像体を選択した。ラセミ体については高濃度においても反応が進行していることがわかる(entry 1, 2)。(R)-体につ

いては低濃度では収率および鏡像体過剰率の低下が観察され、代謝反応の進行が観察された(entry 3)。一方高濃度では反応は全く進行していないことが判明した(entry 5)。これに対し(*S*)-体については共に反応は進行することが確認された(entry 6, 8)。以上のことから(*R*)-体は高濃度となるとデラセミ化酵素に対して阻害を示すことが明らかとなった。

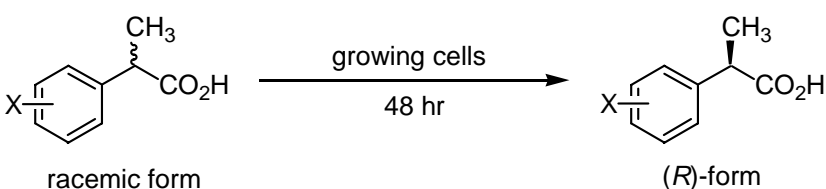
1.2 基質特異性の検討

1.1 にて最適化した条件(Scheme 17)下で、各種構造を有する基質に対する反応性の比較を行った。以下に示すように本酵素の基質特異性は非常に狭く、限られた構造の化合物についてのみ反応の進行が確認されるにとどまっているが、基質の構造の違いによって、立体選択性の逆転が観察されるなど興味深い知見を得ることができた。

1.2.1 2-Substitutedphenylacetic acid 誘導体

2-Phenylpropanoic acid は高い立体選択性にてデラセミ化反応が進行した。そこで本化合物の芳香族環上に様々な置換基を導入した化合物について検討を行った。

Table 4. Substrate specificity of *N. diaphanozonaria*^a



entry	X	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	4-isobutyl	85	9
2	3-fluoro-4-phenyl	99	6
3	2-chloro	59	9
4	3-chloro	62	4
5	4-chloro	61	11
6	4-methoxy	60	4
7	4-fluoro	35	10

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

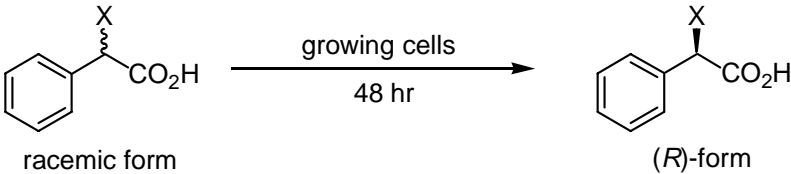
結果を Table 4 に示した。芳香族環上に置換基が導入されると本微生物の有するデラセミ化関連酵素の基質特異性からはずれることが確認された。これは *C. militaris* においては幅広い置換基が許容されるのとは対照的な結果である。*p*-位に水素原子と同程度の原子半径を有するフッ素原子を導入した化合物でも反応はほとんど進行していない(entry 7)。このことから本反応を触媒する酵素は、2-phenylpropanoic acid の芳香族環上置換基の静電的な影響を強く受けることが判明した。

次にカルボニルの α -位置置換基に関する検討を行った(Table 5)。メチル基よりも嵩高いエチル基、ヒドロキシメチル基およびメトキシ基とした場合には反応はまったく進行せず、ラセミ体を回収するにとどまった。そこでメチル基よりも立体的に小さな置換基であるフルオロ基あるいはクロル基について検討を行った。フルオロ基について反応は進行し、生成物の収率は 74%、鏡像体過剰率は

55%、(R)-体を得た。このことからカルボニルの α -位置換基はメチル基と同程度かそれよりも小さな必要があるものと考えられる。

クロロ基は立体的な嵩高さがメチル基と同程度であるため、反応の進行が期待された。しかし目的とするデラセミ化ではなく、マンデル酸および安息香酸を回収する結果を得た。特に注目すべきは得られたマンデル酸がほぼ光学的に純粋な(R)-体であったということである。コントロールとして、培地中に α -chlorophenylacetic acidのみを加え48時間振とう培養行ったところ、塩素原子が水分子によって置換したと考えられるマンデル酸を得ることとなった。つまり α -chlorophenylacetic acidは反応系中にて非酵素的にマンデル酸へと変換され、そのマンデル酸が菌体によって立体選択的に代謝されたものと考えられる(Scheme 18)。マンデル酸誘導体に関する検討については後述する。

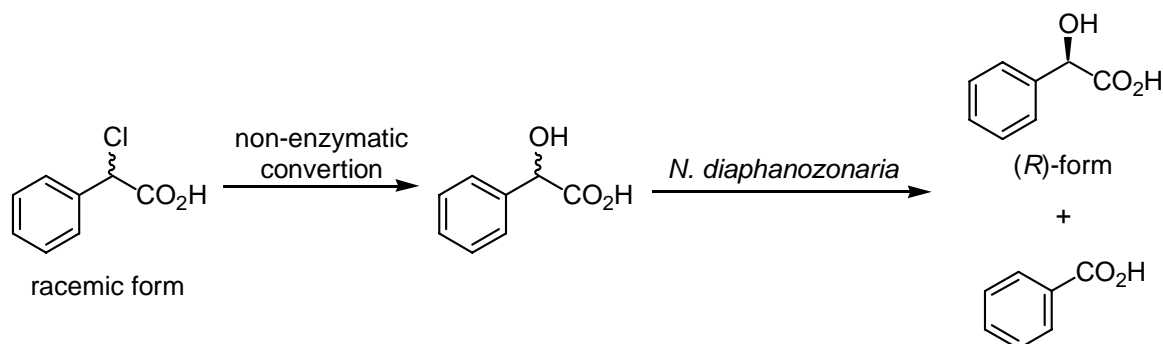
Table 5. Substrate specificity of *N. diaphanozonaria*^a



entry	X	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	C ₂ H ₅	77	racemic
2	CH ₂ OH	76	racemic
3	OMe	85	racemic
4	F	74	55
5	Cl	metabolism	

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C.

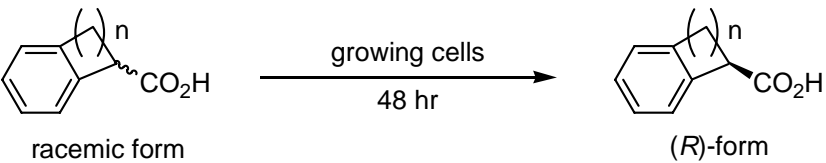
^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.



Scheme 18.

これまでに推定されているデラセミ化の反応経路では、ラセミ化が起こる際、エノール型中間体を経由して反応が進行する²²。本中間体を安定化させる要因としてはいくつか考えることができる。一つは芳香族環上に電子求引性の置換基を導入する方法、もう一つは基質のコンフォメーションを平面上に固定する方法である。このうち前者はすでに検討を行っており、基質特異性から外れることが明らかとなっている。そこで後者からのアプローチを試みることにした。メチル基と芳香族環のオルト位を環にて固定することによって平面構造をとりやすくし反応を試みた。しかし環のサイズを 4, 5, 6 員環とした環状 2-phenylpropanoic acid 誘導体においてデラセミ化反応はほとんど進行しないことが判明した(Table 6)。

Table 6. Substrate specificity of *N. diaphanozonaria*^a



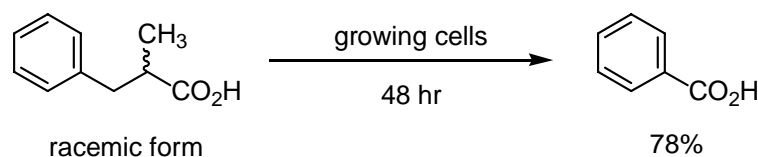
entry	n	ring size	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	1	4	65	racemic
2	2	5	70	12
3	3	6	58	9

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

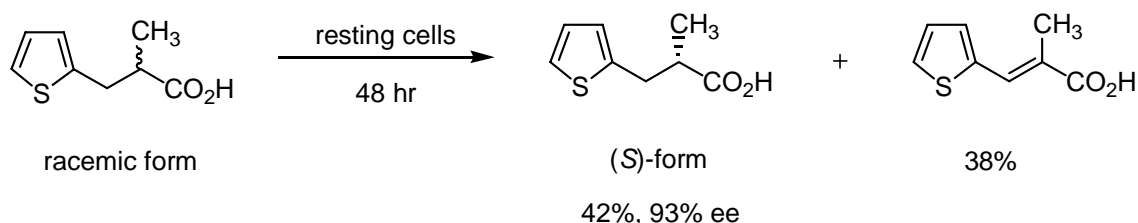
1.2.2 2-Aryloxypropanoic acid 誘導体

2-Phenylpropanoic acid の芳香族置換基と不斉中心の間にメチレンを挿入した化合物、2-methyl-3-phenylpropanoic acid を合成し、本化合物を基質とした検討を行うことにした。しかし、代謝反応が優先して進行したと考えられる安息香酸を回収した(Scheme 19)。代謝産物が安息香酸であることは¹H-NMR、IRの各種スペクトルデータおよびHPLCによる溶出挙動により確認を行った。



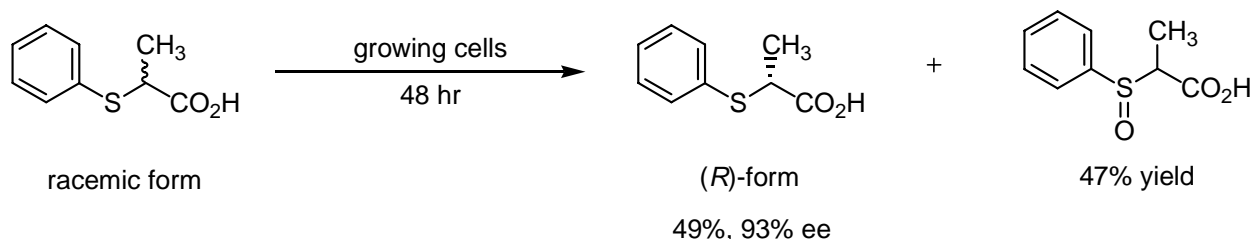
Scheme 19.

また芳香族環を 2-チエニル基とした場合には α,β -不飽和体が生成し、未反応の基質は高い鏡像体過剰率を示した。この際には、2-methyl-3-phenylpropanoic acid の場合とは異なり 2-thienylcarboxylic acid は確認されなかった。代謝産物の α,β -不飽和体は ^1H -、および ^{13}C -NMR、IR の各種スペクトルデータおよび HPLC による溶出挙動により確認を行った。



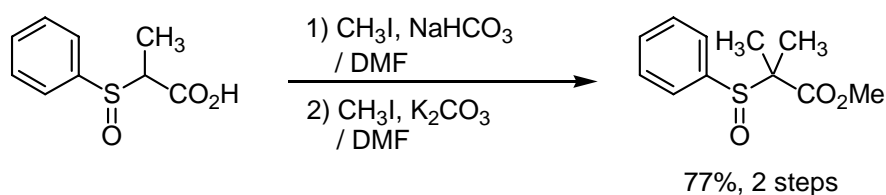
Scheme 20.

次にメチレンに変わって、ヘテロ原子を挿入した化合物について検討を行うこととした。ヘテロ原子としては硫黄原子を選択した。硫黄原子を挿入した化合物、2-phenylthiopropanoic acid に対して反応を行ったところ収率 49%、鏡像体過剰率 93% で (*R*)-体を得た ($[\alpha]_D^{23} +145.7$ (c 1.02, EtOH))。後処理の段階にて TLC 分析を行ったところ、目的とする生成物の他に非常に極性の高い化合物が生成しているのを確認した。これは硫黄原子が酸化反応を受けスルホキシドへと変換された化合物であった (Scheme 21)。

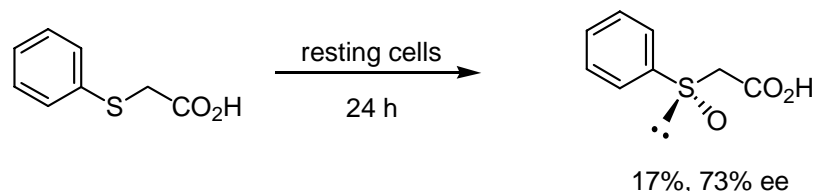


Scheme 21.

本化合物は 2 つの不斉点を有するため、4 種の異性体が存在しうる。2-Phenylthiopropanoic acid より誘導したスルホキシド体との比較を行ったところ、反応生成物中には *syn* 体と *anti* 体が 1:1 の割合で存在していることが確認された。代謝反応を受けずに回収された 2-phenylthiopropanoic acid の収率および鏡像体過剰率より、立体の識別が行われていることは明らかである。そこで、硫黄原子上への酸化反応の立体選択性を検討した。Scheme 22 に示すように化合物を変換し、スルホキシドの立体配置について検討を行った結果、酸化反応は非立体選択的に進行していることが判明した。これは、phenylthioacetic acid を基質とした際の硫黄原子上の酸化反応が立体特異的に進行することとは対照的な結果であり、大変興味深い (Scheme 23)。しかし、本反応の進行速度は大変遅く、24 時間の反応の後に得られたスルホキシド体は 17%にとどまり、原料回収は 80%であった。

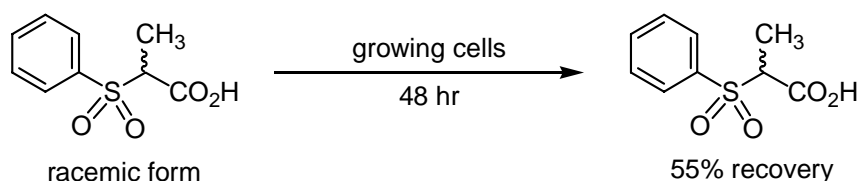


Scheme 22.



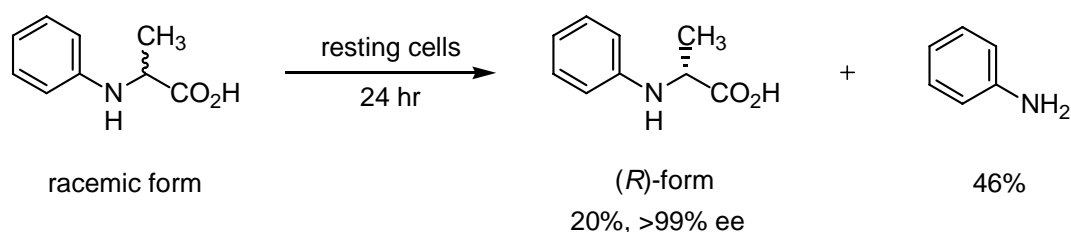
Scheme 23.

硫黄原子に対する酸化が完全に進行したスルホン体は反応系中には全く生成していないことを確認している。スルホン体についても本菌株は基質として認識し、デラセミ化反応が進行するのか検討を行った。しかし反応は進行せずラセミ体を回収するにとどまった。よってスルホン体は基質特異性より外れていると言える(Scheme 24)。



Scheme 24.

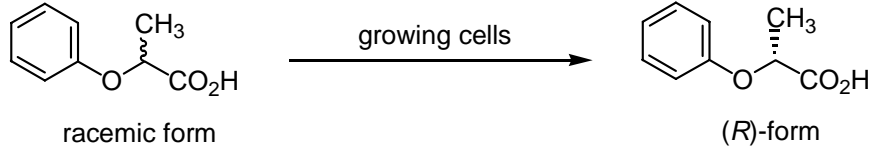
次に硫黄原子に代わり、窒素原子が導入された化合物について検討を行った。この場合にも立体選択的な代謝反応が進行し、光学的に純粋な(*R*)-体と、アニリンを回収した(Scheme 25)。アニリンは、acetanilide へと変換することによって確認した。



Scheme 25.

次に酸化反応を受けにくい酸素原子を選択した。2-Phenoxypropanoic acid を基質としたところデラセミ化反応は進行し、48 時間後の生成物の収率および鏡像体過剰率はそれぞれ 75%、75%、(*R*)-体($[\alpha]_D^{21} +41.0$ (c 0.71, EtOH))であった(Table 7, entry 2)。代謝反応の進行は確認されていない。

Table 7. Substrate specificity of *N. diaphanozonaria*^a



entry	time (hr)	yield (%) ^b	ee (%) ^c	[α] _D
1	24	68	50	
2	48	75	75	+41.0 (c=0.71, EtOH)
3	60	66	91	
4	72	71	97	+41.2 (c=0.58, CHCl ₃)
5	84	54	86	

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

2-Phenoxypropanoic acid のカルボキシル基の α -位メチンプロトンの酸性度は 2-phenylpropanoic acid のそれと比較すると低い。このことは、 α -メチンプロトンが引き抜かれた際に生じるエノール型中間体の安定性が低いことを示している。よって反応速度の低下が予想された。そこで反応時間を延長し、更なる鏡像体過剰率の上昇を試みた。期待通り、反応時間を 72 時間にまで延長すると鏡像体過剰率は 97%にまで上昇した一方で、2-phenylpropanoic acid の場合と同様にそれ以上の延長は生成物の収率および鏡像体過剰率の低下をもたらした。

更に驚くべきことには、生成物の比旋光度の符号による絶対立体配置の決定(lit.³⁴ [α]_D²⁵ +41.2 (c 0.76, CHCl₃); (R))を行ったところ、得られた化合物の立体配置はリガンドの空間的配置でみると 2-phenylpropanoic acid とは逆転していることが判明した。基質によって立体反転される鏡像体の逆転が観察されることはこれまでのデラセミ化反応においては報告がなく大変興味深い。

次に芳香族環上の *p*-位に様々な置換基を導入した化合物を調製し、反応を試みた。その結果を Table 8 に示す。反応時間は 48 時間で一定としている。注目すべきはハロゲン原子を含む置換基を有する化合物を基質とした場合であり、非常に高い選択性にて反応が進行している(entry 2-6)。これに対し、電子供与性の置換基であるメチル基の場合(entry 7)には 90%ee と多少の低下が、さらに高い電子供与能を有するメトキシ基(entry 8)に関しては 44%ee を示す結果にとどまった。これは電子押し出し効果によって α -位メチンプロトンの酸性度が低下し、反応速度が小さくなったためであると予想している。よって反応時間を延長することによって生成物の鏡像体過剰率は上昇するものと期待される。これに対して、電子求引能の大きなアセチル基を有する化合物を基質とした場合(entry 9)、あるいはヒドロキシル基を有する化合物(entry 10)についてはラセミ体を回収するにとどまった。解離性のプロトンを持つ場合には反応の進行が阻害されるようである。また芳香族環の置換基をフェニル基ではなくナフチル基とした場合にもある程度の選択性をもって反応は進行することが確認された(Scheme 26)。

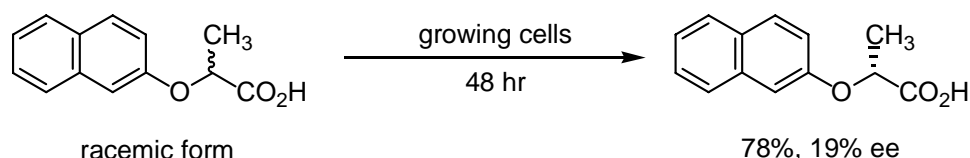
Table 8. Substrate specificity of *N. diaphanozonaria*^a

growing cells
48 hr

racemic form reaction time : 48hr (R)-form

entry	substitution (X)	yield (%) ^b	ee (%) ^c	[α] _D (EtOH)
1	H	75	75	+41.0
2	F	64	96	+52.0
3	Cl	95	97	+44.5
4	Br	83	99	+47.5
5	I	76	97	+43.4
6	CF ₃	64	99	+43.3
7	CH ₃	69	90	+53.3
8	OMe	83	44	+34.0
9	COMe	59	racemic	-
10	OH	79	racemic	-

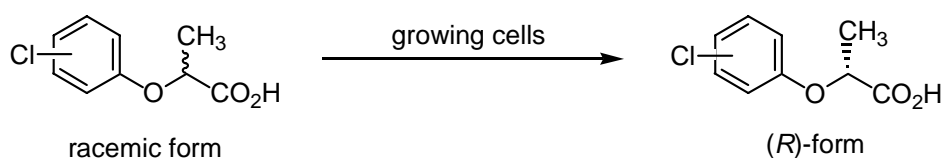
^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C. ^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.



Scheme 26.

次に、*p*-位にクロロ原子を有する 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を基質とした場合に反応時間の最適化を行うこととした(Table 9, entry 3-5)。その結果本培養開始 12 時間後にはすでに 92% ee にまで反応が進行しており、24 時間後には平衡に達していることが明らかとなった。2-Phenylpropanoic acid と比較して本化合物の α -位メチンプロトンの酸性度は小さいと予想されるにもかかわらず、平衡に達するまでの時間は短くなっている。これは単純にカルボニルの α -位メチンプロトンの酸性度によって反応速度の議論ができないことを示している。つまり反応の律速はメチンプロトンの引き抜き段階ではないことを示唆するものである。

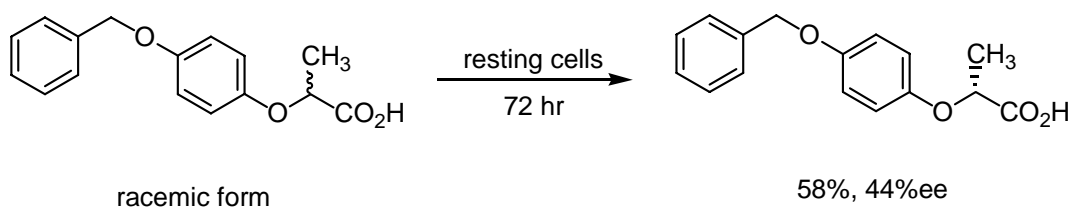
次に *p*-位ではなく *o*-位あるいは *m*-位にクロロ原子を有する化合物を基質とした検討を行った (entry 1, 2)。その結果反応は全く進行せずほぼラセミ体を回収するにとどまった。本酵素の基質特異性は非常に高い。ところで、*p*-位に大変嵩高い置換基である benzyloxy 基を導入した化合物では、反応速度は落ちるものの、デラセミ化が進行していることを確認している(Scheme 27)。このことは芳香族環の *p*-位置換基の嵩高さについてはある程度の自由度が許されることを示しているといえる。

Table 9. Substrate specificity of *N. diaphanozonaria*^a

entry	substrate	time (hr)	yield (%) ^b	ee (%) ^c	$[\alpha]_D(c, \text{EtOH})$
1	2-Cl	48	61	17 (S)	-1.0 (c=0.98)
2	3-Cl	48	73	21 (R)	+2.1 (c=1.17)
3	4-Cl	12	75	92 (R)	
4		24	67	97 (R)	
5		48	95	97 (R)	+44.5 (c=0.94)

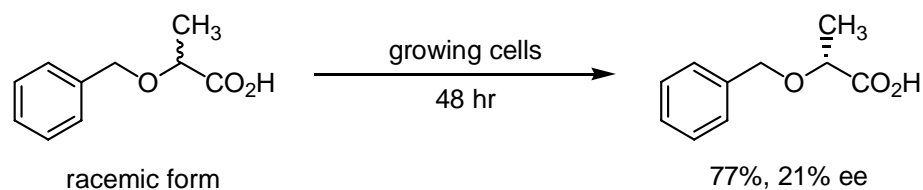
^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

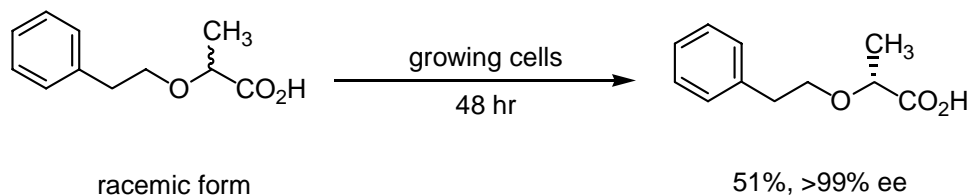
**Scheme 27.**

1.2.3 O-Protected lactic acid 誘導体

2-Aryloxypropanoic acid に対して大変高い立体選択性にてデラセミ化反応が進行することを確認できたため、次に 2-benzyloxypropanoic acid に対して検討を行うこととした(Scheme 28)。反応の結果収率 77%、鏡像体過剰率 21% で(R)-体($[\alpha]_D^{21} +18.1$ (c 1.5, CHCl₃), lit³⁵ $[\alpha]_D +151$ (c 1.5, CHCl₃); (R))を得られたが、満足のいく結果ではない。これは本酵素群が、不斉炭素周りのみを認識しているだけでなく基質全体を認識し、反応を行なっていることを強く示すものである。

**Scheme 28.**

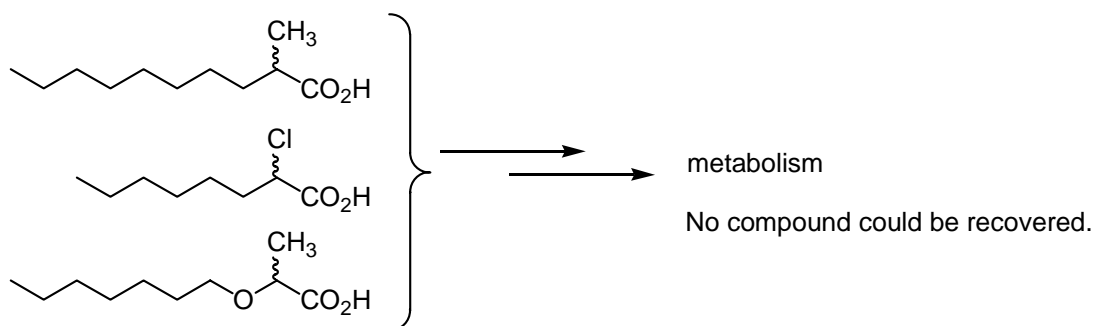
さらにメチレン鎖を延長した 2-(phenylethyloxy)propanoic acid では立体選択的代謝反応が進行し、収率 50%でほぼ光学的に純粋な(*R*)-体が回収された。この際、対応する(*S*)-体が代謝反応を受けたと考えられる安息香酸の生成を確認している。つまり、デラセミ化反応は進行していない(Scheme 29)。



Scheme 29.

1.2.4 2-Alkylpropanoic acid 誘導体

これまでは芳香族環を有する化合物についての検討を行ってきたが、更なる基質特異性の拡張を目指しアルキル鎖を有する α -置換カルボン酸に対する検討を試みることにした。基質としては Scheme 30 に示すような構造を有する化合物を選択した。2-Methyldecanoic acid については反応終了時には完全に代謝分解され、基質あるいは代謝産物と見られる化合物を回収することはできなかった。そこで α -位にメチル基ではなくクロロ基を有する 2-chlorooctanoic acid あるいは β -酸化を防ぐためにカルボニルの β -位に酸素原子を挿入した 2-heptanoxypropanoic acid を選択し反応を行った。しかし予想に反し生成物を回収することはできなかった。



Scheme 30.

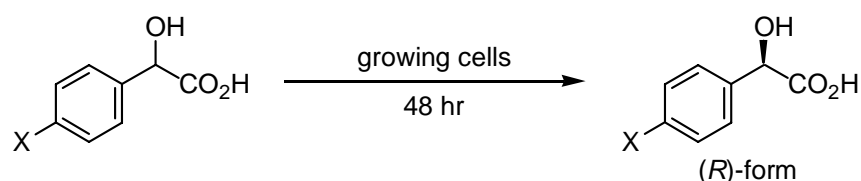
1.2.5 Mandelic acid 誘導体

α -Chlorophenylacetic acid を用いた検討において予想外の反応が進行し、光学的に純粋なマンデル酸と安息香酸が回収されたことを述べた。そこでマンデル酸に対する検討を行うことにした(Table 10)。ラセミ体のマンデル酸を基質とした場合には予想したとおり、光学的に純粋な(*R*)-体のマンデル酸と安息香酸が得られた(entry 1)。収率が 50%程度であることから、立体選択的な代謝反応が進行していると予想される。そこで両鏡像体に分けて反応を行った。その結果、(*R*)-体を出発物質とした際にはほぼ定量的に原料が回収されたのに対し、(*S*)-体の場合にはほとんどが代謝され安息香

酸へと変換していることが確認された(entry 2, 3)。

次に *p*-位にクロロ原子あるいはメトキシ基を有するラセミ体マンデル酸誘導体を基質とした検討も行った(entry 4, 5)。その結果、予想通り立体選択的代謝反応が進行し、光学的に純粋な(*R*)-マンデル酸誘導体と、(*S*)-体が選択的に代謝されて生じたと考えられる安息香酸誘導体を得た。ここで興味深いことには、芳香族環上に置換基を有している場合には、2-phenylpropanoic acid 誘導体の際に基質特異性から外れていたにもかかわらず、マンデル酸誘導体については反応が進行していることである。このことよりマンデル酸誘導体の代謝反応にはデラセミ化を触媒するのとは違った酵素系が関与しているものと予想される。

Table 10. Enantioselective degradation of mandelic acid^a

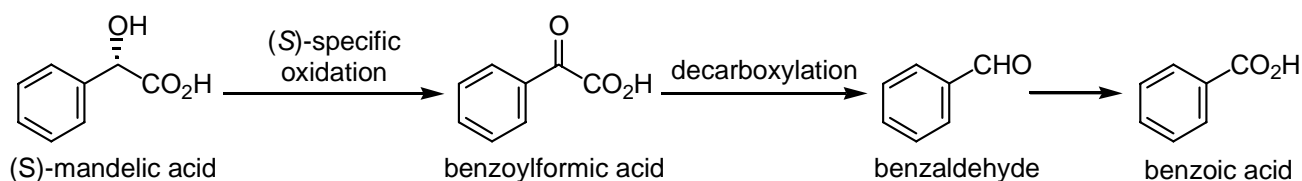


entry	X	starting comp.	yield (%) ^b	ee (%) ^c	metabolic product
1	H	racemic	45	> 99	benzoic acid
2	H	<i>R</i> , > 99% ee	84	> 99	-
3	H	<i>S</i> , 83% ee	34	23 (<i>S</i>)	benzoic acid
4	Cl	racemic	43	> 99	4-chlorobenzoic acid
5	OMe	racemic	38	> 99	4-methoxybenzoic acid

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

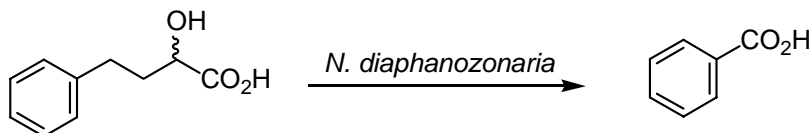
マンデル酸の代謝反応には Halpin らの mandelate pathway が有名である³⁶。しかし本菌株の場合、マンデル酸のラセミ化は観察されていない。よって *N. diaphanozonaria* はマンデル酸ラセマーゼ活性は有していないと考えられ、その結果として立体選択的酸化反応のみが進行したと考えられる。今回と同じことは、宮本らによる *Alcarigenes bronchisepticus* を用いた検討³⁷でも報告されている。彼らは(*S*)-体のマンデル酸に特異的な酸化酵素が関与することによるベンゾイルギ酸の生成、脱炭酸反応を経てベンズアルデヒド、引き続き安息香酸への酸化という反応経路を提示している (Scheme 31)。本反応をアルゴン雰囲気下にて行なうと、立体選択性ならびに反応速度は著しく低下する。このことは本反応を触媒する酵素がオキシダーゼである可能性を強く示している。



Scheme 31.

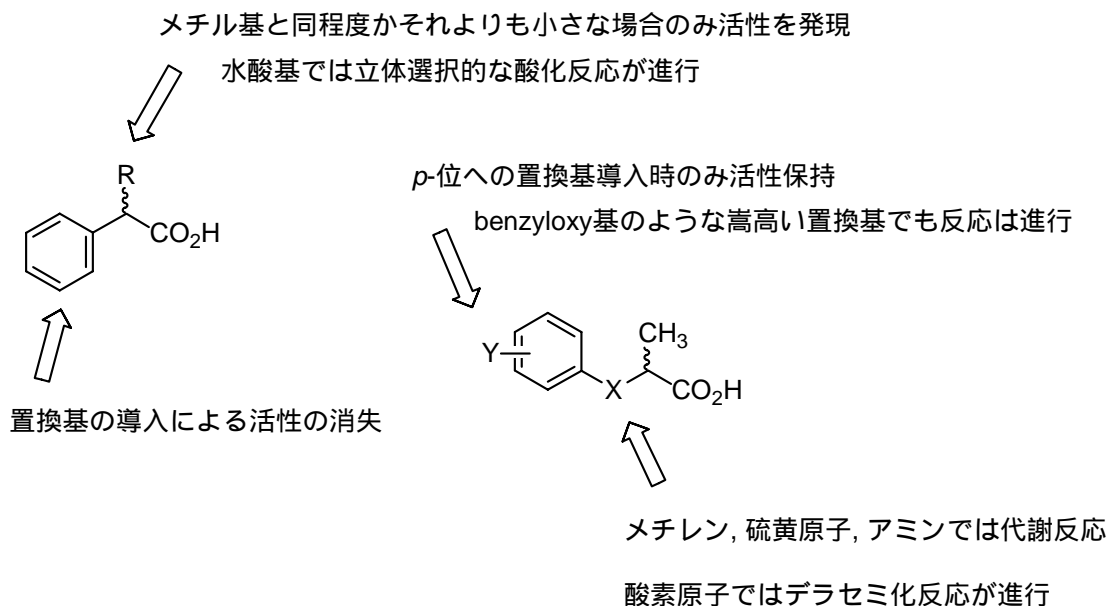
本反応はデラセミ化反応ではないが、非常に高いエナンチオ選択性にて反応が進行することより今後光学活性なマンデル酸誘導体調製法としての展開が期待される。

マンデル酸と同様に、カルボニルの α -位に水酸基を有する 2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid を基質とした検討では、両鏡像体とも代謝反応が進行し、安息香酸が得られることを確認した(Scheme 32)。これはマンデル酸を基質とした際に高い立体選択性を示したのとは対照的な結果であり興味深い。



Scheme 32.

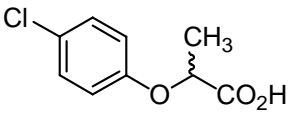
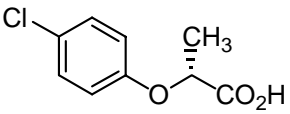
N. diaphanozonaria JCM 3208株の全菌体を用いた際の α -置換基カルボン酸に対する基質特異性



1.3 代謝反応抑制法の確立

好氣的条件下、2-phenylthiopropionic acid を *N. diaphanozonaria* に作用させると α -メチル基の立体を識別し、(S)-体選択的に硫黄原子が酸化されたスルホキシド体が回収されることは先に述べた。微生物による硫黄原子の酸化反応においてスルホキシドへの変換反応をつかさどるのは、オキシゲナーゼであることが多い。つまり酸素分子を利用して反応を行なっている可能性が高い。このような酸化反応を抑制する方法としては、酸素フリーの条件下で反応を試みる事が考えられる。よって不活性ガスであるアルゴンによって反応系中の空気を置換した不活性ガス雰囲気下での検討をおこなうことを計画した。まず、2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を用い、不活性ガス雰囲気下においてもデラセミ化反応が確かに進行することを確認することとした(Table 11)。

Table 11. Deracemization reaction of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid under the inert gas conditions^a

 racemate		 (R)-form	
under Ar resting cells			
entry	reaction time (hr)	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	24	91	65
2	48	86	79
3	96	87	>99

^a The starting compounds were incubated with resting cells of *N. diaphanozonaria* under Ar at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

その結果、確かにデラセミ化反応は進行し 96 時間後には光学的に純粋な化合物を回収することができた。好氣的条件下では 24 時間経過した時点で既に>99%ee を達成していることと比較すると、反応の進行は明らかに遅い。このように反応速度は低下するものの、確かにデラセミ化反応は進行することが確認されたので、同様の条件下、2-phenylthiopropionic acid あるいは 2-(4-chlorophenylthio)propanoic acid について反応を試みた(Table 12)。期待通りこれらの基質に対しても *N. diaphanozonaria* はデラセミ化活性を示すようになり、スルホキシドへの酸化反応は観察されなかった。2-Phenylthiopropionic acid については 96 時間後に 88%ee を、2-(4-chlorophenylthio)propanoic acid に関しては 240 時間後に 90%ee を達成することができた(entry 3, 8)。

Table 12. Suppression of the oxidation reaction on the sulfur atom^a

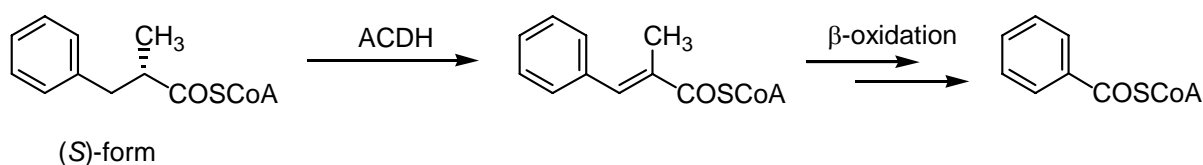
entry	X	reaction time (hr)	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	H	24	68	28
2	H	48	79	42
3	H	96	68	88
4	H	240	9	92
5	Cl	48	83	21
6	Cl	96	77	31
7	Cl	168	88	54
8	Cl	240	88	90
9	Cl	336	77	91

^a The starting compounds were incubated with resting cells of *N. diaphanozonaria* under Ar at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

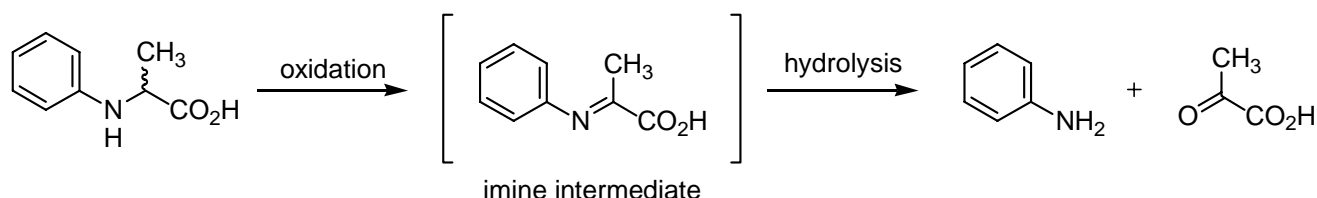
2-Methyl-3-phenylpropanoic acid を基質とし、好氣的条件下にて反応を試みると、この化合物は安息香酸にまで代謝されることを先に述べた。これは、本化合物が脂肪酸の代謝経路である β -酸化経路に入ることによって分解されたと考えると説明できる。つまりカルボン酸部分がチオエステル化された後に acyl-CoA dehydrogenase (ACDH) の作用によって α,β -不飽和カルボン酸へと変換され、その後引き続く水酸化、酸化、プロピオン酸ユニットの切り出しという一連の β -酸化経路によって最終的に安息香酸となる経路である。

実際、ラットの肝臓を用いた検討では、デラセミ化の一段階目においてカルボン酸が補酵素 A と縮合しチオエステルを形成する反応が、acyl-CoA synthetase (ACS) の働きによるものであると報告されている¹⁹⁻²¹。本酵素は脂肪酸の代謝に関与する酵素であり、チオエステルを形成した後に ACDH による脱水素反応が進行し、 α,β -不飽和アシル-CoA 中間体を形成、その後脂肪酸異化酵素群の働きによって安息香酸にまで分解されたものと予想できる(Scheme 33)。



Scheme 33.

先の Scheme 20 で示したように、2-methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid についても α,β -不飽和体が得られることが明らかとなっている。また、2-phenylaminopropanoic acid が立体選択的に代謝されアニリンへと変換される際にもイミン体を経由していると予想され、やはり α,β -不飽和体の関与が考えられる(Scheme 34)。以上のことから、 α,β -不飽和カルボン酸を重要な代謝中間体と位置づけ、本中間体の生成を如何に抑制するかについての検討を行った。



Scheme 34.

2-Methyl-3-phenylpropanoic acid に対し、アルゴン雰囲気下で反応を試みた。その結果、安息香酸の生成は抑制されたが、 α,β -不飽和体である、 α -methylcinnamic acid が得られるようになった。本化合物の生成は先の β -酸化経路の関与を示唆するものである。本反応は立体選択的に進行し、反応時間を延長することによって、ほぼ光学的に純粋な(S)-体と α -methylcinnamic acid が 1:1 の割合で得られることが確認された(Table 13, entry 3)。

Table 13. Reaction of 2-methyl-3-phenylpropanoic acid under Ar^a

entry	reaction time (hr)	(S)-form		α,β -unsaturated carboxylic acid yield (%) ^d
		yield (%) ^b	ee (%) ^c	
1	24	60	33	20
2	96	53	91	40
3	240	42	>99	49

^a The starting compounds were added to the resting cells of *N. diaphanozonaria* under Ar at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester and selective removal of α -methylcinnamic acid under the condition of double bond cleavage oxidation. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. ^d Yields are calculated in comparison with the value of integration in ¹H-NMR spectrum of 2-methyl-3-phenylpropanoic acid and α -methylcinnamic acid.

以上のように、ACDH の関与が疑われる結果を得たことから、本酵素の阻害剤である 2-bromohexanoic acid (2-BH)あるいは 2-bromooctanoic acid (2-BO)を反応系中に添加することとした

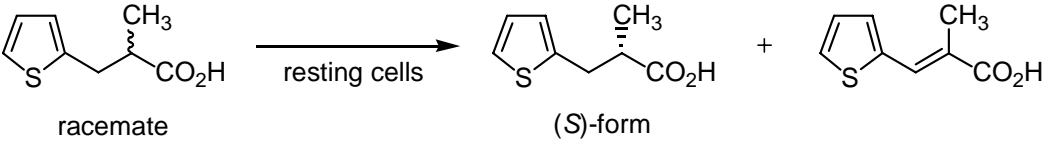
³⁸. 3.0 mM の阻害剤存在下、アルゴン雰囲気下にてデラセミ化反応を試みたが、反応は進行せず、ラセミ体を回収するにとどまった。アルゴン雰囲気下にて反応を行なうことによって、本酵素の反応速度は低下する傾向があることから、デラセミ化能を保持するために好氣的条件下にて反応を試み、阻害剤の添加量を検討した。

結果を Table 14 に示す。2-BH に関しては、添加量が 1.2 mM の場合に高い収率および ee を達成した(entry 1)。しかし添加量を増加すると、それに従い ee が低下することが分かった。また α -methylcinnamic acid についても生成量が減少していることから、本阻害剤はデラセミ化酵素自体にも阻害効果を有することが予想される。デラセミ化酵素への影響と ACDH への阻害効果のバランスが最も良かった濃度が 1.2 mM であると考えられる。これに対し 2-BO については添加量を 0.63 mM にまで減少した際にも阻害効果は低いものにとどまった。最終的に 2-methyl-3-phenylpropanoic acid に対する最適条件は 1.2 mM の 2-BH を添加した条件下 48 時間振とう培養することとし、目的物の(S)-体を収率 71%、88% ee にて回収できた。本条件下において、代謝産物である α -methylcinnamic acid の生成を 26% にまで抑制することに成功した(entry 1)。

Table 14. Suppression of the dehydrogenase reaction by ACDH inhibitor^a

entry	inhibitor ^b	conc. (mM)	(S)-form		α,β -unsaturated carboxylic acid yield (%) ^e
			yield (%) ^c	ee (%) ^d	
1	2-BH	1.2	71	88	26
2	2-BH	3.0	74	82	22
3	2-BH	6.1	78	65	19
4	2-BH	12.2	77	34	4
5	2-BO	0.63	73	35	12
6	2-BO	1.2	75	42	12
7	2-BO	3.0	71	8	3
8	2-BO	4.1	71	3	1

^a The starting compounds were added to the resting cells of *N. diaphanozonaria* after the incubation with appropriate amount of MACDH inhibitor for 10 min at 30 °C. ^b 2-BH: 2-bromohexanoic acid, 2-BO: 2-bromooctanoic acid ^c Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester and selective removal of α -methylcinnamic acid under the condition of double bond cleavage oxidation. ^d Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. ^e Yields were calculated in comparison with the value of integration in ¹H-NMR spectrum of 2-methyl-3-phenylpropanoic acid and α -methylcinnamic acid.

Table 15. Effect of ACDH inhibitor on the reaction of 2-methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid^a

The reaction scheme shows the conversion of a racemate of 2-methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid to its (S)-form and an α,β -unsaturated carboxylic acid derivative using resting cells. The starting material is a racemate of 2-methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid, which is converted to the (S)-form of 2-methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid and an α,β -unsaturated carboxylic acid derivative.

entry	conc. of 2-BH (mM)	reaction time (hr)	(S)-form		α,β -unsaturated carboxylic acid yield (%) ^b
			yield (%) ^b	ee (%) ^c	
1	0	6	70	51	10
2	0	12	74	93	24
3	0	24	73	93	25
4	0	48	42	93	38
5	1.2	3	75	18	5
6	1.2	6	66	30	7
7	1.2	24	70	93	27
8	1.2	48	48	93	34
9	3.0	48	52	93	36
10	6.0	48	79	54	16

^a The starting compounds were added to the resting cells of *N. diaphanozonaria* after the incubation with 2-bromohexanoic acid (2-BH) for 10 min at 30 °C and incubated under aerobic conditions. ^b Yields are calculated in comparison with the value of integration in ¹H-NMR spectrum. ^c Ee of the product was determined by HPLC after conversion to the corresponding methyl ester.

次に 2-methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid について、2-BH の添加による代謝反応抑制の度合いを検討した (Table 15)。その結果、添加量 3.0 mM までは添加と非添加の違いは確認されず、代謝反応を抑制しデラセミ化を優先させることはできなかった。また添加量を 6.0 mM にまで上昇させるとデラセミ化関連酵素にまで悪影響を与えることが分かった。ここで短時間の培養における回収率と ee の関係を調べると大変興味深いことが判明した。つまり、一方の鏡像体選択的に α,β -不飽和化反応が進行したと考えた場合に予想される ee よりも高い値が測定されているのである。このことはデラセミ化反応も一部進行していることを示している。ただし 2-methyl-3-phenylpropanoic acid の場合ほど効果的に代謝を抑制することはできなかった。不活性ガス雰囲気下での検討も試みたが、効果は全くなかった。

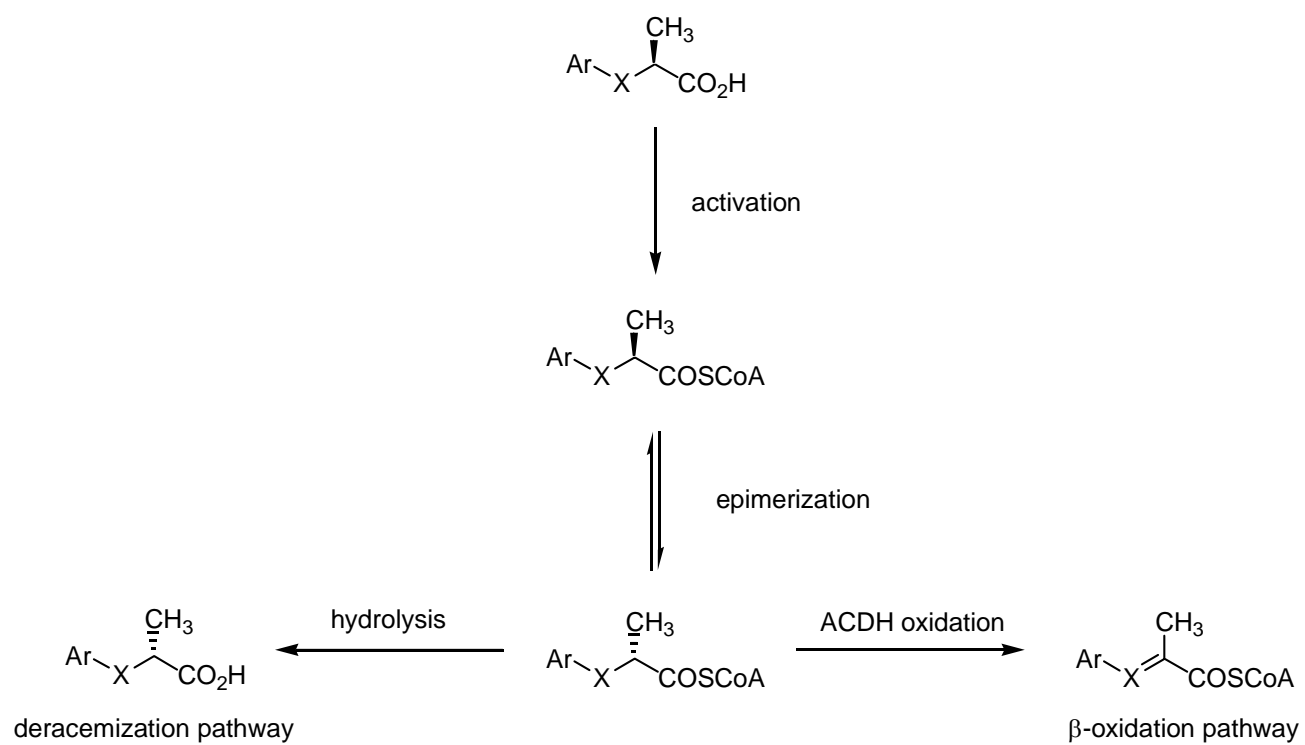
Table 16. Metabolic reaction of 2-phenylaminopropanoic acid under the various conditions

entry	Condition	reaction time (hr)	(R)-form		aniline yield (%) ^c
			yield (%) ^a	ee (%) ^b	
1	Arobic ^d	24	20	>99	46
2	Ar ^e	48	37	65	ND
3	2-BH ^f	48	69	0	0
4	2-BO ^g	48	42	19	ND

^a Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^b Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Isolated yield after conversion to acetanilide. ^d The starting compounds were incubated with resting cells of *N. diaphanozonaria* under aerobic conditions at 30 °C. ^e The starting compounds were incubated with resting cells of *N. diaphanozonaria* under Ar at 30 °C. ^f The starting compounds were added to the resting cells of *N. diaphanozonaria* after the incubation with 1.2 mM 2-bromohexanoic acid for 10 min at 30 °C. ^g The starting compounds were added to the resting cells of *N. diaphanozonaria* after the incubation with 1.2 mM 2-bromooctanoic acid for 10 min at 30 °C.

2-Phenylaminopropanoic acid について各種代謝抑制検討を行った結果を Table 16 に示す。好氣的条件下では、ほぼ光学的に純粋な(R)-体が得られたのに対し、不活性ガス雰囲気下や 2-BO 存在下ではその立体識別能が低下していることが観察される。一方、2-BH 添加条件下においては、代謝反応は完全に抑えられ、ラセミ体を回収するにとどまった。つまり、ACDH の働きを完全に抑えると同時に、デラセミ化酵素の働きをも阻害してしまう結果となった。

以上の検討結果より、様々な有用な知見を得ることができた。一つ目は、代謝が進行する基質は同様の中間体、 α,β -不飽和体を経ていることである。二つ目は、ACDH による不飽和化反応は、立体反転が行なわれた後に進行しているということである(Scheme 35)。これは、ACDH による α -methylacyl-CoA の立体識別が(S)-体選択的であるという事実とも合致する³⁹。デラセミ化反応に脂肪酸の異化経路の一部が関与しているという可能性を強く示唆するものである。



Scheme 35.

2 章

Nocardia diaphanozonaria JCM 3208 株による

反応機構の解析

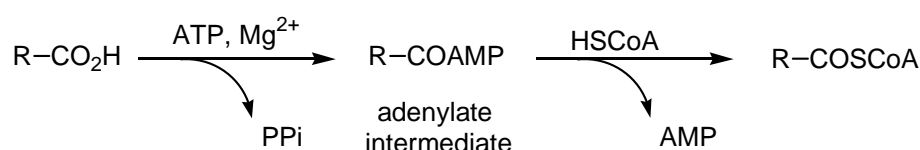
基質特異性を検討する過程で様々な興味深い知見を得ることができた。注目すべきは 2-phenylpropanoic acid 誘導体に対する選択性がこれまでに報告されている例とは逆転していることである。さらに 2-phenylpropanoic acid と 2-phenoxypropanoic acid という構造の類似した 2 種類の化合物間で立体選択性の逆転が起こることである。これは 2 種類の化合物について同一の酵素が関与しているのか、それとも違った酵素が関与しているのかなど、反応機構を解析する上でも大変興味深い。そこで、ラットや *C. militaris* および *V. lecanii* において提唱されている反応機構が *N. diaphanozonaria* についても適用できるのかについての検討を行うこととした。

1 章の代謝反応の抑制法検討時に、脂肪酸の異化経路に關与する酵素がデラセミ化に關与していると仮定し、反応条件最適化を行った結果、期待通り代謝を抑制しデラセミ化を優先させることに成功した。この結果を受け、デラセミ化反応は acyl-CoA synthetase (ACS) と epimerase および hydrolase の 3 種からなる複合反応であると推測した。これはラットの肝臓を用いた検討において既に提唱されている経路と同様である。本章では一段階目を触媒する酵素 ACS および二段階目を触媒する酵素 epimerase に関する検討を行うこととした。これらは、立体の識別や立体反転に關与するなどデラセミ化の過程において非常に重要な役割を担っている酵素である。また、CoA 擬似体(*N*-acetyl cysteamine)を用いた検討も行い、確かにチオエステルをカルボン酸へと加水分解する活性を有することも確認できた。

2.1 全菌体を用いた検討

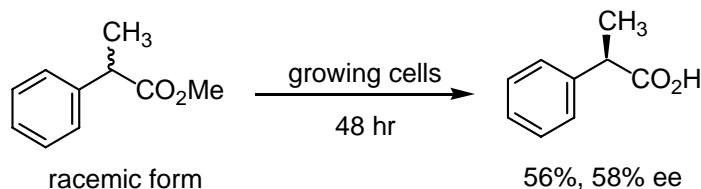
2.1.1 カルボン酸部分の重要性

これまでに提唱されている反応機構では、反応の一段階目にカルボン酸と補酵素 A の縮合反応が進行する。生体内におけるチオエステル化反応には ATP およびマグネシウムイオンが必要である。これはチオエステル化の際の中間体としてアシルアデニル酸中間体を経由するからである。本中間体が生成した後、活性化されたカルボニル炭素を補酵素 A のチオール部分が攻撃し、AMP が脱離すると同時にチオエステルが形成される(Scheme 36)。



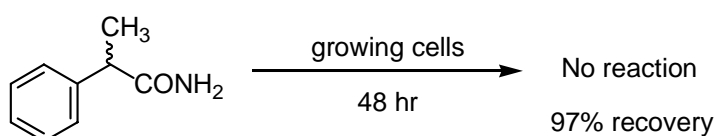
Scheme 36.

チオエステル化の際基質となり得るのは遊離のカルボン酸である。デラセミ化の過程にチオエステル化の段階が含まれると仮定した場合、カルボン酸部分をエステル化あるいはアミド化することによって遊離形でなくすと反応は進行しなくなることが考えられる。カルボン酸部分を修飾することによって酵素の基質特異性から外れてしまうことを避けるため、エステル型基質としては methyl 2-phenylpropanoate を、アミド型の基質としては 2-phenylpropanionamide を選択した(Scheme 37, 38)。それぞれの基質を 1.1 にて最適化した反応条件の下、菌体に作用させ、得られた生成物について解析を行った。



Scheme 37.

メチルエステル体については、反応終了後にはエステル部分が完全に加水分解され遊離のカルボン酸へと変換されていることを確認した。緩衝液に基質を添加しただけではエステル部分の加水分解は進行しないので、菌体の有する加水分解酵素によってカルボン酸への変換反応が進行したものと考えられる。また、デラセミ化も進行しており、収率 56%、鏡像体過剰率 58% で (*R*)-体が回収された。本培養時間が 48 時間であるにも関わらず、生成物の鏡像体過剰率が 58% と低いのは、エス



Scheme 38.

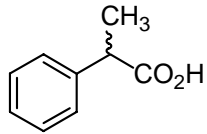
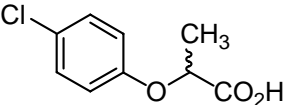
テル部分の加水分解が菌体の有するエステラーゼ等の酵素によって進行した後初めてデラセミ化反応が進行しはじめたからであると推定される。これに対し、アミドについては、デラセミ化反応は進行しておらずラセミ体基質を回収するにとどまった(Scheme 38)。また、アミド部分の加水分解反応は進行していなかった。よって遊離のカルボン酸は反応の進行に重要な役割を果たすものと考えられる。

2.1.2 Acyl-CoA Synthetase (ACS)に対する検討

ATP 依存性の ACS には、その基質特異性の違いにより少なくとも 3 種類の酵素の存在が知られている。つまり、酢酸(C₂)に特異的なもの、中程度の鎖長を有する(C₄-C₁₂)脂肪酸に作用するもの、長鎖脂肪酸(C₁₄-C₂₂)に作用するものである。いずれの酵素も細胞の膜系に局在している。これはアシル基の分解に関与する酵素群がミトコンドリアに局在しているからである。Müller らはデラセミ化の過程において関与しているのは長鎖脂肪酸に作用する long-chain acyl-CoA synthetase (LACS)であると報告している^{20a}。彼らは報告の中で long-chain および medium-chain acyl-CoA synthetase (MACS)についての検討を行っており、それぞれの酵素の阻害剤としてパルミチン酸および安息香酸を用いている。そこで *N. diaphanozonaria* を用いたデラセミ化についても同様の阻害剤を利用した検討を行うこととした。まず各阻害剤を基質の 5 当量添加し、反応が阻害されるかどうか検討した(Table 17)。基質としては 2-phenylpropanoic acid および 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を選択した。これらは基質特異性の検討にて立体選択性の逆転が観察されている化合物である。

検討の結果パルミチン酸を添加した系については反応開始後 12 時間経過した後においてもまったく阻害は観察されなかったのに対し、安息香酸を添加した系では 2 種類の基質ともに明らかな阻害が観察された。これは Müller らの報告^{20a}とは違った種類、つまり MACS が反応に関与していることを示唆するものである。そこで阻害剤の添加量を変化させた際の、本培養時間 12 時間後のデラセミ化の度合いをプロットした。具体的には、各基質の阻害剤無添加時における本培養時間 12

Table 17. Relation of acyl-CoA synthetase to the deracemization reaction^a

entry	substrate	benzoic acid	palmitic acid	control
1		racemic N.D.	24% ee 43% yield	24% ee 65% yield
2		racemic 61% yield	91% ee 76% yield	92% ee 75% yield

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* for 12 h at 30 °C. The amount of inhibitor was 5 equiv. of the substrate. Isolated yield was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. Benzoic acid and palmitic acid are typical substrates of medium-chain acyl-CoA synthetase (MACS) and long-chain acyl-CoA synthetase (LACS), respectively.

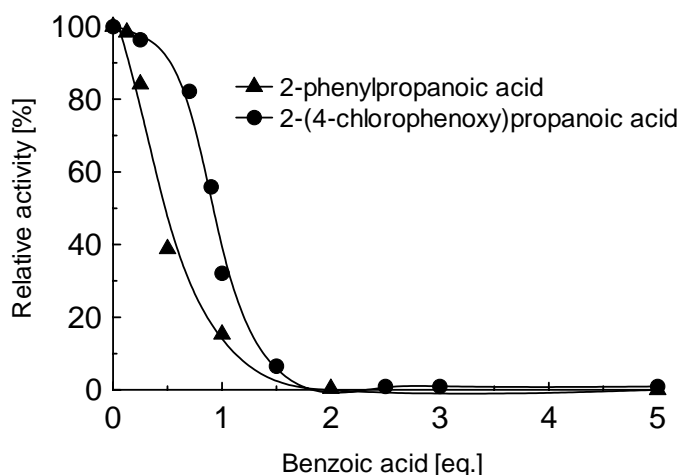


Figure 5.

時間後のデラセミ化の度合いを基準とした相対活性を比較した。その結果を Figure 5 に示す。この結果は安息香酸が 2 種類の基質に対し阻害剤として働いていることを明確に示している。

二種類の基質に対する反応は、共に安息香酸の添加によって阻害された。2 つの化合物の立体選択性が逆転しているにも関わらず、同様の添加剤によって反応が阻害されるということは大変興味深い。また基質によって阻害の度合いが違っているが、これは酵素-基質間の相互作用の強さが異なるためと考えられる。

Table 18. Influence of various chain lengths of *n*-alkanoic acid on the deracemization process^a

entry	inhibitor	chain length	yield (%)	ee (%)
1	none	-	75	92
2	<i>n</i> -butanoic acid	4	76	racemic
3	<i>n</i> -pentanoic acid	5	99	racemic
4	<i>n</i> -hexanoic acid	6	87	racemic
5	<i>n</i> -heptanoic acid	7	76	racemic
6	<i>n</i> -octanoic acid	8	82	racemic
7	<i>n</i> -decanoic acid	10	68	racemic
8	<i>n</i> -dodecanoic acid	12	90	racemic
9	<i>n</i> -tridecanoic acid	13	65	racemic
10	myristic acid	14	62	52
11	palmitic acid	16	76	91
12	stearic acid	18	76	52

^a The starting compounds were incubated with growing cells of *N. diaphanozonaria* for 12 h at 30 °C. The amount of inhibitor was 5 equiv. of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid. Isolated yield was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

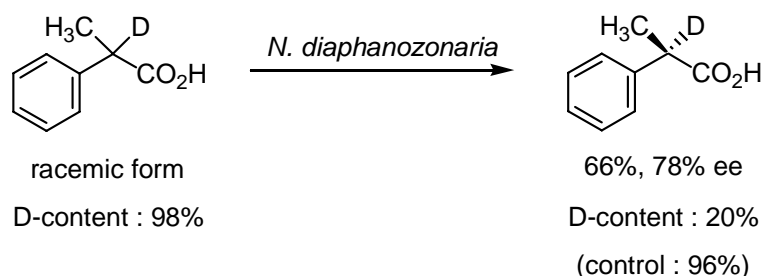
つまり各基質に対する本酵素の立体選択性の程度、2-phenylpropanoic acid については 69% ee, 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid については 97% ee の違いを反映していると考えている。

次に、2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を基質とし、各種鎖長を有する直鎖脂肪酸を 5 当量添加してデラセミ化酵素に対する阻害の度合いを検討した。結果を Table 18 に示す。Medium-chain acyl-CoA synthetase (MACS)は中程度の鎖長(C_4 - C_{12})の脂肪酸に対して活性を有し、また long-chain acyl-CoA synthetase (LACS)は長鎖(C_{14} - C_{22})脂肪酸を基質とすることが知られている。検討の結果、炭素数 4-13 の脂肪酸を系中に添加した際にデラセミ化活性は完全に消失した。一方、炭素数 14,16,18 の長鎖脂肪酸に分類されるカルボン酸を添加した際には、デラセミ化活性に与える影響は少なく、光学活性体を回収することができた。以上の結果からも MACS が *N. diaphanozonaria* におけるデラセミ化反応に関与していると予想できる。

2.1.3 重水素置換した化合物の利用

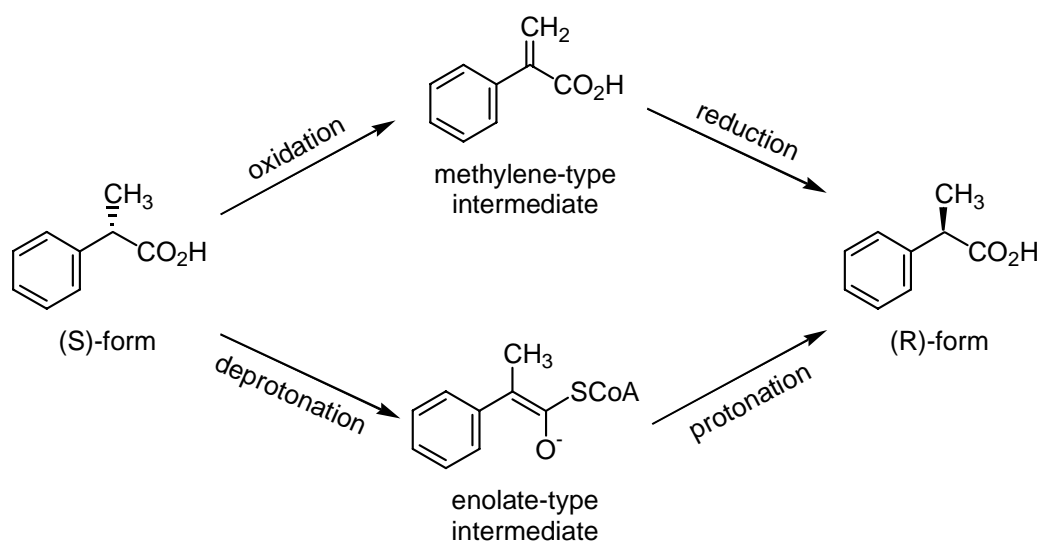
Epimerase は立体反転過程を触媒する最も重要な酵素である。しかし本酵素反応は立体選択的ではなく、先の ACS によって活性化されたカルボニルの α -メチンプロトンを引き抜き、エノール型となった中間体に対し、引き抜き面とは逆の面から新たにプロトンを付加する²²。つまり本酵素がデラセミ化の過程に存在しているとすると、それは即ちデラセミ化の過程にラセミ化を行う酵素が関与しているという一見矛盾するような結論を得ることとなる。しかし、例えばチオエステル化の段階が $R : S = 1 : 9$ という立体選択的の反応であるとするとならセミ体の基質は反応の推移と共に一方の鏡像体へと偏りを見せることとなり、最終的に $R : S = 9 : 1$ という割合を有する平衡状態、80% ee に落ち着くと考えられる。実際 *N. diaphanozonaria* を用いたデラセミ化反応においても両鏡像体から出発したとしても最終的に 70% ee, (*R*)-体に落ち着くことをすでに確認している。

私は α -メチンプロトンを重水素置換したラセミ体 2-phenylpropanoic acid を調製し培養条件下反応を試みた(Scheme 39)。その結果、反応開始前は 98%重水素化されていたものが反応終了時には 20%にまで低下していることが確認された。菌体を作用させない場合には、重水素化率がほとんど変化しなかったことから、デラセミ化の過程で明らかに酵素的に α -メチンプロトンが引き抜かれていることを確認できた。

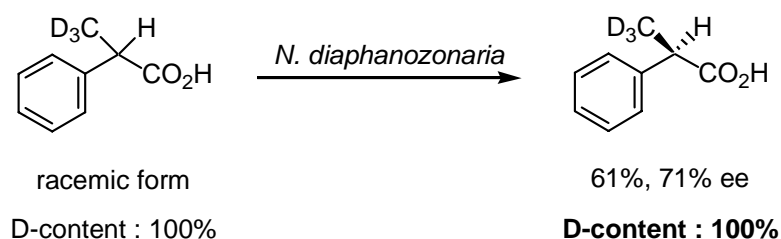


Scheme 39.

α -メチンプロトンが関与する可能性を有する反応機構としては、エノール型中間体を経由する経路の他に、 β -メチル基部分のプロトンも引き抜かれることによる酸化-メチレンの形成、引き続きメチレン部分の還元によるデラセミ化過程も否定できない(Scheme 40)。そこで β -メチル基についても重水素置換を行った基質を合成し反応を試みた(Scheme 41)。しかしその重水素化率は反応の前後にて全く変化しなかった。このことから本反応は α -メチンプロトンのみが関与しており、メチレン型中間体を経由するものではないことを確認できた。



Scheme 40.



Scheme 41.

ラセミ化の過程が存在することをより明確に証明するために、 α -メチンプロトンが重水素化された光学活性な 2-phenylpropanoic acid を用いた検討を行った。Figure 6 には鏡像体過剰率の経時変化をプロットしたもの、また Figure 7 には重水素からプロトンへの交換率の経時変化をプロットしたものを示した。交換率は $^1\text{H-NMR}$ における α -位メチンプロトンの積分値より算出している。これらのグラフから以下のような興味深い知見を得ることができた。

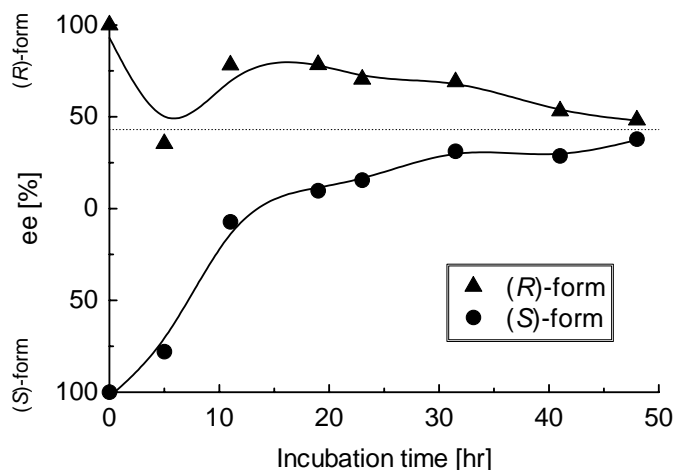


Figure 6. Plot on the ee of the product vs. incubation time

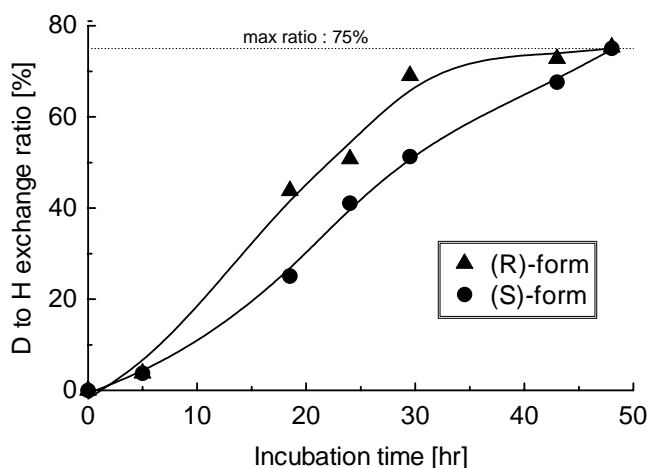
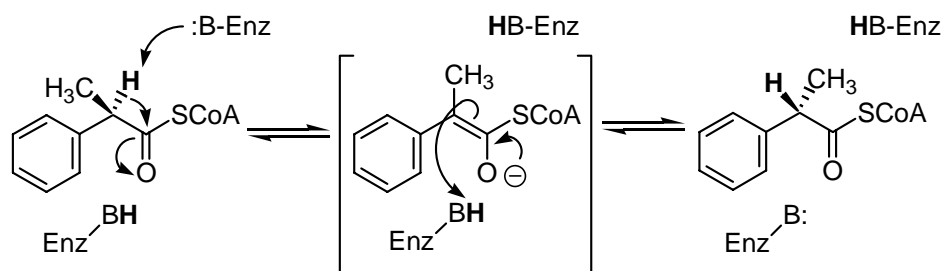


Figure 7. Plot on the D to H exchange ratio vs. incubation time

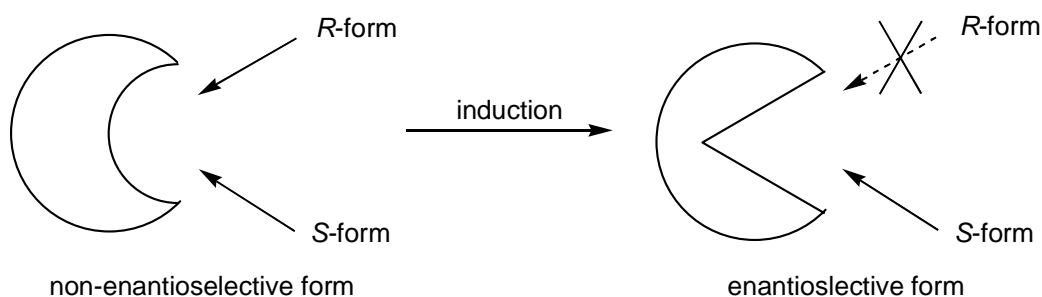
第一には、反応の最適条件検討の際にも確認されているが、どちらの鏡像体から出発した際にも最終的に一定の鏡像体過剰率に収束することである。第二には、両鏡像体とも α -メチンプロトンの引き抜きが進行し、反応開始 48 時間後にはプロトンへの変換率が 80%程度となることである。これはラセミ体を用いた検討とも矛盾しない結果を与えている。(R)-体、(S)-体ともに反応開始前はほぼ 100%重水素化されている。したがってエピメリ化と同時に重水素からプロトンへの変換が起こるとすると、鏡像体過剰率とプロトンへの変換率が比例関係を示すはずである。しかし実際にはそうではないことが判明した。例えば(R)-体より出発した場合、反応開始 5 時間後には鏡像体過剰率 50%にまで落ち込んでいるにも関わらず、プロトンへの変換率は 3%にとどまっている。また(S)-体についても鏡像体過剰率 75%であるにも関わらず、同様にプロトンへの変換率は 3%であった。理論的には変換率はそれぞれ 25%、12.5%である。これは酵素の活性部位に引き抜かれた重水素が残

存し、それが次のラセミ化の際のエノール型中間体に付加されることによって見かけ上重水素化率が小さくなったと考えれば説明できる。以上のことから、本反応はラセマーゼ特有の2塩基機構であることが考えられる(Scheme 42)。従って重水素からプロトンへの変換率は酵素活性部位中のプロトン、あるいは重水素と酵素活性部位の外に存在するプロトンとの交換が反映され、反応開始48時間後には80%程度の平衡状態に落ち着くと予想される。



Scheme 42.

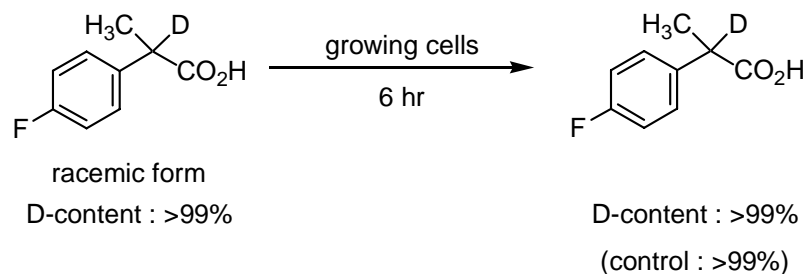
また注目すべき第三の点としては、(R)-体から出発した場合に反応開始後急激に鏡像体過剰率が低下するものの再び上昇し、その後ほぼ一定値を保つということである。Knightsらはラットを用いたデラセミ化の検討の際に acyl-CoA synthetase の構造には2種類あることを報告している^{21a}。立体選択性を発現するものと、発現しないものである。はじめは立体選択性を発現しない構造(isoform)であるが、基質を添加することによって、酵素が立体選択性を発現する構造へと変化することも報告している。*N. diaphanozonaria* の有する ACS もまた基質の添加によって立体を識別する構造へと誘導されるものと予想される(Scheme 43)。



Scheme 43.

基質特異性の検討の際に、2-(4-fluorophenyl)propanoic acid に対してはデラセミ化反応が進行しないことを確認している(Table 4, entry 7)。反応が進行しない理由としては次の2つが考えられる。一つ目としては、反応は起こっているが立体の識別が行われていないため見かけ上ラセミ体を回収するにとどまっているという理由、二つ目としては本化合物が元々基質特異性から外れているという理由である。これらを区別するためにカルボニルの α -位メチンプロトンを重水素化したラセミ体の 2-deuterio-(4-fluorophenyl)propanoic acid を調製し検討を行った。その結果、メチンプロトンの重水素化率は6時間経過しても全く変化していないことが明らかとなった(Scheme 44)。このことは本化合

物が基質特異性から完全に外れていることを示しているといえる。水素原子とほぼ立体的嵩高さが同様の置換基を芳香族環上へ導入することによって、反応が全く進行しなくなったことから、酵素活性部位は置換基の静電的影響を強く受けることを改めて認識させられる。



Scheme 44.

2.1.4 Hydrolase に関する検討

これまでの検討より、デラセミ化の過程にカルボン酸の活性化段階およびラセミ化過程が存在することを確認できた。そこで、活性化されたカルボン酸、つまりチオエステルを加水分解する酵素が存在するのかについての検討を行った。

補酵素 A のアナログとして知られる *N*-acetylcysteamine⁴¹ はポリケタイドの研究において広く利用されている化合物である。本化合物を用いて 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid のチオエステル体を調製^{41c}し、全菌体での反応を試みた。その結果、48 時間後には完全に加水分解が進行していることが確認された。このことから、チオエステル体を加水分解する酵素系が確かに存在することが明らかとなった。Hydrolase については、破碎菌体を用いて更なる検討を加えることとした。

2.2 破碎菌体を用いた検討

全菌体を用いた検討より、*N. diaphanozonaria* によって触媒されるデラセミ化反応に関与する酵素の種類を予想することができた。つまり、カルボン酸を立体選択的に CoA 化してチオエステル化する酵素 medium-chain acyl-CoA synthetase (MACS)、チオエステル化によって活性化された基質に対してラセミ化を行なう酵素 epimerase、およびチオエステルを加水分解する酵素 hydrolase である。

これまでに報告されている α -メチルカルボン酸に対してデラセミ化活性を示す微生物、*V. lecanii* については菌体を破碎することによって デラセミ化活性は消失することが報告されている¹⁸。そのため、酵素の精製には至っていない。本菌株のデラセミ化酵素が菌体を破碎した後も安定であれば、微生物由来のデラセミ化酵素に対して新たな知見を加えることができる。よって酵素の単離精製を目的とし、破碎上清を用いたデラセミ化反応の検討を行なうこととした。

2.2.1 Hydrolase に関する検討

先の中菌体を用いた検討において、本微生物が CoA アナログである *N*-acetylcysteamine のチオエステルを加水分解することが確認された。そこで、菌体を破碎した後の上清を用いてチオエステラーゼ活性の検討を行うこととした。硫酸分画を行い、活性画分の大まかな精製を行なったところ、25-55%飽和部分に、チオエステラーゼ活性を見出すことができた。加水分解反応の進行の有無は HPLC にて行き、溶出時間を標品と比較することによって確認した。基質濃度が 100 mM という高濃度においても反応は進行することが分かった(Table 19)。

Table 19. Hydrolysis of thioester by crude enzyme of *N. diaphanozonaria*^a

entry	cell-free extract	carboxylic acid (mM)	thioester (mM)
1	<i>N. diaphanozonaria</i>	56.4	43.6
2	control	1.4	98.6

^a The *N*-acetylcysteamine thioester of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 41 h at 30 °C with crude enzyme of *N. diaphanozonaria* containing 10% ethylene glycol and 4% DMSO. The concentration of the product was determined by HPLC analysis.

次に光学活性な基質を用いて反応性の比較を行なった(Table 20)。その結果、*R*-体のチオエステルの方が、*S*-体よりも早く加水分解されるという結果を得た。また、ラセミ体から出発した場合に、加水分解されたカルボン酸の鏡像体過剰率を測定したところ 16% ee (*R*)-体であったことから、多少の立体選択性を有することが予想される。

Table 20. Hydrolysis of thioester by crude enzyme of *N. diaphanozonaria*^a

entry	substrate	carboxylic acid (mM)	thioester (mM)	relative activity (%)
1	<i>R</i> -form	17.3	82.7	100
2	<i>S</i> -form	11.0	89.0	64
3	racemate	34.1	65.9	- ^b

^a The *N*-acetylcysteamine thioester of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 16.5 h at 30 °C with crude enzyme of *N. diaphanozonaria* containing 10% ethylene glycol and 4% DMSO. The concentration of the product was determined by HPLC analysis. ^b The ee of the product was determined by HPLC analysis as 16% ee (*R*)-form.

また、阻害剤の検討を行ない、本酵素の活性部位残基の推測を行なった(Table 21)。セリンプロテアーゼ阻害剤として知られる phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)の添加を行なうと、明らかな阻害が観察された(entry 1-5)。一方、システインプロテアーゼ阻害剤である dithiobis(2-nitrobenzoic acid)の添加では、加水分解の反応性は非添加の場合とほとんど変わらなかった。以上のことから、チオエステラーゼの活性部位にはセリン残基が存在することが予想される⁴²。

Table 21. Effect of inhibitor on the hydrolysis reaction^a

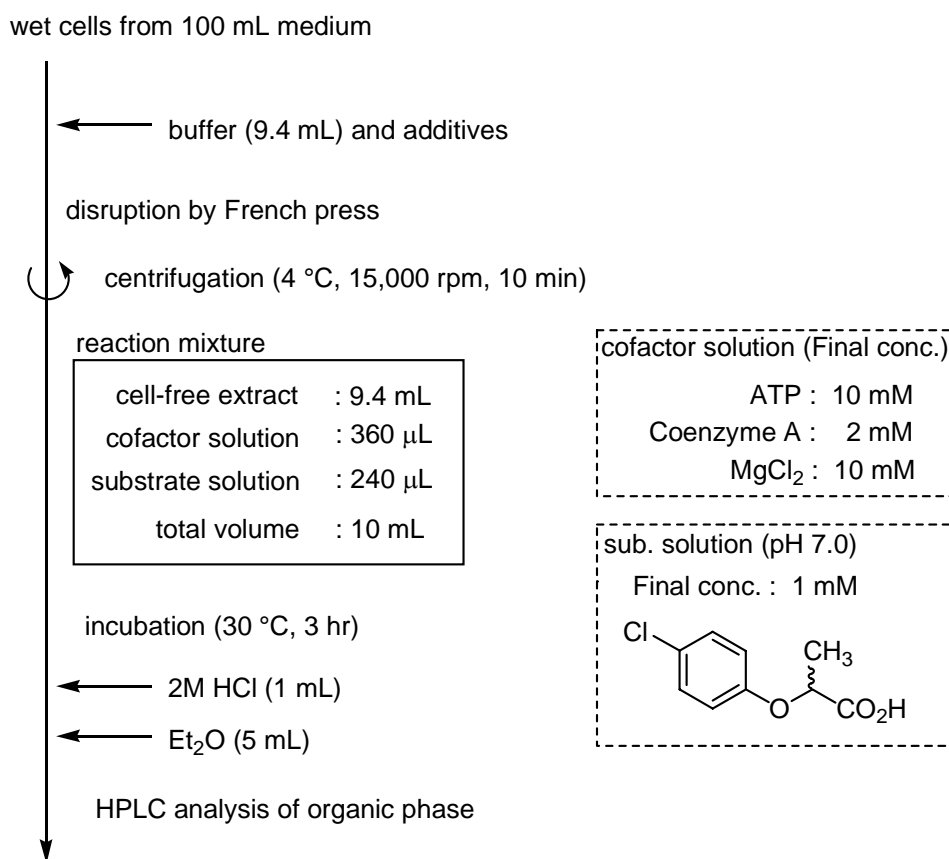
entry	inhibitor type	conc. (mM)	carboxylic acid (mM)	thioester (mM)	relative activity (%)
1	serine ^b	0	45.6	54.4	100
2	serine	1	36.6	63.4	80
3	serine	5	21.0	79.0	46
4	serine	10	7.9	92.1	17
5	serine	15	3.3	96.7	7
6	cysteine ^c	0	52.6	47.4	100
7	cysteine	1	48.9	51.1	93
8	cysteine	5	52.3	47.7	100
9	cysteine	10	52.2	47.8	99

^a The *N*-acetylcysteamine thioester of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 21 h at 30 °C with crude enzyme of *N. diaphanozonaria* containing 10% ethylene glycol and 4% DMSO. The concentration of the product was determined by HPLC analysis. ^bPMSF ^cdithiobis(2-nitrobenzoic acid).

2.2.2 破碎上清にデラセミ化活性を見出す試み

検討基質としては全菌体を用いた際に、高い立体選択性を有してデラセミ化が進行する 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を用いることとした。破碎上清を用いた反応のフローチャートを Scheme 45 に示す。*N. diaphanozonaria* を全菌体を用いた反応条件と同様に培養し、集菌、破碎し、

反応を試みたがデラセミ化活性をみいだすことはできなかった。破碎方法はフレンチプレス、超音波、あるいはリゾチーム処理を利用した。カルボン酸をチオエステル化する酵素、ACS は補因子として、ATP, CoA, Mg^{2+} を必要とする。そこで、これらを添加して、反応を試みたがデラセミ化は全く進行せずラセミ体基質を回収するにとどまった。



Scheme 45.

本酵素は誘導酵素である可能性を考え、培養時に 0.1%となるように各種カルボン酸を添加しデラセミ化酵素群の誘導を試みた。また破碎液中での酵素の安定性を高める目的でいくつかの有機溶媒を体積比で 20%となるように添加した。様々な組み合わせを検討した結果、2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を誘導剤として加えて培養し、菌体破碎時にエチレングリコールを添加すると、これまでと比較して明らかなデラセミ化活性を見出すことができた(Table 22)。誘導剤としてはそのほかに、hexanoic acid, 2-phenylpropanoic acid,および 2-(4-chlorophenoxy)isobutyric acid が効果的だった。一方で、誘導剤非添加あるいは palmitic acid の添加の系では全く活性は見出せなかった。これは全菌体を用いた検討において、MACS の基質である hexanoic acid を添加するとデラセミ化が阻害されるが、LACS の基質である palmitic acid の添加では阻害効果を示さなかったことと関連があると考えられる。つまり、hexanoic acid の添加によって MACS が活性化されたために、デラセミ化活性を見出せたのではないかということである。また、2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid および 2-phenylpropanoic acid の両鏡像体をそれぞれ誘導剤として用いる検討も行ったが、得られる

生成物の鏡像体過剰率に有意な差は見られなかった。そこでこれ以降の検討では、誘導剤としてラセミ体の 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を、また破碎上清中にはエチレングリコールを添加することとした。

Table 22. Effect of inducer on the deracemization reaction of cell free system of *N. diaphanozonaria*^a

entry	inducer (0.1% w/v)	ee (%)
1	none	racemic
2	hexanoic acid	8
3	palmitic acid	racemic
4	2-phenylpropanoic acid	10
5	2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid	19
6	2-(4-chlorophenoxy)isobutylic acid	16

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 12 h at 30 °C with cell-free extract of *N. diaphanozonaria* containing 20% ethylene glycol and cofactors, i.e., ATP, CoA, and Mg²⁺. Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

次に破碎上清を用いた反応の際の温度およびpHについて検討した。その結果最適温度は30 °C、最適pHは7.25であることを確認した(Figure 8, 9)。さらにエチレングリコールの添加量を検討したところ、3%が最適であることが分かった(Figure 10)。

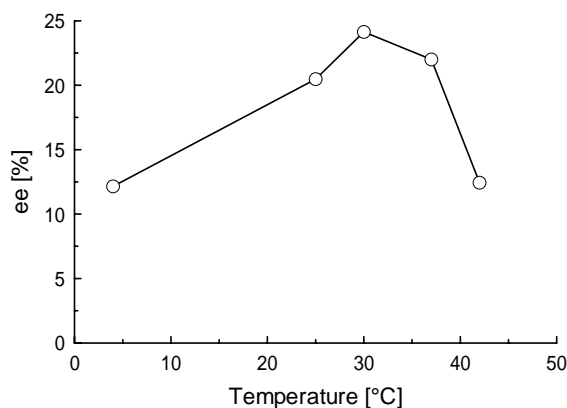


Figure 8. The effect of temperature on the deracemization activity of *N. diaphanozonaria* deracemizing enzymes

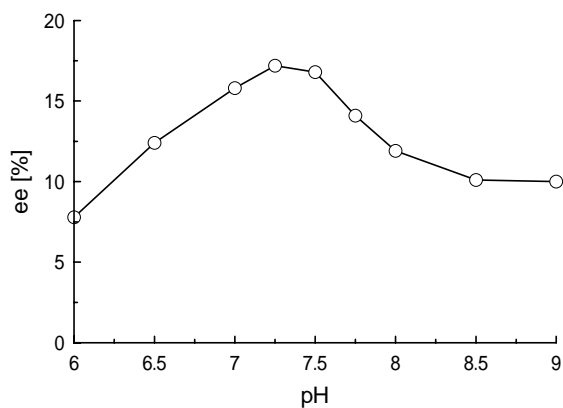


Figure 9. The effect of pH on the deracemization activity of *N. diaphanozonaria* deracemizing enzymes

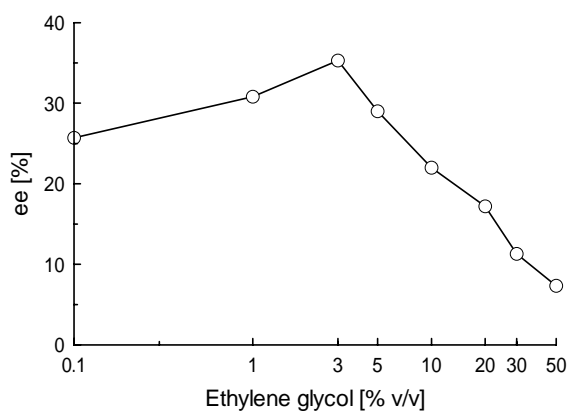


Figure 10. The effect of ethylene glycol on the deracemization activity of *N. diaphanozonaria* deracemizing enzymes

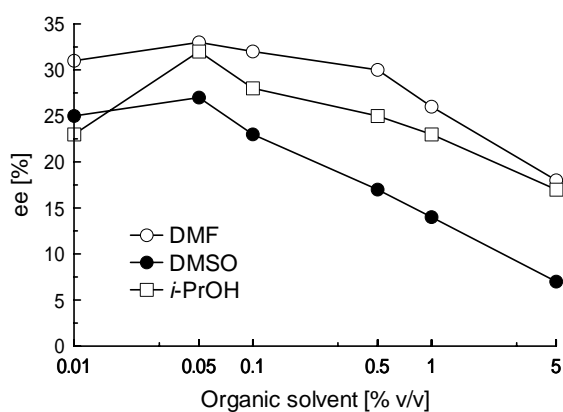


Figure 11. The effect of organic solvent on the deracemization activity of *N. diaphanozonaria* deracemizing enzymes

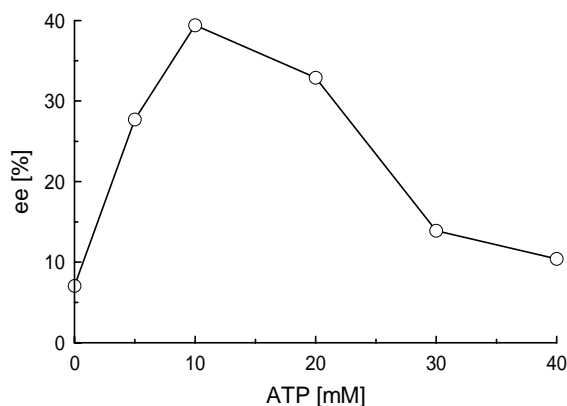


Figure 12. The effect of ATP concentration on the deracemization activity of *N. diaphanozonaria* deracemizing enzymes

ここで 3%の添加量にてエチレングリコール以外の有機溶媒についても再度検討を行ったところ、いくつかの溶媒においてデラセミ化活性を確認することができた。検討の初期の段階で 20%の添加量にて検討を行った際には活性を見出せなかった溶媒でも、3%の添加量では活性を保持する効果を与えることが判明した。そこで DMF, DMSO, *i*-PrOH の 3 種の溶媒についてさらなる添加量の検討を行った(Figure 11)。その結果これらは 0.05%というごく微量が最適添加量であることを確認した。次に補因子として添加している ATP の添加量を検討した(Figure 12)。その結果 10mM が最適であることを確認した。また界面活性剤の添加を検討したが、Brij 58 以外は添加するとデラセミ化活性が消失した。検討した界面活性剤は brij 58, Triton X-100, Tween 20, *n*-octyl- β -D-thioglycoside, Nonidet P-40, cholic acid, deoxycholic acid, hexadecyltrimethylammonium chloride, および hexadecylpyridinium chloride である。

これまでに最適化した条件を用いて、実際に反応を試みた。基質濃度 1.0 mM では収率 85%, 36%ee を 0.5 mM では収率 85%, 48%ee を達成した。ここで基質濃度を半分にしたにもかかわらず、生成物の鏡像体過剰率は 2 倍まで向上していない。これは本酵素反応が何らかの理由によって阻害されている可能性が示唆された。

まず空気中の酸素によって酵素が酸化されることによる不活性化される可能性を考慮し、アルゴン雰囲気下での検討を行った。しかし得られる生成物の鏡像体過剰率に有意な差は見られなかった。

次に反応の結果生じる副産物によって pH が変化しているのではないかと考え、反応系の pH の変化を測定した。Figure13 に示す通り、時間の経過にしたがって系中の pH は著しく低下することが観察された。このことから反応の進行に伴って、酸性物質が系中に生成していることが考えられる。そこで pH 変化を最小限に食い止めるために緩衝液の強度を 50 mM から 400 mM にまで変化させる検討を行った。しかし生成物の ee に変化は見られなかった。

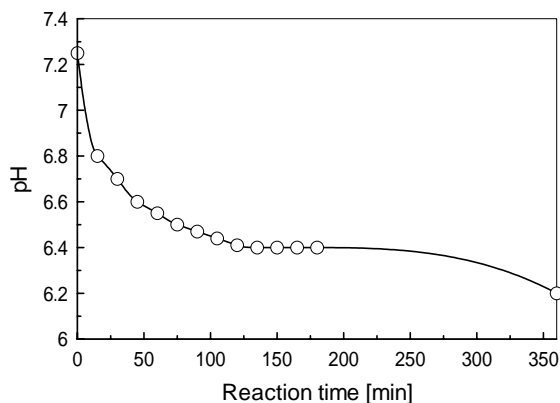


Figure 13. The change of pH in the reaction mixture

そこで最終的な反応条件は以下のように定めた。即ち、3% ethylene glycol, 1 mM DTT を含む 100 mM MOPS-NaOH (pH 7.25) 中で、補因子として 10 mM ATP, 2 mM CoA, 10 mM MgCl₂ を補因子として添加し、基質濃度 1 mM とする条件である。単離収率より明らかにデラセミ化反応が進行しており、立体選択的な代謝反応ではないことを確認した(Figure 14)。図においては、デラセミ化反応に關与する酵素を魚のように模式的に表している。

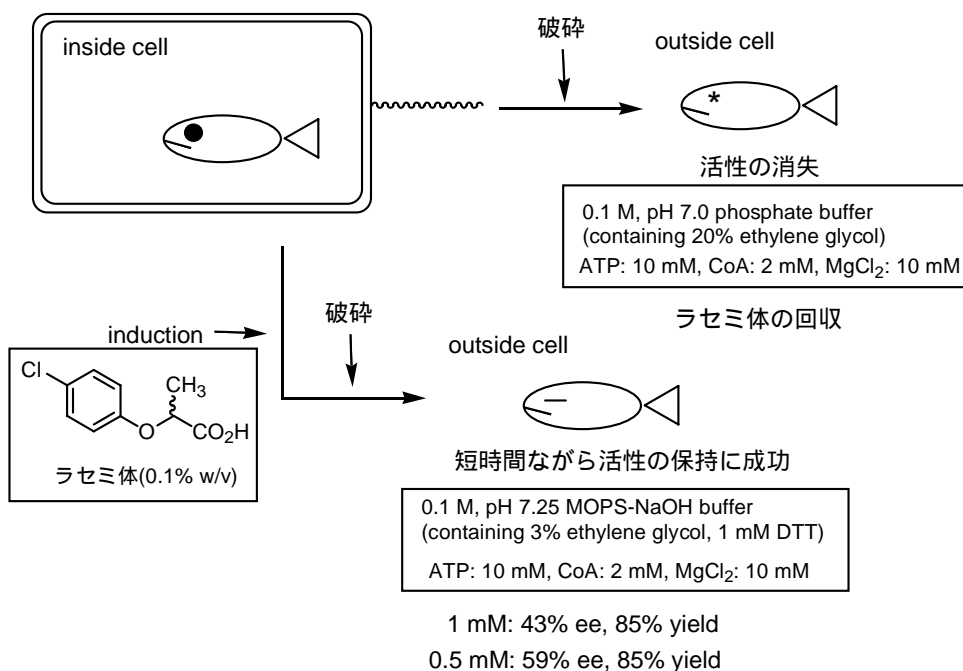


Figure 14. Optimal reaction conditions of cell-free system of *N. diaphanozonaria*

最適化した条件下、反応機構の解析を行った。まず、ATP の必要性について検討を行った。その結果、ATP に換わって GTP や UTP では反応は進行しないことが判明した(Table 23)。

Table 23. Effect of cofactors on the deracemization reaction using cell free systems^a

entry	cofactor ^b	ee (%) ^c	relative activity (%)
1	ATP, CoASH, MgCl ₂	43	100
2	GTP, CoASH, MgCl ₂	16	37
3	UTP, CoASH, MgCl ₂	15	35
4	— CoASH, MgCl ₂	11	26
5	— — —	11	26

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 3 h at 30 °C with cell-free extract of *N. diaphanozonaria* containing 3% ethylene glycol and cofactors. ^b The concentration of cofactors were as follows; ATP, GTP, UTP: 10 mM, CoASH: 2 mM, MgCl₂: 10 mM. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

次に、ATP 存在下補酵素 A (CoA)と Mg²⁺の必要性について検討した(Table 24)。破碎菌体上清は破碎後速やかに活性が低下し、透析操作を行なうとデラセミ化活性は完全に消失してしまう。しかし CoA のような補因子は微量でも反応系中に存在するとそれを利用して反応が進行するため、的確な必要性の確認をおこなうことができない。実際 entry 1 と 2 の比較から明らかのように CoA を添加しなくてもデラセミ化反応は進行することが確認された。そこでアナログである、desulfoCoA を用いて検討を行った。本化合物は、CoA とほとんど構造は同じであるが、活性発現のために必要なチオール部分が存在せず、よって補酵素 A に対する競争阻害剤として作用することが知られている⁴³(Figure 15)。本化合物を CoA に代えて系中に添加するとデラセミ化の進行度合いは CoA 添加時を 100%として、69%にまで抑制された。また ATP, CoA を系中に添加していても Mg²⁺を添加しなかった場合にはその活性は 51%にまで落ち込むことが観察された。これらのことから本反応には CoA および Mg²⁺が必須であることを確認できた。

Table 24. Effect of cofactors on the deracemization reaction of cell free systems^a

entry	cofactor ^b	ee (%) ^c	relative activity (%) ^d
1	ATP, CoASH, MgCl ₂	43	100
2	ATP, —, MgCl ₂	40	93
3	ATP, desulfoCoA, MgCl ₂	30	69
4	ATP, CoASH —	22	51
5	— — —	11	26

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 3 h at 30 °C with cell-free extract of *N. diaphanozonaria* containing 3% ethylene glycol and cofactors. ^b The concentration of cofactors were as follows; ATP: 10 mM, CoASH, desulfoCoA: 2 mM, MgCl₂: 10 mM. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. ^d Deracemization activity totally disappeared after dialysis against 100 mM MOPS-NaOH buffer (pH 7.25) containing 1 mM DTT for 4 h at 4 °C.

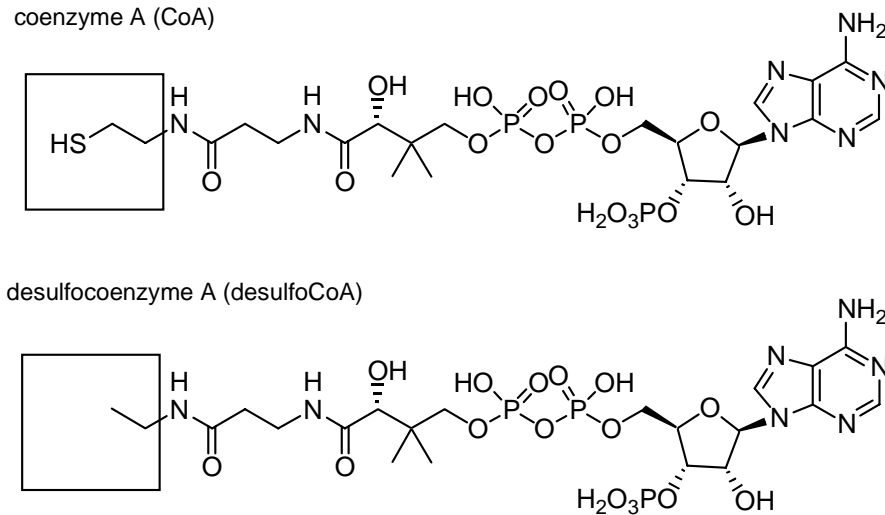
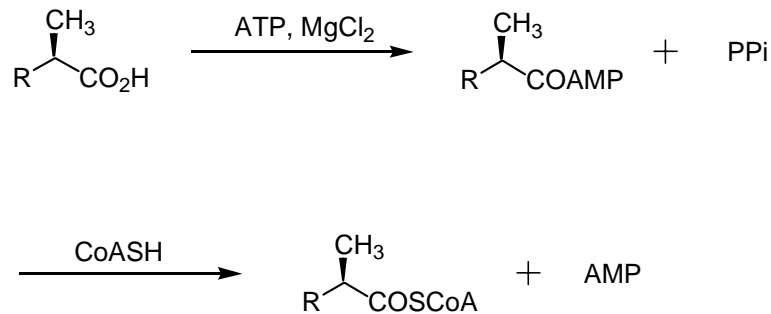


Figure 15. The structure of coenzyme A and desulfocoenzyme A

ATP, CoA, Mg^{2+} という 3 種類の補因子を必要とし、カルボン酸が関与する反応としては ACS によるカルボン酸のチオエステル化が挙げられる。本反応は中間体として acyl-AMP とピロリン酸(Pi)が生成し、その後補酵素 A との縮合反応が進行、AMP が系中に放出される(Scheme 46)。つまり反応の進行にしたがって、AMP と Pi が蓄積し系は徐々に酸性化するものと予想される。これは Figure 13 にて示したような反応系 pH の低下とも合致する。



Scheme 46.

実際、系中に AMP や Pi を添加するとデラセミ化活性は明らかに低下した(Table 25)。また添加の際には pH を 7.25 に調整しているために、反応系の pH だけではなく、本化合物の存在によっても活性は阻害されるものと予想される。一方、ADP を添加した系ではデラセミ化活性に変化は見られなかった。以上の結果より、デラセミ化の過程には ACS によるカルボン酸部分の活性化段階が存在することを確認できた。

Table 25. Effect of additives on the deracemization reaction of cell free systems^a

entry	additive ^b	ee (%) ^c	relative activity (%)
1	—	43	100
2	ADP	45	104
3	AMP	30	71
4	PPi	30	71

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 3 h at 30 °C with cell-free extract of *N. diaphanozonaria* containing 3% ethylene glycol and cofactors(ATP: 10 mM, CoASH: 2 mM, MgCl₂: 10 mM). ^b The concentration of additive was adjusted to 10 mM. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

以上のように PPi の蓄積によって反応の進行が阻害されている可能性があることから、本化合物をリン酸にまで分解することによって阻害の軽減を試みた。Fraga らの報告⁴⁴を参考にし、PPi を分解する *S. cerevisiae* 由来の酵素 Pyrophosphatase (PPase)を反応系に添加した (Table 26)。しかし期待に反し、0.5 unit の添加量では反応の促進は観察されず、非添加時と同程度の活性を示すにとどまった(entry 2)。さらに、添加量を 3 unit まで増加するとデラセミ化反応が阻害された。結局、PPase を用いて副生物を分解することにより、デラセミ化反応を促進させることはできなかった。

Table 26. Effect of PPase on the deracemization reaction of cell free systems^a

entry	PPase (unit)	ee (%) ^b	relative activity (%)
1	—	42	100
2	0.5	43	102
3	3	25	60

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 3 h at 30 °C with cell-free extract of *N. diaphanozonaria* containing 3% ethylene glycol and cofactors(ATP: 10 mM, CoASH: 2 mM, MgCl₂: 10 mM). ^b Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

Brevibacterium ketoglutamicum KU 1073 株を用いた デラセミ化反応

3.1 スクリーニングとデラセミ化能を有する新規微生物の取得

前章までの *N. diaphanozonaria* を利用した検討では、いくつかの構造を有する基質に対して効率的にデラセミ化反応を進行させることに成功した。しかし、破碎上清中の酵素が不安定であることから、酵素の単離精製には至っていない。そこで、カビの一種 *C. militaris* ATCC 34164 株についてこれまでに報告されている文献¹⁵を参考にデラセミ化活性の再現性の確認を行なった(Table 27)。その結果、文献にて示されていた条件(pH 5.5)ではデラセミ化活性を見出すことはできなかった(entry 1, 2)。一方、pH 7.0 とした場合にはある程度の反応の進行を確認できた(entry 2,3)。また本微生物は培養が難しく、再現性の良い結果出すことは困難であった。そこで、最終的には酵素レベルでの検討を目的とし、2-メチルカルボン酸に対してデラセミ化活性を有する新規微生物のスクリーニングを行なうこととした。

Table 27. Deracemization of 2-methyl carboxylic acids by *C. militaris*

entry	substrate ^a	pH	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	2-phenylpropanoic acid	5.5	72	6 (S)
2	2-phenoxypropanoic acid	5.5	89	6 (R)
3	2-phenylpropanoic acid	7.0	69	48 (S)
4	2-phenoxypropanoic acid	7.0	87	17 (R)

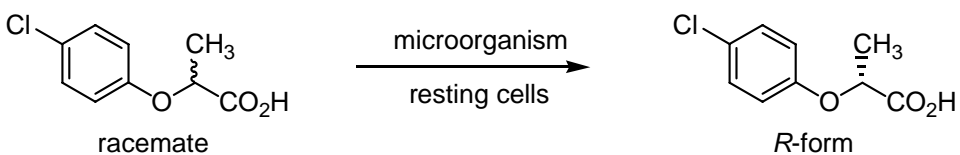
^a The starting compounds were incubated with resting cells of *C. militaris* at 26 °C for 48 h.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

基質としてはラセミ体の2-(4-chlorophenoxy)propanoic acidあるいは2-phenylpropanoic acidを選択した。これは、基質の両鏡像体のうち、どちらに対して活性を示しても、スクリーニングをできるようにするためである。当研究室にて保有している保存菌株について、*N. diaphanozonaria* medium(10 mL)を用いて培養し、集菌、1 mg/mLの基質を含む100 mM KPB (pH 7.0, 5 mL)に懸濁し30 °Cにて72時間振とう培養を行なった。その結果、2-(4-chlorophenoxy)propanoic acidに対して顕著にデラセミ化活性を有する3種の微生物を見出すことに成功した。興味深いことには、これら3種の微生物は共に(S)-体に対して作用し、反応の進行と共に(R)-体へとデラセミ化することが判明した(Table 28)。反

応の進行度合いは *N. diaphanozonaria* と比較すると小さいが、これまでほとんど知られていない 2-aryloxypropanoic acid に対してデラセミ化能を有する微生物を複数株得られたことは今後の研究に大きな進展をもたらすと考えられる。

Table 28. Screening of new microorganisms having the deracemization activity toward 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid

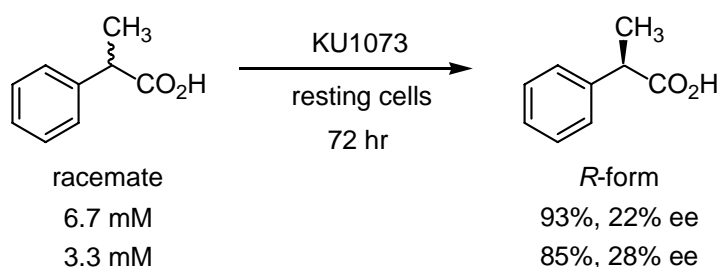


entry	strain ^a	time (hr)	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	<i>Nocardia diaphanozonaria</i> JCM 3208	48	95	97
2	<i>Brevibacterium ketoglutamicum</i> KU1073	72	80	72
3	<i>Mycobacterium smegmatis</i> KU1047	72	98	47
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KU1097	72	85	36

^a 2-(4-Chlorophenoxy)propanoic acid was incubated with resting cells of microorganisms at 30 °C.

^b Isolated yield after conversion to the corresponding methyl ester. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

新たに得られた 3 種の微生物の中で最も高いデラセミ化活性を示した株 *Brevibacterium ketoglutamicum* KU 1073 は、2-phenylpropanoic acid についてもデラセミ化活性を有し、(R)-体へと立体反転することを確認した(Scheme 47)。これは *N. diaphanozonaria* と同様に 2-phenylpropanoic acid と 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid の間で、立体識別能が逆転していることを示しており大変興味深い。ただし、基質濃度を変化させても得られる化合物の ee はほとんど変わらなかった。このことは、本基質に対する立体選択性が高くないことを示しているといえる。



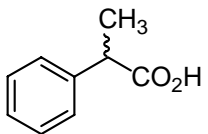
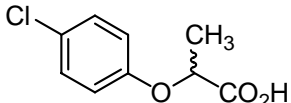
Scheme 47.

また、2-phenylthiopropanoic acid および 2-methyl-3-phenylpropanoic acid を用いた検討も行った。その結果、2-phenylthiopropanoic acid ではデラセミ化反応の進行は見られず、ラセミ体を回収するにとどまった。また硫黄原子が酸化したと考えられるスルホキシド体やスルホン体も確認されなかった。一方、2-methyl-3-phenylpropanoic acid については代謝反応が進行したと考えられる化合物

α -methylcinnamic acid を 8% の収率で回収した。基質は完全に消失していた。

このように、*N. diaphanozonaria* と基質特異性が類似している結果を得たため、2.1.2 にて行なったように、ACS 阻害剤の添加効果に関する検討を行った (Table 29)。具体的には休止菌体反応条件下、基質と共に阻害剤を 3 当量添加し、デラセミ化反応が影響を受けるのかについて確認した。本菌株の有するデラセミ化活性は *N. diaphanozonaria* と比較すると低いため、反応時には菌体を 5 倍に濃縮した。基質としては 2-phenylpropanoic acid と 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を選択した。検討の結果、パルミチン酸を添加した系については、反応開始後 24 時間経過した後においても全く阻害は観察されなかったのに対し、安息香酸を添加した系では 2 種類の基質とも阻害が観察された。特に 2-phenylpropanoic acid に対する安息香酸の阻害効果は高く、基質に対して 1 当量の添加でもデラセミ化反応は完全に阻害されラセミ体を回収することとなった。一方、2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid に対しては 3 当量添加しても完全に活性は抑制されることはなかった。そこで添加量を 5 当量と 10 当量に増加した検討も行った。その結果、5 当量の添加では生成物の ee は 9% と一部デラセミ化活性が残存していたが、10 当量の添加では完全に阻害されることが分かった。一方、反応系にパルミチン酸を 10 当量添加しても、デラセミ化活性には影響を与えないことを確認した。本菌株のデラセミ化の実現機構は明らかではないが、もし *N. diaphanozonaria* と同様の機構、すなわち立体選択的ラセミ化反応、から成り立っているとすると、MACS が反応に関与していると予想できる。

Table 29. Relation of acyl-CoA synthetase to the deracemization reaction^a

entry	substrate	benzoic acid	palmitic acid	control
1		racemic	22% ee	14% ee
		N.D.	91% yield	93% yield
2		55% ee	95% ee	91% ee
		94% yield	94% yield	94% yield

^a The starting compounds were incubated with resting cells of *B. ketoglutaricum* for 24 h at 30 °C. The amount of inhibitor was 3 equiv. of the substrate. Isolated yield was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester. Benzoic acid and palmitic acid are typical substrates of medium-chain acyl-CoA synthetase (MACS) and long-chain acyl-CoA synthetase (LACS), respectively.

3.2 破碎上清中の酵素の安定性

N. diaphanozonaria を利用した検討では破碎上清中における酵素の不安定性から、酵素の単離精製には至っていない。そこで新たに得られた 3 種の微生物と *C. militaris* を対象に、菌体を破碎した上清を用いてデラセミ化活性の評価を行なった (Table 30)。破碎上清の調製条件は 2 章における *N. diaphanozonaria* に対して最適化された系を用いることとした。*Mycobacterium smegmatis* KU 1047 株、*Pseudomonas aeruginosa* KU 1097 株、および *C. militaris* ATCC34164 株は破碎すると活性が著しく低下し破碎上清中よりデラセミ化活性を見出すことはできなくなった。これに対し、*B. ketoglutamicum* KU 1073 株に関しては破碎上清中にも有意なデラセミ化活性を確認できた (entry 1)。

Table 30. Deracemization of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid using the cell-free systems^a

entry	strain	ee (%) ^b
1	<i>Brevibacterium ketoglutamicum</i> KU1073	24
2	<i>Mycobacterium smegmatis</i> KU1047	racemic
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KU1097	racemic
4	<i>Cordyceps militaris</i> ATCC34164	racemic

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 24 h at 30 °C with cell-free extract containing 3% ethylene glycol and cofactors (ATP: 10 mM, CoASH: 2 mM, MgCl₂: 10 mM).

^b Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

誘導剤の検討から、本微生物もまた培養時に 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を培地中に添加することによってデラセミ化酵素の誘導が行なわれ、破碎上清中にデラセミ化活性を見出すことができるようになると判明した。次に添加有機溶媒や補因子の要求性についても検討を行った (Table 31)。その結果、補因子として ATP, CoA, Mg²⁺が必要であることが判明し、また *N. diaphanozonaria* の場合と同様に有機溶媒としてエチレングリコールを添加するとデラセミ化活性が向上することも確認された。

Table 31. Investigation of optimal conditions using the cell-free system of *B. ketoglutamicum*^a

entry	additives ^b	time (hr)	ee (%) ^c
1	cofactors, ethylene glycol	3	15
2	— ethylene glycol	3	1
3	cofactors —	3	8
4	— —	3	2
5	cofactors, ethylene glycol	24	22
6	cofactors —	24	17

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated at 30 °C with cell-free extract of *B. ketoglutamicum*. ^b The concentration of additives was as follows: cofactors (ATP: 10 mM, CoASH: 2 mM, MgCl₂: 10 mM), ethylene glycol: 3% v/v. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

本微生物の破碎上清は透析操作によっても活性が失われることはなかった。そこで、CoA の必要性について検討を行った(Table 32)。透析によって CoA を除去するとデラセミ化反応は進行しなくなることが確認された(entry 1)が、ここへ CoA を添加すると透析前と同等の活性を發揮した(entry 2)。

Table 32. Influence of Coenzyme A on the deracemization of cell-free system of *B. ketoglutamicum*^a

entry	thiol ^b	yield (%)	ee (%) ^c
1	—	84	2
2	CoASH	89	22

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 24 h at 30 °C with dialyzed cell-free extract containing 3% ethylene glycol and cofactors(ATP: 10 mM, MgCl₂: 10 mM).

^b 2 mM CoASH was added to the reaction mixture.

^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

次に破碎上清中におけるデラセミ化関連酵素の安定性を評価するために、酵素の保存日数と活性の変化を追跡することとした(Figure 16)。その結果、およそ1週間で相対活性は50%にまで落ち込むものの、確かに酵素活性は残存しうることを確認できた。これまでに見出された微生物では、速やかに活性が消失することと比べると対照的な結果である。

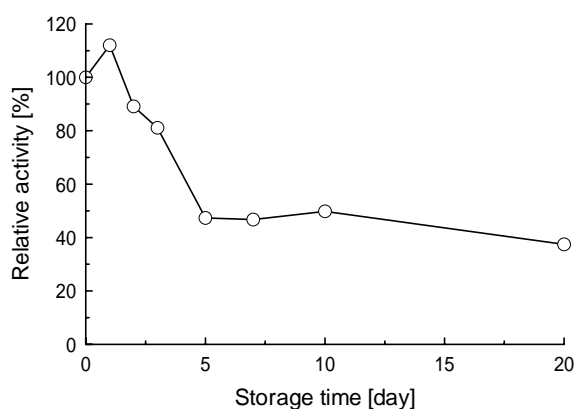


Figure 16. Stability of the deracemization activity in the cell-free extract of *B. ketoglutamicum*

さらに超遠心によって、破碎上清を可溶性画分と膜画分に分離し反応を試みた(Table 33)。遠心条件は 105,000 x g にて 1 時間である。その結果、デラセミ化関連酵素は可溶性画分に含まれることが判明した。このように菌体を破碎しても酵素がある程度安定に存在していることを確認できたため、本微生物の破碎上清を用いて更なる酵素の精製を進めることとした。

Table 33. Deracemization of 2-(4-chlorophoxy)propanoic acid by the aid of ultracentrifugal fractions^a

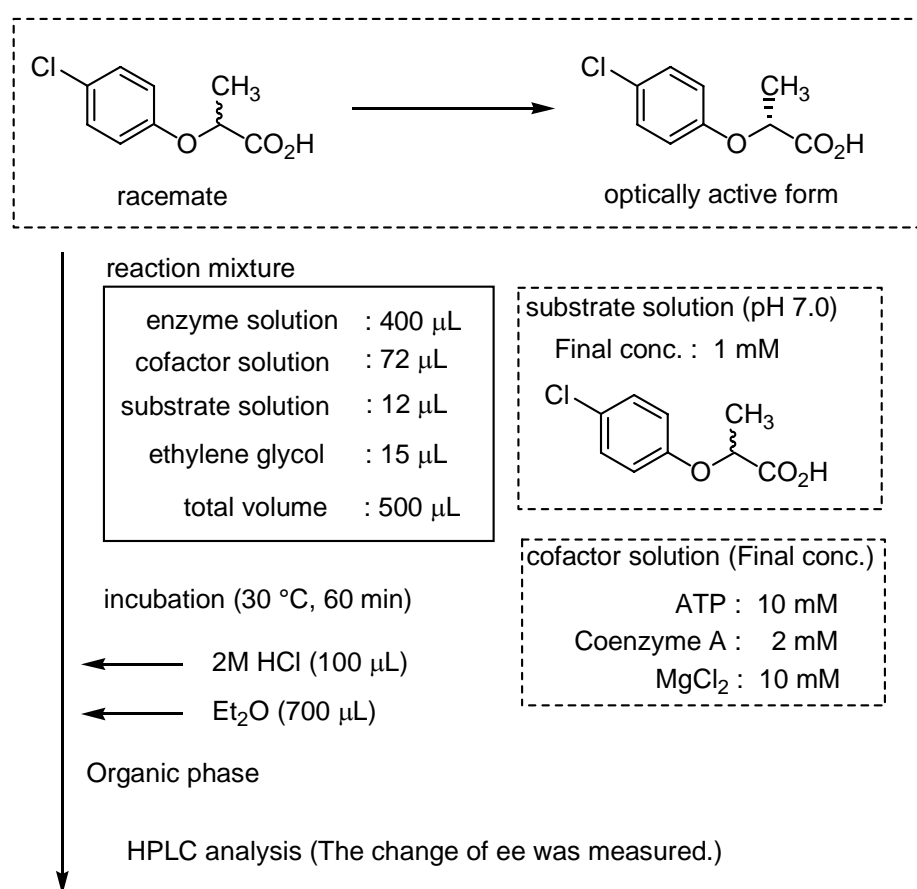
entry	fraction ^b	ee (%) ^c
1	supernatant	18
2	precipitate	3
3	supernatant + pecipitate	18

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 24 h at 30 °C with ultracentrifugal fraction containing 3% ethylene glycol and cofactors(ATP: 10 mM, CoASH: 2 mM, MgCl₂: 10 mM). ^b The cell-free extract was further separated by ultracentrifugation at 105,000 x g for 1 h.

^c Ee of the product was determined by HPLC analysis after conversion to the corresponding methyl ester.

3.3 酵素精製の試み

本デラセミ化活性発現のためには ATP, CoA, Mg^{2+} を必要とする。このことよりラットや *N. diaphanozonaria*、*C. militaris* の例と同様に複数の酵素反応からなる複合反応機構である可能性が高い。しかし単一の酵素によって反応が実現されている可能性も否定できない。そこで、酵素の活性測定には破碎菌体を用いた際の条件をそのまま適用することとした。つまり反応の結果、有機相中に抽出されてくる化合物の鏡像体過剰率を HPLC で測定し、ee の向上を指標に活性画分を決定するというものである。酵素活性の測定法は Scheme 48 に示したとおりである。



Scheme 48.

精製の各段階におけるタンパク量はBio-Rad Protein Assay Systemを用いて測定した。各種クロマトグラフィーにおける溶出パターン作成時のタンパク量は280 nmにおける吸光度を、 $1.0(\text{Abs})=1.0(\text{mg}/\text{mL})$ と仮定して算出した。全ての操作は氷上にて行なった。精製には1 mMのジチオスレイトールを含む100 mM MOPS-NaOH緩衝液(pH 7.25)を用いている。

Step 1 菌体の培養

B. ketoglutamicum KU 1073 株の有するデラセミ化酵素は、培養時に 0.1% の 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を添加した際に生産される誘導酵素である。そこでまず *N. diaphanozonaria* medium を用いて 48 時間全培養した菌体を 10 倍希釈する際に誘導剤を添加し、さらに 24 時間振とう培養を行なった。培養温度は 30 °C とした。2 L の培地より得られる菌体量は、湿重量でおよそ 25 g であった。

Step 2 破碎上清の調製

得られた菌体を MOPS-NaOH 緩衝液 (100 mL) に懸濁し、フレンチプレスを用いて細胞を破碎し遠心分離 (15,000 rpm, 10 min) により破碎上清を得た。

Step 3 プロタミン処理

破碎上清 (112 mL) に 2% 硫酸プロタミン水溶液 (112 μ L) を添加した。15 min 後生じた沈殿を遠心分離 (15,000 rpm, 20 min) により除去した。

Step 4 硫酸分画

得られた酵素液に攪拌しながら硫酸を加え、40% 飽和とした。30 min 後生じた沈殿を遠心分離にて除去した。上清画分にさらに 70% 飽和となるように硫酸を添加し、30 min 攪拌した。生じた沈殿を遠心分離した。得られた沈殿を MOPS-NaOH 緩衝液 (20 mL) に溶解させ、500 mL の同緩衝液を用いて 4 hr 透析を行なった。

Step 5 TOYOPEARL HW-75F カラムクロマトグラフィー

透析後の酵素液 (27 mL) を MOPS-NaOH 緩衝液にて平衡化した TOYOPEARL HW-75F カラムクロマトグラフィー (250 mL) にチャージ、同緩衝液にて溶出させ、以下のような溶出パターンを得た。フラクションは 7 mL ずつ回収した。

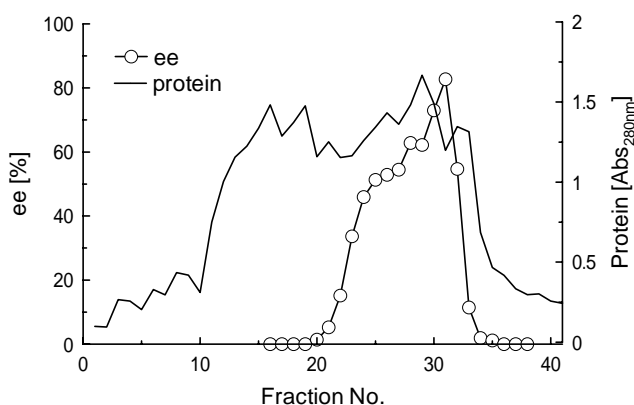


Figure 17. Elution profile of TOYOPEARL HW-75F column chromatography

Step 6 TOYOPEARL Butyl-650Mカラムクロマトグラフィー

上記活性画分(47 mL)を集め20%硫酸飽和とし、20%硫酸飽和の緩衝液で平衡化したTOYOPEARL Butyl-650Mカラムクロマトグラフィー(100 mL)にチャージし、20%飽和の同緩衝液(150 mL)にて洗浄した。20%飽和から硫酸非添加(0%飽和)の同緩衝液(300 mLずつ)の直線的な濃度勾配で溶出させたのち、さらに硫酸非添加の緩衝液(150 mL)にて溶出を続けた。溶出パターンは以下の通りである。フラクションは12 mLずつ回収した。

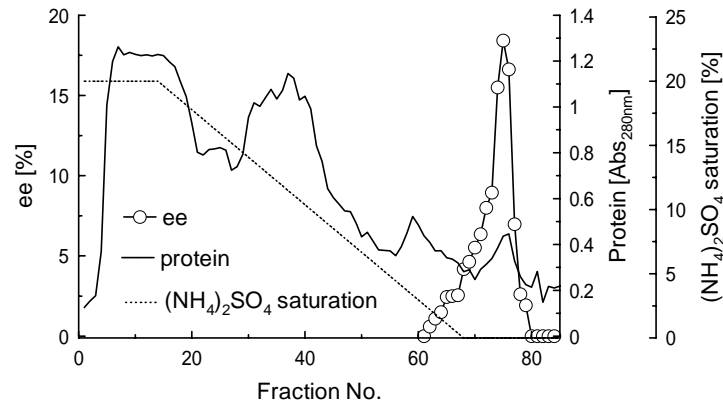


Figure 18. Elution profile of TOYOPEARL Butyl-650M column chromatography

Step 7 TOYOPEARL DEAE-650Mカラムクロマトグラフィー

上記活性画分を集め限外ろ過を行なうことによって濃縮した。本酵素溶液(22 mL)をMOPS-NaOH緩衝液にて平衡化したTOYOPEARL DEAE-650Mカラムクロマトグラフィー(50 mL)にかけた。NaClを濃度0 mMから300 mMになるように添加した緩衝液(200 mLずつ)の直線的な濃度勾配にて溶出させたのち、さらに300 mMのNaClを含む緩衝液(200 mL)にて溶出を続けた。溶出パターンは以下の通りである。フラクションは12 mLずつ回収した。

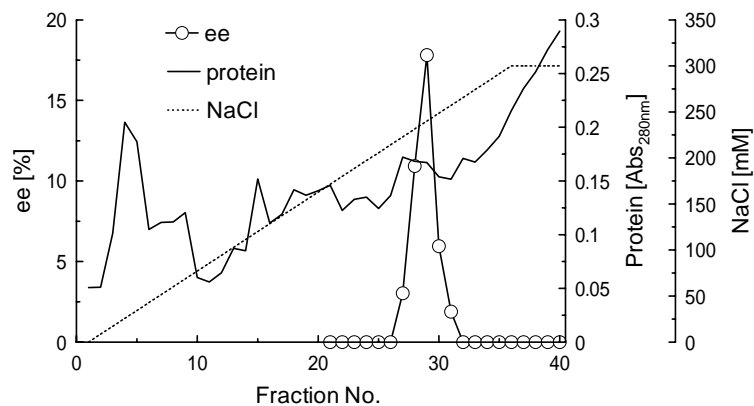


Figure 19. Elution profile of TOYOPEARL DEAE-650M column chromatography

Step 8 Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type Iカラムクロマトグラフィー

上記活性画分を集め限外ろ過を行なうことによって濃縮した。本酵素溶液(20 mL)を25% v/v リン酸緩衝液(100 mM, pH 7.0)を含むMOPS-NaOH緩衝液にて平衡化したMacro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type Iカラムクロマトグラフィー(10 mL)にチャージし、同緩衝液(100 mL)で洗浄した。リン酸緩衝液を25%から75%となるように添加した緩衝液(100 mLずつ)の直線的な濃度勾配にて溶出させたのち、さらに75%の緩衝液(100 mL)にて溶出を続けた。溶出パターンは以下の通りである。フラクションは12 mLずつ回収した。

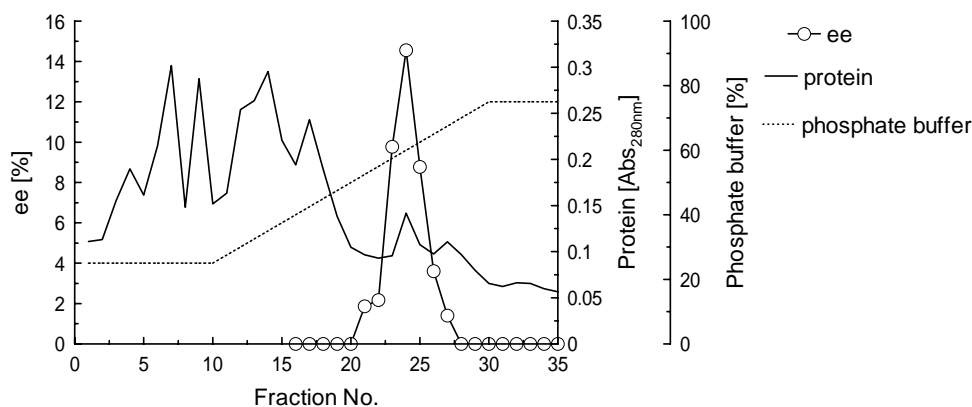


Figure 20. Elution profile of Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I column chromatography

Step 9 DEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー

上記活性画分を集め限外ろ過によって濃縮した後、本酵素溶液(22 mL)を200 mM のNaClを含むMOPS-NaOH緩衝液中にて4 hr透析を行なった。本酵素溶液を200 mM のNaClを含むMOPS-NaOH緩衝液にて平衡化したDEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー(50 mL)にチャージし、200 mM NaClを含む同緩衝液(150 mL)で洗浄した。NaClを濃度200 mMから300 mMになるように添加した緩衝液(200 mLずつ)の直線的な濃度勾配で溶出させたのち、さらに300 mM のNaClを含む緩衝液(150 mL)で溶出を続けた。溶出パターンは以下の通りである。フラクションは12 mLずつ回収した。

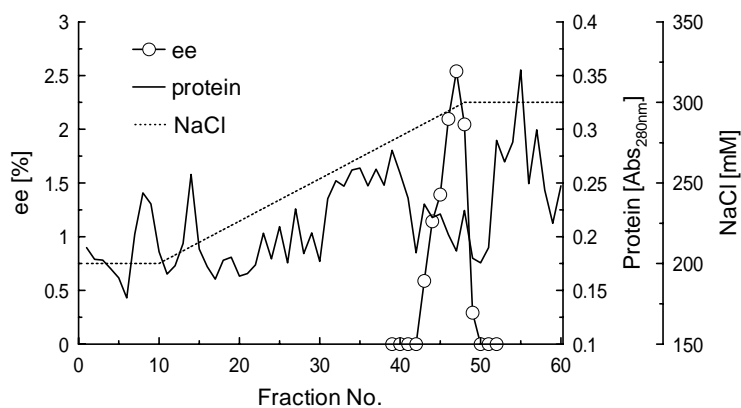


Figure 21. Elution profile of DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography

以上のように、反応の結果有機相へと抽出される化合物の鏡像体過剰率の変化を指標に酵素精製を行なった結果、ほぼ単一のバンドを得ることができた(Figure 22)。精製には、破碎上清に対して、核酸の除去、硫酸分画を行い、本粗酵素液をゲルろ過カラム、疎水性カラム、イオン交換カラム2種、ヒドロキシアパタイトカラムの計5種類のカラムを用いた。最終的におよそ60kDaの位置に最も太いバンドを得た。本酵素をMCAD1 (α -Methyl Carboxylic Acid Deracemizing Enzyme 1)と命名した。

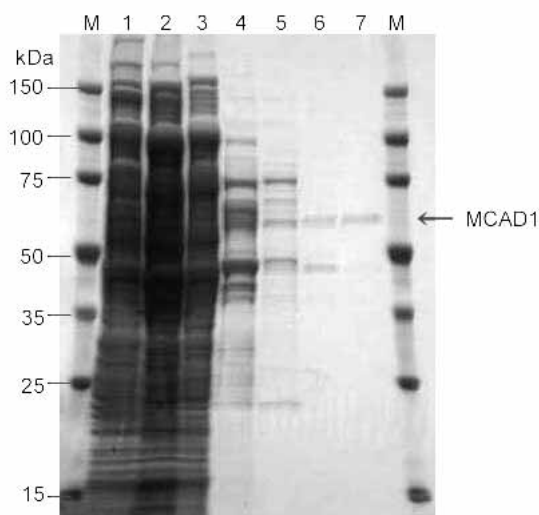


Figure 22. SDS-PAGE analysis of enzyme purification: lane 1-7, protein samples from the purification steps as described in Table 33. Molecular mass standards (Novagen Inc.) were run in lane M.

次に、MCAD1が実際にデラセミ化反応を触媒するのかについて検討を行った。つまり、有機相へと抽出される化合物のeeに加えて、収率の算出も行なった(Table 34)。その結果、精製初期の段階、つまり破碎上清、硫酸分画、およびゲルろ過カラム精製まではほぼ定量的な収率であったものが、疎水性カラム精製以降の段階では明らかな収率の低下が観察された(entry 4-7)。これはラセミ体基質のうち、一方の鏡像体のみが違った構造の化合物へと変換され有機相中へ抽出されてなくなったと仮定すると説明ができる。即ちデラセミ化反応は一段階の反応ではなく、反応の中間体として水溶性の化合物が存在することを意味する。このことから、本反応に関与する酵素もこれまでのラットの例と同様に複数種存在し、MCAD1はそのうちの1つであると考えられる。ここで有機層へと抽出されない高極性化合物としてはチオエステル体が考えられる。

基質として2-(4-chlorophenoxy)propanoic acidを用いると、酵素の反応性が低く反応を解析しにくいいため、より反応性の高い2-methyl-3-phenylpropanoic acidを用いてさらに検討した。すると24時間の反応の後、基質はすべて水溶性化合物に変化し、有機相から出発物質を回収することはできなかった。有機相に抽出されず水相にとどまっている理由は、反応性の低いエナンチオマーも徐々に変換され、最終的には全てが高極性化合物であるチオエステル体に変換されたためと考えた。そこでチオエステル体を加水分解し、カルボン酸へと戻した後に再度、有機相へと抽出することを試みた。具体的には、水相に2M NaOHを添加することによって強塩基性とし、さらに100 °C, 5 分間の煮沸処理を行なった。これを2M HClにて再度酸性化し、エーテル抽出、HPLCによる分析を試みた。その結果、定量的にラセミ体の2-methyl-3-phenylpropanoic acidを回収した。

Table 34. Partially purified enzyme catalyzed reaction toward 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid^a

purification step	recovered acid	
	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1. Cell-free extract	98	9
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ frac.	98	8
3. HW-75F	97	10
4. Butyl Toyopearl	91	9
5. DEAE Toyopearl	—	—
6. Hydroxyapatite	—	—
7. DEAE Sepharose	90	12

^a The 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was incubated for 24 h at 30 °C with partially purified enzyme containing 3% ethylene glycol and cofactors(ATP: 10 mM, CoASH: 2 mM, MgCl₂: 10 mM). ^b Yield was determined by HPLC in comparison with the value of integration in peak area of 2-methyl-3-phenylpropanoic acid as an internal standard. ^c Ee of the product was determined by HPLC analysis.

次に、チオエステル体の生成をHPLCを用いて検出することとした。Kawaguchiらの方法^{41c}にしたがって2-(4-chlorophenoxy)propanoic acidおよび2-methyl-3-phenylpropanoic acidのCoAチオエステル体を調製し、MCAD1と反応を行った後の水相中の化合物の溶出挙動と比較を行なった。その結果、チオエステルであると考えられるピークを微弱ながら確認できた。

このようにチオエステル体の生成が考えられる結果を得た。そこで反応の経時変化を追跡し、MCAD1が基質に対して立体選択的な反応を触媒しているかを確認することとした(Table 35)。その結果、選択性は低いながらも(R)-体優先的なチオエステル化反応が進行していることが分かった。

Table 35. MCAD1 catalyzed thioesterification of 2-methyl-3-phenylpropanoic acid^a

entry	time (hr)	recovered acid		thioester	
		yield (%) ^b	ee (%) ^c	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	0	100	0	0	—
2	1	24	64 (S)	73	17 (R)
3	3	6	91 (S)	93	4 (R)
4	17.5	0	—	100	0

^a The 2-methyl-3-phenylpropanoic acid was incubated at 30 °C with partially purified MCAD1 containing 3% ethylene glycol and cofactors(ATP: 10 mM, CoASH: 2 mM, MgCl₂: 10 mM).

^b Yield was determined by HPLC in comparison with the value of integration in peak area of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid as an internal standard.

^c Ee of the product was determined by HPLC analysis.

ところで、全菌体を用いた検討では、反応の結果2-phenylpropanoic acidのeeは(*R*)-体へと偏っていくことが観察されている(Scheme 47)。よって、もしMCAD1が本化合物に対してもチオエステル化反応を触媒するとすると、その立体選択性は(*S*)-体特異的になるはずである。しかし本基質に対してMCAD1との反応を試みたところ、予想とは逆の立体選択性、つまり(*R*)-体選択的なチオエステル化反応が進行することが確認された。MCAD1は2-(4-chlorophenoxy)propanoic acidを対象として精製した酵素であり、菌体内には2-phenylpropanoic acidの(*S*)-体に対してより活性な同様の酵素が存在しているのではないかと推測される。

以上の検討より、eeの変化を利用して精製を行なったMCAD1は、チオエステル化を触媒する酵素であることが判明した。つまり、*B. ketoglutamicum*による α -メチルカルボン酸に対するデラセミ化反応もまた、これまでに報告されている例と同様に複数の酵素からなる複合反応機構にて進行していることが明らかとなった。

精製のプロフィールをTable 36に示す。酵素活性の指標となるU(unit)の算出方法は以下の通りである。つまり、30 °Cにて反応を行い1 minに1 nmolの2-(4-chlorophenoxy)propanoic acidをthioester化する酵素量を1 Uと定義した。先のTable 34における検討から精製の初期の段階、つまりゲルろ過カラムまで(entry 1-3)はデラセミ化反応が進行するため、表に示されたunitの値は見かけ上のものである。

Table 36. Purification of MCAD1

purification step	total protein (mg)	total activity (unit)	specific activity (unit/mg)	yield (%)
1. Cell-free extract	1660	240	0.145	100
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ frac.	839	317	0.338	132
3. HW-75F	605	250	0.414	104
4. Butyl Toyopearl	24	25.3	1.06	11
5. DEAE Toyopearl	2.9	17.3	6.06	7.2
6. Hydroxyapatite	0.58	9.40	16.1	3.9
7. DEAE Sepharose	0.11	1.77	15.8	0.7

3.4 MCAD1 の N-末端解析

部分精製に成功した MCAD1 タンパク質について N-末端解析を行い以下のように決定した。

MCAD1: MLSTMQDAPLSIA

本配列に対し FASTA を利用した相同性検索を行なった。その結果、バクテリア由来の ACS と大変高い相同性を示すことが確認された (Table 37)。つまり、N-末端解析の結果からも MCAD1 がカルボン酸をチオエステル化する酵素であることを支持する結果を得た。また、触媒する脂肪酸の鎖長の長さからの分類では、本酵素が中程度の鎖長を有する脂肪酸に対して触媒活性を示すチオエステル化酵素、MACS であることが強く示唆されている。これは、ACS 阻害剤に対する全菌体を用いた検討から予想される結果とも合致する。また、*N. diaphanozonaria* が 2-phenylpropanoic acid および 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid に対して示すのと同様の選択性が、*B. ketoglutamicum* でも観察されている。このことから、デラセミ化に関与する酵素系が 2 種類の微生物間において同一のものである可能性が高い。本仮定が正しいとすると、*N. diaphanozonaria* もまた MACS によって立体選択的なチオエステル化を実現していることとなり、これは阻害剤を用いた ACS の分類結果の妥当性を裏付けることとなる。一方、ラットにおいて精製されている立体選択的チオエステル化を触媒する酵素 LACS (Long-chain-fatty-acid-CoA ligase, liver isozyme (EC 6.2.1.3))^{20b} との相同性について確認したところ、MCAD1 の N-末端配列とは全く相同性がないことが明らかとなった。つまり、*B. ketoglutamicum* においてデラセミ化に関与しているチオエステル化酵素が、ラットにおいて報告されているものとは違った種類の酵素であると確認できた。

rat LACS : MEVHELFRYFRMP

Table 37. Results of FASTA search analysis toward N-terminal of MCAD1

entry	strain	protein type	identity (%)	sequence
1	<i>Brevibacterium ketoglutamicum</i> KU 1073	MCAD1	-	MLSTMQDAPLSIA
2	<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	putative acyl-CoA synthetase	84.6 ^a	MLSTMQDEPLSLA
3	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	acyl-CoA synthetase	83.3 ^a	MLSTMQDVPLSLT
4	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	putative fatty acid-CoA ligase	76.9 ^a	MVIIMLSTMQDIP
5	<i>Streptomyces coelicolor</i>	putative fatty acid-CoA ligase	69.2 ^a	VLSTMQDVPLLIS
6	<i>Mycobacterium abscessus</i> 390R	acyl-CoA synthetase	53.8 ^a	MQSTMQNVPLTVS
7	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	medium-chain-fatty-acid-CoA ligase	53.8 ^a	MLGLMQDTPLTLS
8	<i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314D	putative medium-chain-fatty-acid CoA ligase	76.9 ^b	MLSTMQDVPLSLS

^a This identity was calculated by fasta program (protein sequence x protein database).

^b This identity was calculated by tfastx program (protein sequence x DNA database).

4 章

結論

微生物の一種 *Nocardia diaphanozonaria* JCM3208 株および *Brevibacterium ketoglutamicum* KU 1073 株を用いた α -メチルカルボン酸のデラセミ化反応についての検討を行った。本法は光学分割の限界、つまり最大収率が 50%を超えることがないこと、および反応の前後にて未反応基質と生成物の分離操作が必要であること、を克服する新奇かつ有用性の高い光学活性体調製法である。

N. diaphanozonaria を用いた検討の結果、本菌株は最適反応条件の下、2-phenylpropanoic acid の(S)-体を(R)-体へと立体反転することを見出した。これまでに報告されている 2-arylpropanoic acid の酵素的デラセミ化反応において(R)-体へと立体反転が進行する例は報告されておらず、酵素学的視点からだけでなく、有機合成的視点から見た場合にも非常に興味深い。またデラセミ化の過程は可逆反応であり、両鏡像体から出発した場合にも反応の進行と共に一定値に落ち着くことが明らかとなった。さらに基質特異性の検討で 2-phenylpropanoic acid だけでなく 2-aryloxypropanoic acid についても効率よく反応が進行することが明らかとなった。特筆すべきは、構造の類似するこれら 2 つの化合物間において立体選択性の逆転が観察されたことである。立体選択的チオエステル化を行う酵素、acyl-CoA synthetase(ACS)に対する全菌体を用いた検討より、これら 2 つの基質に対するデラセミ化反応は安息香酸の添加によって阻害されることが明らかとなった。安息香酸は中程度の鎖長の脂肪酸に対してチオエステル化を行なう酵素(MACS)のよい基質であり、このことからデラセミ化反応には MACS が関与していることが推測された。また α -メチンプロトンに重水素置換した 2-phenylpropanoic acid を用いた検討より、デラセミ化の過程にはエノール型中間体を經由するラセミ化の過程が存在することが判明した。また CoA チオエステルのアナログ体を用いた検討によって、本菌株はチオエステル活性を有していることも確認された。このようにデラセミ化反応は複数の酵素が関与する立体選択的ラセミ化反応にて実現されることが明らかとなった。

ところで全菌体を利用した反応条件では、基質によっては代謝反応が進行し、デラセミ化の厳密な議論が行えないという欠点を有していた。そこで、機構解析に立脚して代謝を抑制し、代謝の進行した基質、2-phenylthiopropoic acid および 2-methyl-3-phenylpropanoic acid に対してデラセミ化を優先して進行させ、高い光学純度で生成物を回収することに成功した。

破碎上清を用いた検討では、*N. diaphanozonaria* の有する酵素の不安定性より、破碎後、活性の速やかな消失が観察されたが、様々な検討を加えることによって、破碎後しばらくは活性を保持することが可能となった。最適化された条件を利用して、補因子必要性の検討を行ったところ、本反応では ATP, CoA, および Mg^{2+} を要求することが明らかとなった。

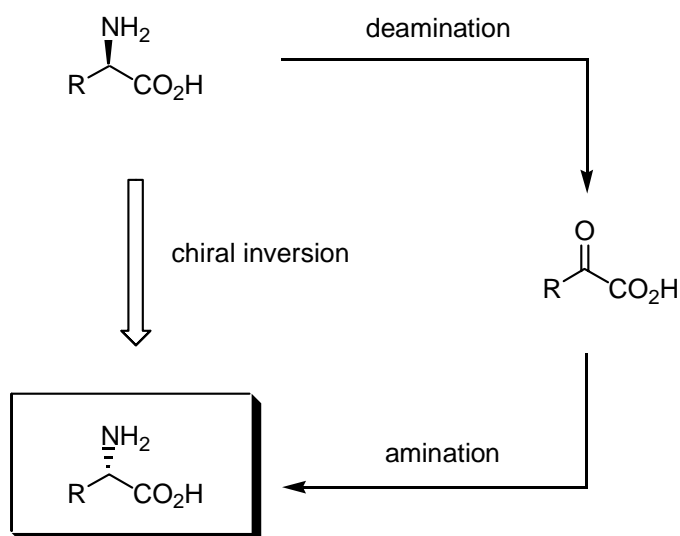
B. ketoglutamicum を用いた酵素精製の検討では、デラセミ化の一段階目の反応であるチオエステル化を触媒する酵素の精製に成功した。また本反応は立体選択的なチオエステル化反応を触媒することを確認できた。本酵素の N-末端解析の結果、MCAD1 がバクテリア由来の MACS と高い相同

性を示すことが明らかとなった。当初想定していたような、一種類のタンパク質でデラセミ化反応を実現するような酵素ではなかったが、バクテリアにおいて立体選択的なチオエステル化を触媒する酵素としては MCAD1 が初めてであり、本分野に新たな知見を与えたものと考えている。今後のより詳細な解析が期待される。

本論

第2部

微生物を用いた α -アミノ酸の デラセミ化反応



Chemical yield : 100%

Optical yield : 100%

Enantioselective Inversion of Configuration Pathway

1 章

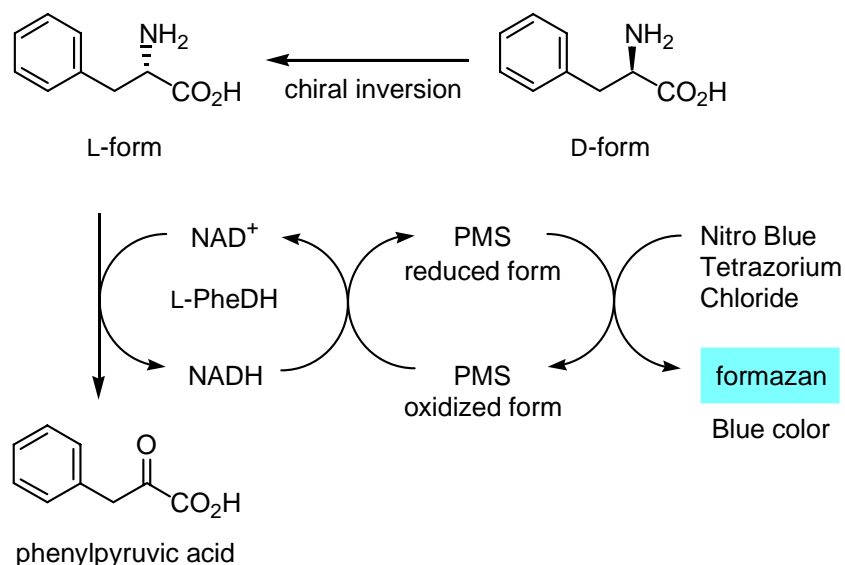
デラセミ化能を有する微生物の探索

近年、呈味機能、栄養機能、生理機能、それにライフスタイル改善機能といった様々な有用な機能をアミノ酸が発揮することが明らかになり、その効率の良い調製法の開発に注目が集まっている。生体触媒を用いた合成法についてもこれまでに多数報告されている。著者はデラセミ化反応がアミノ酸の効率的な合成法として利用できるのではないかと考え検討を行うこととした。天然型アミノ酸は醗酵法などの手法により生産できることが知られているが、非天然型のアミノ酸については適用できない。この場合には化学的手法によって合成することとなる。最も簡便な合成法としては Strecker 法⁴⁵が挙げられるが、本法により得られるのはラセミ体である。したがって従来は光学分割法を利用して両鏡像体に分離する必要があった。もし、ラセミ体に対してデラセミ化反応を進行させ、両鏡像体の濃度平衡を一方の鏡像体側に偏らせることができれば、それは新規な光学活性体調製法として注目すべきものとなる。そこで基質として phenylalanine 誘導体を選択し、本アミノ酸に対してデラセミ化活性を有する新規微生物の取得を試みることにした。

1.1 微生物の探索

スクリーニングの考え方は以下の通りである。即ち、生体がタンパク質等の合成を行なう際には L-体のアミノ酸を用いることとなるが、D-体のアミノ酸を栄養源として生育する菌株の中には D-体を L-体へと変換する活性を有するものが存在するのではないかという考え方である。培地としては、D-phenylalanine を炭素源として含む無機塩培地、minimal D-phenylalanine medium を用いることとし、全国各地の土壌より微生物の取得を試みた。その結果、非常にたくさんの D-phenylalanine 資化性菌を得ることができた。得られた微生物の中で、実際に D-体を L-体へと変換する活性を見出すために Scheme 49 にて示したようなアッセイ系(plate color assay)を構築した。

本アッセイ系には L-phenylalanine dehydrogenase(L-PheDH)が含まれている。デラセミ化酵素の働きによって D-phenylalanine が L-体へと変換されると、L-PheDH によってアミノ基部分が酸化されケト酸へと変換される。この際同時に、補酵素 NAD^+ が NADH に還元される。 NADH は電子受容体である phenazine metasulfate (PMS) に電子を伝達、還元型となった PMS が、最終電子受容体である nitrobluetetrazorium chloride を還元する。本化合物は、還元の結果可視光領域に吸収波長をもつ formazane 構造となり、青色を呈する。つまり、phenylalanine が L-体へと変換されたことを、視覚的に判断することができるわけである。



Scheme 49.

本カラーアッセイ法は検体数の多い際に効果を発揮し、大まかな一次スクリーニングの手法として大変効果的であると考えられる。本手法を用いてスクリーニングを行なった結果を Figure 23 に示した。いくつかの菌株においてストリークを行なった部分が明らかに青く変色していることが分かる。

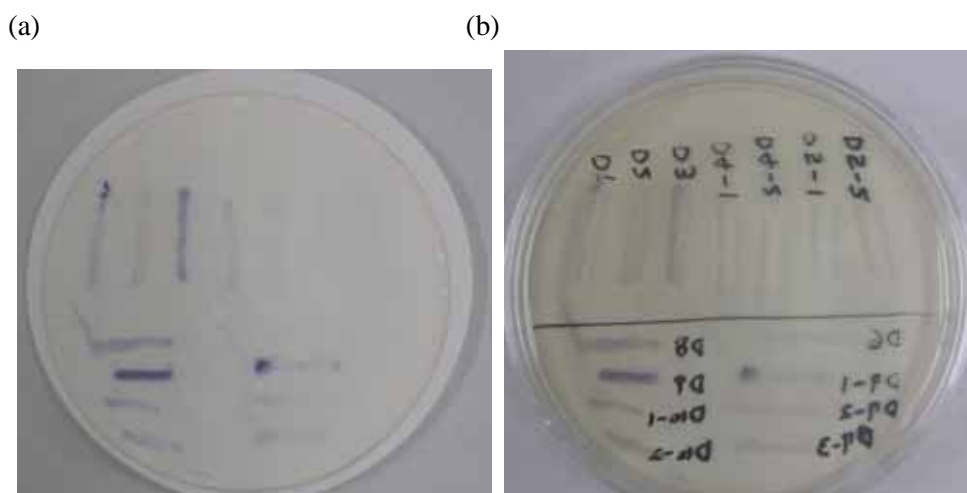


Figure 23. Colorimetric plate based screening assay (plate color assay) for chiral inversion activity of D-phenylalanine by capture of L-phenylalanine production. (a), a color changed membrane; (b), place original streak plate upon the assay membrane.

ところで、本法を用いたスクリーニングでは、phenylalanine に対してラセミ化を行なう酵素活性を有する微生物も陽性の結果を与えるという欠点がある。そこで、実際にアミノ酸を基質として反応を試み、生成物の ee 変化を測定することによって D-体が L-体へと変換されることを確認することとした(二次スクリーニング)。基質としては D-あるいは L-phenylalanine および

DL-4-chlorophenylalanine を選択した。一次スクリーニングの結果得られた複数の菌株について、*N. diaphanozonaria* medium (10 mL)を用いて 30 °C にて培養し、集菌、1 mg/mL の基質を含む 100 mM KPB (pH 7.0, 5 mL)に懸濁して 24 時間振とう培養を行なった。ここで phenylalanine を基質とすると速やかな代謝分解が進行してしまうため、D-体から出発した場合には生成物の鏡像体過剰率が低下し確かに立体反転過程が存在することを、また L-体から出発した場合には、反応の初期の段階(3-10 hr)にてサンプルを回収し、生成物の鏡像体過剰率が全く変化していないことを確認した。次に代謝分解の進行しない非天然型のアミノ酸である DL-4-chlorophenylalanine を用いて反応を行ない、最終的に一方の鏡像体へと平衡が偏っていることを確認した。その結果、明らかなデラセミ化活性を有する 5 種の微生物を見出すことに成功した(Table 38)。

Table 38. Screening of soil microorganisms having the deracemization activity toward phenylalanine

entry	soil strain No. ^a	ee (%)		
		D-phenylalanine	L-phenylalanine	DL-4-chlorophenylalanine
1	1	58 (D)	> 99 (L)	94 (L)
2	7-1	45 (D)	> 99 (L)	> 99 (L)
3	7-2	79 (D)	> 99 (L)	80 (L)
4	7-3	63 (D)	> 99 (L)	86 (L)
5	9	45 (D)	> 99 (L)	95 (L)

^a The wet cells from 10 mL medium were resuspended in 5 mL KPB containing 1 mg/mL racemic substrate and incubated with shaking for 24 h at 30 °C.

土壌からのデラセミ化微生物の探索と平行して、当研究室の保有する微生物を用いたスクリーニングも行なった。基質としては土壌からのスクリーニングの際と同様にD-あるいはL-phenylalanine およびDL-4-chlorophenylalanineを選択した。保存菌株について、*N. diaphanozonaria* medium (10 mL)を用いて30 °Cにて培養し、集菌、1 mg/mLの基質を含む100 mM KPB (pH 7.0, 5 mL)に懸濁して48時間振とう培養を行なった。その結果、顕著なデラセミ化活性を有する複数の微生物を見出すことに成功した(Table 39)。

上記のように土壌あるいは保存菌株から単離した D-phenylalanine に対してデラセミ化活性を有する微生物について特に活性の強かった 9 株を用いてさらなる基質特異性の検討を行うこととした。

Table 39. Screening of microorganisms having the deracemization activity toward phenylalanine

entry	strain	ee (%) DL-4-chlorophenylalanine
1	<i>Nocardia diaphanozonaria</i> JCM 3208 ^a	> 99 (L)
2	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> JCM 2952 ^a	98 (L)
3	<i>Klebsiella planticola</i> JCM 7251 ^a	98 (L)
4	<i>Saccharopolyspora hissuta</i> subsp. <i>kobensis</i> JCM 9109 ^a	94 (L)
5	<i>Pseudomonas taetrolens</i> NBRC 3460 ^a	> 99 (L)
6	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NBRC 3521 ^a	> 99 (L)
7	<i>Arthrobacter pascens</i> NBRC 12139 ^a	98 (L)
8	<i>Streptomyces roseus</i> NBRC 12818 ^a	95 (L)
9	<i>Pseudomonas oleovorans</i> NBRC 13583 ^a	> 99 (L)
10	<i>Pseudomonas oxalaticus</i> NBRC 13593 ^a	> 99 (L)
11	<i>Sinorhizobium meliloti</i> NBRC 14782 ^a	> 99 (L)
12	<i>Sinorhizobium meliloti</i> ATCC 51124 ^a	98 (L)
13	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099 ^b	94 (L)
14	<i>Streptomyces coelicolor</i> IAM 1023 ^a	70 (L)

^a The wet cells from 10 mL medium were resuspended in 10 mL KPB containing 1 mg/mL racemic substrate and incubated with shaking for 48 h at 30 °C. ^b The wet cells from 100 mL medium were resuspended in 10 mL KPB containing 1 mg/mL racemic substrate and incubated with shaking for 144 h at 30 °C.

1.2 基質特異性検討

得られた微生物の中で、最も強いデラセミ化活性を示したのは *Nocardia diaphanozonaria* JCM 3208 株であった (Table 40)。本微生物は α -メチルカルボン酸をデラセミ化する酵素活性を有していることを第一部にて既に報告している。*N. diaphanozonaria* と同様にカビの一種 *Cordyceps militaris* ATCC 34164 株もまた、 α -メチルカルボン酸に対してデラセミ化活性を発揮する。しかし phenylalanine をデラセミ化する活性は持たず、L-体選択的な代謝反応が進行することが観察された (Scheme 50)。



Scheme 50.

また、Table 38 および 39 にて列挙した微生物に対して、 α -メチルカルボン酸である 2-phenylpropanoic acid、2-phenoxypropanoic acid および 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid を基質としたデラセミ化反応を試みた。しかし *N. diaphanozonaria* 以外は目的とする反応は進行せず、ラセミ体を回収するにとどまった。このようなことから、*N. diaphanozonaria* は α -メチルカルボン酸と α -アミノ酸という2種類の基質に対してデラセミ化活性を有する大変珍しい例であるといえる。本微生物を phenylalanine のような天然型アミノ酸に作用させると速やかな代謝分解が観察されるが、4-chlorophenylalanine や phenylglycine のような非天然型アミノ酸に作用させた場合には、代謝反応は進行せずデラセミ化反応が優先的に進行、L-体を高い光学純度かつほぼ 100%の収率にて回収することができた。さらに、アルキル側鎖を有する 2-aminoheptanoic acid や嵩高い tert-butyl 基を有する tert-leucine に対してもデラセミ化活性を示すことが明らかとなった。しかし一方で、proline や indoline-2-carboxylic acid のような環状アミノ酸については、基質特異性から外れることを確認した。

過去に報告されたアミノ酸に対してデラセミ化活性を有する微生物は *Pseudomonas* 属が多かった²⁶。今回のスクリーニングによって新たな微生物、*Sinorhizobium meliloti* NBRC 14782 (entry 2)、ATCC 5112 (entry 3)、および *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 (entry 4)を見出した。本微生物は窒素固定菌の一種であり、*N. diaphanozonaria* の場合と同様に phenylalanine 誘導体に対して高いデラセミ化活性を示すことを確認できた。また、*S. meliloti* に関しては ATCC 51124 株が phenylglycine に対してデラセミ化活性を示したのに対し、NBRC 14782 株は活性を示さないという興味深い結果が得られることとなった。

Table 40. Substrate specificity of phenylalanine deracemizing microorganisms

entry	strain	ee (%)			
		4-Cl-Phe ^a	phenylglycine	C7 ^b	tert-Leu ^c
1	<i>Nocardia diaphanozonaria</i> JCM 3208 ^d	> 99	> 99	97	75
2	<i>Sinorhizobium meliloti</i> NBRC14782 ^d	> 99	N.P. ^g	28	N.P. ^g
3	<i>Sinorhizobium meliloti</i> ATCC 51124 ^d	98	> 99	-	-
4	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099 ^e	94	42	-	-
5	<i>Streptomyces roseus</i> NBRC 12818 ^d	95	38	56	N.P. ^g
6	<i>Streptomyces coelicolor</i> IAM 1023 ^d	70	N.P. ^g	-	-
7	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NBRC 3521 ^d	99	-	-	-
8	<i>Pseudomonas oxalaticus</i> NBRC 13593 ^d	99	-	-	-
9	<i>Pseudomonas</i> sp. No.9 (soil isolate No.9) ^f	95	> 99	-	-

^a 4-chlorophenylalanine, ^b 2-aminoheptanoic acid, ^c tert-leucine, ^d The wet cells from 10 mL medium were resuspended in 10 mL KPB containing 1 mg/mL racemic substrate and incubated with shaking for 48 h at 30 °C. ^e The wet cells from 100 mL medium were resuspended in 10 mL KPB containing 1 mg/mL racemic substrate and incubated with shaking for 144 h at 30 °C. ^f The wet cells from 10 mL medium were resuspended in 5 mL KPB containing 1 mg/mL racemic substrate and incubated with shaking for 24 h at 30 °C. ^g The deracemization reaction did not proceed.

土壌より単離された微生物に関しては、そのほとんどが phenylalanine に対してのみデラセミ化活性を示すにとどまったが、No.9 株については phenylglycine についても立体反転反応を行なう能力を有していることが確認された(entry 9)。そこで、本菌株について生成物の ee の経時変化を測定し、デラセミ化の進行を確認することとした。結果を Table 41 に示す。本反応は D-体選択的に立体反転反応が進行し、最終的に L-体へと平衡が偏っていくことが観察された。そこで本菌株に対して微生物種の同定を依頼した。

Table 41. Deracemization of phenylglycine by the aid of soil isolate No.9^a

entry	time (hr)	ee (%) of the product		
		from D-form	from L-form	from DL-form
1	3	99 (D)	95 (L)	79 (D)
2	6	96 (D)	> 99 (L)	84 (D)
3	12	91 (D)	> 99 (L)	45 (D)
4	24	40 (D)	> 99 (L)	59 (L)
5	48	>99 (L)	> 99 (L)	> 99 (L)

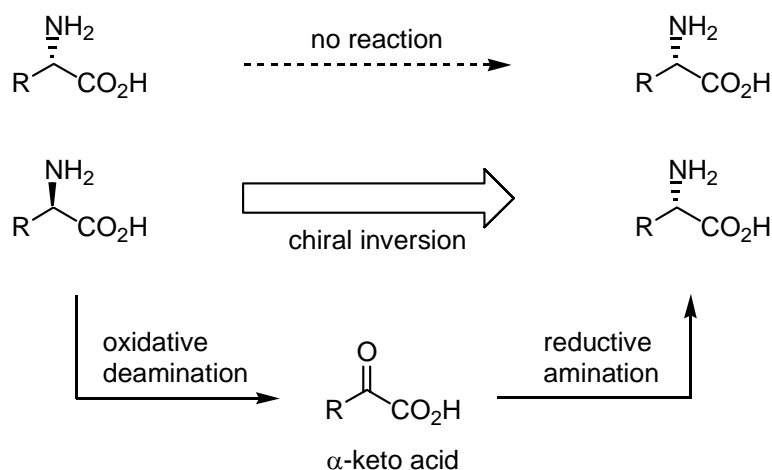
^a The wet cells from 10 mL medium were resuspended in 5 mL KPB containing 1 mg/mL phenylglycine and incubated with shaking at 30 °C.

1.3 土壌単離微生物 No.9 株の同定

同定は、株式会社エヌシーアイエムビー・ジャパンに依頼した。その結果、土壌単離微生物 No.9 株はグラム陰性の桿菌で運動性があり、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応ともに陽性という性状が示された。また 16S rDNA 塩基配列解析より本微生物が *Pseudomonas nitroreducens* (99.6% homology) や *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *pseudoalcaligenes* (98.1% homology) と近縁であることが確認された。これらの結果より、本微生物は *Pseudomonas* sp. であると同定し、当研究室の保存番号 KU 2071 として保存することとした。

2.1 全菌体を用いた検討

これまでに報告されている微生物においては、アミノ酸のデラセミ化反応は2つの酵素が関与する複合反応機構で進行する^{26,27}。即ち、D-体選択的脱アミノ化反応と引き続くL-体選択的アミノ化反応である(Scheme 51)。本反応経路では、 α -ケト酸が反応の中間体として生成していることとなる。そこで、1章にて取得した微生物、*N. diaphanozonaria* JCM 3208 株、*S. meliloti* NBRC 14782 株、および *Pseudomonas* sp. No. 9 株についてもまた同様の経路で反応が進行しているのかについて検討を行うこととした。

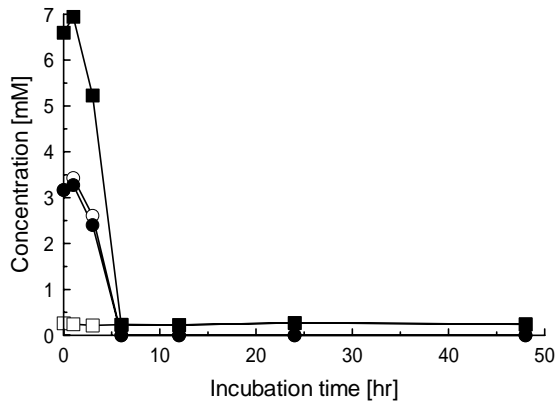


Scheme 51.

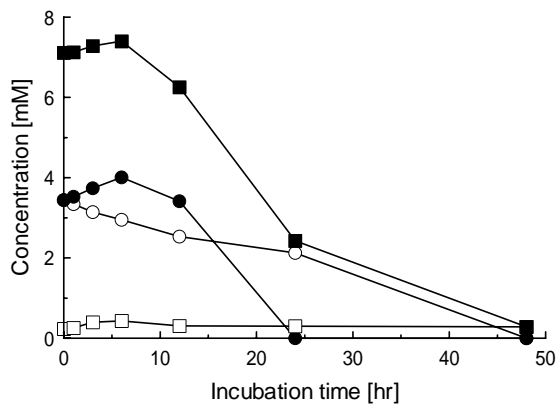
反応系中の各化合物の濃度の経時変化を測定した図を Figure 24-26 に示す。ここで、基質を DL-phenylalanine とすると速やかな代謝分解が進行し、対応する α -ケト酸である phenylpyruvic acid も検出できなかった(Figure 24)。一方、4-chlorophenylalanine の場合には、全ての菌株において明らかな D-体から L-体への立体反転過程が存在することを確認できた(Figure 25)。また、*S. meliloti*、および *Pseudomonas* sp.については系中の α -ケト酸濃度が反応の初期の段階にて多少ながら上昇した。このことは、 α -ケト酸が中間体であることを示すものと考えられる。しかし、*N. diaphanozonaria* の場合には、 α -ケト酸を検出することはできなかった。基質として、DL-phenylglycine を用いた場合についても *N. diaphanozonaria*、および *Pseudomonas* sp.についてデラセミ化の過程を示すことができた(Figure 26)。この際には明らかに α -ケト酸、benzoylformic acid の系中濃度が高まることが観察された。一方、*S. meliloti* については、phenylglycine は基質特異性から外れているためデラセミ

化は観察されず、48時間までの検討では、系中のD-体、L-体、および α -ケト酸の濃度は全く変化しなかった。

a) *N. diaphanozonaria*



b) *S. meliloti*



c) *Pseudomonas* sp.

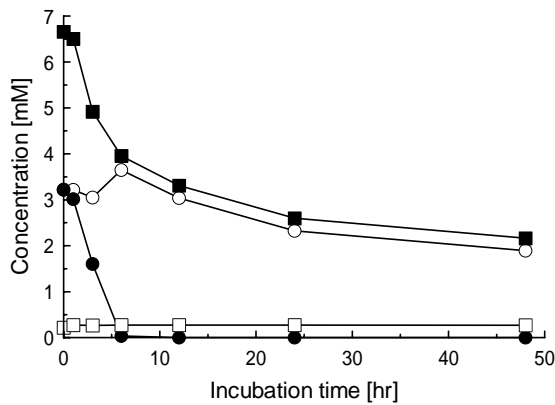
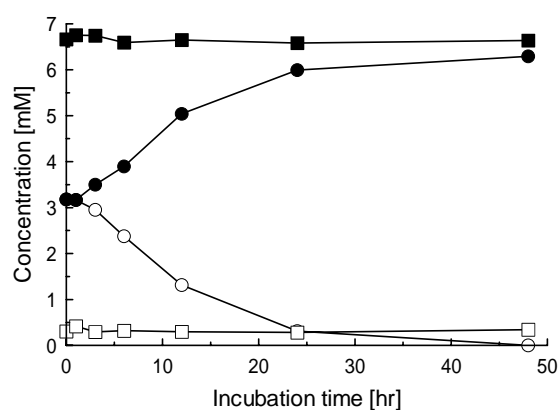
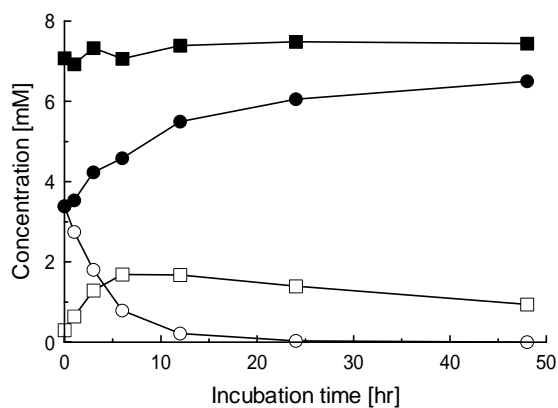


Figure 24. The change of phenylalanine concentration in the reaction mixture. (a), *N. diaphanozonaria* JCM 3208; (b), *S. meliloti* NBRC 14782; (c), *Pseudomonas* sp. No. 9. The cells harvested from 100 mL medium were resuspended in 100 mL of 100 mM potassium phosphate buffer with the substrate (1 mg/mL) in a 500 mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken at 30 °C. Symbols: (), D-phenylalanine; (), L-phenylalanine; (), phenylpyruvic acid; (), total concentration of above three compounds.

a) *N. diaphanozonaria*



b) *S. meliloti*



c) *Pseudomonas* sp.

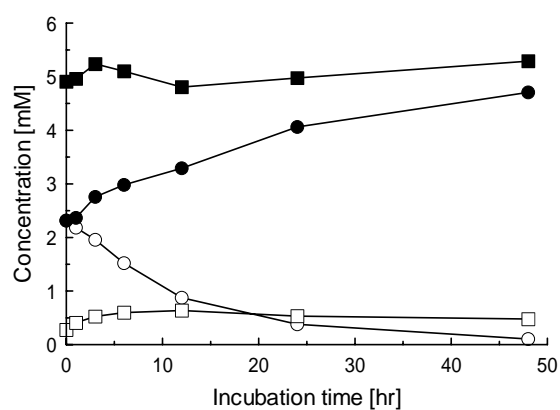
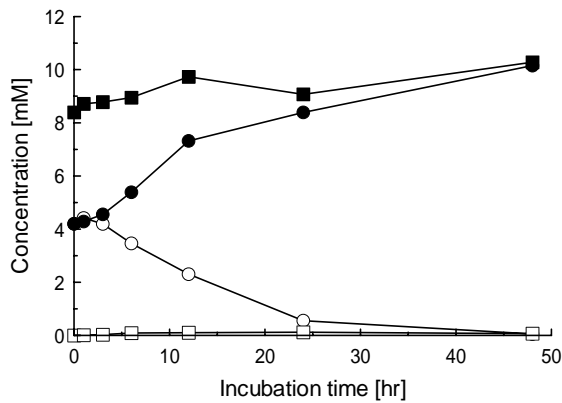
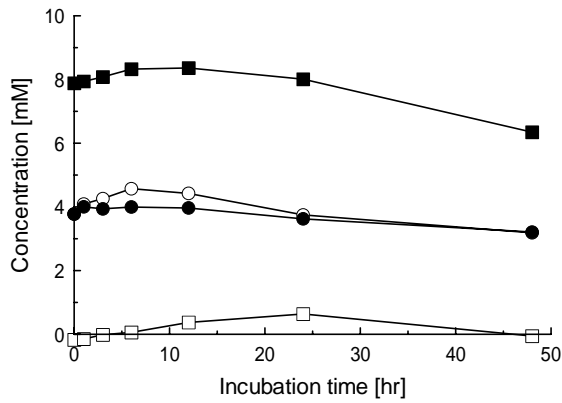


Figure 25. The change of 4-chlorophenylalanine concentration in the reaction mixture. (a), *N. diaphanozonaria* JCM 3208; (b), *S. meliloti* NBRC 14782; (c), *Pseudomonas* sp. No. 9. The cells harvested from 100 mL medium were resuspended in 100 mL of 100 mM potassium phosphate buffer with the substrate (1 mg/mL) in a 500 mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken at 30 °C. Symbols: (), D-4-chlorophenylalanine; (), L-4-chlorophenylalanine; (), 4-chlorophenylpyruvic acid; (), total concentration of above three compounds.

a) *N. diaphanozonaria*



b) *S. meliloti*



c) *Pseudomonas* sp.

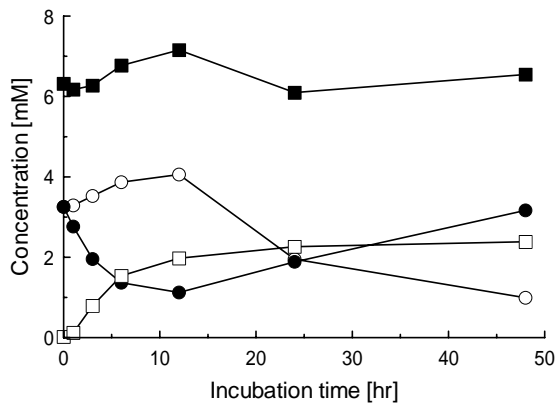
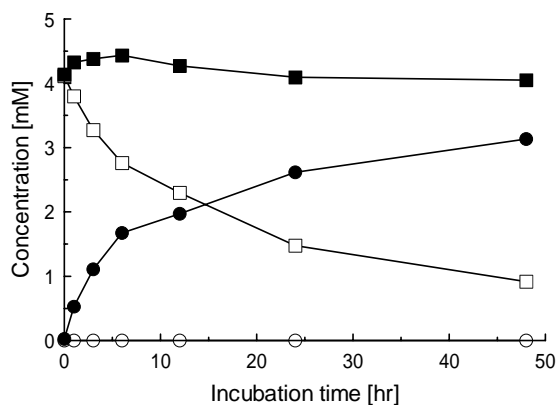


Figure 26. . The change of phenylglycine concentration in the reaction mixture. (a), *N. diaphanozonaria* JCM 3208; (b), *S. meliloti* NBRC 14782; (c), *Pseudomonas* sp. No. 9. The cells harvested from 100 mL medium were resuspended in 100 mL of 100 mM potassium phosphate buffer with the substrate (1 mg/mL) in a 500 mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken at 30 °C. Symbols: (○), D-phenylglycine; (●), L-phenylglycine; (□), 4-benzoylformic acid; (■), total concentration of above three compounds.

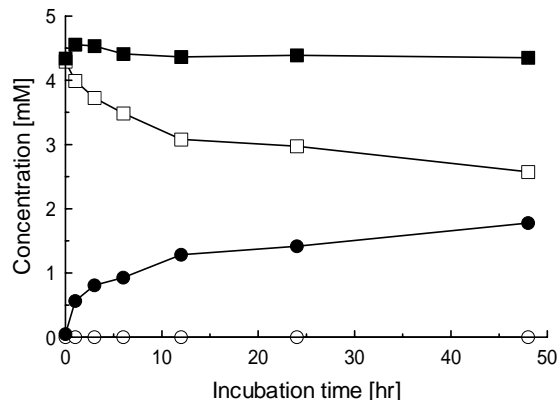
以上のようにデラセミ化が明らかに進行していることが確認され、中間体として α -ケト酸を経由しているのではないかと考えられる証拠を得た。次に、本菌株が α -ケト酸を対応するアミノ酸へと変換する活性を有しているのかについて検討を行った。即ち、4-chlorophenylpyruvic acid を、各微生物の休止菌体反応液に添加し、対応するアミノ酸への変換反応が進行するのかについて確かめた(Figure 27)。その結果、3種の微生物に共通して、反応時間と共に系中のケト酸濃度は減少し、それに伴って対応するアミノ酸、L-4-chlorophenylalanine 濃度が上昇していくことが確認された。D-4-chlorophenylalanine は全く検出されなかった。このことは、本反応がL-体選択的であることを示している。3種の微生物の中で、ケト酸からアミノ酸への生産能が最も高かったのは *N.*

diaphanozonaria であった。*N. diaphanozonaria* については、アミノ化反応の進行速度が速いために、先のラセミ体のアミノ酸を用いた経時変化測定時に α -ケト酸を検出できなかったと考えられる。以上の結果は、 α -ケト酸が立体反転過程において重要な中間体であることを示しているといえる。よって、本ラセミ化反応もまた2種類の酵素反応からなっていることが強く示唆された。

a) *N. diaphanozonaria*



b) *S. meliloti*



c) *Pseudomonas* sp.

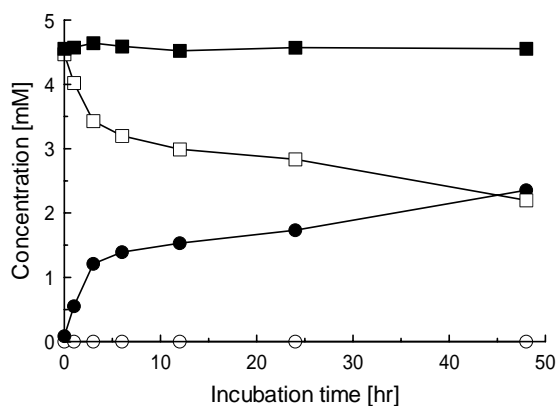


Figure 27. Formation of 4-chlorophenylalanine from 4-chlorophenylpyruvic acid using the whole cell system. (a), *N. diaphanozonaria* JCM 3208; (b), *S. meliloti* NBRC 14782; (c), *Pseudomonas* sp. No. 9. The cells harvested from 100 mL medium were resuspended in 100 mL of 100 mM potassium phosphate buffer with the substrate (1 mg/mL) in a 500 mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken at 30 °C. Symbols: (), D-4-chlorophenylalanine; (), L-4-chlorophenylalanine; (), 4-chlorophenylpyruvic acid; (), total concentration of above three compounds.

2.2 破碎菌体を用いた検討

1.1 全菌体を用いた機構解析より、立体反転過程において α -ケト酸が重要な中間体であることを明らかにできた。本デラセミ化過程は脱アミノ化反応とアミノ基転位反応あるいは還元的アミノ化反応の組み合わせにて実現されていることが考えられる。そこで、さらなる解析のために菌体を破碎した後の上清を用い、2つの酵素反応を個別に解析することとした。*N. diaphanozonaria* の場合には、酵素の不安定性のため破碎上清中にデラセミ化活性を見出すことはできなかった。一方、*S. meliloti* あるいは *Pseudomonas* sp. の場合には、破碎上清中に明らかなデラセミ化活性を見出すことに成功した。しかし、本上清に対して透析操作を行なうと、デラセミ化活性は著しく低下した。このことは、本反応には何らかの補因子の添加が必要であることを示している。Table 42 には *S. meliloti* ATCC 51124 株の破碎上清を用いた際の結果を示している。

Table 42. Deracemization of α -amino acids by cell-free system of *S. meliloti* ATCC 51124^a

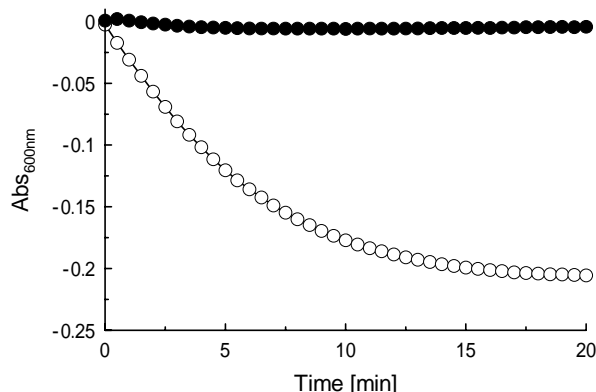
entry	substrate	ee (%)	
		before dialysis	after dialysis ^b
1	DL-4-chlorophenylalanine	95 (L)	56 (L)
2	D-phenylalanine	35 (L)	82 (D)
3	D-phenylglycine	> 99 (L)	79 (D)

^a The cell-free extract of *S. meliloti* ATCC 51124 was subjected to substrate and incubated for 20 h at 30 °C. ^b Dialysis was performed for 12 h at 4 °C against 100 mM MOPS-NaOH (pH 7.25) containing 1 mM DTT.

2.2.1 Phenylalanine の酸化に関する酵素系の解析

まず、アミノ基の酸化反応に関する酵素について検討を行うこととした。アミノ酸の酸化酵素には、酸素分子を電子受容体とする酵素と、他の電子受容体を利用して反応を進行させる酵素の2種類が存在する。デラセミ化反応に関する酸化酵素が、どちらであるのかを確認することとした。まず全菌体を用いた反応における酸素の必要性について検討を行った(Table 43)。反応系をアルゴンで置換した時の反応性は、好氣的条件下でのそれと全く変化しないことが明らかとなった。同様の結果は、透析操作を行っていない破碎菌体を用いた場合にも観察された。このことより、本反応は酸素を必要としないと考えられる。一方、破碎上清に対して透析操作を行なうと反応性は著しく低下した。つまり反応には何らかの電子受容体の存在が必要であるが、本反応における電子受容体は酸素分子ではないと考えられる。

a) *S. meliloti*



b) *Pseudomonas* sp.

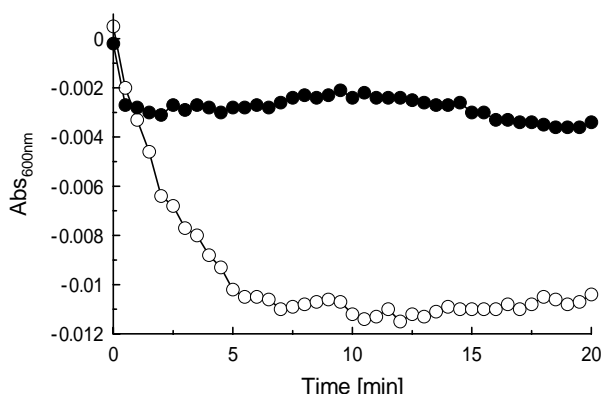


Figure 29. The amino acid oxidizing activity of the cell free systems measured by DCIP method. (a), *S. meliloti* ATCC 51124; (b), *Pseudomonas* sp. No. 9. Symbols: (○), D-phenylalanine; (●), L-phenylalanine

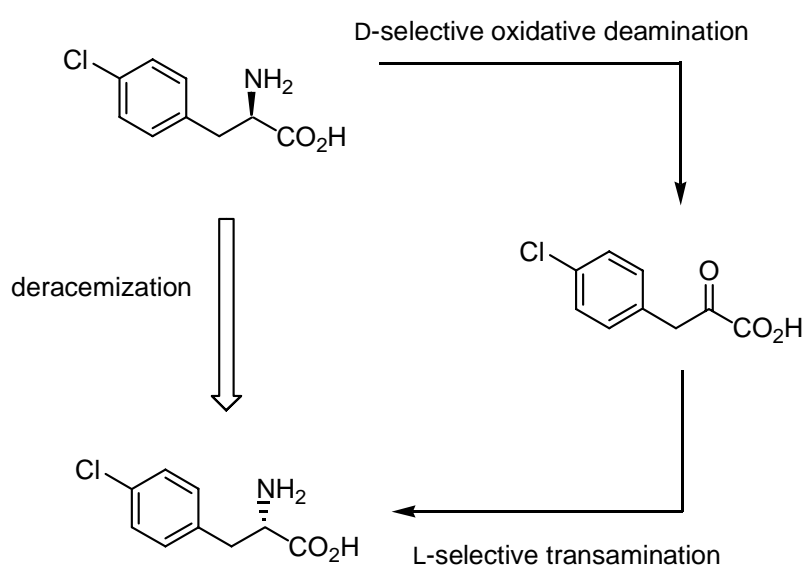
2.2.2 Phenylalanine の形成に関する酵素系の解析

2.2.1 における解析により、D-phenylalanine が酸化されることが確認され、その生成物は phenylpyruvic acid であることが明らかとなった。次に、 α -ケト酸からのアミノ酸の形成反応に対する解析を行うこととした。本反応を実現する過程はアミノ基転位反応と還元的アミノ化反応の2種類が考えられる。まず、アミノ基転位反応に対する検討を行うこととした。HPLC による分析から、破碎上清中に PLP と L-glutamic acid を添加すると、phenylpyruvic acid から L-phenylalanine の生成を確認できた。また、*Pseudomonas* sp. の破碎上清を用いた解析では、基質として benzoylformic acid を利用し、様々なアミノ酸をアミノ基供与体とした際の反応性の違いを検討した。その結果、疎水性アミノ酸を添加した際に L-glutamic acid 添加時と比較して同等か、またはそれ以上の活性を示すことが確認された。具体的には L-valine (167%), L-leucine (135%), L-methionine (81%), L-tryptophane (79%), L-phenylalanine (78%)であった。ここでは、L-glutamic acid をアミノ基供与体とした際の反応性を基準(100%)とした相対活性にて示している。

一方、塩化アンモニウムあるいは尿素をアミノ基供与体とし、補因子として NADH や NADPH を添加した系での還元的アミノ化反応の検討では phenylalanine の生成は一切確認できなかった。以上の結果より、デラセミ化反応の2段階目の反応はアミノ基転位反応であると結論付けた。

2.2.3 反応機構の推測

これまでの解析結果からデラセミ化反応の機構を推定することができる(Scheme 52)。 α -アミノ酸のデラセミ化反応においては、反応中間体として酸化的脱アミノ化反応の結果生成する α -ケト酸を経由する。本反応は、立体選択的であり、D-体のみが α -ケト酸へと変換される。さらに本反応に関与する酸化酵素は酸素を電子受容体として利用せず、PMS を用いることによって反応を進行させる。立体反転過程の2段階目はアミノ基転位反応である。本反応を触媒する酵素、aminotransferase は PLP と L-glutamic acid 存在下、 α -ケト酸を L-体のアミノ酸へと変換する。以上の2種類の酵素の働きによってデラセミ化反応が実現されると推測した。



Scheme 52.

2.2.4 *S. meliloti* ATCC 51124 の破砕上清を用いたデラセミ化反応

各酵素を個別に解析した結果を踏まえ、*S. meliloti* ATCC 51124 株の破砕上清を用いたデラセミ化反応を実現した(Table 44)。具体的には、遮光条件下、補因子として PMS, DCIP, PLP, L-glutamic acid を補因子として加えると D-phenylalanine は L-体へと変換され、DL-4-chlorophenylalanine に対してはデラセミ化反応が進行することを確認した。ここで、遮光条件としたのは PMS の光に対する不安定性のためである。実際、非遮光条件下においては PMS の速やかな分解反応によって、デラセミ化反応はほとんど進行しないことが確認された。また反応系の pH も重要であり、pH 7.0 での反応はほとんど進行しないが、pH 8.5 においては非常に高いデラセミ化能を示すことが明らかとなった(entry 1-3)。さらに、DCIP の添加は必ずしも必要ではないことが判明した(entry 3 vs. 4, and 5 vs. 6)。基質として、phenylglycine を用いた場合にも反応は進行したが、反応の進行は遅く、95 時間後においてもデラセミ化反応が完結することはなかった(entry 7-9)。

Table 44. Deracemization reaction using cell-free system of *S. meliloti*^a

entry	substrate	time (h)	pH	E.A. ^b	ee (%)
1	D-Phe	11	7.0	DCIP, PMS	77 (D)
2	D-Phe	66	7.0	DCIP, PMS	60 (D)
3	D-Phe	38	8.5	DCIP, PMS	95 (L)
4	D-Phe	38	8.5	PMS	95 (L)
5	DL-4-Cl-Phe	38	8.5	DCIP, PMS	99 (L)
6	DL-4-Cl-Phe	38	8.5	PMS	99 (L)
7	D-phenylglycine	23	8.5	PMS, DCIP	29 (L)
8	D-phenylglycine	54	8.5	PMS, DCIP	71 (L)
9	D-phenylglycine	95	8.5	PMS, DCIP	81 (L)

^a 1.2 mM of Substrate was subjected to the cell-free extract of *S. meliloti* at 30 °C in the presence of cofactors for deamination and transamination .

^b artificial electron acceptor

補因子必要性の解析の結果を Table 45 に示す。脱アミノ化に關与する補因子(PMS)を添加しなかったにもかかわらず、デラセミ化反応は多少の進行が確認された(entry 2)。これは脱アミノ化反応が PMS 非添加の場合でも完全に抑制されるわけではなく、徐々に系中に α -ケト酸が生じ、本中間体がアミノ基転位酵素の働きによって L-体のアミノ酸へと変換されるためであると予想される。これに対し、アミノ基転位反応に關与する補因子(PLP, L-glutamic acid)を添加しなかったときには、脱アミノ化のみが進行し、ラセミ体から出発した場合にアミノ酸の収率は 50%程度にまで落ち込むことが観察された(entry 3)。脱アミノ化およびアミノ基転位反応に關与する補因子を共に添加しなかったときにはデラセミ化反応速度は著しく低下した(entry 4)。以上のことから、脱アミノ化反応およびアミノ基転位反応に關与するすべての補因子が存在して初めて、効率の良いデラセミ化反応が進行することを確認できた。

Table 45. The cofactor requirement using the cell-free system of *S. meliloti*

entry	cofactors	D-Phe		rac-4-Cl-Phe		D-phenylglycine	
		yield (%)	ee (%)	yield (%)	ee (%)	yield (%)	ee (%)
1	all ^a	100	96 (L)	100	> 99 (L)	100	29 (L)
2	for transaminase ^b	100	7 (D)	98	76 (L)	100	21 (D)
3	for oxidase ^c	14	72 (L)	51	> 99 (L)	45	42 (D)
4	non ^d	75	82 (D)	72	56 (L)	81	79 (D)

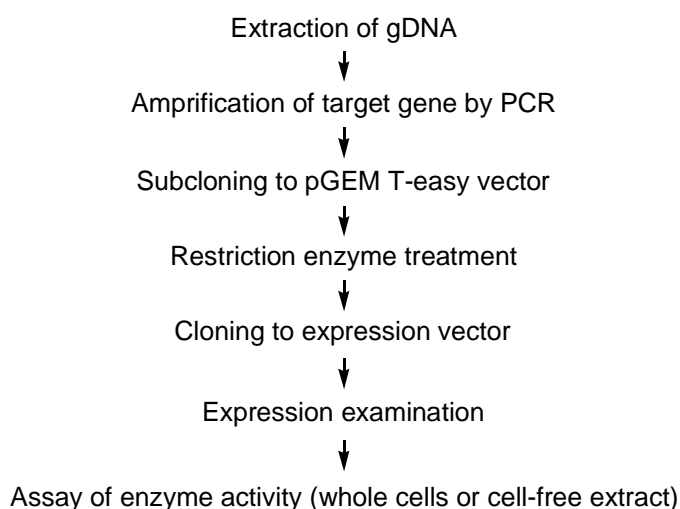
^a DCIP, PMS, PLP, L-Glu, ^b PLP, L-Glu, ^c DCIP, PMS, ^d No cofactors were added.

Sinorhizobium meliloti ATCC 51124 株由来遺伝子を用いたデラセミ化関連酵素の大腸菌による大量発現とデラセミ化反応系の構築

3.1 関連遺伝子の推定とベクターの構築

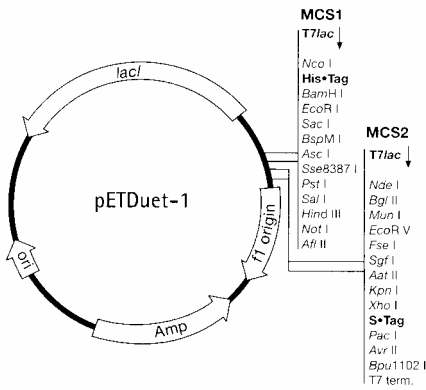
2章において *S. meliloti* ATCC 51124 株より調製した破碎上清を用いてデラセミ化反応を進行させることに成功した。本微生物は既にゲノムの全塩基配列の解析が終了している⁴⁹。そこで、データベース解析を行い、アミノ酸のデラセミ化に関与していると考えられる候補遺伝子を検索、ベクターを構築し、大腸菌による大量発現を試みた。

アミノ酸に対するデラセミ化反応は、2種類の酵素反応からなっていることがこれまでの検討より明らかとなっている。つまり、D-アミノ酸に対して特異的に脱アミノ化反応を触媒する酸化酵素と、ケト酸を L-アミノ酸へと変換するアミノ基転位酵素である。データベース解析よりこれらの反応に関与すると予想される ORF を検索した。その結果、アミノ酸酸化酵素については3種類(AAO, AADH1, AADH2)、アミノ基転位酵素については1種類(BCAAT)の候補を得ることができた。発現ベクターとしては pUC 系、pET 系、pACYC 系、あるいは pCold 系を選択し、それぞれについて構築を行なった(Figure 30)。クローニングの流れは Scheme 53 に示したとおりである。次のセクション(3.1.1-3.1.4)において各 ORF の情報を示す。

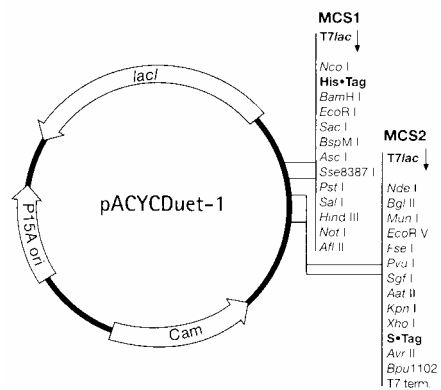


Scheme 53.

a) pETDuet-1 vector



b) pACYCDuet-1 vector



c) pCold I vector

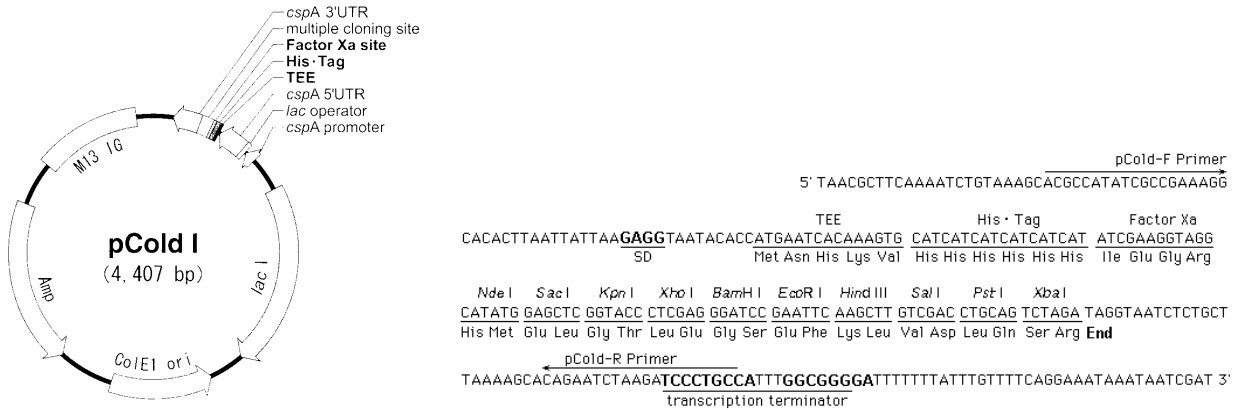


Figure 30. Expression vector

3.1.1 AAO に関する情報

ORF Name : SMb20877

Gene Product : putative oxidoreductase, possibly D-amino acid oxidase protein

Location : Init: 1284434 Term: 1283304 Length(aa):376

Direction : complement

Results of Blast2 searches :

Probable-amino acid oxidase PA4858 from *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (55% identity)

Probable D-amino acid oxidase PA4548 from *Pseudomonas aeruginosa* (29% identity)

Primer for pETDuet-1 vector : pETDAAO

Forward, 5'-CGCGGATCCATCGATGTGCGAAGTTTTGATCGTGGGCG-3', *BamH I* (underlined)

Reverse, 5'-AACGAGCTCCGCCTATCGCAATGCCGCGATATGGTGC-3', *Sac I* (underlined)

Primer for pCold I vector : pColdDAAO

Forward, 5'-CGGGGTACCATGTGCGAAGTTTTGATCGTGGG-3', *Kpn I* (underlined)

Reverse, 5'-AAACTGCAGCTATCGCAATGCCGCGATATGGTGC-3', *Pst I* (underlined)

3.1.2 AADH に関する情報

ORF Name : SMb20267

Gene Product : putative D-amino acid dehydrogenase protein

Location : Init: 271438 Term: 272679 Length(aa):413

Direction: direct

Results of Blast2 searches :

D-amino acid dehydrogenase small subunit from *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (81% identity)

D-amino acid dehydrogenase small subunit from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (34% identity)

Primer for pETDuet-1 vector : pETDAADH1

Forward, 5'-AAACTGCAGTAAATGGCCGCACCGGACGTCATCGTGA-3', *Pst* I (underlined)

Reverse, 5'-CCCAAAGCTTCTGTCAGAATCTTTGCGGCGAAAAGGGT-3', *Hind* III (underlined)

Primer for pCold I vector : pColdDAADH1

Forward, 5'-GGAATTCCATATGGCCGCACCGGACGTCATCGTGAT-3', *Nde* I (underlined)

Reverse, 5'-CCCAAAGCTTCTGTCAGAATCTTTGCGGCGAAAAGGGT-3', *Hind* III (underlined)

3.1.3 AADH2 に関する情報

ORF Name : SMc03265

Gene Product : putative amino acid dehydrogenase transmembrane protein

Init: 3380522 Term: 3381811 Length(aa):429

Direction : direct

Results of Blast2 searches :

D-amino acid dehydrogenase, small subunit from *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 (78% identity)

D-amino acid dehydrogenase small subunit from *Bradyrhizobium japonicum* (29% identity)

Primer for pETDuet-1 vector : pETDAADH2

Forward, 5'-AAACTGCAGATGCCTGAAGTGAGCGCTATTGTCGTAGGGG-3', *Pst* I (underlined)

Reverse, 5'-CCCAAAGCTTTCAACGCAGAAAAAGGTCCGGCGAGTCAT-3', *Hind* III (underlined)

3.1.4 BCAAT に関する情報

ORF Name : SMc02896

Gene Product : probable branched-chain amino acid aminotransferase protein (*ilv E1*)

Init: 254099 Term: 253002 Length(aa):365

Direction : complement

Results of Blast2 searches :

本論第2部 微生物を用いた α -アミノ酸のデラセミ化反応

probable branched-chain amino acid aminotransferase protein from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (67% identity)

Probable branched-chain-amino-acid aminotransferase from *Streptomyces coelicolor* (58% identity)

Primer for pACYCDuet-1 vector : pACYCBCAAT

Forward, 5'-CGCGGATCCACAGATGACCGGTAGCGGTGAGCAGACTT-3', *Bam*H I (underlined)

Reverse, 5'-CCCAAGCTTCGCTCAGAACAGCCGGTCGAGCCAG-3', *Hind* III (underlined)

3.2 発現検討

3.1 にて構築した発現ベクターを用いて、宿主である大腸菌を形質転換し、目的酵素の発現検討を行った(Table 46)。大腸菌としては遺伝子型の違う 9 種類を選択し、最も効率よく目的タンパク質を生産する宿主の検索を行なった。AAO に関しては多くの大腸菌で明らかな発現を確認した。AADH1 については、SDS-PAGE を用いた解析では、どの大腸菌でも発現は確認できなかった。また AADH2 についてはいくつかの株について発現を確認した。一方、BCAAT に関しては、BL21 (DE3)株を用いた際に発現を確認できた。

Table 46. Expression experiments of target genes

entry	ORF	pUC	Duet vector	pCold
1	AAO	○	○	○
2	AADH 1	—	—	—
3	AADH 2	N.C.	○	N.C.
4	BCAAT	—	○	N.C.

○ : expressed — : not-expressed N.C. : not-constructed

host cell: JM109, XL-10 GOLD, BL21(DE3), BL21Star(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta(DE3), Rosetta-gami(DE3), Rosetta-gami B(DE3), Origami(DE3), Origami B(DE3), JM109(DE3)

そこで、37 で培養を行なった大腸菌について、全菌体を用いた反応を行ない、目的の活性を有するかどうか確認した。その結果、残念なことに、どの菌株についても、活性を確認することはできなかった。そこで、培養温度と誘導剤である IPTG 濃度の検討を行った。その結果、温度を低下させると多少とも目的とする酵素活性を示すようになった。しかし、宿主である大腸菌も同様の酵素活性を有していることがベクターを導入していない大腸菌を利用した検討から明らかとなったため、それと比較して有意な差のある活性を示したベクターと宿主の組み合わせを再度検討した(Table 47)。最終的には、IPTG を 0.6 mM 添加することによって目的タンパク質を誘導し、その後温度を 20 程度まで低下させて培養した場合に比較的良好な結果を得られることが判明した。

次に、超音波によって菌体を破碎した後の上清を利用した検討を行ない、目的の活性が上清中に見出せるのかどうかを確認した。アッセイ系の組成は 2 章にて用いた系を利用している。BCAAT に関しては目的のタンパク質は一部であるが可溶化し、破碎した上清中にも SDS-PAGE においてバンドを確認できた。一方で、アミノ酸酸化酵素に関してはほとんどが不溶化しており上清中に目的の活性を確認することはできなかった。AAO について最も良い結果を与えたのは、宿主として BL21(DE3)pLysS を利用し、IPTG (0.6 mM)添加後 15 にて 12 時間培養を行なった菌株について破碎を行なった場合であった。破碎液中にはペプチダーゼ阻害剤である PMSF およびペプスタチンを添加した。本破碎条件下、得られた上清における反応生成物の鏡像体過剰率は 44% (L-form) に達した(entry 2)。

このように、低い培養温度がより良い発現結果を与えることが観察されたため、コールドショ

ックベクター系を用いた検討を行った。その結果、pET系のベクターを用いたときと比較して全菌体を用いた場合に高い反応性を有することが明らかとなった(entry 4)。ただし、本条件下にて得られた大腸菌であっても破碎を行なうと、その酵素活性は著しく低下することがわかった。全菌体での反応を試みた場合には確かにD-アミノ酸に対する酸化活性を確認することができるので、全菌体を用いてデラセミ化反応を試みることにした。

Table 47. Oxidative deamination of overexpressed D-amino acid oxidase (DAAO)

entry	condition	OD value	whole cells ^a	cell-free extract ^b
1	pETDAAO in BL21(DE3)	4	90 (L)	10 (L)
2	pETDAAO in BL21(DE3)pLysS	4	90 (L)	44 (L) ^c
3	pColdDAAO in BL21(DE3)	1	46 (L)	2 (L)
4	pColdDAAO in XL 10-Gold	1	39 (L)	2 (L)

^a The wet cells were resuspended in KPB containing 1 mg/mL DL-4-chlorophenylalanine and incubated with shaking for 24 hr at 30 °C. ^b The cell-free extract were added to the DCIP assay mixture and incubated for 24 hr at 30 °C. ^c Pepstatine (0.7 μ g/mL) and PMSF (0.19 μ g/mL) were included in the cell lysis solution.

3.3 デラセミ化反応実現のための検討

全菌体を用いたデラセミ化反応の実現方法としてはいくつか挙げることができる。一つ目は 2 種類の発現ベクターを 1 つの大腸菌へと導入し、同時に発現させる方法、二つ目は各発現ベクターを大腸菌でおのおの発現させ、各酵素を個別に大量発現させた菌株を反応系中に共存させることによって反応を進行させる方法である。それぞれについて検討を行った(Table 48)。その結果、宿主 BL21 (DE3)株に pETDAAO ベクターと pACYCBCAAT ベクターの 2 種類を導入し、同時に発現する方法では、酵素活性はほとんど確認されなかった(entry 1)。この際、SDS-PAGE による解析では 2 種類のタンパク質が確かに発現していることを確認している。これに対しそれぞれのベクターを別々の宿主にて発現させ、それら 2 種類の大腸菌を反応系中に共存させるという方法では、確かにデラセミ化の進行が確認された。最も良い組み合わせは以下の通りである。つまり、pColdDAAO と pACYCBCAAT 遺伝子を導入した大腸菌の組み合わせである。反応の結果、38 時間の反応の後、生成物の鏡像体過剰率は 95%を達成した(entry 6 and 7)。アミノ基転位酵素である BCAAT のみを発現させた場合にも、得られた生成物の鏡像体過剰率が上昇するという結果を得た(entry 2)。この理由として大腸菌の有する D-アミノ酸化酵素が関与している可能性が示唆される。これまでの検討から分かるように、*S. meliloti* 由来の D-アミノ酸化酵素を用いた場合には、菌体量を増やさないと効率のよいデラセミ化反応を実現することができなかつたため、大腸菌由来の D-amino acid dehydrogenase(DadA)^{42,45} を利用することを考えた。

Table 48. Deracemization of 4-chlorophenylalanine using the recombinant *E. coli*^a

entry	condition	OD value	13 hr	38 hr
1	DoubleTransformant BL21(DE3)	1	17% ee	—
2	pACYCBCAAT in BL21(DE3)	4	71% ee	91% ee
3	pETDAAO in BL21(DE3)	1	18% ee	—
4	pACYCBCAAT in BL21(DE3) and pETDAAO in BL21(DE3)	4 + 4	64% ee	80% ee
5	pACYCBCAAT in BL21(DE3) and pETDAAO in BL21(DE3)pLysS	4 + 4	51% ee	64% ee
6	pACYCBCAAT in BL21(DE3) and pColdDAAO in XL 10-Gold	4 + 4	75% ee	95% ee
7	pACYCBCAAT in BL21(DE3) and pColdDAAO in BL21 (DE3)pLysS	4 + 4	77% ee	94% ee

^a The wet cells were resuspended in KPB containing 1 mg/mL DL-4-chlorophenylalanine and incubated with shaking at 30 °C.

3.4 BCAAT 遺伝子導入大腸菌によるデラセミ化反応の実現

大腸菌の有する D-アミノ酸酸化酵素 DadA は、LB medium を用いた培養条件下では低い活性を示すにとどまった。この場合には、B 株由来および K 株由来の様々な大腸菌について活性の比較を行なったが、どれも同様に低い活性を示すにとどまった。これは、DadA の発現が転写レベルにおける調節を受けており、一般的な培養条件下では発現が抑制されているからである⁵⁰。オペロン *dad* は L-alanine の代謝に関与する 2 種類の遺伝子、*dadA* と *dadX* をコードしている。L-alanine は alanine racemase (DadX)の働きによってラセミ化された後、DadA によって D-体選択的脱アミノ化反応が進行、ピルビン酸へと変換される。本オペロンの転写は培地中に alanine が添加されることによって活性化される。また、転写活性化の度合いは、添加された alanine の立体配置とは関係ないことも報告されている。そこで、L-alanine を過剰に含む培地中にて大腸菌を培養し、*dadA* 遺伝子を活性化すると同時に、本菌株にて *S. meliloti* 由来アミノ基転位酵素 BCAAT を発現することを試みた。つまり、外来遺伝子を 1 つ導入した大腸菌にて 2 種類の酵素が必要なデラセミ化反応を実現させようという試みである。

まず、*dadA* の転写を活性化させるため、pACYCBCAAT ベクターを導入した大腸菌 BL21(DE3) 株を L-alanine が過剰に添加された培地中にて培養した。この際用いた培地は、minimal L-alanine medium, および L-alanine を含む M9, M63 培地の 3 種類である。それぞれの培地にて大腸菌を培養し、また IPTG を添加することによって BCAAT を誘導した。本微生物を集菌、リン酸緩衝液にて懸濁し、OD 値を 1.0 に調整した。このようにした菌体懸濁液に DL-4-chlorophenylalanine を添加し、反応の進行度合いを ee の測定によって比較した(Table 49)。L-alanine を添加した培地中にて培養を行なった場合には、LB medium にて得られた菌体を用いた場合と比較して明らかな活性の向上が観察された。その中で、もっとも高い活性を示したのは、minimal L-alanine medium であった(entry 2)。60 時間後におけるアミノ酸の収率も定量的であった。そこで、本培地にて培養した菌株についてさらなる検討を行った。

Table 49. Effect of growth medium on the deracemization of 4-chlorophenylalanine^a

DL-form $\xrightarrow[1.0 \text{ OD}_{600\text{nm}}]{\text{BCAAT transformant } E. coli}$ L-form

entry	growth medium	ee (%)		
		12 hr	36hr	60 hr
1	LB medium	23	46	52
2	minimal L-alanine medium	71	90	94
3	M63 medium containing L-alanine ^b	62	86	88
4	M9 medium containing L-alanine ^b	42	68	76

^a The wet cells were resuspended in KPB containing 1 mg/mL DL-4-chlorophenylalanine and incubated with shaking at 30 °C. ^b 2% of L-alanine was added to this medium.

Figure 31 は反応系中の各化合物濃度の経時変化を示している。基質としては DL-4-chlorophenylalanine を選択し、菌体量は OD 値 1.5 となるように調整した。BCAAT 遺伝子を IPTG の添加によって誘導した菌株については、明らかに D-体から L-体への立体反転が確認できた (Figure 31a)。さらに反応中間体である α -ケト酸、4-chlorophenylpyruvic acid の系中濃度が、反応の初期の段階において一時的に上昇することが観察された。このことから、本反応が期待通り、 α -ケト酸を経由していることが確認できた。一方、BCAAT 非誘導条件下にて培養を行なった場合には、デラセミ化活性は低いものとどまった (Figure 31b)。本条件下では、 α -ケト酸が反応の進行に伴って、徐々に系中に蓄積していることが確認できる。また、Figure 32 には全菌体のタンパク質を SDS-PAGE にて解析した結果を示している。泳動結果より、LB medium, minimal L-alanine medium の両培地にて培養した場合にも、IPTG の添加によって BCAAT は発現していることが確認できた。一方、DadA タンパク質⁴⁷(45kDa および 55kDa)については全菌体でのタンパク質の比較を行なったため、DadA タンパク質の所在を明確に確認することはできなかった。よって培地の違いによる DadA タンパク質の発現量の差を確認することはできなかった。

最終的には、minimal L-alanine medium 中にて培養し、DadA タンパク質を誘導した BCAAT 大量発現大腸菌を用いることによって、ラセミ体から出発した場合にも光学的に純粋な L-4-chlorophenylalanine をほぼ定量的に得る方法を確立することができた。

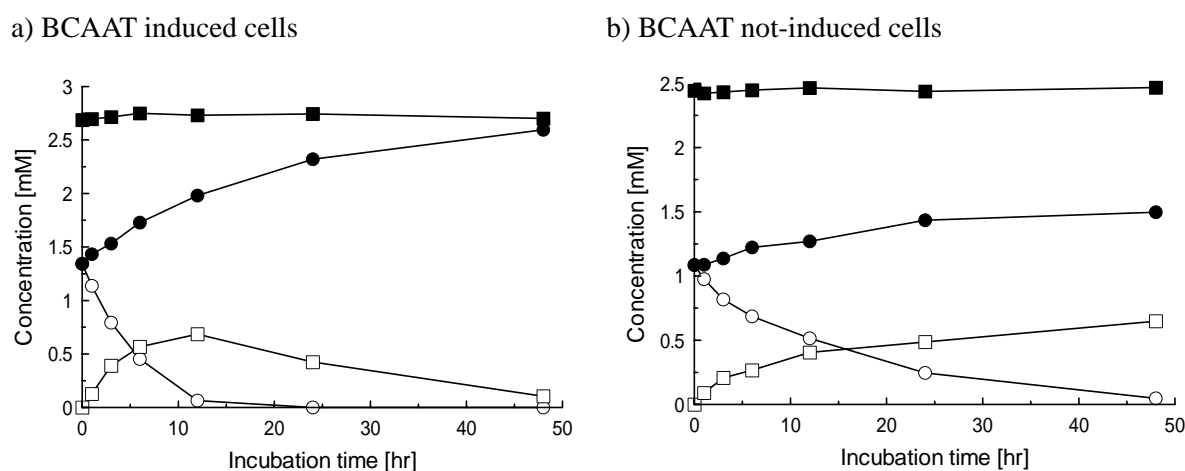


Figure 31. The change of 4-chlorophenylalanine concentration in the reaction mixture. The change of 4-chlorophenylalanine concentration in the reaction mixture. (a), BCAAT induced cells; (b), BCAAT not-induced cells. The cells harvested from 100 mL medium were resuspended in 100 mL of 100 mM potassium phosphate buffer with the substrate (2.6 mM) in a 500 mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken at 30 °C. Symbols: (●), D-4-chlorophenylalanine; (○), L-4-chlorophenylalanine; (□), 4-chlorophenylpyruvic acid; (■), total concentration of above three compounds.

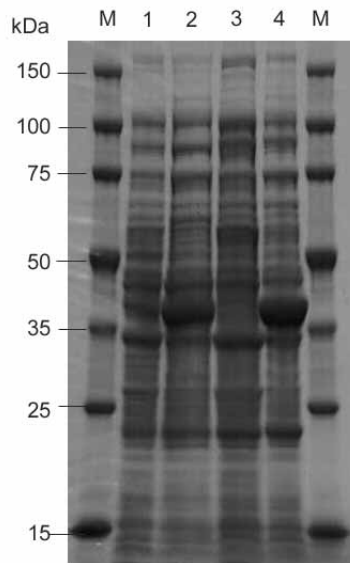


Figure 32. SDS-PAGE of the whole cell proteins of BCAAT gene introduced *E. coli* strain BL21 (DE3): lane 1, BCAAT not-induced cells cultivated in LB medium; lane 2, BCAAT induced cells cultivated in LB medium; lane 3, BCAAT not-induced cells cultivated in minimal L-alanine medium; lane 4, BCAAT induced cells cultivated in minimal L-alanine medium. Molecular mass standards (Novagen Inc., Madison, WI, USA) were run in lane M.

4 章

結論

Phenylalanine に対してデラセミ化活性を有する微生物のスクリーニングを行い、複数の菌株を単離することに成功した。この際に、立体反転過程の存在を色の変化として可視化するスクリーニング法(plate color assay)を考案し、本法の有用性を示すことができた。スクリーニングの結果得られた全ての株は、L-体へとデラセミ化する活性を有することが明らかとなり、逆の選択性を有するものは得られなかった。得られた微生物の中で最も高いデラセミ化活性を発現したのは、放線菌の一種 *Nocardia diaphanozonaria* JCM 3208 株であり、幅広い基質特異性を示した。また、窒素固定菌の一種 *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 株や *Sinorhizobium meliloti* ATCC 51124 株も α -アミノ酸に対してデラセミ化活性を有していることを発見した。これらの微生物は、これまでにアミノ酸のデラセミ化を行なう株としては報告されておらず、本株の新たな有用性を示すことができた。*N. diaphanozonaria* は、 α -アミノ酸および α -メチルカルボン酸という2種類の基質に対してデラセミ化活性を示す大変珍しい菌体である。これまでに得られた生体触媒において、これら2種類の化合物に対して同時にデラセミ化活性を示すものは報告されていない。

全菌体あるいは破碎上清を利用した機構解析より、立体反転過程が2種類の酵素反応によって実現されていることを確認した。いわゆる立体選択的立体反転反応である。1段階目はD-アミノ酸酸化酵素によるD-体選択的脱アミノ化反応であり、人工電子受容体であるPMSを添加することによって効率よく進行する。2段階目はtransaminaseによるアミノ基転位反応であり、L-体のアミノ酸が対応する α -ケト酸より合成される。本反応には、補因子としてPLPとL-glutamic acidが必要であった。*S. meliloti* ATCC 51124 株より得られた破碎上清に対して、2つの反応に必要な補因子を同時に添加することによって、phenylalanine, 4-chlorophenylalanine および phenylglycine に対して効率よくデラセミ化反応を進行させる系を構築することに成功した。また、各反応に必要な補因子を添加しない系では、デラセミ化反応の進行度合いが著しく低下することから、これらの補因子が必須であることを確認した。

デラセミ化に関与する酵素系が推測できたことより、本反応に関与するタンパク質の同定を試みた。*S. meliloti* ATCC 51124 株はゲノムの全塩基配列が既に決定されている。そこで、データベース解析によってデラセミ化に関与すると予想される候補配列を決定、大腸菌による大量発現を試みた。予想した遺伝子に対して発現ベクターを構築し、同時に宿主大腸菌の最適化を行い、全菌体にて各反応を触媒する活性を有する大腸菌を調製できた。これらの大腸菌を組み合わせることによって、デラセミ化反応を実現することにも成功した。最良の組み合わせは脱アミノ化酵素としてpColdDAAOを、アミノ基転位酵素としてpACYCBCAATを用いた場合であった。それらの宿主大腸菌はそれぞれBL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)であった。これら2種類の大腸菌を混合し反応を試みたところ、ラセミ体から出発して38時間後には94%eeのL-4-chlorophenylalanineへと定量的

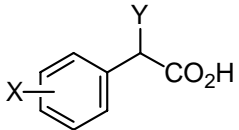
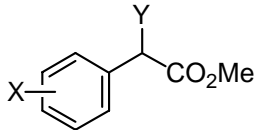
に変換することに成功した。

またアミノ基転位酵素である BCAAT を大量発現させた大腸菌においては、宿主 BL21 (DE3)株の有する D-アミノ酸酸化酵素(DadA)を利用することによってデラセミ化活性を発現させることに成功した。アミノ基転位酵素という 1 種類の外来遺伝子にて形質転換した大腸菌にも関わらず、デラセミ化という新奇な活性を発現するようになったのは大変興味深い。構築した組み換え大腸菌を利用することで、DL-4-chlorophenylalanine を高効率かつ高い収率にて光学的に純粋な L-体へと変換することが可能となった。大腸菌を酵素タンパク質合成のための工場としてみるだけでなく、大腸菌の有している機能を目的の反応を実現するためのプロセスに組み込んで利用するという考え方は、大変画期的であると考えている。

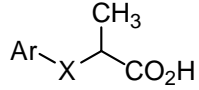
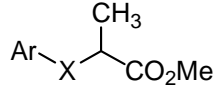
実験の部

化合物一覧

1. 2-Substituted phenylacetic acid 誘導体

		X	Y	
1a		H	methyl	1b
2a		4-isobutyl	methyl	2b
3a		3-fluoro-4-phenyl	methyl	3b
4a		2-chloro	methyl	4b
5a		3-chloro	methyl	5b
6a		4-chloro	methyl	6b
7a		4-methoxy	methyl	7b
8a		4-fluoro	methyl	8b
9a		H	ethyl	9b
10a		H	hydroxymethyl	10b
11a		H	methoxy	11b
12a		H	fluoro	12b
13a		H	chloro	13b
14a		-CH ₂ - (4-membered ring)		14b
15a		-CH ₂ CH ₂ - (5-membered ring)		15b
16a		-CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (6-membered ring)		16b

2. 2-Aryl-x-propanoic acid 誘導体

		Ar	X	
17a		phenyl	CH ₂	17b
18a		2-thienyl	CH ₂	18b
19a		phenyl	NH	19b
20a		phenyl	S	20b
21a		4-chlorophenyl	S	21b
22a		phenyl	S(O)	22b
23a		phenyl	S(O ₂)	23b
24a		phenyl	O	24b
25a		4-fluorophenyl	O	25b

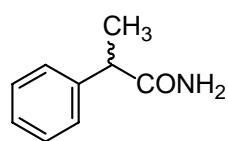
	Ar	X	
26a	4-chlorophenyl	O	26b
27a	4-bromophenyl	O	27b
28a	4-iodophenyl	O	28b
29a	4-trifluoromethylphenyl	O	29b
30a	4-methylphenyl	O	30b
31a	4-methoxyphenyl	O	31b
32a	4-acetylphenyl	O	32b
33a	4-hydroxyphenyl	O	33b
34a	2-naphtyl	O	34b
35a	2-chlorophenyl	O	35b
36a	3-chlorophenyl	O	36b
37a	4-benzyloxyphenyl	O	37b
38a	benzyl	O	38b
39a	phenylethyl	O	39b

3. Mandelic acid, 2-Substituted alkanolic acid, Deuterium compounds

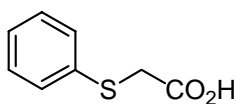
	R	X	Y	
40a	phenyl	OH	H	40b
41a	4-chlorophenyl	OH	H	41b
42a	4-methoxyphenyl	OH	H	42b
43a	PhCH ₂ CH ₂	OH	H	43b
44a	C ₈ H ₁₇	CH ₃	H	44b
45a	C ₇ H ₁₅ O	CH ₃	H	45b
46a	C ₆ H ₁₃	Cl	H	46b
47a	phenyl	CH ₃	D	47b
48a	phenyl	CD ₃	H	48b
49a	4-fluorophenyl	CH ₃	D	49b

実験の部

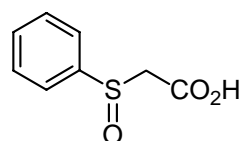
4. Other compounds



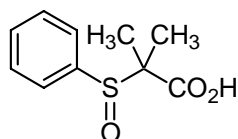
50a



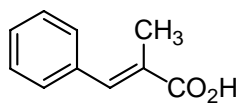
51a



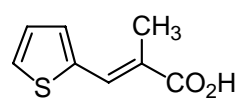
52a



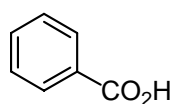
53a



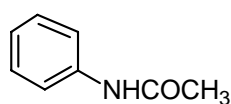
54a



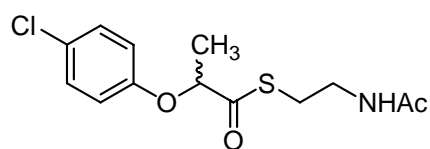
55a



56a



57a



58a

5. α -Amino acid and α -Keto acid

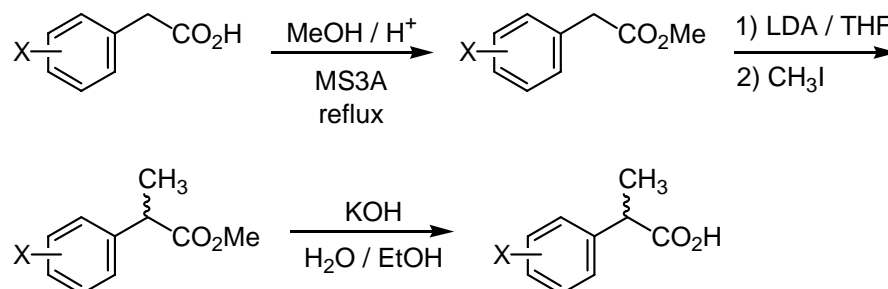
	R	X	name
59a	benzyl	NH ₂	phenylalanine
60a	4-chlorobenzyl	NH ₂	4-chlorophenylalanine
61a	2-fluorobenzyl	NH ₂	2-fluorophenylalanine
62a	3-fluorobenzyl	NH ₂	3-fluorophenylalanine
63a	4-fluorobenzyl	NH ₂	4-fluorophenylalanine
64a	phenyl	NH ₂	phenylglycine
65a	4-fluorophenyl	NH ₂	4-fluorophenylglycine
66a	C ₅ H ₁₁	NH ₂	2-aminoheptanoic acid
67a	tert-butyl	NH ₂	tert-leucine
68a	benzyl	O=	phenylpyruvic acid
69a	4-chlorobenzyl	O=	4-chlorophenylpyruvic acid
70a	phenyl	O=	benzoylformic acid

基質合成概説

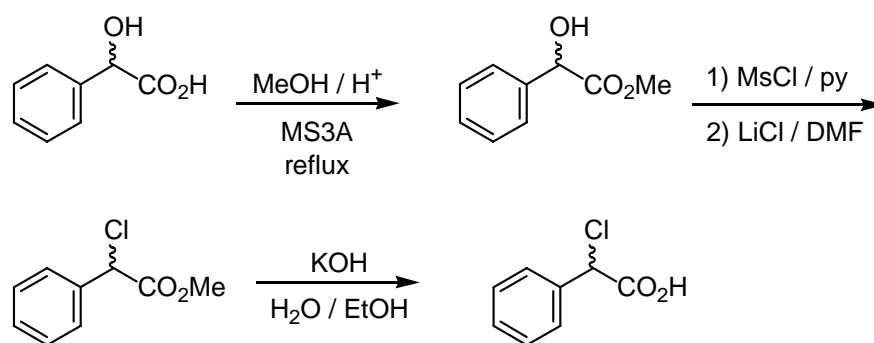
本論文にて用いられた基質は市販品として得られるもの以外は、以下に示す方法によって合成している。

1. 2-Substituted phenylacetic acid 誘導体(1a-16a)

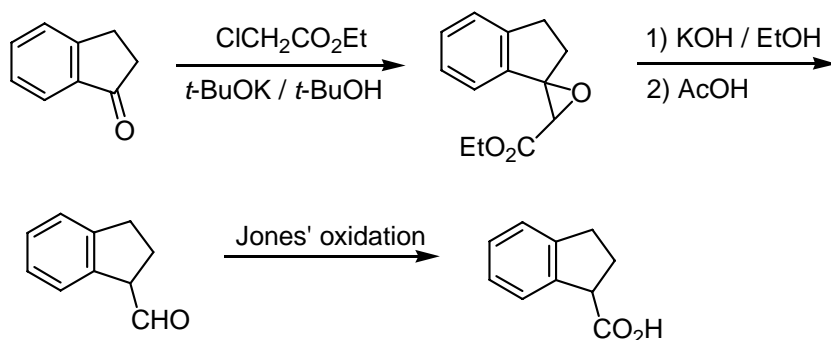
2-Arylpropanoic acid (1a-8a)は aryl acetic acid をメチルエステル化した後、LDA によるアニオンの発生、引き続きヨードメタンによるメチル化を行い、アルカリ加水分解することにより得た(Scheme 54)。また光学活性体の調製法としては 1-(1-naphthyl)ethylamine とのジアステレオマー塩を形成することによって得た。



α -Chlorophenylacetic acid (13a)については、マンデル酸を出発物質としてメチルエステル化、水酸基のメシル化引き続き LiCl による置換反応を経て、アルカリ加水分解することにより得た(Scheme 55)。



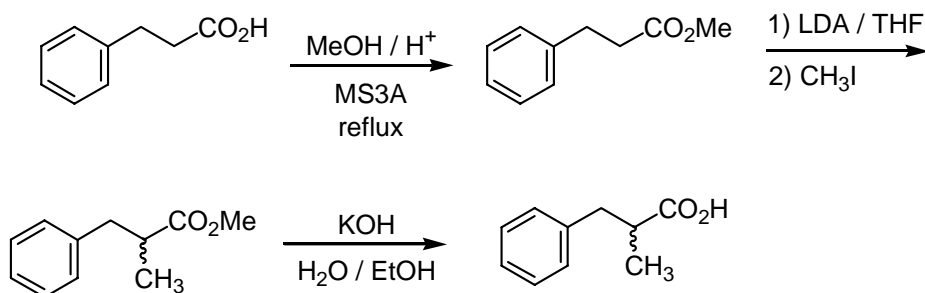
環状 2-phenylpropanoic acid 誘導体(14a-16a)である indan-1-carboxylic acid (15a)は、indan-1-one を出発物質とし、Kavadias らの報告⁵¹を参考に合成した(Scheme 56)。



Scheme 56.

2. 2-Aryloxypropanoic acid 誘導体(17a-37a)

2-Methyl-3-phenylpropanoic acid (17a)は 3-phenylpropanoic acid をメチルエステル化、LDA によるアニオンの発生、引き続きヨードメタンによるメチル化を行い、アルカリ加水分解することによって得た(Scheme 57)。

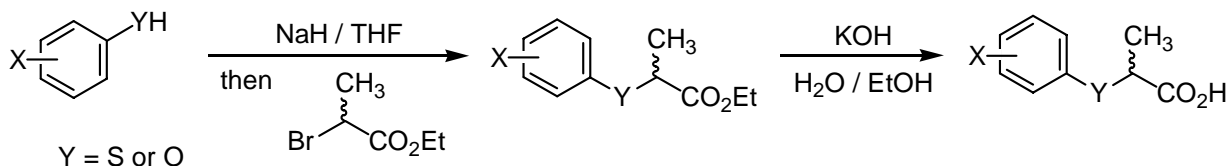


Scheme 57.

2-Methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid (18a)は Ryabov らの方法⁵²に従った。

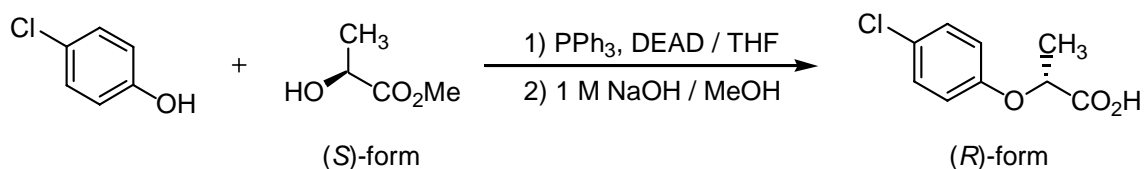
2-Aminophenylpropanoic acid (19a)については、Khadim らの方法⁵³を用いて合成することとした。

2-Phenylthiopropoic acid (20a)および 2-(4-chlorophenylthio)propanoic acid (21a)は Barbier らの例⁵⁴を参考に合成した(Scheme 58)。また、2-aryloxypropanoic acid (24a-37a, 39a)についても同様の手法を用いた。



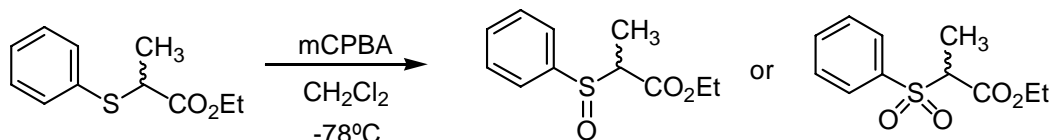
Scheme 58.

ところで、光学活性な 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid については光学的に純粋な methyl lactate を出発物質として利用する光延反転反応によって調製することができた(Scheme 59)。



Scheme 59.

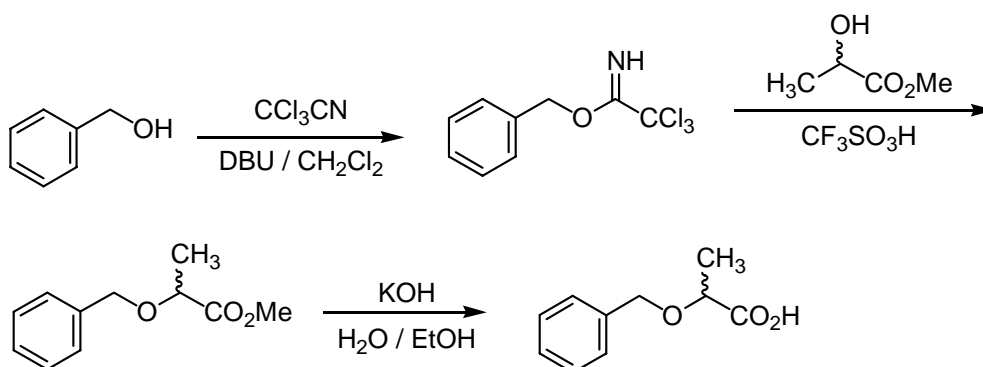
また、2-phenylthiopropanoic acid のスルホキシド体(22a)およびスルホン体(23a)は mCPBA をそれぞれ 1 当量、2 当量作用させ酸化することによって調製した(Scheme 60)。



Scheme 60.

3. 2-Benzyloxypropanoic acid (38a)

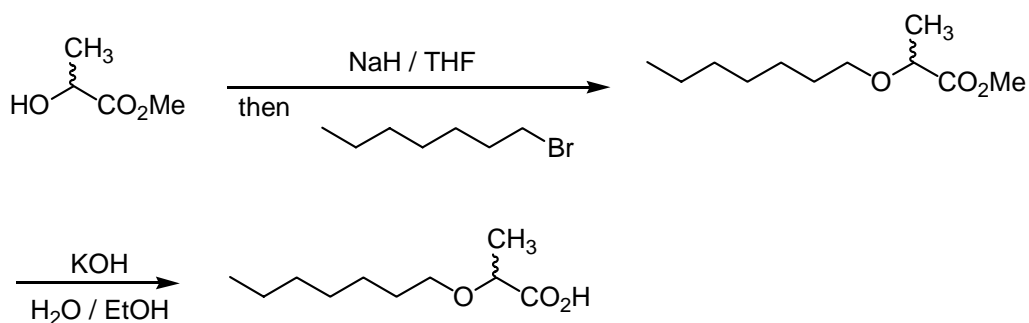
Benzyltrichloroacetimidate を利用して methyl lactate に対する水酸基の保護体として調製した(Scheme 61)。



Scheme 61.

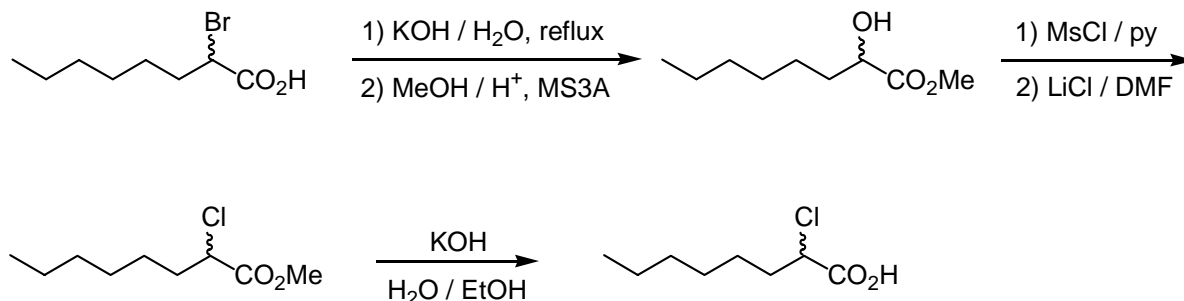
4. 2-Alkylpropanoic acid 誘導体(44a-46a)

2-Heptanoxypropanoic acid (45a)は、methyl lactate に対し heptylbromide を作用させることによって合成した(Scheme 62)。



Scheme 62.

2-Chlorooctanoic acid (**46a**)は2-bromooctanoic acid を出発物質とし、塩基性条件下における臭素原子の水酸基への変換、メチルエステル化、水酸基へのメシル基の導入引き続く塩素原子による置換反応、アルカリ加水分解を経て合成した(Scheme 63)。



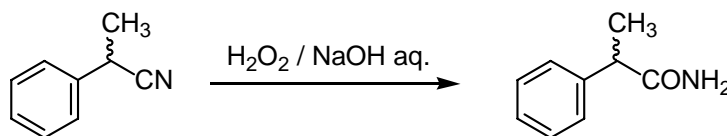
Scheme 63.

5. Deuterium Compounds

重水素化された化合物、2-deuterio-phenylpropanoic acid (**47a**) および 2-deuterio-(4-fluorophenyl)propanoic acid (**49a**)については Adam らの方法⁵⁵を参考にして調製を行った。また光学活性体の調製法としては 1-(1-naphthyl)ethylamine とのジアステレオマー塩を形成することによって得た。さらに 3,3,3-trideuteriophenylpropanoic acid (**48a**)については、Scheme 54 においてヨードメタンに代わり重水素化されたヨードメタン(CD₃I)を用いることで調製した。

6. 2-Phenylpropionamide (**50a**)

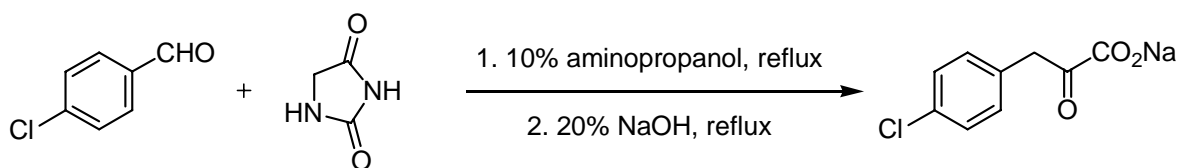
2-Phenylpropionitrile を塩基性条件下、過酸化水素を作用させることによってアミド体へと導いた(Scheme 64)。



Scheme 64.

7. α -Keto acid

α -ケト酸、4-chlorophenylpyruvic acid については、Tao らの方法⁵⁶を参考に調製を行なった(Scheme 65)。またその他必要な α -ケト酸については Tao らのほかに、Creary の方法⁵⁷も参考にして適宜調製した。



Scheme 65.

実験項

General methods

Starting materials and reagents were purchased from standard vendors and used without purification unless otherwise noted. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was developed on E. Merck Silica Gel 60 F₂₅₆ plates (0.25 mm thickness). Preparative TLC was performed using E. Merck Silica Gel 60 F₂₅₆ plates (0.5 mm thickness). Column chromatography was performed on Katayama Chemical Co., Inc. Silica Gel 60 K070-WH (70-230 mesh). NMR spectra were obtained on a JNM AL-300, JEOL EX-270, GX-400 spectrometer (¹H at 270, 300, 400 MHz and ¹³C at 75, 100 MHz) at ambient temperature. ¹H chemical shifts are referenced with CDCl₃ at 7.26 ppm or CD₃OD at 3.30 ppm or D₂O at 4.80 ppm, and ¹³C chemical shifts with CDCl₃ at 77.0 ppm. IR spectra were measured as films for oils and as KBr discs for solids with a Jasco FT / IR-410 instrument. Optical rotations were measured on a Jasco DIP 360 polarimeter. Mass spectra were recorded on a Hitachi M-80B spectrometer. Melting points were measured by Yanaco MP-S3. Spectrophotometrically assay and the measurement of OD value were carried out on a Shimadzu UV-Visible Recording Spectrometer (UV-2100S). High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was carried out by Shimadzu liquid chromatograph (LC-5A) or SSC-3461 (Senshu Scientific Co., LTD). The mechanical cell disruption were carried out by high pressure homogenizer-French Pressure Cell Press 5501 (Ohtake Co., LTD) or ultrasonic disruptor UD-201 (TOMY Digital Biology Co., LTD). The strains, ATCC series, used in this experiment are available from American Type Culture Collection: ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108-1549. The strains, JCM series, are available from the Japan Collection of Microorganism: The Institute of Physical and Chemical Research (Riken), 2-1 Hirosawa, Wako 351-0106, Japan. The strains, NBRC series, are available from NITE Biological Resource Center: Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japan. The strain, MAFF series, are available from Microorganism Section of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries Genebank: National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan. *Escherichia coli* TOP10, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21 Star (DE3) and the cloning vector pETDuet-1 and pACYCDuet-1 were purchased from Invitrogen Corp. *Escherichia coli* Rosetta (DE3), Rosetta-gami (DE3), Rosetta-gami B (DE3), Origami (DE3), Origami B (DE3) were purchased from Novagen. *Escherichia coli* XL10-Gold was purchased from Stratagene. Restriction enzymes and other DNA-modifying enzymes were purchased and were used according to the manufacturers' instructions. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the procedure of Laemmli⁵⁸. Proteins were revealed by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. Protein concentration was determined by the method of Bradford⁵⁹ with the protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), and bovine serum albumin (BSA) was used as the standard. The DNA sequencing was performed with an ABI PRISM 3100 DNA

実験の部

Analyzer (Applied Biosystems). The N-terminal sequencing was performed by automated Edman degradation with a Procise 492 sequencer (Applied Biosystems). A similarity search performed against the nonredundant GenBank-EMBL-DDBJ-PDB sequence database by using the FASTA or BLAST server at the DNA Data Bank of Japan (DDBJ)⁶⁰. The information of enzyme was obtained from the ExpASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)⁶¹. The sequence data of *S. meliloti* ATCC 51124 was collected from RhizoBase, The Genome Database for Rhizobia, of Kazusa DNA Research Institute^{49c}. The ingredients of the cultivation media were as follows (These data were also summarized as Tables in the section of supplementary section): *N. diaphanozonaria* medium; glycerol (10 g), peptone (2 g), beef extract (3 g), yeast extract (3 g), KH_2PO_4 (1 g), K_2HPO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), and 1000 mL of distilled water (pH 7.0), *C. militaris* medium; Glucose (10 g), yeast extract (3 g), malt extract (3 g), peptone (5 g), celite (0.5 g), and 1000 mL of distilled water (pH 5.5), minimal D-phenylalanine medium; glycerol (0.2 g), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (5 g), D-phenylalanine (5 g), yeast extract (0.2 g), Na_2HPO_4 (10 g), K_2HPO_4 (2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8 mg), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8 mg) and 1000 mL of distilled water (pH 7.2), minimal L-alanine medium; glycerol (0.2 g), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (5 g), L-alanine (5 g), yeast extract (0.2 g), Na_2HPO_4 (10 g), K_2HPO_4 (2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8 mg), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8 mg), and 1000 mL of distilled water (pH 7.1), *M. loti* medium; D-mannitol (10 g), yeast extract (0.4 g), K_2HPO_4 (0.5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), NaCl (0.1 g), and 1000 mL of distilled water (pH 6.8), *S. meliloti* medium; D-mannitol (5 g), yeast extract (1 g), K_2HPO_4 (0.7 g), KH_2PO_4 (0.1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g), and 1000 mL of distilled water (pH 7.2), Luria-Bertani medium (LB medium); tryptone (10 g), yeast extract (5 g), NaCl (10 g), and 1000 mL of distilled water (pH 7.1), M9 medium; Na_2HPO_4 (6 g), KH_2PO_4 (3 g), NaCl (5 g), NH_4Cl (1 g), and 1000 mL of distilled water (pH 6.8), after the sterilize by autoclave, following filter sterilized solutions were added; 1% thiamine hydrochloride (1 mL), 1M MgSO_4 (1 mL), and 1M CaCl_2 (0.1 mL), M63 medium; KH_2PO_4 (13.6 g), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.89 mg), and 1000 mL of distilled water (pH 6.8), after the sterilize by autoclave, filter sterilized 1% thiamine hydrochloride (1 mL) was added.

The first part: Microbial Deracemization of α -Methyl Carboxylic Acids

Chapter 1.

1.1 Chemical synthesis of the substrate

Methyl 4-fluorophenylacetate (**8c**)

A mixture of 4-fluorophenylacetic acid (1.23 g, 8.3 mmol), MeOH (5 mL) and concentrated sulfuric acid (catalytic amount) was heated under reflux for 12 h with MS3A. The mixture was cooled to room temperature, neutralized by adding a phosphate buffer solution. After removal of MeOH *in vacuo*, the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 19/1) to give methyl 4-fluorophenylacetate (1.23 g, 92% yield) as a colorless oil; IR (film) 2954, 1740, 1604, 1513, 1436, 1339, 1224, 1156, 1015, 824, 725 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.24 (dd, $J = 2.4$, 8.9 Hz, 2H), 7.01 (tt, $J = 2.4$, 8.9 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.60 (s, 2H).

Methyl (\pm)-2-(4-fluorophenyl)propanoate ((\pm)-**8b**)

To a solution of diisopropylamine (0.5 mL, 3.6 mmol) in tetrahydrofuran (4 mL) was added *n*-butyllithium (1.52 M in hexane, 2.4 mL) at $-78\text{ }^\circ\text{C}$ under Ar, and the mixture was stirred for 30 min. Then a solution of methyl 4-fluorophenylacetate (0.50 g, 3.0 mmol) in tetrahydrofuran (5 mL) was added dropwise, and the mixture was stirred for 20 min at the same temperature. The mixture was then allowed to warm to $0\text{ }^\circ\text{C}$. Methyl iodide (0.3 mL, 4.8 mmol) was added and stirred for 30 min. The reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 19/1) to give methyl (\pm)-2-(4-fluorophenyl)propanoate (0.48 g, 89% yield) as a colorless oil; IR (film) 2983, 2953, 1739, 1604, 1510, 1456, 1436, 1224, 1170, 1070, 838, 732, 551 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.19 (dt, $J = 2.0$, 8.8 Hz, 2H), 6.94 (tt, $J = 2.0$, 8.8 Hz, 2H), 3.64 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 1.41 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

(\pm)-2-(4-Fluorophenyl)propanoic acid ((\pm)-**8a**)

A solution of methyl (\pm)-2-(4-fluorophenyl)propanoate (0.25 g, 1.4 mmol) in EtOH (3 mL) was added to an aqueous solution (3 mL) of potassium hydroxide (0.5 g, 9.0 mmol) at $0\text{ }^\circ\text{C}$. After stirring for 8 h, the reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to give (\pm)-4-fluorophenoxypropionic acid (0.23 g, quant.) as a colorless oil; IR (film) 2985, 2626, 1705, 1603, 1506, 1457, 1410, 1225, 1161, 838, 722, 559 cm^{-1} .

Methyl (\pm)- α -chlorophenylacetate ((\pm)-**13b**)

To a solution of methyl mandelate (1.6 g, 9.59 mmol) and pyridine (3.0 mL, 59.8 mmol) in dichloromethane

実験の部

(10 mL) was added dropwise mesyl chloride (1.1 mL, 14.2 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and was stirred for further 18 h. The reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with 2 M hydrochloric acid, saturated sodium hydrogen carbonate solution and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. To a solution of this residue in anhydrous DMF (10 mL) was added lithium chloride (1.2 g, 28.3 mmol) and the reaction mixture was refluxed at 90 °C for 1.5 h. The reaction was quenched by adding water, and extracted with hexane. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was distilled (150 °C / 7.5 mmHg) to give methyl (±)- α -chloropnenylacetate (1.1 g, 59% yield) as a colorless oil; IR (film) 3065, 2954, 1757, 1496, 1455, 1284, 1196, 1164, 1006, 855, 729, 696 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.50 (m, 2H), 7.39 (m, 3H), 5.37 (s, 1H), 3.78 (s, 3H).

(±)- α -Chlorophenylacetic acid ((±)-13a)

A solution of methyl (±)- α -chloropnenylacetate (0.30 g, 1.6 mmol) in EtOH (3 mL) was added to an aqueous solution (1 mL) of potassium hydroxide (0.17 g, 2.6 mmol) at 0 °C. After stirring for 1 h at this temperature, the reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was distilled (160 °C / 1.0 mmHg) to give (±)- α -chloropnenylacetic acid (0.26 g, 94% yield) as a colorless needle; IR (KBr disc) 3393, 3033, 2574, 1728, 1455, 1413, 1289, 1202, 904, 725, 697, 666, 496 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.31 (m, 2H), 7.20 (m, 3H), 5.18 (s, 1H).

(±)-Indan-1-carboxylic acid ((±)-15a)

A solution of indan-1-one (5.0 g, 37.8 mmol) in freshly distilled ethyl chloroacetate (6.9 g, 56.3 mmol) was added dropwise over 1 h to a solution of potassium *tert*-butoxide (6.4 g, 57.0 mmol) in dry *tert*-butylalcohol (50 mL) at 0 °C. After completion of the addition, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for further 1.5 h. The excess *tert*-butoxide was decomposed by passing CO_2 through the reaction mixture and the solvent was removed *in vacuo* at 35 °C. Ether (20 mL) was added to the residue and the mixture filtered through a pad of celite. The celite was washed with ether and the washing was combined with the filtrate, concentrated *in vacuo* to give a dark-brownish residue. To a solution of potassium hydroxide (3.5 g, 46.0 mmol) in ethanol (5 mL) was added a solution of this residue in ethanol (5 mL) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for additional 3 h. The precipitate was filtered and washed with ice-cold ethanol and with ether. A vigorous evolution occurred, when acetic acid (20 mL) was added to this precipitate at 0 °C. After stirring at room temperature for 15 min, the reaction mixture was heated at 130 °C for 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with water (10 mL) and extracted with ether. The organic layer was washed with saturated sodium hydrogen carbonate and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to give a brownish oil. To a solution of this oil in acetone (10 mL) was added dropwise Jones'

reagent (12 mL) over 20 min at 0 °C and the reaction mixture was stirred for additional 1 h. Adding of MeOH quenched the excess Jones' reagent, and the reaction mixture was stirred for 15 min before adding 10% NaCl solution. The reaction mixture was extracted with ether. The organic layer was washed with brine and saturated sodium hydrogen carbonate solution, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to give crude indan-1-carboxylic acid (3.9 g, 64% yield) as a brownish oil. The crude product was recrystallized from hexane/EtOAc to give indan-1-carboxylic acid (2.0 g, 32% yield (4 steps starting from indan-1-one)) as a yellowish crystal; IR (KBr disc) 2942, 2730, 1710, 1418, 1318, 1282, 1228, 940, 738 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.42 (m, 1H), 7.20 (m, 3H), 4.08 (dd, $J = 6.3, 8.1$ Hz, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.93 (m, 1H), 2.40 (m, 2H).

Methyl (\pm)-2-methyl-3-phenylpropanoate ((\pm)-17b)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **8b**, methyl (\pm)-2-methyl-3-phenylpropanoate (0.31 g, 47% yield) was obtained as a colorless oil starting from methyl-3-phenylpropanoate (0.60 g, 3.7 mmol); IR (film) 3028, 2975, 2951, 1739, 1496, 1455, 1167, 986, 832, 745, 701 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.29 (m, 2H), 7.19 (m, 2H), 3.64 (s, 3H), 3.03 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.70 (m, 2H), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H).

(\pm)-2-Methyl-3-phenylpropanoic acid ((\pm)-17a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **8a**, (\pm)-2-methyl-3-phenylpropanoic acid (0.15 g, quant.) was obtained as a colorless oil starting from methyl (\pm)-2-methyl-3-phenylpropanoate (0.16 g, 0.9 mmol); IR (film) 2977, 2664, 1705, 1455, 1292, 1240, 939, 911, 744, 699 cm^{-1} .

(\pm)-2-Methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid ((\pm)-18a)

Sodium ethoxide (1.10 g, 16.2 mmol) was dissolved in EtOH (6 mL) at 0 °C. After stirring for 5 min, the mixture was allowed to warm to room temperature. A solution of diethyl methylmalonate (2.00 g, 11.5 mmol) in EtOH (2 mL) was added dropwise over a period of 5 min, and the mixture was stirred for 30 min at the same temperature. Then, ethanol solution (2 mL) of 2-chloromethylthiophene (3.30 g, 24.8 mmol), which was freshly prepared from 2-thiophenemethanol and thionyl chloride, was added. The mixture was heated under reflux for 15 h. The reaction mixture was cooled in an ice bath, acidified with 2 M hydrochloric acid and extracted with EtOAc. The organic layer was concentrated *in vacuo*. To the solution of KOH (2.6 g, 9.5 mmol) in water (15 mL), was added this oily residue dissolved in EtOH (15 mL). The mixture was stirred at room temperature for 11 h. The reaction mixture was cooled in an ice-water bath, acidified with 2 M hydrochloric acid and extracted with EtOAc. The organic layer was concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in a mixture of water (50 mL) and concentrated sulfuric acid (5 mL), and heated under reflux for 30 h. Then, the mixture was cooled to room temperature and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated *in vacuo*. The residue was distilled (140 °C / 200 Pa) to give

実験の部

2-methyl-3-(2-thienyl)propanoic acid⁵² (1.54 g, 81% yield) as colorless oil; IR (film) 2978, 2659, 1707, 1462, 1292, 1234, 937, 850, 698 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.15 (dd, $J = 1.3, 5.1$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 3.5, 5.1$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.26 (dd, $J = 6.6, 14.7$ Hz, 1H), 2.94 (dd, $J = 7.3, 14.7$ Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 1.24 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 182.0 (CO), 141.2 (C), 126.8 (CH), 125.7 (CH), 123.9 (CH), 41.6 (CH_2), 33.2 (CH), 16.5 (CH_3).

(±)-2-Phenylaminopropanoic acid ((±)-19a)

A solution of aniline (9.3 g, 0.10 mol), anhydrous sodium acetate (8.3 g, 0.10 mol) and ethyl 2-bromopropanoate (18 g, 0.10 mol) in EtOH (3 mL) was heated under reflux for 25 h. After being cooled to room temperature, the mixture was diluted with water (40 mL) and extracted with ether. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated *in vacuo*. The oily residue was then heated under reflux in 10% aqueous NaOH (70 mL) for 2 h. Then, the mixture was cooled to room temperature and washed with ether. The aqueous layer was cooled in an ice-water bath, and the solution was acidified to pH 2 with concentrated HCl. The resulting slurry suspension was allowed to stand in an ice-water bath for 12 h, filtered, washed sequentially with water (200 mL) and hexane (200 mL), and dried under high vacuum. This crude precipitate was recrystallized from chloroform/acetone to give 2-phenylaminopropanoic acid⁵³ (11.8 g, 71% yield) as a colorless crystal: IR (KBr disc) 2979, 2775, 1572, 1495, 1394, 1358, 1090, 958, 850, 756, 696, 553 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.09 (m, 2H), 6.61 (m, 3H), 4.09 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.45 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (acetone) δ 175.7 (CO), 148.4(C), 129.6 ($\text{CH} \times 2$), 117.8 (CH), 113.6 ($\text{CH} \times 2$), 52.2 (CH), 18.8 (CH_3).

Ethyl (±)-2-(phenylthio)propanoate ((±)-20c)

Sodium hydride (60% in paraffin, 0.47 g, 11.8 mmol) was stirred for 5 min in hexane (5 mL) under Ar, then the solvent was removed by a syringe followed by evaporation with a vacuum pump. After repeating the same operation for three times, the residue was suspended in tetrahydrofuran (5 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. To this mixture, a solution of thiophenol (1.0 g, 9.7 mmol) in tetrahydrofuran (10 mL) was added dropwise over 10 min, and the mixture was stirred for 5 min at the same temperature. Then the mixture was allowed to warm to room temperature, stirred for additional 15 min. A solution of ethyl 2-bromopropanoate (3.5 g, 19.3 mmol) in tetrahydrofurane (3 mL) was added and the mixture was stirred for 6 h. The reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated sodium hydrogen carbonate solution and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 19/1) to give ethyl (±)-2-phenylthiopropanoate⁵⁴ (1.9 g, 99% yield) as a colorless oil; IR (film) 3060, 2980, 2933, 1731, 1583, 1441, 1322, 1256, 1160, 1065, 859, 748, 692 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.39 (m, 2H), 7.22 (m, 2H), 4.04 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.72 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.41 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.10 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

(±)-2-(phenylthio)propanoic acid ((±)-20a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **8a**, (±)-2-phenylthiopropionic acid (0.49 g, quant.) was obtained as a colorless oil starting from ethyl (±)-2-phenylthiopropionate (0.50 g, 2.4 mmol); IR (film) 2980, 2625, 1717, 1583, 1440, 1284, 1239, 1186, 1025, 748, 691 cm^{-1} .

Ethyl (±)-2-(4-chlorophenylthio)propanoate ((±)-21c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **20c**, ethyl (±)-2-(4-chlorophenylthio)propanoate (4.6 g, 88% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-chlorothiophenol (3.1 g, 21 mmol); IR (film) 2981, 2933, 1734, 1477, 1323, 1257, 1161, 1095, 823 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.36 (m, 2H), 7.25 (m, 2H), 4.09 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.71 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.44 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

(±)-2-(4-chlorophenylthio)propanoic acid ((±)-21a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **8a**, (±)-2-(4-chlorophenylthio)propanoic acid (2.5 g, 70% yield) was obtained as a colorless crystal starting from ethyl (±)-2-(4-chlorophenylthio)propanoate (4.1 g, 17 mmol); IR (film) 2937, 2630, 1703, 1475, 1234, 1093, 1012, 829, 744, 505 cm^{-1} .

Ethyl (±)-2-(phenylsulfinyl)propanoate (22c)

Ethyl (±)-2-phenylthiopropionate (0.05 g, 0.24 mmol) was dissolved in dichloromethane (3 mL) cooled at -78 °C and treated under stirring with a solution of mCPBA (0.043 g, 0.24 mmol) in dichloromethane (3 mL) over 5 min. The mixture was stirred for 10 min at the same temperature. The reaction mixture was filtered through a pad of celite for removal of the mCPBA and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated sodium hydrogen carbonate solution, 5% sodium sulfite solution and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 1/1) to give ethyl (±)-2-(phenylsulfinyl)propanoate (0.036 g, 67% yield) as a colorless oil; IR (film) 3058, 2982, 2939, 2359, 1731, 1318, 1253, 1206, 1167, 1050, 858, 693 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.59 (m, 5H), 4.09 (m, 2H), 3.82 (q, $J = 7.1$ Hz, 0.5H, diastereomer), 3.49 (q, $J = 7.3$ Hz, 0.5H, diastereomer), 1.49 (d, $J = 7.3$ Hz, 1.5H, diastereomer), 1.32 (d, $J = 7.1$ Hz, 1.5H, diastereomer), 1.20 (m, 3H).

Ethyl (±)-2-(phenylsulfonyl)propanoate ((±)-23c)

Ethyl (±)-2-phenylthiopropionate (1.0 g, 4.8 mmol) was dissolved in dichloromethane (10 mL) cooled at -78 °C and treated under stirring with a solution of mCPBA (2.7 g, 16 mmol) in dichloromethane (15 mL) over 20 min. The mixture was allowed to warm to room temperature and was stirred for further 2.5 h. The reaction mixture was filtered through a pad of celite for removal of the mCPBA and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated sodium hydrogen carbonate solution, 5% sodium sulfite

実験の部

solution and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 3/1) to give ethyl (\pm)-2-(phenylsulfonyl)propanoate (1.0 g, 86% yield) as a colorless oil; IR (film) 3066, 2985, 2943, 1739, 1584, 1448, 1323, 1239, 1188, 1148, 1085, 1021, 859, 796, 762, 727, 689 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.69 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.11 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.04 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.57 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

(\pm)-2-(Phenylsulfonyl)propanoic acid ((\pm)-23a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **8a**, (\pm)-2-(phenylsulfonyl)propanoic acid (0.45 g, quant.) was obtained as a colorless oil starting from ethyl (\pm)-2-(phenylsulfonyl)propanoate (0.50 g, 2.1 mmol); IR (film) 3218, 2944, 2594, 2358, 1747, 1449, 1309, 1148, 1083, 842, 727, 688 cm^{-1} .

Ethyl (\pm)-2-(4-fluorophenoxy)propanoate ((\pm)-25c)

Sodium hydride (60% in paraffin, 80 mg, 2.0 mmol) was stirred for 5 min in hexane (5 mL) under Ar, then the solvent was removed by a syringe followed by evaporation with a vacuum pump. After repeating the same operation for three times, the residue was suspended in tetrahydrofuran (5 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. To this mixture, a solution of 4-fluorophenol (0.21 g, 1.9 mmol) in tetrahydrofuran (3 mL) was added dropwise over 5 min, and the mixture was stirred for 5 min at the same temperature. Then the mixture was allowed to warm to room temperature, stirred for additional 15 min. A solution of ethyl 2-bromopropanoate (0.7 g, 3.9 mmol) in tetrahydrofurane (2 mL) was added and the mixture was stirred for 14 h. The reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 9/1) to give ethyl (\pm)-2-(4-fluorophenoxy)propanoate (0.34 g, 86% yield) as a colorless oil; IR (film) 2988, 2940, 1753, 1505, 1447, 1377, 1274, 1203, 1134, 1052, 829, 748 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.96 (m, 2H), 6.83 (m, 2H), 4.67 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.22 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.60 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(4-bromophenoxy)propanoate ((\pm)-27c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, ethyl (\pm)-2-(4-bromophenoxy)propanoate (0.75 g, 93% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-bromophenol (0.51 g, 3.2 mmol); IR (film) 2986, 2938, 1753, 1589, 1488, 1376, 1282, 1240, 1198, 1134, 1073, 1051, 1005, 822, 640 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.36 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.69 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.21 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.61 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(4-iodophenoxy)propanoate ((\pm)-28c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, ethyl (\pm)-2-(4-iodophenoxy)propanoate (0.52 g, 73% yield) was obtained as a colorless oil starting from

4-iodophenol (0.49 g, 2.2 mmol) ; IR (film) 2984, 2937, 1749, 1584, 1486, 1376, 1280, 1239, 1196, 1134, 1097, 1051, 821, 632 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.54 (m, 2H), 6.65 (m, 2H), 4.69 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.21 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.61 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(4-trifluoromethylphenoxy)propanoate ((\pm)-29c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, ethyl (\pm)-2-(4-trifluoromethylphenoxy)propanoate (0.69 g, 85% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-trifluoromethylphenol (0.50 g, 3.1 mmol) ; IR (film) 2989, 2942, 1752, 1616, 1519, 1448, 1378, 1330, 1254, 1163, 1114, 1067, 838, 631 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.54 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.79 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.22 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.64 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(4-methylphenoxy)propanoate ((\pm)-30c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, ethyl (\pm)-2-(4-methylphenoxy)propanoate (0.18 g, 26% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-methylphenol (0.45 g, 4.2 mmol) ; IR (film) 2986, 1754, 1614, 1511, 1287, 1237, 1195, 1135, 1053, 817, 742 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.06 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.78 (td, $J = 2.9, 8.8$ Hz, 2H), 4.70 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.21 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.60 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.25 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(4-methoxyphenoxy)propanoate ((\pm)-31c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, ethyl (\pm)-2-(4-methoxyphenoxy)propanoate (0.96 g, 88% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-methoxyphenol (0.60 g, 4.8 mmol) ; IR (film) 2987, 2938, 1752, 1507, 1465, 1376, 1230, 1135, 1099, 1037, 947, 825, 739 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.81 (m, 4H), 4.64 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 1.58 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(4-acetylphenoxy)propanoate ((\pm)-32c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, ethyl (\pm)-2-(4-acetylphenoxy)propanoate (0.44 g, 42% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-acetylphenol (0.59 g, 4.4 mmol) ; IR (film) 2992, 2939, 1749, 1669, 1603, 1505, 1419, 1354, 1275, 1248, 1200, 1180, 1137, 1097, 1021, 955, 838, 591 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.82 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.22 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.64 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(4-benzyloxyphenoxy)propanoate ((\pm)-33d)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, ethyl (\pm)-2-(4-benzyloxyphenoxy)propanoate (0.95 g, 91% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-benzyloxyphenol (0.70 g, 3.5 mmol) ; IR (film) 3063, 2985, 2871, 1748, 1592, 1506, 1455, 1377, 1276,

実験の部

1216, 1134, 1098, 1050, 1017, 823, 742, 697 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.37 (m, 5H), 6.84 (m, 4H), 5.00 (s, 2H), 4.65 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.21 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(4-hydroxyphenoxy)propanoate ((\pm)-33c)

A mixture of **33d** (0.50 g, 1.7 mmol) in ethanol (10 ml) containing 10% palladium on carbon (100 mg) was stirred vigorously in a H_2 atmosphere under balloon pressure at room temperature. After 5 h, the mixture was diluted with ethanol, filtered and concentrated *in vacuo* to give ethyl (\pm)-2-(4-hydroxyphenoxy)propanoate (0.36 g, quant.) as a colorless oil; IR (film) 3421, 2985, 2359, 1732, 1508, 1455, 1376, 1214, 1135, 947, 827, 763 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.75 (m, 5H), 4.63 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.21 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.58 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Ethyl (\pm)-2-(2-naphthoxy)propanoate ((\pm)-34c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, ethyl (\pm)-2-(2-naphthoxy)propanoate (0.25 g, 32% yield) was obtained as a colorless oil starting from 2-naphthol (0.51 g, 3.5 mmol); IR (film) 3059, 2985, 2938, 1754, 1631, 1601, 1510, 1469, 1257, 1216, 1182, 1133, 1095, 1050, 971, 839, 749 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.76 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.20 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.89 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.23 (m, 2H), 1.68 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Methyl (\pm)-2-(benzyloxy)propanoate ((\pm)-38b)

DBU (0.15 mL, 1.0 mmol) was added dropwise over 5 min to a solution of benzyl alcohol (1 mL, 9.7 mmol) and trichloroacetonitrile (4.8 mL, 48 mmol) in dichloromethane (10 mL) cooled by ice bath. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and was stirred for further 3 h. The solvent was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 19/1) and distilled (150 $^\circ\text{C}$ / 1 mmHg) to give benzyl 3,3,3-trichloroacetoimidate (1.6 g, 80% yield) as a colorless oil.

Trifluoromethanesulfonic acid (catalytic amounts) was added to a stirred solution of methyl lactate (0.2 g, 1.96 mmol) and benzyl 3,3,3-trichloroacetoimidate (1.0 g, 3.96 mmol) in cyclohexane-dichloromethane (2:1; 2.5 mL) and the reaction was stirred for 40 h at room temperature. The reaction mixture was filtered through a pad of celite and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated sodium hydrogen carbonate solution and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 29/1) to give methyl (\pm)-2-(benzyloxy)propanoate (0.27 g, 72% yield) as a colorless oil; IR (film) 3031, 2952, 2873, 1748, 1496, 1454, 1274, 1207, 1143, 1065, 1026, 740, 699 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.20 (m, 5H), 4.59 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 3.97 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 1.34 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

Methyl (±)-2-(phenylethoxy)propanoate ((±)-39b)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, methyl (±)-2-(phenylethoxy)propanoate (1.0 g, 59% yield) was obtained as a colorless oil starting from 2-phenylethanol (1.0 g, 8.2 mmol) and methyl 2-bromopropanoate (2.7 g, 16 mmol); IR (film) 3028, 2950, 2870, 1751, 1454, 1275, 1205, 1144, 1030, 750, 700 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.26 (m, 5H), 3.97 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.81 (m, 4H), 3.55 (m, 1H), 2.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.40 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

(±)-2-(4-Fluorophenoxy)propanoic acid ((±)-25a)

A solution of **25c** (0.21 g, 1.0 mmol) in EtOH (3 mL) was added to an aqueous solution (3 mL) of potassium hydroxide (0.62 g, 9.5 mmol) at 0 °C. After stirring for 4 h, the reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to give (±)-2-(4-fluorophenoxy)propanoic acid (0.18 g, quant.) as a colorless solid; IR (KBr disc) 2999, 2645, 1717, 1505, 1291, 1226, 1139, 922, 831, 757, 685, 516 cm^{-1} .

(±)-2-(4-Bromophenoxy)propanoic acid ((±)-27a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-bromophenoxy)propanoic acid (0.25 g, 90% yield) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(4-bromophenoxy)propanoate (0.31 g, 1.1 mmol); IR (KBr disc) 2995, 2542, 1714, 1586, 1486, 1283, 1224, 1138, 923, 823, 642, 504 cm^{-1} .

(±)-2-(4-Iodophenoxy)propanoic acid ((±)-28a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-iodophenoxy)propanoic acid (0.23 g, 94% yield) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(4-iodophenoxy)propanoate (0.26 g, 0.82 mmol); IR (KBr disc) 2983, 2646, 1702, 1584, 1486, 1281, 1235, 1182, 1134, 1094, 907, 817, 632, 504 cm^{-1} .

(±)-2-(4-Trifluoromethylphenoxy)propanoic acid ((±)-29a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-trifluoromethylphenoxy)propanoic acid (0.22 g, 99% yield) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(4-trifluoromethylphenoxy)propanoate (0.25 g, 0.96 mmol); IR (KBr disc) 2995, 2649, 1719, 1618, 1521, 1335, 1236, 1113, 1068, 838, 638 cm^{-1} .

(±)-2-(4-Methylphenoxy)propanoic acid ((±)-30a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-methylphenoxy)propanoic acid (0.13 g, 94% yield) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(4-methylphenoxy)propanoate (0.16 g, 0.76 mmol); IR (KBr disc) 2997, 1715, 1613, 1509, 1453,

実験の部

1291, 1225, 1138, 1097, 1044, 920, 807, 749, 682, 510 cm^{-1} .

(±)-2-(4-Methoxyphenoxy)propanoic acid ((±)-31a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-methoxyphenoxy)propanoic acid (0.22 g, 99% yield) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(4-methoxyphenoxy)propanoate (0.26 g, 1.1 mmol); IR (KBr disc) 2950, 2643, 1717, 1507, 1450, 1290, 1220, 1140, 1044, 921, 821, 739, 682, 525 cm^{-1} .

(±)-2-(4-Acetylphenoxy)propanoic acid ((±)-32a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-acetylphenoxy)propanoic acid (0.22 g, quant.) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(4-acetylphenoxy)propanoate (0.25 g, 1.1 mmol); IR (KBr disc) 2993, 2611, 1754, 1651, 1595, 1512, 1368, 1317, 1263, 1212, 1175, 1098, 964, 836, 739, 640, 590 cm^{-1} .

(±)-2-(4-Hydroxyphenoxy)propanoic acid ((±)-33a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-hydroxyphenoxy)propanoic acid (0.21 g, 95% yield) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(4-hydroxyphenoxy)propanoate (0.25 g, 1.2 mmol); IR (KBr disc) 3266, 2989, 2606, 1708, 1510, 1454, 1371, 1232, 1198, 1135, 822, 762, 672, 507 cm^{-1} .

(±)-2-(2-Naphthoxy)propanoic acid ((±)-34a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(2-naphthoxy)propanoic acid (0.13 g, 91% yield) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(2-naphthoxy)propanoate (0.16 g, 0.64 mmol); IR (KBr disc) 2994, 2642, 1704, 1629, 1599, 1509, 1466, 1390, 1256, 1215, 1182, 1136, 953, 837, 747, 624, 471 cm^{-1} .

(±)-2-(4-Benzyloxyphenoxy)propanoic acid ((±)-37a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-benzyloxyphenoxy)propanoic acid (0.94 g, 98% yield) was obtained as a colorless solid starting from ethyl (±)-2-(4-benzyloxyphenoxy)propanoate (1.0 g, 3.3 mmol); IR (KBr disc) 3033, 2937, 2906, 1709, 1506, 1215, 1132, 1051, 860, 773, 742 cm^{-1} .

(±)-2-(Benzyloxy)propanoic acid ((±)-38a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(benzyloxy)propanoic acid (0.19 g, quant.) was obtained as a colorless oil starting from methyl (±)-2-(benzyloxy)propanoate (0.20 g, 1.1 mmol); IR (film) 3032, 2634, 1718, 1455, 1210, 1118, 1063, 1019, 737, 699 cm^{-1} .

(±)-2-(Phenylethoxy)propanoic acid ((±)-39a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(phenylethoxy)propanoic acid (0.93 g, 99% yield) was obtained as a colorless oil starting from methyl (±)-2-(phenylethoxy)propanoate (1.0 g, 4.8 mmol); IR (film) 3033, 2906, 2644, 1707, 1455, 1215, 1110, 1083, 1012, 754, 677 cm^{-1} .

Methyl (±)-2-heptanoxopropanoate ((±)-45b)

Sodium hydride (60% in paraffin, 0.58 g, 14.5 mmol) was stirred for 5 min in hexane (5 mL) under Ar, then the solvent was removed by a syringe followed by evaporation with a vacuum pump. After repeating the same operation for three times, the residue was suspended in tetrahydrofuran (5 mL) and the mixture was cooled to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. To this mixture, a solution of methyl lactate (1.0 g, 9.6 mmol) in tetrahydrofuran (5 mL) was added dropwise over 5 min, and the mixture was stirred for 5 min at the same temperature. Then the mixture was allowed to warm to $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, stirred for additional 15 min. A solution of *n*-heptyl bromide (3.4 g, 19.3 mmol) in tetrahydrofurane (3 mL) was added and the mixture was stirred for 50 h at room temperature. The reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 19/1) to give methyl (±)-2-heptoxopropanoate (0.43 g, 22% yield) as a colorless oil; IR (film) 2931, 2858, 1767, 1456, 1372, 1273, 1203, 1128, 1074, 982, 830, 754, 668 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.96 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.54 (dt, $J = 6.8, 9.0$ Hz, 1H), 3.35 (d, $J = 6.8, 9.0$ Hz, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.39 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.32 (m, 8H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

(±)-2-Heptanoxopropanoic acid ((±)-45a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-heptoxopropanoic acid (0.29 g, quant.) was obtained as a colorless oil starting from methyl (±)-2-heptoxopropanoate (0.31 g, 1.52 mmol); IR (film) 3110, 2931, 2859, 1723, 1456, 1374, 1328, 1286, 1241, 1128 cm^{-1} .

Methyl (±)-2-hydroxyoctanoate ((±)-46c)

A solution of 2-bromooctanoic acid (2.0 g, 9.0 mmol) and sodium hydroxide (3.5 g, 81.4 mmol) in H_2O (30 mL) was heated at $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 6 h. After being acidified by 2 M hydrochloric acid, the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. A mixture of this residue, MeOH (20 mL) and concentrated sulfuric acid (catalytic amount) was heated under reflux for 12 h with MS3A. The mixture was cooled to room temperature, neutralized by adding a phosphate buffer solution. After removal of MeOH *in vacuo*, the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 7/1) to give methyl 2-hydroxyoctanoate (1.17 g, 75% yield) as a colorless oil; ^1H NMR (CDCl_3) δ 4.19 (m,

実験の部

1H), 3.79 (s, 3H), 2.67 (br s, 1H), 1.78 (m, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.28 (m, 8H), 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

Methyl (\pm)-2-chlorooctanoate ((\pm)-46b)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **13b**, methyl (\pm)-2-chlorooctanoate (1.2 g, 90% yield) was obtained as a colorless oil starting from methyl (\pm)-2-hydroxyoctanoate (1.2 g, 6.8 mmol); IR (film) 2955, 2930, 2859, 1750, 1438, 1279, 1168, 1006, 708 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 4.27 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.02 (m, 2H), 1.30 (m, 8H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

(\pm)-2-Chlorooctanoic acid ((\pm)-46a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **13a**, (\pm)-2-chlorooctanoic acid (0.40 g, 86% yield) was obtained as a colorless oil starting from methyl (\pm)-2-chlorooctanoate (0.50 g, 2.60 mmol); IR (film) 3115, 2930, 2683, 1725, 1458, 1422, 1285, 1203, 923, 812, 688 cm^{-1} .

Ethyl phenylthioacetate (51c)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **20c**, ethyl phenylacetate (1.5 g, 86% yield) was obtained as a colorless oil starting from thiophenol (1.0 g, 9.1 mmol) and ethylbromoacetate (3.0 g, 18 mmol); IR (film) 3059, 2981, 1736, 1583, 1481, 1441, 1367, 1282, 1028, 742, 690 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.33 (m, 2H), 7.20 (m, 3H), 4.09 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.56 (s, 2H), 1.15 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Phenylthioacetic acid (51a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **8a**, phenylthioacetic acid (0.73 g, 98% yield) was obtained as a colorless crystal starting from ethyl phenylthiopropionate (0.81 g, 4.4 mmol); IR (film) 2937, 2717, 1703, 1570, 1475, 1234, 1186, 1093, 943, 829, 667, 505 cm^{-1} .

1.2 Biotransformation

General procedure for the deracemization reaction of α -substituted carboxylic acids by the aid of *N. diaphanozonaria* JCM3208

Condition A (growing cell system)

To 90 mL of *N. diaphanozonaria* medium was added a suspension of 48 h-incubated cells of *N. diaphanozonaria* in 10 mL of the broth and the incubation was carried out at 30 °C for 24 h (first incubation). Then, 100 mg of (\pm)- α -substituted carboxylic acid was added to the suspension, and the mixture was shaken for appropriate time depending on the substrate (second incubation). The reaction mixture was filtered through a pad of celite for removal of the cells. The celite was washed with EtOAc and the washing was combined with the filtrate. After being acidified by 2 M hydrochloric acid, the mixture was extracted with

EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was converted to the corresponding methyl ester by being treated with diazomethane followed by a conventional work up. The residue was purified by pTLC (hexane/EtOAc = 9/1) to give the methyl ester of the starting acid as colorless oil.

Condition B (resting cell system)

To 90 mL of *N. diaphanozonaria* medium was added a suspension of 48-h incubated cells of *N. diaphanozonaria* in 10 mL of the broth and the incubation was carried out at 30 °C for 24 h. The wet cells were harvested by centrifugation (5000 rpm, 10 min) and washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0). The wet cells, together with the substrate (100 mg, 0.1% w/v), were re-suspended in 100 mL of a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) in a 500-mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken at 30 °C on a reciprocal shaker for appropriate time. The work-up procedure was the same as condition A.

Condition C (under inert gas condition)

The wet cells harvested as described in condition B and the substrate (100 mg, 0.1% w/v), were re-suspended in 100 mL of a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) in a 500-mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was purged with argon, equipped with a balloon filled with argon and shaken at 30 °C on a reciprocal shaker for appropriate time indicated in the Tables. The work-up procedure was the same as condition A.

Condition D (with ACDH inhibitor condition)

The wet cells harvested as described above and the appropriate amount of acyl-CoA dehydrogenase inhibitor, were suspended in 100 mL of a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) in a 500-mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken for 10 min. To this cell suspension, the substrate (100 mg, 0.1% w/v) was added and shaken at 30 °C on a reciprocal shaker for appropriate time indicated in the Tables. The work-up procedure was the same as condition A.

1.3 Recovery and analysis of the product

Methyl (*R*)-(-)-2-phenylpropanoate ((*R*)-1b)

Incubation of (±)-**1a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (81% yield): IR (film) 2981, 1738, 1602, 1454, 1208, 1167, 1067, 699, 513 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.25 (m, 5H), 3.68 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.61 (s, 3H), 1.46 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 174.8 (CO), 140.4 (C), 128.5 (CH), 127.3 (CH × 2), 127.0 (CH × 2), 52.0 (CH), 45.4 (CH₃), 18.6 (CH₃); HRMS exact mass calcd for C₁₀H₁₂O₂ requires *m/z* 164.0837, found *m/z* 164.0799. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*S*)-(minor) *t*_R = 17.3 min, (*R*)-(major) *t*_R = 19.2, 69% ee,

実験の部

$[\alpha]_D^{24} -71.3$ (*c* 1.03, EtOH), lit³³, *R* form, 98% ee, $[\alpha]_D -96$ (*c* 1.1, EtOH).

Methyl (*R*)-(-)-2-(4-fluorophenyl)propanoate ((*R*)-8b)

Incubation of (±)-**8a** under condition A for 16 h gave a colorless oil (58% yield): IR (film) 2983, 2953, 1739, 1604, 1510, 1456, 1436, 1224, 1170, 1070, 838, 732, 551 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.19 (dt, *J* = 2.0, 8.8 Hz, 2H), 6.94 (tt, *J* = 2.0, 8.8 Hz, 2H), 3.64 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 1.41 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.8 (CO), 160.7 (C), 130.8 (CH), 130.7 (CH), 129.6 (C), 115.5 (CH), 115.3 (CH × 2), 65.9 (CH), 52.1 (CH₃), 40.3 (CH₃); HRMS exact mass calcd for C₁₀H₁₁FO₂ requires *m/z* 182.0743, found *m/z* 182.0744. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (50/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) *t*_R = 17.6 min, (*S*)-(minor) *t*_R = 18.8, 6% ee, $[\alpha]_D^{26} -5.6$ (*c* 1.00, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(-)- α -fluorophenylacetate ((*R*)-12b)

Incubation of (±)-**12a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (74% yield): Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) *t*_R = 22.1 min, (*S*)-(minor) *t*_R = 24.4, 55% ee. The configuration was revealed to be *R* judging from the literature date⁶².

Methyl (*S*)-(+)-2-methyl-3-phenylpropanoate ((*S*)-17b)

Incubation of (±)-**17a** under condition D for 48 h gave a colorless oil. To a mixture of **17b**, sodium metaperiodate (0.3 g, 1.40 mmol), water (3 mL), and diethyl ether (3 mL) was added 20 mM osmium tetroxide in *tert*-BuOH (1.5 mL, 0.03 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 12 h. Then, saturated sodium thiosulfate (2 mL) was added and extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 19/1) to give methyl 2-methyl-3-phenylpropanoate as colorless oil: IR (film) 3028, 2975, 2951, 1739, 1496, 1455, 1166, 986, 832, 745, 701 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.33 (m, 5H), 3.73 (s, 3H), 3.12 (m, 1H), 2.79 (m, 2H), 1.25 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 176.5 (CO), 139.3 (C), 128.9 (CH × 2), 128.3 (CH × 2), 126.3 (CH), 51.2 (CH₃), 41.4 (CH₂), 39.7 (CH), 16.7 (CH₃). Ee 88% (Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(minor) *t*_R = 24.0 min, (*S*)-(major) *t*_R = 28.6 min), $[\alpha]_D^{25} +39.3$ (*c* 0.95, MeOH), lit,⁶³ *S* form, +49.8 (*c* 2.042, MeOH).

Methyl α -methylcinnamate (**54b**)

Incubation of (±)-**17a** under condition C for 240 h gave a colorless oil: IR (film) 2991, 1709, 1259, 1120, 933, 768, 710, 511 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.39 (s, 1H), 7.25 (m, 5H), 3.82 (s, 3H), 2.13 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 169.2 (CO), 138.9 (C), 135.9 (CH), 129.6 (CH × 3), 128.4 (CH), 128.3 (C), 52.1 (CH₃), 14.1 (CH₃). The product was analyzed by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5

mL/min; 254 nm): $t_R = 29.7$ min.

Benzoic acid (56a)

Incubation of (\pm)-**17a** under condition A for 48 h gave a colorless crystal (78% yield): IR (film) 2846, 2674, 2563, 1686, 1454, 1425, 1327, 1292, 1186, 934, 809, 708, 667 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.13 (dt, $J = 1.5, 8.5$ Hz, 2H), 7.63 (dt, $J = 1.5, 8.5$ Hz, 1H), 7.48 (dt, $J = 1.5, 8.5$ Hz, 2H). Product was analyzed by HPLC with a Shenshu Pak PEGASIL Silica 60-5 (98/2/0.05 hexane/2-propanol/TFA; 1.0 mL/min; 254 nm): $t_R = 5.84$ min.

Methyl (*R*)-2-methyl-3-(2-thienyl)propanoate (18b)

Incubation of (\pm)-**18a** under condition B for 48 h gave a colorless oil: IR (film) 2956, 2860, 1738, 1460, 1275, 1072, 850, 696 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.11 (dd, $J = 1.0, 5.1$ Hz, 1H), 6.91 (dd, $J = 3.3, 5.1$ Hz, 1H), 6.80 (dd, $J = 1.0, 3.3$ Hz, 1H), 3.22 (dd, $J = 7.0, 14.7$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 7.2, 14.7$ Hz, 1H), 2.77 (m, 1H), 1.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 165.5 (CO), 146.0 (C), 126.8 (CH), 125.6 (CH), 123.8 (CH), 51.7 (CH_3), 41.8 (CH_2), 33.6 (CH), 16.8 (CH_3). Ee 93% (Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(minor) $t_R = 9.90$ min, (*S*)-(major) $t_R = 10.9$ min).

Methyl 2-methyl-3-(2-thienyl)propanoate (55b)

Incubation of (\pm)-**18a** under condition B for 48 h gave a colorless oil: IR (film) 3020, 1716, 1653, 1522, 1473, 1421, 1215, 928, 762, 699 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.86 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 3.7, 5.1$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.22 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 169.0 (CO), 139.2 (C), 131.7 (C), 131.7 (CH), 129.1 (CH), 127.3 (CH), 124.7 (CH), 52.1 (CH_3), 14.3 (CH_3). The product was analyzed by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): $t_R = 12.8$ min.

Methyl (*R*)-(+)-2-phenylaminopropanoate ((*R*)-19b)

To the extract of the reaction mixture from 100 mL medium under the cultivation condition B in methanol (6 mL) was added trimethylsilyl chloride (600 μL , 4.72 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. Then, water (5 mL) and aqueous solution of saturated sodium hydrogen carbonate (5 mL) were added and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with aqueous solution of saturated sodium hydrogen carbonate and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5/1) to give methyl 2-phenylaminopropanoate as a colorless oil: IR (film) 3392, 2952, 1739, 1604, 1508, 1315, 1207, 1163, 1055, 750, 694 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.19 (m, 2H), 6.76 (m, 1H), 6.63 (m, 2H), 4.16 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 1.49 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 174.8 (CO), 146.0 (C), 129.3 ($\text{CH} \times 2$), 118.8 (CH), 113.8 ($\text{CH} \times 2$), 52.2 (CH), 52.2 (CH_3), 18.8 (CH_3). Ee >99% (Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 28.2$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 44.1$ min), Only the

実験の部

R-enantiomer could be detected, $[\alpha]_D^{22} +84.56$ (*c* 0.53, MeOH).

Acetanilide (57a)

To the extract of the reaction mixture from 100 mL medium under the cultivation condition B in CH₂Cl₂ (1 mL) was added pyridine (200 μL, 2.47 mmol) and acetic anhydride (114 μL, 1.22 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, water (5 mL) was added and acidified by 2 M hydrochloric acid. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with 0.2 M hydrochloric acid, aqueous solution of saturated sodium hydrogen carbonate, and brine, then dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 1/1) to give acetanilide as colorless needles, mp 113 °C: IR (KBr disc) 3294, 3136, 1664, 1599, 1556, 1434, 1323, 1263, 1041, 756, 694, 509 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 168.4 (CO), 137.8(C), 129.0 (CH × 2), 124.3 (CH), 119.9 (CH × 2), 24.6 (CH₃).

Methyl (*R*)-(+)-2-(phenylthio)propanoate ((*R*)-20b)

Incubation of (±)-**20a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (49% yield): IR (film) 3059, 2989, 2952, 1733, 1437, 1330, 1260, 1227, 1191, 1161, 1067, 854, 749, 691 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.38 (m, 2H), 7.23 (m, 2H), 3.72 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.60 (s, 3H), 1.41 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.9 (CO), 136.6 (C), 133.0 (CH × 2), 128.8 (CH × 2), 128.0 (C), 52.3 (CH), 45.2 (CH₃), 17.5 (CH₃). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) *t*_R = 30.1 min, (*S*)-(minor) *t*_R = 39.7, 93.0% ee, $[\alpha]_D^{23} +145.7$ (*c* 1.02, EtOH), $[\alpha]_D^{22} +141.2$ (*c* 0.68, acetone), lit,⁶⁴ *R* form, +65.5 (*c* 1.0, acetone).

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-chlorophenylthio)propanoate ((*R*)-21b)

Incubation of (±)-**20a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (47% yield): IR (film) 2952, 1738, 1574, 1477, 1329, 1263, 1163, 1095, 1012, 823, 733, 499 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31 (m, 2H), 7.21 (m, 2H), 3.69 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.61 (s, 3H), 1.40 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.7 (CO), 134.4 (C), 134.4 (CH × 2), 131.4 (C), 129.0 (CH × 2), 52.4 (CH), 45.3 (CH₃), 17.4 (CH₃). Ee 90% (Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) *t*_R = 15.4 min, (*S*)-(minor) *t*_R = 17.3 min), $[\alpha]_D^{21} +140.2$ (*c* 1.0, MeOH), lit,⁶⁵ *S* form, -144.6 (*c* 1.0, MeOH).

Methyl 2-(phenylsulfinyl)propanoate (22b)

Incubation of (±)-**20a** under condition A for 48 h gave a colorless oil⁶¹ (47% yield): IR (film) 3058, 2982, 2939, 2359, 1731, 1318, 1253, 1206, 1167, 1050, 858, 693 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.59 (m, 5H), 3.84 (q, *J* = 7.1 Hz, 0.5H, diastereomer), 3.51 (q, *J* = 7.1 Hz, 0.5H, diastereomer), 3.67 (s, 1.5H, diastereomer), 3.66 (s, 1.5H, diastereomer), 1.47 (d, *J* = 7.1 Hz, 1.5H, diastereomer), 1.32 (d, *J* = 7.1 Hz, 1.5H, diastereomer).

Methyl 2-methyl-2-(phenylsulfinyl)propanoate (53b)

To the extract from 100 mL reaction mixture under the cultivation condition B dissolved in DMF (1.5 mL) was added sodium hydrogen carbonate (0.3 g, 3.57 mmol) and methyl iodide (200 μ L, 3.60 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. Then, saturated ammonium chloride (10 mL) was added and extracted with hexane. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 9/1 then 1/1) to give methyl 2-(phenylsulfinyl)propanoate as a colorless oil⁶⁶.

A solution of **22b**, potassium carbonate (0.11 g, 0.80 mmol), and methyl iodide (60 μ L, 0.93 mmol) in DMF (4 mL) was stirred at room temperature. After 16 h, saturated ammonium chloride (10 mL) was added and extracted with hexane. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 1/1) to give methyl 2-methyl-2-(phenylsulfinyl)propanoate (47.5 mg, 77% yield) as a colorless oil: IR (film) 3059, 2925, 1734, 1577, 1475, 1441, 1327, 1456, 1076, 744, 687, 594 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.50 (m, 5H), 3.65 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.28 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.0 (CO), 139.8 (C), 131.6 (C), 128.6 (CH \times 2), 125.4 (CH \times 2), 66.3 (C), 52.5 (CH_3), 20.5 (CH_3), 16.0 (CH_3). Ee racemate (Daicel Chiralcel OD column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm, 37 $^\circ\text{C}$): t_{R} = 22.2 min, 25.4 min.

Methyl (S)-phenylsulfinylacetate ((S)-52b)

Incubation of (\pm)-**52a** under condition B for 24 h gave a colorless oil (17% yield): IR (film) 2981, 1736, 1583, 1481, 1441, 1367, 1282, 1151, 1028, 742, 690 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.69 (m, 2H), 7.55 (m, 3H), 3.85 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.67 (d, J = 13.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 169.5 (CO), 134.9 (C), 129.9 (CH \times 2), 128.9 (CH \times 2), 126.8 (C), 61.5 (CH_2), 45.2 (CH_3). Ee 73% (Daicel Chiralcel OB column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm, 37 $^\circ\text{C}$): (S)-(major) t_{R} = 73.1 min, (R)-(minor) t_{R} = 82.6 min). The absolute configuration was determined by comparison of the retention time with that described in a literature⁶⁷.

Methyl (R)-(+)-2-phenoxypropanoate ((R)-24b)

Incubation of (\pm)-**24a** under condition A for 48 or 72 h gave colorless oil (75 and 71% yield, respectively): IR (film) 2992, 2953, 1758, 1589, 1494, 1449, 1283, 1240, 1211, 1135, 1099, 1053, 978, 754, 691 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.28 (m, 2H), 6.98 (m, 1H), 6.88 (m, 2H), 4.77 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.62 (d, J = 6.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.6 (CO), 157.4 (C), 129.5 (CH \times 2), 121.6 (C), 115.0 (CH \times 2), 72.5 (CH), 52.3 (CH_3), 18.7 (CH_3); HRMS exact mass calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ requires m/z 180.0786, found m/z 180.0780. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (R)-(major) t_{R} = 22.6 min, (S)-(minor) t_{R} = 32.1; 75% ee, $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ +41.0 (c 0.71, EtOH); 97% ee, $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ +41.2 (c 0.58, CHCl_3), lit³⁴, R form, 97% ee, $[\alpha]_{\text{D}}$ +41.2 (c 0.76, CHCl_3).

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-fluorophenoxy)propanoate ((*R*)-25b)

Incubation of (±)-**25a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (64% yield): IR (film) 2994, 2955, 1758, 1505, 1448, 1283, 1216, 1135, 1098, 1053, 979, 829, 749 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.95 (m, 2H), 6.82 (m, 2H), 4.69 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 1.60 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.4 (CO), 156.4 (C), 153.5 (C), 116.4 (CH), 116.3 (CH), 116.0 (CH), 115.8 (CH), 73.4 (CH), 52.3 (CH_3), 18.6 (CH_3); HRMS exact mass calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{FO}_3$ requires m/z 198.0691, found m/z 198.0697. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 18.6$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 29.7$, 96% ee, $[\alpha]_D^{26} +52.0$ (c 1.02, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate ((*R*)-26b)

Incubation of (±)-**26a** under condition A for 48 h gave as a colorless oil (95% yield): IR (film) 2954, 1758, 1596, 1492, 1283, 1240, 1135, 1090, 979, 825, 667 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.25 (dd, $J = 3.4, 9.9$ Hz, 2H), 6.83 (dd, $J = 3.4, 9.9$ Hz, 2H), 5.50 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 1.64 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.2 (CO), 156.0(C), 129.4 (CH \times 2), 126.5 (C), 116.3 (CH \times 2), 72.9 (CH), 52.4 (CH_3), 18.6 (CH_3); HRMS exact mass calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$ requires m/z 214.0396, found m/z 214.0411. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 18.5$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 25.0$; entry 4 (incubation time 48 h), 97% ee, $[\alpha]_D^{20} +44.7$ (c 0.94, EtOH), lit^{3b}, *S* form, 96% ee, -42.3 (c 50, EtOH).

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-bromophenoxy)propanoate ((*R*)-27b)

Incubation of (±)-**27a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (83% yield): IR (film) 2992, 2953, 1758, 1590, 1488, 1282, 1239, 1134, 1099, 1074, 1052, 1005, 823, 640 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.36 (dt, $J = 3.4, 9.6$ Hz, 2H), 6.75 (dt, $J = 3.4, 9.6$ Hz, 2H), 4.72 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 1.61 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.1 (CO), 156.7 (C), 132.3 (CH \times 2), 116.8 (CH \times 2), 113.8 (C), 72.8 (CH), 52.4 (CH_3), 18.5 (CH_3); HRMS exact mass calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrO}_3$ requires m/z 257.9890, found m/z 257.9861. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 19.8$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 23.3$, 99% ee, $[\alpha]_D^{26} +47.5$ (c 1.00, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-iodophenoxy)propanoate ((*R*)-28b)

Incubation of (±)-**28a** under condition A for 48 h gave as a colorless oil (76% yield): IR (film) 2990, 2952, 1757, 1584, 1487, 1447, 1280, 1238, 1134, 1098, 1052, 821, 632 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.54 (dt, $J = 3.4, 9.8$ Hz, 2H), 6.64 (dt, $J = 3.4, 9.8$ Hz, 2H), 4.72 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 1.61 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.1 (CO), 157.3 (C), 138.3 (CH \times 2), 117.3 (CH \times 2), 83.9 (C), 72.6 (CH), 52.4 (CH_3), 18.5 (CH_3); HRMS exact mass calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{IO}_3$ requires m/z 305.9753, found m/z 305.9703. Product

was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 23.1$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 25.9$, 97% ee, $[\alpha]_D^{26} +43.4$ (c 1.01, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-trifluoromethoxy)propanoate ((*R*)-29b)

Incubation of (\pm)-**29a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (64% yield): IR (film) 2996, 2957, 1759, 1615, 1519, 1450, 1332, 1254, 1214, 1164, 1121, 1068, 838, 632 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.81 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.65 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.9 (CO), 159.8 (C), 127.0 ($\text{CH} \times 2$), 126.9 (CF_3), 125.5 (C), 114.8 ($\text{CH} \times 2$), 72.5 (CH), 52.5 (CH_3), 18.5 (CH_3); HRMS exact mass calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{O}_3$ requires m/z 248.0659, found m/z 248.0639. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (120/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 210 nm): (*R*)-(major) $t_R = 23.4$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 34.8$, 99% ee, $[\alpha]_D^{26} +43.3$ (c 1.05, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-methylphenoxy)propanoate ((*R*)-30b)

Incubation of (\pm)-**30a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (69% yield): IR (film) 3030, 2993, 2952, 2869, 1759, 1615, 1509, 1449, 1284, 1238, 1200, 1177, 1134, 1098, 979, 820 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.06 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.72 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 1.60 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.8 (CO), 155.3 (C), 130.9 (CH), 129.9 ($\text{CH} \times 2$), 114.9 ($\text{C} \times 2$), 72.7 (CH), 52.3 (CH_3), 20.5 (CH_3), 18.7 (CH_3). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 1.0 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 11.5$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 20.1$, 90.1% ee, $[\alpha]_D^{26} +53.3$ (c 1.11, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-methoxyphenoxy)propanoate ((*R*)-31b)

Incubation of (\pm)-**31a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (83% yield): IR (film) 2996, 2952, 2905, 2837, 1758, 1507, 1457, 1283, 1230, 1202, 1135, 1101, 1037, 826 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.75 (m, 4H), 4.60 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 1.52 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.8 (CO), 154.3 (C), 151.5 (C), 116.4 ($\text{CH} \times 2$), 114.6 ($\text{CH} \times 2$), 73.6 (CH), 55.7 (CH_3), 52.3 (CH_3), 18.7 (CH_3). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OD column (9/1 hexane/2-propanol; 1.0 mL/min; 210 nm): (*S*)-(minor) $t_R = 7.15$, (*R*)-(major) $t_R = 9.92$ min, 43.6% ee, $[\alpha]_D^{26} +34.0$ (c 1.07, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(+)-2-(2-naphthoxy)propanoate ((*R*)-34b)

Incubation of (\pm)-**34a** under condition A for 48 h gave a colorless oil (78% yield): IR (film) 3054, 2993, 2949,

実験の部

2359, 1733, 1633, 1507, 1391, 1259, 1213, 1182, 1132, 1095, 1050, 980, 839, 752 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.36 (dt, $J = 1.5, 7.4$ Hz, 1H), 7.27 (dt, $J = 1.5, 7.4$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 2.4, 9.3$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.85 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 1.61 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.6 (CO), 155.3 (C), 134.2 (CH), 129.6 (CH), 129.2 (CH), 127.5 (CH), 126.8 (CH), 126.4 (CH), 123.9 (CH), 118.8 (C), 107.5 (C), 72.6 (CH), 52.4 (CH_3), 18.7 (CH_3). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 1.0 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 16.8$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 19.3$, 18.8% ee, $[\alpha]_D^{20} +19.4$ (c 1.38, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-benzyloxyphenoxy)propanoate ((*R*)-37b)

Incubation of (\pm)-37a under condition B for 72 h gave a colorless crystal (58% yield): IR (KBr disc) 3062, 2985, 2871, 1748, 1590, 1506, 1455, 1377, 1276, 1216, 1134, 1098, 1050, 1017, 823, 742, 697 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.37 (m, 5H), 6.84 (m, 4H), 5.00 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 4.65 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.9 (CO), 153.7 (C), 151.8 (C), 137.1 (C), 128.5 ($\text{CH} \times 2$), 127.9 (CH), 127.5 ($\text{CH} \times 2$), 116.4 ($\text{CH} \times 2$), 115.8 ($\text{CH} \times 2$), 73.5 (CH), 70.6 (CH_2), 52.3 (CH_3), 18.6 (CH_3). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (1/1 hexane/2-propanol; 1.0 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 25.4$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 32.1$, 43.6% ee, $[\alpha]_D^{26} +18.7$ (c 0.51, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(+)-2-benzyloxypropanoate ((*R*)-38b)

Incubation of (\pm)-38a under condition A for 48 h gave a colorless oil (77% yield): IR (film) 3031, 2952, 2873, 1748, 1496, 1454, 1274, 1207, 1143, 1065, 1026, 740, 699 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.20 (m, 5H), 4.59 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 3.97 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 1.34 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.6 (CO), 137.4 (CH), 128.3 ($\text{CH} \times 2$), 127.9 (CH), 127.8 ($\text{CH} \times 2$), 73.9 (CH_2), 72.0 (CH), 52.0 (CH_3), 18.8 (CH_3). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 29.3$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 34.6$, 21.3% ee, $[\alpha]_D^{21} +18.1$ (c 1.50, CHCl_3), lit³⁵, *R* form, +151 (c 1.5, CHCl_3).

Methyl (*R*)-(+)-2-(phenylethoxy)propanoate ((*R*)-39b)

Incubation of (\pm)-39a under condition B for 48 h gave a colorless oil (51% yield); IR (film) 3062, 2989, 2950, 2869, 1751, 1454, 1371, 1274, 1143, 1074, 1030, 847, 700 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.26 (m, 5H), 3.97 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.81 (m, 4H), 3.55 (m, 1H), 2.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.40 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.7 (CO), 138.5 (C), 128.9 ($\text{CH} \times 2$), 128.3 ($\text{CH} \times 2$), 126.2 (CH), 75.1 (CH), 71.2 (CH_2), 51.9 (CH_3), 36.3 (CH_2), 18.6 (CH_3). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (50/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) $t_R = 29.5$ min, (*S*)-(minor) $t_R = 39.0$, >99% ee (Only the *R*-enantiomer could be detected.), $[\alpha]_D^{25} +48.5$ (c 0.32, EtOH). The configuration was tentatively estimated comparing the sign of the optical rotation with these of others^{3a, 3d}.

Methyl (*R*)-(-)-mandelate ((*R*)-40b)

Incubation of (±)-40a under condition A for 48 h gave a colorless oil (45% yield): IR (film) 3445, 3033, 2952, 1739, 1435, 1264, 1204, 1188, 1096, 1068, 984, 894, 735, 696, 508 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.38 (m, 5H), 5.18 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.43 (br s, 1H). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) *t*_R = 32.6 min, (*S*)-(minor) *t*_R = 37.1, >99% ee (Only the *R*-enantiomer could be detected.), [α]¹⁸_D -113.6 (*c* 1.42, acetone), lit⁶⁸, *R* form, -115.4 (*c* 1.0, acetone).

Methyl (*R*)-(-)-(4-chloro)mandelate ((*R*)-41b)

Incubation of (±)-41a under condition A for 48 h gave a colorless oil (43% yield): IR (film) 3327, 2951, 1738, 1489, 1438, 1489, 1438, 1412, 1260, 1217, 1092, 1006, 834, 775, 641, 546 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.35 (m, 5H), 5.16 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.46 (br s, 1H). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*R*)-(major) *t*_R = 28.4 min, (*S*)-(minor) *t*_R = 30.5, >99% ee (Only the *R*-enantiomer could be detected.), [α]²¹_D -96.3 (*c* 0.38, acetone), lit⁶⁸, *R* form, -96.7 (*c* 1.0, acetone).

Methyl (*R*)-(-)-(4-methoxy)mandelate ((*R*)-42b)

Incubation of (±)-42a under condition A for 48 h gave a colorless oil (38% yield): IR (film) 3403, 2958, 2842, 1739, 1675, 1599, 1513, 1461, 1307, 1259, 1166, 1081, 1028, 833, 618 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.97 (m, 2H), 6.90 (m, 2H), 5.13 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.39 (br s, 1H). Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OD column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm): (*S*)-(minor) *t*_R = 24.8, (*R*)-(major) *t*_R = 44.2 min, >99% ee (Only the *R*-enantiomer could be detected.), [α]²¹_D -102.6 (*c* 0.19, acetone), lit⁶⁸, *R* form, -110.2 (*c* 1.0, acetone).

Chapter 2.

2.1 Synthesis of the substrate

Methyl (±)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate ((±)-26b)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25c**, methyl (±)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate (33 g, 99% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-chlorophenol (20 g, 0.16 mol) and methyl 2-bromopropanoate (40 g, 0.24 mol). The structure of the product was confirmed by the IR, ¹H-, and ¹³C-NMR.

Methyl (*R*)-(+)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate ((*R*)-26b)

To a solution of 4-chlorophenol (1.0 g, 7.8 mmol), methyl (*S*)-lactate (1.6 g, 16 mmol), and triphenylphosphine (4.1 g, 16 mmol) in THF (200 mL) was added dropwise 40% toluene solution of DEAD (6.8 mL, 16 mmol). After 4 h at rt, organic solvent was concentrated *in vacuo*. To the residue was added hexane (20 mL) and concentrated. After this operation repeated three times, the reaction mixture was filtered through a pad of celite for removal of the precipitate. The celite was washed with hexane and the washing was combined with the filtrate. The solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 19/1) to give methyl (*R*)-(+)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate (1.6 g, 94% yield) as a colorless oil. The ee of the product was confirmed 99% ee (*R*)-form by the HPLC analysis.

Methyl (*S*)-(-)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate ((*S*)-26b)

According to the same procedure as described above for the synthesis of (*R*)-**26b**, methyl (*S*)-(-)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate (1.4 g, 86% yield) was obtained as a colorless oil starting from 4-chlorophenol (1.0 g, 7.8 mmol) and methyl (*R*)-lactate (1.6 g, 16 mmol). The ee of the product was confirmed 97% ee (*S*)-form by the HPLC analysis.

(±)-2-(4-Chlorophenoxy)propanoic acid ((±)-26a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **25a**, (±)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid (27 g, 91% yield) was obtained as a colorless crystal starting from methyl (±)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate (32 g, 0.15 mol); IR (KBr disc) 3005, 2562, 1709, 1586, 1486, 1281, 1210, 1138, 923, 823, 642, 505 cm⁻¹.

(*R*)-(+)-2-(4-Chlorophenoxy)propanoic acid ((*R*)-26a)

On the ice bath, 1 M NaOH (20 mL) was added dropwise to a solution of methyl (*R*)-(+)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate (1.4 g, 6.7 mmol) in MeOH (20 mL). After stirring for 1.5 h, the reaction mixture was acidified by 2 M hydrochloric acid, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to give

(R)-(+)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid (1.3 g, 95% yield) as a colorless crystal. The ee of the product was confirmed by the HPLC analysis; Daicel Chiralcel OJ column (95/5/0.1% hexane/2-propanol/TFA; 0.5 mL/min; 254 nm): (R)- (major) $t_R = 23.9$, (S)- (minor) $t_R = 30.3$ min, >99% ee (Only the R-enantiomer could be detected.).

(S)-(-)-2-(4-Chlorophenoxy)propanoic acid ((S)-26a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of (R)-26a, (S)-(-)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid (1.3 g, 86% yield) was obtained as a colorless crystal starting from methyl (S)-(-)-2-(4-chlorophenoxy)propanoate (1.6 g, 7.3 mmol). The ee of the product was confirmed >99%, (S)-form by the HPLC analysis.

(±)-2-Deuterio-2-phenylpropanoic acid ((±)-47a)

To a solution of methyl 2-phenylpropanoate (2.0 g, 13.6 mmol) in tetrahydrofuran (200 mL) was added dropwise *n*-butyllithium (1.52 M in hexane, 8.8 mL) at -78 °C under Ar. After 1 h, *n*-butyllithium (1.52 M in hexane, 17.5 mL) was added dropwise. During this stage the colorless solution turned yellow. The reaction mixture was stirred for further 100 min at -78 °C. Then the reaction mixture was allowed to warm to 0 °C, deuterium chloride solution (30% in D₂O, 5 mL) was added. The yellow color immediately disappeared. After 60 min of stirring at room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and extracted with ether. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 3/1) to give 2-deuterio-phenylpropanoic acid⁵⁰ (2.0 g, 98% yield) as a colorless oil; IR (film) 2982, 2655, 2548, 1704, 1498, 1449, 1409, 1294, 1231, 1142, 943, 726, 697 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.27 (m, 5H), 1.45 (s, 3H).

(R)-(-)-2-Deuterio-2-phenylpropanoic acid ((R)-47a) and (S)-(+)-2-Deuterio-2-phenylpropanoic acid ((S)-47a)

To a solution of (±)-2-deuterio-Phenylpropanoic acid (0.70 g, 4.7 mmol) in small amount of ether was added dropwise (S)-(-)-1-(1-naphthyl)ethylamine (0.41 g, 2.4 mmol). The reaction mixture was then allowed to stand overnight in a refrigerator to form a colorless solid. The product was collected by filtration, and crude (-)-salt (0.7 g) was obtained. The ethereal mother liquor was washed with 6 M hydrochloric acid and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in small amount of ether and was added dropwise (R)-(+)-1-(1-naphthyl)ethylamine (0.46 g, 2.7 mmol). Then crude (+)-salt (0.9 g) was obtained by a way similar to that described above. Crude salts were recrystallized from acetone three times to give (-)-salt (0.31 g) and (+)-salt (0.24 g) as colorless crystal.

To a solution of (-)-salt in EtOAc (10 mL), there were added 2 M hydrochloric acid (3 mL). The reaction mixture was stirred for 30 min and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to give (R)-2-deuterio-Phenylpropanoic acid

実験の部

(0.15 g, 21% recovery) as a colorless oil. Similarly, from (+)-salt was obtained (*S*)-2-deuterio-Phenylpropanoic acid (0.10 g, 15% recovery) as a colorless oil. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OD column (98/2/0.1 hexane/2-propanol/TFA; 1.0 mL/min; 210 nm): (*R*)- $t_R = 13.0$ min, (*S*)- $t_R = 15.5$, >99% ee (Only the single enantiomer could be detected.). From $^1\text{H-NMR}$ could be confirmed that D-content of the product didn't change (>99%).

Methyl (\pm)-3,3,3-trideuterio-2-phenylpropanoate ((\pm)-48b)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **8b** except for using trideuterio methyl iodide in return for methyl iodide, methyl 3,3,3-trideuterio-phenylpropanoate (0.47 g, 96% yield) was obtained as a colorless oil starting from methyl 2-phenylacetate (0.44 g, 3.0 mmol); IR (films) 3030, 2952, 2233, 1739, 1602, 1495, 1454, 1326, 1246, 1202, 1169, 1022, 943, 806, 768, 730, 698 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.22 (m, 5H), 3.66 (s, 1H), 3.61 (s, 3H).

(\pm)-3,3,3-Trideuterio-2-phenylpropanoic acid ((\pm)-48a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **8a**, 3,3,3-trideuterio-phenylpropanoic acid (0.20 g, 97% yield) was obtained as a colorless oil starting from methyl 3,3,3-trideuterio-phenylpropanoate (0.22 g, 1.3 mmol); IR (film) 3032, 2929, 2722, 2233, 1705, 1601, 1497, 1455, 1416, 1290, 1226, 1186, 939, 731, 696 cm^{-1} .

(\pm)-2-Deuterio-2-(4-fluorophenyl)propanoic acid ((\pm)-49a)

According to the same procedure as described above for the synthesis of **47a**, 2-deuterio-2-(4-fluorophenyl)propanoic acid (0.67 g, 78% yield) was obtained as a colorless oil starting from 2-(4-fluorophenyl)propanoic acid (0.86 g, 5.1 mmol); IR (film) 2986, 2659, 2546, 1706, 1603, 1510, 1459, 1408, 1293, 1231, 940, 835 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.22 (m, 2H), 6.94 (m, 2H), 1.43 (s, 3H).

(\pm)-2-Phenylpropionamide ((\pm)-50a)

To a solution of 2-phenylpropanonitrile (0.52 g, 3.4 mmol) in MeOH (5 mL) was added 35% hydrogen peroxide solution (0.4 mL). The pH was adjusted at 8.0 by adding of 2 M sodium hydroxide. After 1 h, 35% hydrogen peroxide solution (0.4 mL) was added to the reaction. The reaction mixture was stirred for additional 1 h. The solvent was removed *in vacuo*, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc/EtOH = 6/2/1) to give 2-Phenylpropionamide (0.50 g, 95% yield) as a colorless needle; m.p. 87-88°C; IR (KBr disc) 3361, 3185, 2983, 2801, 1657, 1451, 1405, 1287, 1264, 1134, 1114, 696, 656 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.33 (m, 5H), 5.27 (br s, 2H), 3.60 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.55 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

(±)-2-(4-Chlorophenoxy)propionyl- N-acetylcysteamine ((±)-58a)

A solution of (±)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid (0.1 g, 2.5 mmol) in THF (2 mL) was added to a solution of 1,1'-carbonylbis-1H-imidazole (0.48 g, 3.0 mmol) in THF (3 mL). After 10 min at rt, the solvent was removed *in vacuo*, and the residue was dissolved in THF (4 mL). This solution was allowed to react with *N*-acetylcysteamine (0.39 g, 2.5 mmol), which had been dissolved in THF (1 mL). The reaction was carried out at rt for 1 h, and quenched by the addition of sat. NH₄Cl solution. The reaction mixture was extracted with Et₂O. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (chloroform/MeOH = 29/1) to give (±)-2-(4-Chlorophenoxy)propionyl- *N*-acetylcysteamine (0.77 g, 90% yield) as a colorless oil: IR (film) 3286, 3074, 2987, 2935, 1682, 1556, 1442, 1371, 1282, 1236, 1090, 985, 916, 825, 667, 602, 509 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.57 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 6.38 (br s, 1H), 5.07 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.74 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.70 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.34 (dt, *J* = 2.4, 6.3 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 202.3 (CO), 170.3 (CO), 155.8 (C), 129.5 (CH × 2), 126.9 (C), 116.7 (CH × 2), 79.3 (C), 39.2 (CH₂), 27.7 (CH₂), 23.0 (CH₃), 19.2 (CH₃). Product was analyzed by HPLC with COSMOSIL 5C18-ARII column (1/1/0.05% H₂O/acetonitrile/TFA; 0.5 mL/min; 254 nm): *t*_R = 15.3 min (Under this condition, 2-(4-Chlorophenoxy)propanoic acid was eluted in 13.2 min). According to the same procedure, enantiomerically pure compounds were obtained as a crystal.

2.2 Biotransformation

Inhibition study of acyl-CoA synthetase using growing cell system of *N. diaphanozonaria*

To 90 mL of *N. diaphanozonaria* medium was added a suspension of 48 h-incubated cells of *N. diaphanozonaria* in 10 mL of the broth and the incubation was carried out at 30 °C for 24 h (first incubation). Then, 100 mg of substrate ((±)-2-phenylpropanoic acid or (±)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid) and appropriate amount of inhibitor (benzoic acid or *n*-alkanoic acid) were added to the suspension, and the mixture was shaken for 6 or 12 h (second incubation). The reaction mixture was filtered through a pad of celite for removal of the cells. The celite was washed with EtOAc and the washing was combined with the filtrate. After being acidified by 2 M hydrochloric acid, the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was converted to the corresponding methyl ester by being treated with diazomethane followed by a conventional work up. The residue was purified by pTLC (hexane/EtOAc = 9/1) to give the methyl ester of the starting acid as colorless oil. Product was analyzed for ee by HPLC with a Daicel Chiralcel OJ column (9/1 hexane/2-propanol; 0.5 mL/min; 254 nm) and was made a comparison the ee under the non-inhibitor condition.

General procedure for the hydrolysis reaction of 2-(4-Chlorophenoxy)propionyl-N-acetylcysteamine by the aid of the crude enzyme of *N. diaphanozonaria*

The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of *N. diaphanozonaria* medium for 48 h at 30 °C. This pre-cultured cells were then added to 90 mL of the fresh medium and the mixture was shaken for further 24 h. The cells were harvested and washed with 100 mM KPB (pH 7.0). This wet cells were resuspended in 9.1 mL of ice-cooled 100 mM MOPS-NaOH buffer (pH 7.25) containing 1 mM DTT. The cells were disrupted by French press. The cell debris were removed by centrifugation (15,000 rpm, 10 min). Solid ammonium sulfate was added carefully to this extract with gentle stirring and the fraction of 25-55% saturation were collected. The precipitate was dissolved in MOPS-NaOH buffer and dialyzed for 12 h. The volume of enzyme solution was adjusted to 3 mL. To this enzyme solution (20 µL), 5 µL of ethylene glycol (final concentration; 10% v/v), 2 µL of DMSO (final concentration; 4% v/v), and 2 µL of substrate (final concentration; 100 mM), and 21 µL of buffer were added (total volume 50 µL), and incubated at 30°C. The detection of the product was performed by HPLC analysis.

General procedure for the deracemization reaction of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid by the aid of cell free extract of *N. diaphanozonaria*

The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of *N. diaphanozonaria* medium for 48 h at 30 °C. This pre-cultured cells were then added to 90 mL of the fresh medium. To this medium, 500 µL of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid solution (concentration: 200 mg/mL) was added for the purpose of induction and the mixture was shaken for further 24 h. The cells were harvested and washed with 100 mM KPB (pH 7.0). This wet cells were resuspended in 9.1 mL of ice-cooled 100 mM MOPS-NaOH buffer (pH 7.25) containing 1 mM DTT. The cells were disrupted by French press. The cell debris were removed by centrifugation (15,000 rpm, 10 min). To this cell-free extract, 300 µL of ethylene glycol (final concentration; 3% v/v), 360 µL of cofactor solution (final concentration; 10 mM ATP, 2 mM CoASH, and 10 mM MgCl₂) and 240 µL of substrate solution (final concentration; 1 mM 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid, pH 7.0) were added (total volume 10 mL), and incubated for 3 h at 30°C. The reaction was quenched by the addition of 1 mL of 2 M HCl and extracted by Et₂O. The ee and yield of the product were confirmed after the conversion to methyl ester by the treatment of diazomethane.

Chapter 3.

3.1 Biotransformation

General procedure for the deracemization reaction of α -substituted carboxylic acids by the aid of *C. militaris* ATCC 34164

The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of *C. militaris* medium for 6 days at 25 °C. The wet cells were harvested by centrifugation (5000 rpm, 10 min) and washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0). The wet cells, together with the substrate (5 mg, 0.1% w/v), were re-suspended in 5 mL of a phosphate buffer (100 mM, pH 7.0) or MES-NaOH buffer (100 mM, pH 5.5) in a test tube. The flask was shaken at 25 °C on a shaker for 48 h. The reaction mixture was filtered through a pad of celite for removal of the cells. The celite was washed with EtOAc and the washing was combined with the filtrate. After being acidified by 2 M hydrochloric acid, the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The residue was converted to the corresponding methyl ester by being treated with diazomethane followed by a conventional work up. The residue was purified by pTLC (hexane/EtOAc = 9/1) to give the methyl ester of the starting acid as colorless oil.

General procedure for the deracemization reaction of 2-phenylpropanoic acid by the aid of cell free extract of *C. militaris*

The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of *C. militaris* medium for 6 days at 25 °C. This pre-cultured cells were then added to 90 mL of the fresh medium. To this medium, 2-phenylpropanoic acid (50 mg) was added for the purpose of induction and the mixture was shaken for further 72 h. The cells were harvested and washed with 100 mM KPB (pH 7.0). This wet cells were resuspended in 7.5 mL of ice-cooled 100 mM MOPS-NaOH buffer (pH 7.25) containing 1 mM DTT. The cells were disrupted by sonication. The cell debris were removed by centrifugation (15,000 rpm, 10 min). To 2.4 mL of this cell-free extract, 90 μ L of ethylene glycol (final concentration; 3% v/v), 438 μ L of cofactor solution (final concentration; 10 mM ATP, 2 mM CoASH, and 10 mM MgCl₂) and 0.5 μ L of 2-phenylpropanoic acid (final concentration; 1 mM) were added (total volume 3 mL), and incubated for 24 h at 25 °C. The reaction was quenched by the addition of 1 mL of 2 M HCl and extracted by Et₂O. The ee and yield of the product were confirmed after the conversion to methyl ester by the treatment of diazomethane.

Screening for α -methyl carboxylic acids deracemizing microorganisms

Microbial strains were obtained from the glycerol stock cells in our laboratory. The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of *N. diaphanozonaria* medium for 48 h at 30 °C. The wet cells were harvested by centrifugation (5000 rpm, 10 min) and washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0). The wet cells, together with the substrate (5 mg, 0.1% w/v), were re-suspended in 5 mL of a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) in a test tube. The substrate was (\pm)-2-phenylpropanoic acid or

実験の部

(±)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid. The flask was shaken at 30 °C on a shaker for 72 h. The work-up procedure was the same as described above and measured ee by HPLC analysis.

General procedure for the deracemization reaction of α -substituted carboxylic acids by the aid of *Brevibacterium ketoglutamicum* KU 1073, *Mycobacterium smegmatis* KU 1047, and *Pseudomonas aeruginosa* KU 1097

The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of *N. diaphanozonaria* medium for 48 h at 30 °C. This pre-cultured cells were then added to 90 mL of the fresh medium and the incubation was carried out at 30 °C for 48 h (second incubation). In case of *Brevibacterium ketoglutamicum* KU 1073, second incubation was carried out for 24 h. The wet cells were harvested by centrifugation (5000 rpm, 10 min) and washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0). The wet cells, together with the substrate (50 mg, 0.1% w/v), were re-suspended in 50 mL of a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) in a 500-mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken at 30 °C on a reciprocal shaker for 72 h. The work-up procedure was the same as described above.

General procedure for the deracemization reaction of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid by the aid of cell free extract of *Brevibacterium ketoglutamicum* KU 1073, *Mycobacterium smegmatis* KU 1047, and *Pseudomonas aeruginosa* KU 1097

The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of *N. diaphanozonaria* medium for 48 h at 30 °C. This pre-cultured cells were then added to 90 mL of the fresh medium. To this medium, 500 μ L of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid solution (concentration: 200 mg/mL) was added for the purpose of induction and the mixture was shaken for further 48 h (second incubation). In case of *Brevibacterium ketoglutamicum* KU 1073, second incubation was carried out for 24 h. The cells were harvested and washed with 100 mM KPB (pH 7.0). This wet cells were resuspended in 9.1 mL of ice-cooled 100 mM MOPS-NaOH buffer (pH 7.25) containing 1 mM DTT. The cells were disrupted by French press. The cell debris were removed by centrifugation (15,000 rpm, 10 min). To this cell-free extract, 300 μ L of ethylene glycol (final concentration; 3% v/v), 360 μ L of cofactor solution (final concentration; 10 mM ATP, 2 mM CoASH, and 10 mM MgCl₂) and 240 μ L of substrate solution (final concentration; 1 mM 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid, pH 7.0) were added (total volume 10 mL), and incubated for 24 h at 30°C. The reaction was quenched by the addition of 1 mL of 2 M HCl and extracted by Et₂O. The ee and yield of the product were confirmed after the conversion to methyl ester by the treatment of diazomethane.

3.2 Enzyme purification

Cultivation condition

Cell seeds of *B. ketoglutamicum* KU 1073 in glycerol stock were suspended in 10 mL of *N. diaphanozonaria* medium and cultivated for 48 h at 30 °C. This pre-cultured cells were then added to 90 mL of the fresh medium (total volume 100 mL). To this medium, 500 µL of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid solution (concentration: 200 mg/mL) was added for the purpose of induction and the mixture was shaken for further 24 h. The cells were harvested and washed with 100 mM KPB (pH 7.0).

Purification of α -methyl carboxylic acid deracemizing enzyme 1 (MCAD1)

All purification steps were carried out at 4 °C and were monitored by SDS-PAGE.

The cell pellet harvested from 2 L culture broth (100 mL x 20) was suspended in 100 mL of Buffer A (100 mM MOPS-NaOH buffer (pH 7.25) containing 1 mM DTT), and was subjected to disruption by French press. The cell debris were removed by centrifugation (15,000 rpm, 10 min). To this cell-free extract (112 mL), 112 µL of 2% protamine sulfate solution was added. After stirring for 15 min, the precipitate was removed by centrifugation (15,000 rpm, 20 min). Solid ammonium sulfate was added carefully to this supernatant solution with gentle stirring until 40% saturation was reached. After equilibration for 30 min, the precipitate was removed and ammonium sulfate was added again until 70% saturation. The solution was allowed to equilibrate for 30 min and the resulting precipitate was collected by centrifugation (15,000 rpm, 20 min). The precipitate was dissolved in Buffer A and dialyzed 4 h against the same buffer.

The dialyzed ammonium sulfate fraction was loaded onto a TOYOPEARL HW-75F column (250 mL), which had been pre-equilibrated with Buffer A, and eluted the same buffer. The fractions were collected with 7 mL portions. To the collected active fractions, ammonium sulfate was added until 20% saturation.

This enzyme solution was applied to TOYOPEARL Butyl-650M column (100 mL), which had been pre-equilibrated with Buffer A containing 20% saturation of ammonium sulfate. After washing the column with the same buffer, elution was carried out with a linear gradient from 20 to 0% saturation of ammonium sulfate. The fractions were collected with 12 mL portions. The combined solution of active fractions was concentrated to 22 mL by amicon filter.

This enzyme solution was applied to TOYOPEARL DEAE-650M column (50 mL), which had been pre-equilibrated with Buffer A. The elution was carried out with a linear gradient from 0 to 300 mM of NaCl concentration. The fractions were collected with 12 mL portions. The active fractions were combined and the volume was concentrated to 20 mL by amicon filter.

This fraction was loaded onto a Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I column (10 mL), which had been pre-equilibrated with Buffer A containing 25% v/v of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). After washing the column with the same buffer, elution was carried out with a linear gradient from 25 to 75% v/v of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). The fractions were collected with 12 mL portions. The active fractions were pooled and dialyzed for 4 h against Buffer A containing 200 mM of

実験の部

NaCl. The volume of the solution was concentrated to 22 mL by amicon filter.

This dialyzed enzyme solution was loaded onto DEAE-Sepharose CL-6B column (50 mL), which had been pre-equilibrated with Buffer A containing 200 mM of NaCl. After washing the column with the same buffer, elution was carried out with a linear gradient from 200 to 300 mM of NaCl. The fractions were collected with 12 mL portions. The active fractions were combined and the solution was concentrated to 8 mL by amicon filter.

Enzyme assay

One unit of MCAD1 was defined as the amount that produces 1 nmol of Coenzyme A thioester of (*S*)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid per minute from the acid and Coenzyme A at pH 7.25 at 30 °C. The typical procedures for standard assay were as follows: A solution of 1 mM (final concentration) of (\pm)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid, cofactor solution (final concentration; 10 mM ATP, 2 mM CoA, 10 mM MgCl₂), and ethylene glycol (final volume; 3%) was mixed and pre-incubated at 30 °C. The reaction was started by the addition of the enzyme solution, and incubated at 30 °C for 60 min. The typical reaction volume was 500 μ L and the reaction was quenched by adding 100 μ L of 2 M HCl. To this assay mixture, 1 mM (final concentration) of 2-methyl-3-phenylpropanoic acid was added as an internal standard, and the reaction mixture was extracted by 700 μ L of Et₂O. The organic layer was concentrated *in vacuo*. The ee and yield were measured by HPLC analysis.

Analytical method

The concentration of α -methyl carboxylic acid was measured by HPLC, which was performed with COSMOSIL 5C18-ARII (150 mm x 4.6 mm) column at rt, and the compounds were detected at 254 nm. Separation was achieved employing an isocratic mobile phase consisting H₂O/acetonitrile/TFA (2/1/0.05%) at a flow rate of 0.5 mL/min. Under these conditions, the retention times of 2-methyl-3-phenylpropanoic acid and 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid were 33.8 and 40.9 min, respectively.

MACD1 catalyzed thioesterification of 2-methyl-3-phenylpropanoic acid

A solution of 1 mM (final concentration) of (\pm)-2-methyl-3-phenylpropanoic acid, cofactor solution (final concentration; 10 mM ATP, 2 mM CoA, 10 mM MgCl₂), and ethylene glycol (final volume; 3%) were mixed at 30 °C. The reaction was started by the addition of 0.2 U of the partially purified enzyme, and incubated at 30 °C. The total volume of the reaction mixture was 500 μ L. The reaction was quenched by adding 100 μ L of 2 M HCl. To this assay mixture, 1 mM (final concentration) of (\pm)-2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid was added as the internal standard, and the mixture was extracted by 700 μ L of Et₂O. The organic layer was concentrated *in vacuo*. The ee and yield were measured by HPLC.

To the resulting aqueous solution was added 600 μ L of 2 M NaOH. After the boiling for 5 min, the reaction mixture was acidified by the addition of 600 μ L of 2 M HCl. (\pm)-2-(4-Chlorophenoxy)propanoic acid (final

concentration, 0.33 mM) was added as the internal standard and the reaction mixture was extracted by Et₂O. The organic layer was concentrated *in vacuo*. The ee and yield for the aqueous phase were measured by HPLC.

N-terminal sequencing

For N-terminal amino acid sequencing, the protein band of the enzyme purified was separated by SDS-PAGE and blotted onto a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane. The N-terminal sequencing of this band was performed by Edman degradation.

The second part: Microbial Deracemization of α -Amino Acids

Chapter 1.

1.1 Analytical method

The concentration of the α -amino acid in the reaction mixture was measured by TNBS method⁶⁹ or HPLC, which performed with a COSMOSIL 5C18-ARII (150 mm x 4.6 mm) column at room temperature, and the compounds were detected at 254 nm. Separation was achieved employing an isocratic mobile phase consisting H₂O/acetonitrile (20/1) at a flow rate of 0.5 mL/min. Under these conditions, retention times of phenylglycine and phenylalanine were 6.9 and 13.9 min, respectively. The concentration of α -keto acid was determined by derivation to 2,4-dinitrophenylhydrozone⁷⁰. Benzoylformic acid, which was formed by the deamination reaction of phenylglycine, was also detected on HPLC, which was performed with the above mentioned COSMOSIL 5C18-ARII column. Separation condition was the same except for the mobile phase, which was H₂O/acetonitrile/TFA (2/1/0.1%). Under these conditions phenylglycine and benzoylformic acid eluted in 6.8 and 9.5 min, respectively. The enantiomeric excess (ee) of the product was determined by a Chiralpak WM (250 mm x 4.6 mm) column or a Crownpak CR(+) (150 mm x 4.0 mm) column. Detailed separation conditions and retention times are summarized in Table 50.

Table 50. Separation conditions for chiral HPLC analysis

Entry	Compound	Separation conditions ^a	Retention time (min)	
			D	L
1	phenylalanine	A	24.5	30.6
2	phenylalanine	B	7.2	9.4
3	4-chlorophenylalanine	A	29.7	39.3
4	4-chlorophenylalanine	B	26.5	33.2
5	2-fluorophenylalanine	A	18.5	22.1
6	3-fluorophenylalanine	A	17.4	21.9
7	4-fluorophenylalanine	A	16.7	21.4
8	phenylglycine	A	14.9	16.7
9	phenylglycine	B	4.3	15.3
10	4-fluorophenylglycine	A	14.2	16.3
11	2-aminoheptanoic acid	A	25.2	30.4
12	<i>N</i> -Cbz 2-aminoheptanoic acid	C	31.0	26.4
13	tert-leucine	A	19.1	24.8

^a Separation conditions were listed as follows. A; Daicel chiralpak WM column (aqueous solution of 0.25 mM CuSO₄; 1.0 mL/min; 254 nm; 40 °C), B; Daicel crownpak CR(+) column (MeOH-aqueous solution of HClO₄ pH 1.5 (1/10, v/v); 0.7 mL/min; 200 nm; rt), C; Daicel chiralcel OJ column (hexane-2-propanol-TFA (50/1/0.1%, v/v); 1.0 mL/min; 254 nm; rt).

1.2 Screening methods

Screening of microorganisms having the deracemization activity toward phenylalanine

Microbial strains were obtained from the glycerol stock cells in our laboratory or isolated from soil in Japan. Soil microorganisms were screened in minimal D-phenylalanine medium. Soil samples were added to this medium (10 mL) and the mixture was shaken for 7 days at 30 °C. This broth (100 µL) was added to the fresh medium (10 mL) and cultured again for 7 days. After three times repetition of this operation, the broth was spread on an agar plate consisting of the same components. The colonies grown were picked up and assayed for the deracemization activity. The activity of each strain was measured in two-step assay, i.e., plate color assay followed by HPLC assay. Identification of soil isolate No.9 was carried out at NCIMB Japan Co. Ltd. (Shimizu, Japan). The strain No.9 was gram-negative, formed rods, non spore-forming, and without flagella. It produces no acid and gas from glucose. Both catalase and oxidase reaction were found to be positive. Type of 16S rDNA showed that soil isolate No. 9 is closely related to *Pseudomonas nitroreducens* (99.6% homology) and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *pseudoalcaligenes* (98.1%). Based on these results, the soil isolate No.9 was identified as *Pseudomonas* sp. and registered to our stock culture as KU 2071.

Plate color assay

Deracemization activity was detected by the generation of L-phenylalanine from D-isomer utilizing the enantioselective deamination reaction catalyzed by L-phenylalanine dehydrogenase (L-PheDH, origin; *Sporosarcina* sp. which was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Streaked cells on an agar plate were transferred to the Hybond-N⁺ membrane. After incubation for several hours at 30 °C, membrane was treated with 5 mL of a solution of lysozyme hydrochloride (20 mg/mL) in 50 mM potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.0) containing 1 mM EDTA and incubated for 2 h at 37 °C. The cells were lysed completely. This membrane was transferred to an assay plate (20 mM D-phenylalanine, 5 mM NAD⁺, 0.3 mg/mL nitrobluetetrazolium chloride, 0.05 mg/mL phenazine metasulfate and 1.7% agar), to which 0.5 unit of L-PheDH was applied before use, and incubated for 2 h at 30 °C. When the enzyme system of the original cells converted D-Phenylalanine to its L-isomer, then the sample turned blue due to the oxidation of L-phenylalanine to phenylpyruvic acid.

HPLC assay

Each isolated strain was cultured with shaking in 10 mL of the *N. diaphanozonaria* medium which was used before for the growth of *N. diaphanozonaria* for 48 h at 30 °C. The cells were harvested and washed with 100 mM KPB (pH 7.0). This wet cells were resuspended in 5 mL of KPB containing 1 mg/mL of α -amino acid. After shaking for 24 h at 30 °C, the ee of the product was determined by HPLC.

Chapter 2.

2.1 Chemical synthesis of the substrate

4-Chlorophenylpyruvic acid⁵¹ and 2-oxo-3-methylbutanoic acid⁵² were prepared according to the procedure described in literatures.

2.2 Biotransformation

General procedure for the investigation of the change of α -amino acid concentration in the reaction mixture by the aid of *N. diaphanozonaria*, *S. meliloti*, and *Pseudomonas* sp.

The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of *N. diaphanozonaria* medium for 48 h at 30 °C. This pre-cultured cells were then added to 90 mL of the fresh medium and the incubation was carried out at 30 °C for 24 h (second incubation). The wet cells were harvested by centrifugation (5000 rpm, 10 min) and washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0). The wet cells, together with the substrate (50 mg, 0.1% w/v), were re-suspended in 100 mL of a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) in a 500-mL shaking culture (Sakaguchi) flask. The flask was shaken at 30 °C on a reciprocal shaker. Aliquot of the reaction mixture were taken for analysis at appropriate intervals.

2.3 Mechanistic investigation

Preparation of the cell free extract

The microorganism was cultured with shaking in 10 mL of the above mentioned *N. diaphanozonaria* medium for 48 h at 30 °C. This pre-cultured cells were then added to 90 mL of the fresh medium, and the mixture was shaken for further 24 h. The cells were harvested and washed with 100 mM KPB (pH 7.0). This wet cells were resuspended in 10 mL of ice-cooled 100 mM MOPS-NaOH buffer (pH 7.25) containing 1 mM DTT. The cells were disrupted by French press. The cell debris were removed by centrifugation (15,000 rpm, 10 min), and dialyzed in MOPS-NaOH buffer overnight. This cell free extract was used without further purification for the mechanistic investigation of deracemization reaction. Protein concentration was 4.8 mg/mL (*S. meliloti* ATCC 51124) and 3.2 mg/mL (*Pseudomonas* sp. No.9).

D-amino acid deaminating activity assay using the cell free extract

The activity of D-amino acid oxidation was measured spectrophotometrically by the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) at 600 nm in the presence of *N*-methylphenazonium methosulfate

(PMS) according to the report by Tsuchiya *et al.*⁴⁶ The assay mixture contained 50 mM KPB (pH 7.0), 2.4 mM D- or L-phenylalanine, 0.24 mM DCIP, 0.24 mM PMS and 50 μ L of the cell free extract in a total volume of 1 mL.

Aminotransferase activity assay using the cell free extract

The activity of aminotransferase was determined by the conversion of α -keto acid to the corresponding α -amino acid. The assay mixture containing 1.2 mM α -keto acid, 6.7 mM amino donor (for example L-glutamic acid), 0.6 mM PLP, and 100 μ L of the cell free extract in a total volume of 1 mL of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) was incubated for 10 h at 30 °C. The α -amino acid resulting from the α -keto acid was determined by HPLC.

Microbial deracemization of α -amino acids using the cell free extract

The reaction conditions of deracemization of phenylalanine were as follows. A mixture of 1.2 mM D-phenylalanine or DL-4-chlorophenylalanine or D-phenylglycine, 0.24 mM DCIP, 0.24 mM PMS, 6.7 mM L-glutamic acid, 0.6 mM PLP, and 100 μ L of the cell free extract in a total volume of 1 mL of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) was incubated at 30 °C under the light-shielded condition. After the incubation for appropriate time, the ee of the product was determined by HPLC.

Chapter 3.

3.1 Cloning and expression

Cloning and expression of the *Sinorhizobium meliloti* SMb 20877 gene in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

The plasmid pETDAAO carrying *Smb 20877* gene was constructed by introduction of the 1.1 kbp region into multiple cloning sites 1 of pETDuet-1 vector. The DNA fragment was obtained by PCR amplification, using the genomic DNA of *S. meliloti* ATCC 51124 as a template (Sambrook *et al.*, 1989). For PCR amplification, two synthetic oligonucleotides, (5'-***CGCGGATCCATCGATGTGCGAAGTTTTGATCGTGGGCG***-3') and (5'-*AACGTGCTCCGCCTATCGCAATGCCGCGATATGGTGC* -3') were used as the forward and reverse primers, respectively. The overhang sequence (italic face) including *Bam*H I restriction site (boldface) or *Sac* I restriction site (underlined) was introduced in each primer. PCR was carried out with the Ex Taq DNA polymerase. The obtained PCR product was introduced into pGEM-T easy vector, by which *E. coli* XL10-Gold was transformed. The plasmid was extracted from this transformant. Then, the vector was treated with the restriction enzymes and DNA fragment was recombined into the *Bam*H I-*Sac* I site of pETDuet-1 vector using Ligation-Convenience Kit, resulting in the formation of plasmid pETDAAO. This plasmid was introduced in *E. coli* TOP10 and the DNA sequence was confirmed.

E. coli BL21 (DE3) pLysS was transformed with pETDAAO and cultured at 37 °C in Luria–Bertani medium (LB medium) containing 50 µg/ml of ampicillin for 10 h. Then, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.6 mM at final concentration) was added for the induction of the desired enzyme, and cultivation was kept for additional 14 h at 15 °C. The resulting broth was centrifuged at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C. Harvested cells were resuspended 100 mM KPB (pH 7.0) containing 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 µM FAD, 0.19 mg/mL PMSF, and 0.7 µg/mL pepstatin and disrupted by sonication. D-Phenylalanine deaminating activity was measured by DCIP method described elsewhere.

The plasmid pColdDAAO carrying *Smb 20877* gene was constructed by introduction of the 1.1 kbp region into multiple cloning sites of pCold I vector. The DNA fragment was obtained by PCR amplification, using the genomic DNA of *S. meliloti* ATCC 51124 as a template (Sambrook *et al.*, 1989). For PCR amplification, two synthetic oligonucleotides, (5'-***CGGGGATCCATGTGCGAAGTTTTGATCGTGGG***-3') and (5'-*AAACTGCAGCTATCGCAATGCCGCGATATGGTGC* -3') were used as the forward and reverse primers, respectively. The overhang sequence (italic face) including *Kpn* I restriction site (boldface) or *Pst* I restriction site (underlined) was introduced in each primer. PCR was carried out with the Ex Taq DNA polymerase. The obtained PCR product was introduced into pGEM-T easy vector, by which *E. coli* XL10-Gold was transformed. The plasmid was extracted from this transformant. Then, the vector was treated with the restriction enzymes and DNA fragment was recombined into the *Kpn* I-*Pst* I site of pCold I vector using Ligation-Convenience Kit, resulting in the formation of plasmid pColdDAAO. This plasmid was introduced in *E. coli* XL10-Gold and the DNA sequence was confirmed.

Cloning and expression of the *Sinorhizobium meliloti* SMc 02896 gene in *E. coli* BL21 (DE3)

The plasmid pACYCBCAAT carrying *SMc 02896* gene was constructed by introduction of the 1.1 kbp region into multiple cloning sites 1 of pACYCDuet-1 vector. The DNA fragment was obtained by PCR amplification, using the genomic DNA of *S. meliloti* ATCC 51124 as a template (Sambrook *et al.*, 1989). For PCR amplification, two synthetic oligonucleotides, (5'-***CGCGGATCC***ACAGATGACCGGTAGCGGTGAGCAGACTT-3') and (5'-*CCCAAGCTT*CGCTCAGAACAGCCGGTCGAGCCAG-3') were used as the forward and reverse primers, respectively. The overhang sequence (italic face) including *Bam*H I restriction site (boldface) or *Hind* III restriction site (underlined) was introduced in each primer. PCR was carried out with the Ex Taq DNA polymerase. The obtained PCR product was introduced into pGEM-T easy vector, by which *E. coli* XL10-Gold was transformed. The plasmid was extracted from this transformant. Then, the vector was treated with the restriction enzymes and DNA fragment was recombined into the *Bam*H I-*Hind* III site of pACYCDuet-1 vector using Ligation-Convenience Kit, resulting in the formation of plasmid pACYCBCAAT. This plasmid was introduced in *E. coli* TOP10 and the DNA sequence was confirmed.

E. coli BL21 (DE3) was transformed with pACYCBCAAT and cultured at 37 °C in LB medium containing 20 µg/ml of chloramphenicol (up to OD = 0.4). Then, IPTG (0.6 mM at final concentration) was added for the induction of the desired enzyme, and cultivation was kept for additional 6 h at 25 °C. The resulting broth was centrifuged at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C. Cell extract was prepared by sonication. The transaminase activity was determined by HPLC, measuring the amount of resulting L-4-chlorophenylalanine from 4-chlorophenylpyruvic acid in the presence of L-glutamic acid and PLP.

3.2 Biotransformation

Production of L-4-chlorophenylalanine from its racemate by the combination of two transformants

The pColdDAAO transformant *E. coli* BL21 (DE3) pLysS cells were cultured in the LB medium containing 50 µg/ml of ampicillin at 37 °C (up to OD = 0.4). Then, the reaction flask was stand at 15 °C for 30 min before adding IPTG (1 mM at final concentration) for induction. Cultivation was kept for additional 24 h at 15 °C. The resulting broth was centrifuged at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C and washed with 100 mM potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.0).

The pACYCBCAAT transformant *E. coli* BL21 (DE3) cells were cultured in the LB medium containing 20 µg/ml of chloramphenicol (up to OD = 0.4). Then, IPTG (0.6 mM at final concentration) was added for the induction of the desired enzyme, and cultivation was kept for additional 6 h at 25 °C. The resulting broth was centrifuged at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C and washed with 100 mM potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.0).

These two washed cells were resuspended (OD 4.0, respectively) in 100 mM KPB containing 2.6 mM

実験の部

DL-4-chlorophenylalanine, and the reaction was performed at 30 °C with shaking. Aliquot of the reaction mixture were taken for analysis at appropriate intervals. After the 38 h incubation, the ee of the product reached at 94% (L-form) and concentration of the 4-chlorophenylalanine was as high as 100% yield.

Production of L-4-chlorophenylalanine from its racemate by BCAAT transformant *E. coli*

The recombinant cells were cultured in the minimal L-alanine medium containing 20 µg/ml chloramphenicol at 37 °C (up to OD = 0.4). Then, IPTG (0.6 mM at final concentration) was added for induction of the enzyme, and cultivation was kept for additional 20 h at 25 °C. The resulting broth was centrifuged at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C and washed with 100 mM potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.0). The washed cells were resuspended (OD 1.5) in 100 mM KPB containing 2.6 mM DL-4-chlorophenylalanine, and the reaction was performed at 30 °C with shaking. Aliquot of the reaction mixture were taken for analysis at appropriate intervals. After the 48 h incubation, enantiomerically pure L-4-chlorophenylalanine was obtained in a quantitative yield.

参考文献 & 補足

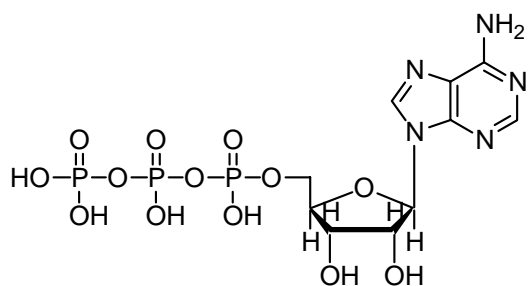
1. (a) Knowles, W. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1998-2007. (b) Noyori, R. *ibid.* **2002**, *41*, 2008-2022. (c) Sharpless, K. B. *ibid.* **2002**, *41*, 2024-2032.
2. (a) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th ed.; Spriger-Verlag: Berlin, 2000. (b) Drauz, K.; Waldmann, H. Ed. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; VCH: Weinheim, 1995. (c) Wong, C.-H.; Whitesides, G. M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*; Pergamon: Oxford, 1994.
3. (a) Wu, S.-H.; Guo, Z.-W.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1990-1995. (b) Cambou, B.; Klibanov, A. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *XXVI*, 1449-1454. (c) Liu, Y.-Y.; Xu, J.-H.; Hu, Y. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 523-529. (d) Colton, I. J.; Ahmed, S. N.; Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 212-217. (e) Guo, Z.-W.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6836-6841.
4. (a) Stecher, H.; Faber, K. *Synthesis* **1996**, 1-16. (b) Caddick, S.; Jenkins, K. *Chem. Soc. Rev.* **1996**, *25*, 447-456. (c) Strauss, U. T.; Felfer, U.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 107-117. (d) Ward, R. S. *ibid.* **1995**, *6*, 1475-1490.
5. Yamada, H.; Shimizu, S.; Shimada, H.; Tani, Y.; Takahashi, S.; Ohhashi, T. *Biochimie* **1980**, *62*, 395.
6. Huerta, F. F.; Minidis, A. B. E.; Backvall, J.-E. *Chem. Soc. Rev.*, **2001**, *30*, 321-331.
7. Jones, M. M.; Williams, J. M. J. *Chem. Commun.* **1998**, 2519-2520.
8. Huerta, F. F.; Laxmi, Y. R. S.; Bäckvall, J.-E. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1037-1040.
9. Turner, N. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 114-119.
10. (a) Alexeeva, M.; Enright, A.; Dawson, M. J.; Mahmoudian, M.; Turner, N. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3177-3180. (b) Carr, R.; Alexeeva, M.; Enright, A.; Eve, T. S. C.; Dawson, M. J.; Turner, N. J. *ibid.* **2003**, *42*, 4807-4810. (c) Alexeeva, M.; Carr, R.; Turner, N. J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4133-4137.
11. (a) Kroutil, W.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2901-2913. (b) Beard, T. M.; Turner, N. J. *Chem. Commun.* **2002**, 246-247. (c) Alexandre, F.-R.; Pantaleone, D. P.; Taylor, P. P.; Fotheringham, I. G.; Ager, D. J.; Turner, N. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 707-710.
12. (a) Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Giovannini, P. P.; Medici, A.; Pedrini, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 3047-3053. (b) Takemoto, M.; Achiwa, K. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1627-1629. (c) Xie, S.-X.; Ogawa, J.; Shimizu, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1721-1729. (d) Xie, S.-X.; Ogawa, J.; Shimizu, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52*, 327-331. (e) Ogawa, J.; Xie, S.-X.; Shimizu, S. *Biotechnol. Lett.* **1999**, *21*, 331-335. (f) Hasegawa, J.; Ogawa, M.; Tsuda, S.; Maemoto, S.-I.; Ohashi, H. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 1819-1827. (g) Goswami, A.; Mirfakhrae, K. D.; Patel, R. N. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4239-4244. (h) Page, P. C. B.; Carnell, A. J.; McKenzie, M. J. *Synlett* **1998**, 774-776. (i) Demir, A. S.; Hamamci, H.; Sesenoglu, O.; Neslihanoglu, R.; Asikoglu, B.; Capanoglu, D. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6447-6449. (j) Padhi, S. K.; Pandian, N. G.; Chadha, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *29*, 25-29.
13. (a) Cusk, R.; Glanzer, B. I. In *Stereoselective Biocatalysis*; Patel, R. N., Ed.; Marcel Dekker: New York, 2000; pp. 527-578. (b) Tsujigami, T.; Sugai, T.; Ohta, H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2543-2549.

14. (a) Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Pedrini, P.; Fontana, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2367-2373. (b) Pérez, H. I.; Luna, H.; Manjarrez, N.; Solís, A. *ibid.* **2001**, *12*, 1709-1712.
15. Rhys-Williams, W.; Thomason, M. J.; Hung, Y.-F.; Hanolon, G. W.; Lloyd, A. W. *Chirality* **1998**, *10*, 528-534.
16. Rhys-Williams, W.; McCarthy, F.; Backer, J.; Hung, Y.-F.; Thomason, M. J.; Lloyd, A. W.; Hanlon, G. W. *Enzy. Micro. Technol.* **1998**, *22*, 281-287.
17. Reid, A. J.; Phillips, G. T.; Marx, A. F.; De Smet, M. J. Eur. Pat. Appl. EP 338,645 (*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 38895k).
18. Rhys-Williams, W.; Thomason, M. J.; Lloyd, A. W.; Hanlon, G. W. *Pharm. Sci.* **1996**, *2*, 537-540.
19. (a) Knihinicki, R. D.; Williams, K. M.; Day, R. O. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 4389-4395. (b) Chen, C.-S.; Chen, T.; Shieh, W.-R. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1033*, 1-6. (c) Knihinicki, R. D.; Day, R. O.; Williams, K. M. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 1905-1911. (d) Menzel, S.; Waibel, R.; Brune, K.; Geisslinger, G. *ibid.* **1994**, *48*, 1056-1058.
20. (a) Müller, S.; Mayer, J. M.; Etter, J.-C.; Testa, B. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1468-1470. (b) Brugger, R.; Reichel, C.; Alía, B. G.; Brune, K.; Yamamoto, T.; Tegeder, I.; Geissinger, G. *ibid.* **2001**, *61*, 651-656.
21. (a) Knights, K. M.; Talbot, U. M.; Baillie, T. A. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 2415-2417. (b) Brugger, R.; Alía, B. G.; Reichel, C.; Waibel, R.; Menzel, S.; Brune, K.; Geisslinger, G. *ibid.* **1996**, *52*, 1007-1013. (c) Brugger, R.; Alía, B. G.; Reichel, C.; Waibel, R.; Menzel, S.; Brune, K.; Geisslinger, G. *ibid.* **1996**, *52*, 1007-1013.
22. (a) Shieh, W.-R.; Chen, C.-S. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3487-3493. (b) Reichel, C.; Bang, H.; Brune, K.; Geisslinger, G.; Menzel, S. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1803-1806. (c) Reichel, C.; Brugger, R.; Bang, H.; Geisslinger, G.; Brune, K. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 576-582.
23. (a) Yasohara, Yoshihiko; Tasato, Yoshiko; Takahashi, Satomi Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 05219985. (b) Bewick, D. W. Eur. Pat. Appl. EP 133,033 (*Chem. Abstr.* **1985**, *102*, 165249a). (c) Bewick, D. W. Eur. Pat. Appl. EP 133,034 (*Chem. Abstr.* **1985**, *102*, 165251v).
24. Takashima, Y.; Kobayashi, Y. Eur. Pat. Appl. EP 1,081,228 (*Chem. Abstr.* **2001**, *134*, 206667s).
25. Takashima, Y.; Nitta, E.; Kobayashi, Y. Eur. Pat. Appl. EP 1,043,401 (*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 280649h).
26. (a) Chibata, I.; Tosa, T.; Sano, R. *Appl. Microbiol.* **1965**, *13*, 618-624. (b) Hasegawa, H.; Matsukawa, T.; Shinohara, Y.; Hashimoto, T. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 920-924.
27. Nakajima, N.; Esaki, N.; Soda, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 947-948.
28. (a) Shen, T. Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 460-472. (b) Selinsky, B. S.; Gupta, K.; Sharkey, C. T.; Loll, P. J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 5172-5180.
29. Review (a) Janes, N. F. Ed. *Recent Advances in the Chemistry of Insect Control*; The Royal Society of Chemistry, 53, 1985. (b) Tsushima, K.; Yano, T.; Takagaki, T.; Matsuo, N.; Hirano, M.; Ohno, N. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1323-1325. (c) Masutomo, S.; Inoue, A.; Kumagai, K.; Murai, R.; Mitsuda, S.

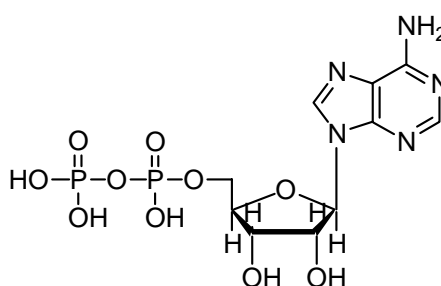
- Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 720-722.
30. Kusumoto, T.; Ueda, T.; Hiyama, T.; Takehara, S.; Shoji, T.; Osawa, M.; Kuriyama, T.; Nakamura, K.; Fujisawa, T. *Chem. Lett.* **1990**, 523-526.
 31. Bracher, F.; Papke, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1653-1656.
 32. (a) Högberg, H.-E.; Hedenström, E.; Wassgren, A.-B.; Hjalmarsson, M.; Bergström, G.; Löfqvist, J.; Norin, T. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3007-3018. (b) Miyamoto, S.; Koga, T.; Terao, J. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 2463-2466.
 33. Miyamoto, K.; Ohta, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4077-4078.
 34. Chordia, M. D.; Harman, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2725-2736.
 35. Ireland, R. E.; Thaisrivongs, S.; Dussault, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5768-5779.
 36. Halpin, R. A.; Hegeman, G. D.; Kenyon, G. L. *Biochemistry* **1981**, *20*, 1525-1533.
 37. Miyamoto, K.; Ohta, H. *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 363-366.
 38. Haeffner-Gormley, I.; Cummings, J. G.; Thorpe, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *317*, 479-486.
 39. Ferdinandusse, S.; Denis, S.; Ijlst, L.; Dacremont, G.; Waterham, H., R. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1890-1896.
 40. Kasuya, F.; Hiasa, M.; Kawai, Y.; Igarashi, K.; Fukui, M. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 363-367.
 41. (a) Lee, M. S.; Qin, G.-w.; Nakanishi, K.; Zagorski, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6234-6241. (b) Mishra, P. K.; Drueckhammer, D. G. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3283-3309. (c) Kawaguchi, A.; Yoshimura, T.; Okuda, S. *J. Biochem.* **1981**, *89*, 337-339.
 42. Hunt, M. C.; Solaas, K.; Kase, B. F.; Alexson, S. E. H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 1128-1138.
 43. Singh, I.; Lazo, O.; Dhaunsi, G. S.; Contreras, M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13306-13313.
 44. Fraga, H.; Silva, J. C. G. E. d.; Fontes, R. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 110-115.
 45. Barrett, G. C. *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, Chapman and Hall: New York, 1985
 46. Tsuchiya, S.; Miyamoto, K.; Ohta, H. *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 1137-1142.
 47. Olsiewski, P. J.; Kaczorowski, G. J.; Walsh, C. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 4487-4494.
 48. Satomura, T.; Kawakami, R.; Sakuraba, H.; Ohshima, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12861-12867.
 49. (a) Galibert, F.; Finan, T. M.; Long, S. R.; Pühler, A.; Abola, P.; Ampe, F.; Barloy-Hubler, F.; Barnett, M. J.; Becker, A.; Boistard, P.; Bothe, G.; Boutry, M.; Bowser, L.; Buhrmester, J.; Cadieu, E.; Capela, D.; Chain, P.; Cowie, A.; Davis, R. W.; Dréano, S.; Federspiel, N. A.; Fisher, R. F.; Gloux, S.; Godrie, T.; Goffeau, A.; Golding, B.; Gouzy, J.; Gurjal, M.; Hernandez-Lucas, I.; Hong, A.; Huizar, L.; Hyman, R. W.; Jones, T.; Kahn, D.; Kahn, M. L.; Kalman, S.; Keating, D. H.; Kiss, E.; Komp, C.; Lelaure, V.; Masuy, D.; Palm, C.; Peck, M. C.; Pohl, T. M.; Portetelle, D.; Purnelle, B.; Ramsperger, U.; Surzycki, R.; Thébault, P.; Vandenbol, M.; Vorhölter, F.-J.; Weidner, S.; Wells, D. H.; Wong, K.; Yeh, K.-C.; Batut, J. *Science* **2001**, *293*, 668-672. (b) Capela, D.; Barloy-Hubler, F.; Gouzy, J.; Bothe, G.; Ampe, F.; Batut, J.; Boistard, P.; Becker, A.; Boutry, M.; Cadieu, E.; Dréano, S.; Gloux, S.; Godrie, T.; Goffeau, A.; Kahn, D.; Kiss, E.; Lelaure, V.; Masuy, D.; Pohl, T.; Portetelle, D.; Pühler, A.; Purnelle, B.; Ramsperger, U.; Renard, C.; Thébault, P.; Vandenbol, M.; Weidner, S.; Galibert, F. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 9877-9882. (c) Rhizo Base, the Genome Database for Rhizobia; <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>
50. Lobočka, M.; Hennig, J.; Wild, J.; Kłopotowki, T. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 1500-1510.
 51. Kavadias, G.; Velkof, S. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 730-732.
 52. Ryabov, A. N.; Gribkov, D. V.; Izmer, V. V.; Voskoboynikov, A. Z. *Organometallics* **2002**, *21*, 2842-2855.
 53. Khadim, M. A.; Colebrook, L. D. *J. Chem. Eng. Data* **1985**, *30*, 239-242.
 54. Barbier, P.; Benezra, C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2705-2709.
 55. Adam, W.; Cueto, O. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 38-40.
 56. Tao, J.; McGee, K. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, *6*, 520-524.
 57. Creary, X. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5026-5030.
 58. Laemmli, U. K. *Nature Genetics* **1970**, *227*, 680-685.
 59. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *78*, 248-254.
 60. DDBJ, the DNA Data Bank of Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>
 61. EXPASy, the Expert Protein Analysis System; <http://www.expasy.org/>
 62. Fukuyama, Y.; Matoishi, K.; Iwasaki, M.; Takizawa, E.; Miyazaki, M.; Ohta, H.; Hanzawa, S.; Kakidani, H.; Sugai, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1664-1666.
 63. Kobayashi, M.; Koga, K.; Yamada, S.-i. *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 1898-1905.
 64. Bach, T.; Körber, C. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2358-2367.
 65. Ferorelli, S.; Liodice, F.; Longo, A.; Molfetta, A.; Tortorella, V.; Amoroso, R. *Chirality* **2000**, *12*, 697-704.
 66. Breitschuh, R.; Seebach, D. *Synthesis* **1992**, 1170-1178.
 67. Abo, M.; Dejima, M.; Asano, F.; Okubo, A.; Yamazaki, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 823-828.
 68. Miyazawa, T.; Kurita, S.; Ueji, S.; Yamada, T. *Biocatal. Biotransform.* **2000**, *17*, 459-473.
 69. Fields, R. *Methods Enzymol.* **1972**, *25*, 464-468.
 70. Job, V.; Marccone, G. L.; Pilone, M. S.; Pollegioni, L. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6985-6993.

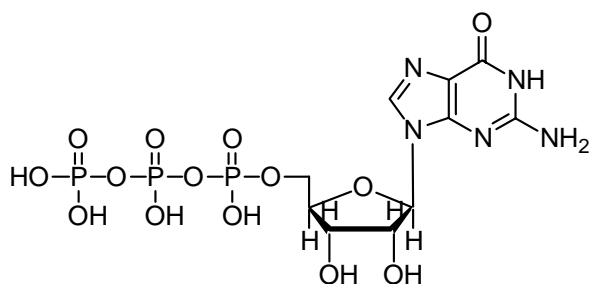
補足 1. 補酵素一覽



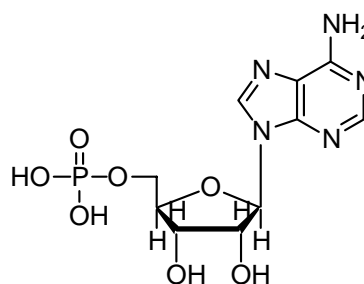
ATP, Adenosine triphosphate



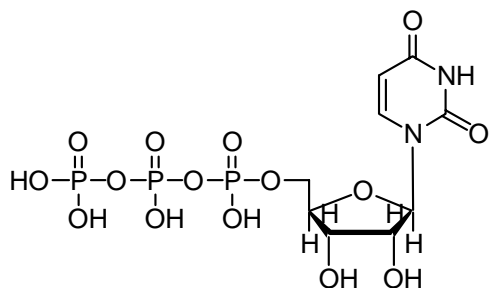
ADP, Adenosine diphosphate



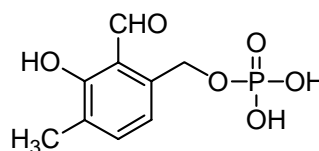
GTP, Guanosine triphosphate



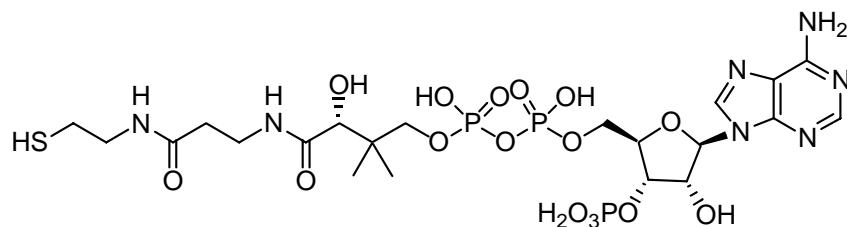
AMP, Adenosine monophosphate



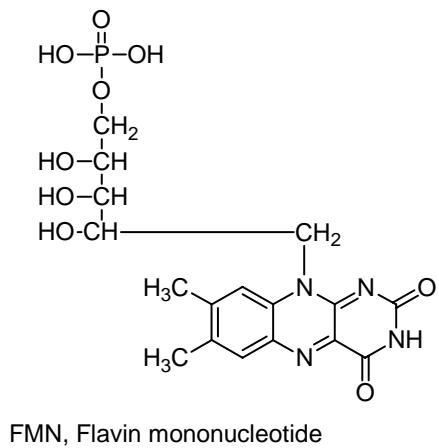
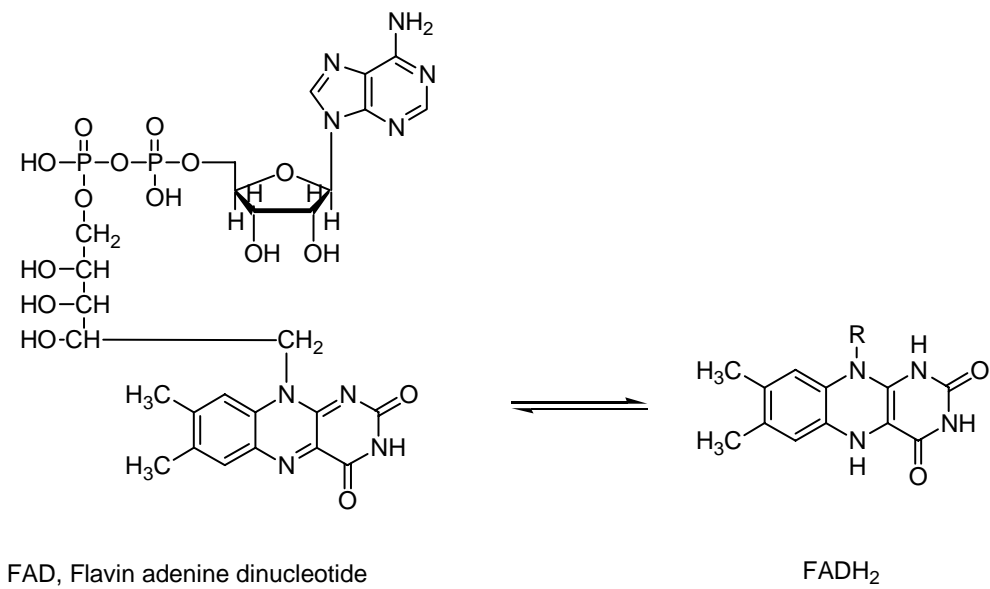
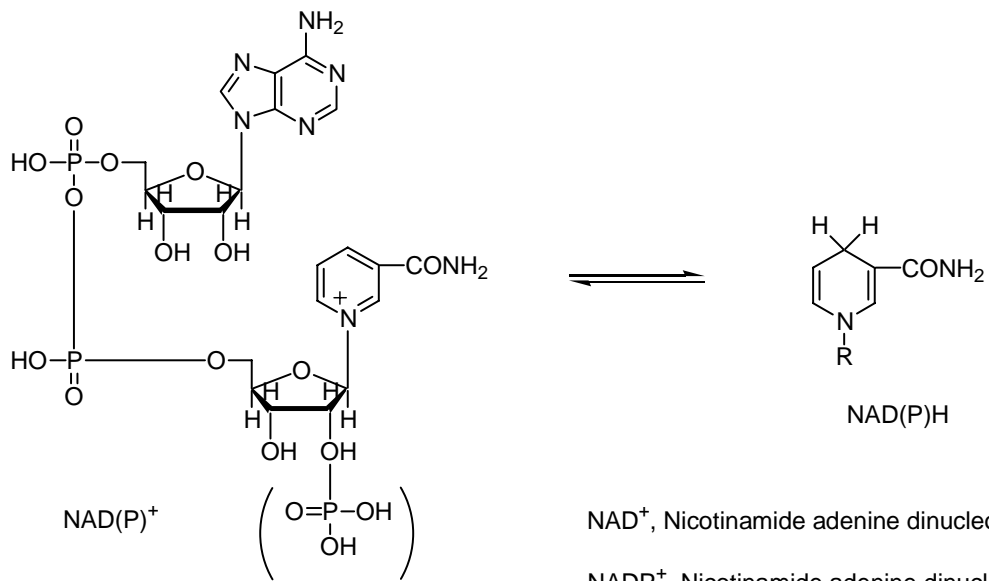
UTP, Uridine triphosphate



PLP, Pyridoxal phosphate



CoA, Coenzyme A



補足 2. 利用培地組成一覽

Nocardia diaphanozonaria medium

glycerol	10 g
peptone	2 g
beef extract	3 g
yeast extract	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
total volume	1000 ml (pH 7.0)

Codyceps militaris medium (YM Broth)

yeast extract	3 g
malt extract	3 g
peptone	5 g
glucose	10 g
total volume	1000 ml (pH 5.5)

If necessary, 0.05% celite is added.

minimal D-phenylalanine medium

glycerol	0.2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5 g
D-phenylalanine	5 g
yeast extract	0.2g
Na ₂ HPO ₄	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8 mg
MnSO ₄ ·7H ₂ O	8 mg
total volume	1000 ml (pH 7.2)

minimal L-alanine medium

glycerol	0.2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5 g
L-alanine	5 g
yeast extract	0.2g
Na ₂ HPO ₄	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8 mg
MnSO ₄ ·7H ₂ O	8 mg
total volume	1000 ml (pH 7.1)

Mesorhizobium loti medium

D-mannitol	10 g
yeast extract	0.4 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.1 g
total volume	1000 ml (pH 6.8)

Sinorhizobium meliloti medium

D-mannitol	5 g
yeast extract	1 g
K ₂ HPO ₄	0.7 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O	0.2 g
total volume	1000 ml (pH 7.2)

Luria-Bertani medium (LB medium)

tryptone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
total volume	1000 ml (pH 7.1)

M9 medium

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	1 g
total volume	1000 ml (pH 6.8)

After the sterilization by autoclave, following filter sterilized solutions are added.

1% thiamine hydrochloride	1 mL
1M MgSO ₄	1 mL
1M CaCl ₂	0.1 mL

M63 medium

KH ₂ PO ₄	13.6 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.89 mg
total volume	1000 ml (pH 6.8)

After the sterilization by autoclave, following filter sterilized solution is added.

1% thiamine hydrochloride	1 mL
---------------------------	------

おわりに

研究をはじめて間もない著者が研究を展開し、本論文をまとめることができたのは、多くの方々の暖かい支援の賜物であると認識しています。ここに深く感謝いたします。特に、デラセミ化反応という人間が驚嘆するような現象を我々に用意してくれた自然には畏敬の念を示さずにはいられません。

本研究の遂行ならびに論文の執筆にあたりましては、慶應義塾大学理工学部教授 太田 博道博士よりご指導および御高配を賜りました。本研究をまとめるにあたりましては、慶應義塾大学理工学部教授 井本 正哉博士、松村 秀一博士、山田 徹博士より副査として有益なご助言を賜りました。住友化学工業株式会社東京本社技術経営企画室 光田 賢博士には、菌株(*Nocardia diaphanozonaria* JCM 3208 株)の譲渡を賜りました。本研究を行うにあたりましては、慶應義塾大学理工学部助教授 須貝 威博士より多大なご助言を頂きました。本研究を行なうにあたりましては慶應義塾大学理工学部専任講師 宮本 憲二博士よりご指導を賜りました。本研究を推進するにあたりましては、慶應義塾大学理工学部特別研究助手 鈴木 陽一博士より丁寧なご指導を賜りました。慶應義塾大学 福山 靖朗修士には、研究者として最も大切な研究室での1年目に実験操作、その他の全般にわたり身を粉にしてまできめ細かいご指導、ご助言をして頂き、また博士課程進学後においても目標とすべき先輩として心の支えとなっていました。また、研究室の先輩、同輩、ならびに後輩の皆様には励まされることばかりでありました。感謝いたします。

本研究を行なうにあたり、奨学金を御給与頂き、経済面にてご援助いただきました、独立行政法人日本学術振興会ならびに慶應義塾大学に感謝いたします。また財団法人鈴木奨学会より奨学金を御貸与いただきました。

最後になりましたが、研究に打ち込める環境を提供し、著者の意見を尊重し、常に暖かいまなざしで見守り、援助を続けてくれた家族に心から感謝します。本当にありがとうございました。

2005年3月

加藤 太一郎