

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 8 月 15 日 (15.08.2002)

PCT

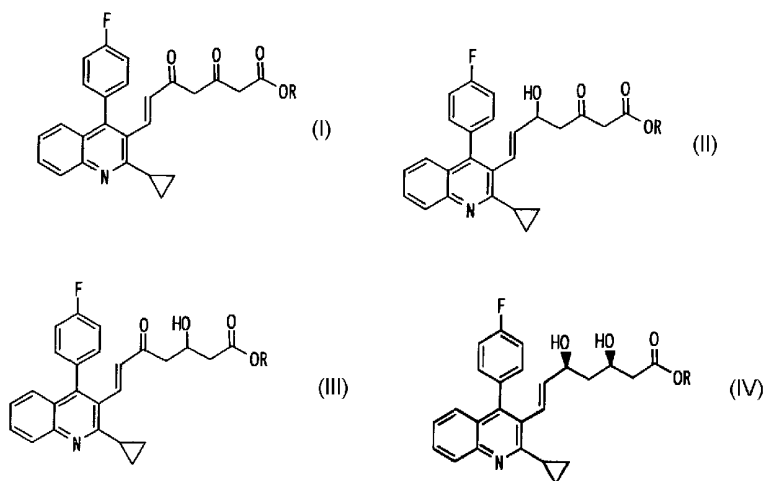
(10) 国際公開番号
WO 02/063028 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 17/12 // (C12P 17/12, C12R 1:645)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/00835
- (22) 国際出願日: 2002 年 2 月 1 日 (01.02.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2001-26316 2001 年 2 月 2 日 (02.02.2001) JP
特願 2001-331480 2001 年 10 月 29 日 (29.10.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二丁目 5 番 2 号 Tokyo (JP). 日産化学工業株式会社 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒101-0054 東京都千代田区神田錦町 3 丁目 7 番地 1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ): 原 磨理 (HARA, Mari) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP). 詫摩 勇樹 (TAKUMA, Yuki) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP). 桂田 学 (KAT-SURADA, Manabu) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP). 細川 明美 (HOSOKAWA, Akemi) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP). 松本 陽一 (MATSUMOTO, Youichi) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP). 春日 優三 (KASUGA, Yuzo) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP). 渡辺 尚之 (WATANABE, Naoyuki) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING (3R,5S)-(E)-7-[2-CYCLOPROPYL-4-(4-FLUOROPHENYL)-QUINOLIN-3-YL]-3,5-DIHYDROXYHEPT-6-ENIC ACID ESTERS

(54) 発明の名称: (3 R, 5 S) - (E) - 7 - [2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル] - 3, 5-ジヒドロキシヘプト-6-エン酸エステル類の製造方法



(57) Abstract: A process for producing a compound represented by the following general formula (IV): (IV) wherein R represents hydrogen, alkyl or aryl; characterized by reducing a compound selected from the group consisting of compounds represented by the following general formula (I): (I) wherein R is as defined above; compounds represented by the following general formula (II): (II) wherein R is as defined above; and compounds represented by the following general formula (III): (III) wherein R is as defined above; by treating optionally processed cells of a microorganism capable of stereoselectively reducing a keto group.

[続葉有]

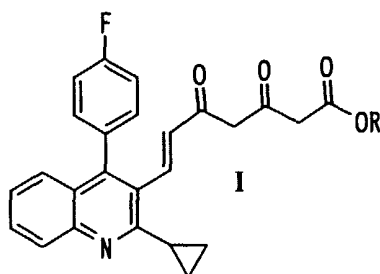


WO 02/063028 A1

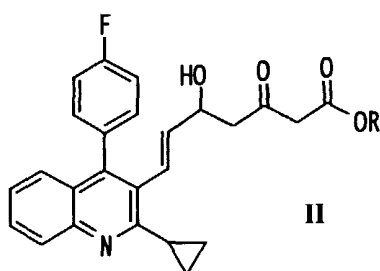


(57) 要約:

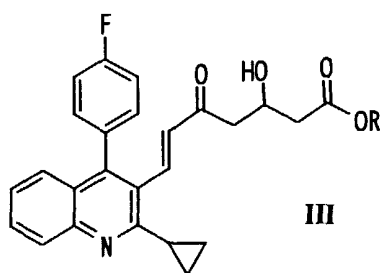
下記式(I)



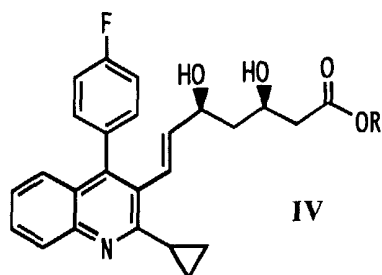
(式中、Rは水素原子、アルキル基またはアリール基を示す)で表される化合物、
下記式(II)



(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物、及び、下記式(III)



(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物からなる群より選ばれる化合物を、ケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用させて還元することを特徴とする下記式(IV)



(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物の製造方法。



(74) 代理人: 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

(3 R, 5 S) - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類の製造方法

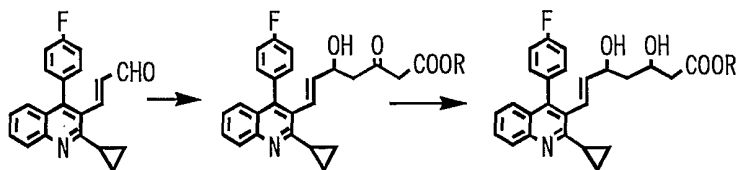
技術分野

本発明は、(3 R, 5 S) - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類の新規な製造方法に関する。該化合物は、血中コレステロール低下剤として有用であるとして、特開平 1 - 2 7 9 8 6 6 号公報に記載された、「3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル CoA 還元酵素阻害剤」の合成中間体として有用である。

また、本発明は、上記 (3 R, 5 S) - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類の合成に必要な、 β - ジケトカルボン酸エステル誘導体の新しい製造方法に関する。

背景技術

(3 R, 5 S) - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類を化学的に製造する方法としては、例えば、特開平 1 - 2 7 9 8 6 6 号公報および Journal of Chromatography A, 832 (1999) p 55 - 65 に、以下に示す製造ルートが知られている。

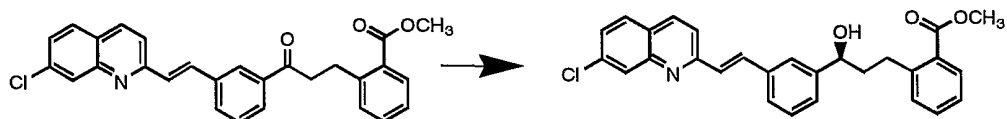


しかしながら、これらの方法では、反応生成物が光学異性体混合物になるため、最終工程において、クロマトグラフィーなどにより所望の光学活性体化合物のみに分離・精製する必要がある。最終工程での異性体分離はロスも多く工業的には安価な効率的製法とは言えない。

また、特開平 8-92217 号公報には、光学活性なシッフ塩基を用いて製造する方法も報告されている。

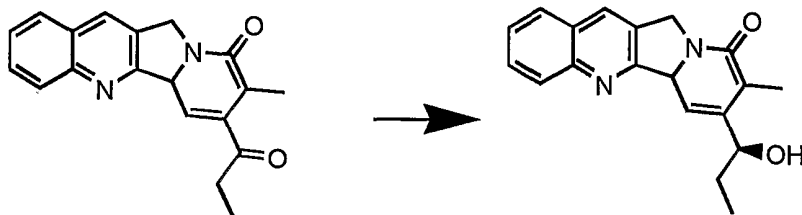
またさらに、特開平 8-127585 号公報には、(R)-3-tert-ブチルジメチルシリルオキシ-6-ジメトキシホスフィニル-5-オキソヘキサン酸メチルエステルを用いて極低温にて製造する方法も報告されている。

一方、微生物の菌体及び／または該菌体処理物を用いてケト基を有する化合物を立体選択的に還元し、光学活性なアルコール体を生成する方法としては、例えば、ケト基の側鎖にキノリン骨格を有する化合物を用いるものとして、Appl. Microbiol. Biotechnol.(1998)49: p. 709-717 に、以下に示す反応をマイクロバクテリウム キャンボクエマドエンシス (*Microbacterium campuquemadoensis*) MB5614 株を用いて行えることが記載されている。



また、Bioorg. Med. Chem. Lett., vol8, p1403-(1998)には、以下に示す反応をパン酵母を用いて行えることが記載されている。

3

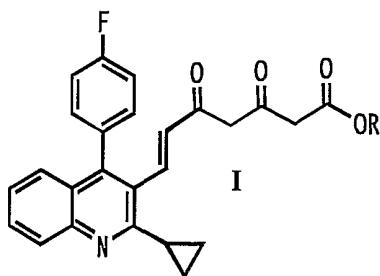


しかしながら、(E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジオキソヘプト - 6 - エン酸エステル類のように、カルボニル基の α 位にオレフィンが存在する上に、カルボニル基が連続して存在する化合物については、微生物を用いて立体選択的に還元できるという例は知られていなかった。

発明の開示

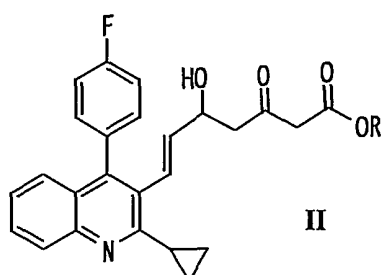
従って、(3R, 5S) - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類を工業的に安価に製造できる新規な製造方法を新たに開発することが望まれていた。

本発明者らは、上記課題を解決するために、微生物反応を利用したケト基の立体選択的還元反応による、(3R, 5S) - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類の製造方法について、鋭意、検討した結果、下記化合物(I) ~ (III) および(I') ~ (III') で示される化合物を原料として用いた場合に、高い光学純度で目的物が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の要旨は、下記式(I)

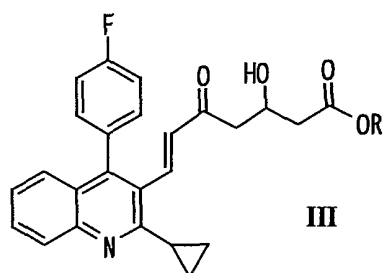


(式中、Rは水素原子、アルキル基またはアリール基を示す)で表される化合物、

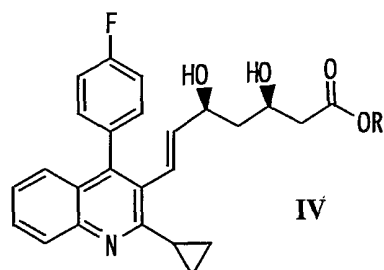
下記式(II)



(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物、及び、下記式(III)

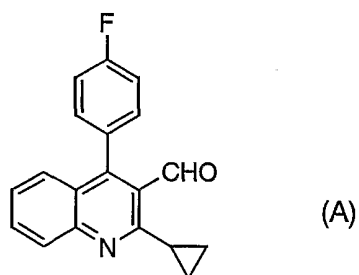


(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物からなる群より選ばれる化合物を、ケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用させて還元することを特徴とする下記式(IV)



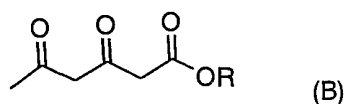
(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物の製造方法に存する。

また、本発明は、下記式(A)



で表される 2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-

カルボアルデヒドと下記式(B)

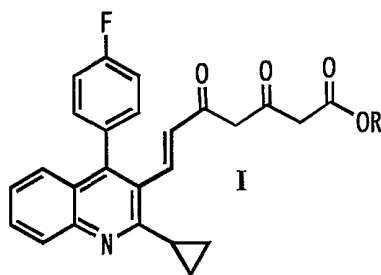


(式中、R は、水素原子、アルキル基、アラルキル基またはアリール基を示す)
で表される化合物とを縮合反応させることを特徴とする上記化合物 (I) の製造
方法に存する。

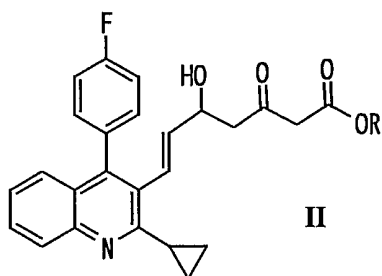
発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明の (3 R, 5 S) - (E) - 7 - [2-シクロプロピル-4-(4-フル
オロフェニル)-キノリン-3-イル] - 3, 5-ジヒドロキシヘプト-6-エ
ン酸エステル類の製造方法は、下記式(I)

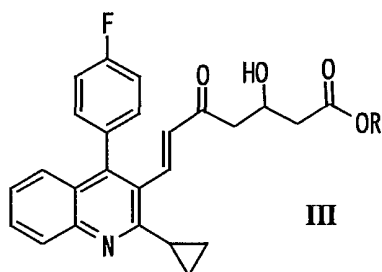


(式中、R は水素原子、アルキル基またはアリール基を示す)
で表される化合物、下記式(II)



(式中、Rは前記と同義である)

で表される化合物、及び、下記式 (III)



(式中、Rは前記と同義である)

で表される化合物からなる群より選ばれる化合物を、ケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用させて還元することを特徴とする。

本発明の製造方法に用いられる原料である、上記式 (I) ~ (III) で表される化合物において、Rは、水素原子、アルキル基またはアリール基を示す。

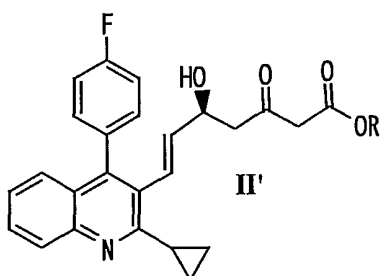
アルキル基としては、メチル基、エチル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ｔ-ブチル基、シクロヘキシル基、ベンジル基、フェネチル基等の、アルキル基またはアリール基で置換されていてもよい直鎖、分岐若しくは環状のアルキル基である。

アリール基としては、フェニル基、メシチル基、ナフチル基等の、アルキル基で置換されていてもよいフェニル基又はナフチル基が挙げられる。

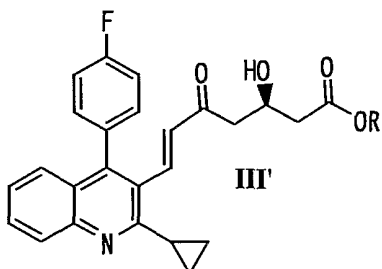
上記Rとして好ましくは、C₁~C₄のアルキル基、ベンジル基又はフェニル基であり、より好ましくはC₁~C₄のアルキル基であり、特に好ましくはメチル基又はエチル基である。

本発明の製造方法において、上記式 (II) および (III) で表される化合物は下

記式 (II') および下記式 (III') で表される光学活性体であってもよい。



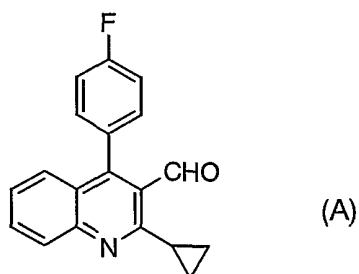
(式中、R は前記と同義である)



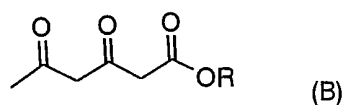
(式中、R は前記と同義である)

式 (I) ~ (III) 及び (II') ~ (III') で表される化合物は、特開平 1 - 279866 号公報、特開平 8 - 127585 号公報、特開平 5 - 178841 号公報等に記載された方法と公知の方法を組み合わせることによって、任意に製造することができる。

また、上記 (I) で表される化合物を製造する好ましい方法として、本発明者らは、下記式 (A)



で表される 2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-カルボアルデヒドと下記式(B)



(式中、Rは、水素原子、アルキル基、アラルキル基またはアリアル基を示す)で表される化合物とを縮合反応させる方法を見出した。この方法を用いることにより、簡便且つ効率的に上記式(I)で表される化合物を製造することができる。

化合物(A)と化合物(B)との縮合反応は、いわゆるアルドール反応と言われているものと同様の操作で行うことができ、通常、窒素ガスまたは不活性ガス雰囲気下で、化合物(B)を含む溶液中に塩基を加えた後に、この溶液中に化合物(A)を含む溶液を滴下して行う方法が好ましく行われる。

上記縮合反応で使用される塩基としては、水素化ナトリウム、水素化カリウム、水素化カルシウム等のアルカリ金属又はアルカリ土類金属の水素化物；*n*-ブチルリチウム、*t*-ブチルリチウム等のアルキルリチウム試薬；*t*-ブチルマグネシウムクロリド等のグリニャール試薬；ナトリウムエトキシド等のアルカリ金属のアルコキシド； NaNH_2 等が挙げられ、このほか、酸化マグネシウム等のアルカリ土類金属の酸化物などの固体塩基も挙げられる。このうち好ましくはアルカリ金属又はアルカリ土類金属の水素化物、 NaNH_2 であり、さらに好ましくは、アルカリ金属水素化物であり、特に好ましくは水素化ナトリウムである。

塩基の使用量としては、通常、化合物(B)に対して1.5当量以上、好ましくは2当量以上用いられるが、あまり過剰に用いると副反応がおこり収率が低下することもあるので通常、10当量以下の範囲で用いられる。このうち好ましい範囲としては2～3当量、特に好ましくは2～2.7当量である。

反応は、通常、溶媒を用いて行われ、溶媒としては、トルエン、ベンゼン、キシレン等の芳香族炭化水素系溶媒；メチルー*t*-ブチルエーテル、ジメトキシエタン、テトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒；塩化メチレン等のハロゲン化炭化水素系溶媒；N,N-ジメチルホルムアミドなどの非プロトン性溶媒が使用でき、これらのうち、好ましい溶媒は20℃における誘電率が2.5以上であり、更に好ましくは5以上である。上記好ましい溶媒の具体例としては、テトラヒド

ロフラン、ジメトキシエタン、N，N－ジメチルホルムアミド、N，N－ジメチルイミダゾリジノンが挙げられ、特に好ましくはテトラヒドロフランである。

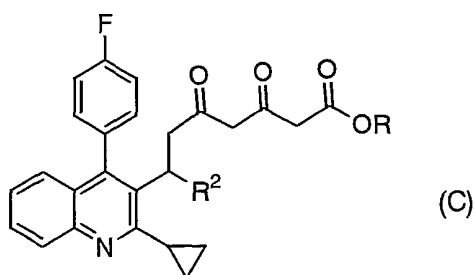
溶媒の使用量は、通常、反応基質に対して0.5倍容量～100倍容量程度用いられ、このうち、工業的な観点から20倍容量以下で行うのが好ましい。

反応操作としては、塩基と化合物（B）を混合した後、化合物（A）を添加してもよいし、塩基と化合物（B）を混合したものを化合物（A）中に添加してもよいし、塩基中に化合物（A）と（B）を混合したものを添加してもよいし、化合物（A）と（B）を混合したものに塩基を添加することも可能である。いずれの操作でも反応は進行するが、好ましくは塩基と化合物（B）を混合した後、これに化合物（A）を添加する方法である。

反応は、 -50°C ～ 100°C 、好ましくは -20°C ～ 40°C の温度で、通常、30分以上、好ましくは1時間以上反応させ、必要に応じて昇温してもよい。

反応終了後、反応系に水、酢酸、塩化アンモニウム等を加えて反応を停止した後、水洗、分液抽出等の通常の単離・精製操作により、化合物（I）を得ることができる。

上記化合物（A）と化合物（B）との縮合反応において、使用する塩基及び溶媒を選択することにより、下記一般式（C）



（式中、Rは、前述と同義である。R²は、水酸基、ハロゲン原子、シリルオキシ基、スルホニルオキシ基、アシルオキシ基、アルコキシカルボニルオキシ基、アルキルチオカルボニルオキシ基、アルコキシチオカルボニルオキシ基、またはアルキルチオチオカルボニルオキシ基を示す）

で表される化合物〔以下、化合物（C）と称する〕またはその塩を経由させてか

ら、化合物（I）を製造することもできる。

上記化合物（C）においてRは前述したものと同様のものを用いることができる。また、R²は、水酸基；塩素原子、臭素原子等のハロゲン原子；トリメチルシリルオキシ基、トープチルジメチルシリルオキシ基などのシリルオキシ基；メタンスルホニルオキシ基、パラトルエンスルホニルオキシ基などのスルホニルオキシ基；アセトキシ基、プロピオニルオキシ基等のアシルオキシ基；メトキシカルボニルオキシ基、ビニルオキシカルボニルオキシ基等のアルコキシカルボニルオキシ基；メチルチオカルボニルオキシ基などのアルキルチオカルボニルオキシ基；メトキシチオカルボニルオキシ基などのアルコキシチオカルボニルオキシ基；または、メチルチオチオカルボニルオキシ基などのアルキルチオチオカルボニルオキシ基を示し、このうち好ましくは水酸基、スルホニルオキシ基またはアシルオキシ基であり、さらに好ましくは、アシルオキシ基であり、特に好ましくはアセトキシ基である。

上記化合物（C）として好ましい置換基の組み合わせとしては、上記置換基の説明で挙げられている好ましいR及びR²を組み合わせたものが挙げられる。

上記化合物（C）を中間体として用いた場合の具体的な反応工程の一つを以下に示す。上記化合物（A）と化合物（B）との縮合反応において使用する塩基を例えばNaHとn-BuLiの組み合わせとすることにより、化合物（C）において上記R²が水酸基である中間体を得られ、この中間体の脱水反応を行うことにより化合物（I）を得る。また、上記中間体の水酸基をハロゲンなどの別の官能基に変換させてから該官能基を脱離させて化合物（I）を得てもよい。ここで、上記NaHの使用量は化合物（A）に対して等モル量前後、n-BuLiの使用量は1.5～2.5当量前後である。また、上記脱水反応および官能基の脱離反応は従来公知の方法を用いて適宜行うことができる。

なお、上記方法により生成された化合物（I）を単離するに際し、上記化合物（I）を塩とした方が単離しやすいため、該化合物の塩として得てもよい。化合物（I）の塩は生成反応停止後の水洗、分液抽出された有機相を必要に応じて濃縮および／または冷却したものに酸を加えて攪拌することにより酸付加塩として得ることもできるし、酸の代わりにアンモニアやアミン類を用いてアンモニウム

塩やアミン付加塩として得ることもできる。化合物（I）を塩として得た場合、後述する微生物の菌体および／または該菌体処理物を用いた還元反応に供されるに際し、塩を脱離させて化合物（I）とすることが好ましい。

本発明では、上記式（I）～（III）で表される化合物を微生物の菌体及び／又は該菌体処理物を用い、ケト基を立体選択的に還元することを特徴とする。

本発明に用いられる微生物としては、ケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物であれば特に限定されない。

具体的には、メシニコウイア ブルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*)、メシニコウイア ビクスピダタ (*Metschnikowia bicuspidata*)、メシニコウイア レウカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*) 及びメシニコウイア ルナタ (*Metschnikowia lunata*) 等のメシニコウイア (*Metschnikowia*) 属に属する微生物；

クリプトコッカス クルバタス (*Cryptococcus curvatus*)、クリプトコッカス フラバス (*Cryptococcus flavus*)、クリプトコッカス フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) 及びクリプトコッカス ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii*) 等のクリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属に属する微生物；

キャンディダ アルビカンズ (*Candida albicans*)、キャンディダ アジマ (*Candida azyma*)、キャンディダ インターメディア (*Candida intermedia*)、キャンディダ ソラニ (*Candida solani*)、キャンディダ ファマタ (*Candida famata*)、キャンディダ ギリエモンディ (*Candida guilliermondii*)、キャンディダ パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、キャンディダ ルゴサ (*Candida rugosa*)、キャンディダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) 及びキャンディダ モリシアナ (*Candida molischiana*) 等のキャンディダ (*Candida*) 属に属する微生物；

フィロバシディウム カプサリゲナム (*Filobasidium capsuligenum*) 等のフィロバシディウム (*Filobasidium*) 属に属する微生物；

オガタエア グリコザイマ (*Ogataea glucozyma*) 及びオガタエア ミヌタ (*Ogataea minuta*) 等のオガタエア (*Ogataea*) 属に属する微生物；

シテロマイセス マトリテンシス (*Citeromyces matritensis*) 等のシテロマイセス (*Citeromyces*) 属に属する微生物；

ヤロウイア リポティカ (*Yarrowia lipolytica*) 等のヤロウイア(*Yarrowia*) 属に属する微生物；

ロドトルラ グルティニス (*Rhodotorula glutinis*)、ロドトルラ オウランテ
ィアカ (*Rhodotorula aurantiaca*) 及びロドトルラ ムシラギノサ (*Rhodotorul
a mucilaginosa*) 等のロドトルラ(*Rhodotorula*)属に属する微生物；

エキソフィアラ デルマティティヂス (*Exophiala dermatitidis*) 等のエキソ
フィアラ (*Exophiala*) 属に属する微生物；

トリゴノブシス バリアビリス (*Trigonopsis variabilis*) 等のトリゴノブシ
ス(*Trigonopsis*)属に属する微生物；

シゾサッカロマイセス ポンベ (*Shizosaccharomyces pombe*) 等のシゾサッカ
ロマイセス(*Shizosaccharomyces*)属に属する微生物；

ウイケルハミエラ ドメルキー (*Wickerhamiella domercqii*) 等のウイケルハ
ミエラ(*Wickerhamiella*)属に属する微生物；

ピキア ピタルソニ (*Pichia petersonii*) 及びピキア アノマラ (*Pichia an
omala*) 等のピキア(*Pichia*)属に属する微生物；

サッカロマイコブシス フィブリゲラ(*Saccharomycopsis fibuligera*)及びサ
ッカロマイコブシス クラタエゲンシス(*Saccharomycopsis crataegensis*)等の
サッカロマイコブシス (*Saccharomycopsis*)属に属する微生物；

サイトエラ コンプリカタ(*Saitoella complicata*) 等のサイトエラ (*Saitoel
la*)属に属する微生物；

サッカロマイセス セルビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロマ
イセス (*Saccharomyces*)属に属する微生物；

ロドスポリジウム トルロイデス(*Rhodosporidium toruloides*) 等のロドス
ポリジウム (*Rhodosporidium*)属に属する微生物；

アシネトバクター カルコアセティカス(*Acinetobacter calcoaceticus*)等の
アシネトバクター属(*Acinetobacter*) に属する微生物；

ブレビバクテリウム リネンス(*Brevibacterium linens*) 及びブレビバクテリ
ウム サッカロリティカム(*Brevibacterium sacchrolyticum*)等のブレビバクテ
リウム(*Brevibacterium*)属に属する微生物；

セルロモナス ゲリダ(*Cellulomonas gelida*)、セルロモナス フラビゲナ(*Cellulomonas flavigena*)、セルロモナス ウダ(*Cellulomonas uda*)等のセルロモナス(*Cellulomonas*) 属に属する微生物；

コリネバクテリウム アンモニアジェネス (*Corynebacterium ammoniagenes*)、コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム アセトアシドフィラム(*Corynebacterium acetoacidophilum*)、コリネバクテリウム ビタルミニス (*Corynebacterium vitaeruminis*)及びコリネバクテリウム バリアビル (*Corynebacterium variabile*)等のコリネバクテリウム (*Corynebacterium*)属に属する微生物；

クルトバクテリウム フラカムファシエンス(*Curtobacterium flaccumfaciens*) 等のクルトバクテリウム(*Curtobacterium*)属に属する微生物が挙げられる。

上記微生物の好ましい具体例としては、メシニコウヰア プルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*) I F O 0 8 6 3 株、メシニコウヰア プルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*) I A M 1 2 1 9 6 株、メシニコウヰア プルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*) I A M 1 2 1 9 7 株、メシニコウヰア プルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*) I F O 1 4 0 7 株、メシニコウヰア プルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*) I F O 1 0 7 9 6 株、メシニコウヰア ビクスピダタ (*Metschnikowia bicuspidata*) I F O 1 4 0 8 株、メシニコウヰア レウカウヰ (*Metschnikowia reukaufii*) I F O 1 0 7 9 8 及びメシニコウヰア ルナタ(*Metschnikowia lunata*) I F O 1 6 0 5 株；

クリプトコッカス クルバタス(*Cryptococcus curvatus*) I F O 1 1 5 9 株、クリプトコッカス フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) I F O 1 0 2 5 0 株、クリプトコッカス フラバス (*Cryptococcus flavus*) I F O 0 4 0 7 株、クリプトコッカス ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii*) I F O 0 6 0 9 株、クリプトコッカス ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii*) I F O 1 3 7 6 株、クリプトコッカス 変種ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii* var *laurentii*) C B S 5 5 3 9 株、クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii* var *laurentii*) C B S 2 1 7 4 株、クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii* var *laure*

ntii) CBS 5746株、クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ (Cryptococcus laurentii var laurentii) CBS 7140株及びクリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ (Cryptococcus laurentii var laurentii) CBS 7235株；

キャンディダ アルビカンス (Candida albicans) IFO 1594株、キャンディダ アジマ (Candida azyma) JCM 1691株、キャンディダ インターメディア (Candida intermedia) IFO 0761株、キャンディダ ソラニ (Candida solani) IFO 0762株、キャンディダ ファマタ (Candida famata) RIFY 7455株(同菌株は IFO 0856株としても入手できる)、キャンディダ ギリエモンディ (Candida guilliermondii) IFO 0566株、キャンディダ パラプシロシス (Candida parapsilosis) CBS 0604株、キャンディダ ルゴサ (Candida rugosa) IFO 0591株、キャンディダ トロピカリス (Candida tropicalis) IFO 0618株、キャンディダ トロピカリス (Candida tropicalis) IFO 1404株、キャンディダ トロピカリス (Candida tropicalis) IFO 1647株及びキャンディダ モリシアナ (Candida molischiana) IFO 10296株；

フィロバシディウム カプサリゲナム (Filobasidium capsuligenum) IFO 1119株及びフィロバシディウム カプサリゲナム (Filobasidium capsuligenum) IFO 1185株；

オガタエア グリコザイマ (Ogataea glucozyma) IFO 1472株及びオガタエア ミヌタ 変種ノンファーメンタス (Ogataea minuta var nonfermentans) IFO 1473株；

シテロマイセス マトリテンシス (Citeromyces matritensis) IFO 0651株及びシテロマイセス マトリテンシス (Citeromyces matritensis) IFO 0954株；

ヤロウシア リポティカ (Yarrowia lipolytica) IFO 1209株；

ロドトルラ グルティニス変種ダイレネンシス (Rhodotorula glutinis var dairenensis) IFO 0415株、ロドトルラ グルティニス変種グルティニス (Rhodotorula glutinis var glutinis) IFO 0395株、ロドトルラ オウ

ランティアカ (*Rhodotorula aurantiaca*) I F O 0 7 5 4 株、ロドトルラ ム
シラギノサ (*Rhodotorula mucilaginosa*) I F O 0 0 0 3 株；

エキソフィアラ デルマティティチス (*Exophiala dermatitidis*) I F O 6
4 2 1 株及びエキソフィアラ デルマティティチス (*Exophiala dermatitidis*)
I F O 8 1 9 3 株；

トリゴノプシス バリアビリス (*Trigonopsis variabilis*) C B S 1 0 4 0
株及びトリゴノプシス バリアビリス (*Trigonopsis variabilis*) I F O 0 6
7 1 株；

シゾサッカロマイセス ポンベ (*Shizosaccharomyces pombe*) I F O 0 3 4
4 株及びシゾサッカロマイセス ポンベ (*Shizosaccharomyces pombe*) I F O 1
6 2 8 株；

ウィケルハミエラ ドメルキー (*Wickerhamiella domercqii*) I F O 1 8 5
7 株；

ピキア ピタソニー (*Pichia petersonii*) I F O 1 3 7 2 株及びピキア ア
ノマラ (*Pichia anomala*) I F O 0 1 1 8 株；

サッカロマイコプシス フィブリゲラ (*Saccharomycopsis fibuligera*) I F O
0 1 0 5 株及びサッカロマイコプシス クラタエゲンシス I F O 1 7 0 8 株
(*Saccharomycopsis crataegensis*)；

サイトエラ コンプリカタ (*Saitoella complicata*) I A M 1 2 9 6 3 株；

サッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) J C M 1 8 1
8 株、サッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) I F O 0 5
6 5 株及びサッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) I F O
0 3 0 5 株；

ロドスポリジウム トルロイデス (*Rhodospiridium toruloides*) I F O 0 5
5 9 株；

アシネトバクター カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) I F
O 1 2 5 5 2 株；

ブレビバクテリウム リネンス (*Brevibacterium linens*) J C M 1 3 2 8 株
及びブレビバクテリウム サッカロリティカム (*Brevibacterium sacchrolyticu*

m) A T C C 1 4 0 6 6 株 ;

セルロモナス ゲリダ(*Cellulomonas gelida*) J C M 1 4 8 9 株、セルロモナス フラビゲナ(*Cellulomonas flavigena*) J C M 1 4 9 0 株及びセルロモナス ウダ(*Cellulomonas uda*) J C M 1 4 9 2 株 ;

コリネバクテリウム アンモニアジェネス (*Corynebacterium ammoniagenes*) J C M 1 3 0 5 株、コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) J C M 1 3 0 7 株、コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) A T C C 1 2 8 1 3 株、コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) A T C C 1 3 0 3 2 株、コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) A T C C 1 3 8 2 6 株、コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) A T C C 1 4 0 6 7 株、コリネバクテリウム アセトアシドフィラム(*Corynebacterium acetoacidophilum*) A T C C 1 3 8 7 0 株、コリネバクテリウム ビタルミニス (*Corynebacterium vitaeruminis*) J C M 1 3 2 3 株及びコリネバクテリウム バリアビル (*Corynebacterium variabile*) J C M 2 1 5 4 株 ;

クルトバクテリウム フラカムファシエンス(*Curtobacterium flaccumfaciens*) A T C C 1 2 8 1 3 株が挙げられる。

上記微生物として好ましくは、メシニコウイア (*Metschnikowia*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、シテロマイセス(*Citeromyces*) 属、ロドトルラ(*Rhodotorula*)属、エキソフィアラ (*Exophiala*) 属、シゾサッカロマイセス(*Shizosaccharomyces*)属、ウィケルハミエラ (*Wickerhamiella*) 属、ピキア(*Pichia*)属、サッカロマイコプシス(*Saccharomycopsis*)属、サイトエラ(*Saitoella*)属、サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属、ロドスポリジウム(*Rhodospiridium*)属、ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属又はコリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属に属するものである。

また、上記メシニコウイア (*Metschnikowia*) 属に属する微生物として好ましくは、メシニコウイア プルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*)、及びメシニコウイア レウカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*) が挙げられる。

クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属に属する微生物として好ましくは、クリプトコッカス フラバス (*Cryptococcus flavus*)、クリプトコッカス フミコラス (*Cryptococcus humicolus*)、及びクリプトコッカス ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii*) が挙げられる。

キャンディダ (*Candida*) 属に属する微生物として好ましくは、キャンディダ インターメディア (*Candida intermedia*)、キャンディダ ソラニ (*Candida solani*)、キャンディダ ファマタ (*Candida famata*) 及びキャンディダ モリシアナ (*Candida molischiana*) が挙げられる。

フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属に属する微生物として好ましくは、フィロバシディウム カプサリゲナム (*Filobasidium capsuligenum*) が挙げられる。

オガタエア (*Ogataea*) 属に属する微生物として好ましくは、オガタエア グリコザイマ (*Ogataea glucozyma*) 及びオガタエア ミヌタ (*Ogataea minuta*) が挙げられる。

シテロマイセス (*Citeromyces*) 属に属する微生物として好ましくは、シテロマイセス マトリテンシス (*Citeromyces matritensis*) が挙げられる。

ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する微生物として好ましくは、ロドトルラ グルティニス (*Rhodotorula glutinis*)、ロドトルラ オウランティアカ (*Rhodotorula aurantiaca*) 及びロドトルラ ムシラギノサ (*Rhodotorula mucilaginosa*) が挙げられる。

エキソフィアラ (*Exophiala*) 属に属する微生物として好ましくは、エキソフィアラ デルマティティヂス (*Exophiala dermatitidis*) が挙げられる。

シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属に属する微生物として好ましくは、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Shizosaccharomyces pombe*) が挙げられる。

ウイケルハミエラ (*Wickerhamiella*) 属に属する微生物として好ましくは、ウイケルハミエラ ドメルキー (*Wickerhamiella domercqiae*) が挙げられる。

ピキア (*Pichia*) 属に属する微生物として好ましくは、ピキア ピタルソニ (*Pichia petersonii*) 及びピキア アノマラ (*Pichia anomala*) が挙げられる。

サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属に属する微生物として好ましくは、サッカロマイコプシス フィブリゲラ (*Saccharomycopsis fibuligera*) が挙げら

れる。

サイトエラ(*Saitoella*)属に属する微生物として好ましくは、サイトエラ コンプリカタ(*Saitoella complicata*)が挙げられる。

サッカロマイセス (*Saccharomyces*)属に属する微生物として好ましくは、サッカロマイセス セルビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)が挙げられる。

ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属に属する微生物として好ましくは、ロドスポリジウム トルロイデス (*Rhodospiridium toruloides*)が挙げられる。

ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属に属する微生物として好ましくは、ブレビバクテリウム サッカロリティカム(*Brevibacterium sacchrolyticum*)が挙げられる。

コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属に属する微生物として好ましくは、コリネバクテリウム アンモニアジェネス(*Corynebacterium ammoniagenes*)、コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム アセトアシドフィラム(*Corynebacterium acetoacidophilum*)及びコリネバクテリウム ビタルミニス (*Corynebacterium vitaeruminis*)等が挙げられる。

又、原料として、式 (I) で表される化合物を用いて式 (IV) で表される化合物を製造する場合には、その製造中間体として、式 (II') で表される化合物を経由する場合と、式 (III') で表される化合物を経由する場合がある。

ついで、式 (I) で表される化合物から、あらかじめ式 (II') で表される化合物及び式 (III') で表される化合物を製造し、それを単離してから、さらに式 (IV) で表される化合物へ誘導してもよいし、式 (II') で表される化合物及び式 (III') で表される化合物を単離することなく、そのまま式 (IV) で表される化合物を製造してもよい。

加えて、原料として、式 (I) で表される化合物を用いる場合には、1種の微生物を用いて式 (IV) で表される化合物を製造してもよいし、2種以上の微生物を組み合わせて製造してもよい。

原料として、式 (I) で表される化合物を用いる場合に特に好ましい微生物としては、

クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシ

ディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ヤロウシア (*Yarrowia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、エキソフィアラ (*Exophiala*) 属及びトリゴノプシス (*Trigonopsis*) 属に属する微生物であり、さらに好ましくはクリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属及びロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する微生物であり、最も好ましくはオガタエア (*Ogataea*) 属に属する微生物である。

原料として、式(II)で表される化合物を用いる場合に特に好ましい微生物としては、

メシニコウシア (*Metschnikowia*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、シテロマイセス (*Citeromyces*) 属、ヤロウシア (*Yarrowia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、エキソフィアラ (*Exophiala*) 属、トリゴノプシス (*Trigonopsis*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、ウイケルハミエラ (*Wickerhamiella*) 属、サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属及びクルトバクテリウム (*Curtobacterium*) 属に属する微生物である。

上記微生物のうちより好ましくはメシニコウシア (*Metschnikowia*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、シテロマイセス (*Citeromyces*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、ウイケルハミエラ (*Wickerhamiella*) 属、サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属又はコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属に属する微生物であり、さらに好ましくはメシニコウシア (*Metschnikowia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、シゾ

サッカロマイセス(*Shizosaccharomyces*)属、ウィケルハミエラ(*Wickerhamiella*)属、サッカロマイコプシス(*Saccharomycopsis*)属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、ロドスポリジウム(*Rhodospiridium*)属、ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属又はコリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属に属する微生物である。最も好ましくはメシニコウィア (*Metschnikowia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、シゾサッカロマイセス(*Shizosaccharomyces*)属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、ロドスポリジウム(*Rhodospiridium*)属、ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属及びコリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属に属する微生物である。

原料として、式(III)で表される化合物を用いる場合に特に好ましい微生物としては、

クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、ロドトルラ(*Rhodotorula*)属及びピキア (*Pichia*) 属に属する微生物であり、より好ましくは、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属及びロドトルラ(*Rhodotorula*)属に属する微生物である。

尚、上記微生物のうち、I F O 番号の付された微生物は (財) 発酵研究所 (I F O) 発行のインターネットカタログ (<http://www.ifo.or.jp>) に記載されており、該 I F O から入手することができる。

C B S 番号の付された微生物は The Centraalbureau voor Schimmelcultures (C B S) のインターネットカタログ (<http://www.cbs.knaw.nl>) に記載されており、該 C B S から入手することができる。

A T C C 番号の付された微生物は American Type Culture Collection (ATCC) のインターネットカタログ (<http://www.atcc.org>) に記載されており、該 A T C C から入手することができる。

I A M 番号の付された微生物は、IAM Culture Collection (IAM) のインターネットカタログ(<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/misyst/ColleBOX/IAMcollection.html>) に記載されており、該 IAM から入手することができる。

J C M 番号の付された微生物は Japan Collection of Microorganism (JCM) の

インターネットカタログ (<http://www.jcm.riken.go.jp>) に記載されており、該 JCM から入手することができる。

RIFY 番号の付された微生物は Research Institute of Fermentation, Yamaguchi Univ. Kofu Japan (RIFY) のカタログに記載されており、該 RIFY から入手することができる。

上記微生物は野生株だけでなく、UV照射やNTG処理等の通常の変異処理により得られる変異株を用いてもよい。

あるいは細胞融合もしくは遺伝子組換え法などの遺伝学的手法により誘導される組換え株などのいずれの株であってもよい。

また、組換え株の発現株としては、もとの菌株の他、大腸菌等のバクテリアや酵母などを用いてもよく、これらの組換え株も上記微生物という概念に含まれる。

本発明の製造方法においては、上記微生物の1種あるいは2種以上が、菌体及び／または菌体処理物として反応に供される。

具体的には、上記微生物を培養して得られた菌体をそのまま、あるいは培養して得られた菌体を公知の手法で処理したもの、即ち、アセトン処理したもの、凍結乾燥処理したもの、菌体を物理的または酵素的に破碎したもの等の菌体処理物を用いることができる。また、これらの菌体または菌体処理物から還元能力を有する酵素画分を粗製物あるいは精製物として取り出して用いることも可能である。さらには、このようにして得られた菌体、菌体処理物、酵素画分等を通常の固定化技術を用いて、すなわち、ポリアクリルアミド、カラギーナンゲル等の担体に固定化したもの等を用いることも可能である。そこで本明細書において、「菌体及び／または該菌体処理物」の用語は、上述の菌体、菌体処理物、酵素画分、及びそれらの固定化物全てを含有する概念として用いられる。

次に、本発明の製造方法について具体的に説明する。

本発明の製造方法において微生物は、通常、培養して用いられるが、この培養については定法通り行うことができる。本微生物の培養の為に用いられる培地には本微生物が資化する炭素源、窒素源、及び無機イオン等が含まれる。炭素源としては、グルコース、フルクトース、サッカロース等の炭水化物、グリセロール、マンニトール、キシリトール等のポリアルコール類、有機酸その他が適宜使

用される。窒素源としては、N Z アミン、トリプトース、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキス、大豆抽出物などの有機窒素源、あるいは硫酸アンモニウム塩、硝酸アンモニウム塩などの無機窒素源、その他などが適宜使用される。無機イオンとしては、リン酸イオン、マグネシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、モリブデンイオンその他が必要に応じ適宜使用される。更に、イノシトール、パントテン酸、ニコチン酸アミドその他のビタミン類を必要に応じ添加することは有効である。

培地中における上記炭素源、窒素源、無機イオン及びビタミンの量としては、菌株培養において一般的に用いられる範囲であれば特に限定されないが、炭素源及び窒素源は、それぞれ通常 0.001 ~ 50 wt %、好ましくは 0.1 ~ 5 wt % 添加される。無機イオンは、通常 0.0001 ~ 5 wt %、好ましくは 0.001 ~ 1 wt % 添加される。ビタミンは、通常 0.00001 ~ 10 wt %、好ましくは 0.001 ~ 1 wt % 添加される。

培養は、好氣的条件下で、pH 約 3 ~ 11、温度約 4 ~ 50 °C の適当な範囲に制御しつつ、1 ~ 100 時間行う。

反応方法としては、本微生物を培養し、それにより得られた菌体及び／または該菌体処理物を含有する水性媒体に式 (I) ~ (III) で表される化合物またはそれらの混合物を添加し、目的とする式 (IV) で表される化合物を得る方法、培地に式 (I) ~ (III) で表される化合物またはそれらの混合物を添加し微生物を培養しながら反応を行う方法、培養終了後、そのままの培地に、式 (I) ~ (III) で表される化合物またはそれらの混合物を添加して、引き続いて反応を行う方法、あるいは、式 (I) で表される化合物を上述のいずれかの方法に供し、ある程度反応が進んだところで、系内の式 (I) ~ (III) で表される化合物の含有量に応じ、別途培養した微生物を追添加する方法等を適宜用いることができる。

上記水性媒体としては、リン酸ナトリウムやリン酸カリウムなどを用いた緩衝液、及び、その緩衝液に有機溶媒や界面活性剤などを適宜加えたものを示す。

有機溶媒としては、ジメチルスルホキシド (DMSO) やテトラヒドロフラン (THF) 等の水溶性溶媒や酢酸ブチルやヘキサン等の非水溶性有機溶媒などが挙げられる。界面活性剤としては Tween 80 やシュガーエステルなどが挙げ

られる。

緩衝液の濃度としては1 M以下、好ましくは0.2 M以下の濃度で用いるのがよい。

反応は温度4～70℃、好ましくは15～50℃の範囲で行い、pHは2～9、好ましくは4～8の範囲で行う。

式(I)～(III)で表される化合物またはそれらの混合物の濃度としては、反応液に対して、0.0001～10 wt%、好ましくは0.001～5 wt%の範囲が望ましく、必要ならば、式(I)～(III)で表される化合物またはそれらの混合物は、反応の間、追補添加してもよい。

また、反応を促進するために補酵素、補酵素とその再生システム、あるいは炭素源を適宜添加してもよい。

補酵素としては、通常、 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Reduced Form(以下NADHと略す)あるいは β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Form(以下NADPHと略す)が挙げられる。添加量としては反応基質の100万分の1当量～10当量、好ましくは1万分の1当量～10当量である。

補酵素の再生システムとしては、蟻酸脱水素酵素等の β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide(以下NADと略す)をNADHに還元する能力を有する酵素とその酵素基質(蟻酸)の組み合わせやグルコース脱水素酵素等の β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate(以下NADPと略す)をNADPHに還元する能力を有する酵素とその酵素基質(グルコースなど)の組み合わせ等が挙げられる。補酵素を再生するこれらの酵素は市販のものでもよいし、補酵素の再生能力を有する微生物の菌体及び／または該菌体処理物でもかまわない。これらシステムの添加量は反応基質の量にあわせて適宜決定される。

上記反応を促進するための炭素源としては、反応に用いる菌体及び／または該菌体処理物が補酵素を再生するために利用しうる炭素源であればいずれでもかまわないが、例えばグルコース、フルクトース、サッカロース等の炭水化物、グリセロール、マンニトール、キシリトール等のポリアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。添加量としては0.0001～5.0 wt%、好ましくは0.0

1 ～ 10 wt % である。

上記の通り、反応は水性媒体を用いて行われるが、式 (I) ～ (III) で表される化合物は、水に対しての溶解度が低いため、有機溶媒や界面活性剤等にあらかじめ溶解あるいは懸濁して添加する事により反応系中に均一に分散させる方が好ましい。

上記製造方法で得られる式 (IV) で表される化合物は、通常、反応液から有機溶媒で抽出した後に、通常の精製方法、すなわちクロマトグラフィーや晶析技術を用いて不純物を除去することにより、精製された式 (IV) で表される化合物を得ることができる。具体的には、式 (IV) で表される化合物を有機溶媒などで可溶化した後に微生物などの固形分を遠心分離、フィルタープレス、限外濾過などの通常の分離装置により除去することで、式 (IV) で表される化合物を含有する液体を得る。得られた液体を通常の方法で、すなわちクロマトグラフィーや晶析技術を用いることで不純物を除去し、精製された式 (IV) で表される化合物を得ることができる。

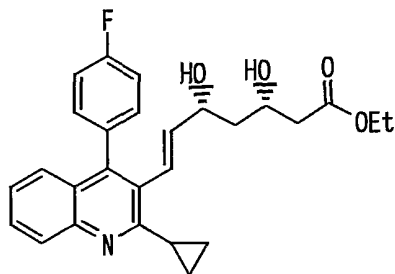
以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、その要旨を越えない限り本発明の技術分野における通常の変更をすることができる。

尚、(E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類 (以後、「DOLE」と略記する) は、目的とする 3R, 5S 体の他に異性体として、3S, 5R 体、3R, 5R 体及び 3S, 5S 体が存在し、その構造式は以下の通りである。

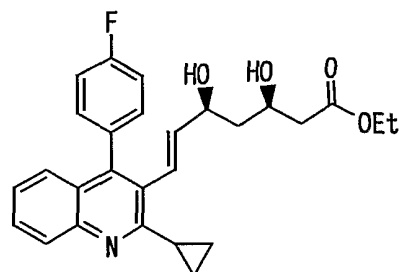
3S, 5R - DOLE 及び 3R, 5S - DOLE はシン (Syn) 体の DOLE であり、3S, 5S - DOLE 及び 3R, 5R - DOLE はアンチ (anti) 体の DOLE である。

実施例中、目的生成物である 3R, 5S 体の純度をジアステレオマー過剰率及びエナンチオマー過剰率で示すことがあるが、本明細書では、ジアステレオマー過剰率を $(\text{syn-DOLE} - \text{anti-DOLE}) / (\text{syn-DOLE} + \text{anti-DOLE})$ で、エナンチオマー過剰率を $(3R, 5S \text{ 体} - 3S, 5R \text{ 体}) / (3R, 5S \text{ 体} + 3S, 5R \text{ 体})$ で示した。

Syn-DOLE

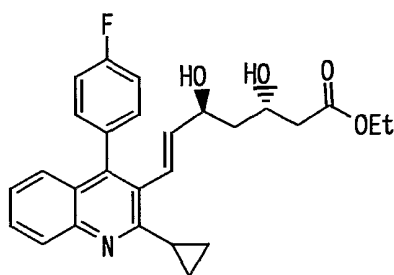


3S,5R-DOLE

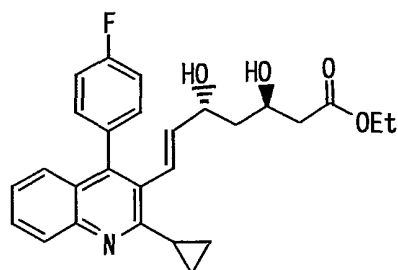


3R,5S-DOLE

anti-DOLE



3S,5S-DOLE



3R,5R-DOLE

製造例 1

(E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3 , 5 - ジオキソヘプト - 6 - エン酸エチルエステル (以後、D O X E と略す) の合成

攪拌機、滴下ロートおよび温度計を付けた 5 0 0 m L の四つ口フラスコに、
(E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 5 - ヒドロキシ - 3 - オキソヘプト - 6 - エン酸エチルエステル (以後、5 - M O L E と略す) 5 . 0 2 g (1 1 . 2 2 m m o l) およびアセトン 4 2 0 m L を加え攪拌する。調製された J o n e s 酸化剤 (濃硫酸 3 m L と酸化クロム 3 . 3 5 g を混合させた後、水で 2 5 m L まで希釈することにより得られた試剤) 1 0 . 5 m L を 0 ° C で 2 0 分を要して滴下し、氷冷下で 2 時間攪拌を行った後、メタノール 1 0 m L をゆっくり加えて反応を停止した。次に反応混合液を減圧下、アセトンを留去させた後、酢酸エチル 2 5 0 m L を加え、得られた

溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 60 mL で 2 回、引き続き飽和食塩水溶液 60 mL で 2 回抽出・分液した後、酢酸エチル溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した後、シリカゲルクロマトグラフィー（溶出溶媒；ヘキサン：酢酸エチル＝2：1）で精製して、標記化合物 3.03 g（収率：60.6%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.79-7.19(8H, m), 7.71(1H, d), 6.03(1H, d), 5.51(1H, s), 4.21(2H, q), 3.40(2H, s), 2.35-2.40(1H, m), 1.39-1.41 (2H, m), 1.28(3H, t), 1.07-1.09(2H, m).

製造例 2

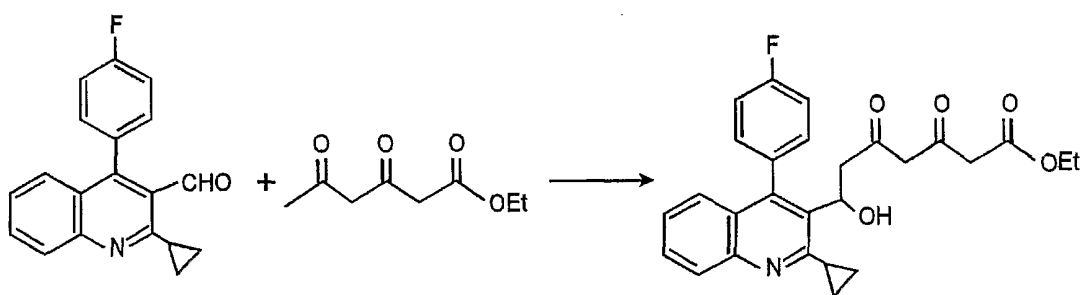
5 S - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 5 - ヒドロキシ - 3 - オキソヘプト - 6 - エン酸エチルエステル（以後、5 S - M O L E と略す）の合成

減圧下加熱乾燥した後に窒素ガスを導入したシュレンク管に、(S) - 2 - [N - (3, 5 - d i - t e r t - ブチルサリチリデン) アミノ] - 3 - メチル - 1 - ブタノール 0.87 g (3.3 mmol)、塩化メチレン 5 mL およびチタンテトラエトキシド 0.63 mL (6.0 mmol) を添加した後、室温で 1 時間攪拌混合した。該シュレンク管を -50 °C に冷却後、(E) - 3 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - プロプ - 2 - エン - 1 - アール 0.95 g (3.0 mmol) を塩化メチレン 2 mL に溶解して滴下し、5 分間攪拌した後、更にジケテン 0.51 g (6 mmol) を添加し、-50 °C を保ちながら 22 時間攪拌して反応させた。得られた反応混合液を、塩化メチレン 25 mL と 0.24 M 重曹水 25 mL の混合溶液中に添加し、2 時間、室温で激しく攪拌し 2 層溶液を得た。得られた 2 層溶液は分液し、水層については塩化メチレン 10 mL で抽出を 2 回行った。塩化メチレン層と塩化メチレン抽出液とを合わせて塩化メチレン溶液を得た。該塩化メチレン溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した後、シリカゲルクロマトグラフィー（溶出溶媒；ヘキサン：酢酸エチル＝3：2）で精製して、5 S - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 5 - ヒド

ロキシ-3-オキソヘプト-6-エン酸エチルエステル0.75 gを得た（光学純度：73% ee、(E)-3-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル]-プロプ-2-エン-1-オールに対する収率：56%）。

製造例 3

7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-イル]-7-ヒドロキシ-3,5-ジオキソヘプタン酸エチルエステルの合成



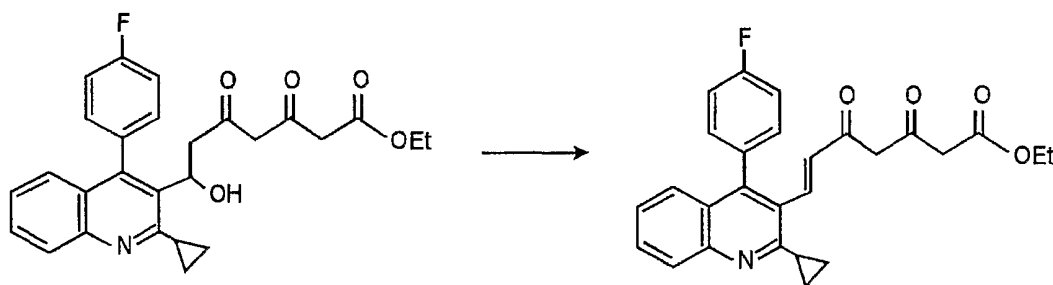
油状、60%水素化ナトリウム2.40 g、テトラヒドロフラン200 mlの混合溶液中に、内温を2℃以下に保ちながら3,5-ジオキソヘキサン酸エチルエステル10.3 g、テトラヒドロフラン40 mlの混合液を20分間で滴下した。-10℃にて50分間反応させた後、内温を-20~-15℃に保ちながらn-ブチルリチウム1.6 Mヘキサン溶液75 mlを40分間で滴下し、内温2℃以下で40分間反応させた。これに内温を-15℃以下に保ちながら、2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-カルボアルデヒド11.7 gとテトラヒドロフラン80 mlの混合液を40分間で滴下し、10℃以下で1時間反応させた。内温を5℃以下に保ちながら、反応系に酢酸14.4 ml、トルエン40 mlを加えた後、水100 ml、飽和食塩水100 mlにて順次洗浄した。溶媒を留去した後、得られた残査にヘキサン100 ml、酢酸エチル5 mlを加えて結晶化し、これを濾取、乾燥し、7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-イル]-7-ヒドロキシ-3,5-ジオキソヘプタン酸エチルエステル16.6 g（収率89%）を得た。

該化合物のNMRは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.11 (2H, m), 1.13 (1H, m), 1.27 (3H, t, $J=10$), 1.76 (1H, m), 2.40 (1H, m), 2.48 (2H, ABq, $J=66, 14$), 2.69 (2H, ABq, $J=52, 16$), 2.78 (1H, m), 3.30 (1H, m), 4.18 (2H, m), 5.25 (1H, d, $J=3$), 5.58 (1H, dd, $J=12, 4$), 7.16 - 7.26 (5H, m), 7.33 (1H, dd, $J=7, 7$), 7.61 (1H, dd, $J=7, 7$), 7.93 (1H, d, $J=7$)

製造例 4

DOXEの合成



製造例 3 で得た、7-〔2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-イル〕-7-ヒドロキシ-3,5-ジオキソヘプタン酸エチルエステル 20.0 g をトルエン 120 ml に溶解し、シリカゲル 10 g、無水硫酸マグネシウム 8 g を加え、95℃にて16時間反応させた。反応系のシリカゲルおよび無機塩を除去した後、溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィー（展開溶媒；ヘキサン：酢酸エチル＝2：1）にて精製し、(E)-7-〔2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-イル〕-3,5-ジオキソヘプト-6-エン酸エチルエステル (DOXE) を 8.4 g（収率 44%）を得た。

該化合物の NMR は以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.09 (2H, m), 1.28 (3H, t, $J=7$), 1.40 (2H, m), 2.38 (1H, m), 3.40 (2H, s), 4.20 (2H, q, $J=7$), 5.51 (1H, s), 6.02 (1H, d, $J=16$), 7.16 - 7.26 (4H, m), 7.30 - 7.40 (2H, m), 7.70 (1H, d, $J=16$), 7.63 (1H, m), 7.97 (1H, m)

製造例 5

DOXEの合成

製造例 3 で得た 7- [2-シクロプロピル-4- (4-フルオロフェニル) キノリン-3-イル]-7-ヒドロキシ-3, 5-ジオキソヘプタン酸エチルエステル 5. 0 g、トルエン 10 ml、無水 p-トルエンスルホン酸 0. 37 g の混合液を 110 °C にて 3 時間反応させた。反応系を重曹水にて洗浄した後、得られる有機層を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー（展開溶媒；ヘキサン：酢酸エチル＝2：1）にて精製し、(E)-7- [2-シクロプロピル-4- (4-フルオロフェニル) キノリン-3-イル]-3, 5-ジオキソヘプト-6-エン酸エチルエステル (DOXE) 3. 0 g（収率 63%）を得た。

製造例 6

DOXEの合成

製造例 3 で得た 7- [2-シクロプロピル-4- (4-フルオロフェニル) キノリン-3-イル]-7-ヒドロキシ-3, 5-ジオキソヘプタン酸エチルエステル 0. 50 g、トルエン 20 ml、無水 p-トルエンスルホン酸 0. 037 g の混合液を減圧条件下、内温 105 °C にて、反応で生成する水をトルエンとの共沸により留去しながら 1 時間反応させた。常圧に戻した後、反応系に水 0. 097 g を加えて 90 °C にて 10 分間反応させた後、再び減圧条件下、内温 105 °C にて、水を留去しながら 1 時間反応させた。反応系を高速液体クロマトグラフィーにて分析し (E)-7- [2-シクロプロピル-4- (4-フルオロフェニル) キノリン-3-イル]-3, 5-ジオキソヘプト-6-エン酸エチルエステル (DOXE) 0. 37 g（収率 78%）相当が生成していることを確認した。

製造例 7

DOXEの合成

製造例 3 で得た 7- [2-シクロプロピル-4- (4-フルオロフェニル) キノリン-3-イル]-7-ヒドロキシ-3, 5-ジオキソヘプタン酸エチルエステル 0. 2 g、酢酸ビニル 2 ml の混合液に硫酸 0. 01 g を加え、加熱還流に

て5時間反応させた。反応系を酢酸エチルで希釈した後、重曹水で水洗し、得られる有機層を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー（展開溶媒；ヘキサン：酢酸エチル＝2：1）にて精製し、(E)－7－[2－シクロプロピル－4－(4－フルオロフェニル)キノリン－3－イル]－3，5－ジオキソヘプト－6－エン酸エチルエステル(D O X E) 0.14 g（収率73%）を得た。

製造例 8

D O X Eの合成

製造例3で得た7－[2－シクロプロピル－4－(4－フルオロフェニル)キノリン－3－イル]－7－ヒドロキシ－3，5－ジオキソヘプタン酸エチルエステル2.0 g、酢酸10 ml、無水酢酸0.66 g、N，N－ジメチル－4－アミノピリジン0.01 gの混合液を90℃にて4時間反応させた。反応系を酢酸エチルで希釈し、水、重曹水にて洗浄した後、得られる有機層を濃縮し、得られた残査をヘキサンにて結晶化し、(E)－7－[2－シクロプロピル－4－(4－フルオロフェニル)キノリン－3－イル]－3，5－ジオキソヘプト－6－エン酸エチルエステル(D O X E) 1.55 g（収率80%）を得た。

製造例 9

D O X Eの合成

製造例3で得た7－[2－シクロプロピル－4－(4－フルオロフェニル)キノリン－3－イル]－7－ヒドロキシ－3，5－ジオキソヘプタン酸エチルエステル0.250 gを、4モル/L塩酸／酢酸エチル溶液5 mlに溶解し、20℃にて12時間攪拌を続行した。反応系を高速液体クロマトグラフィーで分析し、(E)－7－[2－シクロプロピル－4－(4－フルオロフェニル)キノリン－3－イル]－3，5－ジオキソヘプト－6－エン酸エチルエステル(D O X E) 0.198 g（収率82%）相当が生成している事を確認した。

製造例 10

D O X Eの塩酸塩の合成

油状、60%水素化ナトリウム1.37 g、テトラヒドロフラン10 mlの混合溶液中に、内温を20℃に保ちながら3,5-ジオキソヘキサン酸エチルエステル2.36 g、テトラヒドロフラン10 mlの混合液を5分間かけて滴下した。その温度で1時間攪拌の後、2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-カルボアルデヒド2.01 gとテトラヒドロフラン20 mlの混合液を20分間かけて滴下した。4時間攪拌の後、酢酸3.09 gと水20 mlの中に反応液を添加して反応を停止した。酢酸エチル40 mlで抽出し、有機相を飽和食塩水20 mlにて洗浄し、無水硫酸ナトリウム2 gで乾燥した。得られた有機相を分析すると、目的物である(E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-イル]-3,5-ジオキソヘプト-6-エン酸エチルエステル(DOXE)2.52 g(収率82%)が得られた。

溶媒を留去した後、得られた残査に室温にて4モル/L塩酸・酢酸エチル溶液1.7 mlを添加した。結晶が生成した後、温度を5℃まで冷却して、これを濾取、乾燥し、(E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-イル]-3,5-ジオキソヘプト-6-エン酸エチルエステルの塩酸塩2.49 g(収率75%)が得られた。

実施例1

DOXEからのDOLEの製造

イーストエキス(Difco社製)5 g/L、ポリペプトン(日本製薬社製)5 g/L、麦芽エキス(Difco社製)3 g/L、グルコース(日本食品加工社製)20 g/Lの組成からなる液体培地2.5 mLに、表1に示した各種の菌株を接種し、30℃で21時間好氣的に培養した。得られた培養液を1 mLずつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に化合物(I)(式中、R=エチル基の化合物:DOXE)を含む反応液を0.25 mL加え、30℃で20時間好氣的に反応させた。

尚、上記反応液の組成は、DOXEを0.3 g/L、グルコース(日本食品加工社製)20 g/L、ジメチルスルホキシド(DMSO)(キシダ化学社製)20 mL/L、100 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)である。

反応終了後、反応液に酢酸エチルを 0.5 mL 加え激しく混合し、遠心分離にて有機層と水層とに分離した。有機層を別の容器に移し、溶媒を濃縮遠心機で留去し、乾固された生成物を酢酸エチル 0.01 mL で溶解し、薄層クロマトグラフィー (TLC) をおこなった。TLC はシリカゲルプレート (メルク社製 silica gel 60 F₂₅₄) を用い、展開溶媒はヘキサン/酢酸エチル = 1/1 を用いた。

展開終了後、UV ランプにて生成物の確認をした。化合物 (I) は R_f = 0.76 ~ 0.86、化合物 (II) および化合物 (III) は 0.54 ~ 0.61、化合物 (IV) (式中、R = エチル基の化合物: DOLE) は R_f = 0.33 である。DOLE の TLC 上のスポットを掻き取りイソプロパノール 0.25 mL で溶出し、遠心分離後上清を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて光学純度および TLC 掻き取りサンプルの濃度を分析した。

HPLC の条件は以下の通りである。

カラム: CHIRALCEL AD (ダイセル化学工業株式会社製)

溶離液: ヘキサン/エタノール = 9/1

流速: 0.5 mL/min

検出: UV 254 nm

温度: 室温

結果を表 1 に示す。

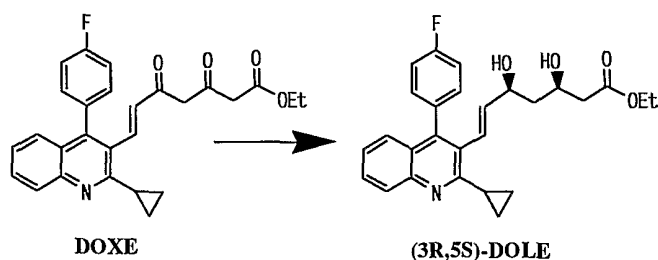


表 1

使用微生物	TLC 掻き取りサンプルの濃度 (ジアステロマー過剰率、エナンチオマー過剰率)
キャンディダ ファマタ変種ファマタ RIFY 7455	7.1mg/L (97.1%d.e., 100.0%e.e.)
クリプトコッカス ロウレンティ IFO 0609	0.4mg/L (100.0%d.e., 100.0%e.e.)
フィロバシディウム カブサリゲナム IFO 1185	2.7mg/L (100.0%d.e., 100.0%e.e.)
オガタエア ミヌタ変種ノンファーメンタス IFO1473	7.4mg/L (92.0%d.e., 100.0%e.e.)

実施例 2

DOXEからのDOLEの製造

実施例 1 と同組成の液体培地 2.5 mL に、オガタエア ミヌタ変種ノンファーマメンタス IF01473 を接種し、27℃で24時間と48時間とそれぞれ時間を変えて好氣的に培養した。得られた培養液を1 mL づつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mL を加え完全に懸濁後、50% (w/v) のグルコース溶液を20 μ l、5 g/L のDOXE (DMSO 溶液) を50 μ l 添加し、よく攪拌後、27℃で20時間反応させた。

反応終了後、実施例 1 と同様に酢酸エチル抽出およびTLCを行い、DOLEのTLCのスポットを掻き取りイソプロパノール200 μ l で溶出し、遠心分離後、上清を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて光学純度およびDOLEの生成量を分析した。

HPLCの条件は以下の通りである。

カラム：CHIRALCEL AD (ダイセル化学工業株式会社製)

溶離液：ヘキサン／エタノール＝95／5

流速：1 mL/min

検出：UV 254 nm

温度：室温

結果を表 2 に示す。

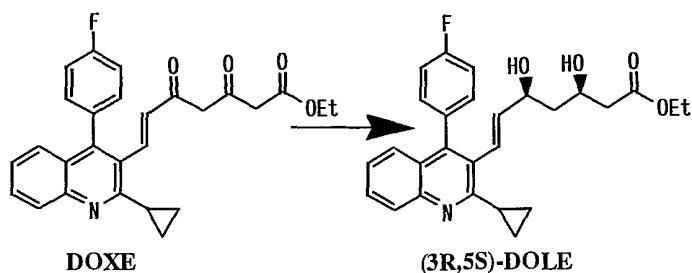


表 2

培養時間	T L C 掻き取りサンプルの濃度 (シ'アステロマ-過剰率、エナンチマ-過剰率)
2 4 時間	113.3mg/L (97.4%d.e.、100.0%e.e.)
4 8 時間	72.8mg/L (100.0%d.e.、100.0%e.e.)

また、上記 T L C を行った際に、5-M O L E もしくは 3-M O L E に相当する R f のスポットがあったので、2 4 時間培養のものについてのみ同様に掻き取り、高速液体クロマトグラフィー (H P L C) を用いて生成量の分析を行った。

H P L C の条件は以下の通りである。

カラム : M C I G E L C H P 2 M G M (4 . 6 x 1 5 0 m m) (三菱化学社製)

溶離液 : メタノール / アセトニトリル / 水 / リン酸 = 8 0 0 / 1 0 0 / 1 0 0 / 0 . 5

流速 : 0 . 6 m l / m i n

検出 : U V 2 5 4 n m

温度 : 6 0 ° C

本 H P L C 条件では 5-M O L E はリテンションタイムは 4 . 7 3 であり、3-M O L E は 5 . 4 7 であったところ、5-M O L E の上記 T L C 掻き取りサンプル濃度は、2 5 . 2 m g / L であり、3-M O L E のサンプル濃度は 2 . 2 m g / L であった。

ちなみに、上記分析条件における D O L E のリテンションタイムは 4 . 0 2 であり、D O X E は 8 . 0 2 である。

実施例 3

D O X E からの M O L E の製造

実施例 1 と同組成の液体培地 2 . 5 m L に、ロドトルラ オウランティアカ I F 0 0 7 5 4 及びロドトルラ グルティニス変種ダイレネンシス I F 0 0 4 1 5 をそれぞれ接種して、2 7 ° C で、ロドトルラ オウランティアカは 2 4 時間、ロドトルラ

グルティニス変種ダイレネンシスは 4 8 時間、それぞれ好氣的に培養した。それぞれ得られた培養液を 1 m l づつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に

100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 ml を加え完全に懸濁後、50% (w/v) のグルコース溶液を 20 μ l、2 g/L の NADP と NAD 混合液を 20 μ l、10 g/L の DOXE (DMSO 溶液) を 30 μ l 添加し、よく攪拌後、27 °C で 12 時間好氣的に反応させた。

反応終了後、実施例 1 と同様に酢酸エチル抽出及び TLC を行い、5-MOLE もしくは 3-MOLE に相当する R_f のスポット部分と DOLE に相当する R_f のスポット部分とをそれぞれ掻き取った。

その後、DOLE については、

カラム：CHIRALCEL AD (ダイセル化学工業株式会社製)

溶離液：ヘキサン/エタノール = 95/5

流速：1 ml/min

検出：UV 254 nm

温度：室温

の条件で、MOLE については、

カラム：MCIGEL CHP 2 MGM (4.6 x 150 mm) (三菱化学社製)

溶離液：メタノール/アセトニトリル/水/リン酸 = 800/100/100/0.5

流速：0.6 ml/min

検出：UV 254 nm

温度：60 °C

の条件でそれぞれ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析を行った。

結果を表 3 に示す。

表 3

使用微生物	TLC 掻き取りサンプルの濃度 (各 mg/L)		
	5-MOLE	3-MOLE	DOLE
ロドトルラ グルティニス変種ダイレネンシス IFO 0415	44.9	2.2	2.9 (100%de、100%ee)
ロドトルラ オウランティアカ IFO 0754	118.9	N.D.	15.3 (98.7%de、100%ee)

実施例 4

DOXEからの3-MOLEの製造

実施例1と同組成の液体培地2.5 mLに、キャンディダ インターメディア IF0 0761 を接種して、27℃で24時間培養後、実施例2と同様の操作でDOXEと反応させ、反応後同様に酢酸エチル抽出及びTLCを行い、スポットのHPLC分析を行ったところ、3-MOLEのTLC掻き取りサンプルの濃度は156.9mg/Lであった。

実施例5

DOXEからの3-MOLEの製造

実施例1と同組成の液体培地2 Lに、フィロバシディウム カプサリゲナム (*Filobasidium capsuligenum*) IFO 1185株を接種し、30℃で21時間好氣的に培養した。得られた培養液を遠心分離し、菌体を集めた。10% (w/v) の菌体懸濁液を10 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7) を用いて作製し、この懸濁液12 mLを30 φの試験管6本に取り、それぞれに10% (w/v) のDOXE (DMSO溶液) 0.1 mLおよび50% (w/v) のグルコース溶液0.15 mLを加え、30℃で20時間好氣的に反応させた。

反応終了後、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。抽出物は、実施例1と同条件でTLCを行い、化合物(III)を含む部分を掻き取り、掻き取ったシリカゲルから酢酸エチルにて抽出し、サンプルを¹H-NMRにて分析した。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.02 (dt, J = 6.4, 3.2 Hz, 2H)、1.21 (t, J = 7.2 Hz, 3H)、1.33 (dt, J = 6.4, 3.2 Hz, 2H)、2.26 (m, 1H)、2.43 (d, J = 6.4 Hz, 2H)、2.60–2.66 (dd, J = 6.4, 6.4 Hz, 2H)、3.37 (m, 1H)、4.11 (q, J = 6.8 Hz, 2H)、4.34–4.41 (m, 1H)、6.27 (d, J = 16.8 Hz, 1H)、7.06–7.36 (m, 6H)、7.52–7.62 (m, 1H)、7.60 (d, J = 16.8 Hz, 1H)、7.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H)

この結果から3-MOLEが生成したことが確認された。

さらに、以下の条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて光学

純度を分析したところ、化合物 (III') が光学純度は 87.3% ee で得られたことがわかった。

なお、本例における HPLC の条件は以下の通りである。

カラム : CHIRALCEL AD (ダイセル化学工業株式会社製)

溶離液 : ヘキサン/エタノール/トリフルオロ酢酸 = 900/100/1

流速 : 1 ml/min

検出 : UV 254 nm

温度 : 室温

実施例 6

DOXE からの DOLE 及び 3R-MOLE の製造

実施例 1 と同組成の液体培地が 50 mL 入った 500 mL フラスコを 120 °C で 20 分滅菌した。このフラスコ 8 本に、オガタエア ミヌタ変種ノンファーマンタス IF01473 を接種し、28 °C で 24 時間好氣的に培養した。得られた培養液をイーストエキス (Difco 社製) 10 g/L、ポリペプトン (日本製薬社製) 10 g/L、麦芽エキス (Difco 社製) 6 g/L、グルコース (日本食品加工社製) (別殺菌) 20 g/L の組成からなる液体培地 20 L が入った 30 L ジャーファーマンター 2 台に 4 本分ずつ植菌し、28 °C で 24 時間培養した。培養後、培養液を遠心分離し、菌体を集めた。

この菌体を 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 9 L に加え完全に懸濁後、3 等分し、それぞれ 5 L ジャーファーマンターに入れた。各ファーマンターにグルコース (日本食品加工社製) を 53 g、NADPH (オリエンタル酵母社製) を 2 g、1.66 g の DOXE を 130 mL の DMSO に溶かした溶液を添加し、40 °C で 6 時間好氣的に反応させた。NADPH はさらに 2 g ずつ、反応 1 時間後に再添加した。反応後、各ファーマンターの反応液を一部取り、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて生成量を分析したところ DOLE は全部で 3.43 g 生成されていた。(収率 71%)

反応液をそれぞれ遠心分離し、沈殿物を集めた。沈殿物に各 600 mL のアセトニトリルを添加し、十分に攪拌後、遠心を行い上清と沈殿に分け、沈殿側には

さらに200mlのアセトニトリル200mlで再懸濁と遠心を行った。上清をすべてあわせてエバポレーターにて濃縮を行い、濃縮後、酢酸エチル600mlを加え溶解後水50mlで2回洗浄した。

酢酸エチル層を濃縮し、シリカゲルクロマトによる精製を行った。シリカゲル400ml分をカラムに入れ、ヘキサン：酢酸エチル＝2：1の液で予め平衡化しておいた。濃縮されたサンプルをアプライしヘキサン：酢酸エチル＝2：1の展開溶媒を2L流した後、ヘキサン：酢酸エチル＝3：2に展開溶媒を変更しさらに2L流しながら溶出させた。

溶出された液は200mlずつの画分とし(全20)、各画分をTLCで確認した。DOLEが検出された画分を集め濃縮したところ3.4gのオイル状のDOLEが得られ、純度換算したところ2.5gのDOLEが得られた。

光学純度を上記実施例2に記載の条件でHPLC分析した所、面積比で3S, 5R体：3R, 5R体：3R, 5S体：3S, 5S体＝0.3：0.2：98.9：0.6であった。(98.4%de、99.4%ee)

一方、カラム精製の画分で3-MOLEが主成分として検出された所を集めたところ、1.5gのオイル状のものが得られたので、再度シリカゲルカラムにかけ、再精製したところ、0.7gの3R-MOLEが得られた。

光学純度を実施例2と同様に分析したところ98%eeであった。

実施例7

5-MOLEからのDOLEの製造

表4に示した各種の菌株を用い、反応基質としてDOXEの代わりにR-5MOLEとS-5MOLEが1：1の比で含まれる5-MOLEを用いた以外は実施例1と同様の操作で反応を行った。

ここで、生成物のDOLEのうち、3S, 5R体及び3R, 5R体は5R-MOLEから生成され、3R, 5S体及び3S, 5S体は5S-MOLEから生成される。

反応終了後、実施例1と同様に酢酸エチル抽出及びTLCを行った後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて光学純度および生成量の分析を行っ

た。

結果を表 4 に示す。

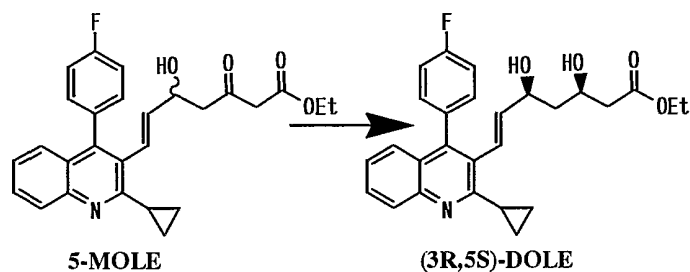


表 4

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (各 mg/L)				5S-MOLE からの 3 位 不斉還元 選択率	エナンチオマー 過剰率 (ee%)
	3s,5r 体	3r,5r 体	3r,5s 体	3s,5s 体		
サッカロマイコプシス フィブリゲラ IFO 0105	0.1,	8.0,	25.8,	1.7	87.6%	99.6%
ウィケルハミエラ ドメルキー IFO 1857	0.2,	16.7,	16.0,	1.4	83.9%	97.3%
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレン ティ CBS 5539	0.1,	3.1,	6.8,	0.6	83.0%	97.5%
メシニコウィア プルケリマ IFO 10796	0.7,	6.6,	15.3,	1.9	78.3%	91.3%
メシニコウィア プルケリマ IFO 1407	0.2,	5.6,	12.1,	1.6	76.7%	97.5%
オガタエア ミヌタ変種ノンファーメンタス IFO 1473	0.2,	10.1,	15.9,	2.1	76.4%	98.1%
エキソフィアラ デルマティティヂス IFO 8193	1.5,	8.0,	16.4,	3.0	68.9%	83.4%
フィロバシディウム カブサリゲナム IFO 1185	N.D.,	12.2,	15.3,	3.5	62.6%	100.0%
ロドトルラ グルティニス変種グルティニス IFO 0395	N.D.,	7.0,	7.9,	1.9	61.2%	100.0%
キャンディダ ファマタ変種ファマタ IFO 0856	N.D.,	8.1,	11.0,	2.8	60.0%	100.0%
ピキア ピタルソニ IFO 1372	0.1,	1.0,	3.3,	0.8	59.2%	92.3%
サッカロマイセス セルビシエ IFO 0565	N.D.,	1.0,	2.0,	0.6	55.5%	100.0%

実施例 8

5-MOLE からの DOLE の製造

イーストエキス (Difco 社製) 10 g/L、ポリペプトン (日本製薬社製) 8 g/L、大豆エキス ハイニユート SMS (不二製油社製) 7 g/L、グルコ

ース（日本食品加工社製）5 g/L、グリセロール（キシダ化学社製）10 g/L、リン酸一カリウム（和光純薬社製）1 g/L、リン酸二カリウム（和光純薬社製）3 g/L、硫酸マグネシウム（キシダ化学社製）0.5 g/L、塩化マンガン（和光純薬社製）10 mg/Lの組成からなる液体培地2.5 mLに、表5に示した各種の菌株を接種し、30℃で24時間好氣的に培養した。得られた培養液を1 mLづつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に100 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）0.2 mLを加え完全に懸濁後、50%（w/v）のグルコース溶液を10 μ l、2 g/LのNADP（オリエンタル酵母社製）とNAD（オリエンタル酵母社製）の混合液を10 μ l、R-5 MOLEとS-5 MOLEが1:1の比で含まれる5-MOLEの5 g/L DMSO溶液を10 μ l添加し、よく攪拌後、30℃で20時間好氣的に反応させた。

反応終了後、実施例1と同様に酢酸エチル抽出及びTLCを行った。DOLEのTLCのスポットを掻き取りイソプロパノール200 μ lで溶出し、遠心分離後上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて光学純度および生成量を分析した。

HPLCの条件は以下の通りである。

カラム：CHIRALCEL AD（ダイセル化学工業株式会社製）

溶離液：ヘキサン／エタノール＝95／5

流速：1 mL/min

検出：UV 254 nm

温度：室温

結果を表5に示す。

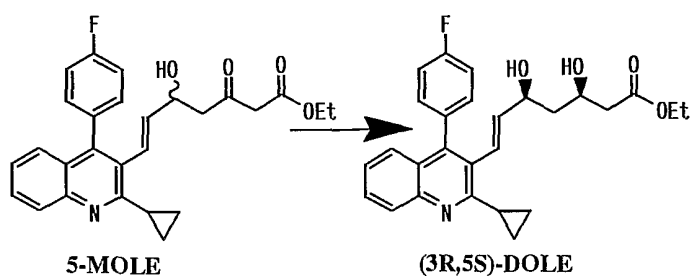


表 5

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度(各 mg/L)				5S-MOLE か らの 3 位不斉 還元選択率	エナンチオマ- 過剰率 (ee%)
	3s,5r 体	3r,5r 体	3r,5s 体	3s,5s 体		
コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 14067	N.D.,	95.7,	54.1,	N.D.	100.0%	100.0%
コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13826	N.D.,	112.1,	22.1,	N.D.	100.0%	100.0%
コリネバクテリウム アンモニアジェネ ス JCM 1305	N.D.,	119.9,	72.8,	N.D.	100.0%	100.0%
コリネバクテリウム グルタミカム JCM 1307	N.D.,	107.7,	71.7,	N.D.	100.0%	100.0%
ブレバクテリウム サッカロリティカ ム ATCC 14066	N.D.,	105.2,	78.5,	N.D.	100.0%	100.0%
コリネバクテリウム アセトアシドフィラ ム ATCC 13870	0.5,	73.8,	42.8,	N.D.	100.0%	97.7%
コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13032	N.D.,	75.9,	56.3,	N.D.	100.0%	100.0%
コリネバクテリウム ビタルミニス JCM 1323	0.4,	140.4,	132.0,	N.D.	100.0%	99.4%

実施例 9

5-MOLE からの DOLE の製造

実施例 1 と同組成の液体培地 2.5 mL に、表 6 に示した各種の菌株を接種し、27℃で48時間好氣的に培養した。得られた培養液を1mlづつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)0.2mlを加え完全に懸濁後、50%(w/v)のグルコース溶液を20μl、R-5MOLEとS-5MOLEが1:1の比で含まれる5-MOLEの5g/L DMSO溶液を50μl添加し、よく攪拌後、27℃で20時間反応させた。

反応終了後、実施例 8 と同様に酢酸エチル抽出及びTLCを行った後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて光学純度および生成量の分析を行った。

結果を表 6 に示す。

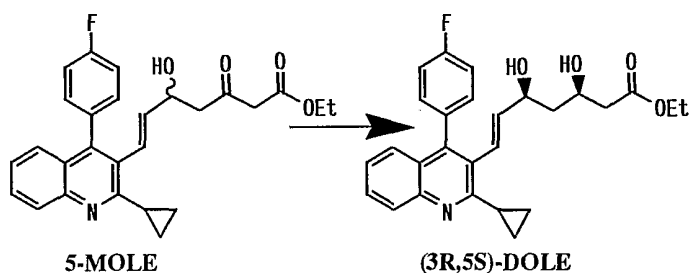


表 6

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度(各 mg/L)				5S-MOLE か らの 3 位不斉 還元選択率	エナンチオマー 過剰率 (ee%)
	3s,5r 体	3r,5r 体	3r,5s 体	3s,5s 体		
キャンディダ インターメディア IFO 0761	N.D.,	137.8,	50.4,	N.D.	100.0%	100.0%
シテロマイセス マトリテンシス IFO 0954	N.D.,	4.7,	9.9,	N.D.	100.0%	100.0%
ロドトルラ オウランディアカ IFO 0754	N.D.,	137.8,	50.4,	N.D.	100.0%	100.0%
サイトエラ コンプリカタ IAM 12963	0.1,	3.7,	23.2,	N.D.	100.0%	99.1%
メシニコウィア プルケリマ IFO 0863	1.4,	47.9,	100.6,	N.D.	100.0%	97.3%
メシニコウィア プルケリマ IFO 10796	2.2,	61.7,	92.3,	N.D.	100.0%	95.3%
ウイケルハミエラ ドメルキー IFO 1857	1.2,	83.7,	47.6,	N.D.	100.0%	95.1%
メシニコウィア レウカウフィ IFO 10798	N.D.,	43.9,	79.1,	0.2	99.5%	100.0%
サッカロマイコプシス フィブリゲラ IFO 0105	2.0,	86.9,	89.1,	0.3	99.3%	95.6%
オガタエア グリコザイマ IFO1472	0.5,	169.6,	221.1,	1.4	98.7%	99.5%
メシニコウィア プルケリマ IFO 1407	N.D.,	37.4,	75.3,	0.5	98.7%	100.0%
オガタエア ミヌタ変種ノンファーメン タス IFO1473	N.D.,	80.1,	80.9,	0.7	98.3%	100.0%
ロドトルラ グルティニス変種ダイレ ネンシス IFO 0415	0.3,	157.3,	50.7,	2.0	92.4%	98.8%
ピキア ピタルソニ IFO 1372	N.D.,	8.9,	16.4,	4.8	54.7%	100.0%

実施例 10

5-MOLEからのDOLEの製造

酵母エキス (D I f c o 社製) 10 g/L、ニュートリエントブロス (D I f c o 社製) 5 g/L、大豆エキス ハイニュートSMS (不二製油社製) 3 g/L

L、グルコース（日本食品加工社製）15 g/Lの組成からなる液体培地2 mLに、表7に示した各種の菌株を接種し、30℃で24時間好氣的に培養した。得られた培養液を1 mLづつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に反応基質としてDOXEの代わりにR-5MOLEとS-5MOLEが1:1の比で含まれる5-MOLEを用いた以外は実施例1と同様の操作で反応を行った。

反応終了後、実施例1と同様に酢酸エチル抽出及びTLCを行った後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて光学純度および生成量の分析を行った。結果を表7に示す。

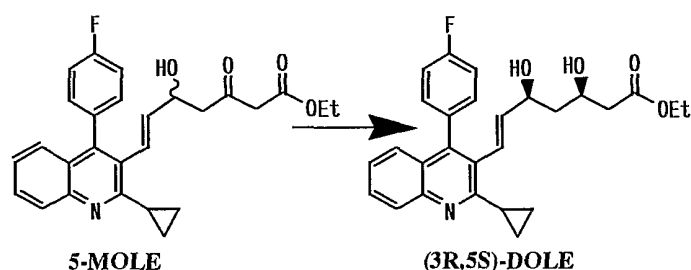


表7

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度(各 mg/L)				5S-MOLE か 元の3位不斉 還元選択率	エナンチオマー 過剰率 (ee%)
	3s,5r 体	3r,5r 体	3r,5s 体	3s,5s 体		
アシネトバクター カルコアセティカス IFO 12552	3.0	6.6	63.8	26.6	41.2%	91.0%
クルトバクテリウム フラカミファシエンス ATCC 12813	0.3	30.3	60.5	8.8	74.6%	99.0%
セルロモナス フラビゲナ JCM 1489	0.2	46.2	43.2	10.4	61.2%	99.1%
セルロモナス ゲリダ JCM 1490	0.2	51.1	38.2	10.5	56.9%	99.0%
セルロモナス ウダ JCM 1492	1.0	37.1	53.1	8.8	71.6%	96.3%

実施例 1.1

5S-MOLEからのDOLEの製造

表8に示した各種の菌株を実施例1と同様に培養を行い、得られた培養液を1 mLづつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体にグルコース（日本食品加工社製）を5 g/L、NADP（オリエンタル酵母社製）を60 μg/L、グルコースデヒドロゲナーゼ（アマノ製薬社製：73 unit/mg）を20 μg/L含む10

0 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を 0.25 ml 加え、よく懸濁した。

この懸濁液に製造例 2 で得られた光学純度が 73.0 % ee の 5S-MOLE を 10 g/L 含む DMSO を 10 μ l 添加し、30 °C で 20 時間好氣的に反応させた。

反応終了後、実施例 1 と同様に酢酸エチル抽出及び TLC を行った後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて光学純度および生成量の分析を行った。

結果を表 8 に示す。

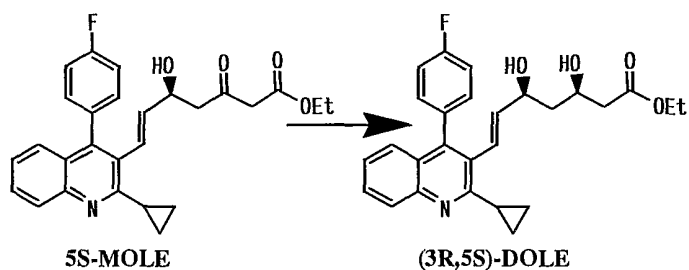


表 8

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (ジアステレオマー過剰率、エナンチオマー過剰率)		5S-MOLE からの3位不 斉還元選択率
サイトエラ コンプリカタ IAM 12963	13.28mg/L	(96.1% de、 96.6% ee)	100.0%
キャンディダ ソラニ IFO 0762	18.00mg/L	(94.7% de、 93.3% ee)	100.0%
メシニコウィア プルケリマ IAM 12197	38.53mg/L	(90.5% de、 97.8% ee)	100.0%
シゾサッカロマイセス ポンベ IFO 0344	26.93mg/L	(88.3% de、 93.3% ee)	96.6%
メシニコウィア プルケリマ IFO 10796	12.62mg/L	(87.6% de、 97.2% ee)	100.0%
オガタエア グリコザイマ IFO 1472	87.69mg/L	(84.7% de、 98.4% ee)	100.0%
オガタエア ミヌタ変種ノンファーメンタス IFO1473	77.02mg/L	(79.4% de、 98.2% ee)	100.0%
サッカロマイセス セルビシエ IFO 0565	1.67mg/L	(81.8% de、 78.4% ee)	100.0%
サッカロマイセス セルビシエ JCM 1818	1.87mg/L	(77.0% de、 70.4% ee)	100.0%
メシニコウィア ビクスピダタ IFO 1408	11.76mg/L	(74.5% de、 94.3% ee)	100.0%
シゾサッカロマイセス ポンベ IFO 1628	12.32mg/L	(74.1% de、 96.4% ee)	96.4%
キャンディダ モリシアナ IFO 10296	36.72mg/L	(73.3% de、 94.7% ee)	93.4%
ロドスポリディウム トロロイデス IFO 0559	20.27mg/L	(67.7% de、 95.7% ee)	100.0%
キャンディダ ファマタ変種ファマタ IFO 0856	114.54mg/L	(64.0% de、 98.2% ee)	93.0%
フィロバシディウム カブサリゲナム IFO 1185	116.20mg/L	(61.2% de、 98.6% ee)	94.4%
シテロマイセス マトリテンシス IFO 0954	6.02mg/L	(59.0% de、 82.0% ee)	82.6%
クリプトコッカス フミコラス IFO 10250	5.02mg/L	(58.9% de、 97.8% ee)	100.0%
ヤロウィア リポティカム IFO 1209	0.90mg/L	(50.9% de、 56.6% ee)	100.0%
キャンディダ インターメディア IFO 0761	84.19mg/L	(49.4% de、 98.4% ee)	89.7%
トリゴノプシス バリアビリス CBS 1040	7.89mg/L	(23.9% de、 91.9% ee)	84.6%

実施例 1 2

3 R-MOLEからのDOLEの製造

実施例 1 と同組成の液体培地 2.5 mL に、表 9 に示した各種の菌株を接種し、27℃で48時間好氣的に培養した。得られた培養液を1 mL づつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mL を加え完全に懸濁後、2 g/L の NADP (オリエンタル酵母社製) と NAD (オリエンタル酵母社製) を 10 μ l、25 ユニット/mL のグルコースデヒドロゲナーゼ (天野製薬社製) を 10 μ l、50% (w/v) のグルコース溶液を 10 μ l、実施例 6 で得られた 3 R-MOLE の 5 g/L DMSO 溶液を 20 μ l 添加し、よく攪拌後、27℃で20時間反応させた。

反応終了後、実施例 8 と同様に酢酸エチル抽出及び TLC を行い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて光学純度および生成量の分析を行った。

結果を表 9 に示す。

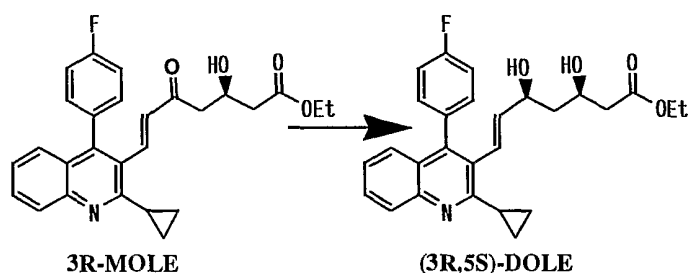


表 9

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (mg/L) (ジアステレオマー過剰率、エナンチオマー過剰率)
キャンディダ ファマタ変種ファマタ IFO 0856	59.9, (100%de、100%ee)
フィロバクテリウム カプサリゲナム IFO 1185	24.0, (100%de、100%ee)
ビキア アノマラ IFO0118	1.0, (100%de、100%ee)
ビキア ピタルソニ IFO 1372	2.8, (78.6%de、100%ee)
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ CBS 2174	23.8, (75.6%de、100%ee)
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ CBS 5746	40.4, (73.3%de、100%ee)
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ CBS 7140	32.4, (75.3%de、100%ee)
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ CBS 7235	18.9, (75.7%de、100%ee)
クリプトコッカス フラバス IFO 0407	36.7, (81.5%de、100%ee)
ロドトルラ ムシラギノサ IFO 0003	81.5, (100%de、100%ee)
ロドトルラ グルティニス変種ダイレネンシス IFO 0415	53.3, (83.9%de、100%ee)
ロドトルラ オウランティアカ IFO 0754	108.6, (100%de、100%ee)

実施例 13

3R-MOLEからのDOLEの製造

実施例 1 と同組成の液体培地 2.5 mL に、表 10 に示した各種の菌株を接種し、27℃で48時間好氣的に培養した。得られた培養液を1 mL ずつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mL を加え完全に懸濁後、2 g/L の NADP (オリエンタル酵母社製) と NAD (オリエンタル酵母社製) 混合液を 10 μl、イソプロパノールを 20 μl、実施例 6 で得られた 3R-MOLE の 5 g/L DMSO 溶液を 20 μl 添加し、よく攪拌後、27℃で20時間反応させた。

反応終了後、実施例 8 と同様に酢酸エチル抽出及び TLC を行い、高速液体ク

ロマトグラフィー（HPLC）を用いて光学純度および生成量の分析を行った。
結果を表10に示す。

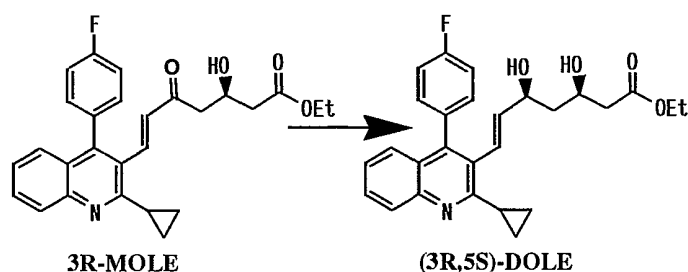


表 10

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (mg/L) (ジアステロマー過剰率、エナンチオマー過剰率)
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ CBS 2174	51.3, (75.8%de、100%ee)
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ CBS 5746	29.3, (74.7%de、98.4%ee)
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ CBS 7140	79.8, (74.4%de、100%ee)
クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ CBS 7235	88.4, (73.5%de、99.2%ee)
ロドトルラ ムシラギノサ IFO 0003	97.3, (100%de、100%ee)
ロドトルラ グルティニス変種ダイレネンシス IFO 0415	101.6, (83.9%de、100%ee)
ロドトルラ オウランディアカ IFO 0754	91.6, (100%de、100%ee)

実施例 14

DOXEからのDOLEの製造

実施例1と同組成の液体培地2.5 mLに、ロドトルラ グルティニス変種ダイレネンシス IFO 0415 を接種し、27℃で48時間好氣的に培養した。得られた培養液1 mLを遠心分離し、菌体を集めた。

また、実施例8と同組成の液体培地2.5 mLに、コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13826 を接種し、30℃で24時間好氣的に培養した。得られた培養液1 mLを遠心分離し、菌体を集めた。

両者をあわせ100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mLを加え完全に懸濁後、2 g/LのNADP (オリエンタル酵母社製) とNAD (オリエンタル酵母社製) 混合液を10 μl、50% (w/v) のグルコース溶液を10 μl、20 g/LのDOXE (DMSO溶液) を30 μl添加し、よく攪拌後、27℃で18時間反応させた。

反応終了後、実施例1と同様に酢酸エチル抽出及びTLCを行った後、実施例

8と同様の条件で、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて光学純度および生成量の分析を行ったところ、本反応では3R, 5S-DOLEのみが得られ、TLC掻き取りサンプルの濃度は9.5mg/Lであった。

実施例 1.5

DOXEからのDCOOHの製造

表11に示した各種の菌株を実施例1と同様に培養と反応を行い、TLC上の化合物（IV）（式中、R=水素の化合物：以下、DCOOHと略す）に相当するスポット（展開溶媒；ヘキサン：酢酸エチル=1：1、 $R_f=0$ ）を掻き取り、イソプロパノール0.25mLで溶出し、遠心分離後、上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて分析した。

HPLCの条件は以下の通りである。

カラム：CHIRALCEL AD（ダイセル化学工業株式会社製）

溶離液：ヘキサン／エタノール／トリフルオロ酢酸=900／100／1

流速：1ml/min

検出：UV254nm

温度：室温

結果を表11に示す。

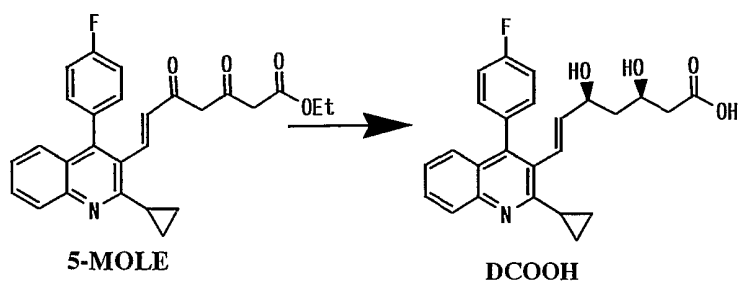


表 11

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (ジアステレオマー過剰率、エナンチオマー過剰率)
キャンディダ ファマタ RIFY 7455	1.3mg/L (94.0% d.e., 100.0% e.e.)
キャンディダ パラプシロシス CBS 604	0.3mg/L (100.0% d.e., 100.0% e.e.)
キャンディダ アルビカンス IFO 1594	0.7mg/L (81.8% d.e., 100.0% e.e.)
キャンディダ トロピカリス IFO 0618	1.1mg/L (89.6% d.e., 100.0% e.e.)
キャンディダ トロピカリス IFO 1404	0.6mg/L (100.0% d.e., 100.0% e.e.)
フィロバシディウムカブサリゲナム IFO 1185	3.8mg/L (94.7% d.e., 100.0% e.e.)
ヤロウイア リポティカ IFO 1209	0.7mg/L (92.5% d.e., 100.0% e.e.)
トリゴノプシス バリアビリス CBS 1040	0.9mg/L (79.2% d.e., 100.0% e.e.)
クリプトコッカス クルバタス IFO 1159	14.5mg/L (87.3% d.e., 100.0% e.e.)
クリプトコッカス フミコラス IFO 10250	2.1mg/L (100.0% d.e., 100.0% e.e.)

実施例 1 6

5-MOLEからのDCOOHの製造

表 1 2 に示した各種の菌株を実施例 1 と同様に培養を行い、DOXEの代わりに5-MOLEを用いて同様に反応を行い、TLC上の化合物(IV)(式中、R = 水素の化合物：以下、DCOOHと略す)に相当するスポット(展開溶媒；ヘキサン：酢酸エチル=1：1、R_f=0)を掻き取り、イソプロパノール0.25 mLで溶出し、遠心分離後、上清を実施例 1 5 と同様の条件で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて光学純度を分析した。結果を表 1 2 に示す。

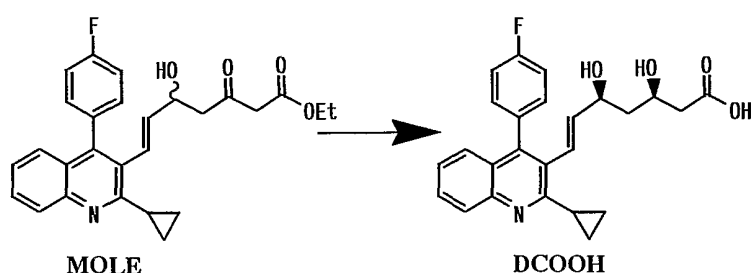


表 12

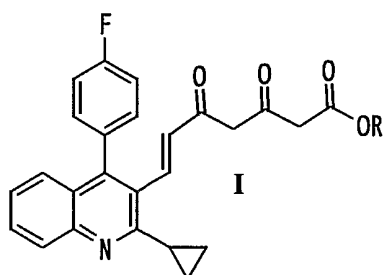
使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (ジアステレオマー過剰率、エナンチオマー過剰率)
キャンディダ ルゴサ IFO 0591	0.5mg/L (85.6%d.e., 100.0%e.e.)
キャンディダ モリシアナ IFO 10296	1.8mg/L (71.9%d.e., 100.0%e.e.)
キャンディダ パラプシロシス CBS 604	2.8mg/L (71.8%d.e., 100.0%e.e.)
クリプトコッカス ロウレンティ IFO 0609	0.1mg/L (100.0%d.e., 100.0%e.e.)
エキソフィアラ デルマティティヂス IFO 6421	9.9mg/L (71.4%d.e., 100.0%e.e.)
エキソフィアラ デルマティティヂス IFO 8193	5.2mg/L (73.1%d.e., 100.0%e.e.)
トリゴノプシス バリアビリス IFO 0671	0.5mg/L (89.9%d.e., 100.0%e.e.)

産業上の利用可能性

本発明によれば、3 R, 5 S - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - ' (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3 , 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類を光学純度よく、かつ、効率的に製造することができる。

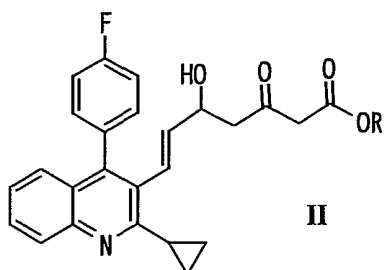
請求の範囲

1. 下記式(I)



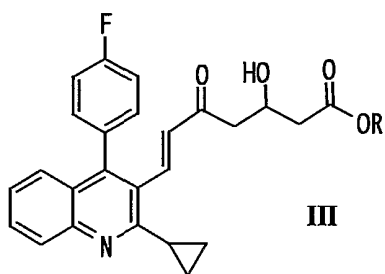
(式中、Rは水素原子、アルキル基またはアリール基を示す)

で表される化合物、下記式(II)



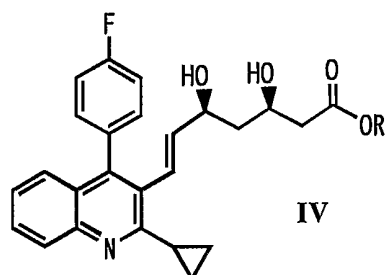
(式中、Rは前記と同義である)

で表される化合物、及び、下記式(III)



(式中、Rは前記と同義である)

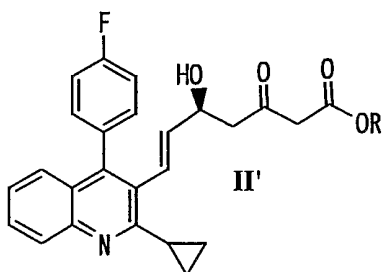
で表される化合物からなる群より選ばれる化合物を、ケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用させて還元することを特徴とする下記式(IV)



(式中、Rは前記と同義である)

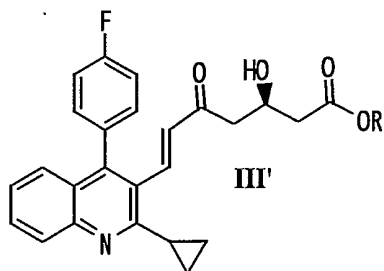
で表される化合物の製造方法。

2. 式(II)及び式(III)で表される化合物が、それぞれ下記式(II')



(式中、Rは前記と同義である)

及び下記式(III')



(式中、Rは前記と同義である)で表される光学活性体であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

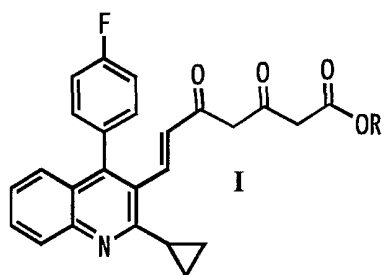
3. 式(II')及び式(III')で表される化合物が、それぞれ式(I)で表される化合物から得られたものであることを特徴とする請求項2に記載の製造方法。

4. 微生物が、メシニコウイア (*Metschnikowia*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、シテロマイセス (*Citeromyces*) 属、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、エキソフィアラ (*Exophiala*) 属、トリゴノプシス (*Trigonopsis*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyc*)

es)属、ウイケルハミエラ(Wickerhamiella)属、ピキア(Pichia)属、サッカロマイコブシス(Saccharomycopsis)属、サイトエラ(Saitoella)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属、ロドスポリジウム(Rhodosporidium)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)属、セルロモナス(Cellulomonas)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属及びクルトバクテリウム(Curtobacterium)属からなる群より選ばれることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の製造方法。

5. 微生物が、メシニコウイア (Metschnikowia) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、キャンディダ (Candida) 属、フィロバシディウム (Filobasidium) 属、オガタエア (Ogataea) 属、シテロマイセス(Citeromyces)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、エキソフィアラ (Exophiala) 属、シゾサッカロマイセス(Schizosaccharomyces)属、ウイケルハミエラ (Wickerhamiella) 属、ピキア(Pichia)属、サッカロマイコブシス(Saccharomycopsis)属、サイトエラ(Saitoella)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属、ロドスポリジウム(Rhodosporidium)属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)属及びコリネバクテリウム(Corynebacterium)属からなる群より選ばれることを特徴とする請求項4記載の製造方法。

6. 下記式(I)

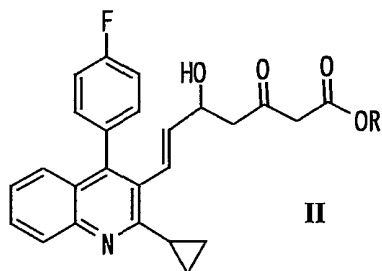


(式中、Rは前記と同義である)

で表される化合物にクリプトコッカス (Cryptococcus) 属、キャンディダ (Candida) 属、フィロバシディウム (Filobasidium) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ヤロウイア(Yarrowia)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、エキソフィアラ (Exophiala)属及びトリゴノプシス(Trigonopsis)属からなる群より選ばれる微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用させることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

7. 微生物が、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属又はロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属するものであることを特徴とする請求項 6 記載の製造方法。

8. 下記式(II)

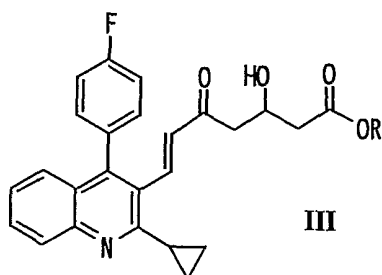


(式中、R は前記と同義である) で表される化合物にメシニコウイア (*Metschnikowia*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、シテロマイセス (*Citeromyces*) 属、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、エキソフィアラ (*Exophiala*) 属、トリゴノプシス (*Trigonopsis*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、ウィケルハミエラ (*Wickerhamiella*) 属、サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属及びクルトバクテリウム (*Curtobacterium*) 属からなる群より選ばれる微生物の菌体及び/または該菌体処理物を作用させることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の製造方法。

9. 微生物がメシニコウイア (*Metschnikowia*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、フィロバシディウム (*Filobasidium*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、シテロマイセス (*Citeromyces*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、ウィケルハミエラ (*Wickerhamiella*) 属、サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*)

属、ロドスポリジウム(Rhodospiridium)属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)属又はコリネバクテリウム(Corynebacterium)属に属するものであることを特徴とする請求項8記載の製造方法。

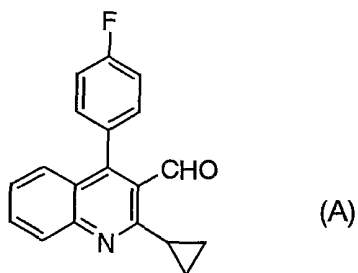
10. 下記式(III)



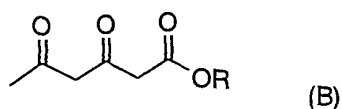
(式中、Rは前記と同義である)

で表される化合物にクリプトコッカス(Cryptococcus)属、キャンディダ(Candida)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、フィロバシディウム(Filobasidium)属及びピキア(Pichia)属からなる群より選ばれる微生物の菌体及び/または該菌体処理物を作用させることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の製造方法。

11. 前記式(I)で表される化合物が、下記式(A)



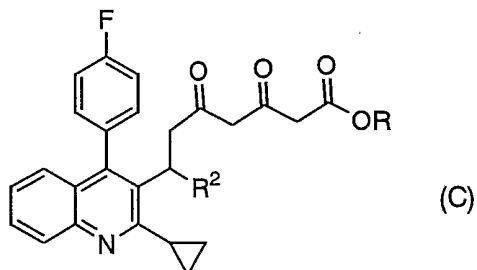
で表される2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)キノリン-3-カルボアルデヒドと下記式(B)



(式中、Rは、水素原子、アルキル基、アラルキル基またはアリール基を示す)
で表される化合物とを縮合反応させることにより得られることを特徴とする請求項1または4～7のいずれか一項に記載の製造方法。

12. 前記式(A)で表される化合物及び前記式(B)で表される化合物と

の縮合反応により上記式 (I) で表される化合物を製造するに当たり、製造中間体として下記一般式 (C)

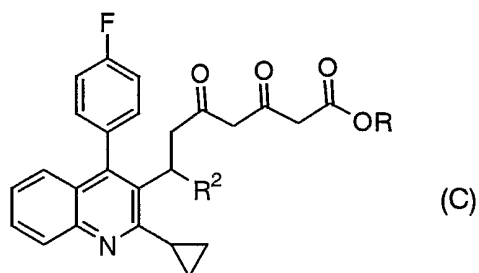


(式中、R は前述と同義であり、R² は、水酸基、ハロゲン原子、シリルオキシ基、スルホニルオキシ基、アシルオキシ基、アルコキシカルボニルオキシ基、アルキルチオカルボニルオキシ基、アルコキシチオカルボニルオキシ基、またはアルキルチオチオカルボニルオキシ基を示す)

で表される化合物またはその塩を経由することを特徴とする請求項 11 記載の製造方法。

13. 前記式 (C) で表される製造中間体から R² を脱離反応させることにより前記式 (I) で表される化合物を得ることを特徴とする請求項 12 記載の製造方法。

14. 下記一般式 (C)



(式中、R¹ 及び R² は、前述と同義である。) で表される化合物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00835

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P17/12/(C12P17/12, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P17/00-17/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI/BIOSYS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-92217 A (Ube Industries, Ltd.), 09 April, 1996 (09.04.96), (Family: none)	1-14
A	EP 569998 A2 (E.R. Squibb & Sons, Inc.), 18 November, 1993 (18.11.93), & CA 2094191 A & JP 6-30783 A & US 5324662 A	1-14
A	NAGAMATSU S. et al., Chiral separation of a pharmaceutical intermediate by a simulated moving bed process. J. Chromatogr. A 1999, Vol.832, pages 55 to 65	1-14
A	JP 8-127585 A (Ube Industries, Ltd.), 21 May, 1996 (21.05.96), (Family: none)	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 April, 2002 (10.04.02)

Date of mailing of the international search report
23 April, 2002 (23.04.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00835

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 304063 A2 (Nissan Chemical Industries Ltd.), 22 February, 1989 (22.02.89), & JP 1-279866 A & US 5011930 A & US 5102888 A & US 5185328 A & US 5854259 A & US 5856336 A & US 5872130 A	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 17/12 //(C12P 17/12, C12R 1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 17/00-17/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI/BIOSYS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-92217 A (宇部興産株式会社) 1996. 04. 09 (ファミリーなし)	1-14
A	EP 569998 A2 (E. R. SQUIBB & SONS, INC.) 1993. 11. 18 & CA 2094191 A & JP 6-30783 A & US 5324662 A	1-14
A	NAGAMATSU S. et al. Chiral separation of a pharmaceutical intermediate by a simulated moving bed process. J. Chromatogr. A 1999, Vol. 832, p. 55-65	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.04.02

国際調査報告の発送日

23.04.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

2937

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-127585 A (宇部興産株式会社) 1996.05.21 (ファミリーなし)	1-14
A	EP 304063 A2 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES LTD.) 1989.02.22 & JP 1-279866 A & US 5011930 A & US 5102888 A & US 5185328 A & US 5854259 A & US 5856336 A & US 5872130 A	1-14