

令和元年5月24日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06878

研究課題名(和文) ヒドロキシチロソール生産を指向した微生物の探索、機能解析とバイオプロセス開発

研究課題名(英文) Screening and characterization of microorganisms for the production of hydroxytyrosol

研究代表者

古屋 俊樹 (Furuya, Toshiki)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・講師

研究者番号：20367064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物のオリーブ中に含まれるヒドロキシチロソールは、近年、多様な生理活性を示すことが明らかにされており、アンチエイジング素材として食品や化粧品への応用に関心が寄せられている。ヒドロキシチロソールは、オリーブ等のモクセイ科の植物からの抽出法により得られるが、含有量が限られていることや抽出操作が煩雑なことから高価であり、より効率的な生産法が望まれている。本研究では、安価な2-フェニルエタノールをヒドロキシチロソールに変換する微生物を自然界から発見し、その機能の詳細を明らかにするとともに、取得した微生物を利用してヒドロキシチロソールを合成可能なことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物機能を活用して有用物質を生産することは古くから行われているが、本研究ではオリーブ中に含まれている有用生理活性物質のヒドロキシチロソールを、微生物を利用して生産できる可能性を示すことができた。自然界にヒドロキシチロソールを合成可能な微生物が存在するという事実は大変興味深いと考えている。植物からの抽出のみに依存せず、微生物を利用してヒドロキシチロソールを生産できるようになれば、天候等に左右されず安定かつ安価な供給が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Hydroxytyrosol is a major active component in olive oil, which is reportedly effective in the maintenance of health and protection from disease. However, the accumulation level of this compound in olive oil is generally low. In this study, we discovered a microorganism capable of producing tyrosol from 2-phenylethanol. The use of tert-butylbenzene as the sole carbon and energy source led to the isolation of microorganisms capable of catalyzing hydroxylation of 2-phenylethanol at the para position. Interestingly, these microorganisms were also able to convert tyrosol to hydroxytyrosol. We characterized a selected isolate and applied the bacterial strain to the production of tyrosol and hydroxytyrosol.

研究分野：生物学

キーワード：生体触媒 微生物変換 微生物探索 有用物質合成 ヒドロキシチロソール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物のオリーブ中に含まれるヒドロキシチロソール(4-(2-Hydroxyethyl)-1,2-benzenediol、図1)は、近年、多様な生理活性を示すことが明らかにされており、アンチエイジング素材として食品や化粧品への応用に 관심이寄せられている。例えば、強い抗酸化作用、抗炎症作用や美白作用を示し(J Agric Food Chem, 62, 1449 (2014))、さらに動脈硬化の予防機能についてはその効果が実験動物レベルですでに確認されている(Food Chem Toxicol, 47, 2327 (2009))。このように、優れた生理活性を示す有用な化合物だが、3つの水酸基を特定の位置に有する本化合物をケミカルな手法により合成することは困難である。また、オリーブ等のモクセイ科の植物からの抽出法により得られるが、含有量が限られていることや抽出操作が煩雑なことから高価であり、より効率的な生産法が望まれている。

そこで、微生物・酵素を利用したバイオプロセスによりヒドロキシチロソールを合成する研究が、近年、盛んに行なわれている(Appl Microbiol Biotechnol, 99, 1119 (2015))。これまでに、代謝工学を利用したグルコースからの合成(Metab Eng, 14, 603 (2012))や3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸からの酵素還元合成(ChemCatChem, 6, 1089 (2014))が試みられているが、収量等に課題を有する。一方、2-フェニルエタノールをヒドロキシチロソールに変換する微生物を見いだせれば、新しい生産法を提供できる可能性がある(図1)。2-フェニルエタノールは安価かつ食品用途にも利用されている化合物であり、本化合物の微生物による位置選択的水酸化によりヒドロキシチロソールを合成できれば、効率的かつ安全性の高いプロセスを提供することができる。また、水酸基のような反応性の高い側鎖を保護せずに、ベンゼン環の選択的水酸化が可能とする生体触媒は、ヒドロキシチロソールのみならず抗酸化物質等の様々な化合物の合成にも有用である。しかしながら、当該変換活性を示す微生物はこれまでに報告されていない。

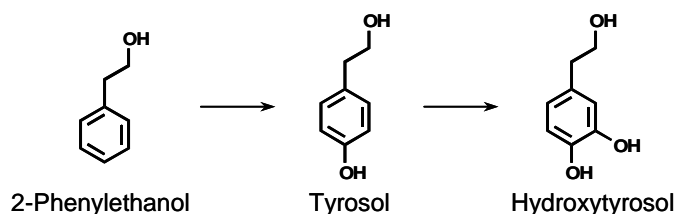


図1 2-フェニルエタノールからのヒドロキシチロソール合成

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究では、2-フェニルエタノールをヒドロキシチロソールに変換する微生物の取得を目的とした。さらに、取得した微生物の水酸化機能を細胞レベルおよび分子レベルで解析するとともに、ヒドロキシチロソール生産への応用を図った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 2-フェニルエタノールをチロソールおよびヒドロキシチロソールに変換する微生物の探索

かさ高い側鎖を有する *tert*-ブチルベンゼンを分解可能な微生物は、ベンゼン環のパラ位に対する水酸化活性を示すことを予想し、一次スクリーニングでは *tert*-ブチルベンゼン分解菌を探索した。無機塩を成分とする KG 培地に Bacto Agar 15 g/L を添加して作製した固体培地に、生理食塩水に懸濁した土壌サンプルを塗布した。さらに、*tert*-ブチルベンゼンを満たしたガラスバイアルをシャーレの蓋の上に置き、*tert*-ブチルベンゼンを唯一の炭素源として気体の状態で供給した。30℃で1週間インキュベート後に生育した微生物については、Bacto Agar の代わりに高純度の電気泳動用アガロース(アガロース H)を使用した KG 固体培地に植え継いだ。数回の継代培養後にも生育した微生物を *tert*-ブチルベンゼン分解菌として選択した。

なお、KG 培地の組成(培地 1 リットル当たり)は次の通りである：(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.1 g、MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 g、FeCl<sub>2</sub> 5H<sub>2</sub>O 10.6 mg、CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 8 mg、ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 4 mg、MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 2 mg、CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.02 mg、KI 0.2 mg、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.2 mg、CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.2 mg、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.4 mg、NaCl 10 mg を 1 L 蒸留水に配合 (pH 7.2)。

一次スクリーニングで取得した *tert*-ブチルベンゼン分解菌に対して、二次スクリーニングでは 2-フェニルエタノールおよびチロソールに対する変換活性を評価した。*tert*-ブチルベンゼンを炭素源とする KG 固体培地上に画線して生育した菌体を緩衝液に懸濁し、2-フェニルエタノールおよびチロソールと反応させた。具体的には、菌体約 40-60 g/L (湿重量換算)、2-フェニルエタノールもしくはチロソール 10 mM、ジメチルスルホキシド 1% (v/v)、グリセロール 10% (v/v)、リン酸カリウム緩衝液 50 mM (pH 7.5) を組成とする反応液 250 μL を調製後、30℃で6時間振とうした。

反応後、生成物を HPLC により解析した。反応液に 5 M HCl 2.5 μL、メタノール 250 μL を添加して攪拌後、遠心分離により菌体を除去したサンプルを HPLC 分析に供した。HPLC 分析は島津社製の装置 (LC-20 システム) と和光純薬社製のカラム (Wakosil-II 5C18 HG column、カラムサイズ 4.6 × 150 mm、粒子径 4.2-4.7 μm) を用いた。サンプルを 10 μL 注入し、0.1% (v/v) ギ酸:メタノール=70:30 の溶離液 (0.5 mL/min) で溶出し、波長 200、220 もしくは 275 nm で検出した。

また、反応生成物を GC-MS により解析した。上述のグリセロール 10% (v/v) 含有リン酸カリウム緩衝液 50 mM (pH 7.5) の代わりにギ酸アンモニウム緩衝液 20 mM (pH 7.5) を用いた反応液を調製後、同様に反応させた。反応液から遠心分離およびフィルター処理により菌体を除去したサンプルを GC-MS 分析に供した。GC-MS 分析はアジレント社製の装置 (6890 Series GC System, 5973 Network Mass Selective Detector) と GL サイエンス社製のカラム (InertCap Pure WAX column, カラムサイズ 0.25 mm × 30 m, 膜厚 0.25 μm) を用い、サンプル注入量: 1 μL、スプリット比 10:1、キャリアガス: He (1.1 mL/min)、注入口温度: 300、オープン初期温度: 40、初期時間: 2 min、昇温速度: 15 /min、最終温度: 300 の条件で行なった。

#### (2) *Cupriavidus* sp. T773 株の変換活性を効率的に誘導可能な培養条件の検討

取得した *Cupriavidus* sp. T773 株の 2-フェニルエタノールおよびチロソール変換活性を効率的に誘導可能な炭素源および培養時間について検討した。液体の KG 培地 5 mL に各種炭素源を終濃度 2.5 mM で添加した。なお、芳香族化合物についてはジメチルスルホキシド溶液 (終濃度 1% (v/v)) として添加し、また揮発性の芳香族化合物についてはスクリーキャップで密閉した。各種炭素源を添加した KG 培地に *Cupriavidus* sp. T773 株を植菌し、30、150 rpm で培養した。炭素源の検討では 21 時間培養した。集菌後、グリセロール 10% (v/v) 含有リン酸カリウム緩衝液 50 mM (pH 7.5) で洗菌し、2-フェニルエタノールおよびチロソールとの反応に用いた。具体的には、菌体 25 g/L (湿重量換算) 2-フェニルエタノールもしくはチロソール 15 mM、ジメチルスルホキシド 1% (v/v)、グリセロール 10% (v/v)、リン酸カリウム緩衝液 50 mM (pH 7.5) を組成とする反応液 250 μL を調製後、30 で 6 時間振とうした。HPLC 分析の条件は、上述と同様である。

#### (3) *Cupriavidus* sp. T773 株の菌体を利用した 2-フェニルエタノールおよびチロソールの変換

*Cupriavidus* sp. T773 株の菌体を利用して、2-フェニルエタノールからのチロソール合成、およびチロソールからのヒドロキシチロソール合成について検討した。液体の KG 培地 5 mL にトルエンを終濃度 2.5 mM で添加した。なお、トルエンについてはジメチルスルホキシド溶液 (終濃度 1% (v/v)) として添加し、また揮発性を有するのでスクリーキャップで密閉した。トルエンを添加した KG 培地に *Cupriavidus* sp. T773 株を植菌し、30、150 rpm で 21 時間培養した。集菌後、グリセロール 10% (v/v) 含有リン酸カリウム緩衝液 50 mM (pH 7.5) で洗菌し、2-フェニルエタノールおよびチロソールとの反応に用いた。具体的には、菌体 25 g/L (湿重量換算) 2-フェニルエタノールもしくはチロソール 15 mM、ジメチルスルホキシド 1% (v/v)、グリセロール 10% (v/v)、リン酸カリウム緩衝液 50 mM (pH 7.5) を組成とする反応液 250 μL を調製後、30 で振とうした。HPLC 分析の条件は、上述と同様である。

#### (4) *Cupriavidus* sp. T773 株からの 2-フェニルエタノール水酸化酵素の精製

トルエンを炭素源として培養した *Cupriavidus* sp. T773 株の菌体をリン酸カリウム緩衝液 50 mM (pH 7.0) に懸濁後、超音波破碎および遠心分離により得られた上清を回収し、カラムクロマトグラフィーにより 2-フェニルエタノール水酸化酵素の精製を試みた。1 段階目の精製には DEAE TOYOPEARL 650S を用い、0-1.0 M KCl の塩濃度の変化でタンパク質の溶出を行なった。2 段階目の精製には Hiprep Butyl Fast Flow 16/10 を用い、1.0-0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の塩濃度の変化でタンパク質の溶出を行なった。部分精製した目的酵素を SDS-PAGE により分離し、セミドライプロットングにより PVDF 膜に転写した。さらに、目的バンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列解析に供した (株式会社アプロサイエンスまたは北海道システム・サイエンス株式会社に依頼分析)。

## 4. 研究成果

### (1) 2-フェニルエタノールをチロソールおよびヒドロキシチロソールに変換する微生物の探索

一次スクリーニングで *tert*-ブチルベンゼン分解菌を探索し、さらに二次スクリーニングで 2-フェニルエタノールおよびチロソールに対する変換活性を評価した。その結果、一次スクリーニングにおいて、土壌 418 サンプルから 64 株の *tert*-ブチルベンゼン分解菌を分離した。さらに、二次スクリーニングにおいて活性を評価し、2-フェニルエタノールをチロソールに、かつチロソールをヒドロキシチロソールに変換する微生物を 4 株取得することに成功した。16S rRNA 遺伝子配列解析による属種同定を行なった結果、3 株は *Cupriavidus* 属、1 株は *Pseudomonas* 属の微生物であることがわかった。最も変換活性の高かった *Cupriavidus* sp. T773 株を以降の実験で使用した。

*Cupriavidus* sp. T773 株による 2-フェニルエタノールおよびチロソール変換の HPLC 分析結果を図 2 に示す。標品とのリテンションタイムおよび GC-MS 分析における MS スペクトルの比較から、2-フェニルエタノール変換産物はベンゼン環のパラ位が水酸化されたチロソール (*p*-チロソール) と同定された。また、チロソール変換産物はチロソールの 3 位が水酸化されたヒドロキシチロソール (3-ヒドロキシチロソール) と同定された。

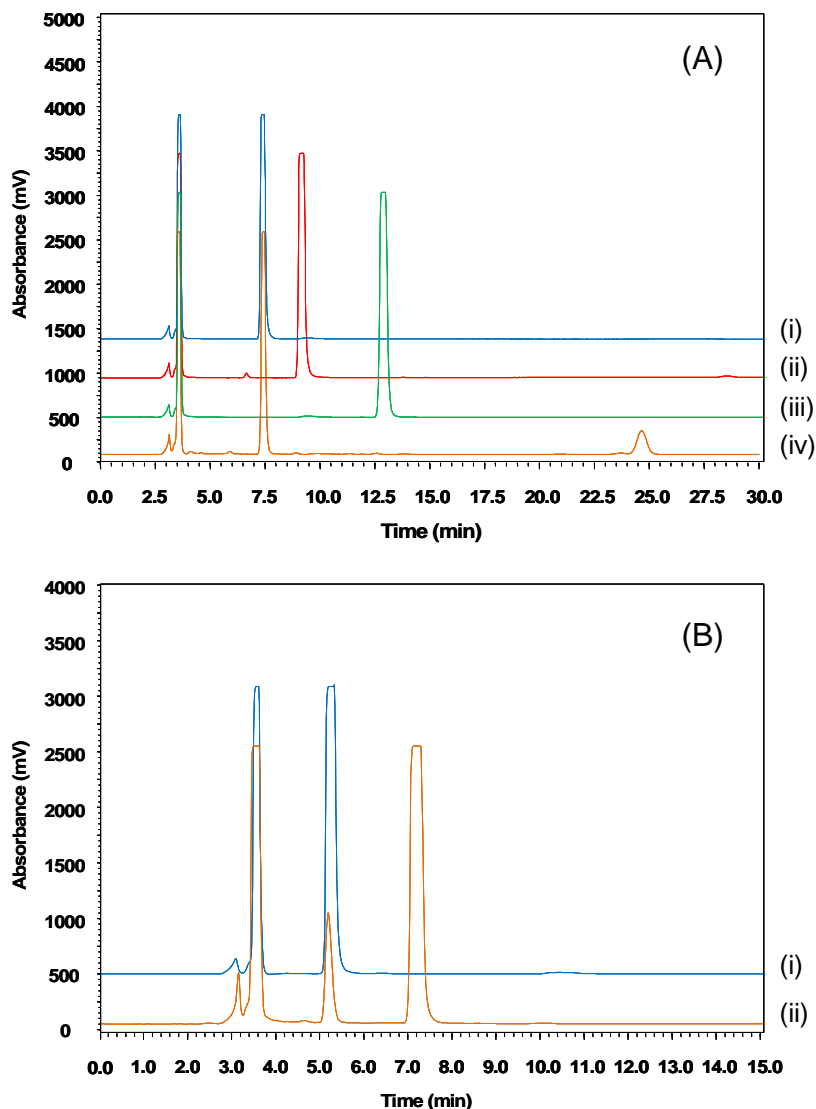


図2 *Cupriavidus* sp. T773 株による 2-フェニルエタノールおよびチロソール変換の HPLC 分析

(A) 2-フェニルエタノールの変換

(i) *p*-チロソール標品、(ii) *m*-チロソール標品、(iii) *o*-チロソール標品、(iv) 反応液

(B) チロソールの変換

(i) 3-ヒドロキシチロソール標品、(ii) 反応液

## (2) *Cupriavidus* sp. T773 株の変換活性を効率的に誘導可能な培養条件の検討

取得した *Cupriavidus* sp. T773 株の 2-フェニルエタノールおよびチロソール変換活性を効率的に誘導可能な炭素源および培養時間について検討した。その結果、*Cupriavidus* sp. T773 株は *tert*-ブチルベンゼンを炭素源とした場合に、固体の KG 培地では生育するが液体の KG 培地では生育しないことが判明した(表 1)。一方、リンゴ酸、クエン酸、フェノール、トルエンを炭素源とした場合には液体培地で生育した(表 1)。そこで、これらの炭素源で生育した菌体を回収して、2-フェニルエタノールおよびチロソールに対する活性を評価した。その結果、フェノールおよびトルエンを炭素源として生育した菌体において、2-フェニルエタノールおよびチロソールに対する変換活性が誘導された(表 1)。

*Cupriavidus* sp. T773 株の変換活性がトルエンにより最も強く誘導されたため、つぎにトルエンを炭素源として培養時間と誘導される変換活性の相関について調べた。その結果、2-フェニルエタノールに対しては 21 時間培養後に回収した菌体が最も高い変換活性を示した(図 3)。一方、チロソールに対しては 12 時間から 48 時間にかけて変換活性を示した(図 3)。以上より、トルエンを炭素源として 21 時間培養することで、*Cupriavidus* sp. T773 株の 2-フェニルエタノールおよびチロソール変換活性が効率的に誘導されることが明らかとなった。

表1 *Cupriavidus* sp. T773 株の変換活性を効率的に誘導可能な炭素源の検討

Carbon source	Cell growth (OD <sub>600</sub> )	Tyrosol-producing activity (μmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		Hydroxytyrosol-producing activity (μmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
Glucose	0.06±0.01	NT	NT	NT	NT
Malic acid	0.37±0.01	0	0	0	0
Citric acid	0.47±0.03	0	0	0	0
2-Phenylethanol	0.05±0.01	NT	NT	NT	NT
Tyrosol	0.00±0.00	NT	NT	NT	NT
Hydroxytyrosol	0.10±0.03	NT	NT	NT	NT
Phenol	0.48±0.01	2.7±0.2	4.2±0.1		
Benzene	0.12±0.01	NT	NT	NT	NT
Toluene	0.50±0.08	34.8±3.4	5.9±0.3		
Ethylbenzene	0.02±0.00	NT	NT	NT	NT
<i>tert</i> -Butylbenzene	0.02±0.00	NT	NT	NT	NT

NT : not tested.

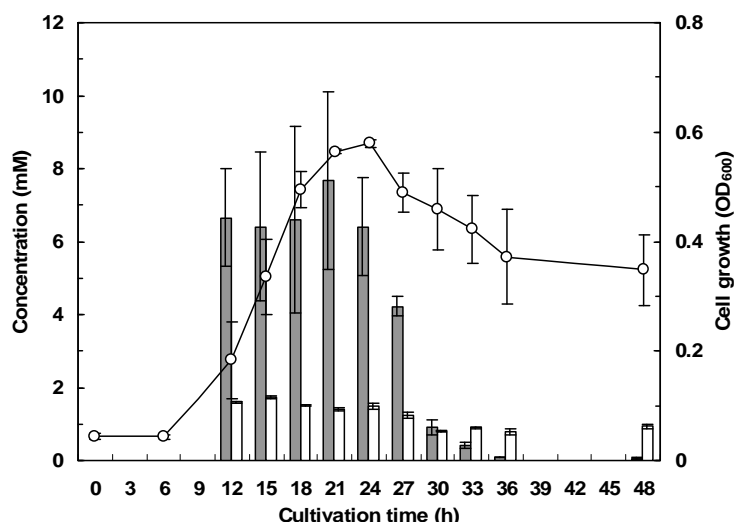


図3 *Cupriavidus* sp. T773 株の変換活性を効率的に誘導可能な培養時間の検討  
 : Growth、灰色のバー：チロソール生成量、白色のバー：ヒドロキシチロソール生成量

(3) *Cupriavidus* sp. T773 株の菌体を利用した 2-フェニルエタノールおよびチロソールの変換

*Cupriavidus* sp. T773 株の菌体を利用して、2-フェニルエタノールからのチロソール合成、およびチロソールからのヒドロキシチロソール合成について検討した。トルエンを炭素源として 21 時間培養することにより、菌体を調製した。その結果、*Cupriavidus* sp. T773 株の菌体を生体触媒として利用することにより、15 mM の 2-フェニルエタノールから 6 時間で 5.2 mM のチロソールを合成できた (図 4A)。さらに、15 mM のチロソールから 6 時間で 0.89 mM のヒドロキシチロソールを合成可能であった (図 4B)。

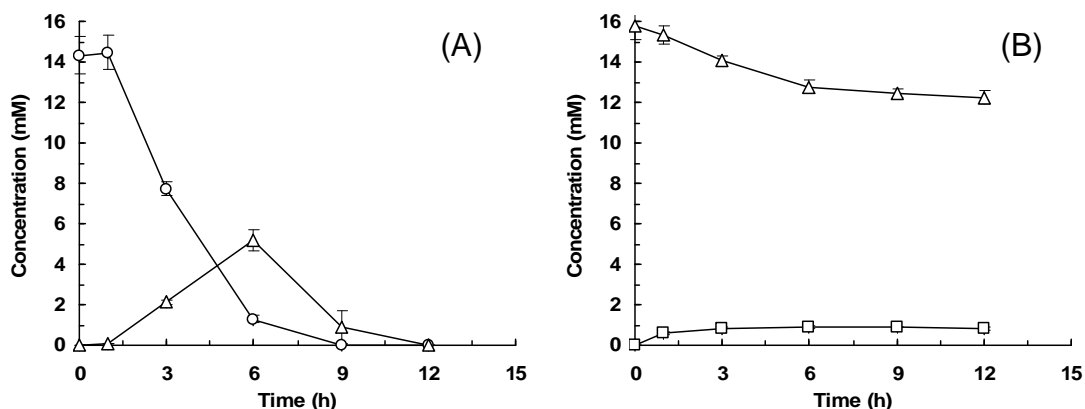


図4 *Cupriavidus* sp. T773 株の菌体を利用した 2-フェニルエタノールおよびチロソールの変換  
 (A) 2-フェニルエタノールの変換  
 (B) チロソールの変換  
 : 2-フェニルエタノール、 : チロソール、 : ヒドロキシチロソール

#### (4) *Cupriavidus* sp. T773 株からの 2-フェニルエタノール水酸化酵素の精製

DEAE TOYOPEARL 650S および Hiprep Butyl Fast Flow 16/10 を用いることで図 5 に示すように 2-フェニルエタノール水酸化酵素に対する候補タンパク質を部分精製できた。これにより、目的酵素が約 50 kDa のタンパク質と約 25 kDa のタンパク質から構成されている可能性が示唆された。カラム精製後の候補タンパク質の 1 つについて N 末端アミノ酸配列解析を行なったところ、15 アミノ酸残基の配列を決定できた。このアミノ酸配列をクエリーとして BLAST 検索を行なったところ、相溶性が高いタンパク質として非ヘム鉄ジオキシゲナーゼの  $\beta$  サブユニットが挙げられたため、目的酵素は非ヘム鉄ジオキシゲナーゼである可能性が示された。

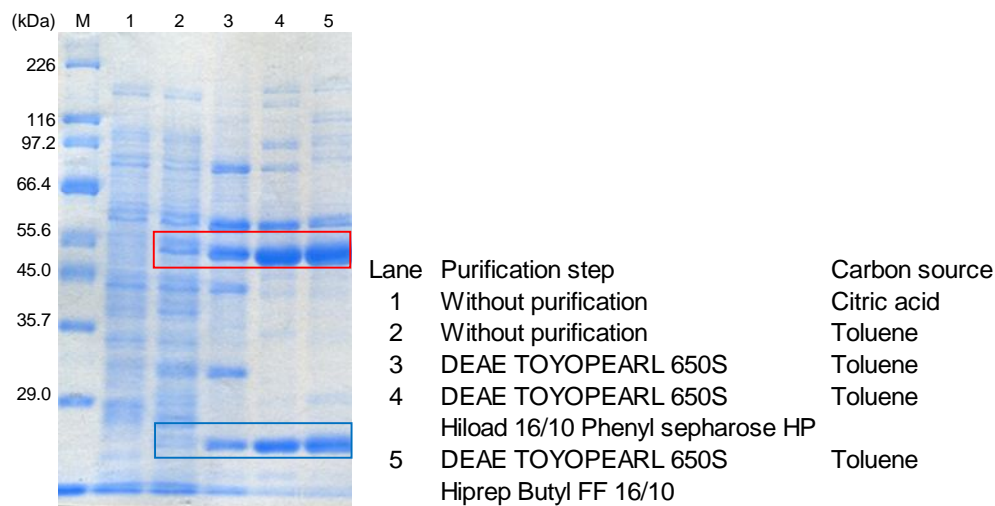


図 5 *Cupriavidus* sp. T773 株からの 2-フェニルエタノール水酸化酵素の精製と SDS-PAGE 分析  
赤枠：推定非ヘム鉄ジオキシゲナーゼ  $\alpha$  サブユニット、青枠： $\beta$  サブユニット

以上のように本研究では、2-フェニルエタノールをチロソールに、チロソールをヒドロキシチロソールに変換する微生物を自然界から発見することに成功した。当該活性を示す微生物の初めての報告である。現在までのところ、ヒドロキシチロソールを 2-フェニルエタノールから直接合成することはできていないため、今後さらに検討を重ねることにより解決する。また、2-フェニルエタノール水酸化酵素に関する有用な知見が得られたため、今後は当該酵素をコードする遺伝子のクローニングを行なう予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

川村駿介、岡本姫佳、古屋俊樹、木野邦器、生体触媒を利用した 2-フェニルエタノールの位置選択的水酸化によるチロソール及びヒドロキシチロソールの合成、2017 年度日本生物工学会大会 (講演要旨集 p.140) 東京、2017 年 9 月 11 日 ~ 14 日。

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.tus.ac.jp/fac\\_grad/p/index.php?6d15](https://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/index.php?6d15)

#### 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：木野 邦器

ローマ字氏名：KINO, Kuniki

所属研究機関名：早稲田大学

部局名：理工学術院

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：60318764

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。