

オリーブ二次代謝産物の微生物変換によって得られる 新規抗酸化物質の性状解析

岡山大学大学院自然科学研究科（農学系）

神崎 浩

Development of novel drugs has been achieved sometimes by microbial conversion of secondary metabolites. For example, hydroxylations of compactin and vitamin D₃ by microbial cytochrome P450s generated well-known commercial medicines, pravastatin and calcitriol, respectively. Thus, novel materials with useful functions for cosmetics or food additives will be possibly developed by bioconversion of secondary metabolites. We found that bakers' yeasts catalyzed the reduction of an aldehyde form of oleuropein aglycon (the substrate) in olive leaf extract. We isolated the substrate and its enzymatically converted product and determined their structures by instrumental analyses. Both of the substrate and the product, a novel alcohol, exhibited a pronounced antioxidative activity in a DPPH test. It was found that contents of oleuropein and its aglycon in olive leaf extract vary with variety. One pot conversion of oleuropein to compound B catalyzed by a combination of β -glucosidase and yeast cells was achieved.

1. 緒言

二次代謝産物の利用法として、微生物による構造変換で化合物を高機能化し、医薬品に応用する例が知られている。図1に、医薬品として開発あるいは利用が期待されている微生物変換の例を示した。三共が開発したプラバスタチン (Pravastatin) は、スタチン系の高脂血症治療薬として1987年から世界中で販売されている薬剤であるが、青カビ *Penicillium citrinum* が生産するコンパクチン (Compactin) を *Streptomyces carbophilus* の酵素を用いる微生物変換によってより有効な化合物に変換させることで製品化に至った^{1,2)}。カルシトリオール (Calcitriol) は骨粗鬆症などの低カルシウム症状の患者に投与されている化合物であるが、ビタミンD₃からの化学合成には複数のステップが必要であったのに対し、大正製薬-メルシャンが1ステップでの微生物変換法を確立したことで注目されている^{3,4)}。我々のグループでも、抗ガン剤としての開発が期待される細胞分裂阻害活性物質の探索の過程で、カビが生産する新規化合物フェニラヒスチン (Phenylahistin) を放線菌 *Streptomyces albulus* 由来の新規酸化酵素で処理することにより、デヒドロフェニラヒスチン (Dehydrophenylahistin) へと変換できること、さらにその変換により細胞分裂阻害活性が飛躍的に上昇し、既存の抗ガン剤レベルに達することを明らかにした^{5,6)}。現在、本化合物の類縁体について、アメリカのベンチャー製

薬企業による臨床開発研究が行われている。

その結果を踏まえ、植物成分に含まれる二次代謝産物についても微生物の処理により、高機能化合物に変換が可能であると考え、研究を行った。植物として、岡山大学の周辺地域、すなわち香川県小豆島、岡山県牛窓地区で日本での生産のほとんどが行われているオリーブを選んで研究を実施した。その結果、オリーブ葉抽出物をパン酵母で処理することにより、新規の抗酸化化合物が生成することを明らかにした。この新規化合物はオリーブ葉に大量に含まれる配糖体オレウロペイン (Oleuropein) のアグリコン (脱グルコース体) のアルデヒド基がヒドロキシメチル基に還元変換された化合物であり、オリーブの代謝産物としては知られていない新規化合物である (図2)。また本化合物は抗酸化活性を有しており、そのユニークな構造から、化粧品素材等としての有効性を有している可能性が高い。

従って、本研究においては、この新規化合物の化粧品素材としての開発の可能性を探るべく、抗酸化活性の詳細を検討するとともに、有効な調製方法の検討を加えることを目的として実施した。

2. 実験

(1) 抗酸化活性測定

抗酸化活性は1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法およびBioVision社のTotal Antioxidant Capacity (TAC) Assay kitにより行った。

(1) - 1 DPPH法

水溶性抗酸化物質の代表例であるアスコルビン酸ナトリウム (Sodium ascorbate, ビタミンC) と脂溶性抗酸化物質の代表例である α -トコフェロール (α -tocopherol, ビタミンE) を比較物質として用いた。1200 μ M DPPH 25 μ L (final 100 μ M), 50% MeOH 225 μ L, 超純水25 μ L, 試料 in 50% MeOH (添加時の濃度: 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ g/mL) を96穴



Characterization of novel antioxidative compound produced by microbial conversion of olive secondary metabolite

Hiroshi Kanzaki

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

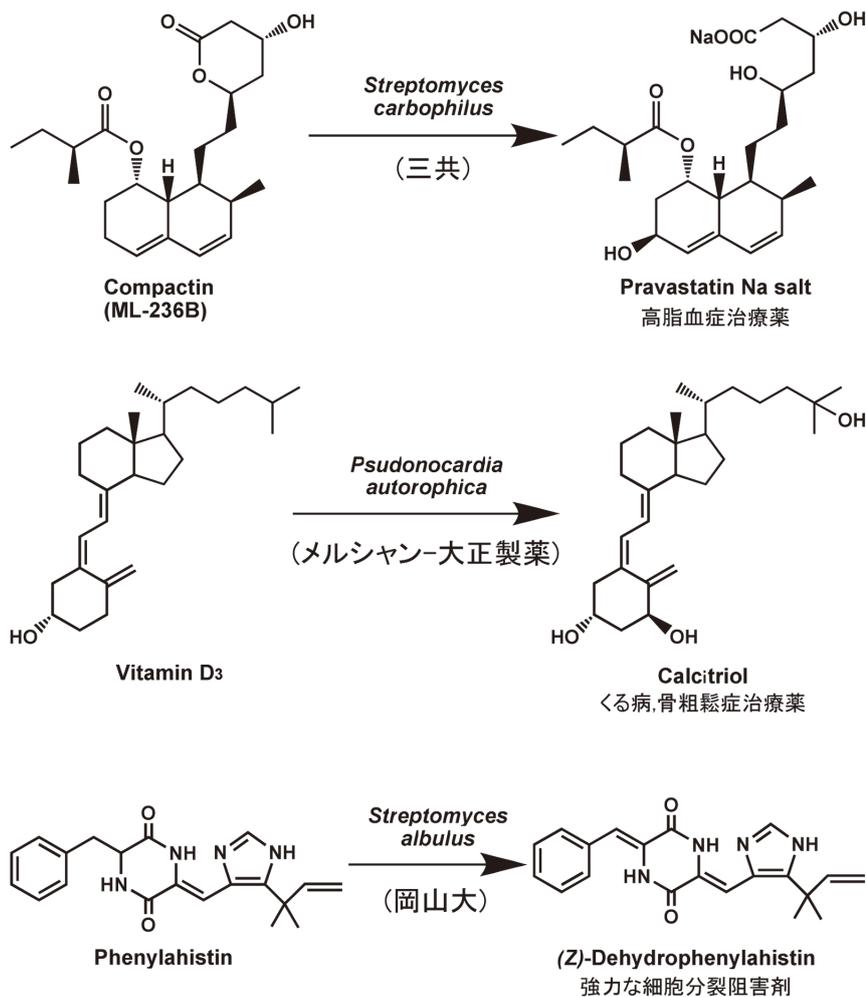


図1 天然有機化合物の生物変換による有用物質生産例

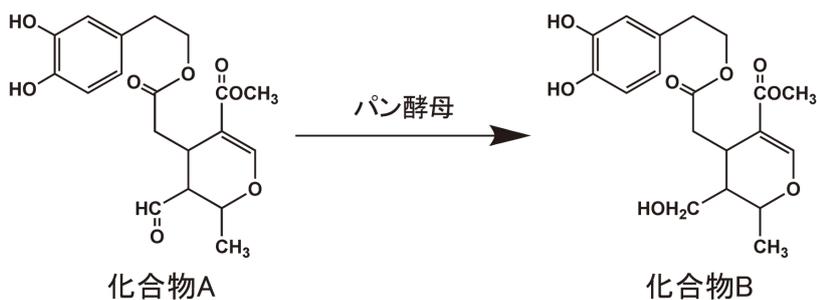


図2 パン酵母により触媒されるオリーブ葉成分の生物変換反応

アッセイプレートに添加して吸光度を測定し、吸光度の減少の割合から抗酸化力を評価した。

(1) - 2 TAC法

本方法では、抗酸化物質により Cu^{2+} が Cu^+ に還元され、その Cu^+ をキレートした試薬が示す吸光度を測定することにより活性を評価する。評価は α -トコフェロール様化合物である Trolox 相当量 (nmol) を求めることで行った。尚、1 nmol の Trolox は 2 nmol の Cu^{2+} を還元する活性を有する。

(2) 品種の異なるオリーブ葉のオレウロペイン関連化合物含有量の比較

日本で栽培されているオリーブ品種に含まれるオレウロペインおよびその関連化合物の量を測定した。当初の実験で用いていたルッカー種に加え、マンザニコ種、ミッシェン種の葉を材料として用いた。採取した生葉を細断し、エタノールに浸漬して抽出物を調製した。得られた抽出物中に含まれるオレウロペインおよびそのアグリコン (化合物 A) 含有量を ODS-HPLC で測定した。HPLC 分析条件

は次に示す通りである。カラム：Inertsil ODS-3（5mm）， $\phi 4.6 \times 250$ （nm），カラム温度：35°C，ポンプ：HITACHI Pump L-710，検出器：HITACHI Diode Array Detector L-7455（200～400 nm），溶離液：60% MeOH + 0.1% TFA，流速：1.0 mL/min

(3) オレウロペインからの化合物Bのワンポット合成法の検討

① β -グルコシダーゼ活性測定

β -グルコシダーゼ活性は\beta-D-glucopyranoside (*p*NPG) を基質とする *p*NPG 分解活性で判定した。酵素活性 1 unit の定義を pH 5.5 の酢酸緩衝液，37°C の条件下で 5 mM *p*NPG を基質として 30 分間反応させた時，1 分間に 1 μ mol の *p*NP を生成する酵素量とした。

② オレウロペインから化合物Aへの脱グルコシル化反応

基質にオレウロペイン，酵素にアーモンド由来 β -グルコシダーゼを用いた。19 mM オレウロペイン (EXTRASYNTHESSE 社製) 14.5 μ L (final 11 mM) と 30 mg/mL アーモンド由来 β -グルコシダーゼ (TOYOBO 社製) 2.75 μ L (final 3.3 mg/mL) に蒸留水を添加して全体で 25 μ L とし，37°C，160 strokes/min で 24 h 反応させ，ODS-HPLC 分析 (条件は表 1 に示した) によって化合物 A 生成の定量を行った。pH の効果を検討する際には，50 mM MES buffer (final 10 mM) 5 μ L を使用した。

③ オレウロペインから化合物Aを経た化合物Bへのワンポット酵素合成

下記の 3 つの反応区での変換を試みた。

- I. 初めから β -グルコシダーゼとパン酵母で 24 h 反応させた反応区
- II. β -グルコシダーゼで 24 h 反応させた後，パン酵母を添加してさらに 24 h 反応させた反応区
- III. パン酵母のみで 24 h 反応させた反応区

19 mM オレウロペイン 72.5 μ L (final 11 mM) に 30 mg/mL β -グルコシダーゼ 13.75 μ L (final 3.3 mg/mL) と蒸留水 38.75 μ L を加えて脱グルコシル化を行った。パン酵母 (日清フーズ社製) は 1.875 mg (final 15 mg/mL) 添加した。それぞれの反応区を 37°C，160 strokes/min で 24 h or 48 h インキュベートし，遠心分離によってパン酵母と上清を分離させた後，上清を HPLC 分析に供した。

3. 結果

(1) 抗酸化活性

(1) - 1 DPPH 法で評価した抗酸化活性

図 3 に示すように，化合物 B，化合物 A，オレウロペインは α -トコフェロール以上の抗酸化活性を示した。さらに，オレウロペインと化合物 A はアスコルビン酸ナトリウムと同程度，化合物 B はアスコルビン酸ナトリウム以上の抗酸化活性を示した。DPPH ラジカルを 20% 消去する濃度 (nM) はアスコルビン酸ナトリウムが 8.88，oleuropein が 7.66，化合物 A が 9.02，化合物 B が 5.11 であった。

(1) - 2 TAC 法で評価した抗酸化活性

TAC 法により求めた活性を Trolox 相当量 (nmol) で示すとアスコルビン酸ナトリウムは 2.55，オレウロペインは 2.30，化合物 B は 7.10 であった。

DPPH 法，TAC 法の両者での評価値は類似しており，アスコルビン酸ナトリウムとオレウロペインはほぼ同程度の活性を，化合物 B はそれより高い活性を示すことが判明した。

(2) 品種の異なるオリブ葉のオレウロペイン関連化合物含有量の比較

オリブには 500 以上の品種があるとされており，日本

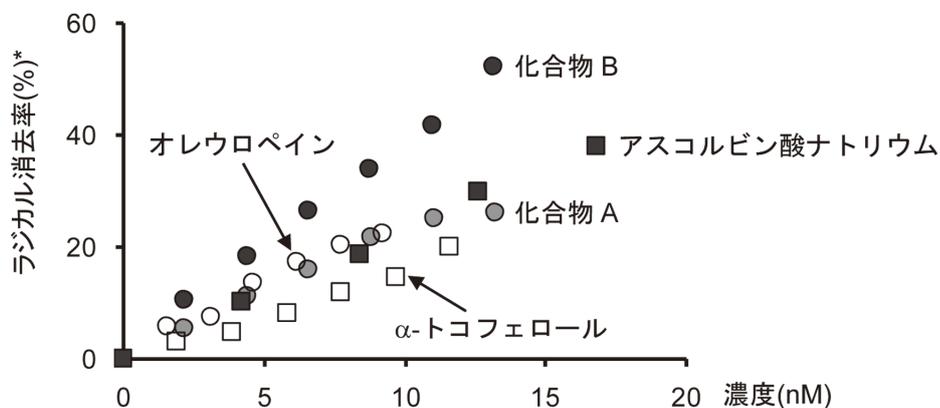


図 3 DPPH 法で評価した抗酸化活性
ラジカル消去率は試料無添加区と試料添加区の吸光度の差の試料無添加区の吸光度に対する比を百分率に換算した値として求めた。

でも数種類が栽培されている。論文などの報告ではオリーブにはオレウロペインが著量含まれているとされており、今回の抽出物に含まれていた化合物Aがオレウロペインのアグリコンであったことから、この基質の品種間の差を調べることにした。品種としては、前回使用していたルッカー種に加え、岡山で栽培されている、マンザニコ種、ミッション種を加えた3種を用いた。

表1から判るように、全ての品種由来の抽出物中にオレウロペインと化合物Aが含まれていた。3種のオリーブを比較すると、オレウロペインと化合物Aの両者ともにマンザニコ種由来の抽出物に最も多く含まれていることが判った。データを示していないが、抽出の際の条件を変更することにより、オレウロペインと化合物Aの比率が変化することが判っており、化合物Bの効率的調製を行うためには抽出条件も重要であることが判明した。

(3) オレウロペインからの化合物Bのワンポット合成法の検討

様々な論文の報告および(2)で示した結果から、オリーブ葉には配糖体オレウロペインが著量含まれており、化合物Bを効率よく生成するためには、オレウロペインからの変換系を確立することが望ましい。この反応は配糖体加水分解、化合物Aの化合物Bへの還元という2ステップから

表1 オリーブ葉抽出物に含まれるオレウロペインおよびそのアグリコンの量
231nmで検出した各化合物のPeak areaを生葉新鮮重1グラムあたりに換算した。

| オリーブ品種 | 化合物A peak area ($\times 10^9$) | オレウロペイン peak area ($\times 10^9$) |
|--------|-------------------------------------|--|
| ミッション | 6.00 | 1.13 |
| ルッカー | 8.85 | 3.01 |
| マンザニコ | 12.6 | 5.25 |

なるが、それをワンポットで実施可能か市販のオレウロペインを基質として検討した。

この手法を用いることにより、
・工程を簡略化することができる
・中間体の単離・精製をすることがないので収率の低下を防ぐことができる
という利点が挙げられる。

①パン酵母のβ-グルコシダーゼ活性

pNPG分解活性測定試験より、現在使用しているパン酵母のβ-グルコシダーゼ活性は 5.08×10^{-4} units/酵母mgと求められた。アーモンド由来β-グルコシダーゼ(TOYOBO社製)のpNPG分解活性は、 6.99×10^{-3} units/mgであった。次の実験で示すが、オレウロペインの脱グルコシル化には 5.77×10^{-4} units必要であり、これをパン酵母で賄おうとすると反応液25μLに対してパン酵母を1.14 mg添加しなければならぬので現実的ではない。そこで、オレウロペインから化合物Aへの変換にはパン酵母ではなく、市販精製β-グルコシダーゼを用いることにした。

②オレウロペインから化合物Aへの脱グルコシル化反応

アーモンド由来β-グルコシダーゼ(TOYOBO社製)でオレウロペインを処理したところ、オレウロペインの減少、化合物Aの生成が確認でき、オレウロペインの脱グルコシル化の進行が判明した。

そこで、その反応についてβ-グルコシダーゼの反応に適したpHとされる5.5と中性付近のpH 7.0で反応の経時変化実験を行った。

酸性領域において化合物Aが多く生成された。これは使用したβ-グルコシダーゼの最適反応pHが5.5であったためだと考えられる。また、化合物Aの生成量は、pH 7.0では反応開始から9hをピークに急激に減少しているのに対し、pH 5.5では反応開始から72hをピークに緩やかに減少している。このことより、化合物Aは酸性条件で安定である可能性が示唆された。

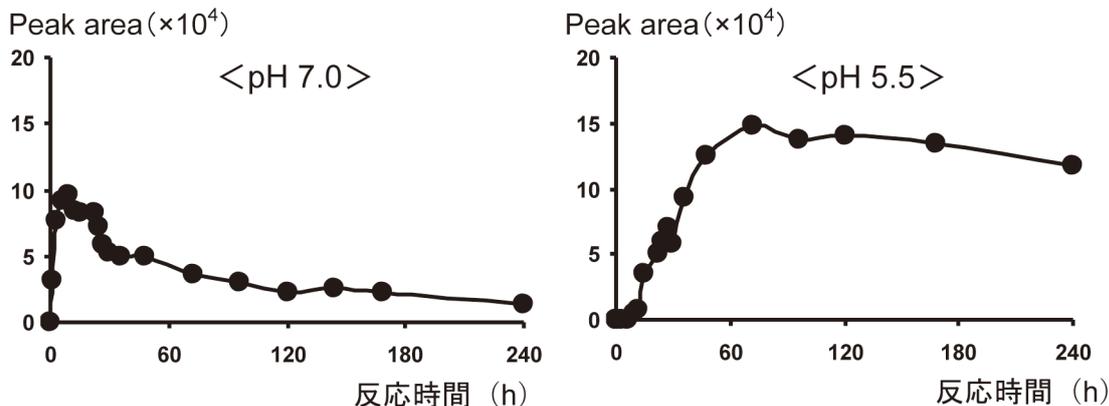


図4 β-グルコシダーゼにより触媒されるオレウロペインからアグリコンへの変換反応

③オレウロペインから化合物Aを経た化合物Bへのワンポット酵素合成

オレウロペインから化合物Bへの変換をワンポットで行うにあたり、オレウロペインから化合物Aへの変換を触媒するβ-グルコシダーゼと化合物Aから化合物Bへの変換を触媒するパン酵母の2種の触媒を、同時に添加する方法(反応区Ⅰ)、触媒を継時的に連続添加する方法(反応区Ⅱ)、パン酵母のみの触媒能で反応する方法(反応区Ⅲ)の3種で検討を行った。各反応区における化合物Bの生成量を図5に示した。このことより、Ⅱのステップワイズ方式で酵素反応を行った方が化合物Bの生成に適していることが示唆された。また、反応区Ⅱにおけるクロマトグラムを図6に示した。このクロマトグラムから、オレウロペインから化合物A、化合物Bが生成されたことが明らかとなった。なお、当初の予想通り、パン酵母のみではβグルコシ

ダーゼ活性が低く、化合物Bの生成は認められなかった。

4. 考 察

オレウロペインアグリコン(化合物A)からパン酵母処理により新たに生成した化合物Bはアスコルビン酸ナトリウムやα-トコフェロールといった抗酸化物質より強い活性を保有していることから、その作用をさらに詳細に検討することにより、化粧品素材等としての開発が期待される。

化合物Bの生成が、オレウロペインからのワンポット合成により達成できることが判明したので、この手法による変換率の向上が達成できれば、化合物Bを含むエキスの経済的な調製が可能となり、素材開発への道が開けることが期待される。

さらに、オリブ葉の抽出物中には著量のオレウロペインとそのアグリコンが含まれており、日本の栽培品種では

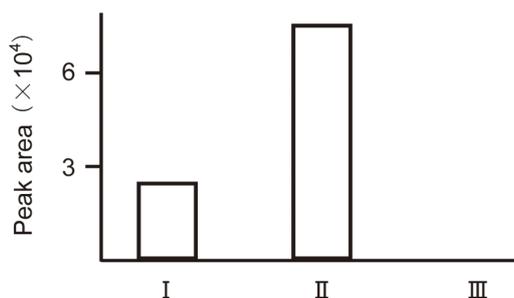


図5 ワンポット変換による化合物Bの生成量

- Ⅰ: β-グルコシダーゼとパン酵母を同時添加し、24 h 反応させた反応区
- Ⅱ: β-グルコシダーゼで24 h 反応させた後、パン酵母を添加してさらに24 h 反応させた反応区
- Ⅲ: パン酵母のみで24 h 反応させた反応区

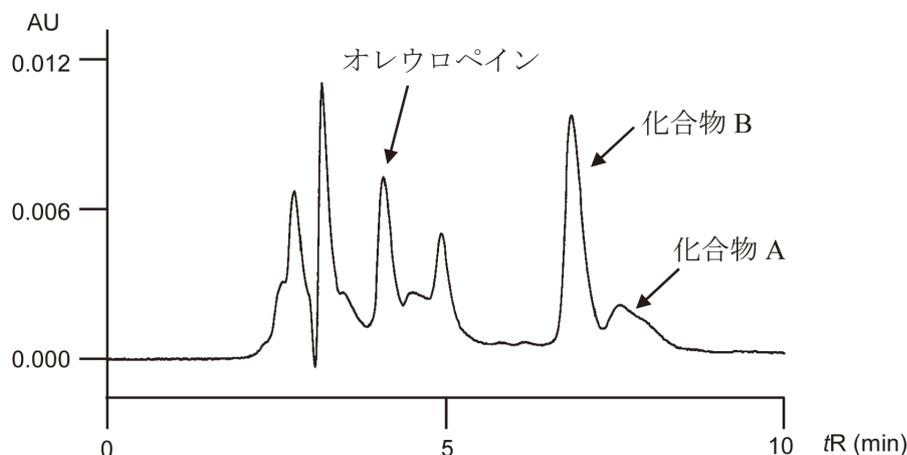


図6 ワンポット変換(反応区Ⅱ)で得られる反応溶液のHPLC分析クロマトグラム
検出波長: 231nm

マンザニロ種由来抽出物に最も含量が多いことが判明した。以上のことから、オリーブ葉抽出物を直接生物変換処理する手法を上記のワンポット合成も含めて検討することにより、より有効な化合物B含有エキス調製法の確立が期待される。

(引用文献)

- 1) Matsuoka T, Miyakoshi S, Tanzawa K, *et al.*: Purification and characterization of cytochrome P-450sca from *Streptomyces carbophilus*. ML-236B (compactin) induces a cytochrome P-450sca in *Streptomyces carbophilus* that hydroxylates ML-236B to pravastatin sodium (CS-514), a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase, *Eur. J. Biochem.*, **184**, 707-713, 1989
- 2) 岸田有吉, 内藤敦, 岩藤誠吾, ほか2名: プラバスタ

チンの開発研究, 薬学雑誌, **111**, 469-487, 1991

- 3) Sasaki J, Miyazaki A, Saito M, *et al.*: Transformation of vitamin D₃ to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ via 25-hydroxyvitamin D₃ using *Amycolata* sp. strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 152-157, 1992
- 4) Takeda K, Asou T, Matsuda A, *et al.*: Application of cyclodextrin to microbial transformation of vitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D₃ and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃, *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 380-382, 1994
- 5) Kanzaki H, Yanagisawa S, Kanoh K, *et al.*: A novel potent cell cycle inhibitor dehydrophenylahistin--enzymatic synthesis and inhibitory activity toward sea urchin embryo, *J. Antibiot.*, **55**, 1042-1047, 2002
- 6) Kanzaki H, Kanoh K, Yanagisawa S, *et al.*: Cell division inhibitors and process for producing the same, PCT Int. Appl., 2001, WO 2001053290