

# 海洋細菌由来の新規カロテノイド配糖体の単離・構造決定と組換え大腸菌による新規カロテノイド配糖体の創製

横 山 昭 裕

## Isolation and Structure Determination of Two Astaxanthin Type Carotenoid Glucosides from a Marine Bacterium. Production of New Carotenoid Glucosides By a *Escherichia coli* Transfromants

Akihiro YOKOYAMA

New carotenoid glucosides, astaxanthin  $\beta$ -glucoside (1) and adonixanthin 3- $\beta$ -glucoside (2) were isolated from a marine bacterium *Agrobacterium aurantiacum*, and their structures were determined. We constructed plasmids having seven carotenoid biosynthetic genes and succeeded in the production of new carotenoid glucoside, astaxanthin  $\beta$ -diglucoside (3) together with presursors, 1 and adonixanthin 3'- $\beta$ -glucoside (4) by the transformed *E. coli*. Those new carotenoids are expected to be useful as water soluble carotenoids.

### 1. 緒 言

カロテノイドは主としてC40のテトラテルペンで、微生物、植物が生産し動物も含め広く分布する黄～橙～赤色の生体色素である。食品添加物や養殖魚貝類の色揚げ剤として広く実用化されているほか、近年抗酸化作用、抗炎症作用、腫瘍細胞の増殖抑制作用、免疫賦活作用などの生理活性作用が報告され注目を集めている<sup>1)</sup>。我々はエビ、カニ、マダイ、サケ等に分布し、強力な抗酸化作用を有する赤色カロテノイド astaxanthin (アスタキサンチン) について、海洋細菌 *Agrobacterium aurantiacum* が、細菌では初めて astaxanthin の生産能を有することを見出した<sup>2)</sup>。

しかしながら、カロテノイドは脂溶性であるため、通常水には難溶であり、用途開発の面から水溶性カロテノイドの開発が望まれる。そこで今回、種々の生理活性が期待される astaxanthin タイプの高極性カロテノイドを探索したところ、*A. aurantiacum* が微量の高

極性赤色カロテノイドを生産していたので、高生産な培養条件を設定し、新規カロテノイド配糖体 astaxanthin glucoside (1) を単離・構造決定した<sup>3)</sup>。

また、既に Misawa らは、上述の *A. aurantiacum* および土壌細菌 *Erwinia uredovora* のカロテノイド生合成遺伝子をクローニングし、大腸菌での astaxanthin 生産に成功すると共に、遺伝子・酵素レベルで astaxanthin 生合成経路を解明した<sup>4-6)</sup>。すなわち、Fig. 2 に示すように、*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* 遺伝子によりイソプレレン鎖の延長、不飽和化、環化反応が起こり  $\beta$ -carotene が生成される。そして *E. uredovora* では、*crtZ* による水酸化、*crtX* による UDP-glucose の転化によって zeaxanthin  $\beta$ -D-diglucoside が合成され、*A. aurantiacum* では、*crtZ* による水酸化、*crtW* によるメチレン基のケト基へのダイレクトな酸化によって zeaxanthin や canthaxanthin を経て astaxanthin が合成される。このことは、これら7個の *crt* 遺伝子全てを1つの細胞内で発現できれば、上述の1やその

diglucoside 体などの astaxanthin タイプのケトカロテノイド配糖体を大腸菌などの微生物で生産できる可能性を示唆している。今回、これらカロテノイド配糖体の生産の試みとして代謝工学（エタポリックエンジ

ニアリング）的手法<sup>7)</sup>により、異種のカロテノイド生合成遺伝子類を組合わせたプラスミドを構築し、大腸菌で発現させることにより、化合物1だけでなく非天然型の新規カロテノイド配糖体 astaxanthin diglucoside

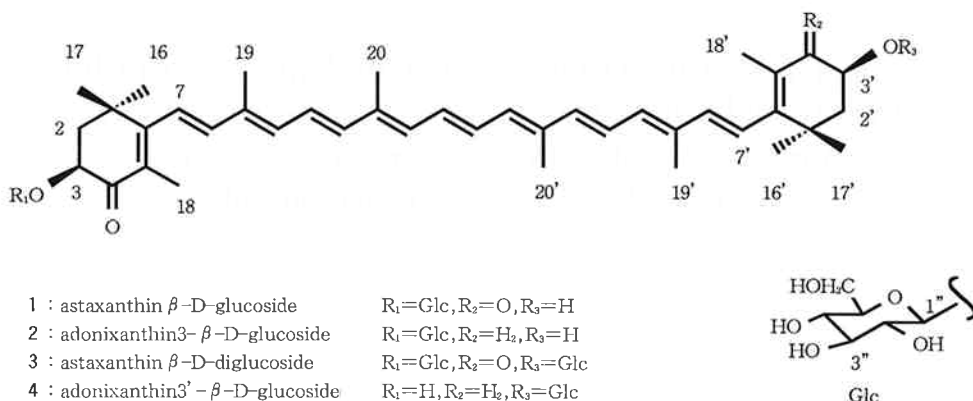


Fig. 1 Structures of new carotenoid glucosides 1-4.

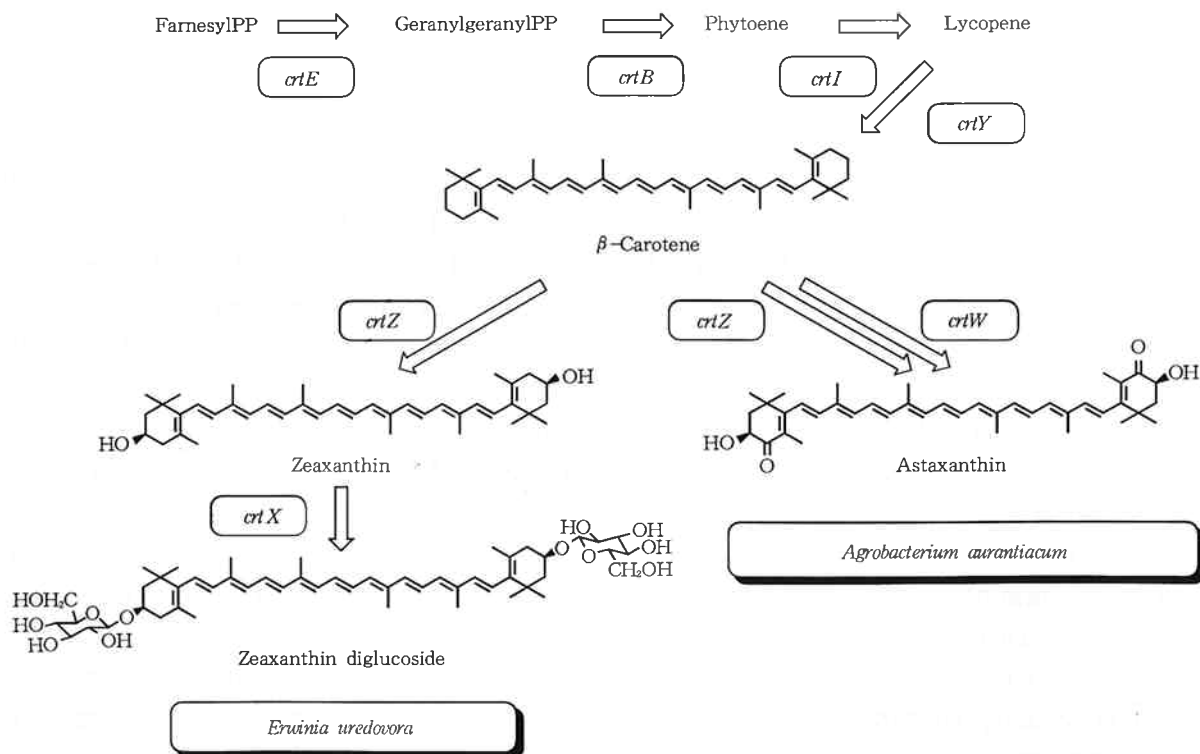


Fig. 2 Functions of carotenoid biosynthesis genes of *E.uredovora* and *A.aurantiacum*.

を創製した<sup>8)</sup>。

## 2. 材料および方法

### [1] 材料の調製

#### (1) Astaxanthin glucoside 生産海洋細菌および培養

Astaxanthin 生産細菌 *Agrobacterium aurantiacum* は、1990年3月に沖縄県阿嘉島沿岸の海水より分離され、Izumidaらにより新種と同定された<sup>9)</sup>。培地は、Bacto peptone (5g)、Bacto yeast extract (1g)、iron(III)phosphate *n*-hydrate (0.04g)、sodium acetate trihydrate (0.1g)、glucose (2gまたは10g)、蒸留水 (500ml)、ろ過海水 (500ml) の組成 (pH7.8) のものを用い、20℃、4日間、ロータリーシェーカーにて培養した。

#### (2) Astaxanthin diglucoside 生産用組換え大腸菌の調製および培養

Fig. 3 に調製したプラスミドを示す。pACCAR25 は、chloramphenicol 耐性遺伝子を有する大腸菌ベクター pACYC184 の *EcoRV* 部位に、*E. uredoovora* の6個全部の *crt* 遺伝子を含む6.50kb断片を挿入したも

ので、pACCAR16は、*crtZ*を除く5個の *crt* 遺伝子を含む6.01kb断片を挿入したものである。またpAK916およびpAK96Kは、ampicillin 耐性遺伝子を有する大腸菌ベクター pBluescript II SK<sup>-</sup>に、各々 *A. aurantiacum* の *crtW* を含む断片および *A. aurantiacum* の *crtW* と *crtZ* を含む断片を挿入したものである<sup>4)</sup>。次に上述のプラスミドを *Escherichia coli* JM109に導入し、以下の2種の形質転換体を作製した。

組換え体A:

*E. coli* JM109 (pACCAR25, pAK916)

[*E. uredoovora* 由来の *crtZ* を含有]

組換え体B:

*E. coli* JM109 (pACCAR16, pAK96K)

[*A. aurantiacum* 由来の *crtZ* を含有]

上述の組換え体を chloramphenicol (30mg/L)、ampicillin (150mg/L) および isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (0.2mM) 含有のLB培地 (tryptone 10g、yeast extract 5g、NaCl 10g、H<sub>2</sub>O 1L) の培地で、30℃、2日間、ロータリーシェーカーにて培養した。

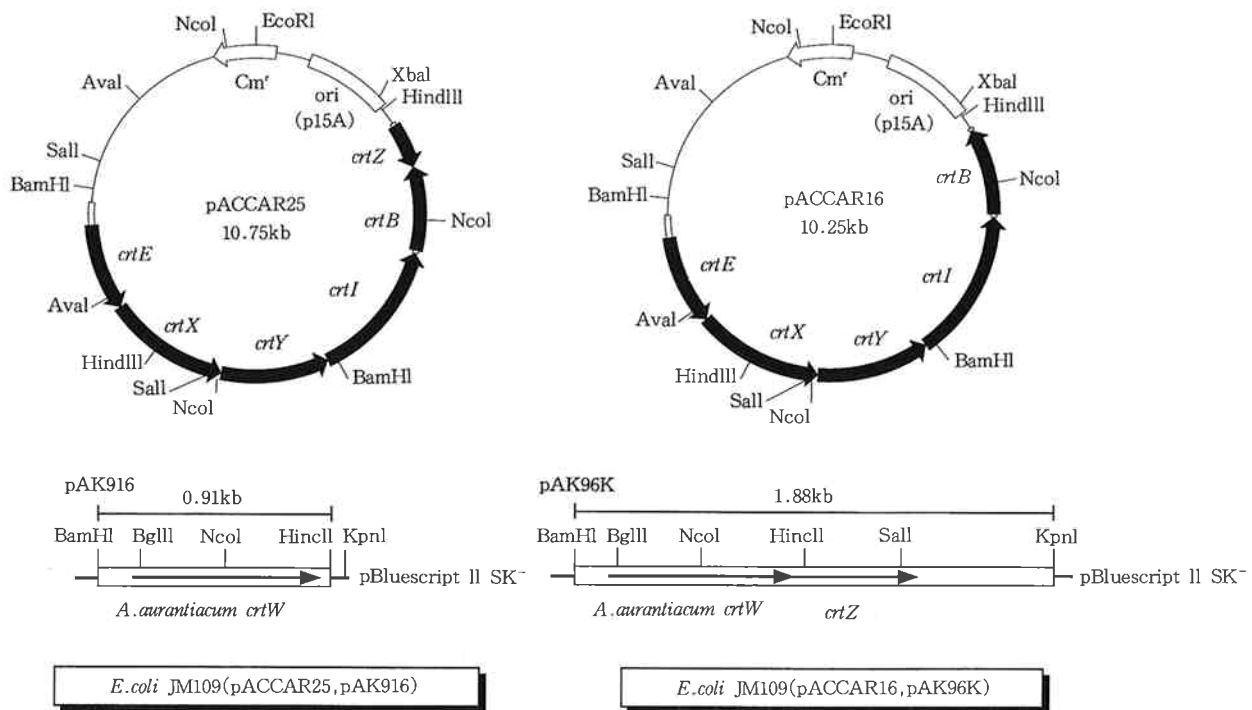


Fig. 3 Structures of plasmids containing the *E. uredoovora crt* genes (pACCAR25 and pACCAR16) and the *A. aurantiacum crt* gene(s) (pAK916 and pAK96K).

## [2] Astaxanthin glucoside 類の単離・構造決定

### (1) 機器分析

UV-VIS スペクトルは、UV-160A (島津) にて、CD スペクトルは Et<sub>2</sub>O-isopentane-EtOH (5:5:2) 中で J-600 (日本分光) 測定した。NMR は Unity-500 (パリアン) または、Lambda-400 (日本電子) にて測定し、高分解能マススペクトル (HRMS) は JMS-SX102 (日本電子) を用い FAB モードで測定した。TLC は silica gel 60 F<sub>254</sub> (メルク) を担体とし、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) を展開溶媒に用いて行った。HPLC 分析は、8010HPLC システム (東ソー) にて、カラムに TKGgel ODS-80Ts (4.6×150mm、東ソー) を用い、溶媒 A [H<sub>2</sub>O-MeOH (5:95)] を 0-5 分、溶媒 A から溶媒 B [acetone-THF (7:3)] のリニアグラジエントを 5-10 分、溶媒 B のみ 10-17 分のプログラムで、流速 1 ml/min で溶出し 470nm でモニターした<sup>10)</sup>。

### (2) 海洋細菌由来の astaxanthin glucoside の単離

Glucose 濃度 1% の培地 15 L を用いて培養した *A. aurantiacum* 菌体を遠心分離にて集菌し、acetone で抽出後、EtOAc-H<sub>2</sub>O 分配を行った。EtOAc 層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で脱水、乾固後、シリカゲルカラム [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1)] に引き続き、HPLC [TSKgel ODS-80Ts, 7.8×300mm, H<sub>2</sub>O-MeOH (5:95)] に供し化合物 1 を 2.3mg 得た。全く同様の操作によって、glucose 濃度 0.2% の培地 18 L スケールで培養した菌体より化合物 2 を約 0.6mg 得た。

### (3) 組換え大腸菌の生産する astaxanthin diglucoside の単離

組換え体 A を 12 L 培養後、遠心分離し、菌体を acetone および acetone-MeOH (7:3) にて抽出・濃縮後、80% MeOH と *n*-hexane で分配した。80% MeOH 画分をシリカゲルカラム (CHCl<sub>3</sub>-MeOH/8:2) にて精製し、2 成分を得た。各々 HPLC [TSKgel ODS-80Ts, H<sub>2</sub>O-MeOH (5:95 or 1:9)] に供し化合物 1 (4.2mg) と化合物 3 (2.3mg) を得た。組換え体 B の 12 L の培養菌体についても同様に、抽出、分配、シリカゲルカラムを行い、HPLC [H<sub>2</sub>O-MeOH (5:95)] により化合物 4 (1 mg 以下) を得た。

## 3. 結果および考察

### [1] 海洋細菌由来の astaxanthin glucoside

菌体粗抽出液の HPLC 分析において、化合物 1 と

2 の割合は全カロテノイドに対し各々 10.5% および 3.7% であった。

化合物 1 の可視部の吸収極大は benzene 中 λ max 487nm で、HRFABMS m/z [M+H]<sup>+</sup>759.4474 (calcd for C<sub>46</sub>H<sub>63</sub>O<sub>9</sub>, 759.4472) より astaxanthin のモノヘキサース誘導体と推定された。<sup>1</sup>H-NMR のデータを Table に示す。一方のエンドグループ (primed number) は astaxanthin の 3-hydroxy-4-keto-β タイプと一致した。もう一方のエンドグループ (unprimed number) は 3-substituted-3-hydroxy-4-keto-β タイプと同定された。糖部分は C-1" の δ<sub>C</sub>104.9 と、C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> 中で測定した H-1" から H-4" の結合定数が 8~9 Hz を示したことから、β-D-glucose と同定した。またカロテノイドの H-3 と糖の H-1" との間に NOESY の相関が観測され、astaxanthin の monoglucoside であることが明らかとなった。3 位、3' 位の絶対配置は、CD の特徴的な負の Cotton 効果 (314nm, Δε-18.5) が (3*S*, 3'*S*)-astaxanthin と良く一致することから、3*S*, 3'*S* 体と決定した。

同様に化合物 2 の可視部の吸収極大は 476nm (benzene 中) で、HRFABMS m/z [M+H]<sup>+</sup>745.4689 (calcd for C<sub>46</sub>H<sub>65</sub>O<sub>8</sub>, 745.4679) で、化合物 1 と比較した<sup>1</sup>H-NMR の結果より adonixanthin の monoglucoside 体と推定された。一方のエンドグループ (unprimed number) は 1 と完全に一致し、adonixanthin の 3 位水酸基に glucose が β 結合した構造であった。CD の結果より絶対配置を 3*S*, 3'*R* 体と決定した。以上、*A. aurantiacum* 培養菌体の高極性成分として、新規カロテノイド配糖体 (3*S*, 3'*S*)-astaxanthin β-D-glucoside (1) および (3*S*, 3'*R*)-adonixanthin 3-β-D-glucoside (2) を単離・構造決定した。

### [2] 組換え大腸菌の生産する astaxanthin diglucoside

組換え体 A の粗抽出液の HPLC 分析において、astaxanthin と一致するピーク (全ピーク面積中 32%)、化合物 1 と一致するピーク (49%)、さらに高極性画分に未同定のピーク (化合物 3、10%) が確認された。前者は、先に述べた astaxanthin glucoside (1) と TLC, HPLC, VIS, <sup>1</sup>H-NMR で完全に一致した。

化合物 3 の可視部吸収極大は 492nm (CHCl<sub>3</sub>-MeOH/2:1) で、HRFABMS m/z [M+H]<sup>+</sup>921.4992 (calcd for C<sub>52</sub>H<sub>73</sub>O<sub>14</sub>, Δ-0.8mmu) より astaxanthin diglucoside の可能性が示唆された。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD/2:1 中) は、対称型の

Table <sup>1</sup>H-NMR data for 1-4

Proton	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> -2	2.04(t,14) 2.15(dd,6,14)	2.04(m) 2.15(dd,6,14)	1.94(m) 2.18(dd,5,13)	1.79(m) 2.06(m)
H-3	4.40(dd,6,14)	4.40(dd,6,14)	4.77(m)	4.28(dd,6,14)
H <sub>3</sub> -16	1.35(s)	1.35(s)	1.31(s)	1.18(s)
H <sub>3</sub> -17	1.23(s)	1.23(s)	1.19(s)	1.29(s)
H <sub>3</sub> -18	1.91(s)	1.91(s)	1.86(s)	1.87(m)
H <sub>2</sub> -2'	1.81(t,13) 2.16(dd,6,13)	1.48(t,12) 1.77(ddd,2,4,12)	1.94(m) 2.18(dd,5,13)	1.52(t,12) 1.83(m)
H-3'	4.32(ddd,2,6,13)	4.00(m)	4.77(m)	4.05(m)
H <sub>2</sub> -4'	—	2.05(m) 2.39(ddd,2,6,17)	—	2.08(m) 2.42(dd,4,17)
H <sub>3</sub> -16'	1.32(s)	1.08(s)	1.31(s)	1.03(s)
H <sub>3</sub> -17'	1.21(s)	1.08(s)	1.19(s)	1.03(s)
H <sub>3</sub> -18'	1.94(s)	1.74(s)	1.86(s)	1.69(s)
Olefinic H(14H)	6.21-6.67	6.12-6.67	6.18-6.67	6.05-6.70
H <sub>3</sub> -19,20,19',20'	1.99-2.01(s)	1.98-2.00(s)	1.98-1.97(s)	1.92-1.96(s)
H-1''	4.57(d,8)	4.57(d,8)	4.49(d,8)	4.42(d,8)
H-2''	3.45(dd,8,9)	3.45(dd,8,9)	3.36(dd,8,9)	3.19(m)
H-3''	3.61(m)	3.61(m)	3.43(t,9)	3.38(m)
H-4''	3.61(m)	3.61(m)	3.41(t,9)	3.38(m)
H-5''	3.41(m)	3.41(m)	3.27(m)	3.27(m)
H <sub>2</sub> -6''	3.83(m) 3.93(m)	3.83(m) 3.93(m)	3.70(dd,5,12) 3.83(dd,3,12)	3.72(dd,5,12) 3.83(dd,3,12)

a) Data were recorded in CDCl<sub>3</sub> at 500MHz.b) Data were recorded in CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD (2:1) at 400MHz.

カロテノイド 1 分子と 1 種類のヘキサース 2 分子が観測された。同一溶媒での化合物 1 との比較の結果、カロテノイド部分は 3 位、3' 位が置換された astaxanthin、糖部分は β-glucose と一致し、化合物 3 を新規カロテノイド astaxanthin β-D-diglucoside と決定した。

組換え体 B の HPLC 分析において、astaxanthin と一致するピーク (54%)、さらに高極性画分に未同定のピーク (化合物 4、45%) が確認された。化合物 4 の可視部吸収極大は 487nm (CHCl<sub>3</sub>-MeOH/2:1 中) で、同一溶媒中での adonixanthin の吸収と良く一致した。HRFABMS m/z [M+H]<sup>+</sup>745.4677 (calcd for C<sub>46</sub>H<sub>65</sub>O<sub>8</sub>, Δ-0.2mmu) より adonixanthin のヘキサース誘導体と推定された。Astaxanthin および zeaxanthin diglucoside との同一溶媒での <sup>1</sup>H-NMR の比較により、化合物 4 を adonixanthin をアグリコ

ンとし、その 3' 位水酸基が glucosyl 化された新規カロテノイド adonixanthin 3'-β-D-glucoside と決定した。

以上、代謝工学的手法により、異種のカロテノイド生合成遺伝子群を組合わせて大腸菌に導入し発現させることにより、その培養菌体が astaxanthin glucoside (1)、astaxanthin diglucoside (3) などの当初目的とする astaxanthin タイプのカロテノイド配糖体を生産することを確認した。

#### 4. 結 論

海洋細菌 *A. aurantiacum* より astaxanthin タイプの新規高極性カロテノイド、化合物 1 (monoglucoside 体) を単離・構造決定した。さらに、7 種のカロテノイド生合成遺伝子が大腸菌に組込み、その培養物より

水溶性が期待できる新規化合物 3 (diglucoside 体) を単離・構造決定した。近年カロテノイド類は各種生理活性が報告されているが、今後これら高極性な astaxanthin glucoside 類にも抗酸化作用やガン予防作用などの生理活性が期待でき、また極性が高いことから用途開発の面からも興味を持たれる。

生合成遺伝子のクローニングおよび recombinant DNA 技術を用いた組換え体の構築による、代謝工学 (メタボリックエンジニアリング) 的手法を用いた有用物質生産は、アミノ酸生産などで一部行われているが、本研究での分子量900を越える新規化合物の生産は初めての例である。代謝工学的手法は、従来の培養条件の最適化、変異体の取得などの発酵工学的手法や、全合成、部分合成、化学修飾などの有機合成的手法とは異なり、新たなファインケミカル生産の手段として、今後の展開が期待される。

## 5. 謝 辞

本研究は、株式会社海洋バイオテクノロジー研究所に著者が出向中に行ったものであり、御指導いただいた清水研究所所長 志津里芳一博士に感謝致します。また、遺伝子組換えによる astaxanthin diglucoside の生産は、キリンビール株式会社基盤技術研究所 主任研究員 三沢典彦博士との共同研究である。



著 者

氏名 横 山 昭 裕

Akihiro YOKOYAMA

入社 昭和62年4月1日

所属 東京研究所

バイオ分野

主任研究員

## 6. 引用文献

- 1) 海洋生物のカロテノイド 代謝と生物活性、幹渉編, 恒星社厚生閣 (1993)
- 2) A. Yokoyama, H. Izumida and W. Miki, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1842-1844 (1994)
- 3) A. Yokoyama, K. Adachi and Y. Shizuri, *J. Nat. Prod.*, **58**, 1929-1933 (1995)
- 4) N. Misawa, Y. Satomi, K. Kondo, A. Yokoyama, S. Kajiwara, T. Saito, T. Ohtani and W. Miki, *J. Bacteriol.*, **177**, 6575-6584 (1995)
- 5) N. Misawa, M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura, and K. Harashima, *J. Bacteriol.*, **172**, 6704-6712 (1990)
- 6) P.D. Fraser, Y. Miura, and N. Misawa, *J. Biol. Chem.*, **272**, 6128-6135 (1997)
- 7) 三沢典彦, 化学と生物, **35**, 60-68 (1997)
- 8) A. Yokoyama, Y. Shizuri and N. Misawa, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 3709-3712 (1998)
- 9) H. Izumida, K. Adachi, M. Nishijima, M. Endo and W. Miki, *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 155-118 (1995)
- 10) A. Yokoyama and W. Miki, *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 139-144 (1995)