

植物精油オイゲノールの微生物代謝： 二重結合の移動を伴う新規水酸化反応

古川 裕考・杉尾 剛・長澤 透^{a)}

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Double Bond-Transferring Novel Hydroxylation Reaction Involved in Microbial Metabolism of Plant Essential Oil Eugenol

Hiroataka Furukawa, Tsuyoshi Sugio and Toru Nagasawa

(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

We isolated a eugenol-degrading bacterium *Pseudomonas fluorescens* E118. This strain produced a novel enzyme, eugenol dehydrogenase which catalyzes the formation of coniferyl alcohol from eugenol. The enzyme required an electron acceptor such as phenazine methosulfate (PMS). The enzyme was purified 242-fold with a 22.4% overall recovery from the eugenol-induced cells of *P. fluorescens* E118. The purified enzyme appeared to be homogeneous, judging from the analysis of polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme was a 68.6 kDa protein composed of two different subunits (α subunit 10.4 kDa and β subunit 58.2 kDa). The enzyme exhibited a cytochrome c-like absorption spectrum. The α subunit containing heme c seemed to play an important role for the dehydrogenation reaction. The enzyme also catalyzes the dehydrogenation of 4-alkylphenol into the corresponding alkyl 1-(4-hydroxyphenyl)-alcohol, and vanillyl alcohol into vanillin, respectively. The reaction products were isolated and identified. These reactions seemed to proceed through the same mechanisms.

Key words : eugenol, eugenol dehydrogenase, coniferyl alcohol

諸 言

植物精油 eugenol は自然界に広く存在し、安価な農業余剰産物である。オイゲノールは *Pseudomonas* 属や *Corynebacterium* 属細菌によって Fig. 1 に示したように代謝されることが知られている^{1,2)}。この中でオイゲノールからコニフェリルアルコールへの変換は二重結合が移動すると同時に酸化されるユニークな反応が予想されるが、この変換に関する酵素化学的知見は全く得られていない。オイゲノール代謝における中間体フェルラ酸は抗酸化剤、医薬品出発原料となり、また、コニフェリルアルコールは高価な香料として知られている。本報では *P. fluorescens* E118 のオイゲノール代謝について、酵素レベルでの

検討を試みた。

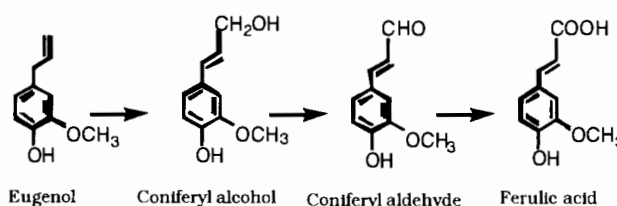


Fig. 1 Catabolic pathway of eugenol-degrading bacteria.

Received October 1, 1996

a) 現 岐阜大学工学部

材料と方法

オイゲノール資化菌の分離

オイゲノールを唯一の炭素源とした培地(0.1% (w/v) オイゲノール, 0.4% 塩化アンモニウム, 0.2% リン酸水素二カリウム, 0.05% 硫酸マグネシウム, 0.1% 酵母エキス, pH 7.0)を用いて28℃で集積培養を行いオイゲノール分解菌の分離を試みた。1週間振盪培養した後、培養液の数滴を同組成の新たに調製した培地に植え継いだ。この操作を4回繰り返した後、2% (w/v) 寒天を含む同培地に広げ、生成したコロニーを分離した。

培養と休止菌体の調製

P. fluorescens E118はオイゲノールデヒドロゲナーゼを誘導するための最適培地(0.15% (w/v) オイゲノール, 1.0% スクロース, 0.1% ポリペプトン, 0.3% 酵母エキス, 0.2% リン酸二水素カリウム, 0.05% 硫酸マグネシウム, pH 7.0)を用いて28℃で48時間培養した。遠心分離(14500 rpm, 20 min)にて集菌後、0.85% (w/v) 食塩水に懸濁し、休止菌体を調製した。休止菌体反応は、(1 ml 休止菌体懸濁液(50倍濃縮), 200 μmol リン酸緩衝液(pH 7.0), 20 μmol オイゲノール)の反応系(2.0 ml)で行った。

定量分析

各種化合物の分析、定量は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた。カラムはM&S PACK C₁₈(4.6×150 mm)を使用し、移動相としてメタノール:水:酢酸=45:52:3 (v/v/v)を用いた。流速は1.0 ml/minとし、280 nmで検出した。

活性測定法とユニットの定義

活性測定は(酵素溶液, 100 μmol 酢酸緩衝液(pH 5.5), 10 μmol PMS, 10 μmol オイゲノール/n-オクタン)の反応組成(1.0 ml)で行い、生成したコニフェリルアルコールをHPLCで定量した。また反応系に1.0 mM PMS と0.5 mM DCPIP を加え、分光学的に測定した³⁾。同反応条件下で、30℃で1分間に1 μmolのコニフェリルアルコールを生成する酵素量を1ユニットと定義した。タンパク量はBradfordの方法⁴⁾に従い測定した。

酵素の精製

P. fluorescens E118の菌体を超音波破碎し、遠心分離(14500 rpm, 20 min)により無細胞抽出液を調製した。硫酸分画(30-50%飽和画分)の後、DEAE-

Sephacel, Phenyl-Sepharose CL-4B, Butyl-Toyopearl等のカラムクロマトグラフィーを用いて常法により精製した

アクリルアミドゲル電気泳動、ヘム染色及び活性染色

SDS-PAGEは、10%ポリアクリルアミドスラブゲルを使用し、Laemmliの方法⁶⁾に従って行った。Native-PAGEは10%ポリアクリルアミドスラブゲルを使用し、上記の組成から1% SDS, 50mM 2-メルカプトエタノールを除いて行った。

ヘム染色にはThomaの方法⁷⁾を用いた。活性染色はNative-PAGE後のゲルを10mM オイゲノール, 1mM PMS, 0.5 mM Nitro blue tetrazolium 溶液に浸すことで発色させた。

結果及び考察

オイゲノール資化菌の分離同定及び代謝経路の推定

約100種の土壌サンプルを用いて集積培養を行い、オイゲノール資化菌E118株を取得した。本菌は分類学的諸性質の検討から*Pseudomonas fluorescens*と同定された。休止菌体を用い、反応生成物を経時的に分析することにより、Fig. 2に示したようにオイゲノール→コニフェリルアルコール→コニフェリルアルデヒド→フェルラ酸の順に変換されることが予想された。休止菌体反応ではオイゲノールの分解は、フェルラ酸で止まり蓄積することから、本反応系の最適化を検討した。最適条件下では、約50 mMのオイゲノールはほぼ100%の転換率で、反応液1 L当たり、約10 gのフェルラ酸が蓄積した。(Data not shown)

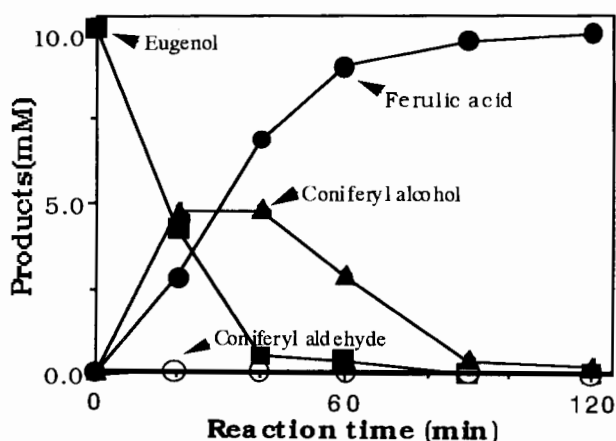


Fig. 2 Conversion of eugenol by the resting cells of *P. fluorescens* E118.

オイゲノールのコニフェリルアルコールへの変換酵素の精製と性質

オイゲノールのコニフェリルアルコールへの変換活性は菌体を破碎し、透析を行うと完全に失われた。しかし、反応系にフェナジンメソサルフェート (PMS) を添加すると活性が認められた。即ち、本反応は電子受容体を必要とするデヒドロゲナーゼであり、透析により酵素活性が消失するのは、菌体内の本来の電子受容体が除去されるためであると考えられた。よって本酵素をオイゲノール脱水素酵素と命名した。

次に本酵素の精製を試みた。Table 1 に示した各精製ステップを踏むことにより、細胞抽出液に対し、収率22.4%で242倍に精製した。精製酵素は、オイゲノールを酸化し、標準反応条件下で $24.2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$ のコニフェリルアルコールを生成した。精製酵素を用いて Native-PAGE を行ったところ単一バンドが現れた (Fig. 3)。本酵素を SDS-PAGE にかけて、2本のバンドが見られた (Fig. 4)。本酵素の分子量は TSK G-3000SW カラムを用いたゲル濾過により約 70 kDa と推定された。また TOF-mass を用いてサブユニットの分子量を測定したところ、10.4 kDa (α) と 58.2 kDa (β) の2種類のサブユニットからなっていることが明らかとなった。即ち、本酵素は68.6 kDa のヘテロダイマーであった。本酵素はオレンジ色を呈し、そのスペクトル分析からヘムを含むことが強く示唆された。Native-PAGE の後、ヘム染色を行ったところ、精製酵素タンパクに相当するバンドが強く染まった (Fig. 3)。また、SDS-PAGE の後、ヘム染色を行ったところ、 α サブユニットに相当する位置が染まり、 β サブユニットは染まらなかった (Fig. 4)。よって、ヘムは α サブユニットに含まれることが明らかとなった。

本酵素は 550, 522, 417 nm に極大吸収を有して

いた (Fig. 5)。酵素液にヒドロサルファイトを加えてもスペクトルの変化は見られず、精製酵素は溶液中では還元型であると思われた。一方、微量の過マンガン酸カリウムを加えた時、417 nm の極大吸収が410 nm にシフトし酸化型になることが明らかとなった。さらに、酸化型の本酵素溶液に基質のオイゲノールを加えると、再び還元型に戻った。本反応に伴う電子の受け渡しには、 α サブユニット中のヘムが深く関与していることが強く示唆された。極大吸収の位置と分子量より、 α サブユニットはチトクローム c と極めて類似していることが予想された。

これらの性質から本酵素はシトクローム c とフラビンを各々のサブユニットに補因子として持つ *p*-クレゾールメチルヒドロキシラーゼ (EC 1.17.99.1)⁷⁾、や 4-エチルフェノールメチレンヒドロキシラーゼ⁸⁾

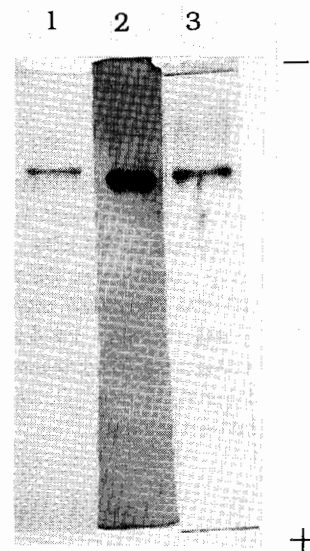


Fig. 3 Native gel electrophoreses of eugenol dehydrogenase. Lane 1, Coomassie brilliant blue R-250 staining. Lane 2, heme staining. Lane 3, active staining.

Table 1 Purification of eugenol dehydrogenase from *P. fluorescens* E118

	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude	5840	584	0.100	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30-50%)	3550	526	0.148	90.0
1st DEAE-Sephacel	202	269	1.58	46.1
Phenyl-Sepharose	21.1	239	11.3	40.9
(NH ₄) ₂ SO ₄ (40-70%)	14.1	180	12.8	30.8
Butyl-Toyopearl	9.08	151	16.7	25.9
2nd DEAE-Sephacel	5.42	131	24.2	22.4

と類似しており、フラボシトクロムグループの酵素であると言えよう。

精製酵素を用いて基質特異性を調べた (Table 2). 本酵素はオイゲノール以外に *p*-ヒドロキシベンジルアルコール類, 4-アルキルフェノール類にも作用した。しかしながら, オイゲノールに対する K_m 値は $5.0 \mu\text{M}$ と最も小さく, また, オイゲノールだけが本酵素生成のインデューサーとして作用する (Data not shown) ことより, 本酵素の本来の生理的基質はオイ

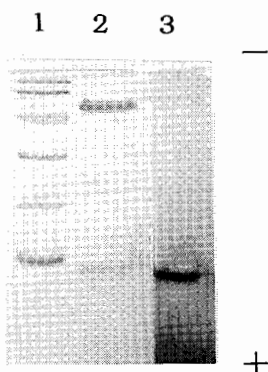


Fig. 4 SDS-PAGE gel electrophoreses of purified eugenol dehydrogenase. Lane 1, Marker proteins : phosphorylase b, 94 kDa ; bovine serum albumin, 67 kDa ; ovalbumin, 43 kDa ; carbonic anhydrase, 30 kDa ; soybean trypsin inhibitor, 20 kDa ; α -lactalbumin, 14.4 kDa. Lane 2. eugenol dehydrogenase (Coomassie brilliant blue R-250 staining). Lane 3. eugenol dehydrogenase (heme staining).

ゲノールであると考えられる。

種々の基質に対する本酵素反応生成物を溶媒抽出, シリカゲルカラムを用いて精製単離し, プロトン NMR, GC-MS を用いて機器分析を行った。オイゲノールからはコニフェリルアルコールが生成し, 本脱水素酵素によりオイゲノールの二重結合の移動を伴う水酸化が起こる。*p*-ヒドロキシベンジルアルコールやバニリルアルコールはそれぞれ対応するアルデヒドに酸化された。また, 4-アルキルフェノール類はアルキル基の α 位の炭素に水酸基が導入された。*p*-クレゾールはメチル基の水酸化に続き, アルコールの酸化が起こり, *p*-ヒドロキシベンズアルデヒドに変換された。

Penicillium simplicissimum のバニリルアルコールオキシダーゼ (EC 1.1.3.7) の精製及び諸性質の

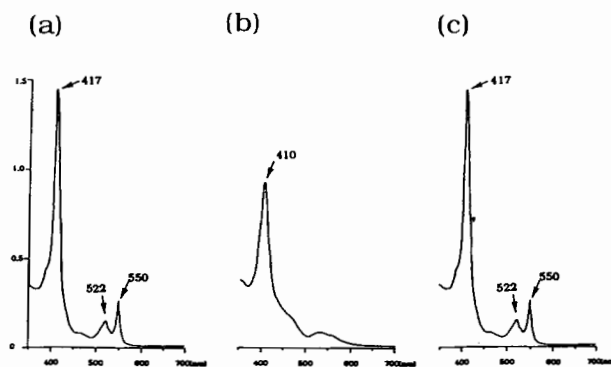


Fig. 5 Changes in absorption spectra by the addition of (a) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, (b) KMnO_4 , (c) KMnO_4 and eugenol.

Table 2 Substrate specificity of eugenol dehydrogenase

Substrate	Relative activity (%)	K_m (μM)	Product
Eugenol	100 ^{a)}	5.0	Coniferyl alcohol
Vanillyl alcohol	90.4	398	Vanillin
<i>p</i> -Hydroxybenzyl alcohol	122	820	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde
<i>p</i> -Cresol	7.93		<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde
2-Ethylphenol	0		
3-Ethylphenol	18.3		1-(3-Hydroxyphenyl) ethyl alcohol
4-Ethylphenol	78.0	142	1-(4-Hydroxyphenyl) ethyl alcohol
4-Ethylanisole	0		
4- <i>n</i> -Propylphenol	72.8	40.0	1-(4-Hydroxyphenyl) propanol
Isopropylphenol	6.25		2-(4-Hydroxyphenyl) propan-2-ol
4- <i>n</i> -Butylphenol	66.4	33.3	1-(4-Hydroxyphenyl) -butanol
4- <i>sec</i> -Butylphenol	12.1		2-(4-Hydroxyphenyl) butan-2-ol
4- <i>tert</i> -Butylphenol	0		
4- <i>n</i> -Hexylphenol	38.1	265	1-(4-Hydroxyphenyl) -hexanol

^{a)} Corresponds to the reduction of 47.3 nmol DCPIP/min

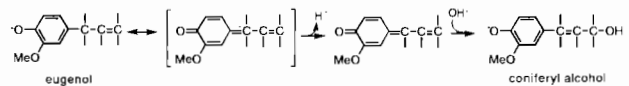
検討が行われ、フラビン酵素であることが報告されている⁹⁾。本酵素は広い基質特異性を示し、オイゲノールに作用してコニフェリルアルコールを生成する¹⁰⁾。オイゲノールデヒドロゲナーゼはチトクローム *c* を含んでおり、脱水素酵素であることを特徴としているが、両酵素反応機構は極めて類似していると思われる。オイゲノールデヒドロゲナーゼは、4-アルキルフェノール類を基質とした場合、生成物は1-(4-ヒドロキシフェニル)-エチルアルコールであり、バニリルアルコールと同様に α 位の炭素の脱水素反応が契機となって進行すると思われる。従って、オイゲノールを基質とした場合でもこの α 位炭素の水素の引き抜きが予想される。よって Scheme 1 に示したように、本酵素のオイゲノールへの作用は、最初に α 炭素のヒドライドオンが引き抜かれ、続いて水由来の水酸基が導入され、コニフェリルアルコールが生成してくると予想した。この反応機構を想定すれば、オイゲノールデヒドロゲナーゼが種々の基質に作用し、脱水素と水酸化の多様な反応を触媒できることが説明できる。また、本酵素は基質を選択することによって、種々の有用化合物の合成への応用が期待される。とりわけ水酸基導入による生成物の光学特異性など興味深い点であり、目下検討中である。

謝 辞

TOF-MASS を用いた機器分析をご指導下さいました岡山大学農学部の田村隆博士に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Tadasa, K : Degradation of eugenol by a microorganism. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 925-929 (1977)
- 2) Tadasa, K., H. Kayahara : Initial steps of eugenol degradation pathway of a microorganism. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2639-2640 (1983)
- 3) Nagel, M. and J. R. Andressen : Purification and characterization of molybdoenzymes nicotinate dehydrogenase and 6-hydroxynicotinate dehydrogenase from *Bacillus niacini*. *Arch. Microbiol.*, **154**, 605-613 (1990)



Scheme 1 Proposed reaction mechanisms of eugenol dehydrogenation catalyzed by eugenol dehydrogenase of *P. fluorescens* E118.

- 4) Bradford, M.M : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
- 5) Laemmli, U. K : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970)
- 6) Thomas, P. E., D. Ryan and W. Levin : An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **75**, 168-176 (1976)
- 7) Hopper, D. J. and D. G. Taylor : The purification and properties of p-cresol-(acceptor) oxidoreductase (hydroxylating), a flavocytochrome from *Pseudomonas putida*. *Biochem. J.*, **167**, 155-162 (1977)
- 8) Reeve, C. D., M. A. Carver and D. J. Hopper : The purification and characterization of 4-ethylphenol methylene-hydroxylase, a flavocytochrome from *Pseudomonas putida* JD1. *Biochem. J.*, **263**, 431-437 (1989)
- 9) De Jong, E., W. J. H. Van Berkel, R. P. Van Der Zwan and J. A. M. De Bont : Purification and characterization of vanillyl alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur. J. Biochem.*, **208**, 651-657 (1992)
- 10) Fraaije, M. W., C. Veeger and W. J. H. Van Berkel : Substrate specificity of flavin-dependent vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur. J. Biochem.*, **224**, 1-7 (1995)