

ヒドロキシクエン酸を生産する微生物と ゲノムシャッフリングによる生産性の増加

飛田浩之、山田隆志、山田靖宙*

ヒドロキシクエン酸 (HCA) は熱帯性植物であるガルシニア (*Garcinia cambogia*)、ハイビスカス (*Hibiscus subdariffa* Linn.) に主に含まれる有機酸である。HCA には 4 種の光学異性体 (2*S*, 3*S*)、(2*R*, 3*R*)、(2*S*, 3*R*)、(2*R*, 3*S*) 型が存在する。*G. cambogia* には (2*S*, 3*S*) -HCA が、*H. subdariffa* Linn. には (2*S*, 3*R*) -HCA のみが含まれており (2*S*, 3*S*)-HCA は動物体内で脂肪合成の経路に関わる酵素、ATP クエン酸リアーゼを競争阻害し、脂肪の合成を抑制する。(2*S*, 3*R*)-HCA は膵臓の α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼを阻害し、血糖値上昇を抑える作用がある。本研究ではこの一部の亜熱帯性植物のみにしか存在が知られていない HCA を生産する微生物をスクリーニングし、その生産性を向上させることを目的とした。

まずガルシニア並びにハイビスカスから HCA をメチルエステル体として精製したのち加水分解しスクリーニング標品とした。次いで自然界から単離した微生物約 2,000 株から HPLC を用いて生産菌をスクリーニングした。*Streptomyces* 属と *Bacillus* 属の候補菌株 2 株を大量培養し、培地上清から HCA をメチルエステル体として精製した。それらの ¹H-NMR スペクトルはハイビスカス由来の HCA メチルエステルと一致した。次いでこれらの絶対構造を決定するため、HCA メチルエステルを合成し、キラルカラムを用いて各異性体を分離できる条件を確立した。分析の結果上記微生物が生産する HCA はハイビスカス型の (2*S*, 3*R*) -HCA であることが判明した。

次いでゲノムシャッフリングによる高生産株の取得を試みた。*Streptomyces* 属の孢子、*Bacillus* 属を NTG または UV 処理し、得られた変異株からプロトプラストを調製した。これらのプロトプラストを再生させた後、HCA の生産性が向上した変異株を単離した。これらはエポキシアコニット酸に対する耐性が上昇し、3 回に渡るゲノムシャッフリングで元の株の約 5-13 倍の HCA 生産性向上が認められた。

以上ヒドロキシクエン酸を生産する微生物を初めて同定し、ゲノムシャッフリングにより HCA 増産株を育成した。

キーワード : Hydroxycitric acid, ガルシニア, ハイビスカス, *Streptomyces* sp.,
Bacillus megaterium, ゲノムシヤフリング

(2*S*, 3*S*)-HCA は、*Garcinia cambogia*, *G. indica*, *G. atroviridis* といった特定のガルシニア (オトギリソウ科フクギ属) の果皮に存在する有機酸である^{1,2,3)}。これらガルシニアはインド、スリランカなどに生成する^{4,5)}。主に食品添加物として南インドの西海岸で広く栽培されており、セイロン島では古くからガルシニアの乾燥果皮は魚の塩漬けに利用してきた⁴⁾。有機酸を多く含んでいる果実には漬物に加えることにより pH が低くなり、細菌の増殖を抑える働きがある^{6,7)}。またマレーシアでは乾燥させた果実をカレーの風味付けとして販売されていたり、果実を魚のドレッシングとして用いたりしている⁴⁾。(2*S*, 3*R*)-HCA は *Hibiscus subdariffa* Linn., *H. furcatus* Linn., *H. cannabinus* Linn. といったハイビスカス (アオイ科フヨウ属) の花弁、葉に存在する^{8,9,10)}。乾燥したハイビスカスの花弁はハーブ茶として広く飲用されている¹¹⁾。HCA は分子内に 2 つの不斉炭素がある為、4 つの立体異性体が存在し、それぞれがラクトン体を形成する (Fig. 1)。

ガルシニア、ハイビスカスはそれぞれ

(2*S*, 3*S*)、(2*S*, 3*R*)-HCA を生産する。

ATP クエン酸リアーゼはミトコンドリアの外部でクエン酸をオキサロ酢酸とアセチル CoA に分解させる。その後生じたアセチル CoA は脂肪酸の合成に用いられる。Sullivan¹²⁾ や Stallings¹³⁾ らの研究により、4 つの HCA のうちガルシニアに含まれる (2*S*, 3*S*)-HCA が ATP クエン酸リアーゼを特異的に阻害することが解明された。また、ヒトの肝臓から精製した ATP クエン酸リアーゼを用いた実験

でも阻害作用があることが示された ($K_i = 3 \times 10^{-4}$ M)¹⁴⁾。さらに動物実験で (2*S*, 3*S*)-HCA は食欲を抑え¹⁵⁾、体重の増加を抑える働きがあると報告されている¹⁶⁾。

一方、 α -アミラーゼあるいは α -グルコシダーゼといったグリコシダーゼの阻害剤の投与により、食後の急激な血糖値上昇及びインスリン値の急上昇が抑制されることが明らかとなった¹⁷⁾。ハイビスカスに含まれる (2*S*, 3*R*)-HCA は膵臓の α -アミラーゼや小腸の α -グルコシダーゼを阻害することが報告されている^{18,11)}。ヒトのセルモデルシステムでの実験においても阻害活性が認められた¹⁹⁾。

HCA は特定の熱帯・亜熱帯地域に生育する植物によって生産され、その生産は地域や気候によって制限されている。さらに立体選択的な化学合成は分子内に二つの不斉炭素が存在していることから非常に難しい。そこで本研究では HCA の微生物生産を目的として行った。

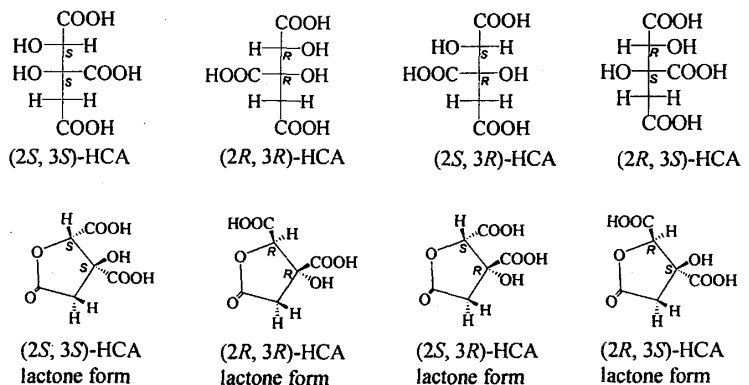


Fig. 1. Structures of HCA Stereoisomers.

HCA has four stereoisomers, (2*S*, 3*S*), (2*R*, 3*R*), (2*S*, 3*R*), and (2*R*, 3*S*), and their lactone forms. *G. cambogia* and *H. subdariffa* produce (2*S*, 3*S*) and (2*S*, 3*R*)-HCA, respectively.

ヒドロキシクエン酸を生産する微生物とゲノムシャフリングによる生産性の増加

実験方法

植物からの HCA の精製 *G. cambogia*, *H. subdariffa* Linn. の乾燥果皮及び乾燥花弁からスクリーニングのための標品として (2*S*, 3*S*)、(2*S*, 3*R*)-HCA メチルエステル体の精製を行った。ガルシニアの乾燥皮、ハイビスカスの乾燥花弁それぞれ 10 g を 10%メタノール硫酸 100m l 中で 2 時間 60°C にて攪拌しメチルエステル化を行い、少量の飽和食塩水とジクロロメタン 100m l を加えて分配抽出した。ジクロロメタン層を集め、硫酸ナトリウムを少量加え水分を完全に除去した後濃縮した。TLC でメチルエステル体の生成を確認した。その後シリカゲルカラム (Silica gel 60(0.015-0.040mm)、MERCK) を用いて分離・精製を行なった。精製した化合物は ¹H-NMR、ESI-MS により構造の確認を行なった。

自然界からの微生物の単離 西日本を中心に土壌、植物などから微生物の単離を行った。単離培地の炭素源としてクエン酸、トランスアコニット酸、トランスエポキシアコニット酸、マンニトール、ガルシニアエキスを用いた。

HCA 生産菌のスクリーニング シングルコロニーとして単離を行った菌株はグルコースを炭素源とした液体培地に植菌し、30°C で 48 時間培養した。培養液を煮沸後、遠心し、菌体を取り除いた上清をフィルターろ過 (Millex-LG 0.20 μ m, Millipore, Bedford, MA) して培養上清サンプルとした。この培養上清サンプル中の有機酸並びに HCA は HPLC (Model L-7100; Hitachi High Technologies, Tokyo) により分析をおこなった。

培養液からの HCA の精製 HPLC を用いたスクリーニングで HCA と同じ溶出時間にピークが現れた菌株 (*Bacillus megaterium* G45C, *Streptomyces* sp. U121) を培養した培養液 2 L から HCA の精製を行った。培養液を遠心し、菌体を取り除いた上清をダイヤイオン、陽イオン交換樹脂に通し、非吸着画分を陰イオン交換樹脂に吸着させた。酸成分を蟻酸で溶出し、濃縮を行い、植物の場合と同じようにメチルエステル化を行い分離・精製を行い、¹H-NMR により構造の確認を行った。

キラルカラムによる分析 (2*S*, 3*R*)、(2*R*, 3*S*)-HCA 光学異性体は Robert らの方法²⁰⁾ を参考に合成した。続いて逆相並びにキラルカラムを用いて(2*S*, 3*R*)、(2*R*, 3*S*)-HCA メチルエステルを分離する条件を確立した。さらに微生物培養液上清から精製した HCA メチルエステルをキラルカラムに供した。

ゲノムシャフリング *Bacillus megaterium* G45C, *Streptomyces* sp. U121 を UV 処理、NTG 処理により変異処理することによりいくつかの変異株を得た。さらに Zhang²¹⁾ らの方法を参考にし、ゲノムシャフリングを行った。生産される HCA の確認は HPLC で行った。

結果および考察

HCA 生産菌のスクリーニングを行うためにガルシニア、ハイビスカスから HCA メチルエステル体を精製し ¹H-NMR 測定を行った (Table 1, 2)。また ESI-MS の結果から HCA のラクトン、非ラクトン体はジメチルエステル、モノメチルエステル体としてメチルエステル化されていることが確認できた (Fig. 2)。

Table 1. ¹H-NMR Data for HCA Methyl Ester from *G. cambogia*

Compound 1 (lactone)				Compound 2 (nonlactone)			
H	Chemical shift	J in Hz		Chemical shift	J in Hz		
(ppm)				(ppm)			
Ha	2.79	<i>d</i>	<i>J</i> = 17.5	Hd	3.03-3.04	<i>m</i>	
Hb	3.16	<i>d</i>	<i>J</i> = 17.5	He	3.03-3.04	<i>m</i>	
Hc	5.30	<i>s</i>		Hf	4.91	<i>s</i>	
OCH ₃	3.60-3.90	<i>s</i>		OCH ₃	3.60-3.90	<i>s</i>	

Three CH₃O- protons belonging to the lactone and nonlactone forms appeared at 3.70-3.90 ppm.

Table 2. ¹H-NMR Data for HCA Methyl Ester from *H. subdariffa*

Compound 3 (lactone)				Compound 4 (nonlactone)			
H	Chemical shift	J in Hz		Chemical shift	J in Hz		
(ppm)				(ppm)			
Ha	3.07	<i>d</i>	<i>J</i> = 17.5	Hd	2.97	<i>d</i>	<i>J</i> = 16.4
Hb	2.87	<i>d</i>	<i>J</i> = 17.5	He	3.17	<i>d</i>	<i>J</i> = 16.4
Hc	5.11	<i>s</i>		Hf	4.36	<i>s</i>	
OCH ₃	3.60-3.90	<i>s</i>		OCH ₃	3.60-3.90	<i>s</i>	

Three CH₃O- protons belonging to the lactone and nonlactone forms appeared at 3.70-3.90 ppm.

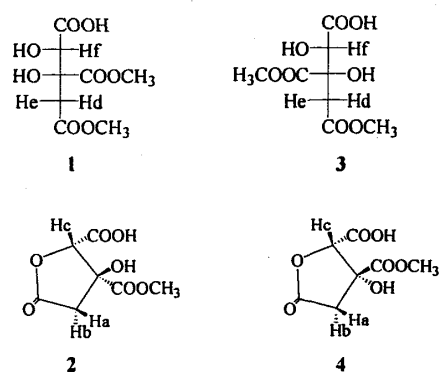


Fig. 2. Structures of HCA Methyl Esters and Their Lactones Prepared from *G. cambogia* (1 and 2) and *H. subdariffa* (3 and 4).

Authentic HCA was purified as its methyl ester. ESI-MS data indicated that they were a mixture of nonlactone HCA dimethyl ester and lactone HCA monomethyl ester.

この¹H-NMRの結果は過去の報告とほぼ一致した。^{11,22)}メチルエステル体を加水分解して得られたHCA

ヒドロキシクエン酸を生産する微生物とゲノムシャフリングによる生産性の増加

を微生物のスクリーニングのための標準サンプルとした (Fig. 3)。

次に自然界から微生物を約 2,000 株 HPLC でスクリーニングした結果、HCA を生産していると考えられる 2 株 (*Bacillus megaterium* G45C、*Streptomyces* sp. U121) の微生物を得た (Fig. 4)。これら微生物培養液から HCA の精製を行い $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った結果、ハイビスカス型の HCA と一致していた。(Table 3) さらにキラルカラムに供したところ、これら微生物は(2*S*, 3*R*)-HCA を生産していることを確認できた。

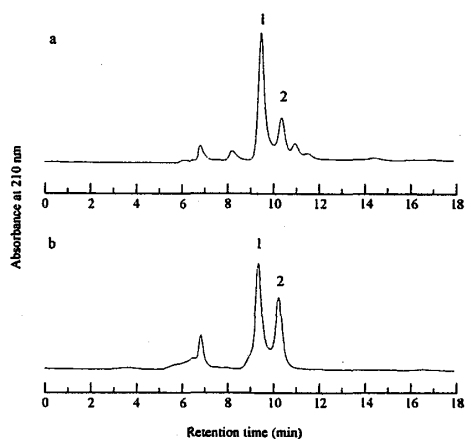


Fig. 3. HPLC Profiles of Extract of Dried Flowers of *H. subdariffa* (A) and Purified HCA (B).

A, HCA lactone and nonlactone are major acid components in the calyxes of *H. subdariffa*. B, Peaks 1 and 2 correspond to HCA lactone and nonlactone

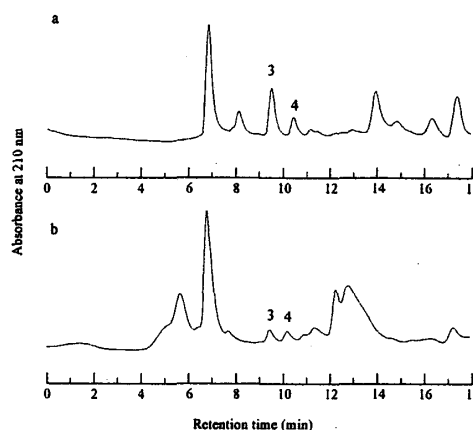


Fig. 4. HPLC Profiles of Supernatants from the Culture Broth of *Streptomyces* sp. U121 (A) and *Bacillus megaterium* G45C (B).

Both strains produced various metabolites including citric acid (retention time, 11.40 min), oxaloacetic acid (12.20 min) and malic acid (13.80 min). Peaks 3 and 4 had the same retention times as HCA lactone and nonlactone respectively.

Table 3. $^1\text{H-NMR}$ Data for Products 1 and 2

H*	Product 1				Product 2			
	Chemical shift (ppm)		J in Hz		Chemical shift (ppm)		J in Hz	
Ha					3.07	d	J = 17.5	
Hb					2.87	d	J = 17.5	
Hc					5.11	s		
Hd	2.98	d	J = 16.4		2.97	d	J = 16.4	
He	3.16	d	J = 16.4		3.17	d	J = 16.4	
Hf	4.36	s			4.36	s		
OCH ₃	3.60-3.90	s			3.60-3.90	s		

*Products 1 and 2 were obtained from *Streptomyces* sp. U121 and *Bacillus megaterium* G45C respectively.

Streptomyces sp. U121、*Bacillus megaterium* G45C それぞれの株をUV、NTG 処理を行い HCA 生産性の向上した株を得た。それぞれの株において UV、NTG、EMS 処理を行ったが、*Streptomyces* sp. U121 は NTG、*Bacillus megaterium* G45C は UV 処理を行うことで生産性が向上した。ここで得られたいくつかの株を次のゲノムシャフリングに用いた。変異株 5-10 株を 1% グリシン入りのグルコース液体培地で 1 晩培養し、SMM 緩衝液で洗浄した菌体をリゾチーム処理によりプロトプラスト化した。得られたプロトプラストは遠心により集められ、30% の PEG (ポリエチレングリコール) が含まれる SMM 緩衝液中で融合させた²¹⁾。融合したプロトプラストは 0.2% の EAA が含まれる再生培地で再生され、その後 HCA 生産性を HPLC により分析した。ゲノムシャフリングにより生産性が向上した菌株に関してはさらにゲノムシャフリングを繰り返し生産性の向上を試みた (Fig. 5)。

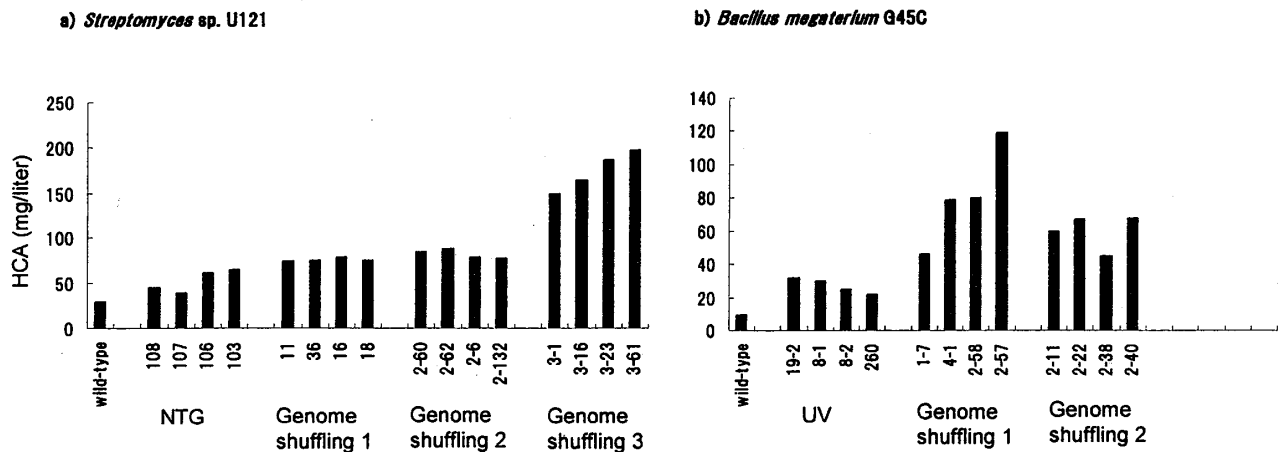


Fig. 5. Improvement of HCA productivity by Genome shuffling.

Genome shuffling (3) was attempted to improve HCA productivity of microorganisms. Protoplasts prepared from mutants obtained by NTG or UV were fused and regenerated in the presence of epoxyaconitic acid. The selected colonies were HCA hyperproducers. The highest productivity of HCA were 197 and 119 mg per liter in *Streptomyces* sp. U121 and *Bacillus megaterium* G45C, respectively, after three rounds of genome shuffling.

まとめ

Bacillus megaterium G45C, *Streptomyces* sp. U121 は ¹H-NMR でハイビスカスタイプの HCA であると確認できた。さらに、これら微生物が生産する HCA はキラルカラムクロマトグラフィーで分析した結果、(2*S*, 3*R*)-HCA であると確認できた。HCA の生産性は *Bacillus megaterium* G45C, *Streptomyces* sp. U121 においてゲノムシャフリングにより向上させることができた。今後さらに生産性を向上させようと試みている。

文献

- 1) Lewis, Y. S.; Neelakantan, S. (-)-Hydroxycitric acid-The principal acid in the fruits of *Garcinia cambogia*. *Phytochemistry*, **4**, 619-625 (1965).
- 2) Lewis, Y. S. Isolation and properties of Hydroxycitric acid. In *Methods in Enzymology*; Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Eds.; Academic Press: New York, **Vol. 13**, pp 613-619 (1969).
- 3) Lowenstein, J. M.; Bruneugraber, H. Hydroxycitrate. In *Methods in Enzymology*; Lowenstein, J. M., Ed.; Academic Press: New York, **Vol. 72**, pp 486-497 (1981).
- 4) The Wealth of India (Raw Materials); CSIR: New Delhi, India, **Vol. 4**, pp 99-108 (1956).
- 5) Watt, G. Dictionary of the Economic Products of India; Periodical Export: Delhi, India, **Vol. 3**, pp 464 (1972).
- 6) Sreenivasan, A.; Venkataraman, R. Chromatographic detection of the organic constituents of Gorikapuli (*Garcinia cambogia* Desr.) used in pickling fish. *Curr. Sci.*, **28**, 151-152 (1959).
- 7) Lewis, Y. S.; Neelakantan, S.; Anjana Murthy, C. Acids in *Garcinia cambogia*. *Curr. Sci.*, **33**, 82-83 (1964).
- 8) Griebel, C., Hibiscus "flowers," a drug used in the preparation of food and drink, its principal component a new acid of fruit acid character (hibiscus acid). *Zeit. Untersuch. Lebensmitt.*, **77**, 561-571 (1939).
- 9) Griebel, C., The constitution and detection of hibiscus acid ((+)-allohydroxycitric acid lactone). *Zeit. Untersuch. Lebensmitt.*, **83**, 481-486 (1942).
- 10) Shchiparev, S. M., Soldatenkov, S. V., Hydroxycitric acid in the leaves of *Hibiscus cannabinus*. *Biologiya*, **2**, 146-148 (1971).
- 11) Kasai, T., Kawabata, J., and Hanswasji, C., Japan Kokai Tokkyo Koho, 239164 (Sept. 5, 2000).
- 12) Sullivan, A. C., Singh, M., Srere, P. A., and Glusker, J. P., Reactivity and inhibitor potential of hydroxycitrate isomers with citrate synthase, citrate lyase, and ATP citrate lyase. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7583-7590 (1977).
- 13) Stallings, W., Blount, T. F., Srere, P. A., Glusker, J. P., Structural studies of Hydroxycitrate and their relevance to certain enzymatic mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 431-448 (1979).
- 14) Hoffman, G. E., Andres, H., Weiss, L., Kreisel, C., Sander, R., Properties and organ distribution of ATP citrate

ヒドロキシクエン酸を生産する微生物とゲノムシャufflingによる生産性の増加

- (pro-3S)-lyase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **620**, 151-158 (1980).
- 15) Rao, R. N., and Sakariah, K. K., Lipid-lowering and antiobesity effect of (-)-hydroxycitric acid. *Nutri. Res.*, **8**, 209-212 (1988).
 - 16) Sullivan, A. C., Triscari, J., Hamilton, J. G., and Miller, O. N., Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat: II. Appetite. *Lipids*, **9**, 129-134 (1974).
 - 17) Tattersall, R., α -glucosidase inhibition as an adjunct to the treatment of type 1 diabetes. *Diabetic Medicine*, **10**, 688-693 (1993).
 - 18) Hansawasdi, C., Kawabata, J., and Kasai, T., α -amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1041-1043 (2000).
 - 19) Hansawasdi, C., Kawabata, J., and Kasai, T., Hibiscus acid as an inhibitor of starch digestion in the Caco-2 cell model system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2087-2089 (2001).
 - 20) Guthrie, R. W., Hamilton, J. G., Kierstead, R. W., Miller, O. N., and Sullivan, A. C., U. S. Patent 3966772 (June 29, 1976).
 - 21) Zhang, Y. X., *et al.* Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria, *Nature*, **415**, 644-646 (2002).
 - 22) Boll, P. M., Sorensen, E., and Balieu, E., Naturally occurring lactones and lactames. III. The absolute configuration of the hydroxycitric acid lactones: hibiscus acid and garcinia acid. *Acta Chem. Scand.*, **23**, 286-293 (1969).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (4), 11-19 (2005)

Screening of Hydroxycitric Acid-Producing Microorganisms and Genome Shuffling for the Improved Production

Hiroyuki Hida, Takashi Yamada, Yasuhiro Yamada*

Department of Applied Biological Science, Faculty of life science and Biotechnology,
Fukuyama University,
Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

The tropical plants *Garcinia cambogia* and *Hibiscus subdariffa* produce hydroxycitric acid (HCA) and their absolute configurations are (2*S*, 3*S*) and (2*S*, 3*R*)-HCA respectively. HCA logically has four stereoisomers, (2*S*, 3*S*), (2*R*, 3*R*), (2*S*, 3*R*), (2*R*, 3*S*) and their lactone forms. Therefore, chemical synthesis of natural type HCA is difficult. (2*S*, 3*S*)-HCA is proved to be an inhibitor of ATP-citrate lyase, which is involved in fatty acid synthesis. (2*S*, 3*R*)-HCA inhibits pancreatic α -amylase and intestine α -glucosidase, leading to reduction of carbohydrate metabolism. In this study, microbial production of HCA was attempted to supply large amount of optically pure HCA. At first, (2*S*, 3*S*) and (2*S*, 3*R*)-HCA were prepared from *Garcinia* and *Hibiscus*, and were used as authentic samples for HPLC analysis. From about 2000 microbial isolates, *Streptomyces* sp. U121 and *Bacillus megaterium* G45C were found to produce trace amount of HCA, which was transformed to the methyl ester and purified. ¹H-NMR of these methyl ester were identical to that of *Hibiscus*-type HCA diastereoisomer. Additionally, the results of HPLC analysis with a chiral column suggested the absolute configuration of these HCA was (2*S*, 3*R*). Spores of *Streptomyces* sp. U121 and cells of *Bacillus megaterium* G45C were treated with NTG or irradiated with UV to give HCA hyperproducing mutants. These mutants were further improved by genome shuffling. Mutants obtained after three rounds of genome shuffling showed enhanced resistance to epoxyaconitic acid, and produced 5 to 13 times amount of HCA. Consequently, for the first time, we succeeded in the isolation of HCA-producing microorganisms from nature. We also successfully improved the productivity of HCA by mutagenesis of wild strains by subsequent genome shuffling.

Key words : Hydroxycitric acid, *Garcinia*, *Hibiscus*, *Streptomyces* sp., *Bacillus megaterium*,
Genome shuffling.