

ベルベリン資化性菌による物質生産に関する研究

石 川 和 樹

星薬科大学大学院 薬化学教室

Strategy for the microbial transformation from berberine using berberine-utilizing bacteria

Kazuki ISHIKAWA

Department of Organic Chemistry, Hoshi University

はじめに

微生物の代謝能を利用した物質変換は、医薬品や香料品、食品、分析技術、環境浄化など様々な分野において利用されている¹⁾。微生物変換法の例として、副甲状腺機能低下症などの治療に用いられる活性型 vitamin D₃ や HMG-CoA 還元酵素阻害作用を示す pravastatin の製造法が知られている²⁻⁵⁾。これらは、微生物の有する一般的な化学反応とは異なるユニークな物質変換能力を利用することで、従来の化学合成と比較して工程数の短縮に成功した例である。この様に、微生物の物質変換能力は物質生産において、有用であることが明らかになっている。しかし、多くの微生物変換の場合は、原料基質の部分的な酸化還元反応が主として報告されており、炭素骨格変換反応を伴う報告はほとんどない。そこで、本研究では、微生物の中でも特異な基質を分解可能な細菌を利用した有用物質の創製を検討することとした。特に、対象とする基質を分解し、単一の炭素源として生育のためのエネルギー源として利用できる資化性菌は、分解基質の炭素骨格の開裂を伴う分解経路を有している可能性が高い。そのため、資化性菌を選択的に用いることで、従来の微生物変換法による各種置換基の導入に加えて炭素骨格の開裂を伴う多彩な分解産物を得ることができ、新たな有用物質の創製に繋がると考えた。また、分解基質として天然由来の医薬品や生理活性物質を用いることで、分解産物も有用な活性を示すことが期待できると考えた。本研究において分解基質として用いた植物由来第二次代謝産物である berberine (BBR) は、オウバク (ミカン科 *Phellodendron amurense* の樹皮)⁶⁾ やオウレン (キンポウゲ科 *Coptis japonica* の根茎)⁷⁾ に多く含まれるプロトベルベリン型アルカロイドの一種で、2 分子の tyrosine を出発原料として生合成される⁸⁾。また、BBR および類縁体は、様々な生理活性を示すことが報告されているため、その分解産物も何らかの生理活性作

用を示すことが期待できる。さらに、BBR が示す黄色色調は、分解菌の探索において目視でも分解反応を確認することが可能となり、実験の効率的な進行に有効である。以上の理由から、資化性菌を利用した BBR からの物質生産の検討を行うこととした。しかし、BBR を資化する微生物の単離例はなかったため、まずは、BBR 資化性菌の単離を検討した。

1. BBR 資化性菌の単離・同定および性状解析

先に述べたように、これまでに BBR 資化性菌の報告例は無い。そこで、我々は、BBR を唯一の炭素源とした無機塩類 (W) 培地を用いて集積培養を行い、土壤中から BBR 資化性菌の単離を試みた。本研究では、BBR 資化性菌の有無は、培地に添加した BBR 由来の黄色色調の変化を指標に、視覚的に資化性菌の有無を判断した。実験には、主に、東日本を中心とする日本国内で無作為に採取した土壌を用いた。数種類の土壌試料を検討した結果、生薬製剤製造工場内から採取した土壌試料を添加した W 培地において、BBR 由来黄色色調の消失および茶色への変色が観察された。この結果から、我々は、培地中に BBR 資化性菌が存在し、BBR を分解していると推測した。そこで、本培養液の一部を 0.05% BBR 含有 W 寒天培地に接種し、BBR 資化性菌の単離を試みた。その結果、黄色のスムーズなコロニーを形成する BD3100 株および肌色のラフなコロニーを形成する BD7100 株の単離に成功した。また、これらのコロニーの周辺では、BBR 由来の黄色色調の消失が観察された。

次に、単離した 2 種類の菌株の系統分類を目的に、それぞれの total DNA を鋳型とした 16S rRNA による系統解析を行った。その結果、それぞれをグラム陰性細菌 *Sphingobium* sp. BD3100 株 (以下、BD3100 株) およびグラム陽性細菌 *Rhodococcus* sp. BD7100 株 (以下、BD7100 株) と決定した (Figure 1-1 および 1-2)。

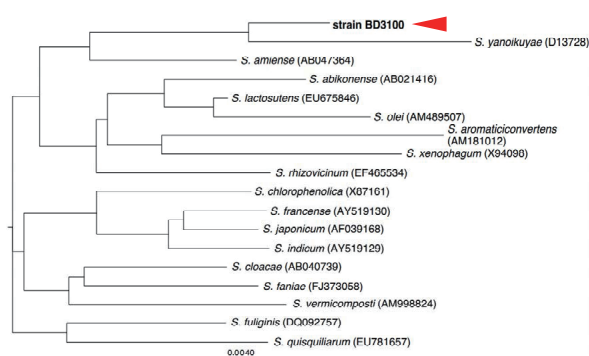


Figure 1-1. 16S rRNA を用いた系統解析による *Sphingobium* sp. BD3100 株の系統樹

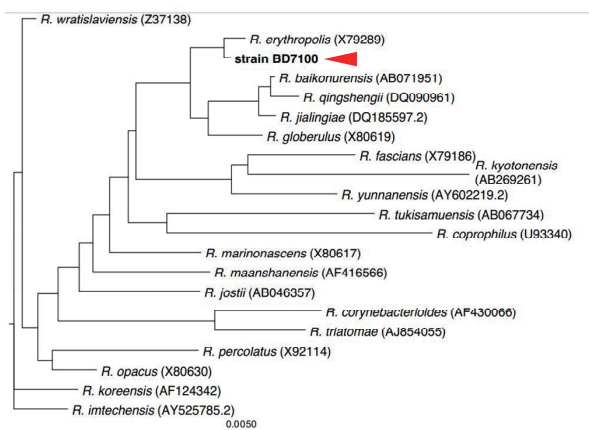


Figure 1-2. 16S rRNA を用いた系統解析による *Sphingobium* sp. BD7100 株の系統樹

次に、単離した BD3100 株および BD7100 株による BBR および BBR 誘導体に対する資化能を検討するため、単一の炭素源として 0.5 mM BBR、PAL および BRU を添加した W 寒天培地で両菌株の培養を行った。その結果、BD3100 株は、BBR および PAL 添加 W 寒天培地上でコロニーを形成した。さらに、コロニーの周辺では、基質由来の黄色色調の消失も観察することが出来た (Figure 1-3)。一方、BD7100 株では、BBR 添加 W 寒天培地上にはコロニーを形成し、コロニー周辺での BBR 由来の黄色色調の消失を確認することが出来た。しかし、BD 3100 株とは異なり、PAL 添加 W 寒天培地上ではコロニーを形成しなかった。また、BRU 添加 W 寒天培地では、両菌株ともコロニーの形成を観察することは出来なかった。これらの結果から、BD3100 株は、BBR および PAL に対する資化能を、BD7100 株は、BBR に対する資化能を有していることが示唆された。

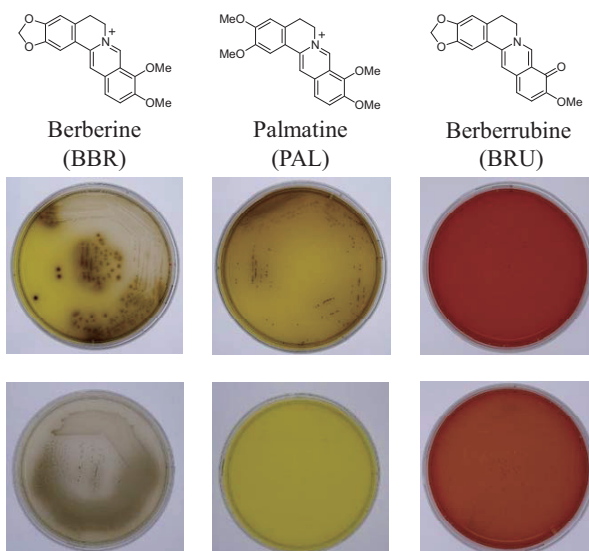


Figure 1-3. BD3100 株および BD7100 株の BBR、PAL または BRU 添加 W 寒天培地上での生育 (各基質濃度 0.5 mM, 30 °C, 6 日間)。

次に、培養条件を W 寒天培地から液体培地に変更し、BD3100 株および BD7100 株の液体培地中での BBR に対する資化能を検討した。1.0 mM BBR を唯一の炭素源として添加した W 液体培地で両菌株を培養し、培地中の濁度 (OD₆₀₀) を測定した。その結果、Figure 1-4 に示すように BBR を添加した両菌株の培地において濁度の上昇が確認され、BBR を添加しなかった培地では、培地中の濁度の上昇は確認されなかった。これらの結果より、両菌株は液体培地中においても BBR に対して資化能を示すことが明らかになった。

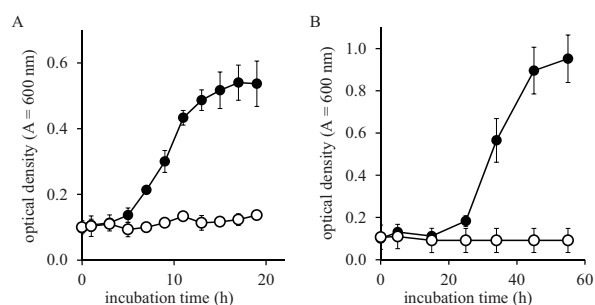


Figure 1-4. BD3100 株 (A) および BD7100 株 (B) の W 培地 (○) および 1.0 mM BBR 添加 W 培地 (●) での成長曲線 (30 °C)。

以上の W 培地を用いた検討の結果から、BD3100 株および BD7100 株は、BBR を単一の炭素源として生育可能な BBR 資化性菌であると判断した。そこで、これら 2 菌株を用いて基質の分解を検討するために BBR および BBR 類縁体に対する分解能の有無を検討した。両菌株を 0.5 mM BBR、PAL または BRU を添加した LB 寒天培地でそれぞれ培養し、基質由来の色調の変化を観

察した。その結果、Figure 1-5 に示す様に BD3100 株では、BBR および PAL 添加培地上においてコロニー周辺での基質由来の黄色色調の消失が観察された。また、BD7100 株では、BBR および BRU 添加培地上においてコロニー周辺で基質由来の色調の消失が観察された。これらの結果から、BD3100 株は、BBR および PAL に対して、BD7100 株は BBR および BRU に対して分解能を有することが推測された。

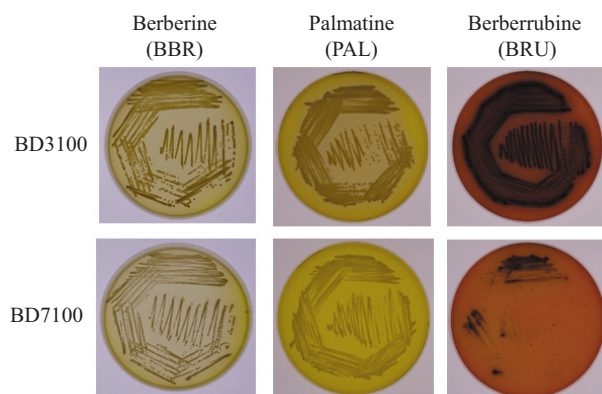


Figure 1-5. BD3100 株および BD7100 株の BBR、PAL または BRU 添加 LB 寒天培地上での生育 (各基質濃度 0.5 mM, 30 °C, 3 日間)。

2. *Sphingobium* sp. BD3100 株による BBR の分解産物に関する検討

BD3100 株による BBR の分解産物を同定するため、異なる 2 種類の培養条件を用いて LB 液体培地中での BBR の分解および休止菌体による BBR の分解について検討した。

BD3100 株の生育と BBR の分解との相関について詳細に解析するために、1.0 mM BBR を添加した LB 液体培地で BD3100 株の培養を行い、培地中の濁度および化合物の詳細な解析を行った。その結果、培養開始 4 時間後から培地中の濁度は上昇し、11 時間後には濁度は 2.7 まで上昇した (Figure 2-1)。また、培地中の

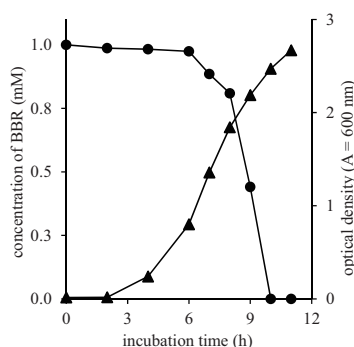


Figure 2-1. BD3100 株の 1.0 mM BBR 添加 LB 培地中での培養。

BD3100 株の成長曲線 () および BBR 濃度の推移 ()。 (培養温度 30 °C)

BBR は、培養開始 7 時間後から減少し、10 時間後には BBR は消失した。

培養開始 0 時間の HPLC クロマトグラム上では、BBR のピークおよび LB 培地由来のピークが検出された (Figure 2-2)。培養開始 7 時間後には BBR の減少に伴って、培養開始時には検出されなかった BBR の分解産物と推測される 2 種のピーク B1 ($t_R = 15.4$ min) および B2 ($t_R = 14.9$ min) が検出された。さらに、培養開始 12 時間後には、BBR は消失し、B1 および B2 は増加していた。

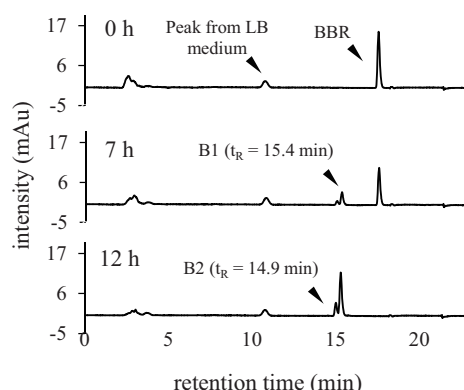


Figure 2-2. BD3100 株の BBR 添加 LB 培養液の HPLC クロマトグラム (検出波長 280 nm)。

次に、HPLC を用いて B1 および B2 を分取・精製し、NMR および MS スペクトルを用いた詳細な構造解析を行った。その結果、B1 および B2 の構造を、それぞれ BBR の 14 位脱メチレン体 demethyleneberberine (D-BBR) および D-BBR の 11 位水酸化体 11-hydroxydemethyleneberberine (HD-BBR) と決定した (Figure 2-3)。D-BBR は Bahadur らによって *Thalictrum javanicum* の成分として単離され⁹⁾、Zhang らがマウスを用いた実験で抗酸化作用によるアルコール性肝疾患の治療薬としての可能性を示している¹⁰⁾。また、HD-BBR は、新規化合物であった。

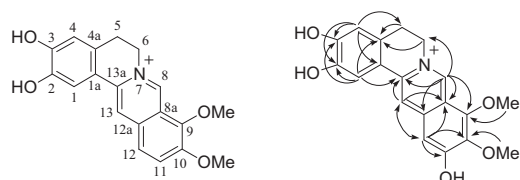


Figure 2-3. D-BBR の構造式 (左) および HD-BBR の HMBC 相関 (右)

次に、さらなる BBR の分解産物の同定を目的に BD3100 株の休止菌体を用いて BBR の分解を検討した。LB 液体培地で BD3100 株を培養後、菌体を回収し、リン酸緩衝液で洗浄した。これを非誘導休止菌体として、リン酸緩衝液中で 0.5 mM BBR の分解を検討した。反

反応液を HPLC を用いて経時的に分析した結果、リン酸緩衝液中の BBR は緩やかに減少していた (Figure 2-4 A)。また、HPLC クロマトグラム上では、LB 液体培地中でも BBR の分解産物として検出された D-BBR および HD-BBR 以外に新たなピーク B3 ($t_R = 17.3$ min)

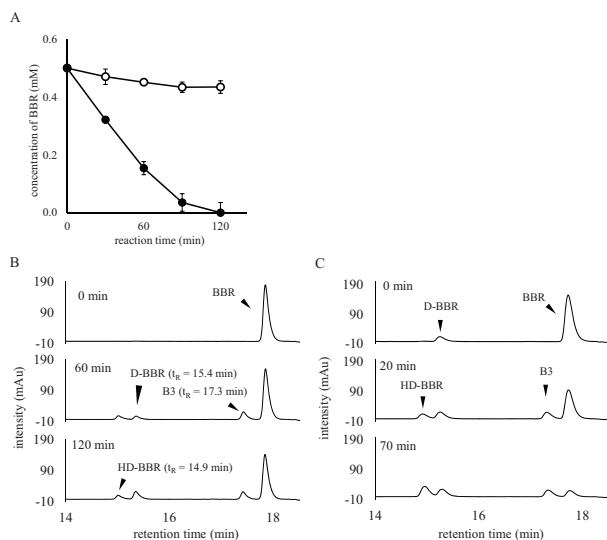


Figure 2-4. BD3100 株の休止菌体による BBR 分解実験

(A) 非誘導休止菌体 (○) または BBR 誘導休止菌体 (●) におけるリン酸緩衝液中の BBR 濃度の経時変化。(B) 非誘導休止菌体または (C) BBR 誘導休止菌体による反応液の HPLC クロマトグラム (検出波長 280 nm)。

が検出された (Figure 2-4B)。

次に、HPLC を用いて B3 を分取・精製し、二次元 NMR を含む詳細な構造解析を行った。その結果、B3 の構造を BBR の 11 位水酸化体 11-hydroxyberberine (H-BBR) と決定した (Figure 2-5)。H-BBR は、HD-BBR と同様に新規化合物であった。このような 11 位が水酸化されたプロトベルベリン骨格を有する天然物や合成物は、これまでに数例しか報告がないが¹¹⁻²⁰⁾、2,3,10,11-hydroxyprotoberberine はラジカル補足作用を示し¹⁹⁾、dehydrocorytenchine は弱いアセチルコリンエステラーゼ阻害作用²¹⁾ や抗マラリア作用¹²⁾ を示すこ

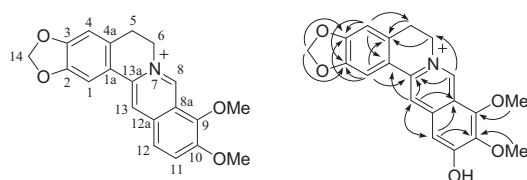


Figure 2-5. BBR の構造式 (左) および H-BBR の HMBC 相関 (右)

とが報告されている。

次に、BBR の添加により分解酵素を誘導した BD3100 株の休止菌体を用いて BBR 分解実験を行った。

BD3100 株を 1.0 mM BBR を添加した LB 液体培地で培養し、菌体を回収後にリン酸緩衝液で洗浄し、BBR 誘導休止菌体とした。この BBR 誘導休止菌体を用いて BBR の分解をリン酸緩衝液中で検討した。反応液を HPLC を用いて分析した結果、BBR は非誘導休止菌体を用いた場合よりも速やかに分解され、反応開始 120 分後には消失した (Figure 2-4A)。また、分解開始 0 時間の HPLC クロマトグラム上では、BBR および菌体作製時に菌体中に残留したと推測される D-BBR のピークが検出された。さらに、分解反応開始 20 分後の HPLC クロマトグラム上では、D-BBR、H-BBR および HD-BBR が検出された。しかし、本実験条件では、この他に新しいピークを検出することは出来なかった (Figure 2-4C)。

3. *Sphingobium* sp. BD3100 株による PAL の分解産物に関する検討

BD3100 株は、PAL を添加した LB 寒天培地を用いた検討によって PAL を分解出来ることが示唆されている。そこで、BD3100 株による PAL の分解産物を同定するために、休止菌体を用いた PAL の分解を検討した。まず、非誘導休止菌体を用いてリン酸緩衝液中で 0.5 mM PAL の分解挙動を検討した。HPLC を用いて反応液を経時的に分析した結果、リン酸緩衝液中の PAL は緩やかに減少し、反応開始 120 分後にはおよそ 50% が分解された (Figure 3-1A)。また、HPLC クロマトグラム上において、反応開始時には PAL のピークのみが検出され、それ以降では PAL の減少とともに増加するピーク P1 ($t_R = 16.9$ min) が検出された (Figure 3-1 B)。さらに、BBR 誘導休止菌体を用いて PAL の分解を検討した結果、リン酸緩衝液中の PAL は非誘導休止菌体と比較して速やかに分解された。また、HPLC クロマトグラム上では、PAL の分解産物として P1 のピークのみが検出された (Figure 3-1C)。

HPLC を用いて P1 を分取・精製し、NMR および MS スペクトルを中心とする機器分析による詳細な構造解析を行った。その結果、P1 の構造を PAL の 11 位水酸化体である 11-hydroxypalmatine (H-PAL) と決定した (Figure 3-2)。H-PAL は Semwal らによって *Stephania glabra* より単離され、マウスでの経口投与実験において血糖降下作用を示すことが報告されている¹⁴⁾。

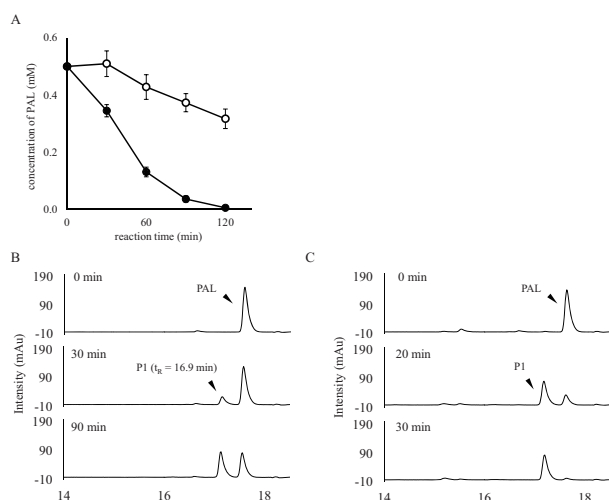


Figure 3-1. BD3100 株の休止菌体による PAL 分解実験

(A) 非誘導休止菌体 (○) または BBR 誘導休止菌体 (●) におけるリン酸緩衝液中の PAL 濃度の経時変化。(B) 非誘導休止菌体または (C) BBR 誘導休止菌体における反応液の HPLC クロマトグラム (検出波長 280 nm)。

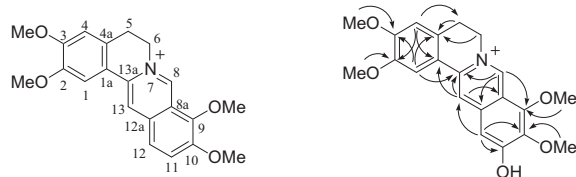


Figure 3-2. PAL の構造式 (左) および H-PAL の HMBC 相関 (右)

4. *Rhodococcus* sp. BD7100 株による BBR の分解産物に関する検討

BD7100 株による BBR の分解産物を同定するために、BD3100 株と同様に、LB 培地中での菌の生育と BBR の分解との相関を詳細に検討した。1.0 mM BBR を添加した LB 液体培地で BD7100 株を培養し、培地中の濁度および BBR の分解挙動を HPLC を用いて分析した。その結果、培養開始 6 時間後から培地中の濁度は上昇し、30 時間後には 7.0 まで上昇した (Figure 4-1)。また、培地中の BBR 濃度は 12 時間後から減少し、培養開始 23 時間後には BBR は消失した。

一方、HPLC クロマトグラム上では、培養開始 0 時間で検出されていた BBR のピークは、培養開始 17 から 21 時間の間に検出されなくなった (Figure 4-2)。また、培養開始 17 から 23 時間では、BD3100 株による BBR の分解産物である D-BBR の経時的な増加が観察された。さらに、36 時間以降では D-BBR のピークも消失し、HPLC クロマトグラム上で検出されなかった。

LB 液体培地を用いた BBR の分解では、新たな分解産物を検出することが出来なかった。そこで、新たな分解産物の検出を目的として BD7100 株の休止菌体を用

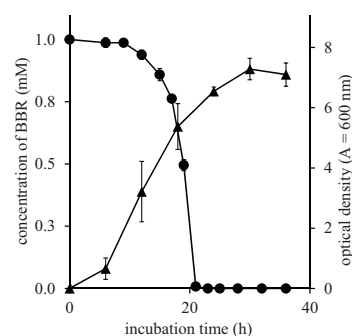


Figure 4-1. BD7100 株の 1.0 mM BBR 添加 LB 培地中での培養。

BD7100 株の成長曲線 (○) および BBR 濃度の推移 (●)。(培養温度 30 °C)

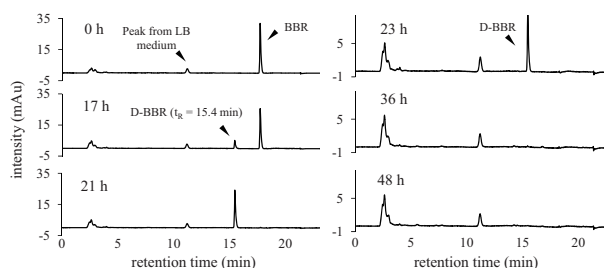


Figure 4-2. BD7100 株の BBR 添加 LB 培養液の HPLC クロマトグラム (検出波長 280 nm)。

いてリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中 30 °C で 1.0 mM BBR の分解を検討した。まず、BD7100 株の非誘導休止菌体を用いて BBR の分解を検討したが、BD3100 株とは異なり、BBR を分解しなかった (Figure 4-3A)。そこで、BD7100 株の BBR 誘導休止菌体を用いて BBR の分解挙動を検討した。その結果、反応開始時の HPLC クロマトグラム上では BBR のピークのみが検出され、反応開始 90 分後では BBR の減少および D-BBR のピークが検出された (Figure 4-3B)。さらに、反応開始 180 分後には BBR のピークは消失した。また、同時に、340 nm の UV 吸収が消失した B4 のピーク ($t_R = 15.3$ min) が検出された (Figure 4-3B および 4-4)。

B4 は HPLC を用いて分取・精製し、NMR および MS スペクトルを中心とする機器分析による詳細な構造解析を行った。その結果、B4 の構造をベンゼン酢酸誘導体である 2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzeneacetic acid (HDBA) と決定した (Figure 4-5)。HDBA は、合成品としての報告されているが、これまでに天然物としての報告例は無い。また、HDBA の 2 位メトキシ体はベンジルイソキノリンアルカロイド誘導体である leucoxylophine²²⁾ やプロトベルベリン誘導体である capaurimine²³⁾ の化学合成原料として用いられている。

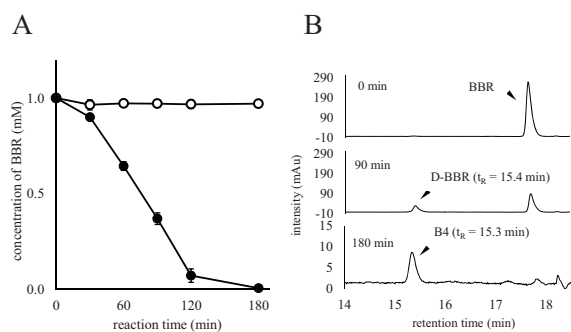


Figure 4-3. BD7100 株の休止菌体による BBR 分解実験

(A) 非誘導休止菌体 (○) または BBR 誘導休止菌体 (●) におけるリン酸緩衝液中の BBR 濃度の経時変化。(B) BBR 誘導休止菌体における反応液の HPLC クロマトグラム (検出波長 280 nm)。

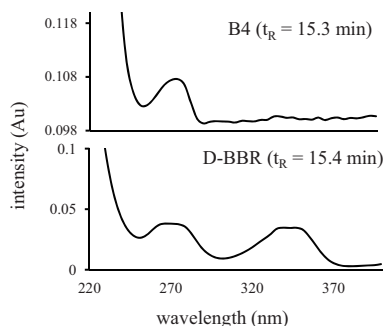


Figure 4-3. BD7100 株の BBR 誘導休止菌体による反応液中の B4 および D-BBR の PDA-HPLC 分析での UV 吸収スペクトル。

(上段) 反応開始 180 分後の反応液中 B4 の UV 吸収スペクトル。(下段) 反応開始 90 分後の反応液中 D-BBR の UV 吸収スペクトル。

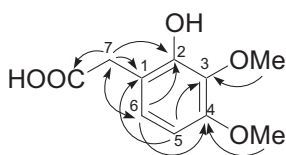


Figure 4-5. HDBA の HMBC 相関

5. *Rhodococcus* sp. BD7100 株による BRU の分解産物に関する検討

BD7100 株は、BRU を添加した LB 寒天培地を用いた実験結果から BRU に対する分解能を有することが推測された。そこで、BRU の分解産物を同定するために、BD7100 株の休止菌体を用いてリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中 30 °C で 0.5mM BRU の分解を検討した。また、本実験では水溶性の高い BRU の HCl 塩 (BRU-HCl) を用いて行った。HPLC を用いて反応液中の BRU 分解の変化を測定した結果、BBR の場合と同様に BD7100 株

の非誘導休止菌体との反応では BRU の分解は確認出来なかった (Figure 5-1A)。そこで、BD7100 株の BBR 誘導休止菌体を用いてリン酸緩衝液中で BRU の分解を行った。その結果、リン酸緩衝液中の 0.5 mM BRU ($t_R = 16.9$ min) は経時的に減少し、反応開始 120 分後には消失した。また、分解開始 90 分後の HPLC クロマトグラムでは R1 のピーク ($t_R = 14.2$ min) が、分解反応開始 180 分後の HPLC クロマトグラムでは、340 nm の UV 吸収が消失した R2 のピーク ($t_R = 11.9$ min) が検出された (Figure 5-1B および 5-2)。

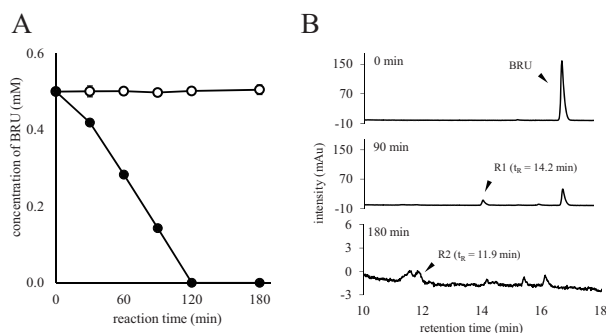


Figure 5-1. BD7100 株の休止菌体による BRU 分解実験

(A) 非誘導休止菌体 (○) または BBR 誘導休止菌体 (●) におけるリン酸緩衝液中の BRU 濃度の経時変化。(B) BBR 誘導休止菌体における反応液の HPLC クロマトグラム (検出波長 280 nm)。

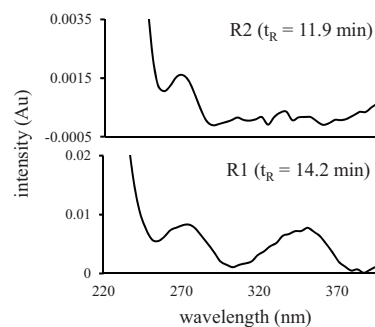


Figure 5-2. BD7100 株の BBR 誘導休止菌体による反応液中の R2 および R1 の PDA-HPLC 分析での UV 吸収スペクトル。

(上段) 反応開始 180 分後の反応液中 R2 の UV 吸収スペクトル。(下段) 反応開始 90 分後の反応液中 R1 の UV 吸収スペクトル。

まず、R1 の構造を決定するために HPLC を用いて分取・精製し、一次元 NMR および MS スペクトルを中心とする機器分析による詳細な構造解析を行った。その結果、R1 は、BRU の脱メチレン化体 demethyleneberrubine (D-BRU) と推測した。そこで、反応液中の R1 のピークと化学合成した D-BRU 標準品 (Scheme 5-1) の HPLC クロマトグラム上での保持時間および一次元 NMR (^1H および ^{13}C NMR) スペクトルの比較を

行った。その結果、HPLC クロマトグラム上での保持時間 (Figure 5-3) および NMR スペクトル上でのケミカルシフトが一致したことから R1 を D-BRU と決定した。

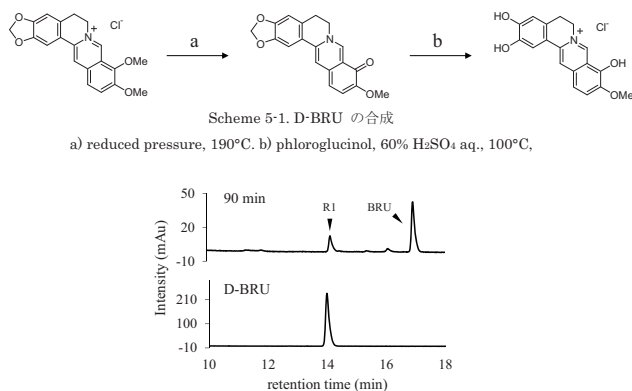


Figure 5-3. BD7100 株の BBR 誘導休止菌体による BRU 分解実験の反応液中 R1 と D-BRU 標準品の HPLC による保持時間の比較。

(上段) 反応開始 90 分後の反応液および (下段) D-BRU 標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 280 nm)。

さらに、R2 は BD7100 株の BBR 誘導休止菌体による反応開始 180 分後の BRU 分解反応液から分取用 HPLC を用いて分離・精製した。二次元 NMR の詳細な解析 (Figure 5-4) から、R2 の構造を BD7100 株の BBR 分解産物である HDBA の 2 位水酸化体 2,3-dihydroxy-4-methoxybenzeneacetic acid (DMBA) と決定した。DMBA は、BBR の分解産物として同定した HDBA と同様に、合成品としての報告例はあるが、これまでに天然物としての報告例はない。また、これら 2 種のベンゼン酢酸誘導体はベンゼン環の置換基の様式からそれぞれの分解基質の D 環由来であると推測される。さらに、この結果は、BD7100 株が BBR や BRU のプロトベルペリン骨格の開裂に關与する酵素を有している可能性を示唆していた。プロトベルペリン骨格の開裂はこれまでに報告例がなく、本反応に關与する酵素は新規酵素である可能性が高いと考えられた。

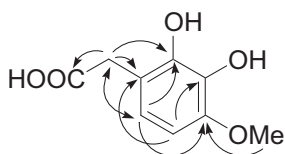


Figure 5-4. DMBA の HMBC 相關

6. *Rhodococcus* sp. BD7100 株による PAL の分解産物に関する検討

BD7100 株は PAL 添加 LB 寒天培地上でコロニーを形成したが、PAL 由来色調の消失は確認出来なかった。そこで、PAL 分解能についてリン酸緩衝液中で 0.5 mM PAL の分解を検討した。まず、BD7100 株の非誘導休止菌体を用いて PAL の分解を試みたが、PAL の減少は確認出来なかった (Figure 6-1A)。さらに、BD7100 株の BBR 誘導休止菌体を用いてリン酸緩衝液中で 0.5 mM PAL の分解を試みたが、PAL の減少は確認することは出来なかった (Figure 6-1B)。

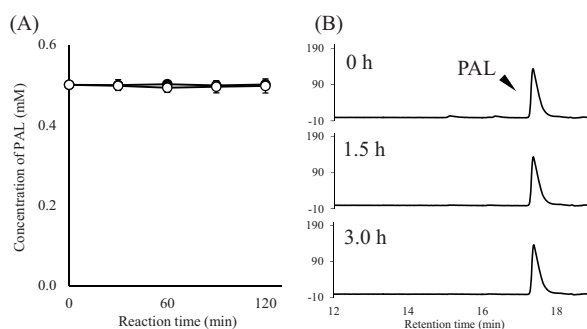


Figure 6-1. BD7100 株の休止菌体による PAL 分解実験

(A) 非誘導休止菌体 (○) または BBR 誘導休止菌体 (●) におけるリン酸緩衝液中の PAL 濃度の経時変化。(B) BBR 誘導休止菌体における反応液の HPLC クロマトグラム (検出波長 280 nm)。

7. CYP 阻害添加による BBR 資化性菌の BBR 分解に対する影響

これまでに、微生物によるメチレンジオキシ基の脱メチレン化に關与する酵素の報告例はないが、哺乳類におけるメチレンジオキシ基の脱メチレン化に關与する酵素として cytochrome P450 (CYP) が報告されている²⁴⁻²⁹⁾。そこで、本章では BBR の脱メチレン化機構の解明の一端として代表的な CYP 阻害剤 6 種類を添加し、休止菌体による BBR の分解に対する影響を検討した。

まず、BD3100 株の BBR 誘導休止菌体による BBR 分解反応に、CYP 阻害剤 6 種を最終濃度 10 または 100 μ M になるように添加し、BBR 分解に対する影響を検討した (Table 7-1)。その結果、10 μ M では KCZ のみが BBR の分解を 23% 抑制した。また、100 μ M では α -NF が 99% と最も強い抑制を示し、MCZ および KCZ がそれぞれ 50 および 54% の抑制を示した。一方、FCZ および QN、EM は BD3100 株の休止菌体による BBR の分解を抑制しなかった。さらに BD3100 株と同様に、BD7100 株の BBR 誘導休止菌体による BBR 分解に対する CYP 阻害剤添加の影響を検討した。その結

果、10 μ M では MCZ が BBR の分解を 53% と最も強い阻害を示し、 α -NF および EM がそれぞれ 6 および 13% 抑制した。また、100 μ M では BD3100 株と同じく α -NF が 99% と最も強い阻害を示した。さらに、MCZ および KCZ、EM はそれぞれ 93 および 40、12% 抑制した。一方、FCZ および QN は BD7100 株の休止菌体による BBR の分解を抑制しなかった。

Table 7-1. CYP 阻害剤による BBR の分解抑制率

CYP inhibitors	inhibition in metabolism of BBR (%)			
	BD3100		BD7100	
	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M
Miconazole (MCZ)	0	50	53	93
Ketoconazole (KCZ)	23	54	0	40
Fluconazole (FCZ)	0	0	0	0
α -Naphthoflavone (α -NF)	0	99	6	99
Quinine (QN)	0	0	0	0
Erythromycin (EM)	0	0	13	12

3 回の測定値の平均値を表記。

BD3100 株および BD7100 株の休止菌体による BBR の分解は、MCZ、KCZ、 α -NF および EM の添加によって抑制された。以上の結果から、両菌株による BBR の分解反応には、CYP が関与している可能性が推測された。

今回使用したアゾール系抗真菌薬 MCZ、KCZ および FCZ、抗生物質 EM は、CYP 3A4 の阻害剤³⁰⁻³³⁾、 α -NF は CYP1A サブファミリーの選択的阻害剤³⁴⁾、QN は CYP2D サブファミリーの選択的阻害剤として知られている³⁵⁾。そのため、今回の結果から BD3100 株および BD7100 株が有する BBR 分解に関与する酵素はこれらの CYP ファミリーと構造的な類似性を有している可能性が推測された。しかし、その詳細な機構の解明には本実験だけでは不十分であるため、より詳細な検討が必要と考えている。

おわりに

本研究では、BBR 資化性菌の分解能を利用した BBR からの新規化合物の創製および有用化合物への変換を検討した。まず、BBR 資化性菌の探索を行い、生薬製剤工場由来の土壌から 2 種類の BBR 資化性菌 (*Sphingobium* sp. BD3100 株および *Rhodococcus* sp. BD7100 株) の単離に成功した。BBR 資化性菌の単離報告例はこれまでになく、これが世界で初めての例であった。また、単離した 2 種類の BBR 資化性菌を用いて BBR、PAL および BRU の分解について検討した結果、それぞれの分解産物として 7 種類の化合物を含む分解経路の一部を明らかにした (Figure 8-1)。

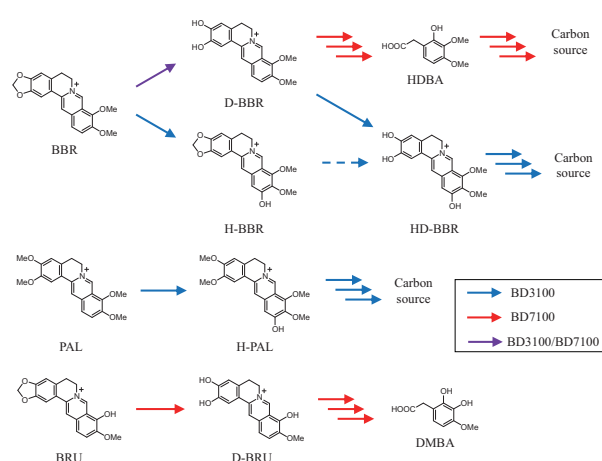


Figure 8-1. BBR 資化性菌 *Sphingobium* sp. BD3100 株および *Rhodococcus* sp. BD7100 株による BBR、PAL および BRU の分解経路

単離した 7 種の分解産物は、2 種類の新規化合物 (H-BBR および HD-BBR) および 3 種類の天然物としては初めての化合物 (D-BRU、HDBA および DMBA) が含まれていた。これらの化合物の中には有用な生理活性作用を示すものや、有機合成の原料となる有用な化合物が含まれていた。

また、両菌株による BBR の分解経路の第一段階として BBR から D-BBR への脱メチレン化反応が共通の反応として確認された。メチレンジオキシ基を分子内に含む化合物は、ヒトに対して重要な生理活性作用を示すものがあり、哺乳類における薬物動態学的な検討においても代謝の際に、脱メチレン化反応が報告されている。例えば、天然物では *Sesamum indicum* の成分である sesamine はラットやヒトの CYP によって脱メチレン化され^{36, 37)}、合成品では覚せい剤の一種である MDMA など CYP による脱メチレン化によって体外に排出されることが報告されている^{27, 28)}。このように、脱メチレン化反応は BBR 資化性菌だけではなく、ヒトを含めた哺乳類での物質代謝で重要な工程であることが推測される。本研究において、CYP 阻害剤の添加が BD3100 株および BD7100 株による BBR の分解反応を阻害したことから BBR 資化性菌による BBR の脱メチレン化機構にも CYP が関与している可能性が示唆された。また、BD3100 株の BBR および PAL の分解産物としてプロトベルベリン骨格の 11 位が水酸化された H-BBR、HD-BBR および H-PAL を同定した。これらの分解産物の存在は、BD3100 株がプロトベルベリン骨格の 11 位を水酸化する酵素を有している可能性を示唆しているが、このような反応を示す酵素はこれまでに報告例がない。そのため、この水酸化酵素をコードしている遺伝子を特定することで、H-BBR や H-PAL などの化合物の創製が可能になると考えている。さらに、11 位が水酸

化されたプロトベルペリン誘導体は報告例が少なく、これまでに生理活性作用に関する検討は殆ど行われていない。そのため、他の生理活性作用に関する更なる検討を行うことで有用な活性を見出すことが可能ではないかと期待している。一方で、BBR および BRU を基質とした BD7100 株による分解実験で、2 種類のフェニル酢酸誘導体 HDBA および DMBA を分解産物として分離した。両分解産物は分解基質の D 環に水酸基およびメトキシ基が結合した構造を有していた。これらの結果は、プロトベルペリン骨格の C 環上の 8/8a および 13/13a 位間で酸化的開裂が生じたことが推測され、仮に 8/8a 位間の開裂が先に生じていれば、中間分解産物として reticuline 様化合物を生成している可能性が期待される。プロトベルペリン骨格の開裂の報告は、Onda らによる 7/8 位の窒素 - 炭素結合の還元を介した Hofmann 分解による 6 位および 7 位の炭素 - 窒素間の単結合の開裂のみであり^{39, 40)}、化学反応としても興味深い。

以上、本研究から新たな化合物の創製および変換方法として BBR 資化性菌利用の有用性を示すことができた。

また、BBR 資化性菌の有する有用化合物の生産に利用可能な新規酵素の存在を示唆する知見を得ることができた。今後、これらの遺伝子や酵素の特定および応用によってより多彩な有用化合物が簡便に生産することが出来るものと期待している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、平成 27 年度星薬科大学大谷記念研究奨励金を賜りましたことに對し、大谷卓男理事長ならびに田中隆治学長に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行のために、多大なるご指導を賜りました星薬科大学薬化学教室 細江智夫教授ならびに武田尚助教、若菜大悟助教に心より御礼申し上げます。また、本研究を進めるなかで、ご支援、ご助言頂きました京都大学大学院 佐藤文彦教授ならびに長岡技術科学大学 福田雅夫教授、笠井大輔助教に深く御礼申し上げます。最後に、本研究を進めるにあたり、多大なるご協力を頂きました薬化学教室の教室員の皆様に深謝致します。

参考文献

- 1) 上野 芳夫, 大村 智, 田中 晴雄土屋 友房, “微生物薬品化学,” 2003.
- 2) Sasaki J., Miyazaki A., Saito M., Adachi T., Mizoue K., Hanada K., Omura S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 152-157 (1992).
- 3) Takeda K., Asou T., Matsuda A., Kimura K., Okamura K., Okamoto R., Sasaki J., Adachi T., Omura S., *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 380-382 (1994).
- 4) Matsuoka T., Miyakoshi S., Tanzawa K., Nakahara K., Hosobuchi M., Serizawa N., *Eur. J. Biochem.*, **184**, 707-713 (1989).
- 5) Hatanaka T., *Clin. Pharmacokinet.*, **39**, 397-412 (2000).
- 6) 土佐政二, 石原朗子, 野瀬康代, 牛川務, 吉田節也, 中澤裕之, 富松利明, 生薬学雑誌, **43**, 28-34 (1989).
- 7) Jung H. A., Yoon N. Y., Bae H. J., Min B. S., Choi J. S., *Arch Pharm Res*, **31**, 1405-1412 (2008).
- 8) Beaudoin G. a W., Facchini P. J., *Planta*, **240**, 19-32 (2014).
- 9) Bahadur S., Shukla A. K., *J. Nat. Prod.*, **46**, 454-457 (1983).
- 10) Zhang P., Qiang X., Zhang M., Ma D., Zhao Z., Zhou C., Liu X., Li R., Chen H., Zhang Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **352**, 139-147 (2015).
- 11) Nishiyama Y., Moriyasu M., Ichimaru M., Iwasa K., Kato A., Mathenge S. G., Chalo Mutiso P. B., Juma F. D., *Phytochemistry*, **65**, 939-944 (2004).
- 12) Silikas N., McCall D. L. C., Sharples D., Watkins W. M., Waigh R. D., Barber J., *Pharm. Pharmacol. Commun.*, **2**, 55-58 (1996).
- 13) Puvanendran S., Wickramasinghe A., Karunaratne D. N., Carr G., Wijesundara D. S. A., Andersen R., Karunaratne V., *Pharm. Biol.*, **46**, 352-355 (2008).
- 14) Semwal D. K., Rawat U., Semwal R., Singh R., Singh G. J. P., *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **12**, 99-105 (2010).
- 15) Chen B., Feng C., Li B.-G., Zhang G.-L., *Nat. Prod. Res.*, **17**, 397-402 (2003).
- 16) Augstein W., Bradsher C. K., *J. Org. Chem.*, **34**, 1349-1352 (1969).
- 17) Yang P., Song D.-Q., Li Y.-H., Kong W.-J., Wang Y.-X., Gao L.-M., Liu S.-Y., Cao R.-Q., Jiang J.-D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 4675-4677 (2008).
- 18) Beausoleil E., Chauvignac C., Taverne T., Lacombe S., Pognante L., Leblond B., Pallares D., Oliveira C. De, Bachelot F., Carton R., Peillon H., Coutadeur S., Picard V., Lambeng N., Désiré L., Schweighoffer F., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 5594-5598 (2009).
- 19) Cui W., Iwasa K., Tokuda H., Kashiwara A., Mitani Y., Hasegawa T., Nishiyama Y., Moriyasu M., Nishino H., Hanaoka M., Mukai C., Takeda K., *Phytochemistry*, **67**, 70-79 (2006).
- 20) Shamma M., Jones C. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4943-4949 (1970).
- 21) Tsai S.-F., Lee S.-S., *J. Nat. Prod.*, **73**, 1632-1635 (2010).
- 22) Adesomoju A. A., Davis W. A., Rajaraman R., Pelletier J. C., Cava M. P., *J. Org. Chem.*, **49**, 3220-3222 (1984).

- 23) Kametani T., Fukumoto K., Iida H., Kikuchi T., *Yakugaku Zasshi*, **88**, 1482-1486 (1968).
- 24) Meyer M. R., Peters F. T., Maurer H. H., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 2345-2354 (2008).
- 25) Akhter N., Tanaka S., Ashino T., Shima N., Katagi M., Tsuchihashi H., Mian A. H., Numazawa S., Yoshida T., *Forensic Toxicol.*, **26**, 52-57 (2008).
- 26) Paul L., *Eur. J. Pharmacol.*, **485**, 69-79 (2004).
- 27) Kumagai Y., Lin L. Y., Hiratsuka A., Narimatsu S., Suzuki T., Yamada H., Oguri K., Yoshimura H., Cho A. K., *Mol. Pharmacol.*, **45**, 359-365 (1994).
- 28) Kumagai Y., Lin L. Y., Philpot R. M., Yamada H., Oguri K., Yoshimura H., Cho A. K., *Mol. Pharmacol.*, **42**, 695-702 (1992).
- 29) Fukuto J. M., Kumagai Y., Cho A. K., *J. Med. Chem.*, **34**, 2871-2876 (1991).
- 30) Wrighton S. A., Ring B. J., *Pharm. Res.*, **11**, 921-924 (1994).
- 31) Niwa T., Shiraga T., Takagi A., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1805-1808 (2005).
- 32) Dilmaghanian S., Gerber J. G., Filler S. G., Sanchez A., Gal J., *Chirality*, **16**, 79-85 (2004).
- 33) Zhang W., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 314-318 (2002).
- 34) McManus M. E., Burgess W. M., Veronese M. E., Huggett A., Quattrochi L. C., Tukey R. H., *Cancer Res.*, **50**, 3367-3376 (1990).
- 35) Ellis S., Rowland K., Ackland M., Rekka E., Simula A., Lennard M., Wolf C., Tucker G., *Biochem. J.*, **316**, 647-654 (1996).
- 36) Yasuda K., Ikushiro S., Kamakura M., Ohta M., Sakaki T., *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 2117-2123 (2010).
- 37) Nakai M., Harada M., Nakahara K., Akimoto K., Shibata H., Miki W., Kiso Y., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1666-1670 (2003).
- 38) Akhter N., Tanaka S., Ashino T., Shima N., Katagi M., Tsuchihashi H., Mian A. H., Numazawa S., Yoshida T., *Forensic Toxicol.*, **26**, 52-57 (2008).
- 39) Kametani T., Fukumoto K., *Acc. Chem. Res.*, **5**, 212-219 (1972).
- 40) 恩田政行, 米澤京子, 阿部薫, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 31-36 (1971).

Strategy for the microbial transformation from berberine using berberine-utilizing bacteria

Kazuki ISHIKAWA

Department of Organic Chemistry, Hoshi University

Berberine (BBR) is an alkaloidal compound isolated from several higher plants. There is a lot of reports about the biosynthesis pathway of plant alkaloids, however, the degradation pathway by the microorganism had not been reported rarely. To examine the production of novel compound from BBR as starting material, two kind of BBR-utilizing bacteria, *Sphingobium* sp. strain BD3100 and *Rhodococcus* sp. strain BD7100, were isolated from soil. In the degradation experiments with BBR and BBR derivatives (palmatine and berberrubine) using the cells of BD3100 and BD7100, two novel compounds (H-BBR and HD-BBR) were isolated along with five known compounds (D-BBR, H-PAL, HDBA, DMBA and D-BRU). There is no report about the microbial enzyme which catalyze the demethylenation of BBR. For the analysis of demethylenation mechanism by BBR-utilizing bacteria, the effect of cytochrome P450 (CYP) inhibitor against the BBR degradation by cells of BD3100 and BD7100 was examined. Demethylenation by BD3100 and BD7100 was inhibited by CYP inhibitor, and these results suggested that BBR demethylenation by BBR-utilizing bacteria was involved in CYP. The results of this study indicated that this method which was used BBR-utilizing bacterium was effective for production of novel compounds.