

論文の内容の要旨

論文題目 *Sphingomonas paucimobilis* strain G5 における 18 β -glycyrrhetic acid の代謝

氏名 吉田 圭司郎

トリテルペノイドは炭素数 30 を基本とするテルペン化合物であり、遊離体あるいは配糖体等の誘導体として様々な構造の化合物が天然に広く存在し、その中には抗腫瘍作用、抗癌作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用、抗菌作用、コレステロール生合成阻害作用、血糖降下作用等の興味深い生理活性を示すものも多い。また、これら生理活性のいくつかについては構造活性相関について報告されており、それらの報告からカルボニル基や水酸基などの親水性官能基が基本骨格のどの部分に存在しているかという点が重要であることが明らかにされている。従って、立体選択的にトリテルペノイドへ官能基を導入する技術が確立できれば、さらに有用な物質として医薬等への応用も期待される。しかしながら、有機合成によるトリテルペノイドの立体選択的修飾には限界があり、例えば、立体選択的なメチル基の酸化反応等は通常の有機化学的手法では非常に困難である。このような反応を効率的に行う方法の一つとして、微生物等の酵素を利用する方法が考えられるが、トリテルペノイドの微生物変換については報告例が少なく、実用的価値を考えていくためには、さらに研究を進める必要がある。そこで本研究では、比較的入手が容易である 18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GRA, Fig. 1) をモデル化合物として、トリテルペノイドの微生物変換について検討し

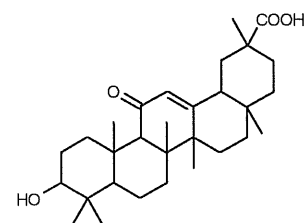


Fig. 1. Structure of 18 β -GRA

た。

1. 18 β -Glycyrrhetic acid 資化菌のスクリーニング

まず、18 β -GRAを唯一炭素源として生育可能な微生物のスクリーニングを行った。50種類の土壌サンプルから7株(A3、A6、C8、G5、G12、L2、L6)の微生物を分離することに成功した。これら7株の中でG5株は18 β -GRAの資化能が安定しており、生育速度も比較的速いことから、本研究の対象として適していると判断し以降の実験材料として用いた。G5株はグラム陰性の桿菌であり、菌学的性質から *Sphingomonas paucimobilis* と同定された。18 β -GRAを唯一炭素源とした培地でG5株を培養し培養液を逆相HPLCで分析した結果、培養液中には主要代謝物(M-A)に由来するピークとその他のいくつかの代謝物に由来すると考えられるピークが見られた。

2. 18 β -Glycyrrhetic acid 代謝物の構造決定

G5株における18 β -GRA代謝経路を明らかにすることを目的として主要代謝物であるM-Aの精製及び構造決定を行った。培養液を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画と再結晶により精製しM-Aの白色結晶を得た。NMRスペクトル及びマスマスペクトルの解析結果に基づいて、M-Aは3,4-*seco*-4,23,24-*trinor*-11-*oxo*-12-*oleanene*-3,28,30-*trioic acid* (Fig. 2)であると結論付けた。M-Aの構造からG5株は18 β -GRAのA環を開裂する反応と28位のメチル基をカルボキシル基に酸化する反応を触媒できると考えられた。特に、28位のメチル基の酸化反応については、トリテルペノイドの立体選択的酸化反応として微生物変換の有効性を考えていく上で興味深く、G5株における18 β -GRAからM-Aへの代謝経路を明らかにすることが必要と考えられた。

3. 18 β -Glycyrrhetic acid 代謝能欠損変異株のスクリーニングと代謝物の構造決定

G5株における18 β -GRAの代謝経路を明らかにするためには、M-A以外の代謝中間体を構造決定する必要がある。まず、M-Aと同様に培養液からの精製を試みたが、様々な代謝中間体が混在し、それぞれの量が非常に少ないために精製することができなかった。そこで、トランスポゾン挿入変異によりG5株から18 β -GRA代謝能に何らかの欠陥がある変異株の取得を試みた。即ち、一次スクリーニングとしてTn5の挿入によるkanamycin耐性変異株を選抜し、二次スクリーニングとして18 β -GRAを唯一炭素源とした平板培地での生育が認められない若しくは生育が弱い株を選抜した。こうして選抜した株を候補株としてそれぞれ18 β -GRAを唯一炭素源とした液体培地で培養し、

HPLC 分析により野生株と異なる代謝物を培養液中に蓄積する変異株を選抜した。その結果、野生株とは明らかに異なる 2 つの代謝中間体 (M-B、M-C) を培養液中に蓄積する変異株として TM9638 株を取得した。これら 2 つの代謝中間体をそれぞれジアゾメタンによるメチル化誘導体として精製し、NMR スペクトル及びマススペクトルを測定した結果、M-B は 1,2,3,4,23,24-hexanor-11,5-dioxo-olean-12-en-28,30-dioic acid (Fig. 2)、M-C は 1,2,3,4,23,24,28-heptanor-11,5-dioxo-olean-9,12,17-trien-30-oic acid (Fig. 2) であることが明らかとなった。これら 2 つの代謝物の構造から G5 株において 18 β -GRA は M-A を経て M-B や M-C へと代謝されていると考えられ、野生株の培養液中には M-B や M-C の蓄積が見られないことから M-B 及び M-C はさらに代謝されると考えられた。

4. Oxygenase 阻害剤が G5 株の 18 β -glycyrrhetic acid 代謝に及ぼす影響

18 β -GRA から M-A に至る代謝経路に存在する反応ステップを阻害することができれば、今までに見られなかった代謝中間体が蓄積すると考えられる。既に述べたように、G5 株は 18 β -GRA の環開裂反応やメチル基の酸化反応を触媒して M-A に代謝すると考えられる。このような反応と類似の反応に oxygenase が関与している例が多いことから、oxygenase 阻害剤が G5 株の 18 β -GRA 代謝に何らかの影響を及ぼすと推測し、4 種類の oxygenase 阻害剤 (1-aminobenzotriazole、metyrapone、proadifen、ketoconazole) について G5 株の 18 β -GRA 代謝に及ぼす影響を検討した。それぞれの oxygenase 阻害剤とプレインキュベートした休止菌体を用いて 18 β -GRA を基質として休止菌体反応を行い、HPLC で反応生成物の違いを比較した結果、ketoconazole は、阻害剤を加えていない場合と同様のクロマトグラムであったが、阻害剤として 1-aminobenzotriazole や metyrapone を加えた場合には、阻害剤を加えていないときには見られないいくつかのピークが検出され、proadifen を加えた場合には、18 β -GRA の代謝物に由来すると考えられるピークがほとんど検出されず、基質である 18 β -GRA が反応溶液中に多量に残存していた。そこで、1-aminobenzotriazole や metyrapone を加えた場合に生成する主要代謝物 (M-D) の精製・構造決定を試みた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相分取 HPLC によって精製し、NMR スペクトル及びマススペクトルを測定した結果、M-D は 3 β -hydroxy-11-oxo-olean-12-en-23,30-dioic acid (Fig. 2) であることが明らかとなった。Oxygenase 阻害剤添加により M-D の生成が認められたことから、M-D は oxygenase によって酸素添加反応を受けて代謝されることが示唆され、例えば、M-D の 5 位に水酸基が導入

されて 4 位と 5 位の炭素 - 炭素結合が開裂し、 β 酸化によって側鎖が切断され M-A に至ると推測された。

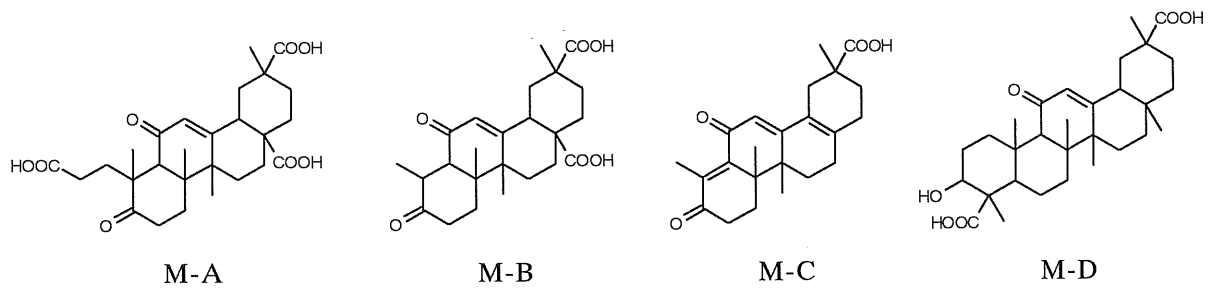


Fig. 2. Structures of metabolites from 18β -glycyrrhetic acid in *Sphingomonas paucimobilis* strain G5.

4. 総括と展望

本研究では、 18β -GRA を唯一炭素源として生育できる細菌 *S. paucimobilis* G5 株を分離し、トランスポゾン挿入変異株のスクリーニングや oxygenase 阻害剤の影響を検討することによって本菌株による 18β -GRA 代謝物として 4 つの化合物 (M-A、M-B、M-C、M-D) を精製・構造決定した。さらに、それら化合物の構造から G5 株の 18β -GRA 代謝経路について推測し、代謝経路の全容の解明には至らなかったものの、環開裂経路の推定や代謝経路への oxygenase の関与を明らかにすることができた。 18β -GRA のような五環式トリテルペノイドを炭素源として生育可能な細菌はこれまで報告されておらず、今回分離した G5 株は 18β -GRA の 28 位や 23 位のメチル基を選択的に酸化できることから、トリテルペノイドの微生物変換に利用する菌株として興味深い能力を有すると考えられる。今後、トリテルペノイドの微生物変換という観点で G5 株の有用性を見極めるためには、代謝経路の特定や反応に関与する酵素の基質特異性を詳細に検討する必要があると考えられる。

審査委員会報告書

〔論文博士用〕

※ 報告番号 学位記番号	乙 第 15387 号	授 与 年 月 日	平成 14 年 7 月 8 日
学位の種類	博 士 (農 学)		
ふ り が な 氏 名	よしだ けいしろう 吉田 圭司郎	生 年 月 日	昭 和 4 5 年 2 月 1 6 日
		国 籍	
論文題目	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain G5 における 18β-glycyrrhetic acid の代謝		
主論文の冊数	1 冊		
審 査 委 員 会 員	(官職)	(氏名)	(印)
	主査 東京大学 教授	大森 俊雄	
	同上	山口 五十麿	
	同上	山根 久和	
	同上	大久保 明	
	東京大学 助教授	野尻 秀昭	
論文の内容の要旨	別紙 1		
審査の結果の要旨	別紙 2		
試験の結果の要旨	別紙 3		
学力の確認の結果の要旨	別紙 4		
審査委員会 の 意 見	審査の結果、博士(農学)の学位を授与できると認める。		

〔注〕 1 報告番号、学位記番号、授与年月日は、研究科委員会の審議後に研究科において記入する。
2 国籍は、外国人のみ記入する。

論文の内容の要旨

論文題目 *Sphingomonas paucimobilis* strain G5 における 18 β -glycyrrhetic acid の代謝

氏名 吉田 圭司郎

トリテルペノイドは炭素数 30 を基本とするテルペン化合物であり、遊離体あるいは配糖体等の誘導体として様々な構造の化合物が天然に広く存在し、その中には抗腫瘍作用、抗癌作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用、抗菌作用、コレステロール生合成阻害作用、血糖降下作用等の興味深い生理活性を示すものも多い。また、これら生理活性のいくつかについては構造活性相関について報告されており、それらの報告からカルボニル基や水酸基などの親水性官能基が基本骨格のどの部分に存在しているかという点が重要であることが明らかにされている。従って、立体選択的にトリテルペノイドへ官能基を導入する技術が確立できれば、さらに有用な物質として医薬等への応用も期待される。しかしながら、有機合成によるトリテルペノイドの立体選択的修飾には限界があり、例えば、立体選択的なメチル基の酸化反応等は通常の有機化学的手法では非常に困難である。このような反応を効率的に行う方法の一つとして、微生物等の酵素を利用する方法が考えられるが、トリテルペノイドの微生物変換については報告例が少なく、実用的価値を考えていくためには、さらに研究を進める必要がある。そこで本研究では、比較的入手が容易である 18 β -glycyrrhetic acid (18 β -GRA, Fig. 1) をモデル化合物として、トリテルペノイドの微生物変換について検討し

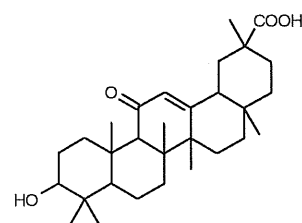


Fig. 1. Structure of 18 β -GRA

た。

1. 18 β -Glycyrrhetic acid 資化菌のスクリーニング

まず、18 β -GRA を唯一炭素源として生育可能な微生物のスクリーニングを行った。50 種類の土壌サンプルから 7 株 (A3、A6、C8、G5、G12、L2、L6) の微生物を分離することに成功した。これら 7 株の中で G5 株は 18 β -GRA の資化能が安定しており、生育速度も比較的速いことから、本研究の対象として適していると判断し以降の実験材料として用いた。G5 株はグラム陰性の早菌であり、菌学的性質から *Sphingomonas paucimobilis* と同定された。18 β -GRA を唯一炭素源とした培地で G5 株を培養し培養液を逆相 HPLC で分析した結果、培養液中には主要代謝物 (M-A) に由来するピークとその他のいくつかの代謝物に由来すると考えられるピークが見られた。

2. 18 β -Glycyrrhetic acid 代謝物の構造決定

G5 株における 18 β -GRA 代謝経路を明らかにすることを目的として主要代謝物である M-A の精製及び構造決定を行った。培養液を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画と再結晶により精製し M-A の白色結晶を得た。NMR スペクトル及びマススペクトルの解析結果に基づいて、M-A は 3,4-*seco*-4,23,24-*trinor*-11-*oxo*-12-*oleanene*-3,28,30-*trioic acid* (Fig. 2) であると結論付けた。M-A の構造から G5 株は 18 β -GRA の A 環を開裂する反応と 28 位のメチル基をカルボキシル基に酸化する反応を触媒できると考えられた。特に、28 位のメチル基の酸化反応については、トリテルペノイドの立体選択的酸化反応として微生物変換の有効性を考えていく上で興味深く、G5 株における 18 β -GRA から M-A への代謝経路を明らかにすることが必要と考えられた。

3. 18 β -Glycyrrhetic acid 代謝能欠損変異株のスクリーニングと代謝物の構造決定

G5 株における 18 β -GRA の代謝経路を明らかにするためには、M-A 以外の代謝中間体を構造決定する必要がある。まず、M-A と同様に培養液からの精製を試みたが、様々な代謝中間体が混在し、それぞれの量が非常に少ないために精製することができなかった。そこで、トランスポゾン挿入変異により G5 株から 18 β -GRA 代謝能に何らかの欠陥がある変異株の取得を試みた。即ち、一次スクリーニングとして Tn5 の挿入による kanamycin 耐性変異株を選抜し、二次スクリーニングとして 18 β -GRA を唯一炭素源とした平板培地での生育が認められない若しくは生育が弱い株を選抜した。こうして選抜した株を候補株としてそれぞれ 18 β -GRA を唯一炭素源とした液体培地で培養し、

HPLC 分析により野生株と異なる代謝物を培養液中に蓄積する変異株を選抜した。その結果、野生株とは明らかに異なる 2 つの代謝中間体 (M-B、M-C) を培養液中に蓄積する変異株として TM9638 株を取得した。これら 2 つの代謝中間体をそれぞれジアゾメタンによるメチル化誘導体として精製し、NMR スペクトル及びマススペクトルを測定した結果、M-B は 1,2,3,4,23,24-hexanor-11,5-dioxo-olean-12-en-28,30-dioic acid (Fig. 2)、M-C は 1,2,3,4,23,24,28-heptanor-11,5-dioxo-olean-9,12,17-trien-30-oic acid (Fig. 2) であることが明らかとなった。これら 2 つの代謝物の構造から G5 株において 18 β -GRA は M-A を経て M-B や M-C へと代謝されていると考えられ、野生株の培養液中には M-B や M-C の蓄積が見られないことから M-B 及び M-C はさらに代謝されると考えられた。

4. Oxygenase 阻害剤が G5 株の 18 β -glycyrrhetic acid 代謝に及ぼす影響

18 β -GRA から M-A に至る代謝経路に存在する反応ステップを阻害することができれば、今までに見られなかった代謝中間体が蓄積すると考えられる。既に述べたように、G5 株は 18 β -GRA の環開裂反応やメチル基の酸化反応を触媒して M-A に代謝すると考えられる。このような反応と類似の反応に oxygenase が関与している例が多いことから、oxygenase 阻害剤が G5 株の 18 β -GRA 代謝に何らかの影響を及ぼすと推測し、4 種類の oxygenase 阻害剤 (1-aminobenzotriazole、metyrapone、proadifen、ketoconazole) について G5 株の 18 β -GRA 代謝に及ぼす影響を検討した。それぞれの oxygenase 阻害剤とプレインキュベートした休止菌体を用いて 18 β -GRA を基質として休止菌体反応を行い、HPLC で反応生成物の違いを比較した結果、ketoconazole は、阻害剤を加えていない場合と同様のクロマトグラムであったが、阻害剤として 1-aminobenzotriazole や metyrapone を加えた場合には、阻害剤を加えていないときには見られないいくつかのピークが検出され、proadifen を加えた場合には、18 β -GRA の代謝物に由来すると考えられるピークがほとんど検出されず、基質である 18 β -GRA が反応溶液中に多量に残存していた。そこで、1-aminobenzotriazole や metyrapone を加えた場合に生成する主要代謝物 (M-D) の精製・構造決定を試みた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相分取 HPLC によって精製し、NMR スペクトル及びマススペクトルを測定した結果、M-D は 3 β -hydroxy-11-oxo-olean-12-en-23,30-dioic acid (Fig. 2) であることが明らかとなった。Oxygenase 阻害剤添加により M-D の生成が認められたことから、M-D は oxygenase によって酸素添加反応を受けて代謝されることが示唆され、例えば、M-D の 5 位に水酸基が導入

されて 4 位と 5 位の炭素－炭素結合が開裂し、 β 酸化によって側鎖が切断され M-A に至ると推測された。

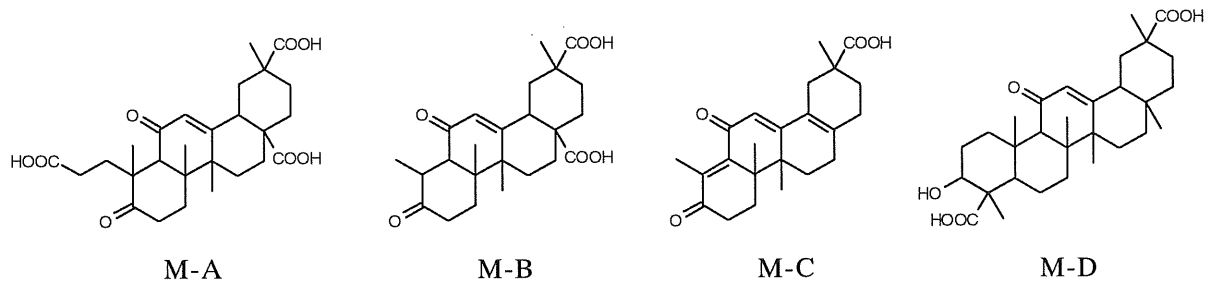


Fig. 2. Structures of metabolites from 18 β -glycyrrhetic acid in *Sphingomonas paucimobilis* strain G5.

4. 総括と展望

本研究では、18 β -GRA を唯一炭素源として生育できる細菌 *S. paucimobilis* G5 株を分離し、トランスポゾン挿入変異株のスクリーニングや oxygenase 阻害剤の影響を検討することによって本菌株による 18 β -GRA 代謝物として 4 つの化合物 (M-A、M-B、M-C、M-D) を精製・構造決定した。さらに、それら化合物の構造から G5 株の 18 β -GRA 代謝経路について推測し、代謝経路の全容の解明には至らなかったものの、環開裂経路の推定や代謝経路への oxygenase の関与を明らかにすることができた。18 β -GRA のような五環式トリテルペノイドを炭素源として生育可能な細菌はこれまで報告されておらず、今回分離した G5 株は 18 β -GRA の 28 位や 23 位のメチル基を選択的に酸化できることから、トリテルペノイドの微生物変換に利用する菌株として興味深い能力を有すると考えられる。今後、トリテルペノイドの微生物変換という観点で G5 株の有用性を見極めるためには、代謝経路の特定や反応に関与する酵素の基質特異性を詳細に検討する必要があると考えられる。