

Title	分子ネットワークを利用した多成分系における化合物間相互作用の解析
Sub Title	Analysis of compound–compound interactions in multi-component systems using molecular networking
Author	植草, 義徳(Uekusa, Yoshinori)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2022
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では，生薬が合わさった際に生じる沈殿・複合体形成の詳細および構造基盤を解明するために，ノンターゲットLC-MS/MS分析に基づいたGNPS（分子ネットワーク）解析をはじめとした分析化学的手法を用いて，多成分系における化合物間相互作用の検出と機序解析を行った．生薬オウゴンに含まれるbaicalinと生薬オウレンあるいはオウバクに含まれるberberineは水溶液中で複合体を形成し沈殿することが明らかとなっている．そこで，オウレン抽出物に含まれるberberine類縁体に着目し，baicalinとの複合体形成能を評価した．</p> <p>オウレン抽出物の水溶液に対してbaicalinを添加したところ，上清中のberberine類縁体であるpalmatineおよびepiberberineの含量は変化しなかったのに対し，coptisineの含量はbaicalinの添加量依存的に低下したことから，baicalinはcoptisineと複合体（沈殿）を形成することが明らかとなった．また，オウレン抽出物含有化合物の分子ネットワークを構築し，baicalinを添加した際にこの分子ネットワークがどのように変化するかを検証した．しかしながら，baicalinが共存することでオウレン抽出物中のどのような化合物が量的に変化するかを捉えるには至っておらず，現在これを解決するために検討を行っている．化合物レベルにおいても，palmatineとbaicalinは沈殿を形成しないことを確認したが，palmatineとberberineが共存した状態でbaicalinを添加すると，berberineとbaicalinの沈殿量が減少することを明らかにした．一方，これら三者が共存した場合においても，palmatineはbaicalinと沈殿を形成しなかった．したがって，palmatineは弱いながらもbaicalinと一時的に複合体を形成することで，berberineとbaicalinの沈殿形成を可逆的かつ競合的に阻害していることが考えられた．以上の結果より，baicalinとの沈殿形成にはberberineおよびcoptisineが有する2,3-メチレンジオキシ構造が重要であることが明らかとなった．さらに先行研究において，berberineとbaicalinの沈殿形成にはberberineのカチオンの存在による静電的相互作用の重要性が提唱されていたが，本研究の結果から，静電的相互作用は沈殿形成において十分条件ではなく必要条件であることが明らかとなった．したがって，berberine類縁体において2,3-メチレンジオキシ構造とカチオンの両要素を有していることがbaicalinとの沈殿形成に重要であるといえる．今後，coptisineを用いたNMR実験にて相互作用部位を特定することにより，この化合物間相互作用の構造基盤が解明されると期待している．以上の研究成果は，既に学術集会にて発表し，天然物や多成分系を扱う多くの研究者より反響があった．</p> <p>In this study, to elucidate the details and structural basis of precipitation and complex formation that occur when crude drugs are combined, we used analytical chemistry methods including GNPS (molecular network) analysis based on non-targeted LC-MS/MS measurements to detect and analyze the mechanism of compound–compound interactions in multi-component systems. It is known that baicalin in <i>Scutellaria</i> root and berberine in <i>Coptis</i> rhizome form a complex and precipitate in aqueous solution. We focused on berberine analogues contained in the extracts and evaluated their ability to form a complex with baicalin.</p> <p>When baicalin was added to an aqueous solution of the extract of <i>Coptis</i> rhizome, the content of the berberine analogs, palmatine and epiberberine, in the supernatant did not change, whereas the content of coptisine decreased in the baicalin concentration-dependently. Thus, it is clear that baicalin forms complex (precipitates) with coptisine. We also constructed a molecular networking of compounds containing the extract of <i>Coptis</i> rhizome and verified how this molecular networking changes when baicalin is added. However, it has not been possible to determine which compounds in the extract are quantitatively changed by the presence of baicalin, and this is currently being investigated to resolve this issue.</p> <p>We confirmed that palmatine and baicalin did not form precipitates at the compound level, but when baicalin was added in an aqueous solution in the presence of palmatine and berberine, the amounts of berberine–baicalin precipitation decreased. On the other hand, palmatine did not precipitate with baicalin when the three compounds coexisted. Therefore, it was considered that palmatine reversibly and competitively inhibits the precipitation formation of berberine and baicalin by transiently forming a complex with baicalin weakly.</p> <p>These results indicate that the 2,3-methylenedioxy structure of berberine and coptisine is important for precipitation formation with baicalin. Furthermore, although previous studies have proposed the</p>

	importance of electrostatic interaction involved in the presence of berberine cations to form the precipitation, the results of present study indicate that electrostatic interaction is not a sufficient condition for the precipitation formation, but a necessary condition. Therefore, the presence of both a 2,3-methylenedioxy structure and a cation in berberine analogs is important for precipitation formation with baicalin. We expect that the structural basis of these compound–compound interactions will be elucidated in the future by identifying the interaction site using NMR experiments. The above results have already been presented at a scientific meeting and were well received by many researchers who deal with natural products and multi-component systems.
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20210002-0030

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	助教	補助額	1,500 千円
	氏名	植草 義徳	氏名 (英語)	Yoshinori Uekusa		
研究課題 (日本語)						
分子ネットワークを利用した多成分系における化合物間相互作用の解析						
研究課題 (英訳)						
Analysis of compound-compound interactions in multi-component systems using molecular networking						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
植草 義徳 (Yoshinori Uekusa)		薬学部・助教				
1. 研究成果実績の概要						
<p>本研究では、生薬が合わさった際に生じる沈殿・複合体形成の詳細および構造基盤を解明するために、ノンターゲット LC-MS/MS 分析に基づいた GNPS(分子ネットワーク)解析をはじめとした分析化学的手法を用いて、多成分系における化合物間相互作用の検出と機序解析を行った。生薬オウゴンに含まれる baicalin と生薬オウレンあるいはオウバクに含まれる berberine は水溶液中で複合体を形成し沈殿することが明らかとなっている。そこで、オウレン抽出物に含まれる berberine 類縁体に着目し、baicalin との複合体形成能を評価した。</p> <p>オウレン抽出物の水溶液に対して baicalin を添加したところ、上清中の berberine 類縁体である palmatine および epiberberine の含量は変化しなかったのに対し、coptisine の含量は baicalin の添加量依存的に低下したことから、baicalin は coptisine と複合体(沈殿)を形成することが明らかとなった。また、オウレン抽出物含有化合物の分子ネットワークを構築し、baicalin を添加した際にこの分子ネットワークがどのように変化するかを検証した。しかしながら、baicalin が共存することでオウレン抽出物中のどのような化合物が量的に変化するかを捉えるには至っておらず、現在これを解決するために検討を行っている。化合物レベルにおいても、palmatine と baicalin は沈殿を形成しないことを確認したが、palmatine と berberine が共存した状態で baicalin を添加すると、berberine と baicalin の沈殿量が減少することを明らかにした。一方、これら三者が共存した場合においても、palmatine は baicalin と沈殿を形成しなかった。したがって、palmatine は弱いながらも baicalin と一時的に複合体を形成することで、berberine と baicalin の沈殿形成を可逆的かつ競合的に阻害していることが考えられた。以上の結果より、baicalin との沈殿形成には berberine および coptisine が有する 2,3-メチレンジオキシ構造が重要であることが明らかとなった。さらに先行研究において、berberine と baicalin の沈殿形成には berberine のカチオンの存在による静電的相互作用の重要性が提唱されていたが、本研究の結果から、静電的相互作用は沈殿形成において十分条件ではなく必要条件であることが明らかとなった。したがって、berberine 類縁体において 2,3-メチレンジオキシ構造とカチオンの両要素を有していることが baicalin との沈殿形成に重要であるといえる。今後、coptisine を用いた NMR 実験にて相互作用部位を特定することにより、この化合物間相互作用の構造基盤が解明されると期待している。以上の研究成果は、既に学術集会にて発表し、天然物や多成分系を扱う多くの研究者より反響があった。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>In this study, to elucidate the details and structural basis of precipitation and complex formation that occur when crude drugs are combined, we used analytical chemistry methods including GNPS (molecular network) analysis based on non-targeted LC-MS/MS measurements to detect and analyze the mechanism of compound-compound interactions in multi-component systems. It is known that baicalin in Scutellaria root and berberine in Coptis rhizome form a complex and precipitate in aqueous solution. We focused on berberine analogues contained in the extracts and evaluated their ability to form a complex with baicalin.</p> <p>When baicalin was added to an aqueous solution of the extract of Coptis rhizome, the content of the berberine analogs, palmatine and epiberberine, in the supernatant did not change, whereas the content of coptisine decreased in the baicalin concentration-dependently. Thus, it is clear that baicalin forms complex (precipitates) with coptisine. We also constructed a molecular networking of compounds containing the extract of Coptis rhizome and verified how this molecular networking changes when baicalin is added. However, it has not been possible to determine which compounds in the extract are quantitatively changed by the presence of baicalin, and this is currently being investigated to resolve this issue.</p> <p>We confirmed that palmatine and baicalin did not form precipitates at the compound level, but when baicalin was added in an aqueous solution in the presence of palmatine and berberine, the amounts of berberine-baicalin precipitation decreased. On the other hand, palmatine did not precipitate with baicalin when the three compounds coexisted. Therefore, it was considered that palmatine reversibly and competitively inhibits the precipitation formation of berberine and baicalin by transiently forming a complex with baicalin weakly.</p> <p>These results indicate that the 2,3-methylenedioxy structure of berberine and coptisine is important for precipitation formation with baicalin. Furthermore, although previous studies have proposed the importance of electrostatic interaction involved in the presence of berberine cations to form the precipitation, the results of present study indicate that electrostatic interaction is not a sufficient condition for the precipitation formation, but a necessary condition. Therefore, the presence of both a 2,3-methylenedioxy structure and a cation in berberine analogs is important for precipitation formation with baicalin. We expect that the structural basis of these compound-compound interactions will be elucidated in the future by identifying the interaction site using NMR experiments. The above results have already been presented at a scientific meeting and were well received by many researchers who deal with natural products and multi-component systems.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
谷岡ちはる, 植草義徳, 遠周直人, 木内文之, 菊地晴久	Baicalin と berberine 類縁体の間で生じる化合物間相互作用の解析	日本薬学会第 142 年会	2022 年 3 月			