

北海道産植物中のコリンエステラーゼ
阻害物質のスクリーニング（第2報）
樹皮中のコリンエステラーゼ阻害物質

Inhibition of Human Plasma Cholinesterase *in vitro* by Extracts
of Plants in Hokkaido (Part 2)
Inhibitor of Human Plasma Cholinesterase in Extracts of Barks

加藤 芳伸 姉帯 正樹 林 隆章
桂 英二 山岸 喬 金島 弘恭

Yoshinobu Katoh, Masaki Anetai, Takaaki Hayashi,
Eiji Katsura, Takashi Yamagishi and Hiroyasu Kaneshima

目 的

先に、我々は北海道産植物中の有用生理活性物質の探索およびそれらの有効利用に関する研究の一環として、北海道産の379種の植物のメタノール抽出物について、コリンエステラーゼ (ChE) 阻害活性の有無を調べ、その結果を報告した¹⁾。前回のスクリーニングでは、草本植物の葉や茎を主な試料として用いたが、木材工業において、副産物として産出されている樹皮については未検討であった。

今回は、道産植物の樹皮の有効利用を図ることを目的として、28種の樹皮のメタノールエキスについて、ChE 阻害活性を調べた。また、阻害活性の認められたものについても阻害物質についても検討を加えたので、その結果について報告する。

方 法

1) 試薬：コリンエステラーゼ (EC, 3.1.1.8, ヒト血清), サリチル酸エゼリンおよび牛血清アルブミンはシグマ社製、ヨウ化ブチリルチオコリンはベーリンガー社製、5-, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB), カテキンおよびメタノールは和光純薬製を用いた。

2) 試料：クリ、ハリエンジュ、クロボプラの樹皮は1984年札幌市内で採集した。その他の植物の樹皮は林野庁林業講習所、北海道立林産試験場および松前林産共同組合の協力を得て入手した。

3) 試験液の調製：樹皮は45 °Cにて温風乾燥後、7 メッシュの篩を通る大きさに粉碎した。各粉末 10 g にメタノール

50 ml を加え、室温で一夜放置後、ろ過した。ろ紙上の残渣をメタノール 50 ml で洗い、先のろ液と合わせ、減圧下で濃縮してメタノールエキスを得た。

各々のメタノールエキス約 10 mg を秤量し、これにメタノール数 ml を加え、超音波処理して溶解し、1.0 mg/ml の濃度となるようにメタノールを加えた。このメタノール溶液 1.0 ml を目盛付遠沈管にとり、メタノール 2 ml を加えた後、水で 10 ml にメスアップして試験液 (0.1 mg/ml) とした。

4) ChE 阻害活性試験：Ellman らの方法を準用して ChE 阻害活性の測定を行った²⁾。

ChE 阻害活性試験 I : 試験管に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 1.0 ml, 試験液 0.5 ml, ChE 溶液 (0.8 μg/ml) 0.5 ml を加え、37 °C で 5 分間放置後、さらに 25 mM ヨウ化ブチリルチオコリン 0.5 ml を加え、37 °C で 20 分間反応させた。この反応を 0.6 mM エゼリン 0.5 ml を加えて停止させた後、1 mM DTNB 0.5 ml を加えて発色させ、412 nm における吸光度 (As) を測定した。コントロールには試験液のかわりに 30% メタノール 0.5 ml を加えて、同様に操作した (Ac)。この吸光度 Ac と As から ChE 阻害率 [(1 - As/Ac) × 100] を求めた。

ChE 阻害活性試験 II : 試験液 0.5 ml にアルブミン溶液 (アルブミン 200 μg/0.1 M リン酸緩衝液 1.0 ml, pH 8.0) 1.0 ml を加え 25 °C で 5 分間放置後、上記と同様に操作し、ChE 阻害率を求めた。

5) カラマツ樹皮の ChE 阻害物質の精製：鮫島らの方法³⁾に従って分画を行った。

カラマツ樹皮の乾燥粉末 250 g にメタノール 1500 ml を加え、室温に一夜放置後、ろ紙でろ過した。残渣はさらにメタノールで 2 回抽出し、抽出液を合わせ、メタノールを減圧下で留去してメタノールエキス 48 g を得た。このメタノールエキスに水 500 ml および酢酸エチル 300 ml を加えて振とうした後、水層を分取し、凍結乾燥して水溶性画分 31 g を得た。この水溶性画分 1.0 g をエタノール 20 ml に溶かし、Sephadex LH-20 カラム (2.0×13 cm) に負荷した後、エタノール 340 ml で洗浄、次いでメタノール 680 ml で溶出し、縮合型タンニン画分（エタノール中で塩酸と加熱することにより anthocyanidin の赤色を呈する）525 mg を得た。

結果および考察

28種の北海道産植物の樹皮のメタノールエキスについて、ChE 阻害活性試験 I の方法にて ChE 阻害活性を調べた。その結果を表 1 に示した。この表から明らかのように ChE 活性を 10% 以上阻害した試料は 28 種中 18 種であった。特に、エゾマツ、カラマツ、ヒノキアスナロ、スギの針葉樹およびシウリザクラの樹皮のメタノールエキスの ChE 阻害活性は強く、50% 以上の阻害率を示した。

次に、これらの阻害物質について検討を加えた。駄島らは日本産針葉樹の樹皮メタノールエキスには多量のフェノ

表 1 樹皮抽出物のコリンエステラーゼ阻害率

科名	学名	和名	樹皮抽出物の ChE阻害率(%)	B S A 添加後の ChE阻害率(%)
カエデ	<i>Acer mono</i>	イタヤカエデ	43	7
ウコギ	<i>Kalopanax pictus</i>	ハリギリ	2	—
カバノキ	<i>Alnus japonica</i>	ハンノキ	19	0
カバノキ	<i>Betula ermanii</i>	ダケカンバ	3	—
カバノキ	<i>Betula maximowicziana</i>	ウダイカンバ	42	0
カバノキ	<i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	シラカンバ	42	5
カバノキ	<i>Ostrya japonica</i>	アサグ	48	0
カツラ	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	カツラ	31	12
ヒノキ	<i>Thujopsis dolabrata</i> var. <i>hondae</i>	ヒノキアスナロ	57	11
ブナ	<i>Castanea crenata</i>	クリ	40	0
ブナ	<i>Fagus crenata</i>	ブナ	16	3
ブナ	<i>Quercus serrata</i>	コナラ	6	—
クルミ	<i>Juglans ailanthifolia</i>	オニグルミ	26	8
マメ	<i>Maackia amurensis</i> var. <i>buergeri</i>	イヌエンジュ	0	—
マメ	<i>Robinia pseudo-acacia</i>	ハリエンジュ	0	—
モクレン	<i>Magnolia obovata</i>	ホオノキ	33	21
モクセイ	<i>Fraxinus mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	ヤチダモ	6	—
マツ	<i>Abies sachalinensis</i>	トドマツ	1	—
マツ	<i>Larix leptolepis</i>	カラマツ	62	3
マツ	<i>Picea abies</i>	ドイットウヒ	35	1
マツ	<i>Picea jezoensis</i>	エゾマツ	52	3
バラ	<i>Prunus ssiori</i>	シウリザクラ	54	2
ミカン	<i>Phellodendron amurense</i>	キハダ	7	—
ヤナギ	<i>Populus nigra</i>	クロボプラ	6	—
イチイ	<i>Taxus cuspidata</i>	イチイ	5	—
スギ	<i>Cryptomeria japonica</i>	スギ	55	9
シナノキ	<i>Tilia japonica</i>	シナノキ	27	4
ニレ	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	ハルニレ	31	2

ChE: コリンエステラーゼ

BSA: 牛血清アルブミン

ール化合物が含まれ、その一部はタンニンとしての性質を示すことを報告している⁴⁾。タンニン類はタンパク質と結合する性質を持つため、種々の酵素に作用して、それを失活させる⁵⁾。そこで、今回のスクリーニングで10%以上の阻害率を示した18種の樹皮のそれぞれのメタノールエキスにアルブミン溶液を添加した後、ChEの活性を測定した(ChE阻害活性試験II法)。その結果、表1に示したようにホオノキ以外の17種の樹皮エキスは阻害活性がほとんど消失した。このことから、ChE阻害物質はホオノキを除きタンニンである可能性が示唆された。

今回、最も強い阻害活性を示したカラマツのフェノール性成分については、既に鮫島らにより検討が加えられている。彼らは、酢酸エチルに抽出されるフェノール性成分が(+)-catechin、(-)-epicatechinおよびprocyanidin B-1、B-2、B-3であること、また水溶性画分には分子量約1000以上の縮合物(proanthocyanidin)が含まれることを報告している^{3,5)}。そこで、本調査ではカラマツ樹皮のメタノールエキス中に含まれるChE阻害物質について以下のように検討を加えた。

カラマツ樹皮のメタノールエキスに、酢酸エチルと水を加えて振とうしたところ、表2に示したように阻害物質のほとんどが水層に分配された。また、この水溶性画分から鮫島らの方法³⁾に従ってSephadex LH-20に吸着する縮合型タンニンを分離し、ChE阻害活性の有無を調べたところ、ChE阻害活性が認められた(表2)。この阻害活性はアルブミン添加により消失した。また、タンニンの構成単位である(+)-catechinはChE阻害活性を示さなかった。これらに加え、Haslam⁶⁾およびBate-Smith⁶⁾はcatechin、procyanidinなどの縮合物であるproanthocyanidinがタンパク質を沈殿させるなどのタンニンとしての性質を有していることを報告しており、カラマツ樹皮エキス中のChE阻害物質は分子量約1000以上のproanthocyanidinであることが示唆された^{3,6)}。

一方、ホオノキのメタノールエキスはアルブミンで前処理してもなおChE阻害活性を示すことから、タンニンと異

なるChE阻害物質が存在するものと思われる。今後は、このChE阻害物質の単離および同定を行いたい。

要 約

北海道内で採集した28種の植物の樹皮メタノールエキスについて、ChE阻害試験を行い以下の結果を得た。

1. 18種の樹皮エキスが10%以上のChE阻害率を示した。
2. エゾマツ、カラマツなど北海道で生産量の多い樹木の樹皮エキスがChE活性を強く阻害した。
3. カラマツ樹皮中のChE阻害物質は縮合型タンニン(procyanidin)で、ホオノキを除く他の植物の樹皮中のChE阻害物質もタンニンであることが示唆された。

終りに臨み、樹皮採集に御協力を頂いた北海道立林業試験場 峯村伸哉林産化学部長、竹内木材株式会社(旭川市)および松前林産共同組合の関係各位に深謝いたします。また、本研究は昭和59年度よりスタートした北海道立衛生研究所におけるプロジェクト研究「北海道産植物資源の保健衛生面への有効利用に関する調査研究」の一環として行われたことを付記し、合わせて関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 姉帯正樹他：道衛研所報、35, 45 (1985)
- 2) G. L. Ellman et al. : Biochem. Pharmacol., 7, 88 (1961)
- 3) 鮫島正浩、善本知孝：木材学会誌、25, 671 (1979)
- 4) E. Haslam : Biochem. J., 139, 285 (1974)
- 5) 鮫島正浩、善本知孝：木材学会誌、27, 491 (1981)
- 6) E. C. Bate-Smith : Phytochem., 12, 907 (1973)

表2 カラマツ樹皮抽出物の分画と
コリンエステラーゼ阻害率

分 画*	収 量(g)	ChE阻害率(%)
メタノール粗抽出物	48	68
酢酸エチル可溶物	17	19
水 可 溶 物	31	79
縮合型タンニン画分	16	88

*カラマツ樹皮250gを使用

ChE: コリンエステラーゼ