

## クマヤナギ地上部水可溶層エキスの抗腫瘍活性とペプチドの単離

佐藤 継雄

### Antitumor Activity of Water-Soluble Portion from Aerial Part of *Berchemia racemosa* SIEB. et ZUCC. and Isolation of a Peptide

Tsuguo SATO

(Received November 22, 2003)

The methanol extract from the aerial part of *Berchemia racemosa* SIEB. et ZUCC. was partitioned with EtOAc and water. The water-soluble portion shows significant antitumor activity. From this portion, a new type peptide has been isolated for the first time in the plant by preparative high-performance liquid chromatography.

**Key words** — *Berchemia racemosa*; Rhamnaceae; antitumor activity; peptide; preparative HPLC

クマヤナギ (クロウメドキ科) の根や茎は、胆石症、肝炎の漢方薬である。この植物の生理活性とその成分に関する薬理学的作用の報告がなされている。Inoshiri ら<sup>1)</sup> は茎のメタノールエキスがラットのマスト細胞からのヒスタミン阻害作用を有することを示した。佐藤ら<sup>2)</sup> は茎のメタノール、水、アセトンのエキスがマウス肝障害を防御する効果のあることを報告した。更に Ueno ら<sup>3)</sup> はこの植物の 50% エタノールとエタノールのエキスが Trp-P-1 あるいは Trp-P-2 による突然変異作用を抑制する阻害作用のあることを明らかにした。また同植物の化学成分としてフェノール化合物と 2, 6-ジメトキシキノン,<sup>1)</sup> リグナン,<sup>4,5)</sup> モノテルペン配糖体,<sup>6)</sup> フラボノイド化合物,<sup>7)</sup> カルプシン,<sup>8)</sup> フェノール配糖体<sup>9)</sup> について報告がある。今回著者は未だ検討されていないメタノールエキスの水可溶部について検討することは重要な意義があると考え、活性作用並びに成分検索を行ったのでここに報告する。

クマヤナギの地上部は福島県で採集 (標本登録: 東北大学植物園 登録番号 TUSG0021626), メタノールで抽出, メタノールエキスを酢酸エチルエステル-水 (1:1) で振盪, 分別, 減圧下蒸発乾固後, 不溶部 (A), 水可溶部 (B),

酢酸エチルエステル可溶部 (C) の各エキスを得た。これら各エキスについて抗腫瘍活性スクリーニング試験を行った。抗腫瘍活性の最も強い水可溶部 (B) エキスをカラムクロマトグラフィー及び分取 HPLC により成分の単離を行った。各エキスについての抗腫瘍活性スクリーニング試験方法並びにカラムクロマトグラフィー及び HPLC 分取方法については実験の部に詳述した。抗腫瘍活性スクリーニング結果は Table 1 に示した。陽性対照群のシクロホスファミド, 5-フルオロウラシルいずれの制癌薬も投与用量に依存して抗腫瘍活性の増大が観察された。試料はいずれも 5 ないし 20mg/kg (*i.p.*) を 1 日 1 回, 10 日間腹腔内に投与することにより Sarcoma 180 固型腫瘍細胞の増殖を投与用量に依存して有意に抑制することが観察された。

次いで, 抗腫瘍性の最も強い水可溶部 (B) の成分を検討した。その結果ペプチドの成分を単離することができ, このペプチドのアミノ酸配列解析を行った。即ち水可溶部 (B) エキス 5g を活性炭カラムクロマトグラフィーに充填し, 水で流出した。この流出液を減圧下濃縮し, ニンヒドリン反応陽性の無色シロップ状エキス (3g (60%)) を得た。この無色シロップ状エキスをアミノ酸分析計にて検討し, アスパラギン酸,

Table 1. Antitumor Activity of the Extract A (Sample A), B (Sample B), and C (Sample C) against Sarcoma 180 Solid Tumor in Mice

	Dose (mg/kg, <i>i.p.</i> )	Tumor weight (g)	Inhibition (%) <sup>a</sup>
Control		11.33±0.966	
Sample A	5	7.91±0.792	30.1
	20	6.06±0.553	46.4
Sample B	5	7.94±0.487	29.9
	20	4.45±0.594	60.7
Sample C	5	6.65±0.706	41.2
	20	6.31±0.785	44.2
Cyclophosphamide	5	6.38±0.892	43.7
	10	6.31±0.425	44.2
	20	5.45±0.615	51.8
5-Furuorouracil	10	6.86±0.662	39.4
	20	5.19±0.428	54.2

<sup>a</sup>Antitumor activity is expressed as the percent increase of drug treated mice compared to control mice. Cyclophosphamide and 5-Furuorouracil were used as positive control.

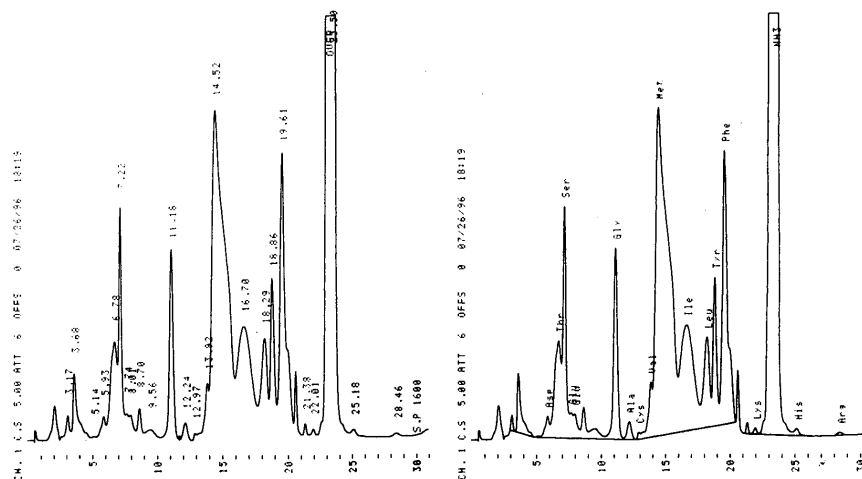


Fig. 1. Amino Acid Analysis of Water Soluble Portion (B)

Amino acid analysis was carried out using an automatic amino acid analyzer by standard method.

スレオニン, セリン, グリシン, アラニン, バリン, メチオニン, イソロイシン, ロイシン, チロシン, フェニールアラニン, リジン, ヒスチジンの遊離アミノ酸の存在を定性確認できた (Fig. 1).

更に無色シロップ状エキス (3g (60%)) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分取条件を種々変えることにより無色シロップ (P1:2.5g (50%)) を得た. この無色シロップ (P1) は HPLC で 10 成分のピークを示した (Fig. 2).

各ピークを HPLC により分取後, 各分取分画

部についてアミノ酸分析計を用いてアミノ酸の存否を検討した. その結果アミノ酸の存在が最も少なかったのはピーク 3 (0.5g (10%)) であった. ピーク 3 (0.5g (10%)) の HPLC はまだ 4 成分のピークを示した (Fig. 3).

各 4 成分を HPLC で分取後, 各分取分画部についてアミノ酸分析計よりアミノ酸の存否を検討した. 4 成分のピークのうち, 保持時間 ( $t_R$ ) 6.542-6.802 min. (ピーク 4 とする. 0.00001g (0.002%)) はアミノ酸の存在が確認されなかつ

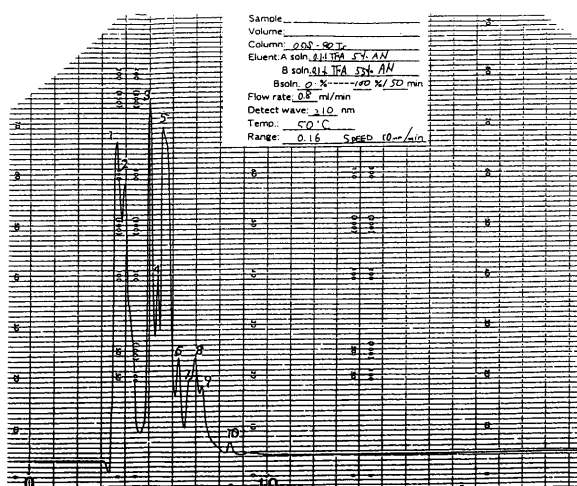


Fig. 2. HPLC Chromatogram of Colorless Fraction (P1) HPLC analysis was performed on a Waters 600E systems using a octadecyl silica (ODS) column (TOSOH Co., Ltd.), AM-313 (20 mm i.d. x 250 mm) for macro-preparative HPLC, and SH-345 (4.6 mm i.d. x 250 mm) for micro preparative HPLC.

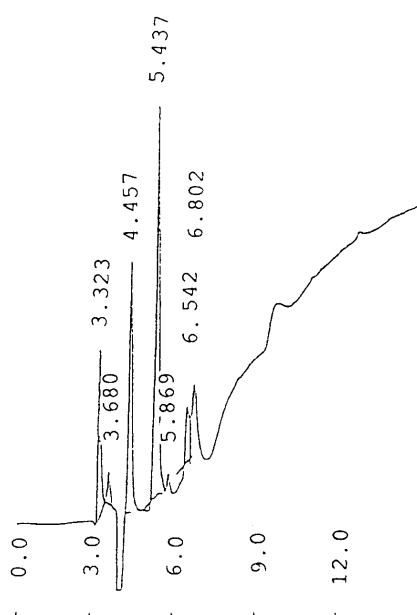
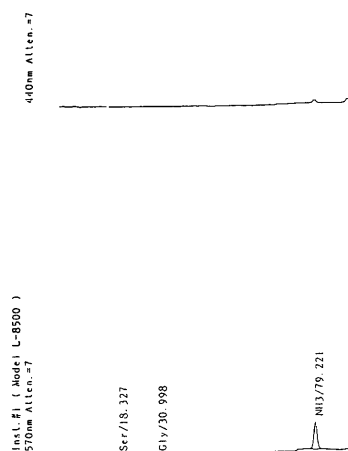
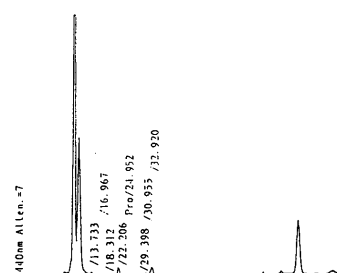


Fig. 3. HPLC Chromatogram of Peak 3 Separated from P1 by using a Micro Preparative HPLC HPLC conditions: TOSOH ODS-80Ts 4.6 mm i.d. x 300 mm column; linear gradient elution, 0.1% TFA / 5% acetonitrile-0.1% TFA / 55% acetonitrile in 50 min; 0.8 ml / min; UV detection at 210 nm.

た (Fig. 4 (4-1 (Top))). このことからピーク 4 分取分画部がペプチドであると推定されたので、このピーク 4 を 6N-HCl (100  $\mu$ l) でチオグリコール酸中窒素気流下封管後、135  $^{\circ}$ C 3 時間で加



4-1 (Top)



4-2 (Bottom)

Fig. 4 (4-1 ~ 2) Chromatogram of Amino Acid Analysis of Peak 4-1 (Top), and of Hydrolysate Peak 4-2 (Bottom) fractionated from peak 4 ( $t_R$  = 6.542-6.802 min.)

Amino acid analysis was carried out using an automatic amino acid analyzer by standard method.

水分解した。この加水分解物をアミノ酸分析計で検討した。その結果アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、バリン、メチオニン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン

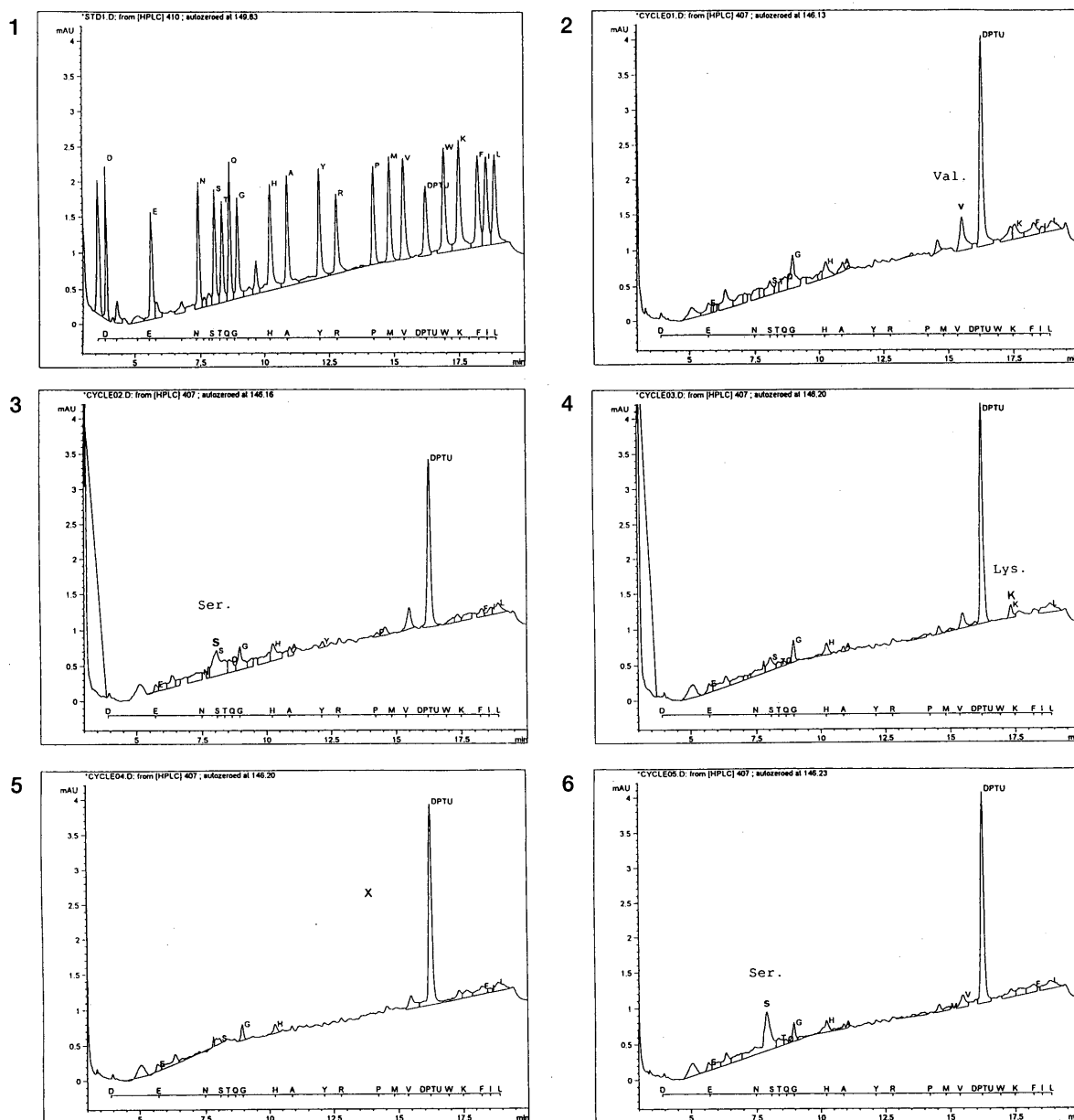


Fig. 5 (5-1 ~ 6) Amino Acid Sequence of peak 4 ( $t_R = 6.542-6.802$  min.)

Amino acid analysis was carried out using an automatic amino acid analyzer by standard method.

の遊離アミノ酸の存在が確認された (Fig. 4 (4-2 (Bottom))). この結果は、ピーク4分取分画部はペプチドであることを強く示唆するものである。

そこでピーク4分取分画部について自動気相中エドマン分解法によるアミノ酸配列解析を行った (Fig. 5 (5-1, 2, 3, 4, 6)).

アミノ酸配列解析結果から、ピーク4分取分画部は4種類のアミノ酸残基 Val-Ser-Lys-Xaa-

Ser からなるペプチドであることがわかった。未確認 Xaa 残基は糖成分、或はジスルフィド結合をしているために確認されないものと考えられる。このペプチドのホモロジー検索を行ったが、同一化合物は見出せなかった。ピーク4分取分画部は非常に微量のため、未確認 Xaa についての更なるアミノ酸残基の構造検討、並びにこのペプチドの抗腫瘍活性試験は行っていない。

## 実験の部

### 抽出分離

クマヤナギの地上部は2001年5月福島県大波字清水で採集（標本登録：東北大学植物園登録番号TUSG0021626）、5kgを細切、メタノール（5l、室温）で抽出、メタノール抽出液を減圧下、濃縮して得たエキス（50g）を酢酸エチルエステル水（1：1）で振盪し、不溶部（A）、水可溶部（B）、酢酸エチルエステル可溶部（C）に分別後、減圧下蒸発乾固した。不溶部（A）1.2g（2.4%, w/w）、水可溶部（B）5g（10%, w/w）及び酢酸エチルエステル可溶部（C）4.5g（9%, w/w）を得た。

### 抗腫瘍活性試験<sup>10)</sup> 方法

本スクリーニングはマウスのEhrlich carcinoma（固型）を用いる方法<sup>10)</sup>を採用した。試料は生理食塩水に可溶の物（A, C）は生理食塩水に、不溶の物については蒸発乾固後にTween80で可溶化（A, B: 7% Tween80, D: 20% Tween80）して投与した。予試験として試料AとBをマウス腹腔内に1回投与して、急性毒性と体重への影響を観察した。いずれの試料も100 mg/kg（i.p.）投与により影響（死亡の有無、体重の減少、外見上の変化）は何ら認められなかった。マウスの左足大腿部皮下に、常法に従いddy系マウスに継代維持した腹水型のSarcoma180腫瘍細胞 $3 \times 10^6$ 個を接種して24時間後からシクロフォスファミドあるいは5-フルオロウラシルを1日1回、10日間腹腔内に投与して、14日後に腫瘍を摘出して腫瘍重量を測定し、薬物未処置の対照群との比較から抑制率を算出した。

### HPLC分取, アミノ酸組成分析, およびアミノ酸配列方法

水可部エキス（B）5g（10%, w/w）を活性炭・セライトカラム処理した試料3gを水210mlに溶解し、下記のHPLC分取条件で（2段の逆相クロマトグラフィーで）各成分を分画した。即ち試料30mlを7回大量分取クロマトグラフに注入し、Fig. 1に示す3つの分画（F1-3）を得た。それぞれのピークを凍結乾燥して1.8ml

の純水に溶解した。これを再度、200  $\mu$ l づつ9回小量分取クロマトグラフに注入し、精製を行い、分画F1-3からF3-10を得た（Fig. 2）。

各成分を分画後、分画成分の加水分解前後について下記の方法によりアミノ酸組成分析、およびアミノ酸配列を行った。

### HPLC分取

装置：Waters 6000E System Controller 型

Waters 486 Tunable Absorbance Detector 型

#### (1)大量分取クロマトグラフィー条件

カラム：東ソー ODS-Pre ( $\phi$  2cmx25cm)

溶離液：① 0.1%TFA/5% アセトニトリル

② 0.1%TFA/55% アセトニトリル

グラジエント：① $\rightarrow$ ② / 50min.

流速：10ml/min.

検出波長：210nm

感度：0.1AUFS

#### (2)小量分取クロマトグラフィー条件

カラム：東ソー ODS-80Ts ( $\phi$  4.6mmx30cm)

溶離液：① 0.1%TFA/5% アセトニトリル

② 0.1%TFA/55% アセトニトリル

グラジエント：① $\rightarrow$ ② / 50min.

流速：0.8ml/min.

温度：50°

検出波長：210nm

感度：0.16AUFS

### アミノ酸分析

装置：日立アミノ酸分析計 L-8500 型

塩酸加水分解処理：チオグリコール酸入り 6N HCl 100  $\mu$ l, 減圧シール下, 135 °C, 3時間で分解した。次に減圧乾固後、純水 100  $\mu$ l を加えて溶解した。試料溶液 50  $\mu$ l を装置に注入, 分析した。

### アミノ酸配列解析

装置：ヒューレットパッカード社 G1000A 型のプロテインシーケンサー自動気相中エドマン分解法にて解析。

**謝辞** 抗腫瘍活性試験を行っていただいた本学第二癌研究所教授：石川正明博士、並びに微量アミノ酸分析、アミノ酸配列解析を行って

ただいた東レリサーチセンター鎌倉研究所：笹川立博士に深謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Inoshiri, S., Sasaki, M., Hirai, Y., Khoda, H., Otsuka, H., K Yamasaki, K., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1333-1336 (1986).
- 2) Sato, N., Ohta, S., Sakurai, N., Kamogawa, A., Inoue, T., M. Shinoda, M., *Yakugaku Zasshi*, **115**, 295-306 (1995).
- 3) Ueno, S., Aoki, K., Ishizaki, M., *Journal of Health Science*, **46**, 29-34 (2000).
- 4) Inoshiri, S., Sasaki, M., Khoda, H., Otsuka, H., K Yamasaki, K., *Phytochemistry*, **26**, 2811-2814 (1987).
- 5) Sakurai, N., Nagashima, S., Kawai, K., T.Inoue, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3311-3315 (1989).
- 6) Inoshiri, S., Sasaki, M., Khoda, H., Otsuka, H., Yamasaki, K., *Phytochemistry*, **27**, 2869-2871 (1988).
- 7) Kikuchi, M.; Sato, K., Shiraishi, Y., Nakayama, R., Watanabe, R., Sugiyama, M., *Yakugaku Zasshi*, **110**, 354-357 (1990).
- 8) Inoue, T., Nagashima, S., Ohata, S., Shinoda, M., Sakurai, N., *Planta Medica*, **56**, 120-121 (1990).
- 9) Sakurai, N., Kobayashi, M., Shigihara, A., Inoue, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 851-853 (1992).
- 10) Ishikawa, M., Aoki T., Yomogida S., Takayanagi Y., Sasaki, K., *Pharmacol. Toxicol.*, **74**, 255-261 (1994).