

北海道の植物から薬のもとを見つけよう

北海道札幌北高等学校
藤居 瑠彌、成田清香、北守美香
Hokkaido Sapporokita high school
Ryuuya Fujii, Sayaka Narita, Mika Kitamori

Summary

This study was aimed at isolation of amylase inhibitors from *Botrychium multifidum* Rupr. var. *robustum* C. Chr. (Ezofuyunohanawarabi) and their structure determination. An inhibitory assay showed extracts from its ground part inhibited α -amylase, so they were partitioned and subjected to chromatography. As a result, we isolated two flavonoid glycosides with strong α -amylase inhibitory activity.

1 はじめに

このプロジェクトは北海道に自生する植物であるエゾフユノハナワラビにスポットを当て、食物として摂取したデンプンをオリゴ糖に分解する酵素であるアミラーゼを阻害する働きを持つ物質を単離し、その構造を決定することを目的としてスタートした。応用としては糖尿病の治療薬が考えられるが、その他にもダイエットの効果なども期待できる。下の図1はアミラーゼ阻害剤の効果を示すものである。

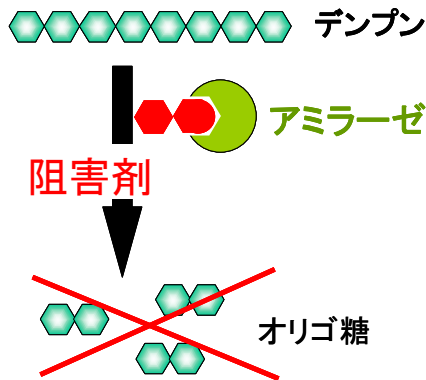


図1 アミラーゼ阻害剤

2 研究内容

2.1 試料採集から抽出

北海道大学原生林より、研究の試料とする、ハナヤスリ科エゾフユノハナワラビの採集を行った。実験室に持ち帰り、エゾフユノハナワラビを地上部と根の部位に分け、50℃のオーブンで乾燥後、地上部と根の部位からそれぞれメタノールで抽出を行った。三日後、得られた抽出液を減圧濃縮して、地上部と根の抽出物を得た。地上部と根の抽出物をそれぞれ用いて α -アミラーゼ阻害活性試験を行った。その結果を図2に示す。

その結果図2のグラフより地上部の抽出物にアミラーゼ阻害活性があることがわかった。これ以降、地上部に絞ってさらに詳しく調べていった。

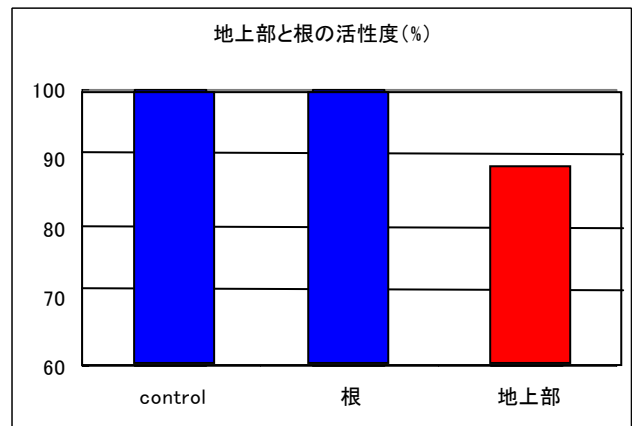


図2 地上部と根のアミラーゼ阻害活性

2.2 分離・精製

地上部抽出物(12g)から、阻害物質の単離・同定を行うため成分の分離を行った。まず、分液漏斗を用いて、図3のようにジエチルエーテル-酢酸エチル-n-ブタノール-水の各層に分配した。

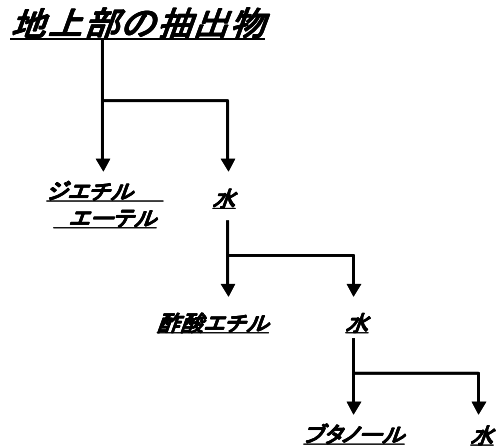


図3 抽出物の分配

各層に分配された物質の質量はジエチルエーテル層が2100mg、酢酸エチル層が50mg、n-ブタノール層が850mg、水層が最も多く8000mgであった。その後、各層のアミラーゼ阻害活性試験を行った。

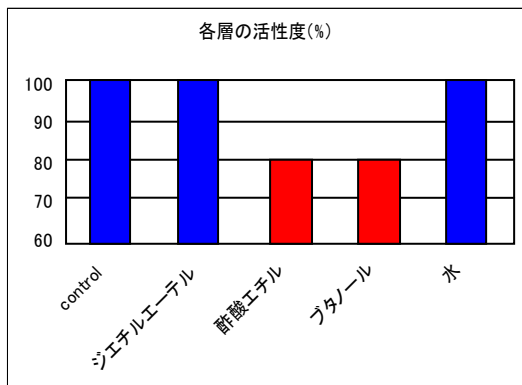


図4各層のアミラーゼ阻害活性

図4より酢酸エチルとn-ブタノールの層にアミラーゼ阻害活性が認められたが、酢酸エチルの層は50mgと量が少なかったためさらなる分析が困難であると考え、n-ブタノール層のみをさらに調べることにした。

まず、ブタノール層を減圧濃縮し得られた抽出物を少量のメタノールに溶かし、フラッシュクロマトグラフィーで分離した(図5)。なお、分離後の液体は100mlごとに15本の試験管に集めた。1本目から6本目までをフラクション1、7本目から9本目までをフラクション2、それ以降をフラクション3とした。それぞれのフラクションごとに減圧濃縮を行い、活性試験を行った。その結果、フラクション2のアミラーゼ阻害活性が高かったため、フラクション2を、さらに細かく分離が可能な高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離した。

ブタノール層

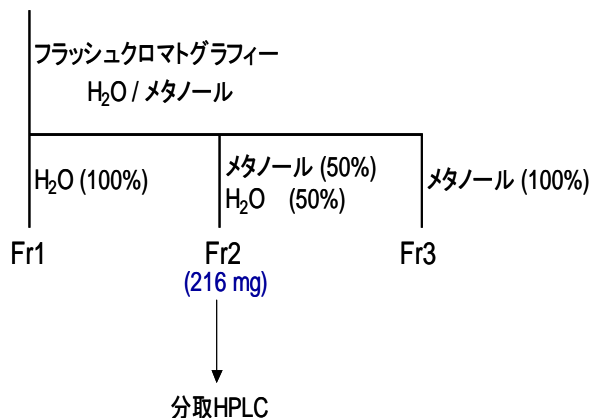


図5 フラッシュクロマトグラフィーによる分離

HPLCでは溶媒に水とアセトニトリルの混合溶媒を用いて、ピークの検出は254nmのUVの吸収により行った。その際得られたピークを図6に示す。

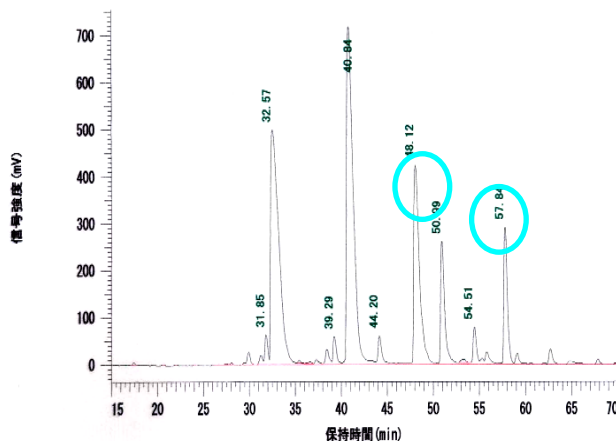


図6 HPLC チャート

図6で得られたピークを分取し、それぞれの化合物についてアミラーゼ阻害活性を調べた結果、印をつけた二つのピークに強い活性が見られた(図7)。

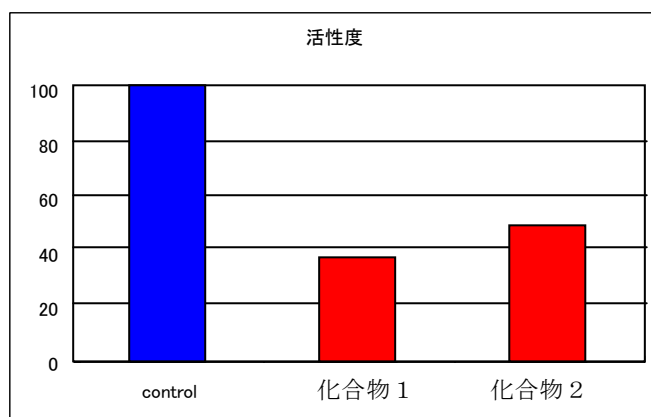


図7 化合物1及び2のアミラーゼ阻害活性試験結果

2.3 構造決定

HPLCで分離し、強いアミラーゼ阻害活性が見られた化合物1、2の構造を調べるため核磁気共鳴分光法(NMR)、質量分析器(MS)による測定を行った。NMRは¹H、¹³C、COSY、HMQC、HMBCの五種類の測定を行った。化合物2の¹HのNMRスペクトルを図8に示す。

図8のNMRチャートとその他に測定した¹³C、COSY、HMQC、HMBCの結果を合わせて化合物2の構造解析を行った。

まず、図8に示す¹HのNMRチャートを見ると、6~8ppm付近の低磁場にピークを持っていることからベンゼン環のような芳香族性の部分を母核に持っていることと推定した。さらに、COSYと合わせてグルコース等の糖が三つ母核に結合している配糖体であると考え、HMBCスペクトルから糖のグリコシド結合にまたがるピークを確認した。母核部分の構造は文献値と比較することによりフラボノイドの一種であるケンフェロールであると決定した。その結果、化合物2の構造はこれまでに報告例のない新規化合物であることがわかった。同様に化合物1についても解析を行い、化合物2とほぼ同じ構造を持つ類縁体であることがわかった。

溶媒: CD₃OD

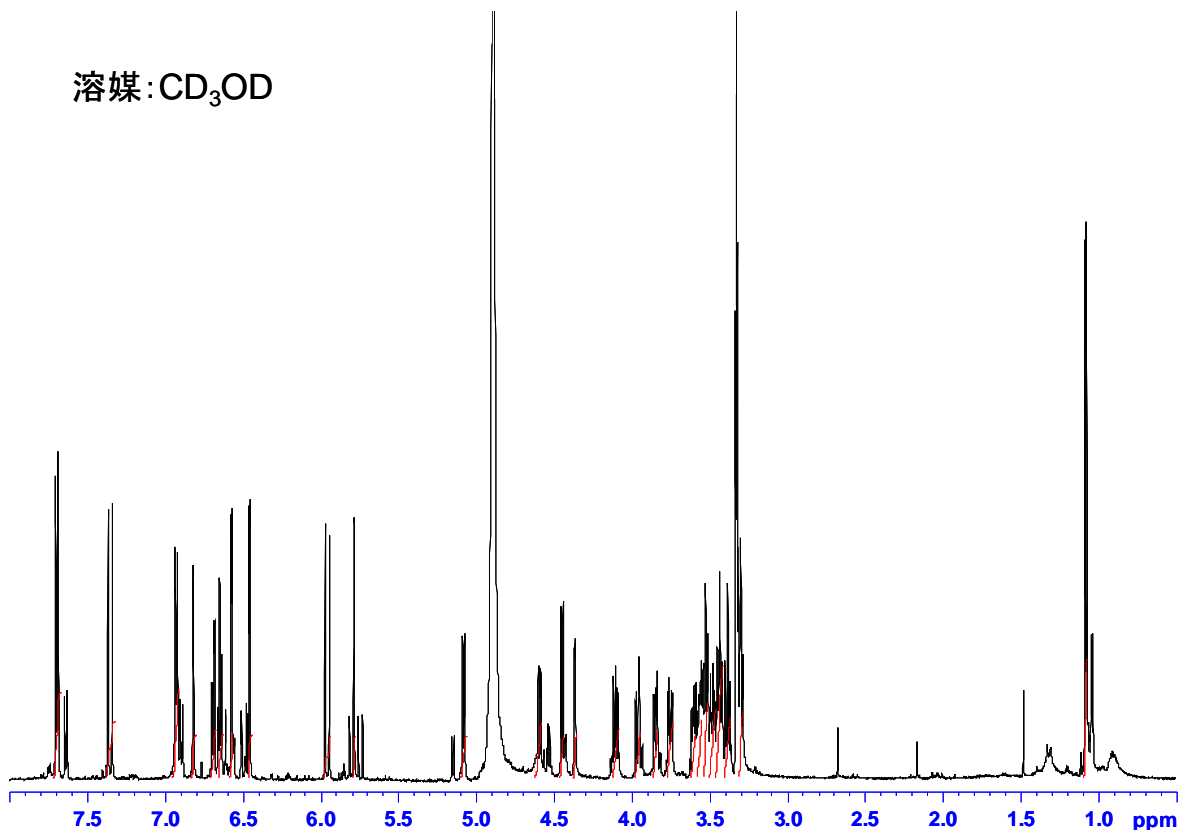
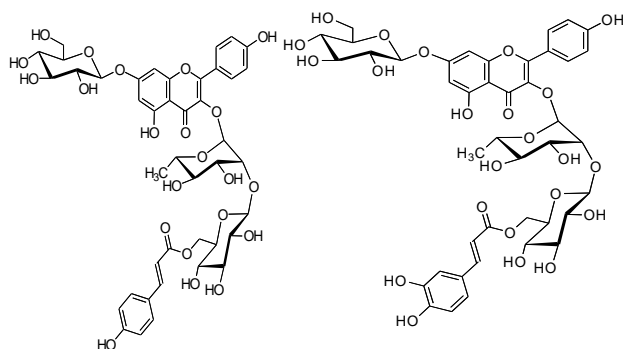


図 8 化合物 2 の ¹H NMR スペクトル

化合物 1 については 2001 年に S. K. El-Desoky らにより別の植物に含まれている成分として報告されている既知化合物であった。しかし、アミラーゼ阻害活性については今回の報告が初めての例である。

この化合物 1, 2 の構造を下の図 9 に示す。



化合物 1

化合物 2

図 9 化合物 1, 2 の構造

2.4 コンピュータシミュレーションによる検証

アミラーゼ阻害物質として同定した化合物 1, 2 について、実際にアミラーゼの活性部位に結合しているかどうかをコンピュータを用いたタンパク質と阻害物質のドッキングシミュレーションからも検証した。

今回活性測定に用いた豚すい臓由来のアミラーゼの三次元構造は X 線結晶構造解析から明らかになっているので、その構造データをもとにアミラーゼの活性部位と阻害活性の強かった化合物 1 がどのように結合するか、ドッキング計算を行った。上の図 10 の結果を見ると、アミラーゼの活性部位に化合物 1 がうまく入るような結果が得られた。この結果からアミラーゼに化合物 1 が結合することで、本来結合するはずの基質であるデンプンをブロックするため糖の分解が抑制されていると予想される。化合物 2 については計算を行わなかったが、化合物 1 に構造がよく似た類縁体であることから同様に活性を示すと推測できる。

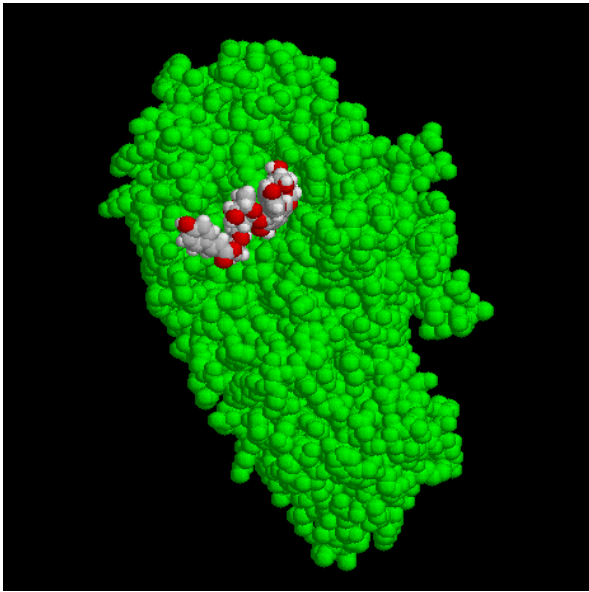


図 10 アミラーゼと化合物 1 の結合の様子

3. まとめ

今回の実験でハナヤスリ科のエゾフユノハナワラビの地上部から抽出した成分に強いアミラーゼ阻害活性があることを見出した。その後、抽出液から阻害物質を同定するため分液ろうとによる分配と各種クロマトグラフィーにより分離・精製を行った。

その結果、新規化合物一つを含む二種のフラボノイド配糖体を阻害物質として同定した。構造決定は NMR と質量分析器を用いて行った。

最も強い阻害活性を示した化合物 1 についてはコンピュータによるドッキングシミュレーションを行った結果、アミラーゼの活性部位にうまく結合し、基質の結合を抑制していると予測でき、酵素を用いた活性測定の結果を支持するものであった。

4. 参考文献

S. K. El-Desoky et al. *Fitoterapia* 72 (2001) 523-537

5. 謝辞

本研究の遂行にあたって終始ご指導を賜りました北海道大学大学院理学研究科生体高分子設計学講座 門出健二助教授、及び大学院生の内田さん、谷口さんに心から感謝申し上げます。