

# 酵母グルコサミン-6-リン酸合成酵素（GFAT）に対する阻害効果を指標とした各種植物からのエタノール抽出液のスクリーニング： ヤマウルシの樹皮における選択的阻害作用

荒 館 忠・尾 崎 宏 基

## 要 約

高血糖状態により惹起されるヘキソサミン合成経路の異常な活性化は、糖尿病合併症の発症と密接な関連があると考えられている。本研究では、糖尿病合併症の予防・治療薬の開発を目指して、この経路の律速酵素であるグルコサミン-6-リン酸合成酵素（L-グルタミン：D-フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ：GFAT）に対する様々な植物のエタノール抽出液の阻害効果を検討した。

104科352種の植物の器官（樹皮、葉、根、花、果実など）から調製した702種類の抽出液において、酵母 GFAT に対する平均阻害率は、樹皮や果実で統計学的に高く、葉、根、花では低かった。また、阻害効果の高かったヤマウルシ（*Rhus trichocarpa* Miq.）の新鮮樹皮をエタノール抽出後、各種クロマトグラフィーで処理して得られた分画は、酵母 GFAT（真核生物型 GFAT）に対して顕著な阻害を示したが、大腸菌 GFAT（原核細胞型 GFAT）の活性はほとんど阻害しなかった。

以上の結果は、1）酵母 GFAT に対する阻害効果は、植物の種類や器官に応じてかなり異なっているが、全体としては樹皮や果実で高いこと、また、2）少なくともヤマウルシの樹皮には、真核生物型 GFAT に対して選択的に作用する阻害物質が含まれていることを示している。

## 緒 言

食生活の欧米化や慢性的な運動不足など、近年のライフスタイルの変化のために、糖尿病患者は増加し続けており、平成14年の調査<sup>(1)</sup>によれば、潜在的な糖尿病患者は約740万人に達するものと推定されている。糖尿病自体は、食事療法や運動療法、インスリン注射などにより血糖値を

コントロールすることで制御可能であるが、糖尿病合併症は腎臓や神経系などに重篤な障害を引き起こし<sup>(2)</sup>、糖尿病患者にとって生死に係わる重大な問題となっている。

糖尿病合併症で見られる様々な代謝異常や組織傷害は、細胞あるいは個体を高濃度のグルコースに暴露することで実験的に再現することができ<sup>(3~6)</sup>、本合併症は、慢性的な高血糖状態が継続することによって発症するものと推定されている。また、実験的に再現した糖尿病合併症（糖利用障害、インスリン抵抗性など）は、ヘキソサミン合成経路（図1）の最初の酵素であるグルコサミン-6-リン酸合成酵素（L-グルタミン：D-フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ：GFAT）の阻害剤（アザセリンあるいは6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン：DON）を投与することにより著明に改善することが示されており<sup>(7,8)</sup>、慢性的な高血糖状態がヘキソサミン合成経路を異常に活性化し、その結果として、細胞の機能障害、ひいては糖尿病合併症を発症させるとの仮説を立てることができる。

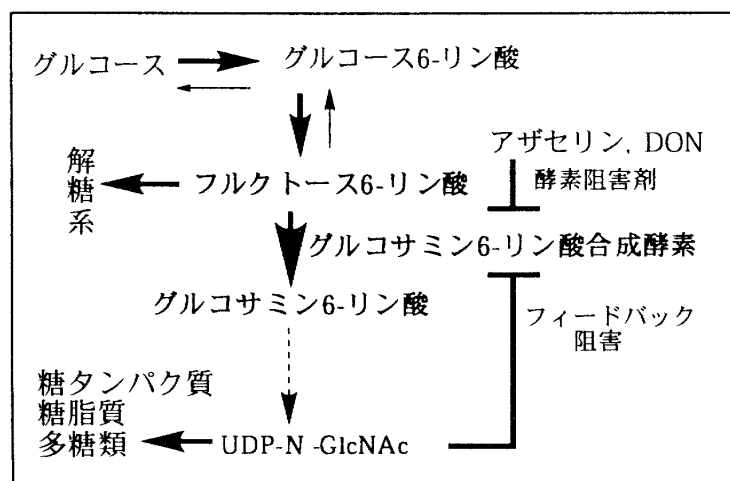


図1：ヘキソサミン合成経路

グルコサミン-6-リン酸合成酵素は最初の反応を触媒し、最終的にウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン（UDP-GlcNAc）が合成される。UDP-GlcNAcは、真核生物型のGFATのフィードバック阻害剤として代謝調節を行う。ヘキソサミン代謝産物は、糖タンパク質や糖脂質（動物細胞）あるいは細胞壁を構成するキチンやペプチドグリカン（微生物）の合成に利用される。

こうした一連の事実は、GFAT活性の抑制が糖尿病合併症の予防に有効であることを示唆しているが、この酵素の阻害剤として既に知られているアザセリンや6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン（DON）は、GFATだけでなく他のアミドトランスフェラーゼに対しても広範囲に作用するため<sup>(9)</sup>、予防薬として不適切であることが分かっている。しかし、様々な有機化合物を対象に酵素阻害物質をスクリーニングすることで、本合併症を克服しようとする試みは、アルドースレダクターゼ<sup>(10)</sup>、 $\alpha$ -グルコシダーゼ<sup>(11)</sup>、プロテインキナーゼC<sup>(12)</sup>などをターゲットに行われており、アルドースレダクターゼや $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害剤は、それぞれ糖尿病性神経障害の治療薬あるいは食後高血糖改善薬として臨床応用されている。

このような背景の下、糖尿病合併症に対する新たな予防・治療薬の開発を目指して、種々の植物抽出液を対象として酵母 GFAT 阻害物質のスクリーニングを行った結果、いくつかの知見を得たので報告する。

## 材料と方法

### GFAT 酵素液の調整

マウス肝臓、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) を細胞粉碎処理して得られた上清中の GFAT 活性を調べたところ、マウスの場合、その GFAT 活性は極めて不安定であるが、酵母や大腸菌の場合は、比較的安定していることが分かった。そこで、本実験では、以下の手順に従って、哺乳類と相同の真核生物型 GFAT を持つ酵母と原核生物型 GFAT を持つ大腸菌から GFAT 酵素液を調整し、実験に使用した。

酵母と大腸菌をそれぞれポテトデキストロース培地 (ジャガイモ煮汁20%, D-グルコース2.0%) あるいは LB 培地 (ペプトン1.0%, 酵母エキス0.5%, NaCl 1.0%) で1日往復振盪培養 (酵母: 30°C, 大腸菌: 37°C, 100rpm) した後、遠心分離 (15,000rpm, 1min, 4°C) により細胞を沈殿させた。沈殿した細胞を氷冷した60mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1mM EDTA) で2回洗浄し、同緩衝液に懸濁 (全容量を15ml) した後、氷冷下で超音波発生装置 (ASTRASON, HEAT SYATEMS, 1/2" チップ) により細胞の破碎処理を行い (酵母: 出力18%, pulsing 30sec. を1min 間隔で12回, 大腸菌: 出力10%, pulsing 30sec. を1回), その破碎液を遠心分離 (15,000rpm, 15min, 4°C) して上清を回収した。

回収した酵母と大腸菌の上清中の GFAT 活性を下記に示す方法で測定し、1mM UDP-GlcNAc (真核生物型 GFAT のフィードバック阻害剤) による酵母 GFAT の阻害率が70%となるように酵素液の濃度を調整し、酵母あるいは大腸菌の GFAT 酵素液とした。

### 酵素液中の GFAT 活性の評価

酵母あるいは大腸菌の酵素液に含まれる GFAT 活性は、Watzele らの方法<sup>(13)</sup> を改変して測定した。すなわち、GFAT の基質である L-グルタミン (5mM), D-フルクトース-6-リン酸二ナトリウム (7mM) を含む60mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1mM EDTA) に、酵素液 (100  $\mu$ l) を添加し (全容量250  $\mu$ l), 37°C で40分間インキュベートした。沸騰水中で2分間加熱処理して酵素反応を停止した後、この反応液を遠心分離 (15,000rpm, 1min, 4°C) して上清を採取した。上清100  $\mu$ l 中の D-グルコサミン-6-リン酸の量は、Ghosh らのモルガン-エルソン反応<sup>(14)</sup> により吸光度 (585nm) を測定して行い、その値に基づいて酵母あるいは大腸菌の酵素液中の GFAT 活性を算出した。

### 植物抽出液の調製

県内外各所にて採集した生の植物は、器官 (樹皮, 葉, 根, 花, 果実など) ごとに分離した後、

それぞれ湿重量の2倍容の100%エタノールを添加して室温で一週間浸出し、その上清を抽出液として使用した。

また、市販されている乾燥植物の場合には、試料1gに対して5mlの70%エタノールを加え室温で一週間抽出して得られた上清を抽出液とした。

#### クロマトグラフィーによる抽出液の分画

ヤマウルシ (*Rhus trichocarpa* Miq., ウルシ科) の枝から得た新鮮樹皮143gを100%エタノール(700ml×3)で48時間抽出し、減圧下でエタノールを除去した後、その濃縮液をクロロホルム、酢酸エチルで順次処理し、褐色の抽出物5.1gを分離した。

この酢酸エチル抽出物をシリカゲルN60(関東化学)のフラッシュカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール:水:酢酸=11:9:2:2)とODSカラム(Mightysil C18, 4.6×250mm, 関東化学)を用いた高速液体クロマトグラフィー(18%アセトニトリル)を行い、さらにセファデックスLH20を用いたカラムクロマトグラフィー(カラム:10×490mm, 溶媒:メタノール)を実施して、分画1(16.7mg)及び2(21.3mg)を得た。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left\{ 1 - \left( \frac{SA - SB}{CA - CB} \right) \right\} \times 100$$

図2: 阻害率(%)の算出方法

- CA: 植物抽出液(あるいは分画)無添加で、酵素反応を40分間行った場合の吸光度
- CB: 植物抽出液(あるいは分画)無添加で、酵素反応を0分間行った場合の吸光度(ブランク)
- SA: 植物抽出液(あるいは分画)を添加した後、酵素反応を40分間行った場合の吸光度
- SB: 植物抽出液(あるいは分画)を添加した後、酵素反応を0分間行った場合の吸光度(ブランク)

#### 植物抽出液によるGFAT活性の阻害効果の評価

上記の酵素反応系に植物抽出液5μl(あるいは分画5μl)を添加し、添加しない場合(対照)との吸光度(585nm)の差により、植物抽出液(あるいは分画)によるGFAT活性の阻害効果(阻害率%)を評価した(図2)。

また、真核生物型GFATのフィードバック阻害剤であるUDP-GlcNAc<sup>(15)</sup>及びGFATを含むアミドトランスフェラーゼ全般に対する阻害剤である6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン(DON)<sup>(9)</sup>についても同様の評価を行い、ヤマウルシのクロマトグラフィー分画による阻害効果(阻害率%)と比較・検討した。

## 実験結果

### 植物のエタノール抽出液による酵母 GFAT への阻害効果

表1は、今回スクリーニングしたすべての植物（科・種）を列挙し、器官（樹皮＝樹皮，枝；葉＝茎葉，地上部，全草；根＝根，根茎などの地下部；花＝花卉，ガクなど；果実＝果皮，種子など）別に酵母酵素液中の GFAT 活性に対する阻害率（%）を示したものである。また，図3は，器官別に阻害率の分布と平均値を表したものである。

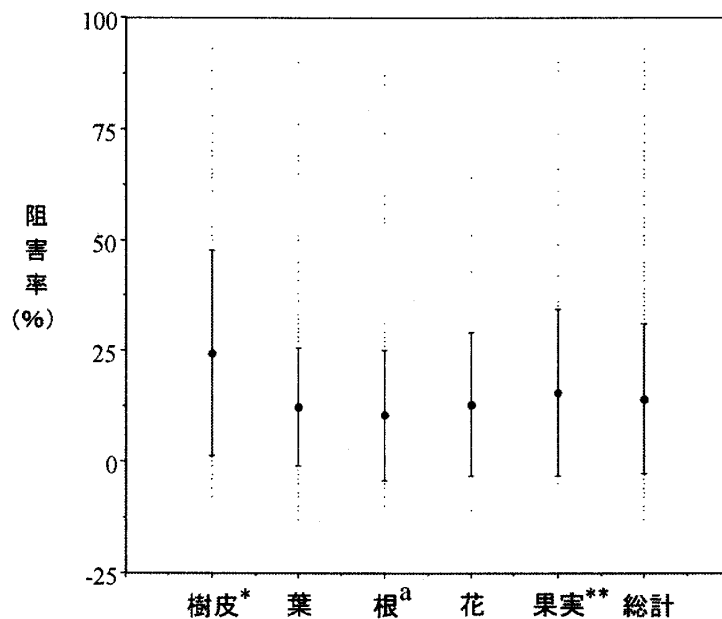


図3：器官別の阻害率の分布とその平均値（±SD）

\* $P < 0.01$  (vs all other groups), \*\* $P < 0.05$  (vs a)

104科352種の植物から得られた702種類の抽出液全体の平均阻害率は $14.2 \pm 17.0\%$ （平均値±SD）で，器官別では，樹皮が最も高く（ $24.4 \pm 23.2\%$ ），果実（ $15.5 \pm 18.8\%$ ），花（ $12.9 \pm 16.1\%$ ），葉（ $12.3 \pm 13.2\%$ ），根（ $10.5 \pm 14.7\%$ ）の順に低くなっていた（図3）。これらのデータについて Student's t-検定を行ったところ，樹皮は，葉，根，花，果実の全てと比較して平均阻害率が有意に高く（ $P < 0.01$ ），果実の阻害率は，根に対してのみ有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。

表1：植物抽出液による酵母 GFAT への阻害効果

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%
(種子植物)						地下茎	5
アカザ科				イチョウ科			
オカヒジキ		茎葉	5	イチョウ		樹皮	4
		根	6			種子	7
アカネ科				イネ科			
アカネ		葉	12	オヒシバ		茎葉	20
		根	12			根	11
カワラマツバ		茎葉	5	クマザサ		葉	10
		根茎	4	ケカモノハシ		茎葉	-4
ツルアリドウシ		全草	-2			根	-6
ヘクソカズラ		茎葉	-2	チガヤ		葉	12
ヤエムグラ		茎葉	-5			地下茎	-2
アカバナ科				チヂミザサ		全草	4
コマツヨイグサ		茎葉	19	ハトムギ		種子*	8
		根	4	モウソウチク		筍	7
チョウジタデ		茎葉	27			かん鞘	12
		根	7	イラクサ科			
ヒシ		根茎	2	ヤブマオ		茎葉	10
		果実	34			根	27
メマツヨイグサ		茎葉	29	ウコギ科			
		根	11	ウド		茎葉	12
アケビ科						根	8
アケビ		樹皮	5	カクレミノ		果実	14
アブラナ科				コシアブラ		樹皮	2
タネツケバナ		全草	-13			葉	7
ハマダイコン		葉	-1	セイヨウキツタ		枝	7
		根	6			葉	8
マメグンバイナズナ		葉	4			根	6
		根	3	タラノキ		樹皮	4
ムラサキキャベツ		葉*	9			葉	19
ワサビ		葉*	8			根皮	16
アヤメ科				ヤツデ		茎葉	-7
キショウブ		葉	14			根	-1
		根茎	19	ヤマウコギ		樹皮	15
ジャガ		葉	7			葉	7
		根茎	8			花	11
ニワゼキショウ		全草	29	ウマノスズクサ科			
ヒメヒオウギズイセン		葉	14	ゼニバサイシン		葉	11
		塊茎	11			地下茎	14
イイギリ科				ウリ科			
イイギリ		樹皮	10	アマチャズル		茎葉	13
		果実	18			根茎	11
イグサ科				カラスウリ		茎葉	3
イ		茎葉	9			塊根	-2

酵母グルコサミン-6-リン酸合成酵素 (GFAT) に対する阻害効果を指標とした各種植物からの  
エタノール抽出液のスクリーニング：ヤマウルシの樹皮における選択的阻害作用

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%
ウルシ科		果皮	4	カタバミ科	フシネハナカタバミ	種子	-11
		種子	-3			塊根	-6
	ヌルデ	樹皮	69	カバノキ科	オオバヤシヤブシ	葉	11
		葉	9			樹皮	32
		果実	7			樹皮	1
	ハゼノキ	樹皮	37	ダケカンバ	樹皮	0	
		葉	45	ハンノキ	樹皮	0	
		未成熟果	49	カヤツリグサ科	アゼナルコ	葉	18
	ヤマウルシ	樹皮	65			根茎	19
		葉	11			根	20
ヤマハゼ	樹皮	78	カヤツリグサ	茎葉	18		
	葉	20		根	12		
	花	27		茎葉	8		
	エゴノキ科	エゴノキ		樹皮	30	根	6
葉			30	葉	7		
がく筒			18	地下茎	87		
果皮			16	果実	16		
オオバコ科	オオバコ	種子	11	サンカクイ	茎葉	11	
		全草	16	根茎	13		
	ヘラオオバコ	種子	5	タマカヤツリ	茎葉	9	
		葉	0	根	6		
		根	-5	ヒデリコ	茎葉	13	
オトギリソウ科	オトギリソウ	全草	11	根	10		
		全草	25	キキョウ科	キキョウ	葉*	0
		オミナエシ科	オトコエシ			茎葉	0
根	-1					ツルニンジン	茎葉
カノコソウ	カノコソウ	茎葉	10	根	12		
		根	18	ホタルブクロ	茎葉	10	
		根	18	根	7		
オモダカ科	クワイ	塊茎*	10	キク科	アキノキリンソウ	茎葉	9
		芽*	10			根	7
		芽*	10			アキノノゲシ	茎葉
カエデ科	ウリハダカエデ	樹皮	72	根	1		
		葉	15	アメリカセンダングサ	茎葉	50	
	トウカエデ	樹皮	7	根	6		
		葉	24	イヌキクイモ	茎葉	8	
カキノキ科	カキ	樹皮	9	根	20		
		種子	17	イワニガナ	全草	6	
		種子	17	オオアレチノギク	葉	-5	
				地下茎	-10		

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%
	オオオナモミ	茎葉	9			根	2
		根	1		ホソバノヤマハハコ	茎葉	12
		果実	9		マルバクワモドキ	茎葉	7
	オニタビラコ	茎葉	7			根	2
		根	11			果実	-3
	オニノゲシ	根	11		ヤクシソウ	茎葉	12
	オヤマボクチ	茎葉	1			根	9
		根	7		ユウガギク	茎葉	-3
	カワラハハコ	茎葉	7			根	-2
		根茎	5		ヨメナ	全草	17
	カワラヨモギ	茎葉	10		ヨモギ	茎葉	11
		根	7			根	4
	ガンクビソウ	茎葉	17		キツネノマゴ科		
		根	1		キツネノマゴ	茎葉	9
	ククイモ	根茎	0			根	2
	キッコウハグマ	葉	-3		キョウチクトウ科		
		根	-10		キョウチクトウ	樹皮	41
	クルマバハグマ	茎葉	14			葉	18
		根	13		ツルニチニチソウ	茎葉	8
	セイタカアワダチソウ	茎葉	9		ラフマ	葉*	8
		根	1		キンボウゲ科		
		花	2		ウマノアシガタ	茎葉	17
	セイヨウタンポポ	根	10			根	29
	セイヨウノコギリソウ	葉	12		カラマツソウ	茎葉	24
		根	9		ケキツネノボタン	茎葉	-4
		花	14			根	-3
	タカサブロウ	茎葉	11		セイヨウオダマキ	茎葉*	14
		根	9			根*	22
	タチチコグサ	全草	8		ヒメウズ	茎葉	9
	チチコグサ	全草	21			根茎	13
	ニガナ	全草	13		ミヤマオダマキ	全草*	17
	ノアザミ	茎葉	8		クスノキ科		
		根	5		ゲッケイジュ	葉*	15
	ノボロギク	茎葉	17		シロダモ	樹皮	39
		根	21			葉	11
	ハハコグサ	全草	9		ニッケイ	樹皮*	28
	ハルジオン	茎葉	1		ヤマコウバン	樹皮	12
		根	-1		クマツヅラ科		
	ヒヨドリバナ	茎葉	-2		クサギ	樹皮	7
		根	-2		クマツヅラ	茎葉	10
	フキ	葉	6			根茎	8
		地下茎	6		コムラサキ	枝	6
	ブタナ	葉	8			葉	20
		根	3			果実	5
	ホウキギク	茎葉	18				



酵母グルコサミン-6-リン酸合成酵素 (GFAT) に対する阻害効果を指標とした各種植物からの  
エタノール抽出液のスクリーニング：ヤマウルシの樹皮における選択的阻害作用

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%
グミ科				シソ科			
	トウグミ	樹皮	-1		イヌコウジュ	茎葉	7
		葉	-2			根	1
		花	-2		オランダハッカ	葉*	7
		果実	-3		カキドオシ	茎葉	12
クルミ科					シソバタツナミ	全草	23
	オニグルミ	樹皮	44		ジュウニヒトエ	全草	13
		葉	11		タチジャコウソウ	葉*	20
		果皮	22		トウバナ	全草	14
クワ科					ハナハッカ	葉*	24
	カナムグラ	茎葉	3		ヒメオドリコソウ	茎葉	-2
		根	8			花	1
	クワ	樹皮	6		ホトケノザ	全草	-13
		葉	5		マヨラナ	果実*	17
		根皮	3		マンネンロウ	葉*	16
	クワクサ	茎葉	0		メボウキ	葉*	7
		根	6		ヤクヨウサルビア	葉*	17
ケシ科					ヤマハッカ	茎葉	12
	クサノオウ	茎葉	10			塊根	31
		根	14	ショウガ科			
	タケニグサ	茎葉	5		ウコン	根茎*	10
		根	9		カルダモン	種子*	6
	ムラサキケマン	茎葉	0		ミョウガ	葉	13
		根	10			根茎	5
ゴマノハグサ科					ヤブミョウガ	葉茎	-5
	オオイヌノフグリ	全草	-7			根茎	0
	クガイソウ	茎葉	24			果実	-5
		根	28	スイカズラ科			
		花	18		ガマズミ	樹皮	37
	ムラサキサギゴケ	全草	10			葉	33
コショウ科						果実	4
	コショウ	種子*	16		コバノガマズミ	果実	6
サクランウ科					スイカズラ	枝	-3
	オカトラノオ	茎葉	9			若枝	-6
		根	31			葉	6
	コナスビ	全草	12			花	-2
サトイモ科						果実	14
	ウラシマソウ	葉	9		タニウツギ	樹皮	23
		塊茎	11		ニワトコ	枝	-8
		仏炎ほう	5			葉	5
	カラスビシャク	葉	13			蕾	-1
		塊茎	4			果実	8
シキミ科				スイレン科			
	ダイウイキョウ	果実*	9		コウホネ	葉	9
					ハス	種子	74

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%
	ヒツジグサ	根茎	6		ミズヒキ	茎葉	11
スギ科						塊茎	27
	スギ	葉	1		ミチヤナギ	茎葉	2
	メタセコイア	樹皮	16			根	5
スズカケノキ科					ミゾソバ	全草	13
	モミジバスズカケノキ	樹皮	45		ヤナギタデ	茎葉	5
		葉	7			根	15
		果実	9	ツツジ科			
スマレ科					アケボノアセビ	枝	32
	アオイスミレ	葉茎	10			葉	51
		地下茎	8			花	43
	アギスミレ	葉茎	-1		キリシマ	樹皮	11
		根	-5		クマコケモモ	葉*	69
	タチツボスミレ	葉茎	7		ヤマツツジ	樹皮	8
		根	1	ツツラフジ科			
セリ科					アオツツラフジ	枝	1
	ウイキョウ	種子*	13			葉	3
	コエンドロ	種子*	11			果実	3
	セリ	全草	30		オオツツラフジ	根茎*	3
	セントウソウ	茎葉	15	ツバキ科			
		根	3		チャノキ	葉*	76
	ノチドメ	全草	15		ツバキ	樹皮	45
	ミツバ	葉	7		ハマヒサカキ	樹皮	31
		根	6			葉	3
	ヤブニンジン	茎葉	7		ヒサカキ	樹皮雄株	22
		根茎	10			葉雄株	7
	ヤブジラミ	全草	5			雄花	27
センリョウ科						樹皮雌株	33
	ヒトリシズカ	茎葉	5			葉雌株	12
		根	16			雌花	19
タデ科					ヤブツバキ	樹皮	10
	アキノウナギツカミ	全草	5			葉	19
	イタドリ	茎葉	9			種子	9
		地下茎皮	54	ツユクサ科			
	ギンギシ	根	2		ツユクサ	全草	4
	サナエタデ	茎葉	4	ツリフネソウ科			
		根	7		キツリフネ	茎葉	12
		種子	4			根	11
	スイバ	根茎	74	トウダイグサ科			
		葉	-1		アカメガシワ	樹皮	24
	ハナタデ	茎葉	8			葉	65
		根	0		ユズリハ	樹皮	4
	ヒメスイバ	茎葉	12			葉	6
		根	17			雄花	-1
	ママコノシリヌグイ	全草	6			果実	8

酵母グルコサミン-6-リン酸合成酵素 (GFAT) に対する阻害効果を指標とした各種植物からの  
エタノール抽出液のスクリーニング：ヤマウルシの樹皮における選択的阻害作用

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%
ドクウツギ科						翼	0
	ドクウツギ	樹皮	93			葉	19
		葉	90		マサキ	樹皮	17
		未成熟果	7			葉	-4
		果皮	5			果皮	12
		種子	4			種子	12
ドクダミ科				ニレ科			
	ドクダミ	全草	15		ケヤキ	樹皮	21
トチュウ科				ハイノキ科			
	トチュウ	葉*	11		ヒロハノミミズバイ	樹皮	28
トチノキ科						未成熟果	22
	トチノキ	樹皮	84			葉	23
		葉	19	ハエドクソウ科			
トベラ科					ハエドクソウ	茎葉	11
	トベラ	樹皮	11			根	15
		葉	2	バラ科			
		種子	-5		ウワミズザクラ	樹皮	37
ナス科						葉	28
	イヌホウズキ	茎葉	6			花	8
		根	0		カナメモチ	樹皮	66
		果実	11			若葉	22
	クコ	果実*	7			葉	14
	トウガラシ	果実*	4		カワラサイコ	茎葉	15
	パプリカ	果実*	10		カワラサイコ	根	20
	バレイショ	芽*	8		カリン	果皮*	35
	ヒヨドリジョウゴ	茎葉	2			種子*	18
		根	4		キンミズヒキ	茎葉	16
	ホオズキ	葉	12			根茎	85
		根茎	4			果実	15
ナデシコ科				コデマリ		樹皮	5
	カワラナデシコ	茎葉	2			葉	12
		根	4		ザイフリボク	枝	17
	ハコベ	茎葉	17			葉	4
	マンテマ	茎葉	-1		シャリンバイ	樹皮	74
		根	-1			葉	20
	ムシトリナデシコ	茎葉	3			花	12
		根	1			果皮	9
		花	3			種子	27
ニクズク科				セイヨウリンゴ		外果皮*	9
	ニクズク	種子*	7		ソメイヨシノ	樹皮	12
ニシキギ科					トキワサンザシ	樹皮	50
	ツルウメモドキ	樹皮	16			葉	38
		葉	20			果実	12
		雄花	9		ハマナス	樹皮	88
	ニシキギ	樹皮	0			葉	50

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%		
フユイチゴ		枝	8	ヒルガオ		茎葉	0		
		葉	7			根莖	8		
		根莖	55			全草	30		
ヘビイチゴ		全草	14	マメダオシ		全草	30		
		ナワシロイチゴ	枝			26	フウロソウ科		
ノイバラ		枝	26	ゲンノショウコ		葉	30		
		葉	15			根	60		
		樹皮	31			ブドウ科			
モミジイチゴ		枝	13	ツタ		枝	21		
		葉	5			葉	15		
		根	12			根皮	24		
ヤブデマリ		樹皮	21	ノブドウ		樹皮	31		
		葉	23			若枝	1		
ヤマザクラ		果実	14			葉	7		
		ヤマブキ	枝			4	果実	2	
ヤマブキショウマ		葉	1	ヤブガラシ		葉	1		
		根	29			地下莖	8		
		花	2			フトモモ科			
		茎葉	30			チョウジノキ	蕾*	64	
ユキヤナギ		根莖	14	ブナ科					
		樹皮	4			アラカシ	樹皮	64	
ヒガンバナ科		葉	14	ウバメガシ		種子	88		
		スイセン	葉			-10	葉	41	
		鱗莖	-8			種子	61		
ヒガンバナ		鱗莖	1			樹皮	36		
		根	0			葉	24		
ヒノキ科		雄花序	4	クリ		樹皮	74		
		カイツカイブキ	樹皮			43	葉	14	
		葉	27			果実	20		
		果実	25			コナラ	種子	66	
ヒノキ		樹皮	61	シラカシ		樹皮	33		
		葉	41			葉	32		
ヒユ科		種子	90	スダジイ		種子	90		
		イノコズチ	茎葉			0	樹皮	42	
		根	-8			葉	28		
ヤナギノイノコズチ		茎葉	8			種子	15		
		根	9			ベンケイソウ科			
ヒルガオ科		キリンソウ		コモチマンネングサ		茎葉	4		
		葉	0			根莖	18		
		地下莖	2			全草	20		
		がく	4			ツルマンネングサ	全草	-5	
		果皮	-1			マツ科			
		種皮	9			クロマツ	樹皮	45	
		胚乳	4			葉	13		
		子葉	0			冬芽	15		

酵母グルコサミン-6-リン酸合成酵素 (GFAT) に対する阻害効果を指標とした各種植物からの  
 エタノール抽出液のスクリーニング：ヤマウルシの樹皮における選択的阻害作用

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%
マメ科						樹皮	17
	アレチヌスビトハギ	茎葉	1			花芽	3
		根	26		クマノミズキ	果実	10
	イタチハギ	樹皮	25		ヒメアオキ	樹皮	37
		花	5			葉	36
	カワラケツメイ	茎葉	31			花序	51
		根	16		ミズキ	樹皮	70
		未成熟果	58			葉	10
	カラスノエンドウ	全草	2			花序	10
		果皮	-1		ヤマボウシ	樹皮	13
		種子	2			葉	11
	クサネム	茎葉	9		ミツバウツギ科		
		根	16		ゴンズイ	樹皮	-1
		果皮	3			葉	-5
		種子	21			果皮	15
	クララ	茎葉	9			種子	5
		根	17		ムラサキ科		
	クズ	根茎	9		キュウリグサ	全草	1
	センナ	葉*	12		メギ科		
	ネムノキ	樹皮	17		ナンテン	葉	22
		種子	3			果実	21
	ハナズオウ	種子	58		ヒイラギナンテン	樹皮	-4
		果皮	-3			葉	-8
	ハリエンジュ	樹皮	13			花	-1
		葉	21		モクセイ科		
		花	16		キンモクセイ	樹皮	21
	フジ	果皮	18		シナレンギョウ	葉	13
		種子	7			樹皮	13
	マルバヤハズソウ	茎葉	8		ネズミモチ	枝	14
		根	2			葉	43
	ミヤコグサ	茎葉	11			果実	33
		根	2		ヒイラギ	樹皮	7
	メドハギ	茎葉	7		モクレン科		
ミカン科					コブシ	樹皮	10
	カラスザンショウ	種子	3			果実	17
		果皮	14		ハクモクレン	樹皮	10
	サンショウ	樹皮	-3			花芽	16
		葉	2		ホオノキ	樹皮	18
		未成熟果	-3			葉	-5
		果実*	19		モチノキ科		
ミズキ科					イヌツゲ	樹皮	6
	アオキ	樹皮	32			虫えい	10
		葉	30			葉	20
		花序	29		ソヨゴ	樹皮	51
		果実	42			葉	29

科	種	器官	阻害率%	科	種	器官	阻害率%
		花	15				
ヤシ科					オオバギボウシ	葉	11
	シュロ	果実	36			根	7
ヤナギ科					サルトリイバラ	葉	10
	シダレヤナギ	樹皮	12			根茎	13
	セイヨウハコヤナギ	樹皮	9		ショウジョウバカマ	果実	6
		若葉	17			葉	6
	タチヤナギ	樹皮	28			根	3
		葉	8		ジャノヒゲ	花	1
	ヤマナラシ	樹皮	29			茎	2
		葉	68			塊根	10
	ヤマネコヤナギ	樹皮	17		タチシオデ	果実	6
		葉	9			茎葉	12
ヤブコウジ科						根茎	16
	カラタチバナ	枝	14		タマネギ	鱗茎皮*	2
		葉	16		チゴユリ	全草	4
		根	10		ナルコユリ	葉	8
		果実	25			根茎	9
	ヤブコウジ	葉	11		ノビル	葉	7
		根	11			鱗茎	4
		果実	5		ホウチャクソウ	全草	7
						果実	10
ヤマゴボウ科				ラン科			
	ヨウシュヤマゴボウ	葉	12		ネジバナ	葉	8
		根	5			根	8
		果実	4		シラン	葉	10
ヤマノイモ科						塊茎	9
	オニドコロ	茎葉	8	リョウブ科			
		根茎	19		リョウブ	樹皮	53
	タチドコロ	茎葉	6			葉	28
		根茎	10			花序	43
	ナガイモ	茎葉	4	(シダ類)			
		担根体	1	トクサ科			
	ヤマノイモ	担根体	12		スギナ	茎葉	7
ユキノシタ科						孢子茎	-11
	アカショウマ	茎葉	17	ゼンマイ科			
		根茎	58		ゼンマイ	孢子葉柄	6
	ヤマアジサイ	枝	3			孢子葉	9
		葉	10	シシガシラ科			
		根茎	9		シシガシラ	葉	8
	ユキノシタ	葉	11			根	-3
		根	8	ハナワラビ科			
ユリ科					フユノハナワラビ	葉	9
	アマドコロ	茎葉	6			根	-3
		根茎	4	ヒカゲノカズラ科			
	アロエ	葉*	-1		ヒカゲノカズラ	茎葉	5

酵母グルコサミン-6-リン酸合成酵素 (GFAT) に対する阻害効果を指標とした各種植物からの  
エタノール抽出液のスクリーニング：ヤマウルシの樹皮における選択的阻害作用

科	種	器官	阻害率%
		根	0
		孢子嚢	6
(コケ類)			
	ミズゼニゴケ科		
	ホソバミズゼニゴケ	葉状体	10

植物は、種子植物・シダ類・コケ類の順で50音順に記載されている。\*は、市販されている生あるいは乾燥植物を表す。

また、50%以上の阻害率を示した抽出液（高阻害抽出液）の割合（%）を植物の器官別に比較したところ、平均阻害率の場合と同様、樹皮（14.5%，16/110）が最も高く、果実（7.3%，7/96）、花（5.4%，2/37）、根（4.2%，7/165）、葉（2.7%，8/294）の順に低下していた（表2）。 $\chi^2$  検定によれば、樹皮の阻害割合は葉と根に対して有意に高く（ $P < 0.01$ ）、果実は葉に対して有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。

以上のことから、酵母 GFAT に対する阻害効果は植物の種類や器官に応じてかなり異なっているが、全体としては樹皮や果実で高く、根や葉で低くなる傾向があることが分かった。

表2：阻害率50%以上を示した抽出液の器官別の割合

組織	抽出液	高阻害	割合 (%)
	全体の数	抽出液の数	
樹皮	110	16	14.5*
葉	294	8	2.7 <sup>a</sup>
根	165	7	4.2 <sup>b</sup>
花	37	2	5.4
果実	96	7	7.3**
総計	702	40	5.7 <sup>c</sup>

\* $P < 0.01$  (vs a,b,c), \*\* $P < 0.05$  (vs a)

表3：酵母及び大腸菌の GFAT 活性に対する分画の阻害効果の特性

	濃度：	阻害率 (%)	
	$\mu\text{g/ml}$	酵母 GFAT	大腸菌 GFAT
分画1	100	22.5±0.7*	5.4±0.3*
	200	71.9±2.8**	2.2±5.3**
分画2	100	16.9±9.0	7.9±9.6
	200	72.4±1.7***	5.3±3.4***
UDP-GlcNAc	150	38.8±3.5 <sup>#</sup>	0.0±3.6 <sup>#</sup>
	300	51.4±4.2 <sup>##</sup>	-2.0±3.5 <sup>##</sup>
DON	3.13	37.6±0.5 <sup>+</sup>	53.3±3.0 <sup>+</sup>
	6.25	58.4±0.6 <sup>++</sup>	75.9±1.0 <sup>++</sup>

\*, \*\*, \*\*\* :  $P < 0.01$  (n = 3), +, ++ :  $P < 0.01$  (n = 3)  
#, ## :  $P < 0.01$  (n = 3)

### クロマトグラフィー分画による GFAT 活性の阻害効果

植物抽出液による GFAT 阻害作用の特性を調べるために、ヤマウルシ (*Rhus trichocarpa*) の新鮮樹皮のクロマトグラフィー分画を用いて、酵母及び大腸菌の GFAT に対する阻害効果を検討した。

表3に示すように、分画1, 2とも酵母 GFAT に対しては濃度に依存して顕著な阻害効果を示したが、大腸菌 GFAT に対しては明瞭な阻害作用は認められなかった。Student's t-検定を行った結果、分画1の酵母 GFAT に対する阻害率は、大腸菌 GFAT の場合と比較して、各濃度で有意に高く ( $P < 0.01$ )、分画2は高濃度の場合だけ阻害率が有意に高かった ( $P < 0.01$ )。また、真核生物型 GFAT のフィードバック阻害剤である UDP-GlcNAc は、大腸菌 GFAT には全く効果は無く、酵母 GFAT に対してのみ阻害効果を示した。

一方、既知の阻害剤である 6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン (DON) について同様の実験を行った結果、酵母 GFAT と比較した場合、大腸菌 GFAT に対する阻害率は有意に高いものの (Student's t-検定:  $P < 0.01$ )、DON は酵母と大腸菌の両方の GFAT を阻害しており、植物抽出液のクロマトグラフィー分画を用いた実験結果とは明らかに相違があった。このことは、DON が、酵素の活性中心に直接作用して、GFAT だけでなく他のアミドトランスフェラーゼに対しても広範囲に阻害作用を及ぼすためであると考えられる。

以上の結果から、ヤマウルシの樹皮のクロマトグラフィー分画には、真核生物型 GFAT に対して選択的に作用する阻害物質が含まれている可能性が強く示唆される。

## 考 察

糖尿病合併症の予防・治療薬の開発を目的として、種々の植物のエタノール抽出液が、グルコサミン-6-リン酸合成酵素 (GFAT) に対してどのような阻害効果を示すのかをスクリーニングした。実験に用いた702種類の抽出液 (104科352種の植物) の間には、植物の種類あるいは器官に応じて、酵母 GFAT に対する阻害率には大きなバラツキがあった。しかし、GFAT 阻害率を器官別に集計して解析したところ、50%以上の阻害率を示す抽出液の割合及び阻害率の平均値は、樹皮や果実で統計学的に有意に高く、葉や根で低いことが明らかになった。

酵母 GFAT に対して50%以上の阻害効果を示した器官の植物には、タンニン (あるいはポリフェノール) 化合物が共通して含まれていることが報告されている<sup>(16~20)</sup>。例えば、バラ科 (*Rubus* 属)、ブナ科 (*Quercus* 属)、ウルシ科 (*Rhus* 属)、カエデ科 (*Acer* 属) 及びツツジ科 (クマコケモモ: 葉) には 1,2,3,4,6-ペンタガロイル- $\beta$ -D-グルコピラノース<sup>(16)</sup> が、トウダイグサ科 (アカメガシワ: 葉) とフウロソウ科 (ゲンノショウコ: 全草) にはゲラニイン<sup>(17)</sup> が共通して含まれ、また、バラ科 (キンミズヒキ: 根) にはアグリモニン<sup>(18)</sup> が、カヤツリグサ科 (コウボウシバ: 根, 根茎) にはコウボウフェノールB<sup>(19)</sup> が、ブナ科 (クリ: 樹皮) には O-ガロ



酵母グルコサミン-6-リン酸合成酵素 (GFAT) に対する阻害効果を指標とした各種植物からの  
エタノール抽出液のスクリーニング：ヤマウルシの樹皮における選択的阻害作用

イルハメラタンニン<sup>(20)</sup>が存在している。

タンニン化合物はタンパク質に対する強い吸着力<sup>(21)</sup>の他、酵素阻害<sup>(22)</sup>、抗腫瘍<sup>(23)</sup>、抗ウイルス<sup>(24)</sup>、抗酸化<sup>(25)</sup>など様々な作用をすることが報告されている。植物の樹皮や虫えい（昆虫や微生物により生じる植物の瘤）にタンニン化合物が多く存在する<sup>(26)</sup>という事実は、今回明らかになった植物抽出液の阻害効果との間に何らかの因果関係があることを示唆しているのかもしれない。

ヤマウルシの樹皮のエタノール抽出液を各種クロマトグラフィーで処理して得られた分画は、UDP-GlcNAcの場合と同様、酵母GFATに対して高い阻害効果を示し、大腸菌GFATにはごく弱い影響しか及ぼさなかった。UDP-GlcNAcは、真核生物型GFATのフィードバック阻害剤であり<sup>(15, 27)</sup>、酵素の調節部位に結合することでその立体構造を変化させて活性を抑制することが知られている。一方、低濃度で酵母及び大腸菌GFATに強い阻害作用を示した6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン (DON) は、酵素の活性中心に存在するシステイン残基と結合することで、GFATを含むアミドトランスフェラーゼ全般を阻害することが報告されている<sup>(9)</sup>。また、多くの生物種のGFAT遺伝子に関する研究<sup>(13, 15, 27, 28)</sup>により、真核生物と原核生物のGFATではタンパク構造に違いがあり、原核生物には真核生物型GFATの調節部位に相当する領域が存在しないことが明らかになっている。

したがって、以上の事実から、ヤマウルシの樹皮のクロマトグラフィー分画には、1) タンニンに見られるようなタンパク質（酵素）への非特異的な吸着反応によって酵素活性を阻害するのではなく、2) 酵素の調節部位に直接作用することでその活性を制御しているある種の成分が存在することが強く示唆される。真核生物のGFATはその一次構造や調節作用において極めて類似している<sup>(13, 15, 29, 30)</sup>ことを考慮すれば、ヤマウルシの樹皮のクロマトグラフィー分画に存在する成分は、哺乳類のGFATに対しても同様の効果を示すものと推定される。現在、この成分の精製・単離を進めている段階である。

## 謝 辞

今回の研究は富山医科薬科大学・実験実習機器センターの機器を利用して行った。研究の遂行に協力していただいた同センターの職員に感謝申し上げます。

## 参 考 文 献

1. 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室  
平成14年糖尿病実態調査(速報), p1-3, 2003.

2. Diabetes Control and Complication Trial Research Group.  
*N. Engl. J. Med.* 329: 977-986, 1993.
3. Kolm-Litty V., Sauer U., Nerlich A., Lemanm R. and Schleicher E.D.  
*J. Clin. Invest.* 101: 160-169, 1998
4. Ayo S.H., Radnik R.A., Glass II W.F., Garoni J.A., Rampt E.R., Appling D.R. and Kreisberg J.I.  
*Am. J. Physiol.* 260: F185-F191, 1991.
5. Cameron N.E. and Cotter M.A.  
*Diabetologia* 35: 1011-1019, 1992.
6. Yamamoto T., Nakamura T., Noble N.A., Ruoslathi E. and Border W.A.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 1814-1818, 1993.
7. Marshall S., Bacote V. and Tranxinger R.R.  
*J. Biol. Chem.* 266: 4706-4712, 1991.
8. Singh L.P. and Crook E.D.  
*Am. J. Pysiol. Renal. Pysiol.* 279: F646-F654, 2000.
9. Tso J.Y., Hermodson M.A. and Zalkin H.  
*J. Biol. Chem.* 257: 3532-3536, 1982.
10. Boulton A.J.M., Levin S. and Comstock J.  
*Diabetologia* 33: 431-437, 1990.
11. Truscheit E., Frommer W., Junge B., Muller L., Schmidt D.D. and Wingender W.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20: 744-761, 1981.
12. Porte D. and Schwartz M.W.  
*Science* 272: 699-700, 1996.
13. Watzele G. and Tanner W.  
*J. Biol. Chem.* 264: 8753-8758, 1989.
14. Ghosh S., Blumenthal H.J., Davidson E. and Roseman S.  
*J. Biol. Chem.* 235: 1265-1273, 1960.
15. Kornfeld R.  
*J. Biol. Chem.* 242: 3135-3141, 1967
16. Ha ddock E.A., Gupta R.J., Al-Shafi S.M.K. and Haslam E.  
*J. Chem. Soc., Perkin Trans.1:* 2515-2524, 1982.
17. Okuda T., Yoshida T. and Nayeshiro H.  
*Chem. Pharm. Bull.* 25(8): 1862-1869, 1977.
18. Okuda T., Yoshida T., Kuwahara M., Memon M.S. and Shingu T.  
*Chem. Pharm. Bull.* 32(6): 2165-2173, 1984.
19. Kawabata J., Mishima M., Kurihara H. and Mizutani. J.  
*Biochemistry* 30: 645 - 647, 1991.
20. Nonaka G., Ishimaru K., Tanaka T. and Nishioka I.  
*Chem. Pharm. Bull.* 32(8): 483-489, 1984.
21. 田中 治, 野副重男, 相見則郎, 永井正博, 編集

酵母グルコサミン-6-リン酸合成酵素 (GFAT) に対する阻害効果を指標とした各種植物からの  
エタノール抽出液のスクリーニング：ヤマウルシの樹皮における選択的阻害作用

天然物化学, 改訂第 5 版, 南江堂, p225-234, 1998.

22. Berry D.E., Mackenzie L., Shultis E.A., Chan J.A. and Hechet S.M.  
*J. Org. Chem.* 57: 422-424, 1992.
23. Miyamoto K., Kishi N., Koshiura R., Yoshida T., Hatano T. and Okuda T.  
*Chem. Pharm. Bull.* 35(2): 814-822, 1987
24. Fukuchi K., Sakagami H., Okuda T., Hatano T., Tanuma S., Kitajima K., Inoue Y., Inoue S.,  
Ichikawa S., Nonoyama M. and Konno K.  
*Antiviral Res.* 11: 285-298, 1989.
25. Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H. and Arichi S.  
*Chem. Pharm. Bull.* 31(5): 1625-1631, 1983.
26. 難波恒雄, 津田喜典, 編集  
*生薬学概論*, 南江堂, p136-137, 1990.
27. Smith R.J., Milewski S., Brown A.J.P. and Gooday G.W.  
*J. Bacteriol.* 178: 2320-2327, 1996.
28. Badet B., Vermoote P., Haumont P.-Y., Lederer F. and Le Goffic F.  
*Biochemistry* 26: 1940-1948, 1987.
29. Milewski S., Kuszczak D., Jedrzejczak R., Smith R.J., Brown A.J.P. and Gooday G.W.  
*J. Biol. Chem.* 274: 4000-4008, 1999.
30. Kikuchi H. and Tsuiki S.  
*Biochim. Biophys. Acta.* 422: 241-246, 1976.