

原著論文

クズ葉のアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性物質の探索

鷲田和人*¹・間島いつか*¹・團迫智子*¹・中野智彦・石橋泰史*²・小山智之*²・野本享資*¹

Angiotensin I-Converting-Enzyme (ACE) Inhibitor from Leaves of *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi

Kazuto WASHIDA*¹, Itsuka MASHIMA*¹, Tomoko DANSAKO*¹, Tomohiko NAKANO, Taishi ISHIBASHI*², Tomoyuki KOYAMA*², and Kyosuke NOMOTO*¹

Summary

A water extract of the leaves of *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi is known to show angiotensin I-converting-enzyme (ACE) inhibition activity. However, the ACE inhibitors derived from them remain unclear. In this study, we tried to search ACE inhibitors from the leaves of *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi and to evaluate the effect of their extract on angiotensin I-loaded mice. In the results, genistein-7-*O*-apiosyl-(1,6)-glucoside was isolated from them as an ACE inhibitor. Its structure was elucidated based on spectroscopic analysis, which showed moderate ACE inhibition activity (IC₅₀ values 34.0 μM). Furthermore, a water extract of the leaves of *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi decreased the blood-pressure gain induced by angiotensin I administration to mice. We found that the leaves harvested not only from plane cultivation but also from shelf cultivation exhibited ACE inhibition activity. Their activity tended to become strong as picking period of the leaves got late. It was indicated that whenever the leaves of *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi were picked, their extract exhibited ACE inhibition activity.

Key Words: *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi, angiotensin I-converting-enzyme (ACE) inhibitor, genistein-7-*O*-apiosyl-(1,6)-glucoside.

緒言

クズ (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) は、マメ科のつる性多年生草本であり、根は生薬として葛根湯などに使用される。また、根から取れる質の良いデンプンが食材として利用されている。加えて、葉は家畜の飼料だけでなく、人の食料としても利用され、様々な機能性を有することから、近年は健康食品の素材としても注目されている。クズの中でも吉野クズは奈良県特産の植物素材であり、我々はクズ葉の機能性に関する研究を行っている。

食事の欧米化や食生活の多様化により、肥満や高脂血症などの患者が増加し、それにとまって、高血圧性疾患患者も急増し、30歳以上の4~5割の人が高血圧であるというのが現状である。高血圧は動脈硬化、心臓病および脳卒中などのリスクファクターであるため、高血圧予防は重要な課題となっている。それゆえ、特定保健用食品など日常的に摂取できる食材による高血圧予防が注目されている。

アンジオテンシン I 変換酵素 (以下 ACE と略記) はアンジオテンシン I から昇圧作用のあるアンジオ

テンシン II を生成する酵素である。人の血圧調節系で重要な働きをしているこの酵素を阻害することにより血圧上昇抑制効果もたらされる。それゆえ、ACE 阻害は抗高血圧薬剤のターゲットになっている。一方で、数多くの植物が ACE 阻害活性を示すことが報告されている^{1), 2), 5), 6)}。

クズの葉および花にも ACE 阻害活性を有することが報告されているが³⁾、その活性成分については明らかとなっていない。加えて、クズ葉の抽出物の *in vivo* 試験での血圧上昇抑制効果については不明である。そこで、われわれはクズ葉由来の ACE 阻害活性物質を単離するとともにクズ葉抽出物の *in vivo* での血圧上昇抑制効果について検討した。

材料および方法

実験 1 クズ葉由来 ACE 阻害活性物質の単離、同定および ACE 阻害活性の評価

ACE 阻害活性の測定

奈良県橿原市を流れる飛鳥川の土手に自生しているクズ葉を 2008 年 12 月に採取し、水で洗浄後、直

*1 財団法人奈良県中小企業支援センター

*2 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

この研究は JST の奈良県地域結集型研究開発プログラムのもとで実施した。

ちに-80℃で急速冷凍して実験に使用するまで冷凍庫で保存した。クズ葉 1,250 g に蒸留水 5000 ml を加え、インキュベーター（バーンステッド社）で 30℃, 160 rpm で一晩攪拌・抽出し、この抽出液をろ過して試料溶液とした。

クズ葉抽出物およびその精製画分の ACE 阻害活性は ACE kit-WST (同仁化学研究所) を用いて測定した。ACE kit-WST は、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) により 3-Hydroxybutyryl-Gly Gly Gly (3HB-GGG) から生成する 3-Hydroxybutyric acid (3HB) を酵素法により検出する方法を使ったキットである。検出はマイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社) を用い、450 nm の吸光度を測定した。ACE 阻害活性は下記の計算式を用いて算出した。

計算式

ACE 阻 害 活 性 (阻 害 率 (%)) =

$$\frac{[A_{blank1} - A_{sample}]}{[A_{blank1} - A_{blank2}]} \times 100$$

A_{blank1}: コントロールの吸光度, A_{blank2}: 試薬自身の吸光度, A_{sample}: サンプル添加時の吸光度

(*着色の強いサンプルの場合は、サンプルの希釈ごとに sample blank (サンプル自身の吸光度) を測定し、A_{sample} から差し引いた値 A_{sample'} を用いた。)

ACE を 50% 阻害するために必要な試料濃度を IC₅₀ 値とし、段階的に希釈した試料溶液の ACE 阻害活性値の近似曲線からその値を算出した。また、精製を進めるときには、それぞれの画分を 1 mg/ml (最終濃度: 77 μg/ml) の濃度になるように添加したときの ACE 阻害活性で活性の強度を判断した。

クズ葉水抽出液から ACE 阻害活性物質の精製

上記の操作で得られたクズ葉水抽出液 5000 ml をダイアイオン HP-20 カラム (φ60 mm × 150 mm) に供し、水画分 (49 g, ACE 阻害率: 66%) と MeOH 画分 (6 g, 86%) が得られた。得られた HP-20 MeOH 画分 500 mg を ODS カラム (Cosmosil 140-C18 OPN, φ20 mm × 150 mm) で分画し、20%MeOH 画分 (268 mg, ACE 阻害率: 82%), 40%MeOH 画分 (161 mg, 62%), 60%MeOH 画分 (27 mg, 71%) および 100%MeOH 画分 (47 mg, 0%) が得られた。

最も活性の高い 20%MeOH 画分 (50.5 mg) を Sephadex LH-20 (φ10 mm × 200 mm, 50%MeOH) に供し、Fr. 1 (2 mg, ACE 阻害率: 33%), Fr. 2 (27 mg, 72%), Fr. 3 (10 mg, 55%), Fr. 4 (6 mg, 60%) および Fr. 5

(8 mg, 93%) が得られた。

続いて、最も活性の高い Fr. 5 (8 mg) を分取 HPLC (Inertsil ODS-3 [φ20 × 250 mm], 40%MeOH, 10 ml/min, UV 254 nm) で 12 画分に分取した。この中で最も ACE 阻害活性が高かったのは Fr. 5F (ACE 阻害率: 95%) であった。この Fr. 5F は量が少なかったため大量精製した。

ACE 阻害活性物質の大量精製

前項での Fr. 5F の HPLC でのピークを指標に、大量精製を行った。前項で得られた HP-20 MeOH 画分 (4 g) を ODS カラム (Cosmosil 140-C18 OPN, φ30 mm × 110 mm) に供し、20%MeOH 画分 (1329 mg), 40%MeOH 画分 (2125 mg), 60%MeOH 画分 (840 mg) および 100%MeOH 画分 (394 mg) が得られた。

Fr. 5F のピークが確認された ODS40%MeOH 画分 (2 g) を Sephadex LH-20 (φ20 mm × 200 mm, 50%MeOH) により精製し、Fr. 1 (1128 mg), Fr. 2 (481 mg) および Fr. 3 (111 mg) の 3 画分に分画した。

続いて、Fr. 5F のピークが確認できた LH-20 Fr. 2 (400 mg) を分取 HPLC (Inertsil ODS-3 [φ20 × 250 mm], 40%MeOH, 10 ml/min, UV 254 nm) で 5 画分に分取し、さらに得られた Fr. 2 (30 mg) を分取 HPLC (Inertsil ODS-3 [φ20 × 250 mm], 20%アセトニトリル, 8 ml/min, UV 254 nm) で最終精製し、ACE 阻害活性物質を 9 mg 単離した。

NMR と ESI-MS による測定

NMR は Bruker BioSpin GmbH 社製の AVANCE-750 (¹H-NMR: 750 MHz, ¹³C-NMR: 187.5 MHz) で測定した。ESI-MS は Waters 社製の ACQUITY UPLC System を連結させた Waters 社製の LCT premier XE のポジティブモードで測定した。

実験 2 クズ葉抽出物のアンジオテンシン I 負荷マウスの血圧上昇に対する効果

5 週齢の ddY マウス (雄, SLC) は 1 週間予備飼育したのち、実験に使用した。本動物実験は「東京海洋大学動物実験指針」に従って実施した。マウスは、コントロール群 (ND, n=8), クズ葉水抽出物投与群 (500 mg, 1000 および 2000 mg/kg, それぞれ n=8), クズ葉エタノール抽出物投与群 (500 mg, 1000 および 2000 mg/kg, それぞれ n=8) に分け、サンプルを経口投与した 1 時間後にアンジオテンシン I (150 μg/kg) を腹腔内投与した。そして、その前後のマウ

スの収縮期血圧を測定し、アンジオテンシン I 投与前後の収縮期血圧の差を計算し、コントロール群の値との比較から血圧上昇抑制効果を評価した。

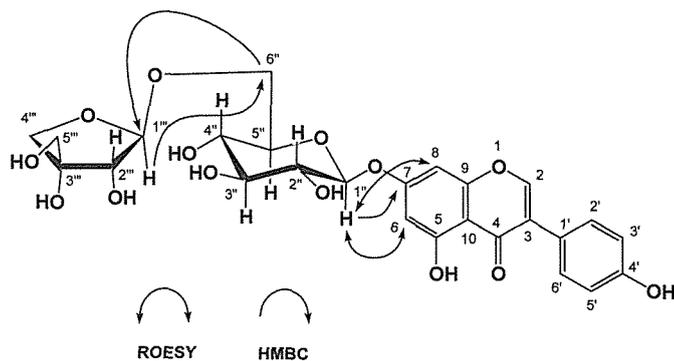
実験3 異なる栽培法でのクズ葉抽出物の ACE 阻害活性の季節変動

クズ葉は 2008 年に奈良県高原農業振興センターで平面 (5, 6, 7, 8, 9 および 10 月にそれぞれ採取) および棚栽培 (5, 6, 7, 8 および 9 月にそれぞれ採取) したものを用いた。そして、コントロールとしては、飛鳥川で採取したサンプルを用いた。この試験では、 IC_{50} 値をクズ葉生重量 / ml で表した。飛鳥川サンプルでは、クズ葉 1 g がクズ葉抽出物 44 mg に相当する。

結果

実験1 クズ葉由来 ACE 阻害活性物質の単離、同定および ACE 阻害活性の評価

単離した物質について、各種 NMR スペクトルを測定した。 1H -NMR (CD3OD, 750 MHz) においては、 δ H 8.15 (1H, s, H-2), 6.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.73 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 7.39 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2' および H-6'), 6.85 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3' および H-5'), 4.99 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-1''), 3.48 (1H, m, H-2''), 3.47 (1H, m, H-3''), 3.34 (1H, m, H-4''), 3.69 (1H, m, H-5''), 3.63 (1H, m, H-6''a), 4.05 (1H, dd, $J = 1.5, 10.5$ Hz, H-6''b), 4.97 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1'''), 3.95 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2'''), 3.78 (1H, m, H-4'''), 4.04 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-4'''), 3.61 (2H, m, H-5''') にシグナルが観測され、 ^{13}C -NMR (CD3OD, 187.5 MHz) においては、 δ C 155.4 (C2), 125.0 (C3), 182.6 (C4), 163.5 (C5), 101.2 (C6), 164.7 (C7), 96.0 (C8), 159.3 (C9), 108.1 (C10), 123.2 (C1'), 131.4 (C2' および C6'), 116.3 (C3' および C5'), 158.9 (C4'), 101.7 (C1''), 74.7 (C2''), 77.9 (C3''), 71.7 (C4''), 77.2 (C5''), 69.1 (C6''), 111.2 (C1'''), 78.2 (C2'''), 80.5 (C3'''), 75.1 (C4'''), 65.8 (C5''') にシグナルが観測された。これらのシグナルのパターンから、イソフラボン骨格と 2 つの糖の存在が示唆された。続いて、HMQC や HMBC などの 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析により、これらのシグナルを帰属した。最終的に、genistein とグルコースの結合位置は、H-1''/C7 の HMBC 相関と H-6/H-1'' および H-8/H-1'' の ROESY 相関より、7 位と 1''

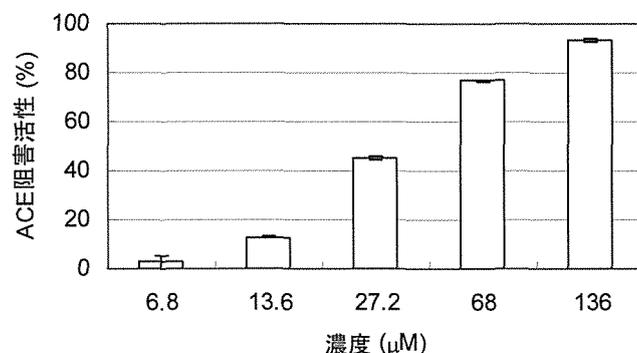


第1図 ACE阻害活性物質の構造と主要なHMBCおよびROESY相関

Fig. 1. Summary of HMBC and ROESY spectral data of ACE inhibitor.

位であると決定し、グルコースとアピオースの結合位置は 6''-H/C1'' および H-1''/C6'' の HMBC 相関より 6'' 位と 1'' 位であると決定した。そして、ESI-MS において、この化学構造の分子量 564 に相当する m/z 565 (M+H)⁺ にイオンピークが観察されたことから、単離した ACE 阻害活性物質が genistein-7-O-apiosyl-(1,6)-glucoside であると同定した。

6.8, 13.6, 27.2, 68 および 136 μ M の濃度で本物質の ACE 阻害活性を評価した結果を第2図に示した。本物質の ACE 阻害活性は、濃度依存的に上昇した。これらの結果から得られた本物質の IC_{50} 値は 34 μ M であった。



第2図 単離した ACE 阻害活性物質の活性 (平均値 \pm 標準偏差, $n=3$)
Fig. 2. Activity of isolated ACE inhibitor (Mean \pm SD, $n=3$).

実験2 クズ葉抽出物のアンジオテンシン I 負荷マウスの血圧上昇に対する効果

第3図に示したように、コントロール群ではアンジオテンシン I の腹腔内投与前後で収縮期血圧が 20~27 mm Hg 上昇した。しかしながら、コントロール群と比較すると、2000 mg/kg の濃度でクズ葉のエタノール抽出物が血圧上昇抑制傾向を示し、クズ葉の水抽出物が血圧上昇を有意に抑制した。そして、これ

らの抽出物の効果は、500 mg, 1000 および 2000 mg/kg と投与量を増加させることで活性が増強し、濃度依存的な傾向が認められた (第3図)。これらのことから、クズ葉の水抽出物が *in vivo* の試験において、血圧上昇を抑制することが判明した。

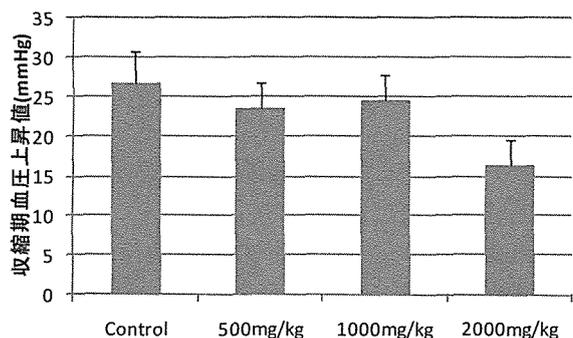
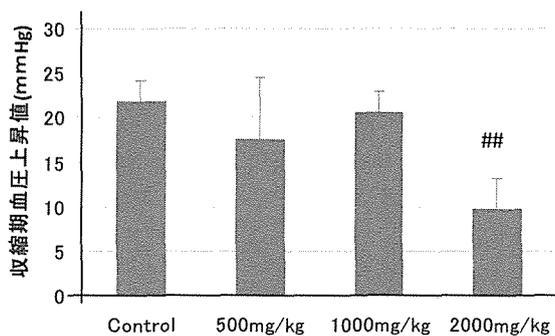
なる傾向が認められた。一方、どの時期に採取しても安定的に ACE 阻害活性を示すことがわかった。

実験3 異なる栽培法でのクズ葉抽出物のACE阻害活性の季節変動

第4図に示したように、飛鳥川サンプルの IC₅₀ 値が 0.6 mg/ml と最も強かった。そして、平面栽培の IC₅₀ 値は 0.97~1.47 mg/ml であり、棚栽培の IC₅₀ 値は 0.71~1.46 mg/ml であった。これらの結果から、どちらの栽培法でも採取時期が遅いほど活性が強くなる傾向が認められた。

考 察

クズ葉の ACE 阻害活性物質として、genistein-7-O-apiosyl-(1,6)-glucoside を単離した。クズ葉中には本物質以外にも ACE 阻害活性物質が存在すると考えられたが、それらは極微量であり、本研究では単離することができなかった。同じアグリコンを有する genistein や genistin と ACE 阻害活性の比較を検討したが、これらの物質は水に不溶で

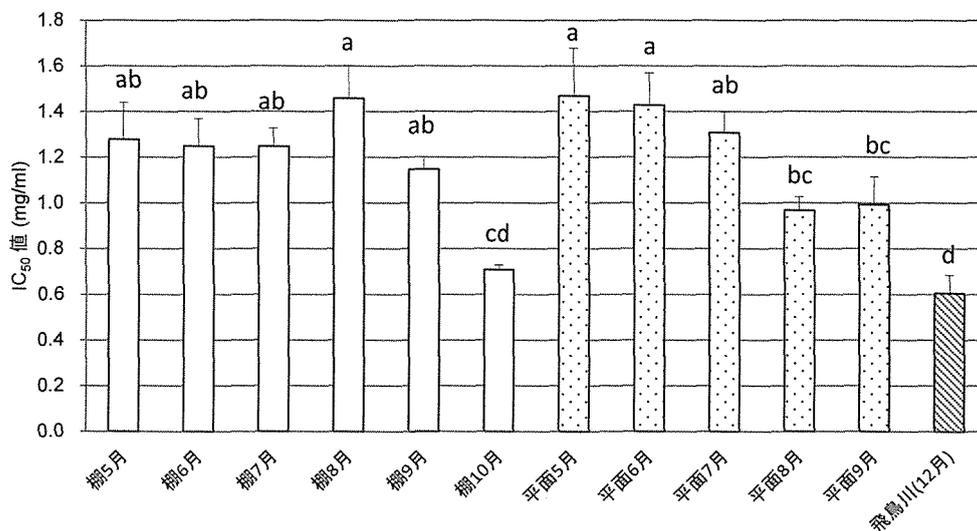


第3図 アンジオテンシンI 負荷マウスに対するクズ葉抽出物の効果

(左: 水抽出物, 右: エタノール抽出物, 平均値±標準誤差, n=8, ##: p<0.01 vs. control)

Fig. 3. Effects of *Pueraria lobata* leaf extract on angiotensin I-loaded mice.

(left, water extract; right, ethanol extract, Mean ± SE, n=8, ##: p<0.01 vs. control).



第4図 棚および平面栽培したクズ葉のACE阻害活性の季節変動 (平均値±標準偏差, n=3)。

異なる文字間にはTukey-Kramer法により5%水準で有意差あり

Fig. 4. ACE inhibition activity of leaves of *Pueraria lobata* obtained from shelf and planar cultivation at different cultivation periods (Mean±SD, n=3).

Different letters are significantly different from each other (Tukey-Kramer test, P<0.05).

あり、サンプル水溶液しか使用できない本キットでは活性を評価することができなかった。クズの主要二次代謝物質である puerarin は水に可溶であったので、活性を評価したところ、ほとんど活性がなかった。フラボノイド類の ACE 阻害活性としては、ケルセチン、イソラムネチンおよびケンフェロール配糖体 (158.9~708.8 μM) が知られているが⁴⁾、今回単離した物質の方が5~10倍くらい強い活性を示した。

クズ葉の水抽出物およびエタノール抽出物について、アンジオテンシン I 負荷マウスに対する血圧上昇抑制活性を評価したところ、水抽出物に抑制効果が見られた。本試験においてマウスの血圧が上昇するためには、ACE がアンジオテンシン I をアンジオテンシン II に変換する必要がある。コントロールの試験では血圧が上昇していることから、投与したアンジオテンシン I は II に変化したと考えられる。クズ葉抽出物が *in vitro* で ACE を阻害することから³⁾、生体内でも ACE を阻害したと推定された。実際、アンジオテンシン II 負荷マウスに対して、クズ葉抽出物を投与しても、ほとんど血圧上昇を抑制しなかったことから (未発表データ)、生体内での ACE 阻害が血圧上昇抑制活性のメカニズムだと考えられる。

異なる栽培法で栽培したクズ葉の ACE 阻害活性の季節変動を検討したところ、棚栽培、平面栽培ともに採取時期が遅いほど ACE 阻害活性が強くなる傾向を示したが、どの時期に採取しても安定的に活性を示すことがわかった。このことから、クズ葉の収穫に適した栽培である棚栽培でも平面栽培のように活性を示すこと、商品価値の高い緑の葉が得られる夏収穫でも活性を示すことが判明した。

摘 要

クズ葉のアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性については知られていたが、その活性物質および *in vivo* での血圧上昇抑制作用については不明であった。そこで、本研究ではクズ葉に含まれる ACE 阻害物質の探索とクズ葉抽出物の単回投与によるマウスの血圧上昇抑制活性を評価した。その結果、クズ葉の水抽出物から、ACE 阻害活性物質を単離することに成功した。そして、機器分析学的手法により、その化学構造を genisitein-7-O-*apiosyl*-(1,6)-*glucoside* であると決定した。この化合物の ACE 阻害活性は IC_{50} 34 μM

であった。さらに、クズ葉の水抽出物の単回投与により、マウスのアンジオテンシン I 誘導性血圧上昇を有意に抑制することが判明した。棚栽培でも平面栽培でも、クズ葉抽出物は ACE 阻害活性を示すこと、採取時期が遅いほど活性が強まる傾向が見られたものの、いずれの時期に採取しても、活性を示すことが判明した。

謝 辞

NMR 測定していただきました財) サントリー生物有機科学研究所の岩下孝博士に感謝いたします。

引用文献

1. 井澤華子・青柳康夫. 2006. キノコのアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性. 日本食品科学工学会誌. 53 : 459-465.
2. ———・吉田望・白貝紀江・青柳康夫. 2008. 豆類のニコチアナミン含量とアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性. 日本食品科学工学会誌. 55 : 253-257.
3. 川上晃・茅野紘・忌部東洋・只左弘治. 1994. ハーブ水抽出物のアンジオテンシン I 変換酵素及びコラゲナーゼ阻害能. 信州大学農学部紀要. 31 (2) : 97-107.
4. Oh, H., Kang, D.-G., Kwon, J.-W., Kwon, T.-O., Lee, S.-Y., Lee, D.-B. and Lee, H.-S. 2004. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. Biol. Pharm. Bull. 27 (12) : 2035-2037.
5. Sakaida, H., Nagao, K., Higa, K., Shirouchi, B., Inoue, N., Hidaka, F., Kai, T. and Yanagita, T. 2007. Effect of *Vaccinium ashei* reade leaves on angiotensin converting enzyme activity *in vitro* and on systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats *in vivo*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71 (9) : 2335-2337.
6. 山口信也・大西淳・十河政信・丸勇史・太田康弘・塚田陽二. 2002. ノニ (*Morinda citrifolia*) 果汁のアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性. 日本食品科学工学会誌. 49 (9) : 624-627.