緑茶中の降圧活性物質の精製とその性状

伊 村 祈 年 子*, 山 本 武*, 明 橋 八 郎**

* 大阪市立環境科学研究所

** 甲子園大学栄養学部

Purification and Characterization of the Hypotensive Substances in Green Tea Leaves

Kineko IMURA,* Takeshi YAMAMOTO* and Hachiro AKEHASHI**

* Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Osaka, 543

** Department of Nutrition Koshien University, Takarazuka, 665

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 37, 541~546 (1984)

As a result of a component fractionation of green tea extracts, it was found that ribonucleic acid was a potent principle of the hypotensive activity. However, the nucleic acid fraction retained the activity after alkaline hydrolysis, and further purification of the hydrolysate clarified that the adenylic acid was the most potent one of the active elements.

(Received February 18, 1984)

著者らは前報¹⁾で、緑茶含有成分を各種の溶媒を用いて抽出し、その抽出画分をウサギの静脈内に投与し、血圧に及ぼす作用を検討した結果、とくに熱水抽出画分に強い降圧活性を認めた。さらに本活性は、Sephadex G-50 によるゲル濾過分析の結果から、260 nm に強い吸収をもつ高分子画分に存在することが、明らかとなった。

本報では、熱水抽出画分における降圧活性成分をさらに単離精製するとともに、その性状についても検討を加えた結果、二、三の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 試 薬

Sephadex G-100: Pharmacia 製, DEAE-セルロース: Serva 製, Dowex 1×2: Dow Chemical 製, リボヌクレアーゼA, デオキシリボヌクレアーゼ (RNase free): Worthington Biochem. 製, プロナーゼE: 科研化学製, 透析膜: Spectram Medical Industries 製, リボ核酸 (酵母) および 5'-モノヌクレオチド: Sigma製, その他の試薬はすべて特級を用いた。

2. 試 料

前報¹⁾に準じ、煎茶の熱水抽出画分を、30,000×g で遠心分離し、上清を試料とした。

3. ゲル濾過およびイオン交換体

* 〒543 大阪市天王寺区東上町 8-34

** 〒665 宝塚市紅葉ヶ丘 10-1

Sephadex G-100, DEAE セルロースおよび Dowex 1×2 を使用し、常法により、膨潤および活性化し、カラムに充てんした。

4. 糖 の 定 量

ゲル濾過溶出液は、フェノール硫酸法により 490 nm で、イオンクロマトグラフィーの溶出液はアンスロン法²⁾により 550 nm の吸光値を測定した。

5. 酵 素 処 理

タンパク分解酵素 (プロナーゼ) および核酸分解酵素 (デオキシリボヌクレアーゼ, リボヌクレアーゼ) は、0.15 M NaCl に溶解後、50 μg/ml になるように添加し、37°C で 30 分間作用させた。リボヌクレアーゼは 80°C で 10 分、プロナーゼは 37°C で 2 時間加熱し、混在する他の酵素を失活後、添加した。

6. アルカリ分解^{3,4)}

0.3 M KOH で、37°C で 18 時間処理したのち、蒸留水に対して 24 時間透析した。

7. リ ン の 定 量

Allen⁵⁾ の方法に準じ、60% の過塩素酸を用いて、有機リンを分解したのち、モリブデン青比色法により定量した。

8. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

DEAE セルロースプレート (Serva 製) を用い、イソ酪酸: アンモニア: 水 (66: 2: 32) の展開溶媒で、上昇法により展開し、紫外線下で検出した。

Fig. 1. Gel filtration profile of the hot water extract from green tea leaves on Sephadex G-100 column.

○ Absorbance at 260 nm, ● absorbance at 280 nm, △ absorbance at 490 nm.

The hot water extract solution was centrifuged at $30,000 \times g$ for 30 min. The supernatant 1.5 ml was applied to the column (2.6×100 cm), and eluted with 0.03 M NaCl at room temperature. The flow rate was 15 ml/hr.

9. 実験動物と投与方法

前報¹⁾と同様、体重約 2 kg 前後の白色雄ウサギ 1 群 3 匹を用い、ウレタンで麻酔後左側頸動脈圧を観血的に測定した。試料は静脈内に投与した。

10. 投与試料

投与試料は、蒸留水に対して 24 時間透析し、内液 (pH 6~7) を 0.5 ml/kg となるよう濃度調整し、生理食塩液として投与した。ただし、イオン交換クロマトグ

Table 1. Phosphorus contents and $\epsilon(P)$ value at 260 nm of different fractions obtained from gel filtration on column of Sephadex G-100.

Fraction (G-100)	Absorbance*		P $\mu M/ml$	$\epsilon(P)$
	260 nm	280 nm		
A	21	18	0.58	36,143
B	61	34	5.75	10,617
C	76	42	9.49	8,008

* Measurement was made at pH 7.0.

ラフィーで得たヌクレオチド画分については、透析操作は行なわない。

実験結果

1. ゲル濾過

Sephadex G-100 カラム (2.6×100 cm) を用い、試料を吸着させたのち、0.03 M 塩化ナトリウム溶液で溶出 (15 ml/hr) し、ゲル濾過を行ない、その結果を Fig. 1 に示す。Sephadex G-50 によるゲル濾過で排斥される高分子画分はさらに糖画分 A および 280 nm/260 nm の吸光比⁶⁾ が約 0.55 の値をもつ C 画分とに分別分離して溶出された。

1) 血圧降下作用 上記溶出画分 (A, B, C) の降圧作用を測定し、Fig. 2 に示す。C 画分は、4.1 mg/kg の投与で約 20 mmHg の降圧作用を示したが、A 画分には、降圧作用が認められなかった。B 画分に認められる降圧作用は一部 C 画分の混在が考えられた。

2) 降圧画分の紫外外部吸収とリンの定量 降圧活性画分 C (40倍希釈 pH 7) の紫外外部吸収スペクトルを Fig. 3 に示し、また、各画分の 260 nm における吸収の強度を、Chargaff らの方法⁷⁾に従い、リン 1 原子当たりの吸光係数 $\epsilon(P)$ として Table 1 に示した。C 画分の吸

Fig. 2. Effects of different fractions obtained from gel filtration on Sephadex G-100 column chromatography on arterial blood pressure in rabbits.

Fig. 3. Ultraviolet absorption profile of fraction C of Sephadex G-100 gel chromatography.

収曲線は、260 nm に吸収極大をもち、230 nm に吸収極小をもつ核酸に特異的⁹⁾な曲線を示し、 $\varepsilon(P)$ の値は 8,000 であった。

3) 酵素処理による降圧活性の消失 C画分に、核酸分解酵素として、デオキシリボヌクレアーゼおよびリボヌクレアーゼ、タンパク質分解酵素として、プロナーゼをそれぞれ作用させたのち、透析し、その内液を投与し、結果を Fig. 4 に示した。リボヌクレアーゼ処理後の透析内液の投与では、降圧作用の消失がみられたが、デオキシリボヌクレアーゼ、プロナーゼ処理後の内液では、降圧作用の変化は認められなかった。

4) アルカリ加水分解 各画分 A, B および C のアルカリ加水分解による紫外吸収の変化を検討した結果、リボヌクレアーゼの処理により降圧作用の消失がみられた C画分では、アルカリ加水分解により、260 nm の吸光度が、76 から 114 と 1.5 倍の増加を示した (Table 2)。またアルカリ加水分解処理後の透析内液の投与では、リボヌクレアーゼの処理後の透析内液の投与と同様降圧作用の消失が認められた。

2. DEAE セルロースカラムによる再分画

以上の結果から降圧活性画分 C に、核酸の存在が予想されたので、DEAE セルロースカラムにより、核酸成分の分離を試みた。OH 型 DEAE セルロース⁹⁾ はあらかじめ、0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) (以下緩衝液) に懸濁し、平衡化したカラム (1.2×15cm) に、C 画分 2 ml を吸着させた。溶出は同緩衝液中の食塩濃度 0.1 M→0.8 M の連続的濃度こう配法によった。その結果酸性糖画分 I および 0.5 M 付近の食塩で溶出される核酸画分 II を得た (Fig. 5)。

1) 血圧降下作用 酸性糖画分 I および核酸画分 II を投与し降圧作用を測定したところ、核酸画分 II に降圧作用が認められ、糖画分 I には降圧作用が認められなかった。

Table 2. Hyperchromic effect of alkaline hydrolysis.

Fraction*	Changes of absorbance at 260 nm	
	nontreatment	alkaline hydrolysis
A	21 (1.0)	25 (1.19)
B	61 (1.0)	82 (1.34)
C	76 (1.0)	114 (1.5)

* Gel filtration on Sephadex G-100 column.

Table 3. Ratios of A_{250} versus A_{260} and A_{280} versus A_{260} various nucleotide fractions.

Fraction	250 nm/260 nm*	280 nm/260 nm*
F-1	0.476	2.0
F-2	0.81	0.39
F-3	0.94	0.69
F-4	0.76	0.40
Authentic nucleotide	250 nm/260 nm*	280 nm/260 nm*
CMP	0.45-0.48	1.80-2.10
AMP	0.85	0.22
GMP	1.02	0.68
UMP	0.74-0.80	0.28-0.38

* Measurement was made at pH 2.0.

2) 薄層クロマトグラフィーによる画分 II の同定 上記の操作で得た核酸画分 II を同定するため、同画分をアルカリまたは、リボヌクレアーゼで分解し、その分解物について薄層クロマトグラフィーを行なった。また酵母リボ核酸のアルカリ分解物および 5'-モノヌクレオチドの標品とともに展開した。その結果 Fig. 6 に示すように、画分 II の分解物は、酵母リボ核酸のアルカリ分解による 4 種の 2'(3')-モノヌクレオチドと一致する R_f 値が認められた。

このことから画分 II の主成分は、リボ核酸であると推定された。

3. イオン交換樹脂による画分 II の構成成分の分離

画分 II は、リボ核酸が主成分であろうと考えられたことから、さらに画分 II の構成成分を分離し、各画分について降圧作用を測定するため、大沢ら¹⁰⁾の方法に準じて、Dowex 1×2 ギ酸型カラム (0.8×30cm) によるカラムクロマトグラフィーを行なった。画分 II は、アルカリ分解し、過塩素酸で中和、その上澄液 ($E_{260}/\text{ml}=75$) 4 ml を吸着させた。溶出は、ギ酸濃度 0→4 N の連続濃度

Fig.4. Effect of enzyme treatments on blood pressure depression activity.

Fig.5. Elution profile of the fraction C on DEAE cellulose column chromatography.

○ Absorbance at 260 nm, ● absorbance at 550 nm.

The fraction C obtained from Sephadex G-100 chromatography was applied to the column (1.2 × 15 cm), equilibrated with 0.1 M Tris buffer (pH 7.5) and eluted with a linear NaCl gradient from 0.1 M NaCl to 0.8 M in the same buffer at room temperature. The flow rate was 24 ml/hr.

こう配法により行ない、その結果を Fig.7 に示した。最初に溶出されるシチジル酸の紫外吸収は、280 nm/260 nm=2 であることから同定された。また各溶出画分の同定は、紫外吸収係数¹³⁾により行なった (Table 3)。

血圧降下作用：上記の各画分をロータリーエバポレータによりギ酸をとばすとともに濃縮し投与したところ、アデニル酸画分では、0.23 mg/kg の投与で約 28mmHg, 0.45 mg/kg の投与で約 34 mmHg, 0.9 mg/kg の投与で約 42 mmHg の降圧作用が認められた (Fig. 8)。しかし、シチジル酸、グアニル酸、ウリジル酸の各画分の投

Fig.6. Thin layer chromatogram of RNase digests and alkaline hydrolysates.

Absorbent: DEAE-cellulose, solvent: iso-BuCO-OH, NH₃, H₂O (66:2:32).

1, Alkaline hydrolysates of tea RNA; 2, enzymatic digests of tea RNA by RNase A; 3~6, authentic nucleotides; 7, alkaline hydrolysates of yeast RNA.

与においては、降圧作用が認められなかった (Fig.9)。

考 察

前報¹⁾において、緑茶熱水抽出画分における降圧作用は Sephadex G-50 によるゲル濾過により排斥される高分子画分に溶出され、その主要な降圧活性の本体は、有機成分であるとの示唆を得た。そこで今回は、Sephadex G-100 によるゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーによる降圧成分の分離、精製を試みるとともに、降圧成分の性状についても検討した。Sephadex G-100 によるゲル濾過では、核酸に特有な紫外外部吸収スペクトルを示す画分 C (Fig.3) に降圧活性が認められ、260 nm における吸収の強度 $\epsilon(P)$ は 8,000 であった (Table 1)。 $\epsilon(P)$ の値は、一般にデオキシリボ核酸では 6,000~8,000, リボ核酸では 7,000~10,000 であること¹²⁾、ま

Fig. 7. Separation of individual mononucleotides of the tea RNA alkaline hydrolysate on Dowex-1 column chromatography.

The fraction II (tea RNA) obtained from DEAE-cellulose chromatography was applied to the column (formate form 0.8×30 cm). The alkaline hydrolysate was the "formic acid system" (according to Hurlbert *et al.*²²). The flow rate was 12 ml/hr.

C, cytidylic acid; A, adenylic acid; G, guanylic acid; U, uridylic acid.

た、画分Cをアルカリ加水分解することにより、260 nmにおける吸光度は約1.5倍に増加し (Table 2), この現象はリボ核酸のアルカリ分解による深色効果¹³⁾として知られていること、また、画分Cのリボヌクレアーゼ処理液ならびにアルカリ分解液の透析内液での投与において、降圧活性の消失がみられたことなどから、降圧活性画分Cには、リボ核酸を含有すること、またその濃度は、核酸のリンの含量を約9%¹⁴⁾およびリボ核酸 $1 \mu\text{g/ml}$ の $\text{OD}_{260\text{nm}}=0.022^{13)}$ として算出すれば、Table 1に示した画分Cのリン含量と260 nmの吸光値から、約0.3%と推定された。そこで、さらに画分CをDEAEセルロースカラムにより再分画し (Fig. 5), 核酸成分を分画して降圧作用を測定した結果、核酸画分 (画分II) に降圧作用が認められた。この核酸画分は、リボヌクレアーゼまたはアルカリ加水分解後薄層クロマトグラフィーにより、4種の2'(3')-モノヌクレオチドに加水分解されていることが明らかになり (Fig. 6), 主成分はリボ核酸であろうと考えられた。ついで、画分IIの構成成分をイオン交換樹脂Dowex 1によるカラムクロマトグラフィーで分離し、得た各ヌクレオチド画分の降圧作用を測定したところ、降圧活性の中心はアデニル酸画分にあることが判明した。この活性は、用量の増加とともにその降圧作用を増加した。

Fig. 8. Effects of adenylic acid fraction obtained from ion-exchange on Dowex-1 column chromatography on arterial blood pressure in rabbits.

Fig. 9. Effects of various nucleotide fractions obtained from ion-exchange on Dowex-1 column chromatography on arterial blood pressure in rabbits.

すでに述べたように、Sephadex G-100 によるゲル濾過で得た降圧活性画分 C (約 20 mmHg (Fig. 2)) は、約 0.3% の核酸を含有し、核酸としての投与量は、約 1.5 mg/kg (体重) となる。さらにアデニル酸としての投与量は、核酸中のアデニル酸のモル比から、約 0.38 mg/kg (体重) と計算される。そこで、イオン交換樹脂で分離したアデニル酸画分の投与量 (Fig. 8) と C 画分中のアデニル酸としての投与量とを対比させその降圧作用を検討すると、アデニル酸としての活性作用は、ほぼ同程度であることが認められた。これらの実験事実から、核酸として投与したアデニル酸量と単一のアデニル酸の有効投与量とは、同価であると考えられる。

緑茶の熱水抽出画分における降圧作用は、イヌの静脈内の投与¹⁵⁾や、本態性高血圧の疾患モデルとして広く用いられている高血圧自然発症ラット (SHR)¹⁶⁾ の経口投与実験¹⁷⁾においても降圧作用を認めたことから、ウサギに特異的な作用ではないと考えられる。

一方、アデノシン物質 (アデノシンやアデニル酸など) は、血管平滑筋の弛緩作用による血管拡張物質¹⁸⁾として知られているが、近年細胞内の cyclic AMP が広く細胞機能の調節に関与し、各種のホルモン作用を媒介し、ホルモン刺激のメッセンジャーとして働くだけでなく、中枢神経の機能調節にも関与している可能性が示唆^{19)~21)}され、さらに脳の神経伝達におけるアデノシン物質の生理活性への関心が急速に高まっている。これらの知見と合わせて考えると、緑茶中の核酸として投与した有効成分も同様の作用機構によるのかもしれない。

また、高血圧自然発症ラット (SHR) の大動脈では、cyclic AMP のレベルの低下が認められており²²⁾、アデノシン物質と血圧との関連については、今後の重要な課題であると考えられる。

要 約

緑茶の熱水抽出画分における降圧活性成分を、さらに分離精製するとともに、その本体について性状の検討を行なった。

1) Sephadex G-100 によるゲル濾過では、260 nm 付近に吸収極大をもち、230 nm 付近に吸収極小をもつ C 画分に降圧作用が認められた。

2) C 画分のリボヌクレアーゼ、または、アルカリ処理後の透析内液では降圧活性が認められなかった。

3) DEAE セルロースカラムによる分画では、リボ核酸画分に降圧活性を認めた。

4) リボ核酸画分のアルカリ分解液を、Dowex 1 カラムを用いて、モノヌクレオチドに分画して投与したところ、アデニル酸画分に降圧活性を認め、グアニル酸、ウリジル酸、シチジル酸画分には認められなかった。ア

デニル酸画分は、0.23 mg/kg (体重) の投与で約 28 mmHg, 0.9 mg/kg (体重) の投与で約 42 mmHg の降圧作用を示した。

稿を終えるにあたり、貴重な示唆、ご指導を賜った香川医科大学安部陽一教授に厚くお礼申し上げます。また、終始ご援助をいただきました大阪市立環境科学研究所食品栄養課佐々木清司課長、衛生化学課山田明男課長、大垣寿美子研究員に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第 38 回日本食品衛生学会学術講演会 (昭和54年11月、仙台) において発表した。

文 献

- 1) 伊村祈年子, 明橋八郎: 栄養誌, 37, 535 (1985)
- 2) Roe, J.H.: *J. Biol. Chem.*, 212, 335 (1955)
- 3) Marrian, D.H., Spicer, V.L., Balis, M.E. and Brown, G.B.: *J. Biol. Chem.*, 189, 533 (1951)
- 4) Davidson, J.N. and Smellie, R.M.S.: *Biochem. J.*, 52, 594 (1952)
- 5) Allen, R.J.L.: *Biochem. J.*, 34, 858 (1940)
- 6) 満田久輝: 実験栄養化学, 75 (1961), いずみ書房 (京都)
- 7) Chargaff, E., Zamenhof, S.: *J. Biol. Chem.*, 173, 327 (1948)
- 8) 江上不二夫編: 蛋白及び核蛋白質, 243 (1951), 共立出版 (東京)
- 9) Otaka, E., Osawa, S., Oota, Y., Ishihama, A. and Mitsui, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 310 (1962)
- 10) 大沢省三, 堀田康雄: 蛋白質 核酸 酵素, 11, 524 (1966)
- 11) 日本化学会編: 実験化学講座 23, 292 (1957), 丸善 (東京)
- 12) 日本化学会編: 実験化学講座 23, 250 (1957), 丸善 (東京)
- 13) 水野重樹: 生物化学実験法, 69 (1969), 東京大学出版会 (東京)
- 14) 江上不二夫: 蛋白及び核蛋白質, 225 (1951), 共立出版 (東京)
- 15) 伊村祈年子, 山本 武, 明橋八郎: (未発表)
- 16) Okamoto, K. and Aoki, K.: *Jpn. Circul. J.*, 27, 282 (1963)
- 17) 伊村祈年子, 大垣寿美子, 山本 武: 日本食品衛生学会第43回学術講演会, 講演要旨集
- 18) 原 三郎: 薬理学入門, 161 (1956), 南山堂 (東京)
- 19) 垣内史郎: 蛋白質 核酸 酵素, 12, 324 (1967)
- 20) 垣内史郎: 蛋白質 核酸 酵素, 14, 336 (1969)
- 21) 黒田洋一郎: 蛋白質 核酸 酵素, 26, 28 (1981)
- 22) Hurlbert, R.B., Schmitz, H., Brumm, A.F. and Potter, Vam R.: *J. Biol. Chem.*, 209, 23 (1954)
- 23) Amer, M.S.: *Science*, 179, 807 (1973)

(昭和 59 年 2 月 18 日受理)