

マキバブラシノキ *Callistemon rigidus* のマトリックスメタロプロテアーゼ-2 阻害作用

佐々木健郎,* 小林 匡子, 川島 美香, 佐藤 絃子, 吉崎 文彦

Constituent of *Callistemon rigidus* Showing an Inhibitory Effect on Activated Matrix Metalloproteinase-2

Kenroh SASAKI,* Kyoko KOBAYASHI, Mika KAWASHIMA, Hiroko SATO, and Fumihiko YOSHIKAWA

(Received November 20, 2010)

The influence of *Callistemon rigidus* (Myrtaceae) on rat lung activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) was examined. Methanol extracts from stem and fruit showed inhibitory effects on MMP-2. Activation was induced by *p*-aminophenylmercuric acetate, and inhibition was measured by using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gelatin zymography. The IC_{50} values were 2.96 and 32.0 mg/mL, respectively. Piceatannol was isolated as the active constituent from the stem of this plant, and its IC_{50} value was 757.1 μ M.

The usefulness of *Callistemon rigidus* as a supply source of piceatannol is noted, and utility of piceatannol for the investigation of the inhibition of activated MMP-2 was also expected for the prevention and treatment of various diseases concerned with excess activation of MMP.

Key words — *Callistemon rigidus*; piceatannol; matrix metalloproteinase-2; rat lung; gelatin zymography

癌の浸潤・転移¹⁾や関節リウマチ,^{2–5)}骨粗鬆症⁶⁾及び多発性硬化症⁷⁾において、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases: MMPs) の過剰な活性化と疾患との関連性が注目され、特に MMP-2 の阻害剤はその有用性が期待されている。^{9,10)}我々は既にラット脳及び肺 MMPs 活性へのフラボンの影響を報告したが、¹¹⁾本研究では新規 MMPs 阻害剤の探索を目的とし、マキバブラシノキ *Callistemon rigidus* (Myrtaceae) 含有成分の活性型 MMP-2 の阻害作用について検討した。

実験方法

1. 使用薬物

マキバブラシノキの茎及び果実は静岡県立大学薬用植物園の植物から供与された。乾燥した茎 300 g あるいは果実 10 g を 5 倍量のメタノールにより還流冷却 (1 hr × 3) した後、溶媒を留去してエキスを得た。メタノールエキスの収量は茎で 2.82 g (9.4%)、果実で 0.0275 g (2.75%) であった。ゼラチン及び 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) は Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA), SDS-PAGE に用いる試薬は Bio-Rad Co., Ltd. (Hercus, CA, USA) から購入した。その他の試薬はナカライテスク (京都) のものを使用した。

2. 使用動物

8 週齢、200–220 g の Wistar 系雄性ラットを使用した。ラットは恒温恒湿 (25 ± 1°C, 55 ± 5%) で明期 (7:00–19:00) 及び暗期 (7:00–19:00) の環境下、固形飼料 (CE-2, 日本クレア) と水道水を自由に摂取させた。ラットを断頭後直ちに肺を摘出し、液体窒素により新鮮凍結した後 -80°C で保存した。肺組織ホモジネートの作製は前報¹¹⁾に準じた。以上の動物実験は東北薬科大学動物実験倫理規程に従って行った。

3. ゼラチンゼイモグラフィー

ゼラチンゼイモグラフィーは前報¹¹⁾の方法に準じた。肺組織を 5 倍量の Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5, 4°C) にてホモジナイズし、上清画分 (9000 × g, 4°C, 20 min) を得た。これを 0.5 mM APMA (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.5) と共に 37°C で 1 h インキュベーションした。タンパク質量は 1.0 mg/ml に設定して使用した。ゼラチンゼイモグラフィーは非還元 SDS-PAGE にて行った。APMA 処理した肺ホモジネート上清画分は 2-mercaptoethanol を除く Laemmli sample buffer に溶解し、1.0 mg/ml のゼラチンを含む 7.5% acrylamide/bisacrylamide (29 : 1) 分離ゲルにアプライし、Mini-Protein III apparatus (Bio-Rad) にて 200 V で 40 min 間 SDS-PAGE を行っ

た. 分子量マーカーには, myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) を用いた. 泳動後, ゲルは室温下 0.25% Triton X-100 で 15 min 2 回, H₂O で 10 min 洗浄し, インキュベーションバッファー [(50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-58)] 中 37°C で 18 h インキュベーションした. ゲルは rapid stain Coomassie Brilliant Blue kit を用いて染色した.

4. MMP-2 活性の定量

ゼラチンザインモグラフィーにより得た, 活性型 MMP-2 の活性を示すゲル中の分子量 66 kDa の消化痕はスキャナ (EPSON ES-2200) で PC に取り込み, 定量的画像解析法 (L Process V2.0 及び Image Gauge V4.0, FUJI PHOTOFILM Co, Ltd.) により処理した.¹¹⁾

5. MMP-2 阻害成分の単離

茎のメタノール抽出物 (2.85 g) を水に溶解してクロロホルム, 酢酸エチル, 及び *n*-ブタノールで 3 回分配し, それぞれの溶剤留去後にエキスを得た. Table 1 に収率を示す. 酢酸エチル画分 (776 mg) はクロロホルム-メタノール系でシリカゲル (ワコーゲル C-200, 和光) カラムクロマトグラフィーに付し, 得られた画分の活性型 MMP-2 阻害作用をスクリーニングして最も阻害の強かった画分から化合物 1 (無色非晶性粉末; 57.0 mg) を得た. この化合物は各種スペクトルデータの標品¹²⁾ との比較によりピセアタンノールと同定された.

6. ピセアタンノールの高速液体クロマトグラフィーによる定量

ピセアタンノールは以下の HPLC 条件下で定量した. 高圧ポンプ, モデル 600E (Waters Associates, ミルフォード (MA)); 検出器, 490E Multiwavelength Detector (Waters Associates; 305 nm); カラム, Lichro CART (Merk; 4.6 mm *i.d.* × 250 mm); 移動相, A : 5% アセトニトリル,

B : 60% アセトニトリル, グラジエント溶出 (A : B, 100 : 0 → 0 : 100; 80 分); 流速, 1.0 mL/min. 移動相はいずれもトリクロロ酢酸で pH 1.6 に調整した. カラム温度 35°C, クロマトグラムは SIC Chromatocorder 12 にて記録した (SIC). 茎 (7 mg) 及び果実 (20 mg) のメタノールエキスは, 5 mL のメタノールに溶解し, 5 μ L を HPLC に付した. ピセアタンノールの濃度 (0.04–0.14 μ g) にて最小二乗法により回帰直線式 ($y = 8.7187 \times 10^5 x + 2487.3$, $r = 0.999$) を作製した. ただし, x は化合物の絶対注入量 (μ g), y はクロマトグラムのピーク面積である.

結果及び考察

マキバブラシノキはオーストラリア原産の Myrtaceae に属する常緑の木本であり, ヨーロッパではその精油成分を含む民間薬が, 咳, 気管支炎, 及び呼吸器感染症¹³⁾ に対して用いられている. その葉,^{13,14)} 果実,¹⁵⁾ 及び種子¹³⁾ からはモノテルペノイドとセスキテルペノイドが精油成分として単離されているほか, フラボノイド¹⁶⁾ やトリテルペノイド¹⁷⁾ が葉より単離されている. 本研究では, マキバブラシノキメタノール抽出エキスによる用量依存的な活性型 MMP-2 の阻害作用がゼラチンゲルザインモグラフィーにより明らかとなり, その IC₅₀ 値はそれぞれ茎で 2.96 mg/mL, 果実で 32.0 mg/mL であった.

茎メタノールエキスを弱い活性型 MMP-2 の阻害を認めたため, エキスを水, クロロホルム, 酢酸エチル, *n*-ブタノールに分配し, 各画分の活性型 MMP-2 に対する阻害活性を検討した. 結果を Table 1 に示す. 酢酸エチル, *n*-ブタノール及び水画分に, それぞれ 0.19, 0.27 及び 0.28 mg/mL の強い阻害が認められ, クロロホルム画分には阻害は認められなかった. 酢酸エチル画分 (776 mg) はクロロホルム-メタノール混液にてシリカゲルカ

Table 1. Inhibition of MMP-2 activity by Extracts from Stems of *Callistemon rigidus*

Extract	Yield (%)	IC ₅₀
Methanol	2.75	2.96 mg/mL
Chloroform	0.85	ND
Ethyl acetate	0.68	0.19 mg/mL
<i>n</i> -Butanol	0.44	0.27 mg/mL
Water	0.64	0.28 mg/mL
Piceatannol		757.1 μ M

ND, not determined.

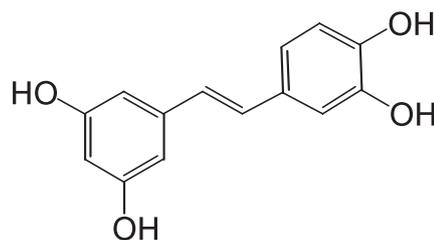


Fig. 1. Structure of Piceatannol

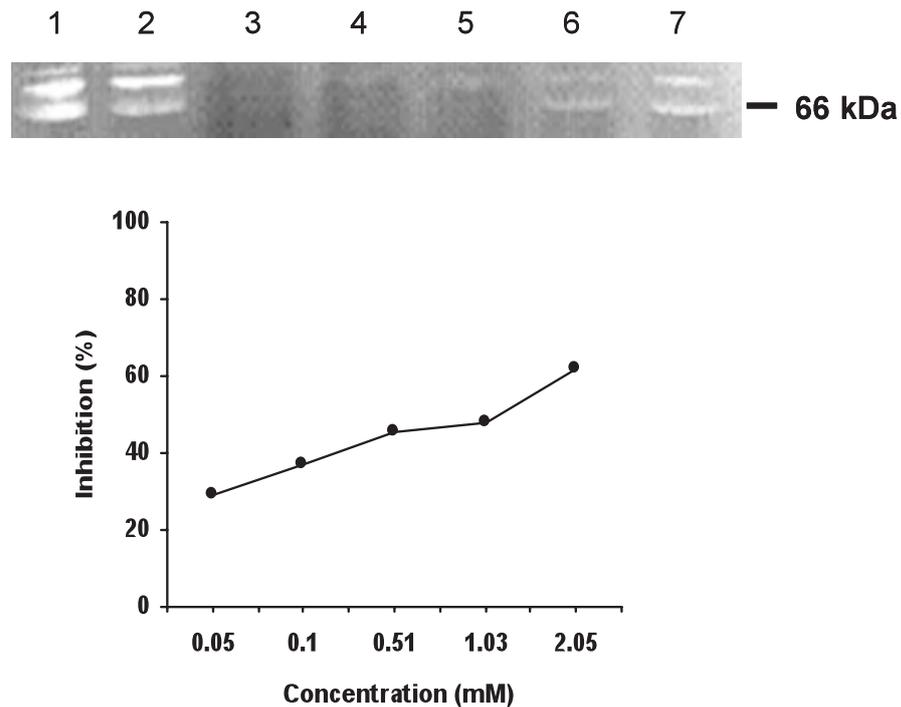


Fig. 2. SDS-PAGE Gelatin-gel Zymography of the Lung 9000×g Supernatant Fraction

Lane 1, 9000×g supernatant fraction activated by APMA; 2, with 10 mM EDTA; 3, with 2.05 mM piceatannol; 4, with 1.03 mM piceatannol; 5, with 0.51 mM piceatannol; 6, with 0.10 mM piceatannol; 7, with 0.05 mM piceatannol.

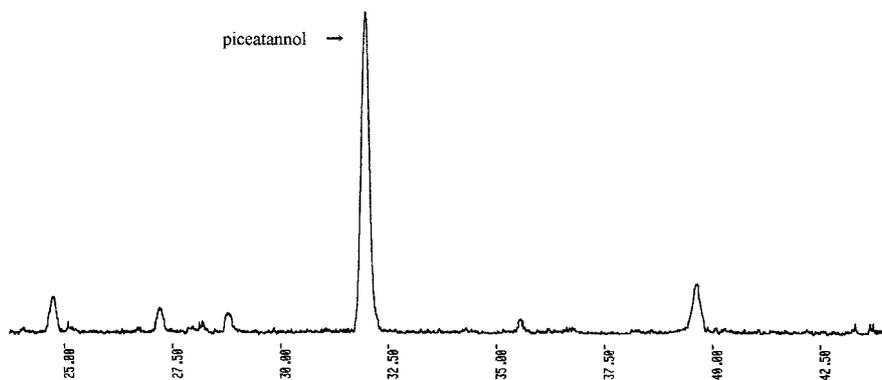


Fig. 3. Elution Profile of Methanol Extract of *Callistemon rigidus* Stem obtained by HPLC

Column, Lichro CART (4.6 mm i.d.×250 mm); mobile phase, 5% CH₃CN in H₂O acidified with trichloroacetic acid (pH 1.6) (solvent A)–60% CH₃CN in H₂O acidified with trichloroacetic acid (pH 1.6) (solvent B) (A : B, 100 : 0 → 0 : 100; 80 min); flow rate, 1.0 mL/min; detector, UV at 305 nm; column temperature, 35°C. Arrow, piceatannol.

ラムクロマトグラフィーに付し、得られた画分の阻害作用をスクリーニングし、最も阻害の強かった画分から化合物 **1** (無色非晶性粉末; 57.0 mg) を得た。この化合物は各種スペクトルデータの標品との比較から、ピセアタンノール (Fig. 1) と同定された。その活性型 MMP-2 阻害作用は Fig. 2 に示すように用量依存的であり、IC₅₀ 値は 757.1 μM であった。

ピセアタンノールは α アミラーゼ阻害作用物質¹²⁾

として同植物から既に単離されており、*Picea* sp.¹⁸⁾ だけでなく、ダイオウ、¹⁹⁾あるいはヨーロッパ産ブドウ²⁰⁾等にも含有される。しかし、いずれもその含量は少なく、ピセアタンノールの有効性に反し、その供給源として有用なものは少ない。このことから、マキバブラシノキの茎及び果実に含まれるピセアタンノールの含量を HPLC により検討した。様々な分離条件の検討の結果、Fig. 3 に示すようにピセアタンノールの良好な溶出条件を得

Table 2. Content of Piceatannol in Methanol Extracts of Stems and Fruits of *Callistemon rigidus*

Sample	Content (mg/g of methanol extract) ^{a)}	Repeatability RSD ^{b)} (%)	Intermediate precision RSD ^{b)} (%)
Stem	36.00 ± 3.16	3.29	5.14
Fruit	6.35 ± 0.91	1.49	2.20

a) all values represent the mean ± S.E. (n=9). b) relative standard deviation.

た。同条件下での茎及び果実中のピセアタンノールの含量を検討した結果を Table 2 に示す。ピセアタンノールは茎エキスに 3.6%, 果実エキスに 0.6% 含有されており, IC₅₀ 値での比較において茎は果実の 10 倍以上阻害活性が強かったが, その活性の差異はピセアタンノールの含量に依存する可能性があることが示唆された。

植物成分として, フラボノイド,²¹⁾ スチルベン,²²⁾ アントシアニン,²³⁾ エピガロカテキン,²⁴⁾ 及びタンニン²⁵⁾ が活性型 MMP-2 の阻害作用を示すことが知られている。赤ワインなどのピセアタンノールを含む食品の摂取は心血管障害の予防,^{26,27)} 及び腫瘍細胞の増殖抑制²⁸⁾ をはじめとする様々な効果があるのが既に知られている。本研究結果からピセアタンノールの供給源としてのマキバブラシノキの有用性及び活性型 MMP-2 阻害作用物質としてのピセアタンノールの有用性が示唆された。安価で容易に供給可能な新規 MMPs 阻害物質は臨床的に MMPs が関与する種々の疾患の予防及び治療において有用である可能性が高く, その供給源としてマキバブラシノキは着目に値すると考える。

REFERENCES

- 1) Deryugina E. I., Quigley J. P., *Cancer Metastasis Rev.*, **25**, 9–34 (2006).
- 2) Ahrens D., Koch A. E., Pope R. M., Steinpicarella M., Niedbala M. J., *Arthritis Rheumatism*, **39**, 1576–1587 (1996).
- 3) Blaser J., Triebel S., Maasjosthusthusmann U., Romisch J., Krahlmateblowski U., Freudenberg W., Fricke R., Tschesche H., *Clin. Chim. Acta*, **244**, 17–33 (1996).
- 4) Ohishi K., Fujita N., Morinaga Y., Tsuruo T., *Clin. Exp. Metastasis*, **13**, 287–295 (1995).
- 5) Witty J. P., Foster S. A., Stricklin G. P., Matrisian L. M., Stern P. H., *J. Bone Mineral Res.*, **11**, 72–78 (1996).
- 6) Martignetti J. A., Aqeel A. A., Sewairi W. A., Boumah C. E., Kambouris M., Mayouf S. A., Sheth K. V., Eid W. A., Dowling O., Harris J., Glucksman M. J., Bahabri S., Meyer B. F., Desnick R. J., *Nat. Genet.*, **28**, 261–265 (2001).
- 7) Hewson A. K., Smith T., Leonard J. P., Cuzner M. L., *Inflamm. Res.*, **44**, 345–349 (1995).
- 8) Maeda A., Sobel R. A., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **55**, 300–309 (1996).
- 9) Zucker S., Lysik R. M., Zarrabi H. M., Moll U., Tickle S. P., Stetler S. W., Baker T. S., Docherty A. J. P., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **732**, 248–262 (1994).
- 10) Levy D. E., Ezrin A. M., *Emerging Drugs: The Prospects for Improved Medicines*, **2**, 205–230 (1997).
- 11) Sasaki K., Tateoka N., Ando H., Yoshizaki F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 459–465 (2005).
- 12) Kobayashi K., Ishihara T., Khono E., Miyase T., Yoshizaki F., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1275–1277 (1996).
- 13) Jirovetz L., Fleischhacker W., Buchbauer G., Ngassoum M. B., *Sci. Pharm.*, **65**, 315–319 (1997).
- 14) Ogunwande I. A., Olawore N. O., Kasali A. A., Ekundayo O., Koning W. A., *J. Essential Oil Bearing Plants*, **5**, 55–59 (2002).
- 15) Siqueira N. C. S., Silva G. A. A. B., Alice C. B., Thiesen F. V., *Rev. Bras. Farm.*, **68**, 78–81 (1987).
- 16) Hashim F. H., El-Shamy A. M., Shehata A. H., *Bull. Fac. Pharm. (Cairo Univ.)*, **19**, 131–138 (1982).
- 17) Takemoto T., Yahagi N., *Yakugaku Zasshi*, **75**, 473–474 (1995).
- 18) Mannila E., Talvitie A., *Phytochemistry*, **31**, 3288–3289 (1992).
- 19) Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3501–3517 (1984).
- 20) Wolter F., Causnitzer A., Akoglu B., Stein J., *J. Nutr.*, **132**, 298–302 (2002).
- 21) Kim H. M., *J. Cell. Biochem.*, **89**, 529–538 (2003).

- 22) Gagliano N., Mosconi C., Torri C., Magnani I., Bertelli A. A., Gioia M., *Biomed. Pharmacother.*, **59**, 359–364 (2005).
- 23) Chen P. N., Chu S. C., Chiou H. L., Kuo W. H., Chiang C. L., Hsieh Y. S., *Cancer Lett.*, **235**, 248–259 (2006).
- 24) Annabi B., Lachambre M. P., Bousquet G. N., Page M., Gingras D., Beliveau R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1542**, 209–220 (2002).
- 25) Streck M., Grolach S., Podsedek A., Sosnowska D., Koziolkiewicz M., Hrabec Z., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 6447–6452 (2007).
- 26) Maxwell S., Cruickshank A., Thorpe G., *Lancet*, **47**, 347–352 (1984).
- 27) Waffo-Tegguo P., Hawthorne M. E., Cuendet M., Merillon J. M., Kinghorn A. D., Pezzuto J. M., Mehta R. G., *Nutr. Cancer*, **40**, 173–179 (2001).
- 28) Carbo N., Costelli P., Baccino F. M., Lopez-Soriano F. J., Argiles J. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 739–743 (1999).