

薬用植物中の金属含有成分 (1)¹⁾
ダツラ葉中の鉄含有成分について三野芳紀
大阪薬科大学Metal-Containing Components in Medicinal Plants (1)¹⁾
Iron-Containing Components in *Datura* Leaves

YOSHIKI MINO

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 2-10-65 Kawai, Matsubara, Osaka 580, Japan

(Received October 1, 1990)

Iron-containing components in fresh *Datura* leaves were assayed by a gel chromatography (Sephadex G-75) system with a multi-type ICP to determine the iron and other element concentrations. As a result, a large portion of the iron in the soluble and anionic protein fraction was found to exist as ferredoxin (Fd), an iron-sulfur protein. The quantity of the iron that exists as Fd corresponds to about 10–20% of the amounts of the soluble iron and to about 1% of the total iron in *Datura* leaves. The electron absorption and resonance Raman spectra of the Fds isolated from each of the four species of the genus *Datura*, *D. metel* (*D. alba*), *D. innoxia*, *D. stramonium* var. *stramonium*, and *D. stramonium* var. *tatula* suggested that the structure of the active center of *Datura* Fds is virtually the same as that of spinach Fd, namely, 2Fe-2S type. However, the analytical results of the amino acid compositions of the Fds showed considerable differences between *Datura* Fds and spinach Fd, and a slight difference among different *Datura* Fds. Therefore, the difference in amino acid composition of Fds from taxonomically closely related plants may be used as a reliable indicator for the identification of such plants.

Keywords—*Datura metel*; *Datura innoxia*; *Datura stramonium* var. *stramonium*; *Datura stramonium* var. *tatula*; iron-containing component; ferredoxin; amino acid composition; resonance Raman spectroscopy

生薬の品質やその薬効を正確に評価するためには、有機化合物と同様、その生薬に含有される無機成分についての知識も不可欠である。筆者らは、いままでに数種の生薬中の金属含量についてケイ光X線法による定量分析的な検討を行い¹⁻⁹⁾、同じ種類の生薬でも、その産地や基原植物の違いによって金属含有パターンにも違いが認められること、およびその金属含有パターンの特徴を利用して、生薬の産地や基原をある程度推定しうることを明らかにしてきた。しかしながら、生薬中の無機成分（金属含有成分）の生体に対する作用を考察するためには、量的な扱いだけではなく、その金属元素の存在状態（化学種）を明らかにする必要がある。そこで、今回は、この研究の一環として、鉄分を比較的多く含有するダツラ属植物の葉を試料として、そのなかに含まれる金属含有成分、とくに鉄含有成分を中心に、ゲル濾過法と誘導結合プラズマ発光分光分析法（Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry, 以下ICPと略す）による検討を行った。その結果、ダツラ葉中の可溶性タンパク質（アニオン性）画分中の大部分の鉄は、鉄-硫黄タンパク質の一種、フェレドキシン（Fdと略す）として存在していることを明らかにした。さらに各ダツラ葉由来 Fd の分光学的性質やアミノ酸組成についても若干の知見を得たので合わせて報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料

チ ョ ウ セ ン ア サ ガ オ (*Datura metel* (*D. alba*)), ケ チ ョ ウ セ ン ア サ ガ オ (*D. innoxia*), ヨ ウ シ ュ チ ョ ウ セ ン ア サ ガ オ

(*D. stramonium* var. *tatula*), およびシロバナヨウシュチョウセンアサガオ (*D. stramonium* var. *stramonium*) は、本学薬用植物園にて栽培したものである¹⁰⁾。

D. metel (*D. alba*) と *D. innoxia* は、後者の葉、茎などに毛茸が顕著であり、さく果の刺が長く、葉の色調がわずかに青みを帯びる点以外は、類似の外部形態を有している。

D. stramonium var. *tatula* と *D. stramonium* var. *stramonium* は、前者の茎が紫色を帯び、淡紫色の花であるのに対し、後者は、茎も黄緑色であり、白花である点を除くと、他の形態学的要素は互いに酷似している。

なお、両グループ間では、葉縁やさく果の形態等に明白な相違がみられる。

2. 実験方法

試料溶液 (可溶性タンパク質画分) の調製——各ダツラの新鮮葉約 1 kg を 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 (pH=7.5) 2.0 l にてホモジネートし、遠心分離 (7,000 g) で得た上澄液に陰イオン交換樹脂 (DE 52 [DEAE セルロース], Whatman) 20 g を加えて、一晚攪拌後、1 M NaCl 含有緩衝液 (500 ml) にて溶出した。得られた溶出液を限外濾過 (YM-05 メンブラン, Amicon) にて 10 ml に濃縮し、可溶性タンパク質画分とした。この溶液の 3 ml をゲルクロマトグラフィー (Sephadex G-75 superfine, 1.5×90 cm, 移動相: 0.1 M NaCl 含有 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 [pH=7.5], 分画サイズ: 3 ml) に附した。なお、タンパク量は 280 nm でモニターし、Fe, Ca, Mg, Cu, Zn, P および S の各元素濃度は誘導結合プラズマ発光分光装置 (ICPV-1000 S, 島津) にて測定した。

Peak II の精製——Peak II (フラクション数 35~37 本) を集め、陰イオン交換クロマトグラフィー (DE 52 1.5×20 cm, 0→1.0 M NaCl 勾配溶出, 0.02 M Tris-HCl [全量 500 ml]) を行い、鉄含有フラクションを分取した。さらに限外濾過で濃縮後、ゲルクロマトグラフィーを再度行い、最終的には、FPLC (Mono Q [HR 5/5], Pharmacia, 0→1.0 M NaCl 勾配溶出, 0.02 M Tris-HCl [全量 20 ml]) で精製し、赤褐色の純粋なタンパク質溶液を得た。

Fd の TCA (Trichloroacetic acid) 処理——約 3 mg の Fd を含む緩衝液を約 100 μ l に限外濃縮 (Centricon 10, Amicon) し、蒸留水で 5 倍に希釈した後、等量の 1.2 M TCA を加え、遠心分離にて白色の沈殿を得た。この沈殿に 0.6 M TCA (500 μ l) を加え、懸濁させた後、再度遠心分離で沈殿を得た。これに蒸留水 (500 μ l) を加え、0.1 M NaOH で中性 (pH=8~9) にし、沈殿を溶解させ、さらに等量の 1.2 M TCA を加えて攪拌し、遠心分離で沈殿を得た。この沈殿をアセトン、続いてエーテルで処理し、デシケーター内で乾燥させた。得られた粉末は、各 Fd 分子から鉄原子と不安定無機硫黄原子が除かれたアポプロテインで、アミノ酸分析の試料とした。

アミノ酸組成の分析——各 Fd (アポプロテイン, 数ナノモル) を 6 N-HCl (1% フェノール含有) 中、110°C で加水分解後、高速アミノ酸分析装置 (L 8500 型, 日立) にて測定した。

共鳴ラマンスペクトル——レーザーラマン分光光度計 (NR-1100, 日本分光) を用いた。励起波長: 488.0 nm, 温度: 15°C, 試料濃度: 2~3 mM Fd (0.05 M Tris-HCl, pH=7.5)。

ダツラ葉中の鉄含量——*D. metel* (*D. alba*) の新鮮葉約 10 g をアルミナ乳鉢で磨りつぶした後、その 2.0 g を精秤し、ろつぽに入れ、約 600°C で 6 時間加熱することにより、灰化した。冷後、6 M-HCl 1 ml を加えて、灰を溶解し、水を加えて希釈、正確に 50 ml とした。この溶液を ICP 分析に供した。

結 果 と 考 察

1. 可溶性タンパク質画分のゲルクロマトグラフィー

Fig. 1 は、*D. innoxia* の新鮮葉から抽出したタンパク質画分のゲル濾過クロマトグラフである。鉄含有成分による 3 個のピークが認められた。ピーク I は Sephadex G-75 カラムでの排除限界の位置であり、分子量 4 万以上のタンパク質と思われる。ピーク III は分子量約 5 千程度のものと推定されたが、微量のため同定には至らなかった。最も大きいピーク II は、その溶出位置より分子量約 1 万のタンパク質と推定された。このタンパク質は今回調べた他のダツラ属植物にも同様に観察され (Fig. 2), これら植物の共通成分と考えられる。

他の元素についても、4 種の植物間では、多少の差異はあるものの、基本的にはそれぞれ類似のクロマトグラムを示した。*D. metel* (*D. alba*) を例として、ICP とゲル濾過を組み合わせたクロマトグラムを Fig. 2 に示した。Ca は排除限界の位置と鉄のピーク II に相当する位置、さらに低分子側にもピークがみられた。Mg では数個の小さいピークが認められた。一方、Cu と Zn には比較的類似した傾向があり、排除限界の位置、38 本目 (フラクション数)、および低分子側にそれぞれピークが重なってみられた。中央のピークは鉄のピーク II (フラクション数, 36 本目) の溶出位置に近いが、明らかに異なる溶出位置にあらわれている。一方、S の 3 個のピークの内、中央のピークは Fe のピーク II と完全に重なっており、ピーク II は鉄と同時に硫黄をも多く含むタンパク質であることが示唆された。また、

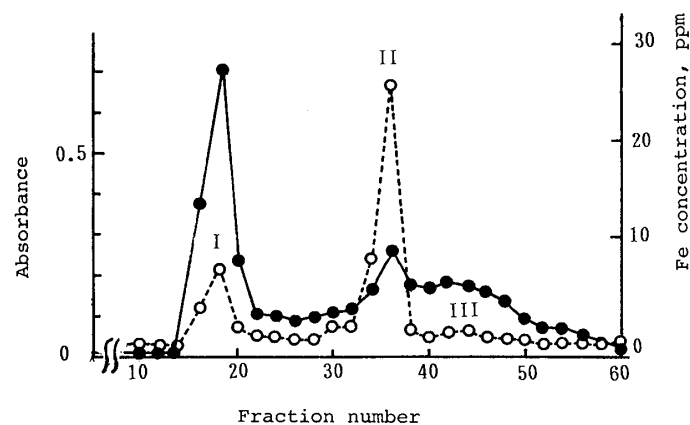


Fig. 1. Gel Filtration Chromatograms of the Soluble Protein Fraction from *Datura innoxia*

●: absorbance at 280 nm, ○: Fe concentration. Column: Sephadex G-25 (1.5 × 90 cm), mobile phase: 0.02 M tris-HCl (pH = 7.5) containing 0.1 M NaCl, fraction size: 3.0 ml, monitor: ICP (multi-type) for Fe and 280 nm (UV) for protein.

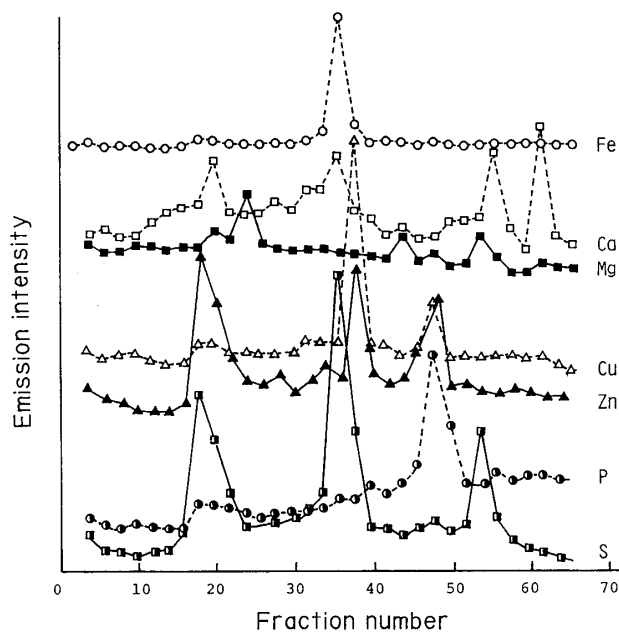


Fig. 2. Gel Filtration Chromatograms of the Soluble Protein Fraction from *Datura metel* (*D. alba*)

Monitor: ICP (multi-type) for several elements. Other chromatographic conditions were the same as in Fig. 1.

ピークⅡのフラクションが赤みがかった色彩を示すことを考え合わせると、このものは鉄-硫黄タンパクの一種である Fd の可能性が高いと推定された。

以上のように、ゲル濾過法とマルチタイプの ICP を組み合わせることで、植物中の金属含有成分を検討するための、基礎的ではあるが有用な知見が得られた。

そこで、本研究では、ピークⅡに焦点を絞り、以下に示す様な詳細な検討を行った。

2. ピークⅡ (Fd) の分光学的性質

ピークⅡのフラクションをイオン交換クロマトグラフィーで分画後、得られた鉄含有フラクションを限外濾過で濃縮することで、赤褐色の溶液を得た。さらに、ゲル濾過と Mono Q カラムを用いる FPLC で精製を行い、純粋なタンパク質を得た。この溶液の吸収スペクトルは、代表的なクロロプラスト型 Fd であるハウレンソウ Fd のスペク

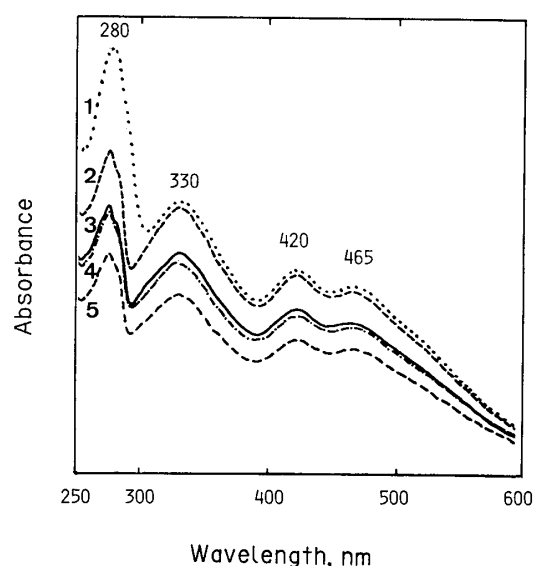


Fig. 3. Absorption Spectra of *Datura* Fds and Spinach Fd
1: Spinach Fd, 2: *Datura stramonium* var. *tatula* Fd, 3: *D. stramonium* var. *stramonium* Fd, 4: *D. metel* (*D. alba*) Fd, 5: *D. innoxia* Fd.

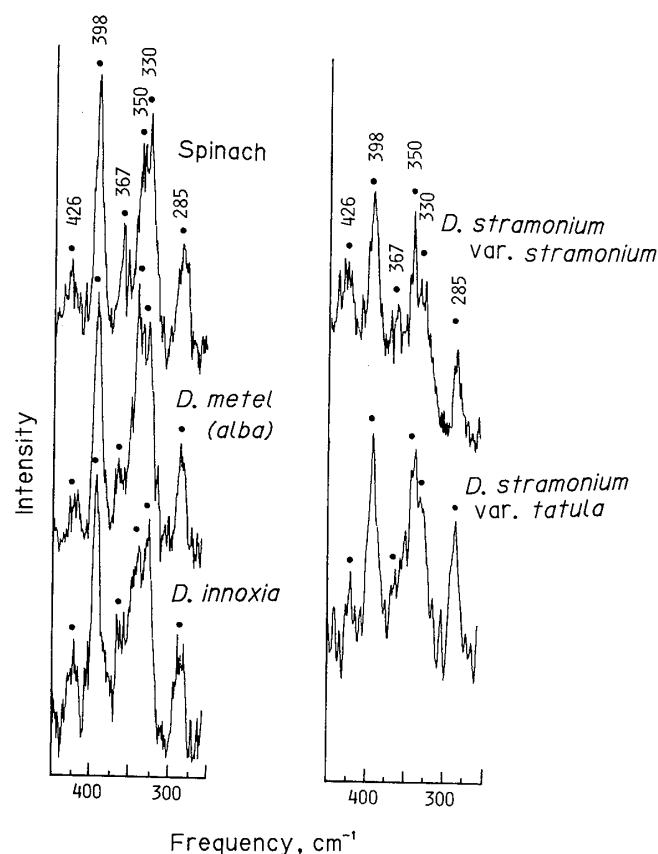


Fig. 4. Resonance Raman Spectra of *Datura* Fds and Spinach Fd
Samples were 2–3 mm in 0.05 M Tris-HCl (pH=7.5). Spectra were obtained at 15°C with 488.0 nm excitation.

トルと極めて類似しており (Fig. 2), ピークⅡはフェレドキシンであることが確認できた。さらに, 活性中心の構造に関する情報を得るため, 共鳴マランスペクトルを測定した (Fig. 3). その結果, ホウレンソウ Fd と同様に¹¹⁾, 426, 398, 367, 350, 330, 285 cm^{-1} にピークが認められることから, ダツラ Fd の活性中心はホウレンソウ Fd のそれと同

TABLE I. Amino Acid Compositions^{a)} of Spinach and Some *Datura* Fds (Apoprotein)

Amino acid	Spinach Cal. (NI)	<i>D. metel</i> (<i>D. alba</i>) Cal. (NI)	<i>D. innoxia</i> Cal. (NI)	<i>D. stram.</i> var. <i>stram.</i> Cal. (NI)	<i>D. stram.</i> var. <i>tatula</i> Cal. (NI)
Asp	12.52(13)	13.18(13)	12.99(13)	13.52(14)	14.41(14)
Thr	8.02(8)	7.63(8)	7.33(7)	7.06(7)	7.61(8)
Ser	6.61(7)*	5.05(5)	4.76(5)	4.51(5)	4.78(5)
Glu	13.09(13)	12.76(13)	12.80(13)	12.65(13)	13.03(13)
Pro	3.99(4)	5.41(5)	5.20(5)	4.95(5)	5.68(6)
Gly	7.01(7)	8.26(8)	8.27(8)	8.42(8)	8.37(8)
Ala	9.07(9)*	7.34(7)	6.64(7)	6.16(6)	6.61(7)
Val	6.90(7)*	8.66(9)	8.59(9)	8.53(9)	9.11(9)
Met	0.35(0)*	1.15(1)	0.99(1)	0.99(1)	1.09(1)
Ile	3.92(4)*	1.95(2)	1.92(2)	1.93(2)	2.01(2)
Leu	7.57(8)*	6.09(6)	5.99(6)	5.93(6)	6.18(6)
Tyr	3.99(4)	4.98(5)	4.53(5)	4.44(4)	5.01(5)
Phe	1.78(2)	2.08(2)	2.40(2)	2.38(2)	2.16(2)
Lys	4.06(4)	3.90(4)	4.08(4)	4.35(4)	4.06(4)
His	1.11(1)*	2.12(2)	2.16(2)	2.36(2)	2.16(2)
Arg	1.05(1)	2.03(2)**	2.00(2)**	1.18(1)	1.07(1)

^{a)}: Residues/molecule, Cal.: calculated value, NI: nearest integer.

* Significantly different from *Datura* Fds, ** Significantly different from the other *Datura* Fds.

様, 2 Fe-2 S 型 (クロロプラスト型) であることが確認された¹²⁾.

3. ダツラ Fd のアミノ酸組成

各ダツラ Fd のアミノ酸組成は全体的に類似していたが, ホウレンソウ Fd との比較では, 明らかな差がみられた (TABLE I). すなわち, ホウレンソウの場合, Fd 1 分子中に含まれるヒスチジン残基が 1 個であるのに対し, ダツラ Fd では 2 個のヒスチジン残基を含有しており, さらに, イソロイシン, バリン, アラニンなどの組成に差異が認められた. また, ダツラ属植物間では *Datura* 節の *metel* (*alba*) と *innoxia* はアルギニン残基が 1 個であるのに対し, *Stramonium* 節の *stramonium* var. *stramonium* と *stramonium* var. *tatula* は 2 個のアルギニン残基を構成アミノ酸として含有している点が明らかとなった. その他の二, 三のアミノ酸にもわずかな違いが推定されるが, この点については, それぞれの Fd の一次構造を解析し, 確認する必要があると思われる.

4. ダツラ葉中の鉄含量

ダツラ属植物から抽出した可溶性タンパク質画分の大部分の鉄が Fd であることが分かったが, この画分を調製する段階 (限外濾過やイオン交換樹脂による処理) で, 鉄分が失われる可能性が十分考えられる. そこで, *D. metel* (*D. alba*) を材料として調製段階ごとの溶液中の各元素濃度を ICP で分析し, その結果を TABLE II にまとめた.

鉄分は, 新鮮葉中には, 46 ppm の濃度 (100 g 中 4.6 mg) で含有されていたが, 緩衝液にて抽出されるものは, その約 10% であり, その可溶性鉄分の約 8 割は陰イオン交換樹脂を通過した. 結局, 新鮮葉中の鉄分の約 1%, 可溶性鉄分の 10~20% 程度が Fd として存在していると考えられる. その他の元素についても, Fe 同様抽出されにくいものとして, Ca と Sr があり, 逆に S, P, Cu, Zn は比較的可溶性の状態で葉中に存在していると考えられた. この結果は, いままでに調べたいくつかの生薬での各元素の溶出の傾向とほぼ一致している^{3,6,7)}.

今後, Fd 以外の可溶性鉄分についても, 検討を続ける予定である.

結 論

ダツラ属植物の葉から抽出した可溶性タンパク質画分の内, 大部分の鉄は, 鉄-硫黄タンパク質の一種である Fd として存在している. その量は, 新鮮葉中の鉄分の約 1% 程度で, 可溶性鉄分の約 1~2 割に当たる. ダツラ Fd とホウレンソウ Fd との比較では, 活性中心の構造に差は認められなかったが, そのアミノ酸組成には有意な相違がみられ, さらにダツラ Fd 間においてもわずかながら差がみられた. ダツラ属植物などの近縁植物を区別 (あるいは同

TABLE II. Contents of Several Elements at Preparation Steps for the Soluble Protein Fraction

Element	Element content (mg)			
	Origin (in 100 g of leaves)	Soluble fraction	Non-adsorbed fraction	1 M NaCl-eluted fraction
S	37	33	30	0.8
P	69	47	45	0.7
Ca	582	1.6	1.5	0.3
Fe	4.6	0.55	0.44	0.045
Cu	0.2	0.19	0.17	0.004
Zn	0.48	0.29	0.28	ND
Mg	61	3.3	3.3	ND
Sr	1.8	0.03	0.018	ND

定) する際の, 科学的な指標の一つとして, このようなアミノ酸組成の相違を利用することも興味深いと思われる。

謝 辞: 本研究にあたり, *D. metel* (*D. alba*), *D. stramonium* var. *stramonium*, *D. stramonium* var. *tatula* の苗をご提供下さった京都薬科大学薬用植物園長 松岡敏郎博士, ダツラ属植物の鑑定に際し, ご助言いただいた名城大学薬学部 野呂征男教授, ならびに終始ご指導, ご鞭撻いただいた大阪薬科大学 太田長世名誉教授に深謝いたします。

引用文献および注

- 1) 生薬の無機化学的研究 (第10報). 第9報: 三野芳紀, 生薬, **44**, 276 (1990).
- 2) Y. Mino, N. Ota, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 591 (1984).
- 3) Y. Mino, Y. Tsukioka, N. Ota, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 571 (1984).
- 4) 三野芳紀, 田中和美, 宇佐美秀子, 太田長世, 生薬, **42**, 310 (1988).
- 5) 三野芳紀, 宇佐美秀子, 井上正敏, 太田長世, 生薬, **42**, 317 (1988).
- 6) Y. Mino, N. Ota, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 709 (1990).
- 7) Y. Mino, H. Torii, N. Ota, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1936 (1990).
- 8) Y. Mino, H. Usami, N. Ota, Y. Takeda, T. Ichihara, T. Fujita, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2204 (1990).
- 9) Y. Mino, N. Ota, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2208 (1990).
- 10) 学会発表では, チョウセンアサガオ, ケイチョウセンアサガオ, ヨウシュチョウセンアサガオ, シロバナヨウシュチョウセンアサガオをそれぞれ *D. alba*, *D. metel*, *D. tatula*, *D. stramonium* と称してきたが, 現在の植物分類学の説に従い, 本文のように訂正した.
S. Satina, A.G. Avery, "Blakeslee: Genus *Datura*," A. G. Avery, S. Satina, J. Rietsema, ed., Ronald Press Company, New York, 1959.
- 11) Y. Mino, T.M. Loehr, K. Wada, H. Matsubara, J. Sanders-Loehr, *Biochemistry*, **26**, 8059 (1987).
- 12) G. Palmer, "Iron-Sulfur Proteins II," W. Lovenberg ed., Academic Press, New York, 1973.