

香辛料は神経伝達物質合成酵素を刺激するか？

植 野 洋 志 (奈良女子大学生生活環境学部教授)

1. 緒 言

γ -アミノ酪酸 (GABA) やヒスタミンは高等動物においては神経伝達物質としての作用が知られている。これらの神経伝達物質の生体内での合成は、それぞれグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) とヒスチジンデカルボキシラーゼ (HDC) が担っている (Fig. 1) が、これらの酵素の作用機構、特に酵素学的諸性質についてはまだ多くは理解されていない状態である¹⁾。その大きな理由は、GAD, HDC ともに動物組織からの精製が困難であること、精製酵素標品が不安定であること、などによる。そこでまず GAD と HDC に分けて本研究の概要を説明する。

【GAD】

GABA は代表的な抑制性神経伝達物質であるが、利尿作用、血圧上昇抑制作用、成長ホルモン誘導作用など食品成分として有効な作用も見ついている。高等動物の場合、GABA 合成は GAD のみでなされるが、近年、GAD にはアイソザイムが存在することが遺伝子の解析で明らか

となった。興味深いことに、GAD アイソザイムは臓器特異的ではなくて、一つの細胞内で両方が発現しており、その発現の様式 (発現時期と発現量) や細胞内での活性制御機構の点に違いがあることが明らかになってきた。しかし、外的因子がどのように GAD の発現や活性を制御するか、という重要な問題に対する解答は得られていない。

GAD の生体内での分布に関しては、脳など神経系を中心に報告されているが、末梢組織、特に食物の消化吸収にかかわる臓器についての報告はあまりない。しかし、ヒトが口にする食品中の大多数の遊離アミノ酸はグルタミン酸であることより、そのグルタミン酸を基質とする GAD の消化器系組織での役割は十分に考えられることであり、その解明は重要な課題となりうる。

我々は、GAD アイソザイムの一つである GAD 65 に注目し、ラット脳由来の GAD 65 cDNA をパン酵母に組込み、GAD 65 タンパク質を発現する系を作成し、GAD 65 のタンパク質化学・酵素学的研究を行う準備を整えてきた。そこで、GAD の消化器系組織での役割解明への第一歩として、食品中の有効成分と GAD の相互作用を検討することにした。具体的には、薬効成分としても知られる香辛料がはたして GAD 活性を制御するか否かの点について研究を行った。

【HDC】

ヒスタミンは GABA 同様に神経伝達物質として作用するが、さらに、アレルギーや胃酸分泌を促す物質でもある。ヒスタミンは、ヒスチジンを基質として、HDC により脱炭酸されて合成され

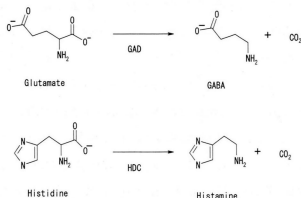


Fig. 1 Reaction scheme of GAD and HDC

る。GAD と同様にビタミン B₆ を補酵素とし、cDNA より予想されるタンパク質の一次構造の比較では、GAD と同じファミリーに属するとされている。生体内では、HDC は GAD の約 1000 分の一程度の濃度で存在するため、その精製、生化学的性質解明は困難を極める。HDC の食に関わる組織・細胞での発現はまだ詳細に検討されていないが、皮膚組織や胃には局在することが示唆されていることより、十分に食品やその添加物、もしくはその消化分解物と相互作用することは予想できる。

我々は、ヒト由来の HDC cDNA をパン酵母で発現する系を作成し、GAD 65 同様、タンパク質化学・酵素学的研究を行う準備を整えてきた。本研究では、この発現タンパク質を用いて、香辛料との相互作用を検討した。

2. 実験方法

2.1 材料および試薬

培地成分、比活性測定用試薬には、ナカライテスク(株)、和光純薬(株)の特級品を用いた。グルタミン酸、GABA、ヒスチジン、ヒスタミンは和光純薬より購入した。香辛料は、ハウス食品(株)ソマテックセンター 鳴神寿彦氏より提供いただいた。プロテアーゼ阻害剤は、Complete protease inhibitor cocktail tablets を Roche 社より、Halt protease inhibitor cocktail kit を Pierce 社より購入した。タンパク質定量には、BioRad 社製プロテインアッセイキットを使用した。その他の試薬は特に断りのない限り、市販特級品を用いた。

2.2 供試菌株および培養条件

GAD 65 発現株はラット脳由来の GAD 65 cDNA を組み込んだパン酵母、pWIG 32-1²⁾ を、HDC 発現株はヒト好塩球白血病細胞 KU-812-F 由来の cDNA を組み込んだパン酵母、pWIH 32

-2³⁾ を用いた。

培地は、GAD の発現には、前培養を YPD もしくは SD (-W) 培地で、本培養は YPA もしくは SA (-W) 培地で行った。YPD 培地の組成は、2 % pepton, 1 % yeast extract, 2 % glucose, YPA 培地の組成は、2 % pepton, 1 % yeast extract, 2.74% sodium acetate, SD (-W) 培地の組成は、0.003% L-leucine, 0.002% L-histidine, 0.002% adenine sulfate dihydrate, 0.002% uracil, 0.67% yeast N₂ base w/o amino acid, 2 % glucose, SA (-W) 培地の組成は、0.003% L-leucine, 0.002% L-histidine, 0.002% adenine sulfate dihydrate, 0.002% uracil, 0.67% yeast N₂ base w/o amino acid, 0.04% casamino acid, 2.74% sodium acetate anhydrous である。5 リットル用三角フラスコに 2 リットルの液体培地を入れオートクレーブ後、振とう培養器 (イノーバ 4330) にて 28°C で本培養を行った。GAD の培養は定常状態まで、HDC の培養は対数増殖期まで成長させてから集菌した。

2.3 粗酵素液の調整

菌体は -80°C で保存し、解凍後、菌体重量の約 2 倍量の lysis buffer に懸濁し、ビードビーター (Biospec 社) で破砕した。遠心分離後、得られた上清を粗抽出液とした。粗抽出液は、Pharmacia desalting column にてゲルろ過することで脱塩と不純物である蛍光物質を除去した。ゲルろ過溶液は、粗酵素液として本研の香辛料との反応に供した。

Lysis buffer は、1 mM 2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide, 0.5 mM pyridoxal 5'-phosphate, 0.1 mM dithiothreitol, 1 mM ethylenediamide tetracetate dihydrate, 60 mM potassium phosphate buffer, pH 7.1 の組成にプロテアーゼ阻害剤を

加えたものを用いた。HDC の場合には、さらに安定化 solution として、1% polyethylene glycol 300 を加えた。

2.4 香辛料抽出画分の調整

香辛料（粉末状）はそれぞれ水抽出画分とエタノール抽出画分とに分けて調整した。香辛料 0.3 g に 1.5 ml の蒸留水または 70% エタノールを加え、一時間超音波をあて十分に攪拌した後、ミニディスクローターで一晩攪拌抽出した。その後、遠心分離し、上清を香辛料抽出画分とした。抽出日から 1 日目と 4 日目のものを実験に用い、その間、室温暗所に放置した。抽出液の pH は弱酸性の 5.6 前後であったが、反応液中での緩衝液の働きで pH 7.1 にコントロールできることを確認した。今回の実験では、抽出された香辛料成分の濃度計算はしていない。

2.5 GAD 活性への香辛料成分の効果の判定法

基質であるグルタミン酸と GAD を反応させる際、香辛料抽出画分を加えたときと加えなかったときとで生成する GABA 量を比較した。GABA の定量は、陽イオン交換カラム（資生堂 Capcell pak SCX UG 80）をつないだ HPLC を用いて行った。カラムは 0.1 N クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 3.3 で平衡化し、溶出した GABA は OPA によるポストカラム誘導法にて蛍光ラベルして検出した。GABA 量は、スタンダードとの面積比較にて定量化した。香辛料抽出画分を加えなかったときの活性を 100% として、それよりも大きな値は活性化、小さな値は不活性化として評価した。

2.6 HDC 活性への香辛料成分の効果の判定法

香辛料抽出画分の HDC 活性に与える効果は、HDC 活性測定時に香辛料抽出画分を加えることで、生成するヒスタミン量の変化を定量的に測定

することで評価した。ヒスタミンの定量は、反応液を陽イオン交換樹脂（Amberlite CG 50, 0.5M sodium phosphate buffer, pH 6.5 にて平衡化）を入れたカラムに通し、順次未反応のヒスチジン、反応生成物のヒスタミンをそれぞれ 0.1 N, 0.5 N HCl 溶液で溶出し、OPA による蛍光ラベル誘導を行ったものを蛍光検出計（励起波長 355 nm, 蛍光波長 440nm）で定量した。

2.7 タンパク質定量

タンパク質定量は Bradford 法に基づく Bio Rad 社のプロテインアッセイキットを用いて行った。サンプル 25 μ l を試験管にとり、アッセイ試薬を 1.25 ml 加え、室温で 30 分間反応させ、595 nm での吸光度を測定した。結果は、血清アルブミンを対象とした検量線により求めた。

3. 結果

3.1 GAD 活性におよぼす香辛料抽出画分の効果

Fig. 2 に 36 種類の香辛料水抽出画分の GAD 活性に対する効果をまとめた。図はコントロールの GAD 活性を 0 とし、活性化、阻害の度合いをパーセントで示している。水溶性抽出画分には、抽出した香辛料の種類によって、GAD を活性化するものと阻害するものがみられた。

Clove, mustard には強い GAD 阻害活性が認められ、anise, paprika, caraway, fennel などには顕著な活性化の効果が認められた。Fig. 2 には示していないが、mustard と tarragon の水溶性画分には内在性の GABA を検出した。

抽出 1 日目と、抽出画分を 4 日間暗所に保存したものが活性に与える効果も示してある。その結果、抽出画分の GAD 活性に与える効果は、必ずしも 1 日目と 4 日目では一致しないことが判った。特に、red pepper や basil では 4 日目の活性が顕著に高まり、逆に allspice などでは阻害効果

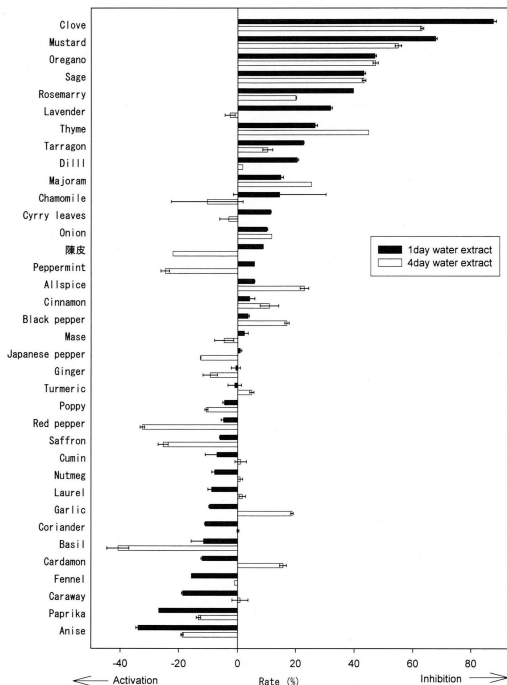


Fig. 2 Effects of spice water extracts on GAD activities.

が高まった。また、peppermintやcardamonでは1日目と4日目の効果が逆になった。香辛料の水抽出画分は、時間が経過することで酸化など何らかの成分変化がおこっている可能性がある。

Fig. 3に36種類の香辛料エタノール抽出画分のGAD活性に対する効果をまとめた。Coriander以外は1日目の抽出液において全て阻害を示した。全体的に水抽出画分と比べると、阻害する

傾向が見られた。GAD阻害因子は、香辛料の油性成分中に多く存在することを示唆するものである。さらに、水抽出画分とは異なって、1日目と4日目とは似た傾向を示した。

3.2 HDC活性におよぼす香辛料抽出画分の効果

Fig. 4に17種類の香辛料水抽出画分のHDC活性に対する効果をまとめた。図はコントロールの

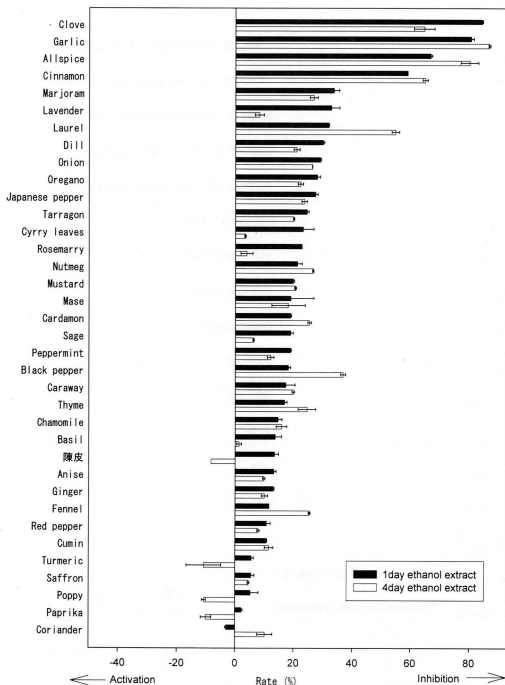


Fig. 3 Effects of spice ethanol extracts on GAD activities.

HDC 活性を 0 とし、活性化、阻害の度合いをパーセントで示している。その結果、GAD と同様に、香辛料成分の HDC 活性に与える効果は非常に多様であった。Clove, rosemary, sage の水抽出画分はほぼ 100 % 近い阻害を示した。その反面、red pepper, nutmeg は顕著な活性化を示した。また、paprika, garlic, ginger のように活性への影響をほとんど示さないものもあった。

Fig. 5 には、エタノール抽出画分の HDC 活性に対する効果をまとめた。水抽出画分と同様に多様な活性化や阻害のパターンが得られた。Nutmeg, cinnamon, allspice より抽出画分は高い阻害活性を示した。Garlic, cumin, peppermint の抽出画分は活性化を示した。興味深いことには、rosemary, paprika, bayleaf においては、4 日目の抽出画分において阻害活性の上昇が観察され

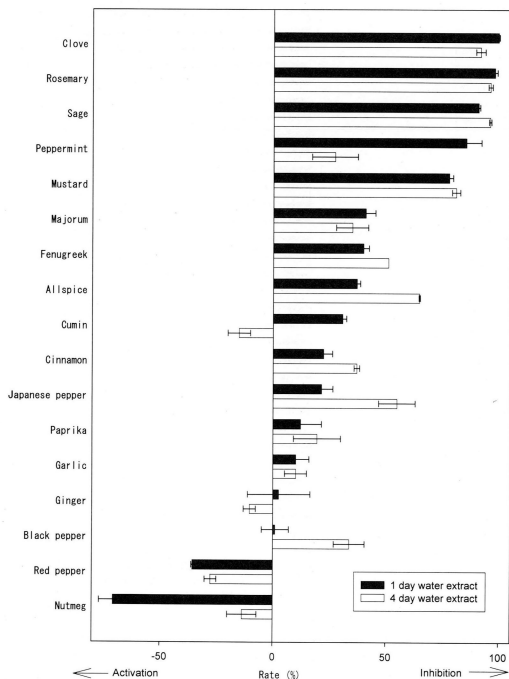


Fig. 4 Effects of spice water extracts on HDC activities.

た。また、nutmeg においては、水抽出画分とエタノール抽出画分の効果が逆転した結果が得られた。

4. 考 察

生体内での神経伝達物質の合成を制御することは、神経伝達物質の供給面をコントロールすることになり、生理的には神経伝達経路のコントロー

ルにつながるであろう。しかし、近年の生化学的研究により、神経伝達物質は、神経系に働くだけでなく、細胞の代謝系でも重要な役割を担っていることが明らかになってきた。例えば、GABA はヒトの成長ホルモンを誘発させることができる。また、ノックアウトマウスの研究^{4,5)}より、GAD のアイソザイムである GAD 67 を欠損させたマウスでは、上顎の口蓋形成ができずに生後すぐに死

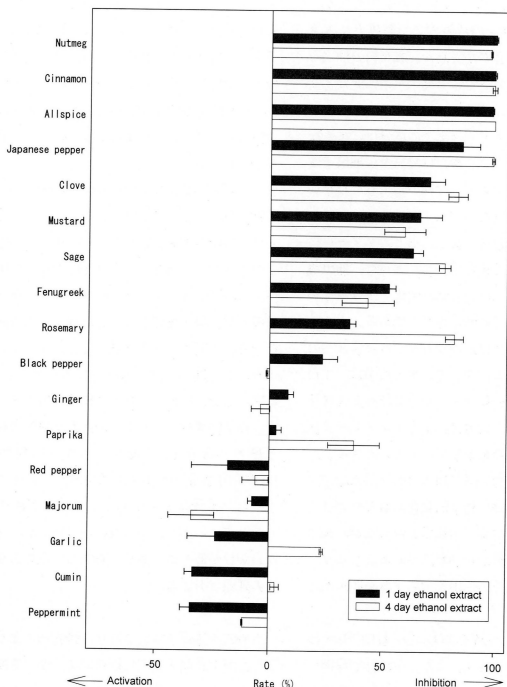


Fig. 5 Effects of spice ethanol extracts on HDC activities.

に至ることから、発生のある段階で未知の役割を担うことが示唆されている。HDC の場合は、ヒスタミンがアレルギーや胃酸分泌にかかわることより、より代謝系に大きな役割を担っていることは想像できる。今回の研究においては、GABA とヒスタミンの合成を活性化したり、阻害する因子を天然物より見出そうとするもので、研究を始めるまでは、まだ一般にはその重要性が認識され

るに至っておらず、なんらの予備的研究成果の報告を見出せない状態であったことを記しておきたい。もし、天然物成分が GAD や HDC の活性制御に関与するならば、恒常的に食したり、使用する香辛料・漢方薬・化粧品などは GABA やヒスタミン合成に少なからず影響をおよぼすことは必定である。

今回の実験結果より、香辛料の水およびエタ

ノール抽出画分は、*in vitro*での系であるが、GABAとヒスタミン合成酵素に予想以上に大きな影響を与えたことが示された。香辛料の抽出を水とエタノールに分けたことは、水溶性成分と油性成分として区分けすることを目的としたもので、あくまでもスクリーニング上での区分けにすぎない。油性成分をエタノールだけで完全に抽出できているとは考えておらず、今回の結果もそれを加味して考える必要はある。

我々の実験の特色は、まず、水とエタノールにて抽出した画分での比較であり、さらに、抽出溶液をフレッシュな1日目と空気酸化を受けたであろう4日目に分けて比較したことである。水とエタノール抽出画分では、かなり異なった活性への効果が得られたこと、そして、多くの場合、4日間放置した抽出画分はフレッシュな場合は異なった結果を示した。前者は、水とエタノールでは、極性の異なる成分を抽出していることを意味し、後者は、成分の酸化や成分同士の相互反応などがおきる事で有効成分に化学的変化がおきたと考えられる。今回は、室温での抽出を行ったが、産業界では水抽出は湯煎法が一般的であることより、熱水もしくは温水での抽出を考慮する必要があると考えている。

いったいどういう成分がGAD・HDCの活性化・阻害に関与するのか、また、その反応機構はどのようなものであるのか、さらには、成分間での整合性があるのか、という疑問が今回の結果から導き出される。これらに対する答えは、今後の研究の進展によってもたらされると考えるが、今回用いた香辛料には、植物由来のものがほとんどであることより、植物学的な分類、葉・茎・根・花・種などのクラス分けをして効果の傾向の有無を検討した。その結果、活性化や阻害に関して、共通の要因は見つけることはできなかった。今後、抽出画分をHPLCにかけて分離し、各成分（フ

ラクション）の活性への影響をモニターしながら、成分の精製を行うことで、より明白な結論を導けるものとする。油性成分については、すでに解析され報告されているものが多数あるために、これらを試験することは重要である。しかし、成分の組み合わせによる相乗効果も考慮する必要があると思われる。

今回の研究で、香辛料は神経伝達物質の活性を大きく左右することが判明した。この事実を踏まえて、次なる課題は、果たしてGADやHDCはこのような香辛料成分と相互作用できる場所に存在するのであろうか、という問いであろう。舌・食道・胃・腸・皮膚などにどれほどのGADが存在するかに関する報告はほとんど存在しないことより、この問いに対する回答はまだない。HDCに関しては、皮膚・胃にての発現が報告されており、香辛料成分により十分に活性が制御されることは考えられる。食品アレルギーの何割かはHDCの活性化が原因である可能性も示唆できる。さらに、生体にとってGAD・HDCを活性化することが良いのか、不活性化が良いのか、という問いかけがあろう。非常に興味ある点であり、今後の課題と考える。

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に深く感謝いたします。また、香辛料サンプルをご提供くださいましたハウス食品(株)ソマテックセンターの鳴神寿彦博士に謝意を表します。さらに、本研究に協力を頂きました当研究室学生諸君（浅井麻衣子、大下樹里、榎間清佳、藤根深枝）に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ueno, H. (2000) *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 10, 67-79

- 2) Kanai, T., Atomi, H., Umemura, K., Ueno, H., Teranishi, Y., Ueda, M., and Tanaka, A. (1996) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 759-765
- 3) Ueno, H., Kanai, T., Atomi, H., Ueda, M., Tanaka, A., Ohtsu, H., Yamauchi, K., and Watanabe, T. (1998) *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys.* **2**, 141-146
- 4) Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R.-G., Ji, F. Y., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., and Obata, K. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 891-895
- 5) Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R.-G., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., and Obata, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6496-6499

Do Spices Really Act on Neurotransmitter-Synthesizing Enzymes ?

Hiroshi Ueno (Laboratory of Applied Microbiology and Biochemistry, Nara Women's University)

γ -Amino butyric acid (GABA) and histamine are inhibitory neurotransmitters for higher animals. GABA and histamine are synthesized by L-glutamate decarboxylase (GAD) and histidine decarboxylase (HDC), respectively. Due to the significance of GABA and histamine in the neuronal functions, there are high demands to have novel agents capable to control the catalytic function of GABA- or histamine-synthesizing enzyme. GABA has a hypotensive activity and histamine is involved in allergy and ulcer. Both of these biological activities have become a target for health-related food components. Unfortunately, because of difficulty in isolating pure GAD and HDC from tissue samples, only a limited study is performed to find compound(s) exhibiting any influence on GAD or HDC activity. It is of our aim to search compounds inhibiting or enhancing GAD or HDC activity from spices. For the first step, we have prepared recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing rat brain GAD65 and human HDC ; namely, pWIG32 and pWIH3, respectively. Currently, we are able to produce highly active enzymes in a reasonable quantity with these recombinant strains. By using the recombinant enzyme preparations, enzymatic activity was measured in the presence and absence of spice extracts, either water or ethanol extracted. As a result, both water and ethanol extracts of spices, 39 kinds for GAD and 17 kinds for HDC, were found to exhibit vast effects on GAD and HDC activities. About a half of water extracts exhibited some activation effects on GAD, whereas only few showed activation effects for ethanol extracts. In case of HDC, water extract of nutmeg and red pepper exhibited strong activation and ethanol extract of peppermint, cumin, garlic, marjoram and red pepper exhibited significant level (20-40%) of activation. In general, majority of ethanol extracts tended to inhibit both GAD and HDC activities. In this study, we found that spice extracts can affect enzymatic activity for both activation and inhibition. It is of great interests to find out if direct interaction of spice components and GAD or HDC would be possible *in vivo*.