

## ヒスチジンデカルボキシラーゼ活性に及ぼす 香辛料抽出物の阻害効果の検討

大下 樹里, 沖上 裕美\*, 新田 陽子\*\*, 植野 洋志\*\*

(元奈良女子大学大学院生, \*奈良女子大学大学院人間文化研究科,

\*\*奈良女子大学生生活環境学部)

原稿受付平成 18 年 9 月 15 日; 原稿受理平成 18 年 12 月 2 日

### Evaluation of Inhibitory Effects of Spice-Derived Natural Extracts on Histidine Decarboxylase

Juri OHSITA, Hiromi OKIGAMI,\* Yoko NITTA\*\* and Hiroshi UENO\*\*

*Graduate School of Human Culture, Nara Women's University, Nara 630-8506*

*\*Graduate School of Human Culture, Nara Women's University, Nara 630-8506*

*\*\*Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University, Nara 630-8506*

This study examines the inhibitory activity of spice extracts on histidine decarboxylase which synthesizes histamine, a bioactive amine participating in gastrointestinal ulcer and allergy ailments. It was found that most of both the water and ethanol extracts affected the enzymatic activity, the majority exhibiting inhibitory activity, although the degree of inhibition varied widely. Cinnamon, allspice, and Japanese pepper were strong inhibitors among the ethanol extracts, with the water extracts of cinnamon, allspice and Japanese pepper also exhibiting strong inhibition, together with other extracts from sage, bayleaf, rosemary, *etc.* Ethanol and water as the solvents had an opposing effect on some of the spice extracts. For example, the water extract of peppermint was inhibitory, while the ethanol extract enhanced the enzyme activity. Individual known components of the ethanol extracts of various spices were examined for their inhibitory effect on histidine decarboxylase, most of them exhibiting inhibition, although not as strongly as the crude extracts. An additive effect of spice components may be important for this inhibition. We demonstrate that it was possible to identify suitable inhibitor(s) of histidine decarboxylase by using our evaluation method. The inhibitors found by our method may be used as anti-allergic agents without any severe side effects. Food components having anti-allergic and anti-ulcer properties are also highly desirable with future development.

(Received September 15, 2006; Accepted in revised form December 2, 2006)

**Keywords:** histidine decarboxylase ヒスチジンデカルボキシラーゼ, histamine ヒスタミン, inhibition 阻害, spice 香辛料.

#### 1. 緒 論

ヒスタミンは動物, 植物, 微生物に広く分布する生理活性アミンである. その役割については, まだ不明瞭な点が多い. 高等動物の生体内では, ヒスタミンの合成は, 主に肥満細胞や好塩基球細胞に存在するヒスチジンデカルボキシラーゼ (histidine decarboxylase: HDC) の作用により行われる. 基質はアミノ酸であるヒスチジンであり, 合成されたヒスタミンの多くは細胞内顆粒に貯留され, その後, 抗原抗体刺激などの

作用により細胞外に放出される. ヒスタミンの生理作用は, H1, H2, H3 あるいは H4 などのヒスタミン受容体に結合することで発揮されると考えられている<sup>1)</sup>. ヒスタミンの三大薬理作用として, 1. 血管透過性亢進, 2. 平滑筋収縮, 3. 胃酸分泌, があり, 古くから食中毒<sup>1)</sup>や胃潰瘍<sup>2)</sup>のほか, 喘息, 蕁麻疹, 鼻炎等のアレルギー症状<sup>3)</sup>が知られている. また, 最近では, これら三大薬理作用の他, 中枢神経系における記憶, 学習, 摂食活動<sup>3)~5)</sup>から, てんかん<sup>6)7)</sup>, 不安

症<sup>8)</sup>まで、様々な作用も注目されている。これらの薬理作用のうち胃酸分泌の促進、神経伝達、癌細胞や骨髄細胞の増殖促進作用などは、ヒスタミン産生細胞内で合成された後直ちに細胞外へ放出される“新生ヒスタミン”によるものであることが明らかになってきており<sup>9)</sup>、これらの作用は受容体への結合を阻害するのみならずその合成酵素の活性を阻害し、ヒスタミン産生を抑えることによって、強く制御されると考えられる。従来、抗ヒスタミン剤はヒスタミンの受容体への結合阻害を目的としてきたが、過剰の遊離ヒスタミンが、不特定の受容体と結合することでおきる副作用などにより今日では、抗アレルギー薬の多くがヒスタミンの細胞からの遊離を抑制する作用を目標としている。なかでもヒスタミンの遊離がバラ抽出物<sup>10)</sup>、シソ抽出物<sup>10)</sup>、茶<sup>11)~13)</sup>、柿の葉抽出物<sup>14)</sup>などをはじめとした多くの植物エキスによって抑制されることが報告されており、自然界よりの成分活性には、特に注目されている。

このように、ヒスタミンの遊離を抑制することは過剰なヒスタミンの放出を妨げ、副作用を低減する効果が期待できる。そこで、これらのヒスタミン遊離抑制物質がヒスタミン合成酵素に作用し、果たしてヒスタミンの合成機能を制御するか否かを検討することは、既述の様々な生理・薬理作用の多様な制御につながると思われる。しかし、ヒスタミン合成酵素である HDC の活性制御については、カテキンや醤油成分によって阻害されるなど限られた報告があるのみである<sup>14)~17)</sup>。これは HDC の基礎研究や薬理研究を進める上では必須となる HDC の精製が極めて困難であるということが一因であり、この問題の解決が必要とされてきた。

そこで、本研究では、HDC 活性を制御する因子を植物エキスより探索することを目的に、ヒト由来 HDC を組換え酵母に発現させた HDC タンパク質を用いて HDC の活性に及ぼす香辛料由来の抽出物の影響について検討した。日常の食品素材として使用される香辛料よりヒスタミン合成酵素を阻害する成分を見出すことは意義深いと考えられる。

## 2. 実験方法

### (1) 試薬

Histamine dihydrochloride, L-histidine hydrochloride は和光純薬社製を用いた。その他の試薬は市販の特級を用いた。

### (2) 香辛料

実験に用いた香辛料は、ハウス食品株式会社ソマティックセンターより提供していただいたものを使用した。

### (3) 香辛料抽出エキス

香辛料(粉末状)をそれぞれ 0.3 g 量りとり、蒸留水、またはエタノール 1.5 ml を加え、ミニディスクローターで一晩攪拌抽出した。その後、遠心分離を行い、得られた上清を香辛料試料とした。

### (4) 試菌株および培養方法

菌株はヒト好塩基球白血病細胞 KU-812-F 由来の HDC を組み込んだパン酵母 pWIH32-2<sup>8)</sup>を用いた。YPD 培地 (1% peptone, 2% yeast extract, 2% glucose) で前培養を行い、その後、SA (-W) HDC 誘導培地 (0.003% L-leucine, 0.002% L-histidine hydrochloride, 0.002% adenine sulfate dihydrate, 0.002% uracil, 0.67% yeast N<sub>2</sub> base w/o amino acids, 0.04% casamino acid, 2.74% sodium acetate anhydrous, pH 6.0) を用いて本培養を行った。誘導条件は文献<sup>8)</sup>を参照して行った。培養された菌を集菌し、菌体容量の 2 倍量の lysis buffer (1 mM 2-aminoethylisothiouonium bromide hydrobromide (AET), 0.5 mM pyridoxal-5' phosphate (PLP), 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM ethylenediamide tetraacetate dehydrate (EDTA), in 60 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8), HDC 安定化溶液 (0.01 mM PLP, 0.2 mM DTT, 0.5 mM EDTA, protease inhibitor, 1% PEG #300) を加え、ビードビーター (Biospec 社製) にて冷却しながら破碎した。菌体を破碎した液を遠心分離機にかけ (10,000 rpm, 30 min) その上清を粗酵素液として回収した。回収された粗酵素液は Sephadex G-25 Superfine (Amersham Pharmacia 製) によってゲルろ過を行い、これにより得られたタンパク質分画を HDC 活性測定に用いる粗酵素液とした。

### (5) HDC 活性測定法

HDC の活性測定は Ohmori ら<sup>19)</sup>の方法を用いた。酵素に香辛料試料を加えたものに基質を含むアッセイミクスチャーを加えることにより酵素反応を開始した。反応液 (1 ml) 中には 100 μmol potassium phosphate buffer (pH 6.8); 0.01 μmol pyridoxal 5'-phosphate; 0.2 μmol dithiothreitol; 20 mg polyethyleneglycol #300; 0.8 μmol L-histidine; 0.2 μM aminoguanidine と酵素、香辛料試料液を含み、37℃で1時間反応させた。ここで、酵素の液量はできるだけ高い活性を与えるために 800 μl とし、(2)で得られた香辛料抽出試料

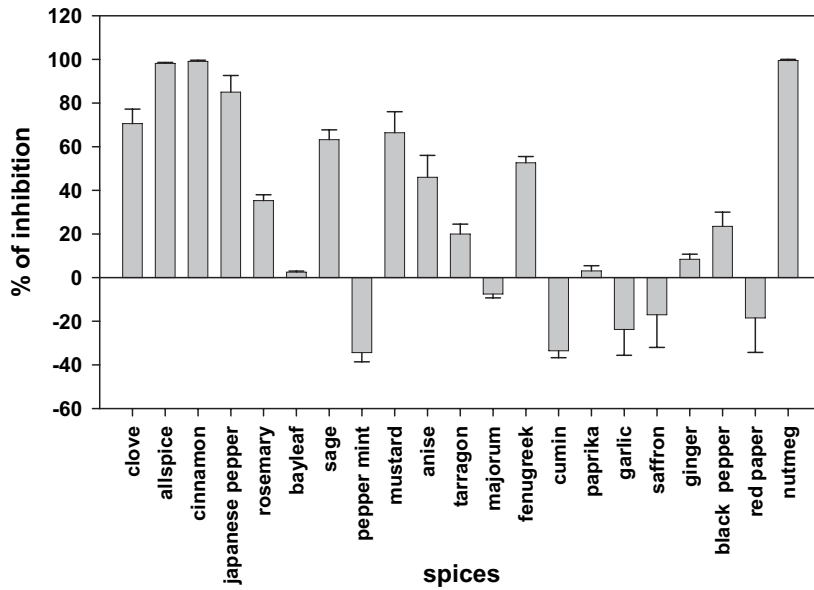


Fig. 1. Inhibitory effects on HDC activity of ethanol extract of spices

HDC was mixed with spice-derived ethanol extract and incubated for 1 h at 37°C. The amount of histamine produced for the sample with or without PCA was taken as 0% and 100%, respectively. Values are the average of 3 independent samples (mean ± SD).

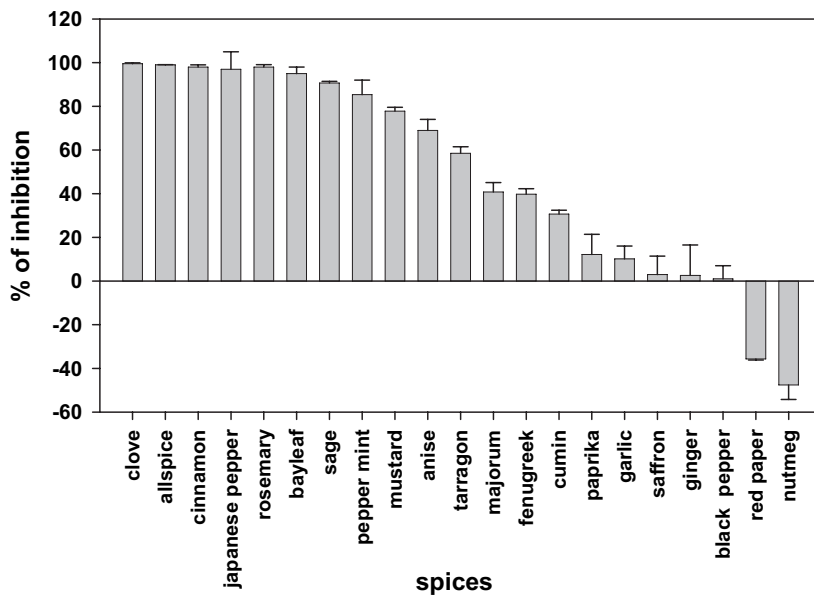


Fig. 2. Inhibitory effects on HDC activity of water extract of spices

HDC was mixed with spice-derived water extract and incubated for 1 h at 37°C. The amount of histamine produced for the sample with or without PCA was taken as 0% and 100%, respectively. Values are the average of 3 independent samples (mean ± SD).

Table 1. Essential oils in spices

Family	Spices	Effect on HDC activity (-: inhibition) (+: activation)		Essential oil									
		Ethanol sample	H <sub>2</sub> O sample	Eugenol	Pinene	Limonene	Cineole	Pherandrene	Borneol	Others			
Lamiaceae	Majorum	+	-		*		*						Terpineol
	Peppermint	+	-		*	*	*						<i>l</i> -Menthhol
	Rosemary	-	-		*	*	*			*			*
	Sage	-	-		*	*	*			*			*
Solanaceae	Paprika	+ -	+ -										
	Red pepper	+	+										
Compositae	Tarragon	-	-							*			Methoxyallyl benzene estragole
	Black pepper	-	+ -		*	*	*			*			
Piperaceae	Nutmeg	-	+	*	*	*	*			*			
	Bayleaf	+ -	+	*	*	*	*			*			
	Cinnamon	-	-	*	*	*	*			*			Cinamic aldehyde
	Mustard	-	-										
Brassicaceae	Japanese pepper	-	-			*				*			Dipentene
													Allyl isothiocyanate
Myrtaceae	Clove	-	-	*									
	Allspice	-	-	*			*			*			
Umbelliferae	Anise	-	-		*		*			*			Anetole
	Cumin	+	-			*				*			
Liliaceae	Garlic	+ -	+ -			*				*			Allicin
	Saffron	+ -	+ -		*		*			*			Safranal
Zingiberaceae	Ginger	+ -	+ -		*		*			*			Zingerone
													Shogaol
Fabaceae	Fenugreek	-	-										

Known essential oil components in the spice extracts are summarized.<sup>21)</sup> The HDC inhibitory effects of each spice were indicated. The inhibition is shown as '-', and the activation is shown as '+',

は 40  $\mu$ l に統一して行った。40  $\mu$ l の 60% perchloric acid (PCA) を加えて反応を停止し、反応液を 10,000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清中のヒスタミン生成量を測定した。この条件で酵素粗抽出液は約 12 pmol/min の活性を示した。生成したヒスタミンは Amberlite CG-50 (Type I, Na<sup>+</sup> form) で分離し、*o*-phthalaldehyde (OPA) 法<sup>20)</sup>にて測定した。生成したヒスタミンは、既知の濃度で作製した標準ヒスタミン溶液を Amberlite CG-50 にて溶出させ、その蛍光強度との比較定量をした。OPA 誘導アミノ酸の検出には、励起波長 (Excitation) 355 nm, 蛍光波長 (Emission) 440 nm を用いた<sup>20)</sup>。

### 3. 結果および考察

計 21 種類の香辛料のエタノール抽出試料、水抽出試料についての結果をそれぞれ Fig. 1, Fig. 2 に示す。酵素反応を行った試料溶液 (1 ml) に含まれるヒスタミン量から、酵素反応開始前に PCA 添加した試料に含まれるヒスタミン量 (ブランク) を差し引いた値を 100% (1 時間当たり生成したヒスタミン量) として、香辛料抽出試料による相対的な阻害率を算出した。

エタノール抽出試料についてはナツメグ、シナモン、オールスパイス、山椒、クローブが HDC 活性をほぼ完全に阻害したことをはじめとし、多くの香辛料抽出試料において、HDC 阻害活性が認められた。一方、唐辛子、マジョラム、ペパーミントなど、一部の試料については、HDC の活性化が認められた。

水抽出試料についてはエタノール抽出試料で HDC 阻害活性を示した多くの試料と同様に阻害活性が認められた。しかし、ナツメグは、エタノール抽出試料は強い HDC の活性の阻害効果を示したが、水抽出試料ではむしろ HDC の活性化を促進した。一方、マジョラム、ペパーミント、クミン、ガーリック、サフランでは、水抽出試料は HDC の活性の阻害効果を示したが、エタノール抽出試料ではむしろ HDC 活性を促進していた。この結果は香辛料の成分の相互作用、安定性の問題などによるものではないかと考えられる。

さらに、これらの香辛料を植物学的分類に基づいて分類し、既知の香辛料成分 (精油成分) と HDC の活性阻害効果についてまとめた (Table 1)。その結果、エタノール抽出試料で HDC 阻害効果を示したナツメグ、シナモン、オールスパイス、クローブに、香油成分としてオイゲノールが共通して含まれていることがわかった。このことからオイゲノールが、HDC の活

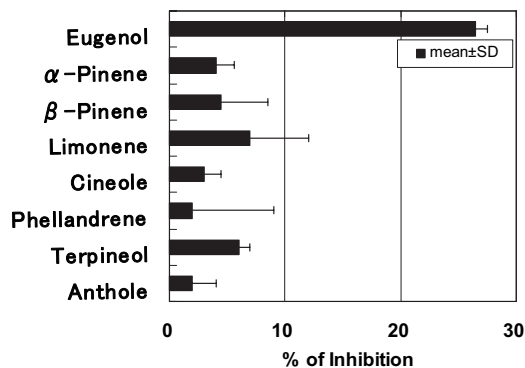


Fig. 3. Inhibitory effects on HDC activity of essential oil

HDC was mixed with various essential oils and incubated for 1 h at 37°C. The amount of histamine produced for the sample with or without PCA was taken as 0% and 100%, respectively. Values are the average of 3 independent samples (mean  $\pm$  SD).

性に影響を及ぼしていることが示唆された。

そこで、次にこれら既知の精油成分の精製標品を用いて、その HDC 活性に対する阻害効果を検討した。結果は Fig. 3 に示す。オイゲノールは単独でも HDC 活性阻害効果を示した。このときに用いたオイゲノールの量 (約 3 mg) は、クローブに含有されていると思われる量の約 3 倍程度であったが、香辛料抽出液に匹敵する強い阻害効果ではなかった。このことから、オイゲノールなどの精油成分は単独では HDC 阻害活性を強く示さないことが考えられる。他の微量成分などの精油成分間の相加相乗作用が HDC の活性阻害に効果があるのか、有効成分が他に存在することが考えられる。

### 4. まとめ

HDC 活性阻害作用をもつ香辛料抽出物由来の因子の探索のため、21 種の香辛料について HDC 活性阻害作用の検討を行った。これらの香辛料が組換え体酵母 pWIH32-2 株の産生した HDC のヒスタミン合成に及ぼす効果を観察した。その結果、エタノール抽出試料については、ナツメグ、シナモン、オールスパイス、山椒、クローブをはじめとし、多くの試料が高い HDC 活性阻害効果を示した。一方、唐辛子、マジョラム、ペパーミントでは HDC の活性を促進する傾向が確認された。また、水抽出成分についても同様の検討をした結果、エタノール抽出成分と同様に HDC の

活性を阻害する傾向にあった。しかし、ナツメグについてはそのエタノール抽出試料は強い HDC 活性阻害効果を示す一方で、水抽出試料ではむしろ HDC 活性を促進した。

以上の結果から香辛料が HDC の活性に影響を及ぼすことが明らかになった。香辛料抽出画分によって HDC の活性が変化したことは興味深く、HDC の生体内における機能は、食物を摂取することにより、制御される可能性を示唆できる。これらの成分を解明することによって、ヒスタミンの生合成を制御する物質の研究開発につながると考える。ヒスタミンの遊離を阻害するだけでなく、その生合成そのものを制御する物質の発見は、抗アレルギー剤のような医薬品に幅広い選択性を供し得る重要な研究課題である。今後、香辛料のみならず、同じく天然物である生薬についても同様に、検討を進めていく予定である。

本研究の一部は、浦上食品・食文化振興財団よりの研究助成金によりサポートされました。

#### 引用文献

- 1) Lehane, L.: Update on Histamine Fish Poisoning, *Med. J. Aust.*, **173**, 149-152 (2000)
- 2) Hung, C. R., and Wang, P. S.: Role of Histamine and Acid Back-Diffusion in Modulation of Gastric Microvascular Permeability and Hemorrhagic Ulcers in *Salmonella typhimurium*-Infected Rats, *Life Sci.*, **74**, 2023-2036 (2004)
- 3) Hill, S. J.: Distribution, Properties, and Functional Characteristics of Three Classes of Histamine Receptor, *Pharmacol. Rev.*, **42**, 45-83 (1990)
- 4) Wada, H., Inagaki, N., Itow, N., and Yamatodani, A.: Histaminergic Neuron System in the Brain: Distribution and Possible Functions, *Brain Res. Bull.*, **27**, 367-370 (1991)
- 5) Brown, R. E., Stevens, D. R., and Haas, H. L.: The Physiology of Brain Histamine, *Prog. Neurobiol.*, **63**, 637-672 (2001)
- 6) Scherkl, R., Hashem, A., and Frey, H. H.: Importance of Histamine for Seizure Susceptibility, *Agents Actions Suppl.*, **33**, 85-89 (1991)
- 7) Vohora, D., Pal, S. N., and Pillai, K. K.: Histamine and Selective H3-Receptor Ligands: A Possible Role in the Mechanism and Management of Epilepsy, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **68**, 735-741 (2001)
- 8) Rizk, A., Curley, J., Robertson, J., and Raber, J.: Anxiety and Cognition in Histamine H3 Receptor-*I*-Mice, *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 1992-1996 (2004)
- 9) Yatsunami, K., Fukui, T., and Ichikawa, A.: Molecular Biology of L-Histidine Decarboxylase, *薬学雑誌*, **114**, 803-822 (1994)
- 10) 青柳光敏, 藤本 啓, 姉帯正樹, 兼俊明夫, 矢野昭起: 北海道産植物のヒスタミン遊離抑制効果, *道衛研所報*, **47**, 46-51 (1997)
- 11) Matsuo, N., Yamada, K., Shoji, K., Mori, M., and Sugano, M.: Effect of Tea Polyphenols on Histamine Release from Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3) Cells: The Structure-Inhibitory Activity Relationship, *Allergy*, **52**, 58-64 (1997)
- 12) Yamashita, K., Suzuki, Y., Matsui, T., Yoshimaru, T., Yamaki, M., Suzuki-Karasaki, M., Hayakawa, S., and Shimizu, K.: Epigallocatechin Gallate Inhibits Histamine Release from Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3) Cells: Role of Tyrosine Phosphorylation Pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **274**, 603-608 (2000)
- 13) Ohmori, Y., Ito, M., Kishi, M., Mizutani, H., Katada, T., and Konishi, H.: Antiallergic Constituents from Oolong Tea Stem, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 683-686 (1995)
- 14) Kotani, M., Fujita, A., and Tanaka, T.: Inhibitory Effects of Persimmon Leaf Extract on Allergic Reaction in Human Basophilic Leukemia Cells and Mice, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **52**, 147-151 (1999)
- 15) Kataoka, S.: Functional Effects of Japanese Style Fermented Soy Sauce (Shoyu) and Its Components, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 227-234 (2005)
- 16) Kinoahita, E., and Saitou, M.: Novel Histamine Measurement by HPLC Analysis Used to Assay Histidine Decarboxylase Inhibitory Activity of Shoyuflavones from Soy Sauce, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1488-1491 (1998)
- 17) Shakila, R. J., Vasundhara, T. S., and Rao, D. V.: Inhibitory Effect of Spices on *In Vitro* Histamine Production and Histidine Decarboxylase Activity of *Morganella morganii* and on the Biogenic Amine Formation in Mackerel Stored at 30°C, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **203**, 71-76 (1996)
- 18) Ueno, H., Kanai, T., Atomi, H., Ueda, M., Tanaka, A., Ohtsu, H., Yamauchi, K., and Watanabe, T.: Expression of Human Histidine Decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, **2**, 141-146 (1998)
- 19) Ohmori, E., Fukui, T., Imanishi, N., Yatsunami, K., and Ichikawa, A.: Purification and Characterization of L-Histidine Decarboxylase from Mouse Mastocytoma P-815 Cells, *J. Biochem.*, **107**, 834-839 (1990)
- 20) Shore, P. A., Burkhalter, A., and Cohn V. H., Jr.: A Method for the Fluorometric Assay of Histamine in Tissues, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182-186 (1959)
- 21) 武政三男:『スパイス百科事典』, 三秀書房, 横浜 (1981)