

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750049

研究課題名(和文) アレルギー疾患の予防を目指したリポキシゲナーゼ阻害食品の探索

研究課題名(英文) Search of foods inhibiting lipoxygenase for prevention of allergic disease

研究代表者

川上 祐生 (Kawakami, Yuki)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：30453202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、増加しているアレルギー疾患の増悪化に関わる生理活性脂質であるロイコトリエンの合成系に着目し研究を行った。このロイコトリエンの合成に関わる酵素である5-リポキシゲナーゼを阻害できる機能性食品成分を探索したところ、香辛料の1つであるナツメグに含まれる成分が本酵素を効果的に阻害することを見出し、その成分の同定、効率的な抽出方法の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：5-Lipoxygenase is an enzyme that catalyzes formation of leukotrienes. Leukotrienes are implicated in inflammatory processes and allergic reaction such as asthma. We evaluated the inhibitory effect of various foods on 5-lipoxygenase activity. We found that nutmeg contained a potent inhibitor of 5-lipoxygenase. We identified an inhibitor of 5-lipoxygenase in nutmeg and established an efficient extraction protocol.

研究分野：食品生化学

キーワード：リポキシゲナーゼ 食品 抗アレルギー作用

## 1. 研究開始当初の背景

近年、気管支喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の罹患率は、先進国を中心として増加傾向にあり、我が国でも気管支喘息は国民全体では約 800 万人、花粉症を含むアレルギー性鼻炎は国民の 4 割以上、アトピー性皮膚炎は国民の約 1 割が罹患しているとされ、その対策は急務となっている。アレルギー疾患の発症機序や原因分子などは、いまだ十分に解明されているとは言えず、治療の中心は抗原回避と抗炎症薬などの薬物療法による対症療法が中心となっているのが現状である。

ロイコトリエンは 5-リポキシゲナーゼによりアラキドン酸から生成され、血管透過性亢進や気管支収縮などの生理作用を持つ炎症性脂質メディエーターである。ロイコトリエンは細胞膜上に存在するそれぞれのロイコトリエン受容体に結合し、種々の生理作用を発揮する。実際、ロイコトリエン受容体の拮抗薬は気管支喘息の効果的な治療薬として臨床的に使用されている (Barnes et al., *Thorax*, 52, 523-527, 1997)。また、5-リポキシゲナーゼ阻害薬は、ロイコトリエンの合成を抑えることで、気管支喘息を抑制することが知られている (Wenzel et al., *Ann. Pharmacother.*, 30, 858-864, 1996)。最近では、マウスを用いた動物実験によりアトピー性皮膚炎の増悪化にロイコトリエンが関わり、その働きを抑えることによりアトピー性皮膚炎が改善する可能性が示されている (Oyoshi et al., *PNSA*, 109, 4992-4997, 2012)。従って、ロイコトリエンの生成を抑えることにより抗アレルギー作用がもたらされると考えられる。

## 2. 研究の目的

香辛料は、食嗜好性を高めるだけでなく、生体調節機能についても注目され、その潜在的可能性は極めて高い。ショウガやワサビなどの香辛料抽出物では抗アレルギー作用が報告されているが、5-リポキシゲナーゼ阻害の観点から抗アレルギー作用を解明しようとする研究はほとんどない。そこで本研究では、香辛料の 5-リポキシゲナーゼ阻害効果を調べ、ロイコトリエンの産生を抑制する成分について検討する。さらに、さらに、その抗アレルギー作用を細胞実験と動物実験で解明することにより、食品によるアレルギー疾患の予防の実現を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 香辛料抽出物の調製

市販の香辛料 8 種類をそれぞれ 1 g ずつ秤とり、50%エタノールを 20 ml 加えて、振とう抽出を行った。この抽出液を濃縮乾固後、10 mg/ml の 50%エタノール溶液として調製し、実験に用いた。

### (2) 酵素の調製

5-リポキシゲナーゼはラット好塩基球由来 RBL 細胞、白血球型 12-リポキシゲナーゼは白血球型 12-リポキシゲナーゼを過剰発現させたマウスマクロファージ由来 J774A.1 細胞、血小板型 12-リポキシゲナーゼはヒト血小板、シクロオキシゲナーゼ-1 とシクロオキシゲナーゼ-2 はそれぞれの酵素を過剰発現させたヒト大腸癌 COLO320DM 細胞から調製した。

### (3) 酵素活性測定

各種酵素活性測定は、以前の報告に従って行った (Kawakami et al., *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 80, 239-245, 2009, Kawakami Y et al., *Food Chem*, 131, 1069-1075, 2012.)。

5-リポキシゲナーゼの酵素反応は、100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で、CaCl<sub>2</sub> と ATP の存在下で行った。阻害剤と酵素をプレインキュベーションした後、基質であるアラキドン酸と 30 で 5 分間反応させ、その後還元型グルタチオンとグルタチオンペルオキシダーゼを加えてヒドロペルオキシドの還元を行った。HCl の添加で反応を停止させ、15-ヒドロキシエイコサジエン酸 (内部標準) の添加を行った。これに、氷冷したジエチルエーテルを加えて脂質抽出した後、上層のジエチルエーテル層を回収し、窒素ガスでジエチルエーテルを蒸発させて HPLC 移動相に再溶解させたものを HPLC 分析試料とした。

白血球型 12-リポキシゲナーゼの酵素反応は、100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で行った。阻害剤と酵素をプレインキュベーションした後、基質であるアラキドン酸と 30 で 5 分間反応させた。血小板型 12-リポキシゲナーゼの酵素反応は、100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で行った。阻害剤と酵素をプレインキュベーションした後、基質であるアラキドン酸と 37 で 30 分間反応させた。その後のヒドロペルオキシドの還元、内部標準の添加、脂質抽出、HPLC 分析試料の調製は上記の 5-リポキシゲナーゼと同様の操作を行った。

シクロオキシゲナーゼ-1 およびシクロオキシゲナーゼ-2 の酵素反応は、100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で、ヘマチンとトリプトファン存在下で行った。阻害剤と酵素をプレインキュベーションした後、基質としてリノール酸を用い、24 で 5 分間反応させた。内部標準の添加、脂質抽出、HPLC 分析サンプルの調製は上記の 5-リポキシゲナーゼと同様の操作を行った。

HPLC 条件は以下の通りである。移動相：メタノール/水/酢酸=80/20/0.01 (v/v)、カラム：COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm、粒子サイズ 5 μm、ナカライテスク社) 流速：1 ml/min、検出器：UV235 nm。

#### (4) ナツメグ抽出物に含まれる阻害成分の精製

ナツメグの 50%エタノール抽出液を濃縮乾固した後、30%メタノールに再溶解し、メタノール 30%から 100%のリニアグラジエントを用いた逆相 HPLC (Inertsil ODS-3 カラム (GL Sciences 社)) で分画した。5-リポキシゲナーゼ阻害が認められた画分について、75%メタノールを用いた逆相 HPLC (COSMOSIL Cholester カラム (ナカライ社)) に供し、ナツメグ抽出物中に含まれる阻害成分の精製を行った。

#### 4. 研究成果

##### 香辛料による 5-リポキシゲナーゼ阻害効果

検討した 8 種類の香辛料の 50%エタノール抽出物について、5-リポキシゲナーゼ阻害効果を検討したところ、ナツメグの 5-リポキシゲナーゼ阻害効果が最も強く、その IC<sub>50</sub> は 1.9 μg/ml であった (図 1)。

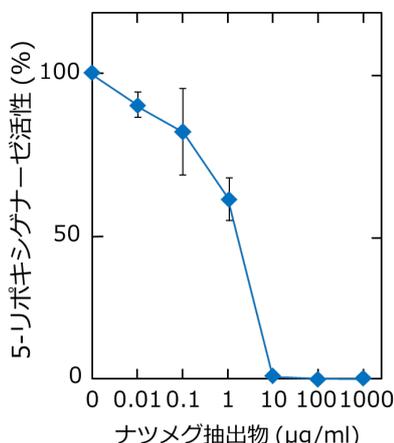


図 1 ナツメグ抽出物による 5-リポキシゲナーゼ阻害効果

##### ナツメグに含まれる 5-リポキシゲナーゼ阻害成分の精製

ナツメグの 50%エタノール抽出物に含まれる 5-リポキシゲナーゼ活性の阻害成分を明らかにするために阻害成分の精製を行った。ナツメグの 50%エタノール抽出物を 30%メタノールに再溶解し、これをメタノール 30%から 100%のリニアグラジエントで ODS カラムを用いた逆相 HPLC により 2 分ごとに分画すると、溶出時間 46 分から 48 分の画分に比較的強い 5-リポキシゲナーゼ阻害効果が確認された。この溶出時間 46 分から 48 分の画分を 75%メタノールで COSMOSIL Cholester カラムを用いた逆相 HPLC により分画すると、溶出時間 18.8 分のピークに強い 5-リポキシゲナーゼ阻害効果が確認された。このピークに含まれる化合物の最大吸収波長は 272 nm と 342 nm であった。

##### 阻害成分の構造解析

5-リポキシゲナーゼを阻害するピークに含

まれる化合物について、<sup>1</sup>H-NMR および高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析装置によるスペクトル解析を行った。その結果、分子量 358 のジアリルノナノイド化合物と同定した。

##### 阻害成分における酵素阻害の特異性

ナツメグに含まれる 5-リポキシゲナーゼ阻害成分の 5-リポキシゲナーゼ、白血球型 12-リポキシゲナーゼ、血小板型 12-リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-1、シクロオキシゲナーゼ-2 に関して阻害効果を検討した。その結果、5-リポキシゲナーゼおよび血小板型 12-リポキシゲナーゼ、白血球型 12-リポキシゲナーゼに対して阻害効果を確認した (図 2)。それぞれの IC<sub>50</sub> は、5-リポキシゲナーゼが 0.08 μM、血小板型 12-リポキシゲナーゼが 0.16 μM、白血球型 12-リポキシゲナーゼが 0.56 μM であった。また、シクロオキシゲナーゼ-1、シクロオキシゲナーゼ-2 に対しての阻害効果は見られなかった (図 2)。

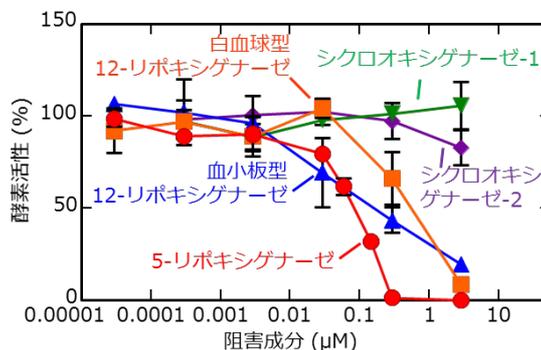


図 2 阻害成分による各種アラキドン酸代謝酵素の酵素活性への影響

香辛料の一種であるナツメグを 50%エタノールで抽出した抽出物は、5-リポキシゲナーゼ活性を阻害する成分が含まれていることを明らかとした。5-リポキシゲナーゼはロイコトリエンの合成に関わるが、ロイコトリエンの生理的作用として、I 型アレルギー発症時に気管支の収縮や血管透過性の亢進などが知られている。ナツメグの 50%エタノール抽出物が 5-リポキシゲナーゼ活性を阻害することから、これらの作用を抑制し、I 型アレルギーによる炎症を抑制する可能性があることが考えられる。今後、ナツメグに含まれる 5-リポキシゲナーゼ阻害成分の I 型アレルギーの喘息を予防する効果について、実際にモデル動物などを用いて確認していく必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5 件)

川上祐生、森香子、岡本憲典、大河内脩

史、金山友紀、金子由季、神崎圭太、山本登志子、木本眞順美、山下広美、伊東秀之、高橋吉孝「ナツメグに含まれる5-リポキシゲナーゼ阻害成分の探索」、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター（札幌市）

川上祐生、森香子、岡本憲典、大河内脩史、金山友紀、金子由季、神崎圭太、山本登志子、木本眞順美、山下広美、伊東秀之、高橋吉孝「Myristica fragrans 成分による 5-リポキシゲナーゼ阻害効果」、BMB2015、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド（神戸市）

川上祐生、伊東秀之、高橋吉孝「炎症性脂質メディエーター合成系を標的とした抗アレルギー作用を有する機能性食品の探索研究」、第 6 回川崎医科大学 学術集会、2015 年 8 月 1 日、川崎医科大学（倉敷市）

川上祐生、山本登志子、伊東秀之、高橋吉孝「生理活性脂質の合成阻害を介した抗アレルギー作用を有する機能性食品の探索」、OPU フォーラム 2015、2015 年 5 月 29 日、岡山県立大学（総社市）

Yuki Kawakami, Yoshiko Mori, Kensuke Okamoto, Shuji Okochi, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Masumi Kimoto, Hiromi Yamashita, Hideyuki Ito, Yoshitaka Takahashi「Inhibitory effect of nutmeg extracts on 5-lipoxygenase activity」、12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), May 15, 2015, Pacifico Yokohama (Yokohama).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川上 祐生 (KAWAKAMI, Yuki)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：30453202