

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00815

研究課題名(和文) 香辛料成分による IL-1 分泌抑制機構の解析

研究課題名(英文) Inhibition of the extracellular export of mature IL-1beta by spice extracts

研究代表者

小倉 裕範 (Ogura, Yasunori)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：60304557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は花椒、桂皮、八角、クローブの抽出液がカスパーゼ1の活性化、プロIL-1の切断、GSDMDの活性化に影響せずに、成熟IL-1の細胞外輸送のみを阻害することを見出した。つまり香辛料抽出物はGSDMDの作用よりもより下流の過程を阻害すると推測された。これらの香辛料に共通して含有されると予想されたガロタンニンの活性を検討した結果、タンニン酸混合物が香辛料抽出物と同様の活性を持つことを確認した。しかし、1,2,3,4,6-ペンタガロイルグルコースには活性を確認できず、タンニン酸混合物中の特定の構造をもった分子種のみが特異的に成熟IL-1の細胞外輸送のを阻害しているものと推測された。

研究成果の概要(英文)： We have found that extracts of 4 spices, i.e. Chinese pepper, cinnamon, Chinese star anise and clove inhibit secretion of IL-1beta from macrophages without affecting either of activation of caspase-1, cleavage of pro-IL-1beta or activation of GSDMD. This finding suggested that the extract of these spices inhibits the extracellular transport of mature IL-1beta at the downstream of GSDMD.

We then tested the activity of tannic acid on the IL-1beta secretion because all these spices were speculated to contains gallotannin. As a result, we have confirmed that commercially available tannic acid specimens has the same activity as the extracts of the spices, but 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucose does not. This suggested that a certain molecular species containing galloyl glucose may specifically inhibit the extracellular transport of mature IL-1beta.

研究分野：細胞生物学、免疫学

キーワード：炎症制御 IL-1 香辛料

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、種々の香辛料抽出物をスクリーニングし、花椒、桂皮、八角の水抽出液が、培養マクロファージからの炎症性サイトカインIL-1の分泌を抑制することを見いだした。さらにこれらの香辛料の抽出液はいずれも、既知のIL-1分泌促進因子であるカスパーゼ1の作用には影響しないことを確認した。つまり、これらの香辛料抽出液中にはIL-1分泌阻害因子が含まれており、それらは細胞中の未知の標的分子に作用して成熟IL-1の細胞外輸送過程を阻害していることを示唆した。

## 2. 研究の目的

香辛料抽出物によるIL-1分泌抑制機構を解明するために次の3つの目標を立てた。

目標(1) 香辛料抽出液に含まれるIL-1分泌阻害因子を単離・同定すること。

目標(2) 花椒抽出液に曝露された細胞内でのカスパーゼ1およびIL-1の細胞内局在、これらの輸送に関する細胞内物質輸送系(細胞内骨格、細胞内小胞、オートファジー調節機構)の変化の検討。

目標(3) 花椒抽出液が作用する細胞側因子の同定。

## 3. 研究の方法

### 目標(1)

香辛料抽出液に含まれるIL-1分泌阻害因子の単離・同定のためには、花椒抽出液を液体クロマトグラフィーの手法で分画し、阻害活性のある分画を絞り込んでいくこととした。

### 目標(2)

花椒抽出液に曝露された細胞内での変化を検出するためには生化学的解析および顕微鏡による形態学的解析を想定した。

### 目標(3)

花椒抽出液が作用する細胞側因子の同定には(1)で単離されたIL-1分泌阻害因子が直接結合する細胞由来分子を探索することとした。

## 4. 研究成果

### 目標(1)

申請者は種々の香辛料をスクリーニングし、花椒、桂皮、八角の水抽出液がIL-1の分泌を抑制することを見いだしたが、これにくわえ、クローブの水抽出物もIL-1の分泌を抑制することを確認した(図1)。

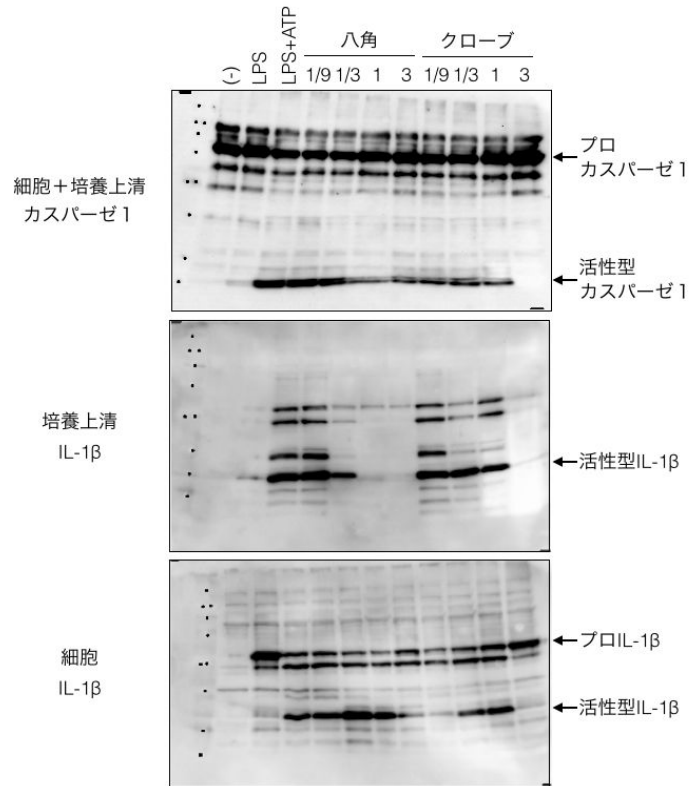


図1 マウスマクロファージ系培養細胞株 RAW-ASC を LPS と ATP で順次刺激するとカスパーゼ1の活性化、プロIL-1の切断、成熟IL-1の細胞外輸送が起こる。この系において、LPS刺激後、ATP刺激前に細胞をある一定量以上の量の香辛料集出物に曝露すると、カスパーゼ1が活性化され、プロIL-1が切断されているにもかかわらず、成熟IL-1が細胞外に輸送されていないことが見いだされた。

これらの香辛料に共通して豊富に含有され、スクリーニングで当該活性のなかった香辛料にはわずかに含有されない化合物を文献的に予想したところ、ガロタンニンが候補として挙げられた。そこでクロマトグラフィーによる分画に先立ち、市販のタンニン酸標品の活性を検討した。その結果、タンニン酸標品もまた香辛料抽出物と同様の活性を有することが確認された(図2)。

この結果より、上記4種の香辛料抽出物のIL-1細胞外輸送阻害活性は、香辛料中に含まれ、水で容易に抽出される、ガロイルグルコースを含有する化合物である可能性が考えられた。そこで、1,2,3,4,6-ペンタガロイルグルコースの活性を検討したが、これは香辛料抽出物とは異なり、カスパーゼ1の活性化を阻害した(図3)。

1,2,3,4,6-ペンタガロイルグルコースがカスパーゼ1の活性化を阻害する機構は不明であり、大変興味深い知見であるが、本研究ではタンニン酸標品による成熟IL-1の細胞外輸送機構の阻害に注目することとした。

現在、タンニン酸標品から責任物質を純化することを目指し、タンニン酸標品の分画を遂行中である。

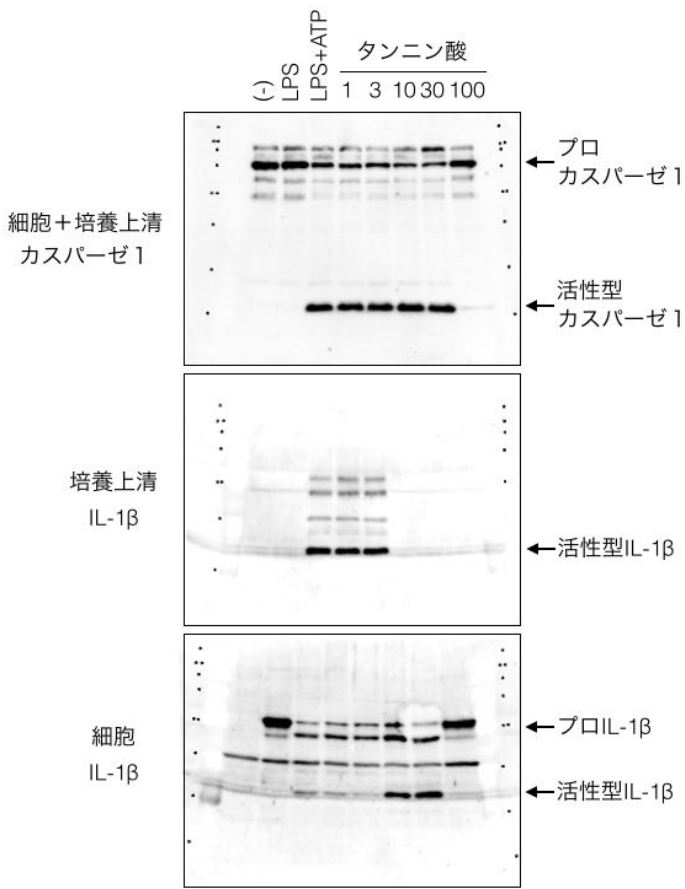


図2 図1と同様の実験系において、LPS 刺激後、ATP 刺激前に細胞をある一定量以上の量のタンニン酸に曝露すると、カスパーゼ1が活性化され、プロIL-1 が切断されているにもかかわらず、成熟 IL-1 が細胞外に輸送されていないことが見いだされた。

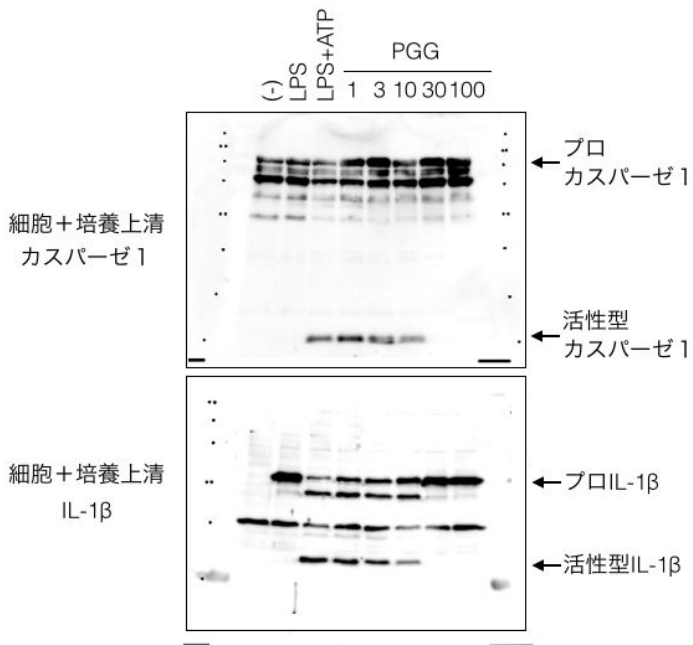


図3 図2と同様の実験系において、細胞をタンニン酸の代わりにペンタガロイルグルコース (PGG) に曝露すると、カスパーゼ1の活性化が阻害され、プロIL-1 の切断も検出されなかった。

## 目標(2)

香辛料抽出物およびタンニン酸標品がカスパーゼ1の活性に影響しないこと、またプロIL-1の切断に影響しないこと、またカスパーゼ1の活性化に伴って細胞内局在を変えるASCタンパク質の挙動に影響しないことを確認した(図4)。

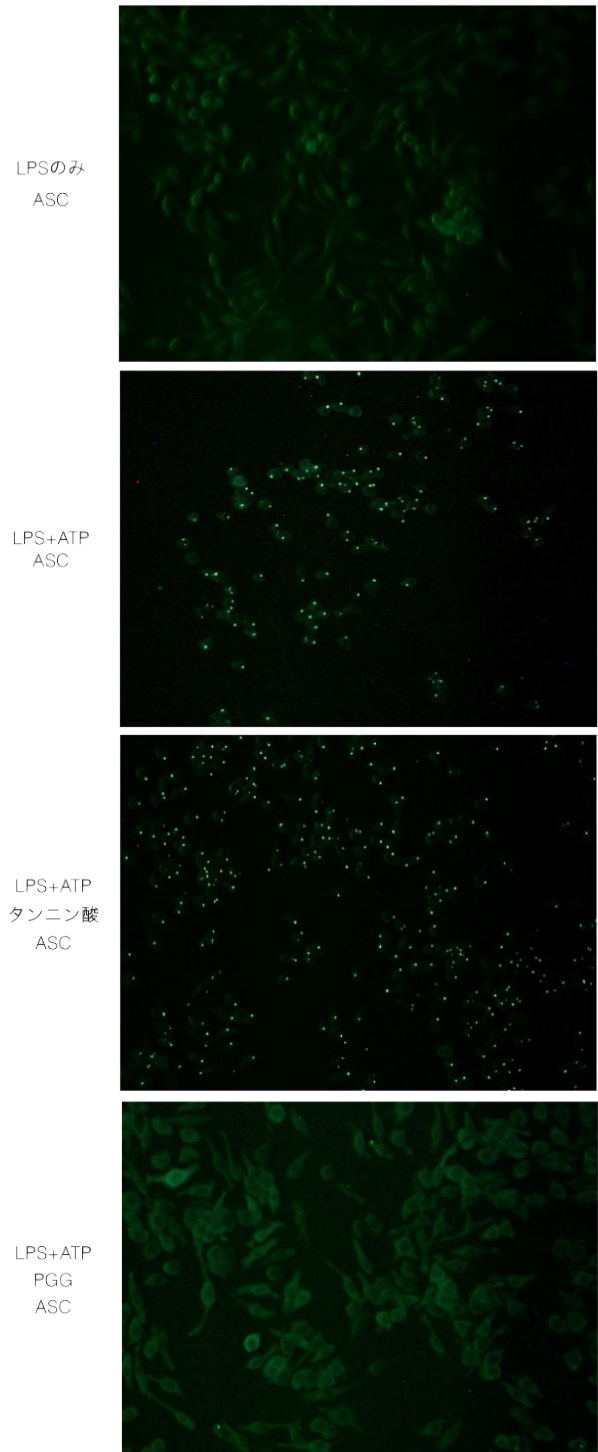


図4 細胞をLPSとATPで順次刺激するとカスパーゼ1の上流因子であるASCタンパク質が細胞内で重合体を形成する。タンニン酸はASCタンパク質の重合に影響しないが、ペンタガロイルグルコース (PGG) はASCタンパク質の重合を阻害した。

本研究期間中に海外の研究者らから、IL-1 の細胞外輸送に GasderminD (GSDMD) という細胞内タンパク質の細胞膜穿孔活性が必須であることが報告されたので、香辛料成分およびタンニン酸標品がGSDMDに影響する可能性を検討した。その結果、香辛料抽出物およびタンニン酸標品はGSDMDの活性化に影響しないことが確認された(図5)。

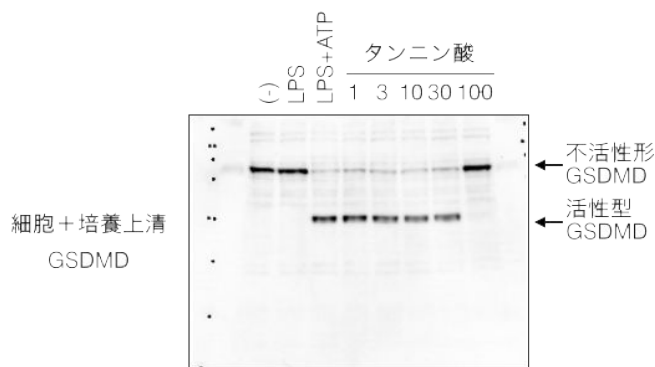


図5 図2と同様の実験系において、LPS プラス ATP 刺激により GSDMD が活性化型に変換されるが、タンニン酸は GSDMD の活性化型への変換に影響しないことが確認された。

香辛料抽出物およびタンニン酸標品がGSDMDの膜穿孔活性に与える影響をいまだ確認できていないが、香辛料抽出物およびタンニン酸標品は、少なくともGSDMDの下流で作用することが示唆された。

### 目標(3)

研究期間中に責任分子の単離にまでたどり着けなかったため、細胞側因子の解析には至っていない。しかし、ガロタンニンが関与することが示唆され、またGSDMDの下流で機能することが示されたことから、香辛料抽出物の当該活性は細胞膜に対して作用していることが想像された。そこでタンニン酸標品の細胞膜機能への影響を検討してみたが、検討したかぎりにおいて、膜受容体の機能やエクソサイトーシスが阻害されているという所見は得られなかった。いまだに、香辛料抽出物が、IL-1 の細胞分泌過程を特異的に阻害している可能性はあると考えている。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. Noboru Nakasone, Yasunori Ogura, Naomi Higa, Claudia Toma, Yukiko Koizumi, Toshihiko Suzuki, Tetsu Yamashiro Hot-PBS Extract of *Vibrio vulnificus* Induces NF- $\kappa$ B Activation. *Electronic Journal of Biology*, 2017 13(2): 131-134

2. Nakasone N, Higa N, Toma C, Ogura Y, Suzuki T, Yamashiro T. Epigallocatechin gallate inhibits the type III secretion system of Gram-negative enteropathogenic bacteria under model conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 2017 Jul 6;364(13)

〔学会発表〕(計 1件)

香辛料抽出物による炎症性サイトカイン IL-1 の分泌抑制について、日本家政学会関西支部 第38回研究発表会、口頭、選考あり

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://oguralab2011.web.fc2.com/narajo/index.html>

<https://www.facebook.com/NwuOguraLab/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 裕範 (OGURA, Yasunori)  
奈良女子大学・生活環境科学系・教授  
研究者番号：60304557

(2)研究分担者 ( )  
研究者番号：

(3)連携研究者  
菊崎 泰枝 (KIKUZAKI, Hiroe)  
奈良女子大学・生活環境科学系・教授  
研究者番号：60291598

(4)研究協力者 ( )