

生体機能調節物質の検索

鳥居貴佳^{*1}、奥村千里^{*2}、加藤丈雄^{*2}、山本晃司^{*2}、矢野未右紀^{*3}、鬼頭幸男^{*4}

Screening of Substances which Control Physiological Function

Takayoshi TORII, Chisato OKUMURA, Takeo KATO, Kouji YAMAMOTO,
Miyuki YANO and Yukio KITO

Food Research Center, AITEC^{*1*2*3} Principal Researcher^{*4}

大豆煮汁、白花豆煮汁、金時豆戻し汁、酒粕の上澄み液、テンペ、穀物酢、米糠よりエチルアルコールを用いて調製した抽出物をヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 培養液に添加し培養を行った。金時豆及び酒粕抽出物を添加した試験区で細胞数が減少し、細胞の形態変化が見られた。細胞から DNA を抽出してアガロースゲル電気泳動を行うと、ラダー状に DNA が分離された。これらの結果から、金時豆及び酒粕抽出物には HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導する物質が含まれていることが示唆された。

1. はじめに

近年、健康志向化が進み、病気の予防や健康増進に関して人々の関心は高くなってきた。このため食品に対して栄養やおいしさを追求するだけでなく、健康の維持と増強、病気の予防といった生体調節機能（食品の第3次機能）が強く求められるようになってきている。1991年には生活習慣病の「危険要因（リスク）の低減・除去」に役立つように工夫され、認可された食品に対して特定保健用食品の表示ができるようになった。2005年3月28日現在で495品目の製品が表示許可を得ており、今後も増加することが予想されている。近年の研究で抗酸化作用、発ガンの抑制作用、細胞の増殖促進や分化誘導作用、免疫賦活機能などの機能が種々の食品素材から見いだされており、これらを利用した健康の増進に役立つ製品の開発が進められている。

アポトーシスはプログラムされた細胞死と呼ばれる現象で、個体発生における形態形成の過程や生体の恒常性の維持など生命維持に欠かせない重要な役割を果たしている。ところが、何らかの原因でアポトーシスが誘導されないと異常細胞が増殖し、ガンや自己免疫疾患など種々の病気や異常をきたす。アポトーシスを誘導する物質は、腫瘍化などを予防する効果も有すると考えられている¹⁾。当センターにて発酵食品、食品廃棄物を中心に食品機能性を検索したところ、清酒製造で排出される酒粕及び、煮豆製品製造時に排出される金時豆汁のアルコール抽出物がヒト白血病細胞に対してアポトーシスを誘

導することが明らかになったので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料及び抽出方法

愛知県内惣菜メーカーより提供を受けた大豆煮汁、白花豆煮汁、金時豆戻し汁、平成12年度に当センターで清酒の試作試験を行った際に排出された酒粕の上澄み液、市販品のテンペ及び穀物酢、米糠を試料として用いた。

大豆煮汁、白花豆煮汁、金時豆戻し汁、酒粕の上澄み液からの抽出物は、試料を合成吸着剤ダイヤイオン HP-20(三菱化学^株製)に吸着させ、蒸留水で水洗後、40%エチルアルコールを用いて溶出させた。また、テンペと米糠の試料は蒸留水で懸濁した後、合成吸着剤ダイヤイオン HP-20(三菱化学製)に吸着させ、蒸留水で水洗後、40%エチルアルコールを用いて溶出させた。いずれも溶出液を凍結乾燥し、抽出物とした。

2.2 供試細胞及び培養条件

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 (JCRB0085) はヒューマンサイエンス研究資源バンクより提供を受けた。10%ウシ胎児血清、硫酸ストレプトマイシン、ペニシリン G を含む RPMI-1640 培地 (Sigma 製) を用いて、37℃、95% Air-5% CO₂ の条件で培養した。

2.3 細胞数の測定方法

各食品抽出物が HL-60 細胞の増殖に及ぼす影響を調べるためにトリパンブルー色素排除試験法を用いて細胞数を計測した²⁾。すなわち、HL-60 細胞を 24 穴培養プレートに 7×10^5 cells/mL になるように播種し、各食品抽出

物を 1 mg/mL となるように添加した。24 時間及び 48 時間培養後、細胞と 0.5% トリパンブルー試薬を混合し、血球計算盤を用いて全細胞数と生細胞率（全細胞数に対して色素染色されなかった細胞の割合）を計測した。

2.4 アポトーシスの検出方法

アポトーシスに伴うクロマチンDNAのオリゴヌクレオソーム単位の切断物（断片化したDNA）を検出するため、HL-60 細胞からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動を行った³⁾。すなわち、HL-60 細胞を 24 穴培養プレートに 7×10^5 cells/mL になるように播種し、各食品抽出物を添加して培養した。培養後、遠心分離により細胞を集め、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含リン酸緩衝生理食塩水PBS(-)で洗浄し、細胞溶解液として 10mM Tris-HCl (pH 7.4)、10mM EDTA (pH 8.0)、0.5% TritonX-100 を添加して細胞を溶解した。RNase (Sigma製)、Proteinase K (Sigma製) を添加して酵素分解を行い、イソプロピルアルコールを用いてDNAを沈殿させ、回収した。回収したDNAを 2% アガロースゲル電気泳動に供し、泳動パターンをエチジウムブロマイド存在下で紫外線照射し、観察した。

2.5 クロマチン凝縮の確認方法

HL-60 細胞を 24 穴培養プレートに 7×10^5 cells/mL になるように播種した。食品抽出物を 1 mg/mL となるように添加し、24 時間培養した。培養後、遠心分離により細胞を集め、PBS(-)で洗浄し、グルタルアルデヒド液を徐々に添加して細胞固定を行った。固定した細胞をスライドグラスに移し、ヘキスト 33258（ナカライテスク(株)製）液を添加してDNAを染色した。蛍光顕微鏡を用いてクロマチンの観察を行った⁴⁾。

3 . 実験結果及び考察

3.1 食品抽出物による HL-60 細胞の増殖抑制効果

大豆、白花豆の煮汁、金時豆戻し汁、酒粕の上澄み液、テンペ、穀物酢、及び米糠より調製した抽出物による HL-60 細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。結果を表 1 に示す。大豆、白花豆の煮汁、テンペ、穀物酢、米糠の抽出物を添加した試験区では細胞の増殖が進行し、高い生細胞率を示した。このことから HL-60 に対して細胞増殖の抑制作用がないことが明らかになった。大豆中にはゲニステイン、ダイゼインなどイソフラボンが含まれており、種々の抗腫瘍作用を持つこと⁵⁾が知られているが、本試験において生細胞数の減少などの抗腫瘍作用は見られなかった。一方、金時豆抽出物及び酒粕抽出物を添加した試験区では 24 時間経過後の全細胞数の計測で細胞数が減少し、生細胞率が低下していた。このことから、金時豆及び酒粕抽出物には HL-60 細胞に対して死滅作用を有する物質が存在していると考えられた。

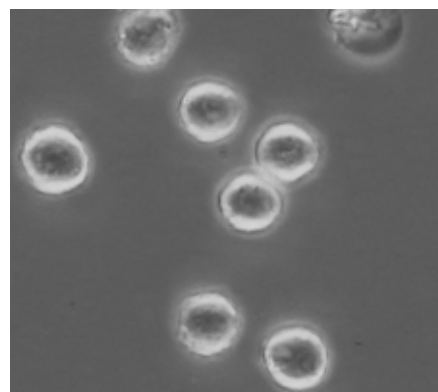
3.2 アポトーシス誘導作用の検出

大豆、白花豆の煮汁、金時豆戻し汁、酒粕の上澄み液、テンペ、穀物酢及び米糠より調製した抽出物を細胞に添加し、位相差顕微鏡で細胞を観察した。写真 1 に示すように、未処理の細胞は球形をしているが、金時豆及び酒粕の抽出物を添加した細胞はくびれを生じ、アポトーシス小体と考えられる断片化した細胞が確認できた。

表 1 抽出物添加後の生細胞率の変化

	生細胞率(%)	
	24hr	48hr
大豆	95	96
白花豆	83	91
金時豆	19	13
酒粕	15	0
テンペ	90	95
穀物酢	95	90
米糠	94	93

(a) 未処理



b) 酒粕抽出物添加

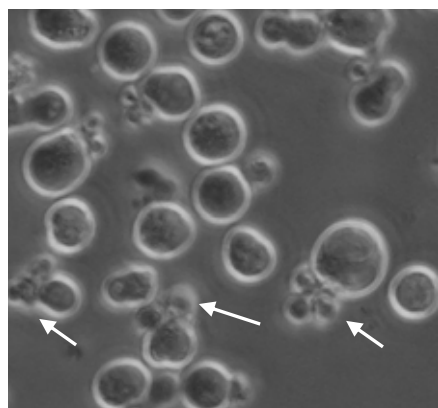


写真 1 細胞の形態変化

(矢印は細胞のくびれ部分を示す)

そこで、金時豆及び酒粕の抽出物を添加して 24 時間培養した細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動により断片化 DNA の検出を行った。写真 2 で示すように未処理の試験区では DNA は検出されないが、添加処理を行った試験区ではアポトーシスに特徴的なヌクレオソーム単位に断片化した DNA が分離された。

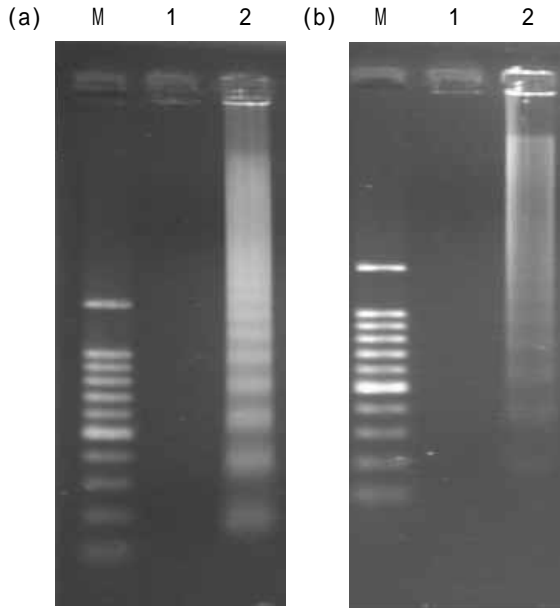


写真 2 断片化 DNA の検出

(a)金時豆, (b) 酒粕.

M: マーカー, 1: 未処理, 2: 抽出物添加.

3.3 細胞内構造の変化

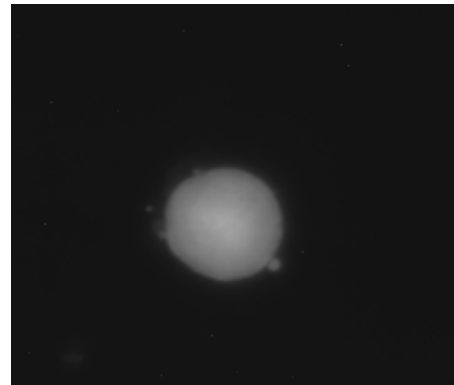
金時豆及び酒粕の抽出物を添加して培養した細胞及び未処理の細胞を固定した後、ヘキスト 33258 で DNA を染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。写真 3 (a) に示すように未処理の細胞は核内全体が染色されており、網状のクロマチン構造が観察された。一方、写真 3 (b)、(c) に示すように金時豆及び酒粕の抽出物を添加して培養した細胞の核は大小の球状に濃縮し、アポトーシスに特徴的なクロマチン凝縮を起こしていることが観察された。

これらの結果から、金時豆及び酒粕抽出物にはヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対してアポトーシスを誘導する物質が含まれていることが示唆された。

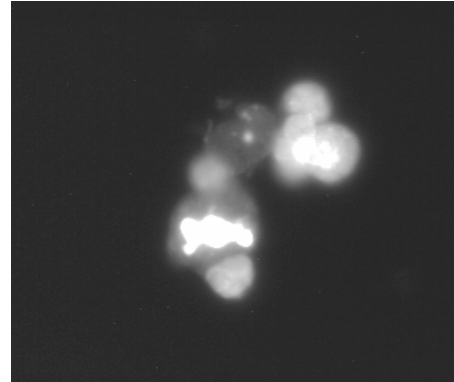
滝沢らは膀胱移行上皮癌細胞及び前立腺癌樹立培養細胞を用いて、清酒の濃縮物に増殖抑制効果があることを報告している⁶⁾。また Ingber らは麴の抽出物に抗腫瘍効果があることを報告している⁷⁾。これらの抗腫瘍効果を示す物質は酒粕にも含まれており、アポトーシス誘導物

質と同じ物質である可能性が考えられる。また、小宮らは黒豆種皮色素成分であるエピカテキン、カテキン 2 量体、カテキン 3 量体、アントシアニン系の色素であるシアニジン 3-O - -D-グルコシドにアポトーシス誘導作用があることを報告している⁸⁾。金時豆抽出物にもアントシアニン系色素が含まれていることから、黒豆と同様に金時豆由来の色素成分が HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導したのではないかと考えられる。

(a) 未処理



(b) 酒粕抽出物添加



(c) 金時豆抽出物添加



写真 3 細胞の核内変化

グルタルアルデヒドで固定し、ヘキスト 33258 で DNA を染色した。

4 . 結び

大豆煮汁、白花豆煮汁、金時豆戻し汁、酒粕の上澄み液、テンペ、穀物酢、米糠の抽出物をヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に添加し、培養した。これらの抽出物のうち、金時豆及び酒粕の抽出物を添加した細胞で断片化が観察された。また細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、ヌクレオソーム単位に分離された DNA が観察された。これらの結果から、金時豆及び酒粕抽出物には HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導する物質が含まれていると考えられた。

文献

- 1) 勝部拓也ら : 島根県産業技術センター研究報告, **38**, 27(2001)
- 2) 田沼靖一 : アポトーシス実験プロトコール, P38, 秀潤社(1998)
- 3) 辻本賀英 : アポトーシス実験法, P61, 羊土社(1995)
- 4) 田沼靖一 : アポトーシス実験プロトコール, P38, 秀潤社(1998)
- 5) 矢ヶ崎一三ら : 大豆たんぱく質研究, **6**, 122 (2003)
- 6) 滝澤行雄ら : 公衆衛生, **58**, 437(1994)
- 7) Ingber D., et al. : *Nature*, **348**, 55(1990)
- 8) 小宮孝志ら : 日本食品科学工学会第 48 回大会講演要旨集, P143(2001)