

金時豆エタノール抽出物のアポトーシス誘導作用の検討

鳥居貴佳^{*1}、近藤徹弥^{*1}、角田有紀^{*2}、竹内啓子^{*1}

Apoptosis-inducing Activity of Ethanol Extracts of *Phaseolus vulgaris*

Takayoshi TORII^{*1}, Tetsuya KONDO^{*1}, Yuki KAKUDA^{*2} and Keiko TAKEUCHI^{*1}

Food Research Center, AITEC^{*1*2}

金時豆戻し汁を合成吸着剤ダイヤイオン HP-20 に吸着させ、20、40%エタノールで溶出した。40%エタノール溶出画分を培地中に 1mg/mL となるように添加し、ヒト印環胃がん細胞(KATO)を培養したところ、10 時間後には生細胞率が約 30% となり、細胞形態の変化が見られた。さらに、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、断片化した DNA が検出された。これらのことから金時豆戻し汁には KATO 細胞に対してアポトーシスを誘導する成分が存在することが明らかになった。

1. はじめに

食品には大きく分けると 3 つの機能があると考えられている。栄養素としての働き（一次機能）、おいしさや香り、食感などの五感に訴える働き（二次機能）及び病気を予防する働き（三次機能）である。近年、健康長寿化社会に対する意識の向上により食品が有する三次機能が注目を集め、日常的に摂取する食事（食品）を制御することにより健康を維持したいという需要が見られるようになってきた。このため、製薬・食品企業、大学、研究所などにより多くの食品・食材を対象に、生活習慣病（高血圧症、肥満、糖尿病など）の予防作用、抗酸化作用、発ガンの抑制作用、免疫賦活機能など種々の機能性の検証と製品化が進められている。

我々は発酵食品、食品廃棄物を中心に機能性の一つとしてアポトーシス誘導能について検討を行ったところ、金時豆戻し汁や酒粕の上澄み液抽出物が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ことを見出した¹⁾。そこで本研究では、ヒト印環胃がん細胞 KATO を用いて培養時間、添加濃度の変化による生細胞率の変化について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

愛知県内の惣菜製造工場より提供を受けた金時豆戻し汁（金時豆を吸水させる際に排出される汁）をガラスカラム管に詰めた合成吸着剤ダイヤイオン HP-20（三菱化学（株）製）に吸着させた。素通りした画分を回収後、カラムを蒸留水で洗浄し、20、40%エタノールで段階的に吸着物を溶出させた。それぞれの画分をエバポレータ

ーで濃縮した後、凍結乾燥を行い細胞培養時に添加する試料として用いた。

2.2 供試細胞及び培養条件

HL-60 ヒト前骨髄性白血病細胞（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。

KATO ヒト印環胃がん細胞（TKG0213）は東北大学加齢医学研究所より提供を受けた。

共に 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

抽出物が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。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 DNA）を検出するため、細胞から DNA を抽出し、アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

2.5 クロマチン凝縮の確認方法

遠心分離により細胞を回収し、グルタルアルデヒド液の添加により細胞固定を行った。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。

*1 食品工業技術センター 応用技術室 *2 食品工業技術センター 応用技術室（現環境部 水地盤環境課）

3. 実験結果及び考察

3.1 試料添加後の培養時間による生細胞率の変化

蒸留水洗浄物及び 20、40%エタノール抽出物を培地に添加し、KATO 細胞の生細胞率を計測したところ、20%エタノール抽出物よりも 40%エタノール抽出物を添加した試験区で低くなった。そこで、40%エタノール抽出物を用いて試料添加後の培養時間による生細胞率の変化を HL-60 細胞と KATO 細胞について測定した。濃度を 1mg/mL になるように添加したところ、10 時間経過後の HL-60 細胞の生細胞率は約 10%、KATO 細胞では約 30%であった(図 1)。また、40%エタノール抽出物は HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導した酒粕の抽出物¹⁾より短時間で生細胞率を低下させることが明らかになった(図 1a)。

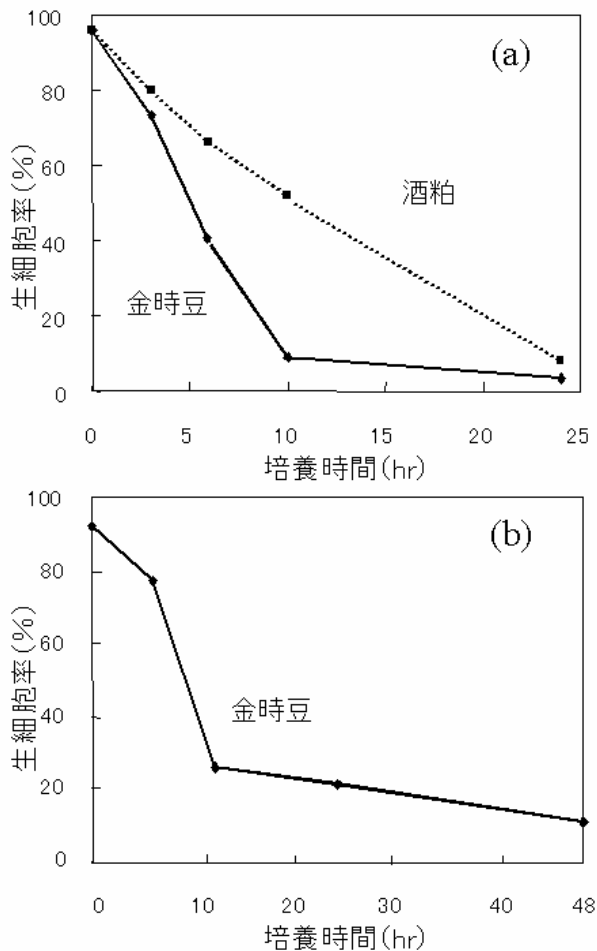


図 1 試料添加による生細胞率の経時変化
(a)HL-60細胞, (b) KATO 細胞

3.2 試料添加濃度による生細胞率の変化

生細胞率に及ぼす 40%エタノール抽出物の濃度依存性を 0.06mg/mL から 1mg/mL まで段階的に変化させて調べ

た。HL-60 細胞の生細胞率は 0.1mg/mL の添加試験区で約 80%であったが、0.2 mg/mL の添加試験区で約 20%と著しく低下した。一方、KATO 細胞では濃度依存的に生細胞率が低下し、1mg/mL の試験区で約 15%となった。

3.3 アポトーシス誘導作用の検出

40%エタノール抽出物を添加して培養した細胞から 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。HL-60細胞及び KATO 細胞でヌクレオソーム単位に断片化した DNA が分離された(写真 1)。この結果からアポトーシスが誘導されていることが考えられた。

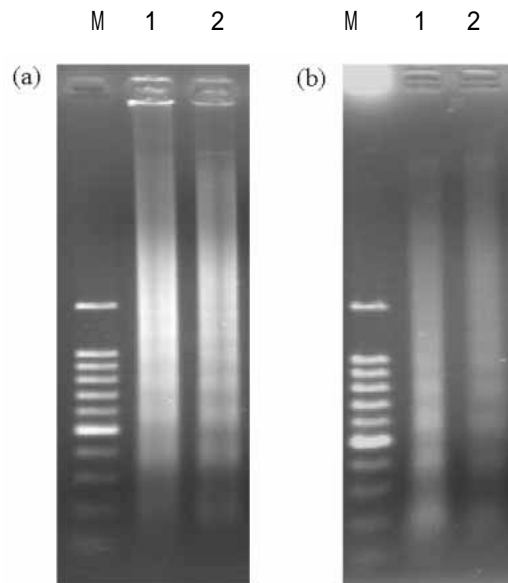


写真 1 断片化 DNA の検出

(a)HL-60細胞, (b) KATO 細胞

M, 分子量マーカー; 1, 1mg/mL; 2, 0.5mg/mL.

3.4 細胞内構造の変化

40%エタノール抽出物を 1mg/mL になるように HL-60、KATO 細胞に添加した。ヘキスト 33258 で DNA を染色したところ、細胞の核は断片化し、クロマチン凝縮を起こしていることが観察された。

4. 結び

金時豆戻し汁のエタノール抽出物を KATO 細胞に添加したところ、アポトーシスを誘導することが明らかになった。また、時間や濃度を変化させて HL-60細胞と KATO 細胞に添加すると生細胞率に差が見られた。

文献

- 1) 鳥居貴佳ほか：愛知県産業技術研究所研究報告, 4, 146(2005)