

研 究 報 告

平成21年度社団法人中央味噌研究所研究助成による研究報告

亜鉛欠乏予防における味噌の効能に関する基盤研究

神戸 大朋

Study of the effects of Miso (Japanese soybean paste) on protection against zinc deficiency

Taiho KAMBE

Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University
Kitashirakawa-Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

緒言

亜鉛は、味覚・免疫機能・創傷治癒力等に重要な役割を果たすため、その欠乏はこれら生体機能に重篤な影響を与える¹⁾(図1)。特に、我が国では高齢者の亜鉛不足が問題となりつつあるため²⁾、健全な食生活により亜鉛欠乏を予防することは極めて重要となる。亜鉛は日常の食事から摂取されるが、その腸管での吸収効率は約30%と低く、亜鉛欠乏を予防するには、腸管での亜鉛吸収効率を高めることが肝要となる。そのため、亜鉛の吸収を促進する食品因子が同定できれば、亜鉛欠乏の予防に大きく貢献することとなる。亜鉛の吸収は、小腸上皮細胞に発現する亜鉛トランスポーター・ZIP4を介して行われるが、ZIP4は先天性亜鉛欠乏症の原因ともなる亜鉛吸収における必須分子である^{3, 4)}(図2)。そのため、ZIP4の発現を促進する食品因子は、亜鉛欠乏の予防に特に効果的であると考えられる。我々は、食品中に含まれる亜鉛吸収促進活性を持つ因子はZIP4の発現を促進する活性を有するとの仮説に従い、ZIP4発現促進因子を探索に適したスクリーニング系を構築した。本スクリーニング系は、腸管上皮細胞に匹敵する鋭敏な感度で亜鉛依存的にZIP4を発現する培養細胞株と、鋭敏にZIP4の量を感知する抗

ZIP4モノクローナル抗体を組み合わせることで、ZIP4の発現を増加させる食品因子を簡単に探索できる*in vitro*スクリーニング系となっている。本研究は、このスクリーニング系を用いてZIP4の発現を促進する味噌(味噌成分)を同定し、亜鉛欠乏の予防に役立てることを目的に実施した。味噌は日本人の食生活に欠かすことのできない食物であるため、味噌の有する効能を十二分に活用することは亜鉛欠乏の予防に非常に有効であると考えられる。

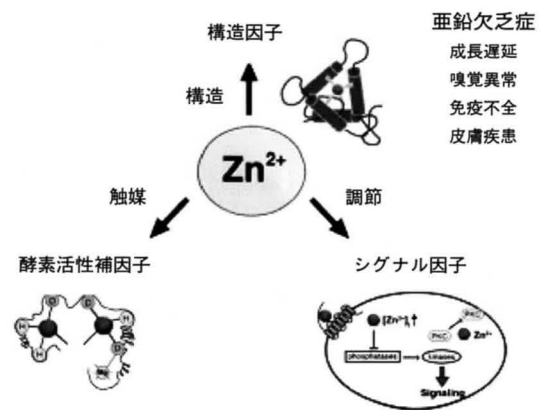


図1. 生体内での亜鉛の生理機能

亜鉛は、様々なタンパク質の構造因子や活性補因子、シグナル因子として重要な役割を果たす。

方法

ZIP4 発現促進活性を持つ味噌サンプルのスクリーニング

中央味噌研究所よりご提供いただいた約130種の味噌をリン酸緩衝液に懸濁した後、加熱(100°C, 5分)・非加熱処理を施し、各2種類のサンプルとして調製した。それらを終濃度0.1%でスクリーニング用細胞の培養液に添加して24~36時間培養した後、細胞から全細胞タンパク質を回収してタンパク質を定量し、各20 μ gをimmunoblot解析に用いた。1次抗体には抗ZIP4モノクローナル抗体を500倍希釈したものを使用し、2次抗体にはHRP標識抗マウスIgG抗体を3000倍に希釈して使用した。なお、本スクリーニングで使用する抗ZIP4モノクローナル抗体は、マウスZIP4のアミノ末端領域(シグナル配列を除くN末から第一膜貫通領域の直前まで、28~328aa)を抗原として作成し、マウス腹水より調製したものである。

改良型スクリーニング系の構築

現在用いているスクリーニング系は、ZIP4発現促進活性のみを反映したものである。そのため、それに加えて細胞内亜鉛量の変化を同時に追跡できるように改良することを試みた。具体的には、現在スクリーニングに使用している培養細胞株に、亜鉛濃度に応じて発現が上昇するメタロチオネインプロモーターの制御により分泌型アルカリフォスファターゼを発現する形質を導入している。本株の樹立により、さらに精度の高いスクリーニングを実施することが可能となる。

ラット腸管上皮細胞の亜鉛応答性についての検討

亜鉛欠乏食で飼育したラットの十二指腸・空腸(それぞれ、胃の幽門部より0.5~1.5cm, 5.5~6.5cmの部分)を回収し、ZIP4の発現量について抗ZIP4モノクローナル抗体を用いたimmunoblot法を用いて検討した。同時に亜鉛依存性酵素として知られるアルカリフォスファターゼ(活性中心に亜鉛を必要とする)の活性を測定し、亜鉛欠乏にあることを確認した(結果省略)。アルカリフォスファターゼの活性測定には、膜タ

ンパク質サンプル2 μ gを使用し、100 μ lの基質溶液(2mg/ml p-nitrophenyl phosphate in 1M diethanolamine buffer, pH 9.8 containing 0.5mM MgCl₂)を加えた後、室温に放置し、遊離してくるp-nitrophenolの量を吸光計にて測定した(波長=405nm)。エビALP(Roche)を用いて検量線を作成し、ALP活性を求めた。

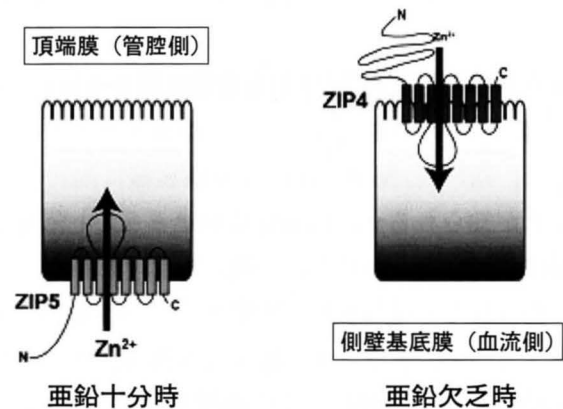


図2. 腸管上皮におけるZIP4の発現制御機構

小腸上皮細胞の頂端膜におけるZIP4の発現は、亜鉛濃度によって厳密に制御される。面白いことに小腸上皮細胞の側壁基底膜には、亜鉛によってZIP4とは全く反対の制御を受ける亜鉛トランスポーター・ZIP5が発現する。

結果

ZIP4 発現促進活性を持つ味噌サンプルのスクリーニング

加熱(100°C, 5分)・非加熱処理を施した各種味噌サンプル(米味噌99種, 麦味噌8種, 豆味噌4種, 調合味噌11種他)を用いて一次スクリーニングを実施した。一次スクリーニングにおいてZIP4発現促進活性を認められた味噌サンプルについては、幾つかのロットを作成してその再現性を確認した。現段階では、弱い活性ながらも6種類のサンプルにおいてZIP4発現促進活性を認めることができた。この6種の味噌に関しては、サンプル調製過程におけるロット差で活性を見落としている可能性も考えられるため、サンプル調整法の改良などを加え、さらに詳細に解析を実施している。また、これらサンプルにおいて、加熱・非加熱処理において大きな差異は認められず、味噌に含有される低分子化合物が、ZIP4発現促進活性を有する可能性が考えられた。今後も抽出方

法なども検討し、さらに多くの味噌サンプルについてスクリーニングを実施する予定である。ただし、現在スクリーニングを実施している未精製の味噌サンプルによる ZIP4 発現促進効果は、ポジティブコントロールとして用いている大豆イソフラボン粗精製画分の効果より弱い傾向が認められる。そのため、現在、ZIP4 の発現上昇の検討と同時に細胞内亜鉛量の変化をモニターできる改良型スクリーニング系の構築を試みている（後述）。

ラット 腸管上皮の ZIP4 発現変動に関する解析

腸管からの亜鉛吸収は、十二指腸・空腸で行われる。ZIP4 の発現もほぼこの両組織に局限することが知られるが、両組織における ZIP4 発現誘導に差異があるかどうかに関しては、これまで全く知られていなかった。味噌サンプルの効果の作用メカニズムをラットを用いて評価するための条件設定を行うために、この両組織における ZIP4 の発現誘導の差異に関して詳細に解析した。14日間、あるいは28日間にわたり亜鉛欠乏食・十分食で飼育したラットの十二指腸・空腸を回収し、ZIP4 の発現レベルを解析した結果、亜鉛吸収に重要と目されていた十二指腸より空腸の方が、亜鉛欠乏に対して鋭敏に ZIP4 を発現誘導すること

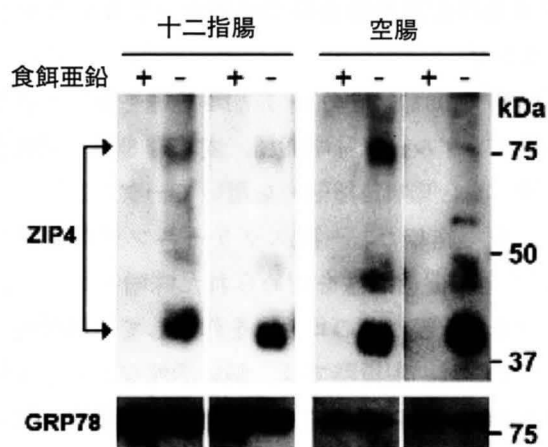


図3. 十二指腸・空腸における ZIP4 の発現の亜鉛欠乏に対する応答性に関する解析

ZIP4 は、食餌由来の亜鉛が不足した場合 (-) に顕著に誘導される。小腸組織では、ZIP4 は全長のものとプロセシングされた半分長のものが検出されるため、2本のバンドが検出されている。ZIP4 と GRP78 はともに immunoblot により検出し、GRP78 は、それぞれ比較対象にあるサンプルの量が等しいことを示すコントロールとして用いている。

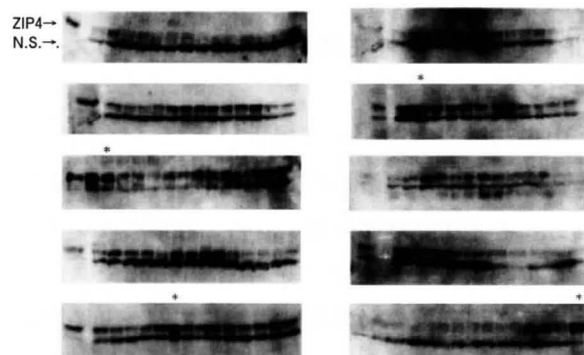


図4. 味噌サンプルのスクリーニング結果（一部）

味噌サンプルを加え24時間培養した細胞の ZIP4 も発現レベルを比較した immunoblot の結果。特に誘導が認められるサンプルに関しては *印で標記した。

が判明した。この結果から、味噌サンプル効果をラットを用いて詳細を解析するには、亜鉛欠乏に対して鋭敏に応答する空腸の方が適切であると判断された。なお、マウスにおいても、同様の解析を行ったが、マウス腸管膜画分においては非特異的に検出されるバンドが多く認められたために、現在までのところ適切な条件を設定するまでには至らなかった。今後の亜鉛吸収促進活性の判定には、ラットを用いた解析を実施する予定にしている。

考察

最近のヒトゲノム配列を用いた *in silico* 解析から、ゲノムにコードされているタンパク質の約 10% が亜鉛と会合するモチーフを有することが示された⁵⁾。この事実は、亜鉛が様々な生体機能の維持に必須であることを示しており、亜鉛の適切な摂取が、健康の増進に極めて重要であることを示唆している。実際、ヨーロッパ各国が共同で実施した疫学調査・ZincAge project（健康・老化と亜鉛との関連に関する研究）において、血清亜鉛値が高い高齢者は健康であり、体内亜鉛量を適切に保つことは健全社会の実現に重要であることが報告されている⁶⁾。にもかかわらず、近年、高齢者や女性を中心に亜鉛欠乏症状を呈する患者が増えてきており、亜鉛を十分に摂取することが強く望まれている。

1970年代に先天性の亜鉛欠乏症であることが実証された腸性肢端皮膚炎（*Acrodermatitis ente-*

ropathica) の原因タンパク質は長らく不明であった⁷⁾。そのため、腸管からの亜鉛吸収を担う輸送担体(トランスポーター)を標的とした *in vitro* スクリーニング系による亜鉛吸収促進因子の探索は事実上不可能であった。このような状況の中、今世紀に入りようやく腸性肢端皮膚炎の原因遺伝子として、亜鉛トランスポーター・ZIP4 が同定され³⁾、その後、我々やその他のグループの詳細な解析の結果、ZIP4 は亜鉛欠乏時に小腸上皮細胞頂端膜に蓄積され亜鉛吸収に機能し、小腸での亜鉛吸収に必須の役割を果たすことが明らかとなった^{4, 8)}。ZIP4 は、体内亜鉛吸収量をコントロールする鍵分子として機能しており、その発現を増加させる因子は、亜鉛吸収効率を高める因子として機能することが予想される。現在、味噌(成分)の一次スクリーニングを実施した段階であるが、すでに6種類ほどの味噌に ZIP4 の発現を促進する活性を認めている。これらの味噌の中で、特に強い ZIP4 発現促進活性を持つものは、亜鉛吸収促進因子として極めて有効に機能し、亜鉛欠乏症の予防に大きく貢献することが期待される。今後、①抽出方法の再検討などを行い、さらに強い ZIP4 発現促進活性を有する味噌を同定する、②その作用メカニズムを解明する、③味噌に含まれる活性因子を同定し、構造決定する、④実際に生体内の亜鉛吸収に与える影響について解析を実施する、⑤亜鉛取り込み活性を迅速に評価するための改良型スクリーニング細胞を樹立する(図

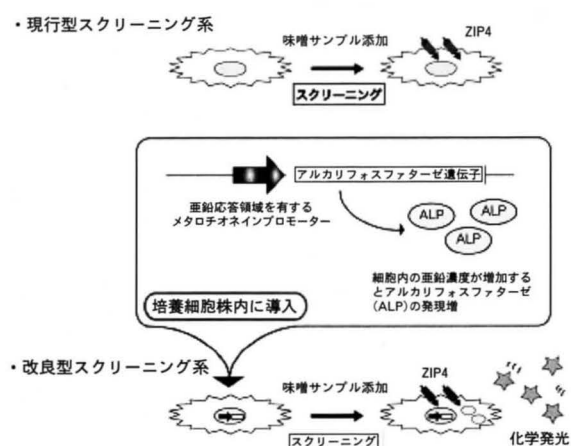


図5. アルカリフォスファターゼによる化学発光を指標として ZIP4 の発現誘導に伴う細胞内亜鉛量の変化を素早く検出する改良型細胞のモデル図

5), 等の課題を速やかに実施し, 亜鉛欠乏の予防に効果ある味噌(味噌成分)として日本人の食事にフィードバックさせていきたいと考えている。

亜鉛をサプリメントにより摂取することは簡単であるが、米国では前立腺ガンの発症頻度との相関性から、長期間にわたる亜鉛サプリメントの過剰摂取の危険性を指摘する疫学調査の結果も報告されており⁹⁾、亜鉛を効率良く吸収させる食品因子は、亜鉛欠乏症の予防のために最も安全で有効な手段である。食生活の簡便化が進む先進諸国においては、潜在型の亜鉛欠乏患者数は今後ますます増加することが予想されており、人々の健康増進のため、亜鉛吸収促進因子を同定する意義は極めて大きい。

謝辞

本研究を実施するにあたり、ご援助賜りました(社)中央味噌研究所に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Hambidge M. Human zinc deficiency. J Nutr 130: 1344S-1349S, 2000.
2. Kogirima M, Kurasawa R, Kubori S, Sarukura N, Nakamori M, Okada S, Kamioka H and Yamamoto S. Ratio of low serum zinc levels in elderly Japanese people living in the central part of Japan. Eur J Clin Nutr 61: 375-381, 2007.
3. Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J and Gitschier J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. Am J Hum Genet 71: 66-73., 2002.
4. Kambe T and Andrews GK. Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. Mol Cell Biol 29: 129-139, 2009.
5. Andreini C, Banci L, Bertini I and Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. J Proteome Res 5: 196-201, 2006.

6. Haase H, Mocchegiani E and Rink L. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology* 7: 421-428, 2006.
7. Moynahan E. J. Letter: Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc-deficiency disorder. *Lancet* 2: 399-400, 1974.
8. Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T and Andrews GK. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol Chem* 388: 1301-1312, 2007.
9. Leitzmann MF, Stampfer MJ, Wu K, Colditz GA, Willett WC and Giovannucci EL. Zinc Supplement Use and Risk of Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 1004-1007, 2003.

Aspergillus oryzae の遺伝子発現を制御するための 低分子核酸信号伝達物質の解析

鈴木 聡, 楠本 憲一, 服部 領太

Gene regulation by small nucleic acid signals in *Aspergillus oryzae*

Satoshi Suzuki, Ryota Hattori and Ken-Ichi Kusumoto

National Food Research Institute, Kan-nondai 2-1-12, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

要旨: *Aspergillus oryzae* は味噌の醸造に重要な微生物である。微生物自身が作り出す微量な低分子化合物による酵素遺伝子生産制御など醸造工程を最適化するための技術の基盤となる基礎知見を得ることを目的に、そのような化合物の一種である、低分子核酸 cAMP の *A. oryzae* 遺伝子発現への影響をマイクロアレイにて解析した。その結果、cAMP 添加により *A. oryzae* の生殖、二次代謝が有意に阻害され、一方で培養上清中の α アミラーゼ、中性プロテアーゼ活性の増加が明らかになった。

序文: 味噌の醸造に重要な微生物である *Aspergillus oryzae* は、栄養物質、温度、湿度等の培養環境に応じて遺伝子発現が制御されており、古来の醸造技術は熟練技術者の経験と勘に基づきそれらの環境要因を制御することにより、間接的に菌体の酵素生産や二次代謝産物生産を制御し、醗酵工程を最適化してきた。一般的に微生物が自身、あるいは共存、競合する他生物の作り出す極微量の低分子信号伝達物質により、劇的に遺伝子発現を変化させる事例が知られている。いくつかの *Aspergillus* 属においてはゲノム情報から低分子核酸受容体の存在が予想されている。我々も *A. oryzae* のゲノム情報からいくつかの低

分子核酸受容体に相同性のある遺伝子配列を見出している。しかしながら細胞外低分子核酸の *A. oryzae* に対する影響は未だ知られていない。そこで、本研究では培地中に与えた細胞外低分子核酸による *A. oryzae* 遺伝子発現への影響をマイクロアレイを用いた網羅的解析により明らかにすることにより、*A. oryzae* による物質生産を人為的に制御する技術の確立のための基礎的な知見を得ることを目的とする。本研究においては、低分子核酸の内、まず他種糸状菌で報告のある環状アデノシンーリン酸 (cAMP) に注目し研究を行った。

材料と方法: 菌株はゲノム解読菌株 RIB 40 株を用いた。マイクロアレイに供するための RNA は次に示す 2 条件にて培養した菌体から抽出した。20 ml の YPD 培地 (%酵母エキス, %ポリペプトン, %グルコース) に 10 mM cAMP (ナカライテスク) を加え、1 ml の胞子けん濁液を接種し、一晚、30°C にて回転振とう培養を行った。あるいは、20 ml ポテトデキストロースブロス (BD) に 1 ml の胞子けん濁液を接種し、30°C にて回転振とう培養にて四晩培養した後に cAMP の透過性アナログ 8 CPT-cAMP (バイオログ) を 10 mM 濃度にて加え、さらに一晚培養した。それぞれについて cAMP を加えていない培養を

対照実験とした。

ISOGEN (ニッポンジーン) にて total RNA の抽出を行った。マイクロアレイ実験は *Aspergillus oryzae* oligonucleotide 12k DNA microarray を用いて、株式会社ファームラボにて解析を行った。色素交換 (ダイスワップ実験) により、各々色素を入れ替えた mRNA を用いて反復実験を行い、2回の実験の実測値を補正したデータを取得した。

培養上清中たんぱく質は20 mM酢酸バッファー (pH 5.0) にて、0.1 mg/ml に調製された。

α アミラーゼ活性測定は、 α アミラーゼ活性測定キット (キッコマン) により添付のマニュアルに従って行った。

中性プロテアーゼ測定は、アゾカゼイン法にて行った。

結果: 対数増殖中の麹菌細胞に対する培地中 cAMP の影響を検討した。グルコースに富む完全培地 YPD にて一晚培養し、活発に増殖中の *A. oryzae* の遺伝子発現パターンにおける10 mM cAMP の影響をマイクロアレイにより解析した (図1)。cAMP 添加により2倍以上の発現の増大が見られた遺伝子数は57であった。一方、cAMP 添加により2倍以上に発現が抑制された遺伝子数は964であった。遺伝子発現パターン全体の変化で見た場合、図1のように、 $y = x$ の線上に近いところに多くの遺伝子が集約しており、大きく発現強度を変化させる遺伝子の割合は比較的少なかった。

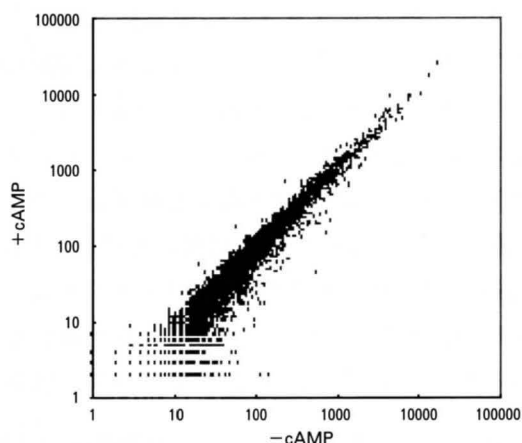


図1. cAMP 添加により変動する遺伝子群のマイクロアレイ解析

培養後期の麹菌細胞に対する透過性 cAMP (8CPT-cAMP) の影響を検討した。デンプン主体の PDB で4晩培養した菌体に10 mM 8CPT-cAMP を加え、さらに一晚培養した *A. oryzae* における10 mM 8CPT-cAMP (透過性 cAMP) の遺伝子発現パターンへの影響をマイクロアレイにより解析した (図2)。8CPT-cAMP 添加により2倍以上の発現の増大が見られた遺伝子数は439であった。一方、8CPT-cAMP 添加により2倍以上に発現が抑制された遺伝子数は4467であった。遺伝子発現パターン全体の変化で見た場合、図2のように、 $y = x$ の線上から離れたところに遺伝子が拡散しており、大きく発現強度を変化させる遺伝子が比較的多くみられた。

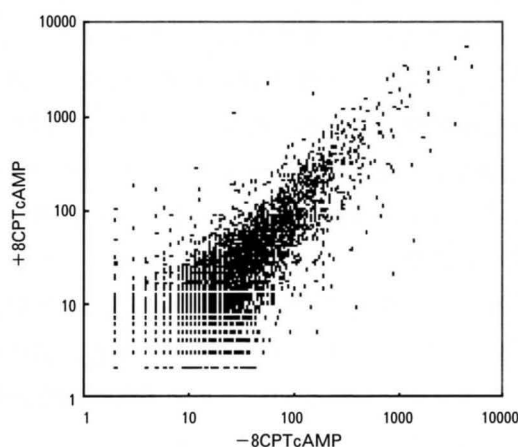


図2. 透過性 cAMP 添加により変動する遺伝子群のマイクロアレイ解析

二つの培養条件における遺伝子発現変化の比較を行った。cAMP 添加により発現が上昇する57遺伝子のうち、8CPTcAMP によっても上昇するものが4、低下するものが13であった。また、cAMP 添加により発現が低下する964遺伝子のうち、8CPT-cAMP によっても低下するものが65、逆に上昇するものが10であった。また、両培養条件共通に発現が上昇する4遺伝子あるいは低下する65遺伝子を調べたところ、ほとんどが機能未知の未同定推定配列であった。また、両培養条件それぞれの、発現変動の大きい順に並べた場合の上位遺伝子のほとんどが機能未知の未同定推定配列であった。

既知の二次代謝関連あるいは胞子形成関連遺伝子への cAMP 添加の影響を検討した。遺伝子発現パターンの変化が大きい 8CPT-cAMP 添加実験において、いくつかの既知遺伝子の発現の上昇あるいは低下を確認した。二次代謝関連遺伝子、分生子関連遺伝子などの発現レベルがいずれも低下していた。

8CPT-cAMP 添加による培養上清中の酵素活性の変化を検討した。培養上清中 α アミラーゼ活性は 8CPT-cAMP 添加試料において、未添加試料よりも高い活性を示した。また、中性プロテアーゼ活性も、8CPT-cAMP 添加試料において、未添加試料よりも高い活性を示した。

考察：我々は培地中に添加した cAMP の *A. oryzae* 遺伝子発現への影響をマイクロアレイにて解析した。グルコースに富む完全培地中にて対数増殖段階の *A. oryzae* においては、2 倍以上の発現変動が見られる遺伝子はおよそ 1000 個程であり、全遺伝子 12000 の約 1 割弱が変動していると考えられる。しかしながら、全体の遺伝子発現パターンによれば、cAMP の影響はあまり大きくないと考えられる (図 1)。 *A. nidulans* において一連の fluffy 変異株という分生子形成のできない変異株の研究により、cAMP の役割が明らかになりつつある。cAMP により PKA が活性化されると、細胞は栄養増殖へ向かい、二次代謝や生殖は抑制される。そこで、外部から cAMP を与えることにより、細胞状態を栄養増殖へかわせる事が出来るのではないかと考えられた。通常 *Aspergillus* 属菌を液体培養した場合、栄養菌糸の状態が保たれ、分生子形成は行われない。しかしながら、液体培養中でも、分生子形成への準備は行われており、*A. nidulans* においては、培養開始後 20 時間以前の菌体を液体培地から引き揚げ、空気中に置いても分生子形成は行われないが、20 時間以降の菌体を液体培地から引き揚げ、空気中に置くと直ちに分生子を形成する。すなわち、見た目は同じ液体培地中の栄養菌糸であっても、培養時間により、その内部における遺伝子発現パターンは違ってきていると考えられる。そこで、我

々は培地を YPD から PD に変え、培養時間を 5 日に伸ばして十分に分化の潜在能力を獲得した細胞における cAMP の影響を検討することにした。また、細胞内 cAMP 濃度の上昇を確実にものとするため、透過性アナログ 8CPT-cAMP を用いた。その結果、2 倍以上に変動する遺伝子数は約 5000 個に増え、その変動の大きさも増大した (図 2)。また、その中で、二次代謝や生殖に関わる遺伝子の発現低下が観察された。したがって、期待通り、透過性 cAMP 添加は培養後期に、本来、生殖と二次代謝に向かう運命にある麹菌細胞に対して阻害効果があるのではないかと予想された。一方発現レベルが上昇した遺伝子には、あまり共通した傾向が見られなかった。最も強く発現誘導されたのは Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases で、コントロールに対し透過性 cAMP の添加によって約 100 倍に発現上昇がみられた (データは示さない)。

醸造に重要な酵素の多くは麹菌の栄養獲得のための分泌酵素であるため、好ましい栄養源 (例えばグルコース) が枯渇してくることにより、培地中に代替の栄養源 (例えばキシラン) が豊富にあれば、それを感知して誘導されてくると考えられている。一方で一般的に微生物では、飢餓刺激は生殖を誘導することが知られている。つまり、栄養源が枯渇してきた状況で、なおかつ生殖への切り替えが阻害されている状況は酵素生産が最も誘導されるのではないかと考えた。そこで、cAMP を加えた場合の、培養上清中の酵素活性の上昇を期待して、 α アミラーゼ活性、中性プロテアーゼ活性を測定したところ、期待通り、ともに cAMP 添加の方が高活性であり、両酵素の生産性が増大していると考えられた。しかしながら、cAMP が生理的にどのようにして酵素生産の誘導に用いられているかを明らかにするためにはさらなるデータの解析と研究の進展が必要であると思われる。

謝辞：本研究は中央味噌研究所 21 年度研究助成により行われた。また、マイクロアレイ解析においては株式会社ファームラボの佐野元昭博士に大きな尽力をいただいた。

SOS 応答生理機能によるヒトの遺伝子を守る味噌食品の探求

鈴木 信夫

Search for Miso Foods Which Protect Human Gene by SOS Physiological Functions

Nobuo SUZUKI

*Department of Environmental Biochemistry, Graduate School of Medicine, Chiba University,
Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba, 260-8670, Japan*

I. 要旨

遺伝子の変異発生を抑制するヒト SOS 応答生理機能における味噌食品の活性化作用を検証した。27種の味噌食品のそれぞれ10gを蒸留水 (MilliQ 水) 20ml に90℃で溶解させ、味噌サンプル液を作製した。その液の添加による培養ヒト細胞 R_{Sa} の生存能を MTT 法にて観察した。細胞培養液量に対し1%以下の量が、全ての製品において細胞死を誘導させない濃度であり、48時間以内の処理時間が、変異発生調査に至適な条件であることを確認した。次に、SOS 応答の鍵分子として変異の抑制に関わる細胞内分子シャペロン類の細胞内量をウェスタンブロッティング法で測定した。GRP78, HSP27, HSP90 α および GRP94 の細胞内量を顕著に増大化させたサンプル11種が見出された。次に、サンプル液処理 R_{Sa} 細胞で紫外線 (UVC) により誘導される変異の頻度が低下することを、ウアバインの致死作用に対する耐性化 (Oua^R) を指標とする形質レベルでの検出法と *K-ras* 癌遺伝子におけるコドン12の塩基置換をドットプロットハイブリダイゼーション法により検出する遺伝子レベルでの検査法とで検証した。11種のサンプルで、変異発生を抑制することが示唆され、その内の10種ではシャペロン量の増加が見出された。今回調査した製品で豆味噌は

1製品のみであり、その製品に変異発生の抑制効果は見出されたが、抑制活性が顕著にみられた残りのものは、全て、米麹味噌製品であった。1製品の原材料である米麹においても変異発生の抑制効果が見出された。従って、シャペロンなどの細胞内分子を介して、ヒト細胞における変異の発生を米麹成分により抑制するという、味噌製品の新しい機能が示唆された。

II. 序論

遺伝子における変異の発生は、癌化・老化・ウイルス感染症などの種々の疾病の原因や誘因と考えられている。そのような変異の発生を抑制しようとするヒト生理機能が存在することを見出し、SOS 応答と呼称している。SOS 応答の原型は大腸菌などの試験管内実験システムで提案され、ヒトにおいても存在することが多くの研究者らにより提案されている。しかし、ヒトにおける実体は不明のままであった。過去に大腸菌における SOS 応答の実証に成功した我々は⁽¹⁾、その後、ヒト個体や培養ヒト細胞における実験システムと新しい種々の方法を用いることにより、ヒトにおいても存在することを報告してきている⁽²⁾。

SOS 応答とは、変異を起こしてまでも細胞の生存を計るべきか、それとも細胞死を誘導させるべ

きかという選択機能である。その機能は次の骨格過程に基づく：①ヒトのストレス状態→②サイトカインなどの血清因子の血液中でのクロストーク状態→③プラスミノゲンアクチベーター (PA) や他のプロテアーゼの一過的活性化を伴うシャペロン分子などの発現誘導→④細胞核外のシャペロン結合分子の核内への移動→⑤DNA 修復などの核酸代謝にかかわる分子の核内作用の変動という過程である。②の過程では、シャペロンやシャペロン結合分子で細胞外へ放出されるものも、オートクライン・パラクライン的に、③以降の過程に関与するらしい³⁾。本研究では、③と④のヒト細胞内での過程に関わる変異発生抑制スーパーバイザー役のシャペロン類に着目して、味噌食品における新規の機能の探索を行う。味噌食品に変異の発生を抑制するとの示唆は、従来、ヒトにおいてはなく、サルモネラ菌を用いるエームテスト法などにおいての報告がある⁴⁾。ただし、変異原因子自身の活性を抑えるというものであり、ヒト体内の変異発生を抑制するという機能に基づく抑制作用ではない。その上で、ヒトへも変異原活性を有するとする因子の活性の阻害を演繹しているものである。本研究は、そのような種を越えての間接的な議論ではなく、ヒト細胞を用いての実証である。

III. 実験方法

III. 1 実験材料

味噌製品は、17社より27製品を中央味噌研究所より提供されるか、製造元で直接購入することにより入手した。各製品は、No.1よりNo.27まで、Miso のMという字を添えて番号にて記載することとした。抗 HSP27 抗体は、広島大学の細谷先生より分与して頂いた。その他の抗シャペロン抗体はサンタクルズ社より購入した。

培養ヒト細胞は、千葉大学医学部微生物学教室桑田次男先生らによりヒト胎児由来線維芽細胞から樹立された R_{Sa} 細胞株を使用した⁵⁾。このヒト R_{Sa} 細胞は高頻度の変異誘発が可能な株である⁶⁾。これまでに、我々は、R_{Sa} 細胞の変異誘発について、ウアバイン耐性試験、および *K-ras* 遺伝子変異の検出により、インターフェロンの変異抑制

作用⁷⁻⁹⁾、肺癌や膵癌の患者血清に含まれる因子^{10,11)}による変異誘発を亢進する活性を明らかにしてきた。基本最小培地 (MEM) は日水製薬株式会社より、仔牛血清 (CS) は、Invitrogen 社より購入した。

Taq DNA ポリメラーゼと検出キットはタカラバイオより購入した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体およびエンハンストケミルミネッセンス (ECL) ウェスタンブロット検出液は、GE-Healthcare 社より購入した。その他の化学試薬類は、和光純薬より購入した。

III. 2 細胞培養液に添加する味噌試料の調整

味噌サンプルの調整は、図1で示すように、10gを20ml蒸留水 (MilliQ 水) に溶解させた。溶解液は、-20℃に保存し、各々の試験の際、解凍し使用した。各々の試験では、解凍溶液 (味噌サンプル液) が培養液中に添加された量 (培養液量, ml) あたりの添加容量の百分率 (% v/v, volume per volume) で示した。

III. 3 細胞培養と紫外線 (UVC) 照射

細胞の培養は、既報¹²⁾に従い行った。即ち、R_{Sa} 細胞は、5% (v/v) の CS を含む MEM 培地中で、95% 空気/5% 炭酸ガス、37℃ の条件下で、炭酸ガスインキュベーター中で培養、継代を行った。また、細胞の味噌サンプル液処理は、MTT アッセイを除いて、次のように行った。直径60mm のシャーレに 5×10^5 個の細胞を撒き、24時間培養した。翌日、味噌サンプル液をシャー

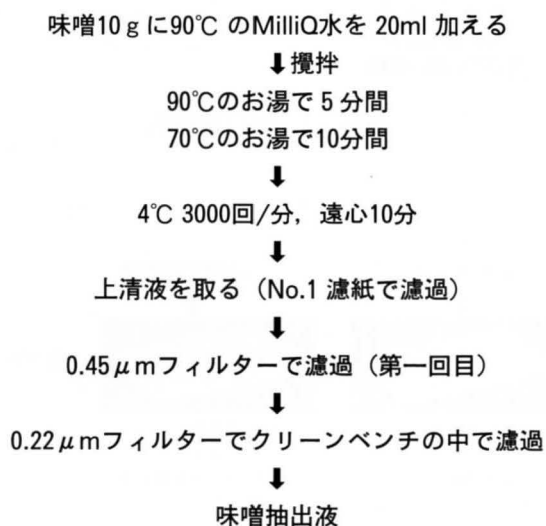


図1 味噌抽出液の調製

レに添加し、さらに24時間培養した。また、細胞の紫外線 (UVC) 照射は次のように行った。シャーレより培地を取り除き、PBS で1回洗浄した。次いで、約 1 J/m^2 秒の強度の UVC を6秒間照射し、直ちに5% (v/v) のCSを含むMEM培地を加え、48時間培養した。UVC 処理の対照細胞は、培地の除去、phosphate buffered saline (PBS) による洗浄を同様に行ったもの (Mock 処理) を使用した。

III. 4 細胞毒性テスト

細胞の生存能を阻害する毒性を検出するために、既報³⁾に従い、MTT 法 (図 2-1, 図 2-2) に準拠した。即ち、96穴培養プレートを用い、1穴中に 5×10^3 個の RSa 細胞を、味噌サンプル液と5% CSを含むMEM培地 $100 \mu\text{l}$ 中で48時間培養した。培養後、ピペットで培地を注意深く取り除き、穴を $150 \mu\text{l}$ の PBS で1回洗浄した後、 $100 \mu\text{l}$ の1%グルタルアルデヒド/PBS を加えて室温で15分間インキュベートし、細胞をプレート底面に固定した。グルタルアルデヒド溶液を除去

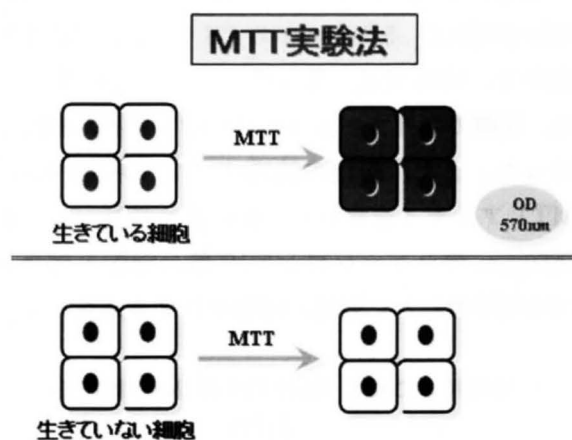


図 2-1 MTT実験法

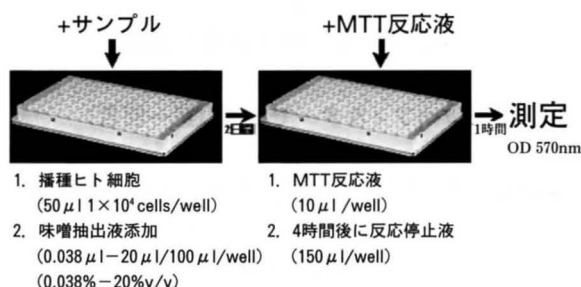


図 2-2 MTT法の測定過程

後、 $100 \mu\text{l}$ の0.1%クリスタルバイオレット染色液を加え、室温で30分間インキュベートし、細胞を染色した。染色液を除去後、培養プレートをよく水洗し、乾燥した後、 $100 \mu\text{l}$ の0.2% (v/v) Triton-X100 水溶液を加えて一晩放置し、固定化細胞に沈着した染料を溶出させた。翌日、マルチプレートリーダー E-max を用いて、595 nm の吸光度測定を測定し、味噌サンプル液未処理の細胞における測定値と比較を行った。

III. 5 シャペロンタンパク量の解析

細胞が含有するシャペロンの量を既報⁴⁾に従いウエスタンブロッティング法により解析した (図 3)。即ち、味噌サンプル液で処理した RSa 細胞を、PBS で洗浄の後、適量の SDS- サンプルバッファー (62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 10% (v/v) グリセロール, 0.001%プロモフェノールブルー, pH 6.8) で細胞を溶解した。溶解液を 95°C で2分間加熱し、これを SDS- ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 試料液とした。この試料液を、10%アクリルアミド濃度ゲル中で展開させ、タンパク質を PVDF 膜に転写した。転写後、膜を0.1% (v/v) Tween 20を含む緩衝液 (TBS-T, 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.5) で洗浄し、5%スキムミルク-TBS-T 中にて、室温で1時間インキュベーションを行った。次いで、膜を5%スキムミルク-TBS-T で適量に希釈した1次抗体液中にて、室温で1時間インキュベーションを行った。膜をTBS-T で洗浄後、5%スキムミルク-TBS-T で適量に希釈した HRP- 標識二次抗体中にて、室温で1時間インキュベーションを行った。膜を

1. 細胞培養条件
ヒトRSa細胞 5×10^5 個培養 (6cmシャーレ)
2. 味噌抽出液処理
味噌(1%抽出液) 処理 (処理時間: 24時間)
(37°C 5% CO_2 培養)
3. タンパク質サンプル回収 (SDS化)
4. 電気泳動法で分子量別によりタンパク質が分離される
5. 膜への分離タンパク質サンプルの転写
6. 抗体を用い、標的タンパク質の量の算出

図 3 ウエスタン・ブロッティング法 (タンパク質量解析法)

TBS-T で洗浄後、ECL 検出液に1分間浸し、酵素反応で生じた発光をX線フィルム上に感光させ検出した。タンパク質の存在量は、フィルム上の目的バンドの黒化度をイメージ解析ソフト (Multi Gauge ver 2.2, 富士写真フィルム) を用いて測定した。

III. 6 ウアバイン耐性を指標とした形質変異頻度の測定

細胞の形質変異頻度を既報⁷⁾のウアバイン耐性化試験法にて測定した。細胞毒性を与えない条件下で、味噌サンプル液を添加した条件下でRSa細胞の培養を24時間行った後、紫外線照射を行い、ウアバイン耐性のクローン化した細胞の出現頻度を測定した。ウアバインは細胞毒であるが、その結合標的分子であるNa⁺, K⁺ATPase に立体構造変異が生じた場合、ウアバインが結合できなくなり、細胞は生存でき、コロニーを形成するという原理を利用している (図4)。

UVC 照射、または Mock 処理後48時間の細胞を直径90mm の新しい培養シャーレに 8 × 10⁴細胞/シャーレで撒きなおし、翌日より0.8 μM のウアバイン存在下で3週間培養を行った。シャーレ中の細胞コロニーを0.2%メチレンブルー/30%メタノール液で染色の後、100細胞以上の大きさのウアバイン耐性コロニーの数をカウントした。同時に、直径90mm の新しい培養シャーレに800細胞/シャーレで撒き、2週間培養の後、コロニー数を計数し、コロニー形成率を求めた。各々のサンプルについて、4枚のシャーレを用い、4枚

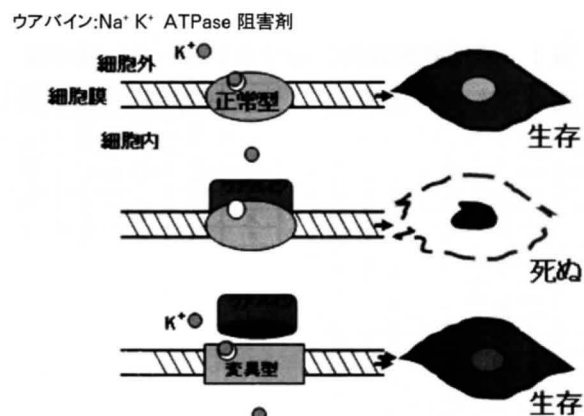


図4 ウアバイン耐性変異テストの原理

の平均値を求めた後、次式により変異コロニー出現頻度を求めた。

$$\text{変異コロニー出現頻度} = (\text{ウアバイン耐性コロニー数}) / [100 \times (\text{形成率判定用コロニー数})]$$

III. 7 遺伝子変異の解析

既報⁸⁾に従い、遺伝子変異解析のために、K-ras 遺伝子をゲノム PCR により増殖後、ナイロンメンブレンへ dot-blot し、DIG ラベル下 K-ras コドン12変異プローブにより塩基置換変異を検出した (differential dot-blot hybridization) (図5)。即ち、UVC 処理、または Mock 処理後4日間培養した。次いで、Sambrook らの成書 (Molecular Cloning 2nd edition) に記された方法に従って、細胞より DNA を抽出し、エタノール沈殿した後、TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。これを鋳型DNA とし、プライマー5'-GACTGAATATAAACTTGTGG-3' および3'-GCTTATACTAGG TTGTTATC-5' を用いて、K-ras 遺伝子のコドン12近傍を PCR 増幅した。PCR 産物をアガロース電気泳動で分離・精製し、ドットプロッター (バイオラッド) を用いてナイロン膜上にスポットした。ナイロン膜上の変異 DNA は、K-ras コドン12変異型遺伝子に特異的に結合するオリゴヌクレオチドの3'-末端をジゴキシゲニン-11-dUTP で標識したプローブとハイブリダイゼーションを行った後、アルカリフォスファターゼ-標識抗ジゴキシゲニ

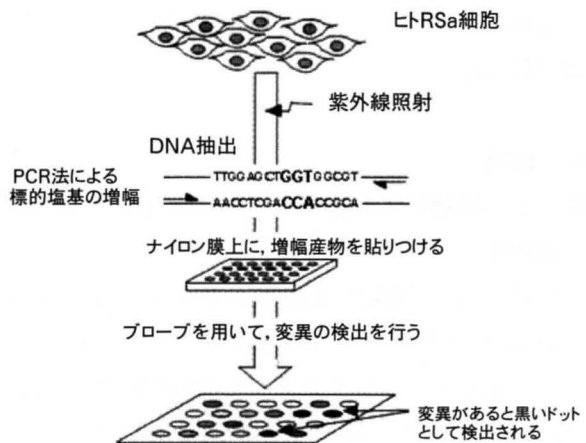


図5 ドットプロットハイブリダイゼーション法による K-ras コドン12における塩基置換の変異検出法

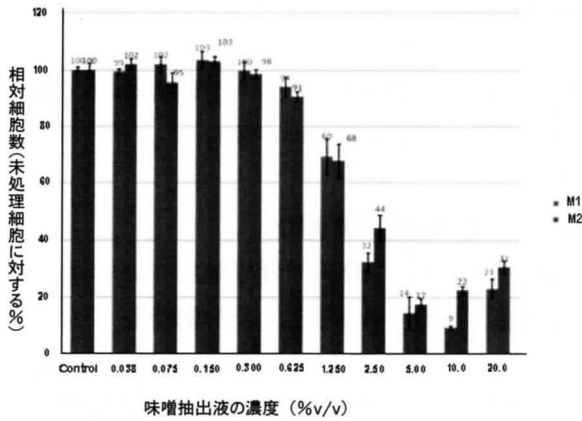


図6 味噌抽出液(M1, M2)の細胞生存への影響

ン抗体と基質 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸を用いて検出した。オリゴヌクレオチドの標識、抗体および基質は、DIG 核酸検出キット（ロシユダイアグノーシス）を使用した。変異 DNA を検出するオリゴヌクレオチドは、5'-GTTGGAGCTAGTGGCGTAGG-3'、5'-GTTGGAGCTCGTGGCGTAGG-3'、5'-GTTGGAGCTTGTGGCGTAGG-3'、5'-GTTGGAGCTGATGGCGTAGG-3'、5'-GTTGGAGCTGCTGGCGTAGG-3' および 5'-GTTGGAGCTGTTGGCGTAGG-3' の 6 種類を等量混合したものを使用した。なお、変異型 DNA 検出の陽性コントロールとして、SW480細胞より抽出したゲノム DNA を鋳型として増幅された DNA を用いた。

III. 8 結果の処理

結果は、2 回以上の独立した実験データの平均値で示した。

IV. 結果

IV. 1 細胞生存を阻害しない味噌サンプルの添加濃度

MTT 法にて測定した細胞の生存レベル（非添加の場合の生存レベルを100%として比較）から、培養液中へ味噌サンプルを48時間添加したままにしておくと、図6で示す例のように、No.1 (M1) と No.2 (M2) の場合、2.5%以上で、半数以上の細胞の生存能力が阻害されることが示唆され

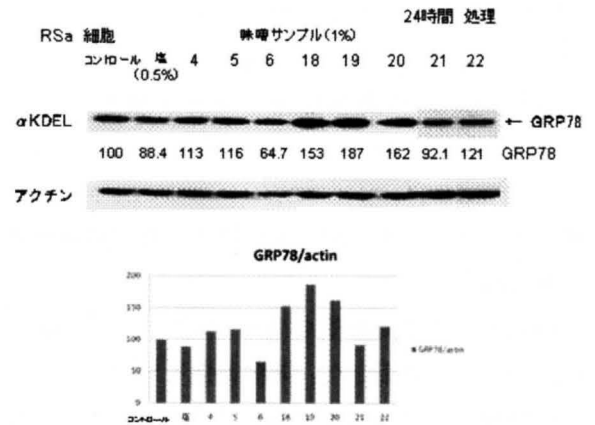


図7 味噌サンプルによるシャペロンの細胞含有量への影響

た。No.1, 2 以外では、No.11, 12 および 20 を除き、おしなべて、2.5%（味噌重量の濃度が 12.5mg/ml）までは増殖阻害が顕著に見られなかった。そこで、原則 2% 以下の処理において以下の検討をすることとした。

IV. 2 味噌サンプル液の添加によるシャペロン量の解析

味噌サンプル24時間処理によるシャペロンタンパク類における細胞含有量の変化をウエスタンブロット解析により調べた。味噌サンプル処理24時間後の細胞内量を非処理細胞内量と比較した。図7で示す1回の解析例のように、No.18, 19 および 20 の味噌サンプルにおいて、GRP78の量がコントロール比で1.5倍以上に増大していた。さらに、解析回数を増やして結果をまとめると GRP94, HSP90 α , HSP27 のシャペロンでも、増大化する味噌サンプルが見出された（表1）。No.3 などの15サンプルでシャペロン類の細胞内

表1 味噌処理細胞におけるシャペロン類の量

味噌サンプル番号	細胞内量(非処理コントロール)に対する比率			
	GRP94	GRP78	HSP90	HSP27
1	87	78	41	71
2	90	82	70	75
3	85	96	175	59
4	91	88	79	113
5	69	74	76	112
6	95	91	83	110
7	99	105	98	117
8	104	97	78	90
9	98	83	60	104
10	81	81	55	96
11	102	107	69	117
12	121	100	105	139
13	80	63	71	106
14	120	110	112	162
15	140	119	109	184
16	131	107	100	156
17	111	103	108	163
18	120	126	87	162
19	127	136	113	164
20	112	131	108	140

含有量が増大すると示唆された(図7で黒いバンドが細胞内量を示し、バンドの幅が太いほど、量が多いことを示し、アクチンタンパクの量と対比させた上で、バンドの濃さを比較数値化し、コントロールでの値を100と示してある)。

IV.3 味噌サンプル液の添加による紫外線誘発変異の抑制

1) ウアバイン耐性化形質変異による解析

RSa細胞における紫外線によるウアバイン耐性化形質変異の誘発頻度が、紫外線照射前にNo.3味噌サンプル液を培養液へ添加しておく、非添加の場合と同程度ないしそれ以下となった(図8)。さらに、No.4, 5, 12, 17, 19, 20, および23の味噌サンプル液の処理により、形質変異頻度の低下が見られた(表2)。

2) ドットプロットによる解析

紫外線照射で誘発される*K-ras*コドン12の変異をドットプロット解析により調べ

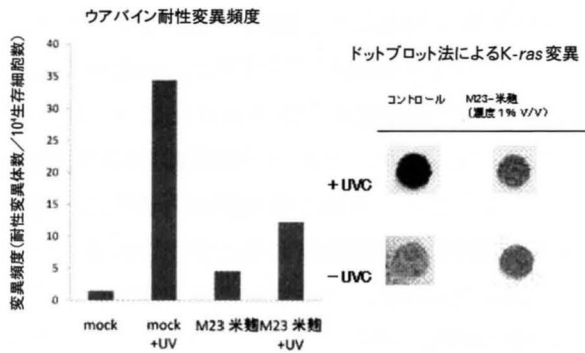


図8 味噌麹サンプルによる変異の抑制

表2 味噌処理細胞における変異発生の調節効果

味噌サンプル番号	薬剤耐性形質 変異の抑制(a)	がん遺伝子 発現抑制効果(b)
1	未	+
2	+	++
3	+	++
4	+	+
5	+	+
6	未	-
12	+	+
18	未	+
14	-	-
15	未	+
16	未	-
17	+	-
18	-	-
19	+	+
20	+	+
21	未	++
22	未	+
23	+	++

(a) + : 変異頻度が低下、- : 変異頻度が不変、未 : 実験未施行。

(b) 図9の判定法による抑制度のレベル。

た。このアッセイでは、ドットの発色が濃くなり黒く示される丸が変異の発生を示し、灰白の丸へと変じれば、変異が検出できなくなり、変異の発生が抑制されたことを示す(図9)。例えば、No.19, 20, および21味噌サンプル処理細胞で、紫外線誘発変異が抑制された(図10)。一方、No.18では、紫外線誘発変異は無添加サンプルと同様であった(図10)。

IV.4 米麹味噌製品における変異発生抑制の検証

紫外線による変異誘導の抑制効果が見られた11サンプル(表2)において、No.17の豆味噌以外の10サンプルが米麹味噌であった。No.3とNo.23は同一社の製品である。そこで、No.23製品の原料素材である米麹について、変異発生への効果を調査した。形質と遺伝子レベルのどちらでも、変異発生の抑制効果が見出された(図11)。

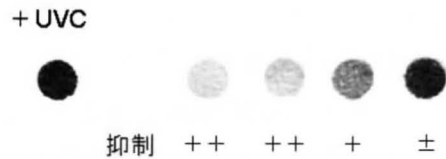


図9 味噌サンプルによる*K-ras*変異の抑制

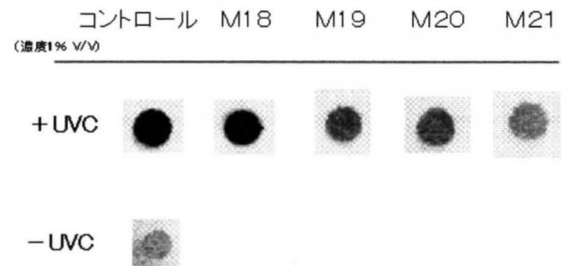


図10 味噌サンプルによる*K-ras*変異の抑制

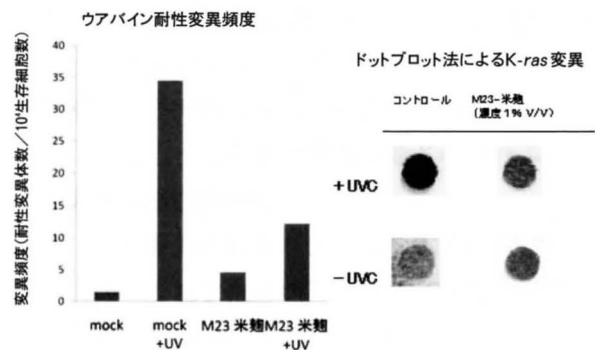


図11 味噌米麹サンプルによる変異の抑制

V. 考察

今回の試験では、27種の味噌製品について、RSa細胞における紫外線照射による変異誘導に及ぼす影響を調査した。即ち、まず、シャペロン4種の細胞含有量の変動より調査し、変異をOuaRと*K-ras* コドン12塩基置換変異で検出した。表2で示したように、変異検査に関して調査した18種の味噌製品の中で、4種のシャペロンのいずれかの量を増大させるなどの変動を促し、しかも、変異を抑制することが示唆されたものは、11製品であった：2, 3, 4, 5, 12, 17, 19, 20, 21, 22, および23。

変異の発生を検討するには、多大な労力と時間等がかかる。そこで、その検討作業の前に、変異の発生に関わるシャペロンを解析するというより簡便な方法により、目的とする味噌の効能の有無を検索することとした。また、味噌処理時間については、24時間と設定した。変異の発生を抑制する事を見出したヒトインターフェロンサンプルでは、その抑制作用を発揮するのに6時間以上を要すること、および、24時間前後が至適であることを見出していることによる⁶⁾。紫外線照射48時間後における増殖可能な細胞の割合についてコロニー形成率を指標として調べたが、紫外線照射前の味噌サンプル液の2% (v/v) 以下での処理は、コロニー形成率に影響を及ぼさなかった。その上で、HSP90 α の細胞内量を増加させたNo.3のサンプル(表1)は、2種類の違う実験法で変異発生の抑制が確認された(表2)。また、GRP78とHSP27の量を増大させたNo.19と20(表1)も、両検査法での変異発生を抑制した(表2)。

通常、変異の発生は極めて低頻度であることから、本研究では、その発生頻度を上昇させ、検知しやすくしている⁷⁾。また、変異誘導因子としては、直接、細胞核内のDNAに傷害を与え得ると考えられている放射線類を使うこととしている。その上で、味噌サンプルで24時間細胞を処理し、その後、紫外線照射により変異を誘導させ、非処理細胞と比較した。変異の検出では2つの方法を樹立しており、その1つは形質レベルの変異検出法である。一方、*K-ras* コドン12における塩基置換変異を指標とするドットプロットハイブリダ

イゼーションを利用した。

No.14の麦味噌では、4種のシャペロン、特に、GRP94とHSP27の細胞内量の増大をもたらしたが、塩基置換類の変異発生における抑制効果が認められなかった。他の種の変異に関して調査する必要がある。GRP94, GRP78およびHSP27の細胞内量を増大化させたNo.18も同様な調査を必要とする。No.17の豆味噌では、GRP94とHSP27量の増大とOua^R検査による変異発生の抑制をもたらしたが、*K-ras* コドン12における塩基置換変異の発生を抑制する作用が認められなかった。おそらく、変異の種類により、抑制する活性が相違したのであろう。一方、シャペロン量の増大化と変異発生抑制が共に検知された製品(3, 4, 5, 12, 19, 20, および23)は、全て米味噌であった。また、No.3と23は、同一社におけるロット番号(製造日)が違う製品であった。そこで、米麴に、シャペロンを介する変異発生抑制作用がある可能性を考え、製品No.3や23の素材である米麴や煮大豆に関して、さらに、シャペロン量と変異発生の調節作用を検証した。図11で示してある米麴における変異発生抑制の結果以外に、両素材共に、Oua^Rにおける誘発値を低下させたこと(結果省略)により、また、上述の豆味噌製品17の結果から、今のところ、米麴と煮大豆の両者共に、変異発生を抑制する可能性があると予測される。今後は、他社の米味噌、豆味噌および麦味噌についても、変異抑制の有無の違いも含め、原材料別の調査をすべく、準備中である。

シャペロンタンパクおよびその関連タンパクの細胞内量が変異誘発頻度に影響を及ぼすと考えられるが、4製品(14, 15, 16, および18)の結果では、明瞭な関連性は見出せなかった。今後は、塩基置換変異を基にする変異検出法以外の変異を高感度で識別可能な検出法を開発する必要がある。例えば、変異誘導因子を紫外線でなく誘発する変異のタイプが違うX線にすることも一法である。但し、複数のシャペロン種の量が変動する傾向にあることより、それらシャペロンタンパク量の増減の複合作用が塩基置換の変異抑制効果を相殺することに結びついた可能性もあり、その精査も今後の課題である。

一方で、調査した6製品(1, 2, 10, 24, 26, および27)でシャペロン量が減少したことは注目に値する。シャペロンは、ガン細胞での細胞内量が高い場合、X線などの抗癌因子に対する致死抵抗性獲得機構のひとつと考えられているからである⁸⁾。そこで、味噌製品の中には、ガン細胞の抗癌剤感受性化にシャペロン量を低下させて関わる効能があるという命題が生じ、今後探求すべき重要な課題となる。

今後は、以下の様々な疑問点の解決もする必要がある。変異発生の抑制にいたる主たるメカニズムの一つとしてDNA修復過程が考えられるが、味噌製品の変異発生抑制はその過程を左右しての作用であるか。生体中には、ヒトインターフェロンという生理活性因子があり、その因子に変異発生を抑制する作用のあることをすでに私共は見出しているが、その作用を味噌が抑えることはないか。あるいは、その作用と競合して味噌の変異抑制作用は相殺されてしまわないか、等々である。

いずれにせよ、味噌食品に変異発生を抑制する作用があるとの示唆が得られたことから、引き続き、他のシャペロン分子を指標とするなどして、全国の様々な会社で販売されている多種製品における変異抑制の有無に関するスクリーニングを行い、同時に、抑制作用の分子メカニズムの解明実験などをする必要がある。その上で、シャペロンを介する変異発生抑制という味噌製品がもたらすSOS応答機能の詳細を確認して行く必要がある。さらに、変異発生以外の多面的生理機能に関わるSOS応答に味噌製品の効能がどのように関わるかは、重大な問題であり、一つ一つ解決させて行く必要もある。

VI. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、中央味噌研究所のご支援をいただいたこと、味噌製造の各社に味噌製品や原材料の素材を快くご提供いただいたこと等に対し、深く感謝を申し上げます。

VII. 参考文献

1. Suzuki N. Nakazawa A. Phenotypic

difference between uvr A and uvr B mutants of *E. coli*. *Nature* 261, 244-245, 1976

2. 鈴木信夫, 喜多和子, 菅谷茂, 鈴木敏和, 一村義信 環境影響生科学 基本研究の展開—突然変異説のアンチテーゼから進化医学の創造へ(ストレス状態によるヒト遺伝子構造の変動調節機能の発見)。千葉医学81,223-227, 2005
3. Chi X-J., Takahashi S., Nomura J., Sugaya S., Ichimura Y., Zhai L., Tong X., Kita K., Suzuki N. Modulation of mutability in UV-irradiated human RSb cells by serum obtained from parabolic flight volunteers. *J. Int. Soc. Life Info. Sci.* 25, 11-22, 2007
4. 海老根英雄 味噌の生態調節機能, 味噌の科学と技術 43,339-361,1995
5. 鈴木信夫 RSa. 動物培養細胞マニュアル, 瀬野悍二, 小山秀機, 黒木登志夫 編, 共立出版, 東京, 204-205, 1993
6. Suzuki H., Suzuki N., Sasaki M., Hiraga K. Orthophenylphenol mutagenicity in a human cell strain. *Mutat. Res.* 156, 123-127, 1985
7. Suzuki N., Suzuki H. Suppression of UV mutagenicity by human interferon. *Mutat. Res.* 202, 179-183, 1988
8. Isogai E., Suzuki N. Involvement of antipain-sensitive protease activity in suppression of UV-mutagenicity by human interferon- α . *Mutat. Res.* 325, 81-85, 1994
9. Suzuki N., Suzuki, H. Suppression of saccharin-induced mutagenicity by interferon- α in human RSa cells. *Cancer Res.* 55, 4253-4256, 1995
10. Suzuki N., Ishibashi M., Kita K., Wu Y., Nomura J., Takakubo Y., Hiroshima K., Genga K., Ohwada H., Hayashi Y. Detection of Serum Factors Enhancing Cell Mutability From Lung Cancer Patients by Application of Hypermutable Human Rs Cells. *Int. J. Cancer* 78, 550-555, 1998

11. Hirano J., Kita K., Sugaya S., Ichimura Y., Yamamori H., Nakajima N., Suzuki, N. Down-regulation of Molecular Chaperone GRP78/Bip Expression Involved in Enhancement of Human RS Cell Mutability. *Pancreas* 36, e7-14, 2008
12. Suzuki N., Fuse, A. A UV-sensitive human clonal cell line, RSa, which has low repair activity. *Mutat. Res.* 84, 133-145, 1981
13. Dong M., Chen S.P., Kita K., Ichimura Y., Guo W-Z., Lu S., Sugaya S., Hiwasa T., Takiguchi M., Mori N., Kashima A., Morimura K., Hirota M., Suzuki N. Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of Sarcodonin G from *Sarcodon scabrosus* in HeLa cells. *Int. J. Oncol.* 34, 201-207, 2009
14. Kita K., Jin Y-H., Sun Z., Chen S-P., Sumiya Y., Hongo T., Suzuki N. Increase in the levels of chaperone proteins by exposure to -estradiol, bisphenol A and 4-methoxyphenol in human cells transfected with estrogen receptor cDNA. *Toxicology in Vitro*, 23, 728-735, 2009
15. Suzuki H., Suzuki N. Detection of K-ras codon 12 mutation by polymerase chain reaction and differential dot-blot hybridization in sodium saccharin-treated human RSa cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 956-961, 1993
16. Suzuki N. Effects of human interferon- α on UV-induced DNA-repair synthesis and cell killing. *Mutat. Res.* 175, 189-193, 1986
17. 鈴木信夫, 鈴木英子培養ヒト細胞RSaにおけるK-ras codon12突然変異のサッカリンナトリウムによる誘発-ベリルアルデヒドの変異原性との比較-. *変異原性試* 3, 155-160, 1994
18. Kubota H., Suzuki T., Lu J., Takahashi S., Sugita K., Sekiya S., Suzuki N. Increased expression of GRP94 protein is associated with decreased sensitivity to X-rays in cervical cancer cell lines. *Int. J. Rad. Biol.* 81, 701-709, 2005

Bacillus 属細菌の γ -グルタミルトランスペプチダーゼをグルタミナーゼとして発酵食品の醪に添加することにより、うま味を向上させる方法に関連する研究

鈴木 秀之, 山田 千晶, Ho Van Thao

Development of A Method to Improve Umami Taste of Fermented Food by the Addition of γ -Glutamyltranspeptidase from *Bacillus* to Moromi as Glutaminase

Hideyuki SUZUKI, Chiaki YAMADA and Thao Van HO

Division of Applied Biology, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Goshokaido-cho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

要旨

枯草菌由来の *ggt* 遺伝子を T5 プロモーター下流に接続したプラスミド pCY167 を作成した。このプラスミドを持つ大腸菌株はペリプラズム空間に多量の GGT を発現し、そのペリプラズム画分からギガバイトカラムにより GGT を精製できた。納豆菌と枯草菌の GGT はそのアミノ酸配列も遺伝子の塩基配列も極めて類似しているにも関わらず、同様に作成した納豆菌の *ggt* 遺伝子を保持するプラスミドで形質転換した大腸菌は GGT を発現しなかった。

【はじめに】

γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT; EC 2.3.2.2) はバクテリアからヒトに至る多くの生物種に見出される酵素である。GGT は大小2つのサブユニットからなる酵素で、小サブユニット N 末端の Thr 残基の側鎖の酸素原子が¹⁾、基質である γ -グルタミル化合物のカルボニルカーボンに求核付加し、 γ -グルタミル酵素中間体を形成する^{2,3)}。アミノ酸などのアミノ基が求核置換すれ

ば、新しい γ -グルタミル化合物を生成する転移反応、水が求核攻撃すればグルタミン酸を遊離する加水分解反応となる。加水分解反応において、基質がグルタミンであれば、グルタミナーゼ反応である。2つの反応の至適 pH は異なっているため、反応液の pH をうまく調整することで、いずれか一方の反応を選択的に進行させることができる (図1)。

醤油のうま味は主にグルタミン酸の量によって決まる。醤油醸造時、大豆タンパク質は麹菌の作るプロテアーゼによってペプチドに、そしてペプチダーゼによってアミノ酸にまで分解され、呈味性に寄与する。遊離してきたグルタミンはグルタ

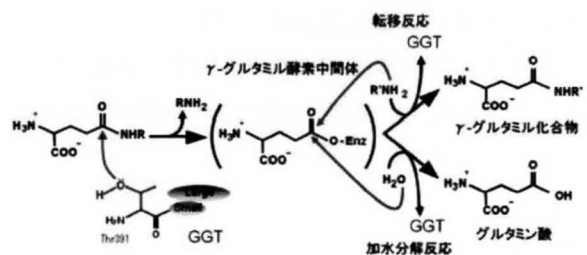


図1 GGT の触媒する反応

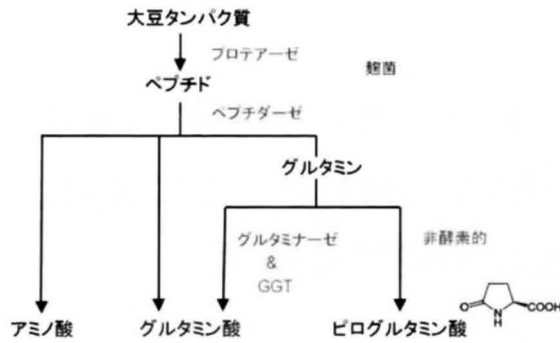


図2 醤油、味噌醸造時の大豆タンパク質の推移

ミナーゼによって加水分解されてグルタミン酸になり、うま味に寄与する。グルタミナーゼの活性が十分でないと、グルタミンは自動的に環化して、無味あるいは酸味を呈するピログルタミン酸になり、せっかくうま味成分になるはずのものをロスしてしまうことになる(図2)。醤油醸造は、雑菌の増殖を防ぐために、18%の食塩存在下、pH5.5で行われる。18%の食塩は、3Mに相当し、このような高濃度の食塩存在下においては、麹菌のグルタミナーゼは強く阻害されている。そこで、耐塩性のグルタミナーゼをバクテリアから見つけだし、醤油醪に添加しようという試みが行われてきたが、食品に使えるバクテリアのグルタミナーゼで耐塩性のものはない。前述したように、GGTはグルタミナーゼ活性を持つことから、耐塩性のGGTをバクテリアに見つけだし、グルタミナーゼとして添加しても同じ効果が期待できる。私たちは、枯草菌GGTが耐塩性であることを見出し⁴⁾、醤油醪に添加することにより、醤油のうま味を増強する方法を開発し、すでに報告した⁵⁾。醤油と違って味噌の場合は、固形分が多いが、発酵中のタンパク質の分解経路は同じである。

ここでは、*Bacillus* 属細菌のGGTが耐塩性であることと組換え枯草菌GGTの高発現株の育種について報告する。

【方法など】

プラスミド

プラスミド pMH2289 は、大腸菌—枯草菌間のシャトルベクターである pHY300PLK に枯草菌の *ggt* 遺伝子を発現調節領域ごとクローニング

したものであり、すでに報告している⁴⁾。醤油醪へのGGTの添加効果を調べた研究⁵⁾で使用したGGTは、このプラスミドを持つ枯草菌から精製した標品である。

【結果および考察】

Bacillus 属細菌のGGTは耐塩性である

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は *Bacillus* 属細菌である。これまでの私たちの研究で枯草菌のGGTは耐塩性であることが分かっていたので、他の *Bacillus* 属細菌のGGTについても耐塩性を比較することにした。枯草菌のGGTは18%食塩存在下でも、食塩非存在下の74%のグルタミナーゼ活性を保持していた。GGTについて報告のある枯草菌の亜種である納豆菌 (*B. subtilis subsp. natto*) や *B. licheniformis* のGGTも18%食塩存在下でそれぞれ72%、64%のグルタミナーゼ活性を保持しており、耐塩性であることが分かった。

枯草菌GGTの高発現株(CY168株)の育種

プラスミド pMH2289 を *Bam* HI と *Sca* I で切断し、枯草菌由来の *ggt* 遺伝子を含むDNA断片を *Bam* HI と *Sca* I で処理した pACYC184 に繋ぎ pCY150 を作製した。pCY150 を鋳型とし、オリゴヌクレオチド (5'-cccggatccatgaaaagaacgtggaacgctc-3' 5'-cccctgcagttatttacctgttttaattaatgccgatac-3') をプライマーとしてPCRにより *ggt* 遺伝子を増幅した。増幅断片 (1.7kb) は枯草菌の *ggt* 遺伝子のORFのN末端に *Bam* HI サイトを、C末端に *Pst* I サイトを付加した形のものであり、*Bam* HI と *Pst* I で処理したのち、*Bam* HI と *Pst* I で切断した pQE-80L に接続し、pCY162とした。pCY162 は *ggt* 遺伝子の開始コドンの前に MRGSH₆GS という12アミノ酸残基を付加した形になっている。そこで、オリゴヌクレオチド (5'-gaggagaaattaactatgaaaagaacgtggaacgctc-3') とこれに相補的なオリゴヌクレオチドを用いてクイックチェンジ法により、この12アミノ酸に相当する塩基を欠失させた。得られたプラスミドのSD配列の少し上流にある *Eco* RI サイトから *Pst* I までの塩基配列が正しいことを確認した後、このプラスミドを *Eco* RI と *Pst* I で切断した。

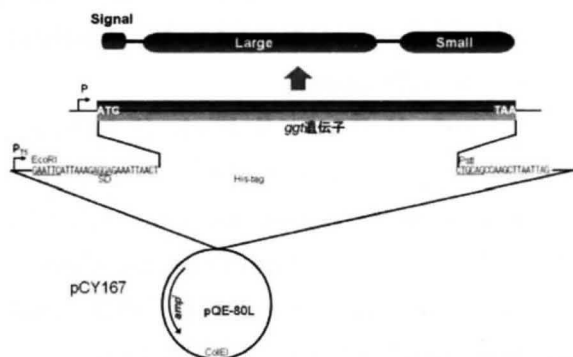


図3 プラスミド pCY167 の構造

得られた1.7kbのDNAフラグメントとpCY162をEcoRIとPstIで切断して得られた4.7kbのDNAフラグメントをDNAリガーゼでつなぎ合わせ、pCY167を得た(図3)。これにより、このプラスミド上のggt遺伝子は、開始コドンから終始コドンまでの間の配列が野生型の枯草菌のggt遺伝子と全く同じ配列となり、T5プロモーターの制御を受ける形となった。pCY167で大腸菌SH641株⁶⁾(F⁻Δggt-2 recA56 rpsL srl300::Tn10)を形質転換して、CY168株を得た。

CY168株のGGT発現

CY168株を100mlのLB培地中37℃で2時間培養した後、IPTGを終濃度0.5mMになるように添加することによってGGTの誘導を開始した。その後、37℃で培養を続けた場合と、20℃にシフトダウンして培養した場合に分けてGGTの

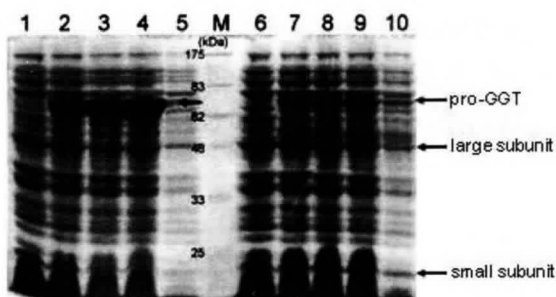


図4 菌体と無細胞抽出液サンプルのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動。IPTG添加後37℃で培養した場合(A), 20℃で培養した場合(B)。

M, 分子量マーカー; 1~4, IPTG添加後37℃で0, 1, 2, 3時間培養後の全菌体; 5, 同3時間培養後の無細胞抽出液(24.0fg); 6~9, IPTG添加後20℃で0, 1, 2, 3時間培養後の全菌体; 10, 同3時間後の無細胞抽出液(48.3fg)。

発現を比較した。IPTG添加後、1時間ごとに3時間まで菌を回収し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図4に示した。誘導後37℃で培養を行ったものは、誘導後の全菌体サンプル中に分子量約6万のタンパク質が有意に増加しているのが見られた。これはGGTの前駆体の分子量に相当する。このバンドは無細胞抽出液サンプルではほとんど見られなかったことから、誘導後37℃で培養した場合、GGTの前駆体が不溶体として蓄積したと考えられた。一方、誘導後20℃で培養したものは、全菌体サンプルにも無細胞抽出液にも前駆体の蓄積はそれほど多くなく、菌体サンプルではGGTの大サブユニットに相当する分子量約5万の位置のバンドが誘導後に増加しているのが確認できた。

無細胞抽出液を用いてγ-GpNAの加水分解反応と転移反応の活性測定を行った。その結果、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果から予想されたとおり、誘導後37℃で培養した場合の転移活性は29.7mU/mgであるのに対して、20℃で培養した場合は481mU/mgであり、20℃で培養した方が16倍比活性が高いことが分かった。

以上の結果から、IPTGによる発現誘導後の培養は20℃で行うのが適当であると考えられた。

CY168株のペリプラズム画分からのGGTの精製

CY168株を200mlの100μg/mlアンピシリンを含むLB培地で培養後、すでに報告した方法に従ってペリプラズム画分を調製した⁷⁾。ペリプラズム画分をギガバイトカラム(1.1x2.1cm)にアプライし、リン酸カリウム緩衝液(pH7)の10mM~1Mでグラジエント溶出した(図5A)。GGT活性の高かった26~34番のフラクションを

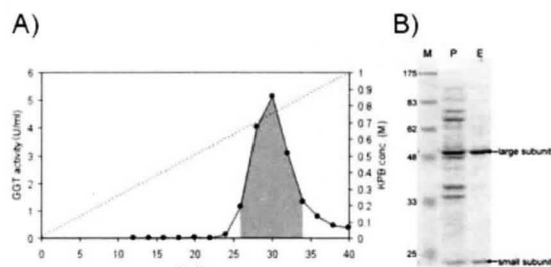


図5

合一し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供して評価したところ(図5B)、高精製度かつ高収率(77.5%)でGGTを精製することができた。最終標品の比活性は37.1 U/mg、収量は47.9 Uであった。

わずかな量のCY168株の培養で、高収率で精製度の高い酵素標品を得ることができるようになり、GGTを利用しやすくなった。

納豆菌GGTの遺伝子クローニングと発現

枯草菌と納豆菌のGGTの違いは、コーディング領域の1,761塩基のうち塩基置換が起きている箇所が16カ所、587アミノ酸残基のうちアミノ酸置換が起きている箇所が4カ所あるに過ぎず、極めて類似している。そこで、pCY167の枯草菌*ggt*遺伝子の開始コドンから終止コドンの領域をそっくり納豆菌の*ggt*遺伝子の開始コドンから終止コドンのDNA配列に置き換えた構造を持つプラスミドを作製した。しかし、このプラスミドで形質転換した大腸菌は、納豆菌のGGTを発現しなかった。納豆菌のGGTのコドンユースエージを枯草菌のGGTと比較すると、3つのコドンが大腸菌にとってコドンユースエージが極めて低いコドンに置き換わっていたが、そのことがGGTが発現しない理由とは考えにくい。

【引用文献】

1. M. Inoue, J. Hiratake, H. Suzuki, H. Kumagai, and K. Sakata. Identification of catalytic nucleophile of *Escherichia coli* γ -glutamyltranspeptidase by γ -monofluorophosphono derivative of glutamic acid: N-terminal Thr-391 in small subunit is the nucleophile. **Biochemistry** 39:7764-7771 (2000).
2. T. Okada, H. Suzuki, K. Wada, H. Kumagai, and K. Fukuyama. Crystal structures of γ -glutamyltranspeptidase from *E. coli* a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103:6471-6476 (2006).
3. 鈴木秀之, 和田啓, 福山恵一. γ -グルタミルトランスペプチダーゼの立体構造に基づいた成熟化と酵素反応機構. 蛋白質核酸酵素 54:245-251 (2009).
4. H. Minami, H. Suzuki, and H. Kumagai. Salt-tolerant γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity. **Enzyme Microb. Technol.** 32:431-438 (2003).
5. K. Kijima and H. Suzuki. Improving the umami taste of soy sauce by the addition of bacterial γ -glutamyltranspeptidase as a glutaminase to the fermentation mixture. **Enzyme Microb. Technol.** 41:80-84 (2007).
6. H. Suzuki, H. Kumagai, T. Echigo, and T. Tochikura. Molecular cloning of *Escherichia coli* K-12 *ggt* and rapid isolation of γ -glutamyltranspeptidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 150:33-38 (1988).
7. H. Suzuki, H. Kumagai, and T. Tochikura. γ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: formation and localization. **J. Bacteriol.** 168:1332-1335 (1986).

新規ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた味噌経口摂取による 子宮筋腫増殖抑制効果についての検討

武田 卓, 築地 謙治, Li Bin, 八重樫伸生

Antiproliferative effect of Miso on uterine leiomyoma cells in vitro and in vivo

Takashi TAKEDA, Kenji TSUIJI, Bin LI, Nobuo YAEGASHI

Center for Traditional Asian Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1
Seiryomachi, Aoba, Sendai 980-8574, Japan

子宮筋腫は良性疾患だが、女性の約25~50%に認められ過多月経・月経痛・圧迫等によりQOLを著しく障害する¹⁾。外科治療が標準治療とされ、子宮摘出の三分の一は筋腫に対して行われている。筋腫は女性ホルモン（エストロゲン）依存性に増殖するため、閉経でエストロゲン分泌がなくなれば治療の必要性はなくなる。子宮筋腫に対する薬物治療では、エストロゲンによる筋腫細胞増殖機構を抑制するGnRHアゴニストが使用されるが、重篤な副作用のため長期投与できない。閉経前の筋腫増殖速度を抑制し閉経まで乗り切れば子宮温存薬物療法は達成されるが、このような薬物は存在しない。疫学的には、大豆製品摂取による筋腫発症抑制の可能性が報告されている²⁾。大豆中には植物性エストロゲンであるイソフラボンが含まれており、そのなかのジェニスタインについては我々の先行研究において子宮筋腫細胞増殖に対するPPAR γ を介する抑制効果を認めている³⁾。我々が最近開発したヒト子宮筋腫モデルマウスは長期間にわたり筋腫の組織学的構造維持が可能である⁴⁾。今回、このモデルも含めて味噌による子宮筋腫増殖抑制効果について検討し、子宮筋腫治療法の新たな展開を目的として実験を行った。

1 実験方法

東北大学利益相反委員会、東北大学倫理審査委員会、動物実験委員会で承認された実験プロトコルに基づいて研究をおこなった。

1) 試料

中央味噌研究所より供与された米味噌（仙台系、信州系）を使用した。味噌を等量の蒸留水に溶解懸濁し、約5分間ボイル後に遠心し上清部分を実験に使用した（以下、味噌上清と表記）。

細胞は子宮筋腫モデル細胞株（ELT-3細胞）を用いて、過去に報告されている培養方法により37度のCO₂インキュベーター（5%）下で培養した⁵⁾。

PPAR γ の阻害剤であるbisphenol A diglycidyl ether (BADGE)はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入し使用した。BADGEはdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し培養液中で0.1% vol/volになるようにし、コントロール細胞にもDMSOを培養液中で0.1% vol/volになるように添加した。

2) 細胞増殖評価

細胞増殖を細胞数およびMTSアッセイ（Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)）で検討した。

3) SDS-PAGE と western blotting

ELT-3 は10 cm ディッシュで培養し、それぞれの味噌上清を添加し24時間後に細胞を回収した。細胞は1 ml の lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM NaF, 1 mM Vanadate, 0.75 mM PMSF, 15% glycerol] で溶解した。各サンプルは (25 mg/lane) SDS-PAGE 10% gel を用いて電気泳動した。PVDF メンブレンに転写しリン酸化 p44/42 抗体 (Cell Signaling Technology) ならびにインターナルコントロールとして β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich) を用いて western blotting を行った。

4) ヒト子宮筋腫モデルマウス

患者同意のもと過多月経等の症状のため子宮全摘あるいは子宮筋腫核出により摘出した子宮筋腫組織を使用した。子宮筋腫組織を細切し免疫不全マウスである NOG マウスの皮下に麻酔下で移植しヒト子宮筋腫モデルマウスを作製した。NOG マウスには子宮筋腫組織移植の48時間前にエストロゲンサポートのためのエストロゲンペレットを皮下に留置した。

安楽死後に移植組織片を摘出し、組織学的検索 (HE 染色, エラスチカマッソントリクローム染色) をそれぞれ行い、子宮筋腫の組織構築および特性を検討した。また、細胞増殖の指標として Ki-67 免疫染色, アポトーシスの指標として TUNEL 染色をおこなった。

味噌上清投与実験では、強制経口ゾンデ方により仙台味噌上清0.1ml を連日投与した。

2 実験結果および考察

1) 味噌上清による子宮筋腫細胞増殖抑制効果

味噌上清添加後72時間後に細胞数および MTS アッセイにより細胞増殖を評価したところ、仙台系、信州系ともに抑制効果を認めた (図1)。信州系でコントロールの約40%, 仙台系で約25%に抑制された。これまでの検討では、大豆中イソフラボンのジェニスタインによる筋腫細胞抑制における PPAR γ の関与を明らかにしてきた。そこで、PPAR γ の特異的阻害剤 BADGE の影響を検討した。ジェニスタインによる細胞増殖抑制効果とは異なり、味噌上清による細胞抑制効果に対

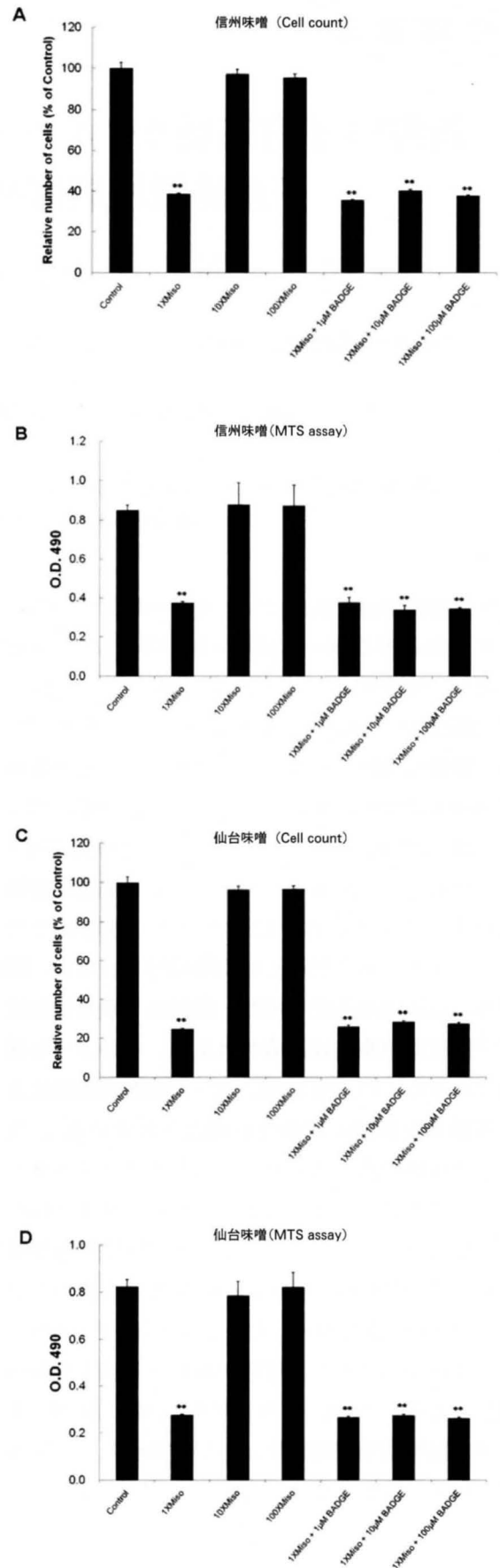


図1 味噌上清による子宮筋腫細胞増殖抑制効果

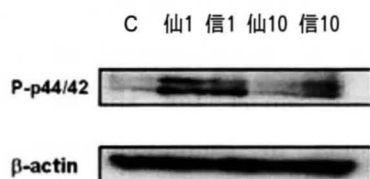


図2 味噌上清によるERKリン酸化

してBADGEは抑制効果を解除できなかった。以上より、味噌上清による抑制効果においては、PPAR γ と異なるメカニズムを介することが明らかとなった。

次に様々な細胞増殖シグナル伝達系において重要な役割をはたすMAPキナーゼ系に対する味噌上清の影響を検討した。味噌上清はERKをリン酸化した(図2)。このリン酸化の細胞増殖における意義は不明であり、今後検討していく必要がある。

2) ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた検討

ヒト子宮筋腫モデルマウスに味噌上清の経口投与実験をおこなった。味噌は*in vitro*でより強い細胞増殖抑制効果を認めた仙台系を使用した。モデル開発直後であり、モデルそのものの特性が十分に解明されていなかったため、とりあえず安定的に移植が確認できていた移植後8週まで投与を行った。摘出した組織からの検討では、HE染色、エラスチカマッソントリクローム染色での組織学的構築に差を認めず、また細胞増殖・アポトーシスにかんしてもKi-67免疫染色・TUNEL染色による評価では差を認めなかった(data not shown)。このモデルにおいては、マウス自身の卵巣から分泌されるエストロゲンに加えて、エストロゲンペレットからの大量のエストロゲンが補充された状況下であり、味噌上清による子宮筋腫細胞増殖抑制効果が十分に認められない可能性が考えられた。そこで、ヒト子宮筋腫モデルマウスでの子宮筋腫のエストロゲン応答性、GnRHアゴニストに対する反応が不明であったため、条件検討をおこなった(図3)。移植後4週での検討では、エストロゲンペレットのありなしでは、エ

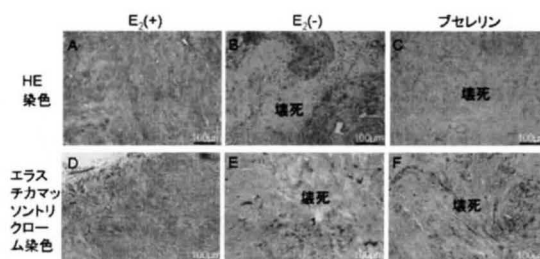


図3 ヒト子宮筋腫モデルマウスのエストロゲン依存性

ストロゲンペレットありE2(+)では子宮筋腫組織の組織学的構築が維持されているのに対して、エストロゲンペレットなしE2(-)では部分的な壊死を認めた。さらに、GnRHアゴニスト(ブセレリン)投与によりマウス卵巣機能抑制することにより、ほとんどの移植子宮筋腫組織が壊死に陥っていることがわかった。これより、このモデルにおいてはマウス自身の卵巣から分泌されるエストロゲンではある程度の移植組織の維持は可能であるが不十分であり、長期の維持にはエストロゲン補充が必要とされることが判明した。移植後8週でも同様の検討を行ったがE2(-)とブセレリン投与との差を認めず、どちらも広範囲な壊死を認めた(data not shown)。

以上の検討より、エストロゲンペレットによるホルモン補充のない状況下での味噌上清投与による検討、GnRHアゴニスト(ブセレリン)投与に味噌上清投与を追加することによる増強効果検討が可能であると考えられた。

3 要約

味噌上清に子宮筋腫増殖抑制効果を認め、味噌の系統の違いにより抑制効果の違いを認めた。ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いた検討では、投与8週では抑制効果を認めなかった。移植4週での検討では、エストロゲン補充がない状態でも筋腫組織が一部維持されており、過剰のエストロゲンが存在しない状況下での味噌上清による抑制効果検討が可能と思われた。今後はさらに投与量・投与期間の検討、味噌からの有効成分抽出方法(DMSOによる抽出等)の検討を加えていくことも必要とされる。

4 文献

- 1) Walker CL, Stewart EA. Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 2005;308:1589-1592.
- 2) Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. Soy product intake and premenopausal hysterectomy in a follow-up study of Japanese women. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:773-777.
- 3) Miyake A, Takeda T, Isobe A, Wakabayashi A, Nishimoto F, Morishige K, Sakata M, Kimura T. Repressive effect of the phytoestrogen genistein on estradiol-induced uterine leiomyoma cell proliferation. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:403-409.
- 4) Tsuiji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M, Yaegashi N. Establishment of a Novel Xenograft Model for Human Uterine Leiomyoma in Immunodeficient Mice. *Tohoku J Exp Med*. 2010;222(1):55-61.
- 5) Isobe, S. Takeda, T. Sakata, M. Miyake, A. Yamamoto, T. Minekawa, R. Nishimoto, F. Okamoto, Y. Walker, L. Kimura, T. Dual repressive effect of angiotensin II-type 1 receptor blocker telmisartan on angiotensin II-induced and estradiol-induced uterine leiomyoma cell proliferation. *Hum Reprod* 23:440-446, 2008.

味噌の低アレルギー性と健康機能性の実証

森山 達哉

Evaluation of Hypoallergenicity and Health-Promoting Effect of Miso

Tatsuya MORIYAMA

*Department of Applied Life Sciences, School of Agriculture, Kinki University,
Naka-machi 3327-204, Nara, Nara, 631-8505, Japan*

はじめに

味噌は、古くから食されてきた伝統的な食品で、調味料としても幅広く使用されている。一般的な味噌の主成分は大豆であるが、大豆にはさまざまな生理機能成分が含まれていることが明らかになってきている。たとえば、大豆タンパク質やペプチド、イソフラボンやサポニン、レシチン、リノール酸などである。従って、主に大豆から製造される味噌にもまたこれらの健康機能成分が含まれており、また他にも米麴由来の成分や、発酵によって新たに生成される有益成分や、ペプチドのように発酵により高機能化される成分などが豊富に含まれる。

しかしながら、大豆は5大アレルギー食品として、一定のアレルギー誘発リスクを有していることが知られている。また、近年、花粉症と関連する新しい大豆アレルギーが明らかとなっており、小児だけでなく成人においても大豆のアレルギーは健康危惧要因として認識されてきている。このような、新しい大豆アレルギーも含めて味噌ではそのアレルギー性が低減化されていることが示唆されるが、実際に個々のアレルギーに対して解析した例はほとんど見られない。

そこで本研究では、我が国における主要な味噌

について、そのタンパク質パターンや各種アレルギーレベル、さらにはエタノール抽出物における脂質代謝適正化能を検討した。この研究によって、味噌の低アレルギー性と優れた健康機能性を実証することを試みた。

実験方法

(1) 味噌サンプル

味噌は中央味噌研究所より供与いただいた。実験に使用した味噌とその原材料の一覧を表1に示す。また、その様子を図1に示す。今回検討した味噌は、甘口米みそ1種類、辛口米みそ7種類、麦みそ、豆みそ各1種類である。

表1. 実験に使用した味噌とその原料

甘口米みそ	: 米, 大豆, 食塩, 水飴, 酒精
辛口米みそA	: 米, 大豆, 食塩, 酒精
辛口米みそB	: 大豆, 米, 食塩
辛口米みそC	: 大豆, 米, 食塩, 酒精
辛口米みそD	: 大豆, 米, 食塩
辛口米みそE	: 大豆, 米, 食塩, 酒精
辛口米みそF	: 大豆, 米, 食塩, 酒精
辛口米みそG	: 大豆, 米, 食塩, 酒精
麦みそ	: 大麦, 大豆, 食塩, 酒精
豆みそ	: 大豆, 食塩

実験に使用した各種みその写真

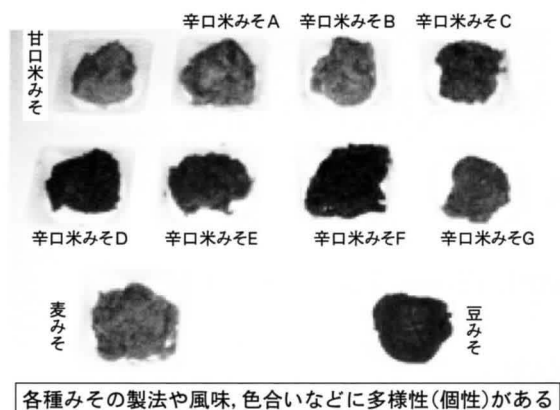


図1. 実験に使用した味噌の写真

(2) 味噌からのタンパク質の抽出

一定量の味噌サンプルに水を一定量加え、ミキサーにて攪拌した。得られた抽出物を Bradford 法にてタンパク定量し、一定レベルのタンパク質を電気泳動やウェスタンブロッティングに供した。

(3) アレルゲンレベルの評価

各大豆アレルゲンの検出は各大豆アレルゲンに対する特異抗体を用いたウェスタンブロッティング法を用いた。すなわち、味噌サンプルを SDS 化し、SDS-PAGE にて電気泳動を行ったのち、PVDF 膜にセミドライブロッティング法にてタンパク質を転写した。転写後の PVDF 膜はブロッティング後アレルゲンに対する抗体（1次抗体）と反応させ、PBST にて洗浄後、抗マウス IgG または抗ラビット IgG などの2次抗体を用いて反応させ、最終的には HRP の化学発光基質（ECL western blotting detection reagent）を用いて発光させ、X線フィルムに露光させた。X線フィルムはレンドール、酢酸、レンフィックスを用いて現像し、得られた像をスキャナにて取り込みデータとした。なお、使用した大豆アレルゲンに対する抗体は、トリプシンインヒビターを除いてすべて我々が作製したものを用いた。

(4) 脂質代謝調節能の評価

ヒト培養肝細胞由来の HepG2 細胞からのアポ B 含有リポタンパク質（VLDL）分泌を指標にして検討した。この細胞は脂質を合成しアポ B タンパク質とともに VLDL 様分子として培地中に分泌する。従って、この過程を抑制することにより、

脂質の合成や分泌過程を抑制することとなり、肝臓における脂質合成・分泌の簡便な評価系として使用できる。HepG2 細胞は DMEM 培地に non essential amino acid や抗生物質（ペニシリン/ストレプトマイシン）、及び10%ウシ血清（FBS）を加えて3日に1回の割合で継代培養した。味噌サンプルはエタノール抽出したものを培地（FBSを抜いた無血清培地）の100分の1容加え、コントロールはエタノールのみを加えた。添加24時間後に培地を回収し、培地中に含まれる VLDL をアポ B タンパク質に対する2種類の抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 系にて測定した。

結果と考察

(1) 各種味噌のタンパク質パターン

まずはじめに、1レーンあたり10 μ g のタンパク量となるように味噌サンプルを電気泳動し、CBB 染色によってタンパク質のパターンを確認した。いずれの味噌も、大豆抽出物と比べると明瞭なタンパク質バンドが消失して、低分子化していることが明らかであった（図2）。タンパク質のアプライ量を1レーンあたり100 μ g に増やして泳動すると、いくつかのバンドが見られた（図3）。味噌間では、概ね似たパターンであったが、米みそと比べて麦味噌や豆味噌ではややタンパク質のパターンが異なり、特徴的なバンドを示した。これは材料が異なるためや、発酵熟成期間

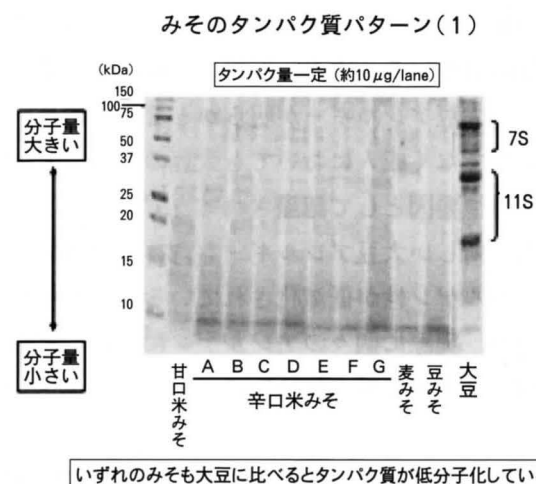


図2. 各種味噌のタンパク質パターン
10 μ gタンパク質/lane で泳動

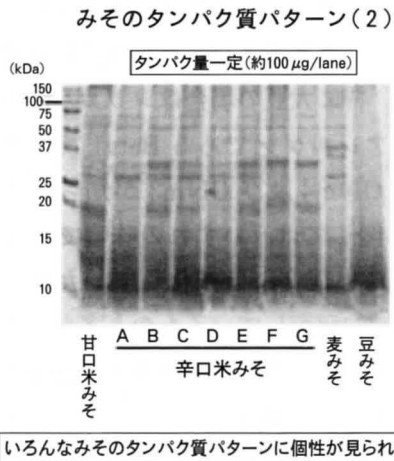


図3. 各種味噌のタンパク質パターン
100 µgタンパク質/lane で泳動

の長さが影響しているものと考えられた。特に、豆味噌ではバンドはほとんど確認できず、スミアな泳動像が見られた。豆味噌は長期間熟成にてタンパク質の分解が他の味噌と比べてより進んでいることが示唆された。

(2) 各種味噌のアレルゲンレベル

特異抗体を用いた各種大豆アレルゲンの検出を行い、大豆そのものと比べた。また味噌間で低減化レベルを相対比較した。まず大豆のクラス1食物アレルゲンと考えられる GlymBd30K, GlymBd28K, 7S グロブリン, トリプシンインヒビター, について調べた。GlymBd30K は Ogawa らによって同定された大豆の主要アレルゲンの一つで、乳幼児で発生するクラス1の大豆アレルギーの最も主要なアレルゲンである。構造的にはパピンスーパーファミリーに属するシステインプロテアーゼ様構造をしているが、活性中心のシステイン残基が変異しているため酵素活性は認められない。本アレルゲンは蕁麻疹やアトピーなどに関連する。ダニのアレルゲンとも構造が似ている。解析の結果、大豆そのものと比べていずれの味噌においても低減化が進んでいた。甘口米みそや一部の辛口米みそでは、一部残存が確認されたが、それ以外の味噌ではほとんど検出できなかった(図4)。

つぎに GlymBd28K について検討した。GlymBd28K は主に乳幼児で発生するクラス1の大豆

みそにおける大豆アレルゲンの検出(1)

Glym Bd30K

(化学発光法による高感度検出)

乳幼児で発生するクラス1の大豆アレルギーの最も主要なアレルゲン、蕁麻疹やアトピーなどに関連。ダニのアレルゲンとも構造が似ている。

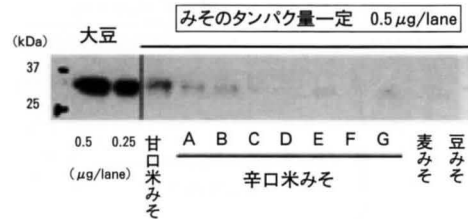


図4. GlymBd30K の残存レベル

みそにおける大豆アレルゲンの検出(2)

Glym Bd28K

(化学発光法による高感度検出)

主に乳幼児で発生するクラス1の大豆アレルギーの2番目に多いアレルゲン、蕁麻疹やアトピーなどに関連。貯蔵タンパク質の一種。

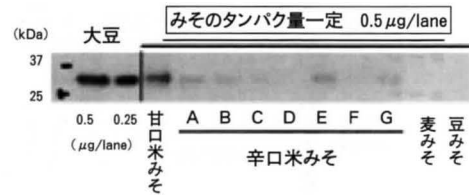


図5. GlymBd28K の残存レベル

アレルギーの2番目に多いアレルゲンであり、蕁麻疹やアトピーなどに関連する。

ビシリンファミリーに属する貯蔵タンパク質の一種である。この場合 GlymBd30K の場合と類似の結果を示し、甘口米みそや一部の辛口米みそでは、一部残存が確認されたが、それ以外の味噌ではほとんど検出できなかった(図5)。

つづいて7Sグロブリンについて検討した。これは、乳幼児や成人で発生するクラス1の大豆アレルギーのアレルゲンであり、蕁麻疹や下痢、FDEIA などに関連することが知られている。症状は比較的軽篤とされる。本分子は大豆主要貯蔵タンパク質の一種であり、大豆タンパク質の約1/4を占める。またこのタンパク質は糖鎖を有しており糖タンパク質である。図6に示すようにいずれの味噌でも7Sグロブリンの3つのサブユニットとは異なる60kDa付近に抗体が反応するバンドを認めた。しかしながらこのバンドは抗体が

みそにおける大豆アレルゲンの検出(3)

7Sグロブリン(α' , α , β) (化学発光法による高感度検出)

乳幼児や成人で発生するクラス1の大豆アレルギーのアレルゲン、蕁麻疹や下痢、FDEIAなどに関連。比較的重篤。大豆主要貯蔵タンパク質の一種。

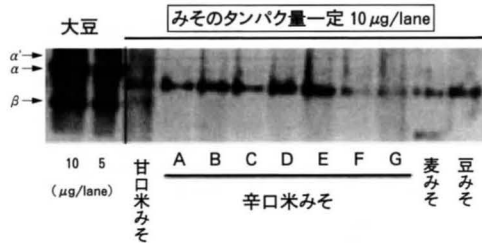


図6. 7S グロブリンの残存レベル

みそにおける大豆アレルゲンの検出(4)

大豆トリプシンインヒビター (化学発光法による高感度検出)

クラス1の大豆アレルギーの主要アレルゲンの一つ。海外では報告例が多いが、わが国では少ない傾向。消化酵素(トリプシン)の阻害活性を有するが、抗ガン作用などの機能性も示唆されている。抗糖尿病作用

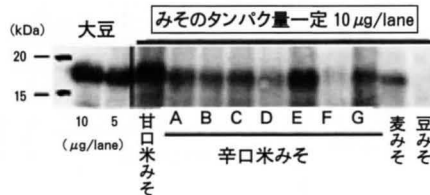


図7. トリプシンインヒビターの残存レベル

反応する非特異的バンドであることが示唆され、実際にタンパク質染色で見た際には該当する位置に明瞭なタンパク質バンドを認めなかった。また、ウェスタンブロッティングでは、7Sの3つのサブユニットの位置にはバンドを認めなかった。よって、7Sグロブリンはいずれの味噌でも高度に分解されていると判断した。

つづいて、海外での大豆アレルゲンとして報告されているトリプシンインヒビターについて調べた。これもクラス1アレルゲンとして認識されているが、我が国では報告は少ない。このアレルゲンに関してはFの辛口米みそと豆みそ以外の味噌では原料の大豆と大差ないレベルが残存していた。よって、このアレルゲンは味噌醸造過程でも分解されにくいことが示唆された。しかしながら、豆味噌はこの場合も明瞭に分解されていることが判明した(図7)。

続いて、大豆のクラス2アレルゲンについても検討した。クラス2アレルゲンは花粉抗原と交差性が強く、特に大豆の場合はシラカバ、ハンノキ属花粉のアレルゲンである Betv1 及び Betv2 と交差する Glym4 及び Glym3 が知られている。Glym4 に関しては、いずれの味噌でもほとんど検出できない程度に低減化していたが、Glym3 は逆に比較的残存しているものも多かった。しかしこの場合もFの米みそや麦みそ、豆みそではほとんど検出不能であった。

みそにおける大豆アレルゲンの検出(5)

Gly m4 (化学発光法による高感度検出)

主に成人で発生するクラス2の大豆アレルギーの主要アレルゲン。花粉症と併発する。症例は主にOASやアナフィラキシーなど。PRタンパク質の一種で病害虫などのストレスで増える。

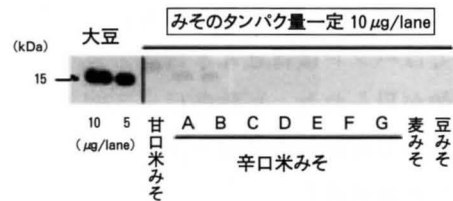


図8. Glym4 の残存レベル

みそにおける大豆アレルゲンの検出(6)

Glym3(大豆プロファイル) (化学発光法による高感度検出)

主に成人で発生するクラス2の大豆アレルギーの2番目に多いアレルゲン。花粉症と併発する。症例はGlym4同様にOASやアナフィラキシーなど。アクチン結合タンパク質で、多くの植物界で普遍的に存在するため、汎アレルゲンとして有名。

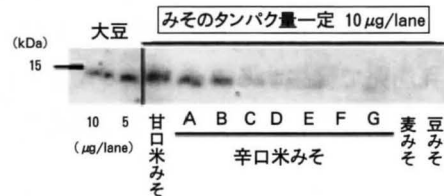
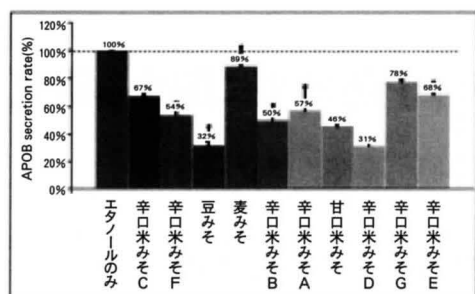


図9. Glym3 の残存レベル

(3) 各種味噌の抽出物の脂質代謝調節能

つぎに、各種味噌のエタノール抽出物を調製し、その脂質代謝調節能について、ヒト培養肝細胞由来の HepG2 細胞からのアポB含有リポタンパク質(VLDL)分泌を指標にして検討した。その結果、図10に示すように、いずれの味噌の抽出物も、ヒト培養肝細胞からのVLDL分泌を抑制することが判明した。なかでも、豆味噌は強い抑制効果を示した。豆味噌は熟成期間も長く、味噌の

ヒト由来培養肝細胞からのアポB含有リポタンパク質 (VLDL:悪玉コレステロール)分泌への影響



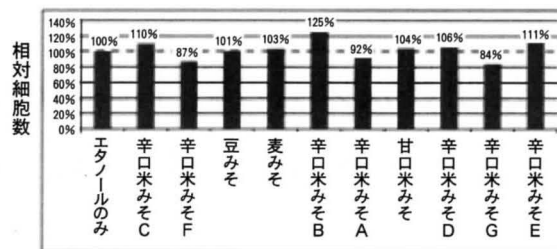
いずれの味噌も分泌抑制効果を示したが、より有効な味噌もいくつか見られた

図10. 肝細胞の脂質代謝調節能

色合いも濃く、メラノイジン色素も多いことが推察される。また、図3で示されるように、タンパク質の低分子化も進んでいたことなどから、この脂質代謝調節能の関与分子は、メラノイジン色素やタンパク質分解ペプチド、あるいは発酵熟成期間で配糖体から変換されるイソフラボンアグリコンなどの可能性が考えられる。実際に、ゲニステインやダイゼインなどのイソフラボンアグリコンには、VLDL分泌抑制効果が知られており、今回の結果と合致する。なお、いずれの味噌抽出物にも細胞に対する毒性はなかった(図11)。

以上の結果より、味噌は、従来から知られていたクラス1食物アレルギーのみならず、新しいクラス2食物アレルギーにおいても低減化してお

ヒト由来培養肝細胞の増殖への影響



いずれの味噌抽出物でも細胞毒性は見られなかった

図11. 細胞増殖への影響

り、また脂質代謝調節能においても活性を示すことが明らかとなった。アレルギー性の低減化及び脂質代謝調節能いずれも、熟成期間の長い豆味噌が優れており、このことから発酵熟成過程がアレルギー分解や機能成分の増加といった健康機能性に有益な変化をもたらすと考えられた。

謝辞

本研究は、(社)中央味噌研究所からの研究助成を受けて行われました。関係各位に厚く御礼申し上げます。また、研究の実施にあたりご指導、ご助言、ご協力いただきました河村幸雄教授、矢野えりか研究員、鶴澤有希研究員、実験担当の学生達に感謝いたします。

長期熟成味噌の給与によるウシの脂肪肝予防効果に関する研究

折橋 毅典, 増子 孝則, 吉田 愛美, 小原 嘉昭, 世良 健司

Effects of long matured Miso in the prevention of fatty liver in cattle

Takenori ORIHASHI, Takanori MASHIKO, Manami YOSHIDA, Yoshiaki OBARA and Kenji SERA

MeijiFeed Co., Ltd. Department of R&D Kanda-Sudacho1-1, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0041, Japan

要約

ウシの周産期疾病における主要な病態である脂肪肝は、畜産物の生産効率を低下させる大きな要因であり、その予防は畜産において重要な課題となっている。本研究では味噌の機能性に着目して長期熟成味噌をウシに6週間給与し、その後実験的な脂肪肝様を発症させるために4日間絶食させ、脂肪肝発症モデルにおける味噌の給与効果を観察した。肝機能マーカーである血漿 GOT, GPT, GGT 濃度は絶食により有意に上昇したが、味噌給与により低く推移し、特に GPT は絶食2日後と3日後で有意に低下した。また、脂質酸化マーカーである血漿 TBARS 値は、味噌給与により有意に低下した。これらの結果から、ウシへの長期熟成味噌の給与は、肝機能改善効果を通して脂肪肝の発症を予防できる可能性が示唆された。

キーワード：味噌, ウシ, 脂肪肝, 肝機能, 抗酸化能

緒言

乳牛の脂肪肝は周産期疾病における主要な病態で、乾乳期での飼料の過剰給与、分娩後のエネルギー不足、ストレスなどが起因となり、体脂肪からの急激な脂肪動員によって血中の遊離脂肪酸 (NEFA) が増加し、肝臓に過剰に脂肪が蓄積することによって発症する (Gerloff, 2000, Katoh, 2002)。脂肪肝の牛では肝機能や免疫機能が低下し、産褥熱や乳房炎などの感染症も併発しやすくなるため、乳生産性や繁殖成績などが低下し (小原, 2005)、生産効率を低下させる大きな要因となっている。全国の乳牛飼養頭数約145万頭に対し、脂肪肝有病率は5~15%と言われ、経済的損失も大きく、その対策は畜産において重要な課題となっている。

一方、日本伝統の大豆発酵食品である味噌には、様々な機能性成分が確認されており、そのなかでも、コリン、ビタミンEなどは、脂肪肝の予防や抗酸化活性による肝機能改善が期待できると考えられる。また、ウシは塩分要求量が高く、味噌を長期間給与可能であること、飼料として大豆や大豆粕は多く配合されていることから、味噌の有効利用が可能と考えられる。

本研究では、長期熟成味噌を飼料として活用し、これをウシに給与したときの脂肪肝予防効果について検討した。

方法

1. 供試味噌

味噌製造メーカーから提供された熟成期間の異

なる4品の長期熟成味噌（麦味噌，豆味噌，赤色辛口米味噌，過熟赤色辛口米味噌）を供試した。供試した味噌のビタミンEおよびリン脂質含量の測定は（財）日本食品分析センターに依頼した。

2. ウシ第一胃（ルーメン）発酵試験

ウシのルーメンには様々な微生物が棲息している。ルーメン発酵への味噌給与の影響を調査するため、ルーメン液を用いた *in vitro* 発酵試験を行った。

5ヶ月齢のホルスタイン種雄ウシ2頭から経口的にルーメン液を採取し、4重ガーゼで濾過した。このルーメン液に人工唾液を1:2の比率で混合した後、炭酸ガス通気により嫌気状態にした。50ml容バイアル瓶に1mm粉碎した基質（飼料）300mgと、上記のルーメン液+人工唾液15mlを入れ、各味噌の10%溶液を100 μ l添加した（コントロールは水を添加）。さらに30秒間炭酸ガスを通気した後、バイアル瓶をブチルゴム栓とアルミシールで密封し、振とう培養（90rpm, 39 $^{\circ}$ C）した。6時間および12時間後にバイアル瓶を開封し、濃硫酸300 μ lを添加して発酵を停止させ、これを遠心分離（3,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15分間）して上清を得た。ガスクロマトグラフィーGC-2010（島津製作所）にて、ルーメン発酵性の指標である揮発性脂肪酸（VFA）濃度を測定した。

3. 脂肪肝モデル牛を用いた味噌給与試験

①供試飼料の調製

長期熟成味噌（過熟赤色辛口米味噌）とタピオカ澱粉粕を57:43の比率でミキサーに投入した後、2分間混合して味噌吸着飼料を調製した。また、同様にタピオカ澱粉粕と大豆粕と大豆油を75:22:3の比率で混合して対照飼料を調製した。

②ウシへの給与方法

4ヶ月齢のホルスタイン種雄牛10頭（体重147.7kg \pm 2.3kg）を対照区と味噌区の2区に分け、対照区にはベース飼料（配合飼料3kg+乾草1kg）に対照飼料185gを、味噌区にはベース飼料（同）に味噌吸着飼料250g（味噌として143g相当）を混合したものを6週間給与した（表1）。

表1. 給与飼料の組成

		1日の摂取量(g)	
		対照区	味噌区
原材料	加熟赤色辛口米味噌	—	143 g
	タピオカ澱粉粕	139	107 g
	大豆粕	41	— g
	大豆油	5	— g
	給与量 g	185 g	250 g
成分	水分	24.1	77.4 g
	粗タンパク	21.4	21.3 g
	粗脂肪	6.8	6.7 g
	粗繊維	17.5	15.7 g
	粗灰分	7.3	5.2 g
	総トコフェロール	1.4	13.5mg
	コリン	0.1	0.1 g
	リン脂質	0.5	0.0 g
	塩分	0.0	20.1 g

③脂肪肝発症モデル

対照区、味噌区それぞれ6週間給与した後、実験的に脂肪肝を発症させるために4日間絶食させ（飲水は自由）、脂肪肝発症モデルにおける味噌給与効果を観察した。なお、すべての試験は明治飼糧（株）動物実験要領に則って実施した。

④測定項目と測定方法

給与試験開始前（Pre）、6週間給与後（絶食試験前、0d）、絶食1日後（1d）、2日後（2d）、3日後（3d）、4日後（4d）にウシの頸静脈から採血し、遠心分離（3,000rpm, 15分）して血漿を得た。

この血漿を用い、GOT, GPT, GGT, TCHOを富士ドライケム3500V（富士フィルムメディカル株式会社）にて測定した。また、遊離脂肪酸（NEFA）をテストワコー-NEFA（和光純薬株式会社）にて、 β -ヒドロキシ酪酸（3-HB, ケトン体）をオートワコー（和光純薬株式会社）にて、TBARS値（チオバルビツール酸反応性物質）をTBARS assay kit（フナコシ株式会社）にて測定した。

結果

①味噌の機能性成分

各種味噌のビタミンE含量は、麦味噌では6.4mg/100gであり、豆味噌、赤色辛口米味噌、

過熟赤色辛口米味噌は 9.5~11.9mg/100g であった (表 2)。また、リン脂質は豆味噌のみに検出された (22mg/100g)。

表 2. 各味噌のビタミン E 含量

	トコフェロール含量(mg/100g)				
	α -	β -	γ	δ	計
豆味噌	1.1	0.2	7.5	3.1	11.9
麦味噌	0.6	0.1	3.9	1.8	6.4
赤色辛口米味噌	0.7	0.1	6.4	2.5	9.7
過熟赤色辛口米味噌	0.7	0.2	6.0	2.7	9.5

②味噌がウシのルーメン (第一胃) 発酵に及ぼす影響

ウシのルーメン液を用いた *in vitro* 発酵試験において、麦味噌、豆味噌、赤色辛口米味噌、過熟赤色辛口米味噌ともにルーメン発酵を阻害することはない、通常飼料と類似の発酵パターンを示した。

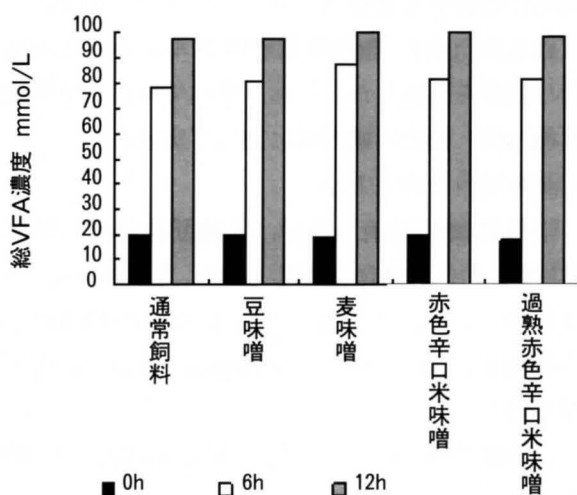


図 1. 味噌のルーメン発酵性の比較

③脂肪肝モデル牛を用いた味噌給与試験

対照飼料, 味噌飼料をそれぞれ 6 週間給与した後の 4 日間絶食試験の結果, 脂肪の分解により肝臓で産生される血漿中ケトン体である 3-HB 濃度 (図 2 A), および脂肪組織から放出される血漿中 NEFA 濃度 (図 2 B) は, 対照区・味噌区ともに絶食により著しく上昇し, 脂肪肝様の血液性状を示した。一方, TCHO (総コレステロール) は, 対照区で絶食により顕著に上昇したが, 味噌区は低値を維持した (図 2 C)。

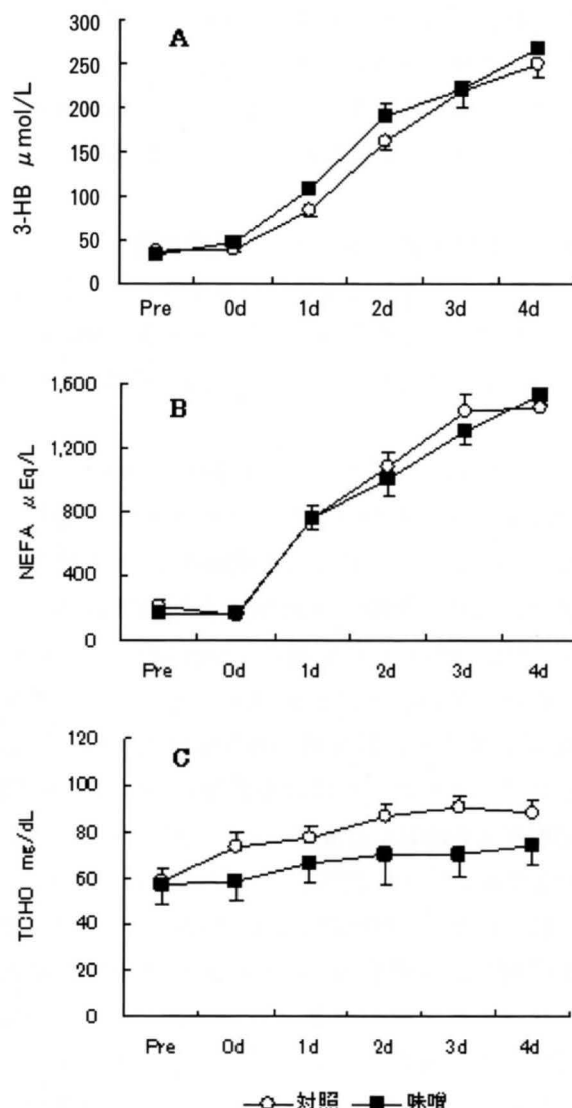


図 2. 血漿 3-HB(A), NEFA(B), TCHO(C) 濃度

また, 肝機能マーカーである GOT, GPT, GGT は絶食により有意に上昇したが (図 3 A, B, C), 味噌区では対照区より低く推移し, 特に GPT は絶食 2 日後と 3 日後で有意に低かった。

また, 血漿 TBARS 値は, 味噌区の給与 6 週間後で有意に低かった (図 4)。

考 察

供試した味噌は, 味噌の種類 (豆, 麦, 米) によりビタミン E 含量は異なったが, 同じ米味噌系であれば熟成期間に関わらず類似であった。また, 供試した 4 種類の味噌はいずれも *in vitro* のルーメン発酵性が類似し, かつ発酵を阻害しなかった。

過熟赤色辛口米味噌を用いて調製した味噌吸着

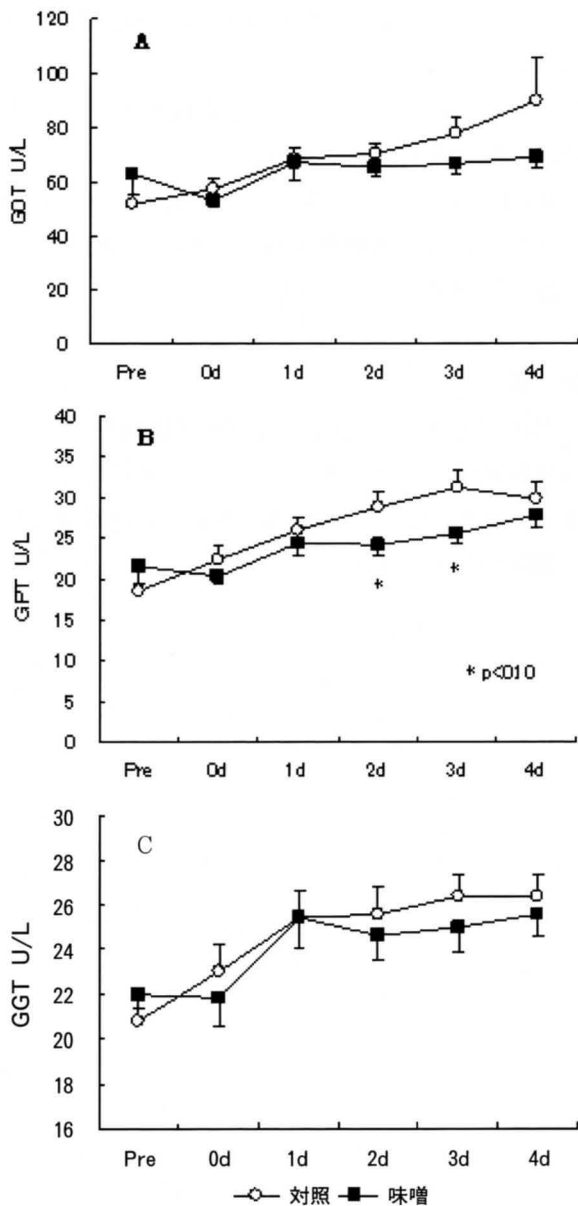


図3. 血漿 GOT(A), GPT(B), GGT(C) 濃度

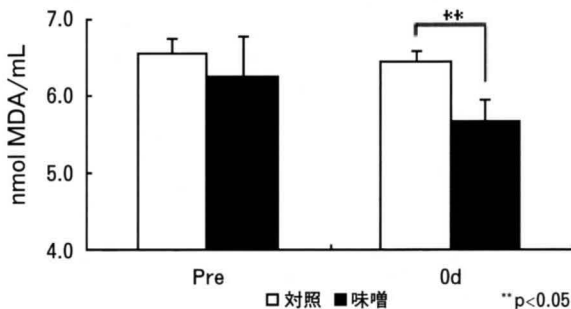


図4. 血漿 TBARS 値

飼料(味噌として1頭1日あたり143g 給与) または対照飼料を6週間給与した後、絶食4日間の処理により脂肪肝発症モデルの作出を試みた。

脂肪肝牛は健康牛に比べて血中の3-HB, NEFA, GOT, GPT 濃度が高値を示し、負のエネルギーバランスに起因した体脂肪動員や肝機能低下が起こっていることが知られている (Sato, 2005)。また、ウシへの飼料の制限給餌により血中の遊離脂肪酸が増加し、肝臓の脂肪化が誘導され、それに伴いインスリンの抵抗性が招来されると報告されている (及川伸, 2003)。また、脂肪肝牛の血清脂肪酸組成はオレイン酸の割合が高く、必須脂肪酸であるリノール酸の割合が著しく低かったという報告がある (大橋傳, 1995)。

本試験においても、対照区で絶食後に顕著な3-HB, NEFA, GOT, GPT 濃度の上昇が確認されたことから、脂肪肝様の症状が誘引されたと考えられた。

この脂肪肝発症モデルにおいて、対照区・味噌区ともに脂質代謝マーカーの顕著な上昇が見られたが、両区間に大きな差は見られなかった。一方、肝機能マーカーは同様に上昇が見られたが、味噌区では対照区より低く推移し、特にGPTは絶食2日後と3日後で有意に低かった。

また、6週間給与時の全身性の酸化ストレスマーカー(TBARS値)は、対照区より味噌区の方が有意に低値であった。

これらのことから、ウシへの長期熟成味噌の給与によって、ウシの肝機能改善と抗酸化能亢進が促進され、ウシの脂肪肝の発症を予防する、または症状を軽減できる可能性が示唆された。

今回は、4ヶ月齢の若い雄ウシを用いた脂肪肝モデル試験であり、本来の課題である乳牛(雌)の周産期とは性別・ステージが異なること、また今回の絶食による脂肪動員レベルが負のエネルギーバランスに起因する脂肪肝牛よりも重度であった(絶食によるNEFA値; 1,450 μ Eq/L, 脂肪肝牛; 600-700 μ Eq/L)ことから、実際の周産期乳牛への味噌給与試験とその効果の検証が必要であると考えられた。

今後は、酸化ストレス抑制および肝機能改善に關与している味噌成分の解明、味噌給与による脂肪酸組成への影響、実際の周産期疾病予防への効果の検証などが課題である。

文 献

Gerloff, B.J. (2000) : Dry cow management for the prevention of ketosis and fatty liver in dairy cows. *Vet. Clin. North. Am.*, 16: 283-292

N. Katoh (2002) : Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.*, 64: 293-307

小原嘉昭 (2006) : ルミノロジーの基礎と応用 249-250 農文協

新版 乳牛の病気119番 p38-39 Dairy Japan

S. Sato, M. Kohno, H. Ono (2005) : Relation between blood β -hydroxybutyric acid and glucose, non-esterified fatty acid and aspartate aminotransferase

in dairy cows with subclinical ketosis. *家畜臨床誌* 28(1):7-13

及川伸 (2003) : 牛における潜在性ケトosisと脂肪肝臨床獣医 21 : 26-29

大橋傳, 他 (1995) : 脂肪肝牛の血清リポタンパク質脂質組成と脂肪酸構成について 第120回日本獣医学会講演要旨 p179

謝 辞

本研究遂行にあたり, (社)中央味噌研究所より研究費助成をいただきましたことを御礼申し上げます。また, 試料をご提供頂きました各社様に厚く御礼申し上げます。