

研究助成報告

平成25年度一般社団法人中央味噌研究所研究助成による研究報告

味噌による抗高血圧作用と 血管保護効果に関する研究

上原 誉志夫

Mechanisms of Antihypertension and Vascular Protection by Japanese
Traditional Miso Extracts

Yoshio UEHARA

*Laboratory of Clinical Nutrition, Faculty of Home Economics, Kyoritsu Woman's University
2-2-1 Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8437, Japan*

はじめに

長期味噌摂取は Dahl 食塩感受性 (DS) ラットにおける高血圧を減弱し、心不全及び腎機能障害を抑制することを報告した (Nutrition 2012 ; 28 : 924-931) ¹⁾。味噌による食塩感受性高血圧抑制効果には消化管での Na 吸収機構への影響については否定的な成績が得られている (中央味噌研究所研究報告 2014 ; vol 35 : 46-53頁³⁾)。したがって、味噌による高血圧効果の作用機序としては、①腎臓での Na 排泄促進による心臓への前負荷軽減と、②直接的な血管拡張作用による後負荷軽減が関与することが考えられる。本研究ではこれらの血圧調節機構への影響を調べ、血管機能への味噌の効果について培養系を用いて評価した。

I. 腎臓での Na 排泄促進作用

Nutrition 誌で報告した研究においては、血圧低下にもかかわらず、腎での Na 排泄量低下及び

心臓重量への効果は検出することができなかった¹⁾。原因を解析する過程から、①極めて過剰な食塩負荷量により腎での Na 利尿効果がマスクされた可能性と、②血圧下降による圧・利尿効果の減弱により食塩排泄効果がマスクされた可能性が考えられた。このため、味噌汁の負荷量を軽減し、血圧への影響を抑制するため、前回の 10% から 5% 味噌水に変更して食塩負荷量を低下させ、また雌の DS ラットを用いることで食塩感受性が軽減された実験系を使用して、再度実験を実施した^{4,5)}。

その結果、前回の研究と同様に味噌汁摂取群では約 50% の減塩効果があること、しかし、このような実験デザインでは、味噌汁摂取は腎臓での Na 排泄量を増加させ、FENa が上昇することが示されたことから、味噌汁中には腎臓での Na 排泄を増加させ、食塩感受性を抑制する因子が含まれることが明らかになった。

腎臓での Na 排泄の増加には、脳内酸化ストレスの低下と交感神経系のうちの腎臓ドパミン産生の増加が関係していた。体液量の減少が心臓重量

の低下と動脈壁重量の低下と結びつき、心血管系障害を抑制したと考えられた。これらの詳細については、Clinical Experimental Hypertension 誌に公表した^{4,5)}。

Du D, Yoshinaga M, Sonoda M, Kawakubo K, Uehara Y: Blood Pressure Reduction by Japanese Traditional Miso is Associated with Increased Diuresis and Natriuresis through Dopamine System in DS Salt-sensitive Rats. Clinical Experimental Hypertension 2014 ; 36 (5) : 359-366.
<http://dx.doi.org/10.3109/10641963.2013.827702>.
Epub 2013 Sep 18.

II. 味噌汁上清中の皮下投与による降圧因子

今回、我々は味噌による直接的降圧作用を検討するため、味噌上清の腹腔内投与が血圧に与える効果を食塩感受性DSラットを用いて検討した⁵⁾。0.1 g/mL 味噌水 10,000 × g 上清 (Miso) を滅菌フィルターに通したのち、高食塩食下の8週齢DSラット腹腔内に0.5mL (味噌 50mg からの抽出物に相当) を単回投与し、投与前、投与2時間、4時間、24時間後にtail-cuff法により無麻酔下で血圧を測定した。同様に、味噌水 0.5mL (50mg) を4日間連続に投与し、nadirでの血圧

を測定した。Miso 0.5mL (50mg) または 0.5mL (10mg) を腹腔内投与し、用量依存性についても検討し、0.1 g/mL Miso から分子量 5kDa 下の分画を採取し、同様に降圧活性の有無を調べた。

その結果、1) 味噌水上清の腹腔内単回投与試験では、対照群 (生食投与) に比し、味噌水群では投与2時間後から血圧が低下し、投与後4時間で最大となった後 ($p<0.05$)、24時間後には投与前のレベルに戻ることを確認した (図1)。また、2) 50mg 味噌水上清を腹腔内連続投与したところ、投与後3日目及び5日目にはnadirでの血圧が、生理食塩水投与群に比較して3日目7.9%、5日目は9.6%の有意に低下し、降圧効果が24時間持続することを実証した。3) 降圧効果は10mg 味噌投与群に比較して50mg 味噌投与群では約2倍の高値を示し、用量依存性があること、4) 味噌水上清 < 5kD 分画の腹腔内投与では投与4時間後まで血圧が有意に低下し、味噌水の10,000 × g 上清原液と同等の降圧効果があることを確認した。

これらのことから、味噌水腹腔内単回投与で味噌 50mg から抽出された 10,000 × g 上清中には2時間後から血圧が低下し、4時間で最大となる降圧成分が含まれることが明らかとなった。単回投与では24時間後に血圧は投与前値に戻ったが、複数回投与ではnadirでの血圧が有意に低下し、24時間有効な降圧成分が存在すると考えられた。降圧成分は分子量 5kDa 以下にあり、用量依存性

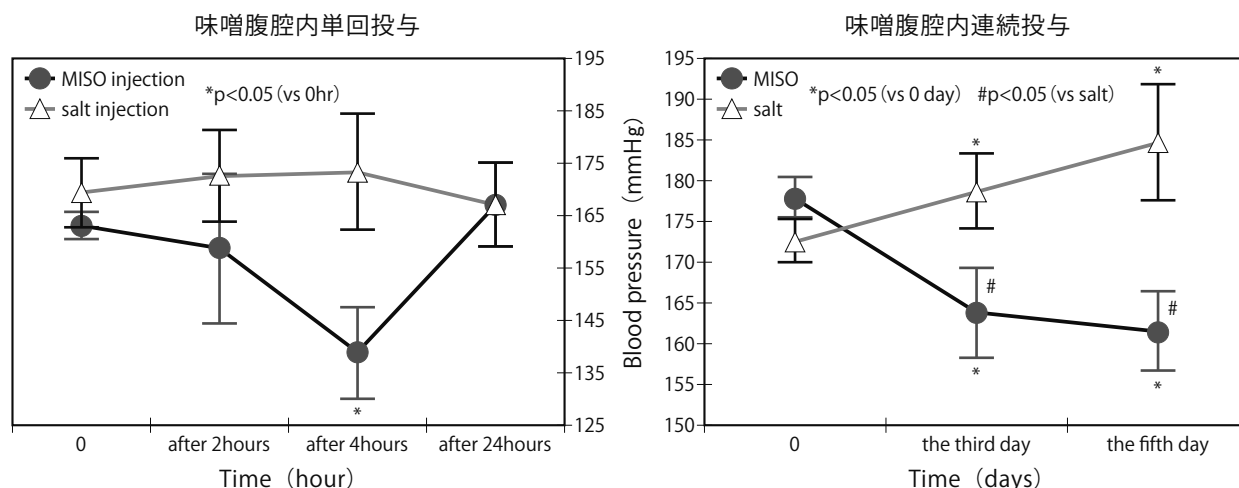


図1. 味噌上清の腹腔内投与によるDahl食塩感受性ラット血圧抑制効果

もみられたことから、単一成分による可能性が示唆された。

降圧成分の降圧機序については今後の課題であるが、腹腔内投与から4時間ですでに最大降圧効果がみられたことから、水・ナトリウム利尿よりも抵抗血管への直接的な作用であると考えられた。また、本降圧因子は中性近辺ではC₁₈カラムを素通りすることも確認された。

Ⅲ. 慢性実験皮下投与実験

DS感受性ラットを用いて、味噌水10,000g上清を浸透圧ミニポンプに充填し、50mg味噌の抽出液/日で皮下に2週間持続投与し、この間の血圧への影響を調べた。味噌群及びシャム群共に4%高食塩食、自由引水とした⁶⁾。50mg味噌上清/日の皮下投与により、対照シャム群比して、2週間後の収縮期血圧は有意に低下した(図2)。実験終了時に代謝ケージに入れ、尿中Na排泄量を検討したところ、持続的皮下投与による降圧時には、腎臓でのNa排泄には変化がみられなかった。このことから、皮下投与による降圧機序には腎臓でのNa代謝を介さないことが考えられた。味噌による降圧には、血管拡張と体液減少の両降圧機序が係り、心臓血管系への前負荷及び後負荷を抑制することで降圧と臓器保護を達成してお

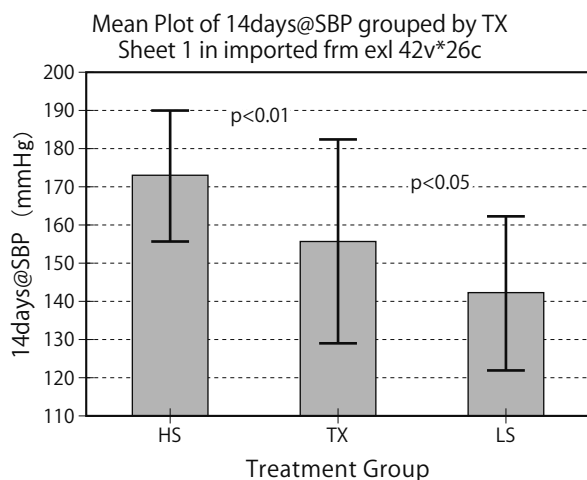


図2. 味噌上清の持続的皮下投与による Dahl 食塩感受性ラットの hypertension 抑制効果

り、極めて理想的な降圧を達成していると考えられた。

Ⅳ. 酸化ストレス抑制効果

味噌汁摂取では血圧下降以外にも、食塩水摂取ラットに比較して腎臓や心臓を保護する効果がある。腎臓の構成要素である糸球体は、食塩感受性ラットでは糸球体硬化としての病理所見を示し、腎臓機能が低下する。長期的な味噌汁摂取では高血圧性糸球体硬化性が抑制され、腎臓機能も保護されることがみだされている。このような臓器保護効果は、心筋においてもみられ、食塩感受性高血圧でみられる心筋組織への膠原繊維の浸潤(AZAN染色では青色に染色される)が食塩水摂取に比較して味噌汁摂取ラットでは有意に低下し、心臓障害が抑制される^{1,4)}。

味噌による心筋保護効果は、心筋内過酸化脂質濃度の低下と並行する。実際、味噌中には、ヒドロキシラジカル消去作用や脂質過酸化抑制作用、superoxide dismutase 活性保護による酸化ストレス抑制活性が検出される(図3)。味噌は降圧を介して臓器機能を保護するとともに、味噌に含まれる酸化ストレスを抑制する因子により脳・心・腎臓の機能を維持す(図4)⁷⁾。

Ⅴ. 味噌上清の血管平滑筋細胞増殖抑制効果

血圧調節には、心臓血管系機能調節とともに、心臓血管壁の解剖学的な再構築を介して血圧上昇に関与することも知られている。心臓血管系の再構築はそれらの臓器の機能障害を惹起することから、血圧調節とともに障害機序への直接的な保護効果を考える必要がある。味噌には複数の機序を介する血圧抑制効果があることは、一連の研究から明らかになっているが、その臓器保護効果については十分な究明がなされていない。実際、味噌の強力な抗酸化作用を考慮すると、内皮保護、血管壁保護の存在が強く示唆される。

われわれは、DSラット胸部大動脈から大動脈

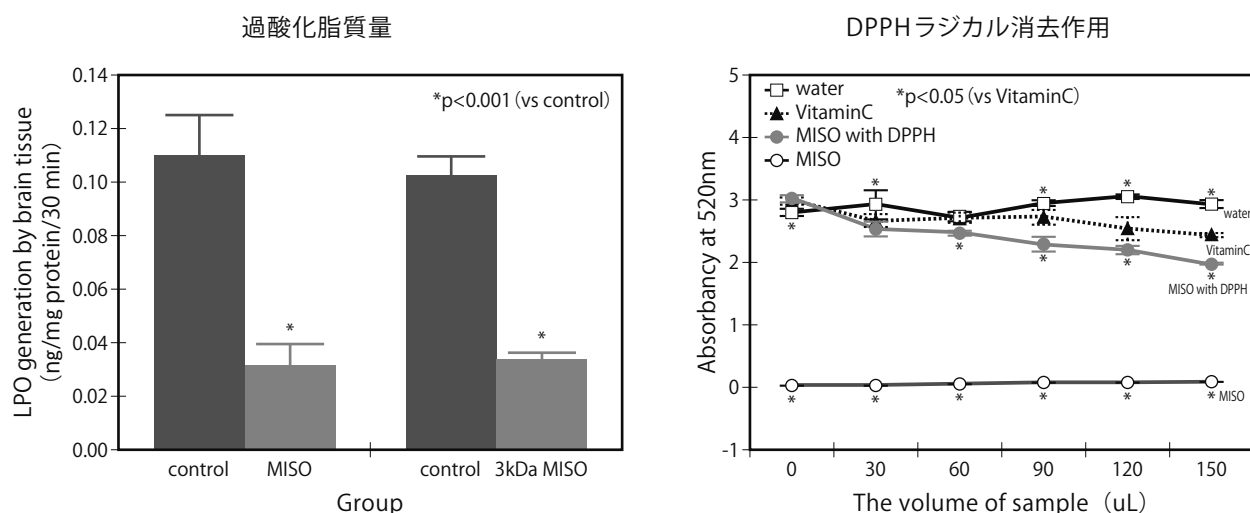


図3. 味噌上清中の抗酸化活性

左図は抗脂質過酸化活性を、右図はラジカルDPPHの消去活性を示す。

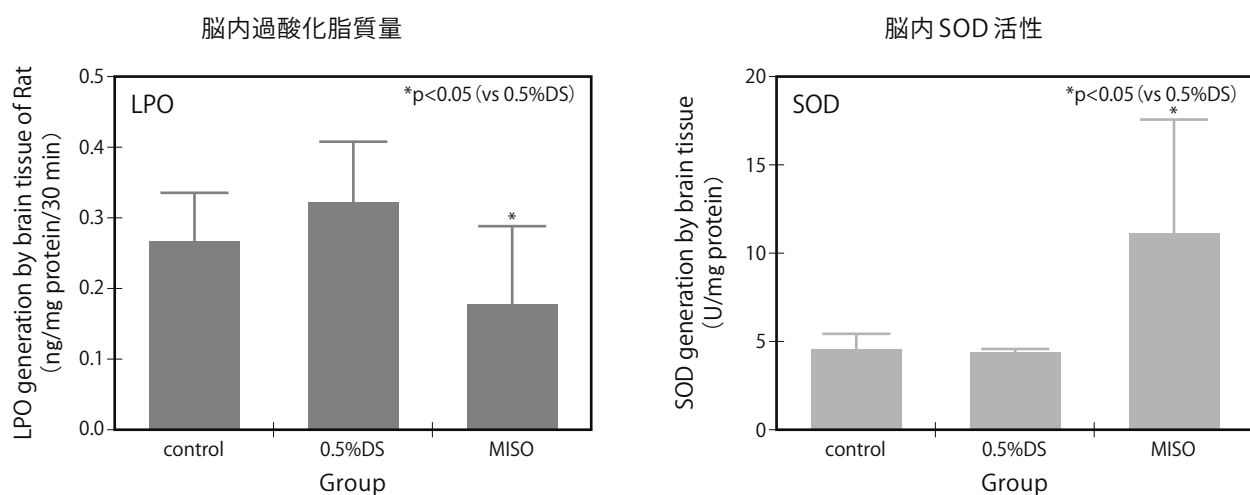


図4. Ex vivo での味噌長期摂取中の活性酸素消去効果

左図は味噌摂取中の脳内過酸化脂質量を、右図はSOD 活性を示す。味噌摂取によりSOD 活性が増加していること、脂質の過酸化が抑制されていることを示す。Dahl 食塩感受性ラットを用いた。

切片を作成し、味噌上清による内皮細胞からの強力な血管弛緩、抗動脈硬化作用を示すNO（一酸化窒素）産生への効果を調べた。NO測定をグリース法で実施したが、対照群でのNO産生量はこの系での測定感度以下であることが判明し、より好感度な蛍光測定法に変更する必要がある（未発表データ）。

血管障害は、内皮傷害による血小板機能の亢進とそれによる血管平滑筋細胞増殖とにより完成される。われわれは、DSラット胸部大動脈血管壁から explant 法により初代血管平滑筋培養細胞

(VSMC)を作成し、味噌上清のVSMC増殖に与える効果を検討した⁸⁾。増殖能は、VSMCの倍加時間及び細胞周期G0/G1期及びG1/S期に同調したVSMCのDNA産生速度で評価した。

1) VSMCの倍加時間：MISO添加群 > buffer 添加群

2) G0/G1期に同調したVSMC増殖

開始から18時間後のDNA含量：MISO添加群 < buffer 添加群

タンパクの量：MISO添加群 > buffer 添加群

3) G1/S 期に同調した VSMC 増殖

開始から 18 時間後の DNA 含量 : 3kDa MISO

≡ MISO < buffer

タンパクの量 : 3kDa MISO ≡ MISO ≡ buffer

これらの結果から、味噌には VSMC の増殖速度を抑制する因子があることが分かった。この作用は、G1 期及び S 期の延長によることが示唆された。血管壁肥厚を抑制し、血压低下に関与すると考えられた。

まとめ

本年度の研究から、味噌による降圧作用には複数の因子によることが明らかになった。このうち、低用量で作用する降圧因子は、現在分離精製が進んでいる。薬理学的特性は今後の研究を待つ必要がある。このような食塩感受性高血圧を抑制することで達成される臓器保護効果には、味噌が腎でのナトリウム利尿効果による体液量増加を抑制する成分を含有していることが相乗的な効果を与え

ている可能性が高い。日本食のなかには、血管拡張により食塩感受性高血圧を抑制するが、腎でのナトリウム排泄促進活性がないため、高血圧性心臓や腎臓障害を抑制する効果が弱いものも存在することを見出している。さらに、味噌による臓器保護は活性酸素消去や血管平滑筋細胞増殖の抑制活性も関与することが強く示唆された。予備的な検討では降圧因子や腎ナトリウム利尿因子と異なる可能性が高い。味噌による降圧、臓器保護効果はこのような複数の因子の相乗的な作用の結果と判断され、関連する因子を一つ一つ明確にしていくことが重要であると考えられた。図 5 には味噌と降圧、臓器保護の機序についてこれまでの成績をまとめた⁹⁻¹³⁾。

文 献

- 1) Yoshinaga M, Toda N, Tamura Y, Terakado S, Ueno M, Otsuka K, Numabe A, Kawabata Y, Uehara Y: Japanese Traditional Miso Soup Attenuates Salt-induced Hypertension and its Organ Damage

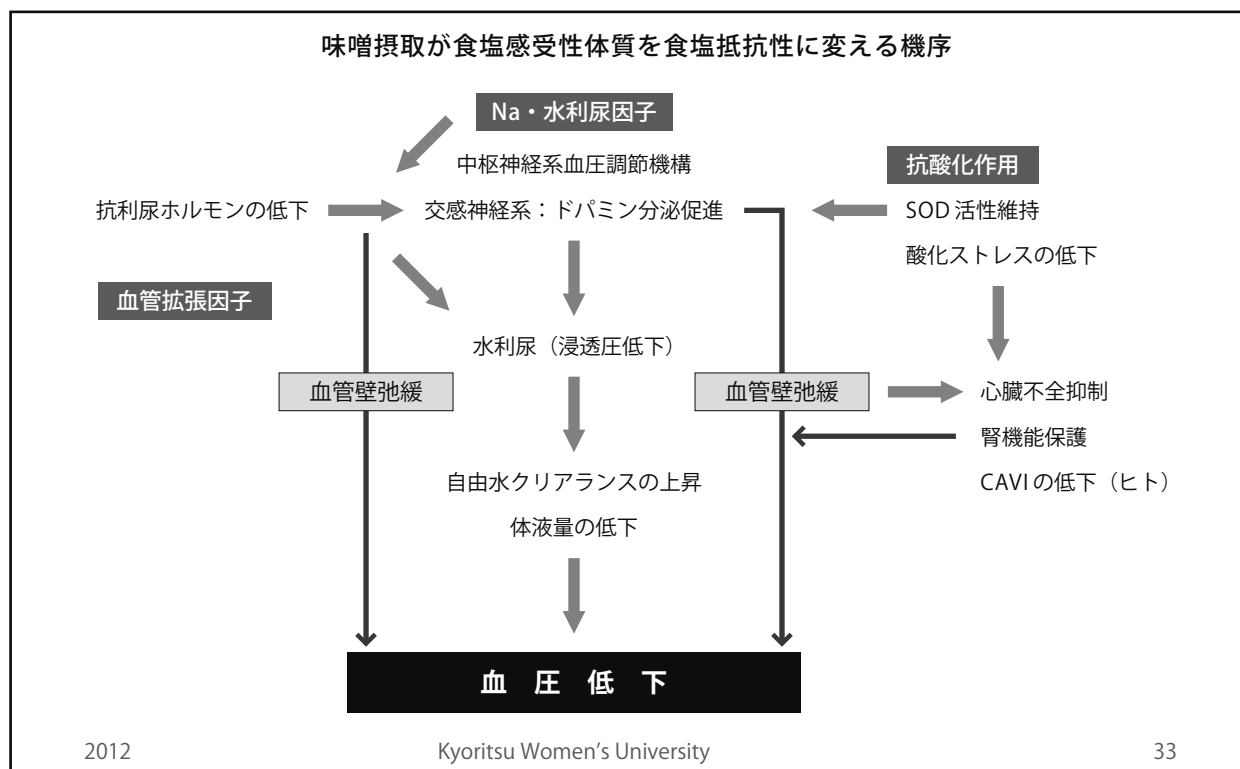


図 5. 味噌摂取により食塩感受性高血圧が抑制され、高血圧性臓器障害が抑制される仮説⁹⁻¹³⁾

- in Dahl Salt-sensitive Rats. Nutrition 2012 ; 28 (9) :924-931. doi:10.1016/j.nut.2011.09.010.
- 2) 上原誉志夫, 宮本祐紀, 海老澤香里, 吉永真理子: 習慣的味噌汁摂取による抗高血圧作用の機序に関する研究. 中央味噌研究所研究報告 2014 ; Vol35 (平成 26 年 3 月, No.35 March 2014) : 46-53.
- 3) 海老澤香里, 宮本悠紀, Du DongDong, 吉永真理子, 上原誉志夫: 長期味噌摂取が Wistar 系ラットの血圧と消化管食塩吸収効率に及ぼす影響. 第 35 回日本高血圧学会総会発表予定. 名古屋 / ウェスティンナゴヤキャッスル・名古屋能楽堂. 平成 24 年 9 月 20-22 日.
- 4) Du D, Yoshinaga M, Sonoda M, Kawakubo K, Uehara Y: Blood Pressure Reduction by Japanese Traditional Miso is Associated with Increased Diuresis and Natriuresis through Dopamine System in Dahl Salt-sensitive Rats. Clinical Experimental Hypertension 2014 ; 36 (5) :359-366. <http://dx.doi.org/10.3109/10641963.2013.827702>. Epub 2013 Sep 18.
- 5) Du DongDong, 吉永真理子, 上原誉志夫: 味噌の血圧上昇抑制作用及び降圧機序. 第 36 回日本高血圧学会総会. 大阪国際会議場 / 大阪. 平成 25 年 10 月 25 日.
- 上原誉志夫: 習慣的な味噌摂取と高血圧および生活習慣病予防に関する臨床的研究. 中央味噌研究所研究報告 2012 ; 33 (March) : 95-111.
- 6) 小田あゆみ, 白岩真由子, 上原誉志夫, 作山裕恵: みそ抽出成分の持続的皮下投与は Dahl 食塩感受性ラットの高血圧発症を抑制する. 第 61 回日本栄養改善学会学術総会 一般講演 口頭発表, セッション名: 「生理・生化学 (2) 成分・機能 2」. 2014/08/21 (木), 10:42 ~ 11:42 F 会場 (パシフィコ横浜 3F [313+314]).
- 7) Du DongDong, 吉永真理子, 藺田勝, 上原誉志夫: 長期味噌摂取が Dahl 食塩感受性ラットの血圧上昇と脳組織酸化ストレスに及ぼす影響. 第 35 回日本高血圧学会総会発表. 名古屋 / ウェスティンナゴヤキャッスル・名古屋能楽堂. 平成 24 年 9 月 20-22 日.
- 8) Du DongDong, 吉永真理子, 上原誉志夫: 味噌水上清中の血管平滑筋細胞増殖抑制活性. 第 36 回日本高血圧学会総会. 大阪国際会議場 / 大阪. 平成 25 年 10 月 25 日.
- 9) 上原誉志夫: みその摂取習慣と高血圧及び生活習慣病の予防について. みそサイエンス最前線. みそ健康づくり委員会 / 東京. p254-264. 平成 24 年 10 月 1 日発行.
- 10) 上原誉志夫: 味噌と血圧の関連性. Food Style 21. pp53-56. 12 月号. 2013.
- 11) Du D, 海老澤香里, 宮本悠紀, 吉永真理子: 習慣的味噌汁摂取の抗高血圧作用の機序. 日本醸造協会誌 2014 ; 109 (3) :128-136.
- 12) 上原誉志夫: 味噌による抗高血圧作用と血管保護効果に関する研究. 第一回みそサイエンス研究会総会 要旨集 (平成 25 年度研究助成報告会) pp29-31. 2014.
- 13) 上原誉志夫: 第 3 章大豆加工食品の機能性 4. 味噌. 家森幸男監修 大豆の栄養と機能性. シーエムシー出版 / 東京. pp107-115. 2014.

線虫 *Caenorhabditis elegans* 初代培養細胞を用いた 味噌由来長寿物質の探索

河野 強

A search of lifespan-extending substances derived from miso using a
primary culture of the nematode *Caenorhabditis elegans*

Tsuyoshi KAWANO

*Department of Bioresource Sciences, Faculty of Agriculture, Tottori University
4-101 Minami, Koyama-cho, Tottori 680-8553, Japan*

1. 背景と目的

我が国は超高齢化社会を迎え、医療費等の増大が見込まれることから、日常的な介護を必要とせず自立した生活ができる生存期間である「健康寿命」への関心が一層高まっている。「食」と「長寿」の関係に関心が寄せられる中、味噌を始めとする発酵食品は健康に良いと言われているが、味噌を寿命の観点から科学的に評価する方法は確立されていないと考えられる。ヒトを対象とした疫学調査では「食」以外の要素が寿命に影響することを考慮せねばならず、また、マウスを用いた実験では最低でも3年以上の期間を要する。

これまで報告者は、モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて寿命制御に関する研究に従事してきた。*C. elegans* は自家受精により増殖するため個体差が極めて少なく、寿命が約4週間と短いことから、寿命研究のための格好の生物材料である、と考えられる。さらに、体が透明であることから、生きたまま蛍光タグを付加したタンパクを観察することができる。すなわ

ち、寿命制御タンパクの挙動を生きたまま観察できる。特筆すべきは、寿命を制御するインスリン/インスリン様成長因子-1シグナルはヒト・*C. elegans* に共通に存在することである。

そこで本研究では、優れたモデル生物 *C. elegans* を用いて、①味噌の長寿効果を検証し、②味噌に含まれる長寿(延命)物質を探索し単離・構造解析を行うことを目指す。寿命制御機構にはインスリン様シグナル経路に加え、Sirtuin 経路、TOR 経路が知られているが、本研究では、報告者が寿命研究の標的としているインスリン様シグナル経路に特化した展開を図る。

2. 研究方法

(材料)

使用した味噌は赤味噌(米辛口赤色系味噌)6種(長野、宮城、新潟、徳島)、豆味噌1種(愛知)、麦味噌2種(長崎、大分)、白味噌(甘味噌)(京都)の10種である。

線虫 *Caenorhabditis elegans* として、野生株ならびに TJ356 株（インスリン様シグナル下流の転写因子 DAF-16 に GFP が連結した融合タンパク DAF-16::GFP を構成的に発現）を用いた。

(*in vivo* 寿命測定)

線虫個体を用いた寿命測定を行った。①みそ懸濁液（10%）に野生株（50 匹）を 1 昼夜浸漬し、寿命測定培地（通常飼育に用いる NGM 培地に FUDR を添加後、餌となる大腸菌を塗布）に移し、寿命測定を行った。②寿命測定培地に味噌を 10%あるいは 5%添加し、大腸菌の増殖を抑えるためにアンピシリンを添加した寿命測定培地上で野生株の寿命を測定した（50 匹）。

(*in vitro* 寿命測定)

初代培養細胞を用いた細胞レベルでのインスリン様シグナルの変動を観測した。TJ356 株を液体培養により大量調製し、アルカリブリーチ法により卵を分離した。コラゲナーゼ処理後、卵殻を破碎することにより個々の細胞に分離した。この状態では DAF-16::GFP が核に局在（長寿状態）していることから、遺伝子組換えインスリン（MBP::INS-6）を添加し、DAF-16::GFP を細胞質に移行させた。その後、試料を添加し、DAF-16::GFP の挙動（核移行）を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3. 研究結果

線虫を味噌試料に一昼夜浸漬した後に寿命測定を行ったところ、特段に寿命延長効果は認められなかった。そこで、寿命測定培地に味噌試料を添加し、恒常的に味噌を摂食させる状態で寿命測定を行った。

10%の味噌を含む培地ではおそらく浸透圧の影響により早期に死滅する線虫が認められた。そこで、培地に添加する味噌試料を 5%として寿命測定を行った。

まず、赤味噌 6 種の延命効果を検証したところ、3 種（宮城、新潟、徳島産）に対照区（試料無添

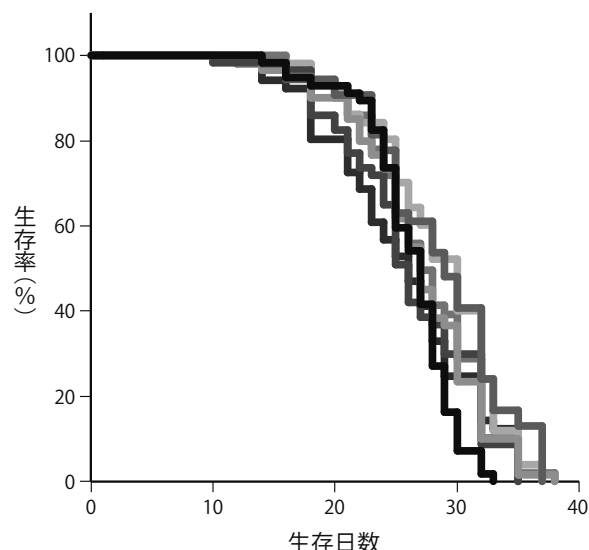


図 1. 赤みその延命効果（カプランマイヤー法）

表 1. ログランクテストによる有意差検定

味噌試料	P 値
赤みそ (秋田)	0.3615
赤みそ (宮城)	<u>0.0439</u>
赤みそ (新潟)	<u>0.0012</u>
赤みそ (長野)	0.2244
赤みそ (長野②)	0.0877
赤みそ (徳島)	<u>0.0012</u>

加）と比較して有意な延命効果が認められた（図 1，表 1）。

次いで、豆みそ・麦みそ・白みその延命効果を検証したところ、麦みそ（長崎産，大分産）ならびに白みそ（京都産）に対照区（試料無添加）と比較して有意な延命効果が認められた（図 2，表 2）。

そこで、麦みその延命効果がインスリン様シグナルによるものかどうかを，TJ356 株初代培養細胞を用いて検証した。

調製した初代培養細胞はインスリン様シグナルが亢進していないため，リン酸化を受けない DAF-16::GFP が核に局在する（図 3 左）。これは寿命延長時の DAF-16 の挙動と一致する。そこにインスリン様分子（MBP::INS-6）を添加すると，DAF-16::GFP がリン酸化され細胞質に移行した

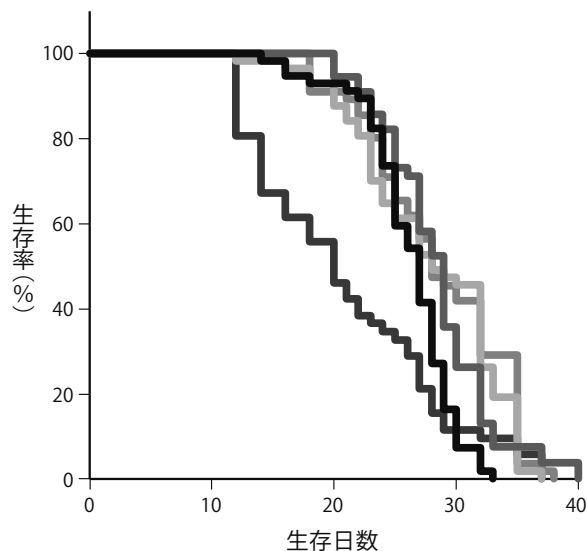


図2. 豆みそ・麦みそ・白みその延命効果（カプランマイヤー法）

表2. ログランクテストによる有意差検定

味噌試料	P 値
豆みそ（愛知）	0.0751
麦みそ（長崎）	<u>0.0017</u>
麦みそ（大分）	<u>0.0032</u>
白みそ（京都）	<u>0.0081</u>

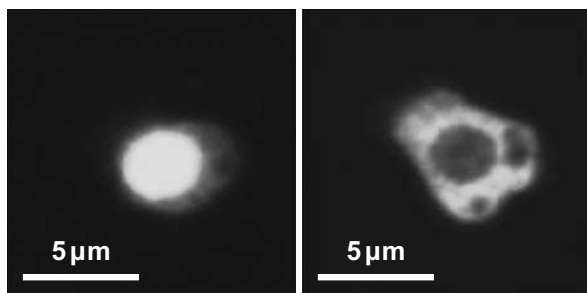


図3. TJ356初代培養細胞のインスリン様分子添加前後の共焦点レーザー顕微鏡写真

（図3右）。

DAF-16::GFPは殆どの細胞で細胞質に移行し、核・細胞質両者に認められる細胞もあった。しかしながら、核のみにDAF-16::GFPが認められる細胞は皆無であった。

そこで、インスリン様分子を添加しDAF-16::GFPを細胞質に移行させた（通常寿命状態）後、

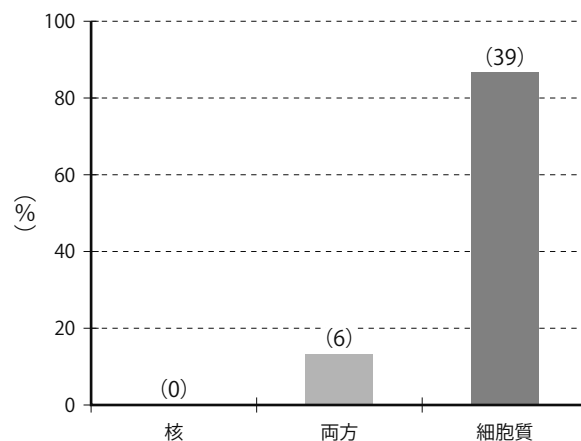


図4. インスリン様分子を添加した際のDAF-16::GFPの細胞内局在

味噌試料を添加しDAF-16::GFPの挙動を観察した。なお、味噌試料に含まれるNaClの影響を勘案して、活性炭クロマトグラフィーに吸着・洗浄・メタノール溶出したものを試料とした。

インスリン様分子を含む5%味噌試料を添加した場合には、細胞質の局在していたDAF-16::GFPが核に移行し、約80%の細胞で核・細胞質に、約20%の細胞で核のみにDAF-16::GFPが観察された（図5）。

また、10%味噌試料を添加した場合には、細胞質の局在していたDAF-16::GFPが核に移行し、ほぼ全ての細胞で核のみにDAF-16::GFPが観察された（図6）。以上の結果から、延命効果を示す麦みそ試料は濃度依存的にDAF-16::GFPの核移行（延命）を促進することが判明した。現在、活性炭処理した麦みそ試料の延命効果を個体レベルで検証している。

4. 総括と今後の展望

本研究において、10種の味噌の延命効果を検証した。赤みそ3種、麦みそ2種、白みそに有意な延命効果が認められた。試験に赤みそ6種のうち、3種のみが延命効果を示したことは興味深い。成分分析の結果を詳細に比較することにより、延命効果を示す成分が見出せるのではないかと

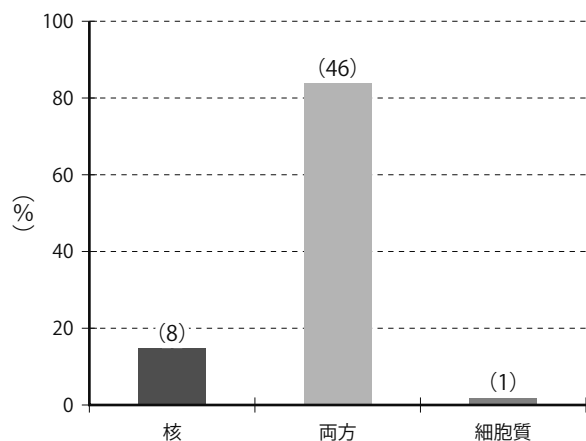


図5. 麦みそ試料5%を添加した際のDAF-16::GFPの細胞内局在

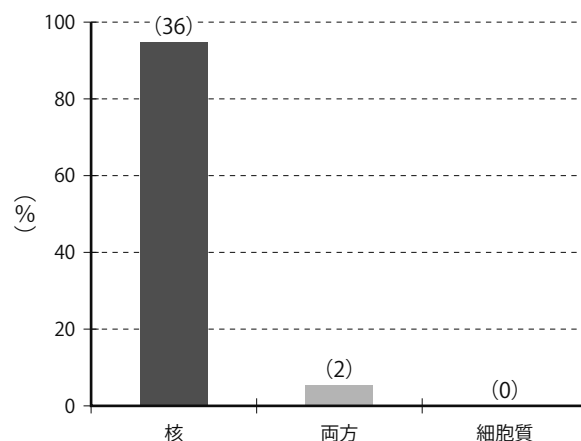


図6. 麦みそ試料10%を添加した際のDAF-16::GFPの細胞内局在

と考えている。長寿（延命）物質の単離・構造解析も重要なテーマであると考えられる。

また、延命効果を示す麦みそに関して、寿命を制御するインスリン様シグナル依存的な延命効果か否かを検証した。その際、試料に関する感受性が高い初代培養細胞を用い、かつ、TJ356株を用いることでDAF-16::GFPの細胞内局在の変動により延命効果を検証した。麦みそ試料は濃度依存的にDAF-16::GFPの核移行を促進したことから、その延命効果はインスリン様シグナル依存的であることが判明した。初代培養細胞を用いた本

システムは迅速に延命効果（DAF-16::GFPの核移行）を検出できることから、長寿（延命）物質の単離の際に用いるアッセイ系として、非常に優れていると考えられる。

5. 謝辞

本研究に対して多大なるご支援を賜りました一般社団法人中央味噌研究所に心よりお礼申し上げます。

味噌中の機能成分（高血圧，骨粗鬆症，脂質代謝）の 血中動態に関する研究－Ⅰ－

河村 幸雄

Studies on absorptional statics of biofunctional components related to
hypertension, osteoporosis, and lipid metabolism in Miso －Ⅰ－

Yukio KAWAMURA

*Department of Food Biochemistry, Kyoto women's University
35 kitahiyoshi-cho Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto, 605-8501, Kyoto, Japan*

はじめに

世界的に日本を含めて先進国では、高血圧，高脂血症，肥満，糖尿病，骨粗鬆症に代表される生活習慣病の蔓延が顕著になっている。その中で、日本は、それらの諸症状が近年進展して来てはい

るが比較的軽度である事が知られている。
その理由の一つに、日本型食事の寄与が指摘されている。疫学調査の結果では、日本型食事の大きな特徴の一つは大豆食品の多用である。味噌製品の摂取が関係しているのは間違いないと考えられているが果たして、どの程度寄与しているのかは評価の難しい問題であり、必ずしも明確ではないのが現状である。我々は、これまで、食品あるいは食品素材中には、高血圧¹⁻⁸⁾，耐糖性⁹⁻¹⁰⁾，骨粗鬆症¹¹⁻¹³⁾の改善や予防に機能する成分のある事や味噌に関しては高血圧抑制や¹⁾ アレルギー性の低減化¹⁴⁻¹⁵⁾を報告してきた。

ヒトの食事は多くの食品アイテムからなっており、米だけあるいは肉だけ、ましてや味噌だけの様な単一食ではなく多種類の成分が含まれてい

る。腸管から吸収される物質は基本的には低分子物質である。従って、食事の塩分，糖分，あるいはイソフラボンのような低分子生理活性物質の腸管吸収挙動は他の成分特に高分子成分の影響を受けるため単純ではなく、実体の詳細を明確にすることは簡単ではない。このような複雑系での吸収事象の解明は、栄養の現実的意味合いでは最も重要である。しかるに、実際の吸収状況は複雑多成分系であることから現代科学の最も苦手とする研究対象である。

味噌は、それだけで善くも悪くも代表的な多成分複雑系である。その構成成分の吸収動態は、それ自身の有する成分のみならず一緒に用いられる食事の他成分の影響を受けるため、実際の吸収挙動は明らかではない。このことから、例えば「味噌は塩分含量が高く血圧に良くない」の様な一般的な評価が出てくる。食塩感受性の高血圧症が存在するのは事実であるが、一般的に食塩が血圧に良くないとは結論づけられるものではない。同様に、でんぷん性の食品の血糖値の上昇効果は一律ではない。そこで、塩（NaCl）および糖

(glucose) の小腸膜の透過に及ぼす味噌の高分子画分の影響を検討するにあたり、まず反転腸管膜を用いた exovivo の系で、味噌の主要タンパク質である大豆タンパク質および共存タンパク質が食塩や糖の腸管吸収に与える影響を検討した。

方法と材料

腸管膜の調製

10 週齢の scl:SD ラット（雌）を研究室に到着後 1 週間慣らし飼育を行い、解剖前日に餌を取り去り 24 時間絶食させた。軽く麻酔し頸骨を脱臼した後、解剖し、胃から直腸までを摘出した（図 1）。摘出小腸は直ちに冷 PBS に浸漬し冷 PBS にて軽く腸管内を洗浄し、粘膜層を剥離あるいは傷つけないように注意しながら内容残存物を洗い流し

た。その後、十二腸、空腸、回腸部に分離し主に空腸から回腸部分を使用した。小腸膜を約 1cm の長さに円筒状に切断し、縦方向に切断し素早く、円筒状チューブに取り付けて基底膜側を内側に腸管内側を外側とするトランスウェル¹⁶⁾を組み立て、腸管側から基底膜側に透過する NaCl 及び糖また一部非代謝性イソフラボンの量を経時的に測定した。

トランスウェル用装置

調製した摘出小腸のうち主として空腸と回腸の部分長さ約 2cm の円筒状に切断した後、長軸方向に切断し基底膜側を外側に腸管側を内となるように細管にセットし、内外ともに 5mM のグルコースを含む生理食塩水あるいは PBS に漬け、細管内部に透過する塩化ナトリウム、グルコース、および非代謝性の 8-C-daidsen, などのイソフ

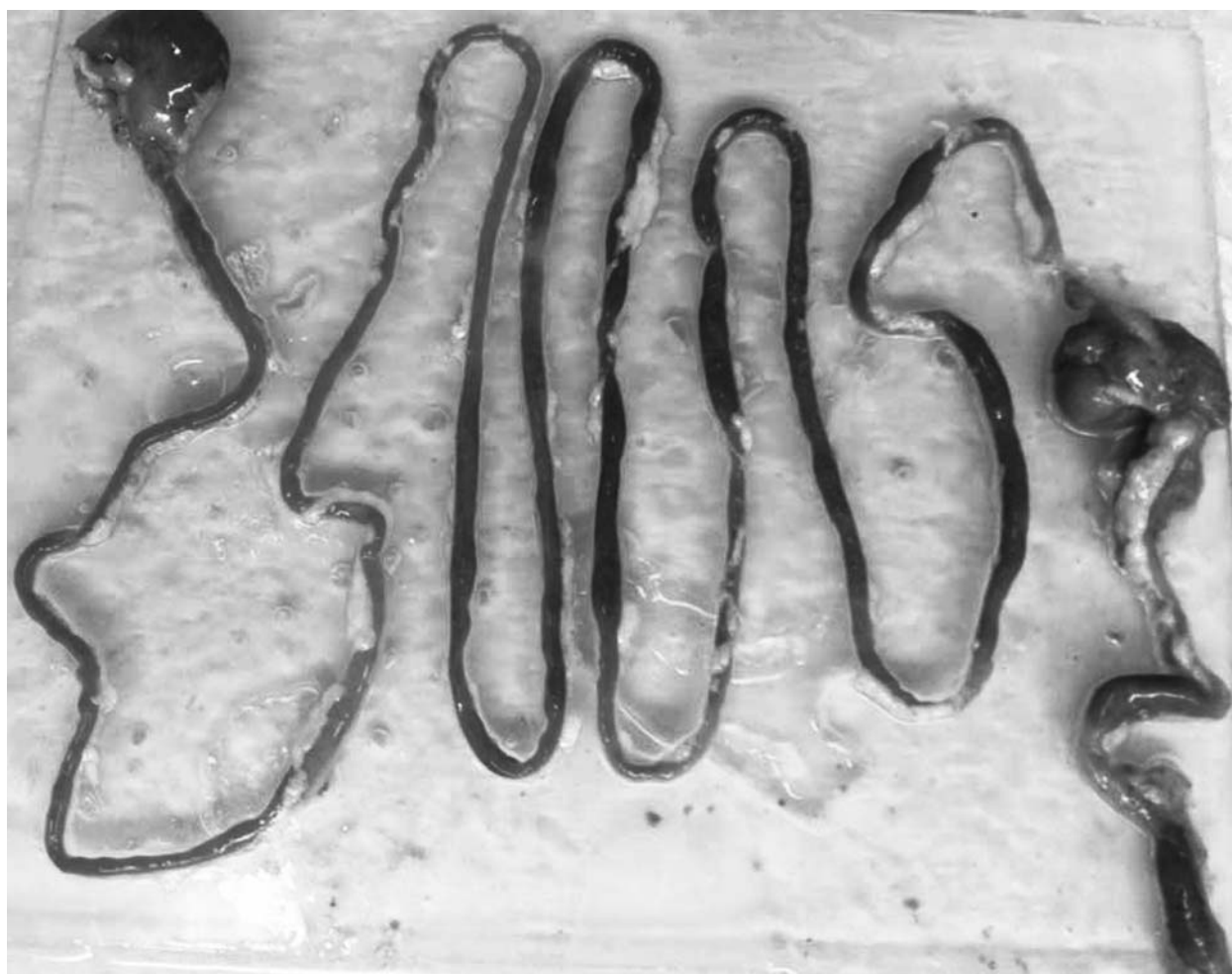


図 1. ラットの摘出消化管図（胃部から大腸・直腸まで）

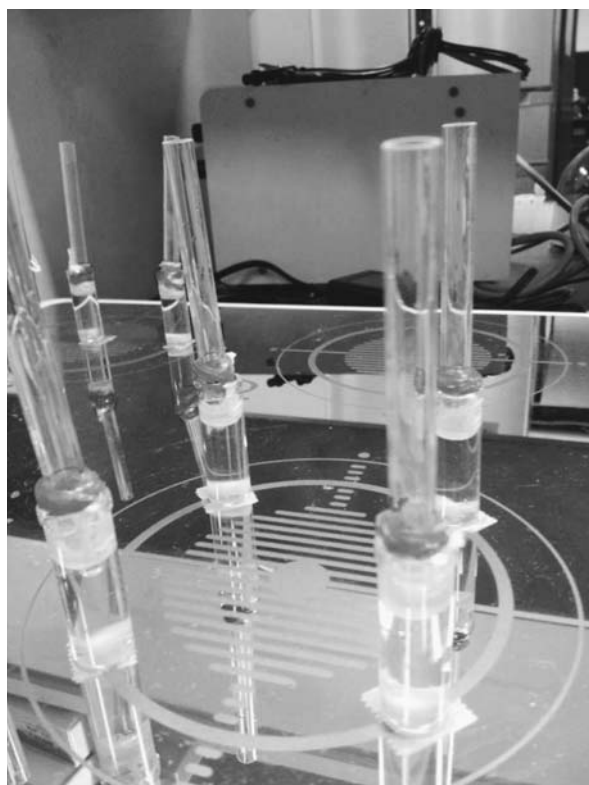


図2. トランスウェル装置

ラボンを定量した。グルコース透過の測定は内外液からグルコースを除いたPBSを使用した。解放系で行っているため、外液を攪拌することで酸素供給とした(図2)。

対照膜として、分子量 8000 カットオフの透析膜を同様にトランスウェルにセットし、時間依存的な NaCl とダイゼインの透過速度を測定した。

浸透圧の影響を検討するために、管腔側と基底膜側の両方にたんぱく質を加えた場合と管腔側に

のみたんぱく質を加えた実験区を作成した。また、たんぱく質を加えない実験区をコントロールとした。

たんぱく質として、大豆たんぱく質(SPI)、卵白アルブミン、ラクトアルブミン、血清たんぱく質として牛血清アルブミンと牛 γ -グロブリンを使用した。SPIの調製は、以下の方法によった。

- ①0.9% NaCl 100mL に大豆タンパクを 10g 加え、1 時間攪拌することで溶解させた。
- ②溶解した SPI 50ml を透析膜に入れ両端を止めた。
- ③外液を 0.9% NaCl とし、攪拌しながら 2 日間放置した。
- ④透析後の液を 20℃ 2500rpm 25min で遠心分離した。
- ⑤上澄みを濾過し、Bradford 法によりタンパク量を測定した。
- ⑥たんぱく質量は 5.816mg/mL と求められた。

糖の定量は、Avigard らの方法¹⁷⁻¹⁸⁾ に準じて行った。タンパク質の定量は、Bradford の色素法¹⁹⁾ によった。塩分濃度は塩分計(HORIBA LAQUAtwin)(低濃度側 1 点校正)により測定した。イソフラボンの定量は、HPLC 法(カラム RP-5C18-AR-II, 分析時間 35 分, 流速 1mL/min, 溶出: 0.1% HCOOH 中 10% CH₃CN → 35% CH₃CN)により行った。

結果と考察

I. NaCl の人工膜および小腸膜透過に及ぼす大豆タンパク質と食品および血清タンパク質の影響

(1) NaCl の人工膜透過と小腸膜透過の比較

まず、最初に NaCl の人工膜透過と小腸膜の透過の比較を行った。小腸膜の場合膜の管腔側(外側)に基底膜側を内側にセットして、NaCl の透過を測定した(図3)。

人工膜、小腸膜の両方で時間経過とともに NaCl が透過が観察された。人工膜の方が NaCl の透過量(透過速度)は多く(大きく)、30 から 60 分後

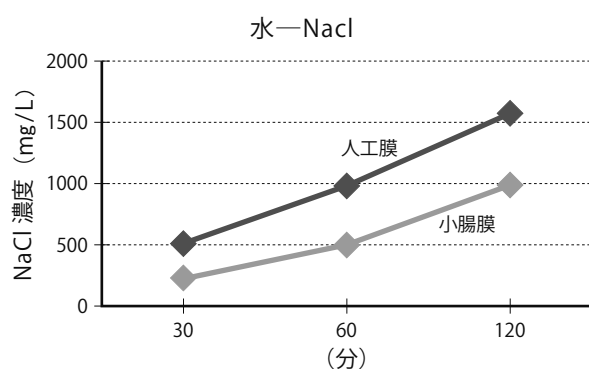


図3. NaCl の人工膜透過と小腸膜の透過の比較

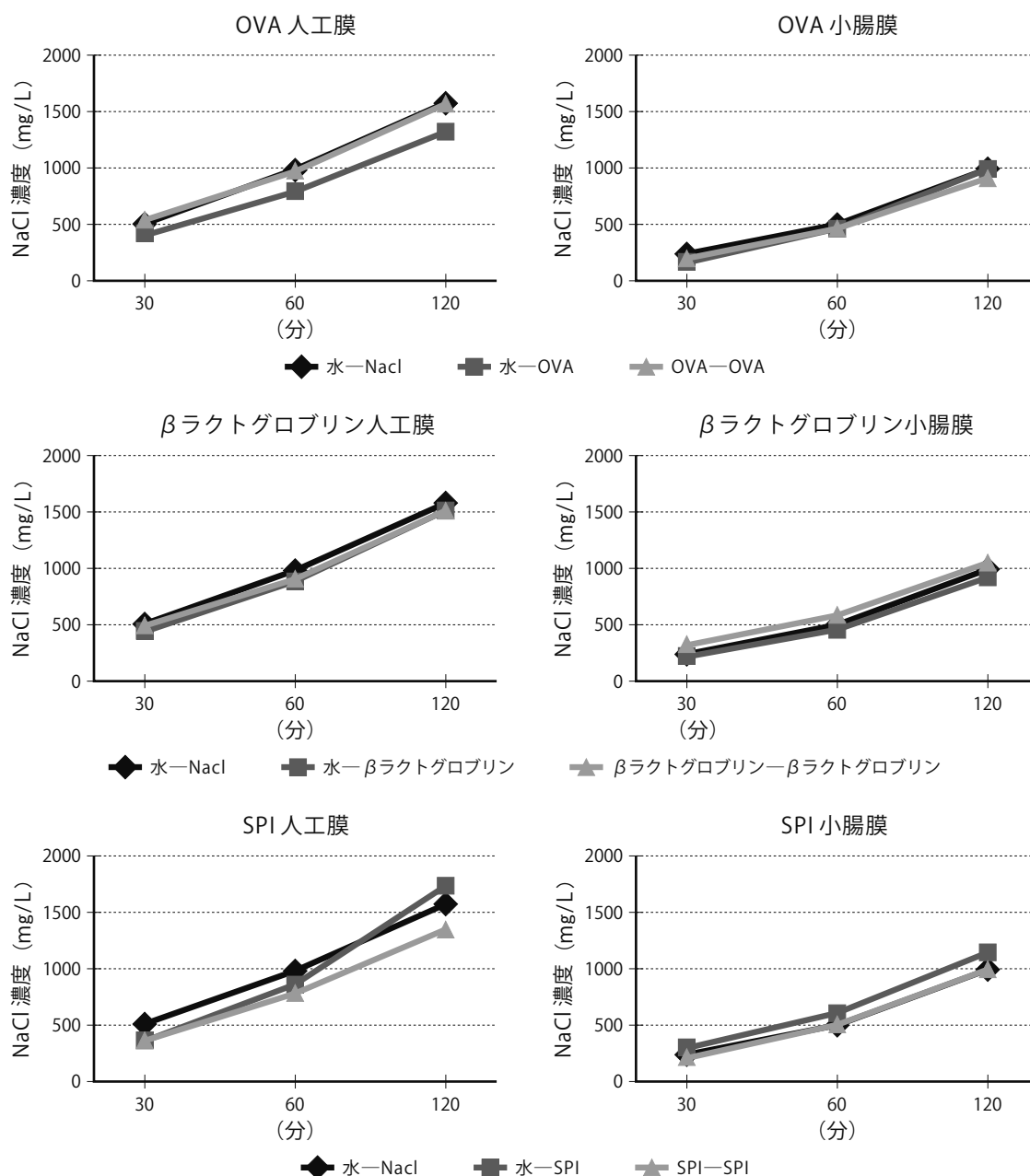


図4. NaClの膜透過に及ぼす食品タンパクの影響

では小腸膜の約2倍であった。120分後、人工膜では上部ウェルのNaCl濃度が約1500mg/Lであったのに対して小腸膜では上部ウェルのNaCl濃度が約1000mg/Lであった。

このようなNaClの膜透過に対する共存タンパク質の影響を検討した。すなわち、膜を挟んでタンパク質の存在するか非存在かがNaClの透過量に与える影響を調べた。数種の食品タンパク質の影響を調べた結果をまとめたのが図4である。代表的な食品タンパク質である卵白アルブミン

(OVA)、ウシミルク由来β-ラクトグロブリン、大豆分離タンパク質(SPI)の効果を示した。また血清タンパク質の影響を示したのが、図5である。

人工膜と小腸膜のNaClの透過量(透過速度)を比べると、NaClの小腸膜の透過は人工膜と比べて約1/2から2/3となりNaClの小腸膜の透過は人工膜に比べて遅いことが示された。NaClの透過に対して膜の消化管側と基底膜側にタンパク質の存否の影響を定量した結果(図4, 5)の要点を以下に示した。

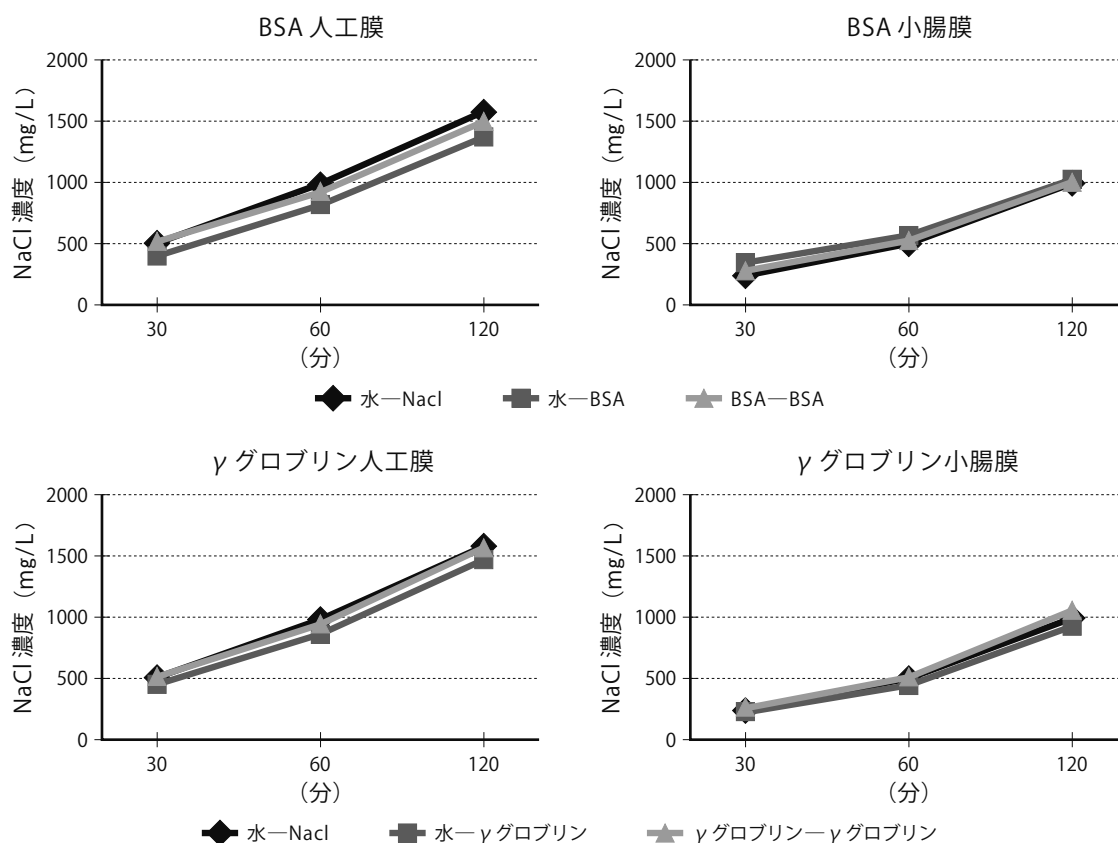


図5. NaClの膜透過に及ぼす血清タンパクの影響

食品タンパク質の影響：人工膜のNaClの膜透過に対する食品タンパク質類の影響は、(i)OVA系ではOVAの入っていないコントロールに比べて、下部ウェルにOVAを加えたものはNaClの透過量が減少傾向にあった。上下ウェルにOVAを加えたものは下部ウェルのみにOVAを加えたものよりNaClの透過量が多く、またOVAによる浸透圧の影響がなくなり、NaClの透過量がコントロールとほぼ同じになった。(ii)βラクトグロブリン系ではβラクトグロブリンの入っていないコントロールと比べて、下部・上下ウェルにβラクトグロブリンを加えたものはNaClの透過量がやや減少傾向にあった。また、下部ウェルのみにβラクトグロブリンを加えたものと上下ウェルにβラクトグロブリンを加えたもののNaClの透過量はほぼ同じであった。(iii)SPIの入っていないコントロールと比べて、上下ウェルにSPIを加えたものはNaClの透過量があまり変わらなかった。下

部ウェルのみにSPIを加えたものはSPIの入っていないコントロールよりNaClの透過量が減少傾向にあった。

小腸膜のNaCl膜透過に対する食品タンパク質類の影響は、(i)OVA系ではOVAの入っていないコントロール、下部・上下ウェルにOVAを加えたもののNaClの透過量はほぼ同じであった。(ii)βラクトグロブリン系ではβラクトグロブリンの入っていないコントロールと比べて、下部ウェルにβラクトグロブリンを加えたものはNaClの透過量がやや減少傾向にあった。上下ウェルにβラクトグロブリンを加えたものは下部ウェルのみにβラクトグロブリンを加えたものよりNaClの透過量が多く、コントロールよりもやや増加傾向にあった。(iii)SPI系ではSPIの入っていないコントロールと比べて、下部ウェルにSPIを加えたものはNaClの透過量がやや増加傾向にあった。上下ウェルにSPIを加えたものは下部ウェルのみにSPI

を加えたものより NaCl の透過量が少なく、また SPI による浸透圧の影響がなくなり、NaCl の透過量がコントロールとほぼ同じになった。

血清タンパク質の影響：人工膜の NaCl の膜透過に対する食品タンパク質類の影響は、(i)BSA 系では BSA の入っていないコントロールと比べて、下部ウェルに BSA を加えたものは NaCl の透過量が減少傾向にあった。上下ウェルに BSA を加えたものは下部ウェルのみに BSA を加えたものより NaCl の透過量がやや多く、また BSA による浸透圧の影響がなくなり、NaCl の透過量がコントロールとほぼ同じになった。(ii) γ -グロブリン系では γ グロブリンの入っていないコントロールと比べて、下部ウェルに γ グロブリンを加えたものは NaCl の透過量が少し減少傾向にあった。上下ウェルに γ グロブリンを加えたものは下部ウェルのみに γ グロブリンを加えたものより NaCl の透過量がやや多く、また γ グロブリンによる浸透圧の影響がなくなり、NaCl の透過量がコントロールとほぼ同じになった。

小腸膜の NaCl 膜透過に対する血清タンパク質類の影響は、(i)BSA 系では BSA の入っていないコントロールと比べて、下部ウェルに BSA を加えたものは NaCl の透過量がやや増加傾向にあった。上下ウェルに BSA を加えたものは下部ウェルのみに BSA を加えたものより NaCl の透過量が少なく、また BSA による浸透圧の影響がなくなり、NaCl の透過量がコントロールとほぼ同じになった。(ii) γ グロブリン系では γ グロブリンの入っていないコントロール、下部・上下ウェルに γ グロブリンを加えたものの NaCl の透過量はほぼ同じであった。

考察

NaCl の吸収におよぼすタンパク質の影響に関して、NaCl 透過量（速度）は人工膜と比べて小腸膜では約 1/2 と少ない（遅い）ことが示された。人工膜および小腸膜の膜内外のタンパク質の有無は、条件下では NaCl の透過量（速度）に大きな影響は及ぼさないと考えらるが、タンパク

質の入っていないコントロールより下部ウェルのみ、上下ウェルにタンパク質を加えた場合の方が減少傾向にあった。一般に食事直後は、小腸内タンパク質やペプチド濃度が高いと考えられることから、小腸膜の内外でタンパク質濃度の差が生じているとすれば、食事時のタンパク質の量と特性が NaCl の初期吸収に影響を与える可能性がある。味噌の主要タンパク質である大豆タンパク質（SPI）で、腸管に SPI が存在する条件に相当する下部ウェルにのみ SPI が存在したときにおいても NaCl の透過速度には差はなかったが、今後は、タンパク質濃度やペプチド量、あるいは糖や脂質など他の食品成分の存在の影響やそれらが混在した時の影響を検討する必要がある。

II. グルコースの小腸膜透過に及ぼすタンパク質の影響

グルコースの小腸膜透過と人工膜透過の比較

食事由来の血糖値の変動は、本来的にはインスリンによる血糖の細胞内取り込み能の問題であるが、II 型糖尿病患者やその前段階の高血糖症状の人にとっては現実的問題として糖の吸収の抑制が重要となっている。現在食品中の小腸における糖の吸収を抑制する成分が、抗糖尿病対策として重視されている。そこで日常的に摂取されている食品タンパク質が、糖の吸収にどのように影響しているか知る目的で、大豆の主要タンパク質が摘出小腸膜の糖吸収にどのように影響するかを検討した。

方法と材料

腸間膜の調製、糖の膜透過量（速度）の測定法、大豆分離タンパク質の調製法その他の方法は、前章と同じ方法によった。糖の定量は、フェリシアナイド法によった。

結果と考察

(1) グルコースの小腸膜透過と人工膜透過の比較

まず最初にグルコースの小腸膜透過と人工膜透過を比較してみた（図 6）。

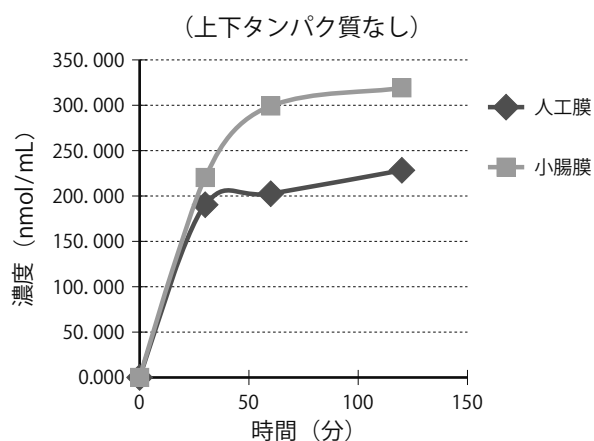


図6. グルコースの小腸膜透過と人工膜透過の比較

前章に用いたトランスウェル様装置に摘出反転小腸膜と対照として分画分子量分子8KDの透析膜をセットして、小腸膜については、腸管側から基底膜側への糖（グルコース）の透過量を測定した。その結果、グルコース透過量は、30分までの初速はあまり変化が無いようであつた低グルコース消費域で飽和曲線を描く事から、腸管の糖輸送系をよく保持していると判断した。1から2時間では、小腸膜の方が対照とした人工膜よりも多く（速く）糖を透過させる事が示された。この結果は、予想外で小腸膜の方が多くのグルコースを透過させた。また、この事は小腸膜が単純な拡散によりグルコースを透過させるのではなく、能動的な糖の輸送系が少なくとも1時間程度は機能している事を示していると考えられた。

このような小腸膜のグルコース輸送に対して、共存タンパク質がどのような影響を及ぼすのかを、反転小腸膜の消化管側にタンパク質を共存させた時の基底膜側へのグルコース透過量（速度）を比較する事で評価した。

(2)小腸膜のグルコース輸送に対する共存タンパク質の影響

反転腸の消化管側に0.9% NaCl,5mM グルコース溶液を漿膜側に0.9%のNaCl溶液を満たし、グルコースの漿膜側への透過を測定した。その際にタンパク質（大豆分離タンパク質SPI, 卵白アルブミン, ラクトアルブミンを消化管側あるいは

消化管側, 基底膜側の両者に1mg/mL濃度で存在させたときのグルコースの透過挙動（速度）を比較した（図7）。

大豆分離タンパク質（SPI）を消化管側に存在させた時（図7左図）、グルコースの基底膜側への透過は、存在しない時に比べて大きく抑制された。消化管側にのみタンパク質が存在する事によるドナン平衡効果を相殺するために、基底膜側にもSPIを存在させた時、この抑制はそれほど大きな影響は受け無かった。この事はSPIそのものが透過を直接抑制した事を示すと解釈できる。このようなSPIの糖吸収作用が、SPIに特有の現象であるかどうかを明らかにするため、他の代表的な食品タンパク質である卵白タンパク質（OVA）とラクトグロブリン（LG）をそれぞれ消化管側に共存させた時のグルコースの透過の様相を解析した（図7中図と右図）。

OVAを消化管側にのみ存在させた時、SPIと同じくグルコースの透過はSPIと同程度に抑制された。しかし、この透過抑制は透過初期には認められなかったが30分以後急速に認められ、それ以後は元の透過の約70%レベルであった。一方、LGを消化管側にのみ共存させた時、やはりグルコースの透過はSPIやOVAと同じく大きく抑制された。しかし、LGを消化管側と基底膜側の両方に存在させると30分までの初期はともかくそれ以後、SPIやOVAと異なりむしろ透過を促進させた。

このように、本測定系において食品タンパク質は（データはここでは示さないがタンパク質一般に）、消化管側にのみ存在した時グルコースの透過（輸送）を抑制すると考えられる。しかし、その効果はタンパク質ごとに異なる可能性が示された。従って、このようなタンパク質による小腸膜での吸収抑制作用とタンパク質ごとのそのような作用の差異がどのような機構によるのかは、今後詳細に検討しなければならない。

今回、SPIにはOVAやLGに認められた消化管側と基底膜側の両者に存在する事による糖の透過（輸送）抑制の解除が認められなかったが、その理由が大豆たんぱく質のどのような特徴に起因するのかについて検討する必要がある。考える有力な可能性は、(1)SPIがOVAやLGのよう

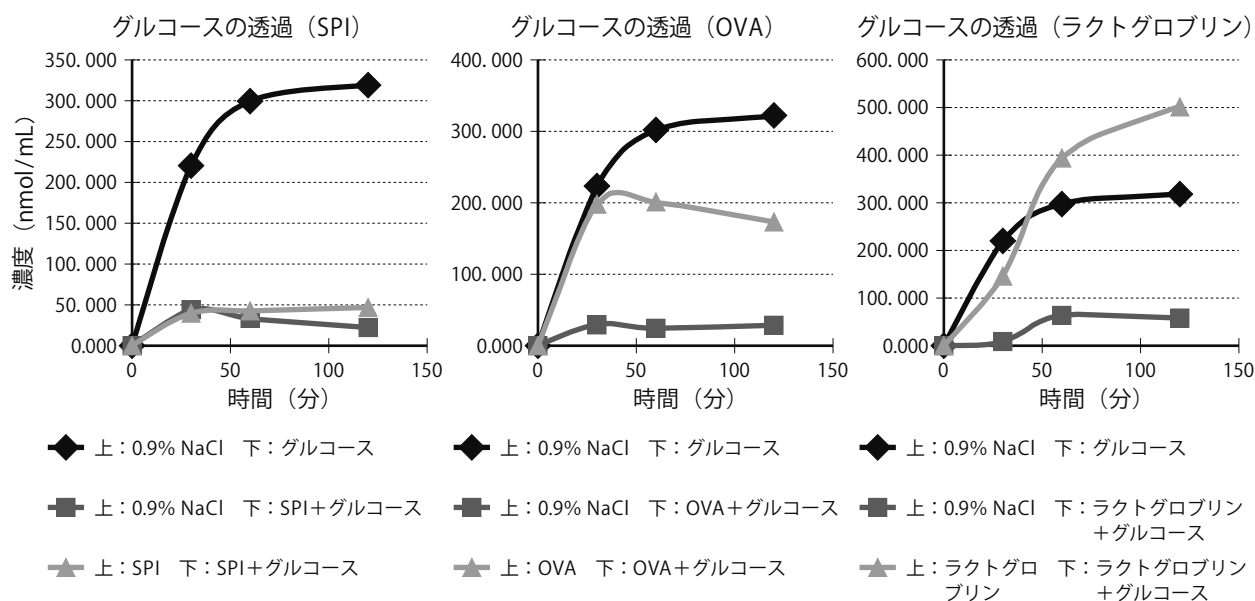


図7. グルコースの小腸膜透過に及ぼすタンパク質の影響

に単一たんぱく質からなるのではなく何種かのたんぱく質の混合物であるため、(2)SPIがOVAやLGのような動物性たんぱく質と比べて、植物性たんぱく質であること、すなわちSPIは、OVAやLGと比べて一般に消化性が低いため、(3)SPIには、プロテアーゼインヒビターたんぱく質の存在が考えられるため、などである。

味噌には、主要素材である大豆たんぱく質だけでなく、種々の植物性および微生物由来たんぱく質とその分解産物とくにプロテアーゼにより分解されにくいペプチドコアが残っているため、それらによる糖の透過（輸送）系の抑制が推定される。その意味で、味噌に含有される難消化性画分や難水溶性画分にどのような成分が存在するかは、本研究との関連で興味を持たれるところである。

現在、味噌を生理機能性物質ライブラリーと捉えてその難消化性画分や難溶解性画分と疾病（高血圧症、骨粗鬆症、高血糖症、高脂血症など）予防の関係の解明を目指している。

謝 辞

本研究は、(一社)中央味噌研究所の研究助成を受けて実施された。ここに記して厚く御礼申し上げる。

味噌試料の提供については各社のご協力を得ました。感謝致します。

研究の実施に当たっては、京都女子大学食物栄養学科食品学第3研究室の研究員並びに学生諸氏および近畿大学農学部応用生命化学科応用細胞研究室の教員、研究員各位のご協力を得ました。ここに深謝致します。

参考文献および資料

- 1) 岩下敦子, 高橋裕司, 河村幸雄 味噌の生理機能, 日本醸造協会誌 1994, 89: 869
- 2) 岡本(貝沼)章子, 松本英子, 河村幸雄, 小泉幸道, 柳田藤治, 糖-アミノ酸系メイラード反応生成物のアンギオテンシンI変換酵素阻害能, 日本醸造学会誌, 2001, 96:199
- 3) Yang S., Yunden J., Sonoda S., Doyama N., Lipkowski A.W., Kawamura Y. and Yoshikawa M., Bubiscolin, a selective opioid peptide derived from plant Rubisco *FEBS Letters* 2001 509: 213
- 4) Yang Y., Marczak E., Usui H., Kawamura Y., and Yoshikawa M., Antihypertensive properties of Spinach Leaf Protein Digests, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52:2223
- 5) Katayama K., Tomatsu M., Sugiyama

- M., Kawahara S., Yamauchi K., Fuchu H., Kodama K., Kawamura Y., and Muguruma M. Inhibitory profile of Nanopeptide derived from porcine troponin C against angiotensin I-converting enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 2001 52(4) 771
- 6) Katayama K., Fuchu H., Sakata A., Kawahara S., Yamauchi K., Kawamura Y., and Muguruma M. Peptic hydrolysate of porcine crude myosine has many active fractions inhibiting Angiotensin I-converting enzyme. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.*, 2003, 16:1384
- 7) Katayama K., Fuchu H., Sakata A., Kawahara S., Yamauchi K., Kawamura Y., and Muguruma M., Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of porcine skeletal muscle proteins following enzyme digestion. *Asian-Aust. J. Animal Sci.*, 2003, 16:412
- 8) Katayama K., Tomatsu M., Fuchu H., Sugiyama M., Kawahara S., Yamauchi K., Kawamura Y., and Muguruma M., Purification and Characterization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C., *Animal Science Journal*, 2003, 74: 53
- 9) Yasuko Makino-Wakagi, Yukihiro Yoshimura, Yuki Uzawa, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama Yukio Kawamura, Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 417: 880
- 10) Yukihiro Yoshimura, Saori Nishii, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, Yukio Kawamura Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-Ay mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, 434: 486
- 11) S. Michihara, S. Suzuki, H.-J. Tang, T. Moriyama and Y. Kawamura Kudzu (*Pueraria lobata*) extracts depress bone absorption of ovariectomized mouse by downregulating NFATc1 of osteoclast *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2008 43: Supl.1, 141
- 12) Teruyoshi Tanaka, Hanjun Tang, Fengnian Yu, Seiwa Michihara, Yuki Uzawa, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, and Yukio Kawamura, Kudzu (*Pueraria lobata*) vine ethanol extracts improve ovariectomy-induced bone loss in Female mice. *J Agric Food Chem.* 2011; 59:13230
- 13) Seiwa Michihara, Teruyoshi Tanaka, Yuki Uzawa, Tatsuya Moriyama, and Yukio Kawamura*, Puerarin exerted anti-osteoporotic action independent of estrogen receptor-mediated pathway, *J. Nutri. Sci. and Vitaminol.*, 2012 58:202
- 14) Moriyama T, Yano E, Suemori Y, Nakano K, Zaima N, Kawamura Y., Hypoallergenicity of various miso pastes manufactured in Japan. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2013; 59: 462
- 15) Tatsuya MORIYAMA, Erika YANO, Kazumi KITTA, Shin-ichi KAWAMOTO, Yukio KAWAMURA, and Setsuko TODORIKI Effect of Gamma Irradiation on Soybean Allergen Levels *Biosci., Biotech, Biochem.* 2013, 77: 2371
- 16) Satake M., Enjoh M., Nakamura Y., Takano T., Kawamura Y., Arai S., and Shimizu M., Transsepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco 2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66:378
- 17) Avigard G. Method in Enzymology, 1975, Vol41, p27 Academic Press
- 18) Avigard G., Amaral D., Asensio, C., and Horecker, B.L. *J. Biol. Chem.* 1962 237:2736

19) Bradford M.M., *Anal. Biochem.*, 1976,
72:248

その他の資料

1. 日本の塩

<http://www.sio.or.jp/index.html>

2. 日本高血圧学会ホームページ

<http://www.jpnsnsh.jp/>

3. 厚生労働省高血圧ホームページ

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/seikatu/kouketuatu/>

亜鉛欠乏予防における味噌の効能に関する 基盤研究とその応用展開

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、タンパク質の構造の保持、各種酵素の補因子、生体内シグナルの調節因子として機能する¹⁾。そのため、亜鉛の不足は、味覚機能や免疫機能、創傷治癒能などを著しく損ない、“Quality of Life”を大きく低下させる²⁾。亜鉛不足を予防するため、日々の食事で十分な亜鉛を摂取し、体内の要求量を充足させることが重要となるが、近年、先進諸国において亜鉛欠乏者の数が増加していることが明らかにされている³⁾。特に、日本においては、高齢者や女性を中心に亜鉛欠乏者が増加していることが示されており、より一層の注意が必要な状況になっている⁴⁾。しかしながら、国民健康・栄養調査において、日々の食事からの亜鉛摂取量が推奨量の7～8割程度にしか達していないという報告がなされているように⁵⁾、亜鉛欠乏に対しては、さほど大きな注意が払われておらず、超高齢社会を迎えた日本においては、食事からの亜鉛摂取、その吸収を高めることを積極的に意識することが重要となっている⁶⁾。

食事に含まれる亜鉛は、十二指腸や空腸の管腔膜に局在する亜鉛トランスポーター ZIP4 を介して吸収される^{7,8)}。ZIP4 遺伝子の変異は、先天性亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎を引き起こすことが知られ、食事由来の亜鉛吸収に不可欠の分子である^{9,10)}。従って、この ZIP4 の発現量が、亜鉛吸収量を制御する上で極めて重要となる。消化管における亜鉛吸収効率は30%程度と低いため¹¹⁾、この ZIP4 の発現量を増加させる因子を見出すことができれば、亜鉛吸収率を高めることができると考えることが出来る。我々は、これまでの「ZIP4 の発現を増加させる食品因子」の探索過程で、ZIP4 の発現を促進と思われる味噌を複数種発見し、味噌の共通の主原料である大豆抽出物に、同様の活性が含まれることを見出している。分取 TLC や各種クロマトグラフィー（中圧カラムや高速液体）を用いて活性因子の単離精製を行い、単一化合物にまで精製することに成功している。今回、その化合物の構造を決定し、詳細な作用機構に関する解析や細胞内亜鉛量に及ぼす効果などについての評価を実施した。さらにこれまでの解

析はマウス ZIP4 に対する効果についての解析であったため、新たにヒト ZIP4 に対する効果を検討できる評価系を構築し、見出した化合物のヒト ZIP4 に対する効果を評価するとともに、各種味噌抽出物の効果を検証した。

方 法

① ソヤサポニンの ZIP4 の発現・細胞内亜鉛量に及ぼす効果の検証

Hepa 細胞を用いてのエンドサイトーシスに関する解析では¹²⁾、対象として Texas Red で標識されたトランスフェリン (Rockland) を使用した。細胞内の亜鉛量の増加の指標として、細胞内亜鉛量と生の相関で発現を増加させるメタロチオネイン I (MT-I) mRNA の発現量を用い、real-time PCR 法にて定量した。ZIP4 の mRNA の発現量変化についての影響も同様の手法で評価し、コントロールとして、 β actin の発現を用いた。以下、使用したプライマーの配列を示す。Zip4 mRNA: forward 5'-CTCTGCAGCTGGCACCAA-3' and reverse 5'-CACCAAGTCTGAACGAGAGCTTT-3', MT-I mRNA: forward 5'-GCTGTGCCTGATGTGACGAA-3' and reverse 5'-AGGAAGACGCTGGGTTTGGT-3', β actin mRNA: forward 5'-GCCAACCGTGAAAAGATGA-3' and reverse 5'-CAGCCTGGATGGCTACGTACA-3'。また、細胞毒性の評価については MTT 法を用いた。¹⁾

② ヒト ZIP4 の発現に及ぼす味噌抽出物の評価

ヒト ZIP4 遺伝子を導入した MDCK FLp-InTM T-Rex 細胞株 (イリノイ大学 Jack Kaplan 教授より分与) の培養液に、同定したソヤサポニン、あるいは新たに調整した味噌抽出物を加えて培養し、ヒト ZIP4 の発現を細胞表面ビオチン化アッセイ (PIERCE) にて評価した。ビオチン化したタンパク質の調整にはストレプトアビジンビーズを使用し、immunoblotting にてヒト ZIP4 の発現量を比較した。

③ 味噌抽出物からの ZIP4 発現促進因子の精製と構造決定

中央味噌研究所よりご提供いただいた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。また、メタノールや酢酸エチルなどで抽出した調整した味噌抽出液を調整した。これらサンプルの ZIP4 の発現に及ぼす効果を上記方法で検討し、活性が認められるサンプルを中圧カラムクロマトグラフィーや分取 TLC, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などを用いて単離精製した。単一化合物まで精製できたものについては、その構造を NMR, MS 等機器分析を用いて決定した。

結 果

1. ZIP4 発現促進因子としてのソヤサポニンの同定とその効果についての検証

これまでの解析で、マウス ZIP4 に対して発現促進効果があることを見出していた大豆抽出物から、複数の単一化合物を精製することに成功していたため、その構造を決定した (図 1)。その結果、ZIP4 発現促進活性を有する化合物がソヤサポニンであることが判明した。このソヤサポニンの ZIP4 の発現に及ぼす効果について解析した結果、ソヤサポニンは、ZIP4 の mRNA の発現量には影響せず、直接、タンパク質の発現に影響していることを確認した (図 1)。詳細な解析の結果、ZIP4 のエンドサイトーシスを抑制してその分解を減少させる効果を持つこと、この効果が ZIP4 特異的に起こることを見出している。ソヤサポニンは、ZIP4 の発現上昇に伴い、細胞内の亜鉛取り込みを増加させる活性も有しているため、亜鉛吸収促進因子として期待される味噌成分の一つであると考えられる。上記解析と合わせ、さらに新しい因子の探索も進めている。

次に、ソヤサポニンを含む抽出物が細胞の亜鉛含量を増加させるかどうかについて解析した。細胞内の亜鉛量の変化については、細胞内亜鉛量と正の相関で発現を増加させるメタロチオネイン I

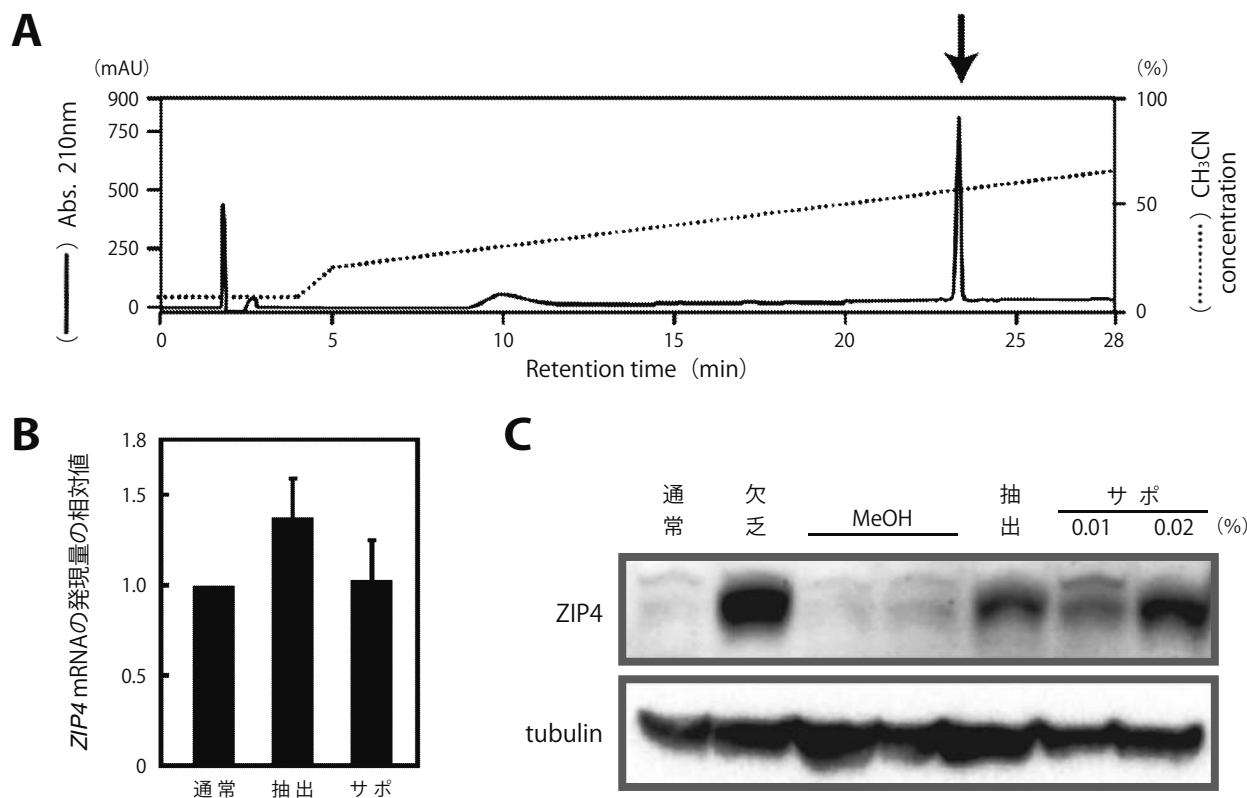


図1. 単一化合物として得られたソヤサポニンの ZIP4 発現促進効果

A. HPLC による単一化合物であることの確認。 **B.** ソヤサポニン (サボ), あるいは精製前的大豆抽出物は, ZIP4 の mRNA の発現には大きな影響を与えない。 **C.** 精製前的大豆抽出物と同様に, ソヤサポニン (サボ) は ZIP4 タンパク質の発現を増加させる。

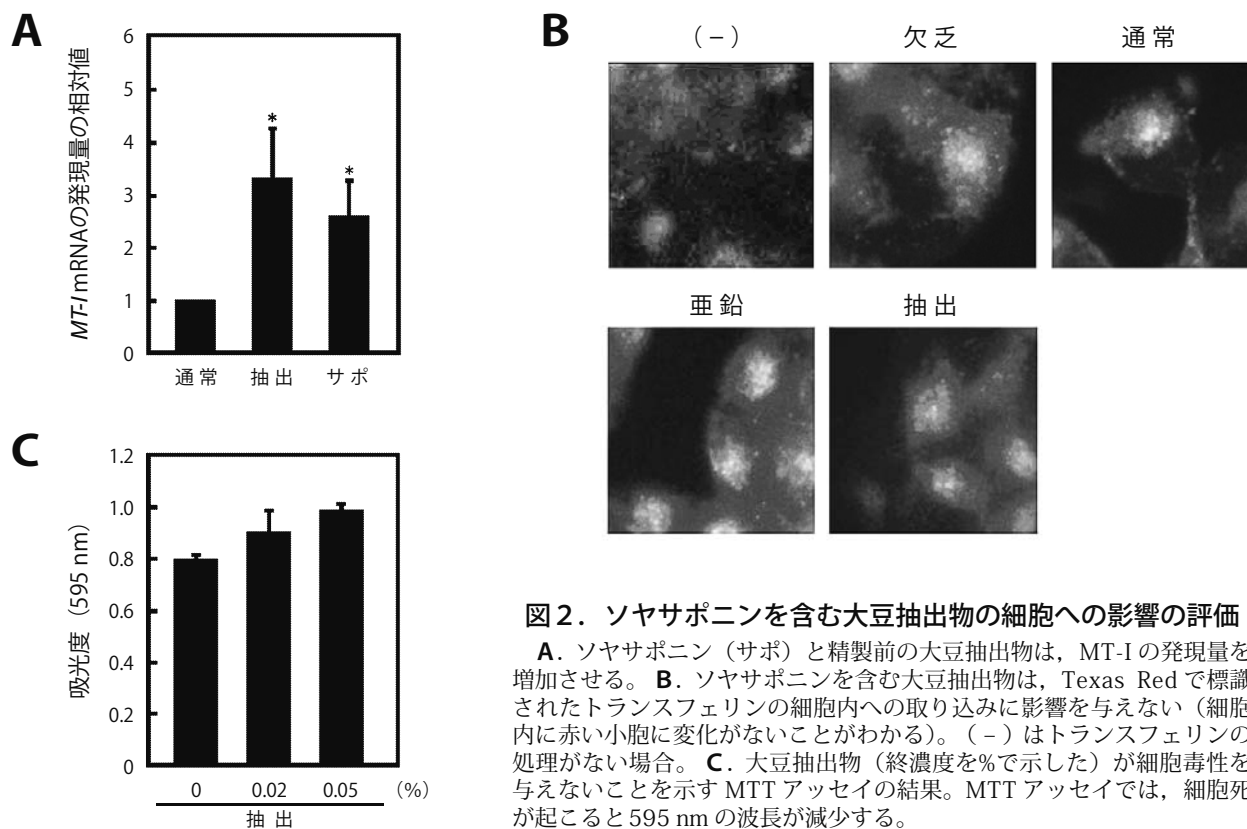


図2. ソヤサポニンを含む大豆抽出物の細胞への影響の評価

A. ソヤサポニン (サボ) と精製前的大豆抽出物は, MT-I の発現量を増加させる。 **B.** ソヤサポニンを含む大豆抽出物は, Texas Red で標識されたトランスフェリンの細胞内への取り込みに影響を与えない (細胞内に赤い小胞に変化がないことがわかる)。(-) はトランスフェリンの処理がない場合。 **C.** 大豆抽出物 (終濃度を%で示した) が細胞毒性を与えないことを示す MTT アッセイの結果。 MTT アッセイでは, 細胞死が起こると 595 nm の波長が減少する。

(MT-I) mRNA の発現量を指標に解析した。その結果、ソヤサポニンを含む抽出物を添加した培養液で培養した細胞は、MT-I の発現を増加させることが確認された(図2)。続いて、ZIP4 タンパク質分解の抑制に繋がるエンドサイトーシスに及ぼす影響について解析した。コレラ毒素B サブユニット(脂質ラフトを介した経路)を対象とした比較解析の結果から、ラフトを介したエンドサイトーシスには作用しないことを見出していたため(前年度の解析で報告)、今回は、トランスフェリンを用いて、クラスリンを介したエンドサイトーシスへの影響について解析した。その結果、ソヤサポニンを含む抽出物は、トランスフェリンのエンドサイトーシスに対しても大きな影響を与えないことを確認した(図2)。従って、ソヤサポニンを含む抽出物の効果はZIP4 に非常に特異的な効果であることが判明した。さらに、本抽出物は、細胞毒性も高くないことが確認でき(図2)、これらの結果は、見出した大豆抽出物中の活性因子は、亜鉛吸収促進因子として非常に有効に作用することを示唆している。

2. ヒト ZIP4 の発現に及ぼす味噌の影響に関する解析

ヒト ZIP4 に対する評価系を用いて、これまで実施した解析を発展させた。ヒト ZIP4 を安定発現させた MDCK 細胞を Transwell Plate 上で培養して腸管上皮を模した極性細胞となるよう分化させた後、各種味噌抽出物やソヤサポニンを含む

抽出物を添加して、ヒト ZIP4 の発現に及ぼす影響を評価した。24 時間培養後に細胞表面に発現するヒト ZIP4 の量を表面ビオチンアッセイにて評価したところ、いくつかの味噌抽出物、並びにソヤサポニンを含む抽出物において、ヒト ZIP4 の発現を増加させる活性があることを見出した(図3)。現在、中圧カラムクロマトグラフィーや分取 TLC などを用いて、最も強い活性が認められた味噌抽出物からの活性成分の精製を進めているところである。

考 察

昨年度までの解析で味噌抽出物には、ZIP4 の発現促進活性が見出されており、味噌には ZIP4 の発現を促進する効果があると推測されていた。従って、味噌には亜鉛吸収を促進する効果が期待されるが、昨年までの解析はマウス ZIP4 に対しての評価であり、ヒト ZIP4 に対しての効果は不明であった。本年度の解析では、これまで有用性が確認されていた大豆抽出物や新たに調整した味噌抽出物にヒト ZIP4 の発現を増加させる活性が確認でき、味噌の亜鉛吸収に及ぼす効果が大きいに期待できる結果となっている。今後は、本解析をさらに進め、多方面の解析で検討を加えていくことを計画している。

味噌の活性が多様な成分からなっているため、活性成分の精製が難しく、味噌抽出物からの精製

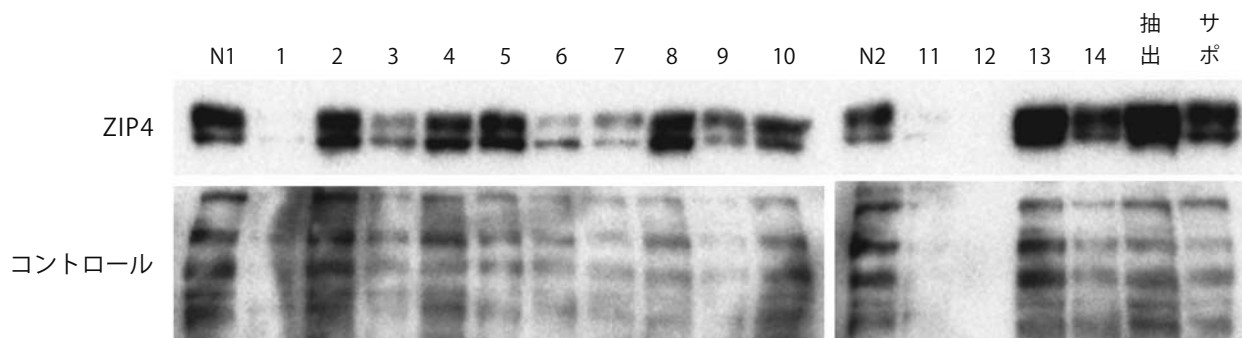


図3. ヒト ZIP4 の発現に及ぼす味噌抽出物の影響

いくつかの味噌抽出物において、MDCK 細胞の膜表面に発現させたヒト ZIP4 量を増加させる活性があることがわかる。N は処理無しを示す。ソヤサポニンと精製前的大豆抽出物にもヒト ZIP4 の発現を増加させる活性が確認できる。

作業は難航している。本研究では、味噌の主成分である大豆抽出物から ZIP4 発現促進因子としてソヤサポニンと同定することに成功した。本報告書で記載したように、ソヤサポニンを含む抽出物は、ZIP4 の発現を特異的に増加させる効果が期待でき、今後、その効果の検証をさらに深めたいと考えている。また、味噌の製造過程には、多種多様な発酵・熟成過程が含まれているため、この極めて有効な因子が生み出されている可能性も考えられ、今後は、活性因子を複数同定して、味噌の効能の科学的根拠を蓄積させていくことも重要となる。

亜鉛欠乏に陥ると、味覚障害や免疫機能低下、創傷治癒力の低下によって“Quality of Life”は大きく低下する¹³⁾。適切な食事からその予防・治療に努めることは極めて大切であるため、誰もが口に味噌から亜鉛吸収促進因子を同定することの意義は大きい。本研究から得られた成果を日々の食事にフィードバックさせることで、人々の健康増進に少しでも役立てたいと考えている。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご援助賜りました(一社)中央味噌研究所に厚く御礼申し上げます。また、活性成分の単離・構造決定に関する解析でご協力いただきました福井県立大学の高橋正和先生、MDCK FLp-InTMT-Rex 細胞を分与頂きましたイリノイ大学の Jack Kaplan 先生に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Fukada T and Kambe T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* 3: 662-674, 2011.
- 2) Haase H, Mocchegiani E and Rink L. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology* 7: 421-428, 2006.
- 3) Hambidge M. Human zinc deficiency. *J*

Nutr 130: 1344S-1349S, 2000.

- 4) 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
- 5) 厚生労働省総務課生活習慣病対策室, 平成 22 年国民健康・栄養調査の概要 (2012)
- 6) 橋本彩子, 神戸大朋. 「亜鉛吸収を向上させる食品因子の探索—亜鉛栄養研究の現状と今後の展望を含めて—」 *日本醸造協会誌* 107:836-841, 2012.
- 7) Andrews GK. Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem Soc Trans* 36: 1242-1246., 2008.
- 8) Kambe T, Hashimoto A and Fujimoto S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases” *Cell. Mol. Life. Sci.*, in press
- 9) 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.
- 10) Kürty S, Dréno B, Bézieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R and Moisan JP. Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet* 31: 239-240, 2002.
- 11) Gallaher DD, Johnson PE, Hunt JR, Lykken GI, and Marchello MJ. Bioavailability in humans of zinc from beef: Intrinsic vs extrinsic labels. *Am J Clin Nutr* 48, 350-354. 1988
- 12) 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.
- 13) Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am J Clin Nutr* 53, 403-412. 1991

慢性拘束ストレスによる脳機能低下を改善する 味噌中の生理活性ペプチドの探索

瀬尾 誠, 荒木 智之, 村越 隆之

Investigation of functional peptides in miso: improvement effects of chronic
restraint stress-induced brain dysfunction

Makoto SEO, Tomoyuki ARAKI, Takayuki MURAKOSHI

*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Saitama Medical University,
38 Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan*

【緒言】

現代社会は、ライフイベントや職場ストレスなど状況因子が関与する精神的ストレス負荷に曝される機会が多く、過度なストレス負荷による鬱病や統合失調症などの精神疾患発症は、今後もさらに増加していくものと考えられる。

通常、物理的・身体的ストレスや心理的ストレスを受けると、視床下部—脳下垂体—副腎軸(hypothalamo-pituitary-adrenal axis: HPA 軸)が活性化されて副腎皮質ホルモンが放出されるのであるが、慢性的にストレスを受け続けると副腎皮質ホルモンの過剰分泌により、海馬の神経細胞の脱落や変性が認められることも知られている。よって、慢性的ストレス負荷や副腎皮質ホルモンの過剰分泌は、海馬の形態的・機能的変化をもたらし、学習・記憶に対して悪影響をおよぼすと考えられている¹⁾。

前年度の本研究助成による研究成果より、慢性拘束ストレス負荷したマウスに対し、日本各地の13種類の原材料の異なる味噌を摂取させたところ、

複数の味噌において血清中コルチコステロン濃度上昇の抑制効果や海馬の神経細胞およびグリア細胞数減少の抑制効果、さらに神経栄養因子の産生量減少の回復効果があることを明らかにした²⁾。

本研究課題では、マウスに慢性拘束ストレス負荷した際の脳機能の低下に対し、特に有用性が高いと考えられた味噌の中でも仙台味噌に焦点を絞り、慢性拘束ストレス負荷に対する仙台味噌摂取による改善効果およびその生理活性ペプチドの探索を行った。

【方法】

1) 味噌サンプルの調製

一般社団法人中央味噌研究所より提供して頂いた11種類の仙台味噌を18.75 g 秤量して、30 mLの水道水で溶いた後、90℃で5分間加熱処理した。室温で3,000 rpm, 5分間遠心分離したのち、濾過して得た上清を各仙台味噌サンプル溶液とした。一回の飲水交換に使用する分量で小分けにし

て、-80℃ で保存した。

さらに慢性拘束ストレス負荷による血清中コルチコステロン濃度上昇に対する抑制効果を期待できる仙台味噌に関しては、Amicon Ultra（メルクミリポア社）を用いた限外濾過法により 3kDa 以上のペプチド分画と 3kDa 以下のペプチド分画を調製し、前述と同様に小分けにして、-80℃ で保存した。

2) マウスへの慢性拘束ストレス負荷実験

動物実験は、埼玉医科大学動物実験委員会の審査、承認を得た実験計画を遵守して遂行した。

前年度と同様にヒトが一日一杯の味噌汁を摂取した際に含まれる味噌量（15g）と同等になるように、マウスが一日あたりに摂取する平均飲水量から換算し、各仙台味噌サンプル溶液を飲水中に添加して 4 週間前投与を行った。

続いて、小動物用採血ホルダー（夏目製作所）を用いて、マウスに一日当たり 3 時間の身体的拘束を 3 週間連日行った。なお、拘束ストレス負荷期間中も仙台味噌サンプル溶液の摂取を継続して行った。なお、試験期間中は飲水交換を 1 日おきに行行って飲水量を記録し、1 週間ごとに体重を計測した。

上記と別に 11 種類の仙台味噌のスクリーニングの結果、有用性が高かった 3 種類の仙台味噌に関しては、拘束ストレス負荷終了日の 3 日前から連日 BrdU（Sigma 社）を腹腔内投与（100mg/kg b.w./day）した。

試験期間最終日前日の拘束ストレス負荷前に、各マウスの眼窩静脈叢より採血を行った。遠心分離して得た血清は、血清中コルチコステロン濃度の測定まで、-80℃ で保存した。

翌日、エーテル麻酔したマウスを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、脳、副腎および胸腺を採取した。脳は OTC コンパウンドに包埋後、凍結組織切片を作成して後述の免疫組織染色を行った。副腎および胸腺は、湿臓器重量を測定した。

3) 血清中コルチコステロン濃度の測定およびグルココルチコイド受容体（GR）発現量の検討

ストレスマーカーである血清中コルチコステロン濃度は、Corticosterone EIA キット（Cayman 社）を用いて測定した。

2) で作成した脳の凍結組織切片を用いて、GR を Vectastain ABC キット（Vector 社）を用いて免疫組織染色により検出した。

4) TUNEL 法によるアポトーシス陽性細胞の検出

2) で作成した脳の凍結組織切片を用いて、慢性拘束ストレスによりアポトーシス誘導された細胞を *in situ* アポトーシス検出キット（TakaraBio 社）を用いて TUNEL 法により検出した。

5) 海馬歯状回（DG）における神経系前駆細胞の検出

2) で作成した脳の凍結組織切片を用いて、神経系前駆細胞増加の指標として、BrdU 陽性細胞を Vectastain ABC キット（Vector 社）用いて免疫組織染色により検出した。

【結果】

1) 拘束ストレス負荷に対して改善効果を有する仙台味噌のスクリーニング

拘束ストレス負荷に対して顕著な改善効果を有する仙台味噌のスクリーニングでは、改善効果の判断の指標として、拘束ストレス負荷による体重減少の抑制と血清中コルチコステロン濃度上昇の抑制から評価した。

水道水を摂取した拘束ストレス負荷群では、前年度と同様に顕著な体重減少が観察された。それに対し、11 種類の各仙台味噌を摂取した拘束ストレス負荷群では、体重の減少率を抑制した仙台味噌が複数あった（図 1 A）。

また拘束ストレス負荷により、血清中コルチコステロン濃度は顕著に増加したのに対し、程度は異なるがすべての仙台味噌摂取群で、コルチコステロン濃度上昇が抑制された（図 1 B）。

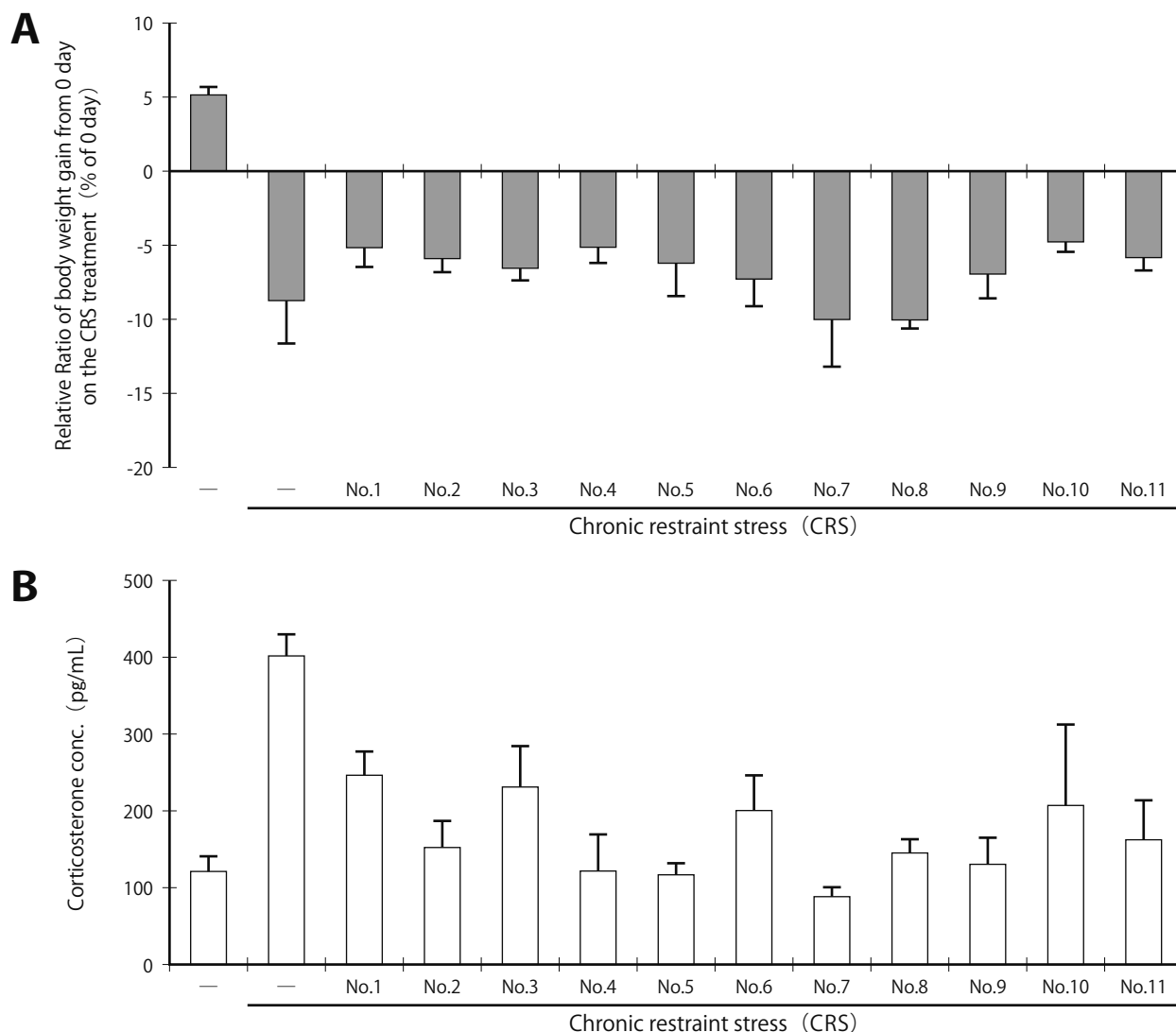


図1. 慢性拘束ストレス負荷および仙台味噌摂取による体重増加率の変化および血清中コルチコステロン濃度の変化

上記の結果より、血清中コルチコステロン濃度上昇をほぼ正常レベルで維持することができた No.4, No.5, No.7 の3種類の仙台味噌について、3kDa 以上および3kDa 以下のペプチド分画を作製し、有用な生理活性ペプチドを含む分画の探索を行うこととした。

2) 体重および臓器重量変化に対する仙台味噌各分画の効果

拘束ストレス負荷により、体重減少および胸腺萎縮と副腎肥大が認められたのに対し、仙台味噌 No.4 および No.7 摂取群では体重減少を軽減する傾向が認められた (図2 A)。さらに 仙台味噌

No.4 の3kDa 以上のペプチド分画摂取群では胸腺萎縮の軽減、仙台味噌 No.7 の3kDa 以上のペプチド分画摂取群では胸腺萎縮の軽減および副腎肥大の軽減が認められた (図2 B, C)。

3) 血清中コルチコステロン濃度および GR 発現量変化に対する仙台味噌各分画の効果

拘束ストレス負荷により、血清中コルチコステロン濃度は顕著に増加したのに対し、3種類の仙台味噌の3kDa 以上のペプチド分画摂取群では、コルチコステロン濃度の増加が有意に抑制された (図3)。

また拘束ストレス負荷により、海馬全体および

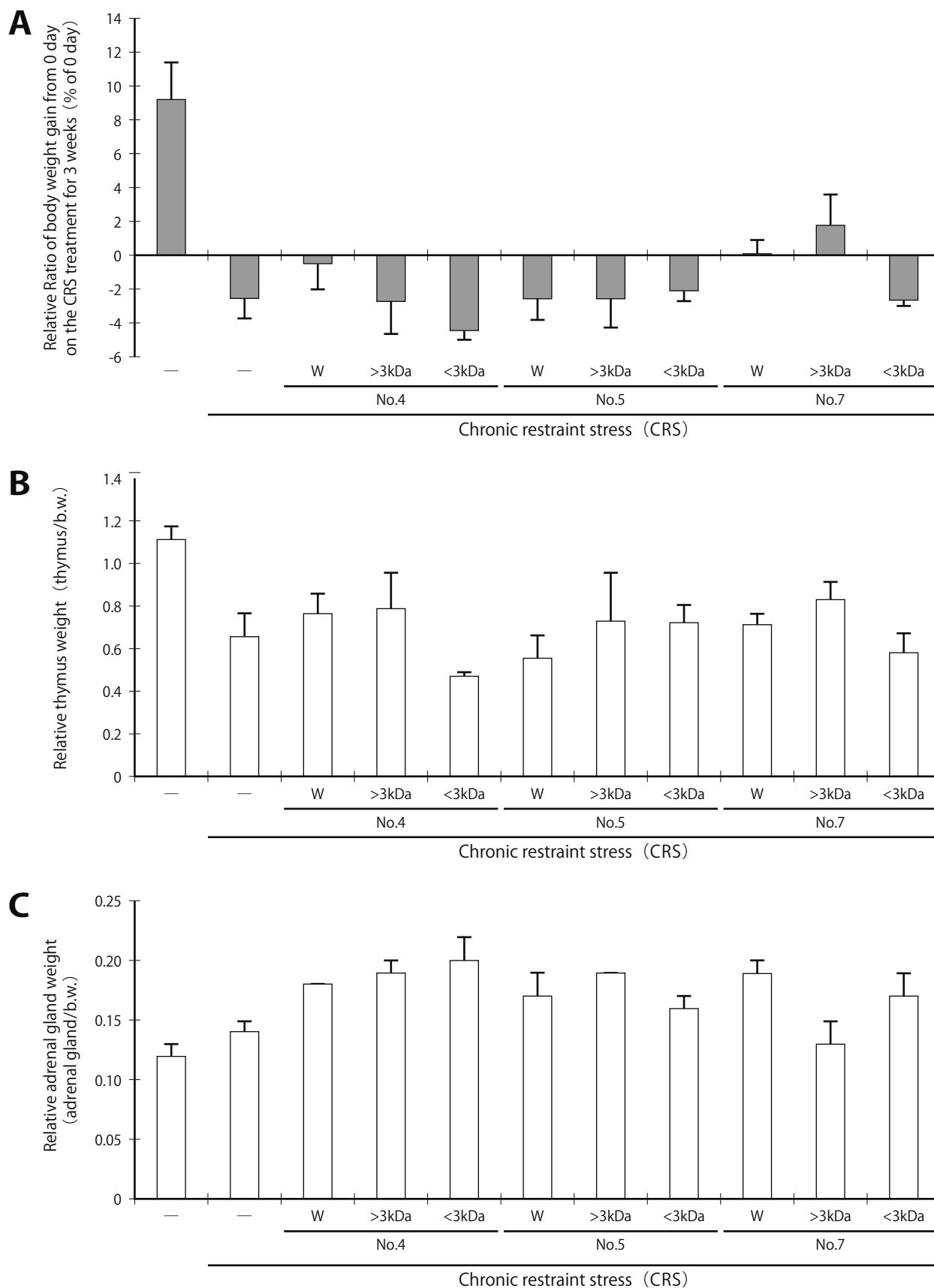


図2. 慢性拘束ストレス負荷および仙台味噌摂取による体重増加率の変化および臓器重量の変化

W : 分画していない味噌サンプル溶液

>3kDa: 3kDa 以上のペプチドを含む味噌サンプル溶液の分画

<3kDa: 3kDa 以下のペプチドを含む味噌サンプル溶液の分画

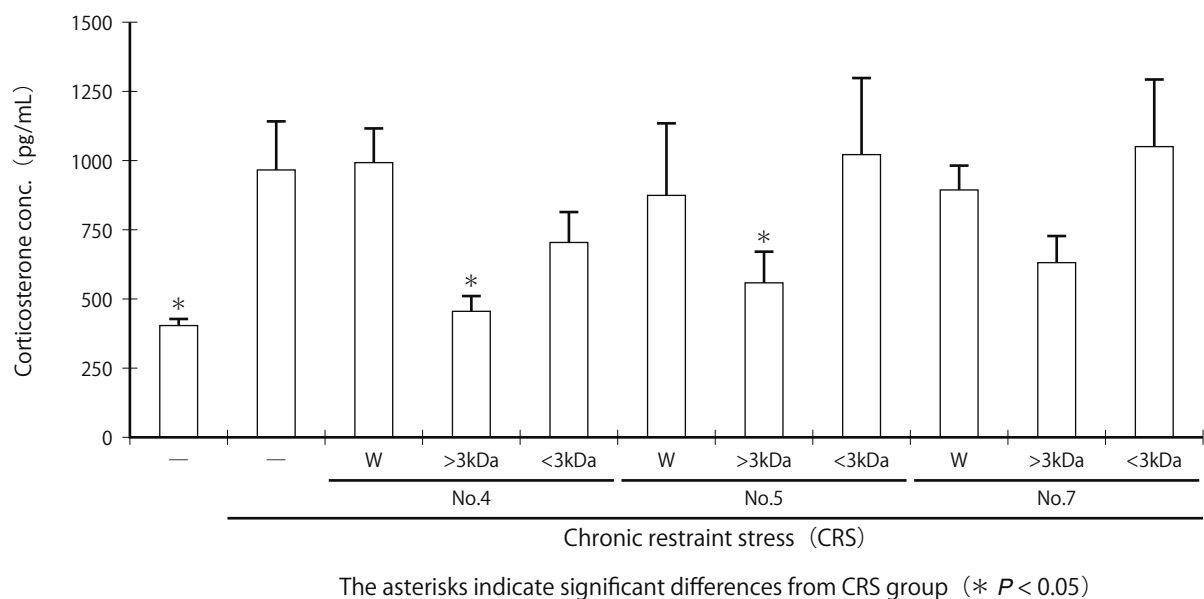


図3. 慢性拘束ストレス負荷および仙台味噌摂取による血清中コルチコステロン濃度の変化

W : 分画していない味噌サンプル溶液
 >3kDa : 3kDa 以上のペプチドを含む味噌サンプル溶液の分画
 <3kDa : 3kDa 以下のペプチドを含む味噌サンプル溶液の分画

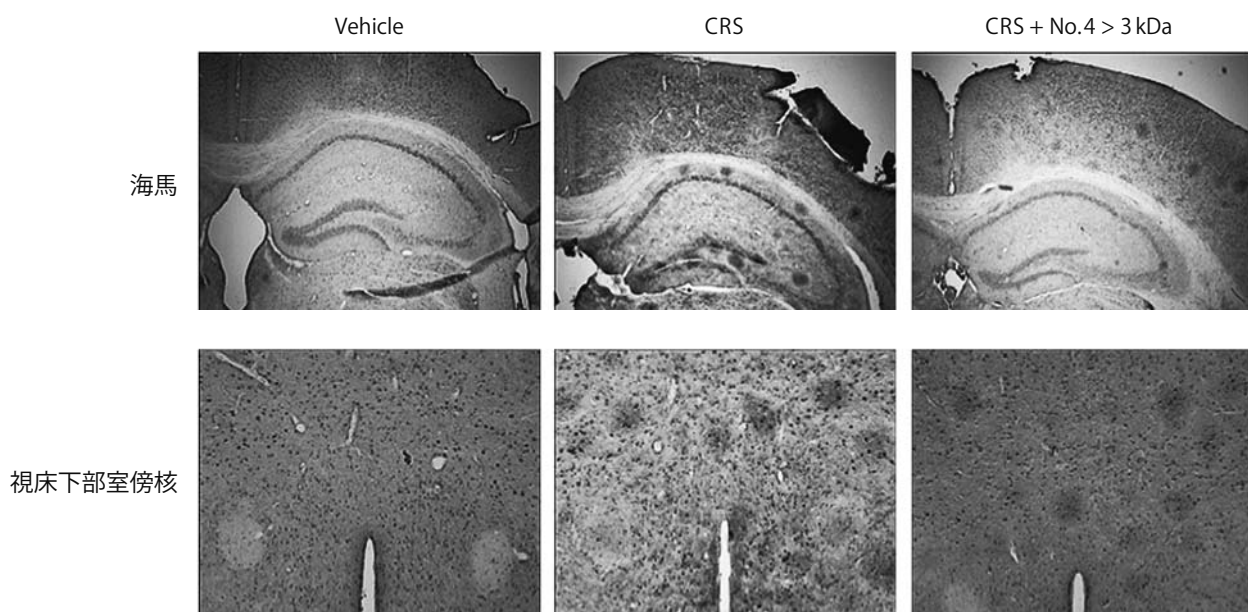


図4. 慢性拘束ストレス負荷および仙台味噌 No.4 の 3 kDa 以上のペプチド分画摂取による GR の局在および発現変化

GR は DAB 染色, 核はメチルグリーンにより染色して検出した。
 GR は正常時に CA1 および DG に好発現しているのだが, CRS により海馬全体で DAB の色調が強くなった。

視床下部室傍核付近での GR 発現量が顕著に増加したのに対し, 仙台味噌 No.4 の 3kDa 以上のペプチド分画摂取群では, 両方の領域で正常レベル程度まで GR 発現量が低下した (図4)。

4) 海馬における神経系細胞のアポトーシス誘導に対する仙台味噌各分画の効果

拘束ストレス負荷により特に海馬 DG においてアポトーシス陽性細胞数が顕著に増加したのであ

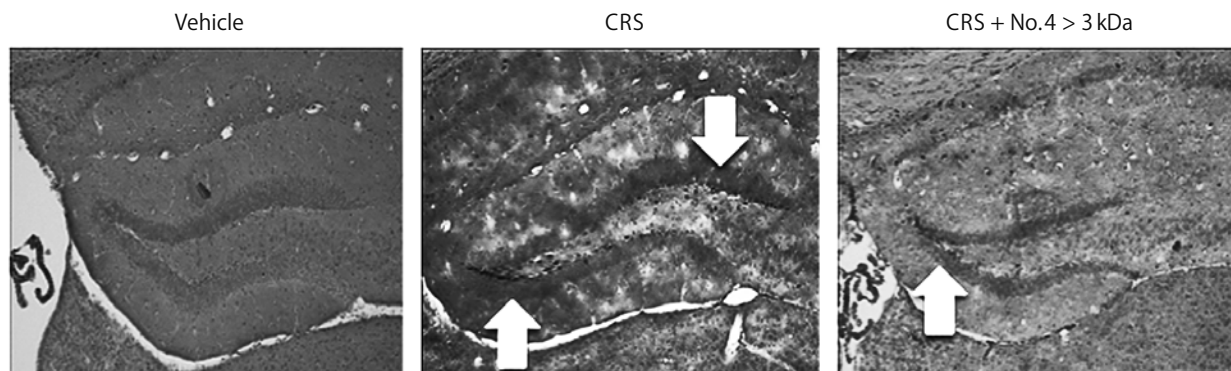


図5．慢性拘束ストレス負荷および仙台味噌 No.4 の 3 kDa 以上のペプチド分画摂取によるアポトーシス陽性細胞の変化

アポトーシス陽性細胞は DAB + Ni 染色，核はメチルグリーンにより染色して検出した。矢印の濃く染まった細胞がアポトーシス陽性細胞である。

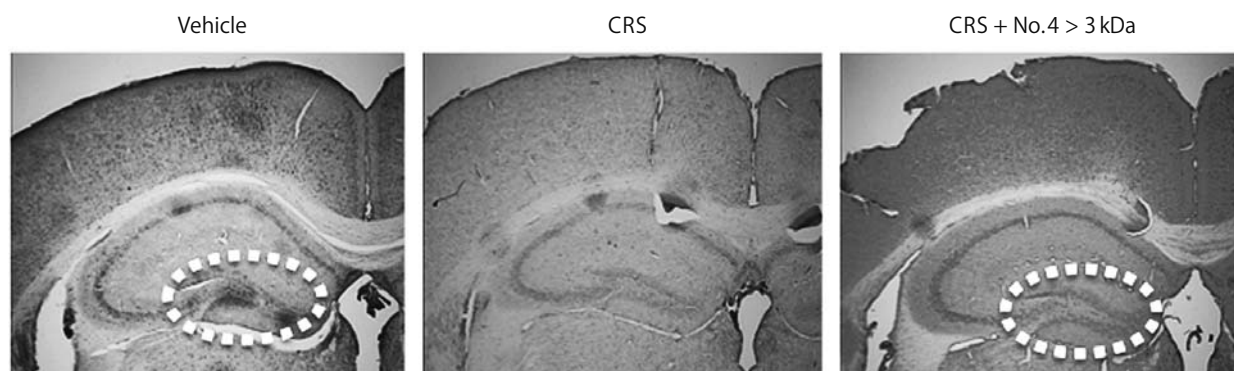


図6．慢性拘束ストレス負荷および仙台味噌 No.4 の 3 kDa 以上のペプチド分画摂取による神経系前駆細胞（BrdU 陽性細胞）の変化

神経系前駆細胞（BrdU 陽性細胞）は DAB + Ni 染色，核はメチルグリーンにより染色して検出した。点線で囲った海馬 DG 付近に濃く染まった神経系前駆細胞が多く観察できる。

るが，仙台味噌 No.4 の 3 kDa 以上のペプチド分画摂取群では，DG のアポトーシス陽性細胞数が顕著に減少した（図5）。

5）DG の神経系前駆細胞の数的変化に対する仙台味噌各分画の効果

海馬 DG で BrdU を取り込み増殖・分化した神経系前駆細胞を検出することで，仙台味噌が神経系前駆細胞の数的変化を調節するか否かを解析した。拘束ストレス負荷により DG の BrdU 陽性細胞数は減少したのであるが，仙台味噌 No.4 の 3 kDa 以上のペプチド分画摂取群では，BrdU 陽性細胞が正常レベル近くまで増加した（図6）。

【考察】

本研究において，一日一杯の仙台味噌を摂取することで，強いストレス環境下に曝された際のストレスが軽減され，海馬の神経細胞およびグリア細胞のアポトーシス抑制効果を期待できるだけでなく，神経幹細胞の増殖・分化過程を保護する効果を示唆する成果を得ることができた。

通常，生体がストレスを感知すると視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）が分泌され，下垂体にはたらきかけて副腎皮質からコルチゾール（コルチコステロンと同類のホルモン）が分泌される。また CRH が自律神経系に

はたらきかけて副腎髄質からアドレナリンやノルアドレナリンが分泌される。これらのホルモンがストレスによる悪影響を緩和するように生体機能を調節している。一過性に増加した血中コルチゾールが脳内に入り GR と結合すると、ストレス応答の休止シグナルが視床下部に伝達されて CRH 分泌を停止することで生体のホメオスタシス（恒常性）が維持されることが知られている³⁾。本研究で用いた慢性拘束ストレス負荷モデルは、血清中コルチコステロン濃度が恒常的に高値に維持され、常に脳内の GR 発現量も増加したままであったことから、明らかに HPA 軸の制御機構が破綻した典型的なストレス実験モデルである。

本研究の結果、慢性拘束ストレス負荷による血清中コルチコステロン濃度上昇が 11 種類の仙台味噌摂取により、程度は異なるがすべて抑制効果を示すことを見出した。特に抑制効果の高かった No.4, No.5, No.7 の仙台味噌は比較的熟成期間が長い味噌であったことから、原材料である大豆タンパク質の分解がすすんだペプチドがストレスの緩和に寄与しているのではないかと考えられた。

そこで No.4, No.5, No.7 の 3 種類の仙台味噌に関しては、限外濾過法により 3kDa 以上のペプチド分画と 3kDa 以下のペプチド分画を作製して、慢性拘束ストレスに対して有用なペプチドを含む分画の検討を行った。その結果、拘束ストレスによる血清中コルチコステロン濃度上昇を抑制した分画は、3 種類の仙台味噌でいずれも 3kDa 以上のペプチド分画であった。

本研究で用いた拘束ストレス負荷モデルでは、血中コルチコステロン濃度が高値で維持されるため、海馬において神経細胞やグリア細胞にアポトーシスが誘導されることが想定された。また高濃度のコルチコステロンは、神経幹細胞の生存・増殖および分化のすべての過程に対して抑制的にはたらくことも知られている⁴⁾。

そこで、本研究では海馬 DG に着目して拘束ストレス負荷によるアポトーシス誘導と神経系前駆細胞の増殖抑制に対する各仙台味噌およびそれらの各ペプチド分画摂取による改善効果を検討した。その結果、血清中コルチコステロン濃度上昇

を正常レベル同等まで抑制した仙台味噌 No.4 の 3kDa 以上のペプチド分画摂取群において、アポトーシス抑制効果と神経系前駆細胞の増加が認められた。

これまでに大豆タンパク質由来の生理活性ペプチドに関しては、高血圧の改善・予防に有用であるとして注目されている味噌に含まれるフィチン酸やジペプチド (Ser-Tyr)、醤油に含まれるニコチアナミンが同定されており、様々な報告がなされている^{5,6)}。また、大豆タンパク質由来のペプチドが脳血管関門を通過するためにはアミノ酸もしくはジペプチド程度の小分子であると考えられるため、各仙台味噌の 3kDa 以下の分画摂取群において最も血清中コルチコステロン濃度上昇が抑制されると想定していたのであるが、予想外の結果であった。

すなわち、仙台味噌中の生理活性ペプチドは比較的大きなペプチドとして摂取された後、体内での消化・吸収過程で小分子（アミノ酸またはジペプチド）となり血液を介して脳内に移行して、抗ストレス効果および神経細胞およびグリア細胞の保護的效果を発揮するものと考えられた。

本研究では、慢性拘束ストレス負荷による脳機能低下に対し、仙台味噌の摂取は優れた改善効果を有することを明らかにした。またその生理活性成分は、比較的大きなペプチド分画に存在する可能性が強く示唆された。

今後、仙台味噌のペプチド分画をより細かく作製し、生理活性ペプチドを含む分画を絞り込んでいくのと並行して、有用な仙台味噌のペプチド分画には特定のアミノ酸が豊富に含まれている可能性があるためアミノ酸分析も取り入れて精査していく予定である。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、味噌サンプルのご提供ならびに本研究のご支援・ご協力頂きました一般社団法人中央味噌研究所 赤羽総一郎理事長と、

また宮城県味噌醤油工業協同組合の佐々木淳一郎理事長を始め各関係者の方々に深謝申し上げます。

【引用文献】

- 1) Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.*, 114, 1840-1851, 2010.
- 2) 瀬尾誠, 村越隆之 慢性拘束ストレス負荷による海馬機能低下に対する味噌摂取による改善効果, 中央味噌研究所研究報告, 35, 119-128, 2014.
- 3) Xiong F, Zhang L. Role of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Front Neuroendocrinol.*, 34, 27-46, 2013.
- 4) Jadavji MN, Deng L, Leclerc D, Malysheva O, Bedell JB, Caudill AM, Rozen R. Severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in mice results in behavioral anomalies with morphological and biochemical changes in hippocampus. *Mol. Genet. Metab.*, 106, 149-159, 2012.
- 5) Teranaka A, Ezawa M, Matsuyama J, Ebine H, Kiyosawa I. 米味噌, 麦味噌, および豆味噌抽出液のアンギオテンシン I 変換酵素抑制効果 *Nippon Nougakagaku Kaishi*, 69, 1163-1169, 1995.
- 6) Kinoshita E, Yamakoshi J, Kikuchi M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 110-1110, 1993.

味噌成分のクロマチン修飾におよぼす 生理活性プロファイルの解析

新井大祐^{1,2}, 杉江啓太¹, 町田光史¹, 大塚悟史¹, 林 陽子³,
木村 宏³, 中尾洋一^{1,2}

Analysis of chromatin modification profiles caused
by constituents of “miso”

Daisuke ARAI^{1,2}, Keita SUGIE¹, Koshi MACHIDA¹, Satoshi OTSUKA¹,
Yoko HAYASHI³, Hiroshi KIMURA³, Yoichi NAKAO^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, School of Advanced Science and Engineering,
Waseda University

3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

²Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

³Department of Biological Sciences, Graduate School of Bioscience and Biotechnology,
Tokyo Institute of Technology

4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan

1. 研究目的

真核生物の細胞核中で、ゲノム DNA はヒストン 8 量体を取り巻いたヌクレオソーム構造を単位とするクロマチンとして存在する¹⁾。クロマチン内の DNA やヒストン分子がメチル化、アセチル化、リン酸化などの化学的修飾を受けることによって遺伝子発現や染色体分配などのゲノム機能が制御されていることがわかりつつあり、これをエピジェネティクスと呼ぶ^{2,3)}。クロマチンの修飾を介したエピジェネティクス制御は細胞の分化や脱分化において決定的な役割を果たしている⁴⁾。また一度起きたエピジェネティクス変化は細胞内に長期にわたって保存され、がん代表され

る種々の慢性疾患に深く関わっている⁵⁾。そのため新たな医薬品開発の標的として世界的に注目されている。

これまでにヒストンや DNA の修飾・脱修飾酵素を調節する天然化合物がいくつも同定されてきた⁶⁻⁸⁾。一方、味噌は *Aspergillus oryzae* などの麹菌による発酵食品であり、微生物が作り出すビタミン類やその他の生理活性物質を豊富に含むことが知られているが、味噌の健康増進作用とそれら生理活性物質の関係、特に微量成分の具体的作用についてはほとんど理解されていない。

本研究は味噌に含まれるクロマチン修飾の制御物質を探索し、味噌の新たな有効成分やその効能を解明することを目的とした。クロマチン修飾を

厳密にコントロールできる成分を味噌中に見出すことができれば、これまでではっきりとした証拠が示されてこなかった味噌の長期摂取による効用についても科学的裏付けを与えられる可能性が高いと考えた。

2. 実験手法

【スクリーニング】

中央味噌研究所より供与していただいた味噌 15 種類を 100 g ずつ、H₂O (300 mL) および EtOH (300 mL) で二回抽出し、濃縮したエキス成分を二層分配によって H₂O 層と CHCl₃ 層に分

表 1. 本研究に用いた味噌とその原料

味噌 (番号)	原 料
miso 1	米
miso 2	米
miso 3	豆
miso 4	米
miso 5	麦
miso 6	米
miso 7	麦
miso 8	米
miso 9	米
miso 10	米
miso 11	米
miso 12	米
miso 13	米・麦
miso 14	米
miso 15	米

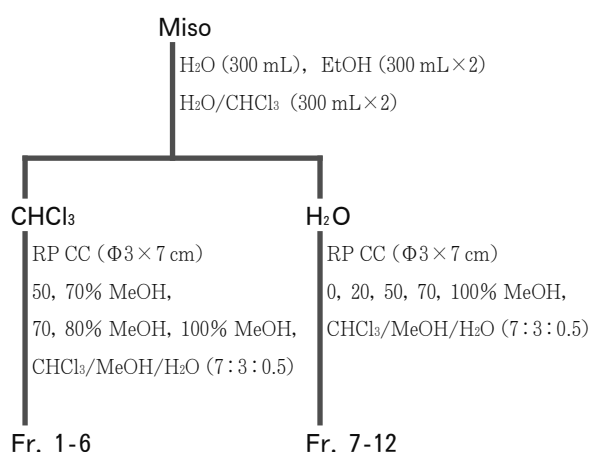


図 1. スクリーニング試料の分画スキーム

けた。各層を濃縮後、さらに逆相クロマトグラフィー (RP CC) によって 6 画分に分け、味噌 1 種類あたり 12 画分を得た (図 1)。計 15 種類の味噌サンプルから合計 180 画分を調製し、それぞれを 3 mg/mL の DMSO 溶液とした。

【ヒストン修飾免疫染色】

サンプル溶液を 96 well plate の各ウェルに播いたヒト子宮頸がん細胞 HeLa ならびにヒト網膜色素上皮不死化細胞 hTERT-RPE1 の培養液中に添加して 20 時間培養した。培地除去後、固定液を添加して 10 分間静置した。PBS で 2 回洗浄後、1 % Triton X in PBS を添加し、20 分間攪拌した。PBS で 2 回洗浄後、Blocking one-p を添加して 20 分間ブロッキングを行った。PBS で 2 回洗浄後、蛍光標識したヒストン修飾特異的モノクローナル抗体⁹⁾ を添加した。抗体反応 (2 時間) 後、PBS で 3 回洗浄して顕微鏡で観察した。

【活性物質の単離・同定】

スクリーニングにより活性が認められた画分 2-2 について、逆相 HPLC により精製を進めてふたつの主要成分を単品として得た。MS, NMR などのスペクトル解析を行い、化合物の構造を決定した。

【In vitro 神経分化への作用解析】

Neural Stem Sphere 法¹⁰⁾ によりマウス ES 細胞を in vitro で神経幹細胞まで分化させた。神経幹細胞からニューロンもしくはアストロサイトへ分化させる過程で味噌成分由来の化合物を添加し、3 日後に免疫染色を行って各細胞種への分化効率を決定した。

3. 結果

15 種類の味噌より得た 180 種類の画分を、最終濃度 30 µg/mL となるようにヒト子宮がん細胞 HeLa に添加し、ヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) のトリメチル化 (H3K9me3), および H3K27 のトリメチル化 (H3K27me3), H3K27

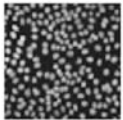
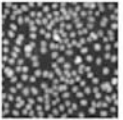
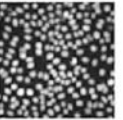
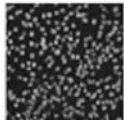
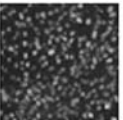
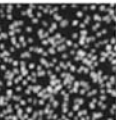
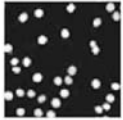
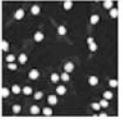
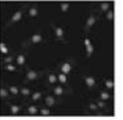
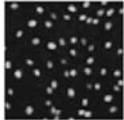
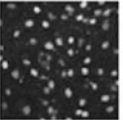
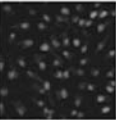
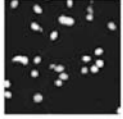
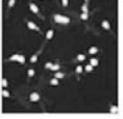
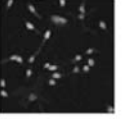
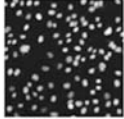
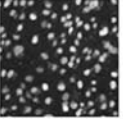
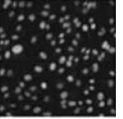
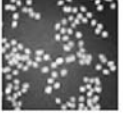
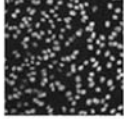
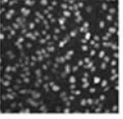
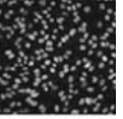
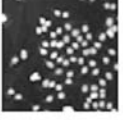
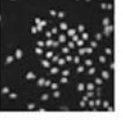
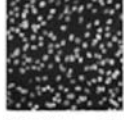
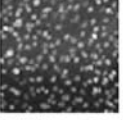
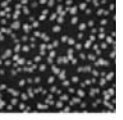
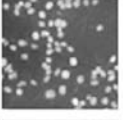
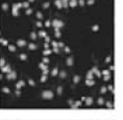
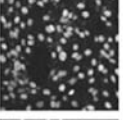
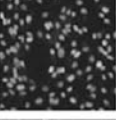
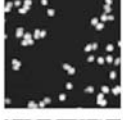
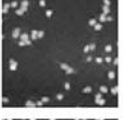
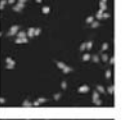
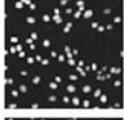
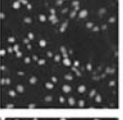
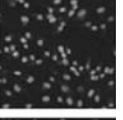
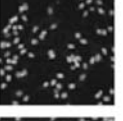
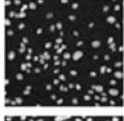
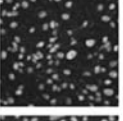
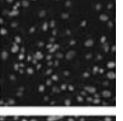
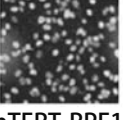
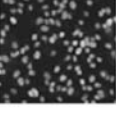
Fraction	Layer	RP CC	H3K9me3	H3K27me3	H3K27ac	H3K9me3	H3K27me3	H3K27ac
Control	—	—						
miso 2-2	CHCl ₃	70% MeOH						
miso 3-3	CHCl ₃	70% MeCN						
miso 3-10	H ₂ O	70% MeOH						
miso 6-4	CHCl ₃	80% MeCN						
miso 8-2	CHCl ₃	70% MeOH						
miso 8-10	H ₂ O	70% MeOH						
miso 15-1	CHCl ₃	50% MeOH						
miso 15-9	H ₂ O	50% MeOH						
			HeLa			hTERT-RPE1		

図 2. 味噌画分によるヒストン修飾変化

活性画分（画分番号、液層、RP CCでの溶出液）と、HeLa および hTERT-RPE1 細胞それぞれにおけるヒストン修飾に対する各画分の影響。顕著な変化を及ぼした画分についてのみ免疫染色の結果を示した。

のアセチル化 (H3K27ac) の状態を調べたところ、複数の画分において H3K9me3 と H3K27me3 が上昇し H3K27ac が減少するという活性が認められた (図 2)。味噌の種類によって、活性の有無、活性のタイプ、および活性が認められる画分が異なった。活性が認められた画分を非がん細胞であるヒト網膜色素上皮不死化細胞 hTERT-RPE1 に添加したところ、多くが HeLa 細胞と同じパターンのヒストン修飾変化を引き起こした (図 2)。画分 2-2 は HeLa および hTERT-RPE1 の両方の

細胞に対して特に顕著なヒストン修飾変化を引き起こしたが、HeLa 細胞では hTERT-RPE1 細胞と比較して細胞数が大きく減じた (図 2)。画分 2-2 が他のヒストン修飾への変化に与える変化を HeLa 細胞を用いて検討したところ、H4K16ac も上昇させることがわかった (図 3)。

画分 2-2 に含まれるヒストン修飾制御活性の本体を明らかにするため、逆相 HPLC による精製を進め、化合物 1 と 2 を得た。これらを HeLa 細胞に添加してヒストン修飾の変化を調べたと

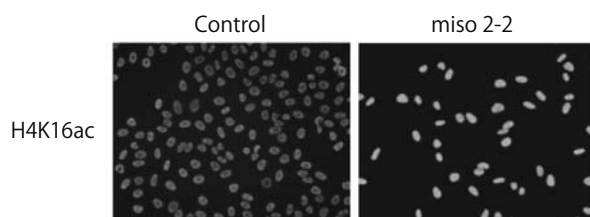


図3. 画分2-2の H4K16ac に対する効果

HeLa 細胞に画分2-2を30 μ g/mLで添加し、H4K16acを免疫染色により検出した。

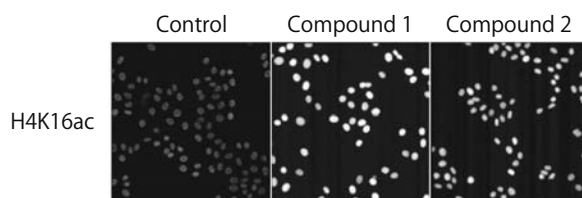


図4. 化合物1および2が H4K16ac に対する効果

HeLa 細胞に化合物1および2を40 μ g/mLで添加し、H4K16acを免疫染色により検出した。

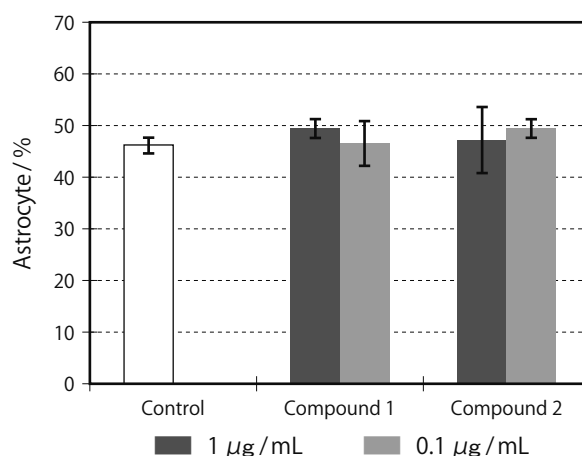
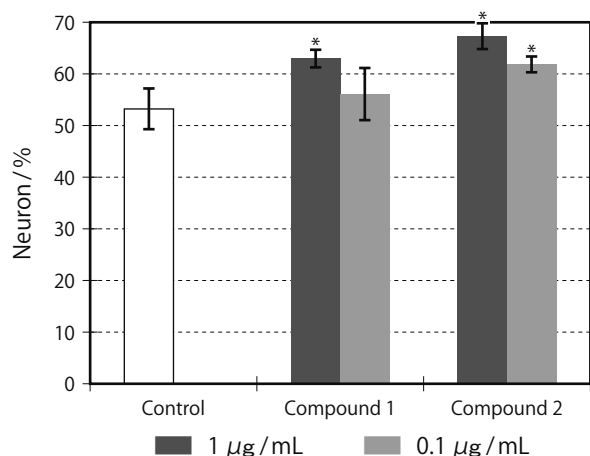


図5. 化合物1および2がニューロン・アストロサイト分化におよぼす影響

神経幹細胞をニューロンまたはアストロサイトへ分化誘導する際に、化合物1および2を終濃度1および0.1 μ g/mLとなるように添加し、3日後にニューロンおよびアストロサイトに対する特異的な抗体を用いて免疫染色を行い、Hoechst陽性細胞数に対する各抗原陽性細胞数の割合から分化効率を算出した（左：ニューロン分化効率，右：アストロサイト分化効率，* $p < 0.05$ ）。

ころ、化合物1を40 μ g/mLで添加したときにH4K16acの上昇が認められた（図4）。化合物1および2について他のヒストン修飾に対する顕著な変化は確認できなかった。

味噌成分が細胞分化に与える影響を調べるため、神経幹細胞をin vitroでニューロンまたはアストロサイトへ選択的に分化させる系に対して化合物1および2を、それぞれ終濃度1および0.1 μ g/mLとなるように添加した。どちらの化合物もニューロンへの分化を促進する一方、アストロサイトへの分化には影響を与えなかった（図5）。

4. 考察

産地や原料・製法の異なる15種類の味噌を化

学的手法により分画して、得られた画分についてヒストン修飾への影響を調べたところ、複数の画分に顕著な活性が認められた。活性の有無、活性のタイプは味噌の種類によって異なり、また異なる画分に活性が認められたことから、活性本体はひとつではなく、複数の活性成分が存在していると考えられ、原料・製法の違いにより変化する各種微量成分がヒストン修飾に影響をおよぼしていると予想される。特に画分2-2はがん細胞および非がん細胞に共通してヒストン修飾変化を引き起こした一方、がん細胞でのみ細胞数が減少したことから、がん選択的な増殖抑制作用を持つ可能性が考えられる。

画分2-2に含まれる主要な活性本体として化合物1と2を同定し、ヒストン修飾活性および神経分化への影響を調べた。画分2-2が変化させた複

数の修飾のうち、H4K16acについては**1**によっても画分2-2と同様に上昇したことから、**1**はヒストン修飾変化を引き起こす活性本体のひとつであると考えられる。だが、**1**の活性がそれほど高くないこと、またH4K16ac以外の修飾に顕著な変化が認められなかったことから、**1**および**2**以外の微量な活性成分が存在する可能性、また複数成分の組み合わせが相乗作用を発揮するといった可能性についても考慮する必要がある。化合物**1**および**2**はいずれも神経幹細胞をニューロンへ選択的に分化させる活性を示した。拘束ストレスにより減少、退縮したマウス海馬のニューロンやアストロサイトが、ある種の味噌を飲水投与させることにより回復することが瀬尾らによって示されているが、**1**および**2**はこの作用の一端を担っている可能性がある¹⁰⁾。

本研究では味噌に含まれる多様な成分がヒストン修飾制御活性を有することを明らかにした。今後は単一成分またはその組み合わせからなる活性本体を決定していくことで、有効性の評価指標となる成分が明らかになり、これまでメカニズムが未解明であった味噌の有効性に対する科学的裏付けも可能になると期待される。また本研究では高濃度・短期間での変化を評価したが、同様の効果を低濃度・長期間の処理で検討することによって、味噌成分がエピジェネティクスに与える長期的な影響と慢性疾患との関連性を評価するシステムとなりうる。これによって味噌汁の日常的摂取による健康増進効果をエピジェネティクスレベルで微細に検出が可能となり、味噌の日常的摂取の効用に対する新たな証拠を提示できると考えられる。

5. 謝辞

本研究は平成25年度一般社団法人中央味噌研究所研究助成を受けて実施されました。

参考文献

- 1) Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin

- structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 436-47. (2012)
- 2) Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. *J. Hum. Genet.* 58, 439-45. (2013)
- 3) Yagi S, Hirose M, Shiota K. DNA Methylation Profile: A Composer-, Conductor-, and Player- Orchestrated Mammalian Genome Consisting of Genes and Transposable Genetic Elements. *J. Reprod. Dev.* 58, 265-273. (2012)
- 4) Chen T, Dent SY. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat. Rev. Genet.* 135, 93-106. (2014)
- 5) Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 28, 1057-68. (2010)
- 6) Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265, 17174-17149. (1990)
- 7) Nakao Y, Yoshida S, Matsunaga S, Shindoh N, Terada Y, Nagai K, Yamashita JK, Ganesan A, van Soest RW, Fusetani N. Azumamides A-E: histone deacetylase inhibitory cyclic tetrapeptides from the marine sponge *Mycale izuensis*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45, 7553-7557. (2006)
- 8) Cherblanc FL, Davidson RWM, Di Fruscia P, Srimongkolpithak N, Fuchter MJ. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. *Nat. Prod. Rep.* 30, 605-24. (2013)
- 9) Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Goto Y, Takizawa N, Nozaki N. The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct. Funct.* 33, 61-73. (2008)
- 10) 瀬尾, 村越, 慢性拘束ストレス負荷による海馬機能低下に対する味噌摂取による改善効果. 中央味噌研究所研究報告第35号. (2014)

味噌メラノイジンの生成機構に関する化学的解析

早瀬 文孝

Chemical Elucidation of Formation Mechanisms of
Soy Paste Melanoidins

Fumitaka HAYASE

*Department of Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Meiji University
1-1-1 Higashimita, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa, 214-8571, Japan*

緒言

味噌の褐変は主としてアミノ酸と還元糖のメイラード反応により起こる。筆者らは食品の褐色化の過程で青色、赤色などさまざまな「色素」が生成し、共通してピロピロール構造(図1)を有することを明らかにしている。^{1,2)} これらの色素が中間体となり最終的には褐色色素メラノイジンを生成するが生成機構については依然として不明である。本研究では食品の褐色化で生成するメラノイジンの生成機構を明らかにし、味噌の褐変の制

御や機能性を付与する機構を化学的に明らかにすることを目的としている。メラノイジンの化学構造については不明な点が多く、中間体の重合機構が解明されれば、新たな知見が得られ、褐変を制御することも可能となるであろう。また、メラノイジンや色素は強い抗酸化性を有し、新たな抗酸化性物質の提示も可能となるであろう。

実験方法

1) Blue-M1 の褐変

Blue-M1 は文献に基づいて調製した。¹⁾ Blue-M1 (200 μ M) と NaHCO₃ (100 mM) を 60 % ethanol 溶液に全量 3ml になるように溶解した。pH は 6N-HCl を 15 μ l 添加し、pH8.1 に調製した。窒素置換後、26.5℃で0~7日間インキュベーションを行った。ethanol の減圧留去後、凍結乾燥した。乾燥後 500 μ l の U.P.W. で溶解し、0.45 μ m のフィルターにて濾過を行い、RP-HPLC (逆相系カラムで溶離液は 10mM Ammonium acetate buffer (pH 4.4) と 50% Acetonitrile の

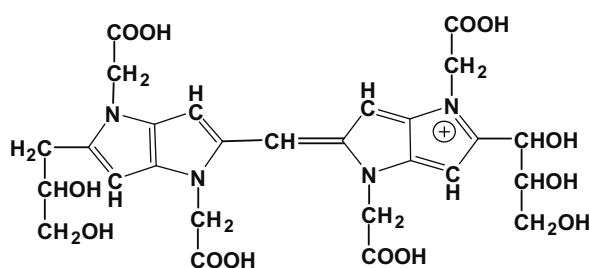


図1. D-キシロースとグリシンより生成した主要青色色素 Blue-M1 の構造

グラジエント溶離)で各生成物の単離・精製を行った。

2) PPA-1 (ピロロピロールアルデヒド - 1) の単離・精製

Blue-M1 を調製した同条件で PPA-1 画分(350 nm で検出) を U.P.W. にて平衡化された陰イオン交換樹脂 DEAE Sephadex A-25 (15 mm × 120 mm) にアブライした。50 ml の U.P.W. にて洗浄後, 0.07 M NaCl 溶液にて溶出し, 350 nm における吸光度の大きい画分を分画した。この画分は Sep-Pak Vac C18 カートリッジ (Waters) に供して, NaCl を除いた後, ロータリーエバポレーターにて濃縮後, 凍結乾燥した。凍結乾燥した PPA-1 画分は, 少量の U.P.W. に溶解させた。0.45 μ m のフィルターにて濾過を行い, RP-HPLC にて単離・精製した。

3) Melanoidin の調製

前報に従い以下のように調製した。³⁾ D-xylose (2.0 M), glycine (2.0 M) と NaHCO₃ (0.2 M) を水に溶解し, 混合液を 95℃ のオイルバスで, 7 時間還流した。還流後得られた褐変溶液を透析した。得られた非透析性画分を凍結乾燥し, これを D-xylose - glycine 系 Melanoidin (Xyl-Gly Mel) とした。

4) N-carboxyl methyl-2-pyrrole aldehyde (PA) の合成

15 ml の U.P.W. に溶解した pyrrole-2-carboxaldehyde 4.5 mg, NaOH 4.4 mg と, bromoacetic acid 7 g を加え, 18 時間室温で攪拌した。この溶液を分液ろうとに移し, chloroform 30 ml を加え, 5 分間攪拌後, 有機層を除去した。この洗浄操作を 5 回行い, 6N-HCl を加え pH3 に調整した。この溶液を ethyl acetate で抽出し, magnesium sulfate を加えて乾燥させた。この溶液をろ過後, ethanol を減圧留去した。得られたサンプルを Sep-Pak Vac C18 にて精製後, 凍結乾燥した。

5) 過酸化物価 (POV) の測定

50 ml の褐色バイアルに ethanol 10 ml, linoleic

acid 0.5 g, 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 12.5 ml, サンプル溶液 2 ml (コントロールは U.P.W.) を混合し, 24 時間 50℃ でインキュベーションした。反応後, ヨードメトリー法により linoleic acid の過酸化物価 (POV) を測定した。

実験結果及び考察

1) Blue-M1 の分解機構の解析

インキュベーションした Blue-M1 を濃縮後, U.P.W. で 500 μ l に希釈して, RP-HPLC で分析した。反応溶液の色調は, インキュベーション時間の増加に伴い, 青色が希薄になり, 緑色を経た後, 黒褐色となった。インキュベーション 3 日の分析結果を図 2 に示した。青色色素 (吸収波長 625 nm) はインキュベーション時間の増加に伴い減少し, インキュベーション 5 日目で消失した。PPA (ピロロピロールアルデヒド) の指標である 350 nm で検出した結果, Peak-1 および Peak-2 が生成した。さらに, 420 nm で検出した結果, 黄色を呈する Peak-3 が生成した。

Peak-2 は LC-ESI-Q-TOF-MS 分析で分子量 325 を示し, 機器分析の結果, 図 3 のように以前報告した⁴⁾ PPA-1 であると同定した。

Peak-1 を LC-ESI-Q-TOF-MS により測定した結果, 分子イオンピーク m/z 341 であり, 組成 C₁₄H₁₆N₂O₈ であると決定した。PPA-1 (m/z = 325) と比較すると, 16 Da 大きく, 酸素原子が一つ多い構造であることを示唆した。

Peak-1 を D₂O 中, 各種 NMR スペクトル (¹H-NMR, H-H COSY, ¹³C-NMR, HMQC, HOHAHA) を測定した。各種 NMR によって帰属されたピーク番号およびデータをまとめて表 1 に示した。Peak-1 のケミカルシフトは PPA-1 のメチレン側鎖を除くと良く一致したため, PPA-1 と同様なピロロピロール構造を持つことが示唆された。

Peak-1 の 3 (図 4) の炭素原子と水素原子のケミカルシフトが PPA-1 に比較して低磁場側に移動していることから, この炭素にはヒドロキシ基が付加していると推察した。以上の解析の

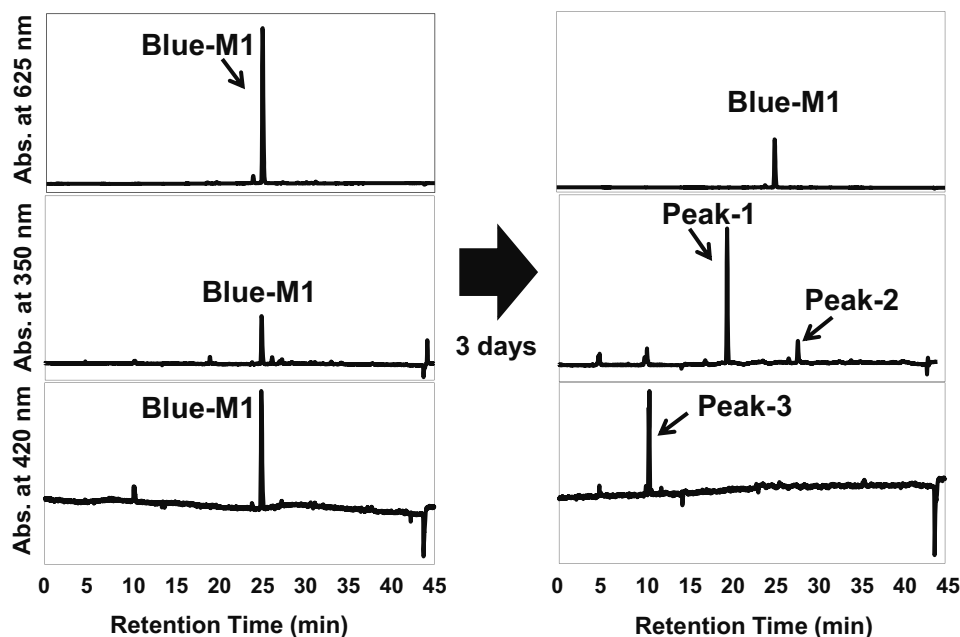


図2. Blue-M1 のインキュベーション溶液の逆相系 HPLC

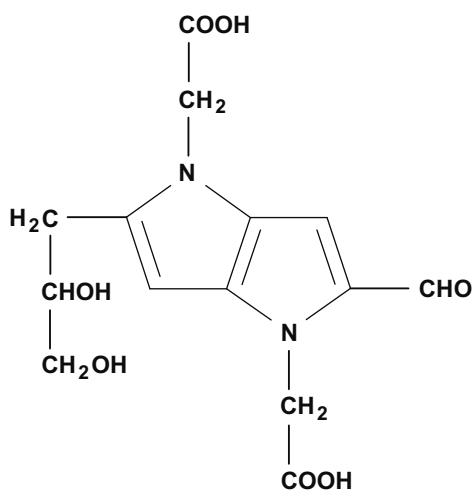


図3. Peak-2の化学構造 (PPA-1)

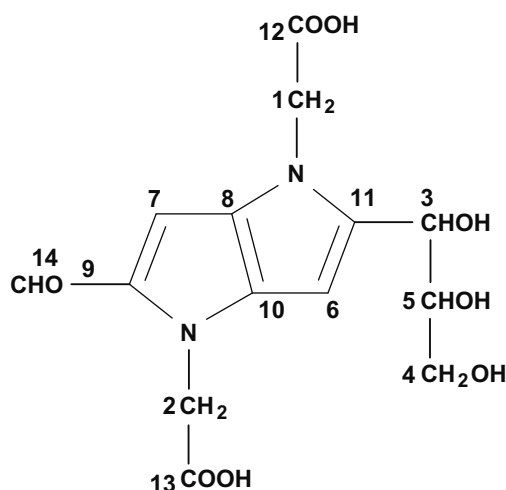


図4. Peak-1の化学構造 (PPA-2)

結果, Peak-1 は図4 のピロロピロールアルデヒドと同定した。このピロロピロールアルデヒドは, xylose 2 分子, glycine 2 分子からなる化合物で, ピロロピロール環にアルデヒド基, 2つの glycine 由来のカルボキシメチル基, xylose 由来のトリヒドロキシプロピル基の側鎖が結合している構造で, 新奇の PPA であると同定し, PPA-2 と命名した。

Peak-3 を LC-ESI-Q-TOF-MS により測定した組成演算の結果, 分子量は 635, 組成式

$C_{27}H_{31}N_4O_{14}$ であると決定した。Blue-M1 ($m/z = 619$)と比較すると, 16 Da 大きい分子量である。従って, 酸素原子が一つ多い構造であることを示唆した。

D_2O 中の Peak-3 の 1H -NMR の結果を表2に示した。Blue-M1 とスペクトルは類似していたが, Blue-M1 の 1H -NMR スペクトルの 5.9-7.2 ppm 間に観測される5本のピロロピロール環とメチン架橋由来のプロトンシグナルのうち2本が消失していた。従って, これらの炭素が脱プロト

表1. Peak-1 の NMR データ

No.	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	³ J _{HH} (HH COSY)	ⁿ J _{HH} (HOHAHA)
1	48.71	4.94 (s)		
2	50.34	4.83 (s)		
3	62.79	4.71 (m)	5	4
4	66.96	3.68 (m)	5	2, 3, 5
5	73.93	4.02 (m)	3, 4	4
6	88.57	6.14 (s)		
7	106.64	6.88 (s)		
8	131.12			
9	133.09			
10	139.29			
11	144.98			
12	176.44			
13	176.87			
14	180.89	9.21 (s)		

表2. Peak-3 の ¹H-NMR データ

No.	¹ H (ppm)
a	2.90 - 3.05 (m)
b, b'	3.50 - 3.62 (m)
c	4.01 (s)
c'	4.06 (s)
d	4.28 - 4.43 (m)
e	4.65 (s)
e'	4.728 (s)
e'', e'''	4.75 (s)
f	4.98, 5.01 (d)
g	6.24 (s)
h	6.56 (s)
i	7.89 (s)

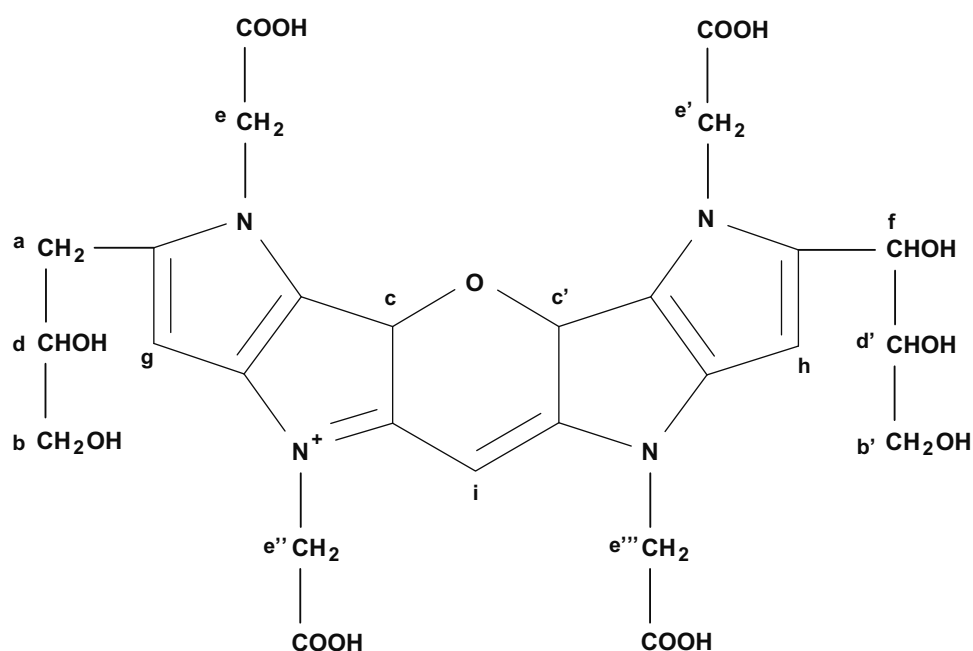


図5. Peak-3 (Yellow-M1) の推定構造

ンし、酸素原子と結合している可能性を示唆している。また、黄色を呈することから Blue-M1 の共役構造が切断されたと推察した。以上の結果、Peak-3 の推定構造を図5に示した。この構造は、Blue-M1 と同様にピロロピロール化合物であり、青色色素が褐変する過程で生じる重要な中間体だと考えられる。この化合物は黄色を呈することから、Yellow-M1 と命名した。

以上のように、Blue-M1 はインキュベーションにより褐色化しメラノイジンを生成する。本研

究で、Blue-M1 のインキュベーションで新たに PPA-1, PPA-2, Yellow-M1 が生成することが明らかとなった。このうち Yellow-M1 は不安定で、メラノイジン生成の重要な中間体と推察される。また、PPA-1 と PPA-2 は Blue-M1 の前駆体としても推定されており²⁾、青色色素の前駆体と分解物の双方に関与すると考えられる。味噌中にも同様な反応が起きていると考えられ、味噌メラノイジンの構造中にもピロロピロール構造の存在が強く示唆される。

2) PPA-1の抗酸化性

Xyl-Gly系の赤色色素については、生成量の問題から、単一化合物ではなく、混合サンプルで抗酸化評価を行った。ただし、RP-HPLCの結果より、最も多く含まれているピークはRed-M1である⁵⁾。

図6(a)は200 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ MのPPA-1を添加した時のPOVの抑制率を示した。PPA-1の過酸化抑制作用は濃度依存的に強くなることが認められた。

図6(b)は、PPA-1, Blue-M1, PA, Xyl-Gly系赤色画分, Xyl-Gly Mel, ascorbic acid, α -

tocopherol添加時のPOVの抑制率を示した。PPA-1は50%, Blue-M1は82%, PAは54%, Xyl-Gly系赤色色素画分は83%, Xyl-Gly Melは76%のPOV値の上昇を抑制した。

従って、PPA-1はPAとほぼ同等の抑制率を示した。また、PPA-1とBlue-M1やXyl-Gly Mel, 赤色色素と比較すると、PPA-1の方がPOVの抑制効果が弱いことが認められた。従って、脂質酸化の抑制にはピロロピロール環だけでなく、メチン架橋などの構造が寄与していると推察した。

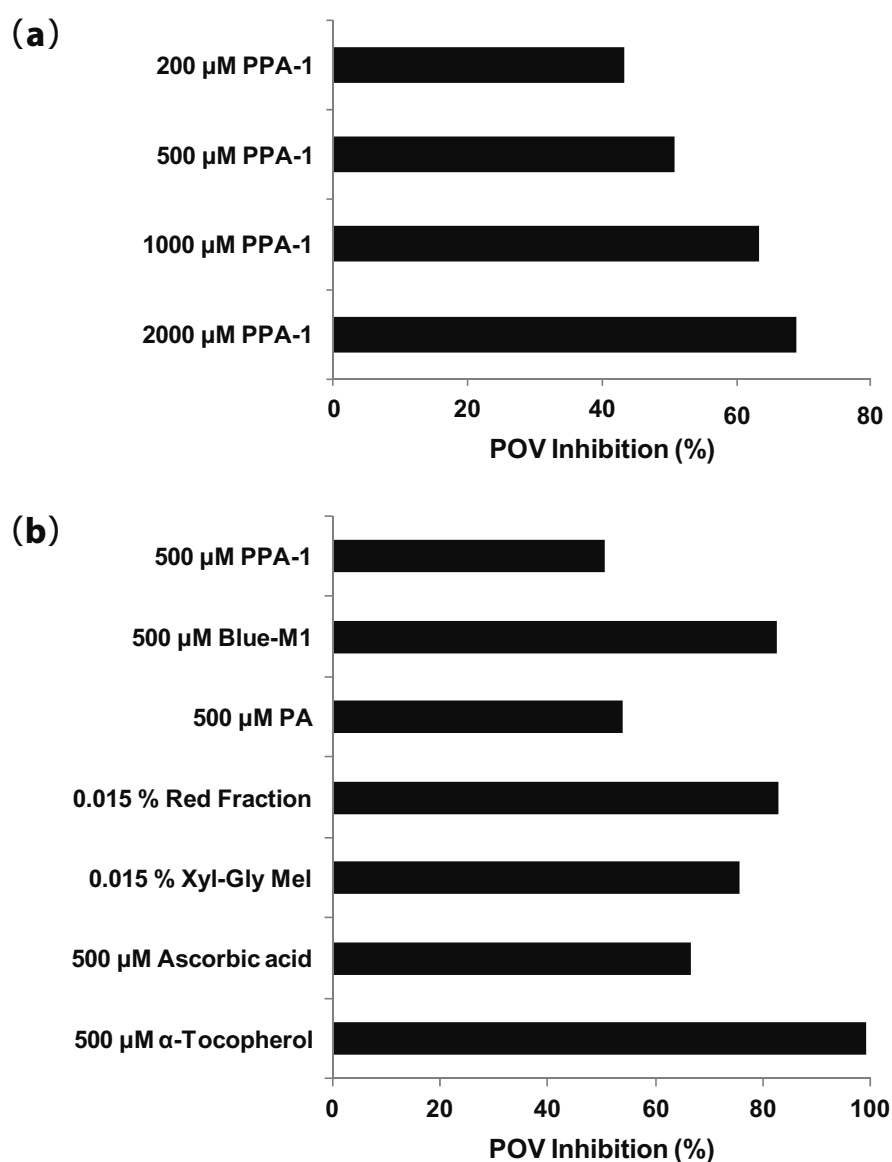


図6. リノール酸の自動酸化に対する抗酸化性 (a) PPA-1; (b) 各種試料

謝 辞

本研究は、(一社)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、共同研究者の明治大学農学部の渡辺寛人教授、高井良輔氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) F. Hayase, Y. Takahashi, S. Tominaga, M. Miura, T. Gomyo, and H. Kato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 1512-1514 (1999).
- 2) 渡辺寛人, 早瀬文孝, 化学と生物, 50(2), 80-82 (2012).
- 3) S. Shizuuchi and F. Hayase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 54-59 (2003).
- 4) F. Hayase, T. Usui, Y. Ono, Y. Shirahashi, T. Machida, T. Ito, N. Nishitani, K. Shimohira, and H. Watanabe, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1126, 53-58 (2008).
- 5) Y. Shirahashi, H. Watanabe, and F. Hayase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2287-2292 (2009).

味噌の習慣的摂取が、動脈系の血圧反射機能に与える 影響に関する定量的評価

山家 智之, 三浦 英和, 白石 泰之

Effect of Japanese traditional food material, Miso on the baroreflex sensitivity of
the heart and artery during the audiovisual immersion

Tomoyuki YAMBE, Hidekazu MIURA, Yasuyuki SHIRAIISHI

*Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University
4-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan*

食生活の欧米化などにより心臓血管系の疾患の発症は重要になっており、薬剤加療などに頼らない新たな方法論が注目されるようになっている。そこで、伝統的に様々な食生活スタイルによる生活習慣病、メタボリックシンドロームなどへの影響が、重要視されている。本研究では、伝統的日本人に多く含有される味噌の自律神経機能効果に注目し研究を行った。健康な医学部学生などを対象に食生活パターンと心臓と動脈の血圧反射機能の定量診断を独立に行い、評価を進めている。

伝統食品の新しい治療効果が定量的に評価できる可能性があるものと期待される。

Several kinds of the Japanese conventional style foods are one of the most important food habit in the candidates to prevent the hypertension. In order to determine the effect of the Miso, which is the conventional and historical Japanese style natural food, the newly developed quantitative baroreflex evaluating device (Jpn Pt.4789203) has

been used in this study. Ten healthy adult volunteers had been used in the experiments after the ethical committee allowance of the Tohoku University Graduate School of Medicine. Coffee and alcohol intake was prohibited before the experiments. Type A behavior pattern, hostility score, and beck depression scale were calculated from the Questionnaire before the measurements. Finger chip pulse wave, blood pressure and ECG were recorded in the data recorder at the sitting position and various kinds of audiovisual contents were added to the subjects. Quantitative analysis, Power spectral analysis of the time series data was carried out, and cross correlation function, transfer function and gain were calculated from the each power spectral data. HRV and fluctuations were calculated from power spectrum, and baroreflex function was calculated from the slope of the regression line between the blood

pressure change and HR. And baroreflex function of the artery was calculated from the regression line between pulse transmission time (PTT) and blood pressure changes with time lag calculated from the cross correlation function. As the results, significant correlation was observed between the some Questionnaire data and Miso intake habit and hemodynamic spectral data. Our results had suggested that eating habit had the effect on the autonomic nervous system baroreflex sensitivity.

1. 緒言

塩分の摂取が高血圧の発生に悪影響を与えるという報告が有り、また、味噌のような発酵食品が、高血圧やメタボリックシンドロームの発生に、好影響を与えるという報告もある。高血圧の発症の要因には様々な因子が有り、心血管系の機能、腎機能、血圧反射を含める自律神経機能など、さまざまな要因を要素別に鑑みないと、味噌のような発酵食品摂取の影響を医学的に定量的に評価することはできない。

そこで、本研究では、高血圧の病態において最も重要な位置を占めると報告されている血圧反射機能に注目し、特に、動脈血管系の血圧反射機能における感度をゲインとコヒーレンシーを計算して、心臓と血管の反射機能を独立に、定量的に診断し、味噌を摂取する食生活と、血圧反射機能の感度の関連性を臓器別に明らかにし、発酵食品の生体を与える影響を定量的に解析して、心血管イベント予防に関わる食生活について科学的な知見を与える。

そのために、我々は、人工心臓制御システムを応用した新たな血圧反射機能診断装置を開発している。

すなわち、遠心式ポンプを応用した人工心臓システムでは、回転式ポンプの応用なので、心室拍動による脈圧が存在しない。そのため、人体の血圧反射システムは、生理的には血圧の存在を感じできないことになるので、人体の血圧反射制御を



図1. 遠心式補助人工心臓 EvaHeart を応用した両心室置換 fitting study

模擬した人工心臓制御ロジックが必要になる。

この原理を応用すれば、人体の血圧反射システムの感度や関連度関数の線形性を解析することができることになる。

そこで、この人工心臓制御システムを応用した人体の血管系の血圧反射機能解析システムを考案した。臨床応用に当たっては、脈管系の運動情報として、脈波伝播速度を応用している。

2. 方法

東北大学は、血管の血圧反射機能の感受性を定量的に診断することができる全く新しい血圧反射機能測定装置を発明し、特許申請を行った。これまで血圧反射機能は、血圧変化に対する心拍変化の反応における回帰直線の傾きなどで診断を行ってきたが、心臓の反応は計測できるが、血管の血圧反射機能については診断できない。そこで新しく発明された診断装置では、血圧の変動と、血管の弾性を計測することで、回帰直線から血管の血圧反射の反応性を定量的に診断することができる方法論を応用した。発明の代表的な実現の形態においては、心電図、あるいは心音図、及び、各動脈の脈波などによる脈波伝播速度の計測を行い、血管の弾性を診断し、血圧の変動に対する血管弾性の変動の反応を計測し、その回帰直線から血管の血圧反射機能を定量的に診断するシステム

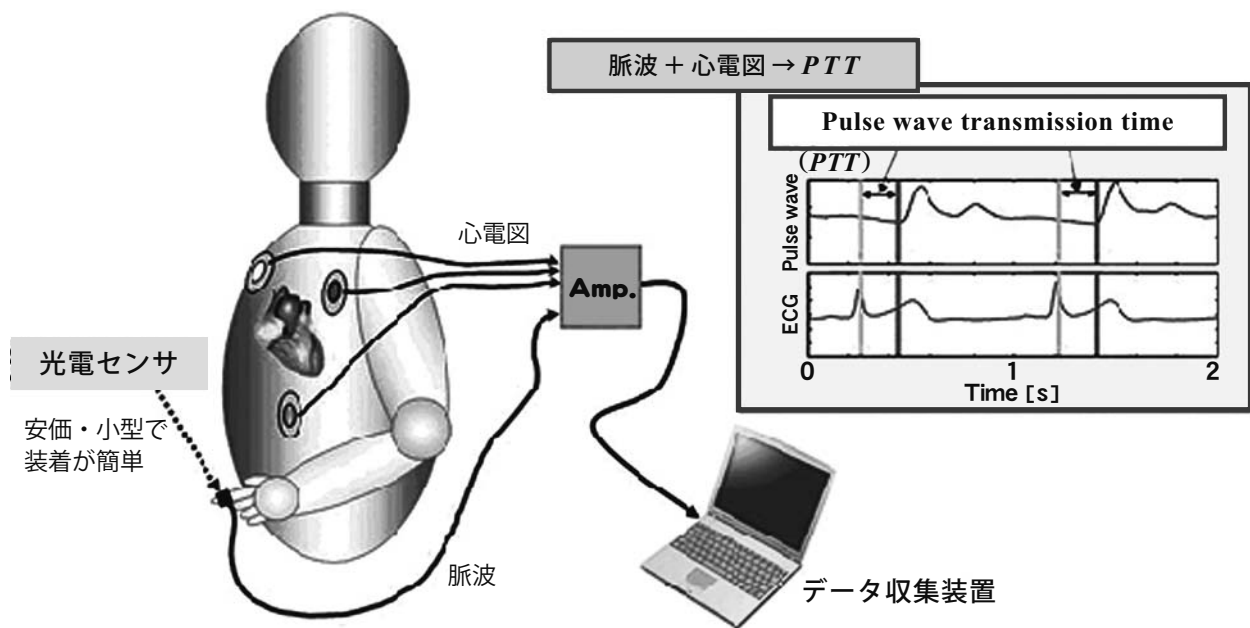


図2. 味噌などの発酵食品が血圧反射に与える影響の解析装置

である。

このシステムを応用すれば、味噌のような発酵食品が生体に与える影響を、医学的、生理学的に、定量的に評価できることになる。そこで、健康なボランティア20例を用いて、心拍、血圧、心臓の血圧反射機能、動脈の血圧反射機能を独立して定量的に解析し、同時に、味噌の摂取パターンに

よるアンケート調査を行い、味噌の摂取と、血圧反射機能に関するデータベース構築を試みた。本研究によって世界に対して味噌の高血圧に対する定量的治療効果を発信できることになる。

また、食事だけでなく、被験者の性格的特性も、心血管イベント発症においては大きなリスクになる。例えば、タイプA行動パターンは、1950年

表1. タイプAスケール (Type A scale)

Q 1	毎日忙しい生活を過ごしていますか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 2	いつも生活の中で、時間に追われるような感じがしていますか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 3	仕事、その他なにかに夢中になりやすいほうですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 4	仕事に熱中すると、他のことに気持ちの切り替えができていくのですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 5	やる以上は、かなり徹底的にやらないと気がすまないほうですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 6	自分の仕事や行動に自信をもてますか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 7	緊張しやすいですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 8	イライラしたり怒りやすいほうですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 9	几帳面ですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 10	勝気なほうですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 11	気性は激しいですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない
Q 12	仕事、その他のことで、他人に負けたくない、競争するという気持ちを持ちやすいですか？	いつもそうである	しばしばそうである	そんなことはない

いつもそうである：2点 しばしばそうである：1点 そんなことはない：0点
Q 5, 6, 9 は2倍で計算する。18点以上でTypeA行動パターンと診断。

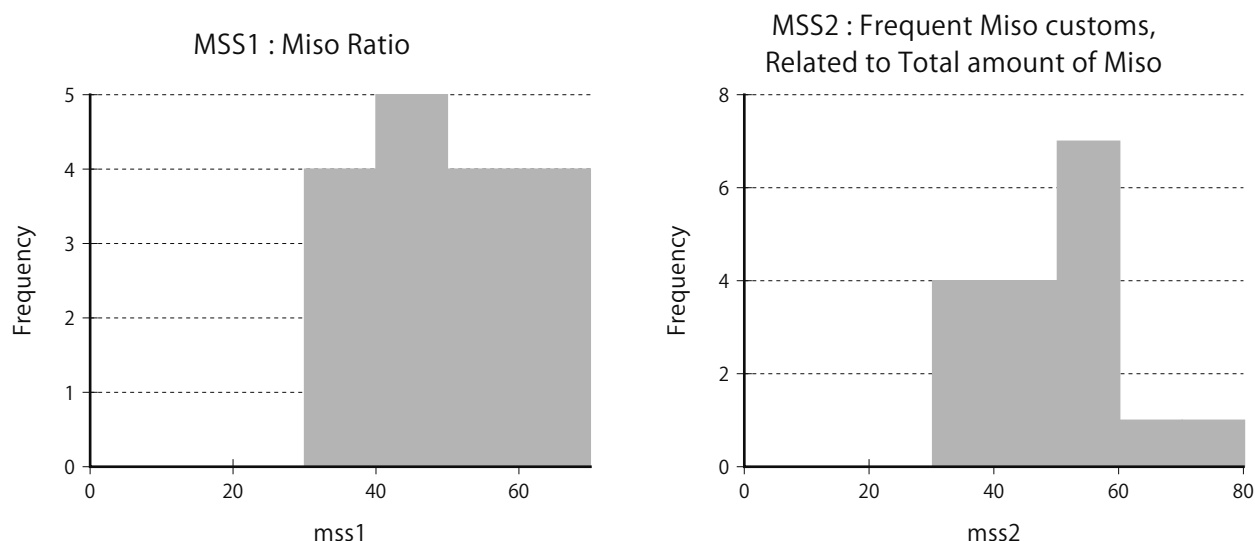


図3. 生活習慣における味噌摂取回数と頻度

代にアメリカのフリードマンとローゼンマンの発見した概念であり、虚血性心疾患の患者には、ある共通した特徴の行動パターンをとることから、命名されており、アグレッシブな性格から、タイプA行動パターンと命名した。

タイプAの特徴として、性格面では競争的、野心的、精力的、行動面では機敏、せっかち、多くの仕事に巻き込まれている、身体面では高血圧、高脂血症といったものがあり、自らストレスの多い生活を選び、ストレスに対しての自覚があまりないままに生活する傾向が多いといわれているので、結果として交感神経が亢進する自律神経バランスを来し、心血管イベント発症との親和性が高い。

本研究では、タイプA、ホスティリティスコア、およびベックうつ病スケール等を定量的に解析し診断に用いた。

3. 結果

被験者は20例、全例が男性であり平均は約24歳である。倫理委員会の判定を受け、厳密に倫理規定に則り計測を遂行しているので、特に危険な不整脈や血行動態の異常もなく、全例において計測が可能であった。

アンケート調査などから定量して生活習慣における味噌などの発酵食品の摂取は比較的頻回であると認識される。

また、味噌摂取の習慣が大きいほど、タイプAのスケールングとしては低値になる傾向も認められたが、タイプAのスケールングが低い対象では、もともと生活習慣がきちんとしている可能性もあり、原因なのか結果なのかの解釈は難しいかもしれない。この他、うつ病スケールと、ホスティリティスコアなどとも相関を比較している。

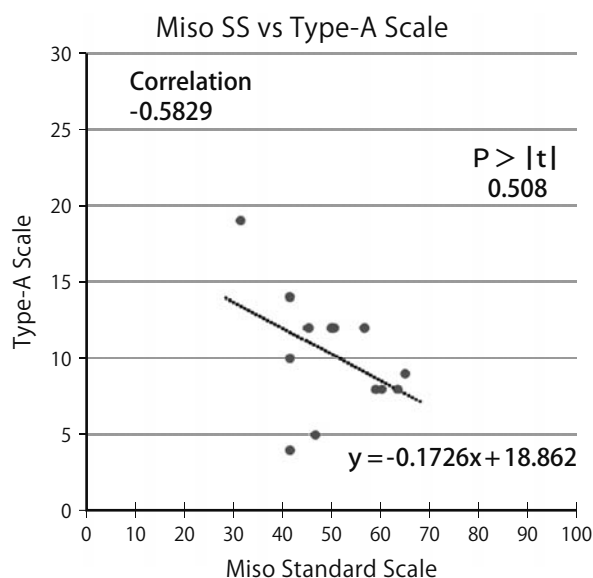


図4. 味噌摂取習慣とタイプAスケール

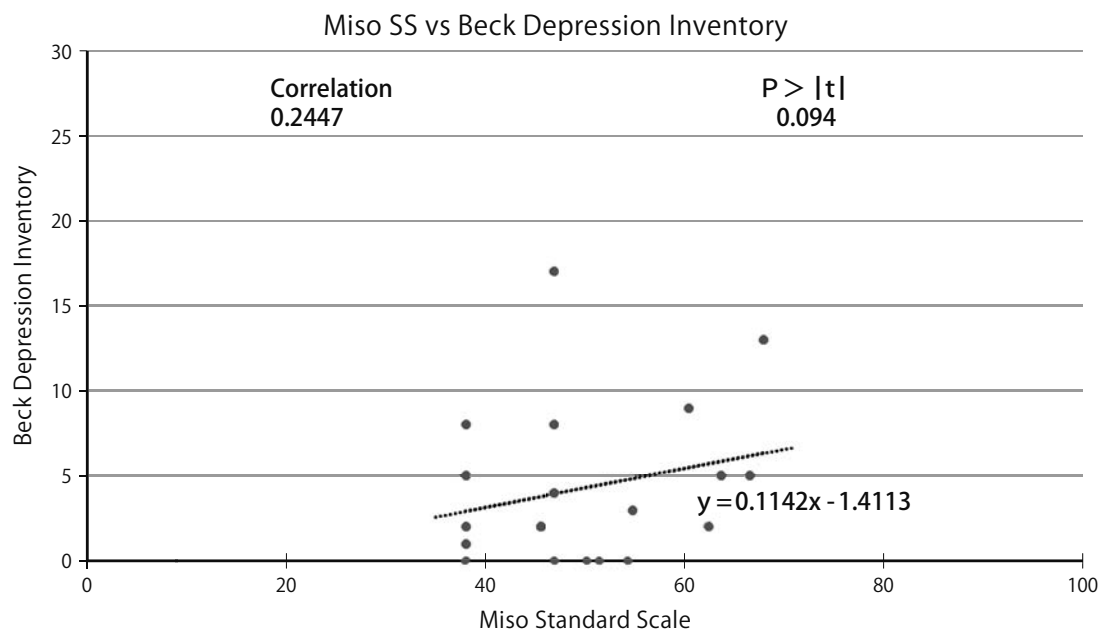


図5. 味噌摂取習慣とベックうつ病スケール

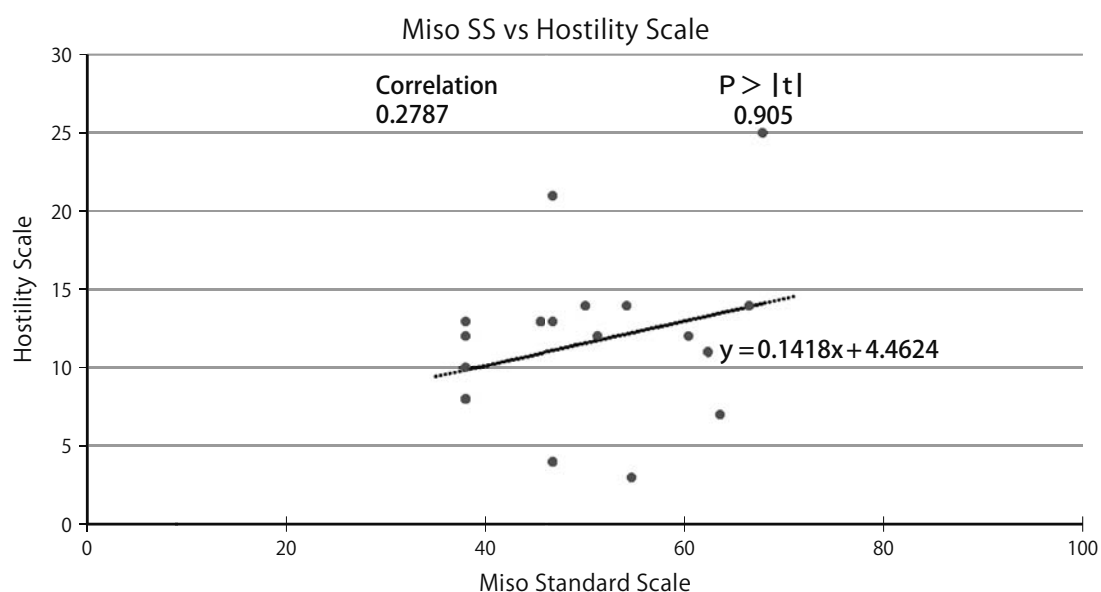


図6. 味噌摂取習慣とホスティリティスケール

さらに本研究では、血管系の血圧反射機能の情報と検出するべく、スペクトル解析を応用し、ピーク周波数の線形性を ρ マックスで定量解析している。

4. 考察

圧反射機能は、生体の恒常性を維持する最も重

要な制御機構であり、本態性高血圧患者の一部においては、この血圧反射制御の感受性が障害され、血圧が上昇しても自律神経を介した制御機構が働かず、血圧が上昇したまま維持されることが知られている。特に若年性の高血圧では、この自律神経制御機構の破綻が、本態性高血圧症の病態において、極めて重要な役割を担っていることが報告されている。

これまで、血圧反射機能の感受性については、

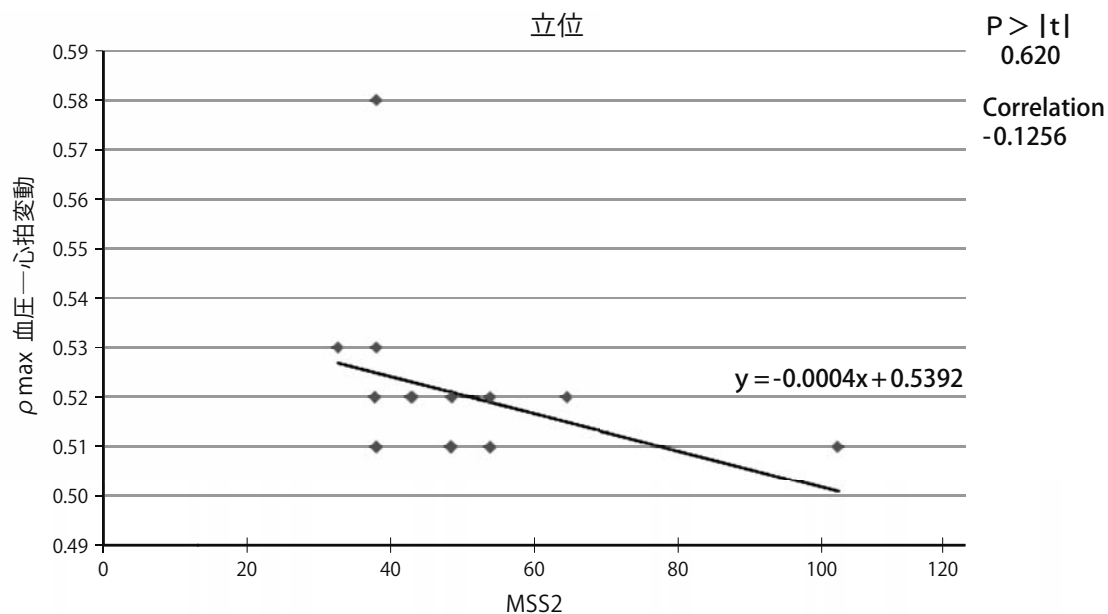


図7. 心拍変動と血圧変動の線形性と味噌摂取パターン

ヘッドアップティルトなどの受動的体位変換や、薬剤などを投与することによる血圧の変化に対する反応性の心拍数の変化を計測し、血圧の変動量に対する心拍数の変動量から最小二乗法を用いた回帰直線の傾きを計算することにより、診断を行ってきた。

しかしながら、心拍数の変動を観測するだけでは、心臓を支配する自律神経に関する反応性を診断することができるが、血管の反応性に関しては診断することはできない。

交感神経の緊張時には、心臓交感神経の反応で、心拍数は増加するが、血管系に関しては抵抗血管の拡張などにより、血流量が増加する方向へ働く。更に、血管の反応性も臓器ごと、部位ごとに異なる。自律神経系に関しては、地域性の反応があることが知られており、人体の臓器ごと、領域ごとに異なる反応を呈することも多く、心臓の反応だけで、全体を診断することは必ずしも正しくない。神経変性疾患や糖尿病などで自律神経障害をきたす場合には、自律神経障害の程度は、部所により様々な度合いを示すので、心臓と血管の自律神経障害は独立に診断する必要がある。更に動脈硬化などにより血管弾性が変化すれば、血管の反応性も低下するので、これも、心臓とは独立に診断しなければならない。しかしながら、これ

までに、血管の血圧反射機能を診断する方法論は報告されておらず、メドラインで国際医学文献を渉猟しても検索できず、特許庁の特許検索においても、このような方法論の特許は過去に申請されていない。そこで、東北大学加齢医学研究所及び関連病院群、情報シナジーセンター、フクダ電子、福島大学などの研究チームは、新しく血管の血圧反射機能を発明し、特許の申請を行っている。心拍変動から血圧反射機能を見る方法論は開発されているが、血管系の血圧反射機能を定量診断する方法論は存在していなかった。

本研究の結果から、被験者の心理行動スケールと味噌摂取習慣の関連性、また、血圧反射機能に与える影響を、スペクトル解析による信号解析の数的手法並びに非線形力学を応用した方法論で解析することができるようになっている。

味噌の摂取が、血圧反射機能に与える好影響が定量評価できれば、食品業界全体にメリットがあり、かつ、海外への情報発信も可能になり、味噌の業界が世界に発展できるものと大きく期待される。

References

- 1) Can personality traits predict pathological responses to audiovisual stimulation? Yambe

- T, Yoshizawa M, Fukudo S, Fukuda H, Kawashima R, Shizuka K, Nanka S, Tanaka A, Abe K, Shouji T, Hongo M, Tabayashi K, Nitta S. Biomed Pharmacother. 2003 Oct;57 Suppl 1:83s-86
- 2) Type A behaviour pattern and hypercholesterolemia in elder patients. Shizuka K, Yambe T, Fukudo S, Nitta S. Nihon Ronen Igakkai Zasshi. 2000 Jun;37(6):486-9.
- 3) Type A Behavior Pattern: its association with coronary heart disease. Friedman M, Rosenman RH. Ann Clin Res. 1971 Dec;3(6):300-12.
- 4) Coronary-prone individuals (type A behavior pattern). Growth hormone responses. Friedman M, Byers SO, Rosenman RH, Neuman R. JAMA. 1971 Aug 16;217(7):929-32.
- 5) Coronary-prone individuals (type A behavior pattern). Some biochemical characteristics. Friedman M, Byers SO, Roseman RH, Elevitch FR. JAMA. 1970 May 11;212(6):1030-7.
- 6) SERUM LIPIDS AND CONJUNCTIVAL CIRCULATION AFTER FAT INGESTION IN MEN EXHIBITING TYPE-A BEHAVIOR PATTERN. FRIEDMAN M, ROSENMAN RH, BYERS S. Circulation. 1964 Jun;29:874-86
- 7) Methods for assessment of effects of habitual exercise on the autonomic nervous function using plethysmogram. Yoshizawa M, Sugita N, Yambe T, Konno S, Sugai TK, Abe M, Homma N. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2011;2011:1157-60. doi: 10.1109/IEMBS.2011.6090271.
- 8) Estimation of blood pressure variability using independent component analysis of photoplethysmographic signal. Abe M, Yoshizawa M, Sugita N, Tanaka A, Chiba S, Yambe T, Nitta S. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009;2009:348-51. doi: 10.1109/IEMBS.2009.5333155.
- 9) Development of new quantitative diagnosis machine to evaluate the baroreflex sensitivity of an artery for patients with hypertension. Yambe T, Sugita N, Yoshizawa M. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009;2009:888-91. doi: 10.1109/IEMBS.2009.5332644.
- 10) Baroreflex sensitivity of an arterial wall during rotary blood pump assistance. Yambe T, Imachi K, Shiraishi Y, Yamaguchi T, Shibata M, Kameyama T, Yoshizawa M, Sugita N. Artif Organs. 2009 Sep;33(9):767-70. doi: 10.1111/j.1525-1594.2009.00864.x.