

研究助成報告

平成29年度研究助成による研究報告

研究報告

味噌による DNA 損傷抑制効果 II

石田 万里¹, 坂井 千恵美¹, 田代 聡², 粟井 和夫³, 吉栖 正生⁴, 石田 隆史⁴

The effect of Miso on radiation-induced DNA damage

Mari ISHIDA¹, Chiemi SAKAI¹, Satoshi TASHIRO², Kazuo AWAI³,
Masao YOSHIZUMI⁴, Takafumi ISHIDA⁴

¹Department of Cardiovascular Physiology and Medicine,

²Research Institute for Radiation Biology and Medicine,

³Department of Diagnostic Radiology, Hiroshima University,

1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8551, Japan.

⁴Department of Cardiovascular Medicine, Fukushima Medical University,

1 Hikarigaoka, Fukushima, 960-1295, Japan.

【背景と目的】

2004年の *Lancet* 誌に、医療先進国15カ国の年間のエックス線検査件数は、単位人口あたりで日本が世界一多く、日本ではがんの3.2%が医療被曝、特に画像診断における被曝に起因すると推測される、との報告がされた¹⁾。しかしその一方で、日本は放射線被曝の少ない国よりも平均余命は長く、各種画像診断によって疾病が早期に発見されるなど、メリットがデメリットを上回っているとも考えられる。

一方、2013年の *British Medical Journal* に、0～19歳までに診断目的でCT検査を行った68万人の約10年後までの発がんリスクは、CT検査を受けていない人に比べ1.24倍であったと報告された²⁾。コホートの規模を考慮すると、私たち医療従事者はこのエビデンスを真摯に受け止めるべきであり、CT検査時の被ばく量そのものと被ばくの影響の低減に力を注ぐ必要がある。

被ばくの影響とは、細胞内でラジカルが生じることによって化学結合が切断されたり分子の酸化が生じ、DNAの切断が起こることである。したがって抗酸化

作用をもつ成分が被ばくの影響を減弱させる可能性がある³⁾。本研究の目的は、放射線被ばくによる障害を薬品などではなく、抗酸化作用をもち古来十分に安全性が認められている味噌という食品によって防御できるか否かを明らかにすることにある。

【方法】

(1) 味噌の抽出

味噌は中央味噌研究所より供与された米味噌3種(米味噌、米味噌(白)、米味噌(麴入り)、麦味噌1種、豆味噌1種)を使用した。味噌の成分の抽出方法として、手順の煩雑さ、抽出液中の塩分濃度、浸透圧等を鑑み、メタノールを用いた抽出法を選定した。これまでの報告を参考に⁴⁾、各味噌10gを20mLのメタノールに溶解し、濾紙で濾過後、0.20 μmセルロースアセテートフィルター(DISMIC®-28CP, ADVANTEC, 東洋濾紙)を通して滅菌した。

(2) 細胞

培養細胞はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を使用した。細胞は内皮細胞基本培地-2 (EBM®-2) を用いて、37℃、5% (v/v) CO₂の条件下で培養した。

(3) DNA 損傷刺激

HUVECを22 x 24 mm カバーガラスに播種し、接着後メタノール抽出した味噌を添加し24時間後に、X線照射装置 CP-160 を用いてX線を照射した。

(4) DNA 損傷の程度の評価

DNA 損傷とくに二本鎖切断が生じると傷周辺のヒストンH2AXは直ちにリン酸化される。これを利用し、DNA 損傷(二本鎖切断)の程度はリン酸化H2AX (γH2AX)の抗体を用いた蛍光免疫染色により評価した⁵⁾。X線照射後30分(最大DNA損傷時)、24時間(DNA修復後)に細胞を4%パラホルムアルデヒドにより固定し、γH2AX抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。Zeiss社 Metapherを用いて画像を撮影し、細胞核内のDNA damage focusの数を自動カウントした。細胞100個分の平均値を算出し、溶媒(メタノール)のみを添加したコントロールと比較した。

2. In vivo 実験

In vitro 実験で効果のあった味噌を15g使用して味噌汁を作成し健常人に摂取させた。摂取前と摂取翌日に採血を行い、X線照射装置 CP-160 を用いて血液にX線(100 mGy)を照射した。照射30分後に、検体からリンフォプレップを用いて単核球を分離・固定し、DNA二本鎖切断をリン酸化ヒストンH2AX (γH2AX)抗体を用いて免疫染色した。

【結果と考察】

1. In vitro 実験

最近のCTによる医療被曝と同等のDNA損傷量を得るため、100 mGy、200 mGyの放射線照射を行い、DNA損傷の程度を比較した。最近の低線量肺CTによってできるDNA損傷(γH2AX focus数)は3.30 ± 2.4個/細胞、今回の実験のX線照射装置による照射100 mGyで4.07 ± 0.66個/細胞、200 mGyで7.29 ± 0.99個/細胞であることから、本実験では100 mGyを照射量として選択した。

ヒト内皮細胞に放射線100 mGyを照射すると、味噌の有無にかかわらずγH2AX focus数は30分後に増

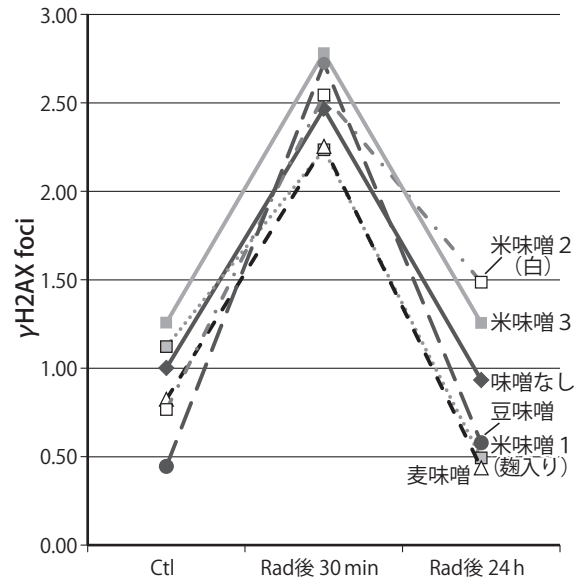


図1. 放射線照射後のγH2AX focus数の変化および各味噌の効果

表1. 対象者背景

年齢(歳)	45.0 ± 13.6	
男女比	3 : 5	
喫煙者	0	
BMI	21.6 ± 3.0	
味噌汁は	ほとんど飲まない	3名
	週1回程度	2名
	週2~4回程度	3名

加し、24時間後にはほぼ前値に戻った(図1)。放射線照射前(0 Gy)、100 mGy照射後30分、100 mGy照射後24時間において、それぞれ味噌を投与していない細胞のDNA損傷量と比較を行った。放射線照射後30分においては米味噌1(麴入り)および麦味噌がDNA損傷を抑制していた。照射後24時間では、米味噌1(麴入り)、麦味噌と豆味噌においてDNA損傷が抑制されていた。以上より、麴入り米味噌および麦味噌は放射線照射直後のDNA損傷の生成を抑制し、米味噌1(麴入り)、麦味噌1および豆味噌は生じたDNA損傷の修復を促進すると考えられた。

2. In vivo 実験

In vitro 実験で用いた味噌のうちDNA損傷抑制効果のあった麦味噌を実験に用いた。細胞に投与した濃

度から人に投与する量を15gと算出し、これを用いて味噌汁を作成し摂取させた。対象は健康人8名で背景は表1に示す。

照射前 (Ctl) のリンパ球の γ H2AX focus 数を100%とし、100 mGy X線照射後の γ H2AX focus 数の増

加率を算出したところ、味噌の摂取による差が認められなかった (図2)。

リンパ球の γ H2AX focus 数の実数を味噌摂取前後で比較すると、味噌の摂取によって γ H2AX focus

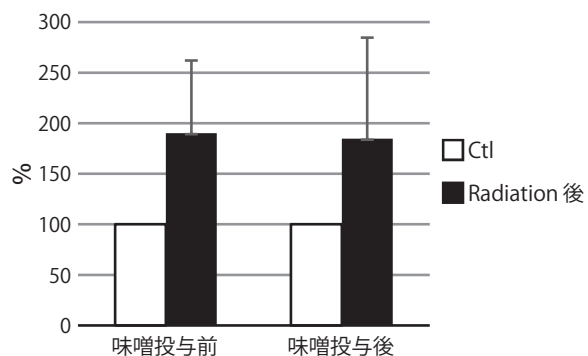


図2. 放射線照射による γ H2AX focus 数増加に対する味噌の効果

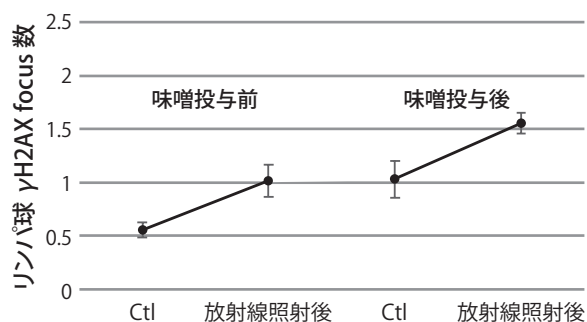


図3. 味噌摂取前と後の γ H2AX focus 数

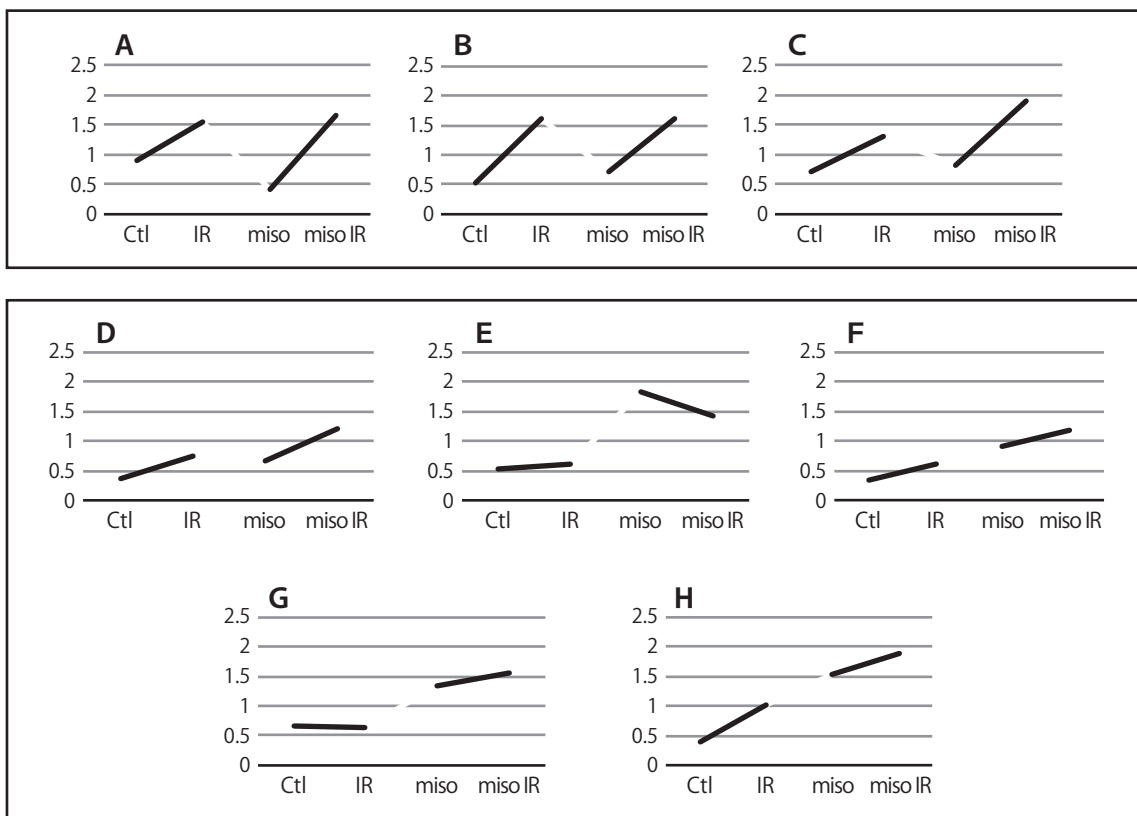


図4. 味噌摂取前と後の γ H2AX focus 数 (個別例)

数が増加する傾向が認められた (図 3 : $p=0.052$)。しかし個々の症例をみると、味噌によりリンパ球 γ H2AX focus 数が増加しない症例もあり (図 4 A, B, C), 今回の検討ではこの差が何によるものかは明らかでなかった。

細胞を用いた実験からは味噌による DNA 損傷抑制効果を確認することができた。放射線照射は酸化ストレスを生じることにより DNA 損傷を引き起こすので、今回 DNA 損傷抑制効果のあった味噌は抗酸化作用によって DNA 損傷の生成を抑制した可能性があると考えられた。また、DNA 損傷が生じると損傷応答および修復機転が活性化される。放射線照射 24 時間後の味噌による DNA 損傷の低減は、味噌が DNA 修復機構に影響を与え、生じた DNA 損傷の修復を促進した可能性も考えられた。

ヒトへの味噌投与による味噌の DNA 損傷抑制効果は、今回の実験条件では認められなかった。味噌の量、投与期間、放射線照射後の時間等、実験条件を変化させ検討を続けたい。

〈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平成 29 年度研究助成を頂きました一般社団法人中央味噌研究所をはじめ各関係者の方々に深謝申し上げます。

【文献】

- 1) Berrington de Gonzalez A and Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *Lancet*. 2004;363:345-51.
- 2) Mathews, J. D., Forsythe, A. V., Brady, Z., et al. Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence ; Data linkage study of 11 million Australians. *BMJ*. 2013; 346:f2360.
- 3) Xiao R, Su Y, Simmen RC and Simmen FA. Dietary soy protein inhibits DNA damage and cell survival of colon epithelial cells through attenuated expression of fatty acid synthase. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2008;294:G868-76.
- 4) Teranaka T, Ezawa, M., Matsuyama, J., Ebine, H., and Kiyosawa, I. Inhibitory effects of extracts from rice-koji miso, barley-koji miso, and soybean-koji miso on the activity of angiotensin I converting enzyme. *Nippon Nogeikagaku Kaishi (in Japanese)*. 1995;69:1163-1169.
- 5) Ishida M, Ishida T, Tashiro S, Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y and Yoshizumi M. Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. *PLoS One*. 2014;9:e103993.

研究報告

味噌の生体防御能の賦活機能に関する研究
— ストレス誘導性記憶減衰の味噌摂取による改善 —

河村 幸雄

Enhancement of self-defence system by Miso intake
— Stress-induced memory decrement is improved by Miso intake —

Yukio KAWAMURA

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

日本を含めて多くの先進国ではガン, 感染症, 脳神経機能異常による健康からの逸脱者が増加している。これらはいずれも広い意味で生体防御系の破綻に起因する。

本研究では, 生体防御能の低下防止及び賦活化が上記の疾病予防に重要であることから, 味噌摂取が単に栄養改善の面からでなく, 疾病予防に機能している可能性を推定している。その主な理由は, 味噌が, 素材の大豆, 米, 麦由来物質に加えて, 発酵微生物(菌体)とそれらによる無数の代謝産物を多く含む多成分系の発酵食品であり, 生理機能の未解明な物質が生成している可能性が高いからである。特に, 麹菌だけでなく酵母などの多種類の微生物の細胞壁由来物質が存在していることはこの可能性を強く示唆する。このことから, 我々は味噌=生理機能性物質ライブラリー説を提唱しているが, 事実, 味噌(成分)には, 高血圧抑制, 脂質代謝や骨代謝改善, ガン抑制など種々の異なった症状の軽減に効果のある事が *in vitro*, *in vivo* の研究で示されている。

本研究では, 味噌の趣好性, 癒し効果に注目し, 脳神経機能との関係で学習とストレス誘導記憶喪失症状との関係について検討した。

I. 味噌汁2杯分の味噌摂取はストレス誘導性
認知/学習/記憶能の喪失を防止するか?

近年, 平均寿命の伸びに伴うアルツハイマー型およびレビー小体型認知症やパーキンソン病など脳神経系異常起因する認知症症状に大きな社会的関心が集まっている。その理由は, これらの疾患が老化に伴い誰にでも起こりうる状態であり, 不可逆性が大きく予防が必須の疾病あるいは生理的状況であるためである。

マウスは, 繰り返し拘束ストレス負荷により容易に鬱状態に陥り, そのような状況の継続は, 周囲に対する無関心から短期記憶の喪失(一種の認知症状)につながる事が知られている。既に, 我々は, 味噌アルコール抽出物の摂取が, マウスの記憶の衰弱抑制に効果のあることを示した。今回は, 味噌(豆味噌)そのものの摂取がこのような記憶喪失に対してどのような効果をもたらすのかを, 強度水中拘束ストレスマウスを使って検討した。

マウスは, 直径120 cmの円形プール中央にある回避プラットフォームの位置を5日~1週間のトレーニングで記憶するが, この定着記憶は, ストレスにより衰弱する。このような記憶衰弱/減衰に対して, 味噌摂取がどのように影響するかを検討した。

5日間の学習トレーニングによりマウスの空間位置

記憶は、速やかに定着し5日後では、一日目のプラットフォームの発見時間平均45秒に対して平均3秒となった。このマウスに7日間、1日1時間水中拘束ストレスを負荷すると、ストレスから解放されると外見上の行動はそれほど大きな変化は示さないが、学習させた位置記憶を水迷路試験で検証すると、日にちの経過（ストレスの蓄積）と共に徐々に位置記憶が不確実と

なり、5日目で記憶水準が強度に低下、発見までに、コントロール食（カゼイン食）群15秒を要するようになった（Fig. 1）。

この記憶減衰が通常の味噌汁2杯分（12g x 2杯、試料中0.48%）の味噌摂取で抑制されるかどうかを測定した（Fig. 2）。

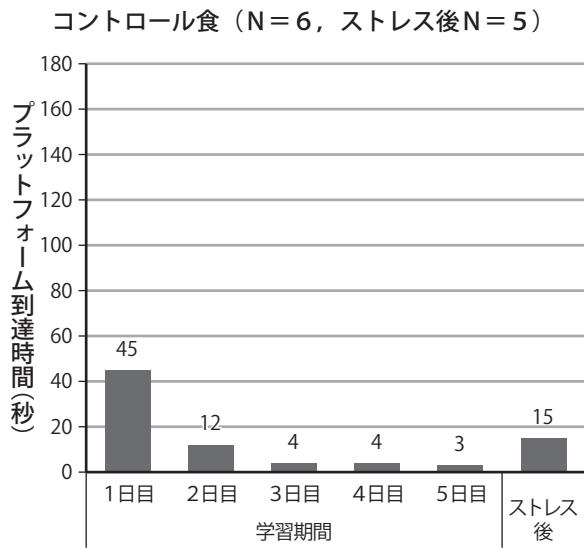


Fig. 1

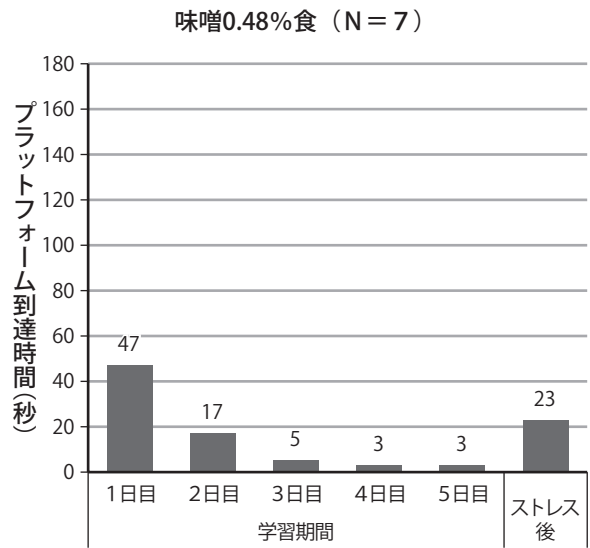


Fig. 2

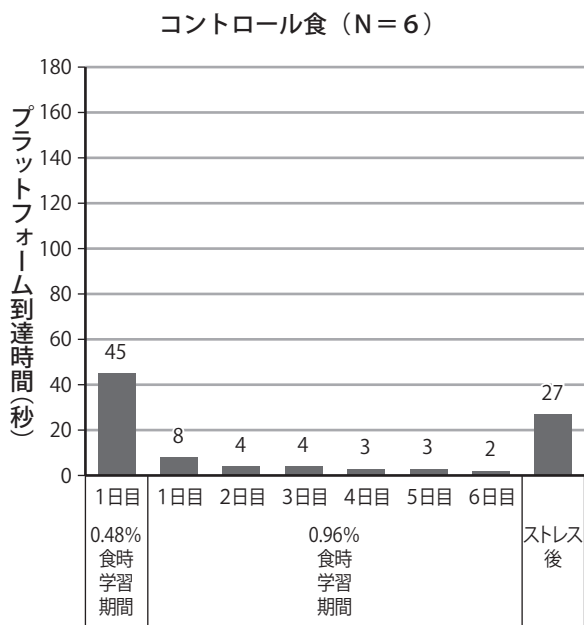


Fig. 3

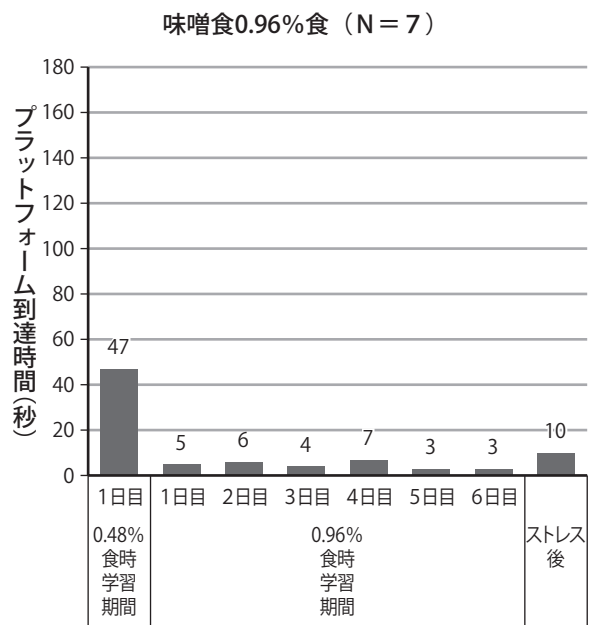


Fig. 4

その結果、味噌汁2杯分の味噌摂取では、ストレス後のプラットフォーム発見時間は平均23秒となり、コントロール食と有為な差は認められなかった (Fig. 2)。

この位置記憶喪失状態は、ストレス解放後も少なくとも2週間までは継続していた。この拘束ストレスによるマウスの位置記憶喪失は、味噌アルコール抽出物を1%添加した給餌群では、添加しないコントロール群と比べて軽度であるが有意 ($n=5$, $p<0.05$) に抑制されていた。そのため、味噌汁2杯分の味噌摂取で、記憶減衰抑制効果が認められなかったのは、摂取量が少なかった可能性が考えられたので、次に味噌汁4杯分 (味噌含量0.96%) の効果を検討した。

II. 味噌汁4杯 (／1日) 量の味噌摂取は記憶減衰を抑制するか？

味噌汁4杯 (／1日) 量 (0.96%) の味噌摂取の記憶減衰抑制効果を検討した。その結果、味噌汁4杯 (／1日) 量の味噌摂取群のストレス誘導性記憶減衰は、コントロール群と比べて、有為に抑制されていた (Fig. 3, 4)。

すなわち、コントロール食ではストレス負荷により、有為に ($P<0.05$) に、プラットフォームの発見

時間が遅延 (2秒:27秒) していたのに対して、味噌食ではストレス前とストレス後のプラットフォームの発見時間 (3秒:10秒) に有為差が認められなかった。つまり、味噌汁4杯分の味噌含有餌料の摂取により、ストレス誘導性の記憶減衰が抑制される事が示された。

この抑制効果は、マウスの性別に関係なく雄、雌の両群で認められた (雄のデータは省略)。

III. 考察とまとめ (味噌のストレス誘導性記憶減衰抑制効果の分子機構は？)

1日味噌汁4杯に相当する豆味噌摂取が、どのような分子機構によりストレス誘導性記憶減衰を抑制しているのかを明らかにするため、現在、味噌摂取に伴うストレスホルモンである血中コルチゾール他のホルモンレベルの変動と脳内における海馬や歯状回などや辺縁系領域のアミロイド β 生成系の変動について、分析を進めている。

なお、この位置記憶喪失が、ストレス誘導性であるため単なる味噌 (成分) の抗ストレス作用を測定したものであるのか、あるいは記憶喪失そのものの喪失あるいは、記憶の呼び出しを抑制したのかの明確な判断は現時点では下せないが、どちらであるかに興味を持たれる。

研究報告

エピゲノム変化を指標とする味噌成分の探索と機能解析

中村 文彬¹, 新井 大祐², 大塚 悟史², 木村 宏³,
塩田 邦郎², 中尾 洋一^{1,2}

Bioactive constituents of “miso”

— search for new substances and analysis of the modes of actions —

Fumiaki NAKAMURA¹, Daisuke ARAI², Satoshi OTSUKA², Hiroshi KIMURA³,
Kunio SHIOTA², Yoichi NAKAO^{1,2}

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

²Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

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

³Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8503, Japan.

1. 研究目的

日本食は日本人の長寿を支える「ヘルシーな食事」として世界的にも広く受け入れられている。しかしながら、そこに含まれる有効成分の作用は薬と比較して微弱であるため、薬と同様の生物活性評価系ではその作用メカニズムを解明することは至難の業である。そこで、われわれは食品成分の微弱な影響を検出する評価基準としてエピゲノムの変化に着目して研究を行っている。われわれが開発したエピゲノム変化誘導活性の評価系とES細胞などの幹細胞に対する分化誘導活性の評価系を組み合わせることで、食品に含まれるさまざまな成分の微弱な影響を検出することが可能となる。以上のような生物活性を指標として、食品に含まれる有効成分を探索した結果、ヒストン修飾(H4K5ac)レベルを抑制する味噌中の活性成分としてフェルラ酸エチルエステル(FAEE)を見出している。¹⁾FAEEは、H4K5acレベルを抑制するとともに、神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導を促

進し、さらにマウスモデルにおいて顕著な抗うつ活性を示し、抗ストレス食品成分として期待されている。

しかしながら、このFAEEによるH4K5acレベルの変化が起こる遺伝子領域や仕組みについては未解明のままであり、FAEEの抗ストレス作用メカニズムはまったくわかっていない。低分子化合物の作用メカニズム解明へのアプローチは様々あるが、ヒストン修飾は酵素だけでなく、様々な補酵素や補因子など数多くの制御因子によって巧みに制御されているため、²⁾FAEEによるヒストン修飾調節に関わる直接の標的分子を同定することがメカニズムを理解する上で重要であると考えた。

2. 実験手法

【プローブの設計および活性】

FAEE類縁体の構造-活性相関を検討し、その結果をもとにプローブ分子の設計および合成を行っ

た。合成したプローブ分子については、ヒストン修飾 H4K5ac 特異的なモノクローナル抗体³⁾を用いたヒストン修飾調節活性試験¹⁾にて活性を確認した。

【FAEE 様分子の細胞内局在の確認】

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞をプローブ分子添加培地にて20時間培養後、細胞を固定し、ゴルジ体をレクチン HPA, Alexa Fluor™ 647 Conjugate (Thermo Fisher) で染色した。染色後、固定細胞に緑色蛍光化合物である Carboxyrhodamine110-Azide (Click Chemistry Tools) を含む反応溶液を添加し、30分、室温の条件にて細胞内クリック反応を行った。反応後、サンプルの洗浄を行い、共焦点顕微鏡で撮影した。

【FAEE 標的分子の探索】

合成したプローブ分子を azide-FG beads (多摩川精機) にクリック反応にて結合させた。その複合体を用いて、HeLa 細胞から抽出したタンパク質に対しブルダウンアッセイを行った。得られたタンパク質混合物は SDS-PAGE にて分離を行ったのち、銀染色にてタンパク質のバンドを検出した。

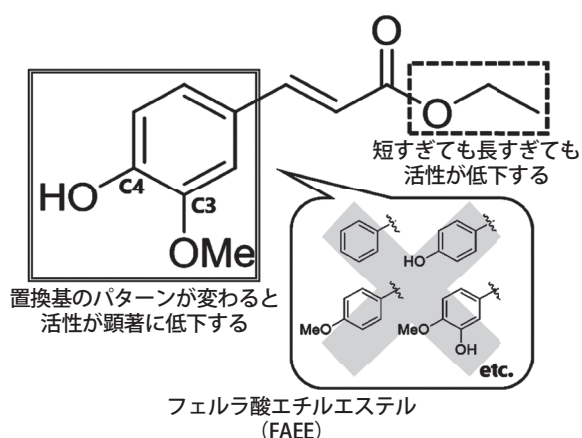


図 3.1. H4K5ac レベルの抑制を示す重要な FAEE の部分構造

3. 結果

【プローブの設計および活性】

FAEE をもとに24種類の類縁体を合成し、構造-活性相関を検討したところ、H4K5ac レベルの抑制には C4 位のヒドロキシ基および C3 位のメトキシ基が活性を示す重要な構造であり、側鎖長も活性に影響する要因のひとつであることを明らかにした (図 3.1)。

アルキンとアジド基とのヒュスゲン環化付加反応はクリックケミストリーの代表的な反応として知られており、それら部分構造を持つ 2 分子は容易に結合することが可能となる。⁴⁾そこで、FAEE のプローブ分子として、末端のエチルエステル基をプロパルギルエステル基に変えた末端アルキン型フェルラ酸 (FAPG) を設計した。導入したプロパルギルエステル基は大きな構造の変化を伴うことなく、末端にアジド基を持つリンカーを導入することが可能となる。しかしながら、通常、プローブ分子による標的分子のつり上げには、複数の標的分子候補が浮かび上がることから、真の標的分子を同定するためには、これらの標的候補の絞り込みに工夫が求められる。そこで、ネガティブコントロールとしてイソフェルラ酸プロパルギルエ

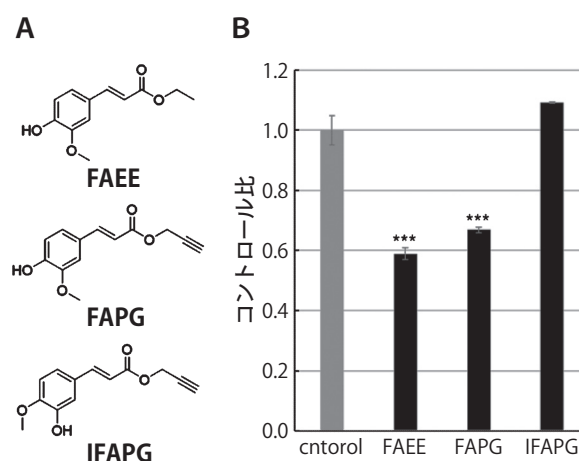


図 3.2. プローブおよびネガティブコントロールの構造と活性

A ; 各化合物の構造 (上; フェルラ酸エチルエステル, FAEE, 中; フェルラ酸プロパルギルエステル, FAPG, 下; イソフェルラ酸プロパルギルエステル, IFAPG).

B ; 各化合物による H4K5ac への影響 (control = DMSO, samples = 50 μM, n = 3, mean ± S.D., *** : p < 0.001).

テル (IFAPG) を置いた。ヒドロキシ基とメトキシ基が入れ替わったイソフェルラ酸エチルエステルは H4K5ac レベル抑制を示さないため、FAEE の構造を特異的に認識している標的分子のみを明らかにできることが期待された。予想通りネガティブコントロールである IFAPG は H4K5ac レベルを変化させなかったが、FAEE のエチルエステル基をプロパルギルエステル基に変えた FAPG では活性が確認された (図 3.2)。

【FAEE 様分子の細胞内局在の確認】

活性成分 FAEE および合成したプローブ分子 FAPG, IFAPG で処理した細胞について、carboxyrhodamine110-Azide を用いて細胞内クリック反応による細胞内局在イメージングを行ったところ、FAPG で処理した細胞のみに強い緑色蛍光が認められた。緑色蛍光は細胞の細胞質全体から観察され、特に核の周りの緑色蛍光は共染色したゴルジ体 (HPA 染色) の一部と重なっていた。一方、IFAPG で処理した細胞は緑色蛍光が僅かにしか観察されなかった。このことから、活性成分 FAEE が HeLa 細胞の細胞質に局在しており、細胞質に FAEE の H4K5ac 抑制機能を介在する標的分子が存在することが示唆された (図 3.3)。

【FAEE 標的分子の探索】

HeLa 細胞の細胞質由来タンパク質に焦点を当てて標的分子の探索を行ったところ、複数の標的分子候補が得られた (図 3.4. A)。標的分子候補の絞り込みを行うために FAPG と azide FG beads を結合させた複

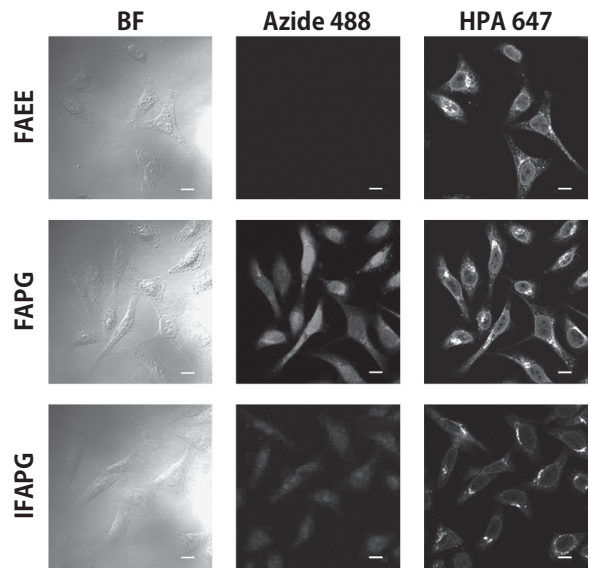


図 3.3. 細胞内クリック反応による各化合物の局在イメージング (BF; 明視野, scale bar; 10 μm)

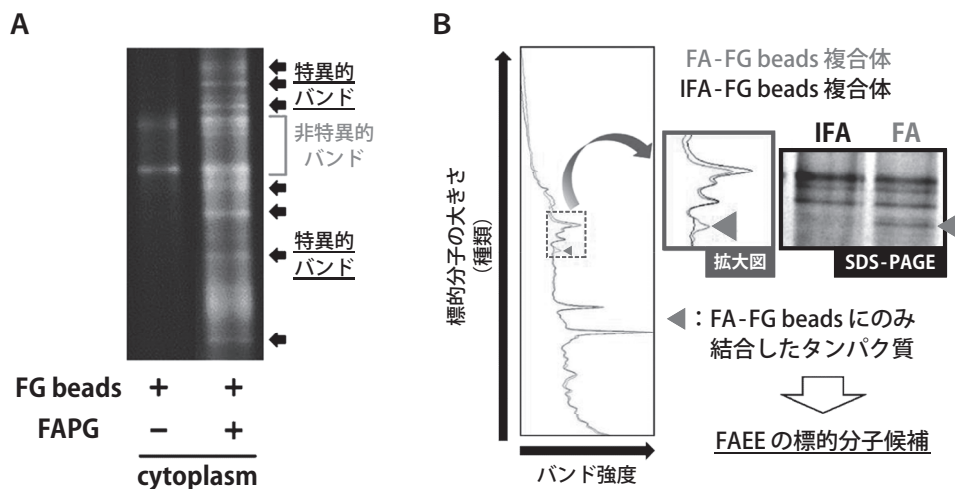


図 3.4. 標的分子候補の探索

A; FA-FG beads 複合体を用いたプルダウンアッセイ結果 (左; FG beads のみによるプルダウンサンプル, 右; FAPG と FG-beads を結合させた複合体, FA-FG beads によるプルダウンサンプル)。
B; FA-FG beads と IFA-FG beads によるプルダウンサンプルの比較。

合体 (FA-FG beads) とネガティブコントロールである IFAPG と azide FG beads を結合させた複合体 (IFA-FG beads) によるプルダウンサンプルと比較したところ、1つのバンドが浮かび上がった (図 3.4. B)。

4. 考察

研究で実施したヒストン修飾パターンの大規模なスクリーニングの結果より、味噌にはエピジェネティクスに対して異なる作用を有する様々な成分が含まれ、これらが複合的に働いていると考えられた。また、そのような活性成分の一つと、既に見出されていた抗ストレス作用をリンクさせるデータを提示することができた。すなわち、細胞機能の基盤であるエピジェネティクスを仲立ちとして、味噌に含まれる有効成分と健康増進作用とを紐づけることに成功したといえる。活性成分 FAEE の作用メカニズム解明を目指して、FAEE のプローブ分子を用いた細胞内局在および標的タンパク質候補のバンドを得た。現在、バンドの解析を行い、RNAi によって標的分子候補ノックダウン時のフェノタイプを確認し、FAEE の真の標的分子であるか否かの確認を行っている。味噌の成分につい

て、これまで明らかにされてこなかったヒストン修飾 (H4K5ac) レベルにおよぼす影響と細胞分化や抗ストレス作用の関係について新たな知見を得ることにより、味噌の効能のさらなる理解へと繋げていきたい。

5. 謝辞

本研究は平成29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。

6. 参考文献

- 1) 松原英祐, 本多芳孝, 嶋川淳, 新井大祐, 中村文彬, 加藤妙子, 中野京子, 大池昶威, 中尾洋一, 他 7 名, 中央味噌研究報告, 一般社団法人 中央味噌研究所, 第38号, pp.34-48, 2017年.
- 2) Chen, T.; Dent, S. Y. *Nat. Rev. Genet.* 2014, 15, 93-106.
- 3) Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Goto Y, Takizawa N, Nozaki N. *Cell Struct. Funct.* 2008, 33, 61-73.
- 4) Huisgen, R. *Proc. Chem. Soc.* 1961, 357-396.