

アポトーシスに関する研究 (9)

発酵食品がアポトーシスに及ぼす影響

Study on Apoptosis (9) Effects of the Fermented Food on the Apoptotic Cells

道家 晶子

Shoko DOKE

Abstract

To check the influence of the fermented food which is good for health on the apoptosis of cells, the extraction solution was prepared from cheese, yogurt, fermented soybean paste and salt koji were picked out by deionized water and the ethyl alcohol. Food stuff which is exerted on the cells did irradiation of ultraviolet rays was examined in the apoptosis happened to cells, the judgment of the apoptosis was made for the LDH activity. The salt koji was the most effective in 4 kinds of the fermented food. The food ingredient which participate in fermented soybean paste and salt koji was vitamin B1, B6 and glucose. As a result, these mixture experiments showed that vitamin B6 was the most useful and indicated inhibiting the apoptotic cells by ultraviolet irradiation in the 0.1% solution density.

Keywords: 発酵食品 アポトーシス ビタミン B6

諸言

発酵食品は麹菌、乳酸菌、酵母などを食品加工に活用した微生物利用食品で、優れた香りや特徴ある呈味性だけでなく栄養性や機能性についても健康の維持増進への活用が注目されている加工食品である。味噌汁、納豆、漬物、清酒など和食を構成する食品においても発酵食品は重要な食材で、和食の良さを引き立てている。特に麴の作り出す発酵食品には、発酵調味料として独特の旨味や栄養を付与していて、伝統ある加工法の継承も重要である。食育の必要性が求められている現代の食生活で、加工食品の利用において発酵食品の効果的な新しい活用方法が期待される。

食品とアポトーシスに関する一連の研究¹⁾で食品中の成分には、紫外線照射、抗がん剤添加、活性酸素により細胞に生じたアポトーシスを抑制する作用があり、その抑制メカニズムは多くの場合、抗酸化作用によるものであることを報告してきた。

そこで、発酵食品についても紫外線照射等で損傷を受けた細胞のアポトーシスに対して抑制作用を示すのではないかと、この場合も抗酸化作用が大きく関与するのか、関与成分名は何かを探るため、発酵食品の抽出液を用いて、細胞に対する発酵食品のアポトーシスへの影響を調べる実験を行ったところ、興味ある結果を得たので以下に報告する。

方法

1. 試料 発酵食品の中から日常的利用度の高いヨーグルト、味噌、チーズ、塩麴を試料とした。近隣のスーパーにて購入したプレーンヨーグルト、有機米味噌、プロセスチーズ、酒精入り塩麴を精秤して乳鉢に取り、純水を加えて乳棒で摩砕したものを、およびエチルアルコールを加えて同様に摩砕したものを、それぞれ遠沈管に移して 2 種類の抽出液を作り遠心分離 3000rpm、5 分後の上清を試料溶液とした。細胞は、独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク（大阪府）より JCRB9068 を調達した。
2. 試薬 細胞の調整には RPMI-1640 培地（Coming 製）を使用した。LDH 活性測定キットは極東製薬工業（株）、ジエチルアルコール、ビタミン B1、B2、B6、葉酸、グリシン、グルコースの各特級試薬はナカライテスク（株）製を用いた。
3. 器具 滅菌シャーレ（IWAKI 製）、UV ランプ LUV-4（アズワン（株）、クリーンベンチ（SANYO MCV-91BNS）、マイクロプレートリーダー（IWAKI SME3400）、遠心分離機（KUBOTA KN-70）マイクロピペット、電動ビュレットは本学備品の実験器具を使用した。
4. 測定法 クリーンベンチ内で滅菌シャーレに培養液 17m 中に細胞数 6×10^7 個になるよう調整後、味噌、ヨーグルト、チー

ズ、塩麴のエタノール抽出液と純水抽出液を、それぞれ 1ml 加えた。これらに UV ランプで 10 分間照射 $513 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ した。LDH 活性測定には、各シャーレの浮遊液からマイクロペットで正確に $100 \mu\text{l}$ 取ってマイクロプレートに加えた。これに、発色試薬 $50 \mu\text{l}$ を添加して、45 分間反応させた後、反応停止液 $50 \mu\text{l}$ を加えた後、 545nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。1 試験あたり、各 3 回行った。

結果および考察

Fig.1 に示したように、細胞を UV 照射した際に、チーズ、塩麴、味噌、ヨーグルトの純水抽出液を加えた場合、発酵食品を何も加えず同量の純水のみ加えて容量を同一にしたブランクと比べて、 545nm における吸光度は、チーズとヨーグルトで増加し、味噌と塩麴で低下した。本実験による吸光度は、紫外線照射によるアポトーシスが実行された際に生成される乳酸脱水素酵素量を示しており、チーズとヨーグルトは細胞のアポトーシスを却って促進したことを表す。一方、味噌と塩麴は細胞のアポトーシスを抑制し、UV 照射による細胞の損傷を保護する成分が含まれていることを示す。実験した 4 つの発酵食品のうち、塩麴が最も抑制した。Fig.2 では、チーズ、塩麴、味噌、ヨーグルトをエタノールで抽出した場合のアポトーシス抑制反応を調べたもので、いずれも吸光度は発酵食品を加えずエタノールのみを含むブランクより上昇した。

Fig.1 純水で抽出した発酵食品による紫外線照射された細胞のアポトーシスの抑制効果

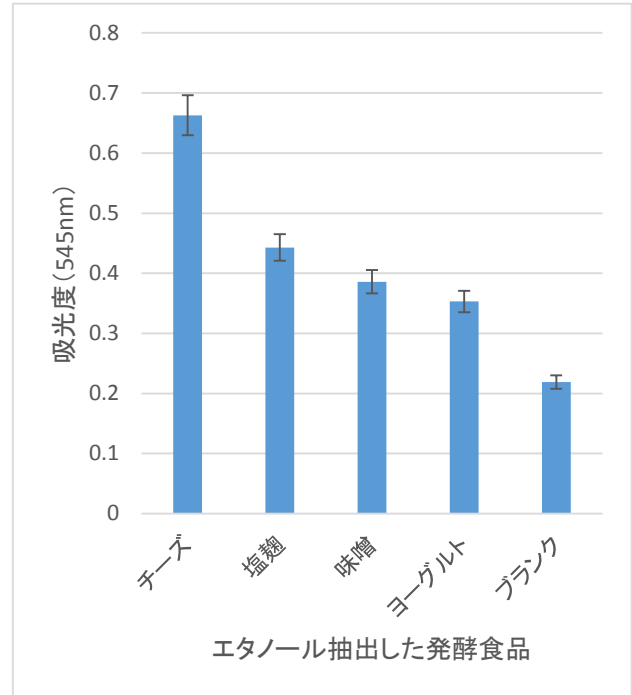
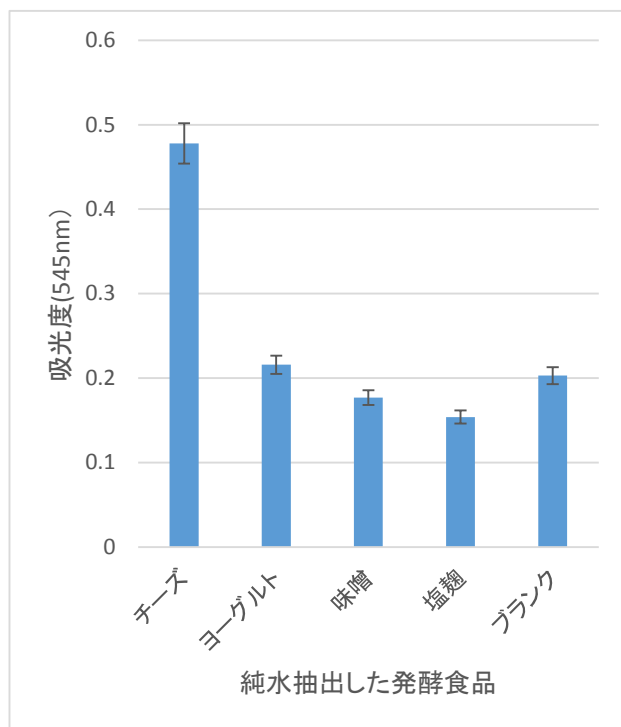


Fig.2 紫外線照射した細胞におよぼす発酵食品のエタノール抽出液の影響

Fig.2 は、水溶性成分以外の食品成分を抽出するために使用したエタノールによる細胞のアポトーシスが進み、期待した発酵食品抽出液中の抗酸化成分による作用を打ち消したと考えられた。そこで、アポトーシスを抑制した味噌と塩麴中の関与成分を調べるため、味噌製造に必要な大豆、米麴、食塩、塩麴製造に欠かせない食塩、米麴、さらに、日本標準食品成分表による味噌と塩麴の主な含有成分であるグリシン、グルコース、ビタミン B1、B2、B6、葉酸を純水に 1% 溶液になるようそれぞれ調製した。Fig.1 の実験と同様の手順で、紫外線照射した時の細胞の LDH 活性を測定した結果を比較して Fig.3 に示した。

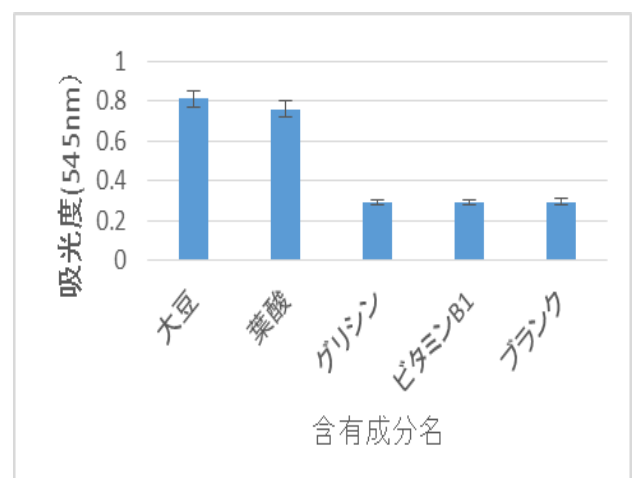


Fig.3 味噌と塩麴を構成する食品および成分による紫外線照射された細胞のアポトーシスへの影響

アポトーシスに関する研究 (9) 発酵食品がアポトーシスに及ぼす影響

その結果、ビタミン B2 は、その黄色色素の影響により比色分析できなかった。大豆と葉酸は予想に反してブランクより増加した。その他の成分は、グリシン、ビタミン B1、B6、米麴、グルコース、食塩でブランクより低値を示した。そこで、同実験を 492nm で再度測定したところ、ビタミン B1、B6、グルコースの 3 種類の成分は、ブランクより明らかに低値を示すことがわかった。とりわけ、ビタミン B6 で有意な抑制を認めた。

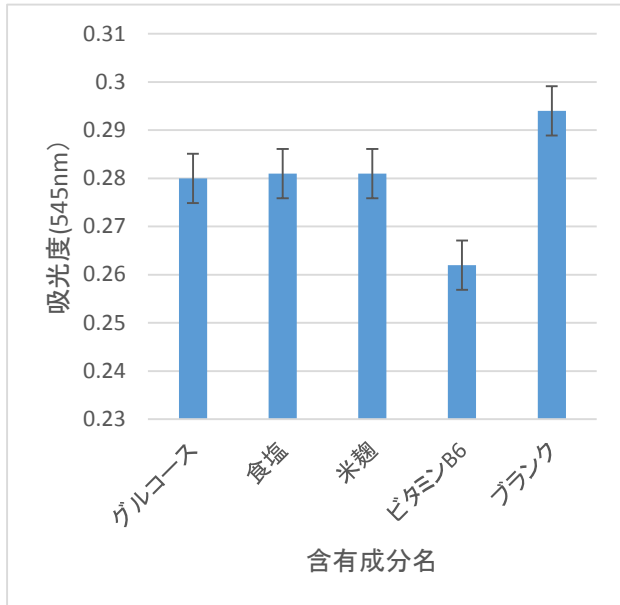


Fig.4 味噌と塩麴の含有成分による紫外線照射された細胞のアポトーシスへの影響

次いで、Fig.3 と Fig.4 の実験結果からビタミン B1、B6、グルコースの 3 種類の成分の影響を調べるため、ビタミン B6 とグルコースの 1% 溶液を 1 : 1、1 : 2、2 : 1 の濃度の異なる 3 種類の混合液を調製した。また、ビタミン相互作用による影響を調べるため、ビタミン B1 と B6 の 1% 溶液で 1 : 1、1 : 2、2 : 1 の 3 種類の混合液を調製して、紫外線照射された細胞に及ぼす影響について測定した。

Fig.5 と Fig.6 の結果より、ビタミン B6 が多く含まれるほど吸光度は低値を示す傾向が認められた。ビタミン B6 とグルコースの間では、アポトーシス抑制割合に対し相乗効果は見られなかった。また、ビタミン B6 と B1 の間では、ビタミン B6 とグルコースの混合系より低値を示す傾向にあったが、同様に相乗効果は見られなかった。むしろ、ビタミン B6 にグルコースやビタミン B1 を混ぜることにより、B6 のアポトーシス抑制効果が抑えられる傾向を示した。

ビタミン B6 によるアポトーシス抑制効果と濃度依存性を調べるため、0.001、0.01、0.1 g/100ml の水溶液を調製して、紫外線照射された細胞に及ぼす影響について測定した。0.001 と 0.01% 濃度では抑制する効果は小さかったが、0.01% 溶液では、有意な差異が見られた。

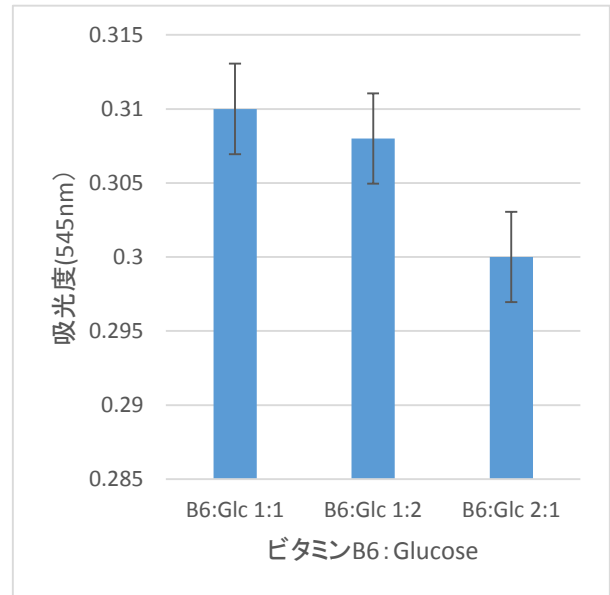


Fig.5 ビタミン B6 とグルコースの混合系におけるアポトーシス抑制効果

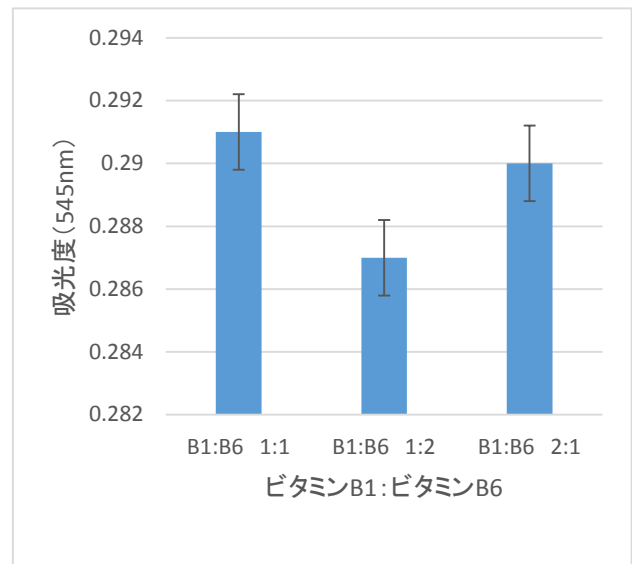


Fig.6 ビタミン B1 とビタミン B6 の混合系におけるアポトーシスへの影響

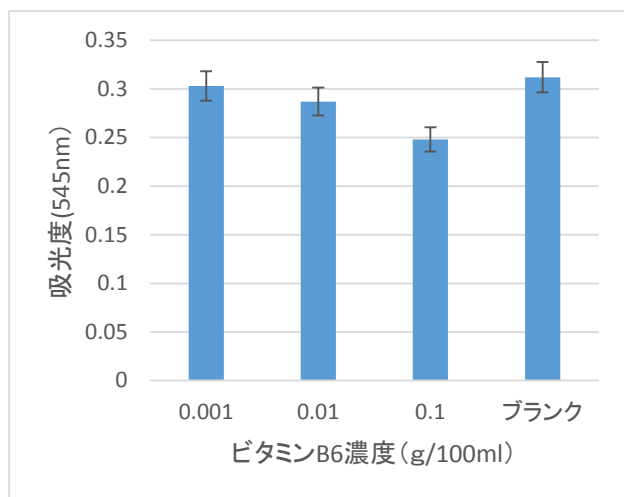


Fig.7 ビタミン B6 によるアポトーシスへの抑制効果

味噌の成分は、種類により大きく異なる。また、同一の種類でも、原料配合、原料処理、熟成方法と期間、発酵微生物などにより異なる。²⁾ 味噌のたんぱく質、ペプチド、アミノ酸は、穏やかな旨味があり味をまろやかにする。炭水化物の糖は、麴の割合の高い味噌ほど甘味が強い。²⁾ 発酵食品は種類によっても反応性が異なることが考えられる。

新しい加工食品として、特別な機能性をもつ素材や食品の品質改良に利用される素材が既に産業界で活用されている。³⁾ 新規に開発された食品素材だけでなく、伝統的な麴を使用した加工食品の中にも新たな機能性があることが示唆される。新しい知見をもとに、加工食品を活用した食育や健康効果について提案していきたい。

要約

健康に良いと言われている発酵食品が細胞のアポトーシスに及ぼす影響を調べるため、チーズ、ヨーグルト、味噌、塩麴を純水で抽出した溶液とエチルアルコールで抽出した溶液を調製し、紫外線照射された細胞に及ぼす影響について実験した。アポトーシスの判定には、細胞にアポトーシスが起これると生じる LDH 活性を指標にした。4種類の発酵食品のうち、アポトーシス抑制効果のある発酵食品は、味噌と塩麴で、特に塩麴が最もアポトーシス抑制効果があった。そこで、味噌と塩麴に共通する食品材料や成分を調べ、味噌や塩麴の製造に必要な大豆、米麴、食塩、グリシン、グルコース、ビタミン B1、B6、葉酸の各水溶液を作り、紫外線照射された細胞のアポトーシス抑制割合を比較した。その結果、ビタミン B1、B6、グルコースで抑制が見られた。これらの混合実験により、ビタミン B6 が最もアポトーシス抑制に効果的であり、0.1%溶液濃度で抑制効果を示すことがわかった。

謝辞

本研究は、岐阜市立女子短期大学 食物栄養学科の食品学研究室に所属した小島歩波さんはじめ卒研生との共同研究によるものです。一所懸命に実験に取り組んでくださった卒研生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 道家晶子 アポトーシスに関する研究 (8) 加工によるアポトーシスへの影響 p.69-71 岐阜市立女子短期大学研究紀要 第59輯 2009年
- 2) 発酵食品学 小泉武夫編書 pp211 講談社 2012年発行
- 3) 初心者のための食品製造学 中島一郎著 pp.239-242 光琳 2009年発行

(提出日 平成27年1月9日)