

# ヒトにおけるSOS応答生理機能の創成に基づく味噌ないし麹 による遺伝子を守る効能の発見

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者	鈴木, 信夫 姜, 霞 喜多, 和子 菅谷, 茂
巻/号	106巻12号
掲載ページ	p. 801-810
発行年月	2011年12月

# ヒトにおける SOS 応答生理機能の創成に基づく味噌ないし麹による遺伝子を守る 効能の発見—被曝に対する防護策を求めて—

人間の細胞は、日常多くのストレスや変異原となる外界刺激に曝されている。細胞は、ストレスや変異原の強度によって、ダメージを修復し再生したり、アポトーシスの経路に進むと推測されている。近年、太陽からの紫外線や放射線の被曝が注目されているが、これらもヒト細胞の遺伝子に変異を引き起こす原因である。本解説の著者は、長年にわたって変異原に対する細胞の応答を研究してこられ、遺伝子変異にかかわる細胞の SOS 応答を明らかにしてきた。ここでは、味噌や麹の発酵食品の成分が、放射線をはじめとする変異原によって引き起こされる遺伝子変異の発生を抑制し、ガン化等の誘発を阻止する機能を持つことについて、研究成果をまとめていただき、発酵食品の有用性についての期待と展望について解説していただいた。

鈴木信夫・姜 霞・喜多和子・菅谷 茂

## 1. はじめに

「ヒトインターフェロンを被曝者へ投与したいのですが、よろしいですか？」この質問は、チェルノブイリ原発事故後に、筆者（鈴木）へ投げかけられたものである。旧ソ連邦保健省の人々が、来訪して問いかけられたもので、放射線による細胞死や癌化の原因となる遺伝子変異をヒトインターフェロンが抑えることを見出していたこと<sup>1-3)</sup>に対する懇願でもあった。しかしながら、当時、抑制という現象論のみの発見であったことから、「生命科学的には、対被曝への有効な方策であるかは不明である。」と答えるのみであった。

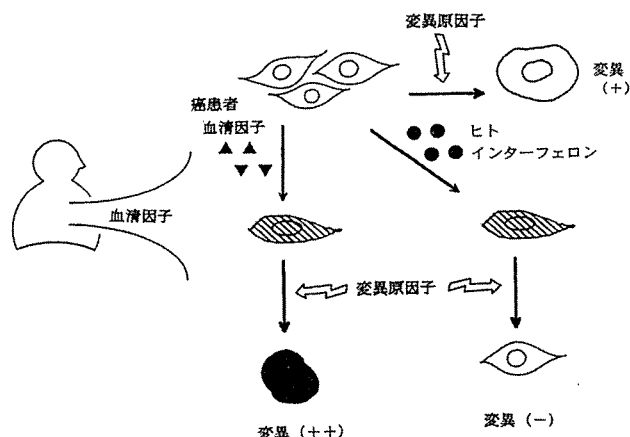
爾来、約 30 年間。ようやく、抑制の分子メカニズムが判明しつつあり、特に、シャペロン分子類の関与が特記すべきことである。GRP78 や HSP27 が細胞外からのシグナルに応じ、変異の発生を抑えるように働くことが出来るというメカニズムである<sup>4)</sup>。そこで、本論では、そのシャペロン類の代謝を基点に、ヒトにおける変異発生抑制という生理機能を高める効能を、

味噌や麹菌の製品について検証することとした。

上述したように、著者らは、紫外線 (UVC) や X 線、あるいは、変異原性化学物質などにより遺伝子における DNA 構造の異常 (変異) が誘導される際、その誘導感受性を抑制する生理機能が存在することを見出している (第 1 図)。ところが、癌患者の血液中には、変異の発生を促進する因子も存在する (第 1 図)<sup>4)</sup>。即ち、ヒト細胞における変異誘導の際、その誘導の有無や変異頻度は、血液中のサイトカイン様因子により変異原因因子曝露前にあらかじめ調節されているのである。そのような変異誘導の抑制や増強のレベルは、詳細は省略するが、胸部 X 線診断の際の被曝直後にも変動するらしいのである。

以上のような、変異の発生を抑制あるいは促進しようとするヒト生理機能を SOS 応答と称している<sup>5)</sup>。この SOS 応答の原型は大腸菌などの試験管内実験システムで提案されたものであるが、ヒトにおいても存在することが複数の研究者らにより提案されている。しかし、ヒトにおける実体は不明のままであった。過

Findings of Gene Protection by Japanese Miso and/or Koji based on Creation of Human Physiological Functions, SOS Response – to Search for Radio-protective Methods –  
Nobuo SUZUKI, Xia JIANG, Kazuko KITA and Shigeru SUGAYA (Department of Environmental Biochemistry, Graduate School of Medicine, Chiba University.)



第1図 ヒト個体を構成する細胞では、変異の誘導をインターフェロンが抑制し、癌患者血清因子が増強させる。

去に大腸菌における SOS 応答の実証に成功した筆者らは<sup>6)</sup>、その後、約 30 年間ヒト個体や培養ヒト細胞における実験システムと新しい種々の方法を開発することにより、ヒトにおける SOS 応答の存在を報告してきている<sup>5,7)</sup>。

SOS 応答機能は、次の骨格過程に基づくもので、変異を起こしてまでも細胞の生存を計るべきか、それとも細胞死を誘導させるべきかという選択機能である：①ヒトのストレス状態→②サイトカインなどの血清因子の血液中でのクロストーク状態→③プラスミノーゲンアクチベーター (PA) や他のプロテアーゼの一過的活性化を伴うシャペロン分子などの発現誘導→④細胞核外のシャペロン結合分子の核内への移動→⑤ DNA 修復などの核酸代謝にかかわる分子の核内作用の変動という過程である。②の過程では、シャペロンやシャペロン結合分子で細胞外へ放出されるものもあり、オートクライン・パラクライン的に、③以降の過程に関与するらしい。

本研究では、変異発生抑制スーパーバイザー役のシャペロン類に着目して、味噌食品と麹素材に対する SOS 応答における調節機能の探索を培養細胞レベルで行う。味噌食品に変異の発生を抑制するとの示唆は、従来、ヒトにおいてはなく、サルモネラ菌を用いるエームテスト法などにおいての報告がある<sup>8)</sup>。その上で、ヒトへも変異原活性を抑制すると演繹しているものである。従って、ヒト体内での変異発生を抑制するという SOS 応答機能に基づく抑制作用の発見はこれまでにない。

## 2. 味噌サンプルの添加効果測定法の開発

まず、標記の研究の遂行上、以下のように各々の実験方法を設定した。

### (1) 実験材料

味噌製品は、36 製品を中央味噌研究所より提供されるか、製造元で直接購入することにより入手した。各製品は、No.1 より No.36 まで、Miso の M という字を添えて番号にて記載することとした。麹菌種は、秋田今野商店より提供され、1 より 10 までの番号付けで記載することとした。抗 HSP27 抗体は、広島大学の細谷先生より分与して頂いた。その他の抗シャペロン抗体はサンタクルズ社より購入した。

培養ヒト細胞は、千葉大学医学部微生物学教室桑田次男先生らによりヒト胎児由来線維芽細胞から樹立された RSa 細胞株を使用した。このヒト RSa 細胞は高頻度の変異誘発が可能な株である<sup>1-3)</sup>。

基本最小培地 (MEM) は日水製薬株式会社より、仔牛血清 (CS) は、Invitrogen 社より購入した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体およびエンハンストケミルミネッセンス (ECL) ウェスタンブロット検出液は、GE-Healthcare 社より購入した。その他の化学試薬類は、和光純薬より購入した。

### (2) 細胞培養液に添加する味噌試料の調整法

味噌類あるいは米麹、麦類、および大豆麹におけるサンプルの調整は、10g を 20ml 蒸留水 (MilliQ 水) に溶解させた。次に、90℃ で 5 分間処理し、さらに、

4℃, 1780 × g 10 分間遠心し, 上清液を採取した。採取液は, 3 回過減菌後, - 20℃に保存し, 各々の試験の際, 解凍し使用した。各試験では, 解凍溶液を細胞培養用シャーレ中の培養液へ添加した。各シャーレにおける添加量は, 培養液の容量に対する添加容量の百分率 (% v/v, volume per volume) で示した。

### (3) 細胞培養法

細胞の培養は, 既報<sup>1-4)</sup>の方法に準じて行った。即ち, R5a 細胞は, 5% (v/v) の CS を含む MEM 培地中で, 95% 空気 /5% 炭酸ガス, 37℃ の条件下で, 炭酸ガスインキュベーター中で培養, 継代を行った。また, 細胞のサンプル液処理は, MTT アッセイを除いて, 次のように行った。直径 60mm のシャーレに  $5 \times 10^5$  個の細胞を撒き, 24 時間培養した。翌日, 味噌サンプル液をシャーレに添加し, さらに 24 時間培養した。

### (4) 細胞毒性テスト法

細胞の生存能を阻害する毒性を検出するために, 既報<sup>9)</sup>の方法に準じて, MTT 法の改変法で検証した。即ち, 96 穴培養プレートを用い, 1 穴中に  $5 \times 10^3$  個の R5a 細胞を, サンプル液と 5% CS を含む MEM 培地 100 $\mu$ l 中で 48 時間培養した。培養後, ピペットで培地を注意深く取り除き, 穴を 150 $\mu$ l の PBS で 1 回洗浄した後, 100 $\mu$ l の 1% グルタルアルデヒド /PBS を加えて室温で 15 分間インキュベートし, 細胞をプレート底面に固定した。グルタルアルデヒド溶液を除去後, 100 $\mu$ l の 0.1% クリスタルバイオレット染色液を加え, 室温で 30 分間インキュベートし, 細胞を染色した。染色液を除去後, 培養プレートをよく水洗し, 乾燥した後, 100 $\mu$ l の 0.2% (v/v) Triton-X100 水溶液を加えて一晩放置し, 固定化細胞に沈着した染料を溶出させた。翌日, マルチプレートリーダー E-max を用いて, 595nm の吸光度を測定し, 味噌サンプル液未処理の細胞における測定値と比較した。

### (5) シャペロンタンパク量の解析法

細胞が含有するシャペロンの量を既報<sup>4)</sup>に従いウエスタンブロッティング法により解析した。即ち, サンプル液で処理した R5a 細胞を, PBS で洗浄の後, 適量の SDS- サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 10% (v/v) グリセロール, 0.001% プロモフェノールブルー, pH 6.8) で溶解した。溶解液を 95℃ で 2 分間加熱し,

これを SDS- ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 試料液とした。この試料液を, 10% アクリルアミド濃度ゲルにて電気泳動を行い, タンパク質を PVDF 膜に転写した。転写後, 膜を 0.1% (v/v) Tween 20 を含む緩衝液 (TBS-T, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.5) で洗浄し, 5% スキムミルク -TBS-T 中にて室温で 1 時間インキュベーションを行った。次いで, 膜を 5% スキムミルク -TBS-T で適当量希釈した 1 次抗体液中で, 室温で 1 時間インキュベーションした。膜を TBS-T で洗浄後, 5% スキムミルク -TBS-T で適当量に希釈した HRP- 標識二次抗体中にて, 室温で 1 時間インキュベーションした。さらに, 膜を TBS-T で洗浄後, ECL 検出液に 1 分間浸した。酵素反応で生じた発光強度を X 線フィルム上に感光させ測定した。タンパク質の細胞含有量 (発現量) は, フィルム上の目的バンドの黒化度をイメージ解析ソフト (Multi Gauge ver 2.2, 富士写真フィルム) を用いて測定した。

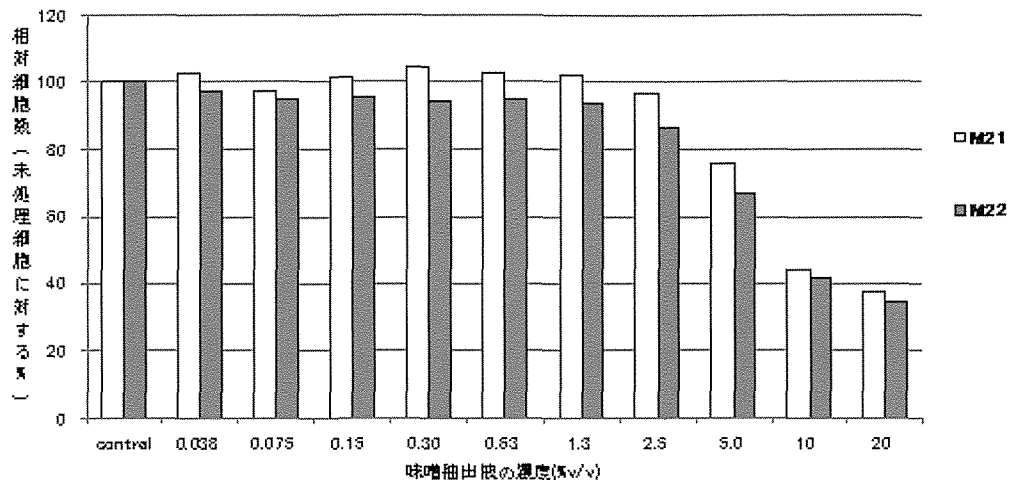
以上の方法により, 次の変異解析へと実験を進めるための検討結果が以下のように得られた。

#### 1) 細胞生存を阻害しない味噌サンプルの添加濃度

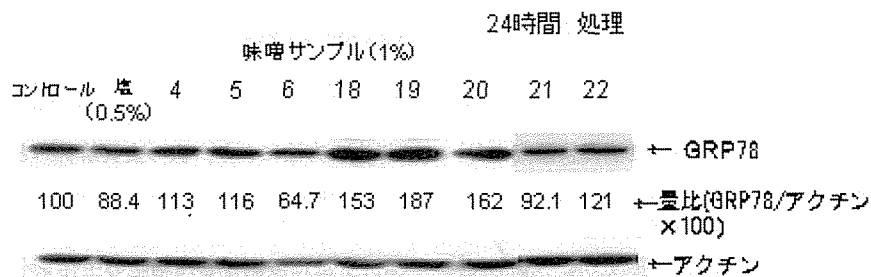
MTT 法にて測定した細胞の生存レベル (非添加の場合の生存レベルを 100% として比較) から, 培養液中へ味噌サンプルを 48 時間添加したままにしておくと, 第 2 図で M21 と M22 の例を示すように, サンプル濃度が 10% 以上で, 半数以上の細胞の生存能力が阻害された。M21 と M22 のサンプル以外でも, おしなべて, 2.5% (味噌重量の濃度が 12.5mg/ml) までは増殖阻害が顕著に見られなかった。そこで, 原則として 2% 以下の添加量において以下の検討をすることとした。

#### 2) 味噌サンプル液の添加によるシャペロン量の解析

味噌サンプル 24 時間処理によるシャペロンタンパク類における細胞含有量の変化をウエスタンブロット解析により調べた。味噌サンプル処理 24 時間後の細胞含有量を非処理の細胞含有量と比較した。第 3 図で M4 他 7 サンプルの処理による GRP78 の細胞含有量を示すように, 複数のサンプルで顕著な増量を誘導した。調査した 36 の味噌サンプルにおいて, 調査シャペロンのいずれかでコントロールに対して 1.4 倍以上に増大していたものは, 18 サンプルであった (第 1 表)。特に, 対紫外線応答において DNA 修復レベル



第2図 味噌抽出液(M21-M22)の細胞生存への影響



第3図

を上昇させることを見出している GRP78 あるいは HSP27 については、それらのシャペロン量を増大化させる味噌サンプルが 16 種見出された (第1表)。

### 3. 紫外線誘発変異の抑制

変異発生を検討するための実験方法は、次の各々の方法により設定した。

#### (1) 紫外線 (UVC) 照射法

細胞の紫外線 (UVC) 照射は既報<sup>14)</sup>の方法に従い、次のように行った。シャーレより培地を取り除き、phosphate buffered saline (PBS) で1回洗浄した。次いで、約 1 J/m<sup>2</sup> 秒の UVC を 6 秒間照射し、直ちに 5% (v/v) の CS を含む MEM 培地を加え、48 時間培養した。対照細胞を得るには、紫外線照射のみせず、培地の除去、PBS による洗浄を照射細胞での操

第1表 味噌処理細胞におけるシャペロン類の量

味噌サンプル番号	細胞内量(未処理コントロール)に対する比率			
	GRP94	GRP78	HSP90	HSP27
M1	-	-	-	-
M2	-	-	-	-
M3	-	-	+	-
M4	-	-	-	-
M5	-	-	-	-
M6	-	-	-	-
M7	-	-	-	-
M8	-	-	-	-
M9	-	-	-	-
M10	-	-	-	-
M11	-	-	-	-
M12	-	-	-	+
M13	-	-	-	-
M14	-	-	-	+
M15	+	-	-	+
M16	-	-	-	+
M17	-	-	-	+
M18	-	-	-	+
M19	-	+	-	+

味噌サンプル番号	細胞内量(未処理コントロール)に対する比率			
	GRP94	GRP78	HSP90	HSP27
M20	-	+	-	+
M21	-	-	-	-
M22	+	-	-	-
M23	+	+	-	-
M24	-	-	-	-
M25	+	+	-	-
M26	-	-	-	-
M27	-	-	-	-
M28	+	+	-	+
M29	+	+	-	+
M30	+	+	-	+
M31	+	+	-	+
M32	+	+	-	-
M33	+	+	-	-
M34	-	-	-	-
M35	-	-	-	-
M36	-	-	-	-

(+, 対コントロール比が1.4倍以上; -, 上昇なし)

作と同様に行った (Mock 処理細胞)。

(2) 薬剤 (ウアバイン) 耐性を指標とした形質変異頻度の測定法

細胞の形質変異頻度を既報<sup>10)</sup>のウアバイン耐性化試験法にて測定した。細胞毒性を与えない条件で、サンプル液を添加した培養液にてRSa細胞の培養を24時間行った。その後、紫外線照射を行い、ウアバイン耐性に変異した細胞の出現頻度を測定した。ウアバインは細胞毒であるが、その結合標的分子であるNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの構造遺伝子の上で塩基置換などの変異が生じてタンパク構造上に異常が生じた場合、ウアバインが結合できなくなり、ウアバイン存在下でも細胞は生存可能となり、コロニーを形成するという原理を利用している。

UVC照射後またはMock処理後48時間の細胞を直径90mmの新しい培養シャーレに8×10<sup>4</sup>細胞/シャーレで撒きなおし、翌日より0.8μMのウアバイン存在下で2週間培養を行った。シャーレ中の細胞コロニーを0.2%メチレンブルー/30%メタノール液で染色の後、100細胞以上に集団化したウアバイン耐性コロ

ニーの数をカウントした。同時に、別途、直径90mmの培養シャーレに800細胞/シャーレで細胞を撒き、2週間培養の後、コロニー数を計数し、コロニー形成率を求めた。各々のサンプルについて、4枚のシャーレを用い、4枚の平均値を求めた後、次式により変異コロニー出現頻度を求めた。

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

(3) 遺伝子変異の解析法

既報<sup>11)</sup>に従い、遺伝子変異解析のために、K-ras遺伝子をゲノムPCRにより増幅後、ナイロンメンブレンへdot-blotし、DIGラベルK-rasコドン12変異プローブにより塩基置換変異を検出した(differential dot-blot hybridization)。即ち、UVC照射処理、またはMock処理した細胞を処理後4日間培養した。次いで、Sambrookらの成書<sup>12)</sup>に記された方法に従って、細胞よりDNAを抽出し、エタノール沈殿した後、TEバッファー(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解した。これを鋳型DNAとし、プライマー5'-GACTGAATATAAACTTGTGG-3'および5'-

CTATTGTTGGATCATATTCG-3' を用いて、K-ras 遺伝子のコドン12近傍をPCR増幅した。PCR産物をアガロース電気泳動で分離・精製し、ドットブロッター（バイオラッド社製）を用いてナイロン膜上にスポットした。ナイロン膜上の変異DNAは、K-ras コドン12変異型遺伝子に特異的に結合するオリゴヌクレオチドの3'-末端をジゴキシゲニン-11-dUTPで標識したプローブ（変異プローブ）とハイブリダイゼーションを行った後、アルカリフォスファターゼ-標識抗ジゴキシゲニン抗体と基質5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸を用いて検出した。オリゴヌクレオチドの標識、抗体および基質は、DIG核酸検出キット（ロシュダイアグノーシス）を使用した。変異DNAを検出する変異プローブにおけるオリゴヌクレオチドは、5'-GTTGGAGCTAGTGGCGTAGG-3'、5'-GTTGGAGCTCGTGGCGTAGG-3'、5'-GTTGGAGCTGCTGGCGTAGG-3'、5'-GTTGGAGCTGATGGCGTAGG-3'、5'-GTTGGAGCTGCTGGCGTAGG-3' および5'-GTTGGAGCTGTTGGCGTAGG-3' の6種類を等量混合したものを使用した。変異型DNA検出の陽性コントロールとして、SW480細胞より抽出したゲノムDNAを鋳型として増幅されたDNAを用いた。なお、Taq DNAポリメラーゼと検出キットはタカラバイオより購入した。

#### (4) siRNA (small interfering RNA) 導入による遺伝子発現抑制法

既報<sup>(13)</sup>の方法に従い、GRP78遺伝子のsiRNAは、各々のmRNAの塩基配列を基に合成されたものを購入した。また、コントロールとして、GRP78およびHSP27 siRNAとGC含量が同じで塩基配列がランダムなsiRNAをnegative control siRNAとして使用した。これらのsiRNAを遺伝子導入用試薬Lipofectamine 2000とよく混合した後、130nM濃度になるようにOPTI-MEMメジウムで希釈し、RSa細胞と5時間インキュベートした。その後、siRNA含有メジウムを除き、5% (v/v) の牛血清を含むMEM培地に換え、2日間培養した。遺伝子発現抑制の効果に関わる確認はウエスタンブロット法により行った。

以上の解析方法により以下の結果が得られた。

##### 1) ウアバイン耐性化形質変異による解析

RSa細胞における紫外線によるウアバイン耐性化形質変異の誘発頻度が、紫外線照射前に味噌サンプル液を培養液へ添加しておく、非添加の場合より低下が見られたものは、調査した11種のうち、8種のサンプルであった（第2表）。

##### 2) ドットプロットによる解析

紫外線照射で誘発されるK-rasコドン12の変異をドットプロット解析により調べた。このアッセイでは、細胞より抽出したDNAにおける変異の頻度が高くなると変異プローブの結合量が増加し、ドット

第2表 味噌処理細胞における変異発生の調節効果

味噌サンプル番号 (a)	薬剤耐性形質変異の抑制 (b)	がん遺伝子塩基置換変異 (c)
M1	未	±
M2	±	++
M3	+	++
M4	+	±
M5	+	+
M6	未	-
M12	+	+
M13	未	±
M14	-	-
M15	未	±
M16	未	-
M17	+	-

味噌サンプル番号 (a)	薬剤耐性形質変異の抑制 (b)	がん遺伝子塩基置換変異 (c)
M18	-	-
M19	+	+
M20	+	++
M21	未	++
M22	未	+
M23	+	++

- (a) ○：シャペロン量の増大（1.4倍以上）有り  
 (b) +：変異頻度が低下，-：変異頻度が不変，未：実験未実施  
 (c) 図4の判定法による抑制度のレベル

トの発色が濃くなる。変異頻度が低くなると結合量が低下し、発色が淡くなる。黒く示されるドットが変異の発生を示し、灰白のドットへと変じれば、変異が検出できなくなり、変異の発生が抑制されたことを示す（第4図）。調査した18種の味噌サンプルで、紫外線誘発変異が抑制されたと判断されたものは、9種の味噌サンプルであった（第2表）。

**味噌サンプルによるK-ras変異の抑制**  
+ UVC



**第4図** 一番左のドットは、紫外線(UVC)照射RSa細胞より抽出したDNAにおけるドットプロット解析の結果を示し、左側二番目からのドットは、味噌サンプル添加後のUVC照射の場合、ドットの色が淡いほど変異の発生が抑制されたことを示す。

3) シャペロンを介する変異発生の抑制に関するsiRNAによる検証

味噌サンプルによるシャペロン量の増大と変異発生の抑制に因果関係のあることを、M19、およびM20の味噌サンプルに関して、siRNAを用い調査した。2サンプル共に、GRP78遺伝子のsiRNA処

**第3表** GRP78量とUVCによる変異誘発頻度との連動性

siRNA 処理	味噌サンプル処理	GRP78 量	変異誘発頻度
-	+	増加	減少
+	+	減少	増加
+	-	減少	無変動

**第4表** 米麴素材によるシャペロン量の増大と変異発生の抑制

米麴素材	GRP78 量	薬剤耐性形質変異頻度	がん遺伝子塩基置換変異頻度
M5 用	増大	低下	低下
M19-20 用	増大	低下	低下
M23 用	増大	低下	低下

理により、GRP78 シャペロン量がコントロールsiRNA 処理細胞における量の約半分へと減少すると、上述の形質や遺伝子レベルでの検査法による変異発生頻度は増大した（第3表）。この場合、たとえ味噌サンプルで処理しても、もはや、変異発生の抑制も見られなくなった（第3表）。

**4. 麹菌による変異発生抑制の可能性**

紫外線による変異誘発の抑制効果が見られたサンプルにおいて、No.17の豆味噌以外の10サンプルが米麴味噌であった。そこで、原料素材である米麴について、味噌と同様のサンプル調整を行い、変異発生への

**第5表** 麹菌株サンプルの処理によるRSa細胞でのシャペロンの発現量

麹菌株 No.	米麴	麦麴	大豆麴	シャペロン発現量の増大化	
				GRP78	HSP27
1	○	○	○	-	-
2	○	○	○	-	-
3	○	○	○	+	+
4	○	○	○	-	+
5	○	○	○	-	-
6	○	○	○	-	-
7	○	○	○	-	+
8	○	○	○	-	+
9	○	○	○	-	+
10	○	○	○	-	++

(+; 対コントロール比が1.3倍以上, ++; 1.5倍以上)



効果を2社の製品で調査した。形質と遺伝子レベルのどちらでも、すべての米麴で、変異発生の抑制効果が見られた(第4表)。次に、別途、10種の菌株による米麴、麦麴、あるいは大豆麴の製品に関しても味噌と同様のサンプル調整を行い、細胞内シャペロン量の変動効果を調査した。GRP78あるいはHSP27の発現量を増大させるものが、それぞれ1種と6種見出された。特に、No.8、No.9およびNo.10で、HSP27の発現量の増大化が、米、麦および大豆のいずれの麴でも顕著であった(第5表)。従って、米麴味噌も含め、味噌による変異発生の抑制には、使用される麴菌株の種類が左右するとの示唆が得られた。

## 5. 考察

今回の試験では、まず、36種の味噌製品について、変異の発生に関わるシャペロン量を解析するという方法により、ヒトRSa細胞における紫外線照射による変異誘導に及ぼす影響を調査した。変異の発生を検討するには、多大な労力と時間等がかかる。そこで、その検討作業の前に、目的とする味噌の効能の有無を検索することとした。次に、変異をOua<sup>R</sup>と*K-ras*コドン12塩基置換変異で検出した。第2表で示したように、変異検査に関して調査した18種の味噌製品の中で、4種のシャペロンのいずれかの量を増大させるなどの変動を促し、しかも、変異を抑制することが示唆されたものは、7製品であった。

今回の調査シャペロンで、GRP78とHSP27を注視したことには、次のような理由がある。SOS応答機能が発揮される起点には、プロテアーゼの活性化があると予測される。そのプロテアーゼとしては、プラスミノゲンアクチベータ様活性を想定している。この活性化を指標とし、ヒト末梢血液中のリンパ球系細胞や培養ヒト細胞での活性調節因子を探すと、GRP78とHSP27が見出された<sup>14)</sup>。活性化レベルと2種シャペロンの発現量が共に遺伝子DNAの修復レベルと正の相関を示すことから、この2種のシャペロン量が、味噌や麴における効能のスクリーニングに使われてもよいとしたのである。

味噌処理時間については、24時間と設定した。インターフェロンによる変異発生抑制の発揮に6時間以上を要すること、および、24時間前後が至適であることを見出していることによる<sup>15)</sup>。Oua<sup>R</sup>計測法では、

紫外線照射48時間後における増殖可能な細胞の割合についてコロニー形成率を指標として調べたが、紫外線照射前の味噌サンプル液の2% (v/v) 以下での処理は、コロニー形成率に影響を及ぼさなかった。その上で、Oua<sup>R</sup>をもたらすNa,K-ATPase遺伝子と*K-ras*コドン12の両遺伝子を阻止すると考えられる味噌サンプルは、6種が見出された(第2表)。

通常、変異の発生は極めて低頻度であることから、本研究では、その発生頻度を上昇させ、検知しやすくしている<sup>16)</sup>。また、変異誘導因子としては、直接、細胞核内のDNAに傷害を与え得る紫外線(UVC)を使うこととしている。生物の進化を考える上でも、対紫外線応答を調節する味噌や麴の効果は意味深長といえる。成分としての化合物には多種多様なものが知られているが<sup>8)</sup>、既に、4-hydroxy-2 (or 5) -ethyl-5 (or 2) -methyl-3 (2*H*) -furanone (HEMF) は、GRP78を介して変異発生を抑制する事を見出してある<sup>17)</sup>。また、第5表に示した麴菌株以外でも、多様な条件下で発酵させた場合、GRP78やHSP27のシャペロンにおける細胞内量の増大化が見られている(未公表結果)。一方、調査した味噌サンプルには、シャペロンの細胞内量の増大をもたらしたが、塩基置換変異の発生における抑制効果が認められなかったものもあった(第2表)。他種の遺伝子の変異形式に関して調査する必要がある。

シャペロンタンパクおよびその関連タンパクの細胞内量に変異誘発頻度に影響を及ぼすと考えられるが、今回、6製品(M2,M14,M15,M16,M18およびM21)の結果では、明瞭な関連性は見出せなかった。ただし、GRP78やHSP27以外の複数のシャペロン種の量が増加する傾向にあること(未公表結果)より、それらシャペロンタンパクの複合作用が塩基置換の変異抑制効果を相殺することに結びついた可能性もあり、その精査も今後の課題である。実際、SOS応答の初段階におけるプロテアーゼの活性化反応では、サイトカイン類によるフィードバック作用が顕著に見られる(未公表結果)。今後探求すべき命題が多岐にわたると予測される。

## 6. まとめ

ヒト個体において、遺伝子情報保持に関わる生理機能(SOS応答)があることを対放射線ストレス応答

の研究から見出している。その応答機能における細胞レベルでのかぎとなるものはシャペロンであり、GRP78やHSP27がある。それらの分子シャペロン類の細胞内量を、培養ヒト細胞RSaを用い、ウェスタンブロット法で測定した。36種の味噌食品を蒸留水(MilliQ水)に溶解させ作製した味噌サンプル液を用い、細胞死を誘導させない濃度(細胞培養液量に対し2%以下)で、48時間以内の処理をしたRSa細胞より、タンパク試料を得て測定した。GRP78とHSP27のいずれかの細胞内量を増大化させるサンプル16種が見出された。次に、サンプル液処理RSa細胞で紫外線(UVC)により誘導される変異の頻度が低下することを、ウアバインの致死作用に対する耐性化(Oua<sup>R</sup>)を指標とする形質変異検出法と*K-ras*癌遺伝子におけるコドン12の塩基置換をドットプロットハイブリダイゼーション法により検出する遺伝子変異検出法で検証した。11種のサンプルで、変異発生を抑制することが示唆され、その内の6種では調査シャペロンの量的増加が連動した。10種の麹菌株それぞれを米麴、麦麴、および大豆麴化した後、水溶液サンプルを調整し、味噌サンプルと同様の処理をし、RSa細胞におけるシャペロン量の変動値を計測した。増大化させるもの6種を見出した。一方、味噌サンプル液により増加したGRP78の発現量をGRP78遺伝子のsiRNAにより低下させると、変異発生の抑制は見られなかった。従って、シャペロンなどの細胞内分子を介して、米麴、麦麴、あるいは大豆麴の成分によりヒト細胞における変異の発生を抑制するという機能が示唆された。

## 7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、墨谷葉子さんに実験の補助をしていただいた。また、中央味噌研究所、および同研究所の中野京子様、加藤妙子様、小川由高様、小畑圭秀様らに多くのご示唆と種々のご支援をいただいた。さらに、味噌製造の各社に味噌製品や原材料の素材を、また、今野宏様より麹菌株類を快くご提供いただいた。深く感謝を申し上げたい。  
(千葉大学大学院医学研究院環境影響生化学)

## 参考文献

- 1) Suzuki N., Suzuki H.: Suppression of UV mutagenicity by human interferon. *Mutat. Res.* 202, 179-183, (1988)
- 2) Isogai E., Suzuki N.: Involvement of antipain-sensitive protease activity in suppression of UV-mutagenicity by human interferon- $\alpha$ . *Mutat. Res.* 325, 81-85, (1994)
- 3) Suzuki N., Suzuki, H.: Suppression of saccharin-induced mutagenicity by interferon- $\alpha$  in human RSa cells. *Cancer Res.* 55, 4253-4256, (1995)
- 4) Hirano J., Kita K., Sugaya S., Ichimura Y., Yamamori H., Nakajima N., Suzuki, N.: Down-regulation of Molecular Chaperone GRP78/Bip Expression Involved in Enhancement of Human RS Cell Mutability. *Pancreas* 36, e7-14, (2008)
- 5) 鈴木信夫, 菅谷茂:「人生これ日々SOS」- 癌・心筋梗塞・脳卒中を防ぐストレス緩和の新提案-. 千葉日報社 (ISBN978-4-904435-25-0), (2011)
- 6) Suzuki N., Nakazawa A.: Phenotypic difference between *uvr A* and *uvr B* mutants of *E. coli*. *Nature* 261, 244-245, (1976)
- 7) Chi X.-J., Takahashi S., Nomura J., Sugaya S., Ichimura Y., Zhai L., Tong X., Kita K., Suzuki N.: Modulation of mutability in UV-irradiated human RSb cells by serum obtained from parabolic flight volunteers. *J. Int. Soc. Life Info. Sci.* 25, 11-22, (2007)
- 8) 海老根英雄:味噌の生態調節機能, 味噌の科学と技術 43, 339-361, (1995)
- 9) Dong M., Chen S.P., Kita K., Ichimura Y., Guo W.-Z., Lu S., Sugaya S., Hiwasa T., Takiguchi M., Mori N., Kashima A., Morimura K., Hirota M., Suzuki N.: Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of Sarcodonin G from *Sarcodon scabrosus* in HeLa cells. *Int. J. Oncol.* 34, 201-207, (2009)
- 10) Suzuki H., Suzuki N., Sasaki M., Hiraga K.: Orthophenylphenol mutagenicity in a human cell strain. *Mutat. Res.* 156, 123-127, (1985)
- 11) Suzuki H., Suzuki N.: Detection of *K-ras* codon 12 mutation by polymerase chain reaction and

- differential dot-blot hybridization in sodium saccharin-treated human RSa cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 956-961, (1993)
- 12) J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis: *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> edition, (1989)
  - 13) Kubota H., Suzuki T., Lu J., Takahashi S., Sugita K., Sekiya S., Suzuki N.: Increased expression of GRP94 protein is associated with decreased sensitivity to X-rays in cervical cancer cell lines. *Int. J. Rad. Biol.* 81, 701-709, (2005)
  - 14) 鈴木信夫：無から有を生む基礎医学研究の面白さ－ヒト SOS 生理機能の創成－前編. 千葉医学 87, 109-118, (2011)
  - 15) Suzuki N.: Effects of human interferon- $\alpha$  on UV-induced DNA-repair synthesis and cell killing. *Mutat. Res.* 175, 189-193, (1986)
  - 16) 鈴木信夫, 鈴木英子：培養ヒト細胞 RSa における K-ras codon12 突然変異のサッカリンナトリウムによる誘発－ペリルアルデヒドの変異原性との比較－. *変異原性試* 3, 155-160, (1994)
  - 17) Jiang X., Ren Q., Chen S., Tong X., Dong M., Sugaya S., Tanaka T., Kita K., Suzuki N.: UVC Mutagenicity is Suppressed in Japanese Miso-Treated Human RSa Cells, Possibly via GRP78 Expression. *Biosci. Biotec. Biochem.* 75, 1685-1691, (2011)
-