

# 食品未利用資源の有効利用を目的とした、大豆煮汁からの醸造酢の製造とその抗腫瘍活性調査

稲垣秀一郎, 森村 茂\*

信州大学 農学研究科 機能性食料開発学専攻

\*熊本大学 自然科学研究科, \*〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1

**要約** 納豆や味噌の製造過程には大量の大豆煮汁が副生しており、その高い有機物濃度から環境に負荷を与えている。しかし、大豆煮汁中にはタンパク質やポリフェノール類などの栄養成分が豊富に含まれており、機能性食品素材としての利用が望まれていた。そこで本研究では、大豆煮汁の有効利用を目的として、大豆煮汁を原料に用いて醸造酢を製造し、機能性食品としての可能性を探るため、本醸造酢の生体調節機能を調査した。本総説では、大豆煮汁醸造酢の抗腫瘍活性について述べる。まず、*in vivo* 抗腫瘍試験において、腫瘍を背部に移植したマウスに本醸造酢の凍結乾燥物を含む飼料を与え、腫瘍の肥大率を通常食摂取群と比較したところ、醸造酢含飼料摂取群で優位に腫瘍の肥大が抑制された。また、ヒト単球性白血病細胞株 (U937) を用いた *in vitro* 試験において、本醸造酢には、アポトーシス誘導物質であるトリプトフォールが含まれること、また、トリプトフォールは、デスレセプター (DR) 5を経由し、カスパーゼ8およびカスパーゼ9を活性化することによりアポトーシスを誘導することが明らかにされた。さらに、発酵試験により、トリプトフォールは本醸造酢製造のエタノール発酵過程に酵母 (協会77号) によってトリプトファンから生成されることが確認された。これらの結果から、大豆煮汁醸造酢の抗腫瘍活性には、本醸造酢に含まれるトリプトフォールのアポトーシス誘導活性が一つの根拠となる可能性が示された。

**キーワード**：大豆煮汁，醸造酢，抗腫瘍活性，アポトーシス

## 1. はじめに

納豆や味噌などの大豆加工食品の製造過程で排出される大豆煮汁は、高いBOD濃度を示すため、製造工場の排水処理に大きな負担を与えている。しかしその一方で、大豆煮汁には栄養成分や機能性成分が豊富に含まれるため、食品素材としての利用方法の開発が望まれていた。そこで本研究では、大豆煮汁からの新規発酵食品の開発を目的として、エタノール発酵および酢酸発酵を行うことにより醸造酢の製造を試みた。

生活習慣病の一つであるガンは、日本人の死亡率の第一位を占めている。近年、食品によるガン予防の可能性が盛んに議論されているとともに、食品成分の抗腫瘍効果に関する研究が行われている<sup>1-3)</sup>。アポトーシスは、生体において、発生や免疫、そしてガン細胞の除去などの恒常性維持に欠かせない重要な機能である<sup>4-6)</sup>。ガン細胞に対してアポトーシ

スを誘導する物質は抗腫瘍効果を発揮するため、医療の現場で抗ガン剤として用いられている。また近年、食品のガン予防効果に期待が高まる中、さまざまな食品からアポトーシス誘導物質が見出されている<sup>7-10)</sup>。

本総説では、製造した大豆煮汁醸造酢の *in vivo* 試験における抗腫瘍活性と、*in vitro* 試験における大豆煮汁醸造酢からのアポトーシス誘導物質の単離およびそのアポトーシス誘導機構、さらにその生成機構について紹介する。

## 2. 大豆煮汁からの醸造酢の製造

大豆煮汁に味噌麹および清酒酵母 (協会酵母77号) を添加して48時間の静置培養によるエタノール発酵を行い、5% (v/v) エタノール濃度の大豆煮汁アルコールを調製した。続いて、酢酸菌 (*Acetobacter aceti* NBRC3283) を添加して16時間の通気攪拌培養による酢酸発酵を行い、酢酸濃度約40g/lの醸造酢を製造した<sup>11)</sup>。

受理日 2010年12月9日

採択日 2011年1月24日

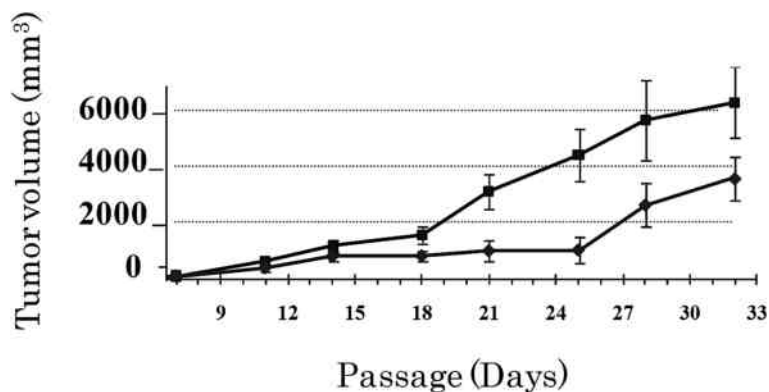


図1 大豆煮汁醸造酢の *in vivo* 抗腫瘍活性試験

■, 標準飼料摂取; ◆, 0.5% (w/w) 大豆煮汁醸造酢含有飼料摂取

### 3. 大豆煮汁醸造酢の *in vivo* 抗腫瘍試験

ddY マウスの背部に Sarcoma180細胞を移植し、食餌による腫瘍の肥大率に対する影響を調査した。その結果、図1に示したように、大豆煮汁醸造酢の凍結乾燥物を0.5% (w/w) 含有させた飼料を与えた群の腫瘍体積の増加は、標準飼料を与えたコントロール群と比較して有意に抑制された。また、図には示していないが、延命率もコントロール群と比較して有意に増加した。

### 4. 大豆煮汁醸造酢からのアポトーシス誘導物質の単離

大豆煮汁醸造酢を分配抽出により水抽出画分と酢酸エチル抽出画分に分離し、ヒト単球性白血病細胞 (U937) に対するDNA断片化能および顕微鏡による細胞形態の観察により、両画分のアポトーシス誘導能を調べた。その結果、酢酸エチル抽出画分はDNAの断片化を誘導したが、水層は誘導しなかったため、大豆煮汁中のアポトーシス誘導物質は酢酸エチル抽出画分に移行していることが示唆された<sup>12)</sup>。そこで次に、酢酸エチル抽出画分からアポトーシス誘導物質を単離するため、HPLCに供し、220および280nmの吸収波長を測定した(図2 A, B)。また各ピーク画分の精製を行い、DNA断片化試験および顕微鏡観察によるアポトーシス誘導の判定を行った。その結果、全画分のうち画分6のみに活性が見られた(図3)。また、構造解析の結果、本成分はトリプトフォールと同定された<sup>13)</sup>(図2 C)。

### 5. トリプトフォールの正常白血球細胞に対する細胞毒性およびアポトーシス誘導活性

抗腫瘍物質の正常細胞に対する毒性は、副作用として人体に有害性を示すことになる。そこで、正常白血球細胞およびU937細胞に対するトリプトフォールの細胞毒性を比較したところ、正常白血球細胞に対するよりもU937細胞に対する方が有意に強い毒性を示した(図4 A)。また、トリプトフォールは正常白血球細胞に対してはアポトーシスを誘導しなかった(図4 B)。さらに、U937細胞ではトリプトフォール処理によりカスパーゼ3の活性化が見られたのに対して、正常白血球細胞では見られなかった(図4 C)。これらの結果から、トリプトフォールは正常白血球細胞に対してはアポトーシスを誘導せず、これがU937細胞との感受性の差として表れているものと推察された<sup>13)</sup>。

### 6. トリプトフォールのアポトーシス誘導機構の解析

アポトーシスが誘導された細胞は、一般的に、カスパーゼの活性化を伴う。トリプトフォールのカスパーゼ活性化機構を明らかにするため、各種カスパーゼの酵素活性を測定したところ、カスパーゼ8およびカスパーゼ3は活性化されたが、カスパーゼ9は活性化されなかった(図5 A)。また、ウェスタンブロット解析においてもカスパーゼ8およびカスパーゼ3の断片化が見られたが、カスパーゼ9の断片化は見られず(図5 B)、酵素活性測定の結果を反映した。これらの結果から、トリプトフォールはカスパーゼ9を活性化せず、カスパーゼ8および3を活性化することによってアポトーシスを誘導することが示された<sup>13)</sup>。

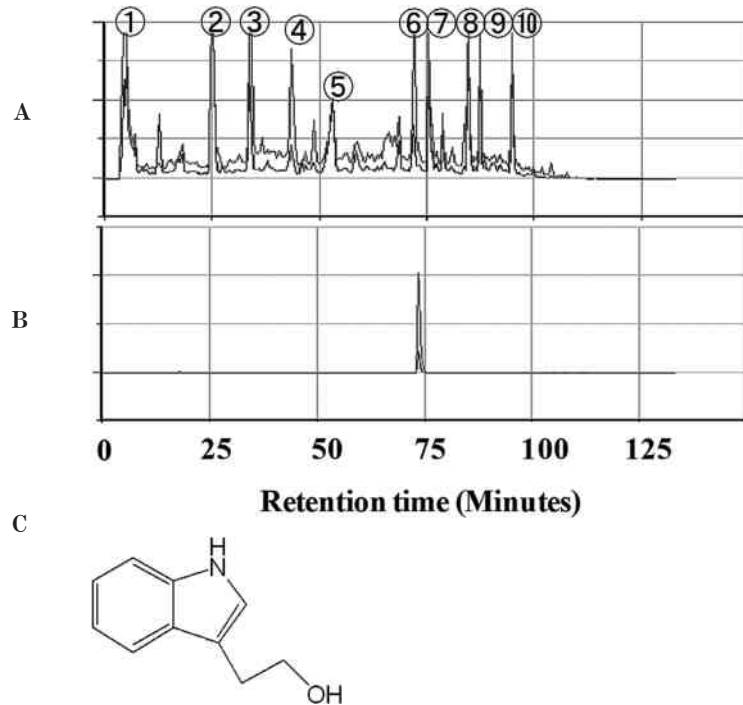


図2 大豆煮汁醸造酢の HPLC クロマトグラムとトリプトフォールの構造  
 A, 酢酸エチル抽出物：画分1～画分10 (①～⑩) ; B, 分画・精製した画分6 (トリプトフォール) ; C, トリプトフォールの構造

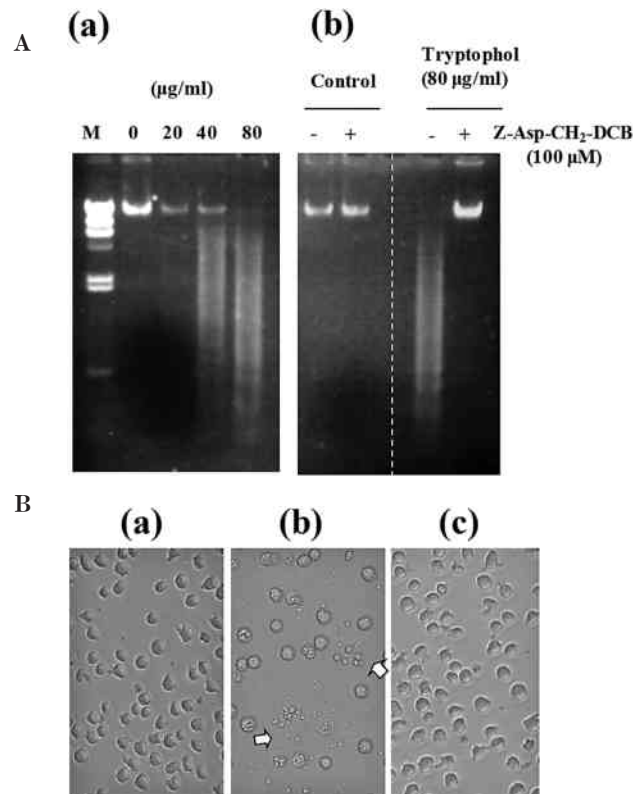


図3 画分6 (トリプトフォール) のアポトーシス誘導活性  
 A, DNA 断片化試験：トリプトフォール添加(a), カスパーゼインヒビター処理後に画分6を添加(b); B, 顕微鏡観察：無処理(a), トリプトフォール添加(b); C, カスパーゼインヒビター処理後に画分6を添加：アポトーシス小体 (矢印)

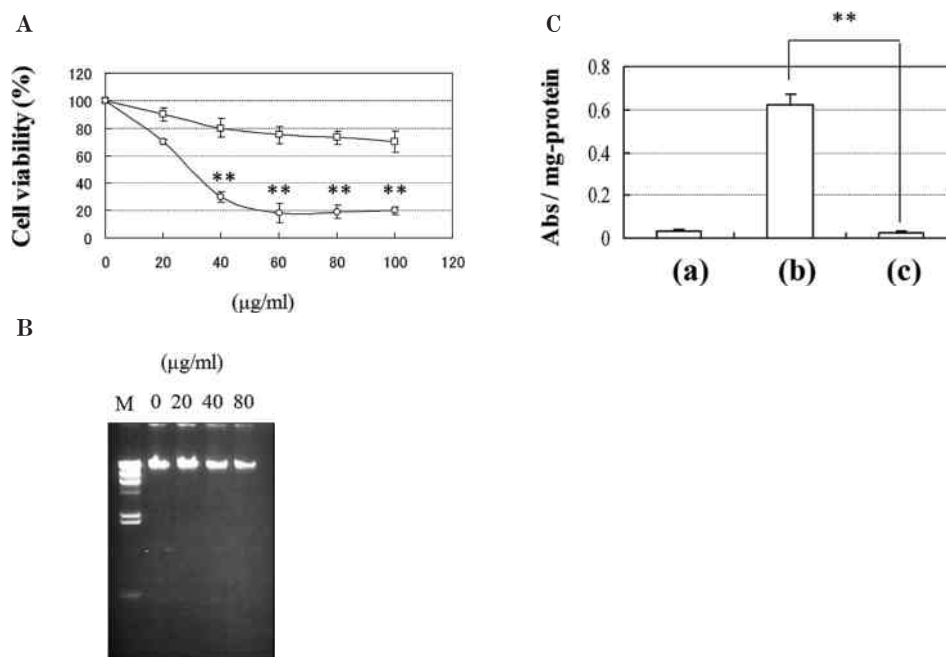


図4 トリプトフォールの正常白血球細胞およびU937細胞に対する作用の比較  
 A, 細胞毒性試験：U937細胞 (○), 正常白血球細胞 (□)；B, 正常白血球細胞に対するアポトーシス誘導試験；C, カスパーゼ3活性：無処理(a), U937細胞(b), 正常白血球細胞(c), \*\*p<0.01

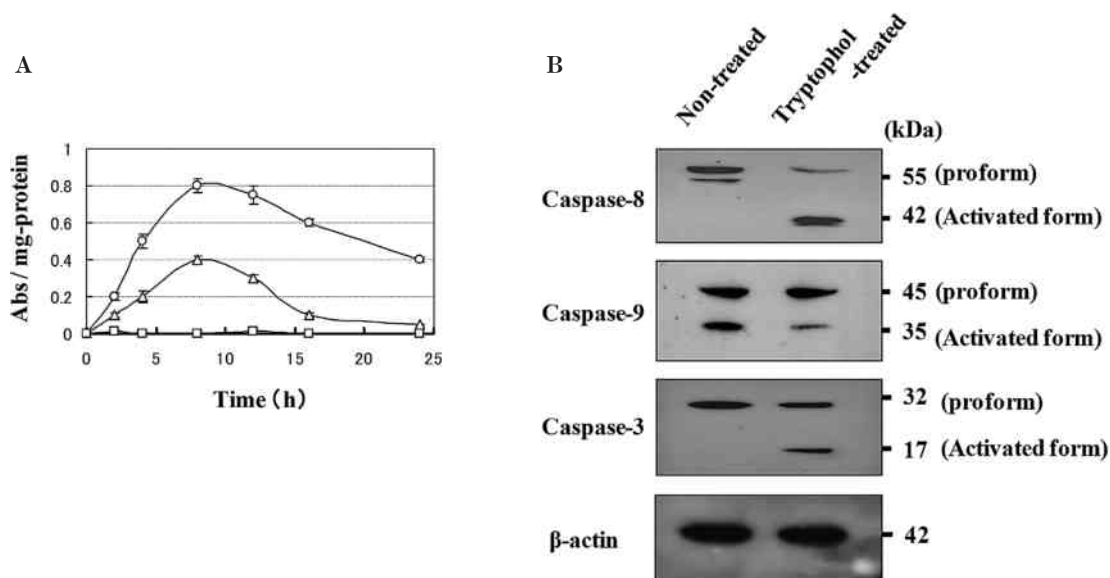


図5 トリプトフォールのカスパーゼ活性化経路の推定  
 A, カスパーゼ酵素活性測定：カスパーゼ3 (○), カスパーゼ8 (△), カスパーゼ9 (□)；B, ウェスタンブロット解析

次に、カスパーゼ8上流の作用機構を明らかにするため、トリプトフォールのデスレセプター (DR) への結合を免疫沈降 (IP) -ウェスタンブロット法により調べた。その結果、カスパーゼ8が結合する可能性のある4種のレセプター (Fas, DR4, DR5およびTNF-R1) のうち<sup>14-15)</sup>, DR5抗体をIP用抗体に用いた場合にのみカスパーゼ8のバンドが

検出された (図6 A)。この結果から、トリプトフォールは、まずDR5に作用し、それに伴ってカスパーゼ8を活性化することにより、一連のアポトーシス誘導機構を活性化していることが示された。続いて、前項で示した、U937細胞と正常白血球細胞のアポトーシス感受性の差が両細胞間におけるデコイレセプター (DcR) の発現量の差に起因する可能

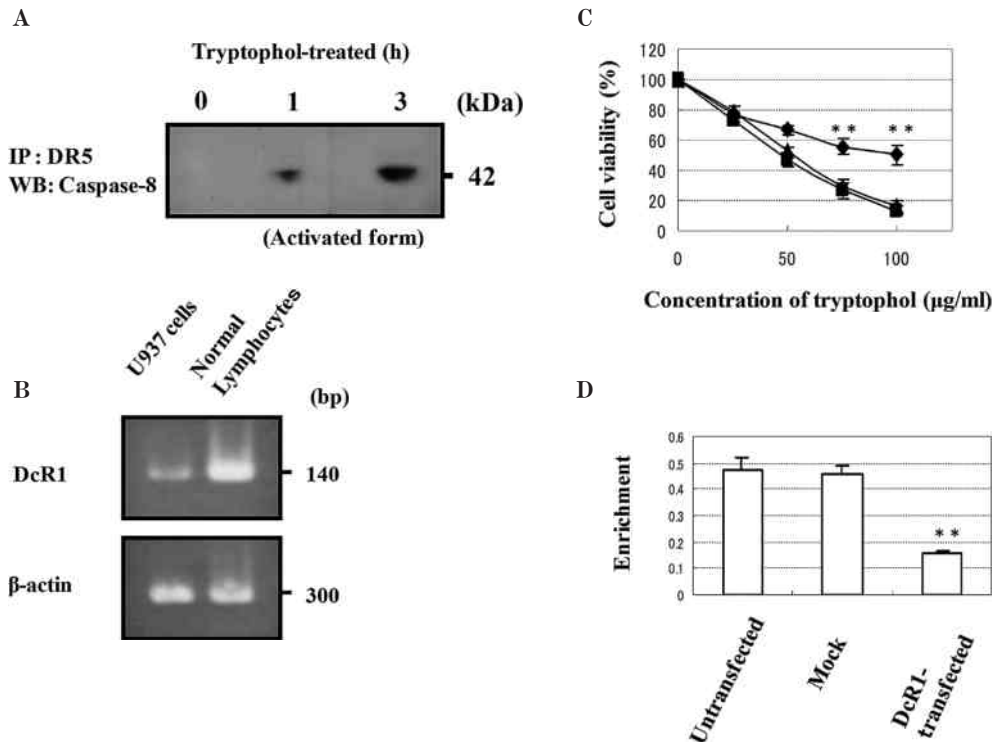


図6 トリプトフォールのU937細胞へのアポトーシス誘導機構の解析

A, 免疫沈降試験; B, RT-PCR; C, DcR1トランスフェクタントの細胞毒性試験; DcR1トランスフェクタント (◆), 非トランスフェクタント (▲), 偽ベクタートランスフェクタント (■); D, DcR1トランスフェクタントのアポトーシス誘導試験 (ELISA法), \*\*p<0.01

性を検証するため、U937細胞と正常白血球細胞のDcR1の発現を比較した。その結果、図6Bに示したように、U937細胞のDcR1の発現は正常白血球細胞に比べて有意に低いことが明らかになった。また、DcR1をU937細胞にトランスフェクションし、トリプトフォールによる細胞毒性およびアポトーシス誘導活性をノーマルU937細胞と比較したところ、トランスフェクションしたU937の細胞毒性およびアポトーシス誘導活性はノーマルU937細胞に比べて有意に低い値を示した(図6C, D)。これらの結果から、トリプトフォールのU937細胞と正常白血球細胞に対するアポトーシス感受性の差は両細胞間におけるDcR1の発現量の差に起因することが示唆された<sup>16)</sup>。

### 7. トリプトフォールの生成機構

トリプトフォールはエタノール発酵過程にトリプトファンを原料として酵母により生成されることがすでに報告されている<sup>17-18)</sup>。そこで、大豆煮汁醸造酢中に含まれるトリプトフォールにおいても同様の生成機構であるかを確認するために発酵試験を行った。発酵試験は、トリプトファン標準液、トリプ

トファンのみを含む最少培地およびトリプトファン標準液に協会酵母77号を含む最少培地を調製後、30°Cで2日間静置培養し、各培養液の酢酸エチル抽出液をHPLCに供し、220および280nmの吸収波長を測定した。その結果、トリプトファン標準液とトリプトファンのみ添加した培養液にはトリプトフォールは検出されなかったが(図7A, B)、トリプトファンおよび協会酵母77号を含む培養液にはトリプトフォールのピークが検出された(図7C)。この結果から、トリプトフォールは、大豆煮汁醸造酢製造のエタノール発酵過程に、トリプトファンを原料として協会酵母77号により生成される二次代謝産物であることが確認された<sup>19)</sup>。

### 8. おわりに

食品製造工場から発生している未利用物から新たな食品の開発を目指すためには、未利用物に付価値を与える技術の開発が不可欠となる。本研究では、発酵により大豆煮汁に付加価値を与えることができることを証明し、未利用物からの新規食品開発の可能性を示した。食品業界における未利用物のリサイクル技術の確立は、環境保全のための循環型社会形

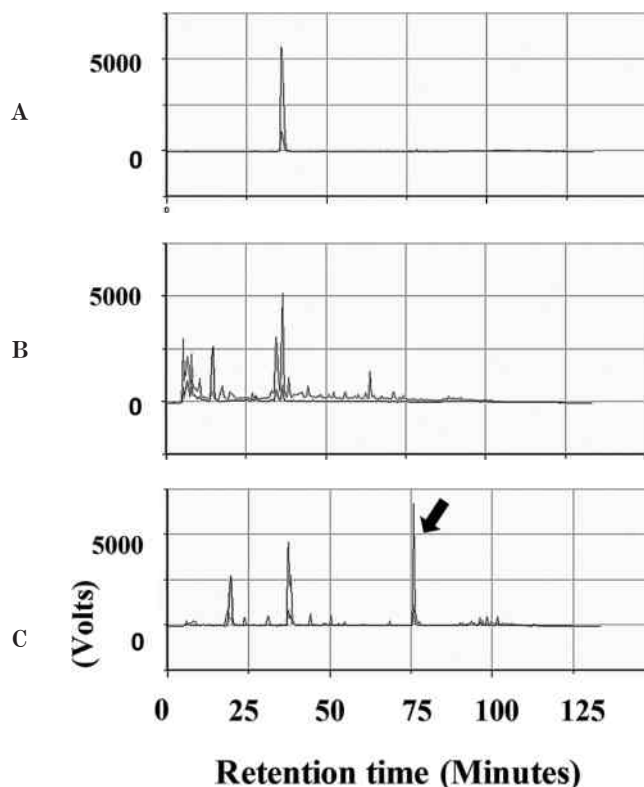


図7 協会酵母77号によるトリプトファンからのトリプトフォールの生成  
A, トリプトファン; B, 最少培地+トリプトファン; C, 発酵液: トリプトフォール (矢印)

成に向けて重要な役割を担うと考えている。今後、さまざまな加工食品業界から発生している未利用物から発酵技術を用いた新たなリサイクルシステムの確立を目指すことにより、循環可能な食品製造システム開発の可能性を追求していきたい。

#### 引用文献

- 1) Herbert, J. et al., Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *J. Nat. Cancer Inst.*, **90**, 1637-1647 (1998).
- 2) Shukla, S. and Gupta, S., Dietary agent in the chemoprevention of prostate cancer. *Nutr. Cancer*, **53**, 18-32 (2005).
- 3) Bonnesen, C. et al., Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.*, **61**, 6120-6139 (2001).
- 4) Kerr, J. F. R. et al., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972).
- 5) Cohen, J. J., Apoptosis. *Immunol. Today*, **14**, 126-130 (1993).
- 6) Arends, M. J. et al., Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, **136**, 593-608 (1990).
- 7) Hayakawa, S. et al., Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 1102-1106 (2001).
- 8) Katsuno, Y. et al., Apoptosis-inducing activity of a driselase digest fraction of green tea residue. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 198-201 (2001).
- 9) Koyama, Y. et al., Apoptosis induction by lectin isolated from the mushroom *Boletopsis leucomelas* in U937 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 784-789 (2002).
- 10) Watanabe, M. et al., Identification of licoumarone as an apoptosis-inducing component in licorice. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1388-1390 (2002).
- 11) 森村 茂ら, 大豆煮汁からの醸造酢の製造とその機能性, *日食工*, **52**, 578-583 (2005).
- 12) Inagaki, S. et al., Apoptosis induction by vinegar produced from boiled extract of black soybeans in human monoblastic leukemia U937 cells: difference in sensitivity to cell toxicity compared to normal lymphocytes. *Food Sci. Technol. Res.*, **11**, 311-317 (2005).

- 13) Inagaki, S. et al., Isolation of tryptophol as an apoptosis-inducing component from vinegar produced from boiled extract of black soybean in human monoblastic leukemia U937 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 371-379 (2007).
  - 14) Mandal, D. et al., Fas-, caspase 8-, and caspase -3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **280**, 39460-39467 (2005).
  - 15) Wang, S. and El-Deiry, W. S., TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, **22**, 8628-8633 (2003).
  - 16) Inagaki, S. et al., Tryptophol induces DR5-mediated apoptosis in U937 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2065-2068 (2007).
  - 17) 秋田 修ら,  $\beta$ -フェネチルアルコール, 酢酸 $\beta$ -フェネチル高生産性酵母の遺伝子背景と清酒醸造への利用, *醸協*, **85**, 501-505 (1990).
  - 18) 岡村成通・渡辺正澄, *Saccharomyces cerevisiae* による糖からの $\beta$ -フェネチルアルコール, チロゾール, トリプトフォールの生成, *醸協*, **76**, 629-634 (1981).
  - 19) 稲垣秀一郎ら, エタノール発酵過程で生成するアポトーシス誘導物質・トリプトフォール, *醸協*, **102**, 222-224 (2007).
- 

## Production of vinegar from soybean-boiled extract and research for its anti-tumor activity

Shyuichiro INAGAKI and Shigeru MORIMURA\*

Affiliation: Department of Sciences of Functional Foods, Graduate School of Agriculture, Shinshu University

\*Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University,

\*2-39-1 Kurokami Kumamoto 860-8555

### Summary

In this study, we produced vinegar using extract of boiled soybean excreted from manufacture of soybean food such as natto or miso, and examined its anti-tumor activity. We showed that the vinegar has tumor-suppressing effect in vivo (mice) and apoptosis-inducing activity in vitro (U937 cells) analysis. We also isolated tryptophol as an apoptosis-inducing component from the vinegar and examined its apoptosis-inducing mechanisms in U937 cells. Caspase activity determination and western blot analysis revealed that tryptophol activated caspase-8 and -3. Immunoprecipitation analysis also revealed that tryptophol induced binding of caspase-8 and death receptor (DR) 5. From these analyses, tryptophol was supposed to induce apoptosis via DR5, caspase-8 and caspase-3. Furthermore we confirmed that tryptophol was produced from tryptophan in raw material by *Saccharomyces cerevisiae* kyokai no. 77 in the process of ethanol fermentation. These results showed that anti-tumor activity of the vinegar in mice could be caused by apoptosis-inducing activity of tryptophol.

**Key word**: extract of boiled soybean, vinegar, anti-tumor activity, apoptosis