

大豆胚軸茶のがん抑制作用に関する研究

安原 義^{*1}・秋澤俊史²・杉本昭子³・渡邊 昌⁴

¹ 東京農業大学短期大学部 ² 摂南大学薬学部

³ 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 ⁴ 東京農業大学応用生物科学部

Anti-carcinogenic Effect of Soybean Hypocotyl

Tadashi YASUHARA¹, Toshifumi AKIZAWA²

Akiko SUGIMOTO³ and Shaw WATANABE⁴

¹ Junior College of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156-8502

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, Hirakata 573-0101

³ Institute for Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 101-0062

⁴ Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156-8502

ABSTRACT

It is proven that metalloproteinase (MMP) lyses extracellular matrix (ECM). Of all MMPs, membrane type-MMP (MT-MMP) is especially associated with tumor metastasis as well as the formation of nascent vessels. Although new tumor treatment drugs derived from substances with MMP inhibition activity are desired, the problem of side effects caused by candidate inhibitors is still left unsolved. Soybean hypocotyl, the safety of which is long proven, was chosen in search of effective yet safe MMP inhibitors. Soybean is known to contain a number of functional substances including genistein which inhibits the propagation of tumor cells. The study was aimed to isolate unknown substances with MMP inhibition activity in soybean hypocotyl. Soybean hypocotyl was analyzed on HPLC using a reverse-phased column to determine MMP inhibition activity of each fraction. As a result, MMP inhibition activity was found in a 60% CH₃CH fraction. Upon comparing the retention time of these two unknown substances and Biochanin A on subsequent HPLC analysis, they were found to be different from isoflavonoids already found in soybean hypocotyl. These substances are now being analyzed for the determination of their structure. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 94-98, 1999.

Key words : soybean hypocotyl, metalloproteinase (MMP), MMP inhibitor

近年、生活習慣病が各国共通の課題として取り上げ

られ、食品成分および摂取法による生活習慣病の予防が提起されている。我が国の食習慣においてはたん白質源として大豆および大豆加工品が多く利用されて来

* 〒 156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

た。そして、疫学調査により乳がん、結腸がんなどのがん抑制との相関が示され^{1,2)}、がん予防効果が期待できる大豆成分の検索が行われた。その結果、大豆に含まれるイソフラボン特にゲニステインが注目された。大豆イソフラボノイドは動物実験でも乳がん、結腸がんの発症を抑制することが確認された^{2,3)}。しかし、このがん抑制効果の機構についてはいろいろの説が言われるがまだ確定されていない。

がんの治療法としては従来、外科的切除と抗がん剤や放射線等によるがん細胞の消滅が行われて来た。しかし、正常細胞に対する影響も大きく、新たな試みとして、がん細胞の増殖に先立つ血管新生の阻害による増殖抑制やがん細胞の転移阻止が注目されている。

近年、細胞外マトリックスを分解する酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が同定され、特に膜型の MMP (MT-MMP) ががんの転移に深く関与していることが明らかになった。また、血管新生の際にも作用していることから、MMP 阻害剤ががん治療の有力な薬剤として開発中である。しかし、副作用などの問題は解決されていない⁴⁾。

我々は、古来から食しており安全性が確認されている大豆より得られる大豆胚軸茶に注目し、MMP 阻害活性を指標に新しい有効成分の探索を試みた。

方 法

実験材料および試薬

大豆胚軸茶は不二製油株式会社より入手した。マトリックスメタロプロテアーゼ類 MMP-1 (間質型コラゲナーゼ)、MMP-2 (ゼラチナーゼ A)、MMP-8 (好中球コラゲナーゼ)、MT-1 (膜型)、MT-3 (膜型) は摂南大学薬学部で発現させたものを入手し、ミリ Q 水で 5 倍に希釈して用いた。MMP 基質 MOCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ は (株) ペプチド研究所から購入し、1.1 mg を 1 mL の DMSO に溶解して stock solution とし、-20℃ に保存し用時ミリ Q 水 (日本ミリポア株式会社) で 30 倍に希釈して用いた。活性測定用緩衝液は 250 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 250 mM ZnSO₄, 0.1% NaN₃, 0.25% Brij35 (pH 7.5) を特級試薬とミリ Q 水で調製して用いた。

大豆胚軸 60% CH₃CN 画分の調製

大豆胚軸茶 100 g を 500 mL 三角フラスコに入れ、*n*-ヘキサン 300 mL を加え、懸濁し室温で一夜抽出し、減圧濾過を行った。同様残査に *n*-ヘキサン 300 mL を加え室温で 6 時間抽出した。減圧濾過を行い脱脂胚軸を得た。次に脱脂胚軸に 300 mL の 60% CH₃CN を加え

懸濁し、1 日室温で抽出し、遠心分離を行い 60% CH₃CN 抽出液 113 mL を得、凍結乾燥を行った (4.50 g)。再度、残査に 60% CH₃CN 300 mL を加え同様に 1 日抽出後遠心分離を行い二番抽出液を凍結乾燥し 9.19 g の抽出物を得た (合計 13.69 g)。

MMP 酵素阻害実験

Knight らの方法⁵⁾ を妨害物質の影響を抑えるため HPLC を用いて測定を行った。試料を MMP 活性測定用緩衝液に溶解し、その溶液 40 μL と基質溶液 60 μL、酵素液を 5 μL 加え、37℃ 3 時間反応後、60 μL の反応停止液 (0.1 M CH₃COONa, pH 4) を加え反応を止め、オートサンプラーを用いて HPLC に注入した。

HPLC の条件：カラム、TSK-ODS-80TM, 4.6 mm × 150 mm, 40℃; 溶媒、50% CH₃CN, 0.1% TFA/H₂O; 溶出、0.8 mL/min; 検出、Ex = 340 nm, Em = 400 nm。

抗酸化活性測定^{6,7)}

β-カロテン 150 μg, リノール酸 10 μg, ツイーン-40 60 μg を 33 mL の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した CL-EM 液を調製し、マイクロタイタープレートに各ウエルに試料溶液 10 μL と CL-EM 液 200 μL を添加し攪拌後 50℃, 50 分間加熱後、マイクロプレートリーダーを用いて OD 492 nm における吸光度を測定し、β-カロテンの残存量を求めて抗酸化活性の指標とした。

結果と考察

大豆胚軸 60% CH₃CN 画分の MMP 活性阻害

一番抽出物 12.5 mg を 500 μL の MMP 活性測定用緩衝液に溶解し、10 倍希釈を 5 段階行って各濃度 40 μL と基質溶液 60 μL、酵素液 (ミリ Q 水で 5 倍希釈) を 5 μL 加え、37℃ 3 時間反応後、60 μL の反応停止液 (0.1 M CH₃COONa, pH 4) を加え反応を止め、オートサンプラーを用いて HPLC に注入した。

Fig. 1 に示すように今回使用した MMP 酵素に対し大豆胚軸 60% CH₃CN 画分は MMP 酵素類の内 4 種に対して、1 mg/mL の濃度で阻害を示した。MT-3 に対しては 10 mg/mL の濃度でも阻害活性を示さなかった。

大豆胚軸 60% CH₃CN 画分の MMP 活性阻害の検討

大豆胚軸 60% CH₃CN 画分中には MT-3 以外の MMP 類の活性を阻害することが解った。そこで阻害物質は単一物質かそれとも混合物で相加的、相乗的に作用しているのかの検討を行った。

HPLC による分画：60% CH₃CN 胚軸画分 20 mg を 1 mL の 0.1% TFA/H₂O に溶解し、15,000 rpm, 20 分間遠心し、上清を HPLC の試料とした。分画は Fig. 2 に示

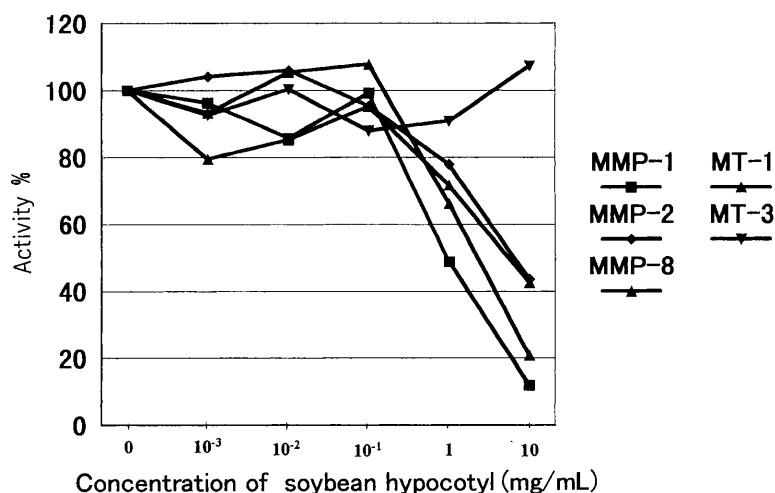


Fig. 1. MMP inhibition of 60% CH₃CN extract of soybean hypocotyl.

すように TSK-ODS-80TM カラムを用いて 400 μ L ずつ HPLC に注入し, 2 分毎分取し 2 回分をまとめた. 各画分 100 μ L ずつ 500 μ L エッペンドルフチューブに分注し, 減圧乾固を行い阻害実験に用いた.

各画分の阻害活性試験: 阻害活性の測定は前項と同様に試薬を調整し, 阻害が認められた MT-1 酵素を用いて行った.

乾燥試料を 20 μ L の assay buffer に溶解し, 基質 60 μ L を加え次に MT-1 酵素液 20 μ L を加えて攪拌し, 37°C で 2 時間反応後, 60 μ L の 0.1 M CH₃COONa (pH 4) を添加して反応を停止した. 反応液から 30 μ L をオートサンプラーを用いて HPLC に注入し前項と同様に阻害物 0 の活性値を 100 として各画分の残存活性を求めて比較した.

Fig. 3 に示すように ODS カラムで 15 画分に分画した大豆胚軸 60% CH₃CN 画分の MMP 酵素阻害活性は MT-1 に対しては Fr. 10, Fr. 11 に認められた.

Fr. 10, Fr. 11 画分中の MT-1 阻害活性ピークの検討:

Fr. 10, Fr. 11 画分は 2 本のピークからなり Fr. 10 は前ピークの一部であり Fr. 11 は前ピーク (p-1) と後ピーク (P-2) の混ざりである.

P-1, P-2 の純度検定のため検出を 210 nm, 溶出を 50% CH₃CN の条件で P-1, P-2 の主ピークを分取した. Fig. 4 に示すように予想されるイソフラボノイドの Biochanin A を同様の条件でクロマトを行ったところ, 後ピークよりも後ろに溶出されこれらのピークは Biochanin A とは異なることが解った.

Biochanin A 及び P-1, P-2 の MT-1 阻害活性の検討

グラジエント溶出の溶出位置から予想された Biochanin A, P-1 画分, 精製 P-1 画分, P-2 画分, 精

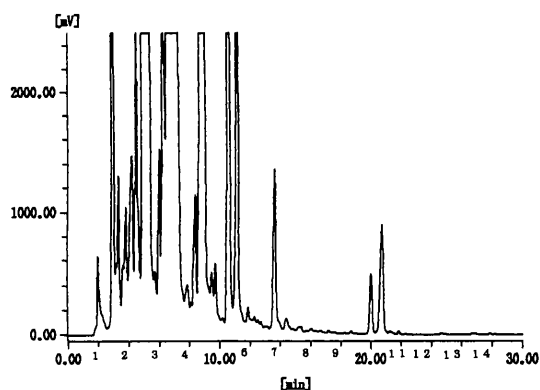


Fig. 2. HPLC profile of 60% CH₃CN extract of soybean hypocotyl.

HPLC condition

Column : TSK-ODS-80TM 6 mm $\times$ 150 mm, 40°C

Eluant : A, 0.1% TFA/H₂O; B, CH₃CN

Elution : min 0 30 31 36

B % 20 80 90 90 1.5 mL/min

Detection : 254 nm

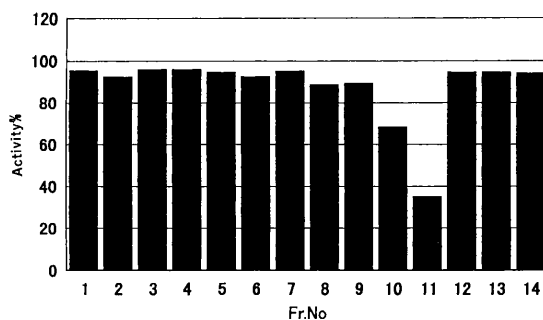


Fig. 3. MT-1 inhibition of HPLC fractions of soybean hypocotyl.

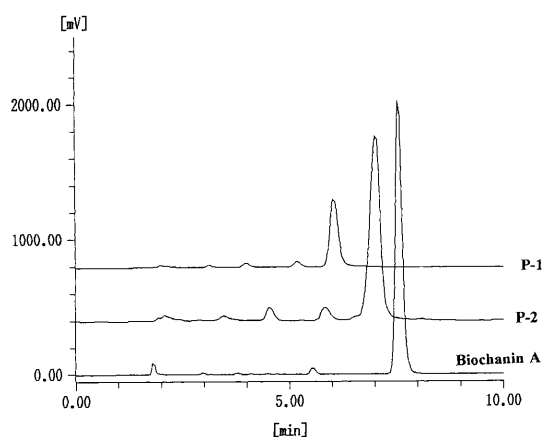


Fig. 4. Chromatograms of P-1, P-2, and Biochanin A. Eluted at 50% CH₃CN, 0.1% TFA, 1.5 mL/min and detected at 210 nm. Other conditions were the same as those of Fig. 2. "a" corresponds to P-1, "b" to P-2, and "c" to Biochanin A. Main peaks of P-1 and P-2 were collected for subsequent activity determination.

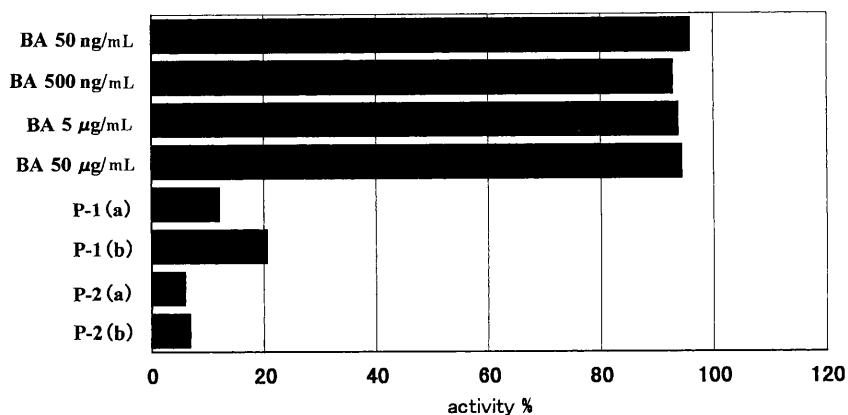


Fig. 5. MT-1 inhibition activity of P-1, P-2, and Biochanin A. P-1 (a) and P-2 (a) are fractions obtained in Fig. 2 P-1 (b) and P-2 (b) are fractions obtained in Fig. 4.

製 P-2 画分について MT-1 阻害活性を前回と同様の条件で行い、Biochanin A の MT-1 に対する活性の有無、及び P-1, P-2 の何れに活性があるのか検討した。

Fig. 5 に示すように前回 Fr. 10, 11 に認められた活性は 2 本のピークのいずれにも認められた。また、グラジエント溶出で Biochanin A と推定されたが 2 本のピークよりも後ろに溶出され、MT-1 に対する活性も認められなかった。

MT-1 に対する阻害活性物質は Fig. 6 に示すように紫外外部吸収スペクトルは良く似ており類縁物質と推定される。また、今までに大豆胚軸に見出されたイソフラボノイドではない未知物質であると推定される。

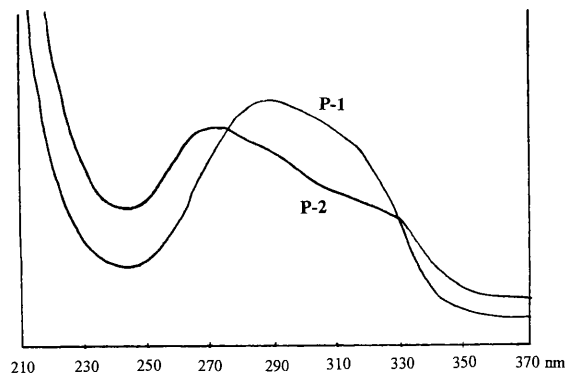


Fig. 6. UV-spectrum of P-1 and P-2 with 50% CH₃CN.

また、P-1, P-2 画分はいずれも β -カロテン・リノール酸系による抗酸化活性試験で抗酸化能を認めた。今

後はこの単離精製を行った MMT 阻害活性物質の構造を明らかにする。

要 約

がん治療の新しい試みとしてがん細胞の転移抑制が注目されている。古来より食し安全が確認されている大豆に注目し、大豆胚軸茶からがん細胞の転移抑制のキー酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の阻害物質の単離を試みた。逆相カラムを用いて分画し、各画分について MMP 阻害活性を指標として単離を行った結果、Biochanin A と同じ溶出位置に活性を認めた。再クロマトグラフィーの結果、活性物質は 2 種類で Biochanin A とは異なり、今までに大豆胚軸に見出されたイソフラボノイドではない未知の物質と推定された。現在構造を解析中である

文 献

- 1) Persky V and Van Horn L (1995) : Epidemiology of soy and cancer : Perspectives and directions. *J Nutr*, **125**, 709S-712S.
- 2) Herman C, Adlercreutz T, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KAV, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Hase TA and Fotsis T (1995) : Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr*, **125**, 757S-770S.
- 3) Barnes S (1995) : Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*, **125**, 777S-783S.
- 4) 秋澤俊史(1998) : マトリックスメタロプロテアーゼインヒビター, 治療学, **32**, 37-41.
- 5) Knight CG, Willenbrock F and Murphy G (1992) : A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS Lett*, **296**, 263-266.
- 6) Nokihara K, Yasuhara T, Muramoto K, Ando E and Wray V (1997) : Studies on peptides exhibiting antioxidative activity : construction of a peptide library and screening. In : *Peptide Chemistry 1996*, Kitada C, ed. Protein Research Foundation, Osaka, pp. 245-248.
- 7) 安原 義, 軒原清史, 古庄 律, 片岡榮子(1999) : 合成トリペプチドライブラリーの構築と抗酸化活性ペプチドの高効率スクリーニング. 東農大農学集報, **43**, 260-267.