

大豆サポゲニンの抗変異原性

松 岡 麻 男

Antimutagenicity of Soybean Sapogenins

Asao MATSUOKA

Antimutagenicities of soyasaponins, soyasapogenins prepared from the hydrolyzate of soyasaponins, and soyasapogenols (A and B) which are the major constituents of soyasaponins were examined. Soyasaponins showed no suppressive effect on the reversional mutation of *S. typhimurium* TA100 induced by ATB1, B(a)P or Trp-P-2 in the presence of the drug-metabolizing enzyme system. Soyasapogenins, soyasapogenol A and soyasapogenol B exhibited the antimutagen activity against ATB1 or Trp-P-2, not but B(a)P. The antimutagen activity was stronger against ATB1 than Trp-P-2. The results reflect the specificity of the soyasapogenins and soyasapogenols in the antimutagenic effect, and suggest a desmutagenic action of these compounds. It is considered that the difference of the activity is based on the specificity for the inhibition of metabolic activation of mutagens. In addition, it was clarified that the compounds exhibited weaker antimutagen activities, compared with genistein existing in the fermented soybean foods.

Key words: 抗変異原性 antimutagenicity, 大豆サポニン soyasaponin, 大豆サポゲニン soyasapogenin, アフラトキシン B1 aflatoxin B1, ベンゾ (a) ピレン benzo (a) pyrene, トリプ-P-2 Trp-P-2

緒 言

大豆サポゲニン (soyasapogenins) は、通常トリテルペンにオリゴ糖が結合した大豆サポニン (soyasaponins) として存在している。黒大豆を除く日本国産大豆には、5種類の soyasaponins が存在しており、0.2~0.3%含まれている¹⁾。

Soyasaponins の生物活性として、脂質の酸化抑制作用^{2),3),4)}、adriamycin 投与によるマウス心臓中の過酸化脂質の低下作用^{2),5)}、高脂肪食によるラット軽度肝障害発症の抑制作用^{2),3),4)}、血清脂質改善作用^{2),6)}などが報告されている。

大豆およびその製品を摂取したとき、その中に含まれる soyasaponins は、腸管内で消化さ

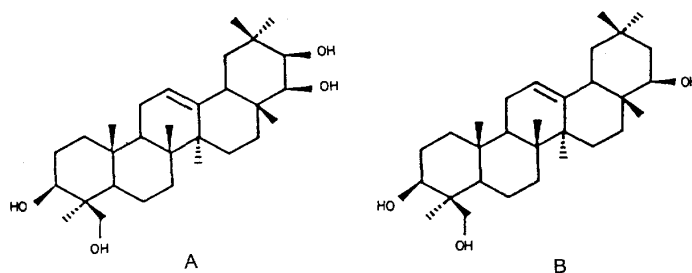


Fig.1. Structures of soyasapogenol A and soyasapogenol B.

れてアグリコンの soyasapogenins となって吸収されて生理的作用を示すと考える。また、発酵大豆食品では、大豆中の soyasaponins の多くが発酵過程で加水分解されて soyasapogenins を生成することが推測される。これまでに見つかっている soyasapogenins は soyasapogenol A-G の 8 種類である^{7),8)}。しかし、その多くは単離・分析操作過程で生成されるものであり、大豆中の soyasaponins の構成成分である soyasapogenins は主として Fig.1 に示す soyasapogenol A と soyasapogenol B であると報告されている^{1),8)}。

発酵大豆食品のテンペは、サルモネラ菌を用いた実験において、発酵前的大豆よりも強い抗変異原活性を示すことが、筆者ら^{9),10)}によって認められた。さらに、味噌も抗変異原性を有することが知られている^{11),12)}。これらの発酵食品の抗変異原性について、isoflavone である daidzein, genistein の関与が明らかにされた¹³⁾。さらに、大豆発酵食品の抗変異原性にはイソフラボン以外の物質も関与していると推測されている¹³⁾。

以上のことから、本研究では soyasaponins, soyasapogenins, soyasapogenol A および soyasapogenol B の二三の発がん物質によるサルモネラ菌の復帰突然変異に対する抑制効果を調べ、これらの物質の抗変異原性について検討を行った。

材料・方法

菌株および前培養

供試菌株の *Salmonella typhimurium* TA100 は財団法人発酵研究所（大阪）より入手した。前培養はニュートリエントブロス0.8%, 塩化ナトリウム0.5%を含む培地7.5ml に保存用菌懸濁液凍結品の融解液15 μ l を接種して、37 $^{\circ}$ C で14時間振とうした。この前培養液は静止期の初期のものである。

試薬

発がん物質（変異原物質）として、aflatoxin B1 (ATB1), benzo(a)pyrene (B(a)P) および 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole (Trp-P-2) を用いた。ATB1 は Makor Chemicals LTD 製のものをナカライテスク（株）より購入した。B(a)P はナカライテスク（株）より購入した。Trp-P-2 は和光純薬工業（株）製を同会社より購入した。これらの発

がん物質は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して実験に供した。突然変異テストにおける薬物代謝酵素系の cofactor として使用される NADPH および NADH は、Kohjin Co. LTD 製をナカライテスク (株) より購入した。その他の試薬は一般に市販されている特級品を使用した。前培養に用いる培地のニュートリエントブrossは Difco Laboratories 製を、寒天はナカライテスク (株) の精製寒天末を使用した。発がん物質による *S. typhimurium* TA 100 の復帰突然変異に対する抑制効果を調べるための soyaaponins と soyaapogenol A は、和光純薬工業 (株) 製を同会社より購入した。Soyaapogenol B は筆者によって単離したものをを使用した。これらの物質は、抗変異原活性を調べる場合には、DMSO に溶解して使用した。薬物代謝酵素系として、薬物投与ラットの肝臓から調製したオリエンタル酵母 (株) 製の S-9 (ミクロソーム画分を含む) を使用した。

Soyaapogenins の調製

市販の soyaaponins (1g) を、12 mol/l 塩酸-メタノール溶液 (1:1, v/v) (100 ml) 中で、5 時間加熱還流して、加水分解した。生成した soyaapogenins の抽出・調製は、Ireland と Dziedzic の方法⁷⁾ に準じて次のように行った。冷却した加水分解混合物から目的物質を酢酸エチル (300 ml) で 3 回抽出し、合わせた抽出液を 2% 水酸化カリウム水溶液 (200 ml) で 1 回、引続き脱イオン水 (200 ml) で 5 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水・乾燥した後、減圧下でエバポレートした。

Soyaapogenol B の単離

調製した soyaapogenins は、蛍光物質を含むシリカゲル薄層板 (Merck5717: Kieselgel60 F₂₅₄, 20×20 cm, 厚さ 2 mm) を薄層板して、n-ヘキサン-酢酸エチル (1:1, v/v) を展開溶媒として用いた薄層クロマトグラフィーにより分離した。検出は UV 照射および 10% 硫酸-エタノール溶液の噴霧後 120°C で 5~10 分間の加熱で行った。Soyaapogenol B に相当するバンドをかき取り、目的物質を diethyl ether で溶出した。純粋になるまで同じ操作でクロマトグラフを繰り返した。単離した物質はマススペクトルの測定によって soyaapogenol B であることを確認した。

抗変異原活性測定

抗変異原活性は、前報¹³⁾ に従って、サルモネラ菌を用いた Ames 法¹⁴⁾ の変法¹⁵⁾ による突然変異テスト系への試料添加によって測定した。発がん物質の ATB1, B(a)P, および Trp-P-2 は 1 プレート当たりそれぞれ 0.05 μg, 5.0 μg および 1.0 μg に相当する量を、試料は 100 μg までの量を添加した。S-9 の添加量は 1 プレート当たり 20 μl とした。全てのテスト系において、殺菌的作用は全く見られなかった。試料の存在下あるいは不在下における変異原物質

に起因する復帰突然変異株のコロニー数は、各試験区のコロニー数からそれに相当する各対照区のコロニー数を差し引いて求めた。

結果・考察

発がん物質の変異原性に及ぼす soyasaponins の影響

ATB1, B(a)P および Trp-P-2 によって誘発される *S. typhimurium* TA100 の His⁺ 復帰突然変異に及ぼす soyasaponins の影響を調べた。

Table 1 に示すように、soyasaponins は 100 μg/plate の添加でも ATB1, B(a)P および Trp-P-2 による本菌の復帰突然変異を抑制しないことが判明した。また、soyasaponins は薬物代謝酵素系存在下において本菌の復帰突然変異を誘発しないこと、すなわち、変異原性を示さないことも明らかにされた。

発がん物質の変異原性に及ぼす soyasapogenins の影響

Soyasaponins の加水分解物から得た soyasapogenins を用いて、ATB1, B(a)P および Trp-P-2 の変異原性に及ぼすこの物質の影響を調べた。

Table 2 から明らかなように、soyasapogenins は添加量を多くするにしたがって ATB1 および Trp-P-2 の変異原性を次第に強く抑制し、50 μg/plate の添加で ATB1 に対して 85%、Trp-P-2 に対して 54% の抑制を示した。しかし、本物質は B(a)P の変異原性を抑制しなかった。この結果は soyasapogenins の抗変異原作用に特異性があることを示した。

これらの発がん物質は薬物代謝酵素系により活性化されて変異原性を発現する。これらの発がん物質の変異原性に対する soyasapogenins の抑制効果の相違は、発がん物質(変異原物質)の代謝的活性化の阻害作用における脱変異原物質としての soyasapogenins の特異性に基づくと考えられる。

Table 1. Effects of soyasaponins on the mutagenicities of ATB1 B(a)P and Trp-P-2 for *S. typhimurium* TA 100.

Soyasaponins (μg)	Number of His ⁺ -revertant colonies/plate			
	Mutagen			
	None	ATB1 (0.05 μg)	B(a)P (5 μg)	Trp-P-2 (1 μg)
0	140 ± 18	2914 ± 105	911 ± 18	2096 ± 113
10	136 ± 12	2911 ± 82	—	2049 ± 112
25	139 ± 13	2972 ± 132	—	2201 ± 107
50	134 ± 11	3217 ± 144	1201 ± 135	2087 ± 126
100	137 ± 10	3179 ± 122	1248 ± 127	2159 ± 114

Values represent the mean ± SE of triplicates.

Table 2. Effects of soyasapogenins on the mutagenicities of ATB1 B(a)P and Trp-P-2 for *S. typhimurium* TA 100.

Soyasapogenins (μg)	Number of His ⁺ -revertant colonies/plate				Inhibition (%)		
	None	ATB1	B(a)P	Trp-P-1	ATB1	B(a)P	Trp-P-2
0	132 ± 12	2950 ± 115	911 ± 18	2096 ± 113			
10	139 ± 14	2786 ± 137	—	1707 ± 149	6	—	20
25	136 ± 11	1619 ± 107	—	1393 ± 121	47	—	36
50	135 ± 11	554 ± 52	1111 ± 68	1035 ± 105	85	ND	54
100	137 ± 13	326 ± 28	1054 ± 72	775 ± 36	94	ND	65

Values represent the mean \pm SE of triplicates. Inhibition (%) was calculated with equation, $\{(A-B)/A\} \times 100$, where B and A are the colony numbers of revertant induced by mutagen with and without soyasapogenins, respectively. ND represents no inhibition.

また、soyasapogenins は soyasaponins と同じく変異原性を示さないことが判明した。

Soyasapogenol A および B の抗変異原活性

大豆中の soyasaponins を構成している soyasapogenins は大部分が soyasapogenol A と soyasapogenol B であると言われている。また、soyasaponins の加水分解物から得た soyasapogenins は、薄層クロマトグラフィーによる分離そして溶出操作により、soyasapogenol A を22%、soyasapogenol B を56%含むことが認められた。したがって、本実験では soyasapogenol A と soyasapogenol B を用いて、添加量50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で ATB1, B(a)P および Trp-P-2 に対する抗変異活性を調べた。

Fig. 2 から明らかなように、soyasapogenol A および B は50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で ATB1 に対してそれぞれ約80%および約95%の抗変異原活性を、Trp-P-2 に対してはそれぞれ約55%および約60%の抗変異原活性を示した。一方、B(a)P に対しては両化合物とも抗変異活性を示さなかった。この結果から、これらの化合物は、soyasaponins の加水分解物から得た soyasapogenins と同様、抗変異原作用に特異性を持つことが判明した。

Soyasapogenols の抗変異原活性が ATB1, B(a)P および Trp-P-2 間において異なるのは、前述のように、これら発がん物質の代謝的活性化に対する soyasapogenols の阻害作用における特異性によると考える。

発酵大豆食品に含まれる isoflavone の genistein は10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の添加量で ATB1 および Trp-P-2 に対して約65%の抗変異原活性を示した¹³⁾。この結果と soyasapogenins, soyasapogenol A および soyasapogenol B の抗変異原活性とを比較すると、これらの化合物は、genistein に比べて、これらの発がん物質に対して弱い抗変異原活性を有することが判明

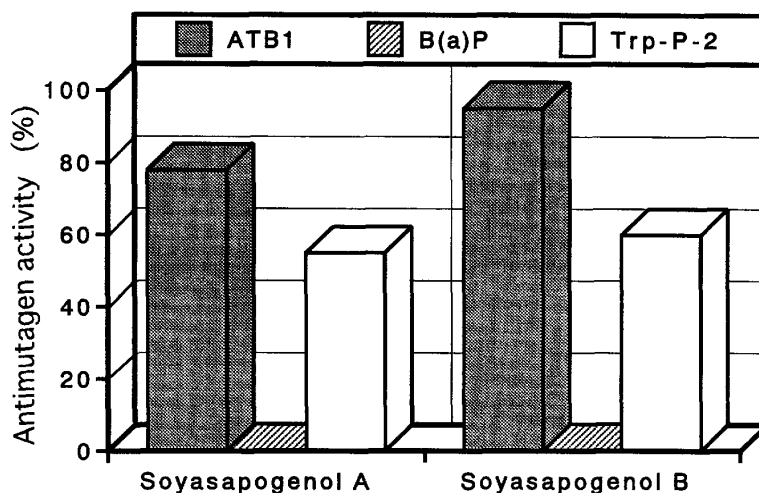


Fig.2. Antimutagen activities of sapogenols againsts ATB1, B(a)P and Trp-P-2 using *S. typhimurium* TA 100.

Antimutagen activity (%) was calculated with the equation, $\{(A-B)/A\} \times 100$, where B and A are the colony numbers of revertant induced by mutagen with and without sapogenol ($50 \mu\text{g}/\text{plate}$), respectively. Values represent the mean of three measurements.

した。

なお, soyasapogenol A と soyasapogeno B は変異原性を示さないことも明らかとなった。

要 約

Soyasaponins, その加水分解物から得た soyasapogenins, その物質の主要構成成分である soyasapogenol A および soyasapogenol B の抗変異原性について検討を行った。Soyasaponins は薬物代謝酵素系の存在下で ATB1, B(a)P および Trp-P-2 によって誘発される *S. typhimurium* TA100 の復帰突然変異を抑制しなかった。Soyasapogenins, soyasapogenol A および soyasapogenol B は, B(a)P に対して抗変異原活性を示さなかったが, ATB1 および Trp-P-2 に対して抗変異原活性を示した。この抗変異活性は Trp-P-2 よりも ATB1 に対して強かった。この結果は, 抗変異原作用における soyasapogenis, soyasapogenols の特異性を表わしており, これらの化合物の脱変異原的作用を示唆する。この活性の相違は, 発がん物質 (変異原物質) の代謝的活性化の阻害に対する特異性に基づくと考えられる。また, これらの化合物は発酵大豆食品中に存在する isoflavone の genistein に比べて弱い抗変異原活性を示すことが判明した。

文 献

- 1) 北川 勲, 吉川雅之, 林 輝明, 谷山登志男: 薬学雑誌, **104**, 162 (1984).
- 2) 北川 勲, 吉川雅之: 化学と生物, **21**, 224 (1983).

- 3) 大南宏治, 奥田拓道, 吉川雅之, 北川 勲: *Proc. Smp. WAKAN-YAKU*, **14**, 157 (1981).
- 4) 大南宏治, 奥田拓道, 浜井藤次郎, 北川 勲, 吉川雅之, 有地 滋, 林 輝明: *栄養と食糧*, **34**, 105 (1981).
- 5) 谷澤久之, 佐塚泰之, 滝野吉雄, 北川 勲, 吉川雅之, 林 輝明, 有地 滋: *Proc. Smp. WAKAN-YAKU*, **15**, 119 (1982).
- 6) 有地 滋, 戸田静夫: *基礎と臨床*, **16**, 135 (1982).
- 7) Ireland P. A. and Dziedzic S. Z.: *J. Chromatogr.* **325**, 275 (1985).
- 8) Price K. R., Fenwick G. R. and Jurzysta M.: *J. Sci. Food Agric.* **37**, 1027 (1986).
- 9) 松岡麻男, 長谷川幸雄, 木下英明: *活水論文集 第31集, 家政科・一般教育・音楽科編*, 1 (1988).
- 10) 松岡麻男: *大豆月報 2/3月合併号 (第169号)*, 20 (1991).
- 11) 海老根英雄: *日本醸造協会誌* **85**, 70 (1990).
- 12) 海老根英雄: *アミノ酸協会技術部会報* **204**, 23 (1990).
- 13) 松岡麻男: *活水論文集 第42集, 生活学科編*, 39 (1999).
- 14) Ames, B. N., MacCann, J. and Yamazaki, E.: *Mutation Res.* **31**, 347 (1975).
- 15) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, T., Matsusima, T., Sugimura, T. and Okada, M.: *Mutation Res.* **48**, 121 (1977).

(2000年1月31日受理)