

大豆・その発酵食品中に存在する イソフラボンの抗変異原性

松 岡 麻 男

Antimutagenicity of Isoflavones Existing in Soybean and Fermented Soybean Foods

Asao Matsuoka

Antimutagenicity of new antioxidant, 3-HAA, isolated from tempe, and DDI, GTI, DDE, GTE of isoflavones existing in soybean and the fermentation foods (tempe and miso) was examined.

3-HAA gave no influence to H⁺ reversional mutation of *S.typhimurium* TA 100 by ATB1 and Trp-P-2 in drug-metabolizing enzyme system. This antioxidant was shown to be no antimutagen in tempe.

GTE, which tempe and miso included most abundantly in isoflavones, inhibited mutagenicities of ATB1 and Trp-P-2 remarkably. Isoflavone aglycons, DDE and GTE, showed stronger antimutagen activity than DDI and GTI of the glucosides. GTE had the strongest antimutagen activity in these isoflavones. These findings proved that isoflavones were antimutagens in tempe and miso. DDE and GTE were shown to be important antimutagens. GTE in particular seems to play an important role in the antimutagenicity of these foods.

Key words: 抗変異原性 antimutagenicity, 抗変異原物質 antimutagen, イソフラボン isoflavone, ゲニステイン genistein, 3-ヒドロキシアンスラニル酸 3-hydroxyanthranilic acid, アフラトキシンB1 aflatoxin B1, トリプ-P-2 Trp-P-2

緒 言

フェノール化合物に属するイソフラボンは、大豆中ではダイゼイン (DDE) やゲニステイン (GTE) およびそれらの配糖体のダイジン (DDI) やゲニスチン (GTI) が主であり、その大部分が配糖体として存在している^{1),2)}。大豆発酵食品のテンペや味噌では、DDE や GTE のようなアグリコンのイソフラボン量の増加が見られ³⁾、テンペにおいてはその大部分がアグリコンとして存在している⁴⁾。そしてテンペや味噌は未発酵大豆よりも抗酸化性が強いことが認められ、これらのアグリコンのイソフラボンが主な抗酸化物質であろうと推測されて

いる^{3),4)}。

一方、抗酸化性を有するベンゾフランキノリンの誘導体や食品中のポリフェノール化合物は、変異原物質・発がん物質による発がんにおけるイニシエーション過程（突然変異）を抑制することが知られている^{5),6)}。最近、未発酵大豆よりも DDE および GTE を多く含有している発酵大豆食品のテンペおよび味噌のメタノール抽出液は、変異原物質による *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 の誘発 SOS 反応に対して高い抑制率を示すことが、清澤ら⁷⁾によって報告された。筆者ら^{8),9)}は、変異原物質による *S. typhimurium* TA100 の復帰突然変異に対する未発酵大豆および発酵大豆テンペの抑制効果を調べた結果、大豆をテンペ菌 (*Rhizopus oligosporus*) で発酵させると、強い抗変異原活性を示すことを認めた。さらに、味噌にも抗変異原性があることが知られている^{10),11)}。

以上のことから、テンペや味噌の強い抗変異原性に対してその中に含まれるアグリコンのイソフラボンである DDE や GTE の関与が仮定できる。本研究ではアフラトキシン B1 (ATB1) および 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole (Trp-P-2) による *S. typhimurium* TA100 の復帰突然変異に対する DDI, DTI, DDE, GTE などのイソフラボンの抗変異原性について検討を行った。さらに、最近テンペから単離された新しい抗酸化物質である 3-hydroxyanthranilic acid (HAA)¹²⁾の復帰突然変異に対する抑制効果も調べた。

材料・方法

菌株および前培養

供試菌株の *S. 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 に凍結保存しておいた菌懸濁液の溶解液15 μ l を接種して、37°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

変異原物質の ATB1 は Makor Chemicals LTD 製のものをナカライテスク(株)より購入し、Trp-P-2 は和光純薬工業(株)製を用いた。これらの変異原物質は Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して実験に供した。突然変異テストの Cofactor として使用される NADPH と NADH は Kohjin Co. LTD 製のものをナカライテスク(株)より購入した。その他の試薬は一般市販品の特級を使用した。前培養に用いる培地のニュートリエントブロスは 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。変異原物質による *S. typhimurium* TA100 の復帰突然変異に対する抑制効果を調べる DDI, GTI, DDE, GTE はフナコシ(株)製を用いた。同じく 3-HAA は Aldrich Chem. Co. 製のものをシグマアルドリッチジャパン(株)より購入した。DDI, GTI, DDE, GTE および 3-HAA は DMSO に溶解して試料溶液とし、実験に供した。

薬物代謝酵素系

薬物投与ラットの肝臓から調製された S-9 (マイクロソーム画分を含むもの) は、オリエンタル酵母(株)製のものを和光純薬工業(株)より購入した。

突然変異テスト

突然変異テストは Ames 法¹³⁾の変法¹⁴⁾に従って行った。変異原物質の ATB1 および Trp-P-2 は 1 プレート当たりそれぞれ 0.05 μ g および 1.0 μ g に相当する量を、試料は 50 μ g 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 μ l とした。

1. 試料存在下における変異原物質の本菌株に対する His⁺復帰突然変異テスト

滅菌小型試験管に試料溶液 0.05ml, 変異原物質溶液 0.05ml, S-9mix (S-9 と Cofactor との混合液) 0.5ml, 前培養液 0.1ml を順に加えて 37 $^{\circ}$ C で 20 分間振とうしながらプレインキュベートした。次に、微量のヒスチジンとビオチンを含む軟寒天 (トッパアガー) 2ml を加え混合し、最少グルコース寒天平板培地の上に注ぎ一様に広げ、遮光した。その後ふ卵器に入れて 37 $^{\circ}$ C で 48 時間インキュベートした。復帰突然変異により生じたコロニー数をカウントした。この試験区に対する対照は変異原物質溶液の代わりに DMSO を用いて、同様に行った。

2. 試料不在下における変異原物質の復帰突然変異テスト

本テストは前述の試験区の試料溶液の代わりに DMSO を用い、同様に行った。この対照は本試験区の変異原物質溶液の代わりに DMSO を用い、同様に行った。

3. 試料の復帰突然変異テスト

本テストは 1 の試験区の変異原物質溶液の代わりに DMSO を用い、同様に行った。この対照は本試験区の試料溶液の代わりに DMSO を用いて同様に行った。本試験区とその対照区において、コロニー数の平均値に差が認められなかった。この結果から、本テストにおいて試料に起因する復帰突然変異は起こらないことが判明した。

なお、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

変異原性に及ぼす 3-HAA の影響

ATB1 および Trp-P-2 に起因する *S. typhimurium* TA100 の復帰突然変異に及ぼす 3-HAA の影響について検討した。Fig. 1 に示すように、3-HAA は 50 μ g/plate を添加しても ATB1 および Trp-P-2 の変異原性に影響を与えなかった。

テンペの 3-HAA 含有量は、発酵期間によって違うが、二日間の発酵で最高の約 50mg/100g 乾重量に達する¹²⁾。テンペのエタノール抽出物は、テンペの湿重量に換算して 2.5mg/plate で ATB1 の変異原性を約 80%⁹⁾、Trp-P-2 のそれを約 50% 抑制する (未発表)。テンペの湿重

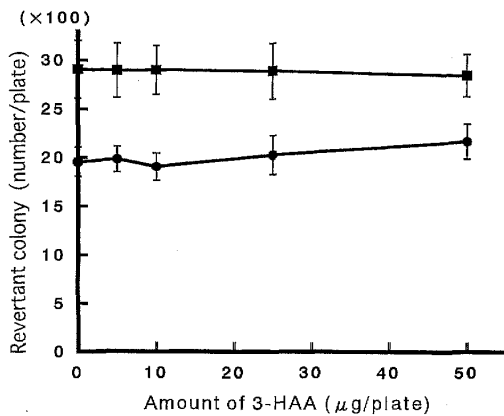


Fig. 1 Effects of 3-HAA on the mutagenicities of ATB1 (■) and Trp-P-2 (●) toward *S. typhimurium* TA100. The revertant colony number is the difference from the colony number on the plate with mutagen minus the colony number on the plate without mutagen. Each value represents the mean \pm SE from triplicate measurements [$n=3$]

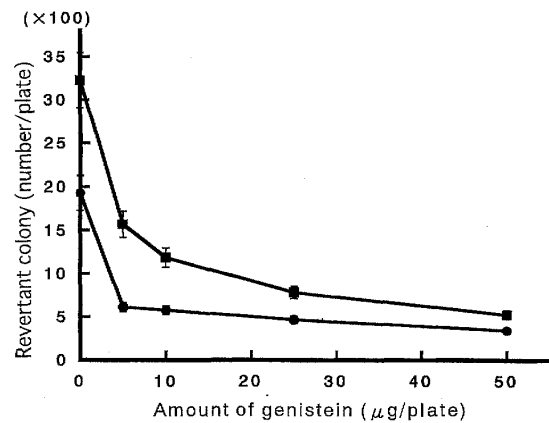


Fig. 2 Effects of genistein on the mutagenicities of ATB1 (■) and Trp-P-2 (●) toward *S. typhimurium* TA100. The revertant colony number is the difference from the colony number on the plate with ATB1 or Trp-P-2 minus the colony number on the plate without mutagen. Each value represents the mean \pm SE from triplicate measurements [$n=3$]

量2.5mgは乾重量として約1.0mgに相当する。この量のテンペに含まれる3-HAA量は、概算すると0.5 μ gになる。本実験では、その量の約100倍(50 μ g)の3-HAAを添加しても、3-HAAによる変異原性抑制効果は全く見られなかった。以上のことから、テンペ中の3-HAAはテンペの抗変異原性に関与しないことが証明された。

GTEの変異原性抑制効果

ATB1およびTrp-P-2の変異原性に対するGTEの抑制効果を検討した。Fig. 2から明らかのように、GTIのアグリコンであるGTEはこれらの変異原性に対して強い抑制効果を示すことが認められた。それは10 μ g/plateでATB1およびTrp-P-2に対して共に約65%の抑制率であった。この結果は、大豆発酵食品のテンペや味噌中のGTEがATB1およびTrp-P-2に対するこれら食品の抗変異原活性に関与することを示唆した。

イソフラボンの抗変異原活性の比較

大豆およびその発酵食品に含まれるイソフラボンDDI, GTI, DDE, GTEのATB1およびTrp-P-2に対する抗変異原活性について、イソフラボン添加量を10 μ g/plateにし、比較・検討した。Fig. 3に示すように、アグリコンのDDEやGTEは、その配糖体のDDIやGTIよりも強い抗変異原活性を有することが明らかになった。また、ATB1およびTrp-P-2に対する抗変異原活性は10 μ g/plateのDDEで約30%、同じくGTEで約65%であり、DDEよりもGTEの方が強いことが認められた。これらの結果から、イソフラボンは大豆発酵食品のテンペや味噌に含まれる抗変異原物質の一つであり、その中でもアグリコンのDDEおよびGTE、特

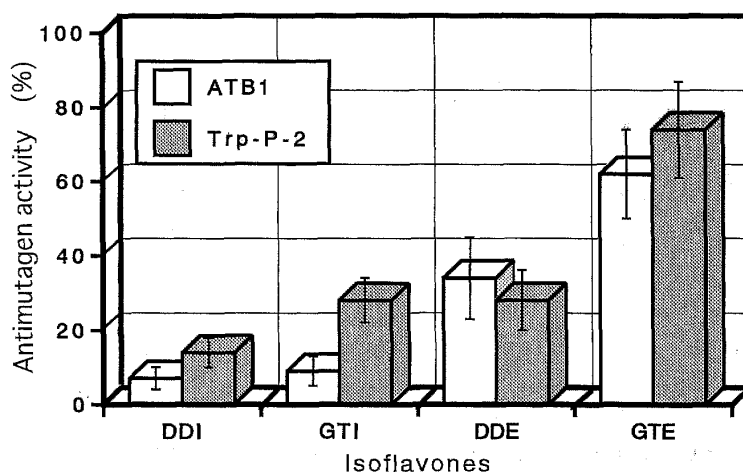


Fig. 3 Antimutagen activities of isoflavones against ATB1 and Trp-P-2 using *S. typhimurium* TA100. Antimutagen activity (%) was calculated with the equation, $(A-B)/A \times 100$, where B and A are the colony numbers of revertant induced by mutagen with and without isoflavone ($10 \mu\text{g}/\text{plate}$), respectively. Values represent the mean \pm SE of three measurements [$n=3$].

に GTE が重要であることが判明した。

未発酵大豆中のイソフラボンは主に配糖体の DDI および GTI であるが、大豆発酵食品のテンペ中には DDI および GTI が極端に少なく、反対にアグリコンの DDE および GTE が著しく多く存在しており、特に GTE 含有量が顕著である⁷⁾。イソフラボン含有量において同様な傾向が味噌にも見られる^{4),7)}。

以上のことから、アグリコンの DDE および GTE、特に GTE は、大豆発酵食品のテンペや味噌の抗変異原性に重要な役割を果たすことが示唆された。

テンペの DDE および GTE の含有量は、三種のテンペのその含有量⁷⁾を平均すると、それぞれ約 $1100 \mu\text{g}/\text{g}$ 乾重量および約 $2700 \mu\text{g}/\text{g}$ 乾重量になる。前に記述しているように、1プレート当たり乾重量として約 1.0mg に相当するテンペからのエタノール抽出物を突然変異テストの系に添加した場合、それは ATB1 の変異原性に対して約 80% の抑制率を、Trp-P-2 に対して約 50% の抑制率を示す。この量のテンペからのエタノール抽出物には概算すると約 $1.1 \mu\text{g}$ の DDE および約 $2.7 \mu\text{g}$ の GTE が含まれる。この量の DDE および GTE の抗変異活性は、Fig. 3 の結果を元に単純に比例計算すると、各々約 3% と約 20% になる。それはテンペのエタノール抽出物の抗変異活性よりも弱い。DDE および GTE は Trp-P-2 と ATB1 の両変異原物質に対してほぼ同程度の抑制であったが、テンペ・エタノール抽出物は前者よりも後者の変異原性を強く抑制した。これらのことから、テンペの抗変異原性にはイソフラボンだけでなく他の物質も関与していると推察する。また、テンペの強い抗変異原性はイソフラボンと他の物質の相乗的作用によることも考えられる。

要 約

大豆およびその発酵食品のテンペや味噌に存在しているイソフラボンの DDI, GTI, DDE, GTE およびテンペの新抗酸化物質 3-HAA の抗変異原性について検討を行った。

3-HAA は薬物代謝酵素系の存在下での ATB1 および Trp-P-2 による *S. typhimurium* TA100 の H⁺ 復帰突然変異に影響を与えなかった。この抗酸化物質はテンペの抗変異原物質ではないことが明らかとなった。

テンペや味噌に含まれるイソフラボンの中で最も量の多い GTE は、ATB1 および Trp-P-2 の変異原性を著しく抑制した。アグリコンのイソフラボンである DDE および GTE はその配糖体である DDI や GTI よりも強い抗変異原活性を示した。GTE はこれらのイソフラボンの中で最も強い抗変異原活性を有していた。以上のことから、イソフラボンはテンペや味噌に含まれる抗変異原物質の一つであり、その中でもアグリコンの DDE および GTE は抗変異原物質として重要であることが実証された。特に GTE はこれらの食品の抗変異原性に重要な役割を果たすと思われる。

文 献

- 1) Ohta, N., Kuwata, G., Akahori, H., and Watanabe, T.: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1415-1419 (1979)
- 2) Pettersson, H. and Kiessling K.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **67**, 503-506 (1984)
- 3) Esaki, H., Onozaki, H., and Osawa, T.: "Food phytochemicals for Cancer Prevention I" pp.353-360 (1994) American Chemical Society, Washington, DC.
- 4) 池田稜子, 太田直一, 渡辺忠雄: 日本食品科学工学会誌 **42**, 322-327 (1995)
- 5) Mizuno, M., Toda, M. and Ueno, N.: *Agric. Biol. Chem.* **53**, 959-964 (1989)
- 6) 篠原和毅: 栄養と健康のライフサイエンス **1**, (4), 4-9 (1996)
- 7) Kiyosawa, I., Matsuyama, J., Arai, C. and Setoguchi, T.: *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **42**, 835-842 (1995)
- 8) 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・音学科編, p.1-11 (1988)
- 9) 松岡麻男: 大豆月報 2/3月合併号 (第169号), 20-25 (1991)
- 10) 海老根英雄: 日本醸造協会誌 **85**, 70-75 (1990)
- 11) 海老根英雄: アミノ酸協会技術部会報 **204**, 23-34 (1990)
- 12) Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T.: *J. Agric. Food Chem.* **44**, 696-700 (1996)
- 13) Ames, B. N., MacCann, J. and Yamazaki, E.: *Mutation Res.* **31**, 347-364 (1975)
- 14) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, T., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M.: *Mutation Res.* **48**, 121-127 (1977)

(1999年1月29日受理)