

味噌の神経細胞保護作用 Neuroprotective action of Miso

小島 百代 (KOJIMA Momoyo)¹ 佐野 愛子 (SANO Aiko)² 鈴木 龍一郎 (SUZUKI Ryuichiro)²
白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)² 坂上 宏 (SAKAGAMI Hiroshi)³

¹ 明海大学歯学部, ² 城西大学薬学部生薬学, ³ 明海大学歯科医学総合研究所 (M-RIO)

Key Words : 味噌 PC12 細胞 NGF 神経細胞分化 アミロイドペプチド 神経保護

要約

味噌は長年、私達の食生活を支えてきた伝統的な発酵食品である。味噌は、様々な疾患の予防、美容効果やダイエット効果を示すことが知られている。味噌の新しい薬理作用を探索する過程で、味噌が、細胞前駆細胞の増殖を促進し、アミロイドペプチドによる神経障害を軽減することを見出した。味噌の神経保護作用は、高齢者社会における認知症発症の予防に貢献する可能性が示唆された。

SUMMARY

Miso is a traditional fermented food that has supported our diet for many years. Miso is known to prevent various diseases, and exerts beauty and diet effect. In the process of searching for a new pharmacological action of miso, we found that miso promotes proliferation of undifferentiated neuronal cells and alleviates neuropathy induced by amyloid peptides. It is suggested that the neuroprotective action of miso may contribute to the prevention of the onset of dementia in the elderly.

はじめに

味噌は1300年もの長い間、基礎調味料の一つとして私達の食生活を支えてきた伝統的な発酵食品である。味噌は大きく分けて米味噌、麦味噌、豆味噌、調合味噌の4種類に分類することができる。現在国内で生産されている8割が米味噌である。米味噌は豆味噌と比較し、炭水化物が多く、タンパク質、カリウム・リン・鉄分などのミネラル、ビタミン類が少ないという特徴を有する。味の違いにより、甘味噌、甘口味噌、辛口味噌の3種類に分類される。味噌の旨味はタンパク質が分解してできるアミノ酸(主にグルタミン酸)に影響され、熟成の進ん

だものほど旨味が強くなる。また、色の違いにより、赤系味噌、淡色系味噌、白味噌の3種類に分類される¹⁾。

味噌は、骨粗しょう症、高血圧、糖尿病、胃腸病、がんの予防、コレステロールの低下、肝臓の健康、二日酔いの改善、胃腸の負担の軽減、美容効果(アンチエイジング)やダイエット効果を示すことが知られている²⁾。

現在の日本の国民の21%が65歳以上の超高齢社会であり、認知症が大きな社会問題となっている。アルツハイマー病は認知症全体の60%を占め、脳にアミロイド-β(Aβ)やタウと呼ばれる特殊なタンパク質が溜まり、神経細

胞が壊れて死んでしまうために発症する³⁾。

我々は、味噌の新しい薬理効果を探る過程で、味噌抽出液が神経細胞の増殖を促進し、A β 誘発性神経細胞死を抑制することを見出したので報告する。

1. 味噌のアミノ酸組成

筆頭著者 (MK) の祖母が調製した味噌 (米味噌・甘口・赤味噌) を 0.1 mg 秤量して、エッペンドルフチューブに入れ、ミリ Q 水を 1 mL 加えた。これを 16 本用意した。37°C, 56°C, 90°C, 100°C にセットしたブロックに載せた。それぞれ 4 本のエッペンドルフチューブを 3 分間、加温した。各温度毎にプールして、1000 rpm, 5 min 遠心して、不要物を除き、ミリポアフィルターでろ過滅菌した。浸透圧は、いずれの抽出液でも大差なく、若干高張気味であった :392 mOsm (37°C) , 456 mOsm (56°C) , 412 mOsm (90°C) , 510 mOsm (100°C) (明海大学

分子生物学研究施設, ゴノテックオズモメーター)。

抽出液 100 μ L に 10% trichloroacetic acid (TCA) を 100 μ L 添加し、混和後、10000 rpm, 5 min 遠心して徐タンパクを行った。上清は、-20°C のフリーザー中に保存した。全自動アミノ酸分析機で各種アミノ酸を定量した。溶出順に、アスパラギン酸 (Asp), スレオニン (Thr), セリン (Ser), グルタミン酸 (Glu), グリシン (Gly), アラニン (Ala), バリン (Val), メチオニン (Met), イソロイシン (Ile), ロイシン (Leu), チロシン (Tyr), フェニルアラニン (Phe), アンモニア (NH₃), リジン (Lys), アルギニン (Arg), プロリン (Pro) が検出された。グルタミンは検出されなかった。37°C, 56°C, 90°C, 100°C いずれの温度で加温しても、抽出されるアミノ酸の相対比は変わらず、グルタミン酸が最も高かった (図 1)。このことは、100°C に熱しても、アミノ酸は安定であることを示す。アミノ酸の

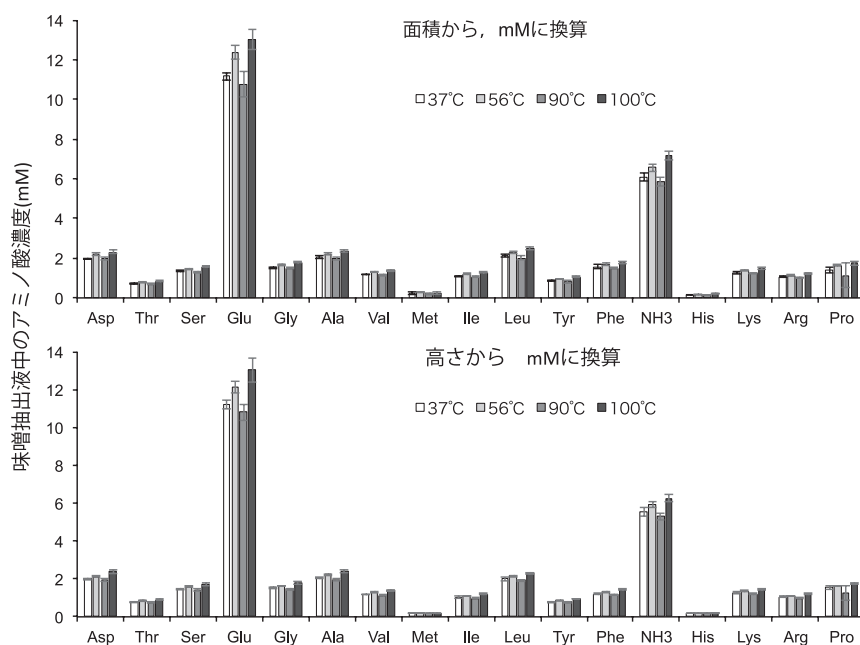


図 1 味噌抽出液中のアミノ酸の組成

味噌を、37°C, 56°C, 90°C, 100°C で 3 分間抽出、その 5%TCA 可溶画分を、日本電子 JLC-500/V 型全自動アミノ酸分析機で分析した。

充填剤: LCR-6, カラム :4mm i.d. \times 120mm, 溶離液: 生体アミノ酸分析用緩衝液キット, 検出: ニンヒドリン発色法 (ニンヒドリン試液ワコー アミノ酸自動分析装置用 日本電子用), 各点は、平均値 \pm S.D. (n=3)

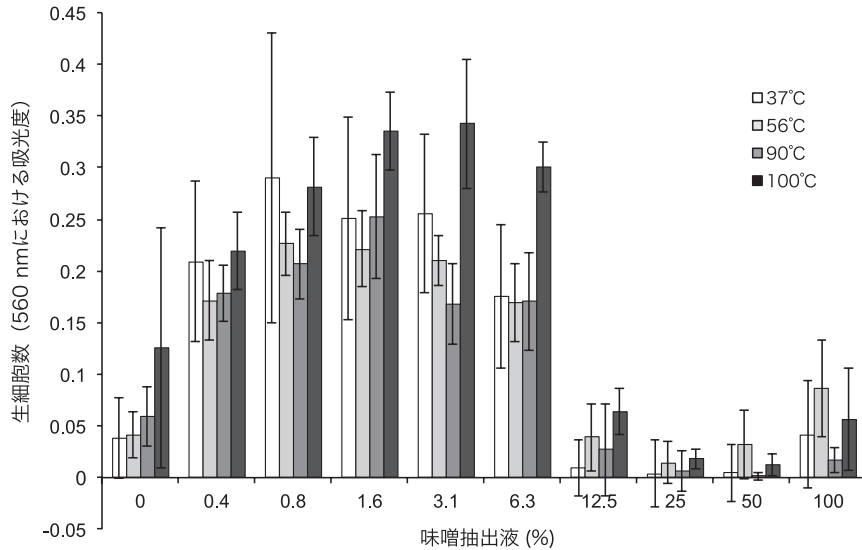


図2 味噌抽出液による未分化神経細胞の増殖促進効果

PC12細胞を、種々の味噌抽出液を含む血清無添加DMEM培地で4日間培養し、生細胞数をMTT法で測定した。各点は、平均値±S.D. (n=6)

総量は味噌の重量の5%程度であった。

2. 未分化PC12細胞の増殖に与える影響

ラット副腎髄質クロム親和性細胞腫から樹立されたPC12細胞を、神経前駆細胞のモデルとして使用した。PC12細胞は、神経成長因子(NGF)の存在下で培養すると、神経突起を伸ばし始め、交感神経細胞様に分化するため、神経細胞の分化機構の解明やNGFの作用機構解明のために多くの研究者に使用されている。

まず、未分化PC12細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。我々は、DMEM培地がPC12細胞の増殖とアミノ酸の消費を最も高く維持でき、これにHam12培地や非必アミノ酸を添加すると、逆に増殖とアミノ酸消費が約半分低下してしまうことを見出した。これらの結果を踏まえ、PC12細胞の維持には、DMEM培地に10%の牛胎児血清(FBS)を添加した培地を用いている⁴⁾。

未分化PC12細胞は、血清なしのDMEM培地で4日間培養すると細胞は死んでしまうが、味噌抽出液の添加により、細胞増殖が促進した。この味噌の増殖促進効果は、37°C、56°C、

90°C、100°Cいずれの温度で調整しても観察された。増殖促進の味噌の至適濃度は、0.8~1.6%であった。12.5%を超すと、その強い酸性度のため、細胞は死滅した(図2)。

顕微鏡観察により、血清を含まない培地で生育した細胞は、4日目でほとんど死滅した。この培地に味噌抽出液を添加すると、死細胞の出現が減少した。

3. 味噌抽出液は、アミロイドβ-ペプチド誘発性神経細胞傷害を抑制する

我々は最近、NGF(50 ng/mL)の添加によりPC12細胞を神経細胞様に分化誘導する方法を確立した⁵⁾。NGF(50 ng/mL)処理で神経細胞に分化させると突起を伸ばす。細胞増殖を抑えて神経分化を誘導するために低濃度(1%)のFBSをDMEMに添加した。この時、あまりに低密度で細胞を播種すると細胞は死滅する。おそらく、分化した細胞から放出される増殖因子が細胞の生存に必要なのではないかと考えている。放出される因子がNGFと同一であるか否かは明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

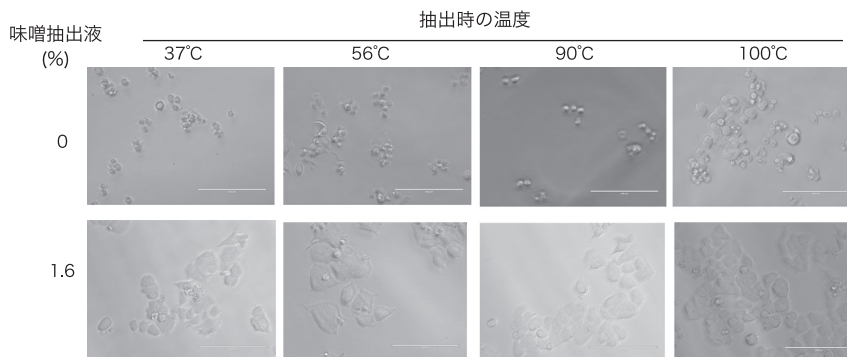


図3 味噌は未分化 PC12 細胞の細胞死を抑制した。培養条件は、図2と同じである。

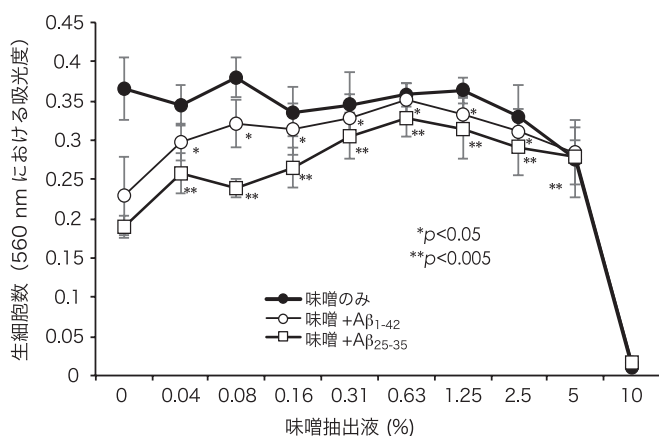


図4 味噌抽出液の神経細胞保護効果

この分化した PC12 細胞を、アミロイドβ-ペプチド (Aβ₁₋₄₂ あるいは Aβ₂₅₋₃₅) で処理すると、生細胞数は、対照の 63% および 52% まで低下した。0.04% 以上の濃度の味噌を添加すると、この神経細胞傷害が有意に緩和された。0.63% の味噌が存在すると、対照の 98% および 92% まで生存率が復帰した (図4)。味噌の 50% 細胞傷害濃度 (6.9%) の 1/11 の濃度の味噌で神経細胞傷害がほぼ完全に抑制された。

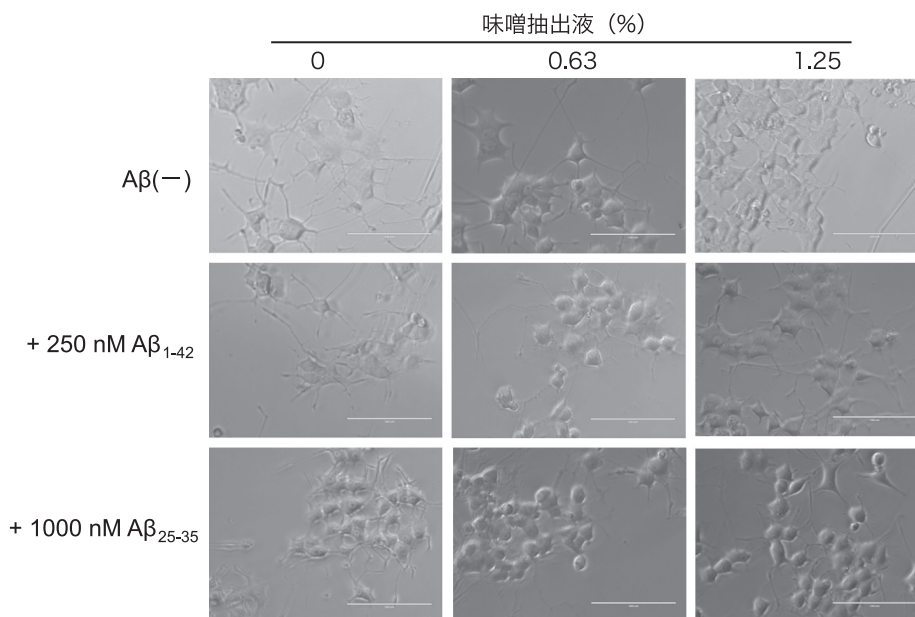


図5 味噌抽出液は、アミロイドによる神経突起の切断を緩和する。

アミロイドβ-ペプチド (Aβ₁₋₄₂ あるいは Aβ₂₅₋₃₅) で処理すると、分化した PC12 細胞の神経突起が切断された。味噌抽出液を添加すると、神経細胞は神経突起を介して連結するのが確認された (図 5)。この結果は、味噌は、アミロイドβ-ペプチドによる神経障害を抑制することを示す。

4. 今後の研究の方向性

本研究により、味噌抽出液は、未分化神経細胞の増殖を促進するばかりでなく、アミロイドによる神経細胞傷害を抑制することが判明した。これらの作用を示す物質が同一のもので

あるか否かを明らかにするためには、更なる研究が必要である。本研究で使用した培養液 (DMEM) の中には、豊富なアミノ酸が含まれているため、未分化 PC12 細胞の死滅は、ただ単純にアミノ酸の不足だけによるものとは考えにくい。味噌の中には、神経細胞の増殖を促進するものが含まれているのかもしれない。

我々は、分化した PC12 細胞の増殖が、神経毒性で知られるパクリタキセルだけでなく、ドキタキセルによっても、低濃度 (1~5 nM) で有意に抑制されることを見出した^{6,7)}。味噌が、これらの抗がん剤の副作用を抑えることができるか否かは、今後の検討課題である。

参考文献

1. <https://www.marukome.co.jp/miso/>
2. <http://cocoaru.net/554>
3. <https://info.ninchisho.net/type/t10>
4. Sakagami H, Suzuki R, Shirataki Y, Iwama S, Nakagawa M, Suzuki H, Tanaka K, Tamura N and Takeshima H: Re-evaluation of culture condition of PC12 and SH-SY5Y cells based on growth rate and amino acid consumption, *In Vivo* **31** (11): 1089-1095, 2017.
5. Sakagami H, Tsuji M, Tomomura M, Masuda Y, Iwama S, Nakagawa M, Suzuki H, Tanaka K, Abe T, Tamura N, Tomomura A, Yokose S, Takeshima H, Natori T, Horiuchi M, Fujisawa T, Kiuchi Y, Oguchi K, Yasui T, Oizumi H and Oizumi T: Protection of differentiating neuronal cells from amyloid β peptide-induced injury by alkaline extract of leaves of *Sasa senanensis* Rehder. *In Vivo* **32**: 231-239, 2018.
6. Hara Y, Sakagami H, Shi H, Abe T, Tamura N, Takeshima H, Horie N, Kaneko T, Shiratsuchi H and Kaneko T: Partial protection of paclitaxel-induced neurotoxicity by antioxidants. Submitted to *In Vivo*.
7. Sakagami H, Hara Y, Shi H, Iwama S, Nakagawa M, Suzuki H, Tanaka K, Abe T, Tamura N, Takeshima H, Horie N, Kaneko T, Shiratsuchi H and Kaneko T: Change in anticancer drug sensitivity during neuronal differentiation of PC12 cells. Submitted to *In Vivo*.

連絡先：

〒350-0283

埼玉県坂戸市けやき台 1-1

明海大学歯学部 小島百代 p.horn.1004@gmail.com

明海大学歯科医学総合研究所 (M-RIO) 坂上宏 sakagami@dent.meikai.ac.jp

〒350-0295

埼玉県坂戸市けやき台 1-1

城西大学薬学部薬科学科 佐野愛子 yk15028@josai.ac.jp

城西大学薬学部薬科学科生薬学研究室 鈴木龍一郎 ryu_suzu@josai.ac.jp

白瀧義明 shiratak@josai.ac.jp