

雑穀の脂肪酸組成と抗癌効果との関連性の研究

Study on the relationship between fatty acids composition
and anti-tumor activity of Japanese millet

木 村 賢 一

岩手大学農学部

〔研究目的〕

日本では癌による死因が第1位を占め、胃癌は減少傾向にあるものの、食生活の欧米化等により性ホルモン依存性の乳癌と前立腺癌が増加傾向にある。癌の分子レベルの原因が分子生物学の進展により明らかとなり、特異的な分子標的の抗癌剤が上市されつつある現在、食品の機能性研究においても、最新の医薬品の情報を利用し、食材に含まれる新たな構造や作用を有する機能性物質の検討が重要であると考えられる。癌において重要な分子標的の一つにヒストンデアセチラーゼ (HDAC) があり、医薬品ではその阻害剤が米国において2006年秋に認可された。本研究者は、平成15年度の本申請研究において、男性ホルモン依存性の前立腺癌に関わる性ホルモン合成酵素 CYP17 (17α -Hydroxylase/C_{17,20}-Lyase) の阻害物質の研究を行い、雑穀中の活性物質をシス型リノール酸 (以下リノール酸と略記する) と同定した¹⁾。その後、多くの癌で異常となっている癌抑制遺伝子 p53 に関わる HDAC 阻害活性も雑穀中に見出し、それと同じくリノール酸を中心とした不飽和脂肪酸であることを明らかにした^{2, 3)}。そこで本研究では、それらの阻害活性が雑穀の種類や栽培法などで異なるのかどうかを調べ、雑穀の違いによる脂肪酸組成とそれに基づく抗癌効果の関係を明らかにすることで、機能性食品素材としての雑穀の新たな領域を拡大することを目的とした。

〔研究方法〕

1. HDAC スクリーニング系³⁾

市販されているキット (AK-501, BIOMOL) を多少改変した、次の方法で行なった。*Color de Lys Substrate* (基質) 5 μ l を HDAC ASSAY BUFFER (緩衝液) 495 μ l で希釈して基質とし、*Nuclear Extract from HeLa Cells* (酵素) 50 μ l を緩衝液50 μ l で希釈し酵素源とした。また、*Color de Lys Developer* (発色液) 30 μ l を緩衝液570 μ l で希釈し発色液とした。96穴プレートに、それぞれ緩衝液18 μ l, 基質25 μ l, サンプル2 μ l, 酵素5 μ l を順次加え全量を50 μ l とし、37℃で6時間反応させた。その後発色液25 μ l を加え、37℃で

10分間反応させ、405nmの吸光度をプレートリーダーで測定した。メタノールをサンプルとしたものをコントロール値とし、色を有する抽出物のブランクとして緩衝液73 μ lにサンプル2 μ lを加えたものを測定し、HDAC 阻害(%)を計算した。

2. CYP17スクリーニング系^{1, 4)}

平成15年度の本申請研究とほぼ同様の方法、すなわち0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4) (2 mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.2mM DTT 含有) 125 μ l, 10mM NADPH 12.5 μ l, 1.25mM プロゲステロンあるいは17 α -ヒドロキシプロゲステロン 5 μ l, メタノール 5 μ l (サンプル溶解液), ラット精巣ミクロソーム画分 (25 μ g タンパク) を加えて全量を250 μ lとし、37°Cで2時間反応を行い、1 N HCl 50 μ l 加えて反応を停止させた。これに酢酸エチル 1 ml を加えて、生成物である17 α -ヒドロキシプロゲステロンあるいはアンドロステンジオンを抽出し、酢酸エチル層 810 μ l を遠心エバポレーターにて乾固後メタノール 90 μ l に溶解した。このうち20 μ l を HPLC に供して各々のピーク面積を定量し、メタノールを加えたものをコントロールとして阻害(%)を計算した。

3. 各種雑穀に含まれる活性物質(脂肪酸)の抽出

本学栄養化学研究室の西澤直行教授から恵与された、産地と栽培法の異なる各種雑穀(モチアワ, ヒエ, モチキビ) をグラインダーにて粉末化した後、メタノール抽出を行い10 mg/ml の濃度に調整した。そのサンプルを HDAC 阻害活性測定, 癌細胞毒性試験, 並びに脂肪酸組成・含量の定量などに用いた。

4. 各種雑穀中の活性物質(脂肪酸)の含量測定

市販のリノール酸, オレイン酸, リノレン酸を標準物質として, 各種雑穀のメタノール抽出物中に含まれる脂肪酸の含量を HPLC を用いて定量した。条件は, SHISEIDO CAPCELL PAK (4.6 ϕ ×150mm), MeOH:H₂O:CH₃COOH=90:10:0.1, 1 ml/min, 210 nm で分析した。

5. 雑穀と脂肪酸の抗癌試験

HDAC 阻害活性とその脂肪酸組成・含量を明らかにした雑穀のメタノール抽出物, 並びに脂肪酸の代表としてリノール酸について, ヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 と, ヒト前立腺癌細胞 LNCaP に対する抗癌活性を調べた。方法は, K562細胞は 5×10⁴ cells/ml, LNCaP 細胞は 1×10⁵ cells/ml の濃度で96穴プレートに100 μ l 播き, 同時に5 μ l のメタノールに溶解したサンプルを添加し, 37°C, 4日間培養した。その後, MTT 溶液を添加しさらに4時間培養後, 570nmの吸光度を測定し, コントロールとの比から生育%を計算した。

〔結果と考察〕

1. 各種脂肪酸の HDAC 阻害活性

雑穀中に含まれるリノール酸に HDAC と CYP 17阻害活性が認められたことから, 市販

Fatty acid	Structure	Inhibition (IC ₅₀ , mM)	
		HDAC	CYP17
C 4:0 Butyric acid		0.45	-
C 6:0 Hexanoic acid		-	未測定
C10:0 Decanoic acid		-	未測定
C14:0 Myristic acid		-	未測定
C18:0 Stearic acid		-	-
C18:1 Oleic acid		1.31	0.22
C18:1 Ricinoleic acid		-	0.73
C18:2 Linoleic acid (LA)		0.51	0.08
C18:2 Linoleaidic acid		-	未測定
C18:2 Conjugated isomer of LA		0.55	未測定
C18:3 α-Linolenic acid		0.46	未測定
C18:3 γ-Linolenic acid		0.38	0.20
C20:0 Docosanoic acid		-	未測定
C20:4 Arachidonic acid		0.27	0.19
C20:5 Eicosapentaenoic acid		0.40	未測定
C22:6 Docosahexaenoic aci		0.36	0.31

- : inhibition was not recognized at 1 mM.

図1 各種脂肪酸の構造, 並びに HDAC と CYP17阻害活性

の各種脂肪酸について HDAC と CYP 17阻害活性を測定することにより構造活性相関を調べた。本実験は、本研究開始以前より継続して行なっていたものであり、その結果も含めたものを図1に示した。文献どおり、古典的な HDAC 阻害剤の短鎖脂肪酸である酪酸は阻害を示した (IC₅₀=0.45mM) が、その他の飽和脂肪酸類は 1 mM で阻害を示さなかった。また、C18の脂肪酸で比べると、不飽和度が高くなるに従って阻害活性が高まる傾向が認められ、一方、水酸基が結合したリシノール酸では活性が低下した。さらに、長鎖不飽和脂肪酸では、アラキドン酸や DHA などの鎖長の長い物質の阻害が高くなる傾向が認められた。

2. 各種脂肪酸の CYP17阻害活性

HDAC 阻害活性と CYP17阻害活性との関係を調べるために、HDAC 阻害活性を有した脂肪酸を中心に CYP17阻害活性を調べた。その結果、飽和脂肪酸の酪酸やステアリン酸では阻害が認められないが、長鎖不飽和脂肪酸では阻害が認められた (図1)。また、不飽和脂肪酸の中では、リノール酸が最も強い阻害活性を示した ($IC_{50}=0.08$ mM)。この結果より、長鎖不飽和脂肪酸で阻害活性が認められることは両方で共通であるが、HDAC 阻害の場合では飽和脂肪酸の中で酪酸にのみ阻害が認められること、また CYP 17阻害の場合では、C18の不飽和脂肪酸の活性が HDAC 阻害より約 6 倍強いなどの特徴が認められた。

3. 雑穀に含まれる脂肪酸の簡易定量

雑穀の抽出物に CYP17と HDAC 阻害活性が認められ、一方でリノール酸以外の長鎖脂肪酸類にも両者の阻害活性が認められた (図1)。このことは、雑穀の酵素阻害活性が含まれる脂肪酸の種類と含量に基づくことを示しており、そのことを確かめるために HPLC を用いて、代表的な脂肪酸の簡易定量を行なった。保持時間が離れていて確実に分析できる 3 種の脂肪酸、リノール酸、オレイン酸、リノレン酸について分析を行なった結果、2004年度産の各種モチアワ、ヒエ、モチキビ全てにおいてリノール酸の割合が最も高いことが確認された (図2)。平は、穀類においてオレイン酸とリノール酸の含量には高い負の相関があると述べており⁵⁾、そのことと今回の結果は矛盾しなかった。

4. HDAC 阻害活性と抗癌活性

脂肪酸組成を調べた 7 種の雑穀のメタノール抽出物において、HDAC 阻害活性、並びに脂肪酸含量とヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 に対する抗癌活性を調べると、その両者には相関傾向が認められた (図2)。また、HDAC と CYP 17阻害活性が強い、C18の不飽和脂肪酸のリノール酸について抗癌活性を調べたところ、K562細胞とヒト前立腺癌細胞 LNCaP に対し、それぞれ $IC_{50}=68$ μ M、193 μ M で抗癌活性を示した。これは、HDAC と CYP17

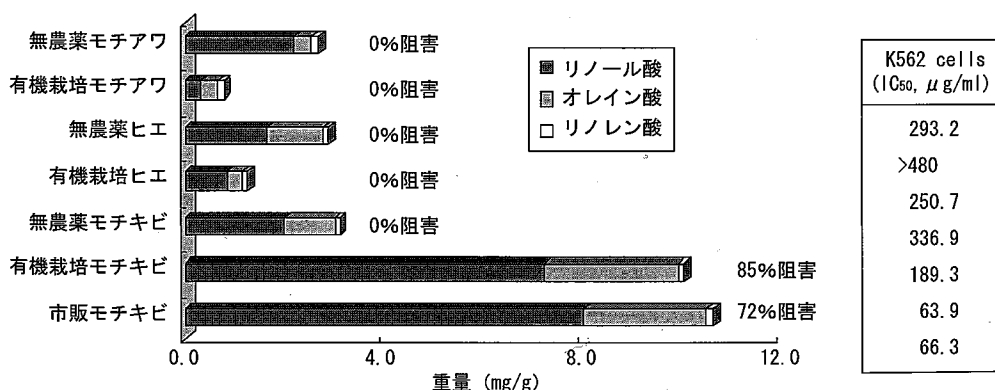


図2 各種雑穀の脂肪酸組成と HDAC 阻害活性、並びに抗癌活性

に対する阻害活性の強さ ($IC_{50}=510, 80 \mu M$) と脂肪酸の膜透過性や特異性の面から考えた場合妥当な値であること, すなわち脂肪酸の CYP17阻害や HDAC 阻害が抗癌活性と結びついていることが推定される。

5. 各種雑穀中のリノール酸と HDAC 阻害活性との関係

ヒエ, モチキビに含まれる HDAC と CYP 17阻害のメイン物質が, リノール酸であることが明らかになったことから, 市販のリノール酸を用いて, 様々な雑穀類のシス型リノール酸含量の測定が可能となった。正確な含量に関しては今後精密な分析が必要であるが, 逆相カラムを用いて90% MeOH-0.1% CH_3COOH , 210nm にて簡易測定すると, 図3に示したように, 同じヒエ, モチキビでも種類や栽培法によって含量に大きな違いがある結果が得られた。HDAC 阻害の結果に比例して, 活性の認められなかったモチアワ類のリノール酸の

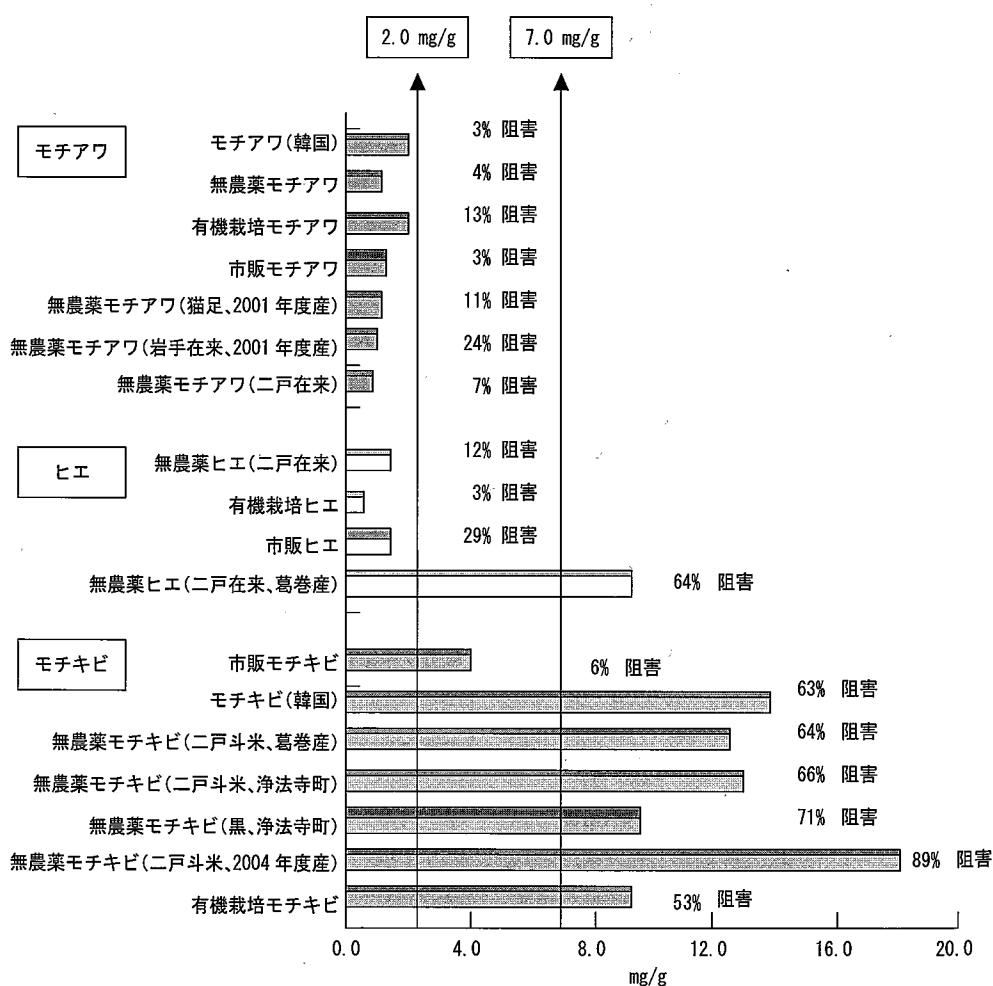


図3 各種雑穀のシス型リノール酸含量と HDAC 阻害活性

含量はいずれも2.0mg/g 以下と低いものであり、また、活性が認められたヒエとモチキビでは、7.0mg/g 以上含まれていると50%以上の阻害活性を示すことが明らかになった。モチキビの多くでリノール酸の含量が高いことが認められる一方、ヒエでは一部のヒエでのみ7 mg/g 以上を超えるものが認められるのみであった。穀類の脂質含量と脂肪酸組成についての研究に、既に平の総説があるが、本研究では様々な種類の雑穀を用いて、生物活性の視点で活性物質である脂肪酸を解析した点に発展性がある結果であると思われる。

〔要 約〕

日本において癌は死因の第1位を占め続け、性ホルモン依存性の乳癌、前立腺癌は年々増加傾向にある。我々は、癌と関わる HDAC と CYP17阻害スクリーニング系により、雑穀のヒエとモチキビに阻害活性を見出し、活性物質をリノール酸と同定している。そこで、本研究では、市販の各種脂肪酸について両方の活性を測定して、その構造活性相関を明らかにした。雑穀の酵素阻害活性は、雑穀中に含まれるリノール酸の含量に比例しており、それは抗癌活性とも相関していた。また、雑穀の栽培法や生産地や種類により脂肪酸組成と含量が異なり、それが雑穀自体の生物活性に反映していることが示唆された。すなわち雑穀の中でも、CYP17阻害活性も HDAC 阻害活性も示さなかったアワは、調べた全てのもので脂肪酸含量、特にリノール酸含量が低いという結果が得られた。一方、モチキビではその含量が高く、リノール酸が7 mg/g 以上含まれる雑穀は、50%以上の HDAC 阻害活性を有することが明らかとなった。今回の研究はあくまで *in vitro* の酵素、並びに細胞レベルの結果であることから、今後脂肪酸含量が異なる雑穀を食した時の男性ホルモン値の低下作用や抗癌効果の実験が重要であり、その結果雑穀の抗癌に関わる機能性が詳細に明らかになるものと思われる。

文 献

- 1) 木村賢一：穀類、豆類抽出物の CYP 17に対する阻害作用の検討とその活性物質に関する研究、平成15年度財団法人食糧科学振興財団年報, 144～148, 2005.
- 2) 木村賢一：酵素や遺伝子変異酵母を用いて見出された食材からの機能性物質―薬と食の接点をめざして―, 食品工業, 50, 34～43, 2007.
- 3) Aburai, N., Esumi, Y., Koshino, H., Nishizawa, N., and Kimura, K. : Inhibitory activity of linoleic acid isolated from proso and Japanese millet toward histone deacetylase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 71, 2061～2064, 2007.
- 4) Kimura, K., Itakura, Y., Goto, R., Tojima, M., Egawa N., and Yoshihama, M. : Inhibition of 17 α -Hydroxylase/C_{17,20} -Lyase (CYP17) from rat testis by green tea catechins and black tea theaflavins. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 71 : 2325～2328, 2007.
- 5) 平 宏和：穀類の脂質含量と脂肪酸組成の変動要因. 化学と生物, 27, 168～175, 1989.