研究論文

納豆抽出成分による抗がん作用機構の解析

畠山詩織¹, 加福万愉¹, 岡本知也¹, 柿崎友佳¹, 島崎奈々¹,
藤江望未¹, 高橋将太¹, 仲山真弘¹, 田川博之^{2,3}, 小松田敦^{2,3},
Ewa Grave¹, 涌井秀樹^{1,2,3}, 伊藤英晃^{1,3}

Studies on the Anticancer Mechanisms of the Natto Extract

Shiori HATAKEYAMA¹, Mayu KAFUKU¹, Tomoya OKAMOTO¹, Yuka KAKIZAKI¹, Nana SHIMASAKI¹,
Nozomi FUJIE¹, Shohta TAKAHASHI¹, Masahiro NAKAYAMA¹, Hiroyuki TAGAWA^{2,3}, Atsushi KOMATSUDA^{2,3},
Ewa GRAVE¹, Hideki WAKUI^{1,2,3} and Hideaki ITOH^{1,3}†

We have investigated anti-cancer properties of Natto, a traditional Japanese food made from soybeans fermented with *bacillus subtilis*. The protein related ingredient was partially purified from Natto using an ammonium sulphate fractionation and added to HeLa cells. As a result, all cancer cells perished the next day. On the other hand, if only a protein related extract from boiled beans and fermented soybean bacterium was added, there were no changes in cell growth. We purified and investigated amino acid sequence of anti-cancer peptide from Natto using Butyl Sepharose column chromatography of 5-kDa peptide. The peptide appeared to be a new antibacterial peptide.

Key Words : Natto, fermented soybeans, anti-cancer effect, antibacterial peptide, fermented food.

1. 緒言

発酵食品は身体の免疫力を高めると言われており、我々の健康維持のためには欠かせないものとなっている^{1,2)}。発酵食品の一般的な健康効果は、腸内環境を整えることにより、栄養価の消化吸収がよくなり、便秘予防、血中コレステロール値の低下、免疫力が高まるなどの効果がある。

納豆は、古来より日本の発酵食品の代表格である。納豆には人体に不可欠な必須アミノ酸群をバランスよく含んでおり、ビタミンB2・E・K等のビタミン群、カリウム・亜鉛・カルシウム・鉄などのミネラル成分、食物繊維などの栄養素も豊富である。納豆の効用は、栄養的な面だけでなく納豆菌自体の優れた作用に負うところが大きい。すなわち、納豆菌は胃酸にも耐えて腸にたどりつき、ビフィズス菌や乳酸菌の増殖を促進して整腸作用を発揮し、便秘を改善する。また、ウェルシュ菌や大腸菌等がつくる腐敗産物の生成を減少させ、有害物質を吸着して排泄を促すことから肝臓の負担を軽くし、肌や各組織にも良い影響を与えるものと考えられている。

納豆の健康効果を挙げると、疲労回復、整腸作用、便秘促進、滋養強壮、コレステロールの代謝を促す、免疫力アップ効果、活性酸素の働きを抑え体の老化やがんを防ぐ、肌や皮膚を若々

しく保つ、などがマスコミや一般書籍等で多数紹介されているが、納豆の如何なる成分が効果を発揮するのか等の科学的分析報告はあまりなく、ナットウキナーゼ以外には科学的解析は殆どされていない³⁾。

アジア圏では豆腐や納豆などの大豆中心の食生活であるため、乳がんと前立腺がんの発症が少ないことが報告されている⁴⁾。中でもイソフラボンは、大豆や漢方薬に使われる葛根などのマメ科の植物に多く含まれており、イソフラボンは、体内でつくられるエストロゲンと構造や働きが似ているためフィト・エストロゲン（植物エストロゲン）とも呼ばれている。我々は、納豆抽出成分のがん細胞に及ぼす作用機構を解析することにした。

2. 材料及び方法

2.1 材料

本研究で使用した納豆（市販のおはよう納豆）、納豆菌添加直前の煮豆、及び納豆菌は、株式会社ヤマダフーズ（秋田県仙北郡美郷町）より入手した。テンペ菌、麹菌は、株式会社秋田今野商店（秋田県大仙市刈和野）より入手した。

2.2 納豆抽出成分

納豆、または煮豆（100g）に300mlの10mM Tris-HCl（pH 7.4）を加え、ポリトロンで全体が均一に滑らかになるまでホモジナイズし、15,000rpm, 15min, 4℃で遠心分離した。上清を回収し、飽和硫酸濃度が0-30%, 30%-50%, 50-75%, 及び75-100%で分画した。遠心分離後の沈殿部分を10mM Tris-HCl（pH 7.4）で溶解し、同バッファーに一晩透析し、透析後に凍結乾燥を行い、サンプルとして回収した。

平成27年11月18日受付；平成27年12月22日受理

1 秋田大学大学院工学資源学研究所

〒010-8502 秋田市手形学園町1-1

Graduate School and Faculty of Engineering Science, Akita University,
1-1 Tegata-Gakuen Town, Akita 010-8502 (†Corresponding author)

2 秋田大学大学院医学系研究科

〒010-8543 秋田市本道1-1-1

Akita University Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine,
1-1-1 Hondo, Akita 010-8543

3 秋田大学発酵食品開発研究所

〒010-8502 秋田市手形学園町1-1

Akita University Institute of Fermented Food, 1-1 Tegata-Gakuen
Town, Akita 010-8502

2.3 培養がん細胞

細胞は、理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞材料開発室より入手した。本研究では60mm dishを用い、がん細胞由来のヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞)、マウス神経芽細胞 (Neuro 2A細胞)、ラット副腎褐色細胞腫細胞 (PC12細胞)、ヒトバークットリンパ腫・Bリンパ球様細胞 (Raji細胞)、及びヒト胎児腎臓細胞 (HEK293細胞)の培養に、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (SIGMA社)にウシ胎児血清 (MBL社) 10 (v/v) %と0.2 (v/v) %ペニシリンストレプトマイシン添加培地を使用し、37℃ 5% CO₂インキュベーターにて培養した。

納豆抽出物凍結乾燥品を、1×PBS (Phosphate Buffered Saline) で100mg/mlの濃度で溶解し、0.2µmの滅菌フィルター (Millipore社) 濾過後、培地中に最終濃度が1mg/mlとなるよう添加し、37℃で24、または48時間培養した。

2.4 タンパク質量及び培養細胞生存率

タンパク質の濃度測定は、BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC社)を用いてBCA法により測定した。細胞生存率は、MTT細胞増殖アッセイキット (コスモバイオ社)により測定した。

2.5 イムノブロット

HeLa細胞に納豆抽出物添加し、24及び48時間後にHSP90、及びそのクライアントプロテインのAkt-1及びRaf-1の発現挙動を確認するため、イムノブロット法を用いて定量した。抗HSP90抗体はウサギに免疫した血清を用いた。また、Akt-1抗体: Akt-1 (B-1) Mouse monoclonal IgG (Santa Cruz社)、Raf-1抗体: Raf-1 (E-10) Mouse monoclonal IgG (Santa Cruz社)、及びβ-actin: Mouse Monoclonal (SIGMA社)を使用し、Image Jソフトウェアにより、定量した。

2.6 Butyl column chromatography

納豆抽出物分画Bを10mM Tris-HCl pH7.4で溶解後、Butyl Sepharose High Performance (GEヘルスケアサイエンス)に添加後、10mM Tris-HCl, pH 7.4バッファー中の硫酸濃度25~0%にて溶出後、10mM Tris-HCl pH 7.4で透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥品はPBSにて溶解後、Raji細胞に1mg/mlの濃度で添加し、24時間後に細胞生存率を確認した。また、Tris-Tricine SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ペプチドを解析した。

2.7 HPLC, アミノ酸配列

納豆抽出物抗がん作用ペプチドのHPLCによる精製、及びアミノ酸配列の同定は、既報に従った^{5,7)}。

3. 結果

3.1 納豆抽出成分のHeLa細胞に及ぼす影響

納豆抽出成分の各硫酸分画をHeLa細胞に投与し、24時間後の細胞生存率を測定した (Figure. 1A)。コントロールと比較し、納豆抽出成分非分画、分画A、及び分画D投与群では約80%の細胞が生存した。分画C投与群では約62%生存率であり、非分画、分画A、C、Dでは僅かな抗がん作用を呈した。一方、分画B投与群での細胞生存率は約18%生存率と、がん細胞はほ

A

B

Figure 1 Influence of Natto extract on the viability of HeLa cells
A. The ammonium sulfate fractionation A, B, C, and D of Natto extract was added to HeLa cells. The cell viability of 24 hours later of addition was shown.
B. Microscopy of panel A.

ぼ死滅した。顕微鏡画像解析の結果、納豆抽出成分投与前、非分画でのHeLa細胞に顕著な変化は観察できなかった (Figure. 1B)。一方、分画B投与群では、接着細胞であるHeLa細胞が死滅し、球状に浮遊していた。納豆抽出成分分画Bには、強力な抗がん作用のあることが判明した。

3.2 煮豆抽出成分、及び納豆菌のHeLa細胞に及ぼす影響

我々は納豆抽出成分分画Bに含まれる抗がん成分がイソフラボンならば、納豆以外の煮豆抽出成分や納豆菌でも抗がん作用が確認できるものと考え、納豆菌添加直前の煮豆抽出成分分画B、及び納豆菌をHeLa細胞に投与し、24時間後の顕微鏡画像を解析した (Figure. 2)。納豆抽出成分分画Bの結果と異なり、細胞増殖には全く変化が生じなかった。また、インドネシアの納豆とも呼ばれる大豆をテンペ菌で発酵させた醃酵食品のテンペ、及び米麹でも同様に実験したが、HeLa細胞の細胞増殖には全く変化が生じなかった (Data not shown)。

3.3 納豆抽出成分の他のがん細胞に及ぼす影響

我々は、HeLa細胞以外の他の培養がん細胞を用いて納豆抽出成分分画Bの抗がん作用を解析した (Figure. 3)。マウス神経芽細胞腫細胞 (Neuro 2A細胞)、ラット副腎褐色細胞腫細胞 (PC12細胞)に煮豆抽出成分分画Bを投与した結果、投与後48時間のHeLa細胞、Neuro 2A細胞、及びPC12細胞では全く変化が確認できなかった (Figure. 3A)。一方、納豆抽出成分分画B投与後24時間のHeLa細胞、Neuro 2A細胞、及びPC12細胞では、枠で囲ったように、がん細胞の種類には無関係に全て細胞は死滅した (Figure. 3B)。この様に、納豆抽出成分分画Bは、HeLa細胞以外の接着型培養がん細胞を死滅させること

Figure 2 The effect of ammonium sulfate fractions B of Natto or boiled soybean extract on HeLa cells. The microscope image 24 hours later after the addition of Natto, boiled soybeans extract ammonium sulfate fraction B, and *Bacillus natto* to HeLa cell.

Figure 3 The influence of ammonium sulfate fractions B of Natto or boiled soybean extract on various cultured cancer cells.

- A. The microscope image for 0 hours and 48 hours later after the dosage of boiled soybeans extract ammonium sulfate fractions B to HeLa cell, Neuro 2A cell and PC12 cell.
- B. The microscope image for 0 hours and 48 hours later after the dosage of Natto extract ammonium sulfate fractions B to HeLa cell, Neuro 2A cell and PC12 cell. The image which had the remarkable change surrounded it in a frame.

が確認できた。

ヒトバキットリンパ腫・Bリンパ球様細胞 (Raji細胞) は浮遊細胞であるが、納豆抽出成分分画B投与後24時間後には、全てのRaji細胞が消滅した (Figure. 4)。納豆抽出成分分画B投与により、Raji細胞の膜破壊により消滅したことが示唆された。以上の結果より、納豆抽出成分分画Bは、接着型、及び浮

Figure 4 The effect of ammonium sulfate fractions B of Natto on Raji cells.

The microscope image 24 hours later after the addition of Natto extract ammonium sulfate fractions B to Raji cells.

Figure 5 The effect of ammonium sulfate fractions B of Natto on HEK293 or HeLa cells.

The ammonium sulfate fractionations B of Natto extract was added to HEK293 or HeLa cells. The cell viability of 24 hours later of addition was shown.

遊型いずれのがんの種類とは無関係に強力な抗がん作用を示すことが確認できた。一方、がん細胞とは由来が異なるヒト胎児腎臓細胞株HEK293細胞では、納豆抽出成分分画B投与0.08 mg/ml濃度において、HeLa細胞の細胞生存率約40%と比較し、約80%であり、細胞生存率に優位な差を認めた (Figure. 5)。

3.4 納豆抽出成分の細胞増殖シグナル経路と細胞生存シグナル経路に及ぼす影響

納豆抽出成分をHeLa細胞に添加し、24、または48時間後のHSP90、Raf-1、及びAkt-1の発現量をイムノブロット法にて解析し、定量した (Figure. 6)。HSP90の発現量にはほとんど差が無く (Figure. 6A)、HSP90のクライアントタンパク質であるRaf-1 (Figure. 6B) 及びAkt-1 (Figure. 6C) の発現量が減少する傾向を示した。

3.5 がん細胞増殖阻止因子の同定

納豆硫酸分画BをButyl Sepharoseカラムクロマトグラフィーを行い、分子量約5,000のペプチドを精製し、HeLa細胞に投与した結果、がん細胞の死滅が確認され、分子量約5,000のペプチドががん細胞増殖阻止因子であることが示唆された (Figure. 7A)。さらに詳細な解析を行うために、このペプチド

Figure 6 Effects of Natto extracts on cell proliferation- and cell survival signaling pathway.

The amounts of HSP90 (A), Raf-1 (B), and Akt-1 expression (C) 24 hours later after addition of Natto extract ammonium sulfate fractions B to HeLa cells. An immunoblot and the result that the quantified of HSP90, Raf-1, and Akt-1 were shown in graphs.

Figure 7 The cancer cell casualties ingredient of Natto extract ammonium sulfate fraction B.

A. Electrophoresis of a purified cancer cell killing and wounding ingredient of the Butyl Sepharose column chromatography of Natto extract ammonium sulfate fractionation. The white triangle indicates 5kDa peptide.

B. Lysyl endopeptidase digested 5kDa peptide was purified by HPLC and sequenced on peptide sequencer.

を電気泳動のゲルから切り出して精製し、リシルエンドペプチダーゼ処理による酵素消化処理後、C18逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーでペプチドを分離精製し (Figure. 7B)、ペプチドシーケンサーにてアミノ酸配列を同定した。その結果、SMATPHVAGAAALのアミノ酸配列結果であった。データベース、及び二次構造予測の結果、納豆抽出成分中の強力な抗がん作用を示す成分は、分子量約5,000の新規抗菌ペプチドであった^{7,8)}。

4. 考察

納豆抽出成分から、強力な抗がん作用を示す抗菌ペプチドを同定した。納豆以外に、納豆菌添加前の煮豆、インドネシアの

納豆と呼ばれるテンペ、米麴、及び納豆菌では、がん細胞の細胞増殖に影響を与えなかった。一方、がん細胞由来ではないヒト胎児腎臓HEK293細胞では、ヒト子宮頸部がん細胞HeLa細胞と比較し、優意に生存率が維持された。がん細胞で活性化されている2つの経路として、Raf-1を介した細胞増殖シグナル経路と、Akt-1を介した細胞生存シグナル経路がある^{9,10)}。

Raf-1の細胞内安定性や局在は、分子シャペロンHSP90により保たれており、HSP90はAkt-1を脱リン酸化による不活性化から保護する¹¹⁾。分子シャペロンHSP90は、N末端のATPaseドメイン、Mドメイン、二量体化形成のCドメインから成り、新規合成タンパク質のフォールディング助成や、ステロイドホルモン受容体、変異体p53 (mutant p53) タンパク質、乳がんに関係するHER2 タンパク質など数百種類以上もの転写因子やリン酸化酵素 (キナーゼ) の生理機能制御等、細胞にとって必須のタンパク質の一つである^{12,15)}。

当初、我々は納豆抽出成分分画Bによる抗がん作用は、HSP90 NドメインのATP結合サイトに納豆抽出成分分画Bが優先的に結合するために、ATPが結合できなくなると推定した。HSP90のシャペロン活性が抑制されるため、Raf-1を介した細胞増殖シグナル経路と、Akt-1を介した生存シグナル細胞経路が阻害され、結果としてがん細胞を死滅させるものと予想した。そのため、細胞に濃度依存的に納豆抽出成分分画Bを添加してHSP90のATPase活性を測定したところ、納豆抽出成分分画Bは濃度依存的にHSP90のATPase活性を抑制する傾向が見られた。さらに、HSP90のクライアントタンパク質であるRaf-1及びAkt-1の発現量が減少する傾向を示した (Figure. 6)。一方、HSP90の発現量に大きな変化は認められなかった。以上の結果より、納豆抽出成分分画BはHSP90の発現量に直接影響はせず、HSP90のATPase活性に影響を及ぼし、HSP90のATPase活性を抑制することにより、通常はHSP90と相互作用しているクライアントタンパク質を不安定化するために抗がん作用を発揮することが示唆された。この様に、納豆抽出成分分画Bは、HSP90のクライアントタンパク質であるRaf-1及びAkt-1を不安定化し、間接的に細胞の生存、増殖シグナル経路を阻害することにより細胞毒性を示したものと考えた。ところが、浮遊細胞のヒトパーキットリンパ腫・Bリンパ球様細胞Raji細胞は、納豆抽出成分分画Bを投与した翌日には、膜破壊により細胞が消失した。そのため、上述した細胞増殖シグナル経路と細胞生存シグナル経路阻害説では説明が付かなくなった。

納豆抽出成分分画Bをさらに分離し、抗がん作用を示す5kDaペプチドのペプチドシーケンスの結果、新規抗菌ペプチドであった。ペプチドの二次構造予測の解析の結果、 α -ヘリックスに富む両親媒性で、かつ数残基ごとに塩基性アミノ酸を含む構造であった。これは、 α -ヘリックスのある面に沿って親水性の残基が並び、反対側には疎水性の残基が並ぶという抗微生物ペプチドと一致した。細菌の細胞膜は、フォスファチジルグリセロールとカルジオリピンのような酸性リン脂質に富む。これらのリン脂質の頭部は非常に強く負に荷電している。抗菌ペプチドの作用機序として、①抗菌ペプチドのプラス電荷が、マイナス荷電の細胞膜に結合、② α -ヘリックス構造が膜を貫通、③細菌の細胞膜をえぐり取るように孔を開け、内容物の流出により殺菌するものと考えられている^{16,17)}。

それでは納豆抽出成分分画B 5kDaペプチドは、なぜがん細胞

を殺傷したのかに関しては、多くのがん細胞表面は正常細胞と比較し、フォスファチジルセリンやムチンなどの陰性荷電分子が高発現するため、正常細胞の膜と比較して、強く負に荷電している。抗菌ペプチドによってがん細胞膜破壊が誘導され、Raji細胞が消滅したのはこのためと考えられる。一方、同一濃度の納豆抽出物分画B 5kDaペプチド投与細胞において、HeLa細胞と比較し、HEK293細胞での高生存率が維持されたのは、細胞膜表面荷電の相違が考えられる。納豆には、強力な抗がん作用を呈する新規抗菌ペプチドが含まれている。

5. 謝辞

本研究の大部分は、2013年10月に若くして急逝した秋田大学技術職員、故宮崎敏夫氏の行った研究結果であり、ここに謹んで深く感謝の意を表します。また、本研究内容は、2014年10月に韓国全州市のChonbuk National Universityで開催された2014 International Conference on Fermentationにおいて、招待講演として発表を行った。Chonbuk National UniversityのProfessor Yong-Seob Jeong, Professor Yong-Suk Kim, 及びProfessor Soon Il Kimはじめ、Conference組織委員会の各位には大変お世話になりました。ここに深謝致します。

参考文献

- 辻 啓介：紅麹の血圧調節作用 日本醸造協会誌 **89**, 207-211 (1994)
- 遠藤明仁, Dicks Leon M.T.: *Lactobacillus* 属乳酸菌の分類と非典型的な特徴 日本乳酸菌学会誌 **19**, 152-159 (2008)
- 須見洋行：納豆の歴史と機能成分 日本味と匂学会誌 **14**, 129-136 (2007)
- Messina M, Nagata C, Wu AH.: Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer*. **55**, 1-12 (2006)
- Itoh H, Komatsuda A, Wakui H, Miura AB, Tashima Y.: Mammalian 60-kDa stress protein (chaperonin homolog). Identification, biochemical properties, and localization. *J Biol Chem*. **270**, 13429-35 (1995)
- Miyazaki T, Sagawa R, Honma T, Noguchi S, Harada T., et al.: 73-kDa molecular chaperone HSP73 is a direct target of antibiotic gentamicin. *J Biol Chem*. **279**, 17295-300 (2004)
- 伊藤英晃, 宮崎敏夫：特許第5572856号
- 伊藤英晃, 涌井秀樹, 宮崎敏夫：特開2012-41316 (2012)
- Roberts, P. J. Der, C. J.: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, **26**, 3291-310 (2007)
- Vivanco, I. Sawyers, C. L.: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Rev. Cancer* **2**, 489-501 (2002)
- Vali S, Pallavi R, Kapoor S, Tatu U.: Virtual prototyping study shows increased ATPase activity of Hsp90 to be the key determinant of cancer phenotype. *Syst Synth Biol*. **4**, 25-33 (2010)
- Itoh H, Tashima Y.: The stress (heat shock) proteins. *Int J Biochem*. **23**, 1185-91 (1991)
- 伊藤英晃：哺乳類分子シャペロンの作用機構：生化学, **77**, 1137-1151 (2005)
- Tsuji N, Fukuda K, Nagata Y, Okada H, Haga A., et al.: AhR activation mechanisms by molecular chaperone HSP90. *FEBS Open Bio* **4**, 796-803 (2014)
- Alvira S, Cuéllar J, Röhl A, Yamamoto S, Itoh H., et al.: Structural characterization of the substrate transfer mechanism in Hsp70/Hsp90 folding machinery mediated by Hop. *Nature Commun*. **5**:5484. doi: 10.1038/ncomms6484 (2014)
- 松崎勝巳：抗菌性ペプチドによる 先天性免疫機構. 蛋白質核酸酵素 **46**, 2060-2065 (2001)
- Zhang LJ et al.: Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science* **347**, 67-71 (2015)