

1. 課題名：「小豆サポニンによる生体機能調節作用の探索とその調節機構解明」

2. 研究者：近畿大学 農学部 水産学科 講師 伊藤智広

3. 成果概要：

【研究目的】

これまでにダイズサポニンをはじめ、サポニン類には脂質代謝改善や免疫機能の向上など、我々の生体機能機構に有益に作用することが知られている。一方、不快味の原因物質であることや溶血作用があることから極端な多量摂取は健康に危害を及ぼすことも知られている。このことから「小豆のサポニン類の安全性は大丈夫なのか？安全性を指示する実験データなどあるのか？」と、小豆に含まれるサポニン類のヒトへの影響が懸念されている。我々はこれまでに小豆や煮汁に含まれるサポニン類の安全性について溶血作用を指標に行ってきたが、その毒性は低いと判断している。本研究課題において、小豆サポニンが有する様々な機能性を検証することで小豆商品の付加価値向上と懸念材料の払拭（小豆サポニンの安全性）を期待し、小豆サポニンのガン細胞増殖抑制作用、抗炎症作用、脱顆粒抑制（抗 I 型アレルギー抑制）作用およびメラニン生成調節作用についてそれぞれ検討した。

【研究方法】

1-1. ガン細胞増殖抑制作用

ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL に調整し、24 ウェルマルチプレートに 500  $\mu$ L /well ずつ播種した。播種後、小豆サポニンを終濃度が 10, 25, 50 および 100  $\mu$ M になるように処理し、培養した。サンプル処理 24, 48 および 72 時間後に細胞をトライパンプルーにて染色し、血球計算盤により生細胞を計数した。

1-2. 抗炎症作用

RAW264 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/mL に調整し 24 ウェルマルチプレートに 500  $\mu$ L ずつ播種した。播種後、小豆サポニン試料を終濃度が 50 または 100  $\mu$ M となるように添加し、前培養を 2 時間行った。2 時間後、LPS/IFN $\gamma$  により刺激し、24 時間炎症反応を惹起させた。その後、産生した一酸化窒素を Griess 試薬により発色させ、540 nm における吸光値を測定した。

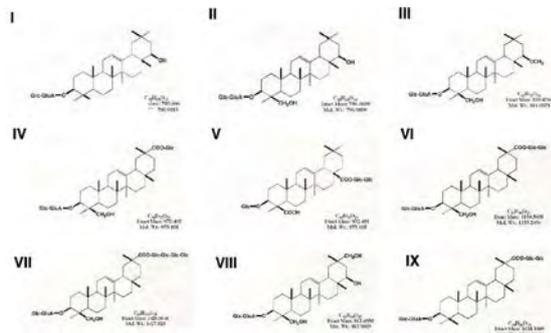
1-3. 脱顆粒抑制（抗 I 型アレルギー抑制）作用

RBL-2H3 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/mL に調整し、24 ウェルマルチプレートに 400  $\mu$ L ずつ播種した。6 時間前培養後、抗 DNP-IgE 抗体（ヤマサ醤油株式会社、東京）を 1.8  $\mu$ L（終濃度: 0.45  $\mu$ g/ml）ずつ加えて、24 時間感作させた。次に小豆サポニンサンプル（100  $\mu$ M）を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間処理後、直ちに DNP-BSA によりアレルギー（脱顆粒）反応を惹起させた。 $\beta$ -hexosaminidase を脱顆粒の指標として活性の小豆サポニンサンプルの脱顆粒抑制能を評価した。

1-4. メラニン生成調節作用

B16-4A5 メラノーマ細胞を  $5 \times 10^4$  cells/mL に調整し、24 ウェルマルチプレートに 500  $\mu$ L ずつ播種後、12 時間接着させた。その後、小豆サポニンを終濃度が 50 または 100  $\mu$ M になるように加え、2 時間前処理後、 $\alpha$ -MSH を終濃度 1  $\mu$ M となるように各ウェルに加えた。 $\alpha$ -MSH 添加 48 時間後、培地と細胞を回収し、PBS で洗浄後、1N NaOH 200  $\mu$ L/well で細胞を溶解した。溶解液を 96 ウェルマルチプレートに 50  $\mu$ L 加え、475nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

(A)



(B)

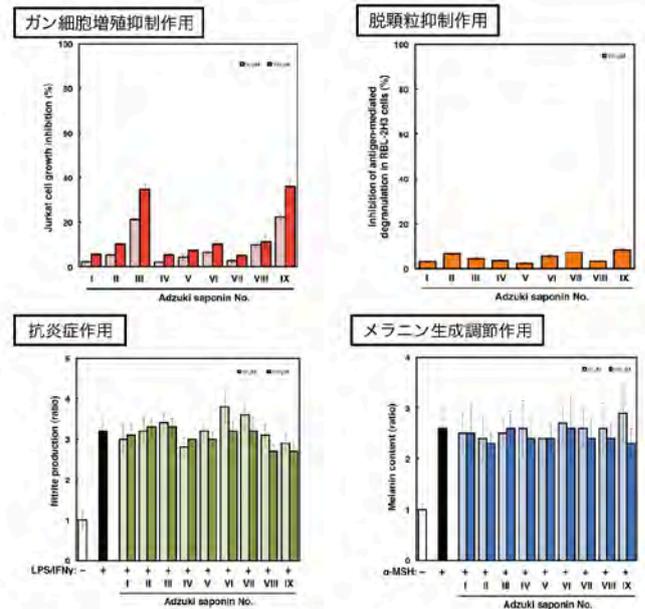


図 1. 小豆サポニン類による各機能評価  
(A) 使用した小豆サポニンの化学構造  
(B) 各種評価結果

### 【研究成果】

図 1 (B) に示したように、本研究で小豆煮汁から調製したサポニンサンプルにおいて小豆サポニン III および IX にガン細胞増殖抑制効果を見出した。しかし、これら小豆サポニンは脱顆粒抑制作用、抗炎症作用、メラニン生成調節作用には影響を与えなかった。そこで次に、効果の見られた小豆サポニン III および IX のガン細胞増殖抑制メカニズムについて検討した。

## 2. 小豆サポニンによるガン細胞増殖抑制メカニズムの解明

### 【研究方法】

Jurkat 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL に調整し、6 ウェルマルチプレートに 1 mL/well ずつ播種した。播種後、小豆サポニン III および IX を終濃度が 100  $\mu$ M になるように添加し、24 時間それぞれ培養した。各培養時間後、5 mg/mL Hoechst33342 を終濃度が 5  $\mu$ g/mL に、また Mito Tracker Red を終濃度が 100 nM になるようにそれぞれ培地に添加し、核およびミトコンドリアを染色した。染色後、PBS にて 3 度洗浄し、蛍光顕微鏡下 (OLYMPUS FX-100) にて観察した。

細胞周期解析は、Jurkat 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL に調整し、小豆サポニン III および IX を終濃度が 100  $\mu$ M になるように添加後、それぞれを 24 時間培養した。処理後、4 時間  $-20^\circ\text{C}$  にてエタノールを用いて細胞を固定後、Muse cell analyzer cell cycle kit により細胞を染色後、Muse cell analyzer に供した。

### 【研究成果】

Jurkat 細胞を Hoechst33342 と Mito Tracker Red を用いて核とミトコンドリアをそれぞれ蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で観察したところ、処理 24 時間後にアポトーシスの特徴の一つである核凝縮が観察された (図 2A および B)。また、小豆サポニン III および IX 処理によりミトコンドリアの膜電位は低下した。合成写真から、ミトコンドリアの膜電位の低下は核が凝縮している細胞において顕著に観察された。

また、Muse cell analyzer により cell cycle 解析を行った結果、アポトーシス誘導時に観察される subG1 ピークの増加が小豆サポニン III および IX 処理により観察された (図 2C)。

以上の結果から、小豆サポニン III および IX によるヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞の増殖

抑制作用は、アポトーシス誘導によるものと推察された。

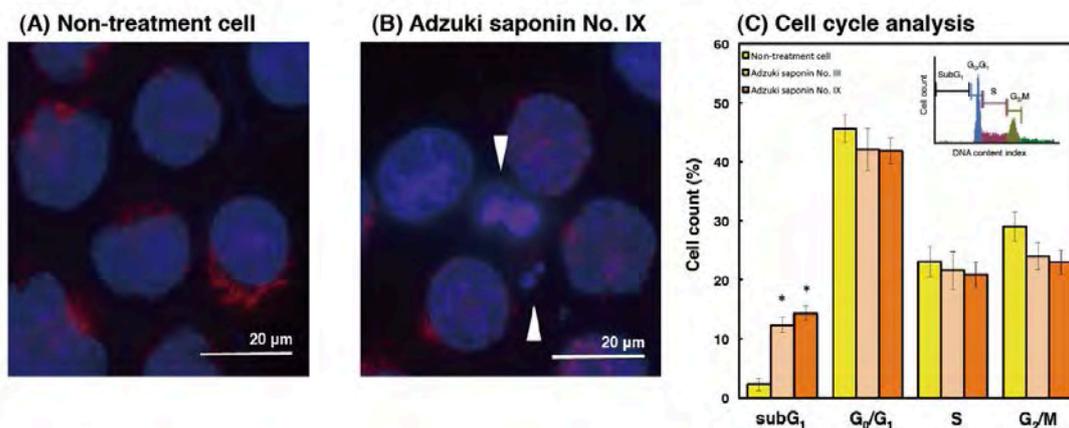


図 2. 小豆サポニン IX 処理による Jurkat 細胞の形態学的変化および cell cycle 解析結果

(A) 無処理細胞 (B)小豆サポニン IX 処理細胞 青 (Hoechst33342 染色) :核、赤 (Mito Tracker Red 染色) :ミトコンドリア膜電位、鏟 :核凝縮細胞 (C) cell cycle 解析 ; グラフ内における右上の図は、無処理細胞における cell cycle 解析結果を示したものである。各 phase における細胞数を示している。測定値は、平均±標準誤差で示した。群間の比較は、Student's t-test より検定を行った (vs. Non-treatment cell、 $p < 0.05$ )。

#### 4. 今後の展開

本研究課題では、小豆サポニンが有する様々な機能性を検証することで小豆商品の付加価値向上と懸念材料の払拭 (小豆サポニンの安全性) を期待し、小豆サポニンのガン細胞増殖抑制作用、抗炎症作用、脱顆粒抑制 (抗 I 型アレルギー抑制) 作用およびメラニン生成調節作用についてそれぞれ検討したが、ガン細胞の増殖抑制作用のみ一部の小豆サポニンが示すだけであった。本研究では、小豆サポニン III および IX によるガン細胞の増殖抑制機構をアポトーシスによるものと推察したが、今後さらに詳細な作用機序 (Caspase カスケードの活性化やミトコンドリアからのアポトーシス誘導因子の放出など) について明らかにすることが必要である。