アブラナ科野菜成分の発がん抑制酵素誘導活性

宇 田 靖 • 小 沢 好 夫* (宇都宮大学農学部教授, 群馬女子短期大学教授*)

I. はじめに

1980年以降、わが国の死亡病因の第一位はがん であり、その原因の約40%は動物性脂肪摂取量の 増加など食生活に負うと推定されているり。こう した食生活面におけるがんの予防対策として野菜, 果実など植物性食品の有効性が疫学的にも立証さ れつつあり20、米国国立がん研究所が中心になっ ていわゆるデザイナーフーズ計画が進行中である。 この研究プロジェクトには野菜の発がん予防効果 の評価、有効成分の特定、それらの野菜あるいは 有効成分を利用した食品の開発などが主要目的と して含まれている3.4)。このデザイナーフーズ計 画でも発がん予防効果が期待されているアブラナ 科野菜類は共涌してグルコシノレートと呼ばれる 芥子油配糖体を含有し、その分解生成物である芥 子油類には発がん予防の可能性があることが指摘 されている3,4)。これまで、芥子油の内、ベンジ ル芥子油はラットにおける発がん抑制効果5)が確 認されており、また、その他の芥子油にも、がん 細胞の増殖抑制作用6,発がん抑制酵素である第 二相薬物代謝酵素の誘導能7.8)などが報告されて いる。アブラナ科野菜はわが国の年間野菜生産量 の約40%を占める主要野菜であり、生食、煮物の ほか、漬け物などの加工品の形で消費されている。 そこで、本研究では、いくつかのアブラナ科野菜 類について, 第二相薬物代謝酵素の一つであるキ ノンレダクターゼ (NAD(P)H:(quinone acceptor) oxidoreductase:以下, NQO1) 活性 の誘導能を検討し、これらの野菜の有用性に関す

る知見を得ようと考えた。

NQO1 は種々の親電子性化合物などが体内に 取り込まれた時に肝臓などの器官の細胞において 誘導される酵素であり、キノン類の2電子還元を 触媒することによりキノンラジカルや活性酸素の 細胞内生成を防止し、これによって細胞の酸化ス トレスの緩和、細胞毒性の消去、細胞内レドック スサイクルの正常な機能の保持などを発揮することから発が人抑制機構に関与する第二相薬物代謝 酵素と考えられている%。したがって野業成分に よる本酵素活性の誘導能を比較検討することは野 菜の生体防御機能及び活性成分の食品加工への応 用の観点から重要であると考えられる。本研究で は、誘導モデルとしてマウスの肝臓が人細胞である 日中21 に1c7とその変異株である Hepa 1c1c7 BPrC1 (ベンゾビレン耐性株)を用いた。

II. NQ01 誘導条件の検討

NQO1 の誘導能はマウス肝由来細胞、Hepa 1 clc7とそのベンゾビレン耐性変異細胞、Hepa 1 clc7BPrC1 (いずれもInstitute of Food Research、Norwich Laboratory、UKより分譲されたもの)を用いて検討した。これらは、NQO1 誘導能が高くかつ安定しているため、しばしば使用されている細胞である 9,10 。また、陽性誘導因子として、 β -ナフトフラボン (BNF)及び tert-ブチルヒドロキノン (BHQ)を使用した。まず、誘導の最適条件を検討する目的で培地中の牛胎児血清濃度と活性炭処理が NQO1 誘導活性に及ぼす影響、次いで誘導因子と細胞との接

触時間がNQO1誘導活性に及ぼす影響を検討した。

(1) 細胞の前培養と薬剤処理法

Hepa 1c1c7皮 U Hepa 1c1c7BPrC1はいずれ $55.0\sim10\%$ 牛胎児血清,100U/ml のベニシリン G, $100\mu g/ml$ のストレプトマイシンを含む MEM 培地中で $3\sim4$ 日間,5%炭酸ガス中,37Cにて培養後,その $10,000cells/180\mul$ ずつを 96パマイクロブレートに播種した。BNF(最終 濃度: $0.05\sim0.4\mu$ M)及 U BHQ(最終 濃度: $2.5\sim10.0\mu$ M)は U メチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、ブレート内培地中の DMSO の最終濃度が0.1%以下になるように上記 培地にて希釈して $20\mul$ ずつ添加した。活性炭 (Sigma 社細胞培養試験用)処理は市販午胎児 血清(Gibco U)に 1%(W)になるように添加後、室温下90分費拌した。これを無菌濾過し,上記培地組成となるように使用した。

(2) 細胞の増殖に及ぼす牛胎児血清の濃度 及び活性炭処理の影響

活性炭処理または非処理の牛胎児血清を5.0 ~10.0%含有するように添加した培地における細胞の増殖を比較するために、各細胞を5日間培養し、24時間毎に細胞をクリスタルバイオレットにより染色した。細胞をリン酸緩衝液 (PBS) にて洗浄後、50%エタノールで抽出される色素濃度を610mmで測定した。

(3) NQO1 誘導に及ぼす血清の活性炭処理 及び薬剤処理時間の影響

活性炭処理及び非処理の牛胎児血清10%を含む 培地を用い, BNFによる NQO1 活性の誘導及び BNFと細胞との接触時間(1~48時間)による NQO1 誘導活性を比較した。播種細胞数, 前培 養条件は上述の通りである。

(4) NQO1 誘導活性の測定法

NQO1誘導活性はProchaska ら8の方法に従

って行った。すなわち、各細胞を含むマイクロブ レートから培地を除去し、PBS で洗浄後、0.8% ジギトニン溶液を75μl ずつ加えて室温下20分口 ータリーシェーカーにて攪拌することにより細胞 を破壊した。各20μl ずつを別のプレートに移し、 BCA 法111により蛋白質濃度を測定する一方,残 りの細胞破壊物に発色試薬 (メナジオン、MTT, NADPH, FAD, グルコース-6-リン酸, Tris-CI 緩衝液及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナ 一ゼの混合液) 200µl ずつを加え、室温下5分後 に0.3mM ジクマロールを加えて反応を停止させ、 直ちにマイクロプレートリーダー (590nm) にて 発色した青色を測定した。この青色は基質である メナジオンが誘導された NOO1 によりメナジオ ールに還元される反応に連動して MTT がフォ ルマザン色素に酸化される結果として生じる。従 って、この青色を比較することにより NQO1 活 性を比較できる。以上の NQO1 活性測定原理を 模式的に Fig.1 に示す。

(5) 結果及び考察

細胞の増殖に及ぼす生胎児血清濃度及び活性炭 処理の影響について検討した結果を Fig.2 に示す。 Hepa 1c1c7は活性炭非処理の血清では5%濃度 でも十分に増殖し、10%血清の場合と大きな差異 は見られなかったが、活性炭処理した血清では10 %含有培地において活性炭未処理区の増殖に比べ ると約半分程度の細胞数にしか増殖しないものの 良好な生育が認められた。これに対して、変異細 胞である Hepa 1c1c7BPrC1株では活性炭処理区, 非処理区とも、野生株である Hepa 1c1c7の増殖 よりその速度は野生株の半分程度であり、増殖に 時間を要することが明らかになった。次に, BNF を陽性誘導因子とした時の Hepa 1c1c7に おける NQO1 誘導に及ぼす薬剤処理時間の影響 を Fig.3 に示す。図に見られるように、BNF と 細胞との接触時間が12時間以下では誘導レベルは

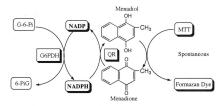


Fig.1 Principle of Quinone reductase (QR)-assay G-6-Pi: Glucose-6-phosphate; 6-PiG: 6-Phosphogluconate; G6PDH: Glucose-6-phosphate dehydrogense.

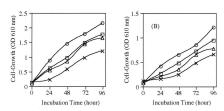


Fig.2 Effects of Charcol-treatment on the Growth of Hepa 1c1c7 and Hepa 1c1c7PPrCl

- (A), Growth in medium containing non-charcol-treated fetal calf serum (FCS).
- (B), Growth in medium containing non-charcot-treated fetal call serum (FCS).
- Symbols: △, 5% FCS; □, 7.5% FCS; ○, 10% FCS; for Hepa lclc7; ×, 10% FCS; for Hepa lclc7BPrCl

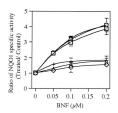


Fig.3 Effect of BNF-Treating Time on the NQO1-induction Treating time: ◊, 1h; Δ, 3h; +, 6h; □, 12h; Ο, 24h; ∇, 48h. Medium: Containing 10% Charco1-treated fetal calf cerum.

低く、最大誘導活性の35~50%程度しか誘導されない。また24時間処理区と48時間処理区における

誘導レベルにはほとんど差異が見られなかった。このことから、NQOI誘導実験に当たっては試料と細胞との接触時間を少なくとも12時間以上とする必要がある。一方、Fig.4に示すように、牛胎児血清の活性炭処理の有無によるNQOI誘導の差異を見ると、活性炭処理区においてNQOI活性の誘導がコントロール(誘導因子を含まない試験区)に比べて明らかに高いレベルになっており、活性炭非処理の血清を含有する培地では、上述のように増殖はすみやか且つ高いレベルまで進むがNQOIの誘導は低いことがわかる。これは、活性炭非処理区では血清中の何らかの因子によりコントロール区の誘導そのものが起こっており、コントロール区の誘導そのものが起こっており、このため、試料添加区との差異が小さくなったた

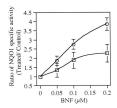


Fig.4 Effect of Charcol-treating of fetal calf serum on the NQOI-induction in Heap Iclc7. Media: □, 10% charcol-non-treated FCS; O, 10% charcol-treated FCS

めである。これらの結果から、培地に添加する牛 胎児血清は活性炭処理により誘導を検出しやすく なることが明らかになった。そこで以下の実験で は血清は全て活性炭処理し、培地中の濃度は10%, 試料との接触時間は実験の都合上12時間の場合と 差が見られなかった24時間とする条件を使用する ことにした。

III. Hepa 1c1c7 細胞と Hepa 1c1c7BPrC1 細胞における NQO1 誘導パターンの確認

NQO1の誘導因子には、Monofunctional 及び Bifunctional 誘導因子の二つのタイプが知られ ているい。前者は直接的に NQO1 遺伝子のプロ モーター 領域に存在する ARE(Antioxidant responsible element)に作用して NQO1 遺伝子 を発現させて酵素を誘導するもので BHQ のほか 芥子油類もそれに含まれると考えられている。こ れに対して後者は細胞内の Ah レセプターを介し て代表的な第一相薬物代謝酵素である P -450遺伝 子を発現させ、誘導された P -450による代謝を経 て形成される代謝物が ARE に作用して NQO1 遺伝子を発現させものとされている。上述の BNF はその代表的化合物である。Hepa 1c1c7 はいずれのタイプの誘導因子によっても NQO1 を誘導できるが、Hepa 1c1c7BPrC1は Ahーレ セプター欠損株であるため、Monofunctional 誘 導因子によってしか NQO1 を誘導できない^{12,13})。 そこで、本実験で使用する両細胞がそれぞれ正常 に誘導因子に応答できるかどうかを確認する必要 があった。

(1) 実験方法

NQO1の誘導活性は、上記設定条件により測定した。陽性誘導因子にはBNF $(0.05\sim0.4\,\mu\text{M})$ 及びBHQ $(2.5\sim10.0\,\mu\text{M})$ を使用した。 Hepa 1c1c7は約 $10,000\,\text{cells/well}$ $(200\,\mu l)$, Hepa 1c1c7BPrC1は約 $25000\,\text{cells/well}$ $(200\,\mu l)$ とした。変異株の播種細胞数を大きくした理由はこの細胞が上述のように増殖速度が遅いため,試料との接触24時間でHepa 1c1c7とほぼ同等な細胞数になるように配慮したためである。

(2) 結果及び考察

得られた結果を Fig.5 に示す。ここに見られる ように Hepa lclc7 では Monofunctional 誘導因 子である BHQ と Bifunctional 誘導因子である BNF の両方により NQO1 が誘導されるが、 Hepa lclc7BPrC1では BHQ によってのみ NQO1 が誘導されることが観察された。これら の結果から、本研究で使用する両細胞は正常に機 能し、試料中の誘導因子のタイプの区別において 利用可能であることが確認できた。

IV. 野菜抽出物,芥子油類及びフラボノイド 類のNQO1 誘導活性の比較検討

以上の検討に基づき、比較的消費量の高いダイコン (根)、キャベツ (薬)、カブ (根) を用いて、それらのメタノール抽出物を調製し、それらのNQOI誘導活性を比較するとともに、アブラナ科野菜の特有成分成分である芥子油類を用いてNQOI酵素誘導活性を比較した。またこれらの野菜にはケルセチンなどフラボノール類も含まれ

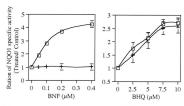


Fig.5 NQO1-induction with BNF and BHQ in Hepa 1c1c7 (□) and Hepa 1c1c7BPrC1 (+).

ることから、関連フラボノイドについても NQO1 誘導活性を検討した。

(1) 野菜試料の調製

野菜はマーケットから購入し,直ちに,(1)新 鮮野菜をそのまま液体窒素中に浸して凍結後,粉 砕して凍結乾燥,(2)新鮮野菜にごく少量の水を 加えてミキサーにてホモジネートとし,そのまま 室温下で2時間放置して自己消化後,凍結乾燥, の2種類の処理を行った。各凍結乾燥物は電動 まいで微粉末とし,使用時まで-80°Cにて保存した。 乾燥微粉未試料の0.5gを25mlの80%メタノール にて3時間,室温抽出し、ガラスフィルターで濾 適し,次いで濾液をロータリーエバボレーターに てメタノールを除去後、凍結乾燥した。ここに DMSO2.0ml を加えて溶解させ、不溶物を遠心 分離 (15000rpm, 10分間) により除去して得ら れた上清を NQO1 誘導活性の測定に用いた。

(2) 芥子油の調製

使用した芥子油 (Fig.6) は、3-ブテニル (3 BITC)、4-ペンテニル (4PITC)、3-メチルチオ プロピル (3MTP)、4-メチルチオブチル (4 MTB)、5-メチルチオペンチル (5MTP)、ペン ジル (BzITC)、2-フェネチル (PEITC) 芥子油 の7種類の合成¹⁰品とダイコンから調製¹⁰した4 -メチルチオ-3-ブテニル芥子油 (MTBI) の計 8種類である。これらは広くアブラナ科野菜に分 布する芥子油として知られている¹⁰。これらはシ リカゲルカラムクロマトグラフィー¹⁰により鉢昨

Fig.6 Structures of Flavonoids and Isothiocyanates Used in This Study

97%以上に精製した。

(3) フラボノイドの調製

使用したフラボノイド類 (Fig.6) は、ガラン ギン (3.5.7-trihvdroxvflavone), アピゲニン (5,7,4'-trihydroxyflavone), ケンフェロール (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone), ケルセチン (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone), ミリセチ \sim (3,5,7,3',4',5'-hexahvdroxyflavone), (±) - タキシフォリン (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone), (+) - $\pi r + \nu$ (2R,3S-3,5, 7,3',4'-penta-hydroxyflavane), (-) -エピカ テキン (2R.3R-3,5,7,3'.4'- pentahvdroxvflavane) 及びケルセチンの3位-配糖体、すなわ ち, アビキュラリン (quercetin -3-α-Larabinofuranoside), ケルシトリン (quercetin-3-rhamnoside), イソケルシトリン (quercetin-3-glucoside)、ハイパリン (quercetin -3-βgalactoside), ルチン (quercetin-3rutinoside), quercetin -3,4- diglucoside 及び quercetin-4'-monogulucosideの8種類を用い た。これらの内、最後の2種はタマネギから調 製16)し、純度90%以上に精製した。これら以外は 全て市販品を用いた。

(4) NQO1 活性の測定

NQO1 活性は上述の条件で測定し、誘導活性 は便宜上、凍結乾燥物0.5g 当たりで比較した。

(5) 結果及び考察

Table 1 に野菜試料の自己消化の有無による

Table 1 NQO1-inducibility of Cruciferous Vegetables in Hepa 1c1c7

2	NQO1 Specic Activity ⁸⁾			
Sample	Nonautolyzed	Autolyzed(2 hours)		
None(Control)	1.00	1.00		
Radish (roots)	1.44	1.89		
Cabbage (Leaves)	1.11	2.14		
Tumip (roots)	1.13	1.16		

a) Expressed as the ratio of NQO1 specific activity between the samples and control.

Hepa 1c1c7 における NQO1 誘導結果を示す。 ダイコンとキャベツでは自己消化後の誘導活性が 自己消化させない場合より著しく上昇し、ダイコ ン組織の破壊に伴い、酵素的に誘導因子が生成す ることが示唆された。これに対し、カブでは自己 消化の有無による誘導活性の上昇における差異は ほとんど見られなかった。キャベツは組織の破壊 により内在する芥子油配糖体分解酵素であるミロ シナーゼにより、アリル芥子油の他に3-MTP 及び4MTB の 2 種の ω-メチルチオアルキル芥子 油が主成分として生成することが知られている17)。 カブの場合は、3-BITC、4-PITC及びPEITC の3種が主に生成する14)。一方、ダイコンに生成 する芥子油は大半が MTBI であり、これ以外の 芥子油は量的にきわめて少ない18)。これらのこと を考慮して芥子油の NQO1 誘導活性を比較検討 した。その結果を Table 2 に示す。ここに見られ るように、芥子油の中では3-MTP、4-MTB及 び5-MTPのω-メチルチオアルキル芥子油が いずれも他の芥子油より高い NOO1 誘導活性を 示し、ベンジル芥子油も比較的高い誘導活性を示 した。また、ダイコンの主辛味成分である MTBI も PEITC とほぼ同等の比較的高い誘導能 を有することが認められた。これらに対して、カ ブの主要芥子油である 3-BITC 及び 4-PITC の

Table 2 Effects of Isothiocyanates on the NOO1-induction

Isothiocyanate (RNCS)	Ratio of NQO1 Specific Activity ⁸⁾					
	0μM ^{b)} 2.5	μM 5.0	μM 7.0	μM 10.0	$0\mu M$	
3BITC	1.00	1.60	1.78	1.95	1.78	
4PITC	1.00	1.45	1.58	1.78	1.66	
3MTB	1.00	2.40	2.58	2.79	2.12	
4MTB	1.00	2.11	2.96	2.61	2.26	
5MTB	1.00	2.41	2.49	2.36	2.43	
MTBI	1.00	1.89	2.12	2.34	2.34	
BzITC	1.00	2.44	2.39	2.39	2.07	
PEITC	1.00	2.13	2.06	2.18	1.78	

Expressed as the ratios between the NQO1 specific activities of the samples and that of control.

The specific activity of the control ranged from 0.56 to 0.64 \(\alpha\)mol/mg/min.

Dose of the isothiocyanates, and the values denote their final concentration in the wells.

NQO1 誘導活性は低かった。これまでブロッコ リーに含まれる 4-メチルスルフィニルブチル芥 子油は強い NQO1 誘導活性を有することが報告 されている19)が、このことと上述の結果とを考え 合わせるとメチルチオ基を有する芥子油は本酵素 の誘導能が他の芥子油より高いことが強く示唆さ れる。ベンジル芥子油の誘導能は高いにもかかわ らず,この芥子油はクレソンなどを除いてわが国 で消費されるアブラナ科野菜にはほとんど含有さ れない。以上の結果から、カブの NQO1 誘導活 性が低かった理由はおそらく, 主要芥子油が誘導 活性の低い 3-BITC と 4-PITC であることに加 えて, これらの自己消化により生成した濃度も誘 導するには低すぎたことが考えられる。キャベツ 及びダイコンにおいて、自己消化後の NQO1 誘 導活性が著しく上昇したのは、自己消化過程で誘 導能が高くかつこれらの野菜の主要芥子油である 3-MTP と 4-MTB あるいは MTBI が牛成した ことに起因するものと思われる。

次に、これらの野菜に含まれるケルセチンとその類縁化合物であるフラボノール、フラバノール、フラバン及び各種ケルセチン配糖体の誘導活性を 比較検討した。結果は Fig.7 に示す通りである。 両図に見られように、7種のフラボノイドのアグ

リコンの中では、特にガランギン、ケンフェロー ル、ケルセチンの3つが高い NQO1 誘導活性を 示した。このうち、前2者は5uMの濃度でコン トロールの2倍程度まで誘導活性を上昇させたが、 ケルセチンは7.5uM以下ではほとんど誘導せず、 10µM 以上の濃度で急激に活性が上昇する誘導パ ターンを示した。また、8種の配糖体の中ではケ ルセチン-4'-モノグルコシドのみが誘導活性を有 し、これ以外の配糖体はほとんど誘導能を示さな かった。これらの結果から、フラボノイド類のう ち、3位に水酸基を持たない(アピゲニン)か2 位、3位間の結合が飽和型のフラバノン(タキシ フォリン) またはフラバノール (カテキン及びエ ピカテキン)にはNQO1誘導活性は無いかあっ てもきわめて弱いことが明らかになった。また. 3位に糖を結合した3-配糖体も全て誘導能を消失 していたことから3位の水酸基の存在がNQO1 誘導において最も重要な役割を演じていることが ・強く示唆された。

V. 芥子油とフラボノイドの NQ01 誘導に おける相乗的作用

上記の検討により、アブラナ科野菜中の NOO1 誘導活性因子は芥子油類とケルセチンな

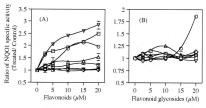


Fig.7 NQO1 Inducibility of Flavonoids (A) and Quercetin glucosides (B).

- (A)

 ∇ Kaempferol

 Galangin

 Quercetin

 Apigenin
- (B) O Quercetin-4'-glucoside △ Quercetin-3,4-glucoside ♥ Quercetin-3-galactoside ♦ Quercetin-3'-rhamnoside ☐ Quercetin-3-glucoside ⊞ Quercetin-3-arabinoside +Quercetin-3-rutinoside

どのフラボノイドであることが明らかになった。 そこで、次に芥子油とフラボノイドが共存した条件で NQO1 の誘導能がどのようになるのかを明らかにするための検討を行った。通常、これらの成分は同時に摂取されることから本検討は重要であると考えられた。そこで、以下では芥子油として水存在下でも安定性が高い2-フェネチル芥子油(PEITC)と代表的なフラボノイドであるケルセチンを用いて各種濃度の組み合わせ条件下における NQO1 誘導活性を検討した。

(1) 試料の調製と組み合わせ

PEITC、ケルセチンはいずれも DMSO に溶解 し、最終濃度が $0.1\sim7.5\mu$ M になるように細胞に 作用させた。また、両者の1:1混合物も調製し た。

(2) NQO1 誘導活性の測定

NQO1 活性は、Hepa 1c1c7 及び Hepa 1c1c7 BPrC1 の両細胞を使用して上記方法により測定 した。

(3) 結果及び考察

まず、両細胞における PEITC とケルセチンの 誘導パターンを確認した。両化合物は異なる誘導 パターンを示した。すなわち、PEITC は野生株 である Hepa 1c1c7 細胞と変異株の Hepa 1c1c7BPrC1の両方においてほぼ同等に NQO1 活

性を誘導し本芥子油が上述した Monofunctional 誘導因子であることが確認された。一方,ケルセ チンは最終濃度7.5uMで野牛株での弱い誘導が 見られたが、変異株ではほとんど誘導が認められ なかった。ここには示していないがケルセチン濃 度を最終20uM 間で増大させた場合でも変異株に おける誘導活性の上昇は30%程度(野生株では 200%) であったことからケルセチンはどちらか と言えば BNF と同様に bi-function 誘導因子で ある可能性が示された。次に両化合物の1:1混 合物による NOO1 誘導活性を各化合物単独のそ れと比較した結果を Fig.8 に示す。両化合物の共 存条件下では野生株において有意に誘導活性の上 昇が見られ、芥子油とフラボノイドは相乗的に NOO1 の誘導活性を増大させる作用を有するこ とが示唆された。しかし、変異株ではこのような 相乗的作用は見られなかった。上述したように, 変異株は Bifunnctional 誘導因子にとって必須の Ah レセプターを欠損している。このため、変異 株では Bifunctional 誘導因子と思われるケルセ チンが機能せず, 芥子油のみの誘導作用になって しまっていると考えられる。これに対して, 野生 株では面タイプの誘導因子が機能するため、相乗 的に誘導活性の上昇が起こったものと思われる。 哺乳類の臓器における NQO1 遺伝子発現には

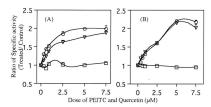


Fig.8 Synergistic Effect of Phenethyl Isothiocyanate and Quercetin on the Induction of NQO1 in Hepa 1c1c7 and Hepa 1c1c7BPrCl.

^{∇,} Sole dose of PEITC; □, sole dose of Quercetin; O, mixture (1:1)
(A): Response in Hepa 1c1c7; (B): response in Hepa 1c1c7BPrC1.

Ahレセプターが備わっていると考えられている²⁰⁾ことから芥子油とフラボノイドの相乗的誘導作用は有用な知見と言える。

VI. ダイコン芥子油の反応生成物の NQ01 誘導活性

ダイコンの芥子油 (MTBI) は水存在下ですみ やかに **Fig.9** に示すように 3-ヒドロキシ-2-チオ キソピロリジン (HMTP), 3-メチルチオメチレ

Fig.9 Formation of HMTP, MMTP and MBDTC from MTBI

ン-2-チオキソピロリジン(MMTP),メチル4-メチルチオ-3-ブテニルジチオカーバメート(MBDTC)及びその飽和型(MB(sat)DTC)に変換されることが明らかにされている^{21,22)}。上記のダイコン自己消化後のNQO1誘導活性の上昇は生成するMTBIに起因すると考えられるが、同時にMTBIの水存在下での上記反応生成物による可能性も考えられた。そこで、これらの反応生成物のNQO1誘導活性を確かめるための検討を行った。

(1) MTBIからの反応生成物の調製

ダイコンから調製した MTBI を既報"に従って緩衝液中で反応させ、純度98%以上の HMTP, (E,Z)-MMTP (E:Z=2.8:1.0) 及び (E,Z)-MBDTC (E:Z=1.7:1.0) を得た。これらを最終濃度2.5~20 μ M になるように DMSOに溶解し、供試した。

(2) NQO1 誘導活性の測定

NQO1誘導活性は上述の方法により, Hepa 1c1c7を用いて測定した。

(3) 結果及び考察

ダイコン芥子油から水の存在下で生成するチオ

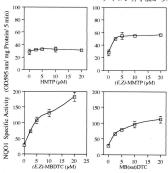


Fig.10 NQO1 Inducibible Activities of the Reaction Products from Radish Isothiocyanate (MTBI)

キソピロリジン類 (HMTP, MMTP) 及びジチ オカーバメート類 (MBDTC, MB (sat) DTC) の NQO1 誘導活性を検討した結果を Fig.10 に示 す。図に見られるように、主要生成物である HMTP は20μ Mまでの濃度ではほとんど本酵素 の誘導活性を示さなかったが、HMTPの3-ヒド ロキシメチレン基が3-メチルチオメチレン基に なっている MMTP では2.5uM 以上でコントロ ールの2倍近い誘導活性の上昇が認められた。ま た、 両ジチオカーバメートは著しく誘導活性を上 昇させることが明らかになった。これらの化合物 は、ダイコンおろしなどに生成することから、ダ イコンの自己消化成分にも含まれ, 同じく誘導活 性が認められた芥子油 (MTBI) とともに NQO1 の有力な誘導因子となり得ることが強く 示唆された。ダイコン辛味成分とその関連化合物 による NQO1 誘導に関する知見は本研究が最初 であることを付記したい。

VII. まとめ

発がん抑制第二相薬物代謝酵素である NQO1 の誘導活性をアプラナ科野菜及びそれらに含まれ る芥子油, フラボノイドを用いて検討した。本研 究で使用したマウス肝臓がん細胞である Hepa 1c1c7 とその変異株, Hepa 1c1c7BPr は各種食 品中の NOO1 誘導因子の一次スクリーニングに 有用であること、その場合、培養条件として牛胎 児血清を活性炭処理することにより検出感度が増 大することが明らかになった。さらに, 芥子油類 はいずれも NOO1 の誘導活性を有するが、特に ω-メチルチオアルキル (アルケニル) 芥子油で ある3MTP, 4MTB, 5MTP, MTBI は高い誘 導能を有することが確認された。これらの芥子油 を主成分として含有するキャベツやダイコンは本 酵素活性の誘導能を有する。芥子油の生成機構は 芥子油葉糖体であるグルコシノレートが酵素ミロ

シナーゼにより加水分解されて生成する。従って, これらの野菜の塩漬け加工や大根おろしなど組織 を破壊した形態での摂取は誘導因子である芥子油 を体内に取り込むものと言える。しかし、生体内, 特に消化管において果たしてこれらの芥子油が首 尾良く吸収されてターゲットの臓器細胞に到達し, NQO1の誘導に寄与しているかどうかは今後の 検討に待たなければならない。また、フラボノイ ド類の NQO1 誘導性には構造による差異が存在 し、誘導活性と構造の相関に関する知見を得るこ とができた。加えて、本研究により、フラボノイ ドの一種,ケルセチンと芥子油が相乗的に NQO1 の誘導活性を上昇させることが見出され たことは、食事成分による協同的な有用な作用が 期待できることを明らかにした点で意義があるも のと考えられ、この点をさらに他の成分との組み 合わせおいて検証することが重要であると思われ る。最後に、本研究の助成を賜った浦上食品・食 文化振興財団に対し,心から御礼申し上げます。

文 献

- G. R. Williams D.M.: in "Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects", ed. by K. W. Waldron, I. T. Johnson & G. R. Fenwick, P.3-11, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1993.
- W. C. Willett & D. Trichopoulos: Cancer Cause Control, 7, 178 (1996)
- 3) A. B. Caragay: Foof Technol. April, 65 (1992)
- 大澤俊彦:栄養と健康のライフサイエンス, 1(4), 32 (1996)
- L. W. Wattenberg: Cancer Res. 45, 1 (1985)
- 6) 福家洋子,大石芳江,岩下恵子,小野晴寛,篠原和毅: 日食工誌,41,709 (1994)
- P. Talalay, M. J. De Long & H. J. Prochaska: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8261 (1988)
- I. T. Johnson, G. Williamson & S. R. R. Musk: Nutr. Res. Reviews, 7, 175 (1994)
- H. J. Prochaska & A. B. Santamaria: Anal. Biochem., 169, 328 (1988)
- 10) N. Tawfiq, S. Wanigatunga, R. K. Heaney, S. R. R.

- Musk, G. Williamson & G. R. Fenwick: Euro. J. Cancer Prevet. 3, 285 (1994)
- H. J. Prochaska & P. Talalay: Cancer Res., 48, 4776 (1988)
- A. G. Miller, D. Israel & J. P. Whitlock, Jr.: J. Biol. Chem., 258, 3523 (1983)
- R. J. Riley & P. Workman: Biochem. Phermacol., 43, 1657 (1992)
- 14) 前田安彦, 小沢好夫, 宇田靖: 農化誌, 53, 261 (1979)
- Y. Ozawa, Y. Uda, T. Ohshima, K. Saito & Y. Maeda,
 Agric, Biol, Chem., 54, 605 (1990)
- 16) T. Tsushida & M. Suzuki: 日食工誌, 43, 642 (1996)

- 近藤弘清,山内実,野崎浩:農化誌,60,815 (1986)
- A. Kjear, J. O. Madsen, Y. Maeda, Y. Ozawa & Y. Uda, Agric, Biol, Chem., 42, 1715 (1978)
- Y. Zhang, P. Talalay, C-G. Cho & G. H. Posner: Proc. Natl. Acd. Sci. USA., 89, 2399 (1992)
- A. M. Benson, Chemica Scripta, 27A, 67 (1987)
- Y. Uda, Y. Ozawa, T. Ohshima & S. Kawakishi, Agric. Biol. Chem., 54, 613 (1990)
- 22) H. Matsuoka, Y. Toda, K. Yanagi, A. Takahashi, K. Yoneyama & Y. Uda, Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 2109 (1997)

Inducibility of A Cancer-Protective Phase II Enzyme, Quinone Reductase in Cruciferous Vegetables

Yasushi Uda and Yoshio Ozawa*

(Laboratory of Food Chemistry, Department of Bioproductive Sciences, Utsunomiya University and Laboratory of Food Science, Department of Food and Nutrition, Gunma Women's Junior College*)

Inducibility of a cancer-protective phase II enzyme, quinone reductase (NQO1) was studied using some cruciferous vegetables and their characteristic components, isoth-iocyanates and flavonoids. The NQO1-induction was detected in mouse hepatoma cells, Hepa 1c1c7 and Ah-receptor-defective strain, Hepa 1c1c7BPrC1. Sensitivity in the NQO1-induction increased by using charcoal-treated fetal calf serum at a concentration of 10% in minimum essential medium. Hepa 1c1c7 cells could response to both monofunctional and bi-functional inducers, such as β -naphthoflavon (BNF) and tert-butylhydroquinone (BHQ), but the Ah-receptor-defective cells could induce NQO1 only with mono-functional inducer (BHQ). Thus, both cell-lines were beneficial for a primary screening of NQO1-inducers in food systems.

Among the vegetables examined, radish and cabbage induced NQO1 when the vegetables were autolyzed for 2 hours, but not with their non-autolyzed extracts. These results suggested that their characteristic components, isothiocyanates that should be generated through an enzymatic degradation of glucosinolates were involved in the NQO1-induction. Then, eight different isothiocyanates were studied for the NQO1-inducibility. It was found that ω -methylthioalk(en)yl isothiocyanates, such as 3-methylthiopropyl, 4-methylthiobutyl, 5-methylthiopentyl and 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanates showed a higher NQO1-induction. These isothiocyanates are known to be contained in cabbage and radish. Thus, they were undoubtedly involved in the NQO1-inducibility of the vegetables.

On the other hand, flavonoids, such as quercetin and its glycosides are known to be components of the vegetables. Hence, we investigated their NQO1-inducibilities. As the results, galangin, kaempferol and quercetin were good inducers of NQO1 at a concentration below 20 μ M. Among seven glycosides of quercetin, however, only 4'-monoglucoside could be a NQO1-inducer. No other glycoside could induced NQO1. A structure-inducibility relationship was observed: 3-hydroxy group in the flavonoid skeleton played as an essential role to induce NQO1. In addition, some reaction products that should be produced from the radish pungent principle, 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate, in the presence of water were found to have a NQO1-inducibility. Among them, methyl 4-methylthio-3-butenyldithiocarbamate and its saturated compound were the most effective

inducer, where the compounds induced NQO1 at a level of $4\sim6$ folds than that of control. In conclusion, cruciferous vegetables can be act as a good NQO1-inducible food, and both isothiocyanates and flavonoids can also play as inducers of the cancer-protective phase II enzyme, NQO1.