

大豆に含まれる各種イソフラボンの吸収・輸送特性と エストロゲン様作用の解析

高嶋慎一郎・佐藤博慶・井上正一郎・友寄博子・佐藤匡央・今泉勝己*

九州大学大学院生物資源環境科学府

Absorption and Transport of Soy Isoflavones and Their Estrogenic Effect

Shinichiro TAKASHIMA, Hiroyoshi SATO, Shoichiro INOUE, Hiroko TOMOYORI,
Masao SATO and Katsumi IMAIZUMI

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate if the type of isoflavones influences their absorption, transport and estrogenic effect in rats and cultured cells. Isoflavone-rich fractions were isolated from soy protein isolate (SPI-I) and Soyaflavone E (Soya-I) preparations. Concentration of the serum isoflavones, in particular daizein, was higher in rats fed a diet containing Soya-I in relation to SPI-I for 2 weeks. These isoflavones affected, in a tissue-dependent manner, the mRNA abundance of cytochrome c oxidase subunit VII related protein (COX7RP) that contains a gene responsive to estrogen. Female rats were sham-operated (Sham) or ovariectomized (OVX) and fed a control diet or a diet containing Soya-I for 3 weeks. The OVX group fed the control diet increased their food consumption, body weight gain and the liver triglyceride concentration. Feeding the diet containing Soya-I improved these parameters. There was no prominent effect of ovariectomy on the COX7RP mRNA abundance in tissues. In cultured COS-7 cells or Hela cells transfected with estrogen receptor (ER) gene and ER responsive element gene, the transactivation effect by genistein was higher than by daizein or glycitein. These results indicate that dietary isoflavones can ameliorate the endocrine derangement, but the active principle involved to be determined. *Soy Protein Research, Japan* 4, 102-106, 2001.

Key words : isoflavones, absorption, ovariectomy, estrogen receptor

*〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

大豆に含まれるイソフラボンのエストロゲン様作用について数多くの報告がある。大豆中にはダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインといった3種のイソフラボン（アグリコン）とそれぞれにグルコースおよびその側鎖にアセチル基またはマロニル基を含むグルコースが結合した配糖体（グリコン）、計12種が知られている。しかしながら食事として摂取したこれらのイソフラボン類のなかで、どの分子種がエストロゲンとしての活性が高いかについては、それぞれの吸収および輸送特性、組織選択性、遺伝子の転写活性等について総合的に評価する必要がある。

今回の研究では、実験動物に異なる組成のイソフラボンを摂食させ、イソフラボン分子種の吸収・輸送特性について検討した。またイソフラボン摂取によるエストロゲン応答性遺伝子の発現制御を様々な組織で検討した。卵巣摘出手術を施し、内因性のエストロゲンの影響を低減させた系を用いた。さらにエストロゲンレセプターおよびレポーター遺伝子を導入した培養細胞系を確立し、イソフラボンの分子種によるエストロゲン作用の違いについて比較した。

方 法

実験 1

11週齢の雄性外因性高コレステロール血症(ExHC)ラットに分離大豆たん白質(SPI)あるいは大豆胚軸水抽出物(ソヤフラボンE)からKudou¹⁾らの方法で

Table 1. Composition of isoflavone in diets

		SPI IF	Soya E
		$\mu\text{mol/kg diet}$	
Glycone	daidzin	194	615
	genistin	261	146
	glycitin	0	344
	acetyldaidzin	590	19
	acetylgenistin	0	12
	acetylglycitin	9	185
	malonyldaidzin	0	41
	malonylgenistin	4	133
	malonylglycitin	0	5
Aglycone	daidzein	234	46
	genistein	323	12
	glycitein	39	92
Total daidzein group		1018	721
Total genistein group		587	303
Total glycitein group		48	625

SPI: soy protein isolate

Soya E: Soyaflavone E

抽出したイソフラボン (Table 1) を 1.65 mmol/kg の濃度でそれぞれ添加した 0.5% コレステロール, 10% オリーブ油, 20% カゼインを含む AIN93G 純化食を 2 週間摂食させた。添加したイソフラボンの量は、たん白質源としたカゼインを SPI に置き換えた場合の食事に含まれる量に相当する量とした。飼育期間終了後、各臓器を摘出した。血清中のイソフラボンを King²⁾らの方法に従って測定した。

実験 2

12 週齢の雌性 SD ラットに卵巣摘出手術を施し、コントロール食として 10% オリーブ油, 20% カゼインを含む AIN93G 純化食を与えた群 (OVX), およびソヤフラボン E から抽出したイソフラボンを実験 1 の 2 倍の濃度で添加した食事を与えた群 (OVX+IF), 偽手術を施しコントロール食を与えた群 (Sham) の 3 群に分け、実験 1 と同様の条件で 3 週間飼育した。

エストロゲン応答性遺伝子の mRNA 発現量の測定: エストロゲン応答性遺伝子のひとつである cytochrome c oxidase subunit VII related protein (COX7RP) の cDNA をクローニングした³⁾。組織から GTC-CsCl 法で total RNA を調製し、ノーザン解析を行った。

実験 3

COS-7 細胞を活性炭処理 FBS を 10% 含む DMEM/F12 培地で 24 時間培養した。その後、ヒト ER α cDNA を哺乳動物発現ベクターである pCI-neo に挿入した pCI-neo-ER α , ERE をホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子である pGL3-Basic に挿入した pGL3-ERE, 遺伝子導入の内部標準として恒常的にウミシイタケルシフェラーゼを発現する pRL-TK, 計 3 種のプラスミドをエレクトロポレーション法により導入した。48 時間後, 17 β -エストラジオール (17 β -E2), ゲニステイン, ダイゼインを 1 μM の濃度で添加し, 24 時間培養した。Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System およびルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。データの解析にはホタル / ウミシイタケルシフェラーゼ活性比を用いた。

HeLa 細胞を活性炭処理 FBS を 10% 含む phenol red-free-MEM (HeLa) 培地で 24 時間培養し, pCI-neo-ER α , pGL3-ERE, pRL-CMV をリポフェクトアミンプラス試薬を用いた方法で導入した。5 時間後活性炭処理 FBS を 5% 含む培地に交換し, その 24 時間後 17 β -E2, ゲニステイン, ダイゼイン, グリシテインを 1 μM の濃度で添加し, さらに 24 時間培養した。ルシフェラーゼ活性を COS-7 細胞と同様の方法で測定した。

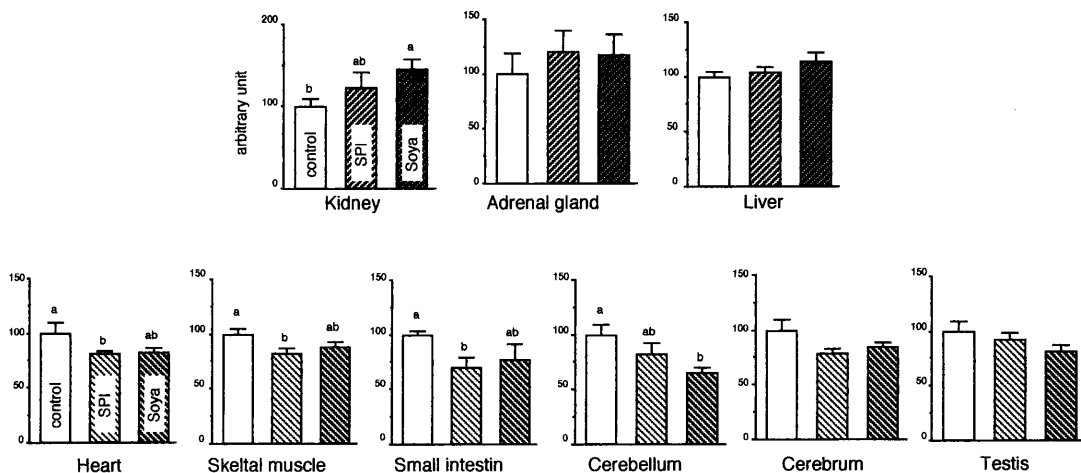


Fig. 1. COX7RP mRNA abundance in various tissues in male ExHC rats fed diet containing SPI and Soya E isoflavones.

Mean $\pm$ SEM. $n = 7$. ^{ab} $P < 0.05$.

結果と考察

実験 1

摂食量, 体重増加量, 肝重量に食事の影響は見られなかった。

各イソフラボン摂取群で食事に含まれるイソフラボン (アグリコン) 3 種すべてが検出された (Table 2)。摂取したイソフラボンの総量は SPI 群, ソヤフラボン E 群で等しいにもかかわらず, 血清中の総イソフラボン濃度はソヤフラボン E 群で SPI 群の約 2 倍であった。ダイゼイン類の食事中の含有量に対する血中濃度の比は SPI 群と比較してソヤフラボン E 群で高かった。食事中的ダイゼインのグリコン組成は, SPI 群がアセチルダイゼインが多いのに対して, ソヤフラボン E 群ではダイジンが多かった。これらのことから, グルコース型グリコンのダイゼインはアセチルグルコース型グリコンのダイゼインよりも吸収されやすい可能性がある。またグリシテインの食事 / 血中濃度の比は両群とも高かったことから, グリシテイン類は吸収率が高

いかあるいは血中での滞留時間が長い性質をもつ可能性が考えられる。

血清のコレステロール, トリグリセリド, リン脂質に食事の影響は見られなかった。

COX7RP mRNA 発現量は肝, 腎, 副腎で増加する傾向が見られた。特に腎ではソヤフラボン E 群で有意な増加が見られた (Fig. 1)。イソフラボンが組織選択的にエストロゲン様に作用しうること, また分子種によってもエストロゲン様作用が異なる可能性が示された。

実験 2

摂食量は Sham 群と比較して OVX 群で有意に増加し, OVX + IF 群は Sham 群と同程度の値であった (Fig. 2)。体重増加量は Sham 群と比較して OVX 群で有意に増加し, OVX + IF 群は Sham 群と OVX 群の中間的な値であった (Fig. 3)。肝重量に各群で差は見られなかった。子宮重量は Sham 群と比較して OVX 群で約 1/3 に減少し, OVX + IF 群は OVX 群と同程度の値であった。

血清のコレステロールは各群に差は見られなかった

Table 2. Serum isoflavone concentration

	SPI	Soya	SPI	Soya
	nmol/ L		serum isoflavone (nmol/L) / diet (μ mol/kg)	
Daidzein	156 $\pm$ 30	251 $\pm$ 40**	0.153	0.348
Genistein	105 $\pm$ 17	45 $\pm$ 6*	0.179	0.149
Glycitein	43 $\pm$ 11	294 $\pm$ 41*	1.11	0.470
Total	304 $\pm$ 54	590 $\pm$ 79*	0.184	0.358

Mean $\pm$ SEM, $n=7$. * $P < 0.05$, ** $P = 0.09$.

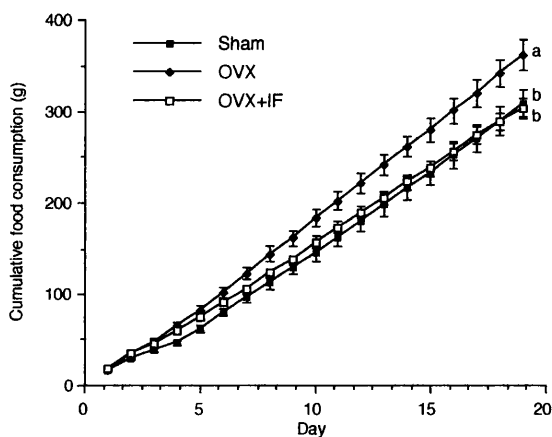


Fig. 2. Food consumption in female SD rats: sham operated-control diet (Sham), ovariectomized-control diet (OVX), ovariectomized-Soya isoflavone diet (OVX+IF). Mean $\pm$ SEM. $n = 5$ or 6 . $^{ab}P < 0.05$.

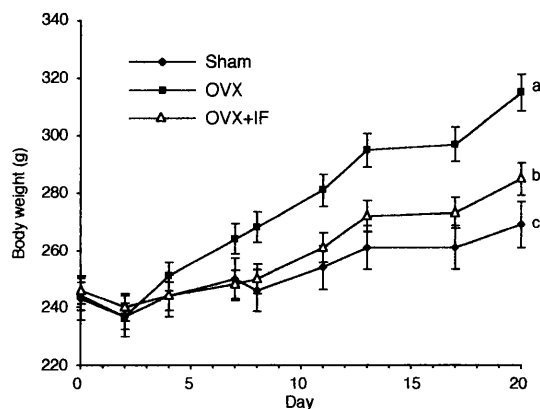


Fig. 3. Body weight change in female SD rats: sham operated-control diet (Sham), ovariectomized-control diet (OVX), ovariectomized-Soya isoflavone diet (OVX+IF). Mean $\pm$ SEM. $n = 5$ or 6 . $^{abc}P < 0.05$.

Table 3. Serum and liver lipids

	Cholesterol	Triglyceride	Phospholipid
Serum		mg/100 mL	
Sham	86.7 $\pm$ 6.6	71.2 $\pm$ 13 ^a	214 $\pm$ 20 ^a
OVX	85.9 $\pm$ 2.3	35.9 $\pm$ 2.6 ^b	167 $\pm$ 6.4 ^b
OVX + IF	79.1 $\pm$ 4.8	44.4 $\pm$ 8.5 ^{ab}	163 $\pm$ 8.4 ^b
Liver		mg/g	
Sham	5.77 $\pm$ 0.67	45.8 $\pm$ 5.3 ^b	29.8 $\pm$ 1.7
OVX	6.93 $\pm$ 0.50	91.9 $\pm$ 18 ^a	29.2 $\pm$ 1.6
OVX + IF	5.58 $\pm$ 0.85	41.8 $\pm$ 9.3 ^b	31.5 $\pm$ 0.5

Mean $\pm$ SEM. $n = 5$ or 6 . $^{ab}P < 0.05$.

が、トリグリセリドはSham群と比較してOVX群で低く、OVX + IF群は中間的な値であった。リン脂質はSham群と比較してOVX群、OVX + IF群で低かった。

肝のコレステロールおよびリン脂質は各群で差は見られなかったが、トリグリセリドはSham群と比較してOVX群で高かった。OVX + IF群はSham群と同程度の値であった。(Table 3)

COX7RP mRNA量は、肝においてOVX群と比較してOVX + IF群で増加した。腎で減少し、小脳では減少する傾向が見られた。卵巣摘出による内因性エスト

ロゲン量の減少は必ずしもエストロゲン応答性遺伝子であるCOX7RPの発現を低下させなかった。

実験 3

COS7細胞において、 17β -E2に対してゲニステインは2倍、ダイゼインは同等の活性を示した。またHeLa細胞においてゲニステインは 17β -E2とほぼ同等の活性をもち、ダイゼイン、グリシテインはほとんど活性を持たなかった (Fig. 4)。このことは、イソフラボンの種類あるいは標的組織によってエストロゲン様の遺伝子の転写活性が異なることを示している。

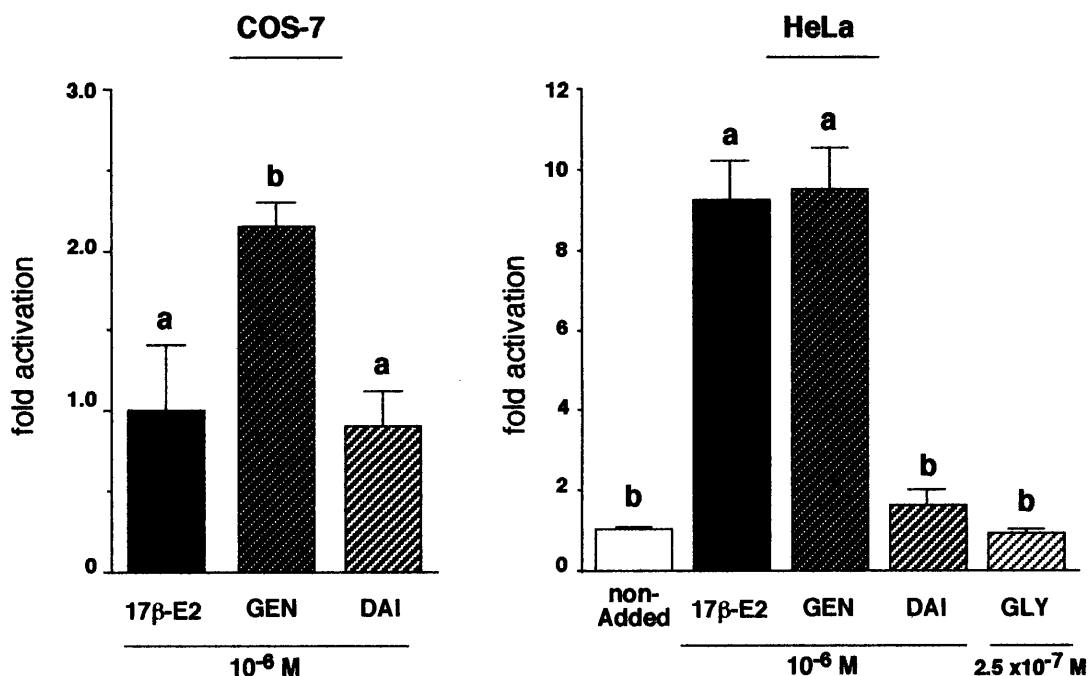


Fig. 4. Transactivation of ERE-luciferase gene by isoflavones in COS-7 and HeLa cells.
Mean $\pm$ SEM. n = 5. ^{ab}P < 0.05.

要 約

ラットにおいて食事として摂取したイソフラボン類はアセチルグルコース型よりもグルコース型グリコンが、効率よく生体内に取り込まれる可能性が考えられる。またグリシテインは、吸収効率が高いかあるいは血中クリアランスが低い可能性が考えられる。生体内でイソフラボンは、血液中を輸送され様々な組織でエストロゲン様に作用し、エストロゲン応答性遺伝子の発現を制御しうる。卵巣を摘出した雌ラットにおいて、イソフラボン摂取が摂食亢進を抑制し、血中および肝の脂質代謝に影響しうることから、食事イソフラボンが脳、肝などの組織においてエストロゲン様に作用し、内分泌系あるいは栄養素代謝に関与する遺伝子の発現制御等を介して、摂食行動、脂質代謝調節に影響を及ぼす可能性が示された。また培養細胞系においてゲニステインはダイゼインと比較して強い転写活性を持つこと、またその強度は由来組織によって異なる可能性が示された。

文 献

- 1) Kudou S and Okubo K (1991): Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem*, **55**, 2227-2233.
- 2) King RA, Broadbent JL and Head RJ (1996): Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J Nut*, **126**, 176-182.
- 3) 高嶋慎一郎, 佐藤博慶, 津田恭征, 佐藤匡央, 今泉勝己 (2000): 分離大豆たん白質エタノール可溶性画分の降コレステロール作用. 大豆たん白質研究, **3**, 110-114.