

核内受容体を介するイソフラボンの作用メカニズムの解明

小川和宏^{*1}・永田耕一¹・鈴木勝也¹・今野俊宏^{1,2}・柴原茂樹¹・柳澤輝行¹

東北大学大学院 ¹医学系研究科 ²歯学研究科

Regulation of Heme Oxygenase-1 and Ligand-binding Transcription Factors by Soybean Isoflavones

Kazuhiro OGAWA¹, Koichi NAGATA¹, Katsuya SUZUKI¹, Toshihiro KONNO^{1,2},
Shigeki SHIBAHARA¹ and Teruyuki YANAGISAWA¹

¹Tohoku University School of Medicine, Sendai 980-8575

²Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai 980-8575

ABSTRACT

Genistein and daidzein, soybean isoflavones, have been described to bind to estrogen receptors and to exert estrogenic and/or anti-estrogenic activity. We have shown that heme binds to Bach1, a transcriptional repressor, and that this binding abrogates the DNA-binding activity of Bach1 to enhance the transcription of genes carrying Bach1-binding sequences. This mechanism is involved in heme oxygenase (HO)-1 induction by heme. HOs degrade heme, a pro-oxidant, to produce bilirubin, an anti-oxidant, and HO-1 is an inducible isozyme of HOs. In this study, we investigated the effects of the isoflavones on gene regulation of HO-1 and its related transcription factors, including Bach1, in human lung carcinoma cells. Both genistein and daidzein inhibited the induction of HO-1 by sodium nitroprusside (SNP), a nitric oxide donor, while genistein but not daidzein inhibited the heme-mediated HO-1 induction. Genistein and daidzein had little effect on the mRNA levels of Bach1 and Nrf2, the transcription factors which regulate transcription of the HO-1 gene. Further study is under way to elucidate the regulatory mechanism of the HO-1 expression by the isoflavones. As the HO-1 induction is an important protective response against excessive free heme and other oxidative stresses, daidzein might be, in some cases, a useful phytoestrogen in that it does not inhibit the heme-mediated HO-1 induction. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 125-129, 2004.

Key words : isoflavone, genistein, daidzein, heme, heme oxygenase-1, phytoestrogen

*〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1

代表的な大豆イソフラボンであるゲニステインやダイゼインは、核内受容体であるエストロゲン受容体に親和性があり、エストロゲン様作用を持つことが示されてきた¹⁾。Zinc finger構造を持つエストロゲン受容体にエストロゲンなどのリガンドが結合すると、転写調節領域にあるestrogen response element (ERE) にダイマーで結合して標的遺伝子の転写を活性化する²⁾。一方、basic leucine zipper 構造を持つBach1は、小Mafたん白質とヘテロダイマーを形成してMaf recognition element (MARE) へ結合する、転写抑制因子である³⁾。我々は、Bach1にヘムが直接結合すること、およびヘムのBach1への結合はBach1のDNA結合を阻害して、MAREを持つ遺伝子の転写を活性化することを見いだした⁴⁾。即ちBach1は「抑制の抑制」で調節されるユニークなリガンド結合型転写因子であり、ヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼ (HO)-1などの転写を制御している^{5,6)}。

ヘムはヘモグロビンやチトクロームP-450など多くのヘムたん白質の補欠分子族として生命維持に必須の物質であるが、たん白質に結合していない遊離ヘムはラジカル発生源で毒性が強い。ヘムオキシゲナーゼ (HO) はヘムを一酸化炭素、鉄、ビリベルジンに分解する酵素であり、生じたビリベルジンは速やかにビリルビンに変換される。HOの誘導性アイソザイムであるHO-1は、基質であるヘムの他に、一酸化窒素 (NO) 供与体や種々の酸化的ストレスなどで転写レベルで強く誘導される^{7,8)}。プロオキシダントであるヘムの抗酸化物質ビリルビンへの分解を促進するHO-1の誘導は、重要な生体防御反応である^{7,9,10)}。

大豆イソフラボンとヘム鉄は栄養補助食品として広く用いられているため、併用される可能性も高い上、ゲニステインがエストロゲン感受性細胞においてHO-1の誘導を抑制する例が報告されている¹¹⁾。こうしたことからヘム分解系とイソフラボンの相互作用の検討は重要と考えられるため、今回我々はヘム分解酵素HO-1や、その転写を制御しているリガンド結合型転写因子Bach1などの発現に対して、大豆イソフラボン誘導体がどのような影響を与えるかを解析した。

方 法

細胞培養および総RNA抽出

ヒト肺がん由来A549細胞を、10%ウシ血清を含むRPMI1640にて5%CO₂下で培養した。HO-1誘導には、ヘミンやNO放出性血管弛緩薬であるニトロプロシドナトリウム (SNP) を、4~6 h培地に加えた。イソフ

ラボンは、HO-1誘導物質の1 h前に培地に加えた。培養終了後、培地を除去して、TRIzol Reagent (Invitrogen) にて総RNAを抽出した。

ノザンプロット解析

ヒトHO-1およびマウスglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNAから、DIG Northern Starter Kit (Roche Diagnostics) によりDIGでラベルされたRNAプローブを調製し、電気泳動後のtotal RNAを固定したナイロンメンブレン上でハイブリダイズし、CSPD (Roche Diagnostics) を用いて検出した。

RT-PCR

Total RNAからReverse Transcription System (Promega) によりcDNAを調製し、Ex Taq (TaKaRa) を用いてPCRを行った。

結 果

ヘミンおよびSNPによるHO-1誘導に対するゲニステインの効果

A549細胞をヘミン (20 μ M, 4 h)、あるいはNO供与体であるSNP (500 μ M, 6 h) で処理すると、HO-1 mRNAが強く誘導された (Fig. 1)。HO-1誘導剤の1 h前にゲニステインを50 μ Mまでの濃度で処理しておくと、これらのHO-1誘導は濃度依存的に抑制された (Fig. 1)。

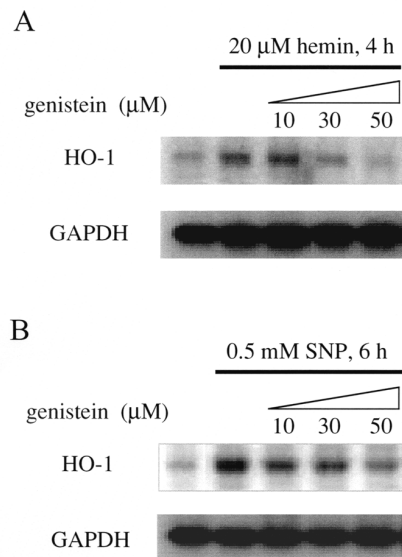


Fig. 1. Regulation of the HO-1 induction by genistein. A549 cells were incubated for 1 h with or without genistein, followed by treatment with hemin (A) or SNP (B), and Northern blot analysis was performed.

ヘミンによるHO-1誘導に対するゲニステインおよびダイゼインの効果

上記と同じヘミン (20 μ M, 4 h) によるHO-1誘導に対し, 他的大豆イソフラボン誘導体であるダイゼインが同様の影響を与えるかを比較検討した. ダイゼインはゲニステインの5位の水酸基が無い化学構造であり, 機能的にはゲニステインがチロシンキナーゼ阻害活性を持つのにに対し, ダイゼインは阻害活性を持たないことが報告されている¹²⁾. これら2種類のイソフラボン化合物を0.1から50 μ Mの濃度で前処理したところ, ゲニステインはヘミンによるHO-1誘導を濃度依存的に抑制したのに対し, ダイゼインは50 μ Mまで濃度を上げて抑制しなかった (Fig. 2A).

SNPによるHO-1誘導に対するゲニステインおよびダイゼインの効果

次に, SNP (500 μ M, 6 h) によるHO-1誘導に対するゲニステインおよびダイゼインの効果を比較するため, これら2種類のイソフラボン化合物をヘミンによる誘導の場合と同様に0.1から50 μ Mの濃度範囲で前処理した. するとヘミンの場合とは対照的に, ゲニステインだけでなくダイゼインもSNPによるHO-1誘導を濃度依存的に抑制した. 抑制に必要な濃度を比べると, ゲニステインの方がダイゼインよりもやや低濃度で同等の阻害作用を示した (Fig. 2B).

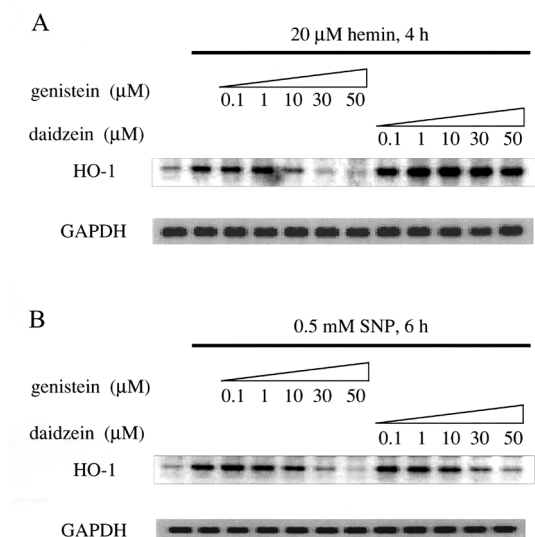


Fig. 2. Effects of genistein and daidzein on the HO-1 mRNA induction. Cells were treated with isoflavones and HO-1 inducers (hemin (A) or SNP (B)) and the HO-1 mRNAs were analyzed as described in the legend for Fig. 1.

Nrf2およびBach1のmRNAレベルに対するイソフラボンの影響

転写抑制因子Bach1と小Mafタンパク質とのヘテロダイマーはMAREに結合してHO-1などの転写を抑制しているが, 遊離ヘム濃度が上昇するとBach1にヘムが結合してBach1ヘテロダイマーがMAREから脱離し, 代わりに転写活性化因子Nrf2などのヘテロダイマーが結合してHO-1の転写を活性化する^{4, 5)}. そこで, これまで行ってきたイソフラボンがHO-1誘導を抑制する条件において, Bach1やNrf2のmRNAレベルが変化しているかどうかを, RT-PCR法で調べた. その結果, Fig. 3に示す通り30~50 μ Mのゲニステインやダイゼインで前処理した後, SNP (500 μ M, 6 h) で処理しても, Nrf2やBach1のmRNAレベルに大きな変化は見られなかった.

考 察

イソフラボンによるHO-1誘導調節のメカニズム

SNPによるHO-1誘導は, ゲニステインおよびダイゼインのいずれによっても抑制されたが, ヘミンによるHO-1誘導はゲニステインによってのみ抑制されダイゼインでは抑制されなかった. この結果は, ヘミンとSNPによる誘導機構やゲニステインとダイゼインに

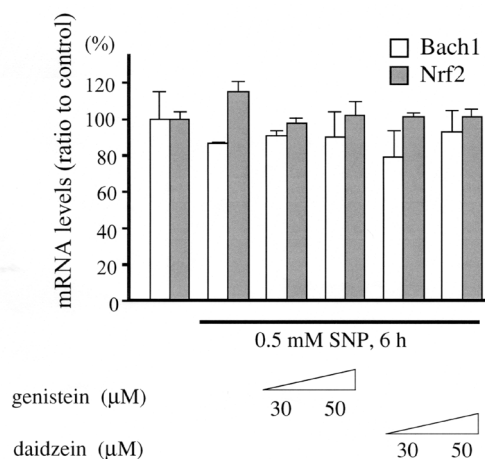


Fig. 3. RT-PCR analysis of the Nrf2 and Bach1 mRNAs. Cells were treated with chemicals as described in the legend for Fig. 1 and the levels of mRNAs were analyzed by RT-PCR. After quantification using NIH image, the intensity for Nrf2 and Bach1 mRNAs were normalized with those for GAPDH mRNAs as controls and plotted as means $\pm$ SE.

よる誘導阻害機構に差異がある可能性を示唆している。ゲニステインはチロシンキナーゼ阻害作用を持ち、ダイゼインは阻害作用を持たないため¹²⁾、ヘムによるHO-1誘導機構にはチロシンのリン酸化が含まれており、SNPによるHO-1誘導機構においてはチロシンリン酸化が含まれていない可能性がある。

HO-1の転写調節に関与する転写活性化因子Nrf2と転写抑制因子Bach1のmRNA量は、ゲニステインやダイゼインで処理しても大きな変化は見られなかった。そこでこれらの転写因子のDNA結合の変化の有無を検討している。また、エストロジェン受容体を発現している細胞との、イソフラボンのHO-1誘導抑制作用の異同を調べている。これらの検討を通して、イソフラボンによる遺伝子発現調節におけるリガンド結合性転写因子の役割を明らかにしたい。

イソフラボンの新しい用途の可能性

ヒトHO-1のプロモーター領域には(GT)_nの長さが異なる多型が存在し、長さによってHO-1誘導能が異なる¹³⁾。低誘導性の個体群は呼吸・循環器疾患などに罹患する危険性が高く、HO-1の誘導がこれらの疾患の予防に重要であることが示唆されている^{13, 14)}。また遊離ヘムは毒性が強く、ヘム鉄と大豆イソフラボンが

食品として併用される可能性も高いことなどから、ヘムによるHO-1誘導を阻害しないことを今回見出したダイゼインが、栄養補助食品の成分として好ましい場合もあると考えられる。

多くの場合HO-1の誘導は生体に有利と考えられるが、がんやマラリアでは逆にHOの活性あるいは誘導が低い方が有利だと報告されている。HO阻害作用を持つ金属ポルフィリン誘導体はがん抑制効果がある^{15, 16)}。イソフラボンもがん抑制作用を持ち、その作用機構はいくつか示唆されているが、ゲニステインがHO-1誘導阻害という新たな作用機序によりがんを抑制できるかどうかは興味深い。またHOのもう1つのアイソザイムであるHO-2は酸素応答に重要であるが¹⁷⁾、このHO-2に対するイソフラボンの影響も今後の検討課題である。一方マラリアは地球上最悪とも言える感染症であり、脳マラリアへ重症化すると致死率が高い。ところが多型によるHO-1低誘導の個体群では、マラリアが重症化しにくいことが報告された^{7, 17, 18)}。マラリア罹患時は溶血によるヘム放出でHO-1が誘導されやすい状態であり、ゲニステインによるHO-1誘導抑制がマラリア重症化予防に応用できれば、医療面での大きな貢献が可能になると考えられる。

要 約

大豆イソフラボンのゲニステインやダイゼインは、核内受容体であるエストロジェン受容体に親和性があり、エストロジェン様作用を持つ。一方、転写抑制因子Bach1にはヘムが結合することでBach1のDNA結合が阻害され、ヘムオキシゲナーゼ (HO)-1などの標的遺伝子の転写を促進する。ヘム分解酵素HO-1は基質であるヘムや酸化的ストレスなどで誘導され、ヘム分解を促進して抗酸化物質ビリルビンを生じる生体防御たん白質である。今回HO-1やBach1などの発現に対するイソフラボンの影響をヒト肺がん由来細胞を用いて解析したところ、ゲニステインはヘムやNO供与体であるニトロプロシドナトリウム (SNP) によるHO-1の誘導を抑制した。これに対しダイゼインはSNPによる誘導は抑制したが、ヘムによる誘導は抑制しなかった。これらの誘導・抑制機構に差異があることが示唆されたが、Bach1やNrf2といったHO-1の転写制御因子のmRNAレベルに大きな変化は無く、作用機序を更に解析している。遊離ヘムは毒性が強く、HO-1誘導は疾病予防にも重要である上、ヘム鉄とイソフラボンが併用される可能性も高いことから、ヘムによるHO-1誘導を阻害しないダイゼインが食品成分としてより好ましい場合もあると考えられる。

文 献

- 1) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, **139**, 4252-4263.
- 2) Yudt MR and Koide S (2001): Preventing estrogen receptor action with dimer-interface peptides. *Steroids*, **66**, 549-558.
- 3) Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, Yamamoto M and Igarashi K (1996): Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription

- factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol*, **16**, 6083-6095.
- 4) Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H and Igarashi K (2001): Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J*, **20**, 2835-2843.
 - 5) Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M and Igarashi K (2002): Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J*, **21**, 5216-5224.
 - 6) Kitamuro T, Takahashi K, Ogawa K, Udon-Fujimori R, Takeda K, Furuyama K, Nakayama M, Sun J, Fujita H, Hida W, Hattori T, Shirato K, Igarashi K and Shibahara S (2003): Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem*, **278**, 9125-9133.
 - 7) Shibahara S (2003): The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J Exp Med*, **200**, 167-186.
 - 8) Takahashi K, Hara E, Ogawa K, Kimura D, Fujita H and Shibahara S (1997): Possible implications of the induction of human heme oxygenase-1 by nitric oxide donors. *J Biochem*, **121**, 1162-1116.
 - 9) Poss KD and Tonegawa S (1997): Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10925-10930.
 - 10) Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y and Koizumi S (1999): Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, **103**, 129-135.
 - 11) Masuya Y, Hioki K, Tokunaga R and Taketani S (1998): Involvement of the tyrosine phosphorylation pathway in induction of human heme oxygenase-1 by hemin, sodium arsenite, and cadmium chloride. *J Biochem*, **124**, 628-633.
 - 12) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262**, 5592-5595.
 - 13) Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S and Sasaki H (2000): Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet*, **66**, 187-195.
 - 14) Exner M, Schillinger M, Minar E, Mlekusch W, Schlerka G, Haumer M, Mannhalter C and Wagner O (2001): Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with restenosis after percutaneous transluminal angioplasty. *J Endovasc Ther*, **8**, 433-440.
 - 15) Fang J, Akaike T and Maeda H (2004): Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis*, **9**, 27-35.
 - 16) Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M, Marculescu R, Printz D, Fritsch G, Wagner O, Selzer E, Sperr WR, Valent P and Sillaber C (2004): Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, **64**, 3148-3154.
 - 17) Adachi T, Ishikawa K, Hida W, Matsumoto H, Masuda T, Date F, Ogawa K, Takeda K, Furuyama K, Zhang Y, Kitamuro T, Ogawa H, Maruyama Y and Shibahara S (2004): Hypoxemia and blunted hypoxic ventilatory responses in mice lacking heme oxygenase-2. *Biochem Biophys Res Commun*, **320**, 514-522.
 - 18) 平山謙二 (2003) : ヘムオキシゲナーゼ-1と脳マリア感受性. 生化学, **75**, 219-223.