

大豆成分の脂質代謝改善効果と核内受容体活性制御

佐藤隆一郎

東京大学大学院農学生命科学研究科

Effects of Soy Bean Ingredients on Lipid Metabolism Through the Activities of Nuclear Receptors

Ryuichiro SATO

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

Although it has been reported that soy products improve lipid metabolism, little is known about the molecular mechanism of the effects. Isoflavones having estrogen-like activities are not enough to explain the whole functions of soy products. In this study we examined the ligand activity of isoflavones to several nuclear receptors including FXR, LXR, PPAR, RXR and HNF-4, which are deeply involved in regulation of lipid metabolism. For this purpose we established a new assay system to evaluate the ligand activity using 96-well plates. The ligand-binding domain of each nuclear receptor was fused to GST, and this fusion protein was expressed in *E. coli* and purified. The coactivator protein fused to alkaline phosphatase was also prepared. This system takes advantage of the recruitment of the coactivator protein to the ligand-binding domain in the presence of the ligand. Using this assay system we examined the ligand-binding activity of several isoflavones to these nuclear receptors. Some isoflavones were found to be able to bind to LXR weakly. By using other nuclear receptor ligand-binding domains this new assay will enable us to reveal novel functions of isoflavones. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 76-80, 2005.

Key words : isoflavones, nuclear receptor, lipid metabolism

大豆食品の摂取が脂質代謝を改善する効果を持つことは広く知られた事実である。しかしその正確な分子機構は十分に解明されているとは言いがたい。その効果の一因として、大豆に含まれるイソフラボン類が挙

げられている。これらイソフラボン類はエストロゲン用活性を示すことから、エストロゲン受容体を介した生理作用が提唱されている。エストロゲン受容体は、核内受容体ファミリーの一員で、ヒトには48種類の核内受容体が存在する。核内受容体は性ホルモンあるいは脂溶性ビタミンの受容体として機能しているが、そ

* 〒113-8657 文京区弥生1-1-1

の他の多くはリガンドが不明のオーファン受容体と呼ばれている。ここ数年の研究結果から、それらリガンドの一部が明らかにされ、酸化コレステロール、脂肪酸誘導体、胆汁酸等の脂質代謝産物が直接ある種の核内受容体を活性化させ、種々の応答遺伝子発現を制御することが示された。大豆に含まれる微量成分に関して、エストロゲン受容体のみならず、これら脂質代謝に関連する受容体のリガンドとしても機能する可能性について解析を行なった。その際に、リガンド結合活性を直接測定する新たなアッセイ系を構築し、それと同時に核内受容体活性化能を評価するアッセイ系も作動させ、2種類の評価系で機能を追跡した。

方 法

核内受容体リガンド活性能評価系の構築

各種核内受容体は、分子内のC末端側に固有のリガンドを結合するリガンド結合領域を有し、リガンドが結合した際には構造変化を引き起こす。その結果、転写を正に制御するコアクチベーター分子と複合体を形成し、転写を促進する。この機構を利用し、リガンド結合領域に食品成分が結合した際に、コアクチベーターが複合体を形成することを定量化するシステムを構築した。

GST遺伝子の下流にヒト各種核内受容体リガンド結合領域を接続し、大腸菌にGST-リガンド結合領域融合たん白質を発現させた。これを Glutathione-Sepharose ビーズで回収し、精製融合たん白質を得た。核内受容体としては、ヒト LXR α 、FXR、HNF-4、

PPAR δ のリガンド結合領域を用いた。また、コアクチベーターとしてヒトTIF2の核内受容体結合領域と大腸菌アルカリフォスファターゼを融合させたたん白質にHis-tagを付加し、大腸菌に大量発現させたリコンビナントをNi-resinを用いて精製した (Fig. 1)。

精製GST融合たん白質を96穴プレートに固着させ、その後イソフラボン成分を1時間吸着させる。その後、アルカリフォスファターゼ融合たん白質を結合させ、さらにp-nitrophenyl phosphate (NPP) を基質として加え、405 nmで酵素活性を測定する評価系を構築した (Fig. 2)。

HNF-4のアンタゴニスト活性を解析する目的で、コリプレッサーであるヒトNCoRをTIF2と同様に融合たん白質として精製し、アンタゴニスト活性評価系の構築も行った。

ルシフェラーゼアッセイを用いた機能評価

ルシフェラーゼ遺伝子の上流に、Gal4応答配列を5回組み込んだレポーター遺伝子と、Gal4 DNA結合領域の後方に各種核内受容体のリガンド結合領域を組み込んだ融合たん白質発現遺伝子をHEK293細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行なった。その際に、各種イソフラボン類を培地に20 μ M加え、核内受容体活性化能を追跡した。

結果と考察

核内受容体としてLXR α 、FXR、PPAR δ 、RXR α 、HNF-4についてそのリガンド結合領域を用いて融合たん白質を調製し、リガンド結合評価系を構築した。

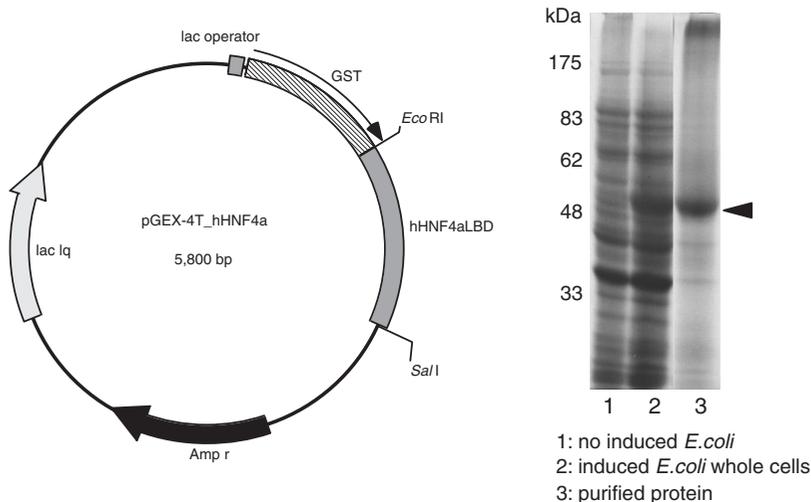


Fig. 1. Purification of GST-HNF4 fusion protein.

FXRとLXR α については、それぞれの合成リガンドを用いて、試料中濃度と吸光度との相関について示した (Fig. 3). FXRについては、合成リガンドGW4064では μ Mレベルから強い吸光度の上昇が認められ、内因性リガンドのCDCA (ケノデオキシコール酸) でもmM以下で吸光度の上昇が確認された. 同様に、LXR α に関しても合成リガンドT0901317で μ Mレベルから強い吸光度の上昇が認められた.

PPAR δ は筋肉組織に多く発現し、内因性のリガンドは脂肪酸誘導体が考えられ、その活性化は骨格筋におけるエネルギー代謝、脂質代謝を改善することが明らかにされている. LXR α は肝臓、小腸で多く発現し、内因性のリガンドは酸化コレステロールであり、その活性化は種々のABCトランスポーターの発現を亢進し、コレステロール代謝を改善する作用が報告されている¹⁾. FXRは小腸、肝臓で主として発現し、胆汁酸

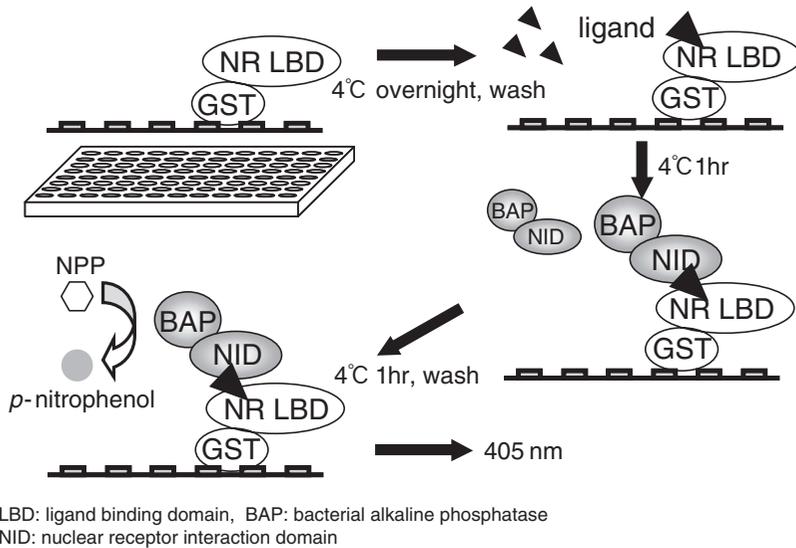


Fig. 2. A nuclear receptor ligand assay system.

FXR

Farnesoid X receptor
Target genes: I-BABP
SHP
BSEP
Ligand: bile acids

LXR α

Liver X receptor
Target genes: ABCA1
SREBP-1c
CYP7A1
Ligand: oxidized chol.

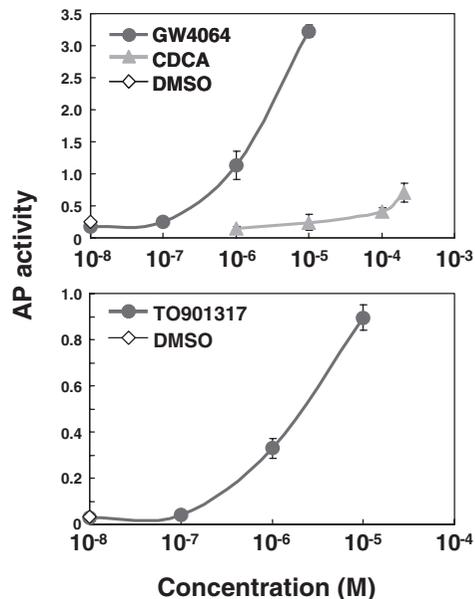


Fig. 3. Synthetic ligands interact with nuclear receptors.

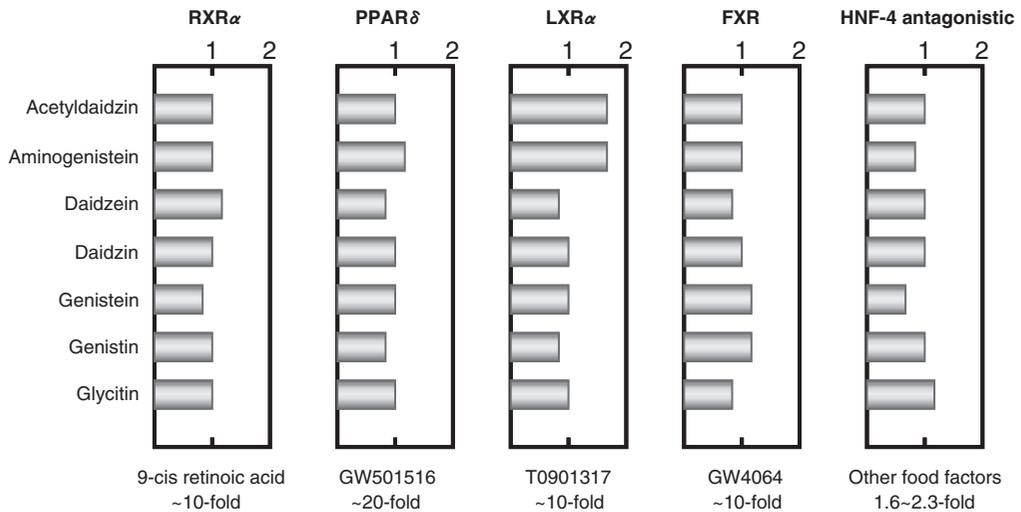


Fig. 4. The ligand-binding activity of several isoflavones to the nuclear receptor ligand-binding domain.

をリガンドとし、その活性化は胆汁酸代謝またはトリグリセリド代謝を改善することが報告されている²⁾。RXR α はこれら受容体とヘテロダイマーを形成していることから、そのリガンドには種々の脂質代謝改善効果が期待できる。HNF-4については、種々のリポたん白質代謝遺伝子、糖新生遺伝子を制御しており³⁾、内因性リガンドの脂肪酸CoAと競合してアンタゴニスト活性を示す成分は、リポたん白質代謝等を改善することが期待される。そこで、HNF-4と結合しcorepressorであるNCoRをリクルートする活性を評価した。

Fig. 4に、評価に用いたイソフラボン類とそのリガンド活性を示した。GST融合たん白質を用いた時の吸光度をGSTの時のそれで割った値に変化がない時が1である。いずれの核内受容体についても合成リガンド等を用いたときの値をグラフの下に示した（10~20

倍）。HNF-4のアンタゴニスト活性は対照とする化合物がないので、他の食品成分で認められた値を参考に示した。ほとんどの項目で顕著な活性が認められなかったものの、acetyldaidzinとaminogenisteinでLXR α の弱い結合活性が認められた。これらの効果について、Gal4 DNA結合領域の後方にLXR α リガンド結合領域を融合させたルシフェラーゼアッセイ系で転写亢進活性を評価したところ十分な活性化は検出されなかった（data not shown）。以上の結果より、上記核内受容体の活性に影響を及ぼす形で脂質代謝を変動する効果をイソフラボン類に見いだすことは出来なかった。しかし、脂質代謝調節に関与する核内受容体は本研究課題で用いた他にも存在することから、他の受容体への結合活性を解析することが今後の課題とも言える。

要 約

大豆成分による脂質代謝改善効果は広く知られた事実ではあるが、その作用成分、機作について十分に解き明かされているとは言い難い。たん白成分による胆汁酸排泄促進効果、イソフラボン類によるエストロゲン様作用などが提唱されているが、それらだけでは、大豆成分による強力な脂質代謝改善効果を十分に説明できない。この様な考えに基づき本研究では、脂質代謝を制御することが近年明らかにされた核内受容体、FXR、LXR、PPAR、HNF-4等の活性を、大豆イソフラボン類が細胞内に取り込まれた後に制御し、脂質代謝を正の方向へと導く可能性について解析を進めた。その評価系として、各種核内受容体リガンド結合領域にイソフラボン類が結合した際にcoactivatorがリクルートされることを利用した評価系を構築した。また、corepressorがリクルートされることを用いてアンタゴニスト活性を評価する系の構築も行なった。各種イソフラボン類の中で弱いながらもリガンド活性を有する化合物を見いだすことに成功した。

文 献

- 1) Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lusting K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM and Mangelsdorf DJ (2000): Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **289**, 1524-1529.
- 2) Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA and Willson TM (2000): Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*, **43**, 2971-2974.
- 3) Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M and Sato R (2004) : Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. *J Biol Chem*, **279**, 45685-45692.