

大豆に含まれるゲニステイン，ダイゼインおよびその代謝産物エクオールの 分子生物学的薬理作用の検討およびその生体内濃度の臨床的意義

臼井 健*

独立行政法人国立病院機構京都医療センター 臨床研究センター

Molecular and Pharmacological Analysis of Genistein, Daidzein and Its Metabolite Equol, and Their Clinical Significance

Takeshi USUI

National Hospital Organization Kyoto Medical Center, Clinical Research Institute
Kyoto 612-8555

ABSTRACT

Genistein and Daidzein are well characterized phytoestrogens rich in soy or soy derived foods. These two isoflavones are considered to play an important role for various soy related human health benefits such as prevention of osteoporosis or arteriosclerosis. Daidzein is metabolized to equol in most of the animals and some human, and the equol is reported to be a stronger estrogenic compound. Individuals who can metabolize daidzein to equol (equol producers) might be more sensitive to soy intake than equol non-producers. Here we characterized the estrogenic properties of these three phytoestrogens, genistein, daidzein, and equol. All of these three phytoestrogens showed strong estrogenic activity in reporter gene assay system. Daidzein showed super agonistic action to estrogen beta mediated target gene expression. Interestingly, the estrogenic activities of genistein and daidzein were reversed by, ICI182720, estrogen pure antagonist, in estrogen receptor alpha mediated target gene expression but not to estrogen receptor beta mediated target gene expression. In contrast to genistein and daidzein, estrogenic activity of equol was reversed by ICI182720 on both estrogen receptor alpha and beta mediated target gene expression. *In vitro* binding experiment showed that these three phytoestrogens bind to both estrogen receptor alpha and beta. Medaka vitellogenin assay and MCF-7 cell proliferation assay showed that these three phytoestrogens have estrogenic activity. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 153-157, 2006.

Key words : phytoestrogen, isoflavone, equol, estrogen receptor

* 〒612-8555 京都市伏見区深草向畑町1-1

近年の米国の大規模臨床試験（WHI study）にて更年期以降の女性のホルモン補償療法はベネフィットよりリスクが高いことが明らかにされ、また認知症の発症予防に関しても懐疑的な報告がなされエストロゲンの補償療法の見直しが迫られている^{1,2)}。また一方で選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）は近年骨粗鬆症の治療薬としてまた更に乳がんや動脈硬化に対するベネフィットも期待されており、将来大きなマーケットを獲得する可能性がある。植物中に含まれる植物エストロゲン（phytoestrogen）の存在は以前より知られている。大豆に豊富に含まれるゲニステインやダイゼインは代表的なイソフラボンであり、植物エストロゲンとして作用することが知られている。またダイゼインは摂取された後に腸内細菌叢によって代謝を受けてダイヒドロダイゼインを経てエクオールに代謝される³⁾。しかしヒトにおいてはこの代謝を司る腸内細菌叢を有する割合は約30%程度とされており、エクオール産生菌を持っている人をエクオールプロデューサーと呼びその意義が注目されている⁴⁾。これらのイソフラボン類の健康に及ぼす影響については多くの疫学研究があるが、必ずしもそれらの結果は一致していないのが現状である⁵⁾。本研究ではこれらのイソフラボンおよびその代謝産物の分子レベルでの作用機構の解明をエストロゲン受容体に対する作用を中心に試みた。

方 法

用いた培養細胞はTSA201細胞（ヒトembryonic kidney 293細胞）であり、フェノールレッド除去DMEM培地に活性炭処理胎児ウシ血清を加え培養を行った。Fig. 1に示す如くこの培養細胞系にエストロゲン受容体 α あるいは β の発現ベクターを、エストロゲン反応性配列を有するレポーター遺伝子とともにリ

ン酸カルシウム共沈法にてトランスフェクションを行う。トランスフェクション後8時間で、培養液中に各種イソフラボンおよび代謝産物を添加し、48時間後に細胞を集め、プロメガ社のピッカジーンキットを用いてルシフェラーゼアッセイ法にて添加したイソフラボン類のエストロゲン活性を測定した⁶⁾。

*in vitro*におけるエストロゲン受容体とリガンドとの結合については東洋紡のLigand Screening System Estrogen Receptor α and β キットを用いてfluorescence polarization assayにて検討をおこなった。

雄のメダカを用いたビテロゲニンアッセイは以下の通り行った。オスのメダカを真水にて1週間飼育。その後コントロール群、エストロゲン暴露群、ゲニステイン暴露群、ダイゼイン暴露群、エクオール暴露群に分けて5日間飼育。その後メダカの血中ビテロゲニンの値をビテロゲニンアッセイキット（Amersham Pharmacia Biotech社）を用いて測定した。

ヒト乳がん細胞であるMCF-7細胞をフェノールレッド除去培地に活性炭処理ウシ血清を加えて培養。各種イソフラボン類を添加し5日間培養を続け細胞の増殖能をMTTアッセイキット（Molecular Probes社）にて検討した。

結 果

ゲニステイン、ダイゼイン、ダイヒドロダイゼイン、エクオールのいずれもレポーター遺伝子アッセイ系でエストロゲン受容体 α 、 β のいずれに対しても活性を認めた。ダイゼインはエストロゲン受容体 β に対するアゴニスト作用においてスーパーアゴニストとして作用した。またこれらのエストロゲン活性は、ICI182,780の添加で相殺されエストロゲン受容体を介する作用であることが示された（Fig. 2）。

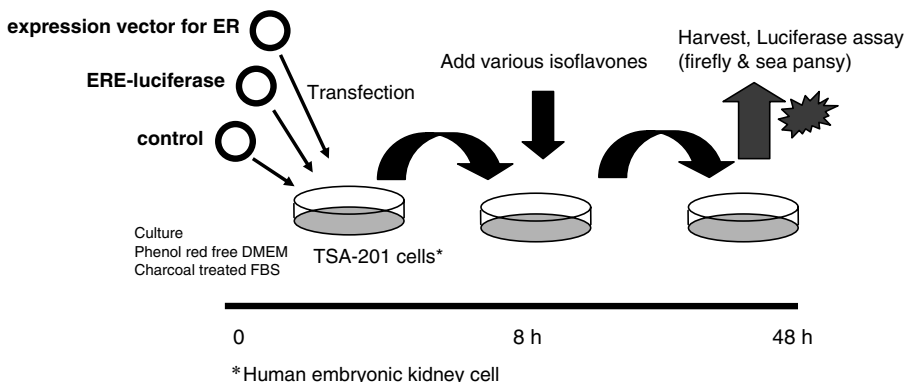


Fig. 1. Experimental schema of the gene transfection and reporter gene assay.

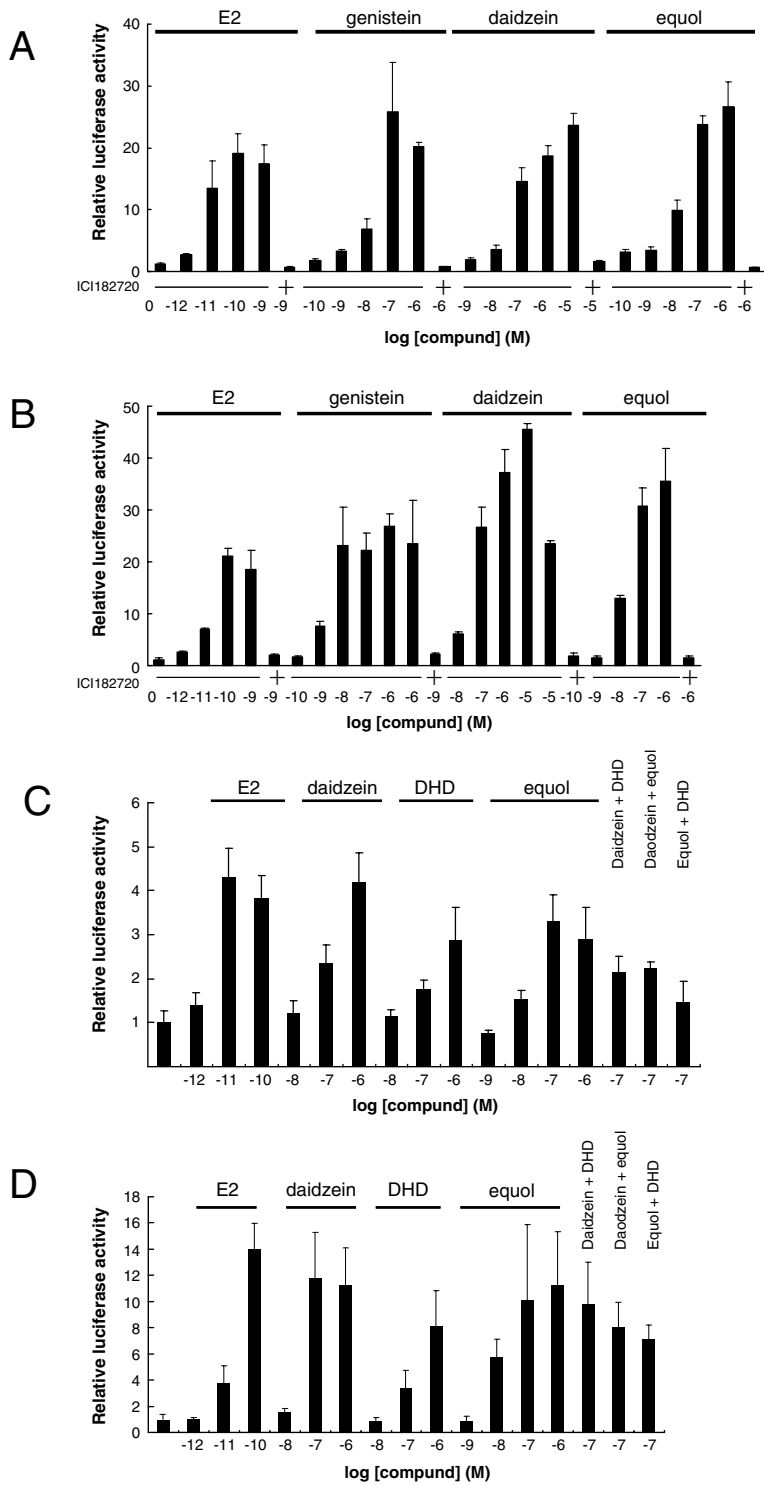


Fig. 2. The effects of various isoflavones and their metabolites on the estrogen dependent reporter gene assay. A, C: The effects on estrogen receptor alpha dependent reporter assay. B, D: The effects on estrogen receptor beta dependent reporter assay. A and B shows the effects of genistein, daidzein, and equol, and C and D shows the effects of daidzein, dihydrodaidzein (DHD) and combinations of daidzein, DHD, and equol.

考 察

*in vitro*における受容体との結合を検討したが、ゲニステイン、ダイゼイン、エクオールはエストロゲン受容体 β に対してはほぼ同様の結合能を示したが、エストロゲン受容体 α に対してダイゼインはゲニステイン、エクオールに比して結合能は弱いことが示された (Fig. 3).

次にこれらのイソフラボン類のエストロゲン活性をメダカビテロゲニンバイオアッセイ方にて検討した。ゲニステイン、ダイゼイン、エクオールはいずれもオスのメダカの血中ビテロゲニン濃度の上昇をもたらした (Fig. 4).

更にエストロゲン依存性に増殖することが知られているMCF-7細胞に対する増殖能を指標に各種イソフラボンの影響を検討した。ゲニステイン、ダイゼイン、エクオールはいずれもMCF-7細胞の増殖能を促進し、その効果はICI182720添加によって完全に相殺された (Fig. 5).

レポーター遺伝子アッセイ系を用いた検討では2種類のイソフラボン (ゲニステイン、ダイゼイン) およびダイゼインの代謝産物であるダイハイドロダイゼイン、エクオールの全てにおいてエストロゲン活性を認めた。特にダイゼインにおいてはエストロゲン受容体 β に対して強い活性を示し、スーパーアゴニストとして作用する可能性が示唆された。ダイゼインのこの β 選択性については*in vitro*結合実験におけるエストロゲン受容体に対する親和性の実験においても矛盾しない結果であった。エクオールのエストロゲン活性はゲニステインとほぼ同程度であった。しかし本研究でもちいたエクオールはラセミ体であり実際の生体中には活性型のみが存在すると言われており、このことを考慮し、また血中の存在様式も考慮するとゲニステイン

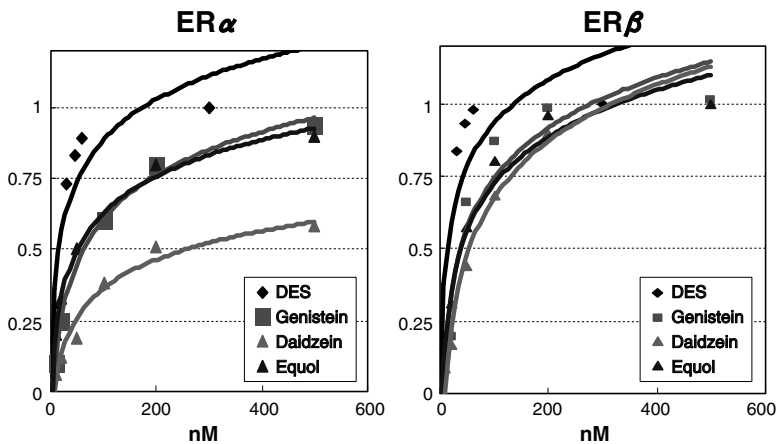


Fig. 3. *In vitro* binding assay on estrogen receptor α (left) and β (right).

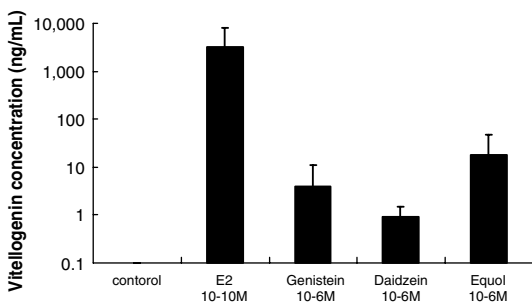


Fig. 4. Male medakas that exposed to 17 β estradiol (E2), genistein, daidzein, and equol, showed marked serum vitellogenin concentrations.

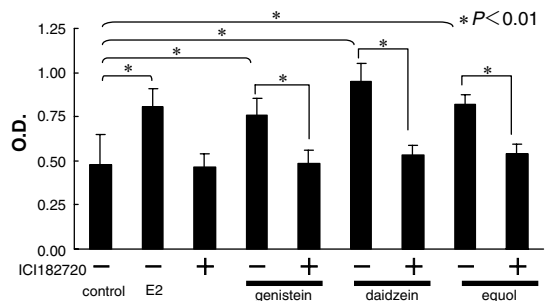


Fig. 5. The effects of genistein, daidzein, and equol on the proliferation of MCF-7 cells. All these cell proliferation effects were reversed by adding ICI182720.

の数倍程度の活性を発揮する可能性がある。また本研究では各種のイソフラボンが実際オスのメダカのピテロゲニン濃度を上げたり、MCF-7細胞の増殖能を促進

したりすることが示され、薬理学的な作用を及ぼしうることが示唆される。

要 約

大豆に豊富にふくまれるイソフラボン類やその代謝産物のエストロゲン活性について複数のアッセイ系を用いて検証した。これらのイソフラボン類やその代謝産物はエストロゲン活性を有しており、その摂取は薬理学的効果をもたらしうると考えられた。

文 献

- 1) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM and Ockene J (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, **288**, 321-333.
- 2) Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC and Breitner JC (2002): Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *Jama*, **288**, 2123-2129.
- 3) Chang HH, Robinson AR and Common RH (1975): Excretion of radioactive diadzein and equol as monosulfates and disulfates in the urine of the laying hen. *Can J Biochem*, **53**, 223-230.
- 4) Setchell KD, Brown NM and Lydeking-Olsen E (2002): The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr*, **132**, 3577-3584.
- 5) Usui T (2006): Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J*, **53**, 7-20.
- 6) Usui T, Ikeda Y, Tagami T, Matsuda K, Moriyama K, Yamada K, Kuzuya H, Kohno S and Shimatsu A (2002): The phytochemical lindleyin, isolated from *Rhei rhizoma*, mediates hormonal effects through estrogen receptors. *J Endocrinol*, **175**, 289-296.