

大豆イソフラボン類の新たな生理活性評価研究

佐藤隆一郎*

東京大学大学院農学生命科学研究科

Evaluation Study on Novel Physiological Activities of Soy Isoflavones

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 increase overall metabolism, little is known about the molecular mechanism of the effects. Isoflavones having estrogen-like activities are thought to contribute to it. In this study we utilized our new assay system to evaluate the ligand-binding activity to estrogen receptor and examined the ligand activity of isoflavones, their glycosides and their derivatives metabolized by bacterial flora in the intestine. We further tested other food factors (~120 compounds) in the same assay. Isoflavones were found to be more potent ligands for the receptor than other food factors. Coumestrol has the highest ligand-binding activity among all compounds tested in the current assay. Equal, a daizein metabolite, has a stronger ligand-binding and receptor inducible activity than daizein does. This suggests that it is required to study the biological activities of isoflavone metabolites in our body. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 93-95, 2007.

Key words : estrogen, coumestrol, isoflavone, equal, daizein

大豆食品の摂取が種々の代謝改善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様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。大豆イソフラボン類は腸内細菌による代謝を受け、活性を変化させた誘導体へと形

を変え、体内で機能している可能性も指摘されている。本研究では大豆に含まれるイソフラボン類、その配糖体、腸内細菌代謝物について、我々が開発したエストロゲン受容体リガンド活性評価系を用いて、リガンド活性の比較検討を行った。さらに同時に、種々の食品成分約120種類も本評価系に供し、大豆イソフラボン類との活性の比較を行った。リガンド活性のみならず、細胞内でのエストロゲン受容体活性化能についてはルシフェラーゼアッセイ系を用いて検討した。

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

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¹⁾。

GST遺伝子の下流にヒトエストロゲン受容体 α 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。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りコンビナントをNi-resinを用いて精製した。

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等を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²⁾。

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方に、エストロゲン受容体応答配列を3回組み込んだレポーター遺伝子と、エストロゲン受容体 α の発現遺伝子を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添加し、核内受容体活性化能を追跡した。

ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、それらの配糖体であるダイジン、ゲニステチン、グリシチン、腸内細菌代謝産物としてジヒドロダイゼイン、エクオール、ジヒドロゲニステイン、HPPA (2-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid) を評品として用いた。さらに、食品由来の成分約120種類を(40%程度がフラボノイド類、25%程度がテルペノイド類)を用いて、エストロゲン受容体リガンド活性評価を行った。

イソフラボンならびにその誘導体に結合活性が認められたが、その他の食品成分としてはクメストロールに最も強力なりガンド活性が見いだされた (Fig. 1)。驚いたことに、クメストロールのリガンド活性は内因性リガンドの17 β -エストラジオールと同程度であった。ケンフェロール、ケルセチンにも微弱なりガンド活性が見られたが、イソフラボンより活性は低かった。イソフラボンの中ではグリシテインのリガンド活性が最も弱かった。イソフラボン配糖体類に結合活性は見いだされなかった。また、代謝産物中ではエクオールが起源のダイゼインよりリガンド活性が若干高いものの、ゲニステインの代謝産物ジヒドロゲニステインは活性が低かった。

一方、細胞内でこれらリガンド候補物質がエストロゲン受容体をどの程度活性化するかについてルシフェラーゼアッセイを行った。内因性リガンドの17 β -エストラジオールは最も活性化が強く、3 nMでルシフェラーゼ活性を十分に上昇させた (Fig. 2)。一方、クメストロールはりガンド活性に比較して細胞内でのエストロゲン受容体活性化能は低く、クメストロール、ゲニ

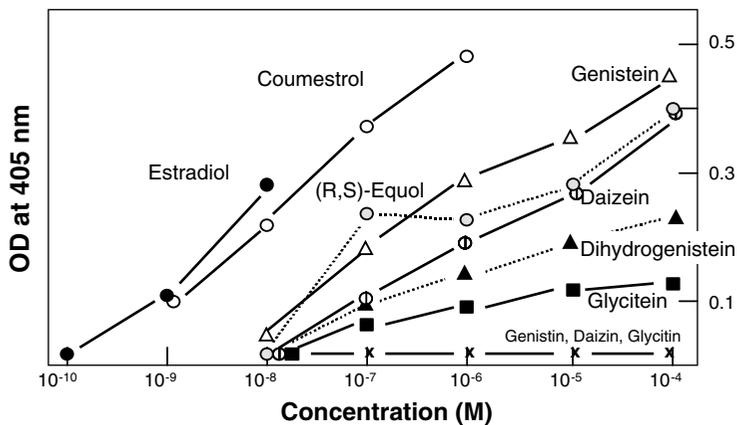


Fig. 1. Estrogen receptor ligand-binding activities of isoflavones and their derivatives. The ligand-binding activities were evaluated as the alkaline phosphatase activities determined by absorbance at 405 nm.

ステイン, エクオール間で差は見られなかった. エストロゲン活性としては17 β -エストラジオールの1/10以下の強度であった. さらに, ダイゼイン, ジヒドロゲニステインは受容体活性化能が低かった. HPPAでは活性そのものが認められなかった. ゲニステインに関しては, リガンド活性の結果と同様に, 代謝産物では活性が低下する傾向が認められた. 一方, ダイゼインは代謝産物の方が強い受容体活性化能を有することが示された.

以上の結果は, クメストロールは内因性リガンドの17 β -エストラジオールとリガンド結合活性に大きな差

がないものの, 受容体活性化能は弱いことから, 内因性17 β -エストラジオールの活性を阻害する可能性が考えられる. 一方, イソフラボン類は内因性リガンドに比べ結合活性は弱く, 低エストロゲン濃度の状況下ではエストロゲン様活性を示すことが期待される. また, エクオールはエストロゲン活性が起源のダイゼインよりも強く, 腸内細菌による代謝変換が重要であることを意味している. さらに, 摂取されたイソフラボン類が体内でどのような代謝変化を受けうるのか, またそれによる活性変化について, 今後は更なる研究が行われる必要がある.

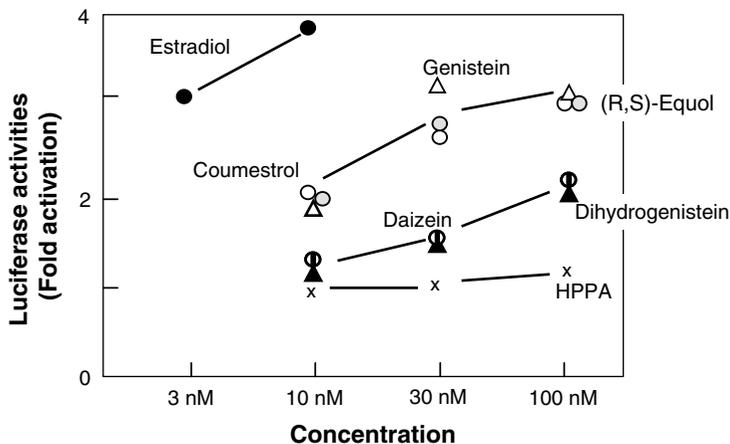


Fig. 2. The transactivation activities of estrogen receptor (ER) α by isoflavones. HEK293 cells were transfected with a reporter gene and an ER α expression construct, and then cultured with one of isoflavones for 24 hr. The luciferase activity in the absence of any isoflavones is represented as 1.

要 約

大豆成分による種々の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. 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, 分子レベルでの十分な解析は行われていない. 本研究では, 新たに開発したエストロゲン受容体リガンド結合領域への食品成分結合能を評価する評価系を用い, イソフラボン類, 配糖体, 誘導体についてリガンド活性評価を行った. また, 他の食品成分約120種類との比較検討も行った. その結果, イソフラボン類には他の食品成分より強い結合活性が見いだされた. また, クメストロールに最も強い結合活性が認められた. ダイゼインの腸内細菌代謝産物エクオールには結合活性, 受容体活性化能の双方で強い活性が見いだされた. これらの事実から, 腸内のみならず体内におけるイソフラボン類の代謝変換による活性変動を解析する必要性が提示された.

文 献

- 1) 金山知彦, 西川 淳, 佐藤隆一郎 (2006): 核内受容体リガンド評価系の創薬・食品開発研究への応用. バイオサイエンスとインダストリー, **64**, 17-20.
- 2) 佐藤隆一郎 (2005): 大豆成分の脂質代謝改善効果と核内受容体活性制御. 大豆たん白質栄養研究, **8**, 76-80.