

# 大豆成分の抗アレルギー性発現に関与する標的分子に関する研究

立花宏文<sup>\*1,2</sup>・矢野知美<sup>1</sup>・山田耕路<sup>1</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院農学研究院 <sup>2</sup>九州大学バイオアーキテクチャーセンター

## Study on the Molecules Involved in Anti-allergic Effect of Soybean Components

Hirofumi TACHIBANA<sup>1,2</sup>, Satomi YANO<sup>1</sup> and Koji YAMADA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

<sup>2</sup>Bio-Architecture Center, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

### ABSTRACT

Genistein and daidzein are polyphenolic isoflavones contained in soy protein and intestinal bacteria metabolize daidzein to equol. We previously reported that isoflavones and equol suppress the expression of the high-affinity IgE receptor Fc $\epsilon$ RI in human basophilic cells. In this study, we examined what molecules are involved in the suppressive effect of isoflavones and equol on Fc $\epsilon$ RI expression. Isoflavones are structurally similar to estrogen and generally bind to estrogen receptors (ERs) with high affinity. To assess whether the suppressive effect of isoflavones and equol on Fc $\epsilon$ RI expression is mediated by ERs, we investigated the effect of 17 $\beta$ -estradiol (E2) on the cell surface expression of Fc $\epsilon$ RI. We found that E2 did not affect the Fc $\epsilon$ RI expression. Moreover, the suppressive effect of isoflavones and equol on the Fc $\epsilon$ RI expression was not inhibited by pre-treatment with ERs antagonist ICI 182780. On the other hand, we have reported that the Fc $\epsilon$ RI expression is negatively regulated by the PPAR $\gamma$  ligand, prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite 15 deoxy- $\Delta^{12,14}$  prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>). In addition, it has been reported that some flavonoids including genistein exhibited weak peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonist activities. To explore whether the effect of isoflavones and equol are mediated by PPAR $\gamma$ , RNA interference-mediated gene silencing was utilized to down-regulate PPAR $\gamma$  expression. The PPAR $\gamma$  down-regulation did not affect the suppressive effect of isoflavones and equol on the cell surface expression of Fc $\epsilon$ RI. These results suggest that the suppressive effect of isoflavones and equol on Fc $\epsilon$ RI expression is not mediated by either ERs or PPAR $\gamma$ . *Soy Protein Research, Japan* **10**, 128-133, 2007.

Key words : isoflavones, equol, Fc $\epsilon$ RI, ERs, PPAR $\gamma$

\*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

大豆イソフラボンであるgenistein, daidzeinおよびその代謝産物であるequolに抗アレルギー作用（高親和性IgE受容体FcεRI発現の抑制作用）を見出してきたが、その作用は、これまでに我々が明らかにしてきたFcεRI発現の抑制機序とは異なることから<sup>1)</sup>、FcεRIの新たな発現抑制機構の存在が示唆された。

大豆イソフラボンおよびequolは、生体内でestrogen receptors (ERs, ERαおよびβ)に結合し、生理機能を発揮することが知られている<sup>2,3)</sup>。一方、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)の合成アゴニストがFcεRI発現を抑制すること<sup>4)</sup>やgenisteinがPPARγリガンド活性を有すること<sup>5)</sup>が報告されている。

そこで本研究では、大豆イソフラボンの抗アレルギー性発現に関与する生体内分子の解明を目的として、大豆イソフラボンおよびequolのFcεRI発現抑制作用におけるERsおよびPPARγの関与について検討した。

## 方 法

### 細胞培養と試薬

ヒト好塩基球様細胞株KU812は5~10%牛胎児血清(FBS)を含むRPMI 1640培地により、ヒト乳がん由来細胞株MCF-7は10%FBSを含むDMEM培地により、マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7およびマウスメラノーマ細胞株B16は5%FBSを含むDMEM培地により37°C、5%炭酸ガス加湿下で継代・維持した。Genisteinおよびdaidzeinは、東京化成工業株式会社より、equolはLC Laboratoriesより、17β-estradiol (E2)はSigmaより、15 deoxy-Δ<sup>12,14</sup> prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>)はCaymanより購入し、dimethylsulfoxide (DMSO)に溶解した。ICI 182780はTocrisより購入しエタノール (EtOH)に溶解した。

### 各種細胞のERα発現レベルの解析

MCF-7細胞、KU812細胞、RAW264.7細胞およびB16細胞の細胞溶解液をSDS-PAGEに供し、抗ERα抗体を用いてERαを検出した。

### 高親和性IgE受容体FcεRI発現の測定

KU812細胞 (3~5×10<sup>5</sup> cells/mL)を25μMのgenistein, daidzein, equol, 1~1,000 nMのE2または5μMの15d-PGJ<sub>2</sub>を添加した5%FBS含有RPMI 1640培地で24時間培養した。また、イソフラボンおよびequolのFcεRI発現抑制作用に及ぼすERsアンタゴニストの影響については、KU812細胞 (3~5×10<sup>5</sup> cells/mL)を1μMのICI 182780あるいはその溶媒であるエタノールを添加した5%FBS含有RPMI 1640培地

で30分間インキュベート後、25μMのgenistein, daidzein, equolを添加し24時間培養を行った。培養後、細胞を回収し、抗FcεRIα鎖抗体を用いたフローサイトメトリー解析により細胞表面上に発現するFcεRIを測定した。図中に示した数値は、コントロールのFcεRI発現量を100%としたときの相対発現量として表した。

FcεRIα鎖たん白質発現レベルについては、イムノブロット解析により検討を行った。細胞を25μMのgenistein, daidzein, equolもしくはその溶媒であるDMSOを添加した5%FCS含有RPMI 1640培地で24時間培養を行った後、細胞溶解液をSDS-PAGEに供し、抗FcεRIα鎖抗体を用いてFcεRIα鎖を検出した。

### siRNAベクターおよびPPARγ発現抑制KU812細胞の構築

PPARγ標的配列GTTTGAGTTTGCTGTGAAG<sup>6)</sup>を含むsiRNAインサートのプライマーを作製し、アニーリングしたsiRNAインサートをpsiRNA-hH1hygro G2ベクター (Invivogen)のAcc65I/HindIII切断サイトに挿入した。コントロールベクターは、PPARγ標的配列およびKU812細胞の遺伝子と相同性を持たないスクランブル配列GCATATGTGCGTACCTAGCATを挿入したベクターを用いた。構築したsiRNA-PPARγおよびコントロールベクターをエレクトロポレーションによりKU812細胞へ導入し、hygromycin B (Roche)添加培養により遺伝子導入細胞を選択した。細胞溶解液をSDS-PAGEに供し、抗PPARγ抗体を用いてPPARγを検出し、siRNA-PPARγベクター導入細胞においてPPARγ発現が抑制されていることを確認した。

## 結果と考察

### イソフラボンおよびequolのFcεRI発現抑制作用におけるERsの関与

ヒト好塩基球様細胞株KU812において、ERαの発現が確認された (Fig. 1)。そこで、KU812細胞のFcεRI細胞表面発現に及ぼすE2の影響を検討した結果、1μMのE2においてFcεRI発現がコントロールに比べて10%低下する程度で顕著なFcεRI発現抑制効果は認められなかった (Fig. 2A)。非妊娠時の血中エストロゲン濃度は排卵期が最も高いが、数nM程度である。通常、E2が1μM以上で血中に存在することは考えにくく、E2は本実験条件においてはFcεRI発現を抑制しないことが示唆された。また、KU812細胞にERsアンタゴニストICI 182780を作用させても、イソフラボンおよびequolのFcεRI発現抑制効果はほとんど阻害されなかった (Fig. 3)。これらの結果から、イソフラボン

はERを介さない経路でFcεRI発現を抑制していることが示唆された。

#### イソフラボンおよびequolのFcεRI発現抑制作用におけるPPARγの関与

RNA干渉法によりPPARγ発現を抑制したKU812細胞を構築し (Fig. 4A), PPARγリガンド15d-PGJ<sub>2</sub>のFcεRI発現抑制効果に及ぼす影響をフローサイトメトリー解析により検討した。その結果, 15d-PGJ<sub>2</sub>のFcεRI発現抑制効果はPPARγ発現を抑制した細胞において阻害された (Fig. 4B)。次にこれら細胞株を用いてイソフラボンおよびequolについても同様に検討した。PPARγを低下させてもFcεRI発現抑制効果は阻害されなかった (Fig. 5)。以上の結果より, イソフラボンおよびequolのFcεRI発現抑制作用には, PPARγが関与しないことが示唆された。

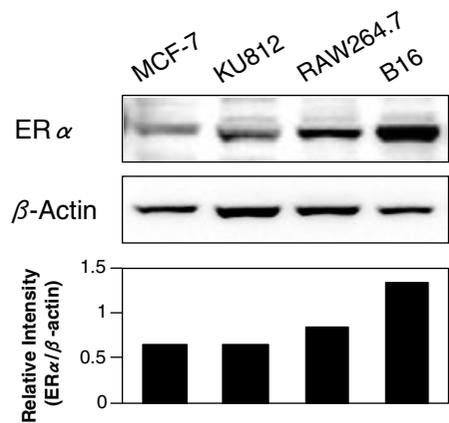


Fig. 1. ERα protein level in various cell lines. Whole cell extracts were analyzed by immunoblot analysis with antibodies against ERα and β-actin.

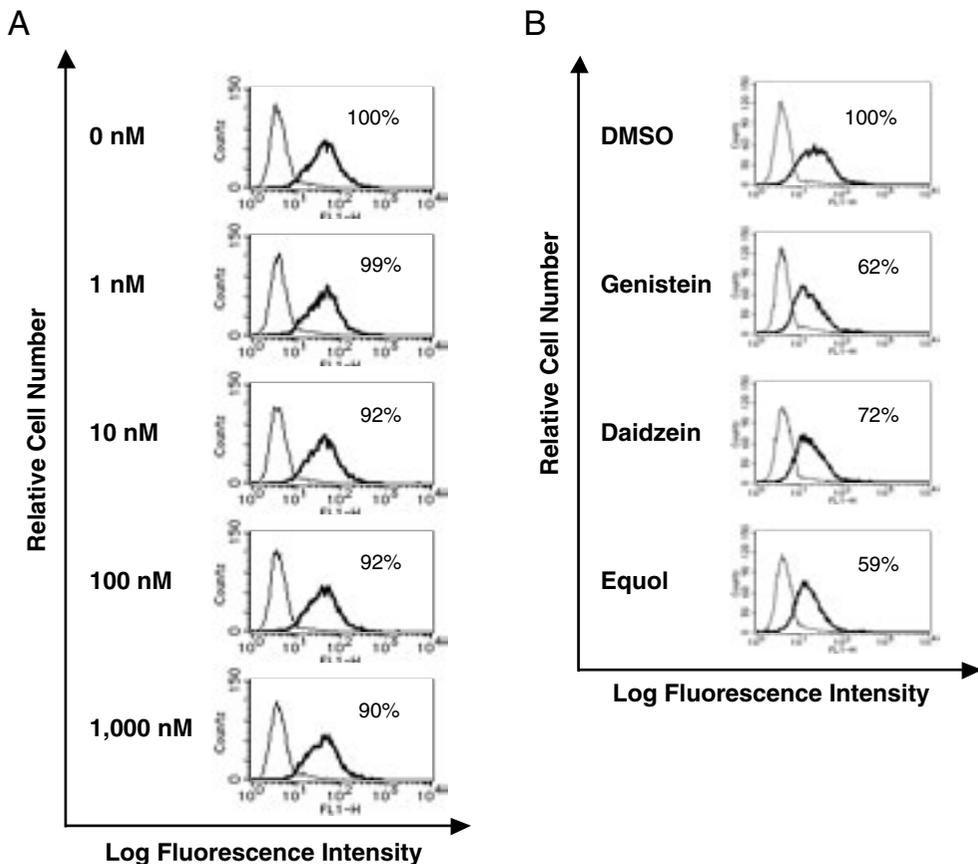


Fig. 2. Effect of E2 on the cell surface expression of FcεRI. KU812 cells were cultured with E2 (A), genistein (25 μM), daidzein (25 μM) or equol (25 μM) (B) for 24 h in 5% FBS-RPMI 1640 medium. Cells were examined by immunolabeling using the anti-FcεRIα chain antibody followed by staining with the FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody. Mouse IgG2b antibody was used as the isotype-matched negative control. Data acquisition was performed on a FACSCalibur flow cytometer.

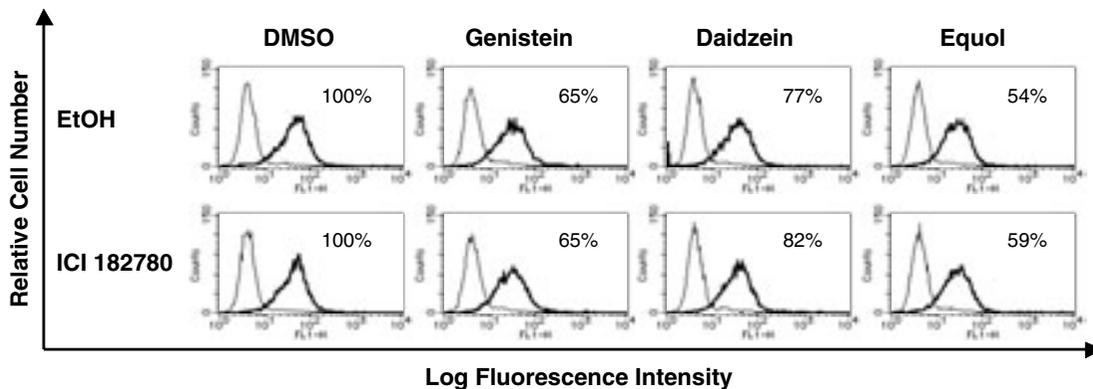


Fig. 3. Effect of isoflavones and equol on the cell surface expression of Fc $\epsilon$ RI in KU812 cells treated with ERs antagonist. KU812 cells were pre-incubated with ICI 182780 (1  $\mu$ M) in 5% FBS-RPMI 1640 medium for 30 min. After pre-incubation, cells were cultured with genistein (25  $\mu$ M), daidzein (25  $\mu$ M) or equol (25  $\mu$ M) in 5% FBS-RPMI 1640 medium for 24 h. Flow cytometric analysis of Fc $\epsilon$ RI expression was done as described for Fig. 2.

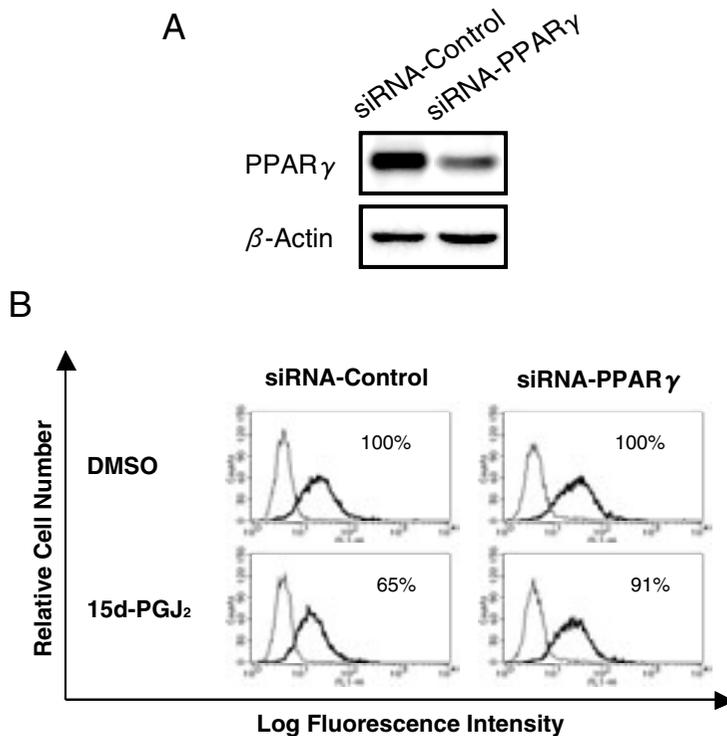


Fig. 4. Effect of 15d-PGJ $_2$  on the Fc $\epsilon$ RI cell surface expression in KU812 cells stably transfected with siRNA-PPAR $\gamma$ . KU812 cells were transfected with the constructed plasmid or control plasmid by electroporation. Cell lysates were fractionated by SDS-PAGE, and then immunoblotted using the PPAR $\gamma$  and  $\beta$ -actin antibodies (A). Stable siRNA expressing cells were cultured with 15d-PGJ $_2$  (5  $\mu$ M) for 24 h under 5% FBS-RPMI 1640 medium. Flow cytometric analysis of Fc $\epsilon$ RI expression was done as described for Fig. 2 (B).

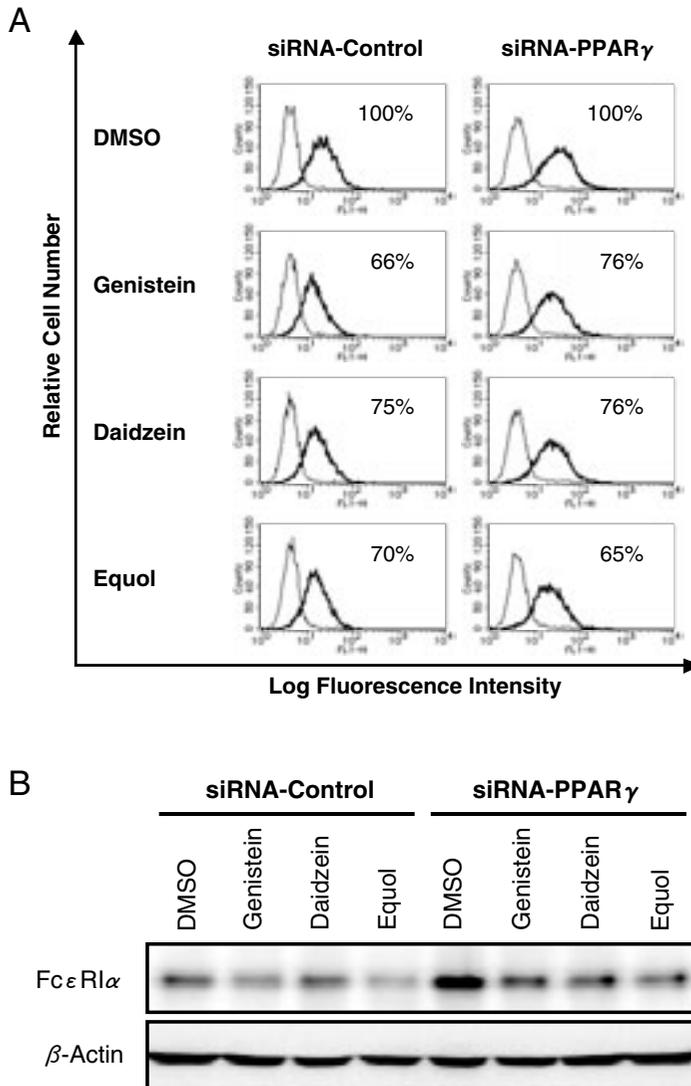


Fig. 5. Effect of isoflavones and equol on the Fc $\epsilon$ RI expression in KU812 cells stably transfected with siRNA-PPAR $\gamma$ . Stable siRNA expressing cells were cultured with genistein (25  $\mu$ M), daidzein (25  $\mu$ M) or equol (25  $\mu$ M) for 24 h in 5% FBS-RPMI 1640 medium. Flow cytometric analysis of Fc $\epsilon$ RI expression was done as described for Fig. 2 (A). Cell lysates were fractionated by 10% SDS-PAGE, and then immunoblotted using the anti-Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  and  $\beta$ -actin antibodies (B).

## 要 約

本研究では、大豆イソフラボンおよびequolの高親和性IgE受容体Fc $\epsilon$ RI発現抑制作用に関与する生体内分子の解明を目的として検討を行った。大豆イソフラボンおよびequolは、生体内でestrogen receptors (ERs) に結合し、生理機能を発揮することが知られている。そこで、大豆イソフラボンおよびequolのFc $\epsilon$ RI発現抑制作用におけるERsの関与についてERsアンタゴニストICI 182780を用いて検討した結果、大豆イソフラボンおよびequolのFc $\epsilon$ RI発現抑制活性はICI 182780により阻害されなかった。これまでに、peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) の合

成アゴニストがFcεRI発現を抑制すること、また、genisteinはPPARγリガンド活性を有することが報告されている。そこで、大豆イソフラボンの抑制作用におけるPPARγの関与を検討するために、RNA干渉法によりPPARγの発現を特異的に抑制したKU812細胞を構築した。このPPARγノックダウン細胞における大豆イソフラボンのFcεRI発現抑制作用について検討した結果、大豆イソフラボンおよびequolのFcεRI発現抑制作用は、細胞表面およびFcεRIα鎖たん白質発現のいずれに対しても観察された。以上の結果から、大豆イソフラボンおよびequolはFcεRI発現抑制作用にERsおよびPPARγは関与せず、細胞内標的分子が他に存在する可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) 立花宏文, 矢野知美, 山田耕路 (2006): 高親和性IgE受容体発現を標的とした抗アレルギー性大豆成分に関する研究. 大豆たん白質研究, **9**, 133-137.
- 2) 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 β. *Endocrinology*, **139**, 4252-4263.
- 3) Tham DM, Gardner CD and Haskell WL (1998): Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 2223-2235.
- 4) Fujimura Y, Tachibana H and Yamada K (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor ligands negatively regulate the expression of the high-affinity IgE receptor FcεRI in human basophilic KU812 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 193-201.
- 5) Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY and Lin JK (2001): Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett*, **496**, 2-18.
- 6) Katayama K, Wada K, Miyoshi H, Ohashi K, Tachibana M, Furuki R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakajima A, Kadowaki T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Kamisaki Y and Mayumi T (2004): RNA interfering approach for clarifying the PPARγ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Lett*, **560**, 178-182.