

大豆イソフラボンのエストロゲン受容体を介した 新たなLDL受容体発現亢進機構の解析

佐藤隆一郎*

東京大学大学院農学生命科学研究科

Study on the Induced Expression of LDL Receptor by Soy Isoflavones through Function of the Estrogen Receptor

Ryuichiro SATO

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

ABSTRACT

Although it has been reported that estrogen and isoflavones increase LDL receptor expression and prevent atherosclerosis, little is known about the molecular mechanism of the effects. Based on our previous finding that LDL receptor mRNA is quite unstable, in this study we investigated whether estrogen and isoflavones affect its stability. Our previous study also revealed that activation of the MAPK pathway prolongs the mRNA half-life. Estradiol treatment to MCF7 cells induced the ERK phosphorylation, suggesting that activation of the estrogen receptor (ER) might exert a stimulating effect on the LDL receptor mRNA stability. Indeed, estradiol treatment to mouse primary hepatocytes elevated the endogenous LDL receptor mRNA level, and slightly affected the mRNA stability. Reporter gene assays using the promoter of the human LDL receptor gene revealed that isoflavones as well as estradiol directly augment the promoter activity only when ER α was transiently expressed. These results indicate that isoflavones as well as estradiol stimulate LDL receptor gene expression through ER. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 138-141, 2008.

Key words : estrogen, isoflavone, LDL receptor, estrogen receptor, MAPK

エストロゲン活性が脂質代謝を制御することは広く知られている。閉経前の女性に虚血性心疾患の発症率が低く、閉経後に上昇する事実はその確たる証左と言える。その効果の一つとして、LDL受容体発現亢進が挙げられる。大豆イソフラボンにも同様の効果が認め

られ、脂質代謝改善効果はLDL受容体ノックアウトマウスでは認められないことから、主たる標的の一つはLDL受容体と行うことができる¹⁾。

血中LDLコレステロール濃度は脂質異常症の診断基準の一つであり、動脈硬化発症と因果関係が深い。各種細胞で発現するLDL受容体は血中LDLのクリアランスに直接関与しており、受容体の数を上昇させること

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

はLDL低下に寄与する。LDL受容体遺伝子発現は、細胞内のコレステロール濃度により厳密に調節されており、その調節の中心には転写因子SREBPが位置する。我々はLDL受容体遺伝子発現の新たな制御機構として、LDL受容体mRNAが非常に短寿命で分解され、不安定であることを見出した²⁾。さらに、細胞内でMAPKカスケードを活性化させると、LDL受容体mRNAは安定化し、発現上昇に寄与することを明らかにした。一方、エストロゲンの作用の一つとして、細胞内のMAPKカスケードの活性化が報告されている³⁾。これらを総合して考えると、エストロゲンならびにイソフラボンの脂質代謝改善効果の一部は、MAPKカスケード活性化を介してLDL受容体mRNA安定化に起因することが想定される。このような作業仮説をもとに、エストロゲン、イソフラボンの作用について、細胞レベルの解析を行なった。

方 法

培養細胞

エストロゲン受容体発現細胞としてMCF7細胞、ほとんど発現しない細胞としてHep G2細胞を用いた。さらに、マウスより初代培養肝細胞を定法に基づき調製し、エストロゲンへの応答を解析した。

Real-time PCR法を用いたmRNA定量

培養細胞より総RNAを回収し、RT-PCRによりcDNAを調製後、各種遺伝子に特異的なTaq-Man probeを用いて定量PCRを行なった (ABI PRISM 7000 使用)。

MAPKカスケード活性化測定実験

MCF7細胞をチャコール処理ウシ血清 (フェノールレッド不含) で培養し、そこに各濃度の17 β -estradiolあるいは1 μ M PMAを添加し、30分後に細胞を回収し

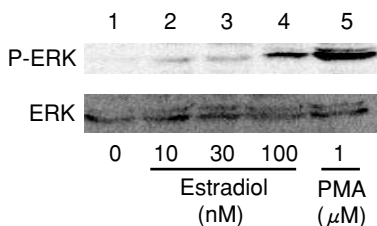


Fig. 1. Activation of MAPK cascade by estradiol. MCF7 cells were cultured with the indicated concentration of 17 β -estradiol or PMA (1 μ M) for 30 min. The whole cell lysates were subjected to western blotting with anti-ERK and anti-phosphorylated ERK antibodies.

た。Cell lysateをSDS-PAGE電気泳動後、メンブレンに転写し、抗ERK抗体、あるいは抗リン酸化ERK抗体 (Santa Cruz社製) を用いてウエスタンブロット解析を行なった。

ルシフェラーゼアッセイを用いた転写調節実験

ルシフェラーゼ遺伝子上流に、ヒトLDL受容体遺伝子プロモーター領域 (約1.5 kb) を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Hep G2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、17 β -estradiolを培地に添加し、エストロゲン受容体 α を介したプロモーター活性化能を定量した。ルシフェラーゼ活性はPromega社製のキットを用いて定量した。

結果と考察

エストロゲン刺激が細胞内においてMAPKカスケードを活性化するかについて検討を行った。エストロゲン受容体を発現するヒト乳がん細胞MCF7細胞を用い、エストロゲン刺激30分後のERKのリン酸化をウエスタンブロット法にて解析した。コントロールで用いたPMAはERKを著しくリン酸化した (Fig. 1)。17 β -estradiolは濃度依存的にERKをリン酸化した。従って、エストロゲンはMAPKカスケードを活性化することが確認された。

エストロゲン刺激によるMAPKカスケード活性化が確認されたことより、エストロゲンはLDL受容体

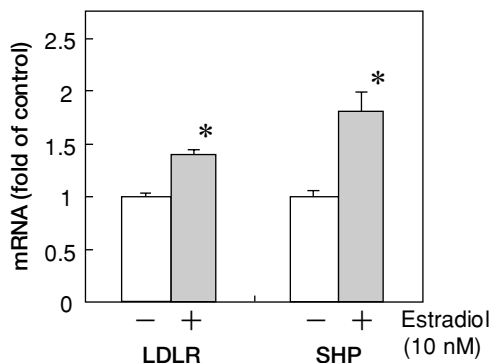


Fig. 2. Estradiol augments the LDL receptor mRNA level in mouse primary hepatocytes. Mouse primary hepatocytes were cultured with 17 β -estradiol (10 nM) for 2 hr. Total RNA was prepared from the cells and quantitative real-time PCR was performed for LDL receptor (LDLR), small heterodimer partner (SHP) and GAPDH.

mRNAを安定化し、mRNA発現を亢進させることが期待された。そこでエストロゲン受容体を発現している細胞として、マウス初代培養肝細胞を調製し、細胞をエストロゲン存在下で短時間（2時間）培養し、mRNAの発現を定量PCRにより解析した。その結果、短時間のエストロゲン処理でLDL受容体mRNA量は有意に上昇した（Fig. 2）。2時間という短時間を考えると、この上昇はmRNAの安定化に起因することが考えられる。この際にエストロゲン応答遺伝子として測定したSHP（small heterodimer partner）mRNAも上昇したことから、遺伝子発現を介した上昇も否定はできない。しかし同時に、SHP mRNAも不安定であることから、双方の遺伝子のmRNAの安定性にエストロゲンが関与している可能性もある。同様の実験を行ない、mRNAの分解実験を行なったところ、10 nM 17 β -estradiolによる有意な分解抑制効果は検証されなかった（data not shown）。Fig. 1で見られるMAPKカスケードの活性化は10 nM 17 β -estradiolでは十分でないことから、更なる高濃度で分解実験の検証を行なう必要はある。

一方、文献等ではエストロゲンがLDL受容体プロモーター活性を直接上昇させる効果を有することが報告されていることから⁴⁾、LDL受容体プロモーターを用い、エストロゲンならびにイソフラボンの効果についてluciferase assayにより評価した。エストロゲン受容

体発現が確認できないHep G2細胞を用い、ヒトER α を発現させた場合とさせない場合について、エストロゲンならびにイソフラボンを培地に添加し、40時間後に細胞を回収し、luciferase活性を定量した（Fig. 3）。10 nM 17 β -estradiolはLDL受容体プロモーター活性を上昇させたが、この効果にはER α 発現が必須であった。同様にgenistein, daidzein, coumestrolに促進効果が認められ、いずれも同様にER α を必要とした。フラボノイド類はエストロゲンに比べ高濃度で添加しているので、見かけ上、効果が強く見える。以上の結果は、エストロゲン、イソフラボンにはエストロゲン受容体を介してLDL受容体プロモーター活性を促進する効果を有することを示している。

ヒトLDL受容体mRNAはopen reading frame（ORF）下流にpoly（A）まで約2.5 kbの3'末端を有する。この領域には多くの短寿命mRNAが有するAU-rich配列（AUE）が4カ所存在する。作業仮説として、このいずれかにAUE結合たん白質（AUBP）が結合し、分解を促進あるいは抑制することが想定される。従って、現在、どの領域が分解に必須であるか、またその領域に結合するAUBPの同定を試みている。イソフラボン、エストロゲンがそのような分解マシナリー活性を修飾し、LDL受容体mRNA分解を抑制し、LDL受容体発現亢進に寄与する可能性について更なる研究を進めている。

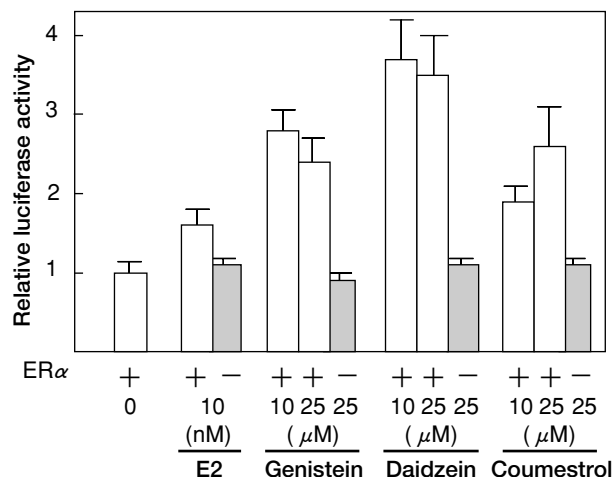


Fig. 3. Estradiol and isoflavones stimulate the LDL receptor promoter activity. Hep G2 cells were transfected with a reporter gene including the promoter of human LDL receptor gene (-1.5 kb), an expression plasmid for β -galactosidase and either an expression plasmid for human estrogen receptor- α or a mock vector. The cells were cultured with the indicated concentration of flavonoids and PMA for 40 hr. The luciferase activity in cell lysates was measured and was normalized with β -galactosidase activity.

要 約

大豆イソフラボンならびにエストロゲンには脂質代謝改善効果が認められている。その作用の一つとして、LDL受容体発現を亢進させ、血中LDLクリアランスを上昇させることが抗動脈硬化効果等に結びつくと考えられている。我々は、このプロセスにLDL受容体mRNA安定化が寄与していることを想定し、大豆イソフラボンならびにエストロゲンの効果を解析した。LDL受容体mRNA安定化にMAPK活性化がリンクすることから、エストロゲンのMAPK活性化能を調べたところ、その効果が確認された。さらに、マウス初代培養細胞を用い、短時間エストロゲン処理をしたところ、LDL受容体mRNAの増加が認められた。エストロゲン活性が直接LDL受容体の転写を亢進する可能性があることから、luciferase assayによりその効果を検証したところ、大豆イソフラボンならびにエストロゲンにLDL受容体プロモーター活性化能を認めた。以上の結果は、イソフラボンは直接転写亢進、あるいはmRNA安定化を介してLDL受容体発現を促進している可能性を示唆している。

文 献

- 1) Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A and LeBoeuf RC (1998): Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, **128**, 954-959.
- 2) Nakahara M, Fujii H, Maloney PR, Shimizu M and Sato R (2002): Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAP kinase cascade mediated stabilization of mRNA. *J Biol Chem*, **277**, 37229-37234.
- 3) Wang ZY, Zhang XT, Shen P, Loggie BW, Chang YC and Deuel TF (2006): A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36 : Transduction of estrogen- α and antiestrogen- α dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 9063-9068.
- 4) Brüning JC, Lingohr P, Gillette J, Hanstein B, Avci H, Krone W, Müller-Wieland D and Kotzka J (2003): Estrogen receptor- α and Sp1 interact in the induction of the low density lipoprotein-receptor. *J Steroid Biochem & Mol Biol*, **86**, 113-121.