インスリン誘導性転写因子SHARP-2遺伝子の発現を誘導できる大豆成分の検索

山田一哉・羽石歩美・高木勝広・浅野公介

松本大学人間健康学部

Screening of Soybean Isoflavones Inducing Gene Expression of An Insulin-inducible Transcription Factor, SHARP-2

Kazuya YAMADA, Ayumi HANEISHI, Katsuhiro TAKAGI and Kosuke ASANO

Faculty of Human Health Science, Matsumoto University, Matsumoto 390-1295

ABSTRACT

The rat enhancer of split- and hairy-related protein-2 (SHARP-2) is an insulin-inducible gene that encodes a transcriptional repressor. In the present study, soybean constituents which induce expression of the SHARP-2 gene were screened. Genistein, a soybean isoflavone, induced the level of SHARP-2 mRNA in rat highly-differentiated H4IIE hepatoma cells. This induction was rapid and temporary, and showed a dose-dependent manner. In contrast, Daidzein, another soybean isoflavone, did not induce the SHARP-2 gene expression. To examine whether an induction of SHARP-2 gene expression by genistein as well as insulin is mediated by a phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K) pathway, H4IIE cells were treated with a PI 3-K inhibitor, LY294002. The induction by genistein was not inhibited by treatment with LY294002. Thus, genistein specifically induced expression of the SHARP-2 gene by a PI 3-K-indepepndent pathway. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 125-128, 2009.

Key words : soybean isoflavones, genistein, daidzein, transcription factor, SHARP-2, insulin

ラットenhancer of split- and hairy-related protein-2（SHARP-2，マウスではStra13，ヒトではDEC1，BHLHB2という）は，basic helix-loop-helix型転写抑制因子である[1]．私どもは，インスリン誘導性転写因子として，SHARP-2を同定している[2,3]．現在までに，ラット肝でのSHARP-2遺伝子の転写が，インスリンによりphosphoinositide 3-kinase（PI 3-K）経路を介して促進されること，初代培養肝細胞等でのSHARP-2の過剰発現が糖新生系酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）遺伝子の発現を低下させること，ならびに，この低下がSHARP-2のPEPCK遺伝子プロモーターに対する作用によることを報告してきた[2,4]．したがって，SHARP-2がインスリンによる遺伝子の転写調節作用に関与する転写因子の一つであると考えて

〒390-1295　松本市新村2095-1

いる．

一方，大豆成分のうち，ゲニステインやダイゼインなどのイソフラボンは植物エストロゲンといわれ，体内でエストロゲン様作用を示すことが知られている[5]．イソフラボンはポリフェノールでもあるため，これ以外にも抗酸化物質としてのはたらきや他の生理活性を有していることも明らかにされている[6]．私どもは，SHARP-2遺伝子の発現が，緑茶ポリフェノールの一種であるepigallocatechin gallateで，インスリンと同様，早期にかつ一過性に誘導されることを報告している[4]．

本研究では，インスリン誘導性転写因子SHARP-2遺伝子の発現を誘導できる活性を持つ大豆成分を検索することを目的とし，その候補としてゲニステインを同定した．

方　　法

細胞培養とtotal RNA調製

ラット高分化型肝がん細胞株であるH4IIE細胞は，米国Vanderbilt大学のGranner博士より分与された．H4IIE細胞は，10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）を用いて，37℃ 5% CO_2 下で培養した．径6 cm dishにて，1×10^6個のH4IIE細胞を24時間培養し，血清とフェノールレッドを含まないDMEMで２回洗浄した後，同無血清培地にてさらに培養を行った．24時間後に，同無血清培地にメディウム交換後，２時間目に様々な濃度のゲニステインや10 nMインスリン処理を行った．50 μM LY294002は，ゲニステインやインスリン処理の30分前に培養液に添加した．ダルベッコリン酸バッファーで細胞を洗浄後，TRIzol Reagent（Invitrogen）を用いて，total RNAを調製した．

逆転写反応・リアルタイムPCR・統計解析

1 μgのtotal RNAからHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit（Applied Biosystems Japan, Co. Ltd.）を用いてcDNAを合成した．cDNAとプライマー，Fast Start Universal SYBR Green Master（ROX）（Roche）ならびにABI PRISM 7300（Applied Biosystems JAPAN, Co. Ltd.）を用いてリアルタイム PCR を行った．SHARP-2 mRNA量測定用のプライマーには，5'-GCGTCAGCACAATTAAGCAAGA-3'および5'-GGGTGAGGCCCAAGAAATG-3'を，内部対照遺伝子としての36B4 mRNA量測定用のプライマーには，5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACT-3'および5'-GGATCTGCTGCATCTGCTTG-3'をそれぞれ用いた．SHARP-2 mRNAの発現量は，36B4 mRNA量との比を算出することにより補正した．なお，すべての実験は最低４回行い，平均値と標準誤差を算出し，ANOVAによる統計解析を行った．

結　　果

ゲニステイン処理によるSHARP-2 mRNAの誘導

インスリン誘導性転写抑制因子であるSHARP-2遺伝子の発現を大豆成分が誘導できるかどうかを検討するために，まず大豆イソフラボンのゲニステインに注目した．

H4IIE細胞を様々な濃度のゲニステインで２時間処理を行い，SHARP-2 mRNAの発現に対する影響について検討した．その結果，ゲニステインは，SHARP-2

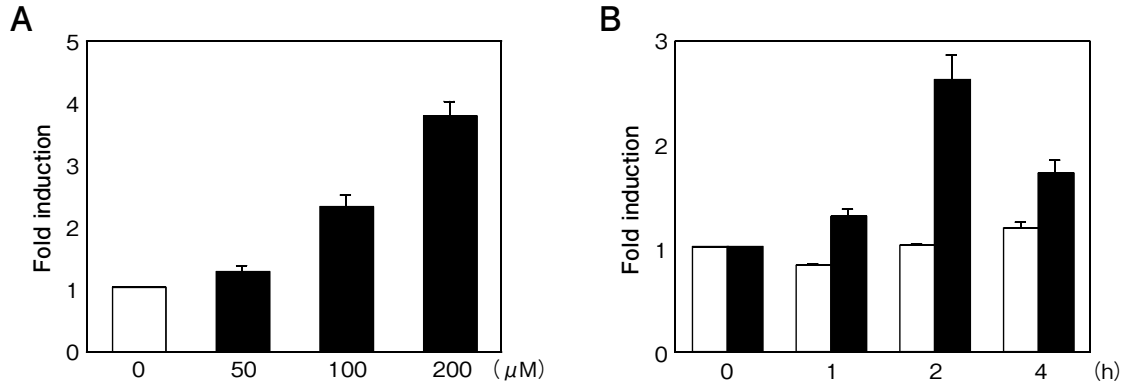

Fig. 1. Effects of genistein on SHARP-2 mRNA levels. (A) H4IIE cells were treated with the concentrations of genistein indicated on the bottom for 2 h. (B) Time course for alterations in the levels of SHARP-2 mRNA in H4IIE cells treated with 100 μM genistein.

mRNAの発現を濃度依存的に誘導することが明らかになった（Fig. 1A）．検討した条件では，200 μMで約４倍の誘導が認められた．

次に，SHARP-2 mRNAの誘導が見られ始めた100 μMゲニステインの存在下でのSHARP-2 mRNAによる誘導の経時的変化を検討した．SHARP-2 mRNAは，１時間目では誘導は見られなかったが，２時間目から４時間目で誘導が見られた（Fig. 1B）．２時間目のSHARP-2 mRNA量の方が，４時間目よりも高かった．

これらの結果から，ゲニステインは，濃度依存的・一過的にSHARP-2 mRNAの発現を誘導することが明らかになった．

ゲニステイン特異的なSHARP-2 mRNAの誘導

つぎに，ゲニステインと同様，大豆イソフラボンの一種であるダイゼインのSHARP-2 mRNAの発現に対する影響を検討した．H4IIE細胞をゲニステインと同濃度の100 μMで，２時間ダイゼイン処理を行ったが，SHARP-2 mRNAの誘導は認められなかった（Fig. 2）．したがって，ゲニステインは特異的にSHARP-2 mRNAの発現を誘導することが示唆された．

ゲニステインによる誘導には，PI 3-K経路は関与しない

SHARP-2 mRNAは，インスリンによりPI 3-K経路を介して誘導される[2]．そこで，ゲニステインによるSHARP-2 mRNAの誘導が，PI 3-K経路を介するかどうかを検討するために，H4IIE 細胞にPI 3-K経路の阻害剤であるLY294002で前処理を行ったあと，ゲニステインで２時間処理を行った．H4IIE細胞をLY294002単独で処理した場合，SHARP-2 mRNAの発現には影響を与えなかった（Fig. 3）．また，インスリンによるSHARP-2 mRNAの誘導は，LY294002の添加により完全に抑制された．一方，ゲニステインによるSHARP-2 mRNAの誘導は，LY294002の添加では抑制されなかった．したがって，ゲニステインによる誘導には，PI 3-K経路は関与しないことが明らかになった．

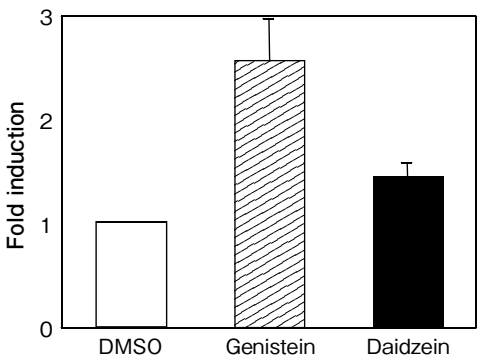

Fig. 2. Effects of genistein and daidzein on the SHARP-2 mRNA levels. H4IIE cells were treated with or without 100 μM an isoflavone for 2 h.

考　　察

SHARP-2は，インスリン誘導性転写抑制因子である[2, 3]．インスリン以外の方法で，SHARP-2遺伝子の発現を誘導できれば，予備軍を含めると1,920万人いるといわれている糖尿病患者に有用となる可能性が考えられる．本研究では，H4IIE細胞を大豆イソフラボンのゲニステインで処理することにより，SHARP-2遺伝子の発現を誘導できることを見いだした．

H4IIE細胞において，ゲニステインは，濃度依存的にSHARP-2遺伝子の発現を誘導した（Fig. 1A）．経時的な変化を検討したところ，２時間と非常に早期にピークを迎えることが明らかになった（Fig. 1B）．この誘導は，同じく大豆イソフラボンのダイゼインでは認められなかったため，ゲニステイン特異的であると考えられた（Fig. 2）．ゲニステインやダイゼインは，植物エストロゲンとして女性ホルモン様作用を有することが知られている[5]．ダイゼインはSHARP-2遺伝子の発現に影響しなかったため，ゲニステインの作用は女性ホルモン様作用以外の機構でSHARP-2遺伝子の発現に寄与したと考えられる．

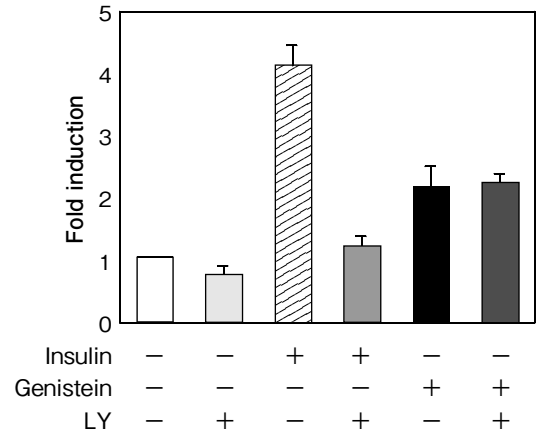

Fig. 3. Effects of a phosphoinositide 3-kinase inhibitor, LY294002 on SHARP-2 mRNA levels in H4IIE cells treated with either insulin or genistein. Fifty microM LY294002 was added to the medium at 15 min before the addition of either 10 nM insulin or 100 μM genistein, then incubated for an additional 2 h.

私どもは，SHARP-2遺伝子の発現が，インスリン処理後２時間で一過的に誘導されることを報告している[2]．また，この誘導は，PI 3-Kの阻害剤であるLY294002処理により抑制されることを報告している[2]．そこで，次に，ゲニステインによるSHARP-2遺伝子の発現誘導が，インスリンと同様，PI 3-K経路を介するかどうかを検討した．しかし，LY294002処理ではゲニステインによるSHARP-2遺伝子の発現誘導は抑制されなかった．したがって，ゲニステインは，インスリンとは異なる機構でSHARP-2遺伝子の発現を誘導したと考えられる．

これらの結果から，ゲニステインは早期に一過的にSHARP-2遺伝子の発現を誘導するが，その機構はゲニステインの女性ホルモン様作用やインスリンシグナル伝達経路によるものではないと結論した．

今後，各種阻害剤を用いて，シグナル伝達経路の解析を行うとともに，ゲニステインによるSHARP-2遺伝子の発現誘導が転写レベルで生じているかどうについて検討することが課題である．

要　　約

ラットenhancer of split- and hairy-related protein-2（SHARP-2）は，インスリン誘導性転写抑制因子である．本研究では，SHARP-2遺伝子の発現を誘導できる活性をもつ大豆成分を検索した．大豆イソフラボンのゲニステインで，ラットH4IIE高分化型肝がん細胞を処理したところ，SHARP-2遺伝子の発現は，濃度依存的に，一過的に早期に誘導された．ゲニステインと同様の大豆イソフラボンであるダイゼイン処理では，SHARP-2遺伝子の発現誘導は認められなかった．このSHARP-2遺伝子の発現誘導がインスリンと同様，phosphoinositide 3-kinase（PI 3-K）経路によるものかどうかを検討するために，PI 3-Kの阻害剤であるLY294002で処理を行ったが，ゲニステインによる誘導を抑制しなかった．したがって，ゲニステインは，インスリンとは異なるシグナル伝達経路を介して，SHARP-2遺伝子の発現を特異的に誘導することが明らかになった．

文　　献

1）Yamada K and Miyamoto K (2005): Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front Biosci*, **10**, 3151-3171.

2）Yamada K, Kawata H, Shou Z, Mizutani T, Noguchi T and Miyamoto K (2003): Insulin induces the expression of the *SHARP-2/Stra13/DEC1* gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Biol Chem*, **278**, 30719-30724.

3）Kawata H, Yamada K, Matsuura K, Shou Z and Miyamoto K (2004): Insulin regulates the expression of the enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene via different pathways in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *Horm Metab Res*, **36**, 526-530.

4）Yamada K, Ogata-Kawata H, Matsuura K and Miyamoto K (2005): SHARP-2/Stra13/DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *FEBS Lett*, **579**, 1509-1514.

5）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 beta. *Endocrinol*, **139**, 4252-4263.

6）Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262**, 5592-5595.