

腸管上皮における解毒・排出酵素を制御する大豆由来成分に関する研究

薩 秀夫*・水上朋彦・三久保絢之・清水 誠

東京大学大学院農学生命科学研究科

Study of the Regulation of Drug Metabolizing Enzymes by Soybean Ingredients in Intestinal Epithelial Cells

Hideo SATSU, Tomohiko MIZUKAMI, Ayano MIKUBO and Makoto SHIMIZU

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

ABSTRACT

The effect of soybean ingredients on the expression level of drug metabolizing enzymes in human intestinal epithelial cells was examined. Among soybean ingredients, the saponin fraction most extensively increased the mRNA levels of CYP1A1, UGT1A1, and MDR1 in human intestinal epithelial LS180 cells. The saponin fraction significantly induced the promoter activity of CYP1A1, UGT1A1, and MDR1, and also pregnane X receptor (PXR)-dependent transcriptional activity. Soyasaponin I, one of the major component of the saponin fraction, also increased the mRNA levels of these enzymes and PXR-dependent transcriptional activity, suggesting that one of the active components in the saponin fraction is soyasaponin I. We further examined the effect of isoflavones on the mRNA levels of CYP1A1, UGT1A1, and MDR1 in LS180 cells. Among seven isoflavones, equol and genistein increased the mRNA levels of these enzymes. Equol also increased the promoter activity, protein expression, and functional activity of MDR1. Nuclear localization and transcriptional activation of PXR by equol were also observed, suggesting that equol induces MDR1 expression and activity via PXR activation. These results show that the drug metabolizing enzymes in intestinal epithelial cells are induced by various soybean ingredients such as soyasaponin I and equol, suggesting that soybean ingredients could strengthen the biological barrier function of intestinal epithelial cells against invasion by xenobiotics and toxicants. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 79-84, 2010.

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

Key words :intestinal epithelial cell, drug metabolizing enzyme, equol, MDR1, pregnane X receptor

食品中に混入する生体異物（発がん物質，内分泌攪乱物質など）は小腸で吸収された後生体に悪影響を及ぼすことが知られているが，一方生体は様々なバリアー機能によってこれら生体異物の侵入から身を守っている．中でも脂溶性の高い生体異物は単純拡散的に腸管上皮細胞膜を通過するが，腸管上皮細胞内に発現する解毒・排出酵素群によって酸化（第一相），抱合化（第二相）などの反応を受けた後，異物排出トランスポーター（第三相）によって体外へ排出される．これらの解毒・排出酵素群はpregnane X receptor (PXR) やaryl hydrocarbon receptor (AhR) といった薬物受容体によってその発現が制御されることが知られており，ある種の薬剤や食品因子がこれらの薬物受容体を活性化することが報告されている^{1,2)}．一方大豆にはペプチド，イソフラボン，サポニンをはじめ様々な機能性成分が含まれており，抗酸化作用やエストロゲン様作用，抗炎症作用など多様な生理機能が注目されている^{3,4)}．そこで本研究では，腸管上皮細胞における解毒・排出酵素に注目し，解毒・排出酵素の発現に対する大豆由来成分の影響を検討するとともにその作用メカニズムについて解析をすすめた．

実験方法

LS180細胞の培養

LS180細胞は，American Type Culture Collection (Rockville, MD, U. S. A.) より購入した．培養には，10% (v/v) 牛胎児血清，ペニシリン（100 U/mL）およびストレプトマイシン（100 μ g/mL）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）を用いた．培地交換は1日おきにおこない，60-80%コンフレントの状態で継代操作をおこなった．

Real-time PCR法による解毒・排出酵素 mRNA発現量の測定

腸管上皮モデル細胞として，ヒト結腸がん由来株化細胞LS180を用いた．LS180細胞を24ウェルプレートに 1.0×10^5 個/wellで培養し，翌日大豆素材を含む培地で適当な時間培養した後ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて細胞を溶解させプロトコルに従って抽出操作をおこない，最終的に20 μ LのRNase free水に溶解しTotal RNAサンプルを得た．得られたTotal RNA 1 μ gを用いて逆転写反応をおこなってcDNAを合成し，それをReal-time PCRのテンプレートDNAとして用いた．Real-time PCRはQuantiTect SYBR Green PCR マスターミックス（QIAGEN）を用い，95℃で15分間変性させた後，95℃で5秒間変性，56℃で15秒間アニーリング，72℃で10秒間伸長の条件で40サイクル増幅させた．解毒・排出酵素およびハウスキーピング遺伝子として用いた β -アクチンのプライマーは，Table 1に示したものをを用いた．実験の結果は各解毒・排出酵素の結果を β -アクチンで割り，コントロールの値を100%に換算したときの相対値を示した．

ルシフェラーゼアッセイ

LS180細胞を24ウェルプレートに 1.0×10^5 /wellで播いて培養し，80% confluentになった時点でlipofection法を用いて，ヒトPXR発現ベクターおよびルシフェラーゼ遺伝子上流にPXRが結合することが知られるDR 4 配列を4つタンデムにつないだレポーターベクター，およびpRL-CMVを一過的に遺伝子導入した²⁾．さらに大豆素材を加えて培養した後，細胞をlysis bufferで溶解し，Dual-Luciferase reporter assay試薬（プロメガ）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した．

ウェスタンブロッティング

LS180細胞を6ウェルプレートに培養し大豆素材を含む培地で一定時間培養した後，膜たん白質画分を

Table 1. Primers for Real-Time PCR

gene	Sequence (5'3')		Anneal temperature
CYP1A1 (NM_000499)	Forward primer	AGA TGG TCA AGG AGC ACT ACA	61℃
	Reverse primer	CTG GAC ATT GGC GTT CTC AT	
UGT1A1 (NM_000463)	Forward primer	CAA CCC ATT CTC CTA CGT G	57℃
	Reverse primer	TCC TGG ACA GTC ACC TCT CT	
MDR1 (NM_000927)	Forward primer	TGG TTT GAT GTG CAC GAT GT	61℃
	Reverse primer	GGC CAA AAT CAC AAG GGT TA	
β -actin (NM_001101)	Forward primer	CCA GCA CAA TGA AGA TCA AGA	57℃
	Reverse primer	AGA AAG GGT GTA ACG CAA CTA A	

調製した。得られた画分をサンプルとしてSDS-PAGEに供した後メンブレンにブロッティングし、さらにメンブレンを4℃で一晩ブロッティングした。1次抗体反応は、MDR1についてはrabbit anti-human Mdr antibody (Santa Cruz Biotechnology) を5%スキムミルクを含むPBS-Tで1,000倍に希釈したもの、 β -actinについてはmouse anti-human β -actin antibody (Sigma) を2,500倍希釈したものを調製して反応させた⁹⁾。さらにanti-rabbit IgG HRP標識抗体およびanti-mouse IgG HRP標識抗体をそれぞれ用いて2次抗体反応をおこなった後、ECL反応に供してバンドを検出した。

結果と考察

大豆サポニン粗抽出物が解毒・排出酵素発現に及ぼす影響

大豆ペプチド、イソフラボンおよびサポニンをそれぞれ多く含む大豆粗抽出物をヒト腸管上皮モデルLS180細胞に添加して培養した後、Real-Time PCR法によって解毒・排出酵素のmRNA発現量を測定した。解毒・排出酵素としては第一相から第三相までの代表的なものとして、CYP1A1, UGT1A1, MDR1をそれぞれ選んだ。その結果、いずれの大豆粗抽出物もこれら3種の解毒・排出酵素のmRNA発現量を増加させ

たが、中でも大豆サポニン粗抽出物の作用が最も顕著であった (Fig. 1)。そこで次に大豆サポニン粗抽出物が解毒・排出酵素の転写活性に及ぼす影響について解析するため、上記3種の解毒・排出酵素のプロモーター領域をluciferase遺伝子の upstream に組み込んだベクターを用いて、レポーターアッセイをおこなった。その結果、大豆サポニン粗抽出物はこれらのレポーターベクターの転写活性をいずれも亢進させ、大豆サポニン粗抽出物は転写レベルでCYP1A1, UGT1A1およびMDR1を亢進することが示された (データ省略)。UGT1A1およびMDR1は共通して核内受容体PXRによりその転写が制御されることが知られている^{1,2)}ことから、さらに大豆サポニン粗抽出物がPXR依存的な転写活性に及ぼす影響を検討した。PXRの応答配列をluciferase遺伝子の upstream に組み込んだベクターを用いてレポーターアッセイをおこなったところ、大豆サポニン粗抽出物はPXR強発現下で転写活性を亢進することが示され (Fig. 2)、大豆サポニン粗抽出物はPXRの活性化を介してUGT1A1やMDR1の転写および発現を亢進していることが示唆された。一方大豆サポニンはその構造より4種類のグループに大別され、そのうち含量の多いグループAサポニンとグループBサポニンをそれぞれ多く含むアリッチおよびBリッチという2種の大豆サポニン精製物、およびグループBサポニンの主要な成分の一つである

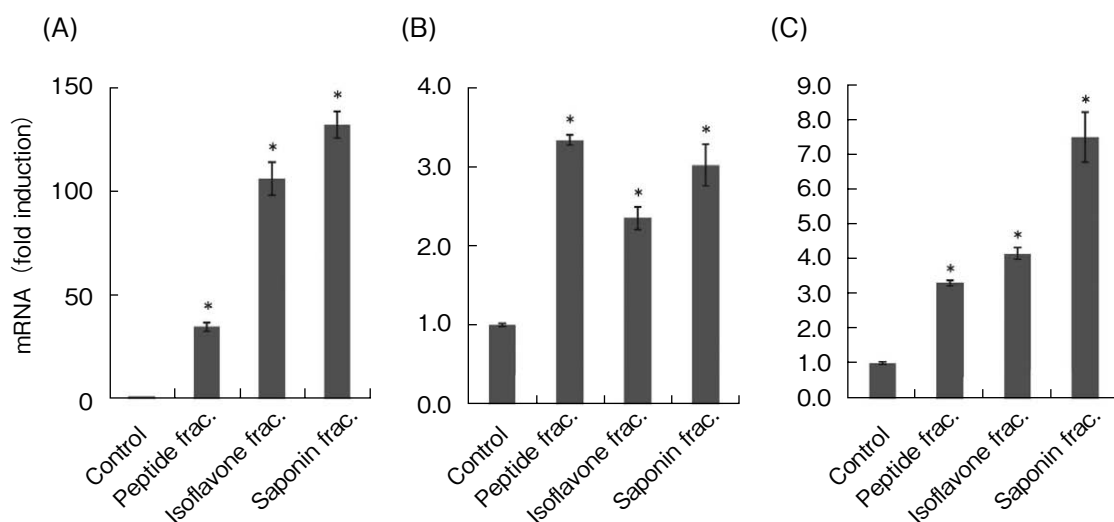


Fig. 1. Effect of soybean ingredients on the mRNA expression level of CYP1A1(A), UGT1A1(B), and MDR1(C) in human intestinal LS180 cells. LS180 cells were incubated with 2 mg/mL of various soybean ingredients for 3 hours (A), and 72 hours (B,C). After incubation, total RNA was extracted and used for real-time PCR analysis, β -actin being used as a housekeeping gene. Each value is the mean $\pm$ S.E. (n=3). *Significantly difference from control ($p < 0.01$).

soyasaponin I を本評価に用いた。その結果、AリッチはCYP1A1およびMDR1のmRNA発現量を亢進し、BリッチはCYP1A1、MDR1およびCYP3A4のmRNA発現量を亢進するとともにPXR依存的な転写活性亢進作用も示した。さらにsoyasaponin I もBリッチ同様に、CYP1A1、UGT1A1、MDR1、CYP3A4のmRNA発現量およびPXRを介した転写活性に対して亢進作用を示した（データ省略）。以上より、大豆サポニン粗抽出物は腸管上皮細胞において核内受容体PXRを介して解毒・排出酵素の発現を亢進すること、また大豆サポニン粗抽出物中の活性本体の一つはグループBサポニンであるsoyasaponin I であることが示唆された。

大豆イソフラボンが解毒・排出酵素発現に及ぼす影響

次にLS180細胞に7種のイソフラボン標品を添加した後、Real-Time PCR法によって解毒・排出酵素CYP1A1、UGT1A1、MDR1のmRNA発現量を測定した。その結果、equolとgenisteinはこれら3種のmRNA発現量を共通して亢進させた（Fig. 3）。さらにequolについて解析を進めたところ、equolはCYP3A4、

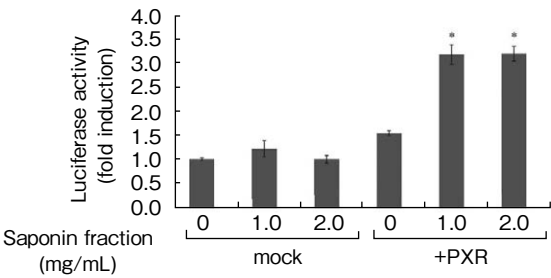


Fig. 2. Effect of saponin fraction on the PXR-dependent transcriptional activity in human intestinal LS180 cells. LS180 cells cotransfected with the pGL3-promoter vector containing DR4 sequence, pRL-CMV, and pcDNA3.1-human PXR (+PXR) or pcDNA3.1 (mock) were treated with saponin fraction for 24 h. The transcriptional activity was estimated by a luciferase assay. Each value is the mean $\pm$ S.E. (n=3). *Significantly difference from the value at 0 mg/mL of mock or +PXR ($p<0.01$).

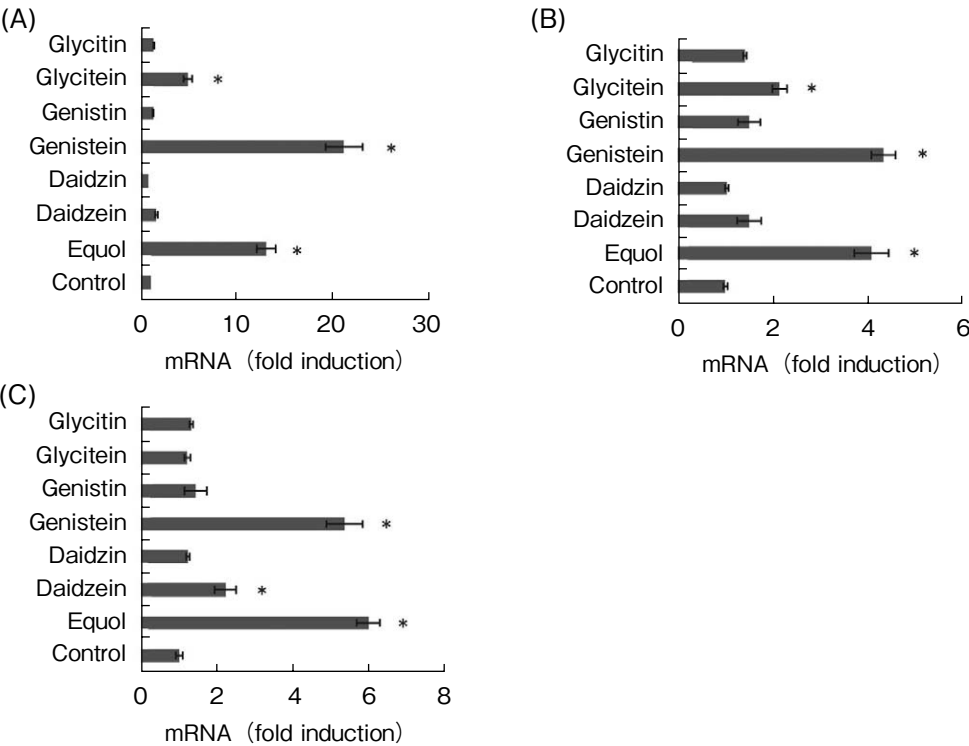


Fig. 3. Effect of isoflavones on the mRNA expression level of CYP1A1(A), UGT1A1(B), and MDR1(C) in human intestinal LS180 cells. LS180 cells were treated with 100 μ M isoflavones for 24 hours. After incubation, total RNA was extracted and used for real-time PCR analysis, β -actin being used as a housekeeping gene. Each value is the mean $\pm$ S.E. (n=3). *Significantly difference from control ($p<0.01$).

UGT1A1, MDR1というPXRの標的遺伝子をいずれも発現亢進させることが見出された(データ省略)。そこでequolとPXRの相互作用を解析するためPXRの応答配列を含むベクターを用いてレポーターアッセイをおこなったところ、equolはPXR依存的な転写活性を亢進させることが明らかとなった(Fig. 4)。またPXRは通常細胞質中に存在するが活性化によって核内に移行することから、equolがPXRの細胞内局在に与える影響を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、equol添加によってPXRの核内移行が誘導されている様子が観察された(データ省略)。並行してequolが実際に標的遺伝子のたん白質発現量およびその活性を制御するかをMDR1について検討したところ、equol添加によって実際にMDR1のたん白質発現量の増加(Fig. 5)および異物排出活性の亢進(データ省略)が確認された。

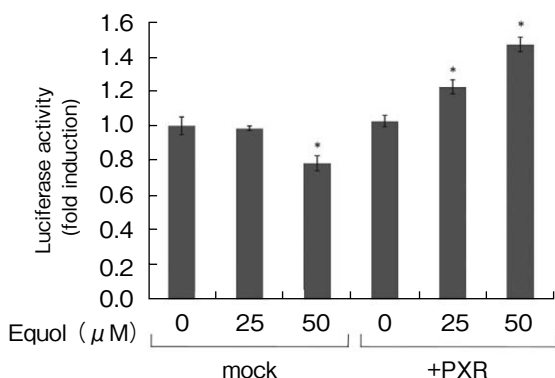


Fig. 4. Effect of equol on the PXR-dependent transcriptional activity in human intestinal LS180 cells. LS180 cells cotransfected with the pGL3-promoter vector containing DR4 sequence, pRL-CMV, and pcDNA3.1-human PXR (+PXR) or pcDNA3.1(mock) were treated with equol for 24 h. The transcriptional activity was estimated by a luciferase assay. Each value is the mean $\pm$ S.E. (n=3). *Significantly difference from the control ($p<0.01$).

以上の結果より、equolは腸管上皮細胞においてPXRの核内移行およびPXR依存的な転写活性を亢進し、その標的遺伝子の一つであるMDR1のmRNA発現量、たん白質発現量および異物排出活性を亢進することが明らかとなった。

本研究の結果より、腸管上皮細胞において大豆サポニン解毒・排出酵素の発現を亢進していることが示唆され、またequolについては実際にたん白質発現・活性レベルにおいても亢進していることが明らかとなった。大豆サポニンやequolがこのような解毒・排出系に影響を及ぼすという報告はこれまでなされていない。大豆素材にはこれまで抗炎症作用など多彩な生理作用が報告されているが、本研究の結果より腸管上皮における生体異物の解毒・排出能(バリアー機能)亢進という新たな機能性が加わることが期待される。

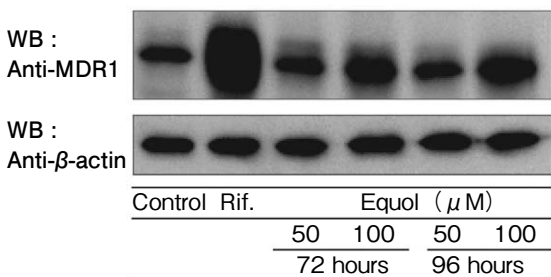


Fig. 5. Effect of equol on the protein expression level of MDR1 in human intestinal LS180 cells. LS180 cells were treated with 50 or 100 mM equol for 72 or 96 hours. After treatment, the amount of MDR1 protein in cell membrane fraction was examined by western analysis. Rif. (rifampicin) is used as a positive control.

要 約

食品中に混入する発がん物質など脂溶性の高い生体異物は単純拡散的に腸管上皮細胞膜を通過するが、腸管上皮細胞内に発現する一連の解毒・排出酵素によってその侵入が防御されることが知られている。そこで、腸管上皮細胞における解毒・排出酵素の発現に対する大豆由来成分の影響を検討することとした。その結果腸管上皮モデルLS180細胞に様々な大豆素材を添加したところ、特に大豆サポニン粗抽出物によってCYP1A1, UGT1A1, MDR1といった解毒・排出酵素のmRNA発現量が増加した。さらに大豆サポニン粗抽出物は核内受容体PXRを活性化することで解毒・排出酵素の発現を亢進すること、また大豆サポニン粗抽出物に含まれるsoyasaponin I がPXR活性化成分

の一つであることが明らかとなった。並行して、7種類の大豆イソフラボンについて解毒・排出酵素のmRNA発現に対する影響を検討したところ、equolとgenisteinがCYP1A1, UGT1A1, MDR1のmRNA発現量をいずれも亢進させた。Equolについてさらに解析を進めたところ、equolはPXR依存的な転写活性を亢進し、さらにPXRの核内移行を誘導することが観察された。またPXRの標的遺伝子の一つであるMDR1は、equol添加によりそのたん白質発現量および異物排出活性が亢進されることが確認された。以上の結果より、大豆サポニンやイソフラボンといった大豆素材中にはPXR活性化を介して腸管上皮細胞における解毒・排出酵素の発現・活性を亢進する作用があることが見出された。これより大豆素材は、食品中に混入する発がん物質など外来異物の侵入に対する腸管上皮におけるバリアー機能を高める可能性が示唆された。

文 献

- 1) Nakata K, Tanaka Y, Nakano T, Adachi T, Tanaka H, Kaminuma T and Ishikawa T (2006) Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet*, **21**, 437-457.
- 2) Satsu H, Hiura Y, Mochizuki K, Hamada M and Shimizu M (2008) Activation of the Pregnane X Receptor and Induction of MDR1 by Dietary Phytochemicals. *J Agric Food Chem*, **56(13)**, 5366-5373.
- 3) 薩 秀夫, 玄 子實, 水上朋彦, 濱田美影, 日浦悠斗, 清水誠 (2007) : 大豆素材による炎症性腸疾患の予防・改善効果に関する研究, 大豆たん白質研究, **10**, 124-127.
- 4) Satsu H, Hyun JS, Shin HS and Shimizu M (2009) Suppressive effect of an isoflavone fraction on tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Nutr Sci Vitaminol*, **55(5)**, 442-446.
- 5) Konishi T, Satsu H, Hatsugai Y, Aizawa K, Inakuma T, Nagata S, Sakuda S, Nagasawa H and Shimizu M (2004) Inhibitory effect of a bitter melon extract on the P-glycoprotein activity in intestinal Caco-2 cells. *Br J Pharmacol*, **143**, 379-387.