

# 大豆成分によるエピジェネティクス機構を介した 認知症予防効果に関する基礎的解析

長井 薫\*

山梨大学大学院医学工学総合研究部

## The Functions of Soy Isoflavones on Epigenetic Regulation and Protection of Neuronal Cells

Kaoru NAGAI\*

Department of Epigenetic Medicine, Interdisciplinary Graduate School of Medicine  
and Engineering, University of Yamanashi, Yamanashi 409-3898

### ABSTRACT

Epigenetic regulation, such as DNA methylation and histone modification, is crucial for brain function. Histone deacetylation is one of the crucial steps for epigenetic transcriptional regulation. It has been reported that histone deacetylase (Hdac) inhibitor displays therapeutic effects on dementia-model mice. However, the molecular mechanisms of the effects have not yet been clarified. Natural products, such as short-chain fatty acids and some polyphenols show modulating effects on Hdac families. Thus, soybean ingredients such as isoflavones might have a modulating function on Hdac activities. Since inhibitors of class I and II Hdacs and activators of class III Hdacs, called sirtuins, have been reported to show a therapeutic effect on the neurodegeneration model, we analyzed the effects of the soy isoflavones genistein, daidzein, and equol on the activities of Hdac families. We found that daidzein showed class I, II Hdac inhibitory and class III Hdac Sirt1 activation effects. Then, we analyzed whether daidzein shows protective effects on endoplasmic reticulum (ER) stress induced Neuro2a cell death. Since ER stress is known to cause considerable neurodegeneration, molecules which protect the cells from ER stress could be candidates for treating neurodegenerative diseases. The commonly used Hdac inhibitor sodium butyrate showed a protective effect, and daidzein showed similar effects. The histone acetyltransferase activator CBT also showed a protective effect, but co-treatment with daidzein with CBT did not show an additive effect. This suggests that daidzein and CBT protected the cells via similar pathways, probably an increase in histone acetylation. Our data raise the

\*〒409-3898 山梨県中央市下河東1110

possibility that consumption of daidzein may reduce the risk of neurodegenerative diseases such as dementia via modulating epigenetic mechanisms. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 90-95, 2012.

Key words : neurodegenerative disease, histone deacetylase, Sirt1, endoplasmic reticulum stress, isoflavone

エピジェネティクスとは、遺伝子DNAの配列に依存せず、DNAのメチル化やヒストンの修飾等により遺伝子発現が調節される機構のことである。その中で重要な役割を有するものの一つにヒストンのアセチル化がある。ヒストンがアセチル化状態の時にはクロマチン構造は開いた状態になり、逆に脱アセチル化状態の時は閉じた状態になる。非アセチル化時の閉じた状態では、転写因子がDNAにアプローチできないため転写抑制状態になる (Fig. 1)。アセチル化はヒストンアセチル基転移酵素 (Hat) が担い、脱アセチル化はヒストン脱アセチル化酵素 (Hdac) により行われている (Fig. 1)。HdacにはクラスIからIVまであり、その内NAD依存性のクラスIIIはサーチュインとして知られ、その寿命延長作用が注目を集めている<sup>1)</sup>。近年、クラスI、II Hdac阻害剤の投与が認知症モデル動物に対する治療効果を示すことが報告され<sup>2)</sup>、サーチュインの活性化についても神経変性疾患予防効果が報告された<sup>3)</sup>。このことから、Hdacを阻害あるいはサーチュインを活性化する分子は認知症予防や治療薬の候補分子となり得る。

認知症モデル動物に対するHdac活性制御分子の治

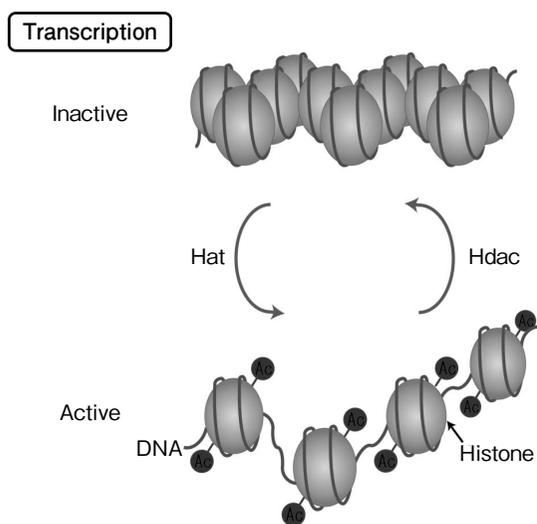


Fig. 1. Transcriptional regulation by histone acetylation.

療効果については上記のように報告されているが、その作用機序についてはほとんど明らかにされていない。認知症を含めた多くの神経変性疾患では、異常たん白質の沈着が引き金となる小胞体ストレスが神経細胞死の原因とされている<sup>4)</sup>。従って、小胞体ストレスからの神経細胞保護は認知症の予防・治療につながると考えられる。実際に、小胞体ストレスを緩和する小胞体シャペロンであるGrp78はエピジェネティクス転写調節を受けており、Hdac阻害剤により発現が上昇することが報告されている<sup>5)</sup>。また、アルツハイマー病患者脳ではエピジェネティクス異常が報告されている<sup>6)</sup>。これらの報告は、過剰なHdac活性の阻害等によるエピジェネティクス状態の改善が、小胞体ストレスの低減につながることで神経保護効果を示し、認知症に対する予防・治療効果を示す可能性を示唆している。

天然物によるHdac活性制御についてはこれまでに幾つか研究が行われている。Hdac阻害活性については、酪酸やバルプロ酸等の低級脂肪酸類や、クルクミン等のポリフェノール類が報告されている<sup>7,8)</sup>。また、サーチュインの活性化については、レスベラトロールやケルセチン等のポリフェノール類に関して報告がなされている<sup>9)</sup>。このことから、大豆イソフラボンについてもHdac活性調節機能を有する可能性が考えられる。

本研究では、大豆イソフラボンによるHdac活性調節作用、およびそれに基づく神経系細胞保護効果について明らかにし、大豆イソフラボン摂取による認知症予防の可能性について検討を行った。

## 方 法

### Hdac阻害活性およびSirt1活性化作用の解析

Hdac阻害活性およびSirt1活性化作用については、CycLex HDACs Deacetylase Fluorometric Assay KitあるいはCycLex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit (株式会社サイクレックス) を用いて行った。簡潔に述べると、アセチル化リジンを持ちペプチド切断後に蛍光を発する合成基質ペプチドをイソフラボン存在下でHDACsまたはSIRT1とリ

シルエンドペプチダーゼにより処理を行う。一定時間の処理後、蛍光強度を測定することによりデアセチラーゼ活性の定量評価を行う。

### ヒストンアセチル化量の定量解析

ヒストンのアセチル化定量はCycLex Cellular Histone Acetylation Assay Kit (株式会社サイクレックス) を用いて行った。簡潔に述べると96 wellプレート中でNeuro2a細胞をイソフラボンにより一定時間処理を行い、処理後の細胞を固定、抗体染色、発色、吸光度測定を行うことでヒストンのアセチル化量の定量評価を行った。

### 小胞体ストレスからの細胞保護効果の解析

Neuro2a細胞をイソフラボンで12時間前処理後、ツニカマイシン (TM), またはタブシガルギン (TG) による小胞体ストレスに曝露した。細胞生存率は、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法を用い、570 nmの吸光度による比色定量により評価を行った。細胞死抑制効果の確認は、Calcein-AM / Propidium iodide (PI) を用いた生死細胞染色法により行った。

## 結 果

### 大豆イソフラボンによるHdac阻害活性およびSirt1活性化作用の解析

ゲニステイン, ダイゼイン, エクオールのそれぞれ100  $\mu$ M, 1 mM存在下でHdac酵素活性を検討した結果、ゲニステインについては100  $\mu$ M, ダイゼインについては100  $\mu$ M, 1 mMにおいて有意な阻害効果が認められた。1 mMダイゼインではほぼ完全に酵素活性が抑制された。エクオールについては阻害効果が認められなかった (Fig. 2A)。Sirt1活性化については、1 mMダイゼイン存在下にのみに弱い活性化作用が見られた (Fig. 2B)。

10  $\mu$ Mダイゼイン24時間処理におけるNeuro2a細胞のヒストンアセチル化に対する影響を解析したところ、増加傾向は見られたが有意差は現在のところ得られていない (Fig. 3)。

### ダイゼインによる小胞体ストレスからの細胞保護効果とHdac阻害依存性

一般的にHdac阻害剤として用いられており、認知症モデル動物に対する治療効果が報告されている酪酸ナトリウム<sup>2)</sup> はTM, TG毒性共に保護効果が認められた (Fig. 4A)。Hdac活性に対する作用が見られたダイゼインについて同様の評価を行ったところ、酪酸ナトリウムと同様小胞体ストレスからの保護効果が見

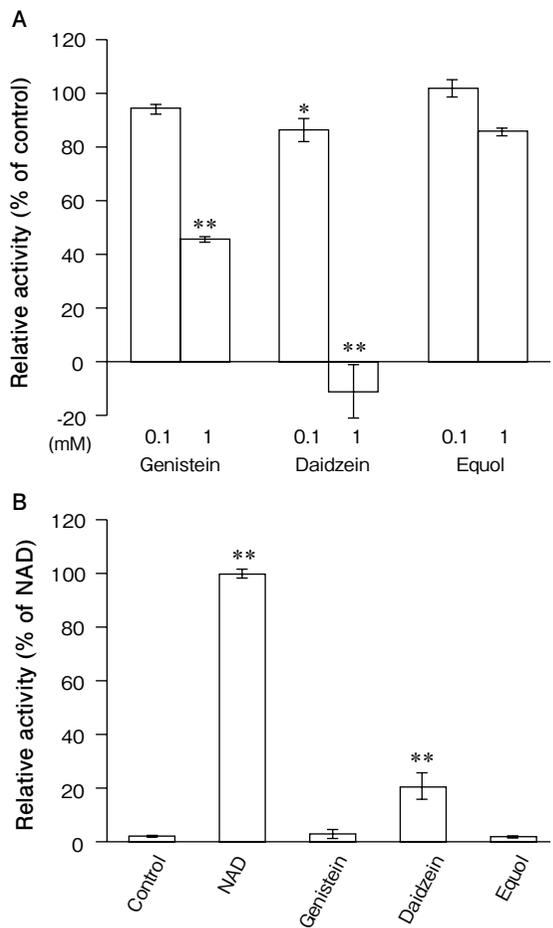


Fig. 2. Effects of isoflavones on Hdac and Sirt1 activities. Hdac (A) or Sirt1 (B) activity was analyzed in the presence of genistein, daidzein, and equol.

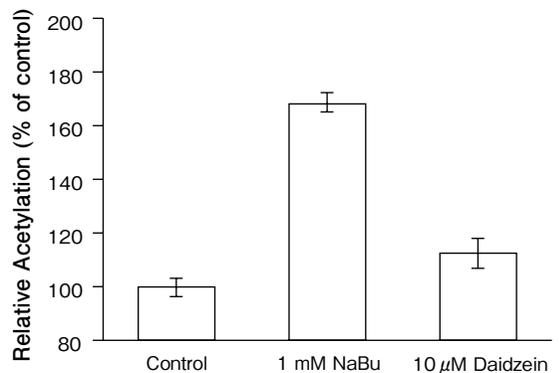


Fig. 3. Effects of daidzein on histone acetylation in Neuro2a cells. Neuro2a cells were incubated with 10  $\mu$ M daidzein for 24 h, and subjected to quantitative analysis of histone acetylation.

られた (Fig. 4B). 実際には, 細胞死抑制効果を示しているかについて細胞染色法により確認を行ったところ, 明らかな死細胞数の減少が見られた (result not shown).

ダイゼインによる保護効果のHdac阻害依存性について, Hat活性化剤であるCBTとの共投与により検討を行ったところ, CBTのみでも細胞保護効果は認められたが, 共投与による相乗効果は認められなかった (Fig. 5).

ヒストンアセチル化による発現調節を受けており, Hdac阻害剤による発現上昇が報告されている小胞体シャペロンGrp78の発現阻害剤Versipelostatatin (VST) との共投与による細胞保護効果への影響についても解析を行った. すると, VSTの共投与によりダイゼインの細胞保護効果が阻害された (Fig. 6).

## 考 察

3種の大豆イソフラボン, ゲニステイン, ダイゼイン, エクオールのHdac阻害効果およびSirt1活性化作用については, ほぼダイゼインにのみ有効な作用が観察された. エクオールはダイゼインが腸内細菌に代謝されることで生成することが知られており, エストロゲン様活性としては活性が高まる事が報告されている<sup>10)</sup>. しかし, Hdac活性制御作用という観点からは, エクオールに代謝されることによってダイゼインは活性を失うことが分かった (Fig. 2). ダイゼイン処理により, 劇的なヒストンのアセチル化増加作用は観察されなかったが, Hdacの強い阻害は細胞毒性を示すことが報告されており<sup>11)</sup>, Hat共投与実験によるデータからも (Fig. 5A), 細胞保護に働くごく少数の遺伝子のアセチル化を増加させている可能性は否定出来ない.

Hdac活性調節作用を示したダイゼインは, 酪酸ナトリウムと同様の小胞体ストレスからの保護効果を示した (Fig. 4). ダイゼイン投与のみでMTT値の低下が認められたが (Fig. 4B), 生死細胞染色では死細胞の増加はあまり見られず, ダイゼインが細胞増殖抑制効果を示している, あるいはMTTの還元能を低下させている可能性が示唆された. 生死細胞染色においても, MTT法の結果に見られるよりも死細胞数が減少していることが観察された. これらのことから, より正確な細胞保護効果の定量評価系を確立することが今後の課題であると考えられた.

ダイゼインの細胞保護効果は, Grp78の発現阻害剤

であるVSTにより抑制されたことから, Grp78遺伝子領域のヒストンのアセチル化増加が保護作用の少なくとも一部であることが示唆された. しかし, 実際はこの遺伝子領域のヒストンのアセチル化量が変化しているのか, 他の保護的に働く標的遺伝子は存在するのか否か等については今後の課題である.

本研究から, ダイゼインはヒストンのアセチル化というエピジェネティクス調節作用を介した神経保護作用を示すことが示唆された. 本研究の結果は, ダイゼインの摂取が認知症予防作用につながる可能性を示していると考えられる.

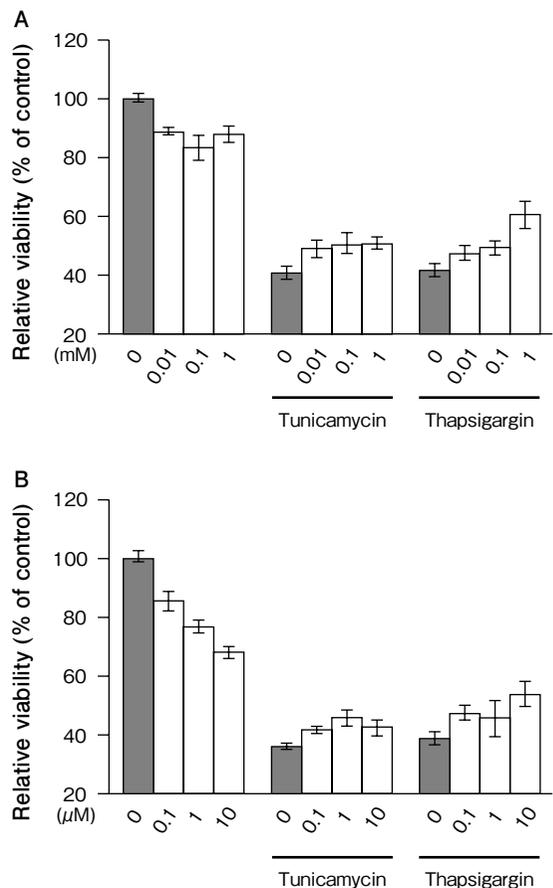


Fig. 4. Effects of sodium butylate (NaBu) and daidzein on ER stress-induced Neuro2a cell death. Neuro2a cells were pre-treated with NaBu (A) or daidzein (B) for 12 h, and then treated with tunicamycin (TM) or thapsigargin (TG) for 24 h. The cell viabilities were analyzed by MTT assay.

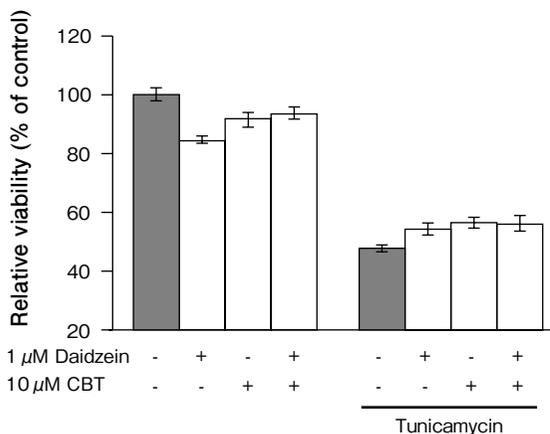


Fig. 5. Effects of Hat activator CBT on the protective function of daidzein. Neuro2a cells were pre-treated with daidzein (B) in the presence or absence of CBT for 12 h, and then treated with tunicamycin (TM) or thapsigargin (TG) for 24 h. The cell viabilities were analyzed by MTT assay.

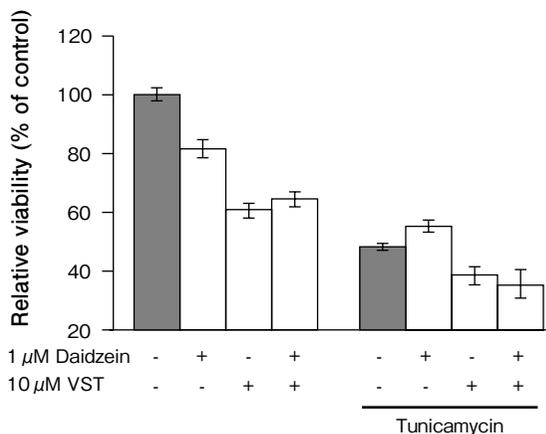


Fig. 6. Effects of Versipelostatatin (VST), an inhibitor of Grp78 expression, on the protective function of daidzein. Neuro2a cells were pre-treated with daidzein (B) in the presence or absence of VST for 12 h, and then treated with tunicamycin (TM) or thapsigargin (TG) for 24 h. The cell viabilities were analyzed by MTT assay.

## 要 約

遺伝子配列に依存しない遺伝子発現調節機構であるエピジェネティクスが近年注目されている。エピジェネティクスには、DNAのメチル化やヒストンのアセチル化等が含まれ、これらの修飾によりクロマチンの高次構造が制御されることで転写調節が行われていると考えられている。エピジェネティクスについてはガンや発生等における重要性が注目されてきたが、近年、神経機能における重要性についても報告されるようになってきた。その内の一つとして、ヒストンアセチル化酵素 (Hdac) 阻害剤が認知症モデルマウスに対する治療効果を示すことが報告され、注目を集めている。しかし、その作用機序に関しては明らかにされていない。一方、低級脂肪酸類や一部のポリフェノール類にはHdac阻害作用を含めたヒストン修飾に対する作用が報告され始めている。認知症は、発症前の診断が困難であるにもかかわらず発症後の治療は不可能な疾患であることから、食品からの予防成分の摂取等による予防が重要であると考えられる。本研究では、大豆イソフラボンに注目し、Hdac酵素活性に対する作用、およびそれに基づく神経細胞保護効果について検討を行った。ゲニステイン、ダイゼイン、エクオールのHdac活性に対する作用を検討したところ、ダイゼインがクラス I, II Hdac阻害作用およびクラス III HdacであるSirt1活性化作用を有することを見出した。認知症における神経変性の主な原因である小胞体ストレス誘導神経系細胞死に対し、我々は既知のHdac阻害剤が保護効果を示すことを見出している。このことから、ダイゼインについても同様の保護作用を有するのかが検討を行ったところ、小胞体ストレスに対し有意な保護効果が認められた。以上の結果は、大豆イソフラボンの摂取によりエピジェネティクス制御作用を介した認知症予防の可能性を示唆している。

## 文 献

- 1) Sanchez-Fidalgo S, Villegas I, Sanchez-Hidalgo M and de la Lastra CA (2012): Sirtuin modulators: mechanisms and potential clinical implications. *Curr Med Chem*, **19**, 2414-2441.
- 2) Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M and Tsai LH (2007): Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling. *Nature*, **447**, 178-182.
- 3) Jiang M, Wang J, Fu J, Du L, Jeong H, West T, Xiang L, Peng Q, Hou Z, Cai H, Seredenina T, Arbez N, Zhu S, Sommers K, Qian J, Zhang J, Mori S, Yang XW, Tamashiro KL, Aja S, Moran TH, Luthi-Carter R, Martin B, Maudsley S, Mattson MP, Cichewicz RH, Ross CA, Holzman DM, Krainc D and Duan W (2011): Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets. *Nat Med*, **18**, 153-158.
- 4) Doyle KM, Kennedy D, Gorman AM, Gupta S, Healy SJ and Samali A (2011): Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorder. *J Cell Mol Med*, **15**, 2025-2039.
- 5) Baumeister P, Dong D, Fu Y and Lee AS (2009): Transcriptional induction of Grp78/Bip by histone deacetylase inhibitors and resistance to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*, **8**, 1086-1094.
- 6) Bihagi SW, Schumacher A, Maloney B, Lahiri DK and Zawia NH (2012): Do epigenetic pathways initiate late onset Alzheimer disease (LOAD): towards a new paradigm. *Curr Alzheimer Res*, **9**, 574-588.
- 7) Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C and Schrenk D (2008): Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem*, **19**, 587-593.
- 8) Chen Y, Shu W, Chen W, Wu Q, Liu H and Cui G (2007): Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch1 in Raji cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **101**, 427-433.
- 9) Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G and Rahman I (2010): Regulation of Sirt1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*, **501**, 79-90.
- 10) Ishimi Y (2009): Soybean isoflavones in bone health. *Forum Nutr*, **61**, 104-116.
- 11) Forgione N and Tropepe V (2011): Histone deacetylase inhibition promotes Caspase-independent cell death of ventral midbrain neurons. *Mol Cell Neurosci*, **48**, 117-128.