

# 大豆をはじめとする豆類の成分による健康に関わる遺伝子発現解析

奥村奈央子\*・吉田仁美・松田 寛

奈良女子大学大学院人間文化研究科共生自然科学専攻環境生活科学講座

## Induction and Suppression of Human Disease-Associated Genes in Cultured Cell Line Cells by Bean-Extract Stimulation

Naoko OKUMURA\*, Hitomi YOSHIDA and Satoru MATSUDA

Department of Environmental and Life Sciences, Graduate School of Humanities and Sciences,  
Nara Women's University, Nara 630-8506

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effects of several bean ingredients and chemical inhibitors on the expression of presenilin, a molecule involved in  $\gamma$ -secretase activity and the generation of amyloid- $\beta$  peptide in Alzheimer's disease, and on the expression of Cip-interacting zinc finger protein 1 (Ciz1), which stimulates DNA replication and has been implicated in tumorigenesis of breast cancer cells. Western blotting revealed the downregulation of presenilin 1 protein expression by stimulation with genistein *in vitro*, while the effects on presenilin 1 gene expression examined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were unaltered in Daudi cells. Genistein likely downregulates presenilin via the inhibition of ubiquitin 1 expression in lymphoid cells. Our findings provide new insights that may help to establish preventive strategies against Alzheimer's disease. In order to investigate the possibility of using medicinal isoflavone against breast cancer, we studied whether some isoflavones could affect the expression of the Ciz1. The *in vitro* effect of isoflavone treatment on the reduction of Ciz1 expression was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Western blotting also confirmed the down-regulation of the protein in dose dependent manner of the genistein treatment in Daudi lymphoid cell line. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 181-185, 2012.

Key words : soybean, genistein, gene expression

---

\*〒630-8506 奈良市北魚屋西町

我々日本人は、大豆をはじめとする豆類を加工食品や発酵食品など様々な形で多量に摂取している。大豆および大豆に含まれる成分やその他の豆類およびそれらに含まれる成分の生理機能は多岐にわたり、健康増進に関与する多くの生理活性が明らかにされている。中でも大豆に含まれるイソフラボンには、有意量を摂取した場合、血中の脂質レベル、閉経後の症状や骨粗鬆症の症状に予防的な効果があると言われている<sup>1)</sup>。また、大豆イソフラボンには、乳がんや前立腺がんのリスクを減少させることが報告されており<sup>2,3)</sup>、がんの予防や治療に効果が期待されている。大豆イソフラボンには、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインがあり<sup>4)</sup>、中でもゲニステインは、エストロゲンと類似した構造をしており、エストロゲンレセプターに親和性を示している<sup>5)</sup>。このために、エストロゲン様活性やその他の生理機能も強い。さらにゲニステインは、抗腫瘍効果の報告も多数ある<sup>6~8)</sup>。

我々は、ゲニステインが乳がんの腫瘍形成に関係があるCip-interacting zinc finger protein 1 (Ciz1) の発現を抑制することを見出した<sup>9)</sup>。他にも、香辛料やハーブなどの食品が健康に関わる遺伝子の発現を抑制することを見出してきた。我々の研究室では、ある食品を摂取した場合、健康に良いことがどのようにして発揮されるのかについて、含有成分単体によるヒトへの影響といった従来の生化学や栄養学的な視点からではなく、その食品がもつすべての成分による複合的なヒトへの影響を、遺伝子発現調節系に的を絞って分子生物学的に調べている。そこで本研究では、大豆をはじめとする豆類を摂取した場合、大豆や豆類がもつすべての成分による複合的なヒトへの影響について遺伝子発現調節系を中心に検討した。

## 方 法

### 細胞培養

ヒト由来のK562細胞、Daudi細胞、Jurkat細胞、U937細胞を10%ウシ血清やペニシリンおよびストレプトマイシンを含むRPMI1640にて5%Co2下で培養した。

### 抽出物および試薬の調製

市販されている大豆、小豆、黒豆、レンズ豆を粉碎し、重量比で2倍量のPBS、50%エタノール、70%エタノール、100%エタノールを加え4℃にて一晩攪拌した。この懸濁液を遠心処理に供し、抽出物を得た。試薬については、エタノールで溶解後、10 mMとなるように希釈し、-20℃で保存した。細胞培養液中に添加する際は、1 mLの細胞培養液中に0.5-10.0  $\mu$ Lとなるように加えた。

### RT-PCR

Total RNAは、RNA isolation kit (Takara) により抽出し、Phusion RT-PCR kit (NEB) によりcDNAを調製した。使用したPrimerは次の通りである。ubiquilin 1 forward, TGCTGCAGGCTCTTGCTGGA; ubiquilin 1 reverse, TGGCTGGGAGCCCAGTAACCT, (179 bp); presenilin 1 forward, GGTCCACTTCGTATGCTGGT; presenilin 1 reverse, GCTGTTGCTGAGGCTTTACC (404 bp); GAPDH forward, TCCCATCACCATCTTCCA; GAPDH reverse, CATCACCGCCACAGTTTCC (376 bp)

### ウェスタンブロット解析

等量のもろ白質サンプルを用い、ウェスタンブロット解析を行った。anti-ubiquilin 1 (GeneTex Inc., Irvine, CA, USA), anti-presenilin 1 (Genscript), anti-ERK2 (Epitomics Inc., Burlingame, CA, USA), anti-Rb2 (BD Transduction Laboratories), anti-Ciz1 (COSMO BIO)

## 結果と考察

プロテアソームシステムの情報伝達や阻害剤の試薬をDaudi細胞やJurkat細胞などの培養液中に添加し、RT-PCR法を用いてubiquilin 1やpresenilin 1の遺伝子発現レベルを定量化した (Fig. 1)。presenilin 1とハウスキープ遺伝子のGAPDHはエタノールを添加したものと比較して変化しなかったが、ubiquilin 1遺伝子は、genisteinを添加した際に著しく減少した。

たん白質の発現状態を確認するために、ウェスタンブロット法を用いて各種試薬で刺激された後の細胞内のubiquilin 1とpresenilin 1のたん白質の検討を行った (Fig. 2)。試薬添加後48時間で、50  $\mu$ Mのgenistein (50  $\mu$ M) を添加した場合と、チロシンキナーゼインヒビターであるAG490 (50  $\mu$ M) を添加したものでubiquilin 1とpresenilin 1のたん白質発現が減少した。

genisteinには、チロシンキナーゼ阻害やエストロゲン受容体 $\beta$ の活性という働きがある。そこで、AG490とエストラジオールの相乗作用がpresenilin 1発現を減少させるかどうかを検討した。濃度の異なるAG490とエストラジオールを細胞培養液中に添加し、presenilin 1, presenilin 2, ERK2のたん白質発現を確認した (Fig. 3)。Daudi細胞において、100 nMエストラジオールと1  $\mu$ MAG490でpresenilin 1の発現を95%以上阻害した。これらの結果は、エストロゲン受容体and/orチロシンキナーゼ伝達がpresenilin 1の発現を抑制する可能性があることを示唆しており、また

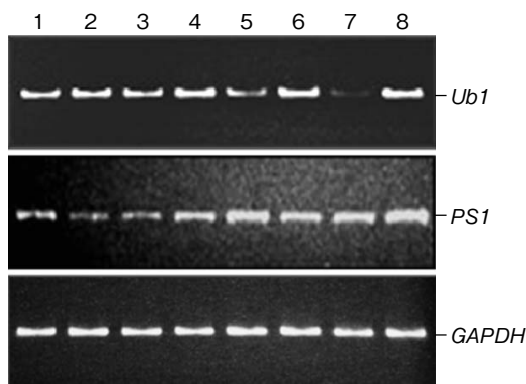


Fig. 1. Genistein reduced the expression of ubiquitin 1 in Daudi cells. Semiquantitative RT-PCR were performed using primers specific to presenilin 1, ubiquitin1 or GAPDH on 100 ng total RNA prepared from Daudi cells without (lane 1) or with reagents (lane 2-8: 1 mM AG490, 10 mM MG132, 20 mM  $\beta$ -secretase inhibitor II, 20 mM lactacystin, 10 mM ALLN, 50 mM genistein, 50 mM daidzein, respectively) for 24 hr. Specific expression was determined in relation to the expression of the housekeeping gene GAPDH used as an internal loading control. At least four independent experiments were done, and typical paired results are documented.

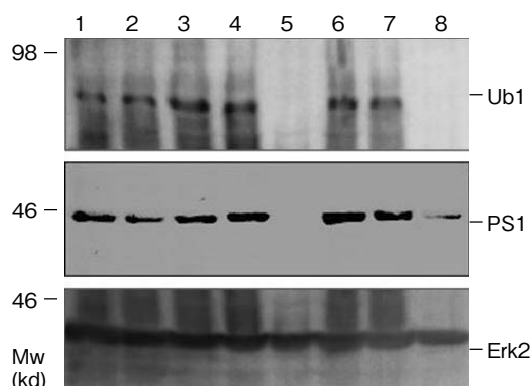


Fig. 2. Genistein and AG490 downregulated ubiquitin 1 and presenilin 1 protein in Daudi cells. Daudi cells were treated without (lane 1) or with reagents (lane 2-8: 1 mM dexamethasone, 0.2 mM 17- $\beta$ -estradiol, 10 mg/mL mixed food isoflavones, 50 mM genistein, 50 mM daidzein, 1 mM AG490, 50 mM AG490, respectively) for 48 hr. After treatment, cell lysates were isolated, Western blotting was performed using antibodies specific to presenilin 1, ubiquitin 1 and Erk2. At least three independent experiments were done, and typical paired results are shown.

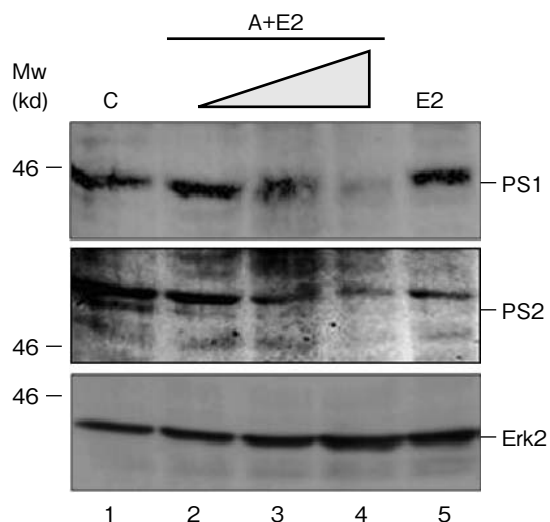


Fig. 3. Dose dependent inhibition of presenilin 1 and presenilin 2 protein expression by AG490 and estradiol. Daudi cells were treated without (lane 1) or with 1 mM AG490 plus 1 nM (lane 2), 10 nM (lane 3), 100 nM (lane 4) of 17- $\beta$ -estradiol (A+E2), 0.2 mM 17- $\beta$ -estradiol alone (lane 5) for 48 hr. The levels of protein were detected by western blot analysis using anti-presenilin 1 and anti-presenilin 2 antibodies as explained at Fig. 2. Western blot with anti-Erk2 antibody was also shown as equal levels of protein loading.

Ubiquitinは本来presenilin相互作用たん白質として知られており、presenilinを安定化することがわかっている<sup>11)</sup>。UbiquitinはADとの関わりがあることも知られている。したがって、今回の結果は、genisteinはリンパ球系細胞において、ubiquitin 1発現の阻害を介してpresenilinを制御する可能性を示唆している。

次にCiz1の発現レベルをRT-PCRを用いてmRNAを定量化した (Fig. 4)。Daudi細胞においてエタノールやエストラジオールに比べて、最終濃度 $10^5$  Mのイソフラボンで処理した際に発現レベルが著しく減少した。さらに、イソフラボンによるCiz1たん白質の変化を確認するために、ウエスタンブロット法により検討を行った (Fig. 5)。Fig. 5に示す通り、daizeinで処理した時には変化しないが、イソフラボンやgenisteinで処理した際にCiz1の発現が減少していた。また、genisteinについては濃度依存的にたん白質発現の減少が確認され、最終濃度 $10^6$  Mで処理後96時間で90%以上の減少が見られた (data not shown)。

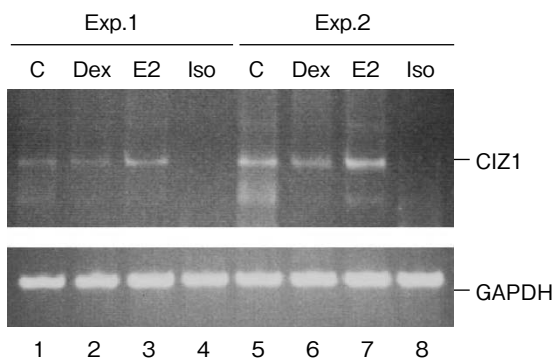


Fig. 4. Ciz1 mRNA was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The semiquantitative RT-PCR was performed on 100 ng total RNA prepared from Daudi cells treated without (lane 1, lane 5) or with dexamethasone (SIGMA) (lane 2, lane 6), estradiol (SIGMA) (lane 3, lane 7), isoflavone (INDOFINE chemical) (lane 4, lane 8) at the final concentration  $10^{-5}$  M for 24 hr. Aglycone form of isoflavone was used for the experiment. Specific expression was determined in relation to the expression of the housekeeping gene GAPDH used as an internal loading control.

大豆イソフラボン全体の約50%を占めるgenisteinには<sup>12)</sup>、乳がんをはじめとする細胞の転移や血管新生を阻害したり、乳腺がんの増殖を抑制することが報告されている<sup>13)</sup>。genisteinを含む大豆や豆類が含有成分全体でがんをはじめとする様々な遺伝子発現に影響を及ぼすかどうかを検討した (Fig. 6)。大豆、小豆、黒豆、緑レンズ豆を粉碎し、PBS、50%エタノール、70%エタノール、100%エタノールで成分を抽出した。各種抽出物をJurkat細胞、Daudi細胞などの培養細胞液中に添加し、96時間後に回収、ウエスタンブロッティング法をたん白質発現の変化を確認した。用いた抗体は、Ciz1、Rb2、presenilin 1、ubiquilin 1である。今回検討したたん白質では大豆をはじめとする豆類の抽出物を添加しても、たん白質発現に変化は見られなかった。

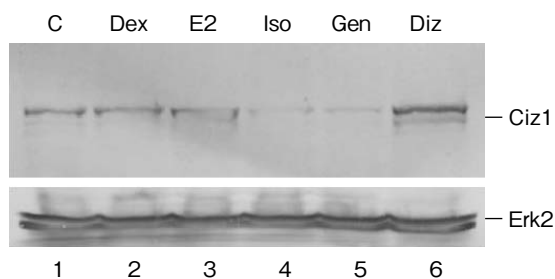


Fig. 5. Genistein diminished the expression of Ciz1 protein. Daudi cells were treated without (lane 1) or with dexamethasone (lane 2), estradiol (lane 3), isoflavone (lane 4), genistein (Cayman Chemical) (lane 5), daidzein (Cayman Chemical) (lane 6) at the final concentration  $10^{-5}$  M for 48 hr. After treatment, cell lysates were isolated, the levels of Ciz1 protein was detected by western blot analysis using anti-Ciz1 antibody (COSMO BIO). Western blot with anti-Erk2 antibody (BD Bioscience) was also shown as equal levels of protein loading.

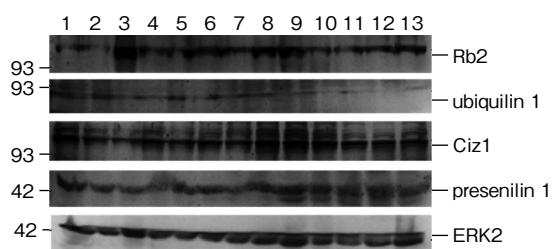


Fig. 6. Expression of proteins of Rb2, ubiquilin 1, Ciz1, presenilin 1, ERK2 protein by bean extracts. Daudi cells were treated without (lane 1) or with extracts of beans (lane 2-4: soybean, lane 5-7: azuki bean, lane 8-10: black soybean, lane 11-13: lentil bean) at final concentration  $50 \mu$ g/mL for 96 hr. After treatment, cell lysates were isolated, the levels of Rb2, ubiquilin 1, Ciz1, presenilin 1, ERK2 protein was detected by western blot analysis using anti-Rb2, anti-ubiquilin 1, anti-Ciz1, anti-presenilin 1 antibody. Western blots with anti-Rb and anti-Erk2 antibody were also shown as equal levels of protein loading.

## 要 約

大豆をはじめ小豆，黒豆，緑レンズ豆を粉碎し，PBS，50%エタノール，70%エタノール，100%エタノールで成分を抽出した．各種抽出物をJurkat細胞，Daudi細胞などの培養細胞液中に添加し，RNAの発現変化とたん白質変化をRT-PCR法やウエスタンブロッティング法を用いて検討した．検討した遺伝子には，認知症に関わりのあるpresenilin 1やubiquilin 1，apoptosis関連遺伝子であるRb1，乳がん細胞の腫瘍形成に影響を及ぼすciz1などである．イソフラボンの一種であるgenisteinを添加した場合，ciz1，presenilin 1やubiquilin 1で発現の変化が見られたが，豆類から抽出した成分を添加した場合では，発現の変化は見られなかった．

## 文 献

- 1) Demonty I, Lamarche B and Jones PJ (2003): Role of isoflavones in the hypocholesterolemic effect of soy. *Nutr Rev*, **61**, 189-203.
- 2) Barnes S (1998): Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 386-392.
- 3) Hoffman R (1995): Potent inhibition of breast cancer cell lines by the isoflavonoid kievitone: comparison with genistein. *Biochem Biophys Res Commun*, **211**, 600-606.
- 4) 家森幸男，太田静行，渡邊 昌 (2001)：大豆イソフラボン．幸書房，東京．
- 5) Miksicek RJ (1994): Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **49**, 153-160.
- 6) Constantinou AI, Mehta RG and Vaughan A (1996): Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in rats by the soybean isoflavones. *Anticancer Res*, **16**, 3293-3298.
- 7) Record IR, Broadbent JL, King RA, Dreosti IE, Head RJ and Tonkin AL (1997): Genistein inhibits growth of B16 melanoma cells *in vivo* and *in vitro* and promotes differentiation *in vitro*. *Int J Cancer*, **72**, 860-864.
- 8) Lamartiniere CA, Murrill WB, Manzillo PA, Zhang JX, Barnes S, Zhang X, Wei H and Brown NM (1998): Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 358-364.
- 9) Okumura N, Nagata Y, Yoshida H, Nishimura Y, Kitagishi Y and Matsuda S (2010): Genistein diminished Ciz1 expression in Daudi lymphoid cells. *Int J Appl Biol Pharm Tech*, **1**, 1040-1045.
- 10) Okumura N, Yoshida H, Nishimura Y, Murakami M, Kitagishi Y and Matsuda S (2012): Genistein downregulates presenilin 1 and ubiquilin 1 expression. *Mol Med Report*, **5**, 559-61.
- 11) Mah AL, Perry G, Smith MA and Monteiro MJ (2000): Identification of ubiquilin, a novel presenilin interactor that increases presenilin protein accumulation. *J Cell Biol*, **151**, 847-862.
- 12) Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K, Beecher GR, Trainer D and Holden J (1999): Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J Agric Food Chem*, **47**, 2697-2704.
- 13) Singh AV, Franke AA, Blackburn GL and Zhou JR (2006): Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. *Cancer Res*, **66**, 1851-1858.