

# 大豆イソフラボンのエストロゲン受容体非依存性作用メカニズム

立花宏文\*<sup>1,2</sup>・山下修矢<sup>1</sup>・山田耕路<sup>1</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食糧化学分野

<sup>2</sup>九州大学食品機能デザイン研究センター

## A Mechanism for Estrogen Receptor-Independent Action of Soy Isoflavone

Hirofumi TACHIBANA \*<sup>1,2</sup>, Shuya YAMASHITA<sup>1</sup> and Koji YAMADA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

<sup>2</sup>Food Functional Design Research Center, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

### ABSTRACT

Daidzein and genistein are polyphenolic isoflavones contained in soy, and daidzein is metabolized to equol by intestinal bacteria. The mechanisms of the physiological effects of isoflavones have been considered to be involved in estrogen receptors (ERs) in many instances, because of their avidity for ERs. On the other hands, some reports indicate the existence of ER-independent effects of isoflavones. We identified a pap-associated domain containing 5 (Papd5), one of the non-canonical poly(A) polymerases, as a responsive gene for ER-independent growth-inhibitory action of equol in cancer cells. In ER-positive human cervical cancer MCF-7 cells, Papd5 ablation did not affect the expression level of ER $\alpha$  and the equol-induced expression of ER $\alpha$  target genes. In ER-negative human cervical HeLa cells, equol induced adenylation of small nucleolar RNA (snoRNA) SNORA68 Papd5-dependently, whereas genistein and green tea (-)-epigallo catechin 3-O-gallate had no effect. These results suggest that Papd5 has no involvement in the ER-agonistic effect of equol and equol inhibits cancer cell growth through activation of Papd5. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 68-72, 2013.

Key words : isoflavone, estrogen receptor, anticancer effect, Papd5, poly adenylation

大豆イソフラボンは、生体内でエストロゲン受容体 (ER) に結合し、生理機能を発揮することが知られている<sup>1,2)</sup>。大豆イソフラボンの生体調節作用は、主にERを介するものと想定されているが、好塩基球に

おける高親和性IgE受容体発現低下作用<sup>3)</sup> や胸腺萎縮作用<sup>4)</sup> など、ERを介さない作用経路の存在が示されている。我々はこれまでに、大豆イソフラボンの一種ダイゼインの腸内代謝産物であるエクオールのER非依存的ながん細胞増殖抑制作用を担う分子として、Pap associated domain containing 5 (Papd5) を同定

\*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

した。本研究では、ER陽性ヒト乳がん細胞株MCF-7に対するエクオールのER依存的な作用に対するPapd5の関与について検討した。また、Non-canonical poly(A) polymeraseの一種であるPapd5は核小体低分子RNA (snoRNA) のアデニル化に関与することが報告されていることから<sup>5)</sup>、ER陰性ヒト子宮頸がん細胞株HeLaにおいてsnoRNAのアデニル化に及ぼすエクオールの影響について検討した。

## 方 法

### 細胞培養と試薬

ヒト乳がん細胞株MCF-7は10%牛胎児血清 (FBS) を含むRPMI-1640培地により、ヒト子宮頸がん細胞株HeLaは10% FBSを含むDMEM培地により、37°C、5%炭酸ガス加湿下で継代・維持した。エクオールはLC Laboratoriesより、ダイゼインおよびゲニステインは東京化成工業株式会社より購入し、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した。Scramble-shRNA発現ベクターおよびPapd5-shRNA発現ベクターはSigma-Aldrichより購入した。

### MCF-7細胞のER $\alpha$ 発現量に及ぼすPapd5ノックダウンの影響の検討

MCF-7細胞にPapd5-shRNA発現ベクター (対照としてScramble-shRNA発現ベクター) を導入し、薬剤選択によりPapd5の発現量が低下したMCF-7細胞を構築した。コントロールMCF-7細胞およびPapd5低発現MCF-7細胞を6 cm dishに播種し、24時間培養後に細胞を回収し、ER $\alpha$ の発現量をウエスタンブロット法に

より測定した (Fig. 1)。

### エクオールのERアゴニスト作用におけるPapd5の関与の検討

コントロールMCF-7細胞あるいはPapd5ノックダウンMCF-7細胞を6 cm dishに播種し、10%エストロゲン除去FBS-RPMI-1640にて24時間培養した。終濃度1  $\mu$ Mエクオールを含む10%エストロゲン除去FBS-RPMI-1640にて24時間培養した後、Trizolにより細胞を回収、cDNAを合成し、リアルタイムPCRによりPS2およびCathepsin Dの発現量を測定した (Fig. 2)。

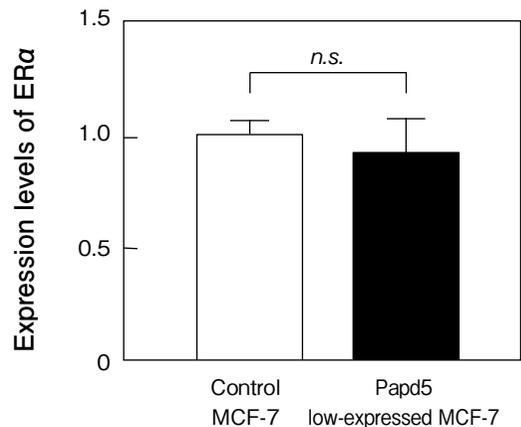


Fig. 1. Involvement of Papd5 in the expression of ER $\alpha$  in MCF-7 cells. ER $\alpha$  expression levels in MCF-7 cells expressing scramble-shRNA or PAPD5-shRNA were assessed by western blotting analysis. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . "n.s." means not significant.

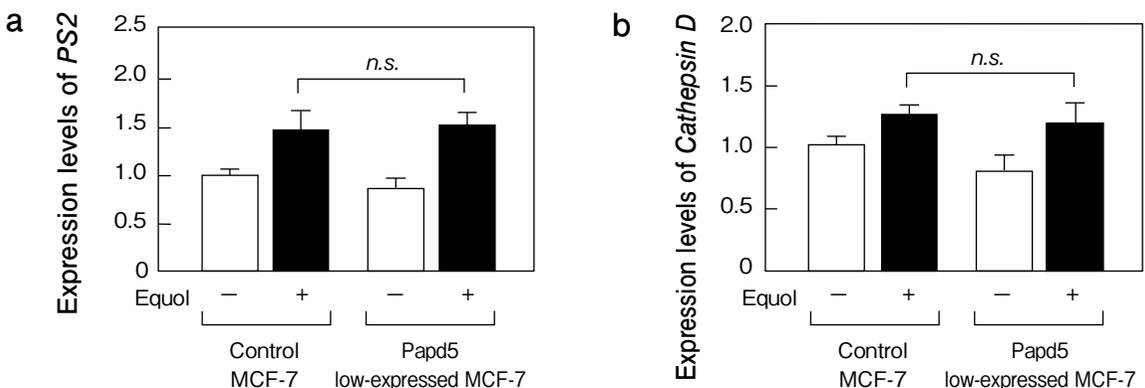


Fig. 2. Involvement of Papd5 in the ER-dependent effect of equol. After treatment with equol in RPMI-1640 medium supplemented with charcoal-treated FBS for 24 h, mRNA expression levels of PS2 and Cathepsin D in MCF-7 cells expressing scramble-shRNA or Papd5-shRNA were measured by real-time quantitative PCR. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . "n.s." means not significant.

## 核小体低分子RNAのアデニル化に及ぼすエクオールの影響

ヒト子宮頸がん細胞株HeLaを24 well plateに播種し、10% FBS-DMEMにて24時間培養した。終濃度5あるいは10  $\mu$ Mのエクオールを含む2% FBS-DMEMにて24時間培養した後、Trizolにより細胞を回収し、Oligo dT primerを用いcDNAを合成した。リアルタイムPCRによりsnoRNAの発現量を測定した。ポリA鎖非特異的なsnoRNAの発現量についてはrandom hexamer primerを用い合成したcDNAを鋳型とするリアルタイムPCRにより測定した。

## 結果と考察

### MCF-7細胞におけるエクオールのERアゴニスト作用におけるPapd5の関与

コントロールMCF-7細胞およびPapd5低発現MCF-7細胞のER $\alpha$ 発現量に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。また、Papd5発現量の低下はエクオールによりER $\alpha$ 依存的に発現が誘導されるER $\alpha$ 標的遺伝子であるPS2ならびにCathepsin Dの発現量に影響を及ぼさなかった (Fig. 2)。以上の結果から、Papd5はエクオールのERアゴニスト作用には関与しないことが示された。

### HeLa細胞の核小体低分子RNAのアデニル化に及ぼすエクオールの影響

Non-canonical poly(A) polymeraseの一種であるPapd5は核小体低分子RNA (snoRNA) をアデニル化することが報告されていることから<sup>5)</sup>、エクオールがPapd5依存的に細胞増殖抑制作用を示すER陰性ヒト子宮頸がん細胞株HeLaのsnoRNAのアデニル化に及ぼすエクオールの影響について検討した。HeLa細胞にエクオールを処理し、核小体低分子RNA (snoRNA) の一種であるSNORA68およびSNORA24発現量について検討した。ポリA鎖特異的な逆転写により合成したcDNAを鋳型とするリアルタイムPCRに供したところ、エクオールはSNORA68の発現量を増加させたが、SNORA24の発現量には影響を与えなかった (Fig. 3a)。一方、ポリA鎖非特異的にcDNAを合成しリアルタイムPCRに供したところ、SNORA68の発現量はエクオールによる影響を受けなかった (Fig. 3b)。従って、エクオールはSNORA68の発現量に影響を及ぼさず、SNORA68のアデニル化を誘導することが示された。次に、エクオールのsnoRNAアデニル化作用におけるPapd5の関与について検討した。Papd5の発現量を低下させたHeLa細胞においてはエクオールのsnoRNAアデニル化作用が消失した (Fig. 3c)。また、このようなsnoRNAのアデニル化作用はゲニステインおよび緑茶カテキン(-)epigallo catechin 3-O-gallateには認められなかった (data not shown)。以上結果より、エクオールはPapd5を活性化することによりsnoRNAをアデニル化することが示された。

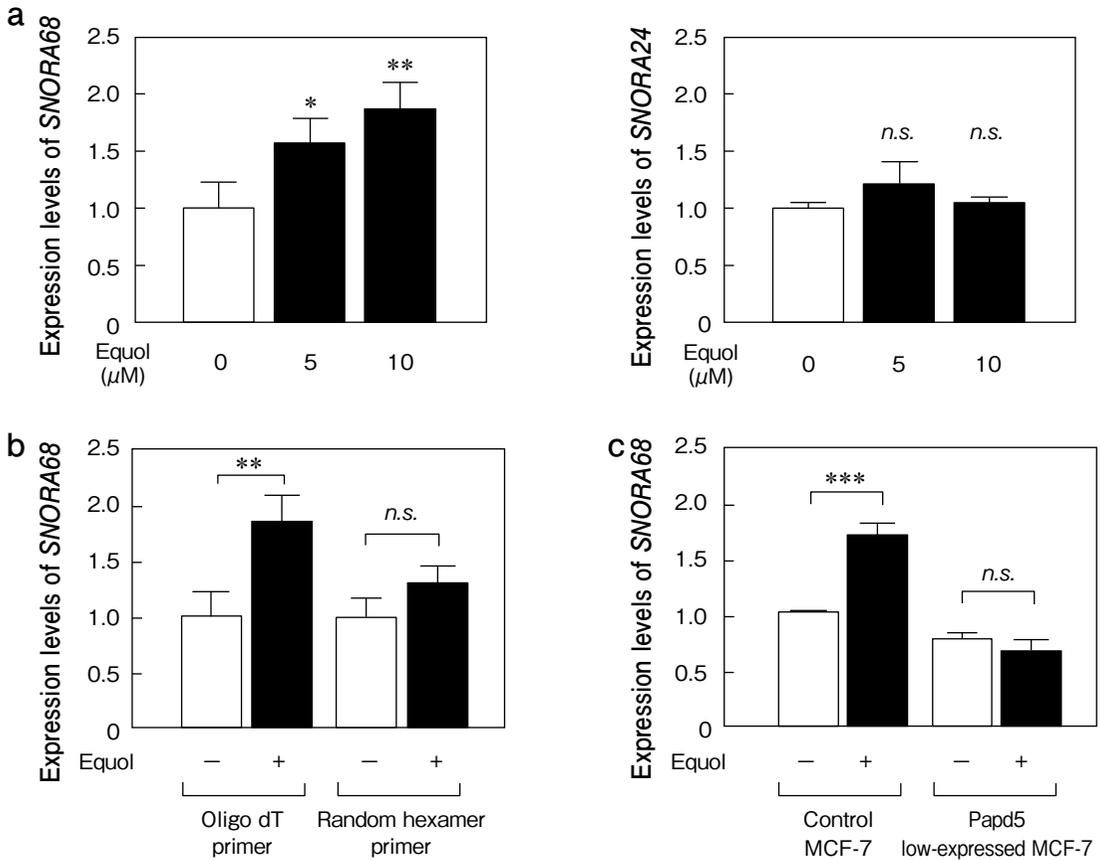


Fig. 3. Effect of equol on adenylation of snoRNAs in HeLa cells. (a) HeLa cells were treated with the indicated concentration of equol for 24 h. Total RNA was isolated from the cells and cDNA was generated with oligo dT primer. The expression levels of adenylated SNORA68 and SNORA24 in HeLa cells were assayed by quantitative PCR (qPCR). (b) After treatment with equol for 24 h, cDNA was generated from total RNA with oligo dT primer or random hexamer. The expression levels of SNORA68 in the cells were assessed by qPCR. (c) HeLa cells expressing scramble-shRNA or Papd5-shRNA were treated with equol for 24 h. The expression levels of adenylated SNORA68 were assayed by qPCR. Data are means  $\pm$  S.D.,  $n=3$ . \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs control. "n.s." means not significant.

## 要 約

我々はこれまでに、大豆イソフラボンのエストロゲン受容体 (ER) 非依存的ながん細胞増殖抑制作用に関わる遺伝子を探索し、Pap associated domain containing 5 (Papd5) を同定した。本研究では、エクオールERアゴニスト作用におけるPapd5の関与について検討した。ER陽性ヒト乳がん細胞株MCF-7においてPapd5の発現低下はER $\alpha$ の発現量ならびにエクオールにより誘導されるER $\alpha$ 標的遺伝子の発現量に影響を及ぼさなかった。エクオールがPapd5依存的に細胞増殖抑制作用を示すヒト子宮頸がん細胞株HeLaにおいて、エクオールはPapd5依存的に核小体低分子RNAをアデニル化することを見出した。以上結果より、Papd5はエクオールのERアゴニスト作用には関与しないこと、また、エクオールはPapd5を活性化することでがん細胞増殖抑制活性を発揮する可能性が示された。

## 文 献

- 1) 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  $\beta$ . *Endocrinology*, **139**, 4252-4263.
- 2) Tham DM, Gardner CD and Haskell WL (1998): Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical epidemiological and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 2223-2235.
- 3) Yamashita S, Tsukamoto S, Kumazoe M, Kim YH, Yamada K and Tachibana H (2012): Isoflavones suppress the expression of the Fc $\epsilon$ RI high-affinity immunoglobulin E receptor independent of the estrogen receptor. *J Agric Food Chem*, **60**, 8379-8385.
- 4) Yellayl S, Naaz A, Szewczycowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG and Cooke PS (2002): The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: A human health concern ? *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 7616-7621.
- 5) Berndt H, Harnisch C, Rammelt C, Stohr N, Zirkel A, Dohm JC, Himmelbauer H, Tavanez JP, Huttelmaier S and Wahle E (2012): Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*, **18**, 958-972.