

大豆イソフラボンによる核内受容体を介した脂質代謝遺伝子の 発現調節機序解明

亀井康富*

京都府立大学生命環境科学研究科分子栄養学研究室

Mechanism of Gene Regulation of Lipid Metabolism by Soy Isoflavone via Nuclear Receptors

Yasutomi KAMEI*

Laboratory of Molecular Nutrition Graduate School of Life and Environmental Sciences
Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8522

ABSTRACT

Lifestyle-related diseases arise from a complex interaction between genetic and environmental factors. It has been suggested that epigenetics, such as DNA methylation, may be involved in the molecular basis for such interactions. Epidemiological and animal studies have suggested that metabolic diseases in adulthood may be acquired during fetal events, including maternal consumption of soy products. In the present study, we obtained the following data: 1) We characterized DNA methylation in primary cultures of mouse hepatocytes treated with a ligand of PPAR α (a target of soy isoflavone). A genome-wide DNA methylation analysis identified hyper- and hypo-methylated genes in the presence of the PPAR α ligand. 2) Expression of *glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1)*, which encodes a rate-limiting enzyme for *de novo* lipogenesis in the liver, was found to be regulated by DNA methylation of the *GPAT1* promoter, which contains SREBP-responsive elements, during the neonatal period. 3) Maternal administration of soy isoflavone (daidzein) was performed during gestation and lactation by intraperitoneal injection. Pups after weaning were fed a high-fat diet to induce obesity. Maternal administration of daidzein markedly suppressed diet-induced obesity in their offspring. Detailed mechanisms are currently under investigation. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 63-70, 2014.

Key words : lipid metabolism, DNA methylation, obesity, isoflavone, PPAR

*〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

多くの疫学調査により、胎生期や新生児期の栄養環境が成人期に発症する肥満や生活習慣病に関連する可能性が指摘されている。また、アジア人の肥満の発生率が欧米と比較して少ないことは大豆の消費量と相関があるとされる。大豆イソフラボンは核内受容体のPPARやエストロゲン受容体を活性化する。本研究では、大豆イソフラボンにより、マウスの新生仔期にDNAメチル化により遺伝子発現が変動する脂肪代謝関連遺伝子を同定し、成獣期に発症する肥満や脂肪肝との関連を明らかにすることを目指した。本研究結果を、新生児期の栄養学的介入の形で応用することにより、肥満・生活習慣病の新しい予防戦略の手がかりになることが期待される。

実験1：新生仔肝臓初代細胞におけるDNAメチル化パターンの網羅的解析

方 法

網羅的DNAメチル化法の確立

本研究では、網羅的なDNAメチル化解析法であるMIAMI法（Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers）¹⁾を用いた。ゲノムDNAをメチル化感受性酵素HpaIIおよび非感受性酵素MspIで処理、アダプター添加後、PCR増幅し、プロモーターゲノムDNAアレイとハイブリさせて、DNAメチル化の有無によるシグナルの変化を比較した。

マイクロアレイ法による発現パターンの変化

イソフラボンによって活性化される核内受容体PPARの合成リガンドであるWy14643を用いた。リガンド添加またはvehicleを添加したマウス新生仔肝臓初代培養よりRNAを調製した。逆転写反応およびCy3-CTPの取り込み後、マウスcDNAアレイとハイブリし、遺伝子発現変化を計測した。得られた結果はバイオインフォマティクスの手法を用いて解析した²⁾。すなわち、新生仔肝臓初代培養における遺伝子発現プロフィールを検討し、プロモーター領域のDNAメチル化の変動と遺伝子発現の変化が逆相関する「DNAメチル化標的遺伝子」の同定を試みた。

結 果 と 考 察

MIAMI法によるDNAメチル化変化の解析

コントロールと比較し、Wy14643処理により39個の遺伝子でDNAメチル化の減少（0.7倍以下）が観察さ

れた。さらに27個の遺伝子で1.7倍以上DNAメチル化が増加した（Table 1, 2）。この結果から、Wy14643処理により、ある特定の遺伝子群がDNAメチル化制御を受けることが示唆された。

Wy14643により発現増加した遺伝子のマイクロアレイ解析

Wy14643添加により多数の遺伝子の発現増加が認められた。（1.4倍以上、197遺伝子）。バイオインフォマティクス解析（GO解析）を行なったところ、PPAR経路および脂肪酸代謝に関する遺伝子の発現増加が認められた。

Wy14643添加による遺伝子発現変化（リアルタイムPCR解析）

マイクロアレイで見られたWy14643添加による遺伝子発現変動をリアルタイムPCR法により確認した。マイクロアレイの結果と一致して、Wy14643添加により脂肪酸酸化酵素に関連する遺伝子Acox, Cpt1, Ehhadhに関しては、発現増加が認められた。また、DNA脱メチル化に関与するといわれる遺伝子類の発現を検討した。その結果、Tet1が発現増加した（Fig. 1）。

培養細胞で認められた遺伝子発現変化およびDNAメチル化変化を、今後、動物個体で確認していく予定である。

実験2：DNAメチル化による新生仔期の脂質代謝遺伝子の発現調節

肝臓は、出生前後から離乳までの新生児期の栄養環境の変化に応じて代謝機能がダイナミックに変化する。例えば、マウス肝臓におけるde novo（新規）脂肪合成は出生直後には強く抑制されているが離乳後に急増する。これは脂質が豊富な母乳から炭水化物が主体の固形食（経口摂取）に変化するために離乳後には糖質から脂質の合成（新規脂肪合成）が必要であることに関連する。

方 法 結 果 と 考 察

我々は、離乳後のマウス肝臓において新規脂肪合成の律速酵素であるglycerol-3-phosphate acyltransferase 1（GPAT1）の遺伝子発現の増加とプロモーター領域のDNAメチル化の著しい減少を見出

Table 1. List of genes methylated in hepatocytes by PPAR ligand

ProbeName	GeneName	Chromosome	Methylation (fold)
A_68_P06832441	Junb	chr8:087867885-087867929	3.39
A_68_P04697714	Tcf1	chr5:115231241-115231287	2.50
A_68_P14356802	Dmrt2	chr19:025739342-025739386	2.25
A_68_P13186432	Kcnk12	chr17:087706366-087706410	2.03
A_68_P02301655	Mrpd9	chr3:094528924-094528968	2.00
A_68_P01878180	Phf19	chr2:034735859-034735904	1.93
A_68_P11688120	A_68_P11688120	A_68_P11688120	1.91
A_68_P02409507	Sox2	chr3:034839686-034839745	1.87
A_68_P04397082	Cops6	chr5:138391613-138391672	1.85
A_68_P13560206	Tmem63b	chr17:045149619-045149667	1.84
A_68_P13107826	Msh5-Clic1	chr17:034654723-034654767	1.84
A_68_P04014076	Mfsd2	chr4:122462952-122462998	1.83
A_68_P12203093	Asb8	chr15:097973159-097973218	1.82
A_68_P02754662	Mab21l2	chr3:086632629-086632673	1.82
A_68_P05882723	Mrps35	chr6:147000757-147000811	1.81
A_68_P04096227	Ube2j1	chr4:033359327-033359386	1.81
A_68_P09200490	Nola2	chr11:051464131-051464179	1.80
A_68_P03895474	Sesn2	chr4:131781519-131781563	1.79
A_68_P06423010	Abcc8	chr7:046047277-046047335	1.79
A_68_P14263582	Foxb2	chr19:016939175-016939234	1.78
A_68_P09758153	Lrrc9	chr12:073360560-073360619	1.77
A_68_P08655198	Mif	chr10:075303605-075303649	1.75
A_68_P07126966	Lonp2	chr8:089514954-089515013	1.73
A_68_P04914226	Atpbd1c	chr5:122633356-122633415	1.72
A_68_P03410592	Wasf2	chr4:132402029-132402073	1.72
A_68_P04111770	Lrrc8d	chr5:105941625-105941684	1.71
A_68_P12259955	Tnfrsf13c	chr15:082051178-082051222	1.71
A_68_P14495356	I830134H01Rik-Cepch5r5	chr19:038119781-038119825	1.70
A_68_P00932178	Epha4	chr1:077400307-077400366	1.70
A_68_P09006081	Hoxb4	chr11:096131296-096131355	1.69
A_68_P00626527	Atf3	chr1:192887101-192887145	1.69
A_68_P03809665	Klf4	chr4:055554801-055554860	1.68
A_68_P00464622	Slc9a2	chr1:040627333-040627387	1.68
A_68_P08953669	A_68_P08953669	A_68_P08953669	1.67
A_68_P04609954	Rnf32	chr5:029526689-029526733	1.67
A_68_P08005228	Acy1	chr9:106296653-106296699	1.67
A_68_P06230788	Abhd2	chr7:079148636-079148695	1.67
A_68_P08377706	Tle6	chr10:081003675-081003734	1.66
A_68_P04093054	Gm694-Zbtb17	chr4:140713990-140714049	1.66
A_68_P14554864	Mid1ip1	chrX:009873980-009874032	1.66
A_68_P00322522	Pou3f3	chr1:042639807-042639866	1.65
A_68_P03164989	Alx3	chr3:107724999-107725056	1.65
A_68_P02436074	Ccbl2	chr3:142637728-142637787	1.65
A_68_P04164161	Tnip2-Sh3bp2	chr5:034836682-034836728	1.65
A_68_P02364880	Pscl1	chr3:108512118-108512169	1.65
A_68_P12648829	Gp5	chr16:030230048-030230107	1.65
A_68_P01707163	Gpiap1	chr2:103597778-103597822	1.64
A_68_P07437462	Brd7	chr8:091253145-091253193	1.64
A_68_P07963004	Rab6b	chr9:102970571-102970615	1.64

Table 2. List of genes de-methylated in hepatocytes by PPAR ligand

ProbeName	GeneName	Chromosome	Methylation (fold)
A_68_P11688120	A_68_P11688120	A_68_P11688120	0.59
A_68_P05495854	Casdl	chr6:004551145-004551189	0.64
A_68_P07955703	5730536A07Rik	chr9:065926007-065926066	0.64
A_68_P14356802	Dmrt2	chr19:025739342-025739386	0.65
A_68_P03228980	Acot7	chr4:151021766-151021810	0.65
A_68_P00451766	Nmnat2	chr1:154711906-154711950	0.65
A_68_P07424530	Hsbp1	chr8:122225535-122225594	0.66
A_68_P09389342	Slc4a1	chr11:102180830-102180876	0.67
A_68_P14420912	Slc1a1	chr19:028901693-028901748	0.67
A_68_P14448901	Ints5	chr19:008959941-008959985	0.67
A_68_P08096796	AB124611	chr9:021276175-021276234	0.67
A_68_P04397082	Cops6	chr5:138391613-138391672	0.67
A_68_P02216243	Grem1	chr2:113557779-113557838	0.68
A_68_P08005228	Acy1	chr9:106296653-106296699	0.68
A_68_P08799615	Cdc216	chr10:040038632-040038678	0.68
A_68_P14612493	Pnck	chrX:069912615-069912659	0.68
A_68_P12203093	Asb8	chr15:097973159-097973218	0.68
A_68_P10676248	Irx1	chr13:072428309-072428367	0.68
A_68_P14343810	Tmem180	chr19:046411098-046411157	0.68
A_68_P05221993	Prmt8	chr6:127736063-127736122	0.68
A_68_P05030578	Cd27	chr6:125202292-125202346	0.68
A_68_P04263889	Emilin1	chr5:031191082-031191132	0.69
A_68_P08699753	Sim1	chr10:050582566-050582624	0.69
A_68_P14844556	Rsl	chrX:156110156-156110201	0.69
A_68_P05562612	Cav2	chr6:017231963-017232020	0.69
A_68_P12069491	Tars	chr15:011343671-011343716	0.69
A_68_P04586643	Fbxl10	chr5:123249054-123249098	0.69
A_68_P09135125	Scarf1	chr11:075330670-075330729	0.69
A_68_P10760761	Hist1hlb	chr13:021790243-021790302	0.69
A_68_P12033275	4930570C03Rik	chr15:097606948-097606997	0.69
A_68_P04813304	Pi4k2b	chr5:053030379-053030438	0.69
A_68_P12390812	pPtp4a3	chr15:073574600-073574650	0.69
A_68_P06832441	Junb	chr8:087867885-087867929	0.70
A_68_P04238078	Grsf1	chr5:089754345-089754401	0.70
A_68_P09050344	Irgm	chr11:048715343-048715402	0.70
A_68_P12654603	Ifngr2	chr16:091435299-091435346	0.70
A_68_P07379479	Npy1r	chr8:069627275-069627329	0.70
A_68_P06466329	Bckdha	chr7:025367311-025367370	0.70
A_68_P04238078	Grsf1	chr5:089754345-089754401	0.70
A_68_P05408741	1700073E17Rik	chr6:145344552-145344611	0.70
A_68_P13919239	Polr2d	chr18:031932592-031932651	0.70
A_68_P06476641	Fbxl19	chr7:127536160-127536219	0.70
A_68_P09337026	Pycr1	chr11:120458030-120458074	0.71
A_68_P10440107	D13Wsu177e	chr13:054599078-054599137	0.71
A_68_P01878180	Phf19	chr2:034735859-034735904	0.71
A_68_P09671123	Socs3	chr11:117790702-117790749	0.71
A_68_P14319765	Ifit2	chr19:034617021-034617066	0.71
A_68_P14039545	ENSMUST00000083c4h6r81.81::02665	chr18:065374456-065374515	0.71
A_68_P04552462	4930515G01Rik	chr5:115035255-115035311	0.71

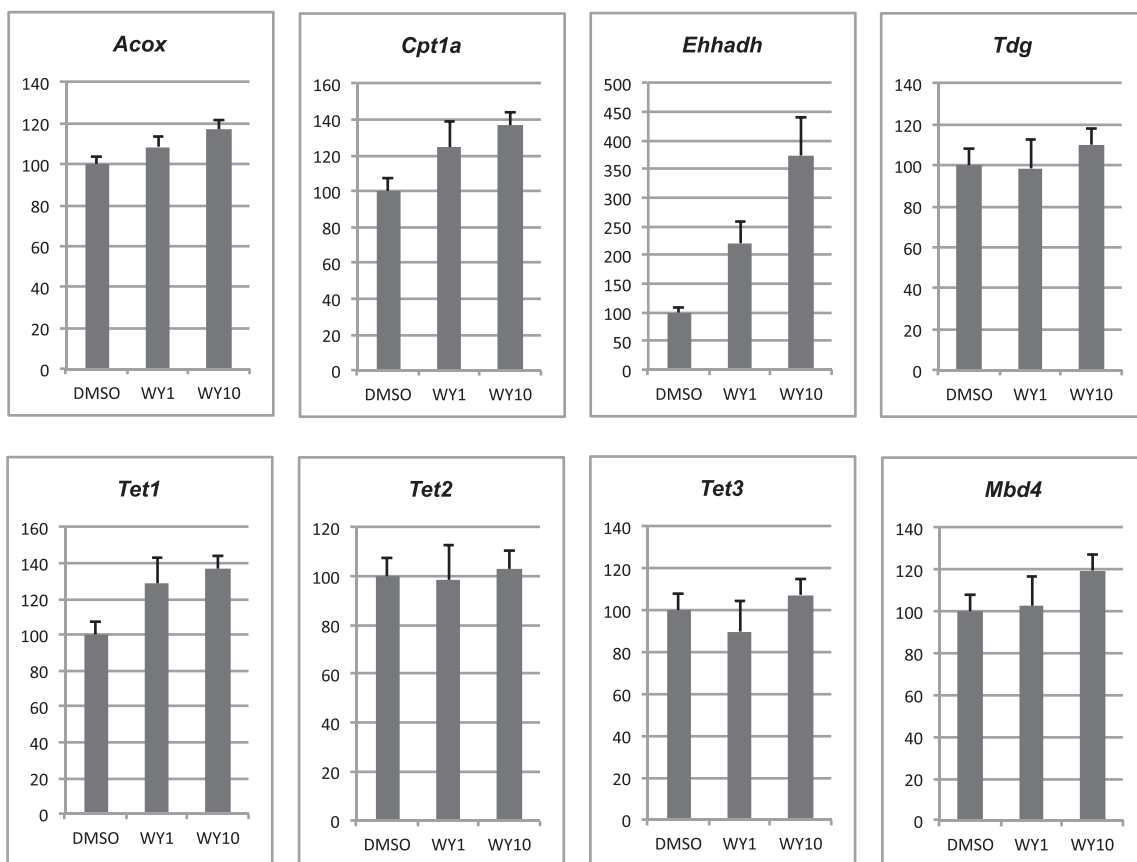


Fig. 1. Quantitative real-time RT-PCR analysis. Relative mRNA levels of hepatocytes, in the presence of PPAR α ligand (Wy), examined by quantitative real-time PCR. Wy1, 1 μ M; Wy10, 10 μ M.

しており、DNAメチル化の程度は遺伝子発現と逆相関していた。この発現制御には転写因子SREBP1の関与が示唆された³⁾。

妊娠期～授乳期の母マウスを過栄養にすることにより新生仔マウスの肝臓ではプロモーター領域のDNAメチル化の減少とともにGPAT1遺伝子発現の増加が認められ、肝脂肪蓄積が増加することを明らかにした (Fig. 2, 3)。以上の研究成果は、胎仔期あるいは個体の成長が著しい新生仔期は全身臓器の可塑性が高い時期であり、胎生期や離乳前後の急激な栄養環境の変化がDNAメチル化を制御し、成獣期に発症する肥満や脂肪肝に対する疾患感受性を決定する可能性を示唆するものである。

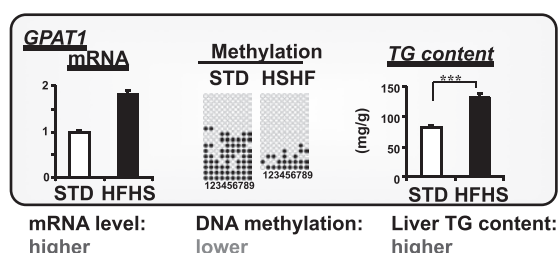


Fig. 2. DNA methylation of the *Gpat* (GPAT) promoter and its mRNA expression in pups of dams fed an HF/HS diet during gestation and lactation. (Left), Relative GPAT1 mRNA levels. (Middle), DNA methylation of the *Gpat* promoter in pups (day 5) of the HF/HS or standard (STD) diet-fed dams. Representative bisulfite sequencing data from three animals in each group. (Right), Liver TG levels of neonatal liver (day 5). Open bar, STD-fed dams; filled bar, HF/HS diet fed dams.

実験3：妊娠期、授乳期における大豆イソフラボンが 仔マウスの肥満表現型に及ぼす効果

子供の成長後の肥満・生活習慣病の発症には、母親の妊娠期・授乳期の栄養環境が影響すると考えられている。核内受容体はDNA結合領域をもつ転写因子で細胞外の化合物に直接応答して遺伝子の転写を調節している。そのなかで、Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) は脂質代謝の遺伝子発現を制御することが報告されている。PPAR α は脂溶性リガンドに応答し、脂肪酸の β 酸化経路における遺伝子の転写を制御している。イソフラボン類であるdaidzeinはPPAR α のリガンドとなり、PPAR α を活性化することが報告されている⁴⁾。本研究ではdaidzeinを妊娠期・授乳期の母マウスに投与し、さらに離乳後、仔マウスに普通食 (Ctr食) または高脂肪食 (HF食) を与えた。そして母親の妊娠期・授乳期の環境がその後の仔マウスの肥満表現型・遺伝子発現にどのような影響を与えるかを明らかにすることを本研究の目的とした。

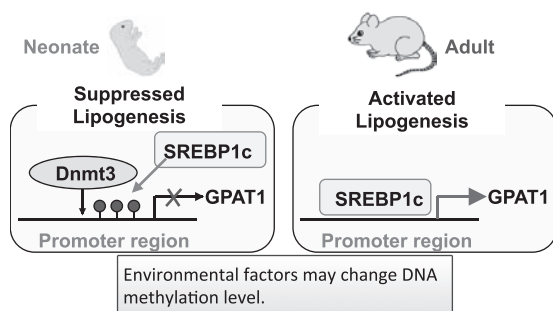


Fig. 3. Schematic model of the DNA methylation-mediated regulation of *Gpam* expression in the neonatal and adult livers. The graph shows the time course of the dietary fat content and rate of hepatic *de novo* lipogenesis before and after weaning. In the neonatal liver, the *Gpam* promoter may be highly methylated at least in part by Dnmt3b, when SREBP-1c cannot access the promoter. In the adult liver, the *Gpam* promoter is less methylated, with SREBP-1c being recruited to the promoter, thereby activating GPAT1 mRNA expression. Environmental factors, such as nutritional state, may change the DNA methylation status.

方 法 結果と考察

妊娠期・授乳期にdaidzeinを投与したマウスから産まれた仔マウスの表現型

妊娠12日目の母マウスを2日間予備飼育し、妊娠14日目～妊娠17日目、出産後2日後～19日後に母マウスの体重を測定した後、daidzeinまたはvehicle (DMSO) を投与した。妊娠期・授乳期にdaidzeinを投与した母マウスから産まれた仔マウス (16日齢) を血糖値・体重測定を行い、解剖した後に臓器重量を測定した。daidzein群の仔マウスでは、体重と脂肪組織重量に減少傾向が見られた。また肝臓、骨格筋の重量には有意差は見られなかった。

妊娠期・授乳期にdaidzeinを投与した母マウスから産まれた仔マウスへの高脂肪食負荷

3週齢で仔マウスを母マウスから離乳させ、4週齢からCtr食またはHF食を与えた。高脂肪食負荷後体重測定を行ったところ、daidzein群においてHF食を与えているのにも関わらずvehicle群に比べて体重の増加の抑制がみられた (Fig. 4)。2ヶ月齢で解剖を行った。血糖値、骨格筋重量は各群において有意な差は見られなかった。一方、肝臓重量はvehicle群よりもdaidzeinを投与したマウスの仔マウス群において有意に減少した。また体重、脂肪組織重量はvehicle群ではCtr食群

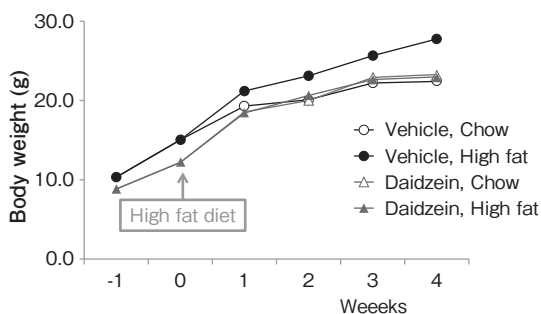


Fig. 4. Body weight change of mice. Body weights were measured weekly. Values represent mean body weight $\pm$ standard error. The error bars are smaller than the symbols. Open circle, vehicle chow; closed circle, vehicle high fat; open triangle, daidzein chow; closed triangle, daidzein high fat.

よりもHF食群で有意に増加するが、daidzein群においては体重、脂肪組織重量の増加が抑制された (Fig. 5).

本研究では、daidzeinを母マウスに投与したところ、daidzein群で仔マウスの肥満表現型に顕著に変化がみられた。16日齢仔マウスでは体重、脂肪組織重量がdaidzein投与群で減少傾向にあった。さらにdaidzein

群仔マウスにHF食を与えたところ、vehicle群で見られた体重・脂肪重量の増加がdaidzein群で抑制されていた。母親の妊娠期・授乳期の栄養環境が仔の表現型に影響をあたえ、仔マウスにエピジェネティクスな変化が起こっているかもしれない。今後これらを明らかにするため、仔マウスの脂質代謝遺伝子のDNAメチル化などを解析していくべきである。

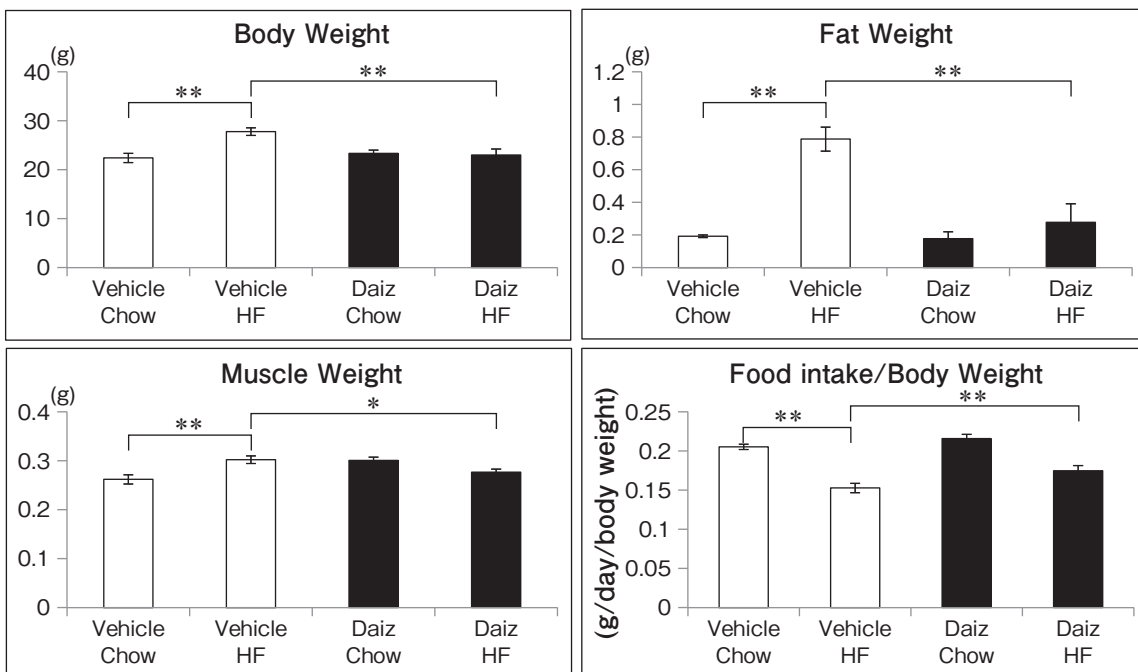


Fig. 5. Phenotypic comparison of mice. Body weight, epididymal adipose tissue weight, skeletal muscle mass, and food intake per body weight are shown.

要 約

実験1：新生仔肝臓初代培養細胞におけるDNAメチル化パターンの網羅的解析。 肝臓初代培養に大豆イソフラボンの標的であるPPARのリガンドを添加し、DNAメチル化の網羅的解析法であるMIAMI法により、新生仔期のマウスの肝臓細胞におけるDNAメチル化状態を網羅的に解析した。その結果、複数の遺伝子においてリガンド依存的にDNAメチル化の変動が観察された。**実験2：DNAメチル化による新生仔期の脂質代謝遺伝子の発現調節。** de novo脂肪合成酵素遺伝子として肝脂肪合成律速酵素GPAT1遺伝子のプロモーター領域を解析した。DNAメチル化によりプロモーター転写活性が抑制された。さらに、妊娠期～授乳期の母マウスを過栄養にすることにより新生仔マウスの肝臓ではプロモーター領域のDNAメチル化の減少とともにGPAT1遺伝子発現の増加が認められ、肝脂肪蓄積が増加することを明らかにした。**実験3：妊娠期、授乳期における大豆イソフラボンが仔マウスの肥満表現型に及ぼす効果。** 妊娠～授乳期の母マウスに大豆イソフラボンであるダイゼインを腹腔内投与した。仔マウスを母マウスから離乳させ、高脂肪食を与えた。その結果、母マウスへのダイゼイン投与により仔マウスの体重および脂肪組織重量の増加が抑制された。

文 献

- 1) Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Ushijima T and Sasaki H (2006): Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene*, **25**, 3059-3064.
- 2) Takahashi M, Kamei Y, Ehara T, Yuan X, Suganami T, Takai-Igarashi T, Hatada I and Ogawa Y (2013): Analysis of DNA methylation change induced by Dnmt3b in mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **434**, 873-878.
- 3) Ehara T, Kamei Y, Takahashi M, Yuan X, Kanai S, Tamura E, Tanaka M, Yamazaki T, Miura S, Ezaki O, Suganami T, Okano M and Ogawa Y (2012): Role of DNA methylation in the regulation of lipogenic glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene expression in the mouse neonatal liver. *Diabetes*, **61**, 2442-2450.
- 4) Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA and Shay N (2003): Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr*, **133**, 1238-1243.