

大豆イソフラボンからのmRNA成熟阻害活性を指標とした 抗ガン活性化化合物の単離精製と食品学的研究

増田誠司*

京都大学大学院生命科学研究所分子応答機構学教室

Isolation of an Anti-Cancer Compound that Inhibits the mRNA Maturation Process from Soyflavone and Food Chemical Research

Seiji MASUDA*

Laboratory of Molecular Biology of Bioresponse, Graduate School of Biostudies,
Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

The inhibitory activity of mRNA maturation process was observed in soya-flavone fraction using a screening system that monitored the mRNA processing steps. The purification of the active compound was attempted and is on-going. And the individual flavones that are potentially included in the soya-flavone fraction were screened. Several compounds showed the inhibitory effect. Their structures were highly analogous. This result suggests that an unidentified structure-activity relation is required to inhibit the mRNA maturation. The detailed analysis of the content of these flavonoids in the soya-flavone fraction and the establishment of efficient isolation methods of these flavonoids are necessary. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 76-79, 2014.

Key words :

日本においてガンによる死亡は、1981年以降、心疾患や脳疾患等の死因を引き離して死因別の第1位となっている。特に高齢者は、細胞内に蓄積された変異を多く含むためにガン化しやすい傾向があるので、発ガンを抑制する機能性化合物の積極的な摂取が必要となっている。最近mRNA成熟過程の阻害因子が¹、抗ガン剤としての機能を期待されており、mRNA成熟

過程は抗ガン剤探索の新たな指標として注目されている¹⁻³⁾。

申請者は、mRNA成熟過程の阻害という新しい指向性を持った抗ガン機能性化合物を効率的に検出する探索系を開発した^{4,5)}。この系を用いて食品中より活性画分を探索し、大豆イソフラボン画分は、mRNAスプライシング阻害剤のGex1A⁶⁾と同等のmRNA成熟阻害活性があることを見いだした。

*〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

本研究は、大豆イソフラボン画分からmRNA成熟過程を阻害する機能性化合物を新たに探索・単離同定するとともに、その作用機構の解明を行う。

方 法

細胞の培養

HeLa細胞にイントロンを含むレニラルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現する株RLM1株を使用した。この細胞は、DMEM+10%牛胎児血清の培地を用い、37℃、5%CO₂に調整したインキュベーターで維持した。

サンプルの調製

イソフラボンを10% (W/V) となるようにPBSで希釈した。その後、ボルテックスで懸濁してサンプルとした。サンプルは、細胞培養液に対して終濃度0.1%、0.2%等となるように添加した。

ルシフェラーゼレポータによるスクリーニング

1段階目は、イントロンを含むレニラルシフェラーゼを安定に発現する株RLM1を用いて、サンプル中のmRNA成熟に関わる因子の探索を遂行した。RLM1細胞2x10⁴ cells/wellとなるように12 well plateに播いた。24時間培養後、細胞にサンプルを添加した。さらに24時間培養した後、PBSで細胞を洗浄し、ルシフェラーゼ可溶性緩衝液 (Promega) を用いてルシフェラーゼたん白質の抽出を行った。レニラルシフェラーゼ活性はRenilla luciferase assay system (Promega) を用いて測定した。またたん白質総量は、Protein assay kit (Nacalai) により測定した。レニラルシフェラーゼ活性を総たん白質量で標準化した。

RNA-in situ hybridizationによるmRNAの局在解析

活性のあったサンプルの作用点がmRNAのプロセッシング過程にあることをRNA-in situ hybridization (FISH) により評価した^{4,5)}。RNA-FISHは、既報告の方法により行った。細胞をカバーガラス上に播き、それを12 well plate中に入れて24時間培養した。さらに、サンプルを添加して24時間培養した。その後、細胞をPBSで洗い、10%ホルムアルデヒドで固定化した。次いで0.1% TritonX100で細胞を透過化した。これを2xSSCで洗浄し、oligo-hybrid buffer (Ambion) で1時間処理した。次いでCy3で標識したoligo-dT₄₅プローブを用いて一晩ハイブリダイズした。翌日、2xSSC、0.5xSSC、0.1xSSCで洗浄した後、DAPIを用いて核を対比染色した。mRNAの局在を蛍光顕微鏡で観察した。

結 果

大豆イソフラボン画分中のmRNA成熟阻害活性の検出

mRNAのプロセッシング過程をモニタリングするシステムを用いてmRNAプロセッシング阻害成分を探索した結果、大豆のイソフラボン画分にmRNA成熟阻害活性を検出した。イソフラボン画分は、添加濃度依存的にルシフェラーゼ活性が低下した (Fig. 1A)。

次にこの効果がmRNAの成熟過程に阻害にあるかをRNA-FISH解析により判定した。その結果、イソフラボン添加濃度依存的に核内mRNAの蓄積を観察した (Fig. 1B)。次いで、今活性成分を単離するためにHPLCにより分画した。それぞれの画分をアッセイ系にかけたところ、弱い活性が検出されたに過ぎなかった。

イソフラボン中のフラボノイドの多くはダイゼインとゲニスタインである。そこでこれらがmRNA成熟阻害活性を持つかについて観察した。ところが、mRNAの局在は変化しなかった。

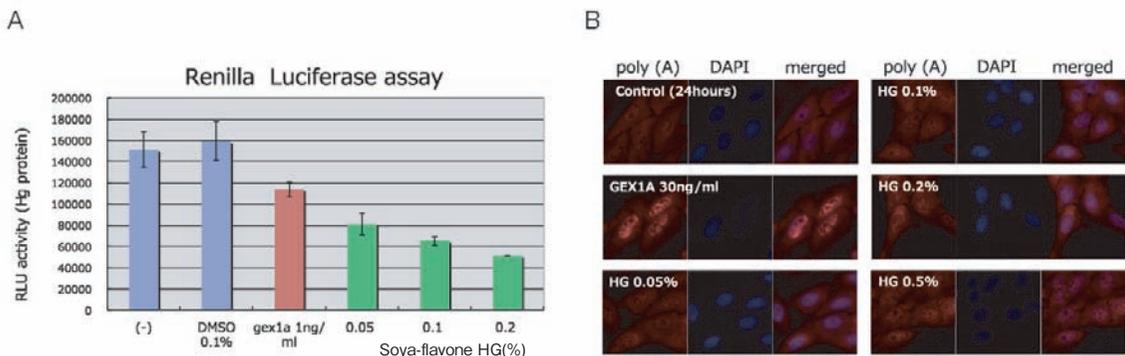


Fig. 1. Inhibition of mRNA maturation. A, Luciferase activity, B, Localization of mRNA.

フラボン類からのmRNA成熟阻害活性成分の探索

イソフラボン画分中の活性成分の単離を試みた。分画したサンプルをRNA-FISHにて観察したが、残念ながら、有意な活性サンプルはなかった。そこで、イソフラボン画分に存在している可能性のある様々なフラボン類について活性の有無を個別に探索した。その結果、特定の構造を持つ複数のフラボノイドに活性を確認した (Fig. 2)。次にRNA-FISHを行い、これらのフラボノイドによりmRNAが核内に蓄積するかについて観察すると、いずれも添加濃度依存的にmRNAは核に蓄積した。これらの活性の強さは、Fig. 3のとおりであった。一方、他のフラボノイドはmRNA成熟阻害活性を持たなかった。

考 察

最近mRNA成熟過程⁷⁾は抗ガン剤の有望なターゲットと見なされてきている。筆者はmRNAの成熟阻害という作用機序の明らかなアッセイ系を用いて食品成分から抗ガン活性を持つ食品機能性分子を探索・利用するためのスクリーニング・評価系を開発した⁴⁾。

この評価系を用いてmRNA成熟阻害活性を探索した。その結果、大豆イソフラボン画分を添加すると濃度依存的にmRNAのシグナルが細胞質から核へと移行した。ただしその効果は比較的弱いものであった。そこで、様々なフラボノイドについてmRNA成熟阻害活性の有無を検討することとした。その結果、多くのフラボノイド類は活性を示さなかったが、一部のフラボノイドにおいて活性が検出された。この結果は、イソフラボン画分中の活性が弱かったことと符合する。またその後の精製過程において十分な活性が検出できなかったこととも符合すると考えられた。

今回解析したフラボノイド類の多くはmRNA成熟阻害活性を持たず、特定の構造を持つ場合のみmRNA成熟阻害活性が観察された。よって、フラボノイドに一般的な抗酸化活性を通して間接的に発揮させたのではなく、細胞内標的因子に特異的に作用してmRNA成熟阻害活性が発揮されたと考えられた。

大豆は優れた栄養価を持つ食品であり、みそ、醤油、納豆などの食品として人々の生活に大きく貢献している。今回、見いだした活性フラボノイドの大豆中の存在量や、品種ごとの比較検討が必要と考えられた。

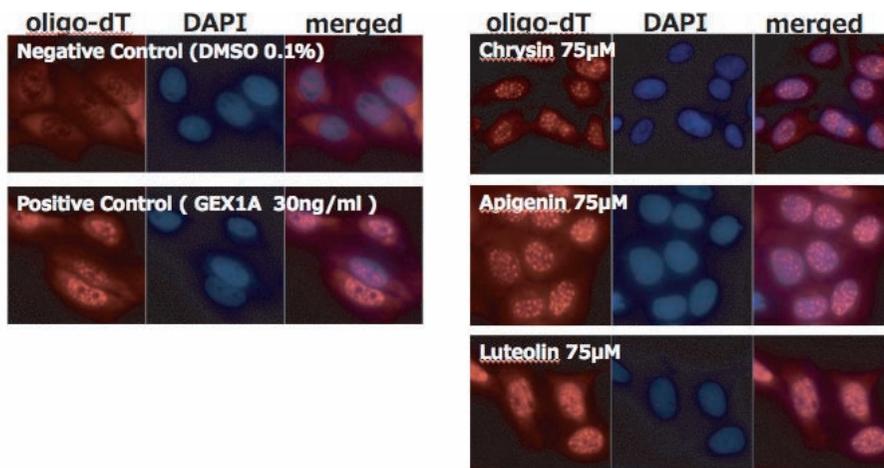


Fig. 2. Inhibition of mRNA maturation by flavonoids.

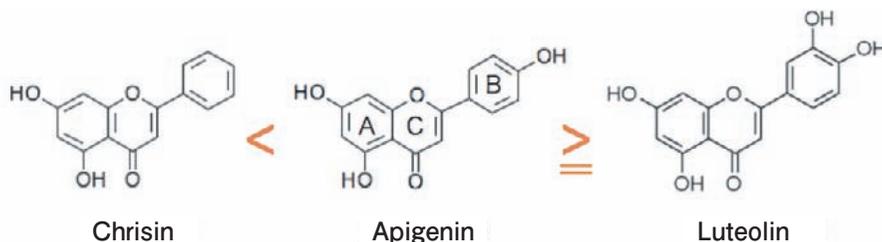


Fig. 3. The structure of flavonoids and its activity.

要 約

mRNAのプロセッシング過程をモニタリングするシステムを用いて探索した結果、大豆イソフラボン画分にmRNA成熟阻害活性を見いだした。活性化化合物の単離を試みることに加えて、フラボン類の活性を個別に探索した。その結果、特定の構造を持ついくつかのフラボノイドに同様の活性を見いだした。今後、これらのフラボノイド類が大豆に含まれている含量や効果的な単離法の解析が必要と考えられた。

文 献

- 1) Kotake Y, Sagane K, Owa T, Mimori-Kiyosue Y, Shimizu H, Uesugi M, Ishihama Y, Iwata M and Mizui Y (2007): Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol*, **3**, 570-575.
- 2) Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, Nojima T, Hagiwara M, Ishigami K, Watanabe H, Kitahara T, Yoshida T, Nakajima H, Tani T, Horinouchi S and Yoshida M (2007): Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol*, **3**, 576-583.
- 3) 小竹良彦, 水井佳治 (2010) スプライシング因子を標的とする抗癌剤研究, *細胞工学*, **29**, 168-174.
- 4) Fujita K, Okamura M, Nishimoto S, Kurihara T, Momma K, Miyamae Y, Kambe T, Nagao M, Narita H and Masuda S (2012): Establishment of a monitoring system to detect inhibition of mRNA processing. *Biosci Biotechnol Biochem*, **76**, 1248-1251.
- 5) Fujiwara N, Yoshikawa M, Yamazaki T, Kambe T, Nagao M and Masuda S (2010): A screening method tuned for mRNA processing factors in human cells by evaluation of the luciferase reporter activity and the subcellular distribution of bulk poly(A)⁺ RNA. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 1512-1516.
- 6) Hasegawa M, Miura T, Kuzuya K, Inoue A, Won KS, Horinouchi S, Yoshida T, Kunoh T, Koseki K, Mino K, Sasaki R, Yoshida M and Mizukami T (2011): Identification of SAP155 as the target of GEX1A (Herboxidiene), an antitumor natural product. *ACS Chem Biol*, **6**, 229-233.
- 7) Yamazaki T, Fujiwara N, Yukinaga H, Ebisuya M, Shiki T, Kurihara T, Kioka N, Kambe T, Nagao M, Nishida E and Masuda S (2010): The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression. *Mol Biol Cell*, **21**, 2953-2965.