# 大豆イソフラボンによる核内受容体を介した新生仔肝臓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. Epigenetics, such as DNA methylation, have been suggested to be involved in the molecular basis for such interactions. Epidemiological and animal studies indicated that metabolic diseases in adulthood may be acquired during fetal events, including maternal consumption of soy products. In the present study, we characterized DNA methylation in mice treated with a ligand of PPAR$\alpha$ (a target of soy isoflavone). Using genome-wide DNA methylation analysis, we identified hyper- and hypo-methylated genes in the presence of the PPAR$\alpha$ ligand. Analysis of mice deficient in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ (PPAR$\alpha$) and maternal administration of a PPAR$\alpha$ ligand during the gestation and lactation periods revealed that the DNA demethylation is PPAR$\alpha$ dependent. Namely, we found that the ligand-activated PPAR$\alpha$-dependent DNA demethylation regulates the hepatic fatty acid $\beta$-oxidation genes during the neonatal period. We are currently studying the underlying mechanisms in detail. These studies will help identify the mechanism whereby maternal nutrition affects offspring early in life. The knowledge gained may enable support of proper DNA methylation status during infancy by appropriate modification of the components of infant formula milk and intake of supplemental foods during pregnancy. The results of this study are expected to provide further insight into the molecular basis of metabolic diseases and lead to development of new preventative methods in the form of functional foods for the baby and mother. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 118-122, 2015.

* 〒606-8522　京都府京都市左京区下鴨半木町1-5

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

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．本研究成果を，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．

## 方　　法
## 結果と考察

多くの疫学研究や動物実験から，胎児期・乳児期の栄養環境が将来の生活習慣病発症に影響することが明らかとなりつつある．すなわち，妊娠・授乳期間中の母親の低栄養・過栄養，栄養成分の偏りが，胎盤・母乳を介して子供に伝わり，これが何らかの仕組みで細胞内にメモリーされ，将来の生活習慣病のなり易さを規定するというものである．この仕組みに，栄養環境に応じた，代謝遺伝子のエピジェネティックな変化が関与することが想定されている．しかしながら，胎児期・乳児期に代謝関連遺伝子がどのようにエピジェネティックに制御されるのかは殆ど明らかにされていない（Fig. 1）．

我々は，栄養環境の変化におけるDNAメチル化の役割を理解する上で，肝臓の脂質代謝に着目している．Fig. 2は哺乳類が経験する栄養環境の生理的な変化を模式的に表したもので，出生を境に主な栄養源が臍帯血由来のグルコースから母乳由来の脂質に切り替わる．その後，離乳を境に脂質の摂取が減少し，主要な栄養源は再びグルコースに切り替わる．この栄養環境の変化に適応するために，肝臓では離乳期には脂肪合成が増加し，また乳児期には乳中の脂質からエネルギーを得るために脂肪酸のβ酸化が発達，成熟していく．我々は，このような脂質代謝の栄養環境の変化への適応に，DNAメチル化による代謝関連遺伝子の発現制御が関与する可能性を考えており，実際に離乳期に増加する脂肪合成には脂肪合成酵素GPAT1のDNAメチル化による発現制御が関与することを，既に報告した[1]．

肝臓の脂肪合成について，Fig. 3のようなモデルを考えている．GPAT1プロモーターは新生仔ではDNAメチル化されており，SREBP1cによる転写活性化は起きないが，これが離乳までの間に脱メチル化され，それによりSREBP1cがGPAT1プロモーターにアクセスできるようになり，律速酵素であるGPAT1の遺伝子発現が起こり，脂肪合成が行われる．このDNAメチル化変化は，栄養環境による影響を受け，おそらく将来的な脂肪肝などのなりやすさが規定される可能性がある．

DNAメチル化の網羅的な変化を調べるために，MIAMI法（Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers）[2] のセットアップを行なった．この方法は，メチル化感受性制限酵素とプロモーターアレイの組み合わせによりメチル化

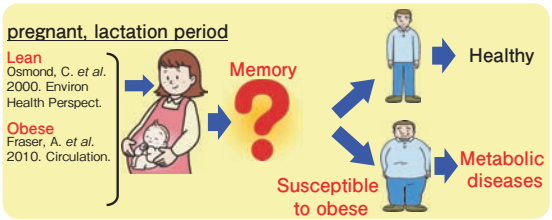


Fig. 1. Metabolic diseases in adulthood may be acquired during fetal events, including maternal consumption of soy products, possibly via epigenetic mechanism.

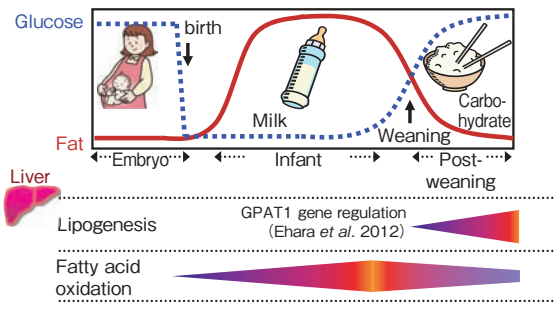


Fig. 2. Liver lipid metabolic change during fetal, newborn to post-weaning period.

の差を検出する方法である．HpaIIという制限酵素はCCGGという配列を認識するが，このシトシンがメチル化を受けていると，切断ない．一方，MspIは同じく，CCGGという配列を認識しますが，メチル化の有無に関わらず切断される．ゲノムDNAをHpaIで切断後，アダプターを付けて増幅し，プロモーターアレイとハイブリさせてメチル化の差をみるという方法である（Fig. 4）．Fig. 5の結果はMIAMI法の実施例である．Dnmt3aとDnmt3b を過剰発現させた肝臓初代培養で，DNAメチル化の比較を行なった．その結果，Dnmt3aとDnmt3bを比べると，Dnmt3bの方がより多くの遺伝子をメチル化していることが判明した[3]．また，コントロールのGFPを発現させた細胞と比較して，メチル化が増加していると検出された個々の遺伝子について，バイサルファイト法によりメチル化を確認したところ，Dnmt3bによってのみメチル化をうける遺伝子はあったが，Dnmt3aによってのみ，メチル化をうける遺伝子はなかった．このため，少なくとも肝臓の初代培養ではDnmt3bが機能的に重要なDNAメチル化酵素ではないかと考えられる．

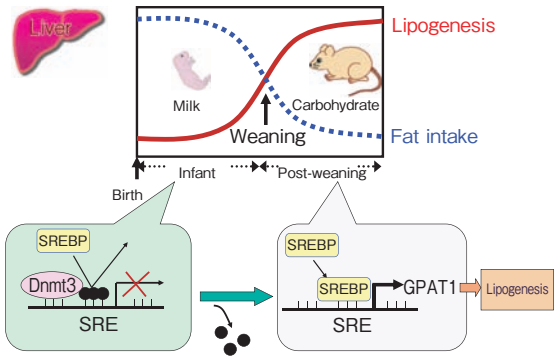


Fig. 3. DNA methylation regulation in liver lipid synthesis pathway during peri-weaning period.

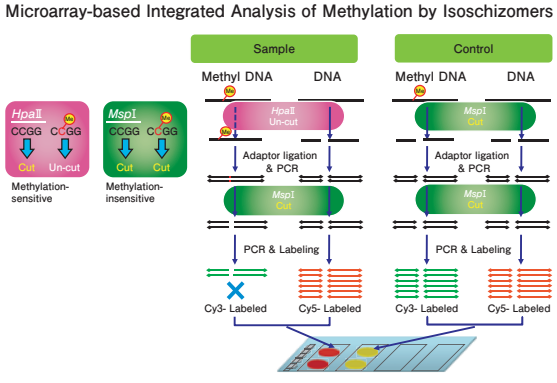


Fig. 4. Protocol and principle of the MIAMI method; Microarray based Integrate Analysis of Methylation by Isoschizomers.

栄養環境の変化に応じた肝臓の脂質代謝機能の変化・成熟におけるDNAメチル化の役割を解明する目的で，マウス肝臓のDNAメチル化を出生前，出生直後，乳児期，離乳後の4点においてゲノムワイドに解析し，DNAメチル化の生理的意義とその調節メカニズムの解明を試みた．

マウス肝臓のDNAメチル化をMIAMI法によりゲノムワイドに解析した．この結果，出生直後のday2（D2）から乳児期のday16（D16）にかけて，多くのメチル化変化が観察された．一般的にDNAメチル化は遺伝子発現を抑制することが知られているため，メチル化と発現が逆相関した遺伝子を抽出すると，メチル化が増加した遺伝子は25.2%のみが発現減少したのに対して，メチル化が減少した遺伝子のうち43.8%が発現増加した．そこで我々はこの249遺伝子，すなわち出生直後から乳児期にかけてメチル化が減少し，発現増加した遺伝子に着目し，バイオインフォマティクス解析を行なった．まず，GO解析を行うと，249遺伝子の実に半分以上が代謝に関連する機能を有するとして分類された．パスウェイ解析では，脂質代謝に関連するパスウェイが上位にリストされ，さらに転写因子結合モチーフ解析により，脂質代謝に重要な転写因子PPARの結合モチーフがリストされた（Fig. 6）．これらの結果から，D2からD16にかけてメチル化の減少を伴い発現増加した遺伝子には，核内受容体型転写因子PPARが制御する脂質代謝関連遺伝子が多いことが明らかとなった．

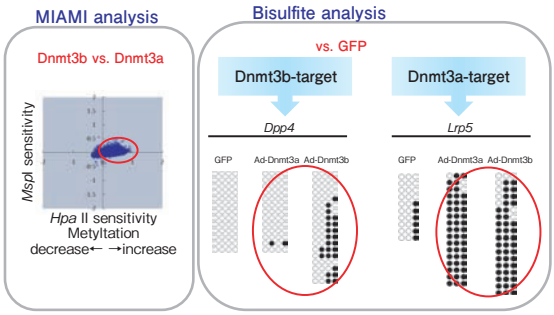


Fig. 5. DNA methylation analysis of Dnmt3b overexpressing cells by the MIAMI analysis.

肝臓においては，PPARファミリーのうち，PPARαが脂肪酸のβ酸化遺伝子の発現を制御することが知られている．メチル化が減少した多くの遺伝子がβ酸化の経路にマッピングされた．このうちいくつかの遺伝子のDNAメチル化をバイサルファイト法により詳細に解析した．この結果，どの遺伝子もD2からD16にかけて大きくメチル化が減少していた．メチル化の減少に伴い発現増加することもリアルタイムPCRにより確認された．以上より，D2からD16にかけて，多くのβ酸化遺伝子のメチル化が減少し，発現増加することが明らかとなった．

PPARαを介したβ酸化遺伝子群のDNA脱メチル化を検証するために，PPARαノックアウトマウスあるいはPPARαリガンドを投与したマウスを用いて，乳児期に起こるβ酸化遺伝子群の脱メチル化の程度が変化するかを解析した．

まず，D16のPPARαノックアウトマウスの肝臓のDNAメチル化を野生型と比較したところ，110個の遺伝子のDNAメチル化が野生型より高い結果であった．これらをバイオインフォマティクス解析したところ，脂肪酸代謝に関連する，PPARのターゲット遺伝子が多く含まれることが明らかとなった．代表としてACOX1をバイサルファイト法でメチル化を解析したところ，野生型ではD2からD16にかけてメチル化は大きく減少するが，ノックアウトではわずかに減少するのみであった．このことから，PPARαは乳児期のβ酸化経路の正常な脱メチル化に重要であることが明らかとなった．

次に，妊娠・授乳期の母マウスへのPPARαリガンド投与が仔マウスのDNAメチル化に与える影響を調べた．母マウスへの投与により，仔マウスは胎盤あるいは母乳を介して胎児期，乳児期にリガンドに晒されることになると考えられる．この結果，大変興味深いことに，リガンドを投与した母マウスが出産し，授乳した仔マウスの肝臓では，D16の時点でAcox1, Ehhadhといったβ酸化遺伝子のDNAメチル化が対照群と比較して明らかに減少し，遺伝子発現が大きく増加した（Fig. 7）．このことから，肝臓のβ酸化経路の遺伝子群は，PPARαのリガンドによる活性化を介して脱メチル化されることが明らかとなった．

以上を結果から以下のモデルを考えている．

胎児期間中，β酸化遺伝子群はDNAメチル化により発現が抑制されているが，乳児期間中にPPARαが何らかのリガンドにより活性化されることで脱メチル化が起こり，これにより経路全体が発現増加し，β酸化を亢進させて母乳中の脂質を効率的に消費してエネルギーを得られるようになるというものである（Fig. 8）[4]．これは，新生仔期の大豆イソフラボン摂取によるPPARの活性化によりエピジェネティックな遺伝子発現制御を受け，将来的な生活習慣病のなりやすさを規定する可能性を示唆するものである．

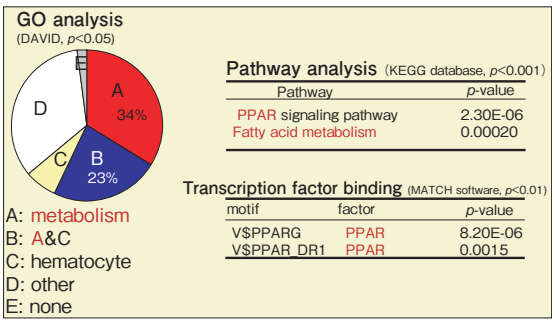


Fig. 6. Bioinformatic analysis of genes with changed DNA methylation from day2 to day 16 in the liver of new born pups.

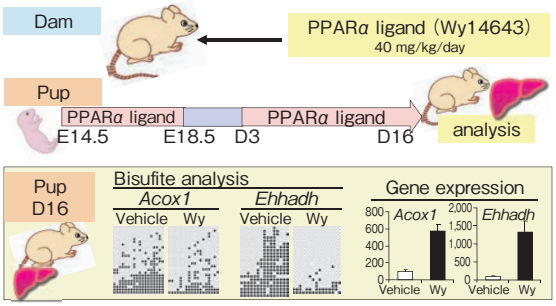


Fig. 7. Effects of maternal administration of PPARα ligand (a target nuclear receptor of soy isoflavone) on DNA methylation of pup liver.

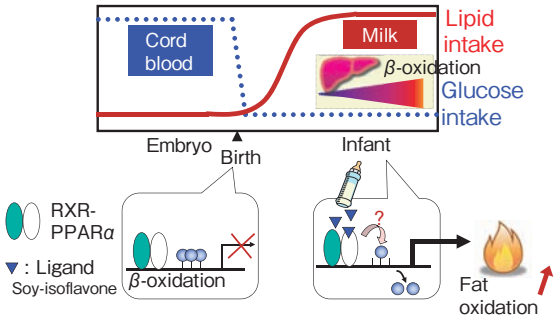


Fig. 8. Schematic summary: Ligand activated PPAR*α* (a soy isoflavone target)-dependent DNA methylation regulates the hepatic fatty acid beta-oxidation genes during the neonatal period.

## 要　　約

母獣に大豆イソフラボンの標的であるPPARのリガンドを投与し，DNAメチル化の網羅的解析法であるMIAMI法により，胎仔期～新生仔期～成獣期のマウスの肝臓および新生仔肝臓初代培養におけるDNAメチル化状態を網羅的に解析した．cDNA発現マイクロアレイ法により，胎仔期～新生仔期～成獣期のマウスの肝臓において発現が変化する遺伝子との比較を行なった．その結果，脂肪酸β酸化関連の遺伝子群がPPARリガンドによるDNAメチル化変化を介して発現制御を受けることが明らかになった．これは，新生仔期の大豆イソフラボン摂取によるPPARの活性化によりエピジェネティックな遺伝子発現制御を受け，将来的な生活習慣病のなりやすさを規定する可能性を示唆するものである．

## 文　　献

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) Ehara T, Kamei Y, Yuan X, Takahashi M, Kanai S, Tamura E, Tsujimoto K, Tamiya T, Nakagawa Y, Shimano H, Takai-Igarashi T, Hatada I, Suganami T, Hashimoto K and Ogawa Y. (2015): Ligand-activated PPAR*α*-dependent DNA demethylation regulates the fatty acid *β*-oxidation genes in the postnatal liver. *Diabetes*, **64**, 775-784.