

大豆イソフラボンの核小体低分子RNA発現調節作用とその機能性

立花宏文*・リンイチェン・山下修矢

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

Regulatory Effect of Soy Isoflavones on the Expression of Small Nucleolar RNA Expression and Its Functionality

Hirofumi TACHIBANA*, I-Chian LIN and Shuya YAMASHITA

Division of Applied Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology,
Faculty of Agriculture, 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 pap associated domain containing 5 (Papd5) as a responsive gene for ER-independent growth-inhibitory action of equol in cancer cells. Papd5, one of non-canonical poly(A) polymerase, has been reported to add adenylnucleotide residues to small nucleolar RNAs. In ER-negative human cervical HeLa cells, equol induced polyadenylation of small nucleolar RNAs (snoRNAs) in the Papd5-dependent manner, suggesting that equol induces snoRNA polyadenylation through activating Papd5. Overexpression of snoRNAs had small influence both on the growth of HeLa cells and on the growth inhibitory effect of equol. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 138-142, 2015.

Key words : isoflavone, estrogen receptor, Papd5, small nucleolar RNA, polyadenylation

大豆イソフラボンはエストロゲン受容体 (ER) に対する結合活性を有し、エストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を発揮することが知られている^{1,2)}。一方、好塩基球における高親和性IgE受容体発現低下作用³⁾ など、ERを介さないイソフラボンの生理作用が報告されているが、そのメカニズムはほとんどわかっていない。我々はこれまでに、主要なイソフラボンであるダイゼインの腸内代謝産物であるエクオー

る^{1,2)}。一方、好塩基球における高親和性IgE受容体発現低下作用³⁾ など、ERを介さないイソフラボンの生理作用が報告されているが、そのメカニズムはほとんどわかっていない。我々はこれまでに、主要なイソフラボンであるダイゼインの腸内代謝産物であるエクオー

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

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)を同定した。Non-canonical poly(A) polymeraseの一種であるPapd5は核小体低分子RNAの3'末端にポリA鎖を付加することが報告された⁴⁾。そこで本研究では、イソフラボンのPapd5活性に及ぼす影響について検討するため、核小体低分子RNAのポリAデニル化を評価し、イソフラボンのがん細胞増殖抑制作用における核小体低分子RNAの関与について検討した。

方 法

細胞培養と試薬

ヒト子宮頸がん細胞株HeLaは10% FBS を含むDMEM培地により、ヒト臍帯血静脈内皮細胞HUVECは10%FBSを含むEBM-2培地 (Lonza) により、ヒト表皮メラノサイトNHMCは無血清完全培地キット (DS Pharma Biomedical) を用い培養し、すべて37℃、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。

核小体低分子RNAのポリAデニル化レベルの測定

HeLa細胞を24 well plateに播種し、10% FBS-DMEMにて24時間培養した。終濃度10 μ Mのエクオールを含む2% FBS-DMEMにて24時間培養した。Trizolにより細胞を回収してRNAを単離し、oligo dT primerを用いcDNAを合成後、リアルタイムPCR法によりポリAデニル化核小体低分子RNAの発現量を測定した。Papd5の関与については、shRNAを用いたRNA干渉法によりHeLa細胞においてPapd5をノックダウンすることで検討した。

核小体低分子RNAの過剰発現

HeLa細胞を24 well plateに播種し、10% FBS-DMEMにて24時間培養した。核小体低分子RNA発現ベクターとFugene6の混合液を細胞に添加し、細胞内に核小体低分子RNAを過剰発現させた。

結果と考察

HeLa細胞の核小体低分子RNAのポリA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をポリAデニル化することが報告されている⁴⁾。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の核小体低分子RNAのポリAデニル化に及ぼすエクオールの影響について検討したところ、エクオールによりSNORA63、SNORA68およびSNORD104の各核小体低分子RNAのポリAデニル化体の発現量が増加したことから (Fig. 1)、エクオールはこれらの核小体低分子RNAにポリAデニル化を誘導することが示された。一方、ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECおよびヒトメラノサイトNHMCにおいて、エクオールは核小体低分子RNAのポリAデニル化に影響を与えなかった (Fig. 2a, b)。

エクオールのsnoRNAポリAデニル化作用におけるPapd5の関与

Papd5の発現量を低下させたHeLa細胞では、エクオールのSNORA63、SNORA68およびSNORD104に対するポリAデニル化作用が消失した (Fig. 3)。したがって、エクオールのsnoRNAポリAデニル化作用はPapd5依存的であり、エクオールはPapd5を活性化させることが示された。

がん細胞増殖およびエクオールの細胞増殖抑制作用における核小体低分子RNAの関与

核小体低分子RNAであるU50は、前立腺がんおよび乳がんにおいて抑制作用を示すことが報告されてお

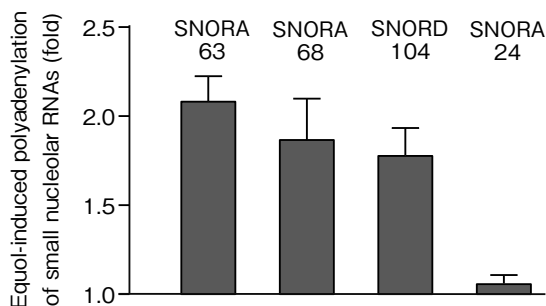


Fig. 1. Effect of equol on polyadenylation of snoRNAs in HeLa cells. HeLa cells were treated with 10 μ M of equol for 24 h. Total RNA was isolated from the cells and cDNA was generated with oligo dT primer. The expression levels of polyadenylated-SNORA63, SNORA68, SNORD104 and SNORA24 were assayed by quantitative PCR (qPCR). Data are represented as mean fold change ($\pm$ SD) relative to the vehicle-treated group. N=3.

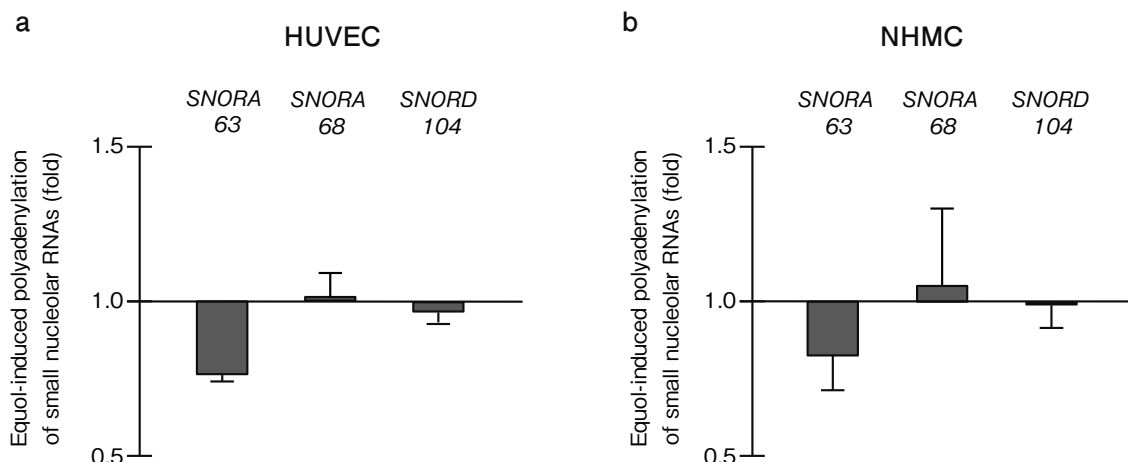


Fig. 2. Effect of equol on polyadenylation of snoRNAs in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and normal human epidermal melanocytes (NHEM). (a, b) HUVEC (a) and NHEM (b) were treated with 10 μ M of equol for 24 h. Total RNA was isolated from the cells and cDNA was generated with oligo dT primer. The expression levels of polyadenylated-SNORA63, SNORA68 and SNORD104 were assayed by quantitative PCR (qPCR). Data are represented as mean fold change ($\pm$ SD) relative to the vehicle-treated group. N=3.

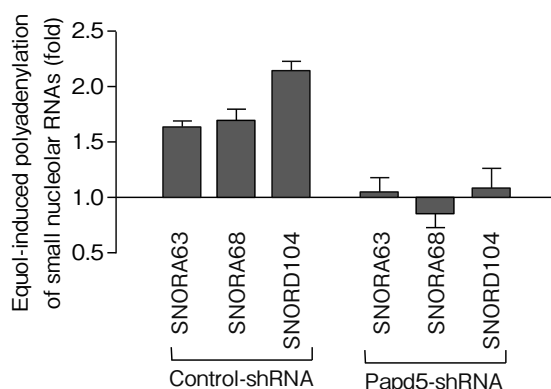


Fig. 3. Involvement of Papd5 in the promoting effect of equol on snoRNAs polyadenylation. HeLa cells expressing scramble-shRNA or Papd5-shRNA were treated with equol for 24 h. The expression levels of polyadenylated-SNORA63, SNORA68 and SNORD104 were assayed by qPCR. Data are represented as mean fold change ($\pm$ SD) relative to the vehicle-treated group. N=3.

り、核小体低分子RNAが腫瘍の成長に関与することが示唆されている^{5, 6)}。そこで、エクオールがポリアデニル化を誘導する核小体低分子RNAのがん細胞増殖における役割ならびにエクオールのがん細胞増殖抑制作用における関与について検討した。HeLa細胞に核小体低分子RNAを過剰発現させたところ、細胞増殖がわずかに阻害された (Fig. 4a)。その作用強度はエクオールの細胞増殖抑制作用の強度よりも弱いものであった。また、エクオールの細胞増殖抑制作用は核小体低分子RNAの過剰発現の影響をほとんど受けなかった (Fig. 4b)。以上より、検討したSNORA63, SNORA68およびSNORD104の各核小体低分子RNAはエクオールによりポリアデニル化が誘導されるが、エクオールの細胞増殖抑制作用の活性を担う分子ではないことが示唆された。

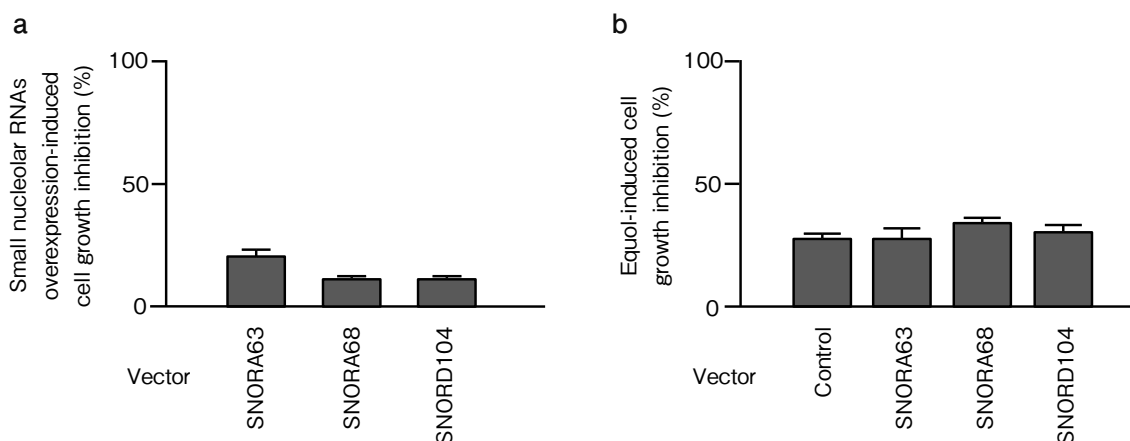


Fig. 4. Effect of overexpression of snoRNAs on the growth of HeLa cells and on the growth inhibitory effect of equol. (a) The expression vectors of SNORA63, SNORA68 and SNORD104 were transfected into HeLa cells and cell number was counted 96 h after the transfection. Data are represented as mean percent change ($\pm$ SD) relative to the control vector-transfected group. N=3. (b) The expression vectors of SNORA63, SNORA68 and SNORD104 were transfected into HeLa cells and the cells were treated with equol for 72 h, and then cell number was counted. Data are represented as mean percent change ($\pm$ SD) relative to the vehicle-treated group. N=3.

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、核小体低分子RNAをポリアデニル化するnon-canonical poly(A) polymeraseとして知られるPapd5の機能に及ぼすイソフラボンの影響について検討した。エクオールが細胞増殖抑制作用を示すヒト子宮頸がん細胞HeLaにおいて、エクオールはPapd5依存的に核小体低分子RNAのポリアデニル化を促進したことから、エクオールはHeLa細胞においてPapd5を活性化することが示された。一方、エクオールがポリアデニル化を誘導する核小体低分子RNAを過剰発現させてもHeLa細胞の増殖およびエクオールの細胞増殖抑制作用に大きな変化は認められなかったことから、エクオールのがん細胞増殖抑制作用には他のメカニズムの関与が示唆された。

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 β . *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 ϵ RI high-affinity immunoglobulin E receptor independent of the estrogen receptor. *J Agric Food Chem*, **60**, 8379-8385.
- 4) 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.
- 5) Dong XY, Rodriguez C, Guo P, Sun X, Talbot JT, Zhou W, Petros J, Li Q, Vessella RL, Kibel AS, Calle EE and Dong JT (2008): SnoRNA U50 is a candidate tumor-suppressor gene at 6q14.3 with a mutation associated with clinically significant prostate cancer. *Hum Mol Genet*, **17**, 1031-1042.
- 6) Dong XY, Guo P, Boyd J, Sun X, Li Q, Zhou W and Dong JT (2009): Implication of snoRNA U50 in human breast cancer. *J Genet Genomics*, **36**, 447-454.