

大豆イソフラボンのシクロオキシゲナーゼ活性調節作用に関する研究

川上祐生*・高橋吉孝

岡山県立大学保健福祉学部

Effect of Soy Isoflavones on Cyclooxygenase Activity

Yuki KAWAKAMI and Yoshitaka TAKAHASHI

Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, Soja 719-1197

ABSTRACT

Cyclooxygenase (COX) is the key enzyme responsible for the production of prostaglandin and thromboxane, which play important roles in inflammation and carcinogenesis. Because soy isoflavones are known to have a variety of beneficial effects on our body including the antioxidative activity, we investigated whether soy isoflavones inhibited the catalytic activity of the two COX isoforms using linoleic acid as an alternative substrate. Genistein dose-dependently inhibited the COX activity of human COX-1 and COX-2 as assessed by conversion of linoleic acid to 9- and 13-hydroxyoctadecadienoic acids. The IC_{50} values for COX-1 and COX-2 were 28 and 110 μ M, respectively. The Lineweaver-Burk plot analysis of the apparent initial velocity as measured by 30-s reaction of purified ovine COX-1 with linoleic acid in the presence of various concentrations of genistein suggested that the inhibition of the enzyme by genistein was apparently noncompetitive. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 182-186, 2010.

Key words : Cyclooxygenase; Soy isoflavone; Enzyme activity

脂質代謝酵素の1つであるシクロオキシゲナーゼ (COX) は、栄養学的に重要な脂肪酸であるアラキドン酸からプロスタグランジン (PG) などの脂質メディエーターの産生を触媒する酵素である。COXはアラキドン酸に2分子の酸素を付加して PGG_2 を産生するシクロオキシゲナーゼ活性と PGG_2 を PGH_2 に還元するPGヒドロペルオキシダーゼ活性の2つの反応を触媒

する¹⁾。 PGH_2 は臓器特異的な酵素により PGD_2 や PGE_2 などの種々のPG類へ変換され、様々な生体機能を發揮する。COXにはCOX-1とCOX-2の2つのアイソザイムが存在し、COX-1はほとんどの細胞に恒常的に発現している構成型酵素であり、COX-2は炎症部位やがん組織において誘導される酵素である^{2,3)}。COX-1は血小板凝集に必須であり、生理機能維持に必要なPGを産生し、COX-2は炎症やがんなどの病態を増悪化するメディエーターとしてPGを産生していると考えられて

*〒719-1197 総社市窪木111

きた⁴⁾。しかしながら、近年、COX-1およびCOX-2を欠損させたマウスやアインザイム特異的阻害剤を用いた研究より、COX-1とCOX-2の両者が炎症やがんに関わることが明らかになってきた⁴⁾。そのため、これらのCOXを制御することで、炎症やがんの増悪化の予防が期待される。

大豆および大豆に含まれる種々の成分の生理機能、とくに健康維持あるいは増進に貢献する作用は多岐にわたり、多くの生理活性が明らかにされている。フラボノイドであるイソフラボン類の有効機能に関する研究は多く、とくに骨代謝との関係やエストロゲン様作用などが注目されてきた⁵⁾。イソフラボン類のようなフラボノイドは、COXの発現を抑制することでPGの産生を減少させることが報告されている⁶⁻⁸⁾。しかしながら、フラボノイドがCOXの酵素活性に対する直接的影響についてはほとんど研究されていない。我々は、日本の伝統的食品である大豆食品に多く含まれているイソフラボン類に着目し、COX活性に対する大豆イソフラボン類の効果を明らかにしようとした。

方 法

細胞培養

安定かつ強力に発現誘導できるエロンゲーションファクター1 α (EF-1 α)のプロモーターをもつpEF-BOSプラスミドのSapIサイトにネオマイシン耐性遺伝子を導入し、XbaIサイトにヒトCOX-1あるいはヒトCOX-2のcDNAを組み込んだ発現プラスミドpBOSNeoCOX1とpBOSNeoCOX2を構築した⁹⁾。アラキドン酸代謝酵素を持たないヒト大腸がん細胞COLO320DMにこれらの発現プラスミドをリポフェクタミン (Invitrogen社)によりトランスフェクションした。1.5 mg/mLのジェネティシンでCOX発現細胞をセレクションし、COXを過剰に発現した安定形質発現COLO320DM細胞を得た。COLO320DMは、10%のウシ胎仔血清と100 U/mLのペニシリン、100 μ g/mLのストレプトマイシンを含むRPMI1640培地を基本培地として、5%CO₂存在下で、37°C、100%水蒸気中で培養した。継代はトリプシン溶液を用いて行った。

シクロオキシゲナーゼ活性の測定

COX活性は、基質としてリノール酸を用い、生成物を逆相HPLCで分離し、235 nmの吸収を連続的にスキニングする方法で測定した¹⁰⁾。ヒトCOX-1およびヒトCOX-2は、COXを過剰発現させたCOLO320DM細胞から調製した。COLO320DM細胞は1 mM EDTAを含む50 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で超音波破碎し

た。150,000 xgで1時間遠心分離することにより膜画分を回収し、ポッター型ホモジナイザーを使って、1 mM EDTAを含む50 mM Tris-HCl (pH7.4) で再懸濁した。ヒトCOX-1とヒトCOX-2は1% Tween20で可溶化し、この可溶化酵素を用いてCOX活性を測定した。この酵素標品を2 μ M のヘマチンと5 mMのトリプトファンを含む100 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で、種々の濃度のイソフラボン存在下で24°Cで5分間プレインキュベーションさせた。その後、基質として25 μ Mのリノール酸を加えて24°Cで5分間反応させた。塩酸でpH2-3とし、内部標準として0.5 nmolの15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (15-HETE) を加えた。冷却したジエチルエーテルで脂質を抽出し、抽出物を逆相HPLCで分析した。HPLC条件は以下の通りである。移動相：メタノール/水/酢酸=80/20/0.01 (v/v)、カラム：COSMOSIL PACKED 5C18-MS-II (4.6×250 mm, 粒子サイズ5 μ m, ナカライテスク社)、流速：1 mL/min, 検出器：UV235 nm。生成物である9-HODEと13-HODEは逆相HPLC分析では単一のピークとして検出できるため、内部標準である15-HETEのピーク面積との比較から酵素活性を測定した。

阻害様式

阻害様式を調べるために、100 mM Tris-HCl, 2 μ M ヘマチン, 5 mM トリプトファンを含む混合液に40 unitの精製ヒツジCOX-1標品を加えて、25, 50 μ Mのゲニステイン存在下あるいは非存在下で、24°Cで5分間プレインキュベーションを行った後、各種濃度(1-100 μ M)のリノール酸を添加して、24°Cで30秒間反応させた。内部標準として0.1 nmolの15-HETEを加え、COX活性測定と同様にして逆相HPLCにて分析した。内部標準として添加した15-HETEの面積との比較から酵素反応生成物であるHODEを定量し、酵素活性を求め、Lineweaver-Burk plotを行った。

結果と考察

COXはアラキドン酸に2分子の酸素を添加しPGG₂を産生する反応と、生成したPGG₂を還元してPGH₂を合成する反応の2つを触媒する酵素である¹⁾。同様にCOXはリノール酸を基質として9-および13-HODEを産生する。COX活性を測定するにあたり、アラキドン酸を基質とした場合、生成するPGH₂は極めて不安定であり、紫外部に吸収を持たないために検出が困難である。そこで我々は簡便にCOX活性を測定するために、リノール酸を基質として紫外部に吸収を持ち、比較的安定な9-HODEと13-HODEを検出する方法で

COX活性を測定した¹⁰。まず、イソフラボン配糖体であるゲニステインとダイゼインについてCOX活性に対する影響を調べた。その結果、ゲニステインとダイゼインはCOX-1とCOX-2のどちらに対しても阻害作用は示さなかった (Fig. 1)。次にこれらのアグリコンであるゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインとダイゼインの代謝物であるエクオールについてCOX活性に対する影響を調べた。ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン、エクオールはいずれもCOX-1活性を濃度依存的に阻害した (Fig. 2)。このときのIC₅₀は、ゲニステインが28 μMと最も低く、ついでエクオールが112 μM、ダイゼインが115 μM、グリシテインが167 μMであった。一方COX-2活性では、ダイゼインとグリシテインは今回調べた濃度では影響が認められなかったが、ゲニステインとエクオールは濃度依存的にCOX-2活性を

阻害した。このときのIC₅₀は、ゲニステインが110 μM、エクオールが210 μMであった。イソフラボン類のCOX活性への影響を調べると、配糖体ではなく、アグリコンにCOX活性の阻害作用が認められた。このことから、糖が結合しているアグリコンの7位のヒドロキシル基がCOX活性の阻害に重要であることが考えられた。また、ゲニステインはダイゼインやグリシテインよりも5位にヒドロキシル基が1つ多く、これがCOX活性の阻害に寄与している可能性が示唆された。

今回調べたイソフラボン類の中で最も強くCOX阻害活性を示したゲニステインによる阻害様式を調べるため、精製ヒツジCOX-1を各濃度のリノール酸をゲニステイン存在下もしくは非存在下で反応させ、Lineweaver-Burk plotを行った。Fig. 3に示すように、3つの直線はX軸上で交差し、ゲニステインはCOXを

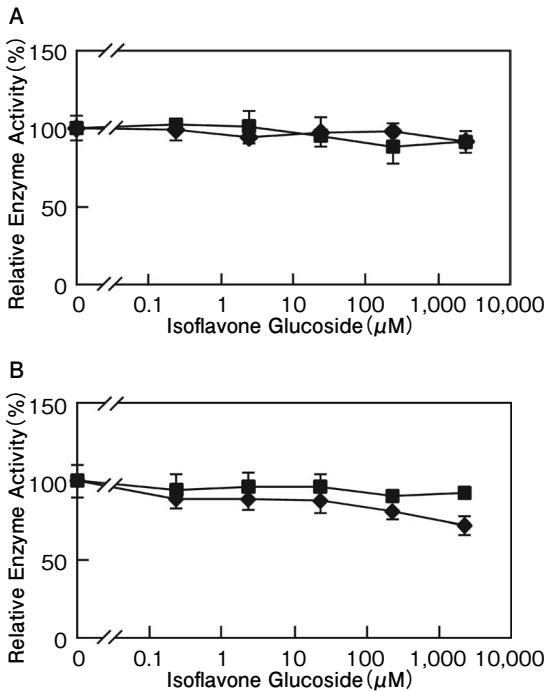


Fig. 1. Inhibition of the cyclooxygenase activity by isoflavone glucoside. Human COX-1 (A) and COX-2 (B) were incubated with 2 μM linoleic acid at 24°C for 5 min in the standard reaction mixture in the presence of genistein (closed lozenges) and daidzein (closed squares) at various concentrations and the products were quantified using reverse-phase HPLC. The data represent means ±SD of three separate experiments.

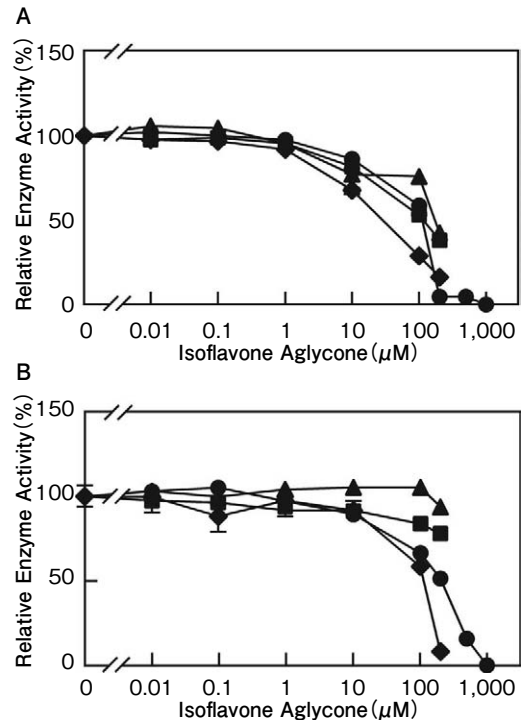


Fig. 2. Inhibition of the cyclooxygenase activity by isoflavone aglycone. Human COX-1 (A) and COX-2 (B) were incubated with 25 μM linoleic acid at 24°C for 5 min in the standard reaction mixture in the presence of genistein (closed lozenges), daidzein (closed squares), glycitein (closed triangles) and equol (closed circles) at various concentrations and the products were quantified using reverse-phase HPLC. The data represent means ±SD of three separate experiments.

非競合阻害することが示された。

以上のことから、イソフラボン類の中で、ゲニステインに比較的強いCOX活性阻害作用を確認し、非競合阻害であることが示された。ゲニステインは、COX阻害を介して炎症やがんの予防、あるいは改善することが期待される。

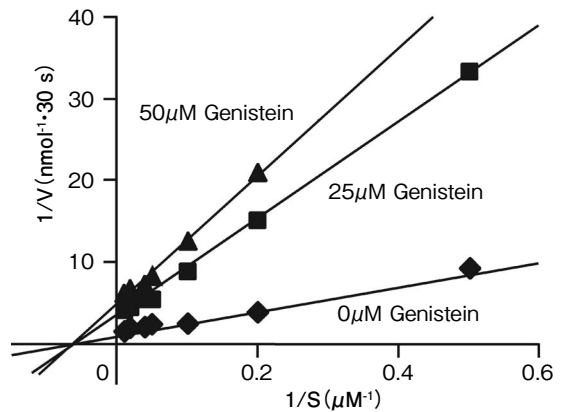


Fig. 3. Kinetic analysis of cyclooxygenase inhibition. The purified ovine COX-1 was incubated with various concentrations of linoleic acid at 24°C for 30 s in the standard reaction mixture in the absence or presence of indicated concentrations of genistein. A double reciprocal plot of the rate of HODE production (nmol/30 s) versus the substrate concentration (μM) is shown.

要 約

大豆に高含されているイソフラボンに着目し、炎症やがんなどの増悪化に関与するプロスタグランジンの生成に必要なシクロオキシゲナーゼ (COX) 活性への影響を検討した。ヒトCOX-1あるいはヒトCOX-2を過剰発現させたヒト大腸がん細胞COLO320DMから可溶性酵素標品を調製し、種々の濃度のイソフラボン存在下でリノール酸を基質として反応させ、生成したヒドロキシリノール酸を逆相HPLCで分離し、235 nmの吸光度を追跡する方法でCOX活性を測定した。ゲニステインは濃度依存的にヒトCOX-1とCOX-2の活性を阻害し、その IC_{50} は、COX-1で28 μM 、COX-2で110 μM であった。また、ゲニステインによるCOXの阻害は非競合阻害であることが示された。以上のことより、ゲニステインはCOX活性阻害を介して炎症やがんの予防、あるいは改善することが期待される。

文 献

- 1) Smith WL and Marnett LJ (1991): Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* **1083**, 1-17.
- 2) Smith WL, Garavito RM and DeWitt DL (1996): Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**, 33157-33160.
- 3) Vane JR, Bakhle YS and Botting RM (1998): Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 97-120.
- 4) Smith WL and Langenbach R (2001): Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* **107**, 1491-1495.
- 5) Setchell KD and Lydeking-Olsen E (2003): Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* **78**, 593S-609S.
- 6) Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M and Di Carlo R (2001): Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci* **68**, 921-931.
- 7) Hermenegildo C, Oviedo PJ, Garcia-Perez

- MA, Tarin JJ and Cano A (2005): Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 722-728.
- 8) Lau TY and Leung LK (2006): Soya isoflavones suppress phorbol 12-myristate 13-acetate-induced COX-2 expression in MCF-7 cells. *Br J Nutr* **96**, 169-176.
- 9) Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T and Yoshimoto T (1999): Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1438**, 120-130.
- 10) Kawakami Y, Nakamura T, Hosokawa T, Suzuki-Yamamoto T, Yamashita H, Kimoto M, Tsuji H, Yoshida H, Hada T and Takahashi Y (2009): Antiproliferative activity of guava leaf extract via inhibition of prostaglandin endoperoxide H synthase isoforms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **80**, 239-245.