

信州大学審査学位論文

*SHARP-2* 遺伝子を指標とした大豆イソフラボンの  
遺伝子発現調節

平成24年9月

羽石歩美

## 目次

要旨 .....	1
序論 .....	4
材料と方法	
1. 材料 .....	7
2. 細胞および細胞培養 .....	8
3. Total RNA の調製とリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) .....	9
4. アデノウイルスの調製 .....	9
5. ウェスタンブロット解析 .....	9
6. プラスミドの作製 .....	10
7. トランスフェクションとリポーター活性の測定 .....	11
8. 統計処理 .....	12
結果	
1. <i>SHARP-2</i> 遺伝子発現を誘導する大豆イソフラボンのスクリーニング ..	13
2. ゲニステインによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子発現の解析 .....	13
3. ゲニステインによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経 路の解析 .....	16
4. ゲニステインによる PKC $\alpha$ の活性化 .....	18
5. ゲニステインによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子発現誘導へのエストロゲン受容体 の関与 .....	18
6. ゲニステインによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子の転写調節機構の解析 .....	20
7. ゲニステインによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子の転写応答領域の解析 .....	20
8. (S)-エクオールによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子発現の解析 .....	22

9. (S)-エクオールによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路の同定 .....	22
10. (S)-エクオールによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子発現誘導におけるドミナントネガティブ変異型 aPKC $\lambda$ の影響 .....	25
11. (S)-エクオールによる PKC $\alpha$ および aPKC $\lambda$ の活性化 .....	28
12. (S)-エクオールによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子発現誘導へのエストロゲン受容体の関与 .....	28
13. (S)-エクオールによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子の転写調節機構の解析 .....	30
14. (S)-エクオールによる <i>SHARP-2</i> 遺伝子の転写応答領域の同定 .....	30
考察 .....	35
まとめ .....	43
文献 .....	44
謝辞 .....	50

## 要旨

糖尿病患者およびその予備軍の増加は、世界的に深刻な問題となっている。2011年には世界で約3.7億人が糖尿病患者であり、2030年にはその数は約5.5億人に達すると推定されている。したがって、インスリン受容体およびインスリンシグナル伝達経路を刺激できる低分子化合物の研究は、糖尿病、特に2型（インスリン非依存型）糖尿病の予防や治療に有効であると思われる。本研究は、インスリン誘導性転写因子 *enhancer of split- and hairy-related protein-2* (SHARP-2) をマーカーとし、糖尿病の予防と治療に有用な食品成分の検索と、その作用メカニズムの解析を行ったものである。

SHARP-2 は、*basic helix-loop-helix* 型転写因子であり、多くの遺伝子の転写制御領域に存在する E box 配列 (5'-CANNTG-3') に結合して転写を制御する。山田らは、高炭水化物食摂食後に分泌されたインスリンにより、ラット肝で誘導される転写因子遺伝子として SHARP-2 を同定した。SHARP-2 を初代培養肝細胞およびインスリン応答性のラット高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞で過剰発現すると、インスリンにより転写が抑制される糖新生系酵素の *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)* 遺伝子のプロモーター活性が低下し、*PEPCK* 遺伝子の発現が抑制される。したがって、SHARP-2 がインスリンによる血糖低下に関与する転写因子の一つであると考えている。

インスリン以外の物質で SHARP-2 遺伝子の発現を促進することができれば、インスリン抵抗性や糖尿病などの病態を改善しうる可能性が示唆される。そこで、本研究は大豆に含まれるポリフェノールの一種である大豆イソフラボンに注目した。初めに、SHARP-2 を誘導する非配糖体大豆イソフラボンのスクリーニングを行ったところ、ゲニステインが最も SHARP-2 mRNA を誘導すること、この誘導はインスリンによる SHARP-2 mRNA の誘導と同様、非常に早期で一

過性に生じることを明らかにした。

次に、シグナル伝達経路を解析したところ、classical protein kinase C (cPKC) 経路を介すること、および cPKC のアイソフォームである PKC $\alpha$  がゲニステインにより早期に一過性に活性化されることが明らかとなった。また、ゲニステインによる *SHARP-2* 遺伝子発現の誘導は転写レベルで生じ、誘導には新規のタンパク質合成を必要とする可能性が示唆されたため、*SHARP-2* 遺伝子のゲニステイン応答性 *cis-acting element* の同定を試みた。しかし、*SHARP-2* 遺伝子転写開始点上流 3.7 kb までにはゲニステインにตอบสนองして転写が促進される領域は認められなかった。

非配糖体大豆イソフラボンであるダイゼインは、腸内細菌により (S)-エクオールに代謝される。興味深いことに、H4IIE 細胞を (S)-エクオールで処理することにより濃度依存的に *SHARP-2* 遺伝子の発現が誘導され、(S)-エクオール処理後 2 時間目とインスリンやゲニステイン処理と同様非常に早期にピークを迎えることが明らかとなった。

シグナル伝達経路の解析の結果、(S)-エクオールによる *SHARP-2* mRNA の誘導には、インスリンによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路と同様の phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 経路と、ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路と同様の cPKC 経路が重要であることを明らかにした。また、(S)-エクオールにより PI3K 下流の atypical PKC (aPKC)  $\lambda$  と cPKC $\alpha$  が早期に活性化されることを明らかにした。(S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子発現の誘導は転写レベルで生じ、誘導には新規のタンパク質合成を必要とする可能性が示唆されたため、*SHARP-2* 遺伝子の転写開始点上流の (S)-エクオール応答性 *cis-acting element* の同定を試みた。その結果、-4687~-4133 の塩基配列を介して (S)-エクオールがラット *SHARP-2* 遺伝子のプロモーター活性を促進するこ

とが明らかとなった。

本研究により、ゲニステインは少なくとも cPKC $\alpha$  活性化を介して何らかの転写因子の転写を促進し、転写レベルで *SHARP-2* 遺伝子の発現を誘導すること、一方、(S)-エクオールは PI3K とその下流の aPKC $\lambda$  を介する経路と、cPKC $\alpha$  を介する経路の少なくとも 2 種類の経路を介して、何らかの転写因子の転写を促進し、ラット *SHARP-2* 遺伝子の -4687~-4133 の塩基配列を介して転写を促進することが明らかとなった。

以上の結果より、ゲニステインと (S)-エクオールは 強力な *SHARP-2* 遺伝子発現の誘導物質であり、2 型糖尿病の予防・治療に有用となる可能性が示唆される。

## 序論

糖尿病患者とその予備軍の増加は、世界中で深刻な問題となっている。平成19年の国民健康・栄養調査では、約2,210万人が糖尿病患者およびその予備軍であり、2011年には世界で約3.7億人が糖尿病を発症していた。そして、2030年には5.5億人に達すると予想されている [1]。糖尿病は、1型糖尿病（インスリン依存型糖尿病）と、2型糖尿病（インスリン非依存型糖尿病）に大別される。1型糖尿病は、膵β細胞の破壊等によりインスリンを産生出来ないのが特徴であり、2型糖尿病は、インスリン分泌量の低下やインスリン抵抗性が特徴である [2, 3]。日本人の糖尿病のうち、少なくとも95%が2型糖尿病である [1]。糖尿病は一般的に発症すると完治せず、1型糖尿病にはインスリンの投与、2型糖尿病においては投薬、運動、食事管理による血糖コントロールが生涯必要となる。また、糖尿病は血糖コントロールの不良により網膜症、腎症、神経障害等の合併症を併発することもある [4, 5]。血糖上昇ホルモンは、グルカゴン、アドレナリン、グルココルチコイド等数種類存在するが、主要な血糖降下ホルモンはインスリンのみである。したがって、インスリン受容体およびインスリンシグナル伝達経路を刺激できる低分子化合物の研究は、糖尿病、特に2型糖尿病の予防や治療に有効であると考えられる。

本研究では、インスリン誘導性転写因子 enhancer of split- and hairy-related protein-2 (SHARP-2) をマーカーとし、糖尿病の予防と治療に有用な食品成分の検索と、その作用メカニズムの解析を行ったものである。

SHARP-2 (DEC1、Stra13、BHLHB2、BHLHE40 ともいう) は、basic helix-loop-helix 型の転写抑制因子であり、普遍的に発現している [6]。SHARP-2 は、多くの遺伝子の転写制御領域に存在する E box 配列 (5'-CANNTG-3') に結合して転写を制御する [6]。また、視交叉上核では概日リズムを調節する時計

遺伝子の一つとして機能することが報告されているが、Yamada らは高炭水化物食摂食後に分泌されたインスリンにより、ラット肝で誘導される転写因子として SHARP-2 を同定した [7, 8]。SHARP-2 を初代培養肝細胞およびインスリン応答性のラット高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞で過剰発現すると、インスリンにより転写が抑制される糖新生系酵素の *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)* 遺伝子のプロモーター活性が低下し、*PEPCK* 遺伝子の発現が抑制される [9]。したがって、SHARP-2 がインスリンによる血糖低下に関与する転写因子の一つであると考えている。

抗糖尿病や血糖降下作用が報告されている緑茶カテキンの一種である (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) が、インスリンによる SHARP-2 mRNA の誘導と同様、早期に一過性に SHARP-2 mRNA を誘導することが報告されている [9-14]。したがって、EGCG のように、インスリン以外の物質で *SHARP-2* 遺伝子の発現を促進することができれば、インスリン抵抗性や2型糖尿病などの病態を改善しうる可能性が示唆される。

本研究では、大豆に含まれるポリフェノールの一種であり、健康との関わりで注目されている大豆イソフラボンに注目した。大豆イソフラボンを含む食餌を摂食させた糖尿病 KKAY マウスでは、インスリン感受性が増加し、空腹時の血漿グルコース値、インスリン値、トリグリセリド値、コレステロール値が低下する [15]。さらに、ストレプトゾトシン誘導性糖尿病ラットではグルコース値が低下し、高密度リポタンパク質-コレステロール値が増加することが報告されている [16]。大豆イソフラボンには、非配糖体、配糖体、配糖体のアセチル化体、配糖体のマロニル化体が合計 12 種類存在する [17, 18]。大豆中では、マロニルグルコシド型のイソフラボンが多いが、発酵食品では発酵菌から分泌される  $\beta$ -グルコシダーゼによりグリコシド結合が切断されるため、非配糖体が多



くなる [18-20]。摂食された配糖体の大豆イソフラボンは、唾液や腸内の酵素によるグリコシド結合の切断後、吸収され血中に移行する [17, 21, 22]。

本研究は、*SHARP-2* 遺伝子の発現を誘導することができる大豆イソフラボンのスクリーニングと、構造機能相関ならびにその作用メカニズムの解析を行うことを目的とした。

## 材料と方法

### 1. 材料

牛胎児血清、LY294002、Horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG ウサギ抗体は Sigma Aldrich (Saint Louis, U.S.A.) から、ストレプトマイシンとペニシリン G は Meijiseika (Tokyo, Japan) から、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、L-グルタミンとフェノールレットを含まない DMEM (high glucose)、dimethyl sulfoxide (DMSO)、6'-*O*-マロニルゲニスチン、6'-*O*-アセチルゲニスチンは Wako (Osaka, Japan) から、ゲニスチン、ダイゼイン、グリシチン、ゲニスチンは Fujicco (Kobe, Japan) から、(S)-エクオールは Cayman Chemical Company (Ann Arbor, U.S.A.) から、Compound-C、rapamycin、staurosporin、PD98059、JNK inhibitor II、okadaic acid、actinomycin D、cycloheximide、ICI182,780、phorbol-12-myristate-13-acetate は Merck chemicals (Darmstadt, Germany) から、TRIzol reagent、Lipofectamine、Plus reagent は Invitrogen (Groningen, the Netherlands) から、High capacity RNA-to-cDNA kit と Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit は Applied Biosystems (Foster City, U.S.A.) から、FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) と Genopure Plasmid Maxi Kit は Roche Diagnostics (Indianapolis, U.S.A.) から、Adeno-X rapid titer kit とラットゲノム DNA は Clontech (Palo Alto, U.S.A.) から、Bio-Rad Protein Assay は Bio-Rad Laboratories (Hercules, U.S.A.) から、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜と Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate は MILLIPORE (Bedford, U.S.A.) から、抗ラット PKC $\alpha$  (C-20) ウサギ抗体 (SC-208) と抗ラット p-PKC $\alpha$  (Ser 657) ウサギ抗体 (SC-12356-R)、は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, U.S.A.) から、抗ラット PKC $\lambda$  マウス抗体 (610207) は BD Biosciences (San Jose, U.S.A.) から、抗ラット p-PKC $\zeta/\lambda$  (Thr 410/403) ウサギ抗体 (9378S) は Cell

Signaling Technology (Danvers, U.S.A.) から、Horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体は BIOSOURCE (Camarillo, U.S.A.) から、Hyperfilm ECL は GE Healthcare (Buckinghamshire, U.K.) から、pGL4.20、pGL4.11、pGL4.13、phRLuc-CMV、Dual-Luciferase Reporter Assay System は Promega (Madison, U.S.A.) から購入した。

## 2. 細胞および細胞培養

高分化型肝癌細胞株であるラット H4IIE 細胞は、Dr. Daryl K. Granner (Vanderbilt University, U.S.A.) から分与された。ラット MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub> 細胞は、American Type Culture Collection から購入した。これらの細胞を、5 % CO<sub>2</sub> を含むインキュベーター内で 10 % 牛胎児血清と 100 µg/ml ストレプトマイシン、100 units/ml ペニシリン G を含む DMEM で培養した。1 x 10<sup>6</sup> 個の細胞を径 6 cm のディッシュにて 24 時間培養後、血清とフェノールレッドを含まない DMEM で 2 回洗浄し、同無血清培地にてさらに培養した。翌日、同無血清培地を交換し 2 時間後、さまざまな濃度や時間の大豆イソフラボン処理を行った。シグナル伝達経路の解析のためには、H4IIE 細胞を各種経路の阻害剤で予め一定時間処理を行った後、ゲニステインあるいは (S)-エクオールで 2 時間処理を行った。ゲニステインのシグナル伝達経路の解析には、阻害剤として、LY294002 (50 µM)、compound-C (1 µM)、rapamycin (0.1 µM)、staurosporin (0.2 µM)、PD98059 (25 µM)、JNK inhibitor II (10 µM)、okadaic acid (10 nM)、actinomycin D (0.8 µM)、cycloheximide (5 µM) を、(S)-エクオールのシグナル伝達経路の解析には、LY294002 (50 µM)、compound-C (1 µM)、rapamycin (0.1 µM)、staurosporin (0.2 µM)、okadaic acid (10 nM)、cycloheximide (10 µM)、actinomycin D (0.8 µM) を用いた。エストロゲン受容体との関連性の解析のためには、ICI182,780 (0.1 µM) を用い

た。

### 3. Total RNA の調製とリアルタイム polymerase chain reaction (PCR)

様々な処理を行った細胞から TRIzol reagent を用いて total RNA を調製し、cDNA は total RNA 1 µg から High capacity RNA-to-cDNA kit を用いて合成した。リアルタイム PCR は ABI PRISM 7300 にて、cDNA、各種プライマーおよび FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) を用いて行った。SHARP-2 mRNA 量測定用のプライマーには 5'-GCGTCAGCACAATTAAGCAAGA-3' と 5'-GGGTGAGGCCCAAGAAATG-3' を、内在性対照遺伝子としての 36B4 mRNA 量測定用のプライマーには、5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3' と 5'-GGATCTGCTGCATCTGCTTG-3' を用いた。SHARP-2 mRNA の発現量は、36B4 mRNA 量との比で補正することにより算出した。

### 4. アデノウイルスの調製

緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するアデノウイルス (Ad-GFP) およびドミナントネガティブ変異型 atypical protein kinase C (aPKC)λ を発現するアデノウイルス (Ad-dn-aPKCλ) は、それぞれ宮崎純一博士 (大阪大学) と小川渉博士 (神戸大学) から分与された [23, 24]。アデノウイルスは超遠心分離後、リン酸塩緩衝液に対して透析を行った [25]。アデノウイルスの力価は Adeno-X rapid titer kit を用いて測定し、それぞれ感染倍率 50 で H4IIE 細胞に 24 時間感染させた。無血清培地で洗浄後、同無血清培地にてさらに 2 時間培養し、(S)-エクオールで 2 時間処理した。

### 5. ウェスタンブロット解析

100  $\mu$ M ゲニステインあるいは (S)-エクオール処理を行った H4IIE 細胞を、12.5 mM Tris-HCl pH 6.8、2 % glycerol、1 % 2-mercaptoethanol、0.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS) で溶解し、全細胞溶解液を調製した。タンパク質定量は Bio-Rad Protein Assay を用いて行った。PKC $\alpha$  の解析には 20  $\mu$ g の全細胞溶解液を、 $\alpha$ PKC $\lambda$  の解析には 50  $\mu$ g の全細胞溶解液を 10 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて展開後、セミドライブロットティング法によりタンパク質を PVDF 膜に転写した。一次抗体として抗ラット PKC $\alpha$  (C-20) ウサギ抗体 (SC-208)、抗ラット p-PKC $\alpha$  (Ser 657) ウサギ抗体 (SC-12356-R)、抗ラット PKC $\lambda$  マウス抗体 (610207) あるいは抗ラット p-PKC $\lambda$  ウサギ抗体を、二次抗体として horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体あるいは horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG ウサギ抗体を用いた。発色は Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate を用いて行い、Hyperfilm ECL に露光した。

## 6. プラスミドの作製

pGL4SHARP-2/Luc3700 プラスミドは、ラット *SHARP-2* 遺伝子の -3699~+265 の塩基配列をもつ 3.7 kb *Nhe* I 断片を pGL4.20 の *Nhe* I 部位に挿入することにより作製した。pSHARP-2/Luc160 は、ラット *SHARP-2* 遺伝子の -160~+110 の塩基配列を有する [26]。pGL4SHARP-2/Luc160 プラスミドは、pSHARP-2/Luc160 の約 200 bp の *Kpn* I/*Hind* III 断片を pGL4.11 の *Kpn* I/*Hind* III 部位に挿入し、サブクローンすることにより作製した。

*SHARP-2* 遺伝子の -3700 より上流の塩基配列 (-4192~-3690、-4687~-4133、-5187~-4628) を有するルシフェラーゼプラスミドを作製するために、ラットゲノム DNA を鋳型として用い、PCR を行った。PCR にはそれぞれ

5'-CCGGGCTAGCCATCATGCTTACTTTTTTAAAAAATTA-3' と

5'-CCGGGCTAGCTAGTGCTAGCCCATTTTCATATAACAC-3'、

5'-CCGGGCTAGCCTCAGTTGTGATTAAACCAAGGG-3' と

5'-CCGGGCTAGCGAGTTCTAGCAGTACATAGGAAGAC-3'、

5'-CCGGGCTAGCTGTTGGGGGAAGTGTGCCGC-3' と

5'-CCGGGCTAGCGGTCAGTTGTTAGACTGCTTACCTA-3' を用いた。それぞれの

PCR 産物は *Nhe*I を用いて消化後、約 600 bp の *Nhe*I 断片を

pSHARP-2/Luc160 の *Nhe*I 部位に挿入してサブクローンし、それぞれ

pGL4SHARP-2/Luc160-A、pGL4SHARP-2/Luc160-B、pGL4SHARP-2/Luc160-C と

命名した。挿入した塩基配列は、DNA sequencer 310 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems) を用いて確認した。

## 7. トランスフェクションとリポーター活性の測定

トランスフェクションに用いた全てのプラスミドは、Genopure Plasmid Maxi

kit を用いて精製した。H4IIE 細胞へは、リン酸カルシウム法によりプラスミド

DNA をトランスフェクションした。10 µg のリポータープラスミド

(pGL4SHARP-2/Luc3700 あるいは SV40 のエンハンサー/プロモーターを含む

ルシフェラーゼリポータープラスミド pGL4.13) と、0.5 µg の phRLuc-CMV を

HEBS pH7.3 (42 mM 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid、276 mM

NaCl、10 mM KCl、3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、11 mM Detrose) および 0.2 M CaCl<sub>2</sub> に混合

することにより DNA・Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 複合体を形成させた。これらの複合体を

DMSO ショックにより H4IIE 細胞に一過性にトランスフェクションした [27]。

トランスフェクションした細胞は、血清とフェノールレッドを含まない DMEM

にて 24 時間培養後、100 µM ゲニステインあるいは (S)-エクオールが存在下、

非存在下でさらに一定時間培養した。

MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub> 細胞へのプラスミド DNA トランスフェクションは、lipofectamine PLUS reagent を用いて行った [28]。5 x 10<sup>4</sup> 個の MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub> 細胞を 24 ウェルプレートにて 24 時間培養し、300 ng のルシフェラーゼリポータープラスミド (pGL4SHARP-2/Luc3700 あるいは pGL4SHARP-2/Luc160-A あるいは pGL4SHARP-2/Luc160-B あるいは pGL4SHARP-2/Luc160-C) および 0.2 ng の phRLuc-CMV をそれぞれ一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション 3 時間後に血清とフェノールレッドを含まない DMEM に交換し、さらに 24 時間培養後、100 μM (S)-エクオールが存在下、非存在下でさらに 4 時間培養した。

これらの細胞のルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて測定し、プロモーター活性は、ホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性との比で算出した。

## 8. 統計処理

全ての実験は少なくとも 3 回以上行い、得られたデータは one-way ANOVA (一元配置分散分析) と、フィッシャーの LSD 多重比較法による統計処理を行うことにより、平均値と標準誤差を算出した。

## 結果

### 1. *SHARP-2* 遺伝子発現を誘導する大豆イソフラボンのスクリーニング

大豆イソフラボンには、非配糖体、配糖体、配糖体のアセチル化体、配糖体のマロニル化体が存在する (図 1A) [17, 18]。初めに、非配糖体の大豆イソフラボンが、インスリン誘導性転写因子である *SHARP-2* 遺伝子の発現を誘導できるかどうかを検討した。H4IIE 細胞を、100  $\mu$ M の非配糖体大豆イソフラボンであるゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインで 2 時間処理を行った。その結果、ゲニステインとグリシテインで *SHARP-2* mRNA 量が増加し、ゲニステインで最も *SHARP-2* mRNA が誘導された ( $P < 0.001$ ) (図 1B)。

次に、非配糖体大豆イソフラボンで *SHARP-2* mRNA の誘導倍率が最も高かったゲニステインに着目し、ゲニステインの様々な構造の違いにより *SHARP-2* mRNA の誘導に影響を及ぼすかどうかを検討した。100  $\mu$ M ゲニスチン (ゲニステインの配糖体)、マロニルゲニスチン (ゲニステインのマロニル化配糖体)、アセチルゲニスチン (ゲニステインのアセチル化配糖体)、ゲニステインで 2 時間処理を行った。その結果、図 1C に示したようにアセチルゲニスチンでも *SHARP-2* mRNA が誘導された ( $P < 0.001$ )。

### 2. ゲニステインによる *SHARP-2* 遺伝子発現の解析

ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA 量の変動を詳細に検討するために、H4IIE 細胞を 50、100、200  $\mu$ M のゲニステインで 2 時間処理を行った。その結果、*SHARP-2* mRNA 量は濃度依存的に増大することが明らかとなった (図 2A)。次に、100  $\mu$ M 濃度での経時的变化を検討したところ、*SHARP-2* mRNA 量は処理後 2 時間目と、インスリンと同様に非常に早期に一過性に *SHARP-2* mRNA を誘導することが明らかとなった (図 2B) [7]。



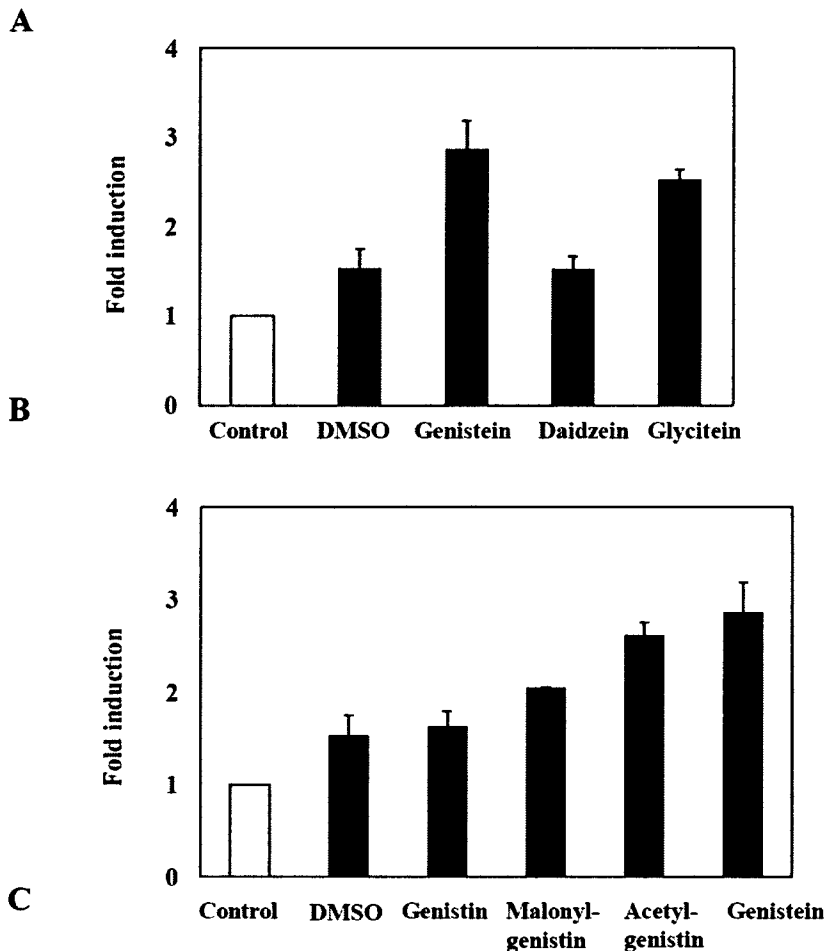
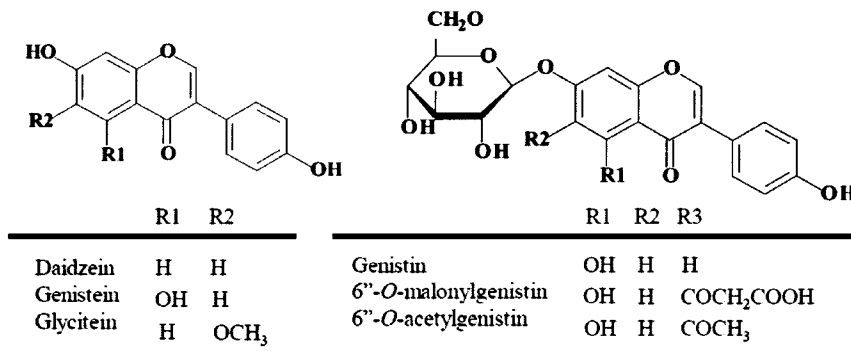


図1 大豆イソフラボンによる SHARP-2 mRNA の誘導

様々な処理を行った H4IIE 細胞から total RNA を調製した。これらの total RNA から逆転写反応を行い、SHARP-2 mRNA 量と 36B4 mRNA 量をリアルタイム PCR 法により測定した。36B4 mRNA 量に対する SHARP-2 mRNA 量の比を算出し、未処理の細胞の比を 1 とした。少なくとも 3 回の実験データの平均値と標準誤差を数値として示した。(A) 大豆イソフラボンの構造。(B) H4IIE 細胞を 100  $\mu$ M ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインで 2 時間処理した。(C) H4IIE 細胞を 100  $\mu$ M ゲニステイン、ゲニステインの配糖体、配糖体のマロニル化体、配糖体のアセチル化体で 2 時間処理した。

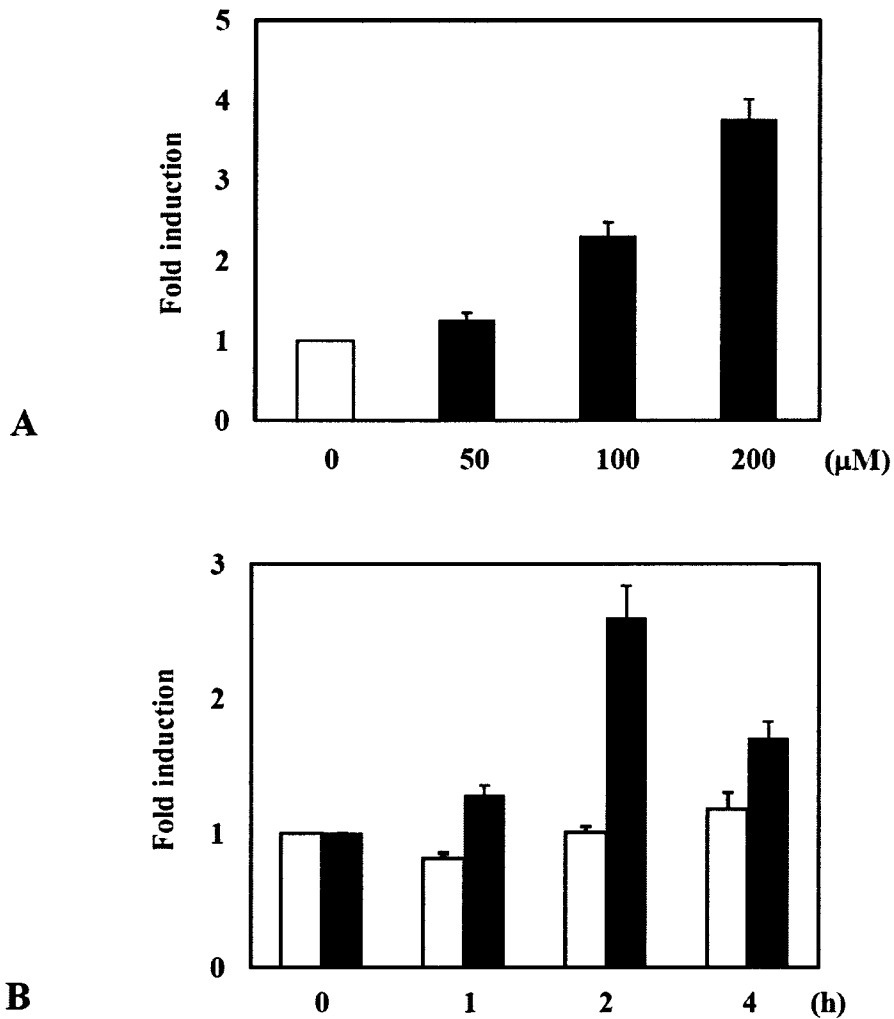


図2 ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導

様々な処理を行った H4IIE 細胞から total RNA を調製した。これらの total RNA から逆転写反応を行い、SHARP-2 mRNA 量と 36B4 mRNA 量をリアルタイム PCR 法により測定した。36B4 mRNA 量に対する SHARP-2 mRNA 量の比を算出し、未処理の細胞の比を 1 とした。少なくとも 3 回の実験データの平均値と標準誤差を数値として示した。(A) H4IIE 細胞を、示された濃度のゲニステインで 2 時間処理した。(B) H4IIE 細胞を、100 μM ゲニステインで示された時間処理した。□は DMSO、■はゲニステイン処理を示す。

### 3. ゲニステインによる *SHARP-2* 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路の解析

ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路を同定するために、H4IIE 細胞を各種経路の阻害剤で処理後、ゲニステインで2時間処理した。まず、ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導が、インスリンによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路と同様であるかどうかを検討するため、インスリンによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路である phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の阻害剤である LY294002 処理を行った。その結果、LY294002 はインスリンによる *SHARP-2* mRNA の誘導を抑制したが、ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導には影響しなかった (図 3A)。したがって、ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導に、PI3K 経路は関与しないことが明らかとなった。

脂肪細胞から分泌されインスリンと同様血糖低下に関与するアディポネクチンは、肝臓で AMP-activated protein kinase (AMPK) 経路を介して糖新生を抑制することが報告されている [29]。そこで、ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導が、AMPK 経路を介しているかどうかを検討するために、AMPK の阻害剤である compound-C 処理を行った。その結果、ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導は、compound-C 処理により抑制されなかった (図 3B)。したがって、ゲニステインによる誘導には AMPK は関与しないことが示された。

次に、ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導に関わるシグナル伝達経路を同定するために、インスリンシグナル伝達経路の各種阻害剤を用いて検討した。阻害剤として、PKC の阻害剤である staurosporin、MAP kinase の阻害剤である PD98059、protein phosphatase の阻害剤である okadaic acid、Jun N-terminal kinase の阻害剤である JNK inhibitor II、ならびに p70S6K の阻害剤である rapamycin を用いて検討した。その結果、これらのうち staurosporin 処理によっ

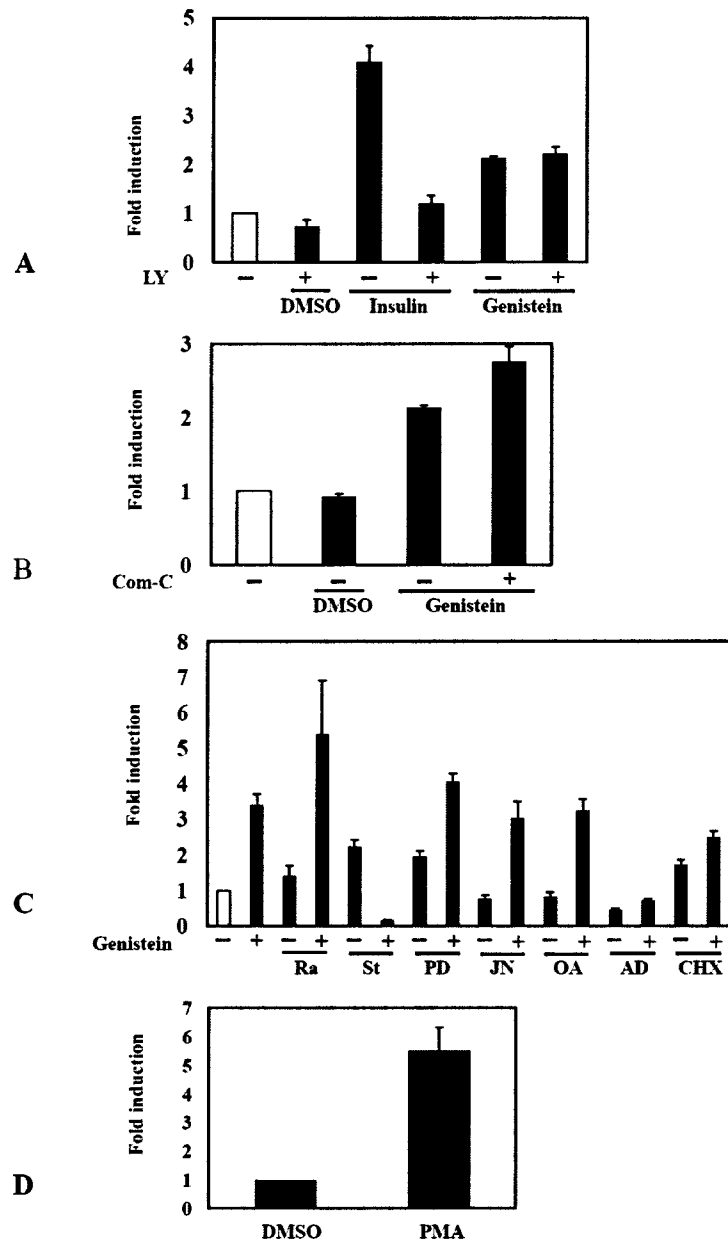


図3 ゲニステインによる *SHARP-2* 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路の解析

各種処理を行った細胞における *SHARP-2* mRNA の相対発現量を測定した。実験は4回行い、それらの細胞での *SHARP-2* mRNA と *36B4* mRNA 量の比の平均値と標準誤差を数値として示した。(A) H4IIE 細胞を PI3K の阻害剤である LY294002 (50  $\mu$ M) で30分間処理後、10 nM インスリンまたは 100  $\mu$ M ゲニステインで2時間処理した。(B) H4IIE 細胞を AMPK の阻害剤である compound-C (1  $\mu$ M) で30分間処理後、100  $\mu$ M ゲニステインで2時間処理した。(C) H4IIE 細胞を 0.1  $\mu$ M rapamycin (Ra)、0.1  $\mu$ M staurosporin (St)、25  $\mu$ M PD98059 (PD)、10  $\mu$ M JNK inhibitor II (JN)、10 nM okadaic acid (OA)、ならびに 0.8  $\mu$ M actinomycin D (AD)、10  $\mu$ M cycloheximide (CHX) で15分間処理後、100  $\mu$ M ゲニステインで2時間処理した。(D) H4IIE 細胞を cPKC の活性化剤である PMA (1  $\mu$ M) で2時間処理した。

でのみ SHARP-2 mRNA の誘導が阻害されることが示された (図 3C)。これらの結果から、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導は、PKC 経路を介する可能性が示唆された。

さらに、実際に PKC 経路が関与することを確かめるために、classical PKC (cPKC) を活性化するホルボールエステルの phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) で H4IIE 細胞を 2 時間処理したところ、SHARP-2 mRNA の発現が誘導されることが明らかになった (図 3D)。したがって、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導には cPKC が関与することが示された。

#### 4. ゲニステインによる PKC $\alpha$ の活性化

ゲニステイン処理により、実際に H4IIE 細胞内の cPKC が活性化されるかどうかを検討するために、代表的な cPKC アイソフォームである PKC $\alpha$  に注目した。ゲニステインでさまざまな時間処理した細胞から全細胞溶解液を調製し、PKC $\alpha$  に対する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、ゲニステイン処理後 5 分で活性化型であるリン酸化型 PKC $\alpha$  が増加し、15 分後には減衰した (図 4)。一方、この間に全 PKC $\alpha$  量には変動は認められなかった。したがって、ゲニステインが極めて短時間に一過性に PKC $\alpha$  を活性化することが示された。

#### 5. ゲニステインによる SHARP-2 遺伝子発現誘導へのエストロゲン受容体の関与

ゲニステインは、女性ホルモンであるエストロゲンと構造がよく似ており、エストロゲン受容体に親和性があり、エストロゲン様活性を示すことが知られている [30]。したがって、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導がエス

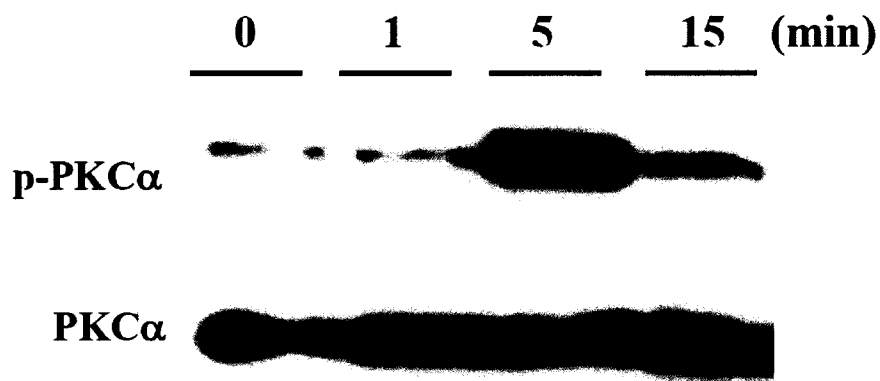


図4 ゲニステインによる PKC $\alpha$  の活性化

100  $\mu$ M ゲニステインで示された時間処理した H4IIE 細胞から全細胞溶解液を調製し、10% SDS-PAGE で展開した (20  $\mu$ g /lane)。タンパク質は PVDF 膜に転写後、一次抗体として 400 倍希釈した抗ラット p-PKC $\alpha$  (Ser 657) ウサギ抗体あるいは 400 倍希釈した抗ラット PKC $\alpha$  (C-20) ウサギ抗体を、二次抗体として 20,000 倍希釈した horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体で処理し発色反応を行った。実験は 3 回行い、代表的なものを図として示した。

エストロゲン受容体を介しているかどうかを検討するために、H4IIE 細胞をエストロゲン受容体の拮抗阻害剤である ICI182,780 で 30 分処理した後、ゲニステインで 2 時間処理した。その結果、ICI182,780 は SHARP-2 mRNA の誘導に影響しなかった。したがって、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導にはエストロゲン受容体は関与しない可能性が示唆された (図 5)。

## 6. ゲニステインによる SHARP-2 遺伝子の転写調節機構の解析

ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導が転写レベルで生じるのか、あるいはその誘導にタンパク質合成を必要とするかどうかについて検討するために、H4IIE 細胞を DNA 依存性 RNA polymerase II の阻害剤である actinomycin D、タンパク質合成の阻害剤である cycloheximide で処理した。その結果、SHARP-2 mRNA はそれぞれの阻害剤で抑制された (図 3C)。これらの結果は、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導は転写レベルで生じ、誘導には新規のタンパク質合成を必要とすることを示唆している。

## 7. ゲニステインによる SHARP-2 遺伝子の転写応答領域の解析

ゲニステインによる SHARP-2 遺伝子発現の誘導に関わる転写機構を解析するために、リポーターアッセイシステムを用いて検討を行った。ラット SHARP-2 遺伝子転写開始点上流 3.7 kb までを含む SHARP-2 遺伝子プロモーター (pGL4SHARP-2/Luc3700)、または SV40 のエンハンサー/プロモーターをルシフェラーゼリポーターベクターに挿入したプラスミド (pGL4.13) を H4IIE 細胞にトランスフェクションした。これらの細胞を 100  $\mu$ M ゲニステインの存在下、非存在下で一定時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を比較したところ、ゲニステインはいずれの遺伝子のプロモーター活性にも影響を及ぼさなかった (図

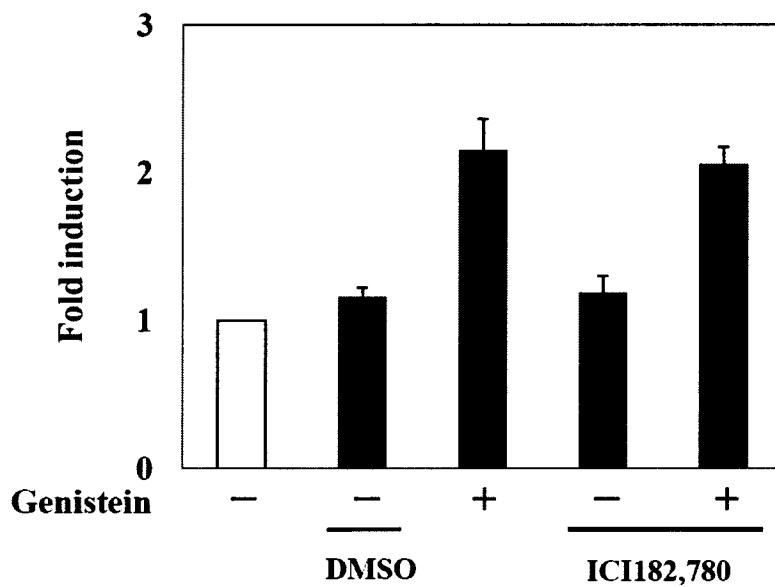


図5 ゲニステインによる *SHARP-2* 遺伝子の発現誘導に対するエストロゲン受容体の関与

H4IIE 細胞を、エストロゲン受容体の拮抗阻害剤である ICI182,780 (0.1  $\mu$ M) で 30 分間処理後、100  $\mu$ M ゲニステインで 2 時間処理した。それぞれの細胞における *SHARP-2* mRNA の相対発現量を測定した。実験は 4 回行い、それらの細胞での *SHARP-2* mRNA と *36B4* mRNA 量の比の平均値と標準誤差を数値として示した。



6)。これらの結果から、*SHARP-2* 遺伝子の転写開始点上流 3.7 kb までの領域には、ゲニステインによる転写応答エレメントは存在しないことが明らかとなった。

## 8. (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子発現の解析

非配糖体大豆イソフラボンのダイゼインは、腸内細菌により (S)-エクオールに代謝されて吸収される (図 7A) [31-34]。そこで、(S)-エクオールが *SHARP-2* mRNA を誘導するかどうか検討した。H4IIE 細胞を、100  $\mu$ M (S)-エクオールで 2 時間処理を行い *SHARP-2* mRNA 量の変動について検討したところ、(S)-エクオールが *SHARP-2* mRNA 量を増加させることが明らかになった (図 7B)。したがって、ダイゼインは (S)-エクオールに代謝されて初めて *SHARP-2* 遺伝子発現に影響することが示唆された。そこで、引き続き (S)-エクオールに着目して解析を行った。

初めに、濃度依存的な変化を検討するために、H4IIE 細胞を 25、50、100、200  $\mu$ M の (S)-エクオールで 2 時間処理を行い、*SHARP-2* mRNA 量の変動について検討した。その結果、*SHARP-2* mRNA 量は濃度依存的に増大することが明らかとなった (図 7C)。次に、100  $\mu$ M 濃度での経時的変化を検討したところ、*SHARP-2* mRNA 量は処理後 2 時間目と、インスリンおよびゲニステインと同様に非常に早期に一過性に誘導されることが明らかとなった (図 7D) [7]。

## 9. (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路の同定

(S)-エクオールによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路が、インスリンあるいはゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路と同様か、あるいは別の経路を

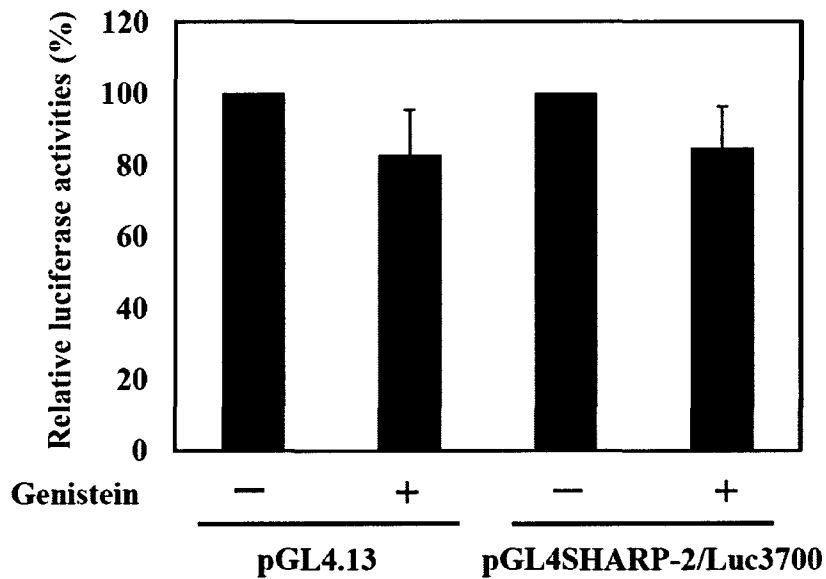


図6 ゲニステインによる *SHARP-2* 遺伝子の転写調節機構の解析

10  $\mu$ g のルシフェラーゼリポータープラスミドと 0.5  $\mu$ g の phRLuc-CMV プラスミドを、リン酸カルシウム法を用いて一過性に H4IIE 細胞にトランスフェクションした。転写開始点上流 3.7 kb までを含む *SHARP-2* 遺伝子プロモーター (pGL4SHARP-2/Luc3700) または SV40 のエンハンサープロモーター (pGL4.13) が挿入されたプラスミドをリポータープラスミドとして用いた。ウミシイタケルシフェラーゼ値で補正したホタルルシフェラーゼ値をプロモーター活性として算出した。ゲニステイン非存在下でのそれぞれのプロモーター活性を 100 として示した。数値は 4 回の実験の平均値と標準誤差で示した。

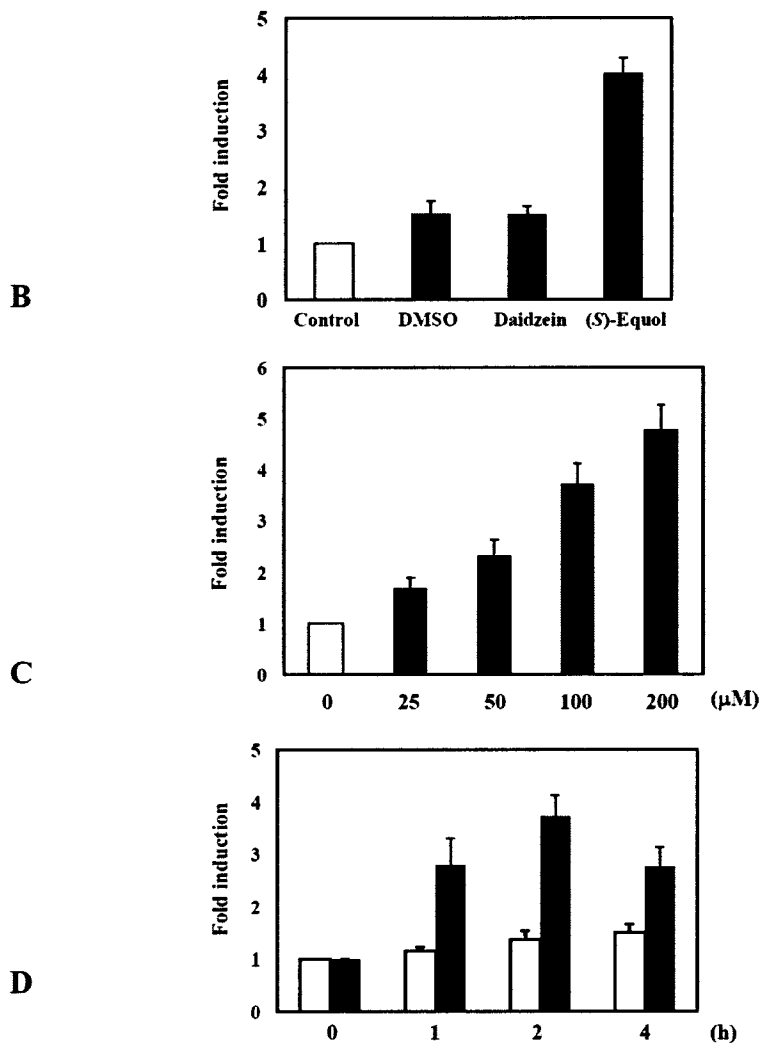
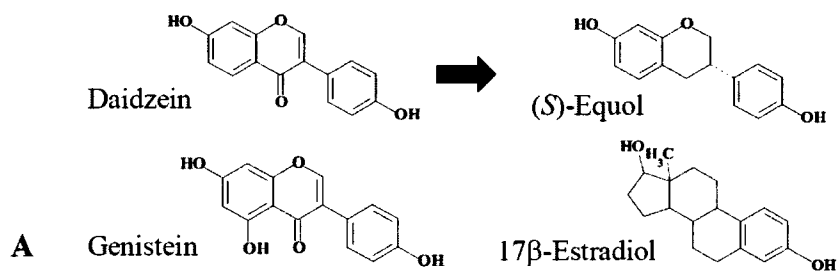


図7 (S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導とシグナル伝達経路の解析

(S)-エクオール処理を行った H4IIE 細胞において SHARP-2 mRNA の相対発現量を測定した。実験は少なくとも4回行い、それらの細胞での SHARP-2 mRNA と 36B4 mRNA 量の比の平均値と標準誤差を数値として示した。(A) ダイゼイン、(S)-エクオール、ゲニステイン、17 $\beta$ -エストラジールの構造。(B) H4IIE 細胞を DMSO、100  $\mu$ M ダイゼイン、100  $\mu$ M (S)-エクオールで2時間処理した。(C) H4IIE 細胞を様々な濃度の (S)-エクオールで2時間処理した。(D) H4IIE 細胞を 100  $\mu$ M (S)-エクオールで示された時間処理した。□は DMSO、■は (S)-エクオール処理を示す。

必要とするのかどうかを検討するために、H4IIE 細胞を各種経路の阻害剤で 30 分間処理した後、(S)-エクオールで 2 時間処理した。阻害剤として、LY294002、compound-C、rapamycin、staurosporin ならびに okadaic acid を用いた。その結果、LY294002 と staurosporin 処理により SHARP-2 mRNA の誘導が阻害されることが示された (図 8)。これらの結果から、(S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導は、インスリンによる SHARP-2 mRNA の誘導経路である PI3K 経路と、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導経路である PKC 経路を介する可能性が示唆された [7]。

#### 10. (S)-エクオールによる SHARP-2 遺伝子発現誘導におけるドミナントネガティブ変異型 aPKC $\lambda$ の影響

PKC には、aPKC、cPKC、novel PKC (nPKC) のアイソフォームが存在する [35]。ゲニステインによる SHARP-2 mRNA には cPKC の一種である PKC $\alpha$  を介することを明らかにした (図 4)。(S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導経路は、PI3K 経路を介することが示唆されたが、肝臓では、PI3K 経路の下流に位置する aPKC $\lambda$  が活性化されることが報告されている [36, 37]。したがって、(S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導に aPKC $\lambda$  が関与するかどうかを検討するために、緑色蛍光タンパク質を発現するアデノウイルス (Ad-GFP) あるいはドミナントネガティブ変異型 aPKC $\lambda$  を発現するアデノウイルス (Ad-dn-aPKC $\lambda$ ) を感染倍率 50 で H4IIE 細胞に感染させた。その結果、GFP を発現するアデノウイルスを感染させた H4IIE 細胞では、(S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導に影響を及ぼさなかった。一方、ドミナントネガティブ変異型の aPKC $\lambda$  を発現するアデノウイルスを感染させた H4IIE 細胞では、(S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導が部分的に抑制された (図 9)。し

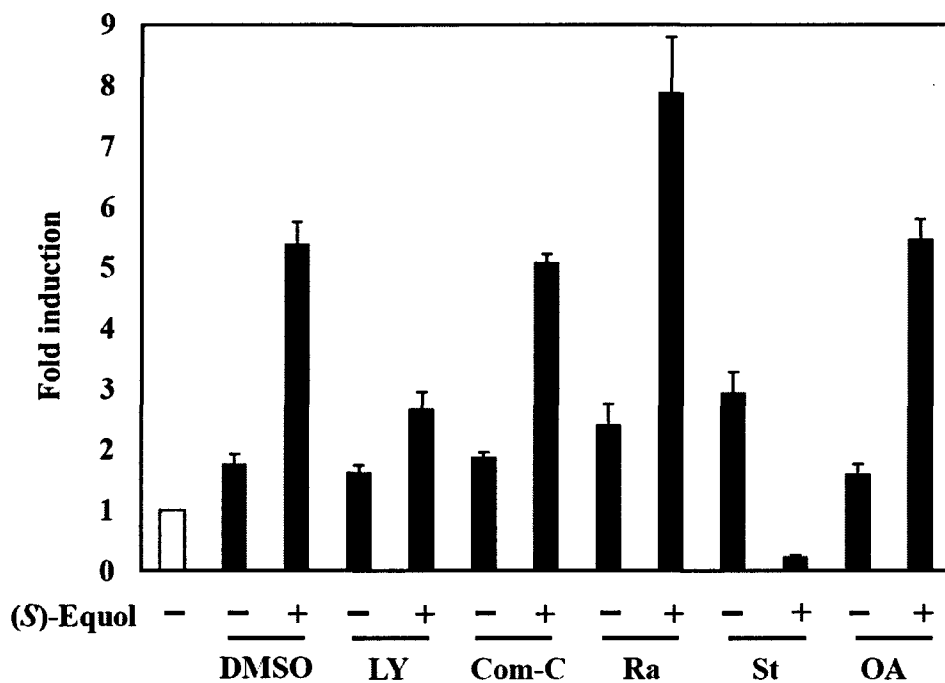


図8 (S)-エクオールによる SHARP-2 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路の解析

各種処理を行った細胞における SHARP-2 mRNA の相対発現量を測定した。実験は 4 回行い、それらの細胞での SHARP-2 mRNA と 36B4 mRNA 量の比の平均値と標準誤差を数値として示した。H4IIE 細胞を 50  $\mu$ M LY294002 (LY)、1  $\mu$ M compound-C (Com-c)、0.1  $\mu$ M rapamycin (Ra)、0.2  $\mu$ M staurosporin (St) ならびに 10 nM okadaic acid (OA) で 30 分間処理後、100  $\mu$ M (S)-エクオールで 2 時間処理した。

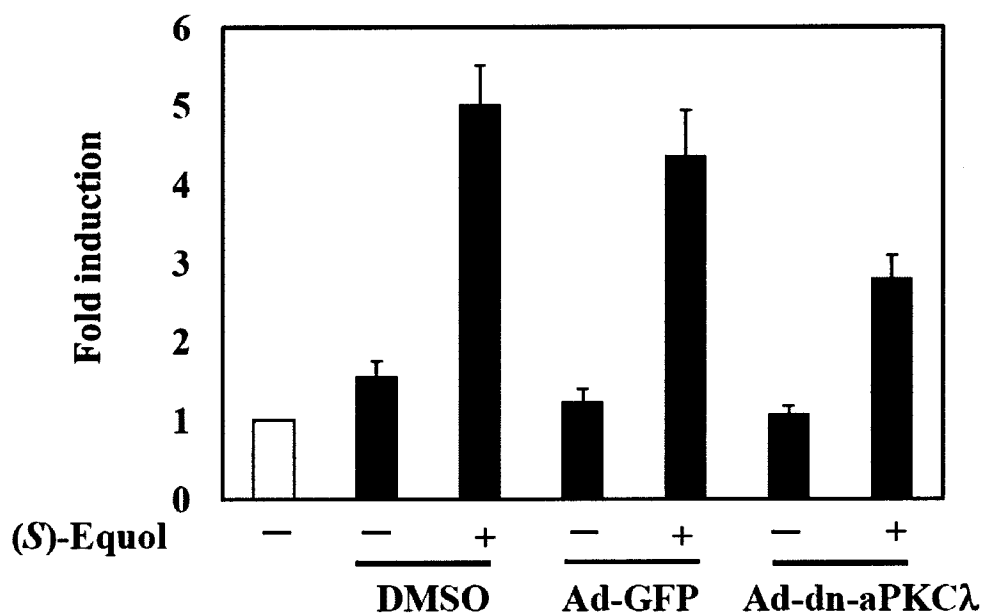


図9 Ad-dn-aPKCλ による SHARP-2 mRNA 誘導の阻害

GFP を発現するアデノウイルス (Ad-GFP) あるいはドミナントネガティブ変異型 aPKCλ を発現するアデノウイルス (Ad-dn-aPKCλ) を、H4IIE 細胞に感染倍率 50 で感染させた。24 時間後、(S)-エクオールで 2 時間処理した。実験は 4 回行い、それらの細胞での SHARP-2 mRNA と 36B4 mRNA 量の比の平均値と標準誤差を数値としてグラフに示した。

たがって、aPKC $\lambda$  が (S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導に関与することが明らかになった。

## 11. (S)-エクオールによる PKC $\alpha$ および aPKC $\lambda$ の活性化

(S)-エクオール処理により、実際に H4IIE 細胞内の PKC $\alpha$  および aPKC $\lambda$  が活性化されるかどうかを検討した。(S)-エクオールでさまざまな時間処理した細胞から全細胞溶解液を調製し、PKC $\alpha$  および aPKC $\lambda$  に対する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、PKC $\alpha$  は (S)-エクオール処理後 5 分で活性化型であるリン酸化型 PKC $\alpha$  が増加し、60 分後には減衰した (図 10)。一方、この間に全 PKC $\alpha$  量には変動は認められなかった。また、aPKC $\lambda$  は (S)-エクオール処理後 1 分で活性化型であるリン酸化型 aPKC $\lambda$  が増加し、60 分後に減衰した (図 10)。一方、この間に全 aPKC $\lambda$  量には変動は認められなかった。

以上の結果から、(S)-エクオールがゲニステインと同様、極めて短時間で PKC $\alpha$  を活性化すること、ならびに PI3K 経路の下流の aPKC $\lambda$  も活性化することが明らかとなった。

## 12. (S)-エクオールによる SHARP-2 遺伝子発現誘導へのエストロゲン受容体の関与

(S)-エクオールは、ゲニステインと同様エストロゲン受容体に弱い親和性があり、エストロゲン様活性を示す [30-32, 34]。したがって、(S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導が、エストロゲン受容体を介しているかどうかを検討するために、H4IIE 細胞をエストロゲン受容体の拮抗阻害剤である ICI182,780 で 30 分間処理後、(S)-エクオールで 2 時間処理した。その結果、ICI182,780 は SHARP-2 mRNA の誘導に影響しなかった。したがって、(S)-エクオールによる

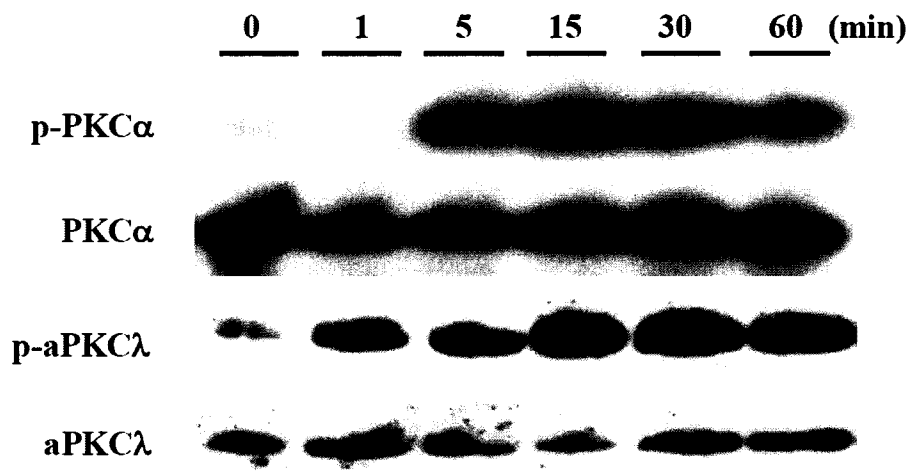


図 10 (S)-エクオールによる PKCα および aPKCλ の活性化

100 μM (S)-エクオールで示された時間処理した H4IIE 細胞から調製した全細胞溶解液 (20 μg/lane あるいは 50 μg/lane) を、10% SDS-PAGE で展開した。タンパク質を PVDF 膜に転写後、一次抗体として 400 倍希釈した抗ラット p-PKCα (Ser 657) ウサギ抗体、抗ラット PKCα (C-20) ウサギ抗体、抗ラット p-PKCλ (Thr 410/403) ウサギ抗体あるいは抗ラット PKCλ マウス抗体を、二次抗体として 20,000 倍希釈した horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体あるいは horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG ウサギ抗体で処理し発色反応を行った。実験は 3 回行い、代表的なものを図として示した。



SHARP-2 mRNA の誘導にはエストロゲン受容体は関与しない可能性が示唆された (図 11)。

### 13. (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子の転写調節機構の解析

(S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導が転写レベルで生じるのか、あるいはその誘導にタンパク質合成を必要とするかどうかについて検討した。H4IIE 細胞を、actinomycin D および cycloheximide で処理したところ、SHARP-2 mRNA の誘導はともに抑制された (図 12)。したがって、(S)-エクオールによる SHARP-2 mRNA の誘導は転写レベルで生じ、誘導には新規のタンパク質合成を必要とする可能性が示唆された。

### 14. (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子の転写応答領域の同定

次に、(S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子発現の誘導に関わる転写機構を解析するために、pGL4SHARP-2/Luc3700 または pGL4.13 を H4IIE 細胞にトランスフェクションした。これらの細胞を 100  $\mu$ M (S)-エクオールの存在下、非存在下で培養後、ルシフェラーゼ活性を比較した。しかしながら、(S)-エクオールはいずれの遺伝子のプロモーター活性にも影響を及ぼさなかった (図 13A)。これらの結果から、*SHARP-2* 遺伝子の転写開始点上流 3.7 kb までの領域には、(S)-エクオールによる転写調節エレメントは存在しないことが明らかとなった。次に、*SHARP-2* 遺伝子の (S)-エクオール応答領域の同定を試みた。ラット *SHARP-2* 遺伝子の肝臓での発現に必須の -160~+110 までの領域を含む pGL4SHARP-2/Luc160 リポータープラスミドの上流に、*SHARP-2* 遺伝子の -4192~-3690、-4687~-4133、-5187~-4628 の DNA 断片を挿入したプラスミド (pSHARP-2/Luc160-A、pSHARP-2/Luc160-B、pSHARP-2/Luc160-C) を作製した。

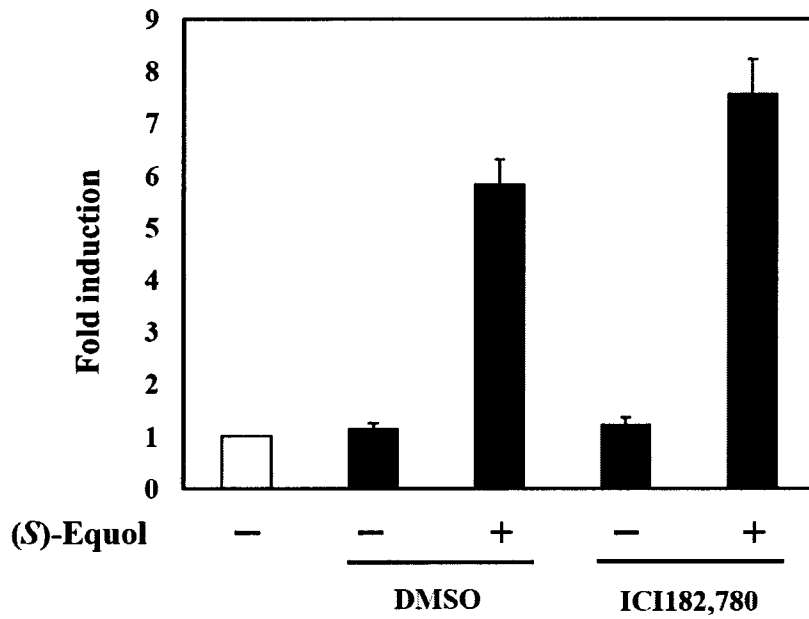


図 11 (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子の発現誘導に対するエストロゲン受容体の関与

H4IIE 細胞を、エストロゲン受容体の拮抗阻害剤である 0.1  $\mu$ M ICI182,780 で 30 分間処理後、100  $\mu$ M (S)-エクオールで 2 時間処理した。それぞれの細胞における *SHARP-2* mRNA の相対発現量を測定した。実験は 4 回行い、それらの細胞での *SHARP-2* mRNA と *36B4* mRNA 量の比の平均値と標準誤差を数値として示した。

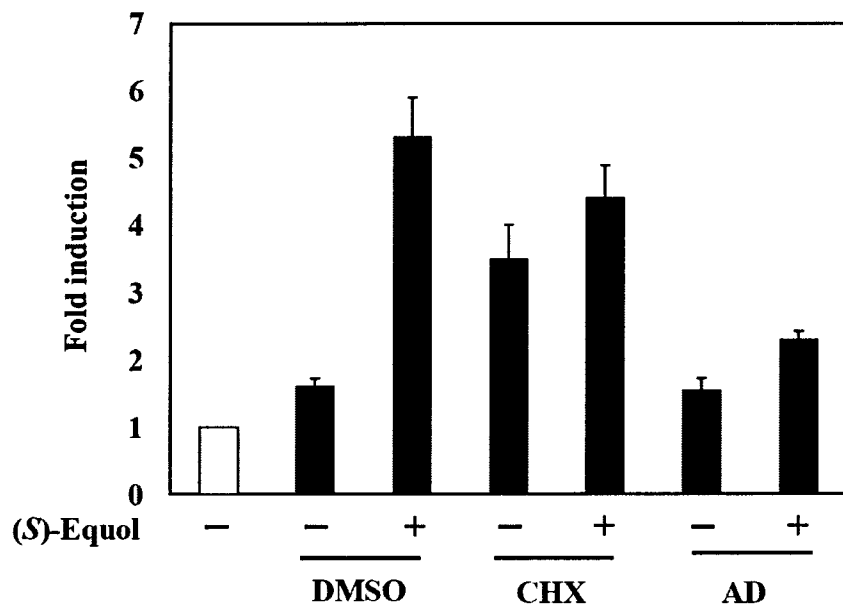
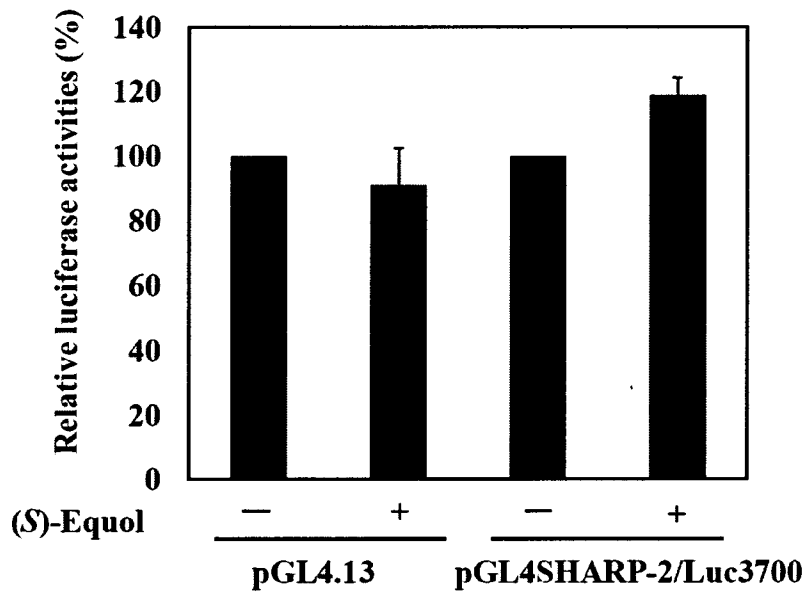
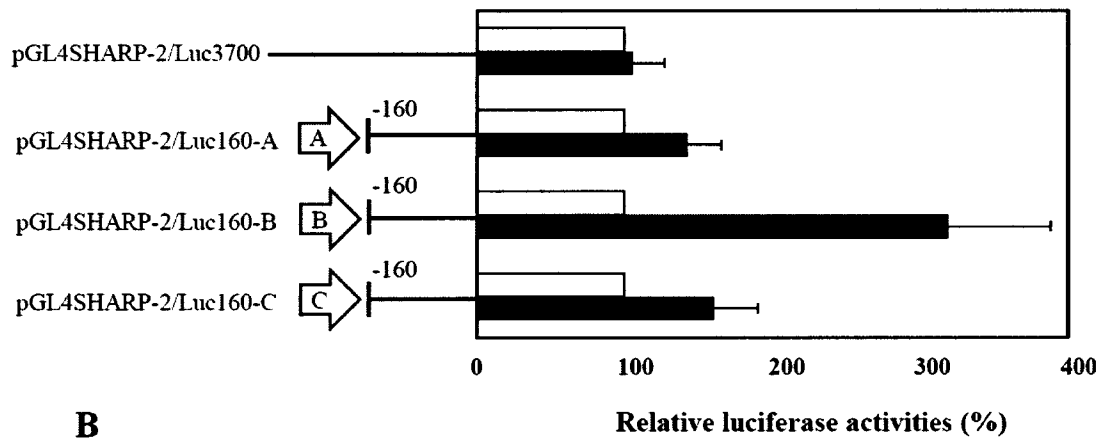


図 12 (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子の発現誘導の転写あるいは新規のタンパク質合成の関与

H4IIE 細胞を、DNA 依存性 RNA polymerase II の阻害剤である actinomycin D およびタンパク質合成の阻害剤である cycloheximide で 30 分間処理後、100  $\mu$ M (S)-エクオールで 2 時間処理した。それぞれの細胞における *SHARP-2* mRNA の相対発現量を測定した。実験は 4 回行い、それらの細胞での *SHARP-2* mRNA と 36B4 mRNA 量の比の平均値と標準誤差を数値として示した。



A



B

図 13 (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子の転写調節機構の解析

(A) 10  $\mu$ g のルシフェラーゼリポータープラスミドと 0.5  $\mu$ g の phRLuc-CMV プラスミドを、リン酸カルシウム法を用いて一過性に H4IIE 細胞にトランスフェクションした。転写開始点上流 3.7 kb までを含む *SHARP-2* 遺伝子プロモーター (pGL4SHARP-2/Luc3700) または SV40 のエンハンサープロモーター (pGL4.13) が挿入されたプラスミドをリポータープラスミドとして用いた。(B) 図の左に示した 300 ng のルシフェラーゼリポータープラスミドと 0.2 ng の phRLuc-CMV プラスミドを、リポフェクション法を用いて一過性に MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub> 細胞にトランスフェクションした。ウミシイタケルシフェラーゼ値で補正したホタルルシフェラーゼ値をプロモーター活性として算出し、(S)-エクオール非存在下でのそれぞれのプロモーター活性を 100 として示した。数値は 4 回の実験の平均値と標準誤差で示した。

これらのプラスミドを  $MH_1C_1$  細胞にトランスフェクションし、 $100 \mu\text{M}$  (S)-エクオールが存在下、非存在下で培養後、ルシフェラーゼ活性を比較したところ、pSHARP-2/Luc160-B のみ (S)-エクオール処理によりプロモーター活性が約 3 倍増加した (図 13B)。

以上の結果から、ラット *SHARP-2* 遺伝子の -4687~-4133 の塩基配列には (S)-エクオール応答領域が存在することが明らかになった。

## 考察

SHARP-2 はインスリン誘導性転写因子であり、糖新生系酵素である *PEPCK* 遺伝子の転写活性を低下させる [6, 7]。インスリン以外の物質で、*SHARP-2* 遺伝子の発現を誘導できれば、世界的に問題となっている 2 型糖尿病の予防および治療に有用となる可能性がある。本研究は、インスリン誘導性転写因子 *SHARP-2* をマーカーとし、*SHARP-2* 遺伝子の発現を誘導できる低分子化合物の研究を行った。

大豆イソフラボンの一種であるゲニステインを含む食餌の摂取は、ストレプトゾトシン誘導性糖尿病ラットにおいて血糖値を低下させ、遺伝性肥満性 2 型糖尿病 *db/db* マウスにおいても血糖値とヘモグロビン A1c 値を低下させることが報告されている [38, 39]。また、ゲニステイン処理をした膵  $\beta$  細胞ではインスリン分泌が促進される等の糖尿病の予防や治療に有益な報告が多数ある他、抗酸化作用や他の生理活性を有することが報告されている [40-42]。

本研究では、非配糖体大豆イソフラボンのうち、ゲニステインでインスリン応答性の高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞を処理することにより、最も *SHARP-2* mRNA が誘導されることを明らかにした [43]。ゲニステインの配糖体のアセチル化体（アセチルゲニステイン）においても *SHARP-2* mRNA は誘導されたが、最も誘導倍率が高いのはゲニステインであった。この誘導は、インスリンによる *SHARP-2* mRNA の誘導と同様、早期で一過性であった (図 1B,1C) [7]。

同じ大豆イソフラボンでも、*SHARP-2* mRNA を誘導する化合物と誘導しない化合物があったため、大豆イソフラボンの構造機能相関について、疎水性度の指標となる分配係数  $\log P$  値を SciFinder データベースを用いて算出して比較した。それぞれの  $\log P$  値は、ゲニステイン  $3.114 \pm 1.137$ 、グリシテイン  $2.549$

±1.341、ダイゼイン 2.632±1.134、ゲニスチン 0.942±0.912、マロニルゲニスチン 1.488±1.066、アセチルゲニスチン 2.126±1.043 であった。しかしながら、SHARP-2 mRNA 誘導倍率と log $P$  値に相関は認められなかった。また、SHARP-2 mRNA を誘導する大豆イソフラボンの構造を比較しても相関は認められなかった。したがって、SHARP-2 mRNA を誘導する化合物の構造機能相関については、別の視点での展開が必要なのかもしれない。

Yamada らは、SHARP-2 遺伝子の発現がインスリン処理後 2 時間で一過的に誘導され、この誘導が PI3K の阻害剤である LY294002 処理により抑制されることを報告している [7]。また、AMPK は通常細胞内で ATP 濃度が低下した場合に活性化されるタンパク質リン酸化酵素であり、様々なシグナルにより活性化されることが明らかになっている [44]。セリン/スレオニンプロテインキナーゼである AMPK は、AMPK kinase により 172 番目のスレオニン残基がリン酸化される。この活性化型 AMPK は、肝臓で糖新生や脂肪合成を抑制することが報告されている [44, 45]。AMPK の活性は、肝臓と筋肉において糖質代謝と脂質代謝を調節するアディポネクチンや、エネルギーのホメオスタシスを調節するレプチンでも調節されることから、糖尿病や肥満の予防との関わりで近年注目されている [44]。これらのシグナル伝達経路の関与について検討したが、LY294002 処理でも、AMPK の阻害剤である compound-C 処理でもゲニスチンによる SHARP-2 mRNA の誘導は抑制されなかった (図 3A,3B)。これらの結果から、ゲニスチンによる SHARP-2 mRNA の誘導は、PI3K 経路や AMPK 経路以外の経路が関与することが示唆された。

そこで、ゲニスチンによる SHARP-2 遺伝子の発現に関わるシグナル伝達経路を同定するために、各種阻害剤を用いて検討を行ったところ、PKC の阻害剤である staurosporin 処理により SHARP-2 mRNA の誘導が阻害されることが

示された (図 3C)。PKC には少なくとも 10 種類以上のアイソフォームが存在するが、大別すると cPKC、nPKC、aPKC の 3 種類に分類される [35]。cPKC は活性化に  $\text{Ca}^{2+}$  とジアシルグリセロールとホスファチジルセリンを必要とするが、nPKC 活性化にはジアシルグリセロールとホスファチジルセリンが必要であり、aPKC はホスファチジルセリンのみを必要とする [35]。肝臓では、PI3K 経路の下流に aPKC $\lambda$  の存在が報告されているが、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導は LY294002 で阻害されなかったため、少なくとも aPKC $\lambda$  は関与しないと考えられる [36, 37]。実際に、aPKC $\lambda$  は活性化しないが cPKC を活性化する PMA で処理を行ったところ、SHARP-2 遺伝子の発現が 2 時間で誘導されることが明らかになった (図 3D)。これらの結果から、SHARP-2 mRNA の誘導には cPKC が関与することが明らかになった。cPKC にもいくつかのアイソフォームが存在するが、最も主要なアイソフォームとして PKC $\alpha$  が知られている。PKC $\alpha$  は活性化されると 497 番目と 638 番目のスレオニン残基および 657 番目のセリン残基がリン酸化される [37]。そこで、実際にゲニステインが内在性の PKC $\alpha$  を活性化するかどうかを検討するため、H4IIE 細胞をゲニステインでさまざまな時間で処理したところ、活性化型であるリン酸化型 PKC $\alpha$  がゲニステイン処理後 5 分と、短時間で PKC $\alpha$  を活性化することが明らかとなった (図 4)。ヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞をゲニステインで 24 時間処理することにより、リン酸化型 PKC $\alpha$  が増加することが報告されているが、本研究は非常に早期に PKC $\alpha$  を活性化することを見いだした [46]。

ゲニステインは、女性ホルモンであるエストロゲンに構造がよく似ており、エストロゲン受容体に親和性がありエストロゲン様活性を示す [30]。しかし、エストロゲン受容体の拮抗阻害剤である ICI182,780 を用いた検討の結果、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導にはエストロゲン受容体を介さない可



能性が示された (図 5)。したがって、ゲニステインの作用は女性ホルモン様作用以外の機構で、*SHARP-2* 遺伝子の発現に寄与したと考えられた。

ゲニステインによる *SHARP-2* 遺伝子発現の誘導は転写レベルで生じ、誘導には新規のタンパク質合成を必要とすることが示唆されたが (図 3C)、*SHARP-2* 遺伝子のゲニステイン応答性 *cis-acting element* は、*SHARP-2* 遺伝子の転写開始点上流 3.7 kb までには認められなかった (図 6)。ゲニステインは、HepG2 細胞においてアポリポタンパク質 *A-I* 遺伝子のプロモーター活性を促進することが報告されている [47]。また、転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  の発現を誘導することも報告されている [48]。したがって、ゲニステインが PKC $\alpha$  の下流に存在する何らかの転写因子の活性化を介して、*SHARP-2* 遺伝子の転写活性を促進することが想定できる。

以上の結果から、ゲニステインは PKC $\alpha$  活性化を介して転写レベルで *SHARP-2* 遺伝子の発現を誘導すると結論した (図 14) [43]。

非配糖体大豆イソフラボンのうち、ダイゼインは *SHARP-2* mRNA の誘導に影響を及ぼさなかった (図 1B)。しかし、ダイゼインは腸内細菌により (S)-エクオールに代謝される [31-34]。ダイゼインから (S)-エクオールに代謝する腸内細菌をもつヒトをエクオール産生者と呼ぶ。30-50% の人がエクオール産生者であり、アジア圏に多い傾向がある [32, 49-52]。また、ゲニステインと同様、抗酸化活性も有している [53, 54]。エクオールを肥満者に経口摂取させると、低密度リポタンパク質-コレステロールおよびヘモグロビン A1c 値が低下する [55]。さらに、エクオール産生者は、非エクオール産生者と比較すると、血清尿酸値とトリグリセリド値が低く、高密度リポタンパク質-コレステロールが高い傾向にある [56, 57]。

興味深いことに、H4IIE 細胞を (S)-エクオール処理することにより濃度依存

的に *SHARP-2* 遺伝子の発現を誘導し、(S)-エクオール処理後 2 時間目とインスリンやゲニステイン処理と同様非常に早期にピークを迎えることが明らかとなった (図 7C,D) [7]。また、(S)-エクオールによる *SHARP-2* mRNA の誘導は、インスリンによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路と同様の PI3K 経路と、ゲニステインによる *SHARP-2* mRNA の誘導経路である PKC 経路が重要である可能性を見出した (図 8)。肝臓では、PI3K 経路の下流の aPKC $\lambda$  が活性化されることが報告されているため、(S)-エクオールによる *SHARP-2* mRNA の誘導には aPKC $\lambda$  の関与が考えられた [36, 58]。そこで、ドミナントネガティブ変異型 aPKC $\lambda$  を発現するアデノウイルスを H4IIE 細胞に感染させたところ、(S)-エクオールによる *SHARP-2* mRNA の誘導が干渉されたため、aPKC $\lambda$  が関与することが明らかとなった (図 9)。加えて、PMA の結果から、ゲニステイン同様 (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子の発現誘導にも cPKC が関与することが考えられた。実際に、(S)-エクオールは内在性の PKC $\alpha$  と aPKC $\lambda$  を非常に早期に活性化した (図 10)。

(S)-エクオールは、ゲニステインと同様にエストロゲン受容体に親和性があり、エストロゲン様作用を示す [30-32, 34]。エストロゲン受容体には  $\alpha$  と  $\beta$  が存在するが、ヒトエストロゲン受容体  $\alpha$  への結合能は、エストラジオールを 100 とした場合、(S)-エクオール 0.1、ゲニステイン 0.017、ダイゼイン 0.010 であり、ヒトエストロゲン受容体  $\beta$  においてはゲニステイン 7.4、(S)-エクオール 3.2、ダイゼイン 0.04 である [31]。エストロゲン受容体  $\beta$  への親和性がダイゼインよりゲニステインの方が高い理由として、カルボニル基と隣接したヒドロキシル基間の分子間水素結合の存在が報告されている [59]。しかし、ゲニステインと同様、(S)-エクオールによる *SHARP-2* mRNA の誘導はエストロゲン受容体を介さない可能性が示された (図 11)。

次に、(S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子発現の誘導は転写レベルで生じ、誘導には新規のタンパク質合成を必要とすることが示唆された (図 12)。エクオールは、HepG2 細胞において、ヒト *cytochrome P450 3A4* 遺伝子のプロモーター活性を促進し、3T3-L1 細胞では peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  を活性化することが報告されている [60, 61]。したがって、(S)-エクオールが aPKC $\lambda$  と cPKC の下流に存在する何らかの転写因子の活性を介して *SHARP-2* 遺伝子の転写活性を促進することが想定できる。実際に、Activator protein 1 (AP-1) は、ホルボールエステルの PMA により活性化した PKC によって活性化され、活性化 AP-1 は TPA-応答エレメントである 5'-TGAG/CTCA-3' に結合して標的遺伝子の転写を促進する [62]。また、PKC はヒト肝癌細胞株である HuH-7 細胞において下流の peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  を活性化し、活性化された PPAR $\alpha$  はリガンドに依存した PPAR $\alpha$  の転写を促進する [63]。他にも、PKC は多数の転写因子に作用して、標的遺伝子の転写を制御していることが報告されている [64]。最後に、*SHARP-2* 遺伝子の転写開始点上流 3.7 kb までの領域の (S)-エクオール応答性 *cis-acting element* の同定を試みた。しかし、この領域には (S)-エクオールに応答して転写が促進される領域は存在しなかった (図 13A)。しかし、-4687~-4133 の塩基配列を有するプラスミドのみ (S)-エクオールに応答したため、この領域に (S)-エクオール応答性配列が存在することが明らかとなった (図 13B)。

以上の結果から、(S)-エクオールは少なくとも PI3K とその下流の aPKC $\lambda$  を介す経路と、cPKC $\alpha$  を介する 2 種類の経路を介し、何らかの転写因子の転写を促進してラット *SHARP-2* 遺伝子の -4687~-4133 の間の塩基配列を介して、*SHARP-2* 遺伝子の転写を促進すると結論した (図 15) [65]。

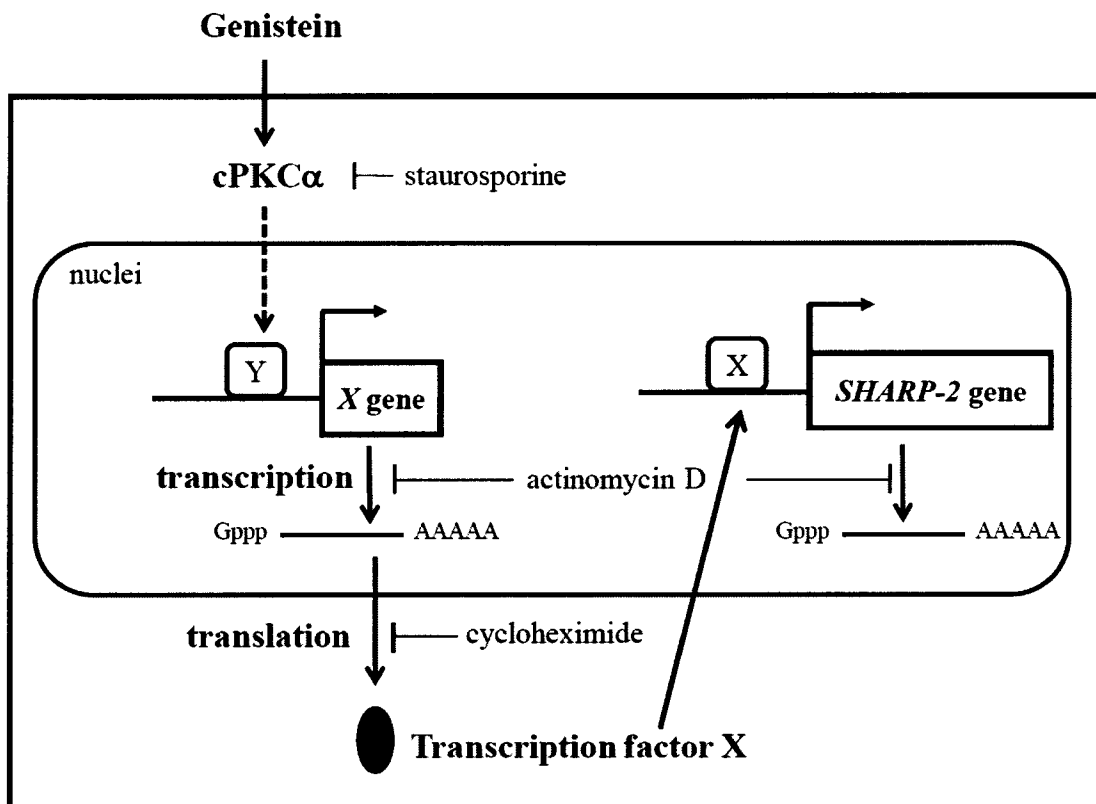


図 14 ゲニステインによる *SHARP-2* 遺伝子発現調節機構の概要

ゲニステインは、cPKC $\alpha$  の活性化を介しその下流の転写因子 Y を活性化する。活性化した転写因子 Y は転写因子 X 遺伝子の転写を促進する。そして、誘導された転写因子 X は翻訳後核内に移行し *SHARP-2* 遺伝子の転写を促進する。

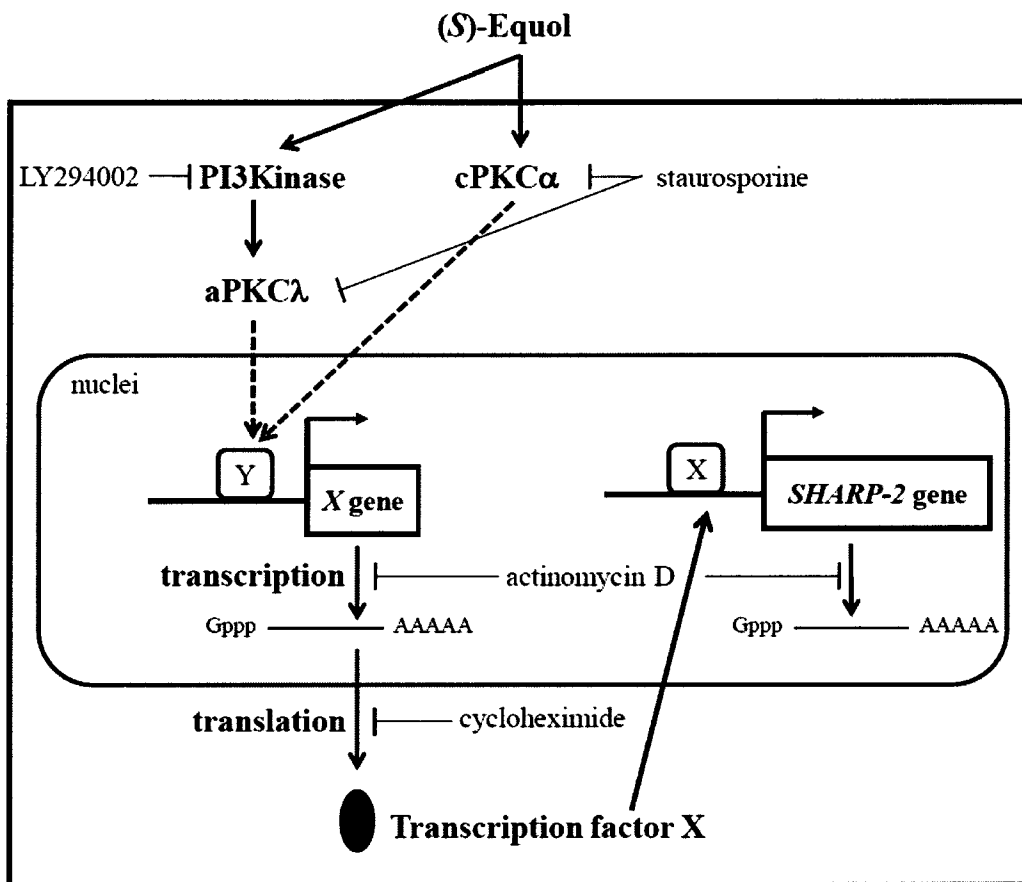


図 15 (S)-エクオールによる *SHARP-2* 遺伝子発現調節機構の概要

(S)-エクオールは、PI3K とその下流の aPKCλ の活性化を介する経路と、cPKCα の活性化を介する少なくとも 2 つの経路を介し、その下流の転写因子 Y を活性化する。活性化した転写因子 Y は転写因子 X 遺伝子の転写を促進する。そして、誘導された転写因子 X は翻訳後核内に移行し *SHARP-2* 遺伝子の転写を促進する。

## まとめ

インスリン受容体およびインスリンシグナル伝達経路を刺激できる低分子化合物の研究は、糖尿病、特に2型糖尿病の治療に有用である。本研究は、インスリン誘導性転写因子 SHARP-2 をマーカーとし、SHARP-2 遺伝子の発現を誘導できる食品成分の検討を行った。その結果、H4IIE 細胞では非配糖体大豆イソフラボンのうち、ゲニステインが最も SHARP-2 遺伝子の発現を誘導することを見いだした。また、非配糖体のダイゼインは代謝型の (S)-エクオールになると SHARP-2 遺伝子の発現を誘導できることも明らかにした。

また、ゲニステインは少なくとも cPKC $\alpha$  の活性化を促進し、何らかの転写因子の合成を介して SHARP-2 遺伝子の転写を促進し、一方、(S)-エクオールはインスリンによる SHARP-2 mRNA の誘導経路と同様の PI3K 経路とその下流の aPKC $\lambda$  の活性化、およびゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導経路と同様の cPKC $\alpha$  の活性化を介し、何らかの転写因子の合成を介して SHARP-2 遺伝子の -4687~-4133 間の塩基配列を介して、SHARP-2 遺伝子の転写を促進した。

以上の結果から、ゲニステインと (S)-エクオールは強力な SHARP-2 遺伝子発現の誘導物質であり、2型糖尿病の予防・治療に有用となる可能性を有すると結論した。

## 文献

1. International Diabetes Federation (2011) IDF Diabetes Atlas, fifth edition. *International Diabetes Federation*.
2. Wang C, Burkhardt BR, Guan Y & Yang J (2012) Role of pancreatic-derived factor in type 2 diabetes: evidence from pancreatic  $\beta$  cells and liver. *Nutr Rev* **70**, 100-106.
3. Zhang L & Eisenbarth GS (2011) Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes* **3**, 48-57.
4. Crawford TN, Alfaro DVr, Kerrison JB & Jablon EP (2009) Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev* **5**, 8-13.
5. Umegaki H (2012) Neurodegeneration in diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol* **724**, 258-265.
6. Yamada K & Miyamoto K (2005) Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front Biosci* **10**, 3151-3171.
7. Yamada K, Kawata H, Shou Z, Mizutani T, Noguchi T & Miyamoto K (2003) Insulin induces the expression of the *SHARP-2/Stra13/DEC1* gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Biol Chem* **278**, 30719-30724.
8. Kawata H, Yamada K, Matsuura K, Shou Z & Miyamoto K (2004) Insulin regulates the expression of the enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene via different pathways in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *Horm Metab Res* **36**, 526-530.
9. Yamada K, Ogata-Kawata H, Matsuura K & Miyamoto K (2005) SHARP-2/ Stra13/ DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *FEBS Lett* **579**, 1509-1514.
10. Moon HS, Lee HG, Choi YJ, Kim TG & Cho CS (2007) Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. *Chem Biol Interact* **167**, 85-98.
11. Collins QF, Liu H-Y, Pi J, Liu Z, Quon MJ & Cao W (2007) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **282**, 30143-30149.
12. Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M & Granner DK (2002) Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* **277**, 34933-34940.
13. Koyama Y, Abe K, Sano Y, Ishizaki Y, Njelekela M, Shoji Y, Hara Y & Isemura M (2004) Effects of green tea on gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in vivo. *Planta Med* **70**, 1100-1102.
14. Thielecke F & Boschmann M (2009) The potential role of green tea catechins in the

- prevention of the metabolic syndrome - a review. *Phytochemistry* **70**, 11-24.
15. Nordentoft I, Jeppesen PB, Hong J, Abudula R & Hermansen K (2008) Increased insulin sensitivity and changes in the expression profile of key insulin regulatory genes and beta cell transcription factors in diabetic KKAY-mice after feeding with a soy bean protein rich diet high in isoflavone content. *J Agric Food Chem* **56**, 4377-4385.
  16. Lu M-P, Wang R, Song X, Chibbar R, Wang X, Wu L & Meng QH (2008) Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res* **28**, 464-471.
  17. Turner NJ, Thomson BM & Shaw IC (2003) Bioactive isoflavones in functional foods: the importance of gut microflora on bioavailability. *Nutr Rev* **61**, 204-213.
  18. Chien H-L, Huang H-Y & Chou C-C (2006) Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* **23**, 772-778.
  19. Kwon DY, Daily JW, Kim HJ & Park S (2010) Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutr Res* **30**, 1-13.
  20. Coward L, Smith M, Kirk M & Barnes S (1998) Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr* **68**, 1486S-1491S.
  21. Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS & Heubi JE (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* **76**, 447-453.
  22. Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR & Williamson G (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* **468**, 166-170.
  23. Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, Kitamura T, Sakaue H, Hino Y, Miyake K, Sano W, Akimoto K, Ohno S & Kasuga M (1998) Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* **18**, 6971-6982.
  24. Tashiro F, Niwa H & Miyazaki J (1999) Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system. *Hum Gene Ther* **10**, 1845-1852.
  25. Kanegae Y, Makimura M & Saito I (1994) A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol* **47**, 157-166.
  26. Hirano S, Yamada K, Kawata H, Shou Z, Mizutani T, Shigematsu Y, Mayumi M & Miyamoto K (2004) The rat *enhancer of split- and hairy-related protein-2* gene: hepatic



- expression, genomic structure, and promoter analysis. *Arch Biochem Biophys* **422**, 81-90.
27. Mitchell JA, Noisin EL, Hall RK, O'Brien RM, Imai E & Granner DK (1994) Integration of multiple signals through a complex hormone response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *Mol Endocrinol* **8**, 585-594.
28. Shimada N, Yamada K, Tanaka T, Kawata H, Mizutani T, Miyamoto K & Matsuzawa T (2001) Alterations of gene expression in endoderm differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Mol Reprod Dev* **60**, 165-171.
29. Towler MC & Hardie DG (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* **100**, 328-341.
30. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B & Gustafsson J-A (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol* **139**, 4252-4263.
31. Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG & Katzenellenbogen JA (2004) Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem* **12**, 1559-1567.
32. Atkinson C, Frankenfeld CL & Lampe JW (2005) Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med* **230**, 155-170.
33. Wang X-L, Hur H-G, Lee J-H, Kim K-T & Kim S-I (2005) Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl Environ Microbiol* **71**, 214-219.
34. Setchell KDR, Clerici C, Lephart ED, Cole SJ, Heenan C, Castellani D, Wolfe BE, Nechemias-Zimmer L, Brown NM, Lund TD, Handa RJ & Heubi JE (2005) S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr* **81**, 1072-1079.
35. Martelli AM, Faenza I, Billi AM, Falà F, Cocco L & Manzoli L (2003) Nuclear protein kinase C isoforms: key players in multiple cell functions? *Histol Histopathol* **18**, 1301-1312.
36. Choi K & Kim Y-B (2010) Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* **25**, 119-129.
37. Keranen LM, Dutil EM & Newton AC (1995) Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* **5**, 1394-1403.

38. Ae Park S, Choi M-S, Cho S-Y, Seo J-S, Jung UJ, Kim M-J, Sung M-K, Park YB & Lee M-K (2006) Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci* **79**, 1207-1213.
39. Lee J-S (2006) Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* **79**, 1578-1584.
40. Ha BG, Nagaoka M, Yonezawa T, Tanabe R, Woo JT, Kato H, Chung UI & Yagasaki K (2012) Regulatory mechanism for the stimulatory action of genistein on glucose uptake in vitro and in vivo. *J Nutr Biochem* **23**, 501-509.
41. Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H & Reynolds KA (2006) Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes* **55**, 1043-1050.
42. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M & Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**, 5592-5595.
43. Haneishi A, Takagi K, Asano K, Nakamura S, Kagawa N & Yamada K (2011) Genistein stimulates the insulin-dependent signaling pathway. *Front Biosci* **E3**, 1534-1540.
44. Hardie DG (2004) The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* **117**, 5479-5487.
45. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D & Hardie DG (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 27879-27887.
46. Ye L, Chan MY & Leung LK (2009) The soy isoflavone genistein induces estrogen synthesis in an extragonadal pathway. *Mol Cell Endocrinol* **302**, 73-80.
47. Lamon-Fava S (2000) Genistein activates apolipoprotein A-I gene expression in the human hepatoma cell line Hep G2. *J Nutr* **130**, 2489-2492.
48. Kim S, Shin H-J, Kim SY, Kim JH, Lee YS, Kim D-H & Lee M-O (2004) Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR alpha. *Mol Cell Endocrinol* **220**, 51-58.
49. Setchell KDR & Clerici C (2010) Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr* **140**, 1355S-1362S.
50. Song KB, Atkinson C, Frankenfeld CL, Jokela T, Wähälä K, Thomas WK & Lampe JW (2006) Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. *J Nutr* **136**, 1347-1351.

51. Akaza H, Miyanaga N, Takashima N, Naito S, Hirao Y, Tsukamoto T, Fujioka T, Mori M, Kim WJ, Song JM & Pantuck AJ (2004) Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. *Jpn J Clin Oncol* **34**, 86-89.
52. Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD & Evans BA (2002) Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr* **132**, 3168-3171.
53. Arora A, Nair MG & Strasburg GM (1998) Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys* **356**, 133-141.
54. Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR & Duthie GG (1998) Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys* **360**, 142-148.
55. Usui T, Tochiya M, Sasaki Y, Muranaka K, Yamakage H, Himeno A, Shimatsu A, Inaguma A, Ueno T, Uchiyama S & Satoh-Asahara N (in press) Effects of natural S-equol supplements on overweight or obesity and metabolic syndrome in the Japanese, based on sex and equol status. *Clin Endocrinol*.
56. Guo K, Zhang B, Chen C, Uchiyama S, Ueno T, Chen Y & Su Y (2010) Daidzein-metabolising phenotypes in relation to serum lipids and uric acid in adults in Guangzhou, China. *Br J Nutr* **104**, 118-124.
57. Wong JM, Kendall CW, Marchie A, Liu Z, Vidgen E, Holmes C, Jackson C-J, Josse RG, Pencharz PB, Rao AV, Vuksan V, Singer W, Jenkins DJ & Jenkins DJ (2012) Equol status and blood lipid profile in hyperlipidemia after consumption of diets containing soy foods. *Am J Clin Nutr* **95**, 564-571.
58. Farese RV, Sajjan MP & Standaert ML (2005) Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med* **230**, 593-605.
59. Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engström O, Ljunggren J, Gustafsson JA & Carlquist M (1999) Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J* **18**, 4608-4618.
60. Li Y, Ross-Viola JS, Shay NF, Moore DD & Ricketts M-L (2009) Human CYP3A4 and murine Cyp3A11 are regulated by equol and genistein via the pregnane X receptor in a species-specific manner. *J Nutr* **139**, 898-904.
61. Cho KW, Lee O-H, Banz WJ, Moustaid-Moussa N, Shay NF & Kim Y-C (2010) Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPAR $\gamma$  transcriptional activity. *J Nutr Biochem* **21**, 841-847.

62. Hess J, Angel P & Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* **117**, 5965-5973.
63. Blanquart C, Mansouri R, Paumelle R, Fruchart JC, Staels B & Glineur C (2004) The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol Endocrinol* **18**, 1906-1918.
64. Hug H & Sarre TF (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* **291**, 329-343.
65. Haneishi A, Takagi K, Asano K, Yamamoto T, Tanaka T, Nakamura S, Noguchi T & Yamada K (2012) Analysis of regulatory mechanisms of an insulin-inducible *SHARP-2* gene by (*S*)-Equol. *Arch Biochem Biophys* **525**, 32-39.

## 謝辞

本学位論文を纏めるにあたり、終始ご懇切なご指導、ご助言、ご援助を賜りました松本大学大学院健康科学研究科 山田一哉教授、信州大学大学院総合工学系研究科 中村宗一郎教授、鏡味裕教授、福田正樹教授、藤井博教授および真壁秀文教授並びに香川大学大学院農学研究科 小川雅廣教授にこころから感謝の意を表します。ありがとうございました。

また、本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご援助を頂きました信州大学農学部応用生命科学科 片山茂助教ならびに信州大学農学部応用生命科学科食品化学研究室の皆様方に厚く御礼を申し上げます。