

線虫を用いた食品機能性因子の探索

武藤 信吾（管理栄養学科・講師）

緒言

健康な身体を維持するためには栄養バランスの良い食事が重要である。質の良い食生活は生活習慣病などの疾病予防などの効果がある。神奈川県には、海産物から農産物まで豊かな食材に恵まれている地域である。これらの食品の特徴・特性を理解し付加価値を高めることは地産地消の推進のみならず、健康的な地域づくりにも重要であると考えられる。特に近年では機能性表示食品制度の普及などから、単に健康に良い食品というだけでは不十分で、食品と生体について分子レベルのエビデンスを求められる。そこで本研究では神奈川県産の果物を用いて比較的簡単に測定ができる酸化ストレスの指標として DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性試験、SOD (Superoxide dismutase) 様活性試験を、高血圧の指標として ACE (アンジオテンシン I 変換酵素) 阻害活性試験を実施した。さらに本研究では実験のモデル生物としてよく知られている線虫に着目した。線虫は大腸菌などの微生物を餌としている。口から肛門までの消化管を備えており、摂取された餌は、消化管内で酵素により分解され細胞膜を介して線虫体内に取り込まれる⁽¹⁾。したがって基本的な消化吸収システムをもつ線虫は、栄養の消化吸収や異物代謝研究のモデルに成り得ると考えられる。そこで本研究では、ヒトでは肝臓や小腸に発現していることが知られている核内受容体に着目した⁽²⁾。ヒトでは48種類の核内受容体が知られているが、線虫ではゲノム配列の解析から200以上の核内受容体が存在することが示唆されている⁽³⁾。ヒトの核内受容体で異物代謝に関わるものは CAR (constitutive androstane receptor) や PXR (pregnane X receptor) が知られている。細胞質に存在している CAR や PXR は外来異物に応答して、核内へと移行してチトクローム P 450 などの薬物代謝酵素遺伝子の発現を促進する⁽⁴⁾。さらに実験モデルとして広く利用されている線虫の食品機能研究に利用する可能性を、線虫とヒトの栄養代謝や異物代謝に関わる核内受容体の解析を行った。またそれらの因子と現在食品機能成分と注目集めている化合物が、そのリガンドに成り得るのか、コンピューターベースのドッキングシミュレーションを実施し検討した。

実験方法

試料

試料として2022年に神奈川県藤沢市で収穫されたぶどう（品種：藤稔）、梨（品種：豊水）、柿（品種：富有柿）を用いた。それぞれの果物は皮、種を取り除き可食部位50 gに対して10倍量の精製水を加えフードプロセッサーで粉碎した。粉碎液をろ過（東洋濾紙 No.2）して得られた抽出液を試料とした。試料は10 mL ずつ分注し、使用時まで-18℃で冷凍保存した。

DPPH ラジカル消去活性測定

DPPH は安定な合成ラジカルであり、その溶液は紫色を示す。抗酸化物質によりラジカルが消去されると透明な溶液へと変化する。DPPH ラジカル消去活性は DPPH Antioxidant Assay Kit (Dojindo) を用いて測定した。ラジカル消去活性は抗酸化物質である Trolox をポジティブコントロールとして用い、Trolox に対する相対的な活性として求めた。DPPH ラジカル消去活性は添付のマニュアルに従い求めた。

SOD 様活性試験

スーパーオキシド (O_2^-) は活性酸素種の一つであり、体内での酸化ストレスの要因となる⁽⁵⁾。SOD はスーパーオキシドを過酸化水素と酸素へと不均化する酵素である。SOD 様活性は SOD Assay Kit - WST (Dojindo) を用いて測定した。実験サンプルに SOD 様活性があると、本キットに含まれるキサンチンオキシダーゼにより生成されたスーパーオキシドをサンプルが不均化する。SOD 様活性はキット添付のマニュアルに従い求めた。

ACE 阻害活性

ACE は、血圧調整において、ペプチドホルモンであるアンジオテンシン I を切断し、血圧上昇作用をもつアンジオテンシン II へ変換する酵素である⁽⁶⁾。また同時に降圧ペプチドであるブラジキニンを分解する。すなわち ACE は血圧上昇に大きく関与している酵素である。ACE 阻害薬は高血圧症の治療薬にも用いられている。ACE 阻害活性は ACE 阻害活性測定キット (Dojindo) を用いて測定した。サンプルを含まないブランクの ACE 活性を 100% として、活性測定値の減少分を ACE 阻害活性とした。から ACE 阻害活性はキット添付のマニュアルに従い求めた。

核内受容体のアミノ酸相同性解析

線虫とヒトの核内受容体のアミノ酸配列の相同性を、Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) を使用して解析した⁽⁷⁾。解析の供した線虫およびヒトの核内受容体のアミノ酸配列は NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) データベースより得た。以下のアクセッションナンバーの配列、Daf-12 (AAD 34462.1)、NHR-8 (AAD 03684.1)、NHR-48 (NP_001361880.1)、CAR (NP_005113.1)、PXR (NP_003880.3)、VDR (NP_001361591.1)、を用いた。Daf-12 の LBD (リガンド結合ドメイン) と CAR、PXR、VDR との相同性は低いため、N 末端側の領域について相同性を解析した。

タンパク質立体構造予測

タンパク質立体構造予測には Web ベースで AlphaFold 2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) を用いて行った⁽⁸⁾。予測された構造の信頼度は構造モデル内に色別で提示した。入力アミノ酸配列はアミノ酸相同性解析に用いた配列を使用した。さらにヒト CAR (hCAR) およびマウス CAR (mCAR) については、全アミノ酸配列を使用した構造予測を行った。また線虫の Daf-12 全長の立体構造の予測モデルは低かったために鉤虫 *Ancylostoma ceylanicum* の Daf-12 (3 UP 0) を使用した。リガ

ンドが結合し得る領域を推定するため、その予測されたモデルのLBD内におけるCavityの部位および体積をCB-DOCK 2 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/index.php>)を用いて検索した⁽⁹⁾。

タンパク質ーリガンドドッキングシミュレーション

Daf-12、hCAR および mCAR と食品中に含まれる化合物との結合のドッキングシミュレーションをCB-DOCK 2を用いて行った。使用した化合物の以下の通りである。化合物の3D構造はPubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)より得て、カッコ内にPubchem CIDを記した。Resveratrol(445154)、Nicotinamide mononucleotide(14180)、Epigallocatechin(65064)、Isohumulone (93090)、Daizein (5391140)、Delphinidin (5391140)、Pelargonidin (440832)、Tcprobop (1,4-bis-[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen 5382)。タンパク質と化合物の結合のフィニティーはVina score (kcal/mol)で示され、-7.0以下の値を閾値とした。

結果

各果実の抗酸化活性を評価するために、各果実のDPPHラジカル消去活性を測定した。

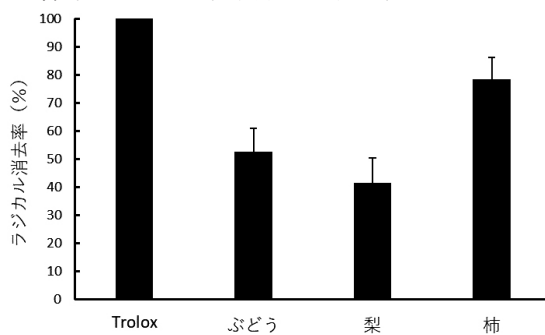


図1 各果実のDPPHラジカル消去活性
(Mean ±SD, n=5)

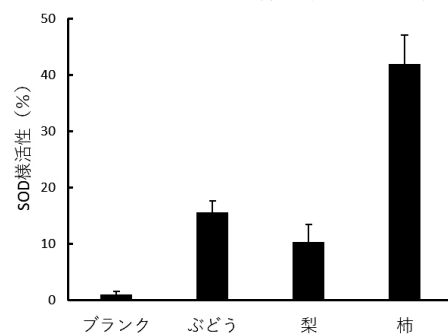


図2 各果実のSOD様活性
(Mean ±SD, n=5)

その結果を図1に示す。柿の抗酸化活性が最も高くTroloxに対して約80%の活性であった。次いでぶどうで約50%、梨では40%であった。一般的に果実は高い抗酸化活性を持つことが知られている。本実験で得られた結果も、果実が高い抗酸化活性を持つことを示している。

SODは植物や動物で活性酸素種であるスーパーオキシドを消去する酵素として重要である。図2に示すように、各果実に含まれるSOD様活性を測定したところ、柿が最も強いSOD様活性を持つことが明らかとなった。またぶどうと梨のSOD様活性では、ぶどうの方が5%高かった。

果物の健康に対する機能性として高血圧に対しての効果が期待されている。そこで実験サンプルにアンジオテンシンIを昇圧ペプチドであ

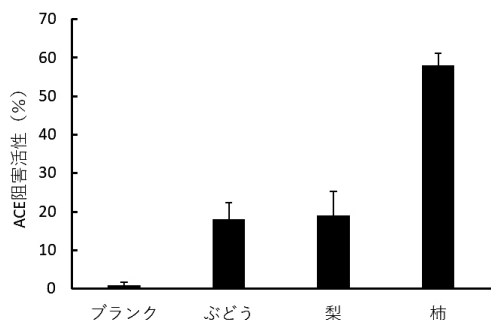


図3 各果実のACE阻害活性
(Mean ±SD, n=5)

るアンジオテンシンⅡへと変換阻害を行う成分が含まれているのか評価した。その結果、図3に示すように、柿に最も高い ACE 阻害活性が認められた。またぶどうと梨の ACE 阻害活性は、柿の1/3程度であった。

(A)



(B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
DAF-12	C	R	V	C	G	D	H	A	T	G	Y	N	F	N	V	I	T	C	E	S	C	K	A
NHR-48	C	R	V	C	G	D	K	A	F	S	Y	N	F	N	V	I	T	C	E	S	C	K	A
NHR-8	C	T	V	C	S	D	R	A	N	G	Y	N	F	G	V	L	T	C	E	S	C	K	A
CAR	C	V	V	C	G	D	Q	A	T	G	Y	H	F	N	A	L	T	C	E	G	C	K	G
PXR	C	R	V	C	G	D	K	A	T	G	Y	H	F	N	V	M	T	C	E	G	C	K	G
VDR	C	G	V	C	G	D	R	A	T	G	F	H	F	N	A	M	T	C	E	G	C	K	G

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
DAF-12	F	F	R	R	N	A	L	R	P	K	E	F	K	C	P	Y	S	-	E	D	C	E
NHR-48	F	F	R	R	N	A	N	K	E	K	E	I	R	C	P	F	N	-	E	Q	C	E
NHR-8	F	F	R	R	N	A	S	K	H	K	E	I	K	C	P	F	S	-	D	S	C	Q
CAR	F	F	R	R	T	V	S	K	S	I	G	P	T	C	P	F	A	-	G	S	C	E
PXR	F	F	R	R	A	M	K	R	N	A	R	L	R	C	P	F	R	K	G	A	C	E
VDR	F	F	R	R	S	M	K	R	K	A	L	F	T	C	P	F	N	-	G	D	C	R

*

	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
DAF-12	I	N	S	V	S	R	R	F	C	Q	K	C	R	L	R	K	C	F	T	V	G	M
NHR-48	I	N	M	V	S	R	R	F	C	Q	R	C	R	L	T	K	C	F	A	V	G	M
NHR-8	I	T	S	A	S	R	K	F	C	Q	A	C	R	L	N	K	C	F	A	V	G	M
CAR	V	S	K	T	Q	R	R	H	C	P	A	C	R	L	Q	K	C	L	D	A	G	M
PXR	I	T	R	K	T	R	R	Q	C	Q	A	C	R	L	R	K	C	L	E	S	G	M
VDR	I	T	K	D	N	R	R	H	C	Q	A	C	R	L	K	R	C	V	D	I	G	M

(C)

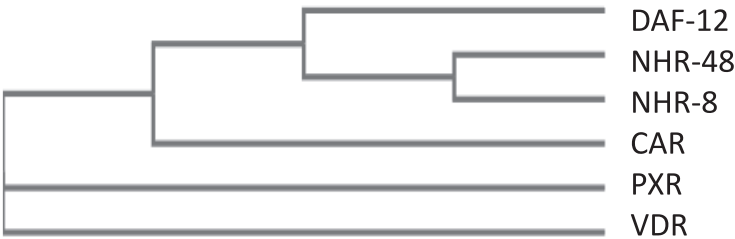


図4 線虫とヒトの核内受容体構造とアミノ酸配列相同性

(A)核内受容体構造の模式図 核内受容体は転写活性を持つN末端側のAF-1 ドメインとAF-2 ドメイン、ジンクフィンガーモチーフを持ち DNA に結合する DBD、リガンド結合ドメインLBD から構成される。(B)表1に示した線虫とヒトのDBDのClustal Omega解析によるアミノ酸配列アライメント。CARのThr 38はアスタリスクで示した。(C)Clustal Omega解析により示された系統樹。

表 1. 線虫としての核内受容体

グループ	ヒトNRs	線虫NRs	DBD 相同性 (%)	リガンド
NR1I	CAR	Daf-12	50	Xenobiotics
	PXR	NHR-8	58	Orphan
	VDR	NHR-48	49	Vitamin D

相同性はN末端側から最初のシステイン残基からGly-Metモチーフまでの間で示した。

図4(A)に示すように核内受容体の構造はアミノ酸配列から、転写活性を持つ AF-1 および AF-2 ドメイン、DBD と LBD とそれらをつなぐヒンジドメインからなる。表1に示すように、ヒトと線虫の DBD のアミノ酸配列の相同性は50%程度であった。InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を用いて、これら DBD のモチーフ検索をしたところ何れの核内受容体にもジンクフィンガーモチーフが認められた。核内受容体は DBD のジンクフィンガーモチーフを介して DNA と結合することが知られている⁽¹⁰⁾。また図2(B)のアスタリスクで示す CAR のスレオニン残基はリン酸化および脱リン酸化を受けて、標的遺伝子の発現を調節することが知られている⁽¹¹⁾。このスレオニン残基（もしくはセリン残基）は、多くの VDR やエストロジェンレセプター α など核内受容体で保存されている⁽¹²⁾。しかしながら、本研究で使用した線虫の Daf-12、NHR-8 および NHR-48 では、それらに相当するスレオニン残基あるいはセリン残基は保存されていなく、アスパラギンであった。また図4(C)に示した系統樹から、ヒトの CAR に最も核内受容体は Daf-12 の可能性が示唆された。

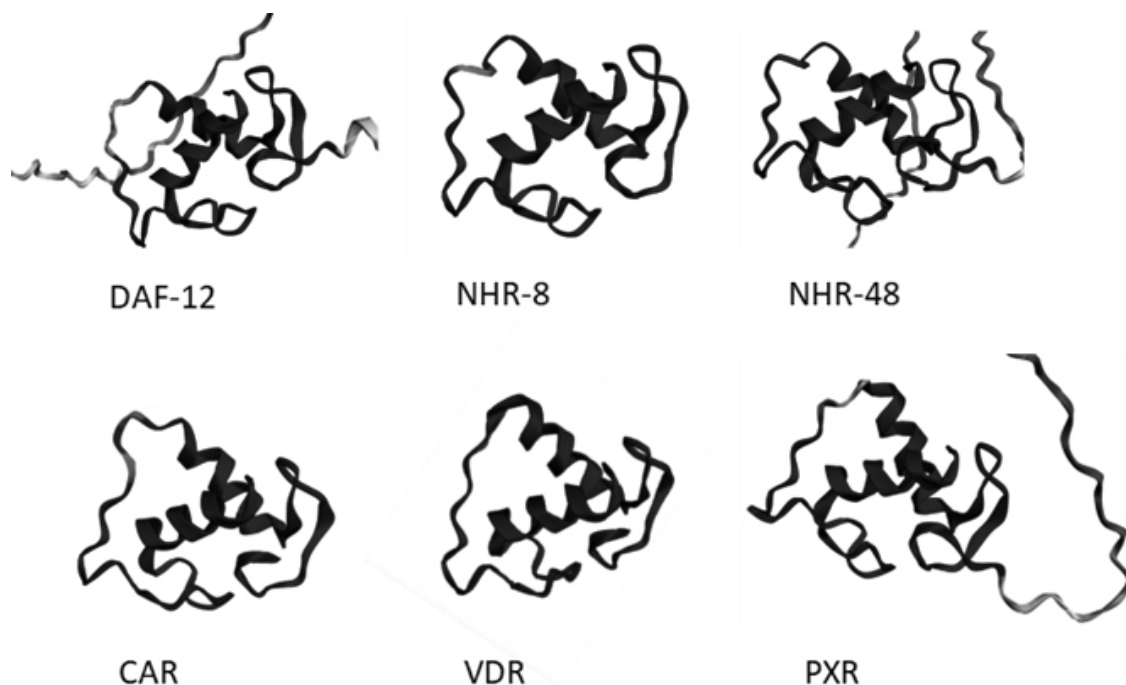


図5 AlphaFold 2 により予測した線虫とヒトの核内受容体の立体構造

AlphaFold 2 は人工知能を用いたタンパク質立体構造予測プログラムである。2021年に無償公開された⁽⁸⁾。精度の高い立体構造予測から利用が拡大している。本研究で利用した線虫とヒトの核内受容体の DBD の構造予測の結果を図5に示した。これらのタンパク質のアミノ酸配列の相同性は50%程度であったが、予測された構造では、ほとんどの領域で90%以上の信頼度の構造が得られた。DBD の構造の2つの α ヘリックスが重なり三角を形成している。その二つの α ヘリックス結ぶ領域に、ヒトの CAR では38番目のスレオニン残基があり、そのリン酸化・脱リン酸化状態により、 α ヘリックスに挟まれる DNA 配列との結合が調節されていると考えられている

表2 予測された Cavity の体積

No.	Cavity volume (\AA^3)		
	hCAR	Daf-12	mCAR
1	437	558	1119
2	374	543	481
3	203	432	306
4	177	None	129

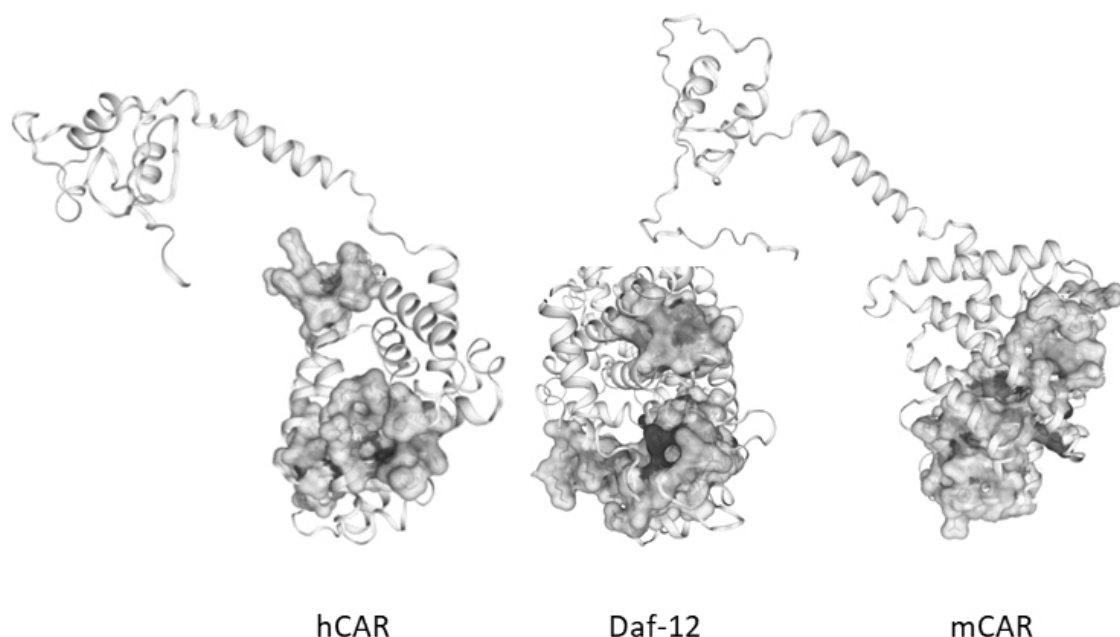


図6 LBD の Cavity 予測

LBD の立体構造を予測し、その構造に含まれる Cavity の箇所および体積を解析した。立体構造モデル内の充填領域が Cavity に相当する。

さらに LBD の立体的な空間 (Cavity) の予測を AlphaFold 2 で得られた構造をもとに CB-DOCK を用いて行った。図6に得られた Cavity の空間充填モデルを示した。hCAR と mCAR では4つの、Daf-12 では3つの Cavity が認められた。また最大 Cavity は mCAR で 1119 \AA^3 であった (表2)。

表3に健康効果が注目されている食品に含まれる化合物と、核内受容体それぞれのとのドッキングシミュレーションを CB-DOCK 2 を用いて実施した際の Vina score を示した。Vina score は CB-DOCK 2 が用いる AUTO DOCK Vina というアルゴリズムから得られるレセプターとリガンドの親和性を表したものである。その数値は低いと親和性が高く、一般に -7 以下が特異的な結合と考えられている⁽⁹⁾。また CAR のリガンドを介した活性化に

は種差が知られている⁽¹³⁾。TCPOBOP はマウスの CAR のアゴニスト（活性化剤）である。mCAR の Vina score は -6.6 であり、ある程度の親和性があるが、ヒトの CAR の数値は -1.8 であるので、本ドッキングシミュレーションにおいても妥当な特異性が示されている。図7に、最も Vina score が低かった Daf-12 と大豆に含まれるイソフラボンの一つである Daizein との結合部位の拡大モデルを示した。Daizein は4' 位と6位に水酸基を持つが、それぞれ Daf-12 の Ile 526 と Arg 536 と結合していることが観察された。

表3 食品由来化合物とのドッキングシミュレーション

Compound	Vina score (kcal/mol)		
	Daf-12	hCAR	mCAR
Resveratrol	-8.4	-6.3	-6.5
Nicotinamide mononucleotide	-8.7	-7.2	-7.3
Epigallocatechin	-8.8	-8.1	-6.6
Isohumulone	-9.6	-6.7	-8.1
Daizein	-9.7	-7.2	-7.7
Delphinidin	-9.4	-7.3	-7.4
Pelargonidin	-9.2	-6.8	-7.4
Tcpobop*	-9.9	-1.8	-6.6

* TCPOBOPはmCARのアゴニスト

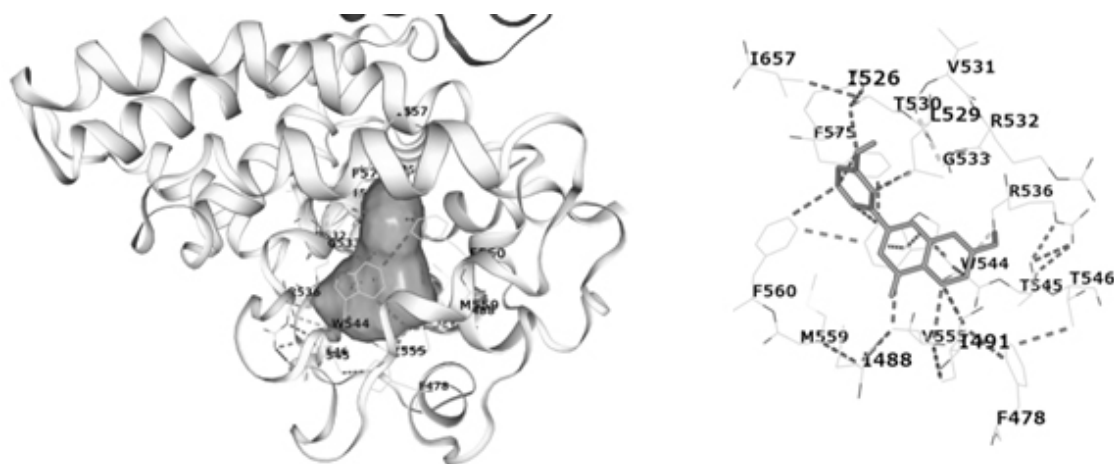


図7 Daf-12 と Daizein の結合モデル

(左) Daf-12 と Daizein の結合モデル。Daizein を充填モデルで示している。

(右) Daf-12 のアミノ酸残基と Daizein の結合

考察

本研究では神奈川県で生産されている果物であるぶどう、梨、柿の機能性について抗酸化性および高血圧症に関する観点から実験を実施した。酸化ストレスに対しては、DPPH 抗酸化性および SOD 様活性について、柿が最も高い機能性を持つことが示唆された。本研究に供した柿は甘柿の富有柿である。柿は黄色い果肉から多くの β カロテンを含んでいる。日本食品標準成分表2020年版によると可食部100 gあたりの β カロテン当量は甘柿で 420 μ g、ぶどうでは 39 μ g、梨では 0 であった。果物の抗酸化性物質についてはビタミンやポリフェノール等が関係しているのでぶどうや梨でも、柿の半分から1/3程度の抗酸化性が認められる。また ACE 阻害活性を指標とすると、柿が最も高血圧に対しては効果的であると考えられる。柿にはポリフェノールの一種であるタンニンを多く含んでいる。タンニンなどのフェノール化合物はタンパク質に非特異的に結合しやすく、その結合したタ

ンパク質を不溶化することが知られている⁽¹⁴⁾。本研究の実験系において、果実に含まれているポリフェノールが非特異的に ACE に結合して、ACE が不溶化した結果かもしれない。またこの酵素とポリフェノールの結合は非特異的であるのであれば、ぶどうや梨で測定された ACE 阻害活性についての特異性についての検討が必要であると考えられる。そのような目的のためには、抽出液から対象物質を精製し結合定数や阻害定数を求める実験が必要である。このような *in vitro* の実験系は、植物がもつ性質を検討する上で重要であると考えられる。しかしながら生体内での酸化ストレスや高血圧に対して食品成分がどのような分子機構で効果を発揮するのかを検討するには不十分である。したがって実際の生体内での食品成分の挙動を解析する必要がある。

CAR や PXR と相同性をもつ線虫の核内受容体では Daf-12、NHR-8 および NHR-48 が報告されている⁽¹⁵⁾。図4に示すアミノ酸配列解析の結果から Daf-12 が hCAR と近いことが分かった。図5に示すように、AlphaFold 2 で予測された DBD の構造は、それぞれ似ている構造を持っていることが分かった。ヒトやマウスの CAR は DBD 内の38番目のスレオニン残基のリン酸化・脱リン酸化により標的 DNA への結合が制御されている⁽⁷⁾。しかしながら Daf-12 では、それに相当するリン酸化サイトはなかった。Daf-12 の転写活性の制御がリン酸化に左右され得るのか明らかにするためには、DNA との結合を測定するゲルシフトアッセイや細胞内での局在などの観察が必要であると考えられる。

さらに食品に含まれる化合物が核内受容体のリガンドとなり得るのか検討するため、いくつかの化合物を用いてドッキングシミュレーションを行った。先に、リガンド分子内の Cavity の推定を行ったところ、hCAR、mCAR および Daf-12 には表2に示す複数の Cavity が推察された。これらの核内受容体は、様々な外来化合物に対して反応を示すことから、複数のリガンド結合サイトを持つことは理にかなっているのかもしれない。赤ワインに含まれるレスベラトールや緑黄色野菜に含まれる Nicotinamide mononucleotide (NMN) は、長寿遺伝子として知られているサーチュイン遺伝子を制御し、長寿化に貢献することが知られている⁽¹⁶⁾。また大豆に含まれるイソフラボンの一つであるダイゼインは Daf-12 と最も強く結合することが示唆された。大豆イソフラボンにはエストロゲン様作用があり、ホルモン依存性乳がんの予防に関与すると考えられている⁽¹⁷⁾。ホップに含まれるビールの苦みのもととなるイソフムロンは脂肪酸をリガンドとする核内受容体の PPAR α （ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体）の活性化を介して、血糖値上昇抑制効果とインスリン抵抗性改善効果があることが報告されている⁽¹⁸⁾。ペラルゴニジンとデルフィニジンは赤紫色のアントシアニン系の色素の一種であり、いくつかの核内受容体を活性化してコレステロール沈着による動脈硬化を防ぐ可能性が示唆されている⁽¹⁹⁾。エピガロカテキンはカテキン誘導体の一種で緑茶や渋柿の苦みの主な成分である。培養細胞を用いたレポーターアッセイにおいて、エピガロカテキンは mCAR ではなく hCAR を活性化する報告がある⁽²⁰⁾。今回、実施したドッキングシミュレーションでは、これらの化合物が核内受容体に結合し得るモデルを示した。3-Keto-4-Cholestenoic Acid (dafachronic acid) は、コレステロールの C 3 と C 26 の位置を線虫の Daf-9 (哺乳類のチトクローム P 450 CYP 27 A の Ortholog) の存在下で酸化することにより合成される。この物質が線虫 Daf-12 の内在的なリガンドとなり、環境および食餌の合図にตอบสนองして、休止期、生殖発生、脂肪代謝、および寿命を制御することが報告されている^(21, 22)。

今後は、線虫を生体モデルとして用いて食品機能成分の解析を進める。線虫の Daf-12 変異体が報告されており、酸化ストレスや熱ストレスに対する daf-12 は寿命を伸ばしたり縮めたりする調節する遺伝子であることが明らかとなった⁽²³⁾。食品由来の成分が特定の遺伝子の抑制を通じて老化やストレス応答を調節するメカニズムや、核内受容体によりある特定の遺伝子が調節を受け寿命の決定における役割を検討していきたい。さらに近年の動物実験を減らそうとする観点からも線虫の利用は注目されている⁽⁸⁾。線虫の外来異物受容体の研究は、化学物質の安全性評価法の開発についても期待できる。

参考文献

- (1) 小原雄治編 線虫－1000 細胞のシンフォニー 1997, 共立出版
- (2) Modica S. *et al.*, The intestinal nuclear receptor signature with epithelial localization patterns and expression modulation in tumors. *Gastroenterology*, 2010, 138, 636–648.
- (3) Sluder A.E. *et al.*, The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes. *Genome Res.*, 1999, 9, 103 – 120.
- (4) Sueyoshi T. *et al.*, The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP 2 B 6 gene. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 6043–6046.
- (5) Li Y. *et al.*, Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.*, 1995, 11, 376–81.
- (6) Skeggs LT Jr, *et al.*, The existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med.* 1954, 99. 275–82.
- (7) Madeira F. *et al.*, Search and sequence analysis tools services from EMBL–EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50, W 276–W 279.
- (8) Jumper J. *et al.*, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, 596, 583–592.
- (9) Yang L. *et al.*, CB–Dock 2 : improved protein–ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50, W 159 –W 164.
- (10) Hard T. *et al.*, Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA–binding domain. *Science*, 1990, 249, 157–60.
- (11) Mutoh S. *et al.*, Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR 1 I 3). *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 34785–34792.
- (12) Kai S. *et al.*, Phosphorylation of a Conserved Serine in the Deoxyribonucleic Acid Binding Domain of Nuclear Receptors Alters Intracellular Localization. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21, 1297 – 1311.
- (13) Moore J. *et al.*, Functional and structural comparison of PXR and CAR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1619, 235–238.
- (14) 桜庭英剛, 一瀬肇. タンニン類による酸化酵素の不活性化とアントシアニン色素の安定化. *日本農芸化学会誌* 1982, 56, 517–524.
- (15) Gissendanne CR. *et al.*, Expression and function of conserved nuclear receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 2004, 266, 399 – 416.

- (16) Imai S. *et al.*, Transcriptional silencing and longevity protein Sir 2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 2000, 403, 795–800.
- (17) Dixon RA. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004, 55, 225–261.
- (18) Miura Y. *et al.*, Dietary isohumulones, the bitter components of beer, raise plasma HDL-cholesterol levels and reduce liver cholesterol and triacylglycerol contents similar to PPARalpha activations in C 57 BL/6 mice. *Br. J. Nutr.*, 2005, 93, 559–567.
- (19) Xia M. *et al.*, Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages : the role of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -liver X receptor α -ABCA 1 pathway. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 36792–36801.
- (20) Yao R. *et al.*, Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 2168–2173.
- (21) Wang Z. *et al.*, The Nuclear Receptor DAF-12 Regulates Nutrient Metabolism and Reproductive Growth in Nematodes. *PLOS Genetics*, 2015, 11, e 1005027
- (22) Motola LD. *et al.*, Identification of Ligands for DAF-12 that Govern Dauer Formation and Reproduction in *C. elegans*. *Cell*, 2006, 124, 1209–1223.
- (23) Fisher AL, Lithgow GJ. The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *Caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms. *Aging Cell*, 2006, 5, 127–138.
- (24) Avila A., *et al.*, An FDA/CDER perspective on nonclinical testing strategies : Classical toxicology approaches and new approach methodologies (NAMs), *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2020, 114, 104662