

サルコペニアに対する大豆由来イソフラボンの予防効果

平坂勝也^{1,2*}・前田 翼²・春名真里江²・安倍知紀²・越智ありさ²・真板（大野）綾子²・
近藤（手嶋）茂忠²・谷山茂人¹・橘 勝康¹・二川 健²

¹長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
²徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

Effects of Isoflavones Derived from Soy Beans on Muscle Atrophy

Katsuya HIRASAKA^{*1,2}, Tasuku MAEDA², Marie HARUNA², Tomoki ABE²,
Arisa OCHI², Ayako OHNO-MAITA², Shigetada TESHIMA-KONDO²,
Shigeto TANIYAMA¹, Katsuyasu TACHIBANA¹ and Takeshi NIKAWA²

¹Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University,
Nagasaki 852-8521

²Department of Nutritional Physiology, Institute of Health Biosciences, The University of
Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis contributes to a progression of age-associated muscle atrophy (sarcopenia). Our previous report has shown that isoflavones derived from soy beans prevent the muscle-specific ubiquitin ligase MuRF1-mediated muscle atrophy through SIRT1 activation in C2C12 myotubes. In this study, we examined the effect of isoflavones derived from soy extracts in atrophied muscle of mice. The intake of soy isoflavone prevented reduction of muscle wet weight and myofiber size. The expression of SIRT1 in muscle of mice fed the soy isoflavone diet was slightly increased, compared with that of mice fed the normal diet. However, there were no significant differences between the normal and soy isoflavone diets in the expression of Atrogin-1 and MuRF1. Sarcopenia causes dysfunction of neuromuscular junction as well as a decrease in muscle strength and mass. Interestingly, soy isoflavone protected the expression of acetylcholine receptors impaired by denervation. These results suggest that isoflavones suppress age-related muscle atrophy through an improvement of neuromuscular junction. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 150-155, 2014.

Key words : muscle atrophy, ubiquitin ligase, isoflavone

*〒852-8521 長崎市文教町1-14

近年の研究において、萎縮した骨格筋ではユビキチンプロテアソームが活性化していることが分かってきた。我々は、宇宙フライトやベッドレストにより萎縮した骨格筋ではユビキチン化たん白質の蓄積が認められることを報告した^{1,2)}。同様に、加齢によって萎縮したラットの骨格筋においてもユビキチン化たん白質の蓄積が認められる³⁾。このように、萎縮筋ではユビキチンプロテアソーム系のたん白質分解経路が重要な働きをしている。骨格筋特異的なユビキチンリガーゼは、主にAtrogin-1/MAFbxとmuscle RING finger 1 (MuRF1)の2種類が知られている。Atrogin-1とMuRF1ノックアウトマウスは、それぞれ坐骨神経切除による萎縮筋に対して抵抗性を示すことから、筋萎縮の原因因子として知られるようになった^{4,5)}。

老化に伴い、血中の炎症性サイトカインが上昇することが知られており、慢性的な炎症状態が老化による筋萎縮の原因の一つであると考えられている。TNF (tumor necrosis factor) - α やTWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis) のような炎症性サイトカインはNF κ Bの活性化を介してMuRF1の発現を誘導する。以前の我々の結果において、NF κ Bのアセチル化ミュータント (アセチル化部位の点変異) や脱アセチル化酵素であるSIRT1の活性化剤はMuRF1の転写活性を阻害することを見出した。したがって、TNF- α によるMuRF1の発現調節にはNF κ Bのアセチル化が重要な働きをしていることが示唆された。興味深いことに、大豆由来イソフラボンはSIRT1活性化に直接作用しないが、SIRT1の発現やAMPキナーゼを介してSIRT1活性化に間接的に作用することがわかった。さらに、C2C12筋管細胞において、大豆由来イソフラボンはTNF- α によって誘導されるMuRF1の転写活性や筋管萎縮を抑制することを報告した⁶⁾。

本研究では、大豆イソフラボンの老化による筋萎縮予防効果をマウス筋萎縮モデルを用いてin vivoで検討した。

方 法

動物実験

8週齢、25-35 gのC57BL/6j系雄マウスは $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、午前8時から午後8時までを明期として飼育した。実験動物の取り扱いには徳島大学実験動物取り扱い指針に則して行った。マウスは普通食を1週間自由摂取させた後、普通食群 (NORMAL) と粗精製大豆イソフラボン (ソヤフラボンHG, 不二製油) を重量比0.4%で配合した飼料を給餌させた群 (SOY) に分け、それぞれ

の試験食を4週間自由摂取させた。その後、筋萎縮モデルを模倣するために、右脚に坐骨神経切除を6日間施した。

坐骨神経切除

4週間のそれぞれの試験食を給餌させた後、筋萎縮モデルを模倣するために、右脚に坐骨神経切除を6日間施した。マウスの右大腿骨後面の皮膚を切開し、坐骨神経を確認するために後部筋肉を分割した。慢性的な坐骨神経切除状態を得るために、坐骨神経を5 mm長取り除いた。

筋肉採取

マウスは6日間、坐骨神経が切除された状態にし、終了後直ちに後肢の前脛骨筋、腓腹筋を採取した。湿重量を測定し、体重当りの筋湿重量を算出した。このとき、普通食群の坐骨神経切除後0日目の平均筋湿重量を100%とした。

Real-time reverse transcription and polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) 法

Real-time RT-PCR は以前と同様の方法で行った⁶⁾。RNAに終濃度1 μM Oligo-dTプライマー、10 μM Randomプライマー、0.5 mM dNTPs (Promega)、200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を加え、 42°C 60分、 95°C 5分逆転写反応を行い、cDNAを合成した。合成したcDNAにSYBR Premix Ex Taq (Applied Biosystems)、プライマーを加え、Real-time PCR system (Applied Biosystems 7300) を用いて反応と解析を行った。反応条件は、 50°C 2分、 95°C 10分の初期変性し、その後、 95°C 15秒、 58°C 30秒を40サイクル繰り返した。内部標準として18S ribosomal RNA (18S) を用いた。

蛍光染色法とヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色法

マウスから前脛骨筋を取り出し、OCT compoundで包埋し、液体窒素で急冷した。クリオスタットの庫内を -20°C に下げ、薄切 (3 μm) し、スライドグラスに付着させた。室温で風乾し、1 mM CaCl_2 を含むTBS (TBS-Ca) で洗浄後、冷アセトンで固定した。固定後、TBS-Caで洗浄した。このスライドグラスを湿箱に並べ、5%精製ミルクカゼイン (雪印乳業) を含むTBS-Caで室温・1時間反応させ、TBS-Caで洗浄した。次にa-Bungarotoxin-FITC (Life Technologies) と室温で1時間反応させ、TBS-Caで洗浄した⁷⁾。蛍光退色防止剤VECTASHIELD (VECTOR) で封入し、

カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡下 (BIOREVO, BZ-9000, KEYENCE) で観察した。H.E染色は切片をアセトン固定後、ヘマトキシリン液・エオジン液で染色した。染色後は流水水洗、アルコールで脱水し、さらにキシレンで透徹後、マリノールで封入し、カバーガラスをかけて顕微鏡下で観察した。

結果と考察

大豆イソフラボン摂取による体重変化と摂食量

4週間の大豆イソフラボン摂取が体重変動に影響を及ぼすか検討したところ、大豆摂取群と普通食摂取群の体重増加および摂食量における変化は認められなかった (Fig. 1A, B)。

坐骨神経切除による筋萎縮に対する大豆イソフラボン摂取の効果

我々はC2C12筋管細胞を用いた研究において、大豆由来イソフラボンがTNF- α によって誘導されるMuRF1の転写活性や筋管萎縮を抑制しうることを報告している⁶⁾。大豆イソフラボンがマウス筋萎縮モデルにおいても効果的かどうか検討した。6日間の坐骨神経切除により、普通食群では筋湿重量がおよそ78%まで減少した。一方、大豆イソフラボン摂取群では、普通食群と比較して、坐骨神経切除による筋萎縮に対して抵抗性を示した (Fig. 2A, B)。特に、普通食群の筋横断面積は6日間の坐骨神経切除により、2,500 μm ~ 4,000 μm の太い筋線維が減少し、500 μm ~ 2,000 μm の細い筋線維が増大した。一方、大豆イソフラボン摂取群は6日間の坐骨神経切除により細い筋線維の出現が認められたが、普通食群と比較して、筋線維面

積の減少に抵抗性を示した (Fig. 2C, D)。したがって、大豆イソフラボンは筋細胞を用いた萎縮モデルと同様に、マウスを用いた萎縮モデルにおいても筋萎縮を抑制することが示唆された。

大豆イソフラボン摂取が脱アセチル化たん白質や筋萎縮関連遺伝子に及ぼす影響

大豆イソフラボンを摂取したマウスは筋萎縮に対して抵抗性を示した。筋萎縮時にはたん白質分解の亢進が認められる。したがって、筋萎縮のマーカー遺伝子である筋特異的ユビキチンリガーゼAtrogin-1とMuRF1の発現が大豆イソフラボン摂取により抑制された可能性が示唆される。そこで、坐骨神経切除によって誘導される筋萎縮関連遺伝子の発現をリアルタイムPCRで検討した。普通食群において、6日間の坐骨神経切除はAtrogin-1、MuRF1の発現をおよそ5倍上昇させた。大豆イソフラボン摂取群においてもまた、普通食群と同様に、坐骨神経切除によるAtrogin-1、MuRF1の発現上昇が認められ、筋管細胞で得られたような大豆イソフラボンの筋萎縮関連遺伝子発現抑制効果は認められなかった (Fig. 3A, B)。一方、脱アセチル化酵素であるSIRT1の発現は大豆イソフラボン摂取により、上昇する傾向を示した (Fig. 3C)。したがって、筋萎縮関連遺伝子群の発現抑制には大豆イソフラボン濃度や純度を上げる必要がある事が示唆された。

大豆イソフラボン摂取が骨格筋内アセチルコリンレセプターに及ぼす影響

大豆イソフラボン摂取は筋萎縮関連遺伝子群の発現を抑制できなかったにもかかわらず、筋萎縮抑制効果を示したことから、大豆イソフラボンが他の分子に作用した可能性が示唆される。大豆イソフラボンのようなポリフェノール類はボツリヌス毒素による神経筋接合部の障害に対して、保護作用がある事が報告されている⁸⁾。そこで、大豆イソフラボン摂取が坐骨神経切除により障害された神経筋接合部アセチルコリンレセプターに影響するかどうか検討した。普通食群では坐骨神経切除により障害されたアセチルコリンレセプターが観察された (Fig. 4)。これに対して、坐骨神経切除に供した大豆イソフラボン摂取群はアセチルコリンレセプターの障害が軽度であった (Fig. 4)。以上の結果から、大豆イソフラボンによる筋萎縮抑制効果は神経筋接合部保護作用によって引き起こされることが示唆された。しかしながら、大豆イソフラボンの神経筋接合部への作用機序については不明な点が多く、今後の課題である。

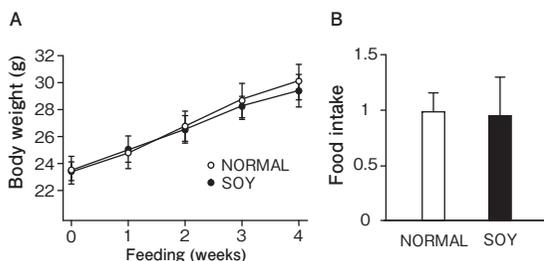


Fig. 1. Changes of body weight and food intake from feeding Soyflavone. (A) Body weight during 4 weeks in feeding normal and Soyflavone diet (control diet, n=12; Soyflavone diet, n=12). (B) Average daily food intakes of mice fed the normal and Soyflavone diet.

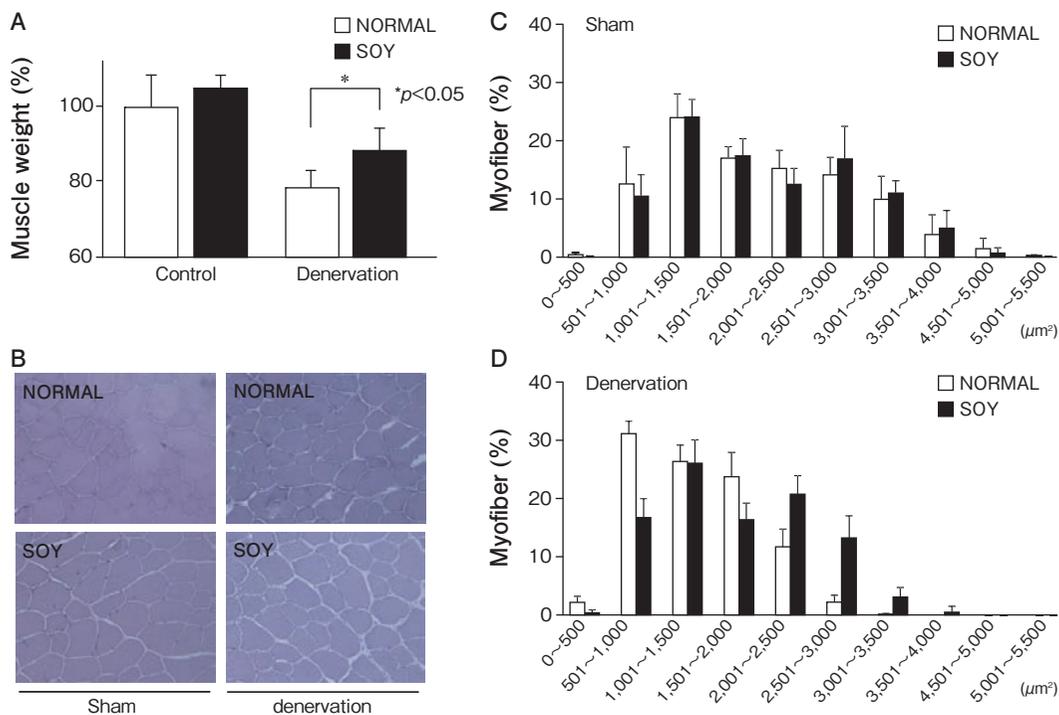


Fig. 2. Effect of dietary soy isoflavone on denervation-induced decrease in muscle wet weight and muscle cross-sectional area. Muscles were isolated at 6 days after operation. (A) Wet weight of gastrocnemius muscle was measured. Data are mean \pm SD (n=6). * p <0.05, compared with denervated muscle of mice fed the normal diet. (B) Representative sections (5- μ m thickness) from tibialis anterior muscle of denervation mice on day 6 were stained with hematoxylin and eosin (H. E.). (C, D) The distributions of cross-sectional areas (CSA) indicate the ratio of the number of myofibers with the indicated area to the number of total myofibers in the section.

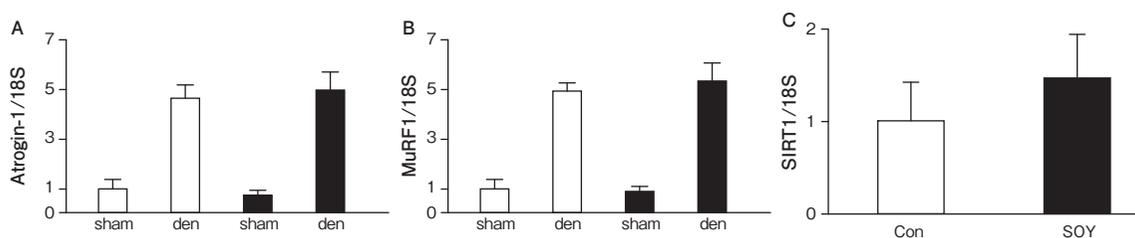


Fig. 3. Effect of dietary soy isoflavone on atrogenes (Atrogin-1 and MuRF1) and SIRT1 expression in denervated muscle. Total RNA of gastrocnemius muscle was extracted and subjected to real-time RT-PCR. The intensity ratio of (A) Atrogin-1, (B) MuRF1 and (C) SIRT1 to 18S was calculated. Data are mean \pm SD (n=3). 18S indicates 18S ribosomal RNA.

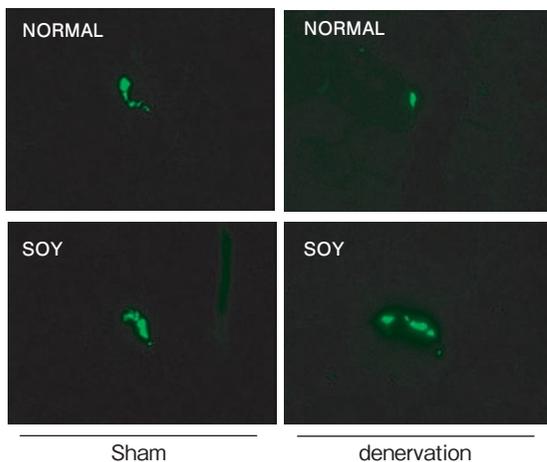


Fig. 4. Effect of dietary soy isoflavone on acetylcholine receptor expression in denervated muscle. Sections (5- μm thickness) of tibialis anterior (TA) muscle from mice were fluorescently stained with α -Bungarotoxin-FITC.

要 約

加齢による筋萎縮（サルコペニア）の予防は高齢者のQOL向上とロコモティブシンドローム発症予防に重要である。サルコペニアでは、たん白質分解に関与するユビキチンリガーゼが重要な働きをしていることが知られている。我々は、マウス由来C2C12筋管細胞を用いて、大豆由来成分であるゲニステインとダイゼインが脱アセチル化酵素であるSIRT1の発現を上昇させ、ユビキチンリガーゼの転写活性を阻害することを報告した。本研究では、大豆イソフラボンの老化による筋萎縮予防効果をマウス筋萎縮モデルを用いてin vivoで検討した。8週齢C57BL/6j雄マウスに、粗精製大豆イソフラボン（ソヤフラボンHG, 不二製油）重量比0.4%で配合した飼料を4週間給餌させ、その後、筋萎縮モデルである坐骨神経切除を6日間施した。坐骨神経切除により、コントロール群では筋重量がおよそ78%まで減少したが、大豆イソフラボン摂取群では坐骨神経切除による筋萎縮に対して抵抗性を示した。特に、コントロール群の筋横断面積は2,500 μm ~ 4,000 μm の太い筋線維が減少し、500 μm ~ 2,000 μm の細い筋線維が増大した。一方、大豆イソフラボン摂取群は筋線維面積の減少に抵抗性を示した。次に、大豆イソフラボン摂取が筋肉内SIRT mRNA発現を誘導するかどうかを検討したところ、筋管細胞を用いた以前の結果と同様に、大豆イソフラボン摂取群ではSIRT1の発現が上昇する傾向を示した。しかしながら、大豆イソフラボン摂取はユビキチンリガーゼ発現抑制には効果を示さなかった。坐骨神経切除は老齡筋で見られるような神経筋接合部変性が起こる。興味深いことに、大豆イソフラボン摂取群では坐骨神経切除で観察されるアセチルコリンレセプターの障害がほとんど起こらなかった。以上の結果より、大豆イソフラボンは神経筋接合部変性を抑制することでサルコペニアの予防につながりうるということが考えられた。

文 献

- 1) Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin KM, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K and Kishi K (2001): Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J*, **15**, 1279-1281.
- 2) Ogawa T, Furochi H, Mameoka M, Hirasaka K, Onishi Y, Suzue N, Oarada M, Akamatsu M, Akima H, Fukunaga T, Kishi K, Yasui N, Ishidoh K, Fukuoka H and Nikawa T (2006): Ubiquitin ligase gene expression in healthy volunteers with 20-day bedrest. *Muscle Nerve*, **34**, 463-469.
- 3) Altun M, Besche HC, Overkleeft HS, Piccirillo R, Edelmann MJ, Kessler BM, Goldberg AL and Ulfhake B (2010): Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem*, **285**, 39597-39608.
- 4) Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD and Glass DJ (2001): Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, **294**, 1704-1708.
- 5) Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A and Goldberg AL (2001): Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 14440-14445.
- 6) Hirasaka K, Maeda T, Ikeda C, Haruna M, Kohno S, Abe T, Ochi A, Mukai R, Oarada M, Teshima-Kondo S, Ohno A, Okumura Y, Terao J and Nikawa T (2013): Isoflavones derived from soy beans prevent MuRF1-mediated muscle atrophy in C2C12 myotubes through SIRT1 activation. *J Nutr Sci Vitaminol*, **59**, 317-324.
- 7) Rudolf R, Bogomolovas J, Strack S, Choi KR, Khan MM, Wagner A, Brohm K, Hanashima A, Gasch A, Labeit D and Labeit S (2013): Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. *Age (Dordr)*, **35**, 1663-1674.
- 8) Satoh E, Ishii T, Shimizu Y, Sawamura S and Nishimura M (2002): The mechanism underlying the protective effect of the thearubigin fraction of black tea (*Camellia sinensis*) extract against the neuromuscular blocking action of botulinum neurotoxins. *Pharmacol Toxicol*, **90**, 199-202.