

大豆イソフラボンが骨格筋線維型に及ぼす影響

水野谷航*・下村健太・佐藤祐介・中村真子・辰巳隆一・池内義秀

九州大学大学院農学研究科

Effect of Dietary Soy Isoflavones on Rat Skeletal Muscle Fiber Type

Wataru MIZUNOYA*, Kenta SHIMOMURA, Yusuke SATO, Mako NAKAMURA,
Ryuichi TATSUMI and Yoshihide IKEUCHI

Graduate School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) is a key regulator of skeletal muscle fiber type. Soy isoflavones (daidzein, genistein and glycitein) are thought to be candidates for PPAR δ ligands. We addressed whether dietary soy isoflavones intake affects skeletal muscle fiber type via the PPAR δ pathway in rats. Seven-week-old male Wistar rats were fed a diet with or without 0.4% (w/w) crude water-soluble soy isoflavones (Soyaflavone HG) for 4 weeks. After the feeding period, blood and tissue samples were collected. The tibialis anterior muscle mass was significantly lower in the soy isoflavone-fed group. The proportion of myosin heavy chain I (slow type) in EDL muscle was significantly increased in the soy isoflavone-fed group. This result suggests that intake of soy isoflavones induced an increase in slow type fibers of rat skeletal muscle. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 157-161, 2011.

Key words : soy isoflavone, skeletal muscle, fiber type, myosin heavy chain, PPAR δ

現在、肥満に起因する生活習慣病の増加が大きな社会問題となっている。脂肪酸酸化能に優れる遅筋型筋線維を増加する食品成分が発見されれば、肥満および生活習慣病予防への応用が期待できる。核内受容体の一種であるPPAR δ は脂肪代謝に関わるたん白質の発現量を調節する転写因子である。近年、有酸素運動により骨格筋PPAR δ の発現が上昇し、標的遺伝子である脂肪代謝関連たん白質の発現を増加させることが明

らかとなった¹⁾。さらにPPAR δ の過剰発現マウスでは、骨格筋が遅筋化することが報告されている²⁾。これらの結果より、骨格筋PPAR δ は遅筋型筋線維の比率を調節する鍵因子と考えられる。

大豆に含まれるイソフラボンアグリコンのダイゼインはPPAR δ のリガンド活性を有することが知られている³⁾。さらに、大豆イソフラボンには体脂肪低下(脂肪代謝の亢進)作用が認められる⁴⁾。我々は、体脂肪の低下の一つの原因として、大豆イソフラボンがPPAR δ のリガンドとして作用し、その結果増加した

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

骨格筋の遅筋型筋線維により引き起こされたのではないかと考えた。

本研究の目的はこの仮説に基づき、ラットに大豆イソフラボンを含む精製飼料を与え、脂肪代謝の亢進および骨格筋の遅筋型筋線維が増加するの調べることに、その作用機序の鍵分子としてPPAR δ の関与を調べることである。

方 法

実験動物

動物は7週齢Wistar系雄ラットを用いた。実験は、1週間の予備飼育後に行った。水は自由摂取させた。動物はステンレス製の個別ケージで、室温22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、湿度50 $\pm$ 10%、12時間照明の空調動物室内にて飼育した。実験動物の取扱いは九州大学実験動物取扱指針に則して行った。

飼料と給餌期間

AIN-93G 組成に基づき、粉末飼料を作成した。ただし、大豆油はコーン油に置き換えた。大豆イソフラボン配合飼料には、重量比0.4%になるようソヤフラボンHG（不二製油）を添加した（Table 1）。ソヤフラボンHGの成分分析値はTable 2に示すとおりである。飼料はpair-feedingを行い、摂食量を揃えた。給餌期間は4週間とし、飼育期間終了後、脚部の速筋主体の筋である、前脛骨筋（TA）、長趾伸筋（EDL）、足底筋、腓腹筋と遅筋主体のヒラメ筋を採取し、分析まで-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

ミオシン重鎖（MyHC）アイソフォーム組成のSDS-PAGE 解析

MyHCアイソフォームを明確に分離するSDS-PAGE法⁵⁾で、各筋組織中のミオシン重鎖アイソフォーム（MyHC1, 2A, 2X, 2B）を分離し、それらの割合をImageJで解析した。

Western blotting

ヒラメ筋、EDLからたん白質を抽出し、Western blottingにより、代謝に関わるたん白質でPPAR δ の標的遺伝子であるUCP3（uncoupling protein-3）⁶⁾、ミトコンドリアマーカー porinの発現量を測定した。ローディングコントロールとして β -actinを用いた。

結果と考察

飼育終了時の体重と総摂食量について、大豆イソフラボン群（S群）と対照群（C群）の間に有意な差は観察されなかった。飼育終了時の、組織重量について

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Control	Soy isoflavone
	g/kg diet	
Soyaflavone HG	0.0	4.0
Casein	200.0	200.0
Cornstarch	397.5	393.5
Alpharized cornstarch	132.0	132.0
Sucrose	100.0	100.0
Corn oil	70.0	70.0
Cellulose	50.0	50.0
Mineral mix (AIN-93G-MX)	35.0	35.0
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5
<i>tert</i> -Butylhydroquinone (mg)	14.0	14.0

Table 2. Composition of Soyaflavone HG

Ingredient	% (w/w)
Soy isoflavones	58.0
Daidzin	8.5
Genistin	0.4
Glycitin	4.8
Malonyl daidzin	26.6
Malonyl genistin	6.0
Malonyl glycitin	11.2
Acetyl daidzin	0.5
Acetyl genistin	0.0
Acetyl glycitin	0.0
Daidzein	0.0
Genistein	0.0
Glycitein	0.0
Soy saponins	9.1
Water	2.4
Ash	3.4
Protein	12.2
Others	14.9

は、脂肪組織や各種臓器では、S群とC群の間に有意な変化は観察されなかったが、S群の骨格筋のTA筋重量で有意な低下、腓腹筋重量で低下傾向が観察された（Table 3）大豆イソフラボン摂取による筋重量の低下は、これまで報告がないが、大豆イソフラボンの女性ホルモン様作用によるものかも知れない。再現性の確認も含め、筋萎縮と大豆イソフラボンの関連性は、今後の検討課題である。

筋線維型を規定する最も重要なたん白質であるMyHCアイソフォームの組成比は、S群のEDLの遅筋型（MyHC1）がC群に比べ、有意に増加していた（Fig. 1）。この変化は、大豆イソフラボン摂取により

Table 3. Body weight and organ weights in rats fed diet containing 0.4% Soyaf flavone HG or the control diet for 4 weeks

Variables (g)	Control	Soy isoflavone
Final body weight	424.7 ± 8.7	425.4 ± 14.3
Skeletal muscle		
Gastrocnemius	4.384 ± 0.123	4.020 ± 0.121#
Tibialis anterior	1.489 ± 0.053	1.335 ± 0.039*
Plantaris	0.884 ± 0.036	0.852 ± 0.039
EDL	0.405 ± 0.015	0.380 ± 0.007
Soleus	0.312 ± 0.012	0.304 ± 0.014
Organ		
Liver	16.193 ± 0.444	17.576 ± 0.678
Heart	1.144 ± 0.023	1.118 ± 0.044
Kidney	2.737 ± 0.077	2.930 ± 0.129
Spleen	0.872 ± 0.091	0.803 ± 0.017
Brown adipose tissue	0.463 ± 0.025	0.409 ± 0.089
Epididymal fat	7.455 ± 0.898	5.735 ± 0.917
Perirenal fat	11.509 ± 0.960	9.989 ± 2.084
Mesentery fat	8.461 ± 0.843	7.544 ± 1.701

Values are means ± SE for 6 rats. * $p < 0.05$, # $p < 0.1$.

速筋主体の筋肉であるEDLが、わずかに遅筋型に向かって変化したことを意味している。大豆イソフラボン摂取により筋線維型が変化することを示した報告は見られず、新規性の高い発見である。しかしながら、TA、足底筋、腓腹筋、ヒラメ筋のMyHCアイソフォーム組成比に有意な変化は観察されなかった (data not shown)。

一方、EDLのMyHC1の増加がPPAR δ を介した変化か調べるために、PPAR δ の標的遺伝子の一つであるUCP3の発現量をWestern blottingにて測定した結果、C群とS群の間に差は観察されなかった (Fig. 2)。これより、筋線維型の変化はPPAR δ を介したものではないと推察された。レポーターアッセイ系の実験から、大豆イソフラボンはおおよそ10 μ M以上でPPARs のリガンド活性を示すことが報告されていることから^{3, 7, 8)}、本実験条件では骨格筋にこのレベルで大豆イソフラボンが到達していない可能性を考え、血中の大豆イソフラボン濃度を測定した。現在まで予備的にS群の2個体の血中ダイゼイン、ゲンステイン、グリシテイン、

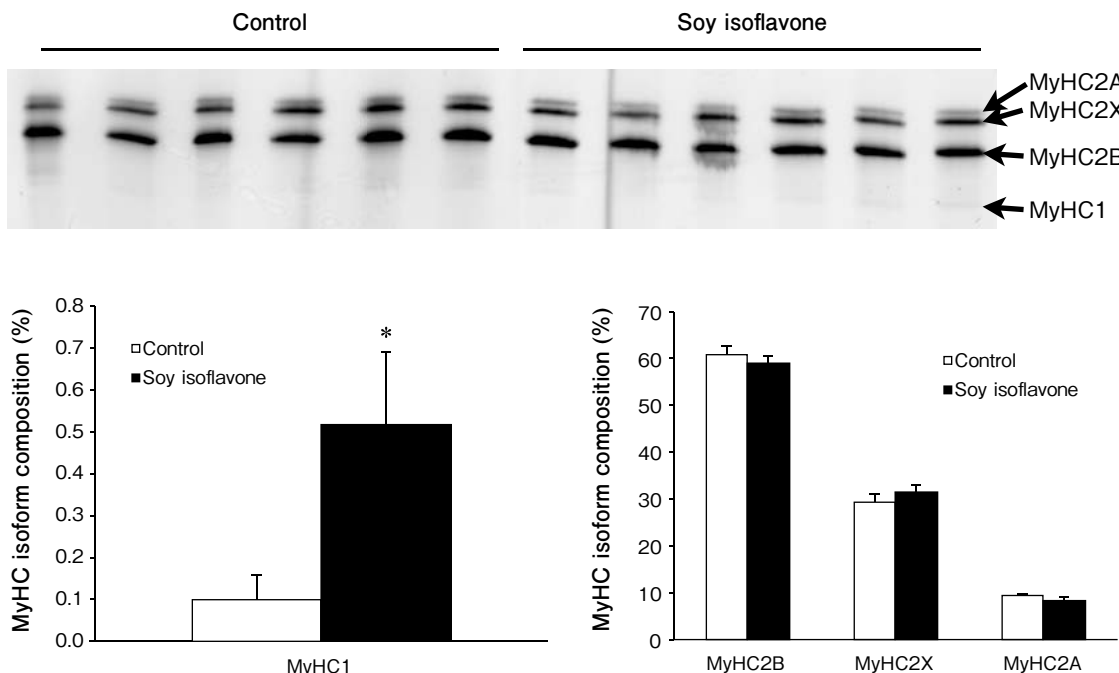


Fig. 1. Effect of four week feeding with a diet containing 0.4% Soyaf flavone HG on myosin heavy chain (MyHC) isoform composition in EDL muscle of rats. The bands were MyHC isoforms of silver-stained SDS-PAGE gel for all rats. Values are means ± SE for 6 rats. *Significantly different from control group ($p < 0.05$).

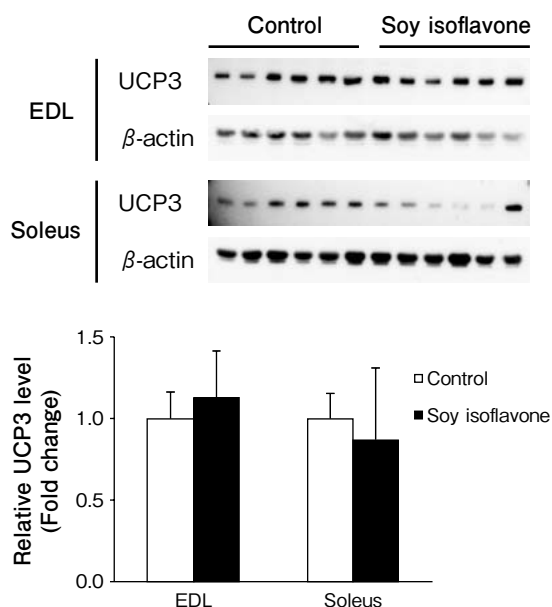


Fig. 2. Effect of four week feeding with a diet containing 0.4% Soyaflavone HG on UCP3 protein expression in EDL and soleus muscles of rats. Expression level of UCP3 was normalized by β -actin. UCP3 is considered one of PPAR δ target genes. Values are means $\pm$ SE for 6 rats.

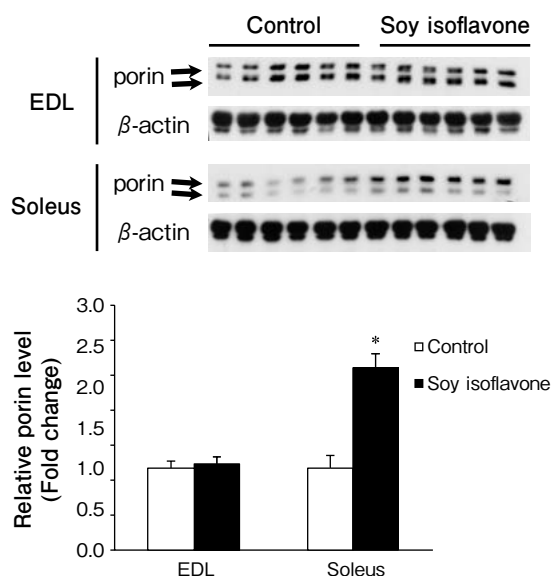


Fig. 3. Effect of four week feeding with a diet containing 0.4% Soyaflavone HG on mitochondria marker (porin) expression in EDL and soleus muscles of rats. Expression level of porin protein was normalized by β -actin. Values are means $\pm$ SE for 6 rats. *Significantly different from control group ($p < 0.05$).

エクオール（ダイゼイン代謝物）濃度を測定しているが、およそ1-20 μ Mの範囲で血中にこれら大豆イソフラボン類が存在していることが分かった。逆に、このレベルでPPAR δ を活性化しなかった理由は不明だが、この測定値は硫酸やグルクロン酸抱合体も含む値であり、生体での作用を考慮する場合は抱合体を除いたアグリコンとしての存在量を測定する必要があると考えている。

ミトコンドリアマーカーのporin発現量は遅筋主体の筋肉であるヒラメ筋で有意に増加していた (Fig. 3)。一方でEDLではこのような変化は見られなかった。この結果は、大豆イソフラボンが、遅筋型線維に対して、ミトコンドリア合成を促進した結果と考えられるが、その作用機序については不明である。

結論として、大豆イソフラボンの摂取により、程度は小さいが、ラットの遅筋型筋線維が増加することが分かった。一方、そのシグナル経路はPPAR δ 以外の何らかの経路であることが示唆された。

要 約

大豆イソフラボンは核内受容体の一種PPAR δ のリガンド活性を有することが知られている。そこで本研究では、大豆イソフラボンが骨格筋PPAR δ のリガンドとして働き、遅筋型筋線維を増加させるのか、ラットを用いて調べた。7週齢Wistar系雄ラットに、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%で配合した飼料あるいは対照飼料（AIN-93G）を4週間、摂食量を揃えて給餌した結果、組織重量に関し、大豆イソフラボン（S）群の前脛骨筋重量はコントロール（C）群と比較して有意な低下が、腓腹筋重量で低下傾向が観察された。筋線維型の指標であるミオシン重鎖アイソフォーム（MyHC1, 2A, 2X, 2B）をSDS-PAGE法により分離、解析した結果、S群のEDL筋の遅筋型（MyHC1）がC群に比べ、有意に増加していた。また、Western blottingの結果、ヒラメ筋でミトコンドリアマーカー porinの発現量が増加していることが分かった。以上より、大豆イソフラボンの摂取は、程度は小さいが、ラットの遅筋型筋線維を増加することが示唆された。

文 献

- 1) Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M and Grimaldi PA (2003): Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J*, **17**, 2299-2301.
- 2) Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H and Evans RM (2004): Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biol*, **2**, 1532-1539 (e294).
- 3) Dang Z and Lowik CW (2004): The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis. *J Bone Miner Res*, **19**, 853-861.
- 4) Morifuji M, Sanbongi C and Sugiura K (2006): Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats. *Br J Nutr*, **96**, 469-475.
- 5) Mizunoya W, Wakamatsu J, Tatsumi R and Ikeuchi Y (2008): Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Anal Biochem*, **377**, 111-113.
- 6) Kleiner S, Nguyen-Tran V, Bare O, Huang X, Spiegelman B and Wu Z (2009): PPAR δ agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 α but does not increase mitochondrial gene expression and function. *J Biol Chem*, **284**, 18624-18633.
- 7) Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA and Shay N (2003): Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr*, **133**, 1238-1243.
- 8) Cho KW, Lee OH, Banz WJ, Moustaid-Moussa N, Shay NF and Kim YC (2010): Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPARgamma transcriptional activity. *J Nutr Biochem*, **21**, 841-847.