

高齢者の筋機能維持に向けた大豆成分の有効利用の基礎研究

加藤久典^{*1}・青山晋也²

¹東京大学総括プロジェクト機構 ²東京大学大学院農学生命科学研究科

The Basic Study of Efficient Use of Soybean Components to Maintain Geriatric Muscle Function

Hisanori KATO^{*1} and Shinya AOYAMA²

¹Organization for Interdisciplinary Research Projects, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

²Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

The result of our previous study has revealed that dietary protein modulates the phosphorylation of insulin receptor substrates (IRSs). In addition, we found in diabetic model mice that the expression of the gene for Atrogin-1, a component of the muscle atrophy-related pathway, was reduced by dietary supplementation of a soy isoflavone, genistein. Considering the importance of prevention of skeletal muscle atrophy in the elderly, effective use of soy components is worth exploring. To clarify the effects of soy protein isolate (SPI), genistein, and their combination on skeletal muscle atrophy, male Wistar rats with excised sciatic nerve were used as a model of atrophy. Intakes of SPI (20%) and the combination of SPI and genistein (0.05%) for 10 days had no effect on muscle atrophy induced by denervation. While genistein intake tended to prevent atrophy of soleus, no preventive effect was observed in gastrocnemius and anterior tibialis. The up-regulations of the genes for Atrogin-1 and Muscle RING-finger protein-1 (MrRF-1) caused by denervation were attenuated by genistein intake. DNA microarray analysis revealed that 1209 genes were up-regulated and 353 genes were down-regulated by genistein intake. The result of transcription factor analysis of the gene expression profile data suggested the involvement of the estrogen receptor in the effect of genistein. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 85-89, 2012.

Key words : muscle atrophy, soy protein isolate (SPI), genistein, microarray

*〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

近年、我が国の高齢化は急速に進んでおり、高齢者のQOLの低下が大きな問題となっている。特に骨格筋量および筋力の低下は、高齢者のQOLに大きく関わる深刻な問題の一つであり、その抑制手段の開発が望まれている。

一般的に筋萎縮はたん白質の合成と分解のインバランスにより引き起こされると考えられており^{1,2)}、重要な伝達経路の一つとしてインスリン様成長因子1 (IGF-1) 経路が知られている³⁾。IGF-1は肝臓の他に多くの組織で生産される成長因子であるが、特に骨格筋において発現するIGF-1やIGF結合たん白質は、成長後の筋肉の維持に重要であるとされている。我々は、ラットに低たん白質食やグルテン食を給与すると、IGF-1受容体の基質でもあるインスリン受容体基質 (IRSs) の活性が顕著に増加することを報告しており^{4,5)}、これらの結果は食事たん白質が筋肉のIGF-1経路に強い影響を及ぼすことを示唆するものである。さらに、大豆たん白質には微小重力下での筋萎縮を抑制する効果があることが報告されており⁶⁾、筋萎縮の予防策の一つとして、食事たん白質に注目した。

一方、我々は糖尿病モデルマウスに大豆イソフラボンであるゲニステインを投与した際の筋肉での遺伝子発現の網羅的解析を行った。その中で注目すべき変化としてFbxo32 (Atrogin-1) の発現低下が観察された。Fbxo32は、E3ユビキチンリガーゼであり、筋萎縮に伴い発現が上昇する。このFbxo32の発現低下はエストロゲンの投与でも誘起されることが認められており、ゲニステインの筋萎縮予防効果が期待された。

そこで、本研究では、筋肉の遺伝子発現に着目し、筋萎縮に対して大豆成分 (分離大豆たん白質およびゲニステイン) の有用性を明らかにすることを目的とした。

方 法

動物実験

実験動物として10週齢ウィスター系の雄性ラットを20%カゼイン (CON) 群、20%分離大豆たん白質食 (SPI) 群、0.05%ゲニステイン (GEN) 添加食群、およびSPI + 0.05%ゲニステイン食群の4群 (各群n=8) に分け、24日間飼育を行った。各飼料はAIN-93Gを基に大豆油の代わりにコーン油を用い、分離大豆たん白質を含む飼料にはメチオニンを加えた。飼育14日目に坐骨神経切除により筋萎縮を誘導した。坐骨神経切除7日目にX線CT装置により、後肢骨格筋量を測定し、10日目に解剖を行い腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋の湿重量を測

定後、サンプルとして得た。

坐骨神経切除

飼育14日目に、坐骨神経切除により筋萎縮を誘導した。ソムノベンチルで麻酔後、片肢の坐骨神経を約1 cmの長さで切除した。もう一方の肢にはSham処置を行った。

後肢骨格筋量の測定

後肢骨格筋量の測定はX線CT装置 (LaTheta; Hitachi-Aloka Medical) を用いて行った。イソフルランで麻酔後、後肢を固定し、脛骨と腓骨の近位の接点から遠位の接点までのCT値を解析した。

遺伝子発現解析

CON群とGEN群のヒラメ筋のtotal RNAサンプルよりcDNA、cRNAを調製し、Affymetrix社のGeneChip Rat Genome 230 2.0 Arrayに対してハイブリダイズ後、GeneChip Operating System (GCOS)を用いてシグナルを解析した。発現変動の見られた遺伝子については、Ingenuity Pathway Analysis Software (IPA)を用いて解析を行った。また、いくつかの遺伝子発現についてリアルタイムRT-PCRでも解析した。

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で示した。有意差検定は一元配置分散分析または二元配置分散分析後、Tukey-Kramer multiple comparisons testで行い、危険率5%未満を有意であると判断した。

結 果

坐骨神経切除による骨格筋湿重量の変動

坐骨神経切除後7日目および10日目の後肢骨格筋重量の変動を比較した (Fig. 1)。CON群とSPI群、S+G群で後肢骨格筋量に差は見られなかった。一方、GEN群の腓腹筋および前脛骨筋湿重量はCON群と同程度であったが、ヒラメ筋はCON群に比べ増加する傾向が見られた (CON群:0.09±0.01 g, GEN群:0.12±0.01 g)。

Atrogin-1およびMuRF-1 mRNA発現量の変動

CON群のAtrogin-1とMuRF-1 mRNA発現は坐骨神経切除により増加したが、GEN群はその増加を有意に抑制し、S+G群も同様の傾向がみられた (Fig. 2)。

ゲニステイン摂取による骨格筋遺伝子発現への影響

ゲニステインの遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析するため、CON群とGEN群のヒラメ筋において、Affymetrix社のGeneChip Rat Genome 230 2.0 Arrayを用いて検討した。その結果、変動した遺伝子数は1,562個で、そのうち増加と判定された遺伝子数は1,209、減少と判定された遺伝子数は353であった。

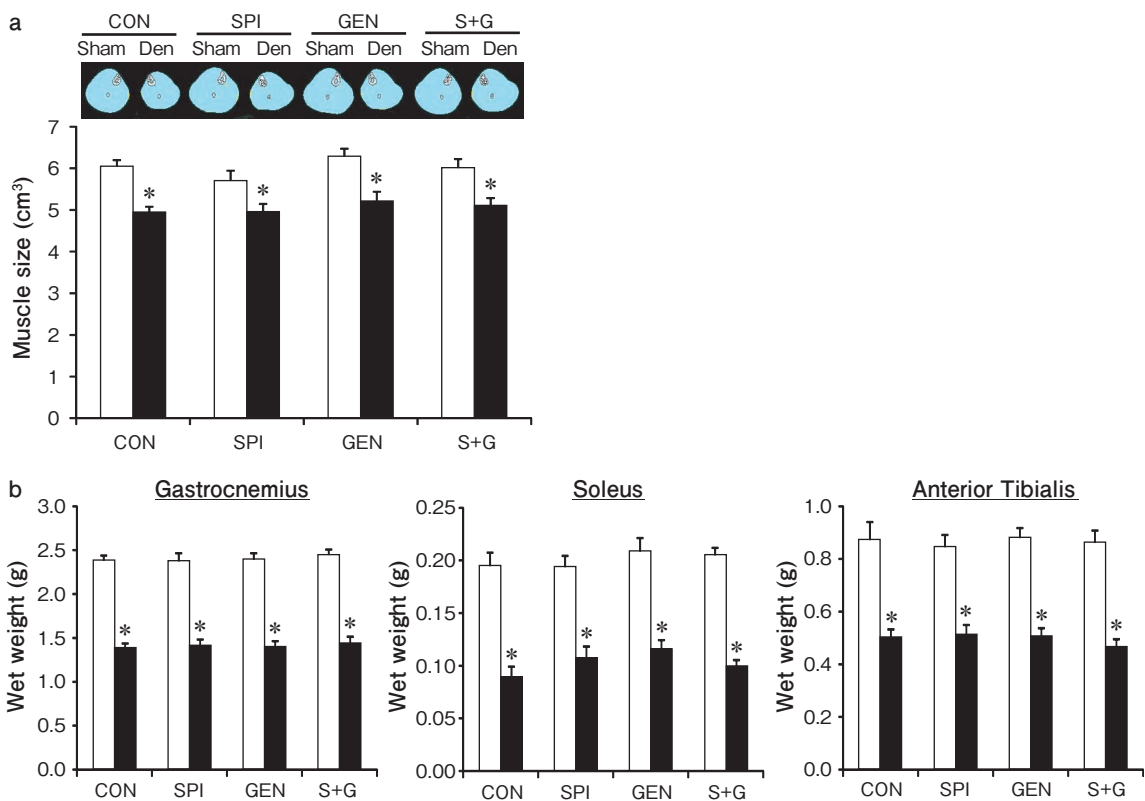


Fig. 1. Effects of SPI, genistein, and their combination on the area assayed by using X-ray CT scan (a) and wet weight (b) of rat hind-limb muscle. □; Sham-treated muscle, ■; Denervated muscle. Each value represents the mean $\pm$ SE (n=8). * p <0.05, Sham vs. Denervation.

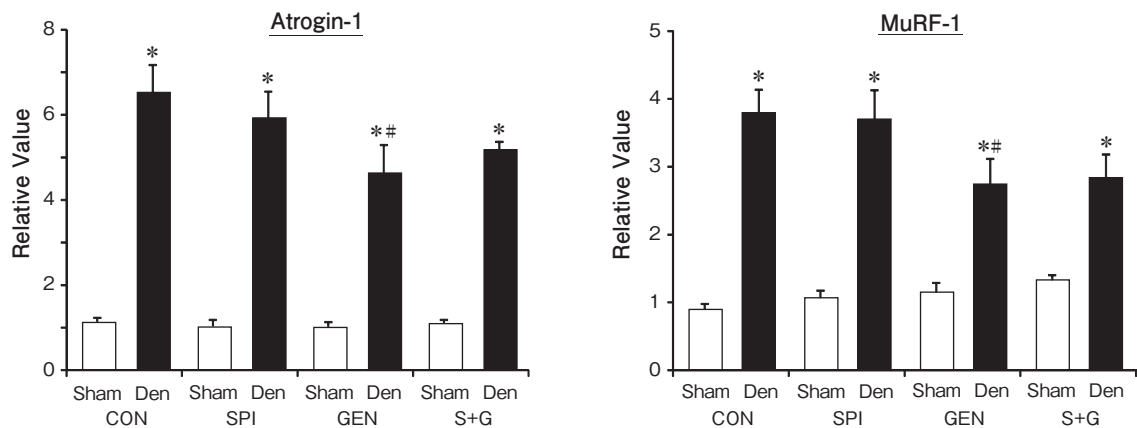


Fig. 2. Effects of SPI, genistein, and their combination on the expression of atrophy-related genes, Atrogin-1 and Muscle RING-finger protein-1 (MuRF-1), in rat soleus muscle. Each value represents the mean $\pm$ SE (n=6-8). * p <0.05, Sham vs. Denervation. ** p <0.05, vs. CON.

IPAソフトウェアを用いて解析を行った結果、エストロゲンレセプター下流の遺伝子発現の変動が認められた。

考 察

本研究では、SPIとゲニステインおよびその組み合わせが廃用性筋萎縮に及ぼす影響について坐骨神経切除モデルを用いて検討を行った。

SPIおよびSPIとゲニステインの組み合わせ食の摂取は、坐骨神経切除による後肢骨格筋の萎縮に影響を及ぼさなかった。一方、ゲニステインの摂取は腓腹筋および前脛骨筋重量には差は見られなかったものの、ヒラメ筋において坐骨神経切除による筋重量の低下を緩和する傾向にあった。ユビキチンリガーゼであるAtrogin-1とMuRF-1のmRNA発現を調べたところ、ゲニステインの摂取は坐骨神経切除によるAtrogin-1お

よびMuRF-1の発現上昇を抑制し、ゲニステインによる筋萎縮予防作用が示唆された。

そこで、DNAマイクロアレイを用いてゲニステインの遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析したところ、エストロゲンレセプター下流の遺伝子が多数変動していた。骨格筋におけるエストロゲンレセプターは、成長や分化に影響することが報告されていることから⁷⁾、ゲニステインがエストロゲンレセプターを介して筋萎縮を予防している可能性が示された。我々は、特にその下流遺伝子の一つとしてIGF-1に着目している。さらに詳細な検討が必要であるが、骨格筋特異的にIGF-1を過剰発現すると、筋肉肥大と筋細胞の再生能の亢進が見られることが報告されていることから^{8,9)}、ゲニステインがエストロゲンレセプターを介してIGF-1の発現を高めることにより、筋萎縮を抑制する可能性が示された。

要 約

高齢者のQOL低下の大きな要因として、骨格筋量および筋力の低下が挙げられる。我々は、これまでの研究により、たん白質栄養の違いやゲニステインの摂取により、筋萎縮やIGF-1シグナル関連因子が変動することを見出している。そこで本研究では、大豆成分（分離大豆たん白質とゲニステイン）の積極的な摂取が、坐骨神経切除モデルの筋萎縮に及ぼす影響を検討した。10週齢のWistar系雄性ラットに对照食（20%カゼイン）、20%分離大豆たん白質食（SPI）、0.05%ゲニステイン添加食、およびSPI+0.05%ゲニステイン食を2週間摂取させ、坐骨神経を切除し筋萎縮を誘導させた。解剖は坐骨神経切除10日後に行った。SPI食およびSPI+ゲニステイン食の摂取は坐骨神経切除による筋重量の低下に影響しなかった。一方ゲニステイン食の摂取はヒラメ筋において、筋萎縮を抑制する傾向が認められた。筋萎縮時に誘導されるユビキチンリガーゼの発現量はゲニステインの摂取により有意に抑制された。さらに、網羅的遺伝子発現解析の結果、エストロゲンレセプター関連遺伝子の多くに発現変動が認められたことから、骨格筋のエストロゲンレセプターを介した作用が示唆された。

文 献

- 1) Goldspink DF, Morton AJ, Loughna P and Goldspink G (1986): The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflugers Arch*, **407**, 333-340
- 2) Tischler ME, Rosenberg S, Satarug S, Henriksen EJ, Kirby CR, Tome M and Chase P (1990): Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism*, **39**, 756-763.
- 3) Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH and Goldberg AL (2004): Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, **117**, 399-412
- 4) Toyoshima Y, Tokita R, Ohne Y, Hakuno F, Noguchi T, Minami S, Kato H and Takahashi S (2010): Dietary protein deprivation up-regulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. *J Mol Endocrinol*, **45**, 329-340.
- 5) Ohne Y, Toyoshima Y and Kato H (2005): Disruption of the availability of amino acids induces a rapid reduction of serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 *in vivo* and *in vitro*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 989-98.
- 6) 芑田 司, 横越英彦 (1999) : 模擬微小重力環境における骨格筋萎縮に及ぼす大豆たん白質摂取の影響. 大豆たん白質研究, **2**, 112-117
- 7) Velders M, Schleipen B, Fritzemeier KH, Zierau O and Diel P (2012): Selective estrogen receptor- β activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB J*, **26**, 1909-1920.
- 8) Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C and Schwartz RJ (1995): Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem*, **270**, 12109-12116.
- 9) Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL and Rosenthal N (2001): Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*, **27**, 195-200.