

大豆イソフラボンがラット骨格筋の線維タイプおよび筋重量に及ぼす影響

水野谷航*・下村健太・赤坂泰輝・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院

Effect of Dietary Soy Isoflavones on Rat Skeletal Muscle Fiber Type and Muscle Mass

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

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

ABSTRACT

Soy isoflavones (daidzein, genistein and glycitein) are thought to be candidates for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ ligands, which are a key regulator of skeletal muscle fiber type. We addressed whether dietary soy isoflavone 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 soy isoflavones (Soyaflavone HG) for 4 weeks, then blood and tissue samples were collected. In our previous report, we showed that the muscle mass was significantly lower in the soy isoflavone-fed group, and the proportion of myosin heavy chain I (slow type) in EDL muscle was significantly increased in the soy isoflavone-fed group. In this study, we analyzed fiber-type related protein expression with Western blotting and soy isoflavone concentration in serum and skeletal muscle. Our result suggests that soy isoflavone existed in serum at concentrations that could be expected from PPAR δ activity. However, UCP3, the representative target protein of PPAR δ , was not upregulated in the soy isoflavone-fed group, which implied that the change in skeletal muscle property was due to a pathway independent of PPAR δ . *Soy Protein Research, Japan* **15**, 160-164, 2012.

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

*〒812-8581 福岡市箱崎6-10-1

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タイプ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 は遅筋タイプ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、その結果増加した骨格筋の遅筋タイプ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タイプ筋線維が増加するのか調べるとともに、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。

本研究は昨年度に開始した。昨年度の成果を以下に記す⁵⁾。ラットに大豆イソフラボン0.4%配合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、骨格筋で以下の変化が観察された。

i) 骨格筋重量

採取した後肢骨格筋の重量を測定したところ、コントロール（C）群にくらべ大豆イソフラボン（S）群で前脛骨筋重量が有意に減少し、腓腹筋で減少傾向が見られた。

ii) 骨格筋のミオシン重鎖（MyHC）アイソフォーム組成

筋線維タイプは主としてMyHCアイソフォームの組成で決まり、成熟ラットでは4種類のアイソフォーム（MyHC1, 2A, 2X, 2B）で構成される。ラット後肢骨格筋のMyHCアイソフォーム組成を、SDS-PAGE⁶⁾により解析した結果、遅筋タイプ主体の筋肉である長趾伸筋（EDL）にわずかに存在する遅筋タイプのMyHC1の組成は、S群で有意に増加していたことから、大豆イソフラボン摂取によって遅筋タイプの筋線維の割合が増加することがわかった。

iii) ミトコンドリアマーカーとPPAR δ 標的遺伝子の発現量変化

ミトコンドリアマーカー porinは、遅筋主体の筋肉であるヒラメ筋において、S群で発現量が有意に増加していた。PPAR δ の標的遺伝子の一つであるUCP3の発現量は、EDLとヒラメ筋共にC群とS群の間で差は観察されなかったことから、筋線維タイプの変化はPPAR δ を介したものではないと推察された。

本年度は、引き続き骨格筋に存在する筋線維タイプに関わるたん白質の発現をWestern blottingで調べた。さらに大豆イソフラボンが血清あるいは骨格筋でPPAR δ リガンドの有効濃度まで達していなかったのか確認をするため、血清および骨格筋中の大豆イソフラボン量を定量した。

方 法

動物、飼育方法、実験飼料についての詳細は前年度の報告に記載した⁵⁾。以下概略を述べる。対照群（C群）として通常のAIN-93G組成に基づいて粉末飼料を作成し（大豆油はコーン油に置換）、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（S群）。ソヤフラボンHGは約58%の大豆イソフラボン配糖体から構成された粗精製大豆イソフラボン粉末である。各群6匹の7週齢Wistar系雄ラットに4週間pair-feedingで飼料を給餌し、飼育期間終了後、脚部の骨格筋を採取し、サンプルとした。

Western blotting

ヒラメ筋、EDLからたん白質を抽出し、Western blottingにより、遅筋タイプの指標であるミオグロビン、筋線維タイプ調節因子PGC1 α のたん白質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。また、SDS-PAGEで認められた大豆イソフラボンによるEDLのMyHC1の増加を確認するため、抗MyHC1抗体を用いたWestern blottingを行った。こちらはactinをローディングコントロールとした。

血清および骨格筋の大豆イソフラボンの定量

(1) 標準物質：ダイゼインはCayman Chemical製、ゲニステインはCayman Chemical製、グリシテインはLC Laboratories製、(S)-エクオールはCayman Chemical製の試験研究用試薬を用いた。

(2) サンプル処理：血清あるいは腓腹筋にクエン酸ナトリウムバッファー（25 mM, pH 5.0）を加え、 β -glucuronidase (Sigma-Aldrich製)、partially purified sulfatase (Sigma-Aldrich製)、recombinant

glucuronidase (Sigma-Aldrich製) を用いて37℃で60分酵素処理を行った。大豆イソフラボンを酢酸エチルで抽出した後、遠心濃縮し、残留物をメタノールで溶かしHPLC分析用サンプルとした。

(3) HPLC：カラムにはYMC-Triat C18を用いた。移動相組成はギ酸を0.1%含むアセトニトリル水溶液とし、グラジエント条件は、0～65分までアセトニトリル濃度を15～30%まで上げ、65～70分までは30%保持とした。ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインの定量は254 nm、(S)-エクオールは282 nmの吸光度で行った。

結果と考察

筋線維タイプに関わるたん白質の発現が大豆イソフラボン摂取で影響を受けたのか調べるため、遅筋化に関わる転写コアクチベーターであるPGC1 α 、酸素の貯蔵体で遅筋に多いとされるミオグロビンの発現量を

Western blottingにより確認した。結果は、どちらの因子についても、骨格筋における発現量にはC群とS群の間に有意な差はなかった (Fig. 1, 2)。大豆イソフラボンによる筋線維タイプへの影響は、前年度までの解析でEDLにおいて遅筋タイプであるMyHC1の増加、ヒラメ筋においてミトコンドリアマーカの増加が観察されていたが、その他の筋線維タイプの指標は、大きくは影響を受けていないことが示唆された。

前回の報告でEDLのミオシン重鎖組成を測定した手法は、MyHCの各アイソフォームが分離できる特殊な組成のゲルを用いたSDS-PAGEで、各アイソフォームの検出は、たん白質を非特異的に染色する銀染色を用いている⁶⁾。この手法は、各アイソフォームの組成比を正確に算出できることが可能だが、極端に組成比が低いアイソフォームはバンドが非常に薄くなる。電気泳動にローディングするたん白質量を増加させることで、組成比が低いアイソフォームのバンドを濃くすることも可能だが、一方で組成比が高いアイソフォーム

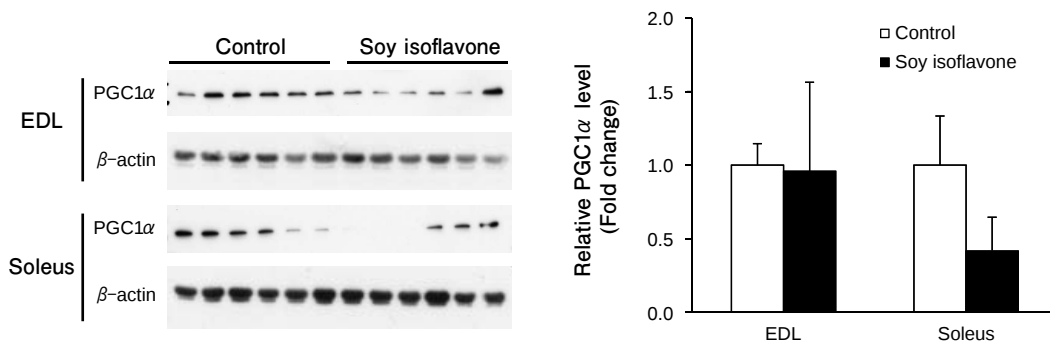


Fig. 1. Effect of four weeks feeding of the diet containing 0.4% Soyafavone HG on PGC1 α protein expression in EDL and soleus muscles of rats. Expression level of PGC1 α was normalized by β -actin. There was no significant difference between control and soy isoflavone group. Values are means $\pm$ SE for 6 rats.

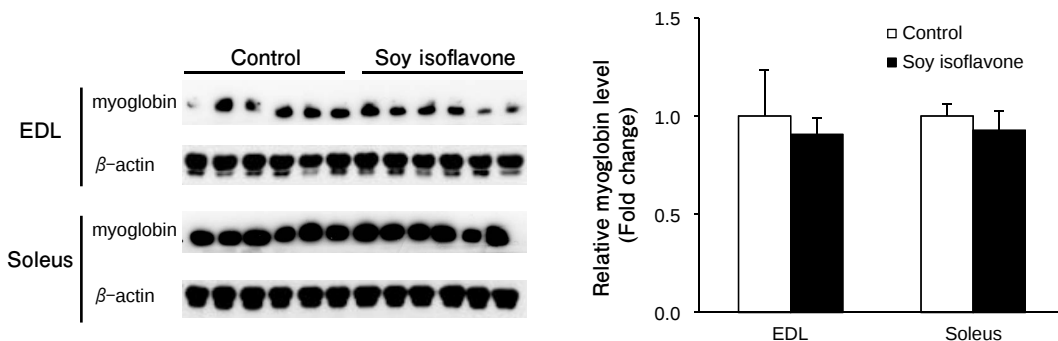


Fig. 2. Effect of four weeks feeding of the diet containing 0.4% Soyafavone HG on myoglobin protein expression in EDL and soleus muscles of rats. Expression level of myoglobin was normalized by β -actin. There was no significant difference between control and soy isoflavone group. Values are means $\pm$ SE for 6 rats.

のシグナルが飽和するため、ミオシン全体量の正確性が損なわれる。そこで、本研究ではMyHC1の発現量を、抗MyHC1抗体を用いたWestern blottingにより確認した。その結果、S群においてMyHC1の弱い増加傾向 ($p=0.11$) が観察された (Fig. 3)。有意な差が得られなかった理由は、MyHC1のレベルが、SDS-PAGEではミオシン全体量に対するMyHC1の比率であるのに対し、Western blottingではactinに対する比で算出したことによるのかもしれない。

大豆イソフラボンによりPPAR δ が活性化されていないことが示唆されたことから、PPAR δ リガンドとして作用する濃度の大豆イソフラボンが筋組織に到達しなかったと考え、血清中および後肢骨格筋 (腓腹筋) 中の大豆イソフラボン (ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、(S)-エクオール) 濃度をHPLCを用いて測定した。本試験で用いたHPLCの条件で、4種類の大豆イソフラボン標準物質は明確に分離が可能であった (Fig. 4A)。血清中の大豆イソフラボンに関して、C群ではゲニステイン以外は検出されなかったが、S群では測定した全ての大豆イソフラボンが検出され、(S)-エクオールは腸内細菌によるダイゼインの代謝物として

知られ、ダイゼインより強力なエストロゲン活性を有すると言われている⁷⁾。これより、ラットが摂取した大豆イソフラボン主として(S)-エクオールとして血中に存在している事がわかった。この濃度は核内受容体リガンド活性が期待できる10 μ Mを上回っていた。ただし、(S)-エクオールのPPAR δ に対するリガンド活性は現在まで明らかにされておらず、(S)-エクオールにPPAR δ リガンド活性がなければ、例え10 μ Mを超えていようがPPAR δ の活性化は生じないと考えられる。骨格筋中の大豆イソフラボン量はS群の3個体で(S)-エクオールのみが検出された (Table 1)。S群の残り3個体とC群6個体では検出されなかった。ここでの大豆イソフラボン濃度は、グルクロニダーゼ、スルファターゼ処理後のアグリコンとしての濃度を示している。生体ではフラボノイド類はグルクロン酸あるいは硫酸抱

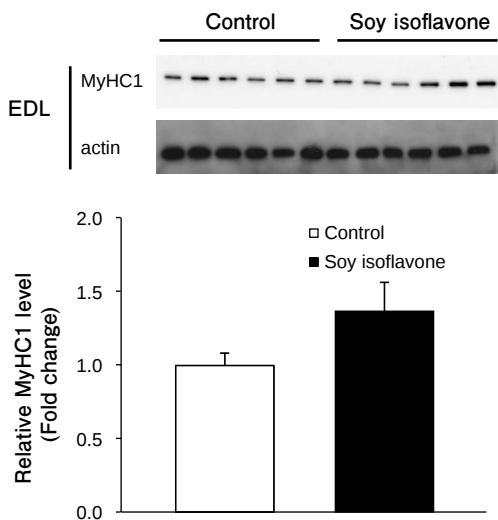


Fig. 3. Effect of four weeks feeding of the diet containing 0.4% Soyaflavone HG on slow-type myosin heavy chain (MyHC)1 protein expression in EDL muscle of rats. Expression level of MyHC1 was normalized by actin. There was a weak tendency of increase in soy isoflavone group compared with control group ($p=0.11$). Values are means $\pm$ SE for 6 rats.

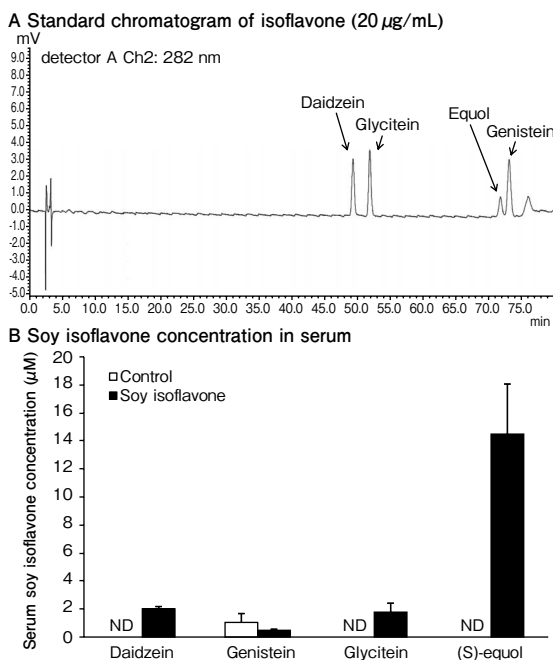


Fig. 4. Serum concentration of daidzein, genistein, glycitein and (S)-equol of rats fed the diet containing 0.4% Soyaflavone HG or control diet for 4 weeks. (A) Resultant chromatogram of the analysis of 20 μ g/mL reference materials, daidzein, genistein, glycitein and (S)-equol, under the instrument conditions presented in the text. (B) Serum concentration of daidzein, genistein, glycitein and (S)-equol. Daidzein, glycitein and (S)-equol were not detected in control group. Values are means $\pm$ SE for 6 rats. ND, not detected.

合体で存在していることが示唆されており、生理的な活性も大きく異なると言われている。今後は抱合体としての存在量も測定をする必要があると考えている。

結論として、大豆イソフラボン摂取がラットのEDL筋において、遅筋タイプのMyHC1を増加させる傾向が観察された。この作用に核内受容体PPAR δ が関与している可能性は低いと考えられた。また、大豆イソフラボンは主として(S)-エクオールとして存在し、骨格筋組織でも検出された。

Table 1. (S)-equol concentration in skeletal muscle

Rat	Control	Soy isoflavone
	$\mu\text{mol/kg wet tissue}$	
#1	ND	1.78
#2	ND	1.18
#3	ND	0.70
#4	ND	ND
#5	ND	ND
#6	ND	ND

ND, not detected

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、遅筋タイプの筋線維を増加させるのか、ラットを用いて調べた。前年度の報告で、大豆イソフラボン (S) 群はコントロール (C) 群に比べ、前脛骨筋重量の有意な低下、EDL筋のMyHC1比率（遅筋タイプ）の有意な増加が見られた事を報告した。本研究では、骨格筋における遅筋タイプの指標であるミオグロビン、筋線維タイプ調節因子PGC1 α のたん白質発現量をWestern blottingで調べた。結果、C群とS群の間で、これらの因子に有意な変化は見られなかった。大豆イソフラボン濃度がPPAR δ リガンドの有効濃度まで達していたかどうかを確認するため、血清中の大豆イソフラボン濃度を測定した結果、血清には(S)-エクオール（腸内細菌によるダイゼインの代謝物）がPPAR δ リガンド活性が期待される濃度（ $>10 \mu\text{M}$ ）で存在していた。従って骨格筋で生じた変化は別の因子による影響と推測された。

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 PPARdelta. *PLoS Biol*, **2**, e294. doi:10.1371/journal.pbio.0020294.
- 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) 水野谷航, 下村健太, 佐藤祐介, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀 (2012): 大豆イソフラボンが骨格筋線維型に及ぼす影響。大豆たん白質研究, **32**, 157-161.
- 6) 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.
- 7) Yuan JP, Wang JH and Liu X (2007): Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora-implications for health. *Mol Nutr Food Res*, **51**, 765-781.