

骨格筋形成における大豆イソフラボンの効果とその作用機構に関する研究

小川真弘・山地亮一*

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

The Effects of Soy Isoflavone on Myogenic Differentiation

Masahiro OGAWA and Ryoichi YAMAJI*

Department of Biological Chemistry, Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Osaka 599-9853

ABSTRACT

The biological activities of 17 β -estradiol (E2) are exerted by two estrogen receptor (ER) isoforms (ER α and ER β), which are ligand-mediated transcriptional factors. Skeletal muscle is the most abundant tissue in the human body. The two ER isoforms are expressed in skeletal muscle. ER α represses myogenic differentiation by increasing the level of ubiquitin-specific peptidase 19 (USP19). On the other hand, ER β agonist inhibits the ER α -induced expression of USP19, and consequently represses the ER α -repressed myogenic differentiation. Knockdown of ER β abolishes the inhibitory effects of ER β agonist on E2-repressed myogenic differentiation. Soy contains estrogenic compounds such as genistein and daidzein, which activate the transcriptional activities of ER α and ER β . In this study, we investigated whether daidzein has inhibitory effects on E2-repressed myogenic differentiation. In C2C12 myoblasts, daidzein attenuated the E2-decreased expression of structural muscle proteins (myosin heavy chain and tropomyosin) and E2-increased expression of USP19. However, genistein had no inhibitory effects of E2-repressed myogenic differentiation. When ovariectomized female ddY mice (8 weeks old) were fed diets containing 0.1% isoflavone (genistein or daidzein) with or without E2 replacement, daidzein, but not genistein, inhibited E2-decreased muscle mass and E2-increased expression of USP19 in skeletal muscles. These results suggest that daidzein inhibits USP19 expression by activating ER β and increases skeletal muscle mass in female mice. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 80-85, 2013.

Key words : isoflavone, daidzein, skeletal muscle, estrogen, ubiquitin-specific peptidase

19

* 〒599-9853 堺市中区学園町1-1

転写因子であるエストロゲン受容体 (ER) は、女性ホルモンのエストロゲン (17 β エストラジオール, E2) と結合して活性型となり、標的遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域に存在するエストロゲン応答配列 (ERE) に結合し、標的遺伝子の発現を亢進する¹⁾。ERにはER α とER β が存在し、ER α とER β は互いに拮抗的に作用する²⁾。E2だけでなく、E2様生理活性を持つ大豆イソフラボンのゲニステインやダイゼインも、ER α とER β の両方に作用するが、ダイゼインはER α よりER β に対する親和性が高い³⁾。ヒトの身体で最大であり、男女間で量的に最も差の大きい組織である骨格筋は、ER α とER β を発現している⁴⁾。男性ホルモン (アンドロゲン) と女性ホルモンが骨格筋量における性差の原因と考えられているが、どちらの性ホルモンとも骨格筋量を調節する詳細な分子機構は不明である。

筋芽細胞から筋管細胞へと分化する過程 (骨格筋形成) が抑制されると筋肉量は低下する⁵⁾。よって高齢化の進む先進諸国で骨格筋形成に関わる食品成分の情報は、介護を不要とする身体的基盤を養うために不可欠である。我々はこれまでに筋芽細胞から筋管細胞への筋分化時に、(1) E2がER α を介して脱ユビキチン化酵素であるユビキチン特異的プロテアーゼ19 (USP19) の発現を亢進して筋分化を抑制すること、(2) ER β アゴニストがUSP19の発現を抑制してE2による筋分化抑制を解除すること、(3) ER β をノックダウンした筋芽細胞では(2)で示すER β アゴニストの作用が消失することを見いだした⁶⁾。さらにゲニステインではなくダイゼインがUSP19の発現を抑制してE2による筋分化抑制を解除することを見いだしたので、本研究ではE2による筋分化抑制をゲニステインではなく、ダイゼインが解除する分子機構を培養細胞株であるC2C12細胞で解析するとともに、マウスの骨格筋形成に及ぼすダイゼインの効果についても検証することを目的とした。

方 法

細胞培養法

マウス由来C2C12筋芽細胞 (RIKEN Bioresource Center Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、10%ウシ胎児血清、100 units/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン、1.0 g/L炭酸水素ナトリウムを含むD-MEM培地 (D-MEM培地 (10% FBS, +P/S)) で培養した。細胞培養は95% Air, 5% CO₂, 37℃のインキュベーター内で行った。継代は70% 飽和状態になった細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、0.25%

トリプシンと0.02% EDTAを含むPBSで処理することで細胞を剥がし、新鮮な培地に懸濁することで行った。C2C12筋芽細胞が飽和状態になったところで2% ウマ血清、100 units/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン、1.0 g/L炭酸水素ナトリウムを含むD-MEM培地 (D-MEM培地 (2% HS, +P/S)) で培養した。以降2日ごとにD-MEM培地 (2% HS, +P/S) 交換をつづけ、筋管細胞へ分化させた。E2とゲニステイン、ダイゼインは培地交換の際に培地に添加し、細胞に8日間暴露続けた。

動物実験飼育法

マウスを用いたすべての動物実験は公立大学法人大阪府立大学動物実験規程に従って実施した。7週齢のddY雌性マウス ($n=30$; Kiwa Laboratory Animals, Wakayama, Japan) をバルビツール酸系鎮静麻酔薬であるペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル; Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) を50 mg/kg体重となるように腹腔内投与した。麻酔下で、卵巣を腹腔から取り出し、卵管を縫合糸で縫合して、卵管と子宮の接合部で切断した。その後、子宮を腹腔にもどし、皮膚を接合した (卵巣摘出マウス, OVXマウスとする)。卵巣摘出してから1週間後、OVXマウスを無作為に1群あたり5匹で4群 (OVX+V群とOVX+E2群, OVX+Dai群, OVX+E2/Dai群, OVX+Gen群, OVX+E2/Gen群) に分けた。OVX+E2群とOVX+E2/Dai群, OVX+E2/Gen群はマウスの両後肢の大腿部にゴマ油に溶解した吉草酸エストラジオール (Mochida Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を0.1 mg/kg体重となるように50 μ Lずつ1回筋肉内投与した。その他の群にはゴマ油を両後肢に50 μ Lずつ1回筋肉内投与した。OVX+V群とOVX+E2群には、スクロースをスターチに代えた改変AIN-76を毎日摂取させた。OVX+Dai群とOVX+E2/Dai群はゴマ油で溶かしたダイゼインを0.1%含んだ改変AIN-76を毎日摂取させ、OVX+Gen群とOVX+E2/Gen群はゴマ油で溶かしたゲニステインを0.1%含んだ改変AIN-76を毎日摂取させた。飼料組成はTable 1に示す。投与を開始してから1週間後、安楽殺したマウスの後肢にある骨格筋組織 (ヒラメ筋) を切除し、重量を測定した。その後、液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。

ER転写活性化能の測定法

ERの転写活性化能はDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を用いてルシフェラーゼ活性を測定することで評価した。70-

Table 1. Composition of diets

Ingredients	%
Casein	20.0
DL-Methionine	0.3
Corn starch	65.0
Cellulose	5.0
Corn oil	5.0
Vitamin mix (AIN-76)	1.0
Mineral mix (AIN-76)	3.5
Choline chloride	0.2
Total	100.0

80%飽和状態に達したC2C12細胞をD-MEM培地（10%活性炭処理FBS、抗生物質およびフェノールレッド不含）を用いて継代した。72時間培養後、ER α 発現ベクターであるpCAGGS-ER α とER β 発現ベクターであるpCAGGS-ER β をそれぞれFireflyルシフェラーゼ遺伝子の上流にEREをもつpGL4-EREとRenillaルシフェラーゼ発現ベクターであるpRL-SV40（Promega）とともにC2C12細胞に形質導入した。24時間後、E2あるいはゲニステイン、ダイゼインを含む培地でC2C12細胞をさらに24時間培養した。ER転写活性測定用に培養した細胞をPBSで2回洗浄し、PBSを完全に取除いた後、Dual-Luciferase Reporter Assay Systemのマニュアルに従ってFireflyルシフェラーゼ活性とRenillaルシフェラーゼ活性を測定した。ER転写活性はFireflyルシフェラーゼ/Renillaルシフェラーゼとして示し、比較元となるサンプルにて相対化し、Relative Luciferase activity (RLU) を求めた。

ウエスタンブロット法

C2C12細胞を細胞溶解緩衝液（50 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.25%デオキシコール酸ナトリウム, 1%ノニデットP-40, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM 4-(2-アミノエチル) ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩, 10 μ g/mLロイペプチン, 1 μ g/mLアプロチニン）で溶解後、超音波で破碎した。破碎した細胞溶解液をSDS-PAGEに供し、ウサギ抗USP19抗体（ab93159; Abcam, Cambridge, MA）、マウス抗ミオシン重鎖（MHC）モノクローナル抗体（MC20; Hybridoma Bank, Iowa City, IA）、マウス抗トロポミオシンモノクローナル抗体（CH1; Hybridoma Bank）、そしてウサギ抗グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）抗体⁷⁾を用いて、ウエスタンブロット法によりUSP19, MHC, トロポミオシン, そしてGAPDHのたん白質発現量を検討した。

リアルタイムRT-PCR法

USP19遺伝子発現量はSYBR[®] Premix Ex Taq[™] II（TAKARA bio, Shiga, Japan）のプロトコルに従い、Thermal Cycler Dice Real Time（TP800, TAKARA bio）を用いてリアルタイムRT-PCR法で評価した。凍結した骨格筋組織から全RNAを抽出後、逆転写反応でcDNAを作製した。その後、USP19遺伝子とペプチジルプロリルイソメラーゼA（PPIA）遺伝子に対して以下の特異的なプライマーを用いてPCRを行い、PPIA遺伝子の発現量を内部標準としてサンプル間の補正を行った：

USP19: センスプライマー

5'-GCGGCACAAGATGAGAAATG-3'

アンチセンスプライマー

5'-ACCAGGAAGCTTGATGGGCTT-3'

PPIA : センスプライマー

5'-GCAAATGCTGGACCAACAC-3'

アンチセンスプライマー

5'-TCACCTCCCAAAGACCACAT-3'

結果と考察

C2C12細胞におけるER転写活性に及ぼすダイゼインまたはゲニステインの影響

大豆イソフラボンを含む植物エストロゲンは一般的にER α よりもER β に強く作用することが知られている³⁾。C2C12細胞ではER α とER β がともに発現しているため^{8,9)}、大豆イソフラボンであるゲニステインとダイゼインのER転写活性に及ぼす影響をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。その結果、E2はER β に比べER α のほうが低濃度でルシフェラーゼ活性が上昇したのに対し（Fig. 1A）、ゲニステインはER α とER β ともに同様の濃度応答性であった（Fig. 1B）。一方、ダイゼインはER α に比べER β に強く作用した（Fig. 1C）。つまり、骨格筋細胞においてダイゼインはゲニステインに比べてER β に対する選択性が高く、またE2のER α を介した筋分化抑制作用に対して阻害効果を発揮すると示唆された。

C2C12細胞におけるUSP19発現に及ぼすダイゼインまたはゲニステインの影響

ゲニステインとダイゼインのE2による筋分化抑制作用に及ぼす影響を検討するため、ゲニステインまたはダイゼインを含む分化誘導培地でC2C12細胞の筋分化を誘導した。その結果、筋分化マーカーであるMHCとトロポミオシンのE2による発現量の減少

をゲニステインではなくダイゼインがコントロール (Vehicleを処理した) 細胞レベルまで回復させた (Fig. 2). 脱ユビキチン化酵素であるUSP19はE2により活性化されたER α を介して発現が上昇し、筋分化抑制を引き起こすが、ER β はE2によるUSP19の発現上昇を抑制する⁶⁾。したがって、E2によるUSP19の発現上昇に対するダイゼインの影響を検討したところ、E2によるUSP19の発現上昇は、ダイゼイン存在下では抑制された (Fig. 2)。一方、ゲニステインはUSP19の発現量に影響を与えなかった (Fig. 2)。またE2とゲニステイン、ダイゼインはGAPDHの発現量に影響を与えなかった。

卵巣摘出マウスの骨格筋に対するダイゼインまたはゲニステインの影響

E2の骨格筋量に及ぼす影響を検討するため、卵巣摘出術をマウスに施した (OVXマウス)。OVXマウスに大豆イソフラボンであるゲニステインまたはダイゼインを摂取させ、E2による筋重量の減少に及ぼす影響を

検討した。ダイゼインとゲニステインの摂取、またはE2の投与による体重への影響は見られなかった (Fig. 3A)。OVXマウスの子宮重量はダイゼインとゲニステインの摂取で変化しなかったが、E2によって増加した (Fig. 3B)。E2による増加はダイゼイン摂取によって影響を受けなかったが、ゲニステインの摂取はE2による子宮重量の増加を抑制した。OVXマウスにE2を投与すると骨格筋組織であるヒラメ筋の重量が減少したが、ダイゼイン摂取はE2によるヒラメ筋重量の減少を抑制した (Fig. 3C)。一方、ゲニステイン摂取はE2によるヒラメ筋重量減少には影響を与えなかった (Fig. 3C)。またUSP19の発現量はOVXマウスにE2を投与すると上昇するが、ダイゼイン摂取したマウスではE2による発現上昇が抑制された (Fig. 3D)。一方、ゲニステインにはダイゼインのようなE2によるUSP19発現の亢進を抑制する効果はなかった。以上より、E2によるUSP19発現の亢進をダイゼインが抑制し、E2による筋重量の減少を解除することが示唆された。つまり、ダイゼインのようなER β に選択的に作用する物質はE2による筋重量の減少を抑制し、女性の骨格筋量の維持に貢献すると期待される。

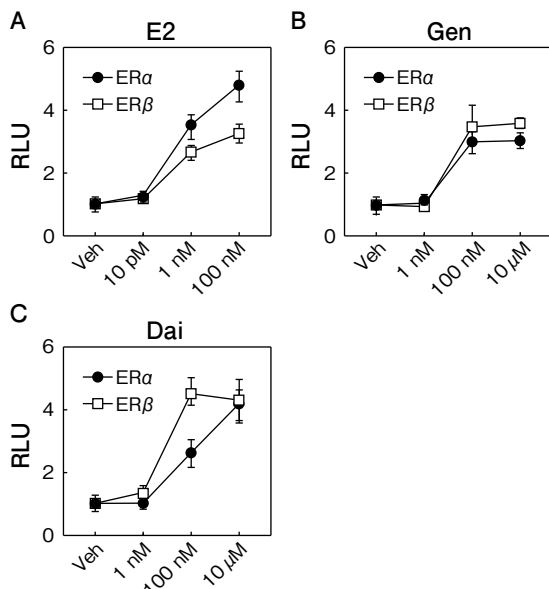


Fig. 1. Daidzein functions as an ER β agonist in C2C12 cells. C2C12 cells were transfected with ER expression vector (pCAGGS-ER α (●) or pCAGGS-ER β (□)) and reporter plasmids, followed by incubation in the presence of 17 β -estradiol (E2) (A), genistein (Gen) (B), or daidzein (Dai) (C) for 24 h. Luciferase activity was determined. The relative light units (RLUs) are expressed after normalizing with *Renilla* luciferase, and data are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=3).

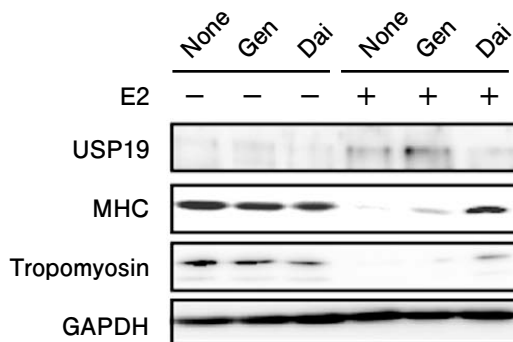


Fig. 2. Daidzein inhibits E2-repressed myogenic differentiation and E2-increased expression of USP19 in C2C12 cells. C2C12 myoblasts were cultured in differentiation medium containing 1 μ M genistein (Gen) or daidzein (Dai) in the presence or absence of 10 nM 17 β -estradiol (E2) for 8 days. Cell lysates were subjected to Western blot analyses with anti-USP19, anti-MHC, anti-tropomyosin, and anti-GAPDH antibodies.

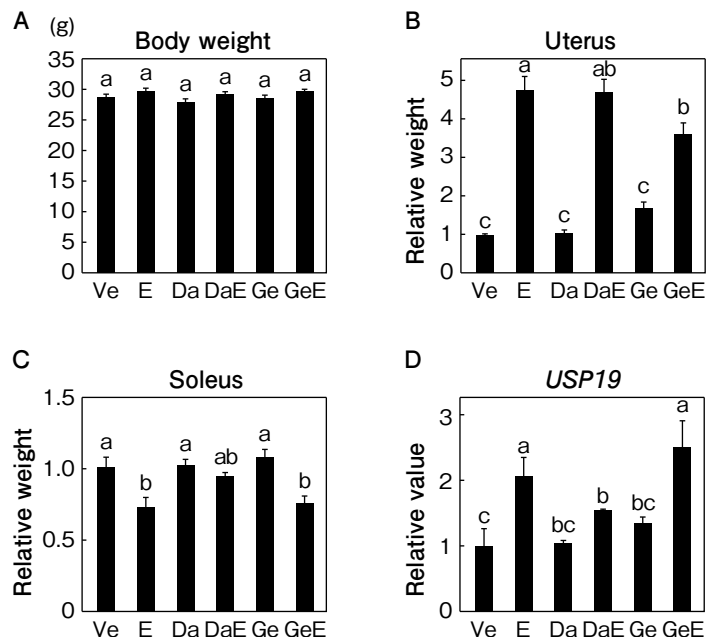


Fig. 3. Daidzein inhibits E2-decreased muscle masses and E2-increased expression of USP19 in skeletal muscles of ovariectomized mice. OVX mice were randomly divided into six groups, OVX+V group (Ve), OVX+E2 group (E), OVX+Dai group (Da), OVX+E2/Dai group (DaE), OVX+Gen group (Ge), and OVX+E2/Gen group (GeE). Body weights (A) were determined. The ratios of wet weight of uterus (B) and soleus muscle (C) to body weight were determined. The *USP19* mRNA level (D) in the soleus muscle was analyzed by qRT-PCR. Data were normalized to *PPIA* mRNA. In all experiments, values are indicated as mean $\pm$ S.D (n=5), and statistically significant differences are indicated by different letters ($p < 0.05$ by one-way ANOVA with Tukey's test).

要 約

骨格筋は運動器以外に糖質や脂質の代謝も担い、生命活動に重要な機能を果たしている。女性ホルモン（ 17β -エストラジオール, E2）が結合したエストロゲン受容体（ER）は標的遺伝子の発現を調節する。ERには2つのアイソフォーム（ER α とER β ）があり、互いに拮抗的に作用する。我々はこれまでにE2がER α を介して脱ユビキチン化酵素USP19の発現を上昇させ、マウス筋芽細胞株（C2C12細胞）の筋分化を抑制するが、ER β はE2によるUSP19発現上昇を抑制することで筋分化抑制を解除することを見いだしている。大豆イソフラボンであるダイゼインとゲニステインはエストロゲン様作用を持つことから、本研究では、E2による筋分化抑制に対するダイゼインとゲニステインの影響について検討した。C2C12細胞においてダイゼインとゲニステインのERアイソフォームの転写活性化能を評価したところ、ダイゼインはゲニステインに比べてER β に対する選択性が高いことが判明した。C2C12細胞の筋分化に対する大豆イソフラボンの影響を検討したところ、ゲニステインではなくダイゼインがE2によるUSP19の発現上昇と筋分化抑制を解除した。E2を投与した卵巣摘出マウスにダイゼインあるいはゲニステインを摂取させると、ダイゼイン摂取はE2投与による筋重量の減少とUSP19の発現上昇を抑制した。一方、ゲニステインは筋重量に影響を与えなかった。以上の結果より、ダイゼインがER β を介してE2によるUSP19の発現上昇を抑制し、骨格筋量の維持に貢献すると考えられる。

文 献

- 1) Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M and Gustafsson JA (2007): Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*, **7**, 905-931.
- 2) Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA and Ohlsson C (2003): Estrogen receptor (ER)- β reduces ER α -regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ER α and ER β in mice. *Mol Endocrinol*, **17**, 203-208.
- 3) Harris DM, Besselink E, Henning SM, Go VL and Heber D (2005): Phytoestrogens induce differential estrogen receptor α - or β -mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, **230**, 558-568.
- 4) Wiik A, Ekman M, Johansson O, Jansson E and Esbjörnsson M (2009): Expression of both oestrogen receptor α and β in human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol*, **131**, 181-189.
- 5) Ríos R, Carneiro I, Arce VM and Devesa J (2002): Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C993-999.
- 6) Ogawa M, Yamaji R, Higashimura Y, Harada N, Ashida H, Nakano Y and Inui H (2011): 17 β -estradiol represses myogenic differentiation by increasing ubiquitin-specific peptidase 19 through estrogen receptor α . *J Biol Chem*, **286**, 41455-41465.
- 7) Yamaji R, Fujita K, Takahashi S, Yoneda H, Nagao K, Masuda W, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Inui H and Nakano Y (2003): Hypoxia up-regulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in mouse brain capillary endothelial cells: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochim Biophys Acta*, **1593**, 269-276.
- 8) Milanesi L, Russo de Boland A and Boland R (2008): Expression and localization of estrogen receptor α in the C2C12 murine skeletal muscle cell line. *J Cell Biochem*, **104**, 1254-1273.
- 9) Milanesi L, Vasconsuelo A, de Boland AR and Boland R (2009): Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor β in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids*, **74**, 489-497.