

大豆由来イソフラボンによる筋萎縮制御の分子メカニズム —加齢による筋萎縮の予防を中心に—

平坂勝也*・前田 翼・春名真里江・河野尚平・安倍知紀・越智ありさ・
近藤茂忠・真板(大野)綾子・奥村裕司・二川 健

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

Inhibitory Effects of Isoflavones Derived from Soy Beans on Muscle Atrophy in C2C12 Myotubes

Katsuya HIRASAKA*, Tasuku MAEDA, Marie HARUNA, Shohei KOHNO,
Tomoki ABE, Arisa OCHI, Shigetada TESHIMA-KONDO, Ayako OHNO,
Yuushi OKUMURA and Takeshi NIKAWA

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

ABSTRACT

Proinflammatory cytokines contribute to a progression of age-associated muscle atrophy (sarcopenia) caused by ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis. Although isoflavones as a potent antioxidative nutrient have been known to reduce muscle damage during the catabolic state, the other effects of isoflavones, but not antioxidants, against on muscle atrophy are not well known. Here we report on the inhibitory effects of isoflavones on muscle atrophy caused by tumor necrosis factor (TNF)- α treatment. In C2C12 myotubes, TNF- α treatment markedly elevated the expression of the muscle-specific ubiquitin ligase MuRF1, but not of atrogin-1, leading to myotube atrophy. We found that MuRF1 promoter activity was mediated by acetylation of p65 that is a subunit of NF- κ B, which is the molecule of the TNF- α downstream signaling pathway, while increased MuRF1 promoter activity was abolished by SIRT1, which is associated with the deacetylation of p65. Moreover, isoflavones significantly suppressed MuRF1 promoter activity and myotube atrophy induced by TNF- α in C2C12 myotubes. These results suggest that isoflavones suppress myotube atrophy in skeletal muscle cells through an activation of SIRT1 signaling. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 150-155, 2013.

Key words : muscle atrophy, ubiquitin ligase, isoflavone

*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

近年、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ており、我々はまた、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)}。このように、萎縮筋ではユビキチンプロテアソーム系の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。骨格筋において、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 の活性化を介してユビキチンプロテアソーム依存的なたん白質分解を誘導する。さらに、TNF- α 処理は p300/CBP アセチルトランスフェラーゼを介して NF- κ B のサブユニットである p65 のアセチル化を促進し、結果として、DNA 結合とターゲットとなる遺伝子の転写を活性化する。最近、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存性ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 は生理的に p65 と結合し、p65 の310番目のリジンを脱アセチル化することによって転写活性を阻害することが報告された³⁾。したがって、NF- κ B の脱アセチル化は筋萎縮予防の重要なターゲットとなりうるかもしれない。

SIRT1 の活性化を増加させるものとして、ポリフェノールであるレスベラトロールが知られている⁴⁾。レスベラトロールと同様にゲニステインやダイゼインなどの大豆由来イソフラボンもまた、エストロゲン作用によりレスベラトロールと同様の作用を有することが知られている。しかしながら、筋萎縮に対するイソフラボンの効果についてはまだ知られていない。

本研究では、C2C12 筋管細胞を用いて、大豆由来イソフラボンの筋萎縮に対する予防効果を検討した。

方 法

プラスミド作成

Atrogin-1 上流 (3,890 bp) と MuRF1 上流 (4,244 bp) をルシフェラーゼに融合したベクターと V5 タグを付加したマウス NF- κ B/p65 の発現ベクター (pcDNA3.1-p65-V5) は、RT-PCR により増幅し、クローニング法により構築した。一方、V5 タグを付加した K310R NF- κ B/p65 (310番目のアルギニンをリジンに変異) 発現ベクターは RT-PCR による Quick Change 法により構築した。

細胞の培養

マウス骨格筋由来細胞である C2C12 筋芽細胞を、37°C、5% CO₂ の条件下で、増殖培地 [100 μ g/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリン、10% 牛胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] で培養した。C2C12 筋芽細胞が 100% コンフルエントになったところで 2% horse serum を含む DMEM に交換し、72 時間分化させた。

ルシフェラーゼアッセイ

C2C12 筋管細胞を用いたルシフェラーゼアッセイは C2C12 筋芽細胞を播種し、翌日、jetPRIME (Polyplus) を用いてトランスフェクションを行った。4 時間後、培地を交換し、C2C12 筋芽細胞が 100% コンフルエントになるまで培養した。その後、分化した C2C12 細胞に TNF- α 、SRT1720、Daidzein、Genistein を処理した。24 時間後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。ウミシイタケ由来の蛍光を内部標準として用いた。

一方、ヒト子宮頸がん細胞由来 HeLa 細胞と、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞は播種した翌日に、HilyMax (dojindo) を用いてトランスフェクションを行った。24 時間後、細胞を回収し、蛍光強度をルミノメーターで測定した。

ウェスタンブロット法

細胞から抽出したたん白質を SDS 化した後、10% ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行った。ゲル中のたん白質は、セミドライブロットティング装置 (ATTO) を用いて Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した。転写後、PVDF 膜を 4% ミルクカゼイン (雪印) にて室温で 1 時間ブロッキングし、0.05% Tween-20 を含む PBS-T で洗浄した。次に、膜を一次抗体 [Mouse monoclonal V5 抗体 (Invitrogen) または β -actin 抗体 (SIGMA)] と 4°C で一晩反応させた。洗浄後、さらに二次抗体 [抗マウス IgG 抗体 (Amersham)] と 37°C で 1 時間反応させた。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence (ECL) 検出システム (Amersham) を用いて抗体と反応したたん白質を検出した。

結果と考察

炎症性サイトカインによる筋管の萎縮

老齢マウスの血中ではTNF- α やIL-6などの炎症性サイトカインの発現レベルが若年マウスと比較して有意に高いことが数多く報告されている⁵⁾。実際に、TNF- α の添加により筋管の萎縮がみられた (Fig. 1)。

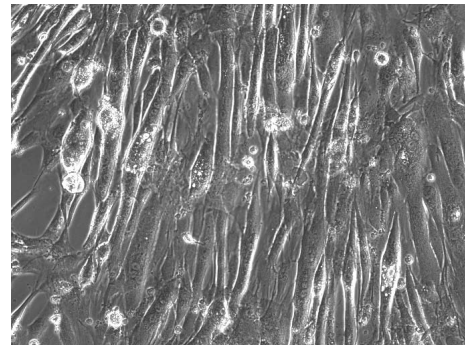
炎症性サイトカインの筋萎縮関連遺伝子への影響

炎症性サイトカインはユビキチンプロテアソームとNF- κ Bの活性化によって筋萎縮を引き起こすことが報告されている^{6,7)}。また、MuRF1遺伝子上流にはNF- κ B結合領域も存在する。炎症性サイトカインであるTNF- α が筋萎縮関連遺伝子群のプロモーター活性へ与える影響について検討するためにルシフェラーゼアッセイを行った。Atrogin-1の転写活性はemptyベクターと比較して、およそ10倍の転写活性が認められた。これはAtrogin-1のプロモーター領域にFOXO結合領域だけでなくMyoD結合領域が存在することから、筋管細胞の内在性転写因子がプロモーター活性に影響したと考えられる。TNF- α 刺激によるAtrogin-1の転写活性変化を検討したところ、プロモーター活性の上昇は認められなかった (Fig. 2)。MuRF1のプロモーター活性はAtrogin-1のプロモーター活性同様、emptyベクターの転写活性と比較して、およそ10倍の転写活性が認められた。MuRF1もまた、そのプロモーター領域にMyoD結合領域を持つことから筋管細胞の内在性転写因子が影響したと考えられる。これに対して、TNF- α 処理によりMuRF1のプロモーター活性は有意な増加が認められた (Fig. 2)。したがって、TNF- α などの炎症性サイトカインはNF- κ Bを介してMuRF1の発現に関与することが示唆された。

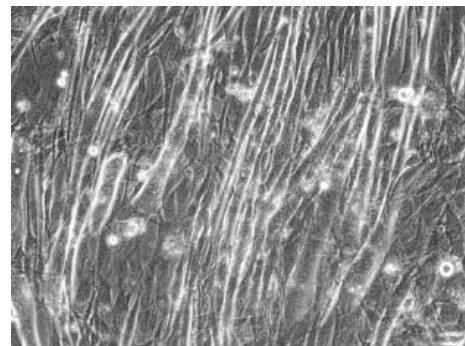
NF- κ Bのアセチル化がMuRF1発現へ及ぼす影響

NF- κ Bのサブユニットであるp65は核内でアセチル化転移酵素であるp300によってアセチル化修飾を受けることが知られている⁸⁾。特に、p65の310番目のリジン残基でのアセチル化は転写因子としての活性を高める作用があることが報告されている⁹⁾。そこで、NF- κ Bのサブユニットであるp65のアセチル化がMuRF1の転写活性に与える影響を検討するために、p65のアセチル化部位を不活化したミュータントK310R NF- κ B/p65 (310番目のリジン残基をアルギニン残基に置換したp65) を作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。まず初めに、NF- κ B/p65あるいはK310R NF- κ B/p65

を強発現したHeLa細胞、HEK293細胞において発現量がそれぞれ等しいことを確認した (Fig. 3)。この条件下でMuRF1のプロモーター活性を検討したところ、HeLa細胞、HEK293細胞のどちらにおいてもK310R NF- κ B/p65ではMuRF1の転写活性がおよそ半分まで減少した (Fig. 3)。これらの結果は、MuRF1の発現調節にはNF- κ B/p65のアセチル化が重要な働きをしていることを示している。



0



10

TNF- α (ng/mL)

Fig. 1. Effect of TNF- α on C2C12 myotubes. C2C12 myoblastic cells were cultured on a 35 mm dish and allowed to differentiate into myotubes by incubation in differentiation medium for 72 h. Differentiated C2C12 myotubes were treated with PBS or TNF- α for 72 h.

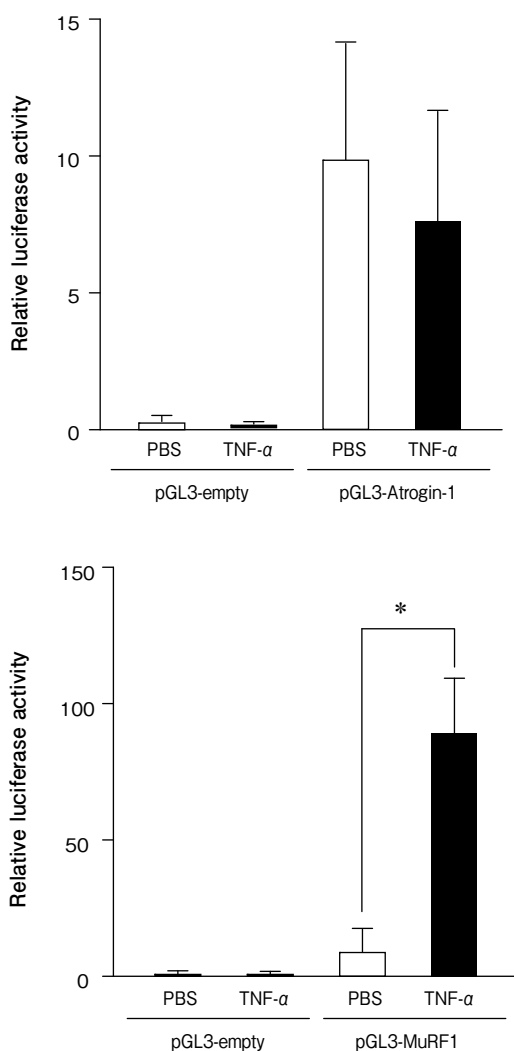


Fig. 2. Expression of atrogenes in TNF- α -treated C2C12 myotubes. (A) C2C12 myoblastic cells were transfected with pGL3-empty, pGL3-atrogin-1 promoter, or pGL3-MuRF1 promoter and pRL-TK. When the cells reached confluence, the medium was shifted to differentiation medium to induce myotube formation. After being cultured in differentiation medium for 72 h, cells were treated with PBS or TNF- α for 24 h. Extracts from cells were subjected to the luciferase reporter assay. The intensity ratio of firefly luciferase activities of the atrogin-1 and MuRF1 reporter construct to the renilla luciferase expression vector was calculated. Data are mean $\pm$ SD (n=4). * p <0.05, compared with PBS-treated cells.

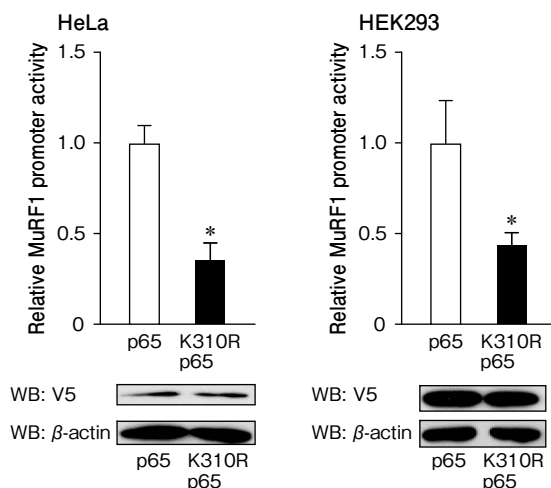


Fig. 3. Effect of deacetylated mutant p65 on MuRF1 expression induced by TNF- α . HeLa or HEK293 cells were transfected with pcDNA3.1-p65, or pcDNA3.1-K310R p65 and both pGL3-MuRF1 promoter and pRL-TK. Extracts from myotubes were subjected to the luciferase reporter assay as described in Materials and Methods. Data are mean $\pm$ SD (n=4). * p <0.05, compared with TNF- α -treated p65 expressing cells.

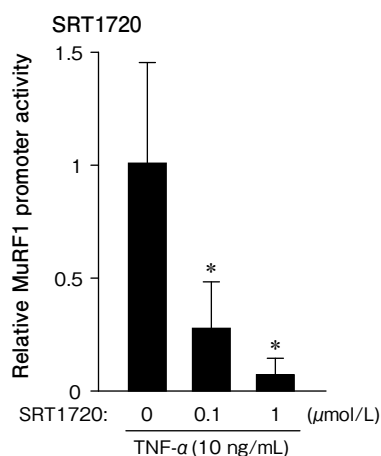


Fig. 4. Effect of SIRT1 activator on MuRF1 expression induced by TNF- α . C2C12 myoblastic cells were transfected with pGL3-MuRF1 promoter and pRL-TK. Differentiated myotubes were treated with indicated concentrations of SIRT1 activator, SRT1720 and TNF- α for 24 h. The luciferase reporter assay was performed as described in the Materials and Methods. Data are mean $\pm$ SD (n=4). * p <0.05, compared with TNF- α -treated cells.

脱アセチル化が筋萎縮関連遺伝子に及ぼす影響

NAD依存性脱アセチル化酵素であるSIRT1はNF- κ Bの転写活性を調節することが報告されている¹⁰⁾。筋萎縮において、脱アセチル化が及ぼす効果を検討するために、SIRT1の活性化剤であるSRT1720を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。MuRF1のプロモーター活性はTNF- α を処理した筋管細胞と比較して、SRT1720を処理することにより発現が有意に抑制された (Fig. 4)。この結果はNF- κ Bの脱アセチル化が老化による筋萎縮の予防に効果的であることを示唆する。

大豆由来イソフラボンがMuRF1発現へ及ぼす影響

SIRT1の活性を高めるものとして赤ワインに含まれるレスベラトロールが報告されている⁴⁾。そこで、構造が類似している大豆イソフラボンにおいても、MuRF1の転写を活性抑制しうるかどうかが検討した。その結果、100 μ mol/Lのダイゼイン、ゲニステイン添加により、MuRF1の転写活性の減少が認められた (Fig. 5)。

以上の結果より、加齢による炎症性サイトカインが引き起こす筋萎縮では、MuRF1の転写調節によるNF- κ Bのアセチル化が重要な役割を担っていることが考えられた。そのアセチル化を防ぐ因子としてSIRT1があり、SIRT1の活性化剤の添加によりMuRF1の転写活性の上昇が抑えられた。同様に、大豆イソフラボンの添加によってもMuRF1の転写活性上昇が抑えられた。よって、大豆イソフラボン添加はSIRT1経路を介してMuRF1の転写活性上昇を抑えることで、加齢による筋萎縮の予防につながりうると考えられる。

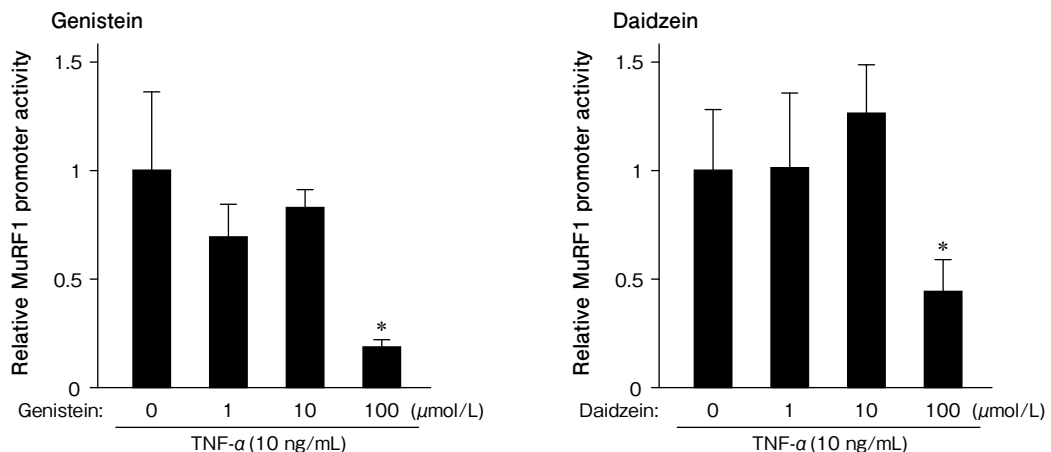


Fig. 5. Effect of isoflavones on MuRF1 promoter activity induced by TNF- α in C2C12 myotubes. C2C12 myoblastic cells were transfected with pGL3-MuRF1 promoter and pRL-TK. Differentiated myotubes were treated with indicated concentrations of isoflavones and TNF- α for 24 h. The luciferase reporter assay was performed as described in the Materials and Methods. Data are mean $\pm$ SD (n=4). * p <0.05, compared with vehicle (DMSO)-treated cells.

要 約

超高齢化社会を迎えている我が国において、加齢による筋萎縮（サルコペニア）の予防は高齢者のquality of life (QOL) 向上と運動器症候群（ロコモティブシンドローム）発症予防に重要である。炎症性サイトカインはサルコペニアの原因の一つであり、ユビキチンプロテアソーム依存性のたん白質分解経路を活性化することによって筋萎縮を引き起こす。大豆由来イソフラボンはその抗酸化効果により筋傷害を軽減することが知られているが、筋萎縮に対する抗酸化以外の効果についてはほとんど報告がない。本研究では、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子（TNF）- α によって引き起こされる筋萎縮に対する大豆由来イソフラボン（ゲニステイン、ダイゼイン）の予防効果について検討した。マウス由来C2C12筋管細胞において、TNF- α 処理は筋特異的ユビキチンリガーゼであるMuRF1の発現を誘導し、筋管萎縮を引き起こした。一方、もう一つの筋特異的ユビキチンリガーゼであるatrogin-1の発現には影響しなかった。次に、TNF- α によるMuRF1の発現調節を検討した結果、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。また、興味深いことに、大豆由来イソフラボンはTNF- α によって誘導されるMuRF1の転写活性を抑制した。以上の結果より、大豆由来イソフラボンはSIRT1を活性化することによってMuRF1を介した筋萎縮を予防することが示唆された。したがって、大豆由来イソフラボンは加齢による筋萎縮の予防につながりうると考えられる。

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) Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA and Mayo MW (2004): Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, **23**, 2369-2380.
- 4) Borra MT, Smith BC and Denu JM (2005): Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*, **280**, 17187-17195.
- 5) Meng SJ and Yu LJ (2010): Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci*, **11**, 1509-1526.
- 6) Ladner KJ, Caligiuri MA and Guttridge DC (2003): Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF- κ B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J Biol Chem*, **278**, 2294-2303.
- 7) Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE and Kumar A (2007): TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J*, **21**, 1857-1869.
- 8) Senf SM, Sandesara PB, Reed SA and Judge AR (2011): p300 Acetyltransferase activity differentially regulates the localization and activity of the FOXO homologues in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, **300**, 1490-1501.
- 9) Hasselgren PO (2007): Ubiquitination, phosphorylation, and acetylation-triple threat in muscle wasting. *J Cell Physiol*, **213**, 679-689.
- 10) Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA and Mayo MW (2004): Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, **23**, 2369-2380.