

ダイゼインによって増量する骨格筋の特徴に関する研究

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応用生命科学専攻

生命機能化学分野食品代謝栄養学研究室

Characterization of Skeletal Muscles in Daidzein-Fed Mice

Masahiro OGAWA and Ryoichi YAMAJI*

Laboratory of Nutrition Chemistry, Course of Biological Chemistry, Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences,
Osaka Prefecture University, Osaka 599-8531

ABSTRACT

Skeletal muscle mass is different between males and females, although most studies are focused on the effects of functional food components on skeletal muscle mass without consideration of sex difference. Soy food is a rich source of isoflavones including genistein and daidzein, which exert weak estrogen-like activities through binding to two isoforms of the estrogen receptor (ER), ER α and ER β . We previously reported that daidzein inhibits estrogen-increased USP19 expression by activating ER β and consequently represses estrogen-decreased skeletal muscle mass in ovariectomized young female mice. However, it is unknown what the effects of daidzein on skeletal muscle mass in female and male mice under normal physiological conditions are. In this study, we evaluated the effects of daidzein on the quantity and quality of skeletal muscle under normal physiological conditions. Dietary daidzein increased soleus and gastrocnemius muscle masses and decreased USP19 expression levels in soleus and gastrocnemius muscles in female mice, but not in male mice. Furthermore, dietary daidzein increased the isometric force of the plantarflexor muscle only in female mice. When we assessed the effects of daidzein on the quantity and quality of skeletal muscle in castrated male mice, dietary daidzein had no influence on muscle mass, USP19 expression level, or the isometric force of muscle. Furthermore, daidzein promoted fusion of myoblasts and caused hypertrophy of myotubes during myogenesis of C2C12 cells. These results suggest that daidzein represses USP19 expression level and consequently increases the soleus and gastrocnemius muscle masses and the isometric force of muscle only

*〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1

in female mice under normal physiological conditions. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 80-84, 2014.

Key words : isoflavone, daidzein, skeletal muscle, sex difference, ubiquitin-specific peptidase 19

加齢による筋量の低下は転倒骨折を誘発し、寝たきりの原因となる¹⁾。そのため、筋量の維持・増強は寝たきり防止に役立つ。骨格筋は寝たきり予防や糖尿病のような生活習慣病の予防に重要な組織であるため、健常時から骨格筋量の維持・増強に寄与する食品成分を日常的に摂取できれば、生活の質（QOL）の向上につながるはずである。しかし骨格筋は男女間で量的に異なるにも関わらず、多くの研究は性差を考慮せずに食品成分の機能性を評価している²⁻⁴⁾。

我々はこれまでに男女間での骨格筋量の違いに着目し、(1) 女性ホルモン（17 β -エストラジオール、E2）がエストロゲン受容体（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形成を抑制すること⁵⁾、(2) E2を産生できない卵巣摘出（OVX）マウスにE2を投与するとUSP19の発現が亢進して骨格筋量が低下すること⁵⁾、(3) ER α に拮抗的に作用するER β に対してアゴニスト活性を持つダイゼインをOVXマウスに摂取させるとE2によるUSP19の発現亢進と骨格筋低下を抑制すること、を見いだした。これらの結果は、女性の骨格筋量の維持・増強に及ぼすダイゼインの有効性を示唆するが、男性の骨格筋量への効果は不明である。そこで本研究では、ダイゼインの骨格筋量に及ぼす有効性に性差があるのかを評価するとともに、ダイゼイン摂取により増加したメスマウスの骨格筋の機能についても評価することを目的とする。

方 法

動物実験飼育法

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。8週齢のddY雌性および雄性マウスを2群に分けた。コントロール群にはTable 1に示す改変AIN-76を、ダイゼイン群にはダイゼインを0.1%含む改変AIN-76を1週間自由摂取させた後、マウスの後肢の腓腹筋とヒラメ筋を切除した。一方、去勢（両側の精巣の摘出）は麻酔下で7週齢の雄性マウスで実施した。手術から1週間後、2群（コントロール群とダイゼイン群）に分けた。

マウス後肢筋力測定法

Iwataら⁶⁾の方法を一部改変して実施した。簡単に述べると、麻酔下でマウスの左足を太ももの裏側が見えるように固定し、露出させた脛骨神経を刺激電極に引っ掛けた。電気刺激を与えることでマウスが測定板を蹴るので、その際の測定板のひずみを解析することで筋力を等尺性収縮力として測定した。刺激の条件は周波数200 Hz、パルス幅2 ms、電流10 mAで実施した。

リアルタイムRT-PCR法

骨格筋組織から全RNAを抽出後、逆転写反応でcDNAを作製し、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でPCRした：

USP19：センスプライマー

5'-GCGGCACAAGATGAGAAATG-3'

アンチセンスプライマー

5'-ACCAGGAACCTTGATGGGCTT-3'

PPIA：センスプライマー

5'-GCAAATGCTGGACCAAACAC-3'

アンチセンスプライマー

5'-TCACCTTCCCAAAGACCACAT-3'

細胞培養法

マウス由来C2C12筋芽細胞（RIKEN Bioresource Center Cell Bank, Tsukuba, Japan）は、10%牛胎児血清（FBS）と抗生物質を含むD-MEM培地（増殖培地）で95% Air, 5% CO₂, 37℃のインキュベーター内で行った。C2C12筋芽細胞が飽和状態になったところで2%ウ

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

マ血清と抗生物質を含むD-MEM培地（分化培地）で培養した。以降2日ごとに分化培地を交換し、筋管細胞へ分化させた。E2とダイゼインは培地交換毎に培地に添加し、細胞に8日間暴露し続けた。

ウエスタンブロット法

C2C12細胞を細胞溶解緩衝液中で破碎後、SDS-PAGEに供し、マウス抗ミオシン重鎖モノクローナル（MyHC）抗体（MC20, Hybridoma Bank, Iowa City, IA）、マウス抗tropomyosin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を行った。

免疫染色法

1 μ Mダイゼイン存在下で分化誘導した細胞を4% paraformaldehyde/PBSで固定した。0.1% Triton X-100/PBSで処理後、抗MyHC抗体、続いて蛍光二次抗体と反応させた。蛍光顕微鏡BIOREVO BZ-9000（Keyence, Osaka, Japan）を用いて細胞の観察をおこなった。

結果と考察

ダイゼインの筋量に及ぼす影響と性差

ダイゼイン摂取が正常な生理的条件下でのマウスの骨格筋の量に及ぼす影響を検討した。このときダイゼインの骨格筋量に及ぼす影響に性差があるのかも合わせて評価するため、雄性マウスと雌性マウスにダイゼインを摂取させた。その結果、雌性マウスで後肢の骨格筋組織であるヒラメ筋と腓腹筋の重量が増加したが、雄性マウスの骨格筋量には影響がなかった（Table 2）。一方、ダイゼイン摂取は雄性マウスと雌性マウス

ともに体重に影響を与えなかった。雌雄間の骨格筋の量的な違いをもたらす要因として性ホルモンが挙げられる。つまりダイゼインの骨格筋に対する作用に男性ホルモンが影響を与えている可能性が考えられる。そこで男性ホルモンを除去するために、雄性マウスに去勢術を施し、ダイゼインを摂取させた。その結果、去勢により腓腹筋重量が低下したが、去勢マウスにおけるダイゼイン摂取はヒラメ筋と腓腹筋の重量に影響をあたえなかった。以上のことから、ダイゼインの骨格筋量に及ぼす影響は雄性和雌性マウスで異なり、雌性マウスでのみ骨格筋量を増加させることが示された。

骨格筋組織におけるUSP19発現に及ぼすダイゼインの影響

USP19は骨格筋量が減少する時に発現が亢進し^{4, 8)}、さらにE2により発現が上昇する⁵⁾。そこで、骨格筋におけるUSP19発現に及ぼすダイゼインの影響を検討した。その結果、ダイゼイン摂取は雌性マウスのヒラメ筋と腓腹筋におけるUSP19の発現量を減少させたが、雄性マウスの骨格筋のUSP19発現には影響を及ぼさなかった（Fig. 1）。

筋力に及ぼすダイゼインの影響と性差

雌性マウスだけで、ダイゼイン摂取が後肢の筋（ヒラメ筋と腓腹筋）を量的に増加させたので、後肢の筋の質的な変化を評価するため、等尺性収縮力を測定した。その結果、雄性マウスは雌性マウスに比べ等尺性収縮力は強く、雌性マウスにおいてダイゼインを摂取させることで後肢の筋力がコントロールに比べ有意に増加した（Table 2）。一方、雄性マウスではダイゼインによる筋力に及ぼす影響が見られなかった。また去勢による筋力への影響は認められず、雌性マウスで認められたダイゼインの筋力亢進作用は去勢した雄性マ

Table 2. Body weights, muscle weights, and muscle force in daidzein-fed female and male mice

	Female		Male		Castrated	
	Control	Daidzein	Control	Daidzein	Control	Daidzein
Body weight (g)	28.7 $\pm$ 4.8	27.3 $\pm$ 5.9	37.0 $\pm$ 2.6	37.4 $\pm$ 1.2	37.8 $\pm$ 2.2	37.2 $\pm$ 2.8
Soles muscle mass ratio ^{*1}	0.358 $\pm$ 0.041	0.426 $\pm$ 0.059 ^a	0.375 $\pm$ 0.052	0.420 $\pm$ 0.053	0.369 $\pm$ 0.092	0.428 $\pm$ 0.101
Gastrocnemius muscle mass ratio ^{*1}	0.97 $\pm$ 0.067	1.12 $\pm$ 0.044 ^a	1.03 $\pm$ 0.061	0.99 $\pm$ 0.12	0.84 $\pm$ 0.054 ^c	0.90 $\pm$ 0.12
Isometric force of the plantarflexor muscle (N)	0.80 $\pm$ 0.13	1.12 $\pm$ 0.23 ^a	1.18 $\pm$ 0.16 ^b	1.28 $\pm$ 0.30	1.13 $\pm$ 0.32	1.18 $\pm$ 0.37

^{*1} Ratio of muscle mass (mg)/body weight (g)

^a Significant difference between the control group and daidzein group ($p < 0.05$)

^b Significant difference between the female group and male group at the same diet ($p < 0.05$)

^c Significant difference between the male group castrated group at the same diet ($p < 0.05$)

ウスでは観察されなかった。これらの結果から、ダイゼインの筋力亢進作用は雌性マウスでのみ誘発されることが判明した。雄性マウスに関しては、去勢期間をより長くしてからダイゼインの影響を観察することは興味深い結果をもたらすかもしれない。今後の課題である。

ダイゼインの筋分化過程に及ぼす影響

ダイゼインの筋形成に及ぼす影響を検討するため、筋芽細胞株であるC2C12細胞をダイゼイン存在下で筋管細胞へと分化誘導させた。その結果、ダイゼイン存在下で筋分化誘導させた細胞では筋構成たん白質であるMyHCとtropomyosinの発現レベルがコントロール

であるvehicle存在下で筋分化誘導させた細胞に比べ高かった (Fig. 2)。またMyHC抗体による蛍光染色法により、細胞形態を観察したところ、ダイゼイン存在下で培養したC2C12細胞では筋管細胞数が増加し、また筋管細胞の肥大が見られた (Fig. 3)。以上のことから、ダイゼインは筋芽細胞の形成と成長を促進し、筋管を肥大させることが示された。

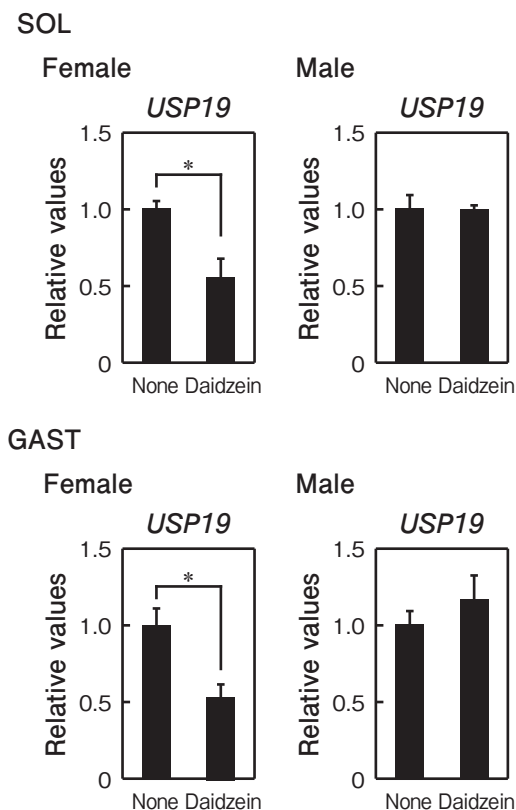


Fig. 1. Dietary daidzein decreased expression levels of USP19 in female mice. Total RNAs were prepared from soleus (SOL) and gastrocnemius (GAST) muscles. The USP19 and PPIA mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Data were normalized to PPIA mRNA. Values are indicated as means $\pm$ S.D. (n=5), and statistically significant differences are indicated (* p <0.05 by Student's t -test).

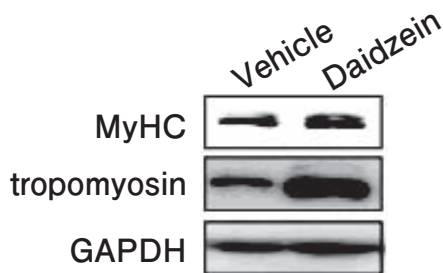


Fig. 2. Daidzein increased expression levels of muscle structural proteins in C2C12 cells. C2C12 myoblasts were cultured in differentiation medium containing daidzein. Cell lysates were subjected to Western blot analyses.

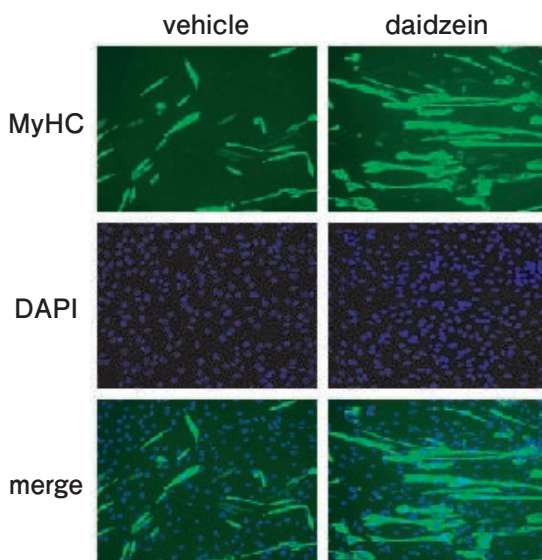


Fig. 3. Daidzein enhanced fusion of C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were cultured in differentiation medium containing daidzein. Fixed cells were visualized with anti-MyHC antibody. The nuclei were counterstained with DAPI.

要 約

加齢による筋量の低下は転倒骨折を誘発し、寝たきりの原因となる。そのため、健常時から骨格筋量の維持・増強に寄与する食品成分を日常的に摂取できれば生活の質（QOL）の向上に貢献できる。しかし表現型として男女間では骨格筋の量が異なる。しかしこれまでに性差を考慮して食品成分の機能性を評価している研究はほとんどない。本研究では骨格筋の量と質（機能）に及ぼすダイゼインの効果とその有効性に性差があるのかを評価した。雄性マウスと雌性マウスにダイゼインを摂取させたところ、雌性マウスでのみ、後肢の骨格筋組織であるヒラメ筋と腓腹筋の重量が増加し、筋量を負に制御するUSP19の発現が減少した。また筋量の増加した雌性マウスでのみ後肢の筋力（等尺性収縮力）がダイゼイン摂取で増加した。男性ホルモンの影響を検討するため、去勢した雄性マウスでも検討したが、ダイゼインはヒラメ筋と腓腹筋の重量と筋力には影響を与えなかった。マウス筋芽細胞株C2C12細胞において、ダイゼインは筋管細胞の形成と肥大を促進させた。以上より、ダイゼイン摂取が雌性マウスでのみ骨格筋重量と筋力を増強させ、USP19の発現を減少させた。その現象としてダイゼインは細胞レベルでも筋形成と肥大を促進させることが示された。つまり雄性マウスと雌性マウスの骨格筋にダイゼインは量的・質的に異なる影響を与えることが判明した。

文 献

- 1) Evans WJ (2010): Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr*, **91**, 1123S-1127S.
- 2) Crozier SJ, Kimbal SR, Emmert SW, Anthony JC and Jefferson LS (2005): Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J. Nutr.* **135**, 376-382.
- 3) Dolinsky VW, Jones KE, Sidhu RS, Haykowsky M, Czubyrt MP, Gordon T and Dyck JR (2012): Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats. *J Physiol*, **590**, 2783-2799.
- 4) Ogawa M, Kariya Y, Kitakaze T, Yamaji R, Harada N, Sakamoto T, Hosotani K, Nakano Y and Inui H (2013): The preventive effect of β -carotene on denervation-induced soleus muscle atrophy in mice. *Br J Nutr*, **109**, 1349-1358.
- 5) Ogawa M, Yamaji R, Higashimura Y, Harada N, Ashida H, Nakano Y and Inui H (2011): 17β -estradiol represses myogenic differentiation by increasing ubiquitin-specific peptidase 19 through estrogen receptor α . *J Biol Chem*, **286**, 41455-41465.
- 6) Iwata A, Fuchioka S, Hiraoka K, Masuhara M and Kami K (2010): Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. *Muscle Nerve*, **41**, 694-701.
- 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 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Biochim Biophys Acta*, **1593**, 269-276.
- 8) Combaret L, Adegoke OA, Bedard N, Baracos V, Attaix D and Wing SS (2005): USP19 is a ubiquitin-specific protease regulated in rat skeletal muscle during catabolic states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **288**, E693-700.