

大豆イソフラボンによる転写因子ERR α を介した 骨格筋エネルギー代謝関連遺伝子制御の検討

飯田薫子*

お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科

The Effect of Dietary Isoflavone Daidzein on ERR α that Regulates Fatty Acid Metabolism-Related Genes in C2C12 Muscle Cells

Kaoruko IIDA*

Department of Nutrition and Food Science, Graduate School of Humanities and Sciences,
Ochanomizu University, Tokyo 112-8610

ABSTRACT

Many epidemiological studies show that intake of isoflavones play a beneficial roles in preventing obesity, however, the mechanism of the anti-obesity effects is unclear. This study therefore aimed to clarify the effects of daidzein, one of soy isoflavones, on transcription factor ERR α which has a crucial role on 'fat burning' in skeletal muscles. ERR α -expressed C2C12 myoblasts were differentiated then treated with daidzein for 48 hr. The effects of daidzein on transcriptional activity of ERR α were assessed by a reporter assay based on the promoter of PDK4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4). When C2C12 myotubes were treated with daidzein for 48 h, there were significant increases in the expression of ERR α target genes, such as PDK4, MCAD (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase) and CPT1- β (carnitine palmitoyltransferase-1 β). ERR α specific inhibitor XCT790 suppressed the increases of these genes' expression by daidzein. In a reporter assay, daidzein upregulated PDK4 promoter activity, We also found that the ERR α responsive elements were necessary for the daidzein-induced increase of PDK-4 promoter activity. In conclusion, daidzein increased the expression of genes such as PDK-4 and MCAD in C2C12 myotubes through the ERR α . These effects of daidzein might enhance fatty acid oxidation in muscles, thereby improving obesity. *Soy Protein Research, Japan* **20**, 89-94, 2017.

Key words : daidzein, skeletal muscles, ERR α , fat oxidation

*〒112-8610 東京都文京区大塚2-1-1

近年、日本を含む世界各国では、糖尿病、脂質異常症、脂肪肝などの生活習慣病が激増しており、その管理予防は現代社会における危急の課題となっている。

ポリフェノールの一種である大豆イソフラボンは、エストロゲン受容体に結合することから様々な生物学的作用が報告されている。近年では、ヒトや動物モデルでの検討において、大豆イソフラボンが糖・脂質代謝の改善や肥満抑制作用をもたらすことが報告され注目されている。しかしながらエストロゲン様作用では説明のつかないこれらの作用について、そのメカニズムは未だ不明な点多い。

我々はこれまでに大豆イソフラボンの一種である daidzein が骨格筋芽細胞である C2C12細胞において、ミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御する転写因子 mitochondrial transcription factor A (Tfam) の発現を増強すること、その結果、ミトコンドリア量の増加や、ミトコンドリア電子伝達系に関わる ATP synthase 5b, Cytochrome b, Cytochrome oxidase I (COX1) などの遺伝子発現量の増加をもたらすことを見いだしてきた¹⁾。骨格筋はミトコンドリアを豊富に含む重要なエネルギー代謝臓器であり、肥満をはじめとした代謝異常を改善する上で担う役割は大きい。そこで本研究では、骨格筋のエネルギー代謝調節に重要な転写因子群の中で ERR α (estrogen related receptor α) に着目し、Daidzein が ERR α に与える影響や、その標的遺伝子の発現制御効果について検討を行った。

方 法

試薬、細胞

Daidzein および ERR α 阻害剤である XCT790 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より入手した。マウス由来筋芽細胞株 C2C12細胞は、RIKEN Cell Bank より入手した。筋管様細胞への分化は、C2C12細胞がコンフルエントに達した後、2%ウマ血清を含む DMEM で培養することにより分化誘導を行った。

ベクターの作成と導入

ERR α 発現ベクターは、マウス骨格筋の cDNA から PCR にて ERR α 領域全長を増幅したのち、pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific, 神奈川) に組込むことにより作成した。PDK4-Lucベクターは先行研究²⁾を参考に、マウスのゲノム DNA より PDK4プロモーター領域 (-874 ~ +31) を PCR により増幅し、pGL3-basicベク

ター (Promega, Madison, WI, USA) に組込むことにより作成した (Fig. 1)。また ERR α 反応領域の欠失変異体は PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TAKARA Bio, 滋賀) を用いて作成した。これらベクターの細胞内への導入には XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostic, 東京) を用いた。

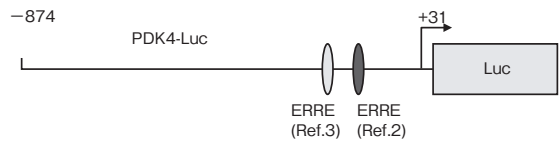


Fig. 1. Structure of PDK4-Luc vector used in the experiments. ERRE indicates ERR α responsive element previously reported (2, 3).

遺伝子発現解析

細胞播種24時間後に ERR α 発現ベクターを導入した後、分化誘導を開始し、24時間後に Daidzein を負荷して48時間培養を行った。その後、細胞より RNA を抽出しリアルタイムPCR法を用いて、各種 mRNA の発現を評価した。

プロモーターアッセイ

細胞播種24時間後に PDK4-Lucベクター、ERR α 発現ベクター、内部標準用ベクターを導入し、24時間後に 25 μ M の Daidzein を負荷して24時間培養を行った。プロモーター活性は Dual Luciferase assay system (Promega, 東京) を用い、マニュアルに準じて測定を行った。

統計処理

統計処理は Student's *t*-test あるいは Analysis of variance (ANOVA) を用いた。 $p < 0.05$ 未満を有意とした。

結 果

ERR α を発現させた C2C12 において Daidzein は、ERR α の標的である PDK4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4), MCAD (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase), CPT1- β (carnitine palmitoyltransferase-1 β) などの mRNA 発現を濃度依存的に増加させた (Fig. 2)。中でも、PDK4 の mRNA 発現量は Daidzein により濃度依存的に顕著に増加する

ことが示された。ERR α 特異的阻害剤であるXCT790の投与により、Daidzein によるPDK4およびMCADのmRNA発現の増強効果は減弱した (Fig. 3)。同様にERR α の標的遺伝子であり、我々の先行研究¹⁾においてDaidzeinで発現増強が確認されているATP5b (ATP synthase) や、Cyt c (Cytochrome c) についても、XCT790の投与によりDaidzein の効果は減弱することを確認した (Fig. 3)。一方で、CPT1- β の発現に関し

てはXCT790の効果は見られなかった(データ未掲載)。

次に我々はDaidzein による効果が比較的顕著であるPDK4 mRNAを選択し、その転写活性についてレポーターアッセイを用いて検討することとした。その結果DaidzeinはPDK4の転写活性を有意に増強させた (Fig. 4)。PDK4プロモーター領域には2カ所のERR α 結合領域が報告されている (Fig. 1)^{2,3)}。PDK4プロモーター領域からこれらのERR α 結合領域を欠失させ検討

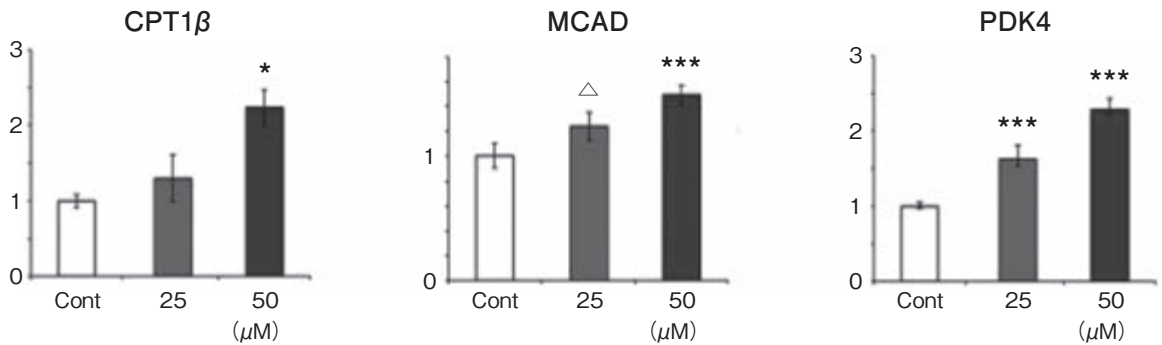


Fig. 2. Effects of Daidzein on FAO-related genes expression in ERR α -expressed C2C12 cells. Daidzein induced FAO-related genes expression in a dose dependent manner. Δ : $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ vs Cont.

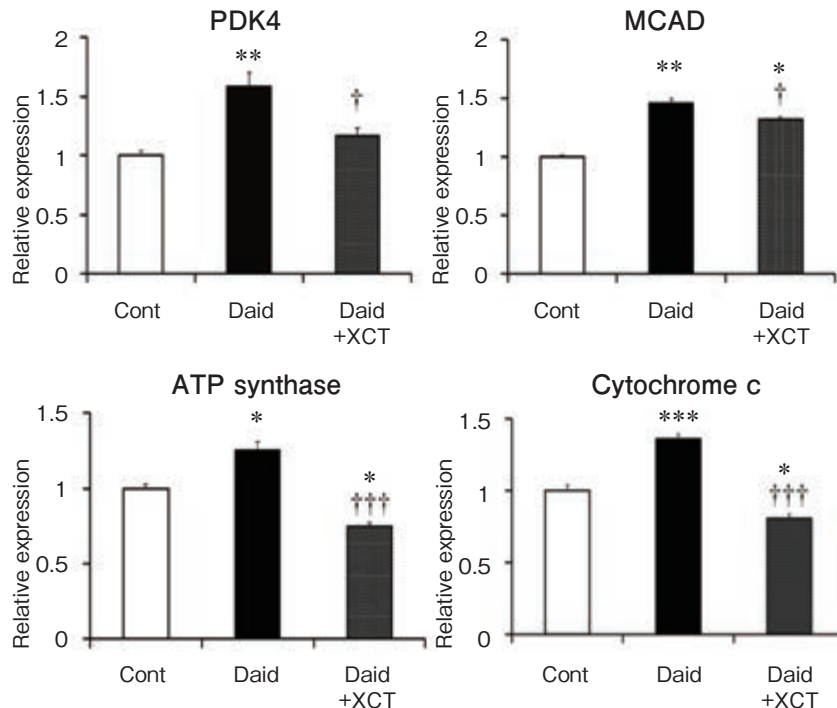


Fig. 3. Effects of ERR α inhibitor on daidzein-induced gene expressions. ERR α inhibitor, XCT790 (XCT), significantly inhibited the daidzein-induced increase of each gene by daidzein. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ vs Cont. †: $p < 0.05$, †††: $p < 0.001$ vs Daid.

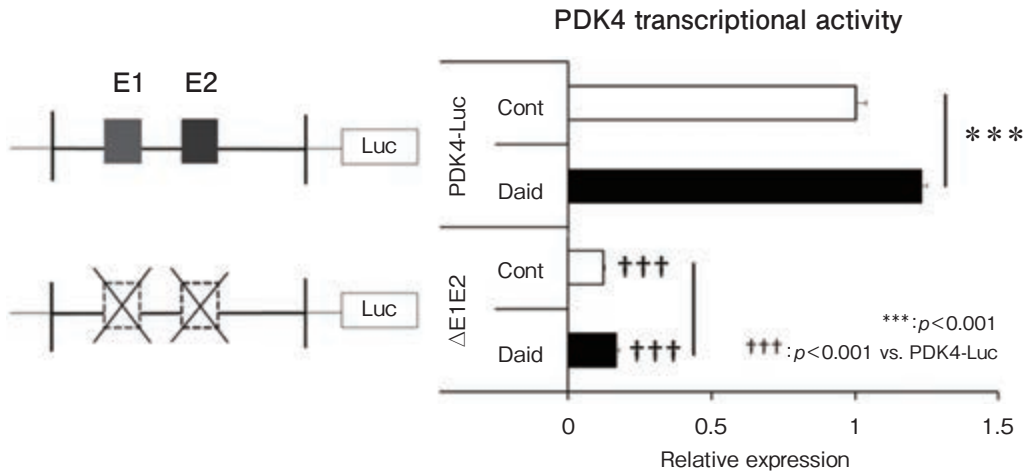


Fig. 4. Effect of daidzein on internal deletion within the PDK4 promoter. When both of two ERREs were deleted in construct, inducible effect of daidzein on PDK4 promoter activity was diminished. ***: $p < 0.001$. † † †: $p < 0.001$ vs PDK4-Luc.

を行ったところ、PDK4の転写活性そのものが有意に減少するだけでなく、2カ所のERR α 結合領域を共に欠失させるとDaidzeinによる転写活性増強効果も減弱することを確認した (Fig. 4)。

考 察

近年、疫学研究において、大豆イソフラボンが糖・脂質代謝の改善や肥満抑制作用をもたらすことが報告され注目されている^{4,5)}。その生物学的メカニズムは未だ不明の点が多いが、我々の先行研究を含む複数の研究により、大豆イソフラボンがエネルギー代謝関連遺伝子の発現調節にかかわる複数の転写因子の活性化作用を有していることが明らかとなっており^{1,6)}、メカニズムの一端として示唆されている。今回我々が着目したERR α (estrogen related receptor α) はその名称の示す通り、エストロゲン受容体と非常に似た構造をもつ核内受容体型転写因子である。しかしながらエストロゲンはリガンドとして結合せず、生体内におけるリガンドは未だ不明のオーファン受容体である。ERR α は骨格筋や褐色細胞に多く発現し、エネルギー代謝に関わる遺伝子の発現に重要な働きを有している⁷⁾。その標的遺伝子としては様々なものが知られるが、骨格筋においては脂肪酸の β 酸化 (fatty acid oxidation; FAO) やミトコンドリアの電子伝達系など、脂肪酸を基質としたエネルギー産生に関わる遺伝子の発現を正の方向に制御することが明らかとなっている⁷⁾。Suetsugiらはコンピューターを用いたin silico解析を用

いてERR α のアゴニストを探索した結果、Daidzeinを含むイソフラボン類がERR α のアクチベーターとなりうる可能性を報告した⁸⁾。しかしながら、実際にこれらイソフラボンがERR α を介してその標的遺伝子の発現を制御しうるかについての検討はこれまでにほとんどなされていない。

本研究では、骨格筋系の培養細胞として汎用されるC2C12細胞を用い、ERR α の標的遺伝子とされるCPT1 β 、MCAD、PDK4などの脂肪酸酸化関連遺伝子がDaidzeinの負荷により増加すること、さらにDaidzeinによるMCADやPDK4遺伝子の発現上昇はERR α の阻害剤により減弱することなどを明らかにした。一方でCPT1 β の発現に関して阻害剤の効果が見られなかった。既存の研究で、肝細胞においてCPT1のサブタイプであるCPT1 α の遺伝子発現が大豆イソフラボンにより上昇すること、その発現調節にはPPAR α が関与していることが報告されている^{9,10)}。今回、我々の検討で観察されたDaidzeinによるCPT1 β の発現上昇についても、他の転写因子が関与している可能性が考えられる。

本研究ではさらに、発現量の増加が顕著だったPDK4についてレポーターアッセイを用い、Daidzeinによる本遺伝子の発現調節メカニズムについて検討を行った。この結果、DaidzeinはPDK4の転写活性を増強させること、さらにその活性増強効果はERR α 結合配列に依存することを明らかとした。PDK4はピルビン酸脱水素酵素 (PDH) をリン酸化し不活性化する酵素である。基質となるPDHはピルビン酸の酸化炭炭

酸を触媒するミトコンドリアの酵素複合体であり、ブドウ糖を基質としたエネルギー産生に主要な役割を果たしている。つまりDaidzeinによりPDK4が増加するとブドウ糖を基質としたエネルギー産生が抑制され、CPT1 β , MCADといった分子の増加とあわせて脂肪酸が優先的に利用され、肥満改善の一助となることが想像される。

本研究では、大豆イソフラボンの一種Daidzeinが

ERR α の活性化を介して骨格筋のエネルギー代謝遺伝発現に影響を与え、脂肪酸燃焼を促進し、肥満を改善する可能性を示した。肥満は様々な疾患の基礎病態となり、その増加が全世界的な問題となっている。今回示した大豆イソフラボンによる代謝関連遺伝子の発現調節のメカニズムの一端が、肥満を基礎とした様々な疾患の予防・改善および治療に寄与することを期待したい。

要 約

近年、大豆イソフラボンの摂取が肥満の改善に有用であることが多くの疫学研究で示されているが、そのメカニズムについては未だ不明の部分が多い。本研究では、脂質燃焼に重要な役割を果たす転写因子ERR α に着目し、イソフラボンの一種であるダイゼインがERR α に与える影響について検討した。ERR α を強発現させた筋芽細胞C2C12を筋管細胞に分化させダイゼインを負荷し、その標的遺伝子の発現について検討した。またERR α の代表的な標的遺伝子であるpyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4)のプロモーター配列を用いたレポーターアッセイを行い、ダイゼインの効果を検討した。その結果、ダイゼインはERR α の標的であるPDK4, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD), CPT-1 (Carnitine palmitoyltransferase 1)などの遺伝子発現を濃度依存的に増強した。このうちPDK4, MCADに対する作用はERR α の特異的阻害剤により減弱した。またダイゼインはPDK4のプロモーター活性を有意に増強し、プロモーター上のERR結合領域を除去するとその作用は消失した。以上のことからダイゼインは骨格筋においてERR α を介してPDK4, MCADなどの発現を増強し、脂質燃焼を増強する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Yoshino M, Naka A, Sakamoto Y, Shibasaki A, Toh M, Tsukamoto S, Kondo K and Iida K (2015): Dietary isoflavone daidzein promotes Tfam expression that increases mitochondrial biogenesis in C2C12 muscle cells. *J Nutr Biochem*, **26**, 1193-1199.
- 2) Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V and Kelly DP (2005): PGC-1 α coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR α : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol. Cell Biol*, **25**, 10684-10694.
- 3) Araki M and Motojima K (2006): Identification of ERR α as a specific partner of PGC-1 α for the activation of PDK4 gene expression in muscle. *FEBS J*, **273**, 1669-1680.
- 4) Bhatena SJ and Velasquez MT (2002): Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr*, **76**, 1191-1201.
- 5) Zhang YB, Chen WH, Guo JJ, Fu ZH, Yi C, Zhang M and Na XL (2013): Soy isoflavone supplementation could reduce body weight and improve glucose metabolism in non-Asian postmenopausal women—a meta-analysis. *Nutrition*, **29**, 8-14.
- 6) Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA and Löwik CW (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem*, **278**, 962-927.
- 7) Giguère V (2008): Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr Rev*, **29**, 677-696.
- 8) Suetsugi M, Su L, Karlsberg K, Yuan YC and Chen S (2003): Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res*, **1**, 981-991.

- 9) Kim S, Shin HJ, Kim SY, Kim JH, Lee YS, Kim DH and Lee MO (2004): Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol*, **220**, 51-58.
- 10) Shin ES, Cho SY, Lee EH, Lee SJ, Chang IS and Lee TR (2006): Positive regulation of hepatic carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) activities by soy isoflavones and L-carnitine. *Eur J Nutr*, **45**, 159-164.