

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750037

研究課題名(和文)大豆イソフラボンの転写因子活性化作用を介した筋エネルギー代謝亢進作用の解析

研究課題名(英文)The effect of soy isoflavone on muscle energy metabolism via transcription factors

研究代表者

中 彩乃(Naka, Ayano)

お茶の水女子大学・生活科学部・学部教育研究協力員

研究者番号：00709181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大豆イソフラボンが骨格筋のエネルギー代謝にもたらす作用について解析することを目的とした。実験の結果、イソフラボンの一種であるDaidzeinが骨格筋細胞において、ミトコンドリア関連遺伝子の発現制御に関わる転写因子Tfamや、その標的遺伝子であるATP5b, Cytochrome b, Cox1, さらに脂質酸化に関わる複数の酵素の遺伝子発現を増加させることを見いだした。またこれらの作用には、NRF, ERR といった転写因子の活性化が関与している可能性が示された。骨格筋に対するDaidzeinのこれらの作用は、肥満やサルコペニアの予防治療に対する応用性が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine whether soy isoflavone regulate mitochondrial biogenesis and fat oxidation in skeletal muscles. For this purpose, we used the C2C12 murine muscle cell line. When C2C12 myotubes were treated with 25-50  $\mu$ M daidzein, there were significant increases in the expression of mitochondrial transcription factor A (Tfam) and its targets such as ATP5b, Cytochrome b and COX1. Daidzein also increased the expression of Mcad and Pdk4 that are involved in fatty acid oxidation. Using several mutant Tfam promoter fragments, we found that the transcription factor, nuclear respiratory factor (NRF) were necessary for the effect of daidzein on Tfam expression. In addition, study using a reporter assay based on the Pdk4 promoter suggested that transcription factor ERR was involved in daidzein-induced enhancement of Pdk4. These results suggest that daidzein would be beneficial to protect against a wide range of diseases caused by muscle metabolic dysfunction.

研究分野：応用栄養学

キーワード：イソフラボン 骨格筋 ミトコンドリア 脂質代謝 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

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。

ポリフェノールは生活習慣病のような代謝性疾患の改善に効果的な機能性成分として新規治療や予防の開発に有用であることが期待され、注目が高まっている。ポリフェノール的一种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認められている。近年では、ヒトや動物モデルの検討が進められ、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、注目された。これら作用をもたらすメカニズムとして、大豆イソフラボンがPPARやERR(以下を参照)などの転写因子を活性化することが関与している可能性がある。

### (1) PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)

これまで我々は先行研究より、動物モデルにて、大豆イソフラボンが脂肪組織におけるPPAR $\gamma$ 活性化を介してアディポカインを制御しインスリン抵抗性など肥満を改善することを報告した(Sakamoto Y, Naka A et al: Mol Nutr Food Res, 2013)。一方で、大豆イソフラボンは他のアイソフォーム PPAR $\delta$ の活性化も誘導することが報告されている(Dang Z et al: J Bone Miner Res. 2004)。PPAR $\delta$ は運動時やカロリー制限時に骨格筋において誘導される因子で脂肪酸の取り込みや燃焼、ミトコンドリアの増加など脂肪酸代謝を調節する。PPAR $\delta$ アゴニストを高脂肪食負荷および遺伝的な肥満モデルのマウスに投与した検討では、骨格筋における脂質代謝を亢進し、抗肥満およびインスリン抵抗性改善効果を示す。

### (2) ERR $\alpha$ (estrogen-related receptor $\alpha$ )

既報より大豆イソフラボンがERR $\alpha$ を活性化することが報告されている(Suetsugi M et al: Mol Cancer Res, 2003)。ERR $\alpha$ はPGC1 $\alpha$ と協調してミトコンドリア生合成や酸化リン酸化に関わる遺伝子の発現を制御することが知られ、多くのミトコンドリア関連遺伝子のプロモーター領域にはERR応答配列が存在している。しかしながら、大豆イソフラボンによるERR $\alpha$ 活性化による生体作用については明らかになっていない。

このように大豆イソフラボンの肥満抑制・代謝改善効果について、脂質代謝やミトコンドリア活性を制御するPPAR $\delta$ やERR $\alpha$ などの転写因子の活性化が関与することが推測されるが、その検討は十分でない。特に、ミトコンドリアが豊富であり、体内最大重量の代謝臓器である骨格筋においては、大豆イ

ソフラボンがこれらの作用を介してエネルギー代謝に影響を与える可能性が十分に期待できる。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、大豆イソフラボンが骨格筋のエネルギー代謝にもたらす作用について解析するとともに、転写因子活性化を中心とした生物学的メカニズムを解明することにより、大豆イソフラボンによる肥満抑制作用など代謝性疾患予防・治療法の科学的根拠を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 大豆イソフラボンによる筋エネルギー代謝関連遺伝子の制御効果の検討

大豆イソフラボンはPPAR $\delta$ やERR $\alpha$ の活性化が予想されることから、大豆イソフラボンが骨格筋の脂質代謝やミトコンドリア制御に影響をもたらすかどうかを解析する。検討には、骨格筋由来の培養細胞株C2C12に大豆イソフラボンに含まれる代表的なダイゼイン、ゲニステインなどを添加し、下記に示す代謝関連遺伝子に着目し遺伝子発現量を定量PCRにより評価する。

- 脂肪酸の取り込みに関与する輸送体や酵素
- 脂肪酸の分解利用に関与する $\beta$ 酸化系/TCA回路/ミトコンドリア電子伝達系の各主要酵素
- エネルギー代謝に影響を与えるホルモンとその受容体

### (2) 大豆イソフラボンによる制御メカニズムの解明

#### ①プロモーター解析

大豆イソフラボンが骨格筋の脂質代謝やミトコンドリア制御の関連遺伝子の発現を誘導することが認められた場合、より詳細な制御メカニズムを明らかにするために変動が認められた遺伝子をターゲットとし、ルシフェラーゼアッセイシステムを用いて培養細胞により検討を行う。アッセイには、発光ルシフェラーゼを組み込んだ転写活性測定用ベクターを用い、ターゲットとする遺伝子のプロモーター制御領域を上流に挿入したアッセイ用ベクターを構築する。ベクターはC2C12細胞に導入し、大豆イソフラボン添加による直接的な転写活性を評価する。この手法は、簡易的かつ正確に安定して遺伝子の転写活性を評価できる。

#### ②分子制御メカニズムの解析

①において転写活性に差異が認められた場合、転写活性を制御する因子を特定し制御メカニズムの解明を目指す。先行報告などからターゲットとしたプロモーター領域を制御する可能性をもつ因子や応答配列を調査し、

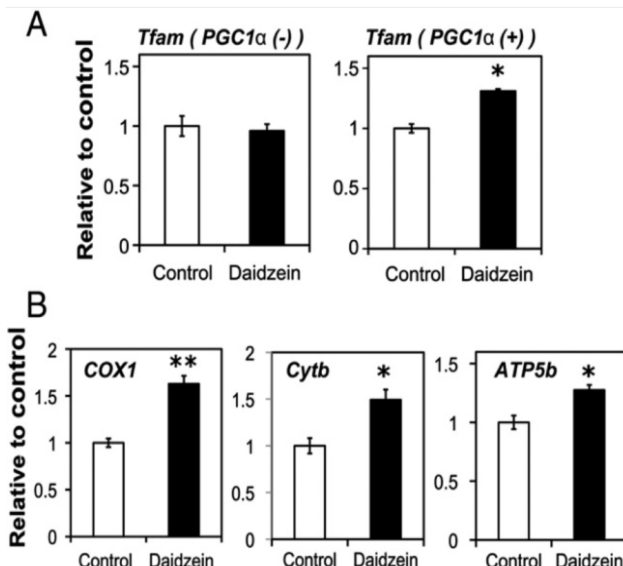
C2C12 細胞に大豆イソフラボンを添加した際に候補に挙げられた転写因子が制御を受けるかを定量性 PCR により評価する。さらに、ルシフェラーゼアッセイシステムを用いて候補因子の応答配列のデリーションコンストラクトなどを作製し、大豆イソフラボンによる効果がなくなるか検討する。

また SIRT1 や AMPK などの修飾酵素の活性化が、PPAR $\delta$ , ERR $\alpha$  などの転写活性を制御していることから、大豆イソフラボンが骨格筋において SIRT1 や AMPK などの修飾酵素の活性化に影響を与えるかを検討するために、特異抗体を用いた免疫学的手法 (Western blotting 等) を用いて評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大豆イソフラボンによる筋エネルギー代謝関連遺伝子の制御効果の検討

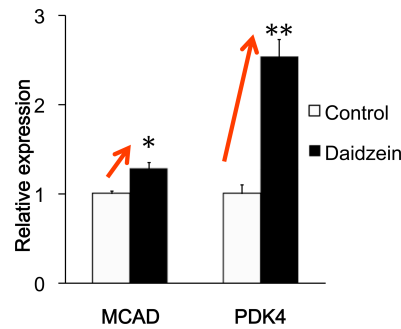
C2C12 細胞を一定の培養条件にて筋線維細胞に分化させ、イソフラボンを一定時間負荷し、遺伝子発現の評価を行った。その結果、イソフラボン的一种である Daidzein が 10~50 $\mu$ M の濃度において、ミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御する転写因子 mitochondrial transcription factor A (Tfam) の遺伝子発現量を増加させることを見いだした。また、Daidzein の負荷により Tfam の標的遺伝子であり、ミトコンドリア電子伝達系に関わる ATP synthase 5b, Cytochrome b, Cytochrome oxidase I (COX1) などの遺伝子発現量も有意に増加した (図 1) (*J Nutr Biochem.* 26(11):1193-99, 2015)。



【図1】C2C12 細胞での遺伝子発現 (発表論文 1 より)

さらに Daidzein は C2C12 細胞において、ERR $\alpha$  の代表的な標的遺伝子であり、ミトコンドリアにおける脂質  $\beta$  酸化に関わる Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) や Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) などの

遺伝子発現を増強すること、これらの遺伝子に対する作用は ERR $\alpha$  を強発現した C2C12 細胞において顕性化することを見いだした (図 2) (学会発表 2)。

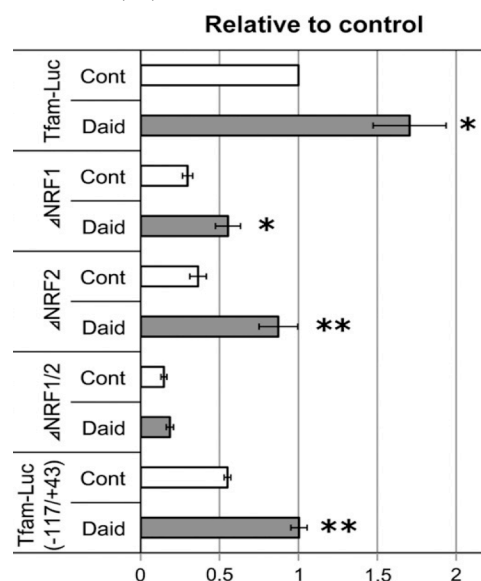


【図2】ERR $\alpha$  を強発現した C2C12 細胞での脂質酸化関連遺伝子発現変化

##### (2) 大豆イソフラボンによる制御メカニズムの解明

(1) で認められた Daidzein の効果のメカニズムを明らかとするためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。

Tfam のプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子をつないだアッセイベクターを C2C12 細胞に導入し Daidzein (25 $\mu$ M) を負荷したところ Tfam の転写活性の有意な増強を認めた。そこで発現調節の主要な転写調節因子である NRF1, NRF2 に着目し、NRF1, NRF2 の反応領域を欠失させた Tfam プロモーター変異体を作成し、メカニズム検討を行った。その結果、NRF1 もしくは NRF2 もしくは両方の反応領域を欠失させることで、Daidzein の Tfam プロモーター活性増強効果は軽減した (図 3)。以上より Daidzein による Tfam およびその標的遺伝子であるミトコンドリア関連遺伝子の遺伝子発現の増強作用には NRF が関与する可能性が示唆された (*J Nutr Biochem.* 26(11):1193-99, 2015)。



【図3】Tfam プロモーター活性 (発表論文 1 より)

さらに、Daidzein により遺伝子発現量が増加した脂質β酸化関連遺伝子のうち PDK4 遺伝子 (*Pdk4*) に着目し PPAR や *ERRα* の関与について検討を行った。上記と同様に *Pdk4* のプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子をつないだアッセイベクターを C2C12 細胞に導入し Daidzein を負荷したところ *Pdk4* の転写活性の増加が認められ、その効果は *ERRα* を強発現させることで増強した。さらに *Pdk4* プロモーターに存在する *ERRα* の反応領域を欠失させた PDK4 プロモーター変異体を作成し、検討を行った。その結果、*ERRα* の反応領域を欠失させることで、Daidzein の PDK4 プロモーター活性増強効果が軽減することを確認した (2016 年度日本栄養・食糧学会にて発表予定)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yoshino M\*, Naka A\*, Sakamoto Y\*, Shibasaki A, Toh M, Tsukamoto S, Kondo K, Iida K, Dietary isoflavone daidzein promotes Tfam expression that increases mitochondrial biogenesis in C2C12 muscle cells. *J Nutr Biochem*. 2015 26(11):1193-9. 査読有

\*These authors contributed equally to this work

[学会発表] (計 6 件)

1. 坂本友里、柴崎絢子、吉野真希子、藤万里子、中彩乃、近藤和雄、飯田薫子 食物イソフラボンであるダイゼインは TFAM およびミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御する 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 2015.12.2

2. 柴崎絢子、吉野真希子、藤万里子、坂本友里、中彩乃、飯田薫子 筋芽細胞 C2C12 における Daidzein のミトコンドリア活性化作用の検討 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 2015.12.2

3. 金津純子、藤万里子、坂本友里、中彩乃、近藤和雄、飯田薫子 脂肪酸誘導性の炎症反応に対するイソフラボン daidzein の効果の検討 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 2015.12.1

4. Yuri Sakamoto, Makiko Yoshino, Ayano Naka, Ayako Shibasaki, Mariko Toh, Kazuo Kondo, Kaoruko Iida Dietary isoflavone daidzein regulates mitochondrial biogenesis in muscle cells by regulating transcriptional

networks. 第 12 回アジア栄養学会議 パシフィック横浜 (神奈川県横浜市) 2015.5.16

5. 坂本友里、内堀寛容子、藤万里子、中彩乃、近藤和雄、飯田薫子 転写因子 PPAR を介した Daidzein の炎症抑制作用の検討 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 酪農学園大学 (北海道江別市) 2014.6.1

6. 畑中由衣子、吉野真希子、塚本咲翔、坂本友里、中彩乃、近藤和雄、飯田薫子 Daidzein の筋ミトコンドリア活性化作用の検討 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 酪農学園大学 (北海道江別市) 2014.6.1

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中 彩乃 (NAKA, Ayano)

お茶の水女子大学・生活科学部・学部教育研究協力員

研究者番号: 00709181