

運動神経・筋肉接合部の機能改善における  
大豆イソフラボンの役割解明

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科

亀井 康富

筋ジストロフィーなどの神経変性疾患や加齢では、運動神経終末と筋肉（骨格筋）の間に形成される神経筋接合部の機能が低下し、自由に筋肉が動かせなくなり寝たきりや車椅子生活となってしまう問題がある。これらの問題において、筋肉や神経筋接合部の機能を維持することは健康寿命延伸のためにも重要である。我々はこれまで転写共役因子 PGC1 $\alpha$  に着目した研究を行っている。PGC1 $\alpha$  は運動によって骨格筋で発現が増加しミトコンドリアの生合成や脂肪酸酸化などの遺伝子発現を活性化する（Terada et al., 2005、Kamei et al., 2015）。また、我々は大豆イソフラボンのダイゼインやゲニステインが PGC1 を活性化させることでミトコンドリアの生合成を増加させていることを見出している（Uchitomi et al., 2019）。さらに、PGC1 $\alpha$  が核内受容体である ERR $\alpha$  を活性化することで標的遺伝子の発現を増加させること見出しており、大豆イソフラボンが ERR $\alpha$  のリガンドとして働くこともわかっている（Kamei et al., 2003、Suetsugi et al., 2003）。

先行研究において骨格筋特異的 PGC1 $\alpha$  欠損マウスと野生型マウスの間で網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、PGC1 $\alpha$  欠損マウスにおいて発現が減少した遺伝子として神経筋接合部で発現する Dok-7 を見出した（Hatazawa et al., 2016）。Dok-7 を欠損したマウスは、神経筋接合部の構造が完全に失われるため Dok-7 は神経筋接合部の形成に重要な遺伝子である（Okada et al., 2006）。そこで本研究では、大豆イソフラボンが PGC1 $\alpha$  や ERR $\alpha$  を活性化させることで神経筋接合部において発現する遺伝子の

発現を更に増加させるかを検討した。

## 【実験方法】

### 1. 培養細胞

レポーター活性の評価には HEK293T 細胞を使用した。DMEM (10% FBS、1% PS) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 中で培養した。細胞が 90%以上コンフルエントになったところで実験に使用した。

### 2. 実験動物

骨格筋特異的に PGC1 $\alpha$  が過剰発現しているマウス (PGC1 $\alpha$  TG) や骨格筋特異的に PGC1 $\alpha$  が欠損しているマウス (PGC1 $\alpha$  KO) を使用した。

Dok-7 の遺伝子発現解析では、10-12 週齢の WT マウスおよび PGC1 $\alpha$  TG マウスを用い、また 8 週齢の WT マウスおよび PGC1 $\alpha$  KO マウスを用いた。大豆イソフラボン (ダイゼイン+ゲニステイン) を投与した実験では、WT マウスおよび PGC1 $\alpha$  KO マウスを回転かごケージで 4 週間飼育した。その後、各個体を HF 餌または HF+大豆イソフラボン餌 (0.01 %大豆イソフラボン) で 4 週間飼育した。飼育終了後に解剖を行い、定量的リアルタイム PCR を用いて、骨格筋の遺伝子発現解析を行った。各群は下記の通りである。①PGC1 $\alpha$  f/f HF 餌群 (WT Sed、n=3)、②PGC1 $\alpha$  f/f HF 餌+運動群 (WT Ex、n=4)、③PGC1 $\alpha$  f/f 大豆イソフラボン含有 HF 餌+運動群 (WT Ex+iso、n=5)、④PGC1 $\alpha$  KO HF 餌群 (KO Sed、n=4)、⑤PGC1 $\alpha$  KO HF 餌+運動群 (KO Ex、n=7)、⑥PGC1 $\alpha$  KO 大豆イソフラボン含有 HF 餌+運動群 (KO Ex+iso、n=5)

### 3. 遺伝子発現解析

マウス腓腹筋から RNA を抽出後、cDNA を合成した。cDNA を鋳型に定量的リアルタイム PCR を用いて、遺伝子発現解析を行った。

### 4. アセチルコリン受容体の染色

PGC1 $\alpha$  TG/KO マウスの長趾伸筋を 1%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定したのち、アセチルコリン受容体に特異的に結合する  $\alpha$ -BTX (終濃度 0.25  $\mu$ g/mL) を使用して染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

### 5. Dok-7 プロモーター活性の評価

マウス腓腹筋 DNA を鋳型として、5'末端および 3'末端に適切な制限サイトを付加した

プライマーを用いてPCR反応を行い、2 kbp の Dok-7 プロモーター領域を増幅した。この領域を pGL3 ベクターにライゲーションさせることで pGL3-Dok-7 を作成した。24 well plate に  $1.0 \times 10^5$  cell/well で HEK293T 細胞を播種し、24 時間後に pGL3-Dok-7 と PGC1 $\alpha$  や ERR $\alpha$  をトランスフェクションしたのち、ダイゼイン (終濃度 10  $\mu$ M) を加え 24 時間後に Dok-7 のプロモーター活性を測定した。

## 6. 統計解析

実験結果は各群の平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。統計解析は t 検定によるに群間の比較、または Turkey-Kramer 法による多重比較検定を行った。0.05 未満の危険率で有意とした。

### 【実験結果】

#### 1. PGC1 $\alpha$ TG マウスにおける Dok-7 遺伝子の発現とアセチルコリン受容体の面積

PGC1 $\alpha$  TG マウスにおいて神経筋接合部で発現する Dok-7 の遺伝子発現やアセチルコリン受容体の面積を調べた。その結果、PGC1 $\alpha$  TG マウスにおいて Dok-7 や ERR $\alpha$  の発現が増加していた (図 1A)。さらに、神経筋接合部の骨格筋側で発現し、神経伝達物質の受容体であるアセチルコリン受容体の面積も野生型に比べて増加していた (図 1B, C)。

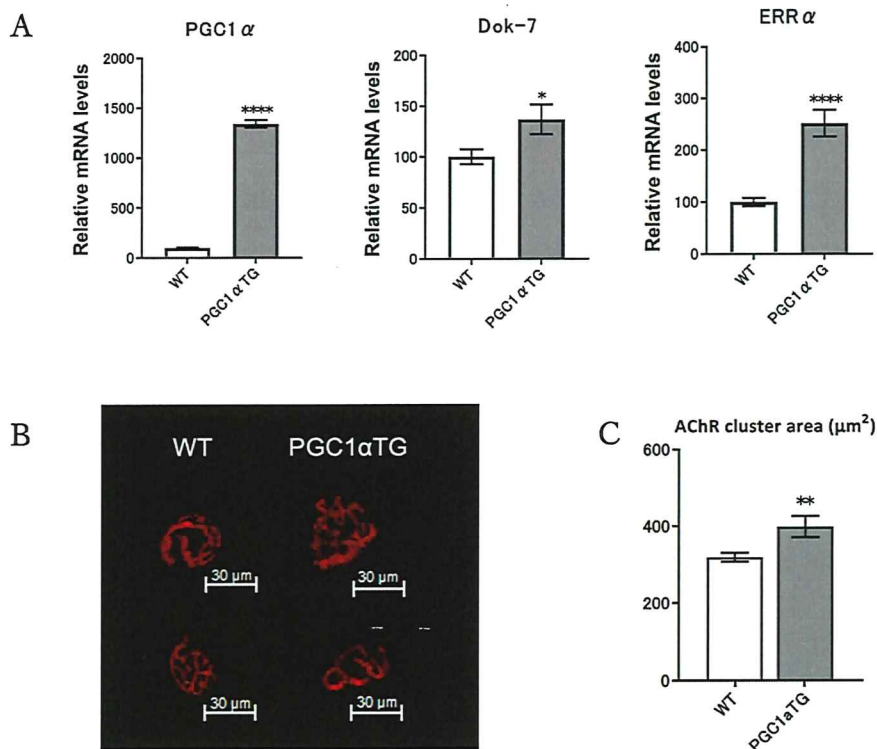


図 1. PGC1 $\alpha$  過剰発現マウスにおける Dok-7 遺伝子の発現とアセチルコリン受容体の面積  
 (A) 雄性の 10-12 週齢マウスの腓腹筋における PGC1 $\alpha$ , Dok-7, ERR $\alpha$  の遺伝子発現の結果 n=8、(B) A と同様のマウスの長趾伸筋におけるアセチルコリン受容体の染色結果 n=6、  
 (C) B の面積結果を定量化した結果 \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*\*: p<0.0001

## 2. PGC1 $\alpha$ KO マウスにおける Dok-7 遺伝子の発現とアセチルコリン受容体の面積

続いて、PGC1 $\alpha$ KO マウスにおいても Dok-7 の遺伝子発現やアセチルコリン受容体の面積を調べた。その結果、PGC1 $\alpha$ KO マウスにおいて Dok-7 や ERR $\alpha$  の発現が減少していた (図 2A)。さらに、アセチルコリン受容体の面積も WT に比べ減少していた (図 2B, C)。

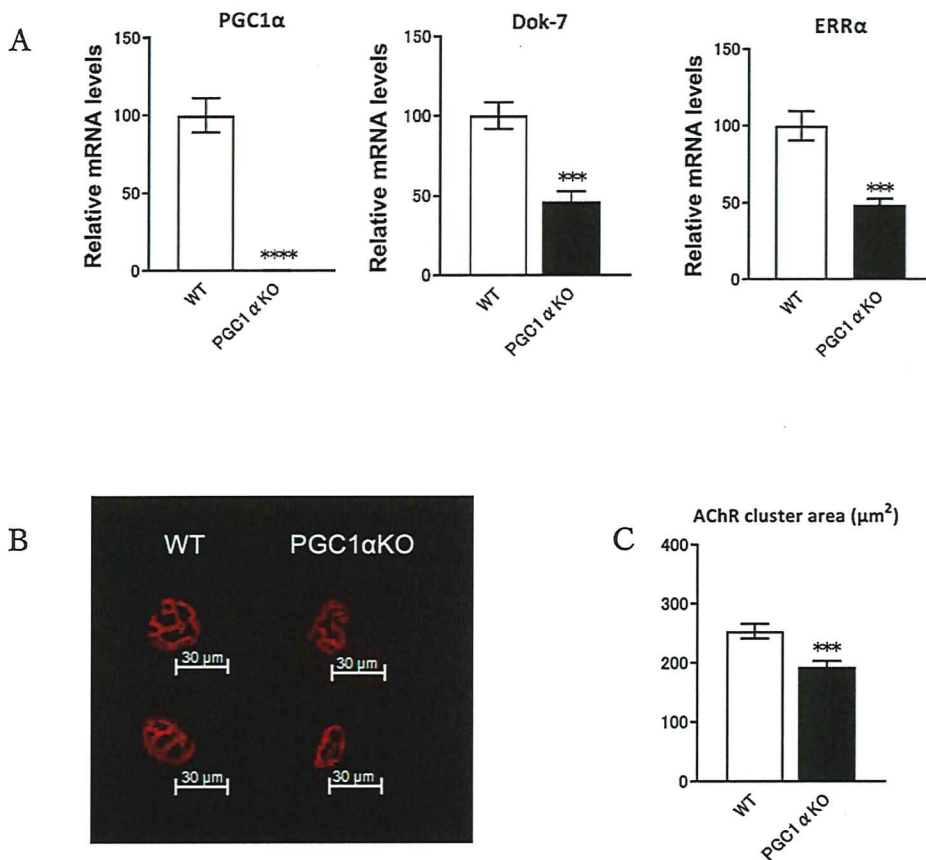


図 2. PGC1 $\alpha$  欠損マウスにおける Dok-7 遺伝子の発現とアセチルコリン受容体の面積  
 (A) 雄性の 8 週齢マウスの腓腹筋における PGC1 $\alpha$ , Dok-7, ERR $\alpha$  の遺伝子発現 n=8、

(B) 雌性の 7 週齢マウスの長趾伸筋におけるアセチルコリン受容体の染色結果 n=3、(C) B の面積を定量化した結果 \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$

### 3. PGC1 $\alpha$ 欠損マウスへの大豆イソフラボン投与

WT マウスにおいて、運動と大豆イソフラボン摂取の組み合わせにより、骨格筋の PGC1 $\alpha$  発現が有意に増加した。KO マウスでは、PGC1 $\alpha$  が欠損していることを確認した。ERR $\alpha$  発現は、どの群においても有意な差は観察されなかった。Dok-7 発現は、WT マウスの運動と大豆イソフラボン摂取の組み合わせにより増加しており、KO マウスでは変化は観察されなかった。つまり、Dok-7 発現は PGC1 $\alpha$  によって制御されている可能性が示唆された。

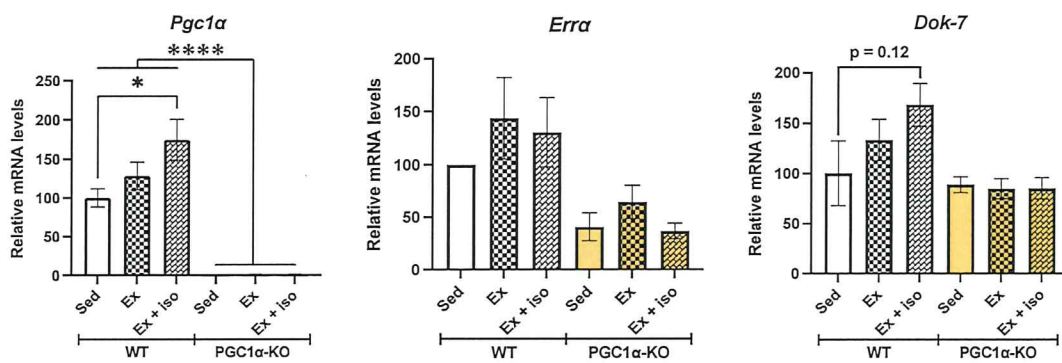


図 3. PGC1 $\alpha$  欠損マウスへの大豆イソフラボン投与

雄性の 8 週齢マウスの腓腹筋における PGC1 $\alpha$ , Dok-7, ERR $\alpha$  の遺伝子発現の結果 \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$

### 4. PGC1 $\alpha$ と ERR $\alpha$ による Dok-7 プロモーター活性の調節

Dok-7 のプロモーター活性は PGC1 $\alpha$  と ERR $\alpha$  をそれぞれトランスフェクションすることで増加していた。さらに、PGC1 $\alpha$  と ERR $\alpha$  を共トランスフェクションすると協調的に働いて Dok-7 のプロモーター活性が大きく増加していた(図 4A)。この時に、ダイゼインを終濃度 10  $\mu$ M で添加すると Dok-7 のプロモーター活性増加している傾向が観察された(図 4B)。

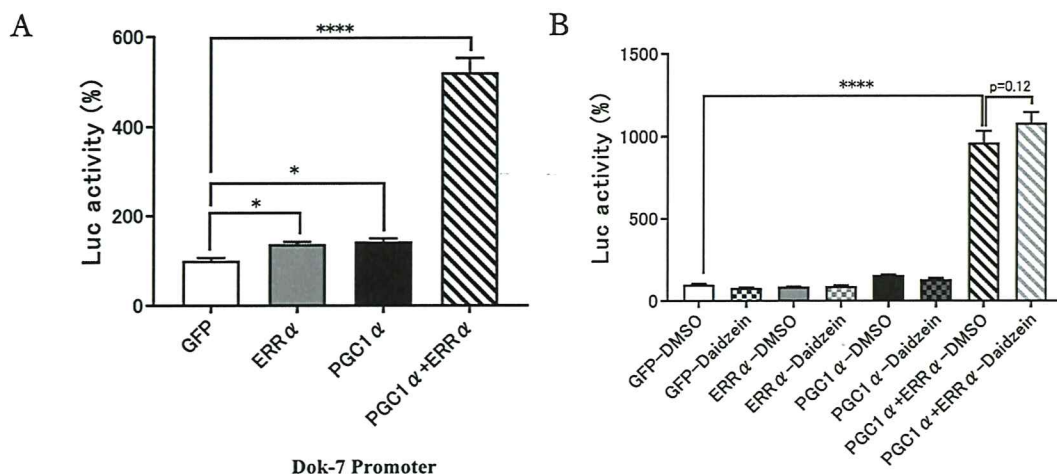


図 4. PGC1 $\alpha$  と ERR $\alpha$  は協調的に働くことで Dok-7 プロモーター活性を増加させる  
(A) 各プラスミドをトランスフェクションした際の Dok-7 のプロモーター活性 n=4、(B)  
A の群にダイゼインを添加した際の Dok-7 のプロモーター活性 n=4、 \*: p<0.05, \*\*\*\*:  
p<0.0001

#### 【考察】

PGC1 $\alpha$  TG マウスと PGC1 $\alpha$  KO マウスを用いて、Dok-7 の遺伝子発現やアセチルコリン受容体の面積を調べた結果、PGC1 $\alpha$  によって Dok-7 の遺伝子発現や神経筋接合部の形成が制御されていることが示された。また、PGC1 $\alpha$  KO マウスを用いて大豆イソフラボン投与した実験から、WT マウスにおいてのみで運動と大豆イソフラボンの組み合わせによって Dok-7 の発現増加傾向を示したことから Dok-7 発現が PGC1 $\alpha$  によって制御されている可能性が示唆された。また、Dok-7 のプロモーター活性を調べたところ PGC1 $\alpha$  と ERR $\alpha$  によって大きく増加し、大豆イソフラボンの添加によってさらに増加した。以上のことから、神経筋接合部の形成に重要な Dok-7 の発現は PGC1 $\alpha$  と ERR $\alpha$  によって増加し、さらに大豆イソフラボンが PGC1 $\alpha$  と ERR $\alpha$  を活性化させることで増加する可能性が示された。大豆イソフラボンが PGC1 $\alpha$ /ERR $\alpha$ /Dok-7 経路を介した神経筋接合部の形成亢進による筋機能改善効果や神経変性疾患、加齢への効果については今後検討していく必要がある。

#### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りましたタカノ農芸化学研究助成財団に深く感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

Terada, S., Kawanaka, K., Goto, M., Shimokawa, T., Tabata, I. (2005). "Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 $\alpha$  protein expression in rat skeletal muscle." *Acta Physiol Scand* 184(1): 59-65.

Kamei, Y., Hatazawa, Y., Yoshimura, R., and Miura, S. (2015). "PGC-1 $\alpha$ , A Stimuli-Inducible Nuclear Receptor Coactivator: Structural Features and Role in Skeletal Muscle Metabolism Gene Regulation." *Biomedical Sciences* 1, 6-9.

Uchitomi, R., Nakai, S., Matsuda, R., Onishi, T., Miura, S., Hatazawa, Y., Kamei, Y. (2019). "Genistein, daidzein, and resveratrols stimulate PGC-1 $\beta$ -mediated gene expression." *Biochem Biophys Res Commun* 517: 51-55.

Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., Kakizuka, A. (2003). "PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\beta$ /ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity." *Proc Natl Acad Sci USA* 100(21): 12378-12383.

Suetsugi, M., Su, L., Karlsberg, K., Yuan, Y.C., and Chen, S. (2003). Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res* 1, 981-991.

Hatazawa, Y., Minami, K., Yoshimura, R., Onishi, T., Manio, M. C., Inoue, K., Sawada, N., Suzuki, O., Miura, S., Kamei, Y. (2016). "Deletion of the transcriptional coactivator PGC1 $\alpha$  in skeletal muscles is associated with reduced expression of genes related to oxidative muscle function." *Biochem Biophys Res Commun* 481(3-4): 251-258.

Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O., Yamanashi, Y. (2006). "The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis." *Science* 312(5781): 1802-1805.