

大豆イソフラボンによる異所性脂肪の蓄積減少効果の 分子メカニズムの解明

信州大学 農学部農学生命科学科

三谷 壘一

我が国では平均寿命と健康寿命の間に乖離があり、「健康上の問題で日常生活が制限される」期間が約 10 年存在するとされている。健康寿命を縮める要因の一つが糖尿病である。これまで糖尿病の発症原因としては、過食による肥満が最大の要因と考えられてきた。しかし、高齢者においては、肥満に依存しない形で糖尿病の発症リスクが高まることが知られている。このリスク上昇の要因として、筋肉内への異所性脂肪の蓄積が挙げられる¹。異所性脂肪とは、脂肪組織以外の本来脂肪が蓄積すべきでない臓器に沈着する脂肪である²。筋肉内の異所性脂肪の蓄積は、運動不足や寝たきりなど、高齢者に多く見られる身体活動の低下に起因する。そしてこの異所性脂肪の蓄積は、体脂肪量にかかわらずインスリン感受性を低下させ、結果として糖尿病の発症リスクを高める。従って、高齢期における身体活動の低下に起因する筋肉内異所性脂肪の蓄積を防ぐための対策を講じることは、我が国が目指す健康寿命の延伸において極めて重要である。

日本人が常食する大豆にはイソフラボンをはじめリン脂質の一種であるレシチンやサポニンなどの生理機能を持つ成分が含まれている。代表的な大豆イソフラボンにはゲニステイン (Gen) ダイゼイン、グリシテインがあり、これらは構造的にヒトの女性ホルモン (エストロゲン) と類似していることから、エストロゲン受容体を介して女性ホルモン様作用を示す。このため、大豆イソフラボンは閉経後女性の骨粗鬆症予防、更年期障害の緩和、脂質代謝改善など、ホルモン変動に関連する多様な健康効果が期待されている。さらに近年では、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用、さらには代謝調節作用に至るまで、大豆イソフラボンの生理活性の多様性が明らかとなっている³。これまでに私達も Gen の新たな生理活性を模索したところ、Gen がマウス筋芽細胞内の脂質蓄積を抑制することを見出した。しかしながら、Gen による脂質蓄積の抑制メカニズムは明らかにできていない。そこで本研究では、Gen が筋細胞内の脂質蓄積を減少する分子メカニズムの解明を試みた。

【実験方法】

1. 細胞培養

マウス筋芽細胞である C2C12 細胞の培養は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM 培地を用いた。培養条件は 95% air、5% CO₂、37°C のインキュベーター内で行った。継代は細胞を PBS で洗浄し、0.25% trypsin, 0.02% EDTA を含む PBS で処理することで細胞を剥がし、新鮮な培地に懸濁することで行った。C2C12 細胞内での脂質合成を誘導する方法を記載する。80%飽和状態になった C2C12 細胞を 2%ウマ血清 (HS)、4.5 g/mL グルコース、100 units/mL ペニシリン G、100 µg/mL ストレプトマイシン硫酸塩を含む DMEM 培地 (誘導培地) に交換した。培地の交換と同時に 0.5 mM の 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、10 µg/mL のインスリン、1 µM のデキサメタゾン、1 µM のロシグリタゾンを添加する。これを誘導 0 日とする。誘導開始 2 日、4 日、6 日後に培地を新鮮な誘導培地に交換し、10 µg/mL インスリンと 1 µM のロシグリタゾンを添加して培養する。誘導 7 日目の細胞を解析に用

いた。Gen は誘導開始 0、2、4、6 日目に培地交換と同時に添加した。

2. 細胞内脂質の染色

Gen の存在下で 7 日間脂質蓄積を誘導した C2C12 細胞を、10%ホルマリン中性緩衝液で 10 分間固定した。細胞内の中性脂質を Oil red O 溶液で 20 分間染色した。染色後蒸留水で細胞を洗浄し、細胞内の脂質を光学顕微鏡で観察した。その後、蒸留水を取り除き、細胞を完全に乾燥させた。乾燥後、細胞内の色素を 4% Triton X-100 を含むイソプロパノールにより抽出した。抽出した色素を分光光度計（吸光度 492 nm）で測定した。

3. siRNA

マウス $ERR\alpha$ mRNA に特異的に反応する siRNA を Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて C2C12 細胞に導入した。siRNA の終濃度は 20 nM とした。siRNA 導入の 24 時間後に培地交換を行い、脂質蓄積の誘導と Gen の 7 日間行った。

4. 定量 PCR

C2C12 細胞から Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque) を用いて RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として定量 PCR を行った。PCR 条件は KAPA SYBR Green Master Mix (日本ジェネティクス) を用いた 2 ステップ反応系 (95°C で 5 秒、60°C で 30 秒を 40 サイクル) で行った。ハウスキーピング遺伝子である *Rn18s* を内部標準として目的遺伝子の発現量を $\Delta\Delta Ct$ 法により解析した。

5. ミトコンドリア DNA の測定

脂質蓄積誘導開始から 3 日後の C2C12 細胞を用いた。細胞を回収後に -80°C で 24 時間凍結することで細胞を破碎した。細胞に MightyPrep reagent (Takara Bio 社) を 20 μ L 添加して、10 分間超音波で処理した。その後、95°C で 10 分間加熱し、2 分毎に溶液を攪拌した。遠心分離し、上清をゲノム DNA (gDNA) とした。gDNA を鋳型として定量 PCR を行った。PCR 条件は KAPA SYBR Green Master Mix (日本ジェネティクス) を用いた 2 ステップ反応系で、以下のプライマーを用いた。全 gDNA に対するミトコンドリア DNA の割合は $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて算出した。ミトコンドリア DNA のコピー数は以下のように算出した。*Hk2* の Ct 値から *Nd1* または *Rn16s* の Ct 値を引いたものを ΔCt 値とし、その後 $2 \times 2^{\Delta Ct}$ 値を算出した。

6. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

核内受容体 estrogen receptor α/β ($ER\alpha/\beta$) と estrogen-related receptor α ($ERR\alpha$) の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイで測定した。 $ER\alpha/\beta$ と $ERR\alpha$ の応答配列である estrogen-responsive element (ERE) と ERR-response element (ERRE) をそれぞれ挿入したルシフェラーゼレポーターベクターと $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、 $ERR\alpha$ の発現ベクターを Avalanche-Everyday

Transfection Reagent (EZ biosystems 社) により C2C12 細胞へ形質導入した。24 時間後に培地に 5 μ M の Gen を含んだ DMEM 培地へと交換し、さらに 24 時間培養した。その後、培地を取り除き細胞を Passive lysis buffer (Promega 社) で溶解した。細胞溶解液をサンプルとして Dual-Luciferase Reporter assay System (Promega 社) により ERR α の転写活性をルシフェラーゼレポーター活性として測定した。

7. ウェスタンブロット法

回収した C2C12 細胞を溶解バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA)に溶解し、タンパク質定量後の試料を電気泳動用試料とした。電気泳動用試料を用いて Laemmli の方法に従い SDS-PAGE を行った後に、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。スキムミルクを用いて PVDF 膜表面をブロッキングした後に一次抗体{rabbit anti-CPT1B 抗体 (ABclonal)、rabbit anti-PDK4 抗体 (ABclonal)、mouse anti-GAPDH 抗体 (Fujifilm)} を用いて抗原抗体反応を 2 時間行った。続いて HRP が標識された二次抗体 (anti-rabbit もしくは anti-mouse; BioRad) で 1 時間反応させた。その後、HRP の基質である ImmunostarLD (富士フイルム) を 2 分間 PVDF 膜に浸し、化学発光をルミノイメージアナライザー (ImageQuant LAS500; GE healthcare) を用いて検出した。

8. Gen 固定化ビーズによるプルダウンアッセイ

FG-bead (多摩川精機) のエポキシ基と Gen のフェノール性水酸基を反応させて Gen 親和性ビーズ (Gen-bead) を作製した。C2C12 細胞の抽出液と Gen-bead を混合し、ローターを用いて 4°C で 4 時間反応させた。反応後、結合力の弱いタンパク質を除去するためにビーズを洗浄し、Gen-bead に結合したタンパク質を SDS 化し SDS-PAGE に供した。電気泳動後のゲルを銀染色し、Gen と相互作用するタンパク質の探索を行った。

9. 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で表した。2 群間の有意差は Student's *t*-test で、3 群以上の有意差は Tukey HSD を用いた分散分析で解析した。統計解析は JMP 統計ソフト (バージョン 11.2.0, SAS Institute, Cary, NC) を用いて実施した。*p* 値 < 0.05 を統計的有意と判断した。

【結果】

1. Gen が脂質の合成系と分解系に及ぼす影響

Gen による脂質蓄積が脂質の分解亢進によって引き起こされているのかを検討するために、脂質分解経路である β 酸化の阻害剤 (etomoxir) を添加して脂質蓄積を誘導した。その結果、Gen による脂質蓄積の抑制効果は、etomoxir により減弱化した (Fig. 1A)。脂質代謝

と糖質代謝に関連する酵素の遺伝子発現量を解析した結果、Gen は β 酸化の律速酵素である *Cpt1b* をはじめ β 酸化関連酵素である *Lcad*, *Acadm* の遺伝子発現量を有意に増加した (Fig. 1B)。CPT1B は、タンパク質レベルでも Gen によって発現量が増加することが示された (Fig. 1C)。以上の結果から、Gen は脂質分解系である β 酸化を活性化することで異所性脂肪の蓄積を減少することが示された。

2. ゲニステインがミトコンドリア量に及ぼす影響

β 酸化反応はミトコンドリア内のマトリックスで進む⁴。Gen が β 酸化に関連する遺伝子の発現量を増加したことから、ミトコンドリア量にも影響を及ぼしているのではないかと仮説を立てた。ミトコンドリア生合成に関わる転写因子の遺伝子発現量を解析した結果、Gen は *Nrf1*, *Tfam*, *Cycs* の遺伝子発現量を有意に増加し、PGC-1 α に関してはタンパク質レベルでの増加も示された (Fig. 2A, 1C)。続いて、実際のミトコンドリア量を測定した結果、Gen はミトコンドリア DNA 量を増加する傾向にあった (Fig. 2B)。

3. Gen による脂質蓄積抑制効果に対する ER の関与

Gen は女性ホルモンであるエストロゲンと類似した構造を持つことから、リガンドとして ER に結合し女性ホルモン様作用を示す⁵。Gen による脂質蓄積の抑制効果に女性ホルモン様作用が関与しているのではないかと推測し、ER の関与を ER のアンタゴニストである ICI 182780 (ICI) を用いて解析した。Gen による ER α と ER β の転写活性の増加は ICI によってキャンセルされた (Fig. 3A)。一方で、Gen による脂質蓄積の抑制効果は ICI の存在下でも維持された (Fig. 3B)。従って、Gen による脂質蓄積の抑制効果に女性ホルモン様作用は関与していないことが示された。

4. Gen による脂質蓄積抑制効果に対する ERR の関与

β 酸化の律速酵素である *Cpt1b* のエンハンサー配列内には ERR の応答配列である ERRE が複数存在する⁶。そこで、Gen による β 酸化関連酵素の遺伝子発現量の増加に、ERR が関与しているのではないかと推測し、ERR の転写活性を測定した。その結果、Gen の添加により ERR の転写活性が増加し、ERR の α アイソフォームである ERR α を発現させた細胞では、Gen 添加による相乗的な転写活性の増加が示された (Fig. 4A)。Gen による脂質蓄積の抑制効果に ERR α が関与するのかを検証するために、ERR α を siRNA でノックダウンした C2C12 細胞を用いて解析した。その結果、Gen による脂質蓄積の抑制効果は ERR α のノックダウンにより減弱化した (Fig. 4B)。また、 β 酸化関連酵素の遺伝子発現量の増加も ERR α のノックダウンによって抑制された (Fig. 4C)。従って、Gen は ERR α を介して β 酸化を活性化し脂質蓄積を抑制することが示された。

5. Gen 類縁体における ERR α の転写活性への影響

ERR α の転写活性の亢進に対する Gen の構造活性相関を調べるために、Gen の誘導体 7 種類を用いて解析した (Fig. 5A)。その結果、Gen とダイゼインは ERR α の転写活性を亢進したが、4'位もしくは 7 位の水酸基がメトキシ基に置換されたイソフラボンでは、転写活性の亢進は示されなかった (Fig. 5B)。また、ダイゼインは腸内細菌によってエクオールに代謝されるが、R/S-エクオールともに ERR α の転写活性に影響を示さなかった。従って、イソフラボン構造の 4',7 位の水酸基が ERR α の転写活性の亢進に必要であることが示された。

6. Gen の標的タンパク質の探索

ERR α の内在性リガンドは同定されていない。*In silico* 解析により、Gen は ERR α のリガンドになり得ることが報告されているが、実際に細胞内で結合することは証明されていない⁷。そこで、筋細胞内の脂質蓄積の抑制に資する Gen の標的タンパク質を探索した。Gen-bead を用いて C2C12 細胞の抽出液から、Gen と相互作用するタンパク質をプルダウンで回収した。その結果、分子量 29 kDa 付近に強く相互作用するタンパク質が得られた (Fig. 6A)。このタンパク質を質量分析器で解析した結果、adenosine nucleotide translocase 2 (ANT2) を見出した。ANT2 抗体を用いたウエスタンブロッティングにおいても Gen-bead と ANT2 との相互作用を確認した (Fig. 6B)。ANT2 はミトコンドリア内膜に局在するタンパク質であり、細胞質の ADP をミトコンドリア内に取り込み、ミトコンドリアのマトリックスで合成された ATP を細胞質へと排出するトランスポーターとして機能する⁸。私達は以前の研究において、ゲニステインが ANT2 に結合することで、トランスポーターとしての機能が阻害することを見出している⁹。そこで、ANT2 の機能低下が β 酸化関連酵素の発現量を制御するのではないかと推測を立てた。ANT2 をノックダウンした結果、*Cpt1b* をはじめ β 酸化関連酵素の遺伝子発現量が増加した (Fig. 6C)。従って、Gen は ANT2 に結合することで機能低下を惹起し、その結果 β 酸化の遺伝子発現量が増加することが示唆された。

【考察】

骨格筋は、インスリン刺激による全身のグルコース代謝の大部分を担っており、インスリン抵抗性の病因において重要な役割を担っている。骨格筋における異所性脂肪の蓄積は、インスリン抵抗性や 2 型糖尿病の発症リスクを増加する主な原因である¹⁰。従って、筋細胞内での脂質蓄積を抑制することは、インスリン抵抗性の発症予防につながる。本研究において、大豆イソフラボンの Gen が①ANT2 と相互作用することでその機能を低下し、 β 酸化関連酵素の発現を誘導すること、②ERR α を介して β 酸化関連酵素の発現と脂質蓄積の減少を誘導することを見出した。

Gen は β 酸化関連酵素の発現を誘導した。骨格筋代謝は、全身の栄養利用と恒常性において重要な役割を果たす。肥満者の多くで骨格筋代謝の基質を糖質から脂質へと切り替える能力が低下している¹¹。PDK4 はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体をリン酸化し、複合体の阻害と糖質利用を抑制する¹²。*Cpt1b* はミトコンドリア外膜に存在し、長鎖脂肪酸

-CoA 分子が細胞質からミトコンドリアへ移動し、酸化するのを制御している¹³。PDK4 と同様に CPT1B も代謝基質の切り替えにおいて重要な役割を果たし、脂肪酸の酸化を増加させる主要因子である。さらに、興味深いことに Gen は脂肪酸合成酵素の発現量も増加した (Fig. X)。 β 酸化の亢進によりアセチル CoA が過剰量産生されると、その一方で遊離の CoA が減少する。それを補うために一過的にアセチル CoA から脂肪酸の合成が促進される。以上の結果から、Gen は骨格筋における代謝のエネルギー源を脂質へと切り替え、 β 酸化を亢進することで細胞内の脂質蓄積を減少するといえる。

Gen は $ERR\alpha$ を介して脂質蓄積を抑制した。Gen は ER を介して女性ホルモン様作用を示すことで骨芽細胞の活性化や破骨細胞の不活性化を制御する⁶。その一方で、Gen は ER に依存しない生理機能を持つことが報告されている⁹。 $ERR\alpha$ は核内受容体に属する転写因子であり、ER と構造的に類似しているが、エストロゲンをリガンドとして認識しない。骨格筋においては、ミトコンドリア生合成や脂肪の β 酸化などエネルギー代謝に関与する遺伝子の発現を制御する¹⁴。*In silico* 解析において、Gen が $ERR\alpha$ に結合することが報告されているが、細胞内での結合は証明されていない¹⁵。PGC-1 α は、コアクチベーターとして機能することで $ERR\alpha$ の転写活性を促進する¹⁴。Fig. 2A より、Gen は PGC-1 α の遺伝子発現

(*Ppargc1a*) を増加したことから、Gen は PGC-1 α の発現誘導を介して $ERR\alpha$ の転写活性を増加している可能性がある。私達の結果から、Gen が間接的に $ERR\alpha$ の転写活性を亢進することで β 酸化を活性化していることが示唆される。

ANT2 のノックダウンにより β 酸化関連酵素の発現量が増加した。私達は以前の研究において、Gen は ANT2 と直接結合することで、ミトコンドリアへの ADP 取り込みを阻害し、その結果 ATP 合成量の低下を引き起こすことを見出している⁹。従って、ANT2 の機能低下が $ERR\alpha$ の転写活性化に寄与する可能性がある。ANT2 はあらゆる組織で普遍的に発現しており、ANT2 のノックダウンは細胞内のエネルギーセンサーである AMP-activated kinase (AMPK) を活性化し、脂質形成の抑制につながるということが知られている¹⁶。さらに、AMPK の活性化は PGC-1 α の発現増加につながるということが報告されている¹⁷。これらを統合すると ANT2 の機能低下は AMPK/PGC-1 α 経路を介して $ERR\alpha$ の転写活性を亢進することが示唆される。今後、ANT2 から $ERR\alpha$ の転写活性化につながる経路の解析が必要である。

本研究をまとめると Gen は ANT2 を標的とし、 $ERR\alpha$ を介して骨格筋における異所性脂肪の蓄積を抑制していることが示唆された。また、その抑制効果に女性ホルモン様作用は関与しないことが示された。

【要約】

Gen は β 酸化関連酵素の遺伝子発現を誘導することで β 酸化を活性化し、その結果として異所性脂肪の蓄積を減少することが示された。この β 酸化関連酵素の発現誘導には $ERR\alpha$ が関与しており、Gen は $ERR\alpha$ の転写活性を亢進することが示された。また、Gen は標的分子として ANT2 と結合し、ANT2 の機能低下は β 酸化関連酵素の遺伝子発現量を増加す

ることが判明した。これらの結果を総合すると、Gen は ANT2 の機能低下を引き起こすことで $ERR\alpha$ の転写活性を亢進すると考えられる。

【謝辞】

本研究の遂行に当たり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に心から感謝を申し上げます。また、本研究の遂行に協力していただいた信州大学農学部の中田駿太氏に謝意を表します。

【文献】

- 1) Boden G, et al., *Diabetes*, 50, 7, 1612-1617 (2001).
- 2) Cuthbertson DJ, et al., *Int J Obes (Lond)*, 41, 853-865 (2017).
- 3) Banerjee S, et al., *Cancer Lett*, 269, 2, 226-242 (2008).
- 4) Bartlett K, et al., *Eur J Biochem*, 271, 3, 462-469 (2004).
- 5) Seo H, et al., *Int J Biol Macromol*, 278, 2 (2024).
- 6) McGarry JD, et al., *Eur J Biochem*, 244, 1, 1-14 (1997).
- 7) Suetsugu M, et al., *Mol Cancer Res*, 1, 13, 981-991 (2003).
- 8) Baik SH, et al., *Exp Mol Med*, 48, 3, e222 (2016).
- 9) Ikeda T, et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 86, 2, 260-272 (2022).
- 10) Jacob S, et al., *Diabetes*, 48, 5, 1113-1119 (1999).
- 11) Kelley DE, et al., *J Clin Invest*, 115, 7, 1699-1702 (2005).
- 12) Sugden MC, et al., *Arch Physiol Biochem*, 112, 3, 139-149 (2006).
- 13) McGarry JD, et al., *Eur J Biochem*, 244, 1, 1-14 (1997).
- 14) Sylvia N Schreiber, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17, 6472-6477 (2004).
- 15) Suetugi M, et al., *Mol Cancer Res*, 1, 13, 981-991 (2003).
- 16) Cho J, et al., *Cell Death Diff*, 22, 9, 1437-1450 (2015).
- 17) Jager S, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 29, 12017-12022 (2007).

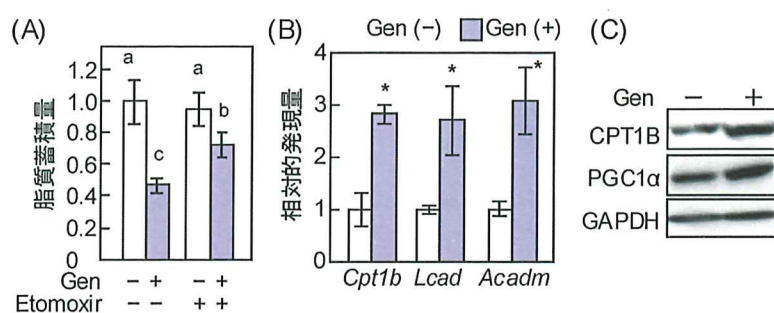


Fig. 1. Genによる脂質代謝関連遺伝子の発現促進とミトコンドリア機能への影響
 (A) Gen (5 μ M)と β 酸化の阻害剤 (Etomoxir)による脂質の蓄積量への影響。(B) β 酸化関連遺伝子の発現量の解析。(C)ウエスタンブロッティングによるタンパク質レベルの解析。異なるアルファベットの群間に統計的有意差がある ($p < 0.05$)。* $p < 0.05$ vs Gen(-)群。

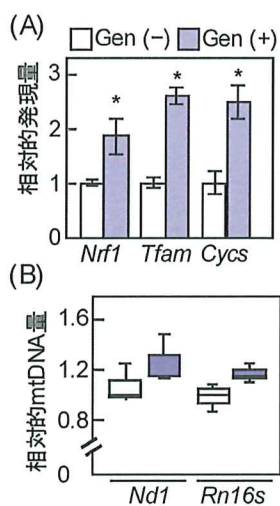


Fig. 2. Genによるミトコンドリア生成に及ぼす影響
 (A)遺伝子発現量の解析。
 (B)ミトコンドリアDNA (mtDNA)量の解析。* $p < 0.05$ vs Gen(-)群。

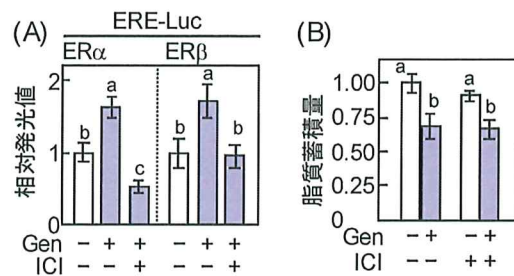


Fig. 3. Genの脂質蓄積抑制におけるエストロゲン受容体の関与

(A)エストロゲン受容体(ER)の転写活性に対するGenとER阻害剤(ICI)の影響。(B) GenとICIを処理した際の脂質蓄積量の測定。異なるアルファベットの群間に統計的有意差がある($p < 0.05$)。

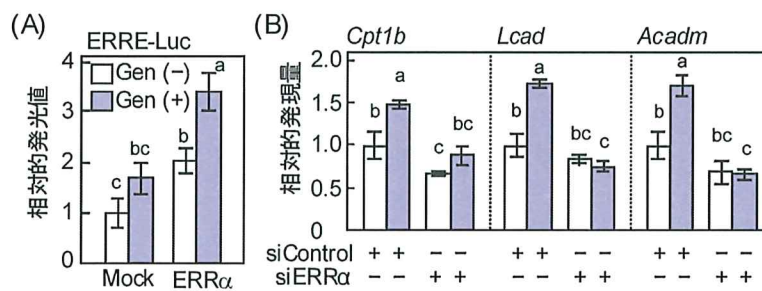


Fig. 4. ERR α の転写活性とGenによる β 酸化関連遺伝子発現促進との関係

(A) ERRの転写活性の測定。(B) ERR α をsiRNA(siERR α)でノックダウンした際の遺伝子発現量の解析。siControlはコントロールのsiRNAを示す。異なるアルファベットの群間に統計的有意差がある($p < 0.05$)。

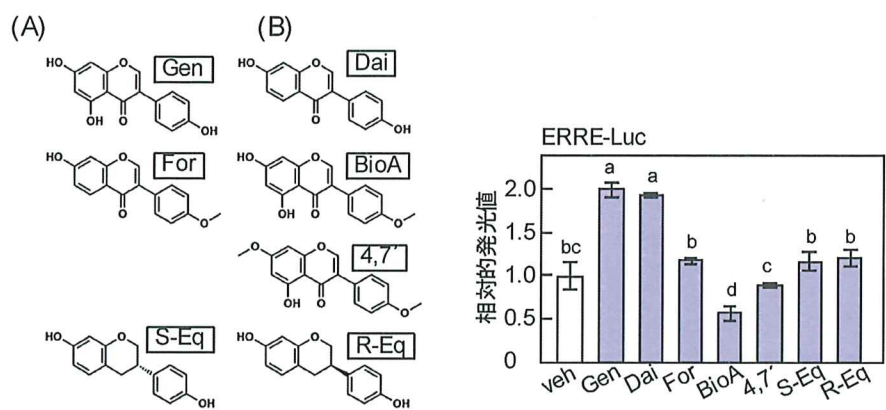


Fig. 5. Gen類縁体がERRαの転写活性に及ぼす影響
 (A) Gen類縁体の構造式。(B) ERRの転写活性の測定。異なるアルファベットの群間に統計的有意差がある($p < 0.05$)。

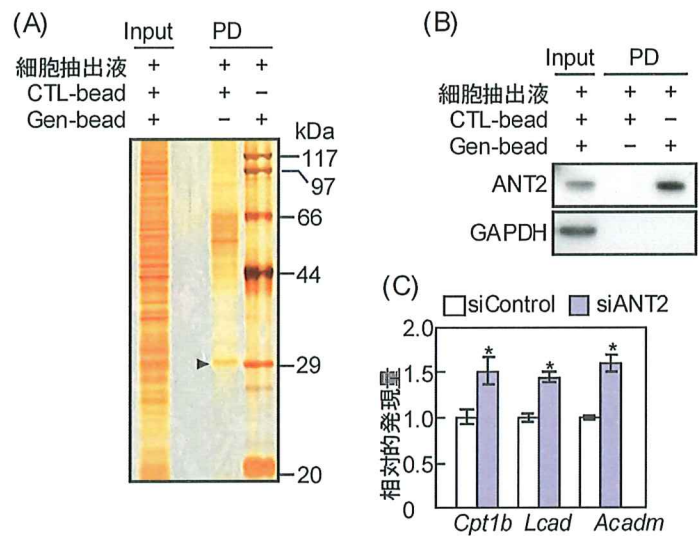


Fig. 6. Genの標的タンパク質の探索

(A) Gne固定化ビーズ(Gen-bead)を用いたプルダウンアッセイ。CTL-beadはコントロールビーズを示す。矢印の部分がGen-beadと強く相互作用したタンパク質。(B) ANT2抗体を用いたウエスタンブロットティング。(C) ANT2のsiRNA(siANT2)処理によるβ酸化関連遺伝子の発現量への影響。siControlはコントロールのsiRNAを示す。* $p < 0.05$ vs siANT2(-)群。