

運動に伴うフリーラジカル傷害の抑制に対する大豆たん白質の効果

EFFECT OF SOY PROTEIN ISOLATE ON FREE RADICAL-INDUCED MUSCLE INJURY UNDER EXERCISE

二川 健・山本 孝・山内有信・大野誉子・難波佳世・木戸康博・
六反一仁・岸 恭一（徳島大学医学部）

Takeshi NIKAWA, Takashi YAMAMOTO, Arinobu YAMAUCHI, Takako OHNO, Kayo NANBA, Yasuhiro KIDO, Kazuhito ROKUTAN and Kyoichi KISHI

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

ABSTRACT

Dietary sulfur amino acids, especially cystine, have been suggested to protect against oxyradical-induced tissue damage. In this study, we examined the effect of soy protein isolate (SPI), whose cystine content is relatively high, on muscle injury under exhaustive exercise. In rats fed 20% SPI diet for 2 weeks, protein concentration in gastrocnemius muscle was higher than that in rats fed casein diet. Five percent SPI diet alleviated the loss of muscle protein as compared with casein diet. SPI diet group showed better exercise performance than casein group as measured by treadmill running. SPI diet significantly suppressed the exercise-induced release of creatine phosphokinase (CPK) from muscle. But SPI diet did not decrease the amount of oxidative products in muscle. The activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the muscle increased with exercise, but were not affected by dietary protein source. In conclusion, work capacity was greater and the muscle injury induced by exercise was less in SPI diet group than casein diet group. But SPI diet did not suppress the oxidative stress under exercise. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 15, 45-50, 1994.

近年、日本人のエネルギー消費量は減少の一途をたどり、肥満を防止し健康を維持するために運動が奨励されている。しかしながら、運動に伴うフリーラジカル生成とそれによる筋たん白質傷害は重大な副作用である。我々は、酸化ストレスに対する防御に、食餌中の含硫アミノ酸が重要な役割を果たすことを明らかにした¹⁾。特に、シスチンは強い抗酸化作用をもつが、このシスチンをカゼインよりも多く含む大豆たん白質に注目し、運動負荷時の酸化ストレス防御の観点から、大豆たん白質の有用性について検討した。

実験方法

動物及び飼料

4週齢の雄 Wistar ラット（日本 SLC）を4群に分け、5,20%カゼイン食及び5,20%分離大豆たん白質（SPI）食を与え、それぞれ自由摂取で2週間飼育した。

運動負荷

2週間飼育後、各飼料群のラットをさらに運動負荷群と非負荷群に分けた。運動負荷群には、傾斜を10%とし、ベルトスピードを30 m/min に設定したトレッ

ドミル (Quinton model 42-15) を用いて疲労困憊になるまで運動させた。その間のラットの運動量は、体重 (kg) × 走行距離 (m) より算出した。

腓腹筋の採取

運動群のラットは疲労困憊運動負荷直後に、非運動負荷群は同じ時間帯に頸椎脱臼により屠殺し、直ちに腓腹筋を取り出した。湿重量を測定後、10 mM EDTA を含む 10 mM HEPES, pH 7.4 を組織重量の 10 倍量加えてホモジナイズし、測定まで -80℃ で保存した。筋ホモジネート中のたん白質量は牛アルブミンを標準として Lowry 法²⁾で測定した。

TBARS の測定

筋ホモジネート 0.2 mL に 10% リンタンングステン液を 0.5 mL 加え、3,000 rpm で 15 分遠心した。この操作を 2 回繰り返した後、沈澱物に 4.0 mL の蒸留水及び 0.8% の TBA 試薬 1 mL を加え、沸騰浴中で 1 時間反応させた。氷冷した後、n-ブタノールを 5 mL 加えよく振とうした。3,000 rpm で 15 分遠心し、上層のブタノール中に抽出された過酸化脂質の最終分解産物であるマロンジアルデヒド量 ($\lambda x = 515$ nm, $\lambda m = 553$ nm) を蛍光分光光度計 (日立 F-4000) で測定し thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 量とした³⁾。

血中 CPK 活性の測定

運動負荷後の血中クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK) 活性の経時的变化を調べるため、運動負荷 3 日前にラットの外頸静脈にカニューレを装着した。運動負荷前後の一定時間に血液を採取し、直ちに血清を分離して、Rosalki らによるヘキソキナーゼ・G-6-PDH による紫外部測定法で CPK 活性を測定した⁴⁾。

GSH 及び GSSG 濃度の測定

筋ホモジネート 0.5 mL に 6% 酢酸 0.1 mL と 10% スルホサリチル酸 0.4 mL を加え氷中で混和した後、15,000 rpm で 30 分遠心して得られた上清を還元型グルタチオン (GSH) の試料として用いた。また上記の処理で得られた上清 200 μ L に 7.5 M トリエタノールアミン 12 μ L 及び 97% 2-ビニールピリジン 4 μ L を加え、氷上で 1 時間反応させ、遠心した上清を酸化型グルタチオン (GSSG) の測定に用いた。GSH 及び GSSG は Griffith の方法で測定した⁵⁾。

SOD 及び GPx 活性の測定

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性は xanthine-xanthine oxidase 系により O_2^- を発生させ、nitroblue tetrazolium (NBT) の還元を 50% 阻害する活性を 1 unit として、今成らの方法で求めた⁶⁾。

グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性は、

glutathione reductase による GSSG の還元に基づいた NADPH の酸化を吸光度計を用いて 340 nm で測定することにより求めた⁷⁾。25℃ で 1 分間に 1 mM の NADPH を還元する活性を 1 unit とした。

統計分析

結果は、二元配置分散分析を行い、有意差検定には Student's *t* test を用いた。

結 果

大豆たん白質食と栄養状態

Fig. 1 に示すように、SPI 食で飼育したラットの体重変動は、カゼイン食で飼育した場合とほとんど変わらなかった。また、摂食量、血清アルブミン濃度、末梢血ヘマトクリット値、各臓器重量 (肝、肺、腎など) にも SPI 食群とカゼイン食群間に差は認められなかった (データは示さず)。しかしながら、20% SPI 食で飼育したラットの腓腹筋の湿重量及び湿重量あたりのたん白質量は、20% カゼイン食で飼育したラットに比べて有意に高かった (Table 1)。一般に、低たん白質食で飼育したラットの筋たん白質量は低下する傾向にあるが、5% SPI 食で飼育したラットの場合、筋たん白質量の低下は 5% カゼイン食群よりも軽度であった。疲労困憊運動の前後の筋たん白質量の比較では、5% カゼイン食で飼育したラットのみで有意な低下を認めた。

大豆たん白質食と運動能力

さらに、SPI 食で飼育したラットの運動能力を疲労困憊まで強制的に運動させた時の運動量として測定し

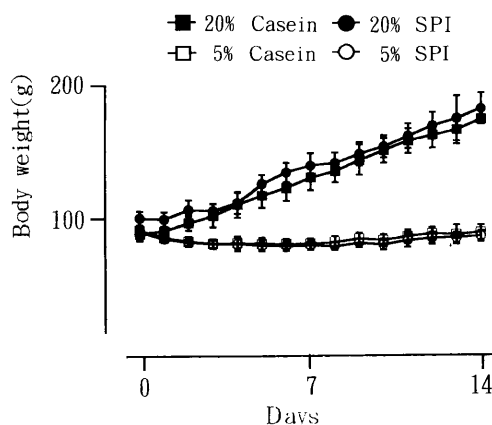


Fig. 1. Body weight changes of rat. Values are mean $\pm$ SD (n=9).

たところ、5%及び20% SPI 食ともに、それと同じ濃度のカゼイン食で飼育したラットに比べ、それぞれ約40%及び20%運動量が増加した (Table 2)。

運動と筋たん白質傷害

運動による筋たん白質傷害の指標として、血中 CPK 活性を用いた。カゼイン食で飼育したラットの場合、運動負荷直後に血中 CPK 活性は最大値を示し、その

Table 1. Wet weights and protein contents in rat gastrocnemius muscle

Group	Organ weight		Protein content (mg/g wet weight)
	(g wet weight)	(g/100 g body weight)	
Control			
5C	0.45±0.05 ^a	0.52±0.06	120.3±4.2 ^a
20C	0.81±0.07	0.48±0.07	136.1±5.7
5S	0.49±0.06 ^a	0.55±0.05	129.5±2.6 ^{ab}
20S	0.87±0.09	0.50±0.06	141.7±4.4
After exhaustion			
5C	0.41±0.02 ^a	0.48±0.03	112.0±1.5 ^{ac}
20C	0.79±0.07	0.48±0.04	131.5±3.5
5S	0.46±0.02 ^{ab}	0.52±0.02	126.7±5.9 ^{ab}
20S	0.86±0.05	0.49±0.03	139.4±2.3 ^b

Values are mean ± SD (n=6).

a, p<0.01 by Student's *t* test (5% vs. 20% protein diet).

b, p<0.01 by Student's *t* test (SPI vs. casein diet).

c, p<0.01 by Student's *t* test (after exhaustion vs. control).

Table 2. Effect of low-protein diets on exercise capacity

Group	Running time (min)	Work (kg•m)
5C	65.2±12.9 ^a	181.0±43.2 ^a
20C	47.5± 9.7	252.7±49.4
5S	93.0±21.6 ^{ab}	248.1±59.3 ^{ab}
20S	54.1±15.2	299.9±89.3 ^b

Work was calculated according to the following equation.

$$\text{Work} = \text{B. W. (kg)} \times \text{running distance (m)}$$

Values are mean ± SD (n=9).

a, p<0.01 by Student's *t* test (5% vs. 20% protein diet).

b, p<0.01 by Student's *t* test (SPI vs. casein diet).

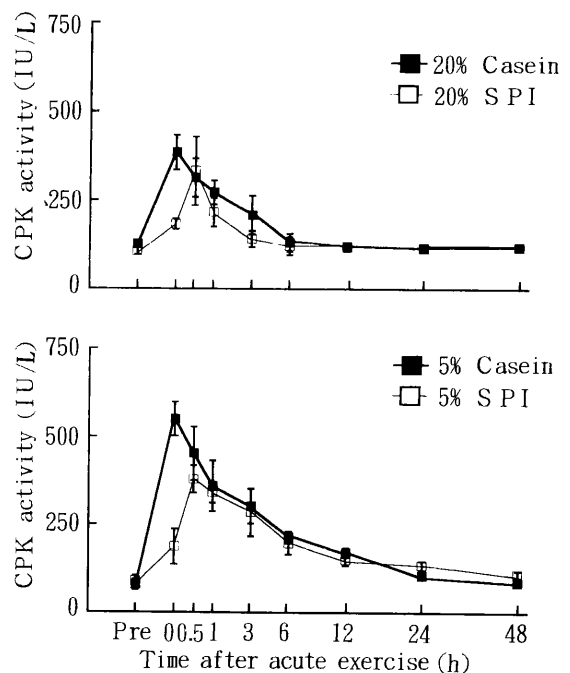


Fig. 2. Changes of plasma CPK activity after acute exercise. Values are mean ± SD (n=5).

後漸減した (Fig. 2)。これに対し、SPI 食で飼育したラットの場合、運動負荷終了後より30分遅れて血中 CPK 活性は最大となり、その値はカゼイン食群よりも小さかった。また、5%のたん白質飼料で飼育すると、20%たん白質の飼料で飼育した場合に比べて、運動による筋たん白質傷害が有意に大であった (Fig. 2)。

運動による酸化ストレスとその防御

運動に伴う筋の酸化ストレスを定量化するため、筋中の TBARS, GSH, GSSG を測定した。Fig. 3 に示すように、運動によりいずれの食餌群においても

TBARS と GSSG の有意な上昇を認め、今回の運動負荷が酸化ストレスとなっていることを意味している。しかし、運動による酸化物の産生は SPI 食群とカゼイン食群間に差は見られなかった。さらに、酸化ストレスの軽減に重要な役割を果たしている酵素 SOD と GPx 活性への SPI 食の影響を調べた結果、運動直後これらの酵素活性は軽度上昇するものの、カゼイン食群との間にほとんど差は見られなかった (Fig. 4)。運動による脂質酸化物の産生量は、5%たん白質飼料で飼育したラットで高かったが、酸化ストレス防御系の酵

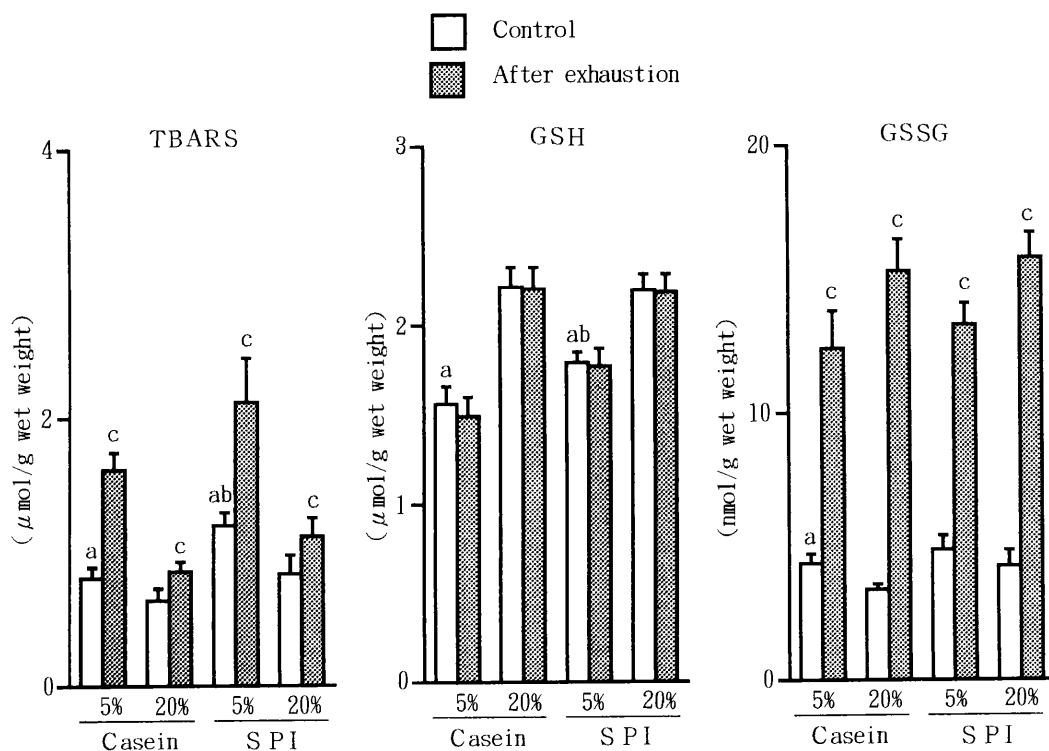


Fig. 3. TBARS levels, GSH and GSSG concentrations in gastrocnemius muscle.

Values are mean $\pm$ SD (n=6).

a, $p < 0.01$ by Student's t test (5% vs. 20% protein diet).

b, $p < 0.01$ by Student's t test (SPI vs. casein diet).

c, $p < 0.01$ by Student's t test (after exhaustion vs. control).

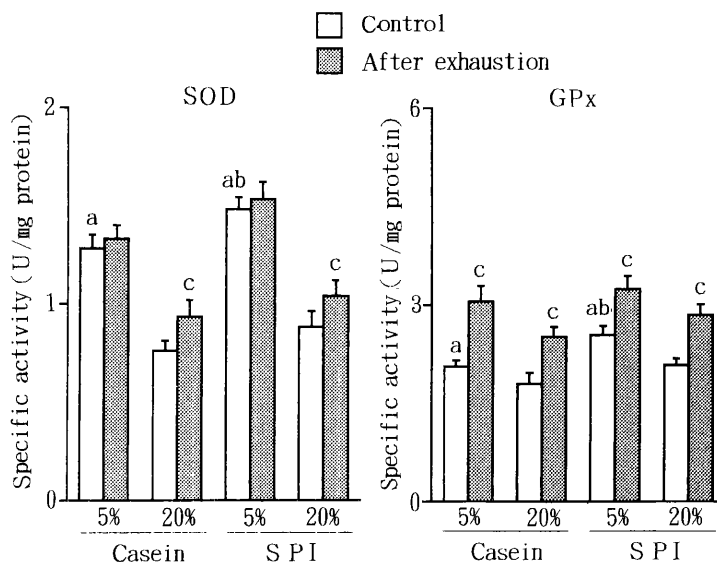


Fig. 4. Activities of SOD and GPx in gastrocnemius muscle.

Values are mean $\pm$ SD (n=6).

a, $p < 0.01$ by Student's t test (5% vs. 20% protein diet).

b, $p < 0.01$ by Student's t test (SPI vs. casein diet).

c, $p < 0.01$ by Student's t test (after exhaustion vs. control).

素活性はむしろ低たん白質食群で高かった。(Figs. 3 and 4)。

考 察

大豆たん白質食で飼育したラットの筋たん白質量は、カゼイン食で飼育したラットに比べ有意に多く、そのラットの運動能力も有意に大であった。食たん白質源に関わらず、5%たん白質飼料で飼育したラットの方が、筋たん白質量及び運動能力は低く、運動による筋傷害に対する抵抗性は、20%食群に比べ劣っていた。しかし、5%大豆たん白質食群では、5%カゼイン食群よりもそれらの指標はすべて高値を示した。大豆たん白質食は筋たん白質の同化を促進するか、または異化を抑制することにより筋たん白質量を増加させ、その結果運動能力が高まったことが示唆された。

一方、大豆たん白質食群において、運動による筋たん白質傷害がカゼイン食群よりも軽度であったのは、大豆たん白質食中のシスチンにより運動負荷後の酸化ストレスが軽減されたためであろうと考えられる。しかし、今回の結果では、運動負荷後のTBARSの上昇は大豆たん白質食群とカゼイン食群の間に有意の差を認めなかった。また、大豆たん白質食は酸化ストレス

防御系の酵素活性にもほとんど影響を与えなかった。これらの所見は、大豆たん白質の筋たん白質傷害軽減効果は運動による酸化ストレスを大豆たん白質食が軽減するからではないことを示唆した。

今回の我々の実験で示したように、筋たん白質量、運動能力、運動後の筋たん白質傷害の観点から考えると、激しい運動を行う場合はシスチンを多く含んだ大豆たん白質をたん白質源とする方が有利な点が多い。現在、我々は大豆たん白質食の筋たん白質代謝への作用機序を明らかにするため、筋たん白質の異化に重要な働きをしているたん白質分解酵素（プロテアーゼ）⁸⁾に焦点をあて研究を進めている。なぜなら、筋肉には多くのプロテアーゼが存在し、その中の多くはシステインなどのアミノ酸により活性化されたり不活性化されたりするからである⁸⁾。事実、我々は大豆たん白質食がいくつかのプロテアーゼ活性を抑制するという興味深い知見を得ている（未発表データ）。今後、大豆たん白質、特にシスチンに注目し、高シスチン栄養と筋プロテアーゼ活性の関係、さらには運動機能への影響について研究してゆきたい。

文 献

- 1) Rumley EJS, Lai A, Hirakawa T, Kido Y, Shizuka F and Kishi K (1992): Protein deficiency potentiates lipid peroxidation in growing rats exposed to hyperoxia. *Nutr Res*, **12**, 1101-1112.
- 2) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall R (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- 3) 八木國夫, 大石誠子, 大川 博 (1981): 測定法. 過酸化脂質と疾患, 八木國夫・五島雄一郎編, 医学書院, 東京, pp. 20-32.
- 4) Szasz G, Gruber W and Bernt E (1976): Creatine kinase. 1. Determination of optimum reaction condition. *Clin Chem*, **22**, 650-656.
- 5) Griffith OW (1985): Glutathione and glutathione disulfide. *Method Enz Anal*, **8**, 521-529.
- 6) 今成登志雄, 広田元子, 宮崎元一, 早川和一, 田村善蔵 (1977): Superoxide dismutase 活性測定法の改良. 医学の歩み, **101**, 496-497.
- 7) Paglin DA and Valentine WN (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, **70**, 158-169.
- 8) 勝沼信彦編 (1992): 細胞内タンパク質分解, 東京化学同人, 東京.