

運動トレーニング中の大豆ペプチドの摂取が筋肉たん白 質の遺伝子発現に及ぼす影響

EFFECTS OF THE SOYBEAN PEPTIDE ON AN INCREASE IN MUS-
CLE MASS DURING TRAINING IN MICE

伏木 亨・松元圭太郎・魚橋良平・井上和生（京都大学農学部）

Tohru FUSHIKI, Keitaro MATSUMOTO, Ryohei UOHASHI and Kazuo
INOUE

Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Kyoto
University, Kyoto 606-01

ABSTRACT

Increase in the muscle mass of mice administered soybean peptide was observed. Mice were fed with commercial diet and 5% soybean peptide solution *ad libitum* during endurance swimming training every 2 days for 5 weeks. The gastrocnemius and quadriceps muscle masses of the soybean peptide group were larger than those of the control group which was given water instead of the soybean peptide. Amino acid mixture which simulated the soybean peptide gave the same increase in the muscle mass when it was administered to the mouse instead of soybean peptide. The soybean peptide has much branched chain amino acids and glutamine which are reported to stimulate muscle hypertrophy. These results suggested that soybean peptide would stimulate muscle hypertrophy during exercise training with its characteristic amino acid composition. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 51-56, 1994.

運動は動物の代謝を大きく変化させ、特に栄養素の要求性が運動時に大きく異なることが明らかになってきている。運動選手、特に高校、大学の運動クラブの選手は、激しい運動を行っているにも関わらず、その栄養に関しては無関心であることが多い。また、十分でない栄養摂取のもとで激しい運動を継続しているものが少なくない。

激しい運動はたん白質、エネルギー等の必要量を増加させる一方、食欲を減退させることも多く、適切な栄養素摂取は困難なことが多い。筋肉は栄養素摂取の如何に関わらず、運動負荷によって適応的に増加するといわれているが、材料となるアミノ酸の不足はその合成を抑制する可能性がある。また、負荷がかかっていない臓器のたん白質は、筋肉合成のためにどんどん分解されてしまう。

本研究は、長期にわたって激しい持久性の運動を行っているヒトに、適切な栄養素を補強するためのモデル実験として、マウスを長期間持久運動させたときの筋肉の合成・維持に対する強制的に与えた大豆たん白質の効果を検討した。

実験方法

マウスの持久運動系の設定

マウスに定量的に持久性の運動負荷を与える方法として流水プールによる遊泳運動装置を試作した。この運動装置は、90×45×45 cm のプールにポンプによって一定の表面流を施したもので、出水口と吸水口は、流れが均一になるように特に工夫を加えている。流量はバルブと流量計でレベルを調節した。本実験には、毎分8,000 mL の流量を用いた。この条件では、マウス

は、トレーニングしない状態で約40分間泳ぎ続けることができる。マウスが疲労して流れに逆らって泳ぐことができなくなった時点を最大遊泳時間とした。水温は34℃に調節した。

動物の飼育と持久運動条件

5週齢の ddY 雄マウスを固形飼料 MF の自由摂取で飼育し、遊泳に慣れさせる目的で、1週間にわたって1日20分間流水プールで遊泳させた（予備飼育）。

実験1

その後実験群の飲料水の中に5%となるように大豆たん白質分解ペプチドを溶かして自由摂取させた（大豆ペプチド群）。このほかに飲料水は与えていない。もう1群には、対照として水道水を飲料水として与えた（対照群）。餌は固形飼料 MF を自由摂取させた。両群マウスを、2日に一度、35日間限界までの遊泳を行わせた。体重および飲水量は毎日測定した。

実験2

同じく5%の大豆ペプチドをマウスに与えたが、35日間運動を行わずに飼育した。

実験3

大豆ペプチドと同じ組成のアミノ酸混合物を調製し、5%になるように水に溶かして与えた。マウスは35日間、実験1と同じ条件で運動を负荷した。

重量測定

実験期間終了後マウスの肝臓、心臓、腓腹筋、四頭筋、ひらめ筋、腎臓、脾臓、腎周脂肪、副睾丸周囲脂肪の重量をそれぞれ測定した。

ミオシン mRNA の測定

ミオシン重鎖 mRNA に相補的な RNA を合成し、これを用いて、マウス筋肉に含まれるミオシンの速筋

および遅筋に対応する mRNA をリボヌクレアーゼ・プロテクションアッセイ法によって定量した。

結 果

実験1

35日間の遊泳運動負荷期間中にマウスの体重は正常に増加し、大豆ペプチド投与群で対照群よりもわずかに少なかったが有意な差ではない（Fig. 1）。この間の飲水量は、5%大豆ペプチド溶液が1日平均体重1gあたり0.28 mL に対して、水道水は0.2 mL であり、大豆ペプチド溶液が非常に大量に飲まれた。餌の摂取量は測定していない。35日後の筋肉および臓器重量を体重あたりの%で表に示した（Table 1）。肝臓や心臓、脾臓、ひらめ筋には全く両群で差がみられなかったが、

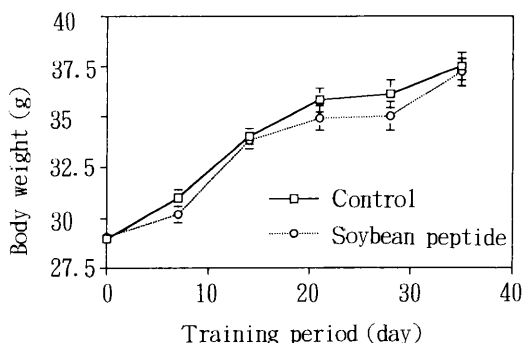


Fig. 1. Body weight change during exercise training in the mice. Training and feeding conditions were described in the text.

Table 1. Organ weight of mice after training for 35 days (% of body weight)

	Control	Soybean peptide
Liver	4.46±0.12	4.65±0.18
Heart	0.39±0.01	0.39±0.01
Gastrocnemius	0.99±0.02	1.05±0.02*
Quadriceps	1.36±0.02	1.45±0.02*
Soleus	0.03±0.01	0.04±0.01
Kidney	1.33±0.05	1.42±0.03*
Spleen	0.28±0.02	0.29±0.01
Peri-fat ¹	0.64±0.07	0.47±0.03*
Epidi-fat ²	1.81±0.17	1.34±0.07*

Values are means ± SEM for 7-9 mice.

*, Significant difference ($p < 0.05$).

¹ Perirenal fat

² Epididymal fat

ふくらはぎの筋肉である腓腹筋，太股の筋肉である四頭筋はいずれも大豆ペプチド投与群で有意に重量が大であった。脂肪組織の重量は大豆ペプチド群が著しく少なかった。

実験 2

実験 1 と同じ飼育条件で，両群とも運動を全くさせなかったところ，体重増加，臓器重量ともに有意な差は見られなかった (Table 2)。このことは，実験 1 で明らかになった大豆ペプチドの効果が，持久運動を行

っているときにのみ見られるものであることを示唆している。

実験 3

実験 1 と同様の実験を，大豆ペプチドと同じ組成のアミノ酸混合物で行った (Table 3)。マウスには実験 1 と全く同じ運動をさせた。体重増加は大豆ペプチド組成のアミノ酸投与群が対照群 (水道水投与) よりも少なかった。飲水量は，水よりもアミノ酸混合物水溶液の方がはるかに多く飲まれた (Fig. 2)。

Table 2. Organ weight of mice without training for 35 days (% of body weight)

	Control	Soybean peptide
Liver	4.41±0.12	4.94±0.18
Heart	0.42±0.01	0.42±0.01
Gastrocnemius	0.99±0.03	0.98±0.02
Quadriceps	1.42±0.04	1.41±0.03
Soleus	0.04±0.01	0.04±0.01
Kidney	1.53±0.04	1.57±0.05
Spleen	0.28±0.02	0.29±0.01
Peri-fat ¹	0.48±0.10	0.54±0.10
Epidi-fat ²	1.62±0.19	1.58±0.12

Values are means ± SEM for 7-9 mice.

¹ Perirenal fat

² Epididymal fat

Table 3. Amino acid composition of the soybean peptide

Amino acid	Weight %
Val	4.03
Leu	6.83
Met	1.10
Trp	0.96
Arg	7.99
Glu	22.46
Tyr	3.30
Asp	12.25
Pro	5.58
Ile	3.99
Lys	6.46
Phe	4.62
Thr	3.63
His	2.46
Cys	1.31
Ala	3.73
Gly	4.02
Ser	5.26

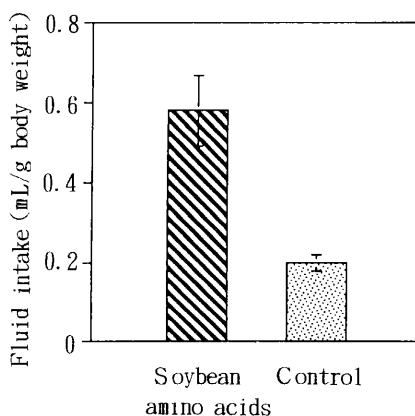


Fig. 2. Difference of fluid intake between 5% amino acid mixture and water. Mice were given 5% amino acid solution, which is the same composition as the soybean peptide, instead of water. Water was given as a control. Each bar expressed as average value of fluid intake through the feeding periods.

Table 4. Organ weight of mice fed amino acids with training for 35 days (% of body weight)

	Control	Soybean peptide
Liver	4.73±0.13	4.97±0.11
Heart	0.40±0.02	0.43±0.01
Gastrocnemius	0.99±0.02	1.00±0.02
Quadriceps	1.34±0.02	1.47±0.03*
Soleus	0.04±0.01	0.03±0.01
Kidney	1.43±0.04	1.52±0.05
Spleen	0.29±0.02	0.30±0.03
Peri-fat ¹	0.51±0.06	0.45±0.10
Epidi-fat ²	1.87±0.21	1.37±0.16*

Values are means ± SEM for 7-9 mice.

*, Significant difference (p<0.05).

¹ Perirenal fat

² Epididymal fat

```

beta  -151 :                               GAAGCTTAGGCTGAAGAGGCGGAGGAACA
beta  -101 : GGCCAACACCAACCTGTCCAAGTTCCGCAAGGTGCAGCAGCAGCTGGATG
beta   -51 : AGGCAGAGGAGAGGGCGGACATTGCCGAGTCCCAGGTCAACAAGCTGCCG

emb    1 : GCTAAACCCGGGACTTCACCTCTAGCCGGATGGTGGTCCATGAAAGTGA
           (catctgagttctctctag)
neo    1 : GTGAAGAGCCGCGAGGTTACACCAAAATCAGTGCAGAGTAAGcatct
f2a    1 : GTAAAGAGCCGCGAGGTTCACTAAAGTCATAAGTGAAGAGTAAggcag
f2b    1 : GTGAAGAGCCGCGAGGTTACACCAAAAGTCATAAGCGAAGAATAGctcaa
beta   1 : GCCAAGAGCCGTGACATTGGCGCCAAGGGCCTGAATGAAGAGTAGatcta

emb    51 : GGAGTGAgcatgtctctctggtgaggggcagaagatatgcagaatgtatg
neo    51 : tgaagagccgccaagtggctgaaggaaaggcacagaatgtgtgccttg
f2a    51 : ctctgatgctgtagaatgaccgaagaaaggcacaaaatgtgaagcctttg
f2b    51 : ttccttctgttgaaagggtgacagaagaaatcacacaatgtgacgttcttt
beta   51 : gatcttgtgtacccaaccctaaggatgcctgtgaagccctgagacctg

emb    101 : ttttcgtggctctctgaccatcctgcttaatttccacgtaacccctttcca
neo    101 : ggtcgcttgctgggtcgcttgccctctctgtgtttactttctcccactgct
f2a    101 : gtcatgccccatgtgattctattttaatcctattgtaaggaaataaagag
f2b    101 : gtcactgtcctgtatatcaaggaaattaagctgcagataattttgc
beta   101 : agcctttgaaacagcaccttaggcagaaacacaataaagccaattttctc

emb    151 : catgcaataaaatttgcttgttttcaagtgggtcttttgccttgcct
neo    151 : gactgaatgaaaccacaactcattgtaatt
f2a    151 : cccaagttcttgcaacc
f2b    151 :
beta   151 : tcaagcc

```

Fig. 3. cDNA sequences of mouse myosin heavy chain subclasses. Sequences with underbar were used as primers for PCR. emb, embryo type; neo, neonatal type; f2a, fast twitch 2a type; f2b, fast twitch 2b type.

臓器重量は、実験1の大豆ペプチド投与で得られたのとはほぼ同じ結果を示している。すなわち、大豆ペプチドによる運動中の筋肉重量の増加は、大豆ペプチドのアミノ組成に起因することが示唆された (Table 4)。

筋肉ミオシンたん白質 mRNA の定量の試み

ミオシン mRNA はリボヌクレアーゼプロテクションアッセイによって定量を試みており、いくつかのプロープの合成を行ってその測定法が確立できた。

骨格筋で発現するミオシン重鎖は Fig. 3 に示したように 5 種類 (Embryonic, Neonatal, Fast II A

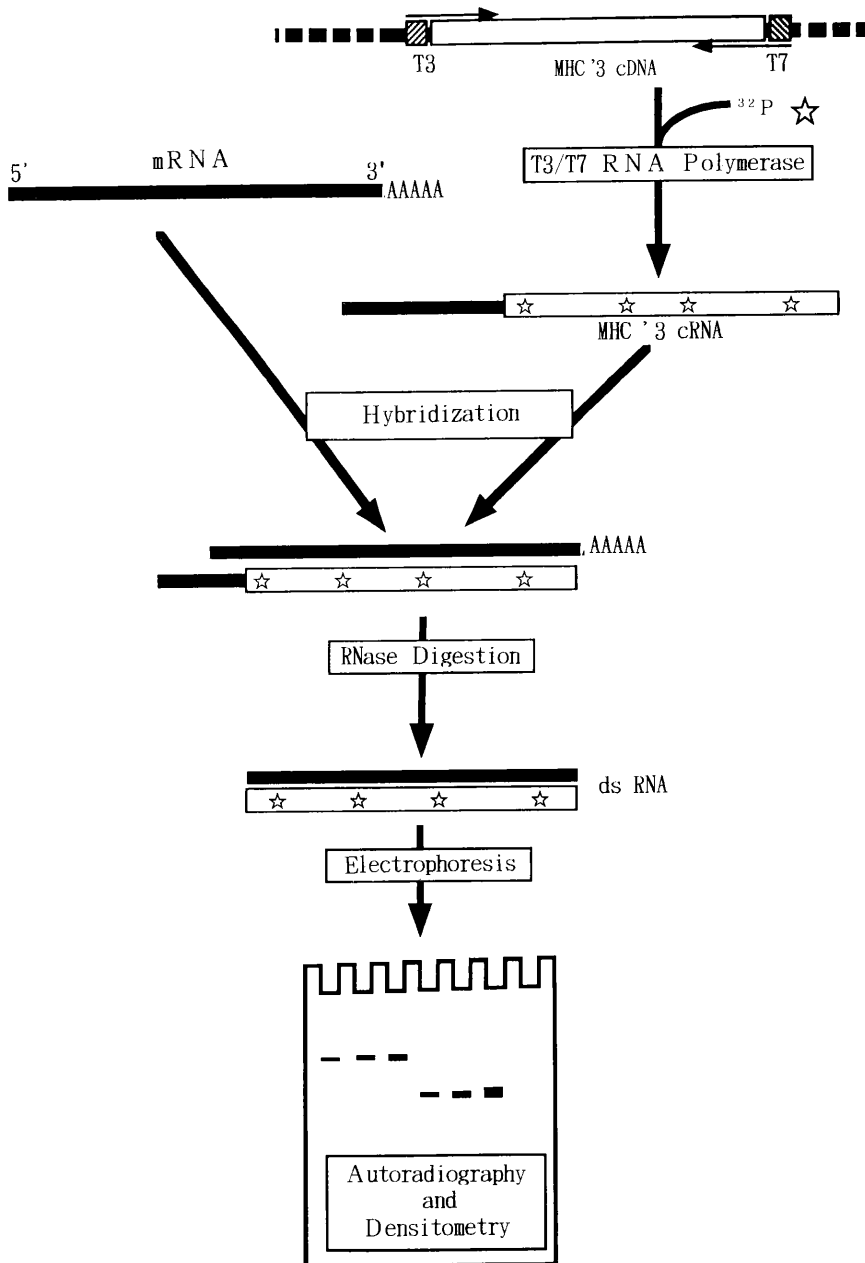


Fig. 4. Scheme of the RNase protection assay method.

[FG], Fast IIB[FOG], Slow β (=Cardiac β)) のタイプが存在する。これらはたん白質コード領域の相同性が非常に高いため、通常のノーザン解析では各分子種を分別定量することは困難である。そこで全く相同性が無い 3'非翻訳領域を Fig. 3 中の下線で示したプライマーを用いて PCR によりクローニングし, Fig. 4 に示したような原理で、各々の mRNA に相補的な cRNA をプローブとして RNase protection assay を行った。特に成熟した筋肉では 3 種類のミオシン重鎖分子が混在するが、この方法により分子量の異なるバンドとして分別定量が行えることを明らかにした。現在この方法を用いて定量を行っている。

考 察

試作した流水プールによる運動は、遊泳持続時間や別の実験で測定した血液乳酸レベルなどから判断して、最大酸素摂取量の 50-60% 程度の運動強度であると推

定できる。これは、典型的な持久運動である。遊泳持続時間は、対照群では徐々に増加したが、大豆ペプチド投与群ではトレーニングの効果が見られなかった。これは、投与したペプチド由来の大量のアミノ酸がアンモニア生成を促進したために持久運動を阻害したと想像される。これは、大豆ペプチドではないペプチドを 5% 濃度で同様に与えた実験でも持久力の伸びが観察されなかったことでも支持される。

持久運動能力が伸びなかったのとは反対に、腓腹筋、四頭筋の重量が増加したことは注目に値する。大豆ペプチドのアミノ酸組成をみると、分岐鎖アミノ酸とグルタミンの含量がいずれも非常に高いことが特徴的である。これらのアミノ酸は、いずれも筋肉の合成を促す効果があることが報告されており、運動時の大豆ペプチドによる筋肉たん白質の増加はこれらアミノ酸による効果である可能性がある。