

模擬微小重力環境における骨格筋萎縮に及ぼす 大豆たん白質摂取の影響

刎田 司・横越英彦*

静岡県立大学大学院生活健康科学研究科

Effect of Soy Protein Isolate on Muscle Atrophy under Simulated Weightlessness by Suspension Hypokinesia / Hypodynamia in Rats

Osamu TADA and Hidehiko YOKOGOSHI

Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, The University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526

ABSTRACT

Under the microgravity condition like the universe, it is known that various nutritional and physiological changes in the body are induced. Especially in the aspect of nutrition, muscle atrophy is characteristic accompanying the weightlessness. In this study, we examined the ameliorative effect on muscle atrophy caused by suspension hypokinesia using soy protein isolate (SPI) as the protein source as compared with casein. Male rats of the Wistar strain (8 weeks old) were divided into two groups, suspended with suspension harness, and were fed 20% casein diet or 20% SPI diet for 10 days. The body weights of the suspended rats fed casein or SPI decreased similarly. The weights of the gastrocnemius and soleus muscles in the suspended rats were significantly decreased, however the degree of the decrease of the weight of gastrocnemius muscle of rats fed SPI diet was smaller than that of rats fed casein diet. The activity of serum creatine kinase of rats fed SPI diet was also smaller than that of rats fed casein diet. The activity of muscle protein-degrading enzymes such as calpain and proteasome in gastrocnemius muscles were almost the same in both test diet groups, but the SPI diet tended to decrease the calpain activity. Therefore, it is suggested that SPI diet might ameliorate the muscle atrophy through the reduction of the activities of calpain in gastrocnemius muscles and of creatine kinase in blood. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 112-117, 1999.

Key words : hypokinesia / hypodynamia, muscle atrophy, calpain, proteasome, soy protein isolate

微小重力環境（宇宙環境）では、生体はその身体に

様々な生理学的変調（体重の低下、骨の脱灰、骨格筋の萎縮、体液電解質の喪失、血液性状の変化、宇宙酔い、心血管系の変調など）の起こることが知られてい

*〒 422-8526 静岡市谷田 52-1

る。先に挙げた身体に起きる変調で、最も深刻な問題のひとつとして、体重の低下に伴う骨格筋の萎縮が挙げられる。しかし、このような現象はなにも宇宙環境に限った状況ではなく、似たような事実を我々の日常生活でも目撃することはできる。例えば、骨折などによる長期間のギプス固定、病気によるベッドレスト、老人の寝たきり状態などにおける筋肉は、健康な人の筋肉と比べると著しく減少しており、微小重力環境における筋萎縮と同様の現象が見られる¹⁻⁴⁾。

これまでに、我々は微小重力環境で引き起こされる骨格筋の萎縮について、模擬微小重力環境の実験モデルとして、ラットにジャケットを装着し、全身を宙吊り状態にする whole body suspension を用い、この条件下、さらにその後の回復における、生理学的変調と骨格筋の生化学的、組織学的変化の解析を行った⁵⁻⁷⁾。さらに、食餌成分、特にたん白質・アミノ酸栄養による骨格筋萎縮の予防と早期回復について検討してきた。その結果、回復期において食餌たん白質源として、それぞれカゼイン及び分離大豆たん白質 (SPI) を用いたところ、カゼインを摂取した群に対し、SPI を摂取した群で骨格筋の重量の回復が亢進しており、さらに、筋肉たん白質分解酵素 (カルパイン) の活性抑制などの効果を見出している。

そこで本研究では、宙吊り期において SPI 食摂取が骨格筋の萎縮に対して抑制効果が見られるか検討した。

方 法

これまで筋萎縮機構を調べる実験系としては、運動

制限、荷重制限、長期間の臥床、関節固定など⁸⁾ いろいろ行われており、さらに実験動物を用いたものでは、腱切り手術、除神経、宙吊りなどがある⁹⁻¹²⁾。本研究では、ラットを用いた実験モデルとして宙吊りを用い、骨格筋萎縮に対して栄養条件を絡め、萎縮機構と抑制効果について解析を行った。

具体的には、ラットにジャケットを装着し、全身を宙吊り状態にする whole body suspension を用いた。宙吊り用ジャケットは、ラットが足を伸ばして開いた状態でラットの体に合うように仕立て、ラットの背中でマジックテープで固定し、ラットがジャケットを簡単に脱いでしまわないように、ビニールチューブに通した針金でラットの首と後肢の付け根を締め付けないように固定した。背部の前後に付いているクリップにチェーンをつけ、代謝ケージで宙吊り状態にした。宙吊りラットの前脚は、餌や水が自由に摂取できるようになっているが、後肢は吊られていてどこにも着かないようにした。ラットは自由に食餌および水を摂取することができ、一方、後肢筋は宙吊り状態である。

供試動物として8週齢 Wistar 系雄ラットを用いた。ラットはそれぞれ2群に分け、ジャケットを装着して宙吊り状態で最長10日間飼育した。1群はたん白質源として20%カゼイン食を与え、もう1群には20% SPI 食を与えた (Table 1)。ラットは室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間照明 (07:00 ~ 19:00) となるように調節された動物飼育室において1匹ずつ飼育し、水および飼料は自由摂取とした。経日変化を見るため、0, 2, 6, 10日目に両群それぞれ血液および筋肉 (腓腹筋、ヒラメ筋) を採取し、筋肉は速やかに液体窒素

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	20% casein	20% soy protein isolate
		% of diet
Casein	20	—
Soy protein isolate	—	20
α -Corn starch	42	42
Sucrose	21	21
Fiber	5	5
Corn oil	5	5
Vitamin mixture	2	2
Mineral mixture	5	5
Choline-Cl	0.15	0.15

で凍結し、 -80°C で保存した。血清はアミノ酸濃度とコルチコステロン濃度、クレアチンキナーゼ活性の測定に用い、筋肉は重量（湿重量）を測定し、筋肉たん白質分解酵素としてカルパイン活性とプロテアソーム活性の測定に用いた。

結果と考察

模擬微小重力状態における骨格筋萎縮に対して、SPI食摂取による抑制効果について検討した。

ラットの体重は10日間の宙吊りにより、2日目以降速やかに減少した（Fig. 1）。このとき、カゼイン食群とSPI食群の間に有意な差は見られないものの、カゼイン食群では6日目から10日目にかけての体重の減少はほとんど見られなかったのに対し、SPI食群は6日目から10日目にかけても減少傾向が見られた。

次に、筋重量変化をFig. 2に示した。腓腹筋重量は宙吊りにより減少し、10日目では0日目と比べ重量は約10%減少していた。このとき、カゼイン食群とSPI食群の間に有意な差は見られないものの、カゼイン食群では10日目まで減少傾向が続くのに対し、SPI食群では6日目から10日目にかけては回復傾向が見られた。また、ヒラメ筋重量も宙吊りにより減少し、10日目では0日目と比べ重量は約40%減少していた。宙吊りによる重量の変化は、腓腹筋に比べヒラメ筋で顕著に見られ、このことはヒラメ筋が重力の有無により大きく

変動することから抗重力筋と呼ばれることを支持する結果と考えられる。しかし、ヒラメ筋では食餌たん白質の違いによる影響は見られなかった。

血中分岐鎖アミノ酸濃度の変動をFig. 3に示した。分岐鎖アミノ酸濃度はバリン、ロイシン、イソロイシン、いずれも同様の傾向を示した。骨格筋が萎縮している、つまり、分解が促進しているので血中の分岐鎖アミノ酸濃度は増加すると予測したが、2日目では0日目と比べ有意に減少し、以降も減少傾向が見られた。しかし、このとき食餌たん白質の違いによる影響は見られなかった。

血中コルチコステロン濃度は宙吊りによるストレスの指標として測定したが、宙吊りによる有意な変化は見られなかった（Fig. 4）。食餌たん白質の違いによる変化は、0日目から10日目までカゼイン食群に対し、SPI食群が有意差は見られないものの高い値を示した。

血中クレアチンキナーゼ活性の変動をFig. 5に示した。クレアチンキナーゼは骨格筋に非常に多く含まれる酵素であり、骨格筋組織が崩壊するとその血中濃度は著明に増加することから、骨格筋組織の崩壊の指標となる。宙吊りにより2日目以降、血中のクレアチンキナーゼ活性の増加が認められた。このことから骨格筋組織の崩壊が早い段階から起きていることが示唆された。また、カゼイン食群では2日目以降、10日目ま

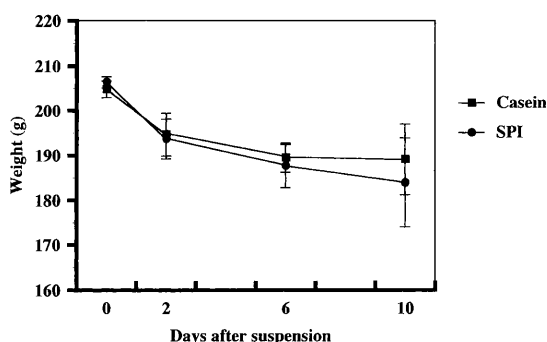


Fig. 1. Changes in body weight of rats during 10 days suspension hypokinesia / hypodynamia and effect of different dietary protein composition. Rats were divided into two groups : Casein diet and soy protein isolate diet (SPI). At the day indicated as 0, rats were put on a jacket, and then suspended during 10 days. At the day of 0, 2, 6 and 10, rats were sacrificed and samples were collected. Values are indicated as means \pm SEM.

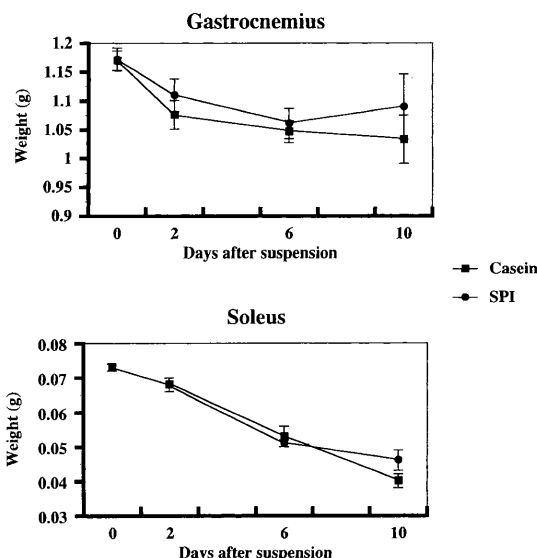
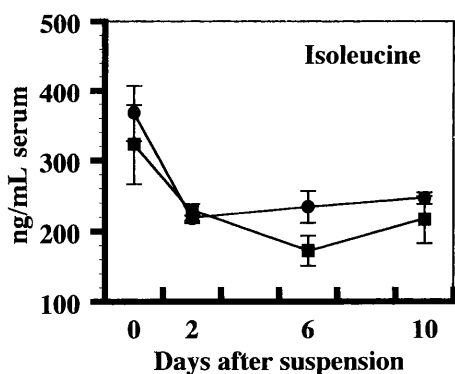
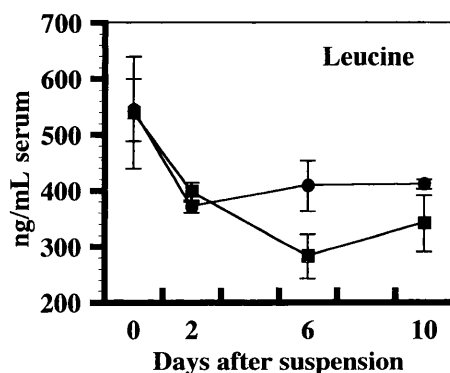
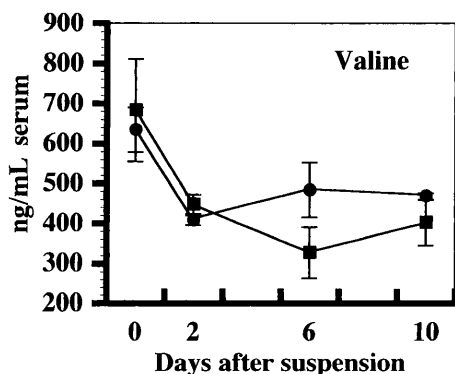


Fig. 2. Changes in skeletal muscle weights of rats during 10 days suspension hypokinesia / hypodynamia and effect of different dietary protein composition. Values are indicated as means \pm SEM.



■ Casein ● SPI

Fig. 3. Changes in serum branched-chain amino acid concentrations of rats during 10 days suspension hypokinesia / hypodynamia and effect of different dietary protein composition. Values are indicated as means \pm SEM.

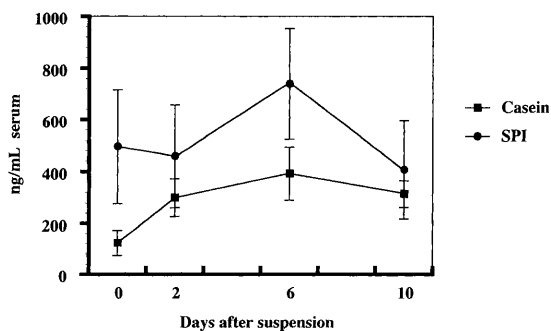


Fig. 4. Changes in serum corticosterone concentration of rats during 10 days suspension hypokinesia / hypodynamia and effect of different dietary protein composition. Values are indicated as means \pm SEM.

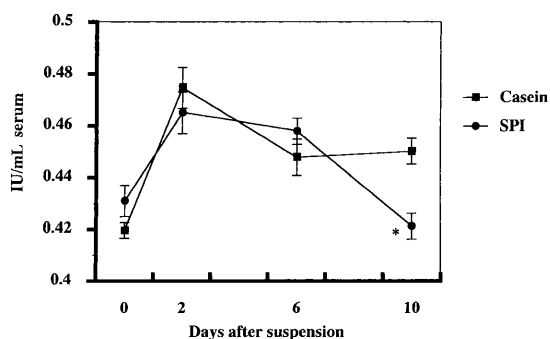


Fig. 5. Changes in serum creatine kinase activity of rats during 10 days suspension hypokinesia / hypodynamia and effect of different dietary protein composition. Values are indicated as means \pm SEM. * Significantly different from Casein diet group at the same day.

で高い活性が続くのに対し、SPI食群では10日目には0日目と同じくらいのレベルにまで活性が低下し、カゼイン食群に対し有意差が見られたことから、骨格筋

組織の崩壊が抑制されたのではないかと考えられた。

筋肉たん白質分解酵素としてカルパインおよびプロテアソームについてそれぞれ活性を測定した。まず、

腓腹筋カルパイン活性は、宙吊りにより2日目から有意に増加し、10日目まで高い活性が見られた (Fig. 6). このことからカルパインは宙吊りによる骨格筋のたん白質分解に初期の段階から関与している酵素であることが示唆された. また、10日目ではカゼイン食群に対し、SPI食群で有意差は見られないものの活性が低下していた. SPI食群の10日目において、腓腹筋で見られた重量回復および血中クレアチンキナーゼ活性の低下は、このカルパイン活性の低下が関与しているものと思われる.

次に、腓腹筋およびヒラメ筋プロテアソーム活性の変動を示した (Fig. 7). 腓腹筋のプロテアソーム活性は宙吊りおよび食餌たん白質の違いによる影響は認められなかった. このことからプロテアソームは腓腹筋の骨格筋萎縮にはほとんど関与していないものと思われる. 一方、ヒラメ筋のプロテアソーム活性は、カゼイン食群では0日目 비해2日目に有意に低下してお

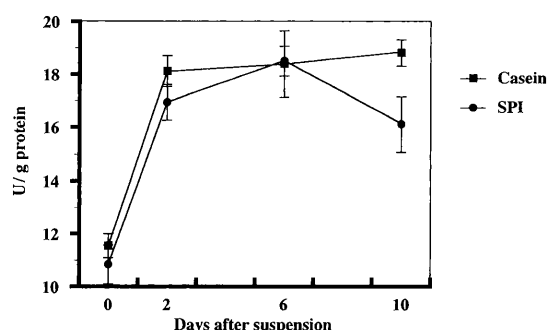


Fig. 6. Changes in calpain activity of gastrocnemius muscle in rats during 10 days suspension hypokinesia / hypodynamia and effect of different dietary protein composition. Values are indicated as means \pm SEM. The enzyme activity in the homogenate of gastrocnemius was measured and calculated as unit/g protein. One unit of calpain activity was an increase of 0.1 unit of absorbance at 366 nm for 30 min at 25°C.

り、SPI食群も低下する傾向が見られた. ヒラメ筋はプロテアソーム活性が2日目で低下しているにも関わらず、腓腹筋よりも重量低下の割合が大きいことから今後はさらに、萎縮に大きく関与していると思われるカルパイン活性などのより深い解析が必要であると考えられる.

以上の結果から、SPI食群における腓腹筋重量の萎縮軽減や血中クレアチンキナーゼ活性の上昇の抑制はカルパイン活性の低下によるものと思われ、SPIによるカルパイン活性の上昇抑制が示唆され、今後さらにその作用機序をより明確にする必要があると考えられた.

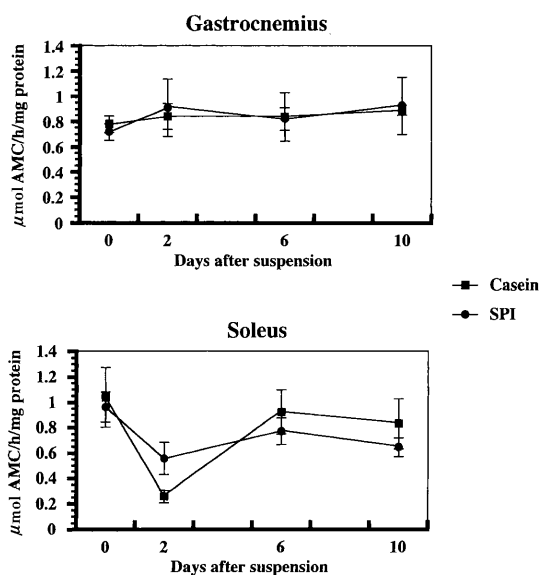


Fig. 7. Changes in proteasome activity of muscles in rats during 10 days suspension hypokinesia / hypodynamia and effect of different dietary protein composition. Values are indicated as means \pm SEM. The enzyme activity in the homogenate of muscles was measured and calculated as μ mol AMC/h/mg protein.

要 約

宇宙のような微小重力環境下では、生体に種々の栄養生理学的な変動の起こることが知られている. 特に栄養学上問題となるのは、体重の低下に伴う骨格筋の萎縮である. 本研究は、食餌たん白質源として分離大豆たん白質 (SPI) を用い、その体重の低下とともに起こる、顕著な骨格筋の萎縮に対する軽減効果について、カゼインと比較して検討した. 8週齢 Wistar 系雄ラットを用い、それぞれ2群に分け、ジャケットを装着して宙吊り状態で最長10日間飼育した. 1群はたん白質源として20%SPI食を与え、もう1群には20%カゼイン食を与えた. 体重は宙吊りにより減少したが両群

に有意な差は見られなかった。筋重量は腓腹筋、ヒラメ筋ともに宙吊りにより減少し、萎縮が見られた。このときヒラメ筋では両群に差は見られなかったが、腓腹筋で有意差は見られないものの SPI 食群で重量低下の抑制効果が見られた。血中クレアチンキナーゼ活性も SPI 食群がカゼイン食群に対し有意に低い値を示した。筋肉たん白質分解酵素は、腓腹筋のカルパインおよびプロテアソーム活性について両群に有意な差は見られなかったが、カルパイン活性は SPI 食群で低下する傾向が見られた。このことから、SPI 食による腓腹筋カルパイン活性の上昇抑制、および血中クレアチンキナーゼ活性の低下から、腓腹筋の萎縮軽減効果が示唆された。

文 献

- 1) Ilyina-Kakueva EI, Portugalov VV and Krivenkova NP (1976) : Space flight effects on the skeletal muscles of rats. *Aviat Space Environ Med*, **47**, 700-703.
- 2) Leonard JJ, Leach CS and Rambaut PC (1983) : Quantitation of tissue loss during prolonged space flight. *Am J Clin Nutr*, **38**, 667-679.
- 3) Rambaut PC, Smith MC Jr, Leach CS, Whedon GD and Reid J (1977) : Nutrition and responses to zero gravity. *Fed Proc*, **36**, 1678-1682.
- 4) Whedon GD, Lutwak L, Rambaut PC, Whittle MW, Reid J, Smith MC, Leach CS, Stadler CR and Sanford D D (1976) : Mineral and nitrogen balance study observations : the second manned Skylab mission. *Aviat Space Environ Med*, **47**, 391-396.
- 5) Yokogoshi H, Mita T, Takase S, Goda T and Hoshi T (1990) : Effects of suspension hypokinesia / hypodynamia on morphometric measurements of rat muscle fibers. *Agric Biol Chem*, **54**, 2127-2131.
- 6) Hayase K and Yokogoshi H (1991) : Effect of suspension hypokinesia / hypodynamia on tissue protein turnover in rats. *Jpn J Physiol*, **41**, 473-482.
- 7) Hayase K, Hashizume M, Odajima CH, Naganuma Y and Yokogoshi H (1998) : Role of protein synthesis on the changes in tissue protein metabolism by suspension hypokinesia and subsequent recovery in rats. *J Recent Res Develop in Agric Biol Chem*, **2**, 115-123.
- 8) MacDougall JD, Ward GR, Sale DG and Sutton JR (1977) : Biochemical adaptation of human skeletal muscle to heavy resistance training and immobilization. *J Appl Physiol : Respirat Environ Exercise Physiol*, **43**, 700-703.
- 9) Herbison GJ, Jaweed MM and Ditunno JF (1979) : Muscle atrophy in rats following denervation, casting, inflammation and tenotomy. *Arch Physiol Med Rehabil*, **60**, 401-404.
- 10) Engel WK, Brooke MH and Nelson PG (1966) : Histochemical studies of denervated or tenotomized cat muscle : illustrating difficulties in relating experimental animal conditions to human neuromuscular diseases. *Ann N Y Acad Sci*, **138**, 160-185.
- 11) Morey ER, Sabelman EE, Turner RT and Baylink DJ (1979) : A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist*, **22**, S23-S24.
- 12) Musacchia XJ, Deavers DR, Meininger GA and Davis TP (1980) : A model for hypokinesia : effects on muscle atrophy in the rat. *J Appl Physiol : Respirat Environ Exercise Physiol*, **48**, 479-486.