

大豆たん白質組成アミノ酸混合物摂取による模擬微小重力環境における 骨格筋萎縮軽減効果

茅田 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 Amino Acid Mixture Simulating the Composition of Soy Protein Isolate on Muscle Atrophy 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 a characteristic phenomenon accompanying the weightlessness. This study was conducted to investigate the ameliorating effect of muscle atrophy caused by suspension hypokinesia, using the amino acid mixtures simulating the composition of soy protein isolate (SPI) as the protein source as compared with simulating the composition of casein. Male Wistar strain rats (190 g) were divided into two groups, suspended with suspension harness, and were fed on a 20% SPI pattern amino acid mixture or a 20% casein pattern amino acid mixture for 10 days. The body weight of the suspended rats fed casein pattern diet and SPI pattern diet decreased similarly. The weights of the gastrocnemius and soleus muscles were decreased by suspension hypokinesia, however the degree of the decrease of the weight of muscles, especially soleus muscle, of rats fed SPI pattern diet was smaller than that of rats fed casein pattern diet. Serum N^ε-methylhistidine concentration was significantly lower in the rats fed SPI pattern diet than that in the rats fed casein pattern diet. Similarly, the activities of muscle protein-degrading enzymes such as calpain and proteasome were significantly lower in the rats fed SPI pattern diet than those in the rats fed casein pattern diet. Therefore, it is suggested that SPI pattern amino acid mixture caused to reduce the proteolysis of skeletal muscles through the reduction of the activities of calpain and proteasome, in consequence to ameliorate the muscle atrophy. *Soy Protein Research, Japan* 4, 70-76, 2001.

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

*〒 422-8526 静岡市谷田 52-1

微小重力環境（宇宙環境）では、生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る。

先に挙げた身体に起きる変調で、最も深刻な問題の一つとして、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ではその骨格筋は、健康な人の骨格筋と比べると著しく減少しており、微小重力環境における骨格筋の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、ラットを用いた模擬微小重力環境の実験モデルとして宙吊りを用い、この条件下またはその後の回復における、生理学的変調と生化学的、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、宙吊り期および回復期において食餌たん白質源として、カゼインまたは分離大豆たん白質（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萎縮軽減や、萎縮筋の回復が亢進しており、さらに、筋肉たん白質分解酵素の活性抑制などの効果を見出している⁸⁾。

しかし、この効果はSPIの何によってもたらされるかは明らかではない。そこで本研究では、SPIと同様のアミノ酸組成のアミノ酸混合物をたん白質源として用い、SPIを摂取した時と同様の効果が見られるか検討した。

方 法

これまで骨格筋の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⁹⁾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¹⁰⁻¹³⁾。本研究では、ラットを用いた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、ラットの背中マッドテープで固定し、ラットがジャケットを簡単に脱いでしまわないように、ビニールチューブを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。

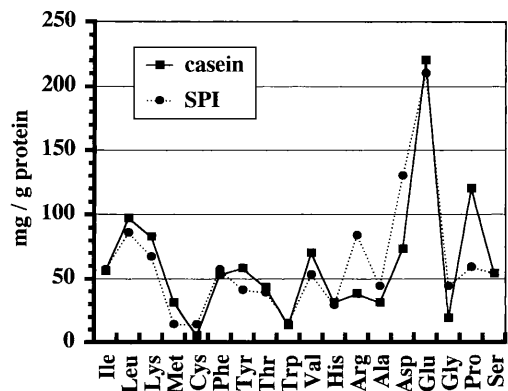


Fig. 1. Amino acid concentration in casein or soy protein isolate (SPI).

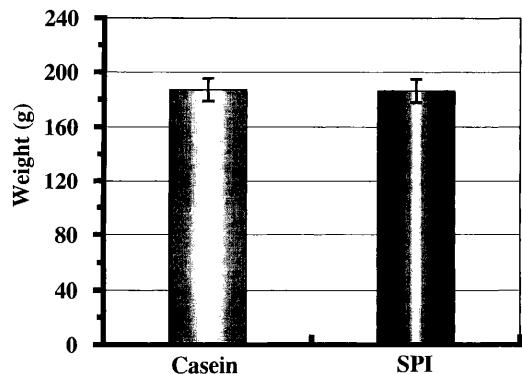


Fig. 2. Body weight of rats after 10 days suspension hypokinesia/hypodynamia. Values represent means $\pm$ SEM, $n = 6$. Student's t -test was performed. It was not significant in this level ($P < 0.05$).

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 Wistar 系雄ラット（190 g）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10日間飼育した。1群はたん白質源としてカゼインと同じアミノ酸組成のアミノ酸混合物（Casein 群）、もう1群にはSPIと同様のアミノ酸組成のアミノ酸混合物（SPI 群）をそれぞれ20%与えた。カゼインおよびSPIのアミノ酸組成をFig. 1に示した。

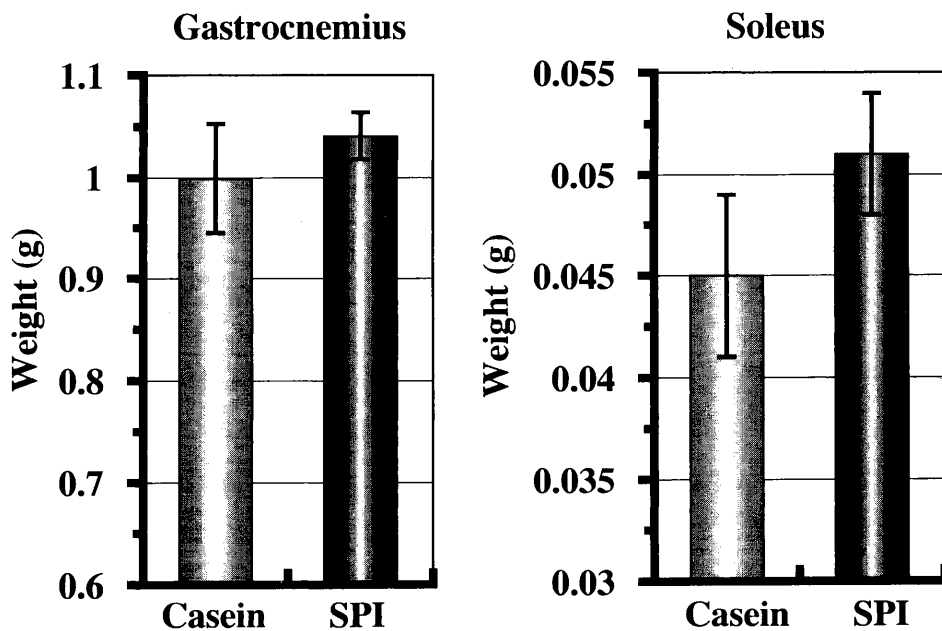


Fig. 3. Skeletal muscle weight of rats after 10 days suspension hypokinesia/hypodynamia. Values represent means $\pm$ SEM, $n=6$. Student's t -test was performed. It was not significant in this level ($P < 0.05$).

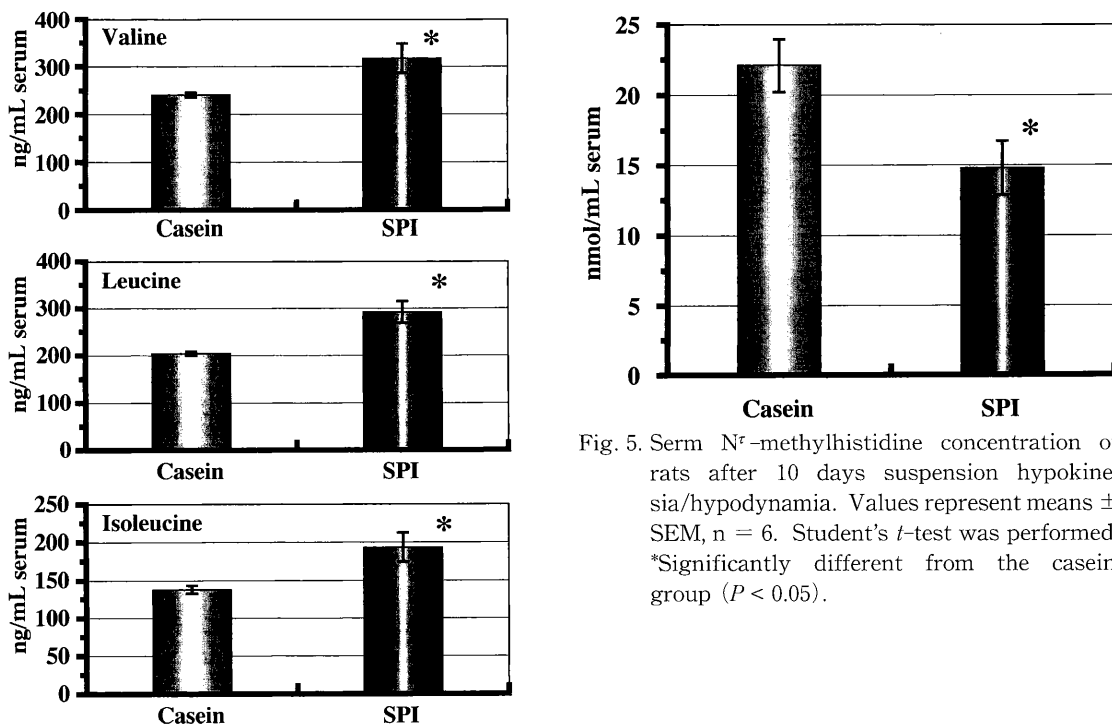


Fig. 4. Serum branched-chain amino acid concentration of rats after 10 days suspension hypokinesia/hypodynamia. Values represent means $\pm$ SEM, $n = 6$. Student's t -test was performed. *Significantly different from the casein group ($P < 0.05$).

Fig. 5. Serum N ϵ -methylhistidine concentration of rats after 10 days suspension hypokinesia/hypodynamia. Values represent means $\pm$ SEM, $n = 6$. Student's t -test was performed. *Significantly different from the casein group ($P < 0.05$).

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のステンレスケージで1匹ずつ飼育し, 水および飼料は自由摂取とした. 試験最終日の10日目に血液および筋肉(腓腹筋, ヒラメ筋)を採取した. 筋肉は重量(湿重量)を測定した後, 速やかに液体窒素で凍結し, 分析時まで -80°C で保存した. 血清はアミノ酸濃度の測定に用い, 筋肉はたん白質分解酵素としてカルパイン, プロテアソーム, カテプシン B + L およびカテプシン H の活性測定に用いた.

結果と考察

ラットの体重は10日間の宙吊りにより速やかに減少した. しかし, このとき Casein 群と SPI 群の間に有意な差は見られなかった (Fig. 2).

次に, 骨格筋重量を Fig. 3 に示した. 腓腹筋重量は Casein 群と SPI 群の間に有意な差は見られなかった. また, ヒラメ筋重量も両群間に有意な差は見られなかった. しかし, 腓腹筋およびヒラメ筋共に SPI 群で高い値を示し, 特に宙吊りによって大きく萎縮するヒラメ筋では SPI 群でより顕著に高い値を示す傾向が見られた.

血中分岐鎖アミノ酸濃度を Fig. 4 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

ずれのアミノ酸も SPI 群で有意に高い濃度を示した. また, 血中 N $^{\epsilon}$ -メチルヒスチジン濃度は SPI 群で有意に低い濃度を示した (Fig. 5). N $^{\epsilon}$ -メチルヒスチジンは, そのほとんどが骨格筋由来のアミノ酸であり, 生体内では再利用されることなく尿中に排泄されることから, 血中濃度や尿中排泄量は骨格筋の分解の指標となる. 分岐鎖アミノ酸は骨格筋の構成たん白質に多く含まれており, SPI 群で有意に高い濃度を示したことから, 骨格筋の分解によりその濃度が増加したのではないかと考えられたが, N $^{\epsilon}$ -メチルヒスチジン濃度が SPI 群で有意に低い濃度を示したことから, 骨格筋の分解系は SPI 群で抑制されていることが示唆された.

骨格筋たん白質分解酵素としてカルパイン, プロテアソーム, カテプシン B+L およびカテプシン H についてそれぞれ活性を測定した. カルパイン活性は腓腹筋, ヒラメ筋共に SPI 群で低い値を示し, 腓腹筋では有意に低い活性であった (Fig. 6). プロテアソーム活性はカルパイン活性と同様に腓腹筋, ヒラメ筋共に SPI 群で低い値を示した. このとき, ヒラメ筋では SPI 群で有意に低い活性であった (Fig. 7). カテプシン B + L 活性, およびカテプシン H 活性は腓腹筋, ヒラメ筋共に同様の傾向を示し, Casein 群と SPI 群との間に有意な差は見られなかった (Figs. 8, 9).

以上の結果から, SPI 群における骨格筋萎縮の軽減効果は血中 N $^{\epsilon}$ -メチルヒスチジン濃度が低値であつ

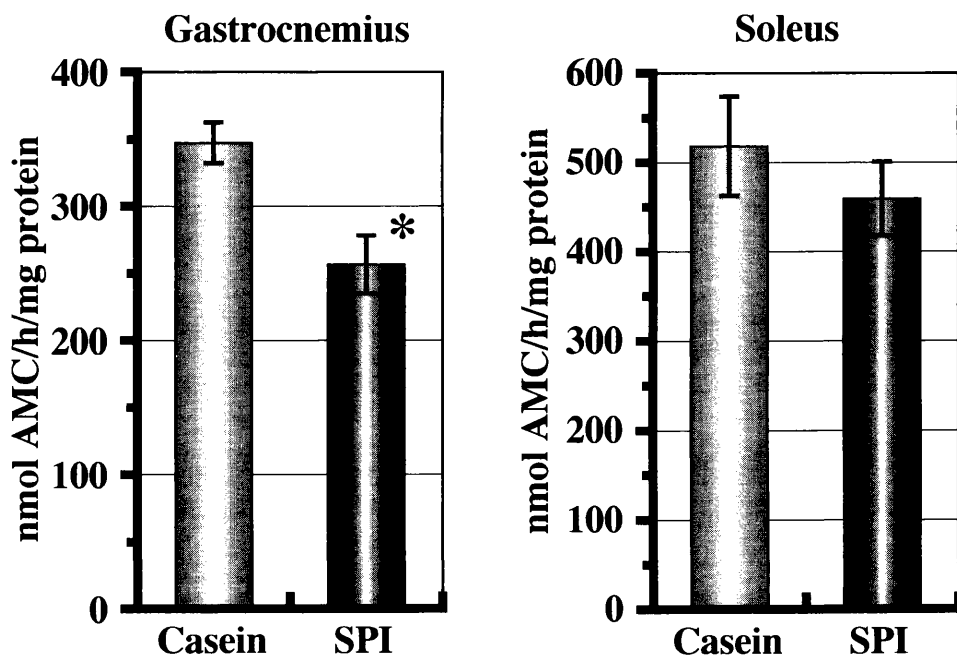


Fig. 6. Skeletal muscles calpain activity in rats after 10 days suspension hypokinesia/hypodynamia. Values represent means $\pm$ SEM, $n = 6$. Student's t -test was performed. *Significantly different from the casein group ($P < 0.05$).

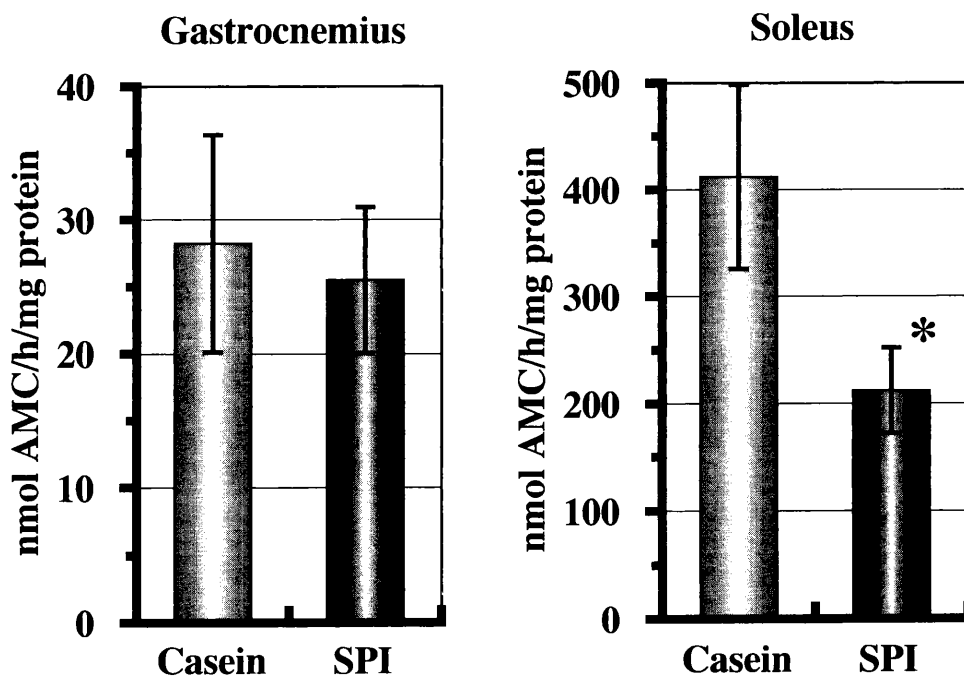


Fig. 7. Skeletal muscles proteasome activity in rats after 10 days suspension hypokinesia/hypodynamia. Values represent means $\pm$ SEM, $n = 6$. Student's t -test was performed. *Significantly different from the casein group ($P < 0.05$).

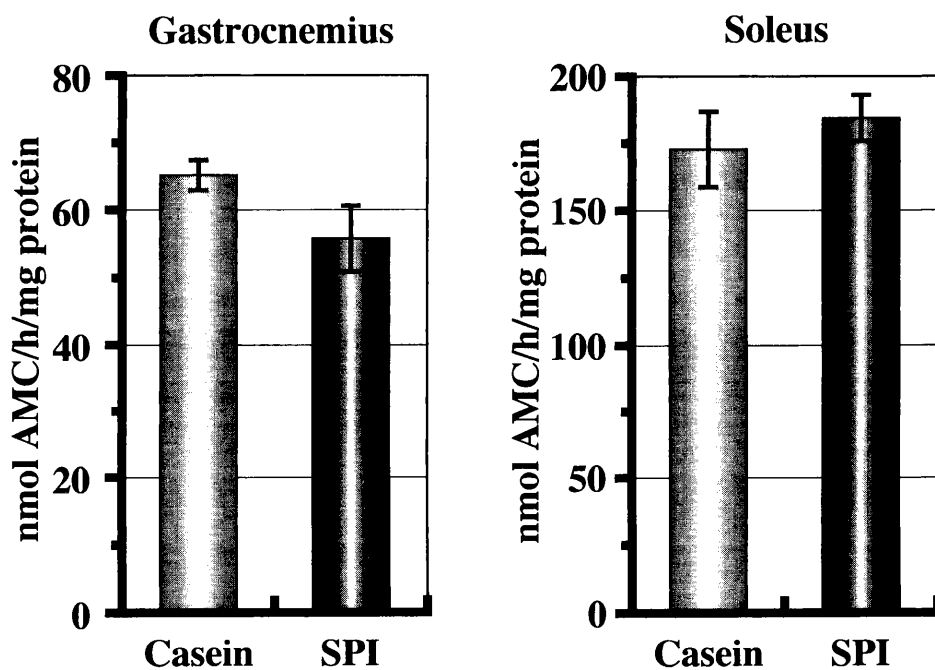


Fig. 8. Skeletal muscles cathepsin B + L activity in rats after 10 days suspension hypokinesia/hypodynamia. Values represent means $\pm$ SEM, $n = 6$. Student's t -test was performed. It was not significant in this level ($P < 0.05$).

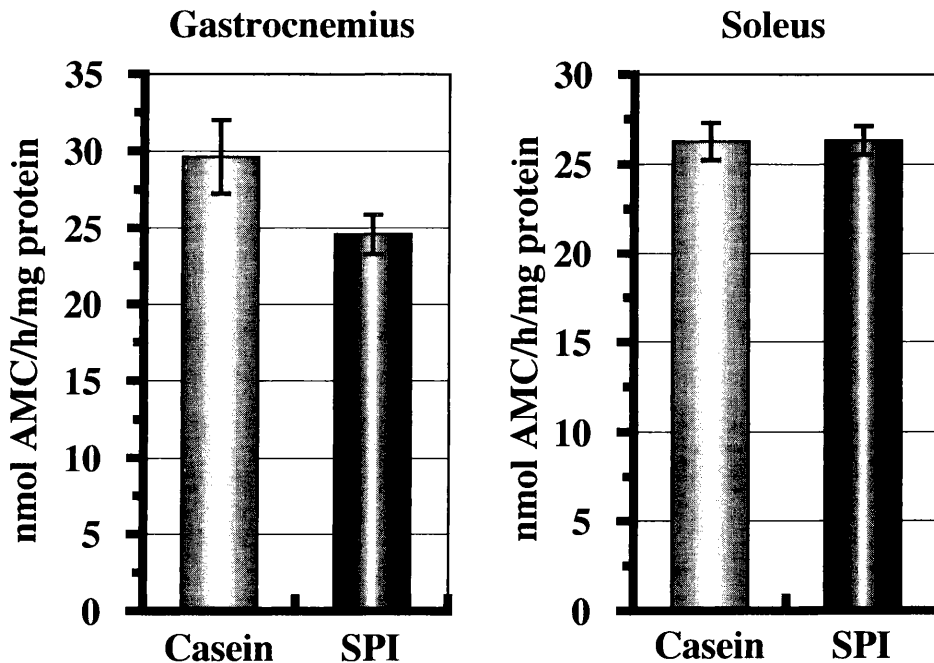


Fig. 9. Skeletal muscles cathepsin H activity in rats after 10 days suspension hypokinesia/hypodynamia. Values represent means $\pm$ SEM, $n = 6$. Student's t -test was performed. It was not significant in this level ($P > 0.05$).

たこと、カルパインおよびプロテアソームの活性上昇抑制が見られたことなどから骨格筋たん白質の分解系の抑制により引き起こされていることが示唆された。カゼインおよびSPIのアミノ酸レベルでの違いを見ると、システイン、アルギニン、アスパラギン、グリシ

ンがSPIで特に多く、中でもシステインには骨格筋の萎縮に対して抑制効果があるとの報告もあり、SPIによる骨格筋の萎縮軽減効果もシステインにより引き起こされた可能性が示唆された。今後さらにその作用機序がより明確にされる必要があると思われる。

要 約

これまでに我々はラットを用いた模擬微小重力環境（宇宙環境）の実験モデルとして宙吊りを用い、その栄養生理学的変調について解析を行ってきた。その結果、食餌たん白質源としてカゼインまたは分離大豆たん白質（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萎縮軽減や、萎縮筋の回復亢進が見られ、さらに骨格筋におけるたん白質分解酵素の活性抑制などの効果を見出している。しかし、この効果がSPIの何によってもたらされるかは明らかではない。本研究はSPIと同じアミノ酸組成のアミノ酸混合物をたん白質源として用い、アミノ酸レベルでの効果について検討した。Wistar系雄性ラットを2群に分け、両群ともジャケットを装着して懸垂状態で10日間飼育した。餌はカゼインと同じアミノ酸組成のアミノ酸混合物、およびSPIと同じアミノ酸組成のアミノ酸混合物を用い、それぞれの群に20%ずつ与えた。試験最終日に骨格筋（腓腹筋、ヒラメ筋）および血液を採取した。骨格筋はたん白質分解酵素としてカルパイン、カテプシンB、LおよびH、プロテアソームの活性測定に用い、血清はアミノ酸濃度を測定した。筋重量は腓腹筋、ヒラメ筋ともに有意差は見られなかったものの、ヒラメ筋ではSPI群で高くなる傾向が見られた。たん白質分解酵素については、カテプシン系は両群で有意な変化は見られなかったが、カルパインはSPI群で活性が低くなる傾向が見られ、腓腹筋では有意差が見られた。また、

プロテアソーム活性は腓腹筋では有意な差が見られなかったが、ヒラメ筋はSPI群で有意に低い活性であった。血清中のN^ε-メチルヒスチジン濃度を測定したところ、SPI群で有意に低い濃度であった。このことから、SPIの骨格筋萎縮軽減効果はアミノ酸レベルも見られ、これはたん白質分解酵素の活性抑制によるたん白質分解系の抑制によることが示唆された。

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 JI, 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 C, Stadler CR and Sanford DD (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 Agric Biol Chem*, **2**, 115-123.
- 8) 刃田 司, 横越英彦 (1999) : 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. 大豆たん白質研究, **2**, 112-117.
- 9) 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*, **43**, 700-703.
- 10) Herbison GJ, Jaweed MM and Ditunno JF (1979) : Muscle atrophy in rats following denervation, casting, inflammation, and tenotomy. *Arch Phys Med Rehabil*, **60**, 401-404.
- 11) 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.
- 12) Morey ER, Sabelman EE, Turner RT and Baylink DJ (1979): A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist*, **22**, S23-24.
- 13) Musacchia XJ, Deavers DR, Meininger GA and Davis TP (1980) : A model for hypokinesia : effects on muscle atrophy in the rat. *J Appl Physiol*, **48**, 479-486.