

## 筋たん白質分解・制御因子としての大豆たん白質の働き

二川 健\*・平坂勝也・不老地治美・大西ゆう子・岸 恭一

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

### Effects of Soy Protein or Its Derived Peptides on Muscle Protein Degradation

Takeshi NIKAWA, Katsuya HIRASAKA, Harumi FUROUCHI, Yuko OHNISHI  
and Kyoichi KISHI

Institute of Health Bioscience, The University of Tokushima Graduate School,  
Tokushima 770-8503

#### ABSTRACT

We have previously demonstrated that muscle proteases and the related molecules play important roles in disorders of muscle function. For example, rats subjected to an acute running exercise have significantly high calpain activity in gastrocnemius muscle. Rat gastrocnemius muscle atrophied by spaceflight or tail-suspension is specifically sensitive to the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. In this study, we examined the effects of soy protein isolate (SPI) or soy protein-derived peptides on these proteolytic pathways. SPI diet prevented exercise-induced protein degradation in skeletal muscle possibly through inhibition of calpain-mediated proteolysis, as compared with the casein diet. Soy protein-derived peptides inhibited protein-ubiquitination caused by oxidative stress in mouse myoblastic cells. Our results suggest that soy protein may contain bioactive factors for regulating proteolysis in skeletal muscle. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 69-74, 2004.

Key words: soy protein isolate, soy protein-derived peptides, calpain, ubiquitin, skeletal muscle

骨格筋には、大きく3つのたん白質分解経路：ユビキチン-プロテアソーム系、カルパイン系とリソソーム系が存在する。最近、これらたん白質分解経路が、急性運動後の筋障害や寝たきりなどによる筋萎縮に重要な働きをしていることがわかってきた。例えば、急

性運動直後や尾部懸垂ラットの腓腹筋には、カルパイン活性とプロテアソーム活性が上昇する<sup>1,2)</sup>。それゆえ、これら上昇したたん白質分解酵素（プロテアーゼ）の活性を食事により抑制することができれば筋萎縮や筋障害の予防に通じるはずである。今回は、大豆たん白質食や大豆たん白質由来ペプチドの筋たん白質分解経路への作用を解析した。

\*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

## 方 法

### 動物および運動負荷と尾部懸垂

Wistarラット（5週令）に20%のカゼインおよび分離大豆たん白質（SPI）をそれぞれ4週間与えた。期間中は、食餌および水は自由摂取とした。その後、これらラットに小動物用トレッドミル（Quinton model 42-15）による急性運動を負荷した。ベルトスピードを20 m/min、傾斜を10度に設定し、総運動量が80 kg・mになるまで走らせた。一部のラットは、実験食の開始と同時に尾部を懸垂し、後肢筋を萎縮させた。

### 細胞培養と大豆ペプチド処理

マウス由来筋芽細胞（C2C12細胞）は37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で、増殖培地 [100 mg/mLストレプトマイシン、100 IU/mLペニシリンGと10%牛胎児血清（FCS）を含むDulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）] で維持された。60%コンフルエントのC2C12細胞に1～10 mg/mLの大豆ペプチドを2種（ハイニユートR、D3、Table 1参照）を処理し、3時間培養した。その後、0.5 mMの過酸化水素を1時間処理し、筋たん白質のユビキチン化を誘導した。ユビキチン化したたん白質の分解を阻害するために、大豆ペプチド処理と同時にプロテアソーム阻害剤（100 nMエボキソマイシン）を投与した。

### ウェスタンブロット法

20 µg量のたん白質をSDS化後、8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲル中のたん白質はセミドライプロット装置（ATTO）を用いてPolyvinylidene difluoride（PVDF）膜（Bio-Rad）に転写した。転写後、PVDF膜を4%精製ミルクカゼインで1時間ブロッキングし、0.05% Tween-20を含むPBS（PBS-T）で洗浄した。次に膜を希釈した一次抗体 [抗ミオシン抗体（Sigma）、抗ユビキチン抗体、抗β-actin抗体（Oncogene Research Products）] と室温で1時間反応させた。PBS-Tで洗浄後、希釈した二次抗体（抗ウサギIgG抗体）と室温でさらに1時間反応させた。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence検出システム（Amersham, Little Chalfont, UK）を用いて抗体と反応したたん白質を検出した。

### プロテアーゼ活性の測定

カルパインとその内在性阻害たん白質であるカルバスタチン活性は、腓腹筋ホモジネートを高速液体クロマトグラフィーでm-カルパイン、μ-カルパインとカルバスタチンに部分精製した後、筋肉FITCでラベルしたカゼインを基質として測定した<sup>1)</sup>。プロテアソーム

活性とカテプシン群活性は池本らが既に報告した方法で測定した<sup>1)</sup>。

## 結果と考察

### 急性運動負荷によるカルパイン・クレアチニン活性の上昇とそのSPIによる抑制

急性運動後の筋肉内カルパイン活性と血中クレアチンキナーゼ活性の変動が非常に相関していることをFig. 1に示す。さらに、腓腹筋内のプロテアーゼ活性を解析すると、急性運動によりμ-カルパインとm-カルパインともに急性運動により著明に上昇するのに対し、プロテアソームやカテプシンB+L活性は急性運動により変化しないことがわかった（Fig. 2）。血中クレアチンキナーゼは運動による筋障害の指標の一つであるので、急性運動による筋障害には筋肉内のカルパインが重要な働きをしていることが示唆された。

Table 1. Soy protein peptides “High-nute D3 and R”

| Characteristics                | High-nute D3  | High-nute R |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| Protein contents (%)           | 90.6          | 91.8        |
| Protein chemistry              |               |             |
| solubility with 15% TCA (%)    | 98.8          | 99.9        |
| mean AA residues of peptides   | 5 6           | 3 4         |
| content of free amino acid (%) | 2以下           | 10 14       |
| Additional contents            | no            | no          |
| Features of solution           |               |             |
| pH                             | 6.3           | 6.8         |
| color                          | clear         | clear       |
| color at acidic conditions     | slight cloudy | clear       |

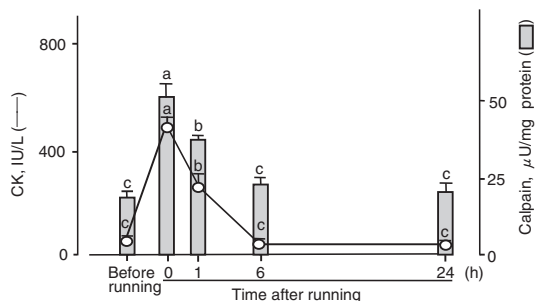


Fig. 1. Plasma CK and muscle calpain activities in rat subjected to an acute running exercise. Rats fed a casein or soy protein isolate diet for 4 wk were subjected to the running exercise at a fixed work of 80 kg・m. Blood and gastrocnemius muscle were collected at the indicated times. Values are mean ± SEM, n=5. Means with different superscripts are significantly different, *P*<0.05.

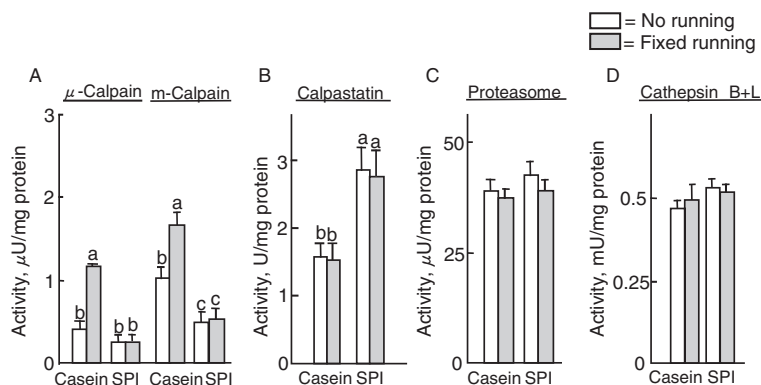


Fig. 2. Effect of SPI diet on muscle protease activities. Rats fed a casein or soy protein isolate diet for 4 wk were subjected to the running exercise at a fixed work of 80 kg·m. Gastrocnemius muscle was collected after the running exercise. Values are mean  $\pm$  SEM, n=5. Means with different superscripts are significantly different,  $P<0.05$ .

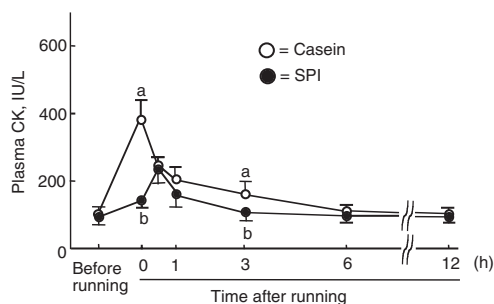


Fig. 3. Effect of SPI diet on plasma CK activity. Rats fed a casein or soy protein isolate diet for 4 wk were subjected to the running exercise at a fixed work of 80 kg·m. Blood was collected at the indicated times. Values are mean  $\pm$  SEM, n=5. Means with different superscripts are significantly different,  $P<0.05$ .

カゼイン食とSPI食を4週間与えたラットに同様の急性運動を負荷し、その後の筋肉内プロテアーゼ活性と血中クレアチンキナーゼ活性の変動を比較した。興味深いことに、SPI食を与えたラットは、カゼイン食群と比較し運動直後の筋肉内プロテアーゼ活性の上昇を認めなかった (Fig. 2)。血中クレアチンキナーゼ活性の上昇もSPI食群ではその上昇が軽度でそのピーク値に達する時間も遅延した (Fig. 3)。筋障害のもう一つのマーカーとして筋肉内のミオシン重鎖の分解（フラグメンテーション）を解析した (Fig. 4)。カゼイン食群で運動直後の腓腹筋内にミオシン重鎖の分解産物が多く検出されるのに対し、SPI食群ではミオシン重鎖の分解はほとんど起こらなかった。以上の結果は、大豆たん白質は急性運動後のカルパイン活性の上昇を抑制し、それによる筋障害を抑制しうることが示唆された。

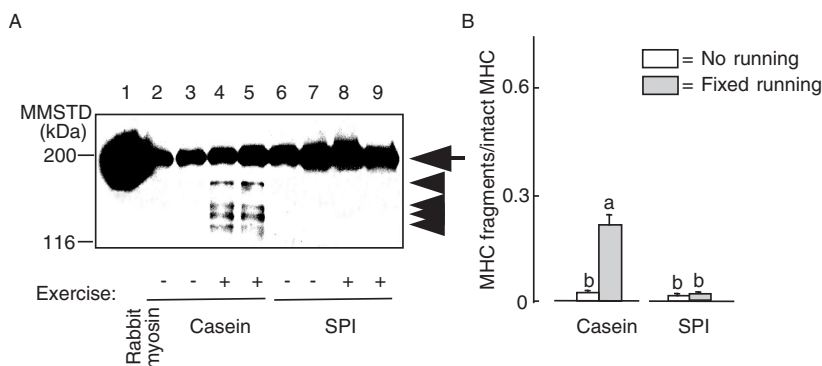


Fig. 4. Effect of SPI diet on fragmentation of SPI. (A) Rats fed a casein or soy protein isolate diet for 4 wk were applied to the running exercise at a fixed work of 80 kg·m. Proteins (40 mg/lane) in the soluble fractions of gastrocnemius muscle in rats fed were subjected to SDS-PAGE. (B) Signals were quantitated by densitometric analysis. Values are mean  $\pm$  SEM, n=5. Means with different superscripts are significantly different,  $P<0.05$ .

なぜ大豆たん白質食が運動直後のカルパイン活性の上昇を抑制できたかについては私たちは次のような知見を得ている。カルパイン活性の測定と同時にその内在性阻害たん白質であるカルバスタチンの阻害活性が、SPI食を与えたラット群で著明に高かった (Fig. 2)。大豆たん白質食は筋肉内のカルパイン阻害物質の発現を上昇させ、運動によるカルパインの活性化を抑制している可能性が示唆された。今後、大豆たん白質のカルバスタチンの発現調節などを解析する必要がある。

#### Unloadingによる筋萎縮に関与するプロテアーゼと大豆たん白質の効果

急性運動とは逆に、筋肉の活動が低下する状態 (Unloading) においても筋たん白質の分解は亢進し筋肉は萎縮する。実際、Unloadingの典型例である宇宙フライトや尾部懸垂では、先に示した急性運動によるものとはほぼ同様のミオシン重鎖のフラグメンテーションが観察できる (Fig. 5)。そこで、急性運動時と同様に、尾部懸垂に供したラットにカゼイン食とSPI食を与えUnloadingによる筋たん白質の分解および筋萎縮が抑制されないかを検討した。予想に反し、SPI食はカゼイン食と比較しほとんど阻害効果は見られなかった (データは示さず)。

今回のSPI食に抑制効果が見られなかったことの原因を探るために、筋肉内のプロテアーゼの発現を解析すると、Unloadingによる筋たん白質の分解亢進の場合

はカルパインの発現上昇はほとんどなかった (Fig. 6)。逆に、カテプシンLやプロテアソーム関連分子の発現上昇が著明であった (Fig. 6)。さらに、腓腹筋のユビキチン化たん白質をイムノブロット法で解析すると、Unloading状態に供したラット群にのみ著明なユビキチン化たん白質の蓄積が見られた (Fig. 7)。

カテプシンLやカルパインの阻害剤であるE-64を尾部懸垂ラットに投与してもミオシン重鎖のフラグメンテーションは抑制されなかった (データを示さず) ことより、Unloadingによる筋たん白質分解には、カルパインではなくユビキチン-プロテアソーム系が重要な働きをしていることが示唆された。

#### ユビキチン-プロテアソームたん白質分解系への大豆たん白質由来ペプチドの効果

ユビキチン-プロテアソームたん白質分解系は、まずユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) とユビキチン連結酵素 (E3) の酵素群が標的と

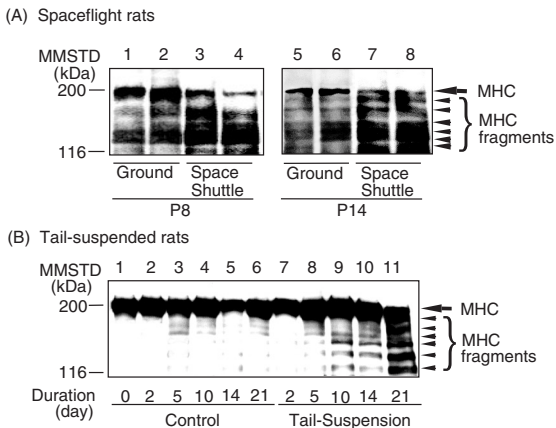


Fig. 5. Accumulation of MHC degradation fragments in gastrocnemius muscle of spaceflight (A) or tail-suspended rats (B). Proteins (40 mg/lane) in the soluble fractions of gastrocnemius muscle in spaceflight or tail-suspended rats were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nylon membrane. Intact MHC (arrows) and its degradation fragments (closed triangles) were detected by Western blot analysis.

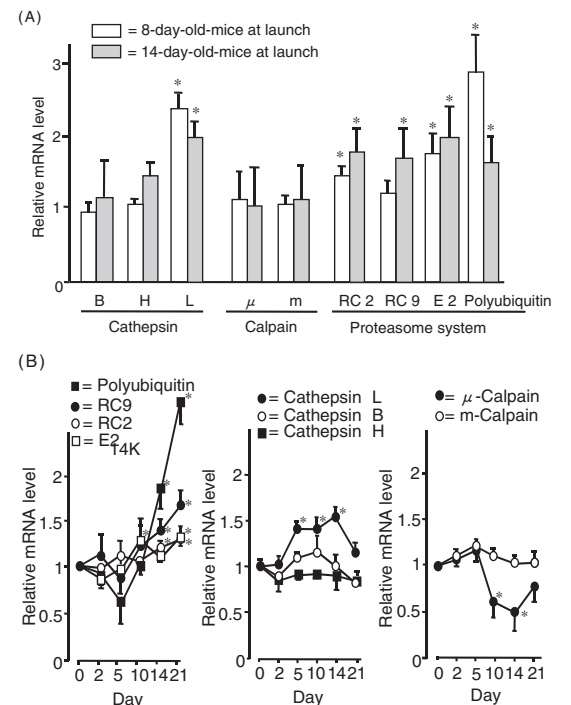


Fig. 6. Protease mRNA expression in gastrocnemius muscle of spaceflight (A) and tail-suspended rats (B). Total RNA (1  $\mu$ g) extracted from the indicated muscles was subjected to a semiquantitative RT-PCR analysis. mRNA concentrations were determined by calculating the ratio of the signal of the target cDNA to that of an internal standard  $\beta$ -actin cDNA. Values are mean  $\pm$  SD, n=6. \*indicates significantly different,  $P<0.05$ .

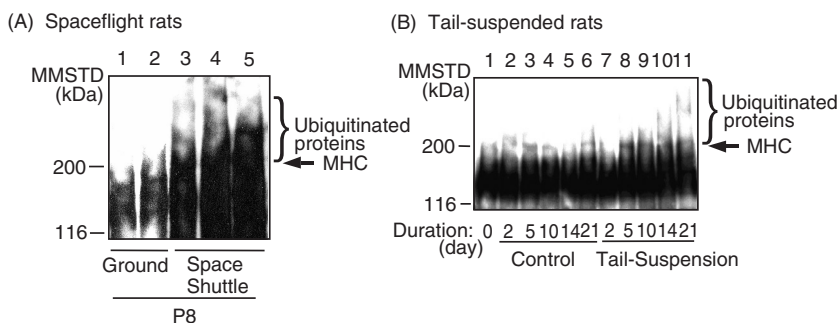


Fig. 7. Accumulation of ubiquitinated proteins in gastrocnemius muscle of spaceflight (A) or tail-suspended rats (B). Proteins (40 mg/lane) in the soluble fractions of gastrocnemius muscle in spaceflight or tail-suspended rats were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nylon membrane. Ubiquitinated proteins were detected by Western blot analysis.

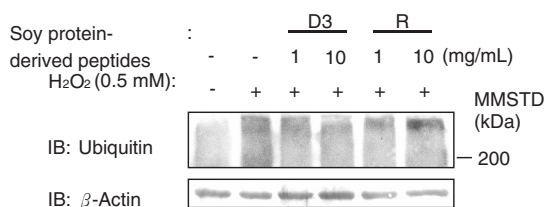


Fig. 8. Effect of soy protein-derived peptides on ubiquitination caused by oxidative stress. Whole proteins (40 mg/lane) of C2C12 cells were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nylon membrane. Ubiquitinated proteins were detected by Western blot analysis.

なるたん白質にユビキチンを結合させる。その後、そのユビキチン化されたたん白質は26Sプロテアソームにより分解される<sup>3)</sup>。近年、ユビキチン連結酵素がこのたん白質分解系の律速酵素であることがわかってきた<sup>3)</sup>。そこで、ユビキチン連結酵素を阻害する方法を

探った。ユビキチンリガーゼは分解すべき基質を選別（基質の立体構造などを認識）するため一般的に巨大たん白質である。それゆえ、基質と良く似た物質はユビキチン化活性を競合阻害できるのではないかと考えた。おそらく、SPI食を経口投与した場合は体内にはアミノ酸として吸収されるため、ユビキチン化の阻害効果は消失したのではないかと考えられた。

平均ペプチド鎖長の異なる2種類の大豆たん白質由来のペプチド群を筋芽細胞に処理すると、平均ペプチド鎖長の長いペプチド群で酸化ストレスによるたん白質のユビキチン化を濃度依存的に抑制した (Fig. 8)。平均ペプチド鎖の短いペプチド群に抑制効果がなかったことは、ユビキチンリガーゼの抑制にはある程度の立体構造が必要であることを示唆した。

今回の私たちの研究より、大豆たん白質は筋たん白質代謝に重要なたん白質分解酵素の活性を制御しうる重要な成分を含んでいることが示唆された。

## 要 約

私たちは、運動後の筋障害やUnloadingによる筋萎縮にカルパイン系とユビキチン-プロテアソーム系のたん白質分解経路がそれぞれ重要な働きをしていることを明らかにした。本研究では、大豆たん白質またはそれ由来のペプチドがこれらたん白質分解酵素に与える影響を解析した。大豆たん白質食は、カゼイン食と比較して運動障害によるカルパイン活性の上昇をより強く抑制した。その効果は内在性阻害たん白質であるカルパインの発現量を増大させたためであると考えられた。一方、Unloadingによる筋たん白質のユビキチン化に大豆たん白質食はほとんど影響を与えなかったが、筋芽細胞に前処理した大豆たん白質由来ペプチドは酸化ストレスによるたん白質のユビキチン化を抑制できた。以上のことから、大豆たん白質は筋たん白質代謝に重要なたん白質分解関連酵素の活性を制御しうる重要な成分を含んでいることが示唆された。

## 文

## 献

- 1) Nikawa T, Ikemoto M, Sakai T, Kano M, Kitano T, Kawahara T, Teshima S, Rokutan K and Kishi K (2002): Effects of a soy protein diet on exercise-induced muscle protein catabolism in rats. *Nutrition*, **18**, 490-495.
- 2) Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin KM, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K and Kishi K (2001): Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J*, **15**, 1279-1281.
- 3) 田中啓二, 大隈良典編 (2001): タンパク質分解の最前線2001. 実験医学, 羊土社, 東京.