

大豆たん白質食の抗筋萎縮効果 —培養細胞実験からヒト介入試験まで—

二川 健*

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学

Anti-Muscle Atrophy Action of Dietary Soy Proteins

Takeshi NIKAWA*

Department of Nutritional Physiology, Institute of Health Biology,
The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

Background: Unloading stress induces skeletal muscle atrophy. We have reported that Cbl-b ubiquitin ligase is a master regulator of unloading-associated muscle atrophy. The present study was designed to elucidate whether dietary soy glycinin protein prevents denervation-mediated muscle atrophy, based on the presence of peptides inhibiting Cbl-b ubiquitin ligase in soy glycinin protein. **Methods** Mice were fed either 20% casein diet, 20% soy protein isolate diet, 10% glycinin diet containing 10% casein, or 20% glycinin diet. One week later, the right sciatic nerve was cut. The wet weight, cross sectional area (CSA), IGF-1 signaling, and atrogene expression in hindlimb muscles were examined at 1, 3, 3.5, or 4 days after denervation. **Results:** The 20% soy glycinin diet significantly prevented denervation-induced decreases in muscle wet weight and myofiber CSA. Furthermore, dietary soy protein inhibited denervation-induced ubiquitination and degradation of IRS-1 in the tibialis anterior muscle. Dietary soy glycinin partially suppressed the denervation-mediated expression of atrogenes, such as MAFbx/atrogen-1 and MuRF-1, through the protection of IGF-1 signaling estimated by phosphorylation of Akt-1. **Conclusions:** Soy glycinin contains a functional inhibitory sequence against muscle-atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b. Dietary soy glycinin protein significantly prevented muscle atrophy after denervation in mice. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 99-103, 2013.

Key words : Soy Protein, Muscle Atrophy, Ubiquitin Ligase Inhibitor

*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

近年、急速に高齢化の進む我国では寝たきりや運動不足による筋萎縮（サルコペニア）が大きな社会問題となっている。我々は、これら筋肉の廃用性萎縮がユビキチンリガーゼ（注：筋たん白質のユビキチン化を触媒する酵素であり、分解すべきたん白質にポリユビキチンというタグを連結する反応を触媒する）の活性化による筋たん白質分解の促進によることを明らかにした¹⁾。ユビキチンリガーゼを欠損させたマウスは廃用性筋萎縮になりにくいことから、廃用性筋萎縮の治療にはこのユビキチンリガーゼの活性を阻害することが有効であると考えられる^{2,3)}。しかし、ユビキチンリガーゼ阻害物質はほとんど報告されていない。ユビキチンリガーゼは基質たん白質の一部（ペプチド）を認識して結合するので、ある特殊な配列を有するペプチドにはユビキチンリガーゼと基質たん白質との結合を阻害できるのではないかと考えられた（Fig. 1）。その結果、これまでに大豆たん白質由来のペプチドなどに数種のユビキチンリガーゼ阻害ペプチドを見いだした。これまでも、大豆ペプチドが運動による筋傷害の軽減に有益であるとの報告⁴⁾があり、大豆ペプチドは骨格筋に特異的な作用を有するのではないかと期待されている。

方法と結果

大豆ペプチドによるIRS-1ユビキチン化阻害

廃用性筋萎縮で発現の増大するユビキチンリガーゼ Cbl-bは、萎縮筋におけるIRS-1のユビキチン化と分解を促進してIGF-1シグナルを調節している（Fig. 2）²⁾。Cbl-b遺伝子を欠損すると尾部懸垂による筋萎縮に抵抗性を示すことから、Cbl-bのユビキチン化活性を抑制することが筋萎縮を予防できる一つの手段と考えた。前項の原理に基づき、Cbl-bによるIRS-1のユビキチン化阻害活性が大豆ペプチド群に存在するかを検討した。分離大豆たん白質（SPI: soy protein isolate）は、主にグリシニン（11S）、コンゴリシニン（7S）と脂質たん白質（LP）群の3種類のたん白質からなる。そこで、それぞれを酵素処理しペプチド化したものをCell-free ubiquitination systemに供した。

Cell-free ubiquitination systemを簡単に説明する。たん白質のユビキチン化経路はユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）とユビキチンリガーゼ（E3）の酵素群からなり細胞質内で行われる。おもしろいことに、基質とこれら酵素群を試験内で反応させることにより細胞内のユビキチン化を再現することができる。この反応系は、雑多なたん白質を含まな

いので阻害剤を検出するのに非常に便利である。SPI、コンゴリシニン、グリシニンと脂質たん白質群由来の同量のペプチドによるユビキチン化阻害を検討したところ、Fig. 3に示すように、グリシニン由来のペプチドはCbl-bによるIRS-1のユビキチン化を阻害した⁵⁾。グリシニン由来ペプチドの抗ユビキチン化作用は、Heck細胞またはCOS7細胞系を用いたユビキチン化システムでも観察された（Fig. 4）。興味深いことに、グリシニンを多く含むたん白質食材は、*in vivo*実験においても坐骨神経切除によるIRS-1の分解を抑制することがわかった（Fig. 5）。

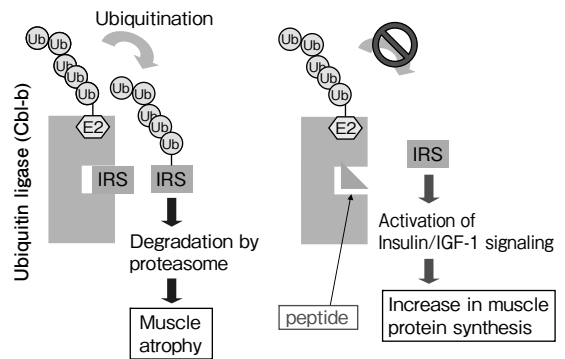


Fig. 1. Peptide-mediated inhibition of ubiquitin ligase.

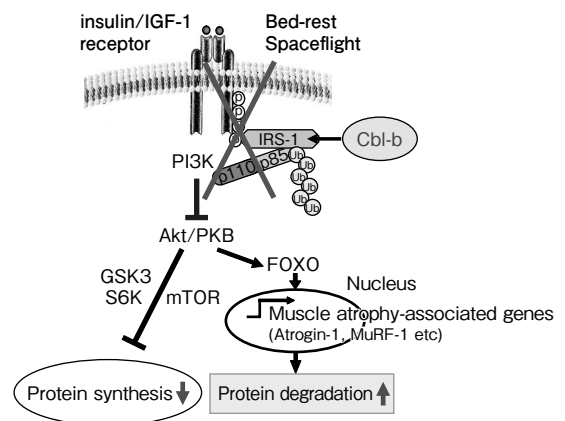


Fig. 2. Mechanistic model of unloading-mediated muscle atrophy. Unloading induces ubiquitin ligase Cbl-b in myocytes. Cbl-b stimulates ubiquitination and the degradation of IRS-1, an important intermediate in IGF-1 signaling pathway, resulting in IGF-1 resistance in myocytes during unloading. IGF-1 resistance induces impaired protein synthesis and enhances protein degradation in muscle, leading to muscle atrophy.

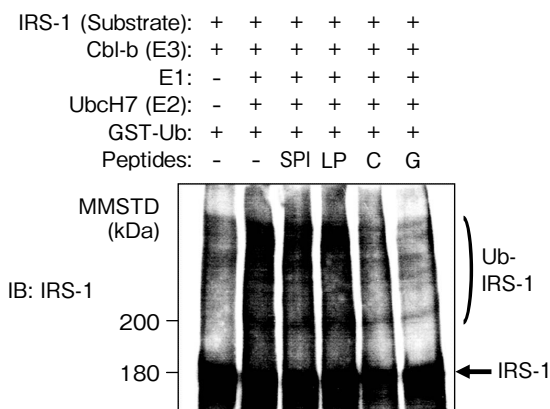


Fig. 3. Inhibitory effect of soy-glycinin-derived peptides on Cbl-b-mediated IRS-1 ubiquitination. (I) Purified soy protein isolate (SPI), lipoprotein (LP), soy glycinin (G), and soy β -conglycinin (C) were digested with trypsin, then 20 μ g/mL of each of the hydrolysates was subjected to cell-free ubiquitination assay to elucidate their inhibitory effects on Cbl-b-mediated IRS-1 ubiquitination.

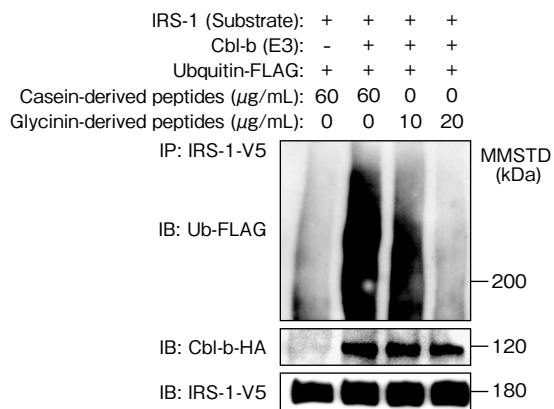


Fig. 4. Inhibitory effect of soy-glycinin-derived peptides on Cbl-b-mediated IRS-1 ubiquitination. (II) HEK293 cells transfected with mock vector/pCEFL-Cbl-b-HA, pcDNA3.1-rat IRS-1-V5, and pcDNA3-FLAG-Ubiquitin were treated with the indicated concentration of casein-derived (control) or soy-glycinin-derived peptides for 2 hours in the presence of 100 nM epoxomicin and 10ng/mL IGF-1. Cell lysates from these cells were immunoprecipitated with an anti-V5 antibody. The immunoprecipitates were subjected to immunoblot (IB) analysis for the indicated proteins. MMSTD: molecular mass standards. Representative findings of three experiments with matching results.

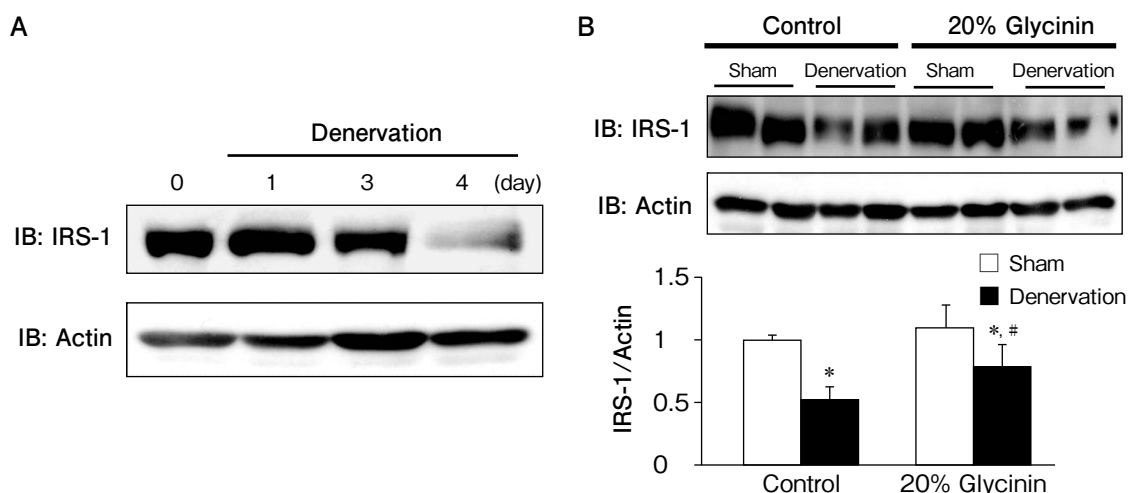


Fig. 5. Effects of dietary soy glycinin protein on IGF-1 signaling in denervated muscle. (A, B) The right and left legs of C57BL/6 mice were subjected to denervation and sham operation, respectively. The mice were fed with 20% casein (control) or 20% soy glycinin diet from 1 week before denervation till the end of the experiment. TA muscles were isolated at days 1, 3, 3.5, and 4 after denervation. Homogenates of TA muscles isolated were subjected to immunoblotting (IB) for IRS-1 and actin on the indicated days after denervation.

合成ペプチドによるCbl-bによるユビキチン化阻害 (Cblin: Cbl inhibitor)

Cbl-bは、主に基質たん白質のリン酸化チロシン残基を認識して結合する。上記のように既存のたん白質由来のペプチドだけでなく、合成ペプチド群にもCbl-bとIRS-1の結合を競合阻害できうるものを探索した。その結果、無細胞系および細胞系においてCbl-bによるユビキチン化に阻害活性を示すペプチドと発見した (DGpYMP:特願2006-145944)²⁾。我々は、それをCblの阻害剤であることからCblinと名付けた。さらに、この合成ペプチドを坐骨神経を切除したマウス (神経性筋萎縮マウス) の腓腹筋に投与すると、IRS-1のユビキチン化とMAFbx-1/atrogin-1 (筋萎縮原因遺伝子の一つ^{6,7)}) の発現が抑制され、坐骨神経切除による筋湿重量の減少が回復した²⁾。

考 察

大豆ペプチドの機能性 (抗ユビキチン化作用) の実用化の有益性と問題点

たん白質の一部 (アミノ酸が2個以上からなるペプチド) が特異なアミノ酸配列を有し、特別な生理機能を発揮する場合がある。一般的に、これらのペプチドはもとのたん白質中では不活性であり、消化管での消化や食品加工工程においてはじめて機能を発揮するようになる。このようなペプチドを“機能性ペプチド”と呼ぶ。先に述べたグリシニンには、Cblinとよく似たアミノ酸配列を有する箇所が含まれており (Fig. 6)、その部分が機能性ペプチドとして働いている可能性が

あると考え、研究を進めた結果、その部分の合成ペプチドはユビキチンリガーゼCbl-bの活性を抑制することが確認できた (データを示さず)⁵⁾。その結果、大豆ペプチドは少なくともこの機能性を介して、筋たん白質代謝を効率よく制御できる食事たん白質源であると考えられた。薬剤などのように副作用が多くなく、長期間摂取可能など、慢性疾患である筋萎縮が食事により予防できる利点は多い。そこで、生研センターのイノベーション研究事業により大豆たん白質を多く含む食材を実際の寝たきり患者に摂取してもらっている。まだN数が少なく、統計学的な解析ができていない。本研究を継続することにより、ヒトでの大豆たん白質の抗筋萎縮効果を実証したい。

興味深いことにCblinと同じ配列を有するたん白質は植物に多いことがわかってきた。動物の筋肉を制御しうるペプチドが植物に多いということは植物性たん白質の運動へ有効性が大きいことを示唆しているのかもしれない。しかしながら、細胞レベルで抗ユビキチン化作用を示すには、高濃度の機能性ペプチドが必要である。例えば、Cblinと同じ配列を持つたん白質を高濃度で有する食材は少ない。今後このような食材を網羅的に検索する必要がある。また、食事たん白質由来のペプチドが、アミノ酸ではなく、ペプチドの形で臓器まで達するかどうかはまだまだ解決しなければいけない点がたくさんある。骨格筋は、小腸上皮に劣らずペプチド・トランスポーターの多い臓器である⁸⁾。さらに、カルノシンなどもともと筋肉にはジペプチドが多いことも有名である⁹⁾。今後筋肉代謝に有用なペプチドが開発されることを期待している。

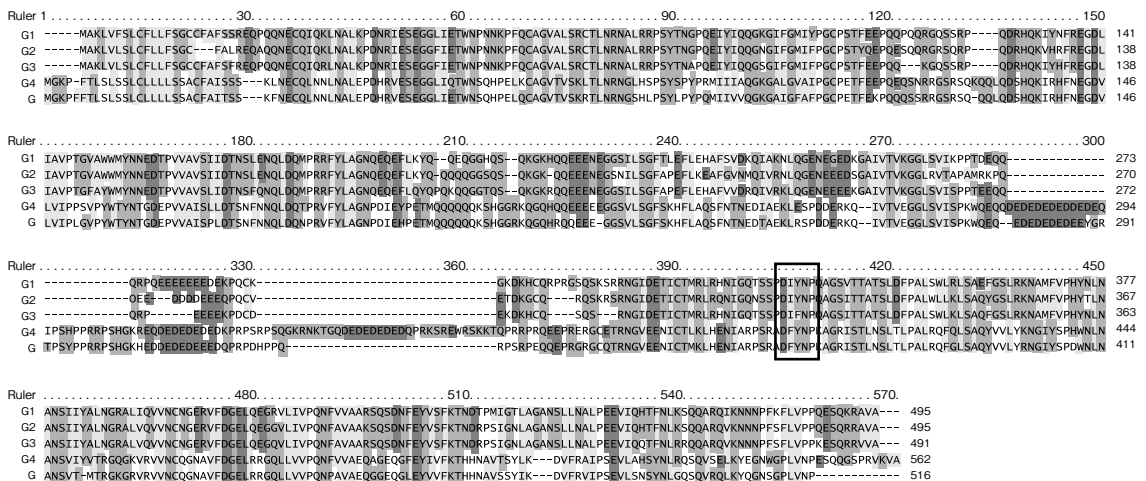


Fig. 6. Alignment of glycinin precursor protein sequences. The sequence of soy glycinin was similar to that of Cblin peptide, indicated by the box. The sequences were retrieved from the UniProt database (<http://www.uniprot.org/>). G1, Glycinin G1; G2, Glycinin G2; G3, Glycinin; G3; G, Glycinin G; G4, Glycinin G4.

要 約

大豆たん白質が筋たん白質代謝に有益な働きをしていることがいくつかの論文で報告されている。我々は、大豆たん白質の一成分であるグリシニンにユビキチンリガーゼCbl-bの阻害活性があることを見いだした。その知見を、細胞レベル、動物実験レベルで検証し、寝たきりなどで起こる廃用性筋萎縮の治療への有効性を明らかにした。現在は、ヒトに対して臨床介入研究を行っている。その一連の流れを本稿でまとめてみた。

文 献

- 1) 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.
- 2) Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K and Takeda S. (2004) Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*, **18**, 522-524.
- 3) Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomu K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S and Nikawa T. (2009) Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol. Cell. Biol*, **29**, 4798-811.
- 4) Masuda K, Maebuchi M, Samoto M, Ushijima Y, Uchida Y, Kohno M, Ito R and Hirotsuka M (2007): Effect of soy-peptide intake on exercise-induced muscle damage. *日本臨床スポーツ医学会誌*, **15**, 228-235.
- 5) Abe T, Kohno S, Yama T, Ochi A, Suto T, Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Oarada M, Choi I, Mukai R, Terao J and Nikawa T. (2013) Soy Glycinin Contains a Functional Inhibitory Sequence against Muscle-Atrophy-Associated Ubiquitin Ligase Cbl-b. *Int J Endocrinol*, doi: **10.1155/2013/907565**. Epub.
- 6) Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD and Glass DJ. (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, **294**, 1704-1708.
- 7) Glass DJ (2003) Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*, **9**, 344-350.
- 8) Higaki K and Amidon GL (2000) Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: Identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS Pharmsci*, **2**, 1-22.
- 9) Begum G, Cunliffe A and Leveritt M. (2005) Physiological role of carnosine in contracting muscle. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, **15**, 493-514.
- 10) Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH and Goldberg AL. (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, **117**, 399-412.