

大豆たん白質の摂取は運動に伴い筋力の低下が継続することを防止するか？
－カルパイン阻害作用に着目して－

神崎圭太^{*1}・渡邊大輝²・和田正信²

¹岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

²広島大学大学院総合科学研究科

**The Effect of Soy Protein Isolate on Exercise
-Induced Calpain Activation and Force Depression-**

Keita KANZAKI^{*1}, Daiki WATANABE² and Masanobu WADA²

¹Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, Soja 719-1197

²Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739-8521

ABSTRACT

In this study, we examined the effects of dietary soy protein isolate (SPI) on calpain activity and force output in rat skeletal muscle exposed to eccentric contractions (EC). Male Wistar rats were allowed free access to a 20% casein (control: CON) or SPI diet for 4 weeks. Following the feeding periods, the left anterior crural muscles were exposed to 200-repeated EC. The contralateral muscles were used as controls. Immediately after and 3 days following EC, extensor digitorum longus muscles were removed and used for force output measurements and biochemical analyses. In CON muscles, maximal calpain activity was unaltered immediately after EC, but elevated to 238% 3 days after EC, whereas in SPI muscles, it was not changed during 3 days of recovery. Immediately after EC, specific forces generated at 20 Hz were decreased to ~40% in both CON and SPI muscles. Following 3 days of recovery, the forces remained depressed in CON muscles, but recovered in SPI muscles. Functional impairment and degradation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel were observed in CON muscles, but not in SPI muscles 3 days after EC. These results suggest that dietary SPI may facilitate force recovery following EC by preventing calpain-mediated proteolysis of Ca²⁺ release channels. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 192-197, 2015.

Key words : soy protein isolate, eccentric contraction, muscle damage, calpain, sarcoplasmic reticulum

*〒719-1197 岡山県総社市窪木111

筋が引き伸ばされながら力を発揮する収縮様式は、伸張性収縮と呼ばれる。身体活動の多くには、この様式の収縮が含まれており、激しい運動や筋力トレーニングでは、高強度の伸張性収縮が主動筋に負荷されることになる。他の収縮様式（短縮性収縮や等尺性収縮）とは異なり、伸張性収縮には、収縮終了後、数日から長ければ数週間にわたって筋力低下が継続するという特徴がある^{1, 2)}。

伸張性収縮後に筋力低下が継続する原因には、カルパインの関与が提唱されている³⁾。カルパインは、Ca²⁺濃度の上昇により活性化するとたん白質分解酵素である。伸張性収縮後には、筋細胞内の遊離Ca²⁺濃度が上昇する⁴⁾。そのため、活性化されたカルパインが、筋機能に関わるたん白質を分解することが、筋力低下が継続する原因の1つであると考えられる。

先行研究では、分離大豆たん白質（soy protein isolate: SPI）を摂取させたラットにおいて、後肢懸垂あるいは一過性の走運動に伴うカルパイン活性の増加が抑制されることが報告されている^{5, 6)}。そこで本研究では、SPIの摂取により、伸張性収縮後のカルパイン活性の増加および筋力低下が抑制されるかどうかを検討することを目的とした。

方 法

被験動物およびSPIの投与

4週齢のWistar系雄性ラットを、SPI群と対照（control: CON）群に分類した。SPI群にはSPIを、CON群にはカゼインを、20%含む試験食をそれぞれ4週間摂取させた（Table 1）。期間中は、食餌および水の摂取は自由とした。4週間の飼育期間中の摂食量お

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	CON SPI	
	% of diet	
Casein	20	-
Soy protein isolate	-	20
L-Cystine	0.3	0.3
β -Corn starch	39.7486	39.7486
α -Corn starch	13.2	13.2
Sucrose	10	10
Corn oil	7	7
Cellrose	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5
Vitamin mixture	1	1
Choline biartrate	0.25	0.25
Tertiary butylhydroquinone	0.0014	0.0014

CON, casin group; SPI, soy protein isolate group.

よび体重増加量に、両群間で差異はみられなかった。

伸張性収縮

麻酔下において、ラットを仰臥位に置き、左脚をフットホルダーに足関節が約90°になるように固定した。フットホルダーと連結したモーターによって、約90°/secの速度で足関節を1秒間で伸展させると同時に、坐骨神経より電気刺激（5 V, 50 Hz）を与えて伸張性収縮を誘起した。その後、1秒で元の位置に戻し、2秒間安静を保った。これを1サイクルとし、200回繰り返した。反対脚は安静脚（Rest）とし、コントロールとして用いた。収縮終了直後および3日後に、長趾伸筋を摘出し、分析に供した。なお、試験食の摂取は、解剖直前まで継続した。

等尺性収縮力の測定

95%O₂-5%CO₂ガスを注入したリンガー液中（30℃）において、長趾伸筋の片側を張力計に、反対側を固定用アームにセットした。筋の両端に置かれた電極から通電することで収縮を誘起した。なお、等尺性収縮力の測定は、20 Hzおよび80 Hzの刺激頻度を用いて行った。その後、筋長および筋湿重量を計測し、筋横断面積を算出した。等尺性収縮力は、単位断面積あたりの値で表した。

総カルパイン活性の測定

総カルパイン活性の測定は、蛍光基質であるN-succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarinを用い、37℃の条件下で行った⁷⁾。なお、活性値はたん白質濃度あたりの値で算出した。

筋小胞体Ca²⁺放出速度の測定

筋小胞体Ca²⁺放出速度の測定は、Ca²⁺蛍光指示薬であるindo-1を用い、37℃の条件下で行った⁸⁾。Ca²⁺放出には10 mM（最終濃度）の4-chloro-m-cresolを用いた。なお、Ca²⁺放出速度は、たん白質濃度あたりの値で算出した。

ウエスタンブロット

筋ホモジネートに含まれる10 μ gのたん白質を、7%SDS-PAGEで分画した後、セミドライプロットティング装置を用いて、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜に転写した（2 mA/cm², 75分）。その後、0.05% Tween-20を含むPBSに3%スキムミルクを溶解したバッファーを用いて、PVDF膜を室温で1時間ブロッキングした。洗浄したPVDF膜を抗リアノジン受容

体抗体 (5,000倍希釈, Affinity Bioreagents社, MA3-925) と一晚反応させた後 (4°C), 再度洗浄を行い, 7,500倍に希釈した二次抗体と室温で1時間反応させた。検出は化学発光試薬を用いて, X線フィルムにシグナルを感光させて行った。フィルムおよびクーマシー染色を行ったPVDF膜の画像をコンピューターに取り込み, Image Jを用いて, たん白質量を定量した。なお, リアノジン受容体 (Ca²⁺放出チャネル) の発現量は, ミオシン重鎖の量で除した値で表した。

統計処理

統計量は平均値 ± 標準誤差で表した。SPIの摂取および回復期間の影響を検討するために, 二元配置の分散分析を行った。分散分析において有意性が認められた場合は, Schefféの方法にしたがって, 統計学的有意性を検討した。なお, 有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

カルパイン活性

Fig. 1は, 総カルパイン活性の変化を示している。収縮終了直後では, CON群およびSPI群の両群において, 収縮脚と安静脚との間に差異はみられなかった。3日後では, CON群において, 安静脚に比べ収縮脚が有意な高値を示したが, SPI群においては, 差異は認

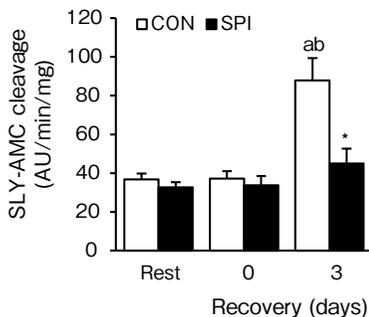


Fig. 1. Effects of soy protein diet on calpain activity following eccentric contractions.

Calpain activity was fluorometrically measured on muscle homogenate using N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (SLY-AMC) as a substrate. Values are means ± SE (n=12-14 for Rest; n = 6-7 for immediately and 3 days after eccentric contractions). ^a $p < 0.05$ vs. Rest, ^b $p < 0.05$ vs. 0, ^{*} $p < 0.05$ vs. CON. CON, casein group; SPI, soy protein isolate group; AU, arbitrary unit.

められなかった。

等尺性収縮力

Fig. 2Aに20 Hzの, Fig. 2Bに80 Hzの電気刺激誘因性張力の変化を示した。いずれの刺激頻度においても, 類似した変化が観察された。収縮終了直後では, CON群およびSPI群の両群において, 安静脚に比べ収縮脚が有意な低値を示した。3日後では, CON群において, 安静脚に比べ収縮脚が有意な低値を示したが, SPI群においては, 差異は認められなかった。

筋小胞体のCa²⁺放出速度と放出チャネルの発現量

筋力の回復の程度がCON群とSPI群とで異なることが, 収縮終了3日後においてのみ観察されたため, 以

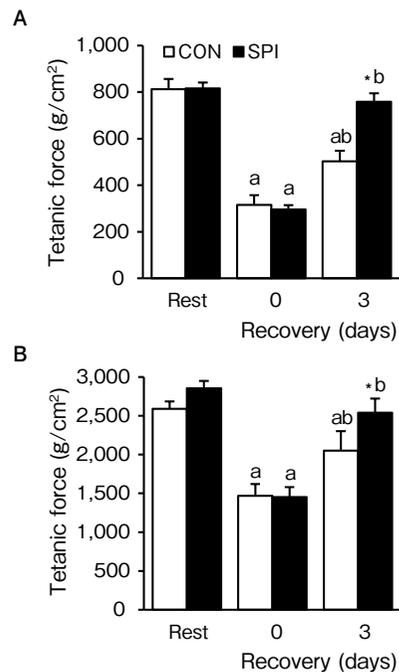


Fig. 2. Effects of soy protein diet on specific force following eccentric contractions.

Isolated extensor digitorum longus muscles were mounted between a force transducer and an adjustable holder and superfused with Ringer solution. Tetanic constructions were evoked by 20 (A) and 80 (B) Hz stimulations. Absolute force was normalized to cross-sectional area. Values are means ± SE (n=12-14 for Rest; n=6-7 for immediately and 3 days after eccentric contractions). ^a $p < 0.05$ vs. Rest, ^b $p < 0.05$ vs. 0, ^{*} $p < 0.05$ vs. CON. CON, casein group; SPI, soy protein isolate group.

下の分析は収縮終了3日後のサンプルを用いて行った。Fig. 3Aは、筋小胞体Ca²⁺放出速度の変化を示している。CON群では、安静脚に比べ収縮脚が有意な低値を示したが、SPI群では、差異が認められなかった (Fig. 3A)。

Fig. 3BにCa²⁺放出チャンネルのウエスタンブロットの一例を示した。矢印で示したバンドが分解型のチャンネルを、その上部のバンドが非分解型のチャンネルを表している。非分解型のチャンネルでは、CON群において、安静脚に比べ収縮脚が有意な低値を示したが、SPI群においては、差異は認められなかった (Fig. 3C)。また、分解型のチャンネルでは、CON群において、安静脚に比べ収縮脚が有意な高値を示したが、SPI群においては、差異は認められなかった (Fig. 3D)。

考 察

競技スポーツにおいては、運動後に低下した筋力を迅速に回復させることが重要な課題となる。そのため、伸張性収縮に伴う筋力低下を軽減すること、あるいは収縮後に低下した筋力を早期に回復させることを目的とした研究が多く行われてきた。しかしながら、効果

があることを示す報告はほとんどなされていない。本研究では、SPIの摂取により、伸張性収縮後に低下した筋力が早期に回復することが明らかとなった (Fig. 3A, B)。

骨格筋の発揮張力が低下する原因の1つには、筋小胞体からのCa²⁺放出が減少することがあげられる⁹⁾。筋小胞体は筋細胞内の遊離Ca²⁺濃度を制御する役割を担う細胞内小器官であり、筋小胞体からCa²⁺が放出され、筋細胞内の遊離Ca²⁺濃度がある一定レベルにまで上昇すると、筋原線維の収縮が誘起される。したがって、筋小胞体からのCa²⁺放出が減少すると、遊離Ca²⁺濃度が十分に高まらず、筋力が低下することになる。本研究では、伸張性収縮3日後における筋小胞体Ca²⁺放出速度の低下が、SPI摂取により抑制されることが観察された (Fig. 3A)。このことがSPI摂取により、筋力が早期に回復する原因の1つと考えられる。

骨格筋において、カルパイン系はアポトーシス系、オートファジー系およびユビキチン-プロテアソーム系とならぶ主要なたん白質分解経路である。伸張性収縮後には、1) 筋細胞内の遊離Ca²⁺濃度が上昇すること⁴⁾、2) カルパインの活性や自己分解 (活性化の指標)が増加すること^{2, 10)}、3) 収縮機能に関わる筋たん白

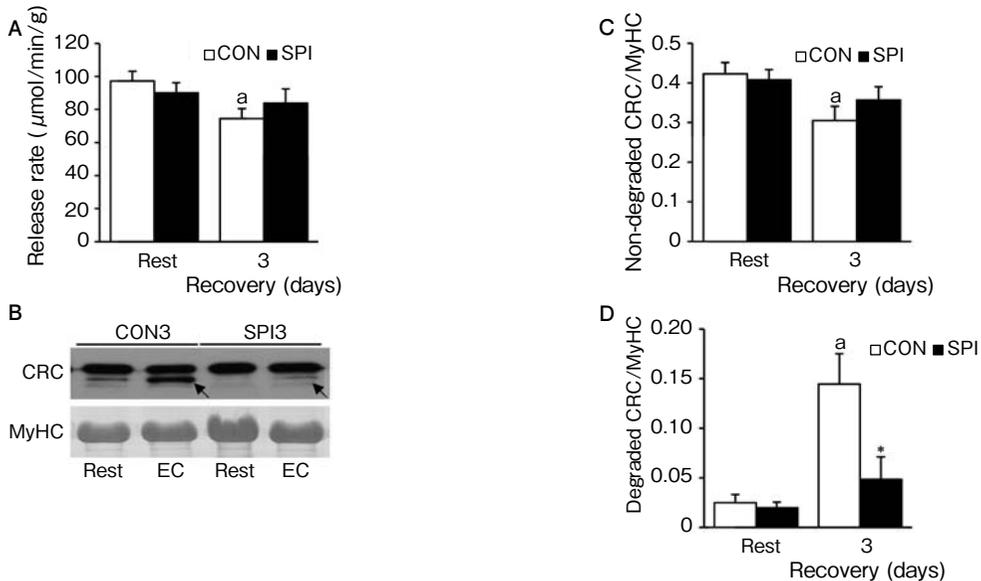


Fig. 3. Effects of soy protein diet on function and content of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ release channel (CRC) following eccentric contractions (EC).

A, SR Ca²⁺ release rate was fluorometrically assessed using the Ca²⁺ fluorescent dye indo-1. B, Representative western blot and coomassie blue staining of myosin heavy chain (MyHC). The arrows indicate degraded CRC. C-D, Quantification of the levels of non-degraded (C) and degraded (D) CRC normalized to MyHC content. Values are means ± SE (n=6-7 for each bar). *p*<0.05 vs. Rest, ^{*}*p*<0.05 vs. CON. CON, casein group; SPI, soy protein isolate group.

質の発現量が減少すること^{1, 2)}, および4) *in vitro*において, カルパインは収縮機能に関わる多くのたん白質を基質とすること¹¹⁾が報告されている。そのため, 伸張性収縮に伴う筋力低下の原因の1つは, カルパインが筋機能に関わるたん白質を分解することにあると提唱されている³⁾。本研究では, SPI摂取により, 総カルパイン活性の増加 (Fig. 2), および筋小胞体Ca²⁺放出チャネルの分解が抑制されることが観察された (Fig. 4C, D)。これらの結果は, SPI摂取により, 伸張

性収縮後に低下した筋力が早期に回復する原因の1つは, カルパインによる筋たん白質分解が抑制されることにあることを示唆する。

以上のように, 本研究では, SPIの摂取が運動後に低下した筋力の回復に有効であること, およびその原因の1つは, カルパインによる筋たん白質分解を抑制することにあることを示す結果を得ることができた。今後は, SPIに含まれるどの成分が, これらの作用を示すのかを明らかにする必要があるだろう。

要 約

分離大豆たん白質 (SPI) の摂取が, 伸張性収縮後のカルパイン活性および筋力の変化に及ぼす影響を検討することを目的とした。Wistar系雄性ラットをSPI群と対照 (CON) 群に分類し, SPI群にはSPIを, CON群にはカゼインを20%含む食餌を4週間摂取させた。飼育期間終了後, 坐骨神経からの電気刺激と伸展装置を用いて, 200回の伸張性収縮を負荷した。収縮終了直後および3日後に, 収縮脚および安静脚から長趾伸筋を摘出した。これらを分析に用い, 以下の結果を得た。

1. 収縮終了3日後において, CON群では, 安静脚に比べ収縮脚の総カルパイン活性が高値を示したが, SPI群では, この差異はみられなかった。
2. 収縮終了3日後において, CON群では, 安静脚に比べ収縮脚の等尺性収縮力が低値を示したが, SPI群では, この差異はみられなかった。
3. 収縮終了3日後において, CON群では, 安静脚に比べ収縮脚の筋小胞体Ca²⁺放出チャネルの発現量が低値を示したが, SPI群では, この差異はみられなかった。

以上の結果から, SPIの摂取により伸張性収縮後に低下した筋力が早期に回復すること, およびその原因の1つは, カルパインによる筋小胞体Ca²⁺放出チャネルの分解が抑制されることにあることが示唆された。

文 献

- 1) Ingalls CP, Warren GL, Williams JH, Ward CW and Armstrong RB (1998): E-C coupling failure in mouse EDL muscle after *in vivo* eccentric contractions. *J Appl Physiol*, **85**, 58-67.
- 2) Kanzaki K, Kuratani M, Mishima T, Matsunaga S, Yanaka N, Usui S and Wada M (2010): The effects of eccentric contraction on myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, **110**, 943-952.
- 3) Belcastro AN, Shewchuk LD and Raj DA (1998): Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem*, **179**, 135-145.
- 4) Lynch GS, Fary CJ and Williams DA (1997): Quantitative measurement of resting skeletal muscle [Ca²⁺]_i following acute and long-term downhill running exercise in mice. *Cell Calcium*, **22**, 373-383.
- 5) 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.
- 6) Tada O and Yokogoshi H (2002): Effect of different dietary protein composition on skeletal muscle atrophy by suspension hypokinesia/hypodynamia in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, **48**, 115-119.

- 7) Sultan KR, Dittrich BT and Pette D (2000): Calpain activity in fast, slow, transforming, and regenerating skeletal muscles of rat. *Am J Physiol*, **279**, C639-C647.
- 8) Ward CW, Spangenburg EE, Diss LM and Williams JH (1998): Effects of varied fatigue protocols on sarcoplasmic reticulum calcium uptake and release rates. *Am J Physiol*, **275**, R99-R104.
- 9) Wada M, Kuratani M and Kanzaki K (2013): Calcium kinetics of sarcoplasmic reticulum and muscle fatigue. *J Phys Fitness Sports Med*, **2**, 169-178.
- 10) Kanzaki K, Kuratani M, Matsunaga S, Yanaka N and Wada M (2014): Three calpain isoforms are autolyzed in rat fast-twitch muscle after eccentric contractions. *J Muscle Res Cell Motil*, **35**, 179-189.
- 11) Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W and Cong J (2003): The calpain system. *Physiol Rev*, **83**, 731-801.