

大豆たん白質に豊富なアミノ酸の摂取は運動後に筋力の低下が 継続することを防止するか？

神崎圭太^{*1}・渡邊大輝²・川上祐生¹・高橋吉孝¹・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 L-arginine Administration on Exercise-induced Calpain Activation and Force Depression

Keita KANZAKI^{*1}, Daiki WATANABE², Yuki KAWAKAMI¹,
Yoshitaka TAKAHASHI¹ 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 L-arginine (ARG) administration on calpain activation and force output in rat skeletal muscle exposed to eccentric contractions (EC). Male Wistar rats were allowed ad libitum to drink 0.3% L-ARG solution (221 ± 7 mg/day of L-ARG) 3 days prior to the EC. Age-matched controls (CON) were provided water without L-ARG. After 3 days, the left anterior crural muscles were exposed to 200-repeated EC. The contralateral muscles were used as controls. Three days following EC, isometric torque produced by the anterior crural muscles was measured and then tibialis anterior muscles were removed and used for biochemical analyses. In CON muscles, the increase in total calpain activity and calpain-1 autolysis was observed. L-ARG treatment alleviate increase in calpain activity and abrogate increase in calpain-1 autolysis. In all stimulation frequency, isometric torque in ARG muscles was greater than that in CON muscles, although the decrease in torque evoked by low-frequency (1~20 Hz) stimulation was also observed in ARG muscles. In addition, L-ARG administration induced the suppressed degradation of dihydropyridine receptor and ryanodine receptor and the attenuated degradation of junctophilin-1. These results suggest that dietary L-ARG supplementation may facilitate force recovery following EC by preventing the calpain-mediated proteolysis of Ca²⁺- regulatory proteins. *Soy Protein Research, Japan* **19**, 136-142, 2016.

*〒719-1197 総社市窪木111

Key words : L-arginine, eccentric contraction, muscle damage, calpain, proteolysis

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、数日間にわたって筋力低下が継続するという特徴がある¹⁾。

カルパインは、Ca²⁺濃度の上昇により活性化される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²⁾。そのため、活性化されたカルパインが、筋力発揮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³⁾。これを支持する知見として、我々はカルパイン阻害剤の投与により、伸張性収縮後に低下した筋力が早期に回復することを確認している⁴⁾。

昨年度の本助成研究において我々は、カゼインに比べ分離大豆たん白質を摂取させたラットの骨格筋では、カルパイン活性の増加や筋たん白質分解が抑制され、伸張性収縮後に低下した筋力が早期に回復することを確認した。カゼインに比べ大豆たん白質には一酸化窒素ドナーであるL-アルギニンが豊富に含まれること⁵⁾、一酸化窒素はS-ニトロシル化を介してカルパインの活性や自己分解を抑制することが報告されている^{6,7)}。

そこで本研究では、昨年度の研究での大豆たん白質摂取時と同程度の量のL-アルギニンの摂取により、伸張性収縮後のカルパインの活性化や筋力の低下が軽減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L-アルギニンの投与

8週齢のWistar系雄性ラットを、アルギニン(arginine: ARG)群とコントロール(control: CON)群に分類した(各n=7)。ARG群には収縮負荷3日前より、0.3%L-ARG溶液を自由飲水投与した。

伸張性収縮の負荷および足背屈力の測定

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、方脚の下腿前部の筋(長趾伸筋と前脛骨筋)に伸張性

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。反対脚は安静脚とした。収縮3日後に、アキレス腱を切除した状態で腓骨神経からの電気刺激を行い(1~80 Hz)、足背屈力を測定した後、前脛骨筋を摘出し、下記の分析に供した。なお、L-ARGの自由飲水は、解剖直前まで継続した。

筋中亜硝酸/硝酸(NO₂/NO₃)濃度の測定

一酸化窒素の代謝産物であるNO₂/NO₃濃度は、Griess法を用いて測定した。なお、NO₃⁻の還元には、塩化バナジウムを用いた。

総カルパイン活性の測定

総カルパイン活性は、蛍光基質であるN-succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarinを用い、還元剤であるジチオトレイトールの存在下または非存在下で測定した。なお、活性値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10μg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(2,500倍希釈; Thermo Scientific, MA3-925)、抗ジヒドロピリジン受容体抗体(1,000倍希釈; Thermo Scientific, MA3-920)、抗ジャンクトフィリン1抗体(500倍希釈; Thermo Scientific, 40-5100)、抗カルセクエストリン1抗体(500倍希釈; Santa Cruz, sc-53012)、抗カルパイン-1抗体(1,000倍希釈; Sigma, C0355)と一晩反応させた後(4℃)、再度洗浄を行い、5,000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、ルミノ・イメージアナライザー(LAS-4000)で行った。検出が終わったPVDF膜はクーマシー染色を行った後、スキャナーで画像をコンピューターに取り込み、Image Jを用いて、各レーンの総たん白質量を定量した。なお、カルパイン-1の自己分解の割合は、総カルパイン-1量に対する自己分解型カルパイン-1の量で、その他の各たん白質の発現量は、総たん白質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。伸張性収縮およびL-Arg摂取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、Holm-sidakの検定にしたがって、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

L-Arg摂取量

飲水量から算出したARG群の平均L-Arg摂取量は 221 ± 7 mg/dayであった。この摂取量は、昨年度の本助成研究における分離大豆たん白質摂取に伴う平均L-Arg摂取量 (254 ± 8 mg/day) に比べ13%の低値であった。

筋中NO₂/NO₃濃度

NO₂⁻とNO₃⁻は一酸化窒素由来の比較的安定な酸化代謝産物であるため、NO₂/NO₃濃度は一酸化窒素の産生量を間接的に表す指標として用いられている。安静脚の筋中NO₂/NO₃濃度は、CON群に比べARG群が83%の高値を示した (Fig. 1)。CON群においては、安静脚に比べ収縮脚の濃度が有意な高値を示したが、ARG群では安静脚と収縮脚との間に差異は認められなかった。

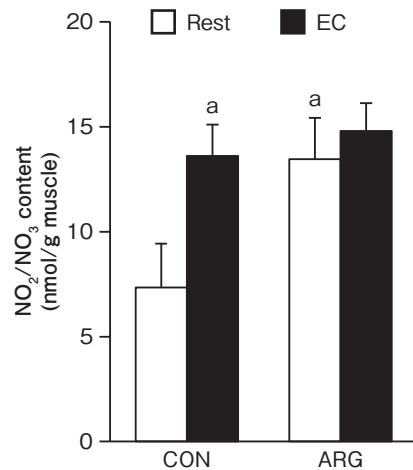


Fig. 1. L-arginine administration and eccentric contractions increase nitrite/nitrate (NO₂/NO₃) concentrations. NO₂/NO₃ concentration in tibialis anterior muscles was spectrometrically determined by using the Griess reaction. Values are means ± SE (n = 6-7). ^a $p<0.05$ vs. CON-Rest. CON, control; ARG, arginine; EC, eccentric contractions.

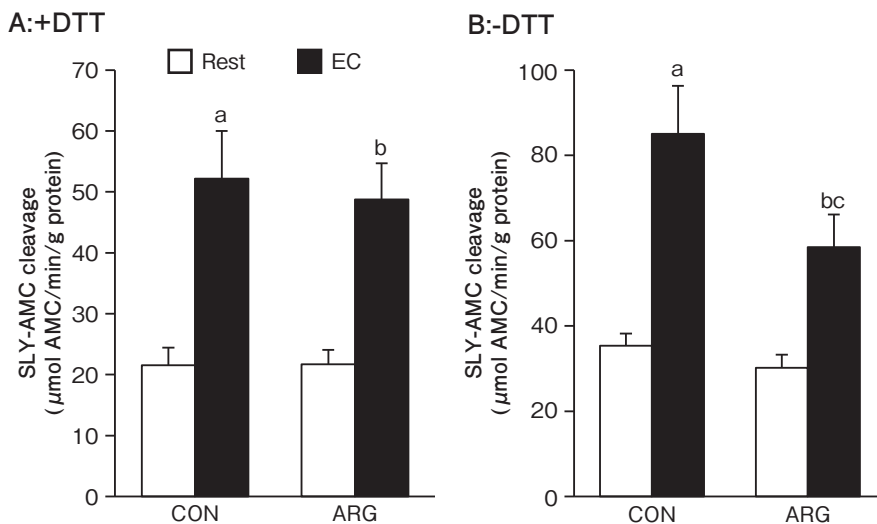


Fig. 2. L-arginine administration attenuates increase in calpain activity following eccentric contractions. Total calpain activity was fluorometrically measured in the presence (A) or the absence (B) of dithiothreitol (DTT) using N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (SLY-AMC) as a substrate. Values are means ± SE (n = 6-7). ^a $p<0.05$ vs. CON-Rest, ^b $p<0.05$ vs. ARG-Rest, ^c $p<0.05$ vs. CON-EC. CON, control; ARG, arginine; EC, eccentric contractions.

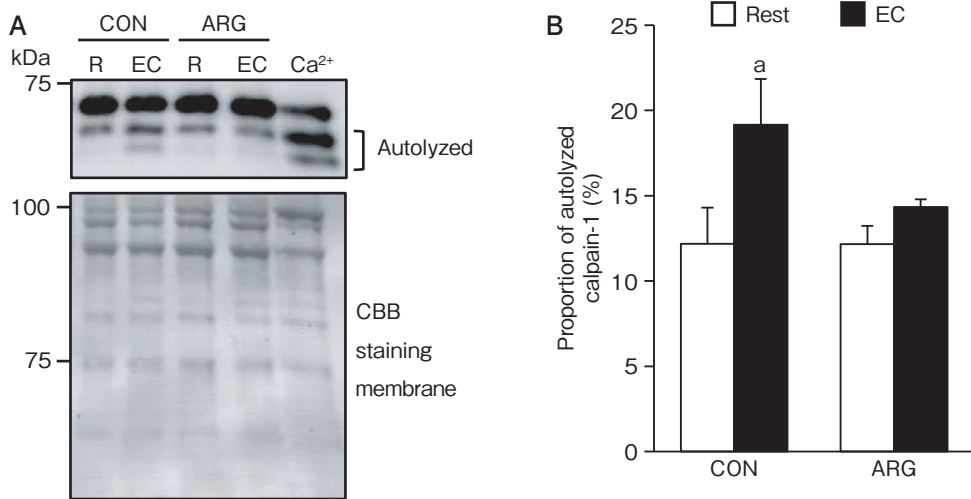


Fig. 3. L-arginine administration suppresses increase in calpain-1 autolysis following eccentric contractions. A, Representative western blot of calpain-1. B, Quantification of the amount of autolyzed calpain-1. Values are means \pm SE (n = 6-7). ^a $p < 0.05$ vs. CON-Rest. CON, control; ARG, arginine; R, rest; EC, eccentric contractions; CBB, coomassie brilliant blue.

カルパインの活性と自己分解

CON群およびARG群の両群において、総カルパイン活性は、ジチオトレイトールの有無にかかわらず、安静脚に比べ収縮脚が有意な高値を示した (Fig. 2A & B)。しかしながら、ジチオトレイトール非存在下においては、CON群に比べARG群の収縮脚の活性が有意な低値を示した (Fig. 2B)。

骨格筋に発現するカルパインアイソフォームの1つであるカルパイン-1は、自己分解すると活性を示すために必要なCa²⁺濃度が低下する。そのため、自己分解型カルパイン-1の増加は、活性化を表す指標として用いられている。CON群では、安静脚に比べ収縮脚の自己分解型の割合が57%の高値を示したが、ARG群では安静脚と収縮脚との間に差異はみられなかった (Fig. 3A & B)。

足背屈力

CON群では、全ての刺激頻度において、安静脚に比べ収縮脚の足背屈力が低値を示した (Fig. 4)。一方、ARG群では、低頻度領域 (1 ~ 20 Hz) において、安静脚に比べ収縮脚の筋力が低値を示したが、高頻度領域 (50 ~ 80 Hz) においては、安静脚と収縮脚との間に差異はみられなかった。また、収縮脚の筋力は、全ての刺激頻度において、CON群に比べARG群が高値を示した。

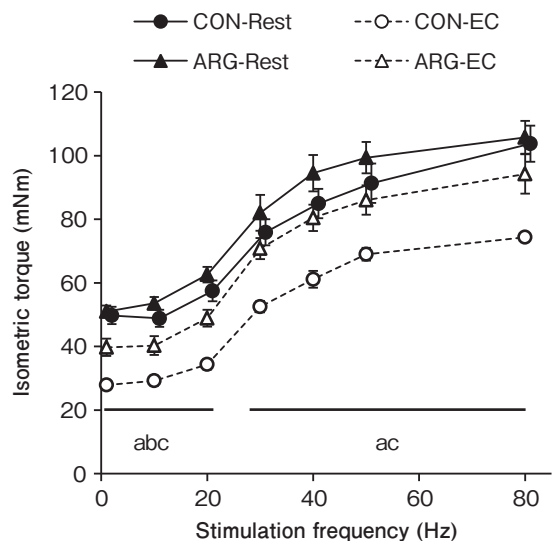


Fig. 4. L-arginine administration attenuate decline in dorsiflex torque following eccentric contractions. Isometric torque of anterior crural muscles were measured by peroneal nerve electrical stimulations (1-80 Hz). Values are means \pm SE (n = 7). ^a $p < 0.05$ CON-Rest vs. CON-EC, ^b $p < 0.05$ ARG-Rest vs. ARG-EC, ^c $p < 0.05$ CON-EC vs. ARG-EC. CON, control; ARG, arginine; EC, eccentric contractions.

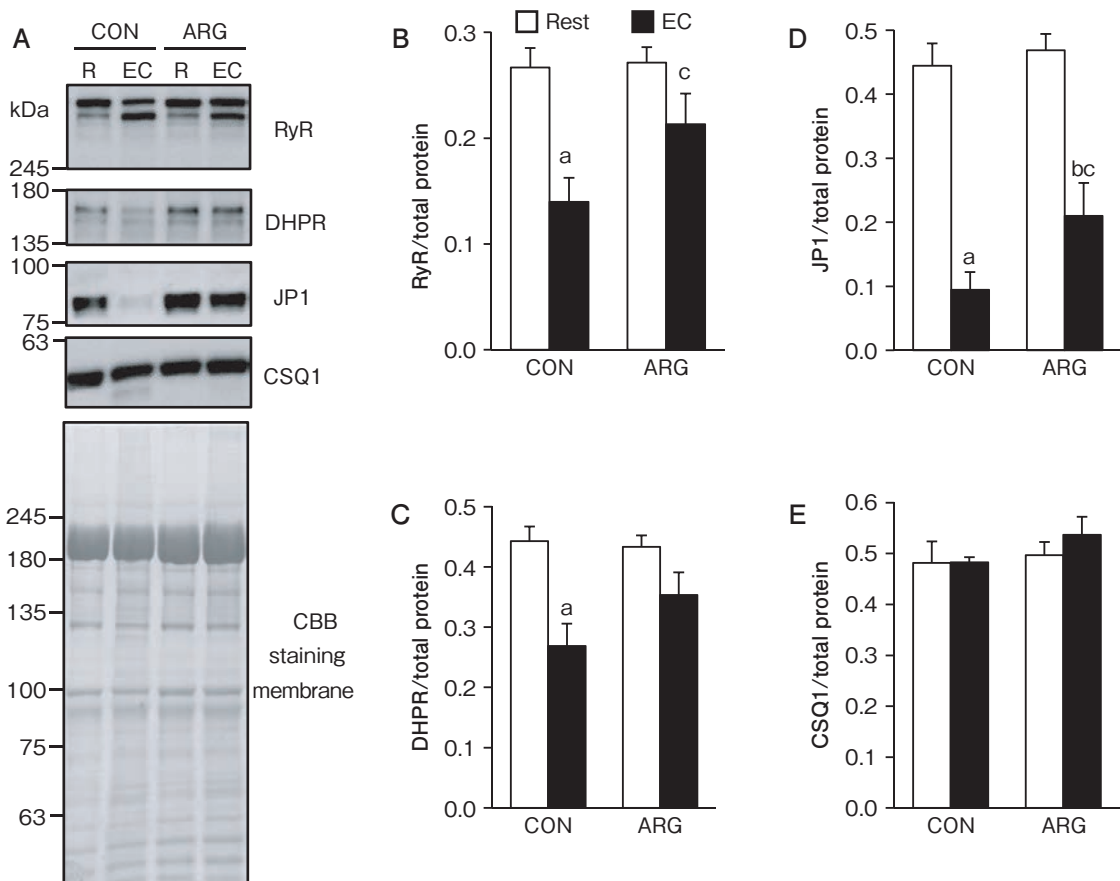


Fig. 5. L-arginine administration attenuate degradation of Ca^{2+} -regulatory proteins following eccentric contractions. A, Representative western blot of ryanodine receptor (RyR), dihydropyridine receptor (DHPR), junctophilin-1 (JP1), calsequestrin-1 (CSQ1). B-E, Quantification of the amount of RyR (B), DHPR (C), JP1 (D) and CSQ1 (E). Values are means \pm SE (n = 6-7). ^a $p < 0.05$ vs. CON-Rest, ^b $p < 0.05$ vs. ARG-Rest, ^c $p < 0.05$ vs. CON-EC. CON, control; ARG, arginine; R, rest; EC, eccentric contractions; CBB, coomassie brilliant blue.

Ca²⁺制御たん白質の発現量

CON群では、安静脚に比べ収縮脚のリアノジン受容体およびジヒドロピリジン受容体の発現量が低値を示したが、ARG群では、安静脚と収縮脚との間に差異はみられなかった (Fig. 5A-C)。また、ジャンクトフィリン1の発現量は、CON群とARG群の両群において、安静脚に比べ収縮脚の発現量が低値を示したが、収縮脚の発現量は、CON群に比べARG群が有意な高値を示した (Fig. 5A & D)。カルセクエストリン1の発現量は、CON群およびARG群の両群において、安静脚と収縮脚との間に差異はみられなかった (Fig. 5A & E)。

考 察

昨年度の本助成研究において我々は、分離大豆たん白質を20%含む食餌を4週間摂取させたラットの骨格筋では、カゼインを摂取させた場合に比べて、伸張性収縮後に低下した筋力がより早く回復することを確認している。本研究では、筋力が早期に回復する原因が、大豆たん白質に豊富に含まれるL-Argの作用にあると考え、分離大豆たん白質摂取時と同程度の量のL-Argの摂取が伸張性収縮後の筋力低下に及ぼす影響を検討した。その結果、L-Arg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を示唆する結果が得られた (Fig. 4)。

骨格筋の発揮張力が低下する原因の1つは、筋小胞体からのCa²⁺放出が減少することにより、収縮時に筋細胞内Ca²⁺濃度が十分に高まらなくなることにある⁸⁾。筋小胞体のCa²⁺放出には、横行小管に位置し、ボルテージセンサーとして機能するジヒドロピリジン受容体や筋小胞体のCa²⁺放出チャネルを構成するリアノジン受容体が主要な役割を果たしている。また、三つ組み構造の形成や維持に関わるジャンクトフィリンは、ジヒドロピリジン受容体からリアノジン受容体へのシグナル伝達に必須の役割を果たしている⁸⁾。これらの機能たん白質の発現量の低下が抑制あるいは軽減されることが (Fig. 5)、L-Argの摂取により筋力が早期に回復する原因の1つであると考えられる。

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。伸張性収縮後の筋たん白質分解にはカルパインが関与することが提唱されており³⁾、我々も伸張性収縮後にカルパインの活性や自己分解が増加すること^{1,9)}、およびカル

パイン阻害剤の投与により、伸張性収縮後の筋たん白質分解が抑制されることを確認している⁴⁾。本研究では、L-Argの摂取により、非還元条件下におけるカルパイン活性の増加が軽減されること (Fig. 2B)、およびカルパイン-1の自己分解の増加が抑制されることが観察された (Fig. 3)。L-Argから産生される一酸化窒素はS-ニトロシル化という可逆的修飾により、カルパインの活性や自己分解を阻害することが報告されている^{6,7)}。これらの知見と、L-Argの摂取により、安静時において、筋中の一酸化窒素濃度が上昇することを示唆する本研究結果は (Fig. 1)、S-ニトロシル化を介したカルパインの阻害が、L-Argの摂取により筋たん白質分解が軽減される原因の1つであることを示唆するものである。

以上のように、本研究では、L-Arg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、筋小胞体のCa²⁺放出に関わるたん白質の分解が軽減されることにあることが示唆された。

要 約

本研究では、L-アルギニン (L-Arg) の摂取が、伸張性収縮後のカルパイン活性化および筋力低下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ARG群とコントロール(CON)群に分類し、ARG群には300 mg/100 mLのL-Arg溶液を収縮負荷3日前より自由飲水投与した。投与3日後に、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3日後に、足背屈力を測定した後、収縮脚および安静脚から前脛骨筋を摘出した。これらを分析に用い、以下の結果を得た。

1. CON群では、カルパイン-1の自己分解が安静脚に比べ収縮脚で高値を示した。ARG群では、この差異はみられなかった。
2. CON群では、足背屈力が安静脚に比べ収縮脚で低値を示した。ARG群では、低頻度領域においてのみ、足背屈力が安静脚に比べ収縮脚で低値を示したが、全ての刺激頻度において、収縮脚の足背屈力はCON群に比べARG群で高値を示した。
3. CON群では、ジヒドロピリジン受容体、リアノジン受容体の発現量が、安静脚に比べ収縮脚で低値を示した。ARG群ではこれらの差異はみられなかった。

以上の結果から、L-Arg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、筋小胞体からのCa²⁺放出を制御するたん白質の分解が軽減されることにあることが示唆された。

文 献

- 1) 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.
- 2) Lynch GS, Fary CJ and Williams DA (1997): Quantitative measurement of resting skeletal muscle $[Ca^{2+}]_i$ following acute and long-term downhill running exercise in mice. *Cell Calcium*, **22**, 373-383.
- 3) Belcastro AN, Shewchuk LD and Raj DA (1998): Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem*, **179**, 135-145.
- 4) 神崎圭太 (2012) : 伸張性収縮による骨格筋機能低下の要因. 広島大学大学院総合研究科紀要I人間科学研究, **7**, 47-50.
- 5) 冨田 司, 横越英彦 (2001) : 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. 大豆たん白質研究, **4**, 70-76.
- 6) Koh TJ and Tidball JG (2000): Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells. *Am J Physiol*, **279**, C806-C812.
- 7) Michetti M, Salamino F, Melloni E and Pontremoli S (1995): Reversible inactivation of calpain isoforms by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, **207**, 1009-1014.
- 8) Wada M, Kuratani M and Kanzaki K (2013): Calcium kinetics of sarcoplasmic reticulum and muscle fatigue. *J Phys Fitness Sports Med*, **2**, 169-178.
- 9) 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.