

大豆たん白質の摂取により運動後に低下した筋力が早期に回復する機序の解明

神崎圭太*¹・渡邊大輝²・川上祐生³・高橋吉孝³・和田正信²

¹川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科

²広島大学大学院総合科学研究科

³岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

Effect of Nitric Oxide Synthesis Inhibition on Soy Protein Diet-Induced Facilitation of Force Recovery in Muscles Undergoing Eccentric Contractions

Keita KANZAKI*¹, Daiki WATANABE², Yuki KAWAKAMI³,
Yoshitaka TAKAHASHI³ and Masanobu WADA²

¹Faculty of Health Science and Technology, Department of Clinical Nutrition, Kawasaki University of Medical Welfare, Kurashiki 701-0193

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

³Faculty of Health and Welfare Science, Department of Nutrition, Okayama Prefectural University, Soja 719-1197

ABSTRACT

We have shown that long-term intake of soy protein isolate (SPI) prevents protein degradation and facilitates force recovery in rat skeletal muscle exposed to repeated eccentric contractions (ECC). To assess underlying mechanisms, we investigated the effects of inhibition of nitric oxide synthesis on the force recovery with the SPI intake. Male Wistar rats were allowed free access to a 20% casein (control: CON) or SPI diet. Following a 3-weeks feeding period, left anterior crural muscles were exposed to 200-repeated ECC. The contralateral rested muscles were used as controls. Immediately after ECC, several rats fed the SPI were allowed to drink water containing an inhibitor of nitric oxide synthase, N^G-L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME, 75 mg/kg/day). Three days following ECC, isometric torque produced by the anterior muscles was measured and then tibialis anterior muscles were removed and used for biochemical analyses. SPI muscles had significantly lower torque deficits than CON and SPI+L-NAME muscles. Under resting conditions, nitrite/nitrate concentration and calpain-1 S-nitrosylation in the SPI muscle were significantly higher than that in the CON muscle. These enhancements were associated with suppression of increased autolysis of calpain-1

*〒701-0193 倉敷市松島288

in SPI muscles subjected to ECC. These results suggest that the SPI intake induces nitrosylative inactivation of calpain and this may contribute to facilitate the force recovery after ECC. *Soy Protein Research, Japan* **20**, 159-164, 2017.

Key words : soy protein isolate, eccentric contraction, nitric oxide, calpain

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。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⁾。そのため、伸張性収縮が主動筋に負荷されることが、激しい運動後にパフォーマンスの低下が長期間継続する原因の1つであると考えられている。

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⁺濃度が上昇し²⁾、カルパインが活性化されること³⁾、およびカルパインの阻害により、伸張性収縮後の筋たん白質分解が抑制され、筋力が早期に回復することが報告されている⁴⁾。これらの知見は、カルパイン活性化の防止が、伸張性収縮を含む運動後におけるパフォーマンス回復の促進に有効な戦略となることを示唆する。

これまでの本助成研究において我々は、1) カゼインに比べ分離大豆たん白質 (soy protein isolate: SPI) を摂取させたラットの骨格筋では、カルパイン活性増加および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⁵⁾、2) SPI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活性化、筋たん白質分解および筋力低下が軽減されることを確認した。これらの知見からは、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つが、L-アルギニンから産生される一酸化窒素の働きにあることが推察される。

そこで本研究では、一酸化窒素の産生の阻害によって、SPI摂取に伴い伸張性収縮後に低下した筋力が早期に回復することがみられなくなるかどうかを検討した。

方 法

被験動物および群分け

4週齢のWistar系雄性ラットを、SPI群 (n=10) とコントロール (control; CON) 群 (n=5) 群に分類し、

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3週間自由摂取させた。SPI群の一部 (n=5) には、一酸化窒素合成酵素の阻害剤であるN^G-L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME) を、伸張性収縮終了直後より自由飲水投与した (75 ± 5 mg/kg/day, 以下SPI+L-NAME群と表記する)。

伸張性収縮の負荷および足背屈筋力の測定

三種混合麻酔下において、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、片脚の下腿前部の筋 (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サイクル繰り返した。反対脚は安静脚とした。収縮3日後に、麻酔下において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 (20 Hz)、足背屈筋力を測定した。その後、前脛骨筋を摘出し、下記の分析に供した。

筋中亜硝酸/硝酸イオン濃度の測定

一酸化窒素の代謝産物である亜硝酸/硝酸イオン濃度は、Griess法を用いて測定した。なお、硝酸イオンの還元には、塩化バナジウムを用いた。

カルパインのS-ニトロシル化および自己分解の測定

S-ニトロシル化の程度分析には、resin-assisted capture of S-nitrosothiols (SNO-RAC) 法を用いた⁶⁾。約50 mgの筋を凍結破砕後、5倍量の0.5% Triton X-100, protease inhibitor cocktailsを含むPENバッファ (PBS (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine) でホモジナイズした (このホモジネートをカルパイン-1の自己分解の測定に用いた)。10,000 rpmで10分間の遠心分離後 (4°C)、得られた上清に2.5% (最終濃度) SDSと0.1% (最終濃度) S-methyl methane thiosulfonateを加え、50°Cに20分間置いた。3倍量の冷却したアセトンを加え、-20°Cに20分間置いた後、5,000 rpmで5分間の遠心分離を行った (4°C)。上清除去後、得られた沈殿を70%アセトンで3回洗浄し、PENバッ

ファーに再溶解した。Bradford法でたん白質濃度を測定後、溶液の濃度を1.0 mg/mLに調整し、inputとして10 μ Lを回収した。残りの溶液(500 μ L)に1% (最終濃度) SDS, 100 mM (最終濃度) アスコルビン酸, 1 μ M (最終濃度) 塩化銅 (I) を加えた後、この溶液を15 mgのThiopropyl Sepharose 6Bを含む懸濁液と混合し、室温で2時間反応させた。1,000 rpmで10秒間の遠心分離後(室温)、上清を除去し、PENバッファーに再懸濁した。この作業を5回繰り返してカラムを洗浄した後、100 mM (最終濃度) 2-メルカプトエタノールを含むPENバッファーを50 μ L加え、S-ニトロシル化されたたん白質を溶出させた。なお、凍結破碎後から溶出までの全ての作業は暗所にて行った。

ホモジネート溶液、溶出液およびinput溶液に含まれるたん白質を7%SDS-PAGEにて分画後、ウエスタンブロットを行った。なお、抗体は抗カルパイン-1抗体(1/1,000倍希釈, Sigma, C0355)を用いた。

統計処理

統計量は平均値 \pm 標準誤差で表した。CON群とSPI群の比較にはStudentのt検定を、収縮脚と安静脚、およびCON群、SPI群、SPI+L-NAME群の比較には二元配置の分散分析を用いた。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

足背屈筋力

安静脚に比べ収縮脚の足背屈筋力は、CON群では58.5%に、SPI群では87.0%に、SPI+L-NAME群では68.4%に有意な低値を示した(Fig. 1)。また、収縮脚の筋力は、CON群およびSPI+L-NAME群に対してSPI群が有意な高値を示した。

筋中亜硝酸/硝酸イオン濃度

亜硝酸イオンと硝酸イオン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、これらのイオン濃度は一酸化窒素の産生量を間接的に示す指標として用いられている。安静脚の亜硝酸/硝酸イオン濃度は、CON群およびSPI+L-NAME群に対してSPI群が有意な高値を示した(Fig. 2)。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、SPI群およびSPI+L-NAME群ではこれらの差異は認められなかった。

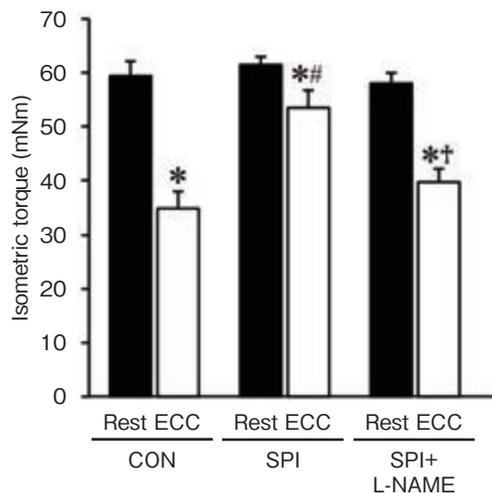


Fig. 1. Effect of soy protein diet and L-NAME administration on dorsiflex torque following eccentric contractions. Isometric torque of anterior crural muscles were measured by peroneal nerve electrical stimulations (20 Hz). Values are means \pm SE (n=5). * $p < 0.05$ vs. Rest, # $p < 0.05$ vs. CON, † $p < 0.05$ vs. SPI. CON, control group; SPI, soy protein isolate group; ECC, eccentric contractions.

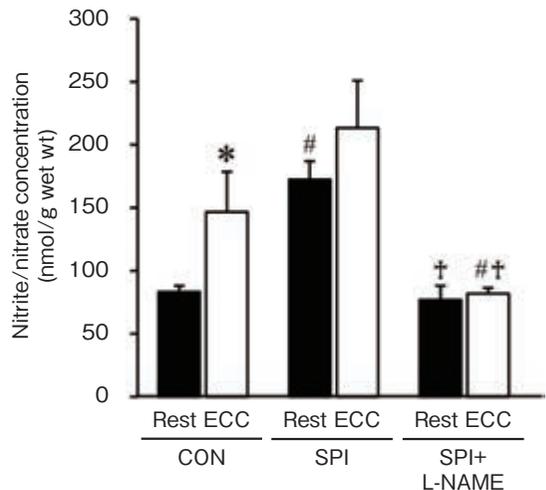


Fig. 2. Effect of soy protein diet and L-NAME administration on nitrite/nitrate concentration following eccentric contractions. Nitrite/nitrate concentration in tibialis anterior muscles was spectrometrically determined by using the Griess reaction. Values are means \pm SE (n=5). * $p < 0.05$ vs. Rest, # $p < 0.05$ vs. CON, † $p < 0.05$ vs. SPI. CON, control group; SPI, soy protein isolate group; ECC, eccentric contractions.

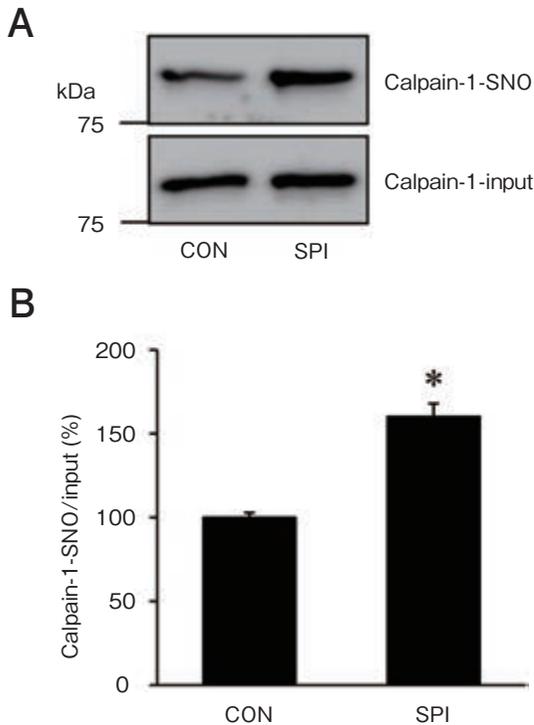


Fig. 3. Effect of soy protein diet on S-nitrosylation of calpain-1. A, Representative western blot of S-nitrosylated calpain-1. B, Quantification of the amount of S-nitrosylated calpain-1. Values are means \pm SE (n=5). * p <0.05 vs. CON. CON, control group; SPI, soy protein isolate group; SNO, S-nitrosylation.

カルパインのS-ニトロシル化および自己分解の程度

カルパイン-1のS-ニトロシル化の程度は、溶出液中のカルパイン-1量をinput中の量で除した値で表した (Fig. 3)。安静脚のS-ニトロシル化の程度は、CON群に対してSPI群が160%の高値を示した。

カルパインは自己分解すると活性化に必要な Ca^{2+} 濃度が低下するため、自己分解型の割合は活性化の指標として用いられている。CON群の自己分解型カルパイン-1の割合は、安静脚では13.9%、収縮脚では22.3%であり、安静脚に比べ収縮脚が有意な高値を示した (Fig. 4)。SPI群の自己分解型の割合には、安静脚と収縮脚との間で差異は認められなかった。

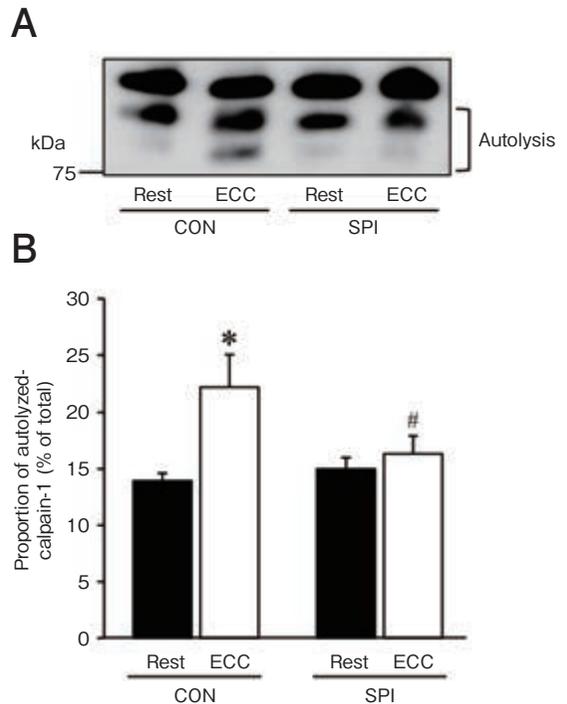


Fig. 4. Effect of soy protein diet on calpain-1 autolysis following eccentric contractions. A, Representative western blot of calpain-1. B, Quantification of the amount of autolyzed calpain-1. Values are means \pm SE (n=5). * p <0.05 vs. Rest, # p <0.05 vs. CON. CON, control group; SPI, soy protein isolate group; ECC, eccentric contractions.

考 察

一昨年度および昨年度の本助成研究において我々は、SPIの摂取やSPI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3日後の筋力低下が軽減されることを確認している⁵⁾。本研究では、SPIおよびL-NAME（一酸化窒素合成酵素阻害剤）の投与が、伸張性収縮後の筋力に及ぼす影響を検討した。その結果、L-NAMEの投与により、SPI摂取で認められる筋力低下の軽減効果や亜硝酸/硝酸イオン濃度の増加がみられなくなることが明らかとなった (Figs. 1 and 3)。これらの結果は、SPI摂取により筋力低下が軽減される原因の1つが、L-アルギニンから産生される一酸化窒素の作用にあることを示すものである。

伸張性収縮後に筋力低下が数日間継続する原因の1つは、カルパインが筋小胞体 Ca^{2+} 放出に関わるたん白質（ジヒドロピリジン受容体、ジャンクトフィリンな

ど)を分解することにある^{4,7)}。L-アルギニン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の増加を抑制する^{8,9)}。本研究では、SPIの摂取により、1)カルパイン-1のS-ニトロシル化が増加すること (Fig. 3)、伸張性収縮後のカルパイン-1の自己分解の増加が抑制されることが観察された (Fig. 4)。これらの知見は、S-ニトロシル化の増加によりカルパインの活性化が抑制さ

れることが、SPI摂取に伴い筋力低下が軽減される要因の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、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、L-アルギニンから産生される一酸化窒素が、S-ニトロシル化を介してカルパインを阻害することにあることが示唆された。

要 約

本研究は、分離大豆たん白質 (SPI) および一酸化窒素合成酵素阻害剤 (L-NAME) の投与が、伸張性収縮後の筋力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群とコントロール (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3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。SPI群の一部には、収縮終了直後からL-NAMEを自由飲水投与した (75 mg/kg/day)。収縮終了3日後に足背屈力を測定した後、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. 収縮脚の足背屈筋力は、CON群およびSPI+L-NAME群に比べSPI群が高値を示した。
2. 安静脚の亜硝酸/硝酸イオン濃度は、CON群およびSPI+L-NAME群に比べSPI群が高値を示した。
3. 安静脚のカルパイン-1のS-ニトロシル化の程度は、CON群に比べSPI群が高値を示した。
4. CON群では自己分解型カルパイン-1の割合が、安静脚に比べ収縮脚で高値を示したが、SPI群ではこれらの差異がみられなかった。

以上の結果から、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、L-アルギニンから産生される一酸化窒素が、S-ニトロシル化を介してカルパインを阻害す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) 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.
- 4) Kanzaki K, Watanabe D, Kuratani M, Yamada T, Matsunaga S and Wada M (2017): Role of calpain in eccentric contraction-induced proteolysis of Ca^{2+} -regulatory proteins and force depression in rat fast-twitch skeletal muscle. *J Appl Physiol*, **122**, 396-405.
- 5) 神崎圭太, 渡邊大輝, 和田正信 (2015): 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-. 大豆たん白質研究, **18**, 192-197.
- 6) Guo J, Gaffrey MJ, Su D, Liu T, Camp DG 2nd, Smith RD and Qian WJ (2014): Resin-assisted enrichment of thiols as a general strategy for proteomic profiling of cysteine-based reversible modifications. *Nat Protoc*, **9**, 64-75.
- 7) Corona BT, Balog EM, Doyle JA, Rupp JC, Luke RC and Ingalls CP (2010): Junctophilin damage contributes to early strength deficits and EC coupling failure after eccentric contractions. *Am J Physiol*, **298**, C365-C376.
- 8) 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.
- 9) Koh TJ and Tidball JG (2000): Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells. *Am J Physiol*, **279**, C806-C812.