

大豆ペプチド AM 摂取が骨格筋萎縮抑制に及ぼす効果について

山田 茂¹⁾・藤田 瞳¹⁾・尾関 彩²⁾・松本葉菜乃²⁾・木崎恵梨子³⁾
山本かおり⁴⁾・大橋 文⁵⁾

食生活科学科¹⁾ 食物栄養学専攻²⁾ 東京湾岸リハビリテーション病院³⁾
株式会社 若菜⁴⁾ 東京都立小平特別支援学校⁵⁾

The effect of soybean peptide AM intake on the skeletal muscle atrophy suppression

Shigeru YAMADA, Hitomi FUJITA, Aya OZEKI, Hanano MATSUMOTO, Eriko KIZAKI,
Kaori YAMAMOTO and Aya OHASHI

1) Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

2) Graduate School of Human Life Sciences

3) Tokyo Bay Rehabilitation Hospital

4) Wakana Co Ltd

5) Tokyo Metropolitan Kodaira special support education schools

This experiment studied the effects of soy peptide AM intake on skeletal muscle atrophy suppression. The experiments were carried out using an older mouse. The skeletal muscle atrophy was induced by using a tail suspension method. After 1 week of tail suspension, we observed the effect of soybean peptide AM intake on the skeletal muscle atrophy. The results showed that the wet weight per body weight of the soleus muscle was statistically significantly reduced by the tail suspension but the weight of the plantaris muscle did not change. Atrophy of the soleus muscle of soybean peptide AM intake group was statistically significantly suppressed. In addition, atrophy of muscle cell (diameter of muscle measured) by the soybean peptide AM uptake was inhibited. In addition, loss of muscle protein contents was suppressed by soy peptide AM intake. Based on these experiments, a study was conducted on the skeletal muscle atrophy suppression mechanism of soybean peptide AM intake. In this experiment, we have studied the behavior of IGF-1, which is promoting the muscle growth of by soy peptide intake. The concentration of IGF-1 in skeletal muscle tissue by soy peptide AM intake was statistically significantly increased. As a result of observation of the IGF-1mRNA expression in skeletal muscle, in soy peptide AM uptake, IGF-1mRNA was statistically significantly increased. In addition, the expression of the receptor IGF-1RmRNA was shown to have increased similarly. From these results, it is suggested that intake of soy peptides AM induces IGF-1 gene expression and promotes protein synthesis by the autocrine mechanism, thereby suppressing muscle atrophy.

Key words : Skeletal muscle atrophy (骨格筋萎縮), Soybean peptide AM (大豆ペプチド AM), IGF-1 (インスリン様成長因子-1), IGF-1mRNA (インスリン様成長因子-1mRNA), IGF-1RmRNA (インスリン様成長因子-1 受容体 mRNA)

I. はじめに

身体組成は加齢とともに大きく変化する。ヒトでは 30 歳を過ぎると 10 年ごとに約 5% 前後の割合で筋量が減少する。また、60 歳を超えるとその減少率はさ

らに加速するといわれている。この骨格筋の萎縮は、骨格筋内でのタンパク質の合成と分解のインバランスが生じ、筋タンパク質量が減少することによって起こる。昨今ではサルコペニアと呼ばれ加齢に伴う骨格筋

の疾患として世界規模で認定されるようになった。

高齢者のサルコペニアの原因は、加齢、低栄養や身体活動量の低下が要因として挙げられる。また、高齢者の場合、筋力の低下が誘導され、それがもとで転倒や骨折のリスクが増加し、寝たきりなど要介護状態に陥る場合も少なくない。この筋萎縮を改善する方法として運動が効果的であるとの報告がなされている。しかしながら運動することのできない介護状態の人やベッド生活を強いられた人の筋萎縮を予防・改善するためには運動以外の方法が求められる。

そこで本研究では、大豆ペプチドに着目し、高齢者の筋萎縮という観点から無負荷モデルで引き起こされる筋萎縮に対する大豆ペプチドの効果を検討した。

II. 実験方法

a. 動物：雄性 ICR リタイアマウス（体重；平均 $42.3 \pm 2.7\text{g}$ 、日本エスエルシー株式会社）20 匹を用いた。これらのマウスを純水摂取群（以下 W）、純水摂取＋尾部懸垂群（以下 WTS）、大豆ペプチドハイニュート AM 摂取群（以下 AM）大豆ペプチドハイニュート AM 摂取＋尾部懸垂群（以下 AMTS）の 4 群に 5 匹ずつ分けた。

b. 飼育方法：室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間昼夜逆転明暗サイクルの環境下にて、食餌及び飲料水を自由摂取とし、7 日間個別ゲージにて飼育した。食餌は MF（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、飲料水は純水（正起薬品工業株式会社）及び 175mg/ml に調製した大豆ペプチドハイニュート AM（不二製油株式会社）を用いた。

c. 不活動方法：1949 年に Emily R. Morey¹¹⁾ が考案した尾部懸垂法を用いた。

d. 骨格筋の採取：尾部懸垂 7 日後、W、WTS、AM、AMTS 群のマウスを麻酔下で屠殺して、体重および遅筋であるヒラメ筋と速筋である足底筋をそれぞれ採取した。

e. 測定項目

1. 筋湿重量の測定

ヒラメ筋と足底筋の重量は電子天秤（METTLER TOLEDO 株式会社）にて小数第 2 位まで計測した。

2. 骨格筋タンパク質量の測定

採取した骨格筋を分析するまで -80°C で保存し使用した。試料となる骨格筋は、乳鉢にて液体窒素下で破

碎後、 $300\mu\text{l}$ の PBS で懸濁させ、 1ml チューブに懸濁液を移した。乳鉢及び乳鉢棒に付着している破砕した骨格筋の残渣を取るために再度 PBS を乳鉢に入れ、その懸濁液をチューブへ移し、計 $1000\mu\text{l}$ に懸濁し、試料とした。筋原線維タンパク質含有量は、ブラッドフォード法に基づき 595nm の波長で Odyssey (LI-OCR, Inc) にて吸光度を測定した。検量線は、BSA (BIO RAD, Bovine Serum Albumin Standard Set) を使って引き、タンパク質量を求めた。

3. 筋細胞面積の測定

試料は、筋細胞横断面積を測定するために骨格筋を液体窒素で冷やしたイソペンタンで凍結させたのち液体窒素に移し保存したものを使用した。凍結した骨格筋を -20°C のクリオスタット (LEICA, CM1510 S) へ移し、コンパウンド (LEICA, Surgipath FSC 22) で試料チャックへ垂直になるように固定し、骨格筋の中腹部をクリオスタット (LEICA, CM1510 S) で $10\mu\text{m}$ の厚さでスライスし、スライドガラスにつけ、風乾燥させ、切片を作製した。HE 染色を行い、筋細胞面積を各群 100 個ずつデジタルマイクロスコープ (KH-7700, 株式会社 HYROX) で計測した。

4. 統計的処理

データは平均±標準偏差で表した。データは一元配置分散分析を用いて有意差を確認し、多重比較 (Tukey) で各群の有意性について検討した。 $P < 0.05$ を有意とした。

遺伝子発現の解析

1) サンプルの調整

骨格筋を採取前に使用する器具類はオートクレーブで滅菌操作を行った。また加熱できないものに関しては RNase AWAY (Molecular Bio Products) を用いた。採取した骨格筋を RNA や RNase コンタミネーションを除去するために RNAlater (QUIAGEN) に浸した。

2) RNA 精製

QUIAGEN の miRNeasy Mini kit を用いて RNA の精製をおこなった。1) で調整したサンプルをチューブ (1.5ml 滅菌バイオマッシャー：株式会社アシスト) に移し、 $700\mu\text{l}$ の QIAzol Lysis Regent を加えて、ホモジナイズした。ホモジナイズは株式会社ニッピのパワーマッシャーを用いた。操作方法は kit のプロトコルに従った。遠心操作は日立工機株式会社の himac

CR 15D を用いた。

3) RNA 精製度の確認

2) で精製した RNA の 1 部を別のチューブに移し、10mM Tris-HCl pH7.5 で 12 倍に希釈をした。これを A_{260} と A_{280} で測定し精製度を確認した。測定には Bio Photometer Plus (Eppendorf) を用いた。精製度は A_{260}/A_{280} が 1.8 ~ 2.1 が適当である。また RNA 濃度の算出は、 $A_{260} = 1$ が $40\mu\text{g}/\text{m}\ell$ として RNA 濃度 = $40\mu\text{g}/\text{m}\ell \times A_{260} \times \text{希釈倍率}$ の式より行った。

4) cDNA の合成

2) で精製した RNA を用いて cDNA の合成を行った。cDNA の合成には、Applied Bio systems の High Capacity RNA-to-cDNA kit を用いた。操作方法は kit のプロトコルに従った。酵素反応装置はタイテック株式会社の Gene Thermo Unit GTU-1615 を用いた。

5) RT-PCR $\Delta\Delta$ Ct 法による解析

合成した cDNA をテンプレートとして PCR を行った。RT-PCR 測定には Applied Bio systems の ABI PRISM 7000 を用いた。96well プレートで内在性コントロールを β -アクチンとし、 $\Delta\Delta$ Ct 法により解析した。IGF-1 と IGF-1R の遺伝子プローブには、Taq Man \otimes Gene Expression Assays Mm 00439560 と Taq Man \otimes Gene Expression Assays Mm 00802831 を用いた。

6) 統計処理

ターゲット遺伝子、及び内在性コントロール遺伝子 (β -actin) の Ct 値をソフトウェア上で算出し、Ct 値の平均値と標準偏差を求めた。内在性コントロールの Ct 値を用いた初期 RNA 量の補正を行い、標準偏差の値から、 Δ Ct 値の標準偏差を算出した。基準とするサンプルの Δ Ct 値を他のサンプルの Δ Ct 値から引いて得られた値を $\Delta\Delta$ Ct 値とした。

III. 実験結果

1. 大豆ペプチド AM 摂取の筋湿重量に対する効果

W、WTS、AM、AMTS の各群の筋湿重量を体重で除し、平均値を比較した。足底筋において、W 群は $0.56 \pm 0.09\text{mg}/\text{g}$ 、WTS 群は $0.51 \pm 0.03\text{mg}/\text{g}$ 、AM 群は $0.54 \pm 0.04\text{mg}/\text{g}$ 、AMTS 群は $0.57 \pm 0.06\text{mg}/\text{g}$ であった。各群の平均値間には統計的に有意差はみられなかった。ヒラメ筋においては、W 群は $0.29 \pm 0.05\text{mg}/\text{g}$ 、WTS 群は $0.24 \pm 0.04\text{mg}/\text{g}$ 、AM 群は $0.26 \pm 0.04\text{mg}/\text{g}$ 、AMTS 群は $0.28 \pm 0.03\text{mg}/\text{g}$ であった。Tukey 法で検

定した結果、W 群と WTS 群の平均値間に統計的に有意差がみられた。

2. 大豆ペプチド AM 摂取の骨格筋タンパク質量に対する効果

実験 2 では W、WTS、AM、AMTS 各群の骨格筋タンパク質量の平均値を比較した。足底筋において、W 群 $2.48 \pm 0.37\text{mg}$ 、WTS 群は $2.53 \pm 0.16\text{mg}$ 、AM 群は $2.75 \pm 0.35\text{mg}$ 、AMTS 群は $2.74 \pm 0.62\text{mg}$ であり、各群の平均値間に統計的に有意差はみられなかった。ヒラメ筋においては、W 群は $1.13 \pm 0.15\text{mg}$ 、WTS 群は $0.52 \pm 0.11\text{mg}$ 、AM 群は $1.14 \pm 0.28\text{mg}$ 、AMTS 群は $1.05 \pm 0.08\text{mg}$ であった。W 群と WTS 群の間に危険率 1%未満で有意差がみられた (図 1)。また WTS 群と AMTS 群の平均値間にも統計的な有意差がみられた。従って、AM 摂取によりヒラメ筋において骨格筋タンパク質の分解が抑制されていることが判明した。

3. 大豆ペプチド AM 摂取の筋細胞面積に対する効果

実験 3 では W、WTS、AM、AMTS の各群の筋細胞面積の平均値を比較した。足底筋において、W 群は $1,593 \pm 794\mu\text{m}^2$ 、WTS 群は $1,331 \pm 700\mu\text{m}^2$ 、AM 群は $1,680 \pm 673\mu\text{m}^2$ 、AMTS 群は $1,476 \pm 652\mu\text{m}^2$ であり、各群の平均値間に統計的な有意差はみられなかった。ヒラメ筋においては、W 群は $1,605 \pm 465\mu\text{m}^2$ 、WTS 群は $829 \pm 279\mu\text{m}^2$ 、AM 群は $1,528 \pm 418\mu\text{m}^2$ 、AMTS 群は $1,556 \pm 447\mu\text{m}^2$ であり、統計処理をすると、W 群と WTS 群の平均値間に有意差がみられた。また WTS 群と AMTS 群の平均値間にも統計的な有意差がみられた。よって AM 摂取によりヒラメ筋において筋細胞面積の縮小が抑制されていることがわかった。

4. 大豆ペプチド AM 摂取が筋 IGF-1 発現に及ぼす効果

AM 投与が TNF α による筋タンパク質分解抑制の効果に着目して研究を進めたが明確な効果は観察されなかった。そこで筋タンパク質合成系に着目し、AM 摂取による IGF-1 の挙動に着目して実験を行った。図 2 は AM 摂取による筋肉中の IGF-1 の濃度を示したものである。尾懸垂によって IGF-1 濃度は増加し、W 群の平均値 $1.25\text{ng}/\text{ml}$ に比較して WTS 群 (b) は $1.70\text{ng}/\text{ml}$ で統計的に有意に高い値を示した。さらに AM 群は W 群の平均値に比較して、統計的に有意に高い値を示し

た。この結果から、AM 摂取によって骨格筋萎縮が抑制された要因として IGF-1 の増加が考えられる。図には 4 群のそれぞれの間の有意差を示すために a、b、c の記号を用いて示した。W 群は a、WTS 群は b (W 群と WTS 群に有意差あり) AM 群は bc (W と有意差あり、WTS 群と AMTS 群との間には有意差なし) AMTS 群は c (W 群及び WTS 群との間に有意差あり、AM 群との間に有意差なし) すなわち、異なる記号には群間の平均値に有意差が ($p < 0.05$) あることを示した。

5. 大豆ペプチド AM 摂取が筋 IGF-1mRNA 発現に及ぼす効果

骨格筋組織での IGF-1 量の増加から骨格筋細胞での

遺伝子発現が想定された。そこで、IGF-1mRNA の測定を行い、結果を図 3 に示した。W 群の平均値に比較して AM 投与群の平均値は高い値を示した。しかしながら尾牽引によって、IGF-1mRNA は減少し、筋組織での IGF-1 の消長とは明らかに異なる挙動を示した。

6. 大豆ペプチド AM 摂取が筋 IGF-1RmRNA 発現に及ぼす効果

骨格筋組織での IGF-1mRNA の増加から AM 投与による自己分泌機構が想定される。そこで IGF-1RmRNA の測定を行った。その結果を図 4 に示した。W 群の平均値と AM 群の平均値を比較すると明らかに AM 投与によって IGF-1RmRNA 値が高い値を示した。

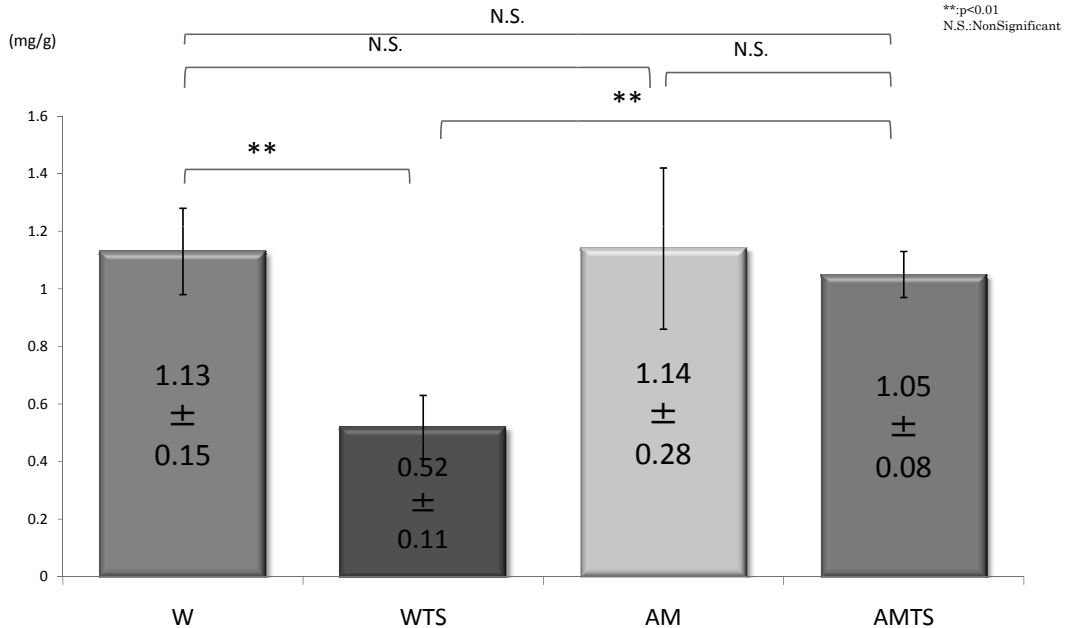


図 1 大豆ペプチド AM 摂取の骨格筋タンパク質に対する効果

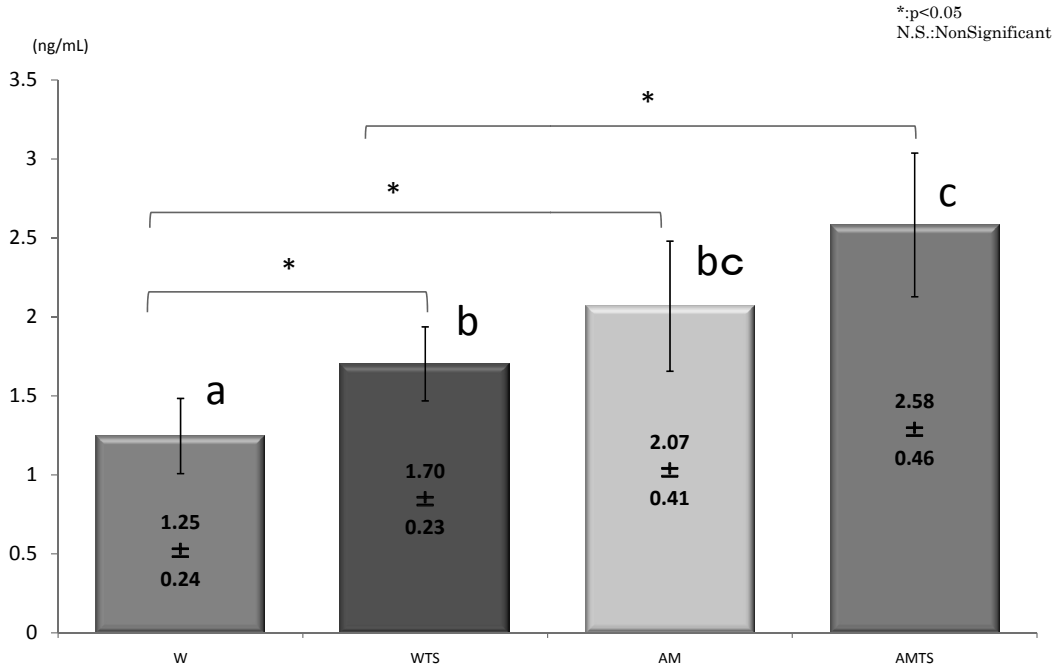


図 2 大豆ペプチド AM 摂取が骨格筋 IGF-1 発現に及ぼす効果

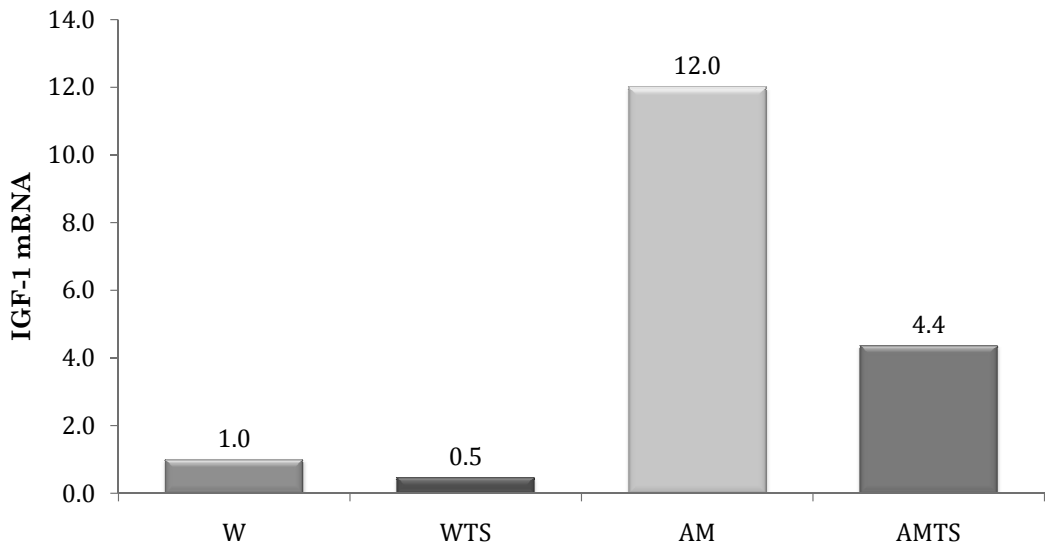


図 3 大豆ペプチド AM 摂取が骨格筋 IGF-1mRNA 発現に及ぼす効果

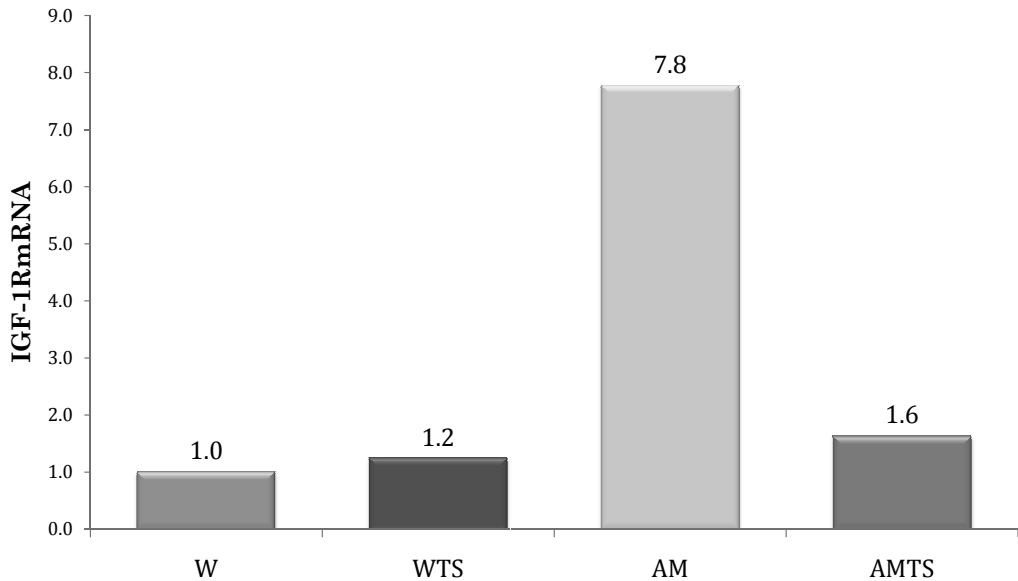


図4 大豆ペプチド AM 摂取が骨格筋 IGF-1RmRNA 発現に及ぼす効果

IV. 考察

日本の65歳以上の高齢者数は2012年度時点で3000万人を超え全人口に占める高齢率は24.1パーセントである。今後も高齢化は加速し、2060年には高齢化率は39.9パーセントに達し、2.5人に1人が65歳以上となると予想されている。その中にはロコモティブシンドロームあるいはサルコペニアと呼ばれるような運動器に障害を持つ方が数多く出現することが予想される。これら運動器の障害は適切な運動処方によって改善されることが知られているが、運動処方を施すことのできない人に対しては何らかの栄養学的処方が求められる。今回の研究はそのことを想定して行った。骨格筋萎縮モデルとして尾牽引法を用いたが、高齢者の筋萎縮の機構を探る上で適切でない部分もある。しかしながら、不活動による萎縮誘導モデルとしては一般的に用いられていることから、今回はこのモデルを用いて研究を進めた。

これまで、分子量の異なる大豆タンパク質を用いて研究を行った結果、大豆ペプチドAMのみが骨格筋の萎縮を抑制した。この大豆ペプチドAMの性質については明らかにされていないが、分子量5,000以下のさまざまなペプチドの混合物である。

今回の実験結果、大豆ペプチドAMを摂取するこ

とによって明らかに骨格筋萎縮が抑制された、したがってこの大豆ペプチドAMの中には骨格筋萎縮を抑制する物質が含まれていることが推測される。しかしながら、大豆ペプチドAMを使つての骨格筋に対する影響について観察した研究は数少ない。唯一、新開らはサルコペニアを合併しやすい虚弱高齢者に対して、筋力向上トレーニングプログラムに大豆ペプチドの栄養介入を加え、その相乗効果を検討している。¹⁾ 年齢が70歳以上で過去1年以内に1回以上の転倒経験者を運動プログラムのみの群と運動+週4本の大豆ペプチド飲料を摂取した群に分け、介入前後で各種パラメーターを測定した。その結果、12週間の介入プログラム実施前後で通常歩行速度、膝伸展力、及び白血球総数において、運動群及び運動+大豆ペプチド群とも改善する傾向が見られたが、運動+大豆ペプチド群における変化のみが有意であったとしている。しかしながら、大豆ペプチドのみの効果については観察していない。また、大豆ペプチドの作用機構についても不明である。

一般的に、骨格筋萎縮抑制機構の解明は筋タンパク質分解機構や合成機構に着目した研究が行われている。これまで大豆ペプチドの骨格筋萎縮や肥大に及ぼす影響については幾つか報告されている。²⁾ その中で

も特に目を引くのが大豆ペプチドの成長ホルモンの分泌促進に関わる研究である。³⁾ 成長ホルモンは骨格筋のタンパク質合成に重要な転写因子 STAT5 を活性化し IGF-1 の合成を高め、タンパク質同化に機能する。

本実験で骨格筋の IGF-1 の挙動について検討した結果、大豆ペプチドの摂取によって骨格筋での IGF-1 遺伝子の発現量は明らかに増加した。この事実から大豆ペプチドの骨格筋萎縮抑制に及ぼす効果はタンパク質合成を促すことによるものだと考えられる。しかしながら、この自己分泌系は尾牽引によって抑制し、大豆ペプチドの摂取により IGF-1 遺伝子と IGF-1R 遺伝子発現ともに低下することが明らかになった。すなわち、成長を促す食材を摂取しても環境の変化によってその効果は異なるものと考えられる。

まとめ

本実験は大豆ペプチド AM 摂取が骨格筋萎縮抑制に及ぼす効果について研究した。高齢マウスを用いて実験を行った。また、骨格筋萎縮誘導には尾牽引法を用いた。1 週間の尾牽引後、大豆ペプチド AM 摂取の影響を観察した。その結果、遅筋であるヒラメ筋の体重当たりの筋湿重量は、尾牽引によって統計的に有意に減少した。速筋である足底筋の重量は変化しなかった。大豆ペプチド AM 摂取群のヒラメ筋の萎縮は、統計的に有意に抑制された。また、大豆ペプチド AM 摂取により筋組織を構成する筋細胞の萎縮は抑制された。さらに、筋タンパク質量は、大豆ペプチド AM 摂取によりその減少が抑制された。これらの実験を踏まえ、大豆ペプチド AM の骨格筋萎縮抑制機構に関する研究を行った。骨格筋組織における IGF-1 の濃度は大豆ペプチド AM 摂取により、統計的に有意に増加した。また、骨格筋での IGF-1mRNA 発現は、明らかに大豆ペプチド AM 摂取により、統計的に有意に増加した。また、その受容体である IGF-1RmRNA は、IGF-1mRNA 同様増加した。以上の結果、大豆ペプチド AM の摂取は IGF-1 遺伝子発現を誘導し、自己分泌機構によりタンパク質合成を促し、筋萎縮を抑制しているものと考えられる。

参考文献

- 1) 新開省二、金憲経、渡辺直紀、李相侖、斉藤京子、鈴木隆雄：虚弱高齢者を対象とした運動 vs. 運動 + 栄養介入（大豆ペプチド）の効果に関する無作為化比較試験。栄養学雑誌 2009; 67: 76-83
- 2) Masuda K., Maebuchi M., Samoto M., Ushijima Y., Uchida Y., Kohno M., Ito R., Hirotsuka M.: Effect of soy-peptide intake on exercise-induced muscle damage. *Jpn. J. Clin. Sports Med.*, 15, 228-235 (2007).
- 3) Nakanishi Y, Shirakawa S, Maebuchi M, Okubo M, Ikeda T, Inage H, Suzuki M., Samoto M., Kimura S.: Effects of soy protein intake in peptide form on delayed-onset muscle soreness induced by eccentric exercise. *J. Sport Sci. Osteo. Thera.*, 13, 9-19 (2011)

