

牛乳タンパク質による廃用性筋萎縮と萎縮筋の 回復に対する効果に関する研究 —乳清タンパク質とカゼインの効果の比較—

名古屋工業大学工学研究科 下村 吉治

要 約

骨格筋の萎縮は、筋不活動及び老化などによってもたらされるが、その予防策を検討することは重要である。タンパク質摂取は、筋タンパク質の維持に重要であり、摂取タンパク質のアミノ酸組成によりその効果が異なる可能性が考えられる。その例として、乳タンパク質を構成するカゼインと乳清タンパク質があげられる。カゼインと比較し、乳清タンパク質は消化吸収が速いタンパク質であり、そのアミノ酸組成においては、タンパク質合成を促進する分岐鎖アミノ酸をカゼインよりも多く含む。そこで、本実験では、ラット後肢懸垂によって起こる骨格筋の萎縮に対する食餌中の乳清タンパク質とカゼインの影響を比較した。5週齢雄ラットを5日間の予備飼育後、後肢懸垂中の食餌により、カゼイン群と乳清タンパク質群に分けた。また、後肢懸垂しない通常飼育のラットを後肢懸垂の対照として、同様にカゼイン群と乳清タンパク質群に分け、合計4群とした。[実験1] カゼイン食と乳清タンパク質食ともに食餌中タンパク質含量を AIN-93Gと同様の17.08%とした。カゼイン食として AIN-93G を用い、乳清タンパク質食として AIN-93G中のカゼインを乳清タンパク質に置き換えた餌を用いた。[実験2] 食餌中タンパク質含量を、カゼイン食と乳清タンパク質食ともに30%とした。両実験とも、6日間の後肢懸垂後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で屠殺し、ヒラメ筋を採取した。体重、摂食量、ヒラメ筋重量、筋タンパク質濃度を測定した。両実験ともに、体重、摂食量に差は見られなかった。また、ヒラメ筋重量は、6日間の後肢懸垂により、約55%に減少したが、食餌群間では差はなかった。しかし、実験1では、後肢懸垂による総タンパク質濃度の減少は、カゼイン群と比較して、乳清タンパク質群で抑制される傾向が見られた。実験2では、筋総タンパク質濃度の減少は、乳清タンパク質群と比較して、カゼイン群で有意に抑制された。これらの結果より、後肢懸垂による筋タンパク質の減少に対する食餌タンパク質の乳清タンパク質とカゼインの影響は、食餌タンパク質含量によって異なることが示唆された。

キーワード：乳清タンパク質、カゼイン、食餌タンパク質、分岐鎖アミノ酸、廃用性筋萎縮、後肢懸垂、ラット

1. はじめに

タンパク質を構成するアミノ酸の中で、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids (BCAA) : バリン、ロイシン、イソロイシン) の占める割合は 15%~26% と高く、また、BCAA は生体のタンパク質中にも比較的多く含まれているので、ヒトは多くの BCAA を摂取し、また体内に蓄えている。近年、BCAA (特にロイシン) は、遺伝子発現における mRNA 翻訳を刺激してタンパク質合成を促進し、同時にリソゾーム系のタンパク質分解を抑制する作用を持つことが明らかにされた¹⁾。したがって、BCAA は体づくり (特に骨格筋の形成) に有効であると考えられる。これらの所見より、BCAA はタンパク質合成の主要成分であると同時に、タンパク質代謝を調節する因子として作用するアミノ酸であると言える。

牛乳タンパク質は約 22% の BCAA を含んでおり、他の動物性および植物性タンパク質 (BCAA 含量: 15~20%) と比べるとその含量は高い。一方、牛乳タンパク質の成分は、約 80% のカゼインと残り約 20% の乳清タンパク質から成っているが、カゼインと乳清タンパク質の BCAA 含量は、それぞれ 20% と 26% であり、かなり乳清タンパク質の BCAA 含量は高い²⁾。さらに、乳清タンパク質は、カゼインに比べて消化吸収されやすいので、その摂取後約 1 時間の早さで血中ロイシン濃度がピークに達することも分かっている^{3, 4)}。この事実は、乳清タンパク質とカゼインの筋タンパク質代謝に及ぼす影響が異なることを示唆している。

骨格筋は、長期にわたって不活動になると萎縮 (廃用性筋萎縮) することが知られている⁵⁾。これは、怪我等により運動を負荷しないとその部分の筋肉が萎縮すること、さらには、運動トレーニングにより肥大させた筋肉もトレーニングを休止すると次第に筋肉が落ちることが広く知られている。

BCAA は、上述のように筋肉づくりを促進するので、廃用性筋萎縮を抑制し、また萎縮筋の回復を促進する可能性が考えられる。このことから、廃用性筋萎縮や萎縮筋の回復時には、牛乳タンパク質は優れたタンパク質であり、特に乳清タンパク質についてはその効果が期待される。

そこで、本研究では、ラットの廃用性筋萎縮モデルを用い、廃用性筋萎縮が起こる期間に乳清タンパク質もしくはカゼインを食餌タンパク質として摂取させた場合の効果を比較検討した。

2. 方法

2-1. 実験動物

実験動物として、5 週齢体重約 110g の Sprague-Dawley 系雄ラット (日本 SLC (株)、静岡) を用いた。ラットを個別ケージに入れ、室温 22±2℃ 12 時間ごとの明暗サイクル (明期: 8 時-20 時) において飼育した。ラットの食餌は AIN-93G (日本クレア (株)、東京) を用い、食餌および水を自由摂取の条件で、5 日間予備飼育した。ラットの入荷した日を 1 日目として、4 日目と 5 日目に、全ラットに後肢懸垂を 1 時間行い、本実験での後肢懸垂に慣れさせた。体重測定は、毎朝 10 時半に行った。

5日間予備飼育の後ラットを以下の4群に分け、各群n=6とした。ラットの群分けでは、各群の平均体重が同じになるように調整した。

1. CT-Casein (通常飼育、カゼイン食)
2. CT-Whey (通常飼育、乳清タンパク質食)
3. HS-Casein (後肢懸垂、カゼイン食)
4. HS-Whey (後肢懸垂、乳清タンパク質食)

後肢懸垂群のラットは、6日目(懸垂初日)の午前11時にペントバルビタールナトリウム麻酔下(50 mg/kg 体重)で、尾部に懸垂用の金具を取り付け、覚醒後に後肢懸垂用ケージにて後肢懸垂を開始し、その状態を6日間保った。後肢懸垂群の対照としてコントロール(通常飼育)群を設けた。コントロール群のラットは、通常飼育を6日間続けた。後肢懸垂開始日を実験1日目とし、実験1日目から、CT-Casein群とHS-Casein群はAIN-93G(17.08%カゼイン含有)⁶⁾を、CT-Whey群とHS-Whey群はAIN-93G中に含まれるカゼインをすべて乳清タンパク質に置き換えた餌を用い、6日間自由摂取させた。実験期間中のコントロール群のラットの体重測定および全ラットの摂食量測定は、毎朝10時半に行った。実験7日目の朝8時に食餌を除去し、11時にペントバルビタールナトリウム麻酔下(60 mg/kg 体重)で、血液、肝臓、ヒラメ筋、腓腹筋+足底筋を採取し、屠殺した。後肢懸垂群のラットは、後肢懸垂状態で麻酔した。血液は、下大静脈よりEDTA 2Na(200 μ M, pH7.5)を抗凝固剤に用いて採取した後、3000gで10分間遠心処理し、血漿を調製した。肝臓、ヒラメ筋、腓腹筋+足底筋は、採取後直ちに液体窒素で凍結し、筋肉のみ重量を測定した。すべてのサンプルは分析まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

2-2. タンパク質濃度の測定

[試薬および装置]

BuufferA: 10mM Tris (pH 6.8), 250 mM sucrose, 100 mM KCl, 5 mM EDTA

BuufferB: 10mM Tris (pH 6.8), 175 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100

BuufferC: 10mM Tris (pH 7.0), 150 mM KCl

BuufferD: 10mM Tris (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA

Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, USA)

ポリトロンホモジナイザー (日音医理科器械製作所、千葉)

インバーター・マイクロ冷却遠心機 1720 (久保田製作所、大阪)

分光光度計 UV-1700 (津島製作所、京都)

[サンプルの抽出]

採取したヒラメ筋を、液体窒素で冷却したステレンス製乳鉢と乳棒を用いて粉末にした。粉末にしたヒラメ筋約15mgに20倍量のBufferA 400 μ Lを加え、ポリトロンホモジナイザーを用いて30秒間ホモジナイズした。ホモジナイズした後、4 $^{\circ}$ C、1,000gで10分間遠心分離した。遠心分

離した後の上清を可溶性タンパク質とした。得られた沈殿に 20 倍量の BufferB 400 μ L を加え、vortex を用いて懸濁した。懸濁した後、4 $^{\circ}$ C、1,000g で 10 分間遠心分離し、遠心分離した後の上清を除去した。再度 20 倍量の BufferB 400 μ L を加え、同様の操作を行った。そして、沈殿に 20 倍量の BufferC 400 μ L を加え、vortex を用いて懸濁した。懸濁した後、4 $^{\circ}$ C、1,000g で 10 分間遠心分離し、遠心分離した後の上清を除去した。沈殿に 40 倍量の BufferD 600 μ L を加え、vortex を用いて懸濁し、筋原線維タンパク質とした。可溶性タンパク質、筋原線維タンパク質に 1 倍量の 1.5 M NaOH を加えて希釈しサンプルとした。

[タンパク質濃度の測定]

タンパク質濃度は、Bradford 法で測定した。サンプル 4 μ L、Milli-Q 水 796 μ L に Bio-Rad Protein Assay 試薬 200 μ L を加え、5 分間のインキュベート後、分光光度計を用いて 595nm の吸光度を測定した。標準タンパク質として、2mg/ml の免疫グロブリン G (IgG: immunoglobulin G) を用いて検量線を作成し、タンパク質濃度を測定した。

2-3. 総 RNA 量の測定

ヒラメ筋の総 RNA 量は、SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA) を用いて測定した。

2-4. 統計処理

2 群のみ存在する場合の群間の差の検定には Student t-test を用いた。4 群存在する場合の分析には、二元配置分散分析および Fisher Protected Least Significant Difference の post hoc test を用いた。P<0.05 を有意とした。以上の統計解析には Stat View5.0 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いた。データは平均 \pm 標準誤差で示した。

3. 結果および考察

[実験 1 (17.08 %食餌タンパク質)]

3-1. ラット体重および摂食量 (表 1、表 2 A, B)

カゼイン食群の後肢懸垂ラットの体重は、コントロールラットに比べて、有意な低値 (約 6 % 低下) を示した。一方、乳清タンパク質食群では、後肢懸垂による体重への影響は認められなかった。

後肢懸垂期間のラット総摂食量では、4 群間で差はなかった。しかし、100g 体重あたりの総摂食量は、コントロールおよび後肢懸垂ラットの両者とも乳清タンパク質食群で高い傾向を示した。

乳清タンパク質食群では、カゼイン食群に比べて、体重あたりの摂食量が高い傾向にあるが、それは体重には反映されていない。おそらく、乳清タンパク質は摂取後の消化が早く、それに伴って血中アミノ酸 (特に BCAA) 濃度の上昇と下降も早いので^{3, 4)}、カゼインよりも速やかに代謝

(分解)される可能性が高い。さらに、血中のロイシン濃度の上昇は、エネルギー代謝を上昇する可能性も指摘されているので⁷⁾、摂食後の血中 BCAA 濃度を上昇する乳清タンパク質の性質が、体重あたりの摂食量が高くても体重に反映されない理由の一つと推察される。

表 1. 屠殺時の体重 (実験 1)

群	(g)
CT-Casein	203 ± 3
CT-Whey	189 ± 1*
HS-Casein	190 ± 3*
HS-Whey	187 ± 3*

*P<0.05 vs.CT-Casein. Means ± SE.

表 2 A. 総摂食量 (実験 1)

群	(g)
CT-Casein	110 ± 2
CT-Whey	110 ± 2
HS-Casein	105 ± 3
HS-Whey	112 ± 1

Means ± SE.

表 2 B. 100g 体重あたりの総摂食量 (実験 1)

群	(g/100g BW)
CT-Casein	54.3 ± 0.3
CT-Whey	57.9 ± 1.1*
HS-Casein	55.3 ± 1.3
HS-Whey	60.1 ± 0.8#

*P<0.05 vs.CT-Casein. # P<0.05 vs.HS-Casein. Means ± SE.

3-2. ラット後肢筋重量 (図 1 A, B, 図 2 A, B)

ヒラメ筋重量は、乳清タンパク質食群およびカゼイン食群のいずれも後肢懸垂により大きく減少し、コントロールラットの約 55% になった。しかし、その重量は、コントロールラットと後肢懸垂ラットのいずれでも食餌による影響を受けなかった。

一方、腓腹筋+足底筋重量は、両食事群とも後肢懸垂により約 10% のみ低下した。両ラットのその重量は食餌による影響を受けなかった。

後肢懸垂によりヒラメ筋重量が大きく減少することは、これまでに我々が行った予備実験および他の研究 [総説文献 5 参照] においても認められている。抗重力筋であるヒラメ筋は、腓腹筋+足底筋に比べて、筋不活動による萎縮 (廃用性筋萎縮) の度合いが大きいことも従来の知見と一致している。

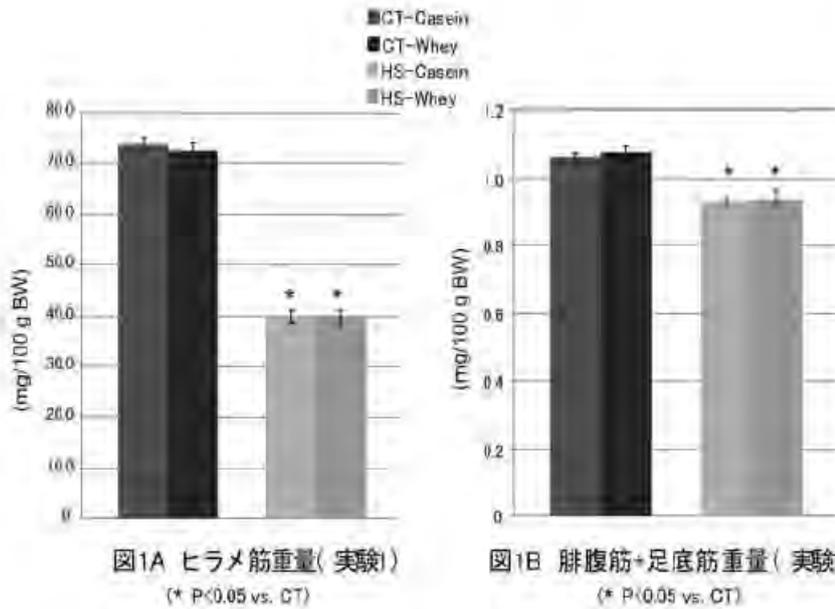


図1A ヒラメ筋重量(実験)

(* P<0.05 vs. CT)

図1B 腓腹筋+足底筋重量(実験)

(* P<0.05 vs. CT)

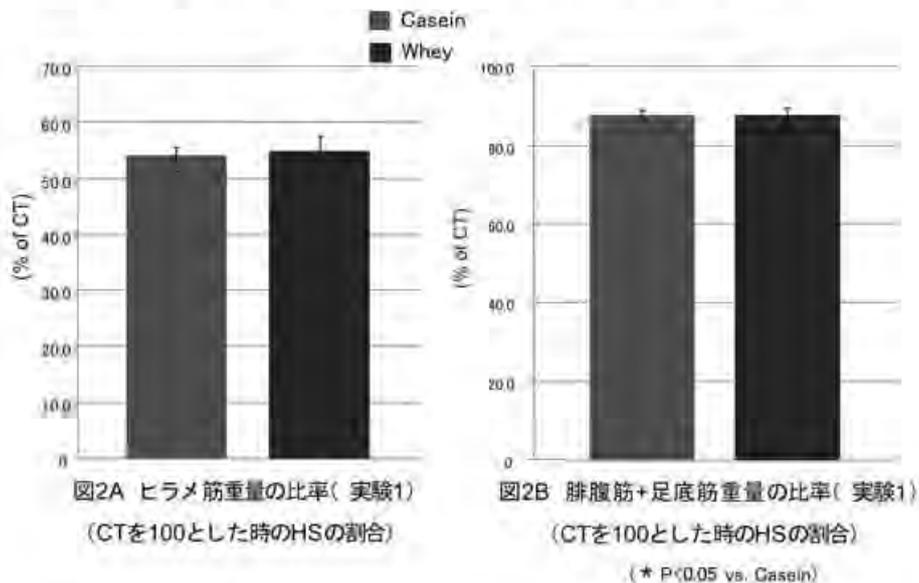


図2A ヒラメ筋重量の比率(実験1)

(CTを100とした時のHSの割合)

図2B 腓腹筋+足底筋重量の比率(実験1)

(CTを100とした時のHSの割合)

(* P<0.05 vs. Casein)

3-3. ヒラメ筋のタンパク質含量

ヒラメ筋の soluble (可溶性) タンパク質量、myofibril (筋繊維) タンパク質、およびそれらの合計の総タンパク質量を分析し、それらを g 組織当たりのタンパク質量 (濃度) (図 3A-C、図 4A-C)、およびヒラメ筋全組織中のタンパク質量を 100g 体重当たりで補正して示したタンパク質量 (図 5A-C、図 6A-C) で示した。

[ヒラメ筋のタンパク質濃度] (図 3A-C、図 4A-C)

Soluble タンパク質濃度は、後肢懸垂もしくは食餌によるどちらの有意な影響も受けなかった。

コントロールラットの myofibril タンパク質濃度は、食餌による影響を受けなかった。しかし、そのタンパク質濃度に対する後肢懸垂の影響を食餌群間で比較すると、カゼイン食群では後肢懸垂により有意に低下したが、乳清タンパク質群では低下しなかった。その結果、後肢懸垂ラットでは、カゼイン食群よりも乳清タンパク質食群で高値を示す傾向にあった。

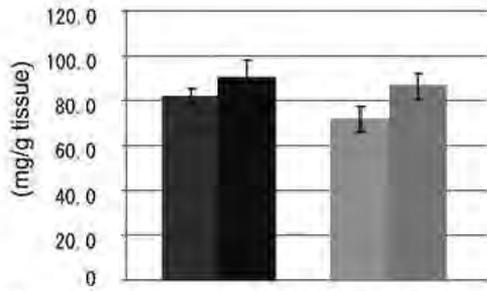


図3A ヒラメ筋solubleタンパク質濃度(実験1)

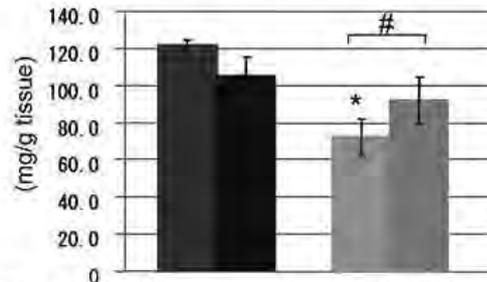


図3B ヒラメ筋myofibrilタンパク質濃度(実験1)
(* P<0.05 vs. CT, # P=0.0988)

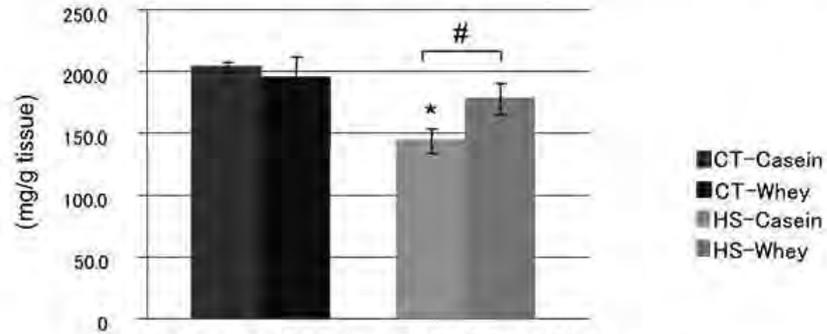


図3C ヒラメ筋総タンパク質濃度(実験1)
(* P<0.05 vs. CT, # P=0.0545)

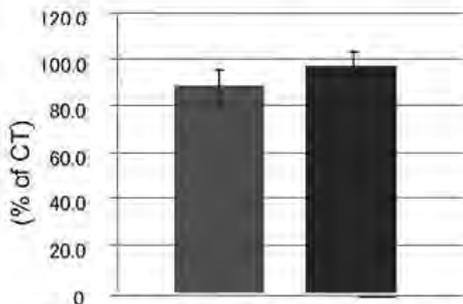


図4A ヒラメ筋solubleタンパク質濃度の比率
(実験1)(CTを100とした時のHSの割合)

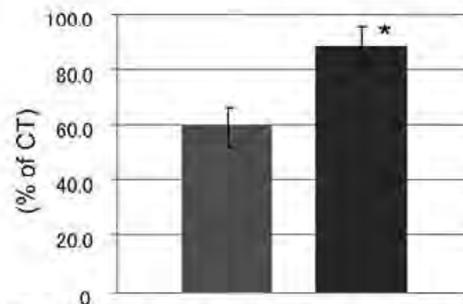


図4B ヒラメ筋myofibrilタンパク質濃度の比率
(実験1)(CTを100とした時のHSの割合)
(*P<0.05 vs. Casein)

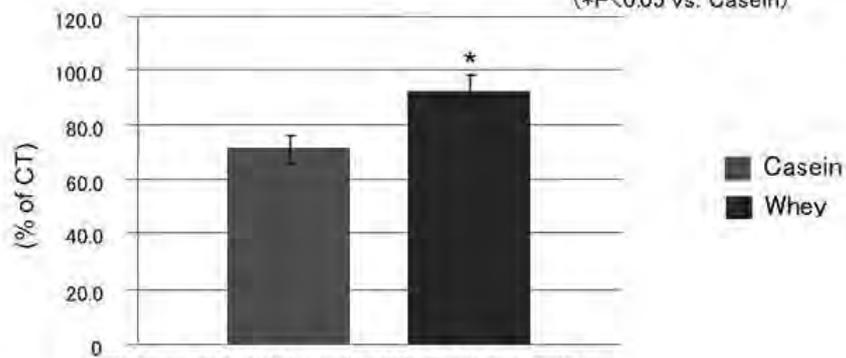


図4C ヒラメ筋総タンパク質濃度の比率(実験1)
(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

ヒラメ筋の総タンパク質濃度は、myofibril タンパク質濃度と同様の傾向にあり、カゼイン食群では筋タンパク質濃度は後肢懸垂により減少したが、乳清タンパク質食群ではその減少は抑制された。

これらの結果は、17%タンパク質食摂取の条件では、カゼインでは後肢懸垂による筋タンパク質減少を誘発するが、乳清タンパク質ではそれを抑制することが示唆された。

コントロールラットに対する比率で後肢懸垂ラットのヒラメ筋タンパク質濃度を示した場合でも、同様な結果であった (図 4A-C)。

[ヒラメ筋のタンパク質量] (図 5A-C、図 6A-C)

コントロール食群のヒラメ筋量は、soluble タンパク質量、myofibril タンパク質量、および総タンパク質量のいずれにおいても、食餌による影響を受けなかった。これらのタンパク質量は、いずれも後肢懸垂により約 1/2 に低下した。後肢懸垂ラットの低下したヒラメ筋の各タンパク質量は、食餌間で有意な差はなかったが、カゼイン食群よりも乳清タンパク質群で高い傾向にあった。

後肢懸垂ラットのヒラメ筋タンパク質量をコントロールラットのその比率で表すと (図 6A-C)、soluble タンパク質量では2つの食餌群間で差はなかったが、myofibril タンパク質量と総タンパク質量ではカゼイン食群よりも乳清タンパク質群で有意な高値を示した。

これらの結果は、コントロールラットおよび後肢懸垂ラットのヒラメ筋の重量は食餌タンパク質による影響を受けなかったが、後肢懸垂によるヒラメ筋のタンパク質含量の低下は、乳清タンパク質摂取により、抑制されることが示唆された。この結果は、後肢懸垂による筋タンパク質濃度の減少が乳清タンパク質摂取により抑制されたことの反映と考えられる。

成長期ラットの標準的な食餌として AIN-93G [6] が設定され、この食餌にはカゼインが約 17% タンパク質として含まれる。上記の研究結果は、AIN93G の食餌タンパク質を、乳清タンパク質に置き換えると、後肢懸垂による筋タンパク質の減少を抑制したが、このことは食餌タンパク質の種類 (または性質) によって廃用性筋萎縮におけるタンパク質代謝への影響が異なることを示している。

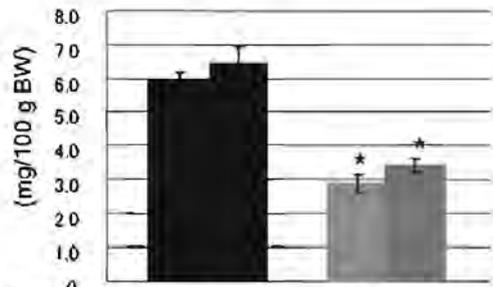


図5A ヒラメ筋solubleタンパク質量(実験1)
(* P<0.05 vs. CT)

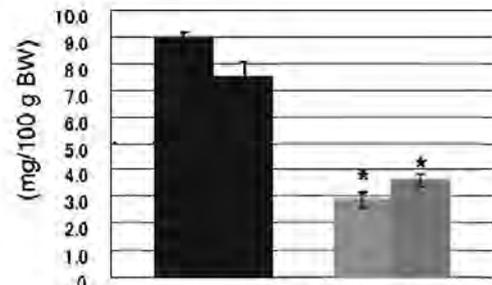


図5B ヒラメ筋myofibrilタンパク質量(実験1)
(* P<0.05 vs. CT)

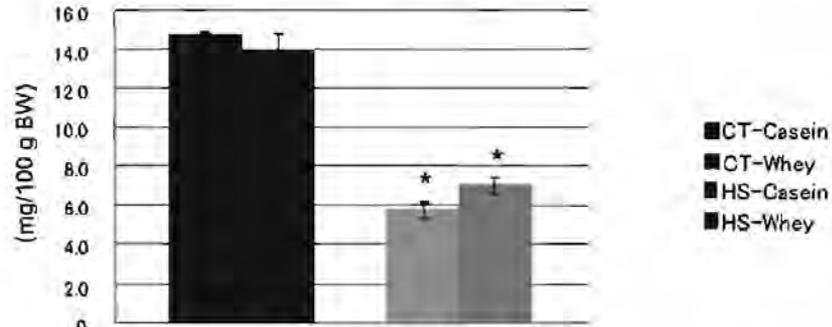


図5C ヒラメ筋総タンパク質量(実験1)
(* P<0.05 vs. CT)

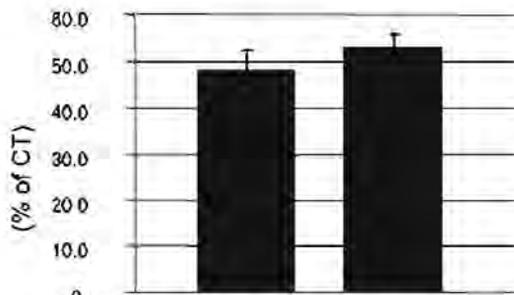


図6A ヒラメ筋solubleタンパク質量の比率(実験1)(CTを100とした時のHSの割合)

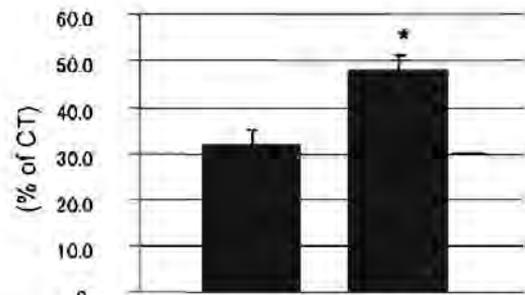


図6B ヒラメ筋myofibrilタンパク質量の比率(実験1)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

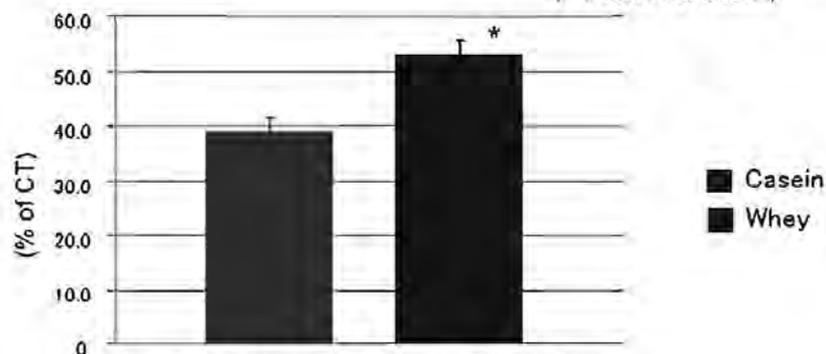


図6C ヒラメ筋総タンパク質量の比率(実験1)
(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

3-4. ヒラメ筋の総 RNA 含量 (図 7A-C、図 8A-C)

組織中の総 RNA 含量は、タンパク質合成の状態を反映することが知られている⁸⁾。すなわち、総 RNA 含量が高いとタンパク質合成が亢進していることを意味する。本研究では、ヒラメ筋の RNA を定量し、それを g 組織当たりの総 RNA 量 (濃度)、ヒラメ筋全組織 (ラット 1 匹) 中の総 RNA 量、およびヒラメ筋全組織中の総 RNA 量を 100g 体重当たりで補正した総 RNA 量 (図 5A-C、図 6A-C) を算出した。

コントロールラットのヒラメ筋総 RNA 濃度は、有意ではないがわずかにカゼイン食群よりも乳清タンパク質食群で低い傾向を示した。この総 RNA 濃度は、後肢懸垂により両食餌群とも有意に低下した。すなわち、後肢懸垂により筋タンパク質合成は抑制されていることが示唆される。一方、後肢懸垂ラットの総 RNA 濃度は、有意ではないがカゼイン食群よりも乳清タンパク質食群で高い傾向を示した。

ヒラメ筋全組織中の総 RNA 量およびそれを 100g 体重当たりで補正した総 RNA 量も総 RNA 濃度とほぼ同様の傾向を示した。

後肢懸垂ラットの総 RNA 濃度および RNA 量をコントロールラットのその比率で表すと、いずれもカゼイン食群よりも乳清タンパク質食群で有意な高値を示した。

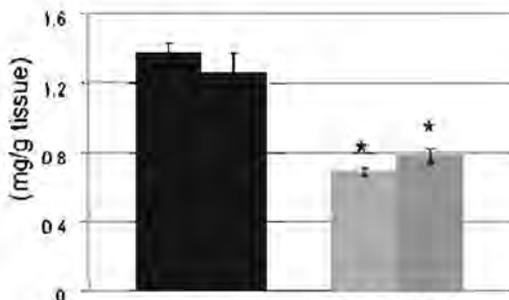


図7A 総RNA濃度(実験)
(* P<0.05 vs. CTRL)

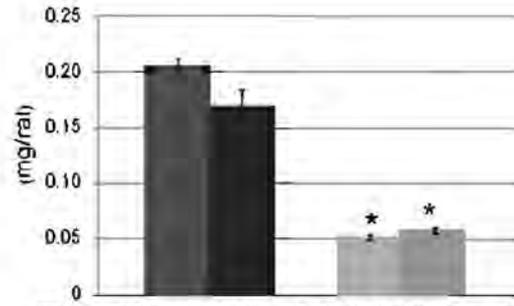


図7B 総RNA量(ラット1匹あたり)(実験)
(* P<0.05 vs. CTRL)

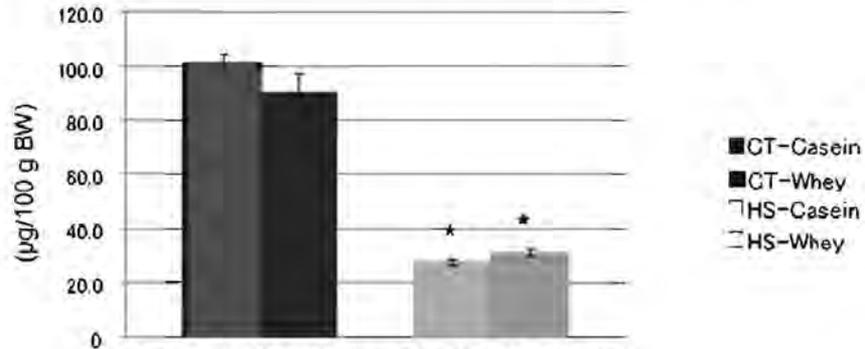


図7C 総RNA量(体重100gあたり)(実験)
(*P<0.05 vs. CT)

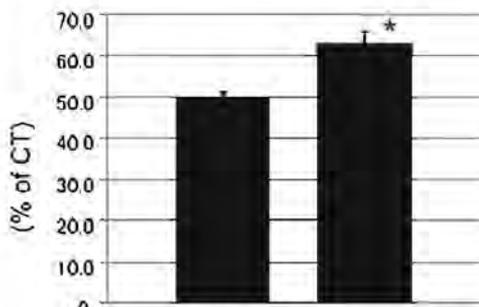


図8A 総RNA濃度(/g tissue)の比率
(実験)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

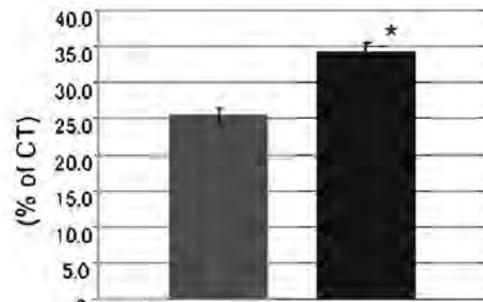


図8B 総RNA量(/rat)の比率
(実験)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

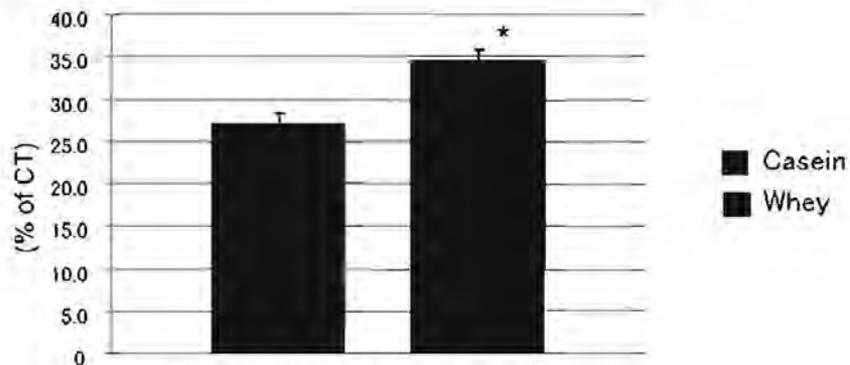


図8C 総RNA量(/100g BW)の比率
(実験)(CTを100とした時のHSの割合)
(*P<0.05 vs. Casein)

[実験2 (30%食餌タンパク質)]

3-5. ラット体重および摂食量 (表3、表4 A, B)

カゼイン食群の後肢懸垂ラットの体重は、コントロールラットに比べて、有意な低値 (約6%低下) を示した。一方、乳清タンパク質食群では、後肢懸垂による体重への有意な影響は認められなかった。これらの結果は、実験1 (17%タンパク質食) と同様の傾向であった。

後肢懸垂期間のラット総摂食量では、4群間で差はなかった。一方、100g体重あたりの総摂食量は、コントロールラットでカゼイン食群が有意な高値を示したが、後肢懸垂ラットでは両食餌群で有意な差は認められなかった。実験1 (17%タンパク質食) の場合には、後肢懸垂ラットで乳清タンパク質食群の摂食量がカゼイン食群よりも高値であった結果とは異なっていた。

表3. 屠殺時の体重 (実験2)

群	(g)
CT-Casein	196 ± 3
CT-Whey	184 ± 3*
HS-Casein	182 ± 2*
HS-Whey	177 ± 4*

*P<0.05 vs. CT-Casein. Means ± SE.

表4 A. 総摂食量 (実験2)

群	(g)
CT-Casein	91.6 ± 1.8
CT-Whey	93.0 ± 1.9
HS-Casein	94.7 ± 2.8
HS-Whey	93.1 ± 2.6

Mean ± SE.

表4 B. 体重100gあたりの総摂食量 (実験2)

群	(g/100g BW)
CT-Casein	46.8 ± 0.6
CT-Whey	50.4 ± 0.4*
HS-Casein	52.1 ± 1.2*
HS-Whey	52.5 ± 0.9*

*P<0.05 vs. CT-Casein. Means ± SE.

3-6. ラット後肢筋重量 (図9 A, B, 図10A, B)

ヒラメ筋重量は、乳清タンパク質食群およびカゼイン食群のいずれも後肢懸垂により大きく減少し、コントロールラットの約55%になった。しかし、その重量は、コントロールラットと後肢懸垂ラットのいずれでも食餌による影響を受けなかった。

一方、腓腹筋+足底筋重量は、両食事群とも後肢懸垂により16%のみ低下した。両ラットのその重量は食餌による影響を受けなかった。

これらの結果は、実験1とほぼ同様であった。

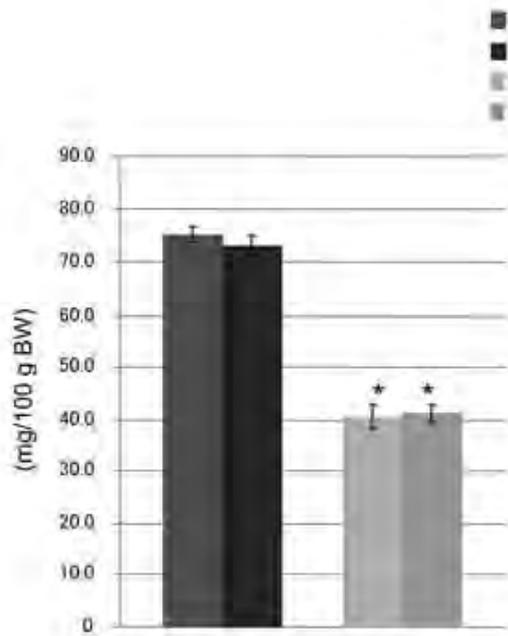


図9A ヒラメ筋重量(実験2)
(* P<0.05 vs. CT)

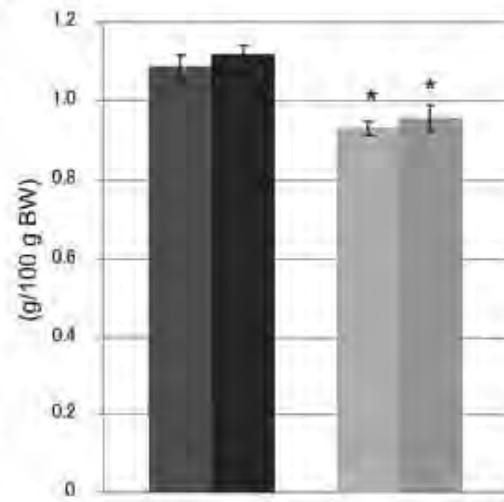


図9B 腓腹筋+足底筋重量(実験2)
(* P<0.05 vs. CT)

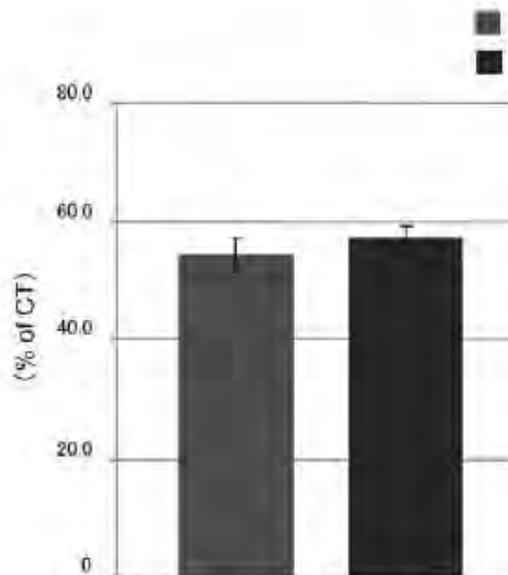


図10A ヒラメ筋重量の比率(実験2)
(CTを100とした時のHSの割合)

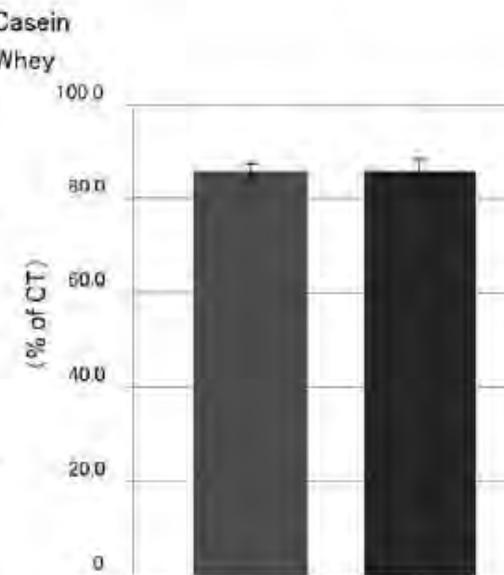


図10B 腓腹筋+足底筋重量の比率(実験2)
(CTを100とした時のHSの割合)

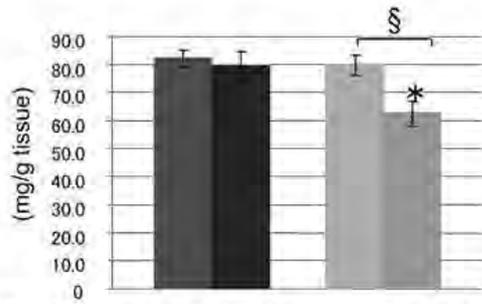


図11A ヒラメ筋solubleタンパク質濃度(実験2)
(*P<0.05 vs. CT, # P<0.05)

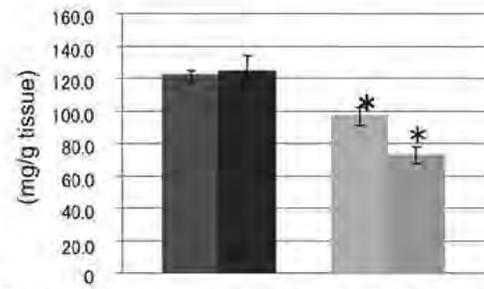


図11B ヒラメ筋myofibrilタンパク質濃度(実験2)
(*P<0.05 vs. CT)

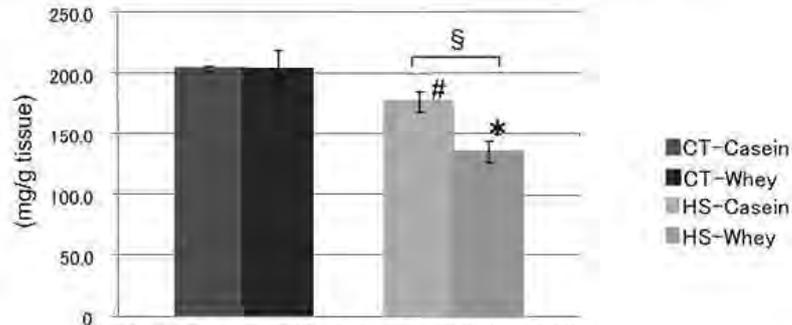


図11C ヒラメ筋総タンパク質濃度(実験2)

(*P<0.05 vs. CT, # P=0.0570, § P<0.05)

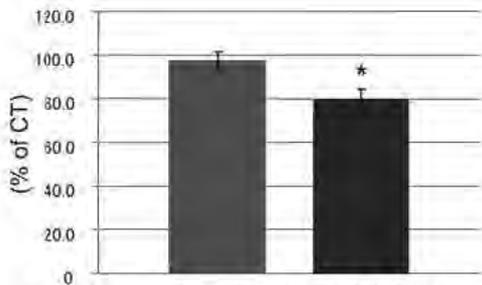


図12A ヒラメ筋solubleタンパク質濃度の比率
(実験2)(CTを100とした時のHSの割合)

(*P<0.05 vs. Casein)

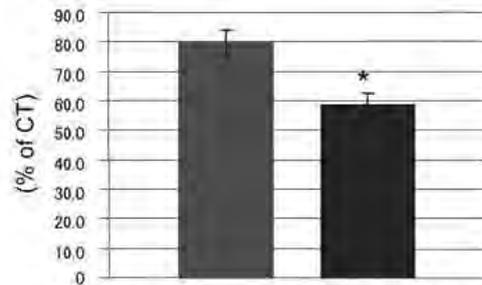


図12B ヒラメ筋myofibrilタンパク質濃度の比率
(実験2)(CTを100とした時のHSの割合)

(*P<0.05 vs. Casein)

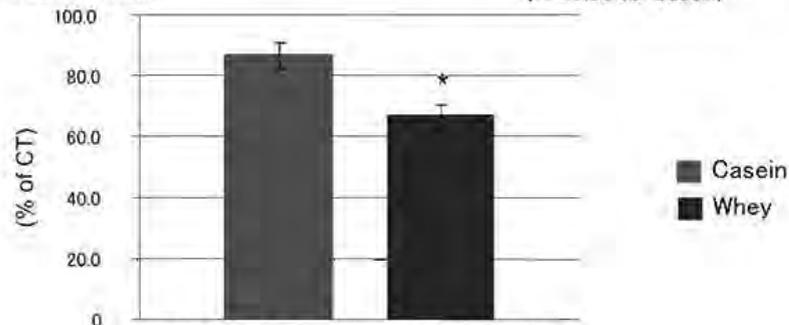


図12C ヒラメ筋総タンパク質濃度の比率
(実験2)(CTを100とした時のHSの割合)

(*P<0.05 vs. Casein)

3-7. ヒラメ筋のタンパク質含量

ヒラメ筋の soluble (可溶性) タンパク質量、myofibril (筋繊維) タンパク質、およびそれらの合計の総タンパク質量を、g 組織当たりのタンパク質量 (濃度) (図 11A-C、図 12A-C)、およびヒラメ筋全組織中のタンパク質量を 100g 体重当たりで補正して示したタンパク質量 (図 13A-C、図 14A-C) で示した。

[ヒラメ筋のタンパク質濃度] (図 11A-C、図 12A-C)

コントロールラットの soluble タンパク質濃度は、食餌による影響を受けなかった。一方、後肢懸垂によるタンパク質濃度の減少は、カゼイン食群では認められなかったが、乳清タンパク質食群では有意であった。結果的に、後肢懸垂ラットの soluble タンパク質濃度は、乳清タンパク質食群がカゼイン食群よりも有意な低値を示した。

コントロールラットの myofibril タンパク質濃度は、食餌による影響を受けなかった。そのタンパク質濃度に対する後肢懸垂の影響を食餌群間で比較すると、後肢懸垂によりカゼイン食群よりも乳清タンパク質食群で低下する度合いが大きい傾向にあった。しかし、後肢懸垂ラットの myofibril タンパク質濃度では食餌間で有意な差はなかった。

ヒラメ筋の総タンパク質濃度は、soluble タンパク質濃度と myofibril タンパク質濃度と同様の傾向にあり、後肢懸垂により乳清タンパク質食群では有意に減少したが、カゼイン食群では減少傾向のみであった。したがって、後肢懸垂ラットの総タンパク質濃度では、乳清タンパク質食群がカゼイン食群よりも有意な低値を示した。

コントロールラットに対する比率で後肢懸垂ラットのヒラメ筋タンパク質濃度を示した場合では、soluble、myofibril、および総タンパク質濃度のいずれも、乳清タンパク質食群がカゼイン食群よりも有意な低値を示した。

これらの結果は、30 %タンパク質食摂取の条件では、後肢懸垂により誘発される筋タンパク質減少は、乳清タンパク質では抑制されず、カゼインにより抑制されることが示された。

この 30 %タンパク質食を用いた実験結果は、実験 1 (17 %タンパク質食) とは対照的な傾向であり、むしろカゼインにより後肢懸垂によるヒラメ筋タンパク質濃度の減少は抑制されるようである。

[ヒラメ筋のタンパク質量] (図 13A-C、図 14A-C)

コントロール食群のヒラメ筋量は、soluble タンパク質量、myofibril タンパク質量、および総タンパク質量のいずれにおいても、食餌による影響を受けなかった。これらのタンパク質量は、いずれも後肢懸垂により約 1/2 もしくはそれ以下に低下した。後肢懸垂ラットの低下したヒラメ筋の各タンパク質量は、食餌間で有意な差はなかったが、乳清タンパク質食群よりもカゼイン食群で高い傾向にあった。

後肢懸垂ラットのヒラメ筋タンパク質量をコントロールラットのその比率で表すと (図 14A-C)、soluble タンパク質量、myofibril タンパク質量、および総タンパク質量のいずれでも、乳清タンパ

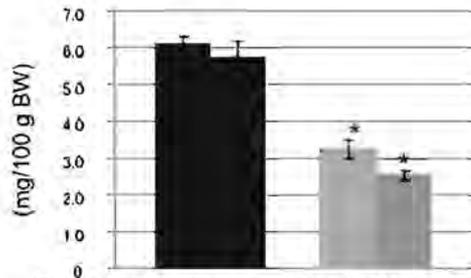


図13A ヒラメ筋solubleタンパク質量(実験)
(* P<0.05 vs. CT)



図13B ヒラメ筋myofibrilタンパク質量(実験)
(* P<0.05 vs. CT)

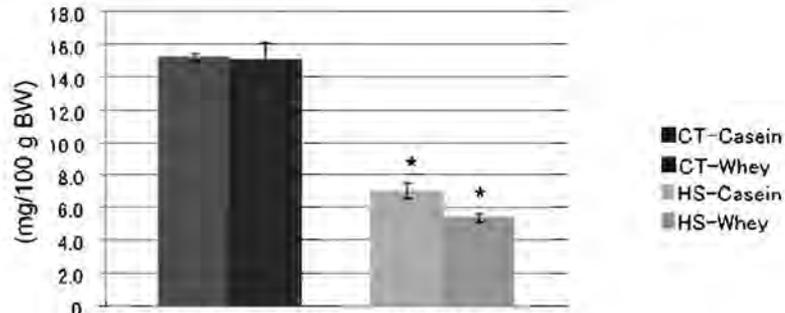


図13C ヒラメ筋総タンパク質量(実験)
(* P<0.05 vs. CT)

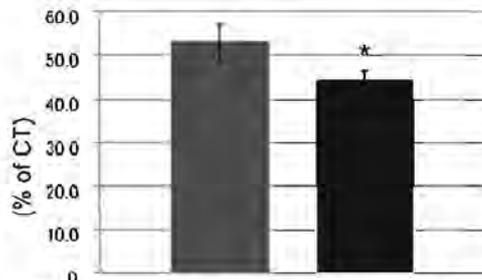


図14A ヒラメ筋solubleタンパク質量の比率
(実験)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P=0.0977 vs. Casein)



図14B ヒラメ筋myofibrilタンパク質量の比率
(実験)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

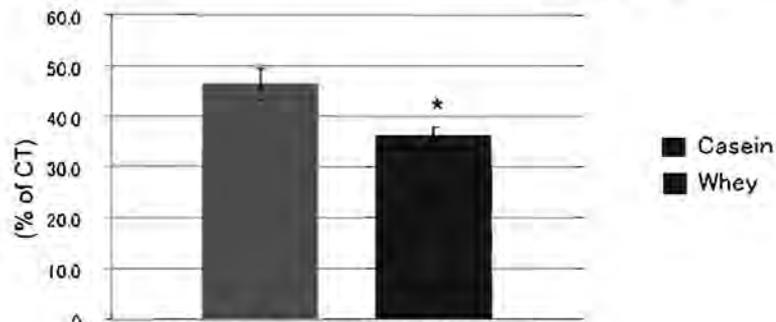


図14C ヒラメ筋総タンパク質量の比率
(実験)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

ク質食群よりもカゼイン食群で有意な高値を示した。

これらの結果は、いずれも実験1（17%タンパク質食）の結果と対照的な傾向であった。したがって、タンパク質が豊富に摂取できる場合には、乳清タンパク質よりもカゼインが後肢懸垂によるヒラメ筋のタンパク質減少を抑制するようである。Dangin 等⁴⁾は、ヒトに30gの混合遊離アミノ酸、カゼイン、乳清タンパク質を摂取させ、その後の体内でのロイシンの挙動を追跡した結果、遊離アミノ酸と乳清タンパク質のように（消化）吸収の早いタンパク質からのアミノ酸は酸化分解率が高く、貯留率が低い結果を示している。本研究結果での30%タンパク質食（実験2）の結果は、Dangin 等の所見により説明される可能性が高いと考えられる。しかし、本研究での17%タンパク質食（実験1）の結果は、実験2とは逆の傾向にあり、Dangin 等の所見では説明できない。

3-8. ヒラメ筋の総 RNA 含量（図 15A-C、図 16A-C）

ヒラメ筋の総 RNA 含量を、g 組織当たりの総 RNA 量（濃度）、ヒラメ筋全組織当たりの総 RNA 量、およびヒラメ筋全組織当たりの総 RNA 量を 100g 体重当たりで補正した総 RNA 量で示した。

コントロールラットのヒラメ筋総 RNA 濃度は、食餌による影響を受けなかった。総 RNA 濃度は、後肢懸垂により両食餌群ともに有意に減少したが、減少の度合いは乳清タンパク質食群よりもカゼイン食群で低い傾向にあった。ヒラメ筋全組織当たりの総 RNA 量、およびその総 RNA 量を 100g 体重当たりで補正した総 RNA 量も同様の傾向を示した。

後肢懸垂ラットの総 RNA 濃度および総 RNA 量をコントロールラットのその比率で表すと、いずれの乳清タンパク質食群よりもカゼイン食群で有意な高値を示した。

これらの総 RNA 含量の結果は、タンパク質含量の傾向と一致していた。よって、30%タンパク質食（実験2）では乳清タンパク質よりもカゼインで後肢懸垂による筋タンパク質の減少が抑制された原因として、筋タンパク質合成が高く保たれた可能性が挙げられる。

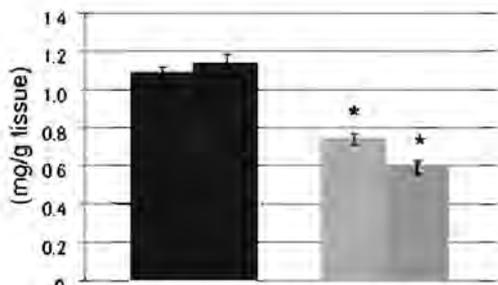


図15A 総RNA濃度(実験2)
(* P<0.05 vs. CT)



図15B 総RNA量(ラット1匹あたり)(実験2)
(* P<0.05 vs. CT)

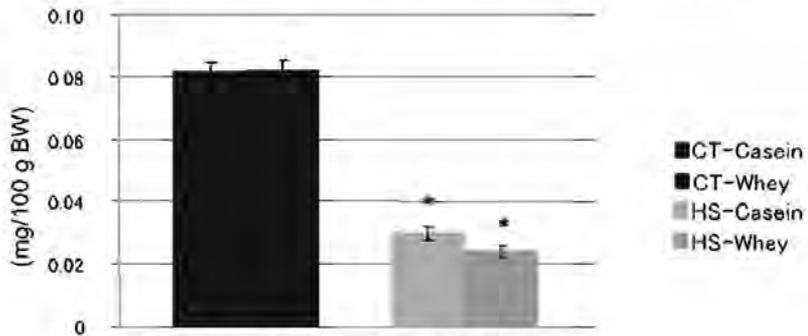


図15C 総RNA量(体重100gあたり)(実験2)
(* P<0.05 vs. CT)

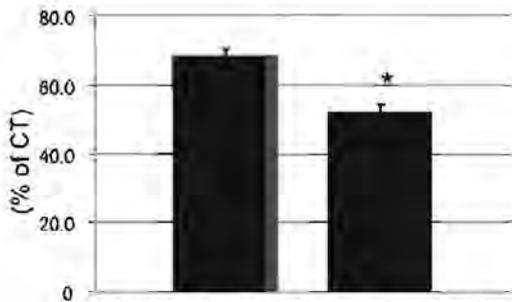


図16A 総RNA濃度(/g tissue)の比率
(実験2)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

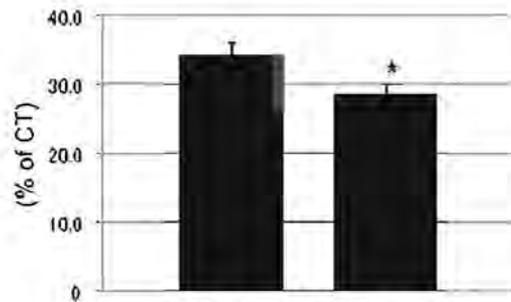


図16B 総RNA量(/Rat)の比率
(実験2)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

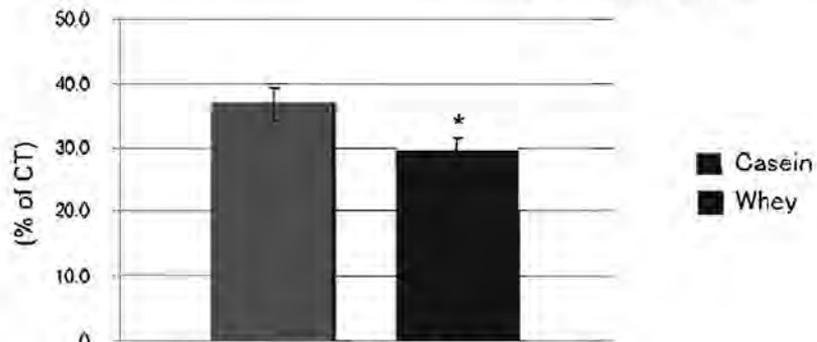


図16C 総RNA量(/100g BW)の比率
(実験2)(CTを100とした時のHSの割合)
(* P<0.05 vs. Casein)

4. まとめ

牛乳タンパク質は、カゼインと乳清タンパク質から成り立つ。カゼインと比較して、乳清タンパク質は、消化吸収が速く、タンパク質合成を促進するアミノ酸である BCAA を多く含む。そのため、骨格筋の不活動による萎縮およびタンパク質の損失を抑制する可能性が考えられる。そこで本研究では、ラットの後肢懸垂による廃用性筋萎縮とそれに伴うタンパク質の損失に対する効果を比較検討した。17%タンパク質食（実験1）では、カゼインに比べ乳清タンパク質が廃用性筋萎縮に伴うタンパク質の損失を抑制する効果が認められた。これは、乳清タンパク質は消化吸収が速いため、摂食後すみやかにタンパク質合成を刺激した可能性が考えられる。30%タンパク質食（実験2）では、逆にカゼインのほうがタンパク質の損失を抑制する効果がみられた。カゼインは乳清タンパク質と比較して消化吸収が遅いが、高濃度にそれを含む食餌の摂取によって体内へのアミノ酸供給が十分であったためと考えられる。よって本実験から、食餌中のタンパク質濃度やそのアミノ酸組成の違いにより、廃用性筋萎縮に伴うタンパク質の損失を抑制する効果が異なる可能性が示唆された。

牛乳は、消化吸収の速いタンパク質（乳清タンパク質）と持続的にアミノ酸を供給するタンパク質（カゼイン）が含まれ、バランスの良い食品であると推定されるが、それらのタンパク質の比率が筋タンパク質の維持・増加に最も効果的であるとは限らない。その比率の影響については今後検討する必要がある。

5. 文 献

- 1) Proud CG. Signalling to translation : how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J.* 403 : 217-234 (2007).
- 2) Layman DK, and Baum JL. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr* 134 : 968S-973S (2004).
- 3) Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, and Beaufrere B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 23 ; 94 (26) : 14930-14935 (1997).
- 4) Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballèvre O, and Beaufrere B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280 (2) : E340-E348 (2001).
- 5) Bajotto G, and Shimomura Y. Determinants of disuse-induced skeletal muscle atrophy : exercise and nutrition countermeasures to prevent protein loss. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 52: 233-247 (2006).
- 6) Reeves PG, Nielsen FH, and Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents : final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123 : 1939-1951 (1993).

- 7) She P, Reid TM, Bronson SK, Vary TC, Hajnal A, Lynch CJ, and Hutson SM. Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle. *Cell Metab.* 6 (3) : 181-194 (2007).
- 8) Haddad F, Roy RR, Edgerton VR, and Baldwin KM. Atrophy responses to muscle inactivity. I. Cellular markers of protein deficits. *J Appl Physiol.* 95 : 781-790 (2003).