

ペプチド食摂取が激運動後の骨格筋および 肝臓でのタンパク質代謝に及ぼす影響

日本医科大学 三上俊夫
(共同研究者) 筑波大学 伊藤 朗
昭和女子大学大学院 吉野芳夫

Effect of Administration of Peptides on Protein Synthesis and Breakdown in Skeletal Muscle and Liver after Strenuous Exercise

by

Toshio Mikami

Department of Health and Physical Education, Nippon Medical School

Akira Ito

Laboratory of Biochemistry of Exercise,

Institute of Health and Sports Sciences, The University of Tsukuba

Yoshio Yoshino

Showa Women's College

ABSTRACT

To examine the effect of administration of peptides on protein synthesis and breakdown in skeletal muscle and liver after strenuous exercise, male ICR mice were orally administered four kinds of test solutions, containing either 10% (w/v) peptides, protein or amino acids, immediately after a 3 hour- period of treadmill running. The fractional rate of protein synthesis (Ks) in skeletal muscle and liver was measured using a flooding dose of [³H]phenylalanine. The rate of plasma albumin synthesis was estimated by intraperitoneally injecting a tracer dose of [¹⁴C]leucine and measuring the [¹⁴C]radioactivity incorporated into plasam albumin. The Ks in skeletal muscle was essentially the same in mice administered any of the four kinds of

test solutions. The Ks in liver for the peptides, protein and amino acids administered was significantly higher than that for water. However, there was no difference in Ks in liver between the peptides, protein and amino acids. Plasma levels of 3-methylhistidine were significantly higher in mice administered water than in those given the other test solutions. The rate of plasma albumin synthesis was higher in mice administered peptides than in those given the protein or amino acid solutions. These results suggest that a supply of protein after prolonged exercise enhances protein synthesis in the liver and inhibits protein breakdown in skeletal muscle. Moreover, peptides, which are a more readily digestible and more readily absorbable nitrogen source than protein or amino acids, more effectively enhance liver protein synthesis than administered protein or amino acids.

要 旨

長時間の激しい運動時には骨格筋タンパク質の異化が亢進し、エネルギー源として利用される割合も増加する。一方、激運動時には消化器官への血流が低下し消化吸収能力も低下する。このような条件下での食事性タンパク質源の補給には、タンパク質およびアミノ酸よりも消化吸収の点で優れているタンパク質の部分分解物であるペプチドが有効であると考えられた。そこで本研究では、ペプチド摂取が長時間の持久的運動後の骨格筋および肝臓でのタンパク質合成と分解に及ぼす影響を調べることを目的とした。

高炭水化物食で飼育したマウスにトレッドミルでの3時間のランニングを負荷し、運動直後に化学形態の異なる3種類のタンパク質源（タンパク質、ペプチド、アミノ酸）を経口投与し、運動後の回復期における骨格筋および肝臓でのタンパク質の合成と分解を調べた。タンパク質の合成は静注した放射性標識 $[^3\text{H}]$ フェニルアラニンの組織への取り込み率と、腹腔内投与した放射性標識 $[^{14}\text{C}]$ ロイシンの血漿アルブミンへの取り込み率より調べた。また、タンパク質の分解は血漿3-メチルヒスチジン値 (3-MeHis) より検討した。

その結果、3種類のタンパク質源の投与はタンパク質源の無投与に比して有意に高い肝臓でのタ

ンパク質合成と、骨格筋でのタンパク質分解の低下をもたらしたが、投与したタンパク質源の化学形態の違いによる差は認められなかった。しかし、運動直後から運動3時間後までのタンパク質合成を肝臓でのアルブミン合成に限定して調べると、ペプチド投与はタンパク質およびアミノ酸の投与に比して有意に高い値を示した。

これらの結果より、運動直後のタンパク質源の補給は運動後の回復期におけるタンパク質代謝の回復に対して効果的であり、この時のタンパク質源としては消化吸収性の優れたペプチドとして摂取することがより効果的であることが示唆された。

緒 言

本来、組織を構成するタンパク質は運動時のエネルギー源として利用されないが、長時間の激しい運動時には骨格筋タンパク質の異化が亢進し、エネルギー源として利用される割合も増加する。また、激運動時には消化器官への血流が低下し、消化吸収能力も低下する¹⁾。このような時に適切な食事性タンパク質の補給が行われないと、タンパク質代謝の回復が損なわれ、身体的トレーニングにより運動能力の向上がもたらされるどころか、逆に運動能力の低下が引き起こされることにもなりかねない。したがって、激しい運動トレーニング時および回復時には効果的なタンパク質の補給

が重要となる。この点から考えると、タンパク質の部分分解物であるペプチドは、タンパク質およびタンパク質の完全分解物であるアミノ酸よりも消化吸收の点で優れており^{2, 3)}、激しい運動トレーニング時のタンパク質源の補給物質としては大変優れていると考えられる。

以上のことを踏まえて本研究では、ペプチド摂取が長時間の持久的運動後の骨格筋および肝臓でのタンパク質合成と分解に及ぼす影響を調べることを目的とした。具体的方法としては、マラソンレースなどの前に行われるグリコーゲンローディングを想定して、高炭水化物食で飼育したマウスに3時間の長時間走を負荷し、運動直後に化学形態の異なる3種類のタンパク質源（タンパク質、ペプチド、アミノ酸）を経口投与し、その後の回復期における骨格筋および肝臓でのタンパク質の合成と分解を調べた。タンパク質の合成は静注した放射性標識 [³H] フェニルアラニンの組織への取り込み率と、腹腔内投与した放射性標識 [¹⁴C] ロイシンの血漿アルブミンへの取り込み率より調べ、タンパク質の分解は血漿3-MeHis値より検討した。

1. 方法

1. 1 マウスの飼育条件

実験には9週令のICR雄マウス（日本クレア社、東京）を用いた。一般市販の飼料のCE-2（日本クレア、東京）を与え1週間の予備飼育を行った後、2日間は低炭水化物食にて、その後5日間は高炭水化物食にて飼育して、8日目に運動負荷実験を行った。ここで用いた低炭水化物飼料と高炭水化物飼料は、オリエンタル酵母社製のOYC改変AIN-93精製飼料からタンパク質を除いたものを基本飼料とし、これにタンパク質はカゼイン、炭水化物はコーンスターチ、脂肪はコーン油を添加して調整した。この調整飼料の糖質、脂質、タンパク質のエネルギー比は、低炭水化物飼料では

糖質25.2%、脂質59.9%、タンパク質14.9%、高炭水化物飼料では糖質75.7%、脂質9.4%、タンパク質14.9%であった。この間、小動物用トレッドミル（KN-73、夏目製作所）にてトレッドミル速度（25 m/min）で毎日15分間の走行練習をマウスに行わせた。

1. 2 運動負荷・試験飼料の投与・タンパク質合成の測定法

運動負荷は3時間のトレッドミル走（トレッドミル速度25m/min、傾斜角度0°）を行わせた。運動直後に尾静脈より25 μ Lの血液を採取してラクトートアナライザーYSI 1500 SPORT（日科機社製）にて血中乳酸を測定した。その後直ちに、栄養カテーテルにて蒸留水、タンパク質、ペプチド、アミノ酸のいずれかを経口投与した。タンパク質は牛乳中に含まれる主要タンパク質であるカゼイン、ペプチドはカゼインを酵素的に部分分解したカゼインペプチドCU2500（森永乳業社製）、アミノ酸はカゼインのアミノ酸組成に準じたアミノ酸混合物を用いた。すべての試料は蒸留水に10%濃度（w/v）で溶解したものを1.0 mL投与した。その後、Chikuら⁴⁾の方法に準じた血漿アルブミン合成率の測定を行うため、0.9%塩化ナトリウムに溶解した[1-¹⁴C]ロイシン（Moravek社製）を5 μ Ci/匹で腹腔内投与して、マウスをケージ内に置いた。

2時間45分後にGarlickら⁵⁾のFlooding dose techniqueによるタンパク質合成率の測定のためにエーテル麻酔下で100 μ Ci/mL [ring-2,6-³H]フェニルアラニン（Moravek社製）と150 μ mol/mL非標識フェニルアラニンを含むフェニルアラニン溶液を尾静脈より1.0 mL/100g body wt.で静注した。15分後、腹部大動脈より採血してマウスを屠殺し、肝臓とヒフク筋を採取して、直ちに液体窒素で凍結して分析まで-40℃で凍結保存した。血液は遠心分離して血漿を-40℃で凍結保存した。

1. 3 肝臓・骨格筋でのタンパク質合成率の測定

肝臓・骨格筋でのタンパク質合成率はDavisら⁶⁾の方法に準じて以下のごとく測定した。筋および肝臓、約0.2gを10倍量の0.2 mol/L 過塩素酸中でホモジナイズし、遠心して酸不溶性分画(タンパク質分画)を得た。これを水酸化ナトリウムで可溶化し、0.2 mLをハイオニックフロー(パッカーードジャパン社製) 5.0 mLと激しく混和した後、液体シンチレーションアナライザー TRI-CARB 2200CA(パッカーードジャパン社製)にて^[3H]放射活性を測定した。その後、水酸化ナトリウム可溶化サンプルを過塩素酸で再度沈澱させ、6 N 塩酸を加えて加熱(110℃, 24時間)してタンパク質を加水分解した。その後、サンプルを乾固して0.2 mol/L 塩酸に再溶解して、AccQ・Tag アミノ酸分析試薬(Waters社製)と反応させ、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりアミノ酸濃度を測定した。上記のごとく測定した^[3H]放射活性とフェニルアラニン濃度をJepsonら⁷⁾の計算式に代入してヒフク筋と肝臓のタンパク合成率(Fractional rate of protein synthesis)を求めた。

1. 4 血漿アルブミン中への^[14C]ロイシンの取り込み率の測定

血漿をHPLC分析の移動相50 mmol/L リン酸二水素カリウム, 0.3 mol/L 塩化ナトリウム(pH 7.0)にて10倍に希釈し、その200 μLをゲル濾過分析用HPLCカラムTSKgel G-2000 SWXL(7.8×300 mm)を接続したHPLCに注入してアルブミン分画を分離した。さらに、このサンプルをカラムに連結したβ-放射線検出装置Flow One A-500(パッカーードジャパン社製)に取り込み、アルブミン分画中に含まれる^[14C]放射活性量を測定した。またHPLC分析に用いたサンプルの一部を用いてアルブミン-B-テストワコー(和光純薬)により血漿アルブミン濃度を測定した。これらの値とマウス体重より算出した全身血液量と全身血漿量と

を用いて⁸⁾、血漿アルブミン分画中への^[14C]ロイシンの総取り込み量を計算し、この値を投与した^[14C]ロイシンの放射活性量で除して血漿アルブミンへの^[14C]ロイシンの取り込み率を算出した。

1. 5 血漿3-メチルヒスチジン濃度と血漿CPK活性の測定

血漿3-メチルヒスチジン(3-MeHis)の測定はWassnerら⁹⁾の方法に準じてHPLC分析により行った。

血漿クレアチンホスホキナーゼ(CPK)活性はCPK-テストワコー(和光純薬)にて測定した。

1. 6 統計処理

本研究では、得られたデータを平均±標準誤差として表示した。平均値の差の検定には、Student's paired t-testを用いた。いずれも、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

2. 結果

運動直後の血中乳酸値を図1に示した。タンパク質投与(2.28 ± 0.20 mmol/L)の運動直後の血中乳酸値は水投与(1.53 ± 0.19 mmol/L)に比して有意に高い値を示した。しかし、タンパク質投与、ペプチド投与(1.90 ± 0.29 mmol/L)、アミノ酸投与(1.57 ± 0.23 mmol/L)の間では有意な差は認められなかった。

運動3時間後での血漿3-MeHis値を図2に示した。タンパク質(3.06 ± 0.36 μmol/mL)、ペプチド(2.51 ± 0.32 μmol/mL)、アミノ酸(3.31 ± 0.44 μmol/mL)の投与はいずれも水投与(6.11 ± 1.0 μmol/mL)に比して有意に低い値を示したが($p < 0.05$)、タンパク質、ペプチド、アミノ酸の投与の間には有意な差は認められなかった。

血漿CPK活性値はタンパク質投与(114.4 ± 17.5 IU/L)、ペプチド投与(97.2 ± 13.5 IU/L)、アミノ酸投与(103.8 ± 39.4 IU/L)、水投与(143.1 ± 19.5 IU/L)となり、個体差が大きくグル

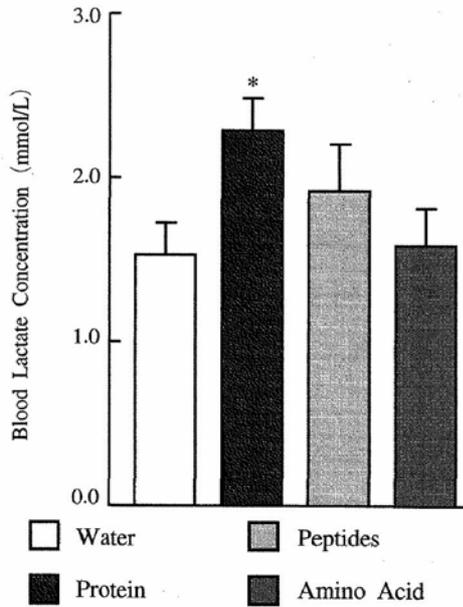


図1 Blood lactate concentration immediately after 3 hours period of running on a treadmill
Values are means \pm SEM.
* $p < 0.05$ Water vs Protein

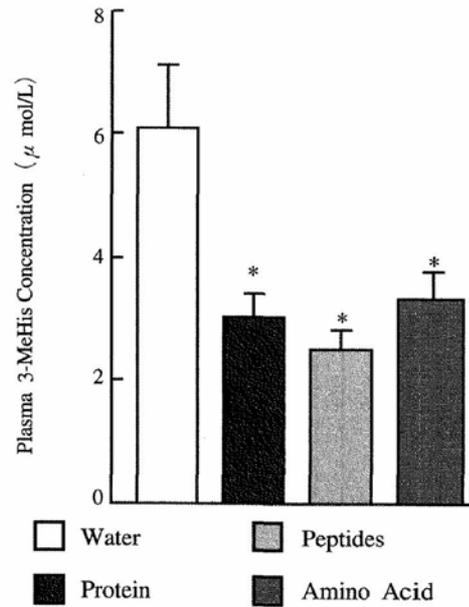


図2 Plasma 3-methylhistidine concentration 3 hours after a period of exercise on a treadmill
Values are means \pm SEM.
* $p < 0.05$ vs Protein

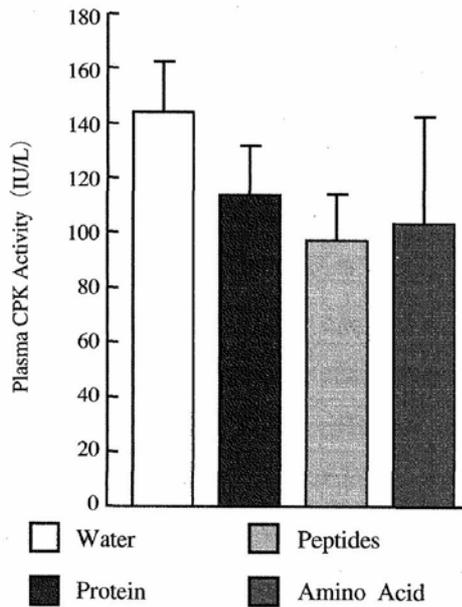


図3 Plasma CPK activity 3 hours after a period of exercise on a treadmill
Values are means \pm SEM.

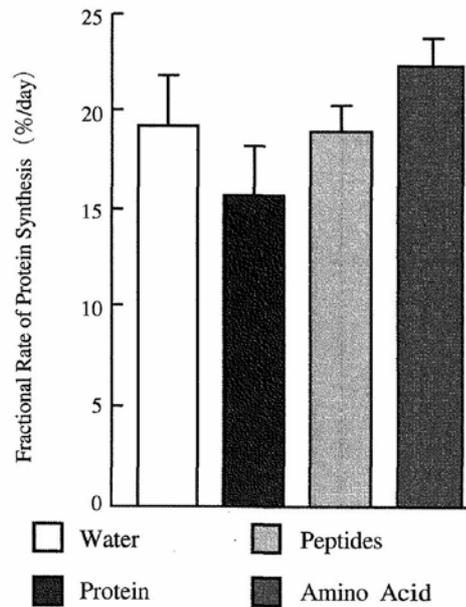


図4 Fractional rates of protein synthesis in the muscle 3 hours after a period of exercise on a treadmill
Values are means \pm SEM.

ープ間での有意な差は認められなかった (図3).
運動3時間後でのヒフク筋および肝臓のタンパク合成率を図4と図5に示した. ヒフク筋のタン

パク合成率はタンパク質投与 (15.7 \pm 2.5%), ペプチド投与 (18.7 \pm 1.3%), アミノ酸投与 (22.0 \pm 1.4%), 水投与 (19.2 \pm 2.5%) で, 各投

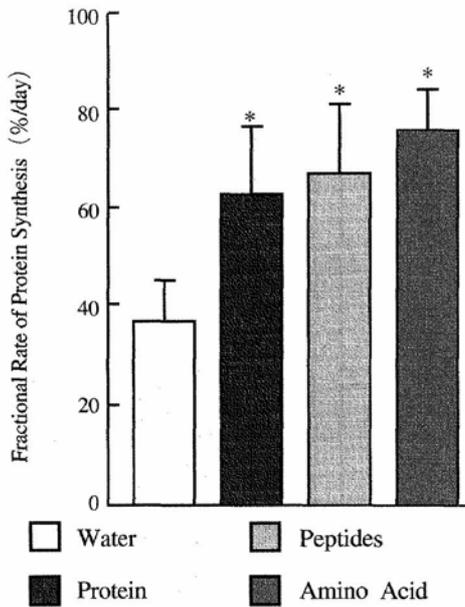


図5 Fractional rates of protein synthesis in the liver 3 hours after a period of exercise on a treadmill. Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Water

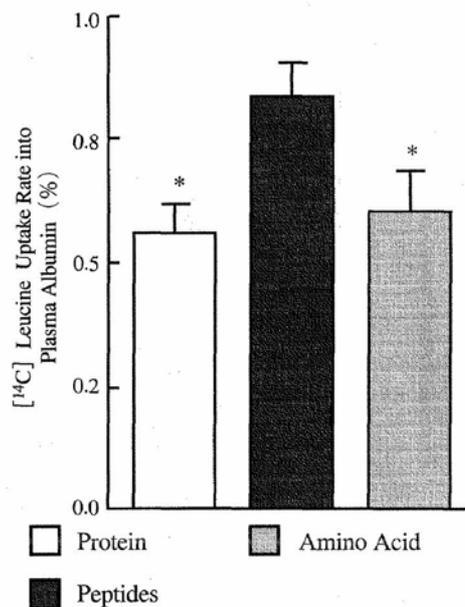


図6 The rate of plasma albumin synthesis during the recovery period after exercise on a treadmill. Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$ Peptides vs Protein and Amino acid

与間で有意な差は認められなかった(図4)。しかし、肝臓のタンパク合成率ではタンパク質投与(62.6 \pm 13.2%), ペプチド投与(66.1 \pm 13.6%),

アミノ酸投与(75.4 \pm 7.9%)は水投与(36.8 \pm 8.0%)に比して有意に高い値を示した(図5)。

運動直後から運動3時間後までの血漿アルブミン中への [¹⁴C] ロイシンの取り込み率をタンパク質投与、ペプチド投与、アミノ酸投与と比較したところ、ペプチド投与(0.83 \pm 0.07%)はタンパク質投与(0.56 \pm 0.06%)とアミノ酸投与(0.60 \pm 0.08%)に比して有意に高い値を示した(図6)。

3. 考察

これまでの研究結果より、骨格筋でのタンパク質合成は運動中は抑制され^{10, 11)}、運動後の回復期には亢進するといわれる^{12, 13)}。また、運動後のタンパク質源の補給が回復期におけるタンパク質の合成と分解に及ぼす影響については、運動後の回復期にタンパク質源をまったく与えない場合はタンパク分解が合成を上回り正味のタンパク質バランスは負になってしまうが¹³⁾、運動直後にアミノ酸投与を行うとタンパク質合成は亢進し分解は抑制されるといわれる¹⁴⁾。今回の研究においてもタンパク質、ペプチド、アミノ酸の3種類のタンパク質源の投与はタンパク質源の無投与に対し、有意に高い肝臓でのタンパク質合成率(図5)と有意に低い血漿3-MeHis値(図3)をもたらした。3-MeHisは骨格筋のミオシンとアクチンに特異的に含まれるアミノ酸で、これらのタンパク質が分解した後もタンパク質合成に再利用されずに定量的に尿中に排泄されるため、尿中3-MeHis排泄量は骨格筋のタンパク質分解を表す指標としてタンパク質代謝に関する研究で広く用いられている¹⁵⁾。さらに、近年は尿中3-MeHis排泄量だけでなく、血漿3-MeHis濃度が短時間の骨格筋タンパク質分解の変化を評価できる指標として有効であることも報告されている¹⁶⁾。本研究では運動3時間後でのタンパク質分解を調べるに際して、実験動物がマウスで短時間の尿を採取する

ことが困難であったため、血漿3-MeHis値を骨格筋でのタンパク質分解の指標として用いた。今回の肝臓タンパク質合成率および血漿3-MeHis値の結果は、長時間の持久的運動後には、運動後の早い時点で何らかの形でタンパク質源の補給を行うことが、運動後のタンパク質代謝の回復には望ましいことを示唆した。しかし、肝臓でのタンパク質合成率で有意な差が認められたのに反し、骨格筋ではタンパク質源の無投与と差が認められなかった(図4)原因については今回の結果からは不明であった。

今回タンパク質源の違いとタンパク質合成との関係を調べることの根本には、ペプチドがタンパク質やアミノ酸よりも消化吸収が速いことがある。中埜らは³⁾ 乳清タンパク質の加水分解ペプチドについて、青山らは²⁾ 大豆タンパク質の加水分解ペプチドについて、それぞれ経口投与後の胃内通過時間がタンパク質やアミノ酸より速いことを報告している。一方で、運動時には全身の血流配分が骨格筋中心となり内臓器官への血流が著しく低下する。これに伴い、運動時には胃酸の分泌が低下し、経口摂取した食物の胃内通過時間が著しく遅延する¹⁾。この様に消化吸収能の低下した運動後では同じタンパク質源でも消化吸収性の優れたペプチドが速やかに吸収され、タンパク質合成基質の迅速な供給を可能にし、運動後のタンパク質合成の回復においても効果的であることが期待された。しかし、結果はタンパク質源の化学形態の違いは骨格筋および肝臓でのタンパク質合成に差をもたらさなかった。これはタンパク質合成率を測定したのが運動後3時間を経過した時点であったことが大きな原因であったと考えられる。ペプチドの吸収が速いことを報告した中埜ら³⁾ および青山ら²⁾ の研究においても、胃内残存物の減少でタンパク質やアミノ酸と差が認められたのは投与1～2時間までで、それ以降では差が認められていない。ペプチドの吸収の速さを考慮すれ

ば今回のタンパク質合成率の測定は運動1時間前後の時点で行うべきであったのかもしれない。しかし、運動後のタンパク質合成を調べたこれまでの研究の多くが運動後2～3時間でのタンパク質合成を調べていたため、本研究においても運動3時間後の時点でのタンパク質合成率を測定したのだが、このことがタンパク質源によるタンパク質合成率の差を明確にできなかった原因となったと考えられる。今後は、運動後の回復期のより早い時点でのタンパク質合成を調べることが必要である。

アルブミンは血漿タンパク質の大部分を占めるタンパク質であり、その合成は肝臓で行われている。したがって、今回の血漿アルブミンへの^[14C]ロイシンの取り込み率は、肝臓でのアルブミン合成率を間接的に表す指標である。このアルブミン合成率においてペプチド投与はタンパク質投与、アミノ酸投与に対して有意に高い値を示した(図6)。先に示したフェニルアラニン静注より求めた肝臓タンパク合成率で差が認められず(図5)、アルブミン合成率で差が認められた原因は、前者は静注した時点でのタンパク質合成を表す値であるのに対し、後者は運動直後から運動後3時間までのタンパク質合成の総和を表す値であることの違いによるものであろう。この結果より、運動終了初期の回復期においては消化吸収性の優れたペプチドの投与で肝臓タンパク質合成の亢進がもたらされていたことが推測され、運動後の消化吸収能の低下した状態においては、より吸収性の高いタンパク質源を摂取することが、運動後の栄養補給としては好ましいことが示唆された。

4. 結 論

本研究では、マウスにトレッドミルでの3時間のランニングを負荷し、運動直後にカゼイン由来のペプチドを経口投与して、運動後のタンパク質合成に及ぼすペプチド投与の影響について検討し

た。この時、カゼインタンパク質、カゼインと同様のアミノ酸組成のアミノ酸混合物および水の投与を平行して行い、タンパク質の合成と分解について比較検討した。結果は、3種類のタンパク質源の投与はタンパク質源の無投与に比して有意に高い肝臓でのタンパク質合成とタンパク質分解の抑制をもたらしたが、投与物の化学形態の違いによる差は認められなかった。しかし、タンパク質合成を肝臓でのアルブミン合成に限定して調べると、ペプチド投与はタンパク質およびアミノ酸投与に比して有意に高い値を示した。

これらの結果より、運動直後にタンパク質源を補給することは運動後の回復期におけるタンパク質の回復に対して効果的であり、さらにこの時のタンパク質源としては消化吸収性の優れたペプチドとして摂取することがより効果的であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に助成して下さった、財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団、ならびにタンパク質、ペプチド、アミノ酸の試料を提供して下さいました森永乳業株式会社・栄養科学研究所に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hellebrandt, F.A., Brogdon, E., Hoopers, S.L. ; The disappearance of digestive inhibition with the repetition of exercise, *Am. J. Dig. Dis. & Nutr.*, 2, 402-408 (1935)
- 2) 青山敏明, 福井健介, 山本孝史 ; ラットに強制投与された窒素源の違いが胃内通過時間に及ぼす影響, *日本栄養・食糧学会誌*, 49, 46-51 (1996)
- 3) 中埜拓, 島谷雅治, 村上雄二, 佐藤則文, 井戸田正 ; 乳清タンパク質酵素分解物の消化吸収性, *日本栄養・食糧学会誌*, 47, 195-201 (1994)
- 4) Chiku, K., Mochida, H., Yamamoto, M., Natori, Y. ; Amino acids suppress intracellular protein degradation in rat liver during parenteral nutrition, *J. Nutr.*, 123, 1771-1776 (1993)

- 5) Garlick, P.J., McNurlan, M.A., Preedy, V.R. ; A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [³H]phenylalanine, *Biochem. J.*, 192, 719-723 (1980)
- 6) Davis, T.A., Fiorotto, M.L., Nguyen, H.V., Reeds, P.J. ; Protein turnover in skeletal muscle of suckling rats, *Am. J. Physiol.*, 257, R1141-1146 (1989)
- 7) Jepson, M.M., Pell, J.M., Bates, P.C., Millward, D.J. ; The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats, *Biochem. J.*, 235, 329-336 (1986)
- 8) Whittaker, P., Mahoney, A.W., Hendricks, D.G. ; Effect of iron-deficiency anemia on percent blood volume in growing rats, *J. Nutr.*, 114, 1137-1142 (1984)
- 9) Wassner, S.J., Orloff, S., Holliday, M.A. ; Protein degradation in muscle: response to feeding and fasting in growing rats, *Am. J. Physiol.*, 233, E119-123 (1977)
- 10) Bylund-Fellenius, A.C., Ojamaa, K.M., Flaim, K.E., Li, J.B., Wassner, S.J., Jefferson, L.S. ; Protein synthesis versus energy state in contracting muscles of perfused rat hindlimb, *Am. J. Physiol.*, 246, E297-305 (1984)
- 11) Rennie, M.J., Edwards, R.H., Davies, C.T., Krywawych, S., Halliday, D., Waterlow, J.C., Millward, D.J. ; Protein and amino acid turnover during and after exercise, *Biochem. Soc. Trans.*, 8, 499-501 (1980)
- 12) Carraro, F., Stuart, C.A., Hartl, W.H., Rosenblatt, J., Wolfe, R.R. ; Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects, *Am. J. Physiol.*, 259, E470-476 (1990)
- 13) Biolo, G., Maggi, S.P., Williams, B.D., Tipton, K.D., Wolfe, R.R. ; Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans, *Am. J. Physiol.*, 268, E514-520 (1995)
- 14) Biolo, G., Tipton, K.D., Klein, S., Wolfe, R.R. ; An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein, *Am. J. Physiol.*, 273, E122-129 (1997)
- 15) 長澤孝志 ; 筋肉タンパク質の分解機構に関する栄養生化学的研究, *日本栄養・食糧学会誌*, 48, 347-355 (1995)
- 16) Hoffer, L.J. ; Nutritional status affects renal 3-methylhistidine handling in humans, *Metabolism: Clin. & Exp.*, 39, 744-748 (1990)