

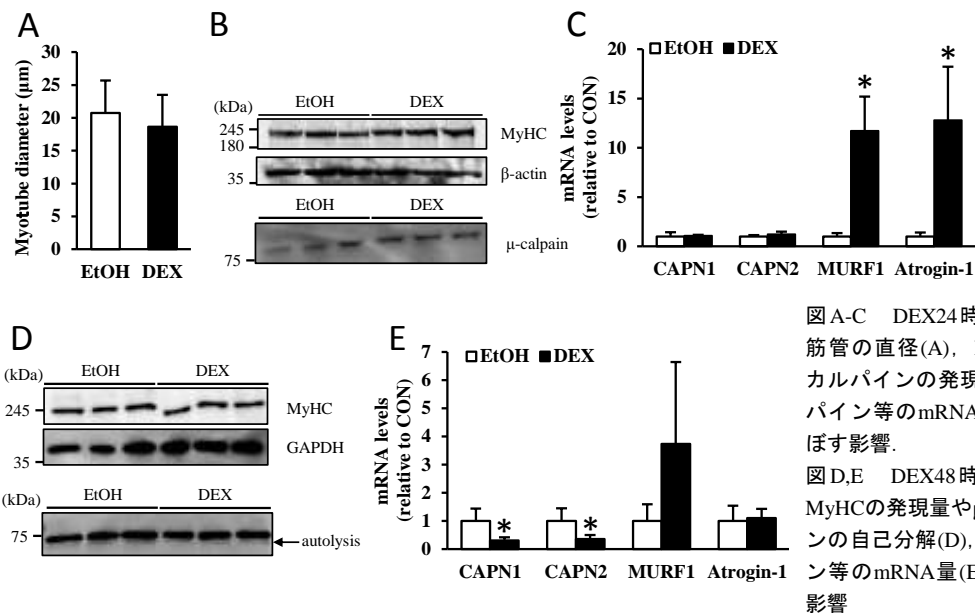
申請者	学科名	栄養学科	職名	助教	氏名	神崎 圭太
調査研究課題	筋タンパク質分解を抑制する大豆機能性成分の探索とその機序の解明					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	神崎 圭太	栄養学科・助教		運動生理・生化学	実験計画の立案, 実施
	分担者	吉村 征浩	栄養学科・助教		脂質生化学, 食品機能学	細胞培養法の確立
調査研究実績の概要	<p>&lt;背景と目的&gt;</p> <p>カルパインは、細胞内 <math>Ca^{2+}</math> 濃度の上昇により活性化されるタンパク質分解酵素であり、筋ジストロフィー症や廃用性症候群のように、安静時においても筋細胞内の <math>Ca^{2+}</math> 濃度が上昇する疾患において、筋萎縮や筋力低下の進行に関与することが知られている。</p> <p>申請者はこれまで、収縮終了後に安静時の細胞内 <math>Ca^{2+}</math> 濃度の上昇が継続する伸張性収縮をラット骨格筋に負荷するモデルにおいて、分離大豆たんぱく質を摂取すると、収縮後のカルパインの発現増加や筋タンパク質分解が抑制されることを観察している。この知見は、何らかの大豆含有成分がカルパインの発現増加の抑制を介して、筋タンパク質分解を抑制することを示唆するが、どの成分がカルパインの発現増加を抑制するかは不明である。</p> <p>ラット L6 筋管細胞に人工的に合成された糖質コルチコイドである Dexamethasone (DEX) を曝露する筋萎縮モデルでは、カルパインの発現増加と筋タンパク質分解の亢進が起こることが報告されている。そこで本研究では、大豆ペプチドや大豆イソフラボンなどの大豆機能性成分が、カルパインの発現増加や筋タンパク質分解を抑制するか否かを検討する前段階として、DEX に曝露した L6 筋管細胞において、カルパインの活性や発現量および筋タンパク質分解の変化を検討することを目的とした。</p> <p>&lt;方法&gt;</p> <p>L6 筋管細胞を 10% 牛胎児血清を含む DMEM 培地（増殖培地）で 2 日間培養し、L6 筋芽細胞が 100% コンフルエントになったところで、培地を 2% 馬血清を含む DMEM 培地（分化培地）に交換し、5~7 日間培養した。筋芽細胞が筋管細胞へと分化したのを確認後、未分化の細胞を除去するために、10 <math>\mu</math>M cytosine arabinoside（最終濃度）を含む分化培地に交換し、さらに 2 日間培養を行った。その後、0.1% エタノール（control: CON）または 1 <math>\mu</math>M DEX を含む分化培地に交換し、24 時間の培養後、細胞の固定・染色や各種抽出を行い、筋管細胞の直径、mRNA 量（<math>\mu</math>-カルパイン、m-カルパイン、MURF1, Atrogin-1）、タンパク質濃度、ミオシン重鎖（myosin heavy chain: MyHC）の発現量、総カルパイン活性を測定した。</p>					

調査研究実績  
の概要

<結果と考察>

1 μM DEXの24時間曝露により、筋管細胞の直径は低下する傾向にあったが、有意な差異は認められなかった(図A)。また、タンパク質濃度、MyHCの発現量、μ-カルパインおよびm-カルパインのmRNA量、μ-カルパインの発現量、総カルパイン活性にもDEX曝露の影響は認められなかった(図B, C)。そこで、骨格筋の代表的なタンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソームのE3リガーゼであるMURF1とAtrogin-1のmRNAの変化について検討を行ったところ、DEX曝露に伴いmRNA量が10倍以上増加することが観察された(図C)。このように、1 μM DEXの24時間曝露に伴い、カルパインの発現増加や筋タンパク質分解の亢進が確認されなかったことから、DEXの曝露時間を48時間に延ばし、再度検討を行った。しかしながら、MyHCの発現量、μ-カルパインの自己分解の程度(活性化の指標)にDEX曝露の影響はみられないばかりか(図D)、μ-カルパインやm-カルパインのmRNA量がDEX曝露により減少することが観察された(図E)。

このように本研究では、L6筋管細胞に1 μM DEXを曝露したが、先行研究の報告とは異なり、カルパインの発現や筋タンパク質の分解が増加することを示唆する結果を得ることができなかった。また、カルパインの活性や自己分解の程度(活性化の指標)にもDEX曝露の影響はみられなかった。今後はカルパインの活性化や筋タンパク質分解の増加が起こることが報告されているCa<sup>2+</sup>イオノフォアを曝露するモデルにおいて、報告通りの変化がみられるかを確認し、大豆機能性成分の効果を検討したい。



図A-C DEX24時間曝露が筋管の直径(A)、MyHCとμ-カルパインの発現(B)、カルパイン等のmRNA量(C)に及ぼす影響。

図D,E DEX48時間曝露がMyHCの発現量やμ-カルパインの自己分解(D)、カルパイン等のmRNA量(E)に及ぼす影響。