

卵タンパク質酵素分解物抽出物によるインスリン分泌促進 および骨格筋糖・脂質代謝亢進作用の検討

愛媛大学大学院連合農学研究科・大学院博士後期課程 落合 優

■ 緒 言

インスリン(INS)は骨格筋におけるグルコース(GLU)取り込みを増加させ、血糖値の低下および骨格筋グリコーゲン充足を導く。特にアスリートにとって骨格筋グリコーゲンは持久運動(Ex)時の主要エネルギー源であるため、膵臓 β 細胞からのINS分泌を活性化させ、骨格筋グリコーゲンを充足させることが望ましい。

近年、食品タンパク質由来低分子ペプチドはタンパク質の合成材料としてだけでなく、多種多様な生理活性を有し、その中にはINS分泌を増加させるペプチドも多数報告されている¹⁻³⁾。Morifujiら¹⁾はヒトにおいて、ホエイタンパク質を摂取した場合、大豆タンパク質を摂取した場合と比べて血中INS値が約2倍に上昇することを報告し、さらに、タンパク質を加水分解処理して低分子化することで、血中INS値の上昇はより速やかになることを報告している。このように、食品タンパク質の種類および分子量の違いによってもINS分泌の応答が異なることが明らかにされている^{4,5)}。したがって、卵白タンパク質(EWP)を低分子化したペプチドにもINS分泌促進作用が期待できるが、EWPおよびその加水分解物(EWH)によるINS分泌促進、骨格筋グリコーゲン充足作用、およびEx後の抗疲労作用についての報告はない。

本研究では、EWHを健常ラットに単回または反復投与し、INS分泌促進作用および骨格筋グリコーゲン充足作用を検討した(実験①および②)。次にINS分泌不全モデル(Goto-Kakizaki(GK))ラットを用いてEWHの摂取がINS分泌指標(HOMA- β)に及ぼす影響について検討した(実験③)。さらに、健常ラットにEWHを反復摂取させ、肝臓および骨格筋グリコーゲン充足作用とEx後の抗疲労作用を検討した(実験④)。

■ 方 法

【実験①】EWHの単回投与がGLU負荷後の血糖値、血漿INS値、および骨格筋グリコーゲン蓄積に及ぼす影響

Wistar系ラット(3週齢、雄)14匹を1週間の馴化期間後、12時間絶食させ、対照群(Ct)、またはEWH群(E)の2群に分けた。Ct群には水を5mL/kg、E群には水に懸濁したEWHを500mg/5mL/kg経口投与し、その30分後にGLU溶液を2g/kg経口投与した。EWH投与前、GLU溶液投与前および投与後120分までの血液を尾静脈より採取し、遠心分離後に血漿を得た。さらに1週間後、同様にEWHおよびGLU溶液を投与した。EWH投与前、GLU溶液投与前および投与30分後に同様に採血を行い、GLU溶液投与60分後に断頭屠殺を行い、血清および骨格筋サンプルを得た。血糖値、血漿INS値を市販キットを用いて測定した。また、骨格筋グリコーゲン含量をLoらの方法⁶⁾を参照して測定した。

【実験②】EWHの反復摂取がGLU負荷後の血糖値、血漿INS値、および骨格筋グリコーゲン蓄積に及ぼす影響

Wistar系ラット(3週齢、雄)21匹を1週間の馴化期間後、カゼイン食(Ct)群、またはEWH食(E)群に分け、2週間自由摂取させた。12時間絶食後、E群をさらにEWH非投与群(EC)またはEWH投与群(E)に分け、Ct群およびEC群には水を5mL/kg、E群には水に懸濁したEWHを500mg/5mL/kg経口投与し、その30分後にGLU溶液を2g/kg経口投与した。EWH投与前、GLU溶液投与前および投与後120分までの血液を尾静脈より採取し、血漿を得た。さらに1週間後、同様にEWHおよびGLU溶液を投与した。EWH投与前、GLU溶液投与前および投与30分後に同様に採血を行い、GLU溶液投与60分後に断頭屠殺により、血清および骨格筋サンプルを得た。血糖値、血漿INS値、および骨格筋グリコーゲン含量を実験①と同様に測定した。

【実験③】GKラットにおけるEWHの反復摂取がINS分泌指標に及ぼす影響

Wistar(W)およびGK(G)ラット(各5週齢、雄)各12匹を1週間の馴化期間後、それぞれ、カゼイン(C)食(WC、GC)群、またはEWH(E)食(WE、GE)群の計4群に分け、6週間飼育した。飼育終了後、

12 時間の絶食後に屠殺し、血糖値および血清 INS 値を実験①および②と同様に測定し、INS 抵抗性指数(HOMA-R)および HOMA- β 値を算出した。

【実験④】EWP および EWH の反復投与が Ex 前後の骨格筋グリコーゲン充足、および Ex 後の筋疲労に及ぼす影響

Wistar ラット(各 3 週齢、雄)47 匹を 1 週間の馴化期間後、カゼイン食(C)群、EWP 食(EWP)群、卵白加水分解物 A 食(EWHA)群、および卵白加水分解物 B 食(EWHB)群に分け、3 週間飼育した。飼育中、毎日全ラットに 2%の錘を胴体に付け、1 時間の Ex(スイミング)を負荷した。飼育 2 週間後、全ラットに 1 時間の Ex を負荷させ、Ex 直前、Ex 後 90 分までの血液を尾静脈より採取し、血糖値、血漿遊離脂肪酸(NEFA)値、および筋疲労指標である血漿クレアチンキナーゼ(CK)活性を市販キットを用いて測定した。全飼育期間終了後、さらに Ex 前屠殺群(R)または 1 時間の Ex 後屠殺群(E)に分けた。血糖値、血清 NEFA 値、血清 CK 活性を上記と同様に測定した。また、肝臓及び骨格筋グリコーゲン含量を上記の方法に従って測定した。

【統計解析】

統計解析は統計ソフト(エクセル統計 2008 for Windows)を用い、結果の数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。それぞれの結果の比較において、 $p < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

■ 結 果

【実験①】1 回目の OGTT の血糖値および血漿 INS 値の結果を Fig.1-A に示した。また、グルコース溶液投与 60 分後の足底筋グリコーゲン含量の結果を Fig.1-B に示した。EWH の単回投与は GLU 投与後の血糖値上昇を有意に抑制した。しかしながら、血漿 INS 値および足底筋グリコーゲン含量は Ct 群と E 群間に有意差は見られなかった。

【実験②】1 回目の OGTT の血糖値の結果を Fig.2-A に示した。また、2 回目の OGTT の血糖値、血漿 INS 値、および GLU 溶液投与 60 分後の腓腹筋グリコーゲン含量の結果を Fig.2-B に示した。EWH の摂取により、空腹時血糖値が有意に低値となった。また、OGTT における血糖値は GLU 投与後 90 分以降、Ct 群に比べて EWH 摂取群で有意に低値を示した。

【実験③】解剖時の血糖値、血清 INS 値、HOMA-R、および HOMA- β の結果を Fig.3 に示した。EWH の摂取は血糖値を有意に低下させ、HOMA-R を有意に改善したが、HOMA- β を改善するには至らなかった。

【実験④】Ex 後の血糖値、血漿 NEFA 値、および血漿 CK 活性の経時変化を Fig.4-A、解剖時の血糖値、血清 NEFA 値、および血清 CK 活性の結果を Fig.4-B、および肝臓および骨格筋のグリコーゲン含量の結果を Fig.4-C に示した。Ex 後の血漿 CK 活性は、C 群と比べて EWP 群で上昇する傾向が示されたが、EWHA および EWHB 群で顕著に抑制され、その程度は EWHB 群でより強く確認された。Ex 後の血糖値は EWHB 群が C 群と比べて高く推移し、血漿 NEFA 濃度は C 群および EWP 群と比較して、EWHA 群および EWHB 群で有意に低値を推移した。また、腓腹筋のグリコーゲン含量は EWP 群において Ex 後に顕著に低下したが、その他の群においては Ex 前後で有意な減少は確認されなかった。

■ 考 察

実験①および②の結果より、EWH の単回および反復投与による血漿 INS 値の上昇は確認されなかった(Fig.1-A および Fig.2-B)。さらに INS 分泌不全である GK ラットに EWH 食を反復摂取させた場合においても HOMA- β は改善されず(Fig.3)、本試験で用いた EWH には INS 分泌促進作用は認められないことが示された。

一方、EWH の単回投与による GLU 溶液投与後の血糖値上昇が有意に抑制され(Fig.1-A, Fig.2-A)、GLU 投与 60 分後の腓腹筋グリコーゲン含量が E および EC 群において Ct 群と比較して有意に高値を示した(Fig.2-C)。本実験結果からは EWH の摂取による骨格筋グリコーゲン充足促進作用の詳細なメカニズムは不明ながら、骨格筋における糖の取り込みが INS 非依存的に促進された可能性やグリコーゲン合成が促進された可能性が考えられる^{2,7)}。これまでに膵臓 β 細胞を用いた *in vitro* 試験において、アルギニン、分岐鎖アミノ酸(BCAA)、フェニルアラニンに強い INS 分泌作用を有すること^{8,9)}や、

摘出筋および筋芽細胞を用いた試験において、BCAAを有するジペプチドにINS非依存的な骨格筋糖取込みとグリコーゲン蓄積作用が確認されている⁷⁾。いずれにしても特定のアミノ酸やジペプチドが血中に移行することがINS分泌や骨格筋における糖取り込みに強く関与することが示唆されている。EWPに含有されるBCAA量は乳タンパク質と同等であるため¹⁰⁾、タンパク質分解酵素種や精製時の反応条件等の検討によりINS分泌を促進するEWHを精製することは、本研究テーマにおける今度の重要な研究課題であると考えられる。

実験④の結果より、EWAおよびEWHB群において、Ex後の血清CK活性の上昇が顕著に抑制され、Ex後の筋損傷が有意に抑制される可能性が示唆された。しかし、EWP群において同様の結果は得られなかった。このことから、EWPを低分子化することにより、その作用メカニズムは不明ながら、筋損傷を抑制する作用が生じることが示唆された。またEWHB群において、Ex後の一過性の血糖値低下がEWP群と比較して抑制されたこと(Fig.4-A)、EWA群およびEWHB群におけるEx後の血漿NEFA値の低下がEWP群と比較して顕著に生じること(Fig.4-A)、さらにEx後の腓腹筋グリコーゲン量の減少がEWP群と比較して抑制されること(Fig.4-C)が示された。これらのことより、EWHの摂取により、Ex時における筋損傷が抑制されるだけでなく、Ex中のエネルギー源として糖の利用が制限され、脂質の利用が促進される可能性が示唆された。

以上より、本研究で用いたEWHはINS分泌を促進する作用は有さないものの、骨格筋グリコーゲン充足を促進する作用を有することが示された。また、EWHはEWPと比較してEx中のグリコーゲン利用を節約するだけでなく、Ex後の筋損傷を著しく抑制することも示唆された。しかしながら、EWHによるこれらの結果の作用メカニズムは不明であり、更なる研究を要すると考えられる。

■ 要 約

EWHの単回投与および反復摂取によるINS分泌促進作用および骨格筋グリコーゲン充足作用の有無について検討したところ、EWHにはINS分泌促進作用は認められなかったものの、GLU投与60分後の腓腹筋グリコーゲン充足作用を有することを見出した(実験①-③)。また、EWHの反復摂取によるEx後の抗疲労作用の有無について検討し、筋損傷指標である血漿CK活性、および腓腹筋グリコーゲン低下が顕著に抑制されることを見出した(実験④)。

■ 文 献

- (1) Morifuji M, Ishizaka M, Baba S, Fukuda K, Matsumoto H, Koga J, Kanegae M, Higuchi M. (2010) Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary protein: effect on plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8788-97.
- (2) 森藤雅史(2012)運動後の筋グリコーゲンの回復に及ぼすアミノ酸, ペプチド, たんぱく質の影響, 臨床スポーツ医学, 29, 887-92, 文光堂, 東京
- (3) Morifuji M, Kanda A, Koga J, Kawanaka K, Higuchi M. (2010) Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle glycogen level in rats. *Amino Acids* 38, 1109-15.
- (4) Calbet JA, MacLean DA. (2002) Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. *J. Nutr.* 132, 2174-82.
- (5) van Loon LJ, Saris WH, Verhagen H, Wagenmakers AJ. (2000) Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr.* 72, 96-105.
- (6) Lo S, Russel JC, Taylor AW. (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 28, 234-6.
- (7) Morifuji M, Koga J, Kawanaka K, Higuchi M. (2009) Branched-chain amino acid-containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake rate in L6 myotubes and isolated skeletal muscles. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo). 55, 81-6.
- (8) Hutton JC, Sener A, Malaisse WJ. (1980) Interaction of branched chain amino acids and keto acids upon pancreatic islet metabolism and insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 255, 7340-6.
- (9) Blachier F, Mourtada A, Sener A, Malaisse WJ. (1989) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Uptake of metabolized and nonmetabolized cationic amino acids by pancreatic islets. *Endocrinology* 124, 134-41.

(10) 文部科学省科学技術学術審議会資源調査分科会(編集),(2010)日本食品標準成分表準拠アミノ酸成分表(2010),全国官報販売協同組合,東京

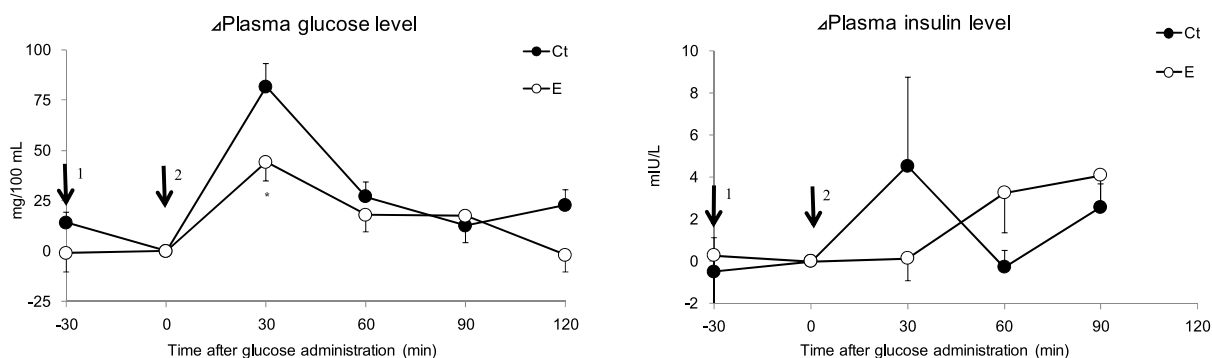


Fig.1-A Effects of single administration of EWH on plasma glucose (left) and insulin (right) levels in OGTT.

All results are expressed as mean $\pm$ SE(n=7). The differences were evaluated using Student's *t* test. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

* $p < 0.05$, vs. Ct group. ↓ 1, Sample administration; ↓ 2, Glucose administration

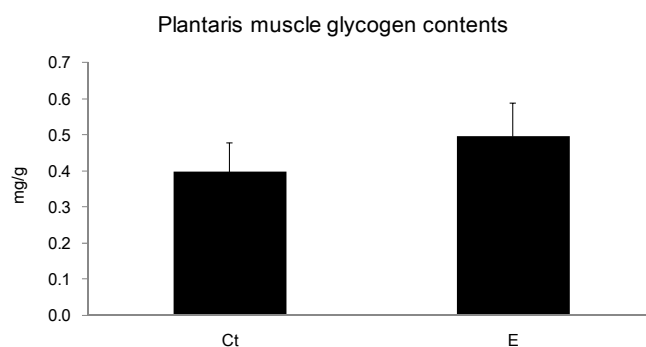


Fig.1-B Effects of single administration of EWH on plantaris muscle glycogen contents at 60 minutes after glucose administration.

All results are expressed as mean $\pm$ SE (n=7). The differences were evaluated using Student's *t* test. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

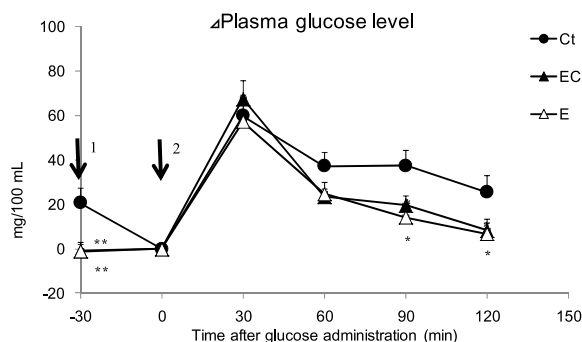


Fig.2-A Effects of dietary feeding of EWH on plasma glucose levels in OGTT-1.

All results are expressed as mean $\pm$ SE(n=7-9). The differences were evaluated using 1-way ANOVA, and Fischer PLSD test. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs. Ct group. ↓ 1, Sample administration; ↓ 2, Glucose administration

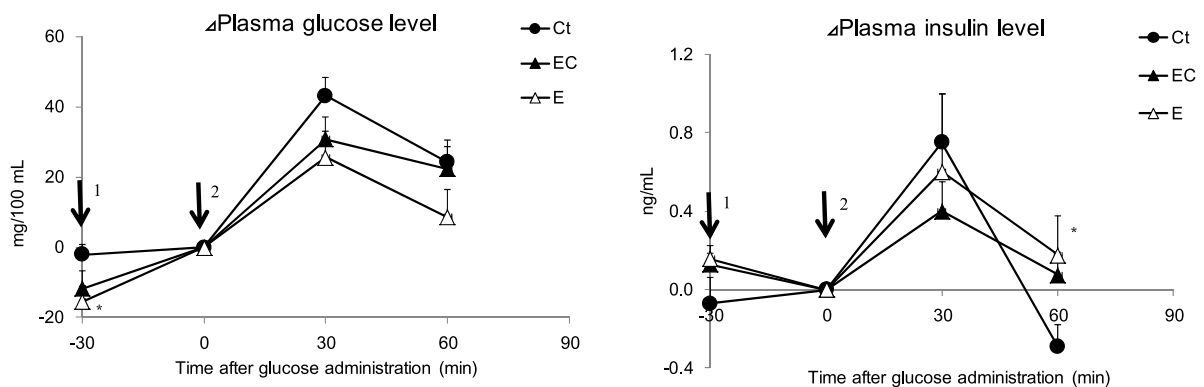


Fig.2-B Effects of dietary feeding of EWH on plasma glucose (left) and insulin (right) levels in OGTT-2. All results are expressed as mean $\pm$ SE(n=7-9). The differences were evaluated using 1-way ANOVA, and Fischer PLSD test. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant. * $p < 0.05$, vs. Ct group. ↓ 1, Sample administration; ↓ 2, Glucose administration

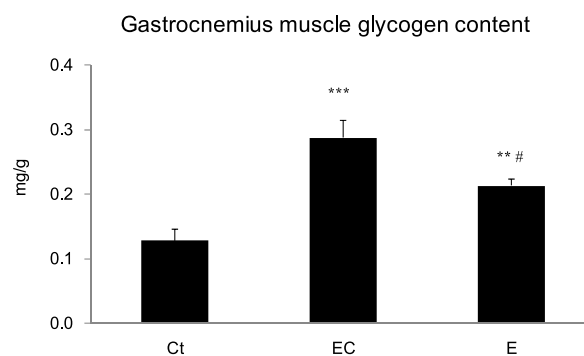


Fig.2-C Effects of single administration of EWH on plantaris muscle glycogen contents at 60 minutes after glucose administration.

All results are expressed as mean $\pm$ SE(n=7-9). The differences were evaluated using 1-way ANOVA, and Fischer PLSD test. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. Ct group. # $p < 0.05$, vs. EC group.

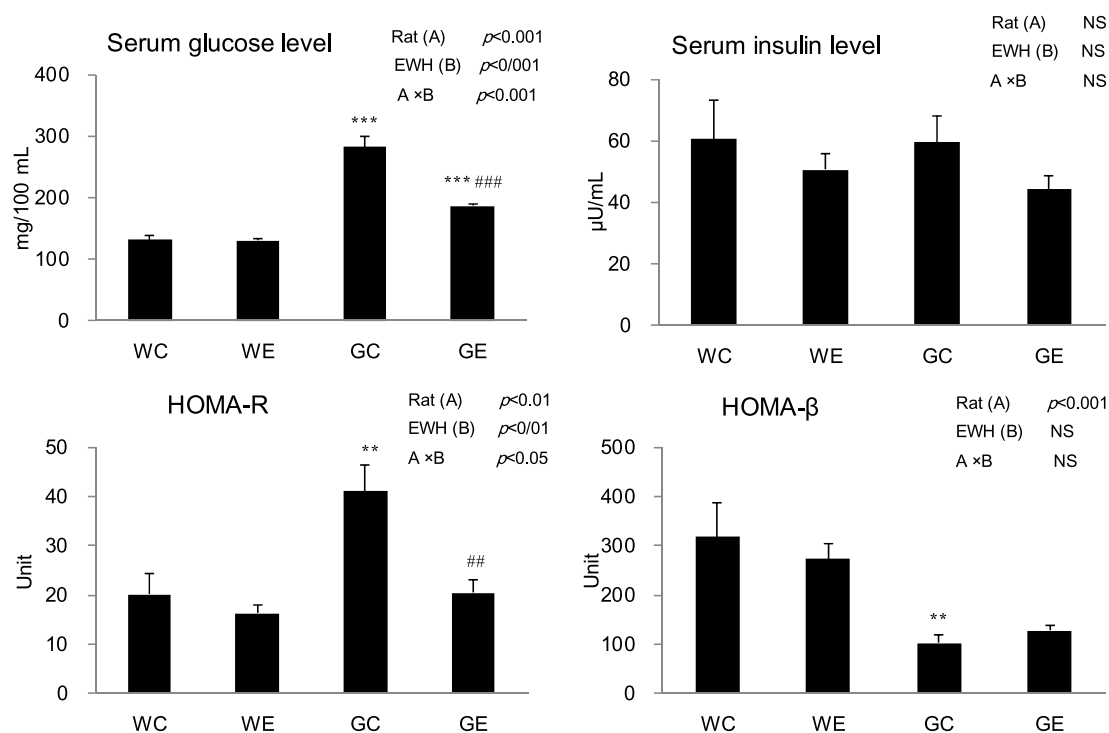


Fig.3 Effects of dietary EWH on fasting serum glucose and insulin levels, HOMA-R, and HOMA- β in Wistar and GK rats.

All results are expressed as mean $\pm$ SE(n=6). The differences were evaluated using 2-way ANOVA, and Tukey-Kramer test. A difference of $p<0.05$ was considered statistically significant. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$, vs. corresponding W group. ## $p<0.01$; ### $p<0.001$, vs. GC group. W, Wistar; G, GK; C, Casein; E, EWH

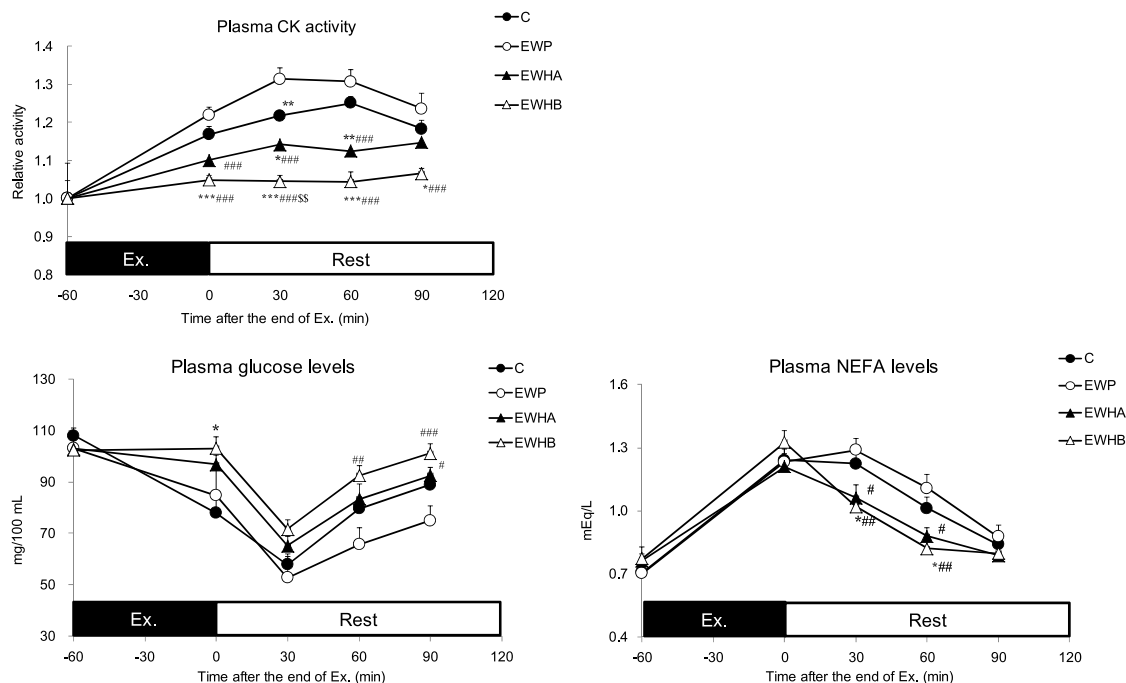


Fig.4-A Effects of dietary EWP and EWH on serum glucose, NEFA levels, and serum CK activity before and after Ex.

All results are expressed as mean $\pm$ SE(n=11-12). The differences were evaluated using 1-way ANOVA, and Tukey-Kramer test. A difference of $p<0.05$ was considered statistically significant.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. C group; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ vs. EWP group; \$\$ $p<0.01$ vs. EWHA group

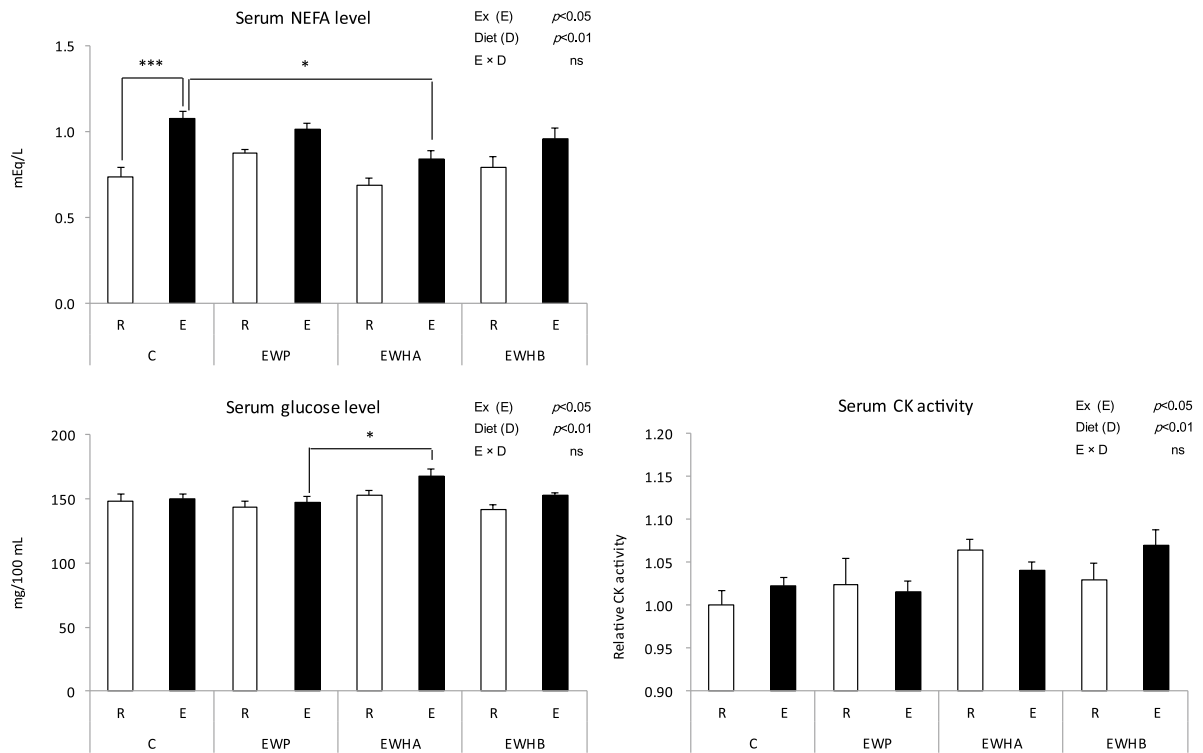


Fig.4-B Effects of dietary EWP and EWH on serum glucose and NEFA levels, and serum CK activity. All results are expressed as mean $\pm$ SE (n=5-6). The differences were evaluated using 2-way ANOVA, and Tukey-Kramer test. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

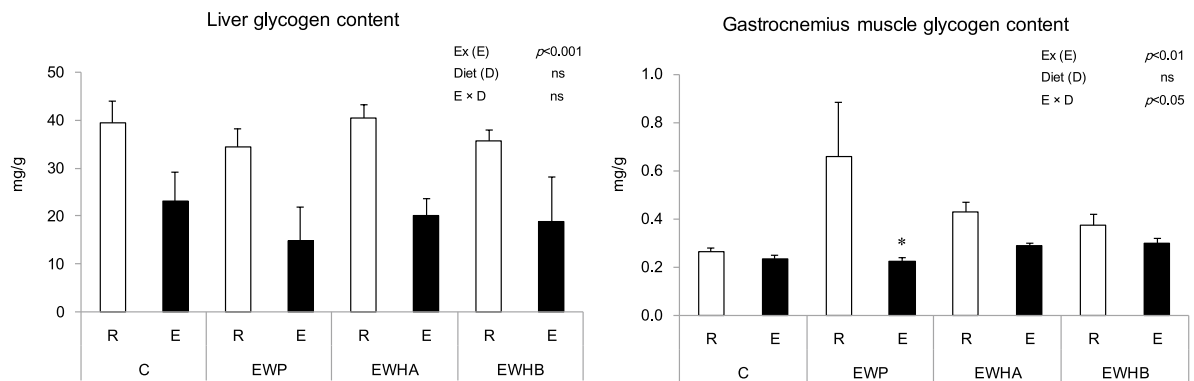


Fig.4-C Effects of dietary EWP and EWH on glycogen contents in liver (left) and gastrocnemius muscle (right). All results are expressed as mean $\pm$ SE (n=5-6). The differences were evaluated using 2-way ANOVA, and Tukey-Kramer test. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant. * $p < 0.05$, vs. corresponding R group.