

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10817

研究課題名(和文) 一酸化窒素供給体の経口摂取が伸張性収縮による筋小胞体機能の減退を抑制する

研究課題名(英文) Ingestion of nitric oxide donor could alleviate the decline of sarcoplasmic reticulum functions following eccentric contraction.

研究代表者

松永 智 (Matsunaga, Satoshi)

宮崎大学・教育学部・教授

研究者番号：70221588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素供給体の摂取が伸張性収縮に伴う筋収縮力、及び筋小胞体機能の減退を緩和するか否かをラット速筋を用いて検討した。5日間の一酸化窒素供給体の摂取は、伸張性収縮に伴う筋収縮力、及び筋小胞体Ca<sup>2+</sup>ATPase活性の減少を顕著に緩和させた。筋小胞体Ca<sup>2+</sup>制御タンパク質を免疫ブロッティング法により検討した結果、リアノジン受容体のタンパク質量は伸張性収縮により減少することが、またその減少は一酸化窒素供給体の摂取により明らかに緩和されることがみいだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、一酸化窒素の基質の1つである硝酸塩摂取により伸張性収縮による筋発揮力の減退緩和の可能性を示してきた。近年、一酸化窒素供給体は、硝酸塩より一酸化窒素を効率よく産生できる物質であることが示された。本研究では、5日間の一酸化窒素供給体の摂取により、伸張性収縮に伴う筋収縮力を顕著に緩和させること、並びにこれは筋小胞体による細胞内Ca<sup>2+</sup>調節機能の減退緩和に起因することを示した。また、これは活動性の筋疲労予防に、一酸化窒素の経口投与が効果的である可能性を示すものであった。しかしながら、この機能減退緩和に最適な一酸化窒素供給体の濃度や摂取期間等については、未だ不明な部分が多く残されている。

研究成果の概要(英文)：We examined whether ingestion of nitric oxide donor would alleviate the decline of muscle contractile properties and sarcoplasmic reticulum (SR) functions in rat fast-twitch muscle following eccentric contraction (ECC). Dietary nitric oxide donor of 5-days could attenuate ECC-induced decline of the maximal tetanic force and SR Ca<sup>2+</sup>ATPase activity. The results using immunoblotting showed that ingestion of nitric oxide donor could also alleviate ECC-induced decline in protein content of ryanodine receptor, which is one of SR Ca<sup>2+</sup>-regulatory proteins.

研究分野：運動生理学

キーワード：一酸化窒素供与体 筋収縮力 筋小胞体 伸張性収縮

## 1. 研究開始当初の背景

筋の収縮・弛緩は、細胞内のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) により制御されている。骨格筋細胞において、筋収縮や筋弛緩のシグナルとしての働きを持つ細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、筋小胞体機能 (SR) によって、すなわち筋細胞質から筋小胞体に  $\text{Ca}^{2+}$  を取込、貯蔵、そして筋細胞内へ放出することにより制御されている。短縮性の収縮により生じた筋疲労は、筋発揮張力を低下させ、ほぼ例外なく SR の  $\text{Ca}^{2+}$  の取込 (SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase タンパク質)・放出 (リアノジン受容体タンパク質: RyR) 能力の低下を引き起こすことが報告されている (松永ら 2000)。SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出に関しては、ジヒドロピリジン受容体 (DHPR) やジャンクトフィリン (Junctophilin) が RyR と密接に関係しており、これらの器官の機能不全が、筋疲労を招来する要因の一つとして (Matsunaga et al 2008)、すなわちこれらの器官のタンパク質の酸化的修飾 (Matsunaga et al 2003) とタンパク質分解 (Matsunaga et al 2001) により引き起こされる可能性があることが分かっている。近年、SUMOylation (ユビキチン様タンパク質を付加する修飾) や  $\alpha$ -GlcNAcylation (リン酸化カスケード由来の修飾) も筋タンパク質を修飾することが報告され、この修飾が機能減退を誘引する因子であることが指摘されている。しかしながら、これらの修飾が SR の  $\text{Ca}^{2+}$  調節機能に及ぼす影響については、明らかにされていない。

筋が引き伸ばされながら収縮する伸張性収縮の主な特徴は、大きな張力発揮を生み出すことができる反面、張力の回復が短縮性収縮より遅いこと、そして運動後 2~3 日でピークに達する遅発性筋肉痛 [DOMS] が生じることなどにある (Allen 2001)。この伸張性収縮は短縮性収縮と比較して、短時間に大きな力発揮を可能にすることから、多くのスポーツ競技現場で積極的に用いられている。伸張性収縮による筋疲労の発生メカニズムについても、物理的な筋線維膜の断裂 (Nosaka & Clarkson 1996)、及び SR の  $\text{Ca}^{2+}$  の放出能力の低下 (Matsunaga et al. 2015) などが認められ、その発生メカニズムは短縮性収縮とは一部異なることが明らかになってきた。しかしながら、筋活動性の傷害誘発や疲労誘因のメカニズムの全容が解明されたとはいえず、未だ不明瞭な部分も多い。

一酸化窒素は、反応性の高い気体で、酸素と反応しやすく直ぐに二酸化窒素に変化する性質を持つ。近年、一酸化窒素の基質の 1 つである硝酸塩の摂取が速筋線維の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  調節機能を向上させることが報告され (Hernández et al. 2012)、一酸化窒素が筋パフォーマンスを向上させる要因として注目を集めはじめている (Ferreira & Behnke, J Appl Physiol 2011)。我々も硝酸塩摂取により、伸張性収縮による筋発揮張力減退の緩和の可能性を示したが、その詳細なメカニズムについては不明なまま残っており (松永: 科学研究費・基盤 C, 平成 27~29 年)、それ以上を明らかにした研究はみあたらない。またこの摂取した硝酸塩が全て、あるいはどの程度一酸化窒素を供給したのかについても不明である。一酸化窒素供給体は、分解されて一酸化窒素を放出する物質で、これを細胞内に付与することにより  $\text{Ca}^{2+}$  の感受性が増加することが分かっていた (Dutka et al. 2011)。このことから、一酸化窒素供給体の摂取により、一酸化窒素摂取が伸張性収縮後の疲労性の筋発揮張力の減退と SR  $\text{Ca}^{2+}$  取込・放出機能の変化に及ぼす影響を精度よく検証することができるであろう。これらの一酸化窒素供給体の摂取と筋収縮力との関係を、適切な摂取期間や摂取時期をともに解明できれば、疲労性の筋パフォーマンス低下を抑制、あるいは低下したとしてもその程度を緩和するための基礎的知見を得ることができ、筋疲労由来のスポーツ傷害の予防等のトレーニング科学の発展に大きく寄与するものと考えている。

## 2. 研究の目的

伸張性収縮に伴う機能減退についての先行研究では、筋が受動的に引き伸ばされたことによる構造的変化に着目したものばかりである。我々は、伸張性収縮による筋発揮張力の減退の緩和の可能性を、一酸化窒素の基質となる物質の 1 つである硝酸塩摂取により示したが、その詳細な減退緩和メカニズムについては未だ不明なまま残っており、それ以上を明らかにした研究はみあたらない。一酸化窒素供給体は、一酸化窒素を硝酸塩より効率よく産生できる物質であり、これらの摂取が、筋線維の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  調節機能を向上させることが示唆される。また一酸化窒素供給体の摂取により、筋収縮力や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  調節機能に関して、運動性の疲労抑制を促進するか否かについての研究は未だ行われてはいない。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験プロトコル・筋発揮張力の測定

10 週齢の雄性ラット 30 匹 (各群 15 匹ずつ) を、一酸化窒素供給体摂取群と非摂取群に分けた。一酸化窒素供給体の摂取は S-ニトロソチオール (S-Nitrosoglutathione: SNOG) を水に溶解させ 5 日間、飲水摂取させた。その濃度については、一酸化窒素供給体の経口摂取について安全性が証明されている濃度と同じとした (1mg/kg/日: Nath et al. 2010)。被検動物は麻酔下で左脚を固定し、電動式の伸張性筋収縮器により、伸張性収縮を 200 回負荷した。伸張性収縮後のカル

パイン活性の増大により RyR が分解され、その分解のピークが収縮後 3 日後に生じることが分かっているため、前脛骨筋を筋収縮終了 3 日後に摘出し、分析に供した。なお、右脚は対照脚とした。摘出した前脛骨筋はすぐに張力計に繋ぎ、生理食塩水 (37 ) 中で、単収縮及び強縮張力を測定した。その後、前脛骨筋は酵素活性測定用とタンパク質解析用に分割した。筋サンプルは測定までの間、必要に応じて-80 冷凍庫にて保管した。

(2) 筋発揮張力の測定

単収縮力、及び強縮張力 (1, 20, 40, 60, 80 及び 100 Hz) を測定した (Kanzaki et al. 2010)。

(3) SR の機能の測定

約 0.2 g の筋を抽出液とともに細分化、及び均一化し、引き続き、遠心処理をした後、筋サンプルを得た。SR $Ca^{2+}$ -ATPase 活性、及び  $Ca^{2+}$ 取込・放出速度を測定した (Matsunaga et al. 2015)。

(4) タンパク質の解析

SDS ポリアクリルアミド法 による電気泳動後に免疫プロットングを行い、以下の項目について量的分析 (タンパク質が分解されていないか) を行った。

SR  $Ca^{2+}$ -ATPase(SERCA1a)、RyR (Matsunaga et al. 2003)

DHPR、Calpine、Junctophilin (Watanabe et al. 2015)

4 . 研究成果

(1) 図 1 に、5 日間の SNOG を経口摂取したラット前脛骨筋に、1 ~ 100Hz の電気刺激により導出した最大等尺性収縮力を示した(対照脚との比較)。SNOG 摂取群では 1 ~ 100Hz の全ての周波数刺激において、非摂取群より高値を示した (主効果 :  $P < 0.05$ )。

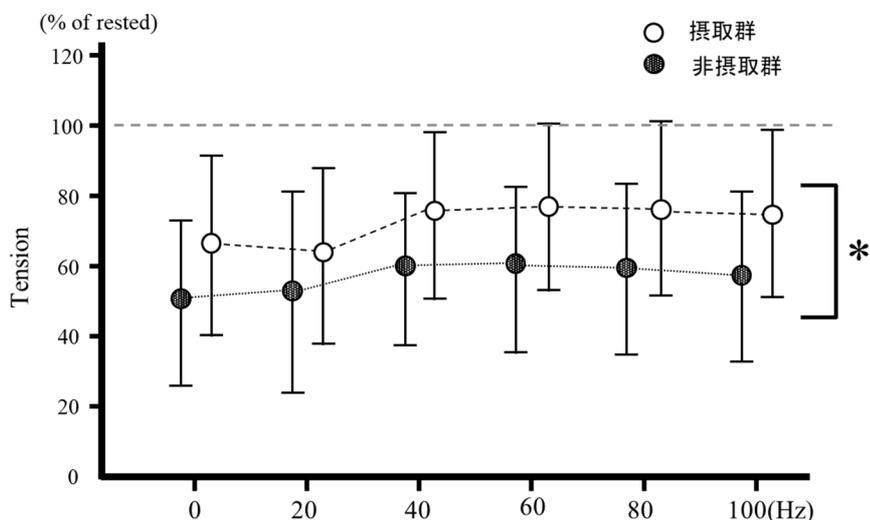


図 1 等尺性最大筋収縮力

\*:  $P < 0.05$

(2) 図 2 に、SNOG 摂取群と非摂取群の血中における一酸化窒素濃度を示した。血中一酸化窒素濃度は、SNOG 摂取群、非摂取群ともに明らかな差はみられなかった。

(3) 図 3 に、SNOG 摂取群と非摂取群の SR  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性を示した。SR  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性は SNOG 摂取群、非摂取群とともに伸張性収縮により低値を示した。しかしながら、SNOG 摂取群の収縮脚の SR  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性は、非摂取群のそれと比較して高値を示し、両群間に有意な差が認められた( $P < 0.05$ )。

(4) 細胞内  $Ca^{2+}$ 制御能力に關与するタンパク質の解析を行うために、SDS ポリアクリルアミド法による電気泳動によりタンパク質分離を行った。引き続き、免疫プロットングを行い、筋小胞体  $Ca^{2+}$ 制御に關与する SERCA1a、RyR、DHPR Calpine と Junctophilin タンパク質の量について分析を行った。その結果、SERCA1a と Calpine は、収縮脚と対照脚の間に SNOG 摂取、及び伸張性収縮の有無に關係なく、差異は認められなかった。Junctophilin については、伸張性収縮に伴う顕著な減少が觀察された( $P < 0.05$ )。RyR のタンパク質量は SNOG 摂取の有無にかかわらず、伸張性収縮により明らかに減少すること( $P < 0.05$ )、またその減少は一酸化窒素供給体の摂取により顕著に緩和されることが明らかとなった ( $P < 0.05$ )。

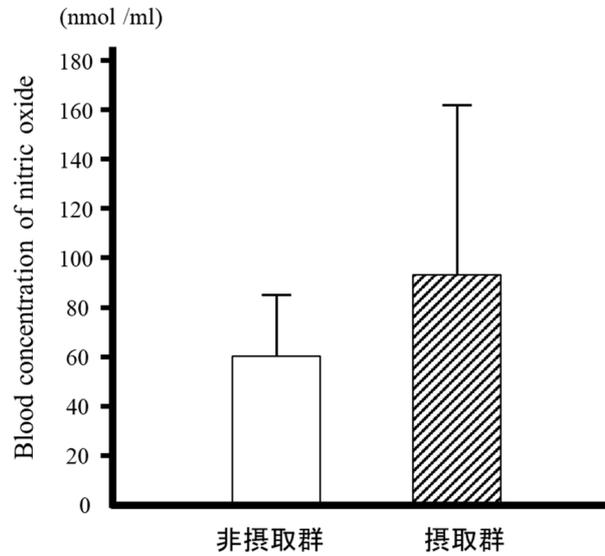


図2 血中一酸化窒素濃度

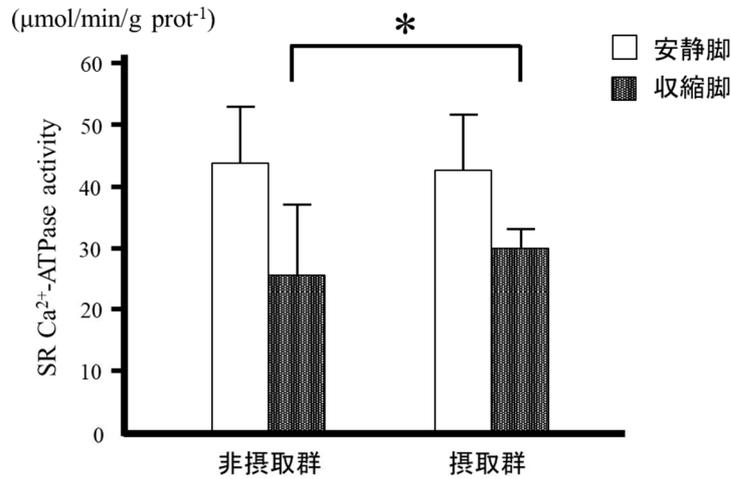


図3 筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性 \* : P < 0.05,

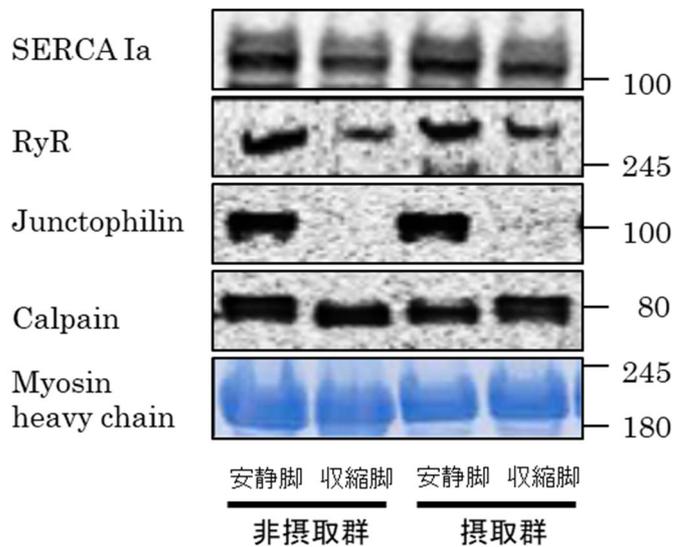


図4 伸張性収縮、及び一酸化窒素供給体摂取による筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>ATPase 活性 (SERCA a)、リアノジン受容体 (RyR)、ジャンクトピリン (Junctophilin)、カルパイン (Calpain) とミオシン重鎖 (myosin heavy chain) の免疫プロット

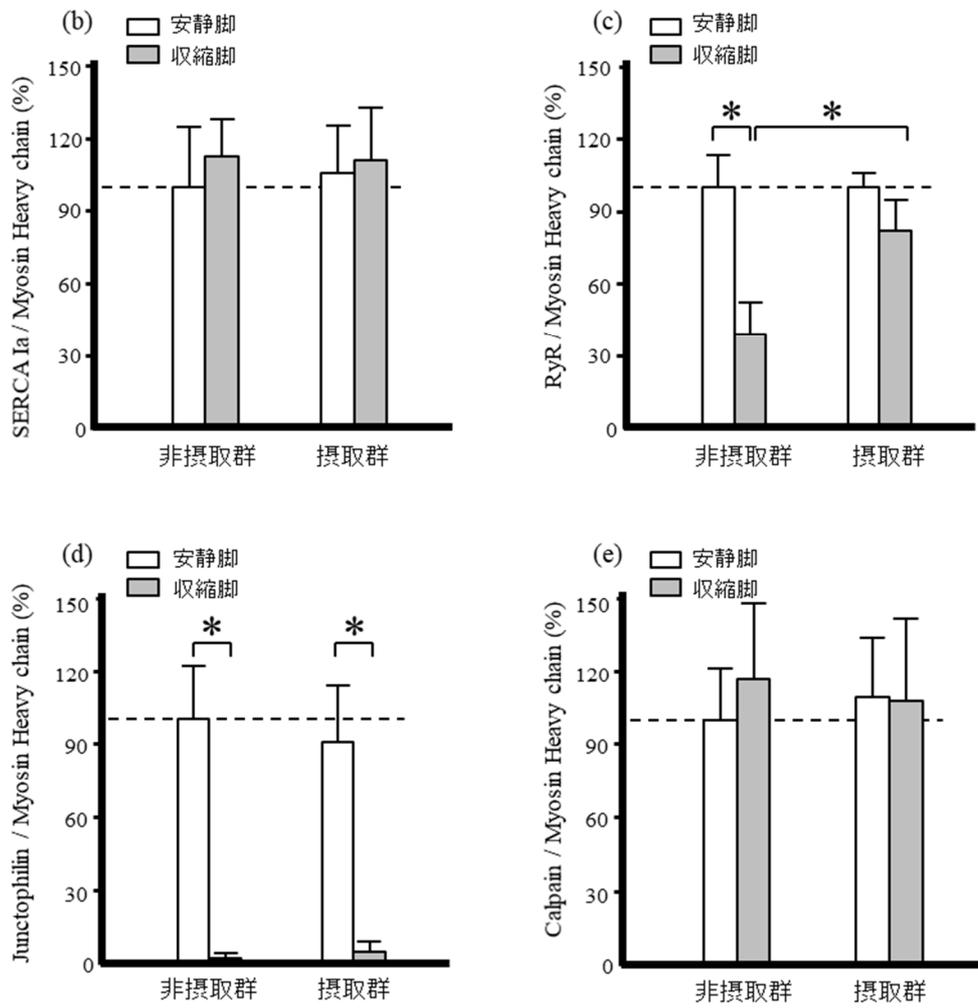


図5 伸張性収縮、及び一酸化窒素供給体摂取による筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase 活性 (SERCA a)、リアノジン受容体 (RyR)、ジャンクトピリン (Junctophilin)、カルパイン (Calpain) とミオシン重鎖 (myosin heavy chain) の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 S. Matsunaga, C. Aibara, D. Watanabe, K. Kanzaki, Y. Morizaki, S. Matsunaga-Futatsuki, M. Wada	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of dietary nitrate on force production and sarcoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> handling in rat fast-twitch muscles following eccentric contraction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Open J. Appl. Sci.	6. 最初と最後の頁 607-618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/ojapps.2018.812049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 谷口夢結, 福田佳尉, 福田侑季実, 山崎裕太, 松永須美子, 松永 智	4. 巻 95
2. 論文標題 硝酸塩経口摂取が女子大学生エリートカヌー選手の無酸素性運動能力に及ぼす影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 宮崎大学教育学部紀要	6. 最初と最後の頁 230-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松永 智, 森崎由理江, 塩瀬圭佑, 松永須美子, 和田正信
2. 発表標題 一酸化窒素供給体の摂取が伸張性収縮による筋小胞体機能の減退を抑制する
3. 学会等名 日本体力医学会第1回南九州地方大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 正信 (Wada Masanobu) (80220961)	広島大学・総合科学研究科・教授  (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森崎 由里江  (Morizaki Yurie)  (60804953)	宮崎大学・教育学部・講師    (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関