

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19570

研究課題名（和文）骨格筋疲労を軽減する新規化合物の同定-グルタチオン化に着目して-

研究課題名（英文）Identification of novel compound for alleviating skeletal muscle fatigue focusing on S-glutathionylation

研究代表者

渡邊 大輝（Watanabe, Daiki）

広島大学・人間社会科学研究科（総）・助教

研究者番号：30823281

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：トロポニンIのグルタチオン化には骨格筋疲労を軽減する効果があることが近年明らかとされてきた。本研究では、グルタチオン化を触媒する酵素であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）活性を変化させる化合物を同定することとした。本研究の結果、インドール-3-カルビノールがGST活性を大きく低下させること、グルタチオン化を抑制すると筋疲労の回復が遅延することが明らかとなった。本研究では、GST活性を高める化合物の発見には至らなかったが、今後検討を継続することで新たな筋疲労抑制物質の発見につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、グルタチオン（GSH）化による骨格筋疲労の抑制効果を高める化合物の開発を試みた。結果的には、そのような化合物の発見には至らなかったが、GSHの筋疲労に対する役割を詳細に検討できた。本研究では、GSHは、1) 筋疲労を迅速に回復させる役割があること、2) 疲労発生初期においては、GSHには正の効果だけでなく負の効果もあることを示した。これらの結果は、GSHを用いた治療の有用性を示すとともに、その負の面も示しており、今後の筋疲労の治療法に対して新たな基盤を提供したものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：It has been recently shown that S-glutathionylation of troponin I ameliorates skeletal muscle fatigue. The purpose of the present study was to identify a novel compound(s) for an enhancement of glutathione-S-transferase which is a catalyst for S-glutathionylation. Present study indicated that indole-3-carbinol significantly decreased GST activity and suppression of S-glutathionylation delayed recovery from muscle fatigue. Although the enhancer of GST activity was not identified in this study, this study may provide a clue to develop the new compound alleviating muscle fatigue.

研究分野：筋生理学

キーワード：骨格筋疲労 S-glutathionylation スキンドファイバー 活性酸素種 筋小胞体 筋原線維

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでの研究において、トロポニン I の S-glutathionylation (タンパク質とグルタチオンが架橋構造を形成する反応のこと) が骨格筋疲労を軽減する生体防御機構の一つであることを明らかにしてきた (Watanabe et al. 2015, 2016, 2019). S-glutathionylation は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ glutathione-S-transferase: GST) によって触媒される反応であり、この酵素の活性を高めれば、S-glutathionylation が促進できると考えられた。

先行研究において、benzyl isothiocyanate, p-naphthoflavone, coumarin, -angelicalactone, disulfiram, indole-3-carbinol および indole-3-acetonitrile の 7 つの化合物(以下、標的七化合物と表記)が GST を活性化させることが報告されていたが、骨格筋に対する影響は不明であった。本研究の当初の目的は、標的七化合物の投与が筋疲労にどのような影響を及ぼすか検討することであった。

研究を進めていくと、標的七化合物は GST 活性を高める効果がないことが明らかとなった。逆に、indole-3-carbinol には濃度依存的に GST 活性を低下させる効果があった。S-glutathionylation はトロポニン I に対しては機能亢進効果があるが、興奮収縮連関に関与する他のいくつかのタンパク質 (Na⁺-K⁺ ATPase など) には機能抑制効果があることが明らかとなったことから (Watanabe & Wada 2020), S-glutathionylation の抑制がどのような効果を筋疲労に及ぼすかを検討することとした。S-glutathionylation はグルタチオン(GSH) を基質として生じることから、細胞内 GSH を約 90%低下させるモデルを作製し、S-glutathionylation を抑制した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、S-glutathionylation をターゲットとした筋疲労抑制物質を探索することであった。そのために、標的七化合物が GST 活性に及ぼす影響を検討し、その結果に基づいて、S-glutathionylation の低減が筋疲労に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験デザイン

本研究は 2 つの実験から構成された。実験 1 では標的七化合物が GST 活性に及ぼす影響を、実験 2 では GSH の低減が筋疲労に及ぼす影響について検討した。以下にそれぞれの実験デザインについて記載する。

【実験 1】6.25 unit/ml (最終濃度) GST 存在下において、標的七化合物を添加した際の GST 活性を測定した。標的七化合物のうち違いが観察されたものは indole-3-carbinol のみであったため、この化合物について濃度依存性を検討した。

【実験 2】実験にはラットを用いた。ラットをコントロール群と buthionine sulfoximine (BSO) 群の 2 群に分けた。BSO 群には 50 mg/kg body weight の BSO を 12 時間ごとに 5 日間投与し、投与終了 12 時間後において、片脚の底屈筋を連続的に収縮させ、筋疲労を誘起した。収縮終了 0.5 時間後および 6 時間後において筋収縮力を評価し、筋疲労の回復の程度を検討した。また、それぞれの回復時間において、腓腹筋を摘出し、スキンドファイバーを用いて筋疲労の生理メカニズムの変化について検討した。GSH 量の測定、張力測定、およびスキンドファイバーを用いた測定の詳細は後述。

(2) GST 活性

測定は GST Colorimetric Assay kit (Biovision 社製)を用いて行った。マイクロプレートのそれぞれのウェルに 6.25 unit/ml (最終濃度) GST と標的七化合物を反応溶液に加え、10 mM (最終濃度) GSH を加えることで反応を開始した。340 nm の吸光度をモニターし、その変化量から GST 活性を測定した。標的七化合物の最終濃度は、-Naphthoflavone, disulfiram および indole-3-carbinol 以外は 10 μM (最終濃度)とした。-Naphthoflavone と disulfiram については 10 μM では GST 活性測定ができなかったため、最終濃度が 1 nM, 10 nM および 100 nM となるように化合物を添加した。indole-3-carbinol については、10 μM (最終濃度)で顕著な抑制効果が得られたため、その効果の濃度依存性 (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM および 10 μM) について検討した。

(3) GSH 量

摘出した筋を液体窒素下でパウダーにした後、9 倍量のバッファーでホモジナイズした。その後、サンプルの脱タンパク化を行い、全グルタチオン (tGSH) 量の測定に用いた。また、脱タンパク化を行った後のサンプルの一部に 2-ビニルピリジンを加えて、60 分間室温で反応させ、そのサンプルを酸化型グルタチオン (GSSG) 量の測定に用いた。tGSH 量から GSSG 量を差し引いた値を GSH 量とした。なお、BSO 群では GSSG 量が検出限界以下となり測定は不可能であった。そのため、本研究では GSH 量の比較のみを行った。

(4) 張力測定

ラットを麻酔下において、仰臥位に置き、フットホルダーに固定した。その後、表面電極をラット腓腹筋内側と外側に平行となるように貼付した。電極を介し、種々の刺激頻度 (1 Hz, 20

Hz, 40 Hz, 60 Hz, 80 Hz および 100 Hz) で電気刺激を筋に対し負荷し収縮を誘起した。筋収縮力はフットホルダーに取り付けられた張力計によって測定した。

(5) スキンドファイバーの作製

ラットの腓腹筋の表層部から単一筋線維を作製し, 形質膜をピンセットで剥離した。作製したスキンドファイバーを張力計に取り付け, K-HDTA 溶液 (細胞質と同様の組成の溶液) に浸漬した。溶液に浸漬しながら, ファイバーに対して垂直になるようにレーザー光 (632 nm) を照射し, 得られた回折像から筋節長を測定し, 2.8 μm になるようにファイバーを伸長した。

(6) 筋小胞体 Ca^{2+} 放出機能の測定

スキンドファイバーを K-HDTA 溶液に 2 分間浸漬した後, Na-HDTA 溶液 (K-HDTA 溶液にすべての K^+ を Na^+ に置き換えた溶液) に浸漬した。これによって, 膜を強制的に脱分極させ, 生理的な脱分極誘因性の筋小胞体 Ca^{2+} 放出を誘起した。放出された Ca^{2+} によって発揮された張力 (脱分極誘因性張力) を記録し, それを Ca^{2+} 誘因性の最大張力 (筋原線維が発揮できる最大の張力) で除した値を筋小胞体 Ca^{2+} 放出機能として評価した。

(7) 筋原線維の機能測定

スキンドファイバーを種々の濃度 (<0.001, 0.25, 0.40, 0.63, 1.00, 1.58, 2.51, 3.98 および 20 μM) の Ca^{2+} 溶液に浸漬し発揮された張力を記録した。また, 測定後に筋線維を垂直方向から撮影し, 得られた画像から筋線維の断面積を計測した。20 μM Ca^{2+} 溶液浸漬時に発揮された Ca^{2+} 誘因性最大張力を断面積で除し, 単位断面積あたりの最大張力を測定した。

4. 研究成果

(1) 標的七化合物が GST 活性に及ぼす影響【実験 1】

Control と比較し, indole-3-carbinol を添加すると, GST 活性が著しく低下した (図 1A)。indole-3-carbinol の効果は濃度依存的であった (図 1C)。

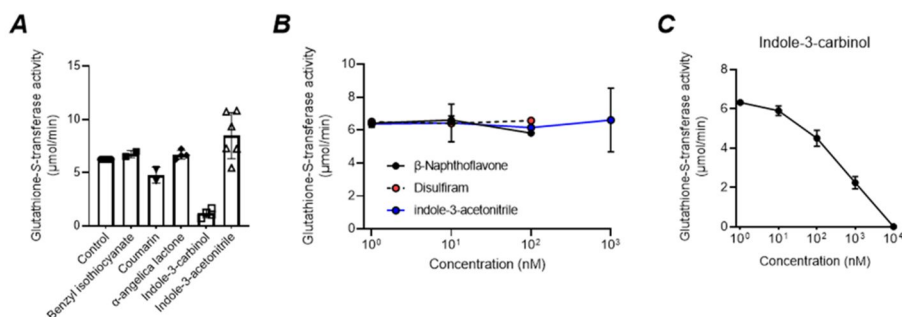


Fig. 1. Effects of various reagents on glutathione-S-transferase (GST) activity

A, GST activities in the absence (Control) and presence of benzyl isothiocyanate, coumarin, α-angelica lactone, indole-3-carbinol and indole-3-acetonitrile. B, dose-dependent changes in GST activity treating with β-naphthoflavone, disulfiram and indole-3-acetonitrile. C, dose-dependent changes in GST activity treating with indole-3-carbinol.

(2) BSO 処置が骨格筋の GSH 量に及ぼす影響【実験 2】

BSO 処置によって, GSH 量が約 90% 低下し (図 2), この低下の程度は, 収縮終了 0.5 時間後と 6 時間後で同様であった。Control 群においては収縮終了 0.5 時間後および 6 時間後のいずれにおいても, 安静脚と比較し刺激脚で GSH 量が低下した。

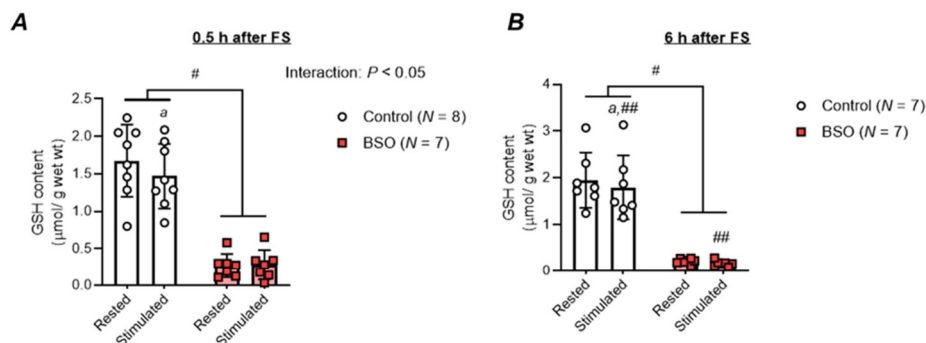


Fig. 2. Effects of buthionine sulfoximine (BSO) treatment on reduced glutathione (GSH) content.

A, means (\pm SD) of GSH content 0.5 h after fatiguing stimulation (FS; 70 Hz, 350 msec train, every 3 sec until force decreased to ~50% of initial). B, means (\pm SD) of GSH content 6 h after FS. *N* denotes the number of rats. Individual values were represented as points. ^a*P* < 0.05, vs. rested muscle within group (two-way ANOVA for repeated measure). [#]*P* < 0.05, vs. control group (main effect; two-way ANOVA for repeated measure). ^{##}*P* < 0.05, vs. stimulated muscle (main effect; two-way ANOVA for repeated measure). Significant interaction (FS effect \times BSO treatment effect) was described in the graphs.

(3) BSO 処置が骨格筋疲労から回復に及ぼす影響【実験 2】

収縮終了 0.5 時間後において, Control 群と BSO 群のいずれにおいても, 40 Hz 誘因性張力および 100 Hz 誘因性張力が安静脚と比較して刺激脚で低値を示し, その低下の程度には両群で差異は認められなかった (図 3A-C)。

収縮終了6時間後においては、BSO群のみにおいて、40 Hz 誘因性張力が安静脚と比較し刺激脚で低値を示し、疲労刺激とBSO処置の交互作用が認められた(図3D-F)。100 Hz 誘因性張力については、疲労刺激とBSO処置の交互作用が認められた。

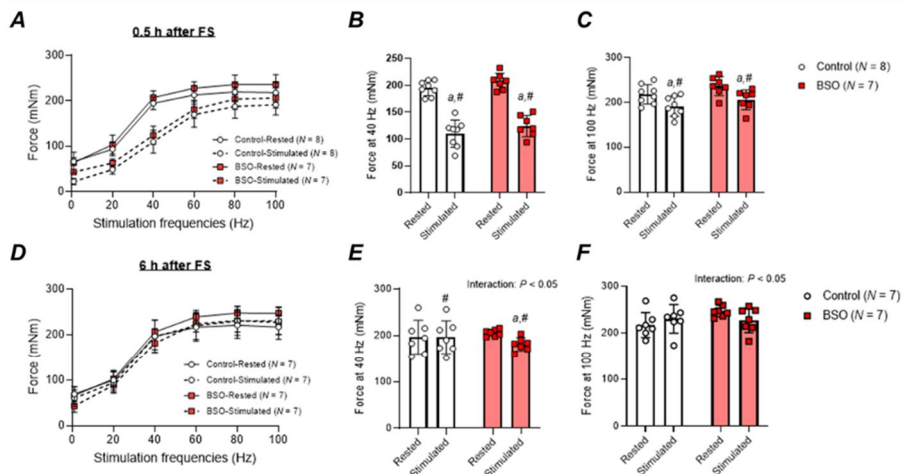


Fig. 3. Effects of buthionine sulfoximine (BSO) treatment on force production in planta flexor muscles.

A, means (\pm SD) of force-frequency relationship 0.5 h after fatiguing stimulation (FS). B, means (\pm SD) of force at 40 Hz 0.5 h after FS, with individual values represented as points. C, means (\pm SD) of force at 100 Hz 0.5 h after FS, with individual values represented as points. D, means (\pm SD) of force-frequency relationship 6 h after FS. E, means (\pm SD) of force at 40 Hz 6 h after FS, with individual values represented as points. F, means (\pm SD) of force at 100 Hz 6 h after FS, with individual values represented as points. *N* denotes the number of rats. #*P* < 0.05, vs. rested muscle within group (two-way ANOVA for repeated measure). #*P* < 0.05, vs. stimulated muscle (main effect; two-way ANOVA for repeated measure). Significant interaction (FS effect \times BSO treatment effect) was described in the graphs.

(4) BSO 処置が筋疲労に伴う筋小胞体 Ca^{2+} 放出機能の低下に及ぼす影響

収縮終了0.5時間後において、Control群のみにおいて、脱分極誘因性張力が安静脚と比較し刺激脚で低値を示した(図4A-C)。また、Control群の刺激脚における脱分極誘因性張力はBSO群の刺激脚における脱分極誘因性張力よりも低値を示した(図4A-C)。

収縮終了6時間後において、BSO群のみにおいて、脱分極誘因性張力が安静脚と比較し刺激脚で低値を示した(図4D-F)。また、BSO群の刺激脚における脱分極誘因性張力はControl群の刺激脚における脱分極誘因性張力よりも低値を示し、疲労刺激とBSO処置の交互作用が認められた(図4D-F)。

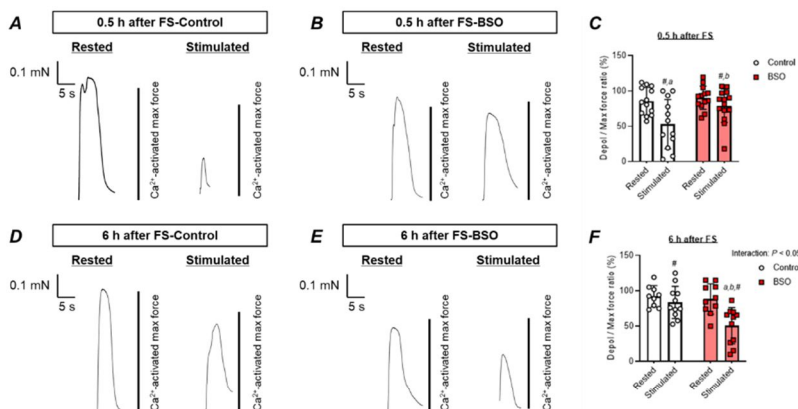


Fig. 4. Effects of buthionine sulfoximine (BSO) treatment on depolarization-induced force of mechanically skinned fibers obtained from the superficial region of medial and distal gastrocnemius muscle.

Depolarization-induced force was normalized by Ca^{2+} -activated maximum force (Depol/Max force ratio) in order to estimate sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release. A and B, representative example of depolarization-induced force responses 0.5 h after fatiguing stimulation (FS). Vertical bars on the right side of the traces indicate Ca^{2+} -activated maximum force. C, means (\pm SD) of Depol/Max force ratio 0.5 h after FS, with values from individual fiber represented as points. The number of rats used were 8, 7, 7 and 7 in control-rested, control-stimulated, BSO-rested and BSO-stimulated, respectively. D and E, representative example of depolarization-induced force responses 6 h after FS. Vertical bars on the right side of the traces indicate Ca^{2+} -activated maximum force. F, means (\pm SD) of Depol/Max force ratio 6 h after FS, with values from individual fiber represented as points. The number of rats used were 5, 6, 5 and 7 in control-rested, control-stimulated, BSO-rested and BSO-stimulated, respectively. #*P* < 0.05, vs. rested muscle within group (two-way ANOVA). #*P* < 0.05, vs. stimulated muscle in control group (two-way ANOVA). #*P* < 0.05, vs. rested muscle (main effect; two-way ANOVA). Significant interaction (FS effect \times BSO treatment effect) was described in the graphs.

(5) BSO 処置が筋疲労に伴う筋原線維の機能変化に及ぼす影響

収縮終了0.5時間後において、主効果として、単位断面あたり最大張力が安静脚と比較し刺激脚で低下した。また、Control群のみにおいて、安静脚と比較し刺激脚で50%張力発揮のた

めに必要な Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{50}$; 筋原線維の Ca^{2+} 感受性の指標) が低下し, 疲労刺激と BSO 処置の相互作用が認められた (図 5A-D).

収縮終了 6 時間後においては, すべての群において, 単位断面積当たりの最大張力, $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ およびヒル係数に差異は認められなかった (図 5E-H).

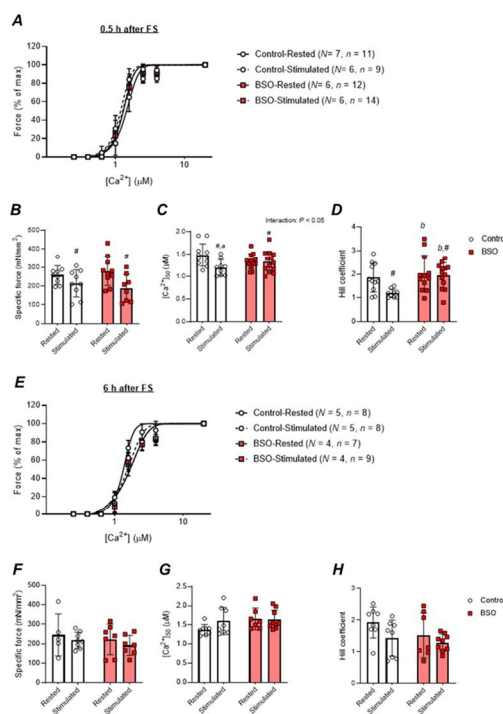


Fig. 5. Effects of buthionine sulfoximine (BSO) treatment on myofibril function of mechanically skinned fibers obtained from the superficial region of medial and distal gastrocnemius muscle.

Skinned fibers were exposed to various Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$). Thereafter, the diameter was measured in some fibers. *A and E*, means (\pm SD) of force at various $[\text{Ca}^{2+}]$ 0.5 h after (*A*) and 6 h after (*E*) fatiguing stimulation (FS). Forces were expressed as a percentage of Ca^{2+} -activated maximum force. *B and F*, means (\pm SD) of specific force at Ca^{2+} -activated maximum force 0.5 h after (*B*) and 6 h after (*F*) FS, with values from individual fiber represented as points. In *B*, the number of rats used were 7, 6, 6 and 6 in control-rested, control-stimulated, BSO-rested and BSO-stimulated, respectively. In *E*, the number of rats used were 5, 4 and 4 in control-rested, control-stimulated, BSO-rested and BSO-stimulated, respectively. *C and G*, means (\pm SD) of $[\text{Ca}^{2+}]$ for half-maximal force ($[\text{Ca}^{2+}]_{50}$) 0.5 h after (*C*) and 6 h after (*G*) FS, with values from individual fiber represented as points. *D and H*, means (\pm SD) of Hill coefficient of individual force- $[\text{Ca}^{2+}]$ curve 0.5 h after (*D*) and 6 h after (*H*) FS, with values from individual fiber represented as points. ^a*P* < 0.05, vs. rested muscle within group (two-way ANOVA). ^b*P* < 0.05, vs. stimulated muscle in control group (two-way ANOVA). [#]*P* < 0.05, vs. rested muscle (main effect; two-way ANOVA). Significant interaction (FS effect \times BSO treatment effect) was described in the graphs.

研究全体の総括

本研究の結果, 標的七化合物のうち indole-3-carbinol が GST 活性を著しく抑制すること, GSH 量を減少させ *S*-glutathionylation を抑制すると筋疲労が長期化することが明らかとなった. このことは, *S*-glutathionylation は筋疲労の回復を早める可能性があることを示唆する.

本研究では, 実際に indole-3-carbinol を投与するまで研究が進展しなかった. 実験 2 の結果を鑑みると, indole-3-carbinol は筋疲労に対してマイナスの効果を持つと予測されるが, 今後研究を深め, *S*-glutathionylation と筋疲労の関係を明らかにしていくことで, 新たなサプリメントの開発につながると考えられる.

GSH 量を減少させたとしても, 回復早期段階 (本研究の場合は収縮終了 0.5 時間後) における疲労の程度は同等だったことは, 学術的に興味深いと言える. これは, GSH 量が低下すると, 通常であれば得られるプラスの効果 (*S*-glutathionylation による筋原線維の Ca^{2+} 感受性の増加) が得られず, マイナスの効果 (筋小胞体 Ca^{2+} 放出機能の低下) が緩和されるためであった. GSH は生体内を代表する抗酸化物質であり, その存在はプラスの影響のみもたらすものと考えられている. しかし, 本研究の結果は GSH のマイナスの側面を反映しており, なぜ GSH がプラスとマイナスの効果を持つ物質なのかを明らかにすることで, 生体内恒常性を維持する新たな仕組みが見えてくる可能性がある.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Daiki, Kanzaki Keita, Wada Masanobu	4. 巻 157
2. 論文標題 How to evaluate skeletal muscle function: suggestion from studies on skeletal muscle fatigue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 9~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.21065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Daiki, Wada Masanobu	4. 巻 598
2. 論文標題 Fatigue induced change in T system excitability and its major cause in rat fast twitch skeletal muscle in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5195~5211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP279574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊大輝, 和田正信
2. 発表標題 生体で骨格筋収縮力が変化した原因を明らかにするために：in vivo収縮とメカニカルスキンドファイバーの融合
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------