

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11362

研究課題名(和文) 伸張性収縮後の筋機能の回復は一酸化窒素供与体の摂取により促進される

研究課題名(英文) Dietary nitric oxide donor supplementation enhances the recovery speed of muscle function following eccentric contraction

研究代表者

松永 智 (MATSUNAGA, SATOSHI)

京都産業大学・現代社会学部・教授

研究者番号：70221588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：「伸張性収縮(ECC)後の一酸化窒素(NO)供与体摂取が筋機能低下を緩和し、その回復を促進する」が否かをラット速筋を用いて検討した。

ECC負荷により筋収縮力は明らかに減少したが、NO供与体摂取により筋収縮力は回復し、その回復の程度は、NO供与体摂取1日間より3日間の方が顕著に大きかった。

細胞内Ca<sup>2+</sup>制御能力に関与するタンパク質の解析を行うために、免疫ブロッティング法を用いて解析した結果、ECC後3日間のNO供与体摂取は非摂取群と比較して、ジャンクトフィリンのタンパク質量、及びリアノジンレセプターのタンパク質量に顕著な差をもたらさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一酸化窒素(NO)の基質である硝酸塩摂取により伸張性収縮(ECC)による筋発揮張力の減退緩和の可能性が示されてきた。近年、NO供与体は、硝酸塩よりNOを効率よく産生できる物質であることが示され、我々も運動前のNO供与体摂取がECCによる筋発揮張力減退を緩和の可能性を示してきた。本研究では、ECC後のNO供与体の摂取により、ECCに伴う筋収縮力を緩和させることを示したが、筋小胞体による細胞内Ca<sup>2+</sup>調節タンパク質の関与を示すことはできなかった。これは活動性の筋疲労予防に運動後の一酸化窒素供与体の摂取が効果的であることを示すものであったが、その要因については本研究では明らかにできなかった。

研究成果の概要(英文)：Whether 'nitric oxide (NO) donor supplementation following eccentric contraction (ECC) alleviates muscle dysfunction and promotes its recovery' was investigated in rat fast-twitch muscle. ECC loading clearly reduced muscle contractility, but dietary NO donor restored muscle contractility, and the degree of recovery was significantly greater over 3 days than during 1 day of oral NO donor administration. To analyse the protein involved in the intracellular Ca<sup>2+</sup> regulatory capacity, immunoblotting was used to analyse the protein, and the results showed that NO donor supplementation for 3 days after ECC did not result in significant differences in the protein levels of junctophilin and ryanodine receptors compared to the non-supplemented group.

研究分野：運動生理学

キーワード：一酸化窒素供与体 伸張性収縮 筋機能 疲労回復

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋における筋収縮や弛緩のシグナルとしての働きを持つ細胞内カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )濃度は、筋小胞体(SR)の機能によって制御されている。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)・放出(リアノジン受容体: RyR)能力の低下を引き起こすことが知られている(松永智ら 体力科学 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(JP)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1つとして(Matsunaga et al. Exp Physiol 2008)、すなわち器官の酸化的修飾とタンパク質分解(Matsunaga et al. Pflügers Arch 2003)により引き起こされることが報告されている。近年、SUMOylation(ユビキチン系のタンパク質修飾)やo-GlcNAcylation(リン酸化カスケード系のタンパク質修飾)もまた、器官の機能不全に関与する筋タンパク質の修飾に関与することが指摘されている。

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日で疲労のピークに達する遅発性筋肉痛の発生などにある。この伸張性収縮は短時間に大きな力発揮を可能にすることから、スポーツ競技の多くの局面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、及びSRの $\text{Ca}^{2+}$ 放出の能力低下(Matsunaga et al. J Phys Fitness Sports Med 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、伸張性収縮による活動性の疲労誘因のメカニズムの解明がなされたとはいえず、未だ不明瞭な部分も多い。

一酸化窒素(NO)は、反応性の高い物質で、酸素と反応しやすく直ぐに二酸化窒素に変性する。近年、NO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(Hernández et al. J Physiol 2012)、またNOが筋パフォーマンスを向上させる要因の1つとして示された(Ferreira et al. J Appl Physiol 2011)。我々も硝酸塩摂取が伸張性収縮による筋発揮張力減退の緩和を引き起こす可能性を示したが(松永智: 科学研究費・基盤C, 平成27~29年)、この摂取した硝酸塩がどの程度、NOとして供給されたのかについては不明なままであった。NO供与体は、分解されてNOを放出する物質で、これが細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ の感受性の増加を引き起こすことが分かっている(Dutka et al. J Physiol 2011)。そこで我々は、運動前のNO供与体の摂取が、伸張性収縮後の筋発揮張力とSR  $\text{Ca}^{2+}$ 取込・放出機能に及ぼす影響について検証を行い、筋機能の低減緩和を誘引する可能性をみだした(松永智: 科学研究費・基盤C, 平成30~令和2年)。

## 2. 研究の目的

本課題は、伸張性収縮後の筋収縮力の維持・減退緩和を念頭においたNO供与体摂取の適切な時期や期間の解明のための筋細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 取込・放出機能変化に着目した研究である。『伸張性収縮後のNO供与体の経口摂取が筋機能低下を抑制し、その回復をも促進する』という仮説を検証するために、NO供与体の経口摂取が筋収縮力やSR  $\text{Ca}^{2+}$ ハンドリング機能に及ぼす影響について検討する。本研究から得られた結果は、適切なNO供与体摂取の時期・期間の解明につながり、疲労性の筋パフォーマンス低下抑制や、低下した機能の回復促進のための有効な知見となること、並びに疲労性の筋機能回復法の開発や筋疲労に起因するスポーツ傷害の予防等、トレーニング科学の発展に寄与することが期待される。

## 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90匹を伸張性収縮後1、3日間のNO供与体摂取群、及び対照群に分けた。NO供与体の摂取はS-ニトロソチオール(SNOG)を水に溶解させ飲水摂取させた。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。筋発揮張力の測定は、伸張性収縮の前後、及び筋摘出直前に行った。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、そのことを考慮し伸張性収縮、1日後、あるいは3日後に長指伸筋、腓腹筋を摘出し、分析に供した。その後、筋サンプルとして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

筋発揮張力のうち最大単収縮力(1Hz)、及び最大強縮張力(20, 40, 60, 80及び100Hz)を麻酔下

において伸張性筋収縮器を用い、測定した (Kanzaki et al. 2010)

(3) Ca<sup>2+</sup>濃度調節タンパク質の解析

泳動用サンプル量を算出するために筋サンプルのタンパク質量を測定する。その後、電気泳動、免疫ブロッティングを行い、以下の項目について量的分析 (タンパク質が分解や合成がされていないかを検討) を行った。

- RyR (Matsunaga et al. 2003)
- Junctophilin (Watanabe et al. 2015)

4 . 研究成果

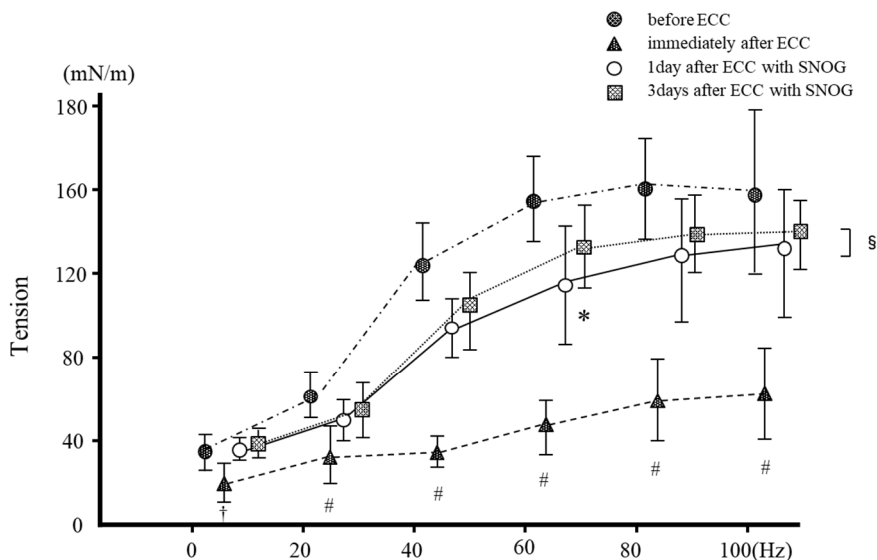


Fig.1 Isometric maximum contractile force

\*  $P < 0.05$ , versus 1 day after ECC with SNOG. §  $P < 0.05$ , significant main effect for SNOG (3 days > 1 day). †  $P < 0.05$ , versus before ECC and 1 day after ECC with SNOG. #  $P < 0.05$ , versus before ECC, 1 day after ECC with SNOG and 3 days after ECC with SNOG. s-nitrosoglutathione, SNGO; eccentric contraction, ECC.

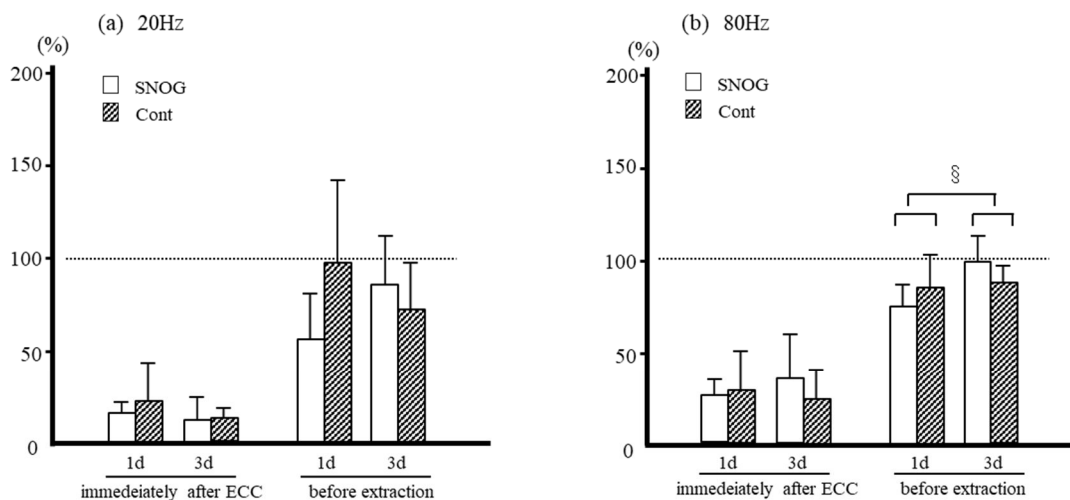


Fig.2 Maximum isometric contraction force by stimulation frequency

(a) 20Hz, (b) 80Hz. Each value is shown as a relative value, with the value before ECC loading as 100%.  $P < 0.05$ , versus 1 day after ECC with SNOG. §  $P < 0.05$ , significant main effect for recovery days (3 days > 1 day). eccentric contraction, ECC; s-nitrosoglutathione, SNGO; SNGO treatment 1-day group, 1d; SNGO treatment 3-days group, 3d.

(1) 等尺性最大筋収縮力 絶対値

Fig.1 に、ECC 後 3 日間の SNOG の経口摂取したラット後肢速筋の 1~100Hz の電気刺激により導出した等尺性最大筋収縮力を、またその比較として ECC 前後、及び ECC 後 1 日間の SNOG の経口摂取群の等尺性最大筋収縮力を絶対値で示した。ECC 後の筋収縮力は ECC 前と比較して全ての刺激頻度において有意な減少がみられた ( $P < 0.05$ )。ECC 後 1、及び 3 日間の SNOG の経口摂取群において、筋収縮力は ECC 直後の値より増加したが、ECC 前値に回復することはなかった。SNOG 1 日群と比較して SNOG 3 日群の筋収縮力はそれぞれの刺激頻度間で高値を示し(主効果、1 日群 < 3 日群 :  $P < 0.05$ )、60Hz においては有意な差が認められた(1 日群 < 3 日群 :  $P < 0.05$ )。

Fig.2 に ECC 後 1、及び 3 日間の SNOG の経口摂取群の等尺性最大筋収縮力を、ECC 前値を 100% とした相対値で示した。20Hz は低頻度疲労、及び 80Hz は高頻度疲労の指標として用いた。低頻度疲労の指標となる 20Hz における筋収縮力は、筋摘出前の SNOG 1 日群と 3 日群のそれぞれの非摂取群との間に差は認められなかった。高頻度疲労の指標となる 80Hz における筋収縮力は、筋摘出前の SNOG 1 日群と 3 日群のそれぞれの非摂取群との間に差は認められなかったが、SNOG 1 日群と 3 日群間に主効果が認められた(1 日群 < 3 日群 :  $P < 0.05$ )。

(2) 免疫プロットング解析

細胞内  $Ca^{2+}$  制御能力に関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  $Ca^{2+}$  制御に関与する RyR と Juncatophilin タンパク質の量について分析を行い、その典型例を Fig.3(a) に示し、RyR と Juncatophilin タンパク質の量の変化のまとめを、それぞれ Fig.3(b)、及び Fig.3(c) に示した。その結果、SNOG 3 日群における Juncatophilin と RyR のタンパク質の量は、収縮脚と対照脚の間に SNOG 摂取、及び伸張性収縮の有無に関係なく、差異は認められなかった。

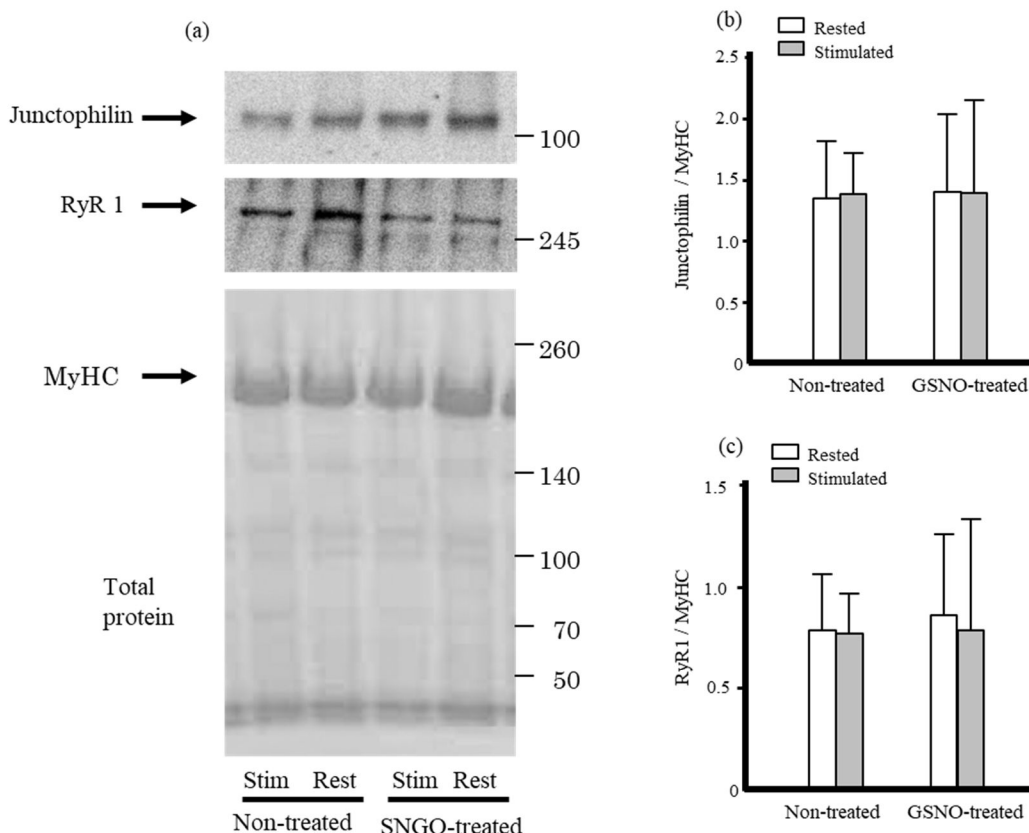


Fig.3 Juncatophilin and RyR1 immunoblotting.

a: immunoblot analyses. b-c: a mount of Juncatophilin and RyR. MyHC, myosin heavy chain; RyR, ryanodine receptor; s-nitrosoglutathione, GSNO.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Matsunaga Satoshi, Watanabe Daiki, Kanzaki Keita, Matsunaga-Futatsuki Sumiko, Wada Masanobu	4. 巻 13
2. 論文標題 Pre-exercise nitric oxide donor supplementation attenuates decline in muscle contractile force and ryanodine receptor proteolysis following eccentric contraction	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 43 ~ 50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7600/jpfsm.13.43	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 -

〔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
2. 発表標題 一酸化窒素供与体の経口摂取が伸張性収縮に伴う張力の変化に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回 日本体力医学会大会
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
研究分担者	和田 正信  (Wada Masanobu)  (80220961)	広島大学・人間社会科学研究科（総）・教授    (15401)	
研究分担者	松永 須美子  (Matsunaga Sumiko)  (70553436)	東大阪大学短期大学部・その他部局等・教授    (44432)	

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