

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500788

研究課題名(和文)低頻度疲労の特徴とそのメカニズム - カルシウム濃度調節タンパクに着目して -

研究課題名(英文)Features and mechanisms of low-frequency fatigue

研究代表者

和田 正信 (Wada, Masanobu)

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：80220961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：低頻度疲労とは、「骨格筋において、低頻度の刺激によって誘起される張力の低下が、長時間継続する現象」を指し、ヒトが日常感じる筋疲労の大部分が低頻度疲労である。本研究では、低頻度疲労が生じる要因について検討し、1) 筋原線維のカルシウム感受性の低下と筋小胞体からの放出されるカルシウム量の低下の2つが関与すること、2) これら2つの要因の関与率は、回復期における時間経過とともに変化すること、および 3) 筋原線維カルシウム感受性の変化には、タンパクの酸化的修飾が関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Low-frequency fatigue (LFF) is defined as a long-lasting depression in force which is induced by low stimulation frequencies in skeletal muscle. LFF may be functionally important as the motor discharge rate during voluntary contraction rarely exceeds 30 Hz, a firing frequency below which PLFFD is apparent. The aim of this study was to examine the mechanisms underlying LFF. The present results suggest (i) that LFF is ascribable to both (a) decreased myofibrillar calcium sensitivity and (b) reduced sarcoplasmic reticulum calcium release, (ii) that the contributions of (a) and (b) to LFF vary with time after fatiguing muscle activity, and (iii) that oxidative modification is involved in (a).

研究分野：運動生理・生化学

キーワード：筋疲労 カルシウム 筋小胞体 酸化的修飾 筋原線維

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋疲労に関するこれまでの研究

筋疲労は、一般に「最大筋力が低下する現象」あるいは「一定の筋力を継続して発揮できなくなる現象」と定義される。筋疲労の原因は現在でも完全には解明されていないが、形質膜の興奮性の低下、高エネルギーリン酸化合物の減少あるいは代謝副産物(水素イオン、マグネシウムイオン、無機リン酸など)の蓄積などが、末梢組織における主な要因として、これまで示されてきた (Fitts 2008, Allen et al. 2008)

(2) 低頻度疲労とその問題点

低頻度疲労 (low-frequency fatigue: LFF) とは、「骨格筋において、低頻度の刺激によって誘起される張力の低下が、長時間継続する現象」を指し、ヒトが日常感じる筋疲労の大部分が低頻度疲労である。LFFが生じるメカニズムについては、過去30年間に渡って研究されてきたが、現在でも明確にはなっていない。

2. 研究の目的

興奮・収縮連関とは、筋の細胞膜に活動電位が発生してから筋原線維が収縮・弛緩するまでの一連の過程を指す。本研究の目的は、LFFが起こる要因が興奮・収縮連関のどこにあるのかを、筋原線維の機能およびカルシウムイオン (Ca^{2+}) 調節機能に着目して検討することであった。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および疲労収縮プロトコール

実験には Wistar 系雄性ラットを用い、これらの右脚を張力計に繋いだプレートに固定した (Fig. 1)。坐骨神経を介して、70 Hz、1回 0.35 秒の電気刺激 (疲労誘因刺激) を 3 秒に 1 回与え、下腿三頭筋の収縮を誘起した。電気刺激は、張力が初期値の 50% に低下するまで継続した。疲労誘因刺激終了後一定の安静期間を置き、下腿三頭筋の張力を測定した。その後、腓腹筋表層部を摘出し、筋の一部から細胞膜を剥離した筋線維 (skinned fiber: SF) を作製した。残りの筋は、後日行う生化学的分析のために、 $-80^{\circ}C$ で保存した。

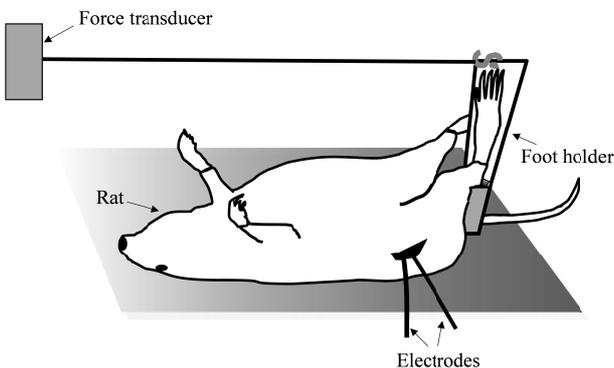


Fig. 1. Schematic diagram of fatigue stimulation.

(2) SF の作製と張力の測定

SF の作製は、約 $4^{\circ}C$ に冷却したパラフィンオイル

中で行った。先が精巧なピンセットを用い、筋束から単一筋線維を分離し、形質膜を剥離した後、線維を張力計に繋いだ。張力の測定は、 $126\text{ mM } K^{+}$ (pH 7.1) を含む溶液をベースとして行った。SFを用いて行った分析項目は、筋原線維 Ca^{2+} 感受性およびリアノジン受容体 (ryanodine receptor: RyR) のカフェイン感受性であった。

(3) 生化学的分析

筋ホモジネートを用いて行った分析項目は、筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum: SR) Ca^{2+} 放出速度、ミオシン軽鎖 2 のリン酸化、速筋型トロポニン I (fast troponin I: TnIf) の S-glutathionylation (S-Glut) および RyR の脱リン酸化であった。

4. 研究成果

(1) 疲労誘因刺激 30 分後における変化 (実験 1)

実験 1 では、疲労誘因刺激 30 分後について検討した。

張力

疲労誘因刺激において、張力が初期値の 50% に低下するまでの時間は、平均 266 秒であった。高頻度誘因性張力に対する低頻度誘因性張力の比 (低頻度/高頻度比) は、コントロール脚に対して刺激脚では、全筋 (20/100 Hz) で 73.3% ($P < 0.05$)、SF (1/50 Hz) で 64.8% ($P < 0.05$) であった。これらの結果は、本研究で用いた疲労誘因刺激によって、LFF が生じたことを示すものである。

筋原線維 Ca^{2+} 感受性

$[Ca^{2+}]_{50}$ は、最大値の 50% の張力が発揮される Ca^{2+} 濃度であり、この値が小さいほど筋原線維の Ca^{2+} 感受性が高いことを示す。コントロール脚と比べ刺激脚では、 $[Ca^{2+}]_{50}$ は有意 ($P < 0.05$) な低値が認められた (Fig. 2, before)。一方、S-Glut を生じさせた後では、差異はみられなかった (Fig. 2, after)。

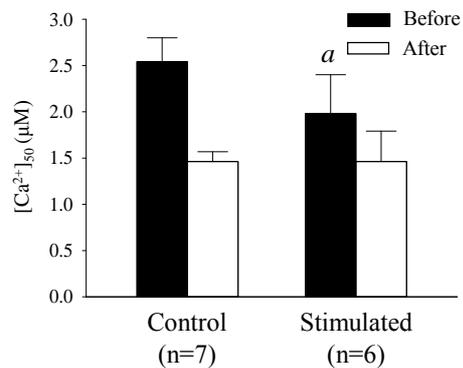


Fig. 2. Effects of stimulation and S-glut on myofibrillar Ca^{2+} sensitivity. ^a $P < 0.05$, vs control before S-glut treatment.

TnIf における S-Glut

TnIf に生じている S-Glut は、コントロール脚に対して刺激脚では 143% ($P < 0.05$) であった (Fig. 3)。一方、ミオシン軽鎖 2 のリン酸化の程度には、差異は観察されなかった。SF および全筋の分析から得られたこ

これらの結果から、LFF に伴って筋原線維の Ca^{2+} 感受性が増加した原因は、TnIf に S-Glut が起こるためであることが示唆される。

SR Ca^{2+} 放出機能

ホモジネートにおける SR からの Ca^{2+} の放出は、4-chloro-m-cresol (CMC) を用いて誘起された。[CMC]₅₀ は、最大値の 50% の Ca^{2+} 放出速度を誘起する CMC 濃度であり、この値が小さいほど RyR の CMC 感受性が高いことを示す。コントロール脚と刺激脚とを比較すると、 Ca^{2+} 放出速度の最大値には差異はみられなかったが、[CMC]₅₀ は後者において高値 ($P < 0.05$) が認められた。また、SF におけるカフェイン感受性も差異がみられ、刺激脚において [Caff-th] (SF において、最大値の 10% の張力を誘起するカフェイン濃度) に高値 ($P < 0.05$) が観察された (Fig. 4)。これらの結果は、LFF に伴って、RyR の最大 Ca^{2+} 放出機能が低下することを示唆するものである。

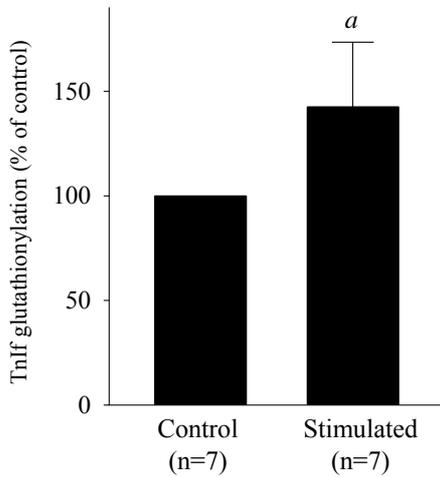


Fig. 3. Effects of stimulation on S-glut of TnIf. ^a $P < 0.05$, vs control.

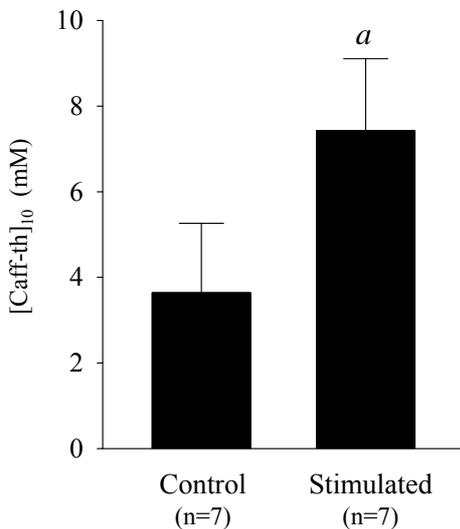


Fig. 4. Effects of stimulation on caffeine threshold. ^a $P < 0.05$, vs control.

RyR の脱リン酸化

RyR 全体に対する脱リン酸化された RyR の割合は、コントロール脚で 0.05%、刺激脚で 1.41% であり、両群間の差異は統計的に有意 ($P < 0.05$) であった。

結論

これまで LFF は、a) 筋原線維の Ca^{2+} 感受性の低下と b) SR の Ca^{2+} 放出機能の低下の 2 つの要因によって生ずるとされてきたが (Allen et al. 2008, Bruton et al. 2008)、実験 1 の結果から、LFF からの回復早期では、a) は関与しないことが明らかになった。また、 Ca^{2+} 感受性が低下しないのは S-Glut が起こることに、 Ca^{2+} 放出機能が低減するのは RyR に構造的変化が生ずることに成因があることも示唆された。

(2) LFF 発生時における筋原線維 Ca^{2+} 感受性の経時的变化 (実験 2)

実験 2 では、疲労誘因刺激直後 (0 時間後)、0.5 時間後、2 時間後、6 時間後および 12 時間後について検討した。

張力

低頻度/高頻度比は、コントロール脚に対して刺激脚において、全筋 (20/100 Hz) では、0.5 時間後、2 時間後および 6 時間後に (Fig. 5)、また SF (1/50 Hz) では、0.5 時間後および 2 時間後に低値 ($P < 0.05$) がみられた。

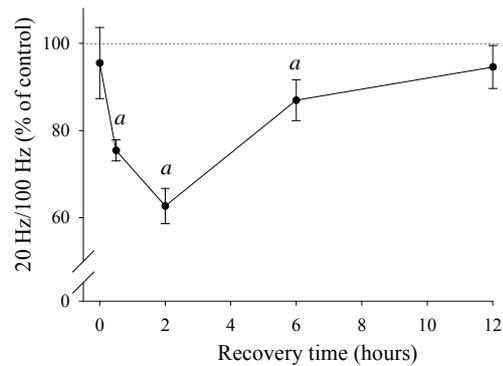


Fig. 5. Time course of changes in ratio of force at 20 Hz to that at 100 Hz during recovery time. ^a $P < 0.05$, vs control.

$[\text{Ca}^{2+}]_{50}$

$[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ は、コントロール脚と比べ刺激脚において、0 時間後および 6 時間後に高値 ($P < 0.05$) が認められた (Fig. 6)。

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{50}$

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ は、S-Glut 処置前の $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ と処置後の $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ 差であり、この値が小さいほど処置前に TnIf に S-Glut が多く生じていたことを示す。 $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ は、コントロール脚と比べ刺激脚において、0.5 時間後および 2 時間後に低値 ($P < 0.05$) が認められた (Fig. 7)。

ジチオトレイトール処置後の $[Ca^{2+}]_{50}$

ジチオトレイトール (dithiothreitol: DTT) は、ジスルフィド結合の切断剤であり、S-Glut が発生している場合、スルフィドリル基から酸化型グルタチオンを解離させる作用を示す。DTT 処置後の $[Ca^{2+}]_{50}$ は、0 時間後においてのみ、刺激脚において高値 ($P<0.05$) が観察された (Fig. 8)。

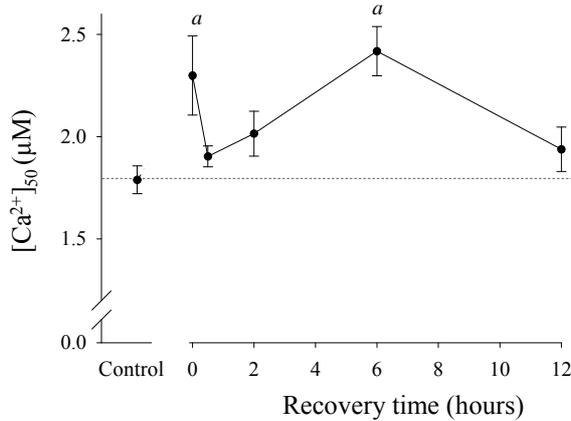


Fig. 6. Time course of changes in $[Ca^{2+}]_{50}$ during recovery time. ^a $P<0.05$, vs control.

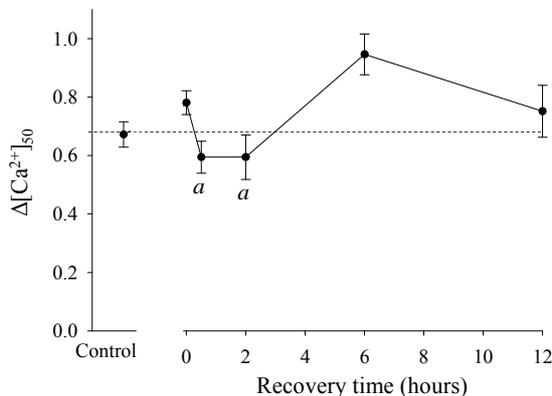


Fig. 7. Time course of changes in $\Delta[Ca^{2+}]_{50}$ during recovery time. ^a $P<0.05$, vs control.

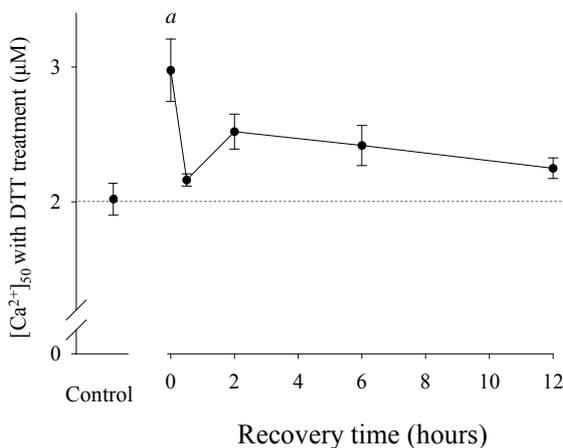


Fig. 8. Time course of changes in $[Ca^{2+}]_{50}$ after DTT treatment during recovery time. ^a $P<0.05$, vs control.

TnIf における S-Glut

TnIf に生じている S-Glut は、コントロール脚対して刺激脚において、0 時間後および 6 時間後では低値が ($P<0.05$)、0.5 時間後では高値が認められた (Fig. 9)。また、0.5 時間後および 2 時間後の値は、0 時間後および 6 時間後と比べ高値 ($P<0.05$) であった。

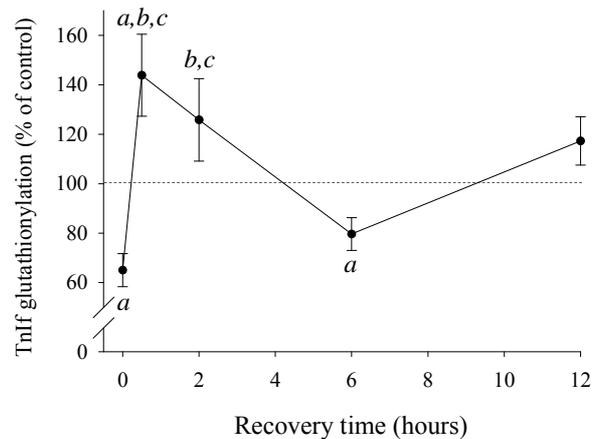


Fig. 9. Time course of changes in S-glut of TnIf during recovery time. ^a $P<0.05$, vs control. ^b $P<0.05$, vs 0 h. ^c $P<0.05$, vs 6 h.

結論

実験 2 の結果から、LFF に対して、a) 筋原線維 Ca^{2+} 感受性の低下と b) SR の Ca^{2+} 放出機能の低下が寄与する割合は、回復期の時間経過とともに変化し、回復早期では主として b) が、それ以降では a) が関与することが示された。また、TnIf に S-Glut が起こることで、筋原線維 Ca^{2+} 感受性の低下が抑制されることが示唆された。

(3) 今後の展望

前述のように、LFF は、競技スポーツ選手あるいはリハビリテーションや運動処方の対象者だけではなく、通常の生活を営む一般の人にも起こる筋疲労である。LFF を効果的に抑制できれば、競技スポーツにおける競技力向上や QOL の向上などに寄与することになるであろう。しかしながら、現在の段階では、具体的な抑制法についての提言はなされていない (Cheng et al. 2014)。

本研究の結果から、筋内の酸化型グルタチオンを増加させることおよび筋の抗酸化能力を S-Glut が減少しないレベルにまで増加させることが、LFF を抑制する方策となることが示唆された。今後、これらの方策が実際に機能するか否かを検討する必要がある。

<引用文献>

- Allen DG et al. (2008) *Physiol Rev* 88, 287-332
- Bruton JD et al. (2008) *J Physiol* 586, 175-184
- Cheng AJ et al. (2014) *J Physiol* 593, 457-472
- Fitts RH (2008) *J Appl Physiol* 104, 551-558

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Watanabe D, Kanzaki K, Kuratani M, Matsunaga S, Yanaka N, Wada M. Contribution of impaired myofibril and ryanodine receptor function to prolonged low-frequency force depression after *in situ* stimulation in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 査読有, 2015, 印刷中
DOI 10.1007/s10974-015-9409-1
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25697123>

Kanzaki K, Kuratani M, Yanaka N, Matsunaga S, Wada M. Three calpain isoforms are autolyzed in rat fast-twitch muscle after eccentric contractions. *J Muscle Res Cell Motil* 35, 査読有, 2014, 179-189
DOI 10.1007/s10974-014-9378-9
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24557809>

渡邊大輝, 和田正信. 低頻度疲労に伴う筋原線維 Ca^{2+} 感受性の変化. *広島体育学研究* 40, 査読有, 2014, 1-7

Wada M, Kuratani M, Kanzaki K. Calcium kinetics of sarcoplasmic reticulum and muscle fatigue. *J Phys Fitness Sports Med* 2, 査読無, 2013, 169-178

[学会発表] (計 7 件)

渡邊大輝, 和田正信. 低頻度疲労の回復過程における筋原線維 Ca^{2+} 感受性の変化の要因. 第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 ~ 18 日, 京都市

渡邊大輝, 神崎圭太, 松永 智, 和田正信. 低頻度疲労に伴う筋小胞体 Ca^{2+} 放出機能の変化. 第 69 回日本体力医学会. 2014 年 9 月 19 ~ 21 日, 長崎市

和田正信, 渡邊大輝. 低頻度疲労とその要因. シンポジウム: 疲労のメカニズムを探る. 第 69 回日本体力医学会. 2014 年 9 月 19 ~ 21 日, 長崎市

Watanabe D, Kanzaki K, Matsunaga S, Wada M. Mechanisms underlying prolonged low-frequency depression. 43rd European Muscle Conference. 10-14 Sep 2014, Salzburg

渡邊大輝, 神崎圭太, 松永 智, 和田正信. 低頻度疲労発生時の筋原線維 Ca^{2+} 感受性に及ぼす S-グルタチオニレクションの影響. 第 22 回日本運動生理学会大会. 2014 年 7 月 19 ~ 20 日, 倉敷市

Watanabe D, Kanzaki K, Kuratani M, Mano H, Wada M. Changes in myofibrillar Ca^{2+} -sensitivity with low-frequency force depression. 42nd European Muscle Conference. 21-25 Sep 2013, Amsterdam

Wada M. Regulation of contractile properties in skeletal muscle fibers (Symposium: Why does

skeletal muscle have fast and slow muscle fibers? The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 27-29 March 2013, Edogawa-ku

[図書] (計 1 件)

和田正信, 渡邊大輝. 筋小胞体. 宮村実春 編
ニュー運動生理学. 真興交易医書出版部, 東京, 2014, pp182-193

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/wada/index.htm>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

和田 正信 (WADA MASANOBU)
広島大学・総合科学研究科・教授
研究者番号 : 80220961

(2) 研究分担者

松永 智 (MATSUNAGA SATOSHI)
宮崎大学・教育文化学部・教授
研究者番号 : 70221588

矢中 規之 (YANAKA NORIYUKI)
広島大学・生物圏科学研究科・准教授
研究者番号 : 70346526

(3) 連携研究者

三島 隆章 (MISHIMA TAKAAKI)
八戸大学・人間健康学部・准教授
研究者番号 : 00461707

山田 崇史 (YAMADA TAKASHI)
札幌医科大学・保健医療学部・講師
研究者番号 : 50583176