

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01622

研究課題名(和文) 硝酸塩摂取により伸張性収縮後の筋収縮力や筋小胞体機能の減退を抑制できるか？

研究課題名(英文) Can dietary nitrate reduce decline of contractile force and sarcoplasmic reticulum function in rat fast-twitch muscle 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：硝酸塩摂取が伸張性収縮による筋収縮力、及び細胞内Ca²⁺制御能力の機能低下抑制に關与するか否かについて、ラットの速筋を用いて検討した。酸塩摂取3日目までみられた伸張性収縮による筋収縮力の減少が、6日間摂取においてはみられなくなり、硝酸塩無摂取群でみられた筋小胞体Ca²⁺放出速度の減少が、硝酸塩摂取3日以降にみられなくなった。細胞内Ca²⁺放出に關与するタンパクであるリアノジン受容体とジヒドロピリジン受容体を免疫プロット法により解析した。硝酸塩摂取と伸張性収縮は、収縮群と対照群間の両タンパク質の量に影響を及ぼさなかったが、収縮群と対照群ともに両受容体のタンパク質量の減少をもたらした。

研究成果の概要(英文)： We examined investigate whether dietary nitrate supplementation would alleviate a decline in muscle contractile properties and sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ handling following eccentric contraction (ECC) in rat fast-twitch muscles. ECC-induced significant decreases of up to 3-days in the maximal tetanic force and of no nitrate supplementation in the SR Ca²⁺ uptake rate weren't observed in more than 6 and 3 days nitrate supplementation, respectively. Dietary nitrate of 0 to 6 days resulted in no alterations in protein content of ryanodine receptor (RyR) and dihydropyridine receptor (DHPR) between ECC-treated and contralateral muscles. However, It has been shown that impairments of RyR and DHPR in with and without ECC-treated muscles resulted from the dietary nitrate.

研究分野：運動生理学

キーワード：伸張性収縮 硝酸塩摂取 筋小胞体機能 タンパク質修飾

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 (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 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 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 Ca^{2+} の取込(SR 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(松永ら体力科学 2000)。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であり(Matsunaga et al, Exp Physiol, 2008)、またこれらはタンパク質の酸化的修飾(Matsunaga et al, Pflügers Arch. 2003) とタンパク質分解(Matsunaga et al, J Muscle Res Cell Motil, 2001)により引き起こされることが分かっている。

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, Acta Physiol Scand. 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, Med Sci Sports Exerc.1996)、及び SR の Ca^{2+} の放出能力の低下(松永: 科学研究費・基盤 C, 平成 21~24 年) 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された。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。

硝酸塩は、血圧の降下や虚血再灌流障害の防御などに効果的に作用することが知られている(Weitzberg et al. Anesthesiology 2010)。この硝酸塩は、ホウレンソウやビートルート(和名: 火焰菜) などを食することにより体内の蓄積量を補充、増量することができる。この硝酸塩摂取が運動に及ぼす影響については、一定負荷運動での酸素消費量を減じさせること(Larsen et al. Acta Physiol.2007; Larsen et al. Cell Metab. 2011)、すなわち、これは有酸素系エネルギー供給に参与するミトコンドリアの機能向上(Lansley et al. J Appl Physiol. 2011) によりもたらされると推察されている。近年、硝酸塩摂取が速筋線維の細胞内 Ca^{2+} 調節機能を向上させることが報告され(Hernández et al. J Physiol. 2012)、これ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)。

伸張性収縮による筋疲労の発生メカニズ

ムは、前述のように短縮性収縮とは一部異なることが知られているが、この硝酸塩摂取が筋パフォーマンスの向上に直接結びつくのであれば、伸張性収縮前にあらかじめ硝酸塩を継続的に、あるいは直前に摂取しておけば、筋小胞体 Ca^{2+} 取込・放出機能の低下を抑制でき、筋発揮張力の低下を抑制できることが期待される。この点が解明されれば、筋パフォーマンスを維持する方法の開発のみならず、スポーツ傷害や筋疲労予防の観点からも、トレーニング科学の発展に大きく寄与するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、伸張性収縮後の硝酸塩摂取が筋の機能低下回復を促進するか否かを、伸張性収縮前にあらかじめ硝酸塩を経口摂取させ、その摂取期間が筋の機能低下の抑制に関与するか否かについて検証する。そのため、伸張性収縮後の筋発揮張力、SR Ca^{2+} 取込・放出機能、及び SR Ca^{2+} -ATPase、RyR、ジヒドロピリジン受容体(DHPR: SR から Ca^{2+} 放出に関与するタンパク質)分解の有無や程度をタンパク質の酸化的修飾の観点から検証するために SR Ca^{2+} 取込・放出機能の減退、及び回復過程について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験プロトコール・筋発揮張力の測定

ラット 90 匹(各群 15 匹) を用いて、伸張性収縮前にあらかじめ硝酸塩を経口摂取させ、硝酸塩摂取期間が筋の機能低下の抑制に関与するか否かについて検討する。なお、硝酸塩摂取の期間は、伸張性収縮前 6、3 日間と無摂取のグループに分類する。伸張性収縮は、1 日・体重 1kg あたり 0.1 mM の硝酸ナトリウムを水に溶解させ、500ml 飲水摂取させる(硝酸イオン 3.1mg/kg/日に相当: Larsen Acta Physiol. et al. 2007)。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 回負荷する。長指伸筋及び前脛骨筋を筋収縮終了直後に摘出し、分析に供する。なお、右脚は対照群(Cont:C)とする。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する。長指伸筋については、酵素活性測定用とタンパク質解析用に分割する。筋サンプルは測定までの間、必要に応じて -80 冷凍庫にて保管する。

(2) 張力の測定

単収縮力及び強縮張力 (20, 40, 60, 80 及び 100 Hz) を測定する (Kanzaki et al, Eur J Appl Physiol. 2010)。

(3) SR の機能の測定

約 0.2 g の筋を抽出液とともに均一化し、遠心処理した後、筋サンプルを得る。筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 活性、及び Ca^{2+} 取込・放出速度を測定する。

(4) タンパク質の解析

細胞内 Ca^{2+} 制御能力に關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後に免疫ブロッティングを行い、以下の項目について質的分析を行う[RyR、DHPR、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) (Matsunaga et al. Pflügers Arch. 2003)]。なお、RyR、DHPR は、同じレーン内の ECC 負荷に伴うタンパク量の変化を伴わない GAPDH 値を基に標準化した。

4. 研究成果

(1) 40Hz で導出した最大等尺性収縮力は、対照脚と比較して収縮脚では、0、3、6 日群において両脚間に差はみられなかった。一方、60Hz で導出した最大等尺性収縮力は、対照脚と比較して収縮脚において、0 日群および 3 日群では有意な低値がみられたが ($P < 0.01$)、6 日群では両脚間に差はみられなかった。

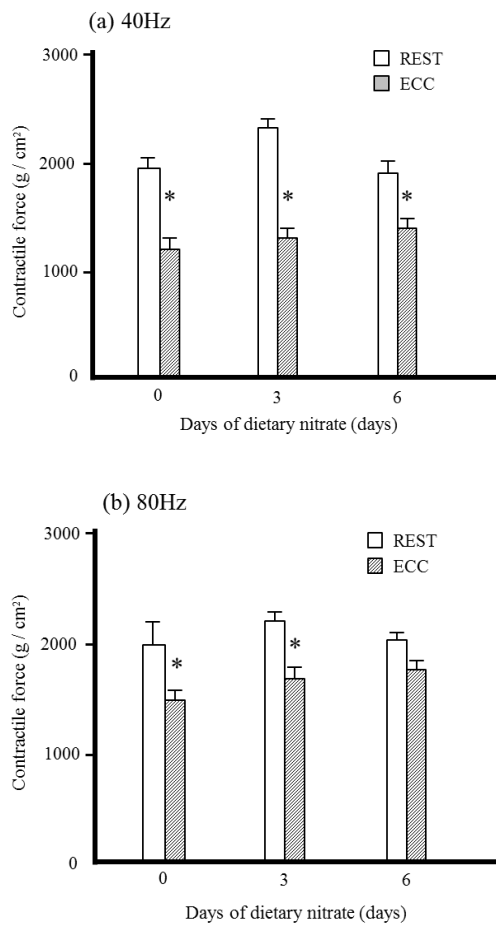


図1 40Hz(a)及び80Hz(b)で導出した筋収縮力

(2) SR Ca^{2+} -ATPase 活性は、対照脚と比較して収縮脚では、0、3、6 日群において両脚間に差はみられなかった。

(3) SR Ca^{2+} 取込速度は、対照脚と比較して収縮脚では、0、3、6 日群において両脚間に

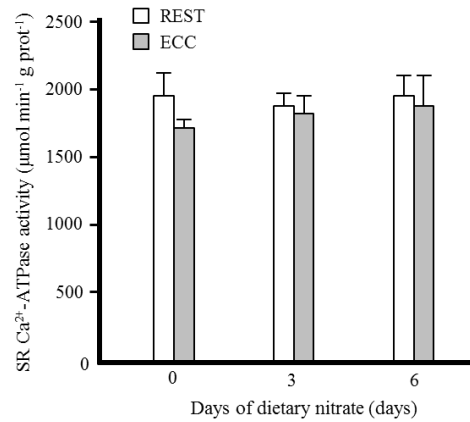


図2 SR Ca^{2+} -ATPase 活性

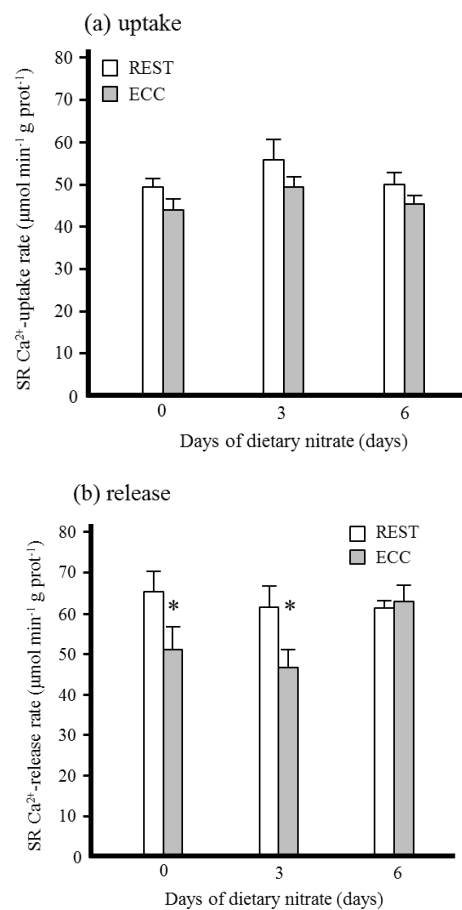


図3 SR Ca^{2+} 取込速度(a)と放出速度(b)

差はみられなかった。SR Ca^{2+} 放出速度は、対照脚と比較して収縮脚において、0 日群では有意な低値がみられたが ($P < 0.05$)、3 日群および 6 日群では差異はみられなかった。

(4) 細胞内 Ca^{2+} 制御能力に關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法にてタンパク質を分離した。引き続き免疫ブロッティングを行い、筋小胞体 Ca^{2+} 放出に關する RyR と

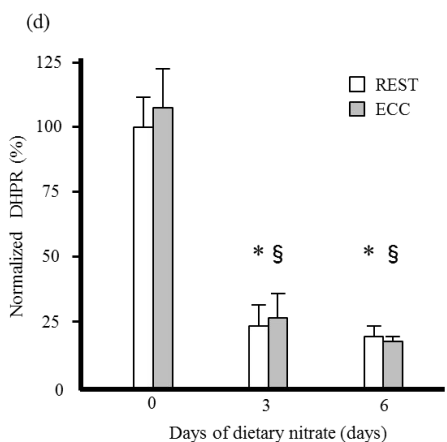
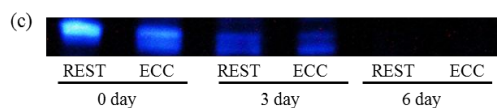
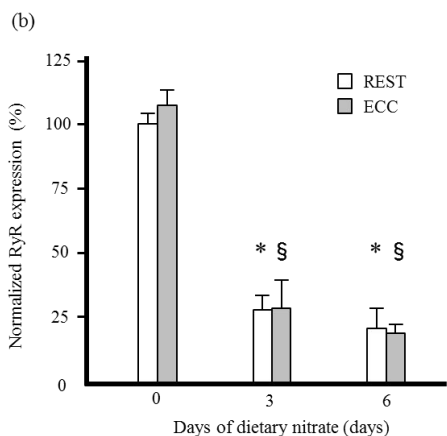
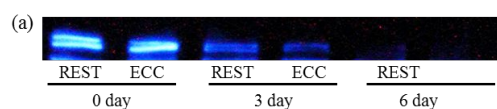


図4 RyR(a・b)とDHPR(c・d)の変化

DHPR タンパク質の質的分析を行った。その結果、収縮群と対照群間に RyR と DHPR の量の変化は認められなかった。しかしながら、3～6日間の硝酸塩摂取により、収縮群と対照群とともに、RyR と DHPR のタンパク質量の減少がみいだされた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

松永 智、渡辺大輝、相原千尋、城本 淳、福田 潤、松永須美子、和田正信: 硝酸塩の経口摂取によって伸張性収縮後の収縮力低下は緩和されるか. 第 71 回日本体力医学会大会(盛岡市), 2016.9.23.

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

和田 正信 (WADA MASANOBU)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号: 80220961

(3)連携研究者

福田 潤 (FUKUDA JUN)

宮崎大学・教育学部・准教授

研究者番号: 30717905