

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21500634

研究課題名（和文） 伸張性収縮による筋発揮張力の減少とその後の回復に筋小胞体機能変化は関与するか？

研究課題名（英文） Does the sarcoplasmic reticulum function contribute to the decline of muscle contractile force following eccentric contraction ?

研究代表者

松永 智 (MATSUNAGA SATOSHI)

宮崎大学・教育文化学部・教授

研究者番号：70221588

研究成果の概要（和文）：伸張性収縮(ECC)による筋収縮力の減退に、筋小胞体(SR)の Ca^{2+} ハンドリング機能、及び筋線維膜の興奮性が関与するか否かを検討するために、ラット骨格筋の SR 機能と $Na^{+}K^{+}$ ポンプ機能に着目し検討を行った。その結果、ECC は筋発揮張力の減少、SR Ca^{2+} 放出能力の減退、そして $Na^{+}K^{+}$ ポンプ機能の減退をもたらし、ECC による筋発揮張力の減少は、SR Ca^{2+} ハンドリング機能の減退と筋線維鞘の興奮性の低下が関与していることを示唆するものであった。

研究成果の概要（英文）：To investigated whether the alterations in sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} handling function and excitability of sarcolemma would contribute to a loss of the contractile force following eccentric contraction (ECC), we examined contractile force, SR functions and sarcolemma $Na^{+}K^{+}$ -ATPase activity in ECC-stimulated rat hindlimb muscles. ECC resulted in force reductions, impaired capacity of Ca^{2+} release by the SR and decreased $Na^{+}K^{+}$ -ATPase activity in rat. These results suggest that force developed by ECC-contracted muscle may be affected to a greater extent by diminished release of Ca^{2+} from the SR and excitability of sarcolemma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：スポーツ科学

キーワード：スポーツ生理学

1. 研究開始当初の背景

短時間の間隔で競技を行なうスポーツ種目の場合、休息期間において、前の競技で生じた筋疲労を迅速に回復することが、次の競技に向けての重要な課題といえる。筋線維内の小器官の 1 つである SR(Sarcoplasmic

reticulum: SR)は、筋原線維を取り囲むように発達している袋状膜組織である。SR は、筋細胞質から Ca^{2+} を取り込み、貯蔵し、そして筋細胞内へ放出することにより、細胞内の Ca^{2+} の濃度を調節する。近年、張力が低下した筋では、ほぼ例外なく SR の Ca^{2+} の取り込

み能力や Ca^{2+} の放出能力が低下していることから、この器官の機能の不全が筋疲労を招来する大きな要因として注目されている (Matsunaga et al, Eur J Appl Physiol, 2007)。なかでも、短縮性収縮により引き起こされた SR の機能不全は、タンパク質の酸化に寄与していることが明らかになっている (Matsunaga et al, Pflügers Arch 2003, Matsunaga et al, Exp Physiol, 2008)。

階段を下りたり、下り坂を走ったりする時、大腿四頭筋は引っ張られながら収縮する、いわゆる伸張性収縮 (ECC) を行なうことになる。日常的な活動のみならず、種々の競技スポーツにおいてもこの種類の運動形態は多く含まれており、身体運動にとって ECC は避けることのできない筋活動といえる。ECC では、運動後 2~3 日でピークに達する筋痛 (遅発性筋肉痛 [Delayed-Onset Muscle Soreness: DOMS]) が生じるとともに、張力の回復速度は短縮性収縮より遅いことが知られている (Allen, Acta Physiol Scand 2001)。この収縮様式による筋疲労からの回復遅延は、受動的に筋線維が引き延ばされたことによる、アクチン・ミオシン分子の配列乱れを伴うサルコメアの崩壊 (Newham et al., Clin Sci 1983) や、SR、T 管や細胞膜の歪曲を含む筋線維内部器官の損傷 (Proske & Allen, Exer Sports Sci Rev 2004) によることが示唆されている。しかしながら、1) ECC は、筋細胞の受動的な損傷のみにその原因は存在するのか、2) なぜ収縮後に時間を経て損傷が激化するのか、などについては現状では必ずしも明確にはなっていない。

ECC が SR 機能に及ぼす影響については、相反する 2 つの先行研究のみが存在する。Yasuda et al. (Acta Physiol Scand 1997) は、SR の Ca^{2+} 取り込み機能に変化はみられないが SR 膜の Ca^{2+} 透過性に変化がみられることを、一方 Chen et al. (Exp Physiol 2007) は、ECC によって SR の Ca^{2+} 取り込み・放出機能は低下するが、膜の透過性には変化がみられないことを報告している。このように、ECC による SR 機能への影響については不明なまま残されている。しかしながら、ECC を行なうと、筋線維内の安静時 Ca^{2+} 濃度が増加することから (Lynch et al, Cell Calcium 1997)、ECC に伴う機能や構造の変化に、SR の機能の低減が関与している可能性は高く、我々が予備的に行った 500 回の ECC 実験によっても SR の機能が低減することをみいだしている。我々はこれらの ECC による SR 機能の低減には、受動的に筋線維が引き延ばされたことによる機械的な損傷のみならず (Allen, Acta Physiol Scand 2001)、SR 膜の透過性の変化 (Yasuda et al, Acta Physiol Scand 1997)、あるいは SR タンパク質の酸化的修飾 (高強度走運動で証明: Matsunaga

et al, Pflügers Arch 2003) などの種々の可能性を仮定している。そして「ECC による SR 機能の減退は、筋の発揮張力の低減と直接関与し、またその機能減退は活性酸素種に起因する機能障害とその後生じるタンパク質の分解・消失が一因である」と仮説を立てている。

2. 研究の目的

ECC による筋活動量の増大が引き起こす筋収縮力減退に SR の機能変化、及び筋線維膜の興奮性が関与するか否かを検討するために、ラット骨格筋の SR Ca^{2+} ハンドリング能力と $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ機能に着目し検討した。

3. 研究の方法

(1) 被検動物と実験プロトコール

実験には 12 週齢のウイスター系雄性ラット 120 匹を用いた。水および飼料 (日本クレア製飼育繁殖固形飼料) は、自由摂取とし、12 時間の明暗サイクルの照明下で温度を 20~24°C に常時維持した飼育室においてこれらを飼育した。12 週齢時から飼育を始め、2~5 週間の予備飼育の後、ECC と等尺性収縮群 (ISO) の群に分類した。これは、得られた知見が ECC に特異的なものであるかどうかを検証するため、ISO との比較検討を行うためである (神崎たち 体力科学 2010)。

ECC 群には ECC を、ISO 群には ISO を 4 秒毎に 1 回行わせた。麻酔下において、ラットを仰臥位に置き、左脚をフットホルダーに足関節が 90° になるように固定した。フットホルダーと連結したモーターによって、毎秒 90° の速度で足関節を 1 秒間で伸張させると同時に、坐骨神経より電気刺激 (5V、50Hz) を与えて ECC を誘起した。その後、1 秒で元の位置に戻し、2 秒間安静を保った。これを 1 サイクルとし、100~500 回繰り返した。ISO 群には足関節を 90° に固定した状態で、坐骨神経を 1 秒間電気刺激して ISO を誘起した。その後、3 秒間安静を保った。これを 1 サイクルとし、ECC と同様に 100~500 回繰り返した。ECC および ISO を負荷した左脚を刺激 (Stimulated :S) 群、右脚をコントロール (Control :C) 群とした。収縮直後に長指伸筋と前脛骨筋を摘出した。本研究では、先行研究と同様に長指伸筋を生化学的分析に、前脛骨筋を等尺性収縮力の測定に用いた。

(2) 等尺性筋収縮力の測定

摘出した前脛骨筋をリンガー液でよく洗浄した後、95% O_2 -5% CO_2 ガスを通入したリンガー液中に置いた。筋の片端を張力計に、反対側を固定用アームにセットした後、単縮張力の最大値が得られるように筋長を調節した。筋の両端に置かれた電極を介し、電気

刺激装置により通電することで収縮を誘起した。すべての測定において、電気刺激に用いる矩形波の幅は 1msec とした。なお、最大等尺性強縮力の計測は室温で行った。また、筋長および筋重量から筋断面積を算出した。

(3) Na⁺-K⁺-ATPase 活性の測定

摘出した前脛骨筋をリンガー液でよく洗浄し、その後ホモジナイズした。Na⁺-K⁺-ATPase 活性の測定用試料は、瞬間凍結解凍を回繰り返した後、抽出液で 10 倍に希釈した。残りの試料は 5,000g で 10 分間遠心分離した後 (4°C)、上清を液体窒素中で瞬間凍結し、分析まで -80° で保存した。

Na⁺-K⁺-ATPase 活性の測定は、蛍光色素である 3-O-MFP を用い、37°C 条件下で測定した。サンプルを反応溶液に加え、37°C で 2 分間インキュベートした後、200μM 3-O-MFP (最終濃度) を加え反応を開始した。1 分間あたりの 3-O-MFP の濃度変化は、細胞内イオン測定装置を用い、475nm の波長で 3-O-MF を励起し、515nm の蛍光量をモニターすることによって計測した。その後、反応溶液に 10mM KCl (最終濃度) を加え、3-O-MF の濃度変化を測定した。高濃度の KCl は活性を特異的に増加させる。従って、KCl を加える前の 3-O-MF 濃度の増加率と加えた後の増加率の差が Na⁺-K⁺-ATPase 活性を表すことになる

(4) SRCa²⁺-ATPase 活性の測定

Simonides & van Haredeveld の方法の一部修正したものを用い SRCa²⁺-ATPase 活性、37°C の条件下で測定した。活性値は以下の①~③のカスケード反応を用いて、NADH の濃度の減少速度を測定することによって算出した。

- ① ATP → ADP + P_i
- ② ホスホエノールピルビン酸塩 + ピルビン酸塩 + ATP
- ③ ピルビン酸塩 + NADH + H⁺ → 乳酸塩 + NAD⁺

反応溶液中にサンプルを加え、37°C で 3 分間インキュベートした後、4mM (最終濃度) の ATP を加えることによって反応を開始し、1 分間あたりの NADH の濃度変化を分光光度計により測定した (波長 340nm)。その後、CaCl₂ の濃度を 2mM (最終濃度) にし、上記と同様にして NADH の濃度変化を測定した。高濃度の Ca²⁺ は SR Ca²⁺-ATPase 活性を特異的に抑制する。従って、初期の NADH の減少率と高濃度の Ca²⁺ 添加後の減少率の差が、SR Ca²⁺-ATPase 活性を示すことになる。

(5) SR Ca²⁺ 取込および放出速度の測定

SR Ca²⁺ の取り込み速度の測定は、蛍光指

示薬である indo-1 を用い、37°C の条件下で Ward et al. の方法に従って行った。サンプルを反応溶液に加え、37°C で 2 分間インキュベートした後、1mM (最終濃度) Mg-ATP を加えることによって SR Ca²⁺ 取り込みを開始した。反応溶液中の [Ca²⁺]_f の減少が完全に止まったことを確認し、5mM (最終濃度) の 4-chlorom-cresol を加え、SR の Ca²⁺ 放出を誘引した。反応溶液中の [Ca²⁺] の変化の測定

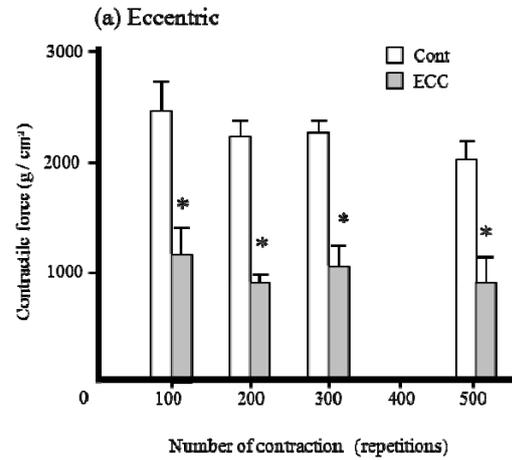


図 1 筋収縮力の変化

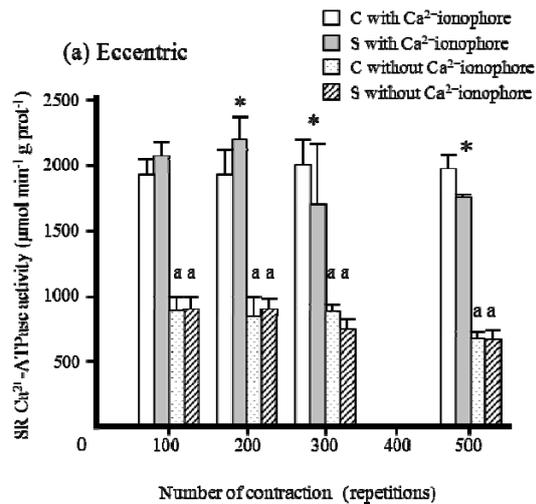


図 2 SR Ca²⁺-ATPase の変化

は、細胞内イオン測定装置を用い、349nm の波長で indo-1 を励起し、405nm および 500nm の蛍光量をモニターすることによって行った。[Ca²⁺] は、Grynkiewicz et al. の報告に従って行った。

4. 研究成果

(1) 等尺性筋収縮力の変化

等尺性筋収縮力は、100 回から 500 回の ECC により C 群と比較して 55~61% 減少した (P < 0.05 : 図 1)。

(2) SR Ca²⁺-ATPase 活性及び SR Ca²⁺ 取込

速度の変化

SR Ca²⁺-ATPase 活性は、カルシウムイオノフォアの付加により有意な増加を示し、それは ECC 負荷回数の違いに依存しないことから、SR 膜の透過性に変化がないことが明らかとなり、膜に傷害を受けていないことが示唆された。

またカルシウムイオノフォアを付加した SR Ca²⁺-ATPase 活性は、200 回の ECC によ

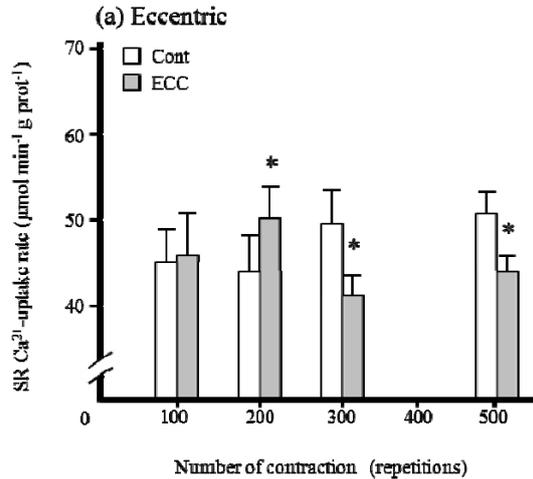


図 3 SR Ca²⁺取込速度の変化

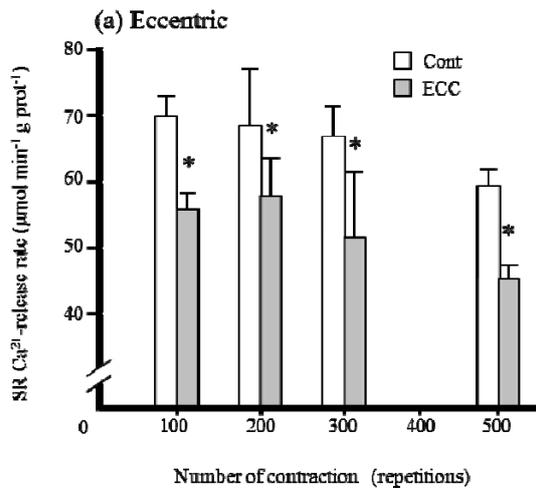


図 4 SR Ca²⁺放出速度の変化

り C 群と比較して有意な増加を、反対に 300 回以降は有意な減少が認められた (P<0.05 : 図 2)。

SR Ca²⁺取込速度は、200 回の ECC により C 群と比較して有意な増加を、反対に 300 回以降は有意な減少が認められた (P<0.05 : 図 3)。

(3) SR Ca²⁺放出速度の変化

SR Ca²⁺放出速度は、100 回から 500 回の ECC により C 群と比較して 15~18%減少した (P<0.05 : 図 4)。

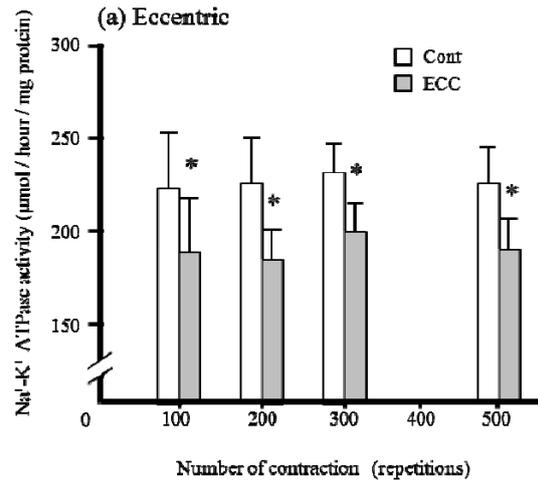


図 5 Na⁺-K⁺-ATPase 活性の変化

(4) Na⁺-K⁺-ATPase 活性の変化

Na⁺-K⁺-ATPase 活性は、100 回から 500 回の ECC により C 群と比較して 13~18%減少した (P<0.05 : 図 5)。

(5) 成果のまとめ

本研究の第 1 の主たる結果は、SR Ca²⁺-ATPase 活性と SR Ca²⁺取込速度は、100 回の ECC では C 群と比較して変化が認められなかったが、200 回では有意な増加を、一方 300 回以降は有意な減少が認められたことである (P<0.05)。両指標は、ECC の活動量増大によりともに増加し、ある一定の閾値に達すると減少するというを示している。これらのことは、ECC により両指標に差異が認められなかったとしている先行研究の結果は、ECC の活動量不足に起因する可能性を示すものである。

過伸展された筋原線維は、細胞質内への Ca²⁺の強制的な移動を伴うことが知られており (Proske and Allen, Exerc Sport Sci Rev 2005)、本研究で得られた ECC による一過性の活性値の増加は、Ca²⁺ホメオスタシスによる触媒活性上昇を伴う急性の Ca²⁺再貯蔵によりもたらされたものと考えられる (Ferrington et al. Biochim Biophys Acta 1996)。

本研究で得られた ECC による閾値を超えた触媒活性の低下は、①細胞質内への Ca²⁺流入の増大が SR による Ca²⁺吸収に間に合わなくなり、②結果として細胞質内の Ca²⁺濃度の上昇が生じ (Balnave and Allen, J Physiol 1995)、③この現象が興奮収縮連関の障害の端緒となり、Ca²⁺依存性の様々なタンパク質分解や機能減少を引き起こし、④SR の Ca²⁺取込能の減退を誘引していることを示唆するものである (Lamb et al. J Physiol 1995.)。

本研究の第 2 の主たる結果は、ECC によ

る SR Ca^{2+} 放出速度と $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ 活性の減退が、筋収縮力の減退と並行していることである。SR Ca^{2+} 放出は、SR と T 管膜との間に隣接して存在するリアノジンレセプター (RyR) がその責を担っている。ECC によるメカニカルストレスが T 管系の三つ組み構造にダメージを生じさせることから (Lovering and De Deyne, Am J Physiol 2004, Warren et al. Exerc Sport Sci Rev 2001)、そこに隣接する RyR も同時に ECC により機能障害を生じたことが示唆される。

$\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ 活性に責を担っている $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ ポンプは筋線維膜上の細胞質内外に貫通したタンパク質ポンプであり、その量の 50%は SR と T 管との間に存在することが分かっている (Nielsen et al. Proc Physiol Soc 2006)。前述のように、SR と T 管との間に、ECC によるストレスから機能障害がもたらされていることから、 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ ポンプの機能減退にもそれらに起因することが示唆される。

これらのことから、本研究で得られた ECC 負荷による筋発揮張力の減少は、T 管膜に付随して存在する SR の機能減退、特に Ca^{2+} 放出能力と、筋線維鞘の興奮性の変化にリンクして生じていることが明らかとなった。

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 4 件)

- ① 松永 智、神崎圭太、倉谷麻衣、松永須美子、山田崇史、和田正信: 繰り返される伸張性収縮間の安静時間の有無が $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ 活性に及ぼす影響. 第 67 回日本体力医学会大会 (岐阜市)、2012.9.16.
- ② 松永 智: 興奮収縮連関と骨格筋疲労. 第 61 回九州体育・スポーツ学会 第 2・4 分科会シンポジウム シンポジスト (宮崎市)、2012.9.9.
- ③ S. Matsunaga, K. Kanzaki, M. Kuratani, T. Yamada, S. Matsunaga, M. Wada: Effects of disuse on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling and sarcolemma $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -cycling properties The 40th European Muscle Conference (Berlin, Germany), 2011.9.16.
- ④ S. Matsunaga, T. Mishima, K. Kanzaki, M. Kuratani, S. Matsunaga and M. Wada: Time course of changes in in vitro sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling and sarcolemmal $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ activity during eccentric contractions. The 39th European Muscle Conference (Padua, Italy), 2010.9.13.

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 智 (MATSUNAGA SATOSHI)

宮崎大学・教育文化学部・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

三島 隆章 (MISHIMA TAKAAKI)

八戸学院大学・人間健康学部・准教授

研究者番号：00461707